

网络药理学结合实验验证探讨四逆散“异病同治”抑郁症、焦虑症和乳腺纤维囊性疾病的作用机制

胡丽丽*, 王 珏, 吴 娜, 蔡东晖

山西中医药大学 基础医学院, 山西 晋中 030619

摘要: **目的** 探讨四逆散对重度抑郁症、广泛性焦虑症和乳腺纤维囊性疾病“异病同治”的作用机制。**方法** 筛选四逆散活性成分, 并与治疗抑郁症、焦虑症和乳腺纤维囊性疾病的药物进行主成分分析判断类药性; 利用多个数据库综合分析四逆散和3种疾病的作用靶点, 使用DAVID数据库对共有靶点进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析, 运用BioGPS数据库对关键靶点进行定位分析。采用皮质酮(CORT)诱导PC12细胞制备抑郁症、焦虑症模型, 6.250 0、3.125 0、1.562 5 mg·mL⁻¹四逆散干预处理, MTT检测细胞存活率, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)mRNA表达。**结果** 四逆散主要活性成分具有较好的类药性, 四逆散“异病同治”共有靶点32个, 关键靶点为IL6、肿瘤坏死因子(TNF)、细胞肿瘤抗原p53(TP53)、丝氨酸/苏氨酸激酶1(AKT1)和IL1B等, 关键活性成分包括槲皮素、木犀草素和川陈皮素等。四逆散主要通过调控HIF-1、癌症和PI3K-Akt等多条信号通路发挥“异病同治”功能, 推测肝、胸腺是药物发挥作用的关键部位。实验结果显示四逆散可逆转CORT对PC12的细胞毒性, 影响不同时间点IL-1 β 、IL-6 mRNA表达。**结论** 四逆散具有“多成分、多靶点、多通路”协同作用的特点, 通过调节炎症反应等发挥“异病同治”作用。

关键词: 四逆散; 重度抑郁症; 广泛性焦虑症; 乳腺纤维囊性疾病; 网络药理学; 槲皮素; 木犀草素; 川陈皮素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)08-1735-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.008

Exploring mechanism of Sini Powder in treatment of depression, anxiety disorder, and breast fibrocystic disease based on network pharmacology and experimental verification

HU Lili, WANG Jue, WU Na, CAI Donghui

School of Basic Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Sini Powder in treatment of major depressive disorder, generalized anxiety disorder, breast fibrocystic disease with the "homotherapy for heteropathy". **Methods** The active components of Sini Powder were screened and compared the drug-like properties with existing drugs for the treatment of major depressive disorder, generalized anxiety disorder, breast fibrocystic disease using principal component analysis. Multiple databases were used to analyze the targets of Sini Powder and three diseases, DAVID database was used to conduct GO enrichment and KEGG pathway analysis of common targets, BioGPS database was used to locate and analyze the key targets. Corticosterone (CORT) induced PC12 cells was used to prepare models of depression. Sini Powder (6.250 0, 3.125 0, 1.562 5 mg·mL⁻¹) was used for intervention treatment. Cell survival was detected by MTT, IL-1 β and IL-6 mRNA expression was tested by qRT-PCR. **Results** Most of the active components of Sini Powder had good drug-like properties. There were 32 common targets of Sini Powder treating three diseases with "homotherapy for heteropathy". The key targets were IL6, TNF, TP53, AKT1 and IL1B, etc. The key active components were quercetin, luteolin, and nobiletin, etc. Sini Powder mainly played the role of treating different diseases through HIF-1, pathways in cancer and PI3K-Akt signaling pathway. It was speculated that the liver and thymus were the key parts of the drug. The results of cell experiments showed

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 山西省基础研究计划青年科学研究项目(202203021222278); 山西省高等学校科技创新项目(2020L0420); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”项目(2020PY-JC-06)

*通信作者: 胡丽丽, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药抗炎。E-mail: hulili0204@163.com

that Sini Powder could reverse the cytotoxicity of CORT on PC12 and affected the mRNA expression of *IL-1 β* and *IL-6*. **Conclusion** The treatment of three diseases with Sini Powder reflected the thought of "homotherapy for heteropathy" in Chinese medicine through multiple components, multiple targets, and multiple pathways by regulating inflammatory response and other factors.

Key words: Sini Powder; major depressive disorder; generalized anxiety disorder; breast fibrocystic disease; network pharmacology; quercetin; luteolin; nobiletin

重度抑郁症(MDD)、广泛性焦虑症(GAD)和乳腺纤维囊性疾病(BFD)是临床常见疾病。MDD和GAD是全球最常见的精神类疾病。依据世界卫生组织的排名显示抑郁症是导致残疾的最大贡献者,同时也是自杀(每年死亡人数接近80万)的主要原因^[1]。MDD作为抑郁症的一个亚类,同样具有兴趣缺失、精力减少、认知功能受损等特点,更由于其持续性、高复发性,导致患者无法进行正常的学习、工作和生活,为患者及亲属造成极大的精神和经济负担^[2]。全球约有11%的人会在一生中出现MDD和GAD相关临床症状,并且这2种疾病在50%~80%的病例中同时或依次发生^[3]。GAD是最常见的一种焦虑障碍,以至少持续6个月过度 and 无法控制的忧虑一系列事件或活动为特点,终生患病率为4.3%~5.9%^[4]。BFD是最常见的良性乳腺疾病,20~50岁发病率最高,我国的发病率可达40%^[5-6]。

BFD在中医类典籍中被称为乳癖,清代祁坤在《外科大成》中记载:“(乳癖)由肝郁脾虚者……又郁结伤脾者”,抑郁症和焦虑症属于中医“郁证”、“脏躁”等范畴^[7]。根据抑郁症中医证候诊断标准,抑郁症分为肾虚肝郁、肝郁脾虚、心脾两虚等6个证型,其中最常见的是肝郁脾虚证^[8]。情志不调与肝的疏泄功能密切相关,肝郁脾虚证亦是同属于情志病范畴的焦虑症常见证型^[9]。

四逆散是出自汉代张仲景《伤寒论》的经典名方,由柴胡(君)、白芍(臣)、枳实(佐)、甘草(使)4味药组成,具有调和肝脾、疏肝理脾之功效。现代药理实验和临床应用均显示四逆散在对肝郁脾虚型功能性消化不良伴焦虑、腹泻、郁证的治疗中具有良好的效果^[10-12]。

“异病同治”的理论基础是“证同治亦同”,同时也与中药复方具有“多成分、多靶点、多通路”的特点相契合^[13]。而网络药理学可以突破传统实验手段仅局限于某些性状、某一条或几条信号通路的局限性,将以全面、系统、整体的角度分析中药复方对疾病的作用机制^[14]。本研究拟采用网络药理学和细胞实验探讨四逆散干预MDD、GAD、BFD“异病同治”的机制。

1 材料

1.1 细胞

高分化型PC12细胞(购买自中国科学院上海生命科学研究院细胞库)。

1.2 药品与试剂

四逆散[批号Z35020282,福州海王金象中药制药有限公司(每袋9g)]; PrimeScript™ RT试剂盒(货号RR037A,宝日医生物技术(北京)有限公司); TB Green® Premix Ex Taq™[货号RR820A,宝日医生物技术(北京)有限公司]; 皮质酮(CORT)(C104537,上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 10%胎牛血清、高糖DTEM培养基[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 仪器

DNM-9602酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司); AiraMX实时荧光定量PCR仪(安捷伦科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 四逆散有效成分及靶点的获取和筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)检索四逆散中4味中药柴胡、白芍、枳实和甘草的化学成分,并以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18为标准进行筛选。进一步检索有效成分对应的蛋白质靶点。有效成分无法在TCMSP数据库查找到靶点时,利用SwissTarget数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>)进行查询,并选取Probability>0.3的作为靶点蛋白质。使用Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org>)将得到的蛋白质靶点名称转换为基因名称。利用Cytoscape3.7.2软件对四逆散4味中药、有效成分及其靶点进行筛选和分析,构建四逆散-有效成分-靶点网络图。

2.1.2 有效成分的DL分析 在TCMSP中查找四逆散所包含活性成分的相对分子质量(MW)、辛醇/水的分配(lgP)、氢键供体数(H-bond donors, Hdon)以及氢键受体数(H-bond acceptors, Hacc)等参数。

在DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)中,分别以“Major depressive disorder”“Generalized anxiety disorder”“Breast fibrocystic disease”查找现有治疗MDD、GAD、BFD的药物,并将每种药物SMILES输入SwissADME(<http://www.swissadme.ch/index.php>)数据库检索药物的MW、lgP、Hdon和Hacc。对上述筛选得到的四逆散有效成分与治疗MDD、GAD、BFD的药物进行主成分分析(PCA)分析,以比较四逆散有效成分的DL。

2.1.3 MDD、GAD、BFD疾病靶点预测 以“Major depressive disorder”“Generalized anxiety disorder”“Breast fibrocystic disease”为关键词,在DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/search>)、OMIM数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和Drugbank数据库(<https://go.drugbank.com/>)分别检索疾病的潜在靶点。DisGeNET数据库选择score_gda ≥ 0.1 的靶点, GeneCards数据库选择Relevance score值 $\geq$ 中位数的靶点。

2.1.4 四逆散作用靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析 将四逆散有效成分和3种疾病共同靶点上传至STRING数据库(<https://www.string-db.org/>),物种选择“Homo sapiens(人类)”,在设置中将minimum required interaction score设置为medium confidence(>0.4),进行PPI分析。并将在STRING数据库得到的数据导入Cytoscape 3.8.0软件进行分析,使用Analyze Network和CytoNCA插件计算PPI网络节点的拓扑参数。

2.1.5 通路富集及定位分析 将四逆散作用靶点运用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体(GO)功能富集与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

利用BioGPS(<http://biogps.org/#goto=welcome>)对四逆散作用靶点进行定位分析,取关键靶点表达前5位的组织,构建中药材-关键靶点-组织定位图。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养 高分化型PC12细胞培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。

2.2.2 MTT检测细胞存活率 将9 g四逆散溶解于90 mL高糖DMEM培养基中,制成质量浓度为100 mgmL⁻¹的储存液,0.22 μm滤膜滤过后保存备用。取处于对数生长期细胞接种于96孔板(每孔1×10⁴个)中,设四逆散组和对照组。培养24 h后,

四逆散组分别加入7种含不同质量浓度(50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 5、0.781 25 mg·mL⁻¹)四逆散的培养基各200 μL;对照组加入等量常规培养基,每组设置5个复孔。培养24、48、72 h,每孔加入20 μL MTT(5 mg·mL⁻¹),继续培养4 h,吸去孔内培养基,避光加入150 μL DMSO溶解结晶物,使用酶标仪检测波长490 nm处的光密度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{四逆散}} / A_{\text{对照}}$$

同上述方法检测四逆散对模型细胞存活率的影响。细胞接种同“2.2.2”项,分为对照组、抑郁症模型组(400 μmol·mL⁻¹ CORT处理)、及50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg·mL⁻¹四逆散处理组(先加四逆散作用2 h后,再加CORT),分别作用24、48、72 h。

2.2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)mRNA表达 Trizol法提取各组细胞总RNA,使用PrimeScript™ RT reagent Kit将RNA逆转录为cDNA(37℃, 15 min; 85℃, 5 s; 4℃, 10 min)。按照TB Green® Premix Ex Taq™说明,利用qRT-PCR对IL-1β、IL-6 mRNA表达进行检测,采用2^{-ΔΔCt}法对mRNA进行分析。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因	序列
IL-1β	正向 TCCTCTGTGACTCGTGCGAT
	反向 TCAGACAGCAGCAGGCATTT
IL-6	正向 CTGGTCTTCTGGAGTTCGGTTT
	反向 AGCATTGGAAGTTGGGGTAGG

2.3 统计学分析

通过SPSS17.0对实验结果进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组组间差异采用单因素方差分析(one-way-ANOVA)进行检验。

3 结果

3.1 网络药理学结果

3.1.1 四逆散有效成分及靶点 TCMSP检索四逆散组成药物柴胡、白芍、枳实、甘草,经筛选共获得144个化合物。具体为柴胡17个、白芍13个、枳实22个、甘草92个。剔除在2个数据库中均未找到蛋白质靶点的15个有效成分(柴胡4个、白芍5个、枳实2个、甘草4个)后,如图1所示柴胡、白芍和甘草共有成分是山柰酚(A1:kaempferol, MOL000422);

柴胡和甘草共有成分是槲皮素(B1: quercetin, MOL000098)和异鼠李素(B2: isorhamnetin, MOL000354);白芍和甘草共有成分是谷甾醇(C1: sitosterol, MOL000359)和丁子香酚(C2: Mairin, MOL000211);枳实和甘草共有成分是柚皮素(D1: naringenin, MOL004328),共计 122 个成分用于后续研究,成分信息见表 2。

四逆散 121 个成分共得到 613 个靶点,柴胡 183 个、白芍 87 个、枳实 120 个、甘草 223 个。柴胡、白芍、枳实和甘草共有靶点 43 个。

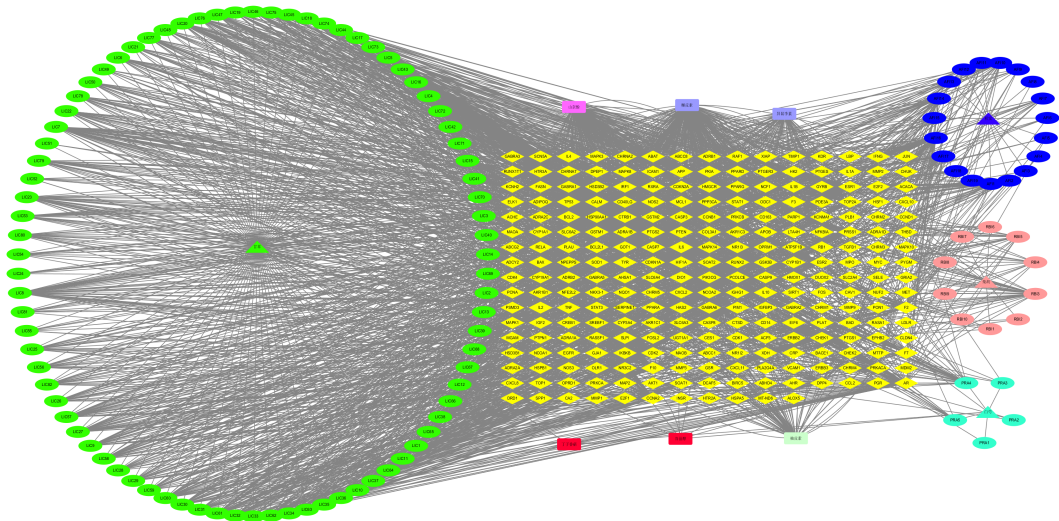


图 1 四逆散-有效成分-靶点网络图

Fig. 1 Network diagram of “Sini Powder-active components-targets”

表 2 四逆散各药材单独有效成分

Table 2 Individual ingredients of Sini Powder

MOLID	编号	活性成分	药材
MOL001484	LIC1	inermine	甘草
MOL001792	LIC2	DFV	甘草
MOL002311	LIC3	glycyrol	甘草
MOL000239	LIC4	jaranol	甘草
MOL002565	LIC5	medicarpin	甘草
MOL003656	LIC6	lupiwighteone	甘草
MOL003896	LIC7	7-methoxy-2-methyl isoflavone	甘草
MOL000392	LIC8	formononetin	甘草
MOL000417	LIC9	calycosin	甘草
MOL004805	LIC10	(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one	甘草
MOL004806	LIC11	euchrenone	甘草
MOL004808	LIC12	glyasperin B	甘草
MOL004810	LIC13	glyasperin F	甘草
MOL004811	LIC14	glyasperin C	甘草
MOL004814	LIC15	isotrifoliol	甘草
MOL004815	LIC16	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	甘草
MOL004820	LIC17	kanzonols W	甘草
MOL004824	LIC18	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	甘草
MOL004827	LIC19	semilicoisoflavone B	甘草
MOL004828	LIC20	glepidotin A	甘草

表 2 (续)

MOLID	编号	活性成分	药材
MOL004829	LIC21	glepidotin B	甘草
MOL004833	LIC22	phaseolinisoflavan	甘草
MOL004835	LIC23	glypallichalcone	甘草
MOL004838	LIC24	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	甘草
MOL004841	LIC25	licochalcone B	甘草
MOL004848	LIC26	licochalcone G	甘草
MOL004849	LIC27	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	甘草
MOL004855	LIC28	licoricone	甘草
MOL004856	LIC29	gancaonin A	甘草
MOL004857	LIC30	gancaonin B	甘草
MOL004863	LIC31	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	甘草
MOL004864	LIC32	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	甘草
MOL004866	LIC33	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	甘草
MOL004879	LIC34	glycyrin	甘草
MOL004882	LIC35	licocoumarone	甘草
MOL004883	LIC36	licoisoflavone	甘草
MOL004884	LIC37	licoisoflavone B	甘草
MOL004885	LIC38	licoisoflavanone	甘草
MOL004891	LIC39	shinpterocarpin	甘草
MOL004898	LIC40	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	甘草
MOL004903	LIC41	liquiritin	甘草
MOL004904	LIC42	licopyranocoumarin	甘草
MOL004907	LIC43	glyzaglabrin	甘草
MOL004908	LIC44	glabridin	甘草
MOL004910	LIC45	glabranin	甘草
MOL004911	LIC46	glabrene	甘草
MOL004912	LIC47	glabrone	甘草
MOL004913	LIC48	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	甘草
MOL004914	LIC49	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	甘草
MOL004915	LIC50	eurycarpin A	甘草
MOL004924	LIC51	(-)-medicocarpin	甘草
MOL004935	LIC52	sigmoidin-B	甘草
MOL004941	LIC53	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	甘草
MOL004945	LIC54	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	甘草
MOL004948	LIC55	isoglycyrol	甘草
MOL004949	LIC56	isolicoflavanol	甘草
MOL004957	LIC57	HMO	甘草
MOL004959	LIC58	1-methoxyphaseollidin	甘草
MOL004961	LIC59	quercetin der.	甘草
MOL004966	LIC60	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	甘草
MOL000497	LIC61	licochalcone a	甘草
MOL004974	LIC62	3'-methoxyglabridin	甘草
MOL004978	LIC63	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	甘草
MOL004980	LIC64	inflatocoumarin A	甘草

表2 (续)

MOLID	编号	活性成分	药材
MOL004985	LIC65	icos-5-enoic acid	甘草
MOL004988	LIC66	kanzonol F	甘草
MOL004989	LIC67	6-prenylated eriodictyol	甘草
MOL004990	LIC68	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	甘草
MOL004991	LIC69	7-acetoxy-2-methylisoflavone	甘草
MOL004993	LIC70	8-prenylated eriodictyol	甘草
MOL004996	LIC71	gadelaidic acid	甘草
MOL000500	LIC72	vestitol	甘草
MOL005000	LIC72	gancaonin G	甘草
MOL005001	LIC73	gancaonin H	甘草
MOL005003	LIC74	licoagrocarpin	甘草
MOL005007	LIC75	glyasperins M	甘草
MOL005008	LIC76	glycyrrhiza flavonol A	甘草
MOL005012	LIC77	licoagroisoflavone	甘草
MOL005016	LIC78	odoratin	甘草
MOL005017	LIC79	phaseol	甘草
MOL005018	LIC80	xambioona	甘草
MOL005020	LIC81	dehydroglyasperins C	甘草
MOL001918	PRA1	paeoniflorgenone	白芍
MOL001919	PRA2	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthrene-15,16-dione	白芍
MOL001924	PRA3	paeoniflorin	白芍
MOL000358	PRA4	beta-sitosterol	白芍
MOL000492	PRA5	(+)-catechin	白芍
MOL001645	RB1	linoleyl acetate	柴胡
MOL002776	RB2	baicalin	柴胡
MOL000449	RB3	stigmasterol	柴胡
MOL004598	RB4	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	柴胡
MOL004609	RB5	areapillin	柴胡
MOL013187	RB6	cubebin	柴胡
MOL004624	RB7	longikaurin A	柴胡
MOL004653	RB8	(+)-anomalin	柴胡
MOL004718	RB9	α -spinasterol	柴胡
MOL000490	RB10	petunidin	柴胡
MOL000098	槲皮素	quercetin	柴胡、甘草
MOL013277	AFI1	isosinensetin	枳实
MOL013279	AFI2	5,7,4'-trimethylapigenin	枳实
MOL013428	AFI3	isosakuranetin-7-rutinoside	枳实
MOL013430	AFI4	prangenin	枳实
MOL013435	AFI5	poncimarín	枳实
MOL013436	AFI6	isoponcimarín	枳实
MOL013437	AFI7	6-methoxy aurapten	枳实
MOL013440	AFI8	citrusin B	枳实
MOL001798	AFI9	neohesperidin_qt	枳实
MOL001803	AFI10	sinensetin	枳实

表 2 (续)

MOLID	编号	活性成分	药材
MOL001941	AFI11	ammidin	枳实
MOL002914	AFI12	eriodictiol (flavanone)	枳实
MOL005100	AFI13	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	枳实
MOL005828	AFI14	nobiletin	枳实
MOL005849	AFI15	didymin	枳实
MOL000006	AFI16	luteolin	枳实
MOL007879	AFI17	tetramethoxyluteolin	枳实
MOL009053	AFI18	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	枳实
MOL013276	AFI19	poncirin	枳实

表 3 四逆散各药材公有有效成分

Table 3 Common ingredients of Sini Powder

MOLID	有效成分	药材
MOL000211	丁子香酚(mairin)	白芍、甘草
MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、柴胡
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	白芍、甘草
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	白芍、甘草、柴胡
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	柴胡、甘草
MOL004328	柚皮素(naringenin)	甘草、枳实

3.1.2 四逆散有效成分 DL 评价 图 2 为对现有治疗 MDD、GAD、BFD 药物及四逆散活性成分的 MW、lgP、Hdon 和 Hacc 进行 PCA 分析的散点图。结果显示大部分四逆散活性成分与治疗上述 3 种疾病的药物同处于一个区域,说明大部分四逆散活性成分具有较好的类药性,可能成为治疗此 3 种疾病的药物。

3.1.3 四逆散作用于疾病靶点的预测 经 DisGeNET、OMIM、GeneCards、DRUGBANK 4 个数据库检索,共获取 MDD 靶点 2 202 个、GAD 靶点 1 342 个、BFD 靶点 965 个。使用在线韦恩图 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)对靶点信息进行分析,3 种疾病的交集靶点为

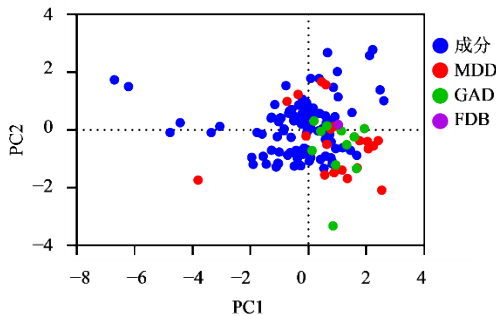


图 2 四逆散有效成分与治疗 MDD、GAD、BFD 药物的 PCA 分析
Fig. 2 PCA analysis of active components of Sini Powder and drugs for MDD, GAD and BFD

111 个(图 3-A)。3 种疾病靶点与四逆散 613 个靶点取交集,获得四逆散治疗 MDD、GAD 和 BFD 的共有靶点为 32 个,分别为 CYP3A4、BCL2、CYP19A1、ERBB2、PTEN、TP53、IGF2、COL3A1、CREB1、CRP、IL1B、IL6、IL10、TNF、NR3C2、IFNG、SERPINE1、EGFR、IL2、MPO、CCL2、ESR1、CXCL8、AR、IL4、NOS3、PON1、TGFB1、AKT1、PPARG、STAT3、PLAU(图 3-B)。其中 ESR1、AR、PPARG、NOS3、AKT1、BCL2、TNF、IL6 属于组成四逆散 4 种中药材的共有靶点。

3.1.4 作用靶点 PPI 分析及关键药材、有效成分分析 对上述 32 个四逆散作用靶点导入 STRING 数据库分析后获得由 32 个节点和 319 条边构成的 PPI 网络,平均节点度值(average node degree)为 19.9,平均中心聚类系数(avg. local clustering coefficient)为 0.827,如图 4-A 所示。度值最高的 10 个靶点分别为 IL6、TNF、TP53、AKT1、EGFR、STAT3、ESR1、PPARG、IL1B、CCL2,提示这些靶点可能在四逆散对 MDD、GAD 和 BFD 的治疗中起到关键作用。结果进一步提示 IL6 发挥了更为重要的作用。

对度值前 10 靶点(关键靶点)对应的成分信息进行分析后,出现次数最多的 6 种成分分别是槲皮素(quercetin)、木犀草素(luteolin)、川陈皮素(nobiletin)、甘草查尔酮甲(licochalcone a)、山柰酚(kaempferol)、柚皮素(naringenin)(图 5)。

3.1.5 GO 和 KEGG 通路富集及定位分析 使用 DAVID 平台对四逆散治疗 3 种疾病作用靶点过程分析显示,GO 功能富集主要包括生物过程(BP)219 个、细胞组分(CC)9 个和分子功能(MF)33 个,共计 261 个生物反应($P < 0.05$)。其中 BP 主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、衰老、序列特异性 DNA 结合转录因子活性的正调控、一氧化氮生物合成过程的正调控、基因表达的正调控等;CC 主

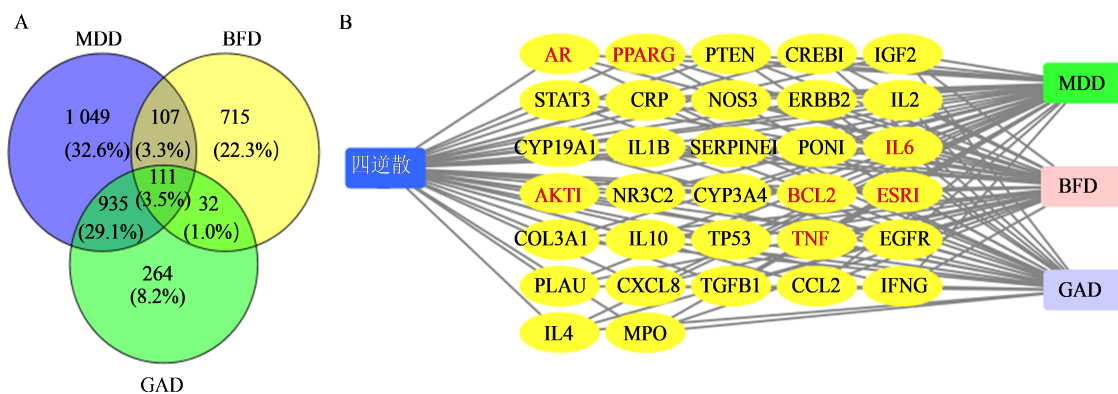
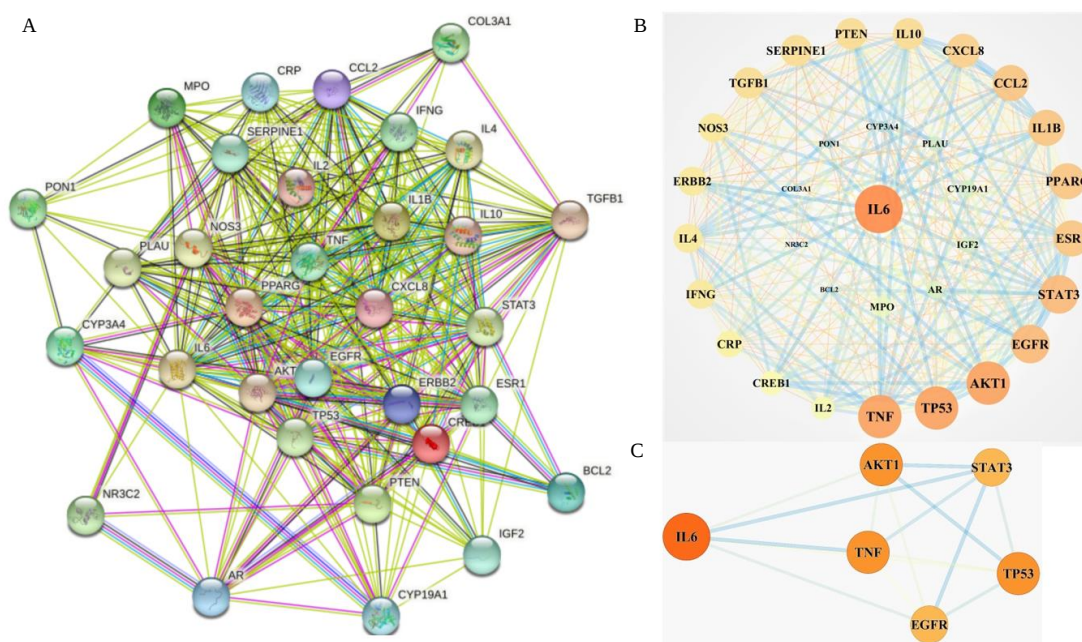


图3 MDD、GAD和BFD交集靶点(A)及四逆散治疗3种疾病的共有靶点(B)

Fig. 3 Intersection targets of MDD, GAD, BFD (A) and common targets of Sini Powder in treating three diseases (B)



A-PPI 交互网络;B-PPI 交互网络可视图;C-度值前6位靶点交互网络。

A-PPI interaction network; B-PPI interaction network viewable form; C-degree value top 6 targets interaction network.

图4 四逆散作用靶点 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network of Sini Powder

要涉及细胞外空间和区域、核染色质等;MF 主要涉及酶结合、细胞因子活性、相同的蛋白质结合、蛋白磷酸酶结合、生长因子活性等。按照 P 值进行排序后,前 10 项条目如图 6 所示。

KEGG 通路富集分析共确定了 69 条富集通路,根据 P 值分析,前 20 条通路中与 MDD、GAD 和 BFD 相关的包括 HIF-1 信号通路、乙型肝炎、癌症、细胞因子-细胞因子受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路等(图 7)。

如图 8 中药材-关键靶点-组织定位网络图所示,甘草成分对应所有的 10 个关键靶点,柴胡对应 9 个关键靶点,枳实对应 7 个关键靶点,

白芍对应 5 个关键靶点。在关键靶点定位信息中可知心肌细胞(Cardiac Myocytes)、平滑肌(Smooth Muscle)、Burkitt's 淋巴瘤 Raji 细胞[Lymphoma_burkitts(Raji)]、视网膜(Retina)、721-B 淋巴细胞(721-B-lymphoblasts)、CD33⁺髓细胞(CD33⁺Myeloid)、肝脏(Liver)、胸腺(Thymus)、BDCA4⁺树突状细胞(BDCA4⁺DendriticCells)等是关键靶点定位较多的组织。推测肝、胸腺、免疫细胞、神经细胞在四逆散“异病同治”MDD、GAD 和 BFD 中发挥着重要作用。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 四逆散对 PC12 细胞存活率的影响 采用不

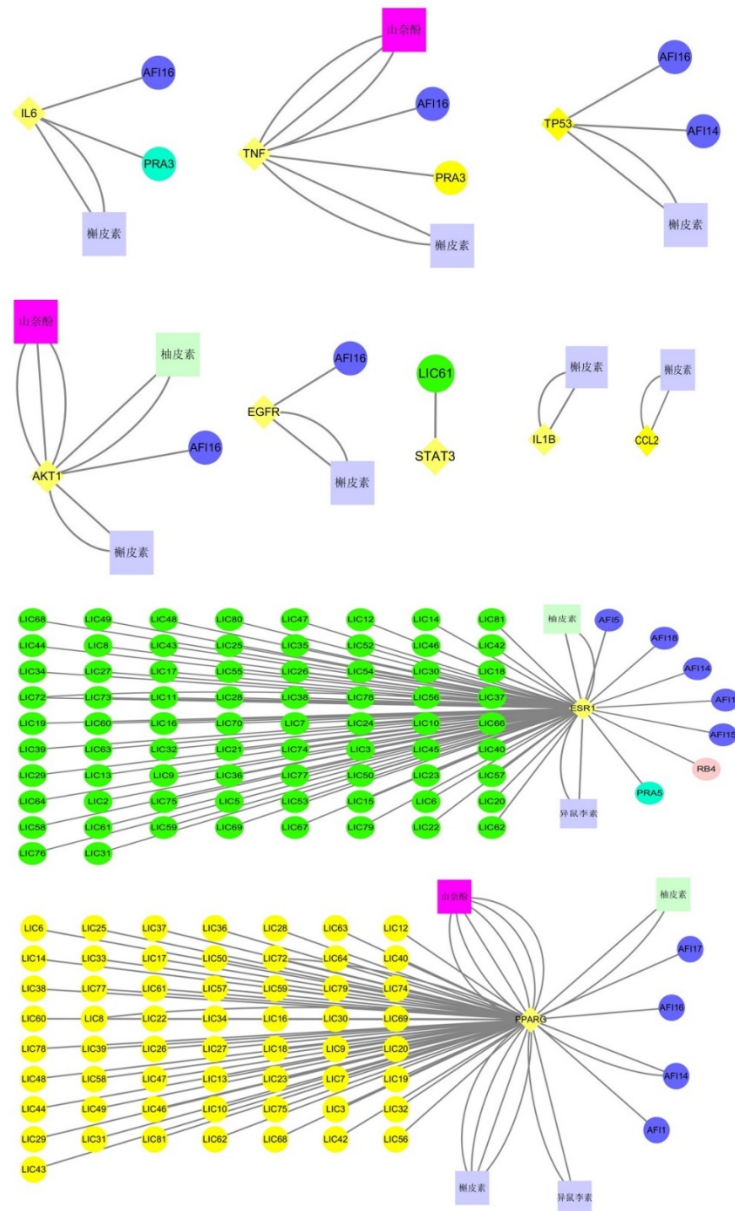


图5 度值前10位靶点对应的成分信息

Fig. 5 Components information corresponding to top 10 degree value targets

同浓度四逆散处理PC12细胞并分析其存活率,结果如图9所示。与对照组相比,3.125 0、1.562 5 mg·mL⁻¹四逆散作用于PC12细胞24、48、72 h后,对细胞存活率影响不显著。经6.250 0 mg·mL⁻¹四逆散作用72 h,细胞存活率极显著下降($P<0.01$),24、48 h无明显影响。

图10所示为四逆散对CORT诱导PC12细胞模型存活率的影响。在3个不同时间点,模型组PC12细胞存活率均明显低于对照组($P<0.01$);与模型组相比,经四逆散(3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg·mL⁻¹)干预后,存活率显著升高($P<0.05$)。6.250 0 mg·mL⁻¹四逆散作用于模型组细胞24、48 h,明显提高了其存活

率($P<0.01$);72 h时,对存活率影响不显著。基于上述结果,选择6.250 0、3.125 0、1.562 5 mg·mL⁻¹进行后续实验。

3.2.2 四逆散对*IL-1β*、*IL-6* mRNA表达的影响 四逆散(6.250 0 mg·mL⁻¹)作用24 h明显降低了由CORT引起的*IL-1β* mRNA高表达($P<0.05$);而3.125 0 mg·mL⁻¹作用24 h、6.250 0 mg·mL⁻¹和1.562 5 mg·mL⁻¹作用48 h持续提升了*IL-1β* mRNA表达($P<0.05$)(图11-A)。作用时间为72 h,模型组*IL-1β* mRNA表达明显低于对照组($P<0.01$);经四逆散1.562 5 mg·mL⁻¹干预后表达持续下降($P<0.01$)(图11-B)。

CORT作用于PC12细胞24、48 h,*IL-6* mRNA

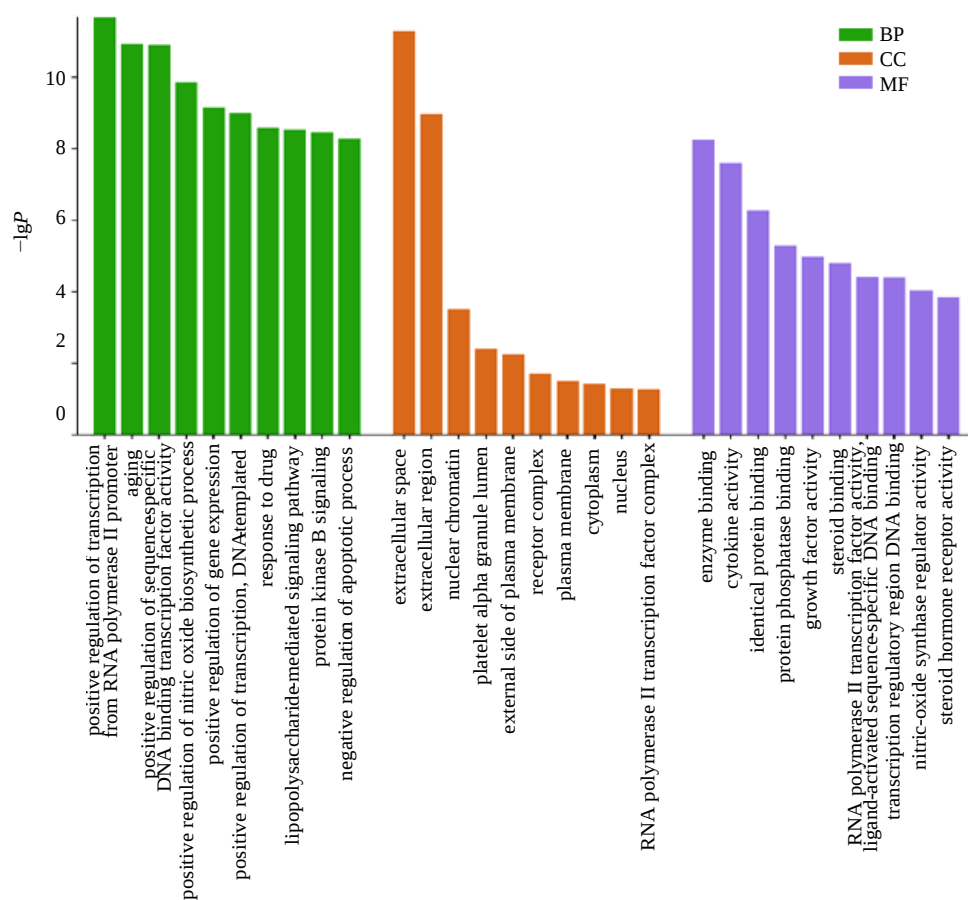


图 6 GO 富集分析

Fig. 6 GO function enrichment analysis

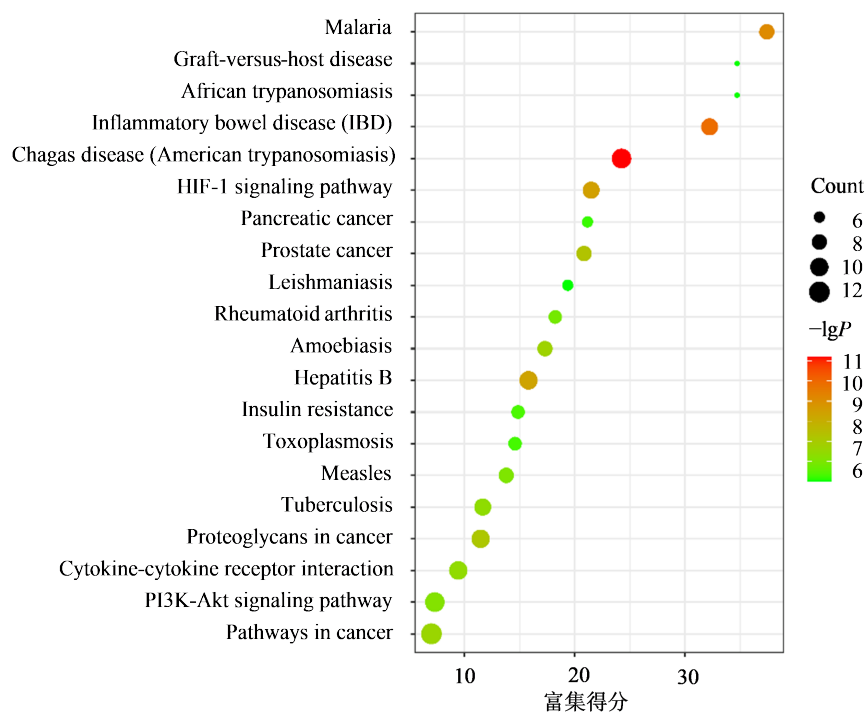


图 7 KEGG 信号通路分析

Fig. 7 KEGG pathway analysis

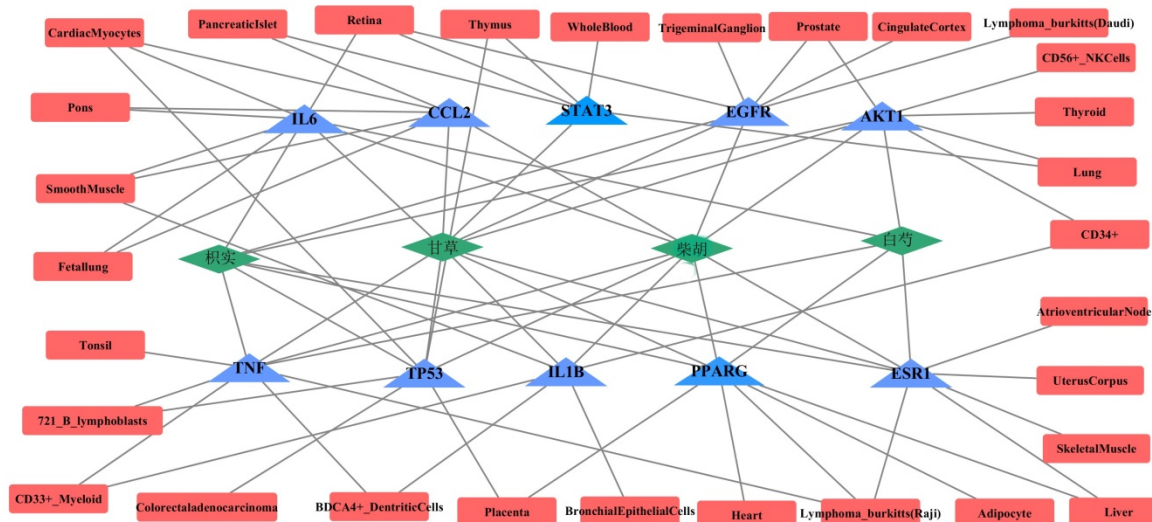
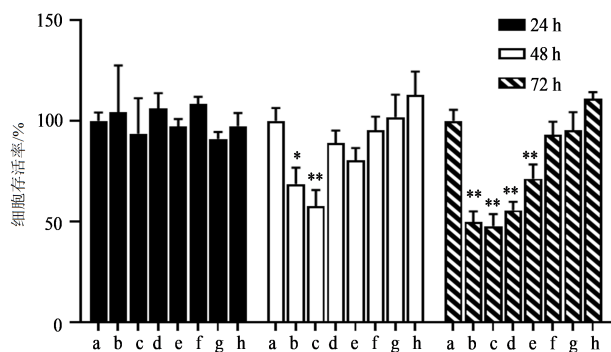


图8 中药材-关键靶点-组织定位网络图

Fig. 8 Network diagram of “traditional Chinese medicine-key targets-organization positioning”



a-对照组;b-模型组;c~h:四逆散 50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg·mL⁻¹;与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

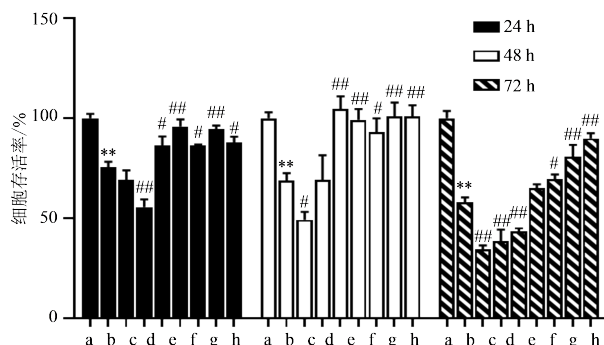
a-control group;b-model group;c-h-Sini Powder 50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg·mL⁻¹; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图9 四逆散对PC12细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 9 Effect of Sini Powder on viability of PC12 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表达明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 24 h 时四逆散 3.125 0、1.562 5 mg·mL⁻¹ 和 48 h 时四逆散 6.250 0、1.562 5 mg·mL⁻¹ 均进一步使模型组 *IL-6* mRNA 表达增多 ($P < 0.01$) (图 11-C)。作用时间为 72 h 时, 模型组 *IL-6* mRNA 表达较对照组极显著下降 ($P < 0.01$), 四逆散 3.125 mg·mL⁻¹ 极明显逆转此下降趋势 ($P < 0.01$) (图 11-D)。

4 讨论

MDD、GAD、BFD 病因复杂, 均与人的情绪存在着极大的相关性, 具有肝郁脾虚证的共同特点。四逆散中的柴胡具有疏肝解郁的功效; 白芍具有养血柔肝、收敛止血的功效; 枳实具有理气解郁、泄热破结的功效; 甘草具有调和诸药、补脾和中的功效,

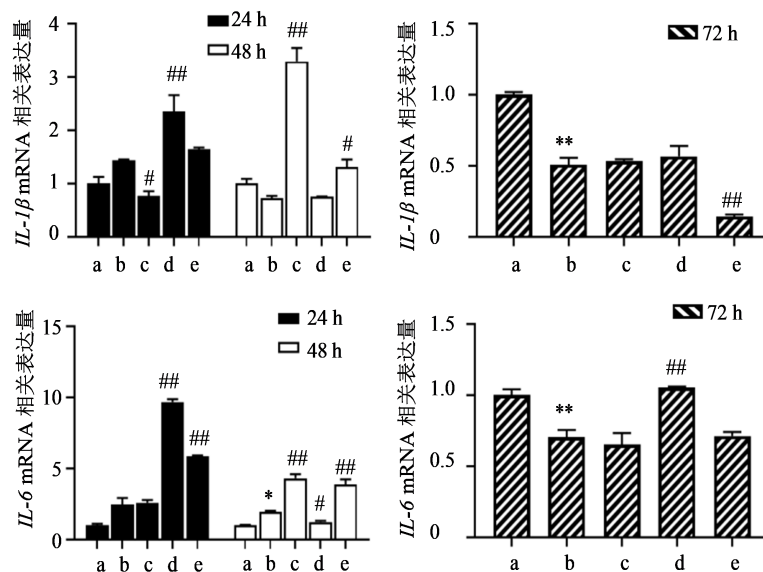


a-对照组;b-模型组;c~h:四逆散 50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg mL⁻¹;与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

a-control group;b-model group;c-h-Sini Powder 50.000 00、25.000 00、12.500 00、6.250 00、3.125 00、1.562 50、0.781 25 mg mL⁻¹; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图10 四逆散对CORT诱导PC12细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 10 Effect of Sini Powder on viability of CORT induced PC12 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

全方四药合用, 共奏疏肝健脾之功^[14]。本研究分析可知四逆散治疗 MDD、GAD、BFD 的靶点为 32 个, 其中 10 个关键靶点对应的成分主要是槲皮素、木犀草素、川陈皮素、甘草查尔酮甲、山柰酚、柚皮素。动物实验研究显示槲皮素可对母体分离、掠食性应激、慢性不可预见性温和应激、LPS、链脲佐菌素、阿霉素所致抑郁行为具有改善作用, 具体机制可能是通过抑制炎症、保护神经、调节 5-羟色胺等单胺类神经递质等实现抗抑郁作用^[15]。槲皮素对焦虑行为和乳腺癌也具有明显的改善作用^[16]。已有研究从自噬、氧化应激和神经炎症反应等方面证实木犀草素、山柰酚可抑制小鼠乳腺炎症反应, 改善抑郁



a-对照组;b-模型组;c~e-四逆散6.250 00、3.125 00、1.562 50 mg mL⁻¹;与对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组相比: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
a-control group b-model group c-e-Sini Powder 6.25000, 3.12500, 1.56250 mg mL⁻¹; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图11 四逆散对CORT诱导PC12细胞IL-1 β 、IL-6 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 11 Effects of Sini Powder on IL-6 and IL-1 β levels in CORT induced PC12 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

和焦虑行为^[17-20]。川陈皮素与焦虑症及乳腺相关疾病的实验研究鲜有报道。从以上的分析可知,单味中药对疾病的治疗具有局限性,而复方能够实现对多种疾病治疗的同病异治。此外网络药理学可从整体层次上更为全面分析四逆散对疾病的治疗作用,为之后的实验研究提供思路。

对四逆散有效成分及3种疾病靶点整合并进行PPI分析后,发现四逆散“异病同治”主要是通过IL6、TNF、TP53、AKT1、EGFR、STAT3、ESR1、PPARG、IL-1 β 和CCL2等关键靶点发挥作用。MDD发病机制存在多种假说,例如单胺假说、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴负反馈失调假说及近期出现的免疫炎症系统失调等。促炎细胞因子如IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等在抑郁症患者血中表达升高。IL-6是一种多效性细胞因子,主要由巨噬细胞等免疫细胞产生。大量研究已显示IL-6与MDD具有密切且稳定的关系,IL-6可能成为治疗MDD的潜在靶点^[21]。焦虑与神经炎症关系密切,天麻素抗焦虑作用与降低海马中IL-6、IL-1 β 、iNOS含量相关^[22-23]。同样炎症也是BFD的诱因之一,BFD与多种乳腺疾病及乳腺癌的发病密切相关。结合已有研究结果和网络药理学推测,本研究通过细胞生物学实验验证了四逆散对IL-6、IL-1 β 表达的影响。IL-6通过两条主要信号通路发挥作用,第一条是经典信号通路,IL-6与膜受体(仅在肝细胞和免疫细胞等表达)结合,迅速诱导肝脏急性期反应蛋白如C-反应蛋

白(CRP)等的产生。第二条是反式信号通路,IL-6与可溶性受体结合形成复合物,此复合物能够与细胞相互作用。IL-6和大脑之间的相互作用大部分都是通过此条信号通路发生的^[24]。在经典和反式信号中,通过JAK/STAT(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)与MAPK(mitogen-activated protein kinase)途径激活细胞内信号。IL-6/STAT3(signal transducers and activators of transcription,能被细胞因子、生长因子和激素等激活的转录因子)信号通路在肿瘤、炎症反应中具有重要作用,STAT3作为IL-6信号通路的下游效应因子可发生磷酸化,磷酸化STAT3进一步入核激活NF- κ B,进而促使TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子表达增多^[25]。而IL-1 β 和TNF能够诱导IL-6的表达^[26]。AKT是PI3K/Akt信号通路的重要组成部分,可调节NF- κ B信号通路,进而调节炎症因子等的产生。MDD、GAD、BFD在女性中的发病率明显高于男性,ESR1在3种疾病的发生、发展中均起到了重要的作用。内皮细胞中,17 β -雌二醇作用于ESR后,STAT3的酪氨酸和丝氨酸残基发生磷酸化后易位入核^[27]。由此可说明四逆散治疗3种不同疾病MDD、GAD、BFD“异病同治”的机制可能是通过不同的途径最终实现对炎症的调节,从而达到治疗效果^[28-30]。

综上所述,四逆散主要作用靶点和通路涉及炎症反应、心脑血管、能量储存与摄取、癌症、应激等生理病理过程,并在细胞水平对炎症因子进行了初步检测。

本研究以中医药理论为依据揭示了四逆散在“异病同治”MDD、GAD、BFD过程中多成分、多靶点、多通路的特点,为临床用药及相关研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf;jsessionid=>
- [2] McCarron R M, Shapiro B, Rawles J, et al. Depression [J]. Ann Intern Med, 2021, 174(5): ITC65-ITC80.
- [3] Thompson K N, Hübel C, Cheesman R, et al. Age and sex-related variability in the presentation of generalized anxiety and depression symptoms [J]. Depress Anxiety, 2021, 38(10): 1054-1065.
- [4] Ren L, Wei Z H, Li Y, et al. The relations between different components of intolerance of uncertainty and symptoms of generalized anxiety disorder: A network analysis [J]. BMC Psychiatry, 2021, 21(1): 448.
- [5] 刘宇飞. 消癥丸对小鼠乳腺增生病及乳腺非典型增生、乳腺癌HCC1937细胞系的作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
Liu Y F. Study on the Mechanism of Xiaozheng Pill on Mouse Breast Hyperplasia, Breast Atypical Hyperplasia and Breast Cancer HCC1937 Cell Line [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.
- [6] Brkić M, Vujović S, Ivović M, et al. The role of e2/p ratio in the etiology of fibrocystic breast disease, mastalgia and mastodynia [J]. Acta Clin Croat, 2018, 57(4): 756-761.
- [7] 徐春燕. 中药复方治疗抑郁症的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
Xu C Y. Clinical study on treatment of depression with traditional Chinese medicine compound prescription [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [8] 吴丹, 高耀, 邢婕, 等. 逍遥散治疗肝郁脾虚型抑郁症的药理作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 187-193.
Wu D, Gao Y, Xing J, et al. Pharmacological mechanism of Xiaoyaosan in treating depression due to liver stagnation and spleen deficiency [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(8): 187-193.
- [9] 陈兆斌, 张博, 刘秀敏, 等. 焦虑症发病机制的研究进展 [J]. 天津中医药, 2018, 35(4): 316-320.
Chen Z B, Zhang B, Liu X M, et al. Research progress on the pathogenesis of anxiety [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2018, 35(4): 316-320.
- [10] 张雅婷, 蔡皓, 段煜, 等. 基于炮制与配伍探究四逆散在抑郁模型大鼠体内代谢成分的差异 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7244-7255.
Zhang Y T, Cai H, Duan Y, et al. Investigation on difference of metabolites of Sini Powder in the depressive rats based on processing and compatibility [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(23): 7244-7255.
- [11] 李娅玲. 香砂六君子汤合四逆散加减治疗胆囊切除术后肝郁脾虚型腹泻的临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
Li Y L. Clinical Observation on Treating Diarrhea of Liver Depression and Spleen Deficiency after Cholecystectomy with Xiangsha Liujunzi Decoction and Sini Powder [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2020.
- [12] 智华, 苏娟萍. 苏娟萍教授运用四逆散治疗郁证临床经验探析 [C]//第三十一届全国中西医结合消化系统疾病学术会议论文集. 济南, 2019: 276.
Luan H, Su J P. An Exploration of Professor Su Juanping's Clinical Experience in Treating Depression with Sini Powder[C] Proceedings of the 31st National Conference on Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Digestive System Diseases. Jinan, 2019: 276.
- [13] 韩立杰. 关于中医异病同治理论的研究 [J]. 中国社区医师, 2020, 36(8): 93-94.
Han L J. Research on the theory of treating different diseases with the same treatment in Chinese medicine [J]. Chin Community Dr, 2020, 36(8): 93-94.
- [14] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [15] 王叶情, 王宇红, 邹蔓姝, 等. 槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 53(5): 1548-1557.
Wang Y Q, Wang Y H, Zou M S, et al. Research progress on antidepressant effect of quercetin and their glycoside derivatives and their mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 53(5): 1548-1557.
- [16] Lee B, Yeom M, Shim I, et al. Protective effects of quercetin on anxiety-like symptoms and neuroinflammation induced by lipopolysaccharide in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 4892415.
- [17] 牟瑞营, 马国成, 郭光礼, 等. 木犀草素对LPS诱导的小鼠乳腺炎保护作用研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(3): 181-184, 295.

- Mu R Y, Ma G C, Guo G L, et al. Study on the protective effect of luteolin on LPS-induced mastitis in mice [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2017(3): 181-184, 295.
- [18] Cordaro M, Cuzzocrea S, Crupi R. An update of palmitoylethanolamide and luteolin effects in preclinical and clinical studies of neuroinflammatory events [J]. Antioxidants, 2020, 9(3): 216.
- [19] 张胜, 张尧, 李彪, 等. 山奈酚对CUMS抑郁模型大鼠海马神经元过度自噬和氧化应激损伤的保护作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(2): 146-150, 155.
- Zhang S, Zhang Y, Li B, et al. Protective effects of kaempferol on autophagy-and oxidative stress-mediated injury of hippocampal neuron in CUMS-induced depression model rats [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(2): 146-150, 155.
- [20] Ahmad H, Rauf K, Zada W, et al. Kaempferol facilitated extinction learning in contextual fear conditioned rats via inhibition of fatty-acid amide hydrolase [J]. Molecules, 2020, 25(20): 4683.
- [21] Roohi E, Jaafari N, Hashemian F. On inflammatory hypothesis of depression: What is the role of IL-6 in the middle of the chaos? [J]. J Neuroinflamm, 2021, 18(1): 45.
- [22] Gomes J A S, Silva J F, Marçal A P, et al. High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice [J]. J Nutr Biochem, 2020, 77: 108317.
- [23] Peng Z, Wang H, Zhang R, et al. Gastrodin ameliorates anxiety-like behaviors and inhibits IL-1 β level and p38 MAPK phosphorylation of hippocampus in the rat model of posttraumatic stress disorder [J]. Physiol Res, 2013, 62 (5): 537-545.
- [24] Kelly K M, Smith J A, Mezuk B. Depression and interleukin-6 signaling: A mendelian randomization study [J]. Brain Behav Immun, 2021, 95: 106-114.
- [25] 蓝颖, 张可锋, 连苑宇, 等. 基于IL-6/JAK2/STAT3信号通路研究岩白菜素对急性肝损伤大鼠的保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1445-1451.
- Lan Y, Zhang K F, Lian Y Y, et al. Study on the protective effect of bergenin on acute liver injury in rats based on IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33(9): 1445-1451.
- [26] 张伟洁, 郑宏. IL-6介导免疫炎症反应作用及其与疾病关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33 (5): 699-703.
- Zhang W J, Zheng H. Research progress of IL-6-mediated immune inflammatory response and its relationship with diseases [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2017, 33(5): 699-703.
- [27] Björnström L, Sjöberg M. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(10): 2202-2214.
- [28] 漆哲宁, 彭晓明, 刘立, 等. 中药有效成分和复方调控焦虑症相关信号通路研究进展 [J/OL]. 中成药, 2024: 1-7. (2024-03-27). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240325.1845.002.html>.
- Qi Z N, Peng X M, Liu L, et al. Progress in the regulation of anxiety-related signaling pathways by active ingredients and complexes of traditional Chinese medicines [J/OL]. Chin Tradit Pat Med, 2024: 1-7. (2024-03-27). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240325.1845.002.html>.
- [29] 李艳明, 马秀兰, 黄仕琦, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨大补肝汤治疗广泛性焦虑症的作用机制 [J/OL]. 中国中药杂志, 1-14. [2024-05-14]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20240221.502>.
- Li Y M, Ma X L, Huang S Q, et al. Mechanism of Dabugan Decoction in treatment of generalized anxiety disorder based on network pharmacology and experimental verification [J/OL]. China J Chin Mater Med, 2024: 1-14. (2024-05-14). <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20240221.502>.
- [30] Fries G R, Saldana V A, Finnstein J, et al. Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse [J]. Mol Psych, 2023, 28: 284-297.

[责任编辑 齐静雯]