

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.10.012

二仙汤对迟发性抑郁症模型大鼠脑组织 脉络丛叶酸转运-海马神经发生的影响

李兰心¹, 曾宁溪², 张天鸽¹, 严灿¹, 吴丽丽¹✉

1. 广州中医药大学中西医结合基础研究中心, 广东省广州市番禺区大学城外环东路232号, 510006; 2. 深圳市龙华区人民医院

[摘要] **目的** 探讨二仙汤治疗迟发性抑郁症 (LOD) 的效果及可能作用机制。**方法** 40 只雄性 7~8 周龄 Wistar 大鼠分为正常组和青年抑郁组各 20 只。60 只 20 月龄雄性 Wistar 大鼠分为衰老组、迟发抑郁组、二仙汤组各 20 只。青年抑郁组大鼠采用慢性不可预计应激刺激 (CUMS) 6 周建立抑郁模型, 迟发抑郁组、二仙汤组衰老大鼠采用 CUMS 6 周建立 LOD 模型, 正常组和衰老组不进行任何干预。造模的同时进行灌胃给药, 二仙汤组大鼠给予二仙汤 8 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、青年抑郁组、衰老组、迟发抑郁组给予 4 ml/(kg·d) 纯净水灌胃, 各组均给药 6 周。采用糖水偏爱实验、强迫游泳实验评估大鼠抑郁样行为, 旷场实验评价大鼠自发活动能力, T 迷宫实验评估大鼠认知功能; Western Blot 法检测海马组织神经元核心抗原 (NeuN)、巢蛋白、双皮质素 (DCX) 及脉络丛组织中闭锁小带蛋白 1 (ZO-1)、叶酸 α 受体 (FR α)、还原型叶酸转运体 (RFC)、质子耦合叶酸转运体 (PCFT) 蛋白表达; 采用免疫荧光法检测海马齿状回 Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数、5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)/DCX 双阳性细胞数及脉络丛组织中 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达; ELISA 法检测血浆、脑脊液、海马组织中 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 含量; 采用 Pearson 相关分析对各组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白、DCX、NeuN 蛋白表达进行相关性分析。**结果** 与正常组比较, 青年抑郁组及迟发抑郁组大鼠糖水偏爱度降低, 旷场总路程、穿格次数减少, 强迫游泳不动时间延长, 海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达均降低, 海马齿状回 Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数、BrdU/DCX 双阳性细胞数减少, ZO-1、FR α 蛋白表达及荧光强度减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 青年抑郁组大鼠第 3、4 天及迟发抑郁组大鼠第 2~4 天 T 迷宫正确率均明显降低, 迟发抑郁组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与青年抑郁组相比, 迟发抑郁组大鼠旷场总路程、穿格次数减少, 第 1~4 天 T 迷宫正确率均显著降低, 海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达及海马齿状回 Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数、BrdU/DCX 双阳性细胞数减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与迟发抑郁组比较, 二仙汤组大鼠糖水偏爱度及旷场总路程、穿格次数均升高, 强迫游泳不动时间缩短, 第 3~4 天 T 迷宫正确率明显升高, 海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达升高, 海马齿状回 Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数、BrdU/DCX 双阳性细胞数增加, 脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量明显升高, 脉络丛中 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达及荧光强度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。相关性分析结果显示, 脑脊液 ($r=0.466$) 和海马组织 ($r=0.522$) 中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白表达存在正相关 ($P<0.05$)。**结论** 二仙汤可改善 LOD 模型大鼠抑郁样行为及认知障碍, 其机制可能通过减轻脑组织脉络丛结构损伤, 改善脉络丛叶酸转运障碍, 从而促进海马神经发生。

[关键词] 迟发性抑郁症; 二仙汤; 脉络丛; 叶酸; 神经发生; 认知功能

迟发性抑郁症 (late-onset depression, LOD) 为 60 岁及以后首次发病的一种抑郁症, 其显著特

征之一即认知障碍^[1]。LOD 的神经解剖学标志是海马萎缩, 而叶酸缺乏可导致海马勾状回 (dentate gyrus, DG) 神经干细胞增殖减少, 神经元方向分化减弱, 神经可塑性降低, 致海马萎缩, 继而造成

基金项目: 国家自然科学基金 (81774102, 82174255)

✉ 通讯作者: wulili@gzucm.edu.cn

认知障碍^[2-3]。叶酸经脉络丛转运至脑脊液，作用于中枢神经，脉络丛叶酸转运障碍时脑脊液中叶酸含量降低，可直接导致海马结构和功能异常，海马神经发生障碍，影响认知功能^[4-5]。研究^[6]表明，叶酸缺乏是老年人患 LOD 的危险因素之一。5-甲基四氢叶酸（5-Methyltetrahydrofolate, 5-MTHF）是血液、脑脊液、脑组织中最具有生物活性的主要叶酸形式，因此，5-MTHF 是最能代表叶酸含量水平的指标^[7]。

中医学认为，脑为髓海，髓海以先天肾精为基，依赖后天水谷精微在肾阳蒸腾下化生充盈。中医补肾方药可明显改善 LOD 患者焦虑、抑郁情绪，具有抗海马神经发生障碍的作用^[8]。二仙汤有补肾精、温肾阳、泻相火、平阴阳之功效。研究表明，二仙汤及其加减具有明确的抗更年期抑郁作用^[9-10]，其治疗抑郁症具有多成分、多靶点、多通路的作用特点^[11]。本研究以脉络丛叶酸转运及海马神经发生为切入点，探讨二仙汤抗 LOD 的效应与机制，为其临床应用提供科学依据。本研究经广州中医药大学动物伦理委员会批准。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 60 只，8~9 月龄，体质量 650~720 g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物使用许可证号：SCXK（京）2016-0011，8~9 月龄大鼠饲养至 20 月龄为自然衰老大鼠，体质量 800~850 g。SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只，7~8 周龄，体质量 230~270 g，购于南方医科大学实验动物中心，实验动物使用许可证号：SCXK（粤）2016-0041。所有大鼠均饲养于广州中医药大学 SPF 级动物房，饲养期间自由饮食，日照时长 12 h，温度（23±2）℃，湿度 45%~65%。

1.2 药物

二仙汤组成药物淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母均购自广州至信药业有限公司，经中药鉴定学专家鉴定为正品。以上药材按 3:3:2:2:3:3 的比例浸泡 1 h，常规用纯净水武火煮沸后，转文火煎煮 1 h，过滤取汁，药物重复煎煮 1 次，合并浓缩至生药浓度 1 g/ml，高压灭菌，分装后置于 -20℃ 冰箱保存，使用前解冻并保存于 4℃ 冰箱。

1.3 主要仪器与试剂

旷场视频捕捉系统、强迫游泳视频捕捉系统、

T 迷宫（广州飞迪生物科技有限公司，型号分别为 FYY20001-RO、FD-qb-201、FD-ty-001）；激光共聚焦显微镜（德国 ZEISS 公司，型号 LSM800）；多功能酶标仪、电泳系统（美国 Bio-Rad 公司，型号分别为 3903-2010、PowerPac™ Basic）；低温高速离心机（湖南中佳科技有限公司，型号 SC3614）；化学发光工作站（上海天能公司，型号 5200）；冰冻切片机（德国 Leica 公司，型号 CM1860）。

4% 水合氯醛（上海麦克林生化科技股份有限公司，货号 C804539）；蔗糖、甲醇、无水乙醇（广州化学试剂厂，货号分别是 IB11-AR-500G、HB05-AR-0.5L、HB15-AR-0.5L）；多聚甲醛、TBS 粉末、PBS 粉末、免疫组化笔（合肥白鲨生物科技有限公司，货号分别是 BL539A、BL602A、BL601A、BC004）；兔抗海马组织巢蛋白多克隆抗体、小鼠抗巢蛋白单克隆抗体、兔抗神经元核心抗原（NeuN）单克隆抗体、兔抗双皮质素（DCX）多克隆抗体、山羊抗兔 AlexaFluor®594 二抗、山羊抗小鼠 AlexaFluor®488 二抗、山羊抗兔 AlexaFluor®488 二抗、山羊抗大鼠 AlexaFluor®594 二抗、兔抗还原型叶酸转运体（RFC）多克隆抗体、兔抗质子耦合叶酸转运体（PCFT）多克隆抗体、5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）、大鼠抗 BrdU 单克隆抗体（英国 Abcam 公司，货号分别是 ab92391、ab6142、ab177487、ab18723、ab150080、ab150133、ab150077、ab150160、ab62302、ab25134、ab6326、ab142567）；OCT 包埋剂（日本樱花公司，货号 4583）；兔抗 Ki-67 单克隆抗体、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、山羊抗兔 HRP 二抗、山羊抗小鼠 HRP 二抗（美国 CST 公司，货号分别是 9129、3700、97166、7074、7076）；RIPA 裂解液（大连美仑生物技术公司，货号 MA0151）；PMSF 溶液、抗荧光衰减封片剂（北京索莱宝科技有限公司，货号分别是 P0100、S2110）；BCA 蛋白定量试剂盒、彩色标准蛋白（美国 Thermo 公司，货号分别是 23227、26616）；0.45 μm PVDF 膜、ECL 化学发光液（美国 Millipore 公司，货号分别是 IPVH00010、WBKLS0500）；牛血清白蛋白（美国 Roche 公司，货号 9048-46-8）；三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）、甘氨酸（德国 Biofroxx 公司，货号分别是 1115GR500、1275GR500）；5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、5% 山羊血清（北京碧云天生物技术有限公司，货号分别是 P0015、C0265）；吐温-20、聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-X）（美国 Amresco 公司，货号分别是

900564-5、0694); 大鼠 5-MTHF ELISA 试剂盒(武汉菲恩生物技术有限公司, 货号 ER1599); 兔抗组织闭锁小带蛋白 1 (ZO-1) 多克隆抗体、兔抗叶酸 α 受体 (FR α) 多克隆抗体(美国 Invitrogen 公司, 货号分别是 61-7300、PA5-42004)。

1.4 分组、造模及给药

40 只 7~8 周龄雄性 Wistar 大鼠适应性静养 1 周后, 与 20 月龄自然衰老雄性 Wistar 大鼠 60 只分别按体质量和糖水偏爱度进行分组。采用糖水偏爱实验计算糖水偏爱度^[12]。录入 EXCEL 2013 排序编号后, 将每项编号分别录入 SPSS 22.0 统计学软件, 运用随机数字生成器进行随机分组, 40 只青年大鼠分为正常组和青年抑郁组各 20 只, 60 只衰老大鼠分为衰老组、迟发抑郁组、二仙汤组各 20 只。

分组后青年抑郁组采用慢性不可预计应激刺激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 建立青年抑郁模型^[13], 迟发抑郁组、二仙汤组衰老大鼠采用 CUMS 建立 LOD 模型^[14]。正常组、衰老组不予应激, 饲养于房间 A, 正常组每笼 5 只, 衰老组每笼 3 只。青年抑郁组、迟发抑郁组、二仙汤组予以应激造模, 孤养于房间 B, 每日予以 1 或 2 种随机应激源, 3 天内避免出现相同的应激源, 连续 6 周。应激源如下: 1) 禁食 12 h; 2) 禁水 12 h; 3) 夜晚持续光照 12 h; 4) 足底电击: 电流 1 mA, 2 s/次, 每次间隔 30 s, 共电击 10 次; 5) 白噪音: 85 db, 持续 5 h; 6) 300 次/min 持续频闪 5 h, 夜晚关灯进行; 7) 45 °C 热水强迫游泳 5 min; 8) 持续束缚 12 h; 9) 湿笼持续 10 h; 10) 并笼 10 h: 将 4 只接受应激的大鼠放入同一鼠笼, 每次并笼更换组合; 11) 禁食禁水 24 h。

造模的同时进行灌胃给药, 二仙汤组大鼠给予二仙汤 8 g/(kg·d) 灌胃, 灌胃剂量根据大鼠体表面积换算公式^[15], 是成人 60 kg 体重等效剂量的 2 倍。正常组、青年抑郁组、衰老组、迟发抑郁组给予 4 ml/(kg·d) 纯净水灌胃。各组均每日 2 次, 灌胃 6 周。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠抑郁样行为检测 糖水偏爱实验^[12]: 最后一次灌胃后禁食禁水 24 h, 糖水偏爱实验进行 12 h。测试时在大鼠笼盖两侧同等高度处, 以相同出水角度分别放置同规格、加入液体后等重的 1% 糖水和纯水, 大鼠自由饮用 12 h 后移除瓶子并称重, 计算大鼠糖水偏爱度, 糖水偏爱度=糖水消耗量/总液体消耗量 $\times 100\%$ 。

1.5.2 大鼠认知功能检测 旷场实验: 糖水偏好实验结束后将大鼠放入空旷、黑暗的行为学房间静息 1 h。实验时操作者将大鼠轻柔置于实验箱体 (100 cm $\times$ 100 cm $\times$ 48 cm) 中央后迅速远离箱体, 待大鼠适应 10 s 后采用旷场视频捕捉系统记录大鼠 5 min 内的总路程、穿格次数, 以评估大鼠自发活动情况。

强迫游泳实验: 旷场实验结束 24 h 后, 将大鼠打乱顺序静息于行为学房间 1 h。测试时操作者将大鼠缓慢放入水深 35 cm、水温 (25 $\pm$ 1) °C 游泳桶 (直径 30 cm, 高 100 cm) 内, 拍摄大鼠 6 min 内行为, 记录后 4 min 各大鼠的不动时间 (漂浮于水面、四肢不活动或前爪及尾巴轻微划动以使头部露出水面)。

T 迷宫实验: 强迫游泳实验结束 24 h 后采取随机数字法每组取 9 只大鼠进行 T 迷宫实验。各组所选大鼠并笼静息饲养 3 天, 每笼 4 只, 饲料中混入奶酪。迷宫适应训练持续 2 天, 每天重复 5 轮, 每次间隔 20 min, 操作人员将一笼 4 只大鼠自起始臂放入 T 迷宫 (黑色无反光材质, 起始臂长、宽、高为 71 cm、18 cm、30 cm, 目标臂长、宽、高为 46 cm、18 cm、30 cm), 目标臂中放入奶酪, 自由采食 5 min 后回收大鼠。测试阶段持续 4 天, 每天重复 10 次, 每次间隔 20 min, 两目标臂均放置相同数目奶酪, 随机关闭其中一侧闸门, 大鼠自起始臂放入, 待大鼠进入未关闭阀门的目标臂并进食后取出, 30 s 后再次将大鼠放入起始臂, 打开所有闸门, 任大鼠自由选择进入目标臂, 若大鼠进入曾关闭的目标臂, 允许进食后取出并记为正确 1 次, 否则记为错误 1 次。计算每天正确率。

1.5.3 Western Blot 法检测海马组织中 NeuN、巢蛋白、DCX 及脉络丛组织中 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达 T 迷宫实验后次日采取随机数字法每组取 5 只大鼠, 腹腔注射 4% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉, 断头取脑, 取新鲜海马组织和脉络丛组织, 分别加入含 1%PMSF 的 RIPA 裂解液, 冰上裂解后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min (离心半径 8 cm), 取上清, 抽取适量蛋白液进行 BCA 蛋白定量。蛋白变性后等量上样、电泳、转膜、封闭 1 h, 一抗 (兔抗巢蛋白、兔抗 DCX、兔抗 NeuN、兔抗 ZO-1、兔抗 FR α 、兔抗 RFC、兔抗 PCFT 稀释比例均为 1:2000, 大鼠抗 GAPDH、大鼠抗 β -actin 稀释比例为 1:5000) 4 °C 孵育过夜, NeuN 内参为 β -actin, 余指标内参均为 GAPDH。TBST 快洗 3 次 $\times$

5 min, 加入相应二抗(山羊抗兔、山羊抗小鼠稀释比例均为 1:5000)室温孵育 1 h, TBST 快洗 3 次×5 min, 加发光液 1 ml 曝光成像。采用 Image J 1.53 软件分析条带灰度值, 得到目的蛋白/内参的相对灰度值。

1.5.4 免疫荧光法检测海马齿状回 Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数、BrdU/DCX 双阳性细胞数及脉络丛中 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 蛋白表达 采取随机数字法每组取 4 只大鼠, 取新鲜双侧海马组织和脉络丛组织, 浸泡于 4% 多聚甲醛, 置于 4℃ 冰箱 24 h 后更换为 30% 蔗糖溶液进行脱水, 沉底后更换新鲜的 30% 蔗糖溶液, 重复 3 次。切片梯度复温至室温后 PBS 清洗 5 min 共 3 次 (BruU/DCX 需 2 mol/L 盐酸室温变性 30 min 后清洗, pH 8.5 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液室温中和 15 min 后再次清洗), 5% 山羊血清 (含 0.3% Triton-X) 封闭 1 h 后, 4℃ 一抗 (兔抗 Ki-67 稀释比例 1:150, 鼠抗巢蛋白、大鼠抗 BruU、兔抗 DCX、兔抗 ZO-1、兔抗 FRα、兔抗 RFC、兔抗 PCFT 稀释比例均为 1:200) 孵育过夜, TBST 清洗 3 次×5 min, 37℃ 避光孵育二抗 (山羊抗小鼠、山羊抗兔稀释比例均为 1:500) 2 h, TBST 清洗 3 次×5 min, 抗荧光衰减封片剂 (含 DAPI) 封片, 激光共聚焦拍照, 采用 Image J 1.53 软件进行统计分析。

1.5.5 ELISA 法检测脑脊液、血浆、海马组织中 5-MTHF 含量 采取随机数字法每组取 8 只大鼠, 眼眶采血法取全血于含抗凝剂采血管。眼眶采血后将大鼠固定于脑立体定位仪上, 剪开皮毛暴露枕骨大孔, 1 ml 注射器连接 0.45 号针头, 直接穿刺小脑延髓池抽取脑脊液。脑脊液及全血标本采集后均冰上静置 20 min, 4℃、3000 r/min 离心 20 min (离心半径 8 cm), 分别取上清。海马组织称重, 每 10 mg 海马组织中加入 100 μl 预冷的 PBS 缓冲液, 匀浆后

4℃、12 000 r/min 离心 20 min (离心半径 8 cm), 取上清。据 ELISA 试剂盒操作步骤进行, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 标准曲线下计算 5-MTHF 含量。

1.5.6 大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量及海马组织中巢蛋白、DCX、NeuN 蛋白表达相关性分析 将各组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量数据及海马组织巢蛋白、DCX、NeuN 蛋白表达数据依照组别录入 Excel 2013 进行整理, 采用 SPSS 22.0 软件进行 Pearson 相关性分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。各组数据均符合正态分布用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合方差齐性的多组间比较采用单因素分析, 两两比较采用 LSD 法, 方差不齐的多组间比较用 Welch 法检验, 两两比较采用 Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中衰老组死亡 1 只大鼠, 迟发抑郁组死亡 3 只, 为造模过程中游泳后死亡, 考虑原因为游泳过程中肺部呛水。

2.1 各组大鼠抑郁样行为及认知功能指标比较

表 1 示, 与正常组比较, 青年抑郁组及迟发抑郁组大鼠糖水偏爱度均降低, 旷场总路程缩短、穿格次数减少, 强迫游泳不动时间延长, 衰老组旷场总路程、穿格次数减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与青年抑郁组比较, 迟发抑郁组旷场总路程、穿格次数减少 ($P < 0.01$)。与衰老组比较, 迟发抑郁组大鼠糖水偏爱度及旷场总路程、穿格次数均降低, 强迫游泳不动时间延长 ($P < 0.01$)。与迟发抑郁组比较, 二仙汤组大鼠糖水偏爱度及旷场总路程、穿格次数均升高, 强迫游泳不动时间缩短 ($P < 0.01$)。

表 2 示, 与正常组比较, 衰老组大鼠第 1~4 天

表 1 各组大鼠糖水偏爱度、旷场穿格次数及总路程、强迫游泳不动时间比较

Table 1 Comparison of sugar-water preference, forced swimming immobility time, number of absent field penetration and total distance travelled by rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	糖水偏爱度/%	旷场总路程/mm	旷场穿格次数/次	强迫游泳不动时间/s
正常组	20	95.76±2.53	20758.78±1742.89	129.30±19.18	41.87±15.30
青年抑郁组	20	61.88±13.74 ^{a)}	16350.62±3197.19 ^{a)}	106.85±25.89 ^{a)}	92.00±51.80 ^{a)}
衰老组	19	91.66±4.67	17385.65±5197.77 ^{b)}	111.63±30.45 ^{a)}	31.79±21.92
迟发抑郁组	17	61.40±10.36 ^{a) d)}	10930.75±4074.38 ^{a) c) d)}	59.59±25.14 ^{a) c) d)}	86.73±28.25 ^{a) d)}
二仙汤组	20	84.49±7.69 ^{e)}	16329.53±5539.13 ^{e)}	101.65±35.22 ^{e)}	41.69±21.54 ^{e)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与正常组比较, $P < 0.05$; c) 与青年抑郁组比较, $P < 0.01$; d) 与衰老组比较, $P < 0.01$; e) 与迟发抑郁组比较, $P < 0.01$ 。

T 迷宫正确率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 青年抑郁组大鼠第 3、4 天, 迟发抑郁组大鼠第 2~4 天 T 迷宫正确率明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与青年抑郁组比较, 迟发抑郁组大鼠第 1~4 天 T 迷宫正确率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但二仙汤组第 3 天 T 迷宫正确率升高 ($P<0.05$)。与衰老组比较, 迟发抑郁组大鼠第 1~4 天 T 迷宫正确率均显著降低 ($P<0.01$)。与迟发抑郁组比较, 二仙汤组大鼠第 2~4 天 T 迷宫正确率明显升高 ($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 及脉络丛组织 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达比较

表 3、表 4 示, 与正常组比较, 青年抑郁组大鼠与迟发抑郁组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、

DCX 蛋白表达均降低, 脉络丛 ZO-1、FR α 均降低, 迟发抑郁组大鼠脉络丛 RFC、PCFT 亦降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与青年抑郁组比较, 迟发抑郁组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达降低, 脉络丛 RFC、PCFT 蛋白表达降低; 二仙汤组大鼠脉络丛 ZO-1、FR α 蛋白表达增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与衰老组比较, 迟发抑郁组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达均降低, 脉络丛 RFC、PCFT 蛋白表达降低; 二仙汤组大鼠脉络丛 ZO-1、FR α 蛋白表达增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与迟发抑郁组比较, 二仙汤组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白表达及脉络丛 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间 T 迷宫正确率比较

Table 2 Comparison of the correct rate of T-maze at different times in each group of rats (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常组	9	57.78 $\pm$ 16.41	71.11 $\pm$ 14.53	75.56 $\pm$ 8.82	84.44 $\pm$ 8.82
青年抑郁组	9	54.44 $\pm$ 8.82	61.11 $\pm$ 10.54	58.89 $\pm$ 7.82 ^{a)}	64.44 $\pm$ 8.82 ^{a)}
衰老组	9	64.44 $\pm$ 11.30	66.67 $\pm$ 10.00	73.33 $\pm$ 10.00	81.11 $\pm$ 9.28
迟发抑郁组	9	48.89 $\pm$ 7.82 ^{d)}	51.11 $\pm$ 9.28 ^{b) d)}	51.11 $\pm$ 7.82 ^{b) d)}	54.44 $\pm$ 8.82 ^{b) d)}
二仙汤组	9	54.44 $\pm$ 8.82	65.56 $\pm$ 10.14 ^{e)}	75.56 $\pm$ 5.27 ^{c) e)}	81.11 $\pm$ 9.28 ^{e)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与正常组比较, $P<0.01$; c) 与青年抑郁组比较, $P<0.05$; d) 与衰老组比较, $P<0.01$; e) 与迟发抑郁组比较, $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 蛋白相对表达量比较

Table 3 Comparison of relative expression of NeuN, nestin, DCX proteins in hippocampal tissues of rat in each group

(相对灰度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NeuN	巢蛋白	DCX
正常组	5	0.87 $\pm$ 0.14	0.19 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.08
青年抑郁组	5	0.57 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.13 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.25 $\pm$ 0.07 ^{a)}
衰老组	5	0.98 $\pm$ 0.27	0.20 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.07
迟发抑郁组	5	0.36 $\pm$ 0.09 ^{b) c) e)}	0.07 $\pm$ 0.03 ^{b) d) f)}	0.14 $\pm$ 0.05 ^{b) d) f)}
二仙汤组	5	0.86 $\pm$ 0.19 ^{g)}	0.19 $\pm$ 0.03 ^{h)}	0.38 $\pm$ 0.07 ^{h)}

注: NeuN, 神经元核心抗原; CX, 双皮质素。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与正常组比较, $P<0.01$; c) 与青年抑郁组比较, $P<0.01$; d) 与青年抑郁组比较, $P<0.05$; e) 与衰老组比较, $P<0.05$; f) 与衰老组比较, $P<0.01$; g) 与迟发抑郁组比较, $P<0.05$; h) 与迟发抑郁组比较, $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠脉络丛组织 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白相对表达量比较

Table 4 Comparison of relative expression of ZO-1, FR α , RFC and PCFT proteins in choroid plexus tissue of rat in each group

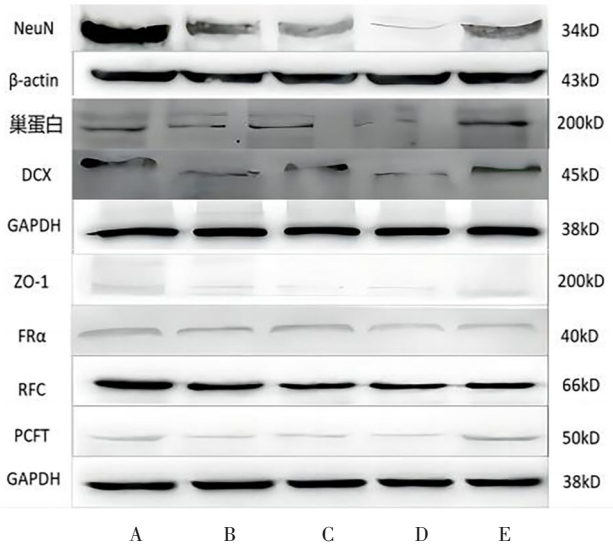
(相对灰度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	FR α	RFC	PCFT
正常组	5	0.72 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.15	0.55 $\pm$ 0.08
青年抑郁组	5	0.33 $\pm$ 0.07 ^{a)}	0.52 $\pm$ 0.08 ^{a)}	1.13 $\pm$ 0.26	0.55 $\pm$ 0.12
衰老组	5	0.32 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.53 $\pm$ 0.09 ^{a)}	0.91 $\pm$ 0.21	0.61 $\pm$ 0.12
迟发抑郁组	5	0.29 $\pm$ 0.09 ^{a)}	0.51 $\pm$ 0.15 ^{a)}	0.64 $\pm$ 0.13 ^{a) b) d)}	0.34 $\pm$ 0.08 ^{a) c) e)}
二仙汤组	5	0.66 $\pm$ 0.12 ^{b) e) f)}	0.89 $\pm$ 0.10 ^{b) e) f)}	0.99 $\pm$ 0.17 ^{f)}	0.56 $\pm$ 0.17 ^{f)}

注: ZO-1, 闭锁小带蛋白 1; FR α , 叶酸 α 受体; RFC, 还原型叶酸转运体; PCFT, 质子耦合叶酸转运体。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与青年抑郁组比较, $P<0.01$; c) 与青年抑郁组比较, $P<0.05$; d) 与衰老组比较, $P<0.05$; e) 与衰老组比较, $P<0.01$; f) 与迟发抑郁组比较, $P<0.01$ 。

各组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 及脉络丛组织 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 蛋白电泳情况见图 1。



注：NeuN，神经元核心抗原；DCX，双皮质素；ZO-1，闭锁小带蛋白 1；FRα，叶酸 α 受体；RFC，还原型叶酸转运体；PCFT，质子耦合叶酸转运体；A，正常组；B，青年抑郁组；C，衰老组；D，迟发抑郁组；E，二仙汤组。

图 1 各组大鼠海马组织 NeuN、巢蛋白、DCX 及脉络丛组织 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 蛋白电泳图

Figure 1 Electrophoresis of NeuN, nestin, DCX in hippocampal tissues and ZO-1, FRα, RFC, PCFT proteins in choroid plexus tissues of rats in each group

2.3 各组大鼠海马齿状回 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数比较

表 5 示，与正常组比较，青年抑郁组和迟发抑郁组海马齿状回 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数减少，且迟发抑郁组均低于青年抑郁组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与衰老组比较，迟发抑郁组大鼠海马齿状回 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与迟发抑郁组比较，二仙汤组大鼠海马齿状回 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 6 各组大鼠脉络丛组织中 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 荧光强度比较

Table 6 Comparison of fluorescence intensity of ZO-1, FRα, RFC and PCFT in choroid plexus tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	ZO-1	FRα	RFC	PCFT
正常组	4	39.95±4.61	35.62±6.04	29.68±2.21	29.95±1.57
青年抑郁组	4	25.73±3.01 ^{a)}	22.40±3.25 ^{a)}	34.47±3.64	31.21±3.73
衰老组	4	27.17±0.76 ^{a)}	23.66±2.64 ^{a)}	36.30±3.01	34.13±4.57
迟发抑郁组	4	24.46±5.31 ^{a)}	21.23±1.00 ^{a)}	19.34±1.14 ^{a)}	19.88±2.23 ^{a)}
二仙汤组	4	37.26±5.68 ^{b)}	29.82±3.93 ^{c)}	32.54±4.17 ^{c)}	30.86±1.53 ^{b)}

注：ZO-1，闭锁小带蛋白 1；FRα，叶酸 α 受体；RFC，还原型叶酸转运体；PCFT，质子耦合叶酸转运体。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与迟发抑郁组比较， $P<0.01$ ；c) 与迟发抑郁组比较， $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠海马齿状回 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数比较

Table 5 Comparison of the number of Ki-67/nestin, BrdU/DCX double-positive cells in hippocampal dentate gyrus of rats in each group (个, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	Ki-67/巢蛋白双阳性细胞数	BrdU/DCX 双阳性细胞数
正常组	4	25.00±4.69	24.00±0.82
青年抑郁组	4	10.50±1.29 ^{a)}	17.75±2.22 ^{a)}
衰老组	4	26.75±6.99	21.75±3.10
迟发抑郁组	4	5.25±0.96 ^{a) c) e)}	10.75±2.22 ^{b) d) f)}
二仙汤组	4	24.75±5.74 ^{g)}	21.50±3.70 ^{h)}

注：BrdU，5-溴脱氧尿嘧啶核苷；DCX，双皮质素。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.01$ ；c) 与青年抑郁组比较， $P<0.01$ ；d) 与青年抑郁组比较， $P<0.05$ ；e) 与衰老组比较， $P<0.05$ ；f) 与衰老组比较， $P<0.01$ ；g) 与迟发抑郁组比较， $P<0.05$ ；h) 与迟发抑郁组比较， $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠脉络丛组织中 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 免疫荧光强度比较

表 6 示，与正常组比较，青年抑郁组大鼠及衰老组大鼠脉络丛组织中 ZO-1、FRα 荧光强度降低，迟发抑郁组大鼠脉络丛组织中 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 荧光强度均降低 ($P<0.01$)。与迟发抑郁组比较，二仙汤组大鼠脉络丛组织中 ZO-1、FRα、RFC、PCFT 荧光强度均增强 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 各组大鼠脑脊液、海马组织、血浆中 5-MTHF 含量比较

表 7 示，各组大鼠血浆中 5-MTHF 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较，衰老组大鼠脑脊液、海马组织 5-MTHF 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组、衰老组大鼠比较，迟发抑郁组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与迟发抑郁组大鼠比较，二仙汤组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量明显升高 ($P<0.01$)。

表 7 各组大鼠脑脊液、海马组织、血浆中 5-MTHF 含量比较

Table 7 Comparison of 5-MTHF levels in cerebrospinal fluid, hippocampal tissue and plasma of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脑脊液/ng·ml ⁻¹	海马组织/ng·μg ⁻¹	血浆/ng·ml ⁻¹
正常组	8	14.23±4.05	117.99±39.88	271.18±69.70
青年抑郁组	8	14.94±3.61	111.06±51.48	256.58±39.99
衰老组	8	13.51±3.00	84.08±32.02	261.30±65.54
迟发抑郁组	8	8.64±1.45 ^{a)} b)	45.90±23.68 ^{a)} c)	273.49±56.64
二仙汤组	8	14.07±4.40 ^{d)}	114.69±20.57 ^{d)}	252.07±17.24

注: 5-MTHF, 5-甲基四氢叶酸。

a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与衰老组比较, $P < 0.01$; c) 与衰老组比较, $P < 0.05$; d) 与迟发抑郁组比较, $P < 0.01$ 。

2.6 各组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白、DCX、NeuN 蛋白表达相关性分析结果

为了明确脑脊液、海马组织中 5-MTHF 降低是否为迟发抑郁组大鼠脉络丛叶酸转运功能障碍的影响因素, 对各组大鼠脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白、DCX、NeuN 蛋白表达进行相关性分析, 以探讨脑脊液和海马组织中 5-MTHF 含量与海马神经干细胞增殖分化、神经元保护是否存在相关性。结果显示, 脑脊液中 5-MTHF 含量与海马组织中 5-MTHF 存在正相关 ($r=0.781$, $P < 0.05$); 脑脊液中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白表达存在正相关 ($r=0.466$, $P < 0.05$); 海马组织中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白表达存在正相关 ($r=0.522$, $P < 0.05$)。

3 讨论

LOD 属于中医学“郁证”范畴。《医林改错》曰:“灵机记性在脑”, 中医理论认为, 脑为髓海, 为肾精所充, 因此肾中精气是大脑发育和发挥功能的基础。肾精不足则髓海空虚, 神失所养, 由此可以引发情感和认知功能障碍。LOD 发病既有脏腑气血阴阳失调的内在原因, 又有情志外伤等外在因素。张玉龙等^[16]认为老年抑郁症中医病机为肾虚和中焦枢机不利; 王越等^[17]通过对 194 例临床患者资料的分析, 认为肝肾阴血亏虚是本病发病基础; 薛丽飞^[18]通过对老年抑郁症及体质的相关性进行线性回归分析, 发现肝肾阴虚证和肝郁脾虚证为常见证候; 国医大师阮士怡^[19]认为, 心、肝、肾不足及心神失养是本病的病机特点, 提出抑郁之源在肾。因此, 可以看出肾虚是其核心病机之一, 补肾法为防治 LOD 的基本治法。二仙汤是补肾治法的代表方剂之一, 方中淫羊藿、仙茅、巴戟天温

补肾阳, 黄柏、知母滋肾坚阴, 当归养血和血, 具有补肾精、温肾阳、泻相火、调冲任、平阴阳之功效。

LOD 是老年期抑郁症的一个特殊亚型, 衰老是 LOD 发病的重要因素之一, 因此 LOD 模型必须建立在衰老的基础上。大鼠自然衰老最符合人类衰老特征, CUMS 模型可以很好地模拟人类由于长期低强度压力引起的抑郁症的完整发病过程, 是慢性应激诱发抑郁症的经典动物模型。因此本研究对自然衰老大鼠施加 CUMS 以模拟 LOD 的发病。

糖水偏爱实验、强迫游泳实验用于评价大鼠的抑郁样行为, 旷场实验评价大鼠的自发活动能力。本研究行为学实验结果显示, 未施加应激的衰老组大鼠仅出现旷场总路程及穿格次数减少, 但无糖水偏爱度降低及强迫游泳不动时间延长, 说明衰老组大鼠在旷场中出现自发活动降低为衰老所致进行性自发活动降低而非处于抑郁状态。青年抑郁组和迟发抑郁组大鼠糖水偏爱度降低, 强迫游泳不动时间延长, 旷场总路程及穿格次数减少, 说明大鼠均存在抑郁样行为和自发活动降低。相比青年抑郁组大鼠, 迟发抑郁组大鼠旷场实验总路程和穿格次数明显降低, 说明迟发抑郁组大鼠自主活动能力减退症状更明显, 提示衰老是迟发抑郁组大鼠自发活动能力降低更严重的原因之一。T 迷宫是用于检测实验动物认知功能的常用方法之一, 可同时检测其学习能力、工作记忆和空间记忆能力。本研究结果显示, 衰老组大鼠 T 迷宫正确率与正常组大鼠正确率无明显差异, 提示自然衰老大鼠没有表现出明显学习记忆障碍, 我们推测可能与设置了奖励机制有关; 而青年抑郁组和迟发抑郁组大鼠第 3、4 天 T 迷宫正确率均降低, 说明大鼠出现了认知功能的损伤。经二仙汤干预后, 大鼠糖水偏爱度升高, 强迫游泳不动时间减少, 旷场总路程及穿格次数增加, 第 2 天开始 T 迷宫正确率升高, 说明二仙汤可以改善自发活动降低、快感缺失、绝望情绪、学习记忆障碍, 具有改善 LOD 抑郁行为的功效。从以方测证的角度也进一步证实 LOD 模型大鼠肾阳不足、髓海不充的病机特点。

海马萎缩是 LOD 的典型标志, 而海马神经元减少是引起海马萎缩的重要原因之一^[20], NeuN 是神经元的标志物^[21]。神经发生障碍与神经元减少密切相关, 是引起海马萎缩的重要原因^[22], 与抑郁症的发病^[23]、认知功能障碍^[24]关系密切。本研究结果显示, 迟发抑郁组大鼠出现了比青年抑郁组大鼠更严重的海马 NeuN 蛋白的表达下降, 这与临

床上 LOD 患者海马严重损伤、海马萎缩的特点相吻合。迟发抑郁组大鼠海马组织中 NeuN 蛋白表达较青年抑郁组大鼠降低更显著,而二仙汤组大鼠海马组织 NeuN 蛋白表达较青年抑郁组及迟发抑郁组大鼠明显升高,提示衰老也可能是加重 LOD 模型大鼠海马神经元损伤的因素之一,而二仙汤对 LOD 模型具有良好的抗海马损伤的效应,从而改善认知功能。另外,尽管本研究中衰老组大鼠海马 NeuN 蛋白的表达均与正常组大鼠无显著差异,但既往研究^[25-26]显示衰老可增加海马萎缩和认知障碍的风险,分析原因可能与样本量较少有关。

巢蛋白是神经干细胞的标记物,DCX 是前体神经元的标志物^[27]。本研究结果显示,青年抑郁组和迟发抑郁组大鼠海马巢蛋白和 DCX 蛋白表达减少,免疫荧光结果显示 Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数在大鼠海马齿状回大量减少,且迟发抑郁组减少较青年抑郁组更明显。说明青年抑郁症大鼠和 LOD 模型大鼠均出现前体神经元及神经干细胞增殖减少,大鼠神经干细胞向神经元分化减少,青年抑郁症大鼠也出现了类似 LOD 的神经发生障碍,但损伤的程度不及 LOD 模型大鼠,这也与 T 迷宫实验中的结果一致。经二仙汤干预后,巢蛋白和 DCX 蛋白表达增加, Ki-67/巢蛋白、BrdU/DCX 双阳性细胞数亦增加,说明二仙汤可以促进大鼠神经干细胞向神经元分化。

叶酸缺乏会妨碍海马神经发生,故 LOD 临床治疗采用叶酸作为抗抑郁的增效剂^[4-5]。5-MTHF 是血液、脑脊液、脑组织中最具有生物活性的主要叶酸形式,血浆中的 5-MTHF 主要通过脉络丛转运至脑脊液,继而进入中枢神经系统,对情绪和认知产生重要影响^[28]。本研究结果显示,与正常组相比,青年抑郁组大鼠血浆、脑脊液、海马组织中 5-MTHF 含量均无差异,说明青年抑郁组大鼠无明显叶酸缺乏现象。与青年抑郁组大鼠相比,迟发抑郁组大鼠血浆中 5-MTHF 无差异,但脑脊液和海马组织中 5-MTHF 含量明显降低,提示 LOD 模型大鼠海马及脑脊液出现叶酸缺乏,且叶酸含量是在脉络丛转运至脑脊液过程中大幅降低。而二仙汤治疗后大鼠脑脊液中 5-MTHF 含量明显升高,这说明二仙汤可以缓解叶酸转运障碍。相关性分析结果亦显示,脑脊液和海马组织中 5-MTHF 含量与海马组织中巢蛋白表达存在正相关,提示脑脊液和海马组织中 5-MTHF 含量与海马神经干细胞增殖分化、神经元保护也存在一定相关性。

为了更进一步明确 LOD 叶酸转运障碍机制及二仙汤作用机制,我们选择检测紧密连接蛋白 ZO-1 和 3 种已经明确参与脉络丛叶酸转运的蛋白(FR α 、RFC、PCFT)的表达,以反映大鼠脉络丛紧密连接结构和叶酸转运功能的变化。脉络丛上皮细胞是高度极化的细胞,上皮细胞极性功能失常,会影响到转运蛋白在细胞膜上的分布,ZO-1 在上皮细胞中高表达,对紧密连接的稳定性至关重要^[29],也是维持脉络丛上皮细胞细胞极性的重要因素^[30]。本研究结果显示,迟发抑郁组大鼠脉络丛组织 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达和免疫荧光强度均降低,而二仙汤组大鼠 ZO-1、FR α 、RFC、PCFT 蛋白表达和免疫荧光强度较迟发抑郁组明显升高,说明二仙汤可以保护脉络丛结构,并改善脉络丛叶酸转运障碍。

本研究初步证实二仙汤可显著改善 LOD 模型大鼠抑郁样行为及认知障碍,通过减轻脑组织脉络丛结构损伤,调节脉络丛叶酸转运蛋白的表达,进而改善脉络丛叶酸转运障碍可能是其机制之一。在未来的研究中,我们将通过蛋白质组学、转录组学、代谢组学等进一步证实其疗效并探讨其机制。

参考文献

- [1] 吕永良,吴爱勤,李鸣,等.老年抑郁症的心理社会因素研究[J].中国心理卫生杂志,2004,18(4):254-256,261.
- [2] LLOYD AJ, FERRIER IN, BARBER R, et al. Hippocampal volume change in depression: late- and early-onset illness compared[J]. Br J Psychiatry, 2004, 184:488-495. doi: 10.1192/bjp.184.6.488.
- [3] TERRACCIANO A, BILGEL M, ASCHWANDEN D, et al. Personality associations with amyloid and tau: results from the baltimore longitudinal study of aging and meta-analysis [J]. Biol Psychiatry, 2022, 91(4):359-369.
- [4] ALTHUBAITY N, SCHUBERT J, MARTINS D, et al. Choroid plexus enlargement is associated with neuroinflammation and reduction of blood brain barrier permeability in depression [J]. Neuroimage Clin, 2022, 33: 102926. doi: 10.1016/j.nicl.2021.102926.
- [5] BRUNO D, REICHERT PLASKA C, CLARK DPA, et al. CSF alpha-synuclein correlates with CSF neurogranin in late-life depression [J]. Int J Neurosci, 2021, 131(4): 357-361.
- [6] KIM JM, STEWART R, KIM SW, et al. Predictive value of folate, Vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression [J]. Br J Psychiatry, 2008, 192(4):268-274.
- [7] 薛娟,马文斌,涂华,等.不同人群抑郁症特点和叶酸干

- 预的研究进展[J]. 中国当代医药, 2022, 29(16):53-56.
- [8]牛婕,严灿,吴丽丽. 补肾法抗晚发型抑郁症研究的新视角:脉络丛衰老-叶酸脑转运-海马神经发生-认知功能[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(7):868-871.
- [9]马学玉. 二仙汤治疗更年期抑郁症 16 例[J]. 陕西中医, 2002, 23(5):438-439.
- [10]李光义. 加味二仙汤治疗更年期抑郁症的临床研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2014.
- [11]罗武龙,陈洁,牛婕等. 基于网络药理学的二仙汤治疗抑郁症的作用机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9):1317-1324.
- [12]HUANG YL, ZENG NX, CHEN J, et al. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(6):1150-1159.
- [13]KATZ RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1982, 16(6):965-968.
- [14]WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation[J]. Psychopharmacology (Berl), 1997, 134(4):319-329.
- [15]赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5):54-55.
- [16]张玉龙,吴世伟,颜明辉,等. 探讨老年期抑郁症的中医病机和治疗原则[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(3):315-317, 384.
- [17]王越,丁元庆,张成博. 老年期抑郁症病机探讨与常见证候分析[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4):942-943.
- [18]薛丽飞. 老年抑郁症证候与中医体质相关性研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2011.
- [19]程坤,张军平. 阮士怡辨治老年抑郁症经验[J]. 中医杂志, 2017, 58(13):1097-1099.
- [20]ROESKE MJ, KONRADI C, HECKERS S, et al. Hippocampal volume and hippocampal neuron density, number and size in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem studies[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(7):3524-3535.
- [21]MULLEN RJ, BUCK CR, SMITH AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates[J]. Development, 1992, 116(1):201-211.
- [22]VIDEBECH P, RAVNKILDE B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies[J]. Am J Psychiatry, 2004, 161(11):1957-1966.
- [23]牟君,谢鹏. 海马神经发生障碍:抑郁症发病机制的新观念[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11):1264-1266.
- [24]FRIMODT-MØLLER KE, MØLLEGAARD JEPSEN JR, FELDT-RASMUSSEN U, et al. Hippocampal volume, cognitive functions, depression, anxiety, and quality of life in patients with cushing syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(10):4563-4577.
- [25]GEERLINGS MI, GERRITSEN L. Late-life depression, hippocampal volumes, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation: a systematic review and meta-analysis[J]. Biol Psychiatry, 2017, 82(5):339-350.
- [26]GAO J, WU Y, HE D, et al. Anti-aging effects of Ribes meyeri anthocyanins on neural stem cells and aging mice[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(17):17738-17753.
- [27]郑志斌,林玲,胡建石,等. 大鼠脑的神经干细胞的体外培养、增殖和分化[J]. 神经解剖学杂志, 2003, 19(1):33-36.
- [28]RUTJES AW, DENTON DA, DI NISIO M, et al. Vitamin and mineral supplementation for maintaining cognitive function in cognitively healthy people in mid and late life[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2018, 12(12):CD011906.
- [29]HAWKINS BT, DAVIS TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2):173-185.
- [30]刘君丽,敬海明,李国君. 脑脉络丛组织的连接蛋白、转运蛋白及其药理毒理学研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1):120-126.

Effects of *Erxian Decoction* (二仙汤) on Choroid Plexus Folate Transport-Hippocampal Neurogenesis in Rat Brain Tissue of Late-Onset Depression Model

LI Lanxin¹, ZENG Ningxi², ZHANG Tiange¹, YAN Can¹, WU Lili¹

1. Basic Research Center for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006; 2. Longhua District People's Hospital

ABSTRACT Objective This study aims to investigate the effectiveness and potential mechanism of *Erxian Decoction* (二仙汤) for late-onset depression (LOD). **Methods** Forty Wistar male rats of 7-8 weeks were divided into 20 each of normal group and youth depression group. Sixty Wistar male rats of 20 months were divided into 20 each of elder group, LOD group and *Erxian Decoction* group. The rats in youth depression group were modelled with chronic

unpredictable mild stress (CUMS) for 6 weeks to build a depression model, and the elder rats in LOD group and *Erxian Decoction* group were modelled with CUMS for 6 weeks to build a LOD model, with no interventions in the normal group and the elder group. Gastric administration was carried out at the same time of modelling, rats in *Erxian Decoction* group were given 8 g/(kg·d) of *Erxian Decoction* by gavage, and rats in the normal group, youth depression group, elder group, and LOD group were given 4 ml/(kg·d) of pure water by gavage, for 6 weeks in each group. Sugar water preference experiment and forced swimming experiment were used to evaluate the depression-like behaviour of rats, absent field experiment was used to evaluate the spontaneous activity ability of rats, and T-maze experiment was used to evaluate the cognitive function of rats; Western blot assay was used to detect neuronal nuclei (NeuN), nestin, doublecortin (DCX) in hippocampal tissue, and zonula occludens-1 (ZO-1), folate receptor α (FR α), reduced folate carrier (RFC), and protoncoupledfolate transporter (PCFT) protein expression in choroid plexus; immunofluorescence was used to detect the number of double-positive cells for Ki-67/nestin, the number of double-positive cells for 5-bromodeoxyuracil nucleoside (BrdU)/DCX in hippocampal dentate gyrus, and the protein expression of ZO-1, FR α , RFC, and PCFT in choroid plexus tissues; ELISA technique was used to detect plasma, cerebrospinal fluid, 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) in hippocampal tissues; Pearson correlation analysis was used to correlate the 5-MTHF content in cerebrospinal fluid and hippocampal tissues and the expression of nestin, DCX, and NeuN proteins in hippocampal tissues of rats in youth depression group and LOD group. **Results** Compared with normal group, rats in youth depression group and LOD group showed reduced sugar water preference, reduced total distance travelled in the absent field, reduced number of times through the grid, prolonged forced swimming immobilisation, reduced hippocampal NeuN, nestin and DCX protein expression, reduced number of Ki-67/nestin double-positive cells in hippocampal dentate gyrus, reduced number of BrdU/DCX double-positive cells in hippocampal dentate gyrus, and reduced expression of ZO-1 and FR α proteins and fluorescence intensity ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the correct rate of T-maze on days 3 and 4 in the rats of youth depression group and on days 2 to 4 in the rats of LOD group significantly decreased, and the content of 5-MTHF in the cerebrospinal fluid and hippocampal tissues of the rats of LOD group significantly decreased as well ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with youth depression group, rats in LOD group showed a decrease in total distance travelled in absenteeism, number of times through the grid, a significant decrease in the correct rate of the T-maze on day 1-4, a decrease in NeuN, nestin, DCX protein expression of hippocampal tissue and the number of Ki-67/nestin double-positive cells, BrdU/DCX double-positive cells of hippocampal dentate gyrus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with LOD group, rats in *Erxian Decoction* group had elevated sugar-water preference and total distance travelled in absenteeism and number of times through the grid, shorter forced swimming immobility time, significantly higher correct rate of the T-maze on day 3-4, elevated expression of NeuN, nestin, and DCX proteins in hippocampal tissues, increased number of Ki-67/nestin double-positive cells and BrdU/DCX double-positive cells in hippocampal dentate gyrus, and increased 5-MTHF content in cerebrospinal fluid and hippocampal, and ZO-1, FR α , RFC, PCFT protein expression and fluorescence intensity increased in choroid plexus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Correlation analysis showed that there was a positive correlation between 5-MTHF content in cerebrospinal fluid ($r = 0.466$), hippocampal tissue ($r = 0.522$) and nestin expression in hippocampal tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** *Erxian Decoction* could improve depressive-like behaviour and cognitive impairment in LOD model rats, and its mechanism may promote hippocampal neurogenesis by alleviating structural damage to the choroid plexus of the brain tissue, and improving impaired choroid plexus folate transport.

Keywords late-onset depression; *Erxian Decoction* (二仙汤); choroid plexus; folic acid; neurogenesis; cognitive function

(收稿日期: 2023-10-29; 修回日期: 2024-03-05)

[编辑: 王利芬]