

基于 LC-MS/MS 分析、网络药理学和动物实验验证探究霍山石斛抗抑郁作用

吴金湘^{1,2}, 王豪豪^{2,3}, 冀乐园^{1,4}, 苏婷^{2,3}, 邓辉^{2*}, 刘东^{2,3,4*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012; 3. 安徽省石斛产业化开发协同创新中心, 安徽 六安 237012; 4. 安徽省现代中药产业共性技术研究中心, 安徽 六安 237012)

摘要: 目的 探讨霍山石斛对慢性不可预测温和应激 (CUMS) 刺激小鼠抑郁样行为的作用。方法 采用 LC-MS/MS 鉴定霍山石斛入海马体活性成分。通过 Swiss Target Prediction 数据库获取活性成分作用靶点, OMIM 或 GeneCards 数据库获取疾病相关靶点, Venny 2.1 平台获取药物与疾病的交集靶点, STRING 数据库构建 PPI 网络并筛选核心靶点, DAVID 6.8 数据库对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。60 只 ICR 小鼠随机分空白组、模型组、氟西汀组 (10 mg/kg) 及霍山石斛醇提取物 (DHEE) 高、中、低剂量组 (8、4、2 g/kg, 按生药量计), 每组 10 只, 除空白组外, 其余组建立 CUMS 小鼠抑郁模型后, 给予相应剂量药物, 持续 14 d, 观察小鼠行为学变化, 甲苯胺蓝染色观察海马体组织病理学变化, ELISA 法检测炎症因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10) 水平, Western blot 法检测 TNFR1、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达。结果 共鉴定出 22 种入海马体活性成分及 414 个潜在治疗靶点, 核心靶点包括 TNF、ERK 等, KEGG 富集通路 149 条, 涉及 MAPK 等通路。动物实验显示, 与模型组比较, 氟西汀组及 DHEE 高、中剂量组 CUMS 小鼠抑郁样行为改善, 糖水偏好率升高 ($P < 0.01$), 旷场运动总路程增加且中央区停留时间延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 开臂进入次数及时间占比均升高 ($P < 0.01$), 悬尾和强迫游泳总不动时间缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马体组织神经元密度增加, 细胞凋亡减少, 尼氏小体形态萎缩与变性明显恢复, 促炎因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抗炎因子 (IL-4、IL-10) 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TNFR1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 霍山石斛可通过多成分、多靶点协同调控 TNF/ERK 信号通路、抑制神经炎症, 从而有效缓解 CUMS 小鼠的抑郁样行为。

关键词: 霍山石斛; 抑郁; 网络药理学; LC-MS/MS; 动物实验; 慢性不可预测温和应激 (CUMS); 炎症; TNF/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)04-1358-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.04.042

抑郁症是一种以持续心境低落、兴趣丧失为核心特征的精神障碍性疾病, 已成为全球公共卫生领域的重大挑战^[1]。目前, 临床抗抑郁药物以选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRIs 等) 为主, 可缓解患者抑郁症状, 但存在起效延迟 (通常 2~4 周)、复发率高 (约 50% 患者复发)、不良反应显著 (如胃肠道反应、性功能障碍等)、治疗成本高昂等问题^[2]。因此, 以天然药物作为多成分、多靶点、低毒性的新型抗抑郁药物已成为当前趋势。

中医理论认为, 情志失调与“心胆气虚”“肝

郁气滞”等脏腑功能失衡密切相关, 主张通过调和气血、扶正祛邪实现整体调节^[3]。霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang & S. J. Cheng 是兰科石斛属植物干燥茎, 其干燥茎可入药, 为“中华九大仙草”之一^[4]。《名医别录》记载其可“久服定志, 除惊”^[5], 表明其具有调节情志障碍的潜在价值。现代药理学研究表明, 霍山石斛富含多糖、黄酮类、生物碱及菲类成分, 具有抗炎、抗氧化、保护神经、调节免疫等多种生物活性^[6]。但目前关于霍山石斛在抑郁症中的具体作用机制尚

收稿日期: 2025-12-08

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC3503804); 安徽省大别山中医药研究院开放课题 (TCMADM-2023-02); 皖西学院高层次人才启动项目 (WGKQ2021083); 皖西学院自然科学重点项目 (WXZR202417)

作者简介: 吴金湘 (1998—), 女, 硕士在读, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: 18844951236@163.com

* 通信作者: 邓辉 (1974—), 男, 博士, 高级实验师, 从事中药现代化、蛋白质和酶工程研究。E-mail: dhup@qq.com

刘东 (1984—), 男, 博士, 教授, 从事中药资源开发与利用研究。E-mail: liudong3000@163.com

未系统阐明,故本研究采用慢性不可预测温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)小鼠模型探究霍山石斛的抗抑郁作用,观察其对海马体组织炎症微环境与神经元可塑性的调控作用^[7],以为抑郁症患者提供更好的药物选择,也为霍山石斛“定志除惊”的传统药效学内涵奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 药材 样品购自霍山县天下泽雨生物科技发展有限公司,经皖西学院韩邦兴教授鉴定为兰科植物霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang & S. J. Cheng 的干燥茎。

1.2 试剂 氟西汀(批号 C16408306)、无水乙醇(批号 20230913)、氯化钠(批号 20230801)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;IL-1 β (批号 202401)、IL-6(批号 202403)、TNF- α (批号 202405)、IL-4(批号 202409)、IL-10(批号 202405)ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;GAPDH(批号 AC241020001)、TNFR1(批号 AC241106287)抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司;ERK1/2(批号 T06261864)、p-ERK 1/2(批号 T04291512)抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;动物行为分析软件购自上海吉亮信息科技有限公司。

1.3 动物 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,5~6 周龄,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号 SCXK(豫 2020-0005)]。实验前,动物适应性饲养 1 周,室温(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 \pm 10)%,12 h/12 h 明暗循环。本研究动物实验经皖西学院动物伦理委员会审核批准后执行(伦理号 202412003)。

1.4 霍山石斛提取物制备

1.4.1 霍山石斛醇提取物(DHEE)制备 取霍山石斛干燥茎适量,粉碎,加入 20 倍量 70%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,60 $^{\circ}$ C 下减压浓缩,即得。

1.4.2 霍山石斛水提取物(DHAE)制备 取霍山石斛干燥茎适量,粉碎,加入 20 倍量蒸馏水回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,60 $^{\circ}$ C 下减压浓缩,即得。

1.5 动物 造模及给药 首先进行预实验,对比 DHEE 和 DHAE 对 CUMS 小鼠行为学的影响。40 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、DHEE 组(4 g/kg,按生药量计)和 DHAE 组(4 g/kg,按生药量计),每组 10 只。小鼠适应性饲养 7 d 后,

开始建立 CUMS 模型。将小鼠暴露于应激环境中,应激种类包括禁水 12 h;禁食 12 h;昼/夜颠倒 24 h;笼倾斜 45 $^{\circ}$,持续 24 h;轻夹鼠尾 1 min;保持笼中潮湿 12 h;噪声干扰 1 h;4 $^{\circ}$ C 冷水游泳 5 min;摇晃 30 min 等,在选择每种刺激时应保持随机性,同一刺激的间隔时间应大于 5 d^[8]。实验造模开始后每周定时称量并记录小鼠体质量,以分析抑郁样行为对体质量增长的影响。造模时间为 21 d,第 0、7、14、21 天测试各组小鼠的蔗糖偏好,以确定 CUMS 模型构建成功。

造模成功后,连续灌胃给予霍山石斛提取物,期间给药组继续进行 CUMS 刺激,持续 14 d。末次给药 2 h 后,按照糖水偏好实验、悬尾实验、强迫游泳实验的顺序进行行为学检测。

1.6 LC-MS/MS 分析入海马体组织成分

1.6.1 供试品溶液制备 行为学检测完成后,对小鼠实施安乐死,去除大脑并剥除脑膜,快速取出海马体组织,用 PBS 冲洗,匀浆,加入胶原酶进行消化,离心,去除上清,加入 20%蔗糖溶液重悬细胞,弃去下层粉红色微血管,加入 17%蔗糖溶液重悬细胞。随后,加入盐酸、乙腈,涡旋,加入甲醇-乙腈-水(2:2:1)进行提取,离心后收集上清液,即得。

1.6.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m);流动相水(含 25 mmol/L 乙酸铵和氨水)(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 95%B; 0.5~7 min, 95%~65%B; 7~8 min, 65%~40%B; 8~9 min, 40%B; 9~9.1 min, 40%~95%B; 9.1~12 min, 95%B);体积流量 0.5 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 2 μ L。

1.6.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);正、负离子扫描;喷雾电压 3.8、-3.4 kV;离子传输管温度 320 $^{\circ}$ C;鞘气压力 50 arb;辅助气压力 15 arb;一级全扫描分辨率 60 000;二级质谱分辨率 15 000。

1.7 网络药理学分析

1.7.1 霍山石斛有效成分作用靶点预测 选择“1.6”项下鉴定出的入海马体组织成分作为活性成分,利用 SwissTargetPrediction 数据库预测霍山石斛活性成分的潜在作用靶点。

1.7.2 抑郁症相关靶点预测 以“depression”为关键词,在 OMIM 及 GeneCards 数据库中检索并筛选疾病相关靶点,然后通过 Venny 2.1 平台获取药

物作用靶点与疾病靶点的交集靶点, 并进行可视化处理。

1.7.3 PPI网络构建 将“1.7.2”项下获取的交集靶点导入 STRING 数据库中, 仅保留综合置信度分数 >0.7 (高置信度) 的相互作用关系用于网络构建, 并利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 PPI 网络进行可视化处理。

1.7.4 GO功能和KEGG通路富集分析 将交集靶点导入 DAVID 6.8 数据库中, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析^[9]。以 $P<0.05$ 为筛选标准, 得到药物干预疾病的生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 以及相关信号通路。

1.8 霍山石斛对 CUMS 小鼠抑郁样行为的改善作用

1.8.1 动物分组、造模及给药 60 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (10 mg/kg) 及 DHEE 高、中、低剂量组 (8、4、2 g/kg, 按生药量计), 每组 10 只。按“1.5”项下方法处理。

1.8.2 行为学测试

1.8.2.1 糖水偏好实验 实验前, 对小鼠进行 1 次 1% 糖水偏好训练。每笼放置分别装有纯水和 1% 蔗糖水溶液的瓶子, 12 h 后称定质量。计算基础糖水偏好率, 公式为糖水偏好率 = (糖水消耗量/总饮水量) $\times 100\%$, 每周固定时间复测 1 次^[10]。

1.8.2.2 旷场实验 将小鼠置于旷场中心, 使用红外跟踪系统 (Digbehv 4.5) 记录其活动, 适应 2 min 后, 测定 4 min 内的运动总路程和中央区停留时间^[11]。

1.8.2.3 高架十字迷宫实验 根据小鼠对开臂 (新奇) 和闭臂 (安全) 的矛盾选择评估焦虑行为。将小鼠置于迷宫中心自由探索 2 min 后, 用红外跟踪系统 (Digbehv 4.5) 记录 4 min 内开臂停留时间及开臂进入次数^[12]。

1.8.2.4 悬尾实验 用胶带固定小鼠尾部 1 cm 处, 悬挂于离地 2 cm 处。在小鼠适应 2 min 后, 记录 4 min 内的总不动时间 (无挣扎即判定为不动)^[13]。

1.8.2.5 强迫游泳试验 将小鼠置于透明游泳缸 (水温 23~25 $^{\circ}\text{C}$, 水深 30 cm), 适应 2 min 后, 记录 4 min 内的总不动时间 (仅维持平衡的微小肢体运动即判定为不动)^[14]。

1.8.3 小鼠海马体组织收集 行为学测定完成后, 对小鼠实施安乐死, 迅速取出小鼠全脑, 在冰上分离取得大脑海马组织, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.8.4 甲苯胺蓝染色观察海马体组织病理学形态 取小鼠海马体组织, 用多聚甲醛固定, 脱水包埋, 切片。将组织切片脱蜡、水化, 并用甲苯胺蓝染色, 置于光学显微镜下观察并拍照^[15]。

1.8.5 ELISA 法检测海马体组织炎症因子水平 取海马体组织适量, 参照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平。

1.8.6 Western blot 法检测海马体组织 TNFR1、p-ERK1/2 蛋白表达 取海马体组织适量, 经蛋白裂解后, BCA 法测定总蛋白含量。取适量蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 并转至 PVDF 膜, 加一抗 GAPDH、TNFR1、ERK1/2、p-ERK1/2, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜后, 加二抗室温孵育 1 h, 使用超灵敏 ECL 显影后, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值^[16]。

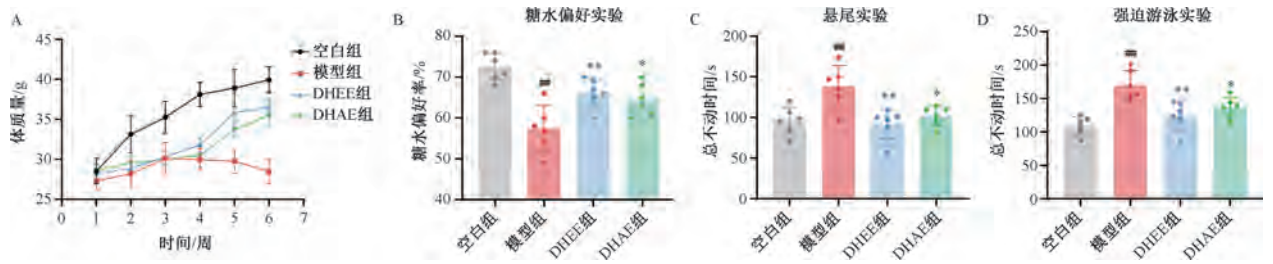
1.8.7 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.02 软件进行处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 Student *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DHEE 和 DHAE 对 CUMS 小鼠行为学的影响 造模 3 周后, 与空白组比较, 模型组小鼠体质量降低, 糖水偏好率降低 ($P<0.01$), 提示 CUMS 小鼠造模成功。与模型组比较, DHEE 组和 DHAE 组小鼠体质量增加 (图 1A), 糖水偏好率升高 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 1B), 悬尾和强迫游泳实验的总不动时间均缩短 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 1C~1D)。以上结果说明霍山石斛对 CUMS 小鼠抑郁样行为具有显著的改善作用, 且以 DHEE 的效果更明显。

2.2 DHEE 入海马体组织的活性成分鉴定 对“2.1”项下 DHEE 组小鼠海马体进行 LC-MS/MS 检测, 总离子流图见图 2, 共得到 22 种入海马体的成分, 信息见表 1。

2.3 霍山石斛活性成分治疗抑郁症的靶点预测 共获得 480 个霍山石斛活性成分靶点, “药物-化合物-靶点”网络见图 3A。从 GeneCards 数据库中获取 16 310 个抑郁症相关靶点, 将霍山石斛入海马体活性成分靶点与抑郁症疾病靶点取交集后, 共得到 414 个靶点, 韦恩图见图 3B。利用 STRING 数据库获得交集靶点的相互关系, 构建出包含 150 个靶点的 PPI 网络 (图 3C)。该网络由 155 个节点和 809 条边组成, 其中排名前 10 位的核心靶点依次为



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图1 DHEE和DHAEE对CUMS小鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

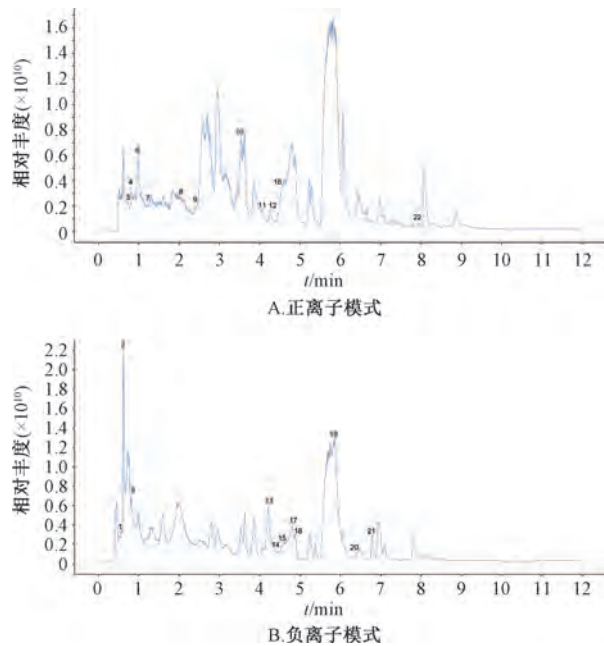


图2 霍山石斛 LC-MS 总离子流图

TP53、EGFR、MAPK3、SRC、TNF、HSP90AA1、PRKACA、MAPK14、JAK2、PIK3CB。经Cytoscape软件分析，网络节点的连接度(Degree)中位数为11，其中75个靶点(占总数的50%)的Degree值高于该中位数，提示这些靶点在网络中可能扮演重要角色。

2.4 GO功能和KEGG通路富集分析 GO功能分析显示，霍山石斛防治抑郁的BP主要包括离子型谷氨酸受体信号通路、MAPK级联的正向调控、化学性突触传递等；CC主要包括GABA-A受体复合物、神经元突起、树突等；MF主要包括苯二氮草受体活性、细胞外配体门控单原子离子通道活性、神经递质受体活性等。按P值排序，每个种类选择前10个条目进行可视化分析(图4A)。KEGG通路富集分析共筛选得到149条信号通路($P < 0.01$)，发现排名前20位的多为与MAPK信号通路相关的炎症通路(图4B)。

2.5 霍山石斛对CUMS小鼠抑郁样行为学的影

响 由图5可知，与模型组比较，氟西汀组及DHEE高、中剂量组CUMS小鼠体质量增长改善，糖水偏好率升高($P < 0.01$)，旷场运动总路程增加且中央区停留时间延长($P < 0.05, P < 0.01$)，开臂进入次数和开臂进入时间占比均升高($P < 0.01$)，悬尾和强迫游泳的总不动时间缩短($P < 0.05, P < 0.01$)。以上结果说明霍山石斛对CUMS诱导的抑郁样行为具有显著改善作用。

2.6 霍山石斛对CUMS小鼠海马体组织病理形态的影响 根据海马体的功能解剖，齿状回(DG)主要负责神经发生与模式分离，海马角3区(CA3)参与模式完成与记忆联想；两者在抑郁症中常出现神经元萎缩及突触可塑性受损，共同导致海马体体积缩小。由图6可知，空白组小鼠的海马体神经元中的尼氏小体排列整齐，细胞形态完整，胞浆充盈，未见明显的病理改变。模型组小鼠海马体神经元中尼氏小体排列紊乱，形态不规则，部分出现萎缩或变性，间隙增大，提示神经元损伤和凋亡。氟西汀组和DHEE高、中、低剂量组小鼠海马体组织病理形态明显改善，表现为海马体神经元密度恢复，细胞凋亡减少，尼氏小体形态萎缩与变性有明显恢复。表明霍山石斛通过保护海马体神经元，减轻慢性应激所致的神经损伤，从而改善抑郁样行为。

2.7 霍山石斛对CUMS小鼠海马体组织炎症因子水平的影响 由图7可知，与空白组比较，模型组小鼠海马体组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高($P < 0.01$)，IL-4、IL-10水平降低($P < 0.01$)；与模型组比较，氟西汀组和DHEE高、中剂量组小鼠海马体组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$)，IL-4、IL-10水平升高($P < 0.05, P < 0.01$)。表明霍山石斛对CUMS引起的海马体神经炎症反应具有一定的抑制作用。

2.8 霍山石斛对CUMS小鼠海马体组织TNFR1、p-ERK1/2蛋白表达的影响 TNF/ERK信号通路作

表1 霍山石斛入海马体的活性成分

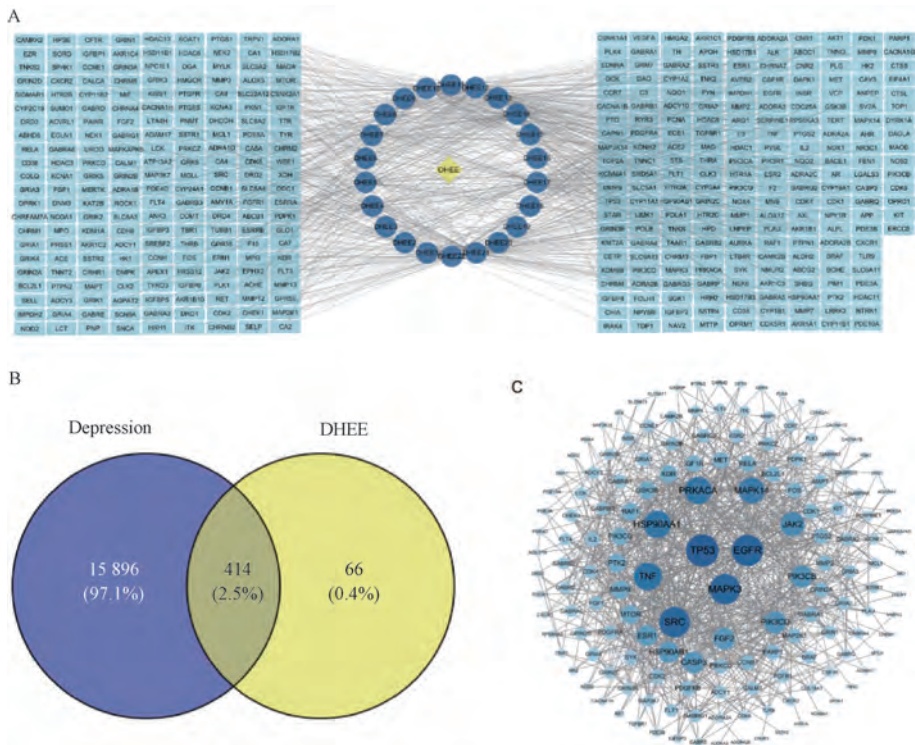
编号	化合物名称	化学式	MS/MS	加合方式
DHEE1	hexamethylquercetagenin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	309.076 0, 324.099 8, 357.135 8, 386.097 8, 401.120 5	[M-H] ⁻
DHEE2	(2S)-6-[(2S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-2,3-dihydrochromen-8-yl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	60.349 1, 245.050 6, 363.068 8, 381.079 0, 543.131 5	[M+H] ⁺
DHEE3	schaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	393.096 1, 435.106 1, 469.112 3, 500.128 9, 530.140 0, 565.152 7	[M+H] ⁺
DHEE4	methyl 4,6-di-O-galloyl-β-D-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄	258.050 5, 277.039 9, 302.042 9, 366.093 4, 499.114 7	[M+H] ⁺
DHEE5	2'-hydroxy-2,4',6'-trimethoxychalcone	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	102.027 7, 120.038 3, 143.034 5, 161.045 2, 180.059 5, 313.113 3	[M-H] ⁻
DHEE6	violanthin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	354.071 4, 384.079 2, 416.236 1, 473.105 9, 503.117 2, 559.143 1, 577.155 2	[M-H] ⁻
DHEE7	(4S, 5Z, 6S)-4-(2-methoxy-2-oxoethyl)-5-[2-[(Z)-3-phenylprop-2-enoyl]oxyethylidene]-6-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-4H-pyran-3-carboxylic acid	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	222.126 0, 263.140 3, 299.100 4, 357.037 5, 414.096 1, 471.611 2, 531.264 0	[M-H] ⁻
DHEE8	isorhamnetin-3-O-rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	425.087 6, 467.097 1, 503.118 3, 533.127 9, 605.141 4, 623.159 3	[M-H] ⁻
DHEE9	lonicerin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	355.081 0, 425.085 8, 474.110 9, 503.118 6, 534.133 6, 575.137 7, 593.149 9	[M-H] ⁻
DHEE10	3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	57.033 4, 87.043 8, 116.042 6, 145.049 3, 433.143 7	[M+H] ⁺
DHEE11	isoshinanolone	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	69.070 3, 95.085 6, 119.085 6, 147.080 8, 174.055 1, 193.085 6	[M+H] ⁺
DHEE12	N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]octanamide	C ₁₆ H ₂₅ NO ₃	101.059 6, 122.096 3, 166.122 6, 244.118 2, 262.128 2, 280.190 5	[M+H] ⁺
DHEE13	dihydroresveratrol	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	81.034 4, 106.042 2, 124.047 8, 229.086 5	[M-H] ⁻
DHEE14	succinimide	C ₄ H ₅ NO ₂	41.998 4, 55.018 8, 61.988 1, 71.013 4, 98.024 5	[M-H] ⁻
DHEE15	hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	207.051 6, 257.071 6, 286.075 1, 302.076 4, 325.077 7	[M-H] ⁻
DHEE16	vicenin-1	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	353.064 2, 413.087 0, 443.096 6, 473.105 7, 503.120 3, 563.139 3	[M-H] ⁻
DHEE17	naringenin chalcone	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	65.003 2, 93.034 5, 125.024 3, 151.003 4, 177.019 1, 227.071 3, 256.074 4, 271.060 8	[M-H] ⁻
DHEE18	apigenin 6-C-alpha-L-arabinopyranosyl-8-C-beta-D-xylopyranoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	338.073 5, 364.088 0, 406.101 3, 434.095 6, 469.112 5, 500.127 1, 535.144 1	[M+H] ⁺
DHEE19	(E)-3-[2-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]prop-2-enoic acid	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	129.054 6, 145.049 6, 160.076 4, 214.085 4, 262.107 7, 308.112 8, 344.074 0	[M+NH ₄] ⁺
DHEE20	(E)-3-[4-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]prop-2-enoic acid	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	129.003 4, 145.049 4, 159.995 7, 214.035 5, 262.056 0, 307.100 8, 344.094 6	[M+NH ₄] ⁺
DHEE21	dehydrodiisoeugenol	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	175.118 8, 214.086 0, 241.100 2, 267.111 9, 283.106 9, 314.100 7, 349.138 6	[M+Na] ⁺
DHEE22	2,3-bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]butane-1,4-diol	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	214.093 7, 244.142 1, 274.148 5, 363.175 8	[M+H] ⁺

为炎症与抑郁症交互作用的核心分子枢纽，通过多维度机制参与疾病进程。由图8可知，与空白组比较，模型组小鼠 TNFR1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)，p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组 TNFR1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，氟西汀组及 DHEE 中、高剂量组 p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这些结果表明，霍

山石斛可能通过抑制 MAPK 信号通路中的 TNFR1 蛋白和 ERK 蛋白磷酸化来减轻炎症反应，发挥改善抑郁的作用。

3 讨论

抑郁症是一种全球范围内高发的精神障碍疾病，现有药物存在疗效滞后、不良反应明显等局限性^[17]。本研究通过网络药理学分析构建了“霍山



注：A 为“药物-化合物-靶点”网络图，B 为霍山石斛和抑郁症交集靶点 Venny 图，C 为霍山石斛和抑郁症交集靶点 PPI 网络图。

图 3 霍山石斛活性成分治疗抑郁症的靶点预测及 PPI 网络

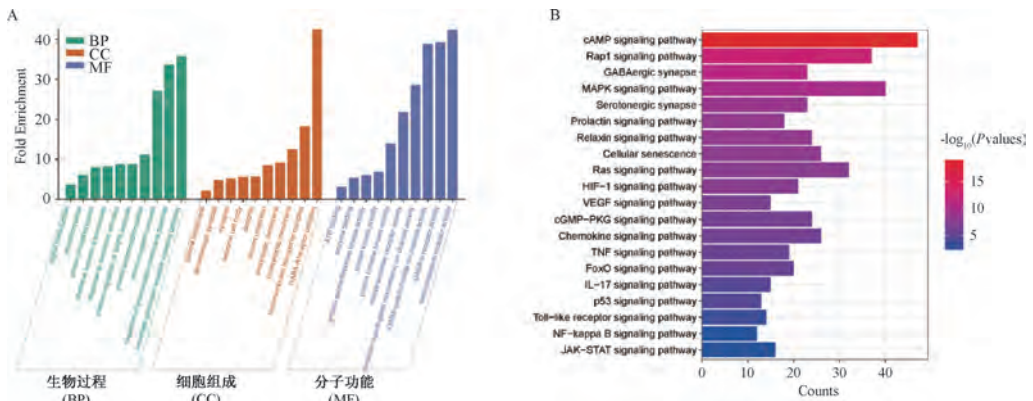
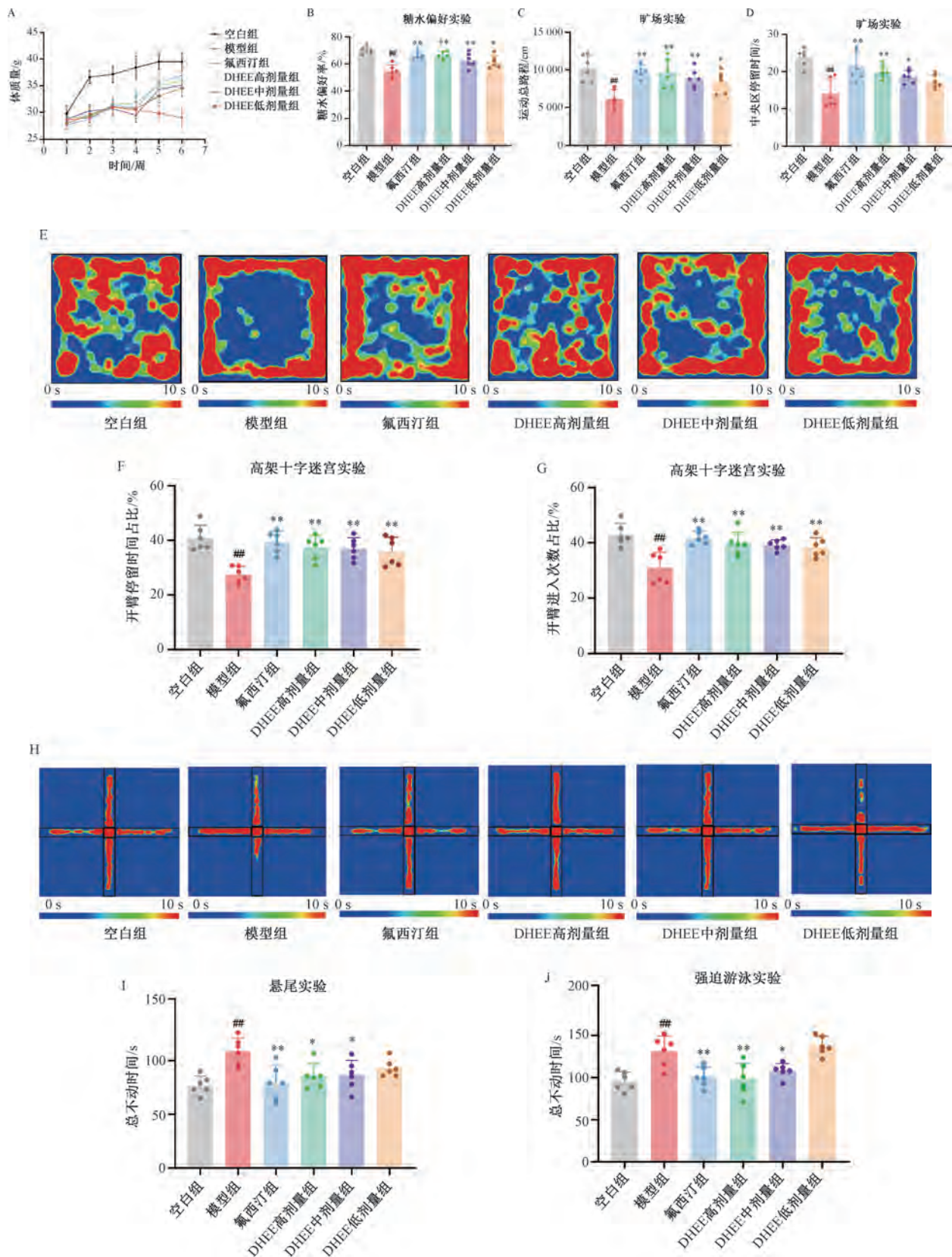


图 4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

石斛-成分-靶点”互作网络，并结合动物实验探究霍山石斛的抗抑郁机制，其中 TNF 和 MAPK 信号通路是其发挥作用的关键靶点。现有研究表明，TNF- α 作为神经炎症中的关键介质，不仅能够通过 TNFR1/TNFR2 信号通路激活下游 JNK、NF- κ B 等信号，还可能通过间接调节 MAPK/ERK 信号通路活性影响神经细胞可塑性^[18]。霍山石斛能降低促炎因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 水平，提高抗炎因子 (IL-4、IL-10) 水平，提示其可能通过重塑炎症微环境，缓解对 MAPK/ERK 信号通路的抑制。这一结果与网络药理学中的“炎症反应”“TNF 信

号通路”等富集结果相符，体现了中药通过多靶点协同调节炎症稳态的特点。

MAPK/ERK 信号通路是调控突触可塑性与神经元存活的关键信号轴，其磷酸化水平降低会削弱 CREB1、BDNF 等下游蛋白功能，损害神经可塑性^[19]。在本研究中，霍山石斛恢复了小鼠海马体中 p-ERK1/2 的表达，提示其可能通过激活该通路促进神经营养信号转导，进而改善突触结构与功能。行为学测试中，小鼠糖水偏好率升高与自主活动改善与上述分子层面神经可塑性恢复密切相关，进一步凸显 MAPK/ERK 信号在抑郁症病理过程中



注：与空白组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图5 霍山石斛对CUMS小鼠抑郁样行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

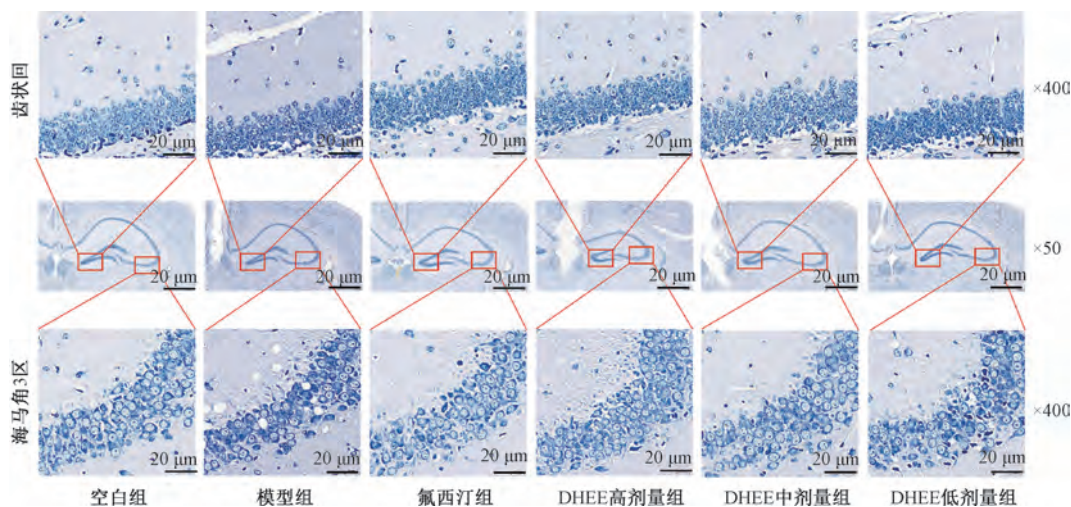
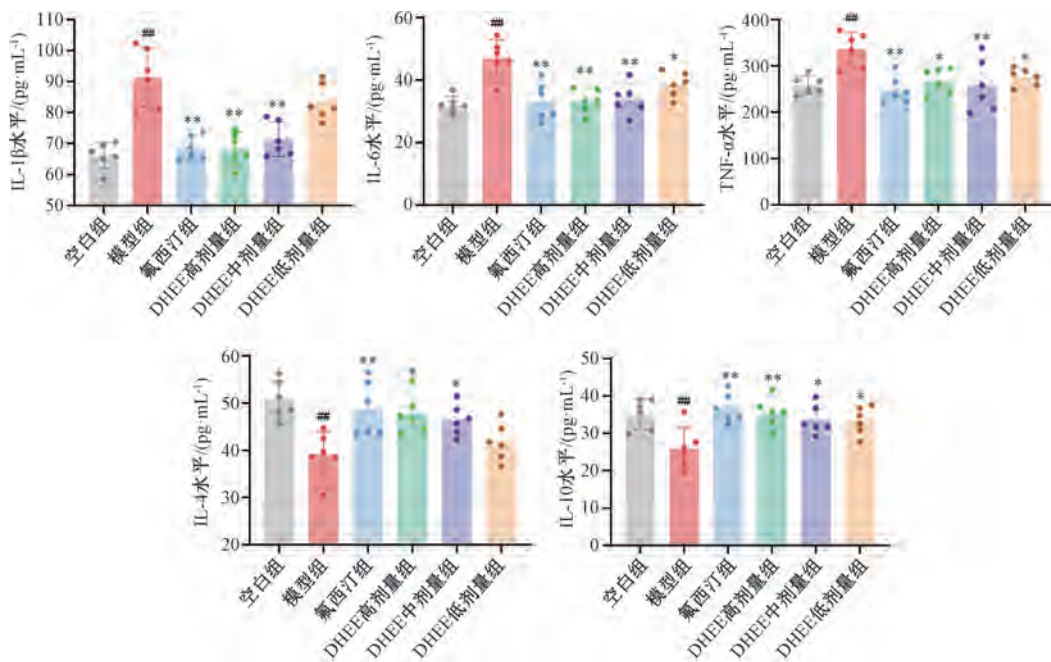
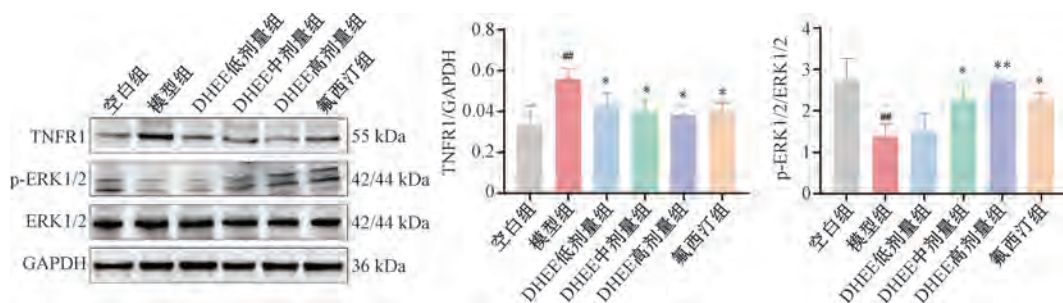


图6 霍山石斛对 CUMS 小鼠海马体组织病理形态的影响 (甲苯胺蓝染色)



注: 与空白组比较, ### $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图7 霍山石斛对 CUMS 小鼠海马体组织炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



注: 与空白组比较, ### $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图8 霍山石斛对 CUMS 小鼠海马体组织 TNFR 1、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

的关键地位。

此外, GO 功能和 KEGG 通路富集分析发现,

霍山石斛的潜在靶点还涉及 5-HT、DA、GABA 等神经递质系统。神经炎症可通过影响关键合成酶或

转运体功能,破坏神经递质稳态^[20],而MAPK信号通路也参与调控多种神经递质受体的表达与功能。因此,推测霍山石斛可能通过抑制神经炎症、恢复MAPK信号通路,进而调节神经递质系统功能,形成从炎症调控到信号转导、再到神经递质平衡的多层次抗抑郁机制。

进一步分析表明,霍山石斛对“神经炎症-MAPK/ERK”这一网络的调控,可能与其所含多种活性成分的协同效应有关。LC-MS/MS分析得到的活性成分可能分别作用于炎症通路、神经营养信号或递质稳态的不同环节,共同构成其整体抗抑郁效应的物质基础。未来研究可进一步聚焦于关键成分的分离与功能验证,明确其在上述网络中的具体靶点与功能,从而为霍山石斛治疗抑郁的应用提供依据。

综上所述,本研究基于LC-MS/MS与网络药理学,构建“入海马体成分—作用靶点—信号通路—行为表型”的研究框架,阐释了霍山石斛抗抑郁的科学内涵。实验证实,霍山石斛通过多组分、多靶点协同作用调控MAPK信号通路,减轻神经炎症,改善突触可塑性,从而缓解CUMS小鼠抑郁样行为。这一发现不仅为霍山石斛“定志除惊”的传统功效提供了现代科学解释,也为开发新型抗抑郁中药提供了理论依据和研究思路。

参考文献:

[1] Zhang G H, Shang R R, Zhong X, *et al.* Natural products target pyroptosis for ameliorating neuroinflammation: A novel antidepressant strategy[J]. *Phytomedicine*, 2025, 138: 156394.
[2] Lu J, Xu X F, Huang Y Q, *et al.* Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study[J]. *Lancet Psychiatry*, 2021, 8(11): 981-990.
[3] 马 喆. 从肝论治抑郁症的中医诊治思路[J]. *人人健康*, 2019(4): 108.
[4] 蔡 明, 蔡静雯, 杨青山, 等. 霍山石斛化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(18): 4860-4873.
[5] 陶弘景. *名医别录*[M]. 尚志钧, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1986.

[6] 李绍洋, 许 永, 李秀春. 霍山石斛有效成分和药理作用研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(4): 101-104.
[7] Beurel E, Toups M, Nemeroff C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble[J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234-256.
[8] 李杉杉, 刘新民, 王 琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 77-83.
[9] 梁 丹, 宋月月, 刘德坤, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨复方丹参方延缓衰老、拮抗动脉粥样硬化的作用[J]. *中成药*, 2025, 47(4): 1356-1362.
[10] 刘冬播, 陈泽文, 王 云, 等. 慢性不可预知温和应激诱导的抑郁小鼠中央杏仁核和边缘前皮质神经网络的可塑性变化[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(11): 2082-2091.
[11] 王 贞, 黄怡佳, 乃爱桃, 等. 氟西汀通过上调海马内溴结构域蛋白4的表达改善慢性束缚应激所致小鼠的抑郁样行为[J]. *解剖学报*, 2019, 50(1): 18-23.
[12] Antoniuk S, Bijata M, Pomimaskin E, *et al.* Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
[13] 刘子轩, 霍 清, 孙雅焯, 等. 抑郁症动物模型的建立及评价方法研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2025, 33(2): 249-258.
[14] 韩雪梅, 朱 英, 秦琰杰, 等. 柴胡皂苷D靶向抑制NLRP3炎症小体调控犬尿酸代谢的抗抑郁作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(14): 1543-1549.
[15] 王浩玉, 荆治华. 银杏叶提取物对阿尔茨海默病小鼠模型的治疗潜力及其可能的作用机制[J]. *工业微生物*, 2024, 54(3): 58-60.
[16] 吴迎朝, 朱仕奇, 梁嘉谊, 等. 逍遥散通过减轻海马神经炎症缓解乳腺癌性抑郁[J]. *中草药*, 2025, 56(11): 3910-3919.
[17] Malhi G S, Mann J J. Depression[J]. *Lancet*, 2018, 392(10161): 2299-2312.
[18] 张一凡, 韩向晖, 刘 萍. 丹酚酸B通过抑制MAPKs/NF-κB信号通路减轻动脉粥样硬化模型小鼠肝脏炎症反应[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(4): 525-530.
[19] 赵 霞, 薛 娣, 师少军. 芍药苷通过激活LKB1/AMPK信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 671-678.
[20] 蔡海燕, 闫 雨, 焦旭文, 等. 癫痫发作后诱发炎症反应对癫痫大鼠学习记忆以及Erk1/2、p-Erk1/2和Caspase-3阳性表达的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2024, 46(11): 1096-1101.