温阳解郁汤对肾阳虚型抑郁大鼠PI3K/Akt信号通路及神经递质的影响Δ

王旭艳[1*]，王鑫鑫[1]，冯振宇[2]，孟　霜[2]，马小娟[2]，赵　杰[2]，赵建平[1#]（1.山西中医药大学中药与食品工程学院，山西 晋中　030619；2.山西省中西医结合医院中心实验室，太原　030013）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）06-0671-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.06.06

摘　要　目的　探讨温阳解郁汤对肾阳虚抑郁症大鼠磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路及神经递质的影响。**方法**　将雄性SD大鼠分为空白组、模型组、氟西汀组（西药阳性对照，4.17 mg/kg）、逍遥散组（中药阳性对照，1.88 g/kg）和温阳解郁汤低、中、高剂量组（1.25、2.50、5.00 g/kg），每组15只。除空白组外，其余各组均皮下注射皮质酮20 mg/kg以复制肾阳虚型抑郁大鼠模型，并同时灌胃相应药液，每天1次，连续28 d。观察大鼠的一般情况，检测其糖水偏好率、强迫游泳静止不动时间，计算其脏器指数，检测其血清中神经递质水平/含量，检测其海马组织中PI3K/Akt通路相关蛋白的表达量和树突棘数量。**结果**　与空白组比较，模型组大鼠出现了掉毛、畏冷扎堆、蜷缩等症状，糖水偏好率，肾上腺、胸腺、脾指数，血清环磷酸腺苷（cAMP）、脑源性神经营养因子、γ氨基丁酸水平，cAMP与环磷酸鸟苷比值，去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺含量，PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的表达量，以及海马组织中树突棘数量均显著降低（$P<0.01$）；静止不动时间、谷氨酸水平、糖原合成酶激酶3β蛋白的表达量均显著延长或升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组大鼠的抑郁症状有所改善，上述指标大部分逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　温阳解郁汤可改善大鼠的抑郁样行为和肾阳虚状态，调节神经递质的分泌，并可激活PI3K/Akt信号通路，从而起到保护海马神经元的作用。

关键词　温阳解郁汤；抑郁症；肾阳虚；磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路；神经递质；大鼠

Effects of Wenyang jieyu decoction on PI3K/Akt signaling pathway and neurotransmitters in kidney-yang deficiency depressed rats

WANG Xuyan[1], WANG Xinxin[1], FENG Zhenyu[2], MENG Shuang[2], MA Xiaojuan[2], ZHAO Jie[2], ZHAO Jianping[1]（1. College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China; 2. Central Laboratory, Shanxi Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taiyuan 030013, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of Wenyang jieyu decoction on phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and neurotransmitters in rats with kidney-yang deficiency depression. **METHODS** The SD rats were divided into blank group, model group, fluoxetine group (positive control of western medicine, 4.17 mg/kg), Xiaoyao powder group (positive control of TCM, 1.88 g/kg) and Wenyang jieyu decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups (1.25, 2.50, 5.00 g/kg), with 15 rats in each group. Except for blank group, the other groups were treated with corticosterone 20 mg/kg subcutaneously to induce kidney-yang deficiency depressed model, meanwhile the mice were given relevant medicine intragastrically, once a day, for 28 consecutive days. The general conditions of rats were observed. The sucrose preference rate and the static time of forced swimming were detected, and organ indexes of rats were calculated. The levels/contents of neurotransmitters in serum were detected, the expressions of PI3K/Akt pathway-related proteins in hippocampus were detected, and the number of dendritic spines was determined. **RESULTS** Compared with blank group, model group suffered from the symptoms such as hair loss, fear of cold, curling up; sucrose preference rate, indexes of adrenal gland, thymus gland and spleen, serum levels of cyclic adenosine phosphate (cAMP), brain-derived neurotrophic factor and gamma-aminobutyric acid, the ratio of cAMP to cyclic guanosine monophosphate, the contents of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxy-

Δ **基金项目**　山西省基础研究计划青年科学研究项目（No.20210302124565）；山西省卫生健康委员会重点实验室建设计划项目；山西省重点实验室项目（No.202104010910011）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药临床应用。电话：0351-2150899。E-mail：1196133050@qq.com

＃**通信作者**　主任药师，博士生导师。研究方向：临床中药学、中药药理学。电话：0351-2150899。E-mail：4668719@163.com

tryptamine, the expressions of PI3K, Akt, mammalian target of rapamycin, and the number of dendritic spines in the hippocampus were significantly decreased ($P<0.01$). The time of immobility, level of glutamic acid and protein expression of glycogen synthetase kinase-3β were prolonged and increased ($P<0.01$). Compared with model group, depression symptoms of rats in each administration group were improved, and the above indexes were mostly reversed ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Wenyang jieyu decoction can improve depression-like behavior and the deficiency of kidney-yang, regulate the secretion of neurotransmitters, and activate PI3K/Akt signaling pathway, thus playing a role in protecting hippocampal neurons.

KEYWORDS Wenyang jieyu decoction; depression; kidney-yang deficiency; PI3K/Akt signaling pathway; neurotransmitter; rat

抑郁症是常见的大脑功能紊乱性疾病，患者多表现为自主活动减少、情绪持续性低落并伴有思维缓慢、神情呆滞等临床症状[1]。据统计，由抑郁所致全球经济疾病负担将在2030年位居首位，极度不利于社会的稳定与发展[2-3]。同时，抑郁症可严重损害人们的身心健康，降低生活质量，是自杀死亡的主要影响因素[4]。可见，抑郁症已成为不可忽视的疾病之一，如何有效防治抑郁症是学界亟待解决的问题。但目前几乎所有的合成抗抑郁药都难以实现这一目标，越来越多的科研工作者将研究重点转向中医药。

本课题组通过临床观察发现，大多抑郁症患者存在不同程度的肾阳虚，主要病机为升发疏泄功能下降、温煦功能减退、阴阳寒热失调等[5]。为深入探讨抑郁症机制、阐释抑郁症本质，结合中医的整体观念并以温阳立法寻找新方法，对抑郁症的诊断、治疗具有重要价值。温阳解郁汤为山西省中西医结合医院治疗情志疾病的临床经验方，其抗抑郁作用已经动物实验和临床研究予以证实[5-6]。本课题组前期研究发现，机体长期处于慢性应激状态可导致下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进、糖皮质激素释放增多，进一步造成海马组织损伤，引起抑郁等情感障碍，其具体机制可能与磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，又称Akt）信号通路密切相关[6-7]。为进一步挖掘温阳解郁汤抗抑郁的潜在机制，本研究拟以皮质酮（corticosterone，CORT）诱导建立大鼠肾阳虚型抑郁模型，以临床常用药物氟西汀、逍遥散为对照，从PI3K/Akt信号通路、神经递质入手，初步探讨该方的抗抑郁作用，为其临床应用提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ZH8297型酶标分析仪、Centrifuge5328R型台式高速冷冻离心机、ABI A28567型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），BT 25S型十万分之一电子天平（德国Sartorius公司），e2695型高效液相色谱仪、2475型荧光检测器（美国Waters公司），IAS-500型多色荧光及化学发光凝胶成像系统[莱普特科学仪器（北京）有限公司]，1624DN-19型制胶器、DYY-6D型电泳仪（北京六一生物科技有限公司），DNM-9602型酶标分析仪（北京普朗新技术有限公司），CX41型正置显微镜（日本Olympus公司）等。

1.2 主要药品与试剂

温阳解郁汤由桂枝、附子、炙甘草[基原为豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.，下同]、生姜、乌梅、大枣组成，各饮片批号分别为200601、190301、200601、201022、190301、200621；逍遥散由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、干姜、薄荷组成，各饮片批号分别为200301、200401、200601、200301、200301、200601、200601、200301。上述饮片均购自山西维康堂中药饮片有限公司，由山西中医药大学中药与食品工程学院裴香萍副教授鉴定均为真品。

CORT（批号RH248547）购自上海凛恩科技发展有限公司；氟西汀原料药（批号BNP761，纯度99%）购自上海毕得医药科技股份有限公司；二甲基亚砜（批号1209M036）购自北京索莱宝科技有限公司；环磷酸腺苷（cyclic adenosine phosphate，cAMP）、环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphate，cGMP）、脑源性神经营养因子（brain derived neurotrophic factor，BDNF）、谷氨酸（glutamic acid，Glu）、γ氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid，GABA）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为F3424-A、F2903-A、F3085-A、F3476-A、F3317-A）均购自上海泛柯实业有限公司；5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）对照品（批号111656-200401，纯度≥98%）、多巴胺（dopamine，DA）对照品（批号100070-201006，纯度＞98%）均购自中国食品药品检定研究院；去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）对照品（批号C11428823，纯度98%）购自上海麦克林生化科技有限公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔IgG二抗（批号BA1054）购自武汉博士德生物工程有限公司；兔PI3K、糖原合成酶激酶3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）单克隆抗体（批号分别为#4257、#12456）均购自美国CST公司；兔Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamy-

cin，mTOR）单克隆抗体（批号分别为Ab179463、Ab134903）均购自英国Abcam公司；兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（批号AB0037）购自美国Abways公司；其余试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠，体质量180～220 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2016-0011。所有大鼠均饲养于山西中医药大学动物实验室（室温24 ℃，12 h昼夜循环光照，空气流通）内，适应性喂养7 d，期间自由摄食饮水。本实验操作过程严格遵守实验动物伦理标准，并经过山西中医药大学医学伦理委员会审批（批准编号2021DW159）。

2 方法

2.1 药液的制备

按温阳解郁汤原方比例，称取桂枝、附子各15 g，炙甘草10 g，生姜、乌梅各30 g，大枣5个。先取附子，加12倍量水，煎煮1 h；再取剩余药味，加12倍量水，煎煮1 h×3次；合并煎液，滤过，滤液减压浓缩至浸膏状，干燥，得干膏（每1 g干膏对应生药总量5 g），粉碎成细粉，备用。

按逍遥散原方比例，称取柴胡、当归、白芍、白术、茯苓各30 g，炙甘草15 g，干姜、薄荷各10 g，加10倍量水浸泡40 min后煎煮2 h；药渣再加8倍量水煎煮1.5 h；合并煎液，滤过，滤液减压浓缩至稠膏状，干燥，得干膏（每1 g干膏对应生药总量10.27 g），粉碎成细粉，备用。

2.2 分组、造模与给药

将105只雄性SD大鼠按体质量分为7组，分别为空白组、模型组、氟西汀（西药阳性对照）组、逍遥散（中药阳性对照）组和温阳解郁汤低、中、高剂量组，每组15只。温阳解郁汤低、中、高剂量组大鼠的给药剂量分别为1.25、2.50、5.00 g/kg（以生药量计，中剂量根据临床成人等效剂量换算而得，以水为溶剂），氟西汀组大鼠给予氟西汀4.17 mg/kg（剂量根据临床成人等效剂量换算而得，以水为溶剂），逍遥散组大鼠给予逍遥散1.88 g/kg（以生药量计，剂量根据临床成人等效剂量换算而得，以水为溶剂），空白组及模型组大鼠灌胃水，灌胃体积均为15 mL/kg，每天1次，连续28 d。

采用反复不定时皮下注射CORT 20 mg/kg（CORT先用1%二甲基亚砜溶解，再加至含0.1%聚山梨酯80的生理盐水中，超声30 min使成均匀混悬液）的方式建立肾阳虚型抑郁模型[8]，并于造模的同时灌胃给药。空白组大鼠皮下注射含二甲基亚砜、0.1%聚山梨酯80的生理盐水4 mL/kg。

2.3 一般情况观察

实验过程中，观察各组大鼠的精神状态、毛发、进食和对外刺激反应等一般情况。

2.4 大鼠行为学指标检测

2.4.1 糖水偏好率 末次给药后，在安静环境中对各组大鼠进行糖水偏好训练。大鼠禁食禁水24 h后，单独分笼，并于笼中同时放置已定量的2个水瓶（第1天，2瓶均装有1%蔗糖水；第2天，其中1瓶蔗糖水被换成纯水），1 h后取走，称定质量并计算大鼠的糖水偏好率：糖水偏好率（%）＝糖水消耗量/（糖水消耗量+纯水消耗量）×100%。

2.4.2 静止不动时间 在糖水偏好训练的第1天进行强迫游泳实验。将各组大鼠放入高50 cm、直径20 cm的圆柱形筒中，水温为25 ℃，水深约为40 cm。强迫游泳共进行6 min，前2 min为适应阶段，后4 min为记录阶段，记录大鼠在水中的静止不动时间。

2.5 大鼠样本采集及脏器指数检测

上述实验完成后，所有大鼠禁食不禁水12 h，麻醉后于腹主动脉取血。血样静置1～2 h，以3 000 r/min离心15 min，取上层血清，于－20 ℃冰箱中冻存，备用。取血完成后，处死各组大鼠，分离其海马组织，置于冻存管中，于液氮中迅速冷冻，待全部取材完成后移至－80 ℃冰箱中保存；摘取大鼠肾上腺、胸腺和脾，精确称定质量并计算各脏器指数：脏器指数（%）＝大鼠脏器湿质量/大鼠体质量×100%。

2.6 大鼠血清中cAMP、cGMP、BDNF、Glu、GABA水平检测

取“2.5”项下各组大鼠的血清样品适量，采用酶标仪以ELISA法检测其血清中cAMP、cGMP、BDNF、Glu、GABA水平，并记录cAMP与cGMP的比值（cAMP/cGMP）。严格按照试剂盒说明书操作。

2.7 大鼠血清中NE、DA、5-HT含量检测

取“2.5”项下各组大鼠的血清样品500 μL，加入等体积的5%高氯酸溶液，于4 ℃下以14 000 r/min离心10 min，取上清液，采用高效液相色谱仪以标准曲线法检测其中NE、DA、5-HT含量。色谱柱为Diamonsil C_{18}（200 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.1 mol/L磷酸二氢钠缓冲液（10∶90，*V*/*V*）；流速为1 mL/min；激发波长为254 nm，发射波长为338 nm；柱温为30 ℃；进样量为20 μL[9]。严格按照2020年版《中国药典》（四部）“生物样品定量分析方法验证指导原则”进行方法学考察。

2.8 大鼠海马组织中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取“2.5”项下各组大鼠的海马组织，加裂解液研磨并于冰上裂解30 min，蛋白经BCA法检测浓度后，加蛋白上样缓冲液于100 ℃下煮沸20 min变性，取变性蛋白适量行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，湿法转膜，以5%脱脂奶粉室温封闭1 h；加入PI3K、Akt、mTOR、GSK-3β、GAPDH一抗（稀释度分别为1∶1 000、1∶10 000、1∶10 000、1∶1 000、1∶4 000），4 ℃孵育过夜；TBST缓冲液清洗10 min×3次，加入二抗（稀释度为1∶5 000），室温孵育1 h；TBST缓冲液清洗10 min×3次后显色，使用凝胶成像系统显影并利用Image J软件分析蛋白条带的灰度值，以目的蛋白与内参（GAPDH）的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

2.9 大鼠海马组织中海马神经元树突棘数量检测

采用高尔基染色法进行检测。取“2.5”项下各组大鼠的海马组织，置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h，用水清洗后，以梯度乙醇脱水，浸蜡、包埋后切片。切片用水清洗4 min×2次后，置于混合液[溶液D-溶液E-水（1∶1∶2，*V*/*V*/*V*）]中静置10 min；用水清洗4 min×2次，用结晶紫染色，再依次以50%、75%、95%乙醇和无水乙醇梯度脱水各4 min，重复4次；在二甲苯中透明4 min×3次后，以中性树脂封片，置于显微镜下观察并记录海马组织中海马神经元树突棘数量。

2.10 统计学方法

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

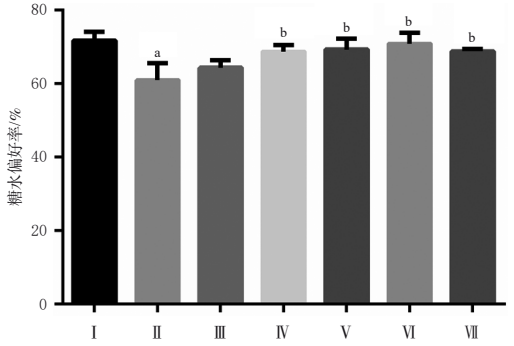
3.1 温阳解郁汤对大鼠一般情况的影响

随着造模时间的延长，模型组大鼠出现了掉毛、畏冷扎堆、蜷缩、精神不佳、活动量减少、进食减少的症状；逍遥散组、氟西汀组和温阳解郁汤中、高剂量组大鼠的上述症状在给药7 d后逐渐改善，而温阳解郁汤低剂量组大鼠较模型组无明显变化。

3.2 温阳解郁汤对大鼠行为学指标的影响

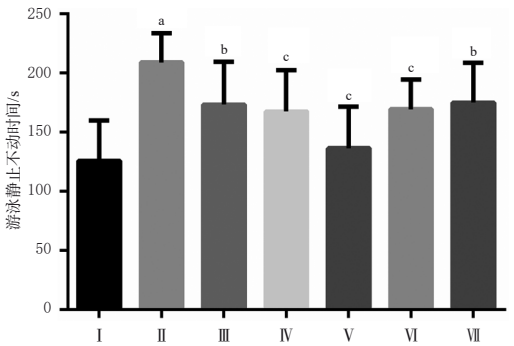
3.2.1 糖水偏好率 与空白组比较，模型组大鼠的糖水偏好率显著降低（*P*<0.01）。与模型组比较，氟西汀组、逍遥散组和温阳解郁汤中、高剂量组大鼠的糖水偏好率均显著升高（*P*<0.01）。结果见图1。

3.2.2 静止不动时间 与空白组比较，模型组大鼠的静止不动时间显著延长（*P*<0.01）。与模型组比较，各药物组大鼠的静止不动时间均显著缩短（*P*<0.01或*P*<0.05）。结果见图2。



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：温阳解郁汤低剂量组；Ⅳ：温阳解郁汤中剂量组；Ⅴ：温阳解郁汤高剂量组；Ⅵ：氟西汀组；Ⅶ：逍遥散组；a：与空白组比较，*P*<0.01；b：与模型组比较，*P*<0.01

图1 温阳解郁汤对大鼠糖水偏好率的影响



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：温阳解郁汤低剂量组；Ⅳ：温阳解郁汤中剂量组；Ⅴ：温阳解郁汤高剂量组；Ⅵ：氟西汀组；Ⅶ：逍遥散组；a：与空白组比较，*P*<0.01；b：与模型组比较，*P*<0.05；c：与模型组比较，*P*<0.01

图2 温阳解郁汤对大鼠强迫游泳静止不动时间的影响

3.3 温阳解郁汤对大鼠脏器指数的影响

与空白组比较，模型组大鼠肾上腺、胸腺、脾指数均显著降低（*P*<0.01）。与模型组比较，氟西汀组、逍遥散组和温阳解郁汤中、高剂量组大鼠肾上腺、胸腺和脾指数均显著升高（*P*<0.01或*P*<0.05）。结果见表1。

表1 温阳解郁汤对大鼠脏器指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	肾上腺指数/%	胸腺指数/%	脾指数/%
空白组	14.03±2.11	148.14±23.41	239.97±36.10
模型组	7.27±0.64[a]	78.23±15.65[a]	138.89±14.14[a]
温阳解郁汤低剂量组	7.28±1.54	82.10±16.08	147.98±16.65
温阳解郁汤中剂量组	10.12±2.06[b]	97.90±11.18[c]	209.94±20.21[b]
温阳解郁汤高剂量组	10.03±2.09[c]	97.97±16.13[c]	214.51±20.20[b]
氟西汀组	10.34±2.35[b]	114.93±10.65[b]	206.04±28.75[b]
逍遥散组	9.69±1.32[c]	95.09±7.50[c]	196.22±19.12[b]

a：与空白组比较，*P*<0.01；b：与模型组比较，*P*<0.01；c：与模型组比较，*P*<0.05

3.4 温阳解郁汤对大鼠血清中cAMP、cGMP、BDNF、Glu、GABA水平的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中cAMP、BDNF、GABA水平和cAMP/cGMP均显著降低，Glu水平显著升高（*P*<0.01）。与模型组比较，各药物组大鼠血清中cAMP（温阳解郁汤低剂量组除外）、BDNF（温阳解郁汤

低剂量组除外）、GABA水平和cAMP/cGMP（温阳解郁汤低剂量组除外）均显著升高，Glu水平（温阳解郁汤低剂量组除外）均显著降低（$P<0.01$或$P<0.05$）。结果见表2。

表2　温阳解郁汤对大鼠血清中cAMP、cGMP、BDNF、Glu、GABA水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	cAMP/（nmol/L）	cGMP/（nmol/L）	cAMP/cGMP	BDNF/（pg/mL）	Glu/（mg/L）	GABA/（μmol/L）
空白组	9.78±0.58	52.79±4.83	0.20±0.02	1 127.74±30.55	54.29±1.48	10.61±0.51
模型组	6.51±0.52[a]	48.04±7.12	0.15±0.02[a]	820.49±117.25[a]	70.04±3.48[a]	8.32±0.33[a]
温阳解郁汤低剂量组	6.94±0.80	48.94±4.67	0.16±0.01	872.45±56.08	68.55±2.45	9.16±0.43[b]
温阳解郁汤中剂量组	7.60±0.87[b]	49.40±7.22	0.17±0.01[c]	982.13±52.99[b]	63.21±1.26[b]	9.52±0.22[b]
温阳解郁汤高剂量组	9.18±0.90[b]	48.82±4.74	0.19±0.01[b]	966.74±2.22[b]	57.18±1.32[b]	10.33±0.31[b]
氟西汀组	7.17±0.49[c]	47.08±6.15	0.17±0.03[c]	1 052.69±34.64[b]	57.34±1.96[b]	9.41±0.39[b]
逍遥散组	7.31±0.62[c]	46.02±5.40	0.17±0.02[c]	943.00±13.88[c]	64.94±0.86[b]	9.95±0.21[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

3.5　温阳解郁汤对大鼠血清中NE、DA、5-HT含量的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中NE、DA、5-HT含量均显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组大鼠血清中NE、DA、5-HT含量均显著升高（$P<0.01$或$P<0.05$）。结果见表3。

表3　温阳解郁汤对大鼠血清中NE、DA、5-HT含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	NE/（mg/μL）	DA/（mg/μL）	5-HT/（mg/μL）
空白组	4.53±0.32	8.94±1.41	58.67±3.95
模型组	2.84±0.11[a]	6.56±0.52[a]	13.56±6.15[a]
温阳解郁汤低剂量组	3.21±0.14[b]	8.70±0.67[c]	33.58±1.06[c]
温阳解郁汤中剂量组	3.29±0.12[c]	8.42±0.96[b]	63.76±0.83[c]
温阳解郁汤高剂量组	3.19±0.10[b]	10.90±0.81[c]	63.20±6.31[c]
氟西汀组	3.49±0.01[c]	8.65±0.28[c]	39.29±7.42[c]
逍遥散组	3.30±0.17[c]	8.35±0.46[b]	37.04±9.77[c]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

3.6　温阳解郁汤对大鼠海马组织中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠海马组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白的表达量均显著降低，GSK-3β蛋白的表达量显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组大鼠海马组织中PI3K、Akt（温阳解郁汤低剂量组除外）、mTOR蛋白的表达量均显著升高，GSK-3β蛋白的表达量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3。

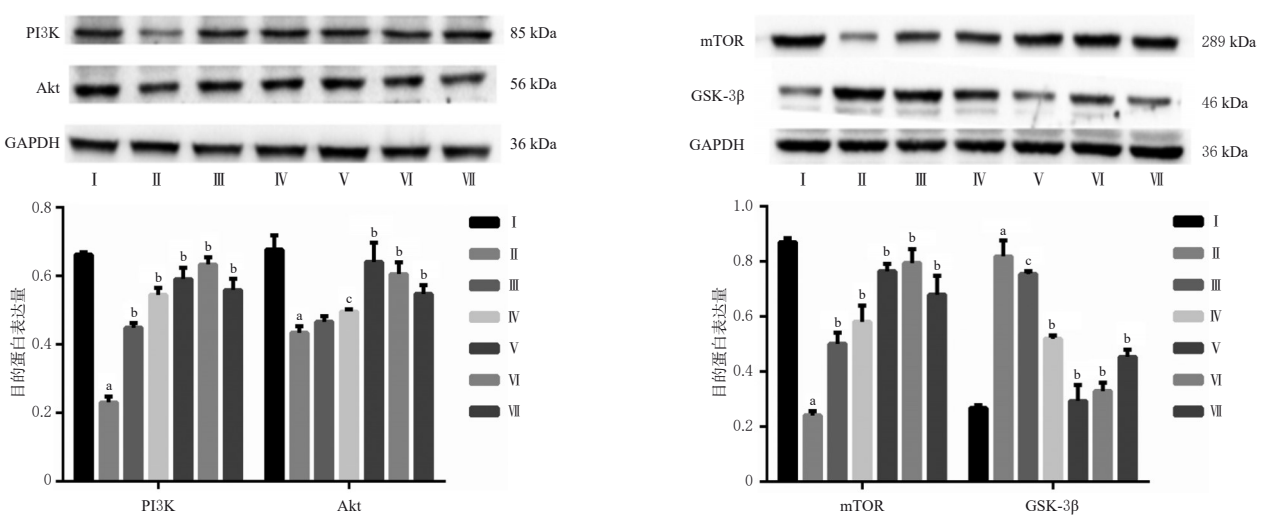
3.7　温阳解郁汤对大鼠海马组织树突棘数量的影响

与空白组比较，模型组大鼠海马组织中树突棘数量显著减少（$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组大鼠海马组织中树突棘数量均显著增加（$P<0.01$或$P<0.05$）。结果见图4。

4　讨论

温阳解郁汤由清末郑钦安《医法圆通》补坎益离丹化裁而来，由附子、桂枝、乌梅、炙甘草、大枣、生姜6味中药组成。其中，附子为君药，辛热，能补坎中真阳，上助心阳，中温脾阳；桂枝、生姜为臣药，辛通心阳，温肝阳，补肝用；炙甘草、大枣为佐药，甘缓其中，合辛甘化阳、酸甘化阴之意；生姜、大枣温中焦，助脾阳；乌梅为使药，统领阳药入肝，温补肝阳，使肝中阳气得以升发，又可敛肝气、养肝血以柔肝。诸药合用，复肾阳、补肝阳、暖心阳、运脾阳，收纳微阳于肾，伏虚火于中，缓解因长期生活压力、精神紧张导致的肾精受损、阳气不足，共奏温阳助肾、开郁安神之功[5]。

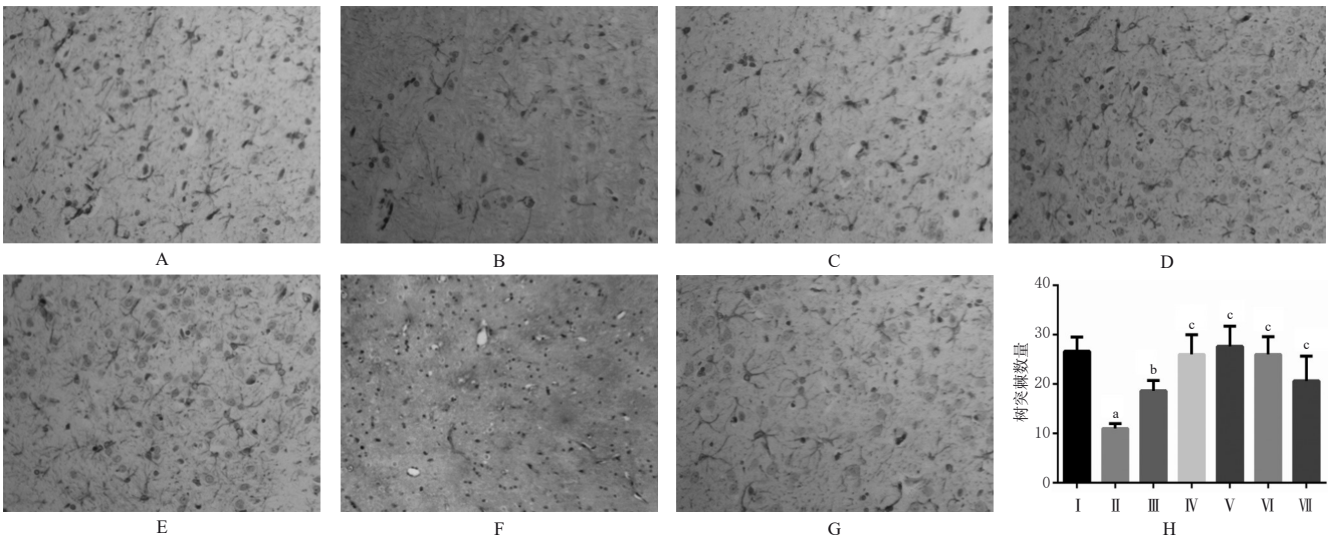
有研究证实，外源性CORT可用于建立稳定的抑郁动物模型，且所得模型与抑郁症患者具有相似的抑郁行为和神经学变化[10]。糖水偏好试验是研究抑郁模型大



A. PI3K和Akt　　B. mTOR和GSK-3β

Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：温阳解郁汤低剂量组；Ⅳ：温阳解郁汤中剂量组；Ⅴ：温阳解郁汤高剂量组；Ⅵ：氟西汀组；Ⅶ：逍遥散组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

图3　温阳解郁汤对大鼠海马组织中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）



A：空白组树突棘显微图（×100）；B：模型组树突棘显微图（×100）；C：温阳解郁汤低剂量组树突棘显微图（×100）；D：温阳解郁汤中剂量组树突棘显微图（×100）；E：温阳解郁汤高剂量组树突棘显微图（×100）；F：氟西汀组树突棘显微图（×100）；G：逍遥散组树突棘显微图（×100）；H：各组树突棘数量柱形图；Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：温阳解郁汤低剂量组；Ⅳ：温阳解郁汤中剂量组；Ⅴ：温阳解郁汤高剂量组；Ⅵ：氟西汀组；Ⅶ：逍遥散组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图4　温阳解郁汤对大鼠海马组织树突棘数量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

鼠快感缺失的典型行为测试实验，强迫游泳实验是一种行为绝望测试实验[11－12]。本研究采用CORT诱导建立大鼠抑郁模型后，模型组大鼠的糖水偏好率较空白组显著降低，静止不动时间较空白组显著延长，说明抑郁大鼠模型复制成功。连续给药28 d后，氟西汀组、逍遥散组和温阳解郁汤各剂量组大鼠的糖水偏好率（温阳解郁汤低剂量组除外）均显著升高，静止不动时间均显著缩短，可见温阳解郁汤能够改善抑郁模型大鼠快感缺失和绝望行为的状态。

cAMP、cGMP是细胞内信息传递的第二信使，两者相互制约，可使细胞功能维持在稳定状态，与中医学的阴阳学说有相似之处[13]。有研究指出，cAMP水平和cAMP/cGMP、脏器指数是肾阳虚证动物模型的特异性指标[8]。本研究结果显示，模型组大鼠血清中cAMP水平、cAMP/cGMP均较空白组显著降低，同时表现出掉毛、畏冷扎堆等症状，且其肾上腺、胸腺、脾指数均显著降低，上述表现与中医肾阳虚证的表现基本一致，提示抑郁模型大鼠的证候归属于中医的“阳虚证”范畴。连续给药28 d后，各药物组大鼠血清中cAMP水平和cAMP/cGMP（温阳解郁汤低剂量组除外）均较模型组显著升高，上述症状均有不同程度改善，且各脏器指数（温阳解郁汤低剂量组除外）均显著升高，提示温阳解郁汤可改善抑郁模型大鼠的肾阳虚症状。

BDNF可增加突触可塑性，促进海马神经形成和神经元生存，与抑郁症的发生发展密切相关[14－15]。Glu为GABA的前体物质，是人脑中重要的兴奋性神经递质，与突触可塑性、大脑发育、学习记忆功能等密切相关，过度表达可导致神经元损伤甚至凋亡[16－18]。同时有研究指出，单胺类神经递质NE、DA、5-HT含量常被作为评价抑郁模型的重要指标[19]。本研究结果显示，温阳解郁汤可显著升高抑郁模型大鼠血清中BDNF（低剂量组除外）、GABA水平和NE、DA、5-HT含量，并可逆转Glu水平（低剂量组除外）的异常升高，提示该方可通过调节神经内分泌指标的表达来改善大鼠的抑郁状态。

Akt是PI3K的下游底物，GSK-3β、mTOR是PI3K/Akt信号通路的下游底物。抑制GSK-3β的活性是情感障碍性疾病药物治疗的新靶点[20]；mTOR能通过依赖PI3K/Akt信号通路的方式而被激活和调节，在神经元生长、增殖、凋亡乃至抑郁症的发生中具有重要的作用，是Glu能和胆碱能药物发挥快速抗抑郁作用的关键靶点[21－22]；同时有研究指出，当PI3K/Akt信号通路受到抑制时，神经元突触可塑性受损，从而导致抑郁症的发生[23]。本研究结果显示，温阳解郁汤可通过显著上调大鼠海马组织中PI3K表达，激活Akt（低剂量组除外），阻止mTOR降解并抑制GSK-3β活性，进而激活PI3K/Akt信号通路，最终发挥保护海马神经元、促进海马神经元再生的作用。

树突棘是树突上接收神经元信息传递的重要结构，是形成认知功能的基础，其可塑性的降低可导致抑郁症患者海马功能缺失并失去对情绪的正常调节，其数量异常所引起的突触功能紊乱是抑郁症的重要发病机制之一[24－25]。本实验结果发现，温阳解郁汤可使抑郁大鼠海马组织中树突棘数量增加，提示该方有助于恢复树突棘的正常神经生理功能。

综上所述，温阳解郁汤可有效控制大鼠的抑郁样行为，改善其肾阳虚状态，调节神经递质的分泌，并可激活PI3K/Akt信号通路，从而起到保护海马神经元的作用，最终发挥抗抑郁的功效。

参考文献

[1] 马凌悦，向倩，周颖，等. 心境障碍及其治疗与生物节律相关性的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2019，35(14)：1533-1536.

[2] DEY A，HANKEY GIBLIN P A. Insights into macrophage heterogeneity and cytokine-induced neuroinflammation in major depressive disorder[J]. Pharmaceuticals (Basel)，2018，11(3)：64.

[3] MICHALIS G，BELLOS S，POLITIS S，et al. Epidemiology of alcohol use in late adolescence in Greece and comorbidity with depression and other common mental disorders[J]. Depress Res Treat，2019，2019：5871857.

[4] 徐宁阳，任路，杨关林. 基于“脑-心-肾”轴理论构建冠心病合并抑郁症的中医防治体系[J]. 中华中医药杂志，2022，37(5)：2677-2680.

[5] 赵杰，彭涛，马艳苗. 温阳解郁汤治疗抑郁症30例临床观察[J]. 山西中医，2011，27(7)：15-16.

[6] 冯振宇，赵杰，刘慧宇. 温阳解郁汤对抑郁模型大鼠HPA轴的影响[J]. 中华中医药杂志，2015，30(12)：4304-4307.

[7] 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.

[8] 唐维我，张会永，李芹，等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2021，23(4)：1317-1324.

[9] 孟霜，冯振宇，马小娟，等. 温阳解郁颗粒对抑郁模型大鼠行为学和血清中单胺类神经递质水平的影响[J]. 中国药房，2019，30(23)：3226-3231.

[10] GREGUS A，WINTINK A J，DAVIS A C，et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats[J]. Behav Brain Res，2005，156(1)：105-114.

[11] PIZZAGALLI D A. Depression，stress，and anhedonia：toward a synthesis and integrated model[J]. Annu Rev Clin Psychol，2014，10：393-423.

[12] STREKALOVA T，SPANAGEL R，BARTSCH D，et al. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration[J]. Neuropsychopharmacology，2004，29(11)：2007-2017.

[13] 严林，欧则民，王艳静，等. 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(24)：42-49.

[14] ZALETEL I，FILIPOVIĆ D，PUŠKAŠ N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation[J]. Rev Neurosci，2017，28(6)：675-692.

[15] 尹传红，闫宇辉. 高压氧通过激活CREB/BDNF信号通路减轻阿尔茨海默病小鼠海马神经元突触损伤[J]. 中国病理生理杂志，2020，36(6)：1063-1070.

[16] BAK L K，SCHOUSBOE A，WAAGEPETERSEN H S. The glutamate/GABA-glutamine cycle：aspects of transport，neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer [J]. J Neurochem，2006，98(3)：641-653.

[17] KITAMURA A，TSURUGIZAWA T，UEMATSU A，et al. New therapeutic strategy for amino acid medicine：effects of dietary glutamate on gut and brain function[J]. J Pharmacol Sci，2012，118(2)：138-144.

[18] 刘晓，洪浩. 谷氨酸-谷氨酰胺循环在抑郁症发病机制中作用的研究进展[J]. 今日药学，2022，32(3)：206-210.

[19] 赵洪庆，韩远山，柳卓，等. 焦虑性抑郁模型大鼠脑区单胺递质含量与神经因子表达的变化[J]. 中国实验动物学报，2017，25(4)：373-379.

[20] 尚立芝，毛梦迪，许二平，等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织PI3K/Akt/GSK3β/β-catenin信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(23)：12-19.

[21] 杨茜，王静，裴双义. 文拉法辛对抑郁模型大鼠认知功能及海马神经元凋亡的作用研究[J]. 中国免疫学杂志，2018，34(11)：1642-1648.

[22] 张治楠，梁丽艳，连嘉惠，等. 中枢神经系统PI3K/AKT/mTOR信号通路研究进展[J]. 实用医学杂志，2020，36(5)：689-694.

[23] IGNÁCIO Z M，RÉUS G Z，ARENT C O，et al. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs[J]. Br J Clin Pharmacol，2016，82(5)：1280-1290.

[24] 凌志峰，罗洪斌，谢枫枫，等. 柴胡越鞠汤对CUMS诱导的抑郁症模型大鼠治疗作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(21)：68-76.

[25] SHRESTHA B R，VITOLO O V，JOSHI P，et al. Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons[J]. Mol Cell Neurosci，2006，33(3)：274-282.

（收稿日期：2022-08-09　修回日期：2023-01-31）

（编辑：张元媛）