

龙骨-牡蛎通过调节肠道微生态增强柴胡加龙骨牡蛎汤的抗抑郁效应

宋永贵¹, 陈运丽^{1*}, 苏丹¹, 李前民¹, 李惠珍¹, 艾志福¹, 杨明², 朱根华¹,
陈丽玲^{1*}

[1. 江西中医药大学中药药效(防治精神障碍脑疾病)评价江西省中医药管理局重点研究室/抑郁症中医证候动物模型江西省中医药管理局重点研究室,江西南昌330004; 2. 江西古香今韵大健康产业有限公司,江西南昌330029]

摘要: 目的 探索龙骨-牡蛎在经典名方柴胡加龙骨牡蛎汤中对抗抑郁的增效作用。方法 将小鼠随机分为空白组、模型组、帕罗西汀组(10 mg/kg)、全方(柴胡加龙骨牡蛎汤)低、高剂量组(10.4、20.8 g/kg)和去方(柴胡加龙骨牡蛎汤去龙骨和牡蛎)低、高剂量组(9.1、18.2 g/kg),采用慢性不可预测性温和刺激联合孤养法建立小鼠抑郁模型,共造模35 d,造模21 d后,各组给予相应药物干预14 d。给药结束后,通过旷场实验、强迫游泳实验和悬尾实验评价小鼠抑郁样行为,并检测小鼠颈动脉血流量。收集小鼠粪便,运用16S rRNA测序分析评估肠道微生物群落的变化。追踪肠道偶氮还原酶活性以及神经递质变化,进行相关性分析。**结果** 全方的抗抑郁神经行为学表现优于去方,对2种差异菌门(厚壁菌门、拟杆菌门)及其10种差异菌属的丰富度产生回调作用。与去方比较,全方对厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值的调节突出,降低了肠道偶氮还原酶的活性,回调了海马和结肠组织所含神经递质水平。此外,抑郁样行为的减轻、肠道菌群以及神经递质的改变显示与偶氮还原酶活性高度相关。**结论** 龙骨-牡蛎可通过调节肠道微生态,包括恢复厚壁菌门/拟杆菌门菌落稳态,降低肠道偶氮还原酶活性,回调神经递质的异常变化,增强柴胡加龙骨牡蛎汤的药效,对全方配伍后抗抑郁效应具有不可或缺的价值。

关键词: 龙骨-牡蛎; 柴胡加龙骨牡蛎汤; 抗抑郁; 肠道菌群; 偶氮还原酶活性; 神经递质

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)02-0625-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.044

抑郁症以显著持久的情绪低落为主要临床特征,是造成全球疾病负担的第三大因素^[1]。与化学治疗药物相比,中医药疗效稳定、不易复发。中药配伍是多种化学成分相互协同作用,从而增强疗效^[2],可避免单一成分药效的毒副作用。柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论·少阳篇》^[3],能有效缓解抑郁症患者负性情绪,不良反应较少^[4-5]。有报道显示,柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁症的治疗可能与调节神经递质及其受体表达有关^[6]。神经递质受到来自肠道微生物群的靶向调节^[7]。肠道菌群及神经递质、短链脂肪酸,以及大量存在的各种酶类^[8-10],共同构成了肠道微生态系统,在肠道复杂的生物反应中逐渐受到关注。龙骨-牡蛎是临床常用药对,具有镇静、催眠等作用^[11-12],单独使用具有一定局限性,且易引发胃肠道不适,临床多配伍使用,相须为用^[13]。本研究通过比较柴胡加龙骨牡蛎汤全方和去龙骨-牡蛎方对小鼠抗抑郁效应的作用,根据肠道菌落稳态的变化和偶氮还原酶活性^[14],探索龙骨-牡蛎增强柴胡加

龙骨牡蛎汤抗抑郁药效的潜在机制,以期对龙骨-牡蛎的配伍增效机制有更深入的认识。

1 材料

1.1 仪器 SMART 3.0型动物行为学分析软件(西班牙Panlab公司); Vevo 2100型超高分辨率小动物超声影像系统(加拿大VisualSonics公司); R546Pro型小动物麻醉机(福建瑞沃德科技有限公司); TGem Plus型全波长分光光度计[天根生化科技(北京)有限公司]; Triple QudaTM 4500型液质联用仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司)。

1.2 试剂 莛菜红(批号S25HS196182)、多巴胺盐酸盐(DA,批号S14GB161091,纯度≥98%)、5-羟色胺盐酸盐(5-HT,批号F05D11E128683,纯度≥98%)、L-谷氨酸(Glu,批号S01GB159555,纯度≥99%)、L-谷氨酰胺(Gln,批号011M01991V,纯度≥98%)、γ-氨基丁酸(GABA,批号O11GB163610,纯度≥99%)、皮质酮

收稿日期: 2024-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074014); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ201206, GJJ201239)

作者简介: 宋永贵(1979—),男,博士,副教授,硕士生导师,从事中医药防治失眠、抑郁作用机制及中药药效物质基础研究。Tel: 18079131056, E-mail: songyonggui1999@163.com

#共同第一作者: 陈运丽(1998—),女,硕士生,从事中医药防治认知障碍脑疾病研究。Tel: 15191923492, E-mail: chenyunli3492@163.com

*通信作者: 陈丽玲(1983—),女,博士,讲师,从事中医药防治抑郁研究。Tel: 18970065640, E-mail: chenliling309@163.com

(Cort, 批号 A06HB190960, 纯度≥99%)、对乙酰氨基酚(Ace, 批号 H17011Z127515, 纯度≥99%)对照品, 均购自上海源叶生物科技有限公司。质谱级乙腈, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 质谱级甲酸, 购自德国 Merck 公司; 异氟烷, 购自福建瑞沃德科技有限公司; $H_2/CO_2/N_2$ (体积比 3:10:87) 三元混合气, 购自南昌市宏伟气体有限公司。

1.3 药物 柴胡加龙骨牡蛎汤由柴胡 12 g、生半夏 6 g、大黄 6 g、黄芩 4.5 g、生姜 4.5 g、桂枝 4.5 g、人参 4.5 g、茯苓 4.5 g、龙骨 4.5 g、牡蛎 4.5 g、大枣 6 枚组成, 药材均购自江西江中中药饮片有限公司, 经江西中医药大学吴蜀瑶主管药师鉴定为正品。将一剂柴胡加龙骨牡蛎汤加 10 倍量水煎煮 2 次, 过滤后浓缩蒸干, 得到浸膏干粉; 去方为去除龙骨、牡蛎两味药后按相同方法提取。帕罗西汀(批号 B14200006562), 购自中美天津史克制药有限公司, 用纯水配制成 1 mg/mL 的药液备用。

1.4 动物 42 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 6 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2018-0008], 饲养于江西中医药大学实验动物科技中心 SPF 级实验动物屏障环境中, 12 h 光照与 12 h 黑暗循环, 温度 24~26 ℃, 相对湿度 45%~65%, 给予充足的饲料和饮用水, 适应饲养 1 周。本动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理受理编号 20230313038)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将小鼠随机分为空白组、模型组、帕罗西汀组、全方低、高剂量组和去方低、高剂量组, 每组 6 只。除空白组(6 只/笼)外, 其余各组(1 只/笼)小鼠采用慢性不可预测性温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)联合孤养法建立抑郁模型^[15-16], 共采用 12 种刺激源, 分别为①束缚(将小鼠装进底部有孔的 50 mL 离心管内, 1 h); ②摇晃(将小鼠置于 50 cm×30 cm×20 cm 的塑料筐内, 换各个方位进行摇晃, 1 h); ③悬尾(将鼠尾悬挂在距离地面 1 m 高的架子上, 使其身体不能接触其他支撑物, 1 h); ④禁食(剥夺饮食, 24 h); ⑤禁水(剥夺饮水, 24 h); ⑥拥挤(15 只/笼, 24 h); ⑦倾斜(45°倾斜鼠笼, 24 h); ⑧湿垫料(向鼠笼中加入湿润的垫料, 24 h); ⑨无垫料(空笼饲养, 24 h); ⑩夜间照明(12 h); ⑪噪音(>80 dB, 5 h); ⑫频闪(180 次/min, 5 h)。每日不定时给予 2 种应激, 每种刺激源不连续出现 2 次, 造模持续共 35 d。造模 21 d 后, 持续给药 14 d(造模的同时给药)。帕罗西汀组为 10 mg/kg, 柴胡龙骨牡蛎汤全方组低、高剂量组按每日临床剂量折算后给予实验小鼠, 去方同理。即全方低、高剂量组分别为生药量 10.4、20.8 g/kg, 去方低、高剂量组相当于生药量 9.1、18.2 g/kg。给药方式均为灌胃给药, 空白组和模型组灌胃给予等量纯水。

2.2 行为学检测 参考文献[17-18] 报道进行检测。

2.2.1 旷场实验 在敞箱(内径 40 cm×40 cm×40 cm)顶部安装摄像机, 定义敞箱底部正中间约 1/4 区域为中心区, 敞箱内部无明显干扰标记, 无灯光阴影, 四周保持静音, 用遮光帘隔绝外部视野。每只小鼠单独放在箱内的一个固定角落, 拍摄其在箱内自由探索 6 min 的视频, 利用行为分析软件分析视频后 4 min 内的运动轨迹。

2.2.2 强迫游泳实验 使用装有纯净水的透明圆柱桶(直径 12 cm, 水深 25 cm), 水温 25~30 ℃, 正前方装有摄像机。将小鼠放入水中后, 采集其在水中 6 min 内的活动视频。采用分析软件分析视频后 5 min 内的小鼠静止不动时间。

2.2.3 悬尾实验 测量开始之前, 将小鼠尾巴用胶带固定在距离地面 1 m 高的架子边缘, 正前方装有摄像机进行录像。实验共持续 6 min, 采用行为学软件分析小鼠后 4 min 内的静止不动时间。

2.3 颈动脉血流量检测 所有小鼠在完成行为学检测后, 使用异氟烷麻醉, 剃除颈部周围毛发。安装好检查台后, 将小鼠仰卧, 四肢固定在电极片上用于检测体温和心率, 在小鼠颈部裸露的皮肤上涂上适量的耦合剂, 选用 MS-550D 探头以 90°方向靠近颈部, 找到颈动脉分叉, 在多普勒脉冲模式下测量颈动脉血流量。

2.4 微生物区系 16S rRNA 测序分析 在无菌操作下, 收集空白组、模型组、全方组(柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量)、去方组(去龙骨-牡蛎高剂量)小鼠粪便, 置于冻存管内并立即放入 -80 ℃ 冰箱保存。对样品进行 16S rRNA 测序, 本部分工作委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

2.5 偶氮还原酶活性检测 参考文献[14, 19] 方法, 处死小鼠后, 取整个盲肠, 在超净台上称取 0.2 g 盲肠内容物样品, 用无菌 PBS 缓冲液稀释(1:50), 700 r/min 离心 2 min, 吸取上清液, 37 ℃ 水浴处理 10 min, 加入 0.06 mol/L 萍菜红 3.5 μL 混匀, 取 0.1 mL 作为零时间样品, 将剩余溶液注入事先经 3 次换气($H_2/CO_2/N_2$ 体积比 3:10:87)的密闭双口瓶中, 每隔 0.5 h 取 0.1 mL 样品测定 520 nm 波长处吸光度(A_{520}), 直至样品完全褪色, 并计算脱色率, 公式为脱色率 = [(初始 A_{520} 值 - 样品 A_{520} 值) / 初始 A_{520} 值] × 100%。

2.6 小鼠海马和结肠组织神经递质水平测定 取海马和结肠组织, 精确称重后, 加入 2 倍体积预冷生理盐水, 随后加入 2~4 粒磁珠, 在匀浆机中匀浆 2 min, 3 500 r/min 离心 10 min, 取 50 μL 组织上清液, 加入 190 μL 乙腈溶液和 10 μL 内标溶液, 随即混匀 1 min, 静置, 18 000 r/min 离心 12 min, 取上清液, 4 ℃ 下短期保存备用。采用 Triple QudaTM 4500 液质联用仪进行测定。

质谱条件: 电喷雾电离源(ESI); 离子源温度 550 ℃; 离子源气体 1:45 psi (1 psi = 6.895 kPa), 离子源气体 2 40 psi; 气帘气 35 psi; 多反应离子监测模式(MRM); 入口电压 10 V; 碰撞室出口电压 14 V; 碰撞气 7 psi; 去簇电压(DP)、碰撞能量(CE) 及用于定量分析的母离子(Q1)、子离子(Q3) 参数见表 1。

表1 神经递质质谱 MRM 参数

神经递质	Q1	Q3	Transitions	DP/V	CE/eV
5-HT	177.1	160.1	177.1→160.1	112	13
DA	154.1	137.1	154.1→137.1	39	11
Cort	347.1	329.4	347.1→329.4	118	36
Gln	147.0	130.1	147.0→130.1	40	14
Glu	148.0	84.0	148.0→84.0	47	15
GABA	104.1	87.1	104.1→87.1	62	33
Ace	152.0	123.0	152.0→123.0	61	22

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相水 (含 0.01% 甲酸) (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱, 程序见表 2; 体积流量 0.35 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 35 °C。

表2 洗脱程序

时间/min	A 水(含 0.01% 甲酸)/%	B 乙腈/%
0	60.0	40.0
2.0	60.0	40.0
4.0	5.0	95.0
6.0	5.0	95.0
6.1	60.0	40.0
8.0	60.0	40.0

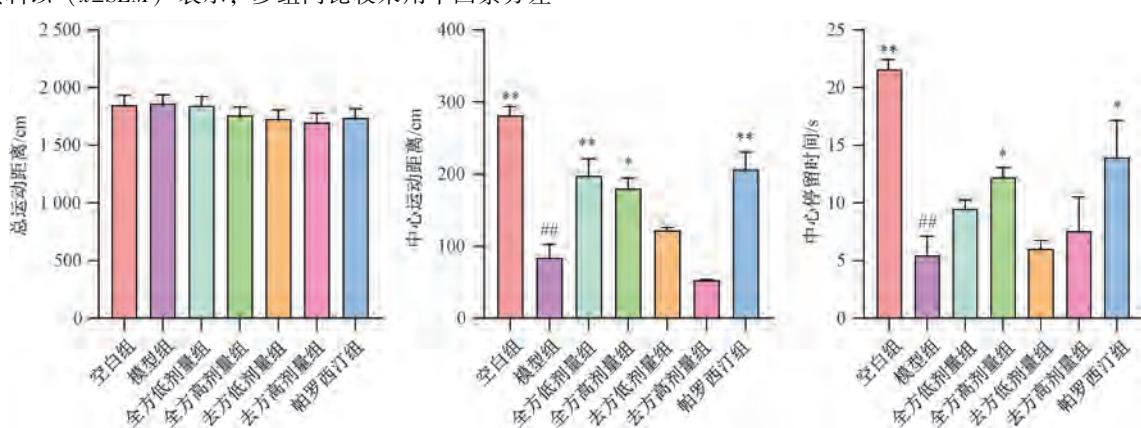
2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm SEM$) 表示, 多组间比较采用单因素方差

分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用 Pearson 相关系数进行相关性分析。肠道菌群数据利用 NovoMagic 平台进行分析。

3 结果

3.1 龙骨-牡蛎在柴胡加龙骨牡蛎汤中对 CUMS 抑郁小鼠行为学的影响

3.1.1 旷场实验 如图 1 所示, 与空白组比较, 在总运动距离相近的情况下, 模型组中心运动距离和中心停留时间均缩短 ($P<0.01$); 与模型组比较, 全方各剂量组和帕罗西汀组中心运动距离增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 全方高剂量组和帕罗西汀组中心停留时间延长 ($P<0.05$), 而去方各剂量组中心运动距离和中心停留时间均无显著变化 ($P>0.05$)。



注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 各组 CUMS 抑郁小鼠总运动距离、中心运动距离和中心停留时间比较 ($\bar{x}\pm SEM$, n=6)

3.1.2 强迫游泳实验 如图 2 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠强迫游泳不动时间延长 ($P<0.01$); 全方各剂量组、去方各剂量组和帕罗西汀组强迫游泳不动时间有缩短趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.1.3 悬尾实验 如图 3 所示, 与空白组比较, 模型组悬尾不动时间延长 ($P<0.01$); 与模型组比较, 全方高剂量组悬尾不动时间缩短 ($P<0.05$), 全方低剂量组、去方各剂量组和帕罗西汀组悬尾不动时间有缩短趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

以上行为学结果显示, CUMS 诱导的小鼠抑郁模型成功建立; 且全方高剂量组抗抑郁效果最佳, 即全方能有效地改善小鼠抑郁状态; 而去除龙骨-牡蛎后抗抑郁效果明显

下降, 提示龙骨-牡蛎的配伍在柴胡加龙骨牡蛎汤全方抗抑郁作用中是必不可少的。

3.2 龙骨-牡蛎在柴胡加龙骨牡蛎汤中对 CUMS 抑郁小鼠颈动脉血流量的影响 如图 4 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠颈动脉血管径增大 ($P<0.05$), 劲动脉血流量减缓 ($P<0.05$); 与模型组比较, 全方高剂量组和帕罗西汀组小鼠劲动脉血管径缩小 ($P<0.05$), 帕罗西汀组小鼠劲动脉血流量加快 ($P<0.05$), 去方组小鼠高颈动脉血管径和低血流量的恢复效果不佳。

3.3 龙骨-牡蛎在柴胡加龙骨牡蛎汤中对 CUMS 抑郁小鼠肠道菌群的影响 对空白组、模型组、全方组 (高剂量) 和去方组 (高剂量) 4 组样本进行了 OTU 分析, 样本稀释

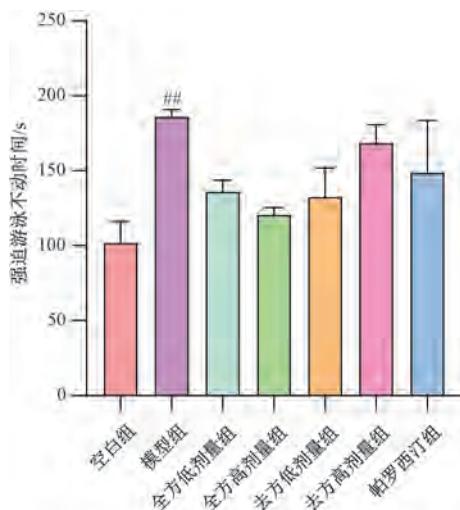


图 2 各组 CUMS 抑郁小鼠强迫游泳不动时间比较 ($\bar{x} \pm SEM$, $n=6$)

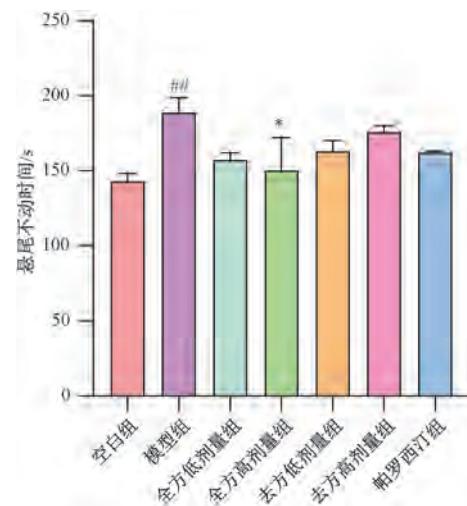


图 3 各组 CUMS 抑郁小鼠悬尾不动时间比较 ($\bar{x} \pm SEM$, $n=6$)

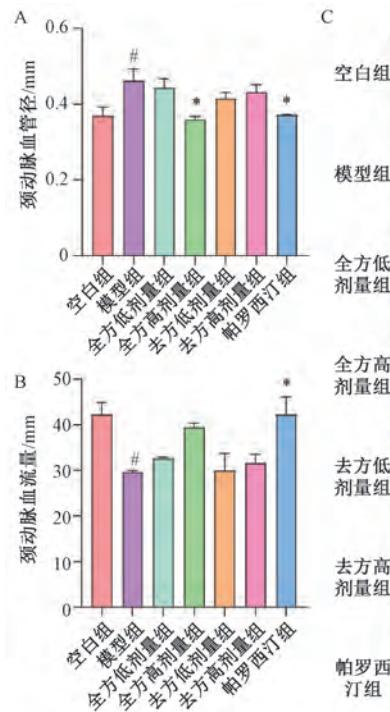
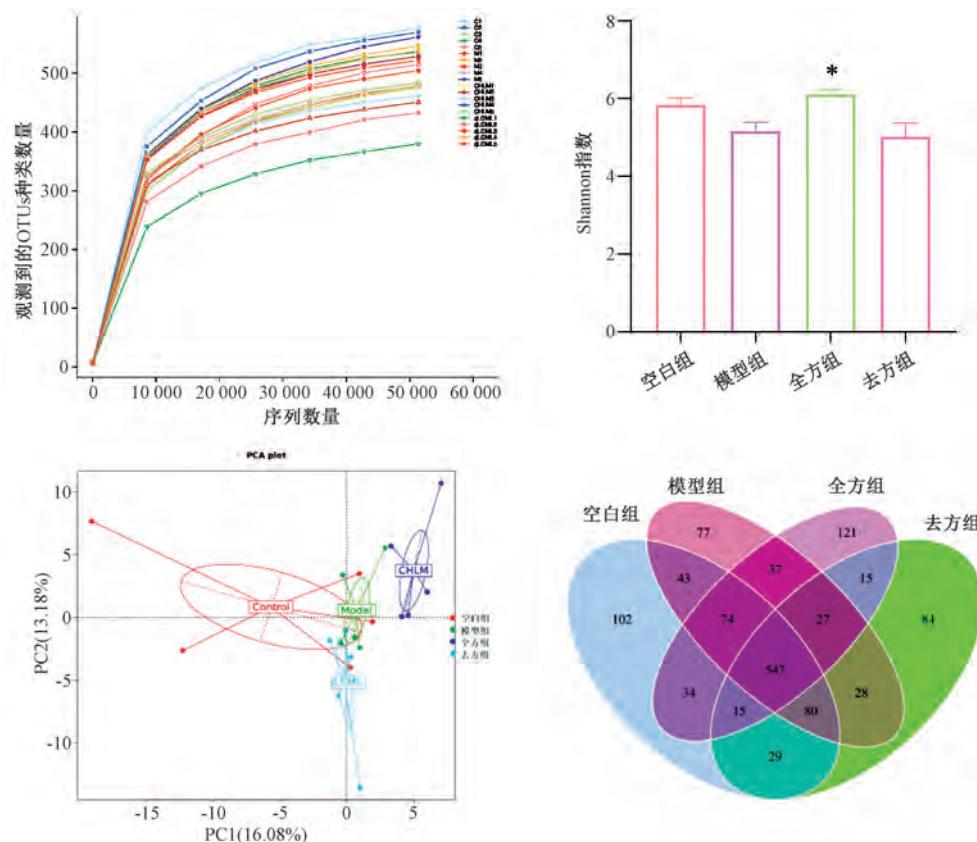


图 4 各组 CUMS 抑郁小鼠多普勒超声结果 ($\bar{x} \pm SEM$, $n=6$)

曲线见图 5A, 结果显示, 当测序值达到峰值时, 各样本曲线趋于平缓, 表明样本测序数据量充足, 取样合理, 样本物种丰富度理想。Shannon 指数见图 5B, 结果显示, 与空白组比较, 模型组菌群 α 多样性有降低的趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与模型组比较, 全方组给药后恢复了菌群相对丰度和多样性 ($P<0.05$), 而去方组对菌群 α 多样性没有回调作用 ($P>0.05$)。主成分分析 (PCA) 见图 5C, 结果显示, 全方组与其余 3 组存在主要差异。物种

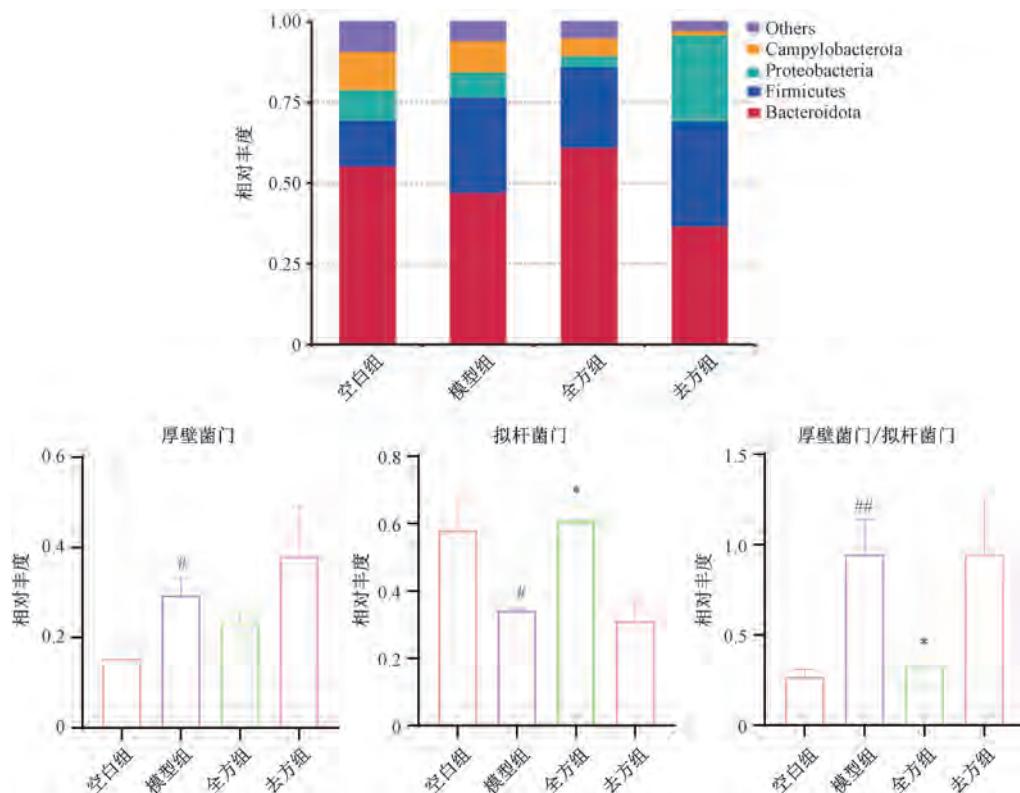
Venn 图见图 5D, 结果显示, 空白组、模型组、全方组、去方组分别独有的 OTU 有 102、77、121、84 个, 4 组共有的 OTU 有 547 个。

在门水平下 (图 6), 各组样本肠道菌群组成以 *Firmicutes* (厚壁菌门)、*Bacteroidota* (拟杆菌门)、*Proteobacteria* (变形菌门)、*Campylobacterota* (弯曲杆菌门)。与空白组比较, 模型组厚壁菌门相对丰度升高 ($P<0.05$), 拟杆菌门相对丰度降低 ($P<0.05$), 厚壁菌门/拟



注：A为稀释曲线分析，B为Shannon指数分析，C为各组样品肠道菌群PCA分析图，D为物种Venn图。与模型组比较， $* P<0.05$ 。

图5 各组 CUMS 抑郁小鼠肠道微生物多样性分析 ($\bar{x}\pm SEM, n=5$)



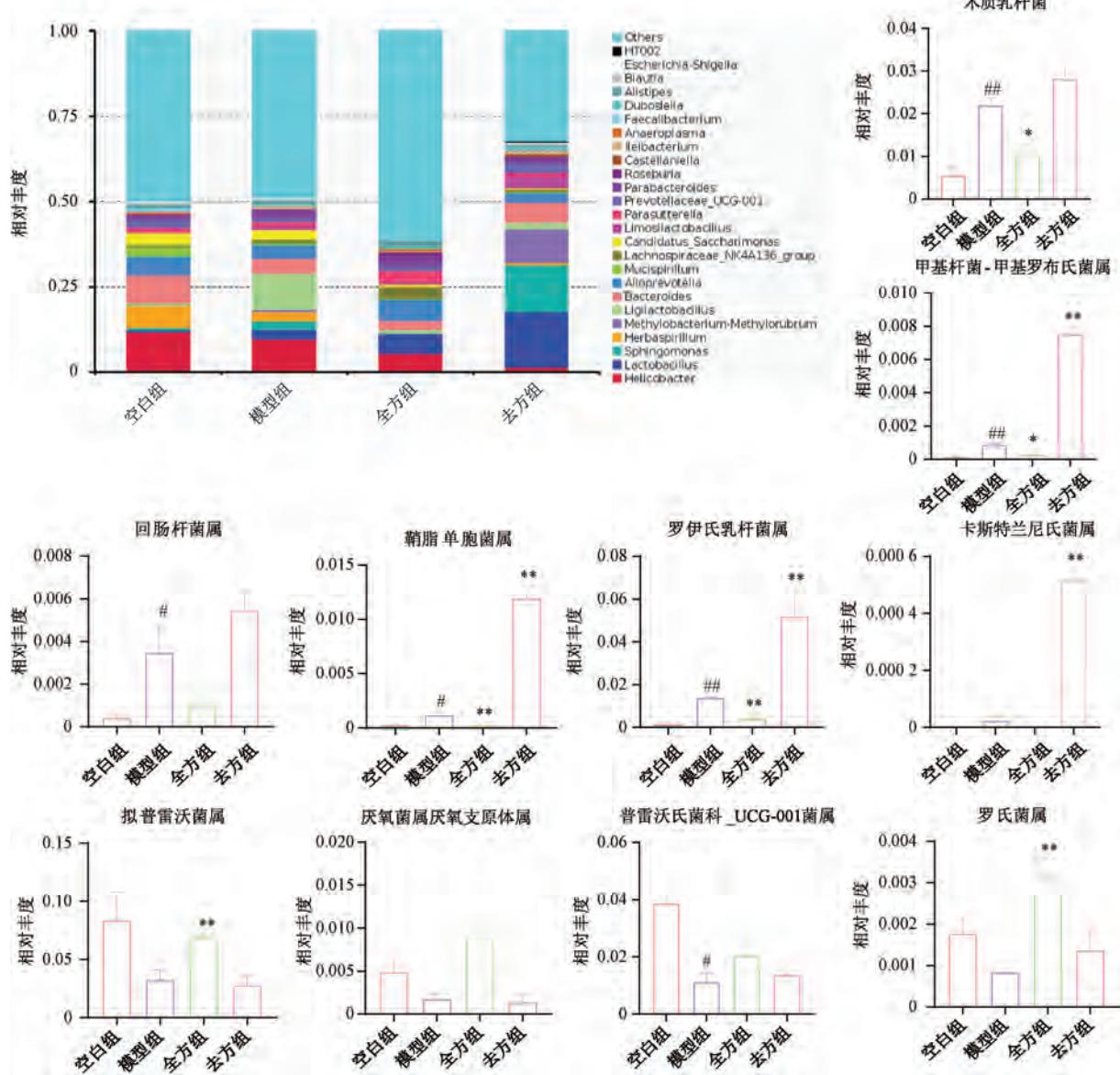
注：与空白组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ 。

图6 门水平下各组小鼠肠道菌群组成 ($\bar{x}\pm SEM, n=5$)

杆菌门比值升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，全方组拟杆菌门相对丰度升高 ($P<0.05$)，厚壁菌门/拟杆菌门比值降低 ($P<0.01$)，而去方组厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度均无明显变化 ($P>0.05$)。

在属水平下(图7)，与空白组比较，模型组 *Ligilactobacillus*(木质乳杆菌属，属于厚壁菌门)、*Methylobacterium-Methylorubrum*(甲基杆菌-甲基罗布氏菌属，属于变形菌门)、*Ileibacterium*(回肠杆菌属，属于厚壁菌门)、*Sphingomonas*(鞘脂单胞菌属，属于拟杆菌门)、*Limosilactobacillus*(罗伊氏乳杆菌属，属于厚壁菌门)、

Castellaniella(卡斯特兰尼氏菌属，属于变形菌门)相对丰度升高，*Alloprevotella*(拟普雷沃菌属，属于拟杆菌门)、*Anaeroplasma*(厌氧菌属厌氧支原体属，属于软壁菌门)、*Prevotellaceae_UCG-001*(普雷沃氏菌科_UCG-001菌属，属于拟杆菌门)、*Roseburia*(罗氏菌属，属于厚壁菌门)相对丰度降低。与模型组比较，全方组能回调以上菌属变化，而去方组未见回调作用。这些菌属大部分都属于厚壁菌门和拟杆菌门，并且在各组间的变化趋势与门水平的变化趋势较为一致。由此可见，龙骨-牡蛎在全方恢复抑郁小鼠肠道菌群的异常变化中发挥着重要作用。



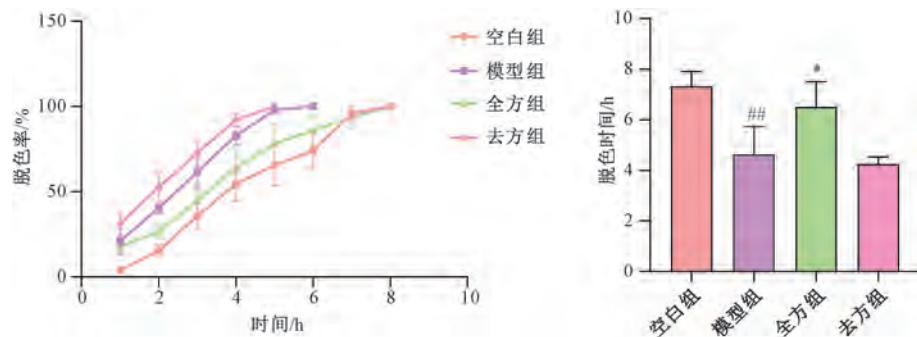
注：与空白组比较， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

图7 属水平下各组小鼠肠道菌群组成 ($\bar{x}\pm SEM$, $n=5$)

3.4 龙骨-牡蛎在柴胡加龙骨牡蛎汤中对CUMS抑郁小鼠偶氮还原酶活性的影响 如图8所示，与空白组比较，模型组脱色时间缩短 ($P<0.01$)，脱色率增大，表示模型组偶氮还原酶活性增强；与模型组比较，全方组脱色时间延

长 ($P<0.05$)，脱色率减小，表示全方组偶氮还原酶活性减弱，而去方组脱色时间和脱色率未见明显变化 ($P>0.05$)。

3.5 龙骨-牡蛎在柴胡加龙骨牡蛎汤中对CUMS抑郁小鼠

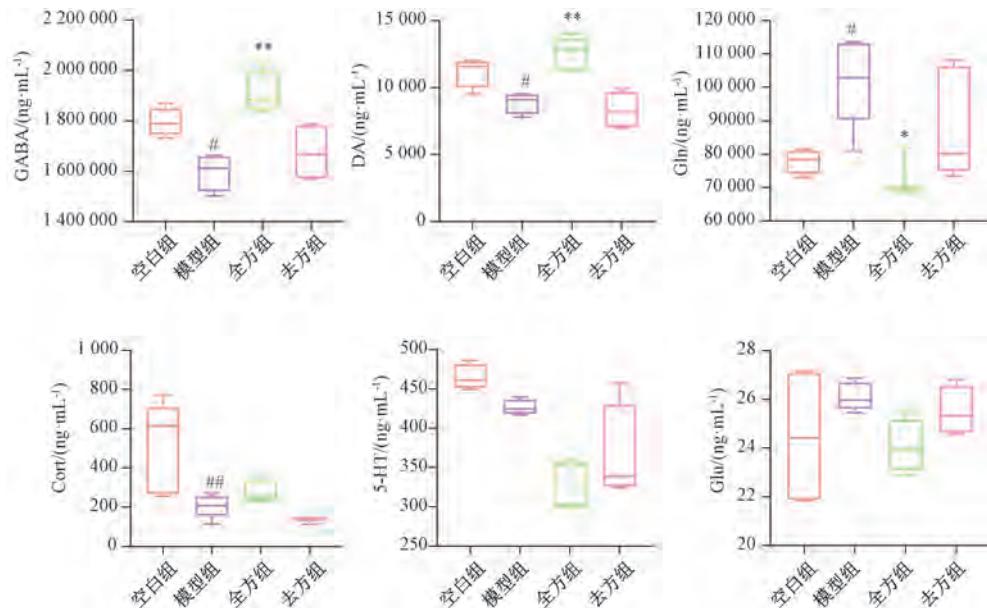


注：与空白组比较， $^{**}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ 。

图8 各组CUMS抑郁小鼠脱色率和脱色时间比较 ($\bar{x}\pm SEM$, $n=6$)

结肠及海马神经递质水平的影响 如图9所示，在结肠中，与空白组比较，模型组GABA、DA、Cort水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Gln水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比

较，全方组GABA、DA水平升高 ($P<0.01$)，Gln水平降低 ($P<0.05$)，而去方组未见调节效果。



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

图9 各组CUMS抑郁小鼠结肠神经递质水平比较 ($\bar{x}\pm SEM$, $n=6$)

如图10所示，在海马中，与空白组比较，模型组GABA水平升高 ($P<0.01$)，Gln、5-HT水平降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，全方组DA水平升高 ($P<0.05$)，而去方组未见调节效果。

3.6 相关性分析

3.6.1 偶氮还原酶活性与抑郁样行为学指标的相关性分析 如图11所示，脱色时间与旷场中心运动距离的 $|r|>0.8$ ，表示两变量极高度相关；脱色时间分别与旷场中心停留时间、进入中心次数、强迫游泳不动时间的 $|r|$ 在 $0.6\sim0.8$ 之间，表示两变量高度相关；脱色时间与悬尾不动时间的 $|r|$ 在 $0.4\sim0.6$ 之间，表示两变量中度相关。

3.6.2 偶氮还原酶活性与肠道菌群的相关性分析 脱色时间与拟杆菌门相对丰度的 $|r|>0.8$ ，表示两变量极高度相关；脱色时间与厚壁菌门的 $|r|$ 在 $0.4\sim0.6$ 之间，表示两

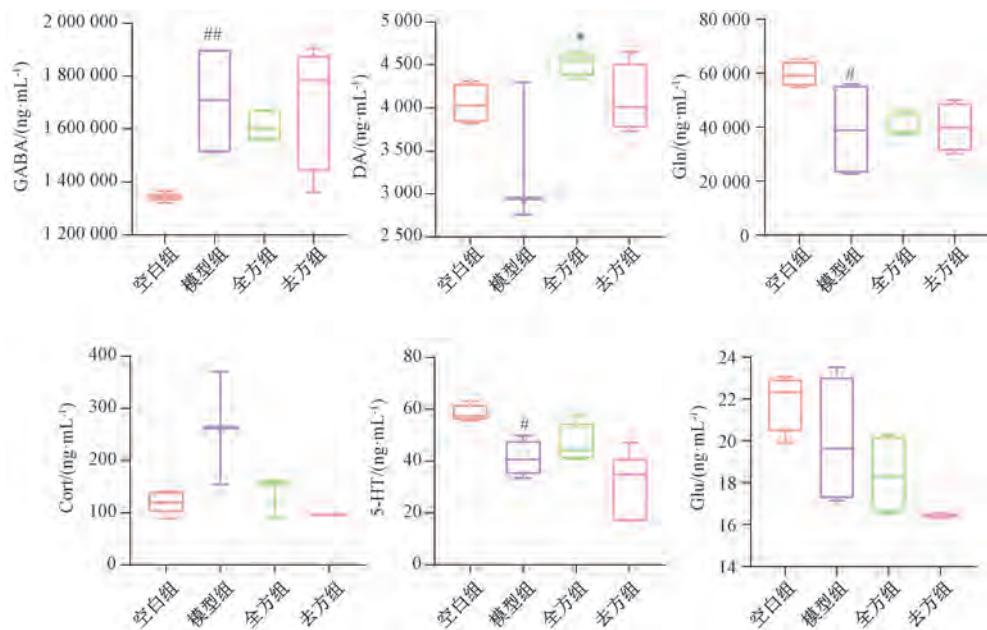
变量中度相关；脱色时间与变形菌门、弯曲菌门的 $|r|$ 在 $0.2\sim0.4$ 之间，表示两变量低度相关。

3.6.3 偶氮还原酶活性与结肠神经递质的相关性分析 脱色时间与DA水平的 $|r|>0.8$ ，表示两变量极高度相关；脱色时间分别与Cort、Gln、GABA水平的 $|r|$ 在 $0.6\sim0.8$ 之间，表示两变量高度相关；脱色时间与5-HT、Glu水平的 $|r|$ 在 $0.4\sim0.6$ 之间，表示两变量中度相关。

4 讨论

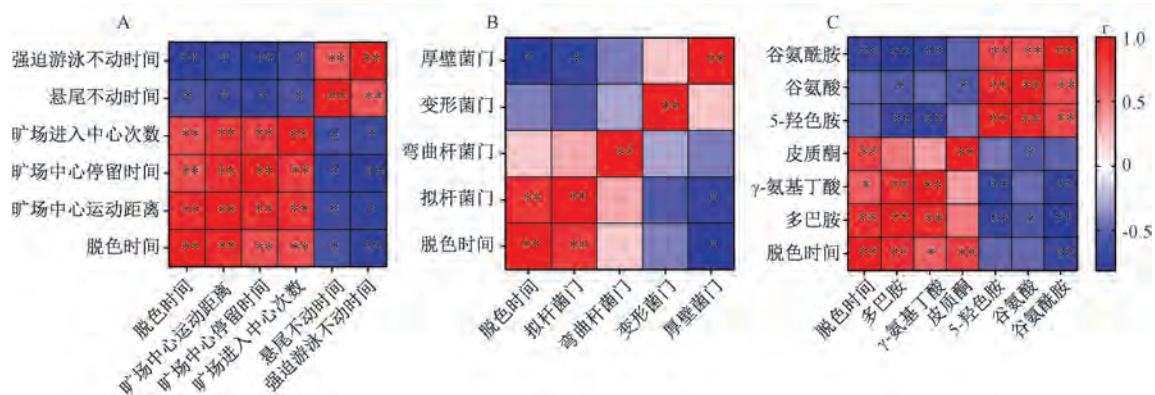
厌氧偶氮还原是细菌偶氮还原的主要形式，所以偶氮还原反应发生所需的厌氧环境至关重要。在文献[14, 19]方法的基础上，本研究进一步优化了厌氧装置，比起厌氧手套箱，本装置易于实现且气密性好，具有操作简便、费时少、耗气量少的优点。

柴胡加龙骨牡蛎汤能有效改善肠道菌群和神经内分泌



注：与空白组比较，#P<0.05, ##P<0.01；与模型组比较，*P<0.05。

图 10 各组 CUMS 抑郁小鼠海马神经递质水平比较 ($\bar{x} \pm SEM$, n=6)



注：* 表示显著相关，** 表示极显著相关。

图 11 偶氮还原酶活性与抑郁样行为学指标 (A)、肠道菌群 (B)、结肠神经递质 (C) 相关性分析热图

的异常变化^[20-23]，然而对于肠道菌群的影响可能受到动物来源、品种品系、年龄等因素的干预。肠道微生物区系 16S rRNA 测序分析显示，龙骨-牡蛎在原方中的配伍作用可以通过回调厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值的异常升高，恢复抑郁小鼠肠道菌群的稳态实现，且抑郁小鼠和给药小鼠肠道偶氮还原酶活性的变化与厚壁菌门/拟杆菌门比值变化趋势一致，相关性分析结果也支持偶氮还原酶活性与拟杆菌门、厚壁菌门的相关性。肠道厚壁菌门/拟杆菌门比值的失衡与脂肪积累、全身炎症和能量代谢等有关^[24]，而本研究首次探究抑郁后该相对丰度比值与肠道偶氮还原酶活性的相关性。可见，柴胡加龙骨牡蛎汤对肠道微生态的干预不仅表现在对肠道菌群的影响上，还表现在对肠道中偶氮还原酶活性的影响，而去龙骨-牡蛎方的以上作用不显著。

肠道和大脑之间不断交换神经和生化信号，肠道菌群中的氧化还原酶可以调节神经递质的水平^[25]。在神经内分

泌物质的进一步检测中发现，全方可通过影响结肠中 DA、Gln 和 GABA 水平，从而对海马中 DA 和 Gln 的异常变化产生较大的回调作用。偶氮还原酶活性与结肠各类神经递质水平变化均具有相关性，即肠道偶氮还原酶可能通过调节肠道 DA、GABA、Gln、Cort 的异常变化，肠内分泌细胞通过内分泌和旁分泌方式影响中枢神经系统活动，影响海马中的神经递质水平，改善小鼠的抑郁症状，表明神经递质不仅与肠道菌群有关，还与偶氮还原酶活性以及整个肠道微生态有关。

综上所述，小鼠的抑郁样行为、肠道菌群、神经递质都与偶氮还原酶活性具有较高的相关性，提示全方抗抑郁作用的增强可能与肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度比值的变化，以及肠道中偶氮还原酶活性的恢复有关，使肠道中神经递质趋于正常水平，进而使整个肠道微生态回调至正常状态，通过靶向调节微生物-肠-脑轴回调中枢神经递质的异常变化，从而更好地发挥抗抑郁效果。本研究确

认了龙骨-牡蛎通过肠道微生态发挥对原方配伍增效作用的重要价值,以及协同全方经由肠道菌群、偶氮还原酶和神经递质代谢物三者相互影响的复杂作用。由于肠道微生态与中枢神经系统存在双向沟通,未来在关注中枢神经系统的基础上,还需要综合考虑肠道微生态整体的变化。并且随着对偶氮还原酶研究工作的开展,三者相互作用的机理将会得到进一步挖掘和阐释。

参考文献:

- [1] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2021, 8(11): 981-990.
- [2] 张优, 戴国梁, 赵权, 等. 黄连、黄连-生地配伍中5种生物碱在正常、抑郁大鼠中体内药动学的比较[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1117-1122.
- [3] 南京中医药大学(南京中医药大学). 伤寒论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 171.
- [4] 张英美, 王亚丽, 常人瑞, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗抑郁症的研究进展[J]. 江苏中医药, 2022, 54(10): 79-82.
- [5] 潘恩. 抗抑郁药物的不良反应分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(46): 128-129.
- [6] 许异川, 林江. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的基础与临床研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(10): 104-108.
- [7] 王小咪, 邵云晓, 王小兰, 等. 肠道菌群与抑郁症相关性的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 331-341.
- [8] Wu R, Yu S, Chen S, et al. A carbon dots-enhanced laccase-based electrochemical sensor for highly sensitive detection of dopamine in human serum[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1229: 340365.
- [9] Gao J, Zhao X, Hu S, et al. Gut microbial DL-endopeptidase alleviates Crohn's disease via the NOD2 pathway[J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(10): 1435-1449.
- [10] 张秀娟, 马骏池, 赵晋彤, 等. 小檗碱对肠道菌群作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 359-363.
- [11] 张永玲, 范文涛. 张锡纯应用龙骨、牡蛎药对经验[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(5): 869-871.
- [12] 王春芳, 田文国, 陈金鹏, 等. 中药抗抑郁作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(9): 2890-2901.
- [13] 陈修保, 刘秀娟, 陈泽涛. 浅析龙牡配伍应用[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(7): 60.
- [14] Zahran S A, Ali-Tammam M, Ali A E, et al. Compositional variation of the human fecal microbiome in relation to azo-reducing activity: a pilot study[J]. *Gut Pathog*, 2021, 13(1): 58.
- [15] 蔡依琳, 朱乐政, 陈彬, 等. 大黄酚对CUMS抑郁小鼠行为学的改善作用[J]. 中国医药科学, 2023, 13(13): 22-25; 59.
- [16] 郑若韵, 贺娟, 熊为锋, 等. 敷和汤对CUMS联合孤养致抑郁模型大鼠的行为学及血清单胺类神经递质的影响[J]. 中医药导报, 2021, 27(5): 29-33.
- [17] 信欣, 韦彩川, 毕文鹏, 等. 慢性应激刺激对抑郁模型小鼠构建的行为学研究[J]. 延边大学医学学报, 2017, 40(2): 92-96.
- [18] 姜宁, 张亦文, 姚彩虹, 等. 大鼠抑郁行为实验方法概述[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.
- [19] Zahran S A, Ali-Tammam M, Hashem A M, et al. Azoreductase activity of dye-decolorizing bacteria isolated from the human gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5508.
- [20] 李自辉, 庞牧, 林佩锜, 等. 基于16S rRNA技术分析柴胡龙骨牡蛎汤对精神分裂症大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 1-8.
- [21] 李宇, 蔡萧君, 王雪, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对2型糖尿病合并抑郁患者肠道菌群的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(12): 1433-1441.
- [22] 李浩经, 吴圆圆, 蔡英杰, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对2型糖尿病合并抑郁大鼠炎症因子及单胺类神经递质的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(17): 2357-2364.
- [23] 王亚楠, 孙宏, 王秀珍, 等. 基于肠道菌-神经递质-脑轴探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对大鼠抑郁症的改善作用[J]. 中成药, 2023, 45(10): 3446-3452.
- [24] Han M, Zhang M, Wang X, et al. Cloudy apple juice fermented by *Lactobacillus* prevents obesity via modulating gut microbiota and protecting intestinal tract health[J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 971.
- [25] Ahlawat S, Asha, Sharma K K. Gut-organ axis: a microbial outreach and networking[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(6): 636-668.