

# 基于肝脏蛋白质组学探讨加味丹栀逍遥散的抗抑郁作用及机制

汪保英<sup>a</sup>, 李雅静<sup>a</sup>, 田磊<sup>a</sup>, 刘辉<sup>b</sup>, 白明<sup>a</sup>, 栗俞程<sup>a</sup>, 许二平<sup>a</sup>

(河南中医药大学 a. 中医药科学院; b. 药学院, 郑州 450046)

**摘要:** [目的] 探讨加味丹栀逍遥散对慢性不可预知性温和应激(CUMS)抑郁小鼠模型的干预作用及可能机制。[方法] C57BL/6N小鼠分为正常组、模型组、加味丹栀逍遥散组和氟西汀组。采用CUMS复制抑郁模型, 模型成功后灌胃给药4周。末次给药后进行行为学测试, 采用串联质谱标签法(TMT)蛋白质组学分析小鼠肝脏差异蛋白的表达谱, 通过Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG)通路富集加味丹栀逍遥散抗抑郁的相关通路和蛋白; 血液生化检测总胆固醇及总胆汁酸含量。[结果] 与正常组相比, 模型组小鼠糖水偏好率下降, 自主活动次数减少, 加味丹栀逍遥散给药后上调小鼠糖水偏好率及自主活动次数。蛋白组学结果显示模型组与加味丹栀逍遥散给药组之间肝脏差异表达蛋白20个, 其中上调11个, 下调9个。KEGG通路富集分析发现差异表达蛋白主要参与了胆固醇代谢、初级胆汁酸的合成等。生化检测发现, 与正常组相比, 模型组总胆固醇含量下降而胆汁酸含量升高, 加味丹栀逍遥散给药能显著增加总胆固醇含量而减少胆汁酸含量。[结论] 加味丹栀逍遥散具有良好的抗抑郁效应, 其机制可能与调节肝脏胆固醇异常代谢、降低血液总胆汁酸有关。

**关键词:** 抑郁症; 蛋白质组学; 加味丹栀逍遥散; 肝郁; 胆汁酸

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-2367(2024)01-0150-07

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要临床特征的精神性疾病, 其发病机制复杂, 涉及系统众多。目前临床上的三、四环类, 选择性五羟色胺再摄取抑制剂等抗抑郁药物起效慢、不良反应多, 且对约1/3病人无效<sup>[1-2]</sup>。

抑郁症属于中医“郁证”范畴, 郁证的关键是肝郁。丹栀逍遥散出自清代薛己之《内科摘要》, 具有疏肝解郁, 健脾和营, 兼清郁热之功效。加味丹栀逍遥散源于本课题组长期临床经验, 是在丹栀逍遥散组方基础上添加石菖蒲、远志2味中药, 具有疏肝健脑解郁之功效。课题组前期临床研究表明, 加味丹栀逍遥散治疗抑郁症临床疗效显著<sup>[3-4]</sup>, 其抗抑郁作用机制与调节脑内5-羟色胺、去甲肾上腺素、多巴胺等神经递质的含量<sup>[5-6]</sup>, 改善下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能亢进<sup>[7]</sup>、调节海马内盐皮质激素受体和糖皮质激素受体平衡相关<sup>[8]</sup>。现有的研究较少从“肝郁”角度探讨中医药的抗抑郁作用机制。基于此, 本文采用定量蛋白质组学技术系统分析抑郁症小鼠肝脏蛋白质组水平的变化, 揭示加味丹栀逍遥散从肝论治抑郁症的生物学基础, 为阐释传统中医理论的科学内涵提供理论依据, 为研究中药复方的药理作用机制提供科学参考。

**收稿日期:** 2023-03-03; **修回日期:** 2023-04-28。

**基金项目:** 国家自然科学基金(81973739; 82274496); 河南省优秀青年科学基金(202300410249); 河南省科技攻关项目(222102310233)。

**作者简介(通信作者):** 许二平(1962-), 男, 河南郑州人, 河南中医药大学教授, 博士, 博士生导师, 主要研究方向为仲景方药配伍规律机制研究, E-mail: xuerping0371@163.com。

**引用本文:** 汪保英, 李雅静, 田磊, 等. 基于肝脏蛋白质组学探讨加味丹栀逍遥散的抗抑郁作用及机制[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2024, 52(1): 150-156. (Wang Baoying, Li Yajing, Tian Lei, et al. Exploring the antidepressant effect and mechanism of modified Danzhi Xiaoyao San based on liver proteomics[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2024, 52(1): 150-156. DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.03.0001.)

## 1 材料与方法

### 1.1 实验药物

加味丹栀逍遥散由柴胡 12 g、当归 10 g、白芍 12 g、白术 10 g、茯苓 10 g、甘草 3 g、薄荷 6 g、丹皮 12 g、栀子 12 g、石菖蒲 12 g、远志 12 g 组成,购自河南中医药大学第一附属医院中药房,经中药教研室陈随清教授鉴定符合《中华人民共和国药典》(2020 年版)规定。

### 1.2 实验动物

30 只 SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠,6~8 周龄,体质量(20±2) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。单笼饲养,适应性喂养 1 周后开始实验。所有动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准进行(DWLL201903018)。

### 1.3 主要试剂与仪器

试剂 SDS、BSA、Tris 购于上海生工,碘乙酰胺、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、二硫苏糖醇(DTT)、 $\text{HCOONH}_4$ 、C18 Empore™ 固相萃取圆盘购于美国 Sigma 公司,BCA 定量试剂盒购于碧云天生物技术公司,TMT 6/10plex Isobaric mass tag labeling kit 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司,C18 Cartridge 购于 Waters 公司,总胆固醇及总胆汁酸检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

Easy nLC 色谱系统、Nano Drop 3000、Q Exactive plus 质谱仪及 Multiskan FC 酶标仪购于美国 Thermo Fisher 公司,Agilent 1260 infinity II HPLC 系统购于美国 Agilent 公司,电泳仪购于美国 BIO-RAD 公司,小鼠自主活动仪购于四川泰盟公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 造模与分组

将小鼠随机分为正常组 10 只和刺激组 30 只,根据 WILLNER 等<sup>[9]</sup>的方法稍作调整建立 CUMS 小鼠模型。刺激组接受 CUMS 刺激,8 周后将其随机分为模型组、氟西汀组、加味丹栀逍遥散组,每组 10 只小鼠,连续灌胃给药 4 周,加味丹栀逍遥散组给药剂量 31.7 g/kg(等效临床剂量),氟西汀组给药剂量 10 mg/kg,正常组和模型组灌胃等体积生理盐水。除正常组外,给药期间同时给予 CUMS。

#### 1.4.2 行为学测试和组织样本的采集

末次给药后进行糖水偏好试验(SPT)和自主活动试验(LAT)。计算蔗糖水偏好率,糖水偏好率=(蔗糖水摄入量/蔗糖水和纯水摄入总量),记录 5 min 的活动总次数。行为学测试结束后摘眼球取血,分离血清,取小鼠肝脏样本,液氮速冻后转移至-80 °C 冰箱保存待测。

#### 1.4.3 蛋白组学测试

蛋白质样品前处理及 TMT 标记。取肝组织样本加入适量 SDT 裂解液(质量分数 4% SDS,100 mmol/L Tris-HCl,pH7.6),采用 MP Fastprep-24 自动均浆器匀浆(转子线速度 6.0 m/s,30 s,2 次),超声后煮沸 15 min,14 000 g 离心 40 min 后,用 0.22 μm 的过滤器过滤,滤液用 BCA 法检测蛋白含量。用过滤器辅助样品制备方案(filter-aided sample preparation,FASP)酶切蛋白质<sup>[10-11]</sup>。取样品 200 μg 先后加入 30 μL SDT 缓冲液(质量分数 4% SDS,100 mmol/L DTT,150 mmol/L Tris-HCl pH8.0)、200 μL UA 缓冲液(8 mol/L Urea,150 mmol/L Tris-HCl pH 8.5)超滤离心后,加入 100 μL 碘乙酰胺(IAA)(100 mmol/L IAA in UA buffer),室温避光反应 30 min 后洗涤,4 μg 胰蛋白酶消化,37°C 放置过夜,收集肽段滤液后脱盐、定量(OD280)。每个样品取 100 μg 肽段,按照 TMT 标记试剂盒(Thermo Fisher 公司)说明书进行标记。

High PH RP 分级及质谱分析。采用 Agilent 1260 infinity II 高效液相色谱法对 TMT 标记的多肽进行分馏、稀释后,上样到 XBridge Peptide BEH C18 柱进行分离,收集馏分、干燥。采用 Easy nLC 系统分离后用 Q Exactive plus 质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行质谱分析。

采用 Mascot 2.6 和 Proteome Discoverer 2.1(Thermo Fisher Scientific)软件对质谱原始数据 raw 文件进行查库鉴定及定量分析。设定差异倍数(fold change)>1.2、 $P < 0.05$  的蛋白质是差异表达蛋白。

### 1.4.4 生信分析

利用 Blast2GO<sup>[12]</sup> 对差异蛋白进行 GO 注释,利用 KOALA(KEGG orthology and links annotation)软件<sup>[13]</sup>对差异蛋白进行 KEGG 通路注释,然后进行 GO 及 KEGG 富集分析.采用 Matplotlib 软件从 2 个维度对样本和蛋白质表达量进行分类,并生成层次聚类热图.

### 1.4.5 血清总胆固醇及总胆汁酸检测

按试剂盒说明采用微板法检测血清总胆固醇及总胆汁酸的含量.

### 1.4.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 分析数据,使用  $t$  检验对 2 组之间的差异进行显著性评估,使用单因素方差分析(ANOVA)对 2 组以上的差异进行评估,然后采用 Fisher's LSD 进行事后分析. $P < 0.05$  被认为是有统计学意义的.

## 2 结果

### 2.1 加味丹栀逍遥散对 CUMS 小鼠行为学的影响

与正常组比较,模型组糖水偏好率明显降低( $P < 0.05$ ),自主活动次数明显减少( $P < 0.05$ ).与模型组相比,加味丹栀逍遥散与氟西汀组显著升高糖水偏好率( $P < 0.05$ ),且明显增加小鼠的自主活动次数( $P < 0.05$ ),见图 1.

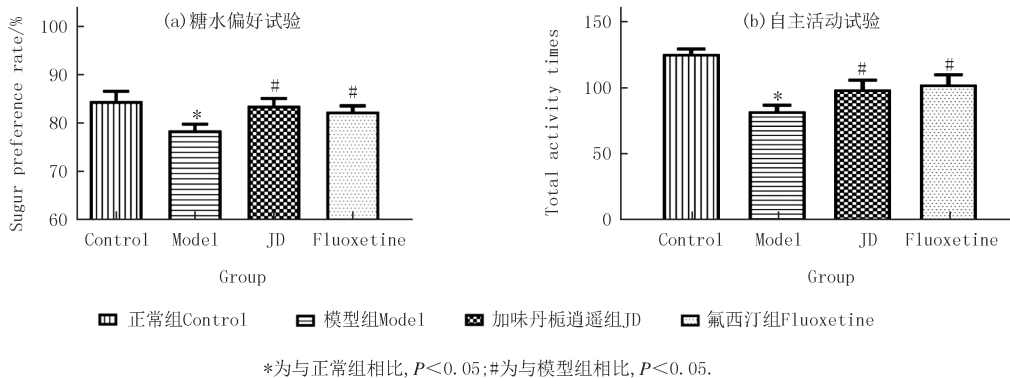


图1 加味丹栀逍遥散对CUMS小鼠行为学的影响

Fig.1 The effect of modified Danzhi Xiaoyao San on the behavior of CUMS mice

### 2.2 差异表达蛋白分析

使用 Proteome Discoverer 2.1(Thermo Scientific)鉴定样本中所有的蛋白质.模型组和加味丹栀逍遥散组 2 组中所有蛋白质的火山图如图 2 所示.将差异倍数(FC) $\geq 1.2$  或 $\leq 0.8$ ,且  $P \leq 0.05$  作为筛选标准,模型组和加味丹栀逍遥散组之间有 20 个差异表达蛋白,其中 11 个上调,9 个下调(见表 1).在附录图 S1 中,模型组和加味丹栀逍遥散组被清楚地分开,且重复性良好.

### 2.3 差异表达蛋白的生物信息学分析

GO 富集分析显示,差异表达蛋白主要参与循环中免疫球蛋白复合物、多泡体、电压门控型钾离子通道复合物的细胞组成,分子功能主要是与免疫球蛋白受体、抗原结合,主要参与吞噬、抗体依赖性细胞毒性等生物过程(附录图 S2).KEGG 通路富集分析显示,模型组和加味丹栀逍遥散组之间差异表达蛋白主要富集到胆固醇代谢、初级胆汁酸生物合成、糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白的生物合成等途径(图 3).

### 2.4 加味丹栀逍遥散对 CUMS 小鼠总胆固醇及总胆汁酸含量的影响

KEGG 富集分析揭示 CUMS 小鼠差异表达蛋白与胆固醇代谢相关,为验证这一结果,检测了血浆中总胆固醇及其代谢主要产物胆汁酸的含量.生化检测结果显示,与正常组相比,模型组血浆总胆固醇含量显著降低( $P < 0.01$ ),加味丹栀逍遥散给药后能显著升高其含量( $P < 0.05$ )(图 4(a)).与正常组相比,模型组血浆总胆汁酸含量显著升高( $P < 0.05$ ),与模型组相比,加味丹栀逍遥散组胆汁酸含量明显降低( $P < 0.01$ )(图 4(b)).

### 3 讨 论

在郁证发病过程中,肝为起病之源,脑为传病之所;肝疏泄功能正常,则气机调畅,气血和调,心情开朗;肝失疏泄,气机逆乱,则肝气郁结,稍加刺激,即抑郁难解.因此,郁证的病变部位在脑,但关键病机在肝脏<sup>[14-15]</sup>,故疏肝解郁为郁证的主要治则.

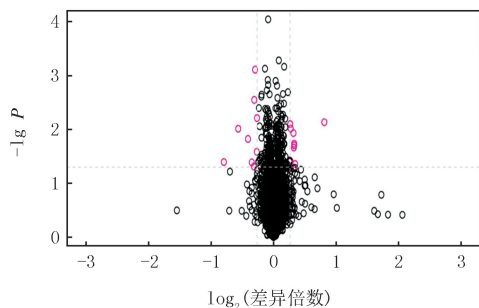


图2 模型组和加味丹栀逍遥散组肝脏所有蛋白质的火山图  
Fig.2 Liver proteomic analysis between the model group and modified Danzhi Xiaoyao San group

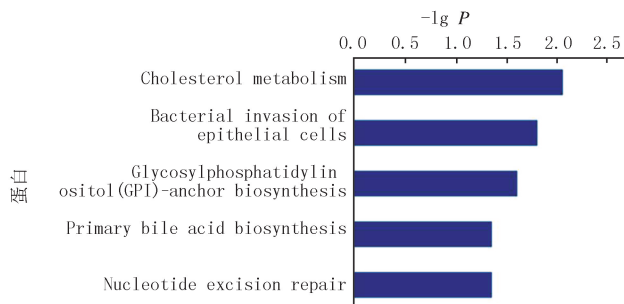


图3 差异表达蛋白KEGG通路富集  
Fig.3 Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins

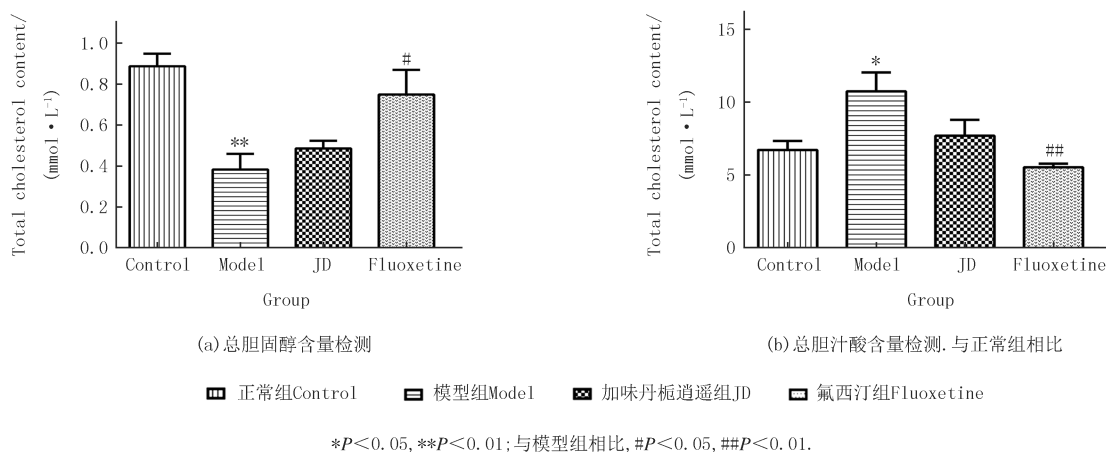
表 1 加味丹栀逍遥散与模型组之间差异表达蛋白列表

Tab. 1 List of DEPs between the modified Danzhi Xiaoyao San group and the model group

No.	Accession	Gene Name	Description	JD/M	P-value
1	Q8CGR7	<i>Upp2</i>	Uridine phosphorylase 2	1.755	0.007
2	Q91XC8	<i>Dap</i>	Death-associated protein 1	1.269	0.044
3	Q64505	<i>Cyp7a1</i>	Cytochrome P450 7A1	1.256	0.018
4	P18581	<i>Slc7a2</i>	Cationic amino acid transporter 2	1.256	0.020
5	Q9D7B1	<i>Dus2</i>	tRNA-dihydrouridine(20)synthase <sup>[NAD(P)+]</sup> -like	1.251	0.022
6	Q05020	<i>Apoc2</i>	Apolipoprotein C-II	1.247	0.012
7	P03987		Ig gamma-3 chain C region	1.218	0.050
8	P01867	<i>Igh-3</i>	Ig gamma-2B chain C region	1.216	0.048
9	P60840	<i>Ensa</i>	Alpha-endosulfine	1.209	0.010
10	O35423	<i>Agxt</i>	Serine-pyruvate aminotransferase	1.207	0.039
11	Q60598	<i>Ctn</i>	Src substrate cortactin	1.202	0.008
12	Q9DC63	<i>Fbxo3</i>	F-box only protein 3	0.832	0.006
13	O88502	<i>Pde8a</i>	High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	0.830	0.026
14	Q9R1K9	<i>Cetn2</i>	Centrin-2	0.813	0.001
15	Q6PD26	<i>Pigs</i>	GPI transamidase component PIG-S	0.806	0.003
16	P0DJF3	<i>Tmem95</i>	Transmembrane protein 95	0.803	0.049
17	Q8R0F3	<i>Sumf1</i>	Formylglycine-generating enzyme	0.785	0.041
18	P43274	<i>H1-4</i>	Histone H1.4	0.753	0.015
19	Q8BQM4	<i>Heatr3</i>	HEAT repeat-containing protein 3	0.675	0.010
20	Q8BHL5	<i>Elmo2</i>	Engulfment and cell motility protein 2	0.576	0.040

大量临床研究证实,通过治疗肝气郁结可有效缓解抑郁症<sup>[16-19]</sup>,而疏肝解郁、肝脑同治抑郁症的物质基础目前尚知之甚少.本研究采用蛋白质组学方法观察了抑郁症模型小鼠及加味丹栀逍遥散给药后其肝脏蛋白质谱的变化情况.KEGG 通路富集分析发现模型组和加味丹栀逍遥散组小鼠之间差异表达蛋白主要富集到胆固醇代谢及初级胆汁酸形成这些生化代谢途径.有研究显示在一些有抑郁症状<sup>[20-21]</sup>和严重抑郁症<sup>[22-23]</sup>患者中胆固醇含量较低,其代谢终产物胆汁酸可通过激活糖皮质激素受体(GR)来抑制下丘脑分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),抑制垂体分泌促肾上腺皮质激素(ACTH),从而维持 HPA 轴的稳态<sup>[24-27]</sup>.另有研究表明抑郁状态大鼠“肠-肝-脑轴”内存在胆汁酸代谢障碍,胆汁酸受体 FXR 的水平升高;开心解郁丸可有效促进抑郁症大鼠的胆汁酸代谢,抑制胆汁酸 FXR 受体水平<sup>[28]</sup>.靶向代谢组学研究发现抗抑郁药安郁沛勃胶囊影响初级胆汁酸的生物合成<sup>[29]</sup>,抑郁模型小鼠海马中胆汁酸受体发生改变<sup>[30]</sup>.本研究发现抑郁症模型小鼠血液中胆固醇含量降低,而其主要代谢产物总胆汁酸,含量明显增加.加味丹栀逍遥散给药后可逆转上述变化,具体为可上调总胆固醇含量而下调胆汁酸水平.

综上,研究表明加味丹栀逍遥散的抗抑郁机制可能与肝脏胆固醇代谢、胆汁酸合成相关,也为“肝气郁结”“肝脑同治”提供了一定的科学依据.至于抑郁症是如何影响胆固醇及胆汁酸代谢,加味丹栀逍遥散又是从何种途径调控而发挥抗抑郁作用的,有待进一步研究.



(a) 总胆固醇含量检测

(b) 总胆汁酸含量检测.与正常组相比

■ 正常组Control    ▨ 模型组Model    ▩ 加味丹栀逍遥组JD    ▤ 氟西汀组Fluoxetine

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

图4 加味丹栀逍遥散对CUMS小鼠血清总胆固醇及胆汁酸含量的影响

Fig.4 Effects of modified Danzhi Xiaoyao San on serum total cholesterol and bile acid contents in CUMS mice

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.03.0001).

## 参 考 文 献

- TAMMINGA C A, NEMEROFF C B, BLAKELY R D, et al. Developing novel treatments for mood disorders: accelerating discovery[J]. *Biological Psychiatry*, 2002, 52(6): 589-609.
- ADELL A, CASTRO E, CELADA P, et al. Strategies for producing faster acting antidepressants[J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(8): 578-585.
- 许二平. 丹栀逍遥散加味治疗中风后抑郁症的临床研究[J]. *河南中医*, 2007, 27(3): 42-43.  
XU E P. Clinical study on modified Danzhi Xiaoyao Powder in treating post-stroke depression[J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 2007, 27(3): 42-43.
- 许二平, 王伟杰, 苗明三, 等. 丹栀逍遥散联合氟西汀治疗中风后抑郁症 200 例[J]. *河南中医*, 2017, 37(1): 79-81.  
XU E P, WANG W J, MIAO M S, et al. Modified Danzhi Xiaoyao Powder combined with fluoxetine in the treatment of 200 cases of post stroke depression[J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 2017, 37(1): 79-81.
- 郭晓冬, 许二平, 李琳, 等. 加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠下丘脑内 5-HT 和 NE 的影响[J]. *中医学报*, 2013, 28(12): 1831-1833.  
GUO X D, XU E P, LI L, et al. Effect of modified Danzhi Xiaoyao Powder on 5-HT and NE in hypothalamus of depression model in rats[J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2013, 28(12): 1831-1833.
- 许二平. 舒肝健脑调郁片对卒中后抑郁大鼠模型 5-HT、5-HIAA、DA、DOPAC 含量的影响[J]. *新中医*, 2008, 40(2): 97-99.  
XU E P. Effect of Shugan Jiannao Tiaoyu Tablet on the contents of 5-HT, 5-HIAA, DA and DOPAC in rat model of post-stroke depres-

- sion[J].Journal of New Chinese Medicine,2008,40(2):97-99.
- [7] 许二平,郭晓冬,李琳,等.加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠 HPA 轴功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):236-238.  
XU E P, GUO X D, LI L, et al. Effect of Jiawei Danzhi Xiaoyao Powder on the function of HPA in the depression rats[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(10): 236-238.
- [8] 郭晓冬,许二平,李琳,等.加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内盐皮质激素受体和糖皮质激素受体的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):119-122.  
GUO X D, XU E P, LI L, et al. Effect of Jiawei Danzhi Xiaoyao Powder on mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in hippocampus of depression rats[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(11): 119-122.
- [9] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. Psychopharmacology, 1987, 93(3): 358-364.
- [10] WIŚNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [11] 王曼,鄢丹,孟波,等.基于非标记定量技术的肝细胞癌血浆蛋白质组学研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2022,50(1):115-122.  
WANG M, YAN D, MENG B, et al. Plasma proteomic analysis of hepatocellular carcinoma based on label-free quantitative technology[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2022, 50(1): 115-122.
- [12] GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ J M, TEROL J, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(10): 3420-3435.
- [13] KANEHISA M, SATO Y, MORISHIMA K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(4): 726-731.
- [14] 张丽娜,张金生,惠小珊,等.张金生教授运用“肝脑同治”理论治疗抑郁症经验[J].中医临床研究,2019,11(9):1-2.  
ZHANG L N, ZHANG J S, HUI X S, et al. Professor Zhang Jinsheng's experience of applying the theory of "simultaneous management of liver and brain" in treating depression[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2019, 11(9): 1-2.
- [15] 张金生. 郁病与肝脑相关的探讨[J]. 新中医, 2008, 40(7): 106.  
ZHANG J S. Discussion on the correlation between depression and liver and brain[J]. Journal of New Chinese Medicine, 2008, 40(7): 106.
- [16] 张婧. 抑郁症社会心理机制及疏肝解郁法的用药规律与机制的研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [17] 肖春霞,刘新,张星平.从疏肝理脾升降枢辨治抑郁症临床经验[J].中医药学报,2021,49(4):54-57.  
XIAO C X, LIU X, ZHANG X P. Clinical experience of diagnosing and treating depression in terms of regulating ascending and descending of liver and spleen[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2021, 49(4): 54-57.
- [18] 翟丽丽,胡俊杰,郭清华.疏肝解郁治疗抑郁症 50 例临床观察[J].光明中医,2009,24(7):1291-1292.  
ZHAI L L, HU J J, GUO Q H. Clinical observation on 50 cases of depression treated by soothing the liver and relieving depression[J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2009, 24(7): 1291-1292.
- [19] 潘惠萍,张玲.解郁安神汤治疗轻抑郁症 80 例[J].陕西中医,2006,27(9):1111-1112.  
PAN H P, ZHANG L. 80 cases of mild depression treated by Jieyu Anshen Decoction[J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006, 27(9): 1111-1112.
- [20] MORGAN R E, PALINKAS L A, BARRETT-CONNOR E L, et al. Plasma cholesterol and depressive symptoms in older men[J]. The Lancet, 1993, 341(8837): 75-79.
- [21] TERAU T, IWATA N, KANAZAWA K, et al. Low serum cholesterol levels and depressive state in human dock visitors[J]. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2000, 101(3): 231-234.
- [22] HUANG T L. Serum cholesterol levels in mood disorders associated with physical violence or suicide attempts in Taiwanese[J]. Chang Gung Medical Journal, 2001, 24(9): 563-568.
- [23] PARTONEN T, HAUKKA J, VIRTAMO J, et al. Association of low serum total cholesterol with major depression and suicide[J]. The British Journal of Psychiatry, 1999, 175: 259-262.
- [24] MANO N, GOTO T, UCHIDA M, et al. Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain[J]. Journal of Lipid Research, 2004, 45(2): 295-300.
- [25] HUANG C, WANG J L, HU W F, et al. Identification of functional farnesoid X receptors in brain neurons[J]. FEBS Letters, 2016, 590(18): 3233-3242.
- [26] MCMILLIN M, FRAMPTON G, QUINN M, et al. Suppression of the HPA axis during cholestasis can be attributed to hypothalamic bile acid signaling[J]. Molecular Endocrinology, 2015, 29(12): 1720-1730.
- [27] MERTENS K L, KALSBECK A, SOETERS M R, et al. Bile acid signaling pathways from the enterohepatic circulation to the central nervous system[J]. Frontiers in Neuroscience, 2017, 11: 617.
- [28] 翟吴剑文. 开心解郁丸调控“肠-肝-脑轴”内胆酸代谢的抗抑郁机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.
- [29] 陆冬媛. 抗抑郁新药安郁沛勃胶囊主要活性成分体内定量分析及靶向代谢组学研究[D]. 宜春: 宜春学院, 2022.

- [30] 吴静,李学义,陈京红,等.抑郁模型小鼠海马中胆汁酸受体变化的研究[J].上海交通大学学报(医学版),2021,41(12):1628-1634.  
WU J,LI X Y,CHEN J H, et al.Study on changes of hippocampal bile acid receptors in the depression mouse models[J].Journal of Shanghai Jiao Tong University(Medical Science),2021,41(12):1628-1634.

## Exploring the antidepressant effect and mechanism of modified Danzhi Xiaoyao San based on liver proteomics

Wang Baoying<sup>a</sup>, Li Yajing<sup>a</sup>, Tian Lei<sup>a</sup>, Liu Hui<sup>b</sup>, Bai Ming<sup>a</sup>, Li Yucheng<sup>a</sup>, Xu Erping<sup>a</sup>

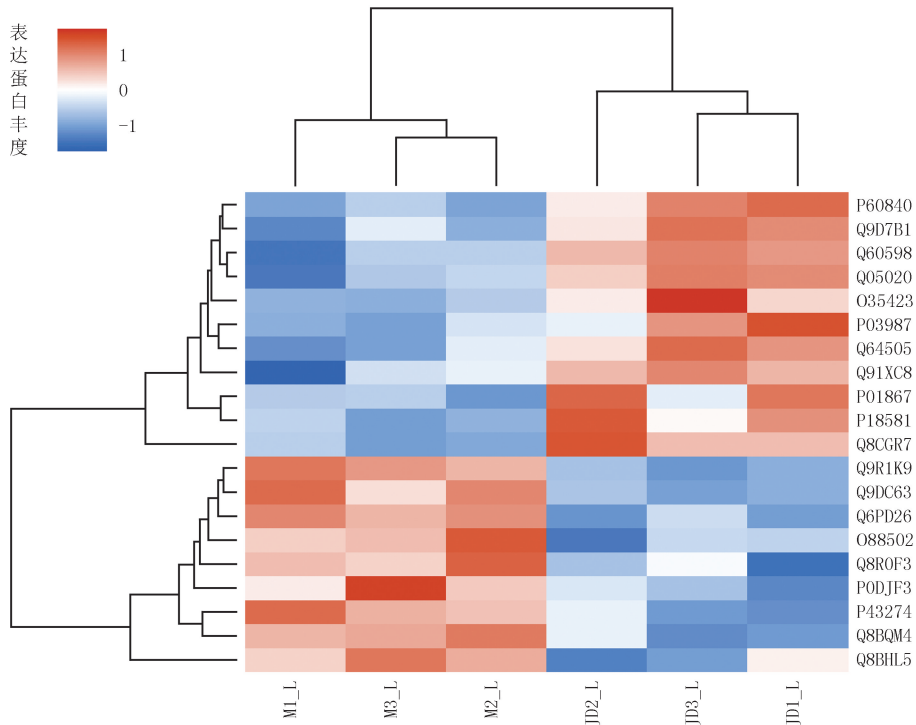
(a. Academy of Chinese Medical Sciences; b. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the interventional effects and possible mechanisms of modified Danzhi Xiaoyao San on chronic unpredictable mild stress(CUMS)depression mouse model. [Method] Forty C57BL/6N mice were divided into the normal, the model, the fluoxetine, and modified Danzhi Xiaoyao San groups, 10 mice in each group. The depression model was successfully replicated by CUMS for 8 weeks, and then all the mice were administered by gavage for 4 weeks. After the final administration, behavioral tests were performed; the expression profiles of the differential proteins in the mice liver were analyzed by tandem mass spectrometry tagging(TMT) proteomics; the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway were used to enrich the antidepressant pathways and proteins associated with modified Danzhi Xiaoyao San. The total cholesterol and total bile acids in mice were analyzed by blood biochemistry. [Result] The behavioral results showed that the sugar preference rate decreased( $P < 0.05$ ) and the locomotor activity times decreased( $P < 0.05$ ) in the model group compared with the normal group; compared with the model group, the sugar preference rate and the locomotor activity times were significantly increased( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) in the modified Danzhi Xiaoyao San group. The proteomic results showed a total of 20 DEPs in the liver between the model and the modified Danzhi Xiaoyao San groups, of which 11 were up-regulated and 9 were down-regulated. The KEGG pathway enrichment analysis revealed that the DEPs were mainly involved in cholesterol metabolism, primary bile acid synthesis, etc. . Compared with the normal group, the total cholesterol content of the model group decreased significantly while the bile acid content increased significantly, and the total cholesterol content of the model group increased significantly while the total bile acid content decreased with the administration of modified Danzhi Xiaoyao San. [Conclusion] The modified Danzhi Xiaoyao San has good antidepressant effects and its antidepressant mechanisms may be related to the regulation of abnormal cholesterol metabolism and the reduction of total blood bile acids.

**Keywords:** depression; proteomics; modified Danzhi Xiaoyao San; liver stagnancy; bile acids

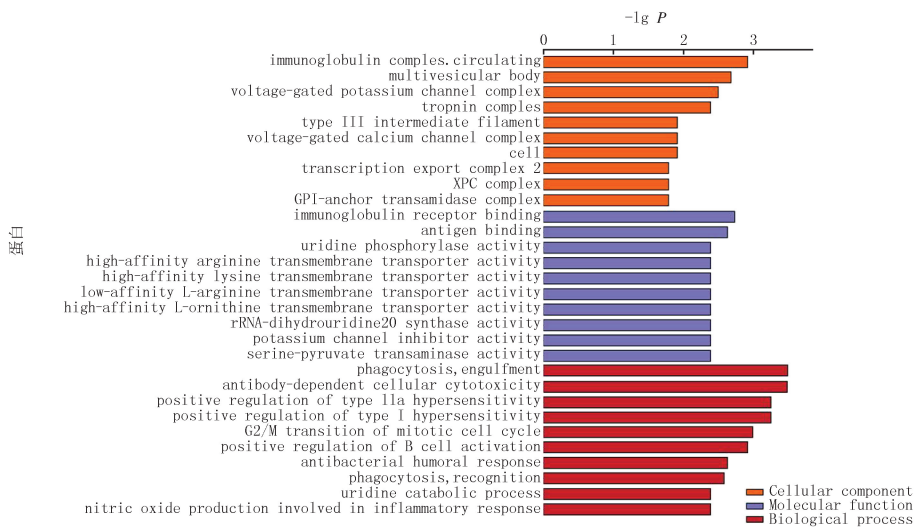
[责任编辑 杨浦 刘洋]

附录



图S1 模型组和加味丹栀逍遥散组差异表达蛋白丰度

Fig.S1 Liver proteomic analysis between the model group and modified Danzhi Xiaoyao San group



图S2 差异表达蛋白的GO富集分析

Fig.S2 Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins