

桑叶黄酮酶解产物对利血平诱导斑马鱼抑郁的改善作用

郑 萱¹ 吕允珂¹ 周春伶¹ 张 菊¹ 王明雪² 崔施展² 贾东升²

(1. 河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061;

2. 河北省农林科学院经济作物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: [目的] 探究桑叶黄酮酶解产物(EMLF)的抗抑郁作用。[方法] 制备 EMLF 并用 UPLC-MS 分析其成分, 采用 40 mg/L 利血平诱导斑马鱼抑郁模型, 分别设置对照组、模型组、氟西汀组、L-EMLF 组 (20 $\mu\text{g/mL}$)、M-EMLF 组 (40 $\mu\text{g/mL}$) 和 H-EMLF 组 (80 $\mu\text{g/mL}$) 进行新环境行为测试和明暗箱行为测试, 通过苏木素—伊红 (HE) 染色观察各组斑马鱼脑组织结构变化, q-PCR 检测脑组织炎症因子白介素-1 β (*IL-1 β*)、肿瘤坏死因子- α (*TNF- α*)、色氨酸羟化酶-2 (*TPH-2*) 和 5-羟色胺 2A (*5-HT2A*) 受体 mRNA 表达水平, 测定斑马鱼脑组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和活性氧 (ROS) 含量, 利用代谢组学技术对斑马鱼脑组织代谢进行分析, 筛选差异代谢物及相关代谢通路。[结果] UPLC-MS 共鉴定出 10 种黄酮苷元类化合物; 40 mg/L 利血平使斑马鱼出现抑郁样行为, EMLF 改善了抑郁斑马鱼的底栖行为和趋暗行为, 增强其探索欲望; 使中脑区域神经细胞排列紊乱现象得到恢复, 细胞数量增加; 下调 *IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *5-HT2A* mRNA 表达水平, 上调 *TPH-2* mRNA 表达水平, 提高 SOD 活性, 降低 ROS 含量; 显著调节脑组织中 24 种差异代谢物, 主要途径为嘌呤代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、色氨酸代谢以及核黄素代谢。[结论] EMLF 对利血平诱导的斑马鱼抑郁模型具有改善作用, 其作用机制可能是通过调节色氨酸代谢、嘌呤代谢以及精氨酸和脯氨酸代谢通路实现的。

关键词: 桑叶黄酮; 酶解产物; 斑马鱼; 代谢组学; 抑郁

Enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids alleviate depression induced by reserpine in zebrafish

ZHENG Xuan¹ LU Yunke¹ ZHOU Chunling¹ ZHANG Ju¹ WANG Mingxue²
CUI Shizhan² JIA Dongsheng²

(1. College of Bioscience and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China; 2. Cash Crop Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the anti-depression effects of enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids (EMLF). [Methods] EMLF was prepared and its components were analyzed by UPLC-MS. A zebrafish model of depression was induced by 40 mg/L reserpine. Six groups were designed, including the control, model, fluoxetine, L-EMLF (20 $\mu\text{g/mL}$), M-EMLF (40 $\mu\text{g/mL}$), and H-EMLF (80 $\mu\text{g/mL}$) groups. Behavioral tests, including the new tank test and the light-dark box test, were conducted. The structural changes in the brain tissue of zebrafish in each group were observed by HE staining. The mRNA levels of interleukin-1 β (*IL-1 β*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), tryptophan hydroxylase-2 (*TPH-2*), and 5-hydroxytryptamine 2A (*5-HT2A*) receptor in the brain tissue were determined by q-PCR. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of reactive oxygen species (ROS) in the brain tissue of zebrafish were measured. Metabolomics analysis was performed to identify differential metabolites and associated metabolic pathways.

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (编号: 2024348); 河北省现代农业产业技术体系项目 (编号: HBCT2023080204); 河北省农林科学院科技创新专项课题 (编号: 2022KJCXX-JZS-4)

通信作者: 张菊 (1987—), 女, 河北经贸大学副教授, 博士。E-mail: juzi437163804@163.com

贾东升 (1982—), 男, 河北省农林科学院副研究员, 博士。E-mail: jiads1@163.com

收稿日期: 2024-07-12 **改回日期:** 2024-11-29

[Results] UPLC-MS identified 10 flavonoid aglycone compounds. Reserpine (40 mg/L) induced depression-like behaviors in zebrafish, while EMLF alleviated the bottom-dwelling and dark-preference behaviors, restored the orderly arrangement of nerve cells in the midbrain region, and increased the cell number. EMLF treatment down-regulated the mRNA levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , and *5-HT2A* while up-regulating the mRNA level of *TPH-2*. In addition, EMLF increased the SOD activity and reduced the ROS level. Metabolomics analysis revealed that EMLF significantly regulated 24 differential metabolites, primarily affecting purine metabolism, arginine and proline metabolism, tryptophan metabolism, and riboflavin metabolism. **[Conclusion]** EMLF effectively alleviated reserpine-induced depression in zebrafish, potentially by regulating the tryptophan metabolism, purine metabolism, and arginine and proline metabolism.

Keywords: mulberry leaf flavonoids; enzymatic hydrolysates; zebrafish; metabolomics; depression

抑郁症是一种常见的精神疾病,其特征为活动减少,情绪低落,思维和认知功能减慢^[1],严重影响患者生活质量。通常认为,抑郁的发生与5-羟色胺(5-HT)通路抑制、脑源性神经营养因子(BDNF)缺乏及下丘脑—垂体—肾上腺(HPA)轴异常活跃等多种因素关系密切^[2]。目前抑郁的临床治疗药物以选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)为主,SSRIs药物可导致恶心腹泻、失眠不安和性功能障碍等不良反应,严重者可诱发5-HT综合征的发生^[3]。因此,筛选新型抗抑郁药物成为医药研究的热点领域。

中药具有疗效显著、安全可靠以及毒副作用低等优势,被广泛应用于多种疾病的治疗^[4]。桑叶富含黄酮、多酚和多糖等活性成分,具有抗炎、抗氧化及增强免疫活性^[5]。已有研究^[6]发现,桑叶总黄酮在小鼠悬尾和强迫游泳试验中显示出抗抑郁作用。植物体中大部分黄酮类化合物以糖苷形式存在,黄酮糖苷在人体内吸收率低,只有通过肠道菌降解脱糖形成苷元后,才易被人体吸收和利用。课题组^[7]前期曾采用酶解技术对桑叶黄酮进行酶解,发现获取的次级苷或苷元能明显增强桑叶黄酮的抗炎活性,并能改善应激斑马鱼的活动能力及觅食行为,显示出抗抑郁作用,推测桑叶黄酮酶解产物(enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids, EMLF)在抑郁治疗领域具有潜在价值。目前,未见桑叶黄酮酶解产物具有抗抑郁作用的相关报道。

研究拟采用利血平诱导斑马鱼抑郁模型,探究EMLF对斑马鱼抑郁的改善作用,为抗抑郁药物的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

野生型AB系斑马鱼3~6月龄(南京一树梨花生物科技有限公司;合格证号苏ICP2023046901号-1),养殖环境为(28±5)℃,每天光照14 h黑暗10 h,每12 h喂1次丰年虾,试验前适应性喂养14 d。

1.2 材料与试剂

桑叶:2023年10月份采摘于河北省农林科学院种质资源圃,经温春秀研究员鉴定为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶;

桑叶黄酮:黄酮质量分数602.37 mg/g,实验室自制;

蜗牛酶(酶活力3 000 U)、苏木素—伊红:北京索莱宝

科技有限公司;

利血平(纯度≥98.0%)、氟西汀(纯度≥99.0%):上海麦克林生化科技有限公司;

Bouin's固定液:飞净生物科技有限公司;

RNA抽提试剂盒:上海生工生物工程有限公司;

逆转录试剂盒、荧光定量预混试剂:北京天根生化科技有限公司;

超氧化物歧化酶试剂盒、活性氧试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器与设备

冷冻干燥机:FDS-2000型,东京理化器械株式会社;

高速冷冻离心机:H1850R型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

全自动切片机:HS-3345型,金华市华速科技有限公司;

酶标仪:MK3型,美国Thermo Fisher Scientific公司;

荧光定量PCR仪:C1000型,美国Bio-rad公司;

显微镜:B-510LD4型,北京博为高科生物科技有限公司;

超高效液相色谱—质谱联用仪:Thermo Orbitrap Exploris120型,美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.4 试验方法

1.4.1 桑叶黄酮酶解 取2 g桑叶黄酮加水30 mL,调pH至5.5,加蜗牛酶0.5 g,37℃恒温振荡72 h,结束后,加无水乙醇70 mL离心,上清减压浓缩,冷冻干燥。

1.4.2 分组、造模与给药 3~6月龄野生型斑马鱼随机分为对照组(Con)、模型组(Mod)、氟西汀组(Flu)、L-EMLF组(20 μg/mL)、M-EMLF组(40 μg/mL)和H-EMLF组(80 μg/mL),每组10尾。Con组不做任何处理;Mod组暴露于40 mg/L利血平溶液中20 min^[8];Flu组、L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组处理方法同Mod组,应激处理后,Flu组每天暴露于0.01 μg/mL氟西汀中,浸泡给药^[9],L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组分别浸泡于相应浓度的药物中,给药时间均为7 d。

1.4.3 UPLC-MS分析EMLF成分

(1)液相条件:选用Hyperil Gold aQ(100 mm×2.1 mm,1.9 μm)色谱柱;流动相A为甲醇溶液,B为0.1%甲酸水,梯度洗脱程序为0~2 min(95% B)、2~13 min(95%→76% B)、13~25 min(76%→68% B)、25~63 min

(68%→5% B)、63~63.1 min (5%→95% B)、63.1~65 min (95% B),流量 0.3 mL/min,柱温 35 ℃,进样量 5 μL。

(2) 质谱条件:电喷雾(ESI)离子源温度 350 ℃;扫描范围 m/z 100~1 500;分辨率 120 000;正、负离子模式电压分别为 3.5、2.5 kV;鞘气压力 275.8 kPa。

1.4.4 行为学观察 利用新环境水槽(NTT)试验、明暗箱(LDB)试验观察各组斑马鱼行为学差异^[10]。

(1) NTT 试验:测试缸为 1.5 L 梯形水槽(高 15 cm×顶部 28 cm×底部 23 cm×宽 7 cm)。在 1/2 高处绘制水平线,分为上下 2 个部分。斑马鱼给药后,每次 1 尾转移至测试缸中,待其稳定后,记录在 NTT 中的底部潜伏时间和穿越中线次数,时长 5 min。

(2) LDB 试验:测试缸为 12 L 矩形水箱(高 20 cm×长 30 cm×宽 20 cm),以中线为界限,一半采用无光线黑暗处理,一半可透光。斑马鱼给药后,每次 1 尾转移至测试缸中,待其稳定后,记录在 LDB 中的暗箱潜伏时间和进入明箱次数,时长 5 min。

1.4.5 HE 染色观察脑组织结构变化 将解剖出的脑组织置于 Bouin's 固定液中固定 24 h,脱水、石蜡包埋、切片、烘片、脱蜡、苏木素-伊红(HE)染色、中性树胶封片,显微镜下观察并采集图像,使用 Image J 软件统计脑组织细胞数量。

1.4.6 荧光定量 PCR(q-PCR)检测脑组织基因表达水平 q-PCR 检测斑马鱼脑组织 *IL-1β*、*TNF-α*、*TPH-2*、*5-HT2A* mRNA 表达水平。脑组织均浆提取 RNA,逆转录为 cDNA。特异性引物(见表 1),*β-actin* 作为内参基因,总反应体系为 20 μL,q-PCR 仪循环条件为:95 ℃ 15 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.4.7 SOD 活性和 ROS 含量测定 按照试剂盒操作说明书测定 SOD 活性和 ROS 含量,每个样本重复检测 3 次。

1.4.8 非靶向代谢组学测定分析

(1) 样本制备:取斑马鱼脑组织 40 mg,用组织破碎仪

匀浆 50 s,离心 30 s(4 ℃,3 000 r/min),加入 70% 甲醇水内标提取液 400 μL,振荡 5 min(1 500 r/min),冰上静置 15 min。离心 10 min(4 ℃,12 000 r/min),移取上清液 300 μL,-20 ℃ 静置 30 min,再离心 3 min(4 ℃,12 000 r/min),上机分析。

(2) 色谱条件:色谱柱为 Hyperil Gold aQ(100 mm×2.1 mm,1.9 μm);流动相:正离子模式流动相 A 为 0.1% 甲酸水、流动相 B 为乙腈,负离子模式流动相 A 为纯水,流动相 B 为乙腈;柱温 35 ℃;流量 0.35 mL/min;梯度洗脱程序:0~2 min(98% A),2~15 min(98%→2% A);进样量 2 μL。

(3) 质谱条件:离子源温度 320 ℃;扫描范围 m/z 70~1 050;正、负离子模式电压分别为 3.5、3.2 kV;鞘气压力 275.8 kPa。

(4) 代谢组学数据处理与分析:将数据导入 Compound Discover 3.3 软件中进行归一化处理,采用 SIMICA 14.1 软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),VIP>1 及 t 检验($P<0.05$)筛选差异代谢物,使用 MetaboAnalyst 6.0 进行聚类 and 代谢通路富集分析。

1.5 数据统计及分析

试验数据均以平均数±标准差表示,并通过 GraphPad Prism 9.1.0 软件进行分析并绘图。组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 t 检验法。 $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EMLF 成分分析

通过 UPLC-MS 技术对 EMLF 成分进行分析,得到总离子流图(见图 1)。根据质谱数据与 MassLists、ChemSpider、mzCloud 和 mzVault 数据库匹配结果,分析得到 EMLF 的主要黄酮苷元类化合物如表 2 所示,主要鉴定出二氢槲皮素、柚皮素、桑黄素、槲皮素、山柰酚、漆黄素、异鼠李素、泽兰黄酮、圣草酚以及芹菜素 10 种成分。

据报道^[6],黄酮苷元类化合物具有相对分子质量小、极性小和易穿透细胞膜等特点,可迅速达到所需血药浓度,发挥药效。Ge 等^[11]发现,槲皮素通过抑制小鼠的神经炎症和氧化损伤来减轻其抑郁样行为。Bansal 等^[12]发现,柚皮素可通过其抗氧化和抗炎作用恢复犬尿酸通路的改变,具有神经保护作用。其他研究证实,山柰酚^[13]、漆黄素^[14]、圣草酚^[15]以及芹菜素^[16]均具有改善抑郁的作用;而二氢槲皮素^[17]、桑黄素^[18]和异鼠李素^[19]具有治疗抑郁的潜能,表明 EMLF 具有良好的抗抑郁活性。

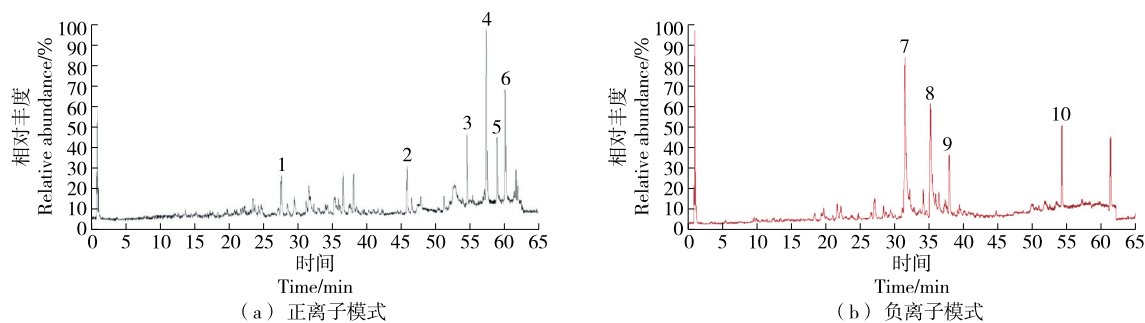
2.2 行为学试验

2.2.1 新环境水槽(NTT)试验 由图 2 可知,与 Con 组相比,Mod 组斑马鱼在底部潜伏时间显著延长($P<0.01$),穿越中线次数明显减少($P<0.01$),表明利血平的诱导降低了斑马鱼的活动水平,减少其探索行为。与 Mod 组相比,

表 1 基因名称及 qPCR 引物序列

Table 1 Gene names and qPCR primer sequences

基因名称	引物序列
<i>β-actin</i> F	ATGGATGAGGAAATCGCTGCC
<i>β-actin</i> R	CTCCCTGATGTCTGGGTCGTC
<i>IL-1β</i> F	TGGACTTCGCAGCACAAAATG
<i>IL-1β</i> R	GTTCACCTTCACGCTCTTGATG
<i>TNF-α</i> F	GACCCAGGGCAATCAACAAG
<i>TNF-α</i> R	CAAGCCACCTGAAGAAAAGGC
<i>TPH-2</i> F	CAGCAAATACTGGGCTCGGA
<i>TPH-2</i> R	TAAAGGATGTCCTGCGGAGC
<i>5-HT2A</i> F	CCTGCATCACTGTGTCCCAT
<i>5-HT2A</i> R	TTGTGTCGGATGGGGTTACG



1. 二氢槲皮素 2. 柚皮素 3. 桑黄素 4. 槲皮素 5. 山柰酚 6. 漆黄素 7. 异鼠李素 8. 泽兰黄酮 9. 圣草酚 10. 芹菜素

图1 EMLF总离子流图

Figure 1 Total ion current diagrams of enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids

表2 EMLF成分结构鉴定结果

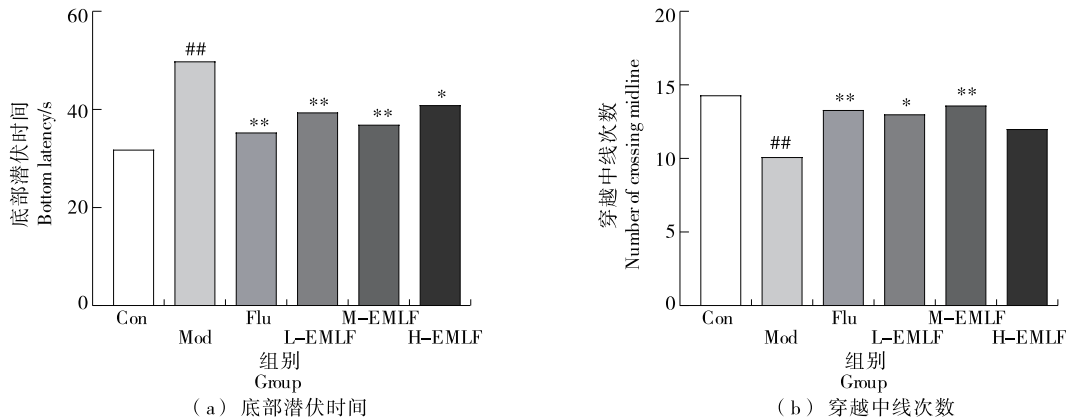
Table 2 Structural identification results of enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids

编号	保留时间/min	离子模式	实际值	测量值	误差($\times 10^{-6}$)	分子式	MS/MS碎片离子	鉴定结果
1	27.51	$[M+H]^+$	303.051 0	303.050 9	-0.32	$C_{15}H_{12}O_7$	125, 151, 175, 177, 199, 217, 241, 285	二氢槲皮素
2	45.64	$[M+H]^+$	271.061 2	271.061 2	0.07	$C_{15}H_{12}O_5$	107, 119, 151, 177, 271	柚皮素
3	54.30	$[M+H]^+$	301.035 4	301.035 2	-0.64	$C_{15}H_{10}O_7$	107, 149, 178, 229, 257, 273, 301	桑黄素
4	57.04	$[M+H]^+$	301.035 4	301.035 2	-0.64	$C_{15}H_{10}O_7$	107, 121, 151, 178, 229, 273, 301	槲皮素
5	58.21	$[M+H]^+$	285.040 5	285.040 4	-0.30	$C_{15}H_{10}O_6$	93, 107, 151, 169, 185, 213, 257, 285	山柰酚
6	59.78	$[M+H]^+$	285.040 5	285.040 4	-0.30	$C_{15}H_{10}O_6$	121, 213, 229, 257, 285	漆黄素
7	31.47	$[M+H]^-$	315.051 0	315.050 9	-0.40	$C_{16}H_{12}O_7$	107, 151, 227, 255, 272, 300, 315	异鼠李素
8	35.21	$[M+H]^-$	315.051 0	315.050 9	-0.40	$C_{16}H_{12}O_7$	315	泽兰黄酮
9	37.90	$[M+H]^-$	287.056 1	287.056 1	-0.07	$C_{15}H_{12}O_6$	65, 83, 107, 151, 287	圣草酚
10	54.29	$[M+H]^-$	269.045 6	269.045 5	-0.18	$C_{15}H_{10}O_5$	107, 149, 181, 201, 225, 269	芹菜素

Flu组、L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组显著缩短底部潜伏时间($P<0.01$ 或 $P<0.05$),Flu组、L-EMLF组和M-EMLF组明显增加穿越中线次数($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。试验结果表明,EMLF改善了抑郁斑马鱼的底栖行为,增强其探索欲望。郭梦杰等^[20]研究发现,利血平会增加斑马鱼的抑郁样行为,高剂量磷虾油可以改善抑郁

斑马鱼的低探索欲望和底栖行为,与试验结果一致。

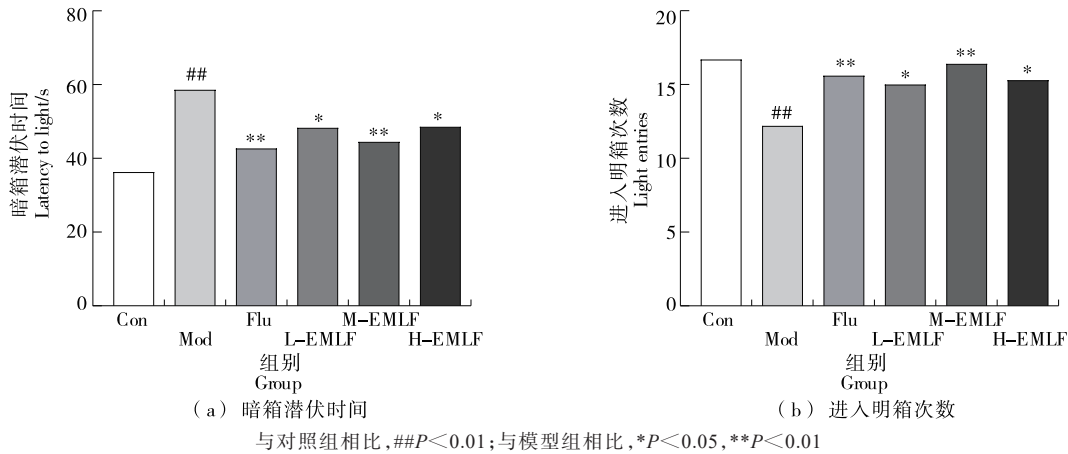
2.2.2 明暗箱(LDB)试验 由图3可知,与Con组相比,Mod组斑马鱼暗箱潜伏时间显著延长($P<0.01$),进入明箱次数明显减少($P<0.01$),表明利血平的诱导使斑马鱼产生趋暗行为。与Mod组相比,Flu组、L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组显著缩短暗箱潜伏时间($P<$



与对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图2 斑马鱼NTT行为测试结果

Figure 2 Results of the NTT test in zebrafish ($n=10$)



与对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图3 斑马鱼LDB行为测试结果

Figure 3 Results of the LDB test in zebrafish ($n=10$)

0.01或 $P<0.05$),显著增加进入明箱次数($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。试验结果表明,EMLF能明显改善抑郁斑马鱼的潜伏及趋暗行为。研究^[21]发现,抗抑郁药物可减少斑马鱼在暗箱的停留时间,增加进入明箱的次数以及停留时间,与试验结果一致。

综上,利血平成功诱导了斑马鱼抑郁模型,且EMLF对斑马鱼抑郁样行为具有改善作用。

2.3 脑组织HE染色

斑马鱼脑组织HE染色结果(图4和图5)显示,利血平诱导抑郁后中脑区域神经细胞的变化明显。Con组中脑区域神经细胞排列整齐紧密,形态正常;与Con组相比,Mod组中脑区域神经细胞排列紊乱,细胞形态不规则,该区域细胞数量显著减少($P<0.01$)。与Mod组相比,Flu组、L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组中脑区域神经细胞排列相对整齐有序,细胞形态有一定的改善,细胞数量显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果表明,EMLF减轻了抑郁斑马鱼脑组织中脑区域神经元的损伤程度。研究^[22]表明,斑马鱼捕获猎物和位置控制行为是由中脑的视觉途径介导的。此外,抑郁往往伴随着海马神经元损伤和突触的可塑性改变^[23]。综上,EMLF可减轻中脑区域神经元的损伤,改善斑马鱼的抑郁状态。

2.4 脑组织炎症因子和5-HT相关因子mRNA表达水平

由图6可知,与Con组相比,Mod组显著上调 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $5-HT2A$ mRNA表达水平($P<0.01$),显著下调 $TPH-2$ mRNA表达水平($P<0.01$);与Mod组相比,Flu组、L-EMLF组和M-EMLF组 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $5-HT2A$ mRNA表达水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$), $TPH-2$ mRNA表达水平显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$);H-EMLF组 $IL-1\beta$ mRNA表达水平降低($P<0.01$), $TNF-\alpha$ 、 $5-HT2A$ 和 $TPH-2$ mRNA表达水平无显著性差异。免疫异常假说认为,抑郁症与机体炎症联系紧密。炎症状态下,促炎因子分泌增加,抗炎因子水平下降,导致神经内分泌及免疫

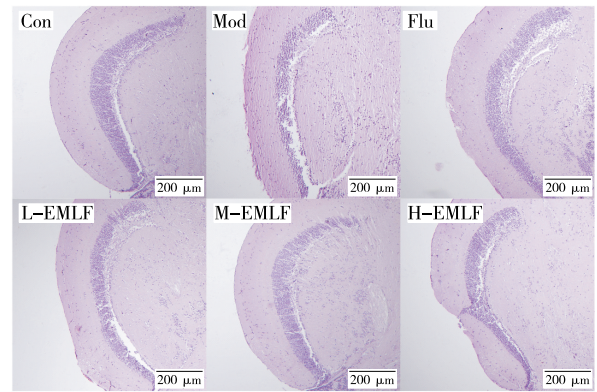
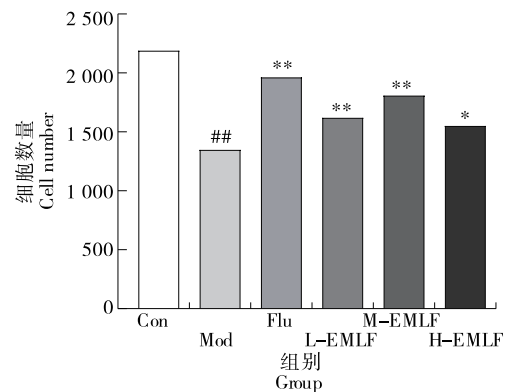


图4 斑马鱼脑组织HE染色结果

Figure 4 Results of HE staining of zebrafish brain tissue ($\times 100$)



与对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图5 细胞数量

Figure 5 Number of cells ($n=3$)

系统功能紊乱,引发抑郁症^[24]。同时,炎症会激活吲哚胺2,3-双加氧酶和单胺氧化酶的活性,加速单胺类神经递质降解,进而引发抑郁症状和病理改变^[25]。研究^[26]证明,抑

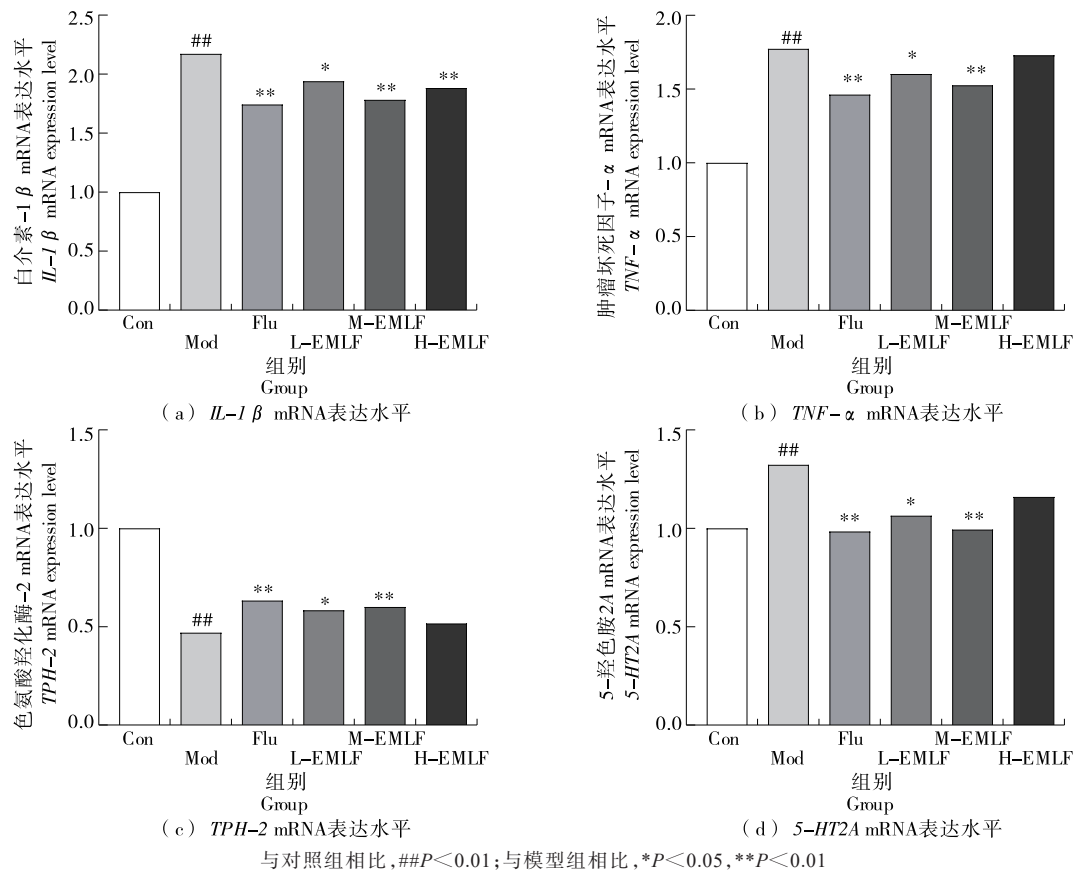


图6 脑组织炎症因子和5-HT相关因子mRNA表达水平

Figure 6 mRNA levels of inflammatory factors and 5-HT related factors in the brain tissue ($n=5$)

郁症患者中枢5-HT缺乏,其前额叶皮层5-HT_{2A}型受体水平会明显升高。此外,色氨酸羟化酶(TPH)作为5-HT合成过程中的关键酶,具有特异性和限速作用,其中TPH-2亚型主要在脊椎动物的中枢神经系统内发挥作用^[27]。结果表明,EMLF可以抑制促炎因子的表达,并通过升高TPH-2和降低5-HT_{2A} mRNA的表达来提高5-HT水平,最终发挥抗抑郁作用。

2.5 脑组织SOD活性和ROS含量

由图7可知,与Con组相比,Mod组脑组织SOD活性降低($P < 0.01$)、ROS含量升高($P < 0.01$);与Mod组相比,Flu组、L-EMLF组和M-EMLF组SOD活性升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),H-EMLF组无显著性差异;与Mod组相比,Flu组、L-EMLF组、M-EMLF组和H-EMLF组ROS含量均显著降低($P < 0.01$)。抑郁症的发展伴随着氧化应激的发生^[28]。当氧化应激发生时,ROS过度积累,导致抗氧化系统紊乱,引起细胞凋亡。SOD是抗氧化系统中的关键酶,可以抑制外界刺激对机体造成的氧化损伤^[29],并且较高的SOD水平有助于神经元与神经细胞发育^[30]。试验结果显示,EMLF可提高抑郁斑马鱼脑组织SOD活性并减少ROS含量,表明其可以通过改善脑部氧化应激状态,发挥抗抑郁作用。

2.6 脑组织代谢组学分析

由正负离子模式下脑组织样本PCA分析(图8)可知,Con组、Mod组和EMLF组分布在不同象限区域内,离散程度明显,且各组内样品聚集性良好,表明各组斑马鱼脑组织代谢物发生显著改变。进一步研究PCA散点图,发现Con组和EMLF组接近,提示EMLF对抑郁斑马鱼脑组织代谢轮廓具有显著调节作用。对Con组 vs Mod组和Mod组 vs EMLF组的OPLS-DA进行了200次交叉验证(图9), Q^2 值均大于0.9,同时 R^2Y 与 Q^2 的差值均小于0.3,表明模型没有过度拟合,反映了代谢变化,所建立的模型预测能力较好。

根据VIP值(> 1.0)和 t 检验($P < 0.05$)筛选Con组和Mod组之间的差异代谢物,筛选出24种差异代谢物(表3)。与Con组相比,Mod组脑组织中 N -乙酰鞘氨醇、鸟苷酸、腺苷、磷酸腺苷、腺嘌呤、1-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、巴豆酰辅酶A、 L -谷氨酸、四氢皮质醇、脱氧鸟苷酸、半乳糖醛酸、 L -色氨酸、5-羟基吡啶乙酸、甲基丙二酸、黄素腺嘌呤二核苷酸、11-反式白三烯C4和胸苷单磷酸17种代谢物含量显著降低,脯氨酸、4-胍基丁酸、棕榈油酸、 L -苏糖酸、庚二酸、黄素单核苷酸以及喹啉酸7种代谢物含量显著升高。与Mod组相比,EMLF能显著回调抑

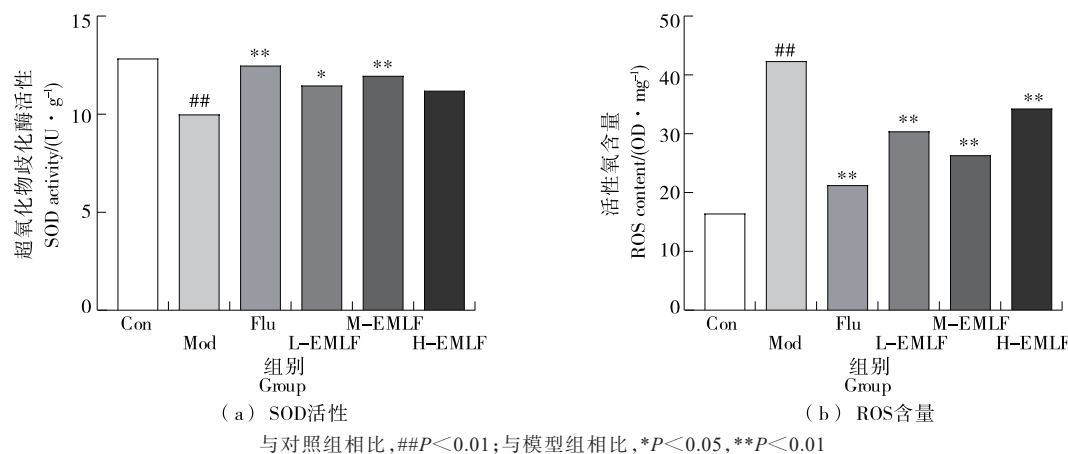
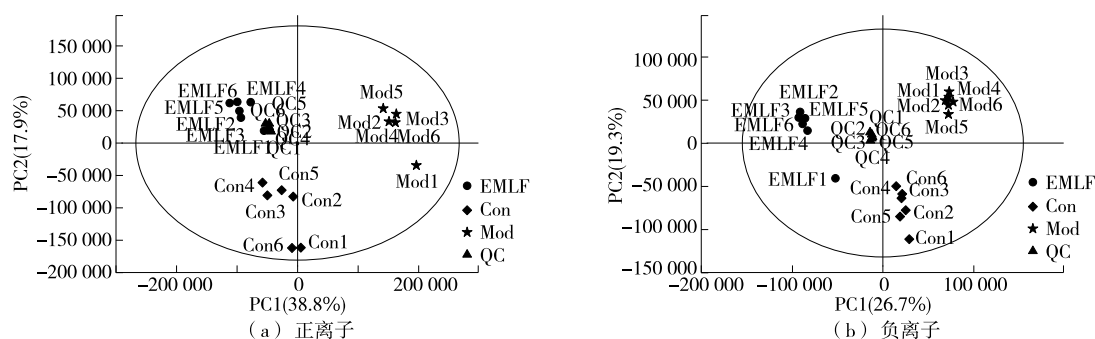
Figure 7 SOD activity and ROS content in zebrafish brain tissue ($n=5$)

Figure 8 PCA plots of metabolites in the brain tissue in positive and negative ion modes for each

郁斑马鱼的 24 种差异代谢物。为进一步推测 EMLF 改善抑郁斑马鱼代谢紊乱机制,将 24 种差异代谢物进行代谢通路富集分析,筛选出 4 条重要代谢通路,即嘌呤代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、色氨酸代谢以及核黄素代谢(图 10)。

色氨酸代谢途径在中枢神经系统发育中起着关键作用。色氨酸是合成 5-HT 的唯一前体,而 5-HT 水平下降是抑郁症的显著特征^[31]。此外,色氨酸还可通过犬尿氨酸代谢途径产生 3-羟基氨基酸和喹啉酸等神经毒性代谢产物,其中喹啉酸的神经毒性会损害神经胶质细胞和神经元,加速神经元凋亡,阻碍神经可塑性,引发抑郁症状^[32]。试验发现,Mod 组斑马鱼脑组织色氨酸含量降低,喹啉酸含量上升,而给予 EMLF 后能明显增加色氨酸含量,减少喹啉酸含量。推测 EMLF 能够增加色氨酸的含量进而提高 5-HT 的水平,同时调节色氨酸—犬尿氨酸代谢紊乱,最终发挥抗抑郁作用,与胡超等^[33]的研究结果相一致。

嘌呤代谢在细胞能量代谢和神经元—神经胶质细胞通信中起着关键作用,这可能与抑郁和焦虑行为有关^[34]。在活跃状态下,星形胶质细胞释放到细胞外的 ATP 会被水解成腺苷,而腺苷又与神经元腺苷受体结合,参与神经

元的信号传导活动。此外,受损神经元细胞释放的胞外腺嘌呤和肌苷嘌呤可刺激星形胶质细胞增殖,促进损伤或缺氧后的神经元修复^[35]。研究^[36]表明,体外增补适宜剂量的腺苷、肌苷和鸟苷均具有明显的抗抑郁作用,且与嘌呤能系统密切相关。试验发现,EMLF 对嘌呤代谢相关代谢物(腺苷、腺嘌呤和鸟苷酸等)具有显著调节作用,提示 EMLF 的抗抑郁作用可能与嘌呤代谢相关。

据报道^[37],在抑郁患者中精氨酸和脯氨酸代谢通路是主要的差异代谢途径,其中谷氨酸在醛脱氢酶 18 家族成员 A1 和吡咯啉-5-羧酸还原酶-1 两种酶的作用下转化为脯氨酸。在抑郁症模型大鼠体内,这两种酶的表达水平显著增加,促进了谷氨酸向脯氨酸的转化,这种代谢过程的增强导致抑郁模型中谷氨酸的含量减少,而脯氨酸的含量增加。试验发现,抑郁斑马鱼谷氨酸含量显著下调,脯氨酸含量显著上调,与 Bian 等^[37]和伍春桃等^[38]的研究结果一致。在 EMLF 的干预下,谷氨酸和脯氨酸的含量显著回调,表明 EMLF 可能通过调节精氨酸和脯氨酸代谢发挥抗抑郁作用。

3 结论

桑叶黄酮酶解产物中鉴定出的 10 种黄酮苷元类化合

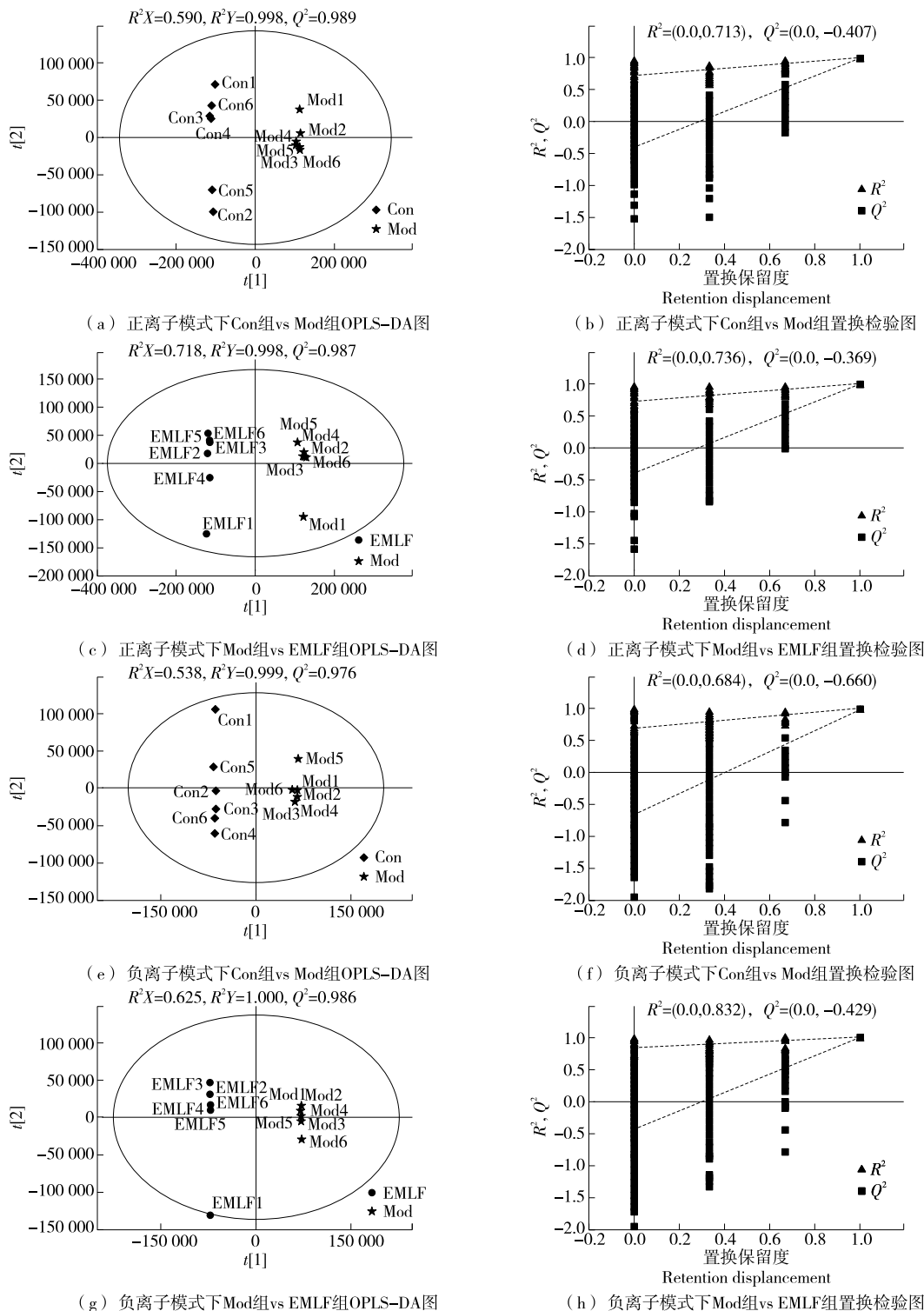


图9 正、负离子模式下各组样本间 OPLS-DA 图和置换检验图

Figure 9 OPLS-DA diagram and permutation test diagram in positive and negative ion modes

物(二氢槲皮素、柚皮素、桑黄素、槲皮素、山柰酚、漆黄素、异鼠李素、泽兰黄酮、圣草酚以及芹菜素)具有改善抑郁或保护神经元的作用。提示桑叶黄酮酶解后,其活

性成分具有良好的抗抑郁功效。进一步研究发现,桑叶黄酮酶解产物可通过降低抑郁斑马鱼促炎因子 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达,缓解脑部氧化应激,提高 5-HT 水平,减轻

表 3 正负离子模式下 Con 组、Mod 组和 EMLF 组间共同差异代谢物的变化

Table 3 Changes of common differential metabolites among Con, Mod, and EMLF groups in positive and negative ion modes

编号	名称	质荷比	化学式	模式	空白组比模型组			模型组比桑叶黄酮酶解产物组		
					P	VIP	趋势	P	VIP	趋势
1	N-酰基鞘氨醇	677.670 3	C ₄₄ H ₈₇ NO ₃	+	7.707 5E-09	1.511 9	↓	3.248 5E-02	1.112 0	↑
2	鸟苷酸	363.056 4	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	+	2.796 1E-11	1.544 2	↓	1.270 3E-06	1.452 5	↑
3	腺苷	267.095 5	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	+	3.275 2E-14	1.584 8	↓	3.163 8E-14	1.622 1	↑
4	脯氨酸	115.062 8	C ₅ H ₉ NO ₂	+	3.275 2E-14	1.571 4	↑	5.957 7E-05	1.433 9	↓
5	磷酸腺苷	347.061 6	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	+	3.253 2E-14	1.562 2	↓	4.740 7E-14	1.601 5	↑
6	腺嘌呤	135.053 9	C ₅ H ₅ N ₅	+	6.590 4E-12	1.532 8	↓	3.895 5E-09	1.518 3	↑
7	1-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱	522.346 1	C ₂₆ H ₅₃ NO ₇ P	+	4.323 9E-08	1.351 6	↓	8.771 5E-06	1.600 2	↑
8	4-胍基丁酸	145.084 5	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	+	3.632 7E-02	1.478 5	↑	2.327 1E-03	1.289 8	↓
9	棕榈油酸	254.239 5	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	+	4.938 2E-11	1.580 9	↑	1.028 4E-07	1.591 9	↓
10	巴豆酰辅酶 A	835.629 6	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	+	3.275 2E-14	1.582 7	↓	6.760 5E-03	1.447 1	↑
11	L-谷氨酸	147.315 6	C ₅ H ₉ NO ₄	+	4.041 6E-04	1.374 7	↓	3.374 6E-04	1.387 1	↑
12	四氢皮质醇	366.591 7	C ₂₁ H ₃₄ O ₅	-	3.519 4E-14	1.523 3	↓	3.275 2E-14	1.530 2	↑
13	L-蔗糖酸	136.035 5	C ₄ H ₈ O ₅	-	3.333 1E-02	1.341 5	↑	1.502 5E-02	1.219 2	↓
14	庚二酸	160.072 2	C ₇ H ₁₂ O ₄	-	1.818 4E-02	1.490 1	↑	1.104 2E-02	1.215 0	↓
15	脱氧鸟苷酸	347.059 5	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	-	3.275 2E-14	1.519 1	↓	3.408 4E-14	1.543 4	↑
16	半乳糖醛酸	194.140 7	C ₆ H ₁₀ O ₇	-	8.271 2E-14	1.462 7	↓	3.275 2E-14	1.527 9	↑
17	L-色氨酸	204.128 5	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-	3.598 2E-13	1.471 4	↓	3.273 0E-14	1.545 9	↑
18	5-羟基吡啶乙酸	191.187 3	C ₁₀ H ₉ NO ₃	-	9.393 5E-03	1.328 9	↓	3.469 4E-05	1.392 8	↑
19	黄素单核苷酸	456.100 5	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	-	2.821 9E-07	1.525 4	↑	2.153 8E-04	1.503 0	↓
20	喹啉酸	167.023 7	C ₇ H ₅ NO ₄	-	5.290 2E-13	1.541 4	↑	4.005 1E-04	1.115 8	↓
21	甲基丙二酸	118.025 5	C ₄ H ₆ O ₄	-	9.747 1E-10	1.485 4	↓	2.169 1E-09	1.460 3	↑
22	黄素腺嘌呤二核苷酸	785.150 7	C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂	-	7.741 7E-03	1.365 2	↓	6.173 0E-04	1.355 1	↑
23	11-反式白三烯 C4	625.736 0	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₉ S	-	2.866 4E-05	1.406 9	↓	4.252 2E-14	1.535 8	↑
24	胸苷单磷酸	322.053 5	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₈ P	-	1.407 3E-03	1.331 3	↓	3.686 6E-09	1.515 9	↑

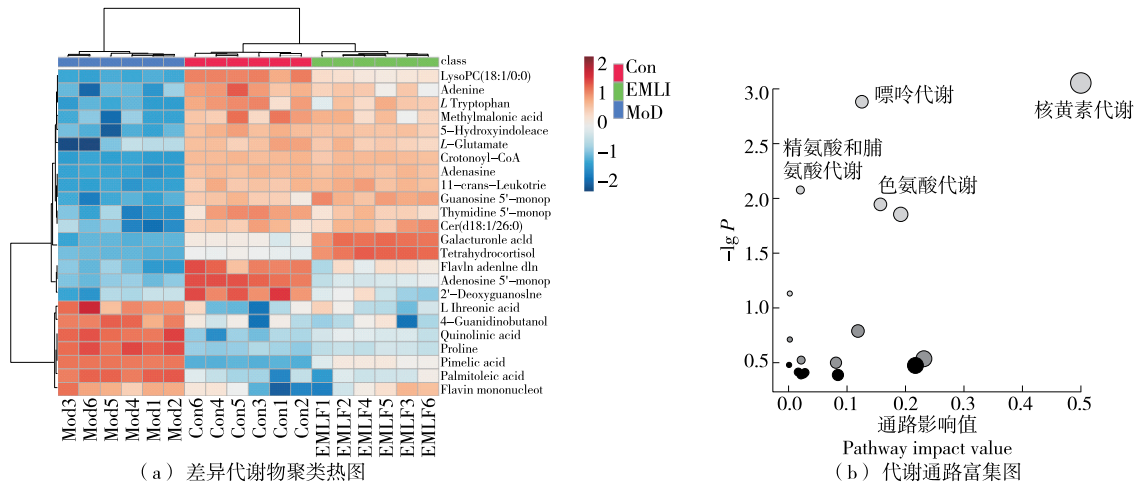


图 10 差异代谢物聚类热图和代谢通路富集图

Figure 10 Heat map of differential metabolites and bubble chart of metabolic pathway enrichment

中脑区域神经元的损伤程度,进而缓解斑马鱼的抑郁样行为,具有改善抑郁的作用。通过代谢组学研究发现,桑叶黄酮酶解产物能显著回调抑郁斑马鱼的 24 种差异代谢物,

其作用机制可能是通过调节嘌呤代谢、精氨酸和脯氨酸代谢以及色氨酸代谢通路来发挥抗抑郁作用。该研究从内源性代谢物的角度探究桑叶黄酮酶解产物的抗抑郁作用

机制,后期可通过网络药理学找到其发挥抗抑郁作用的有效成分以及调节抑郁症代谢异常的关键靶点,并深入研究各关键成分与抑郁症的内在联系。此外,评估桑叶黄酮酶解产物的副作用或毒性,研究与其他治疗方法的联合使用,将有助于提高其在抑郁症治疗中的作用。

参考文献

- [1] 郑涵文, 王梓航, 刘昕玥, 等. 黄花菜醇提物对斑马鱼抑郁样行为的改善作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 20-27.
ZHENG H W, WANG Z H, LIU X Y, et al. Improvement of depressive-like behavior in *Hemerocallis citrina* Baroni using a zebrafish model[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2024, 34(4): 20-27.
- [2] MEDEIROS G C, ROY D, KONTOS N, et al. Post-stroke depression: a 2020 updated review[J]. General Hospital Psychiatry, 2020, 66: 70-80.
- [3] CALDIROLI A, CAPUZZI E, TAGLIABUE I, et al. Augmentative pharmacological strategies in treatment-resistant major depression: a comprehensive review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 13070.
- [4] 李晓辉, 杜冠华. 新药研究与评价概论[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 342.
LI X H, DU G H. Introduction to new drug research and evaluation[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2022: 342.
- [5] 黄越, 黄传书, 吴均, 等. 桑资源生物活性物质及其在食品领域应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(23): 362-370.
HUANG Y, HUANG C S, WU J, et al. Research progress on bioactive substances of mulberry resources and their application in food field[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(23): 362-370.
- [6] 刘静波, 陈晶晶, 王二雷. 黄酮苷元类化合物制备技术及功能活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 276-285.
LIU J B, CHEN J J, WANG E L. Research progress in preparation technologies and functional activities of flavonoid aglycone compounds[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(10): 276-285.
- [7] JIA D S, TIAN X, CHEN Y T, et al. Preparation of enzymatic hydrolysates of mulberry leaf flavonoids and investigation into its treatment and mechanism for zebrafish inflammatory bowel disease[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 154: 109960.
- [8] KYZAR E, STEWART A M, LANDSMAN S, et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish[J]. Brain Research, 2013, 1527: 108-116.
- [9] MARCON M, HERRMANN A P, MOCELIN R, et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline[J]. Psychopharmacology, 2016, 233(21/22): 3 815-3 824.
- [10] LACHOWICZ J, NIEDZIALEK K, ROSTKOWSKA E, et al. Zebrafish as an animal model for testing agents with antidepressant potential[J]. Life, 2021, 11(8): 792.
- [11] GE C J, WANG S L, WU X Q, et al. Quercetin mitigates depression-like behavior via the suppression of neuroinflammation and oxidative damage in corticosterone-induced mice[J]. Journal of Chemical Neuroanatomy, 2023, 132: 102313.
- [12] BANSAL Y, SINGH R, SAROJ P, et al. Naringenin protects against oxido-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2018, 355: 257-268.
- [13] ZHU Q, HAN Y S, HE Y, et al. Kaempferol improves breast cancer-related depression through the *COX-2/PGE2* pathway[J]. Frontiers in Bioscience, 2023, 28(11): 311.
- [14] GOPNAR V V, RAKSHIT D, BANDAKINDA M, et al. Fisetin attenuates arsenic and fluoride subacute co-exposure induced neurotoxicity via regulating *TNF- α* mediated activation of *NLRP3* inflammasome[J]. NeuroToxicology, 2023, 97: 133-149.
- [15] ZHANG L, LIU C, YUAN M. Eriodictyol produces antidepressant-like effects and ameliorates cognitive impairments induced by chronic stress[J]. Neuroreport, 2020, 31(15): 1 111-1 120.
- [16] AMIN F, IBRAHIM M A A, RIZWAN-UL-HASAN S, et al. Interactions of apigenin and safranal with the *5HT1A* and *5HT2A* receptors and behavioral effects in depression and anxiety: a molecular docking, lipid-mediated molecular dynamics, and in vivo analysis[J]. Molecules, 2022, 27(24): 8 658.
- [17] YANG R, YANG X X, ZHANG F. New perspectives of taxifolin in neurodegenerative diseases[J]. Current Neuropharmacology, 2023, 21(10): 2 097-2 109.
- [18] 薛丽, 韩红, 张力. 桑黄素通过抑制 *TXNIP/NLRP3/Caspase-1* 信号通路对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡的影响[J]. 天津医药, 2023, 51(5): 487-491.
XUE L, HAN H, ZHANG L. Effects of Morin on neuronal apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion rats by inhibiting *TXNIP/NLRP3/Caspase-1* signaling pathway[J]. Tianjin Medical Journal, 2023, 51(5): 487-491.
- [19] GAMMOH O, QNAIS E Y, ATHAMNEH R Y, et al. Unraveling the potential of isorhamnetin as an adjuvant in depression treatment with escitalopram[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(9): 7 668-7 679.
- [20] 郭梦杰, 刘云, 吴志强, 等. 南极磷虾油对利血平诱导的斑马鱼抑郁模型的改善作用[J]. 食品与机械, 2023, 39(7): 152-156, 171.
GUO M J, LIU Y, WU Z Q, et al. Improvement of Antarctic krill oil on reserpine induced zebrafish depression model[J]. Food & Machinery, 2023, 39(7): 152-156, 171.
- [21] 胡国俊. 丙戊酸钠对慢性不可预知应激诱导斑马鱼抑郁模型的改善作用及机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2022: 39.
HU G J. The improvement effect and mechanism of valproate

- sodium on chronic unpredictable stress-induced zebrafish depression model[D]. Chongqing: Southwest University, 2022: 39.
- [22] GAHTAN E, TANGER P, BAIER H. Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum[J]. The Journal of Neuroscience, 2005, 25(40): 9 294-9 303.
- [23] JOËLS M, KARST H, ALFAREZ D, et al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus[J]. Stress, 2004, 7(4): 221-231.
- [24] 王慧敏, 秦雪梅, 刘晓节. 脑-肠交互视域下抑郁症与胃肠疾病共病的中西药调节及其机制研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(1): 332-343.
- WANG H M, QIN X M, LIU X J. Modulation of depression and gastrointestinal disease co-morbidity by Chinese and western medicines and its mechanism under perspective of brain-gut interaction[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(1): 332-343.
- [25] 何璎, 邹蔓妹, 韩远山, 等. 小胶质细胞活化介导的神经元损伤与抑郁症的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(1): 12-15.
- HE Y, ZOU M S, HAN Y S, et al. Research progress of neuronal injury mediated by microglial activation and depression[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2024, 40(1): 12-15.
- [26] PEHRSON A L, ROBERTS D, KHAWAJA A, et al. The role of serotonin neurotransmission in rapid antidepressant actions [J]. Psychopharmacology, 2022, 239(6): 1 823-1 838.
- [27] 邓淑怡, 王佳佳, 张永平, 等. 海马改善斑马鱼慢性应激所致抑郁样行为和病理变化的机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(3): 520-525.
- DENG X Y, WANG J J, ZHANG Y P, et al. Mechanism of seahorse ameliorating depression-like behavioral and pathological changes caused by chronic stress in zebrafish[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(3): 520-525.
- [28] 陈贝贝, 彭志兰, 章超桦, 等. 牡蛎酶解物对慢性不可预知温和应激斑马鱼抑郁行为改善作用研究[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(4): 55-63.
- CHEN B B, PENG Z L, ZHANG C H, et al. Study on improving effect of oyster hydrolysate on depressive behavior of zebrafish under chronic unpredictable mild stress[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(4): 55-63.
- [29] 张莉, 卢仁睿, 王慧慧, 等. 地黄苷 D 对皮质酮诱导的 PC-12 细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2022, 53(11): 3 385-3 393.
- ZHANG L, LU R R, WANG H H, et al. Protective effect and mechanism of rehmannioside D on PC-12 cells injury induced by corticosterone[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(11): 3 385-3 393.
- [30] 林洁筠, 段阳, 龙森青, 等. 柴胡疏肝散在抗抑郁治疗中的药效物质与作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 246-257.
- LIN J J, DUAN Y, LONG M Q, et al. Pharmacodynamic substances and action mechanisms of Chaihu Shugansan in antidepressant treatment: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(10): 246-257.
- [31] LILIANA D, CLAUDIA C, FEDERICO M, et al. Depression, Serotonin and Tryptophan[J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(8): 949-954.
- [32] GONG X L, CHANG R, ZOU J, et al. The role and mechanism of tryptophan-kynurenine metabolic pathway in depression[J]. Reviews in the Neurosciences, 2023, 34(3): 313-324.
- [33] 胡超, 杨蕙, 赵洪庆, 等. 基于代谢组学与网络药理学的百合地黄汤抗抑郁作用机制研究[J/OL]. 中国中药杂志. (2024-07-16) [2024-08-12]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20240712.710>.
- HU C, YANG H, ZHAO H Q, et al. Antidepressant mechanism of Baihe Dihuang Decoction based on metabolomics and network pharmacology[J/OL]. China Journal of Chinese Materia Medica. (2024-07-16) [2024-08-12]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20240712.710>.
- [34] JI S, HAN S S, YU L, et al. Jia Wei Xiao Yao San ameliorates chronic stress-induced depression-like behaviors in mice by regulating the gut microbiome and brain metabolome in relation to purine metabolism[J]. Phytomedicine, 2022, 98: 153940.
- [35] TAKAHASHI T, OTSUGURO K, OHTA T, et al. Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats[J]. British Journal of Pharmacology, 2010, 161(8): 1 806-1 816.
- [36] 陈佳俊, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 基于嘌呤能系统及嘌呤代谢的抑郁症发病机制研究进展[J]. 药学报, 2021, 56(9): 2 464-2 471.
- CHEN J J, QIN X M, DU G H, et al. Advances in the pathogenesis of depression based on purinergic system and purine metabolism[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(9): 2 464-2 471.
- [37] BIAN X Q, ZHOU N, ZHAO Y R, et al. Identification of proline, 1-pyrroline-5-carboxylate and glutamic acid as biomarkers of depression reflecting brain metabolism using carboxylomics, a new metabolomics method[J]. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2023, 77(4): 196-204.
- [38] 伍春桃, 陈磊, 常祥兵, 等. 白术多糖对抑郁症小鼠动物模型的作用及机制研究[J]. 中国药学杂志, 2024, 59(9): 789-800.
- WU C T, CHEN L, CHANG X B, et al. Effect and mechanism of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide on CUMS mouse models[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2024, 59(9): 789-800.