

基于NLRP1炎症小体探讨百合知母汤抗抑郁的作用机制

岳春华, 贵永光, 王海桥

Exploration of the antidepressant mechanism of Baihe Zhimu decoction based on NLRP1 inflammasome

YUE Chunhua, BEN Yongguang, WANG Haiqiao

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202401033>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

益母草碱抑制NLRP3炎症小体过度激活调控巨噬细胞M1/M2表型分化

Effect of leonurine on peritoneal macrophages M1/M2 phenotypic differentiation via inhibiting overactivation of NLRP3 inflammasome

药学实践与服务. 2021, 39(2): 143-147 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101003

炎症小体介导的细胞焦亡在非酒精性脂肪肝病中的作用及机制

The role and mechanism of inflammasome-associated pyroptosis in nonalcoholic fatty liver disease

药学实践与服务. 2020, 38(1): 9-13,41 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201902051

雷公藤次碱通过调控TLR4/MyD88/TRAF6信号通路抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应

Wilforine inhibits LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells by regulating the TLR4/MyD88/TRAF6 signaling pathway

药学实践与服务. 2022, 40(6): 505-509 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202111068

肠道菌群相关的抗抑郁治疗研究进展

Advances in antidepressant therapy related to gut microbiota

药学实践与服务. 2022, 40(5): 422-426 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202111034

针灸结合选择性5-羟色胺再摄取抑制剂治疗抑郁症的临床疗效分析

Analysis of the clinical efficacy of acupuncture combined with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the treatment depression

药学实践与服务. 2021, 39(4): 366-368 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202006099

Th2相关炎症因子在湿疹发病中的作用机制

Mechanism of Th2 related inflammatory factors in the pathogenesis of eczema

药学实践与服务. 2019, 37(1): 9-13 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.003



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于 NLRP1 炎症小体探讨百合知母汤抗抑郁的作用机制

岳春华¹, 贲永光¹, 王海桥² (1. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院中医科, 上海 201112)

[摘要] 目的 基于 NLRP1 炎症小体研究百合知母汤抗抑郁的作用机制。方法 构建慢性不可预测轻度应激 (CUMS) 诱导的抑郁症小鼠模型, 将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、百合知母汤低剂量组、百合知母汤高剂量组以及 MDP 组 (NLRP1 激活剂)。连续给药 4 周, 考察小鼠行为学特征。ELISA 检测小鼠海马炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和神经递质 5-HT、NE、DA 的水平。Western blot 检测炎症小体相关蛋白 NLRP1、ASC 和 caspase-1 的表达, 以及 BDNF/TrkB 和 ERK/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的变化, 免疫荧光检测小鼠海马 BDNF 表达的变化。结果 百合知母汤能抑制 CUMS 小鼠海马 NLRP1 炎症小体的活化, 改善小鼠行为特征, 提高小鼠海马神经递质水平, 降低炎症反应。NLRP1 激活剂 MDP 能逆转百合知母汤的上述作用。百合知母汤能上调下游分子 BDNF、TrkB 的表达水平, 提高 ERK、AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平, 而 MDP 能逆转上述作用。结论 百合知母汤通过抑制 NLRP1 炎症小体活化, 抑制 CUMS 抑郁症小鼠海马神经炎症反应, 进而激活 BDNF/TrkB 信号通路和 ERK/AKT/mTOR 信号通路来改善 CUMS 小鼠的抑郁样行为。

[关键词] 百合知母汤; 抑郁症; 炎症反应; NLRP1 炎症小体; BDNF/TrkB 信号通路

[文章编号] 2097-2024(2024)08-0325-09 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202401033

Exploration of the antidepressant mechanism of Baihe Zhimu decoction based on NLRP1 inflammasome

YUE Chunhua¹, BEN Yongguang¹, WANG Haiqiao² (1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201112, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of antidepressant effect of Baihe Zhimu decoction based on NLRP1 inflammasome. **Methods** A chronic unpredictable mild stress (CUMS) induced depression mouse model was constructed. C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, CUMS group, low-dose Baihe Zhimu decoction group, high-dose Baihe Zhimu decoction group, and MDP group (NLRP1 activator). After continuous administration for 4 weeks, the behavioral characteristic of mice was investigated. The levels of mice hippocampal inflammatory factors IL-1 β , IL-6, TNF- α , and neurotransmitters 5-HT, NE, and DA were detected by ELISA. The expression of inflammasome related proteins NLRP1, ASC, and caspase-1, as well as related proteins in BDNF/TrkB and ERK/AKT/mTOR signaling pathway were detected by Western blot. Immunofluorescence was used to detect changes in BDNF expression in the hippocampus of mice. **Results** Baihe Zhimu decoction inhibited the activation of NLRP1 inflammasomes in the hippocampus of CUMS mice, improved their behavioral characteristics, increased the level of neurotransmitters in the hippocampus, and reduced the inflammatory response. The NLRP1 activator MDP reversed the above effects of Baihe Zhimu decoction. Baihe Zhimu decoction increased BDNF, TrkB expression, and phosphorylation levels of ERK, AKT, and mTOR proteins, which could be reversed by MDP. **Conclusion** Baihe Zhimu decoction improved depression like behavior in CUMS mice by inhibiting NLRP1 inflammasome activation and hippocampal neuroinflammatory response, and thereby activating BDNF/TrkB and ERK/AKT/mTOR signaling pathway.

[Key words] Baihe Zhimu decoction; Depression; Inflammatory response; NLRP1 inflammasome; BDNF/TrkB signaling pathway

[基金项目] 国家自然科学基金 (82274254); 广东省中医药局科研项目 (20221220)

[作者简介] 岳春华, 硕士, 讲师, Email: yuechunhua2004@126.com

[通信作者] 王海桥, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中医药物质基础与作用机制研究, Email: haiqiaodr@163.com

抑郁症是一种使人衰弱的精神障碍, 其特征是持续情绪低落, 对几乎所有活动都失去兴趣或愉悦感, 并与疲劳、睡眠障碍、焦虑和神经认知障碍症状有关^[1], 是全球残疾的第三大原因。抑郁症患者工作低下、具有较高的自杀倾向, 严重影响患者的生活, 造成沉重的社会经济负担^[2]。由于疫情的影

响,社会心理健康问题正在急剧增加^[3,4]。目前,临床上使用的大多数抗抑郁药都具有耐药性,并伴有各种不良反应。因此,寻找安全性更高、不良反应更少的抑郁症治疗方法具有重要意义。既往研究表明,炎症反应在抑郁症中起着至关重要的作用^[5]。抑郁症患者血液及额叶皮层中的促炎细胞因子增加^[6,7]。抗炎治疗可以产生抗抑郁作用,而抗抑郁药可以减弱抑郁症中促炎细胞因子的表达^[8,9]。因此,抑制神经炎症是治疗抑郁症的重要方向。

百合知母汤是中国东汉张仲景医典《金匱要略》中记载的一种经典中药方剂,用于治疗“百合病”^[10]。中医“百合病”被认为与现代抑郁症的表现具有较高的相似性^[11]。目前,百合知母汤在中医临床上被广泛用于治疗抑郁症^[12]。药理学研究表明,百合知母汤在动物模型中具有显著的抗抑郁作用^[13]。然而,百合知母汤治疗抑郁症的作用机制并未完全明了。前期研究发现百合知母汤能够通过抑制 CUMS 抑郁模型小鼠的神经炎症,降低海马 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎细胞因子的表达,来发挥抗抑郁作用^[14]。鉴于 NLRP1 炎症小体在炎症反应过程中的重要的作用^[15],且最近研究发现 NLRP1 炎症小体在抑郁症的发展过程中扮演重用角色^[16]。该研究基于 NLRP1 炎症小体的活化,对百合知母汤的抗抑郁作用进行进一步的探索。

1 材料和方法

1.1 百合知母汤的制备

取百合药材 400 g、知母药材 200 g,浸泡 0.5 h 后,加 10 倍量水,煎煮两次,每次 2 h,煎液过滤后,将两次滤液混合并浓缩至 600 ml。

1.2 实验试剂

Muramyl dipeptide (MDP) 购自 Sigma-Aldrich 公司; IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、5-HT、NE、DA 试剂盒和 ELISA 试剂盒均购自美国 R&D 公司; BSA 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 去离子水采用 Milli-Q 纯水机制备 (Millipore 公司); NLRP1、ASC、caspase-1、BDNF、TrkB、ERK、AKT、mTOR、 β -actin 等抗体均购自 Cell Signaling 公司; BCA 蛋白测定试剂盒与 RIPA 裂解液购自碧云天公司。

1.3 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠 8 周龄,体质量 22 g ~ 25 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证: SCXK(浙)[2019-0001]。所有小鼠均在标准条件下饲养(12 h 光/暗循环,温度: 22 $^{\circ}$ C ~ 24 $^{\circ}$ C,湿度: 55% \pm 10%),在整个实验过程小鼠自由摄取食

物和水。实验前对所有小鼠进行适应性喂养 1 周。该研究经上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会审批通过,实验操作严格按照动物福利和伦理原则进行。

1.4 CUMS 模型建立

CUMS 造模过程参考前期研究,通过给予小鼠不同刺激构建抑郁症模型小鼠,主要过程如下: ①禁食 24 h; ②禁水 24 h; ③空瓶刺激 1 h; ④昼夜照明 24 h; ⑤笼子倾斜 45 $^{\circ}$, 24 h; ⑥潮湿垫料 24 h; ⑦摇笼 30 min; ⑧夹尾 1 min; ⑨冰水游泳 5 min。小鼠每天接受不同的应激,持续 5 周。

1.5 动物分组及给药

根据前期研究^[14],百合知母汤给药采用 6 g 生药量/kg(相当于百合 4 g,知母 2 g)和 12 g 生药量/kg(相当于百合 8 g,知母 4 g)两个剂量。将 30 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组($n=6$): 对照组、模型组、百合知母汤低剂量组(百合知母汤, 6 g/kg, i.g.)、百合知母汤高剂量组(百合知母汤, 12 g/kg, i.g.)、百合知母汤+MDP 组(百合知母汤, 12 g/kg, i.g.; MDP, 脑立体定位注射)。除对照组外,各组小鼠接受 CUMS 刺激,持续 5 周,对照组被放置在不受干扰的笼子里。从第 6 周开始,给药组按剂量通过灌胃给予百合知母汤浓缩液,1 次/d,持续 4 周。模型组小鼠给予等量的蒸馏水。为考察 NLRP1 在百合知母汤抗抑郁过程中的重要作用,设立百合知母汤+MDP 组,给药前接受脑立体定位注射 NLRP1 激活剂 MDP,过程如下: 经异氟烷麻醉的小鼠俯卧位固定于脑立体定位仪上,将眼中线靠后 2 ~ 3 cm 处用 75% 乙醇消毒、剪皮露出头骨,用注射器针头将头骨表层骨膜轻挑剥离,前后凶在同一水平,暴露前凶(冠状缝)。选择小鼠双侧海马 CA1 区为注射位置,进针 1.6 mm 至海马区,注射 MDP,剂量 5 mg/kg,结束后使用可吸收缝合线进行无菌缝合。

1.6 行为学考察

1.6.1 蔗糖偏好实验

每只小鼠置于单独的笼子里孤养,放置 2 瓶含有 1% 蔗糖溶液,进行 24 h 的适应。然后其中一瓶蔗糖溶液用蒸馏水代替,进行另一次 24 h 的适应。随后禁水、禁食 24 h。最后,放置 2 个预先称重的含有 1% 蔗糖溶液或蒸馏水的瓶子。3 h 后,记录蔗糖溶液消耗量和水消耗量,计算蔗糖偏好指数。

1.6.2 悬尾实验

用胶带固定每只小鼠的尾部,头部向下,离台面 50 cm。在实验过程中,将小鼠隔开以避免互相

干扰。记录 6 min 内小鼠的累计不动时间。

1.6.3 强迫游泳实验

在室温下,将每只小鼠分别放入直径 12 cm 的塑料桶中,桶中装满 25 cm 深的水。在正式实验前 24 h,进行 15 min 的预游泳适应训练。记录 5 min 内小鼠的累计漂浮不动时间。

1.6.4 旷场实验

将小鼠单独放置在敞箱装置中,给予 6 min 的自由探索时间,使其适应,然后记录其 4 min 内穿越的格子数。

1.7 神经递质和炎症因子水平的测定

各组小鼠用 10%(w/v)水合氯醛深度麻醉。迅速取脑,置于冰上。分离海马,液氮预冷冻,于 -80°C 下储存,分析用。检测时,取海马,加入磷酸盐缓冲液(PBS: 137 nmol/L NaCl、2.7 nmol/L KCl、10 nmol/L Na_2HPO_4 、1.8 nmol/L KH_2PO_4),于冰上匀浆, 4°C 下以 12000 r/min,离心 10 min,收集上清液。使用 ELISA 试剂盒检测小鼠海马中的炎症因子水平。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、5-HT、NE 和 DA 的水平,操作均按照说明书进行。

1.8 免疫荧光染色

迅速取小鼠大脑放置冰上,分离海马,用液氮预冷冻,并在 -80°C 下储存。使用冷冻切片机将海马组织切成 5 μm 的切片。切片用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。然后用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 缓冲液透化,并用 0.5% BSA 固定,加入一抗, 4°C 孵育过夜。加入荧光素标记的二抗孵育(室温,1 h)。通过荧光显微镜对切片成像。

1.9 Western blot 法检测蛋白的表达水平

取小鼠海马组织,加入含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上研磨,在 4°C 下,12000 r/min,离心 10 min。收集上清液,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,用 10% 十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,分离后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用 5% 牛血清白蛋白(BSA)在室温下封闭 2 h,随后孵上一抗, 4°C 孵育过夜。过夜后用 TBST 洗涤 3 次,每次洗涤 10 min。然后与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后使用 ECL 显影液进行显影。

1.10 统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0(GraphPad Software, USA)进行统计分析。数据以平均值 \pm 标准差(SD)表示。使用单向方差分析和 Tukey HSD 检验评估各组之间的差异。 $P<0.05$ 的显著性水平被认为是

统计学显著性的指示。

2 结果

2.1 百合知母汤对 CUMS 小鼠行为学影响

为了评估百合知母汤的药理作用,首先进行糖水消耗实验、悬尾实验、强迫游泳实验和旷场实验,观察百合知母汤对 CUMS 小鼠行为学的影响。如图 1 所示,与对照组相比,CUMS 模型组在糖水消耗实验中的蔗糖消耗百分比和旷场实验中的格子穿越数显著减少($P<0.01$, $P<0.05$),而悬尾实验和强迫游泳实验的不动时间显著增加($P<0.01$)。而百合知母汤能显著提高这些参数($P<0.05$, $P<0.01$),并呈明显的剂量依赖性。表明百合知母汤能改善抑郁小鼠的行为学特征。值得注意的是,NLRP1 炎症小体激活剂 MDP 能够显著的逆转百合知母汤对抑郁症小鼠行为学的作用($P<0.05$, $P<0.01$),提示百合知母汤通过抑制 NLRP1 炎症小体活化来发挥抗抑郁作用。

2.2 百合知母汤对 CUMS 小鼠神经递质变化的影响

中枢神经系统单胺类神经递质水平降低与抑郁症的产生具有密切关系。图 2 结果表明,CUMS 模型组的 DA、5-HT、NE 水平与对照组相比显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),而 CUMS+BZD6 组和 CUMS+BZD12 组上述神经递质的含量明显高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。NLRP1 激活能够显著的逆转百合知母汤对上述神经递质的影响($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.3 百合知母汤对抑郁症相关炎症因子的影响

越来越多的研究表明炎症在抑郁症的病因中起着关键作用。因此,用 ELISA 法测定了几种关键的促炎细胞因子。如图 3 所示,与对照组相比,CUMS 模型组小鼠海马中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高($P<0.01$),而百合知母汤显著抑制了由 CUMS 引起的这些炎症因子的升高($P<0.05$, $P<0.01$),NLRP1 激活剂 MDP 能够显著的逆转百合知母汤对上述神经递质的影响($P<0.01$)。

2.4 百合知母汤对小鼠海马 NLRP1 炎症小体的影响

NLRP1 炎症小体在神经炎症相关疾病中扮演重用角色,NLRP1 炎症小体的活化能促进各种炎症因子的产生^[17]。因此,采用 Western blot 检测 NLRP1 炎症小体的活化。图 4 结果显示,CUSM 刺激显著增加了 NLRP1、ASC 和 caspase-1 的蛋白表达($P<0.01$),表明 NLRP1 炎症小体在 CUSM 抑郁模型中被激活。而百合知母汤显著抑制了由

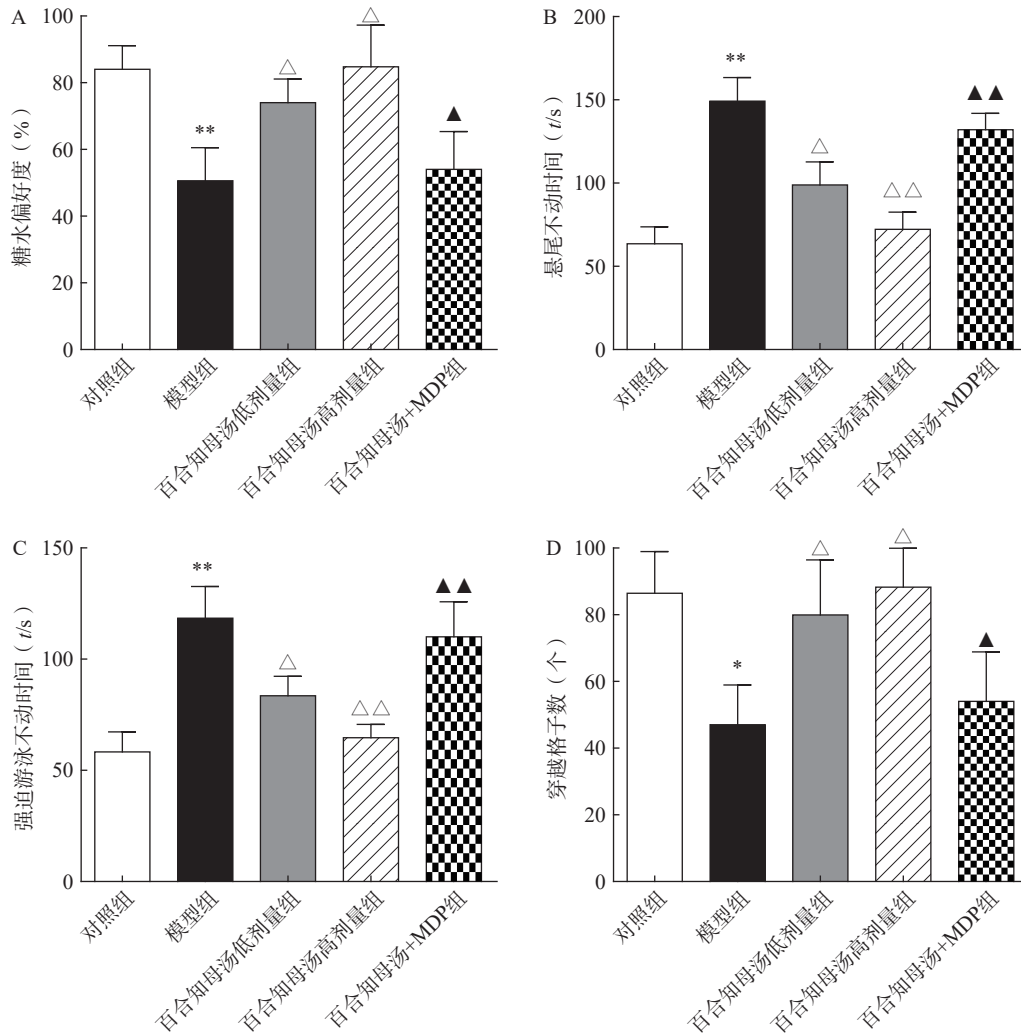


图1 百合知母汤对 CUMS 小鼠行为学影响 (n=6)

A. 糖水消耗实验; B. 悬尾实验; C. 强迫游泳实验; D. 旷场实验

*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01, 与模型组比较; [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01, 与百合知母汤高剂量组比较。

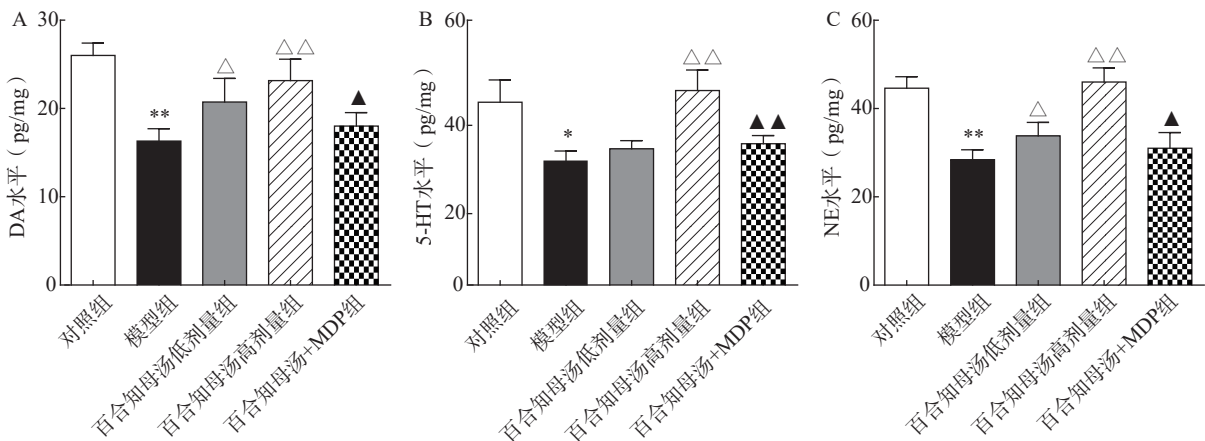


图2 百合知母汤对 CUMS 小鼠海马单胺类神经递质 DA、5-HT、NE 水平的影响 (n=6)

A. 小鼠海马 DA 水平; B. 小鼠海马 5-HT 水平; C. 小鼠海马 NE 水平

*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01, 与模型组比较; [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01, 与百合知母汤高剂量组比较。

CUMS 引起 NLRP1、ASC 和 caspase-1 表达升高 (P<0.05)。表明百合知母汤能抑制 NLRP1 炎症小

体的激活。值得注意的是, NLRP1 激活剂 MDP 能够显著逆转百合知母汤对上述蛋白表达的抑制作

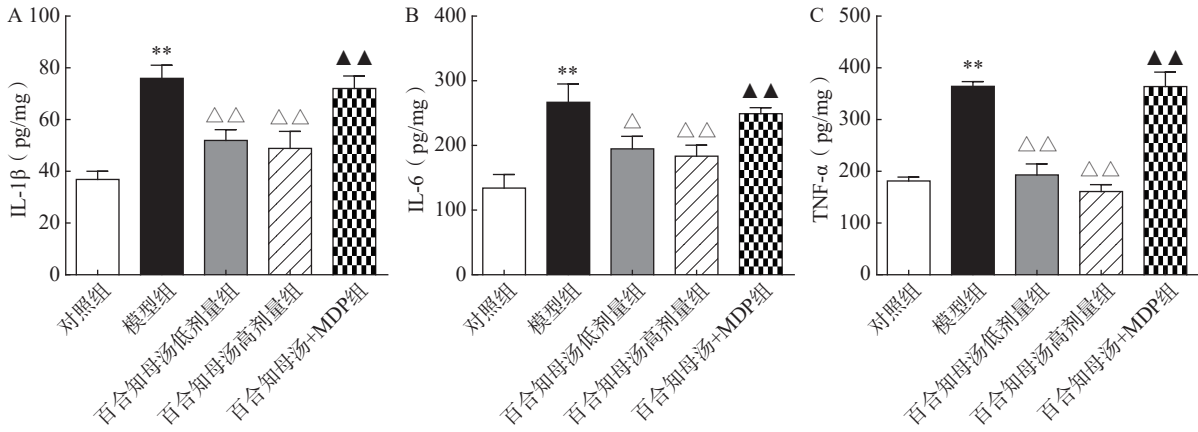


图3 百合知母汤对抑郁症相关炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响 (n=6)

A.小鼠海马 IL-1 β 水平; B.小鼠海马 IL-6 水平; C.小鼠海马 TNF- α 水平

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与模型组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, 与百合知母汤高剂量组比较。

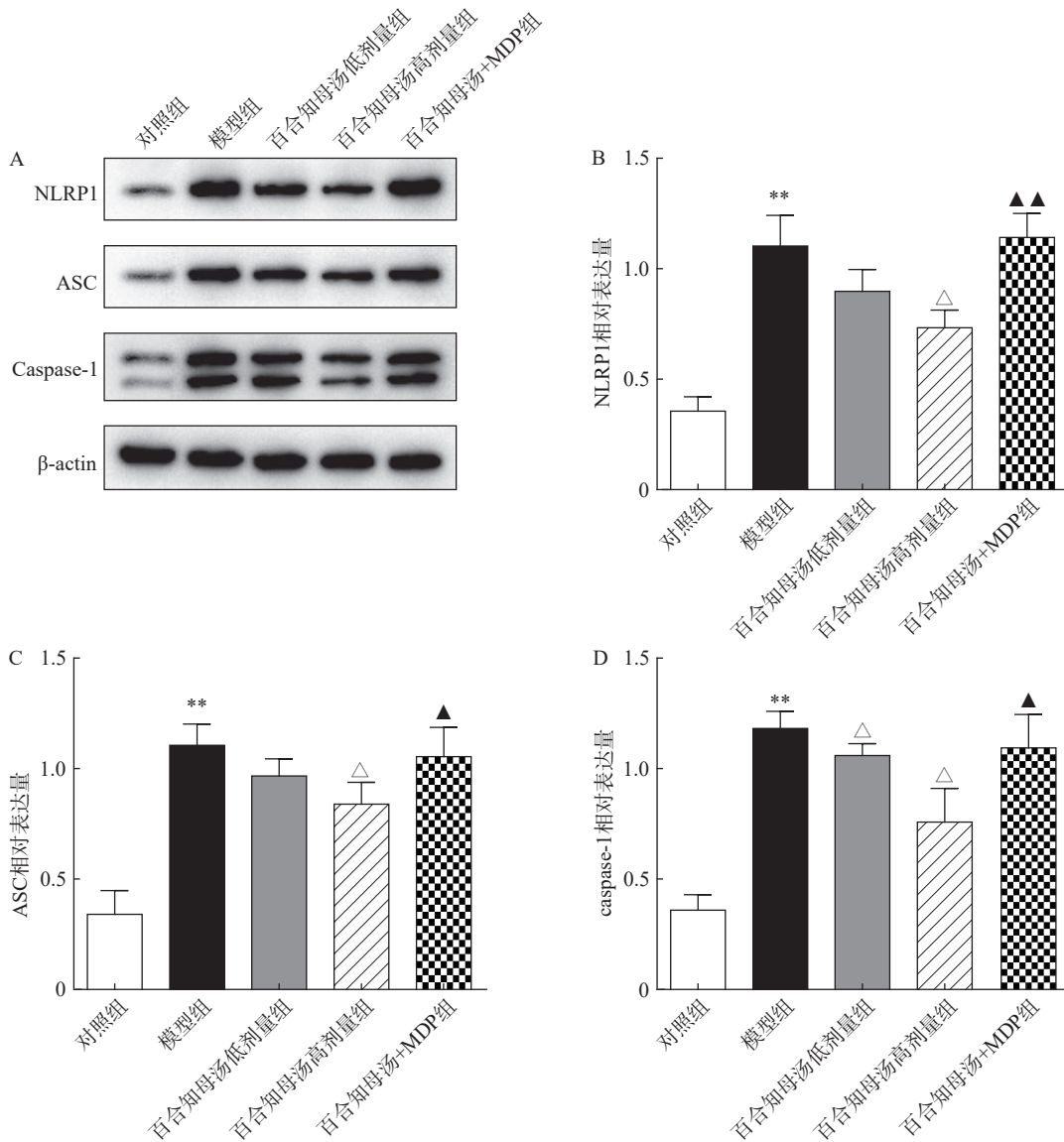


图4 百合知母汤对小鼠海马 NLRP1 炎症小体相关蛋白 NLRP1、ASC 和 caspase-1 表达的影响 (n=6)

A. Western blot 检测小鼠海马 NLRP1、ASC 和 caspase-1 表达条带图; B. NLRP1 表达量统计结果;

C. ASC 表达量统计结果; D. caspase-1 表达量统计结果

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与模型组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, 与百合知母汤高剂量组比较。

用($P<0.05, P<0.01$), 进一步表明百合知母汤通过抑制 NLRP1 炎症小体活化来发挥抗神经炎症的作用。

2.5 百合知母汤对小鼠海马 BDNF 表达的影响

由于 BDNF 与抑郁症的发生发展密切相关^[18], 通过 Western blot 检测 BDNF 在不同组小鼠海马中的表达(图 5A)。与对照组相比, CUMS 模型组小鼠海马表达 BDNF 水平显著降低($P<0.01$), 而百合知母汤以量效依赖方式显著上调 BDNF 表达水平($P<0.01$)。MDP 能够显著阻断百合知母汤对 BDNF 表达水平的作用($P<0.01$)。

随后, 用免疫荧光对小鼠海马的 BDNF 表达进行检测(图 5B)。结果发现, 与对照组相比, CUMS 模型组小鼠海马表达 BDNF 水平显著降低, 而百合知母汤治疗组 BDNF 表达水平显著上调。NLRP1 激活剂 MDP 能够显著的逆转百合知母汤对 BDNF 表达水平表达的上调作用。

2.6 百合知母汤对小鼠海马 TrkB 和下游 ERK/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

BDNF 能够与 TrkB 结合, 从而激活 AKT/mTOR 级联反应, 最终通过调节突触蛋白合成和细胞骨架发育来增强树突的复杂性^[19]。因此, 继续探讨百合

知母汤对 TrkB 及下游 ERK/AKT/mTOR 通路关键蛋白表达的影响。百合知母汤对小鼠海马 TrkB 表达的影响如图 6A 所示。与对照组相比 CUMS 模型组小鼠海马 TrkB 的表达显著降低($P<0.01$), 百合知母汤给药组小鼠海马 TrkB 的表达水平显著升高($P<0.01$)。而 MDP 能够逆转百合知母汤对 TrkB 表达水平的上调作用($P<0.05$)。

如图 6B-D 所示, 与对照组相比, CUMS 组小鼠海马 ERK、AKT 和 mTOR 的磷酸化水平显著降低, 而百合知母汤给药可显著促进抑郁小鼠 ERK、AKT 和 mTOR 的磷酸化水平($P<0.05, P<0.01$)。NLRP1 激活剂 MDP 能够显著的逆转百合知母汤对上述蛋白磷酸化水平的促进作用($P<0.05, P<0.01$)。

3 讨论

神经炎症是一种对组织损伤的先天免疫反应, 在许多中枢神经系统疾病中发挥着重要作用, 被认为与抑郁症的发生发展息息相关^[20, 21]。大量证据表明, 海马体的神经炎症对抑郁和焦虑障碍的发展至关重要。神经性疼痛诱导的抑郁样行为的发作

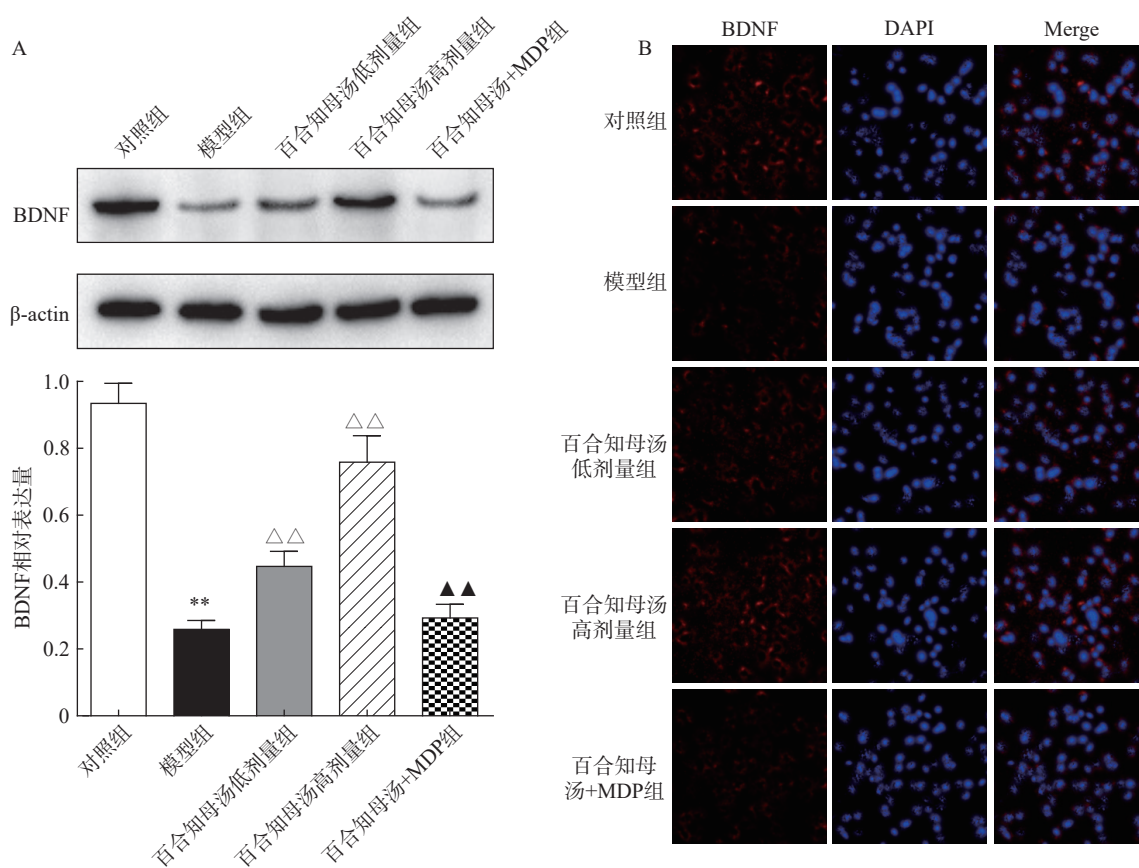


图 5 百合知母汤对小鼠海马 BDNF 表达的影响 ($n=6$)

A. Western blot 检测 BDNF 在不同组小鼠海马中的表达; B. 免疫荧光检测小鼠海马中的 BDNF 表达

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$, 与模型组比较; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$, 与百合知母汤高剂量组比较。

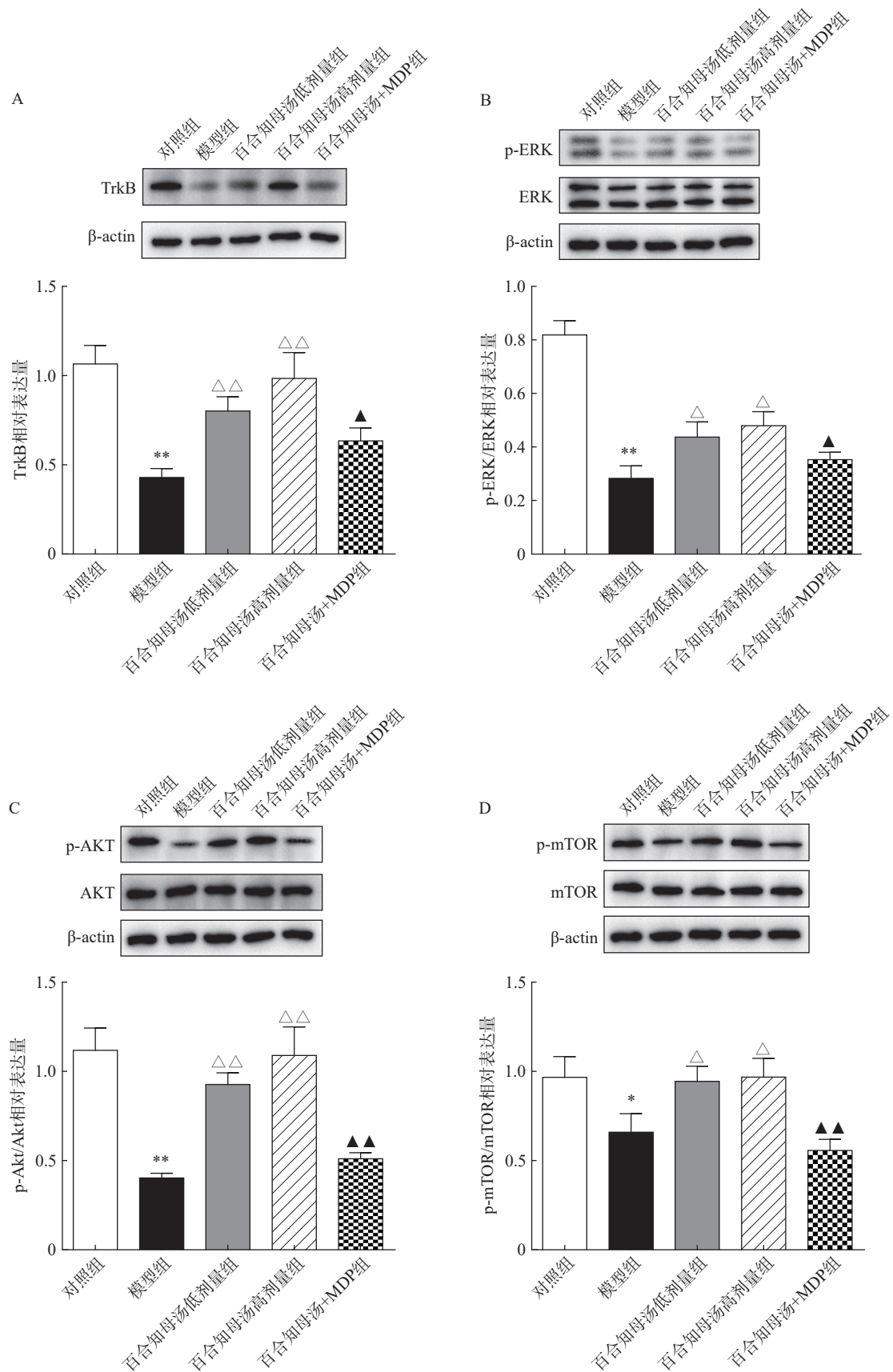


图6 百合知母汤对小鼠海马 TrkB 和下游 ERK/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 (n=6)

A. Western blot 检测 TrkB 在不同组小鼠海马中的表达; B. Western blot 检测 p-ERK/ERK 在不同组小鼠海马中的表达; C. Western blot 检测 p-AKT/AKT 在不同组小鼠海马中的表达; D. Western blot 检测 p-mTOR/mTOR 在不同组小鼠海马中的表达

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与模型组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, 与百合知母汤高剂量组比较。

与海马 TNF 及其受体 TNFR1 水平的增加相关^[22]。敲减海马中 IL-1 β 可以减轻 LPS 诱导的小鼠焦虑和抑郁样行为^[23]。而给予 IL-1 受体拮抗剂可以改善神经性疼痛对抑郁样行为的影响^[24]。以上研究结果表明,海马神经炎症在抑郁症的病理过程中起着重要作用。

炎症小体是先天免疫反应的关键成分,据报道与炎症相关神经系统疾病的机制有关^[25]。NLRP1 炎症小体由受体蛋白 NLRP1、衔接蛋白 ASC 和效应蛋白 caspase-1 组成,在神经炎症相关疾病中起重要作用。NLRP1 可被多种刺激激活,包括炭疽杆菌致死毒素、弓形虫、胞壁酰二肽、宿主细胞内 ATP 耗竭等^[21]。NLRP1 炎症小体的激活导致 Caspase-1 的直接成熟,随后诱导促炎细胞因子(如 IL-1 β 和 IL-18)的产生,从而触发神经炎症反应^[26]。据报道,NLRP1 炎症小体驱动的炎症途径与许多神经系统疾病有关,如脑损伤、神经退行性疾病、伤害感受和癫痫^[27]。

百合知母汤抗抑郁作用及其机制既往已有研究^[13,14],然而基于 NLRP1 炎症小体的活化对其抗抑郁机制的研究未见报道。该研究旨在通过探讨百合知母汤对 NLRP1 炎症小体的活化作用来阐释百合知母汤抗抑郁的作用机制。结果显示,百合知母汤抑制了 CUMS 抑郁症小鼠海马 NLRP1、ASC 和 Caspase-1 的表达升高。表明百合知母汤能够抑制 NLRP1 炎症小体的活化。为了证实百合知母汤通过 NLRP1/Caspase-1 通路发挥抗抑郁作用,采用 NLRP1 激活剂 MDP 注射抑郁症小鼠。结果发现,MDP 逆转了百合知母汤对 CUMS 小鼠的抑郁样行为和神经炎症的改善作用。因此,百合知母汤可能通过抑制 NLRP1 炎症小体的活化,以调节抑郁症小鼠的神经炎症反应,来发挥抗抑郁作用。

BDNF 属于神经营养因子家族,在神经的生成、发展和功能维持中起着至关重要的作用^[28]。大量研究表明,BDNF 与抑郁症的病理生理学和抗抑郁疗效有关^[29]。研究发现,抑郁症动物和患者以及抑郁症受试者的尸检样本中,大脑 BDNF 水平降低^[28,30]。此外,给予 LPS 或促炎细胞因子可显著降低海马和大脑皮层的 BDNF 水平^[31]。这表明炎症会影响 BDNF 的表达。抗抑郁药物治疗可以有效改善抑郁症引起的 BDNF 含量的降低,进一步促进神经发生,增强神经可塑性,并起到抗抑郁的作用^[32]。研究发现,BDNF 的释放以及与 TrkB 的结合能够触发多种下游信号级联,包括 RAS/MAPK 通路和 PI3K/AKT 通路,这些信号通路与抑郁症的

发生发展密切相关^[33]。慢性应激可抑制 ERK 信号的传递,抗抑郁治疗则可逆转这种抑制^[34],表明 ERK 信号阻断会导致抑郁和焦虑行为。这与抑郁症患者的尸检报告一致^[35]。此外,慢性应激还会导致内侧前额叶皮层锥体神经元的树突形态发生变化,具体表现为树突回缩和树突棘丢失^[36]。而抗抑郁治疗可以通过 AKT/mTOR 途径逆转这一现象,并有效改善小鼠的抑郁样症状^[37]。上述研究表明,BDNF 与 TrkB 结合,进而通过 ERK 和 AKT/mTOR 信号通路引发的信号级联反应可能是抗抑郁药物发挥治疗作用的关键分子机制。本研究结果显示,百合知母汤能显著促进抑郁症小鼠海马 BDNF 和 TrkB 的表达水平,表明百合知母汤能上调 BDNF/TrkB 信号通路。同时,百合知母汤能显著促进 ERK、AKT 和 mTOR 的磷酸化水平。表明百合知母汤能同时激活下游的 ERK/AKT/mTOR 信号通路。而采用 NLRP1 激活剂 MDP 活化 NLRP1 炎症小体后,百合知母汤对 BDNF/TrkB 信号通路和 ERK/AKT/mTOR 信号通路上调作用被显著逆转,表明百合知母汤通过抑制 NLRP1 炎症小体活化,激活 BDNF/TrkB 信号通路和 ERK/AKT/mTOR 信号通路。

综上所述,百合知母汤通过抑制 NLRP1 炎症小体活化,抑制 CUMS 抑郁症小鼠海马的神经炎症反应,进而激活 BDNF/TrkB 信号通路和 ERK/AKT/mTOR 信号通路来改善 CUMS 小鼠的抑郁样行为。

【参考文献】

- [1] PAOLI C, MISZTAK P, MAZZINI G, et al. DNA methylation in depression and depressive-like phenotype: biomarker or target of pharmacological intervention?[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(12): 2267-2291.
- [2] SIRASANGI M I, ROOHI T F, KRISHNA K L, et al. Dietary Co-supplements attenuate the chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice[J]. *Behav Brain Res*, 2024, 459: 114788.
- [3] BAREEQA S B, AHMED S I, SAMAR S S, et al. Prevalence of depression, anxiety and stress in China during COVID-19 pandemic: a systematic review with meta-analysis[J]. *Int J Psychiatry Med*, 2021, 56(4): 210-227.
- [4] HOFFART A, JOHNSON S U, EBRAHIMI O V. Loneliness and social distancing during the COVID-19 pandemic: risk factors and associations with psychopathology[J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 589127.
- [5] 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.
- [6] RETHORST C D, TOUPS M S, GREER T L, et al. Pro-inflammatory cytokines as predictors of antidepressant effects of exercise in major depressive disorder[J]. *Mol Psychiatry*, 2013,

- 18(10): 1119-1124.
- [7] SHELTON R C, CLAIBORNE J, SIDORYK-WEGRZYNOW-ICZ M, et al. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(7): 751-762.
- [8] KÖHLER O, BENROS M E, KROGH J. Anti-inflammatory intervention in depression: reply[J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72(5): 512-513.
- [9] KOHLER O, KROGH J, MORS O, et al. Inflammation in depression and the potential for anti-inflammatory treatment[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2016, 14(7): 732-742.
- [10] 贾竑晓, 李自艳. 基于伤寒方证思想的精神疾病辨治体系的构建[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(9): 5055-5059.
- [11] 张辉, 王来法, 王雪琴, 等. 知母及其活性成分抗抑郁作用机制研究进展[J]. *现代中医药*, 2023, 43(6): 1-7.
- [12] 徐海玉, 司国民. 司国民运用越鞠丸合百合知母汤治疗郁证经验[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(10): 143-146.
- [13] DU H L, WANG K Q, SU L, et al. Metabonomic identification of the effects of the Zhimu-Baihe saponins on a chronic unpredictable mild stress-induced rat model of depression[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 128: 469-479.
- [14] WANG H Q, LIU H T, WANG L, et al. Uncovering the active components, prospective targets, and molecular mechanism of Baihe Zhimu Decoction for treating depression using network pharmacology-based analysis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114586.
- [15] BI F F, BAI Y, ZHANG Y Y, et al. Ligustroflavone exerts neuroprotective activity through suppression of NLRP1 inflammasome in ischaemic stroke mice[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 25(1): 8.
- [16] SONG A Q, GAO B, FAN J J, et al. NLRP1 inflammasome contributes to chronic stress-induced depressive-like behaviors in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 1-13.
- [17] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. Inflammasome signaling in colorectal cancer[J]. *Transl Res*, 2023, 252: 45-52.
- [18] YANG T, NIE Z, SHU H F, et al. The role of BDNF on neural plasticity in depression[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 82.
- [19] LI J Y, ZHANG M, PEI Y Y, et al. The total alkaloids of *Sophora alopecuroides* L. improve depression-like behavior in mice via BDNF-mediated AKT/mTOR signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116723.
- [20] WANG B, JIN K L. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis[J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(2): 355-365.
- [21] WANG Y C, LI W Z, WU Y, et al. Acid-sensing ion channel 1a contributes to the effect of extracellular acidosis on NLRP1 inflammasome activation in cortical neurons[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12(1): 246.
- [22] DELLAROLE A, MORTON P, BRAMBILLA R, et al. Neuro-pathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 41: 65-81.
- [23] LI M M, LI C L, YU H J, et al. Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 1-12.
- [24] NORMAN G J, KARELINA K, ZHANG N, et al. Stress and IL-1beta contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(4): 404-414.
- [25] SINGHAL G, JAEHNE E J, CORRIGAN F, et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review[J]. *Front Neurosci*, 2014, 8: 315.
- [26] HU W, ZHANG Y D, WU W N, et al. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 52: 58-70.
- [27] DAVIS B K, WEN H T, TING J P Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 707-735.
- [28] KOWIAŃSKI P, LIETZAU G, CZUBA E, et al. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(3): 579-593.
- [29] JIN Y, SUN L H, YANG W, et al. The role of BDNF in the neuroimmune axis regulation of mood disorders[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 515.
- [30] TRIPP A, OH H, GUILLOUX J P, et al. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder[J]. *Am J Psychiatry*, 2012, 169(11): 1194-1202.
- [31] CALABRESE F, ROSSETTI AC, RACAGNI G, et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(8): 430.
- [32] MOLENDIJK M L, SPINHOVEN P, POLAK M, et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9 484)[J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 19(7): 791-800.
- [33] DUMAN R S, VOLETI B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents[J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(1): 47-56.
- [34] FIRST M, GIL-AD I, TALER M, et al. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(2): 246-255.
- [35] YUAN P X, ZHOU R L, WANG Y, et al. Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in post-mortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia[J]. *J Affect Disord*, 2010, 124(1-2): 164-169.
- [36] GOLDWATER D S, PAVLIDES C, HUNTER R G, et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery[J]. *Neuroscience*, 2009, 164(2): 798-808.
- [37] FUKUMOTO K, FOGAÇA M V, LIU R J, et al. Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor signaling is required for the antidepressant actions of (2R, 6R)-hydroxynorketamine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(1): 297-302.