

[药 理]

逍遥散对脂多糖诱导抑郁样行为的影响

石博宇, 叶晓林, 罗杰, 刘小波, 彭希, 刘蓉, 曾南*

(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 探讨逍遥散对脂多糖诱导抑郁样行为的影响。**方法** 脂多糖诱导抑郁样小鼠模型, 小鼠随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (3.03 mg/kg) 及逍遥散低、高剂量组 (15、30 g/kg), 检测强迫游泳实验、悬尾实验中不动时间, 血清、海马、皮层 IL-6、TNF- α 水平, 海马、皮层 IDO、5-HT 水平, 尼氏染色观察海马神经元形态学变化。然后, 脂多糖诱导大鼠海马神经元细胞炎症模型, 细胞随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (10 μ mol/L) 及空白血清、含药血清低、高剂量组 (4%、8%), 检测上清液 NO、IL-6、TNF- α 水平, 裂解液 5-HT、IDO 水平, IL-6、TNF- α 、5-HT1A、IDO1 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 逍遥散组显著缩短强迫游泳实验中不动时间 ($P < 0.01$), 显著降低血清 IL-6 水平及皮层 IL-6、TNF- α 、IDO 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 显著升高海马 5-HT 水平 ($P < 0.01$); 高剂量组显著缩短悬尾实验中不动时间 ($P < 0.01$), 显著上调皮层 5-HT 水平 ($P < 0.01$), 显著增加海马平均光密度 ($P < 0.05$); 低剂量组显著降低海马 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 含药血清组显著下调 IL-6、TNF- α 、IDO1 mRNA 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 显著上调 5-HT1A mRNA 表达 ($P < 0.01$); 高剂量组显著下调 NO、IL-6、TNF- α 、IDO 水平 ($P < 0.01$), 显著上调 5-HT 水平 ($P < 0.01$); 低剂量组显著降低 IDO 水平 ($P < 0.01$)。**结论** 逍遥散对脂多糖诱导抑郁样行为有拮抗作用, 其机制可能与抑制炎症反应有关。

关键词: 逍遥散; 脂多糖; 抑郁样行为

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0760-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.010

Effects of Xiaoyao Powder on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors

SHI Bo-yu, YE Xiao-lin, LUO Jie, LIU Xiao-bo, PENG Xi, LIU Rong, ZENG Nan*

(State Key Laboratory Breeding Base for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-founded by Sichuan Province and MOST; College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of Xiaoyao Powder on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors. **METHODS** The mouse model for depressive-like behaviors was induced by lipopolysaccharide, mice were randomly divided into blank group, model group, fluoxetine group (3.03 mg/kg) and Xiaoyao Powder low-dose, high-dose groups (15, 30 g/kg), immobility time in forced swim test and tail suspension test, IL-6, TNF- α levels in serum, hippocampus and cortex, IDO, 5-HT levels in hippocampus and cortex were detected, and Nissl staining was applied to observing the morphological changes of hippocampal neurons. Subsequently, the rat model for hippocampal neuron cell inflammatory was induced by lipopolysaccharide, cells were randomly divided into blank group, model group, fluoxetine group (10 μ mol/L) and blank serum, medicated serum low-dose, high-dose groups (4%, 8%), NO, IL-6, TNF- α levels in supernatant, 5-HT, IDO levels in lysate, IL-6, TNF- α , 5-HT, IDO mRNA expressions were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the Xiaoyao Powder groups

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (81473399, 81503277); 四川省教育厅自然科学基金项目 (16ZB0116); 成都中医药大学科研基金 (ZRQN1643)

作者简介: 石博宇 (1992—), 女, 硕士生, 从事中药神经精神药理学研究。Tel: 18380445507, E-mail: spring729477@126.com

* 通信作者: 曾南, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药免疫、神经精神药理学研究。Tel: 13198502352, E-mail: zengnan966@126.com

demonstrated significantly shortened immobility time in forced swim test ($P < 0.01$), markedly decreased IL-6 level in serum and IL-6, TNF- α , IDO levels in cortex ($P < 0.05$, $P < 0.01$), obviously increased 5-HT level in hippocampus ($P < 0.01$), among which the high-dose group exhibited significantly shortened immobility time in tail suspension test ($P < 0.01$), markedly up-regulated 5-HT level in cortex ($P < 0.01$), obviously increased mean optical density in hippocampus ($P < 0.05$), and the low-dose group showed significantly decreased IL-6 level in hippocampus ($P < 0.05$). Compared with the model group, the medicated serum groups demonstrated significantly down-regulated IL-6, TNF- α , IDO1 mRNA expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$), markedly up-regulated 5-HT1A mRNA expression ($P < 0.01$), the high-dose group exhibited significantly down-regulated NO, IL-6, TNF- α , IDO levels ($P < 0.01$), markedly up-regulated 5-HT level ($P < 0.01$), and the low-dose group showed significantly decreased IDO level ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Xiaoyao Powder reveals its antagonistic effects on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors, whose mechanism may contribute to the inhibition of inflammatory reactions.

KEY WORDS: Xiaoyao Powder; lipopolysaccharide; depressive-like behaviors

抑郁症是一种临床常见的精神障碍性疾病,以持续性情绪淡漠、悲观等为主要临床特征,大量研究表明炎症反应与其病理生理机制密切相关。逍遥散始载于宋代《太平惠民和剂局方》,是中医调治情志活动异常的经典名方,具有疏肝解郁、养血健脾之功效,主治肝郁血虚脾弱诸证;现代药理研究显示,它具有抗抑郁、调节中枢单胺类神经递质水平、调控体内激素水平、调节免疫等药理作用。本实验基于炎症可诱发抑郁症的认识及逍遥散具有一定抗炎作用的基础,在体内、体外实验采用脂多糖诱导抑郁样行为,观察逍遥散对其影响,以期对相关临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6J小鼠,雄性,体质量18~22 g;SPF级新生24 h SD乳鼠;SPF级SD大鼠,雄性,体质量180~220 g,均由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号SCXK(川)2013-24。

1.2 药物 逍遥散药材饮片(柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、薄荷、生姜、甘草)购自成都太极大药房。水煎液制备方法为按方剂组成要求^[1]取相应量药材,8倍量水浸泡30 min,加热煮沸后文火煎煮60 min,趁热过滤药液,再加6倍量水同法分别煎煮40、30 min,合并3次滤液,60℃下减压浓缩至所需浓度(1.5 g生药/mL),生药量分别为30、15 g/kg,相当于成人临床日用量的30、15倍。含药血清制备方法为将大鼠按体质量分层随机分为空白组和逍遥散高剂量组(30 g/kg),连续灌胃给药7 d,每天1次,末次给药1 h后麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 500 r/min离心10 min,分离血清,每组混合,56℃水浴

30 min灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤分装,-20℃下冷冻保存备用。

1.3 试剂 盐酸氟西汀胶囊(法国Patheon公司,20 mg,国药准字J20130010,批号6607A);盐酸氟西汀(批号SLBM4298V)、脂多糖(批号086M4159V)、DAPI(批号066M4053V)(美国Sigma公司);Hanks液(批号1752164)、B-27(批号1813319)、L-谷氨酰胺(批号1816803)、Neurobasal-A培养基(批号1852901)(美国Gibco公司);胎牛血清(呼和浩特市草原绿野生物工程有限公司,批号150501);DMEM培养基(美国HyClone公司,批号AB10134657);小鼠IL-6、TNF- α ,大鼠TNF- α ELISA试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号M170221-004a、M170221-102a、R170110-102a);小鼠IL-6、TNF- α ,大鼠TNF- α 、IL-6 ELISA试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号21G137、21G152、21G128、21G156);小鼠IDO、5-HT,大鼠5-HT、IDO ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号01/2018、01/2018、02/2018、02/2018);NO检测试剂盒(批号081216161111)、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(批号112316170306)(上海碧云天生物技术有限公司);兔源NeuN单克隆抗体(美国Cell signaling Technology公司,货号5292S、24307S);山羊抗兔IgG/Cy3[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号10、AG04017512];FastQuant RT Kit(Witn gDNase)100rxn(批号Q5725)、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)20 μL \times 500rxn(批号Q5516)[天根生化科技(北京)有限公司]。

1.4 仪器 3001型酶标仪、3111二氧化碳培养箱、ST16R冷冻离心机、NanoDrop2000超微量分

光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TS-200 小鼠悬尾测试仪 (成都泰盟科技有限公司); FV1200 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); iCycler iOMulticolor Real-Time PCR Detection System (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 逍遥散对脂多糖致炎性抑郁样小鼠的影响 取C57BL/6 J小鼠, 适应性饲养 3 d 后按体重分层随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (3.03 mg/kg) 及逍遥散低、高剂量组 (15、30 g/kg), 以 0.02 mL/g 剂量连续灌胃给药 12 d, 每天 1 次, 空白组、模型组给予等体积蒸馏水, 第 11 天除空白组外, 其余各组小鼠腹腔注射脂多糖 (1 mg/kg) 造模, 共 2 次, 每次间隔 30 min, 空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水^[2]。造模后, 所有小鼠于 24 h 内完成行为学测试, 分批进行悬尾实验和强迫游泳实验, 完成行为学实验后小鼠取血分离血清, ELISA 法检测血清 IL-6、TNF- α 水平, 再剖取大脑皮层和海马组织, 4% 多聚甲醛固定后制切片, 尼氏染色法观察海马神经元尼氏小体数, Image-Pro plus 图像分析软件测定海马 CA3 区尼氏小体 ($\times 400$) 表达平均光密度; 另取 1 批大脑皮层和海马组织, PBS 缓冲液制备 0.1 g/mL 组织匀浆, 离心, 收集上清液, ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 、5-HT、IDO 水平。

2.2 逍遥散含药血清对脂多糖致海马神经元细胞炎症模型的影响

2.2.1 海马神经元细胞鉴定 将新生 24 h 的 SD 乳鼠颈椎脱臼处死, 75% 酒精消毒后置于盛有 PBS 液的平皿内, 剪开头部皮肤, 迅速剥离海马并置于冰冷 PBS 液中, 移至盛有少量 Hanks 液的小瓶中, 眼科剪将组织剪成糜状, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C 下消化 25 min, 弃上清后用 PBS 洗 2 次, 每次 5 min, 弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 反复吹打制成细胞悬液, 过 150 目网筛, 收集细胞滤液, 离心 (1 100 r/min、4 $^{\circ}$ C) 5 min, 弃上清液, 加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞。然后, 血球计数板计数细胞, 调节细胞密度 5×10^5 /mL, 接种神经细胞悬液于预先用 poly-L-lysine 包被的 48 孔培养板内, 每孔 350 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 全量更换为含 2% B-27、1% L-谷氨酰胺的 Neurobasal-A 培养液, 以后每 3 d 半量换液。再观察海马神经元生长形态^[3], 并将培养 12 d 的海马

神经细胞用 NeuN (1 : 50 稀释) 一抗和 Cy3 (1 : 100 稀释) 二抗孵育, 1 μ g/mL DAPI 染核, 激光共聚焦显微镜下观察鉴定神经元。

2.2.2 含药血清对脂多糖致海马神经元细胞损伤模型炎症和色氨酸代谢通路的影响 按“2.2.1”项下方法体外培养大鼠海马神经元细胞, 细胞在第 7~10 天进入对数生长期, 将细胞随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (10 μ mol/L) 及空白血清、含药血清低、高剂量组 (4%、8%), 培养至第 10 天, 将含 5 μ g/mL 脂多糖的培养基加入除空白组以外的各组培养孔中造模, 空白组加入不含 B-27 的 Neurobasal-A 培养基, 每孔 350 μ L。24 h 后, 各组细胞给予含氟西汀 (10 μ mol/L)、空白血清 (4%、8%)、含药血清 (4%、8%), 不含 B-27 的 Neurobasal-A 培养液, 空白组、模型组均加入不含 B-27 的 Neurobasal-A 培养液, 每孔 350 μ L, 培养至第 13 天, 收集上清, 检测 NO、IL-6、TNF- α 水平; 收集裂解液, ELISA 法检测 5-HT、IDO 水平; 提取各组海马神经元细胞总 RNA, 实时荧光定量 PCR 法测定 IL-6、TNF- α 、5-HT1A、IDO1 mRNA 表达, 所有引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/Gbp
<i>β-actin</i>	正向 CACCCGCGAGTACAACCTTC	207
	反向 CCCATACCCACCATCACACC	
<i>IL-6</i>	正向 AGAGACTTCCAGCCAGTTGC	115
	反向 CTGGTCTGTTGTGGGTGTA	
<i>TNF-α</i>	正向 GATCGGTCCCAACAAGGAGG	138
	反向 GCTTGGTGGTTTGCTACGAC	
<i>5-HT1A</i>	正向 TGATCTCGCTCACTTGGCTC	145
	反向 AAAGCGCCGAAAGTGGAGTA	
<i>IDO1</i>	正向 GCATCAAGACCCGAAAGCAC	154
	反向 GTTGCCCTTCCAACCAGACA	

2.3 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布者, 采用单因素方差分析或独立样本 *t* 检验; 不符合者, 采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 逍遥散对不动时间的影响 表 2 显示, 与空白组比较, 模型组小鼠 2 个实验中不动时间显著延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散高剂量组 2 个实验中不动时间显著缩短 ($P < 0.01$), 低剂量组强迫游泳实验中不动时间显著缩短 ($P < 0.01$)。

表2 逍遥散对不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)

Tab.2 Effect of Xiaoyao Powder on immobility time ($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	不动时间/s	
		悬尾实验	强迫游泳实验
空白组	—	178.24±6.82	121.55±13.92
模型组	—	213.13±8.51 ^{##}	141.97±12.17 [#]
氟西汀组	3.03 mg/kg	124.80±46.58 ^{**}	124.07±9.33 [*]
逍遥散组	15	196.69±19.29	98.48±17.27 ^{**}
逍遥散组	30	171.15±4.16 ^{**}	74.18±19.44 ^{**}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

3.2 逍遥散对 IL-6、TNF- α 水平的影响 表3显示,与空白组比较,模型组血清、皮层 IL-6、TNF-

表3 逍遥散对 IL-6、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4\sim 6$)

Tab.3 Effects of Xiaoyao Powder on IL-6 and TNF- α levels ($\bar{x}\pm s, n=4\sim 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	血清		海马		皮层	
		IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·g ⁻¹)	TNF- α /(ng·g ⁻¹)	IL-6/(ng·g ⁻¹)	TNF- α /(ng·g ⁻¹)
空白组	—	38.73±10.10	81.31±2.13	0.79±0.10	1.07±0.16	0.57±0.07	0.64±0.18
模型组	—	82.23±29.99 [#]	91.84±9.60 [#]	1.00±0.16 [#]	1.14±0.22	1.11±0.19 ^{##}	1.12±0.15 [#]
氟西汀组	3.03 mg/kg	39.65±1.95 [*]	84.16±2.30	0.80±0.27	1.02±0.15	0.78±0.09 ^{**}	0.74±0.09 [*]
逍遥散组	15	48.54±14.14 [*]	88.48±5.30	0.74±0.17 [*]	0.99±0.18	0.65±0.13 ^{**}	0.62±0.07 [*]
逍遥散组	30	48.41±14.22 [*]	90.15±0.22	0.75±0.34	1.32±0.39	0.59±0.21 ^{**}	0.64±0.02 [*]

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

表4 逍遥散对 5-HT、IDO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab.4 Effects of Xiaoyao Powder on 5-HT and IDO levels ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	海马		皮层	
		5-HT/(ng·g ⁻¹)	IDO/(ng·g ⁻¹)	5-HT/(ng·g ⁻¹)	IDO/(ng·g ⁻¹)
空白组	—	708.46±218.79	85.15±20.93	627.02±53.56	63.46±41.28
模型组	—	412.67±98.44 [#]	142.52±58.81	353.97±32.86 ^{##}	127.06±30.13 [#]
氟西汀组	3.03 mg/kg	688.66±56.07 ^{**}	120.58±42.74	616.72±135.61 ^{**}	57.93±35.28 [*]
逍遥散组	15	671.32±69.07 ^{**}	138.55±54.53	366.62±23.98	86.51±17.25 [*]
逍遥散组	30	742.88±105.51 ^{**}	126.23±56.25	653.29±132.60 ^{**}	65.57±43.17 [*]

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

3.4 逍遥散对尼氏小体的影响 表5、图1显示,与空白组比较,模型组小鼠海马神经元损伤,排列不规则,分层不清楚,尼氏小体数减少,呈较明显空泡状,平均光密度显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散高剂量组平均光密度显著增加 ($P<0.05$)。

表5 逍遥散对尼氏小体的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.5 Effect of Xiaoyao Powder on Nissl bodies ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	平均光密度
空白组	—	48.14±5.03
模型组	—	28.69±3.40 ^{##}
氟西汀组	3.03 mg/kg	39.37±4.96 ^{**}
逍遥散组	15	31.48±2.34
逍遥散组	30	33.03±7.90 [*]

注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

α 水平及海马 IL-6 水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,逍遥散组血清 IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$),皮层 TNF- α 、IL-6 水平显著下调 ($P<0.05, P<0.01$),并且低剂量组海马 IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$)。

3.3 逍遥散对 5-HT、IDO 水平的影响 表4显示,与空白组比较,模型组海马、皮层 5-HT 水平显著降低 ($P<0.05, P<0.01$),皮层 IDO 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,逍遥散组海马 5-HT 水平显著上调,皮层 IDO 水平显著下调 ($P<0.05, P<0.01$),并且高剂量组皮层 5-HT 水平显著上调 ($P<0.01$)。

3.5 大鼠原代海马神经元细胞体外生长形态观察及鉴定 海马神经元细胞接种 24 h 后,其中有很多神经胶质细胞,其胞体较小,数量较少,再进行全量更换为 Neurobasal-A 培养液培养 24 h 后,神经胶质细胞数量减少,海马神经元细胞数目增多,而且胞体饱满。随着培养时间延长,神经元细胞纯度更高,长出神经突触,并呈现聚团生长,胞体饱满,有光泽,细胞生长到第 10 天时细胞聚集成团,神经突触明显增长。

NeuN 是神经元特异标记物,神经元细胞可被 NeuN-Cy3 标记为红色。图2显示,经 NeuN、DAPI 双染色后,培养 12 d 的细胞红色、蓝色荧光分布基本重合,表明所培养细胞为成熟神经元细胞,纯度可达 95% 以上。

3.6 含药血清对 NO、IL-6、TNF- α 水平的影

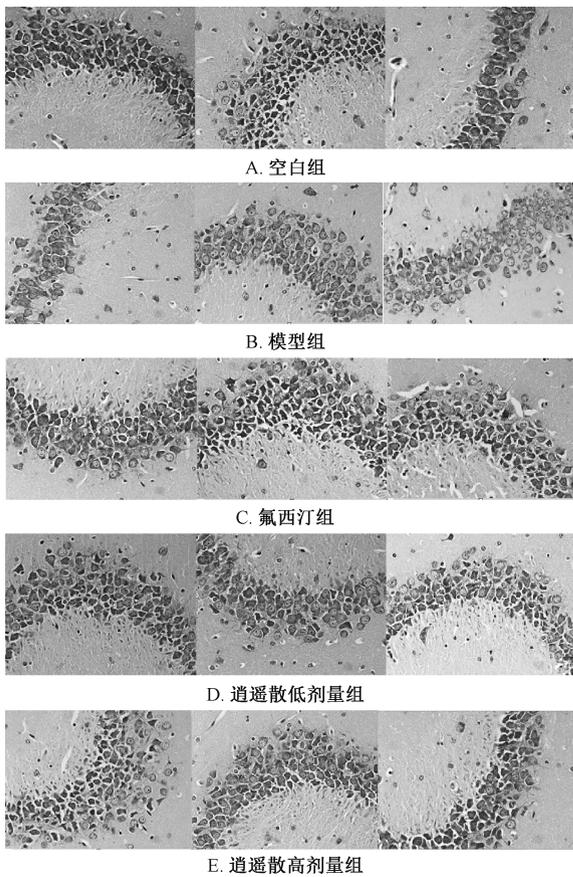


图1 逍遥散对尼氏小体的影响 (×400)

Fig.1 Effect of Xiaoyao Powder on Nissl bodies (×400)

响 表6 显示, 与空白组比较, 模型组 NO、IL-6、TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 含药血清高剂量组三者水平显著下调 ($P < 0.01$)。

表6 含药血清对 NO、IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

Tab.6 Effects of medicated serum on NO, IL-6 and TNF-α levels ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

组别	剂量/%	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF-α/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组	—	1.27±0.08	223.45±19.71	18.86±1.70
模型组	—	13.74±0.70 ^{##}	1 671.91±30.74 ^{##}	40.47±2.62 ^{##}
氟西汀组	10 $\mu\text{mol/L}$	7.60±1.15 ^{**}	268.01±19.58 ^{**}	38.36±4.97
空白血清组	4	10.04±1.63	1 407.85±173.19	38.65±2.77
含药血清组	4	11.55±1.97	1 635.90±69.67	36.14±7.45
空白血清组	8	10.63±2.35	1 641.56±9.92	39.26±6.72
含药血清组	8	8.73±1.31 ^{**}	1 312.48±113.83 ^{**△}	28.20±7.89 ^{**△}

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$;与空白血清高剂量组比较,[△] $P < 0.05$

3.7 含药血清对 5-HT、IDO 水平的影响 表7 显示, 与空白组比较, 模型组 5-HT 水平显著降低 ($P < 0.05$), IDO 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 含药血清高剂量组 5-HT 水平显著上调, IDO 水平显著下调 ($P < 0.01$), 低剂量组 IDO 水平显著下调 ($P < 0.01$)。

3.8 含药血清对 IL-6、TNF-α mRNA 表达的影响 表8 显示, 与空白组比较, 模型组 IL-6、TNF-α mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 含药血清组两者 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

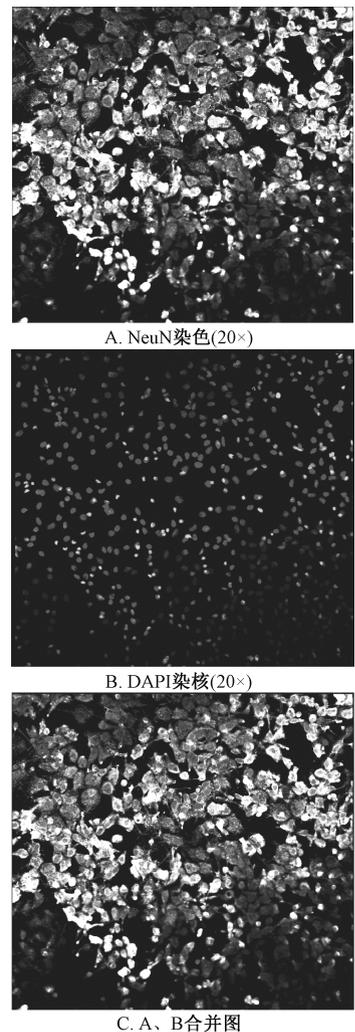


图2 大鼠原代海马神经元细胞鉴定

Fig.2 Identification of primary hippocampal neuron cells in rats

表7 含药血清对5-HT、IDO水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5\sim 6$)
Tab.7 Effects of medicated serum on 5-HT and IDO levels ($\bar{x}\pm s$, $n=5\sim 6$)

组别	剂量/%	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	IDO/(ng·mL ⁻¹)
空白组	—	51.66±16.17	1.22±0.21
模型组	—	29.77±11.41 [#]	1.65±0.16 ^{##}
氟西汀组	10 μmol/L	57.95±13.24 ^{**}	0.79±0.18 ^{**}
空白血清组	4	29.52±5.37	2.04±0.64
含药血清组	4	43.77±14.92	1.12±0.14 ^{**▲}
空白血清组	8	20.21±4.88	2.13±0.66
含药血清组	8	74.82±8.51 ^{**△△}	1.25±0.09 ^{**△}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与空白血清低剂量组比较,[▲] $P<0.05$;与空白血清高剂量组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表8 含药血清对IL-6、TNF-α mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 5$)
Tab.8 Effects of medicated serum on IL-6 and TNF-α mRNA expressions ($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 5$)

组别	剂量/%	mRNA 相对表达量	
		IL-6	TNF-α
空白组	—	1.04±0.40	1.20±0.38
模型组	—	7.49±1.09 ^{##}	9.73±2.01 [#]
氟西汀组	10 μmol/L	4.43±0.92 ^{**}	4.08±1.09
空白血清组	4	5.87±1.10	7.17±0.42
含药血清组	4	1.52±0.18 ^{**▲▲}	0.86±0.30 ^{**▲▲}
空白血清组	8	6.09±0.58	7.06±0.76
含药血清组	8	2.15±0.14 ^{**△△}	1.07±0.03 ^{**△}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与空白血清低剂量组比较,^{▲▲} $P<0.01$;与空白血清高剂量组比较,[△] $P<0.01$,^{△△} $P<0.05$

3.9 含药血清对5-HT1A、IDO1 mRNA表达的影响 表9显示,与空白组比较,模型组5-HT1A mRNA表达显著降低($P<0.01$),IDO1 mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组5-HT1A mRNA水平显著上调($P<0.01$),IDO1 mRNA水平显著下调($P<0.01$)。

表9 含药血清对5-HT1A、IDO1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 5$)
Tab.9 Effects of medicated serum on 5-HT1A and IDO1 mRNA expressions ($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 5$)

组别	剂量/%	mRNA 相对表达量	
		5-HT1A	IDO1
空白组	—	1.04±0.01	0.87±0.39
模型组	—	0.34±0.05 ^{##}	2.17±0.19 ^{##}
氟西汀组	10 μmol/L	0.76±0.05 ^{**}	0.99±0.30 ^{**}
空白血清组	4	0.35±0.03	1.92±0.17
含药血清组	4	0.57±0.09 ^{**▲▲}	0.74±0.23 ^{**▲▲}
空白血清组	8	0.31±0.03	1.82±0.34
含药血清组	8	0.67±0.13 ^{**△△}	1.07±0.42 ^{**△}

注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与空白血清低剂量组比较,^{▲▲} $P<0.01$;与空白血清高剂量组比较,[△] $P<0.01$,^{△△} $P<0.05$

4 讨论

炎症反应参与了抑郁症的发生发展过程,细胞因子水平异常与神经精神综合征发生存在必然联系^[4],炎性细胞因子会通过影响大脑神经传递和可塑性来触发氧化应激,抑制成年神经发生等途径。从而诱发抑郁症^[5]。脂多糖刺激机体诱导产生的炎性细胞因子能激活吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO),它是一种能由IL-6、IFN-α、IFN-γ、TNF-α中1种或几种结合的细胞因子激活若干炎症信号通路激活的酶,可导致色氨酸(Trp)更多地代谢为犬尿氨酸(KYN),进而引起神经毒性产物的增加,抑制海马神经元的可塑性^[6-7],同时被色氨酸羟化酶(TpH)和1-芳香族氨基酸脱羧酶(LAADC)代谢成5-HT的色氨酸减少,导致后者合成水平下降,并引起强迫游泳不动时间延长、飞溅测试梳洗时间减少等抑郁样行为,给予细胞因子抑制剂米诺环素后能间接阻断IDO激活,表现出阻止抑郁症的发展^[8]。Corona等^[9]报道,LPS诱导的IDO激活会导致趋化因子受体缺陷小鼠(CX₃CR1^{-/-}小鼠)产生抑郁样行为,小胶质细胞激活和脑内5-HIAA/5-HT比率增加,给予IDO抑制剂1-MT后可缓解该状况。另外,非甾体抗炎药物阿司匹林也能在通过下调细胞因子(IL-6、TNF-α)释放来减轻炎症反应的同时,缩短SD大鼠强迫游泳的不动时间从而缓解抑郁样行为^[10]。

逍遥散具有良好的抗抑郁作用,方中君药柴胡有效成分柴胡皂苷抗炎作用明显^[11],其机制与抑制炎症介质(IL-1、IL-6、TNF-α等)释放有关^[12];臣药当归、白芍均具有抗炎作用,前者所含阿魏酸能提高吞噬细胞功能,抑制IL-1β、JNK信号通路来发挥神经保护作用,而后者所含芍药苷、牡丹酚等可抑制IL-6、TNF-α等炎性因子分泌;佐药白术、茯苓、生姜^[13]、薄荷^[14],以及使药甘草^[15]均可通过抑制炎症因子释放来发挥抗炎作用,有效成分包括白术内酯、茯苓多糖、姜黄素、薄荷酮、甘草黄酮等。课题组前期采用二甲苯致小鼠耳肿胀实验及醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高实验,也发现逍遥散具有一定抗炎作用,显示出其处方药物抗炎作用的整合表现。

本实验结果显示,脂多糖刺激可引起小鼠出现悬尾、强迫游泳不动时间延长等抑郁样行为,而且小鼠血清、皮质、海马中IL-6、TNF-α水平明显升高,提示抑郁样行为与IL-6、TNF-α水平升高存在一定相关性;它也可诱导小鼠皮层、海马中IDO

水平上调, 5-HT水平下降, 海马CA3区锥体细胞形态不规则, 细胞间隙增大, 排列不齐, 甚至尼氏小体消失, 提示该模型小鼠抑郁样行为发生与炎症反应有关; 体内实验显示, 逍遥散能缩短模型小鼠强迫游泳实验、悬尾实验中不动时间, 降低外周及中枢皮层、海马IL-6、TNF- α 、IDO水平, 提高5-HT水平; 体外实验显示, 含药血清可对抗脂多糖诱导的海马神经细胞炎症因子异常释放及其mRNA表达, 并提高模型细胞5-HT分泌水平及5-HT1A mRNA的表达。

综上所述, 逍遥散对脂多糖诱导的神经炎症抑郁样模型有对抗作用, 其机制可能与直接上调5-HT水平及其受体功能, 或通过阻断炎症因子诱导的IDO激活途径来抑制TRP-KYN代谢途径, 促使更多TRP向5-HT转化, 并同时降低KYN及其下游神经毒性代谢物的产生, 或保护神经元、促神经元增殖分化有关。同时也进一步表明, 逍遥散的抗抑郁作用是多途径、多靶点模式。

参考文献:

[1] 段富津. 方剂学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995.
[2] 李 云, 苟小军, 周明眉, 等. 复方丹参滴丸对LPS造抑郁样行为模型小鼠的抗抑郁作用实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(3): 83-86.
[3] 周桢昊. 逍遥散及其组方抗抑郁作用及机制研究——对大鼠海马神经元的保护及BDNF、TrkB表达的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
[4] Piser T M. Linking the cytokine and neurocircuitry hypotheses of depression: a translational framework for discovery and development of novel anti-depressants[J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(4): 515-524.
[5] Aalling N, Hageman I, Miskowiak K, et al. Erythropoietin prevents the effect of chronic restraint stress on the number of hippocampal CA3c dendritic terminals—relation to expression of

genes involved in synaptic plasticity, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress in male rats[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 96(1): 103-116.
[6] Brooks A K, Janda T M, Lawson M A, et al. Desipramine decreases expression of human and murine indoleamine-2, 3-dioxygenases[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 62: 219-229.
[7] Parrott J M, Redus L, O' Connor J C. Kynurenine metabolic balance is disrupted in the hippocampus following peripheral lipopolysaccharide challenge [J]. *J Neuroinflamm*, 2016, 13: 124.
[8] Souza L C, Jesse C R, de Gomes M G, et al. Intracerebroventricular administration of streptozotocin as an experimental approach to depression: evidence for the involvement of proinflammatory cytokines and indoleamine-2, 3-dioxygenase [J]. *Neurotox Res*, 2017, 31(4): 464-477.
[9] Corona A W, Norden D M, Skendelas J P, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX₃CR1) -deficient mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 134-142.
[10] Guan X T, Shao F, Xie X, et al. Effects of aspirin on immobile behavior and endocrine and immune changes in the forced swimming test: comparison to fluoxetine and imipramine[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 124: 361-366.
[11] 彭 成. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 96.
[12] Han N R, Kim H M, Jeong H J. Inactivation of cystein-aspartic acid protease (caspase) -1 by saikosaponin A[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(6): 817-823.
[13] 张 旭, 赵芬琴. 生姜提取液抗炎镇痛作用研究[J]. 河南大学学报(医学版), 2015, 34(1): 26-28.
[14] Cheng H M, Hsiang C Y, Chen G W, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production by menthone through nuclear factor- κ B signaling pathway in HaCat cells[J]. *Chin J Physiol*, 2008, 51(3): 160-166.
[15] 李晓红, 齐 云, 蔡润兰, 等. 甘草总皂苷抗炎作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 110-113.