

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20250303004

# 四逆散对缺血性卒中后抑郁小鼠抑郁样行为的作用及其对 SIRT3/SOD2 通路的影响

都丹阳<sup>1</sup>, 侯芳琴<sup>2</sup>, 李海波<sup>3</sup>

1. 辽宁中医药大学第一临床学院(辽宁 沈阳 110847); 2. 遵义医科大学药学院(贵州 遵义 563000);  
3. 辽宁中医药大学中医学院(辽宁 沈阳 110847)

**【摘要】 目的** 研究四逆散对缺血性卒中后抑郁(PSD)小鼠抑郁样行为的作用及可能的机制。**方法** 通过大脑中动脉栓塞(MCAO)联合慢性不可预知温和应激(CUMS)构建 PSD 小鼠模型。完成建模后,将 75 只符合标准的雄性 C57BL/6J 小鼠随机分配至 PSD 相关组:PSD 组、PSD+四逆散低剂量组、PSD+四逆散中剂量组、PSD+四逆散高剂量组、PSD+氟西汀组,每组 15 只。另选取 30 只仅接受麻醉及血管分离操作(未行 MCAO 和 CUMS)的雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为假手术组和假手术+四逆散高剂量组,每组 15 只。给药组小鼠分别灌胃氟西汀或四逆散(4.9 g/kg、9.8 g/kg 和 19.6 g/kg),假手术组和假手术+四逆散高剂量组分别灌胃 0.9% 氯化钠溶液和四逆散(19.6 g/kg),连续 28 d。评估小鼠抑郁样行为,用酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测大脑内侧前额叶皮质(mPFC)中 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,基于酶偶联比色法测定腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)活性,通过分光光度法确定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)与还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)比值,观察线粒体超微结构,Western blot 法检测沉默信息调控因子 3(SIRT3)、超氧化物歧化酶 2(SOD2)和凋亡相关蛋白表达。**结果** PSD 组小鼠体重降低,蔗糖偏好率降低,悬尾不动时间延长,显示抑郁样行为。四逆散干预后,小鼠体重增加,蔗糖偏好率升高,悬尾不动时间缩短,抑郁样行为改善。PSD 小鼠 mPFC 中 ROS 和 MDA 水平增加,SOD 活力、ATP 和 NADP<sup>+</sup>/NADPH 比值降低,四逆散能逆转这些变化。PSD 小鼠 mPFC 中 SIRT3 和 SOD2 蛋白表达减少,Bcl-2 相关 X 蛋白/B 淋巴细胞瘤-2(Bax/Bcl-2)比值和剪切型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白水平增加,四逆散能逆转这些蛋白变化,表明四逆散可能通过调节线粒体功能和抗氧化途径改善 PSD 小鼠的抑郁样行为。**结论** 四逆散具有明显改善 PSD 小鼠抑郁样行为的作用,其机制与调控 SIRT3/SOD2 信号通路抑制线粒体氧化应激,进而抑制细胞凋亡有关。

**【关键词】** 脑卒中;抑郁;四逆散;线粒体;氧化应激;凋亡;小鼠模型;中药研究

## Effects of Sini San on depressive-like behaviors in mice with post-ischemic stroke depression and its influence on SIRT3/SOD2 signaling pathway

DU Danyang<sup>1</sup>, HOU Fangqin<sup>2</sup>, LI Haibo<sup>3</sup>

1. First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847, China;  
2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 3. School of Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Sini San (SNS) on depressive-like behaviors and its potential mechanism of action in mice with post-stroke depression (PSD) following ischemic stroke. **Methods** A PSD mouse model was established by combining middle cerebral artery occlusion (MCAO) with chronic unpredictable mild stress (CUMS). After successful modeling, 75 eligible male C57BL/6J mice were randomly assigned to PSD-related groups: PSD group, PSD+SNS low-dose group (4.9 g/kg), PSD+SNS medium-dose group (9.8 g/kg), PSD+SNS high-dose group (19.6 g/kg), and PSD+Fluoxetine group (n=15 per group). An additional 30 male C57BL/6J mice undergoing anesthesia and vascular dissection only (without MCAO or CUMS) were randomly divided into a sham surgery group and a sham surgery+SNS high-dose (19.6 g/kg) group (n=15 per group). Treatment groups received daily gavage of fluoxetine or SNS (4.9, 9.8, or 19.6 g/kg) for 28 consecutive days. The sham surgery group and sham surgery+SNS high-dose group received 0.9% saline and SNS (19.6 g/kg) via gavage, respectively,

[基金项目] 辽宁省科技计划项目(2022JH2/101300058)

[作者简介] 都丹阳,女,硕士研究生,主要从事心脑血管疾病的基础及临床研究

[通信作者] 李海波,教授,博士研究生导师;

E-mail: 735658485@qq.com

for 28 days. Depressive-like behaviors were assessed. Levels of serotonin (5-HT), norepinephrine (NE), reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in the medial prefrontal cortex (mPFC) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Adenosine triphosphate (ATP) activity was determined using an enzyme-coupled colorimetric assay. The ratio of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) to reduced NADP<sup>+</sup> (NADPH) was measured spectrophotometrically. Mitochondrial ultrastructure was observed. Protein expression of sirtuin 3 (SIRT3), superoxide dismutase 2 (SOD2), and apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3) was detected by Western blot analysis. **Results** Mice in the PSD group exhibited decreased body weight, reduced sucrose preference rate, and prolonged immobility time in the tail suspension test, indicating depressive-like behaviors. SNS intervention increased body weight, elevated sucrose preference rate, shortened tail suspension immobility time, and ameliorated these depressive-like behaviors. PSD mice showed increased ROS and MDA levels, and decreased SOD activity, ATP levels, and NADP<sup>+</sup>/NADPH ratio in the mPFC; SNS reversed these changes. Reduced protein expression of SIRT3 and SOD2, increased Bax/Bcl-2 ratio and cleaved Caspase-3 levels were observed in the mPFC of PSD mice; SNS reversed these protein alterations. This suggests SNS may improve depressive-like behaviors in PSD mice by regulating mitochondrial function and antioxidant pathways. **Conclusions** SNS exerts significant antidepressant effects on depressive-like behaviors in PSD mice. Its mechanism is associated with the modulation of the SIRT3/SOD2 signaling pathway, suppressing mitochondrial oxidative stress and thereby inhibiting neuronal apoptosis.

**Keywords:** stroke; depression; Sini San; mitochondria; oxidative stress; apoptosis; mice model; Chinese materia medica research

卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是缺血性脑卒中最常见的并发症之一,其特征包括快感缺失、情绪低落、兴趣缺乏、内疚及无价值感等<sup>[1]</sup>。PSD严重影响患者生活质量和神经功能的恢复,增加脑卒中患者的致残率、病死率和自杀率,给社会和家庭造成沉重精神和经济负担<sup>[2]</sup>。PSD目前仍以选择性5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂(SSRI)的药物治疗为主,主要包括氟西汀、舍曲林、西酞普兰等<sup>[3]</sup>。然而,临床实践证明SSRI只能在一定程度上改善PSD的抑郁症状,同时,因其可导致脑出血、勃起功能障碍、停药反应、自杀意念和行为风险增加等较严重的不良反应,限制了其在临床应用<sup>[4-5]</sup>。因此,寻找疗效更好和安全性更高的药物,对于PSD的治疗有着重要的社会意义及广阔的临床应用前景。

近年来研究表明,线粒体氧化应激与细胞凋亡在PSD的病理进程中发挥关键作用。线粒体作为活性氧(ROS)的主要来源,其功能失调可导致ROS过度积累,引发脂质过氧化、蛋白质损伤及DNA断裂,进而破坏线粒体膜结构及抑制腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)生成,最终通过激活线粒体凋亡途径导致神经元丢失。大脑内侧前额叶皮质(mPFC)作为情绪调节的核心脑区,其线粒体超微结构损伤与氧化应激水平升高已被证实与抑郁样行为密切相关。因此,靶向调控线粒体氧化应激及凋亡通路可能为PSD治疗提供新方向<sup>[6]</sup>。

四逆散首载于汉代张仲景所著的《伤寒论》,由柴胡、白芍、枳实、炙甘草四味药物组成。四逆散具有保肝<sup>[7]</sup>、抗肿瘤<sup>[8]</sup>、降血糖<sup>[9]</sup>等多重药理作用。研究<sup>[10]</sup>报道,四逆散具有疏肝解郁、和解表里之功效,为具有调节情志作用的经典名方,同时也是中医临床治疗抑郁的基础方。值得注意的是,四逆散能够通过抑制线粒体功能障碍、氧化应激和细胞凋亡发挥抗抑郁作用<sup>[11-13]</sup>。但是,四逆散能否通过抑制氧化应激和细胞凋

亡改善PSD的抑郁症状尚不清楚。因此,本研究采用大脑中动脉栓塞(MCAO)联合慢性不可预知温和应激(CUMS)构建PSD小鼠模型,探讨四逆散治疗PSD的作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 雄性C57BL/6J小鼠105只(体质量18~22 g,周龄8~10周),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产合格证号:SCXK(湘)2019-0004。动物使用许可证号:SYXK(黔)2021-0003。所有小鼠均饲养于遵义医科大学SPF级动物实验室,昼夜循环为12 h/12 h,环境温度为(25±1)℃,湿度为(55±10)%,所有小鼠均可自由获取食物和水。所有动物实验均符合《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892—2018)》并经遵义医科大学伦理委员会批准(伦理批准号:ZMU21-2409-020)。

1.1.2 药物与试剂 柴胡、白芍、枳实、炙甘草购自辽宁中医药大学附属医院,由辽宁中医药大学吕佳教授鉴定为正品。四逆散制备过程如下:以上4种药材按1:1:1:1的质量比例配制。将4种药材粉碎为粗粉,置于其10倍质量的蒸馏水中浸泡1 h,采用武火迅速煮沸,再转文火慢炖40 min后,停止加热并待药液自然冷却至室温,采用8层纱布过滤并收集滤液。加入药材质量8倍的水,重复上述蒸煮步骤,再次用8层纱布过滤获取滤液。将2次所得滤液合并,利用旋转蒸发器浓缩至浓度为1.96 g/mL储备液,并于4℃条件下保存。结合以往文献报道<sup>[10]</sup>,四逆散低剂量的确定根据其临床常用剂量,按照人与小鼠给药剂量的换算系数换算为低剂量为4.9 g/kg,以2倍剂量9.8 g/kg为中剂量和4倍剂量19.6 g/kg为高剂量。

氟西汀(批号:SF8500)、放射免疫沉淀试验(RIPA)

裂解液(批号:R0010),北京索莱宝科技有限公司;5-HT测定试剂盒(批号:H104-1-2)、去甲肾上腺素(NE)测定试剂盒(批号:H096-1-2)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(批号:A001-3-2)、ROS测定试剂盒(批号:E004-1-1)、丙二醛(MDA)测试盒(批号:A003-1-2),南京建成生物工程研究所;二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P0009),上海碧云天生物技术有限公司;增强型化学发光液(ECL)(批号:MA0186-1),大连美仑生物技术有限公司;腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)活性检测试剂盒(批号:ab176724)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)检测试剂盒(批号:ab109714)、沉默信息调控因子3(SIRT3)检测试剂盒(批号:ab246522)、超氧化物歧化酶2(SOD2)检测试剂盒(批号:ab68155)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)检测试剂盒(批号:ab32503)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)(1:1 000)检测试剂盒(批号:ab182858)、剪切型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)抗体检测试剂盒(批号:ab214430),美国Abcam公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体检测试剂盒(批号:60004-1-Ig),武汉三鹰生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 MCAO栓线(型号:1620-50A4),北京西浓科技有限公司;Bio-Rad ChemiDoc MP全能型成像系统(型号:ChemiDocXRS),美国Bio-Rad公司;Multiskan全波长酶标仪(型号:Thermo Multiskan GO),美国Thermo Fisher Scientific公司;透射电子显微镜(型号:JEM-1400FLASH),日本电子株式会社。

1.2 分组与造模 首先采用改良Zea Longa法建立MCAO小鼠模型<sup>[14]</sup>,主要实验步骤如下:小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 g/L),每只30 mg/kg,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎CCA和ECA后,于CCA处切口并将栓线(直径0.36 mm)插入ICA内,结扎并缝合创口2 h后,将线栓拔出约1 cm行再灌注。术后24 h进行神经功能评分。0分:无神经功能损伤症状;1分:瘫痪侧前爪不能完全伸展;2分:行走时向瘫痪侧转圈;3分:行走时向瘫痪侧倾倒;4分:不能自动行走,存在意识丧失现象。选取神经功能评分1~3分小鼠,入选小鼠在孤养基础上进行CUMS刺激28 d建立PSD模型,选择7种刺激方式,分别为禁食24 h、禁水24 h、夹尾2 min、强迫游泳5 min、潮湿垫料24 h、倾笼7 h、水平振荡5 min。每日随机选取2项刺激方式且保持连续2 d刺激不一致。完成建模后,将75只符合标准的雄性C57BL/6J小鼠随机分配至PSD相关组:PSD组、PSD+四逆散低剂量组、PSD+四逆散中剂量组、PSD+四逆散高剂量组、PSD+氟西汀组,每组15只。另选取30只仅接受麻醉及血管分离操作(未行MCAO和CUMS)的雄性C57BL/6J小鼠,随机分为假手术组和假

手术+四逆散高剂量组,每组15只。全实验共设置7组,每组15只,总计105只小鼠。

1.3 干预 造模结束后,立即通过糖水偏好实验(SPT)、悬尾实验(TST)和强迫游泳实验(FST)评估小鼠抑郁样行为,确认模型成功。在造模后第30天,给予假手术+四逆散高剂量组和PSD+四逆散高剂量组小鼠四逆散(19.6 g/kg)、PSD+四逆散中剂量组小鼠四逆散(9.8 g/kg)、PSD+四逆散低剂量组小鼠四逆散(4.9 g/kg),给予PSD+氟西汀组小鼠氟西汀(5 mg/kg),假手术组和PSD组则给予等体积的0.9%氯化钠溶液。各组小鼠均干预4周,每日1次,连续28 d后,进行行为学检测,随后采用戊巴比妥钠(30 g/L)腹腔注射麻醉小鼠,每只30 mg/kg,取大脑内侧前额叶皮质(mPFC)存储于-80℃条件下备用。

#### 1.4 检测指标及方法

1.4.1 体质量 于给药第28天称量记录小鼠体质量,观察各组小鼠体质量的变化。

1.4.2 SPT 小鼠在实验前3天置于放有2个水瓶的笼中,2个水瓶内均装有蔗糖水(10 g/L),进行适应性饲养24 h后,每只小鼠笼内放置2个500 mL的水瓶,1瓶装蔗糖水(10 g/L),1瓶装有纯水。待小鼠自由饮水后,禁食、禁水24 h。SPT正式测试,每笼中放置100 mL的蔗糖水(10 g/L)和100 mL的纯水,3 h后取走水瓶并记录各组小鼠饮用的蔗糖水量与纯净水量。采用以下公式计算小鼠的糖水偏好度:SPT(%)=(蔗糖水饮用量/蔗糖水饮用量+纯净水饮用量)×100%。

1.4.3 TST 将小鼠尾部用胶带粘贴并悬挂于距地面50 cm的高度,胶带粘贴位置距离尾尖约1 cm。实验持续6 min,其中前1分钟作为适应阶段,不计入数据分析。随后5分钟内,记录小鼠的不动持续时间,即小鼠在被动悬挂状态下完全保持静止的时间段。

1.4.4 FST 将小鼠置于透明圆柱体容器(直径为20 cm,内装25 cm高的水,水温维持在25℃)。各组小鼠被迫游泳6 min,其中前1分钟作为适应阶段,不计入数据分析。随后5分钟内,记录小鼠的不动持续时间,即小鼠漂浮在水中且不进行挣扎,仅进行必要动作以保持头部浮出水面的时间。

1.4.5 酶联免疫吸附分析(ELISA) 将小鼠mPFC脑组织进行匀浆后,4℃条件下以3 000 r/min离心20 min,取上清。采用相关检测试剂盒,分别检测5-HT、NE、ROS和MDA含量以及SOD活力。

1.4.6 ATP含量的测定 收集脑组织线粒体,即取新鲜脑组织,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,洗净血水,冰浴中剪碎,加入A液(甘露醇0.3 mol/L,乙二胺四乙酸0.1 mmol/L, pH=7.4,使用前加无脂肪酸的牛血清蛋白1 g/L),匀浆,组织研磨20次;将组织匀浆物转移到离心

管, 4 °C, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀; 取上清, 转移至新的离心管中, 4 °C, 10 000 r/min 再次离心 10 min, 留取沉淀即为脑组织线粒体。

将脑组织线粒体重悬于 100  $\mu$ L ATP 测定缓冲液后, 将组织匀浆以 13 000 r/min 离心 10 min。随后, 在上清液中加入 ATP 探针, 严格按照 ATP 检测试剂盒说明书操作, 在 590 nm 处测量吸光度波长。

1.4.7 NADP<sup>+</sup>/NADPH 测定 按上述方法收集脑组织线粒体并将其重悬于缓冲液中充分匀浆后以 10 000 r/min 离心 10 min。按照 NADP<sup>+</sup>/NADPH 检测试剂盒说明书操作, 在 550 nm 处测量含葡萄糖-6-磷酸脱氢酶工作溶液的吸光度并计算 NADP<sup>+</sup>/NADPH。

1.4.8 透射电子显微镜观察线粒体超微结构 将小鼠脑组织置于戊二醛 (25 g/L) 24 h 后, 再于四氧化锇 (10 g/L) 中保存 2 h, 经分级丙酮中脱水后, 切片 (约 80 nm) 采用醋酸铀酰和柠檬酸铅进行染色。通过透射电子显微镜观察线粒体的形态。

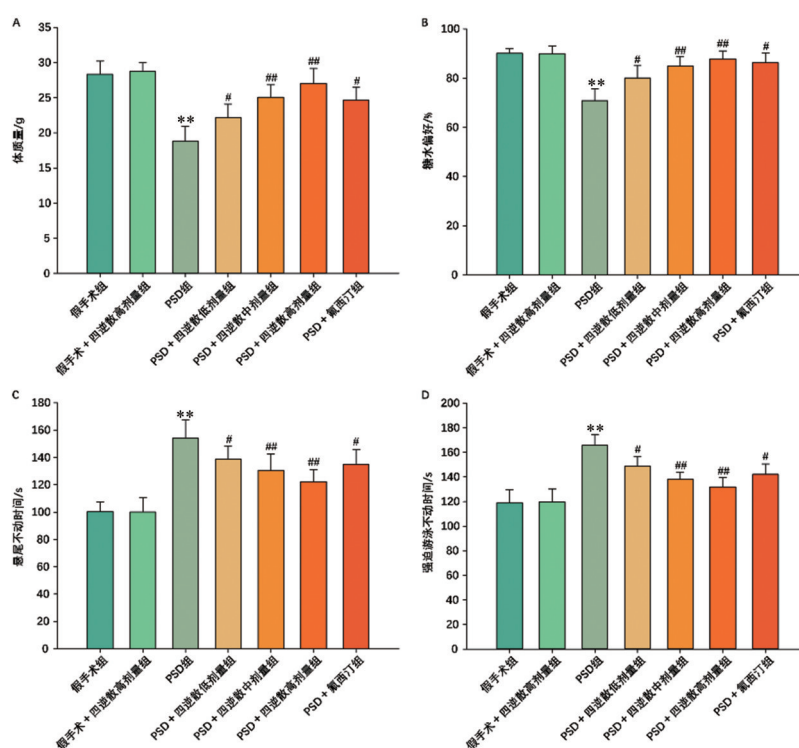
1.4.9 免疫印迹实验 提取小鼠 mPFC 脑组织总蛋白, 取等量蛋白质 (30  $\mu$ g) 进行十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离, 并转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。随后, 采用含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液 (TBST) 配制的 5% (w/v) 脱脂奶粉在室温下将膜封闭 2 h 后, 将其与 SIRT3 (1:1 000)、SOD2 (1:1 000)、Bax (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000) 和 cleaved Caspase-3 (1:1 000) 一

抗在 4 °C 条件下孵育过夜。次日, 将膜放入含有吐温 20 的 1  $\times$  TBST 中洗涤 3 次, 每次 10 min。加入相应二抗 (1:5 000) 在室温下孵育 1 h。采用 ECL 显影后, 使用 ImageJ 软件分析蛋白条带光密度值。以 GAPDH 或  $\beta$ -actin 为内参计算 SIRT3、SOD2、Bax、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 蛋白的相对表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS29.0 软件统计分析实验数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间数据的两两比较采用单因素方差分析, 方差齐采用 Bonferroni 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 对 PSD 小鼠抑郁样行为的影响 与假手术组比较, PSD 组小鼠体质量下降明显 ( $P < 0.01$ )。与 PSD 组比较, PSD+四逆散干预组小鼠的体质量均明显上升, 其中以 PSD+四逆散高剂量组增加最为显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1A。行为学结果显示, 与假手术组比较, PSD 组小鼠的糖水偏好率显著降低 ( $P < 0.01$ ), TST 和 FST 的不动时间明显延长 ( $P < 0.01$ )。与 PSD 组比较, PSD+四逆散干预组小鼠的糖水偏好率明显升高, TST 和 FST 中小鼠的不动时间明显缩短 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1B~D。以上研究结果提示, 四逆散能够明显改善 PSD 小鼠的抑郁样行为。

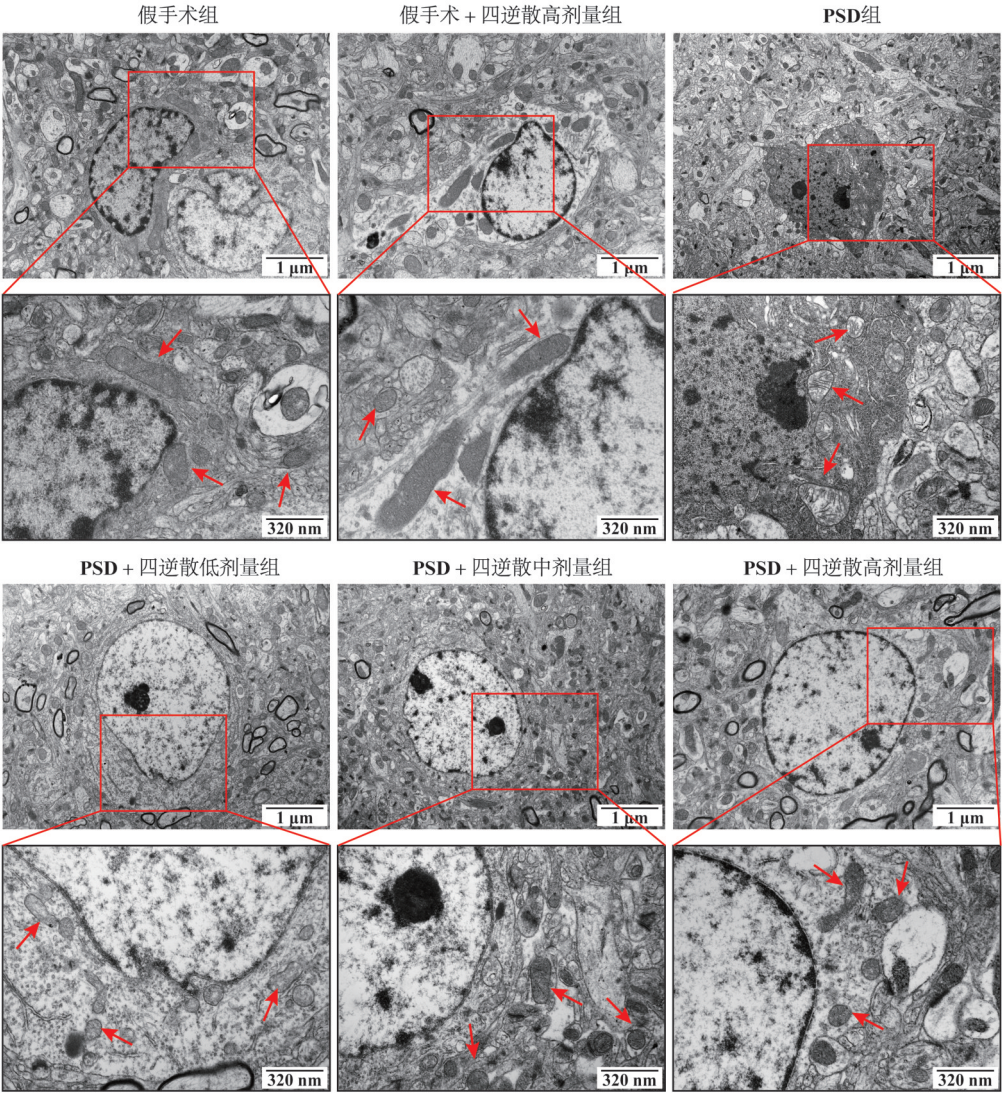


注: PSD 为卒中后抑郁。A 为体质量统计图, B 为糖水偏好统计图, C 为悬尾不动时间统计图, D 为强迫游泳不动时间统计图。与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PSD 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ 。

图1 四逆散对 PSD 小鼠抑郁样行为的影响

2.2 对 PSD 小鼠神经元细胞线粒体超微结构的影响  
与假手术组相比,PSD 小鼠脑组织神经元细胞线粒体出现肿胀、空泡样改变、线粒体嵴消失或断裂。与 PSD

组比较,PSD+四逆散干预组均明显改善以上神经元细胞线粒体出现的病理损伤。见图 2。以上结果提示,四逆散可明显改善小鼠 mPFC 神经元细胞线粒体损伤。



注:红色箭头代表线粒体。

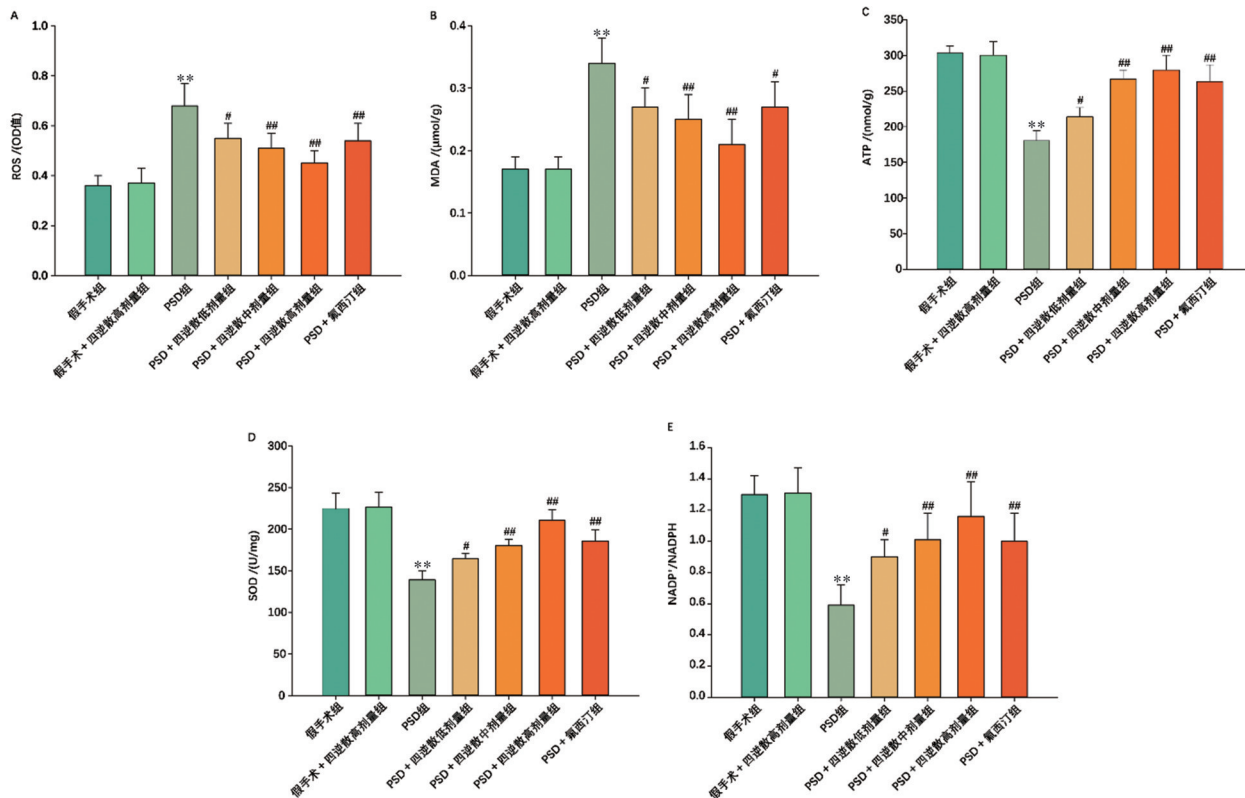
图 2 四逆散对卒中后抑郁(PSD)小鼠前额叶皮质(mPFC)脑组织神经元细胞线粒体超微结构的影响(醋酸铀酰和柠檬酸铅染色)

2.3 对 PSD 小鼠 mPFC 脑组织线粒体氧化应激的影响  
与假手术组比较,PSD 组小鼠 mPFC 脑组织中 ROS 和 MDA 的水平显著升高。与 PSD 组比较,四逆散干预组小鼠 mPFC 脑组织中 ROS 和 MDA 的水平均明显降低。此外,与假手术组比较,PSD 组小鼠 mPFC 脑组织中 SOD 活性及线粒体中 ATP 水平、NADP<sup>+</sup>/NADPH 的比值明显降低。与 PSD 组比较,四逆散干预组小鼠 mPFC 脑组织中 SOD 及线粒体中 ATP、NADP<sup>+</sup>/NADPH 均明显增加。见图 3A ~ E。以上结果提示,四逆散通过抑制线粒体氧化应激损伤发挥抗 PSD 作用。

2.4 对 PSD 小鼠 mPFC 脑组织中 SIRT3、SOD2 和凋亡相关蛋白的影响  
与假手术组比较,PSD 组小鼠 mPFC

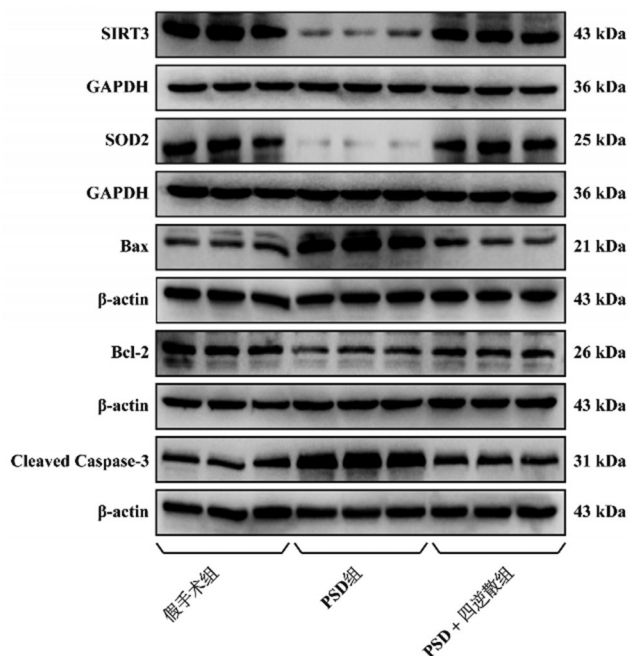
脑组织中 SIRT3 和 SOD2 蛋白表达明显减少,而 Bax/Bcl-2 比值和 cleaved Caspase-3 蛋白水平明显增加。与 PSD 组比较,四逆散干预组小鼠 mPFC 脑组织中 SIRT3 和 SOD2 蛋白表达均明显增加,而 Bax/Bcl-2 比值和 cleaved Caspase-3 蛋白水平均明显减少(图 4、图 5A ~ D)。以上结果提示,四逆散抗 PSD 的作用与调控 SIRT3 信号途径进而抑制细胞凋亡有关。

2.5 对 PSD 小鼠 mPFC 脑组织中 5-HT 和 NE 水平的影响  
与假手术组比较,PSD 组小鼠 mPFC 脑组织中 5-HT 和 NE 的水平显著降低。与 PSD 组比较,四逆散干预组小鼠 mPFC 脑组织中 5-HT 和 NE 的水平均明显升高。见图 6A、B。以上结果提示四逆散可显著改善脑组织中 5-HT 和 NE 含量,从而发挥抗 PSD 作用。



注:PSD为卒中后抑郁,ROS为活性氧,MDA为丙二醛,ATP为腺嘌呤核苷三磷酸,SOD为超氧化物歧化酶,NADPH为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,NADP<sup>+</sup>为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。A为ROS表达统计图,B为MDA表达统计图,C为ATP表达统计图,D为SOD表达统计图,E为NADP<sup>+</sup>/NADPH统计图。与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与PSD组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ; $\bar{x}\pm s$ , $n=4$ 。

图3 四逆散对PSD小鼠前额叶皮质(mPFC)脑组织氧化应激的影响

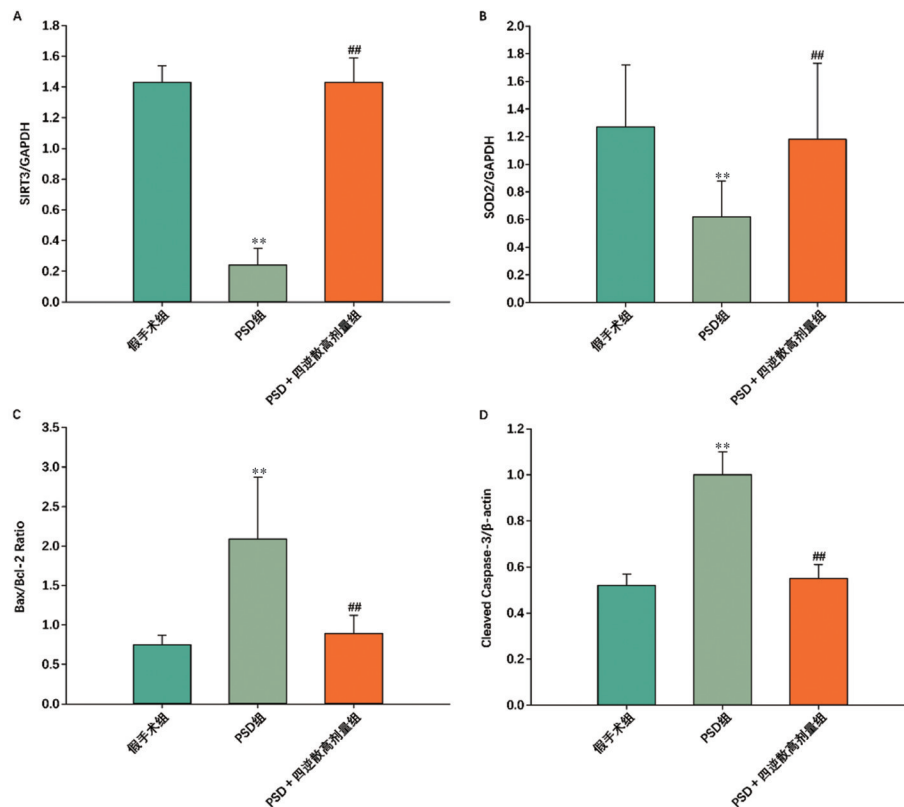


注:SIRT3为沉默信息调控因子3,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,SOD2为超氧化物歧化酶2,Bax为Bcl-2相关X蛋白, $\beta$ -actin为 $\beta$ -肌动蛋白,Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2,cleaved Caspase-3为剪切型胱天蛋白酶-3。

图4 各组小鼠前额叶皮质(mPFC)脑组织中SIRT3、SOD2和凋亡相关蛋白表达电泳

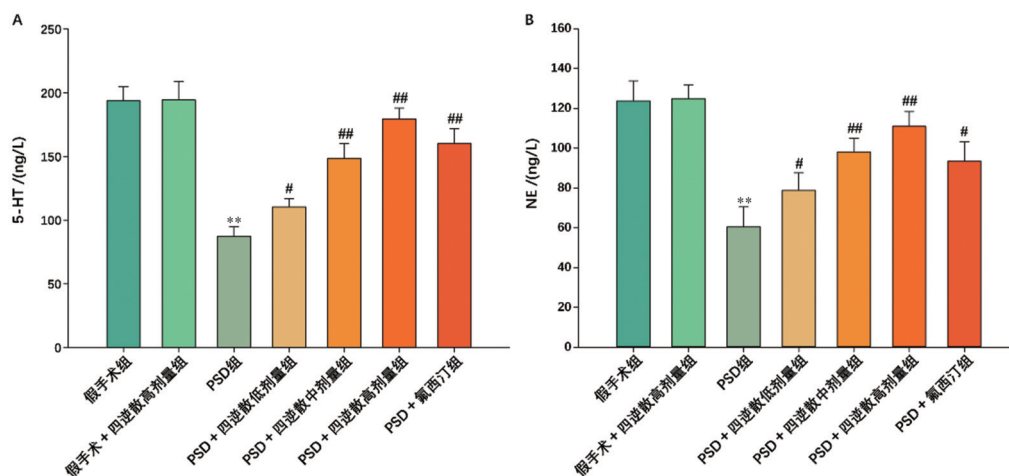
### 3 讨论

PSD归属于中医学“郁证”范畴,病位在脑,与心、肝、肾密切相关,卒中后脑窍受损,脑络痹阻<sup>[15]</sup>,郁阻气机,肝失疏泄,肝郁气滞,而致情绪抑郁。结合以往研究报道,我们发现四逆散抗抑郁的机制可能与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴、调控炎症因子水平及神经递质、增加脑源性神经营养因子的表达及调节相关信号通路有关<sup>[16]</sup>。四逆散可通过调控相关通路抑制小胶质细胞M1极化介导炎症反应,从而改善CUMS小鼠的抑郁样行为<sup>[13]</sup>。许嘉芯等<sup>[17]</sup>进行的单中心、随机、双盲、剂量对照研究提示,四逆散加减方可有效改善焦虑状态。PSD患者服用加味四逆颗粒后,血清NE、5-HT水平变化明显优于单独服用盐酸氟西汀,证实其临床有效性<sup>[18]</sup>。一项荟萃分析<sup>[19]</sup>显示,加味四逆散对PSD患者疗效优于盐酸氟西汀。因此我们提出“四逆散具有改善PSD抑郁样症状作用”的科学假设。为了验证该假设,本研究采用MCAO联合CUMS法构建PSD模型这一经典模型,观察四逆散对PSD抑郁样行为的作用及其可能的作用机制。研究结果发现,PSD小鼠的体质量明显减少并出现明显的抑郁样行为,与以往研究报道



注:PSD为卒中后抑郁,SIRT3为沉默信息调控因子3,SOD2为超氧化物歧化酶2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2,cleaved Caspase-3为剪切型胱天蛋白酶-3。A为SIRT3相对表达统计图,B为SOD2相对表达统计图,C为Bax/Bcl-2统计图,D为cleaved Caspase-3相对表达统计图。与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与PSD组比较,## $P<0.01$ ; $\bar{x}\pm s$ , $n=4$ 。

图5 各组小鼠SIRT3、SOD2和凋亡相关蛋白表达水平比较



注:PSD为卒中后抑郁,5-HT为5-羟色胺,NE为去甲肾上腺素。A为5-HT表达统计图,B为NE表达统计图。与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与PSD组比较,## $P<0.01$ ; $\bar{x}\pm s$ , $n=4$ 。

图6 各组小鼠前额叶皮质(mPFC)脑组织中5-HT和NE水平比较

一致<sup>[20-21]</sup>;而四逆散能够明显增加PSD小鼠的体质量并改善其抑郁样症状。以上研究结果提示,四逆散具有良好的抗PSD作用,其作用机制值得深入研究。

线粒体是产生ROS的主要部位,在PSD的发生过程中,线粒体结构被破坏,同时,线粒体电子传递链复合体的活性被明显抑制,使ATP水平和NADP<sup>+</sup>/NADPH的比率下降,进而诱导线粒体内ROS过度产生,最终导

致线粒体氧化应激<sup>[22-23]</sup>。此外,位于大脑的前额叶内侧部分的mPFC属于高度进化的大脑区域,在情绪调节、社会行为、决策制定等方面发挥着关键作用。由于mPFC的结构异常与抑郁样行为密切相关<sup>[24-25]</sup>,本研究重点关注mPFC区域的变化。本研究结果发现,PSD小鼠的mPFC线粒体出现肿胀,线粒体脊断裂或消失;同时,ROS和脂质过氧化物MDA含量增加,抗氧化物酶

SOD、ATP 生成和 NADP<sup>+</sup>/NADPH 的比率减少;而四逆散可明显逆转以上变化。以上结果提示,四逆散的抗 PSD 作用与抑制线粒体氧化应激有关。

SIRT3/SOD2 信号通路是调控线粒体功能和维持机体氧化稳态平衡的重要信号通路<sup>[26]</sup>。SOD2 是主要位于线粒体基质的抗氧化酶,能够将线粒体内过量产生的超氧阴离子转化为过氧化氢,从而降低 ROS 的水平,抑制线粒体损伤<sup>[27]</sup>。SIRT3 是定位于线粒体并在进化上高度保守的烟碱腺嘌呤二核苷酸依赖型去乙酰化酶。SIRT3 可通过上调线粒体基质内的 SOD2,清除过量产生的 ROS,进而发挥保护线粒体和抑制氧化应激的作用<sup>[28-29]</sup>。研究<sup>[30-32]</sup>发现,SIRT3/SOD2 在缺血性脑卒中、抑郁等神经系统疾病中发挥重要作用。本研究结果发现,PSD 小鼠 mPFC 中 SIRT3 和 SOD2 蛋白表达明显下降,而四逆散可明显上调以上两者的表达。此外,PSD 小鼠 mPFC 中促凋亡蛋白 Bax 表达明显升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低,同时,凋亡执行蛋白 cleaved Caspase-3 水平升高;而四逆散可明显逆转上述蛋白的表达或水平的变化。以上研究结果表明,SIRT3/SOD2 在四逆散抗 PSD 诱导的凋亡中发挥重要作用。

综上,四逆散能够明显改善 PSD 小鼠的抑郁样行为,抑制 mPFC 大脑区域的线粒体功能损伤,其作用机制可能与调控 mPFC 组织中 SIRT3/SOD2 信号通路,进而抑制氧化应激和细胞凋亡有关。本研究仅初步证明了四逆散抗 PSD 的作用及其对 SIRT3/SOD2 信号途径的影响,鉴于四逆散作为中药复方的多成分和多靶点的特性,其抗 PSD 的物质基础及其具体作用机制或靶点仍需进一步探究。

#### 参考文献:

- [1] BEN ASSAYAG E, TENE O, KORCZYN A D, et al. Posttraumatic stress symptoms after stroke: the effects of anatomy and coping style [J]. *Stroke*, 2022, 53(6): 1924-1933.
- [2] LIU L, LI X, MARSHALL I J, et al. Trajectories of depressive symptoms 10 years after stroke and associated risk factors: a prospective cohort study [J]. *Lancet*, 2023, 402(Suppl 1): S64.
- [3] GUO J, WANG J, SUN W, et al. The advances of post-stroke depression: 2021 update [J]. *J Neurol*, 2022, 269(3): 1236-1249.
- [4] VOGEL A C, OKENG'O K, CHIWANGA F, et al. MAMBO: Measuring ambulation, motor, and behavioral outcomes with post-stroke fluoxetine in Tanzania: Protocol of a phase II clinical trial [J]. *J Neurol Sci*, 2020, 408: 116563.
- [5] MOHAMUD YUSUF A, BORBOR M, HUSSNER T, et al. Acid sphingomyelinase inhibition induces cerebral angiogenesis post-ischemia/reperfusion in an oxidative stress-dependent way and promotes endothelial survival by regulating mitochondrial metabolism [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(9): 650.
- [6] WU Y, DENG J, MA J, et al. Unraveling the pathogenesis of post-stroke depression in a hemorrhagic mouse model through frontal lobe circuitry and JAK-STAT signaling [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(33): 2402152.
- [7] 冯贺龙, 王晓雪, 张福利. 基于网络药理学的四逆散保肝作用机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6258-6268.
- [8] 陈逸菲, 李笑. 基于网络药理学分析四逆散活性成分对肿瘤血管新生调节作用的分子机制探析 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(3): 306-317.
- [9] 毕艺鸣, 殷贝, 夏亚情, 等. 基于网络药理学探讨四逆散治疗 2 型糖尿病的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 169-177.
- [10] 莫子晴, 蔡皓, 段煜, 等. 柴胡和白芍醋炙前后组方四逆散对抑郁大鼠粪便代谢组学的比较 [J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(2): 216-224.
- [11] DENG D, CUI Y, GAN S, et al. Sinisan alleviates depression-like behaviors by regulating mitochondrial function and synaptic plasticity in maternal separation rats [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154395.
- [12] 王威, 周艳艳, 喻小明, 等. 四逆散对抑郁大鼠 NLRP3 炎症小体及抑郁样行为的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12): 22-30.
- [13] 陈虹云, 杨东英, 廖回庆, 等. 四逆散调控 GSK-3 $\beta$ /A20/C/EBP $\beta$  抑制小胶质细胞激活改善抑郁模型小鼠抑郁样行为 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(12): 16-23.
- [14] GAO J, MA C, XIA D, et al. Icariside II preconditioning evokes robust neuroprotection against ischaemic stroke, by targeting Nrf2 and the OXPHOS/NF- $\kappa$ B/ferroptosis pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(3): 308-329.
- [15] 陈祥, 杨凯琪, 侯臻臻, 等. 醒神解郁汤对卒中后抑郁大鼠模型 IL-33、IL-18、IL-1 $\beta$  影响的实验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(5): 60-65.
- [16] 金霞霞, 董文迪, 闫咏梅, 等. 四逆散及其单味药有效成分抗抑郁的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(12): 29-34.
- [17] 许嘉芯, 杨洪军, 吴宏伟, 等. 四逆散加减方治疗轻、中度广泛性焦虑障碍(肝郁化火证)的单中心、随机、双盲、剂量对照研究 [J/OL]. *中国中药杂志*, 2025 [2025-05-05]. <https://link.cnki.net/doi/10.19540/j.cnki.cjmm.20250414.501>.
- [18] 翁小容. 加味四逆散对卒中后抑郁症患者血清去甲肾上腺素和 5-羟色胺的影响 [J]. *中医临床研究*, 2015, 7(33): 29-30.
- [19] CAI L, JIEJIE L, HU Y, et al. Efficacy and safety of modified Sini San for treating poststroke depression: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Explore (NY)*, 2021, 17(2): 162-169.
- [20] QIAN L, HUANG S, LIU X, et al. Morroniside improves the symptoms of post-stroke depression in mice through the BDNF signaling pathway mediated by MiR-409-3p [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155224.
- [21] HAKON J, QUATTROMANI M J, SJÖLUND C, et al. Inhibiting metabotropic glutamate receptor 5 after stroke restores brain function and connectivity [J]. *Brain*, 2024, 147(1): 186-200.
- [22] REMEDI M S, NICHOLS C G, KOSTER J C. The mitochondria and insulin release: Nnt just a passing relationship [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(1): 5-7.
- [23] WANG P, CUI Y, LIU Y, et al. Mitochondrial ferritin alleviates apoptosis by enhancing mitochondrial bioenergetics and stimulating glucose metabolism in cerebral ischemia reperfusion [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102475.