

# 柴胡加龙骨牡蛎汤对卒中后抑郁大鼠小胶质细胞极化及突触可塑性的影响

刘元月,胡丹,丁彩霞,李传游,肖婧,李婷婷,郭雪艳,盛蕾

(南京中医药大学第二附属医院,江苏 南京 210017)

**摘要:**目的 探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对脑卒中后抑郁(PSD)模型大鼠行为学和小胶质细胞极化及神经突触可塑性的影响。方法 将 50 只 SD 大鼠分为假手术组,模型组,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组,大脑中动脉栓塞(MCAO)手术后进行慢性不可预知性温和应激(CUMS)4 周,后进行柴胡加龙骨牡蛎汤治疗。治疗结束后进行 Longa 神经功能评分测定,通过糖水偏好测试和强迫游泳实验检测大鼠抑郁样表现,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定海马区炎症因子白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达水平,免疫荧光及蛋白免疫印迹法(Western blot)标记并定量大鼠海马区中 CD16/CD32、CD206、突触后致密蛋白-95(PSD95)蛋白表达水平,透射电镜检测突触超微结构并可视化海马神经元的突触结构。结果 与假手术组比较,模型组大鼠糖水偏好率降低( $P<0.01$ ),强迫游泳实验静止时间延长( $P<0.01$ ),海马区炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平及 M1 表型 CD16/CD32 蛋白荧光强度升高( $P<0.01$ ),PSD-95、CD206 蛋白水平明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),CD16 蛋白水平升高( $P<0.01$ );与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组上述各指标均明显改善( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论 柴胡加龙骨牡蛎汤可以改善 PSD 模型大鼠的卒中后抑郁的相关行为学变化,其机制可能与调节小胶质细胞极化抗炎从而改善突触可塑性有关。

**关键词:**卒中后抑郁;小胶质细胞;突触可塑性;柴胡加龙骨牡蛎汤

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2023)08-0746-07

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2023.0746

引文格式:刘元月,胡丹,丁彩霞,等.柴胡加龙骨牡蛎汤对卒中后抑郁大鼠小胶质细胞极化及突触可塑性的影响[J].南京中医药大学学报,2023,39(8):746-752.

## Effects of Chaihu Plus Longgu Muli Decoction on Microglial Polarization and Synaptic Plasticity in Post-Stroke Depressed Rats

LIU Yuan-yue, HU Dan, DING Cai-xia, LI Chuan-you, XIAO Jing, LI Ting-ting, GUO Xue-yan, SHENG Lei

(The Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210017, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effects of Chaihu Plus Longgu Muli Decoction on behavior, microglial polarization and synaptic plasticity in post-stroke depression model (PSD) rats. **METHODS** 50 SD rats were divided into sham operation group, model group, and low, medium and high dose groups of Chaihu Plus Longgu Muli Decoction. After middle cerebral artery occlusion (MCAO) operation, chronic unpredictable mild stimulation (CUMS) was performed for 4 weeks, PSD model was established, and Chaihu Plus Longgu Muli Decoction was treated. After treatment, Longa nerve function score was measured, and depression-like manifestations were detected by sucrose preference test and forced swimming test. The expression levels of inflammatory factors interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in hippocampus were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of CD16/CD32, CD206 and postsynaptic dense protein-95 (PSD95) in the hippocampus of rats were labeled and quantified by immunofluorescence and Western blot. The synaptic ultrastructure was detected by radio microscopy and the synaptic structure was visualized. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the sucrose preference rate of rats in the model group decreased ( $P<0.01$ ), the static time of forced swimming experiment was prolonged ( $P<0.01$ ), the expression levels of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the hippocampus region and the fluorescence intensity of CD16/CD32 protein in M1 phenotype were increased ( $P<0.01$ ), PSD-95, CD206 protein levels were significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), CD16 protein level was increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the above indexes in the medium and high dose groups of Chaihu Plus Longgu Muli Decoction were significantly improved ( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Chaihu

收稿日期:2023-02-12

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82205013);第四批全国西医学习中医优秀人才研修项目;江苏省第二中医院院内重点课题(SEZ202110,SEZ202012);南京中医药大学自然科学基金(XZR2020050);江苏省第二中医院中青年科技菁英项目(SEZJY2023001)

第一作者:刘元月,女,中医师,E-mail:liuyuanyue@126.com

通信作者:盛蕾,女,主任医师,主要从事中西医结合脑病研究,E-mail:hejieqong1234@163.com

Plus Longgu Muli Decoction can improve the behavioral changes related to post-stroke depression in PSD model rats, and the mechanism may be related to the regulation of microglial polarization and anti-inflammatory, thereby improving synaptic plasticity.

**KEYWORDS:** post-stroke depression; microglia; synaptic plasticity; Chaihu Plus Longgu Muli Decoction

卒中后抑郁(Post-stroke depression, PSD)是缺血性脑卒中后最常见的精神障碍性疾病,课题组前期研究发现即使轻型卒中患者,其3个月抑郁发病率仍为24.1%<sup>[1]</sup>, PSD已经成为影响全球公共卫生的重大问题<sup>[2]</sup>。临床广泛运用的选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)、三环类抗抑郁药(Tricyclic antidepressants, TCAs)等存在疗效差、缓解率低、起效较晚、副作用多等局限性,而中医药不仅在预防及治疗抑郁上发挥了重大作用,而且明显改善以上药物治疗PSD产生的恶心、呕吐、头晕和嗜睡等副作用。

PSD属中医学“郁证”与“中风”之共病范畴,《证治汇补·郁证》曰:“郁病虽多,皆因气不周流,法当顺气为先”<sup>[3]</sup>,因此,疏肝解郁、调畅脏腑气机为PSD的根本治疗法则。柴胡加龙骨牡蛎汤出自张仲景《伤寒论·辨少阳病脉证并治少阳病兼变证篇》第107条:“伤寒八九日,下之,胸满烦惊,小便不利,谵语,一身尽重,不可转侧者,柴胡加龙骨牡蛎汤主之。”<sup>[4]</sup>该方疏肝开郁,安神定志,临床上广泛用于情志病的治疗。前期研究发现柴胡类方具有快速和持久的抗抑郁作用,其作用机制可能与调节小胶质细胞活化、抑制神经炎症及改善突触结构有关<sup>[5-8]</sup>。近年来研究<sup>[9-10]</sup>显示,神经炎症是抑郁发生的重要机制,而小胶质细胞向促炎型激活介导神经炎症,进而损伤突触可塑性可能是PSD的发病基础。

本研究旨在通过大脑中动脉栓塞(MCAO)联合慢性不可预知性温和应激(CUMS)建立大鼠PSD模型,探讨柴胡加龙骨牡蛎汤通过调节PSD大鼠小胶质细胞极化改善突触可塑性,从而发挥抗抑郁功效的机制,以期为干预PSD的研究提供新的靶向药物思路及循证学依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

成年健康雄性清洁级SD大鼠,体质量180~210 g, SPF级,购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。标准混合饲料饲养,保持室温25℃,相对湿度45%,昼夜明暗12 h交替,适应性饲养1周,本实验经由南京中医药大学动物伦理委员会批准,伦理审查编号为

202112A146。

### 1.2 实验药物

柴胡加龙骨牡蛎汤由柴胡25 g, 龙骨25 g, 牡蛎25 g, 人参10 g, 桂枝15 g, 茯苓15 g, 半夏10 g, 黄芩10 g, 大黄6 g, 生姜10 g, 大枣5 g组成,均选用中药免煎颗粒剂,由江阴天江药业有限公司提供,购自南京中医药大学第二附属医院(江苏省第二中医院)中药房。所有中药药材的用药剂量根据2位主任医师临床经验拟定,药材鉴定均符合《中国药典》2020年版的要求。颗粒剂具体剂量如下:柴胡6.25 g(每克配方颗粒相当于4 g饮片),龙骨2 g(每克配方颗粒相当于12.5 g饮片),牡蛎2 g(每克配方颗粒相当于12.5 g饮片),人参4 g(每克配方颗粒相当于4 g饮片),桂枝2 g(每克配方颗粒相当于7.5 g饮片),茯苓1.2 g(每克配方颗粒相当于12.5 g饮片),半夏2.9 g(每克配方颗粒相当于3.4 g饮片),黄芩4.5 g(每克配方颗粒相当于2.2 g饮片),大黄1.5 g(每克配方颗粒相当于4 g饮片),生姜0.8 g(每克配方颗粒相当于12.5 g饮片),大枣4.1 g(每克配方颗粒相当于1.2 g饮片),按比例换算备齐全部颗粒剂后研钵碾细使其能充分溶解,100℃恒温水浴后玻璃棒搅拌至完全溶解,定容至360 mL,生药量为 $0.26 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,放入4℃冰箱备用。

### 1.3 仪器与试剂

全波长酶标仪(Thermo Fisher, 51119570);低温离心机(Thermo Fisher, Micro CL21R);电泳及转膜系统(Bio-Rad, 041BR121667);凝胶成像系统(天能, Tanon-4600);生物倒置显微镜(OLYMPUS, X3-SVR);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, P0010)。

PBS(索莱宝, 货号:KGB500);磷酸盐缓冲液(博士德, 货号:AR0030);Iba1一抗(Wako, 016-26721);CD206、CD16一抗(Abcam, 货号:ab64693、ab215977);TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10 ELISA试剂盒(茁彩, 货号:ZC-37624、ZC-36404、ZC-36391、ZC-36379);RIPA强裂解液(碧云天, 货号:P0013B);Goat Anti-Rabbit IgG H&L(Abcam, 货号:ab150081)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模及给药

将50只SPF级饲养的雄性SD大鼠分为假手

术组,模型组,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量(2.5、5、10 g·kg<sup>-1</sup>),分组方法均采用随机数字表法。以线栓法阻塞大鼠左侧大脑中动脉诱导局灶性脑缺血来建立 MCAO 模型。术后 24 h 按 Longa 的标准行神经功能评分(总分为 0~4 分,评分越高表示神经功能损伤越严重),选取≥1 且<4 分的大鼠,单笼孤养,恢复 7 d。在术后第 7 天开始,将动物予以夹尾 1 min、禁水 24 h、禁食 24 h、束缚 5 min、昼夜颠倒 24 h、电击 1 min、4℃冰水游泳 5 min 等 7 种刺激方法,以每天不同时间采取 1 种的频率交替应激大鼠。假手术组在 MCAO 术中只分离动脉不做阻断,不给予 CUMS,以常规方式喂养;其余组采用 MCAO 联合 CUMS 复合建立 PSD 模型。共安排 3 周。

造模后按大鼠体表面积换算药物剂量进行灌胃给药,各组每日灌胃 1 次,给药 3 周。柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组各给药剂量为生药量 2.5、5、10 g·kg<sup>-1</sup>。取柴胡加龙骨牡蛎汤溶液用生理盐水稀释成所需浓度,给药体积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,假手术组、模型组每天灌胃等体积生理盐水。

## 2.2 糖水偏好实验

实验前 1 d 训练大鼠适应糖水。禁食 24 h 后,分别将装有蒸馏水和 1%糖水水溶液的水瓶放于鼠笼上,中途交换 2 只水瓶的位置。记录 10 h 内大鼠摄入蒸馏水及糖水的量,计算小鼠糖水偏好指数=糖水消耗量/总液体消耗量×100%。

## 2.3 强迫游泳实验

实验前 1 d 训练大鼠适应性游泳 15 min。将大鼠放入水深 25 cm 的玻璃缸(高 26 cm,直径 18 cm)内,水温 25℃。应用 DepressionScan 记录 6 min 内大鼠的运动状态,测量后 4 min 大鼠躯体及四肢不动的时间。

## 2.4 ELISA 法测定海马区中炎症因子的表达水平

行为学测试结束后,脱颈处死大鼠后解剖获得海马组织,液氮迅速冷冻,粉碎。称取相应质量的组织,加入 10 倍体积 PBS,利用 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α ELISA 试剂盒,按试剂盒所列操作步骤,测定相应因子的表达水平。

## 2.5 免疫荧光检测海马区小胶质细胞的表达

将一抗加入脑片后,置 4℃冰箱过夜,次日加二抗于常温、避光条件下孵育 1 h,之后用 PBS 避光快洗 3 次,每次 5 min,滴加甘油封固,立即于激光共聚焦显微镜下观察,每只大鼠选不连续的 5 张切片观

察,免疫荧光实验发红色荧光的为阳性细胞表达。

## 2.6 Western blot 检测大鼠海马组织 CD16/CD32、CD206、PSD95 蛋白相对表达量

收集样品提取总蛋白,BCA 测定蛋白浓度、电泳、转膜、孵育抗体,CD16/CD32、CD206、PSD95 抗体均按照 1:1 000 稀释,二抗用封闭液按照 1:5 000 的比例进行稀释;ECL 化学发光法成像,Image Lab 显影并进行数据分析。

## 2.7 透射电镜检测突触超微结构

将海马组织切块,2.5%戊二醛固定 3 d,而后 1%锇酸避光固定 2 h,丙酮逐级脱水,树脂包埋,50 nm 超薄切片,采用醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后置于铜载网上,透射电镜下观察海马突触超微结构。

## 2.8 统计学处理

实验数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 Graphpad prism 8 软件进行统计学分析, $P<0.05$  说明差异有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 各组大鼠 Longa 评分比较

持续造模 4 周,行为学检测判断抑郁模型是否成功,若成功给予柴胡加龙骨牡蛎汤处理 3 周,并分别于第 28、49 天分别对大鼠进行 Longa 评分,结果显示:与假手术组比较,模型组,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠 Longa 评分差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,第 49 天给药结束后柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组 Longa 评分显著降低( $P<0.01$ ),提示柴胡加龙骨牡蛎汤治疗后有助于神经功能恢复。见表 1。

## 3.2 各组大鼠糖水消耗情况和强迫游泳实验结果比较

小鼠强迫游泳及糖水偏好度的结果显示:与假手术组比较,模型组有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组糖水偏好率明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),而游泳不动时间显著缩短( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),说明柴胡加龙骨牡蛎汤能够改善 PSD 大鼠的快感消失表现,见图 1。

## 3.3 ELISA 法测定海马区中炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 的表达水平

与假手术组比较,模型组炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平上升,具有统计学意义( $P<0.01$ ),炎症因子 IL-10 无统计学意义。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组均能显著下调模型动物海马区中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达( $P<0.01$ );

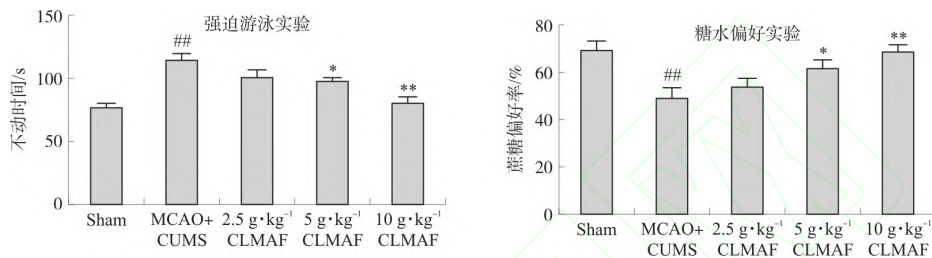


低、中、高剂量组 IL-10 的表达均上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其中中、高剂量组显示出较强的作用趋势。

表 1 各组大鼠 Longa 评分比较  
Table 1 Comparison of Longa scores in each group

组别	第 1 天	第 28 天	第 49 天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	2.79±0.53 <sup>##</sup>	2.40±0.76 <sup>##</sup>	1.80±0.79 <sup>##</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组	2.76±0.62 <sup>##</sup>	2.35±0.64 <sup>##</sup>	1.55±0.61 <sup>##*</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组	2.68±0.61 <sup>##</sup>	2.39±0.72 <sup>##</sup>	1.33±0.56 <sup>##**</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组	2.69±0.57 <sup>##</sup>	2.41±0.69 <sup>##</sup>	1.27±0.49 <sup>##**</sup>

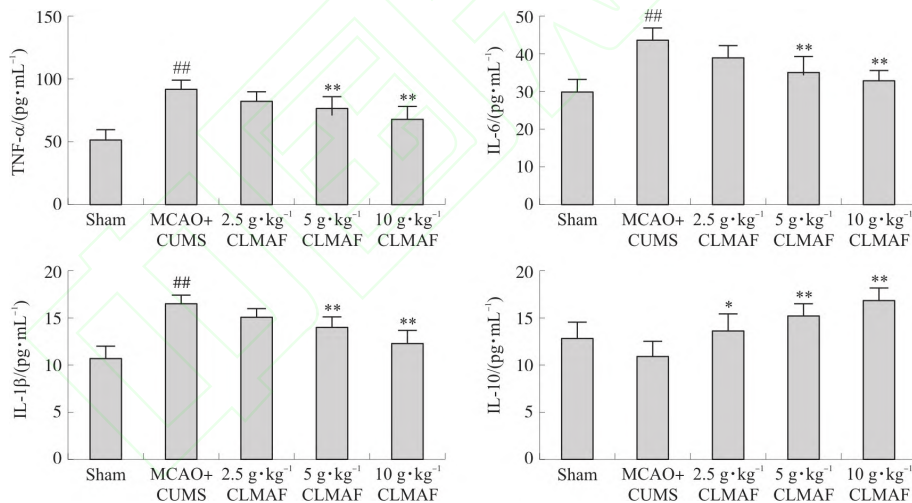
注:与假手术组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。



注:Sham.假手术组;MCAO+CUMS.模型组;2.5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组;5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组;10 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组;与假手术组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠糖水偏好及强迫游泳的结果比较

Fig.1 Comparison of the results of sugar water preference and forced swimming in each group



注:Sham.假手术组;MCAO+CUMS.模型组;2.5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组;5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组;10 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组;与假手术组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

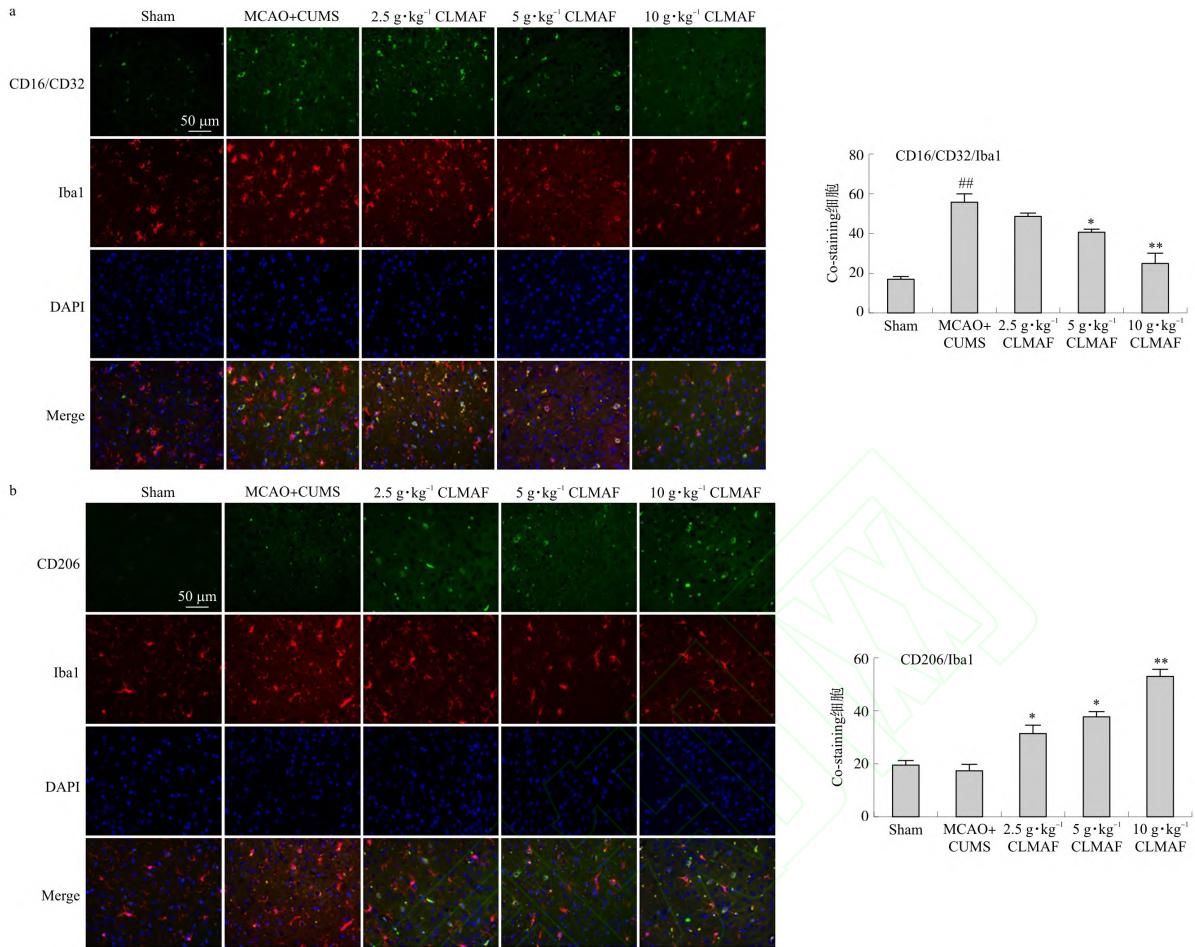
图 2 各组大鼠海马区炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 的表达水平的比较

Fig.2 Comparison of expression levels of inflammatory factors IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α in hippocampus of rats in each group

### 3.4 免疫荧光检测海马区中 CD16/CD32、CD206 表达水平

与假手术组比较,模型组 M1 型小胶质细胞活化标记物(CD16/CD32)表达升高,具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),M2 型小胶质细胞活化标记物(CD206)

不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组的 CD16/CD32 表达显著下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组的 CD206 表达均上调 ( $P < 0.01$ ),其中高剂量组更为显著,见图 3。



注：a.各组代表性脑切片标记活化的 M1 小胶质细胞及 CD16/CD32 表达水平；b.各组代表性脑切片标记活化的 M2 小胶质细胞及 CD206 表达水平；Sham.假手术组；MCAO+CUMS.模型组；2.5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组；5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组；10 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组；与假手术组比较，<sup>##</sup>*P*<0.01；与模型组比较，<sup>\*</sup>*P*<0.05，<sup>\*\*</sup>*P*<0.01。

图 3 各组大鼠海马区小胶质细胞 CD16/CD32、CD206 表达水平的比较

Fig.3 Comparison of CD16/CD32 and CD206 expression levels in hippocampal microglia of rats in each group

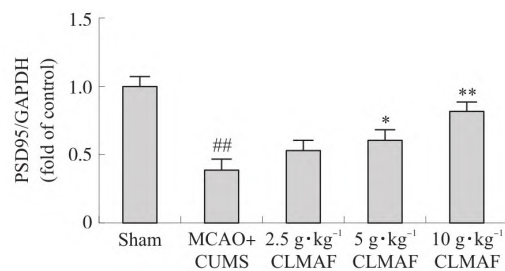
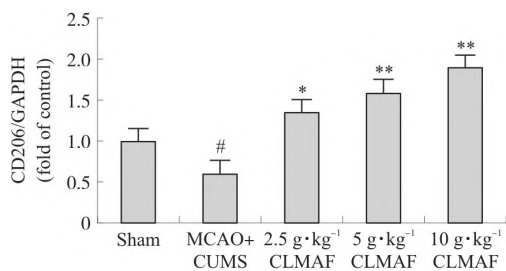
### 3.5 Western blot 检测 CD16/CD32、CD206、PSD95 蛋白表达

与假手术组比较，模型组 CD206、PSD95 蛋白表达水平下降，具有统计学意义 (*P*<0.05, *P*<0.01)，而 CD16/CD32 蛋白表达升高 (*P*<0.01)，提示模型组大鼠小胶质细胞活化，突触蛋白表达下调。与模型组比较，柴胡加龙骨牡蛎汤低、中剂量组大鼠海马组织中 CD16/CD32 蛋白表达明显下降 (*P*<0.05)，而高剂量组更为显著 (*P*<0.01)；中、高剂量组大鼠海马

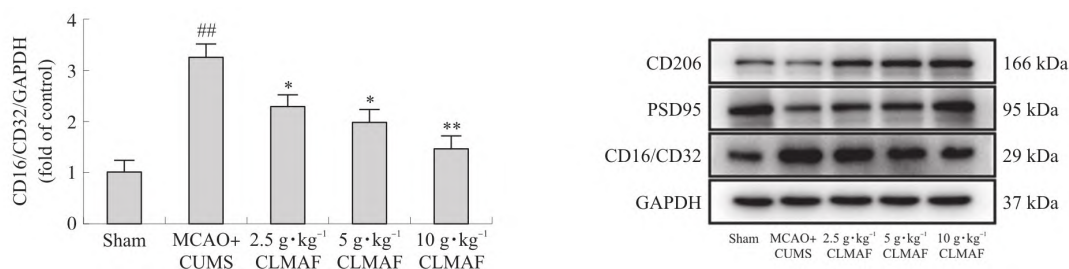
组织中 CD206、PSD95 蛋白表达显著上调 (*P*<0.05, *P*<0.01)，提示柴胡加龙骨牡蛎汤有抑制小胶质细胞活化，改善突触结构的作用，见图 4。

### 3.6 透射电镜检测突触超微结构结果

与假手术组比较，模型组海马突触间隙增宽，致密区厚度减小；与模型组比较，柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组海马突触有明显改善，突触数量增加不明显，但前后膜边界相对清晰完整，致密区厚度明显增大，突触间隙明显变窄。见图 5。



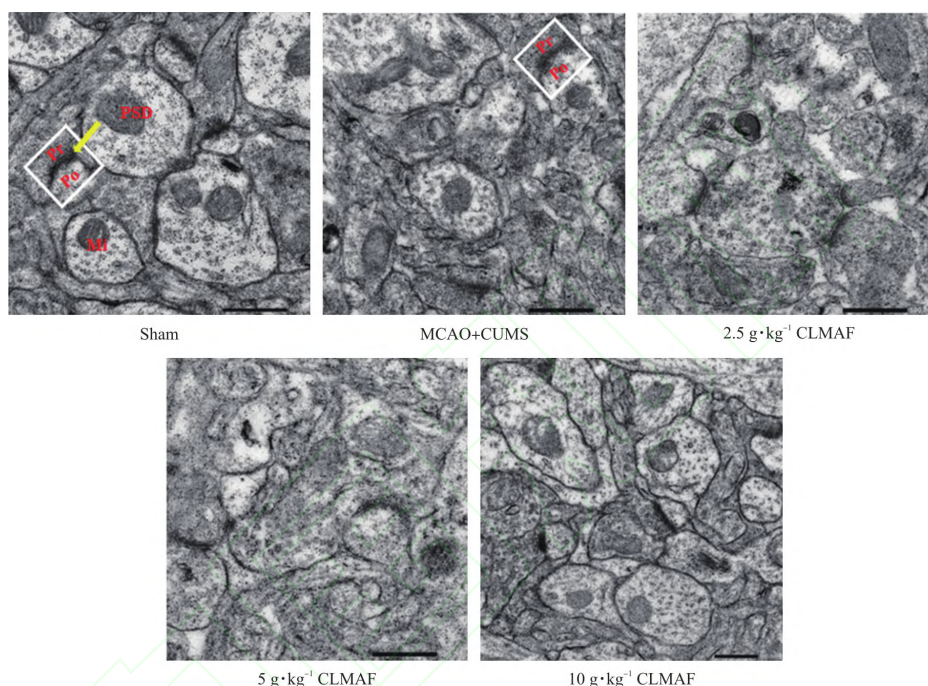




注: Sham.假手术组; MCAO+CUMS.模型组; 2.5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组; 5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组; 10 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组; 与假手术组比较, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较, <sup>\*</sup>*P*<0.05, <sup>\*\*</sup>*P*<0.01。

图4 各组大鼠海马区 CD16/CD32、CD206、PSD95 蛋白表达的比较

Fig.4 Comparison of protein expression of CD16/CD32, CD206 and PSD95 in hippocampus of rats in each group



注: Sham.假手术组; MCAO+CUMS.模型组; 2.5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组; 5 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组; 10 g·kg<sup>-1</sup> CLMAF.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组; Mi.线粒体 (Mitochondrion); Po.突触后膜 (Postsynaptic membrane); Pr.突触前膜 (Presynaptic membrane); PSD.突触后致密物 (Postsynaptic dense matter)

图5 透射电镜下大鼠海马超微结构

Fig.5 Ultrastructure of rat hippocampus under transmission electron microscope

#### 4 讨论

本研究结果显示, PSD 模型大鼠经过柴胡加龙骨牡蛎汤治疗后, 神经功能缺损评分以及糖水偏好率、强迫游泳静止时间在内的指标均得到显著改善 (*P*<0.05, *P*<0.01), 表明柴胡加龙骨牡蛎汤具有改善大鼠神经缺损和抗抑郁的双重作用。与此同时, PSD 模型大鼠海马区促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的水平明显升高 (*P*<0.01), 而柴胡加龙骨牡蛎汤降低海马区促炎因子的表达 (*P*<0.01) 的同时, 抗炎因子 IL-10 的水平也升高 (*P*<0.05, *P*<0.01)。这表明柴胡加龙骨牡蛎汤可以通过减轻神经炎症反应, 进而达到治疗抑郁的效果。

进一步机制研究发现, PSD 模型大鼠海马区 M1 型小胶质细胞数量、蛋白表达显著升高 (*P*<0.01), 治疗后 M2 型小胶质细胞呈现类似的改变 (*P*<0.01), 提示柴胡加龙骨牡蛎汤可以促进小胶质细胞 M1 向 M2 型极化。我们知道, 小胶质细胞的激活主要受炎症介质的调控, 中枢神经损伤后其向具有促炎作用的 M1 表型转化; 而抗炎因子可促使向 M2 型极化, 进而过表达 CD206 以分泌保护因子, 进一步减轻炎症因子的表达。

与此同时, 本次实验发现随着小胶质细胞极化状态和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子水平改变, PSD 模型大鼠的突触结构、数量与功能亦随之改

变,其中尤以突触蛋白 PSD95 的表达最为明显,这与已有的文献报道相一致<sup>[11-12]</sup>。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤组海马区突触前后膜边界相对清晰完整、致密区厚度明显增大、突触间隙明显变窄;且突触相关蛋白 PSD95 的表达显著增加。PSD95 作为突触后致密物质中含量最丰富的蛋白之一,控制突触传递并调节突触活动<sup>[13]</sup>,它与树突棘数量和形态的改变均为突触可塑性的常用检测指标。现代实验研究表明,柴胡加龙骨牡蛎汤可以抑制炎症反应、改善前额皮层突触可塑性,具有疏肝开郁,安神定志的作用<sup>[14-15]</sup>。有研究显示柴胡加龙骨牡蛎汤的主要成分槲皮素、黄芩素及甘草苷分别可以增加突触可塑性相关蛋白 BDNF 表达以及神经突触增生<sup>[16]</sup>、减少突触核蛋白的聚集<sup>[17]</sup>、增加海马中树突棘的密度发挥调节神经突触可塑性的作用<sup>[18]</sup>。

综上,本研究证实柴胡加龙骨牡蛎汤能够减轻 PSD 大鼠海马神经炎症,造成突触可塑性降低,改善突触结构,从而发挥抗抑郁作用。本研究仍存在不足,仅初步验证了柴胡加龙骨牡蛎汤对 PSD 的疗效,神经炎症与突触可塑性两者间的核心介质以及可能对应存在的上游信号通路目前仍不明确。在今后的工作中,有待进一步阐明柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的物质基础。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG X, TANG Y, XIE Y, et al. Total magnetic resonance imaging burden of cerebral small-vessel disease is associated with post-stroke depression in patients with acute lacunar stroke [J]. *Eur J Neurol*, 2017, 24(2): 374-380.
- [2] 于冰清, 邵欣欣, 付晓凡, 等. 抗抑郁中药复方的组方特点及作用机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3344-3352.
- [3] YU BQ, SHAO XX, FU XF, et al. Study on composition characteristics and mechanism of anti-depression traditional Chinese medicine compound based on literature mining and correlation analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(11): 3344-3352.
- [4] 李用粹. 证治汇补 [M]. 竹剑平, 江凌圳, 胡森等, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [5] Li YC. Syndrome, Governance and replenishment [M]. ZHU JP, JIANG LZ, HU S, et al. sorted. Beijing: People's medical publishing house, 2006.
- [6] 汪琥. 伤寒论辨证广注 [M]. 王振亮, 王晓艳, 李亚红等, 校注. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 17.
- [7] WANG H. General Notes on *Syndrome Differentiation of Febrilis* [M]. WANG ZL, WANG XY, LI YH, et al. annotated. Beijing: China traditional Chinese medicine press, 2016: 17.
- [8] 胡丹, 凌志香, 盛蕾. 加味柴胡疏肝散联合西药对卒中后抑郁患者睡眠影响的临床研究: 附 32 例临床资料 [J]. *江苏中医药*, 2018, 50(4): 43-45.
- [9] HU D, LING ZX, SHENG L. Clinical study on the effect of modified Chaihu Shugan Powder combined with western medicine on sleep of patients with post-stroke depression—a report of 32 cases [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2018, 50(4): 43-45.
- [10] 胡丹, 盛蕾. 加味柴胡疏肝散辅助治疗缺血性脑卒中后抑郁的疗效观察 [J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3866-3870.
- [11] HU D, SHENG L. Clinical observation on efficacy of Modified Chaihu Shugan Granule for treating post ischemic stroke depression [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(21): 3866-3870.
- [12] 刘元月. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗抑郁症的临床和实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [13] LIU YY. Clinical and experimental study on treatment of depression with Chaihu Plus Longgu Muli Decoction [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.
- [14] 盛蕾, 刘元月, 胡丹, 等. 柴胡疏肝散治疗卒中后抑郁的网络药理学研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3509-3515.
- [15] SHENG L, LIU YY, HU D, et al. Network pharmacology of Chaihu Shugan Powder for treating post-stroke depression [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(15): 3509-3515.
- [16] 徐磊, 张丽萍, 宋瑞雯, 等. 加味温胆汤对抑郁模型大鼠小胶质细胞炎症反应的抑制作用及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3832-3837.
- [17] XU L, ZHANG LP, SONG RW, et al. Inhibitory effect and mechanism of Jiawei Wendan Decoction on inflammation of microglia in depressed rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(7): 3832-3837.
- [18] 胡丹, 刘元月, 盛蕾. 柴胡疏肝散对卒中后抑郁模型大鼠 BDNF/TrkB 信号通路和炎症指标的影响 [J]. *江苏中医药*, 2020, 52(8): 78-81.
- [19] HU D, LIU YY, SHENG L. Effects of Chaihu Shugan Powder on BDNF/TrkB signal pathway and inflammatory indexes in post-stroke depression model rats [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2020, 52(8): 78-81.
- [20] YU CJ, WANG M, LI RY, et al. TREM2 and microglia contribute to the synaptic plasticity: From physiology to pathology [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 512-523.
- [21] MARINELLI S, BASILICO B, MARRONE MC, et al. Microglia-neuron crosstalk: Signaling mechanism and control of synaptic transmission [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 138-151.
- [22] 张丽凤, 余双全, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对慢性酒精中毒大鼠海马突触相关蛋白表达的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(12): 1573-1576.
- [23] ZHANG LF, YU SQ, LIANG ZR, et al. Effect of Schisandrin B on the expressions of hippocampal synapses associated proteins in rats with chronic alcoholism [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(12): 1573-1576.
- [24] 赵迪克, 牛君, 杜志欣, 等. 基于 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(3): 17-25.
- [25] ZHAO DK, NIU J, DU ZX, et al. Based on cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway, this paper discusses the antidepressant mechanism of Chaihu Jialonggu Muli Decoction [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(3): 17-25.
- [26] 李凡, 肖波飞, 宋敏, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤加减通过 p38 MAPK 通路改善 CKD 小鼠 PFC 突触可塑性及抑郁行为研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(6): 878-885.
- [27] LI F, XIAO BF, SONG M, et al. Modified Chaihu Longgu Muli Decoction improved the synaptic plasticity of PFC and alleviated the depressive symptoms in CKD mice via p38 MAPK pathway [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 37(6): 878-885.
- [28] 王叶情, 王宇红, 邹蔓姝, 等. 槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1548-1557.
- [29] WANG YQ, WANG YH, ZOU MS, et al. Research progress on antidepressant effect and mechanism of quercetin and its glycoside derivatives [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(5): 1548-1557.
- [30] ZHAO XY, KONG DW, ZHOU QM, et al. Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone-induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111556.
- [31] CHEN M, ZHANG QP, ZHU JX, et al. Involvement of FGF-2 modulation in the antidepressant-like effects of liquiritin in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881: 173297.

(编辑: 杨巍敏)