

本文引用:吴源陶,邹译娴,王理槐.运用网络药理学模式探讨开心散治疗抑郁症的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2020,40(4):445-451.

运用网络药理学探讨开心散治疗抑郁症的作用机制

吴源陶,邹译娴,王理槐*

(湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

[摘要] **目的** 本研究旨在运用网络药理学方法,预测开心散活性成分的抗抑郁药理作用机制。**方法** 通过TCMSP、ETCM获取开心散的成分和靶点,运用Genecard、OMIM筛选抑郁症相关的蛋白,通过STRING构建蛋白相互作用网络,使用Cytoscape进行靶点的拓扑分析、MCODE聚类分析,使用R语言进行GO和KEGG通路富集分析,最后使用MOE软件进行分子对接验证。**结果** 网络分析表明,开心散中25个活性成分与其发挥抗抑郁作用密切相关,该机制涉及到51个靶点(包括ACHE、HTR3A、DRD2等)以及24条通路;分子对接结果显示化合物aposcopolamine、perlolryne、hederagenin与PPARG、ACHE、SLC6A4、DRD2靶点均具有较好的结合能力。**结论** 开心散可能主要通过神经活性受体配体相互作用、羟色胺突触、cAMP通路等相关靶标起到抗抑郁的功效,该研究为进一步揭示开心散治疗抑郁症的潜在活性成分及其可能的作用机制提供了思路。

[关键词] 开心散;抑郁症;网络药理学

[中图分类号] R277.7

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.04.012

Using Network Pharmacology Model to Explore the Mechanism of Kai-Xin-San in Treating Depression

WU Yuantao, ZOU Yixian, WANG Lihuai*

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To predict the anti-depressant pharmacological mechanism of Kai-Xin-San (KXS) active ingredients by network pharmacology. **Methods** The components and targets of KXS were obtained by TCMSP and ETCM, and the proteins related to depression were screened by Genecard and OMIM. The protein interaction network (PPI) was constructed by STRING. Topological attribute analysis and MCODE cluster analysis of the target were performed by Cytoscape. R language was performed to conduct GO and KEGG path enrichment analysis. Finally, MOE software was applied for molecular docking verification. **Results** Network analysis showed that the 25 active ingredients in KXS were closely related to its anti-depressant effect. The mechanism involved 51 targets (ACHE, HTR3A, and DRD2, etc.) and 24 pathways. The molecular docking showed that aposcopolamine, perlolryne, and hederagenin had good docking activity with PPARG, ACHE, SLC6A4, and DRD2, respectively. **Conclusion** KXS may exert anti-depressant effects through pathway-related targets such as neuroactive receptor-ligand interactions, serotonin synapses, and cAMP pathways efficacy. This study provides an idea for the study of the potential active components of KXS in the treatment of depression and its possible mechanism of action.

[Keywords] Kai-Xin-San; depression; network pharmacology

[收稿日期] 2019-10-17

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(18C0373);湖南省卫生健康委科研课题(20191304)。

[作者简介] 吴源陶,女,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合防治内分泌疾病。

[通讯作者] *王理槐,男,主治医师,E-mail:510236274@qq.com。

抑郁症又称抑郁障碍,是各种原因导致的一种心理障碍的精神疾病,临床表现为情绪低落,兴趣减低,精神不振,悲观,思维迟缓,严重者甚至出现自杀行为,严重影响着人类的健康^[1]。据世界卫生组织统计,截止到2017年,全球范围的抑郁症患者高达3亿多。有研究显示,我国约20%人群出现抑郁症状,在疾病负担排名第2位^[1]。目前针对抑郁症的治疗主要是依靠氟西汀、文法拉辛等药物,但这些药物不良反应以及单一成分发挥药效使其应用受到限制。而近年来,通过对中草药的深入研究,发现了许多具有抗抑郁的天然药物,中草药凭借自身效果好、副作用少,越来越受到人们的青睐^[2]。

在唐代孙思邈的《备急千金要方》中,记载着开心散(人参、远志、茯苓、石菖蒲)主治悲忧不乐、神志不宁、善忘等症,而这些与现代医学的抑郁症状相一致^[3]。动物研究发现,开心散可增加神经递质与神经的营养因子,从而缓解抑郁样症状,在细胞中可以促进星型胶质细胞合成与神经营养因子分泌^[4]。但中药复方成分复杂,研究作用机制困难,而基于系统生物学和药理学的网络药理学的兴起,以更省时省力的方式从整体水平上探讨中药与疾病之间的关系,为解释中药复方多成分、多靶点、多途径的整体机制提供了新的研究方式^[5-6]。

本研究主要通过网络药理学的方法,探究其治疗抑郁症的关键靶点和潜在作用机制,为阐释中药复方作用机制提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 构建开心散化学成分和预测靶点

从数据库TCMSP(<http://spnwnu.edu.cn/tcmspphp>)^[7]、ETCM (<http://www.nrc.ac.cn:9090/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>)收集开心散各单味药的化学成分,并在TCMSP进行筛选。

ADME指机体对外源化学物的吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)及排泄(excretion)一系列过程^[8]。在这项研究中,我们选取ADME的3个相关的指标:口服生物利用度(OB),血-脑屏障(BBB),和类药性(DL),设置 $OB \geq 30\%$, $BBB \geq -0.3$, $DL \geq 0.18$ 进行化合物筛选。

1.2 抑郁症靶点的收集及蛋白质互作网络构建

在OMIM(<http://omim.org/>)^[9]、GeneCards(<http://www.genecards.org/>)^[10]中输入“Depression”,获得相关的抑

郁症靶点;同时将潜在治疗靶基因输入STRING(<http://stringdb.org/cgi/input.pl>)^[11-13]网站,设置物种为“人”和置信度分数 >0.4 ,获得蛋白相互作用关系图。

1.3 GO、KEGG富集

使用R语言对靶点进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)途径富集分析。

1.4 网络分析

运用Cytoscape(3.7.1)^[13]的Network Analyzer分析中介中心度和节点度2个拓扑参数、MCODE聚类分析。此外,通过Cytoscape构建PPI网络图,抑郁症的成分-靶点-通路图。

1.5 分子对接

运用Molecular Operating Environment(MOE 2015.10软件)来验证化合物(apocopolamine, perlolyrine, hederagenin)与部分靶蛋白之间的关系^[13]。从蛋白数据库-PDB数据库(<http://www.RCSB.org/>)获取靶点PPARG(PDB ID: 6k0t)、ACHE(PDB ID: 1DX4)、SLC6A4(PDB ID: 5i6x)、DRD2(PDB ID: 3PBL)的3D结构,经过对靶点原始结构的预处理,最后保留靶点的活性区域。用MOE软件中MOE-Dock模块,将配体(化合物)与受体(靶点)进行半柔性对接,通过得分值的高低和与氨基酸残基结合的数目评价化合物与靶点的结合活性。

2 结果

2.1 开心散成分分析

根据 $OB \geq 30\%$ 、 $BBB \geq -0.3$ 、 $DL \geq 0.18$,我们共获得开心散化合物31种,去除没有靶点的成分后,得到25种活性成分(表1),其中2种源于石菖蒲,4种源于茯苓,17种源于人参,2种源于远志,并且基于TCMSP,得到53个开心散预测的靶点。

2.2 开心散治疗抑郁症靶点的预测和PPI网络的构建

对OMIM和GeneCard收集的抑郁症相关靶点去重,获得9274个相关的靶点。通过与开心散预测的靶点匹配,获得51个潜在治疗抑郁症靶点。将51个潜在治疗靶点输入STRING,得到由49个节点和228条边构成的PPI网络图(图1)。根据介度中心性(BC)确定关键分子,其中ACHE(BC=0.160)、PTGS2(BC=0.144)、HTR3A(BC=0.141)、NR3C1(BC=0.124)、DRD2(BC=0.099)排名靠前。

表 1 开心散的潜在活性成分及其基本信息

Pubchem Cid/ChemSpider ID	化合物名称	OB/%	BBB	DL
P325601	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan	52.35	0.05	0.62
C83157	cycloartenol	38.69	1.33	0.78
C10193870	trametenolic acid	38.71	0.14	0.80
P5283628	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.91	0.72
C4508532	ergosterol peroxide	40.36	0.34	0.81
C66038	hederagenin	36.91	0.96	0.75
P33934	diop	43.59	0.26	0.39
P5280794	stigmasterol	43.83	1.00	0.76
P12303645	beta-sitosterol	36.91	0.99	0.75
C82631	inermin	65.83	0.36	0.54
C4477852	aposiopolamine	66.65	0.40	0.22
C251502	deoxyharringtonine	39.27	-0.25	0.81
P5312542	arachidonate	45.57	0.58	0.20
P441965	frutinone A	65.90	0.46	0.34
C8358443	ginsenoside-Rh ₄ -qt	31.11	-0.18	0.78
P96943	girinimbin	61.22	1.22	0.31
C66186	panaxadiol	33.09	0.23	0.79
C4479250	suchilactone	57.52	0.28	0.56
C192962	alexandrin_qt	36.91	0.88	0.75
C4799	fumarine	59.26	-0.13	0.83
C151215	campesterol	37.58	0.98	0.71
C10393207	aposcopamine	59.68	0.68	0.25
C2272987	gomisin A	30.69	-0.02	0.78
P160179	perlolyrine	65.95	0.15	0.27
P5320290	onjixanthone I	79.16	0.04	0.30

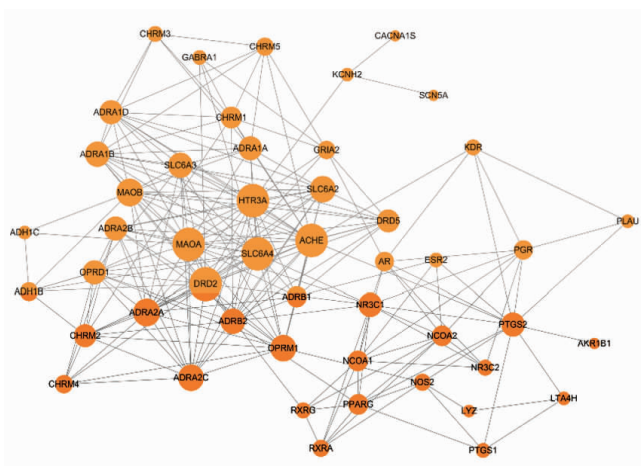


图 1 开心散治疗抑郁症的 PPI 网络

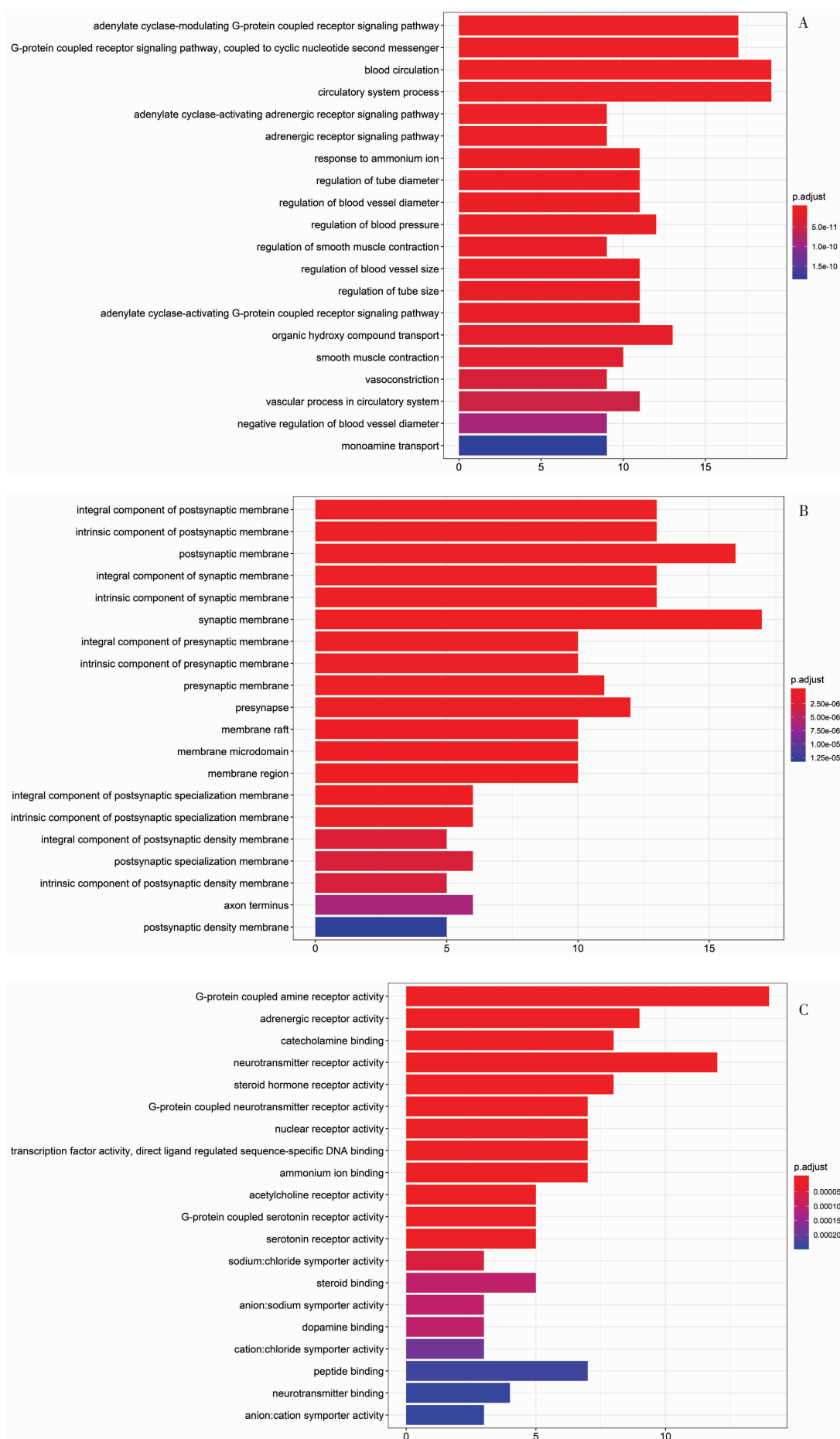
2.3 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析中,生物过程(BP)得到 405 个条目,细胞组成(CC)得到 56 个条目,分子功能(MF)有 88 个条目,分别取前 20 个绘制柱状图(图 2)。在生物过程分析中,排名前五的是腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路(GO:0007188),G 蛋白偶联

受体信号途径与环核苷酸第二信使偶联(GO:0007187),腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路(GO:0071880),血液循环(GO:0008015),循环过程(GO:0003013);在细胞组成分析中,主要涉及突触后膜、突触前膜、突触等;在分子功能中,主要有 G-蛋白偶联胺受体、肾上腺素受体、儿茶酚胺、神经递质受体、类固醇激素受体等参与。KEGG 通路富集分析显示共 24 条通路,取前 20 条通路绘制 KEGG 气泡图(图 3)。从图中可看出治疗抑郁症的常见的通路:神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、5-羟色胺能神经突触、钙信号通路和胆碱能突触、多巴胺能突触等。

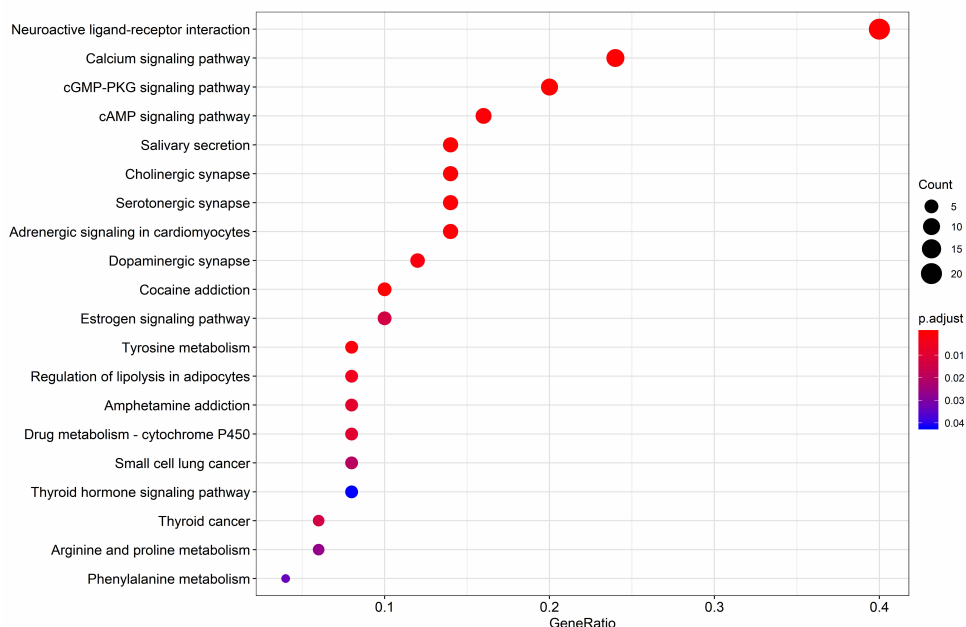
2.4 网络分析

开心散治疗抑郁症的“成分-靶点-通路”相互作用网络如图 4 所示。该网络有 102 个节点,374 条边,密集的连线显示开心散的多个成分通过多个目标与治疗抑郁症途径相关联,揭示开心散多成分、多靶点、多途径的治疗作用。



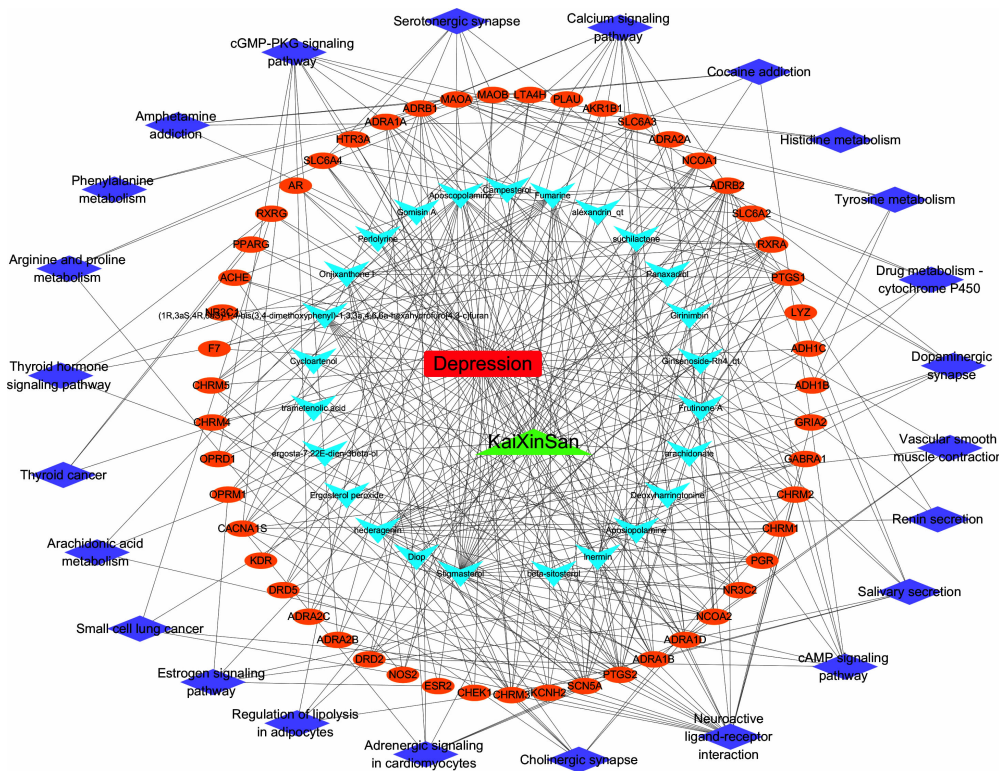
注:纵轴表示路径和横坐标表示基因的途径中的比例,和的颜色代表校正后的p值。A.代表生物过程,B.代表细胞组分,C.代表分子功能

图2 开心散治疗抑郁症靶标的GO富集分析



注:纵轴表示各条目,横坐标代表基因在该条目中的比例,而点的大小表示在该条目注释的基因的数目,和所述点的颜色代表校正后的 p 值

图 3 开心散治疗抑郁症靶标的 KEGG 富集分析



注:绿色三角形、红色矩形、蓝色箭头、黄色圆圈和紫色钻石分别代表开心散、抑郁症、开心散成分、靶点和途径

图 4 开心散治疗抑郁症的成分-靶点-通路图

2.5 分子对接

如图 5 所示,开心散 3 种潜在活性化合物(apocopolamine,perlolyrine,hederagenin)与靶点PPARG、ACHE、SLC6A4、DRD2 中的氨基酸残基结合主要以分子间的氢键为主,分子间的氢键是较为重要的稳定作用力,可使得配体与受体之间结合更加稳定,进

而发挥调控蛋白的作用^[4]。由此说明,开心散的主要特征性化学成分与 PPARG、ACHE、SLC6A4、DRD2 靶点均具有较好的结合能力。

3 讨论

开心散中人参补益元气,是为君药;臣药茯苓养

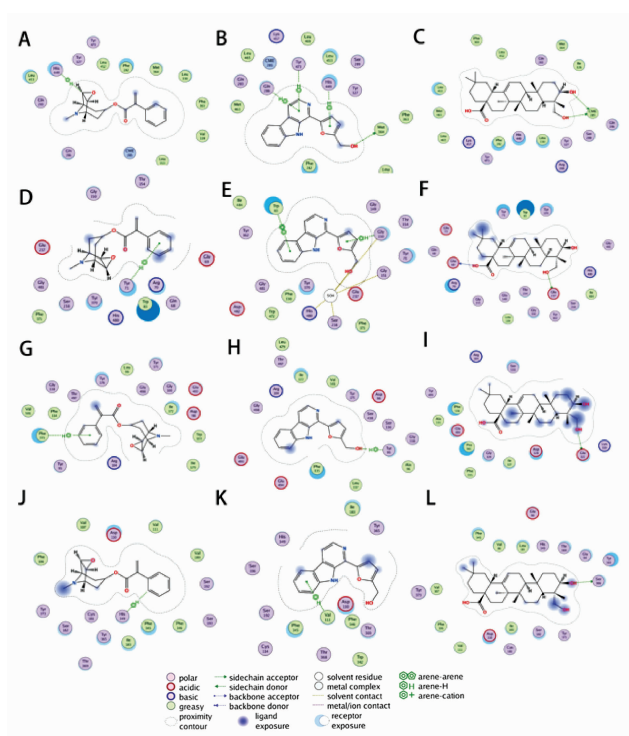


图5 开心散体外特征性化学成分与 PPAR γ (A、B、C), ACHE (E、F、G), SLC6A4 (E、F、G), DRD5 (J、K、L) 靶点氨基酸残基对接情况

心安神;佐药远志,宁心化痰;使药石菖蒲,具有益智醒神和引药入经功效^[8]。刘丽琴等^[15]发现人参中的主要成分人参皂苷能改善慢性应激所致的大鼠抑郁行为;此外,人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re、Rg₃ 等都具有一定的抗抑郁作用^[16]。远志中的皂苷类、寡糖酯类化合物具有抗氧化、抗抑郁作用^[17]。胡霜等^[18]通过悬尾实验和强迫游泳实验发现石菖蒲具有一定的抗抑郁作用;茯苓具有镇静、抗氧化、调节免疫等作用^[19]。这些研究表明,开心散活性成分具有抗抑郁、抗氧化、保护神经等作用,而且该方可能主要通过人参中而且该方的人参皂苷可能是主要发挥疗效的成分。发挥其抗抑郁疗效。

预测结果显示 ACHE、HTR3A、DRD2 可能是潜在的核心靶点。分子对接结果亦证实,开心散可能作用于 ACHE、DRD2 靶点。乙酰胆碱酯酶(AChE)在神经元发育和神经再生起到重要作用。张晓杰等^[20]发现抑郁症模型中 AChE 活性升高,并且随着年龄的增长而升高。在一项前瞻性纵向研究中,色胺(5-HT)转运蛋白基因可以缓解应激性生活事件对抑郁的影响^[21]。多巴胺(DA)参与神经内分泌系统功能的调节,研究发现,抑郁动物体内多巴胺能神经元的放电频率明显增加^[22]。综合分析表明,开心散可能通过

调节这些靶点发挥神经保护作用。

KEGG 分析发现,羟色胺突触有 7 个靶点,分别是 PTGS2、PTGS1、MAOB、MAOA、HTR3A、SLC6A4、CACNA1S,其中 SLC6A4 靶基因经分子对接证实与开心散有靶向关系。Dong 等^[23]发现,开心散可以通过增加关键酶 TPH 的蛋白质 mRNA 的表达,从而使 5-HT 在大脑和突触间隙的含量升高,发挥抗抑郁作用。王石等^[24]发现开心散对体外 MAOA 和 MAOB 的活性均有一定的抑制作用。PTGS2、PTGS1 调节抑郁症中的炎症介质,而 cAMP 通路可以促进 NGF 与 BDNF 表达。临床研究表明,抑郁症患者血清中神经生长因子 NGF 与 BDNF 均有显著下降^[25]。此外,神经活性受体-配体相互作用通路、钙信号通路、胆碱能突出通路等通过调节多巴胺受体、 γ -氨基丁酸受体、谷氨酸受体、乙酰胆碱受体、5-HT 受体、糖皮质激素受体等靶点发挥抗抑郁的功效。

综上所述,本文通过构建“活性成分-靶标-通路”的网络药理研究模式进行开心散抗抑郁的研究。分析发现,开心散中有潜在 25 个药物活性成分共涉及 51 个靶标,24 条通路,预测结果表明开心散可能通过作用于羟色胺突触、cAMP 通路、神经活性受体配体相互作用等通路发挥抗抑郁作用。本研究虽然采用网络药理学及分子对接方法对开心散抗抑郁的活性成分、关键靶点、作用机制做了预测分析,但是其进一步的机制研究还需要通过实验技术来进行验证。

参考文献

- [1] 周芯蕾, 闫芳. 1999-2017 年抑郁症领域科技成果项目分析[J]. 预防医学情报杂志, 2019, 35(7): 777-782.
- [2] 姚媛, 周艺, 周婷婷. 抑郁症致病机制及中药治疗抑郁症的机制研究[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(3): 193-197.
- [3] ZHU Y, DUAN X, CHENG X, et al. Kai-Xin-San, a standardized traditional Chinese medicine formula, up-regulates the expressions of synaptic proteins on hippocampus of chronic mild stress induced depressive rats and primary cultured rat hippocampal neuron [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 193: 423-432.
- [4] 曹程, 肖钧元, 刘梦秋, 等. 中药复方开心散调控神经生长因子抗抑郁物质基础与作用机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(6): 847-855.
- [5] 高耀, 吴丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3483-3492.

- [6] LI X J, ZHANG H Y. Synergy in natural medicines: implications for drug discovery[J]. Trends in Pharmacol Sciences, 2008,29(7):331-332.
- [7] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014,6:13.
- [8] 时悦,姚瓊珈,蔺莹,等.基于网络药理学的开心散治疗阿尔茨海默病的作用机制分析[J].药学报,2018,53(9):1458-1466.
- [9] AMBERGER J S, HAMOSH A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2017,58:1-2.
- [10] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2016,54:1-30.
- [11] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Research, 43(D1):D447-D452.
- [12] 周鹏,杨建澳,许继公,等.基于分子对接技术预测苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的作用机制[J].云南中医学院学报,2018,41(4):82-87.
- [13] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003,13(11):2498-2504.
- [14] HE D, HUANG J H, ZHANG Z Y, et al. A Network Pharmacology-Based Strategy For Predicting Active Ingredients And Potential Targets Of LiuWei DiHuang Pill In Treating Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Drug Design Development and Therapy, 2019,13:3989-4005.
- [15] 刘丽琴,罗艳,张瑞睿,等.人参皂苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及HPA轴、BDNF的影响[J].中国中药杂志,2011,36(10):1342-1347.
- [16] 任思宇,王真真,陈乃宏.人参皂苷抗抑郁作用研究进展[J].药学报,2019,54(12):2204-2208.
- [17] 章主恒,王静,付宇,等.中药远志抗抑郁有效成分及其作用机制研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(12):1797-1801.
- [18] 胡霜,马义泽,石菖蒲等五味中药抗抑郁作用的实验研究[J].山东中医杂志,2009,28(11):799-800.
- [19] 温智林,王真真,贺文彬,等.开心散及其有效成分抗抑郁作用的研究进展[J].中药新药与临床药理,2015,26(3):420-423.
- [20] 张晓杰,兴桂华,董海影,等.不同年龄组抑郁症模型大鼠脑乙酰胆碱酯酶及乙酰胆碱转移酶活性的变化[J].中国老年学杂志,2012,32(6):1191-1193.
- [21] CASPI A, SUGDEN K, MOFFITT T E, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene[J]. Science, 2003,301(5631):386-389.
- [22] LI Z, HE Y, TANG J, et al. Molecular imaging of striatal dopamine transporters in major depression—a meta-analysis[J]. Journal of Affective Disorders, 2015,174:137-143.
- [23] DONG X Z, LI Z L, ZHENG X L, et al. A representative prescription for emotional disease, Ding-Zhi-Xiao-Wan restores 5-HT system deficit through interfering the synthesis and transshipment in chronic mild stress-induced depressive rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013,150(3):1053-1061.
- [24] 王石,董宪喆,谭潇,等.开心散对单胺氧化酶活性的影响[J].中国中药杂志,2016,41(10):1898-1902.
- [25] ALFONSO J, FRICK L R, SILBERMAN D M, et al. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments[J]. Biological Psychiatry, 2006,59(3):244-251.

(本文编辑 苏维)