

百合地黄汤通过抑制 SHP2 改善焦虑性 抑郁症海马神经元损伤

戴佳程^{1,2}, 陈荣霖^{2,3}, 贺可欣^{2,3}, 唐林², 孟盼², 王宇红^{1,2}, 赵洪庆^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学 中医药科学院/科技创新中心, 湖南 长沙 410208;

2. 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学 医学院, 湖南 长沙 410208)

摘要 基于 Src 同源-2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 (SHP2) 信号探讨经典名方百合地黄汤改善焦虑性抑郁症神经元损伤机制。将 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 文拉法辛组 (13.5 mg·kg⁻¹), 百合地黄汤高、中、低剂量组 (16、8、4 g·kg⁻¹)。采用 28 d 慢性束缚应激 (6 h) 联合皮质酮 (ih, 30 mg·kg⁻¹) 的方法建立焦虑性抑郁症大鼠模型, 从造模第 8 天起连续灌胃给药 21 d, 评价焦虑和抑郁样行为; 高尔基染色观察海马神经元树突棘形态变化, Western blot 法检测海马磷酸化 (p)-SHP2、突触蛋白 1 (SYN1)、突触后致密蛋白-95 (PSD-95) 表达。细胞实验中, 通过慢病毒转染特异性过表达或敲低神经元 SHP2 表达, RT-PCR 和 Western blot 法评价转染效率, 皮质酮造模诱导神经元损伤并给予百合地黄汤含药血清干预。MTT 法检测细胞存活率, Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡状态, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 免疫荧光法检测 SHP2、p-SHP2、SYN1、PSD95 表达。结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马树突棘呈现萎缩、消失、形态不规则、短缩等特征, SYN1、PSD-95 表达显著降低, p-SHP2/SHP2 水平显著增加; 百合地黄汤干预后, 大鼠海马神经元损伤情况显著改善, p-SHP2/SHP2 水平受到抑制。体外神经元成功转染 SHP2 过表达 (SHP2 OE) 病毒或经皮质酮造模后, 细胞存活率显著下降, 细胞凋亡率显著增加, SYN1、PSD-95 表达均显著降低; 百合地黄汤含药血清干预后, 神经元 SHP2 高表达受到抑制, 细胞存活率增加, 凋亡减少, SYN1、PSD-95 表达均显著增加; 此外, 转染 SHP2 干扰 (SHP2 KD) 慢病毒也能模拟百合地黄汤的保护作用。综上, 百合地黄汤能够通过调控 SHP2 信号改善焦虑性抑郁症海马神经元损伤。

关键词 百合地黄汤; 焦虑性抑郁症; SHP2; 海马; 神经元; 慢病毒

Baihe Dihuang Decoction attenuates hippocampal neuronal injury in anxious depression by inhibiting SHP2

DAI Jia-cheng^{1,2}, CHEN Rong-lin^{2,3}, HE Ke-xin^{2,3}, TANG Lin², MENG Pan², WANG Yu-hong^{1,2}, ZHAO Hong-qing^{1,2*}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences/Science & Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for

Prevention and Treatment of Depressive Disorders, Changsha 410208, China;

3. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] This study explored the mechanism by which the classical prescription Baihe Dihuang Decoction alleviates neuronal injury in anxious depression, based on the Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) signaling pathway. Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, model group, venlafaxine group (13.5 mg·kg⁻¹), and Baihe Dihuang Decoction high-, medium-, and low-dose groups (16, 8, and 4 g·kg⁻¹, respectively). An anxious depression model was established

收稿日期 2025-07-21

基金项目 国家自然科学基金项目 (82104836); 湖南省自然科学基金创新研究群体项目 (2024JJ1007); 湖南省自然科学基金项目 (2023JJ60482); 湖南省教育厅资助项目 (23B0391); 湖南省科技人才托举工程项目 (2023TJ-N22)

通信作者 * 赵洪庆, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药神经精神药理研究, E-mail: 516005398@qq.com

作者简介 戴佳程, 硕士研究生, E-mail: 1371168137@qq.com

using 28 days of chronic restraint stress (6 h/day) combined with corticosterone administration ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *ih*). From day 8 of modeling, intragastric administration of the corresponding treatments was given for 21 consecutive days. Anxiety- and depression-like behaviors were evaluated. Golgi staining was used to observe dendritic spine morphology of hippocampal neurons, and Western blot was performed to detect hippocampal phosphorylated (p)-SHP2, synapsin 1 (SYN1), and postsynaptic density protein-95 (PSD-95). In cell experiments, primary hippocampal neurons were transfected with lentiviruses to specifically overexpress or knock down SHP2. Transfection efficiency was assessed by RT-PCR and Western blot. A corticosterone-induced neuronal injury model was established, followed by intervention with Baihe Dihuang Decoction-containing serum. Cell viability was measured using the MTT assay, apoptotic morphology was observed by Hoechst 33342 staining, apoptosis rates were determined via flow cytometry, and immunofluorescence was used to detect SHP2, p-SHP2, SYN1, and PSD-95 expression. The results showed that, compared with the normal group, model rats exhibited hippocampal dendritic spines with atrophy, loss, irregular morphology, and shortening, accompanied by significantly reduced SYN1 and PSD-95 expression and markedly increased p-SHP2/SHP2 levels. After Baihe Dihuang Decoction intervention, hippocampal neuronal injury was significantly alleviated, and p-SHP2/SHP2 levels were suppressed. *In vitro*, neuronal SHP2 overexpression (SHP2 OE) or corticosterone modeling led to a marked decrease in cell viability, increase in apoptosis rate, and downregulation of SYN1 and PSD-95. Following treatment with Baihe Dihuang Decoction-containing serum, SHP2 overexpression was inhibited, cell viability increased, apoptosis decreased, and SYN1 and PSD-95 expression significantly increased. In addition, SHP2 knockdown (SHP2 KD) via lentiviral transfection also mimicked the protective effects of Baihe Dihuang Decoction. In conclusion, Baihe Dihuang Decoction improves hippocampal neuronal injury in anxious depression by regulating the SHP2 signaling pathway.

[Key words] Baihe Dihuang Decoction; anxious depression; SHP2; hippocampus; neurons; lentivirus

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250814.401

焦虑性抑郁症是一类以持续性焦虑和抑郁情绪共病为主要表现的精神障碍,病程迁延且自杀率高。与单独的抑郁症相比,焦虑性抑郁症具有更高的自杀风险、更差的治疗效果、更重的功能损害,且更易合并其他精神疾病,给患者的生活质量带来严重影响^[1-3]。目前焦虑性抑郁症的治疗以西药和心理治疗为主,但常常效果有限,且药物存在较多不良反应。因此,寻找更为有效和安全的治疗方案已成为焦虑性抑郁症研究中的迫切需求,尤其是探索传统中医药在该领域的潜力,成为近年来研究的一个重要方向。

Src 同源-2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP2)是一种重要的细胞内酪氨酸磷酸酶,在细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程中发挥重要作用^[4]。SHP2 通过其独特的 SH2 结构域,能够特异性地结合多种受体酪氨酸激酶和非受体酪氨酸激酶,调节下游信号通路,参与细胞的生理活动^[5]。近年来,SH2 在神经系统疾病中的作用逐渐受到关注,其广泛表达于大脑皮层、海马、纹状体等关键脑区,且在神经元发育^[6]、突触可塑性^[7]以及神经保护^[8]等方面发挥重要作用。研究表明,SH2 的异常表达与阿尔茨海默病^[9]、帕金森病^[10]和抑郁症^[11]等多种神经退行性疾病和精神障碍密切相关,且在影响神经元的存活、突触传递与情绪调节等方面发挥重要

作用^[12]。

百合地黄汤作为一种传统的中医方剂,出自汉代《金匱要略》,由百合和生地黄 2 种草药组成,历史上被广泛用于治疗百合病。现代药理学研究表明,百合地黄汤具有抗焦虑、抗抑郁、神经保护等多重作用,能够应对神经炎症、氧化应激等导致的神经损伤^[12-14]。临床研究亦表明,百合地黄汤在治疗原发/继发性抑郁症、更年期综合征、广泛性焦虑障碍等方面均有良好的疗效,能够有效改善患者的情绪状态和睡眠质量,安全性更高^[15-17]。课题组前期研究发现,百合地黄汤能够通过改善神经元突触可塑性,缓解神经元损伤,抑制炎症小体激活等途径发挥抗焦虑性抑郁症功效^[18-19],其是否通过调控 SHP2 改善神经元损伤尚不清楚。本研究拟结合动物和细胞实验,系统探讨百合地黄汤通过 SHP2 信号通路改善神经元损伤的潜在机制,以期为焦虑性抑郁症的治疗提供新的理论依据和治疗策略。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(湘)2021-0002,饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级大鼠饲养室,环境温度(22 ± 2)℃,相对湿度 50%±5%。动物实验经湖南

中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号 HNUCM21-2307-17)。

1.2 药物与试剂

盐酸文拉法辛片, 每片 75 mg, 批号 220819, 由成都康弘药业集团股份有限公司生产。SHP2(批号 ab300579)、磷酸化(p)-SHP2(批号 ab62322) 购自上海艾博抗贸易有限公司; 突触后致密蛋白-95(PSD-95, 批号 20665-1-AP)、突触蛋白 1(SYN1, 批号 20258-1-AP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE, 批号 66150-1-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 批号 60004-1-Ig) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; 皮质酮(批号 HY-B1618) 购自美国 MCE 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 批号 M2003) 购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒(批号 E-CK-A211)、CY3 标记的山羊抗兔二抗(批号 E-AB-1010)、488 标记的山羊抗鼠二抗(批号 E-AB-1056) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

BR-DSG 型高架十字迷宫、VisuTrack 动物行为分析软件(上海欣软信息科技有限公司); Varioskan Flash 型多功能酶标仪、Nanodrop One 超微量分光光度计(美国 ThermoFisher 公司); CCL-170T-8 型三气培养箱(新加坡 ESCO 公司); Stemi 508 型体视显微镜、LSM 900 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司); K960 型梯度 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司); ChemiDoc XRS⁺ 型凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司); BD Fortessa 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

百合地黄汤由百合 30 g、生地黄 30 g 组成, 所有中药饮片购自湖南中医药大学第一附属医院, 经王宇红研究员鉴定为百合科植物卷丹 *Lilium landformium* Thunb. 的干燥肉质鳞叶、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根, 符合《中国药典》2020 年版规定。采用传统水煎法制备药液, 取等量百合、生地黄饮片, 加入 8 倍体积蒸馏水, 浸泡 30 min, 全方共煎煮 2 次, 合并水煎液, 浓缩至终浓度 1.6 g·mL⁻¹, 分装保存。采用高效液相色谱法对提取液主要成分进行定量分析, 测得含王百合苷 A 1.296 mg·mL⁻¹、毛蕊花糖苷 0.088 mg·mL⁻¹、异毛蕊花糖苷 0.152 mg·mL⁻¹。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 大鼠购入后适应性喂养 5 d, 进行糖水偏好测试, 根据糖水偏好度将大鼠随机分为 6 组, 包括正常组, 模型组, 阳性药组, 百合地黄汤高、中、低剂量组, 每组 8 只。除正常组外, 其余组动物均采用慢性束缚应激联合皮质酮注射的方法建立焦虑性抑郁症模型^[20-21], 大鼠每天于束缚器中接受束缚应激 6 h, 并于束缚结束后皮下注射皮质酮混悬液 30 mg·kg⁻¹, 连续造模 28 d, 通过焦虑、抑郁相关行为学测试评价模型是否建立成功。从造模第 8 天起灌胃给药, 阳性药组给予临床等效 2 倍剂量的文拉法辛 13.5 mg·kg⁻¹(前期证实有效), 百合地黄汤高、中、低剂量组分别给予百合地黄汤水煎液 16、8、4 g·kg⁻¹, 正常组和模型组灌胃等量蒸馏水, 每天 1 次, 连续给药 21 d。

2.2.2 行为学测试 采用序贯法对所有大鼠进行行为学测试, 确保每只大鼠从给药到开始测试时间为 1 h, 测试前大鼠已提前适应测试环境, 在测试过程中保持安静, 避免人为干扰。

高架十字迷宫实验: 将大鼠头朝开臂放入高架十字迷宫正中央, 记录其 5 min 内进入开臂、闭臂的次数以及在开臂、闭臂的停留时间, 计算大鼠进入开臂次数比(OE)和开臂停留时间比(OT)。OE = 进入开臂的次数 / (进入开臂次数 + 进入闭臂次数) × 100%; OT = 开臂停留时间 / (开臂停留时间 + 闭臂停留时间) × 100%。

糖水偏好实验: 分为适应期和测试期 2 个阶段。在适应期, 每只大鼠提供 2 瓶 2% 蔗糖水, 持续 24 h; 随后, 再提供 1 瓶蔗糖水和 1 瓶蒸馏水, 持续 24 h, 并在 12 h 时交换 2 瓶水的位置; 其后大鼠禁水不禁食 12 h。测试期开始后, 记录 2 h 内对糖水和蒸馏水的摄入量, 其中在测试的开始 1 h 交换 2 瓶水的位置以减少位置偏好。糖水偏好度 = 糖水摄入量 / (糖水摄入量 + 蒸馏水摄入量) × 100%。

强迫游泳实验: 将大鼠放入专用强迫游泳实验装置中, 水温为 22 ~ 24 ℃。在大鼠适应水环境 1 min 后, 记录其在接下来 5 min 内处于静止或漂浮状态的总时间。

2.2.3 高尔基染色观察树突棘形态 行为学测试完成后, 对部分大鼠进行经心灌注, 剪开大鼠胸腔, 剪破右心耳, 采用灌注泵依次灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛溶液, 至肝脏完全变白停止灌注, 剥离脑组

织,浸泡于高尔基染液中。在脑组织充分镀银后进行切片,厚度为 100 μm ,将切片固定在玻片上,2% 重铬酸钾溶液漂洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明化,中性树胶封片。于显微镜下观察神经元胞体及树突、轴突形态。

2.2.4 Western blot 法检测 p-SHP2、SYN1、PSD-95 蛋白表达 剥离大鼠海马组织冷冻保存,称重后加入适量含 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF 的组织裂解液,冰上匀浆,静置 30 min 后离心取上清液。采用微量分光光度计检测蛋白浓度,制胶,在蛋白样本中加入上样缓冲液,煮沸变性,上样量为 30 μg ,电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,洗膜后加入稀释后的一抗 (p-SHP2, 1:1 000; SHP2, 1:1 000; SYN1, 1:5 000; PSD-95, 1:5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。同样洗膜后加入稀释后的二抗 (1:5 000) 于室温下孵育 2 h。采用全自动凝胶成像系统进行显影成像,ImageJ 图像分析软件分析各条带灰度值,计算各目的蛋白的相对表达水平。

2.3 细胞实验

2.3.1 原代神经元培养 取孕 18 d 的 SD 大鼠,麻醉后打开腹腔,取出胎鼠,消毒,剥离脑组织,在显微镜下小心分开皮层,夹取海马区组织块于培养皿中。剪成约 1 mm^3 左右的小块,加入胰酶消化 15 min,培养基终止消化,吹打均匀,过 200 目筛,离心,去上清液,加入培养基重悬细胞,再次过筛,计数,以每毫升 1×10^6 个种植于 6 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。培养 4 h 后将培养基更换为含 2% B27 的 Neurobasal 培养基,以抑制非神经元细胞的增殖。以后每 3 d 半量换液,7 d 后用于实验,检测神经元标志物 NSE 的表达,鉴定神经元纯度。

2.3.2 含药血清制备 另取 6 只 SD 大鼠,空白血清组和含药血清组各 3 只,分别灌胃给予蒸馏水和高剂量百合地黄汤 (16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日 2 次,连续 7 d。末次给药前禁食 12 h,给药后 1 h 麻醉大鼠,腹主动脉取血,分离血清,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。根据前期预实验结果,本实验采用 5% 的血清进行干预。

2.3.3 细胞分组、造模与给药 细胞实验分为 2 部分,其中第一部分将神经元细胞分为对照组、SHP2 过表达组、SHP2 过表达+含药血清组,根据大鼠 SHP2 基因序列 (NM_001177593.1) 由深圳布林凯

斯生物公司构建过表达质粒,原代细胞培养 3 d 后利用慢病毒干扰 24 h,对照组转染空载慢病毒 (rLV-CMV-mCherry-WPRE),SHP2 过表达组、SHP2 过表达+含药血清组转染 SHP2 过表达慢病毒 (rLV-CMV-SHP2-P2A-mCherry-WPRE),采用 RT-PCR 和 Western blot 法评价转染效率。SHP2 过表达+含药血清组给予 5% 百合地黄汤含药血清干预 24 h。

第二部分细胞实验将神经元分为对照组、模型组、模型+SHP2 敲低组、模型+含药血清组。其中对照组、模型组、模型+含药血清组转染空载慢病毒 [LV-U6-shRNA (Scramble)-CMV-mCherry-WPRE],模型+SHP2 敲低组转染 SHP2 干扰慢病毒 [LV-U6-shRNA (rSHP2)-CMV-mCherry-WPRE],采用 RT-PCR 和 Western blot 法评价转染效率。采用 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 皮质酮干预 24 h 的方法进行造模,模拟焦虑性抑郁症神经元损伤状态^[22-23]。模型+含药血清组给予 5% 百合地黄汤含药血清干预 24 h。

PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其中 SHP2 引物序列:正向 5'-AAGTGCT-GCCGATGACTACA-3',反向 5'-TCCCTGGAGTAGA-GCTTGTC-3'; GAPDH 引物序列:正向 5'-TCCTG-CACCACCAACTGCTTAG-3',反向 5'-AGTGGCAGT-GATGGCA-TGGACT-3'。

2.3.4 免疫荧光法检测神经元 SHP2、SYN1、PSD-95 表达情况 各组细胞给药培养 24 h 后,用 PBS 洗涤细胞后加入 1 mL 多聚甲醛固定,随后加入 1 mL 0.3% Triton X-100 通透,用山羊血清进行封闭 1 h 后分别加入一抗 NSE (1:300)、SHP2 (1:400)、p-SHP2 (1:300)、SYN1 (1:200)、PSD-95 (1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜,加入二抗 (1:400),室温避光孵育 1 h,避光洗去二抗,滴加 DAPI 使其充分覆盖孔板,避光孵育 8 min 弃 DAPI,PBS 洗涤细胞后,于激光共聚焦显微镜下观察并记录。采用 ImageJ 软件进行图像分析,选取相同参数下获取的图像,计算各目的蛋白的相对荧光强度。

2.3.5 MTT 法检测细胞存活率 原代海马神经元以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板内。每组设置 6 个复孔。各组处理结束后,弃去上清液,加入现配的 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT,放入培养箱中继续孵育 4 h。取出后,轻轻吸出孔内的 MTT,加入 DMSO 溶液 150 μL ,在摇床上振荡 10 min 充分溶解。以空白对照调零,用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度 (A)。

取复孔平均数,计算细胞存活率。细胞存活率 = $(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

2.3.6 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡状态 原代海马神经元以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板内。培养至适当密度后,弃去培养基,PBS 缓冲液洗涤细胞。随后加入终浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Hoechst 33342 染色液,轻柔混匀,避光孵育 10 min。染色结束后,吸除废液,PBS 洗涤 2~3 次以去除多余染料,荧光显微镜下观察细胞核染色情况。

2.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 原代海马神经元以每毫升 1×10^6 个接种于 6 孔板内。收集各组处理结束后的原代海马神经元细胞,并加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \times \text{binding buffer}$ 缓冲液重悬,制成每毫升 1×10^6 个的细胞悬液。加入 Annexin V-FITC/PI $5 \mu\text{L}$,混匀后于室温下避光放置 15 min。然后加入 $400 \mu\text{L}$ $1 \times \text{binding buffer}$ 缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析与科研绘图。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采取单因素方差分析进行组间比较,2 组间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 百合地黄汤对模型大鼠焦虑和抑郁样行为的影响

与正常组比较,模型组大鼠高架十字迷宫实验中 OE、OT 均显著降低($P < 0.01$),糖水偏好度显著降低($P < 0.01$),强迫游泳实验不动时间显著延长($P < 0.01$),展现出显著的焦虑和抑郁样行为;与模型组比较,百合地黄汤高剂量组上述指标趋势均被显著逆转($P < 0.01$),百合地黄汤中剂量组 OT、糖水偏好度显著增加且强迫游泳实验不动时间显著减少($P < 0.05, P < 0.01$),百合地黄汤低剂量强迫游泳实验不动时间显著减少($P < 0.05$),见表 1。

表 1 百合地黄汤对模型大鼠焦虑和抑郁样行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	OE/%	OT/%	糖水偏好度/%	不动时间/s
正常	—	39.64 $\pm$ 6.52	14.94 $\pm$ 4.00	81.34 $\pm$ 10.45	18.49 $\pm$ 6.03
模型	—	19.83 $\pm$ 4.28 ¹⁾	6.81 $\pm$ 3.39 ¹⁾	59.16 $\pm$ 8.02 ¹⁾	55.26 $\pm$ 13.94 ¹⁾
文拉法辛	0.013 5	29.48 $\pm$ 11.60 ³⁾	17.43 $\pm$ 4.49 ³⁾	76.75 $\pm$ 7.76 ³⁾	34.87 $\pm$ 10.46 ³⁾
百合地黄汤	16	28.93 $\pm$ 6.62 ³⁾	16.17 $\pm$ 3.80 ³⁾	75.24 $\pm$ 6.55 ³⁾	29.29 $\pm$ 7.45 ³⁾
	8	24.95 $\pm$ 7.96	12.59 $\pm$ 5.62 ²⁾	69.37 $\pm$ 6.13 ²⁾	32.17 $\pm$ 8.76 ³⁾
	4	21.02 $\pm$ 6.13	9.97 $\pm$ 2.49	62.75 $\pm$ 7.03	40.59 $\pm$ 10.15 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 百合地黄汤对模型大鼠海马树突棘形态的影响

正常组大鼠海马神经元树突清晰,分支丰富,树突棘密集且排列整齐,形态完整;模型组树突分支稀疏,部分神经元树突出现断裂或变细,树突棘数量明

显减少,呈现萎缩、消失、形态不规则、短缩等特征;经百合地黄汤干预后,树突结构基本恢复完整,树突棘数量不同程度的恢复,形态趋于正常,以高剂量组效果最为显著,见图 1。

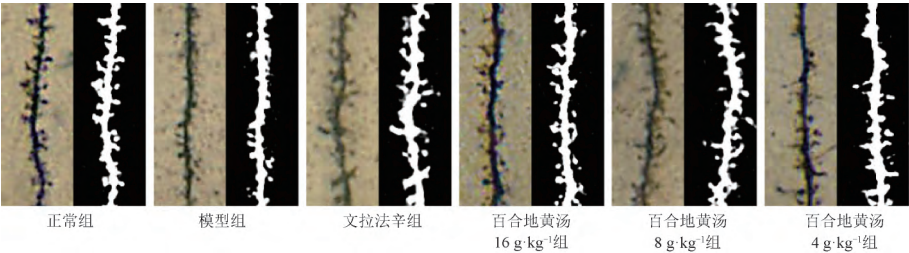


图 1 百合地黄汤对模型大鼠海马树突棘形态的影响(高尔基染色, $\times 630$)

Fig.1 Effect of Baihe Dihuang Decoction on the morphology of hippocampal dendritic spines in model rats (Golgi-Cox staining, $\times 630$)

3.3 百合地黄汤对模型大鼠海马 SHP2 及突触结构蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠海马 p-SHP2/SHP2 水平显著增加 ($P<0.01$),突触结构蛋白 SYN1、PSD-95 表达均显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各剂量百合地黄汤均能显著抑制模型大鼠 p-SHP2/SHP2 的高表达 ($P<0.05, P<0.01$),高剂量百合地黄汤能够同时逆转 SYN1、PSD-95 蛋白的表达 ($P<0.01$),中剂量百合地黄汤能够增加 PSD-95 蛋白的表达 ($P<0.05$),见图 2、表 2。

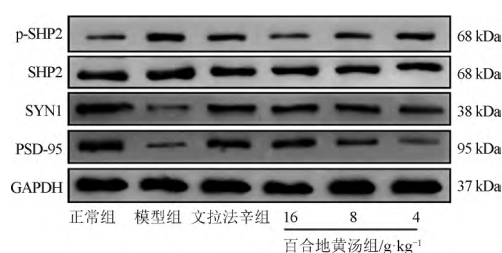
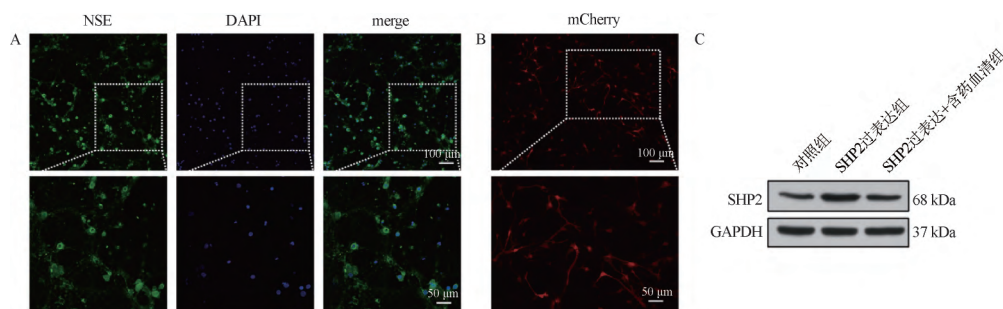


图 2 p-SHP2、SHP2、SYN1、PSD-95 蛋白电泳条带

Fig.2 Electrophoresis bands of the proteins of p-SHP2, SHP2, SYN1, and PSD-95

3.4 百合地黄汤对神经元 SHP2 过表达的影响

原代海马神经元特征符合典型的神经元生长,神经网络丰富,轴突和树突相互交叠。免疫荧光染



A. 原代海马神经元鉴定; B. 慢病毒转染后神经元 mCherry 表达情况; C. SHP2 蛋白电泳条带图。

图 3 原代海马神经元鉴定、转染及 SHP2 蛋白电泳条带

Fig.3 Identification, transfection, and SHP2 protein electrophoresis bands of primary hippocampal neurons

3.5 百合地黄汤对 SHP2 过表达致神经元损伤的影响

与对照组比较,SHP2 过表达组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$),Hoechst 33342 染色提示活细胞数量减少,流式细胞术显示细胞凋亡率显著增加

表 2 百合地黄汤对模型大鼠海马 p-SHP2/SHP2、SYN1、PSD-95 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Baihe Dihuang Decoction on the protein expression of p-SHP2/SHP2, SYN1, and PSD-95 in model rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

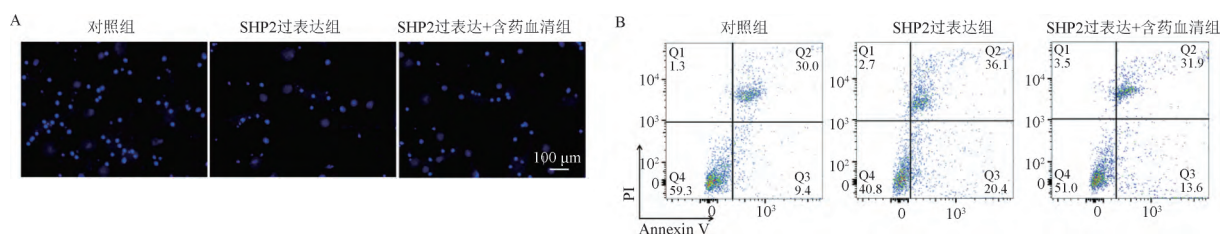
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p-SHP2 /SHP2	SYN1 /GAPDH	PSD-95 /GAPDH
正常	-	0.245±0.035	0.713±0.103	0.487±0.070
模型	-	0.590±0.055 ¹⁾	0.187±0.037 ¹⁾	0.211±0.037 ¹⁾
文拉法辛	0.013 5	0.339±0.031 ³⁾	0.344±0.031 ³⁾	0.387±0.075 ³⁾
百合地黄汤	16	0.269±0.039 ³⁾	0.319±0.025 ³⁾	0.414±0.035 ³⁾
	8	0.324±0.033 ³⁾	0.270±0.032	0.324±0.040 ²⁾
	4	0.437±0.060 ²⁾	0.237±0.037	0.227±0.038

色结果显示,其特异性标志物 NSE 呈阳性表达,可用于后续实验。经过慢病毒转染,目标细胞成功整合携带荧光报告基因 mCherry 的外源基因,并实现高效表达。荧光显微镜观察结果显示,细胞内呈现出清晰的红色荧光信号,表明外源基因在细胞中得到了稳定表达。进一步采用 RT-qPCR 和 Western blot 实验进行验证,显示 SHP2 在转染细胞内 mRNA 及蛋白表达均显著高于对照组 ($P<0.05, P<0.01$);经百合地黄汤含药血清干预后,神经元 SHP2 过表达水平显著降低 ($P<0.05, P<0.01$),提示其可能通过调节 SHP2 的表达,发挥其神经保护作用,见图 3、表 3。

($P<0.01$),说明 SHP2 高表达可导致神经元损伤;与 SHP2 过表达组比较,百合地黄汤含药血清干预后细胞存活率显著增加 ($P<0.05$),活细胞数量增加,细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$),提示百合地黄汤通过调控 SHP2 的表达,发挥海马神经元保护作

表 3 百合地黄汤对转染过表达慢病毒神经元 SHP2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effect of Baihe Dihuang Decoction on the expression of SHP2 in neurons transfected with overexpressing lentivirus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SHP2 mRNA 相对表达	SHP2 蛋白相对表达
对照	0.985±0.045	0.594±0.027
SHP2 过表达	1.297±0.145 ¹⁾	1.825±0.024 ²⁾
SHP2 过表达+含药血清	1.025±0.113 ³⁾	0.727±0.031 ⁴⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 SHP2 过表达组相比³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 4 同)。

A. Hoechst 33342 染色观察神经元活性; B. 流式细胞术检测神经元凋亡(图 5 同)。

图 4 SHP2 过表达对正常神经元凋亡的影响

Fig.4 Effect of SHP2 overexpression on apoptosis of normal neurons

表 4 百合地黄汤对 SHP2 过表达致神经元损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effect of Baihe Dihuang Decoction on neuronal injury caused by overexpression of SHP2 ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	细胞存活率	细胞死亡率
对照	92.05±4.07	39.42±2.79
SHP2 过表达	75.25±4.24 ²⁾	58.25±4.72 ²⁾
SHP2 过表达+含药血清	87.56±3.50 ³⁾	47.42±3.35 ³⁾

细胞活性和导致神经元损伤的关键靶标,而百合地黄汤则对皮质酮诱导神经元损伤有明显的保护作用,见图 5、表 5。

3.7 百合地黄汤对神经元 SHP2 及突触结构蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组 SHP2、p-SHP2 表达均显著增加($P<0.01$),SYN1、PSD-95 表达均显著降低($P<0.01$),说明在模拟焦虑性抑郁症状状态下 SHP2 异常高表达,导致神经元突触结构受损;与模型组相比,SHP2 敲低组 SHP2、p-SHP2 表达均显著降低($P<0.01$),SYN1、PSD-95 表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),进一步说明 SHP2 干扰慢病毒转染成功,且敲低 SHP2 表达有助于改善皮质酮诱导的突触损伤;与模型组相比,百合地黄汤含药血清也能显著降低 SHP2、p-SHP2 表达($P<0.01$),显著增加 SYN1

用,见图 4、表 4。

3.6 百合地黄汤对皮质酮诱导神经元损伤的影响

与对照组比较,皮质酮造模后 SHP2 mRNA 水平显著升高($P<0.01$),细胞存活率显著降低($P<0.01$),细胞凋亡率显著增加($P<0.01$),活细胞数量减少;与模型组比较,模型+SHP2 敲低组和模型+含药血清组 SHP2 mRNA 水平均显著降低($P<0.01$),细胞存活率均显著升高($P<0.01$),细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$),说明 SHP2 可能是影响

和 PSD-95 表达($P<0.01$),提示其可能通过调控 SHP2 表达从而缓解海马神经元损伤,见图 6、表 6。

4 讨论

焦虑性抑郁症是一种高度共病的精神障碍,临床表现兼具抑郁和焦虑 2 类核心症状,具有发病率高、迁延难愈、易复发、自杀风险大等特点。患者除典型的抑郁症状如情绪低落、快感缺失、思维迟缓、注意力不集中之外,常伴有显著的焦虑表现,如坐立不安、紧张烦躁、易怒和睡眠障碍等,显著降低其生活质量和社会功能。当前常用的西药治疗如选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)在部分患者中疗效不佳,且长期使用常伴随耐药、情绪波动加剧或认知功能下降等^[24]。因此,深入探讨焦虑性抑郁症的神经生物学机制并开发更为安全有效的干预策略已成为该领域亟需解决的重要科学问题。

神经可塑性的损伤,尤其是突触结构与功能的异常,是情绪障碍的重要神经病理基础^[23]。突触作为神经元之间信息传递的核心结构,其形态变化和数目变化直接反映中枢神经系统的可塑性水平。持续的慢性应激可导致海马、杏仁核等情绪调节相关脑区的突触密度降低、树突萎缩、神经元间连接丧失,从而破坏神经网络的整体稳定性^[24]。本研究动

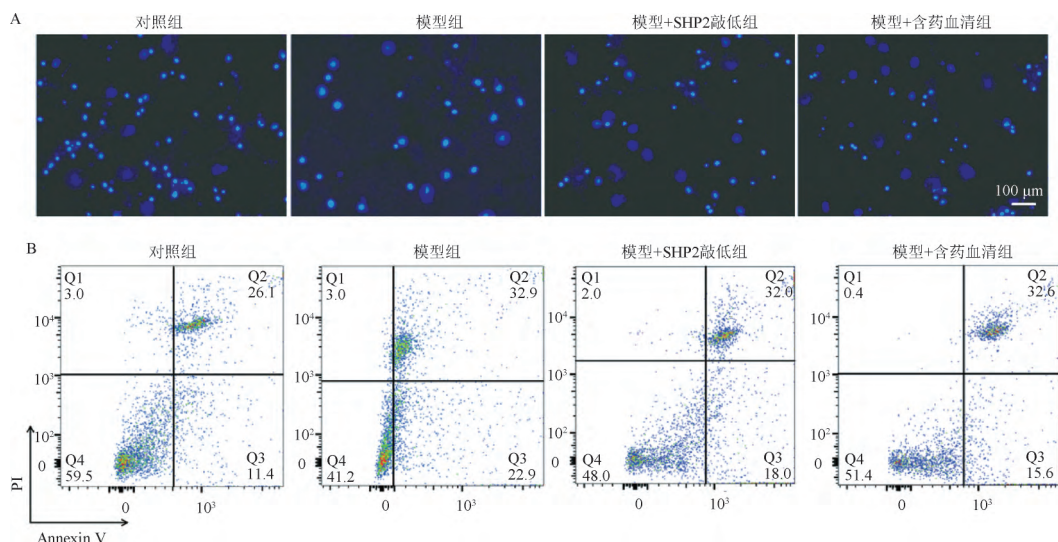


图 5 SHP2 敲低对皮质酮诱导的神经元凋亡的影响

Fig.5 Effect of SHP2 knockdown on corticosterone-induced neuronal apoptosis

表 5 百合地黄汤对皮质酮诱导神经元损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effect of Baihe Dihuang Decoction on corticosterone-induced neuronal injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SHP2 mRNA 相对表达	细胞存活率 /%	细胞凋亡率 /%
对照	0.995±0.068	91.51±2.25	41.33±2.24
模型	1.250±0.112 ¹⁾	52.47±2.77 ¹⁾	56.90±3.82 ¹⁾
模型+SHP2 敲低	0.584±0.062 ³⁾	65.10±3.84 ³⁾	50.03±2.39 ²⁾
模型+含药血清	0.751±0.067 ³⁾	76.12±3.21 ³⁾	47.57±2.45 ²⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表 6 同)。

物实验发现,模型大鼠表现出明显的焦虑样和抑郁样行为,海马神经元树突分支减少、树突棘密度降低、结构紊乱,突触前膜蛋白 SYN1 和突触后膜蛋白 PSD-95 表达均显著降低,突触可塑性明显受损。

SHP2 广泛表达于中枢神经系统的多个脑区,尤其在海马、前额叶皮层等情绪调节关键区域中表达丰富,且在突触区的表达要显著高于非突触区^[2]。SHP2 可通过与多种受体酪氨酸激酶结合,调控 MAPK/ERK、PI3K/Akt 和 JAK/STAT 等多条与神经生存、突触形成、树突发育密切相关的信号通路^[5-4]。研究表明,SHP2 功能障碍会导致突触生成减少、轴突与树突发育异常以及神经元传递效率下降,这些变化与情绪障碍的发生密切相关^[23]。另有研究发现,脑内 SHP2 高表达与学习记忆功能障碍以及动物抑郁样行为的发生有关^[29-30]。本研究发现,模型大鼠海马 SHP2 异常高表达,而在正常培养

的神经元中转染 SHP2 过表达慢病毒后,神经元存活率降低,细胞凋亡率增加。在皮质酮诱导损伤的神经元中敲低 SHP2 表达后,细胞凋亡率降低,突触蛋白表达增加,以上说明 SHP2 的过度激活会导致神经元结构损伤,并可能参与焦虑性抑郁症的发生发展过程。

百合地黄汤是张仲景创制的治疗百合病的主方,也是现代临床治疗阴虚内热型抑郁症或抑郁症伴焦虑失眠的基本方。现代药理研究表明,百合中的多糖、皂苷和黄酮类成分具有抗焦虑、抗抑郁、抗氧化、抗炎及神经保护等多重作用^[31-32]。地黄中富含的环烯醚萜苷类、苯丙素类成分,如梓醇、毛蕊花糖苷,可通过调控肠微生物-脑轴、神经营养、突触可塑性等途径发挥抗抑郁作用^[23,33]。本研究结果表明,百合地黄汤能够抑制焦虑性抑郁症模型大鼠海马 SHP2 高表达,改善树突棘密度降低与突触结构损伤,发挥神经保护作用;而在体外实验中,百合地黄汤含药血清能够缓解海马神经元损伤,增加突触蛋白的表达,降低神经元凋亡水平,该作用与抑制 SHP2 表达有关。

综上,本研究通过基因过表达与干扰双向干预,结合体内外实验,首次揭示了百合地黄汤通过调控 SHP2 信号改善神经元损伤,发挥抗焦虑性抑郁症功效的潜在机制,丰富了百合地黄汤治疗情志病的现代药理基础,为其临床推广运用提供了理论支撑。未来研究将进一步聚焦 SHP2 下游信号通路及其在

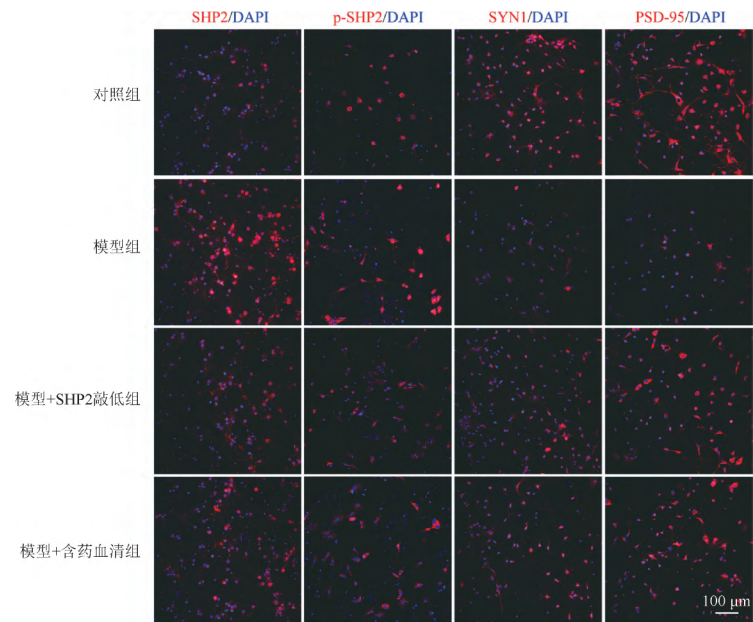


图 6 各组神经元 SHP2、p-SHP2、SYN1 及 PSD-95 蛋白表达(免疫荧光, ×100)
Fig.6 Expression of SHP2, p-SHP2, SYN1, and PSD-95 proteins in neurons of each group (immunofluorescence, ×100)

表 6 百合地黄汤对神经元 SHP2、p-SHP2、SYN1 及 PSD-95 相对荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Effect of Baihe Dihuang Decoction on the relative fluorescence intensities of SHP2, p-SHP2, SYN1, and PSD-95 in neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SHP2 相对荧光强度	p-SHP2 相对荧光强度	SYN1 相对荧光强度	PSD-95 相对荧光强度
对照	29.92±3.45	30.76±0.94	46.51±3.00	44.08±2.86
模型	47.93±5.03 ¹⁾	38.82±1.25 ¹⁾	25.76±5.15 ¹⁾	28.66±1.38 ¹⁾
模型+SHP2 敲低	21.62±2.56 ³⁾	11.32±2.60 ³⁾	40.91±2.09 ³⁾	34.38±2.09 ²⁾
模型+含药血清	31.36±3.25 ³⁾	28.44±1.40 ³⁾	38.75±2.57 ³⁾	37.70±1.77 ³⁾

其他关键脑区的功能变化,鉴定靶向 SHP2 的活性成分,以期为传统中药治疗焦虑性抑郁症提供更加精准、系统且可重复验证的机制基础。

参考文献

[1] AYYACI E R, NANDY K, GORMAN A, et al. Clinical correlates of anxious depression in youth from the texas youth depression and suicide research network (TX-YDSRN) [J]. J Affect Disord, 2024, 362: 510.

[2] GASPERSZ R, NAWIJN L, LAMERS F, et al. Patients with anxious depression: overview of prevalence, pathophysiology and impact on course and treatment outcome [J]. Curr Opin Psychiatry, 2018, 31(1): 17.

[3] ZHU G, XIE J, KONG W, et al. Phase separation of disease-associated SHP2 mutants underlies MAPK hyperactivation [J]. Cell, 2020, 183(2): 490.

[4] ROCCOGRANDI L, BINDER Z A, ZHANG L, et al. SHP2 regulates proliferation and tumorigenicity of glioma stem cells [J]. J Neurooncol, 2017, 135(3): 487.

[5] EASTON J B, ROYER A R, MIDDLEMAS D S. The protein

tyrosine phosphatase, Shp2, is required for the complete activation of the RAS/MAPK pathway by brain-derived neurotrophic factor [J]. J Neurochem, 2006, 97(3): 834.

[6] RYU H H, KIM T, KIM J W, et al. Excitatory neuron-specific SHP2-ERK signaling network regulates synaptic plasticity and memory [J]. Sci Signal, 2019, 12(571): 5755.

[7] DING X, CHEN C, ZHAO H, et al. Inhibiting SHP2 reduces glycolysis, promotes microglial M1 polarization, and alleviates secondary inflammation following spinal cord injury in a mouse model [J]. Neural Regen Res, 2025, 20(3): 858.

[8] KIM Y, LIU G, LEUGERS C J, et al. Tau interacts with SHP2 in neuronal systems and in Alzheimer's disease brains [J]. J Cell Sci, 2019, 132(14): 229054.

[9] LIU W, WANG M, SHEN L, et al. SHP2-mediated mitophagy boosted by lovastatin in neuronal cells alleviates parkinsonism in mice [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 34.

[10] ZHOU H, XIE Y, FANG W, et al. The down-regulation of tyrosine phosphatase SHP2 activity is involved in the removal of surface AMPA receptors in long term depression [J]. Neurosci

- Lett, 2022, 779: 136636.
- [1] CHONG Z Z, LIN S H, KANG J Q, et al. The tyrosine phosphatase SHP2 modulates MAP kinase p38 and caspase 1 and 3 to foster neuronal survival [J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23 (5): 561.
- [2] TANG L, LIU J, YANG H, et al. Microbiome metabolomic analysis of the anxiolytic effect of Baihe Dihuang Decoction in a rat model of chronic restraint stress [J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 2227.
- [3] CAO L H, WANG Z Z, ZHAO H, et al. The microglial state transition as a novel mechanism by which fresh Baihe Dihuang Decoction prevents depression by regulating SIRT1/HMGB1 signaling [J]. Phytomedicine, 2025, 141: 156718.
- [4] TANG L, ZHAO H Q, YANG H, et al. Spectrum-effect relationship combined with bioactivity evaluation to discover the main anxiolytic active components of Baihe Dihuang Decoction [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117090.
- [5] 张忠, 张国玲, 甄丽芳, 等. 百合地黄汤联合舍曲林治疗抑郁症阴虚火旺型临床疗效及安全性观察 [J]. 中国临床医生杂志, 2024, 52(9): 1123.
- [6] 李赛君. 百合地黄汤加味逍遥散治疗更年期综合征临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(20): 88.
- [7] 杨蒙蒙, 张怀亮. 百合地黄汤治疗脑卒中后抑郁症的疗效探讨 [J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(20): 213.
- [8] 赵洪庆, 唐林, 吴碧茹, 等. 百合地黄汤抑制 NLRP3 炎症小体激活改善焦虑性抑郁症模型大鼠海马神经元损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 7.
- [9] 赵洪庆, 刘检, 孟盼, 等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1205.
- [10] 崔妍, 王若男, 吴九如, 等. 酸枣仁和合欢花水提取物对焦虑性抑郁症模型大鼠 HPA 轴及炎症因子的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(3): 539.
- [11] TIAN X, WANG G, TENG F, et al. Zhi Zi Chi decoction (Gardeniae Fructus and Semen Sojae Praeparatum) attenuates anxious depression via modulating microbiota-gut-brain axis in corticosterone combined with chronic restraint stress-induced mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(4): e14519.
- [12] LATT H M, MATSUSHITA H, MORINO M, et al. Oxytocin inhibits corticosterone-induced apoptosis in primary hippocampal neurons [J]. Neuroscience, 2018, 379: 383.
- [13] MAO Q, ZHANG H, ZHANG Z, et al. Co-decoction of Lili Bulbus and Radix Rehmannia Recens and its key bioactive ingredient verbascoside inhibit neuroinflammation and intestinal permeability associated with chronic stress-induced depression via the gut microbiota-brain axis [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155510.
- [14] KOVICH H, KIM W, QUASTE A M. Pharmacologic treatment of depression [J]. Am Fam Physician, 2023, 107(2): 173.
- [15] 谢光璟, 徐波, 夏婧, 等. 基于 NRG1/ErbB4 信号通路研究安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马神经元损伤及突触微环境的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(18): 4957.
- [16] LIAO C, DUA A N, WOJTASIEWICZ C, et al. Structural neural plasticity evoked by rapid-acting antidepressant interventions [J]. Nat Rev Neurosci, 2025, 26(2): 135.
- [17] VERMA R, VENKATAREDDY M, KALINOWSKI A, et al. SHP2 associates with and enhances nephrin tyrosine phosphorylation and is necessary for foot process spreading in mouse models of podocyte injury [J]. Mol Cell Biol, 2016, 36 (4): 596.
- [18] LEE S, KIM J, RYU H H, et al. SHP2 regulates GluA2 tyrosine phosphorylation required for AMPA receptor endocytosis and mGluR-LTD [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(18): e2316819121.
- [19] KUSAKARI S, SAITOW F, AGO Y, et al. SHP2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice [J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(9): 1557.
- [20] LEAHY S N, VITA D J, BROADIE K. PTPN11/corkscrew activates local presynaptic MAPK signaling to regulate synapsin, synaptic vesicle pools, and neurotransmission strength, with a dual requirement in neurons and glia [J]. J Neurosci, 2024, 44 (17): e1077232024.
- [21] WANG Y F, AN Z Y, YUAN L Q, et al. *Lilium brownii*/Baihe as nutraceuticals: insights into its composition and therapeutic properties [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2024, 17(9): 1242.
- [22] MA H, HUANG H, LI C, et al. The antidepressive mechanism of *Longya lilium* combined with fluoxetine in mice with depression-like behaviors [J]. NPJ Syst Biol Appl, 2024, 10 (1): 5.
- [23] WU X, ZHANG Y, WANG J, et al. Role of SIRT1-mediated synaptic plasticity and neurogenesis: sex-differences in antidepressant-like efficacy of catalpol [J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156120.

责任编辑 马超一