

基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨四磨汤口服液防治抑郁症的药效物质基础与作用机制

赵 权¹, 戴国梁², 许美娟²,
欧阳冰琛², 蒋 婷¹, 颜晓静¹, 张卫东^{1*}

¹南京中医药大学常州附属医院, 常州 213003; ²南京中医药大学附属医院, 南京 210029

摘要:采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)挖掘四磨汤口服液的化学成分,并联合网络药理学探讨四磨汤口服液防治抑郁症的主要活性成分及机制。采用液质手段对该成药入血成分进行准确分析;采用 PubChem Compound、SwissTargetPrediction 等数据库进行入血成分的蛋白靶点预测;同时从 OMIM、GeneCards 检索抑郁症的疾病靶点,选取成分与疾病的交集靶点作为蛋白靶点库。在 STRING 在线数据平台上输入交集靶点,设置检索条件“Homo sapiens”,分析其蛋白质间的相互作用。将交集靶点信息输入 Cytoscape 3.7.1 进行可视化网络分析,构建 PPI 网络;对药效疾病靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。最后绘制“入血成分-作用靶点-作用通路”网络图;尝试筛选出关键药效物质基础,并初步探究其作用机制。从四磨汤口服液血浆样品中共鉴定出 20 个化学成分;“成分-靶点-通路”网络图涉及 19 个化合物、181 个靶点和 20 条通路,从中筛选出与抑郁症相关的活性成分有:波尔多定碱、去甲异波尔多定、异波尔多定碱、柠檬苦素、异鼠李素;与抑郁症相关的靶点有磷脂酰肌醇-3-激酶亚基 γ (PIK3CG)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶 1(MAP2K1)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、磷酸肌醇-3-激酶亚基 α (PIK3CA)、蛋白激酶 C α (PRKCA)。四磨汤口服液可能主要从参与炎症反应、神经元凋亡、细胞生理、氧化应激及免疫应答等活动,调节 PI3K-Akt、cAMP、5-HT、MAPK 等通路方面发挥了防治抑郁症的作用。

关键词:四磨汤口服液;抑郁症;网络药理学;液相色谱/四级杆-飞行时间质谱法;药效物质;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0144-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.019

Investigation on the pharmacodynamic material basis and mechanism of Simotang oral liquid against depression based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology

ZHAO Quan¹, DAI Guo-liang², XU Mei-juan²,
OUYANG Bing-chen², JIANG Ting¹, YAN Xiao-jing¹, ZHANG Wei-dong^{1*}

¹Changzhou Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213003, China;

²Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: To explore the chemical constituents of Simotang oral liquid by high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS), and to explore Simotang oral liquid with network pharmacology. The main active components and mechanisms of prevention and treatment of depression. Liquid-mass method was used to accurately analyze the blood components of the patent medicine; PubChem Compound, SwissTargetPrediction and other databases were used to predict the protein targets of blood components; at the same time, the disease targets of depression were retrieved from OMIM and GeneCards, and the components and diseases were selected. The intersection targets are used as a protein target library. Enter the intersection targets on the STRING online data platform, set the search condition "Homo sapi-

ens", and analyze the interaction between their proteins. The intersection target information was input into Cytoscape 3.7.1 for visual network analysis, and PPI network was constructed; GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed on drug efficacy disease targets. Finally, draw a network diagram of "blood entry components-action targets-action pathways"; try to screen out the key pharmacodynamic material basis, and preliminarily explore its mechanism of action. A total of 20 chemical components were identified from the plasma samples of Simotang oral liquid; the "component-target-pathway" network map involved 19 compounds, 181 targets and 20 pathways. Active ingredients are boldine, norisoboldine, isoboldine, limonin, isorhamnetin; targets related to depression are PI3-kinase p110-gamma subunit (PIK3CG), dual specificity mitogen-activated protein kinase1 (MAP2K1), mitogen-activated protein kinase1 (MAPK1), PI3-kinase p110-alpha subunit (PIK3CA), protein kinase C alpha (PRKCA). Simotang oral liquid may play a role in the prevention and treatment of depression mainly by participating in inflammatory response, neuronal apoptosis, cell physiology, oxidative stress and immune response, and regulating PI3K-Akt, cAMP, 5-HT, MAPK and other pathways.

Key words: Simotang oral liquid; depression; network pharmacology; HPLC/Q-TOF-MS; pharmacodynamic substances; mechanism

抑郁症作为一种常见的精神疾病,其特征为显著而持久的心境低落,如情绪低落、快感缺乏、失去兴趣或快乐,并与高发病率和死亡率相关^[1]。根据世界卫生组织(WHO)的数据,全球抑郁症患者估计有3.5亿人,最严重时,抑郁症可引致自杀,每年有近80万人因自杀死亡,自杀是15~29岁年龄组人群的第二大死亡原因^[2,3]。抑郁症危及人类身心健康,已经成为精神卫生领域的难题。

中医把抑郁症归属“郁”的范畴,典籍记载有“脏躁”“梅核气”“百合病”等。中医认为“肝气郁结”“肝郁脾虚”为郁证的主要证候类型,叶天士指出“泄肝以安胃,培土必先制木”。唐容川认为“肝主疏泄,喜条达而恶抑郁”。可见肝、脾两脏生理功能的紊乱是抑郁症的病机之一。

四磨汤又名四磨饮子,源自明代翁仲仁《痘疹金镜录》,具有顺气降逆,消积止痛之效^[4],主要用于治疗因七情感伤而见气上气逆之证^[5],上气喘息,胸膈不舒,烦闷不食。方中木香为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根;行气止痛,健脾消食;枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实;理气宽中,行气消胀;槟榔为棕榈科植物 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子;杀虫、消积、行气、利水、截疟;乌药为 *Lindera aggregate* (Sims) Kos-term. 的干燥块根;行气止痛,温经散寒^[6]。四磨汤药味组成精简,皆为理气之品,全方着眼于调畅中焦气机,共奏疏肝和胃、顺气降逆之功效,符合疏肝理气治法之原则。运用四磨汤加减,可以治疗脏躁呃逆证,肝郁气滞型、肝脾不和型肠易激综合征和功能性消化不良伴焦虑抑郁症等抑郁病症^[7-9];四磨汤对脑-肠轴,肠道细菌多样性

等均有调节作用^[10,11];Chen等^[12]通过临床试验发现,四磨汤可以增加抑郁患者血液中的单胺类神经递质和氨基酸类神经递质的含量,其中包括5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和谷氨酸(glutamic acid, Glu)等,并且可以降低白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子水平,其治疗抑郁作用显著。然而,对于四磨汤的入血成分分析未见报道,且对于四磨汤化学成分体内作用机制尚不明确,研究其活性成分及体内关键靶点对于阐述其药效物质基础和作用机制具有重要意义。

UPLC-Q-TOF-MS/MS由于灵敏度高、扫描范围广的特点,已成为快速确定复方药效物质的有效途径之一^[13]。网络药理学作为一种研究中药复方的新方法,它融合了包括生物信息学、系统生物学和传统药理学在内的多个学科^[14]。以四磨汤入血成分定性结果为依据,结合网络药理学研究可初步阐明复方制剂体内多成分-多靶点-多通路作用机制,可为其进一步研究四磨汤药效物质及作用机制提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC(美国Agilent)-Triple TOF TM 5600液相色谱-质谱联用仪(美国B Sciex),配有PeakView(version 1.2)数据处理软件和质谱自动校准调谐系统(CDS);Milli-Q Advantage A10超纯水机(美国Millipore公司);Legend Micro 17R冷冻离心机(美国Thermo公司);KH5200E超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);WH2微型旋涡混合仪(上海沪

西分析仪器厂); CPA 225D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试药与试剂

辛弗林(批号 MUST-17041915)、柚皮苷(批号 MUST-17040102)、木香烃内酯(MUST-17050705)、橙皮苷(MUST-17032502)、新橙皮苷(MUST-17040707)、乌药醚内酯(MUST-17022303)、去甲异波尔定(MUST-17030605)均购于成都曼斯特,纯度均大于 98%;甲醇和乙腈(HPLC 级,德国 Merck);甲酸(质谱级,瑞士 Fluka-Sigma-Aldrich);四磨汤口服液(批号:2012316,湖南汉森制药股份有限公司)。将四磨汤口服液减压浓缩至 7.7 倍,待用。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠,体重 180 ± 20 g,许可证号:SCXK(苏)2017-0029,由南通大学提供。经南京中医药大学附属医院实验动物伦理委员会审查,该研究符合动物保护、动物福利和伦理原则,伦理审查批件号:2020 DW-17-02。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB C_{18} 柱(4.6 mm \times 100 mm,1.8 μ m);流动相:乙腈:甲醇(V/V = 1:1, A)-0.1% 甲酸水(B);梯度洗脱见表 1;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样体积:10 μ L。

表 1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

时间 Time(min)	流速 Flow rate (μ L/min)	A(%)	B(%)
0	400	85	15
2.5	400	80	20
7	400	75	25
12	400	50	50
19	400	20	80
23	500	54	46
26	550	85	15
30	550	85	15

1.4.2 质谱条件

电喷雾离子源以正负离子模式采集数据,TOF-MS 扫描模式参数设置如下:分子量扫描范围 m/z 100 ~ 1 000,累积时间 0.280 0 s;离子化温度(TEM) 550 $^{\circ}$ C;雾化气(GS1):50 psi;辅助加热气(GS2):60 psi;气帘气(CUR):20 psi;去簇电压(DP):80 V;碰

撞能量(CE):30 eV;正负离子模式下喷雾电压(IS-VF)分别为 5 500 V 和 4 500 V。采用信息关联采集(information dependent acquisition, IDA)、智能化的动态背景扣除(dynamic background subtraction, DBS)和高灵敏度的模式采集数据。主要的 IDA 转换标准如下:信号强度大于 10 cps,4 Da 以内排除同位素,分子量误差 50 mDa。采用 AB 公司的调谐液传递系统(CDS)对分子量准确度进行自动校准。通过 AB 公司的分析控制软件 Analyst[®]TF 1.6 software 控制仪器操作和数据采集。

1.4.3 对照品溶液的制备

精密称取辛弗林、柚皮苷、木香烃内酯、橙皮苷、新橙皮苷、乌药醚内酯、去甲异波尔定对照品适量,分别加甲醇制成质量浓度分别为 2.24、2.17、1.00、1.00、1.00、2.60、1.00 mg/L 的对照品溶液,4 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.4.4 实验动物饲养、给药及样品处理

SD 大鼠适应性喂养 1 周后,禁食 12 h,取空白血。按照每 100 g 体质量 1 mL 灌胃给药。根据前期实验,于给药后 0.25、0.5、1 h 眼眶取血约 0.3 mL 于含肝素钠的 Ep 管中,5 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆于 -20 $^{\circ}$ C 保存一天后,转移至 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.5 血浆样品的制备

取空白及含药血浆 100 μ L,加入 400 μ L 甲醇,涡旋 30 s,振荡 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液再次离心后尽可能转移上清液于另一个 1.5 mL EP 管内,40 $^{\circ}$ C 下 N_2 吹干。用 100 μ L 50% 甲醇复溶,涡旋 15 s,振荡 3 min,12 000 r/min 离心 10 min 两次,再次离心 10 min 取上清液后进样。

1.4.6 入血成分的鉴定

通过相应文献检索各中药材所含的化合物,根据 ChemSpider、PubChem Compound 收集四磨汤可能含有的物质的分子式、分子量。PeakView 软件分析其总离子流图,为保证分析结果的准确性,筛选在 5 ppm 的质量偏差(error 值)范围内的化合物准分子离子峰与二级碎片离子峰。检索相关文献和参考对照品,核对各化合物保留时间、母离子、碎片离子等。其中辛弗林、柚皮苷、木香烃内酯、橙皮苷、新橙皮苷、乌药醚内酯、去甲异波尔定经对照品对比保留时间、一级质谱和二级质谱碎片等信息确认,其余化合物则依据精确相对分子量、碎片离子信息结合参考文献进行确认。

1.4.7 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

经鉴定出的入血成分在 PubChem Compound 上获取其 Canonical Smiles 号,输入到 SwissTargetPrediction 中,获取入血成分的蛋白靶点,同时从 OMIM、GeneCards 检索抑郁症的疾病靶点,选取成分与疾病的交集靶点作为蛋白靶点库。在 STRING 在线数据平台上输入交集靶点,设置检索条件“Homo sapiens”,分析其蛋白质间的相互作用。将交集靶点信息输入 Cytoscape 3.7.1 进行可视化网络分析,根据介度中心性、接近中心性、计算度中心性三者筛选出核心蛋白靶点,构建 PPI 网络。

1.4.8 作用靶点的功能和通路富集分析

为了探究四磨汤治疗抑郁症潜在作用靶点的生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组成(cellular component, CC)以及在通路中的作用,本研究借助 DAVID 数据库,实现 GO 和 KEGG 分析。DAVID 生物信息学资源数据库同时是一个综合的生物学知识库和分析工具,将功能基因组注释与直观的图形摘要集成在一

起,旨在系统地从大型基因列表中获取其代表的生物学意义。

1.4.9 “入血成分-作用靶点-作用通路”网络的构建

将筛选得到的活性成分与预测得到的蛋白靶点输入 Excel 文件,导入到 Cytoscape 3.7.1 作网络图,得到活性成分-蛋白靶点网络图。同理,将预测得到的蛋白靶点与 DAVID 数据库中的功能注释中预测得到的作用通路输入 Excel 文件,导入到 Cytoscape 3.7.1 作网络图,得到蛋白靶点-作用通路网络图。选择 Cytoscape 中的 Tools-Merge-Networks,可将活性成分、蛋白靶点、作用通路合并在一起,构建活性成分-蛋白靶点-作用通路网络图。

2 结果

2.1 化学成分鉴定

从血浆样品中共鉴定出 20 种化合物,包括 9 种来自枳壳,3 种来自槟榔,4 种来自乌药,4 种来自木香。以上成分归属及鉴定信息见表 2,正、负离子模式下的总离子流图见图 1。

表 2 四磨汤口服液中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定结果

Table 2 UPLC-Q-TOF-MS identification results of chemical constituents in Simotang oral liquid

No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	碎片离子 MS ^E fragmentation		化合物 Compound	参考文献 Ref.
					正离子模式 Positive ion mode	负离子模式 Negative ion mode		
1	2.05	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168.014 9	-	150.091 2, 135.116 7, 107.086 1	-	辛弗林 Synephrine *	
2	2.3	C ₈ H ₁₃ NO ₂	156.102 2	-	124.021 6, 113.013 5	-	槟榔碱 Arecoline	15
3	2.54	C ₆ H ₆ O ₃	127.039 2	-	109.021 0	-	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	16
4	3.42	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.070 8	-	285.009 2, 266.998 4, 256.948 2	-	绿原酸 Chlorogenic acid	16
5	3.98	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.153 7	-	297.111 8, 282.088 0, 265.085 7, 237.090 3, 222.068 1, 205.064 6, 194.071 7	-	波尔定碱 Boldine	17
6	5.15	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.140 6	-	297.111 6, 265.085 9, 237.090 7, 222.066 9, 178.075 8	-	去甲异波尔定 Norisoboldine *	
7	5.43	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.153 7	-	297.111 8, 269.085 7, 237.090 3, 209.081 1	-	异波尔定碱 Isoboldine	17
8	6.43	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.111 7	-	243.100 7, 189.054 1, 131.048 9, 103.054 7	-	乌药醚内酯 Linderane *	
9	8.74	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	233.153 0	-	215.142 7, 187.147 6, 145.101 4, 131.085 8, 119.085 4, 105.071 2	-	木香烃内酯 Costunolide *	
10	11.00	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 2	-	425.101 5, 367.082 5, 213.063 5, 161.127 5, 105.086 4	-	柠檬苦素 Limonin	18
11	11.17	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.015 6	579.170 0	273.075 3, 195.028 7, 153.019 8	459.114 4, 271.059 9	柚皮芸香苷 Narirutin	18
12	11.77	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.012 5	579.170 0	435.127 6, 273.075 3, 153.019 8	459.114 4, 271.059 9, 151.003 4	柚皮苷 Naringin *	

续表 2(Continued Tab. 2)

No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	[M + H] ⁺		[M - H] ⁻		碎片离子 MS ^E fragmentation		化合物 Compound	参考文献 Ref.
							正离子模式 Positive ion mode	负离子模式 Negative ion mode		
13	12.87	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.183 3	609.182 1			566.319 1, 507.250 6, 449.149 6, 356.068 4, 303.084 1, 221.083 1	301.913 0	橙皮苷 Hesperidin*	
14	13.57	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.192 6	609.181 3			449.012 5, 303.086 2, 281.051 0, 223.063 3, 153.127 5, 118.086 7	301.912 2	新橙皮苷 Neohesperidin*	
15	15.37	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.140 4	-			178.027 3, 151.042 1	-	槲皮素 Quercetin	18
16	16.37	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.074 7	271.060 5			153.018 2, 119.050 6	177.018 8, 151.003 2, 119.049 9, 107.013 6	柚皮素 Naringenin	18
17	16.89	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	249.144 9	-			231.174 8, 203.141 1, 189.163 6	-	珊塔玛内酯 Santamarine	16
18	17.13	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303.085 1	301.071 4			177.054 4, 153.018 1, 145.026 0	285.047 4, 242.058 0, 201.018 7, 164.011 1	橙皮素 Hesperetin	18
19	18.01	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-	315.947 0			-	300.081 4	异鼠李素 Isorhamnetin	19
20	20.35	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.151 3	-			388.151 3, 373.140 4, 355.120 4, 330.050 5, 327.179 7, 301.140 4, 259.172 0, 211.062 9, 149.023 5	-	川陈皮素 Nobiletin	18

注: * 表示与标准品对照后鉴定。

Note: * Identified by comparison with reference substance.

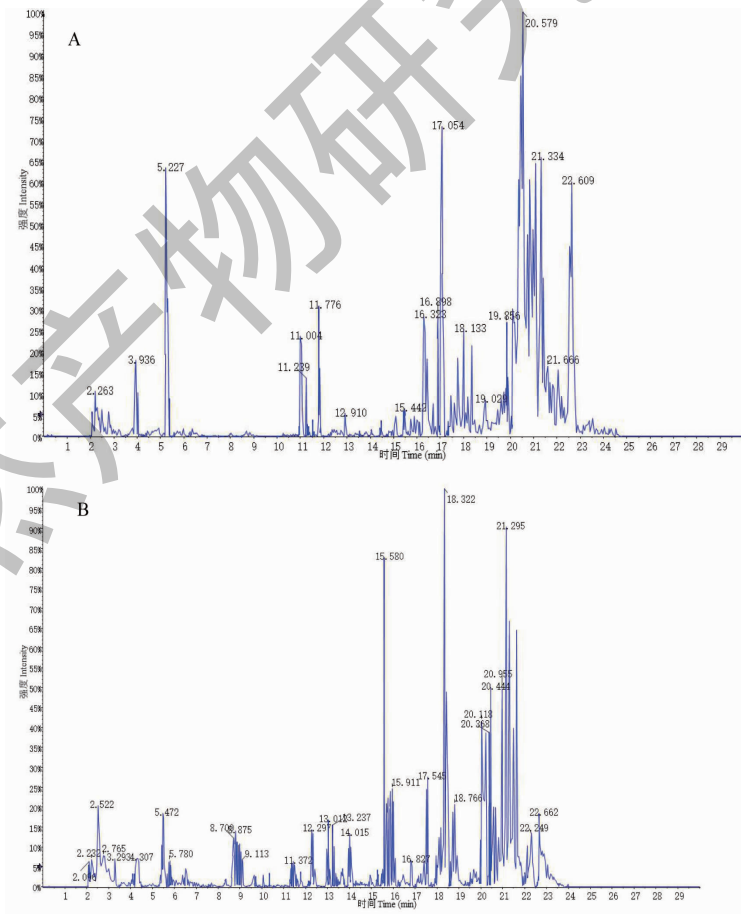


图 1 四磨汤口服液入血成分在正(A)、负(B)离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Simotang oral liquid in positive (A) and negative (B) ion modes

2.2 PPI 网络构建与分析

在 STRING 在线数据平台上输入 181 个共有靶点,设置检索条件“Homo sapiens”,分析其蛋白质间的相互作用,分析后得到 PPI 网络图。该网络由 181 个节点和 2 357 条互动边所组成,平均节点度值 26.483。利用 Cytoscape 3.7.1 中的网络分析功能,将蛋白质互作分析出相关具体数据。为了更好的判断枳实栀子豉汤发挥抗抑郁的关键靶点,拟通过的

拓扑参数(度、度介中心度、接近中心度)对 181 个蛋白靶点进行分析和筛选。参考较多文献后,采用上述三个特征值的中位数进行数次筛选,因本次分析的靶点众多,因此共筛选 2 次。第一次按照 $BC > 0.001\ 534$ 、 $CC > 0.480\ 978$ 、 $Degree > 21.5$ 初步筛选得到 70 个蛋白靶点,第二次按照 $BC > 0.009\ 327$ 、 $CC > 0.540\ 459$ 、 $Degree > 41.5$ 筛选得到 21 个蛋白靶点(见图 2)。

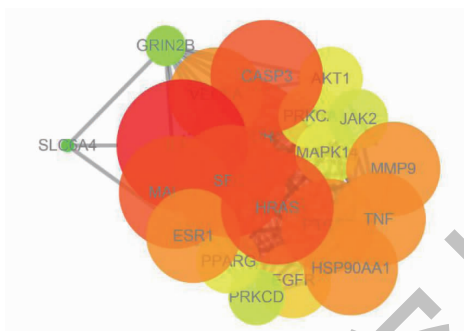


图 2 核心靶点 PPI 网络

Fig. 2 Protein-protein interaction network of key targets

2.3 GO 生物功能及 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对 181 个交集靶点进行 GO 和 KEGG 分析。GO 富集分析($P < 0.01$)结果分析得到 GO 条目 517 个,其中生物学过程(BP)371 个,主要涉及蛋白质磷酸化、信号转导、细胞外信号调节激酶 1(ERK1)和 ERK2 级联的正向调节等;细胞组成(CC)55 个,主要涉及神经元细胞体、受体复合物、质膜细胞质侧的外源成分;分子功能(MF)91

个,主要涉及蛋白激酶活性、丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酪氨酸激酶活性、神经递质受体活性等。

KEGG 富集分析($P < 0.01$),结果共得到 112 条信号通路。其共同靶点主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、5-HT 能突触、MAPK 信号通路、神经营养素信号通路、HIF-1 信号通路等(见图 3)。

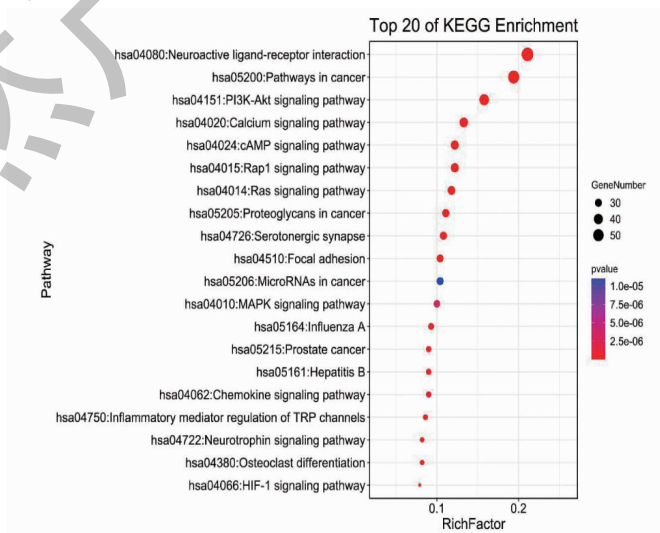


图 3 四磨汤口服液防治抑郁症核心靶点 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of key targets from Simotang oral liquid for treatment of depression

2.4 四磨汤“入血成分-作用靶点-作用通路”网络的构建及分析

以鉴定出的 20 种入血成分作为参考,收集其在 SwissTargetPrediction 上预测的作用靶点,同时检索 OMIM、GeneCards 数据库收集抑郁症的潜在疾病靶点,选取成分与疾病的交集靶点作为蛋白靶点库,采用 STRING 获取交集靶点蛋白相互作用的网络,通过 Cytoscape 软件对数据进行可视化分析,构建活性成分-预测靶点-信号通路网络(见图 4)。该网络图

共包含 220 个节点(包括 19 个化合物节点、181 个靶点节点和 20 条通路节点)和 1 115 条边。其中,绿色三角形表示化合物,蓝色长方形表示靶点,红色菱形表示通路。通过对图中入血成分、潜在靶点和作用通路的整理分析发现,度值排名靠前的靶点包括 PIK3CG、MAP2K1、MAPK1、PIK3CA、PRKCA。度值排名靠前的化合物是波尔定碱、去甲异波尔定、异波尔定碱、柠檬苦素、异鼠李素。

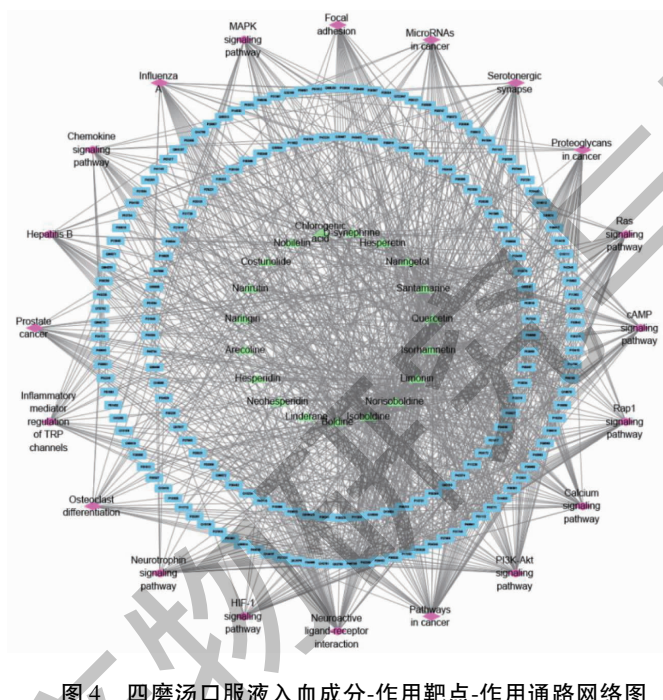


图 4 四磨汤口服液入血成分-作用靶点-作用通路网络图

Fig. 4 Component absorbed into blood-target-pathway network map of Simotang oral liquid

3 讨论与结论

随着生物学大数据研究的发展,网络药理学已经成为一种系统的药物靶点分析方法,并逐渐推动了药物发现的方式转变:由“一靶一药”模式向“网络靶向多成分治疗”模式转变^[20]。网络药理学是通过构建“成分-靶点-通路”网络,综合分析中药成分的作用机制,与中医的整体辨证思想不谋而合。网络药理学多以中药复方中单味药的成分作为研究对象。然而,由于传统中药制剂大多是通过口服给药,且常常为汤剂。体内代谢生物过程复杂,体内化合物可能不会都入血发挥作用。并且,考虑到汤剂在煎煮过程中中药发生相互作用并伴随挥发性成分的损失,因此,本研究以入血成分为研究对象,并通过网络药理学的的方法对其抗抑郁机制进行了初步探讨。

首先,采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术从灌胃四磨汤的大鼠血浆中鉴别了 20 个化合物。其中去甲异波尔定具有抗炎镇痛的作用,可以减弱破骨细胞分化和芳烃受体依赖式的炎症性骨侵蚀^[21];辛弗林、新橙皮苷可通过抑制单胺氧化酶 A 的活性来改善慢性不可预见性温和应激抑郁模型大鼠的抑郁状态^[20];柚皮苷能够显著增加超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽的活性,达到诱导抗焦虑的作用;有研究表明:给予柚皮素后,可改善抑郁模型大鼠的行为学,还可减轻海马锥体细胞 1 区和大脑皮层的形态异常^[22];橙皮素可选择性抑制磷酸二酯酶 4 的活性,降低小鼠模型中炎症细胞和细胞因子的表达^[23],而炎症假说已在抑郁症的发生发展过程中成为被公认的假说之一^[24]。这些成分相互协同,共同发挥治疗抑郁症的功效。

但这些成分如何协同发挥抗抑郁的作用机制尚不明确,因此,进一步做了网络药理学的分析。根据“入血成分-作用靶点-作用通路”网络图,PI3KCG、MAP2K1、MAPK1、PI3KCA、PRKCA 等靶点映射的通路最多,推测这些靶点可以在治疗抑郁症方面发挥更重要的作用。上述靶点涉及 PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路、5-HT 能突触、MAPK 信号通路、神经营养因子信号通路等多条信号通路,能够影响中枢神经中重要的神经递质^[25]。有文献报道,逍遥散通过 PI3K/AKT/mTOR 通路调节血管性痴呆小鼠焦虑抑郁行为^[26]。5-HT 是海马中的一个关键信号,在那里它直接影响到生物体的精神状态。因此选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)成为早期治疗抑郁症的首选^[27]。cAMP 反映元件可结合环磷酸腺苷效应元件结合蛋白或蛋白激酶 A 抑制炎症反应的发生并促进脑源性神经营养因子的增加,达到改善抑郁样行为的效果^[28,29]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,人类的 MAPKs 主要有三条信号通路亚族,分别是 ERK1/2、应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)和 p38。已发现有方剂通过抑制 p38MAPK 和激活 ERK1/2 来减少神经元凋亡等^[30]。这些结果均为四磨汤防治抑郁症的分子机制研究提供了新思路。

综上所述,本研究应用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和网络药理学方法,以四磨汤入血成分为网络药理学研究基础,初步探讨了四磨汤治疗抑郁症的多成分、多靶点、多通路协同作用机制,为后续四磨汤的临床应用研究提供科学依据。

参考文献

- Walker ER, McGee RE, Druss BG. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72: 334-341.
- Busch Y, Menke A. Blood-based biomarkers predicting response to antidepressants [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2019, 126: 47-63.
- Shusaku U, Hirota Y, Tomoe S, et al. Epigenetic mechanisms of major depression: targeting neuronal plasticity [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2018, 72: 212-227.
- Yang H, Yi XL, Xie JH, et al. Determination of synephrine, norisoboldine and arecoline in Simo Tang oral liquid by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19: 79-81.
- Qu J. Re-read Simo Decoction [J]. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med (山西中医学院学报)*, 2013, 14: 3.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 79.
- Li H, Zeng XD. Efficacy of the Simo decoction on gastrointestinal hormones in the patients with functional dyspepsia of the Ganpi Buhe type [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2018, 10: 36-37.
- Lai MN, Lin RX, Chen BT, et al. Observation on curative effect of Simo Decoction in irritable bowel syndrome due to liver [J]. *World Chin Med (世界中医药)*, 2017, 12: 2961-2963.
- Pan KM. Study on Simao Decoction combined with western medicine in the treatment of irritable bowel syndrome of incoordination between the liver and the spleen type [J]. *Guangming Tradit Chin Med (光明中医)*, 2020, 35: 3032-3034.
- Liang JK. Study on the mechanism of Simo Decoction in the treatment of functional constipation based on the theory of Brain-Gut Axis [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2013.
- Zhao XP. The effect of simo decoction on mice intestinal bacterial diversity with onstipation [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine (湖南中医药大学), 2016.
- Chen HH, Ye DL. Effect of Simoyinzi Decoction on serum 5-HT and inflammatory factors in early onset of severe depression of perimenopausal women [J]. *Chin J Biological Pharms (中国生化药物杂志)*, 2016, 36: 108-111.
- Liu Y, Wei WF, Huo JH, et al. Serum pharmacochimistry of Qinbai Qingfei concentrated pellets based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 572-579.
- Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network Pharmacology databases for traditional chinese medicine: review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- Ren HL, Yan B, Liang ZT, et al. Antifebrile effect of Dayuanyin and its determination by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2015, 37: 131-137.
- Xiao JL, Zhao L, Zhang DX, et al. Identification of chemical constituents in mongolian medicine Anshen Buxin Liuwei Pills based on HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2021, 44: 1653-1664.
- Hong H, Du WF, Kang XJ, et al. Qualitative comparison of chemical constituents from root and taproot of *Lindera aggregata* based on UPLC-Triple-TOF/MS [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2020, 43: 615-620.

- 18 Wei FT, Cheng H, Qiao RF, et al. Identification of prototype compounds and their metabolites in rat plasma after oral administration of Aurantii Fructus extract by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26:161-172.
- 19 Xiao GL, Jiang JY, Xu AL, et al. Analysis of chemical constituents in Bushao Tiaozhi capsules by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26:190-199.
- 20 Jia HM, Su ZH, Long W, et al. Metabonomics combined with UPLC-MS chemical profile for discovery of antidepressant ingredients of a traditional Chinese medicines formula, Chaihu-Shu-Gan-San [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:487158.
- 21 Wei ZF, Lv Q, Xia Y, et al. Norisoboldine, an anti-arthritis alkaloid isolated from Radix Linderae, attenuates osteoclast differentiation and inflammatory bone erosion in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11:1113-1126.
- 22 Tayyab M, Farheen S, Mariyath PMM, et al. Antidepressant and neuroprotective effects of naringenin via sonic Hedgehog-GLII cell signaling pathway in a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. Neuromolecular Med, 2019, 21:250-261.
- 23 Yang YL, Hsu H T, Wang KH, et al. Hesperetin-7,3'-O-dimethylether selectively inhibits phosphodiesterase 4 and effectively suppresses ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness with a high therapeutic ratio [J]. J Biomed Sci, 2011, 18:84.
- 24 Cardinal P, de Oliveira CM, Sauvants J, et al. A new experimental design to study inflammation-related versus non-inflammation-related depression in mice [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18:290.
- 25 Li J. PI3K/AKT/JNK/P38 signaling pathway-mediated neural apoptosis in the prefrontal cortex of mice is involved in the antidepressant-like effect of pioglitazone [D]. Chongqing: Chongqing Medical University(重庆医科大学), 2018.
- 26 Shan N, Tan ZH, Yang B, et al. 1. Xiaoyao powder modulates the myelin function of mPFC-BLA neural circuit through PI3K/ AKT/ mTOR pathway to Alleviates the anxiety and depression phenotype in VaD mice [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2022, 38:212-219.
- 27 Klempin F. Enduring effects of conditional brain serotonin knockdown, followed by recovery, on adult rat neurogenesis and behavior [J]. Cells, 2021, 10:3240.
- 28 Huang P, Wei S, Luo M, Tang Z, et al. MiR-139-5p has an antidepressant-like effect by targeting phosphodiesterase 4D to activate the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. Ann Transl Med, 2021, 9:1594.
- 29 Wang K, Zhai Q, Wang S, et al. Cryptotanshinone ameliorates CUS-induced depressive-like behaviors in mice [J]. Transl Neurosci, 2021, 12:469-481.
- 30 Gao S, Lin J, Wang T, et al. Qingxin kaiqiao fang ameliorates memory impairment and inhibits apoptosis in APP/PS1 double transgenic mice through the MAPK pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13:459-475.

(上接第 41 页)

- 22 Lin AQ. Studies on the chemical constituents of *Cynanchum bungei* Decne [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine(山东中医药大学), 2005.
- 23 Qian XC. Studies on the chemical constituents of *Cynanchum caudatum* [J]. Agric Henan(河南农业), 2019(11):40.
- 24 Yi W, Song ZR, Liu JQ, et al. Chemical constituents of *Osmanthus fragrans* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 40:679-685.
- 25 Gong SS, Liu CD, Liu SL, et al. Studies on the chemical constituents of *Cynanchum caudatum* [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1988, 23:276-280.
- 26 Páska C, Innocenti G, Ferlin M, et al. Pinoresinol from *Ipomoea cairica* cell cultures [J]. Nat Prod Lett, 2002, 16:359-363.
- 27 Liu YP, Wang XC, Li XB, et al. Studies on non-alkaloid constituents from *Ochrosia elliptica* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 40:1508-1513.