

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.06.016

论著·基础

粉防己碱调节 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路对抑郁症大鼠神经元损伤的影响

邱雪, 赵雯婧, 王飞燕, 李蓉, 何宗岭, 姚刚

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(62173069)

作者单位: 610036 四川省成都市第四人民医院精神科(邱雪、王飞燕、姚刚), 老年精神科(赵雯婧), 脑电图室(李蓉),

临床心理科(何宗岭)

通信作者: 姚刚, E-mail: hfkzqdsshou33@163.com



【摘要】目的 探讨粉防己碱(Tet)调节核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶 1(HO-1)/Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路对抑郁症大鼠神经元损伤的影响。**方法** 2022 年 3—7 月在电子科技大学脑科学学院附属临床医院基础医学实验室进行实验。选用 SD 大鼠 72 只,随机数字表法分为 6 组(12 只/组):空白组、模型组、Tet 低剂量组(10 mg/kg)、Tet 中剂量组(20 mg/kg)、Tet 高剂量组(40 mg/kg)、抑制剂组(Tet 40 mg/kg + Nrf2/HO-1/NLRP3 通路抑制剂 ML385, 30 mg/kg);除空白组外其他大鼠采用皮下注射皮质酮构建抑郁症模型,建模成功后,空白组和模型组大鼠灌胃并腹腔注射等量生理盐水,其余大鼠灌胃和腹腔注射相应药物,每天 1 次,持续 21 d。用糖水偏好试验、强迫游泳试验和旷场试验对大鼠进行抑郁评估;苏木素—伊红(HE)及尼氏(Nissl)染色评估各组大鼠海马组织及神经元损伤情况;透射电镜观察海马突触超微结构;酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠海马组织白介素(IL)-6、IL-β、肿瘤坏死因子(TNF)-α 水平及过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)水平;Western-blot 检测各组大鼠海马组织中 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路蛋白及凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠抑郁样行为显著、海马神经元损伤严重,大鼠体质量、糖水偏好率、自主活动评分、神经元数目、活性带长度、致密区厚度,海马组织中 CAT 活性、Nrf2/HO-1 蛋白表达水平均显著降低,不动时间、突触间隙、海马组织中 IL-6、IL-β、TNF-α、MDA、ROS 水平、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,低、中、高剂量 Tet 可改善大鼠抑郁行为,减轻海马神经元损伤($P < 0.05$);抑制剂可逆转高剂量 Tet 对抑郁症大鼠的改善作用($P < 0.05$)。**结论** Tet 可能通过激活 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路,减轻海马组织炎症反应和氧化应激损伤,从而起到缓解大鼠抑郁的作用。

【关键词】 抑郁症;粉防己碱;Nrf2/HO-1/NLRP3;神经元损伤;大鼠**【中图分类号】** R749.4⁺1**【文献标识码】** A

The effect of tetrandrine on regulating Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway and neuronal damage in depression rats

Qiu Xue, Zhao Wenjing, Wang Feiyan, Li Rong, He Zongling, Yao Gang. Department of Acute Psychiatry, the Fourth People's Hospital of Chengdu, Sichuan Province, Chengdu 610036, China

Corresponding author: Yao Gang, E-mail: hfkzqdsshou33@163.com

Funding program: National Natural Science Foundation of China (62173069)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of tetrandrine (Tet) on regulating the nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase 1 (HO-1)/Nod like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway on neuronal damage in depression rats. **Methods** Seventy-two SD rats were selected and randomly divided into 6 groups (12 rats/group) using a number table method: control group, model group, low dose Tet group (10 mg/kg), medium dose Tet group (20 mg/kg), high dose Tet group (40 mg/kg), and inhibitor group (Tet 40 mg/kg + Nrf2/HO-1/NLRP3 pathway inhibitor ML385, 30 mg/kg); Except for the control group, other rats were injected subcutaneously with corticosterone to construct a depression model. After successful modeling, the control group and model group rats were gavaged and intraperitoneally injected with an equal amount of physiological saline, while the other rats were gavaged and intraperitoneally injected with corresponding drugs once a day for 21 days. Evaluate depression in rats using sugar water preference test, forced swimming test, and open field test; Hematoxylin eosin (HE) and Nissl staining were used to evaluate the damage of hippocampal tissue and neurons in each group of rats; Observa-

tion of hippocampal synaptic ultrastructure using transmission electron microscopy; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting interleukin-6 (IL-6) and IL- β in the hippocampus of rats in each group, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Levels and levels of catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), and reactive oxygen species (ROS); Western blot was used to detect the expression of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway proteins, apoptosis related spot like proteins (ASC), and cysteine protease-1 (Caspase-1) in the hippocampus of rats in each group. **Results** Compared with the control group, the model group showed significant depressive behavior and severe damage to hippocampal neurons. The body mass, glucose preference rate, autonomous activity score, number of neurons, length of active zone, thickness of dense zone, CAT activity, Nrf2, and HO-1 protein expression levels in the hippocampal tissue of the rats were significantly reduced, while immobility time, synaptic gap, IL-6, and IL- β TNF- α , MDA, ROS, NLRP3, ASC, and Caspase-1 protein expression levels in the hippocampal tissue were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with the Model group, low, medium, and high doses of Tet can improve depressive behavior in rats and alleviate hippocampal neuronal damage ($P < 0.05$); Inhibitors can reverse the improvement effect of high-dose Tet on depression in rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Tet may alleviate depression in rats by activating the Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway, alleviating inflammatory responses and oxidative stress damage in the hippocampus.

【Key words】 Depression; Tetrandrine; Nrf2/HO-1/NLRP3; Neuron damage; Rats

抑郁症是一种常见的精神障碍疾病,其病因复杂,患者主要表现为情绪低落、思维迟缓、快感缺失、易怒喜哭等症状,具有持久或者反复发作的特点,严重时会出现自杀倾向和自杀行为,严重威胁患者的身体健康和和生活质量^[1-2]。抑郁症的发病率随着人们生活和工作压力的增大在逐渐升高,据统计,抑郁症患者人数在 2005—2015 年增加了 18.4%,将在 2030 年成为全球第二大疾病^[3]。目前已有的抗抑郁症药物治疗效果有限,不能治愈难治性抑郁症患者,因此,积极开发新的安全有效的治疗抑郁症的药物有重要意义^[4]。粉防己碱(tetrandrine, Tet)是从粉防己根中分离出来的一种双苄基异喹啉类生物碱,具有抗炎、抗肿瘤、抑制纤维化、镇痛等多种生理活性^[5]。Gao 等^[6]研究发现, Tet 可以通过增加抑郁大鼠体质量、1%蔗糖消耗量和脑源性神经营养因子水平,在抑郁大鼠模型中发挥抗抑郁的作用。Sheng 等^[7]同样发现, Tet 具有缓解、治疗抑郁症的作用。近年来, Nrf2/HO-1/NLRP3 通路成为抑郁症研究的热点。一项研究发现,二氢硫辛酸通过 Nrf2/HO-1/NLRP3 通路对脂多糖诱导的抑郁大鼠具有预防作用^[8]。Tao 等^[9]同样发现,厚朴酚通过调控 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路,使小胶质细胞向 M2 表型极化,从而减弱小鼠抑郁行为。但 Tet 能否通过调节 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路改善抑郁症大鼠神经元损伤,尚不清楚。因此,本研究旨在探讨 Tet 对抑郁症大鼠神经元损伤的影响及其可能的作用机制,以期临床治疗抑郁症提供一定的参考价值,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 (1)实验动物:SPF 级 SD 大鼠购自长沙市天勤生物技术有限公司[生产许可编号:SCXK

(湘)2019-0014], 8~10 周龄,体质量 180~200 g,饲养温度 22℃,湿度 55%~60%,12 h 光暗循环,每小时通风 8~12 次。不禁食水。(2)主要试剂:Tet、蛋白提取试剂盒购于北京伊塔生物科技有限公司;皮质酮购于上海凛恩科技发展有限公司;ML385 Nrf2/HO-1/NLRP3 通路抑制剂购于上海一研生物科技有限公司;HE 染色试剂盒、Nissl 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;活性氧试剂盒(ROS)购于上海烜雅生物科技有限公司;过氧化氢酶试剂盒(CAT)、丙二醛(MDA)、白介素-6 和白介素- β (IL-6, IL- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔抗凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)、Nrf2、HO-1、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)一抗抗体购于美国 Abcam 公司;辣根酶标记羊抗兔二抗购于上海信裕生物科技有限公司。

1.2 实验方法 2022 年 3—7 月在电子科技大学脑科学学院附属临床医院基础医学实验室进行实验。选用 SD 大鼠 72 只,随机数字表法分为 6 组(12 只/组):空白组、模型组、Tet 低剂量组、Tet 中剂量组、Tet 高剂量组、抑制剂组。除空白组外余大鼠采用皮下注射皮质酮构建抑郁症模型,每天 1 次,连续 28 d,具体操作参考文献[10]。通过行为学指标观测判定造模成功^[11]。在建模后第 8 天, Tet 低、中、高剂量组大鼠分别灌胃 10、20、40 mg/kg 的 Tet^[6],并腹腔注射等量的生理盐水;抑制剂组大鼠灌胃 40 mg/kg 的 Tet 和腹腔注射 30 mg/kg 的 ML385^[12];模型组和空白组大鼠灌胃并腹腔注射等量的生理盐水,每天 1 次,持续 21 d。在建模结束后称量各组大鼠体质量。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 大鼠行为学检测:糖水偏好试验:首先对大鼠进行糖水训练,第 1 天每笼放 2 瓶 1% 蔗糖水,第 2 天将 1 瓶蔗糖水换成纯水。大鼠禁食禁水 24 h 后,笼中放定量好的 1 瓶 1% 蔗糖水和 1 瓶纯水,1 h 后取走称质量,计算大鼠糖水偏好率。糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (糖水消耗量 + 纯水消耗量) × 100%。

强迫游泳试验:将大鼠放入透明的圆柱形筒中(水深约 40 cm,水温 24℃ ± 2℃)适应 2 min 后,记录 5 min 内大鼠在水中不动时间。

旷场试验:将大鼠放在底部为 25 个方格的黑色敞箱(80 cm × 80 cm × 40 cm)中间自由活动 1 min 后,记录 4 min 内的水平跨格次数及垂直活动次数,两项总次数之和表示大鼠自主活动评分。

1.3.2 HE 及 Nissl 染色:颈椎脱臼处死 6 只大鼠后,分离出大鼠大脑组织中的海马组织,在 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,蔗糖梯度脱水,石蜡包埋后切片(3 μm)。然后将切片放进二甲苯进行脱蜡,随后进行 HE 染色与 Nissl 染色。乙醇脱水后封片,在显微镜观察,随机选取 Nissl 染色切片上 CA1 区 5 个视野进行神经元计数。

1.3.3 透射电镜观察海马突触超微结构:将上述剩余海马组织切块,先后用戊二醛(2.5%)固定 3 d、锇酸(1%)避光固定 2 h,经无水乙醇、丙酮梯度脱水,包埋剂渗透包埋后切片(50 nm),铀铅双染色后在透射电镜下观察海马神经元突触超微结构变化。

1.3.4 大鼠海马组织中炎性因子和氧化应激产物的检测:处死剩余 6 只大鼠,分离出海马组织,将大鼠海马组织制成匀浆后,根据 IL-6、IL-β、TNF-α ELISA 试剂盒检测大鼠海马组织中 IL-6、IL-β、TNF-α 水平, CAT、ROS、MDA 试剂盒检测大鼠海马组织中 CAT、ROS、MDA 水平。

1.3.5 Western-blot 法检测 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路蛋白及 ASC、Caspase-1 蛋白表达:提取各组大鼠海马组织总蛋白,对蛋白进行定量、电泳分离。转 PVDF 膜后室温条件下封闭 2 h,最后再分别加 Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GAPDH 一抗在 4℃ 条件下孵育过夜,加入二抗在 37℃ 条件下孵育 90 min。最后 Image J 软件分析各个蛋白条带的灰度值,计算各个蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学方法 采用 Graphpad Prism 7.0 软件用于分析数据。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步 2 组间比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Tet 对大鼠体质量及行为学的影响 与空白组比较,模型组大鼠体质量、糖水偏好率、自主活动评分显著降低,不动时间显著升高,有明显的焦虑和抑郁样特征($P < 0.05$);与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠体质量、糖水偏好率、自主活动评分显著升高,不动时间显著降低($P < 0.05$);与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠体质量、糖水偏好率、自主活动评分显著降低,不动时间显著升高($P < 0.05$),见表 1。

2.2 Tet 对大鼠海马组织及神经元损伤的影响 空白组大鼠海马组织结构正常,锥体细胞排列紧密有序且完整,细胞核清晰,胞浆内有大量尼氏小体;模型组大鼠海马组织结构受损,锥体细胞排列松散无序,部分核固缩,尼氏小体、神经元数目减少($P < 0.05$);与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠海马组织结构较为正常,锥体细胞排列较为整齐有序,细胞较为完整,核固缩现象减轻,尼氏小体、神经元数目增加($P < 0.05$);与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠海马神经元损伤加重,神经元数目减少($P < 0.05$),见图 1、2 和表 2。

表 1 各组大鼠体质量及行为学比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of body mass and behaviors of rats in each group

组别	<i>n</i>	体质量(g)	糖水偏好率(%)	不动时间(s)	自主活动评分(次)
空白组	12	318.25 ± 26.51	68.54 ± 6.21	12.36 ± 2.14	54.21 ± 7.35
模型组	12	223.54 ± 19.26 ^a	49.38 ± 5.11 ^a	46.85 ± 5.96 ^a	30.64 ± 5.17 ^a
Tet 低剂量组	12	248.81 ± 18.59 ^b	55.76 ± 5.35 ^b	41.32 ± 5.27 ^b	35.75 ± 5.46 ^b
Tet 中剂量组	12	274.82 ± 20.07 ^{bc}	58.42 ± 5.74 ^b	35.72 ± 4.62 ^{bc}	41.68 ± 5.78 ^{bc}
Tet 高剂量组	12	291.37 ± 24.32 ^{bc}	66.19 ± 6.15 ^{bed}	27.86 ± 3.75 ^{bed}	48.81 ± 6.32 ^{bed}
抑制剂组	12	256.83 ± 22.38 ^e	55.31 ± 4.23 ^e	38.69 ± 4.81 ^e	35.27 ± 5.63 ^e
<i>F</i> 值		27.581	20.550	85.364	60.068
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 Tet 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 Tet 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 Tet 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

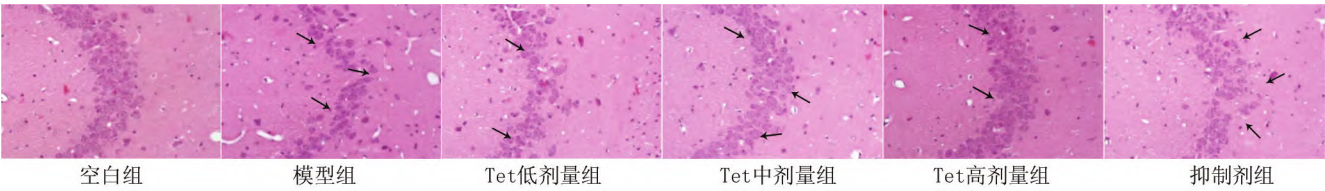


图 1 各组大鼠海马组织损伤情况(HE 染色, ×400)
Fig. 1 Hippocampal tissue damage of rats in each group (HE staining, × 400)

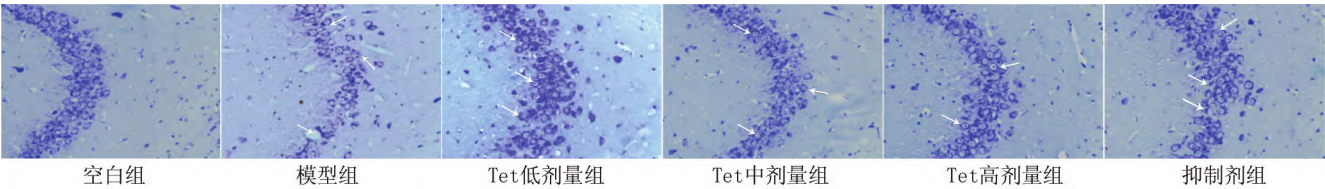


图 2 各组大鼠神经元损伤情况(Nissl 染色, ×400)
Fig. 2 Neuron damage in each group of rats (Nissl staining, × 400)

表 2 各组大鼠神经元存活情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of neuron survival in each group of rats

组 别	n	神经元数目(个)
空白组	6	62.82 ± 5.21
模型组	6	30.76 ± 3.18 ^a
Tet 低剂量组	6	37.51 ± 3.85 ^b
Tet 中剂量组	6	44.84 ± 4.52 ^{bc}
Tet 高剂量组	6	51.62 ± 5.31 ^{bcd}
抑制剂组	6	37.28 ± 2.96 ^e
F 值		45.642
P 值		<0.001

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 Tet 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 Tet 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 Tet 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

2.3 Tet 对大鼠海马突触超微结构的影响 空白组大鼠海马突触结构清晰且完整、神经元胞器丰富,突触囊泡丰富,突触数量多,突触前膜致密区存在、连续,树突棘基质均匀。与空白组比较,模型组大鼠线粒体肿胀、内质网扩张,神经元胞核皱缩,基质稀疏,突触数量

减少,活性带长度和致密区厚度显著降低,突触间隙显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠海马突触结构有明显改善,神经元各细胞器结构基本正常、前后膜边界相对清晰,活性带长度和致密区厚度显著增加,突触间隙显著降低($P < 0.05$)。Tet 高剂量组大鼠突触数量和突触小泡明显增多,Tet 低剂量组大鼠突触数量增加不明显。与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠海马突触结构受损加重,线粒体肿胀及内质网扩张明显,突触数量减少,活性带长度和致密区厚度显著降低,突触间隙显著增加($P < 0.05$),见图 3 和表 3。

2.4 Tet 对大鼠海马组织中 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马组织中 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠海马组织中 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$);与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠海马组织中 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$),见表 4。

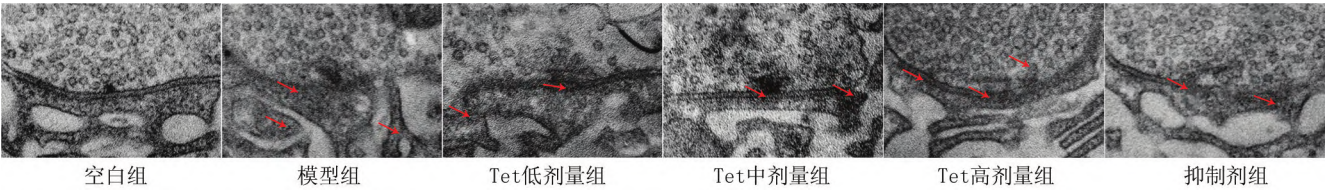


图 3 透射电镜观察各组大鼠海马突触超微结构(×20 000)
Fig. 3 Transmission electron microscopy observation of synaptic ultrastructure in the hippocampus of rats in each group(×20 000)

表 3 各组大鼠海马突触超微结构参数比较 ($\bar{x} \pm s, \text{nm}$)

Tab. 3 Comparison of ultrastructural parameters of hippocampal synapses in different groups of rats

组 别	n	活性带长度	突触间隙	致密区厚度
空白组	6	376.85 ± 20.35	9.24 ± 1.08	37.85 ± 3.36
模型组	6	173.54 ± 15.32 ^a	18.67 ± 2.67 ^a	18.92 ± 1.10 ^a
Tet 低剂量组	6	214.63 ± 16.25 ^b	15.21 ± 2.04 ^b	23.63 ± 2.12 ^b
Tet 中剂量组	6	245.26 ± 16.31 ^{bc}	11.54 ± 1.26 ^{bc}	28.58 ± 2.61 ^{bc}
Tet 高剂量组	6	287.57 ± 17.64 ^{bcd}	9.36 ± 1.13 ^{bcd}	34.96 ± 3.17 ^{bcd}
抑制剂组	6	186.42 ± 15.83 ^e	15.46 ± 1.87 ^e	23.41 ± 2.36 ^e
F 值		118.396	27.639	49.006
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 Tet 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 Tet 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 Tet 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠海马组织中 IL-6、IL- β 、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Tab. 4 Comparison of IL-6 and IL- β , TNF- α levels in the hippocampal tissue of rats in each group

组 别	n	IL-6	IL- β	TNF- α
空白组	6	4.53 ± 0.49	15.47 ± 1.77	5.16 ± 0.67
模型组	6	22.61 ± 2.25 ^a	40.68 ± 4.45 ^a	17.34 ± 1.46 ^a
Tet 低剂量组	6	18.91 ± 1.82 ^b	34.47 ± 3.76 ^b	14.23 ± 1.25 ^b
Tet 中剂量组	6	13.14 ± 1.25 ^{bc}	26.96 ± 3.21 ^{bc}	10.86 ± 1.07 ^{bc}
Tet 高剂量组	6	6.82 ± 1.01 ^{bcd}	18.48 ± 2.15 ^{bcd}	5.73 ± 0.74 ^{bcd}
抑制剂组	6	17.84 ± 1.76 ^e	31.56 ± 3.10 ^e	13.62 ± 1.13 ^e
F 值		128.412	54.226	120.712
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 Tet 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 Tet 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 Tet 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

2.5 Tet 对大鼠海马组织中 CAT、ROS、MDA 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马组织中 CAT 活性显著减弱,MDA、ROS 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠海马组织中 CAT 活性显著增强,MDA、ROS 水平显著降低($P < 0.05$);与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠海马组织中 CAT 活性显著减弱,MDA、ROS 水平显著升高($P < 0.05$),见表 5。

2.6 Tet 对大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著降低,NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,Tet 低、中、高剂量组大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著升高,NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与 Tet 高剂量组比较,抑制剂组大鼠海马组织中 Nrf2、

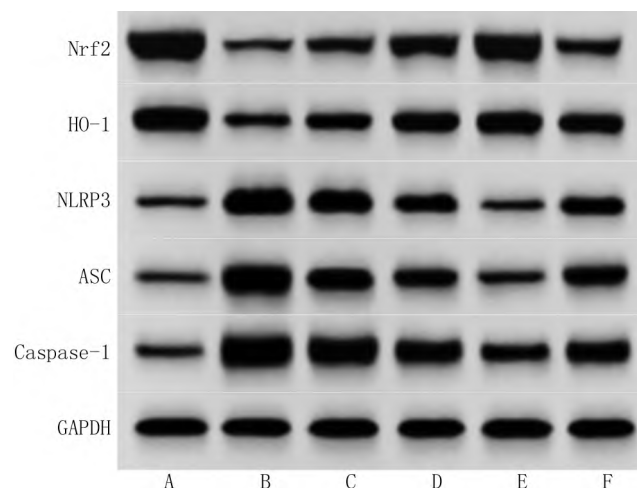
HO-1 蛋白表达水平显著降低,NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),见图 4 和表 6。

表 5 各组大鼠海马组织中 CAT、ROS、MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of CAT, ROS, and MDA levels in the hippocampal tissue of rats in each group

组 别	n	CAT(U/mg)	MDA(nmol/mg)	ROS($\mu\text{mol/mg}$)
空白组	6	6.78 ± 0.87	3.83 ± 0.42	104.72 ± 9.81
模型组	6	1.02 ± 0.15 ^a	12.74 ± 0.79 ^a	253.49 ± 16.43 ^a
Tet 低剂量组	6	2.15 ± 0.42 ^b	9.53 ± 0.64 ^b	216.83 ± 13.26 ^b
Tet 中剂量组	6	3.86 ± 0.64 ^{bc}	6.34 ± 0.48 ^{bc}	165.62 ± 11.75 ^{bc}
Tet 高剂量组	6	6.05 ± 0.83 ^{bcd}	3.36 ± 0.37 ^{bcd}	110.87 ± 9.68 ^{bcd}
抑制剂组	6	2.24 ± 0.51 ^e	8.87 ± 0.62 ^e	205.17 ± 12.31 ^e
F 值		83.216	239.993	139.696
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 Tet 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 Tet 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 Tet 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。



注:A. 空白组;B. 模型组;C. Tet 低剂量组;D. Tet 中剂量组;E. Tet 高剂量组;F. 抑制剂组。

图 4 Western-blot 检测各组大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达比较

Fig. 4 Western blot detection of Nrf2, HO-1, NLRP3, ASC, Caspase-1 protein expression in the hippocampus of rats in each group

3 讨论

重度抑郁症是一种慢性、复发性和潜在威胁生命的多病因异质性精神疾病,其患病率和病死率极高^[13]。实验中常用皮下注射皮质酮构建抑郁症大鼠模型进行动物研究,以往对抑郁症模型大鼠研究发现^[3,10-11],大鼠出现体质量减轻、探索欲与活动度低、绝望等抑郁情绪。本研究发现,模型组大鼠出现体质量、糖水偏好率、自主活动评分显著降低,强迫游泳不

表 6 各组大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 6 Comparison of Nrf2, HO-1, NLRP3, ASC, Caspase-1 protein expressions in hippocampal tissue of rats in each group

组 别	n	Nrf2	HO-1	NLRP3	ASC	Caspase-1
空白组	6	1.88 ± 0.15	1.58 ± 0.14	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.02
模型组	6	0.10 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.06 ^a	1.88 ± 0.14 ^a	1.92 ± 0.17 ^a	2.14 ± 0.19 ^a
Tet 低剂量组	6	0.57 ± 0.07 ^b	0.59 ± 0.05 ^b	1.41 ± 0.11 ^b	1.38 ± 0.10 ^b	1.63 ± 0.13 ^b
Tet 中剂量组	6	1.12 ± 0.09 ^{bc}	0.98 ± 0.07 ^{bc}	0.92 ± 0.08 ^{bc}	0.87 ± 0.08 ^{bc}	1.03 ± 0.09 ^{bc}
Tet 高剂量组	6	1.76 ± 0.15 ^{bcd}	1.37 ± 0.14 ^{bcd}	0.27 ± 0.01 ^{bcd}	0.33 ± 0.02 ^{bcd}	0.46 ± 0.04 ^{bcd}
抑制剂组	6	0.68 ± 0.07 ^e	0.84 ± 0.08 ^e	0.91 ± 0.07 ^e	0.96 ± 0.08 ^e	1.16 ± 0.11 ^e
F 值		281.335	151.497	351.251	299.467	253.291
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a*P* < 0.05; 与模型组比较,^b*P* < 0.05; 与 Tet 低剂量组比较,^c*P* < 0.05; 与 Tet 中剂量组比较,^d*P* < 0.05; 与 Tet 高剂量组比较,^e*P* < 0.05。

动时间延长等抑郁行为,与前人研究结果一致,说明抑郁症大鼠模型构建成功^[11]。

目前临床上对抑郁症的治疗虽然有效,但因存在着用药时间长、易产生不良反应等问题,仍不够理想,因此,研究出更快速、更安全、更有效的抗抑郁药物是临床上亟待解决的难题^[14]。研究表明,来源于中草药的 Tet 能增加抑郁大鼠体质量和 1% 蔗糖消耗量、降低强迫游泳试验和尾悬实验的静止时间,具有缓解、治疗抑郁症的作用^[6-7]。本研究发现,Tet 能缩短强迫游泳不动时间,增加大鼠体质量、糖水偏好率、自主活动评分,大鼠抑郁行为得到显著改善,与前人研究结果一致。

神经炎症反应被认为与神经精神疾病有关,一些临床研究表明,抑郁症状与促炎因子的表达之间存在很强的关联。而且,抗炎药的使用已被证明可以改善抑郁症状,证明了炎症反应作为抑郁症介质的重要性^[15]。机体免疫功能紊乱所引起的中枢炎症反应会损伤神经元,导致神经元的结构功能发生改变。Nrf2 是一种重要的转录因子,已成为炎症疾病的潜在治疗靶点。HO-1 是一种具有抗炎和抗氧化应激作用的酶,Nrf2 是 HO-1 表达的关键调制器^[16]。Nrf2/HO-1 信号通路在抗炎中起着关键作用。其他研究表明,激活的 Nrf2/HO-1 信号通路可能会减少细胞内 ROS 的产生^[17]。已知神经炎症反应和 NLRP3 炎性小体激活与抑郁症的病理有关。NLRP3 是细胞内一种多蛋白质复合体,由 NLRP3、ASC 及 pro-Caspase-1 组成。当细胞受到刺激时,NLRP3 被激活并能够通过结合蛋白 ASC 招募 pro-Caspase-1,形成 NLRP3 炎性小体。在 NLRP3 炎性小体的作用下 pro-Caspase-1 被激活成为 Caspase-1,最终导致 IL-1 β 、IL-18 的成熟与分泌,引起一系列炎症反应^[18]。阻断 NLRP3/Caspase-1 途径,对神经炎症反应和认知障碍具有神经保护作用^[19]。

ROS 是氧化还原反应的正常代谢产物,ROS 水平过高会破坏细胞的完整性,通过细胞脂质、蛋白质、线粒体和 DNA 的过氧化作用导致组织功能障碍^[20]。文献报道 ROS 与 NLRP3 炎性小体激活相关^[21]。研究发现,激活 Nrf2/HO-1/NLRP3 通路,可有效地降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 Caspase-1、ROS 的水平,对缓解抑郁大鼠的抑郁行为有很好的效果^[8-9]。研究发现,Tet 不仅对 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 等均有显著的抑制作用,还对神经系统起保护作用^[5]。本研究发现,Tet 显著增加海马组织中神经元数目、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平及 CAT 活性,降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平、炎症因子(IL-6、IL- β 、TNF- α)及 MDA、ROS 水平。

综上所述,Tet 可能通过激活 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路,减轻海马组织炎症反应和氧化应激损伤,从而起到缓解大鼠抑郁的作用。此研究为抑郁症的治疗提供了新思路。然而本研究尚存在不足之处,仅验证了 Tet 对 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路的作用,未对其其他靶点、途径进行验证,后续研究将会进一步明确 Tet 在抑郁症中的作用机制。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

邱雪、赵雯婧:提出研究思路,设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王飞燕、李蓉:分析试验数据,论文审核;何宗岭、姚刚:实施研究过程,进行统计学分析,论文修改

参考文献

[1] Yuan Y, Min HS, Lapane KL, et al. Depression symptoms and cognitive impairment in older nursing home residents in the USA: A latent class analysis[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2020, 35 (7): 769-778. DOI:10.1002/gps.5301.
[2] 丁娜娜,陈毅恒,李伟峰,等. 小柴胡汤及其类方辨治抑郁症的研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-13 [2023-01-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20221118.1337.016.html>. Ding NN, Chen HY, Li WF, et al. Research progress of Xiaochaihu

- decoction and its similar prescriptions in the treatment of depression [J/OL]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022; 1-13 [2023-01-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20221118.1337.016.html>.
- [3] 施学丽, 李玲, 王明杰, 等. 对药酸枣仁—合欢花对抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡及 CRT 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7): 1616-1618. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.21.
- Shi XL, Li L, Wang MJ, et al. Effects of jujuboside-albizzia julibrissin on hippocampal neuronal apoptosis and CRT expression in depression model rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(7): 1616-1618. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.21.
- [4] Kverno KS, Mangano E. Treatment-resistant depression: Approaches to treatment[J]. J Psychosoc Nurs Ment Health Serv, 2021, 59(9): 7-11. DOI: 10.3928/02793695-20210816-01.
- [5] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 20-28. DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20190830.401.
- Xi W, Zhang HJ, Ye ZG, et al. Research progress on tetrandrine and its derivatives[J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(1): 20-28. DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20190830.401.
- [6] Gao S, Cui YL, Yu CQ, et al. Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: Role of brain-derived neurotrophic factor[J]. Behav Brain Res, 2013, 238(1): 79-85. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.10.015.
- [7] Sheng ZF, Cui XY, Cui SY, et al. Involvement of adrenoceptors, dopamine receptors and AMPA receptors in antidepressant-like action of 7-O-ethylfangchinoline in mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(8): 949-956. DOI: 10.1038/aps.2015.57.
- [8] Bian H, Wang G, Huang J, et al. Dihydrolipoic acid protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammation via regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling in rat[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 166-178. DOI: 10.1186/s12974-020-01836-y.
- [9] Tao W, Hu Y, Chen Z, et al. Magnolol attenuates depressive-like behaviors by polarizing microglia towards the M2 phenotype through the regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2021, 91(1): 1-13. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153692.
- [10] 姜宗飞, 刘振瑞, 李强, 等. 骨髓间充质干细胞外泌体通过 microRNA-1297/CTGF 改善抑郁大鼠海马神经元损伤[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(9): 667-678. DOI: 10.3760/cma.j.cn112309-20201114-00519.
- Jiang ZF, Liu ZR, Li Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell exosomes improve hippocampal neuronal damage in depressed rats through microRNA-1297/CTGF[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2021, 41(9): 667-678. DOI: 10.3760/cma.j.cn112309-20201114-00519.
- [11] 王鑫鑫, 赵杰, 冯振宇, 等. 温阳解郁汤对皮质酮诱导的抑郁大鼠海马神经可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 93-103. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220237.
- Wang XX, Zhao J, Feng ZY, et al. Effect of Wenyang Jieyu decoction on hippocampal neuroplasticity in depressed rats induced by cortico-
- steron[J]. Chin J Exp Med Formul, 2022, 28(2): 93-103. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220237.
- [12] 罗鸿波, 周明建, 陈宇鑫. 三七皂苷 R1 对大鼠脊髓损伤后线粒体功能和神经炎症的作用及相关机制研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2022, 32(9): 823-833. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2022.09.07.
- Luo HB, Zhou MJ, Chen YX. Study of the roles and mechanism of NGR1 in regulating mitochondrial function and neuroinflammation after spinal cord injury in rats[J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2022, 32(9): 823-833. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2022.09.07.
- [13] 王冬, 汤艳清. 重度抑郁症与肠道菌群关系的研究进展[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(3): 259-262. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2022.03.013.
- Wang D, Tang YQ. The relationship between major depressive disorder and gut microbiota[J]. Journal of China Medical University, 2022, 51(3): 259-262. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2022.03.013.
- [14] Oliva V, Lippi M, Paci R, et al. Gastrointestinal side effects associated with antidepressant treatments in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2021, 109(1): 1-10. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2021.110266.
- [15] Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns[J]. Brain Behav Immun, 2018, 72(1): 2-13. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.10.025.
- [16] Taira J, Ogi T. Induction of antioxidant protein HO-1 through Nrf2-ARE signaling due to pteryxin in peucedanum japonicum thunb in RAW264.7 macrophage cells[J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(12): 621-630. DOI: 10.3390/antiox8120621.
- [17] Lou Y, Guo Z, Zhu Y, et al. Houttuynia cordata Thunb and its bioactive compound 2-undecanone significantly suppress benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis by activating the Nrf2-HO-1/NQO-1 signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 242-262. DOI: 10.1186/s13046-019-1255-3.
- [18] Guo HT, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics[J]. Nat Med, 2015, 21(7): 677-687. DOI: 10.1038/nm.3893.
- [19] Shao A, Fei J, Feng S, et al. Chikusetsu saponin IVa alleviated sevoflurane-induced neuroinflammation and cognitive impairment by blocking NLRP3/caspase-1 pathway[J]. Pharmacol Rep, 2020, 72(4): 833-845. DOI: 10.1007/s43440-020-00078-2.
- [20] Rizwan H, Pal S, Sabnam S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes[J]. Life Sci, 2020, 241(1): 1-46. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117148.
- [21] Harper SN, Leidig PD, Hughes FM Jr, et al. Calcium pyrophosphate and monosodium urate activate the NLRP3 inflammasome within bladder urothelium via reactive oxygen species and TXNIP[J]. Res Rep Urol, 2019, 11(1): 319-325. DOI: 10.2147/RRU.S225767.

(收稿日期: 2023-01-04)