

贯东艳,张米佳,侯志颖,等.胡椒提取物改善慢性束缚应激小鼠抑郁样行为的潜在机制研究[J].中国比较医学杂志,2025,35(2):58-71,84.

Guan DY, Zhang MJ, Hou ZY, et al. Potential mechanism of *Piper nigrum* extract in improving depressive-like behaviors in chronic restraint stress mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 58-71, 84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.006

胡椒提取物改善慢性束缚应激小鼠抑郁样行为的潜在机制研究

贯东艳^{1,2,3},张米佳^{4,5},侯志颖¹,王佳音⁵,于佳玮¹,范蓓¹,谢辉³,
段宙位³,白亚娟^{1,2,3},吴宏红¹,王凤忠^{1,2,3*},王琼^{1,2,3,5*}

(1.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;2.三亚中国农业科学院国家南繁研究院,海南 三亚 572024;
3.海南省农业科学院农产品加工设计研究所,海口 571100;4.澳门科技大学中医药质量研究国家重点实验室,
澳门 999078;5.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)

【摘要】 目的 借助网络药理学和分子对接技术预测胡椒(*Piper nigrum*, PN)中的活性成分改善慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)小鼠抑郁样行为的潜在机制。方法 首先,利用TCMSP数据库筛选出PN主要的化学成分及靶点,通过OMIM、Genecards和FerrDB数据库获得铁死亡及抑郁症相关的靶点。取交集靶点进行GO和KEGG信号通路富集分析。其次,通过分子对接验证核心靶点与其对应的有效成分之间的结合能力。最后,建立CRS小鼠模型,用不同浓度的PN(75、150和300 mg/kg)处理4周后,进行行为学检测,并通过RT-qPCR验证核心基因表达。结果 从PN中筛选出9种活性成分,对应27个靶点,抑郁症靶点8377个,铁死亡靶点547个,取三者交集得到25个靶点基因。通过KEGG富集分析发现,这些核心靶点主要富集在胆碱能突触、5-羟色胺能突触及神经活性配体-受体相互作用等信号通路中。分子对接结果表明,PN主要活性成分与CHRM2、SLC6A4、PTGS2和SLC6A2靶点具有很好的结合能力。行为学检测表明,PN能够显著提升各给药组小鼠糖水偏爱指数($P<0.01$, $P<0.001$),降低小鼠在悬尾和强迫游泳实验中的不动时间($P<0.01$, $P<0.001$),增加小鼠在旷场中自主探索能力($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。ELISA结果表明,PN可以显著降低小鼠血清中炎症水平($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。神经递质检测表明,PN可以显著提高小鼠海马中血清素和乙酰胆碱的水平($P<0.05$)。RT-qPCR结果显示,PN可以下调SLC6A4 mRNA表达量($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。结论 PN可能通过调节血清素和乙酰胆碱水平,抑制炎症反应,参与免疫调节,并发挥神经保护作用,改善小鼠抑郁样行为。

【关键词】 胡椒;抑郁症;神经保护;网络药理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2025)02-0058-14

Potential mechanism of *Piper nigrum* extract in improving depressive-like behaviors in chronic restraint stress mice

【基金项目】 海南省重点研发项目(ZDYF2024XDNY243);海南省财政科技计划资助(FW20230002);三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”项目(YYLH2307);海南省农业科学院科技创新项目(HAAS2024KJCX01)。

【作者简介】 贯东艳(1993—),女,在读博士研究生,研究方向:食药同源中药功效评价。E-mail:1983597909@qq.com

【通信作者】 王琼(1975—),女,博士,研究员,研究方向:中药神经精神药理与航天医学。E-mail:luyiwangqiong@163.com

王凤忠(1972—),男,博士,研究员,研究方向:农产品时空多维品质评价及综合利用。E-mail:wangfengzhong@sina.com

* 共同通信作者

GUAN Dongyan^{1,2,3}, ZHANG Mijia^{4,5}, HOU Zhiying¹, WANG Jiayin⁵, YU Jiawei¹, FAN Bei¹, XIE Hui³,
DUAN Zhouwei³, BAI Yajuan^{1,2,3}, WU Honghong¹, WANG Fengzhong^{1,2,3*}, WANG Qiong^{1,2,3,5*}

1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.
2. National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024.
3. Institute of Processing & Design of Agro-products, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou 571100.
4. State Key Laboratory for Quality Research of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macao 999078.
5. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective Network pharmacology and molecular docking techniques were used to predict the potential mechanisms by which the active components of *Piper nigrum* (PN) regulate depressive-like behaviors in chronic restraint stress (CRS) mice. **Methods** The major chemical components and targets of PN were screened using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology database. Targets related to ferroptosis and depression were obtained from the Online Mendelian Inheritance in Man, GeneCards, and FerrDB databases. The intersecting targets were then subjected to Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses, and molecular docking was performed to validate the binding capacities between the core targets and their corresponding active components. Finally, we established a CRS mouse model. Mice were treated with PN 75, 150, and 300 mg/kg for 4 weeks, followed by behavioral assessments and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to verify the expression of core genes. **Results** Nine active components were screened from PN, corresponding to 27 targets, and 8377 targets related to depression and 547 targets associated with ferroptosis were screened from the databases. The intersection of these three sets resulted in 25 target genes. KEGG enrichment analysis revealed that these core targets were predominantly enriched in signaling pathways, including cholinergic synapses, serotonergic synapses, and neuroactive ligand-receptor interactions. Molecular docking result showed that the main active components of PN had strong binding affinities for the targets CHRM2, SLC6A4, PTGS2, and SLC6A2. Behavioral assessments demonstrated that PN significantly increased the sucrose preference index ($P < 0.01, P < 0.001$), reduced immobility time in the tail suspension and forced swimming tests ($P < 0.01, P < 0.001$), and enhanced exploratory behavior in the open field test ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$). PN significantly reduced the serum levels of inflammation markers ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$), as shown by enzyme-linked immunosorbent assay, and neurotransmitter analysis revealed that PN significantly increased the levels of serotonin and acetylcholine in the mouse hippocampus ($P < 0.05$). RT-qPCR showed that PN demonstrated the mRNA expression of SLC6A4 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$). **Conclusions** PN may improve depressive-like behavior in mice by modulating serotonin and acetylcholine levels, inhibiting inflammatory responses, participating in immune regulation, and exerting neuroprotective effects.

【Keywords】 *Piper nigrum*; depression; neurological protection; network pharmacology

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是一种以情绪低落为主要特征的精神障碍疾病,其形成主要受遗传、环境等多种因素相互作用的影响,病因错综复杂,病理机制尚未完全阐明。据世界卫生组织(WHO)的调查,全球约有3.5亿人受到抑郁症的困扰^[1]。抑郁症的高发率使得医疗体系面临巨大的压力,增加了医疗支出和社会保障负担^[2-3]。因此,抑郁症的预防和治疗得到越来越多的关注和重视。目前,治疗抑郁症的常用药物主要包括几类:三环类抗抑

郁药、单胺氧化酶抑制剂、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂以及新型抗抑郁药(如阿戈美拉汀、氟唑西汀)^[4-5]。这些药物可以减缓抑郁症发病的持续时间和严重程度,但存在治疗周期长、副作用多、治疗效率低等问题。随着抗抑郁药物副作用问题的日益突出,寻找安全有效的防治抑郁症的药物显得尤为重要。铁死亡(ferroptosis)是一种新型的程序性细胞死亡,主要与细胞内铁的过量积

累和脂质过氧化相关^[6]。近年来的研究显示,铁死亡与抑郁症密切相关。抑郁症与神经炎症有关,铁死亡可能在炎症过程中起到重要作用,影响神经细胞的存活和功能^[7]。此外,铁在与抑郁症相关的神经递质(如血清素和去甲肾上腺素)的合成和代谢过程中起着关键作用^[8]。

随着对心理健康问题的日益重视,中药在治疗抑郁症中的作用逐渐受到人们的关注。许多研究者将药食同源类物质作为研究对象,研究其生物活性成分抗抑郁的效果和潜在的作用机制^[9-11]。胡椒(*Piper nigrum*, PN)是一种食药两用的香料。近年来,其药理作用逐渐引起研究者的关注。PN 具有抗氧化、抗炎、杀菌和改善神经系统疾病等作用^[12]。研究表明,PN 精油可以通过参与血清素传递,发挥抗抑郁和焦虑作用^[13]。胡椒叶醇提取物也被证实可以通过调节单胺氧化酶活性发挥镇静、催眠和抗抑郁作用^[14]。从 PN 中分离出的胡椒碱具有抗炎作用,能够通过抑制 STAT3 磷酸化改善皮肤炎症^[15]。此外,研究发现胡椒油碱通过减少炎症和氧化应激调节凋亡蛋白,改善记忆损伤^[16]。但 PN 抗抑郁的关键活性成分及潜在的抗抑郁机制尚未完全阐明。因此,有必要研究 PN 抗抑郁作用中的药效物质基础和潜在机制,充分挖掘 PN 的抗抑郁活性成分。

为此,本研究首先采用网络药理学方法筛选出 PN 中的主要活性物质,结合铁死亡收集 PN、抑郁症和铁死亡核心靶点,预测 PN 抗抑郁的潜在机制。其次结合分子对接技术对网络药理学结果进行验证。最后建立慢性束缚应激小鼠模型进行了体内实验验证。深入挖掘 PN 的药用价值,为探索天然药物在心理健康领域的应用提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

72 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠,体重(35±2)g,7~8 周龄,购自北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2021-0006],饲养于中国医学科学院药用植物研究所实验动物房[SYXK(京)2023-0008],饲养条件与先前文献中描述一致^[17]。本实验已获得中国农业科学院农产品加工研究所动物实验伦理委员会批准(SLXD-2023011728),

并遵循 3R 原则和国际实验动物伦理学要求。

1.2 主要试剂与仪器

PN 样品由海南省农科院提供,经段宙位研究员鉴定为 PN 果实。将 PN 粉碎,过 12 目筛,加入 80%乙醇(料液比 1:12,g/mL)浸泡过夜,加热回流 3 次,每次 1 h。过滤,滤液浓缩,收稠膏,即得 PN 提取物,-20 °C 储存备用。阿戈美拉汀(法国 Les Laboratoires Servier Industrie 公司,货号 HJ20150581);吐温 80(上海 Macklin 公司,货号 T6336);IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,货号 SEKM-0007、SEKM-0002 和 SEKM-0034);RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒(北京 Aidlab 公司,货号 RN28 和 PC5802);NovoStart SYBR qPCR SuperMix 试剂盒(苏州 Novoprotein 公司,货号 E096-01B);引物由擎科生物科技有限公司合成。PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);KZ-III-F 高速低温组织研磨仪(武汉 Servicebio 公司)。本实验所用的束缚器及行为学检测仪器均为中国医学科学院药用植物研究所与中国航天员中心和北京康森益友科技有限公司联合研制。

1.3 实验方法

1.3.1 PN 活性成分及靶点收集

参考文献方法^[18],根据口服利用度(oral availability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的标准,在中药系统药理学分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)筛选出 PN 的化学成分。相关靶点在 Uniprot (<https://www.uniprot.org>)数据库进行注释,获得 PN 化合物的有效靶点。

1.3.2 抑郁症和铁死亡靶点收集

在 GeneCards、OMIM 数据库中输入“depression”进行检索,整合搜索结果并剔除重复靶点,从而得到抑郁症疾病靶点。铁死亡靶点从 FerrDB 数据库获得。将 PN 靶点、抑郁症靶点和铁死亡靶点取交集,得到 PN 调控铁死亡缓解抑郁的相关靶点基因,并利用 Venny 2.1.0 软件绘制成韦恩图。

1.3.3 构建 PPI 网络

选取 PN、抑郁症和铁死亡的交集靶点,导入 STRING 构建蛋白相互作用网络(protein-protein interaction networks, PPI)。然后,使用 Cytoscape 3.9.2 软件对结果进行拓扑分析,根据 Degree 值

筛选出 PN 抗抑郁的前 10 个核心靶点。

1.3.4 GO 和 KEGG 富集分析

利用 Bioconductor 提供的 R 包,对 25 个交集靶点进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。通过生物信息学平台对结果进行可视化处理。

1.3.5 分子对接验证

从 PPI 网络中选取关键靶点与其对应的潜在活性成分进行分子对接。首先,从 Alphafold 数据库中获取核心靶点蛋白的晶体结构,然后在 TCMSp 数据库中下载活性成分的 mol2 格式文件。接着,使用 AutodockTools1,2 对蛋白质晶体结构进行脱水 and 加氢处理,并准备受体结构。随后,使用 Open Babel 和 Autodock 对小分子进行预处理。最后,使用 Autodock 进行分子对接,并将结果导入 Pymol 进行可视化展示。

1.3.6 动物分组及模型构建

经过 5 d 适应性喂养后,随机将 72 只 ICR 小鼠分为 6 组:对照组、模型组、阿戈美拉汀组 (AGO, 50 mg/kg)、胡椒低剂量组 (PN-LD, 75 mg/kg)、胡椒中剂量组 (PN-MD, 150 mg/kg) 和胡椒高剂量组 (PN-HD, 300 mg/kg),剂量设置参考文献研究^[14,19]。束缚造模参考文献^[11,20],除正常对照组外,其余组小鼠被置于束缚器中,束缚时间为 22:00 至次日 8:00,共 10 h/d,连续 28 d 后进行行为学检测。

1.3.7 行为学检测

(1) 糖水偏爱实验

在实验开始前,给予小鼠 2 d 适应期,第 1 天给予两瓶糖水,第 2 天将其中 1 瓶换成纯水。禁水 24 h 后,给予小鼠一瓶蔗糖糖水 (1%) 和一瓶纯水,确保它们可以自由选择,在 12 h 后测定瓶子中剩余的水量。计算糖水和纯水的摄入比例 (糖水偏爱指数 = 糖水消耗量 / (糖水 + 纯水消耗量) × 100%),以评估小鼠对糖水的偏爱度^[21]。

(2) 旷场实验

将小鼠放入一个 90 cm × 50 cm 的黑色圆形箱子中央,箱子上方装有摄像机,可自动记录小鼠在 5 min 内的活动情况,并通过计算机实时监测分析系统对小鼠的行为进行分析^[22]。

(3) 悬尾实验

参考文献^[23],将小鼠尾巴末端用胶布固定后挂在距离底部约 5 cm 的挂钩上。小鼠适应 2 min

后,仪器开始自动测定 4 min 内的累计不动时间。

(4) 强迫游泳实验

将小鼠放置在装有 3/4 水的透明水桶 (18 cm × 20 cm) 中,保持水温在 (24 ± 2) °C。然后将小鼠放入水中 2 min 后,分析处理系统开始自动记录 4 min 内的累计不动时间。每次测试结束后,及时更换清水并用毛巾擦干小鼠^[24]。

1.3.8 收集血清和组织样本

行为学检测结束后,小鼠麻醉后取血,血液于 4 °C 静置过夜,分离血清 (4500 r/min, 5 min, 4 °C), -80 °C 保存备用。采血后,在冰上迅速剥离出小鼠左右两侧海马组织、皮层,迅速放入液氮中暂存,并转移到 -80 °C 保存。

1.3.9 慢性束缚应激 (chronic restraint stress, CRS) 小鼠血清中炎症因子水平测定

根据制造商的说明测定 CRS 小鼠血清中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平。

1.3.10 LC-MS/MS 检测 CRS 小鼠海马中神经递质含量

准确称取小鼠海马组织 10 mg,加入 50 μL 超纯水,在低温高速研磨仪中研磨 (60 HZ/30 s)。取 40 μL 均浆液,加入 10 μL 三氟乙酸,涡旋混匀后,4 °C 下 1000 r/min。收集上清液待测。色谱及质谱条件按前人所述^[25]。

1.3.11 RT-qPCR 检测关键基因 mRNA 表达水平

按试剂盒说明提取小鼠皮层和海马组织中的 RNA,逆转录为 cDNA,以 β-actin 为内参基因进行扩增。分别检测 SLC6A4、PTGS2 和 CHRM2 的 mRNA 表达,通过 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因的表达水平 (引物序列如表 1 所示)。

1.4 统计学方法

统计分析采用 Graph Pad Prism 9.0 软件进行。所有数据呈正态分布,组间比较使用单因素方差分析,结果以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PN 活性成分及靶点收集

根据 OB ≥ 30%、DL ≥ 0.18 的筛选标准在 TCMSp 数据库中筛选出 12 种 PN 中的活性成分,其中有 9 种活性成分具有对应的靶点 (表 2)。

2.2 预测 PN 调控铁死亡缓解抑郁的核心靶点

通过检索 TCMS 得到 PN 靶点基因 27 个;在 GeneCards 和 OMIM 数据库中获得 8377 个抑郁症相关的靶点基因;通过 FerrDB 数据库检索到 547 个与铁死亡相关的靶点基因。取三者靶点基因的交集,共获得 25 个共同作用靶点(图 1A)。绘制 PN 活性成分-靶点网络图(图 1B)。

2.3 PPI 网络构建

如图 2 所示,将上述得到的 25 个交集靶点导入 String 在线数据库,以可信度 ≥ 0.9 作为筛选条件,并将生物物种限定为“Homo sapiens”,筛选后导入 Cytoscape 构建 PN 活性成分缓解抑郁的 PPI 网络图。共获得了 23 个节点、66 条边(图 2A),每个节点对应一个靶点基因,而边表示这些靶点基因之间的相互作用,边越多表示它们之间的关联度越高。根据 Degree 值的大小(图 2B),

靶点基因的颜色和形状也会随之变化。由 PPI 网络图可知,SLC6A4 和 SLC6A2 基因处于核心位置,其次是 PTGS2、CHRM2、SLC6A3、ADRB2、ADRA1B、ADRA2B、GABRA1 和 ADRA1A。提示这些靶点基因可能在防治抑郁中具有重要的调控作用,或许是 PN 发挥抗抑郁作用的关键靶点。

2.4 GO 和 KEGG 富集分析

如图 3A 所示,GO 富集分析从生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3 个方面对 PN 抗抑郁靶基因的作用进行了注释。BP 富集主要涉及腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、G 蛋白偶联乙酰胆碱受体信号通路、管径调节等;CC 富集包括了神经突触膜、突触后膜、突触后膜的组成部分等;MF 富集主要包括 G 蛋白偶联受体的活性、G 蛋白偶联神经递质受体的活性、突触后神经递质受体活动等功能。

表 1 RT-qPCR 引物序列

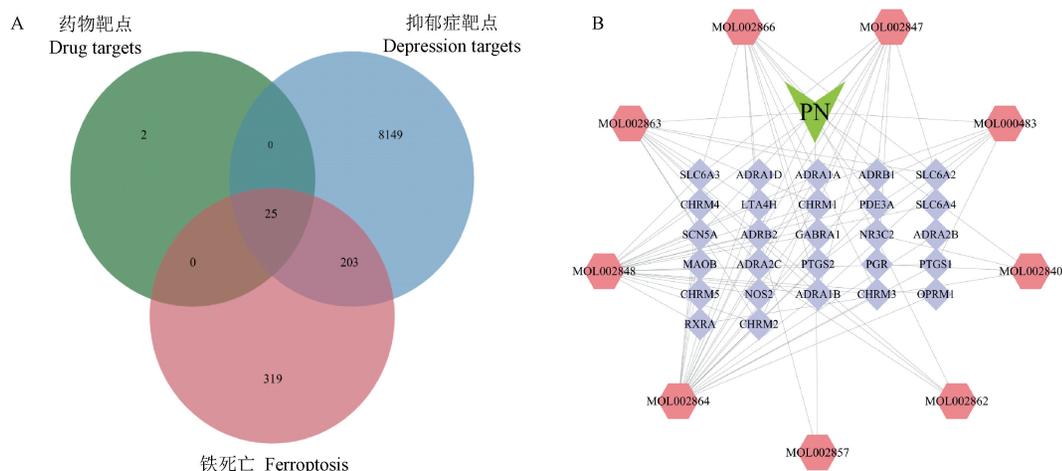
Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	
β -actin	F: GCACCACACCTTCTACAATG	R: TGCTTGCTGATCCACATCTG
SLC6A4	F: TATCCAATGGGTACTCCGCAG	R: CCGTTCCCTTGTTGAATCT
PTGS2	F: TTCAACACACTCTATCACTGGC	R: AGAAGCGTTTGGCGTACTCAT
CHRM2	F: TGGTTTGCTATTACCAGTCT	R: CTGAAGGTGGCGTTGACTT

表 2 PN 活性成分

Table 2 Active components of PN

编号 NO.	成分 ID Ingredient ID	活性成分 Active ingredients	口服利用度/% OB	类药性 DL
1	MOL002866	萘萘宁 (2E,4E,8E)-9-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-isobutylnona-2,4,8-trienamide	65.90	0.33
2	MOL002864	胡椒碱 (2E,4Z)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidino-penta-2,4-dien-1-one	37.52	0.23
3	MOL002863	胡椒亭碱 (E)-7-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidino-hept-6-en-1-one	54.19	0.31
4	MOL002862	胡椒酰胺 Pipericide	42.72	0.43
5	MOL002857	几内亚胡椒酰胺 (2E,4E,12E)-13-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(2-methylpropyl)trideca-2,4,12-trienamide	42.64	0.53
6	MOL002848	萘萘酰胺 cis-Piplartine	96.65	0.24
7	MOL002847	胡椒油碱 Piperolein B	32.26	0.41
8	MOL002840	隐海松酸 Cryptopimaric acid	39.58	0.28
9	MOL000483	N-顺式阿魏酰酰胺 (Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26

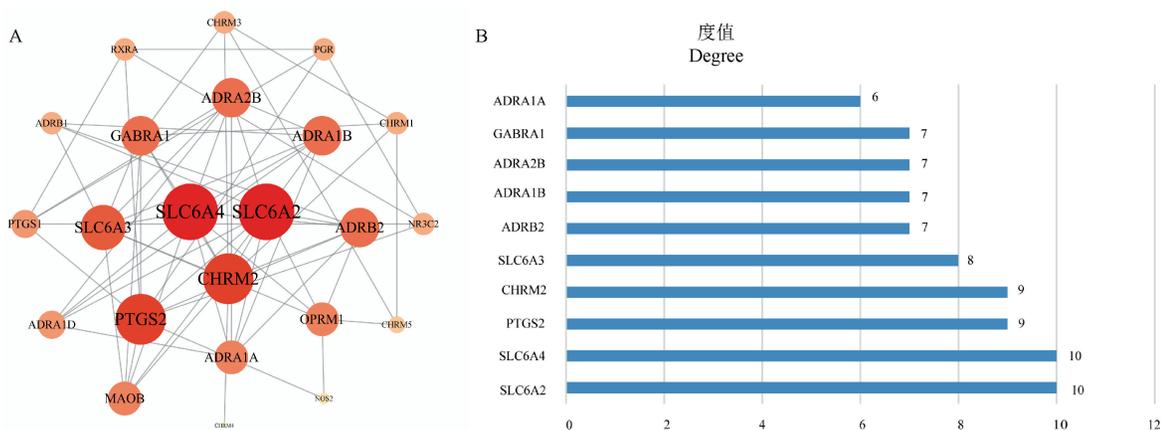


注:A:PN、抑郁症和铁死亡三者交集靶点维恩图;B:PN“成分-靶点-疾病”网络图,紫色代表靶点,粉色代表活性成分。

图 1 PN 调控铁死亡缓解抑郁的核心靶点预测

Note. A, Venn diagram showing the intersection of targets among PN, depression, and ferroptosis. B, Network diagram of “components-targets-diseases” for PN, purple represents targets and pink represents active components.

Figure 1 Core target prediction for how PN regulates ferroptosis to alleviate depression



注:A:PN 活性成分缓解抑郁的 PPI 网络图;B:核心靶点度值。

图 2 PPI 网络图

Note. A, PPI network diagram of PN’s active components alleviating depression. B, Core target degree values.

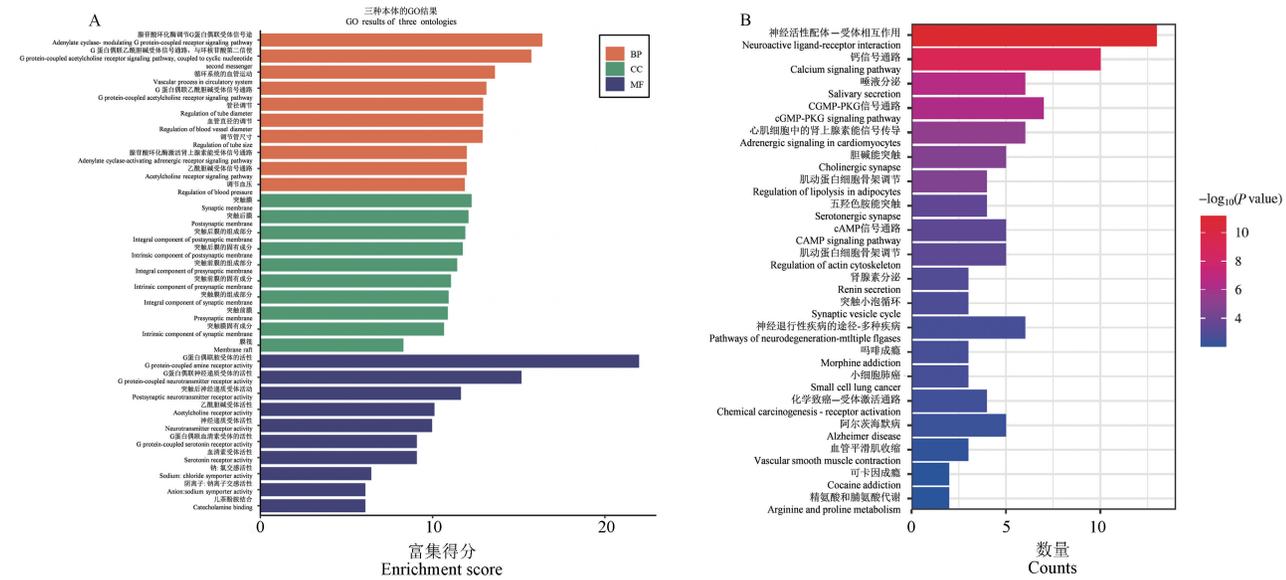
Figure 2 PPI network diagram

KEGG 共富集到 86 条通路,以 $P < 0.05$ 作为筛选标准,选取显著富集的前 20 条通路,绘制条形图。如图 3B 所示,主要包括胆碱能突触、5-羟色胺能突触、神经活性配体-受体相互作用、钙信号途径、突触小泡循环、cGMP-PKG 信号通路等。相关通路富集到的靶点详见表 3。

2.5 分子对接结果

在 PPI 网络中,SLC6A4、SLC6A2 基因处于核心位置,其次是 PTGS2、CHRM2、SLC6A3。我们将排名前五位的核心靶点分别与 Piperolein B、

(E)-7-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidino-hept-6-en-1-one、(2E,4E,8E)-9-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-isobutylnona-2,4,8-trienamide、cis-Piplartine 和 (2E,4Z)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidino-penta-2,4-dien-1-one 进行分子对接。由图 4A 可知,这 5 种化合物与其相应的靶蛋白的结合能在 $-7.8 \sim -4.2$ kcal/mol 之间,均显示出良好的结合活性。此外,我们发现 cis-Piplartine 与 CHRM2 和 SLC6A4,Piperolein B 与 PTGS2 和 SLC6A2 的对接结合能较高(图 4B~4E)。



注:A:GO 富集分析;B:KEGG 通路富集分析(前 20 条)。

图 3 PN 中潜在抗抑郁靶点的 GO 和 KEGG 富集分析

Note. A, GO enrichment analysis. B, KEGG pathway enrichment analysis (Top 20 bars).

Figure 3 GO and KEGG enrichment analysis of potential antidepressant targets in PN

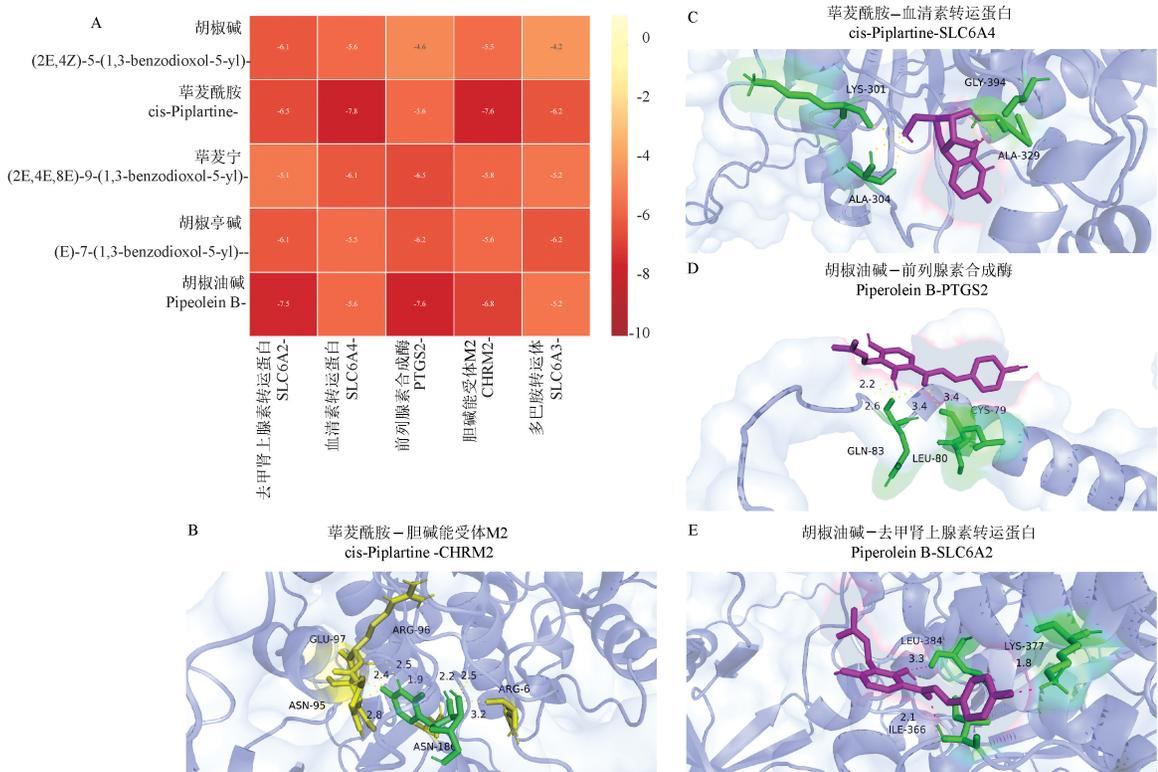
表 3 KEGG 富集分析通路(前 20 条)

Table 3 KEGG enrichment analysis pathways (Top 20)

信号通路 Signaling pathways	数目 Number	靶点 Target
5-羟色胺能突触 Serotonergic synapse	4	PTGS2、PTGS1、MAOB、SLC6A4
胆碱能突触 Cholinergic synapse	5	CHRM3、CHRM1、CHRM4、CHRM2、CHRM5
突触小泡循环 Synaptic vesicle cycle	3	SLC6A3、SLC6A2、SLC6A4
神经活性配体-受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	13	CHRM3、CHRM1、ADRB2、ADRB1、ADRA1B、OPRM1、GABRA1、CHRM4、CHRM2、ADRA2B、ADRA1D、ADRA1A、CHRM5
钙信号通路 Calcium signaling pathway	10	CHRM3、CHRM1、ADRB2、ADRB1、ADRA1B、CHRM2、ADRA1D、ADRA1A、NOS2、CHRM5
cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	7	PDE3A、ADRB2、ADRB1、ADRA1B、ADRA2B、ADRA1D、ADRA1A
PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	3	CHRM1、RXRA、CHRM2
心肌细胞中的肾上腺素能信号传导 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	6	ADRB2、ADRB1、ADRA1B、SCN5A、ADRA1D、ADRA1A
神经退行性疾病的途径-多种疾病 Pathways of neurodegeneration-multiple diseases	6	SLC6A3、PTGS2、CHRM3、CHRM1、NOS2、CHRM5
唾液分泌 Salivary secretion	6	CHRM3、ADRB2、ADRB1、ADRA1B、ADRA1D、ADRA1A
cAMP 信号通路 cAMP signaling pathway	5	PDE3A、CHRM1、ADRB2、ADRB1、CHRM2
肌动蛋白细胞骨架调节 Regulation of actin cytoskeleton	5	CHRM3、CHRM1、CHRM4、CHRM2、CHRM5

续表3

信号通路 Signaling pathways	数目 Number	靶点 Target
阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	5	PTGS2、CHRM3、CHRM1、NOS2、CHRM5
脂肪细胞的脂肪分解调控 Regulation of lipolysis in adipocytes	4	PTGS2、ADRB2、ADRB1、PTGS1
化学致癌-受体激活通路 Chemical carcinogenesis-receptor activation	4	ADRB2、ADRB1、RXRA、PGR
肾素分泌 Renin secretion	3	PDE3A、ADRB2、ADRB1
吗啡成瘾 Morphine addiction	3	PDE3A、OPRM1、GABRA1
小细胞肺癌 Small cell lung cancer	3	PTGS2、RXRA、NOS2
可卡因成瘾 Cocaine addiction	2	SLC6A3、MAOB
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	2	MAOB、NOS2



注:A:分子对接热图;B:草茛酰胺与CHRM2;C:草茛酰胺与SLC6A4;D:胡椒油碱与PTGS2;E:胡椒油碱与SLC6A2。

图4 核心靶点与核心成分之间的分子对接结果

Note. A, Molecular docking heat map. B, cis-Pipltartine and CHRM2. C, cis-Pipltartine and SLC6A4. D, Piperolein B and PTGS2. E, Piperolein B and SLC6A2.

Figure 4 Molecular docking results between core targets and core components

2.6 PN 对 CRS 小鼠糖水偏爱指数的影响

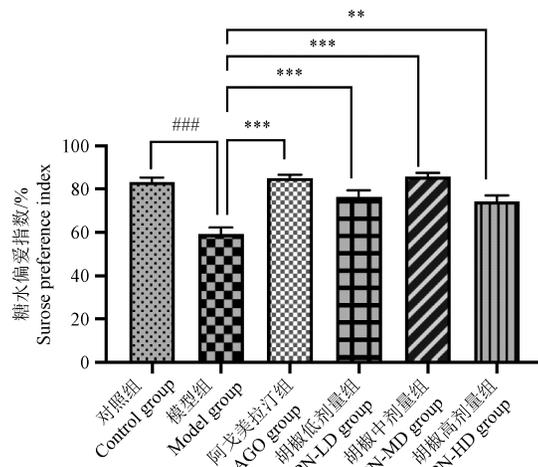
如图 5 所示,模型组小鼠的糖水偏爱指数显著低于对照组 ($P < 0.001$);而与模型组相比,AGO、PN-LD、PN-MD 和 PN-HD 组小鼠糖水偏爱指数均显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$)。

2.7 PN 对 CRS 小鼠旷场实验的影响

如图 6 所示,模型组小鼠在总路程、平均速度、中央区总路程和中央区运动时间中均显著低于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组相比,AGO、PN-LD、PN-MD 和 PN-HD 组在总路程中均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。此外,AGO 组在平均速度和中央区运动时间方面显著高于模型组 ($P < 0.01$)。而 PN-MD 组在平均速度和中央区总路程的表现显著优于模型组 ($P < 0.01$)。但其余给药组与模型组相比并未见显著差异 ($P > 0.05$)。

2.8 PN 对 CRS 强迫游泳和悬尾实验的影响

如图 7A 所示,模型组小鼠在强迫游泳中的不动时间显著升高 ($P < 0.001$);与模型组相比,

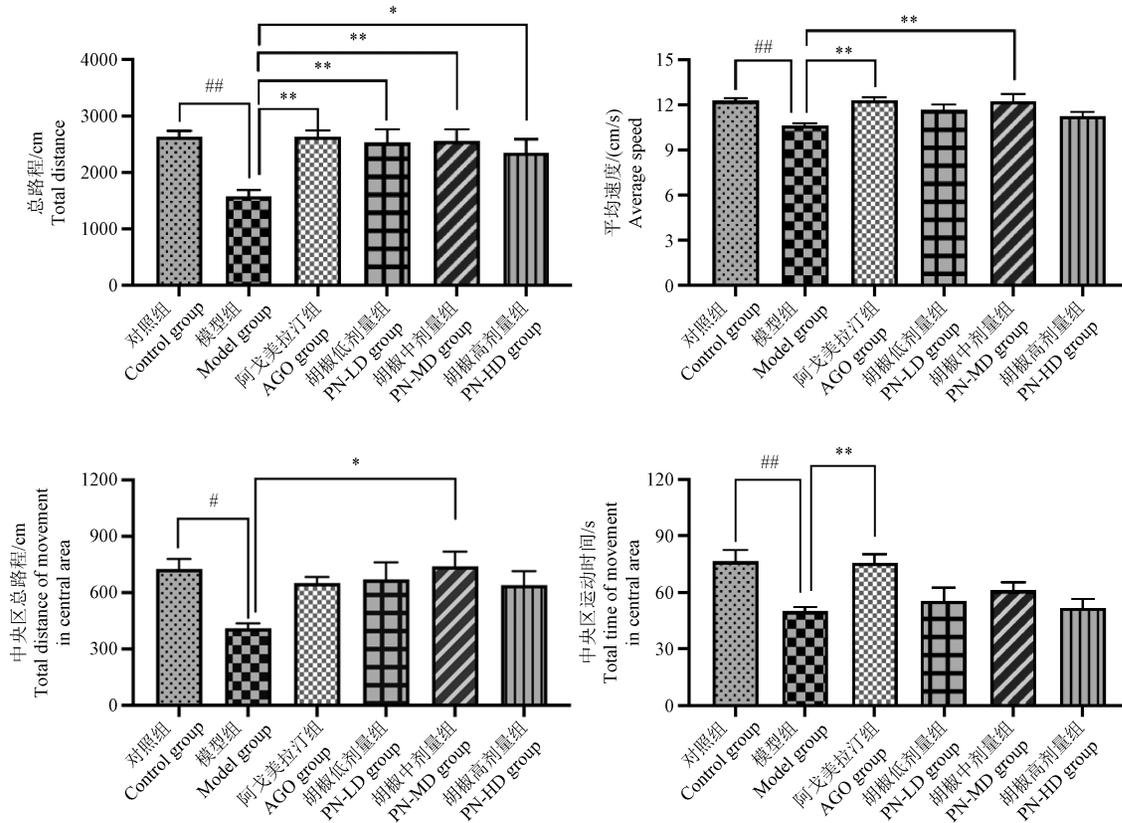


注:与对照组相比,### $P < 0.001$;与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 5 PN 对 CRS 糖水偏爱的影响 ($n = 8$)

Note. Compared with the control group, ### $P < 0.001$; Compared with the model group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of PN extract on surose preference in CRS mice ($n = 8$)



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

图 6 PN 对 CRS 小鼠旷场实验的影响 ($n = 8$)

Note. Compared with the control group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of PN extract on absenteeism experiment in CRS mice ($n = 8$)

AGO、PN-LD、PN-MD 和 PN-HD 组小鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。表明 PN 有助于改善小鼠的绝望情绪。如图 7B 所示,模型组小鼠在悬尾实验中不动时间显著高于对照组 ($P < 0.001$);与模型组相比,AGO、PN-LD 组和 PN-MD 组小鼠在悬尾实验中的不动时间显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

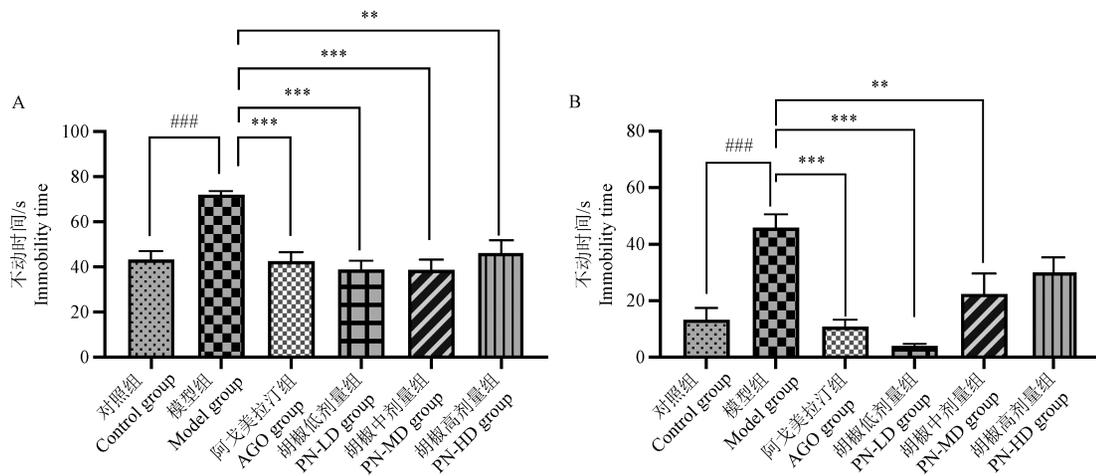
2.9 PN 对 CRS 小鼠血清中炎症因子的影响

如图 8 所示,模型组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P <$

0.001);与模型组相比,AGO、PN-LD、PN-MD、PN-HD 组显著降低了 CRS 小鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$)。PN-MD 组和 PN-HD 组 (300 mg/kg) 小鼠血清中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 PN-LD 对小鼠血清中 IL-1 β 水平无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.10 PN 对 CRS 小鼠海马中神经递质含量的影响

由图 9 可知,模型组小鼠海马中 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和乙酰胆碱

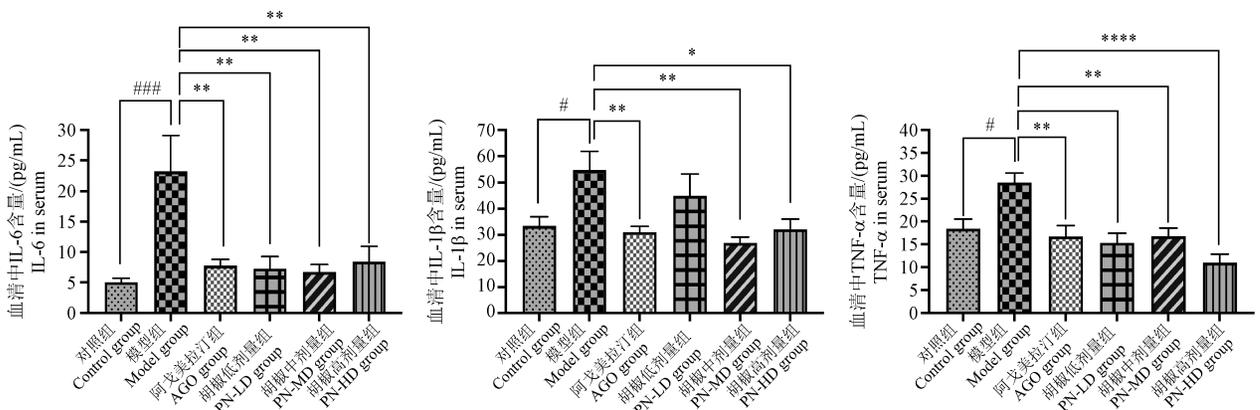


注:A:PN 对 CRS 小鼠强迫游泳的影响;B:PN 对 CRS 小鼠悬尾实验的影响。与对照组相比,### $P < 0.001$;与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 7 PN 对 CRS 小鼠强迫游泳和悬尾实验的影响 ($n = 8$)

Note. A, Effect of PN on forced swimming test in CRS mice. B, Effect of PN on tail suspension test in CRS mice. Compared with the control group, ### $P < 0.001$. Compared with the model group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 Effect of PN on forced swimming test and tail suspension test in CRS mice ($n = 8$)



注:与对照组相比,* $P < 0.05$,### $P < 0.001$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$ 。

图 8 PN 对 CRS 小鼠血清中炎症因子的影响 ($n = 8$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ### $P < 0.001$. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

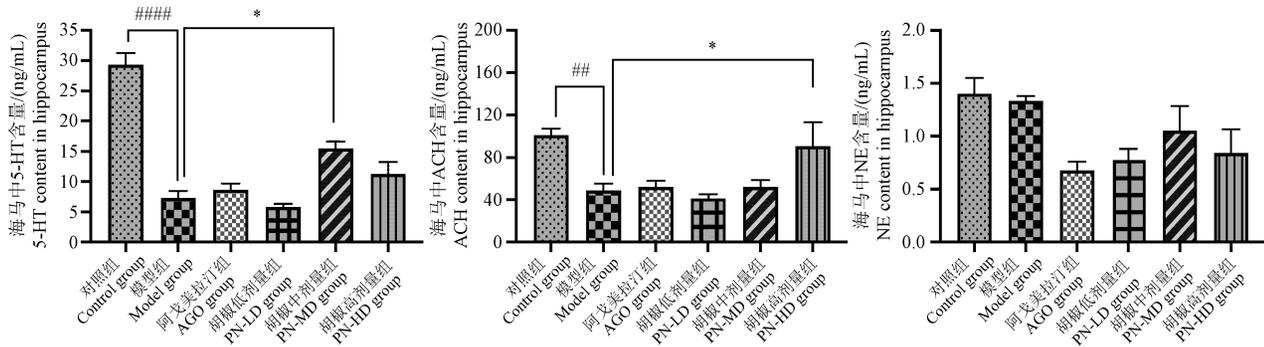
Figure 8 Effect of PN on inflammatory factors in serum of CRS mice ($n = 8$)

(acetylcholine, ACH) 的含量显著低于对照组 ($P < 0.01, P < 0.0001$); 与模型组相比, PN-MD 可显著提高小鼠海马中 5-HT 水平 ($P < 0.05$), 但其余给药组治疗后小鼠海马中 5-HT 水平无显著差异 ($P > 0.05$)。同样, PN-HD 可显著提高小鼠海马中 ACH 水平, 但其余给药组治疗后小鼠海马中 ACH

水平与模型组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。研究还发现各给药组去甲基肾上腺素 (NE) 水平虽有下降的趋势, 但无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.11 PN 对关键基因表达水平的影响

如图 10 所示, 研究测定了小鼠皮层和海马组织中 SLC6A4、CHRM2 和 PTGS2 mRNA 表达情

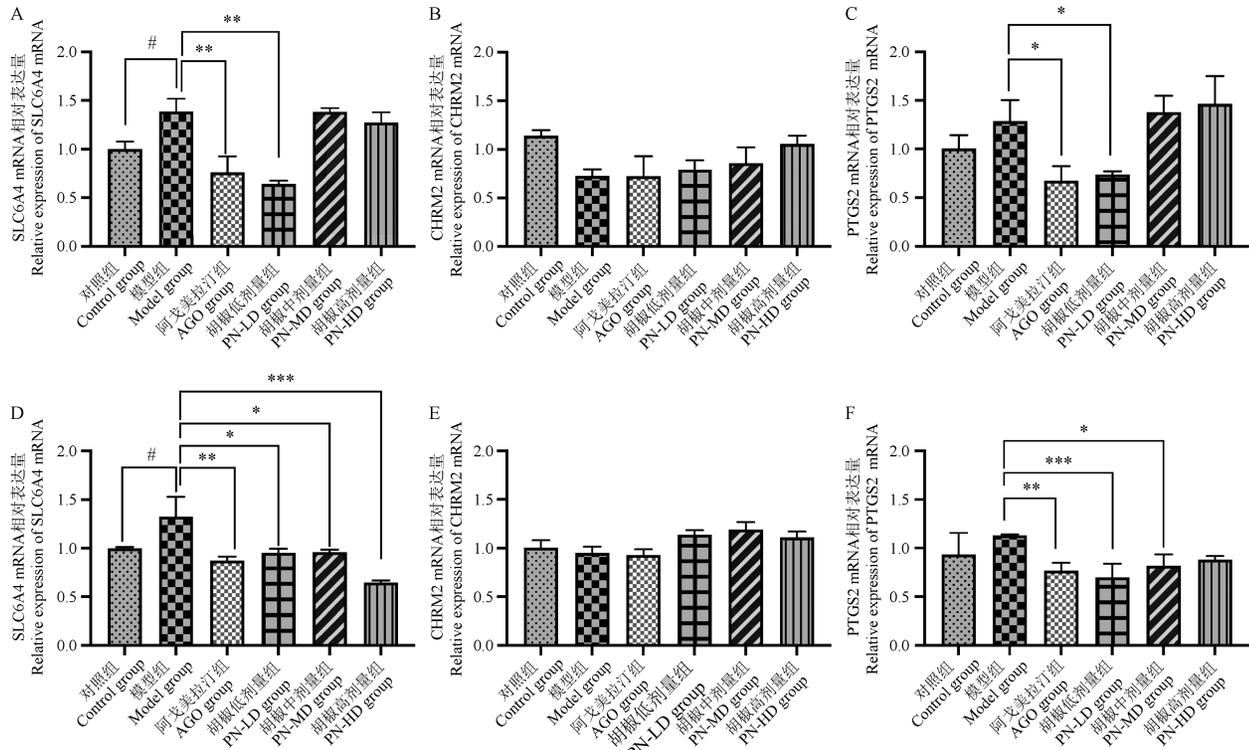


注: 与对照组相比, # $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$; 与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图 9 PN 对 CRS 小鼠海马中神经递质的影响 ($n = 8$)

Note. Compared with the control group, # $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

Figure 9 Effects of PN extract on neurotransmitters in the hippocampus of CRS mice ($n = 8$)



注: A~C: 小鼠皮层组织中 SLC6A4、CHRM2 和 PTGS2 mRNA 表达情况; D~F: 小鼠海马组织中 SLC6A4、CHRM2 和 PTGS2 mRNA 表达情况。与对照组相比, # $P < 0.05$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 10 PN 对关键基因 mRNA 表达水平的影响 ($n = 6$)

Note. A~C, SLC6A4, CHRM2 and PTGS2 mRNA expression in mouse cortical tissues. D~F, SLC6A4, CHRM2 and PTGS2 mRNA expression in mouse hippocampal tissues. Compared with the control group, # $P < 0.05$. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 10 Effects of PN extract on the mRNA expression levels of key genes ($n = 6$)

况。由图 10 A 可知,模型组 SLC6A4 mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),而 AGO 和 PN-LD 显著降低了 SLC6A4 mRNA 表达($P < 0.01$),但 PN-MD 和 PN-HD 对 SLC6A4 mRNA 表达无显著影响。如图 10 B 所示,模型组 CHRM2 mRNA 的表达量呈现下降的趋势,各给药组中 CHRM2 表达量均有上升的趋势,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。由图 10 C 可知,模型组 PTGS2 mRNA 表达量升高,但无显著差异($P > 0.05$),与模型组相比,AGO 和 PN-LD 组 PTGS2 mRNA 表达量显著下降($P < 0.05$),但 PN-MD 和 PN-HD 组 PTGS2 mRNA 表达量与模型组相比并无显著差异($P > 0.05$)。在小鼠海马组织中,我们发现模型组 SLC6A4 mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),而各给药组均可显著降低 SLC6A4 mRNA 在小鼠海马组织中的表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, 图 10 D)。小鼠海马组织中 CHRM2 mRNA 表达与小鼠皮层中相一致,各组均无显著差异(图 10 E)。如图 10 F 所示,模型组 PTGS2 mRNA 与对照组无显著差异($P > 0.05$),但 AGO、PN-LD 和 PN-MD 组可显著降低 PTGS2 mRNA 的表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

3 讨论

中医认为抑郁症是一种由情绪内伤引起的气机失调的“郁症”。肝气郁结会导致气机不畅,进一步影响心脏、脾等脏腑功能,导致气血运行不畅,从而引发抑郁症^[26]。铁死亡是一种依赖铁离子的细胞死亡方式,区别于传统的细胞死亡形式。它通过铁离子催化的脂质过氧化反应导致细胞膜破裂,从而引发细胞死亡^[27]。研究表明,靶向抑制铁死亡的治疗方法在缓解抑郁症状方面具有显著效果。例如,抗抑郁药物氟西汀既可以通过抑制 5-HT 再摄取发挥作用,还能够减少铁沉积^[28]。一些中药,如柴胡皂苷和木犀草苷,通过调节铁死亡相关基因,显示出抗抑郁作用^[29-30]。

中药含有多种化学成分,通过多个有效成分的协同作用和多靶点调控,能够实现整体调节的治疗效果。现有研究表明,中药的某些活性成分表现出良好的抗抑郁作用,且天然无毒副作用^[31]。PN 是我国卫生部门最早公布的食药同源

植物之一。但鲜有 PN 在调节铁死亡缓解抑郁方面的研究。为了研究 PN 在抗抑郁和调节铁死亡方面的作用,采用网络药理学分析方法获得了 PN 中 12 种主要活性成分,筛选得到 25 个核心靶点基因,发现 PN 可能通过 SLC6A4、SLC6A2、PTGS2、CHRM2 等核心靶点调控 cGMP-PKG 信号通路、胆碱能突触、5-羟色胺能突触等多条通路发挥抗抑郁的作用。利用分子对接技术筛选出萘萘酰胺、胡椒油碱两种与核心靶点结合活性最好的有效小分子药物单体。分子对接结果表明萘萘酰胺和胡椒油碱与 SLC6A4、SLC6A2、PTGS2 和 CHRM2 靶点具有很好的结合能力。

为验证上述结果,研究建立了 CRS 小鼠模型进行体内实验验证。行为学结果显示,模型组小鼠糖水偏爱指数显著低于对照组。此外,CRS 小鼠在强迫游泳和悬尾实验中的不动时间显著延长,表明模型建立成功。给予适量 PN 干预后可显著降低 CRS 小鼠在强迫游泳和悬尾实验中的不动时间,提高其对糖水的偏爱程度,改善小鼠抑郁样情绪。WANG 等^[32]发现 PN 叶水醇提取物具有很好的神经保护作用,其可以降低小鼠在悬尾和强迫游泳中的不动时间,改善抑郁样行为。这与我们的研究结果一致。已有研究表明黑胡椒醇提取物和圣罗勒提取物联合治疗可显著降低小鼠在强迫游泳中的不动时间,发挥协同抗抑郁作用^[33]。此外,研究发现 PN-MD 组可以显著增加小鼠在旷场实验中运动的总路程和中央区总路程,提高小鼠在旷场实验中的运动速度,而 PN-LD 和 PN-HD 组与模型组相比无显著差异,表明适量的 PN 可改善抑郁小鼠自主探索行为。GHOSH 等^[13]通过悬尾实验、高架十字迷宫和旷场实验评估了 PN 精油对抑郁小鼠作用,并测定了小鼠大脑的单胺水平,发现 PN 精油可以通过参与血清素能传输系统发挥抗焦虑和抗抑郁样双重作用。上述研究表明,PN 在抗抑郁样行为方面具有很大的潜力。

SLC6A4 基因编码血清素转运蛋白,负责再摄取 5-HT 到神经元中,从而调节血清素在突触间的浓度。SLC6A4 的异常表达与抑郁症、焦虑症和其他情绪障碍相关^[34]。LE-NICULESCU 等^[35]研究发现情绪障碍患者血液中 SLC6A4 表达量增加^[36]。研究也发现 CRS 小鼠皮层和海马

中 SLC6A4 mRNA 表达量显著增加,给予适量 PN 干预后 SLC6A4 mRNA 表达量下降。此外,还发现 CRS 小鼠海马中 5-HT 含量显著下降,给予 PN-MD 干预后,可显著提高小鼠海马中 5-HT 水平。表明 PN 可能通过调节血清素改善抑郁样情绪。

CHRM2 基因与神经递质 ACH 的作用相关。研究表明 CHRM2 对调节神经元兴奋性、突触可塑性以及 ACH 释放的反馈调节起着重要作用^[36-37]。在本研究中,PN 干预后虽然能够提高 CHRM2 mRNA 的表达量,但差异不显著。但是,通过检测 CRS 小鼠海马中 ACH 含量,发现 PN-HD 组可显著提高小鼠海马中 ACH 水平。研究表明胡椒碱能够通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性,增加 ACH 在突触间隙的浓度,以此来发挥神经保护作用^[38]。这与我们得到的结果相似。

PTGS2,又称 COX2,是一种在炎症反应中起重要作用的酶,参与前列腺素的合成^[39]。炎症的激活可能会诱导铁死亡,在铁死亡过程中 PTGS2 表达量会显著上升^[40]。WANG 等^[41]研究发现胡椒碱可以通过诱导铁死亡和抑制细胞内抗氧化能力抑制口腔鳞癌细胞增殖。本研究中发现给予 PN-LD 和 PN-MD 干预后 PTGS2 mRNA 表达量显著下降。然而,与对照组相比,模型组 PTGS2 mRNA 虽有升高,但无显著差异。CRS 小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平被显著降低,表明 PN 具有良好的抗炎效果。

综上所述,本文利用网络药理学和分子对接技术对 PN 中的主要成分和作用机制进行了预测分析,表明 PN 中胡椒油碱和萜萘酰胺可能是其发挥抗抑郁的主要活性成分,SLC6A4 可能是其发挥作用的主要靶点。结合动物实验可知 PN 可改善小鼠绝望情绪,增加小鼠在旷场实验中自主探索能力。此外,PN 可以上调小鼠海马组织中 5-HT 和 ACH 水平,并提高 SLC6A4 mRNA 表达量。表明 PN 可能通过调节血清素和 ACH 水平参与免疫调节,来抑制炎症反应,从而改善小鼠抑郁样行为。但由于动物与人类之间存在差异,未来仍需进一步的临床研究以验证其抗抑郁效果。

参考文献:

[1] NOWORYTA K, CIESLIK A, RYGULA R. Neuromolecular

underpinnings of negative cognitive bias in depression [J]. Cells, 2021, 10(11): 3157.

- [2] XU Y, LI R, HU C, et al. Global, regional, and national incidence trends of depressive disorder, 1990-2019: an age-period-cohort analysis based on the Global Burden of Disease 2019 study [J]. Gen Hosp Psychiatry, 2024, 88: 51-60.
- [3] KESSLER R C, BERGLUND P, DEMLER O, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R) [J]. JAMA, 2003, 289(23): 3095-3105.
- [4] MCCARRON R M, SHAPIRO B, RAWLES J, et al. Depression [J]. Ann Intern Med, 2021, 174(5): ITC65-ITC80.
- [5] KISHI T, IKUTA T, SAKUMA K, et al. Antidepressants for the treatment of adults with major depressive disorder in the maintenance phase: a systematic review and network meta-analysis [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28(1): 402-409.
- [6] ROCHETTE L, DOGON G, RIGAL E, et al. Lipid peroxidation and iron metabolism: two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 449.
- [7] DU L, WU Y, FAN Z, et al. The role of ferroptosis in nervous system disorders [J]. J Integr Neurosci, 2023, 22(1): 19.
- [8] RAHA A A, BISWAS A, HENDERSON J, et al. Interplay of ferritin accumulation and ferroportin loss in ageing brain: implication for protein aggregation in down syndrome dementia, Alzheimer's, and Parkinson's diseases [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1060.
- [9] 魏山山, 王孟迪, 姜宁, 等. 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1⁺Rb1 改善东莨菪碱致小鼠认知障碍的作用比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 94-101.
- WEI S S, WANG M D, JIANG N, et al. Comparison of the effects among ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg¹⁺Rb1 on scopolamine-induced cognitive impairment in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 94-101.
- [10] XU Y, KU B S, YAO H Y, et al. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 518(1): 40-46.
- [11] 黄红, 姜宁, 张亦文, 等. 鲜天麻对慢性束缚应激诱导小鼠学习记忆损伤的改善作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 653-654.
- HUANG H, JIANG N, ZHANG Y W, et al. Effect of fresh *Gastrodia elata* on learning and memory impairment induced by chronic restraint stress in mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(9): 653-654.
- [12] GUTIERREZ R M P, GONZALEZ A M N, HOYO-VADILLO C. Alkaloids from *Piper*: a review of its phytochemistry and pharmacology [J]. Mini Rev Med

- Chem, 2013, 13(2): 163-193.
- [13] GHOSH S, KUMAR A, SACHAN N, et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of essential oil from the fruits of *Piper nigrum* Linn. (Black pepper) in mice: involvement of serotonergic but not GABAergic transmission system [J]. Heliyon, 2021, 7(4): e06884.
- [14] MAIA M A, JURCEVIC J D, MALHEIROS A, et al. Neuropharmacology potential of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Piper cernuum*: anxiolytic, hypnotic, and antidepressant-like effects [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2023, 2023: 1183809.
- [15] LU H, GONG H, DU J, et al. Piperine ameliorates psoriatic skin inflammation by inhibiting the phosphorylation of STAT3 [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119: 110221.
- [16] MAO K, LEI D, ZHANG H, et al. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(2): 695-700.
- [17] 张北月, 卢聪, 董黎明, 等. 不同长时间的束缚应激致雌雄大鼠的抑郁样行为改变 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 18-23.
- ZHANG B Y, LU C, DONG L M, et al. Depressive-like behavior of male and female rats induced by restraint stress with different restraint duration [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(11): 18-23.
- [18] 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.
- [19] EMON N U, ALAM S, RUDRA S, et al. Antidepressant, anxiolytic, antipyretic, and thrombolytic profiling of methanol extract of the aerial part of *Piper nigrum*: *In vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(2): 833-846.
- [20] 刘雨培, 张瑛毓, 范蓓, 等. 黄精多糖对模拟航天狭小空间诱导认知功能损伤的改善作用及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 494-503.
- LIU Y P, ZHANG Y Y, FAN B, et al. Protective effect and mechanism of action of *Polygonati rhizoma* polysaccharide on the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 494-503.
- [21] SHEN F, XIE P, LI C, et al. Polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneema* Hua reduce depression-like behavior in mice by inhibiting oxidative stress-calpain-1-NLRP3 signaling axis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2566917.
- [22] 姜宁, 姚彩虹, 叶帆, 等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 698-704.
- JIANG N, YAO C H, YE F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 698-704.
- [23] CRYAN J F, MOMBEBEAU C, VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29(4/5): 571-625.
- [24] CHO I S, RYU H S, KIM J R, et al. Sintering behavior and microwave dielectric properties of tricalcium phosphate polymorphs [J]. Jpn J Appl Phys, 2007, 46(5R): 2999.
- [25] 练东银, 陈颖, 李晗, 等. 八角枫提取物的神经毒性及对脑组织神经递质的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 6003-6007.
- LIAN D Y, CHEN Y, LI H, et al. Neurotoxicity of *Alangium chinense* and its effect on neurotransmitters in brain tissue [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(12): 6003-6007.
- [26] 许梦丽, 朱悦, 李乐军. 近三年抑郁症的中医研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(8): 1608-1613.
- XU M L, ZHU Y, LI L J. Research progress of traditional Chinese medicine on depression in recent 3 years [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2024, 36(8): 1608-1613.
- [27] ZHANG G, LV S, ZHONG X, et al. Ferroptosis: a new antidepressant pharmacological mechanism [J]. Front Pharmacol, 2024, 14: 1339057.
- [28] WANG L, XU R, HUANG C, et al. Targeting the ferroptosis crosstalk: novel alternative strategies for the treatment of major depressive disorder [J]. Gen Psychiatr, 2023, 36(5): e101072.
- [29] WANG X, LI S, YU J, et al. Saikosaponin B2 ameliorates depression-induced microglia activation by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation and ER stress [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 316: 116729.
- [30] ZHOU Y, HUANG Y, YE W, et al. Cynaroside improved depressive-like behavior in CUMS mice by suppressing microglial inflammation and ferroptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 173: 116425.
- [31] LV S, ZHANG G, HUANG Y, et al. Adult hippocampal neurogenesis: pharmacological mechanisms of antidepressant active ingredients in traditional Chinese medicine [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1307746.