

中药复方开心散调控慢性压力应激小鼠海马炎症细胞因子水平抗抑郁作用机制研究*

曲苏晨, 曹 程, 戚明珠, 刘梦秋, 段金廛, 朱 悦**

(南京中医药大学药学院, 江苏省方剂研究重点实验室/江苏省方剂高新技术研究重点实验室/中药资源产业化于方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 南京 210029)

摘 要:目的 探究中药复方开心散调控中枢神经炎症系统抗抑郁的作用机制。方法 制备开心散不同配伍比例提取物,采用小鼠慢性应激压力(CUMS)模型,通过糖水偏嗜实验、悬尾实验和强迫游泳实验评价开心散不同配伍比例的抗抑郁功效。采用ELISA法测定受试动物海马组织促炎物质如脂多糖(LPS)、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。采用免疫组织化学染色法观察受试动物海马区小胶质细胞形态。进而采用LPS促进小鼠小胶质永生化细胞(BV2)炎症因子表达细胞模型,采用ELISA法评价开心散抑制炎症因子表达的作用,采用Western blotting法考察NF- κ B信号通路的调控情况。结果 开心散不同配伍比例能显著上调模型小鼠糖水偏嗜率,缩短小鼠悬尾和强迫游泳不动时间,以D-652效用最强。该配伍比例通过抑制NF- κ B的入核和抑制NF- κ B磷酸化等环节,下调BV2细胞中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平。结论 对中枢神经炎症的调控是中药复方开心散抗抑郁的重要作用环节。

关键词:开心散 神经炎症 抑郁症

doi: 10.11842/wst.20190619010 中图分类号: R258 文献标识码: A

开心散始载于唐代孙思邈所著的《备急千金要方》,由人参、远志、石菖蒲、茯苓组成^[1]。在长期的临床实践中,根据辨证论治的需要,开心散形成了多种配伍比例。尤以人参、远志、石菖蒲、茯苓配比为3:2:2:3(D-652)、1:1:1:2(K-984)、1:1:4:8(K-1640)的比例应用较多^[2-3]。无论配伍比例如何变化,开心散均用以治疗情志疾病证见心气不足、忧愁悲伤、好忘等,这些症状与抑郁症和阿尔兹海默症的症状极为相似,故该方在现代常用于以上疾病的治疗。

对于开心散抗抑郁机制的研究,过往报道多集中于神经递质和神经营养因子系统,而对其调控中枢神

经炎症的效用和机制研究报道极少。因此,我们拟对开心散调控中枢炎性细胞因子水平抗抑郁效用及作用机制进行研究,为进一步阐明中药复方开心散多靶点抗抑郁的科学内涵提供更多现代科学解释。

1 材料

1.1 动物

ICR小鼠,雄性,体质量22 g-25 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,动物许可证号SCXK(苏)2018-0008。动物饲养于南京中医药大学实验动物中心SPF环境中,常规饲养,12 h光照,温度22-25℃,湿度40%-70%。

收稿日期:2019-06-19

修回日期:2019-12-13

* 国家自然科学基金委员会面上项目(81673720):基于压力应激-肠道微生态-中枢神经炎症系统调节的开心散抗抑郁作用机制研究;负责人:朱悦;江苏省方剂高新技术研究重点实验室开放课题(FJGJS-2015-10):抗抑郁六类中药新药加味开心散的成药性研究;负责人:朱悦,詹华强;江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX18-1612):开心散调控压力应激-肠道微生态-中枢神经炎症系统抗抑郁机制研究,负责人:曹程。

** 通讯作者:朱悦,男,博士,副研究员,主要从事中药复方物质基础研究。

1.2 药物

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、远志(*Polygala tenuifolia* Wild.)、石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)、茯苓(*Poriacocos* (Schw.) Wolf)药材饮片购自苏州天灵中药饮片公司,经南京中医药大学严辉副教授鉴定为相应药材。

1.3 试剂

小鼠 ELISA 检测试剂盒 LPS(JEB-12983)、IL-1 β (JEB-12787)、IL-6(JEB-12267)、TNF- α (JEB-12474)均购自南京金益柏生物科技有限公司。TRIzol RNA(15596-026)购自美国 Thermo Fisher 公司。RT-PCR 反转录试剂盒(AE311)和 SYBR 荧光定量 qPCR 检测试剂盒(AQ132)购自北京全式金生物科技有限公司。实验所用抗体 NF- κ B p65 Rabbit mAb、Phospho-NF- κ B p65 Rabbit mAb、Lamin B1 Rabbit mAb、Histone H3 Rabbit mAb、GAPDH Rabbit mAb, Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) 购自 CST 公司, Anti Iba1 polyclonal antibody, Rabbit, for Immunocytochemistry 购自日本 Wako 和光纯药公司。DAPI 购自 Sigma 公司。

细胞培养试剂购自以色列 Biological Industries 公司、耗材购自美国 Corning 公司。

1.4 仪器

凝胶成像系统(Bio-Rad);动物行为测试系统(上海吉量软件公司);qPCR 仪(ABI7500, Life);细胞恒温培养箱(1300 series A2, Thermo Fisher Scientific 公司);多功能酶标仪(Enspire, Perkin-Elmer 公司);AXIO Vert.A1 荧光倒置显微镜(Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 开心散提取物的制备

按照人参、远志、石菖蒲、茯苓(3:2:2:3)的配伍比例,称取 100 g 药材,采用 8 倍量的溶剂回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并二次提取液,减压浓缩,冷冻干燥,得到 D-652 冻干粉。使用前,按需复溶。更换配伍比例,同法制备 K-984(1:1:1:2)和 K-1640(1:1:4:8)提取物。

2.2 CUMS 模型建立

所有小鼠适应环境 5 天后,经过旷场实验、基础糖水消耗量与体重测定等测试后,综合评分。选取评分

表 1 动物实验给药剂量

动物组别	每天给药剂量和给药天数
空白组	0.9% 生理盐水, 10 天
CUMS 组	0.9% 生理盐水, 10 天
D-652 低剂量组	3 g·kg ⁻¹ , 10 天
D-652 高剂量组	10 g·kg ⁻¹ , 10 天
K-984 低剂量组	3 g·kg ⁻¹ , 10 天
K-984 高剂量组	10 g·kg ⁻¹ , 10 天
K-1640 低剂量组	3 g·kg ⁻¹ , 10 天
K-1640 高剂量组	10 g·kg ⁻¹ , 10 天
氟西汀组	7.2 mg·kg ⁻¹ , 10 天

相近的 90 只小鼠,其中随机选取 10 只作为正常组,每笼 5 只饲养。其余小鼠进行 CUMS 造模,均单笼孤养。CUMS 模型建立方法的具体细节参考课题组已经发表的成果^[4]。

2.3 动物给药

模型组动物待 8 周抑郁表型出现后,随机分为 8 组,即空白组、CUMS 组、D-652 低、高剂量组、K-984 低、高剂量组、K-1640 低、高剂量组、氟西汀组。各给药组剂量根据临床人用剂量,按照体表面积折算为受试动物剂量。

2.4 行为学检测

采用糖水偏嗜实验、悬尾实验以及强迫游泳实验考查小鼠的抑郁样行为,实验的具体过程参照本课题组已经发表过的成果^[4]。

2.5 ELISA 法测定海马区中炎症因子的表达

行为学测试结束后,处死小鼠,解剖获得海马组织,液氮迅速冷冻,粉碎。称取相应重量组织,加入 10 倍体积 PBS,利用 LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒,按试剂盒所列操作步骤,测定相应因子的含量。试剂盒检测范围为 20-500 pg/mL。

2.6 海马区小胶质细胞形态学观察

行为学测试结束后,处死小鼠,解剖获得小鼠全脑,常温固定于 4% PFA 固定液中。常规脱水,石蜡包埋后切片。小鼠脑片进行二甲苯脱蜡处理,乙醇梯度脱水,于枸橼酸钠缓冲液中保持微沸状态 15 min,冷却 30 min,用 3% 过氧化氢脱氢处理。5% BSA+PBS-T (Triton) 封闭 1 h。一抗(Anti Iba1, 1:1000)4°C 孵育过夜。二抗(Alexa 488 conjugate anti-rabbit IgG, 1:400)室温避光孵育 1 h,DAPI 染核。封片,荧光倒置显微镜下观察结果。运用 ZEN 2012(blue edition)图像处理软件系统分析。

表2 实验所用引物序列

Primer	Sequence (5'-3')	Gene bank number
IL-1 β -S	TGC CAC CTT TTG ACA GTG ATG	NM_008361.4
IL-1 β -AS	TGATACTGCCTGCCTGAAGC	
IL-6-S	TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG	NM_012589.2
IL-6-AS	CCA GGT AGC TAT GGT ACT CC	
TNF- α -S	CAC GTC GTA GCA AAC CAC C	AE013599.5
TNF- α -AS	TGG GTG AGG AGC ACG TAG	
β -actin-S	TAC GAG GGC TAT GCT CTCC	AE014298.5
β -actin-AS	CAC GCA CGA TTT CCC TCTC	

2.7 细胞培养

小鼠小胶质细胞系(BV2)的培养基由下列组成: MEM-Eagle(88%)、胎牛血清(10%)、青霉素/链霉素(1%)、丙酮酸钠溶液(1%)。每48 h换液一次,待细胞密度为70%时,进行传代培养,以传代培养三代后的细胞用于实验研究。

2.8 实时定量荧光PCR法测定神经营养因子转录水平表达

取BV2细胞样品,按TRIzol RNA提取试剂盒所列步骤进行RNA提取,依据Transgen逆转录试剂盒的说明,进行逆转录操作获得cDNA。然后依照SYBR荧光实时定量试剂盒操作步骤,利用荧光实时定量PCR仪测定神经营养因子的基因转录水平表达。所用引物序列见表2。基因的表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,设置GAPDH为内参基因。以正常组对照组样本为对照样本,设为100%,计算其余各组的基因表达差异。

2.9 蛋白免疫印迹法

细胞末次给药24 h后,采用RIPA蛋白裂解液提取细胞总蛋白,或根据碧云天胞浆/胞核蛋白抽提试剂

盒分别提取胞浆蛋白和核蛋白,按照BCA试剂盒的方法测定总蛋白浓度,98℃,5 min高温变性。按照Western Blotting法的实验步骤,制备7.5%的聚丙烯酰胺凝胶,上样后90 V电泳2 h,300 mA转膜2 h,5% BSA封闭,一抗(NF- κ B p65 Rabbit mAb、Phospho-NF- κ B p65 Rabbit mAb、Lamin B1 Rabbit mAb、Histone H3 Rabbit mAb、GAPDH Rabbit mAb),抗体比例1:3000。4℃过夜,孵育二抗(Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody),二抗比例1:5000,室温50 min。ECL试剂盒显色。

2.10 统计学处理与数据表示

采用SPSS 19.0统计软件对实验数据进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$,有差异; $P < 0.01$,有极显著差异。

3 结果

3.1 开心散提取物抗抑郁效用评价

给药10日后,进行糖水偏嗜实验、强迫游泳实验和悬尾实验。统计行为学的测试结果发现,模型组糖水偏嗜率较空白组显著降低($P < 0.01$),强迫游泳与悬尾不动时间较空白组显著增加($P < 0.05$);给药组与模型组相比,开心散各提取物具有上调模型动物糖水偏嗜率和下调其强迫游泳、悬尾不动时间的作用趋势。开心散提取物三个比例给药组比较,并未见显著性差异,但以D-652高剂量减轻动物抑郁样行为的作用趋势最强,其作用趋势与阳性药氟西汀相当,(结果见图1)。

3.2 开心散提取物对小鼠海马炎症因子表达的影响

分离并获取受试动物海马组织,采用ELISA法检

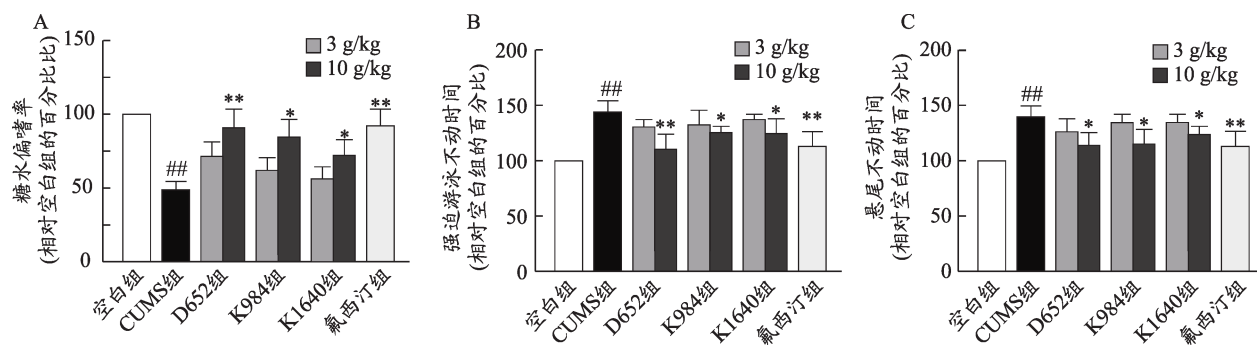


图1 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠行为学的影响($n = 10$)

A 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠糖水偏嗜率的影响;B 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠强迫游泳不动时间的影响;C 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠悬尾不动时间的影响。

^{##}与空白组比较, $P < 0.01$; ^{*}与模型组比较, $P < 0.05$; ^{**}与模型组比较, $P < 0.01$ 。

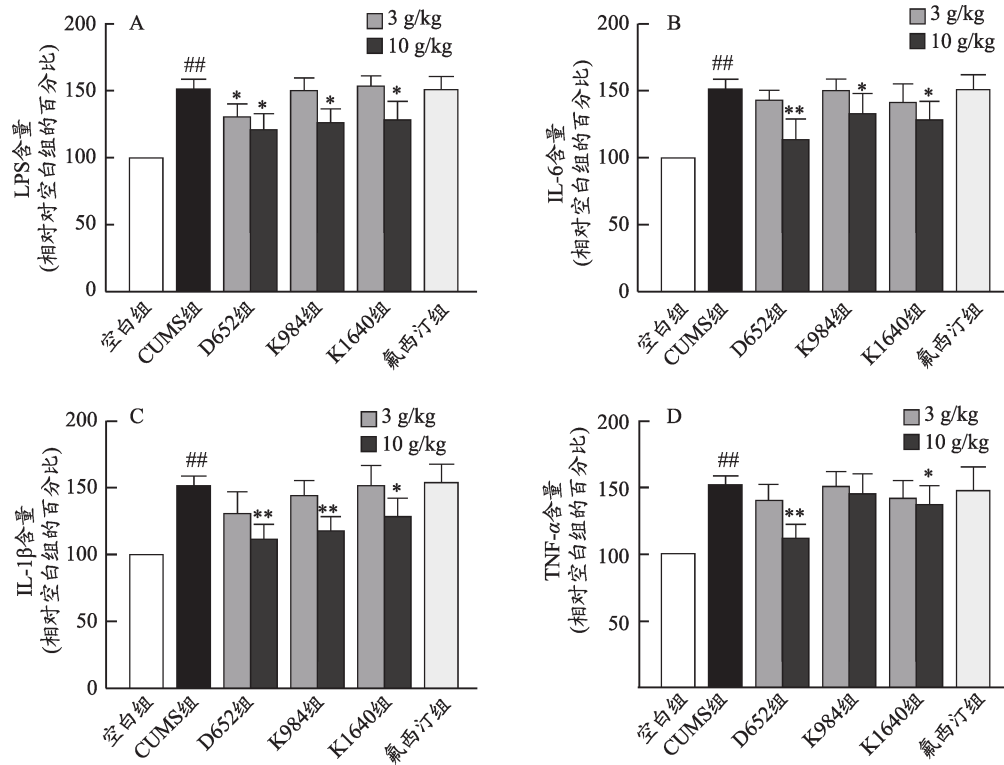


图2 开心散不同配伍比例对CUMS模型动物海马区中促炎物质表达的影响($n = 10$)

A 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠海马区中LPS含量的影响;B 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠海马区中IL-6含量的影响;C 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠海马区中IL-1 β 含量的影响;D 开心散不同配伍比例对CUMS模型小鼠海马区中TNF- α 含量的影响
##与空白组比较, $P < 0.01$; *与模型组比较, $P < 0.05$; **与模型组比较, $P < 0.01$ 。

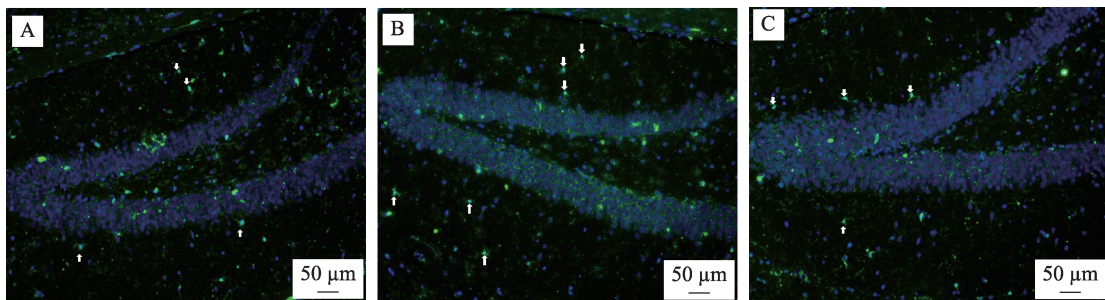


图3 小鼠海马区小胶质细胞形态学观察($n = 3$)

A 空白组;B CUMS模型组;C D-652高剂量组(比例尺 = 50 μm)

测海马中LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。实验结果表明,模型动物海马区LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平较空白组显著上调($P < 0.01$),开心散各配伍比例均能显著下调模型动物海马区中LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达(与模型组相比, $P < 0.05$),各比例间比较,未见显著性差异,D-652高剂量组显示出较强的作用趋势(结果见图2)。

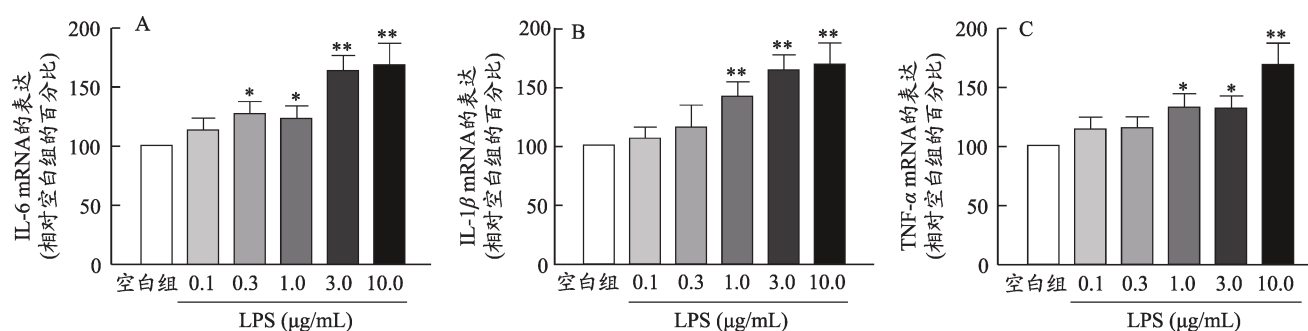
3.3 开心散提取物对小鼠海马区小胶质细胞的影响

分离并获取受试动物全脑,利用免疫组化技术标

记受试动物海马区小胶质细胞生物标记物Iba1。实验结果表明,空白组小鼠海马区小胶质细胞多呈分枝状的未激活状态;CUMS组小鼠海马区小胶质细胞成圆形状态,提示被激活。给以开心散D-652高剂量后,小鼠小胶质细胞形态接近空白组,提示开心散给药可抑制慢性压力激活小胶质细胞(结果见图3)。

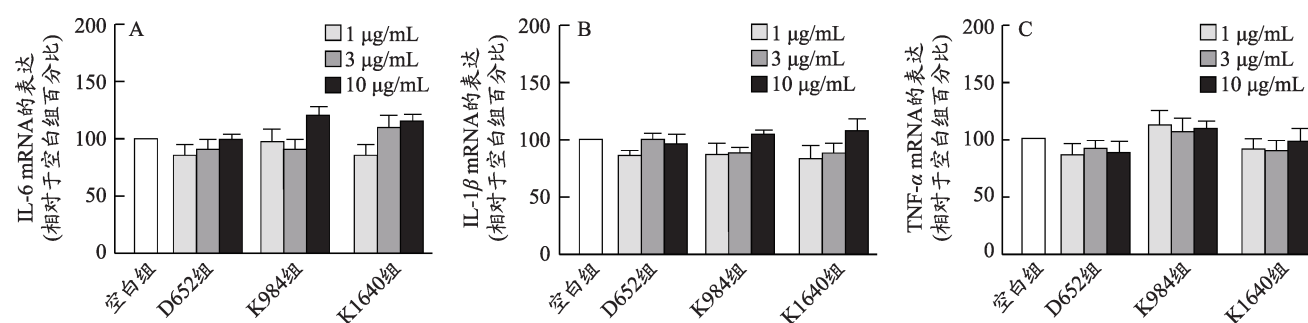
3.4 开心散D-652配伍比例对BV2细胞中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的影响

我们采用小鼠小胶质细胞系(BV2),加以LPS刺

图4 不同浓度的LPS对BV2细胞中炎症因子表达的影响($n=9$)

A不同浓度的LPS对BV2细胞中IL-1 β 表达的影响;B不同浓度的LPS对BV2细胞中IL-6表达的影响;C不同浓度的LPS对BV2细胞中TNF- α 表达的影响

*与空白组比较, $P<0.05$;**与空白组比较, $P<0.01$ 。

图5 开心散不同配伍比例对BV2细胞中炎症因子表达的影响($n=9$)

A开心散不同配伍比例对BV2细胞中IL-1 β 表达的影响;B开心散不同配伍比例对BV2细胞中IL-6表达的影响;C开心散不同配伍比例对BV2细胞中TNF- α 表达的影响

炎症因子产生,构建体外中枢神经炎症因子表达模型,进一步探索开心散降低海马区中炎症因子表达水平的作用机制。

首先,考察了不同浓度LPS对BV2细胞中炎症因子表达的影响,发现 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的剂量范围内LPS可显著促进BV2细胞内炎症因子表达(结果见图4)。

其次,在 $1\sim 10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的剂量范围内,开心散各配伍比例不会促进BV2细胞表达炎症因子(结果见图5)。

将开心散各配伍比例提取物与LPS($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共同加至BV2细胞作用48h后,检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达情况。结果发现,与空白组相比,LPS显著促进了炎症因子的表达,提示造模成功。与LPS给药组相比,开心散各配伍比例提取物的中剂量与高剂量显著下调了IL-1 β 、IL-6与TNF- α 的表达(与LPS组相比, $P<0.05$)。各配伍比例中,以D-652高剂量组($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)下调IL-6的效用最强,与比例K-984和K-1640的高剂量组比较,存在显著性差异($P<0.05$);

在下调与TNF- α 表达方面,三个比例没有显著性差异。D-652高剂量组下调IL-1 β 表达的作用趋势更强,而K-1640高剂量组下调TNF- α 表达的作用趋势更强。(结果见图6)。

3.5 开心散D-652配伍比例对NF- κ B信号通路的影响

依据上述体系实验结果,我们选取开心散D-652配伍比例,进一步对BV2细胞中NF- κ B的入核与磷酸化情况进行研究。结果显示,LPS的作用使得胞浆内NF- κ B的表达水平降低,胞核内NF- κ B的表达水平提高,且核内NF- κ B的磷酸化水平提高,提示LPS可以促进NF- κ B入核并激活NF- κ B磷酸化(与空白组相比, $P<0.05$)。而D-652能够削弱LPS的作用趋势,抑制NF- κ B的入核过程,且降低NF- κ B的磷酸化水平(与LPS组相比, $P<0.05$)(结果见图7)。

4 讨论

抑郁症是一种以长期的心情压抑,忧愁悲伤为主要特征的情志疾病。其发病过程极为复杂,也提出了

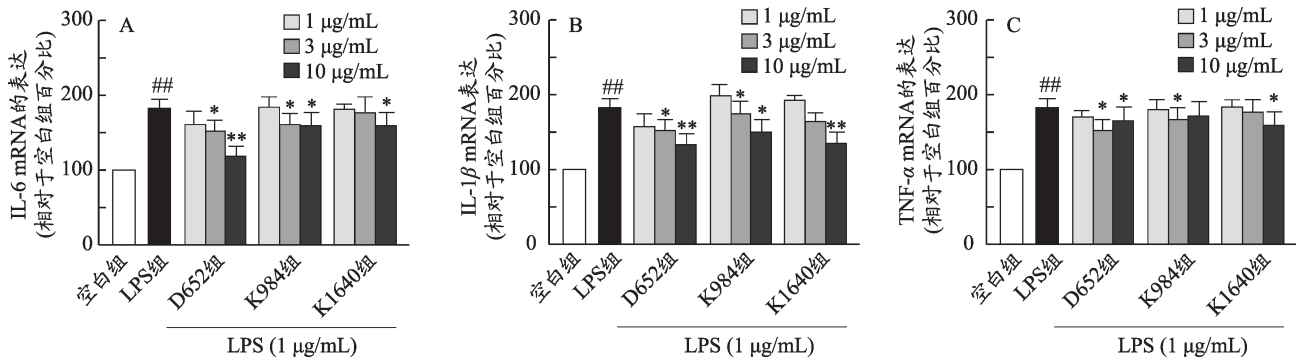


图6 开心散不同配伍比例对LPS激活状态的BV2细胞中炎症因子表达的影响($n=9$)

A 开心散不同配伍比例对LPS激活状态下的BV2细胞中IL-1 β 表达的影响;B 开心散不同配伍比例对LPS激活状态下的BV2细胞中IL-6表达的影响;C 开心散不同配伍比例对LPS激活状态下的BV2细胞中TNF- α 表达的影响

##与空白组比较, $P<0.01$; *与模型组比较, $P<0.05$; **与模型组比较, $P<0.01$ 。

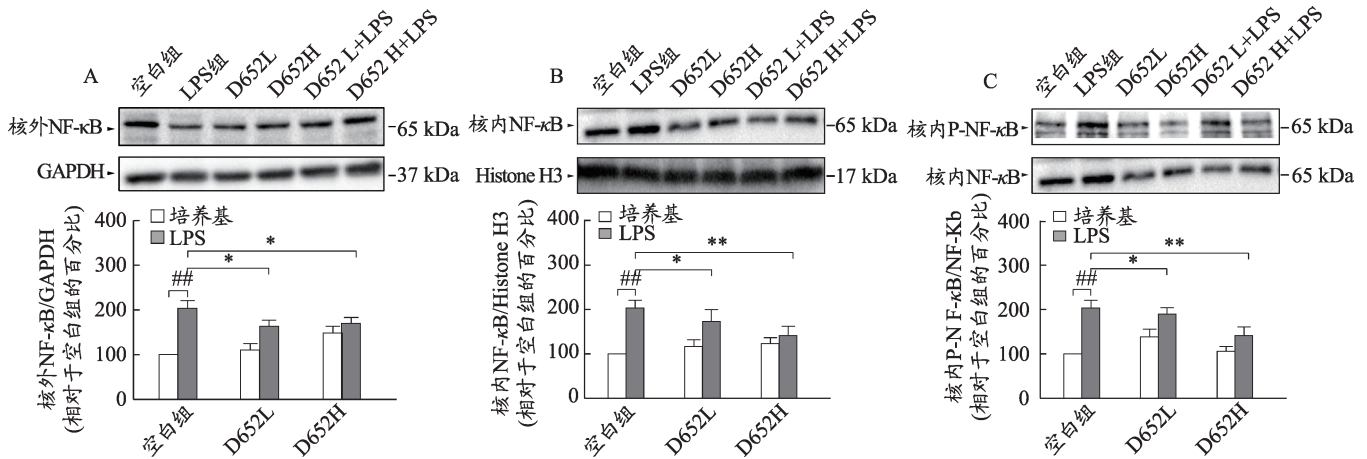


图7 开心散D-652配伍比例对LPS激活状态下的BV2细胞中NF- κ B信号通路的影响($n=3$)

A 开心散D-652对胞浆中NF- κ B的表达影响;B 开心散D-652配伍比例对细胞核内NF- κ B的表达影响;C 开心散D-652配伍比例对细胞核内NF- κ B磷酸化水平的影响

神经递质失调、神经生长障碍、神经内分泌紊乱等多种发病假说。仅针对单一环节起效的抑郁症治疗药物可能无法适应这一复杂疾病的治疗需要,目前常用的单胺类神经递质重摄取抑制剂对30%的病人无效的临床事实也充分说明了这一点^[4-5]。

目前,中枢神经炎症已被认为是抑郁症病理发生发展的重要作用环节。临床发现,抑郁症患者血清中炎性细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF α 水平显著高于正常人。动物研究亦证实,持续的慢性压力应激激活下丘脑-垂体-肾上腺轴,激活小胶质细胞分泌炎性细胞因子,不仅激活色氨酸犬尿酸合成代谢通路导致5-羟色胺合成减少,还可以直接损伤神经元的存活及其发育,使抑制小胶质细胞激活的趋化因子CX3CL1释放减少,小胶质细胞更易被激活,过度分泌促炎因子,构

成恶性循环。NF- κ B信号通路是促进小胶质细胞分泌细胞炎症因子的重要信号通路,LPS是该信号通路的重要诱导因子。LPS作用于小胶质细胞的Toll样受体,促使胞浆中NF- κ B进入胞核,发挥转录调控,促进炎性细胞因子的合成与分泌^[6,7]。因此,抑制脑中炎性细胞因子水平,减轻神经元炎性损伤已成为抑郁症治疗药物的重要开发靶点。

开心散是轻、中度抑郁症的有效治疗方剂^[8]。中医理论认为,抑郁一证,多因七情损伤,气机失和,渐致脏腑气血阴阳失调而形成。脑为元神之府,心脑共主神明。心气不足,无力推动气血精津上荣于脑。倘受七情内伤,或外感湿邪,渐成痰饮水湿清窍蒙蔽,浊阴蔽阻元神,故见忧愁悲伤不乐,好忘,眩晕诸证。该证按脏腑辨证,病在心系。按八纲及气血津液辨证,

为心气虚损,湿浊蔽阻的虚实并见,虚中夹湿。故治法当以补气强心以补心气虚损,开窍化湿以清痰湿蒙蔽。方中用人参大补心气,鼓动气血上荣于脑,使脑得阳气温煦与阴血滋养。远志开心气宁心安神,兼豁痰利窍以泄浊。石菖蒲开窍化湿,茯苓淡渗利水,使痰湿得化,不复上僭。四药共享,共奏补心安神,开心益智之功^[9]。诸多现代研究证实,开心散可通过调节神经递质、神经营养因子、促进神经突触生长等多环节、多靶点发挥抗抑郁与增强学习记忆能力的效用,但是,开心散抑制中枢神经炎症抗抑郁的研究报道却较为少见^[10-13]。而其他研究发现,人参总皂苷与人参皂苷 Rg₃ 等,可抑制慢性压力应激抑郁大鼠 HPA 轴激

活,降低海马中 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 的水平,并通过抑制色氨酸代谢为犬尿酸来提高海马区 5-羟色胺水平^[14-15]。而人参正是开心散的组成药味,并且开心散全方不仅可显著促进人参皂苷溶出,还可促进人参皂苷进入中枢发挥作用^[11-12]。本研究中,我们的确发现,抑制炎症细胞因子表达也是开心散抗抑郁效用发挥的重要方式,各个比例均表现出抑制炎症因子表达的效用,未表现出统计学差异,但人参与远志含量较高的 D-652 配伍比例作用趋势最明显。因此,我们将对开心散调控中枢神经炎症的功效物质基础进行深入的研究,全面揭示开心散抗抑郁的作用环节与抗抑郁物质基础。

参考文献

- 1 李景荣. 备急千金要方校释. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 320.
- 2 沈澍农. 医心方校释. 北京: 学苑出版社, 2001: 1635.
- 3 李志庸. 张景岳医学全书. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 1614.
- 4 Friedrich M J. Depression Is the Leading Cause of Disability Around the World. *Jama*, 2017, 317:1517-1522.
- 5 Santarsieri, D.; Schwartz, T. L., Antidepressant efficacy and side-effect burden: a quick guide for clinicians. *Drugs in context* 2015, 4:212290.6
- 6 Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, et al. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 2018, 173:1073-1081.
- 7 Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a Microglial Disease. *Trends in Neurosciences*, 2015, 38:637-658.
- 8 包祖晓, 赵国平, 孙伟, 等. 开心散治疗轻、中度抑郁症临床观察. 中华中医药学刊, 2011, (5): 987-988.
- 9 陈潮祖. 中医治法与方剂(第5版). 北京: 人民卫生出版社, 2016: 610.
- 10 曹程, 肖钧元, 刘梦秋, 等. 中药复方开心散调控神经营养因子抗抑郁物质基础与作用机制研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(06): 847-855.
- 11 Zhu Y, Chao C, Duan XZ, et al. Kai-Xin-San series formulae alleviate depressive-like behaviors on chronic mild stressed mice via regulating neurotrophic factor system on hippocampus. *Sci Rep*. 2017, 7:1467.
- 12 Zhu KY, Mao QQ, Ip SP, et al.. A standardized Chinese herbal decoction, kai-xin-san, restores decreased levels of neurotransmitters and neurotrophic factors in the brain of chronic stress-induced depressive rats. *eCAM*. 2012, 2012: 149256.
- 13 Zhu Y, Duan X, Huang F, et al. Kai-Xin-San, a traditional Chinese medicine formula, induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: Modulating neurotransmitter regulation enzymes and potentiating NGF inducing neurite outgrowth. *J Ethnopharmacol*. 2016, 193:272-282.
- 14 Kang A, Xie T, Zhu D, et al. Suppressive Effect of Ginsenoside Rg3 against Lipopolysaccharide-Induced Depression-Like Behavior and Neuroinflammation in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65: 6861-6869.
- 15 Zhao J, Lu S, Yu H, et al. Baicalin and ginsenoside Rb1 promote the proliferation and differentiation of neural stem cells in Alzheimer's disease model rats. *Brain Research*, 2018, 1678:187-194.
- 16 Zhu KY, Fu Q, Xie HQ, et al. Quality assessment of a formulated Chinese herbal decoction, Kaixinsan, by using rapid resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry: A chemical evaluation of different historical formulae. *Journal of Separation Science* 2010, 33(23-24): 3666-3674.
- 17 Wei W, Qing-Ping L, Li-Hui Q, et al. The effect of Acorusgramineus on the bioavailabilities and brain concentrations of ginsenosides Rg1, Re and Rb1 after oral administration of Kai-Xin-San preparations in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 131(2): 313-320.

Exploration of Anti-depression Mechanism of Kai-Xin-San via Regulation of Inflammation Cytokines of Hippocampus on Chronic Unpredictable Mild Stress Induced Mice

Qu Suchen, Cao Cheng, Qi Mingzhu, Liu Mengqiu, Duan Jinao, Zhu Yue

(School of Pharmacy, Key Laboratory for Modern Research of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu, Jiangsu

*Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nation and local union project research center
of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Innovative drug from TCM Formulae and Jiangsu
Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing , 210023, China)*

Abstract: Objective To explore the anti-depression mechanism of Kai-Xin-San via regulation of inflammation cytokine levels in hippocampus of depression-like mice. Methods The extracts of Kai-Xin-San (KXS) were prepared with different compatible ratios were prepared and the anti-depression effects of Kai-Xin-San were evaluated by behavioral tests on chronic expected mild stress (CUMS) induced depression-like mice. Amounts of LPS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampus were determined by ELISA tests. Morphology of microglia was observed by immunohistochemistry methods in hippocampus. BV2 mouse microglia cell line was used to evaluate the effect of Kai-Xin-San on decreasing the expression of inflammatory cytokines. In addition, effects of KXS on regulating NF- κ B signaling pathway were explored by Western blotting. Result Kai-Xin-San significantly ameliorated the depression-like behaviors in presence of increased sucrose preference rate and decreased immobile time of tail suspension and forced swimming. D-652 ratio showed comparative better effect in behavior tests and decreasing the expressions of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampus. On BV2 cells, KXS also decreasing expressions of inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B entering into nuclear and suppressing the phosphorylation of NF- κ B. Conclusions Regulation of inflammation cytokines in hippocampus accounted for KXS exerting anti-depression effect on CUMS induced depression-like mice.

Keywords: Kai-Xin-San, neuronal inflammation, depression

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)