

· 温阳解郁方治疗抑郁症机制研究专题 ·

[编者按] 该课题组自2006年提出以温阳解郁法论治抑郁症,以“阳虚肝郁”为基本病机,拟定了二仙汤与逍遥散合方(温阳解郁方)治疗抑郁症,选择母婴分离小鼠为基础模型,进行抑郁症的药效、作用机制及病机规律研究,发现该方可有效调节社会交互行为、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能及基因组DNA甲基化。母婴分离作为早年不良应激可增加抑郁症易感性,在此基础上,以慢性束缚应激作为“二次打击”诱导抑郁症模型(母婴分离联合束缚应激,MS+RS),可持续激活HPA轴,造成阳气过度消耗,导致肝气激发精神活动功能下降,出现典型抑郁行为。通过宏观行为学表现观察,结合5-HT神经系统、HPA轴、脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路相关指标的变化,以及温阳方二仙汤、解郁方逍遥散和温阳解郁方的方药反证,认为二次打击致抑郁小鼠的证候属性可能是阳虚肝郁型。课题组还发现温阳解郁方缓解抑郁样行为与改善MS+RS小鼠的神经可塑性有关,且疗效优于单一的温阳方和解郁方,因此通过BDNF/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,发现温阳解郁方能改善MS+RS小鼠神经元凋亡情况,并保护其突触结构和功能。课题组前期研究发现神经炎症反应是应激诱导抑郁症的重要媒介,对神经发生、树突及突触修剪和神经细胞命运均有重要影响,因此选择NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症通路,发现温阳解郁方可减轻小胶质细胞诱导的神经炎症,增加海马神经递质含量,改善突触可塑性。

该专题旨在通过温阳解郁方治疗MS+RS抑郁症模型的药理机制解析,对近年来课题组温阳解郁方治疗抑郁症的重要研究结果和发现进行介绍,并以药理研究的角度,对抗抑郁用药规律进行了思考,期冀为临床诊疗抑郁症提供借鉴。

二次打击致抑郁小鼠的证候属性及其机制

巩子汉¹, 王英², 杨婧雯², 梁文青³, 孟丹华², 余楷杰², 梁媛², 岳广欣^{2*}

(1. 宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院, 银川 750021;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

3. 河南中医药大学, 郑州 450000)

[摘要] 目的:探讨母婴分离(MS)联合慢性束缚应激(RS)致抑郁小鼠的证候属性及其机制研究。方法:仔鼠出生第0天(PD0)随机分为空白组和造模组。PD21后剔除雌鼠,随机分为模型组、温阳组、解郁组、温阳解郁组、氟西汀组,采用MS+RS建立二次打击模型,每组15只。采用糖水、悬尾及旷场实验评估小鼠焦虑抑郁样行为;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)及皮质酮(CORT)含量;高效液相-电化学法(HPLC-ECD)检测各组小鼠海马单胺类神经递质含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组小鼠海马5-HT系统、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴及脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路基因表达水平;免疫组化法(IHC)检测各组小鼠海马5-HT系统及HPA轴蛋白表达水平;全自动蛋白表达分析系统(Simple Wes)检测各组小鼠海马BDNF等蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠出现抑郁样行为,温阳解郁方及氟西汀可显著缓解。与空白组比较,模型组血浆CORT及ACTH含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,温阳解郁方及氟西汀组小鼠血浆CORT及ACTH含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,单胺类神经递质表达方面,模型组海马神经递质表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,温阳解郁方及氟西汀组小鼠海马神经递质表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠5-HT能神经受到抑制、HPA轴异常激活,温阳解郁方及氟西汀可调控5-HT能神经及HPA轴的异常状态。与空白组比较,海马组织BDNF、TrkB mRNA及蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,温阳、解郁、温阳解郁方及氟西汀组小鼠海马BDNF、TrkB mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:二次打击致抑郁小鼠的证候属性可能是阳虚肝郁型,温阳解郁方可能通过调节5-HT神经系统及HPA轴介导的BDNF信号通路,增加海马神经递质含量,进而缓解模型小鼠抑郁样行为。

[关键词] 二次打击; 抑郁样行为; 5-羟色胺(5-HT)神经系统; 下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴; 脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路; 阳虚肝郁

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R742 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)06-0029-10

[收稿日期] 2023-10-31

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174251,81573846);北京市自然科学基金面上项目(7232300);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A00607);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YZ-202107, YZ-202148, YZX-202242)

[第一作者] 巩子汉, 博士, 副研究员, 从事情志病的中医药防治基础及方证相关研究, E-mail: 1217253647@qq.com

[通信作者] *岳广欣, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事情志病的中医药防治基础及方证相关研究, E-mail: yuegx73@hotmail.com

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20232244

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240129.1606.003>

[网络出版日期] 2024-01-30 11:57:49

Syndromes and Mechanisms of Depression Induced by Second Hit in Mice

GONG Zihan¹, WANG Ying², YANG Jingwen², LIANG Wenqing³, MENG Danhua², SHE Kaijie²,
LIANG Yuan², YUE Guangxin^{2*}

(1. Ningxia Chinese Medicine Research Center, Yinchuan 750021, China; 2. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Traditional Chinese Medicine (TCM) School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the syndromes and mechanisms of depression induced by maternal separation (MS) combined with chronic restraint stress (RS) in mice. **Method:** On postnatal day 0 (PD0), the offspring mice were randomized into a blank group (NC) and a modeling group. The mouse model of depression was established by MS+RS for 21 days. After removal of female mice on PD21, the modeled mice were randomized into model, Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu, and fluoxetine groups, with 15 mice in each group. The sucrose preference, tail suspension, and open field tests were carried out to evaluate the anxiety and depression-like behavior in mice. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) levels in mouse plasma. High performance liquid chromatography-electrochemical detector was used to determine the content of monoamine neurotransmitters in the hippocampus. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was employed to determine the mRNA levels of genes in the 5-hydroxytryptamine (5-HT) system, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway in the hippocampus. Immunohistochemistry was employed to determine the expression levels of proteins in the 5-HT system and HPA axis in the hippocampus. The Simple Western system was used to determine the protein levels of BDNF and tyrosine kinase receptor B (TrkB) in the hippocampus. **Result:** Compared with the NC group, the model group exhibited depression-like behavior, which was significantly relieved by Wenyang Jieyu prescription and fluoxetine. Compared with the NC group, the model group showed elevated levels of CORT and ACTH in the plasma ($P<0.01$), which, however, were lowered by Wenyang Jieyu prescription and fluoxetine ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the NC group, the model group showed inhibited expression of neurotransmitters in the hippocampus ($P<0.05$, $P<0.01$), while Wenyang Jieyu prescription and fluoxetine restored the expression of neurotransmitters ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with NC group, the model group showed inhibition of the 5-HTergic nerve and abnormal activation of the HPA axis, and Wenyang Jieyu prescription and fluoxetine regulated the abnormal state of the 5-HTergic nerve and HPA axis. Compared with NC group, the modeling down-regulated the mRNA and protein levels of BDNF and TrkB in the hippocampus ($P<0.05$, $P<0.01$), which, however, were recovered in Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu, and fluoxetine groups ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** The mouse model of depression induced by MS+RS may present the syndrome of Yang deficiency and liver depression. Wenyang Jieyu prescription may increase the content of hippocampal neurotransmitters by regulating the 5-HT system and the BDNF signaling pathway mediated by the HPA axis, thereby alleviating depression-like behavior in mice.

[Keywords] second hit; depression-like behavior; 5-hydroxytryptamine (5-HT) system; hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis; brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway; Yang deficiency and liver depression

抑郁症的发病率呈逐年上升趋势,据世界卫生组织(WHO)统计,全球约有3.5亿抑郁症患者^[1],尤其在全球遭受新冠肺炎疫情肆虐后,很大比例的个体在后疫情时代呈现出焦虑/抑郁样状态^[2-4],给全球健康及经济发展带来严重危害。早年不良经历是抑郁症的重要危险因素,可致精神和躯体疾病的易感性,并引起机体表观遗传学改变,其影响可持续至成年,甚至遗传至后代。母婴分离作为早年不良经历的一种形式,可引起下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的高反应性,显著影响大脑的发育和行为模式,已成为研究抑郁症发病机制的重要模型。

课题组前期研究发现,母婴分离可造成小鼠抑郁易感性,表现为社会行为异常,HPA轴功能、神经营养因子信号通路多基因甲基化异常,并经宏观表征观察、方证反证确定其基础证候属性为阳虚肝郁。目前临床对于抑郁症阳虚肝郁证候属性的认识得到广泛认可,但在疾病发展过程中,阳虚肝郁证形成的机制及生物学内涵是什么,将直接影响临床诊疗的精确性。因此本实验通过研究温阳、解郁、温阳解郁方对母婴分离联合束缚应激模型小鼠糖水偏好、悬尾及旷场实验的影响,运用现代生物学指标及“方证相关”理论进行证候评价,以确定母婴分离联合束缚应激致抑郁样小鼠的证候属性和生物学机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康C57BL/6J小鼠,2月龄,体质量(20±2)g,雌性20只,雄性5只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2021-0006,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所清洁级动物房,许可证号SYXK(京)2021-0017。所有动物饲养、实验操作均严格按照中国中医科学院中医基础理论研究所要求进行。动物实验伦理经中国中医科学院中医基础理论研究所医学伦理委员会批准,批准文号IBTCMCACMS-21-2105-05。

1.2 药物及试剂 北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、薄荷、炙甘草、仙茅、炙淫羊藿、制巴戟天、黄柏、知母均购自北京同仁堂中药有限公司,货号分别为211009009、210811011、210826004、210801002、210716002、210825004、210908006、210227005、210316003、210414006、210309004、210423003,由中国中医科学院中医基础理论研究所岳广欣研究员鉴定;盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,货号20160029);促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质

酮(CORT)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为m1001895、m1037564);去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)对照品[Sigma(上海)贸易有限公司,货号分别为A9512、I5627、H8502、H9523];糖皮质激素受体(GR)抗体(美国Abcam公司,货号ab183127);促肾上腺皮质激素释放激素受体1(CRHR1)、5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R抗体[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,货号分别为PAG-27121、PA5-95035、MA5-32717];5-HT_{2c}R抗体(美国MerK公司,货号MABNI595);TRIZol(美国Ambion公司,货号152104);GoScript™ Reverse Transcription System、GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems(普洛麦格北京生物技术有限公司,货号分别为A5001、A6002);检测模块、5×荧光混合物、二抗[普诺森生物科技(上海)有限公司,货号分别为DM-001、SM-W00412(230 kDa)、042-206]。

逍遥散和二仙汤分别出自《太平惠民和剂局方》、上海中医学院《中医方剂临床手册》,其组成如下,逍遥散:柴胡15g、当归15g、白芍15g、白术15g、茯苓15g、生姜5g、薄荷5g、炙甘草7.5g;二仙汤:仙茅9g、淫羊藿9g、巴戟天9g、当归9g、知母4.5g、黄柏4.5g;温阳解郁方为二方合方,其中当归为15g。于上述药物中首次加入10倍量水浸泡30min,武火煮开后文火煎煮1.5h取滤液,药渣中再加入8倍量水,操作同上。将2次煎煮药汁合并,水浴浓缩并干燥,制成药粉于4℃冰箱中备用。

1.3 仪器 2K15型超速低温离心机(德国Sigma公司),Eclipse E100型光学显微镜(日本尼康公司),CFX96™型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司),DECADE II型电化学检测器(荷兰Antec公司),AperioVersa 8型全自动明场荧光全切片成像分析系统(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备与分组^[5-6] 母婴分离动物模型(MS):将C57BL/6J小鼠50只,雌、雄小鼠按4:1数量进行混居,孕鼠待产前单笼饲养,分娩后每窝仔鼠保持在4~7只,以小鼠出生日记为PD0,于P5进行母婴分离动物模型制备:先将母鼠移至新笼,再将仔鼠移至分离盒后置于孵育箱(32℃),8h·d⁻¹,共10d(PD5~PD14)。后继续饲养至PD21离乳,选取雄性小鼠纳入后续实验。束缚应激动物模型(RS):取90日龄(P90)雄性小鼠,使用预处理的

50 mL离心管作为束缚装置对小鼠进行束缚应激, 3 h/d。“二次打击”动物模型(MS+RS):将经母婴分离的雄性小鼠饲养至90日龄,使用预处理的50 mL离心管作为束缚装置对小鼠进行束缚应激, 3 h·d⁻¹。

未进行母婴分离的小鼠作为空白组,将母婴分离小鼠随机分为母婴分离组、模型组、温阳组、解郁组、温阳解郁方组、氟西汀组,共7组,每组15只,温阳、解郁、温阳解郁方及氟西汀组小鼠分别给予二仙汤、逍遥散、温阳解郁方及氟西汀的药混饲料干预,90日龄时给与21 d的束缚应激。

2.2 给药 温阳、解郁及温阳解郁方的出膏率分别为26.9%、25.4%及27.3%,干燥、打粉备用。按成年小鼠进食量(5 g·d⁻¹),将饲料打粉,按体型系数计算小鼠用药量,将药粉按温阳、解郁、温阳解郁方及氟西汀(5.85、12.03、16.71、2.6×10⁻³ g·kg⁻¹)的用药剂量混入饲料粉末中,烘干、压条,制备药混饲料。

2.3 动物取材 血浆取样:禁食不禁水12 h后,以0.4%戊巴比妥钠(10 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉小鼠,眼球取血存放于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,静置2 h,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径16 cm),取上清于-80 °C冰箱保存备用。全脑取样:将取血后的小鼠仰卧置于冰板上,暴露心脏,生理盐水灌注,需做免疫组化小鼠继续采用4%多聚甲醛灌注,取全脑备用。

2.4 指标检测

2.4.1 糖水偏好实验 将各组小鼠预先暴露于2瓶2%蔗糖水环境适应饮用24 h后,更换为1瓶2%蔗糖水和1瓶纯水饮,12 h后换位。实验开始各组小鼠禁水12 h,给予小鼠2%蔗糖水、纯水各1瓶,并记录质量,12 h后称量剩余蔗糖水、纯水的质量,计算蔗糖水消耗比例^[7]。糖水偏好占比= $V1_{糖水消耗量} / (V1_{糖水消耗量} + V2_{纯水消耗量}) \times 100\%$ 。

2.4.2 悬尾实验 距尾尖1 cm处固定小鼠,使其头部向下悬挂并距离地面60 cm,计时6 min,在后4 min记录小鼠的不动时间。使用XR-XQ202型SuperFst悬尾实验分析软件记录小鼠不动时间。

2.4.3 旷场实验 将小鼠放入旷场箱(40 cm×40 cm×35 cm)中心点,设中心点附近20 cm×20 cm区域为中央区,记录前5 min小鼠运动总长度,中央区进入次数,中央区停留时间。75%乙醇清洁旷场,然后进行下一批小鼠旷场实验。采用TopScan Version 2.0软件进行行为学数据分析^[8]。

2.4.4 ELISA检测 各组小鼠血浆ACTH及CORT含量 将试剂盒和待测样品平衡至室温,制备对照品

和洗涤液,按要求加样、温育、洗涤、温育、洗涤、显色、终止。酶标仪内测定450 nm波长时各孔吸光度A,并绘制标准曲线,计算样品浓度。

2.4.5 高效液相-电化学法(HPLC-ECD)检测 各组小鼠脑内单胺类神经递质含量 参照小鼠脑立体定位图谱^[9],冰上分离海马组织,采用HPLC-ECD法检测NE、E、DA及5-HT的含量。

2.4.6 Real-time PCR检测 小鼠海马组织5-HT能神经及HPA轴相关mRNA表达水平 称取海马组织,TRIzol法提取总RNA。PCR扩增ACTH、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、单胺氧化酶(MAOA)、5-羟色胺转运体(SERT)、5-HT_{1A}R、GR基因片段(引物由上海生工有限公司设计合成)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,反应条件:95 °C预变性100 s,95 °C变性15 s,60 °C退火55 s,循环42次,终末延伸65 °C 5 s,95 °C。用2^{-ΔΔC_t}法计算各mRNA相对表达量,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
GAPDH	上游 GGTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	下游 TGGTCCAGGGTTTCTACTCC	
ACTH	上游 CAGCAGATGACATCATTGACTG	103
	下游 GCATGGAAGATGGTGATGTAAC	
CRH	上游 CAGCCCTTGAATTTCTTGACAG	106
	下游 GACTTCTGTTGAGATTCCCCAG	
MAOA	上游 CAAGAGCCTGAGTCCAAGGATGTTC	106
	下游 ACAAAAGCAGAGAAGAGCCACAGAAG	
SERT	上游 GAACAGGAGAAACAGAGGGCTGATG	127
	下游 AATGTTGCCAACTATCTCATCG	
5-HT _{1A} R	上游 GTTCACGTAGTCTATAGGGTCG	234
	下游 ACTCCAAAGAATCCTTAGCTCC	
GR	上游 TATACAAGTCCATCACGCTTCC	90
	下游 CCCATGAAAGAAGTAAACGTCC	

2.4.7 免疫组化法检测 小鼠海马组织5-HT系统及HPA轴蛋白表达 取小鼠全脑组织,切片,进行抗原抗体反应后显色,GR、5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R、CRHR₁一抗稀释比例1:1 000,5-HT_{2C}R稀释比例1:200。将切片裱于载玻片上,干燥、脱水、透明、封片,采用全自动明场荧光全切片成像分析系统拍照,Image 1.8.0图像分析系统进行分析,根据小鼠脑立体定位图谱确定核团位置^[9]。

2.4.8 全自动蛋白表达分析系统(Simple Wes)法 检测各组小鼠相关脑区BDNF及TrkB蛋白表达水平 称取海马组织10 mg,加入裂解液500 μL提取

蛋白。BCA蛋白定量法测定样品蛋白浓度,按照Simple Wes上机要求,依次配制并在上样板上加入缓冲液、抗体稀释液、链霉亲和素及发光液等。其中一抗稀释比例为GAPDH(1:8000)、BDNF(1:200)、TrkB(1:20000),二抗(1:5000);取出毛细管放入Wes,运行程序。采用Compass for SW软件分析得到条带灰度值。

2.5 统计学处理 采用SPSS 24.0软件对实验数据进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态性检验,符合后进行单因素方差分析(One-way ANOVA)分析多组间差异,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时采用Welch检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表2 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠糖水、悬尾及旷场实验的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on sugar water, tail suspension, and open field experiments of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水消耗占比/%	悬尾不动时间/s	旷场实验		
				运动距离/m	穿越中央次数/次	中央停留时间/s
空白组		0.68±0.08	126.07±14.95	1.42±0.22	25.87±10.53	30.43±12.05
母婴分离组		0.70±0.08	147.53±13.92 ¹⁾	1.57±0.33	34.87±9.95	28.83±7.09
模型组		0.45±0.10 ^{2,4)}	166.80±15.26 ^{2,4)}	1.34±0.18 ³⁾	20.87±4.26 ⁴⁾	20.07±5.38 ³⁾
温阳组	5.85	0.55±0.11 ⁷⁾	138.93±33.81	1.47±0.28	31.27±10.96	28.08±12.72
解郁组	12.03	0.52±0.09 ⁷⁾	156.67±11.55 ⁸⁾	1.39±0.23	22.47±11.88	23.49±5.25
温阳解郁组	16.71	0.63±0.16 ⁶⁾	126.33±20.52 ⁶⁾	1.48±0.38	31.67±10.18 ⁶⁾	31.13±11.78 ⁶⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	0.67±0.13 ⁶⁾	134.27±16.05 ⁶⁾	1.46±0.19	27.87±6.60	29.76±9.18 ⁵⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与母婴分离组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与模型组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与温阳解郁组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$

3.2 对各组小鼠血浆ACTH及CORT含量的影响

与空白组、及母婴分离组比较,模型组小鼠血浆CORT及ACTH含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,温阳解郁及氟西汀组小鼠血浆CORT及ACTH含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表3。

3.3 对各组小鼠脑内单胺类神经递质含量的影响

与空白组及母婴分离组比较,模型组小鼠海马NE、E、DA、5-HT含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,温阳、解郁、温阳解郁及氟西汀组海马NE、E、DA、5-HT含量明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

3.4 对各组小鼠海马5-HT能神经关键mRNA及蛋白表达水平的影响

与空白组及母婴分离组比较,模型组小鼠海马5-HT、SERT及MAOA mRNA表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,温阳、温阳解郁组及氟西汀组5-HT、SERT及MAOA mRNA表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),解郁组小鼠海马MAOA mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。见表5。

3 结果

3.1 对小鼠糖水、悬尾及旷场实验的影响

与空白组比较,母婴分离组小鼠悬尾不动时间明显升高($P < 0.05$),模型组小鼠糖水消耗占比显著降低($P < 0.01$),悬尾不动时间显著升高($P < 0.01$);与母婴分离组比较,模型组小鼠糖水消耗占比显著降低($P < 0.01$),悬尾不动时间显著升高($P < 0.01$),旷场运动距离、穿越中央区域次数及中央区域停留时间明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,温阳解郁方及氟西汀组小鼠糖水消耗占比显著升高($P < 0.01$),悬尾不动时间显著降低($P < 0.01$),温阳解郁方组小鼠穿越中央区域次数、中央区域停留时间显著升高($P < 0.01$)。见表2。

表3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠血浆CORT及ACTH含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on plasma CORT and ACTH content in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CORT/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白组		103.59±4.61	100.28±13.59
母婴分离组		112.24±9.56	119.64±18.14
模型组		140.19±10.77 ^{1,2)}	161.32±18.34 ^{1,2)}
温阳组	5.85	129.32±13.38	141.32±12.05 ⁵⁾
解郁组	12.03	122.01±9.76	145.11±20.02
温阳解郁组	16.71	117.30±7.42 ³⁾	137.04±23.08 ³⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	128.54±17.48 ³⁾	126.12±17.92 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与母婴分离组比较²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与温阳解郁组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表4-表7同)

与空白组及母婴分离组比较,模型组小鼠海马CA3区5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R及5-HT_{2C}R蛋白表达明显

表4 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马NE、E、DA、5-HT含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription in NE, E, DA, and 5-HT content in hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NE	E	DA	5-HT
空白组		2 063.89±175.44	866.19±80.84	1 259.37±135.37	481.81±31.14
母婴分离组		2 161.42±204.50	1 048.59±98.34	1 174.53±115.18	522.06±29.94
模型组		1 537.14±220.15 ^{1,2)}	447.77±40.34 ^{1,2)}	785.74±95.61 ^{1,2)}	352.29±54.11 ^{1,2)}
温阳组	5.85	2 018.75±174.56 ⁴⁾	714.59±31.52 ^{4,6)}	1 202.32±94.67 ^{4,6)}	462.93±46.15 ^{4,6)}
解郁组	12.03	1 750.21±223.04 ^{3,6)}	609.15±35.32 ^{4,6)}	1 107.63±141.75 ^{4,6)}	400.38±44.77 ^{3,6)}
温阳解郁组	16.71	2 109.15±179.35 ⁴⁾	929.33±63.25 ⁴⁾	1 354.38±60.61 ⁴⁾	522.52±36.59 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	2 087.60±179.35 ⁴⁾	1 052.43±63.25 ⁴⁾	1 156.77±60.61 ⁴⁾	535.47±36.59 ⁴⁾

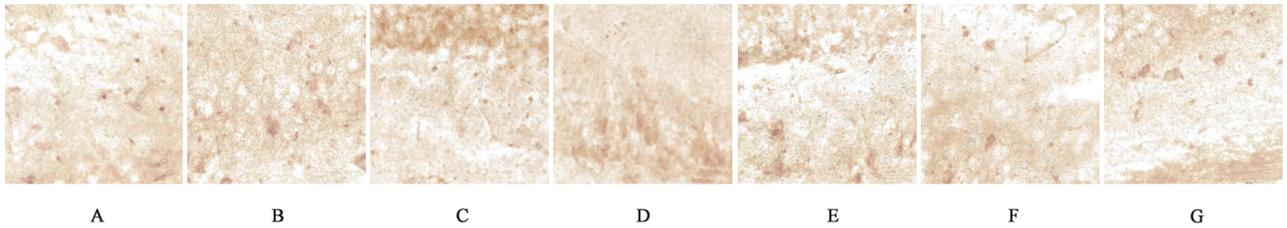
表5 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马5-HT、SERT及MAOA mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on 5-HT, SERT, and MAOA mRNA expression in hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT	SERT	MAOA
空白组		1.00±0.10	1.00±0.05	1.00±0.07
母婴分离组		0.94±0.10	0.96±0.10	1.13±0.11
模型组		1.38±0.15 ^{1,2)}	1.48±0.12 ^{1,2)}	4.62±0.37 ^{1,2)}
温阳组	5.85	1.24±0.08 ³⁾	1.27±0.13 ³⁾	2.19±0.13 ^{4,5)}
解郁组	12.03	1.33±0.15	1.38±0.17 ⁶⁾	3.26±0.09 ^{4,6)}
温阳解郁组	16.71	1.21±0.07 ³⁾	1.17±0.05 ⁴⁾	2.51±0.08 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	1.12±0.09 ⁴⁾	1.10±0.08 ⁴⁾	2.42±0.24 ⁴⁾

增多;与模型组比较,温阳组海马CA3区5-HT_{2A}R及5-HT_{2C}R蛋白表达明显减少,温阳解郁组及氟西汀

组小鼠海马CA3区5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R及5-HT_{2C}R蛋白表达明显减少。见图1-图3。



注:A.空白组;B.母婴分离组;C.模型组;D.温阳组;E.解郁组;F.温阳解郁组;G.氟西汀组(图2-图6同)

图1 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA3区5-HT_{1A}R表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 1 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on expression of 5-HT_{1A}R in hippocampal CA3 region of mice in each group (IHC, ×200)

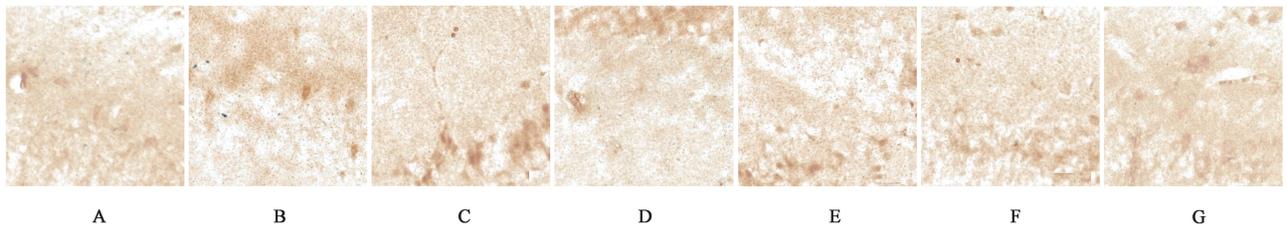


图2 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA3区5-HT_{2A}R表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 2 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on expression of 5-HT_{2A}R in hippocampal CA3 region of mice in each group (IHC, ×200)

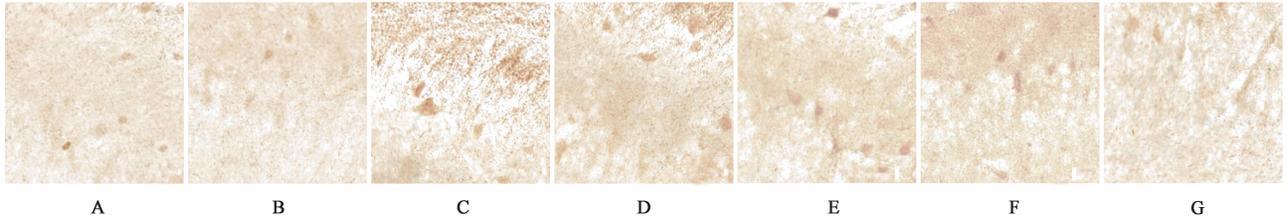


图3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA3区5-HT_{2c}R表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on expression of 5-HT_{2c}R in hippocampal CA3 region of mice in each group (IHC, ×200)

3.5 对各组小鼠HPA轴关键mRNA及蛋白表达水平的影响 与空白组及母婴分离组比较,模型组小鼠海马ACTH、CRH mRNA表达显著升高($P < 0.01$),GR mRNA表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,温阳组、温阳解郁组及氟西汀组小鼠海马GR mRNA表达显著升高($P < 0.01$),ACTH、CRH mRNA表达显著降低($P < 0.01$),解郁组GR mRNA表达

显著升高($P < 0.01$),ACTH mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。见表6。与空白组比较,模型组小鼠海马CA3区CRHR1蛋白表达明显增多;与母婴分离组比较,模型组小鼠海马CA3区GR蛋白表达明显减少,CRHR1蛋白表达明显增多;与模型组比较,各给药组小鼠海马CA3区CRHR1蛋白表达明显减少。见图4和图5。

表6 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马GR、ACTH及CRH mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on mRNA expression of GR, ACTH, and CRH in hippocampus of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GR	ACTH	CRH
空白组		1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.03
母婴分离组		1.10±0.07	1.20±0.20	1.13±0.07
模型组		0.41±0.05 ^{1,2)}	3.26±0.39 ^{1,2)}	2.23±0.18 ^{1,2)}
温阳组	5.85	0.76±0.06 ^{4,6)}	1.96±0.33 ⁴⁾	1.54±0.05 ^{4,6)}
解郁组	12.03	0.65±0.06 ^{4,6)}	2.48±0.22 ^{3,6)}	1.92±0.08 ⁶⁾
温阳解郁组	16.71	0.88±0.08 ⁴⁾	1.47±0.15 ⁴⁾	1.27±0.05 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	0.92±0.03 ⁴⁾	1.53±0.12 ⁴⁾	1.28±0.08 ⁴⁾

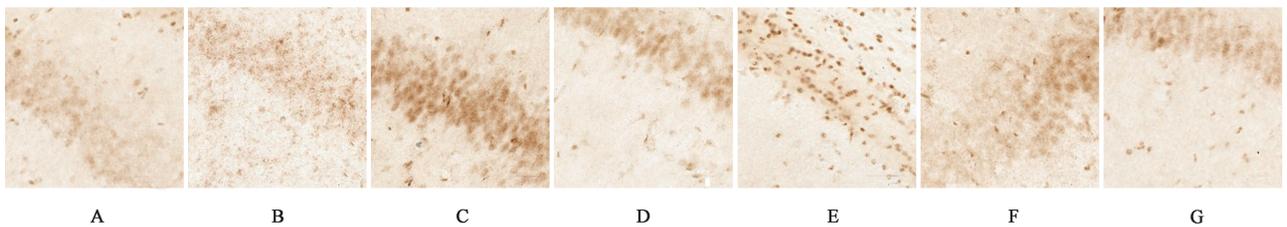


图4 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA3区GR表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on expression of GR in hippocampal CA3 region of mice in each group (IHC, ×200)

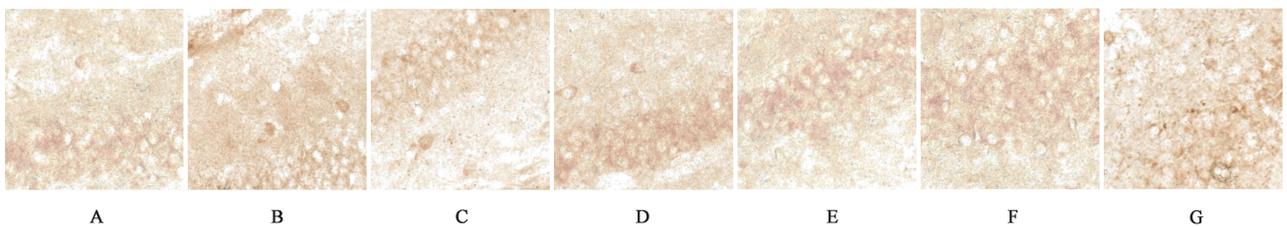


图5 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA3区CRHR₁表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 5 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on expression of CRHR₁ in hippocampal CA3 region of mice in each group (IHC, ×200)

3.6 对 各 组 小 鼠 BDNF 信 号 通 路 关 键 mRNA 及 蛋 白 表 达 水 平 的 影 响 与 空 白 组 及 母 婴 分 离 组 比 较, 模 型 组 小 鼠 海 马 BDNF、TrkB mRNA 与 蛋 白 表 达 显

著 降 低 ($P<0.01$); 与 模 型 组 比 较, 各 给 药 组 小 鼠 海 马 BDNF、TrkB mRNA 与 蛋 白 表 达 明 显 升 高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见 表 7、图 6。

表 7 温阳、解郁及温阳解郁方对 各 组 小 鼠 海 马 BDNF、TrkB mRNA 与 蛋 白 表 达 的 影 响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on mRNA and protein expression of BDNF, TrkB of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF mRNA	TrkB mRNA	BDNF/GAPDH	TrkB/GAPDH
空白组		1.00±0.03	1.00±0.09	1.04±0.10	1.02±0.13
母婴分离组		1.15±0.09	1.10±0.06	1.08±0.09	1.06±0.13
模型组		0.48±0.06 ^{1,2)}	0.54±0.08 ^{1,2)}	0.70±0.08 ^{1,2)}	0.73±0.07 ^{1,2)}
温阳组	5.85	0.75±0.11 ^{4,5)}	0.71±0.04 ^{4,5)}	0.92±0.12 ⁴⁾	0.90±0.09 ³⁾
解郁组	12.03	0.64±0.11 ^{4,6)}	0.65±0.04 ^{3,6)}	0.89±0.11 ⁴⁾	0.92±0.09 ⁴⁾
温阳解郁组	16.71	0.92±0.10 ⁴⁾	0.80±0.11 ⁴⁾	0.91±0.12 ⁴⁾	0.93±0.10 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	0.95±0.07 ⁴⁾	0.72±0.06 ⁴⁾	0.89±0.12 ⁴⁾	0.96±0.10 ⁴⁾

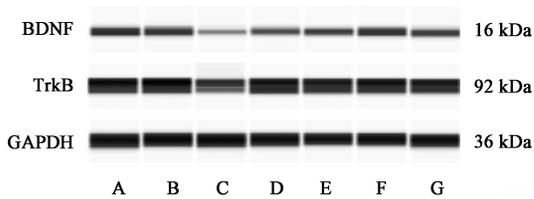


图 6 各 组 小 鼠 海 马 海 马 BDNF、TrkB 蛋 白 表 达 电 泳
Fig. 6 Electrophoresis of BDNF and TrkB protein expression in hippocampus of mice in each group

4 讨论

《黄帝内经·素问》云：“阳气者，若天与日，失其所则折寿而不彰”，阳气是人体生命功能的体现，发挥着推动、温煦等作用。全身阴阳之根又为肾阴肾阳，著名中医学家李可认为阳气最主要的来源是肾中坎中一丝真阳，小儿稚阳未充，早年不良经历更易造成阳气的折伤进而形成“阳虚”的潜质，影响机体脏腑功能的成熟，为诸多疾病的发生埋下了夙根。强应激作用于机体，可致使下丘脑产生大量糖皮质激素以应对应激源对机体造成的影响，研究发现糖皮质激素可激发人体阳气大量外出以应对紧急事件，易使阳气耗损，肾精受损^[10]。诸多研究发现肾阳虚存在下丘脑-垂体-靶腺轴的功能紊乱，HPA轴作为其中之一，主要以CRH、ACTH及GC3种激素低表达为具体表现^[11-13]。有研究者发现肾阳虚患者大多表现为肾上腺皮质功能抑制，CORT合成分泌减少，故CORT可作为评价肾阳虚模型的重要指标^[14]。

本研究结果发现模型组小鼠血浆ACTH及CORT含量显著升高，海马ACTH及CRH mRNA，CRHR1蛋白表达水平显著升高，HPA轴处于持续激

活状态。结合本实验过程，母婴分离小鼠具有潜在的阳虚证，再加以束缚应激，再结合本实验结果发现，模型小鼠无明显畏寒蜷缩、精神萎靡、神情淡漠等表现，根据方证相应理论，笔者以方测证发现母婴分离小鼠在束缚应激21 d时以阳虚肝郁证为主，结合前期实验结果，说明在束缚应激14~21 d的阶段中，模型小鼠由14 d时的主证——肝郁证，逐渐向21 d时的主证——阳虚肝郁证转变，并非前文研究者所述单纯的肾阳虚证模型，故而HPA轴尚未表现出抑制状态。同时本实验发现温阳

对于HPA轴的调节作用最为明显，二仙汤次之，逍遥散再次之。故而推断母婴分离联合束缚应激所形成的“二次应激”模型存在“肝郁”证，亦存在“阳虚”证，且“阳虚”较“肝郁”更为明显。

笔者发现小鼠海马组织NE、E、DA、5-HT均显著下降，单胺学说是抑郁症发病机制研究中的经典理论之一，认为抑郁症是脑中单胺递质5-HT和NE功能不足引起的。中枢5-HT含量下降，出现抑郁、焦虑情绪、自伤自杀行为、攻击行为、认知障碍、食欲、性欲和睡眠障碍。5-HT可能对脑内参与情绪反应的功能系统具有稳定作用，脑内5-HT的缺乏构成了发病的倾向，或具备了发病的可能性，但最终导致抑郁症则同去甲肾上腺素能系统活动失常有关，去甲肾上腺素能系统活动减弱时可导致抑郁^[15]。笔者结果发现边缘系统组织SERT、MAOA mRNA表达显著降低，研究发现反复应激可致使色氨酸羟化酶(TPH)表达的降低^[16]，TPH是5-HT生物合成中的限速酶，TPH低表达致5-HT的合成减少，5-HIAA亦减少；5-HT分子需从突触间隙转运回突触前末端

以调节5-HT系统信号传导能力,故而SERT含量升高。抗抑郁药物如单胺氧化酶抑制剂(MAOI)就是通过降低单胺氧化酶活性从而提高突触间隙单胺递质水平而发挥抗抑郁效应^[17],故而MAOA高表达可能是致抑郁的重要原因之一。5-HT递质作为5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R及5-HT_{2C}R激动剂,急性应激使5-HT过度合成,可激活突触前膜5-HT_{1A}R,激活的5-HT_{1A}R又可抑制5-HT的合成及释放,使突触间隙的5-HT含量明显下降,引起抑郁。超敏的5-HT亦可激活突触后膜的5-HT_{2A}R及5-HT_{2C}R,致传导加速,则出现抑郁、焦虑及自杀等抑郁样表现,与本实验的结果一致。

本实验结合药物干预效应,发现温阳、逍遥散及温阳解郁方均可部分逆转“二次应激”后5-HT系统的改变。根据方证相应理论,提示在母婴分离联合束缚应激的过程中,在21d存在“肝郁证”的同时,亦存在“阳虚证”。因此,“阳虚证”在抑郁症的发生发展过程中具有重要的生理病理意义,这与众多研究者的临床研究结果一致。同时温阳组与解郁组比较发现,在束缚应激21d的阶段中,温阳药的部分缓解作用有优于逍遥散组的趋势,提示此阶段也存在“阳虚肝郁证”,但总体以“阳虚证”为主。

中医学“肾脑相济”理论认为“脑为髓海”“肾主骨生髓”,肾中精气旺盛,上通于脑则髓海充盈、神机灵活。然独阴不生,故肾阴、肾精依赖肾阳之温养方可充盈有余,才能够供养脑神,若阳气亏虚,温养无力、则肾精无以化髓充脑,故而髓海失养,终致“肾脑失济”,进而引起一系列的精神情志变化^[18],一身之阳根于肾,故肾阳不足可影响体内阳气的盛衰,阳气虚羸之表现与郁证表现较为吻合,因此诸多学者认为阳虚为抑郁症发病的关键所在^[19-21]。BDNF对促进神经元的分化、生长及存活具有重要作用。研究发现自然衰老大鼠海马神经元数量减少,神经生长因子(NGF)和神经营养因子3(NT3)及其受体(Trk)表达显著减少^[22-23]。肾主藏精、肾中精气足则可上通于脑,髓海充盈、神机灵活。随着年龄的增长肾中精气渐衰,可致髓海空虚、神无所归,进而引起一系列的精神情志类变化。研究发现补肾类中药在老年患者和脑老化动物模型中有提高神经营养因子表达的作用^[24-25]。基于此认为中医所指“髓海”其现代生物学基础是脑内神经元和BDNF;脑内BDNF减少、神经元大量萎缩和丢失而造成“髓海不足”可引起认知功能下降进而可诱导各种精神情志类疾病^[26]。而对抑郁症自杀者的

大脑进行尸检发现,BDNF水平显著低于对照组^[27]。本实验结果表明,母婴分离小鼠遭受束缚应激21d后,其海马组织BDNF及TrkB mRNA和蛋白表达水平均显著降低,研究发现,补肾温阳类中药及其提取物对具有逆转BDNF的低表达或抗抑郁的作用,如研究发现淫羊藿苷可增加围绝经期抑郁症大鼠脑组织匀浆液中5-HT、DA和NA的表达,进而发挥抗抑郁的作用^[28]。综上所述,结合本实验结果,发现二仙汤及温阳解郁方均有提高模型小鼠脑内BDNF及其受体TrkB表达的作用,以方测证,说明束缚应激21d后的小鼠存在“阳虚证”,同时逍遥散也可提高模型小鼠脑内BDNF及其受体TrkB的表达水平,提示在此阶段“肝郁证”依然存在,故而此阶段的中医证候是“阳虚肝郁”证。

综上所述,母婴分离小鼠束缚应激21d时,CRH、ACTH高表达,GR低表达,HPA轴激活,结合对外界刺激的反应减弱,表现为旷场穿越次数显著减少,说明其有“阳虚证”。三方比较发现,温阳解郁方可显著调节CRH、ACTH、GR等的异常表达,HPA轴激活状态受到抑制,作用优于二仙汤,逍遥散仅对部分指标有调节作用,根据方证相应理论,认为此时小鼠的证候属性是“阳虚肝郁证”,且以“阳虚证”为主。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ALIREZAEI M, ESKANDARIEH S, SAHRAIAN M A, et al. Depression, anxiety, and fear of COVID-19 in patients with multiple sclerosis in pandemic era: A cross-sectional study [J]. *Neurol Sci*, 2022, 43 (1): 59-66.
- [2] HUANG T L, LIN C C. Advances in biomarkers of major depressive disorder [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 68: 177-204.
- [3] ZALD D H, MCHUGO M, RAY K L, et al. Meta-analytic connectivity modeling reveals differential functional connectivity of the medial and lateral orbitofrontal cortex [J]. *Cereb Cortex*, 2014, 24 (1): 232-248.
- [4] 潘明敏,岳广欣.从温阳解郁方研究谈抑郁症治疗用药思路[J].*中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(6): 58-65.
- [5] 孟丹华,余楷杰,孟晓莹,等.基于BDNF/Akt/mTOR信号通路探讨温阳解郁方调控海马神经元凋亡和突触可塑性的机制[J].*中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(6): 48-57.

- [6] 孟丹华,余楷杰,孟晓莹,等. 基于NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路探讨温阳解郁方调节小鼠海马突触可塑性的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(6): 39-47.
- [7] CHU X, ZHOU Y, HU Z, et al. 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:32935.
- [8] 巩子汉,高静静,余楷杰,等. 温阳、解郁及温阳解郁方对LPS“二次应激”诱发的抑郁样行为小鼠海马小胶质细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):55-62.
- [9] PAXINOS G F. The mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2012:273.
- [10] 张军,王华楠,陈艳. 糖皮质激素性骨质疏松症的中医病机新论[J]. 河北中医, 2006, 28(2):116-117.
- [11] 周蓓,朱巧凤,陈誉丹,等. 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾虚模型大鼠神经内分泌免疫网络的调节机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33(11):1313-1319.
- [12] 李莫愁. 耳穴结合中药治疗肾虚型功能性便秘的临床疗效探究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2022.
- [13] 张文钊,田洪昭,左军,等. 右归丸对肾虚模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(11):2893-2897.
- [14] 戴冰,张嘉妮,杨梦琳,等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1):70-73.
- [15] 许绍芬. 神经生物学[M]. 上海:复旦大学出版社, 2006:428.
- [16] SHIMOMURA Y, INAHATA M, KOMORI M, et al. Reduction of tryptophan hydroxylase expression in the brain of medaka fish after repeated heat stress [J]. *Zoolog Sci*, 2019, 36(3):223-230.
- [17] 廖莎,周佳,平锋锋,等. 慢性束缚与慢性不可预期温和应激抑郁模型小鼠的行为学比较及其发生机制研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2012, 40(11):29-34, 41.
- [18] 曹灵修,任路. 温肾通督针对抑郁症肾虚证模型大鼠相关神经递质及cAMP-RAF1信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(1):141-148.
- [19] 曹灵修,任路,张林. 基于“心肾相关”理论探讨“肾虚虚证”的病机及治疗[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4):919-920.
- [20] 江泳. 抑郁症肾阳不足基础病机的探讨[D]. 成都:成都中医药大学, 2009.
- [21] 刘志慧. 巴戟天寡糖胶囊治疗肾阳亏虚型轻中度抑郁症的临床研究[D]. 太原:山西中医药大学, 2018.
- [22] 李林,李斌,叶翠飞,等. 中药复方962对老年大鼠学习记忆功能及兴奋性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(6):364-366.
- [23] 张兰,李林,李斌,等. 中药复方962胶囊对老年大鼠海马神经生长因子及其受体表达的影响[J]. 中国自然医学杂志, 2000, doi: 10.16505/j. 2095-0136. 2000. 04. 001.
- [24] WEI W, YIXIN Z, WENTAO Y, et al. Bushenhuoxue improves cognitive function and activates brain-derived neurotrophic factor-mediated signaling in a rat model of vascular dementia [J]. *J Trad Chin Med*, 2020, 40(1):49-58.
- [25] SHENG C, XU P, LIU X, et al. Bushen-tiansui formula improves cognitive functions in an A β_{1-42} fibril-infused rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neural Plast*, 2020, 2020:8874885.
- [26] 易希,潘露茜,顾耘,等. 从心主神明及肾生髓理论探讨林水淼治疗阿尔茨海默病经验[J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志, 2022, 5(3):205-208.
- [27] MONDAL A C, FATIMA M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: Role of antidepressants treatment [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(3):283-296.
- [28] CAO L H, QIAO J Y, HUANG H Y, et al. PI3K-Akt signaling activation and icariin: The potential effects on the perimenopausal depression-like rat model [J]. *Molecules*, 2019, 24(20):3700.

[责任编辑 孙丛丛]