

基于PFC-NAc-VTA神经环路代谢组学探讨疏肝和胃汤的抗抑郁作用机制^Δ

屈鑫月^{1*}, 胡俊杰¹, 李娟¹, 章敏¹, 周贤², 刘松林², 陈新^{1#} (1. 湖北中医药大学中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学中医临床学院, 武汉 430060)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)10-1172-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.10.04



摘要 **目的** 基于前额叶皮层(PFC)-伏隔核(NAc)-腹侧被盖区(VTA)神经环路代谢组学探讨疏肝和胃汤(SGHWT)的抗抑郁作用机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为空白组, 模型组, SGHWT低、中、高剂量组[3.67、7.34、14.68 g/(kg·d), 以生药量计]以及氟西汀组[1.58 mg/(kg·d), 阳性对照], 每组12只。除空白组外, 其余各组大鼠均采用慢性不可预知温和应激结合单笼饲养的方式构建抑郁模型, 并于造模同时灌胃相应药液或生理盐水, 每天1次, 持续6周。末次给药后, 检测各组大鼠的体重、糖水偏好率、总移动距离、穿越中心次数和不动时间。收集空白组、模型组、SGHWT中剂量组、氟西汀组大鼠的脑组织PFC、NAc、VTA区样本, 观察其组织形态学特征, 进行非靶向代谢组学分析(氟西汀组除外)并验证。**结果** 与模型组相比, 各药物组大鼠3个脑区细胞溶解、结构受损等病理损伤均明显改善, 其体重、糖水偏好率、总移动距离、穿越中心次数均显著升高或延长($P<0.05$), 不动时间均显著缩短($P<0.05$); 非靶向代谢组学结果显示, 共鉴定出78个内源性差异代谢物, PFC、NAc、VTA区分别有40、35、24个, 主要涉及氨基酸、脂质、鞘脂代谢等; 代谢通路富集分析结果显示, SGHWT主要通过鞘脂代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 不饱和脂肪酸的生物合成3条代谢通路对抑郁大鼠的神经环路产生影响, 且以丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路为主; 验证实验结果显示, SGHWT可显著升高大鼠NAc区蛋白激酶B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化水平, 显著下调N-甲基-D-天冬氨酸受体1(NMDAR1)蛋白的表达。**结论** SGHWT可显著改善模型大鼠的抑郁样行为, 减轻其PFC-NAc-VTA神经环路组织的病理损伤, 上述作用可能与抑制NMDAR1蛋白表达、激活Akt/mTOR信号通路有关。

关键词 疏肝和胃汤; 抑郁; 非靶向代谢组学; PFC-NAc-VTA神经环路; NMDAR1/Akt/mTOR信号通路

Exploration of the antidepressant mechanism of Shugan hewei tang based on metabolomics of PFC-NAc-VTA neural circuit

QU Xinyue¹, HU Junjie¹, LI Juan¹, ZHANG Min¹, ZHOU Xian², LIU Songlin², CHEN Xin¹ (1. Hubei Key Laboratory of Resources and Chemistry of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Clinical College of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the antidepressant mechanism of Shugan hewei tang (SGHWT) based on the metabolomics of prefrontal cortex (PFC)-nucleus accumbens (NAc)-ventral tegmental area (VTA) neural circuit. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into blank group, model group, SGHWT low-, medium- and high-dose groups [3.67, 7.34, 14.68 g/(kg·d), by raw material], and fluoxetine group [1.58 mg/(kg·d), positive control], with 12 rats in each group. Except for the blank group, the depression model was established by chronic unpredictable mild stress combined with individual cage housing in the remaining groups, and the corresponding drug solution or normal saline was administered via gavage during modeling, once a day, for 6 consecutive weeks. After the last administration, the body weight, sucrose preference rate, total moving distance,

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82004253); 湖北省自然科学基金计划项目(No.2023AFD146); 湖北省中医药重点学科建设项目(No.鄂中医通[2023]2号); 湖北省卫生健康委重点科研项目(No. WJ2023Z002); 湖北省中医药管理局中医药联合基金项目(No. ZY2025L221)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: qxyzhq@163.com

通信作者 副研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: chenxin30172@hotmail.com

frequency into the center and immobility time of rats in each group were detected. Samples of PFC, NAc and VTA areas of rats in the blank group, model group, SGHWT medium-dose group and fluoxetine positive control groups were collected, and their histomorphological features were observed, and non-targeted metabolomics analysis (except for fluoxetine group) were performed and validated. **RESULTS** Compared with model group, the cytolysis, structural damage and other

pathological damages in three brain regions of rats were significantly alleviated in each drug group, while their body weight, sucrose preference rate, total moving distance and frequency into the center were all significantly higher or longer ($P < 0.05$), and immobility time was significantly shorter ($P < 0.05$). The results of non-targeted metabolomics showed that a total of 78 endogenous differential metabolites were identified, with 40, 35 and 24 in the PFC, NAc and VTA regions respectively, mainly involved in amino acid, lipid and sphingolipid metabolism. The results of metabolic pathway enrichment analysis showed that SGHWT affected the neural circuits of depressed rats by regulating sphingolipid metabolism, alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism, saturated fatty acid biosynthesis, among which alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism was predominantly involved. Validation experiments showed that SGHWT significantly increased the phosphorylation levels of protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR), and decreased the protein expression of *N*-methyl-D-aspartic acid receptor 1 (NMDAR1) in the NAc region of rats. **CONCLUSIONS** SGHWT significantly improves the depression-like behavior and attenuates pathological damage of PFC-NAc-VTA neural circuit of model rats, the mechanism of which is associated with inhibiting NMDAR1 expression and activating the Akt/mTOR signaling pathway.

KEYWORDS Shugan hewei tang; depression; non-targeted metabolomics; PFC-NAc-VTA neural circuit; NMDAR1/Akt/mTOR signaling pathway

抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病,具有发病率高、致残率高、死亡率高等特点^[1]。该症以持续性的情绪消沉、快感缺失、学习记忆功能障碍为主要表现,并伴有乏力、疲倦、食欲减退、体重下降等躯体症状,给社会、家庭和个人带来巨大负担^[2]。据预测,到2030年,抑郁症将成为全球疾病负担的主要原因之一,故对其进行有效防治具有重要的临床意义^[3]。

本课题组前期研究发现,作为脑部奖赏通路,前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)-伏隔核(nucleus accumbens, NAc)-腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)神经环路在调节精神心理活动,调控快感、奖励、动机等行为方面具有至关重要的作用,与抑郁症的发生密切相关。具体作用过程如下:位于PFC区的谷氨酸能神经元可投射至NAc区,其释放的谷氨酸可作用于NAc区的*N*-甲基-D-天冬氨酸受体(*N*-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR),通过长时程抑制(long-term depression, LTD)减弱γ氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)能神经元活动,进而抑制VTA区的多巴胺(dopamine, DA)能神经元;VTA区的DA能神经元可通过释放DA来激活PFC区和NAc区神经元的DA受体,从而调节快感感受^[4]。

疏肝和胃汤(Shugan hewei tang, SGHWT)由柴胡、炒枳实、白芍、郁金、砂仁、广木香、焦白术、黄连、吴茱萸、炙甘草10味中药组方而成,是国医大师梅国强教授以《伤寒论》所载“四逆散”为基础结合临床经验衍生所得,用于治疗抑郁症及并发抑郁症的效果显著。本课题组前期研究发现,SGHWT可通过调节PFC-NAc-VTA神经环路来发挥抗抑郁作用^[5],但具体机制尚未探明。研究指出,代谢组学可揭示生物体受到刺激后小分子代谢物的动态变化,从而揭示相关生命活动机制,是药理作用机制研究的常用方法^[6]。基于此,本研究拟结合非靶向代谢组学和动物实验,分析SGHWT对慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)大鼠

PFC-NAc-VTA神经环路相关代谢物及代谢通路的影响,初步探讨其抗抑郁的潜在机制,为该方的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ENV-520型旷场测验装置(武汉一鸿科技有限公司),G6805- I型低频脉冲治疗仪(青岛鑫升实业有限公司),1290型超高液相色谱-G6540A型四极杆飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS/MS)仪(美国Agilent公司),U-LH100HGA型倒置光学显微镜(日本Olympus公司),xMark型全波长酶标仪、Power Pac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司),G-BOX型凝胶成像分析系统(英国Syngene公司)等。

1.2 主要药材与试剂

柴胡、炒枳实、白芍、郁金、砂仁、广木香、焦白术、黄连、吴茱萸、炙甘草饮片均购自湖北省中医院,经湖北中医药大学中药资源与中药化学湖北省重点实验室李娟教授鉴定为真品。

盐酸氟西汀胶囊[阳性对照,批号220103,规格20 mg(按 $C_{17}H_{18}F_3NO$ 计)]购自山西仟源医药集团股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染液(批号G1003)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;L-2-氯苯丙氨酸对照品(批号J29IB218395,纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)单克隆抗体(批号分别为9272S、13038T、2983T、5536T)均购自美国CST公司;兔抗NMDAR1单克隆抗体(批号HY-P80247)购自美国MCE公司;兔抗β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体(批号00123310)购自武汉三鹰生物技术有限公司;甲醇、乙腈(质谱级,纯度 $\geq 99.9\%$)均购自德国Merck公司;甲酸(色谱级,纯度 $\geq 96.0\%$)购自北京迈瑞达科技有

限公司;乙酸乙酯(分析纯,纯度 $\geq 99.5\%$)购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠72只,体重 (150 ± 20) g,由湖北省实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(鄂)2020-0018。所有大鼠均饲养于湖北中医药大学中医基础理论研究所清洁级动物房[温度 $(24 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $(50 \pm 5)\%$,每12 h光暗循环],自由摄食、饮水。本动物实验方案通过湖北中医药大学实验动物中心的伦理审查(批准号为HUCMS202202001)。

2 方法

2.1 药物的制备

称取SGHWT各饮片(柴胡、炒枳实、白芍、郁金、砂仁、广木香、焦白术、黄连、吴茱萸、炙甘草的质量比为10:10:10:10:10:10:10:6:6:6),混匀,加10倍量水,浸泡1 h后,煎煮2 h,以纱布过滤;取药渣,再重复煎煮 $2 \text{ h} \times 2$ 次,以纱布过滤;合并3次滤液,经水浴浓缩、冷冻干燥后,得SGHWT冻干粉(得率为41.97%)。

2.2 分组、造模与给药

将大鼠适应性喂养1周后,按体重分为空白组、模型组、SGHWT低、中、高剂量组(SGHWT-L、SGHWT-M、SGHWT-H组)以及氟西汀组(阳性对照),每组12只。除空白组外,其余各组大鼠均采用CUMS结合单笼饲养的方式建立大鼠抑郁模型(以行为学实验结果判断造模是否成功),具体造模方法参考本课题组前期研究^[7]。造模同时,SGHWT-L、SGHWT-M、SGHWT-H组和氟西汀组大鼠灌胃相应药液,其中SGHWT-M组和氟西汀组的剂量根据60 kg成人临床剂量[每天93 g/kg(以生药量计)和20 mg/kg]进行换算,分别为7.34 g/(kg·d)和1.58 mg/(kg·d),SGHWT-L、SGHWT-H组的剂量分别为SGHWT-M组的1/2和2倍,即3.67、14.68 g/(kg·d)。各药物组灌胃药液均以水为溶剂,灌胃体积均为0.01 mL/g;模型组和空白组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,持续6周。

2.3 行为学实验

实验期间,于每周固定时间称定并记录各组大鼠的体重。末次给药后,再次称定各组大鼠的体重,并进行糖水偏好实验、旷场实验。以糖水偏好实验的糖水偏好率,旷场实验的总移动距离、穿越中心次数、不动时间为指标,评估大鼠的行为学特点。上述各实验的具体操作参考本课题组前期行为学研究^[7]。

2.4 样本采集

行为学实验完成后,鉴于其评估结果和前期研究结果^[8],本研究选择药效最好的SGHWT中剂量进行后续研究,以SGHWT组表示。

取空白组、模型组、SGHWT组、氟西汀组大鼠,麻醉,随机选取每组3只,取全脑,并将脑组织置于4%多

聚甲醛溶液中固定,备用。取每组余下9只大鼠,于腹主动脉取血后分离全脑;血样于室温下静置30 min后,于 4°C 下以3 000 r/min离心15 min,吸取上层血清,经液氮速冻后于 -80°C 下保存,备用;取全脑PFC、NAc、VTA 3个脑区,经液氮速冻后于 -80°C 下保存,备用。

2.5 大鼠PFC-NAc-VTA神经环路组织形态学观察

取“2.4”项下各组大鼠经4%多聚甲醛溶液固定的全脑组织,分离PFC、NAc、VTA 3个脑区,分别进行石蜡包埋、切片、脱蜡、复水、苏木精染色、分化、伊红染色、脱水、封片后,使用显微镜观察各脑区的组织形态学变化。

2.6 SGHWT抗抑郁潜在机制挖掘与验证

2.6.1 样本预处理

随机选取“2.4”项下冻存的空白组、模型组、SGHWT组各6只大鼠的PFC、NAc、VTA脑区样本 $[(30 \pm 5)\text{mg}]$,自然解冻后,加入含内标L-2-氯苯丙氨酸(质量浓度10 $\mu\text{g/mL}$)的提取液I($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=7:3$)500 μL 及直径0.5 mm的钢珠4~6颗,于 4°C 下匀浆3 min,静置15 min后,于 4°C 下以12 000 r/min离心15 min,取上清液于1.5 mL EP管中。在沉淀中加入预冷的提取液II($V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲醇}}=1:3$)500 μL ,涡旋3 min,静置15 min后,于 4°C 下以12 000 r/min离心15 min,取上清液。将上述两次上清液混合,涡旋1 min混匀后,于 45°C 下真空浓缩50 min后,加入提取液I 250 μL 复溶,涡旋3 min,于 4°C 下以12 000 r/min离心15 min,取上清液,用于非靶向代谢组学分析。同时,取上述各组上清液10 μL ,混匀,作为质控(quality control, QC)样本,用于检验系统的稳定性。

2.6.2 色谱和质谱检测条件

取上述待测样本及QC样本,采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术进行检测,具体的色谱与质谱条件参考本课题组前期下丘脑代谢组学研究^[9]。

2.6.3 代谢组学分析

采集样本色谱/质谱数据后,将原始数据依次导入Profinder软件及MPP软件进行数据预处理及差异统计分析,并使用SIMCA-P 14.1软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)及200次置换检验分析,以进行代谢轮廓分析。同时,计算各色谱峰的变量重要性投影(variable important in projection, VIP),将满足组间差异倍数(fold change, FC) ≥ 1.20 或 ≤ 0.83 ,对应色谱峰VIP >1 且 $P<0.05$ 的物质表征为内源性差异代谢物^[10],并根据化合物的精确分子量,借助HMDB数据库(<https://www.hmdb.ca/>)对化合物的二级碎片离子信息进行分析、鉴定。利用MetaboAnalyst 6.0数据处理工具,以 $P<0.05$ 为筛选条件,对最终得到的内源性差异代谢物进行京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclope-

dia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析^[11], 对富集通路的一lgP 进行比较, 以筛选变化显著的共同代谢通路。

2.6.4 机制验证实验

根据“2.6.3”项下结果和PFC-NAc-VTA神经环路具体作用过程^[4], 采用Western blot法对代谢通路的相关蛋白表达进行检测。取“2.4”项下空白组、模型组、SGHWT组另3只大鼠和氟西汀组3只大鼠的NAC区组织[(30±5)mg], 加入含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液250 μL, 提取组织总蛋白, 然后于4℃下匀浆3 min后裂解30 min, 再于4℃下以12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 以BCA法定量后, 进行变性处理。取变性蛋白适量, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再转膜、封闭; 洗膜后, 加入相应蛋白一抗(稀释比例均为1:1 000), 于4℃下孵育过夜; 洗膜后, 加入相应二抗(稀释比例为1:1 000), 于室温下孵育1 h; 洗膜后, 以ECL法显影后成像。以β-actin为内参, 使用Image J软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量, 以磷酸化蛋白与原型蛋白的灰度值比值表示该蛋白的磷酸化水平。

2.7 统计学方法

采用Graph-Pad Prism 8.0软件作图, 采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 SGHWT对抑郁大鼠体重及行为学的影响

与空白组相比, 模型组大鼠的体重、糖水偏好率、总移动距离、穿越中心次数均显著降低或缩短, 不动时间显著延长($P<0.05$); 与模型组相比, 各药物组大鼠的体重、糖水偏好率(SGHWT-H组除外)、穿越中心次数、总移动距离均显著升高或延长($P<0.05$), 不动时间均显著缩短($P<0.05$)。结果见表1。这提示抑郁大鼠造模成功, SGHWT可改善其抑郁状况。

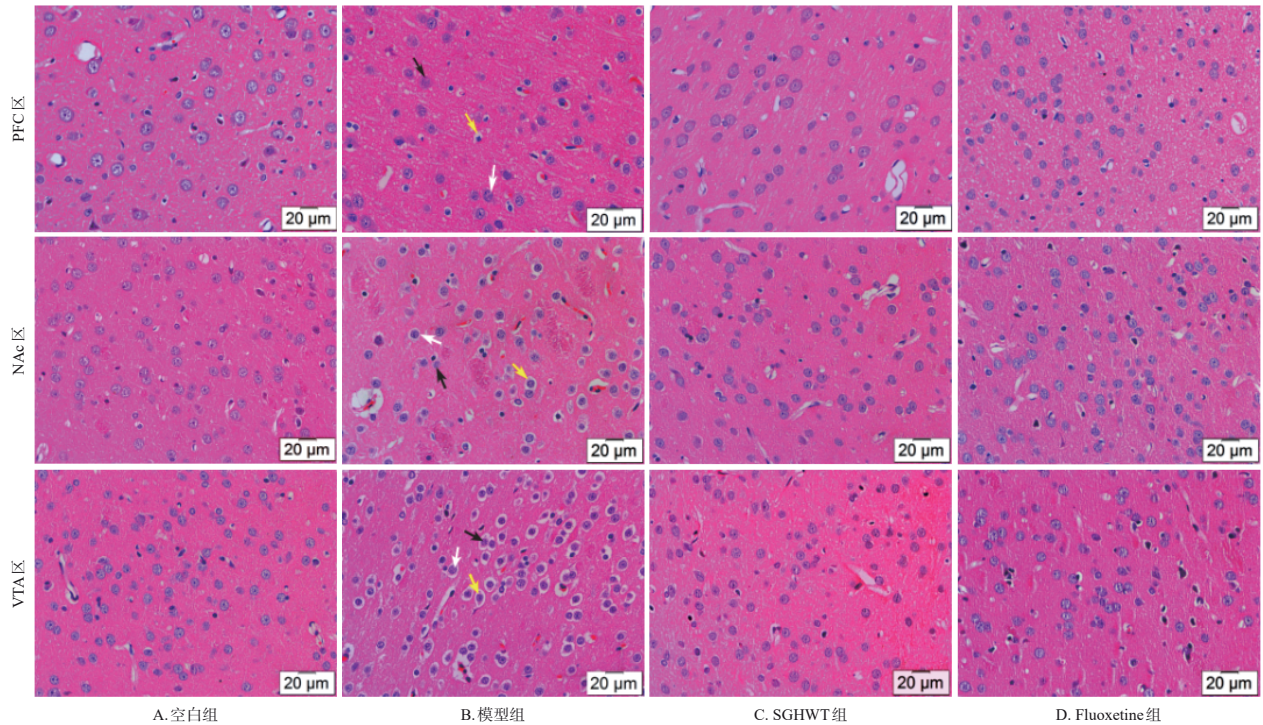
表1 SGHWT对抑郁大鼠体重及行为学的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	体重/g	糖水偏好率/%	总移动距离/cm	穿越中心次数	不动时间/s
空白组	412.33±30.89	88.15±5.10	1 311.30±432.15	46.67±20.02	153.78±32.72
模型组	326.99±17.08 ^a	65.41±13.64 ^a	461.37±197.20 ^a	5.17±2.85 ^a	212.23±33.23 ^a
SGHWT-L组	343.71±12.28 ^b	84.06±7.71 ^b	1 294.15±471.91 ^b	46.50±20.62 ^b	163.34±40.66 ^b
SGHWT-M组	356.07±15.98 ^b	85.40±7.91 ^b	1 430.37±389.40 ^b	71.67±36.70 ^b	145.52±20.31 ^b
SGHWT-H组	338.56±17.20 ^b	64.72±21.89	1 033.87±426.16 ^b	34.42±23.34 ^b	160.60±31.07 ^b
氟西汀组	356.63±19.65 ^b	80.58±10.10 ^b	872.59±433.63 ^b	26.08±23.02 ^b	176.05±29.57 ^b

a: 与空白组相比, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$ 。

3.2 SGHWT对抑郁大鼠PFC-NAc-VTA神经环路组织形态学的影响

空白组大鼠3个脑区的神经元细胞排列均较为整齐, 结构完整, 形态充盈。与空白组相比, 模型组大鼠3个脑区的神经元细胞部分溶解, 结构受损严重, 细胞形态萎缩, 细胞核偏移或溶解消失。与模型组相比, SGHWT组及氟西汀组大鼠3个脑区的神经元细胞均不同程度地恢复, 结构相对完整, 萎缩状况有所改善, 形态恢复至充盈状态。结果见图1。



黑色箭头: 溶解且结构受损的细胞; 黄色箭头: 萎缩的细胞; 白色箭头: 细胞核偏移或溶解消失的细胞。

图1 SGHWT对抑郁大鼠PFC-NAc-VTA神经环路组织形态学影响的显微图(HE染色)

3.3 SGHWT抗抑郁潜在机制挖掘与验证结果

3.3.1 代谢组学分析结果

(1)脑区组织代谢轮廓分析:由3个脑区QC样本总离子流图可知,各样本的出峰情况良好且高度重叠,表明仪器稳定性良好,所建方法具有一定的可靠性。由各组脑区样本的PCA得分图(图2A)可知,在正/负离子模式下,3个脑区QC样本均聚集良好,表明该检测系统稳定可靠;空白组、模型组、SGHWT组组间分离明显。由各组脑区样本的OPLS-DA得分图(图2B、2C)可知,空白组与模型组、模型组与SGHWT组组间分离明显;由200次置换检验分析结果可知,模型未出现过拟合,具有较好的预测能力和稳定性^[12]。这表明大鼠在造模及给药干预后,体内代谢物产生了明显变化,SGHWT能调节抑郁大鼠的体内代谢(限于篇幅,QC样本的总离子流图、负离子模式下的PCA得分图和OPLS-DA得分图、置换检验分析结果可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图1~3)。

(2)内源性差异代谢物挖掘:共鉴定出78个内源性差异代谢物,其中PFC区40个、NAc区35个、VTA区24个(各区有重复代谢物,故合计值>78),主要涉及氨基酸代谢、脂质代谢、鞘脂代谢等,部分代谢物信息见表2(限于篇幅,完整结果可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附表)。

(3)内源性差异代谢物富集分析:KEGG通路富集分析结果显示,内源性差异代谢物在PFC区主要富集于9条代谢通路,包括鞘脂代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨

表2 PFC-NAc-VTA神经环路内源性差异代谢物(部分)

代谢类型	代谢物示例	VIP	PFC区		NAc区		VTA区	
			A	B	A	B	A	B
氨基酸代谢	焦谷氨酸	1.16	—	—	↑	—	—	—
	谷氨酰胺	1.63	↑	↓	↑	—	—	—
	谷氨酸	1.54	↑	—	—	—	—	—
	γ-谷氨酰谷氨酸	1.55	↑	—	—	—	—	—
脂质代谢	亚油酸	1.35	↑	↓	↓	↑	—	—
	油酸	1.47	—	↓	↓	↑	—	—
	二十二碳六烯酸	1.33	↓	↑	↓	↑	—	↑
鞘脂代谢	神经氨酸	1.37	↑	—	—	—	—	—
	鞘氨醇	1.48	↓	—	—	↓	↑	↓
	二氢神经酰胺	1.75	—	↓	—	↑	—	—

A:与空白组相比,模型组中代谢物的变化趋势;B:与模型组相比,SGHWT组中代谢物的变化趋势;—:表达水平无明显变化;↑:表达水平上调;↓:表达水平下调。

酸代谢,精氨酸生物合成,氮代谢,嘌呤代谢,不饱和脂肪酸的生物合成,烟酸和烟酰胺代谢,组氨酸代谢,泛酸盐和辅酶A(coenzyme A, CoA)生物合成;在NAc区主要富集于4条代谢通路,包括不饱和脂肪酸的生物合成,鞘脂代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,核黄素代谢;在VTA区主要富集于6条代谢通路,包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸生物合成,柠檬酸循环,鞘脂代谢,不饱和脂肪酸的生物合成,亚油酸代谢。其中,PFC-NAc-VTA神经环路中鞘脂代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,不饱和脂肪酸的生物合成在给药前后均发生了显著变化,且以丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢为主($-\lg P$ 较大)。结果见图3。

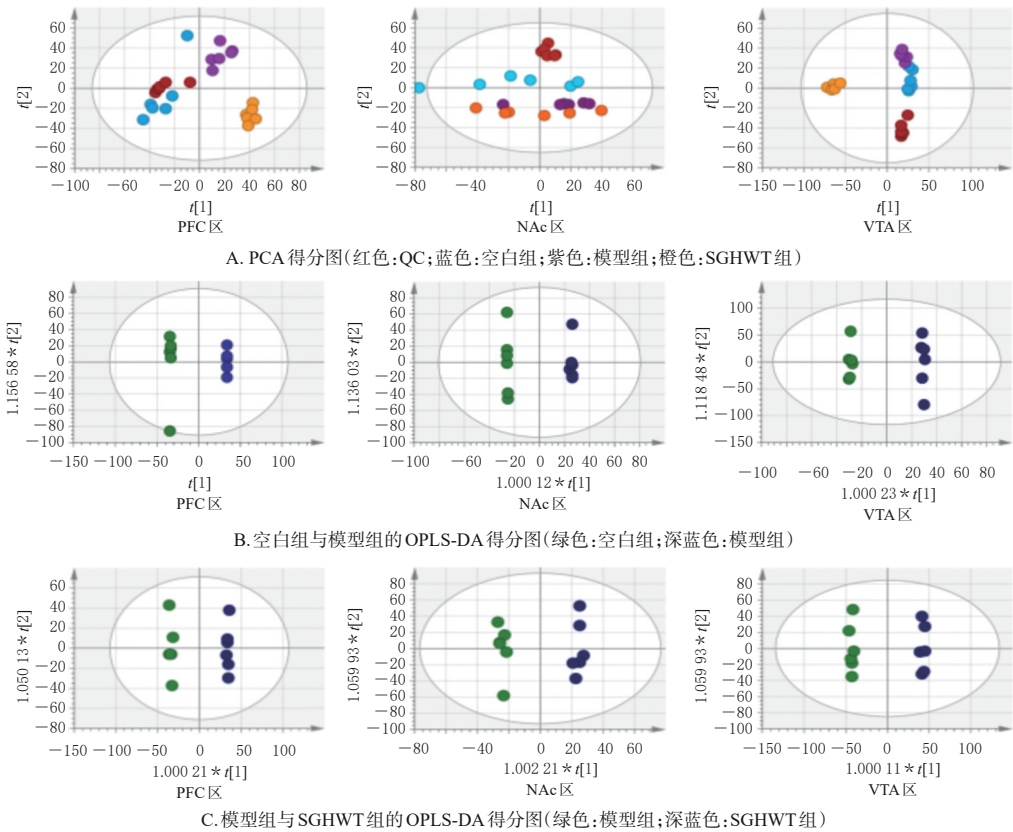


图2 各脑区组织代谢轮廓分析(正离子模式,n=6)

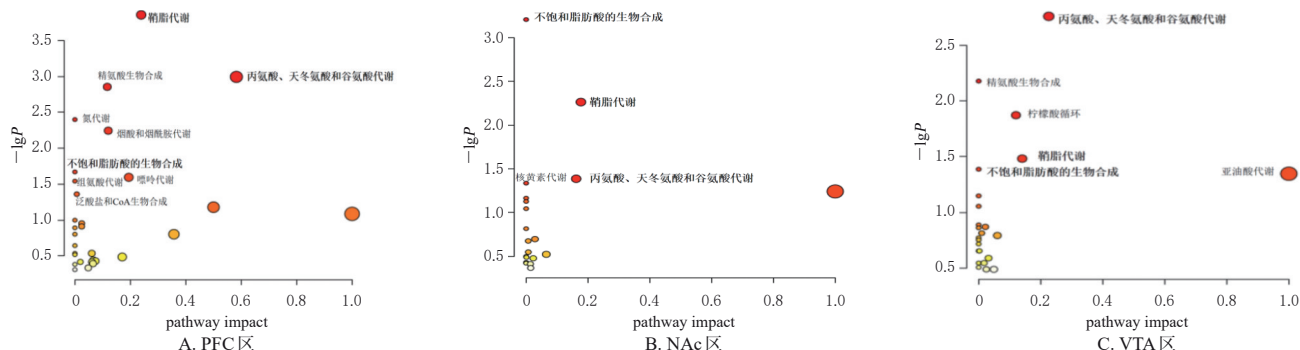


图3 内源性差异代谢物的KEGG通路富集分析气泡图

3.3.2 机制验证实验结果

根据上述代谢组学分析结果和PFC-NAc-VTA神经环路具体作用过程,本研究对丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢相关的NMDAR1/Akt/mTOR信号通路^[4]的蛋白表达情况进行了分析。结果显示,与空白组相比,模型组大鼠NAc区Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低,NMDAR1蛋白的表达显著上调($P<0.05$);与模型组相比,SGHWT组和氟西汀组大鼠NAc区Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著升高,NMDAR1蛋白的表达均显著下调($P<0.05$)。结果见表3、图4。

表3 SGHWT对抑郁大鼠NAc区NMDAR1/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR	NMDAR1/ β -actin
空白组	0.996 ± 0.010	0.892 ± 0.016	0.295 ± 0.013
模型组	0.833 ± 0.001^a	0.710 ± 0.033^a	0.366 ± 0.012^a
SGHWT组	0.994 ± 0.007^b	0.897 ± 0.014^b	0.283 ± 0.016^b
氟西汀组	1.018 ± 0.004^b	0.857 ± 0.039^b	0.296 ± 0.012^b

a: 与空白组相比, $P<0.05$;b: 与模型组相比, $P<0.05$ 。

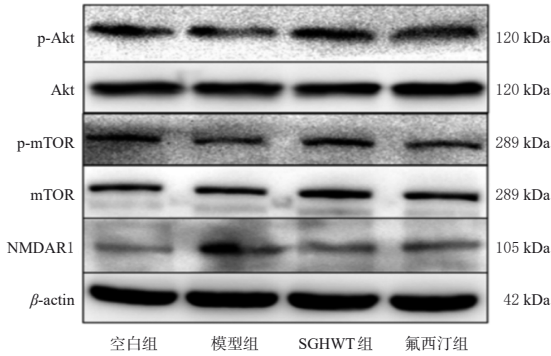


图4 SGHWT对抑郁大鼠NAc区NMDAR1/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达影响的电泳图

4 讨论

与正常动物相比,抑郁动物体内的内源性代谢物会发生显著变化,且已有研究通过代谢组学检测来筛选潜在的抑郁生物标志物^[13-14]。本研究通过行为学实验和组织形态学观察,初步证实SGHWT具有一定的抗抑郁作用。进一步的PFC-NAc-VTA神经环路代谢组学研究结果显示,SGHWT可通过调节PFC-NAc-VTA神经环路中的氨基酸类、脂肪酸类及其衍生物、鞘脂类等差异代

谢物的表达来发挥抗抑郁作用。KEGG通路富集结果表明,SGHWT主要通过调节PFC-NAc-VTA神经环路中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,鞘脂代谢,不饱和脂肪酸的生物合成这3条代谢通路来发挥抗抑郁作用。其中,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路的变化最为显著,且该代谢通路中的焦谷氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸及 γ -谷氨酰谷氨酸等均存在明显的组间差异。研究指出,谷氨酸是中枢神经系统重要的兴奋性神经递质,可参与突触的可塑性改变,在PFC-NAc-VTA神经环路中具有至关重要的作用^[15]。鞘脂代谢通路中的神经氨酸、鞘氨醇、二氢神经酰胺等均属于鞘脂类化合物,可参与增殖、分化、凋亡等多种细胞过程,其代谢与抑郁的生理病理机制密切相关,主要涉及下丘脑-垂体-肾上腺轴激活、神经递质的运输与传递、神经变性、炎症发生等^[16],其中神经酰胺还是与抑郁大鼠行为学指标和血液指标相关的关键代谢物^[17]。脂质代谢通路中的二十二碳六烯酸、油酸、亚油酸等多不饱和脂肪酸可调节大脑中的神经发生、大脑发育、突触形成和神经炎症等多条信号通路,进而影响其生物学功能^[18]。亚油酸可参与调节凋亡、炎症反应以及线粒体生物发生等细胞过程,其摄入不足可引发神经病理学改变、神经精神疾病或造成代谢失衡等^[19]。由此可见,学者后续可基于PFC-NAc-VTA神经环路,通过丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,鞘脂代谢,多不饱和脂肪酸生物合成这3条代谢通路来进一步探究SGHWT的抗抑郁作用机制。

研究指出,NMDAR1是离子型谷氨酸受体的一种亚型,能与谷氨酸特异性结合,从而引发突触后神经元的兴奋反应,在神经可塑性和学习记忆等过程中发挥着关键作用^[15]。此外,谷氨酸浓度的异常升高会激活NMDAR1信号,从而下调Akt蛋白的磷酸化水平,进而抑制mTOR蛋白的激活,导致突触发生减少和树突萎缩,最终导致抑郁的发生发展^[20-21]。本课题组前期研究发现,PFC-NAc的LTD减弱会导致以NAc为核心的PFC-NAc-VTA神经环路失调,而LTD减弱可能与谷氨酸浓度的异常升高有关^[22]。由此本课题组结合上述文献推测,SGHWT基于PFC-NAc-VTA神经环路的抗抑郁

作用可能与NMDAR1/Akt/mTOR信号通路有关,即细胞外高浓度的谷氨酸可激活NAc区内的NMDAR1受体,进而抑制Akt/mTOR信号通路,从而导致GABA能神经元的突触可塑性受损,使得环路的投射效应减弱,进一步加重各脑区损伤,产生抑郁行为^[20-22]。为此,本研究结合代谢组学结果和PFC-NAc-VTA神经环路的具体作用过程,对NMDAR1/Akt/mTOR信号通路相关蛋白的表达进行了检测。结果显示,SGHWT可通过下调抑郁大鼠NAc区NMDAR1蛋白的表达,升高Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平来发挥抗抑郁作用。

综上所述,SGHWT可显著改善模型大鼠的抑郁样行为,减轻其PFC-NAc-VTA神经环路组织的病理损伤,上述作用可能与抑制NMDAR1蛋白表达、激活Akt/mTOR信号通路有关。

参考文献

- [1] ZHAO J L, JIANG W T, WANG X, et al. Exercise, brain plasticity, and depression[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(9): 885-895.
- [2] 孟丹华, 余楷杰, 孟晓莹, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(6): 48-57.
- [3] 王旭艳, 王鑫鑫, 冯振宇, 等. 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[J]. *中国药房*, 2023, 34(6): 671-677.
- [4] 刘松林, 陈雨, 许乐思, 等. 从抑郁症前额叶皮层-伏隔核-腹侧被盖区神经环路进行中医肝郁证研究的思路分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(12): 1511-1514.
- [5] 许乐思. 基于抑郁症PFC-NAc-VTA神经环路研究疏肝和胃汤的抗抑郁作用机制[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [6] 白琳, 王洋洋, 白静怡, 等. 中药治疗溃疡性结肠炎的代谢组学研究进展[J]. *中国药房*, 2023, 34(22): 2810-2816.
- [7] 朱靓婷, 桂西, 李琦, 等. 整合网络药理学与非靶向血清代谢组学探讨四逆散治疗抑郁症的作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(12): 1390-1397, 1404.
- [8] 陈新, 牟雄军, 刘昊, 等. 疏肝和胃汤及其物质部位组方对抑郁模型大鼠HPA轴和脑区神经递质的调控作用[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(10): 2305-2312.
- [9] LI Q, HU J J, QIU Z P, et al. Shuganhewitang ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors in rats through the PI3K/AKT/mTOR pathway: involvement of amino acids, glycerophospholipids, and energy metabolism[J]. *Chin Med*, 2023, 14(1): 13-55.
- [10] 李琦, 何地, 周密思, 等. 基于UPLC-MS/MS技术的疏肝

和胃汤干预慢性应激大鼠肝脏代谢组学分析[J]. *沈阳药科大学学报*, 2024, 41(6): 686-698.

- [11] DU S Y, CHEN X, REN R M, et al. Integration of network pharmacology, lipidomics, and transcriptomics analysis to reveal the mechanisms underlying the amelioration of AKT-induced nonalcoholic fatty liver disease by total flavonoids in vine tea[J]. *Food Funct*, 2024, 15(9): 5158-5174.
- [12] 高梦梦, 陈桢琳, 郝雅坤, 等. 大蓟提取物改善高胆固醇血症模型小鼠的代谢组学研究[J]. *中国药房*, 2023, 34(13): 1590-1595.
- [13] 吕梦, 王雅泽, 赵迪, 等. 基于粪便代谢组学技术的逍遥散抗抑郁作用机制研究[J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3482-3492.
- [14] 宫文霞, 宋亚鹏, 王艳丽, 等. 基于肝脏代谢组学的当归“活血解郁”作用机制研究[J]. *中草药*, 2023, 54(19): 6314-6322.
- [15] 李超, 李继安, 高振安, 等. 中医药调控谷氨酸治疗抑郁症的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(3): 133-141.
- [16] 杨文山, 王一晨, 王元博, 等. 脑内脂质代谢在抑郁症发生发展中作用的研究进展[J]. *大连医科大学学报*, 2022, 44(3): 239-243.
- [17] 徐少华. 当归“养血”与“解郁”功效的相关性剖析及鞘脂代谢调节机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2023.
- [18] 王潇潇, 孙辰辉, 孙祥虹, 等. ω -3脂肪酸在抑郁障碍中的研究进展[J]. *国际精神病学杂志*, 2022, 49(6): 970-972.
- [19] KIM O Y, SONG J. Important roles of linoleic acid and α -linolenic acid in regulating cognitive impairment and neuropsychiatric issues in metabolic-related dementia[J]. *Life Sci*, 2024, 337: 122356.
- [20] REN L. The mechanistic basis for the rapid antidepressant-like effects of ketamine: from neural circuits to molecular pathways[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2024, 129: 110910.
- [21] WANG X, ZOU Z L, SHEN Q Q, et al. Involvement of NMDA-AKT-mTOR signaling in rapid antidepressant-like activity of Chaihu-jia-longgu-muli-tang on olfactory bulbectomized mice[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1537.
- [22] CHEN X, MA Y C, MOU X J, et al. Synergistic effect of several neurotransmitters in PFC-NAc-VTA neural circuit for the anti-depression effect of Shuganhewitang in a chronic unpredictable mild stress model[J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(3): 1934578X211002415.

(收稿日期: 2024-10-21 修回日期: 2025-03-31)

(编辑: 张元媛)