

基于网络药理学和实验验证探讨双夏汤对抑郁症的改善作用及分子机制

陈聪^{1,2}, 母伟林³, 邵欣欣⁴, 张艳新^{1,2}, 王振国^{1,2*}

1. 山东中医药大学 中医文献与文化研究院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250355

3. 山东中医药大学 中医学院, 山东 济南 250355

4. 山东中医药大学 第一临床医学院, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 基于网络药理学及动物实验, 探讨双夏汤对于慢性不可预知温和应激刺激 (CUMS) 抑郁样大鼠行为的改善作用及分子机制。 **方法** 采用网络药理学方法收集双夏汤的活性成分和治疗抑郁症的潜在靶点, 筛选核心网络靶点。通过动物实验对网络药理学结果进行实验验证, 具体方法为连续 3 周通过 CUMS 建立大鼠抑郁样模型, 给予双夏汤干预 2 周, 给药结束后进行行为学测试, 通过旷场实验、强迫游泳实验评估抑郁行为, ELISA 法检测大鼠血清白细胞介素 (IL)-6 水平, 蛋白免疫印迹法检测各组大鼠海马组织中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 表达水平, 及其 p-蛋白激酶 B1 (Akt)、p-糖原合成酶激酶 3 β (GSK3B) 蛋白表达水平。 **结果** 网络药理学分析获得 245 个双夏汤抗抑郁症的潜在靶点, 蛋白相互作用 (PPI) 网络分析发现双夏汤可能通过调控 GSK3B、Akt1、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸肌醇-3-激酶 (PIK3CA) 等靶蛋白发挥抗抑郁作用, 涉及神经活性配体与受体的相互作用、HIF-1 等信号通路。与模型组比较, 双夏汤组大鼠体质量明显上升, 强迫游泳测试及旷场测试中大鼠不动时间明显缩短 ($P < 0.05$ 、 0.001), 血清 IL-6 水平明显下降 ($P < 0.01$), HIF-1 α 、CREB、p-Akt、p-GSK3B 蛋白表达明显降低, GSK3B 蛋白表达明显升高。 **结论** 双夏汤对于 CUMS 大鼠的抑郁样行为具有改善作用, 其机制可能是通过 Akt/GSK3B 和 HIF-1 α /CREB 信号通路调节机体昼夜节律及海马组织中葡萄糖稳态而改善海马神经元可塑性。

关键词: 双夏汤; 抑郁症; 网络药理学; 低氧诱导因子-1 α ; cAMP 反应元件结合蛋白; 蛋白激酶 B1; 糖原合成酶激酶 3 β

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)12-3029-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.12.005

Ameliorative effects and molecular mechanisms of Shuangxia Decoction on depression based on network pharmacology and experimental validation

CHEN Cong^{1,2}, MU Weilin³, SHAO Xinxin⁴, ZHANG Yanxin^{1,2}, WANG Zhenguo^{1,2}

1. Academy of Chinese Medicine Literature and Culture, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Key Laboratory of Classical Theory of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. College of traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

4. First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To investigate the ameliorative effect and molecular mechanism of Shuangxia Decoction on the behaviour of chronic unpredictable mild stress stimulation (CUMS)-like depressed rats based on network pharmacology and animal experiments.

Methods A network pharmacology approach was used to collect the active ingredients and potential targets of Shuangxia Decoction for the treatment of depression and to screen the core network targets. The network pharmacology results were experimentally verified through animal experiments, as follows: depression-like modeling in rats by CUMS for 3 consecutive weeks, Shuangxia Decoction

收稿日期: 2024-09-14

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702700); 山东省中医药科技项目 (2021Q077); 山东省高等学校青创科技支持计划 (2023RW093)

作者简介: 陈聪, 女, 副教授, 博士, 研究方向为中医药文献数据挖掘与利用研究。E-mail: keaidedacong@163.com

*通信作者: 王振国, 男, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中医古籍整理与经典理论诠释、中药药性理论、中医药现代化研究。

E-mail: zhenguow@vip.126.com

and fluoxetine were given to intervene for 2 weeks, and behavioral tests were conducted at the end of drug administration to assess the depressive behaviors through the absent-field experiment and forced-swimming experiment, the serum IL-6 level of the rats was detected by the ELISA method, and the Western blotting was used to detect the protein expression levels of HIF-1 α and CREB, as well as the expression levels of p-Akt and p-GSK3B proteins in the hippocampal tissues of rats in each group. **Results** Network pharmacological analysis obtained 245 potential targets of Shuangxia Decoction for antidepressant. PPI network analysis revealed that Shuangxia Decoction might exert antidepressant effects by regulating target proteins such as GSK3B, Akt1 and PIK3CA. It involves neuroactive ligand-receptor interaction, HIF-1 and other signaling pathways. The experimental results showed that compared with the model group, the body mass of rats in the Shuangxia Decoction group were increased significantly, and immobility time of rats in the forced swimming test and open field test was shortened significantly ($P < 0.05$, 0.001), serum IL-6 was significantly decreased ($P < 0.01$). And the protein expression of HIF-1 α , CREB, p-Akt, and p-GSK3B was significantly reduced, and that of GSK3B was significantly elevated. **Conclusion** Shuangxia Decoction can improve the depression-like behavior of CUMS rats, and its mechanism may be to improve the plasticity of hippocampal neurons through the regulation of circadian rhythm and glucose homeostasis in hippocampal tissues through AKT/GSK3B and HIF-1 α /CREB signaling pathways.

Key words: Shuangxia Decoction; depression; network pharmacology; HIF-1 α ; CREB; Akt; GSK3B

抑郁症为一种常见的精神障碍类疾病,临床以情绪低落、兴趣缺乏、乐趣丧失 3 个情绪症状为主要表现,同时常伴有失眠等睡眠障碍,已成为世界上导致非致命性健康损失的最主要原因^[1]。抑郁症发病机制复杂,涉及神经递质水平异常、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能异常、炎症、氧化应激、神经元死亡和突触可塑性紊乱等多种学说^[2]。目前临床抗抑郁药物多从调节神经递质水平入手^[3],虽有一定疗效,但存在复发率高、不良反应大、患者依从性差等问题^[4]。抑郁症根据患者临床表现可归属于中医古籍中“情志病”“郁证”等疾病范畴,早在《黄帝内经》中就已有关于情志致病、五气之郁较系统的论述,中医药治疗抑郁症药效缓和、不良反应小,临床效果显著^[5-7]。昼夜节律紊乱对于抑郁障碍发作具有特征性意义^[8],抑郁症患者常有“昼不精,夜不瞑”的症状,是营卫气昼夜运行失序、阴阳神机不和的表现^[9]。双夏汤由半夏、夏枯草配伍而成,首载于《重订灵兰要览》。《医学秘旨》曰:“盖半夏得阴而生,夏枯草得阳而长,是阴阳配合之妙也”。二者配伍具有通利枢机、引阳入阴的独特功效,与天地间阴阳盛衰的自然规律相顺应,且暗合人体营卫循行节律,为镇静安神的良方之一^[10]。

作为中医的经典方剂,目前已有以 5-HT_{1A} 受体为靶标来筛选双夏汤治疗失眠的作用物质基础的相关研究,结果表明双夏汤中总黄酮可能是其治疗失眠的组分之一,并通过响应面法优化了提取总黄酮的工艺^[11],当半夏、夏枯草以 1:1 配伍时,果蝇飞行时间较对照组显著减少,提示半夏、夏枯草以 1:1 配伍治疗失眠效果最佳^[12]。除此以外,已证实双夏汤能明显缩短抑郁模型小鼠的悬尾实验

和强迫游泳实验不动时间,具有抗抑郁作用^[13],能对抗应激所导致的慢性不可预知应激模型大鼠血清皮质醇(CORT)升高^[14]。然而由于双夏汤多种成分作用于不同生化途径的复杂性,其抗抑郁的作用物质基础和具体作用机制尚不清楚。因此本研究基于网络药理学筛选双夏汤的活性化合物及其作用靶点,并进一步通过双夏汤对慢性不可预知应激模型的验证,以明确其作用及潜在机制,以期为临床运用双夏汤治疗抑郁症提供科学依据。

1 网络药理学分析

1.1 双夏汤活性成分及靶点筛选

通过 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索“半夏”“夏枯草”成分,结合文献给予补充。借助 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取双夏汤成分的 SMILES 号或 2D 结构 SDF 文件,将其导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行靶点预测,通过 Cytoscape 3.10.0 双夏汤“成分-靶点”网络图。

1.2 双夏汤治疗抑郁症潜在靶点获取

通过 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)、TTD(<https://db.idrblab.net/web/>)数据库,以“depression”“major depression in order”为关键词进行抑郁症相关基因查找,将各数据库靶点进行合并且删除重复项,使用 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>)将抑郁症靶点和双夏汤靶点取交集即获得双夏汤治疗抑郁症的潜在靶点。

1.3 蛋白质相互作用(PPI)网络构建

将交集靶点输入到 STRING 11.5 数据库

(<https://version-11-5.string-db.org/>), 限定研究物种来源于人种 (*homo sapiens*), 形成 PPI 网络, 通过 Cytoscape 3.10.0 将 PPI 网络做可视化处理, 使用 CytoNCA 插件对网络进行分析, 以大于 degree 值、中介中心性、接近中心性的中位数作为截点, 依次筛选出核心靶点进行后续研究。

1.4 双夏汤治疗抑郁症核心靶点的富集分析

借助 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 对潜在靶点进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 通过微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将 GO 和 KEGG 分析结果绘制成图。

2 动物实验验证

2.1 动物、药物及试剂、仪器

2.1.1 动物 6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司 (合格证号 110011211102183957), 于山东中医药大学实验动物中心进行饲养, 温度控制 (22 ± 1) °C, 相对湿度 (60 ± 10) %, 光照条件 12 h/12 h 明暗交替, 动物自由采食饮水, 适应性饲养 1 周。本实验经山东中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理批号: SDUTCM20210309002)。

2.1.2 药物及试剂 清半夏 (郑州瑞龙制药股份有限公司, 批号 19100201), 夏枯草 (河北汉草堂药业有限公司, 批号 190902CP257) 药材经山东中医药大学赵东升教授鉴定, 清半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的炮制加工品, 夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗; 盐酸氟西汀胶囊 (法国礼来有限公司, 批号 9891AD)。SDS-PAGE 上样缓冲液 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 01411/20413), 超敏 ECL 化学发光检测试剂盒 (美国 Millipore 公司, 批号 2106001), 三色预染蛋白 Marker (上海雅酶生物科技有限公司, 批号 025C4860), RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0013B), 一抗低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB)、p-蛋白激酶 B (Akt)、Akt (英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR3368586-5、GR3231215-9、GR3309848-6、GR242901-37), β 微管蛋白 (β -tubulin)、p-糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)、GSK3 β (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号分别为 3507438005、5500008253、3560350002); 三磷酸甘

油醛脱氢酶 (GAPDH, 美国 Proteintech 公司, 批号 00075847), 凝胶快速制备试剂盒 (上海雅酶生物科技有限公司, 批号 02571100)。

2.1.3 仪器 SuperFst 动物行为分析系统、强迫游泳实验系统、Super Maze 动物行为分析系统、旷场实验系统 (上海欣软信息科技有限公司), 旋转蒸发仪 (BUCHI, Labortechnik AG), 冷冻干燥机 (上海利闻科学仪器有限公司), 高通量组织细胞破碎仪 (美国 Next Advance, Bullet Blender GOLD), 显影仪 (上海天能科技有限公司, Tanon5200), 酶标仪 (赛默飞, MultiskanSky)。

2.2 动物分组及造模

适应性喂养 1 周后剔除体质量相对偏轻或偏重和强迫游泳时间偏长的 10 只大鼠。将剩余 40 只大鼠按体质量均衡和随机数字表法^[15]分为对照组、模型组、氟西汀组、双夏汤组, 每组 10 只, 除对照组外每只大鼠单笼饲养。

慢性不可预知温和应激刺激 (CUMS) 大鼠模型造模方法在 Willner 方法的基础上加以修改^[16], 除对照组大鼠外, 连续刺激 3 周。刺激方式有: (1) 冷刺激 10 min, 在大鼠笼内填满冰袋; (2) 夹尾 2 min, 长尾夹夹住大鼠尾根部 1 cm 的位置; (3) 打湿垫料 24 h; (4) 摇晃 15 min (将大鼠固定在摇床上 160 Hz 匀速摇晃); (5) 禁食 24 h; (6) 禁水 24 h; (7) 热刺激 5 min (大鼠放置于 45 °C 水浴锅的空瓶内); (8) 异味 6 h (每笼放置 2 粒樟脑); (9) 异物 3 h (鼠笼内放同规格钢制品); (10) 昼夜颠倒 24 h; (11) 45°倾斜 12 h; (12) 束缚 3 h (将大鼠放入束缚桶内)。以上 12 种刺激因子不连续出现且随机排列, 出现次数 ≤ 4 次, 使其形成温和的不可预知的刺激, 以避免动物对同种刺激产生耐受性。3 周后采用行为学 (旷场实验、强迫游泳实验) 进行抑郁模型评价, 确认造模成功后开始给药干预。

2.3 药物制备及给药

清半夏、夏枯草以 1:1 比例制备合剂^[17]。将清半夏、夏枯草各 300 g 加入圆底烧瓶中, 10 倍量水浸泡 30 min, 加水回流提取 2 h, 8 倍量水重复回流 2 h, 合并 2 次药液。静置至室温后进行抽滤、蒸发浓缩。浓缩液放入真空冷冻干燥机中, 连续干燥 120 h, 得到冻干粉 64.62 g, 将冻干粉分装备用。

造模成功后, 连续 2 周每日 7:00 时 ig 给药, 每周根据体质量调整药量。双夏汤成人用量 20 g/d, 按照等效剂量系数折算法换算, 双夏汤组大鼠每日

给药量为 226.17 mg/kg, 氟西汀组给予盐酸氟西汀 2.1 mg/kg, 均用生理盐水配制给药, 给药体积为 1 mL/100 g。对照组及模型组 ig 等体积生理盐水。

2.4 观测指标

2.4.1 体质量测定 每周称取各组大鼠体质量, 并记录。

2.4.2 旷场实验 借助旷场测试系统对所有大鼠进行旷场实验测试, 评估大鼠的自主活动能力。实验时, 将每只大鼠平托置于大鼠旷场试验箱的中央格, 计时 5 min 内大鼠穿越的格子数量(水平活动)、直立次数(垂直活动)和离开中央格时间。在观察下一只大鼠之前, 单次实验结束后用 75%乙醇彻底清洁敞箱, 待气味散尽后进行下一次实验。本实验分别于造模前、造模后、末次给药后进行。

2.4.3 强迫游泳实验 将大鼠放入直径 20 cm、高 50 cm, 水深约 30 cm, 水温(24±1)℃的透明玻璃圆桶。正式实验前 24 h 进行预游泳, 15 min 后将大鼠取出擦干后放回笼中。实验时, 同等条件下进行强迫游泳 5 min, 记录 5 min 内静止不动时间(大鼠在水中停止挣扎或呈漂浮状态, 仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面), 测试过程采用摄影机记录。

2.4.4 ELISA 法检测血清白细胞介素(IL)-6 水平 行为学检测结束后麻醉处死大鼠, 行腹主动脉取血, 血液于 4℃、3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液于-80℃保存, 根据试剂盒说明书检测大鼠血清 IL-6 水平。

2.4.5 检测海马组织 HIF-1 α 、CREB、p-Akt、Akt、p-GSK3B、GSK3B 蛋白表达 取 20 mg 海马组织于 1.5 mL 离心管中, 加入组织裂解液 200 μ L, 研磨机中研磨, 冰上静置 30 min 后以 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 说明书进行电泳, 转至 PVDF 膜, 室温经 5%脱脂牛奶封闭 2 h 后加入稀释后的一抗 HIF-1 α 、CREB、p-Akt、Akt、GSK3B、P-GSK3B, 4℃孵育过夜。次日取出 PVDF 膜, 加入二抗室温孵育 1 h, ECL 显色, 化学发光成像显影仪中拍摄图像。目的蛋白 HIF-1 α 、CREB 表达水平以 β -tubulin 灰度为参照; p-Akt、Akt、p-GSK3B、GSK3B 表达水平以 GAPDH 灰度为参照。

2.5 统计学分析

采用 OriginPro 2018 统计软件进行数据分析, 两组计量资料如符合正态分布, 方差齐则采用 t 检

验, 方差不齐用 t' 检验, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 非正态分布时采用秩和检验。

3 网络药理学研究结果

3.1 双夏汤活性成分收集及构建双夏汤“成分-靶点”网络图

共获得双夏汤成分 323 个, 对应靶点 1 114 个。将收集到双夏汤的活性成分和靶点在 Excel 构建关联表格, 导入 Cytoscape 3.9.1 制作双夏汤“成分-靶点”网络图, 见图 1。图中共有 1 438 个节点, 16 549 条边。

3.2 抑郁症相关基因查找及药物疾病交集靶点的获取

各数据库检索的抑郁症相关靶点结果合并, GeneCards 筛选条件为大于相关性中位数 3.117 967, 去除重复靶点, 最终得到抑郁症相关靶点 1 015 个, 将双夏汤的潜在靶点与抑郁症相关靶点取交集, 共得 245 个交集靶点, 见图 2, 此 245 个交集靶点即为双夏汤治疗抑郁症的潜在靶点。

3.3 PPI 网络分析

将 String 数据库的 TSV 文件导入 Cytoscape 3.10.0 构建 PPI 网络关系图, 删除游离节点后有 170 个节点, 453 条边, 见图 3。使用 CytoNCA 插件分析 degree 值、中介中心性、接近中心性, 依次以此 3 值中位数为阈值筛选, 得到 PPI 子网络, 该图中有 52 个节点, 178 条边。进一步取 degree 值前 10 位得到核心 PPI 网络, 该图中有 10 个节点, 27 条边, 包括糖原合酶激酶-3B(GSK3B)、蛋白激酶 B1(Akt1)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸肌醇-3-激酶(PIK3CA)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)等。

3.4 GO、KEGG 富集分析

富集分析获得 935 条生物过程(BP), 115 条细胞成分(CC), 223 条分子功能(MF), 根据 P 值由小到大各选择前 10 条进行可视化展示, 主要涉及化学突触传输、对外源性刺激的反应等 BP, 树突、溶质等 CC, 相同蛋白质结合、G 蛋白偶联血清素受体活性等 MF; 获得 166 条 KEGG 信号通路, 根据 P 值由小到大选择前 20 条进行可视化展示, 主要涉及神经活性配体与受体的相互作用、HIF-1 信号通路等通路, 见图 4、5。

4 动物实验结果

4.1 对 CUMS 大鼠抑郁行为表型的影响

为保证实验结果有效性, 造模前称取实验所用

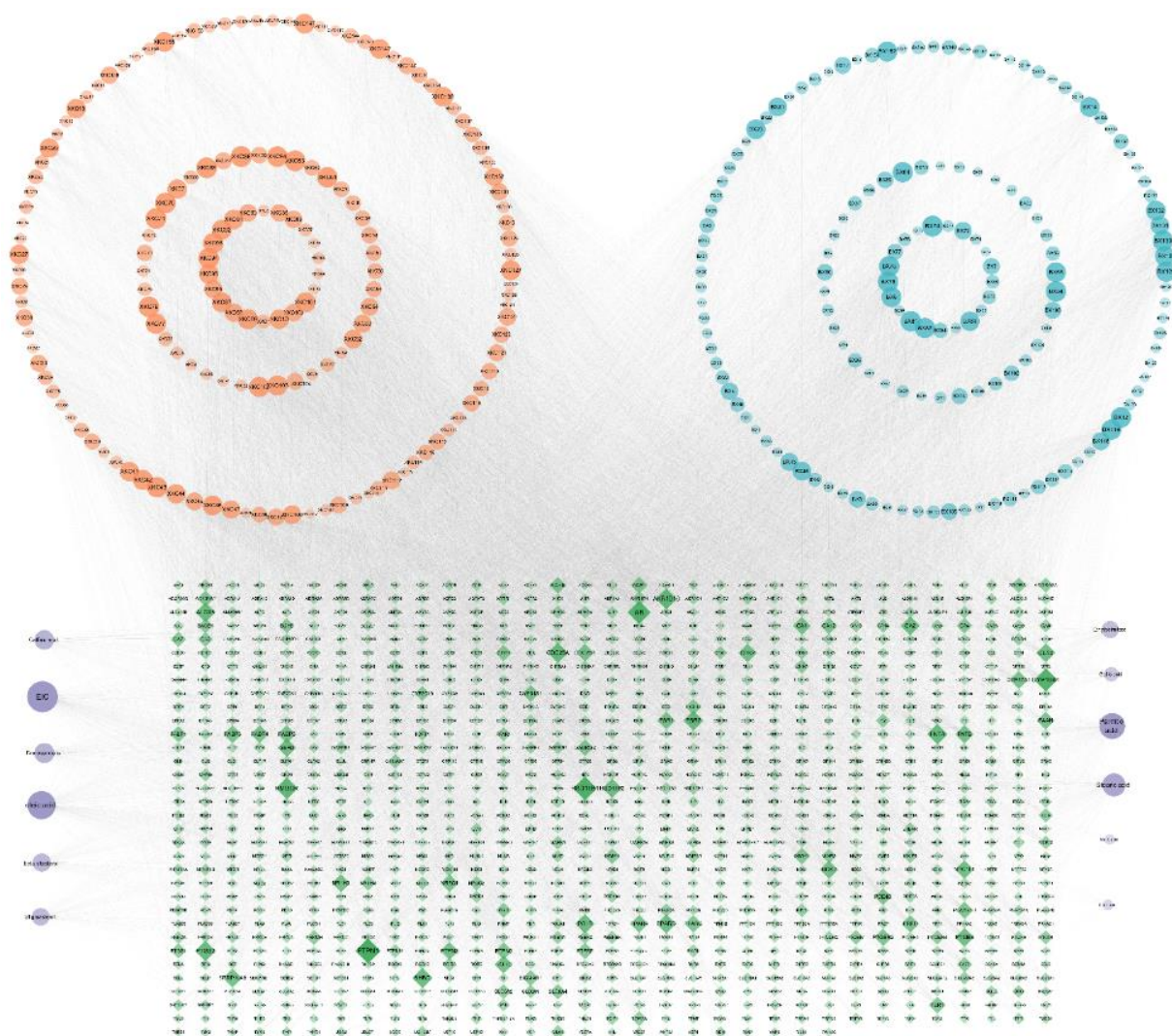


图 1 双夏汤成分-靶点网络图

Fig. 1 Diagram of Shuangxia Decoction ingredient-target interaction network

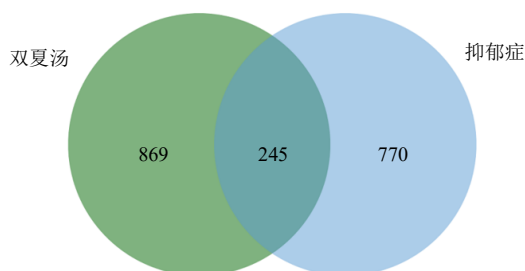


图 2 双夏汤与抑郁症靶点交集图

Fig. 2 Intersection map of Shuangxia Decoction and depression related targets

40 只大鼠体质量, 并进行旷场实验、强迫游泳测试, 结果显示各项数据均符合正态分布, 见图 6。

强迫游泳实验结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠不动时间显著增加 ($P < 0.01$), 与模型组相

比, 双夏汤组大鼠不动时间显著缩短 ($P < 0.05$)。旷场实验结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠不动时间显著增加 ($P < 0.001$), 与模型组相比, 双夏汤组不动时间显著缩短 ($P < 0.001$)。体质量结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠体质量均明显减轻 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 双夏汤组大鼠体质量明显增加 ($P < 0.05$), 见图 7。

4.2 各组大鼠 IL-6 水平

与对照组相比, 模型组大鼠血清 IL-6 水平显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 双夏汤组大鼠血清 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 8。

4.3 双夏汤对抑郁大鼠海马组织 HIF-1 α 、CREB、Akt、p-Akt、GSK3B、p-GSK3B 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠海马组织 HIF-1 α 、

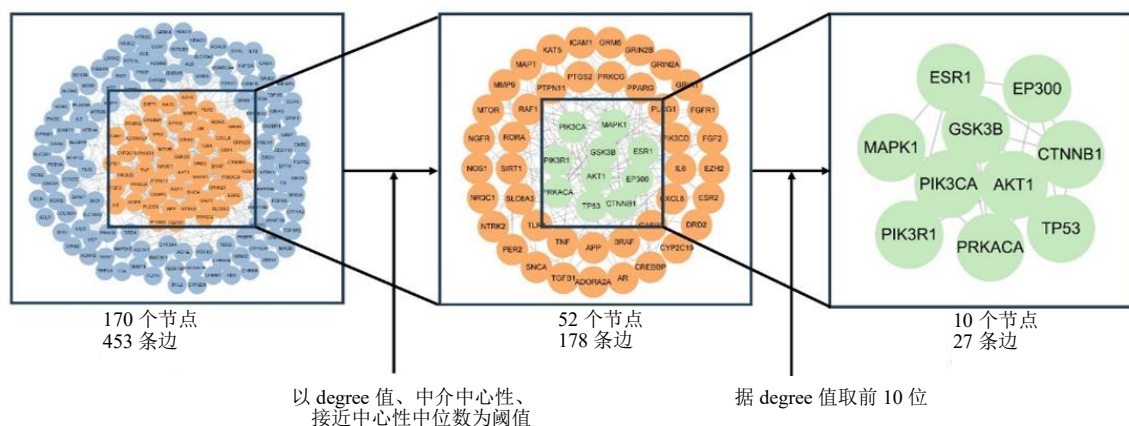


图 3 PPI 可视化网络

Fig. 3 PPI visualization network

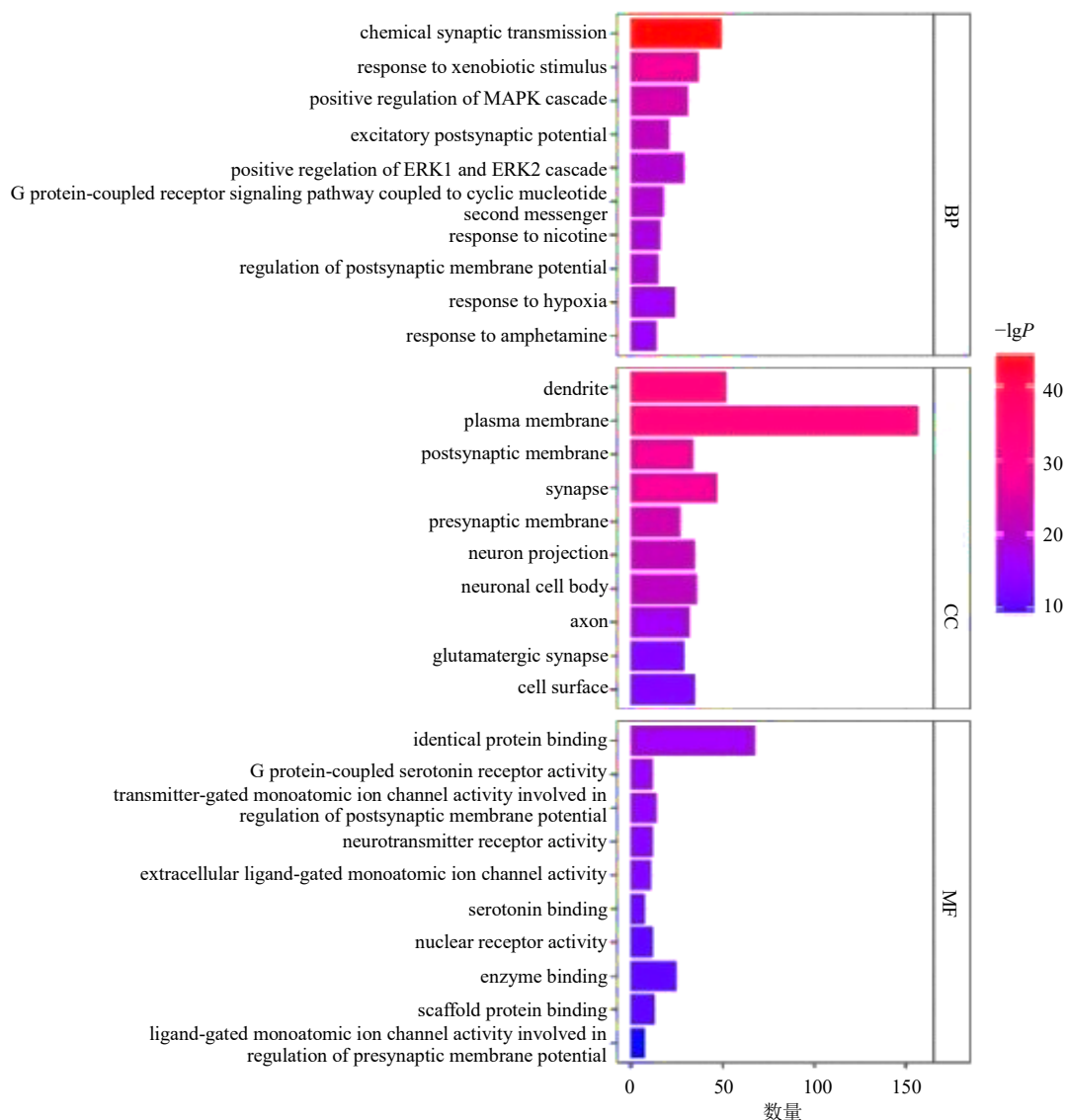


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis

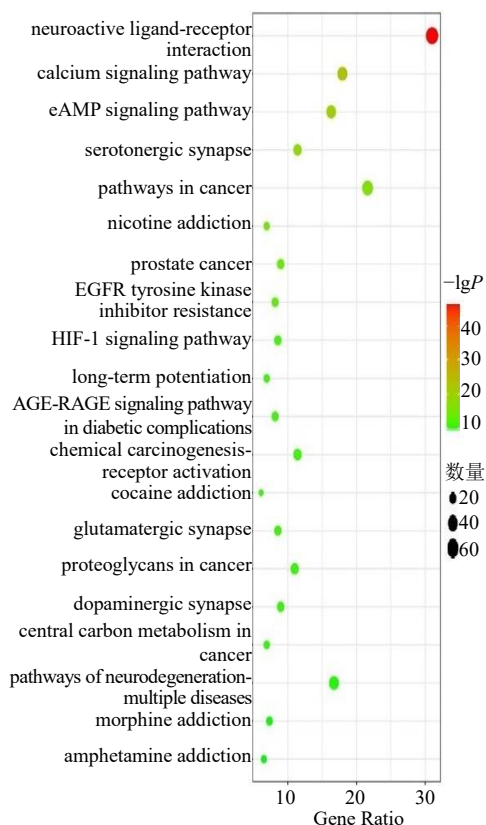


图 5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathways analysis

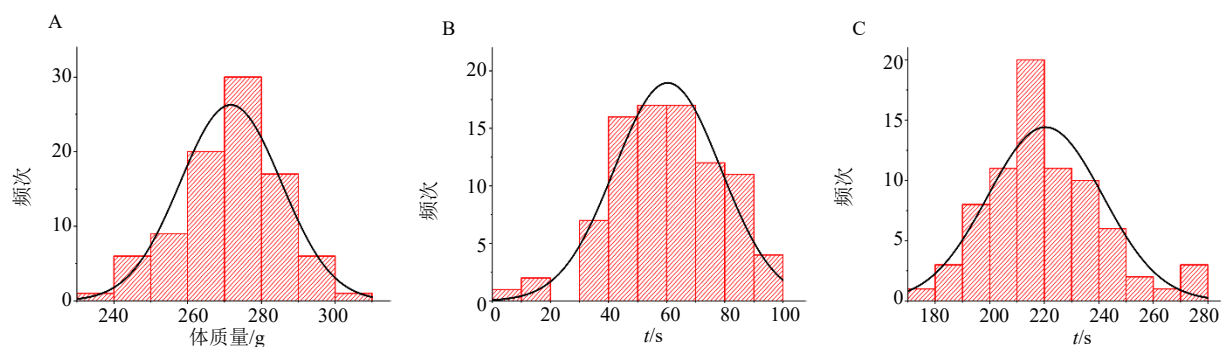


图 6 造模前体质量 (A)、强迫游泳测试 (B)、旷场测试 (C) 正态分布图

Fig. 6 Normal distribution of pre-modelling body weight (A), forced swimming test (B), open field test (C)

衰始生变化之时，阴气逐渐在地下萌动，故谓之夏至一阴生；“夏至后即枯，盖禀纯阳之气，得阴气则枯”的夏枯草能使浮散的卫气收于阳分，半夏得阴而生可把卫气从阳分引入阴分，故二者配伍而成的双夏汤循顺应阴阳之法，可发挥镇静安神之效，从而使抑郁症得到改善。

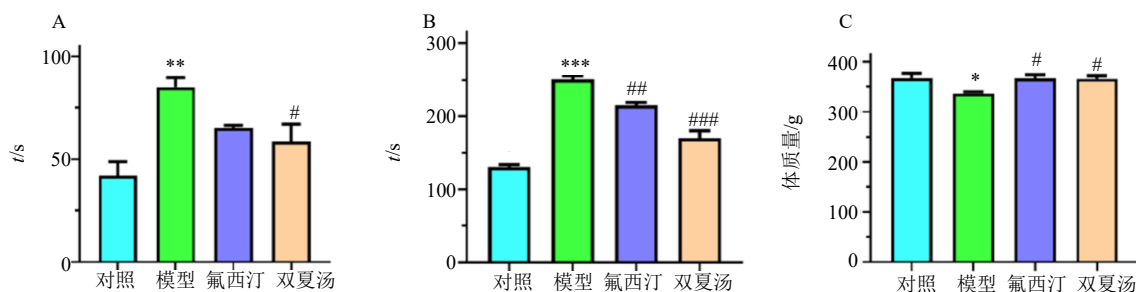
本研究通过网络药理学 PPI 网络分析表明双夏汤可能通过调控 Akt1、GSK3B、PIK3CA、MAPK1

CREB 蛋白相对表达量明显增加；与模型组比较，双夏汤组大鼠 HIF-1 α 、CREB 蛋白相对表达量明显减弱。与对照组相比，模型组大鼠 GSK3B 在海马中的表达明显减弱，双夏汤组表达明显增强。与对照组相比，模型组大鼠 p-Akt、p-GSK3B 在海马中的表达明显增强；与模型组比较，双夏汤组大鼠海马组织中 p-Akt、p-GSK3B 表达明显降低，见图 9。

5 讨论

现代医家常将抑郁症纳入“郁证”范畴，认为“肝郁气滞”为主要发病机制^[18]，常以“疏肝解郁”为基本治则。《金匱要略》最早将“百合病”“脏躁”“梅核气”“奔豚气”等情志引起的病证进行描述及鉴别，为郁证的辨证论治奠定了基础。《医学正传》首次将“郁证”作为疾病名，伴随着病名的提出，“郁证”的临床症状更加具象化，专指以情绪抑郁、烦闷为主要临床表现的一类疾病。鉴于抑郁症为慢性、易反复发作的疾病，发病机制复杂，除从脏腑论治外，需结合新的治疗思路提高中医药治疗抑郁症的疗效。抑郁症患者临床表现具有明显时段性，白天兴奋不足、快感缺失、情绪低落、思维迟钝，夜晚宁静不足、难以入睡，为阴阳枢机转换不利、营卫失序的表现^[19]。双夏汤由半夏和夏枯草配伍而成，《本草纲目》载“五月半夏生”，逢阴阳二气盛

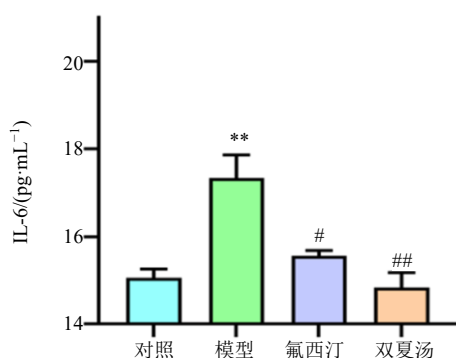
等靶蛋白及 KEGG 富集分析结果中的 HIF-1 等信号通路发挥抗抑郁作用。CUMS 模型是目前研究啮齿动物抑郁症最常用模型，广泛应用于抗抑郁药物筛选、抑郁症病理生理学机制等研究领域^[20]。动物实验采用 CUMS 造模方法，并分别于造模前、造模后、干预后进行大鼠旷场实验、强迫游泳实验。结果发现，与对照组相比，模型组大鼠旷场实验中水平活动、垂直活动明显减少，强迫游泳实验不动时间明



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 7 大鼠强迫游泳测试 (A)、旷场测试 (B)、体质量 (C) 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 7 Results of forced swimming test (A), open field test (B) and body mass (C) in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 8 各组大鼠 IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 8 Levels of IL-6 in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

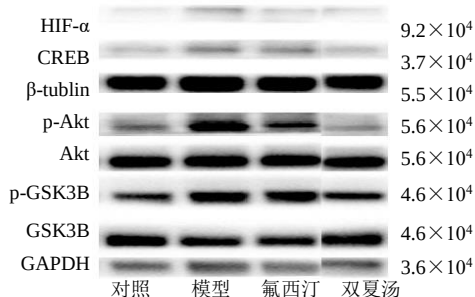


图 9 大鼠海马组织 HIF-1α、CREB、Akt、P-Akt、GSK3B、P-GSK3B 蛋白表达电泳

Fig. 9 Rat hippocampal tissue HIF-1α, CREB, Akt, p-Akt, GSK3B, p-GSK3B protein expression electrophoresis

显延长;经双夏汤干预后,大鼠旷场实验水平垂直活动均有所增加,强迫游泳实验不动时间显著减少,说明双夏汤可通过抵抗慢性应激造成的快感、好奇心缺失,改善抑郁样行为。

相关研究指出抑郁症与免疫激活反应有关,抑郁症患者的 IL-6 等炎症因子水平升高,且因子水平

高低与抑郁症严重程度相关^[21]。本实验结果表明,与对照组相比,模型组大鼠 IL-6 水平显著增加,表明抑郁症伴有炎症反应。双夏汤组 IL-6 水平与模型组相比显著降低,提示双夏汤可有效抑制抑郁症伴发的炎症反应。昼夜节律紊乱与人类多种精神疾病存在关联,如季节性抑郁症^[22]、双相情感障碍^[23]等,昼夜系统可通过 GSK3B 介导突触可塑性发挥重要作用,临床研究发现 GSK3B 的特异性与重度抑郁症发作患者的严重失眠有关^[24]。本实验中模型组大鼠海马组织 GSK3B 磷酸化增强,大鼠表现出强烈的昼夜节律紊乱。Akt 在调节神经元细胞存活和突触可塑性方面发挥着重要作用^[25],GSK3B 是 Akt 的下游底物,随着磷酸化 Akt 的激活,GSK3B 发挥磷酸化作用。抑制 GSK3B 活性是治疗情感障碍性疾病的新靶点^[26],GSK3B 活性增强促使整个神经突中微管的高效形成,而引发更多的分支损害颗粒神经元突触连接^[27]。本实验结果显示,与模型组比较,双夏汤大鼠海马组织中 p-Akt、p-GSK3B 蛋白表达明显降低,表明双夏汤可通过降低 Akt、GSK3B 磷酸化水平,促进神经元轴突生长,调节机体昼夜节律,从而发挥抗抑郁作用。机体在长期应激状态下易致海马组织处于相对缺氧状态,反馈性增高 HIF-1α 表达水平^[28]。HIF-1α 可介导神经元和星形胶质细胞中的葡萄糖代谢^[29],当其表达大量增加导致大脑中葡萄糖代谢改变,为引发抑郁的因素之一^[30]。CREB 是海马组织中葡萄糖稳态的调节分子^[31],当细胞处于缺氧状态时 CREB-HIF1α 表达增加,反激活神经母细胞葡萄糖转运体,导致有氧代谢不足,从而促进海马细胞的萎缩和凋亡^[32],抑制大鼠海马区神经再生及突触之间的传递,其中,神经元损伤及细胞可塑性改变是抑郁症发病的关键因素^[33]。已

有研究表明, Akt/GSK3B 和 HIF-1 α /CREB 通路对神经系统细胞的发育、生长和存活中起着重要作用, 能够修复海马神经前体细胞的损伤, 从而达到神经元重塑的目的^[34-35]。本研究中, 与对照组相比, 模型组大鼠海马中 CREB、HIF-1 α 表达显著升高, 经双夏汤干预后 CUMS 大鼠海马 CREB、HIF-1 α 表达明显下降, 表明双夏汤可能通过下调 CUMS 大鼠海马中 CREB、HIF-1 α 水平, 调节海马组织中葡萄糖稳态, 从而改善海马神经元可塑性而减轻抑郁样症状。

综上, 本研究通过网络药理学及动物实验验证的方式对双夏汤治疗抑郁症的改善作用及机制进行了探讨, 表明双夏汤可通过调节 Akt/GSK3B 和 HIF-1 α /CREB 信号通路改善海马神经元可塑性, 有效减轻 CUMS 大鼠抑郁样行为。其具体作用机制可能与降低 Akt、GSK3B 的磷酸化水平, 调整机体昼夜节律的同时下调 CREB、HIF-1 α 水平而调节海马组织中葡萄糖稳态有关, 为双夏汤在临床上治疗抑郁症的潜在临床应用价值提供理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yuan Y Y, Min H S, Lapane K L, *et al.* Depression symptoms and cognitive impairment in older nursing home residents in the USA: A latent class analysis [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2020, 35(7): 769-778.
- [2] Jesulola E, Micalos P, Baguley I J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 341:79-90.
- [3] Agius M, Bonnici H. Antidepressants in use in clinical practice [J]. *Psychiatr Danub*, 2017, 29(Suppl 3): 667-671.
- [4] Natter J, Yokoyama T, Michel B. Relative frequency of drug-induced sleep disorders for 32 antidepressants in a large set of Internet user reviews [J]. *Sleep*, 2021, 44(12): zsab174.
- [5] 田磊, 栗俞程, 白明, 等. 栀子及其方剂配伍治疗抑郁症研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 239-247.
- [6] 杨倩, 付英杰, 任佳丹, 等. 葛根在躯体疾病共病抑郁治疗中的应用及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4701-4712.
- [7] 王春芳, 田文国, 陈金鹏, 等. 中药抗抑郁作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2890-2901.
- [8] 陈志红, 李积荣. 青少年昼夜节律紊乱与睡眠状态及抑郁的相关性 [J]. 护理研究, 2023, 37(11): 2065-2068.
- [9] Chi X S, Wang S J, Baloch Z, *et al.* Research progress on classical traditional Chinese medicine formula lily bulb and rehmannia decoction in the treatment of depression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108616.
- [10] Zhang C N, Liu C X, Wu H, *et al.* Global analysis the potential medicinal substances of Shuangxia Decoction and the process *in vivo* via mass spectrometry technology [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 654807.
- [11] 李丹丹. 以 5-羟色胺 1A 受体为靶标的双夏汤治疗失眠的活性组分筛选 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [12] 张俊义. 双夏汤化学物质基础及药效学筛选研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [13] 刘冬, 张耀, 陈小莉, 等. 半夏夏枯草合剂抗抑郁作用的药理实验研究 [J]. 武警医学, 2009, 20(1): 9-11.
- [14] 刘冬, 吴琨, 杨卫平, 等. 半夏夏枯草合剂对慢性应激抑郁模型大鼠血清皮质醇的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(1): 22-23.
- [15] 宋珊珊, 孙红, 井汶, 等. 基于雌激素受体通路探讨青娥丸对 CUMS 大鼠的抗抑郁机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 9-15.
- [16] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 134(4): 319-329.
- [17] 刘悦, 裴文慧, 王冉, 等. 双夏汤对肝郁型失眠大鼠行为学和脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(15): 1616-1621.
- [18] 潘瑾, 王塘, 高志礼, 等. 中医经典名方治疗抑郁症的研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022, 24(7): 2809-2816.
- [19] 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.
- [20] Zhang X P, Zeng L, Shen C P, *et al.* Tao-Hong-Si-Wu Decoction improves depressive symptoms in model rats via amelioration of BDNF-CREB-arginase I axis disorders [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1739-1750.
- [21] Mehdi S, Wani S U D, Krishna K L, *et al.* A review on linking stress, depression, and insulin resistance via low-grade chronic inflammation [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2023, 36: 101571.
- [22] Ng E, Nestor S M, Rabin J S, *et al.* Seasonal pattern and depression outcomes from repetitive transcranial magnetic stimulation [J]. *Psychiatry Res*, 2023, 329: 115525.
- [23] Gold A K, Kinrys G. Treating circadian rhythm disruption in bipolar disorder [J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, 21(3): 14.
- [24] Costemale-Lacoste J F, Colle R, Martin S, *et al.* Glycogen synthase kinase-3B genetic polymorphisms and insomnia

- in depressed patients: A prospective study [J]. *J Affect Disord*, 2018, 240: 230-236.
- [25] Lee H, Shin W, Kim K, *et al.* NGL-3 in the regulation of brain development, Akt/GSK3 β signaling, long-term depression, and locomotive and cognitive behaviors [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(6): e2005326.
- [26] 尚立芝, 毛梦迪, 许二平, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 12-19.
- [27] Hooper C, Markevich V, Plattner F, *et al.* Glycogen synthase kinase-3inhibition is integral to long-term potentiation [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(1): 81-86.
- [28] Fan X X, Sun W Y, Li Y, *et al.* Honokiol improves depression-like behaviors in rats by HIF-1 α - VEGF signaling pathway activation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 968124.
- [29] Bolaños J P, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: A bioenergetic or a survival pathway? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(3): 145-149.
- [30] Shibata T, Yamagata H, Uchida S, *et al.* The alteration of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes in mood disorder patients [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 43: 222-229.
- [31] Oh K J, Han H S, Kim M J, *et al.* CREB and FoxO1: Two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis [J]. *Bmb Rep*, 2013, 46(12): 567-574.
- [32] 尹炳琪, 李星, 武峻艳, 等. 针刺督脉对 AD 大鼠海马区葡萄糖代谢及 cAMP/PKA 信号通路的影响机制 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(5): 1264-1267.
- [33] 王钦, 蔡萧君, 颀彦鹏, 等. 基于 BDNF/Trk B/CREB 通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对 2 型糖尿病合并抑郁大鼠海马的影响及其机制研究 [J]. 中药材, 2021, 44(12): 2922-2927.
- [34] Hui J J, Zhang J P, Pu M J, *et al.* Modulation of GSK-3 β / β -catenin signaling contributes to learning and memory impairment in a rat model of depression [J]. *Int Neuropsychopharmacol*, 2018, 21(9): 858-870.
- [35] Peng H, Wang H B, Wang L, *et al.* GSK3 β aggravates the depression symptoms in chronic stress mouse model [J]. *J Integr Neurosci*, 2018, 17(2): 169-175.

[责任编辑 高源]