

· 实验研究 ·

栀子豉汤通过调节 KYNA/QA 平衡与小胶质细胞极化改善 CUMS 大鼠抑郁样行为的研究

孟拓, 秦铭骏

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要 目的:探讨栀子豉汤(ZZCD)对慢性不可预测性应激(CUMS)诱导大鼠抑郁样行为的作用及机制。方法:大鼠随机分为5组,①对照组(Control):不接受慢性不可预测性轻度应激(CUMS)及药物处理;②ZZCD组:未接受CUMS,对应给药时间点灌胃栀子豉汤(ZZCD, $10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);③CUMS组:连续7周接受CUMS处理;④CUMS+氟西汀组(CUMS+Flu):接受7周CUMS,自第21天起灌胃氟西汀(fluoxetine, $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)连续4周;⑤CUMS+ZZCD组:接受7周CUMS,自第21天起灌胃ZZCD($10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)连续4周。小胶质细胞系BV-2在对数生长期进行分组并处理,①对照组(Control):不加任何处理;②ZZCD组:加入ZZCD 4 mg/mL 处理24 h;③QA组:加入喹啉酸(QA, 5 mmol/L)处理24 h;④QA+ZZCD组:同时加入QA(5 mmol/L)与ZZCD(4 mg/mL)处理24 h。采用蔗糖偏好实验(SPT)、旷场实验(OFT)、高架十字迷宫实验(EPM)评价大鼠行为学;采用免疫荧光、实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)、蛋白质印迹(Western blot)技术检测小胶质细胞活化和炎症因子水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)及生化试剂盒测定犬尿氨酸(KYNA)、喹啉酸(QA)及氧化应激指标水平;并在小胶质细胞BV-2中进行QA处理验证。同时采用液相色谱-质谱(LC-MS)对栀子豉汤进行化学成分分析,以表征其物质基础特征。结果:ZZCD改善CUMS大鼠抑郁和焦虑样行为,抑制M1型活化并促进M2型极化($P < 0.001$),纠正KYNA/QA失衡,降低活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)($P < 0.001$),提高超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性($P < 0.01$, $P < 0.001$),抑制核因子- κB (NF- κB)通路并激活ERK/CREB信号($P < 0.001$),同时上调海马脑源性神经营养因子(BDNF)及突触可塑性相关蛋白突触后致密物质95(PSD95)和突触素(SYP)的表达($P < 0.001$)。结论:栀子豉汤可通过多靶点作用改善CUMS大鼠抑郁样行为,其机制可能与抑制神经炎症、调控犬尿氨酸通路、减轻氧化应激并促进神经可塑性恢复有关,为中药抗抑郁提供实验依据。

关键词 栀子豉汤;抑郁症;小胶质细胞;犬尿氨酸通路;NF- κB ;ERK-CREB;神经可塑性

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)09-0007-12

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260173

抑郁症是常见精神障碍之一,其发生机制复杂,现有抗抑郁药物仍存在疗效不稳定、起效延迟及复发率较高等问题,因此有必要从神经炎症、代谢异常和神经可塑性损伤等角度探索新的干预机制^[1-3]。

神经炎症在抑郁症发生发展中具有重要作用,其中小胶质细胞异常活化是关键环节。M1型小胶质细胞可释放白细胞介素- 1β (IL- 1β)、诱导型一氧化氮

合酶(iNOS)等促炎因子,加重炎症反应和神经损伤;M2型小胶质细胞则与精氨酸酶-1(Arg-1)、白细胞介素-10(IL-10)等抗炎因子表达升高有关,有助于炎症缓解和组织修复。因此,本研究选择Iba-1、CD86、CD206及iNOS、IL- 1β 、Arg-1、IL-10作为评价小胶质细胞活化和极化状态的主要指标^[4-6]。

除神经炎症外,色氨酸-犬尿氨酸代谢通路失衡也是抑郁症的重要病理机制。喹啉酸(QA)具有神经毒性,可通过激活N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)诱导兴奋性毒性和氧化应激;犬尿氨酸酸(KYNA)则具有一定神经保护作用。因此,KYNA、QA

收稿日期:2025-08-28 修回日期:2026-06-03

基金项目:黑龙江省中医药管理局国医大师学术思想传承科研课题(GY2022-03)

作者简介:孟拓(1989-),男,博士,讲师,研究方向:方剂配伍规律研究。

及二者平衡可作为反映犬尿氨酸通路异常和神经毒性变化的重要指标^[7-9]。同时,氧化应激、炎症信号激活及神经可塑性损伤与抑郁样行为密切相关,故本研究进一步检测氧化应激指标、NF- κ B 和 ERK/CREB 信号通路,以及 BDNF、PSD95、SYP 等神经可塑性相关蛋白,以探讨栀子豉汤改善抑郁样行为的可能分子基础。

栀子豉汤(Zhizi-Chi Decoction, ZZCD)源于《伤寒论》,传统上用于烦躁、失眠及情志不舒等症状。现代研究提示,ZZCD 具有一定抗抑郁样作用,其主要成分包括栀子苷、栀子苷酸、大豆苷元、染料木素等多类活性成分,提示其可能通过多成分、多靶点方式调节神经炎症、代谢稳态和神经可塑性^[10-13]。然而,ZZCD 是否能够通过调控小胶质细胞极化、改善 KYNA/QA 代谢失衡并恢复神经可塑性,从而发挥抗抑郁作用,仍需进一步验证。

基于此,本研究采用慢性不可预测性应激(CUMS)大鼠模型,并结合 QA 诱导的 BV-2 小胶质细胞模型,观察 ZZCD 对抑郁样行为、小胶质细胞极化、KYNA/QA 平衡、氧化应激、NF- κ B 及 ERK/CREB 信号通路和神经可塑性相关蛋白的影响,旨在阐明 ZZCD 改善应激诱导抑郁样行为的潜在机制,为经典方剂抗抑郁作用的现代研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

选用 6~8 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体质量 200~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SYXK(京)2025-0074。所有动物在屏障环境中饲养,饲养条件为恒温(22~24)℃、相对湿度 40%~60%、12 h 光/暗周期,自由摄食饮水。实验开始前,所有大鼠均进行 7 d 适应性饲养。所有操作均符合黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会的动物实验伦理要求(2025031125)。

小胶质细胞系 BV-2 购自中国科学院细胞库(上海,CBP60922)。

1.2 药物与试剂

栀子豉汤由栀子和淡豆豉组成,药材购自哈尔滨市润禾中药饮片加工厂,批号分别为 20240101、20240102;氟西汀(fluoxetine)购自上海罗氏制药有限公司,批号为 20231234;喹啉酸(QA)购自 Sigma-Aldrich 公司,批号为 Q31234。

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)和青链霉素购自 Gibco 公司,批号分别为 11885-084、10099141 和 15140-122;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司(15596018,美国);反转录试剂盒购自 Takara 公司(RR047A,日本);SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒购自

Takara 公司(RR820A,日本);ELISA 试剂盒包括犬尿氨酸(KYNA, MyBioSource, MBS703546,美国)和喹啉酸(QA, MyBioSource, MBS732679,美国);一抗包括 p-NF- κ B (Abcam, ab76302)、NF- κ B (Abcam, ab16502)、p-I κ B α (Abcam, ab133462)、I κ B α (Abcam, ab76429)、p-ERK (Abcam, ab201015)、ERK (Abcam, ab184699)、p-CREB (Abcam, ab32096)、CREB (Abcam, ab32515)、BDNF (Abcam, ab108319)、PSD95 (Abcam, ab18258)、SYP (Abcam, ab32127)和 α -Tubulin (Abcam, ab7291);二抗为 HRP 标记山羊抗兔/鼠 IgG (Cell Signaling Technology, 7074/7076,美国)。

1.3 主要仪器

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统(Waters,美国);高分辨质谱系统(Q-TOF-MS, Waters,美国);激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8,德国);实时荧光定量 PCR 仪(ABI StepOnePlus, Thermo Fisher,美国);ChemiDoc 成像系统(Bio-Rad,美国);酶标仪(BioTek Synergy H1,美国);分光光度计(Shimadzu UV-2600,日本);荧光显微镜(Olympus IX73,日本)及流式细胞仪(BD FACSCanto II,美国)。

1.4 栀子豉汤的 LC-MS 化学成分分析

采用非靶向液相色谱-质谱(LC-MS)技术对 ZZCD 提取物进行化学成分分析。取适量冻干样品,加入 70% 甲醇水溶液,在冰水浴条件下超声提取后离心收集上清液,必要时对残渣进行补充提取并合并上清。所得提取液经氮吹浓缩,于 -80℃ 保存;上机检测前以预冷的 50% 甲醇水溶液复溶,经混匀、低温超声及离心处理后,取上清并通过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤备用。

液相色谱分析采用 BEH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m)。柱温设定为 40℃,流速为 0.3 mL/min,进样体积为 10 μ L。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水,流动相 B 为乙腈,采用梯度洗脱程序,总运行时间为 20 min。质谱检测在高分辨质谱系统上完成,于正、负离子电喷雾电离(ESI)模式下分别采集数据。一级质谱扫描范围为 m/z 60~1 200,主要离子源参数按仪器推荐条件设置。

原始质谱数据经相应软件进行峰提取、保留时间校正及峰对齐处理。基于高分辨质谱获得的精确质荷比信息,结合数据库检索及文献报道^[14],对部分检测到的信号峰进行初步定性注释。由于本研究未对所有化合物开展系统的二级质谱结构确证,上述分析结果仅用于描述 ZZCD 的整体化学组成特征,而不作为具

体成分结构确证依据。

1.5 CUMS 模型建立

CUMS 模型参考文献^[15-16]并结合方案进行建立。实验中共设置 11 种轻度应激源,包括潮湿垫料、隔夜禁水、隔夜禁食、笼盒 45°倾斜 24 h、夜间灯光闪烁、昼夜周期反转、拥挤饲养过夜、臭味暴露、80 dB 白噪声 3 h、8 ℃冷水游泳 5 min 以及限制活动 4 h。在建模过程中,每日随机给予 2~3 种应激方式,且同一应激源不连续重复,以保证应激的不可预测性。CUMS 处理持续 7 周,在建模第 3 周末(第 21 天)开始对相应治疗组大鼠进行药物干预(氟西汀或 ZZCD),直至第 7 周结束。于最后一次给药后 1 h 进行蔗糖偏好实验(SPT)、旷场实验(OFT)和高架十字迷宫实验(EPM),以评估大鼠抑郁样行为。

1.6 实验动物分组

40 只大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,①对照组(Control):不接受慢性不可预测性轻度应激(CUMS)及药物处理;②ZZCD 组:未接受 CUMS,对应给药时间点灌胃栀子豉汤(ZZCD, 10 g · kg⁻¹ · d⁻¹);③CUMS 组:连续 7 周接受 CUMS 处理;④CUMS + 氟西汀组(CUMS + Flu):接受 7 周 CUMS,自第 21 天起灌胃氟西汀(fluxetine, 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)连续 4 周;⑤CUMS + ZZCD 组:接受 7 周 CUMS,自第 21 天起灌胃 ZZCD(10 g · kg⁻¹ · d⁻¹)连续 4 周。所有动物在第 7 周最后 1 次给药后 1 h 进行行为学测试,随后取材用于组织学与分子检测。

1.7 细胞培养与处理

小胶质细胞系 BV-2 在含有 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和 1% 青链霉素的高糖(DMEM)中培养,培养条件为 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱。细胞在对数生长期进行分组并处理,①对照组(Control):不加任何处理;②ZZCD 组:加入 ZZCD 4 mg/mL 处理 24 h;③QA 组:加入喹啉酸(QA, 5 mmol/L)处理 24 h;④QA + ZZCD 组:同时加入 QA(5 mmol/L)与 ZZCD(4 mg/mL)处理 24 h。各组处理结束后,收集细胞用于免疫荧光、qRT-PCR、Western blot、活性氧(ROS)检测及抗氧化指标检测。

1.8 行为学实验

1.8.1 蔗糖偏好实验(SPT)

采用蔗糖偏好实验评估大鼠的快感缺失行为,实验开始前所有大鼠需进行为期 48 h 的适应性训练,首先提供两瓶 1% 蔗糖溶液 24 h,然后更换为一瓶 1% 蔗糖溶液和一瓶清水 24 h。适应期结束后,正式实验前禁水 12 h,并将大鼠单笼饲养,随后同时给予两瓶等量

的 1% 蔗糖溶液和清水,测试持续 12 h。实验结束后测量两瓶液体的消耗量,计算蔗糖偏好率 = 蔗糖消耗量 / (蔗糖消耗量 + 清水消耗量) × 100%。

1.8.2 旷场实验(OFT)

旷场实验用于评价大鼠的自主活动能力与焦虑水平。实验装置为正方体开放场(100 cm × 100 cm × 40 cm),底面划分为 25 个等面积方格,其中中央 9 格定义为中央区。实验前大鼠在测试室内静置 30 min 以适应环境。随后将大鼠轻轻置于装置中央,允许自由活动 5 min,通过自动视频跟踪系统记录其总移动距离及在中央区停留的时间。较低的运动总距离及中央区探索时间减少,通常提示抑郁或焦虑样行为。实验结束后,每次测试均用 75% 酒精擦拭装置,避免气味干扰。

1.8.3 高架十字迷宫实验(EPM)

高架十字迷宫实验用于进一步评估大鼠的焦虑相关行为。实验装置由相互垂直的两个开臂和两个闭臂组成,臂长 50 cm,宽 10 cm,闭臂四周有高 40 cm 的挡板,整个装置距地面高度为 50 cm。实验时,将大鼠置于中央平台,头部朝向开臂,允许自由探索 5 min。通过视频跟踪系统记录大鼠进入开臂的次数及在开臂内停留的时间。进入开臂频率增加和停留时间延长反映焦虑水平下降,而显著减少则提示焦虑或抑郁样行为。实验过程中保持环境光照柔和,避免外部刺激干扰。

1.9 免疫荧光染色观察病理形态

为观察小胶质细胞活化状态及表型变化,对海马组织切片及 BV-2 细胞进行免疫荧光染色。动物经 4% 多聚甲醛灌流固定,脑组织脱水后制备 30 μm 冰冻切片。切片经 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h 后,加入以下一抗:兔抗 Iba-1 (Abcam, ab178846)、兔抗 CD86 (Abcam, ab239075)、兔抗 CD206 (Abcam, ab64693),于 4 ℃ 孵育过夜;次日加入 Alexa Fluor 标记二抗(In-vitrogen, A-21206),室温避光孵育。细胞经 4% 多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100 透化后进行相同染色处理。DAPI 用于细胞核染色,激光共聚焦显微镜下成像。荧光强度通过 ImageJ 软件定量分析。

1.10 实时定量 PCR(qRT-PCR)检测相关基因水平

海马组织及 BV-2 细胞经 Trizol 试剂提取总 RNA,使用反转录试剂盒合成 cDNA。qPCR 反应采用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒,在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。目标基因包括 iNOS、IL-1β、Arg-1、IL-10,内参为 β-actin。引物由 Sangon Biotech(上海,中国)合成。基因相对表达量采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算。

1.11 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测相关蛋白表达水平

组织和细胞蛋白采用 RIPA 裂解液提取,BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。等量蛋白经 SDS - PAGE 分离后转膜至 PVDF 膜。封闭液为 5% 脱脂奶粉。ECL 发光液显影,使用 ChemiDoc 成像系统采集信号。条带灰度通过 ImageJ 软件分析。

1.12 酶联免疫吸附试验检测相关指标浓度

取海马组织匀浆,经离心取上清,采用 ELISA 试剂盒检测犬尿氨酸和喹啉酸。检测步骤依照说明书操作,酶标仪在 450 nm 波长下读取吸光度,利用标准曲线计算浓度。

1.13 生化指标检测

采用商业化生化试剂盒(南京建成生物工程有限公司,南京)检测抗氧化酶活性与脂质过氧化水平。检测指标包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)水平。结果通过分光光度计测定。

1.14 活性氧水平检测

BV - 2 细胞经不同处理后,加入荧光探针 2', 7' - 二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH - DA, Beyotime, S0033S, 上海)10 mol/L 孵育 30 min, PBS 冲洗去

除多余探针。荧光显微镜拍摄图像,并使用流式细胞仪检测荧光强度。ROS 水平通过平均荧光强度(MFI)表示。

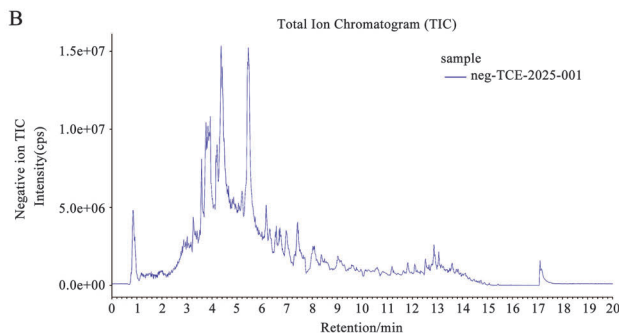
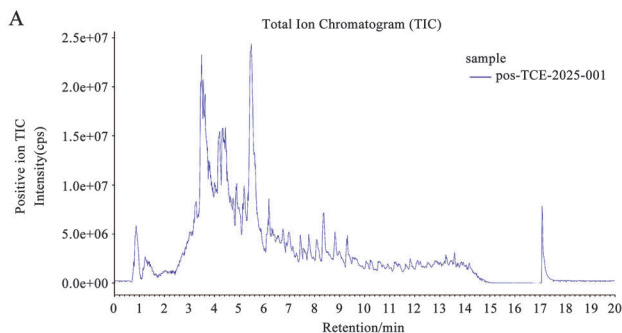
1.15 统计学分析

所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用 IBM SPSS Statistics 23 软件。组间差异通过单因素方差分析(one - way ANOVA)比较,符合条件时进行 LSD 或 Bonferroni 事后检验;两组间比较采用独立样本 t 检验。非正态分布数据采用非参数检验(Mann - Whitney U 检验)。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 栀子豉汤的 LC - MS 化学成分分析

采用非靶向液相色谱 - 质谱(Liquid chromatography - mass spectrometry, LC - MS)技术对 ZZCD 提取物进行化学成分分析。在正、负离子电喷雾电离模式下均获得稳定且重复性良好的总离子流色谱图(TIC)(图 1A, 1B)。色谱结果显示,ZZCD 在多个保留时间区间内分布有丰富的信号峰,提示 ZZCD 具有较高的化学复杂性和多成分特征。



注:A. 正离子电喷雾电离模式;B. 负离子电喷雾电离模式。

图 1 ZZCD 提取物的 LC - MS 总离子流色谱图

基于高分辨质谱获得的精确质荷比信息,并结合数据库检索及文献报道^[14],对部分检测到的信号峰进行了初步定性注释。结果显示,这些化合物主要分布于黄酮类、酚酸类、有机酸及脂质相关化合物等类别,反映了 ZZCD 作为中医复方制剂所具有的多成分物质基础。鉴于本研究未对所有化合物开展系统的二级质谱结构解析,上述成分注释仅作为物质基础的初步线索,相关详细信息见表 1。

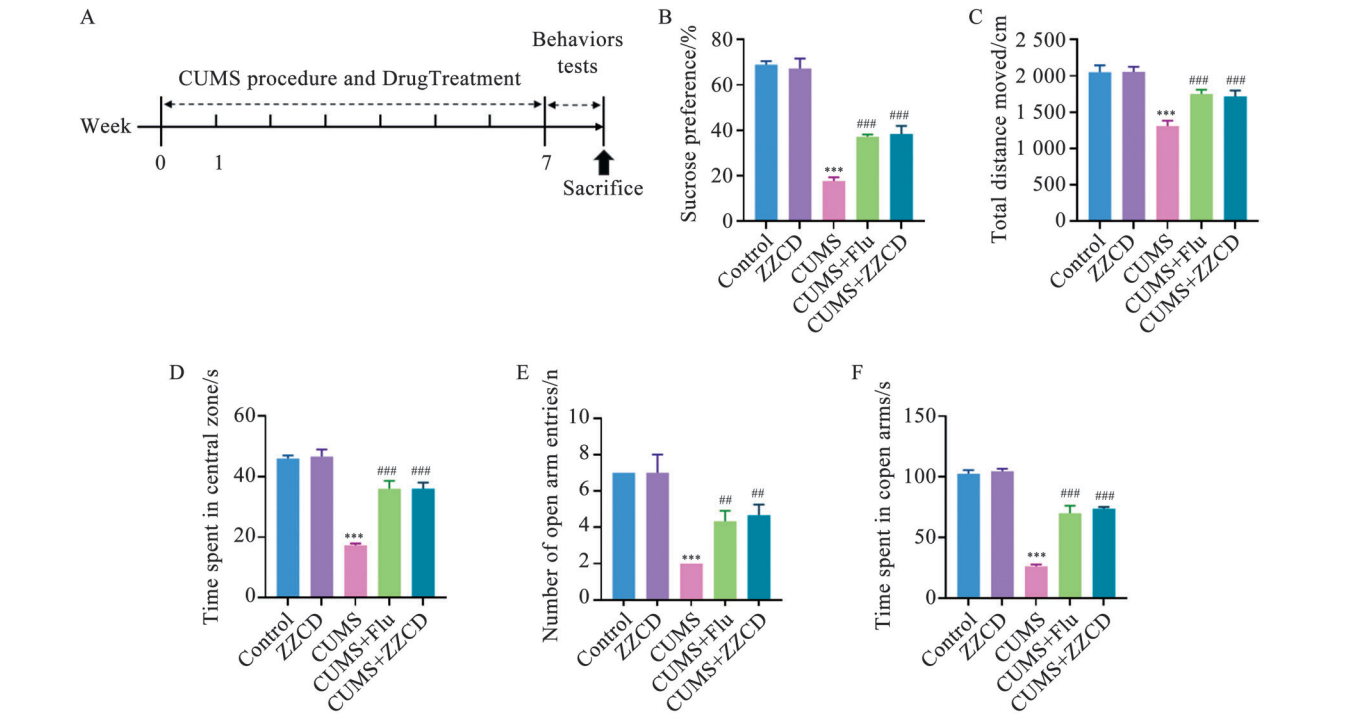
2.2 栀子豉汤对 CUMS 大鼠行为学指标的影响

本实验流程包括 CUMS 建模、药物干预及行为学检测(图 2A)。图 2B 结果显示,CUMS 组大鼠的蔗糖偏好率较 Control 组显著降低($P < 0.001$),而 CUMS + Flu 组

和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组显著升高($P < 0.001$)。图 2C 显示,CUMS 组大鼠在旷场实验中的总运动距离较 Control 组显著减少($P < 0.001$),CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组显著增加($P < 0.001$)。图 2D 显示,CUMS 组大鼠在旷场中央区的停留时间显著减少($P < 0.001$),CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组显著延长($P < 0.001$)。图 2E 显示,CUMS 组进入开臂次数较 Control 组显著减少($P < 0.001$),而 CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组均较 CUMS 组显著增加($P < 0.01$)。图 2F 显示,CUMS 组在开臂停留时间显著减少($P < 0.001$),CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组显著延长($P < 0.001$)。

表 1 各化学成分鉴定分析结果

编号	t_R /min	化合物	分子式	正离子模式峰面积	负离子模式峰面积
1	0.87	6"-O-丙二酰黄豆黄苷	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	5 836 047.66	3 973 720.22
2	1.23	异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	2 685 663.40	600 604.93
3	3.43	西红花苷-3	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	16 919 306.16	3 049 797.92
4	3.48	山梔子苷甲酯	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	23 265 450.77	2 938 127.09
5	3.49	N-甲基酪胺	C ₉ H ₁₃ NO	20 544 645.33	3 129 851.55
6	3.51	曲枝芸香苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	20 623 903.64	3 539 576.89
7	3.55	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	20 745 431.33	4 311 974.76
8	3.61	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	19 100 685.98	5 199 188.78
9	3.63	梔子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	19 255 915.89	5 181 145.87
10	4.31	大豆苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	15 758 008.03	9 436 704.46
11	4.34	染料木苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	15 784 943.71	11 308 875.42
12	4.44	京尼平龙胆双糖苷	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	15 835 979.34	11 976 986.79
13	4.84	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	8 808 660.97	5 247 417.28
14	4.86	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	9 834 885.58	5 673 201.60
15	4.87	柚橙苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	9 410 909.76	5 273 735.15
16	5.01	柠檬苦素	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	7 082 088.22	4 631 240.32
17	5.18	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	9 912 162.11	5 737 579.86
18	5.38	黄豆黄苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	12 042 519.15	6 999 056.35
19	5.39	去乙酰基车叶草苷酸甲酯	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	17 150 688.89	9 067 663.30
20	5.47	芦荟素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	24 409 504.89	14 535 585.38
21	6.17	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	8 606 043.20	5 080 756.75
22	6.73	鸡屎藤苷酸甲酯	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	5 538 901.00	3 388 453.95
23	6.96	羟异梔子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	5 200 717.63	3 517 689.93
24	7.43	辛弗林	C ₉ H ₁₃ NO ₂	4 909 837.32	3 321 942.59
25	7.76	6'-O-乙酰大豆苷	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₀	4 954 593.04	756 921.88
26	8.08	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	4 451 387.12	2 257 731.30
27	8.37	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	7 173 923.80	1 961 994.16
28	8.81	异橙黄酮	C ₂₀ H ₃₀ O ₇	5 214 432.82	974 696.81
29	9.31	黄豆苷元	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	4 846 642.45	1 108 526.49

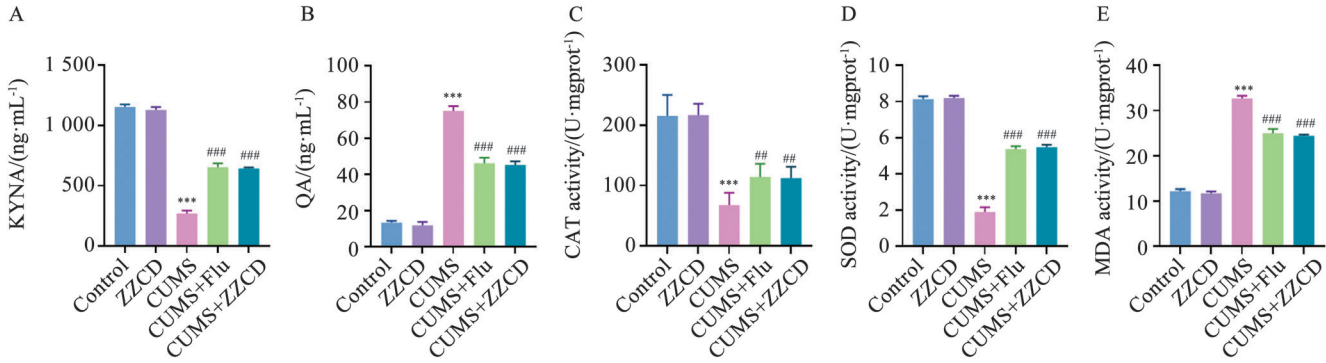


注:A. 实验流程;B. 蔗糖偏好实验;C. 旷场实验总运动距离;D. OFT 中央区停留时间;E. 高架十字迷宫进入开臂次数;F. EPM 开臂停留时间。
与 Control 组比较,*** $P<0.001$;与 CUMS 组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 2 梔子豉汤对 CUMS 大鼠行为学指标的影响

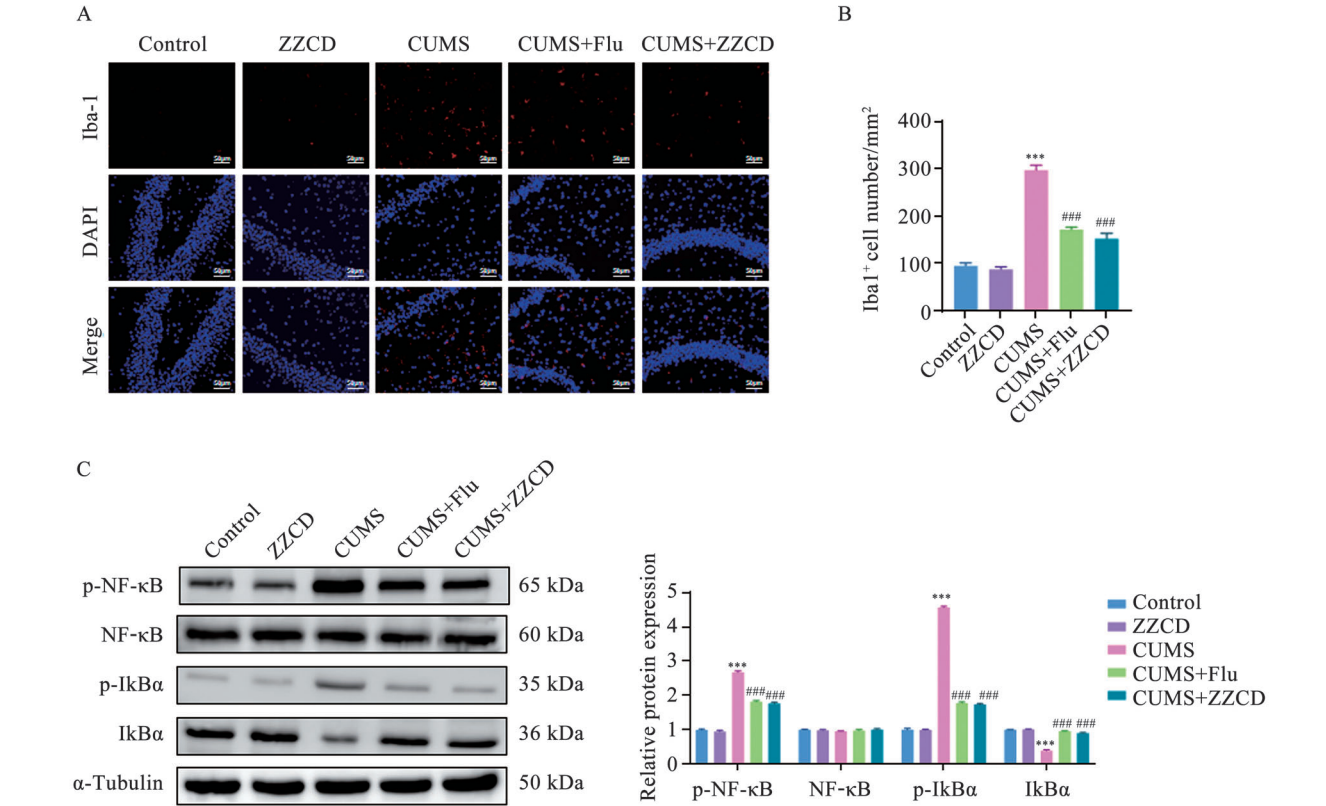
2.3 栀子豉汤调节 CUMS 大鼠海马 KYNA/QA 水平及氧化应激相关指标

在犬尿氨酸代谢方面,CUMS 组大鼠海马组织中 KYNA 水平显著低于 Control 组($P < 0.001$),而 QA 水平显著升高($P < 0.001$)。与 CUMS 组相比,CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组的 KYNA 水平均明显升高($P < 0.001$),QA 水平均显著降低($P < 0.001$) (图 3A,3B)。在氧化应激相关指标中,CUMS 组大鼠 CAT 和 SOD 活性显著下降($P < 0.001$),而 MDA 水平显著升高($P < 0.001$);经氟西汀或 ZZCD 处理后,CAT 和 SOD 活性均明显升高($P < 0.01, P < 0.001$),MDA 水平显著下降($P < 0.001$) (图 3C ~ 3E)。



注:A. KYNA 水平;B. QA 水平;C. CAT 活性;D. SOD 活性;E. MDA 水平。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 3 栀子豉汤对 CUMS 大鼠海马 KYNA/QA 水平及氧化应激指标的影响



注:A. Iba-1 免疫荧光染色;B. Iba-1 阳性细胞数定量;C. p - NF - κ B、NF - κ B、p - I κ B α 、I κ B α 蛋白条带和蛋白定量分析。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,### $P < 0.001$ 。

图 4 栀子豉汤对 CUMS 大鼠海马小胶质细胞活化及 NF - κ B 通路的影响

2.5 栀子豉汤调节 CUMS 大鼠海马小胶质细胞的极化状态

在小胶质细胞极化相关免疫荧光检测中, CUMS 组大鼠海马组织 Iba-1⁺CD86⁺ 细胞数显著高于 Control 组 ($P < 0.001$), 而 CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组显著减少 ($P < 0.001$) (图 5A)。相反, Iba-1⁺CD206⁺ 细胞数在 CUMS 组较 Control 组显著升高, 而在 CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组相较 CUMS 组均显著升高 ($P < 0.001$) (图 5B)。在炎症因子基因水平上, CUMS 组 iNOS 和 IL-1 β 的表达显著升高 ($P < 0.001$), 而 Arg-1 和 IL-10 表达无显著差异 ($P > 0.05$); 与 CUMS 组相比, CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组 iNOS 和 IL-1 β 表达显著降低 ($P < 0.001$), 而 Arg-1 和 IL-10 表达显著升高 ($P < 0.001$) (图 5C)。

2.6 栀子豉汤调节 QA 处理的 BV-2 细胞极化及 NF- κ B 通路活性

在免疫荧光检测中, QA 处理的 BV-2 细胞中 CD86 水平显著高于 Control 组 ($P < 0.001$), 而 QA + ZZCD 组较 QA 组显著降低 ($P < 0.001$) (图 6A)。CD206 水平在 QA 组与 Control 组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 而 QA + ZZCD 组较 QA 组显著升高 ($P < 0.001$) (图 6B)。在基因水平检测中, QA 处理显著上调 iNOS 和 IL-1 β 的表达 ($P < 0.001$), 而对 Arg-1 和 IL-10 的表达影响不显著 ($P > 0.05$); 与 QA 组相比, QA + ZZCD 组 iNOS 和 IL-1 β 的表达显著降低 ($P < 0.001$), Arg-1 和 IL-10 的表达显著升高 ($P < 0.001$) (图 6C)。在蛋白水平检测中, QA 处理显著增加 p-NF- κ B 和 p-I κ B α 水平 ($P < 0.001$), 并降低 I κ B α 水平 ($P < 0.001$), 而 NF- κ B 水平无显著差异 ($P > 0.05$); 与 QA 组相比, QA + ZZCD 组 p-NF- κ B 和 p-I κ B α 水平显著降低 ($P < 0.001$), I κ B α 水平显著升高 ($P < 0.001$) (图 6D)。

2.7 栀子豉汤减轻 QA 处理的 BV-2 细胞氧化应激

在氧化应激指标检测中, QA 处理的 BV-2 细胞 ROS 水平较 Control 组显著升高 ($P < 0.001$), 而 QA + ZZCD 组较 QA 组显著降低 ($P < 0.001$) (图 7A)。CAT 活性在 QA 组显著低于 Control 组 ($P < 0.001$), QA + ZZCD 组较 QA 组显著升高 ($P < 0.001$) (图 7B)。SOD 活性在 QA 组显著下降 ($P < 0.001$), QA + ZZCD 组显著升高 ($P < 0.001$) (图 7C)。MDA 水平在 QA 组显著升高 ($P < 0.001$), QA + ZZCD 组显著降低 ($P < 0.001$) (图 7D)。

2.8 栀子豉汤促进 CUMS 大鼠海马及 QA 处理 BV-2 细胞 ERK/CREB 通路磷酸化水平

在海马组织中, CUMS 组大鼠 p-ERK/ERK 和 p-CREB/CREB 比值显著低于 Control 组 ($P < 0.001$), 而 CUMS + Flu 组和 CUMS + ZZCD 组较 CUMS 组均显著升高 ($P < 0.001$) (图 8A, 8B)。在 BV-2 细胞中, QA 处理显著降低 p-ERK/ERK 和 p-CREB/CREB 比值 ($P < 0.001$), 而 QA + ZZCD 组较 QA 组显著升高 ($P < 0.001$) (图 8C, 8D)。

2.9 栀子豉汤改善 CUMS 大鼠海马神经可塑性相关蛋白表达

Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, CUMS 组大鼠海马组织中 BDNF、PSD95 和 SYP 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$), 提示慢性不可预测性应激可明显损伤海马神经可塑性和突触结构完整性。与 CUMS 组相比, 氟西汀处理显著上调上述蛋白的表达水平 ($P < 0.001$)。同样, ZZCD 干预后, CUMS + ZZCD 组大鼠海马中 BDNF、PSD95 和 SYP 的蛋白表达均明显升高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 其改善趋势与氟西汀组相近 (图 9A, 9B)。

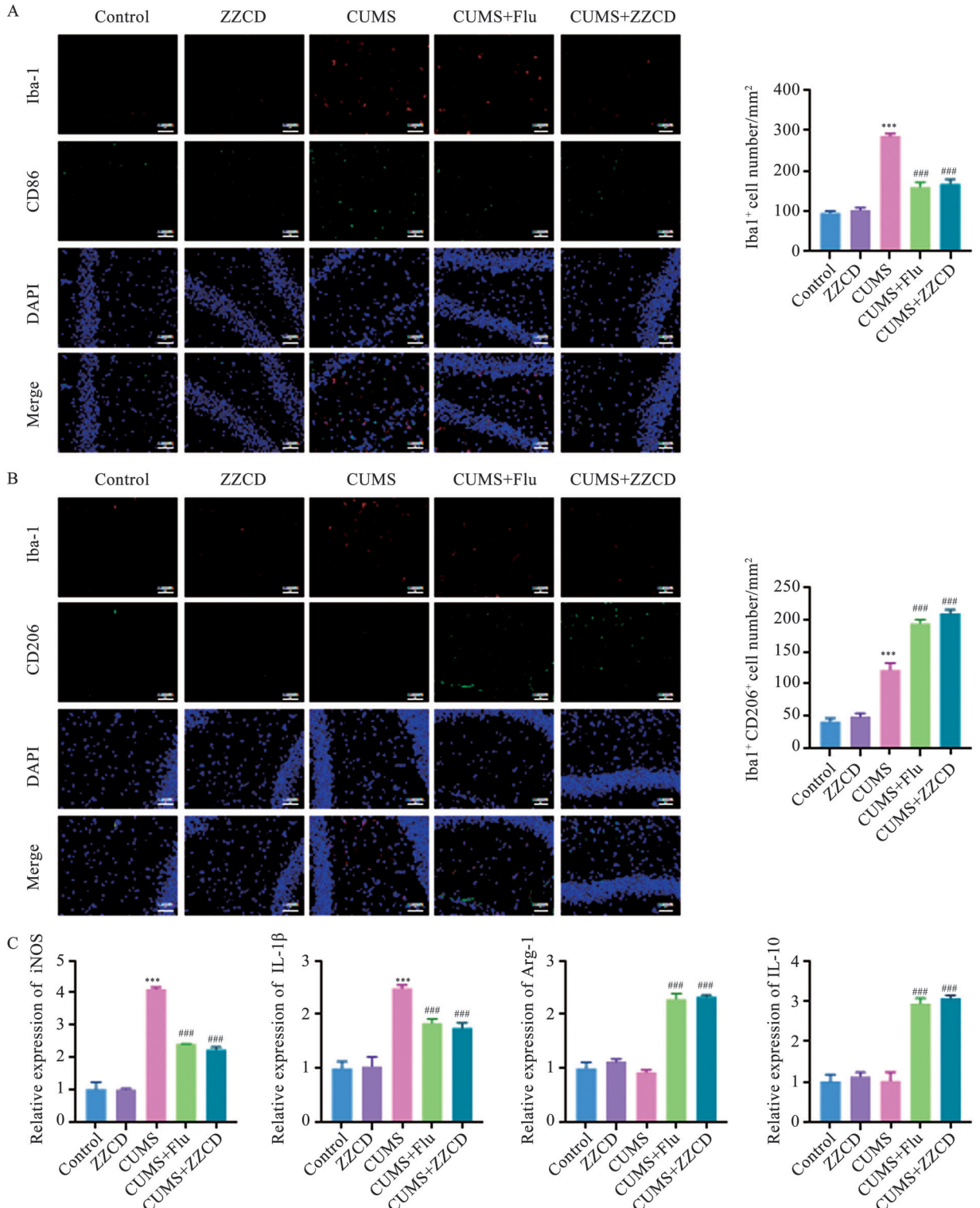
3 讨论

ZZCD 在 CUMS 大鼠中显著改善了抑郁和焦虑样行为。机制研究表明, ZZCD 能够抑制小胶质细胞过度活化并促进 M1/M2 表型平衡, 降低 QA 水平、提升 KYNA 水平, 从而改善犬尿氨酸通路异常。同时, ZZCD 减轻了氧化应激反应 (ROS、MDA 下降; CAT、SOD 升高), 并表现出对 NF- κ B 通路的抑制和对 ERK/CREB 信号的激活, 从而为其后续神经可塑性改善提供分子基础, 这与其作为多成分中医复方所具有的多靶点作用特征相一致。

CUMS 大鼠在 SPT、OFT 和 EPM 中均表现出明显的抑郁和焦虑样行为, 而经 ZZCD 干预后, 上述指标得到显著改善, 其效果与氟西汀相当。这一发现与既往报道的其他中药复方抗抑郁作用相一致。例如, 柴胡加龙骨牡蛎汤被证实能够改善 CUMS 大鼠的抑郁样表现^[17], 百合地黄汤则通过调控下丘脑-垂体-肾上腺轴功能发挥抗抑郁作用^[18]。与这些复方相比, ZZCD 源于《伤寒论》, 传统用于“烦躁”与“失眠”, 本研究首次通过系统的动物与细胞实验验证其在现代抑郁模型中的抗抑郁样效应, 提示该经典方剂在现代精神疾病防治中具有潜在应用价值。小胶质细胞作为中枢神经系统的主要免疫细胞, 其活化状态被认为是抑郁症发生发展的关键环节^[19]。结果显示, CUMS 大鼠海马中 Iba-1 阳性细胞及 Iba-1⁺CD86⁺ (M1 型) 细胞比例

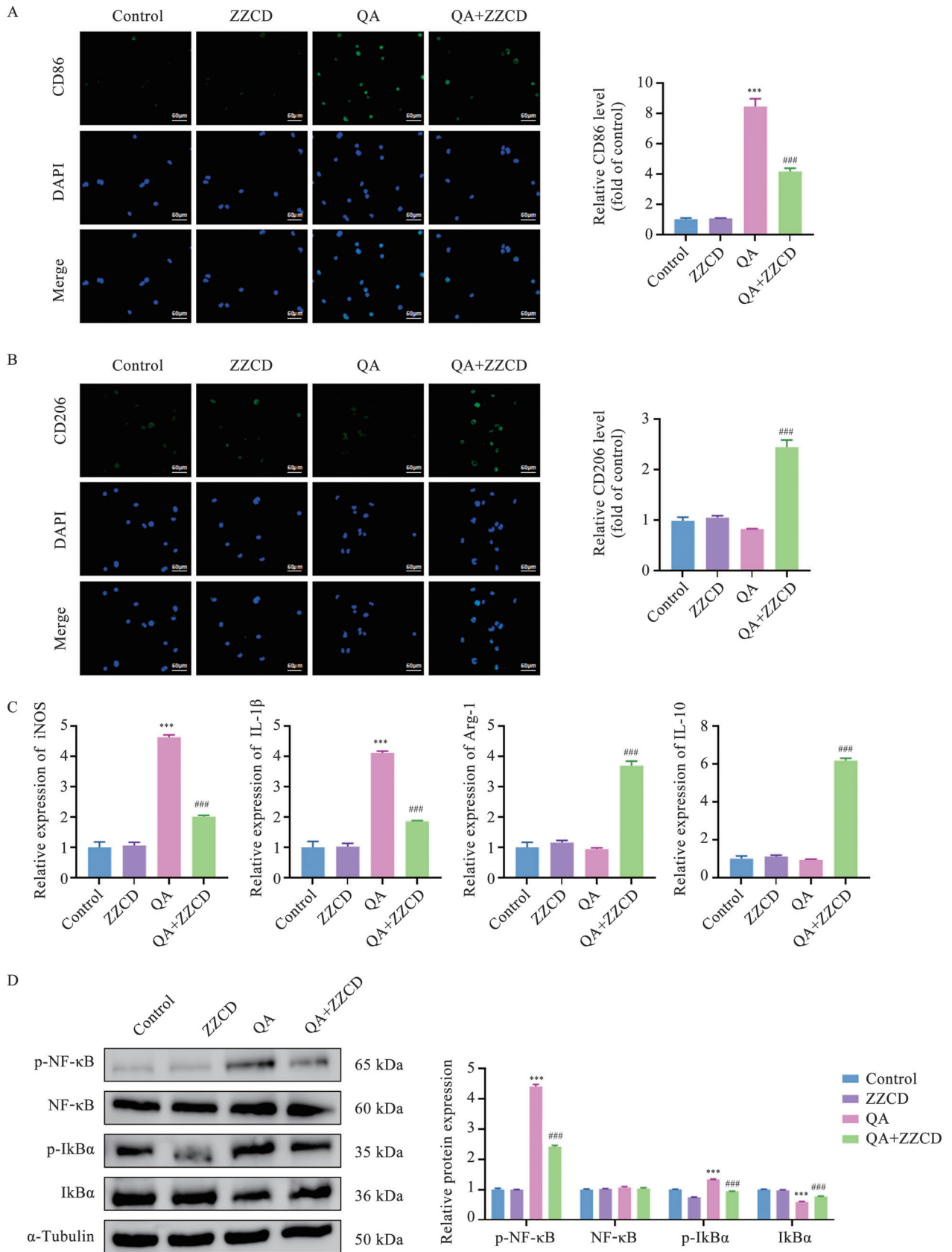
显著升高,而 ZZCD 干预后这些指标明显下降,同时 $Iba-1^+CD206^+$ (M2 型) 细胞比例上升,伴随炎症因子 $iNOS$ 、 $IL-1\beta$ 下调,抗炎因子 $Arg-1$ 、 $IL-10$ 上调。这与既往研究一致,即 M1 极化伴随促炎因子升高,而

M2 极化则与抗炎因子上调相关^[20-21]。本研究提示 ZZCD 通过抑制 M1 活化并促进 M2 极化,实现“抗炎+神经保护”的双重效应,这为中药复方调节神经炎症提供了新的证据。



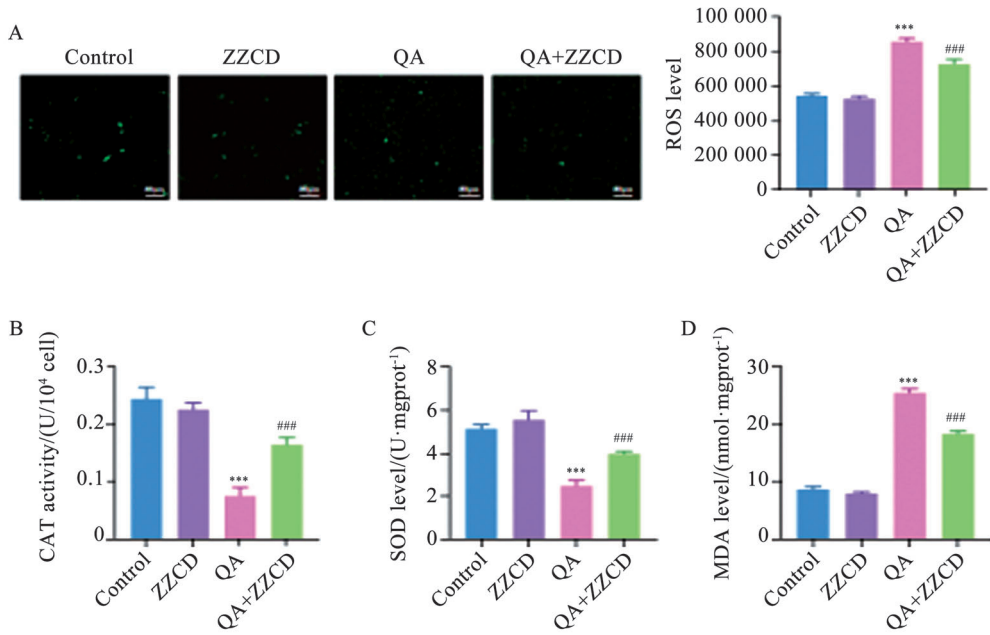
注:A. $Iba-1$ 与 $CD86$ 的双标免疫荧光及定量分析;B. $Iba-1$ 与 $CD206$ 的双标免疫荧光及定量分析;C. qRT-PCR 检测 $iNOS$ 、 $IL-1\beta$ 、 $Arg-1$ 、 $IL-10$ 的表达。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,### $P < 0.001$ 。

图5 栀子豉汤对 CUMS 大鼠海马小胶质细胞极化的影响



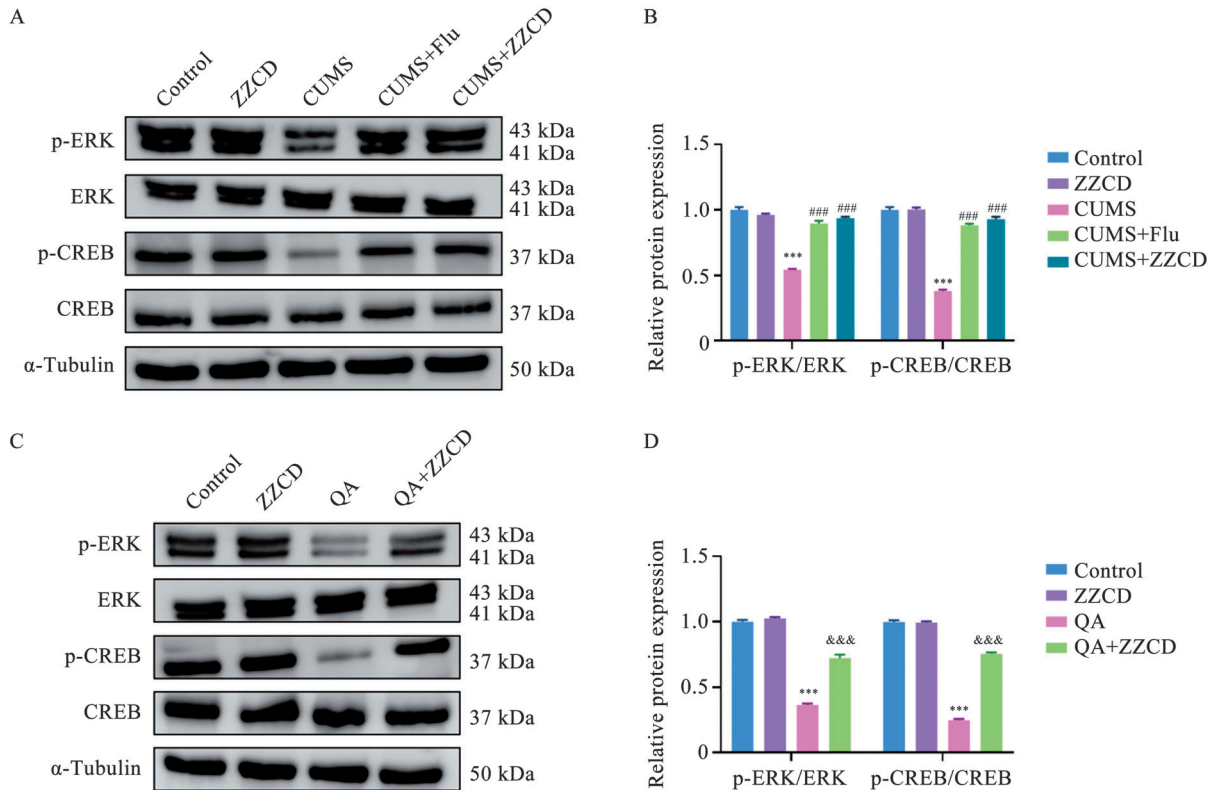
注:A. CD86 免疫荧光染色及定量;B. CD206 免疫荧光染色及定量;C. qRT-PCR 检测 iNOS、IL-1 β 、Arg-1、IL-10 表达水平;D. Western blot检测 p-NF- κ B、NF- κ B、p-I κ B α 、I κ B α 蛋白水平及定量分析。与 Control 组比较,*** P <0.001;与 QA 组比较,### P <0.001。

图6 栀子豉汤对 QA 处理的 BV-2 细胞极化及 NF- κ B 通路的影响



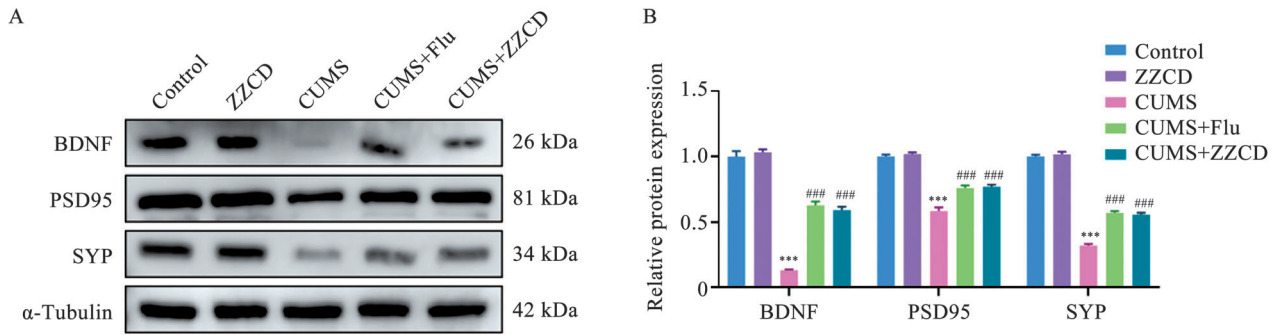
注:A. ROS 水平及定量分析;B. CAT 活性;C. SOD 活性;D. MDA 水平。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,### $P < 0.001$ 。

图 7 栀子豉汤对 QA 处理的 BV-2 细胞氧化应激水平的影响



注:A. Western blot 检测海马组织中 p-ERK、ERK、p-CREB、CREB 蛋白条带;B. 海马组织 p-ERK/ERK 及 p-CREB/CREB 比值定量分析;C. Western blot 检测 BV-2 细胞中 p-ERK、ERK、p-CREB、CREB 蛋白条带;D. BV-2 细胞 p-ERK/ERK 及 p-CREB/CREB 比值定量分析。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,### $P < 0.001$;与 QA 组比较,&&& $P < 0.001$ 。

图 8 栀子豉汤对 CUMS 大鼠海马及 QA 处理 BV-2 细胞 ERK/CREB 通路的影响



注:A. Western blot 检测海马组织中 BDNF、PSD95 和 SYP 蛋白表达;B. BDNF、PSD95 和 SYP 蛋白表达定量分析。与 Control 组比较,*** $P < 0.001$;与 CUMS 组比较,### $P < 0.001$ 。

图9 栀子豉汤对 CUMS 大鼠海马神经可塑性相关蛋白表达的影响

KYN 通路被认为是连接炎症与抑郁的重要代谢途径。CUMS 大鼠海马中 KYNA 水平下降、QA 水平升高,反映出该通路失衡。ZZCD 处理后可显著降低 QA 水平并提高 KYNA 水平,从而改善 KYNA/QA 比值异常。已有临床报道,重性抑郁障碍患者的 KYNA/QA 比值显著下降,而 QA 作为 NMDAR 激动剂可导致谷氨酸兴奋毒性与神经损伤^[7,9]。因此,本研究结果提示,ZZCD 可能通过调控 KYN 代谢恢复 KYNA/QA 平衡,阻断炎症-神经毒性-抑郁的病理链条,这与其抗抑郁效应高度一致。氧化应激被认为是抑郁症病理过程中的关键环节之一^[22]。本研究结果表明,CUMS 和 QA 均导致 ROS 与 MDA 水平升高,CAT 与 SOD 活性下降,而 ZZCD 显著逆转了这些变化。进一步分析发现,ZZCD 可下调 p-NF- κ B 和 p-I κ B α 表达,恢复 I κ B α 水平,从而抑制 NF- κ B 通路过度活化。已有研究证实,氧化应激与 NF- κ B 信号存在正反馈作用,二者相互促进炎症反应与细胞损伤^[23]。因此,ZZCD 在本研究中所表现出的“降低氧化应激—抑制 NF- κ B 活化”作用,揭示了其在抗抑郁过程中可能存在的炎症-氧化应激互作环节。ERK/CREB 通路是调控突触可塑性和 BDNF 表达的重要分子机制,被认为是抗抑郁作用的关键信号^[24]。本研究发现,CUMS 导致大鼠海马及 QA 处理的 BV-2 细胞中 p-ERK 和 p-CREB 水平下降,而 ZZCD 干预显著恢复了二者的磷酸化水平,并伴随 BDNF 及突触可塑性相关蛋白表达的上调。已有研究^[25-26]证实,多种抗抑郁药物可通过激活 ERK/CREB 通路提高 BDNF 水平,从而改善抑郁症状。结合本研究结果,可以推测 ZZCD 在改善抑郁样行为过程中,可能通过炎症抑制、KYN 代谢调控和抗氧化作用,共同促进 ERK/CREB 通路激活及神经可塑性恢复。

本研究亦存在一定局限性。首先,CUMS 模型虽然广泛用于模拟抑郁,但其仍不能完全覆盖人类抑郁症的复杂病理过程。其次,本研究仅选用氟西汀作为阳性对照,未进一步引入其他中药复方或大尿氨酸通路特异性调节剂进行比较,这在一定程度上限制了不同干预策略在 KYNA/QA 调控层面的横向对照。再次,ZZCD 为复方制剂,具体的活性成分及其相互作用尚不明确,后续需通过代谢组学和单体成分验证进一步解析其物质基础。未来的研究可结合转录组学与代谢组学方法,系统描绘 ZZCD 的作用网络,并在临床人群中进行干预性试验,以推动其向临床应用转化。

本研究揭示了 ZZCD 在抗抑郁作用中的潜在价值,并提出其可能通过多靶点协同机制发挥效应。该研究为传统方剂的现代化研究提供了新的实验依据,也为中药干预抑郁症的临床应用与新药研发提供了参考。

参考文献:

- [1] BASSETT B, SUBRAMANIAM S, FAN Y, et al. Minocycline alleviates depression-like symptoms by rescuing decrease in neurogenesis in dorsal hippocampus via blocking microglia activation/phagocytosis[J]. Brain Behav Immun, 2021, 91: 519-530.
- [2] VERDONK F, PETIT A C, ABDEL-AHAD P, et al. Microglial production of quinolinic acid as a target and a biomarker of the antidepressant effect of ketamine[J]. Brain Behav Immun, 2019, 81: 361-373.
- [3] BAO C, HUANG J, WU H, et al. Moxibustion alleviates depression-like behavior in rats with Crohn's disease by inhibiting the kynurenine pathway metabolism in the gut-brain axis[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 1019590.
- [4] WANG M Y, WEI X, JIA Y G, et al. Quercetin alleviates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior by inhibiting NMDAR1 with $\alpha 2\delta-1$ in rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(4): e14724.
- [5] ÖZTÜRK M, YALIN SAPMAZ S, KANDEMİR H, et al. The role of the kynurenine pathway and quinolinic acid in adolescent major depressive disorder[J]. Int J Clin Pract, 2021, 75(4): e13739.
- [6] DUMAN R S, SANACORA G, KRISTAL J H. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal

- by novel treatments[J]. *Neuron*, 2019, 102(1): 75–90.
- [7] FENG W, WANG Y, LIU Z Q, et al. Microglia activation contributes to quinolinic acid – induced neuronal excitotoxicity through TNF – α [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(5): 696–709.
- [8] 朱小琴, 余保平, 朱贝贝, 等. 色氨酸尿氨酸代谢、免疫细胞与炎症性肠病的研究进展[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2024, 33(4): 436–439, 443.
- [9] WANG X M, LI S S, YU J Y, et al. Saikosaponin B2 ameliorates depression – induced microglia activation by inhibiting ferroptosis – mediated neuroinflammation and ER stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116729.
- [10] 朱文彦, 贺圆圆, 李玉丽, 等. 经典名方栀子豉汤的历史沿革与关键信息考证[J]. *上海中医药杂志*, 2025, 59(6): 13–21.
- [11] 徐露荧, 孙植艺, 张梓澄, 等. 基于代谢组学解析血清代谢物与抑郁症因果关联及栀子豉汤的干预机制研究(英文) [J/OL]. *南京中医药大学学报*, 1–12 [2026–05–22]. <https://link.cnki.net/urlid/32.1247.R.20250411.1409.002>.
- [12] 曹康迪, 胡帅航, 王烁, 等. 栀子豉汤的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(6): 182–185.
- [13] 刘朋良, 许二平, 康丽杰, 等. 栀子豉汤治疗抑郁症研究新进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(2): 171–174.
- [14] 赵权, 张优, 陈影, 等. HPLC – VWD – Q – TOF – MS/MS 法定性与定量分析枳实栀子豉汤成分[J]. *中成药*, 2021, 43(11): 3067–3075.
- [15] ZOU T Y, SUGIMOTO K, ZHAO Y, et al. Zhi – zi – Chi decoction mitigates depression by enhancing lncRNA Six3os1 expression and promoting histone H3K4 methylation at the BDNF promoter [J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2024, 28(11): e18365.
- [16] ZHOU J X, ZHAO Y Q, LI Y L, et al. Jasmine tea extract prevents CUMS – induced depression – like behaviors through the modulation of microbiota – gut – brain axis [J]. *Food Res Int*, 2025, 209: 116214.
- [17] 闫继红, 施晓瑜, 秦峰玲, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁症患者情绪及认知功能的研究进展[J]. *系统医学*, 2025, 10(14): 195–198.
- [18] 贾星远, 王真真, 黄胜楠, 等. 基于网络药理学和药理实验验证探讨鲜百合地黄汤抗焦虑样行为作用机制[J]. *中国药理学杂志*, 2025, 60(19): 2046–2057.
- [19] 邵千枫, 李悦, 金琳, 等. 麻黄附子细辛汤对慢性不可预见性应激诱导抑郁小鼠肠道菌群和小胶质细胞的影响[J]. *中成药*, 2025, 47(8): 2767–2774.
- [20] 白蕊, 李卫红, 陈迷, 等. 壮骨方调控巨噬细胞 M1/M2 型极化对绝经后骨质疏松症大鼠破骨细胞分化的影响[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(23): 4444–4451.
- [21] 谭宇航, 李波, 唐铭宏, 等. C57BL/6 小鼠骨髓来源巨噬细胞分离、培养、鉴定及 M1/M2 的极化诱导[J]. *中国组织工程研究*, 2026, 30(13): 3233–3241.
- [22] LI H N, XIANG Y J, ZHU Z M, et al. Rifaximin – mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS – induced depression – like behaviors in adolescent rat [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 254.
- [23] 折哲, 孙永宁. 清肺方上调 PPAR γ /NF – κ B 通路抑制人气道上皮细胞炎症氧化应激反应的机制研究[J]. *世界科学技术 – 中医药现代化*, 2025, 27(8): 2119–2131.
- [24] BARBOSA M L, DE MENESES A P M, DE AGUIAR R P S, et al. Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: a systematic review of biochemical and molecular markers [J]. *Neurol Psychiatry Brain Res*, 2020, 36: 65–72.
- [25] LIU L, ZHANG R, CHEN C, et al. The effect of Banxia – Houpo decoction on CUMS – induced depression by promoting M2 microglia polarization via TrkA/Akt signalling [J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2023, 27(21): 3339–3353.
- [26] 师云霖, 殷军波. 氟伏沙明和其他 SSRIs 类抗抑郁药物治疗伴焦虑痛苦特征抑郁症患者的临床效应差异[J]. *山东第二医科大学学报*, 2025, 47(1): 6–11, 82.

Study on the Improvement of Depression – Like Behavior in CUMS Rats by Zhizi Chi Decoction Through Regulating KYNA/QA Balance and Microglial Polarization

MENG Tuo, QIN Mingjun

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract To investigate the antidepressant effects of Zhizi Chi Decoction (ZZCD) on depression – like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) in rats and to elucidate the underlying mechanisms. Methods: Depression – and anxiety – like behaviors were evaluated using the sucrose preference test (SPT), open field test (OFT), and elevated plus maze (EPM). Microglial activation and inflammatory mediators were assessed by immunofluorescence, quantitative real – time PCR (qRT – PCR), and Western blot. Levels of kynurenic acid (KYNA), quinolinic acid (QA), and oxidative stress markers were measured using enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and biochemical kits. In addition, QA – treated BV – 2 microglial cells were employed to validate the cellular mechanisms. Liquid chromatography – mass spectrometry (LC – MS) analysis was performed to characterize the chemical profile of ZZCD. Results: ZZCD significantly improved depression – and anxiety – like behaviors in CUMS rats, suppressed M1 – type activation and promoted M2 polarization of microglia, corrected the imbalance of KYNA/QA, and alleviated oxidative stress by reducing reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) while enhancing superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Moreover, ZZCD inhibited the NF – κ B pathway and activated ERK/CREB signaling in both hippocampal tissues and BV – 2 cells, accompanied by upregulation of brain – derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptic plasticity – related proteins, including postsynaptic density protein 95 (PSD95) and synaptophysin. Conclusion: ZZCD exerts antidepressant effects through multi – target mechanisms, including regulation of microglial activation, kynurenine pathway balance, oxidative stress reduction, and ERK/CREB pathway activation, which may contribute to the restoration of synaptic plasticity. These findings provide experimental evidence supporting the potential of ZZCD as a traditional Chinese medicine – based intervention for depression.

Key words Zhizi Chi Decoction; Depression; Microglia; Kynurenine pathway; NF – κ B; ERK/CREB; Synaptic plasticity