

· 抑郁症专题 ·

医用三氧对抑郁症模型小鼠行为学的影响及相关机制探究

陶红波 刘斌 刘燕芹

430084 武汉市武东医院麻醉科(陶红波), 外科(刘斌), 手术室(刘燕芹)

通信作者: 刘燕芹, Email: weiguoye01@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.06.006

【摘要】目的 探讨医用三氧对抑郁症模型小鼠行为学的影响及相关机制。**方法** 选取 30 只健康雄性 ICR 小鼠, 建立抑郁症小鼠模型, 并随机分为 Sham 组(不作抑郁处理+生理盐水)、模型组(抑郁处理+生理盐水)以及低、中、高浓度组(抑郁处理+腹腔注射 60、80、100 μ g/ml 医用三氧), 每组 6 只。通过旷场实验、绝望行为实验检测小鼠抑郁行为, 通过 HE 染色观察小鼠海马部位病理变化, 采用 Western blot 检测小鼠海马组织中炎症因子细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。**结果** 抑郁症模型小鼠旷场行为实验结果显示, 模型组小鼠的水平穿越格数、直立次数以及修饰次数显著少于 Sham 组 ($P < 0.05$), 排便粒数显著多于 Sham 组 ($P < 0.05$), 且中、高浓度组的水平穿越格数、直立次数、修饰次数及排便粒数显著优于模型组 ($P < 0.05$), 低浓度组的水平穿越格数、直立次数、修饰次数及排便粒数与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。绝望行为实验结果显示, 模型组小鼠实验后 4 min 连续不动时间显著长于 Sham 组 ($P < 0.05$), 各浓度组小鼠实验后 4 min 连续不动时间显著短于模型组 ($P < 0.05$), 其中高浓度组小鼠差异最大。体重实验结果显示, 第 0、7、14、21 天, 模型组小鼠的体重显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$); 第 21 天, 高浓度组的体重显著高于模型组 ($P < 0.05$), 其余时间的体重与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 7、14、21 天, 低、中浓度组的体重与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。显微镜观察结果显示, 模型组小鼠海马部位小胶质细胞数量 [23.64 ± 3.57 个] 显著多于 Sham 组 [18.11 ± 2.92 个] ($P < 0.05$), 高浓度组小鼠海马部位小胶质细胞数量 [17.27 ± 2.69 个] 显著少于模型组 ($P < 0.05$), 中、低浓度组小鼠海马部位小胶质细胞数量 [22.58 ± 3.84 个、 20.03 ± 3.21 个] 与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blot 结果显示, 模型组小鼠海马组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著高于 Sham 组 ($P < 0.05$), 高浓度组小鼠海马组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); 中、低浓度组小鼠海马组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 高浓度医用三氧能够改善抑郁症模型小鼠抑郁样行为, 其相关机制可能与下调脑组织中炎症因子表达有关。

【关键词】 抑郁症; 医用三氧; 行为学; 小鼠; 炎症**基金项目:** 湖北省武汉市卫生计生委科研项目(320.2199)

- [16] Clepce M, Gossler A, Reich K, et al. The relation between depression, anhedonia and olfactory hedonic estimates—a pilot study in major depression[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 471(3): 139-143. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.01.027.
- [17] 王芳, 金金, 胡笑楠, 等. 抑郁症嗅觉功能与临床特征的关系探讨[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(4): 262-265.
- [18] Wang F, Wu X, Gao J, et al. The relationship of olfactory function and clinical traits in major depressive disorder[J]. *Behav Brain Res*, 2020, 386: 112594. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112594.
- [19] Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, et al. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies[J]. *J Affect Disord*, 2009, 117(1-2): 1-17. DOI: 10.1016/j.jad.2008.11.021.
- [20] Arnsten AFT. Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10): 1376-1385. DOI: 10.1038/nn.4087.
- [21] Yuan TF, Hou G, Arias-Carrion O. Chronic stress impacts on olfactory system[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015, 14(4): 486-491. DOI: 10.2174/1871527314666150429111356.
- [22] Yaldizli Ö, Penner IK, Yonekawa T, et al. The association between olfactory bulb volume, cognitive dysfunction, physical disability and depression in multiple sclerosis[J]. *Eur J Neurol*, 2016, 23(3): 510-519. DOI: 10.1111/ene.12891.
- [23] Wang F, Jin J, Wang J, et al. Association between olfactory function and inhibition of emotional competing distractors in major depressive disorder[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6322. DOI: 10.1038/s41598-020-63416-7.

(收稿日期: 2020-12-20)

(本文编辑: 赵金鑫)

Effects of medical ozone on the behaviors of depression model mice and its related mechanisms

Tao Hongbo, Liu Bin, Liu Yanqin

Department of Anesthesiology, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, China (Tao HB); Department of Surgery, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, China (Liu B); Operating Room, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, China (Liu YQ)

Corresponding author: Liu Yanqin, Email: weiguoye01@163.com

【 Abstract 】 Objective To explore the effects of medical ozone on behaviors of depression model mice and its related mechanisms. **Methods** A total of 30 healthy male ICR mice were selected to establish depression model, and randomly divided into Sham group (no depression treatment + normal saline), model group (depression treatment + normal saline), and low, medium, and high concentration groups (depression treatment + intraperitoneal injection of 60 μ g/ml, 80 μ g/ml and 100 μ g/ml medical ozone), with six mice in each group. Depressive behaviors of mice were detected by open field experiment and behavioral despair experiment. Pathological changes in the hippocampus of mice were observed by HE staining. The levels of inflammatory cytokines of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hippocampus of mice were detected by Western blot. **Results** The open field behavior experiment results of depression model mice showed that the number of horizontal crossing lattice, the number of uprights, and the number of modifications in model group were significantly less than those in Sham group ($P < 0.05$), and the number of defecation grains was significantly more than that in Sham group ($P < 0.05$), and the indexes in medium and high concentration groups were significantly better than those in model group ($P < 0.05$), and there were no significant differences between low concentration group and model group ($P > 0.05$). The behavioral despair experiment results showed that the 4 min continuous immobility time of mice in model group after experiment was significantly longer than that in Sham group ($P < 0.05$), and the time in each concentration group was significantly shorter than that in model group ($P < 0.05$). Among them, the mice in high concentration group had the largest difference. The results of body mass test showed that the body mass on the 0 d, the 7th d, the 14th d and the 21st d of mice in model group was significantly lower than that in Sham group ($P < 0.05$). On the 21st d, the body mass in high concentration group was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the rest of the time compared with that in model group ($P > 0.05$). On the 7th d, the 14th d and the 21st d, there was no significant difference among low and medium concentration groups and model group ($P > 0.05$). The results of microscope observation showed that the number of microglia in the hippocampus of model group was significantly more than that of Sham group [(23.64 \pm 3.57) vs (18.11 \pm 2.92)] ($P < 0.05$), and that of high concentration group (17.27 \pm 2.69) was significantly less than that of model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference among low (20.03 \pm 3.21) and medium (22.58 \pm 3.84) concentration groups and model group ($P > 0.05$). Western blot results showed that the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α of hippocampus of model group were significantly higher than those of Sham group ($P < 0.05$), and those of high concentration group were significantly lower than those of model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference among low and medium concentration groups and model group ($P > 0.05$). **Conclusions** High-concentration medical ozone can improve depression-like behaviors in depression model mice, and its possible related mechanism is related to the down-regulation of expression of inflammatory levels factors in brain tissue.

【 Key words 】 Medical ozone; Depression; Behaviors; Mice; Inflammation

Fund program: Scientific Research Project of Wuhan Health and Family Planning Commission of Hubei Province (320.2199)

抑郁症是一种复杂的神经系统疾病,其主要临床表现为持续情绪低落、活动能力减弱、思维迟滞以及认知能力低下^[1]。最新数据统计显示,抑郁症大约影响着全球 3 亿人,到 2030 年将成为全球第二大致残原因^[2]。抑郁症会严重损害患者健康以及影响患者生活质量,给其家庭、社会和政府带来沉重的负担,严重影响社会 and 经济发展,已成为重要的社会和医疗问题^[3]。药物虽是治疗抑郁症的有效方法,但其治疗效果仍然不甚理想,约有 30% 的抑郁症患者无法通过药物治疗完全康复^[4]。因此,

积极寻找更加有效的方案治疗抑郁症已成为世界范围内迫切需要解决的问题。医用三氧具有较强的氧化性,其作为一种杀菌剂首次在临床中得到广泛应用,被用于治疗感染性皮肤病、过敏性疾病以及伤口愈合等,作用机制可能与抗菌作用、免疫调节、抗氧化防御、表观遗传修饰以及血管合成有关^[5]。最近的研究表明,精确控制医用三氧浓度能够诱导细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等各种细胞因子的产生^[6]。

医用三氧能够诱导并激活机体抗氧化酶系统,产生自由基清除剂,清除炎症反应产生的部分自由基,并在疾病发展过程中干扰炎症因子的产生^[7]。既往报道^[8]指出,大脑中小胶质细胞激活所诱发的神经炎症反应在抑郁症发病中具有重要作用。医用三氧在抑郁症治疗中是否有效尚有待探究。鉴于此,本研究通过构建抑郁症小鼠模型,以探究医用三氧对抑郁症模型小鼠行为学的影响及相关作用机制。

一、材料与方 法

1. 材料: 30只健康雄性ICR小鼠(8~10周龄,体重18~22g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠在标准环境[温度(22±2)℃、湿度(55±5)%以及12h光/暗周期]进行喂养,并提供水和食物。所有动物实验均按照国家卫生研究所实验动物护理和使用指南进行。本研究小鼠连续接受42d的压力刺激符合实验动物伦理,且本实验经动物伦理委员会批准(伦理编号:20180803C024)。

2. 方法: (1) 分组及建立小鼠抑郁症模型。将小鼠分组饲养并使其适应环境1周,并将小鼠随机分为5组,包括Sham组(不作抑郁处理+腹腔注射生理盐水)、模型组(抑郁处理+腹腔注射生理盐水)、低浓度组(抑郁处理+腹腔注射60 μg/ml医用三氧)、中浓度组(抑郁处理+腹腔注射80 μg/ml医用三氧)、高浓度组(抑郁处理+腹腔注射100 μg/ml医用三氧),每组6只。接下来的42d, Sham组小鼠单独放置于1个房间的笼子里中免受打扰,而其他4组小鼠则被单笼饲养,并接受42d的各种轻度压力刺激,分别为禁食24h、禁水24h、通宵照明、笼子倾斜(45°,持续12h)、弄湿笼子里的用品(12h)、异物暴露、改变光/暗周期(24h)、悬垂(10min)、物理束缚3h、夹1min尾巴(距尾巴起点1cm)、5min振荡、白噪声。为了确保实验的不可预测性,所有应激源均随机进行,每天随机安排2~3种刺激,连续3d不可重复。从第22天起,每天腹腔静脉注射不同浓度的医用三氧(溶于生理盐水),持续21d。旷场实验和绝望行为结束时,处死小鼠,取各组小鼠海马组织,各6只,分成两份,一份用于HE染色,另一份用于Western blot检测。(2) 旷场实验。实验第42天,应激处理结束以后1h进行旷场实验,首先将各组小鼠放置于观察箱(宽40cm,长40cm,高30cm)中5min,观察并且记录小鼠在观察箱中的水平穿越格数、直立次数、修饰次数以及排便粒数。其中,水平穿越格数指小鼠爪子全部进入到方格内则计1次;直立次数指的是小鼠前爪攀附墙壁或者腾空到距离

地面1cm。实验结束以后,清洁观察箱以去除小鼠气味,方可对下一只小鼠进行观察,整个实验期间需要保持安静。(3) 绝望行为实验。首先,在距离小鼠尾部尾尖大约2cm处将小鼠尾部固定到自制悬尾装置上,并使小鼠头部距离箱底大约10cm,继而观察6min内小鼠的活动情况,并且记录小鼠4min连续不动时间。(4) 体重测试。分别于实验第0、7、14、21天对各组小鼠体重进行测定。(5) 小鼠下丘脑海马组织HE染色。行为学实验结束后,采用0.4%的戊巴比妥钠腹腔麻醉处死小鼠,开颅取大脑组织,并置于固定液中固定2h。固定后进行常规石蜡切片,进行HE染色,并在显微镜下观察小鼠海马部位小胶质细胞的病理变化。(6) Western blot检测。采用RIPA蛋白裂解液在冰上裂解海马组织,并采用BCA检测试剂盒测定蛋白质浓度。采用SDS-PAGE电泳分离蛋白质样品(每孔50 μg),并转移至聚偏二氟乙烯膜上,于室温下使用5%的脱脂牛奶封闭1.5h,使用IL-1β、IL-6、TNF-α抗体和β-actin抗体(由联科生物提供,型号分别为96-500-M01B-500、96-500-M06-500、RK-210-401-321、HA-R1207-1-200)在4℃下孵育过夜,次日置于辣根过氧化物酶结合的二抗中室温震荡孵育1h,蛋白密度使用ImageQuant LAS 4000仪器检测,并使用Image J软件进行定量分析。

3. 统计学方法: 采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异对比采用两因素方差分析,组间两两之间比较采用SNK-*q*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 医用三氧对抑郁症模型小鼠旷场行为的影响: 见图1。抑郁症模型小鼠旷场行为实验结果显示,模型组小鼠的水平穿越格数、直立次数以及修饰次数显著少于Sham组($P < 0.05$),排便粒数显著多于Sham组($P < 0.05$);中浓度组、高浓度组小鼠的旷场行为各指标显著优于模型组($P < 0.05$);低浓度组小鼠的旷场行为各指标与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 医用三氧对抑郁症模型小鼠绝望行为的影响: 见图2。抑郁症模型小鼠绝望行为实验结果显示,模型组小鼠实验后4min连续不动时间显著长于Sham组($P < 0.05$);低浓度组、中浓度组、高浓度组小鼠实验后4min连续不动时间显著短于模型组($P < 0.05$),其中高浓度组小鼠差异最大。

3. 医用三氧对抑郁症模型小鼠体重的影响: 见图3。体重实验结果显示, 第0、7、14、21天, Sham组、低浓度组、中浓度组、高浓度组小鼠的体重呈增长趋势, 模型组小鼠的体重在第1周呈缓慢增长, 在第2、3周呈下降趋势。第7、14、21天, 模型组小鼠的体重显著低于Sham组($P < 0.05$); 第21天, 高浓度组小鼠的体重显著高于模型组($P < 0.05$), 其余时间与模型组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 第7、14、21天, 低浓度组、中浓度组小鼠的体重与模型组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

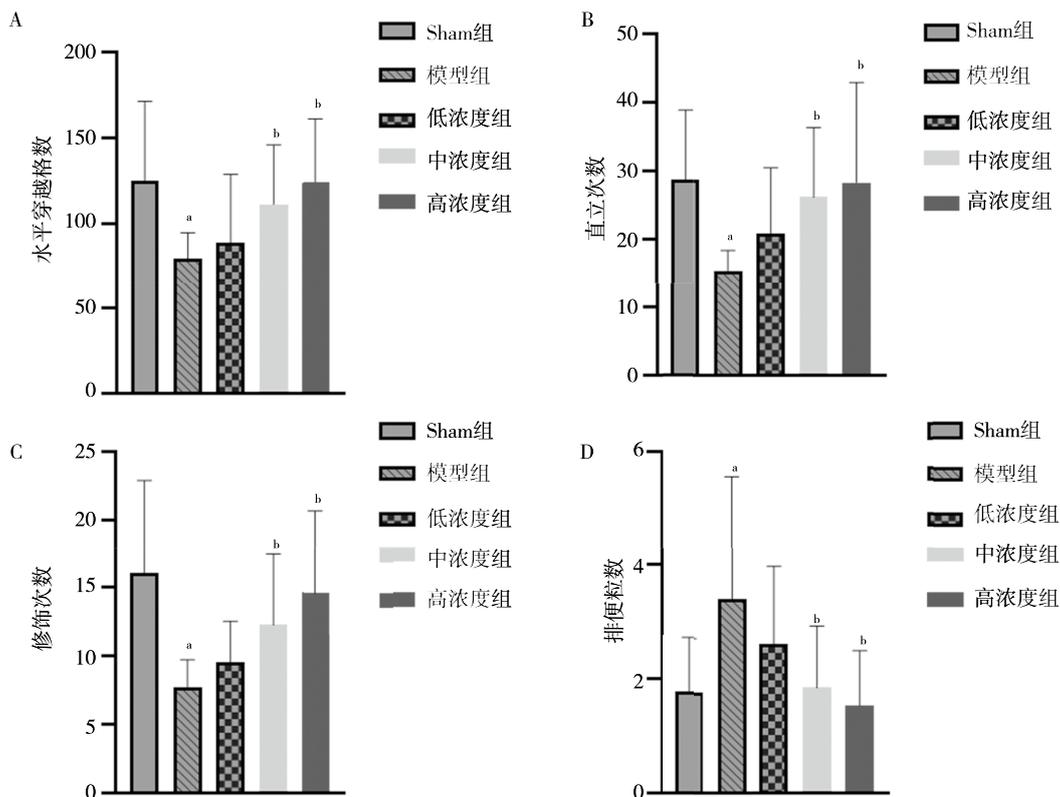
4. 医用三氧对抑郁症模型小鼠海马部位小胶质细胞形态以及数量的影响: 见图4(见本期封三)、5。显微镜观察结果显示, 模型组小鼠海马部位小胶质细胞出现变形, 部分呈现空泡状, 排列不整齐, 数量减少, 细胞间隙较大, 可见较多梭形或三角形细胞, 染色较淡且不均匀。Sham组、高浓度组小鼠海马部位小胶质细胞完整、排列整齐, 细胞质呈淡红色, 细胞核呈深蓝色。低浓度组、中浓度组小鼠海马部位小胶质细胞排列不紧密, 数量减少, 细胞间隙较Sham组更大, 且有少部分梭形或三角形细胞, 染色较浅。模型组小鼠海马部位小胶质细胞数量显著多于Sham组($P < 0.05$); 高浓度组小鼠海马部位小胶

质细胞数量显著少于模型组($P < 0.05$); 中浓度组、低浓度组小鼠海马部位小胶质细胞数量与模型组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5. 医用三氧对抑郁症模型小鼠海马组织中炎症因子的影响: 见图6。Western blot结果显示, 模型组小鼠海马组织中的炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著高于Sham组($P < 0.05$); 高浓度组小鼠海马组织中的炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著低于模型组($P < 0.05$); 中浓度组、低浓度组小鼠海马组织中的炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平与模型组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

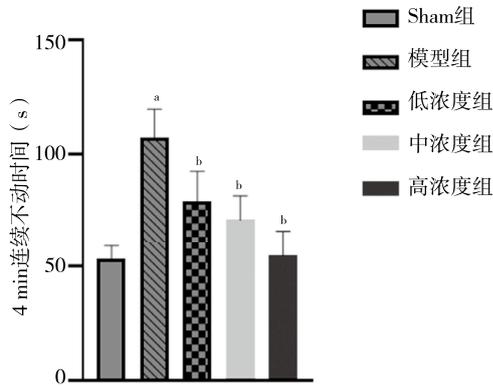
讨论 抑郁症对患者的健康以及生活质量产生了重大影响, 已经成为一个严重的社会问题, 变得不容忽视^[9]。经典的单胺类神经递质假说认为, 抑郁症的发生主要与中枢神经系统中5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素的减少有关, 抗抑郁药就是根据这一理论开发而来, 但这些药物的有效率一般只有60%~70%, 且存在许多不良反应, 这使得其临床应用受到限制^[10]。因此, 深入研究抑郁症的发病机制, 寻找新的治疗靶点对抑郁症的治疗具有十分重要的临床意义。

医用三氧又称臭氧, 具有很强的灭菌消毒作用。



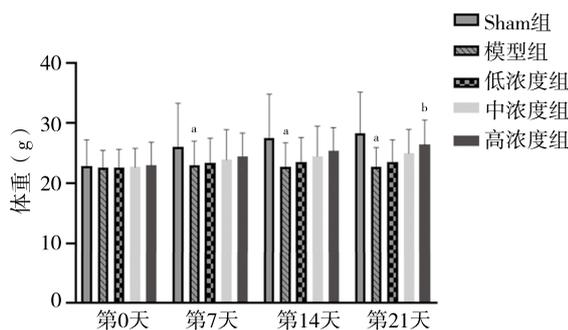
注: 与Sham组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图1 医用三氧对抑郁症模型小鼠旷场行为的影响



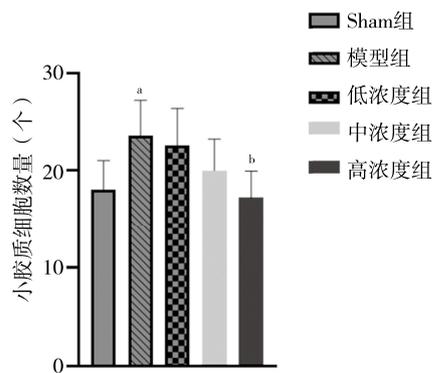
注: 与Sham组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图2 医用三氧对抑郁症模型小鼠绝望行为的影响



注: 与Sham组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图3 医用三氧对抑郁症模型小鼠体质量的影响



注: 与Sham组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图5 医用三氧对抑郁症模型小鼠海马部位小胶质细胞数量的影响

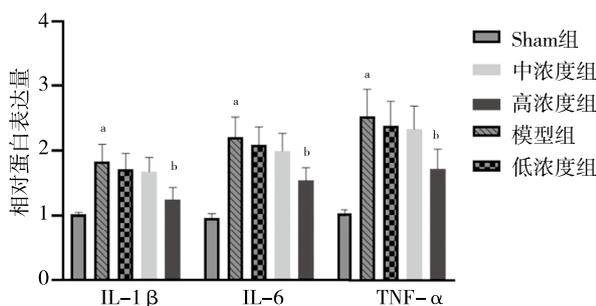


图6 医用三氧对抑郁症模型小鼠海马组织中炎症因子的影响

此外,医用三氧具有抗炎、抗氧化、抗感染以及免疫调节等作用^[11]。动物实验也证实,对大鼠注射医用三氧可降低其TNF- α 表达水平,改善氧化应激指标水平,进而达到抗炎以及抗氧化的作用^[12]。先前的研究表明,预防性医用三氧干预可减少小鼠抑郁行为,可能是通过减少小鼠脑内小胶质细胞数量以及降低IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平发挥抗抑郁作用^[8]。然而,治疗性医用三氧对慢性不可预见性轻度应激诱导的抑郁小鼠是否具有抗抑郁作用尚不清楚,其潜在的分子机制也不完全明确。因此,本研究建立了抑郁症模型小鼠,并用不同浓度的医用三氧处理小鼠发现,较高浓度的医用三氧可减轻慢性不可预见性轻度应激诱导的抑郁样行为,并降低小鼠海马组织内促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。为探讨医用三氧对抑郁症的影响,本研究采用慢性不可预见性轻度应激诱导建立小鼠抑郁症模型,结果显示,第1周模型组小鼠体重增长缓慢;第7~21天,模型组小鼠的体重显著低于Sham组。动物实验表明,慢性应激能够使小鼠体重下降或者增长率降低,分析其原因为进食量减少;此外,由于皮质酮浓度升高,其过高则会影响小鼠新陈代谢,进而导致其体重增长缓慢。本研究结果还表明,模型组小鼠具有类似抑郁的行为,包括旷场行为实验中水平穿越格数、直立次数以及修饰次数减少,排便粒数增多以及绝望行为实验中实验后4 min连续不动时间延长;但经医用三氧治疗后,尤其是高浓度医用三氧治疗后以上行为变化显著改善,表明高浓度医用三氧有可能对抑郁症模型小鼠抑郁样行为具有改善作用。

炎症细胞因子在抑郁症的发生和发展中起着重要作用^[13],心理以及生理应激能够激活免疫和炎症过程^[14]。研究表明,促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在抑郁症小鼠海马组织中明显上调^[15]。IL-1 β 与抑郁症患者认知能力所需的神经元可塑性有关^[16];IL-6与突触可塑性、神经发生以及神经调节有关^[17];TNF- α 作为应激生物标志物,在脑内天然免疫中起主要作用^[18]。同样,本研究发现,模型组小鼠海马组织中的炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著高于Sham组,而高浓度医用三氧治疗则显著降低了IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。因此,高浓度医用三氧对抑郁症模型小鼠具有抗抑郁作用,其分子机制可能与抑制炎症通路激活有关,故较高浓度医用三氧可能对抑郁症模型小鼠具有一定的抗抑郁作用,有望成为治疗抑郁症新的研究方向,但还需

进行大量的体内实验研究,从而为临床治疗抑郁症提供更加可靠的理论根据。

综上所述,较高浓度医用三氧可能是通过下调脑组织中炎症因子表达改善抑郁症模型小鼠抑郁样行为,可为临床开展抑郁症治疗研究提供新的视角,值得借鉴。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为陶红波、刘斌,研究实施、资料收集为陶红波、刘斌、刘燕芹,论文撰写为陶红波,论文修订为刘斌,刘燕芹审核

参 考 文 献

- [1] Leng L, Zhuang K, Liu Z, et al. Menin deficiency leads to depressive-like behaviors in mice by modulating astrocyte-mediated neuroinflammation[J]. *Neuron*, 2018, 100(3): 551-563. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.031.
- [2] Alboni S, Dijk RMV, Poggini S, et al. Fluoxetine effects on molecular, cellular and behavioral endophenotypes of depression are driven by the living environment[J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(4): 552-561. DOI: 10.1038/mp.2015.142.
- [3] Dehn LB, Beblo T. Depressed, biased, forgetful; the interaction of emotional and cognitive dysfunctions in depression[J]. *Neuropsychiatr*, 2019, 33(3): 123-130. DOI: 10.1007/s40211-019-0307-4.
- [4] Liu S, Xu S, Wang Z, et al. Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(1): 7646-7653. DOI: 10.12659/MSM.908422.
- [5] Zeng J, Lei L, Zeng Q, et al. Ozone therapy attenuates NF- κ B-mediated local inflammatory response and activation of Th17 cells in treatment for psoriasis[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1833-1845. DOI: 10.7150/ijbs.41940.
- [6] Gürkan G, Sayin M, Kizmazoglu C, et al. Evaluation of the neuroprotective effects of ozone in an experimental spine injury model[J]. *J Neurosurg Spine*, 2020. [Online ahead of print]. DOI: 10.3171/2020.2.SPINE191439.
- [7] Aslaner A, Çakır T, Tekeli SÖ, et al. Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rat[J]. *Acta Cir Bras*, 2016, 31(4): 256-263. DOI: 10.1590/S0102-865020160040000006.
- [8] 芦国芳, 安建雄, 马钧, 等. 三氧可通过减轻小鼠脑小胶质细胞激活预防抑郁症发生[J]. *转化医学杂志*, 2018, 7(1): 20-26. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2018.01.006.
Lu GF, An JX, Ma J, et al. Ozone intraperitoneal injection prevents the depression by ameliorating microglia re-activation in depressed mice[J]. *Translational Medicine Journal*, 2018, 7(1): 20-26
- [9] Yeung KS, Hernandez M, Mao JJ, et al. Herbal medicine for depression and anxiety: a systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(5): 865-891. DOI: 10.1002/ptr.6033.
- [10] Gulyaeva VV, Zinchenko MI, Uryumtsev DY, et al. Exercise for depression treatment. Physiological mechanisms[J]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2019, 119(7): 112-119. DOI: 10.17116/jnevro2019119071112.
- [11] 赵旭, 傅志俭. 医用臭氧临床应用和安全性研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2018, 24(7): 489-492. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2018.07.002.
- [12] 李海群, 张志仕, 李博, 等. 医用臭氧水对兔膝关节骨性关节炎软骨 IL-1 β 、TNF- α 与 VEGF 表达的影响[J]. *解剖科学进展*, 2018, 24(1): 12-14. DOI: 10.16695/j.cnki.1006-2947.2018.01.004.
Li HQ, Zhang ZS, Li B, et al. Effects of medical ozone water on the expressions of IL-1, TNF- α and VEGF in articular cartilage of rabbits with knee osteoarthritis[J]. *Progress of Anatomical Sciences*, 2018, 24(1): 12-14.
- [13] Barnes J, Mondelli V, Pariante CM. Genetic contributions of inflammation to depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 81-89. DOI: 10.1038/npp.2016.169.
- [14] Adwitia D, Pamela HG. Insights into macrophage heterogeneity and cytokine-Induced neuroinflammation in major depressive disorder[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, 11(3): 64-64. DOI: 10.3390/ph11030064.
- [15] Ng A, Tam WW, Zhang MW, et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in elderly patients with depression or Alzheimer's disease: systematic review and Meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12050. DOI: 10.1038/s41598-018-30487-6.
- [16] Shen Z, Xu Y, Jiang X, et al. Avicularin relieves depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in mice[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 2777-2784. DOI: 10.12659/MSM.912401.
- [17] Tucker P, Pfefferbaum B, Zhao YD, et al. Associations of biological stress markers in hurricane survivors: heart rate variability, interleukin-2 and interleukin-6 in depression and PTSD[J]. *Am J Disaster Med*, 2018, 13(4): 267-278. DOI: 10.5055/ajdm.2018.0306.
- [18] Sandoval-Carrillo A, Alvarado-Esquivel C, Salas-Martinez C, et al. TNF- α polymorphisms and maternal depression in a Mexican mestizo population[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(1): 69-74. DOI: 10.2174/1871527317666180207165238.

(收稿日期: 2020-12-18)

(本文编辑: 赵金鑫)