

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS、网络药理学和动物实验探究百事乐加味方对脑卒中后抑郁症的防治作用

刘羽^{1,2}, 缪程铎², 王鑫^{1,2}, 龙红萍¹, 易亚乔², 王华¹, 刘检¹, 刘林^{1,2*}
(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨百事乐加味方(MBD)防治脑卒中后抑郁症(PSD)的作用。**方法** 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS分析MBD潜在活性化合物, SwissTargetPrediction、PharmMapper数据库进行靶点预测; 采用DrugBank、DisGeNET、OMIM、GeneCards数据库检索PSD治疗靶标; 将药物靶标和疾病靶标进行交叉; 采用Cytoscape对中药成分-靶点的关系进行建模与解析; 采用STRING数据库进行蛋白质互作实验, 寻找调控疾病发生发展的关键靶标; 采用DAVID数据库进行GO、KEGG分析, 采用AutoDockVina软件将可能的药效物质及作用靶标进行分子对接。采用大脑中动脉闭塞(MCAO)+慢性不可预知温和刺激(CUMS)法建立PSD大鼠模型, 设置对照组、模型组、阳性药组(0.005 4 g/kg盐酸氟西汀胶囊及0.027 g/kg阿司匹林肠溶片)和MBD组(23.5 g/kg), 连续给药28 d, 通过Morris水迷宫、旷场实验检测行为学指标; HE染色观察海马病理变化; ELISA法检测海马组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平; 免疫荧光法检测海马组织cAMP、PKA、CREB、BDNF蛋白表达。**结果** 共得到MBD潜在活性化合物65个、药物靶标641个、疾病靶标219个、共同靶标65个, Akt1、TNF、VEGFA、CASP3、APP、ACE、TLR4、SLC6A3、MMP9、SLC6A4为核心靶标, 并与黄芩素、藁本内酯等6种核心活性成分均能较好地结合。GO、KEGG分别得到218、39条通路, cAMP/PKA/CREB信号通路为MBD防治PSD的主要途径之一。与模型组比较, MBD组大鼠旷场实验爬格次数和直立次数增加($P<0.05$), Morris实验目标象限停留时间延长($P<0.01$), 穿越平台次数增加($P<0.01$), 海马神经病理损伤得到改善, 海马组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低($P<0.01$), 海马组织cAMP、PKA、CREB、BDNF蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论** MBD防治PSD的机制涉及多种成分靶点和信号通路, 其中cAMP/PKA/CREB信号通路可能是关键。

关键词: 百事乐加味方; 卒中后抑郁; cAMP/PKA/CREB信号通路; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 网络药理学; 动物实验; BDNF

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)05-1709-11

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.05.042

脑卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是卒中后最常见和最严重的精神疾病, 中风后2周至7年抑郁症患病率高达33.5%^[1], 严重影响了患者生活质量, 造成了巨大的经济负担及社会危害, 目前本病发生机制有单胺能、神经营养因子、血管性抑郁、炎症等^[2]。百事乐加味方(modified Baishile Decoction, MBD)经补阳还五汤化裁而成, 由姜黄、柴胡、川芎、黄芪等7味中药组成, 具有益气活血、疏肝解郁功效, 对PSD大鼠具有良好的改善抑郁样行为作用, 但其作用机制不明确^[3]。本研究采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)法分析MBD潜在活性

成分, 基于网络药理学预测其治疗PSD的作用机制, 并通过动物实验进行验证, 以期对相关临床治疗提供理论、实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 MBD由姜黄、贯叶连翘、人参、生黄芪、川芎等中药组成, 均由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供, 经唐林副主任药师鉴定为正品, 符合2020年版《中国药典》规定; 盐酸氟西汀(20 mg/粒, 批号23341A, 礼来苏州制药有限公司); 阿司匹林肠溶片(100 mg/片, 批号BJ75960, 拜耳医药保健有限公司)。环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)、cAMP反应成

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 国家自然科学基金(8247404); 湖南省自然科学基金(2025JJ80956, 2023JJ60488); 湖南省中医药科研项目(B2023129); 湖南省重点研发项目(2023DK2005, 2024JK2121); 湖南省教育厅项目(22A0262, 24B0344)

作者简介: 刘羽(1984—), 女, 硕士, 副教授, 从事中西医结合临床、基础研究。E-mail: 50748282@qq.com

* **通信作者:** 刘林(1984—), 男, 博士, 研究员, 从事中药新药开发研究。E-mail: 286410883@qq.com

分结合蛋白 (CREB)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 一抗 (批号 DF6523、AF7746、BF8028、DF6587, 江苏生物研究中心有限责任公司); IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 FY3056-A、FY2923-A、FY3066-A, 江苏菲亚生物科技有限公司)。

1.2 仪器 Agilent 1290 UPLC-6540 Q-TOF 质谱-质谱联用仪 (配置 MassHunter 质谱工作站、Mass analysis 质谱数据处理系统)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m) (美国 Agilent 公司); LSM800 激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司); Enspire 多功能酶标仪 (美国 Perkinelmer 公司); HZ32HK 高速冷冻离心机 (德国 Hermle 公司); FluorChemR 多功能成像系统 (美国 ProteinSimple 公司)。

1.3 数据库与软件 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>); U-niProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>); DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>); OMIM 数据库 (<https://omim.org/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>); PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>); Venny 2.1.0 软件; Cytoscape 软件; OpenBabel 2.4.1 软件; PyMOL 软件; AutoDockTool 1.5.7 软件; AutoDockVina 软件; STRING 网站 (<https://cn.string-db.org/>); Bioinformatics 网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)。

1.4 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量220~250 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004], 饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2020-0010], 温度 22~26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~55%, 适应性饲养 7 d。实验经湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准 (伦理审查批号 ZYFY20231110-167)。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 精密称取 MBD 3.0 g, 加入 30 mL 甲醇, 超声处理 30 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相乙腈 (A) -0.05 mmol/L 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~15% A; 10~20 min, 15%~35% A; 20~40 min, 35%~85% A); 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.3 质谱条件 进样分析前, 采用 Agilent 标准调谐液来进行准确质量数校正。电喷雾离子源 (ESI); 正负离子扫描; 除溶剂干燥气体 N₂, 温度 325 $^{\circ}$ C, 体积流量 6.8 L/min; 鞘气温度 350 $^{\circ}$ C; 毛细管电压 4.0 kV; Fragment 电压 150 V; 扫描范围 m/z 100~1 700。

2.4 MBD 活性化合物获取及网络药理学研究

2.4.1 MBD、PSD 靶点库建立 将 MBD 活性成分采用 PubChem 数据库检索名称后比对, 得到相应 sdf 文件, 上传至 SwissTargetPrediction、PharmMapper 数据库进行靶点预测, 取 PharmMapper 数据库预测得分前 20 位、SwissTargetPrediction 数据库得分>0 的靶点, 整合后去重, U-niProt 数据库将靶点名称规范化, 得到药物靶点数据库。再采用 DisGeNET、DrugBank、OMIM、GeneCards 数据库检索关键词 “post-stroke depression”, 将相应靶点整合, 得到疾病靶点数据库。然后, 采用 Venny2.1.0 软件将药物靶点与疾病靶点取交集, 得到有效靶点。

2.4.2 MBD 成分-有效靶点网络构建 将能作用于有效靶点的成分作为有效物质, 通过 Cytoscape 软件进行网络构建和分析。

2.4.3 MBD 有效靶点蛋白互作网络构建 将有效靶点通过 STRING 在线网站进行蛋白互作分析, 去除孤立节点, 设置 interaction score>0.4, 并将结果导入 Cytoscap 软件进行可视化分析与筛选, 得到关键靶点信息。

2.4.4 GO、KEGG 分析 将有效靶点通过 DAVID 进行基因生物过程分析 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 均设置 $P < 0.01$, 将排名靠前的重要通路通过 Bioinformatics 网站进行可视化呈现。

2.5 分子对接 采用 PubChem 下载潜在活性成分的 sdf 结构文件, OpenBabel 2.4.1 软件将 sdf 文件转化成 PDB 格式。再下载核心靶点蛋白的 PDB 结构文件, 选择条件为 (1) X-ray 测定; (2) 文件中已含有配体; (3) 分辨率高。使用 PyMOL 软件对蛋白结构进行去除水分子、杂原子及配体操作,

AutoDockTool 1.5.7 软件对靶蛋白与化合物进行加氢、加电荷处理,再转化为 PDBQT 格式。然后,采用 AutoDockVina 软件对潜在活性成分与核心靶点进行对接。

2.6 动物实验

2.6.1 PSD 模型建立 采用大脑中动脉闭塞 (MCAO) 手术建立脑卒中大鼠模型,颈部正中纵向切口,钝性分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA),分离 ICA、ECA 分叉处的迷走神经,分别结扎 CCA 主干和 ECA 近心端,采用微动脉夹暂时夹闭 ICA 远端,在距 CCA 分叉部 3 mm 处剪一小口,将线栓插入 ICA 并轻推到大脑中动脉 (MCA) 起始段,手术线结扎 CCA 主干远端及 ICA 根部,松开微动脉夹,缝合并消毒。大鼠制备模型后单笼孤养,随机采用分布于 5 个应激周期的 7 种刺激 (包括禁食、禁水、强迫冰水游泳、倾笼、噪音、夹尾、昼夜颠倒) 进行慢性不可预知刺激 (CUMS) 造模,评分合格后进行实验^[3]。

2.6.2 分组及给药 大鼠适应性饲养 7 d 后,随机选取 6 只作为对照组 (除栓线不插入颈总动脉外,其他操作同 MCAO 大鼠,应激造模期间仅灌胃蒸馏水),其余大鼠造模后采用随机数字表分为模型组、MBD 组和阳性药组,每组 6 只,模型组灌胃蒸馏水,MBD 组灌胃 23.5 g/kg 相应水煎液 (依据前期研究基础确定给药质量浓度),阳性药组灌胃盐酸氟西汀胶囊 (0.005 4 g/kg) 及阿司匹林肠溶片 (0.027 g/kg),剂量均为 10 g/kg,每天 1 次,连续 28 d。

2.6.3 行为学检测 实验结束前进行旷场实验和 Morris 水迷宫实验。旷场实验在一个高 40 cm、长宽均为 100 cm 的无盖黑色敞箱中进行,将敞箱底部等分成 25 个正方形,从中心放入大鼠,适应 1 min 后分别记录 4 min 内穿越底面格数 (水平活动) 和直立次数 (垂直活动)。水迷宫实验大鼠先按照象限顺序训练 4 d,再于第 5 天进行空间探索实验,记录 3 min 内在平台所在象限的活动时间和穿越平台的次数。

2.6.4 HE 染色观察海马组织病理形态 大鼠麻醉后取全脑,将脑组织在 4% 多聚甲醛中浸泡固定 48 h,冠状切取,经脱水、包埋、切片、漂片、烘片处理后放入染色槽中进行 HE 染色,在显微镜下观察海马组织病理形态。

2.6.5 ELISA 法检测海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF-

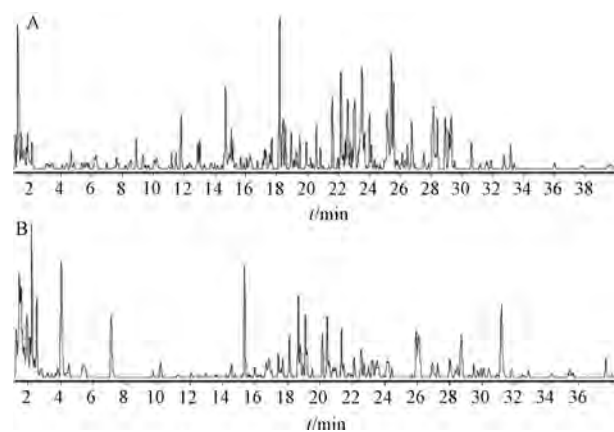
α 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书,采用多功能酶标仪检测大鼠海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.6.6 免疫荧光法检测海马组织 cAMP/PKA/CREB 蛋白表达 取大鼠脑组织石蜡切片,脱蜡至水后进行抗原修复,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加 3% BSA 封闭 30 min,甩掉封闭液,滴加相应一抗,放于湿盒内,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日滴加相应二抗,避光室温孵育,洗涤后加 DAPI 染液,采用抗荧光淬灭剂封片,在激光共聚焦显微镜下观察,测定荧光强度。

2.6.7 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理,满足正态性分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐性时组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法,方差不齐时组间比较采用 Game-Howell 法;若计量资料不满足正态性分布,组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 潜在活性化合物 共鉴定出 128 种成分,见图 1。根据 SwissADME、TCMSP 数据库筛选出 65 个潜在活性化合物,具体见表 1。



注: A 为正离子模式, B 为负离子模式。

图 1 MBD UPLC-Q-TOF-MS/MS 色谱图

3.2 药物-疾病靶点 共筛选得到 641 个药物靶点、219 个疾病靶点,交集共同靶点 65 个,见图 2。

3.3 活性成分-靶点网络 如图 3 所示,共有 147 个节点和 379 条边,其中绿色圆点表示药味,八边形表示有效成分,菱形表示疾病靶点,degree 值排名靠前的靶点有 TTR (degree = 5)、MAOB (degree = 26)、F2 (degree = 23)、CASP3 (degree = 16); degree 值排名靠前的活性成分有川芎中的汉黄芩素 (degree = 15)、藁本内酯 (degree = 13)、川芎萜呔

表 1 MBD 潜在活性化合物

序号	t_R /min	分子式	误差	英文名称	中文名称	归属
1	1.184	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	1.36	L(+)-arginine	精氨酸	黄芪
2	1.641	C ₅ H ₇ NO ₃	-0.64	L-pyroglutamic acid	L-焦谷氨酸	黄芪
3	2.162	C ₄ H ₆ O ₄	1.28	succinic acid	琥珀酸	贯叶金丝桃
4	3.289	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	0.53	forsythoside D	连翘酯苷 D	贯叶金丝桃
5	4.099	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	0.18	geniposide	梔子苷	贯叶金丝桃
6	4.857	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1.24	ferulic acid	阿魏酸	川芎、石菖蒲
7	5.835	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	0.31	ligustilide	藁本内酯	川芎
8	7.475	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.50	isoquercitrin	异槲皮苷	黄芪
9	7.617	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.14	hyperoside	金丝桃苷	贯叶金丝桃、黄芪
10	8.525	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	0.16	ligustractone A	洋川芎内酯 A	川芎
11	8.881	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0	chlorogenic acid	绿原酸	人参
12	10.055	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	0.48	isorhamnetin	异鼠李素	黄芪
13	11.196	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	-0.38	naringin	柚皮苷	贯叶金丝桃
14	11.477	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	-0.43	narirutin	芸香柚皮苷	贯叶金丝桃
15	14.423	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	0.25	chuanxiongnode B	川芎内酯 B	川芎
16	14.591	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-0.27	forsythiaside A	连翘脂苷 A	贯叶金丝桃
17	14.925	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.43	rutin	芦丁	贯叶金丝桃
18	15.043	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-0.22	acteoside	毛蕊花糖苷	黄芪
19	16.049	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	-1.03	kaempferide	山柰素	黄芪、贯叶金丝桃
20	16.279	C ₂₅ H ₃₂ O ₅	0.01	wallichilide	川芎萜内酯	川芎
21	17.103	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	0.21	wogonin	汉黄芩素	川芎
22	17.190	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	-0.05	ginsenoside F3	人参皂苷 F3	人参
23	17.564	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	0.08	notoginsenoside R1	三七皂苷 R1	人参
24	17.678	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	0.10	baicalin	黄芩苷	黄芪
25	18.160	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	0.24	ginsenoside Re	人参皂苷 Re	人参
26	18.556	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.01	astragaloside	黄芪苷	黄芪
27	18.897	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₃	0.02	ginsenoside La	人参皂苷 La	人参
28	20.181	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	0.12	wogonoside	汉黄芩苷	黄芪
29	20.328	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	0.34	formononetin	芒柄花素	黄芪
30	20.550	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	0.21	baicalein	黄芩素	黄芪
31	20.948	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	0.44	astragaloside IV	黄芪甲苷 IV	黄芪
32	21.379	C ₂₄ H ₂₈ O ₉	0.28	6-acetylpiropolin	乙酰苦酮素	姜黄
33	21.592	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	-0.28	ginsenoside Rg1	人参皂苷 Rg1	人参
34	21.952	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	0.55	ginsenoside Ra1	人参皂苷 Ra1	人参
35	22.157	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	0.01	ginsenoside Rb1	人参皂苷 Rb1	人参
36	22.603	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	0.07	ginsenoside Rb3	人参皂苷 Rb3	人参
37	22.751	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	0.15	20(S)-ginsenoside Rg3	人参皂苷 Rg3	人参
38	22.859	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	0.15	20(R)-ginsenoside Rg2	人参皂苷 Rg2	人参
39	22.895	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	0.10	ginsenoside Rs2	人参皂苷 Rs2	人参
40	22.983	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	-0.11	ginsenoside Rc	人参皂苷 Rc	人参
41	23.128	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	0.15	ginsenoside Rb2	人参皂苷 Rb2	人参
42	23.358	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	-0.14	20(R)-ginsenoside Rh1	人参皂苷 Rh1	人参
43	23.374	C ₄₉ H ₈₀ O ₁₉	0.12	saikosaponin Q2	柴胡皂苷 Q2	柴胡
44	24.003	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	0.24	ginsenoside Rd	人参皂苷 Rd	人参
45	24.313	C ₄₉ H ₈₀ O ₁₉	0.32	saikosaponin R	柴胡皂苷 R	柴胡
46	24.473	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	0.22	saikosaponin C	柴胡皂苷 C	柴胡
47	25.147	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	-0.30	astragaloside II	黄芪皂苷 II	黄芪
48	25.406	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	-0.59	saikosaponin A	柴胡皂苷 A	柴胡

续表 1

序号	t_R/min	分子式	误差	英文名称	中文名称	归属
49	25.553	$C_{42}H_{68}O_{13}$	-0.54	saikosaponin D	柴胡皂苷 D	柴胡
50	25.718	$C_{48}H_{78}O_{18}$	0.09	saikosaponin S	柴胡皂苷 S	柴胡
51	25.843	$C_{48}H_{78}O_{18}$	0.15	saikosaponin N	柴胡皂苷 N	柴胡
52	26.110	$C_{43}H_{70}O_{15}$	-0.07	astragaloside II	黄芪皂苷 II	黄芪
53	26.452	$C_{42}H_{68}O_{13}$	-0.12	saikosaponin B1	柴胡皂苷 B1	柴胡
54	26.734	$C_{42}H_{68}O_{13}$	-0.35	saikosaponin B2	柴胡皂苷 B2	柴胡
55	26.951	$C_{45}H_{72}O_{16}$	0.04	astragaloside I	黄芪皂苷 I	黄芪
56	27.514	$C_{42}H_{68}O_{12}$	0.07	saikosaponin M	柴胡皂苷 M	柴胡
57	27.522	$C_{36}H_{60}O_8$	-0.03	ginsenoside Rh4	人参皂苷 Rh4	人参
58	28.133	$C_{45}H_{72}O_{16}$	-0.46	astragaloside I	黄芪皂苷	黄芪
59	28.452	$C_{45}H_{72}O_{16}$	-0.19	isoastragaloside I	异黄芪皂苷 I	黄芪
60	28.914	$C_{42}H_{72}O_{13}$	-0.34	20(S)-ginsenoside Rg2	人参皂苷 Rg2	人参
61	29.155	$C_{42}H_{72}O_{13}$	-0.21	ginsenoside Rf2	人参皂苷 Rf2	人参
62	30.609	$C_{45}H_{72}O_{16}$	-0.19	dioscin	薯蓣皂苷	黄芪
63	32.716	$C_{42}H_{70}O_{12}$	-0.01	ginsenoside Rg5	人参皂苷 Rg5	人参
64	33.151	$C_{43}H_{72}O_{14}$	-0.07	saikosaponin B3	柴胡皂苷 B3	柴胡
65	33.382	$C_{48}H_{76}O_{19}$	0.27	ginsenoside Ro	人参皂苷 Ro	人参

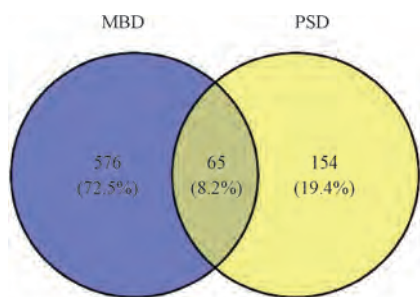


图2 MBD 药物靶点与 PSD 疾病靶点交集

内酯 (degree = 12), 黄芪中的异鼠李素 (degree = 13)、芒柄花素 (degree = 13), 以及姜黄中的乙酰苦酮素 (degree = 12)。

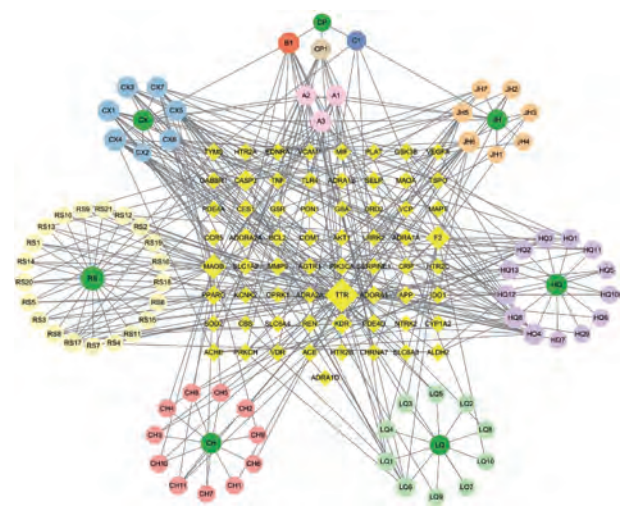


图3 MBD 活性成分-靶点网络

3.4 靶点蛋白互作网络 将 65 个有效靶点通过 STRING 在线平台进行蛋白互作分析, 再利用 Cytoscap 软件进行可视化作图与分析, 见图 4, 共

有 64 个节点与 408 条边, 大部分有效靶点均能互相作用。核心靶点排序及 degree 值见图 5, 可知排名前三的靶点为丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (Akt1)、TNF、VEGFA。

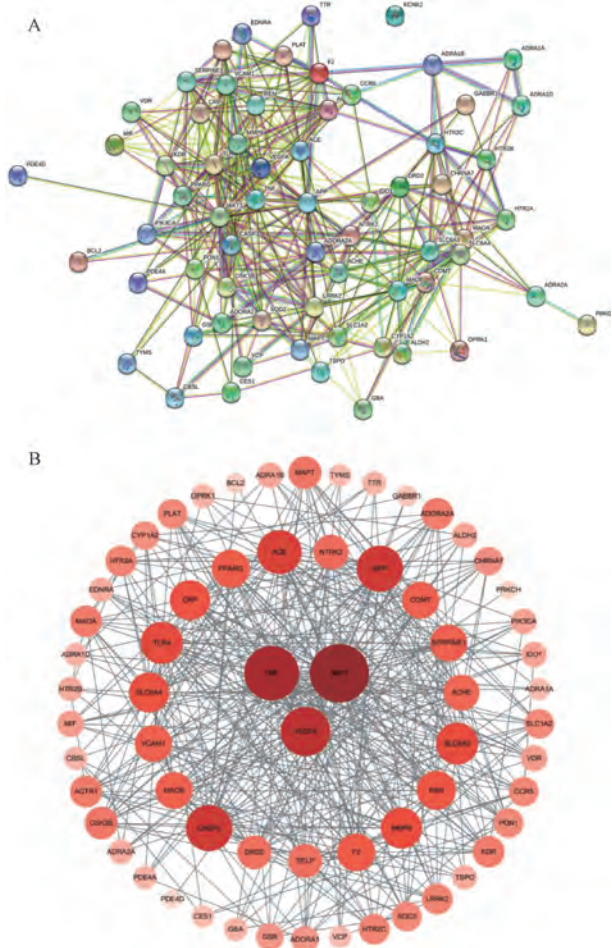


图4 PPI 图 (A) 和 Cytoscap 软件处理后图 (B)

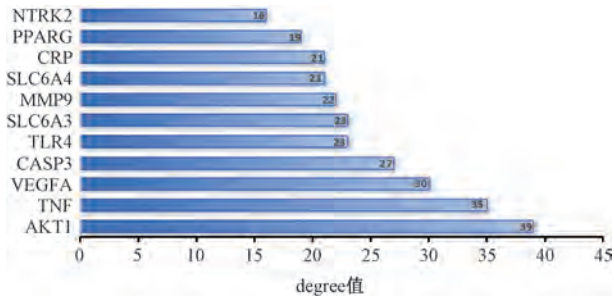


图5 核心靶点排序及 degree 值

3.5 GO、KEGG 分析 GO 分析得到生物过程 (biological process, BP) 条目 160 个, 包括药物反应、对外来刺激的反应、G 蛋白偶联受体信号通路 (GPCRs)、缺氧反应、ERK1/2 信号通路等; 细胞组成 (cellular component, CC) 条目 34 个, 包括质膜、膜的组成部分、细胞外空间、细胞外泌体、胞外区、树突等; 分子功能 (molecular function, MF) 条目 24 个, 包括蛋白结合、酶结合、GPCRs 等, 排名前 10 位者见图 6。

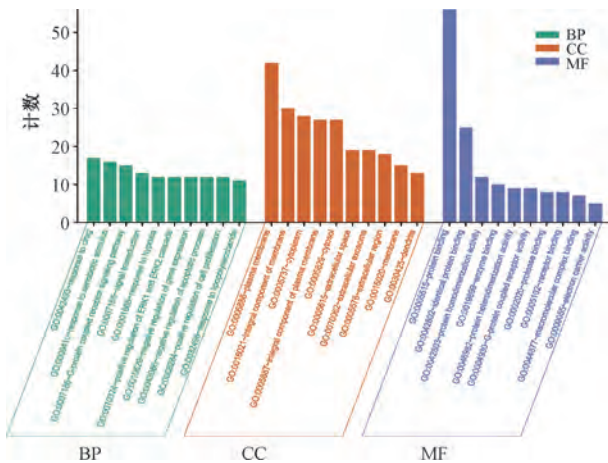


图6 GO 分析条状图

KEGG 分析得到 39 个条目, 包括神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、脂质和动脉粥样硬化、流体剪切力与动脉粥样硬化、cAMP 信号通路、5-羟色胺能突触、cGMP-PKG 信号通路、多巴胺能神经突触、血管平滑肌收缩等, 排名前 15 位者见图 7。

3.6 分子对接 将 6 种潜在活性成分与前 10 个关键靶点 Akt1、TNF、VEGFA、CASP3、APP、ACE、TLR4、SLC6A3、MMP9、SLC6A4 进行分子对接, 当结合能 < -5 kcal/mol 时可认为具有较好的结合活性。本研究发现, 60 个对接结果中有 57 个结合能 < -5 kcal/mol, 表明大部分潜在活性成分与关键靶点之间均能较好地结合, 见表 2, 可视化图见图 8。

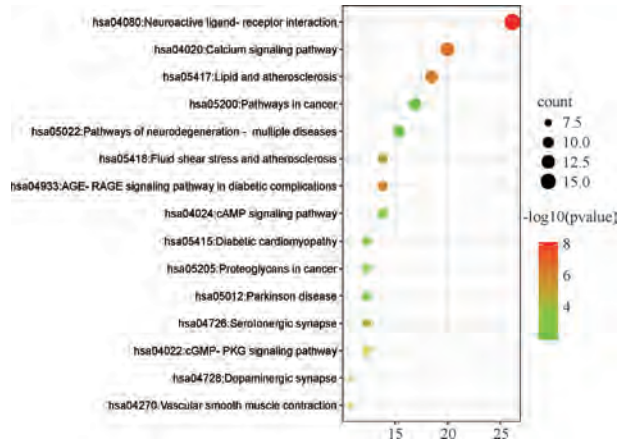
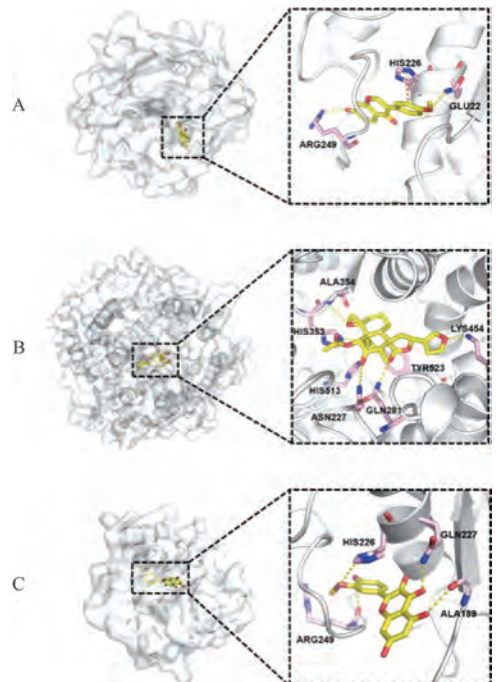


图7 KEGG 分析气泡图

表2 潜在活性成分与关键靶点分子对接结合能 (kcal/mol)

靶点	汉黄芩素	藜本内酯	川芎茶酚内酯	异鼠李素	芒柄花素	乙酰苦酮素
Akt1	-5.9	-4.8	-5.8	-5.9	-6.0	-7.7
TNF	-7.2	-5.8	-6.1	-6.2	-6.2	-6.9
VEGFA	-7.4	-5.9	-6.6	-7.6	-6.9	-6.5
CASP3	-6.2	-5.4	-6.4	-6.7	-6.6	-6.4
APP	-7.2	-5.6	-6.0	-6.9	-6.1	-7.3
ACE	-8.4	-7.2	-9.1	-8.8	-8.4	-9.9
TLR4	-6.1	-6.2	-5.7	-6.7	-6.1	-5.9
SLC6A3	-7.0	-6.9	-2.1	-8.4	-8.5	-4.4
MMP9	-9.3	-7.6	-6.7	-9.8	-10.7	-7.4
SLC6A4	-8.7	-7.6	-8.4	-8.8	-8.9	-9.7



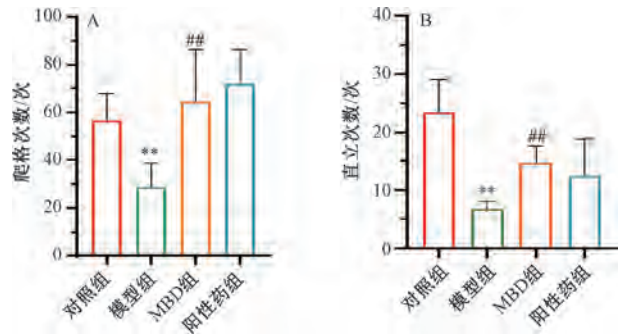
注: A 为 MMP9 与芒柄花素对接, B 为 ACE 与乙酰苦酮素对接, C 为 MMP9 与异鼠李素对接。

图8 潜在活性成分与关键靶点对接可视化图

3.7 动物实验

3.7.1 MBD对PSD大鼠行为学的影响 旷场实验中,与对照组比较,模型组大鼠爬格次数和直立次数减少 ($P<0.01$);与模型组比较,MBD组大鼠爬格次数和直立次数增加 ($P<0.01$),见图9~10。

Morris水迷宫实验中,与对照组比较,模型组大鼠目标象限停留时间缩短 ($P<0.01$),穿越平台次数减少 ($P<0.01$);与模型组比较,MBD组大鼠目标象限停留时间延长 ($P<0.01$),穿越平台次数增加 ($P<0.01$),见图11~12。



注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图9 各组大鼠爬格次数(A)、直立次数(B)比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

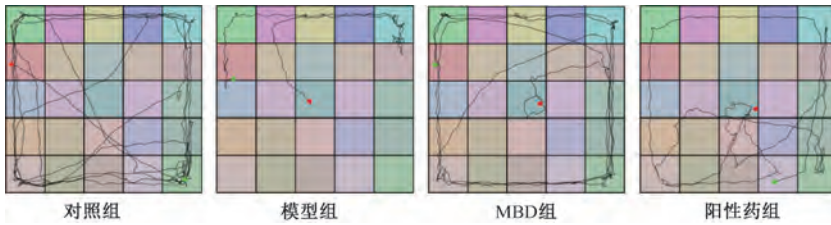
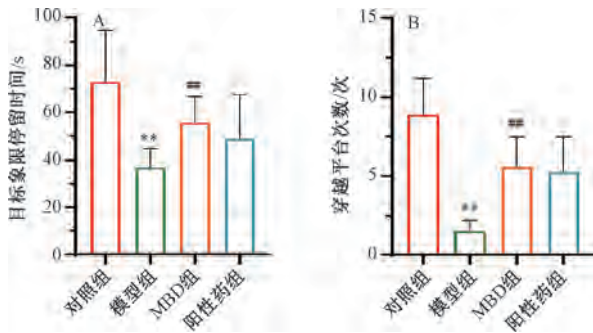


图10 各组大鼠旷场实验轨迹



注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图11 各组大鼠目标象限停留时间(A)、穿越平台次数(B)比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

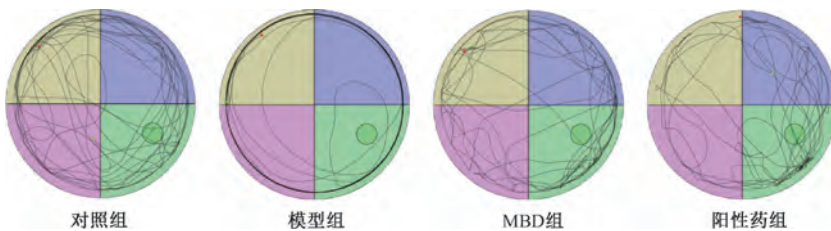


图12 各组大鼠Morris水迷宫空间探索实验轨迹

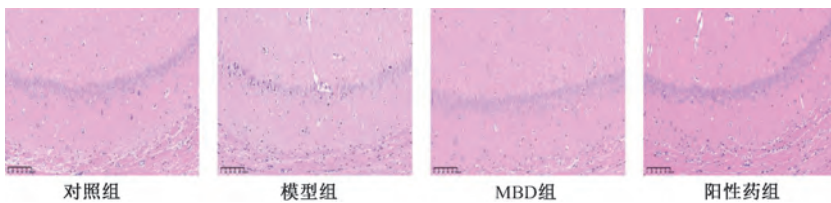
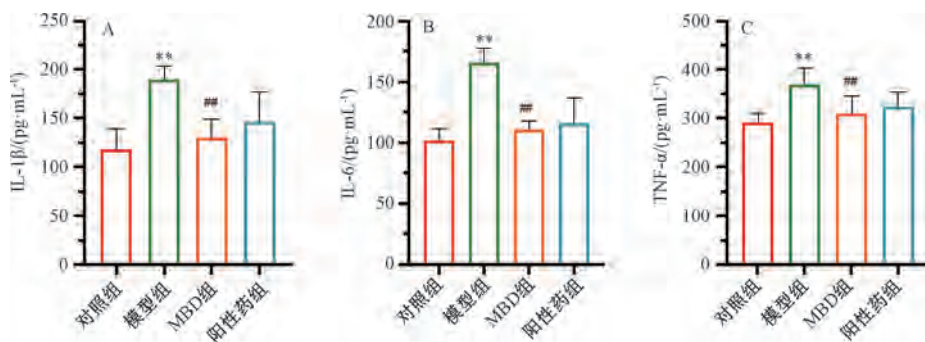


图13 各组大鼠海马组织HE染色($\times 200$)

3.7.4 MBD对PSD大鼠海马组织cAMP、PKA、CREB、BDNF蛋白表达的影响 与对照组比较,

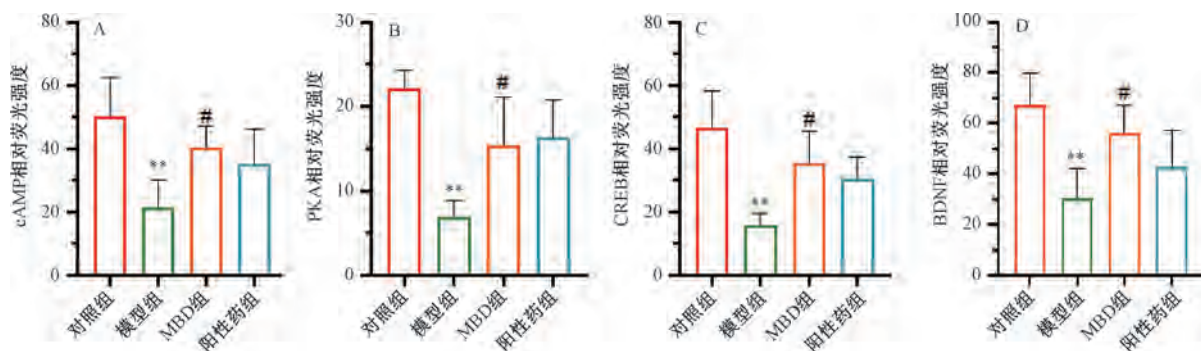
模型组大鼠海马区cAMP、PKA、CREB、BDNF荧光强度减弱,阳性表达降低 ($P<0.01$);与模型组



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 14 各组大鼠海马组织 IL-1 β (A)、IL-6 (B)、TNF- α (C) 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

比较，MBD 组大鼠海马区 cAMP、PKA、CREB、BDNF 荧光强度增强，阳性表达升高 ($P < 0.05$)，见图 15~19。



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

图 15 各组大鼠海马组织 cAMP (A)、PKA (B)、CREB (C)、BDNF (D) 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

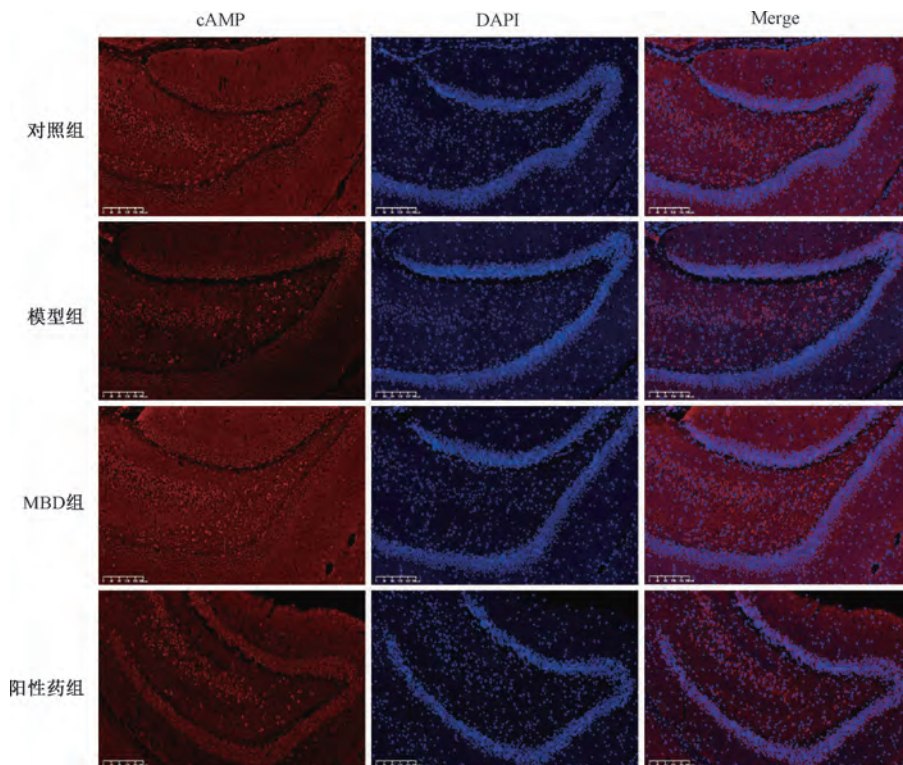


图 16 各组大鼠海马组织 cAMP 免疫荧光染色 ($\times 200$)

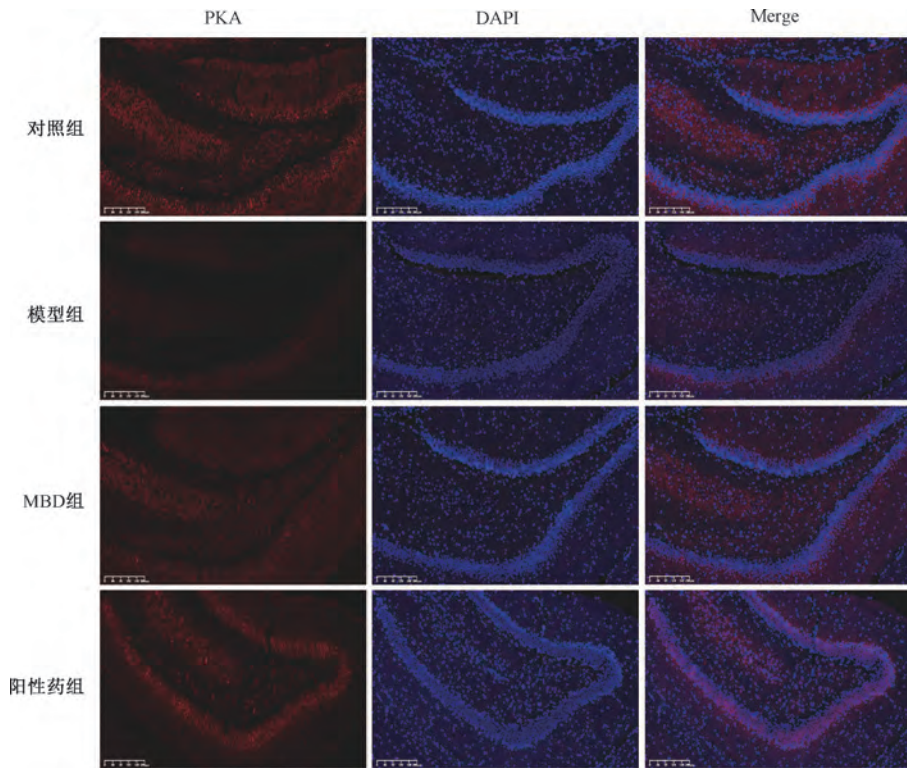


图 17 各组大鼠海马组织 PKA 免疫荧光染色 (×200)

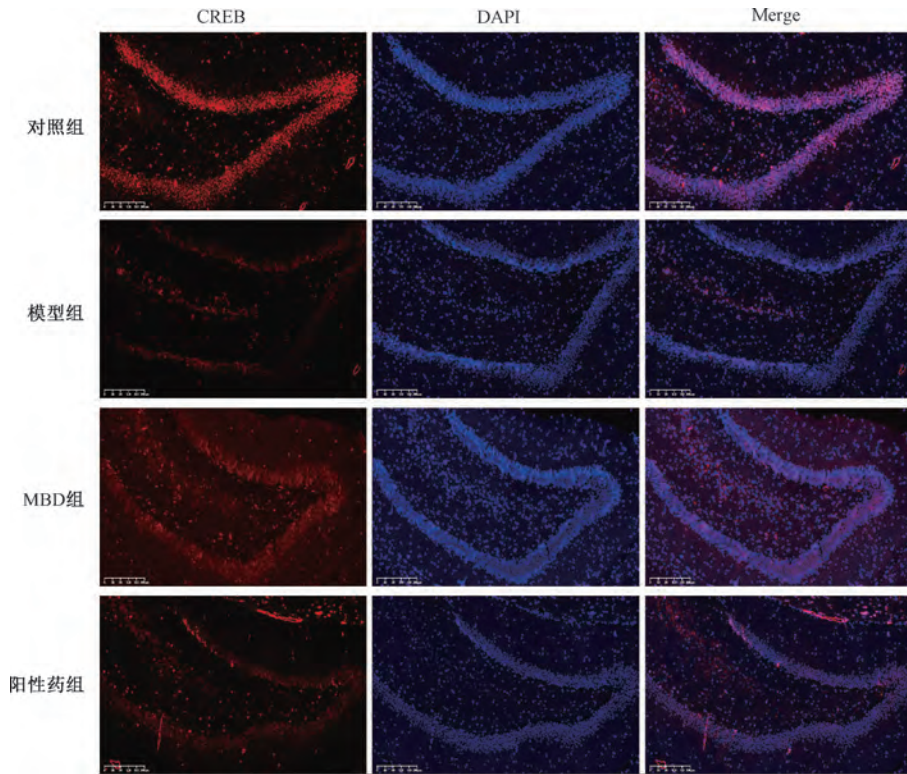


图 18 各组大鼠海马组织 CREB 免疫荧光染色 (×200)

4 讨论

本实验鉴定出 MBD 中 128 个化合物，网络药理学分析得到 6 种潜在活性成分与 10 个关键靶点。其中，汉黄芩素可通过抑制 JNK/AP-1 通路，从而

改善大鼠神经功能障碍及脑组织损伤^[4]；藁本内酯具有抑制 PSD 大鼠神经炎症、改善线粒体功能、促进血管生成等作用^[5-6]；异鼠李素对炎症反应引起的缺血性脑卒中具有一定抗炎、抗抑郁效

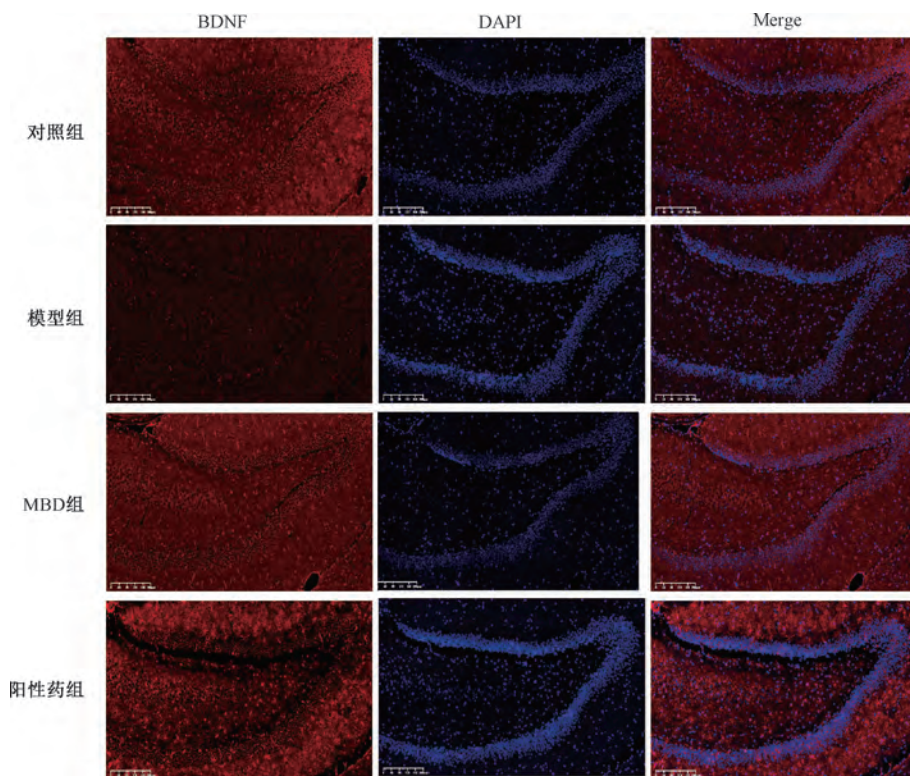


图 19 各组大鼠海马组织 BDNF 免疫荧光染色 ($\times 200$)

果^[7-8]；芒柄花素可通过调控 p38 MAPK 信号通路来发挥抗炎作用，对抗缺血性中风后的炎症反应和抑郁症状^[9-10]。在关键靶点中，Akt1 在调节大脑功能中起着重要作用，调控 PI3K/Akt 信号通路可改善海马区域的活动，而 Akt 可促进 PRAS40 磷酸化，激活 mTOR 通路，从而缓解小鼠抑郁症状^[11-12]。TNF- α 过度表达可影响 5-羟色胺活性，从而触发抑郁症状^[13]。VEGF 被认为是重度抑郁症的血清标志物^[14]，而 VEGFA 是 VEGF 家族中具有生物活性的主要存在形式。SLC6A3 与 SLC6A4 交互作用可能对重度抑郁症产生影响^[15]。本研究阐明了 MBD 对卒中及卒中后神经炎症、抑郁症防治作用的主要有效成分及关键靶点。

GO 分析发现 ERK1/2、GPCRs 在内的 218 条条目，其中 p-ERK1/2 在缺血性脑卒中的表达增加，故抑制 ERK1/2 信号通路可改善卒中后抑郁大鼠神经功能和产生抗抑郁作用^[16-17]；激活 GPCRs 后可改善大鼠缺氧损伤后的脑微血管功能，减少细胞死亡，发挥神经保护作用^[18]。KEGG 分析发现 cAMP 信号通路、5-羟色胺能突触、多巴胺能神经突触在内的 39 个条目，其中 cAMP 是细胞内第二信使，具有调节神经元生长发育、神经发生、突触可塑性、记忆功能的作用；PKA 在信号传导中发挥关键作用，其功能异常可导致神经生长发育故

障；cAMP 调节细胞功能主要通过 PKA 亚基结合；CREB 被称为“记忆开关”，是 PKA 下游底物，对神经元损伤起保护作用^[19-20]；GPCRs 与单胺类神经递质结合后激活 cAMP/PKA/CREB 通路，对缺血性脑卒中起到神经保护作用^[21-23]。结合 cAMP/PKA/CREB 信号通路的富集程度及相关靶点，本研究通过动物实验来考察此通路中相关蛋白表达，确证其作用机制。

PKA/CREB/BDNF 信号通路可通过影响突触形态、炎症反应、神经发生来参与抑郁症发生发展，抑郁症患者和动物均存在脑内 cAMP 通路的异常，而调节 cAMP/PKA/CREB 可促进脑内 BDNF 产生，增加突触可塑性，从而发挥抗抑郁作用^[24]。柴胡类抗抑郁方可增加抑郁大鼠海马 cAMP、PKA、CREB 表达，促进 BDNF 生成，抑制 IL-6、IL-1 β 等炎症因子分泌，改善抑郁^[25-27]。Tao 等^[28]研究发现，栀子豉汤可升高 CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达，改善抑郁小鼠海马 CA1 区树突棘形态并逆转其损伤。BDNF 调控炎症反应与小胶质细胞、星形胶质细胞密切相关，其激活可减少小胶质细胞和星形胶质细胞活化，减轻神经炎症，改善神经突触可塑性，保护神经细胞^[29]。本研究结果表明，MBD 干预后能改善 PSD 大鼠抑郁行为和海马病理形态，升高 cAMP/PKA/CREB

信号通路相关蛋白表达, 增加 BDNF 表达, 降低大鼠海马组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 表明 MBD 可能是通过调控 cAMP/PKA/CREB 信号通路来促进 BDNF 生成, 调控神经炎症水平, 从而实现抗抑郁症作用。

综上所述, 本研究阐明了 MBD 抗抑郁的药效物质基础、潜在作用靶点及信号通路, 为该方临床应用提供了科学依据, 也为将其开发成相关新药奠定了扎实基础。

参考文献:

[1] Gong J, Zhang Y, Zhong X, et al. Liver function test indices-based prediction model for post-stroke depression: a multicenter, retrospective study[J]. *BMC Med Inform Decis Mak*, 2023, 23(1): 127.

[2] 齐士魁, 高静, 余明月, 等. 脑卒中后抑郁发病机制的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*, 2022, 29(5): 483-486.

[3] 王华, 袁霞红, 刘羽, 等. 百事乐加味方对卒中后抑郁大鼠小胶质细胞焦亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(13):1933-1937.

[4] 叶维, 张红, 王莉, 等. 汉黄芩素通过调控 JNK/AP-1 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经功能障碍、脑组织损伤的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3241-3246.

[5] 李喜香, 杨萍, 张亚会, 等. 藁本内酯治疗神经系统疾病作用机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(9): 2290-2298.

[6] Ma J C, Zhang H L, Huang H P, et al. Antidepressant-like effects of Z-ligustilide on chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 677.

[7] Zhao J J, Song J Q, Pan S Y, et al. Treatment with isorhamnetin protects the brain against ischemic injury in mice[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(8): 1939-1948.

[8] Guan Y, Wang J, Wu X, et al. Quercetin reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior *in vivo* by involving nuclear factor-E2-related factor 2[J]. *Brain Res*, 2021, 1772: 147661.

[9] 闫敏, 荆文馨, 林强, 等. 刺芒柄花素对缺血性脑卒中的作用及机制[J]. *牡丹江医学院学报*, 2023, 44(2): 20-24; 49.

[10] 程瑶, 翟冠楠, 王春霞, 等. 芒柄花素激活 Nrf2/ARE 信号通路对抑郁症大鼠的改善作用及机制[J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(11): 1467-1472; 1486; 1611.

[11] Pazini F L, Cunha M P, Rosa J M, et al. Counteracts depressive-like behavior induced by corticosterone *via* PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6818-6834.

[12] Yao Y M, Ju P J, Liu H M, et al. Ifenprodil rapidly ameliorates depressive-like behaviors, activates mTOR signaling and modulates proinflammatory cytokines in the hippocampus of CUMS rats[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2020, 237(5):

1421-1433.

[13] 朱寅捷, 李欧, 徐建, 等. 疏肝解郁方治疗失眠伴轻度中度抑郁的疗效及对睡眠质量、负性情绪、血清炎症因子水平的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41(12): 3132-3140.

[14] Li K, Wang K, Xu S X, et al. *In vivo* evidence of increased vascular endothelial growth factor in patients with major depressive disorder[J]. *J Affect Disord*, 2025, 368: 151-159.

[15] 毕燕. 汉族人群中 SLC6A2、SLC6A3、DRD2 基因与精神分裂症和重度抑郁症的关联研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.

[16] 杨华, 李金波. miR-17-5p 对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用及其对细胞外调节蛋白激酶 1/2 信号通路的影响[J]. *解剖学杂志*, 2023, 46(4): 311-316.

[17] 郑国玉, 栗静媛, 杨广军, 等. 醒神解郁汤通过 CyPA-ERK1/2-NF- κ B 信号通路调控神经炎症改善卒中后抑郁[J]. *解剖科学进展*, 2024, 30(4): 349-353.

[18] 秦书华. 基于 G 蛋白偶联受体的柴胡皂苷抗抑郁作用机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.

[19] 刘京霞, 陈新旺, 郭娅静, 等. cAMP 信号通路在抑郁症发病机制及干预策略中的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2025, 33(2): 267-274.

[20] 何佩宜, 陈聪, 侯雅静, 等. 逍遥散对抑郁大鼠大脑皮层 cAMP 信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(12): 6008-6012.

[21] 李璟怡, 黄俊山, 陈沁, 等. 松郁安神方对失眠大鼠海马 cAMP/PKA 信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(3): 212-217.

[22] Shen L, Wang Z, Huang R, et al. Electroacupuncture modulates 5-HT_{4R}-mediated cAMP/PKA signaling to improve intestinal motility disorders in a Thy1- α Syn Parkinson's mouse model[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 8659462.

[23] 李文鑫, 何聪, 刘征. 针刺治疗脑卒中后抑郁机制研究进展[J]. *环球中医药*, 2024, 17(8): 1679-1684.

[24] 樊薛津, 金博文, 杨秋怡, 等. 基于 BDNF/TrkB/p-CREB 信号通路探讨血府逐瘀胶囊促进神经再生防治卒中后抑郁的作用及机制[J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6704-6711.

[25] Chang B, Liu Y, Hu J, et al. *Bupleurum chinense* DC improves CUMS-induced depressive symptoms in rats through upregulation of the cAMP/PKA/CREB signalling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115034.

[26] 张景超, 唐廷, 许明. 中药调控抑郁症相关信号通路研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2024, 33(18): 49-53.

[27] 赵迪克, 牛君, 杜志欣, 等. 基于 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(3): 17-25.

[28] Tao W, Yao G, Yue Q, et al. 14-3- ζ Plays a key role in the modulation of neuroplasticity underlying the antidepressant-like effects of Zhi-Zi-Chi-Tang[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154888.

[29] 黄辰杰, 施学丽, 樊明理, 等. 脑源性神经营养因子信号通路在中医药干预抑郁症中的作用机制研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2025, 37(6): 1170-1185.