

郑涵文,刘昕玥,赵海燕,等. 基于网络药理学和实验验证探究酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 901-912.

ZHENG H W, LIU X Y, ZHAO H Y, et al. Exploring the mechanism of action of sour jujube nut compound formula for depression based on network pharmacology and experimental validation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 901-912.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.009

基于网络药理学和实验验证探究酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制

郑涵文^{1,2},刘昕玥¹,赵海燕^{1,3},王佳音^{1,2},罗福龙⁴,范蓓¹,
Alberto Carlos Pires Dias⁵,王凤忠^{1*},王琼^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;2. 西南医科大学附属中医医院中葡
中医药国际合作中心,四川 泸州 646000;3. 西南医科大学附属中医医院脾胃病科,
四川 泸州 646000;4. 首都医科大学宣武医院急诊科,北京 100053;
5. 葡萄牙米尼奥大学生物系中葡药食植物资源研究中心,葡萄牙 布拉加 4710-057)

【摘要】 目的 通过网络药理学技术预测酸枣仁复方(Ziziphi spinosae semen formula,ZSSF)对于抑郁症的关键作用靶点,并通过利血平诱导的抑郁斑马鱼模型验证酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制。方法 通过 TCMSPP 数据库检索酸枣仁复方的药物作用靶点,利用 UniProt 数据库对靶点名称进行校正。采用 GeneCards、OMIM、NCBI 数据库检索抑郁症相关靶点,并对 3 个数据库的靶点结果进行汇总去比重。利用 STRING 数据库预测了交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)信息,利用 Metascape 数据库构建进行富集研究,并利用微生信对 KEGG 和 GO 的富集结果实现了可视化。通过利血平诱导的斑马鱼抑郁模型进行行为学实验和 RT-qPCR 实验,验证酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用。结果 筛选出抑郁症与酸枣仁复方的交集靶点 188 个,蛋白质-蛋白质相互作用结果显示,酸枣仁复方抗抑郁主要作用于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清白细胞介素 2(IL-2)、血清白细胞介素 6(IL-6)、血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、血清白细胞介素 10(IL-10)等靶点,KEGG 通路富集分析表明,酸枣仁复方通过 TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、cGMP-PKG 信号通路等多种信号通路发挥其治疗抑郁症的作用。动物实验结果显示,与利血平组相比,酸枣仁复方高、中、低剂量组斑马鱼在声光刺激下的运动距离显著延长($P < 0.05$),运动速度显著增快($P < 0.01$)。RT-qPCR 结果显示,与利血平组相比,酸枣仁复方高、中、低剂量给药组斑马鱼脑组织中 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-1 β 、IL-10 mRNA 表达水平上调($P < 0.001$)。结论 酸枣仁复方通过多成分、多靶点发挥抗抑郁作用,且其抗抑郁作用可能与抑制炎症因子的表达有关。

【关键词】 网络药理学;酸枣仁复方;抑郁症;炎症因子

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2024)07-0901-12

Exploring the mechanism of action of sour jujube nut compound formula for depression based on network pharmacology and experimental validation

[基金项目] 新疆建设兵团 NGHJG 项目(2023AA503), 高端外国专家引进计划(G2022051012L), 国家重点研发计划(2021YFD1600100), 泸州市应用基础研究项目(2018LZXNYD-ZK32)。

Funded by NGHJG Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2023AA503), High-End Foreign Experts Introduction Program (G2022051012L), National Key Research and Development Program (2021YFD1600100), Luzhou Applied Basic Research Project (2018LZXNYD-ZK32).

[作者简介] 郑涵文,女,硕士,研究方向:中药神经药理与航天医学。Email:zhenghanwen0524@163.com

[通信作者] 王琼,女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与航天医学。Email:luyiwangqiong@163.com;

王凤忠,男,博士,研究员,研究方向:农产品多维品质评价及综合利用研究。Email:wangfengzhong@sina.com。

* 共同通信作者

ZHENG Hanwen^{1,2}, LIU Xinyue¹, ZHAO Haiyan^{1,3}, WANG Jiayin^{1,2}, LUO Fulong⁴,
FAN Bei¹, Alberto Carlos Pires Dias⁵, WANG Fengzhong^{1*}, WANG Qiong^{1,2*}

- (1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of
Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Spleen and Stomach Diseases,
the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;
4. Emergency Department, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 5. Sino-PT
Research Center for Medicinal and Food Plant Resources, Department of Biology, University of Minho,
Braga 4710-057, Portugal)

Corresponding author: WANG Qiong. E-mail: luyiwangqiong@163.com;
WANG Fengzhong. E-mail: wangfengzhong@sina.com

【Abstract】 Objective In this study, we aimed to use network pharmacology techniques to predict the key targets of a prescription of Ziziphi spinosae semen formula (ZSSF) compound for depression, and to verify its mechanism of action using a zebrafish model of rifampicin-induced depression. **Methods** The drug targets of ZSSF were retrieved from the TCMSP database, and the target names were corrected using the UniProt database. Depression-related targets were identified using the GeneCards, OMIM, and NCBI databases. Protein-protein interaction information for the shared targets was predicted using the STRING database. The collected data were then analyzed using the Metascape database to determine GO and KEGG pathway enrichment, and the result were visualized using microbotics. Behavioral experiments and reverse-transcription quantitative PCR experiments were conducted to verify the therapeutic effects of ZSSF on a zebrafish depression model induced by risperdal. **Results** 188 targets were screened to find the interactions between depression and ZSSF. The protein-protein interaction result showed that ZSSF primarily targeted TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , and IL-10 to produce its antidepressant effect. KEGG pathway enrichment analysis revealed that ZSSF exerted its effects on depression through various signaling pathways, including the TNF, PI3K-Akt, and cGMP-PKG signaling pathways. The result of the animal experiments showed that the treatment groups given high, medium, and low doses of ZSSF exhibited significant improvements in movement distance under acoustic and light stimulation compared with the model group ($P < 0.05$). The speed of movement of the treatment groups was also significantly faster ($P < 0.01$). Additionally, the mRNA expression levels of TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , and IL-10 were up-regulated in the brain tissues of zebrafish in the high-, medium-, and low-dosage groups of ZSSF compared those in the model group ($P < 0.001$). **Conclusions** ZSSF exerts its antidepressant effect through multiple components and targets, and its antidepressant effects may be associated with its inhibition of inflammatory factors.

【Keywords】 network pharmacology; Ziziphi spinosae semen formula; depression; inflammatory factor
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是一种慢性、复发性的情感问题综合症,具体表现为明显而持久的情绪低落,近年来其患病率呈上升趋势,在世界范围内造成了重大的经济负担^[1]。现今常见的抑郁症治疗方法主要有药物干预和心理干预两种,其中药物干预为主要的治疗方法^[2]。然而研究表明,氟西汀、氟伏沙明、瑞波西汀等现今常用的一线抗抑郁药物疗效低而且副作用明显^[3],因此开发疗效更高、副作用更小的新型抗抑郁药至关重要。

中医作为一种传统的补充医学,其方药已被证实对抑郁症及其临床并发症的治疗具有显著效果^[4]。四逆散作为《伤寒论》的经典方剂,被证实可

以通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、PI3K-Akt 信号通路 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K-Akt) 等信号通路的作用治疗抑郁症^[5-6]。一项研究也表明,《伤寒论》名方小柴胡汤及其类方均可以辩证治疗抑郁症^[7]。酸枣仁复方 (Ziziphi spinosae semen formula, ZSSF) 由酸枣仁、茯苓、当归、百合、玫瑰花五味中药配伍组成,具有宁心安神、抗抑郁的作用,是《金匮要略》经典方剂酸枣仁汤的类方。方中酸枣仁、茯苓、百合宁心安神,当归活血通络,玫瑰花疏肝解郁,五味药配伍既可宁心安神,又可疏解肝郁,针对抑郁症进行治疗。与化学药物相比,酸枣仁复方的

作用是由中药配伍的整体功能介导的。中药方剂具有成分复杂、多靶点的特点,为开发优质抗抑郁药物提供了可能,但是也存在无法阐明其作用机制的问题。网络药理学是以网络生物学和多方位药理学为基础,全面研究药物对病情的干预与作用,并遵循传统中药复方多成分、多渠道、多靶点地防治病情的基本原则^[8-9]。因此本研究将酸枣仁复方从网络药理学角度筛选抑郁症作用靶点,而后采用体内实验逐步证明了酸枣仁复方的作用机理,为后期研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

斑马鱼为中国农业科学院斑马鱼实验室自主孵化后养殖【SYXK(京)2023-0048】,种鱼共 20 条,10 条雄性、10 条雌性,为 3 ~ 5 个月大野生型 AB 成鱼,购自国家斑马鱼资源中心。饲养于购自上海海盛生物技术有限公司的水箱中,水箱采用循环水系统。体系水的氯化钾(KCl)值为 0.05 g/L、碳酸氢钠(NaHCO₃)值为 0.025 g/L、氯化钠(NaCl)值为 3.5 g/L、氯化钙(CaCl₂)值为 0.1 g/L。斑马鱼胚胎用 Holt 培养液(15 mmol/L NaCl、0.67 mmol/L KCl、0.03 mmol/L NaHCO₃、0.90 mmol/L CaCl₂, pH = 7.2)孵育。饲养环境:斑马鱼(胚胎)维持在 14 h 明/10 h 暗的光周期下,相对湿度 50% ~ 80%,温度控制在 28 ~ 32 ℃。所有动物实验均通过中国农业科学院农产品加工所实验动物伦理委员会审批(2023-0412),实验动物饲养和实验过程均遵循 3R 原则。

1.1.2 数据库与软件

TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、UniProt 数据库(<https://uniprot.org>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、NCBI 数据库(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov>)、STRING 数据库(<http://string-db.org/>)、Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step>)、venny 2.1.0 软件、Cytoscape 3.9.1 软件。

1.1.3 主要试剂与仪器

北京市四方中药饮片有限公司购买的酸枣仁复方相关药材,经中国农业科学院农产品加工所中试实验室提取;利血平(上海源叶生物科技有限公司,Reserpine,纯度 ≥ 98%);盐酸氟西汀(美国

MCE 公司,Fluoxetine hydrochloride,纯度 ≥ 99.82%);二甲基亚砷(DMSO,北京酷来搏科技有限公司);RNA 萃取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司);cDNA 反转录试剂盒(普洛麦格(北京)生物技术有限公司);引物(擎科生物科技公司(中国,北京))。美国 MolecuLar Devices 公司提供的酶标仪;美国 Bio-Rad 公司提供的实时荧光定量 PCR 仪;德国 Eppendorf 公司提供的低温高速离心机和诺达思(北京)信息技术有限责任公司提供的斑马鱼行为轨迹跟踪系统。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学

(1)酸枣仁复方活性成分和作用靶点筛选:在 TCMSP 数据库中筛选酸枣仁复方的活性化合物和靶点,采用 UniProt 数据库对靶点名称进行校正。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) ≥ 30%、药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 为标准,筛选酸枣仁复方的活性化合物成分和相关靶点,完成酸枣仁复方活性成分数据库构建。

(2)抑郁症与药物交叉靶点:使用关键词“depression”,采用 Genecards、OMIM、NCBI 数据库检索“Gene Map”,导出并合并相应数据,得到抑郁症相关靶点。然后通过 R4.1.0 软件获取抑郁症与酸枣仁复方之间的潜在靶点。采用 venny 2.1.0 绘制 Venn 图,获取药物成分和疾病的交集靶点。采用 Cytoscape3.9.1 构建成分靶点网络图。

(3)蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的绘制:将抑郁症和酸枣仁复方的潜在靶点引入 STRING 数据库,构建 PPI 网络。蛋白质类型设置为“Homo sapiens”。将隐藏的断开连接的节点从网络中移除,并将所需的最小交互分数设置为 0.900 的高置信度,以获得 PPI 数据。然后将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.9.1 构建 PPI 图,并计算网络的拓扑参数。通过度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)和中间中心性(betweenness centrality, BC)3 个关键拓扑参数对核心目标进行过滤,这 3 个参数的值表明了网络中相关节点的重要性和影响力。截止值设为中位数。利用 Cytoscape 中的分子复合物检测算法(molecular complex detection, MCODE)插件对 PPI 网络进行过滤。其中,degree 设为 2, k-core 设为 2, max depth 设为 0.2, maximum depth 设为 100。

(4)GO 富集分析和 KEGG 通路分析:采用

Metascape 数据库进行富集分析, 微生信对 KEGG 和 GO 富集结果进行可视化。其中, 最小重叠设置为 3, P 值的截止值设置为 0.01, 最小富集设置为 1.5。GO 富集和 KEGG 通路分析项目按 $\log P$ 值升序排序, 并通过生物信息学服务器绘制相应的气泡图。将潜在靶点提交给 R4.1.0 软件, 通过 Bioconductor 平台绘制靶点的通路图。为了进行化合物、靶点和通路之间的可视化, 利用 Cytoscape 3.9.1 绘制药物成分靶点网络图, 并计算网络的拓扑参数。

1.2.2 实验验证

(1) 斑马鱼抑郁模型的建立及分组: 用 180 枚

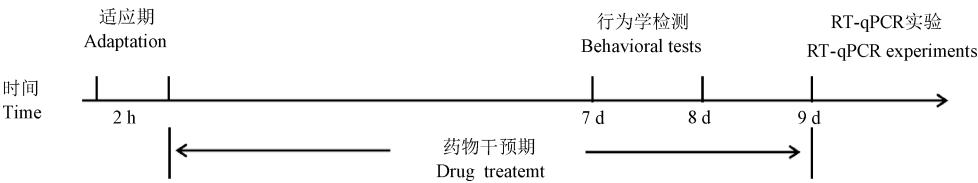


图 1 实验流程

Figure 1 Flowchart of the experiment

(2) 斑马鱼声光刺激行为学: 斑马鱼在普通光照条件下适应 20 min。数据整合周期为 30 s。设置实验 100% 光照强度 (8000 Lux), 时长 20 min。斑马鱼在声音强度为 0 Hz 的条件下适应 20 min。数据整合周期为 30 s。设置实验 100% 声音强度 (440 Hz), 时长 20 min。

(3) 基因表达量测定: 末次行为学实验结束后, 将斑马鱼幼鱼处死后迅速断头, 于冰上截取脑部, 标记后置于液氮, 取材完成后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存组织。为确定酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用, 行为学实验结束后 24 h 内按照 RT-qPCR 说明书流程从斑马鱼脑组织中提取总 RNA、反转录和实时荧光定量检测斑马鱼脑中炎症因子标志物如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清白细胞介素 2 (IL-2)、血清白细胞介素 6 (IL-6)、血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、血清白细胞介素 10 (IL-10) 的表达量。引物序列如表 1 所示。

1.3 统计学分析

该实验统计学分析使用 SPSS 20.0 软件, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异统计显著性采用单因素方差分析表示, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 酸枣仁复方的靶点和活性成分

在 TCMSP 数据库通过 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$

斑马鱼胚胎进行实验研究, 将胚胎随机分为 6 组: 对照组、利血平组 (4 mg/L)、盐酸氟西汀组 (6 mg/L)、酸枣仁复方低剂量组 (3.0 mg/L)、酸枣仁复方中剂量组 (6.0 mg/L) 和酸枣仁复方高剂量 (12.0 mg/L) 组, 培养箱内发育 24 h 后进行实验。将胚胎置于 6 孔板中孵育, 每孔 30 枚胚胎, 重复 3 次。将利血平、氟西汀和酸枣仁复方提取物分别溶解于 1 mL DMSO, 为排除药物溶剂影响, 6 组分别加入同等含量的 DMSO。各组胚胎每天在固定时间进行换液, 每天 1 次, 连续 7 d, 建立利血平抑郁模型。实验第 7 天 20:00 前进行行为学检测, 实验流程见图 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR	
基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
β -actin	F: ATCTTGACTGAGCGCGTTAT
	R: TCATGGATGCCAGCAGACTC
TNF- α	F: ACCAGGCCTTTCTTCAGGT
	R: TTGCTCCGTAGGATTCAG
IL-2	F: CGACCTGACTCTCTACACGC
	R: CGGTTGCCTCGTATTCCTCA
IL-6	F: AGACCGCTGCCTGTCTAAA
	R: TTTGATGTCGTCACCAGGA
IL-10	F: CTTTAAAGCACTCCACAACCCAA
	R: CTTGCATTCACCATATCCCGCTT
IL-1 β	F: CATAAACACCTTCGAGTCCG
	R: TCTTTCCTGTCCATCTCCACCA

的条件筛选出 44 个酸枣仁化学成分、27 个茯苓化学成分、81 个百合化学成分、65 个当归化学成分、222 个玫瑰花化学成分。酸枣仁复方活性成分基本信息见表 2。采用 Pubchem 检索酸枣仁复方成分结构, 将结构文件导入 SwissTargetPrediction 数据库预测成分靶点, 筛选出 439 个靶点。从 GeneCards 数据库中获得 15 686 个抑郁症靶点, 共获得 188 个药物-疾病交叉靶点作为进一步研究的潜在靶点 (见表 3)。

2.2 “药物-活性化合物-潜在目标”网络

在 Jvenn 服务器和 Bioinformatics 服务器上绘制

表 2 酸枣仁复方的活性成分基本信息表
Table 2 Basic information of the active ingredients of ZSSF

化合物编号 Mol-ID	化合物 Compound	来源 Source
MOL002039	类视黄醇 X 受体 RXR-alpha	百合 Lilium brownie var
MOL000449	孕酮受体 PGR	百合、茯苓、玫瑰花 Lilium brownie var, Poria cocos (Schw.), Rosa rugosa Thunb.
MOL000358	环加氧酶 1 PTGS1	百合、当归 Lilium brownie var, Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	环加氧酶 2 PTGS2	百合、当归 Lilium brownie var, Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL009449	盐皮质激素受体抗体 NR3C2	百合 Lilium brownie var
MOL000358	热休克蛋白 HSP90AA1	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	对氧磷酶 1 PON1	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	人微管相关蛋白 MAP2	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL001522	环加氧酶 1 PTGS1	酸枣仁 Semen Ziziphi spinosae
MOL001522	人类重组蛋白 1 CHRM1	酸枣仁、玫瑰花 Semen Ziziphi spinosae, Rosa rugosa Thunb
MOL001546	人类重组蛋白 3 CHRM3	酸枣仁、玫瑰花 Semen Ziziphi spinosae, Rosa rugosa Thunb
MOL001522	肾上腺素受体 α2A ADRα2A	酸枣仁 Semen Ziziphi spinosae
MOL000273	人盐皮质激素 NR3C2	茯苓 Poria cocos (Schw.)

抑郁症靶点和酸枣仁复方靶点的 Venn 图。如图 2A 所示,酸枣仁复方与抑郁症共有 188 个共同靶点,其中都是酸枣仁复方中化合物的靶点。由 5 种草药、35 种化合物、188 个靶点组成的“药物-活性化合物-潜在靶点”网络如图 2B 所示,可以看出,酸枣仁和百合中均有 8 个化合物、茯苓和玫瑰花中均有 7 个化合物、当归中有 3 个化合物。表明酸枣仁复方通过多种作用于不同靶点的化合物治疗抑郁症。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络

为了探索酸枣仁复方治疗抑郁症的潜在机制,基于 STRING 数据库构建了 PPI 拓扑网络。将 188 个交集靶点导入数据库,设置交互因子设为 0.9,隐藏游离靶点,保存蛋白交互信息文件并将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建 PPI 网络图,结果见图 3。利用该网络进行筛选,获得 10 个核心靶点,分别

为 TP53、AKT1、JUN、TNF、IL-6、IL-2、IL-1β、BCL-2、IL-10、IL-1A,见表 4。这些靶点主要为炎症因子,可作为酸枣仁复方治疗抑郁症的主要作用靶点。

2.4 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

通过 GO 富集分析,进一步深入研究酸枣仁复方在抗抑郁症中的分子机制。选择排名前 50 的靶点进行 GO 富集分析,并将其中前 50 个 $P < 0.05$ 的基因纳入 KEGG 富集分析,GO 富集分析得到了 3 个重要的结果:生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)(图 4A),酸枣仁复方的 BP 主要参与激素响应和无机物响应,CC 主要参与转录规则复合体, MF 主要包括转录因子结合。基于通路分类的结果显示,核心靶点涉及 PI3K-AKT 通路、TNF 通路和 cGMP-PKG 通路(图 4B)。

2.5 酸枣仁复方对模型斑马鱼光声刺激下运动距离和运动速度的影响

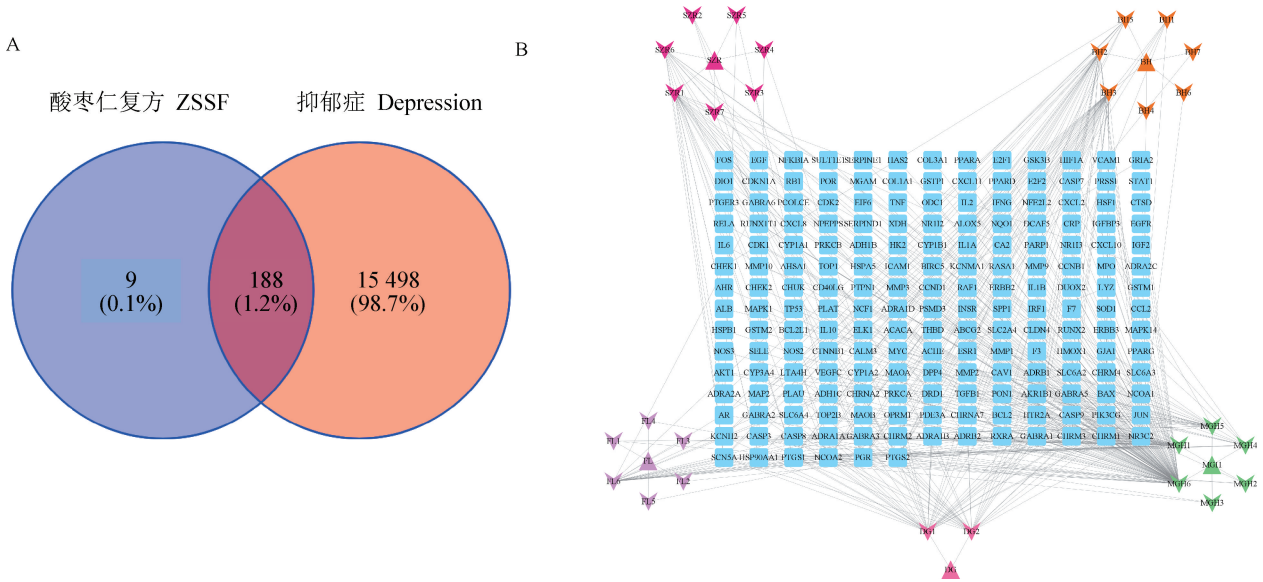
如图 5A,5B 所示,造模 7 d 后,在光照刺激下利血平组的移动距离以及移动速度相较对照组有明显下降($P < 0.01$)。与利血平组比较,氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的移动距离有明显恢复($P < 0.05, P < 0.01$);与利血平组比较,酸枣仁复方低中剂量组的运动速度显著降低($P < 0.05, P < 0.001$),而氟西汀组和酸枣仁复方高剂量组的运动速度无显著性差异。如图 5C,5D 所示,造模 7 d 后,在声音刺激下利血平组的移动距离以及移动速度相较对照组有明显下降($P < 0.01$)。与利血平组比较,氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的移动距离与移动速度有明显恢复($P < 0.01$)。如图 5E,5G 所示,利血平组在光照和声音刺激下的运动轨迹显著少于利血平组,提示利血平组对光照刺激和声音刺激反应不敏感,造模成功。氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的运动轨迹相较于利血平组而言显著增加,提示经酸枣仁复方治疗后抑郁症状减轻。如图 5F,5H 所示,利血平组在光照和声音刺激下的运动热图显示其运动频率呈现负表达,提示利血平组对光照刺激和声音刺激反应不敏感,造模成功。氟西汀组、酸枣仁复方低剂量组的运动热图相较于利血平组而言呈现正表达,提示经酸枣仁复方治疗后抑郁症状减轻。

2.6 酸枣仁复方对利血平幼鱼脑组织中炎症因子的影响

用 RT-qPCR 测定斑马鱼鱼脑中炎症因子标志

表 3 酸枣仁复方与抑郁症的潜在靶点
Table 3 Potential targets of ZSSF and depression

序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name
1	PTGS1	48	BAX	95	FOS	142	SERPINE1
2	CHRM1	49	CASP9	96	CDKN1A	143	COL1A1
3	SCN5A	50	JUN	97	EIF6	144	IFNG
4	PTGS2	51	CASP3	98	MMP9	145	ALOX5
5	RXRA	52	CASP8	99	MAPK1	146	IL1A
6	PDE3A	53	PRKCA	100	IL10	147	MPO
7	ADRA1A	54	TGFB1	101	EGF	148	NCF1
8	ADRA1B	55	PON1	102	RB1	149	ABCG2
9	SLC6A3	56	MAP2	103	TNF	150	HAS2
10	ADRB2	57	AKR1B1	104	IL6	151	GSTP1
11	SLC6A4	58	PLAU	105	AHSA1	152	NFE2L2
12	HSP90AA1	59	LTA4H	106	TP53	153	NQO1
13	MAOB	60	MAOA	107	ELK1	154	PARP1
14	CALM3	61	ADRB1	108	NFKBIA	155	AHR
15	DRD1	62	NOS2	109	POR	156	PSMD3
16	CHRM3	63	ESR1	110	ODC1	157	SLC2A4
17	ADRA2A	64	CHEK1	111	XDH	158	COL3A1
18	CA2	65	PPARG	112	TOP1	159	CXCL11
19	ADRA2C	66	PTPN1	113	RAF1	160	CXCL2
20	ADRA1D	67	DPP4	114	SOD1	161	DCAF5
21	OPRM1	68	MAPK14	115	HIF1A	162	NR1I3
22	NCOA2	69	GSK3B	116	STAT1	163	CHEK2
23	PGR	70	CDK2	117	RUNX1T1	164	INSR
24	AR	71	AKT1	118	CDK1	165	CLDN4
25	TOP2B	72	VEGFC	119	HSPA5	166	PPARA
26	ACHE	73	MMP2	120	ERBB2	167	PPARD
27	NCOA1	74	MMP1	121	ACACA	168	HSF1
28	KCNMA1	75	HMOX1	122	CYP1A1	169	CRP
29	NR3C2	76	CYP3A4	123	ICAM1	170	CXCL10
30	GABRA2	77	CYP1A2	124	IL1B	171	CHUK
31	GABRA3	78	ALB	125	CCL2	172	SPP1
32	CHRM2	79	CAV1	126	SELE	173	RUNX2
33	GABRA1	80	CTNNB1	127	VCAM1	174	E2F1
34	GRIA2	81	MYC	128	PTGER3	175	E2F2
35	GABRA6	82	CASP7	129	CXCL8	176	CTSD
36	GABRA5	83	F3	130	PRKCB	177	IGFBP3
37	ADH1B	84	GJA1	131	BIRC5	178	IGF2
38	ADH1C	85	MMP10	132	DUOX2	179	CD40LG
39	LYZ	86	PRSS1	133	HSPB1	180	IRF1
40	SLC6A2	87	SERPIND1	134	SULT1E1	181	ERBB3
41	PIK3CG	88	MMP3	135	MGAM	182	DIO1
42	KCNH2	89	F7	136	IL2	183	PCOLCE
43	CHRM4	90	NOS3	137	NR1I2	184	NPEPPS
44	HTR2A	91	RELA	138	CYP1B1	185	HK2
45	CHRNA2	92	EGFR	139	CCNB1	186	RASA1
46	CHRNA7	93	CCND1	140	PLAT	187	GSTM1
47	BCL2	94	BCL2L1	141	THBD	188	GSTM2



注:A:成分靶点-疾病靶点韦恩图;B:酸枣仁复方成分靶点网络图。

图 2 酸枣仁复方治疗抑郁症的潜在作用靶点

Note. A. Component target-disease target of Venn diagram. B. Component target network diagram of ZSSF.

Figure 2 Potential targets of action of compound prescription of ZSSF in the treatment of depression

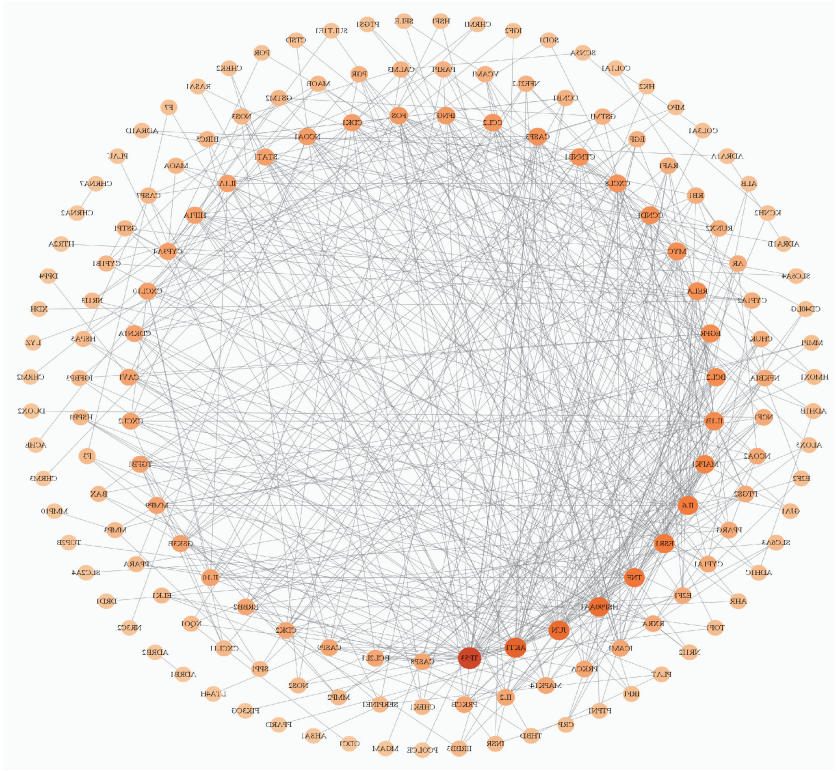
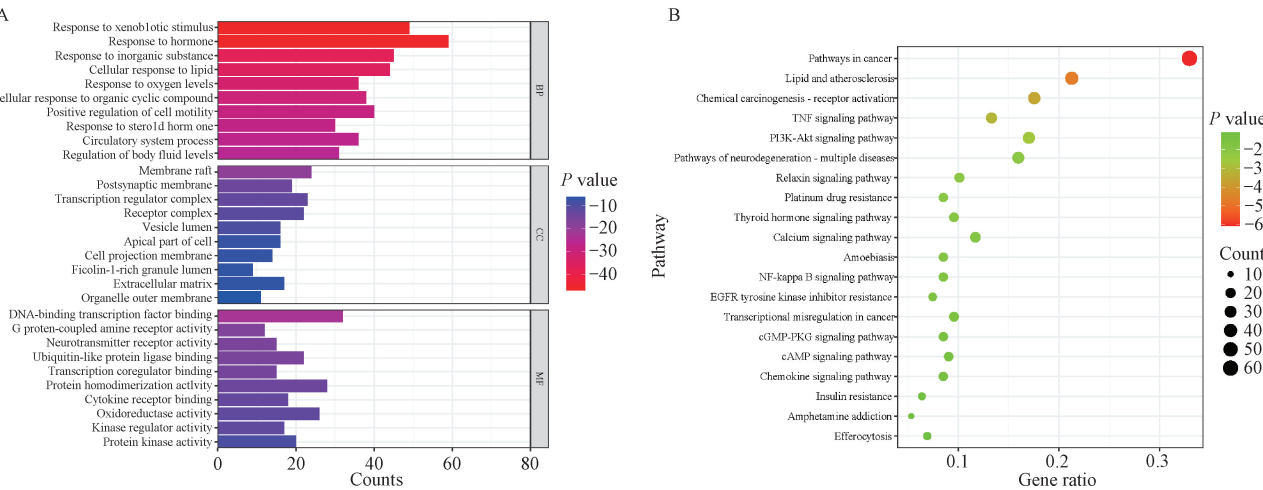


图 3 PPI 分析酸枣仁复方在抑郁症中潜在的作用目标

Figure 3 PPI analyses of potential targets for the action of the ZSSF in depression

物 (TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β) 的相对表达水平。RT-qPCR 检测的结果如图 6 所示,与对照组相比,利血平组斑马鱼幼鱼的炎症因子标志物 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。与利血平组相比,酸枣仁复方低中高剂量组各指标均显著下降 ($P < 0.001$)。



注:A:GO 富集分析结果;B:KEGG 通路分析结果。

图 4 GO 富集分析结果和 KEGG 通路分析结果

Note. A. GO enrichment analysis results. B. KEGG pathway analysis results.

Figure 4 GO enrichment analysis results and KEGG pathway analysis results

表 4 酸枣仁复方与抑郁症蛋白质-蛋白质相互作用网络中的核心作用靶点

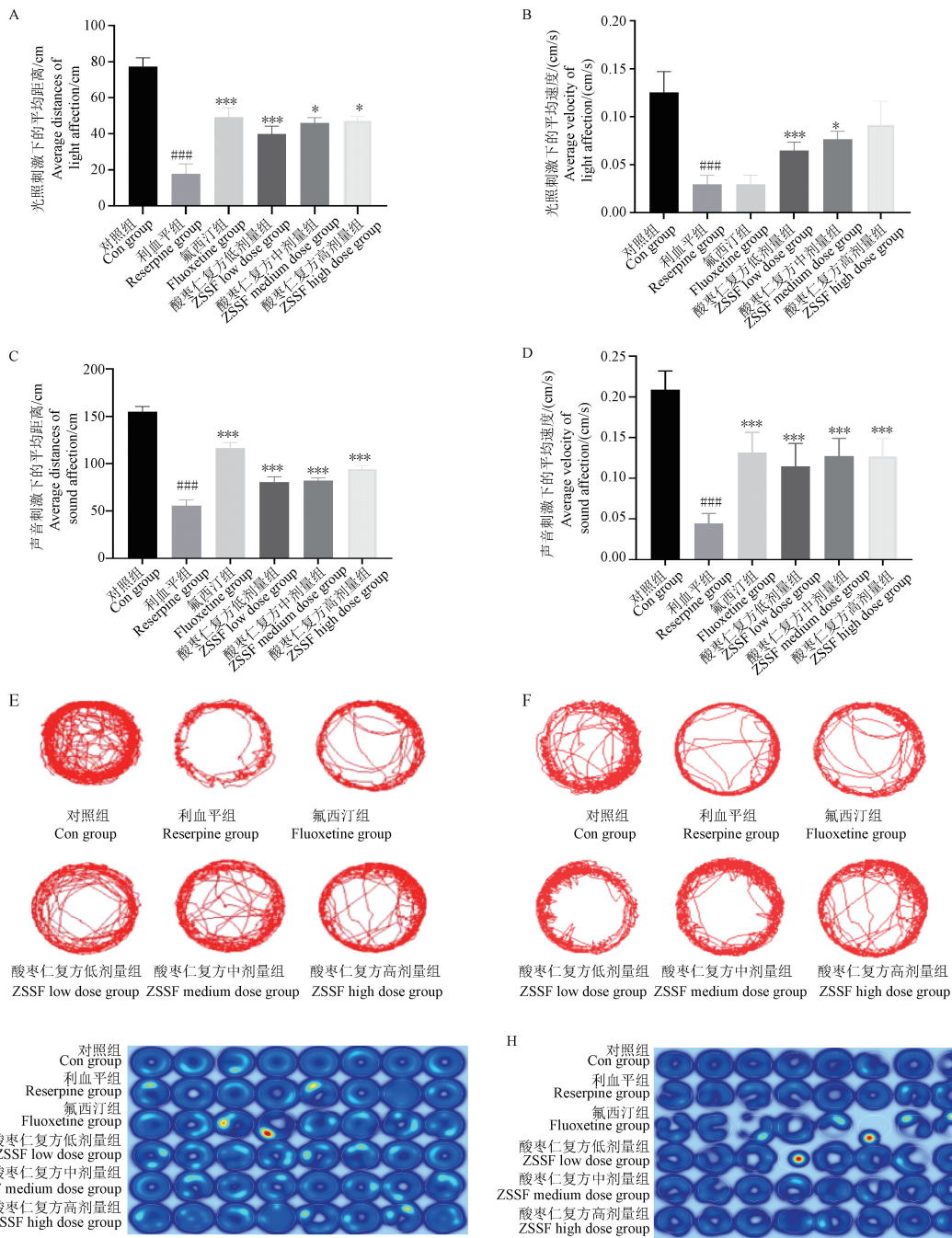
Table 4 Core targets of action in the protein-protein interaction network of ZSSF with depression			
靶点名称 Target name	度中心性 Degree	接近中心性 CC	介度中心性 BC
TP53	40	0.425 655 97	0.213 346 76
AKT1	30	0.420 749 28	0.102 864 50
JUN	27	0.446 483 18	0.236 443 89
TNF	24	0.392 473 11	0.075 095 83
IL-6	23	0.389 333 33	0.065 254 38
IL-1β	18	0.371 501 27	0.023 724 50
BCL-2	17	0.383 202 17	0.039 648 85
IL-10	10	0.306 722 68	0.000 948 32
IL-2	9	0.310 638 29	0.004 396 59
IL-1A	11	0.343 529 41	0.002 158 88

3 讨论

抑郁症作为一种常见的精神障碍类疾病,其主要临床表现为患者情绪低落。因为高患病率、高自杀率等特点,越来越受到人们的关注^[10]。虽然现在市面上的一线抗抑郁药可以改善抑郁症所带来的一些问题,但这些药物有更多的副作用,如性功能障碍、睡眠障碍和认知功能障碍^[11]。中药复方具有价格低且疗效显著的特点,因此许多患者喜欢用中药复方来缓解抑郁症状,而不喜欢使用疗效有限而副作用大的抗抑郁药物^[12]。但是中药复方组成成分复杂而且作用靶点多,限制了对中药复方作用机制的研究。而网络药理学可以通过多靶点研究药物作用,被广泛应用于中药活性化合物发现、整体

作用机制阐释方面^[13-14],很好地解决了这一问题。本研究通过网络药理学获得了“药物-活性化合物-潜在靶点”网络图,用其中得到的 188 个潜在靶点建立 PPI 网络。使用生物信息学工具筛选 10 个核心靶点,包括 TP53、AKT1、JUN、TNF、IL-6、IL-2、IL-1β、BCL-2、IL-10、IL-1A。GO 富集分析表明,酸枣仁复方在抑郁症中的作用与多种生物学过程有关,包括对激素的反应、对无机物的反应、对激素刺激的细胞反应和对有机环化化合物的细胞反应。分子功能主要包括转录因子结合、激酶结合和蛋白结构域特异性结合。本研究发现的靶点富集于炎症因子通路和细胞凋亡通路,如 PI3K-AKT 通路、TNF 通路和 cGMP-PKG 通路。有大量证据表明,抑郁症的发生与系统性免疫激活有关,包括炎症标志物和免疫细胞数量增加^[15]。转化生长因子(TGF)-β 和 IL-10,在抑郁症患者中也经常升高^[16],而 IL-6 和 IL-1β 的升高可能与抑郁症中单核/巨噬细胞的激活有关^[17]。这表明,调节炎症因子标志物的表达是治疗抑郁症的重要途径之一。

基于网络药理学研究得到酸枣仁复方治疗抑郁症的核心靶点后,进一步进行了体内实验验证。利血平是一种中枢镇静剂,长期使用利血平的患者会出现抑郁症^[18],因此,利血平被广泛应用于抑郁症、帕金森病和精神分裂症等神经退行性疾病的动物实验建模^[19]。首先建立了利血平诱导的斑马鱼抑郁模型,然后通过斑马鱼行为学实验初步探究了酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用,之后利用 RT-qPCR 技术进行斑马鱼脑组织中炎症因子标志物的

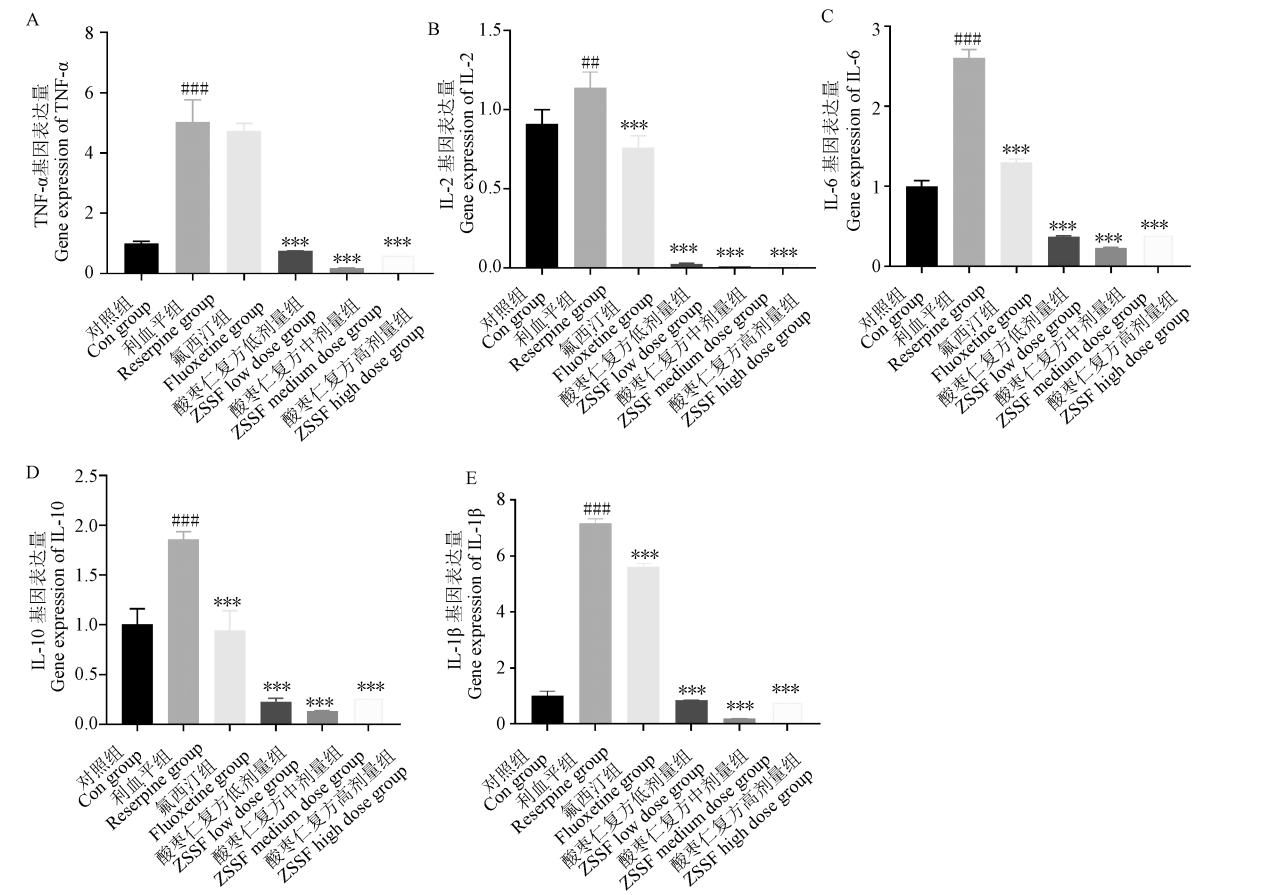


注:A:光照刺激对斑马鱼的运动距离的影响;B:光照刺激对斑马鱼的运动速度的影响;C:声音刺激对斑马鱼的运动距离的影响;D:声音刺激对斑马鱼的运动速度的影响;E:光照刺激对斑马鱼的运动轨迹的影响;F:声音刺激对斑马鱼的运动轨迹的影响;G:光照刺激下斑马鱼的运动热图;H:声音刺激下斑马鱼的运动热图;与对照组相比,###*P* < 0.001;与利血平组相比,**P* < 0.05,****P* < 0.001。(下同)

图5 酸枣仁复方对利血平幼鱼声光刺激状态下游行速度和距离的影响(*n* = 6)

Note. A. Effect of light stimulation on the movement distance of zebrafish. B. Effect of light stimulation on the movement speed of zebrafish. C. Effect of sound stimulation on the movement distance of zebrafish. D. Effect of sound stimulation on the movement speed of zebrafish. E. Effect of light stimulation on the movement trajectory of zebrafish. F. Effect of sound stimulation on the movement velocity of zebrafish. G. Thermogram of zebrafish movement under light stimulation. H. Thermogram of zebrafish movement under sound stimulation. Compared with con group, ###*P* < 0.001. Compared with the reserpine group, **P* < 0.05, ****P* < 0.001. (The same in the following figures)

Figure 5 Effect of the compound of ZSSF on the marching speed and distance in the state of acoustic and visual stimulation in the zebrafish larvae(*n* = 6)



注:与对照组相比,## $P < 0.01$ 。

图 6 酸枣仁复方对利血平幼鱼脑组织中炎症因子标志物的影响($n = 90$)

Note. Compared with the control group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of ZSSF on inflammatory factor markers in the brain tissue of zebrafish larvae($n = 90$)

实验验证。结果表明,酸枣仁复方治疗后,斑马鱼在光照刺激下的游动速度明显加快,游动距离明显增长($P < 0.05, P < 0.001$)。在声音刺激下也出现了游动速度和距离的恢复($P < 0.01$)。这表明酸枣仁复方可以明显改善利血平诱导的斑马鱼抑郁样行为表现。RT-qPCR 实验结果显示,与对照组相比,模型组中的 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β 基因表达水平升高($P < 0.01, P < 0.001$),而经过酸枣仁复方治疗后的炎症因子标志物基因表达量均出现下降趋势($P < 0.001$)。这表明酸枣仁复方可以通过抑制炎症因子的激活改善抑郁样症状,这与网络药理学的预测结果一致。

中药复方在抑郁症的治疗中具有独到的优势。如柴胡疏肝散可以通过提高 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的表达对抑郁症起到治疗作用^[20]。甘麦大枣汤可以通过降低 TNF 通路的表达治疗抑郁症^[21]。酸枣仁复方是《金匱要略》中经

典方剂酸枣仁汤的类方,由酸枣仁、茯苓、当归、百合、玫瑰花五味中药组成。之前对于组方中单味药的研究均证实组方中的中药有治疗抑郁症的效果。酸枣仁作为君药,有宁心安神、养津敛汗的功效。之前的研究表明,酸枣仁皂苷 A 可以上调抑郁小鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平,进而治疗抑郁症^[22-23]。当归作为臣药,可以健脾宁心、养血活血。研究证实,当归皂苷可以调控抑郁大鼠血清中 IL-1 β 、IL-4、IL-6 和 TNF- α 的水平,进而治疗抑郁^[24-25]。这提示了酸枣仁复方对抑郁症有很好的治疗效果,本研究从网络药理学入手,证实了酸枣仁复方可能通过调控炎症因子的表达治疗抑郁症。而后采用实验验证,进一步证实了酸枣仁复方可以缓解利血平诱导的斑马鱼运动障碍和反应迟缓,其作用机制可能是通过降低炎症因子标志物如 IL-6 和 TNF- α 的表达来实现的。

本研究从网络药理学和实验验证两个方面探讨了酸枣仁复方的抗抑郁作用机制,阐明了酸枣仁复方可以改善利血平诱导的抑郁斑马鱼炎症反应。本研究有一些局限性,现有的药物和基因数据库可能不完整,降低了预测结果的置信度。此外,酸枣仁复方的确切生物活性成分还有待进一步研究,酸枣仁复方对抑郁症的其他作用有待进一步探讨。尽管如此,本研究结果还是为酸枣仁复方在抑郁症治疗中的作用提供了重要的初步信息,并表明酸枣仁复方有开发为新的抗抑郁中成药的潜力。

参 考 文 献(References)

[1] ALI T, RAHMAN S U, HAO Q, et al. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation [J]. J Pineal Res, 2020, 69(2): e12667.

[2] CALDIROLI A, CAPUZZI E, TAGLIABUE I, et al. Augmentative pharmacological strategies in treatment-resistant major depression: a comprehensive review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 13070.

[3] CIPRIANI A, FURUKAWA T A, SALANTI G, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis [J]. Lancet, 2018, 391(10128): 1357–1366.

[4] XIE W, MENG X, ZHAI Y, et al. *Panax notoginseng* saponins: a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology [J]. Molecules, 2018, 23(4): 940.

[5] 朱靛婷,桂西,李琦,等. 整合网络药理学与非靶向血清代谢组学探讨四逆散治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(12): 1390–1397.

ZHU L T, GUI X, LI Q, et al. Integration of network pharmacology and non-targeted serum metabolomics to explore the mechanism of action of Sini SAN in the treatment of depression [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(12): 1390–1397.

[6] ZONG Y, CHEN T, DONG H, et al. Si-Ni-San prevents reserpine-induced depression by inhibiting inflammation and regulating CYP450 enzymatic activity [J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1518.

[7] 丁娜娜,陈毅恒,李伟峰,等. 小柴胡汤及其类方辨治抑郁症的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 69–73.

DING N N, CHEN Y H, LI W F, et al. Research progress of xiaochaihu decoction and its SimilarP rescriptions in treatment of depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(6): 69–73.

[8] SHANG L, WANG Y, LI J, et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. J

Ethnopharmacol, 2023, 302: 115876.

[9] ZHANG W, TIAN W, WANG Y, et al. Explore the mechanism and substance basis of Mahuang FuziXixin Decoction for the treatment of lung cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Comput Biol Med, 2022, 151: 106293.

[10] TANG Y Q, LI Z R, ZHANG S Z, et al. Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish [J]. Neurotoxicol Teratol, 2019, 76: 106835.

[11] VU H, SHAYA F T. Predicting factors of depression, antidepressant use and positive response to antidepressants in perinatal and postpartum women [J]. Clin Pract Epidemiol Ment Health, 2017, 13: 49–60.

[12] 何俊慧, 韦洁, 李冬梅, 等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探究壮药金缕半枫荷对抑郁症炎症的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 9(7): 1362–1370.

HE J H, WEI J, LI D M, et al. Mechanism of effect of Zhuang medicine *Semiliquidambar* cathayen. sis Chang on depression inflammation based on network pharmacology, molecular docking and animal experiments [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 9(7): 1362–1370.

[13] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110–1111.

[14] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682–690.

[15] GAŁECKI P, GAŁECKA E, MAES M, et al. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-II A in patients with recurrent depressive disorder [J]. J Affect Disord, 2012, 138(3): 360–366.

[16] BUFALINO C, HEPGUL N, AGUGLIA E, et al. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies [J]. Brain Behav Immun, 2013, 31: 31–47.

[17] CERVENKA I, AGUDELO L Z, RUAS J L. Kynurenes: Tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health [J]. Science, 2017, 357(6349): eaaf9794.

[18] PARK B K, KIM Y R, KIM Y H, et al. Antidepressant-like effects of *Gyejibokryeong-hwan* in a mouse model of reserpine-induced depression [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5845491.

[19] LEITH N J, BARRETT R J. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression? [J]. Psychopharmacology, 1980, 72(1): 9–15.

[20] 贾奎, 冯龙, 黄晨杰, 等. 柴胡疏肝散对卒中后抑郁大鼠行为学及脑区 5-HT2A、BDNF 表达的影响 [J]. 中成药, 2023, 45(12): 3943–3949.

JIA K, FENG L, HUANG C J, et al. Effects of Chaihu Shugan Powder on behaviors and expression of 5-HT2A and BDNF in brain region of a rat model of post-stroke depression [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(12): 3943–3949.

[21] 于千尧, 于忠和, 戴玉良. 甘麦大枣汤联合艾司西酞普兰在

治疗抑郁症中的应用 [J]. 心理月刊, 2023, 18(12): 141-143.

YU Q Y, YU Z H, DAI Y L. Application of Ganmai Dazao Tang combined with escitalopram in the treatment of depression [J]. PSY, 2023, 18(12): 141-143.

[22] 李会涛, 李剑男, 张桐, 等. 酸枣仁皂苷 A 对抑郁小鼠行为及突触可塑性相关蛋白的作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(2): 36-43.

LI H T, LI J N, ZHANG T, et al. Effects of jujuboside A on behavior and synaptic plasticity-related proteins in depressed mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2024, 40(2): 36-43.

[23] LI H, LI J, ZHANG T, et al. Antidepressant effect of Jujuboside

A on corticosterone-induced depression in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 620: 56-62.

[24] GONG W, CHEN J, XU S, et al. The regulatory effect of Angelicae Sinensis Radix on neuroendocrine-immune network and sphingolipid metabolism in CUMS-induced model of depression [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319: 117217.

[25] GONG W, ZHU S, CHEN C, et al. The anti-depression effect of angelicae Sinensis Radix is related to the pharmacological activity of modulating the hematological anomalies [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 192.

[收稿日期] 2024-01-25

《中国实验动物学报》2024 年征订启事

《中国实验动物学报》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转账:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

账号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。