

·实验研究·

本文引用: 陈思源, 蔡娜, 赵洪庆, 欧阳舒雯, 王宇红, 尹抗抗. 加味百合地黄汤对围绝经期抑郁症模型大鼠 HPO 轴和雌激素受体表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 343-349.

加味百合地黄汤对围绝经期抑郁症模型大鼠 HPO 轴和雌激素受体表达的影响

陈思源¹, 蔡娜², 赵洪庆¹, 欧阳舒雯¹, 王宇红^{1*}, 尹抗抗^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] **目的** 基于下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamic-pituitary-ovarian, HPO)轴及雌激素受体(estrogen receptor, ER)探明加味百合地黄汤治疗围绝经期抑郁症的功效及潜在机制。**方法** 将大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药物组(氟哌噻吨美利曲水溶液 1.89 mg/kg)以及加味百合汤高、中、低剂量组(16.2 g/kg, 8.1 g/kg, 4.05 g/kg), 每组 10 只。除正常对照组外, 其他组均采用双侧卵巢摘除联合慢性不可预见性应激建立围绝经期抑郁症大鼠模型。各组给药 21 d 后采用糖水偏好实验和强迫游泳实验评价大鼠抑郁样行为, 酶联免疫吸附法检测血清促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E₂)含量, HE 染色观察下丘脑、垂体、海马等组织病理损伤情况, RT-PCR 和 Western blot 法检测下丘脑、海马组织雌激素受体基因及蛋白的表达。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠糖水偏好度显著下降($P<0.01$), 强迫游泳不动时间显著增加($P<0.01$), 表现出明显抑郁样行为, 血清 GnRH、FSH、LH 含量均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$), E₂ 降低($P<0.01$), 下丘脑、垂体及海马组织受损, 雌激素受体表达显著降低($P<0.01$); 经加味百合地黄汤干预治疗后, 模型组大鼠抑郁样行为显著改善($P<0.01$ 或 $P<0.05$), HPO 轴亢进状态及海马损伤得以缓解, 下丘脑、海马雌激素受体表达均显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与阳性药物组比较, 加味百合地黄汤高剂量组下丘脑雌激素受体基因表达显著增加($P<0.05$)。**结论** 加味百合地黄汤通过抑制 HPO 轴亢进及增加脑内雌激素受体水平, 发挥抗围绝经期抑郁作用。

[关键词] 加味百合地黄汤; 围绝经期抑郁症; 下丘脑-垂体-卵巢轴; 雌激素受体; 下丘脑; 海马

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.001

Effects of Jiawei Baihe Dihuang Decoction on HPO axis and estrogen receptor expression in perimenopausal depression model rats

CHEN Siyuan¹, CAI Na², ZHAO Hongqing¹, OUYANG Shuwen¹, WANG Yuhong^{1*}, YIN Kangkang^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To explore the efficacy and potential mechanism of Jiawei Baihe Dihuang Decoction (JWBHDHD) in treating perimenopausal depression based on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HPO axis) and estrogen receptor (ER). **Methods** The rats were randomized into normal control group, model group, positive drug group (1.89 mg/kg of flupentixol-melitracen solution), and high-, medium-, and low-JWBHDHD doses (16.2, 8.1, 4.05 g/kg) groups, with 10 rats in each group. Except the normal control group, all the other groups were established a perimenopausal depression rat model by bilateral ovariectomy combined with chronic unpredictable stress. After 21 days of administration in each group, a sugar preference test and a forced swimming test were used to evaluate the depression-like behavior of rats; enzyme-linked immunosorbent assay was used to check serum gonadotropin-releasing hormone (GnRH), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and estradiol (E₂) levels; HE

[收稿日期] 2023-08-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174357, 82104836, 82104793); 中药粉体与创新药物国家重点实验室培育基地开放基金项目(21PTKF017)。

[通信作者] * 尹抗抗, 男, 硕士, 实验师, E-mail: yinkk-001@163.com; 王宇红, 女, 博士, 研究员, 博士研究生导师, E-mail: wyh107@126.com。

staining was used to observe the histopathological damage of the hypothalamus, pituitary gland, and hippocampus; the expressions of estrogen receptor genes and proteins in the hypothalamus and hippocampus tissues were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the normal group, the preference for sugar water of rats in the model group significantly decreased ($P<0.01$), the immobility time of forced swimming significantly increased ($P<0.01$), and the rats in the model group showed obvious depression-like behaviors, the content of serum GnRH, FSH, and LH was significantly higher ($P<0.01$ or $P<0.05$), and E_2 was lower ($P<0.01$). The hypothalamus, pituitary, and hippocampal tissues were damaged, and the expression of estrogen receptors was significantly lower ($P<0.01$). After the intervention of JWBHDHD, the depression-like behavior of model rats was significantly improved ($P<0.01$ or $P<0.05$), the hyperactivity of HPO axis and hippocampal injury were relieved, and the expression of estrogen receptor in hypothalamus and hippocampal significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the positive drug group, the expression of estrogen receptor genes in the hypothalamus of the high-dose JWBHDHD group significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** JWBHDHD exerts an anti-perimenopausal depression role by inhibiting HPO axis hyperactivity and increasing estrogen receptor levels in the brain.

[**Keywords**] Jiawei Baihe Dihuang Decoction; perimenopausal depression disorder; hypothalamic-pituitary-ovarian axis; estrogen receptor; hypothalamus; hippocampus

围绝经期抑郁症(perimenopausal depressive disorder, PDD)是妇女绝经及其前后1年,因自身调节能力较差而出现的心理和认知障碍,是一种以精神障碍为主的常见妇科疾病。临床数据显示,约40%的妇女在围绝经期会伴随抑郁症状,且围绝经期持续时间越长,抑郁症发病率越高,其中仅8%患者接受抗抑郁治疗^[1]。随着社会竞争压力增大、生活节奏加快以及妇女地位的进一步提高,PDD正逐渐成为全球性疾病问题。现代医学认为,绝经前后卵巢功能衰退、性激素水平降低与PDD的发生密切相关。卵巢功能的衰退会严重影响下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamic-pituitary-ovarian, HPO)轴的平衡,导致雌激素分泌减少,从而使其对下丘脑和垂体抑制作用减弱^[2]。同时,雌激素减少会影响其受体功能,导致相关生物学效应无法发挥,加重HPO轴的失调现象,进一步加重抑郁症状^[3]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)主要分为ER α 和ER β 两种亚型,均能通过影响单胺神经递质系统、神经肽类物质及脑源性神经营养因子的释放或再摄取参与抑郁症的发生^[4]。而在PDD状态下,ER的变化水平及其与HPO轴的关联性相关研究较少。

目前,临床以激素替代疗法、抗抑郁药联合心理治疗为主的疗法存在患者依从性差、脑出血风险增加、阴道不规则出血等问题^[5],长期应用也会增加心血管疾病、乳腺癌的发生率^[6]。中医药强调整体观念、辨证论治,在治疗PDD上有其独特优势。加味百合地黄汤由经典名方百合地黄汤加味而成,具有补益气血、调和阴阳、活血安神的功效,主治妇女围绝经期抑郁、焦虑、失眠症状。本研究通过建立PDD大鼠模型,旨在明确加味百合地黄汤对HPO轴和ER的调节作用,为该药的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,雌性,60只,体质量(200 \pm 20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,质量许可证号为430727211102752021,饲养于湖南中医药大学实验动物中心SPF级动物房。饲养温度:20~26℃,湿度:30%~70%,动物照度15~20lx。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,批号为LL2022062802。

1.2 药物与试剂

加味百合地黄汤由百合30g、生地黄9g、麦冬9g、紫苏叶6g、首乌藤15g、郁金9g、五味子6g、白芍6g组成,购买于湖南中医药大学第一附属医院,经鉴定,药材质量均符合2020年版《中华人民共和国药典》相关规定。将所有中药材一起进行水提,共提取2次,分别加入10倍、6倍体积水,合并2次水提液,浓缩至含药量为1.62g/mL。阳性药为氟哌噻吨美利曲辛片(规格:每片含美利曲辛10mg、氟哌噻吨0.5mg,每板10片,每盒2板;由丹麦H. Lundbeck A/S生产,进口药品注册证号H20171104,批号:2691302)。血清促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E_2)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)酶联免疫吸附试剂盒(江苏菲亚生物公司,批号分别为2203R09、2203R13、2203R20、2203R17);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(苏州近岸科技公司,批号分别为E096-01、E047-01);ER α 、ER β 一抗(美国Proteintech公司,批号分别为21244-1-AP、60197-1-Ig)。

1.3 仪器

动物行为追踪分析系统[博睿唯思(香港)科技有限公司];MK3型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);ChemiDoc XRS+型凝胶成像分析系统、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);DMi8A 倒置光学显微镜(德国 Leica 公司)。

1.4 动物分组与造模

适应性喂养结束后,每只大鼠均进行糖水偏好实验测试,根据糖水偏好度将动物随机分为正常对照组,模型组,阳性药物组,加味百合地黄汤高、中、低剂量组,每组 10 只。采用双侧卵巢摘除(ovariectomy, OVX)联合慢性不可预见性应激(chronic unpredictable stress, CUS)的方法建立 PDD 大鼠模型^[7],自腰椎沿背部正中线下,作 1 cm 纵行切口,切开皮肤,夹取分离脂肪团,内可见多泡状卵巢,将卵巢进行结扎并切除,缝合消毒,而后同样方法摘除对侧卵巢,正常对照组则仅摘除游离脂肪组织。次日起,连续 7 d 阴道涂片未见动情周期视为造模成功^[8]。将 OVX 模型大鼠继续予以 28 d 慢性应激,每天随机采用 1 种以下应激方法:夹尾 1 min;束缚 6 h;冰水浴 4 min;潮湿垫料 24 h;禁食禁水+昼夜颠倒 24 h;足底电击 2 min;噪声干扰 4 h。实验期间大鼠均单笼饲养。慢性应激后根据参考文献评价慢性应激是否造模成功^[9],将造模成功的大鼠予以相应的分组。

1.5 动物给药及处理

在 CUS 造模后第 7 天开始灌胃给药,参照陈奇主编《中药药理实验方法学》中动物与人体表面比^[10],和根据成人的用量,依公式“大鼠药量=成人剂量×0.018(200 g 大鼠与 70 kg 成人表面积比)”大鼠的剂量=X mg/kg×70 kg×0.018/200 g=X mg/kg×70 kg×0.018/0.2 kg=6.3X mg/kg^[11],换算得出大鼠灌胃等效剂量。以此为基础和依据,将相应的药物制成溶液备用。阳性药物给予氟哌噻吨美利曲辛片水溶液 1.89 mg/kg,加味百合地黄汤高、中、低剂量组分别给予药液 16.2、8.1、4.05 g/kg,正常对照组与模型组给予等量蒸馏水,灌胃体积为 10 mL/kg,共给药 21 d。给药结束后,进行行为学测试,其后麻醉大鼠,留取血液与相关组织备用。

1.6 行为学检测

(1)糖水偏好实验^[12]。测试第 1 天给予大鼠两瓶 2%蔗糖水 24 h,第 2 天蔗糖水与蒸馏水各一瓶,中间切换两者位置,其后禁水不禁食 12 h,记录接下

来 2 h 的糖水与蒸馏水摄入量,同时为了避免位置偏好,于测试 1 h 时调换两瓶水的位置。计算糖水偏好度。糖水偏好度=糖水摄入量/(糖水摄入量+蒸馏水摄入量)×100%。(2)强迫游泳实验^[13]。将大鼠放入透明圆柱形专用强迫游泳筒内,水温约 24 ℃,记录 5 min 内大鼠不动时间。

1.7 指标检测

1.7.1 酶联免疫吸附实验 采用酶联免疫吸附试剂盒检测大鼠血清 GnRH、FSH、LH、E₂ 含量,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.7.2 HE 染色 待检组织于多聚甲醛溶液中充分固定后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,约 5 μm 厚切片,烤干后脱蜡,水洗,苏木素-伊红溶液先后浸泡,常规脱水透明后封片,于显微镜下观察拍摄。

1.7.3 Western blot 实验 将冷冻保存的下丘脑、海马组织在冰上充分匀浆,静置 30 min 后离心取上清液。检测蛋白浓度,制胶,上样量为 30 μg,电泳,转膜,脱脂奶粉室温封闭 2 h,洗膜后加入按说明书稀释后的一抗,4 ℃冰箱孵育过夜。同样洗膜后,加入稀释后的二抗于室温下孵育 2 h。全自动凝胶成像系统成像保存,采用 Image J 图像分析软件计算目的蛋白与内参的灰度值,并进行统计学分析。

1.7.4 RT-PCR 实验 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取组织样本总 RNA,检测含量合格后,将 RNA 逆转录成 cDNA,PCR 反应扩增基因产物,具体条件为:95 ℃ 15 min 预变性,95 ℃ 10 s 变性,60 ℃ 30 s 退火延伸,40 个循环。每个样本重复 3 次,以 β-actin 基因为内参,2^{-ΔΔCT} 法分析各基因 mRNA 的相对表达水平。引物由上海吉玛公司合成,其中 ESR1 (ERα)序列:正向 5'-GCCACTCGATCATTCGAGCA-3'(长度为 19 pb);反向 5'-CCTGCTGGTTCAAAGCGTC-3'(长度为 20 pb);ESR2 (ERβ)序列:正向 5'-AACGCAAAGAGGGATGCTCA-3'(长度为 19 pb);反向 5'-TCTCTCCTGGATCCTTGAATGC-3'(长度为 22 pb);β-actin 引物序列:正向 5'-CAGGCATTGCTGACAGGATG-3'(长度为 19 pb);反向 5'-TGCTGATCCACATCTGCTGG-3'(长度为 19 pb)。

1.8 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计,计量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”描述。多组间比较采用单因素方差分析,进行方差齐性检验,方差齐时采用 LSD-t 检验,方差不齐时采用 Dunnett-t 检验。

2 结果

2.1 加味百合地黄汤对 PDD 模型大鼠抑郁样行为的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠糖水偏好度显著降低($P<0.01$),强迫游泳不动时间显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,阳性药物组大鼠糖水偏好度增加($P<0.05$),不动时间降低($P<0.05$);加味百合地黄汤高、中剂量组大鼠糖水偏好度增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),加味百合地黄汤各组均能显著降低大鼠的不动时间($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与阳性药组比较,加味百合地黄汤各组糖水偏好度、不动时间均未见统计学差异($P>0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠抑郁样行为结果比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	糖水偏好度/%	不动时间/s
正常对照组	73.40±11.50	19.12±14.21
模型组	44.13±17.55**	57.48±20.98**
阳性药物组	63.90±14.74 [#]	39.10±12.70 [#]
加味百合地黄汤高剂量组	73.95±17.52 ^{###}	30.57±8.54 ^{###}
加味百合地黄汤中剂量组	64.53±20.41 [#]	34.95±17.90 [#]
加味百合地黄汤低剂量组	59.33±21.96	40.10±15.39 [#]

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{###} $P<0.01$ 。

2.2 加味百合地黄汤对 PDD 模型大鼠 HPO 轴的影响

正常对照组大鼠下丘脑神经元细胞分布均匀,

细胞核深染细胞少,垂体细胞间隙正常,分布均匀,负责内分泌激素释放的嗜碱性细胞形态与数量正常。模型组下丘脑神经元数量相对缺失,胞体肿胀,细胞核深染,其分泌的 GnRH 含量较正常对照组显著增加($P<0.05$);各给药组中垂体嗜碱性细胞胞体肿胀,细胞核深染,且分布聚集,呈亢进状态,其分泌的 FSH、LH 含量较模型组显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),卵巢分泌的 E_2 较模型组显著减少($P<0.01$);其中以加味百合地黄汤高剂量组效果最为显著,能显著降低模型大鼠血清 GnRH、FSH、LH 含量($P<0.01$),增加 E_2 水平($P<0.01$)。与阳性药物组相比,加味百合地黄汤低剂量组 E_2 水平显著降低($P<0.05$)。详见表2、图1。

2.3 加味百合地黄汤对 PDD 模型大鼠海马组织形态的影响

正常对照组大鼠海马神经元分布均匀,排列整齐,形态正常,数量丰富,细胞核清晰;模型组大鼠海马神经元排列散乱,细胞间隙增大,部分胞体肿胀,细胞核深染,呈凋亡状,神经元密度降低。与模型组比较,阳性药物组与加味百合地黄汤高剂量组神经元排列趋于整齐,胞体间隙小,细胞核清晰,神经元密度明显增加;加味百合地黄汤中、低剂量组神经元数量增加,但仍可见排列不紧凑,少数神经元胞体增大,趋于凋亡的病理现象。详见图2。

表2 各组大鼠血清 HPO 轴相关因子含量比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	GnRH/(mIU/mL)	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)	E_2 /(pg/mL)
正常对照组	22.23±3.42	70.54±9.90	66.45±8.73	129.22±11.20
模型组	31.20±2.49*	87.53±10.14*	89.72±6.29**	92.73±7.67**
阳性药物组	22.33±4.19 [#]	70.10±8.79 ^{###}	62.77±4.20 ^{###}	121.36±9.87 ^{###}
加味百合地黄汤高剂量组	21.66±2.05 ^{###}	68.71±7.14 ^{###}	68.28±6.74 ^{###}	109.62±10.29 ^{###}
加味百合地黄汤中剂量组	23.08±2.41	74.34±8.12 [#]	66.07±7.27 ^{###}	111.17±13.73 [#]
加味百合地黄汤低剂量组	24.33±3.66	72.30±8.39 [#]	69.73±6.82 ^{###}	102.60±16.26 ^Δ

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{###} $P<0.01$;与阳性药物组比较,^Δ $P<0.05$ 。

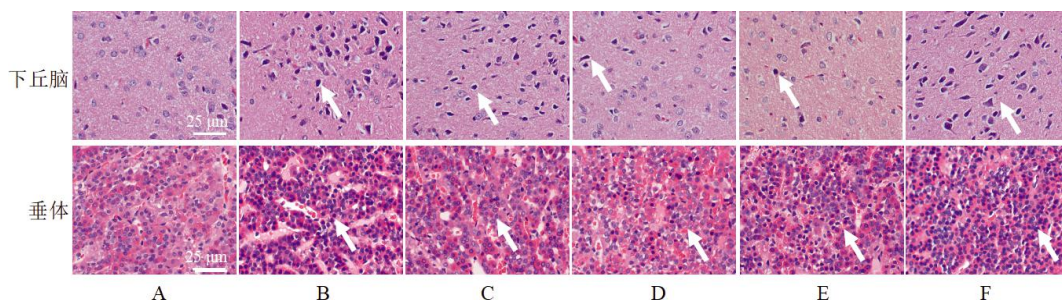


图1 各组大鼠下丘脑、垂体组织病理染色情况(HE,×400)

注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性药物组;D.加味百合地黄汤高剂量组;E.加味百合地黄汤中剂量组;F.加味百合地黄汤低剂量组。

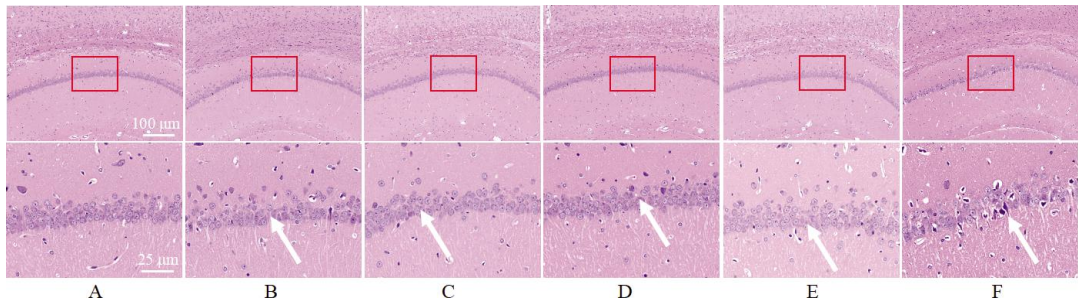


图2 各组大鼠海马CA1区病理染色情况(HE,×400)

注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性药物组;D.加味百合地黄汤高剂量组;E.加味百合地黄汤中剂量组;F.加味百合地黄汤低剂量组。

表3 各组大鼠下丘脑、海马 ESR1、ESR2 表达水平比较(n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	下丘脑 ESR1	下丘脑 ESR2	海马 ESR1	海马 ESR2
正常对照组	0.973±0.039	0.981±0.026	0.968±0.075	0.962±0.074
模型组	0.409±0.047**	0.456±0.042**	0.620±0.101**	0.448±0.076**
阳性药物组	0.741±0.089 [#]	0.813±0.205 [#]	0.953±0.186 [#]	0.854±0.252 [#]
加味百合地黄汤高剂量组	1.012±0.099 ^{##ΔΔ}	1.065±0.063 ^{##Δ}	1.191±0.133 ^{##Δ}	0.996±0.145 ^{##}
加味百合地黄汤中剂量组	0.877±0.103 ^{##Δ}	0.852±0.098 ^{##}	1.015±0.344	0.686±0.104 [#]
加味百合地黄汤低剂量组	0.512±0.054 ^{ΔΔ}	0.737±0.153 [#]	0.711±0.211 ^Δ	0.556±0.122 ^{ΔΔ}

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.05,^{##}P<0.01;与阳性药物组比较,^ΔP<0.05,^{ΔΔ}P<0.01。

2.4 加味百合地黄汤对 PDD 模型大鼠脑内 ER 基因表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠下丘脑、海马 ESR1、ESR2 表达均显著下降(P<0.01)。与模型组比较,加味百合地黄汤高剂量组下丘脑、海马 ESR1、ESR2 表达均显著增加(P<0.01);加味百合地黄汤中剂量组下丘脑 ESR1、ESR2 表达增加(P<0.01),海马 ESR2 表达增加(P<0.05);加味百合地黄汤低剂量组下丘脑 ESR2 表达显著增加(P<0.05)。阳性药物组下丘脑、海马 ESR1、ESR2 表达增加(P<0.05)。与阳性药物组相比,加味百合地黄汤高剂量组下丘脑 ESR1、ESR2 及海马 ESR1 表达增加(P<0.05),中剂量组下丘脑 ESR1 表达增加(P<0.05),低剂量组下丘脑 ESR1、海马 ESR1、ESR2 表达均显著降低(P<0.05)。详见表 3。

2.5 加味百合地黄汤对 PDD 模型大鼠脑内 ER 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组下丘脑、海马 ERα、

ERβ 表达均显著降低(P<0.01)。与模型组比较,阳性药物组、加味百合地黄汤各剂量组下丘脑区的 ERα、ERβ 表达均显著增加(P<0.01 或 P<0.05),阳性药物组与加味百合地黄汤高剂量组海马区 ERα、ERβ 表达显著增加(P<0.01);加味百合地黄汤低剂量组海马区 ERα 增加(P<0.05)。与阳性药物组比较,加味百合地黄汤高剂量组下丘脑、海马 ERα、ERβ 表达均无显著差异,中、低剂量组 ERα、ERβ 表达均显著降低(P<0.05)。详见图 3,表 4。

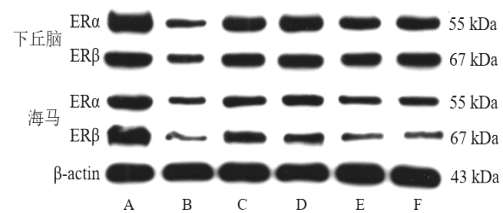


图3 各组大鼠下丘脑、海马 ERα、ERβ 蛋白电泳条带图

注:A.正常对照组;B.模型组;C.阳性药物组;D.加味百合地黄汤高剂量组;E.加味百合地黄汤中剂量组;F.加味百合地黄汤低剂量组。

表4 各组大鼠下丘脑、海马 ERα、ERβ 蛋白相对表达情况(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	下丘脑 ERα	下丘脑 ERβ	海马 ERα	海马 ERβ
正常对照组	0.989±0.116	0.890±0.087	0.857±0.131	0.926±0.089
模型组	0.312±0.055**	0.336±0.050**	0.358±0.040**	0.225±0.053**
阳性药物组	0.811±0.124 ^{##}	0.757±0.092 ^{##}	0.702±0.112 ^{##}	0.694±0.125 ^{##}
加味百合地黄汤高剂量组	0.924±0.216 ^{##}	0.810±0.077 ^{##}	0.709±0.106 ^{##}	0.686±0.084 ^{##}
加味百合地黄汤中剂量组	0.520±0.082 ^{##ΔΔ}	0.589±0.078 ^{##ΔΔ}	0.512±0.113 ^Δ	0.338±0.051 ^{ΔΔ}
加味百合地黄汤低剂量组	0.498±0.075 ^{##ΔΔ}	0.611±0.083 ^{##Δ}	0.509±0.079 ^{##ΔΔ}	0.304±0.042 ^{ΔΔ}

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.05,^{##}P<0.01;与阳性药物组比较,^ΔP<0.05,^{ΔΔ}P<0.01。

3 讨论

围绝经期妇女因卵巢激素波动,导致内分泌系统紊乱,出现明显的身体和心理问题,患抑郁症的概率是绝经前的2~2.5倍。HPO轴作为调控女性生殖的关键内分泌轴,是女性生理周期维系的关键,其任何环节出现问题都有可能导致妇科疾病,而PPD的本质是HPO轴老化,此时卵巢功能衰退,雌激素分泌减少,对下丘脑-垂体的反馈性抑制作用减弱,引发HPO轴功能紊乱,进而影响自主神经中枢及其支配的各脏器功能^[14-15]。研究表明,雌激素参与认知、行为、记忆及突触可塑性形成等,并能对应激和创伤引起的神经损伤,支持神经元生长,也是海马神经新生的有效调节因子,能够发挥对HPO轴正负反馈的双重调节作用,其中E₂的含量最高且生理活性最强^[16]。RYAN等^[17]发现,E₂可影响脑组织内多种神经递质的含量,增加5-HT突触后膜活性和去甲肾上腺素(noradrenaline,NE)再摄取,通过调节5-HT系统发挥抗抑郁作用。临床研究证实,调节围绝经期患者雌激素水平可以促进围绝经期症状的缓解^[18]。

雌激素主要通过其特异性受体发挥生物学活性,包括两种经典亚型ER α 和ER β ,分别由*ESR1*和*ESR2*基因编码表达。ER α 主要分布在中枢神经系统、子宫、卵巢,该受体与雌激素的异常结合可能是导致雌激素对HPO轴负反馈调节作用紊乱的重要因素,但目前对于ER α 对抑郁症的调节有一定争议。有研究认为,卵巢去除抑郁模型大鼠海马组织中ER α 的mRNA和蛋白质水平都显著下降,树突棘数目和密度随体内雌激素水平波动而变化^[19];也有研究认为,抑郁情绪的缓解与脑区ER α 降低有关,且ER α 基因的异常突变与重度抑郁症发生相关^[20]。ER β 主要分布在中枢神经系统、心血管系统、卵巢,其低表达能够诱发抑郁症状。研究发现,ER β 激动剂可以逆转卵巢切除大鼠的抑郁样行为^[21];ER β 基因敲除会导致大鼠脑内脑源性神经营养因子水平显著下降,而长期的抑郁应激也会减少海马中脑源性神经营养因子的表达^[22]。以上可知,ER α 和ER β 均能参与抑郁情绪的调节,是PDD疾病防治所关注的靶点。

下丘脑负责调节机体内分泌活动,是内分泌轴负反馈失调后首先受到攻击的脑区。海马负责情绪行为的调控,在结构上与下丘脑毗邻,功能上又能负反馈调控各内分泌轴,是HPO轴的高级神经中枢,海马分泌的因子可直接影响下丘脑从而实现调控

HPO轴的作用^[23]。海马与下丘脑内均存在丰富的ER,这些受体在神经元突触形成的各个阶段中都发挥重要作用^[24]。本研究发现,PDD模型大鼠HPO轴功能亢进,下丘脑-海马组织均存在较明显的病理损伤,ER α 和ER β 均有显著的低表达,可能与大鼠的抑郁行为有关。

百合地黄汤出自医圣张仲景所著《金匮要略》,该方不仅是古代医家治疗百合病的常用方,在现代临床中也作为基本方广泛应用于各种情志疾病。加味百合地黄汤以百合地黄汤为基础加味而成,由百合、生地黄、郁金、白芍、麦冬、首乌藤、五味子、紫苏叶组成。方中百合调和五脏、养心安神为君药;生地黄清热生津、滋阴凉血,白芍养血荣筋、柔肝缓急,郁金行气活血、清心安神,麦冬润肺清心、养阴生津,四者共为臣药;首乌藤、五味子均有宁心安神之功,紫苏叶调和脾胃,三者共为佐药。全方共奏补益气血、调和阴阳、活血安神之功,主治妇女围绝经期抑郁、焦虑、失眠等症。本研究发现,加味百合地黄汤能够显著改善PDD模型大鼠抑郁样行为,改善下丘脑神经元损伤,并抑制GnRH过度分泌,缓解垂体损伤,进而抑制FSH、LH释放,增加体内雌激素水平,上调下丘脑、海马组织ER基因和蛋白的表达。在不同剂量组之间比较发现,高剂量上述内容改善优于中、低剂量组,表明高剂量组疗效优于中、低剂量。

现代研究发现,中医药单体或组方可有效减轻PDD的临床症状:柴胡疏肝散可从增加神经递质的角度改善PDD患者的抑郁行为^[25];滋肾疏肝汤可对PDD患者血清激素、FSH、LH进行调节,进而发挥滋补肝肾、疏肝解郁的作用^[26];左归丸可调节PDD模型小鼠HPO轴、增加其血清E₂含量、增加其脑组织单胺类神经递质含量,进而减轻其抑郁样行为^[27];小柴胡汤可调节PDD模型小鼠5-HT等激素水平、增强前额叶皮质和下丘脑ER β 和TPH2的表达,进而减轻其抑郁样行为^[28]。梁艳等^[29]临床研究发现,在治疗女性围绝经期失眠中,百合地黄汤联合常规西医主要通过下调LH、FSH水平,上调P、E₂水平来调节患者性激素,调整内分泌紊乱,改善患者负性情绪,提升睡眠质量,减少失眠;段士攀^[30]发现百合地黄汤加减联合氟哌噻吨美利曲辛片治疗围绝经期抑郁症疗效显著,能改善围绝经期症状及抑郁状态,调节血清神经递质水平,降低不良反应发生率。本研究以加味百合地黄汤为干预药物,在选方上紧扣临床病因病机,观察加味百合地黄汤通过HPO轴及ER对

PDD模型抑郁症状的改善作用。

综上,本研究证实加味百合地黄汤通过抑制HPO轴亢并增加脑内ER水平,发挥抗PDD功效,为该方的新药研发与应用提供重要理论基础。

参考文献

- [1] WILLI J, EHLERT U. Assessment of perimenopausal depression: A review[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2019, 249: 216–222.
- [2] 司夏樱, 岳秀宁, 王 昕, 等. 舒肝解郁胶囊联合重复经颅磁刺激治疗对围绝经期抑郁神经内分泌功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 163–168.
- [3] NAULÉ L, HARDIN-POUZET H, MHAOUTY-KODJA S. Estrogens and social and emotional related behaviors: Role of estrogen receptor B[J]. *Medecine Sciences: M/S*, 2021, 37(2): 117–119.
- [4] 穆道周, 胡桂芳, 陈 雷, 等. 雌激素受体与抑郁症的相关性研究进展[J]. *天津医药*, 2019, 47(4): 436–439.
- [5] 吴杭玉, 叶 梅, 张宜生. 氯胺酮抗围绝经期抑郁症的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(8): 1173–1177.
- [6] 潘 雪. 多囊卵巢综合征与心理应激相关性及其补肾解郁调冲法干预的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [7] SONG Q L, HUANG W M, YE W B, et al. Neuroprotective effects of estrogen through BDNF–transient receptor potential channels 6 signaling pathway in the hippocampus in a rat model of perimenopausal depression[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2022, 14: 869274.
- [8] 郝 娟, 王春莲, 王培嵩, 等. 雷公藤多甙片致卵巢早衰大鼠动物模型的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2012, 27(12): 1866–1870.
- [9] 马 菲, 张小凡, 李华南. CFS大鼠模型的建立与评价[J]. *按摩与康复医学*, 2022, 13(15): 45–50.
- [10] 郝媛媛, 苏 敏, 高怀林, 等. 中药津力达颗粒通过抑制肝细胞焦亡来改善非酒精性脂肪肝[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 744.
- [11] PÉREZ-CARRERAS M, DEL HOYO P, MARTÍN M A, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 999–1007.
- [12] CHOUDHARY K, PRASAD S R, LOKHANDE K B, et al. 4-Methylscutellin ameliorates LPS-induced depression-like behavior through the inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1120508.
- [13] 赵洪庆, 刘 检, 孟 盼, 等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1205–1210.
- [14] 蒋希荣, 任 路, 李春日. 电针对围绝经期抑郁症大鼠下丘脑–垂体–卵巢轴的影响[J]. *针刺研究*, 2017, 42(1): 45–49.
- [15] AMIEL CASTRO R T, EHLERT U, FISCHER S. Variation in genes and hormones of the hypothalamic–pituitary–ovarian axis in female mood disorders: A systematic review and meta-analysis[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2021, 62: 100929.
- [16] O'LEÍME C S, CRYAN J F, NOLAN Y M. Nuclear deterrents: Intrinsic regulators of IL-1 β -induced effects on hippocampal neurogenesis[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2017, 66: 394–412.
- [17] RYAN J, ANCELIN M L. Polymorphisms of estrogen receptors and risk of depression: Therapeutic implications[J]. *Drugs*, 2012, 72(13): 1725–1738.
- [18] 陈 曦, 李良松, 彭 静. 疏肝解郁胶囊联合盐酸帕罗西汀对围绝经期抑郁患者性激素、神经营养因子及炎症因子的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(24): 2644–2648.
- [19] ZHANG J, CHEN L, MA J S, et al. Interaction of estrogen receptor β and negative life events in susceptibility to major depressive disorder in a Chinese Han female population[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2017, 208: 628–633.
- [20] 何凤琴, 向全丽, 屈庚超, 等. 大豆异黄酮影响C57BL/6J母鼠行为与雌激素受体 α 的关系[J]. *西安文理学院学报(自然科学版)*, 2020, 23(1): 50–55.
- [21] ESTRADA C M, GHISAYS V, NGUYEN E T, et al. Estrogen signaling in the medial amygdala decreases emotional stress responses and obesity in ovariectomized rats[J]. *Hormones and Behavior*, 2018, 98: 33–44.
- [22] CHHIBBER A, WOODY S K, KARIM RUMI M A, et al. Estrogen receptor β deficiency impairs BDNF-5-HT2A signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 82: 107–116.
- [23] VALSAMAKIS G, CHROUSOS G, MASTORAKOS G. Stress, female reproduction and pregnancy[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 100: 48–57.
- [24] BOWERS J M, WADDELL J, MCCARTHY M M. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol[J]. *Biology of Sex Differences*, 2010, 22(1): 1–8.
- [25] 吴 忧, 任秋萍, 蔡晓诗, 等. 柴胡疏肝散对围绝经期肝郁证大鼠神经环路变化的影响[J]. *中医药学报*, 2023, 51(5): 27–32.
- [26] 庞东林. 滋肾疏肝汤治疗女性围绝经期抑郁症的临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [27] 王 睿, 吴睦霖, 王 伟, 等. 左归丸对围绝经期抑郁症模型小行为学影响及神经保护机制研究[J]. *医学研究杂志*, 2020, 506(2): 135–139.
- [28] 张 阔, 王芷倩, 杨静玉, 等. 小柴胡汤对围绝经期小鼠抑郁焦虑症状的改善作用及其机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(10): 876.
- [29] 梁 艳, 郑丽娟. 百合地黄汤联合常规西医治疗女性围绝经期失眠的疗效观察[J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(14): 2451–2454.
- [30] 段士攀. 百合地黄汤加减联合氟哌噻吨美利曲辛治疗围绝经期抑郁症[J]. *实用中西医结合临床*, 2020, 20(12): 84–86.