

淫羊藿苷对抑郁症模型小胶质细胞表型转化的调控作用

曹利华^{1,2},高松²,王笑雨¹,
王真真¹,贺红娟¹,李娜³,白明¹,苗明三^{1*}¹河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046;²仲景宛西制药股份有限公司
河南省中药固体制剂技术创新中心,西峡 474550;³河南中医药大学药学院,郑州 450046

摘要:探索淫羊藿苷抗抑郁的作用机制,将 SPF 级 KM 小鼠分为空白组、模型组、盐酸氟西汀组(10 mg/kg)、淫羊藿苷高(50 mg/kg)、低(25 mg/kg)剂量组。除空白组外,其余各组小鼠采用 56 d 慢性不可预知温和应激建立抑郁症模型。造模第 1 d 开始灌胃给予各组小鼠相应药物,连续 56 d。于给药后第 53~56 d,进行行为学测试。末次给药后,取材。酶联免疫吸附剂实验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测脑组织匀浆白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10(interleukin-10,IL-10)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)、多巴胺(dopamine,DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)水平;实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-PCR)检测脑组织中 IL-6、IL-10、诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、分化簇 206(cluster of differentiation 206,CD206)mRNA 表达;蛋白免疫印迹(Western blot)检测脑组织 iNOS、CD206 蛋白表达。体外培养小鼠小胶质细胞(BV-2),采用细胞增殖与毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8,CCK-8)法检测淫羊藿苷的细胞毒性。BV-2 细胞暴露于 100 μg/mL 脂多糖及 15 μg/mL、25 μg/mL 的淫羊藿苷 24 h 后,收集细胞。免疫荧光技术检测细胞 iNOS、CD206 蛋白表达。研究结果表明,慢性不可预知温和应激致抑郁症模型制备成功,淫羊藿苷可降低抑郁症小鼠脑组织 IL-6 水平及 IL-6、iNOS mRNA 表达,升高脑组织 IL-10、5-HT、DA、NE 水平及 IL-10、CD206 mRNA 表达;降低脑组织 iNOS 蛋白,升高 CD206 蛋白表达;改善模型小鼠抑郁样行为。淫羊藿苷可降低 LPS 刺激的 BV-2 细胞 iNOS 蛋白表达,升高 CD206 蛋白表达。结果表明,淫羊藿苷抑制小胶质细胞 M1 表型转化,促进 M2 表型转化,从而改善模型小鼠抑郁样行为。

关键词:淫羊藿苷;抑郁症;小胶质细胞表型转化;细胞炎症模型

中图分类号:R964

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)2-0187-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.2.001

Regulatory effect of icariin on the microglia phenotypic transformation in depression model

CAO Li-hua^{1,2},GAO Song²,WANG Xiao-yu¹,
WANG Zhen-zhen¹,HE Hong-juan¹,LI Na³,BAI Ming¹,MIAO Ming-san^{1*}¹Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;²Henan Provincial Technology Innovation Center for Solid Preparations of Traditional Chinese Medicine, Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Xixia 474550, China;³School of Pharmacology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: This study aims to explore the antidepressant mechanism of icariin. Mice (SPF, KM) were randomly divided into five groups, including the control group, model group, fluoxetine hydrochloride group, high-dose icariin group, and low-dose icariin group. Mice were subjected to different stressors for 56 days except control group mice. Meanwhile, groups of mice were intragastrically administered fluoxetine hydrochloride (10 mg/kg), high-dose icariin (50 mg/kg), low-dose icariin (25 mg/kg) or a vehicle once per day for 56 consecutive days. On the 53th-56th day after administration, behavioral tests were per-

收稿日期:2023-10-30 接受日期:2024-01-04

基金项目:河南省青年人才托举工程项目(2022HYTP049);河南省高等学校重点科研项目(23A360012);河南省博士后科研启动项目(202101058);河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-7-13)

*通信作者 Tel:86-371-65962546;E-mail:miaomingsan@163.com

formed. At the end of the treatment, blood was collected using cardiac puncture under anesthesia. ELISA was used to detect interleukin-6 (IL-6), IL-10, 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), and norepinephrine (NE) level. The expression of IL-6, IL-10, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cluster of differentiation 206 (CD206) mRNA in brain tissue were detected using quantitative real-time PCR (RT-PCR). Western blot was used to detect the expression of iNOS and CD206 protein in brain tissue. BV-2 cells were cultured *in vitro*, and CCK-8 method was used to detect the cytotoxicity of icariin. After the exposure of BV-2 cells to lipopolysaccharide (LPS) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and icariin (15, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The expression of iNOS and CD206 mRNA in brain tissue were detected using immunofluorescence. We found that the model of depression caused by chronic unpredictable mild stress was successful. Icariin reduced the level of IL-6 and the expression of IL-6, iNOS mRNA in the brain tissue of depression mice, increased the level of IL-10, 5-HT, DA, NE and the expression of IL-10, CD206 mRNA, inhibited the brain iNOS protein and increase the expression of CD206 protein, and improved depression-like behavior in model mice. The results of *in vitro* studies show that icariin could reduce the expression of iNOS and protein in BV-2 cells stimulated by LPS, and increased the expression of CD206 and protein. The results show that icariin inhibits the M1 phenotype transformation of microglia and promotes the M2 phenotype transformation, thereby improving the depression-like behavior of model mice.

Key words: icariin; depression; microglia phenotypic transformation; cellular inflammation model

抑郁症是一种情感性精神障碍,其发病率高,易反复发作,严重者危及生命,已成为全球性公共健康问题^[1]。抑郁症患者临床表现主要有抑郁情绪、快感减退、无价值感或内疚感以及自杀意念。由于抑郁症的复杂生物学机制和涉及众多系统,发病机制尚未完全了解,抗抑郁药的研究是世界范围内的焦点,但进展缓慢^[2,3]。寻找治疗抑郁症的新途径和新药物靶点已成为一个紧迫的问题。

应激引起的神经炎症反应在抑郁症的发病机制中日益受到重视^[4],小胶质细胞是中枢神经系统一类固有免疫细胞,与脑内神经炎症反应有着密切的关系,有望成为新的治疗靶点^[5]。经典的 M1 型极化,释放炎症因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等,引起神经炎症反应;替代激活的 M2 型极化,分泌白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子 (transforming growth factor beta, TGF- β) 等,诱导组织修复,发挥神经保护作用^[6]。调节小胶质细胞表型转化是干预抑郁症发生发展的重要途径之一^[7]。中医药一直以来在抑郁症防治方面都有着明显的优势,中医学中,肾阳虚是抑郁症发病的重要机制之一,从肾论治为治疗抑郁症提供了思路^[8]。临床中,补肾阳中药淫羊藿常与其他中药配伍(仙茅、巴戟天、夜交藤等),用于治疗肾阳虚型抑郁症^[9,10]。在前期研究中观察到补肾阳中药淫羊藿(小檗科植物淫羊藿 *Epi-medium brevicomu* Maxim. 干燥叶)活性成分淫羊藿苷具有良好的抗抑郁作用^[11],但其机理仍不清楚。

本研究拟采用慢性不可预知温和应激致抑郁症模型,结合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 BV-2 细胞极化模型,探索淫羊藿苷抗抑郁的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

DW-86L728J 超低温保存箱(海尔股份有限公司); FilterMAX F5 酶标仪(美国 Molecular Devices); 3111 二氧化碳培养箱(赛默飞); Amersham Imager 600 超灵敏多功能成像仪(美国 GE); ABI 7500 FAST 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 7500 FAST); OFT-100D 大小鼠开场活动实验系统(成都泰盟软件有限公司)。

1.2 材料与试剂

材料:淫羊藿苷(批号 20190801,成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度 > 98%); 盐酸氟西汀(批号 T739411W,苏州中化药品工业有限公司)。

试剂:小鼠 IL-6、IL-10 酶联免疫吸附剂实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(批号 3361-1A-6、3432-1A-6, Mabtech); 小鼠 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE) ELISA 试剂盒(批号 ADI-900-175、ENZ-KIT188-0001、ASB-OKEH02565, Enzo Biochem); 蛋白免疫印迹(Western Blot)所需抗体:诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(批号 CY5993, Abways Technology); 分化簇 206(cluster of differentiation 206, CD206)抗体(批号 YT5640, Immunoway); 二抗 Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) HRP

(批号 AB0101, Abways Technology)。免疫荧光技术所需抗体:一抗:iNOS 抗体(批号 ab283655, Abcam); CD206 抗体(批号 AF2535-SP, R&D Systems);二抗 Cy3 conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(批号 GB21303, Servicebio);4',6-二脒基-2-苯基吲哚二乳酸盐(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(批号 D3571, Thermo Fisher);实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-PCR)引物(生工生物工程(上海)股份有限公司)。

细胞:小鼠小胶质细胞(BV-2)(批号:CL-0493, 武汉普赛诺生命科技有限公司)。

动物:SPF 级,雄性,KM 小鼠,体质量 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物使用许可证:SYXK(浙)2019-0001)。操作符合动物实验 3R 原则和动物实验伦理要求(经河南中医药大学动物实验中心审批,审批号为 DELL202103164)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备及分组给药

模型制备:以连续 56 d 慢性不可预测性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立抑郁症小鼠模型。将 7 种刺激,随机安排到 56 d 内,每天随机安排 1 种刺激方法,每种刺激避免重复出现,以免发生适应性。7 种刺激方法:剥夺饮食(禁水禁食 12 h);热刺激(将小鼠放入烘箱为 45 °C 中刺激 5 min 后取出);冷刺激(将小鼠中放入水温为 4 °C 冷水中,冰水浴刺激 5 min 后取出,低温烘干);疼痛刺激(在小鼠尾部 1 cm 处进行夹尾刺激 5 min,以小鼠发出哀鸣声为宜);潮湿刺激(小鼠处于垫料和水以 1:2 的比例的潮湿环境中 24 h);颠倒昼夜节律(昼/夜颠倒 24 h;于当日 8:30 关闭实验室内光源,营造黑夜环境,至 20:30 开启光源,模仿白昼环境,使其白昼颠倒,直至次日 8:30 恢复正常白昼环境);倾斜鼠笼(12 h 倾斜鼠笼,约 45°)。

分组给药:将小鼠随机分为 5 组,每组 6 只:空白组(control, Con)、模型组(model, Mod)、盐酸氟西汀组(floxetine hydrochloride, Flx, 10 mg/kg)、淫羊藿苷高(high-dose icariin, ICA-H, 50 mg/kg)、低剂量组(low-dose icariin, ICA-L, 25 mg/kg)。除空白组外,其余小鼠进行造模,于造模第 1 d,在造模的同时,给药组灌服相应的药物,每天 1 次,连续 56 d,灌胃体积 0.1 mL/g,空白组及模型组灌服同体积生理盐水。

1.3.2 行为学及生化指标检测

于给药后第 53~56 d,分别对各组小鼠进行行

为学测试(糖水消耗测试、强迫游泳测试、旷场活动测试)。

糖水消耗测试:在造模开始之前(作为基线)和造模结束后进行。经过 48 h 的适应期:给予小鼠两个水瓶(1%蔗糖溶液),24 h 后,将其中一瓶蔗糖溶液替换普通饮用水,持续 24 h。24 h 禁食禁水后,分别给予小鼠两瓶装水和 1%蔗糖溶液的水瓶(各 100 mL),12 h 后,记录各组小鼠消耗的纯净水和蔗糖溶液,计算糖水偏好百分比(糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量)×100%)。

旷场活动测试:采用 OFT-100D 大小鼠开场活动实验系统,观察各组小鼠 5 min 内的水平活动距离,每只小鼠结束后,用 75%酒精,对开场活动实验箱进行清理和消毒。

强迫游泳测试:采用小鼠全自动强迫游泳实验系统,记录各组小鼠 5 min 内的游泳不动时间。

末次给药后,脱颈椎处死,取小鼠脑组织。一部分脑组织制备脑组织匀浆(脑组织:生理盐水=1:10),离心,取上清。分离另一部分脑组织海马区:采用 Trizol 法提取各组小鼠海马区脑组织 RNA,反转录;采用 RIPA 裂解液提取各组小鼠海马区脑组织蛋白,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度;所有样品,存于-20 °C 冰箱备用。

ELISA 检测脑匀浆 IL-6、IL-10、5-HT、DA、NE 水平。RT-PCR 检测脑组织 IL-6、IL-10、iNOS、CD206 mRNA 表达水平。RT-PCR 采用 SYBR Green 法。根据前期实验设定 RT-PCR 反应条件^[12,13],实验所需引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司(见表 1)。采用 Western blot 检测脑组织 iNOS、CD206 蛋白表达,并用 Image J 进行分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物长度 Product length(bp)
IL-6	F:TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	23
	R:GAATTGCCATTCACAACCTTT	23
IL-10	F:GCTCTTACTGACTGGCATGAG	21
	R:CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	20
iNOS	F:GGAGTGACGGCAAACATGACT	21
	R:TCGATGCACAACCTGGTGAAC	21
CD206	F:CTCTGTTCAGCTATTGGACGC	21
	R:CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC	23
GAPDH	F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21
	R:TGTAGACCATGTACTTGAGGTCA	23

1.3.3 小鼠小胶质细胞(BV-2)培养

于 37 °C、5 % CO₂ 孵箱内培养,采用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)。

1.3.4 淫羊藿苷适宜受试浓度筛选

96 孔板接种 BV-2 细胞(2×10^4 个/孔),培养 24 h 后,完全培养基换液并加入淫羊藿苷,其浓度为 100、80、60、30、15、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,孵箱内培养 24 h 后,采用细胞增殖与毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8,CCK-8)法检测细胞活力。

1.3.5 药物处理及指标检测

根据“1.3.4”实验结果选取淫羊藿苷适宜受试浓度。实验分组如下:空白组(control,Con)、模型组(LPS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Mod)、淫羊藿苷高剂量组(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LPS,ICA-30)、淫羊藿苷低剂量组(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LPS,ICA-15)。

于 6 孔板内,放置细胞爬片,接种 BV-2 细胞,培养 24 h 后,完全培养基换液每组分别加入相应浓度的淫羊藿苷或 LPS,孵箱内培养 48 h 后,收集各组细胞爬片,多聚甲醛固定 30 min。用 0.1% Triton X-100 处理 20 min,然后在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min。将细胞与 iNOS 抗体或 CD206 抗体孵

育 4 °C 过夜。用冰冷的 PBS 洗涤三次后,将细胞与二抗体在室温下孵育 1 h。三次洗涤后,细胞核用 DAPI 在 37 °C 下复染 10 min。荧光显微镜观察不同的小胶质细胞状态标记。

1.3.6 数据处理

采用 GraphPad Prism 8 对每组数据进行统计学分析,分析结果均以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验数据采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 淫羊藿苷对抑郁症小鼠抑郁样行为的影响

与空白组相比较,模型组小鼠的运动距离显著缩短($P < 0.01$),糖水消耗明显减少($P < 0.01$),强迫游泳不动时间明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,盐酸氟西汀、淫羊藿苷高剂量可增加模型小鼠的运动距离($P < 0.01$)和糖水消耗量($P < 0.01$),降低模型小鼠游泳不动时间($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);淫羊藿苷低剂量可增加小鼠的运动距离($P < 0.01$),降低模型小鼠游泳不动时间($P < 0.05$),有增加模型小鼠糖水消耗的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见图 1。

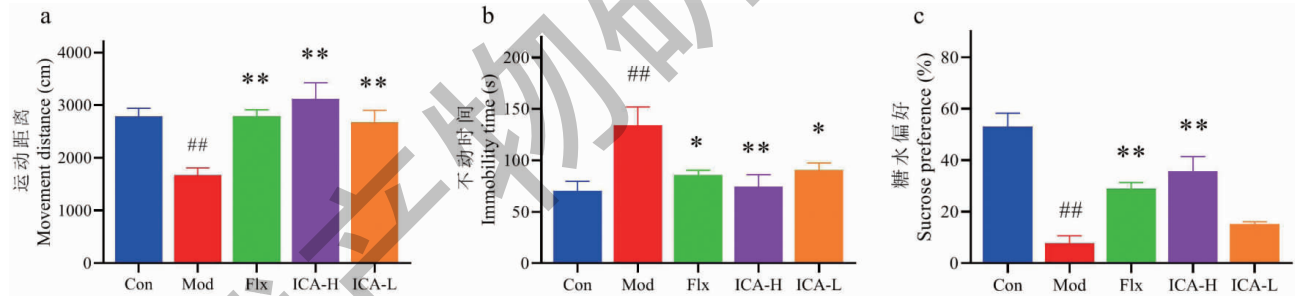


图 1 淫羊藿苷对抑郁症小鼠抑郁样行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of icariin on depression-like behaviors of depression model mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,下同。Note:Compared with Con,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$.

Compared with Mod,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,the same below.

2.2 淫羊藿苷对抑郁症小鼠脑组织单胺类神经递质的影响

与空白组相比较,模型组小鼠脑组织单胺类神经递质 5-HT、DA、NA 水平显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组相比较,盐酸氟西汀可增加模型小鼠的脑组织 5-HT 水平($P < 0.01$)和 NE 水平($P < 0.05$),有增加 DA 水平的趋势;淫羊藿苷高剂量可增加小鼠单胺类神经递质 5-HT、DA、NA 水平($P < 0.05$),淫羊藿苷低剂量有增加模型小鼠单胺类神经递质水平的趋势,但差异无统计学意义($P >$

0.05),结果见图 2。

2.3 淫羊藿苷对抑郁症小鼠脑组织 IL-6、IL-10 水平及海马区 IL-6、IL-10 mRNA 的影响

与空白组相比较,模型组小鼠脑组织 IL-6 水平、IL-6 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$),但 IL-10 水平、IL-10 mRNA 表达仅有升高的趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组相比较,盐酸氟西汀可降低模型小鼠的脑组织 IL-6 水平和 IL-6 mRNA 表达($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),有增加 IL-10 水平、IL-10mRNA 表达的趋势,但差异无统计学意义($P >$

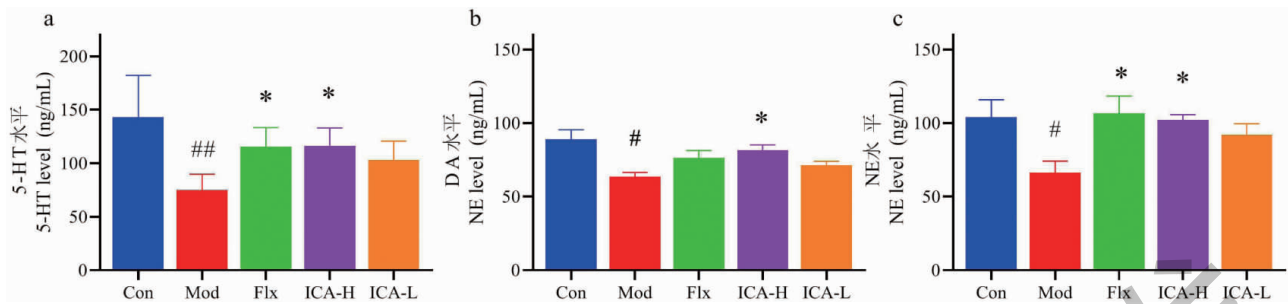


图2 淫羊藿苷对抑郁症小鼠脑组织单胺类神经递质的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of icariin on brain monoamine neurotransmitters of depression model mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

>0.05);淫羊藿苷高、低剂量可降低 IL-6 水平、IL-6 mRNA 表达($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),增加小鼠脑组织

IL-10 水平、IL-10 mRNA 表达($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),结果见图3。

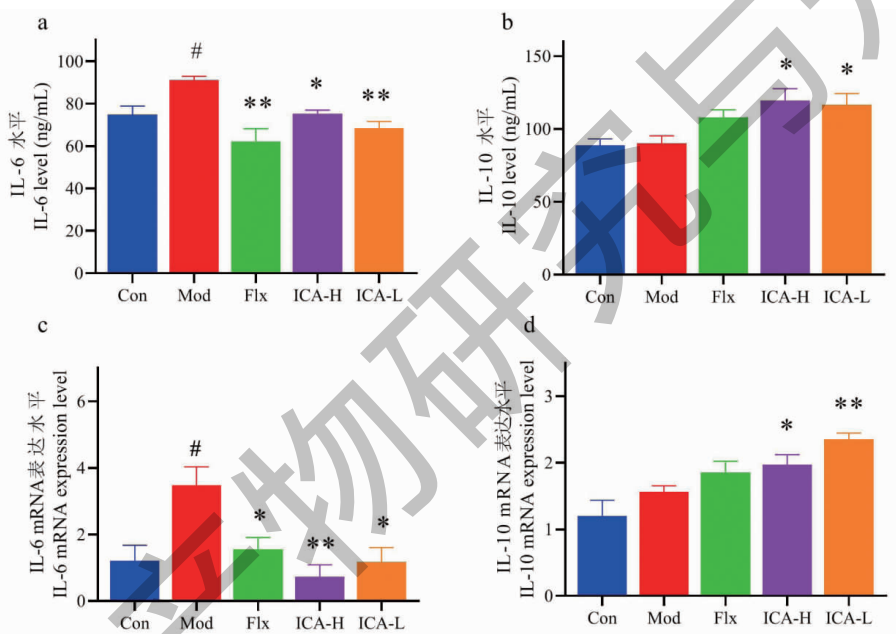


图3 淫羊藿苷对抑郁症小鼠脑组织 IL-6、IL-10 水平及海马区 IL-6、IL-10 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of icariin on brain IL-6 and IL-10 levels and expression of IL-6 and IL-10 mRNA of depression model mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4 淫羊藿苷对抑郁症小鼠海马区小胶质细胞表型转化的影响

与空白组相比较,模型组小鼠脑组织 iNOS 蛋白相对表达量显著升高($P < 0.05$),CD206 蛋白相对表达量仅有升高的趋势。与模型组相比较,盐酸氟西汀可降低模型小鼠的脑组织 iNOS 蛋白相对表达量和 iNOS mRNA 表达($P < 0.01$);淫羊藿苷高剂量可降低 iNOS 蛋白相对表达量($P < 0.01$),并促进 CD206 mRNA 表达($P < 0.01$);淫羊藿苷低剂量可降低小鼠脑组织 iNOS 蛋白相对表达量和 iNOS mRNA 表达($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),升高小鼠脑组织

CD206 蛋白相对表达量和 CD206 mRNA 表达($P < 0.05$),结果见图4。

2.5 淫羊藿苷对小胶质细胞(BV-2)表型转化的影响

根据细胞活力实验,选取淫羊藿苷高、低剂量(30、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为适宜的受试浓度;与空白组相比较,模型组细胞 iNOS 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),CD206 蛋白表达仅有升高的趋势。与模型组相比较,淫羊藿苷高、低剂量可降低 iNOS 蛋白表达($P < 0.01$),并促进 CD206 蛋白表达($P < 0.01$)结果见图5。

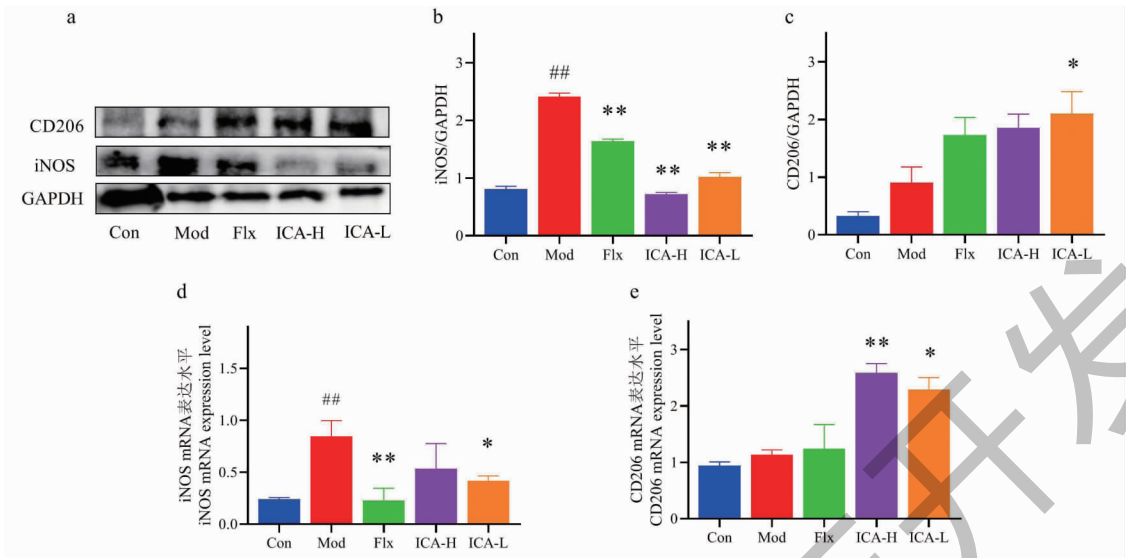


图4 淫羊藿苷对抑郁症小鼠海马区小胶质细胞表型转化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of icariin on microglia phenotypic transformation of depression model mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

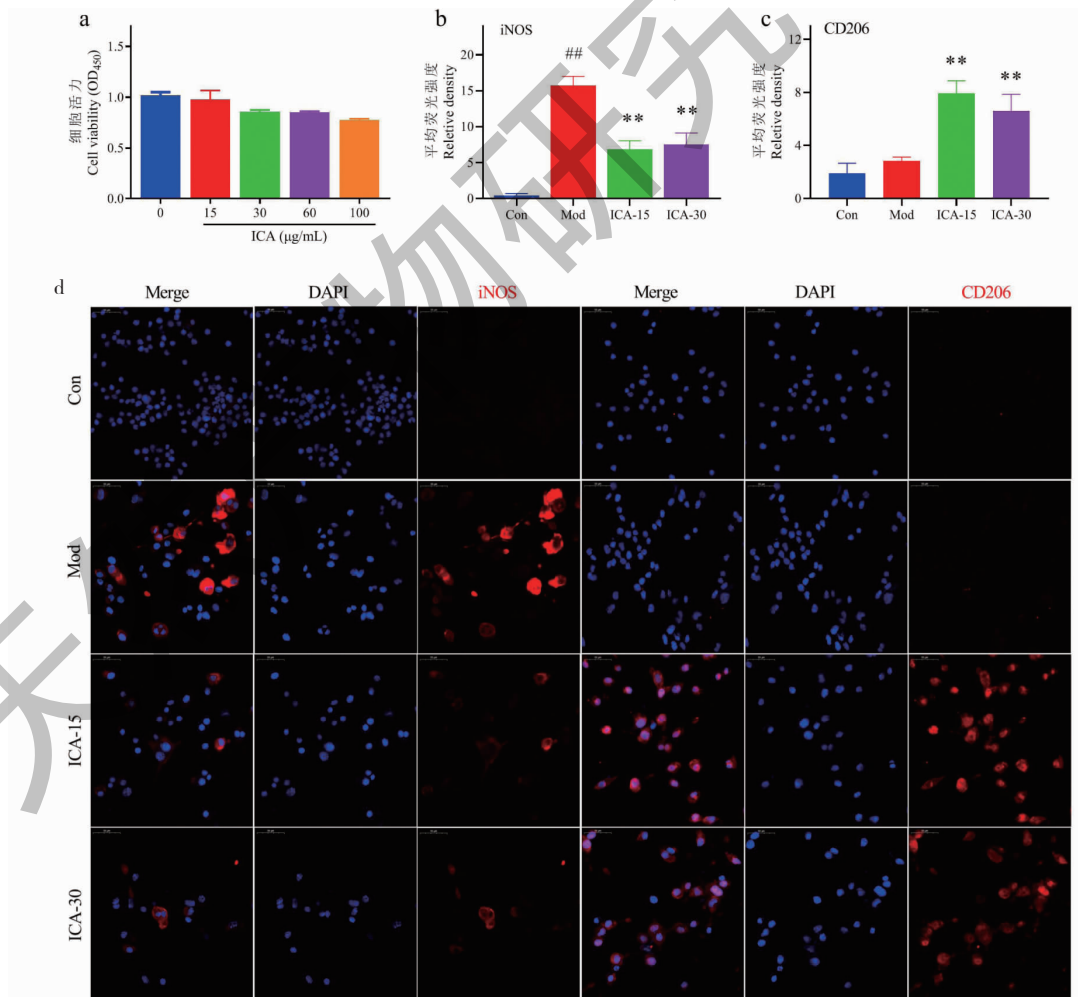


图5 淫羊藿苷对LPS刺激的小胶质细胞(BV-2)表型转化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of icariin on microglia phenotypic transformation in LPS-exposed BV-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

抑郁症是严重的精神疾患,因发病机制复杂,尚缺乏理想的治疗方法。中医药在治疗抑郁症方面具有自身特色和优势^[14]。目前,抑郁症发病机制尚不完全清楚,目前形成的假说主要有:炎症免疫假说,下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴功能紊乱假说,单胺类神经递质假说,神经营养因子假说等^[15,16]。随着研究的深入,炎症免疫假说受到国内外广泛关注^[17]。研究表明,抑郁症患者体内不仅存在外周炎症反应,还存在中枢神经系统的免疫激活^[18]。小胶质细胞是中枢神经系统中重要的一种免疫细胞,与中枢神经系统炎症反应密切相关,长期应激状态下,其结构和功能异常,导致情绪和精神状态等变化,是抑郁症发生发展的重要因素^[19,20]。

经典激活型(M1型)以及替代激活型(M2型)是小胶质细胞的两种主要的极化表型^[18,21,22]。M1型占活化细胞的绝大部分,可合成与分泌促炎介质TNF- α 、IL-1、IL-6和一氧化氮合酶iNOS等,引发免疫炎症级联反应;M2型(三种亚型M2a型、M2b免疫表型、M2c失活性表型)可被白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素13(interleukin-13, IL-13)等刺激产生,释放抗炎因子IL-10和CD206等,发挥抑制炎症反应及神经保护功能,在大脑神经修复和可塑性中起着重要作用^[23]。动物实验研究表明,暴露于CUMS的小鼠和大鼠前额叶皮层中的小胶质细胞高度激活并伴随着相关炎症介质的高表达,此类炎症介质可导致与抑郁症相关的炎症相关神经元变性^[24,25]。一项尸检结果表明,重度抑郁症患者前扣带皮质区及腹侧前额叶白质区小胶质细胞密度显著增加呈现激活状态,但M2型小胶质细胞典型标志物CD206显著下调^[26]。上述研究提示,小胶质细胞过度活化,M1型和M2型小胶质细胞极化状态在抑郁症的发生发展中起重要作用。

本研究发现,在CUMS致抑郁症小鼠海马区,促炎细胞因子IL-6水平升高,IL-6 mRNA、iNOS mRNA和iNOS蛋白过度表达并伴随着抑郁样行为的增加(强迫游泳不动时间增加,糖水消耗、运动距离减少),提示抑郁症小鼠海马区经典激活型M1型小胶质细胞显著增加。淫羊藿苷一方面可抑制小胶质细胞M1型激活,减少促炎细胞因子IL-6水平,降低IL-6 mRNA、iNOS mRNA和iNOS蛋白过度表达,抑制模型小鼠大脑炎症反应;另一方面,淫羊藿苷可促

进小胶质细胞M2型激活,增加CUMS暴露小鼠海马区IL-10水平,促进IL-10 mRNA、CD206 mRNA和CD206蛋白表达,从而抑制模型小鼠的抑郁样行为。体外实验也表明,在LPS刺激下,小胶质细胞M1型极化增加,淫羊藿苷可抑制小胶质细胞M1型极化,并促进M2型极化。这提示,淫羊藿苷通过调节小胶质细胞表型转化来减轻过度的神经炎症。

单胺类神经递质5-HT、DA、NE代谢紊乱与抑郁症等神经精神疾病的发生发展密切相关^[27]。CUMS致抑郁症模型大鼠大脑单胺类神经递质5-HT、DA、NE水平显著减少,地黄可降低模型大鼠海马区5-HT、DA和NE水平,改善抑郁症大鼠的抑郁样行为^[28]。丹参多酚酸能有效改善大鼠抑郁样行为,可能通过抑制非受体酪氨酸蛋白激酶2(Janus kinase 2)/信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)信号通路,减轻神经炎症,调节单胺类神经递质水平^[29]。越来越多的证据开始表明,与压力相关的情绪可能通过影响单胺氧化酶的活性,激活初级免疫细胞-小胶质细胞。活化的小胶质细胞诱导许多炎症因子白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、TNF- α 、TGF- β 等的释放,这些炎症因子可影响单胺类神经元的功能,通过氧化应激诱导单胺能神经传递减少,被认为是抑郁症的重要因素。已证实,单胺能药物可阻断小胶质细胞的激活,并以某种方式逆转抑郁症^[30]。研究发现,四氢生物喋呤(tetrahydrobiopterin, BH4)作为抑郁症公认的标志物,是合成5-HT、DA和NE所需的关键酶促辅因子^[31],BH4缺失可能会导致抑郁。M1型小胶质细胞可能会导致BH4分解代谢^[32],抑制小胶质细胞M1极化可限制BH4的分解代谢,促进单胺类神经递质的合成和分泌^[33]。本研究结果显示,CUMS致小鼠抑郁模型大鼠海马区单胺类神经递质减少伴随着小鼠抑郁样行为的增加,淫羊藿苷可增加模型小鼠海马区单胺类神经递质的水平,可能是淫羊藿苷抗抑郁的作用机制之一,与之前的报道一致。但淫羊藿苷是否通过调控小胶质细胞表型转化,促进抑郁模型小鼠海马区单胺类神经递质合成和分泌,仍有待深入研究。

综上所述,本研究采用CUMS建立抑郁症小鼠模型和LPS诱导的小胶质细胞极化模型,发现补肾阳中药淫羊藿活性成分淫羊藿苷抑制小胶质细胞M1型极化、促进M2型极化,减轻抑郁小鼠海马区炎症反应,促进单胺类神经递质的产生是其抗抑郁

的作用机制之一。

参考文献

- Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. *Lancet*, 2018, 392: 2299-2312.
- Jha MK, Mathew SJ. Pharmacotherapies for treatment-resistant depression; how antipsychotics fit in the rapidly evolving therapeutic landscape [J]. *Am J Psychiatry*, 2023, 180: 190-199.
- Harmer CJ, Duman RS, Cowen PJ. How do antidepressants work? new perspectives for refining future treatment approaches [J]. *Lancet Psychiatry*, 2017, 4: 409-418.
- Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation; double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 22; 107: 234-256.
- Kalkman HO, Feuerbach D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163: 82-93.
- Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, et al. Microglia states and nomenclature; a field at its crossroads [J]. *Neuron*, 2022, 110: 3458-3483.
- Wang Y, Wan TF, Duan CM, et al. Sirt1 ameliorates chronic mild unpredictable stress-induced depression-like behaviors in mice by promoting hippocampal microglia M2 polarization [J]. *J Third Mil Med Univ (第三军医大学学报)*, 2019, 41: 1301-1307.
- Xie L, Zhang P, Luo R, et al. Basic research of prescription for warming and recuperating the kidney-yang in treating trismania on basis of kidney is Yuan yang's essence [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2011, 26: 1130-1134.
- Chen S, Gu CJ, Tang C, et al. Application of state-target syndrome differentiation in depression of yang, deficiency of spleen and kidney type-sini decoction with Xianmao (*Festuca arundinacea*), Yinyanghuo (*Epimedium brevicornum*) and Bajitian (*Morinda officinalis*) [J]. *Liaoning J Tradit Chin (辽宁中医杂志)*, 2020, 47: 4-6.
- Lin JR, Tang S, Liu HF. Experience of epimedium herb, ginseng and prepared common monkshood branched root in treating sun deficiency depression—collection of three prescriptions by professor TONG Xiaolin [J]. *Jilin J Chin Med (吉林中医药)*, 2020, 40: 296-298.
- Cao LH, Qiao JY, Huang HY, et al. PI3K-AKT signaling activation and icariin; the potential effects on the perimenopausal depression-like rat model [J]. *Molecules*, 2019, 24: 3700.
- Cao LH, Yang X, Zhao YY, et al. Effect of Rhizoma Phragmitis on chronic bronchitis based on network pharmacology and its mechanism [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2021, 37: 96-103.
- Cao LH, Zhao YY, Miao JX, et al. Effect of fresh phragmitis rhizoma on airway inflammation in chronic bronchitis based on TGF- β signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 5887-5894.
- Song ZG, Zhou XQ, Yan DM, et al. Research progress on effective components and mechanisms of anti-depressive Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2022, 47: 1184-1189.
- Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation; double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107: 234-256.
- Tartt AN, Mariani MB, Hen R, et al. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression; pathogenesis and therapeutic implications [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27: 2689-2699.
- Berk M, Williams LJ, Jacka FN, et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? [J]. *BMC Med*, 2013, 11: 200.
- Cao LH, Wang XY, Wang ZZ, et al. Discussion on the essence of theory of 'kidney-brain connection' based on mechanism of tonifying kidney yang Chinese herbs in preventing and treating depression [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2022, 37: 6889-6894.
- Li JM, Jiang CL. Role of microglia in pathogenesis of depression; an update [J]. *Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报)*, 2018, 39: 780-783.
- Wang H, He Y, Sun Z, Ren S, Liu M, Wang G, Yang J. Microglia in depression; an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19: 132.
- Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38: 637-658.
- Jia XN, Gao ZH, Hu HL. Microglia in depression; current perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 911-925.
- Cao LH, Zhao YY, Bai M, et al. Mechanistic studies of gypenosides in microglial state transition and its implications in depression-Like behaviors; role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 838261.
- Arioz BI, Tastan B, Tarakcioglu E, et al. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-Like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1511.
- Cardinal P, Monchaux de Oliveira C, et al. A new experimental design to study inflammation-related versus non-inflammation-related depression in mice [J]. *J Neuroinflammation*,

- 2021, 18:290.
- 26 Ohgidani M, Kato TA, Haraguchi Y, et al. Microglial CD206 gene has potential as a state marker of bipolar disorder[J]. *Front Immunol*, 2017, 7:676.
- 27 Jiang N, Xu XY, Yu MY, et al. Study on anti-depressive effect and mechanism of swertisin[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:129-134.
- 28 Tian P, Zhang W, Li KY, et al. Effect of rehmanniae radix on depression-like behavior and hippocampal monoamine neurotransmitters of chronic unpredictable mild stress model rats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47:4691-4697.
- 29 Zhao YN, Cao LJ. Therapeutic effect and mechanism of salivianic acid on depression rat model[J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2023, 39:1768-1772.
- 30 Hodes GE, Kana V, Menard C, et al. Neuroimmune mechanisms of depression[J]. *Nat Neurosci*, 2015; 18:1386-1393.
- 31 Vancassel S, Fanet H, Castanon N, et al. Tetrahydrobiopterin modulates the behavioral neuroinflammatory response to an LPS challenge in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 105:139-148.
- 32 Celik C, Erdem M, Cayci T, et al. The association between serum levels of neopterin and number of depressive episodes of major depression[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010, 34:372-375.
- 33 Kalkman HO, Feuerbach D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163:82-93.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		