

· 基础研究 ·

基于脑脊液蛋白组学探讨二仙汤抗抑郁作用

陆文君 牛 捷 罗武龙 曾宁溪 严 灿 吴丽丽

摘要 **目的** 探讨二仙汤对抑郁大鼠模型的干预作用及可能机制。**方法** 将体重和糖水偏爱度合格的 Wistar 大鼠 (45 只) 平均分为 3 组: 正常组、模型组、二仙汤组, 每组 15 只。通过慢性温和不可预计应激 (CUMS) 造模 6 周制备抑郁模型, 其中正常组和模型组给予生理盐水灌胃, 二仙汤组给予二仙汤灌胃。6 周后进行大鼠行为学测试; 运用免疫荧光方法观察各组大鼠海马 DG 区 NeuN 神经元数目及 BrdU/DCX 阳性细胞数; 运用串联质谱标签法 (TMT) 蛋白质组学分析各组大鼠脑脊液 (CSF) 差异蛋白的表达谱; 通过 Gene Ontology (GO) 注释和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路富集分析二仙汤抗抑郁的相关通路和蛋白; 通过平行反应监测 (PRM) 验证差异蛋白中与细胞增殖分化相关的蛋白。**结果** 造模 6 周后, 行为学结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠体重、糖水偏爱度、旷场活动总路程降低, 强迫游泳不动时间延长 ($P=0.000$); 与模型组比较, 二仙汤组大鼠体重、糖水偏爱度、旷场活动总路程升高, 强迫游泳不动时间缩短 ($P=0.000$); 免疫荧光结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马 DG 区神经元数目减少及神经干细胞增殖分化减弱 ($P=0.000$); 与模型组比较, 二仙汤组海马 DG 区的神经元数目增多、神经干细胞增殖分化增强 ($P=0.000$)。TMT 蛋白组学筛选到由模型组和二仙汤组共同调节的差异蛋白共 40 个, PRM 结果显示, Rps19、Rps4x、Rps12、Rps14、Vim、UBA1 在 CUMS 造模后上调, 而二仙汤治疗后下调。**结论** 二仙汤具有良好的抗抑郁及抗海马损伤效应。其可能通过调控 CSF 中与核糖体、泛素介导的蛋白水解作用通路相关的蛋白如 Rps19、Rps12、Rps14、Vim、UBA1, 来缓解海马神经元损伤, 改善抑郁症状。

关键词 抑郁症; 脑脊液; 蛋白组学; 神经发生; 二仙汤

Antidepressant Effect of Erxian Decoction Based on Cerebrospinal Fluid Proteomics LU Wen-jun, NIU Jie, LUO Wu-long, ZENG Ning-xi, YAN Can, and WU Li-li *College of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510006)*

ABSTRACT Objective To observe the intervention effect and possible mechanism of Erxian Decoction (EXD) on depression model rats. **Methods** Totally 45 Wistar rats were divided into the normal group, model group, and EXD treatment group according to body weight and sugar-water preference, 15 in each group. Depression model was established by 6-week CUMS. Normal saline was administered to rats in the normal group and the model group by gastrogavage, while EXD was given to rats in EXD group by gastrogavage. Behavioral tests were performed after 6 weeks. The immunofluorescence method was used to observe the number of NeuN neurons and BrdU/DCX positive cells in the DG hippocampus of rats. The protein expression patterns of cerebrospinal fluid (CSF) were analyzed by TMT proteomics technology. The related pathways and proteins of EXD were analyzed through Gene Ontology (GO) annotations and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways enrichment. Parallel reaction monitoring (PRM) was used to identify the proteins associated with cell proliferation and differentiation in the differential proteins. **Results** Six weeks after CUMS modeling, behavioral results showed, as compared with the normal group, body weight and sugar-water preference, total route of mine activity all decreased, forced swimming immobility was prolonged ($P=0.000$) in the model

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81774102)

作者单位: 广州中医药大学基础医学院 (广州 510006)

通讯作者: 吴丽丽, Tel: 020-39358223, E-mail: wulili@gzucm.edu.cn

DOI:10.7661/j.cjim.20210918.332

group. Compared with the model group, body weight and sugar-water preference, total route of mine activity all increased, forced swimming immobility was shortened ($P=0.000$) in EXD group. Immunofluorescence results showed, as compared with the normal group, the number of neurons in the DG area of the hippocampus decreased, and the proliferation and differentiation of neural stem cells were attenuated in the model group ($P=0.000$). Compared with the model group, the number of neurons in the DG area of the hippocampus increased, and the proliferation and differentiation of neural stem cells were enhanced in EXD group ($P=0.000$). TMT proteomics screened a total of 40 differential proteins regulated by CUMS and EXD. These differential proteins were mainly involved in the following pathways: Ribosome pathway, Epstein-Barr virus infection pathway, Ubiquitin-like modifier activating pathway, and so on. PRM results showed that Rps19, Rps4x, Rps12, Rps14, Vim, and UBA1 were up-regulated after CUMS modeling, while they were down-regulated after EXD treatment.

Conclusions EXD had good effects of anti-depression and anti-hippocampal injury. EXD alleviated hippocampal neuron injury and improved depressive symptoms possibly by regulating proteins in CSF related to ribosome and ubiquitin-like modifier activating pathways, such as Rps19, Rps12, Rps14, Vim, and UBA1.

KEYWORDS depression; cerebrospinal fluid; proteomics; neurogenesis; Erxian Decoction;

抑郁症是一种常见的精神障碍,其发病机制复杂,涉及多种遗传、心理和环境因素^[1]。临床上,抑郁症患者可表现出认知障碍,例如记忆力和学习障碍^[2]。二仙汤出自《中医方剂临床手册》,是上海中医药大学张伯讷教授研制出的方剂^[3]。刘波等^[4]通过海马蛋白质组学的研究发现二仙汤通过调控突触囊泡的融合与运输,抑制兴奋性神经递质的释放以减少海马神经元的损伤,具有明确的抗抑郁和海马神经保护效应。脑脊液是研究大脑内疾病的最直接相关的研究样本,因为它反映了大脑的代谢状态和生化反应。研究者发现脑脊液成分的改变可以明显影响到海马结构,引起海马神经元损伤和海马的萎缩^[5,6]。此外,脑脊液的蛋白成分变化对脑组织的结构及功能非常重要。因此,本研究利用慢性温和不可预计应激模型进行了一项大鼠脑脊液的串联质谱标签法相对定量蛋白质组学研究,观察二仙汤影响抑郁症海马神经元的可能相关蛋白和通路。

材料与方 法

1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 60 只,7~8 周龄,体重 180~220 g,购自方医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2016-0041。实验动物合格证编号为:No.44002100016162]。环境温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光暗周期为 12 h/12 h(光照时间 8:00-20:00),自由饮水进食。本实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准(审批时间:2017 年 2 月 28 日)。

2 药物 二仙汤组成:淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母(药材购自广州至信药业有限公司),按照 9:6:10:15:12:10 比例,常规煎煮 2 次,取汁合并后浓缩至生药浓度为 1 g/mL 药液,高压灭

菌,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

3 主要试剂及仪器 PBS 缓冲液(广州捷倍斯生物科技有限公司,批号:16021GB016);氯化钠(天津市大茂化学试剂厂,批号:1310-73-2);硼酸(上海麦克林生化科技有限公司,批号:10043-35-3);盐酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:7647/1/1);TBS 缓冲液(上海桥星贸易有限公司,批号:172160);一抗稀释液(北京索莱宝科技有限公司,批号:A1810);DAPI(碧云天生物技术,批号:C1002);Tween20(美国赛默飞公司,批号:0946c032);TritonX-100(美国赛默飞公司,批号:1286c380);封闭 5% 正常山羊血清(北京普利莱基因技术有限公司,批号:C1771);抗荧光淬灭封片剂(上海桥星贸易有限公司,批号:182411);BrdU 一抗(批号:Ab6326),Doublecortin 一抗(批号:Ab18723),山羊抗兔二抗(批号:Ab150077);山羊抗鼠二抗(批号:Ab150116)均购自广州新晋生物科技有限公司;甘油(生工生物工程上海股份有限公司,批号:G0854);溴酚蓝(生工生物工程上海股份有限公司,批号:161-0404);SDS(美国 Bio-Rad 公司,批号:161-0302);Urea(美国 Bio-Rad 公司,批号:161-0731);Tris(美国 Sigma 公司,批号:A6141);二硫苏糖醇(美国 Bio-Rad 公司,批号:161-0404);碘乙酰胺(美国 Bio-Rad 公司,批号:163-2109);碳酸氢铵(美国 Sigma 公司,批号:A6141);胰蛋白酶(美国 Promega 公司,批号:317107);甲酸(美国 Fluka 公司,批号:06450);三氟乙酸(美国 Sigma 公司,批号:T6508);乙腈(德国默克公司,批号:I592230123)。RO 纯水系统(青岛富勒姆科技有限公司,FYY20001-RO);

台式高速冷冻离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司, HR/T1615081032); 移液器 (德国 Eppendorf 公司, K41831G); 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司, LSM800); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司, CM1860) Easy nLC 色谱系统, Q Exactive 质谱仪, 微量紫外光度计, Multiskan FC 酶标仪, TMT 蛋白标记试剂盒, Pierce™ 高 pH 反相肽分离试剂盒, 多重亲和层析 LC 色谱柱—人 14 / 小鼠 3, C18 上样柱, C18 分析柱 (赛默飞世尔科技公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司; 5430R); 超声破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司, JY92-II); 恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司, GNP-9080); Vortex 振荡器 (上海精宏分析仪器有限公司, QT-1)。

4 动物分组、造模、给药及样品采集方法

4.1 分组 分组前需要适应性喂养 1 周, 期间通过糖水偏爱实验 (sucrose preference test, SPT) 剔除不合格大鼠, 剔除标准为: 糖水偏爱度过低 (<60%)、位置偏好 (偏好饮用固定方位的液体)、饮水量过低 (既不饮用糖水也不饮用纯水) 和过量饮水 (总液体消耗量超过所有大鼠总液体消耗量均值的 2 倍)。依据体重和糖水偏爱度将合格的大鼠 (45 只) 平均分为 3 组: 正常组、模型组、二仙汤组, 每组大鼠 15 只。

4.2 造模方法 正常组大鼠不施加任何刺激, 单独房间并笼饲养, 每笼 5 只; 模型组和二仙汤组每日施加不同应激源并结合孤养连续 6 周。采用 Willner P 慢性不可预测温和刺激模型 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 造模方法^[7], 并加以改进。适应性喂养 1 周后, 给予大鼠白噪音 (85 db, 5 h)、热水游泳 (45 °C, 5 min)、频闪 (300 次/min, 5 h)、湿笼 (10 h)、并笼 (5 只、10 h)、冰水游泳 (4 °C, 5 min)、夹尾 (3 min)、狭小空间 (12 h)、禁食禁水 (12、24 h) 9 种应激源刺激。应激源每日随机给予 1~2 种, 连续 6 周, 3 日内不出现相同的应激源。

4.3 给药方法 在造模期间, 二仙汤组每日两次灌胃二仙汤, 剂量为 8 g/kg (相当于成人 60 kg 体重等效剂量的 2 倍); 正常组和模型组每日 1 次给予单次相同体积生理盐水灌胃。距离实验取材前 1 周进行 BrdU 腹腔注射 (共注射 3 次, 每次间隔 4 h, 用量 200 mg/kg, 采用 23 号规格针头、5 mL 注射器注射。)

4.4 样品采集方法 行为学实验结束后, 麻醉大鼠并将其头部固定在脑立体定位仪上, 剪开皮毛肌肉暴露枕骨大孔, 微量进样器经延髓腔穿刺抽取脑脊液。冰上静置 20 min, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,

收集上清, 保存于 -80 °C 冰箱。

最后一次行为学测试后 24 h, 进行灌注, 处死大鼠, 解剖脑组织, 将脑组织放入 4% 多聚甲醛 (约 50 mL), 4 °C 环境后固定 24 h, 捞出后用 PBS 冲洗 3 次, 再分别浸入 30% 蔗糖 (每次约 50 mL, 4 °C 过夜) 脱水至沉底后取出, 参照《大鼠脑立体定位图谱 (第三版)》对本标本进行修整, 范围大致为距冠状沟 2.7~6.7 mm, 用 OCT 包埋冷冻成块后, 冰冻切片机连续冠状切片, 片厚 40 μm, 并按照顺序做好标记。切片加至多聚赖氨酸处理过的载玻片, 风干约 4 h 后放入 -20 °C 冰箱保存。

5 检测指标及方法

5.1 行为学检测

5.1.1 SPT 测试 共分为 4 部分: 糖水训练 48 h, 糖水基线测试 36 h, 禁水禁食 24 h, 糖水偏爱度测试 12 h。测试时操作者同时将称量好重量的两瓶液体 (一瓶 1% 糖水, 一瓶纯水) 分别放置于大鼠笼盖的左右两边, 尽量保持瓶身的角度及出水口的位置一致, 待大鼠自由饮用 12 h (20:30~次日 8:30) 后将两个瓶子移除, 并称重。计算大鼠的糖水偏爱度 (糖水偏爱度 = 糖水消耗量 / 总液体消耗量)。

5.1.2 旷场实验 (open-field test, OFT) 实验开始前 1 h 将大鼠放入空旷、安静且黑暗的行为学房间内, 使其熟悉房间环境。实验开始时操作者将大鼠轻缓地放入箱体 (100 cm × 100 cm × 48 cm) 中央, 然后迅速离开旷场箱体的位置。待大鼠在箱体中适应约 15 s 后记录和评估大鼠的自发活动情况, 观察指标为活动的总路程 (即大鼠 5 min 移动的总距离)。

5.1.3 强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 游泳桶为圆柱形透明水桶中直径 30 cm, 高 100 cm, 水深 35 cm (水深以高于大鼠体长, 后足不着地, 尾部无法支撑为准), 水温控制为 (25 ± 1) °C。实验前 1 h 将大鼠饲养于行为学房间内使其熟悉实验室环境, 并将各组大鼠顺序打乱。测试时操作者将大鼠缓慢放入游泳桶内, 并拍摄大鼠 6 min 内的行为。然后 3 位经过训练的操作人员双盲记录后 4 min 各大鼠在游泳桶内的不动行为 (大鼠漂浮在水面上、四肢不活动或者前爪及尾巴轻微划动以使头部探出水面) 的时间, 最后取 3 位操作人员记录的时间平均值; 若数值差异较大, 重新记录并取平均值。

5.1.4 T 迷宫实验 (T-maze test, TMT) 在各组随机选取 7~10 只大鼠, 实验开始前 2 天将测试大鼠并笼 (3~5 只) 饲养, 按照 5 g/100 g 给食, 并在鼠笼中放入 8~10 颗奶酪, 使大鼠习惯奶酪的味道。T 迷

宫设备为黑色且避免反光,起始臂长 71 cm、宽 18 cm、高 30 cm,目标臂长 46 cm、宽 18 cm、高 30 cm。

实验开始前 24 h 将大鼠置于行为学房间 T 迷宫内进行适应训练,使大鼠形成目标臂两端均有食物的记忆。正式实验时,两目标臂均放有食物,并且随机关闭两目标臂其一的闸门。大鼠自起始臂放入,待大鼠进入未关闭的目标臂,吃完此目标臂中的食物后取出,放入鼠笼,30 s 后再次将大鼠放入起始臂,打开目标臂两侧闸门,大鼠自由选择进入,如果大鼠进入关闭的目标臂,则允许其吃完食物后取出,并记正确 1 次,否则记错误 1 次。正式实验每天循环 10 次(每次实验最多 2 min,每次间隔 20 min),持续 4 天。

5.2 串联质谱标签法(tandem mass tag, TMT)

5.2.1 蛋白质提取和肽段酶解 样品采用 SDT[4% (w/v) SDS, 100 mmol/L Tris/HCl pH7.6, 0.1 mmol/L DTT] 裂解法提取蛋白质,然后采用 BCA 法进行蛋白质定量。每个样品取适量蛋白质采用 Filter aided proteome preparation (FAPP) 方法进行胰蛋白酶酶解,肽段定量(OD280)。

5.2.2 TMT 标记 各样品分别取 100 μ g 肽段,按照 Thermo 公司 TMT 标记试剂盒说明书进行标记。

5.2.3 High pH Reversed - Phase 肽段分级 将每组标记后的肽段等量混合,采用 High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit 进行分级。首先采用乙腈和 0.1% 三氟乙酸(TFA)进行柱平衡,然后把混合的标记肽段样品上样,加入纯水后低速离心进行脱盐处理,最后采用浓度依次增加的高 pH 乙腈溶液对柱结合肽段进行梯度洗脱。每份洗脱的肽段样品真空干燥后用 12 μ L 0.1%FA 复冻冻干样品,OD280 测定肽段浓度。

5.2.4 LC-MS/MS 数据采集 每份分级样品采用纳升流速的 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离。缓冲液 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)。色谱柱以 95% 的 A 液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, 100 μ m \times 2 cm, nanoViper C18),经过分析柱(Thermo Scientific EASY column, 10 cm, ID75 μ m, 3 μ m, C18-A2)分离,流速为 300 nL/min。样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析检测方式为正离子,母离子扫描范围 300~1 800m/z,一级质谱分辨率为 70 000 at 200 m/z, AGC (automatic gain control) target 为 1e6, Maximum IT 为 50 ms, 动态排除时间(dynamic exclusion) 为 60.0 s。多肽和多肽碎

片的质量电荷比按照下列方法采集:每次全扫描(full scan)后采集 20 个碎片图谱(MS2 scan), MS2 Activation Type 为 HCD, Isolation Window 为 2 m/z, 二级质谱分辨率 17 500 at 200 m/z (TMT 6-plex) 或者 35 000 at 200 m/z (TMT 10-plex), Normalized Collision Energy 为 30 eV, Underfill 为 0.1%。

5.2.5 蛋白质鉴定和定量分析 用软件 Mascot 2.2 和 Proteome Discoverer 1.4 进行查库鉴定及定量分析。

5.2.6 生物信息学分析 利用 Blast2 GO 对目标蛋白质集合进行 GO 注释,过程大致可以归纳为序列比对(Blast)、GO 条目提取(Mapping)、GO 注释(Annotation)和 InterProScan 补充注释(Annotation Augmentation)等 4 个步骤。利用 KAAS (KEGG automatic annotation server) 软件,对目标蛋白质集合进行 KEGG 通路注释。

5.3 平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM) 提取 CSF 样品蛋白并酶解后,采用 HPLC 系统进行色谱分离,分离后的肽段进行 PRM 质谱分析。PRM 检测重复 3 次,最终采用软件 Skyline 3.7.0 对 PRM 原始文件进行数据分析,并对目标蛋白和目标肽段进行定量。

5.4 免疫荧光检测 DG 区 NeuN 神经元数目及 BrdU/DCX 阳性细胞数 切片在 5% 山羊血清(含 0.03% Triton-X-100)中室温封闭 1 h,然后在兔抗 NeuN (1:400, mAb, Abcam, Cambridge, UK) 中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。在含有 0.01% 吐温 -20 的 Tris 缓冲盐水中冲洗后,切片与 AlexaFluor488 山羊抗兔抗 (1:500, Abcam) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用 0.01% 吐温 -20 的 Tris 缓冲盐水冲洗和 DAPI 染色后,使用激光扫描共聚焦显微镜 (LSM800, ZEISS) 获取图像。使用 Image J 软件(美国国立卫生研究院)分别对 NeuN 阳性和 DAPI 染色的细胞(总细胞数)进行计数。用 NeuN 阳性细胞占总细胞数的比例来测定齿状回中 NeuN 的表达。DCX 染色阶段,用兔抗 DCX 抗体 (1:200, pAb, Abcam) 孵育切片。其他步骤和参数与 NeuN 染色一致。与 NeuN 标记相似,使用 ImageJ 软件分别计数 DCX 阳性和 DAPI 染色的细胞(总细胞数)。

6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析,结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合方差齐性的 3 组及以上组间比较用单因素方差分析,不符合方差齐性运用 Welch 法检验。两两比较,方差齐的采用 LSD 法,方差不齐的采用 Games-Howell 法。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

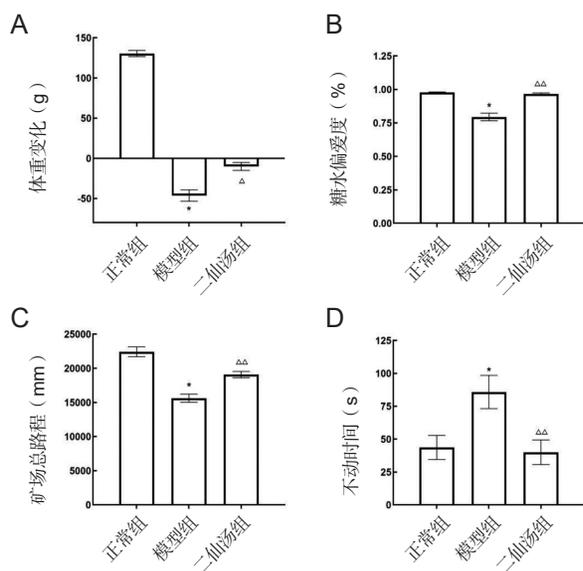
1 各组大鼠行为学结果比较

1.1 各组大鼠体重变化比较 (图 1A) 与正常组比较, 模型组应激后体重增加量减少 ($P=0.000$), 与模型组比较, 二仙汤组体重增加量增加 ($P=0.02$)。

1.2 各组大鼠糖水偏爱度比较 (图 1B) 与正常组比较, 模型组糖水偏爱度降低 ($P=0.000$)。与模型组比较, 二仙汤组大鼠糖水偏爱度增加 ($P=0.000$)。

1.3 各组大鼠旷场总路程比较 (图 1C) 与正常组比较, 模型组旷场总路程缩短 ($P=0.000$)。与模型组比较, 二仙汤组旷场总路程延长 ($P=0.000$)。

1.4 各组大鼠强迫游泳不动时间比较 (图 1D) 与正常组比较, 模型组强迫游泳不动时间延长 ($P=0.000$)。与模型组比较, 二仙汤组强迫游泳不动时间缩短 ($P=0.000$)。

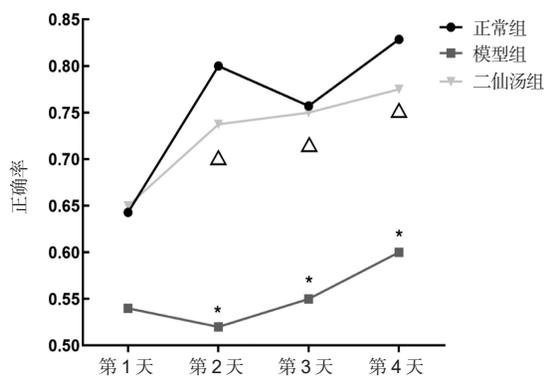


注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各组大鼠行为学结果比较

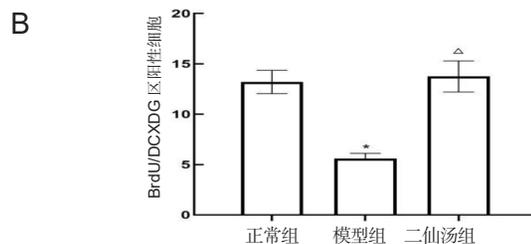
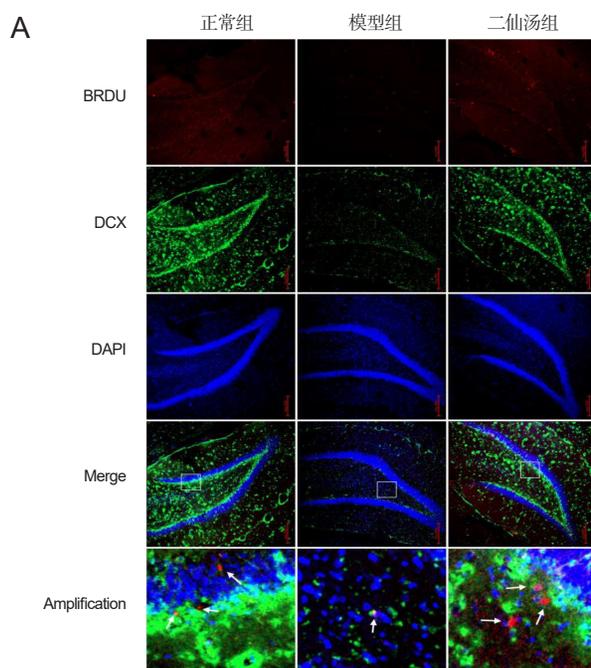
2 各组大鼠 T 迷宫正确率比较 (图 2) 与正常组比较, 除第 1 天外, 模型组第 2~4 天的正确率降低 ($P=0-0.003$); 与模型组比较, 二仙汤组在第 2~4 天的正确率提高 ($P < 0.01$)。

3 各组大鼠海马 DG 区神经干细胞的变化比较 (图 3) 与正常组比较, 模型组大鼠 BrdU/DCX 阳性细胞数明显减少 ($P=0$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 二仙汤组 BrdU/DCX 阳性细胞数明显升高 ($P=0$, $P < 0.01$)。



注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 各组大鼠 T 迷宫正确率比较

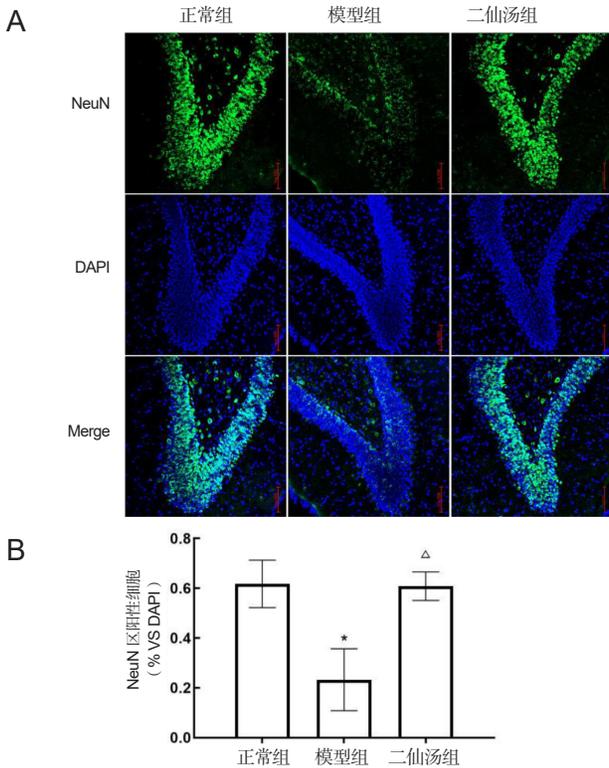


注: A 为各组大鼠海马 DG 区 BrdU/DCX 阳性神经激光共聚焦, 箭头表示 BrdU (红色)/DCX (绿色) 阳性细胞 ($\times 10$); B 为 BrdU/DCX 阳性细胞结果; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

图 3 各组大鼠海马 DG 区神经干细胞的变化

4 各组大鼠 DG 区神经元数目比较 (图 4) 与正常组比较, 模型组 NeuN 阳性细胞数 / 总细胞比值降低 ($P=0$); 与模型组比较, 二仙汤组 NeuN 阳性细胞数 / 总细胞比值升高 ($P=0$)。

5 模型组和正常组大鼠脑脊液蛋白质组的变化 (图 5、6) 模型组和正常组共筛选出 1 915 个蛋白,



注: A 为海马 DG 区 NeuN 免疫荧光图片、神经元特异性核蛋白 NeuN (绿色)、DAPI 标记的细胞 (蓝色) 激光共聚焦 (×20); B 为 NeuN 阳性细胞结果; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

图 4 各组大鼠 DG 区神经元数目比较

按照表达倍数变化上调 >1.2 倍或者下调 <0.83 倍且 P 值 <0.05 的标准筛选出 100 种差异表达蛋白质。与正常组比较, 模型组有 34 个蛋白质上调, 66 个蛋白质下调。图 5 为 100 个蛋白质的 GO 注释结果, 这些差异蛋白质的功能主要是结合, 催化活性, 结构分子活性, 分子功能调节剂和转录调节剂的活性, 参与了再生产, 代谢过程, 细胞杀伤及增殖, 免疫系统过程, 生物过程的调控和应激反应等重要生物学过程。图 6 为 KEGG 富集分析结果, 核糖体、流体剪切应力与动脉粥样硬化、氨酰生物合成、雌激素信号通路及细胞凋亡等信号通路发生了显著变化。

6 模型组和二仙汤组大鼠脑脊液蛋白质组比较 (图 7、8) 与模型组比较, 二仙汤组上调差异表达蛋白质 19 个, 下调差异表达蛋白质 64 个。图 7 显示, 这些差异表达蛋白质的功能主要是结合, 催化活性, 结构分子活性, 分子功能调节剂和转运蛋白活性, 参与了再生产, 代谢过程, 细胞杀伤及增殖, 免疫系统过程, 生物过程的调控和应激反应等生物学过程。图 8 显示, 核糖体、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 信号通路和基底转录因子通路等通路发生了显著变化。

7 各组大鼠脑脊液差异蛋白的表达 (表 1, 图 9、

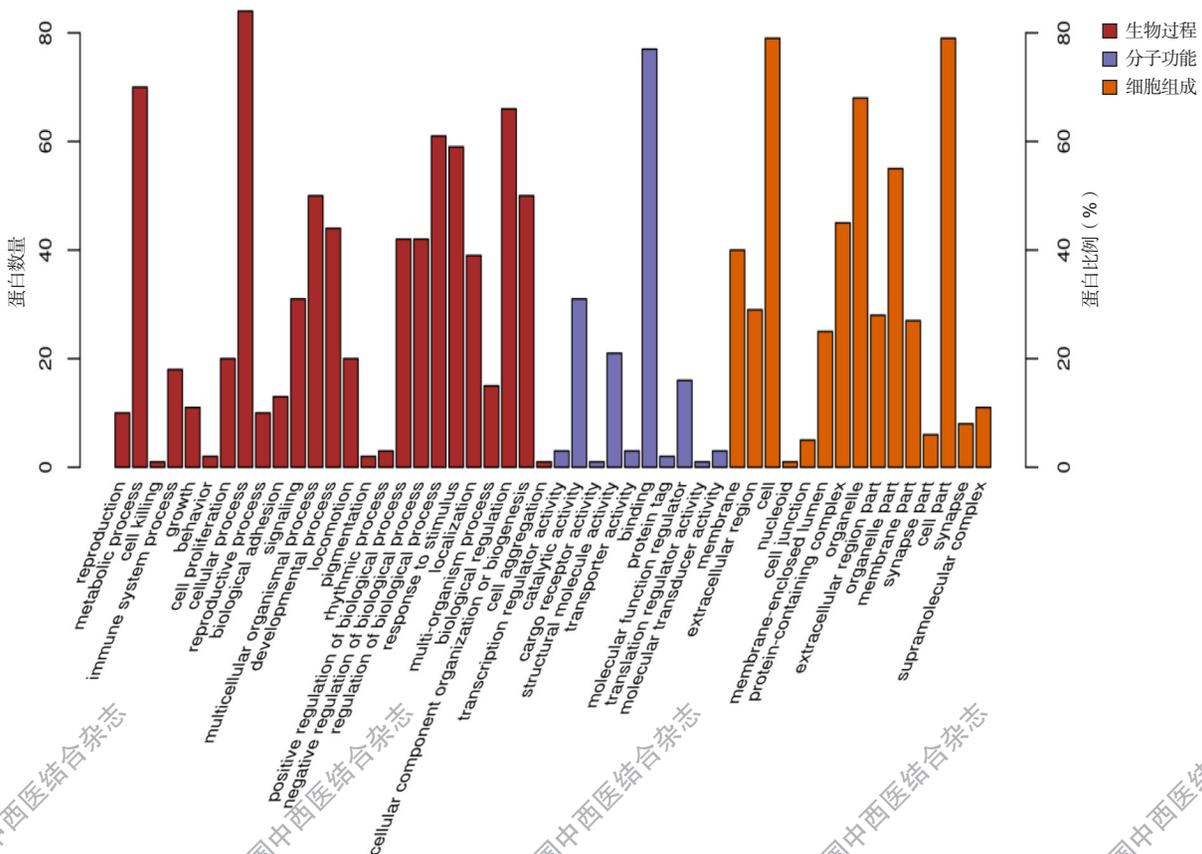


图 5 正常组与模型组差异表达蛋白的 GO 注释分析结果

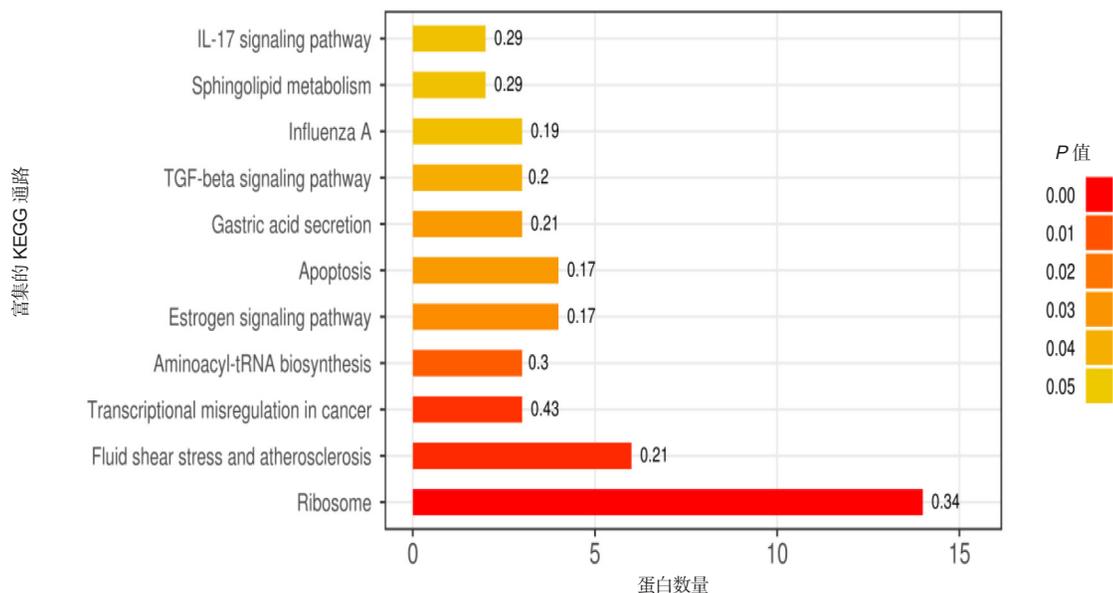


图 6 正常组与模型组差异表达蛋白 KEGG 通路分析结果 (前 20)

10、11) 通过比较分析, 鉴定出 40 个既受模型组影响又受二仙汤组影响的差异蛋白质, 具体信息见表 1。图 9 显示, 在 6 周慢性温和不可预计应激后, 有 5 个蛋白表达下调, 35 个蛋白表达上调, 而服用二仙汤后可显著抵消这一变化。图 10 显示, 这些差异蛋白主要参与了细胞过程、生物调控、代谢过程、应激反应等生物学过程。图 11 显示, 这些差异蛋白主要富集在核糖体、PI3K-Akt 信号通路、内质网蛋白加工、RNA 运输、氨酰生物合成等通路上。

8 PRM 对目标蛋白定量分析 基于 GO 注释及 KEGG 富集分析结果, 选择了 Rps3、Rps12、Rps4x、Rps14、Rps19、Vim、UBA1、Calm1、Cpd 9 种与细胞增殖存活密切相关的蛋白质进行 PRM 蛋白定量分析。结果显示: 与 TMT 结果一致的是, 脑脊液中 Rps4x、Rps12、Rps14、Rps19、Vim、UBA1 等蛋白在模型组中上调, 而在二仙汤组中下降。此外, 通过 PRM 未能识别到 Rps3、Calm1、Cpd 在脑脊液中的表达。

讨 论

海马作为一种易受到应激影响的大脑结构, 在慢性长期的应激下会很容易受损, 并且与行为抑制、空间编码和记忆有关^[8]。从结构上来看, 海马是边缘系统的一部分, 位于侧脑室下角的下壁和侧壁上, 并与情绪相关的大脑区域 (例如前额叶皮层) 形成神经纤维的连接。从功能上来看, 海马体是产生和调节情绪、学习和记忆的重要大脑区域, 同时也是情绪应激累及的敏感区。海马结构损伤包括海马神经元的凋亡或死

亡和海马神经发生障碍; 海马功能损伤包括学习记忆、情绪调节两方面。在抑郁症的发展过程中, 海马在可塑性和神经化学物质方面发生改变, 包括体积的缩小, 神经发生的减少, 细胞死亡数量的增加以及脑源性神经营养因子的减少等^[9]。神经影像学研究表明, 抑郁症患者和动物模型的海马体积均有缩小^[10,11]。因此, 海马结构和功能的损伤可能是抑郁症的病理机制之一。

脑脊液的主要生成来源之一是侧脑室的脉络丛, 侧脑室内的脑脊液蛋白成分发生改变, 能够对海马的组织结构和功能产生不同程度的影响。脑脊液生物标记物水平与大海马体的萎缩相关已经被证明^[12]。有研究表明, 脑脊液中大量的分子信号可直接影响神经干细胞和神经发生^[13,14]。此外, 中药复方二仙汤作用于多靶点、多器官、多通路, 且二仙汤是个多组分的药物, 很多组分可能无法直接进入脑实质如海马产生影响, 鉴于二仙汤的抗抑郁及抗海马损伤效应, 推测二仙汤的效应部分可能通过外周或者直接通过脑脊液来发挥作用。

本研究观察到在二仙汤的作用下, 模型组大鼠中快感缺失、自主活动减少、绝望情绪等典型抑郁症状被明显改善, 提示二仙汤具有良好的抗抑郁效果。

CUMS 模型是研究抑郁症神经生物学的理想动物模型^[15]。在该模型中, 动物每天暴露在不同的温和和应激中, 其中使用的应激源接近人们生活中经常遇到的压力事件的强度, 基本上模拟了人类抑郁症的主要症状, 即缺乏愉悦感, 还模拟了抑郁症的其他症状, 如无望感增加, 探索行为以及学习和记忆力

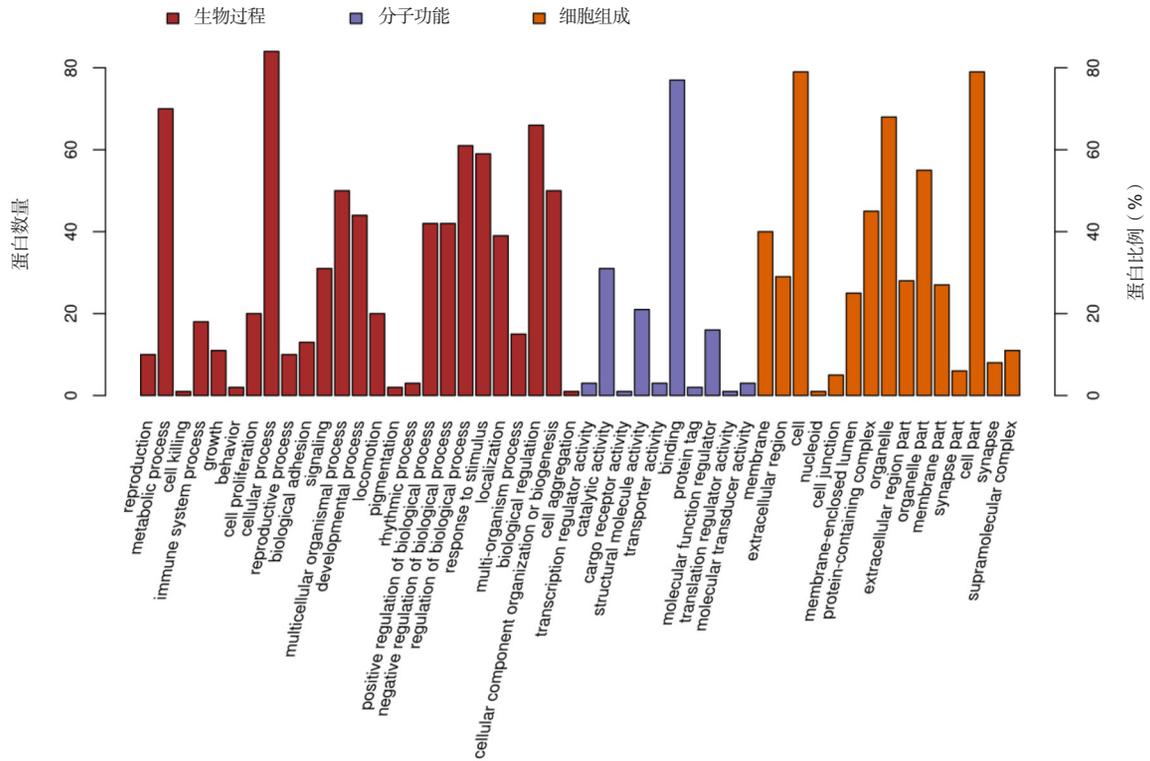


图 7 模型组与二仙汤组差异表达蛋白的 GO 注释分析结果

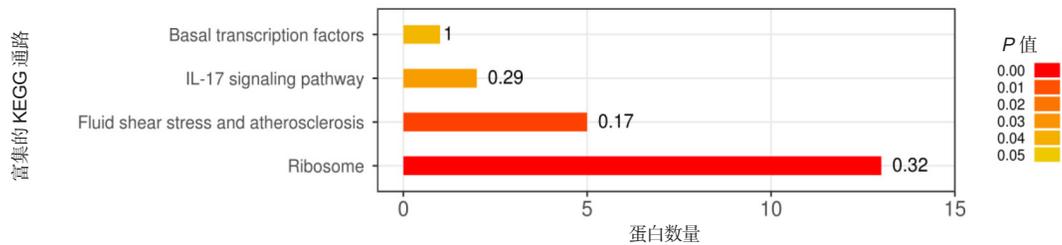


图 8 模型组与二仙汤组差异表达蛋白 KEGG 通路分析结果 (前 20)

表 1 模型组与正常组、二仙汤组与模型组的共同差异蛋白

通路	蛋白名称	基因名称	Fold Change	
			CUMS/CON	EXD/CUMS
ENSRNOP00000074005	dyskerin pseudouridine synthase 1	Dkc1	7.606	0.177
ENSRNOP00000060949	ribosomal protein L34	Rpl34	6.628	0.221
ENSRNOP00000022184	ribosomal protein S12	Rps12	3.913	0.280
ENSRNOP00000075909	NFKB activating protein	Nkap	3.425	0.333
ENSRNOP0000004278	ribosomal protein S4, X-linked	Rps4x	2.827	0.390
ENSRNOP00000033144	ribosomal protein s25	Rps25	2.742	0.337
ENSRNOP00000034657	ubiquitin-like protein fubi and ribosomal protein S30-like	LOC100360647	2.548	0.457
ENSRNOP00000026528	ribosomal protein S5	Rps5	2.414	0.393
ENSRNOP00000070331	protein kinase N3	Pkn3	2.194	0.495
ENSRNOP00000001397	transmembrane p24 trafficking protein 2	Tmed2	2.111	0.382
ENSRNOP00000025217	ribosomal protein L17	Rpl17	2.073	0.542
ENSRNOP00000070867	neuraminidase 1	Neu1	2.043	0.576
ENSRNOP00000021048	myosin light chain 12A	Myl12a	2.017	0.557
ENSRNOP00000071398	glutaminyI-tRNA synthetase	Qars	1.942	0.588

续表 1

ENSRNOP00000038448	seryl-tRNA synthetase	Sars	1.933	0.497
ENSRNOP00000056260	ribosomal protein S14	Rps14	1.911	0.552
ENSRNOP00000009249	proteasome 26S subunit, , non-ATPase 6	Psm6	1.816	0.360
ENSRNOP00000026576	ribosomal protein S16	Rps16	1.711	0.627
ENSRNOP00000015612	S100 calcium binding protein A6	S100a6	1.653	0.602
ENSRNOP00000063496	annexin A3	Anxa3	1.626	0.636
ENSRNOP00000008509	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	Eif1ax	1.518	0.647
ENSRNOP00000019247	ribosomal protein L27a	Rpl27a	1.485	0.755
ENSRNOP00000026696	heat shock protein family A member 9	Hspa9	1.471	0.591
ENSRNOP00000070868	tubulin, alpha 1B	Tuba1b	1.451	0.707
ENSRNOP00000072016	TATA-box binding protein associated factor 15	Taf15	1.442	0.674
ENSRNOP00000047328		AC129049.1	1.390	0.717
ENSRNOP00000024430	vimentin	Vim	1.374	0.755
ENSRNOP00000009556	heat shock protein HSP 90-alpha	LOC103692716	1.368	0.688
ENSRNOP00000074688	ubiquitin C	Ubc	1.364	0.638
ENSRNOP00000034846	heat shock protein 90 beta family member 1	Hsp90b1	1.359	0.810
ENSRNOP00000012726	angiopoietin like 7	Angptl7	1.346	0.701
ENSRNOP00000004867	small ubiquitin-like modifier 2	Sumo2	1.300	0.634
ENSRNOP00000017234	heparin binding growth factor	Hdgf	1.296	0.659
ENSRNOP00000033950	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	Uba1	1.269	0.693
ENSRNOP00000004764	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	Efemp1	0.825	1.247
ENSRNOP00000013896	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3C	Serpina3c	0.809	1.220
ENSRNOP00000073724	periostin	Postn	0.787	1.206
ENSRNOP00000012293	alpha-2u globulin PGCL3	LOC259244	0.783	1.269
ENSRNOP00000059194	angiopoietin-like 1	Angptl1	0.773	1.250

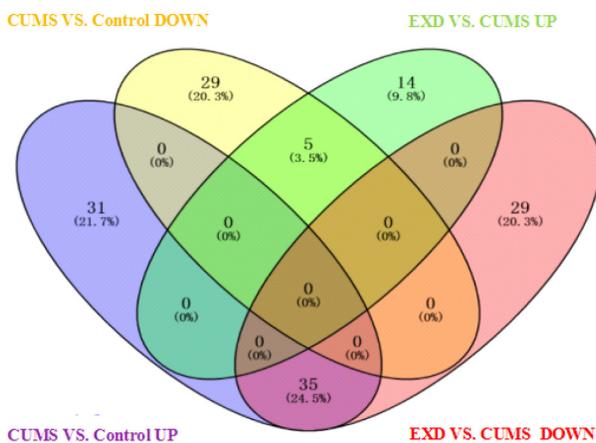


图 9 模型组与正常组与二仙汤组与模型组差异蛋白的维恩图

的能力下降。在动物实验中，给予老鼠和猴子长时间的应激后，观察到其海马神经元损失和树突萎缩^[16]；将大鼠长期暴露在应激条件下，会导致海马锥体神经元树突形态变化并且萎缩^[17]。表明慢性应激可引起海马损伤，而 CUMS 6 周模型可以较好模拟抑郁症海马损伤的病理变化，因此是研究抑郁症海马损伤的

理想动物模型。

抑郁症患者，海马的结构损伤导致认知障碍，海马神经发生减少，表明海马损伤与抑郁症的发生发展密切相关。因此，抗海马损伤是目前抑郁症治疗的一大重点。在本实验中，二仙汤显示出良好的抗海马损伤效果，显著改善了抑郁症大鼠的认知障碍、海马神经发生障碍和 DG 区神经元缺失。脑脊液中存在能够控制神经前体细胞行为、诱导前体增殖和神经元分化的神经源性信号，可直接作用于脑脊液的神经元及周围脑室器官神经干细胞和前体细胞，调节神经发生^[18]。海马作为大脑皮质的一个内褶区，在侧脑室底部绕脉络丛裂形成一弓形隆起，受侧脑室脑脊液的影响。因此，猜测二仙汤可能更多的是通过改变脑脊液成分，影响海马，从而发挥保护海马神经元和改善海马神经发生障碍的效应。选择蛋白质组学来进行进一步验证，蛋白质组学的结果显示实验大鼠脑脊液中的差异表达蛋白。通过这种比较方法，能够发现二仙汤抗抑郁症海马损伤的可能相关蛋白和通路。

在由模型组和二仙汤组共同调节的 40 个显著

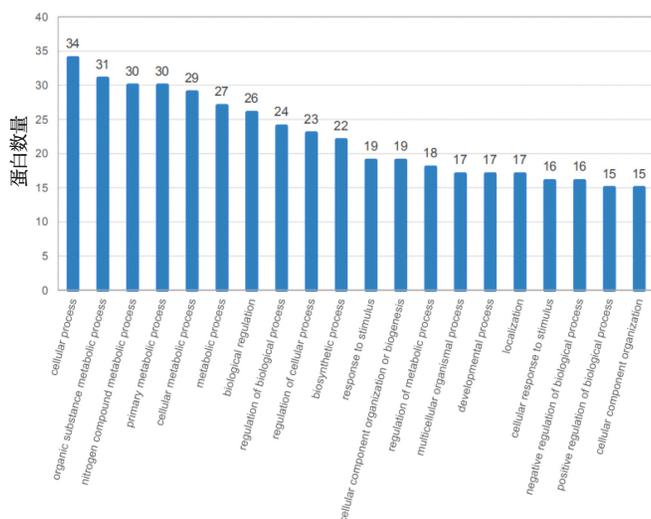


图 10 模型组与正常组、二仙汤组与模型组差异蛋白生物学过程分析结果 (前 20)

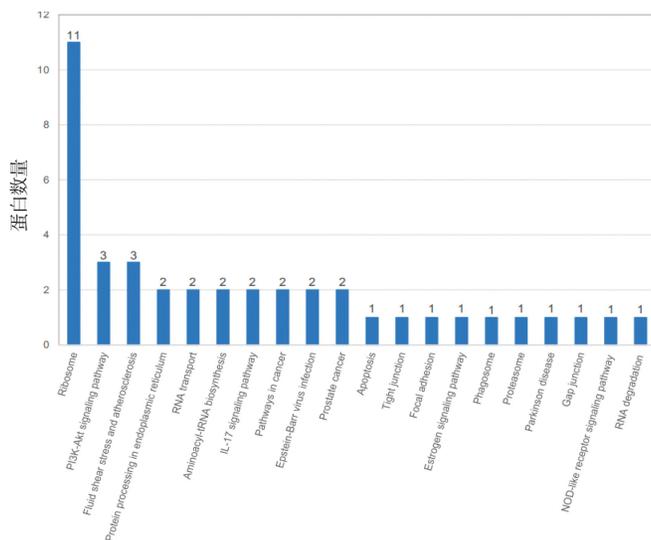


图 11 模型组、正常组与二仙汤组、模型组差异表达蛋白 KEGG 通路分析结果 (前 20)

差异表达蛋白中有 9 个被富集到核糖体通路,是富集程度最高的 KEGG 通路,验证了这 9 个蛋白,结果 Rps4x、Rps12、Rps14、Rps19 这几个蛋白在脑脊液中均被模型组诱导上调,提示核糖体在抑郁症发病及二仙汤干预中发挥了重要作用。核糖体是 RNA 翻译的工作场所,是蛋白质合成的重要细胞器^[19]。核糖体对于蛋白质的产生,细胞的存活、生长和繁殖都是至关重要的。核糖体的组装是一个受到精确调控的过程,这个过程在广义上也被称为核糖体的成熟过程,包括生物体内核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)、核糖体蛋白的合成直到产生成熟核糖体的全部过程^[20]。在体内,这一过程受到近 30 个核糖体组装因子蛋白和大量跨细胞分子调控,因此,这一过程容易受到应激影响。当核糖体的组装

过程受到细胞外的应激影响时,胞内核糖体蛋白的平衡规范被打破,这可能导致核糖体蛋白不正确的折叠,从而导致功能丧失,堆积在细胞核内^[21-23]。另外,还有人提出,抑制新的 rRNA 合成可能会阻止核糖体组装的进展,导致游离核糖体蛋白的过量^[24]。核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 是核糖体的重要组成部分,在核糖体的翻译过程中起重要的作用,这些蛋白负责翻译、转录和增殖。本研究检测出抑郁大鼠脑脊液中 Rps19、Rps4x、Rps12、Rps14 等核糖体相关蛋白表达上调,而二仙汤逆转了这一现象。表明抑郁大鼠的核糖体组装出现障碍,导致核糖体蛋白的聚集,细胞的增殖修复能力受损,而以往的研究表明,抑郁大鼠海马 SGZ 区的神经前体细胞的增殖分化出现障碍,从而影响到海马的神经发生^[25],而二仙汤的治疗能改善海马神经发生障碍。揭示了二仙汤作用于核糖体通路的作用机制,通过影响核糖体组装过程来保持细胞内核糖体蛋白的正常运作,为神经元的增殖分化提供足够的蛋白质补给。

此外,在神经系统中,核糖体对神经元的发育有重要作用。核糖体生物过程中某一环节出现干扰,可能引起核糖体应激,导致一些核糖体蛋白游离进细胞核,与 MDM2 癌基因结合引起抑癌基因 p53 的激活,从而抑制细胞周期甚至促进细胞凋亡^[26],如有研究表明 Rps14 可通过激活 p53 通路等多种途径显著抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡^[27,28]。本的研究发现抑郁症大鼠海马 DG 区的神经干细胞出现显著的增殖分化障碍。提示抑郁症大鼠体内可能存在核糖体应激,进而导致细胞的增殖及存活障碍,而二仙汤可能通过激活一些相关核糖体通路来对抗抑郁症的核糖体应激。

本研究检测出抑郁大鼠脑脊液中 Rps19、Rps4x、Rps12、Rps14 等核糖体相关蛋白表达上调。一项临床研究观察到抑郁症患者的 Rps19 显著上调^[29]。Hori H 等^[30]的研究发现, Rpl17 和 Rpl34 是与应激易感性相关的关键分子, Rpl17 和 Rpl34 的表达水平与编码其糖皮质激素受体亚型的 NR3C1 基因的表达呈显著负相关,提示这些核糖体基因可能通过降低糖皮质激素受体的敏感性而参与应激易感性和抑郁,从而导致下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 轴) HPA 轴过度活跃和皮质醇增多,提示核糖体蛋白可能通过影响 HPA 轴和皮质醇来参与到抑郁症的发病从而影晌应激易感性和弹性,但其中的具体机制有待进一步研究。有趣的是,有研究发现 21 天 CUMS 应激后大鼠海马中的 Rps19 表达减少^[31],在本实验中 CUMS 大鼠脑脊液

中呈现出相反的趋势。一般情况下 CUMS 造模周数为 3~4 周, 但本实验前期研究已经证实海马病理变化的出现晚于行为学变化。造模 4 周后 CUMS 模型大鼠虽然已经出现了类抑郁样行为, 但此时还处于抑郁症发病早期阶段, 其海马损伤程度较轻。因此不排除造模周期的长短会对一些核糖体蛋白或其他相关蛋白的表达产生一定影响。另外, 脑脊液中成分浓度的改变会影响海马与其的物质交换以及核糖体蛋白的异质性而使二者某些蛋白的表达出现不一致性。但其中的具体机制有待进一步研究。虽然关于抑郁症核糖体功能变化有关的文献资料十分缺乏, 但是对抑郁大鼠脑脊液核糖体蛋白表达变化的观察表明, 慢性应激会导致核糖体功能发生障碍, 而二仙汤对其具有明显的调节作用, 这可能是二仙汤发挥其抗抑郁作用的潜在机制之一。

本实验在进行差异蛋白分析的过程中发现爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染这条通路和抑郁症之间可能存在潜在的联系。EBV 是疱疹病毒科的成员, 具有潜在的嗜神经性^[32]。一项研究表明, 暴露于 EBV 的潜在精神发生机制可能包括炎症细胞因子在先天免疫系统激活后对大脑的影响^[33], 这与抑郁症的炎症假说是相符的; 动物研究也表明炎症在精神病病因中的作用^[34]。此外, 笔者还注意到 EBV 感染通路中的波形蛋白 (Vim), 波形蛋白作为一种中间丝, 是构成细胞骨架必不可少的一部分。细胞骨架的三个主要组成部分是微管、中间丝和肌动蛋白纤维, 它们以多种方式相互作用。细胞骨架对于维持细胞形态、细胞力学和细胞的正常功能至关重要^[35]。Vim 是中间丝蛋白质家族的重要成员, 在间充质细胞中广泛表达^[36]。由于它对肌动蛋白和微管蛋白的组织至关重要, 因此它可以构成细胞骨架并保持细胞完整性。有研究表明, 大脑的结构可塑性与细胞骨架微管系统的动力学严格相关, 这是形成和维持突触连接的基础, 包括轴突和树突的重塑和延伸, 轴突和树突的重塑需要更多动态形式的微管^[37]。据报道, 细胞骨架的变化可能与隔离饲养引起的海马结构改变有关, 包括海马锥体细胞的树突长度和树突密度减少, 突触前标志物 synaptophysin 的表达减少, 以及新生神经元的数量减少^[38], 但在本研究中没有检测二仙汤对海马锥体细胞的树突长度和树突密度, 突触前标志物的影响, 这也是后续研究将进行补充的部分。本研究中模型组大鼠脑脊液中的 Vim 蛋白出现上调, 而在二仙汤的干预后转为下调, 这提示 CUMS 造模后, 细胞骨架的变化引起神经元和突触结构的改

变, 而二仙汤给药可能通过改变细胞骨架动力学来影响神经元和突触的重构和减少炎症细胞因子激活后对大脑的影响, 从而发挥神经元保护效应。

除此之外, 笔者还注意到与神经系统密切相关的差异蛋白 UBA1。UBA1 是一种泛素样修饰物激活酶 1, 位于泛素级联的顶端, 是细胞蛋白质稳态的重要调节因子^[39]。UBA1 的发现是研究泛素和泛素与底物蛋白结合 (泛素化) 过程的基础。泛素化是一个关键的调控信号, 调节蛋白质的功能, 并指导许多关键的细胞过程。它最常被研究的可能是它在引导蛋白质通过细胞中两个主要的蛋白水解系统, 泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 和选择性自噬中的关键作用^[40, 41]。UPS 是降解调节蛋白和受损、错误折叠蛋白的主要蛋白水解系统。选择性自噬主要负责清除长寿命的蛋白质、大分子复合物、细胞器和错误折叠的蛋白质聚集体, 是真核生物中高度保守的途径^[42]。有研究表明, 在神经系统中, UBA1 活性和泛素化更普遍地参与了神经功能的许多方面的调节, 如神经元的分化、生长和发育、神经元的兴奋性、神经传递、长时程增强和突触的形成和消除。因此, 神经元中的 UBA1 的破坏可能会导致神经元的形态和功能受损^[43]。我们的研究表明 UBA1 可能参与了抑郁症神经发生障碍和神经元损伤的过程, 而二仙汤的海马保护效应之一可能与泛素介导的蛋白水解有关。

以上结果说明, 二仙汤可能通过调控核糖体通路、泛素介导的蛋白水解作用通路, 从而保护海马神经元损伤, 抑制海马神经发生障碍, 从而发挥抗抑郁的作用。

综上所述, 抑郁症的发病机制及二仙汤对抑郁症的作用机制涉及多个脑区、多种蛋白质、多种因素, 多条通路, 关于以上提到的通路和差异蛋白在其中的具体作用及机制还需要通过实验和理论进行进一步的探讨。同时, 本研究仍然存在很多不足之处, 如未研究二仙汤对相关突触结构的影响以及缺少对海马蛋白质组学的验证, 在未来的研究中, 将检测抑郁个体海马的蛋白质组学, 与本研究的脑脊液蛋白组学进行对照分析; 以及进行二仙汤对相关突触结构影响的研究来进一步明确二仙汤抗抑郁、抗海马损伤的具体通路和靶点。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 李凌江, 马辛. 中国抑郁障碍防治指南 (第二版) 解读: 概述 [J]. 中华精神科杂志, 2017, 50(3): 167-168.

- [2] Sampogna G, Del Vecchio V, Giallonardo V, et al. Diagnosis, clinical features, and therapeutic implications of agitated depression[J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2020, 43 (1): 47–57.
- [3] 王少坤, 邹勇, 付毅敏. 二仙汤研究及临床应用进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2021, 19 (3): 201–205.
- [4] 刘波, 刘志文, 王莹, 等. 二仙汤改善去卵巢大鼠学习记忆能力的海马蛋白质组学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (14): 2991–2998.
- [5] 尹莹莹. 抑郁症精神运动迟滞及认知功能损害的脑影像遗传学研究 [D]. 南京: 东南大学, 2017.
- [6] 王金立. 实验性蛛网膜下腔出血对侧脑室脉络丛和海马组织结构的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [7] 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.
- [8] Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety[J]. *Nature Rev Neurosci*, 2014, 15 (3): 181–192.
- [9] Liu W, Ge T, Leng Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex[J]. *Neural Plasticity*, 2017, (5): 1–11.
- [10] Sheline YI, Liston C, McEwen BS. Parsing the hippocampus in depression: chronic stress, hippocampal volume, and major depressive disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85 (6): 436–438.
- [11] Hu Y, Zhou J, Fang L, et al. Hippocampal synaptic dysregulation of exo/endocytosis-associated proteins induced in a chronic mild-stressed rat model[J]. *Neuroscience*, 2013, 230 (Complete): 1–12.
- [12] Wu Y, Tang J, Zhou C, et al. Quantitative proteomics analysis of the liver reveals immune regulation and lipid metabolism dysregulation in a mouse model of depression[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 311: 330–339.
- [13] Kim DH, Lee D, Chang EH, et al. GDF-15 secreted from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells delivered through the cerebrospinal fluid promotes hippocampal neurogenesis and synaptic activity in an Alzheimer's disease model[J]. *Stem Cells Development*, 2015, 24 (20): 2378–2390.
- [14] Lamus F, Martín C, Carnicero E, et al. FGF2/EGF contributes to brain neuroepithelial precursor proliferation and neurogenesis in rat embryos: the involvement of embryonic cerebrospinal fluid[J]. *Development Dynamics*, 2020, 249 (1): 141–153.
- [15] 黄艳妮, 何小华, 郑晓霞, 等. 慢性不可预计温和刺激抑郁模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26 (1): 54–58.
- [16] Norbury R. Chronotype, depression and hippocampal volume: cross-sectional associations from the UK Biobank[J]. *Ray Norbury*, 2019, 36 (5): 709–716.
- [17] Li SY, Rong PJ, Gao GJ, et al. Auricular electroacupuncture improves depression possibly by promoting hippocampal Raf/ERK/RSK/CREB signaling in chronic unpredictable mild stress induced depression rats[J]. *Acupunct Res*, 2019, 44 (8): 554–559.
- [18] Illes S. More than a drainage fluid: the role of CSF in signaling in the brain and other effects on brain tissue[J]. *Handb Clin Neurol*, 2017, 146: 33–46.
- [19] Liutkute M, Samatova E, Rodnina MV. Cotranslational folding of proteins on the ribosome[J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (1): 97.
- [20] Peña C, Hurt E, Panse VG. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24 (9): 689–699.
- [21] Zhou X, Liao WJ, Liao JM, et al. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome[J]. *J Molec Cell Biol*, 2015, 7 (2): 92–104.
- [22] Ghulam MM, Catala M, Abou Elela S. Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (4): 1954–1968.
- [23] 田媛, 张俊平. 核糖体蛋白质的新功能及其与相关疾病的关系 [J]. *生命的化学*, 2011, 31 (4): 488–491.
- [24] Fox JM, Rashford RL, Lindahl L. Co-assembly of 40S and 60S ribosomal proteins in early steps of eukaryotic ribosome assembly[J]. *Int J Molec Sci*, 2019, 20 (11): 2806.
- [25] 衣昕. 成年大鼠创伤性脑损伤后的皮质与海马内源性神经发生研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [26] Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction[J]. *Blood*, 2010, 115 (16): 3196–205.

- [27] Zhou X, Hao Q, Liao JM, et al. Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (30): 21793–21801.
- [28] Zhou X, Hao Q, Liao JM, et al. Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress[J]. *Oncogene*, 2013, 32 (3): 388–396.
- [29] Hori H, Sasayama D, Teraishi T, et al. Blood-based gene expression signatures of medication-free outpatients with major depressive disorder: integrative genome-wide and candidate gene analyses[J]. *Sci Reports*, 2016, 6 (1): 18776.
- [30] Hori H, Nakamura S, Yoshida F, et al. Integrated profiling of phenotype and blood transcriptome for stress vulnerability and depression[J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 104: 202–210.
- [31] Singh SA, Goldberg TA, Henson AL, et al. p53-Independent cell cycle and erythroid differentiation defects in murine embryonic stem cells haploinsufficient for Diamond Blackfan anemia-proteins: RPS19 versus RPL5[J]. *PLoS One*, 2017, 9 (2): e89098.
- [32] Ford JL, Stowe RP. Depressive symptoms are associated with salivary shedding of Epstein-Barr virus in female adolescents: the role of sex differences[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 86: 128–133.
- [33] Onozawa E, Shibayama H, Imadome KI, et al. Inflammatory cytokine production in chronic active *Epstein-Barr* virus infection[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2017, 58 (3): 189–196.
- [34] Reed MD, Yim YS, Wimmer RD, et al. IL-17 α promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders[J]. *Nature*, 2020, 577 (7789): 249–253.
- [35] Moujaber O, Stochaj U. The cytoskeleton as regulator of cell signaling pthways[J]. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45 (2): 96–107.
- [36] Mendez MG, Restle D, Janney PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress[J]. *Biophysics J*, 2014, 107 (2): 314–323.
- [37] Liu YF, Sowell SM, Luo Y, et al. Autism and intellectual disability-associated KIRREL3 interacts with neuronal proteins MAP1B and MYO16 with potential roles in neurodevelopment[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0123106.
- [38] Willmes CG, Mack TG, Ledderose J, et al. Investigation of hippocampal synaptic transmission and plasticity in mice deficient in the actin-binding protein Drebrin[J]. *Sci Reports*, 2017, 7: 42652.
- [39] Groen EJM, Gillingwater TH. UBA1: At the crossroads of ubiquitin homeostasis and neurodegeneration[J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21 (10): 622–632.
- [40] Bax M, McKenna J, Do-Ha D, et al. The ubiquitin proteasome system is a key regulator of pluripotent stem cell survival and motor neuron differentiation[J]. *Cells*, 2019, 8 (6): 581.
- [41] Lambert-Smith IA, Saunders DN, Yerbury JJ. The pivotal role of ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA1) in neuronal health and neurodegeneration[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 123: 105746.
- [42] Shu Q, Lai S, Wang XM, et al. Administration of ubiquitin-activating enzyme UBA1 inhibitor PYR-41 attenuates angiotensin II -induced cardiac remodeling in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505 (1): 317–324.
- [43] Douglas C, Allan JC, Phillips. Evolution of the ubiquitinactivating enzyme Uba1 (E1)[J]. *Physica A: Statist Mechan and Its Applications*, 2017, 483: 456–461.

(收稿: 2020–11–01 在线: 2021–12–21)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶