

基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路探讨清宫汤对广泛性焦虑症大鼠神经炎症的影响

刘晓珍¹, 陈毅恒¹, 高静静², 杜晓丹¹, 谢忠礼^{1*}, 段凯旋¹

[1. 河南中医药大学中医学院(仲景学院), 河南 郑州 450046; 2. 开封市中医院, 河南 开封 475000]

摘要: 目的 探讨清宫汤通过调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路对广泛性焦虑症(GAD)大鼠焦虑样行为的影响。

方法 将48只大鼠随机分为对照组、模型组、劳拉西洋组(0.09 mg/kg)和清宫汤高、中、低剂量组(20.34、10.17、5.09 g/kg)。除对照组外,其他各组大鼠均采用不确定空瓶刺激和慢性束缚应激的方法制备GAD模型。造模成功后,各组给予相应剂量药物干预14 d。通过高架十字迷宫实验(EPM)、旷场实验(OFT)和明暗箱实验(LDB)检测各组大鼠的焦虑样行为,ELISA法检测大鼠血清和海马组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,RT-qPCR法检测海马组织TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA表达,Western blot法检测海马组织TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白表达,免疫荧光法检测NF- κ B p65入核情况。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠在EPM、OFT、LDB中的探索行为学指标降低($P<0.05$, $P<0.01$),血清和海马组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平升高($P<0.01$),海马组织TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA和蛋白表达升高($P<0.01$),p-NF- κ B p65蛋白表达升高($P<0.01$),海马组织NF- κ B p65入核增多;与模型组比较,清宫汤高剂量组行为学指标升高($P<0.01$),清宫汤高、中剂量组血清和海马组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),清宫汤各剂量组海马组织TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),p-NF- κ B p65蛋白表达降低($P<0.01$),NF- κ B p65入核减少。**结论** 清宫汤可能通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路活化,降低促炎因子水平,进而缓解GAD大鼠的焦虑样行为。

关键词: 清宫汤; 广泛性焦虑症; 炎症因子; TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3120-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.046

广泛性焦虑症(generalized anxiety disorder, GAD)是最常见的焦虑障碍,终生患病率约为4%~7%^[1],表现为至少6个月的过度担忧和焦虑,常伴有肌肉紧张、易激惹、失眠和消化不良等症状^[2]。研究发现,神经炎症与固定应激引起的焦虑样行为密切相关^[3-4],慢性束缚应激能够激活小胶质细胞,造成神经炎症反应^[5-7]。尽管西药在治疗焦虑方面有一定的疗效,但存在依赖性、戒断反应和患者依从性差等局限性^[8],而中药具有疗效显著、不良反应少的优势,从中药方剂中寻找适用于治疗焦虑的药物已成为当前的研究热点。

广泛性焦虑在中医学中属于情志类疾病,常见病症包括“郁证”“心悸”“不寐”“脏躁”等。清宫汤的雏形最早见于叶天士的《三时伏气外感篇》,由《温病条辨》成方,主要用于治疗邪陷心包而导致的心烦失眠、躁动不安和神昏谵语等症状。目前,在临床广泛用于治疗焦虑性神经症、神经衰弱和强迫性神经症等情志类疾病,具有良好疗效^[9]。研究发现,清宫汤对小鼠中枢神经系统具有明显

的镇静、催眠和抗焦虑作用^[10-12]。本研究旨在探讨清宫汤是否通过调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路,减少炎症因子的释放,从而改善GAD模型大鼠的焦虑行为。

1 材料

1.1 动物 48只SPF级Wistar雄性大鼠,6周龄,体质量(200 \pm 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(鲁)2022-0006,动物质量合格证编号370726231100624361],饲养于河南中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号SYXK(豫)2021-0015],环境温度20~26℃,相对湿度40%~70%,压强差10 Pa~20 Pa,环境相对安静,饲养室所有物品定期消毒。本动物实验经过河南中医药大学伦理委员会批准(伦理号IACUC-202302027)。

1.2 药物 玄参、麦冬、竹叶、连翘、水牛角、莲子心(批号2021201、230301、210801、230101、2021001、211201)购自张仲景大药房,将清宫汤所有饮片加水浸泡30 min,水牛角浸泡1 h,煎煮2次,每次用8层纱布过滤,

收稿日期: 2024-05-11

基金项目: 2022年第五批全国中医临床优秀人才研修项目(2022-11-27); 河南省中医药科学院研究专项课题(2022ZY1187)

作者简介: 刘晓珍(1996—),女,硕士生,从事中医临床基础的临床与研究。Tel: 15083371067, E-mail: 1798809126@qq.com

*通信作者: 谢忠礼(1972—),男,博士,教授,硕士生导师,从事中医经典研究。Tel: 13673610110, E-mail: 1069182490@qq.com

将2次药液合并，浓缩，清宫汤高、中、低剂量分别为2.03、1.01、0.51 g/mL，无菌条件下装瓶，于4℃冰箱中保存备用。劳拉西洋（规格1 mg/片，国药准字H20060105）购自山东信谊制药有限公司。

1.3 试剂 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒（批号 E-EL-R2856c、E-EL-R0012c、E-EL-R0015c，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）；总 RNA 提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 R1200、PC0020，北京索莱宝科技有限公司）；逆转录试剂盒（批号 K1622，美国 Thermo 公司）；2X 通用型 SYBR Green 快速 qPCR 预混液（批号 RM21203，美国 ABclonal 公司）；TLR4、MyD88、NF- κ B p65 和 NF- κ B p-p65 抗体（批号 AF7017、AF5195、AF5006、AF2006，美国 Affinity 公司）；GAPDH 抗体（批号 60004-1-Ig，美国 Proteintech 公司）；HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记山羊抗鼠二抗（批号 RS0001、RS0002，美国 Immunoway 公司）；引物（江苏金唯智生物科技有限公司）。

1.4 仪器 XR-XG201 型高架十字迷宫、XR-XZ301 型旷场实验箱、XR-XB120 型明暗穿箱、VisuTrack 动物行为分析软件（上海欣软信息科技有限公司）；iMark 型酶标仪、164-5050 型电泳仪电源、Mini-PROTEAN 型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot 型电泳转印仪（美国 Bio-Rad 公司）；Nanodrop 2000 型核酸蛋白浓度微量测定仪、Multiskan GO 全波长酶标仪（美国 Thermo 公司）；FC-96 型 PCR 仪（杭州比格飞序生物科技有限公司）；TL-988 型荧光定量 PCR 仪（西安天隆科技有限公司）；D3024 型高速离心机 [大龙兴创实验仪器（北京）股份公司]；KZ-II 型高速组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；GNP-9080BS-III 型电热恒温培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司）；TS-1000 型脱色摇床（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；QuickChemi 5200 型化学发光成像系统 [莫纳（武汉）生物科技有限公司]；大鼠束缚笼（自制）。

2 方法

2.1 模型建立 大鼠适应性饲养 7 d 后随机分为对照组、模型组、劳拉西洋组和清宫汤高、中、低剂量组，每组 8 只，采用不确定空瓶应激和慢性束缚应激法制备 GAD 模型。除对照组外，所有大鼠均接受 7 d 定时喂水训练，即每天 8:30~8:40 和 20:30~20:40 各予以饮水 10 min，其余时间大鼠处于口渴状态，从第 8~21 天开始执行不确定空瓶应激，随机选择 1 个时间段予以饮水 10 min，另一时间段不予饮水（放置空水瓶），严格执行应激 14 d；不确定空瓶应激的同时予以大鼠慢性束缚应激法，每天 9:00 至 15:00 将大鼠放置于自制束缚装置中，连续束缚 6 h，21 d 后，进行高架十字迷宫、旷场、黑白箱实验测试大鼠焦虑样行为，模型成功后，进行后续研究。

2.2 给药 根据《温病条辨》，按药物剂量古今换算得出，清宫汤成人每天用量为 113 g，根据《药理实验方法学》^[13]可知大鼠等效剂量为成人的 6.3 倍，以成人体质量

70 kg 计算，换算成大鼠剂量 10.17 g/kg，所以清宫汤高、中、低剂量为 20.34、10.17、5.09 g/kg；劳拉西洋按成人每天用量 1 mg/kg，换算为大鼠剂量 0.09 mg/kg，各组按照 10 mL/kg 灌胃相应剂量药物，对照组和模型组灌胃给予相应体积生理盐水，每天 1 次，连续 14 d。灌胃期间造模仍同步进行，灌胃结束后再次进行行为学实验。

2.3 标本采集 大鼠称定质量后，麻醉，腹主动脉取血，血液静置 2 h，4℃、3 000 r/min 离心 15 min，取上层血清，于-80℃冰箱中保存。取血后，断头取脑，分离出海马，于-80℃冰箱中保存。

2.4 高架十字迷宫（EPM）实验 将大鼠的头部背对实验者，头朝开臂方向放置在 EPM 中央区，释放后使用 VisuTrack 跟踪系统，记录 5 min 内大鼠活动轨迹，并统计大鼠在开臂活动的次数百分比和时间百分比。

2.5 旷场实验（OFT） 将大鼠置于敞箱底面的中心方格内，使用 VisuTrack 跟踪系统记录大鼠 5 min 内在旷场实验箱中的活动情况，并统计大鼠进入中央区的次数、在中央区的停留时间以及水平运动总距离。

2.6 明暗箱实验（LDB） 将大鼠放在明箱内，且背对暗箱，使用 VisuTrack 跟踪系统记录 5 min 内大鼠在明暗箱中的活动情况，统计大鼠在明箱路程、明箱时间比以及穿箱次数。

2.7 ELISA 法检测大鼠血清、海马组织中炎症因子水平 取大鼠血清和海马组织，海马组织经匀浆、离心、取上清后进行测定。严格执行试剂盒操作步骤，分别检测大鼠血清、海马组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.8 RT-qPCR 法检测大鼠海马组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达 取海马组织，根据 RNA 提取试剂盒说明书，采用 TRIzol 法提取海马组织中总 RNA，然后用逆转录酶将其逆转录为 cDNA，并使用荧光定量 PCR 仪进行扩增。以 GAPDH 为内参， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
TLR4	正向 TCCACAAGACCCGAAAGTT
	反向 TGAAGATGATGCCAGACGG
MyD88	正向 GAGCAGTGTCCACAGACAA
	反向 AGTAGCAGATGAAGCCGCTCG
NF- κ B p65	正向 TGTATTTACAGGGACCTGGC
	反向 CAGGCTAGGTCAGCGTATG
GAPDH	正向 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC
	反向 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

2.9 Western blot 法检测大鼠海马组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达 使用蛋白质提取试剂盒从大鼠海马组织提取总蛋白质，将蛋白溶液于-20℃保存。根据试剂盒说明书，采用 BCA 法测定各样本蛋白质浓度，然后经 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、脱脂奶粉溶液封闭后，加入一抗 TLR4(1:1 000)、MyD88 (1:1 000)、NF- κ B p65 (1:1 000)、p-NF- κ B p65 (1:1 000)、GAPDH (1:10 000)，

4℃摇床孵育过夜，次日TBST洗涤3次，加入相应山羊抗兔和抗鼠二抗(1:10 000)孵育1h，TBST洗涤3次，加入ECL发光显色液显影，显影后使用Image J图像处理软件分析目的蛋白灰度值。

2.10 免疫荧光法观察大鼠海马NF-κB p65核转移情况 制备海马组织石蜡切片，脱蜡，水化，用0.3% Triton X-100破膜15 min，PBS洗涤3次，0.5% BSAT封闭30 min，加入一抗4℃孵育过夜，洗片后加入二抗避光孵育1h，洗片后加入含有DAPI的防荧光淬灭剂，封片，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.11 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理，计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 清宫汤对GAD大鼠高架十字迷宫实验的影响 造模21 d后，与对照组比较，模型组大鼠在开臂次数、开臂停留时间所占的比例降低($P<0.01$)；给药14 d后，与模型组比较，清宫汤高、中剂量组和劳拉西洋组在开闭次数和开臂停留时间所占的比例升高($P<0.05$, $P<0.01$)，见表2。

表2 清宫汤对GAD大鼠高架十字迷宫实验的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	开臂时间比/%		开臂次数比/%	
	造模后	给药后	造模后	给药后
对照组	29.91±3.73	28.65±5.49	40.61±6.48	38.82±5.72
模型组	7.41±6.11**	4.97±3.17**	18.90±8.25**	10.58±5.88**
劳拉西洋组	7.25±4.11**	13.93±4.81#	17.74±5.03**	28.92±7.23##
清宫汤高剂量组	7.19±4.04**	14.90±4.00##	19.08±9.22**	27.86±17.39##
清宫汤中剂量组	7.94±4.65**	13.35±5.20#	19.83±9.67**	25.02±6.08#
清宫汤低剂量组	6.33±3.76**	7.24±5.81	18.81±7.06**	18.15±3.79

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3.2 清宫汤对GAD大鼠旷场实验的影响 造模21 d后，与对照组比较，模型组大鼠进入中央区次数以及在中央区的停留时间均减少($P<0.01$)；给药14 d后，与模型组比

较，清宫汤高、中剂量组和劳拉西洋组大鼠进入中央区次数以及在中央区的停留时间均增加($P<0.05$, $P<0.01$)，见表3。

表3 清宫汤对GAD大鼠旷场实验的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	中央区停留时间/s		中央区进入次数/次	
	造模后	给药后	造模后	给药后
对照组	24.32±5.60	23.90±3.96	5.88±2.47	5.75±1.67
模型组	6.52±3.65**	3.15±5.46**	0.63±0.52**	0.63±0.52**
劳拉西洋组	6.72±5.71**	14.60±2.56##	0.63±0.74**	4.13±1.13##
清宫汤高剂量组	4.87±6.05**	13.68±3.98##	0.75±0.71**	3.63±1.06##
清宫汤中剂量组	6.96±4.25**	11.27±4.05#	0.75±0.89**	2.75±1.04#
清宫汤低剂量组	5.15±6.29**	6.43±4.14	0.63±0.74**	0.88±0.64

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3.3 清宫汤对GAD大鼠明暗箱实验的影响 造模21 d后，与对照组比较，模型组大鼠在明箱时间比以及穿箱次数均降低($P<0.01$)；给药14 d后，与模型组比较，清宫汤高

剂量组和劳拉西洋组大鼠在明箱时间比和穿箱次数均升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4。

表4 清宫汤对GAD大鼠明暗箱实验的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	明箱时间比/%		穿箱次数/次	
	造模后	给药后	造模后	给药后
对照组	47.60±10.04	49.25±10.64	16.00±4.00	16.13±3.40
模型组	26.06±8.18**	23.57±17.47**	8.75±2.87**	7.00±4.57**
劳拉西洋组	28.52±6.44**	38.21±9.26##	8.38±1.85**	12.00±1.93##
清宫汤高剂量组	30.93±4.90**	38.59±5.57##	9.00±1.41**	11.50±3.02#
清宫汤中剂量组	28.01±6.26**	33.27±15.14#	8.75±3.11**	9.13±1.25
清宫汤低剂量组	27.24±5.82**	25.62±14.78	8.38±2.67**	7.50±4.63

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3.4 清宫汤对GAD大鼠血清、海马组织TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响 给药14 d后，与对照组比较，模型组大鼠血清、海马组织TNF-α、IL-1β、IL-6水平均升高($P<0.01$)；与模型组比较，清宫汤高、中剂量组和劳拉西洋组大鼠血清、海马组织TNF-α、IL-1β、IL-6水平均降低($P<$

0.05, $P<0.01$)，见表5~6。

3.5 清宫汤对GAD大鼠海马组织TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达的影响 给药14 d后，与对照组比较，模型组大鼠海马组织TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA表达升高($P<0.01$)；与模型组比较，清宫汤各剂量组和劳拉

西洋组大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 见表 7。

表 5 清宫汤对 GAD 大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	142.61±8.52	23.59±6.17	2.24±0.58
模型组	331.35±37.50**	177.70±5.09**	24.51±1.45**
劳拉西洋组	190.49±11.71##	78.58±5.56##	13.49±1.68##
清宫汤高剂量组	221.86±23.23##	82.17±19.08##	13.90±3.29##
清宫汤中剂量组	248.01±20.93##	104.07±26.75#	15.17±2.59##
清宫汤低剂量组	291.32±30.62	143.14±18.11#	21.01±1.61

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

表 6 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	27.39±3.02	48.92±3.65	27.16±5.13
模型组	137.82±15.42**	310.33±28.82**	145.45±20.73**
劳拉西洋组	80.82±7.21##	138.06±14.98##	72.70±5.91##
清宫汤高剂量组	77.66±16.31##	125.67±28.71##	75.79±13.53##
清宫汤中剂量组	90.20±7.81##	150.77±11.95##	85.77±7.82##
清宫汤低剂量组	119.01±12.90	220.19±24.77##	116.72±7.72#

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

表 7 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	<i>TLR4</i>	<i>MyD88</i>	<i>NF-κB p65</i>
对照组	1.00±0.23	1.00±0.06	1.00±0.08
模型组	3.92±0.30**	2.39±0.27**	3.09±0.28**
劳拉西洋组	1.92±0.17##	1.48±0.06##	1.57±0.07##
清宫汤高剂量组	1.46±0.13##	1.31±0.09##	1.20±0.07##
清宫汤中剂量组	1.95±0.05##	1.63±0.08##	1.71±0.09##
清宫汤低剂量组	2.58±0.13##	1.92±0.13##	2.09±0.12##

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

3.6 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65*、*p-NF-κB p65* 蛋白表达的影响 给药 14 d 后, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65*、*p-NF-κB p65* 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清

宫汤各剂量组和劳拉西洋组大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65*、*p-NF-κB p65* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 8、图 1。

表 8 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织 *TLR4*、*MyD88*、*NF-κB p65*、*p-NF-κB p65* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	<i>TLR4</i>	<i>MYD88</i>	<i>NF-κB p65</i>	<i>p-NF-κB p65</i>
对照组	0.09±0.04	0.10±0.03	0.11±0.09	0.06±0.01
模型组	0.98±0.05**	1.05±0.08**	0.87±0.08**	1.24±0.12**
劳拉西洋组	0.57±0.13##	0.43±0.09##	0.43±0.08##	0.48±0.11##
清宫汤高剂量组	0.19±0.04##	0.16±0.07##	0.26±0.18##	0.18±0.11##
清宫汤中剂量组	0.52±0.05##	0.38±0.02##	0.39±0.08##	0.32±0.06##
清宫汤低剂量组	0.71±0.14#	0.55±0.11##	0.56±0.05##	0.57±0.06##

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

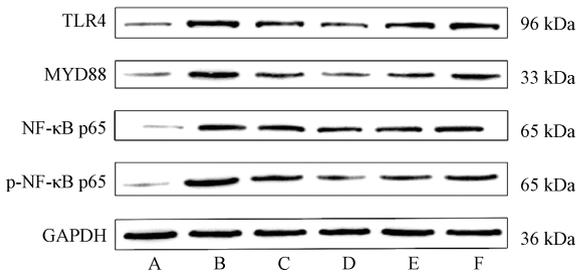
3.7 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织中 *NF-κB p65* 入核的影响 如图 2 所示, 对照组大鼠海马组织中 *NF-κB p65* 蛋白主要分布于细胞质中, 仅少量分布于细胞核中; 而模型组大鼠海马组织中 *NF-κB p65* 蛋白入核增多; 与模型组比较, 清宫汤组和劳拉西洋组都不同程度地抑制了大鼠海马组织中 *NF-κB p65* 的入核。

因此需要寻找更为有效、副作用更少的新型治疗药物。

焦虑症归于中医情志病的范畴, 治疗上多从心、肝、胆入手^[16-17]。《黄帝内经素问·灵兰秘典论》^[18]提出“心者, 君主之官也, 神明出焉”, 强调了“心神”在情志病发病过程中的重要性。《灵枢经·口问》^[19]所言“悲哀愁忧则心动, 心动则五脏六腑皆摇”表明过度忧郁可能对心神造成损伤, 进而引发一系列伴焦虑等精神症状。清宫汤以玄参、水牛角为君药, 以补养离心之虚; 莲子心则可促进心肾的交通, 舒缓烦躁、安定心神, 调和心火与肾水之间的关系; 连翘和竹叶作为辅助药物, 则有退去心火、清除

4 讨论

GAD 作为一种焦虑障碍类精神疾病, 据统计焦虑障碍患病率高达 7.6%^[14], 严重的患者可能会出现自残和自杀的倾向^[15]。目前, 临床上常用的西药治疗并不十分理想,



注: A 为对照组, B 为模型组, C 为劳拉西泮组, D~E 分别为清宫汤高、中、低剂量组。

图1 各组大鼠海马组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白条带图

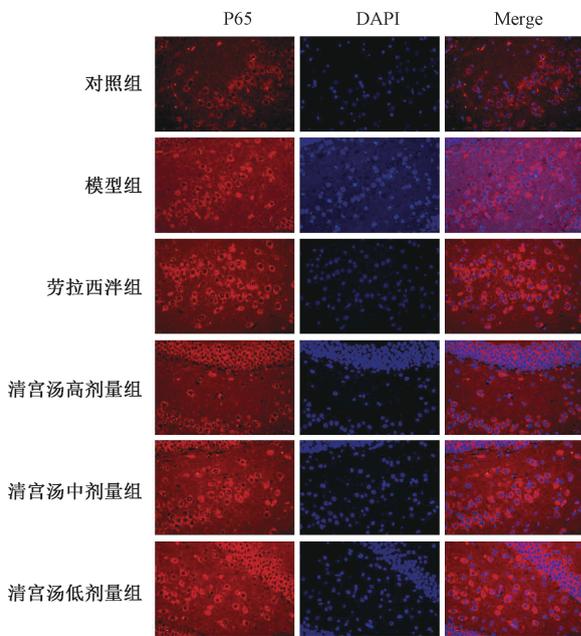


图2 清宫汤对 GAD 大鼠海马组织中 NF-κB p65 入核的影响 (免疫荧光, ×400)

心热的作用, 诸药合用可调和阴阳, 共同发挥清心养阴、安抚心神的效果。临床实践表明, 清宫汤加减治疗郁证, 疗效显著^[20]。

研究发现, 焦虑患者通常伴有免疫功能紊乱, 应激后血清中 IL-6 和 TNF-α 水平升高, 可导致炎症反应^[21]。TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路是经典的抗炎信号通路^[22]。研究发现该信号通路在多种神经炎症性疾病中起作用, 如帕金森病、阿尔兹海默病和抑郁症^[23-25]。Kwatra 等^[7]发现, 通过调节 TLR4/NF-κB 信号通路可逆转束缚应激诱导的小鼠焦虑行为。TLR4 的激活可以引发小胶质细胞发生免疫反应, 产生炎症介质和趋化因子, 从而导致神经炎症的发生, 与神经炎症的产生和小胶质细胞的活化密切相关^[26]。TLR4 通过 MyD88 介导的途径激活 NF-κB, 而激活后的 NF-κB 进入细胞核, 促使炎症因子的转录与释放, 加强免疫反应和炎症反应^[27]。这一过程, 对焦虑症的发生和发展产生影响。因此, 调控 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路对海马神经炎症的抑制作用可能是治疗 GAD 的一个重要途径。

本研究采用不确定空瓶应激^[28]和慢性约束应激^[29]的方法来构建 GAD 大鼠模型。经过 21 d 的慢性应激刺激, 造模大鼠表现出易受惊、毛色深黄、失去光泽、蜷缩在角落等特征。药物干预 14 d 后, 给药组大鼠的一般状态改善, 在 EPM 开臂的活动、OFT 中央区域的活动、LDB 明箱的活动都有不同程度的上升, 表明清宫汤可以增加大鼠的探索能力, 改善焦虑行为; 检测 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路相关指标显示, 清宫汤各剂量组大鼠海马组织中 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达降低, p-NF-κB p65 蛋白表达降低, NF-κB p65 的入核减少, 说明清宫汤可以抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的激活, 减轻 GAD 大鼠脑内炎症反应, 减轻 GAD 发病进展。本研究还发现, 清宫汤高、中剂量组大鼠血清和海马组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低, 说明清宫汤可以减少促炎因子的释放。

综上所述, 清宫汤可通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路活化, 减少炎症因子的分泌, 从而发挥其抗 GAD 的作用。本研究单从 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的异常表达方面探讨, 不足以完全揭示 GAD 的发病机制, 中药的治疗具有多靶点、多渠道、副作用少等特点, 因此, 需要寻求其它有效的多信号转导通路, 深入探索各通路之间的交叉联系和相互作用, 以更全面地了解 GAD 的发病机制。

参考文献:

[1] Hoge E A, Ivkovic A, Fricchione G L. Generalized anxiety disorder: diagnosis and treatment [J]. *Brit Med J*, 2012, 345: e7500.

[2] Mishra A K, Varma A R. A comprehensive review of the generalized anxiety disorder [J]. *Cureus*, 2023, 15 (9): e46115.

[3] Salim S, Asghar M, Taneja M, et al. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension [J]. *Brain Res*, 2011, 1404: 63-71.

[4] Saral Ö, Şahin H, Saral S, et al. Bee pollen increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and suppresses neuroinflammation in adult rats with chronic immobilization stress [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 766: 136342.

[5] 张海洋. 番茄红素对慢性束缚应激大鼠海马损伤的保护作用及机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.

[6] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF-κB signaling[J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 648.

[7] Kwatra M, Ahmed S, Gawali B, et al. Hesperidin alleviates chronic restraint stress and lipopolysaccharide-induced hippocampus and frontal cortex damage in mice: Role of TLR4/NF-κB, p38 MAPK/JNK, Nrf2/ARE signaling [J]. *Neurochem Int*, 2020, 140: 104835.

[8] Fagan H A, Baldwin D S. Pharmacological treatment of generalised anxiety disorder: Current practice and future directions[J]. *Expert Rev Neurother*, 2023, 23(6): 535-548.

- [9] 王 伟,唐 戈. 清宫汤加减治疗狂证[J]. 吉林中医药, 2002, 22(1): 16.
- [10] 孟登科,周 静,楼建秀. 清宫汤抗焦虑作用实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(1): 18-19; 82.
- [11] 李越兰,张世亮. 清宫汤对小鼠注射氟马西尼后高架十字迷宫实验的影响[J]. 中国中医急症, 2013, 22(7): 1111-1112.
- [12] 张世亮,李越兰,张丽英,等. 清宫汤抗焦虑作用及其机制的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 215-217.
- [13] 魏 伟. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 70.
- [14] Huang Y, Wang Y, Wang H, *et al.* Prevalence of mental disorders in China: A cross-sectional epidemiological study[J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224.
- [15] DeMartini J, Patel G, Fancher T L. Generalized anxiety disorder[J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(7): ITC49-ITC64.
- [16] 孙雅伦,杨秋莉,杜 渐,等. 广泛性焦虑症与常见中医情志疾病的比较分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(11): 1530-1531; 1610.
- [17] 许欣跃,孙 庆,张 玮. 孙庆运用“疏肝行气,调神解郁”腹部推拿法治疗广泛性焦虑症的经验[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(7): 1200-1202.
- [18] 佚名. 黄帝内经素问[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 40.
- [19] 佚名. 灵枢经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 64.
- [20] 李彦杰,白 清,冯小东. 张磊关于郁证的辨证论治[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(8): 605; 609.
- [21] Hou R, Garner M, Holmes C, *et al.* Peripheral inflammatory cytokines and immune balance in generalised anxiety disorder: case-controlled study [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 62: 212-218.
- [22] 郝任娟,胡颖超,于顾然,等. 哈巴俄苷通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路减轻神经炎症诱导的神经元损伤[J]. 中草药, 2023, 54(13): 4202-4213.
- [23] 崔拓拓,曹俊岭,欧阳竞锋,等. 大定风珠对帕金森病模型小鼠脑黑质小胶质细胞活化及 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64(9): 930-938.
- [24] 李 平,夏小芳,于文静,等. 当归芍药散基于 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路对阿尔茨海默病模型大鼠神经炎症的影响研究[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(4): 494-500.
- [25] Cao L H, Zhao Y Y, Bai M, *et al.* Mechanistic studies of gypenosides in microglial state transition and its implications in depression-like behaviors: Role of TLR4/MyD88/NF-κB signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 838261.
- [26] Nie X, Kitaoka S, Tanaka K, *et al.* The innate immune receptors TLR2/4 mediate repeated social defeat stress-induced Social avoidance through prefrontal microglial activation [J]. *Neuron*, 2018, 99(3): 464-479.
- [27] 张 娟,尚德静. Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路及其靶向药物的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(7): 657-662.
- [28] Zhang W, Yu W, Liu X, *et al.* Effect of Jian-Pi-Zhi-Dong Decoction on the amino acid neurotransmitters in a rat model of tourette syndrome and comorbid anxiety disorder [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 515.
- [29] Ma Q, Li X, Yan Z, *et al.* Xiaoyaosan ameliorates chronic immobilization stress-induced depression-like behaviors and anorexia in rats: The role of the nesfatin-1-oxytocin-proopiomelanocortin neural pathway in the hypothalamus [J]. *Front Psychiatry*, 2019, 10: 910.