

· 数据挖掘 ·

## 基于网络药理学和实验验证的二仙汤调治焦虑障碍的分子机制

余楷杰<sup>1</sup>, 杨婧雯<sup>1</sup>, 孟丹华<sup>1</sup>, 梁文青<sup>2</sup>, 巩子汉<sup>1</sup>, 岳广欣<sup>1\*</sup>

(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, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的: 基于网络药理学方法预测二仙汤治疗焦虑障碍的潜在分子机制, 并借助母婴分离结合束缚应激动物模型进行疗效及机制验证。方法: 利用中医药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)和成分靶点预测数据库(SwissTargetPrediction)获取二仙汤的活性成分及作用靶点; 通过基因数据库(GeneCards)、疗效药靶数据库(TTD)、在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM)和药物数据库(DrugBank)等获取焦虑障碍相关靶点, 与药物靶点取交集获得药物-疾病交集靶点; 利用STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图, 并基于拓扑参数分析筛选核心靶点; 通过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)通路富集分析。采用母婴分离结合束缚应激建立焦虑小鼠模型, 在第21天(PD21)离乳至第97天(PD97)束缚完成期间给予二仙汤药混饲料干预。通过开放旷场实验、高架O迷宫实验评估小鼠焦虑状态。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血浆皮质酮(CORT)含量; 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)检测小鼠海马蛋白激酶B(Akt1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、脑源性神经营养因子(BDNF)、突触后致密物-95(PSD95)及突触素(synaptophysin)的表达水平。结果: 共获得二仙汤活性成分97种, 作用靶点227个, 焦虑障碍相关靶点3863个, 药物-疾病交集靶点161个, 其中Akt1、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、mTOR等核心靶点可能与焦虑障碍密切相关。KEGG通路分析结果显示二仙汤治疗焦虑障碍主要涉及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及神经活性配体-受体相互作用等信号通路。动物实验结果显示, 与模型组比较, 二仙汤可显著增加小鼠中央区活动时间及穿越次数、开放臂停留时间及穿越次数、明显上调p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95、Syp的表达水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 二仙汤调治焦虑障碍具有多靶点-多通路的作用特点, 其机制可能与二仙汤通过影响Akt1、mTOR、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF等核心靶点及调控PI3K/Akt、MAPK及神经活性配体-受体相互作用等信号通路, 改善神经炎症与突触可塑性有关。

**[关键词]** 二仙汤; 网络药理学; 焦虑障碍; 动物实验; 分子机制

**[中图分类号]** R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0185-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221218

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220720.1940.010.html>

**[网络出版日期]** 2022-07-21 15:12

### Molecular Mechanism of Erxian Decoction in Treatment of Anxiety Disorder Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

SHE Kaijie<sup>1</sup>, YANG Jingwen<sup>1</sup>, MENG Danhua<sup>1</sup>, LIANG Wenqing<sup>2</sup>, GONG Zihan<sup>1</sup>, YUE Guangxin<sup>1\*</sup>

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

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

**[收稿日期]** 2022-03-20

**[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]** \* 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

**[Abstract]** **Objective:** To predict the potential molecular mechanism of Erxian decoction in the treatment of anxiety disorder based on network pharmacology, and to verify the efficacy and mechanism using the animal model of maternal separation combined with restraint stress. **Method:** Active components and related targets of Erxian decoction were obtained by traditional Chinese medicine system pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and SwissTargetPrediction. The targets related to anxiety disorder were screened out through GeneCards, therapeutic target database (TTD), online mendelian inheritance in man database (OMIM), and DrugBank, and the drug-disease intersection targets were obtained by taking intersections with the drug targets. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by the STRING database, and the core targets were screened out based on topological parameter analysis. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out for the intersection targets through the Metascape platform. Maternal separation combined with restraint stress was used to induce the mouse model of anxiety disorder. From the end of lactation on the 21st postnatal day (PD21) to the completion of restraint stress on the 97<sup>th</sup> postnatal day (PD97), the mice were fed with Erxian decoction mixed with diet. The anxiety state of mice was evaluated by open field test and elevated O-maze test. The content of plasma corticosterone (CORT) in mice was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of protein kinase B (Akt1), mammalian target of rapamycin (mTOR), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic density-95 (PSD95), and synaptophysin in the hippocampus of mice were detected by Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Ninety-seven active components and 227 action targets of Erxian decoction were obtained. There were 3 863 targets related to anxiety disorder, with 161 drug-disease intersection targets. Among these intersection targets, core targets such as Akt1, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), and mTOR were presumed closely related to anxiety disorder. The results of KEGG pathway analysis showed that Erxian decoction mainly treated anxiety disorder through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathways. The results of animal experiments showed that compared with the model group, the Erxian decoction group significantly increased the time of mice spent in the central zone and central crossing times and time spent in the opened arm and opened arm crossing times, with significantly increased expression levels of p-Akt1, p-mTOR, BDNF, PSD95, and synaptophysin (Syp). **Conclusion:** Erxian decoction has the multi-target and multi-pathway characteristics in the treatment of anxiety disorder, and its mechanism may be related to the improvement of synaptic plasticity and neuroinflammation by affecting Akt1, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, mTOR, and other core targets and modulating PI3K/Akt, MAPK, as well as neuroactive ligand-receptor interaction signal pathways.

**[Keywords]** Erxian decoction; network pharmacology; anxiety disorder; animal experiments; molecular mechanism

焦虑障碍俗称焦虑症,是一种常见的精神障碍疾病,至少包括12种不同的分型,如广泛性焦虑障碍、惊恐障碍及特定恐惧焦虑障碍等。其症状群包括心理症状及躯体症状,前者以过度紧张、恐惧不安、睡眠及记忆障碍为主,后者集中表现为内脏自主神经紊乱及运动性不安<sup>[1]</sup>。相关数据统计,我国焦虑障碍患病率最高,年患病率4.98%,终生患病率已达7.57%<sup>[2]</sup>,且焦虑症是抑郁患者治疗效果的主要阻抗因素。焦虑障碍发病机制复杂,涉及突触结

构和功能可塑性改变、神经炎症及神经递质紊乱等。以往研究表明,母婴分离诱导子代小鼠海马突触可塑性损伤,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA轴)功能紊乱,使得小鼠成年遭受二次束缚打击时出现更加明显的焦虑样行为<sup>[3-4]</sup>。目前临床上多采用苯二氮卓类药物、5-羟色胺受体激动剂及部分抗抑郁药进行对症治疗,但药物服用周期长、存在胃肠反应、焦虑反跳等不良反应,长期服用易产生耐药性与成瘾性。

二仙汤出自《中医方剂临床手册》，由仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、黄柏、知母组成，具有温肾补精、滋阴降火的功效，主治更年期妇科病症及焦虑抑郁、失眠等情绪障碍。课题组前期研究表明，二仙汤具有抑制神经炎症、调节神经-内分泌紊乱的作用，可通过调节HPA轴的异常激活，改善早年不良经历诱导的焦虑样行为<sup>[5]</sup>。但目前对于二仙汤治疗焦虑的机制研究仅针对部分靶标和信号通路，难以体现中药的整体调节特点。而网络药理学是集生物信息学、计算机科学及系统科学等多学科交叉的一种新兴方法，能够更为系统、综合的反映中药复方对于疾病网络的干预效应及机制，揭示复方多成分-多靶点-多通路的作用特点，在微观机制层面与中医药宏观整体观念互补。因此，本研究欲采用网络药理学方法及母婴分离结合束缚应激焦虑小鼠模型实验验证，探讨二仙汤治疗焦虑障碍的作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 实验所用二仙汤中药饮片(仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、黄柏、知母)由北京仟草中药饮片公司提供，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均为正品，批号分别为200716001、200814005、210204003、201211003、200519001、200702001。盐酸氟西汀(法国 Patheon 公司，货号 HJ20160501)。

**1.2 动物** 于北京维通利华实验动物技术有限公司购买8周龄C57BL/6N种鼠，其中雄性10只，雌性40只，SPF级，体质量(22±2)g，动物合格证号SCXK(京)2016-0006，于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心进行为期1周的适应性喂养(温度22~25℃，自由进食进水，相对湿度40%~50%，昼夜各半)，之后开始配对繁殖。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伦理委员会审查。

**1.3 试剂** 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)；TRIzol(美国赛默飞世尔科技公司，货号 15596026)；皮质酮(CORT)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国 R & D 公司，货号 KGE009)；磷酸化(p)-蛋白激酶B1(Akt1)、Akt1 抗体、 $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)抗体(美国 Proteintech 公司，货号分别为 28731-1-AP、10176-2-AP、11224-1-AP)；脑源性神经营养因子(BDNF)抗体、突触后致密物质 95(PSD95)抗体、突触素(Syp)抗体(英国 Abcam 公司，货号分别为 ab108319、ab18258、

ab32127)；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体、p-mTOR 抗体(美国 CST 公司，货号分别为 2983、5536)；聚偏氟乙烯树脂(PVDF)膜(美国 Millipore 公司，货号 IPVH00010)，其他常规试剂均购自北京索莱宝科技有限公司

**1.4 仪器** 40 cm×40 cm×35 cm 小鼠旷场箱(自制)；XR-XZR209型高架O迷宫(上海欣软科技有限公司)；小鼠束缚管(自制)；Elx800型酶标仪(美国 BioTek 公司)；C1000型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、1645050-OG型垂直电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)；ND8000型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司)；3K30型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)；CHB-100型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司)；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型行为分析软件(美国 Clever Sys Inc 公司)，FluorChemFC3图像处理器(美国 ProteinSimple 公司)。

## 2 方法

### 2.1 二仙汤治疗焦虑障碍的网络药理学研究

**2.1.1 二仙汤活性成分及作用靶点筛选** 通过中医药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmospw.com/tcmosp.php>)<sup>[6]</sup>检索仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、黄柏、知母的化学成分，以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18作为筛选指标，并结合文献报道及2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)记载，筛选出二仙汤包含的活性成分。通过TCMSP及成分靶点预测数据库(SwissTargetPrediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测潜在作用靶点，借助UniProt数据库将蛋白质靶点名称转化为基因名。

**2.1.2 焦虑障碍相关靶点筛选** 以“anxiety”“anxiety disorder”“generalized anxiety disorder”为关键词，从基因名片数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org>)、疗效药靶数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)中检索调治焦虑障碍的潜在靶点，并检索药物数据库(DrugBank, <https://www.drugbank.ca>)进行靶点补充。将所有筛选结果进行汇总、去重，得到焦虑障碍相关靶点。将2.1.1项活性成分的作用靶点与焦虑障碍相关靶点取交集，并利用Venny 2.1工具绘制韦恩图。

**2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络建构及核心靶点筛选** 将药物-疾病交集靶点输入STRING

平台(<https://string-db.org>),设置物种为“Homo sapiens”,最小互相作用阈值设置为 Medium confidence(0.4),构建PPI网络。将PPI网络结果导入Cytoscape 3.8.2软件中,运用“CytoNCA”插件对节点交互关系进行分析,计算度值(DC)、介数中心性(BC)、接近中心性(CC)及局部平均连接性(LAC),以上述拓扑参数的中位数为标准筛选核心靶点。

**2.1.4 基因本体(GO)富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 利用Metascape平台(<http://metascape.org/gp/index.html>)对交集靶点进行GO富集分析与KEGG通路富集分析,筛选条件 $P < 0.01$ ,利用微生信在线工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对富集结果进行可视化分析。

## 2.2 二仙汤治疗焦虑障碍的药理学实验验证

**2.2.1 焦虑模型制备、分组** 将雌鼠与雄鼠按4:1的比例混居繁殖,母鼠待产前单笼饲养,分娩后保持每笼4~6只仔鼠。以仔鼠出生当天为第0天(PD0),于PD0将仔鼠随机分为空白组、造模组,母婴分离造模后按随机数字表法分为模型组、二仙汤低、中、高剂量组、氟西汀组,共6组,每组10只。模型制备方法:于PD1~PD14对仔鼠进行母婴分离,将仔鼠转运至恒温孵育箱(32℃),每天3h。空白组进行相同操作但分离时间少于10min。仔鼠三周龄(PD21)离乳喂养至成年3月龄(PD90)后,除空白组外各组进行束缚应激制备焦虑模型,根据以往研究的造模方法进行改进<sup>[7]</sup>,将小鼠装入50mL的透气离心管束缚3h(9:00~12:00),持续7d至PD97。束缚完成2h后进行开放旷场实验、高架O迷宫,若行为学实验结果显示,与空白组比较,模型组小鼠中央区活动时间及穿越次数、开放臂停留时间及穿越次数下降,说明模型复制成功<sup>[8]</sup>。

**2.2.2 药物制备及给药** 二仙汤选自《中医方剂临床手册》,组成为仙茅9g、巴戟天9g、淫羊藿9g、当归9g、知母4.5g、黄柏4.5g。一煎加入10倍体积纯水充分浸泡,武火煮开转文火煎煮1h,过滤药液静置。二煎加入8倍体积纯水煎煮1h,将2次滤液合并,水浴浓缩至稠膏后减压真空干燥(80℃,6h)获得中药浸膏粉,称重粉碎后备用。共煎煮30服剂量,总生药量1350g,煎煮后获得浸膏粉357.8g,出膏率26.5%,合计11.9g/剂。小鼠给药剂量参考《药理实验方法学》<sup>[9]</sup>,以体表面积折算的等效比值0.0026进行换算(人与小鼠体质量为70kg和

20g),则二仙汤低剂量组小鼠给药计算公式为 $0.77\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (0.5倍临床剂量),中剂量组小鼠给药剂量 $1.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (1倍临床剂量),高剂量组小鼠给药剂量 $3.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (2倍临床剂量),氟西汀推荐成人剂量为20mg,则氟西汀组小鼠给药剂量为 $2.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。按成年小鼠 $5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ 的进食量制作药混饲料,则浸膏/饲料混合比例分别为3.08、6.16、12.32 $\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $10.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。将浸膏粉混入打碎备用的饲料中,加入适量纯净水混匀,60℃烘干定型备用。在小鼠3周龄(PD21)离乳至束缚结束PD97,空白组和模型组饲喂普通饲料,其余给药组饲喂相应的药混饲料。

**2.2.3 开放旷场实验** 小鼠先于实验室适应1h。将小鼠放入自制旷场箱中心点,以中心点周围20cm×20cm的区域为中央区,记录小鼠5min内的中央区活动时间、中央区穿越次数。每轮试验后用75%乙醇清洗旷场箱,以减少气味及排泄物对后续小鼠实验的影响,采用TopScan™2.0软件分析行为学数据。

**2.2.4 高架O迷宫实验** 高架O迷宫装置分别有两个开放臂和两个闭合臂,外径65cm,内径60cm,迷宫距离地面高60cm,闭合臂高10cm。将实验小鼠放置于开放臂上,头朝向闭合臂,观察小鼠5min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。

**2.2.5 动物取材** 行为学检测结束24h后,采用1%浓度的戊巴比妥钠( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )对小鼠进行腹腔注射麻醉。麻醉后眼球取血,放入抗凝管与枸橼酸钠充分混匀后离心( $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,4℃,15min,离心半径10cm)获得血浆。取血完成后断头取全脑,分离海马脑组织,液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存。

**2.2.6 ELISA检测小鼠血浆CORT表达水平** 采用双抗体夹心ELISA法检测小鼠血浆中CORT表达水平,参照试剂盒说明书进行操作。

**2.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马 p-Akt1、Akt1、p-mTOR、mTOR、BDNF、PSD95、Syp蛋白表达水平** 采用高效RIPA裂解液提取海马组织蛋白,配置BCA工作液检测蛋白浓度,后加入4×蛋白变性缓冲液,100℃煮沸10min使蛋白变性。按照十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)说明书进行电泳,电转,封闭,一抗4℃孵育过夜(p-Akt1、Akt1、p-mTOR、mTOR、BDNF 1:1 000;α-tubulin 稀释;PSD95 1:5 000;Syp 1:2万),洗膜后二抗(1:5 000)室温孵育1~2h,ECL

底物发光显色。采用 Image J 软件分析条带,以待测蛋白表达量与内参照  $\alpha$ -tubulin 表达量进行对比,以表示目的蛋白的相对表达水平。

**2.2.8 Real-time PCR 检测小鼠海马 Akt1、mTOR、BDNF、PSD95、Syp mRNA 表达水平** 根据 TRIzol 试剂说明书提取小鼠海马组织总 RNA,提取总 RNA 后测定浓度及纯度,以  $A_{260}/A_{280}$  数值在 1.8~2.0 为标准。参照说明书合成第一链 cDNA,以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR,体系 20  $\mu$ L,扩增条为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 40 个循环。按  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达水平。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,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 CGTTCCTTGTAGCCAATAAAGG	
mTOR	上游 CTGATCCTCAACGAGCTAGTTC	112
	下游 GGTCTTTGCACTACTGTGCATG	
BDNF	上游 CCCATGAAAGAAGTAAACGCTCC	205
	下游 CCTTATGGTTTTCTTCGTTGGG	
PSD95	上游 ATGTGCTTCATGTAATTGACGC	136
	下游 TTTAACCTTGACCACTCTCGTC	
Syp	上游 CCACTGACCCAGAGAACATTAT	164
	下游 CTTGAACACGAACCATAGGTTG	
$\beta$ -actin	上游 CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	73
	下游 CACAGCCTGGATGGCTACGT	

**2.2.9 统计学分析** 相关数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。若组间数据符合正态分布且方差齐,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。方差不齐时应用非参数秩和检验, $P<0.05$  说明组间差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 二仙汤与焦虑障碍靶点交集** 通过 TCMSP 数据库检索二仙汤中药化学成分,经过 OB、DL 筛选后,共获得活性成分 91 种。当归中存在较多的高生物活性成分,但并不符合筛选标准,结合 2020 年版《中国药典》及文献报道<sup>[10-16]</sup>,补充蒿本内酯、阿魏酸、香草酸、丁烯基苯酚、绿原酸、咖啡酸,最终获得 97 种活性成分,剔除重复靶点,最终 97 种活性成分

共获得靶点 227 个。GeneCards 检索到焦虑障碍靶点 5 570 个,以 relevance score $\geq$ 中位数 3.44,筛选出 2 785 个靶点,与 TTD、OMIM、Drugbank 等数据库检索结果合并后获得焦虑障碍相关靶点 3 863 个,将二仙汤活性成分作用靶点与焦虑障碍靶基因进行映射,得到交集靶点 161 个,借助 Venny2.1 工具绘制韦恩图,见增强出版附加材料。进而将 161 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络,其中节点数 161,边数 472,平均节点度 5.86,平均局部聚类系数 0.417,预期边数 164,PPI 富集  $P<1.0\times 10^{-16}$ 。

**3.2 二仙汤治疗焦虑障碍核心靶点获取** 将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.8.2 软件中,借助“CytoNCA”插件计算出节点交互关系的 DC、BC、CC、LAC 等值,以中位数为标准逐步筛选核心靶点,见增强出版附加材料。其中与焦虑障碍相关的核心靶点分别是 Akt1、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、mTOR。

**3.3 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析** 采用 Metascape 平台对交集靶点进行功能与通路的富集分析,并进行结果可视化,共富集到生物学过程 1 816 条,细胞组分 131 条,分子功能 200 条,通过  $P$  值筛选排名前 20 的条目绘图,见图 3。KEGG 通路富集条目 203 条,结合靶点富集数及  $P$  值筛选条目进行分析并作图,见增强出版附加材料。气泡大小代表基因靶点富集数,气泡颜色由绿逐渐转红表明其显著性越强。其中与焦虑障碍密切相关的信号通路主要有磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路、神经活性配体/受体相互作用,将 KEGG 信号通路及富集靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建靶点-通路网络图,见增强出版附加材料,可见 Akt1、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF、mTOR 等核心靶点是多通路共同作用的靶点。

### 3.4 动物实验验证

**3.4.1 二仙汤对小鼠旷场实验的影响** 与空白组比较,模型组小鼠中央区活动时间及穿越次数均明显减少( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与模型组比较,二仙汤中、高剂量组和氟西汀组小鼠中央区活动时间和穿越次数明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),二仙汤低剂量组小鼠穿越次数明显增加( $P<0.05$ )。见表 1。

**3.4.2 二仙汤对小鼠高架 O 迷宫实验的影响** 与空白组比较,模型组小鼠开放臂停留时间明显缩短( $P<0.05$ ),开放臂穿越次数显著减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,二仙汤低、中、高剂量组及氟西汀组小

表1 二仙汤对小鼠旷场实验中央区活动时间和中央区穿越次数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Erxian decoction on time spent in central zone and central crossing times of mice in open field test ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	中央区活动时间/s	中央区穿越数/次
空白组		39.62±10.69	33.40±7.50
模型组		22.11±10.54 <sup>2)</sup>	21.80±7.84 <sup>1)</sup>
二仙汤低剂量组	0.77	29.90±12.33	31.20±9.98 <sup>3)</sup>
二仙汤中剂量组	1.54	45.10±13.61 <sup>4)</sup>	36.70±11.88 <sup>4)</sup>
二仙汤高剂量组	3.08	51.21±13.11 <sup>4)</sup>	32.80±10.35 <sup>3)</sup>
氟西汀组	0.002 6	46.70±14.31 <sup>4)</sup>	30.60±7.23 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表5同)

鼠开放臂停留时间明显延长( $P<0.05, P<0.01$ ),二仙汤中、高剂量及氟西汀组小鼠开放臂穿越次数显著增多( $P<0.01$ )。见表2。

**3.4.3 二仙汤对小鼠血浆CORT含量的影响** 与空白组比较,模型组小鼠血浆皮质酮CORT含量显著增高( $P<0.01$ )。与模型组比较,二仙汤中、高剂量组及氟西汀组小鼠血浆CORT含量明显下降( $P<0.05$ )。见表3。

**3.4.4 二仙汤对小鼠海马p-Akt1/Akt1、p-mTOR/mTOR、BDNF、PSD95、Syp蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型小鼠海马pAkt1、p-mTOR、BDNF、PSD95、Syp等蛋白表达量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,二仙汤中、高剂量组及氟西汀组小鼠海

表2 二仙汤对小鼠高架O迷宫实验开放臂停留时间及开放臂穿越次数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Erxian decoction on time spent in opened arm and opened arm crossing times of mice in zero maze test ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	开放臂停留时间/s	开放臂穿越数/次
空白组		72.09±12.93	5.30±2.16
模型组		55.57±15.26 <sup>1)</sup>	2.20±1.03 <sup>2)</sup>
二仙汤低剂量组	0.77	75.74±18.44 <sup>3)</sup>	3.20±1.55
二仙汤中剂量组	1.54	75.49±19.21 <sup>3)</sup>	4.90±1.79 <sup>4)</sup>
二仙汤高剂量组	3.08	84.55±18.05 <sup>4)</sup>	5.20±1.87 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 6	82.98±15.50 <sup>4)</sup>	4.50±1.72 <sup>4)</sup>

表3 二仙汤对小鼠血浆皮质酮含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Erxian decoction on plasma corticosterone in mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	皮质酮CORT
空白组		23.55±2.40
模型组		30.35±4.42 <sup>2)</sup>
二仙汤低剂量组	0.77	27.96±4.05
二仙汤中剂量组	1.54	24.92±1.46 <sup>3)</sup>
二仙汤高剂量组	3.08	25.45±4.43 <sup>3)</sup>
氟西汀组	0.002 6	24.94±3.20 <sup>3)</sup>

马p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95及Syp蛋白表达量明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),二仙汤低剂量组小鼠海马BDNF、PSD95、Syp蛋白表达亦明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4和图1。

表4 二仙汤对小鼠海马p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95、Syp蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

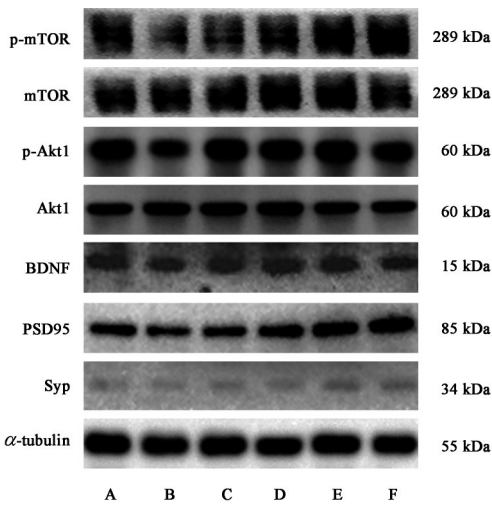
Table 4 Effect of Erxian decoction on expression of p-Akt1, p-mTOR, BDNF, PSD95, Syp in hippocampus of mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-Akt1/Akt1	p-mTOR/mTOR	BDNF/ $\alpha$ -tubulin	PSD95/ $\alpha$ -tubulin	Syp/ $\alpha$ -tubulin
空白组		0.61±0.05	1.16±0.14	0.47±0.03	0.45±0.04	0.19±0.02
模型组		0.41±0.03 <sup>2)</sup>	0.90±0.08 <sup>2)</sup>	0.30±0.02 <sup>2)</sup>	0.28±0.04 <sup>2)</sup>	0.14±0.02 <sup>2)</sup>
二仙汤低剂量组	0.77	0.46±0.04	1.01±0.07	0.36±0.03 <sup>4)</sup>	0.38±0.03 <sup>4)</sup>	0.17±0.02 <sup>3)</sup>
二仙汤中剂量组	1.54	0.54±0.08 <sup>4)</sup>	1.05±0.16 <sup>3)</sup>	0.38±0.03 <sup>4)</sup>	0.40±0.03 <sup>4)</sup>	0.19±0.02 <sup>4)</sup>
二仙汤高剂量组	3.08	0.59±0.06 <sup>4)</sup>	1.05±0.14 <sup>3)</sup>	0.44±0.03 <sup>4)</sup>	0.47±0.09 <sup>4)</sup>	0.22±0.03 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 6	0.59±0.04 <sup>4)</sup>	1.16±0.14 <sup>4)</sup>	0.43±0.03 <sup>4)</sup>	0.47±0.03 <sup>4)</sup>	0.20±0.02 <sup>4)</sup>

**3.4.5 二仙汤对小鼠海马Akt1、mTOR、BDNF、PSD95、Syp mRNA表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠mTOR、BDNF、PSD95、Syp的mRNA表达显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,二仙汤中、高剂量组和氟西汀组小鼠mTOR、BDNF、PSD95、Syp mRNA表达明显上调( $P<0.05, P<0.01$ ),二仙汤低剂量组小鼠mTOR、二仙汤中剂量组小鼠Akt1的表达亦明显上调( $P<0.05, P<0.01$ )。见表5。

## 4 讨论

焦虑障碍发病机制复杂,社会负担严重。中医学无焦虑症病名,根据其临床症状,可归属为“郁证”“脏躁”“惊悸”等范畴。课题组从经典理论分析,幼年个体发育尚未成熟,肾封藏能力较弱,若遭受外界刺激则易使阳气外泄以应对不良刺激,成为个体成年后焦虑抑郁的阳虚体质基础<sup>[17]</sup>,其病理基础为母婴分离诱导仔鼠的HPA轴反应增强<sup>[18]</sup>,正如



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 二仙汤低剂量组; D. 二仙汤中剂量组; E. 二仙汤高剂量组; F. 氟西汀组

图1 二仙汤对小鼠海马 p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95、Syp 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of Erxian decoction on expression of p-Akt1, p-mTOR, BDNF, PSD95, Syp in hippocampus of mice

《黄帝内经·灵枢·本神》言：“肾藏精，精舍志。”肾阳不足则精髓不生，波及肾志而致惊恐、悸动不安，正如“肾在志为恐”，而“阳气者，精则养神”。成年束缚应激进一步诱导机体 HPA 轴持续过度激活，皮质激素超量分泌使机体阳气大量外出以应对不良应激<sup>[19-20]</sup>，而肾中元阳外泄，火热扰神则烦躁、焦虑等<sup>[21]</sup>。二仙汤出自《中医方剂临床手册》，主要治疗更年期妇科病症及焦虑抑郁等精神情志疾病。方中巴戟天、仙茅、淫羊藿等温肾壮阳，黄柏、知母以泄火，当归以柔肝和木。对于证型属于阳虚兼虚火上炎者疗效甚优。课题组以往研究表明，二仙汤可通过调节 HPA 轴的异常激活改善焦虑样行为<sup>[22]</sup>，但目前未见二仙汤治疗焦虑障碍作用机制的系统研究。因此本次研究采用网络药理学方法和实验验证，分析二仙汤治疗焦虑障碍的核心靶点及参与的信号途径。

通过网络药理学技术对二仙汤治疗焦虑障碍

的靶点进行分析，并与活性成分关联后筛选出槲皮素、山柰酚、木犀草素、 $\beta$ -谷甾醇、四氢非洲方己碱、四氢小檗碱等核心成分，目前已证明槲皮素、山柰酚、木犀草素具有突触可塑性及神经保护的药理作用<sup>[23-25]</sup>。KEGG 通路富集分析结果中与焦虑障碍密切相关的有 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。PI3K/Akt 是重要的胞内信号转导通路，PI3K 激活后可以磷酸化 Akt1 的特定活性位点，Akt1 激活后可磷酸化其下游底物糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )，产生神经及突触保护功能，而 GSK-3 $\beta$  本身对神经元及突触有损害作用<sup>[26]</sup>。其次，Akt1 依赖的 mTOR 下游底物磷酸化后可促进蛋白质的翻译，其中以脑源性神经营养因子(BDNF)最为重要，具有维持长期突触可塑性及神经元网络稳态的作用。而 MAPK 信号通路是胶质细胞促炎病理过程中的重要信号转导途径，作为连接神经炎症及突触可塑性的关键信号分子，若遭受不良应激如母婴分离、空间束缚，一方面 MAPK 家族中的细胞外信号调节激酶(ERK)和应激活化蛋白激酶(JNK)可直接磷酸化激活，作用于细胞核内的核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和激活蛋白-1(AP-1)，促进细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的转录表达，神经炎症加重，直接损害突触可塑性<sup>[27]</sup>；另一方面不良应激造成的神经炎症可激活 MAPK 的另一家族成员 p38 途径，进而抑制 BDNF 介导的突触可塑性保护作用，具体表现为 BDNF 介导的突触活动响应元件受损，且 p38 激活后还抑制了海马树突棘中丝状肌动蛋白(F-actin)的形成，这是维持突触可塑性长时程增强(LTP)所必需的<sup>[28]</sup>。而神经活性配体-受体相互作用通路靶标丰富，如多巴胺受体(DRD)、 $\gamma$ -氨基丁酸受体(GABR)、5-羟色胺受体等均均为焦虑障碍的治疗靶点，亦是保持突触结构和功能正常的核心要素。

本次研究结果表明，母婴分离结合束缚应激造

表5 二仙汤对小鼠海马 Akt1、mTOR、BDNF、PSD95、Syp mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Erxian decoction on expression of Akt1, mTOR, BDNF, PSD95 and Syp mRNA in hippocampus of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Akt1	mTOR	BDNF	PSD95	Syp
空白组		1.04±0.18	1.01±0.21	1.03±0.19	1.01±0.17	1.03±0.17
模型组		0.84±0.18	0.68±0.17 <sup>2)</sup>	0.73±0.13 <sup>2)</sup>	0.76±0.13 <sup>2)</sup>	0.69±0.11 <sup>2)</sup>
二仙汤低剂量组	0.77	0.97±0.17	0.95±0.13 <sup>3)</sup>	0.91±0.17	0.83±0.13	0.72±0.09
二仙汤中剂量组	1.54	1.04±0.15 <sup>4)</sup>	1.01±0.19 <sup>4)</sup>	0.97±0.20 <sup>3)</sup>	1.05±0.15 <sup>4)</sup>	1.06±0.18 <sup>4)</sup>
二仙汤高剂量组	3.08	1.07±0.19	1.00±0.18 <sup>4)</sup>	1.07±0.19 <sup>4)</sup>	0.95±0.14 <sup>3)</sup>	1.13±0.17 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 6	0.96±0.17	1.15±0.21 <sup>4)</sup>	0.94±0.18 <sup>3)</sup>	1.07±0.20 <sup>4)</sup>	0.97±0.15 <sup>4)</sup>

模后小鼠血浆CORT含量增高、海马区p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95及Syp等表达水平显著降低,表明小鼠遭受不良刺激后HPA轴过度激活,Akt1下游的mTOR信号通路及BDNF表达受抑制,海马突触可塑性受损,为焦虑障碍发生的可能原因之一,与以往研究结果一致<sup>[29]</sup>。而二仙汤中、高剂量组给药后小鼠血浆CORT含量显著降低,海马区p-Akt1、p-mTOR、BDNF、PSD95及Syp等表达水平显著升高,表明二仙汤的抗焦虑作用可能与降低HPA轴过度激活、促进Akt1下游的mTOR磷酸化激活及BDNF表达,进而改善突触可塑性有关。造模后小鼠旷场实验中央区活动时间及中央穿越次数显著减少,表明小鼠遭受应激后自主活动受到影响,进入空旷环境后探索欲望降低,而在高架O迷宫实验中造模小鼠开放臂停留时间及穿越次数减少,综合说明造模后小鼠表现出焦虑行为,对新异环境的探索欲望降低,高架开放臂恐惧心理增加,而二仙汤中、高剂量给药后可显著增加小鼠的中央区活动时间及穿越次数、开放臂停留时间及穿越次数,缓解小鼠出现的焦虑行为。

综合本次网络药理学及动物实验结果,初步说明二仙汤可能通过调节PI3K/Akt、MAPK及神经活性配体/受体信号通路,作用于Akt1、mTOR、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 等核心靶点,改善海马突触可塑性,进而缓解小鼠的焦虑行为。而本次研究仅对部分核心靶点及核心通路进行验证,且网络药理学结果仅是对目前数据库收录的成分、靶点进行简单叠加,而实际中药复方煎煮或提纯中存在复杂化学反应,成分必然发生变化,因此需在不断补充、纠错的基础上综合研究二仙汤治疗焦虑障碍的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 陆林. 沈渔邨精神病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2017:423-431.
- [2] HUANG Y, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: A cross-sectional epidemiological study[J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3):211-224.
- [3] HUANG J, SHEN C, YE R, et al. The effect of early maternal separation combined with adolescent chronic unpredictable mild stress on behavior and synaptic plasticity in adult female rats[J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12:539299.
- [4] DANDI E, KALAMARI A, TOULOUMI O, et al.

Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2018, 67:19-32.

- [5] 岳广欣,张玲,卢贺起,等. 温阳解郁法对母婴分离小鼠行为模式及HPA轴功能的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(1):42-46.
- [6] 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.
- [7] 贾晶晶,石天尧,周文霞. 束缚应激与单程长时应激致小鼠焦虑障碍的应激参数比较与优化[J]. *国际药理学研究杂志*, 2019, 46(2):109-115.
- [8] 朱明好,蒋宁,周文霞. 不确定性空瓶饮水刺激法和束缚应激法建立小鼠焦虑模型及比较[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(2):102-108.
- [9] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [11] 宫文霞,周玉枝,李肖,等. 当归抗抑郁化学成分及药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(21):3905-3911.
- [12] ARAKI R, YASUBUCHI A, IKEGAYA M, et al. Ferulic acid alleviates abnormal behaviors in isolation-reared mice via 5-HT (1A) receptor partial agonist activity[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2021, 238(8):2147-2154.
- [13] KHOSHNAME S E, FARBOOD Y, FATHI MOGHADDAM H, et al. Vanillic acid attenuates cerebral hyperemia, blood-brain barrier disruption and anxiety-like behaviors in rats following transient bilateral common carotid occlusion and reperfusion[J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(3):785-793.
- [14] 王慧. 柴归颗粒在正常和CUMS大鼠体内过程比较研究[D]. 太原:山西大学, 2021.
- [15] 邢丽娜,周明眉,李云,等. 绿原酸及其肠道代谢产物对中枢神经系统疾病的作用和机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(6):1044-1047.
- [16] 王小红. 天然小分子酚的抗焦虑作用及其构效关系初探[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [17] 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(2):1-4.
- [18] 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.
- [19] EVANSON N K, HERMAN J P. Metabotropic

- glutamate receptor-mediated signaling dampens the HPA axis response to restraint stress [J]. *Physiol Behav*, 2015, 150:2-7.
- [20] 张军. 糖皮质激素性骨质疏松症的中医病机及封髓潜阳微粉作用机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2006.
- [21] 王鹏伟. 基于BDNF-TrkB信号通路探讨交泰丸对慢性束缚应激大鼠抗焦虑作用的机制研究[D]. 天津:天津中医药大学, 2020.
- [22] 李耿, 张喆, 尹西拳, 等. 地黄丸类方对肾阳虚大鼠HPA轴的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(3):320-324.
- [23] GAO X R, CHEN Z, FANG K, et al. Protective effect of quercetin against the metabolic dysfunction of glucose and lipids and its associated learning and memory impairments in NAFLD rats[J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20(1):164.
- [24] YAO Z H, YAO X L, ZHANG Y, et al. Luteolin could improve cognitive dysfunction by inhibiting neuroinflammation[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(4):806-820.
- [25] SILVA B, OLIVEIRA P J, DIAS A, et al. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults[J]. *Neurotox Res*, 2008, 13(3/4):265-279.
- [26] TAO J, CUI Y, DUAN Y, et al. Puerarin attenuates locomotor and cognitive deficits as well as hippocampal neuronal injury through the PI3K/Akt1/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in an *in vivo* model of cerebral ischemia [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63):106283-106295.
- [27] 余楷杰, 高静静, 巩子汉, 等. 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(18):49-57.
- [28] TONG L, PRIETO G A, KRAMÁR E A, et al. Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 $\beta$  via p38 mitogen-activated protein kinase[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(49):17714-17724.
- [29] DOW-EDWARDS D, SILVA L. Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior [J]. *Brain Res*, 2017, 1654(Pt B):157-164.

[责任编辑 顾雪竹]