

参味宁郁片对慢性束缚应激大鼠海马TLR4/MyD88信号通路介导免疫炎症的影响

姜会梨¹, 王雅欣², 图娅^{1,3}, 曾美桦⁴, 曾锦标⁴, 崔晓兰², 李亚欢^{1,3},
高兴州^{1,3}, 孙阳^{1,3}, 郭珊珊^{2*}

(1. 北京中医药大学 针灸推拿学院, 北京 100029; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 北京中医药大学 国际精神疾患研究中心, 北京 100029;
4. 广东思济药业有限公司, 广东 汕头 515041)

【摘要】目的:探究治疗抑郁症中药新药参味宁郁片对抑郁模型大鼠行为学及海马Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路介导免疫炎症的影响。**方法:**将44只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、艾司西酞普兰组和参味宁郁片组。除正常组外,其余各组大鼠均采用慢性束缚应激(CRS)结合孤养建立抑郁症模型、持续接受21 d CRS刺激;艾司西酞普兰组每日在CRS应激前1 h给予艾司西酞普兰($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃给药;参味宁郁片组每日在CRS应激前1 h给予参味宁郁片($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃干预。实验前、后通过体质量变化、糖水实验、旷场实验测试,观察各组大鼠体质量、糖水偏好指数、水平运动评分、垂直运动评分变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马TLR4、MyD88蛋白表达水平,应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清炎症因子白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量变化。**结果:**行为学结果显示,实验前,各组大鼠行为学基线水平具有一致性、各组均值差异无统计学意义。随着时间推移应激负荷增加,与正常组比较,模型组大鼠在接受CRS应激21 d后体质量、糖水偏好指数、水平运动评分和垂直运动评分均显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组大鼠体质量、糖水偏好指数、水平运动评分和垂直运动评分均显著升高($P < 0.01$),参味宁郁片表现出明显的抗抑郁效应;Western blot和ELISA结果显示,与正常组比较,模型组大鼠海马TLR4、MyD88蛋白及血清炎症因子IL- 1β , TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$),血清IL-10含量降低($P < 0.01$),而与模型组比较,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组有效逆转了应激诱导的海马TLR4、MyD88蛋白及血清炎症因子IL- 1β 含量显著升高、血清IL-10含量降低情况,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**治疗抑郁症中药新药参味宁郁片对慢性应激诱导抑郁模型的抗抑郁作用可能是通过抑制海马TLR4/MyD88信号通路介导的免疫炎症反应途径有关。

【关键词】 抑郁症; 慢性束缚应激(CRS); 免疫炎症反应; Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路; 参味宁郁片

【中图分类号】 R2-0;R22;R285.5;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)15-0008-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20211405

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210601.1525.006.html>

【网络出版日期】 2021-06-02 11:16

Effect of Shenwei Ningyu Pills on Immunoinflammatory Response Mediated by TLR4/MyD88 Signaling Pathway in Hippocampus of Rats Exposed to Chronic Restraint Stress

JIANG Hui-li¹, WANG Ya-xin², TU Ya^{1,3}, ZENG Mei-hua⁴, ZENG Jin-biao⁴, CUI Xiao-lan²,
LI Ya-huan^{1,3}, GAO Xing-zhou^{1,3}, SUN Yang^{1,3}, GUO Shan-shan^{2*}

(1. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. International Research Center for Mental Disorders, Beijing University of Chinese

【收稿日期】 20210324(011)

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09301-005)

【第一作者】 姜会梨,博士,讲师,从事针刺抗抑郁临床与机制研究,Tel:010-53912190,E-mail:756637117@qq.com

【通信作者】 *郭珊珊,博士,研究员,从事中药抗病毒药理学研究,Tel:010-84252805-4102,E-mail:ssguo@icmm.ac.cn

Medicine, Beijing 100029, China; 4. Guangdong Siji Pharmaceutical Co. Ltd., Shantou 515041, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Shenwei Ningyu pills (SNP), a new Chinese medicine for depression, on the immunoinflammatory response mediated by Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signaling pathway in the hippocampus of rats exposed to chronic restraint stress (CRS). **Method:** Forty-four male Sprague Dawley rats were randomly enrolled into a normal group, a model group, an escitalopram group, and an SNP group. Except for the rats in the normal group, all rats were exposed to CRS and isolated rearing for 21 days continuously. Rats in the escitalopram group and the SNP group were administered with escitalopram ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and SNP ($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) one hour prior to CRS, respectively. The changes in body weight, sucrose preference index, horizontal movement scores, and vertical movement scores were observed by body weight assessment, sucrose preference test, and open field test. The expression of hippocampal TLR4 and MyD88 was detected by Western blot. The content of serum interleukin- 1β (IL- 1β), IL-10, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The results of the behavioral assessment showed that there was no significant difference in the changes of behavioral baselines among the groups before intervention. However, significant differences were found among the groups following different interventions. The body weight, sugar preference index, horizontal movement score, and vertical movement score of rats in the model group decreased after CRS for 21 days as compared with those in the normal group ($P < 0.01$). The above indicators in the SNP group and the escitalopram group were higher than those in the model group ($P < 0.01$), which indicated that SNP exerted an obvious antidepressant effect. The results of Western blot and ELISA showed that compared with the normal group, the model group showed elevated levels of hippocampal TLR4 and MyD88 and serum IL- 1β and TNF- α ($P < 0.01$) and dwindled serum IL-10 ($P < 0.01$), while SNP and escitalopram reversed the conditions in the model group ($P < 0.01$) except for TNF- α . **Conclusion:** The present study indicated that the antidepressant effect of SNP was presumably achieved by inhibiting the immunoinflammatory response mediated by the TLR4/Myd88 signaling pathway in CRS rats.

[Keywords] depression; chronic restraint stress (CRS); immunoinflammatory response; Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signaling pathway; Shenwei Ningyu pills

抑郁症是一种以情绪低落、兴趣丧失、易疲劳为主要特征的临床常见精神障碍性疾病^[1-3],是非致命性健康损失最大的独立因素,给人类社会造成沉重的疾病负担^[4-5]。目前,临床上针对中重度抑郁症主要应用包括帕罗西汀、氟西汀、舍曲林等选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)进行治疗^[6],但存在起效慢、应答率低^[7-9],且伴有诸如恶心、体质量增加、性功能减退等明显不良反应,限制了患者的治疗依从性^[10]。可见,多角度阐明抑郁症的病理机制、寻找更有效的抗抑郁新方法亟待解决。

当今,抑郁症的确切病因及病理机制研究仍然缺乏重大突破。抑郁症发病机制涉及遗传、人格及社会环境等多方面因素,虽然从单胺类神经递质紊乱、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能失调、神经可塑性损伤等方面揭示了抑郁症潜在的发生发展机制,但尚无确切定论。目前,应激诱导中枢/外周免

疫系统激活、炎性反应增强,为抑郁症病理机制和防治策略研究提供了新的视角,这也是抑郁症病理机制细胞因子假说的重要内容。研究显示,抑郁症的发生可能与免疫激活导致炎症反应增强、细胞因子分泌增多有关。中枢神经系统免疫/炎症反应激活过程中,小胶质细胞的激活是其特征性表现,持续活化的小胶质细胞诱导多种炎性细胞因子释放,进而诱导细胞凋亡,参与抑郁症病理过程。其中,Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路介导免疫炎症反应在抑郁症病理过程中的作用逐渐受到关注。研究显示,应激导致TLR4/MyD88信号通路激活可刺激其他促炎性细胞因子的释放,包括白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,可通过体液和神经环路转运至大脑,从而参与抑郁症的病理过程。临床研究显示,抑郁症患者外周血单

核细胞表达更高水平的TLR4^[11]。而治疗后TLR4的高表达水平得到逆转,抑郁症状得到改善。可见,TLR4活性直接参与了抑郁症的病理生理过程^[12-13],提示这些抑郁样行为改变的内在机制可能是由特定的细胞因子依赖性信号级联驱动而导致的^[14-15]。另外,尸检研究发现,自杀患者脑组织中免疫反应和TLR4表达水平的变化具有显著性^[16],同时,在之前的随访研究中,随访期间自杀的患者对自杀性的汉密尔顿抑郁评分量表评分具有显著更高的评分^[17]。可见,基于模式识别受体TLR4信号通路的异常可能是抑郁症病理过程的关键环节。

参味宁郁片为2005年获得中华人民共和国国家药品监督管理局(CFDA)临床研究批件的抗抑郁新药(批件号2005L02629),他为国内第一个批准进入临床试验的用于治疗抑郁症的纯中药复方制剂(6.1类)独家专利品种(专利号ZL031531040)。参味宁郁片主要由郁金、酸枣仁、西洋参、五味子组成,诸药配伍可益气养心、宁神解郁,主要用于抑郁症气阴两虚证的治疗,前期Ⅱ期临床试验和Ⅲ期临床试验结果显示,在治疗抑郁症方面疗效确切,具有较好的安全性和有效性^[18]。而参味宁郁片是否通过调节TLR4/MyD88信号通路介导的免疫炎症反应而发挥抗抑郁效应尚不清楚。因此,本研究采用孤养结合慢性束缚应激(CRS)抑郁模型大鼠,探究治疗抑郁症中药新药—参味宁郁片对CRS大鼠行为学及海马TLR4/MyD88信号通路介导免疫炎症的影响,以期为抑郁症的临床防治提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 纳入6周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量200~220 g。实验动物由北京维通利华公司实验动物中心提供,合格证号SCXK(京)2012-0001。动物实验所有操作过程均在北京中医药大学清洁级动物实验室进行,并通过动物伦理审查(批号Kj-dw-18-20151111)。本实验中的所有操作过程均遵循美国国立卫生研究院(NIH)倡导的实验动物关怀和使用指导原则和以减少(Reduction),替代(Replacement)和优化(Refinement)为核心的动物实验“3R”原则,大鼠自由摄食饮水,光照控制实验室昼夜交替,室温18~26℃,湿度55%±2%。

1.2 药物 草酸艾司西酞普兰(西安杨森制药有限公司分装,10 mg/片,批号150527269);参味宁郁片(广东思济药业有限公司,0.62 g/片,批号190101)。

1.3 试剂 蔗糖(美国Sigma-Aldrich公司,

500 g/瓶,批号S9378);大鼠IL-1 β ,IL-10,TNF- α 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号分别为20180112,20180112,20180112);BCA蛋白试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号02912E);兔抗TLR4,MyD88,IL-1 β 抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab32127,ab22048,ab16502);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号TA-09);ECL显色液(美国Millipore公司,批号WBKLS0500);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(美国Jackson公司,批号111-035-003)。

1.4 仪器 ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);BioSens SC 810B型凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司);WFZUV-2000型紫外-可见光分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);DYY-6C型电泳仪电源(北京市六一仪器厂);1658000型小型垂直电泳槽、转膜槽(美国Bio-Rad公司);Beckman Allgre 21R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司)。

2 方法

2.1 动物分组 采用随机数字表将大鼠分为正常组、模型组、艾司西酞普兰组和参味宁郁片组,每组11只,共44只,最终纳入本研究机制研究共32只大鼠。除正常组外,各组均采用孤养结合CRS制备抑郁症模型,持续21 d。正常组为正常大鼠,每笼4只群养,自由摄食、饮水;模型组大鼠采用CRS结合孤养模拟抑郁症模型;艾司西酞普兰组每日在CRS应激前1 h进行艾司西酞普兰(30 mg·kg⁻¹)灌胃给药干预,每日1次;参味宁郁片组每日在CRS应激前1 h进行参味宁郁片(18 mg·kg⁻¹)灌胃干预,每日1次。

2.2 造模方法 采用国际公认的CRS方法模拟抑郁症模型^[19-20]。每日上午9:00~下午3:00应用CRS装置将大鼠置于软铁丝束缚网筒内6 h,束缚期间保持大鼠呼吸通畅,连续束缚21 d,束缚期间,禁食禁水,束缚结束后,将大鼠放回鼠笼中,自由摄食、饮水。

2.3 给药剂量及方法 本研究主要干预药物参味宁郁片为中成药分散片,根据成人用药剂量与大鼠用药计量转换,大鼠用药剂量为18 mg·kg⁻¹·d⁻¹。将参味宁郁片片剂碾成粉末状,然后将其用生理盐水配成溶混悬液(31 g·L⁻¹),按10 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,CRS前1 h进行灌胃给药,每日1次,持续21 d。

本研究采用治疗抑郁症临床一线用药草酸艾司西酞普兰作为阳性药来对比参味宁郁片的抗抑

郁效应^[21-22]。将艾斯西酞普兰片剂碾成粉末状,然后将其溶解于经过高压蒸汽灭菌的生理盐水中配成溶液($0.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药,CRS前1 h进行灌胃给药,剂量为 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,持续21 d。

2.4 行为学观察

2.4.1 体质量监测 分别于第0天(实验开始前1 d)和第21天对大鼠进行体质量监测,比较不同时间点各组大鼠体质量变化。

2.4.2 糖水偏好实验 在实验开始前,训练所有大鼠使其适应含1%蔗糖饮水。别于实验开始前1 d(第0天)和第21天进行糖水实验^[19],然后计算大鼠的糖水偏好指数,糖水偏好指数=(糖水消耗/总液体消耗) $\times 100\%$,比较分析各组大鼠在不同时间点糖水偏好指数的差异。

2.4.3 旷场实验 旷场实验开始前确保室内隔音且保持安静状态。将大鼠放置于旷场实验箱底面的正中央方格内,然后开始记录大鼠在3 min内的探究行为、活动频率和运动情况。以大鼠双后肢穿越旷场箱底面的正方形块数为水平穿越格数(四爪均进入方格方可计数,得分为大鼠的水平穿越格数计为水平运动评分1分;以双前肢离开旷场箱底面的直立数为垂直竖立次数,大鼠两前爪腾空或攀附侧壁,得分为垂直竖立次数计为垂直运动评分1分。分别于第0天(实验开始前1 d)和第21天进行测试,比较分析各组大鼠在不同时间点旷场实验测试的水平穿越格数和垂直竖立次数的差异^[19]。

2.5 指标检测

2.5.1 取材方法 各组大鼠大鼠造模与给药结束后,大鼠经10%水合氯醛($3.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,然后断头取血5 mL的同时,迅速将大鼠头移至冰上,快速剥离,取出海马,4℃磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后装入冻存管,迅速置于液氮中,然后移入-80℃保存备用,5只大鼠用于海马蛋白免疫印迹法(Western blot)检测;所取血室温静置2 h后,4℃条件下 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径6.6 cm),分离血清,分装后移入-80℃保存备用,8只大鼠血清用于ELISA检测IL-1 β ,IL-10和TNF- α 含量。

2.5.2 Western blot检测海马TLR4和MyD88蛋白表达 检测前从-80℃冰箱取出冻存的海马组织,然后进行蛋白提取;采用BCA法进行蛋白浓度测定,完成BCA法蛋白定量后对蛋白浓度调整,采用RIPA调整蛋白浓度,样品终质量浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,待

检测蛋白样品上样量为 $32\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$;然后进行电泳,浓缩胶恒压90 V,约20 min,分离胶恒压120 V,通过预染蛋白Marker来确定电泳停止时间;湿转法转膜,300 mA恒流; $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 孔径PVDF膜,转膜时间150 min。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色;将膜完全浸没于5% BSA-TBST中,水平摇床孵育1 h;然后进行一抗孵育(1:1 000),5% BSA-TBST稀释一抗,4℃水平摇床孵育过夜;TBST洗膜3次然后进行二抗孵育(1:1 000),室温孵育40 min;TBST洗膜3次后将ECL滴加到膜的蛋白面,反应3 min;胶片曝光,显影2 min,定影。对曝光后胶片进行图片扫描,使用Gel Image Ststem Ver 4.00软件对图像进行灰度分析,结果用目标条带灰度值/ β -actin灰度值表示校正误差。

2.5.3 ELISA检测血清IL-1 β ,IL-10和TNF- α 含量

采用ELISA法测不同组别血清IL-1 β ,IL-10和TNF- α 含量,所有操作根据试剂盒检测流程进行。检测终止反应后,立即使用酶标仪在450 nm处读取吸光度 A ,比较不同组别血清IL-1 β ,IL-10和TNF- α 含量。

2.6 统计学分析 采用SPSS 22.0进行实验数据统计,实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据进行正态性检验,各组资料方差齐用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)或SNK;若方差不齐,用非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CRS大鼠体质量的影响 实验前(第0天)各组大鼠体质量基线水平具有一致性、各组均值差异无统计学意义。随着时间变化,与正常组比较,模型组大鼠在接受CRS结合孤养刺激21 d后体质量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组体质量在21 d显著升高($P<0.01$),提示参味宁郁片可在一定程度改善CRS大鼠的体质量降低。见表1。

3.2 对CRS大鼠糖水偏好指数的影响 实验前(第0天),各组大鼠糖水偏好指数差异无统计学意义。随着时间变化,与正常组比较,模型组大鼠在接受CRS应激21 d后糖水偏好指数显著降低($P<0.01$),表现出明显的快感缺乏症状;与模型组比较,参味宁郁片和艾司西酞普兰干预在第21天表现出逆转效应,糖水偏好指数显著升高($P<0.01$),提示参味宁郁片可显著改善CRS大鼠快感缺乏行为。见表2。

3.3 对CRS大鼠旷场实验中水平运动评分的影响 实验前(第0天)各组大鼠水平运动评分差异无统

表1 参味宁郁片对CRS大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=11$)

Table 1 Effect of Shenwei Ningyu pills on body weight of CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=11$) g

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第0天	第21天
正常		220.091±0.782	425.027±10.589
模型		221.582±6.143	373.682±8.284 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	220.245±1.951	402.364±8.378 ²⁾
参味宁郁片	18	220.162±0.763	412.035±7.613 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与艾司西酞普兰组比较³⁾ $P<0.01$ (表2~6同)。

表2 参味宁郁片对CRS大鼠糖水偏好指数的影响($\bar{x}\pm s, n=11$)

Table 2 Effect of Shenwei Ningyu pills on sucrose preference index CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=11$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第0天	第21天
正常		74.012±1.744	70.341±3.405
模型		74.056±4.190	35.320±6.084 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	73.897±2.352	69.699±3.573 ²⁾
参味宁郁片	18	74.096±1.876	69.801±4.137 ²⁾

计学意义。随着时间变化,与正常组比较,模型组大鼠在接受CRS应激21 d后水平运动评分显著降低($P<0.01$),自发活动和探究行为明显受到抑制;与模型组比较,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组水平运动评分在第21天显著升高($P<0.01$),提示参味宁郁片可有效改善CRS大鼠自发活动和探究行为抑制情况。见表3。

表3 参味宁郁片对CRS大鼠旷场实验中水平运动评分的影响($\bar{x}\pm s, n=11$)

Table 3 Effect of Shenwei Ningyu pills on horizontal motion scores in open field test of CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=11$) 分

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第0天	第21天
正常		42.455±2.464	39.909±1.921
模型		42.545±3.174	5.091±1.044 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	42.636±6.281	38.273±1.679 ²⁾
参味宁郁片	18	41.964±1.694	39.216±1.525 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ 。

3.4 对CRS大鼠旷场实验中垂直运动评分的影响

实验前(第0天)各组大鼠垂直运动评分差异无统计学意义。与正常组比较,模型组大鼠在CRS应激21 d后垂直运动评分显著降低($P<0.01$);与模型组比较,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组垂直运动评分在第21天显著升高($P<0.01$),提示参味宁郁片可

有效逆转CRS大鼠自发活动和探究行为抑制状况。见表4。

表4 参味宁郁片对CRS大鼠旷场实验中垂直运动评分的影响($\bar{x}\pm s, n=11$)

Table 4 Effect of Shenwei Ningyu pills on vertical motion scores in open field test of CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=11$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	第0天	第21天
正常		13.455±1.293	10.909±1.375
模型		11.818±2.183	2.455±1.036 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	13.364±1.690	8.364±1.433 ²⁾
参味宁郁片	18	12.963±2.147	7.645±1.331 ²⁾

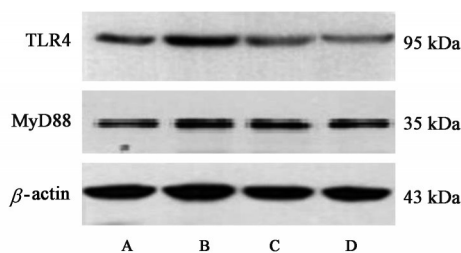
3.5 对CRS大鼠海马TLR4和MyD88蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组海马中TLR4和MyD88蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,参味宁郁片干预显著逆转了CRS诱导海马中TLR4和MyD88蛋白高表达,参味宁郁片组海马中TLR4和MyD88蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见表5,图1。

表5 参味宁郁片对CRS大鼠海马TLR4和MyD88蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Shenwei Ningyu pills on expression of TLR4 and MyD88 in hippocampus of CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TLR4/ β -actin	MyD88/ β -actin
正常		0.163±0.014	0.242±0.019
模型		0.471±0.046 ¹⁾	0.504±0.023 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	0.395±0.026	0.410±0.010 ²⁾
参味宁郁片	18	0.335±0.026 ²⁾	0.339±0.041 ²⁾



A. 正常组;B. 模型组;C. 艾司西酞普兰组;D. 参味宁郁片组

图1 各组大鼠海马TLR4和MyD88蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of TLR4 and MyD88 protein expression in hippocampus of rats

3.6 对CRS大鼠血清IL-1 β , IL-10和TNF- α 的影响

与正常组比较,CRS 21 d后模型组大鼠血清促炎性细胞因子IL-1 β 和TNF- α 均显著升高($P<0.01$),血清IL-10显著降低($P<0.01$);与模型组比较,参味

宁郁片和艾司西酞普兰干预均显著逆转了CRS诱导血清中IL-1 β 高表达和血清IL-10显著降低,参味宁郁片组和艾司西酞普兰组血清中IL-1 β 显著降低

($P<0.01$),而血清IL-10显著升高($P<0.01$),参味宁郁片组和艾司西酞普兰组血清中TNF- α 差异无统计学意义。见表6。

表6 参味宁郁片对CRS大鼠血清IL-1 β , IL-10和TNF- α 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Shenwei Ningyu pills on expression of IL-1 β , IL-10 and TNF- α in serum of CRS rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-10	TNF- α
正常		76.610 $\pm$ 2.432	159.127 $\pm$ 2.616	109.823 $\pm$ 1.220
模型		106.687 $\pm$ 1.369 ¹⁾	122.005 $\pm$ 3.571 ¹⁾	152.708 $\pm$ 4.108 ¹⁾
艾司西酞普兰	30	91.573 $\pm$ 1.224 ²⁾	161.509 $\pm$ 4.995 ²⁾	145.098 $\pm$ 1.702
参味宁郁片	18	92.226 $\pm$ 1.217 ²⁾	155.601 $\pm$ 6.326 ²⁾	151.369 $\pm$ 2.163

4 讨论

当今,尽管国际上对抑郁症的关注研究已历经50余年,但是抑郁症的确切病因及病理机制研究仍然缺乏重大突破,其治疗尚缺乏有效治疗手段。因此,抑郁症仍然是困扰医学界的一大难题。“应激”在脑神经科学与精神疾患研究中不断被赋予新的内涵。当刺激具备了超负荷、冲突、不可控制性3个基本特点时,就成为应激原。机体需要对环境中的应激原进行适应,所以个体应激受到经历、遗传和行为反应的影响;当大脑感知到应激原,生理和行为反应被启动,导致适应负荷产生^[23]。适应负荷累积造成对神经、内分泌和免疫应激介质的过度暴露,进而参与抑郁症等病理过程^[24-26]。可见,应激导致的适应负荷在抑郁症的发生和病理过程具有重要作用^[27]。本研究结果显示,CRS作为应激源可诱导大鼠表现出一系列抑郁样行为:包括体质量显著降低,大鼠自然生长和整体情况受到抑制;糖水偏好指数显著降低,大鼠机体对糖水奖赏的敏感性降低,进而快感缺乏程度加重;水平运动评分和垂直运动评分显著下降,大鼠的自发活动和探索行为受到影响干扰。然而,参味宁郁片和抗抑郁药干预均有效逆转了CRS诱导的大鼠体质量降低、糖水偏好指数降低、水平运动评分和垂直运动评分下降,改善了大鼠自然生长和整体情况,增强大鼠机体对糖水奖赏的敏感性、减轻快感缺乏程度,恢复大鼠自发活动和探索行为,参味宁郁片和抗抑郁药干预均表现出明显的抗抑郁效应,这与前期关于参味宁郁片的Ⅱ期临床试验和Ⅲ期临床试验结果具有一致性。

研究证实,应激诱导的免疫炎症反应是抑郁症病理过程中的重要环节。一方面免疫炎症反应激活诱导细胞因子通过神经递质系统调节大脑神经环路,进而影响调节动机和奖赏、冲动、焦虑和恐慌

等,从而参与抑郁症病理过程,另一方面,可以通过免疫炎症反应激活介导参与奖赏、冲动、焦虑和恐慌等脑区神经元凋亡,诱导快感缺乏、焦虑等抑郁样行为^[28-30]。功能磁共振成像(fMRI)及定量磁化转移成像结果证实,细胞因子介导对大脑影响具有有效性和可重复性^[31-32]。

TLR家族是宿主细胞识别各种微生物致病成份的主要受体,激活的TLR不仅诱导炎症反应,而且促进抗原特异性获得性免疫反应的分化和成熟。TLR4是TLR家族中同时能够激活依赖性MyD88和非依赖性MyD88通路、进而诱导炎症分子进行基因编码的受体^[33]。目前认为TLR4激活主要通过依赖性MyD88路径介导下游IL-1 β , IL-6, TNF- α 合成及释放,产生炎症级联反应,参与抑郁症病理过程^[34-35]。本研究发现,持续CRS诱导CRS大鼠海马TLR4, MyD88蛋白显著上调表达,激活TLR4/MyD88信号通路,同时,CRS大鼠血清炎症因子IL-1 β , TNF- α 含量显著升高、血清IL-10含量降低,提示应激可能是通过TLR4/MyD88信号通路诱导了显著免疫炎症反应。值得注意的是,参味宁郁片组有效逆转了应激诱导的海马TLR4, MyD88蛋白及血清炎症因子IL-1 β , TNF- α 含量显著升高、血清IL-10含量降低情况,提示参味宁郁片可能通过依赖MyD88路径减轻炎症的级联反应,进而发挥抗抑郁效应。

抗抑郁新药—参味宁郁片的抗抑郁疗效已经得到前期Ⅱ期临床试验和Ⅲ期临床试验结果的初步证实^[12]。本研究基于参味宁郁片前期Ⅱ期临床试验和Ⅲ期临床试验结果及基础,探究防治抑郁症中药新药—参味宁郁片对CRS大鼠海马TLR4/MyD88信号通路介导免疫炎症的影响,这是基于前期Ⅱ期临床试验和Ⅲ期临床试验疗效确切后的初步机制探索,仅观察了参味宁郁片对大鼠海马

TLR4, MyD88 蛋白及血清炎性因子 IL-1 β , TNF- α , IL-10 含量的影响, 未观察海马 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 及重要转录因子核转录因子- κ B(NF- κ B)等蛋白的表达, 这是本研究的不足之处, 本团队下一步工作将基于本研究基础, 增加观察海马 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 以及重要转录因子 NF- κ B 等蛋白的表达, 并且选用 TLR4/MyD88 信号通路的特异性阻断剂和激动剂作为对照, 更加深入探究防治抑郁症中药新药—参味宁郁片对 CRS 大鼠海马 TLR4/MyD88 信号通路介导免疫炎症的影响, 关于防治抑郁症中药新药—参味宁郁片的效应机制研究将结合临床、从重视研究的整体性和实际价值路径出发, 切实为抑郁症的临床防治奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SINGH J B, DALY E J, MATHEWS M, et al. Approval of esketamine for treatment-resistant depression [J]. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7 (3): 232-235.
- [2] FERRARI A J, SOMERVILLE A J, BAXTER A J, et al. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature [J]. *Psychol Med*, 2013, 43 (3):471-481.
- [3] CHARLSON F J, FERRARI A J, FLAXMAN A D, et al. The epidemiological modelling of dysthymia: application for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *J Affect Disord*, 2013, 151(1):111-120.
- [4] American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association, 1994.
- [5] WHITEFORD H A, DEGENHARDT L, REHM J, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 382 (9904):1575-1586.
- [6] BRADFORD H, HIDEYUKI N, SUN Z J, et al. Characterization of treatment resistant depression episodes in a cohort of patients from a US commercial claims database [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):65.
- [7] BRAMBILLA P, CIPRIANI A, HOTOPF M, et al. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a Meta-analysis of clinical trial data [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2005, 38(2):69-77.
- [8] THASE M E. Preventing relapse and recurrence of depression: a brief review of therapeutic options [J]. *CNS Spectr*, 2006, 11(12 Suppl 15):12-21.
- [9] UHER R. Genes, environment, and individual differences in responding to treatment for depression [J]. *Harv Rev Psychiatry*, 2011, 19(3):109-124.
- [10] GOMEZ F, VENERO C, VIVEROS M P, et al. Short-term fluoxetine treatment induces neuroendocrine and behavioral anxiogenic-like responses in adolescent male rats [J]. *Exp Brain Res*, 2015, 233(3):983-995.
- [11] KÉRI S, SZABÓ C, KELEMEN O. Expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 40: 235-243.
- [12] HINES D J, CHOI H B, HINES R M, et al. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e60388.
- [13] DANTZER R, KELLEY K W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(2):153-160.
- [14] DANTZER R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 500(1/3):399-411.
- [15] MILLER A H, MALETIC V, RAISON C L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65(9):732-741.
- [16] PANDEY G N, RIZAVI H S, REN X, et al. Toll-like receptors in the depressed and suicide brain [J]. *J Psychiatr Res*, 2014, 53:62-68.
- [17] SCHNEIDER B, PHILIPP M, MÜLLER M J. Psychopathological predictors of suicide in patients with major depression during a 5-year follow-up [J]. *Eur Psychiatry*, 2001, 16(5):283-288.
- [18] 图娅. 一种抗抑郁症的中药组合物及其制备方法: 中国, CN1579461 [P]. 2005-02-16.
- [19] WANG Y, JIANG H, MENG H, et al. Genome-wide transcriptome analysis of hippocampus in rats indicated that TLR/NLR signaling pathway was involved in the pathogenesis of depressive disorder induced by chronic restraint stress [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134:195-204.
- [20] HINWOOD M, MORANDINI J, DAY T A, et al. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex [J]. *Cereb Cortex*, 2012, 22(6):1442-

- 1454.
- [21] EDWARDS J G, ANDERSON I. Systematic review and guide to selection of selective serotonin reuptake inhibitors[J]. *Drugs*, 1999, 57(4): 507-533.
- [22] NI J W, MATSUMOTO K, LI H B, et al. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. *Brain Res*, 1995, 673(2): 290-296.
- [23] MCEWEN B S. Protective and damaging effects of stress mediators[J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(3): 171-179.
- [24] IWATA M, OTA K T, DUMAN R S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 105-114.
- [25] BOSANAC P, CASTLE D. How should we manage anxiety in patients with schizophrenia? [J]. *Australas Psychiatry*, 2015, 23(4): 374-377.
- [26] ABRAM K M, ZWECKER N A, WELTY L J, et al. Comorbidity and continuity of psychiatric disorders in youth after detention: a prospective longitudinal study [J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72(1): 84-93.
- [27] 苏晓鹏, 孙文军, 张璐璐, 等. 基于阳气的重要性从五脏阳气论治抑郁症——国家名老中医唐启盛教授神志病学术思想系列之一[J]. *世界中医药*, 2019, 14(12): 3302-3305.
- [28] CAPURON L, PAGNONI G, DRAKE D F, et al. Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2012, 69(10): 1044-1053.
- [29] EISENBERGER N I, BERKMAN E T, INAGAKI T K, et al. Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(8): 748-754.
- [30] FELGER J C, MUN J, KIMMEL H L, et al. Chronic interferon- α decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(11): 2179-2187.
- [31] DOWELL N G, COOPER E A, TIBBLE J, et al. Acute changes in striatal microstructure predict the development of interferon-alpha induced fatigue [J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 79(4): 320-328.
- [32] HARRISON N A, CERCIGNANI M, VOON V, et al. Effects of inflammation on hippocampus and substantia nigra responses to novelty in healthy human participants [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(4): 831-838.
- [33] BIRAGYN A, RUFFINI P A, LEIFER C A, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2 [J]. *Science*, 2002, 298(5595): 1025-1029.
- [34] FLESHNER M, FRANK M, MAIER S F. Danger signals and inflammasomes: stress-evoked sterile inflammation in mood disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 36-45.
- [35] YANG J, LIU R, LU F, et al. Fast green FCF attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior and downregulates TLR4/Myd88/NF- κ B signal pathway in the mouse hippocampus [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 501.

[责任编辑 周冰冰]