

基于网络药理学和实验验证探讨二仙汤及其温肾拆方治疗 抑郁症的可行性

余楷杰¹, 巩子汉¹, 杨婧雯¹, 梁文青², 孟丹华^{1*}, 岳广欣^{1*}

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 河南中医药大学 基础医学院, 河南 450000)

[摘要] 目的:基于网络药理学技术预测二仙汤全方和温肾方治疗抑郁症的分子机制,通过母婴分离结合慢性束缚应激抑郁模型进行药效及机制对比,探讨温肾拆方治疗抑郁症的可行性。方法:通过中药系统药理学数据平台(TCMSP)和中药分子机制生物信息学数据库(BATMAN)收集二仙汤全方及温肾方的活性成分及作用靶点;利用人类基因数据库(Genecards)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、药物银行(Drugbank)等数据库筛选抑郁症相关靶点,与药物靶点取交集获得药物-疾病共同靶点,随后导入Cytoscape 3.8.2软件绘制中药-活性成分-靶点-疾病网络图;利用STRING平台构建蛋白相互作用网络并筛选核心靶点及关联的核心成分;采用Metascape平台对交集靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能富集分析。采用母婴分离结合慢性束缚应激制备抑郁小鼠模型,在离乳第21天(PD21)至束缚完成第111天(PD111)给予二仙汤全方和温肾方的药混饲料进行干预。根据糖水偏好实验、悬尾实验、旷场实验、高架O迷宫实验评估小鼠抑郁状态;免疫组织化学法(IHC)观察小胶质细胞离子钙接头蛋白-1(Iba-1)表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测蛋白激酶B1(Akt1)、脑源性神经营养因子(BDNF)、突触后致密物95(PSD95)、突触素(Syn)等表达水平。结果:共筛选二仙汤全方和温肾方治疗抑郁症靶点126和118个,全方仅多8个靶点。两方核心靶点相同,主要包括Akt1、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、KEGG通路富集分析预测二仙汤全方和温肾方治疗抑郁症主要涉及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路及神经活性配体-受体相互作用通路。动物实验表明,与抑郁症模型组比较,二仙汤全方和温肾方均可明显上调小鼠糖水偏好指数、中央区活动时间及穿越次数、开放臂停留时间及穿越次数、p-Akt1、BDNF、PSD95及Syn的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),明显下调悬尾不动时间和海马小胶质细胞Iba-1表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),两方疗效差异无统计学意义。结论:以肾阳虚为主的抑郁症病机和证候规律下,二仙汤的温肾拆方治疗具有可行性。其机制可能与两方均可通过影响Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等核心靶点及调控PI3K/Akt、MAPK及神经活性配体-受体相互作用信号通路,改善海马区神经炎症及突触可塑性有关。

[关键词] 抑郁症; 二仙汤; 拆方研究; 网络药理学; 实验验证

[中图分类号] R2-0;R33;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0211-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221542 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220613.2001.002.html>

[网络出版日期] 2022-06-14 11:34

Feasibility of Erxian Decoction and Wenshen Prescription in Treatment of Depression Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

SHE Kaijie¹, GONG Zihan¹, YANG Jingwen¹, LIANG Wenqing², MENG Danhua^{1*}, YUE Guangxin^{1*}

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China;

[收稿日期] 2022-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174251, 81573846);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A00607);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YZ-202107, YZ-202153)

[第一作者] 余楷杰,在读硕士,从事情志病的中医防治及方证相关研究, E-mail: 894543462@qq.com

[通信作者] * 孟丹华,博士,从事情志病的中医方证与甲基化相关性研究, E-mail: 2830790468@qq.com;

* 岳广欣,研究员,博士生导师,从事情志病的中医药防治基础及方证相关研究, E-mail: yuegx73@hotmail.com

2. School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To predict the molecular mechanism of Erxian decoction and Wenshen prescription (modified Erxian decoction) in the treatment of depression based on network pharmacology and explore the feasibility of Wenshen prescription in the treatment of depression by comparing the efficacy and mechanism of the two decoctions based on a depression model induced by maternal separation combined with chronic restraint stress. **Method:** Active components and targets of Erxian decoction and Wenshen prescription were collected through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM). Targets related to depression were screened out from databases such as GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man database (OMIM), and DrugBank. Common targets of drugs and disease were obtained and imported to Cytoscape 3.8.2 to plot the drug-active component-target-disease network. STRING platform was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network and core targets and related core components were screened out. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional enrichment analysis were performed on common targets through Metascape platform. The depression model was induced in mice by maternal separation combined with chronic restraint stress. From the 21st day of maternal separation (PD21) to the 111th day of restraint stress completion (PD111), mice were fed with the diet mixed with Erxian decoction or Wenshen prescription for intervention. The depressive state of mice was evaluated according to the sucrose preference test, tail suspension test, open field test, and elevated O-maze test. The expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) in the microglia was observed by immunohistochemistry (IHC). Western blot and Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the expression levels of protein kinase B1 (Akt1), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic density-95 (PSD95), and synaptophysin (Syn). **Result:** A total of 126 and 118 targets of Erxian decoction and Wenshen prescription in the treatment of depression were screened out, with only eight more targets of Erxian decoction than Wenshen prescription. The two decoctions shared the same core targets, mainly including Akt1, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). KEGG pathway enrichment analysis predicted that Erxian decoction and Wenshen prescription mainly treated depression through the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and neuroactive ligand-receptor interaction pathway. Animal experiments showed that compared with the results in the model group, Erxian decoction and Wenshen prescription could up-regulate the sucrose preference index, prolong the time spent in the central zone, increase the number of crossings, prolong the time spent in opened arm, increase the number of crossings in the opened arm, elevate the expression levels of p-Akt1, BDNF, PSD95, and Syn ($P<0.05$, $P<0.01$), shorten the immobility time of tail suspension, and reduce the expression level of Iba-1 in the hippocampal microglia ($P<0.05$, $P<0.01$). No significant difference between the two decoctions was found. **Conclusion:** Under the pathogenesis and syndrome law of depression dominated by kidney yang deficiency, Wenshen prescription modified from Erxian decoction is feasible in the treatment of depression. The mechanism may be attributed to the fact that both decoctions can improve neuroinflammation and synaptic plasticity in the hippocampus by affecting Akt1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and other core targets and regulating the PI3K/Akt, MAPK, and neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathways.

[Keywords] depression; Erxian decoction; modification research; network pharmacology; experimental verification

抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病,表现为持续的情绪低迷,快感缺失,自杀倾向等。具有较

高的复发率、致残率及致死率。相关流行病学数据表明^[1],2019年全球抑郁症患病率达4.4%,预计到2030年将成为疾病负担的首位,目前尚未完全揭示抑郁症的发生发展机制,而传统抗抑郁药物如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、三环抗抑郁药(TCA)药物等存在服用周期长、副作用多及停药反应,限制了患者的长期服用及依从性。抑郁症可归属于中医学的“郁证”“脏躁”“百合病”“不寐”等范畴,课题组前期研究发现,不良应激可折伤小儿肾阳,成为抑郁症易感性的体质基础^[2],如《医贯·相火论》有言:“相火为水中之火,寄于肝肾之间”,《新安医籍丛刊》云:“肾命者,精神之所舍”。肾为精髓封藏气化之所,阳盛髓充则精神情绪稳定。

仙茅、巴戟天、淫羊藿三药具有温肾阳、填精髓的功效^[3]。研究表明,仙茅、巴戟天、淫羊藿具有多种抗抑郁有效成分,如巴戟天寡糖^[4-5]具有修复海马神经损伤、改善神经可塑性及提高脑源性神经营养因子BDNF表达的作用;淫羊藿苷^[6-7]可通过抗炎、减轻海马神经元凋亡等作用,缩短大鼠的强迫游泳不动时间。仙茅苷可促进BDNF的表达,通过消退恐惧记忆以减轻小鼠的抑郁行为^[8]。课题组结合中医理论分析,小儿为少阳之体,阳气稚嫩,肾封藏功能较低下,幼年遭受母婴分离应激易折伤肾中元阳,其中仔鼠以下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴异常激活及皮质酮水平升高为典型改变^[9],成为二次打击抑郁症易感性的阳虚体质基础,二仙汤可以通过改善HPA轴异常激活及神经营养因子表达,改善母婴分离应激所致阳虚体质的抑郁样改变,但二仙汤全方治疗后部分小鼠存在滑肠泄泻、饮食减少等现象,思考为方中黄柏、知母苦寒泻火,当归滋腻滑肠,不符合病机所致。目前仅限于二仙汤全方的抗抑郁疗效、单一靶标及通路进行研究,缺乏以疾病病机及证候规律为导向的二仙汤拆方治疗抑郁症的疗效及机制对比研究。

网络药理学是在系统生物学及复杂网络科学的基础上提出的一种新的研究策略,基于中药数据库及生物信息学资源,以预测中药多成分-多靶点相互作用产生的药效及机制^[10],符合中医药整体观念的作用特点。因此,本研究以母婴分离结合慢性束缚应激建立阳虚抑郁症小鼠模型,通过动物行为表现评估二仙汤全方与温肾拆方(仙茅-淫羊藿-巴戟天,以下简称温肾方)的药效,以期探讨抑郁症肾阳虚病机导向下,温肾方代替二仙汤进行治疗的可行

性。借助网络药理学及实验验证的方法,对二仙汤全方及温肾方干预抑郁症的分子机制进行对比研究,以探讨温肾方治疗抑郁症的可行性。

1 材料

1.1 动物 实验用8周龄C57BL/6N种鼠,体质量(22±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心(温度22~25℃,相对湿度40%~50%,自由进食进水,12/12h昼夜循环),适应1周后开始繁殖。本实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心实验动物福利伦理审查。

1.2 药物 实验所用中药饮片购自北京仟草中药饮片公司,由中国中医科学院中医基础理论研究所方证中心岳广欣研究员鉴定。药物组成为仙茅9g、淫羊藿9g、巴戟天9g、当归9g、知母4.5g、黄柏4.5g(批号分别为200716001、200814005、210204003、201211003、200519001、200702001)。

1.3 试剂 ABC工作液、生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、冰冻切片包埋剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为ZB-2050、PK-6100、ZLI-9555);离子钙接头蛋白-1(Iba-1)抗体、DAB工作液、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(英国Abcam公司,货号分别为ab5076、D5637、ab7090、ab6789);反转录试剂盒、聚合酶链式反应(PCR)扩增试剂盒(美国Promega公司,货号分别为A5001、A6010);戊巴比妥钠、4%多聚甲醛(北京百诺威生物科技有限公司,货号分别为ST3761、P1110);TRIzol(美国赛默飞世尔科技公司,货号15596026);磷酸化(p)-蛋白激酶B1(Akt1)、Akt1抗体、兔抗小鼠 α -微管蛋白(α -tubulin)抗体(中国Proteintech公司,货号分别为66444-1-Ig、60203-2-Ig、11224-1-AP);脑源性神经营养因子(BDNF)抗体、突触后致密物95(PSD95)抗体、突触素(Syn)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab108319、ab18258、ab32127);特超敏ECL发光底物(中国Biosharp公司,货号BL520B)。

1.4 仪器 小鼠束缚管(自制);40cm×40cm×35cm小鼠旷场箱(自制);XR-XZR209型O迷宫设备(上海欣软信息科技有限公司);Elx800型酶标仪(美国BioTek公司);CFX96型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪、垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司);ND8000型超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司);3K15型高速冷冻离心机(德国Sigma公司);HtPot10型恒温金属浴(上海珂准仪器

有限公司); vs120型数字切片扫描系统(日本Olympus公司); CM1950型冰冻切片机(德国Leica公司); TopScan™2.0型行为分析系统(美国Clever Sys Inc公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 二仙汤全方及温肾方活性成分和靶点筛选

采用中医药系统药理学数据库与分析平台(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[11]和BATMAN数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)收集仙茅、巴戟天、淫羊藿、黄柏、知母、当归的化学成分,基于药物代谢动力学(ADME)核心参数,以口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18为筛选标准,并以2015年版《中华人民共和国药典》中药物的指标性成分及文献报道活性成分作为补充,获得6味中药的活性成分及其作用的靶点,将蛋白质靶点录入UniProt蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行基因名称规范,设置物种为“Homo sapiens”。

2.1.2 抑郁症相关靶点筛选 为确保疾病靶点的全面性与准确性,以“depression”“major depressive disorder”为关键词,在人类基因数据库(GeneCards)(<https://www.genecards.org>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)(<http://www.omim.org>)等数据库进行检索以获得抑郁症相关靶点。并检索药物银行(DrugBank)数据库(<https://www.drugbank.ca>),以临床一线用药的作用靶点进行补充。将所有靶点汇总、去重后,得到抑郁症相关疾病靶点。将二仙汤全方和温肾方作用靶点与抑郁症相关靶点取交集,利用R语言绘制韦恩图。

2.1.3 药物-活性成分-靶点-疾病网络图构建 通过Cytoscape 3.8.2软件对2.1.1和2.1.2项下的中药、活性成分、交集靶点与疾病进行关联,构建二仙汤全方和温肾方治疗抑郁症的网络机制。

2.1.4 PPI网络构建和核心靶点筛选 采用STRING数据库(<https://string-db.org/>)分别预测二仙汤全方和温肾方与抑郁症交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)。设置物种为“Homo sapiens”、最小相互作用阈值为“Medium confidence>0.4”,隐藏无连接节点,其余设置不作变更。将PPI结果导入Cytoscape 3.8.2软件进行拓扑分析,采用“CytoNCA”插件计算度值(DC)、介数中心性(BC)、接近中心性(CC)、局部平均连接性(LAC),数值越高表明该靶点在PPI网络中愈加重要。根据各值中位数筛选核心靶点。

2.1.5 GO功能富集分析及KEGG通路富集分析

Metascape平台(<http://metascape.org/>)为系统级数据集的分析提供了全面的基因注释列表和分析资源。将二仙汤全方和温肾方与抑郁症的交集靶点分别导入Metascape平台,进行GO富集分析及KEGG通路富集分析,设置 $P<0.01$,最小富集数为3,并利用R语言对富集结果进行可视化。

2.2 动物实验验证

2.2.1 药物制备 二仙汤组成:仙茅9g、淫羊藿9g、巴戟天9g、当归9g、黄柏4.5g、知母4.5g。温肾方组成:仙茅9g、淫羊藿9g、巴戟天9g。按上述剂量称取药材,一煎加入10倍体积纯水,浸泡30min后煎煮1h,过滤药液。二煎加入8倍水煎煮1h。合并两次煎煮药液,水浴浓缩至稠膏后减压真空干燥(80℃,6h),称质量粉碎后备用。二仙汤全方煎煮10服剂量,共得浸膏粉113g,出膏率25.1%,合11.3g/剂;温肾方煎煮10服剂量,共得浸膏粉81g,出膏率30%,合8.1g/剂。

2.2.2 抑郁症模型制备、分组及干预 按雌:雄4:1的比例将40只雌鼠与10只雄鼠进行混居繁衍,待产前的孕鼠进行单笼饲养,分娩后每笼仔鼠保持4~6只,定义仔鼠出生为第0天(PD0),PD0仔鼠随机分为空白组、造模组,造模后造模组按随机数字表法分为模型组、全方组、温肾方组,共4组,每组12只。模型制备:仔鼠分别于PD1~14进行母婴分离,先将仔鼠转移至幼儿孵育箱(32℃),再将母鼠移至新笼,每天3h。空白组仔鼠也进行相同操作,但分离时间少于10min。在仔鼠离乳喂养至成年3月龄(PD90)后,除了空白组,其余各组均进行慢性束缚应激:将小鼠装入50mL透气束缚管中限制其活动,期间不予进食进水,3h后放出,持续21d,直到PD111,最后1d造模完成2h后进行糖水偏好实验、悬尾实验、旷场实验、O迷宫实验评价造模成功与否^[12]。

2.2.3 给药 参考第4版《药理实验方法学》^[13],70kg人与20g小鼠体表面积折算的等效比值为0.0026,则二仙汤全方组小鼠给药剂量计算公式为 $0.0026 \times 11.3 \text{ g/剂} \div 0.02 \text{ kg} = 1.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,温肾方小鼠给药剂量计算公式为 $0.0026 \times 8.1 \text{ g/剂} \div 0.02 \text{ kg} = 1.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按成年小鼠 $5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 的摄食量制作药混饲料,则浸膏/饲料混合比例分别为5.88、4.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,将浸膏粉与打碎备用的饲料混匀,加入纯净水压成条状,烘干备用。在小鼠离乳PD21至束缚结束PD111,空白组和造模组饲喂普通饲料,全方组和温

肾组饲喂相应的药混饲料。

2.2.4 糖水偏好实验 糖水偏好实验可从快感缺失层面评估小鼠的抑郁行为。第1天在鼠笼左右放置两瓶外观及体积相同的1%蔗糖溶液进行适应,第2天将其中一瓶蔗糖溶液更换为纯水,12 h后更换1次位置,避免位置偏爱产生的误差。第3天小鼠禁食禁水,第4天进行糖水偏好实验,在鼠笼左右放置事先称量好的1%蔗糖溶液和纯水各1瓶,12 h后取水称质量,计算糖水偏好指数=蔗糖溶液消耗量/总液体消耗量×100%。

2.2.5 悬尾实验 悬尾实验可从“行为绝望”层面评价小鼠抑郁行为。将小鼠尾尖约1 cm处固定于支架上,使小鼠悬挂,头部朝下(距离台面25 cm),维持6 min,记录后4 min小鼠的不动时间。

2.2.6 开放旷场实验 小鼠在实验室提前适应1 h。于自制旷场箱中心点(40 cm×40 cm×35 cm)放入小鼠,将中心点附近20 cm×20 cm区域定义为中央区,记录小鼠5 min内的中央区活动时间、中央区穿越次数。用75%乙醇清洗旷场箱,以减少上轮实验小鼠气味及尿液、粪便对后续小鼠的影响。采用TopScan™2.0软件分析行为学数据。

2.2.7 高架O迷宫实验 高架O迷宫装置内径60 cm,外径65 cm,离地面高60 cm,分别有开放臂和闭合臂,闭合臂高10 cm。将实验小鼠身体放于开放臂上,头朝向闭合臂,观察小鼠5 min内的开放臂停留时间,开放臂穿越次数。采用TopScan™2.0软件分析行为学数据。

2.2.8 免疫组化检测海马小胶质细胞Iba-1表达 行为学实验结束后24 h,采用1%戊巴比妥钠(100 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,各组随机选择6只小鼠以4%多聚甲醛灌注固定,解剖取全脑。全脑置于4%多聚甲醛中继续固定12 h,后于30%蔗糖溶液中进行脱水。包埋脑组织后连续冰冻切片,片厚30 μm,切片于磷酸盐缓冲液(PBS)中平衡30 min,0.5% Triton处理30 min后于3% H₂O₂溶液中浸泡15 min,10%羊血清室温封闭1 h;Iba-1(1:1 000)一抗4℃过夜,PBS冲洗3遍,生物素标记山羊抗兔(Ig)G(1:200)室温孵育4 h,DAB显色20 min后用蒸馏水中止反应,贴片,梯度脱水,中性树胶封片。使用数字切片扫描系统采集图像(物镜设置20倍,分辨率1 024×1 024),观察海马区小胶质细胞形态、数量,用Image Pro Plus 6.0软件计算阳性染色区域的平均积分吸光度AA指示Iba-1的表达情况。

2.2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测p-Akt1、Akt1、BDNF、PSD-95、Syn蛋白表达 各组剩余小鼠腹腔注射麻醉后,断头取全脑,分离两侧海马脑组织,海马于液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存备用。向装有左侧海马的离心管中加入RIPA高效裂解液,于冰上研磨,充分裂解后低温离心取上清液。配置BCA工作液测量海马组织蛋白浓度。配置10% SDS-PAGE分离胶,蛋白加样(每孔20 μg),电泳(横压60 V,30 min后调为100 V,60 min),聚偏氟乙烯树脂PVDF膜电转(横流200 mA,90 min),5%脱脂牛奶室温封闭2 h,一抗4℃孵育过夜(p-Akt1、Akt1、BDNF按1:1 000稀释,PSD95按1:2 000稀释,Syn按1:2万稀释),TBST洗膜3次,二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL底物显色。以Image J软件分析电泳条带图,以目的蛋白/内参照α-tubulin表达量作为目的蛋白的相对表达水平。

2.2.10 Real-time PCR检测Akt1、BDNF、PSD-95、Syn mRNA表达 使用TRIzol试剂提取右侧海马组织的总RNA,测量RNA的浓度及纯度。第1链cDNA合成参照试剂盒说明书进行。以cDNA为模板进行Real-time PCR,反应体系20 μL,扩增条件为95℃预变性2 min,95℃变性15 s,60℃退火1 min,共40个循环。以空白组为对照样本,β-肌动蛋白(β-actin)为内参基因,以2^{-ΔΔC_t}代表目的基因的相对表达水平,引物由生工生物工程(上海)有限公司设计,具体序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Akt1	上游 TGCACAAACGAGGGGAATATAT	88
	下游 CGTTCCTGTAGCCAATAAAGG	
BDNF	上游 CCCATGAAAGAAGTAAACGTCC	205
	下游 CCTTATGGTTTTCTTCGTTGGG	
PSD95	上游 ATGTGCTTCATGTAATTGACGC	136
	下游 TTTAACCTTGACCACTCTCGTC	
Syn	上游 CCACTGACCCAGAGAACATTAT	164
	下游 CTTGAACACGAACCATAGGTTG	
β-actin	上游 CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	73
	下游 CACAGCCTGGATGGCTACGT	

2.2.11 统计学方法 应用SPSS 20.0软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据符合方差齐性则采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间数据比较,事后多重比较采取最小显著性差异法

(LSD)-*t*检验。方差不齐时以非参数检验进行比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 二仙汤全方和温肾方活性成分及靶点获取

通过TCMSP数据库、BATMAN数据库筛选及文献检索,获得二仙汤全方和温肾方的活性成分为96和48个,活性成分靶点分别有227和214个。从GeneCards数据库获得抑郁症疾病靶点11 036个,以Relevance score ≥ 7.60 (2倍中位数)为标准进行筛选得到1 691个疾病相关靶点。结合OMIM及DrugBank数据库的检索结果,汇总、去重后共得到抑郁症靶点2 227个。通过R语言对抑郁症靶点与二仙汤全方、温肾方活性成分靶点取交集,绘制韦恩图,全方和温肾方调控抑郁症的靶点分别有126和118个,见增强出版附加材料,全方较温肾方多调控8个靶点。

3.2 中药-活性成分-靶点-疾病网络图构建

将二仙汤全方、温肾方活性成分及其作用于抑郁症的靶点导入Cytoscape 3.8.2软件,构建中药-活性成分-靶点-疾病网络图进行结果可视化,见增强出版附加材料。其中棕色图形代表方剂及相应中药,绿色代表活性成分,紫色矩形代表二仙汤全方、温肾方调控抑郁症的共有靶点,黄色矩形代表二仙汤全方治疗抑郁症的靶点。初步结果显示,在治疗抑郁症上,二仙汤全方较之温肾方仅多8个作用靶点,说明温肾方在治疗抑郁症的分子机制层面仍具有较强的调控作用。全方与温肾方之间的靶点重复性极强,也符合温肾三药在二仙汤中作为“君臣”的组方意义。

3.3 PPI网络构建及核心靶点筛选

将二仙汤全方及温肾方治疗抑郁症的126和118个靶点分别导入STRING平台,构建PPI网络。温肾方PPI网络由118个节点及1 494条边构成,全方PPI网络由126个节点及1 632条边构成,将结果导入Cytoscape 3.8.2软件中进行拓扑分析。基于CytoNCA插件计算DC、BC、CC、LAC等数值,以各值中位数为标准,即全方DC >21 ,LAC $>13.523\ 809$,BC $>45.552\ 74$,CC $>0.506\ 122\ 47$;温肾方DC >20 ,LAC >13.9 ,BC $>42.887\ 234$,CC $>0.508\ 771\ 96$,筛选全方和温肾方排名前十的核心靶点,两方核心靶点主要有Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等。核心靶点与活性成分进行关联后构建“核心成分-核心靶点”网络图见增强出版附加材料,全方和温肾方关联核心成分见增强出版附加材料。结果可见,全方和温肾方核心靶点前

10位相同。

3.4 二仙汤全方、温肾方治疗抑郁症靶点功能与通路的富集分析

采用Metascape平台对二仙汤全方、温肾方治疗抑郁症的相关靶点进行功能与通路的富集分析,并对结果进行可视化。GO富集分析结果见增强出版附加材料,其中深蓝色柱代表生物过程(BP),浅蓝色柱代表细胞组分(CC),橙色柱代表分子功能(MF)。在生物过程方面,全方和温肾方共同调控有机环化合物反应、氮化合物细胞反应、化学突触传递、跨突触信号等生物学过程。在细胞组分层面,全方和温肾方共同调节突触后、膜筏、膜微区等结构,温肾方还对树突结构具有调控作用。在分子功能方面,全方和温肾方共同对神经递质受体活性、G蛋白偶联胺受体活性、信号受体调节活性、信号受体激动活性等进行调节。可见温肾方与全方GO富集分析结果高度相似,通过突触结构及突触信号传递,细胞反应、信号受体等治疗抑郁症。

KEGG结果见增强出版附加材料,其中气泡越大代表该通路富集靶点数越多。二仙汤全方和温肾方调控的前20条通路中有18条相同。其中与抑郁症密切相关的通路主要有PI3K/Akt信号通路、神经活性配体-受体相互作用及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,且度值排名靠前的核心靶点如Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等富集于3条主要通路,可进一步说明温肾方和二仙汤全方可能主要通过Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等核心靶点调节PI3K/Akt、MAPK和神经活性配体受体相互作用等信号通路以治疗抑郁症。

3.5 二仙汤全方、温肾方对小鼠行为表现的影响

3.5.1 对小鼠糖水偏好实验和悬尾实验的影响

与空白组比较,模型组小鼠糖水偏好指数显著降低($P<0.01$),悬尾不动时间显著延长($P<0.01$)。与模型组比较,二仙汤全方和温肾方组小鼠糖水偏好指数明显升高($P<0.05$),二仙汤全方小鼠悬尾不动时间显著缩短($P<0.01$),而温肾方组小鼠仅有下调趋势,差异无统计学意义。两方疗效比较差异无统计学意义。见表2。

3.5.2 对小鼠开放旷场实验的影响

与空白组比较,模型组小鼠中央区活动时间及穿越次数明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,二仙汤全方和温肾方小鼠中央区活动时间及穿越次数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),两方疗效差异无明显统计学意义。见表3。

3.5.3 对小鼠高架O迷宫实验的影响

与空白组

表2 二仙汤全方、温肾方对小鼠糖水偏好指数和悬尾不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on sucrose preference index and immobility time of tail-suspension of mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好指数/%	悬尾不动时间/s
空白组		60.22±8.82	98.36±27.84
模型组		44.56±7.34 ²⁾	132.70±27.25 ²⁾
二仙汤组	1.47	55.81±9.88 ³⁾	102.50±34.29 ⁴⁾
温肾方组	1.05	54.66±13.23 ³⁾	111.80±16.54

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表7同)

表3 二仙汤全方、温肾方对小鼠中央区活动时间和中央区穿越次数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on time spent in central zone and central crossing times of mice in open field test ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	中央区活动时间/s	中央区穿越次数/次
空白组		50.90±13.14	34.08±6.54
模型组		25.98±7.27 ²⁾	23.08±10.73 ¹⁾
二仙汤组	1.47	37.77±14.02 ³⁾	33.25±9.57 ³⁾
温肾方组	1.05	40.68±14.36 ⁴⁾	36.75±12.33 ⁴⁾

比较,模型组小鼠开放臂停留时间及穿越次数均明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,二仙汤全方及温肾方小鼠开放臂停留时间及穿越次数明显增加($P<0.05, P<0.01$),其中二仙汤全方对开放臂停留时间的改善略优于温肾方,对穿越次数疗效略差于温肾方,两方疗效无显著差异。见表4。

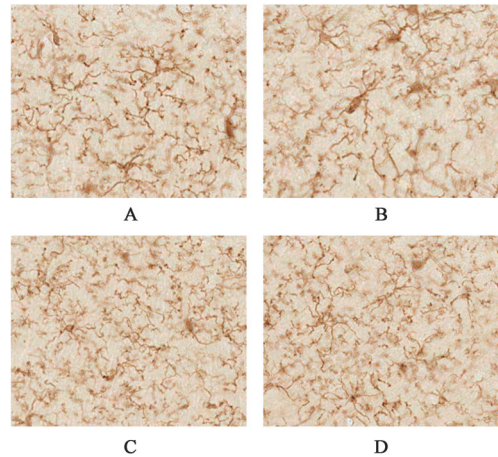
表4 二仙汤全方、温肾方对小鼠开放臂停留时间和开放臂穿越次数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on time spent in opened arm and opened arm crossing times of mice in zero maze test ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	开放臂停留时间/s	开放臂穿越次数/次
空白组		76.53±25.76	4.91±1.78
模型组		55.05±22.96 ¹⁾	2.08±0.79 ²⁾
二仙汤组	1.47	88.37±23.12 ⁴⁾	3.67±1.44 ⁴⁾
温肾方组	1.05	76.07±16.61 ³⁾	4.42±1.17 ⁴⁾

3.6 二仙汤全方、温肾方对海马小胶质细胞 Iba-1 表达的影响 空白组小鼠海马小胶质细胞胞体小,形状不规则,胞体分化延伸出大量细长的突起,呈现未激活的相对“静息态”。而模型组小鼠海马小胶质细胞胞体增大,突起分支减少并回缩变短,呈

典型的“阿米巴”激活态。两方给药后小胶质细胞形态均有所改善,见图1。与空白组比较,模型组小鼠海马 Iba-1 AA 显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二仙汤全方和温肾方小鼠海马 Iba-1 AA 均显著下调($P<0.01$),两方改善效果差异无统计学意义。见表5。



注:A.空白组;B.模型组;C.二仙汤全方组;D.温肾方组(图2同)

图1 二仙汤全方、温肾方对小鼠海马小胶质细胞的影响(免疫组化,×200)

Fig. 1 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on microglia in hippocampal region of mice (IHC, ×200)

表5 二仙汤全方、温肾方对小鼠海马 Iba-1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on expression of Iba-1 in hippocampal region of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Iba-1 AA
空白组		8.03±0.83
模型组		9.24±0.75 ²⁾
二仙汤组	1.47	7.35±0.63 ⁴⁾
温肾方组	1.05	7.40±0.70 ⁴⁾

3.7 二仙汤全方、温肾方对海马 p-Akt1/Akt1、BDNF、PSD95、Syn 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马 p-Akt1、BDNF、PSD95 及 Syn 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,二仙汤全方和温肾方小鼠海马 p-Akt1、BDNF、PSD95 和 Syn 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$),两给药组间比较差异无统计学意义。见图2、表6。

3.8 二仙汤全方、温肾方对海马 Akt1、BDNF、PSD95、Syn mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠 BDNF、PSD95、Syn 的 mRNA 表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,二仙汤全方和温肾方小鼠 BDNF、PSD95 和 Syn 的 mRNA 表达

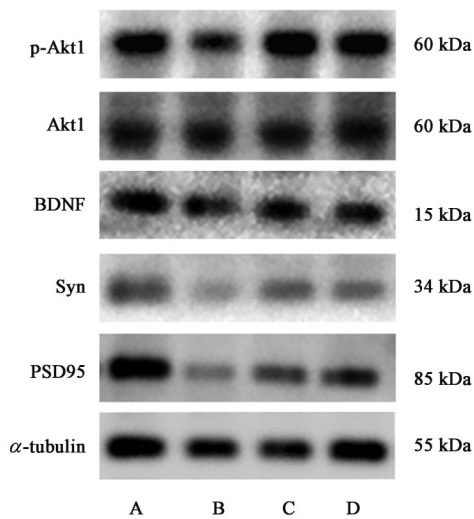


图2 小鼠海马 p-Akt1、BDNF、PSD95、Syn 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of p-Akt1, BDNF, PSD95 and Syn protein expression in hippocampal region of mice

明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 温肾方组小鼠 Akt1 mRNA 表达显著增加, 两治疗组间比较各指标差异无统计学意义。见表 7。

4 讨论

抑郁症归属于中医“郁证”“脏躁”“百合病”等范畴, 临床上治疗抑郁症多以疏肝解郁为法, 以逍遥散、四逆散、柴胡疏肝散等为主方^[14], 对于轻度抑郁患者躯体症状效果较好, 而对中、重度抑郁患者治疗效果不尽人意。部分中、重度抑郁患者^[3]以情绪低落、乏力、畏寒失眠及思维迟缓为特点, 表现为“脾肾阳虚”证型。课题组通过中医经典理论探讨及方-证疗效反证, 证明了早期应激导致成年后肾

阳虚体质的抑郁倾向^[2], 成年二次束缚应激更加严重, HPA 轴过度激活, 糖皮质激素超量表达激发个体大量阳气以应对不良事件, 由此造成肾阳虚为主的抑郁症动物模型。二仙汤中仙茅、淫羊藿、巴戟天温肾补精, 以消阴翳。知母、黄柏滋阴泻火, 当归柔木和肝, 调理冲任, 具有调控 HPA 轴异常激活的作用, 并改善抑郁行为表现。临床常用二仙汤加减治疗“肾阴阳两虚、虚火上扰”型更年期抑郁症^[15], 但对于“肾阳虚型”抑郁症, 二仙汤中的知母、黄柏苦寒伤阳, 当归滋腻滑肠, 并不完全符合患者的病机及证候规律^[16], 课题组亦观察到二仙汤全方治疗阳虚抑郁症小鼠时出现的滑肠泄泻、饮食减少等表现。初步猜想在不影响疗效的前提下, 以疾病病机和证候规律为导向, 进行温肾方(仙茅-淫羊藿-巴戟天)组方研究以精简药量, 减少副作用。以往“单药-单靶点”的中药研究模式无法完全解释中医理论指导下的拆方研究, 而网络药理学技术“复方-网络靶点-疾病”研究模式的出现使其成为可能, 并在分子机制的微观层面弥补了中医药宏观整体观念的不足。因此, 本研究欲通过网络药理学结合实验验证, 从疗效及机制上初步探索温肾方干预抑郁症的可行性。

母婴分离结合慢性束缚应激是常用的抑郁症动物模型^[12], 可模拟早年应激的个体成年遭受二次打击后出现悲观失落、情绪低下、快感缺失等抑郁表现。以糖水偏好实验、悬尾实验、开放旷场及高架 O 迷宫实验, 从“奖赏”“绝望”“探索”等 3 个层面

表6 二仙汤全方、温肾方对小鼠海马 p-Akt1、BDNF、PSD95、Syn 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on expression of p-Akt1, BDNF, PSD95 and Syn protein in hippocampal region of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-Akt1/Akt1	BDNF/ α -tubulin	PSD95/ α -tubulin	Syn/ α -tubulin
空白组		0.66±0.08	0.35±0.04	0.73±0.05	0.19±0.02
模型组		0.32±0.06 ²⁾	0.24±0.02 ²⁾	0.39±0.03 ²⁾	0.09±0.01 ²⁾
二仙汤组	1.47	0.58±0.08 ⁴⁾	0.31±0.02 ⁴⁾	0.59±0.05 ⁴⁾	0.16±0.02 ⁴⁾
温肾方组	1.05	0.54±0.05 ⁴⁾	0.29±0.03 ⁴⁾	0.57±0.04 ⁴⁾	0.16±0.03 ⁴⁾

表7 二仙汤全方、温肾方对小鼠海马 Akt1、BDNF、PSD95、Syn mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Erxian decoction and Wenshen prescription on expression of Akt1, BDNF, PSD95 and Syn mRNA in hippocampal region of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Akt1	BDNF	PSD95	Syn
空白组		1.02±0.21	1.06±0.13	1.09±0.13	1.03±0.07
模型组		0.85±0.20	0.78±0.10 ¹⁾	0.79±0.10 ¹⁾	0.72±0.09 ²⁾
二仙汤组	1.47	1.04±0.18	1.21±0.16 ⁴⁾	1.06±0.15 ³⁾	0.91±0.13 ³⁾
温肾方组	1.05	1.34±0.24 ⁴⁾	1.36±0.18 ⁴⁾	1.09±0.16 ³⁾	1.07±0.12 ⁴⁾

评估小鼠的快感体验、行为绝望、探索活动及高悬臂恐惧^[17]。本次实验结果表明,造模组小鼠糖水偏好指数、中央区活动时间及穿越次数、开放臂停留时间及穿越次数显著降低,悬尾不动时间显著增加,说明母婴分离结合慢性束缚应激诱导小鼠出现快感缺失、行为绝望、探索欲望下降及高架臂恐惧等表现,与以往抑郁症模型表现趋势一致^[18],提示造模成功。全方和温肾方治疗后小鼠糖水偏好指数、中央区活动时间及穿越次数、开放臂穿越次数显著增加,悬尾不动时间显著降低,两方均有改善作用且无明显差异。

本次采用网络药理学分析二仙汤全方和温肾方治疗抑郁症的潜在作用机制。通过TCMSP数据库筛选活性成分及作用靶点,与抑郁症疾病靶点取交集后分别获得118和126个交集靶点,二仙汤全方仅多8个作用靶点。PPI网络分析后发现二仙汤全方和温肾方的核心靶点基本相同,主要有Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等;KEGG通路分析结果表明二仙汤全方和温肾方靶点富集数排名前20的信号通路有18条相同,其中与抑郁症密切相关的有PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路及神经活性配体-受体相互作用通路。Akt1作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,PI3K活化后促使Akt1的磷酸化,随后激活下游的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)等信号通路,促进BDNF表达及凋亡基因失活,从神经营养、神经元存活及抑制凋亡等层面改善突触可塑性并维持神经元稳态^[19],且研究表明Akt1磷酸化后介导的突触和神经保护作用可被PI3K抑制剂LY294002逆转^[20]。Iba-1作为小胶质细胞M1型促炎激活的表面标志物,激活后介导释放超量的炎症因子(包括IL-1 β 、IL-6、TNF- α)、趋化因子及诱导性一氧化氮合酶、抗原呈递分子等,一方面提高神经中枢对不良应激的防御能力,但长期过度的胶质细胞激活反而诱导神经炎症,加重神经毒性,而MAPK信号通路在小胶质细胞促炎过程中介导重要的胞内信号传导途径,在抑郁症病理机制上与突触可塑性^[21]及神经免疫炎症失调^[22]相关。MAPK家族包括细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)及p38 3个主要成员,其中ERK及JNK通过激活核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路关键上游的NF- κ B抑制物(I κ B)的磷酸化,细胞质中NF- κ B释放入核并促使促炎靶基因转录^[23-24],导致IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子过度表达,进而诱导小胶质细胞M1型促炎激活及

神经炎症加重,Iba-1标志物表达上升,这与抑郁症的发生密切相关。神经活性配体-受体相互作用通路迄今发现由211个基因组成,是质膜上与细胞内外信号传导相关的配体和受体的集合,涵盖了上述两条信号通路所涉及的突触可塑性及神经炎症调节,与神经元功能正常运作密切相关^[25-26]。

动物实验结果表明,造模后小鼠海马小胶质细胞呈M1型促炎激活,Iba-1表达水平显著升高,细胞胞体增大,突起分支减少并回缩变短,呈典型的“阿米巴”激活态,p-Akt1、BDNF、PSD95及Syn等表达水平均显著降低,表明母婴分离结合慢性束缚应激诱导小鼠海马小胶质细胞激活及促炎表达,突触可塑性损害,为抑郁症发生的潜在作用机制。二仙汤全方及温肾方均可显著下调小鼠海马小胶质细胞Iba-1表达,促使其从激活态向静息态转化,并显著改善p-Akt1、BDNF、PSD95及Syn等表达水平,且两方的改善作用无明显差异,表明两方的抗抑郁机制类似,与降低海马区神经炎症,改善突触可塑性有关。

综合本次网络药理学、行为学及实验结果,可初步表明二仙汤全方及温肾方对母婴分离结合慢性束缚应激诱导的抑郁小鼠有显著的改善作用,其机制可能为两方均可调节PI3K/Akt及MAPK信号通路,作用于Akt1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等核心靶点,改善小鼠海马区神经炎症及突触可塑性,且无明显差异。初步表明以肾阳虚为主的抑郁症病机和证候规律下,二仙汤中的温肾拆方治疗具有可行性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MOKDAD A H, FOROUZANFAR M H, DAOUF F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2016, 387 (10036): 2383-2401.
- [2] 岳广欣,黄启福,陈家旭,等. 相火在抑郁症发病过程中的地位和作用[J]. 中医研究,2007,20(2):1-4.
- [3] 陈烁,顾成娟,唐程,等. 态靶辨证在脾肾阳虚型抑郁症中的运用—四逆汤加仙茅、淫羊藿、巴戟天[J]. 辽宁中医杂志,2020,47(9):4-6.
- [4] 邓朔,宓为峰,徐意,等. 巴戟天寡糖对抑郁症患者血浆BDNF、GDNF、VEGF和IGF-1水平的影响[J]. 中国新药杂志,2017,26(20):2454-2458.
- [5] 邹连勇,马远林,宓为峰,等. 巴戟天寡糖对海马神经

- 细胞再生及神经元生长的影响[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(22): 2623-2626.
- [6] 薛亚兰, 许晶廷, 邱继红. 淫羊藿苷对抑郁症大鼠抑郁样行为和神经元损伤的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(20): 2152-2156.
- [7] WANG Y S, SHEN C Y, JIANG J G. Antidepressant active ingredients from herbs and nutraceuticals used in TCM: Pharmacological mechanisms and prospects for drug discovery [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104520.
- [8] YANG S J, SONG Z J, WANG X C, et al. Curculigoside facilitates fear extinction and prevents depression-like behaviors in a mouse learned helplessness model through increasing hippocampal BDNF [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(10): 1269-1278.
- [9] GEHRAND A L, HOEYNCK B, JABLONSKI M, et al. Programming of the adult HPA axis after neonatal separation and environmental stress in male and female rats [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(7): 2777-2789.
- [10] HE D, LI Q, DU G, et al. An Integration of network pharmacology and experimental verification to investigate the mechanism of guizhi to treat nephrotic syndrome [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 755421.
- [11] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [12] WANG A, ZOU X, WU J, et al. Early-life stress alters synaptic plasticity and mtor signaling: Correlation with anxiety-like and cognition-related behavior [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 590068.
- [13] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [14] 许鹏, 章程鹏. 基于抑郁症发病机制的中药防治规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 232-238.
- [15] 周雨禾, 刘婷, 马宏博. 逍遥二仙汤加减治疗围绝经期综合征情绪障碍的临床疗效 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 144-149.
- [16] 章宸一瑜. 含黄芩方剂治疗神志病研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [17] 牛晨旭, 郝瀚, 张海林. 啮齿类动物抑郁症模型的行为学检测方法 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(3): 370-372.
- [18] 杨颖雯, 周瑾, 黄菲. 不同年龄段小鼠抑郁及焦虑样行为的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 248-253.
- [19] LI L, XU B, ZHU Y, et al. DHEA prevents $A\beta_{25-35}$ -impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 59(4/5): 323-333.
- [20] BRUEL-JUNGERMAN E, VEYRAC A, DUFOUR F, et al. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7901.
- [21] CALABRÒ M, MANDELLI L, CRISAFULLI C, et al. Genes involved in neurodevelopment, neuroplasticity and major depression: No association for CACNA1C, CHRNA7 and MAPK1 [J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2019, 17(3): 364-368.
- [22] ANTYPAN N, SOUERY D, TOMASINI M, et al. Clinical and genetic factors associated with suicide in mood disorder patients [J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2016, 266(2): 181-193.
- [23] 吴川, 柴潇潇, 王秀丽, 等. JNK 信号通路在紫杉醇诱发大鼠海马神经元凋亡中的作用: 与 NF- κ B 通路的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(11): 1347-1349.
- [24] 覃斌, 叶刚, 吴述轩, 等. 氯胺酮通过抑制 ERK1/2/NF- κ B 信号通路发挥抗抑郁作用 [J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 134-137.
- [25] 潘玲珍, 闫智勇, 左长英, 等. 长期使用地西泮对神经活性配体受体相互作用信号通路的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(5): 443-446.
- [26] LAUSS M, KRIEGNER A, VIERLINGER K, et al. Characterization of the drugged human genome [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(8): 1063-1073.

[责任编辑 孙丛丛]