

UHPLC-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证 探讨左金丸治疗抑郁症作用机制

戴国梁, 杭华茜, 陈佩瑶, 洪盛威, 许美娟, 马程遥, 黄茜, 叶峪,
于美双, 居文政*

(南京中医药大学附属医院 临床药理科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 基于入血成分、网络药理学与实验验证研究策略, 探讨左金丸治疗抑郁症的作用机制。采用 UHPLC-TOF-MS 对左金丸含药血清进行定性分析。采用 PharmMapper、GeneCards 等数据库获取入血成分及疾病相关靶点, 取交集后构建蛋白互作 (PPI) 网络, 筛选核心靶点并进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“化合物-靶点-通路”网络, 预测左金丸抗抑郁的作用靶点与信号通路, 并构建 CUMS 抑郁模型小鼠对关键靶点进行验证。结果显示, 共鉴定左金丸入血成分 21 个, 主要为生物碱类化合物。化合物-疾病共有靶点 155 个, PPI 网络分析筛选出核心靶点 67 个。KEGG 富集与 PPI 网络分析发现, 左金丸可能通过 AMPK/SIRT1、NLRP3、insulin 等靶点与通路发挥抗抑郁作用。动物实验结果表明, 左金丸可显著改善 CUMS 抑郁模型小鼠的抑郁样行为, 显著降低海马区和血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平, 激活 AMPK/SIRT1 信号, 并降低 NLRP3 的蛋白表达水平。综上可得, 左金丸可能主要通过激活小鼠海马区 AMPK/SIRT1 信号通路, 抑制 NLRP3 激活及神经炎症, 从而发挥抗抑郁作用。

[关键词] 左金丸; 抑郁症; 网络药理学; UHPLC-TOF-MS; 小鼠

Anti-depression mechanism of Zuojin Pills: based on UHPLC-TOF-MS , network pharmacology , and experimental verification

DAI Guo-liang , HANG Hua-xi , CHEN Pei-yao , HONG Sheng-wei , XU Mei-juan , MA Cheng-yao , HUANG Qian ,
YE Yu , YU Mei-shuang , JU Wen-zheng*

(Department of Clinical Pharmacology , Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine , Nanjing 210029 , China)

[Abstract] This study aims to explore the anti-depression mechanism of Zuojin Pills based on the plasma constituents , network pharmacology , and experimental verification. UHPLC-TOF-MS was used for qualitative analysis of Zuojin Pills-containing serum. Targets of the plasma constituents and the disease were retrieved from PharmMapper and GeneCards. Then the protein-protein interaction (PPI) network was constructed and core targets were screened for GO term enrichment and KEGG pathway enrichment. Cytoscape 3.7.2 was employed construct the "compound-target-pathway" network and the targets and signaling pathways of Zuojin Pills against depression were predicted. CUMS-induced depression mouse model was established to verify the key targets. The results showed that a total of 21 constituents migrating to blood of Zuojin Pills were identified , which were mainly alkaloids. A total of 155 common targets of the constituents and the disease and 67 core targets were screened out. KEGG enrichment and PPI network analysis showed that Zuojin Pills may play a role in the treatment of depression through AMPK/SIRT1 , NLRP3 , insulin and other targets and pathways. Furthermore , the results of animal experiments showed that Zuojin Pills could significantly improve the depression behaviors of depression , reduce the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampus and serum , activate AMPK/SIRT1 signaling , and reduce the protein expression of

[收稿日期] 2022-10-10

[基金项目] 江苏省中医药科技发展计划面上项目(MS2021011); 江苏省基础研究计划面上项目(BK20211394 , BK20221425); 江苏省中医药领军人才项目(SLJ0208)

[通信作者] * 居文政, 教授, 博士生导师, 主要从事中药抗抑郁研究, E-mail: juwz333@hotmail.com

[作者简介] 戴国梁, 助理研究员, E-mail: daiguoliang2@qq.com

NLRP3. In conclusion, Zuojin Pills may play a role in the treatment of depression by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway, and inhibiting NLRP3 activation and neuroinflammation in the hippocampus of mice.

[Key words] Zuojin Pills; depression; network pharmacology; UHPLC-TOF-MS; mice

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20221102.706

抑郁症是以情绪低落为核心症状的精神障碍,具有高患病率、高疾病负担、高致残率等特点。2019 年,中国精神卫生调查发现,我国抑郁症的 12 个月患病率为 3.6%,终生患病率为 6.8%,是全球抑郁症疾病负担较重的国家之一^[1]。世界卫生组织(WHO)预测,到 2030 年,抑郁症将会成为全球疾病负担首位因素^[2]。目前抑郁症主要通过药物治疗,临床上常用抗抑郁药多为三环类抗抑郁药、五羟色胺再摄取抑制剂以及去甲肾上腺素再摄取抑制剂。鉴于对抑郁症病理机制认识的局限性,上述药物均存在疗效有限(有效率不高,完全缓解率<40%)、起效慢、不良反应严重等缺点^[3]。因此,开发新型高效低毒的抗抑郁药物具有重要的临床价值和社会意义。

中医已被 WHO 纳入《第 11 版国际疾病分类规则》,并作为治疗指导意见。中医学中没有确切的有关“抑郁症”的病名,但根据抑郁症临床症状特点,可将其归属于“郁证”“脏躁”“百合病”等病证范畴。中医药的整体观、多成分及多靶点特性与系统药物治疗复杂疾病(如抑郁症)的治疗理念非常吻合。左金丸是《丹溪心法》中的经典名方,其方药精良,配伍特殊,由黄连、吴茱萸按 6:1 配比组成。黄连苦寒,清心泻肝,吴茱萸辛热,引热下行,二药一主一辅,一寒一热,相反相成。现代药理学研究表明,左金丸并非局限于古方“泻肝火”之功效,其具有抗溃疡、抗肿瘤、抗抑郁、抗炎、镇痛等药理活性^[4-6]。虽然左金丸临床常用于治疗抑郁症^[7],但其作用机制尚未明确,值得深入研究。

本研究采用 UHPLC-TOF-MS 结合网络药理学的策略探讨左金丸抗抑郁的潜在药效机制,并建立慢性不可预知温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)抑郁小鼠模型,采用小鼠行为学实验、Western blot 等技术对左金丸抗抑郁的作用及关键靶点进行验证,旨在阐明左金丸抗抑郁的作用机制,为其临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Triple TOF™ 5600 高分辨质谱仪(美国 SCIEX

公司),配有 CDS 质谱自动校准系统及 PeakView 2.2 数据处理软件;Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);EG1150 石蜡包埋机(德国徕卡公司);RM2245 石蜡切片机(德国徕卡公司);ZH-O FT 小鼠旷场实验箱(安徽正华生物仪器设备有限公司);FD000011 小鼠悬尾实验箱(广州飞迪科技生物有限公司);DB009 小鼠游泳实验箱(北京智鼠多宝生物科技有限责任公司);SuperMaze 动物行为分析系统(上海欣软信息科技有限公司);Synergy LX 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);PowerPac™ Basic 基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);5300 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);MS105 电子天平(美国梅特勒-托利多公司);5810R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 药物与试剂

左金丸(批号 20220602,湖北香连药业有限责任公司);阳性对照药氟西汀(批号 D1823052,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0011,上海碧云天生物技术有限公司);AMPK、p-AMPK、SIRT1、NLRP3、 β -actin 抗体(货号 5831、2537、8469、15101、4970,美国 CST 公司);小鼠血清及组织白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(货号 70-EK201B、70-EK206、70-EK282,联科生物科技技术股份有限公司);对照品木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、非洲防己碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、小檗红碱、柠檬苦素(货号 B20882、B21451、B21438、B21433、B21449、B20391、B21315、B21314、B21377、B20911,上海源叶生物科技有限公司);色谱纯甲醇、乙腈、甲酸(德国 Merck 公司);水为超纯水。

1.3 动物

60 只 6 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20~24 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0006,饲养于南通大学实验

动物中心。本实验经南通大学实验动物伦理委员会审查通过,批号 S20220701-903。

2 方法

2.1 左金丸入血成分分析

2.1.1 UHPLC-TOF-MS 分析条件 色谱条件如下:色谱柱为 Agilent SB C₁₈(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相为 A(0.1%甲酸溶液)-B(甲醇-乙腈 1:1)梯度洗脱,具体洗脱程序见表 1;流速 500~600 μL·min⁻¹;柱温 40℃;进样量 5 μL;进样室温度 4℃。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流速/μL·min ⁻¹	A/%	B/%
0	500	90	10
3.5	500	85	15
5.0	500	70	30
9.0	500	65	35
11.0	500	50	50
12.0	500	40	60
14.0	500	30	70
19.0	500	10	90
24.0	600	10	90
24.5	600	90	10
30.0	600	90	10

质谱条件如下:离子源为电喷雾离子源(ESI);母离子扫描范围为 m/z 100~1 200;累积时间 0.15 s;离子化温度(TEM) 550℃;雾化气(Gas1, GS1) 50 psi(1 psi≈6.895 kPa);辅助加热气(Gas2, GS2) 60 psi;气帘气(CUR) 20 psi;去簇电压(DP) 90 V;碰撞能量(CE) 5 eV;正、负离子模式下喷雾电压(ISVF)分别为 5 500、-4 500 V。采用信息依赖型采集(IDA)、动态背景扣除(DBS)和高灵敏度的模式采集数据。子离子扫描模式的参数设置:扫描范围为 m/z 50~1 200;碰撞能量(30±20) eV;其他主要参数同母离子扫描模式。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取对照品木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、非洲防己碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、小檗红碱及柠檬苦素适量,分别使用 50%甲醇溶解并制成 1 mg·mL⁻¹的对照品储备液。分别精密吸取上述储备液适量,涡旋混匀,加入 50%甲醇配制成各化合物终浓度为 1 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 血清样本前处理 分别取空白血清或左金丸含药血清样品 100 μL(具体制备方法见 2.3.3

项),加入甲醇 500 μL,涡旋振荡 3 min,4℃条件下 12 000 r·min⁻¹离心 10 min。吸取上清液,35℃条件下氮气吹干,100 μL 50%甲醇复溶,涡旋振荡 3 min,4℃条件下 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液 50 μL 进样分析。

2.1.4 左金丸化学成分数据库的建立及鉴定 通过中药系统药理学数据库分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)及相关文献收集左金丸中黄连与吴茱萸所含化合物,获得各化合物的名称、分子式及精确相对分子质量等信息,建立左金丸的化学成分数据库。同时,通过 PubChem、ChemSpider 等数据库下载上述化合物的 mol 文件,计算其常见离子形态及精确质荷比。进一步借助 PeakView 2.2 软件,导入获取的原始质谱数据,对色谱峰进行提取、匹配及鉴别,提取各色谱峰的二级碎片,并与 mol 文件或对照品的二级碎片进行比对、确认。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 左金丸入血成分靶点与抑郁症疾病相关靶点筛选 将左金丸入血成分导入 SwissTargetPrediction 与 PharmMapper 数据库搜索作用靶点,合并去重后作为左金丸入血成分的作用靶点。此外,分别在 GeneCards 数据库与 DisGeNET 数据库中输入“depression”“depressive disorder”等检索词查找疾病相关作用靶点。以 relevance score ≥ 5 (GeneCards) 或 GDA score ≥ 0.6 (DisGeNET) 为筛选条件,删除重复靶点,得到抑郁症高相关性疾病靶点。

2.2.2 蛋白相互作用(PPI)网络构建与分析 将左金丸入血成分靶点与抑郁症疾病相关靶点合并取交集,将获得的交集靶点导入 STRING 数据库,选择物种为 *Homo sapiens*,设置 minimum required interaction score 为 medium confidence (0.400),将 PPI 网络结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行网络分析,运用其中的插件“Network Analyzer”分析拓扑参数,以节点度值(degree)为指标,筛选出左金丸抗抑郁的关键靶点。

2.2.3 Gene Ontology(GO)功能分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)通路富集分析 将关键靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,获取关键靶点的生物学信息,并分析左金丸治疗抑郁症的潜在作用机制。

2.2.4 “化合物-靶点-通路”网络的构建 采用 Cytoscape 3.7.2 关联化合物、关键靶点以及富集通路,

构建“化合物-靶点-通路”网络,其中长方形代表化合物,三角形代表靶点,菱形代表通路。

2.3 动物实验验证

2.3.1 造模、分组与给药 60 只小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药氟西汀组($\text{Flu } 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、左金丸低剂量组($\text{ZJP-L } 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及左金丸高剂量组($\text{ZJP-H } 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 12 只。除对照组外,其余 4 组小鼠进行 CUMS 造模。刺激条件包括:①饲养笼倾斜 45 度 12 h;②禁食 24 h;③禁水 24 h;④足底电击 3 次;⑤束缚 2 h;⑥夹尾 1 min;⑦强迫游泳 10 min;⑧夜间照明 12 h。刺激的方法为:随机选取 8 种条件中的 4 种对小鼠进行刺激,每天 1 次,持续 3 周,各组小鼠同 1 d 内接受的刺激相同。模型复制后,对照组与模型组小鼠按体质量每 10 g 灌胃 0.1 mL 生理盐水,其余各组小鼠灌胃相应药物,每日 1 次,持续 2 周。

2.3.2 小鼠行为学检测 根据课题组前期已建立的检测方法^[8],分别对每组小鼠进行糖水偏好实验、旷场实验、悬尾实验以及强迫游泳实验。

2.3.3 动物取材及样本处理 末次给药 1 h 后,各组小鼠进行眼眶取血,置于血清管中,离心后将血清置于 -80°C 冰箱保存。尔后小鼠颈椎脱臼处死,冰上快速分离海马组织,液氮速冻后存储于 -80°C 冰箱备用。

分别吸取对照组或左金丸高剂量组中各小鼠血清样本 20 μL ,将上述同组血清样本合并,用于左金丸含药血清的质谱定性分析。

2.3.4 ELISA 检测小鼠海马及血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平 -80°C 冰箱中取出小鼠海马组织和血清,海马组织匀浆后离心收集上清液,小鼠血清和海马组织上清液中的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平的检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测相关蛋白表达 -80°C 冰箱中取出各组小鼠的海马组织,全程于冰上操作,提取小鼠海马组织总蛋白并测定蛋白浓度。制备蛋白印迹实验样品和 SDS-PAGE 凝胶,各孔加样量为 50 μg 。电泳分离蛋白后,进行转膜操作。使用稀释后的 AMPK、p-AMPK、SIRT1、NL-RP3 及 β -actin(1:1 000)抗体在 4°C 孵育 PVDF 膜过夜。清洗后,使用稀释后的 HRP-山羊抗兔 IgG(1:10 000)孵育 PVDF 膜 2 h。再次清洗后,使用凝胶成像系统对蛋白印迹进行显影,存储图片。

2.4 统计分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析,所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间均数差异性比较采用 t 检验,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 左金丸入血成分识别

在正、负离子模式下,从左金丸含药血清中共鉴定出 21 个化学成分,主要为生物碱类化合物,其中大多数化合物在正离子模式下具有较好的质谱响应。左金丸含药血清的总离子流色谱图(TIC)见图 1。此外,左金丸入血成分鉴定结果见表 2。

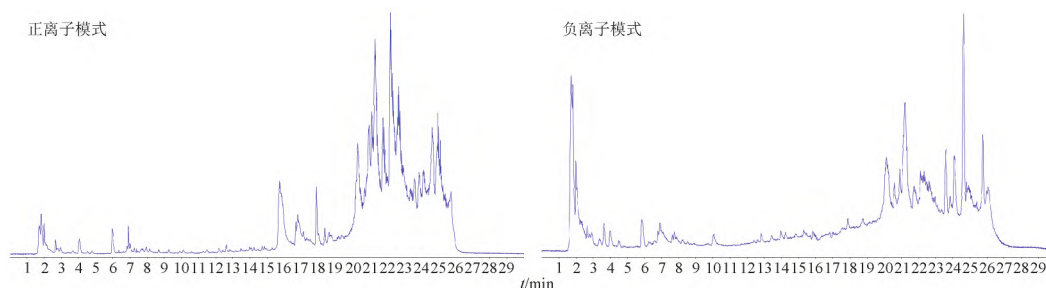


图 1 左金丸含药血清的总离子流图

Fig.1 TIC chromatograms of Zuojin Pills medicated serum

3.2 左金丸入血成分靶点与疾病靶点分析

通过 SwissTargetPredicton 与 PharmMapper 数据库检索并合并 21 个左金丸入血成分的作用靶点,共得到作用靶点 771 个。同时,通过 GeneCards 与 Dis-

GeNET 数据库检索抑郁症相关靶点,共得到相关靶点 1 731 个。将抑郁症相关靶点与左金丸入血成分作用靶点导入 Venny 2.1.0 软件,获得共有靶点 155 个,见图 2。

表 2 左金丸入血成分的信息

Table 2 Information of Zuojin Pills' constituents migrating to blood

No.	t_R /min	化合物	分子式	离子化模式	主要二级碎片离子
1	2.06	citric acid	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.018 9, 173.008 6, 111.008 4, 87.009 5, 85.030 4, 67.019 5
2	4.4	danshensu	$C_9H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	197.043 6, 179.036 9, 152.892 8, 135.046 0, 123.044 5, 72.993 0
3	7.24	magnoflorine ¹⁾	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	M^+	342.170 8, 297.112 2, 282.085 5, 265.085 2, 237.089 9, 222.067 1
4	9.32	berberrubine ¹⁾	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	M^+	322.106 3, 307.084 1, 279.087 7, 278.081 4, 250.086 6
5	9.64	ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M+H]^+$	177.053 7, 145.028 6, 89.039 0
6	11.12	coptisine ¹⁾	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	M^+	320.091 6, 318.076 3, 292.096 4, 277.074 3, 262.086 3
7	11.16	columbamine ¹⁾	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	M^+	338.138 0, 322.109 0, 307.084 4, 294.112 8, 279.089 4, 265.073 2
8	11.43	hydroxyevodiamine	$C_{19}H_{17}N_3O_2$	$[M+H]^+$	320.139 6, 302.128 5, 287.102 9, 286.097 2, 144.081 5, 115.055 5
9	11.44	jatrorrhizine ¹⁾	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	M^+	338.138 6, 323.114 1, 322.107 7, 308.090 8, 307.084 4, 279.090 0
10	12.58	palmatine ¹⁾	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	M^+	352.155 8, 337.130 7, 336.122 9, 322.106 1, 308.128 5, 294.113 1
11	12.62	berberine ¹⁾	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	M^+	336.123 7, 321.100 2, 320.092 0, 304.097 0, 292.097 1, 278.080 5
12	12.98	chrysophanic acid	$C_{15}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	253.049 6, 224.046 7, 223.036 5, 208.059 7, 197.058 7, 135.008 2
13	13.59	limonexic acid	$C_{26}H_{30}O_{10}$	$[M+HCOOH-H]^-$	547.187 4, 501.177 4
14	15.2	limonin ¹⁾	$C_{26}H_{30}O_8$	$[M+H]^+$	471.199 8, 425.196 5
15	15.84	rutaevin 7-acetate	$C_{28}H_{32}O_{10}$	$[M-H]^-$	527.188 8, 485.173 5, 467.171 4, 465.186 6, 407.150 1, 397.163 9
16	16.88	evodiamine ¹⁾	$C_{19}H_{17}N_3O$	$[M+H]^+$	304.143 9, 171.091 9, 161.070 9, 144.081 0, 134.060 1, 106.066 1
17	16.97	secoisolariciresinol	$C_{20}H_{26}O_6$	$[M-H]^-$	361.160 2, 236.103 7, 223.033 8, 221.153 1, 220.152 8
18	17.63	rutaecarpine ¹⁾	$C_{18}H_{13}N_3O$	$[M+H]^+$	288.115 1, 273.088 1, 271.082 4, 260.119 2, 247.092 5, 142.052 5
19	18.22	caulophyllogenin	$C_{30}H_{48}O_5$	$[M-H]^-$	487.341 2, 283.263 8
20	20.84	β -sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	$[M+Na]^+$	437.374 3, 420.353 2, 402.336 8, 385.310 4, 384.326 4
21	23.49	evocarpine	$C_{23}H_{33}NO$	$[M+H]^+$	340.263 2, 200.107 5, 187.099 5, 186.092 2, 173.084 5, 158.061 0

注: ¹⁾ 该化合物经对照品比对、鉴定。

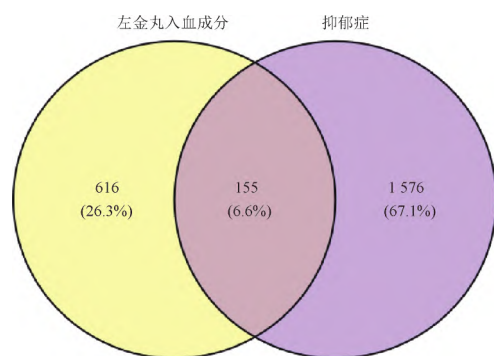


图 2 活性成分靶点与抑郁疾病靶点维恩图

Fig.2 Venn diagram of active constituents and depression-related targets

3.3 PPI 网络构建与分析

将筛选出的 155 个共有靶点导入 STRING 数据库,利用 Cytoscape 3.7.2 软件设置节点的大小、颜色随 degree 大小变化,构建 PPI 网络图,见图 3。筛选出 degree 大于平均数的靶点作为核心靶点,共计 67 个。上述 67 个靶点可作为左金丸抗抑郁的关键靶点,其中节点颜色越深代表 degree 越大。

3.4 GO 与 KEGG 分析

利用 DAVID 平台对上述关键靶点进行 GO 和

KEGG 富集分析。将 $P < 0.05$ 设定为显著性富集的阈值,进行 GO 分析,其中 GO 分析包含 3 个子项,分别为生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)与分子功能(molecular function)。上述 67 个关键靶点共计涉及 4 816 个生物学过程,399 个细胞组分及 620 个分子功能。主要的 GO 二级注释见图 4A,在生物学过程层面,上述关键靶点主要参与细胞增殖、细胞黏附等;在细胞组分层面,上述关键靶点主要定位于细胞膜、突触等;分子功能分析显示,上述关键靶点主要涉及催化活性、抗氧化活性等。此外,利用 DAVID 平台对上述关键靶点进行 KEGG 通路注释,共富集到 237 条 KEGG 通路,排名前 15 的 KEGG 通路见图 4B,其中主要涉及 AMPK、calcium、insulin 等信号通路。

3.5 “化合物-靶点-通路”网络的构建

借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建“化合物-靶点-通路”网络图,见图 5。21 个左金丸入血成分均参与网络调控,其中 AMPK、insulin、calcium 等信号通路可能参与左金丸抗抑郁的过程。该实验结果体现了中药复方通过“多成分-多靶点-多途径”治疗疾病的特点。

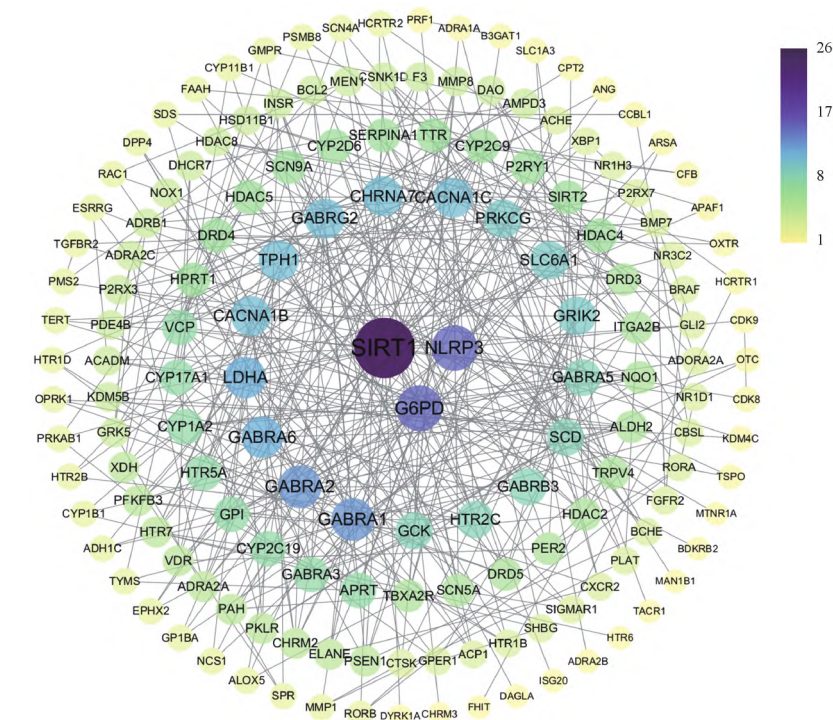


图 3 交集靶点 PPI 网络
Fig.3 PPI network of common targets

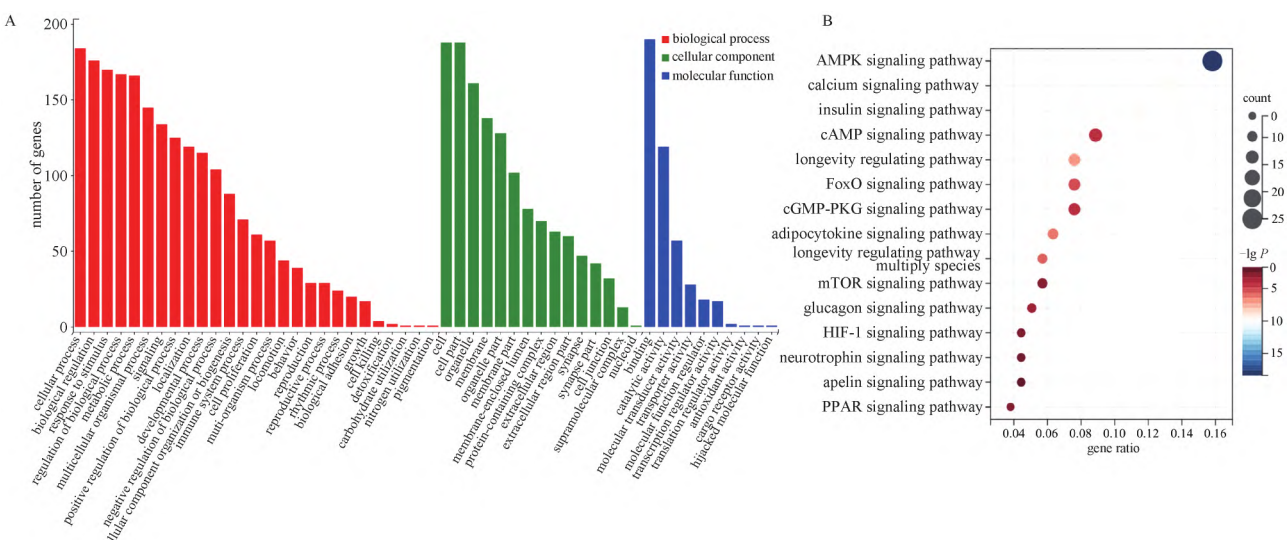


图 4 GO 富集分析 (A) 与 KEGG 通路富集分析 (B)
Fig.4 Enrichment analysis of GO terms (A) and KEGG pathway (B)

3.6 动物实验验证
3.6.1 左金丸对 CUMS 抑郁模型小鼠行为学的影响 与对照组相比 ,CUMS 抑郁模型小鼠的糖水偏好率、旷场实验中的运动距离及进入中心的次数均显著下降 ,悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间

显著增加 ,提示模型小鼠具有显著的抑郁样症状;与模型组相比 给予氟西汀或左金丸不同剂量干预后 ,模型小鼠的糖水偏好率、运动距离及进入中心的次数均显著增加 ,悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间显著降低 ,见图 6。

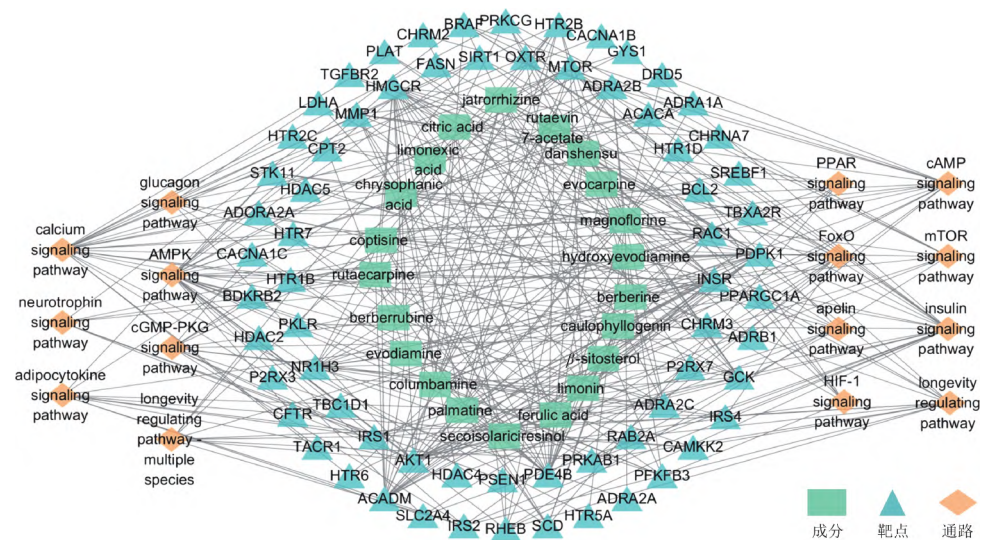
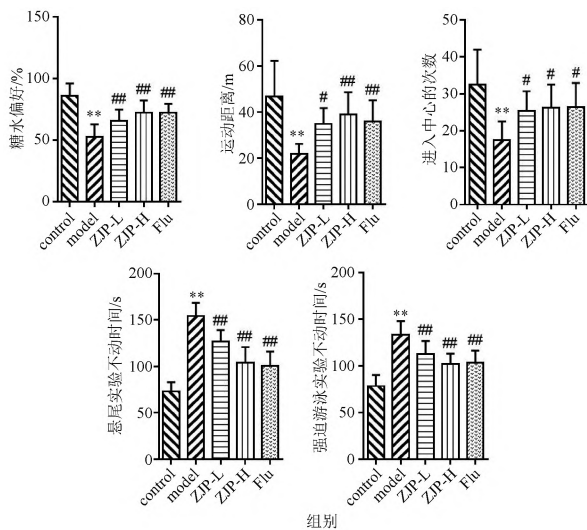


图5 “化合物-靶点-通路”网络

Fig.5 "Compounds-targets-pathway" network

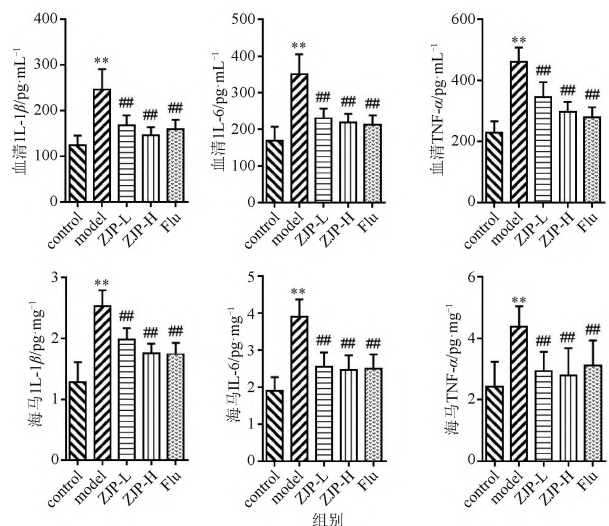


control. 对照组; model. 模型组; ZJP-L. 左金丸低剂量组 ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); ZJP-H. 左金丸高剂量组 ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); Flu. 阳性药氟西汀组 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 与对照组相比 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组相比 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ (图 7、8 同)。

图6 左金丸对抑郁模型小鼠抑郁样行为的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Fig.6 Effect of Zuojin Pills on depression behaviors of depression mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.6.2 左金丸对 CUMS 抑郁模型小鼠海马和血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平的影响 ELISA 结果显示 与对照组相比, CUMS 抑郁模型小鼠的海马和血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的水平显著增加; 与模型组相比 给予氟西汀或左金丸不同剂量干预后 模型

小鼠海马和血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的水平显著降低, 见图 7。上述结果提示 左金丸具有良好的抑制抑郁模型小鼠神经炎症的作用。

图7 左金丸对抑郁模型小鼠血清和海马中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Fig.7 Effect of Zuojin Pills on levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum and hippocampus of depression mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.6.3 左金丸对抑郁模型小鼠海马区 AMPK、SIRT1 及 NLRP3 蛋白的影响 根据 KEGG 通路和疾病相关核心蛋白结果, 选择与抑郁症相关的 AMPK/SIRT1 信号通路及 NLRP3 蛋白进行验证。与对照组相比, CUMS 抑郁模型小鼠海马区

p-AMPK/AMPK 与 SIRT1 的蛋白表达水平显著降低, NLRP3 的蛋白表达水平显著增加; 与模型组相比, 给予左金丸不同剂量干预后, 模型小鼠海马区 p-AMPK/AMPK 与 SIRT1 的蛋白表达水平显著提高, NLRP3 的蛋白表达水平显著降低, 见图 8, 结果提示, 左金丸发挥抗抑郁作用可能与激活 AMPK/SIRT1 信号通路, 抑制 NLRP3 蛋白表达有关。

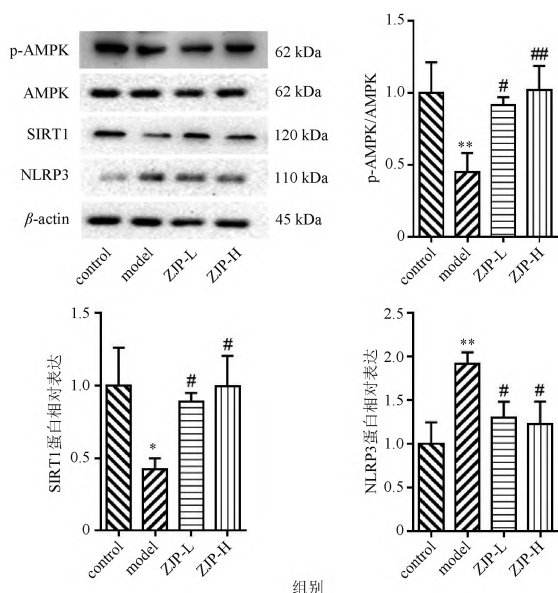


图 8 左金丸对抑郁模型小鼠海马区 AMPK/SIRT1 信号通路及 NLRP3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.8 Effect of Zuojin Pills on AMPK/SIRT1 signaling pathway and NLRP3 protein expression in hippocampus of depression mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要临床特征的精神疾病, 可伴有思维迟钝、兴趣丧失、睡眠障碍、身体疼痛, 严重者可出现自杀倾向。目前临床上常用的抗抑郁药物副作用相对较大, 需要定期监测, 且容易诱发强烈的戒断症状^[9]。中医药在改善抑郁症症状方面具有独特的治疗经验与优势, 是开发疗效好、副作用小、药物依赖性低的抗抑郁药的有效途径, 但同时存在药物作用机制及药效物质基础不明确等问题。近年来, 随着网络药理学的兴起, 其整体性、系统性的特点与中医药整体观、辨证论治原则相一致^[10-11], 目前已被广泛应用于中药及中药复方的研究。网络药理学强调从系统层次和生物网络的整体角度出发, 解析药物与治疗疾病之间

的分子关联规律, 该研究方法为发现中药活性成分、阐明中药作用机制、解析方剂配伍规律等方面提供了新思路。

本研究采用 UHPLC-TOF-MS 技术对左金丸含药血清进行定性分析, 结果共鉴定出 21 个入血成分, 主要为生物碱类化合物, 其余为三萜类、酚酸类等成分。大量研究表明, 生物碱类成分是左金丸中的主要活性成分, 具有显著的抗炎、抗病毒、抑菌、抗肿瘤等药理活性^[6]。小檗碱亦称黄连素, 是黄连中最具代表性也是含量最高的生物碱。越来越多的研究证据表明, 小檗碱对不同抑郁模型动物表现出良好的抗抑郁作用, 其作用机制被认为与调节大脑内单胺类成分及代谢、调节肠道菌群、抗炎、抗氧化等方面有关^[12]。吴茱萸次碱是吴茱萸中的一种主要活性成分, 研究显示吴茱萸次碱具有一定的抗抑郁效果, 其机制可能与提高大鼠海马单胺神经递质水平、提高 BDNF 的表达有关^[13]。此外, 木兰花碱、阿魏酸、丹参素及 β -谷甾醇等入血成分均具有较好的抗抑郁活性^[14-17]。上述结果表明, 左金丸含药血清中鉴定出的大多数成分均具有较好的抗抑郁作用。

抑郁症的病理机制尚未明确, 现代研究认为与炎症、单胺类神经递质、下丘脑-垂体-肾上腺轴、神经营养因子等有关, 其中炎症反应与其他病理机制之间均存在相关性^[18]。一方面, 体内较高水平的炎症反应是抑郁症的高危因素^[19]; 另一方面, 炎症因子也与抑郁症直接相关, 临床试验表明, 健康志愿者注入脂多糖可以诱发明显的抑郁症状^[20], 该结果与动物实验相一致^[21]。同时, 大量临床研究发现, 抑郁症患者外周血和脑脊液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子水平显著升高^[22]。并且, 抑郁症的临床症状缓解常伴随炎症标志物恢复正常^[23], 而临床症状缓解不佳的患者与其炎症标志物水平持续升高有关^[24]。上述结果提示, 炎症是抑郁症发生、发展过程中的关键病理因素。

NLRP3 炎症小体是由含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3 (NLRP3)、凋亡相关微粒蛋白 (ASC) 及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (caspase-1) 组成的多蛋白复合物, 主要表达于巨噬细胞、小胶质细胞等免疫细胞。NLRP3 炎症小体过度激活可以活化 caspase-1, 从而持续地将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18, 导致过量的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 生成, 进而激活下游信号转导通路,

引发一系列“炎症瀑布”反应,导致抑郁症的发生^[25]。研究表明,CUMS 抑郁模型大鼠海马小胶质细胞中 NLRP3 炎症小体被激活^[26]。本研究结果显示,左金丸可显著降低抑郁模型小鼠海马和血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平,同时抑制海马区 NLRP3 的蛋白表达水平。上述结果提示,左金丸抗抑郁作用可能与抑制 NLRP3 激活及神经炎症有关。

SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶,在海马、丘脑、小脑和大脑皮层中广泛表达^[27],通过脱乙酰化作用于众多转录因子,维持大脑正常的生理功能并与抑郁症等精神疾病关系密切。2015 年,中国-牛津-弗吉尼亚联邦大学-实验性基因流行病学研究团队完成了对 5 303 例中国汉族女性重度抑郁症患者及 5 337 名健康志愿者的 DNA 序列分析,结果发现了 2 个与抑郁症相关的突变位点,SIRT1 基因位点就是其中之一^[28]。上述临床研究结果显示,抑郁症的发病与 SIRT1 基因的表达密切相关。同时,前期研究表明,SIRT1 在 CUMS 抑郁模型小鼠海马区低表达^[8]。此外,AMPK 为 AMP 依赖的蛋白激酶,具有维持细胞稳态和能量平衡的作用。活化后的 AMPK 可以参与多种生物学过程,如细胞生长、增殖、凋亡等,在神经退行性疾病的治疗中发挥作用^[29]。AMPK 可作为 SIRT1 激活剂上调 SIRT1 的表达,而 SIRT1 则通过调节下游分子的乙酰化状态发挥抗炎作用。SIRT1 发挥抗炎作用的具体分子机制尚不明确,可能与 NLRP3、NF- κ B 及组蛋白等相关^[21,30],然而目前未见通过 AMPK/SIRT1 信号通路调控 NLRP3 及神经炎症发挥抗抑郁作用的相关报道。本研究结果表明,左金丸可显著激活抑郁模型小鼠海马区 AMPK/SIRT1 信号,上述结果提示,左金丸抗抑郁作用可能与其激活海马区 AMPK/SIRT1 信号通路,抑制 NLRP3 激活及神经炎症有关。

综上所述,本研究通过 UHPLC-TOF-MS 与网络药理学技术,探讨了左金丸入血成分、靶点、通路之间相互作用的关系,发现左金丸通过多成分、多靶点、多通路发挥抗抑郁作用,同时结合动物实验进一步验证上述预测结果,发现左金丸可能主要通过激活抑郁模型小鼠海马区 AMPK/SIRT1 信号通路,抑制 NLRP3 激活及神经炎症,从而发挥抗抑郁作用。本研究将为左金丸临床治疗抑郁症提供理论依据,同时为其新药开发提供参考借鉴。

[参考文献]

- [1] HUANG Y Q, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiat*, 2019, 6(3): 211.
- [2] MIRET M, AYUSO-MATEOS J L, SANCHEZ-MORENO J, et al. Depressive disorders and suicide: epidemiology, risk factors, and burden [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37(10 Pt 1): 2372.
- [3] COCCARO E F. New hope for patients with major depressive disorder? [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(10): 980.
- [4] 李艳英, 黄能听, 韩馥蔓, 等. 左金丸的古代文献分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12): 39.
- [5] 王强松, 崔元璐, 丁世兰. 左金丸提取物的抗炎和抗抑郁机制研究 [C]. 烟台: 2011 年中国药学会大会暨第 11 届中国药师周, 2011.
- [6] 管慧莹, 徐蔚杰, 李和根. 左金丸现代药理研究进展 [J]. *中医药学报*, 2020, 48(5): 78.
- [7] 周佩琳. 左金丸治疗非糜烂性反流病肝胃郁热证的临床观察及脑肠轴机制初探 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [8] 戴国梁, 杨欣怡, 陈闪闪, 等. 基于脑内海马区 Sirt1 表达的变化研究交泰丸对 CUMS 抑郁模型小鼠的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(24): 6511.
- [9] RUBERTO V L, JHA M K, MURROUGH J W. Pharmacological treatments for patients with treatment-resistant depression [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(6): 116.
- [10] 丁瑾, 郑攀, 孙营营, 等. 乌梅丸“异病同治”慢性消化系统疾病网络药理学及分子对接研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(15): 4164.
- [11] 邹翔, 隋洋, 唐锡玉, 等. UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学探讨南柴胡-赤芍药对抗肝癌作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13): 3597.
- [12] 孙亚南, 刘敏, 王琪, 等. 小檗碱抗抑郁的研究进展 [J]. *药学报*, 2018, 53(12): 2006.
- [13] 袁志坚, 吴小瑜, 何文涓. 吴茱萸次碱对慢性不可预见性温和刺激诱导大鼠的抗抑郁作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(11): 3197.
- [14] LI B J, HAN L M, CAO B Y, et al. Use of magnoflorine-phospholipid complex to permeate blood-brain barrier and treat depression in the CUMS animal model [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 566.
- [15] ZHANG Y J, HUANG X, WANG Y, et al. Ferulic acid-induced anti-depression and prokinetics similar to Chaihu-Shugan-San via polypharmacology [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(3/4): 222.
- [16] 钟淑娟, 郑思超, 丘秀玉, 等. 丹参素钠对慢性不可预知温和应激模型小鼠的抗抑郁作用 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(23): 2819.
- [17] YIN Y X, LIU X F, LIU J P, et al. The effect of beta-sitosterol and its derivatives on depression by the modification of 5-HT, DA and GABA-ergic systems in mice [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(2): 671.
- [18] BEUREL E, TOUPS M, NEMEROFF C B. The bidirectional re-

- lationship of depression and inflammation: double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234.
- [19] MILLER A H, RAISON C L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(1): 22.
- [20] REICHENBERG A, YIRMIYA R, SCHULD A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2001, 58(5): 445.
- [21] ARIÖZ B I, TASTAN B, TARAKCIOGLU E, et al. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1511.
- [22] CIZZA G, MARQUES A H, ESKANDARI F, et al. Elevated neuroimmune biomarkers in sweat patches and plasma of premenopausal women with major depressive disorder in remission: the POWER study [J]. *Biol Psychiatry*, 2008, 64(10): 907.
- [23] HANNESTAD J, DELLAGIOIA N, BLOCH M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a Meta-analysis [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(12): 2452.
- [24] ELLER T, VASAR V, SHLIK J, et al. Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(2): 445.
- [25] WONG M L, INSERRA A, LEWIS M D, et al. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition [J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(6): 797.
- [26] ZHANG Y, LIU L, LIU Y Z, et al. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(8): pyv006.
- [27] RAMADORI G, LEE C E, BOOKOUT A L, et al. Brain Sirt1: anatomical distribution and regulation by energy availability [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(40): 9989.
- [28] CONSORTIUM C. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder [J]. *Nature*, 2015, 523(7562): 588.
- [29] QIN S R, TANG H L, LI W, et al. AMPK and its activator berberine in the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(39): 5054.
- [30] 代洁, 张晓明, 林玲, 等. 能量敏感的 AMPK-SIRT1 通路炎症调控 [J]. *生命科学*, 2014, 26(4): 362.

[责任编辑 陈玲]