

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

孟丹华¹, 余楷杰¹, 孟晓莹¹, 巩子汉¹, 梁文青², 王英¹, 梁媛^{1*}, 岳广欣^{1*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 河南中医药大学基础医学院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:探讨温阳解郁方调节“母婴分离+束缚应激(MS+RS)”抑郁小鼠海马神经元凋亡改善突触可塑性的机制。方法:仔鼠出生第0天(PD0)随机分为空白组10只和造模组50只。造模采用MS+RS建立抑郁模型,PD21离乳后随机分为模型组、温阳组、解郁组、温阳解郁组、氟西汀组,每组10只,PD21~PD111分组给药。糖水偏好、开放旷场、O迷宫及新物体识别行为实验评估小鼠焦虑抑郁和学习记忆能力;免疫组化法(IHC)检测小鼠海马突触后致密物95(PSD95)表达情况;原位末端标记法(TUNEL)染色检测小鼠海马神经元凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马脑源性神经营养因子(BDNF)、磷酸化酪氨酸蛋白激酶/酪氨酸蛋白激酶(p-TrkB/TrkB)、磷酸化蛋白激酶B/蛋白激酶B(p-Akt/Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR/mTOR)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、突触后致密蛋白95(PSD95)、突触素(Syn)蛋白表达情况。结果:与空白组比较,模型组小鼠糖水偏好程度、中央区停留时间、运动总距离、开臂停留时间和认知指数显著减少($P<0.01$),IHC结果显示海马PSD95表达明显减少,海马神经元凋亡数量增加($P<0.01$),BDNF、p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、Bcl-2、p-mTOR/mTOR、PSD95、Syn蛋白表达显著减少($P<0.01$),Bax、Caspase-3蛋白含量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁组和氟西汀组糖水偏好程度、5 min中央运动时间、5 min开臂停留时间和认知指数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),海马PSD95表达明显增加、海马凋亡指数显著增加($P<0.01$),BDNF、p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、Bcl-2、PSD95、Syn蛋白含量显著增加($P<0.01$),Bax、Caspase-3蛋白含量显著减少($P<0.01$)。结论:温阳解郁方可以通过BDNF/Akt/mTOR信号通路,改善模型组小鼠神经元凋亡情况,保护海马突触结构和功能,缓解模型组小鼠抑郁样行为,其综合疗效及分子机制效果优于温阳方和解郁方。

[关键词] 温阳解郁方; 脑源性神经营养因子(BDNF)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 海马; 神经元凋亡; 突触可塑性

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R742 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)06-0048-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230838

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230627.1450.001>

[网络出版日期] 2023-06-28 14:04:23

Wenyang Jieyu Prescription Regulates Hippocampal Neuron Apoptosis and Improves Synaptic Plasticity in Depressed Mice via BDNF/Akt/mTOR Pathway

MENG Danhua¹, SHE Kaijie¹, MENG Xiaoying¹, GONG Zihan¹, LIANG Wenqing², WANG Ying¹,
LIANG Yuan^{1*}, YUE Guangxin^{1*}

(1. Institute of Basic Theroy for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China;

2. School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[收稿日期] 2023-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174251,81573846);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-202153,YZ-202216)

[第一作者] 孟丹华,在读博士,从事情志病的中医方证研究,E-mail:2830790468@qq.com

[通信作者] *梁媛,副研究员,硕士生导师,从事精神情志类疾病的病理生理基础研究,E-mail:zhongyijichu7@126.com;

*岳广欣,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

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Wenyang Jieyu prescription in regulating hippocampal neuron apoptosis and improving synaptic plasticity in the mouse model of depression induced by maternal separation combined with restraint stress. **Method:** The mice on postnatal day 0 (PD0) were randomly assigned into a control group ($n=10$) and a modeling group ($n=50$). Maternal separation combined with restraint stress was adopted to establish the mouse model of depression, and the modeled mice were randomized into model, Wenyang prescription, Jieyu prescription, Wenyang Jieyu prescription, and fluoxetine groups ($n=10$) on the weaning day (PD21). From PD21 to PD111, the mice were fed with the diets mixed with corresponding medicines. The sucrose preference test, open field test, O-maze test, and novel object recognition test were then conducted to evaluate the depression, memory, and learning abilities of mice. Immunohistochemistry (IHC) was employed to measure the atomic absorbance (AA) of postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the hippocampus. Terminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) was employed to detect the apoptosis of hippocampal neurons. Western blot was employed to determine the protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), phosphorylated tyrosine kinase receptor B/tyrosine kinase receptor B (p-TrkB/TrkB), phosphorylated protein kinase B/protein kinase B (p-Akt/Akt), phosphorylated mammalian target of rapamycin/mammalian target of rapamycin (p-mTOR/mTOR), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3), synaptophysin (Syn), and PSD95. **Result:** Compared with the control group, the modeling decreased the sucrose preference rate, time spent in central zone within 5 min, total movement distance, time spent in the open arm, and cognition index ($P<0.01$). Furthermore, it decreased the expression of PSD95, increased the neuron apoptosis in the hippocampus ($P<0.01$), down-regulated the protein levels of BDNF, p-TrkB/TrkB, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, Bcl-2, PSD95, and Syn ($P<0.01$), and up-regulated the protein levels of Bax and Caspase-3 ($P<0.05$) in the hippocampus. Compared with the model group, Wenyang Jieyu prescription and fluoxetine increased the sucrose preference rate, time spent in central zone within 5 min, total movement distance, time spent in the open arm, and cognition index ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, the drugs increased the expression of PSD95, reduced the neuron apoptosis ($P<0.01$), up-regulated the protein levels of BDNF, p-TrkB/TrkB, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, Bcl-2, PSD95, and Syn ($P<0.01$), and down-regulated the protein levels of Bax and Caspase-3 ($P<0.01$). **Conclusion:** Wenyang Jieyu prescription outperformed Wenyang prescription and Jieyu prescription in the treatment of the depressive behavior induced by maternal separation combined with restraint stress in mice. It exerted the therapeutic effect by reducing the hippocampal neuron apoptosis and improving the synaptic plasticity via the BDNF/Akt/mTOR pathway.

[Keywords] Wenyang Jieyu prescription; brain-derived neurotrophic factor/protein kinase B/mammalian target of rapamycin(BDNF/Akt/mTOR) pathway; hippocampus; neuron apoptosis; synaptic plasticity

抑郁症又称重度抑郁障碍(MDD),是一种常见的精神疾病,以情绪低落、快感减退、睡眠和食欲紊乱、强烈的自我否定及高自杀率为主要特征^[1]。目前全球约有3.5亿人受到抑郁症的影响,5%~17%的人一生中至少患有一次抑郁症,是目前主要的医疗和经济负担^[2]。目前药物治疗仍然是MDD最常推荐的一线治疗方法,主要包括选择性血清素再摄取抑制剂(SSRIs)、三环抗抑郁药(TCA)、单胺氧化酶抑制剂(MAOIs)等,但存在用药周期长、缓解率低、容易耐受、复发率高等问题^[3-4]。

以往研究表明,细胞凋亡属于程序性死亡的

一种形式,也是抑郁症神经病理损伤的重要过程,抑制海马的细胞凋亡可以明显缓解抑郁行为^[5],如柴胡皂苷能促进脑源性神经营养因子(BDNF)的表达而降低海马区神经元凋亡,进而发挥抗抑郁疗效^[6]。而海马区的突触可塑性损害是抑郁症及学习记忆障碍的重要病理过程,BDNF/酪氨酸蛋白激酶(TrkB)是突触可塑性和神经元生长的重要调节机制,其通过下游的蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路介导神经保护作用^[7],同时,Akt/mTOR信号通路还可以激活抗凋亡途径以改善抑郁行为^[8]。因此,BDNF/Akt/mTOR

可能是抑制海马神经元凋亡、保护突触可塑性,从而改善小鼠抑郁样行为的重要作用机制。

课题组从中医理论角度分析,母婴分离联合束缚应激(MS+RS)抑郁模型小鼠的病机为阳虚肝郁^[9-10]。正如《景岳全书》言:“天之大宝,只此一丸红日;人之大宝,只此一息真阳”,小儿少阳为本,幼年阳气稚嫩,对不良应激的适应和调整能力低下,且肾封藏能力较弱,在遭受母婴分离应激后易折伤肾中元阳,而阳气为一身之本,肾阳不足,推动、温煦功能失职,肝木升发不畅,疏泄不及而致“郁”,成年束缚应激后其“郁”的程度加重^[11]。温阳方(二仙汤)、解郁方(逍遥散)具有缓解抑郁的作用^[12-14]。基于MS+RS抑郁小鼠的阳虚肝郁病机,课题组以温肾疏肝为法,将二仙汤和逍遥散结合以建立温阳解郁方,目前发现温阳解郁方在抑郁行为的干预疗效上优于单方^[9],并可抑制下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的过度激活^[15-16],但温阳解郁方的治疗优势是否与抑制凋亡、改善突触可塑性相关,以及其机制仍不明确。因此,本研究通过“MS+RS”方法建立学习记忆能力减退的抑郁小鼠模型,研究温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠的行为改善情况,并基于BDNF/Akt/mTOR信号通路对海马神经元凋亡和突触可塑性的调节作用机制研究三方的药理作用差异,以此反证MS+RS抑郁小鼠的阳虚肝郁证型及其分子机制。

1 材料

1.1 动物 选购北京维通利华实验动物技术有限公司的8周龄C57BL/6J小鼠,体质量20~24 g,合格证号SCXK(京)2016-0006。常规饲养于室温22~25℃,相对湿度45%~55%,12 h/12 h(黑暗/光照)条件下,自由饮水进食。适应性喂养1周后进行合笼繁殖雄-雌1:4,孕鼠产前单笼饲养。实验经中医基础理论研究所实验动物伦理委员会审核通过,伦理审批编号为IBTCMCACMS21-2105-05。

1.2 药物 中药饮片:淫羊藿、仙茅、巴戟天、柴胡、当归、知母、黄柏、白术、白芍、茯苓、薄荷、炙甘草、生姜,均购自北京仟草中药饮片公司,批号分别为141102009、150607006、150710006、150822001、210811011、131227003、140116003、150628001、131106007、140903005、150915005、151223009,生姜为自购,无批号,由中国中医科学院中医基础理论研究所柏冬副研究员鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》质量标准;盐酸氟西汀胶囊(法国Patheon公司,批号21217A)。

1.3 试剂 BDNF抗体、TrkB抗体、磷酸化(p)-TrkB抗体、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、突触素(Syn)抗体、突触后致密蛋白95(PSD95)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(英国Abcam公司,货号分别为ab108319、ab187041、ab229908、ab184787、ab32127、ab18258、ab7090);mTOR抗体、p-mTOR抗体(美国CST公司,批号分别为7C10、D9C2);Akt、p-Akt、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为60203-2-Ig、66444-1-Ig、10494-1-AP);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Santa Cruz公司,货号分别为SC-7480、SC-7382);生物素标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号ZB-2050);原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号P-CA-301)

1.4 仪器 40 cm×40 cm×35 cm旷场箱(自制);XR-XZR209型O迷宫装置(上海欣软信息科技有限公司);3K15型高速低温离心机(美国Sigma公司);ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);N-800F型荧光显微镜(宁波永新光学股份有限公司);1645050-OG型垂直电泳仪、hemiDoc MP型凝胶成像扫描仪(美国Bio-Rad公司);AG285型电子分析天平(沈阳杰龙仪器有限公司);APERIO VERSA 8型切片扫描系统(德国Leica公司);激光共聚焦FV3000型激光扫描共聚焦显微成像系统(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组 本实验采用MS+RS方法复制小鼠抑郁模型。将实验小鼠按雄-雌1:4比例合笼繁衍,母鼠孕后标号单笼饲养,分娩后每窝仔鼠数量在4~7只,仔鼠出生日作为第0天(PD0),PD0仔鼠随机分为空白组10只、造模组50只。造模组仔鼠于PD5~PD14进行母婴分离:先将母鼠移至新笼,再将仔鼠移至孵育箱(32℃,8 h·d⁻¹),当日分离结束后将母鼠和仔鼠放回原鼠笼中,正常喂养直至第2天分离,空白组进行相同操作但母婴分离时间<10 min。PD16~PD20母鼠仔鼠正常生活不受影响。PD21离乳后将造模组仔鼠按随机数字表法分为MS+RS模型组(以下简称模型组)、温阳组、逍遥组、温阳解郁组和氟西汀组,仔鼠于PD21离乳并正常饲喂至成年3月龄(PD90),除空白组外,其余各组小鼠给予慢性束缚应激:将小鼠置于50 mL透气离心管中限制活动3 h,持续21 d^[17]。最后1 d造模完成后进行糖水偏好、开放旷场、O迷宫、新物体

识别实验,若小鼠出现糖水偏好率、中央运动时间、开放臂运动时间及新物体认知指数等行为指标降低,则判断抑郁造模成功^[18]。

2.2 药物制备及给药方法 依据《太平惠民和剂局方》及上海中医学院《中医方剂临床手册》确定逍遥方(逍遥散)、温阳方(二仙汤)药物组成及用量:逍遥散(柴胡 15 g、当归 15 g、白芍 15 g、白术 15 g、茯苓 15 g、生姜 5 g、薄荷 5 g、炙甘草 7.5 g),二仙汤(仙茅 9 g、淫羊藿 9 g、巴戟天 9 g、当归 9 g、知母 4.5 g、黄柏 4.5 g),温阳解郁方为二者合方。于上述药物中首次加入 10 倍量纯水浸泡 30 min,武火煮开后文火煎煮 1.5 h 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,水浴浓缩并真空干燥(80 °C, 6 h),于 4 °C 冰箱中备用。3 方各煎煮 30 剂,温阳、逍遥和温阳解郁方煎煮后每克药粉含生药量分别为 3.83、3.51、3.69 g。参考课题组以往给药剂量^[9],按人(70 kg)与小鼠(20 g)体表面积等效比值 0.002 6 折算,温阳、解郁、温阳解郁组小鼠的给药剂量分别为 5.85、12.03、16.71 g·kg⁻¹,氟西汀组小鼠的给药剂量为 2.60 mg·kg⁻¹,本研究药物干预时间较长,故采用更为安全、躯体应激更小的药混饲料方式进行给药。按成年小鼠的进食量为 5 g·d⁻¹,则温阳、逍遥、温阳解郁 3 方药物与饲料量混合比例为 23.4、48.12、66.84 g·kg⁻¹,氟西汀与饲料量混合比例为 10.4 mg·kg⁻¹,将药粉混合入饲料粉末中,加入适量纯净水压成条状,60 °C 烘干备用。在仔鼠 PD21 离乳至 PD111 束缚结束,空白组和模型组饲喂正常饲料,其余各组饲喂相应的药混饲料,持续 90 d。

2.3 行为学实验

2.3.1 糖水偏好实验 束缚应激第 21 天结束后,开始训练性实验,放置 2 瓶 1% 糖水适应性喂饲 24 h 后,其中一瓶更换为水,24 h 后更换位置,适应 24 h 后,禁食禁水 24 h。开始测试性实验,放置 1% 糖水、纯水各 1 瓶,常规喂饲 24 h 后称取糖、水的质量。糖水偏好率=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量)。

2.3.2 旷场实验 小鼠转移至实验场所后适应 1 h,保持实验室环境安静,按分组依次将小鼠背对实验者放入旷场箱中心点箱(40 cm×40 cm×35 cm),以中心点附近 20 cm×20 cm 区域为中央区,记录 5 min 小鼠运动总路程,中央区活动时间,每只动物实验后清理粪便和尿液并喷洒 75% 乙醇。采用美国 Clever Sys Inc 公司 TopScan 2.0 软件分析行为学数据。

2.3.3 O 迷宫实验 O 迷宫外径 65 cm,内径 60 cm,离地面高 60 cm,分别有开臂和闭臂,闭臂高 10 cm。实验开始时将实验小鼠背对实验者放入开臂上,头向闭臂,观察 5 min 内小鼠的开臂停留时间。采用美国 Clever Sys Inc 公司 TopScan 2.0 软件分析行为学数据。

2.3.4 新物体识别实验 实验分适应期、训练期、测试期 3 个阶段。适应期将小鼠依次放入空置的新物体识别箱中,自由活动 10 min;24 h 后进行训练,在新物体识别箱靠近角落 10 cm 处平行放置两个颜色、体积相同的正方体积木,将小鼠背对物体从中间放入,自由探索 5 min,全程录像记录;24 h 后开始测试,测试期间,其中一块积木更换为不同颜色的圆柱体,具体流程同测试期。探索新物体时间为 T_1 ,探索旧物体时间为 T_2 ,认知指数 $CI=T_1/(T_1+T_2)$ 。行为学数据采用美国 Clever Sys Inc 公司 TopScan 2.0 软件分析。

2.4 取材 行为学实验结束后,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)进行麻醉,每组随机挑选 4 只,灌注 4% 多聚甲醛后取脑,置于 4% 组织固定液中保存待用。其余小鼠麻醉取脑,剥离海马组织后置于 -80 °C 冰箱中保存待检。

2.5 免疫组化法检测小鼠海马 PSD95 表达 小鼠全脑于 30% 蔗糖溶液中脱水、包埋后冰冻切片(片厚 30 μm),0.5% Triton-X 100 渗透 30 min,3% H₂O₂ 溶液消除内源性过氧化物酶,10% 山羊血清室温封闭 1 h,PSD95 一抗(1:500)室温孵育 1 h 后 4 °C 孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,室温孵育生物素山羊抗兔二抗(1:250)4 h,ABC 工作液室温孵育 1 h,DAB 显色 30 min,PBS 终止反应,贴片后自然风干,乙醇梯度脱水后二甲苯透明处理,中性树胶封片。采用切片扫描系统采集图像,Image Pro Plus 6.0 软件分析阳性染色区域的平均积分吸光度 AA 。

2.6 TUNEL 法检测海马神经元凋亡 小鼠全脑于 30% 蔗糖溶液中脱水、包埋后冰冻切片(厚 15 μm),切片后贴片,自然晾干,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 2 次,5 min/次,每个样本滴加 1×蛋白酶 K 工作液 100 μL,37 °C 反应 10 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,样品滴加 TdT Equilibration Buffer 100 μL,37 °C 反应 30 min,吸除 TdT Equilibration Buffer,每个样品滴加标记工作液 50 μL,湿盒中 37 °C 避光孵育 2 h,PBS 洗 3 次,5 min/次,吸干水分后加 DAPI 工作液 100 μL,室温避光孵育 5 min,PBS 洗 4 次,每次 5 min,吸干水分,含抗荧光淬灭剂封片剂封片。

激光共聚焦拍摄, Image J分析数据。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马BDNF、TrkB、p-TrkB、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、Bcl-2、Bax、Syn、PSD95蛋白表达 将海马组织剪碎、充分研磨后于4 °C、14 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径8.2 cm),取上清,在562 nm波长以蛋白定量(BCA)法检测蛋白浓度。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳、电转、5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入相应一抗(BDNF、TrkB、p-TrkB、mTOR、p-mTOR, 1:1 000; Akt、p-Akt, 1:5 000; Bcl-2、Bax, 1:200; Syn, 1:20 000; PSD95, 1:2 000; GAPDH, 1:5 000)4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次后二抗(1:5 000)室温孵育2 h, TBST洗膜3次, 10 min/次, 凝胶成像仪器显影, Image J软件分析条带灰度值。

2.8 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计分析,以单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间数据比较,方差齐采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验,方差不齐采用多组间差异均值比较(Welch's ANOVA),事后多重比较采用Dunnett's *T*₃检验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温阳、解郁、温阳解郁方对小鼠抑郁状态的影响

3.1.1 对小鼠一般情况的影响 空白组小鼠毛发柔顺有光泽,体态正常,活泼好动,反应灵敏,食欲良好;模型组小鼠精神萎靡,毛发干枯无光泽,扎堆蜷卧,倦怠嗜睡,反应迟钝,大便便质较软;各给药组小鼠体态、毛发、精神状态均较模型组好转。

3.1.2 对小鼠糖水偏好的影响 与空白组比较,模型组小鼠的糖水偏好率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,解郁组、温阳解郁组、氟西汀组小鼠糖水偏好率明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),以温阳解郁组、氟西汀组疗效较优。见表1。

3.1.3 对小鼠旷场行为的影响 与空白组比较,模型组小鼠5 min中央运动时间显著减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,温阳解郁组、氟西汀组小鼠5 min中央运动时间明显增加($P < 0.05$)。见表2。

3.1.4 对小鼠O迷宫行为和新物体识别的影响 与空白组比较,模型组小鼠5 min开臂停留时间和认知指数显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,解郁组、温阳解郁组和氟西汀组小鼠5 min开臂停留

表1 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠糖水偏好率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on sucrose preference rate of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好率/%
空白组		79.64±8.45
模型组		64.82±10.09 ²⁾
温阳组	5.85	72.49±11.26
解郁组	12.03	74.99±10.24 ³⁾
温阳解郁组	16.71	77.33±8.81 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	78.01±6.63 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表7同)

表2 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠5 min中央运动时间和运动总距离的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on time spent in central zone in 5 min of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5 min中央运动时间/s
空白组		32.06±11.44
模型组		19.98±9.38 ²⁾
温阳组	5.85	23.89±10.78
解郁组	12.03	29.04±11.25
温阳解郁组	16.71	30.94±9.44 ³⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	32.32±10.39 ³⁾

时间明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),温阳组、温阳解郁组和氟西汀组小鼠认知指数明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见表3。

表3 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠5 min开臂停留时间和认知指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

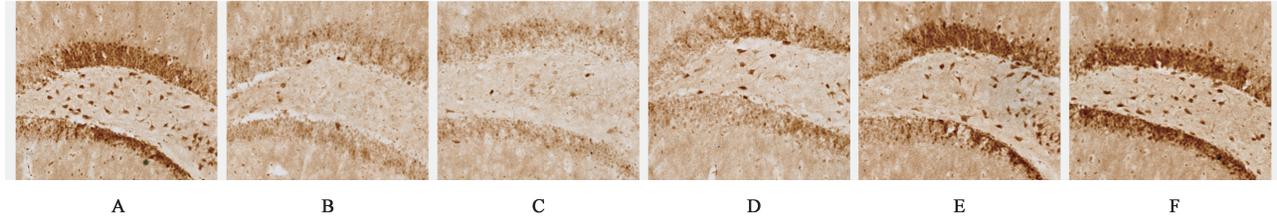
Table 3 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on time spent in opened arm in 5 min and cognition index of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5 min开臂停留时间/s	认知指数/%
空白组		128.48±27.10	0.74±0.28
模型组		69.52±30.34 ²⁾	0.44±0.11 ²⁾
温阳组	5.85	83.21±31.44	0.58±0.11 ³⁾
解郁组	12.03	97.22±31.63 ³⁾	0.53±0.11
温阳解郁组	16.71	103.44±23.06 ³⁾	0.62±0.10 ³⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	115.04±25.87 ⁴⁾	0.65±0.14 ⁴⁾

3.2 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马突触可塑性的影响

3.2.1 对抑郁小鼠海马PSD95表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马PSD95表达减少;与

模型组比较,温阳组、解郁组、温阳解郁组、氟西汀组小鼠海马PSD95表达明显增加。见图1。



注:A.空白组;B.模型组;C.温阳组;D.解郁组;E.温阳解郁组;F.氟西汀组(图1-图5同)

图1 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马PSD95表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 1 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on PSD95 expression in hippocampus of depressed mice (IHC, ×200)

3.2.2 对小鼠海马PSD95、Syn蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠海马PSD95、Syn蛋白表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠PSD95、Syn蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$),温阳解郁和氟西汀组疗效较优。见图2、表4。

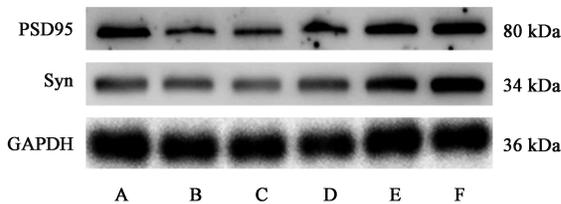


图2 抑郁小鼠海马PSD95、Syn蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of PSD95, Syn in hippocampus of depressed mice

3.3 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马神经元凋亡情况的影响

3.3.1 对抑郁小鼠海马神经元凋亡的影响 与空

表4 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马PSD95、Syn蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on protein expression of PSD95, Syn in hippocampus of depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PSD95/GAPDH	Syn/GAPDH
空白组		1.00±0.15	1.00±0.19
模型组		0.54±0.16 ²⁾	0.62±0.17 ²⁾
温阳组	5.85	0.81±0.25 ³⁾	0.91±0.22 ³⁾
解郁组	12.03	0.95±0.25 ⁴⁾	0.96±0.23 ⁴⁾
温阳解郁组	16.71	1.01±0.30 ⁴⁾	1.03±0.22 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	0.99±0.22 ⁴⁾	1.06±0.20 ⁴⁾

白组比较,模型组小鼠海马神经元凋亡数量明显增加($P<0.01$);与模型组比较,温阳组、温阳解郁组、氟西汀组小鼠神经元凋亡数量明显下调($P<0.05, P<0.01$),温阳解郁和氟西汀组疗效较优。见图3、表5。

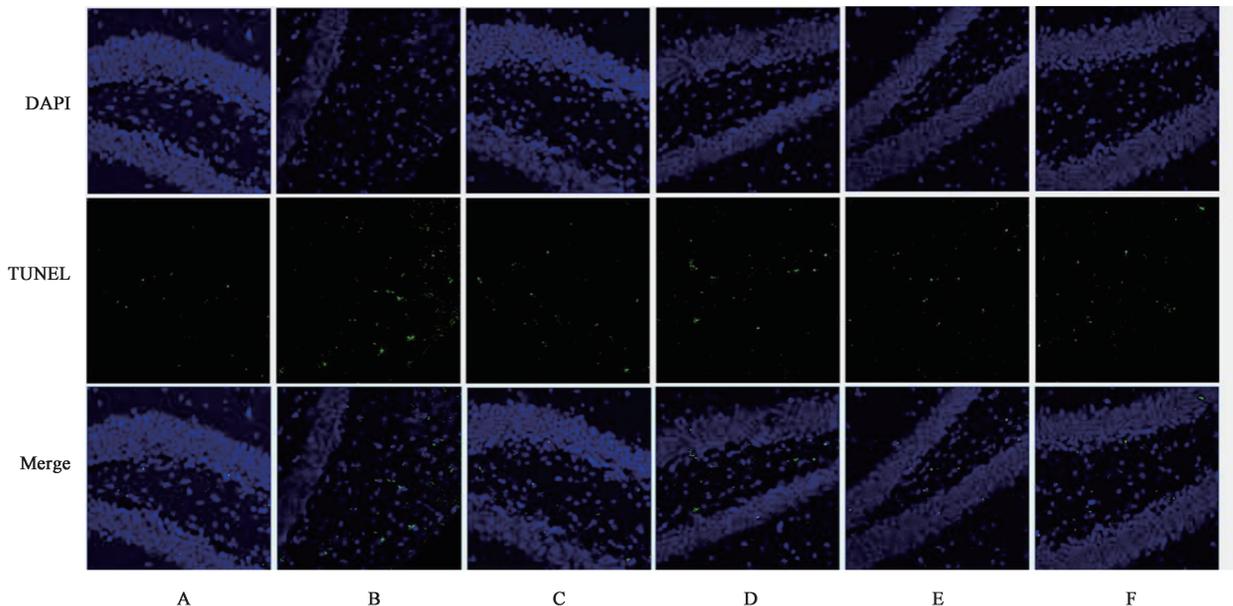


图3 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马神经元凋亡数量的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on apoptosis of hippocampal neurons in depressed mice (IF, ×200)

表5 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马神经元凋亡数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on apoptosis of hippocampal neurons in depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡数量/个
空白组		11.25±3.30
模型组		23.85±4.99 ²⁾
温阳组	5.85	17.25±3.40 ³⁾
解郁组	12.03	18.25±3.86
温阳解郁组	16.71	15.00±3.46 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	13.25±4.35 ⁴⁾

3.3.2 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马凋亡指示蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠海马 Bcl-2 蛋白表达显著减少($P<0.01$), Bax、Caspase-3 蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠海马 Bcl-2 蛋白表达显著增加($P<0.01$), Bax 蛋白表达明显减少($P<0.05, P<0.01$), 解郁组、温阳解郁组、氟西汀组 Caspase-3 蛋白表达显著减少($P<0.01$)。温阳解郁和氟西汀组疗效较优。见图4、表6。

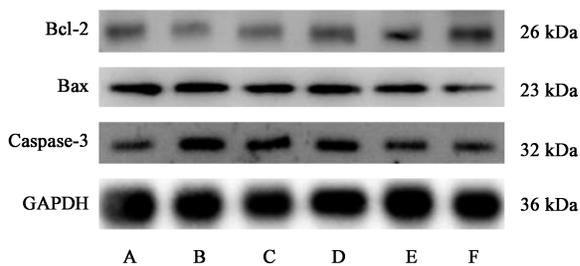


图4 抑郁小鼠海马 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 in hippocampus of depressed mice

表6 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 in hippocampus of depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2 /GAPDH	Bax /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH
空白组		1.00±0.12	1.00±0.16	1.00±0.16
模型组		0.61±0.12 ²⁾	1.24±0.19 ¹⁾	1.55±0.23 ²⁾
温阳组	5.85	0.98±0.20 ⁴⁾	0.98±0.19 ³⁾	1.37±0.14
解郁组	12.03	1.01±0.21 ⁴⁾	1.00±0.16 ³⁾	1.14±0.21 ⁴⁾
温阳解郁组	16.71	1.12±0.14 ⁴⁾	0.82±0.13 ⁴⁾	1.19±0.16 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	1.17±0.15 ⁴⁾	0.76±0.16 ⁴⁾	1.05±0.14 ⁴⁾

3.4 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马 BDNF/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马 BDNF、p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,温阳组、解郁组、温阳解郁组、氟西汀组小鼠海马 BDNF、p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$),解郁、温阳解郁、氟西汀组 p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt 蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$)。温阳解郁组和氟西汀组疗效较优。见图5、表7。

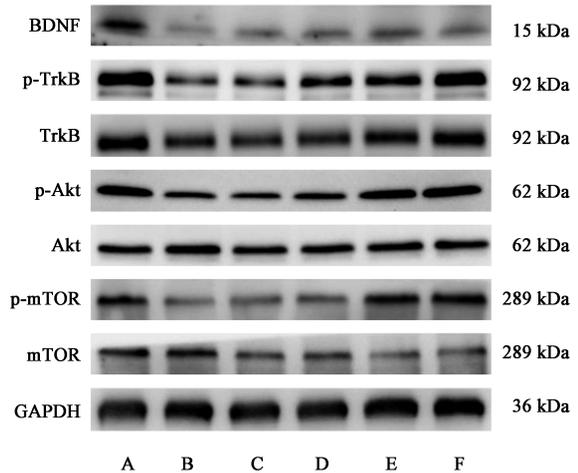


图5 抑郁小鼠海马 BDNF、p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of BDNF, p-TrkB/TrkB, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR in hippocampus of depressed mice

4 讨论

应激是抑郁症发生发展的主要诱导因素,母婴分离作为早年不良应激的主要表现形式之一,对神经内分泌系统进行编程,增加压力敏感性,从而影响后期的应激反应,已经成为诱发抑郁易感性的重要造模方法^[19-20]。慢性束缚应激(CRS)作为成年后二次打击,通过影响海马突触的形态结构和功能诱发抑郁样行为^[21-23]。课题组基于方-证对应的研究方法证明 MS+RS 抑郁小鼠的基本病机为“阳虚肝郁”,并据此建立温阳解郁方,全方由二仙汤和逍遥散组成,二仙汤出自《中医方剂临床手册》,由仙茅、淫羊藿、巴戟天、知母、黄柏、当归组成,方中仙茅、淫羊藿、巴戟天温肾阳,补肾精,黄柏、知母滋肾阴以潜阳,当归养血柔肝和木,有温肾补精之功^[24]。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由当归、白芍、柴胡、茯苓、白术、甘草、生姜、薄荷组成,其中当归、芍药养血柔肝,柴胡、薄荷疏肝解郁,茯苓、白术健脾

表7 温阳、解郁、温阳解郁方对抑郁小鼠海马BDNF、p-TrkB/TrkB、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu prescription on expression of BDNF, p-TrkB/TrkB, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR in hippocampus of depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/GAPDH	p-TrkB/TrkB	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
空白组		1.00±0.14	1.00±0.15	1.00±0.17	1.00±0.10
模型组		0.50±0.11 ²⁾	0.56±0.16 ²⁾	0.58±0.16 ²⁾	0.61±0.14 ²⁾
温阳组	5.85	0.98±0.20 ³⁾	0.72±0.11	0.69±0.12	0.83±0.12 ⁴⁾
解郁组	12.03	1.01±0.21 ³⁾	0.79±0.14 ³⁾	0.98±0.17 ⁴⁾	0.97±0.10 ⁴⁾
温阳解郁组	16.71	1.12±0.14 ⁴⁾	0.92±0.17 ⁴⁾	1.18±0.19 ⁴⁾	1.05±0.19 ⁴⁾
氟西汀组	2.6×10 ⁻³	1.17±0.15 ⁴⁾	0.97±0.28 ⁴⁾	1.15±0.21 ⁴⁾	0.87±0.16 ⁴⁾

祛湿,生姜温胃和中,炙甘草调和诸药,有疏肝解郁,养血健脾之效^[25]。两方合用,温肾益精而不壅塞,疏肝行气而不伤正,肝肾同调,共奏温肾益精、疏肝行气之功,主治阳虚肝郁证。

抑郁的主要症状包括持续性的情绪消沉、快感缺失、学习记忆功能障碍,还伴有乏力、疲倦、目光无神、食欲减退、体质量下降等躯体症状。本实验行为学结果显示,模型组小鼠精神萎靡、蜷缩懒动、毛发干枯,温阳解郁组小鼠活动灵敏度高,精神状态尚可。采用糖水偏好、旷场、O迷宫、新物体识别行为学实验,通过分析快感缺失、探索能力、学习记忆能力评价实验小鼠的抑郁程度。实验结果显示,模型组小鼠糖水偏好程度、中央区停留时间、运动总距离、开放臂停留时间及对新物体的嗅探兴趣显著降低,提示小鼠抑郁模型复制成功。温阳、解郁、温阳解郁3组小鼠的行为学表现均明显好转,但温阳解郁方的效果更加综合和明显,说明温阳解郁方可以更有效改善抑郁小鼠抑郁样行为,但其优势作用的潜在机制仍需进一步探索。

突触是实现神经元信息传递的基本结构单元,其形态、数量、密度和信号传递效率的变化称为突触可塑性^[26],突触可塑性是神经系统生长发育、损伤修复及学习和记忆的神经生物学基础^[37]。PSD95和Syn是用于衡量突触可塑性的2种特异性蛋白标记。其中,PSD95在突触后密度区表达丰富,与膜受体、离子通道和细胞黏附因子等相互作用,进而参与调节突触可塑性及学习记忆能力^[28]。Syn是关键突触前囊泡膜蛋白,其表达能准确反映突触的分布、数量和密度,是突触可塑性变化的最直接指标^[29]。实验结果表明,MS+RS抑郁小鼠海马PSD95和Syn的蛋白表达显著减少,温阳解郁组小鼠海马突触相关指标PSD95和Syn表达显著增加,但需进一步探索温阳解郁方调节突触可塑性的潜在机制。

研究显示慢性应激诱导的中枢神经元损伤是

抑郁的重要病因,细胞凋亡是程序性死亡的一种关键模式,是介导海马神经元损伤的关键病理机制。而应激诱导的海马神经元凋亡与小鼠的抑郁行为出现时间基本同步,说明应激诱导的抑郁行为与海马神经元凋亡紧密相关^[30]。促凋亡成员蛋白和抗凋亡成员蛋白在细胞凋亡的平衡点上存在复杂的调节机制,决定了应激诱导神经元的生存或凋亡结局,其中Bcl-2作为抗凋亡因子,可防止神经元凋亡,Bax属于促凋亡蛋白质,与Bcl-2同属于Bcl-2基因家族,Bax/Bcl-2直接反映细胞的凋亡水平变化^[31]。其次,在外源性凋亡途径中,跨膜受体与配体结合形成死亡信号复合物,激活剪切Caspase-3以诱导细胞凋亡。内源性凋亡途径则由Bax作用于线粒体外膜并促进细胞色素C的释放,形成凋亡小体后活化Caspase-3以诱导细胞凋亡,因此Caspase-3是介导细胞凋亡的关键调控因子。而Bcl-2可减少线粒体细胞色素C释放,防止Caspase-3依赖性蛋白水解级联,从而保护细胞免于凋亡^[32]。本次实验结果显示,抑郁模型小鼠海马凋亡指数显著上调,Bax/Bcl-2显著上调,Caspase-3蛋白含量显著增加,与以往研究结果基本一致^[33]。而温阳解郁组小鼠的凋亡指数明显降低,Bax/Bcl-2显著减少,Caspase-3蛋白含量显著减少,说明温阳解郁方可能通过改善海马细胞凋亡以缓解抑郁样行为,但其机制亦有待进一步阐述。

BDNF属于神经营养因子家族,主要通过结合高亲和力受体TrkB发挥抗抑郁疗效^[34],最新研究也表明抗抑郁药物通过直接结合TrkB的跨膜结构域,促使其重新定位于突触,并激活下游的Akt,mTOR等靶标而增强突触可塑性^[35];而磷脂酰肌醇3-激酶(P13K)/Akt信号通路是其关键下游信号通路,通过下游靶标mTOR而参与调节突触可塑性、神经发生及海马神经元凋亡^[36]。当BDNF与TrkB的胞外结构域结合后,TrkB产生自磷酸化,随后募集PI3K至

质膜表面催化二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)为PIP3, PIP3作为第二信使结合到Akt的pH调节域和结构域上的Thr308和Ser473而激活Akt信号,随后活化的Akt可直接或间接激活mTOR。mTOR通过磷酸化下游靶标如翻译起始因子及核糖体蛋白激酶而启动转录、翻译作用,促进突触相关核心蛋白PSD95、Syn的表达而增强突触可塑性^[37]。其次, Bcl-2、Caspase-3是PI3K/Akt信号通路调节凋亡的关键下游活化因子, Akt通过切割Caspase-3,促进Bcl-2与Bcl-2相关细胞凋亡促进因子(Bad)解聚为游离蛋白,并磷酸化Bax的Ser184位点^[38],从而抑制Bax、Bad等诱导的神经元凋亡^[39];同时Akt还能阻断Caspase-3的活化^[40],抑制线粒体细胞色素C及凋亡因子的释放,从而抑制细胞凋亡^[41]。本次结果表明,模型组小鼠海马组织BDNF/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达显著较少,温阳解郁组小鼠BDNF/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达显著增加,说明温阳解郁方可以通过调控BDNF/Akt/mTOR信号通路改善神经元凋亡及突触可塑性。

综上所述,温阳解郁方可以通过调控BDNF/Akt/mTOR信号通路调节海马神经元凋亡情况,改善海马突触结构和功能的可塑性,从而改善MS+RS模型小鼠学习和记忆能力,缓解抑郁样行为。从结果来看,温阳解郁方的综合疗效及分子机制改善效果优于单一的温阳方和解郁方,据此也可反证MS+RS抑郁小鼠的基本病机是“阳虚”与“肝郁”并存,治疗当以温阳、解郁并用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SMITH K. Mental health: A world of depression[J]. Nature, 2014, 515(7526): 181.
[2] NOBIS A, ZALEWSKI D, WASZKIEWICZ N. Peripheral markers of depression [J]. J Clin Med, 2020, 9(12)
[3] KRAUS C, KADRIU B, LANZENBERGER R, et al. Prognosis and improved outcomes in major depression: A review[J]. Transl Psychiatry, 2019, 9(1): 127.
[4] GADAD B S, JHA M K, CZYSZ A, et al. Peripheral biomarkers of major depression and antidepressant treatment response: Current knowledge and future outlooks[J]. J Affect Disord, 2018, 233: 3-14.
[5] PENG Z, ZHANG C, YAN L, et al. EPA is more effective than DHA to improve depression-like behavior, glia cell dysfunction and hippocampal

apoptosis signaling in a chronic stress-induced rat model of depression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1769.

[6] 欧小龙, 黄涛阳. 柴胡属植物化学成分研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(3): 749-755.
[7] ZHANG S S, TIAN Y H, JIN S J, et al. Isoflurane produces antidepressant effects inducing BDNF-TrkB signaling in CUMS mice [J]. Psychopharmacology (Berl), 2019, 236(11): 3301-3315.
[8] XIAO X, SHANG X, ZHAI B, et al. Nicotine alleviates chronic stress-induced anxiety and depressive-like behavior and hippocampal neuropathology via regulating autophagy signaling[J]. Neurochem Int, 2018, 114: 58-70.
[9] 余楷杰, 高静静, 巩子汉, 等. 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 49-57.
[10] 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.
[11] 刘燕, 邹小娟, 丁秀芳, 等. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1840-1844.
[12] 陆文君, 牛婕, 罗武龙, 等. 基于脑脊液蛋白组学探讨二仙汤抗抑郁作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(10): 1231-1243.
[13] 薛哲, 钱越, 赵宗耀, 等. 逍遥散对慢性束缚应激抑郁大鼠海马神经再生的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 121-125.
[14] 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.
[15] 岳广欣, 张玲, 卢贺起, 等. 温阳解郁法对母婴分离小鼠行为模式及HPA轴功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 42-46.
[16] 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.
[17] WANG A, ZOU X, WU J, et al. Early-life stress alters synaptic plasticity and mTOR signaling: Correlation with anxiety-like and cognition-related behavior [J]. Front Genet, 2020, 11: 590068.
[18] 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): 178.

- [19] KESSLER R C, MCLAUGHLIN K A, GREEN J G, et al. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO world mental health surveys [J]. *Br J Psychiatry*, 2010, 197(5):378-385.
- [20] KAMBALI M Y, ANSHU K, KUTTY B M, et al. Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour [J]. *Exp Brain Res*, 2019, 237(8):1993-2010.
- [21] HUANG P, LI C, FU T, et al. Flupirtine attenuates chronic restraint stress-induced cognitive deficits and hippocampal apoptosis in male mice [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 288:1-10.
- [22] BOUVIER E, BROUILLARD F, MOLET J, et al. Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(12):1701-1713.
- [23] QIAO H, LI M X, XU C, et al. Dendritic spines in depression: What we learned from animal models [J]. *Neural Plast*, 2016, 2016:8056370.
- [24] 陈世洲,毛国庆,孙玉明,等. 加味二仙汤治疗阳虚骨质疏松症临床疗效及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7):104-108.
- [25] 纪雅菲,芮翊馨,方洋,等. 逍遥散正丁醇部位基于 IGF-1R β /PI3K/Akt 信号通路的抗抑郁作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14):1-11.
- [26] YASUDA R. Biophysics of biochemical signaling in dendritic spines: Implications in synaptic plasticity [J]. *Biophys J*, 2017, 113(10):2152-2159.
- [27] SEHGAL M, SONG C, EHLERS V L, et al. Learning to learn-intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2013, 105:186-199.
- [28] GANGULY P, HOLLAND F H, BREHOUSE H C. Functional uncoupling NMDAR NR2A subunit from PSD-95 in the Prefrontal Cortex: Effects on behavioral dysfunction and parvalbumin loss after early-life stress [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(12):2666-2675.
- [29] HARPER C B, MANCINI G, VAN SLEGTENHORST M, et al. Altered synaptobrevin- II trafficking in neurons expressing a synaptophysin mutation associated with a severe neurodevelopmental disorder [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 108:298-306.
- [30] 柳丽,徐海玲,季凯琳,等. 神经病理性疼痛致抑郁小鼠脑内 BDNF/TrkB/CREB 信号的动态变化 [J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(11):1132-1137.
- [31] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1):49-63.
- [32] SWANTON E, SAVORY P, COSULICH S, et al. Bcl-2 regulates a Caspase-3/Caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts [J]. *Oncogene*, 1999, 18(10):1781-1787.
- [33] ZHANG H, WEI M, SUN N, et al. Melatonin attenuates chronic stress-induced hippocampal inflammatory response and apoptosis by inhibiting ADAM17/TNF- α axis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 169:113441.
- [34] MACHAALANI R, CHEN H. Brain derived neurotrophic factor (BDNF), its tyrosine kinase receptor B (TrkB) and nicotine [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 65:186-195.
- [35] CASAROTTO P C, GIRYCH M, FRED S M, et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors [J]. *Cell*, 2021, 184(5):1299-1313. e19.
- [36] XU X K, WANG S Y, CHEN Y, et al. Fangjing decoction relieves febrile seizures-induced hippocampal neuron apoptosis in rats via regulating the Akt/mTOR pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, doi: 10.1042/BSR20181206.
- [37] YOON S, IQBAL H, KIM S M, et al. Phytochemicals that act on synaptic plasticity as potential prophylaxis against stress-induced depressive disorder [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2023, 31(2):148-160.
- [38] KALE J, KUTUK O, BRITO G C, et al. Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance [J]. *EMBO Rep*, 2018, doi: 10.15252/embr.201745235.
- [39] KUMAR D, SHANKAR S, SRIVASTAVA R K. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(2):179-189.
- [40] PARK B, JE Y T, CHUN K H. Akt is translocated to the mitochondria during etoposide-induced apoptosis of HeLa cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):7577-7581.
- [41] HWANG Y, KIM H C, SHIN E J. Enhanced neurogenesis is involved in neuroprotection provided by rottlerin against trimethyltin-induced delayed apoptotic neuronal damage [J]. *Life Sci*, 2020, 262:118494.

[责任编辑 孙丛丛]