

温阳解郁颗粒调控 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路对大鼠的抗抑郁作用机制研究^Δ

孟霜^{1,2*}, 赵杰^{1,2}, 王鑫鑫^{1,2}, 谭丹丹³, 周晓荣^{1,2}, 孙慧敏^{1,2}, 马小娟^{1,2}, 冯振宇^{1,2#} (1. 山西省中西医结合医院中心实验室, 太原 030013; 2. 经方扶阳山西省重点实验室, 太原 030013; 3. 宁远县中医院脾胃科, 湖南永州 425699)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)11-1440-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.11.10



摘要 **目的** 通过NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)/凋亡相关斑点样蛋白质(ASC)/胱天蛋白酶1(Caspase-1)通路探讨温阳解郁颗粒的抗抑郁作用机制。**方法** 采用慢性不可预知温和应激(CUMS)结合孤养的方法构建抑郁大鼠模型,造模持续42 d。实验设置空白组、模型组、MCC950(NLRP3炎症小体抑制剂)组(10 mg/kg)、氟西汀组(阳性对照,2.08 mg/kg)和温阳解郁颗粒低、高剂量组(3.78、7.56 g/kg),每组10只。从实验第22天起,氟西汀组和温阳解郁颗粒低、高剂量组大鼠灌胃相应浓度药物并腹腔注射等体积生理盐水,MCC950组大鼠腹腔注射相应浓度MCC950并灌胃等体积蒸馏水,空白组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水并腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续21 d。每周进行1次行为学考察。末次给药后,检测大鼠海马组织中ASC、离子钙结合适配器分子1(Iba1)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18含量以及NLRP3、分化簇68(CD68)、Caspase-1、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白表达情况和神经元凋亡情况。**结果** 末次给药后,与模型组比较,温阳解郁颗粒高剂量组大鼠旷场活动时间显著延长($P<0.05$),新环境进食潜伏期显著缩短($P<0.05$);海马组织中ASC、Iba1、IL-1 β 、IL-18含量以及NLRP3、Caspase-1、CD68蛋白表达和神经元凋亡阳性率均显著降低/下调($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达显著上调($P<0.05$),神经元凋亡阳性细胞密度显著减小($P<0.05$)。**结论** 温阳解郁颗粒通过抑制NLRP3/ASC/Caspase-1通路,减轻小胶质细胞介导的神经炎症,抑制海马神经元凋亡,从而发挥抗抑郁作用。

关键词 温阳解郁颗粒;抑郁症;NLRP3炎症小体;凋亡相关斑点样蛋白;胱天蛋白酶1;神经炎症;神经元

Mechanism of Wenyang jieyu granules regulating NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway on antidepressant effect in rats

MENG Shuang^{1,2}, ZHAO Jie^{1,2}, WANG Xinxin^{1,2}, TAN Dandan³, ZHOU Xiaorong^{1,2}, SUN Huimin^{1,2}, MA Xiaojuan^{1,2}, FENG Zhenyu^{1,2} (1. Central Laboratory, Shanxi Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taiyuan 030013, China; 2. Shanxi Key Laboratory of Fuyang with Classical Prescriptions, Taiyuan 030013, China; 3. Dept. of Spleen and Stomach Diseases, Ningyuan County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan Yongzhou 425699, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the antidepressant mechanism of Wenyang jieyu granules (WYJYG) via the NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)/Caspase-1 pathway. **METHODS** A rat model of depression was established by chronic unpredictable mild stress combined with single-housing for 42 consecutive days. The experiment set up blank group, model group, MCC950 (NLRP3 inflammasome inhibitor) group (10 mg/kg), fluoxetine group (positive control, 2.08 mg/kg), low-dose WYJYG (3.78 g/kg) and high-dose WYJYG group (7.56 g/kg), with 10 rats in each group. From the 22nd day of the experiment, rats in the fluoxetine group, low-

dose and high-dose WYJYG groups were intragastrically administered with the corresponding drugs and intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. Rats in the MCC950 group were intraperitoneally injected with MCC950 at the corresponding concentration and intragastrically administered with an equal volume of distilled water. Rats in the blank group and model group were given an equal volume

Δ基金项目 山西省中医药管理局科研课题(No.2023ZYA020); 经方扶阳山西省重点实验室项目(No.202504010931053); 山西省中医药管理局科研课题(No.2023ZYA2006); 山西省卫生健康委科研课题(No.2024132)

* 第一作者 副主任药师, 硕士。研究方向: 药效物质基础。
E-mail: mengzhaoshuang@126.com

通信作者 主任医师, 硕士。研究方向: 中医内科。E-mail: sxzfz@163.com

of distilled water by gavage and an equal volume of normal saline by intraperitoneal injection. All interventions were performed once a day for 21 consecutive days. Behavioral tests were conducted once a week. After the last administration, the contents of ASC, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-18 in hippocampal tissues were detected. The protein expressions of NLRP3, cluster of differentiation 68 (CD68), Caspase-1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein were determined, and neuronal apoptosis was observed. **RESULTS** After the last administration, compared with the model group, the open-field activity time was significantly prolonged ($P<0.05$), and the latency to feed in a novel environment was significantly shortened ($P<0.05$) in rats of the high-dose WYJYG group. In hippocampal tissue, the contents of ASC, Iba1, IL-1 β , and IL-18, as well as the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and CD68, and the positive rate of neuronal apoptosis were all significantly decreased/downregulated ($P<0.05$). Bcl-2 protein expression was significantly upregulated ($P<0.05$), and the density of neuronal apoptosis-positive cells was significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** WYJYG play on antidepressant role by inhibiting the NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway, reducing microglia-mediated neuroinflammation, and inhibiting hippocampal neurons apoptosis.

KEYWORDS Wenyang jieyu granules; depression; NLRP3 inflammasome; ASC; Caspase-1; neuroinflammation; neurons

抑郁症是一种常见的精神障碍类疾病,以持续的情绪低落为主要特征。由于生活压力、就业环境等多方面的影响,抑郁症的发病率逐年上升^[1]。目前常用的抗抑郁药物有舍曲林、帕罗西汀、艾司西酞普兰等,但上述药物的不良反应(如恶心、口干、头晕等)较多,给患者带来了显著困扰。因此,探索其他安全的抗抑郁药物迫在眉睫。

抑郁症的发病原因和发病机制尚不明确。现代医学研究发现,慢性应激是抑郁症发生的重要诱因之一,中枢神经系统的低度慢性炎症(即神经炎症)已被证实发生在抑郁症的发生发展中起着关键作用^[2]。小胶质细胞作为大脑免疫系统的第一道防线,维持着大脑神经细胞的内环境稳态。研究显示,慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)可激活小胶质细胞,进而上调NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体的表达与活化^[3]。NLRP3炎症小体被激活后,可招募凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC),继而通过ASC招募并激活胱天蛋白酶1(Caspase-1);活化的Caspase-1将细胞因子前体如白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-18切割成生物活性形式,最终引发神经炎症,损伤神经元功能及突触可塑性,导致抑郁症的发生发展^[4-5]。因此,靶向NLRP3/ASC/Caspase-1通路、抑制神经炎症,已成为抗抑郁药物机制研究的新方向。

温阳解郁颗粒是山西省中西医结合医院赵杰教授根据清末郑钦安所著《医法圆通》中补坎益离丹进行化裁,并采用现代化工艺制备而成,具有温阳助肾、开郁安神的功效,临床上主要用于治疗抑郁症,疗效显著^[6]。本

课题组前期基础研究发现,温阳解郁颗粒可抑制神经元凋亡,促进神经元增殖分化^[7-8]。然而,温阳解郁颗粒抗抑郁的机制尚不完全清楚。因此,本研究拟在前期研究基础上,通过CUMS结合孤养的方法建立大鼠抑郁模型,以NLRP3/ASC/Caspase-1通路介导的神经炎症为切入点,进一步阐明其抗抑郁的分子机制,从而为温阳解郁颗粒的临床应用提供更坚实的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:TM-Vision型行为学实验系统(成都泰盟软件有限公司),DYY-6D型电泳仪、1624DN-19型制胶器(北京六一生物科技有限公司),IAS-500型多色荧光及化学发光凝胶成像系统(北京莱普特科学仪器有限公司),Nikon Eclipse C1型正置荧光显微镜、Nikon DS-U3型成像系统、D5100型数码相机(日本Nikon公司),BT25S型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],FRESCO-17型低温高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 主要药品与试剂

温阳解郁颗粒(批号20220516,规格8 g/袋)由山西省中西医结合医院提供;盐酸氟西汀胶囊(批号23380A,规格20 mg)购自礼来苏州制药有限公司;NLRP3炎症小体抑制剂MCC950(批号S780909,纯度99%)购自美国Selleck Chemicals公司;兔抗NLRP3、Caspase-1、B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、分化簇68(cluster of differentiation 68, CD68)抗体(批号分别为ab263899、ab307560、ab196495、ab32503、ab178846)均购自英国Abcam公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G

(IgG)二抗(批号分别为AP0060、BS13278)均购自美国BioWorld公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号AB0037)购自上海埃必威生物技术有限公司;离子钙结合适配器分子1(ionized calcium binding adaptor molecule 1,Iba1)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(批号RA22385)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;IL-1 β 、IL-18、ASC ELISA 试剂盒(批号分别为23110124R、23110124R、F40467-B)均购自上海泛柯实业有限公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、广谱蛋白 Marker(批号分别为2306001、2308001、2308001)均购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(批号11684817910)购自瑞士 Roche 公司;DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片剂(批号分别为C1002、P0126)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,6 周龄,体重(200 ± 20) 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)2021-0011。动物购入后,饲养于山西中医药大学实验动物中心,饲养环境室温为 24℃、12 h 光照/12 h 昼夜循环、空气流通。本研究已得到山西省中西医结合医院医学伦理委员会审核批准(伦理审批号:KYLL-2023-018)。

2 方法

2.1 大鼠抑郁模型建立

将 60 只大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为空白组(10 只)和造模组(50 只)。空白组大鼠(一笼 5 只,共 2 笼)自由饮水、摄食,不接受任何应激刺激;造模组大鼠采用 CUMS 结合孤养的方法建立抑郁模型^[9-10]。CUMS 方式包括:禁食 24 h、禁水 24 h、4℃冰水游泳 5 min、持续光照 24 h、45°大鼠笼倾斜 24 h、昼夜颠倒 24 h、湿笼 24 h、夹尾 10 min、水平振荡 10 min、100 dB 噪声持续刺激 12 h、剥夺垫料 24 h、45℃热水浴 10 min、悬尾 5 min。每天随机选取 1 种应激方法对大鼠进行刺激,使其无法预料刺激的发生。造模持续 42 d,造模期间每周进行 1 次行为学考察(每周的最后 2 d 开展研究)。造模 3 周(21 d)后,通过分析发现,与空白组比较,造模组大鼠旷场活动时间显著缩短、新环境进食潜伏期显著延长,说明造模成功^[11]。因此,本研究从实验第 22 天开始,边造模边给药。

2.2 动物分组与给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、氟西汀组(阳性对照,2.08 mg/kg,为临床等效剂量)、温阳解郁颗粒

低、高剂量组(3.78、7.56 g/kg,分别为 1、2 倍临床等效剂量),MCC950 组(10 mg/kg)^[12],每组 10 只。氟西汀组和温阳解郁颗粒低、高剂量组大鼠灌胃相应浓度药物并腹腔注射等体积生理盐水,MCC950 组大鼠每天腹腔注射相应浓度的 MCC950 并灌胃等体积蒸馏水,空白组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水并腹腔注射等体积生理盐水,每天 1 次,连续 21 d。

2.3 行为学考察

2.3.1 旷场活动时间测定

在每周六给药 1 h 后,通过旷场实验进行检测。将大鼠放于长、宽、高均为 60 cm 的箱体中间,摄像机观察大鼠的活动情况,并用 TM-Vision 行为学实验系统记录大鼠在 5 min 内的活动时间(即旷场活动时间)。实验时需保持环境安静。每次实验结束后,为了避免排泄物的臭味及其他因素影响实验结果,必须将箱体完全清洗干净后,再取另一只大鼠进行实验。

2.3.2 新环境进食潜伏期测定

旷场实验结束后的第二天进行新环境进食抑制实验。实验开始前大鼠禁食 24 h。实验时,在长、宽、高均为 60 cm 的实验箱底中央的一小块白纸上放置少许食物,将大鼠放入实验箱一角,记录每只大鼠从放入到进食的时间(即新环境进食潜伏期),观察总时间为 5 min。如果大鼠在规定时间内还没有进食,则将新环境进食潜伏期记为 5 min。每只大鼠检测结束后,需在实验箱中喷洒 75% 乙醇,避免上一只大鼠留下的气味影响下一只大鼠的检测。

2.4 样本采集与处理

在最后一次行为学检测结束后,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液将大鼠麻醉,再腹主动脉采血。将血样静置 1~2 h,然后以 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,置于-80℃冰箱中冻存,备用。

采血后,处死大鼠,迅速在冰上小心剥离其大脑。将大脑沿正中矢状面切开,分为左右 2 个半球。将其中一个大脑半球置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,常规制备石蜡切片(厚 4 μ m),备用;将另一个大脑半球中的海马组织分离出来,置于液氮中迅速冷冻,待全部取材完成后,再将海马组织移至-80℃冰箱中保存,备用。

2.5 海马组织中小胶质细胞炎症相关指标含量检测

取“2.4”项下冻存的海马组织,采用 ELISA 法检测海马组织中 ASC、Iba1、IL-1 β 、IL-18 含量。具体操作严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.6 海马组织中炎症与凋亡相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取“2.4”项下冻存的海马组织,加入蛋白裂解液提取组织中总蛋白,采用 BCA 法

检测蛋白浓度后进行变性处理。取变性后蛋白上样进行电泳(恒压110 V,电泳时间30 min)、转膜(转膜时间为60或90 min)、封闭1 h处理后,加入NLRP3、Caspase-1、Bcl-2、Bax、CD68抗体(稀释比例均为1:500)和GAPDH或 β -actin内参(稀释比例均为1:1 000),4℃封闭过夜;次日加入二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育1 h;洗膜后,使用ECL发光液显影。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH或 β -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.7 海马组织中小胶质细胞标志物 Iba1 表达检测

取“2.4”项下石蜡切片进行脱蜡、水化以及经pH6.0柠檬酸盐溶液抗原修复、Iba1一抗4℃孵育过夜、二抗室温孵育50 min后,滴加DAPI染色液室温避光孵育10 min;将切片甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片,然后将切片置于荧光显微镜下观察并采集图像,评估海马组织中小胶质细胞活化状态,并计算Iba1阳性率和Iba1阳性细胞密度。DAPI染色后的细胞核呈蓝色,Iba1阳性表达呈绿色荧光。Iba1阳性率=阳性细胞数/细胞总数×100%;Iba1阳性细胞密度=阳性细胞数/待测组织面积。

2.8 海马组织中神经元凋亡情况检测

取“2.4”项下石蜡切片进行脱蜡、水化以及经蛋白酶K工作液修复、破膜工作液孵育20 min后,加入TUNEL反应液并在37℃恒温箱中孵育2 h,再滴加DAPI染色液避光孵育10 min。将切片甩干后,用抗荧光淬灭封片剂封片,然后置于荧光显微镜下观察并采集图像,计算神经元凋亡阳性率和神经元凋亡阳性细胞密度。神经元凋亡阳性细胞呈绿色荧光。神经元凋亡阳性率=神经元凋亡阳性细胞数/细胞总数×100%;神经元凋亡阳性细胞密度=神经元凋亡阳性细胞数/待测组织面积。

2.9 统计学方法

采用SPSS 24.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;方差齐性时,两组间比较采用LSD检验;方差不齐性时,两组间比较采用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 行为学考察结果

实验第42天时,与空白组比较,模型组大鼠旷场活动时间显著缩短($P<0.05$),新环境进食潜伏期显著延长($P<0.05$);与模型组比较,除温阳解郁颗粒低剂量组外其余各组大鼠旷场活动时间均显著延长($P<0.05$),各组大鼠新环境进食潜伏期均显著缩短($P<0.05$)。结果见表1。

表1 实验第42天时各组大鼠的旷场活动时间、新环境进食潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	旷场活动时间	新环境进食潜伏期
空白组	145.00±9.70	62.17±18.32
模型组	95.77±6.09 ^a	300.00±0.00 ^a
温阳解郁颗粒低剂量组	68.57±9.38 ^b	85.20±33.52 ^b
温阳解郁颗粒高剂量组	151.40±4.52 ^b	121.20±19.75 ^b
氟西汀组	146.50±5.13 ^b	138.80±19.33 ^b
MCC950组	116.70±2.33 ^b	236.20±19.33 ^b

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

3.2 海马组织中小胶质细胞炎症相关指标含量测定结果

与空白组比较,模型组大鼠海马组织中ASC、Iba1、IL-1 β 、IL-18含量均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠海马组织中ASC、Iba1含量以及除温阳解郁颗粒低剂量组外其余各组大鼠海马组织中IL-1 β 含量和除氟西汀组外其余各组大鼠海马组织中IL-18含量均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

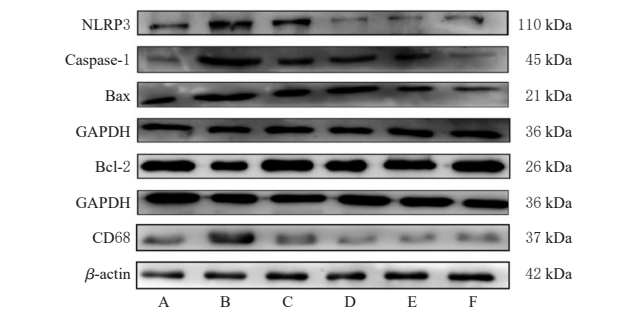
表2 各组大鼠海马组织中小胶质细胞炎症相关指标含量比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	ASC	Iba1	IL-1 β	IL-18
空白组	814.60±85.37	2 128.75±404.75	32.40±2.51	114.25±8.18
模型组	1 186.20±99.64 ^a	2 978.25±327.30 ^a	36.20±0.84 ^a	138.50±7.85 ^a
温阳解郁颗粒低剂量组	818.75±89.00 ^b	2 152.83±546.38 ^b	35.60±0.55	114.50±7.29 ^b
温阳解郁颗粒高剂量组	911.50±136.65 ^b	2 110.80±635.30 ^b	31.80±2.39 ^b	114.50±13.20 ^b
氟西汀组	811.40±93.45 ^b	2 195.25±581.75 ^b	32.00±1.22 ^b	133.33±7.64
MCC950组	926.75±124.66 ^b	2 248.20±486.10 ^b	29.40±2.41 ^b	117.00±7.00 ^b

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

3.3 海马组织中炎症与凋亡相关蛋白表达测定结果

与空白组比较,模型组大鼠海马组织中NLRP3、Caspase-1、Bax、CD68蛋白表达均显著上调($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达显著下调($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠海马组织中NLRP3、Caspase-1、Bax、CD68蛋白表达(温阳解郁颗粒低剂量组NLRP3及温阳解郁颗粒高剂量组Bax结果除外)均显著下调($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图1、表3。



A:空白组;B:模型组;C:温阳解郁颗粒低剂量组;D:温阳解郁颗粒高剂量组;E:氟西汀组;F:MCC950组。

图1 各组大鼠海马组织中炎症与凋亡相关蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠海马组织中炎症与凋亡相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NLRP3/GAPDH	Caspase-1/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	CD68/ β -actin
空白组	0.32±0.08	0.25±0.08	0.85±0.07	0.49±0.08	1.16±0.40
模型组	0.78±0.04 ^a	1.14±0.09 ^a	0.34±0.04 ^a	1.52±0.38 ^a	2.88±0.53 ^a
温阳解郁颗粒低剂量组	0.66±0.08	0.49±0.06 ^b	1.54±0.17 ^b	0.65±0.11 ^b	1.66±0.39 ^b
温阳解郁颗粒高剂量组	0.59±0.08 ^b	0.66±0.22 ^b	1.38±0.24 ^b	1.42±0.14	1.03±0.17 ^b
氟西汀组	0.41±0.08 ^b	0.28±0.16 ^b	0.92±0.10 ^b	0.40±0.11 ^b	1.38±0.48 ^b
MCC950组	0.37±0.04 ^b	0.27±0.11 ^b	0.70±0.11 ^b	0.41±0.14 ^b	1.23±0.62 ^b

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

3.4 海马组织中小胶质细胞标志物 Iba1 表达测定结果

与空白组比较,模型组大鼠海马组织中小胶质细胞的体积增大,分支变得粗短,呈现“阿米巴样”形状,Iba1 阳性率显著升高($P<0.05$),Iba1 阳性细胞密度显著增大($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠海马组织中小胶质细胞的体积变小,分支变得细长,趋近于静息状态下的形态,Iba1 阳性率(氟西汀组和MCC950组除外)均显著降低($P<0.05$),Iba1 阳性细胞密度(温阳解郁颗粒高剂量组和氟西汀组除外)均显著减小($P<0.05$)。结果见表4、图2。

表4 各组大鼠海马组织中 Iba1 表达及神经元凋亡情况比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Iba1 阳性率/%	Iba1 阳性细胞密度	神经元凋亡阳性率/%	神经元凋亡阳性细胞密度
空白组	39.30±3.69	1.09±0.28	0.61±0.21	0.017±0.005
模型组	58.41±4.78 ^a	2.16±0.24 ^a	7.24±1.46 ^a	0.214±0.110 ^a
温阳解郁颗粒低剂量组	37.81±6.61 ^b	1.52±0.62 ^b	2.09±0.56	0.081±0.096
温阳解郁颗粒高剂量组	42.62±5.87 ^b	1.83±0.07	0.75±0.16 ^b	0.037±0.024 ^b
氟西汀组	44.57±2.51	1.63±0.32	1.09±0.40 ^b	0.031±0.005 ^b
MCC950组	44.19±6.05	1.20±0.12 ^b	1.44±1.50 ^b	0.047±0.038 ^b

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

3.5 海马神经元凋亡情况检测结果

与空白组比较,模型组大鼠海马组织中神经元凋亡阳性率显著升高($P<0.05$),神经元凋亡阳性细胞密度显著增大($P<0.05$)。与模型组比较,温阳解郁颗粒高

剂量组、氟西汀组和MCC950组大鼠海马组织中神经元凋亡阳性率均显著降低($P<0.05$),神经元凋亡阳性细胞密度均显著减小($P<0.05$)。结果见表4、图3。

4 讨论

当机体受到致炎物质刺激时,免疫系统被激活并分泌大量炎症因子。这些炎症因子作用于中枢神经系统,引发神经炎症,进而导致神经递质释放异常、神经内分泌功能紊乱、突触可塑性受损^[13-14]。在中枢神经系统中,炎症因子主要来源于小胶质细胞。该类细胞在维持中枢神经系统稳态中发挥核心作用,参与调节神经元存活与突触可塑性;当中枢神经系统受损或稳态紊乱时,小胶质细胞被激活并分泌炎症因子,进而启动免疫应答与损伤调控反应;但长期暴露于应激事件会过度激活小胶质细胞,使其分泌大量炎症因子、趋化因子及活性氧,启动炎症级联反应,放大炎症信号,进而损伤正常组织和细胞,加剧神经炎症^[15-16]。

MCC950是一种二芳基磺酰脲化合物,可与NLRP3的NACHT结构域中Walker B基序直接结合,阻止腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)水解,有效抑制NLRP3蛋白的ATP酶活性,并间接调控硫氧还蛋白相互作用蛋白-NLRP3信号轴,从而选择性阻断NLRP3炎症小体的活化,抑制NLRP3蛋白的生成,是NLRP3炎症小体特异性抑制剂^[17]。旷场活动时间和新环境进食潜伏期可直观反映大鼠自主活动能力、探究行为及情绪状态,是评价抑郁样行为最经典的行为学指标^[18]。炎症小体是小胶质细胞介导神经炎症的关键响应者,由NLRP3炎症小体介导的NLRP3/ASC/Caspase-1信号轴是炎症反应的核心通路^[19]。其中,NLRP3炎症小体由NLRP3、ASC和pro-Caspase-1在胞内组装形成,其组装是激活该通路的核心环节^[20]。IL-1 β 和IL-18是NLRP3炎症小体

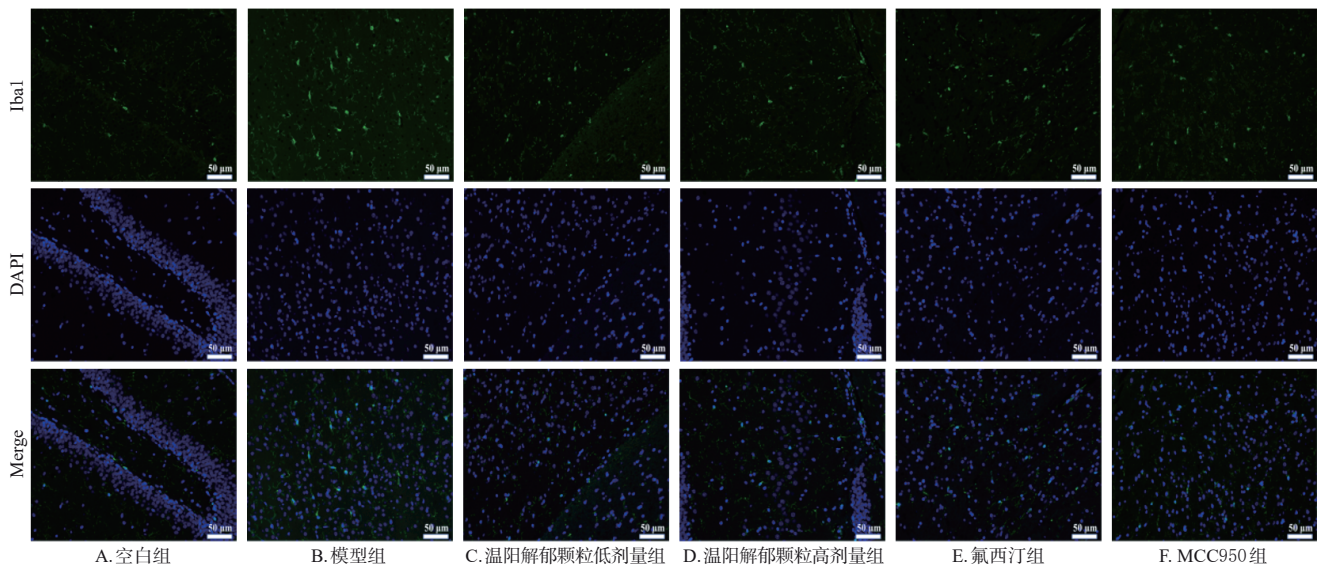


图2 各组大鼠海马组织中 Iba1 表达的观察结果(免疫荧光法)

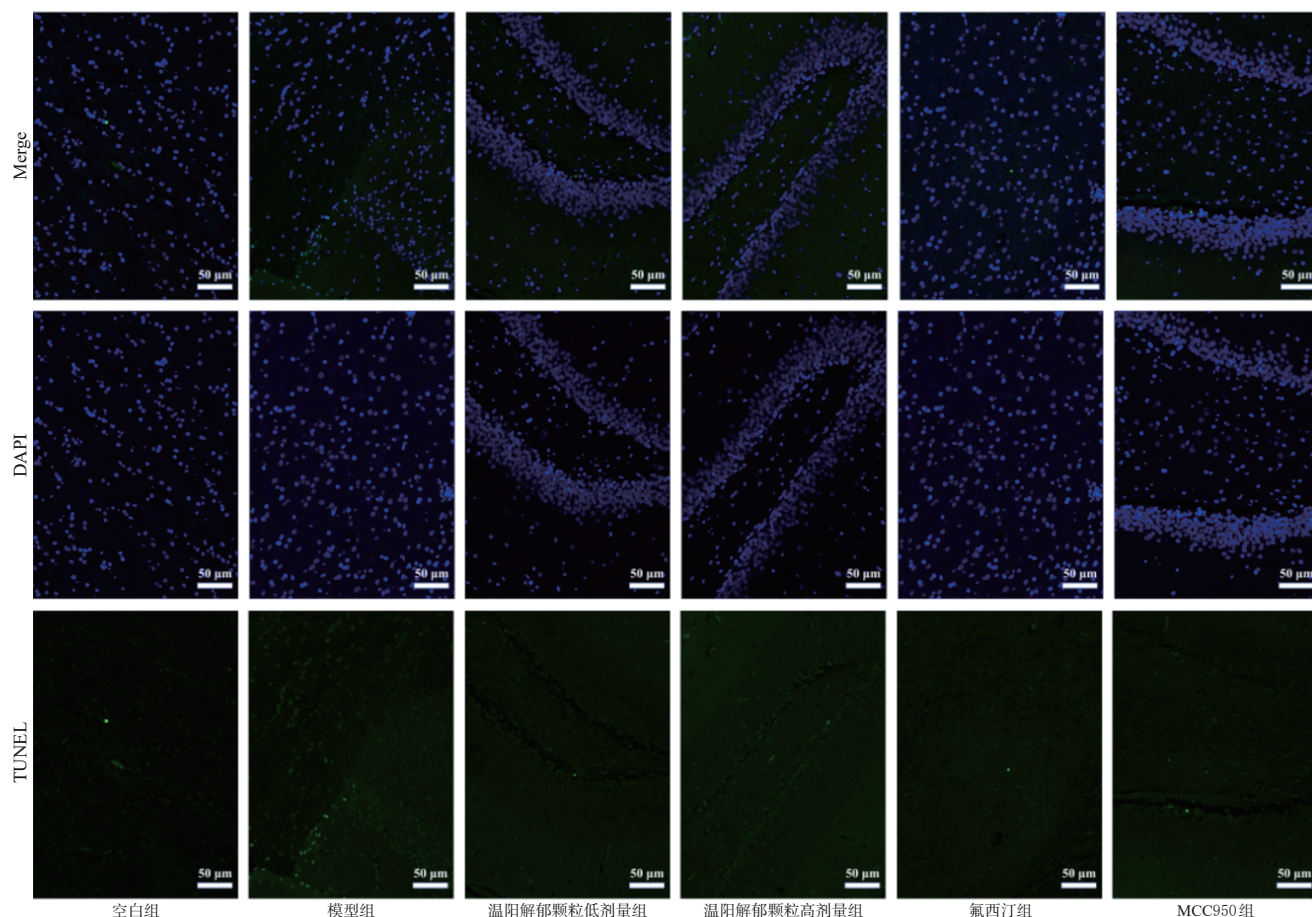


图3 各组大鼠海马组织中神经元凋亡检测图(TUNEL染色)

活化的核心下游促炎因子,主要由激活的小胶质细胞释放,可协同放大神经炎症、损伤神经可塑性并诱导抑郁样行为,其水平升高是抑郁症神经免疫紊乱的关键生化特征^[21]。本研究发现,温阳解郁颗粒、MCC950均能明显延长抑郁模型大鼠旷场活动时间、缩短新环境进食潜伏期。且温阳解郁颗粒干预后,能显著下调抑郁模型大鼠海马组织中NLRP3、ASC、Caspase-1的表达,同时减少下游炎症因子IL-1 β 和IL-18的释放,且与MCC950的作用一致。该结果表明,温阳解郁颗粒具有明显的抗抑郁作用,其抗抑郁的机制可能与抑制NLRP3/ASC/Caspase-1通路的过度活化,进而遏制神经炎症的启动与扩散有关。

小胶质细胞是中枢神经系统中NLRP3炎症小体的免疫细胞,其活化状态直接决定了炎症反应的发生与否^[22]。在生理状态下,小胶质细胞呈静息状态;病理状态下,中枢神经微环境系统被打破,启动炎症级联反应。Iba1是小胶质细胞的特异性标志物,其表达上调反映小胶质细胞的增殖与活化;CD68则是活化吞噬性小胶质细胞的标志物^[23]。小胶质细胞具有形态可塑性,胞体大小及突起分支等形态学改变可作为判断小胶质细胞神经免疫活化状态的重要形态学指标^[24]。本研究发现,温

阳解郁颗粒干预后,抑郁模型大鼠海马组织中Iba1和CD68的表达显著下调;Iba1阳性率及Iba1阳性细胞密度显著降低/减小;小胶质细胞的体积变小,分支变得细长。这表明温阳解郁颗粒能够抑制小胶质细胞的异常活化,进而抑制NLRP3炎症小体的活化,减少炎症反应的发生。

神经炎症可导致线粒体功能障碍,触发内源性细胞凋亡。Bcl-2家族蛋白在调控线粒体凋亡过程中起关键作用:Bax促凋亡,Bcl-2抗凋亡^[25]。本研究发现,模型组大鼠海马组织中Bax表达水平升高、Bcl-2表达水平降低,TUNEL染色结果同样显示该组大鼠海马区神经元凋亡阳性率及神经元凋亡阳性细胞密度显著升高/增加;温阳解郁颗粒干预后,有效逆转了上述指标的变化。这表明温阳解郁颗粒能减少神经炎症介导的神经元损失,起到神经保护作用。

综上,温阳解郁颗粒通过抑制NLRP3/ASC/Caspase-1通路,减轻小胶质细胞介导的神经炎症,抑制海马神经细胞凋亡,从而发挥对模型大鼠的抗抑郁作用。温阳解郁颗粒的具体活性成分及其他潜在作用机制有待进一步阐明。

参考文献

- [1] SHOREY S, NG E D, WONG C H J. Global prevalence of depression and elevated depressive symptoms among adolescents: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Clin Psychol*, 2022, 61(2): 287-305.
- [2] GHAFARIPOUR JAHROMI G, RAZI S, REZAEI N. NLRP3 inflammatory pathway. Can we unlock depression?[J]. *Brain Res*, 2024, 1822: 148644.
- [3] 何起臣, 金立强, 贾运涛, 等. 黄芩素通过TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路减轻抑郁症小鼠神经炎症的作用机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2026, 38(1): 46-53.
- [4] GAO L, QIN J X, SHI J Q, et al. Fine particulate matter exposure aggravates ischemic injury via NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(7): 1045-1058.
- [5] ROY S, ARIF ANSARI M, CHOUDHARY K, et al. NLRP3 inflammasome in depression: a review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 109916.
- [6] 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.
- [7] 马小娟, 孟霜, 冯振宇, 等. 温肾助阳法对慢性应激性抑郁症大鼠学习记忆功能及海马神经增殖分化功能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(1): 87-91.
- [8] 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.
- [9] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
- [10] MA H, LI C Y, WANG J P, et al. Amygdala-hippocampal innervation modulates stress-induced depressive-like behaviors through AMPA receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(6): e2019409118.
- [11] 魏宏文, 矫玮, 张有志, 等. 运动对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及体重的影响[J]. *体育学刊*, 2010, 17(11): 100-105.
- [12] 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NLRP3通路的免疫调节作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(24): 33-39.
- [13] IWATA M, OTA K T, DUMAN R S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 105-114.
- [14] MAYDYCH V. The interplay between stress, inflammation, and emotional attention: relevance for depression[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 384.
- [15] 施佳仪, 向韵, 周梓洋, 等. 逍遥散加味对青幼期抑郁模型大鼠抑郁行为及小胶质细胞活化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(5): 46-56.
- [16] 杜菊梅, 阮俊, 宋媛, 等. TRAF6对抑郁症大鼠海马区神经元细胞损伤和免疫紊乱的调节[J]. *局解手术学杂志*, 2021, 30(5): 379-384.
- [17] 罗一鸣, 宋静远, 杨忠金, 等. NLRP3炎症小体及其抑制剂在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. *药学报*, 2025, 60(11): 3396-3407.
- [18] LEE J S, KANG J Y, SON C G. A comparison of isolation stress and unpredictable chronic mild stress for the establishment of mouse models of depressive disorder[J]. *Front Behav Neurosci*, 2021, 14: 616389.
- [19] 张楠, 许二平, 陈玉龙. NLRP3炎症小体与抑郁症的关系及中医药的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(3): 186-193.
- [20] 张思远, 刘艳秋. NLRP3炎症小体调控小胶质细胞活化的机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(5): 865-871.
- [21] 张磊, 陈晨. NLRP3炎症小体介导IL-1 β 、IL-18释放在抑郁症中的研究进展[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2023, 32(6): 567-572.
- [22] 刘芳, 陈晨, 李娟, 等. 小胶质细胞与NLRP3炎症小体在神经炎症中的作用机制[J]. *协和医学杂志*, 2023, 14(5): 721-727.
- [23] 石喆, 左夏林, 彭林辉, 等. M1型小胶质细胞极化在大脑皮层梗死后继发丘脑损伤中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(22): 3138-3145.
- [24] DAVIS B M, SALINAS-NAVARRO M, CORDEIRO M F, et al. Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1576.
- [25] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 732-748.

(收稿日期: 2026-01-13 修回日期: 2026-05-13)

(本文责编: 林 静)