

## 基于网络药理学与体外实验探究柴胡疏肝散改善抑郁症的作用机制

谢林倩<sup>1</sup>, 芦芳<sup>1</sup>, 张忠强<sup>1</sup>, 刘嘉璐<sup>1</sup>, 王堰<sup>1</sup>, 付金蕾<sup>1</sup>, 张悦<sup>1</sup>, 王文文<sup>2</sup>, 周玉<sup>2</sup>, 徐红丹<sup>1,2\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 无锡卫生高等职业技术学校 药学系, 江苏 无锡 214028

**摘要:** **目的** 评价柴胡疏肝散(CSP)对抑郁症的药效学影响,并探究CSP治疗抑郁症的关键有效入脑成分及潜在作用机制。**方法** 制备慢性社交挫败应激(CSDS)小鼠模型,模型组、CSP(6.46 g·kg<sup>-1</sup>)组和氟西汀(10 mg·kg<sup>-1</sup>)组分别ig给药12 d,通过行为学测试评估各组小鼠的社交能力以及抑郁程度;苏木素-伊红(HE)、尼氏染色观察海马神经元与尼氏体状态;采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术全面分析CSP的原型入脑成分。通过Pubchem、SwissTargetPrediction查找CSP原型入脑成分对应的靶点,通过GeneCards查找抑郁症相关基因,绘制疾病与入脑成分相关基因的Venn图。根据成分及作用靶点制作成分-靶点网络图。将STRING数据库导出的靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)数据导入Cytoscape3.9.1软件,构建PPI网络,调用Centiscape2.2插件对网络节点进行拓扑分析,计算各节点的关键中心性参数,以各参数的平均值为筛选阈值得到同时满足3项阈值条件的节点,作为核心靶点。使用微生信对核心靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。最后建立神经元应激模型,以CCK-8法、TUNEL染色法、JC-1试剂盒和Western blotting法对关键有效入脑成分柴胡皂苷A的作用机制进行验证。**结果** CSP对小鼠的抑郁样行为和海马神经元具有改善保护作用。利用网络药理学对UPLC-Q-TOF-MS鉴定出的9个原型入脑成分治疗抑郁靶点进行预测,聚焦到柴胡皂苷A是CSP中发挥抗抑郁作用的关键入脑成分,其作用机制可能与改善细胞凋亡有关,最后通过体外实验对其进行验证,从机体-细胞-分子层面,得出柴胡皂苷A通过对线粒体膜电位产生影响,并上调B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)的表达,下调Bcl-2相关X(Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和Caspase-9的表达发挥抗抑郁的作用。**结论** CSP中发挥抗抑郁的关键入脑成分为柴胡皂苷A,其机制与改善细胞凋亡有关。

**关键词:** 柴胡疏肝散;抑郁;成分分析;网络药理学;柴胡皂苷A;凋亡

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)08-2751-12

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.012

## Mechanism of Chaihu Shugan Powder alleviates depression: A study integrating network pharmacology and *in vitro* experimental validation

XIE Linqian<sup>1</sup>, LU Fang<sup>1</sup>, ZHANG Zhongqiang<sup>1</sup>, LIU Jialu<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, FU Jinlei<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, WANG Wenwen<sup>2</sup>, ZHOU Yu<sup>2</sup>, XU Hongdan<sup>1,2</sup>

1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Department of Pharmacy, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the pharmacodynamic effects of Chaihu Shugan Powder (CSP) in treating depression and to identify its key brain-penetrating active components, as well as to elucidate the underlying mechanisms. **Methods** A chronic social defeat stress (CSDS) mouse model was established, and the model group, CSP group (6.46 g·kg<sup>-1</sup>), and fluoxetine group (10 mg·kg<sup>-1</sup>) were administered ig for 12 d, respectively. Depression-like behaviors and social ability were assessed using a battery of behavioral tests. Hippocampal neuronal morphology and Nissl body status were examined by hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining. The prototype brain-penetrating components of CSP were comprehensively analyzed using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). Putative targets of these components were retrieved from PubChem and SwissTargetPrediction databases, while depression-related genes were obtained from GeneCards. A Venn diagram was generated to identify overlapping genes between CSP components and depression. A component-target network was constructed, and

收稿日期: 2026-02-25

作者简介: 谢林倩, 硕士研究生, 主要从事中药防治精神疾病的机制研究。E-mail: 1993276008@qq.com

\*通信作者: 徐红丹, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药防治精神疾病的作用及机制研究。E-mail: xuhd8431@126.com

protein-protein interaction (PPI) data retrieved from the STRING database were imported into Cytoscape 3.9.1 to establish a PPI network. Topological analysis was performed using the Centiscape 2.2 plugin, and nodes satisfying all three predefined threshold criteria were defined as core targets. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted using the microbioinformatics platform. Finally, a neuronal stress model was established, and the mechanism of the key brain-penetrating component, saikosaponin A, was validated using CCK-8 assay, TUNEL staining, JC-1 kit, and Western blotting. **Results** CSP significantly ameliorated depression-like behaviors and protected hippocampal neurons in mice. Network pharmacology analysis of the nine prototype brain-penetrating components identified by UPLC-Q-TOF-MS revealed that saikosaponin A was the key antidepressant component, and its mechanism was closely associated with the regulation of apoptosis. Subsequent *in vitro* validation confirmed that saikosaponin A exerted its antidepressant effects by modulating mitochondrial membrane potential, upregulating Bcl-2 expression, and downregulating the expression of Bax, Caspase-3, and Caspase-9 at both the organismal, cellular, and molecular levels. **Conclusion** The key brain-penetrating component responsible for the antidepressant action of CSP is saikosaponin A, and its therapeutic mechanism involves the inhibition of neuronal apoptosis.

**Key words:** Chaihu Shugan Powder; depression; compositional analysis; network pharmacology; saikosaponin A; apoptosis

抑郁症是一种发病率逐年上升的慢性疾病,以情绪低落、精力不足、悲伤、失眠和无法享受生活为主要特点,常常影响个体的工作、学习和社交能力<sup>[1]</sup>。有研究表明海马中神经元凋亡增加与抑郁症密切相关<sup>[2]</sup>。细胞凋亡作为细胞消亡的一种程序性过程,对于多细胞生物而言是不可或缺的生理机制。大脑的某些功能取决于神经元死亡和新生之间的微妙平衡,应激刺激可能通过影响海马脑区神经元死亡速度打破这个微妙的平衡,所以抑制神经元凋亡是改善抑郁的关键<sup>[2]</sup>。中医认为情绪不畅会引发身体内部的气机紊乱,进而会导致肝脏功能受阻,郁积成火,使得情绪问题更加严重。因此疏肝解郁、调和五脏以及调整脑神经功能是治疗抑郁症的重要途径。柴胡疏肝散(CSP)出自《医学统旨》,由柴胡、川芎、香附、陈皮、枳壳、白芍、甘草 7 味药组成,具有疏肝理气、活血止痛之功效。现代药理学研究表明,CSP 可改善抑郁患者的抑郁状态,且安全性较高<sup>[3-4]</sup>,故本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析 CSP 的化学成分,通过网络药理学结合体外实验对其进行系统研究,探索 CSP 发挥抗抑郁的关键活性成分及其作用机制,为 CSP 的后续临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与动物

CSP 组方药材(柴胡、陈皮各 6 g, 香附、枳壳、川芎、白芍各 4.5 g, 甘草 1.5 g)购自北京同仁堂药店(哈尔滨店),经黑龙江中医药大学孙惠峰教授鉴定为正品。制备方法参照《中国药典》2025 年版<sup>[5]</sup>。8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 55 只,体质量(20±2) g,生产许可证号 SCXK(浙)2022-0005,购自杭州启真实验动物科技有限公司;退役 CD1 鼠 40 只,SPF

级,体质量(215±15) g,生产许可证号 SCXK(浙)2019-0004,购自杭州子源实验动物科技有限公司。饲养条件温度为(21±1)℃,相对湿度为(60±10)%,昼夜光照,食水、饲料自由。适应环境 1 周后,进行正式实验。动物实验获得黑龙江中医药大学动物伦理委员会的批准(2024032913)。

### 1.2 细胞株

SH-SY5Y 神经元细胞(CX0092),购自于武汉博士德生物科技有限公司。

### 1.3 试剂

甲苯胺蓝(货号 T104232)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号 20230310)购自北京索莱宝科技有限公司;乙腈(货号 E670105)购自美国 Fisher 公司;甲醇(货号 E-BC-R187)购自美国 Dikma 公司;甲酸(货号 E-BC-R115)购自美国 TEDIA 公司;甘草次酸(货号 B29042,质量分数≥95%)、柴胡皂苷 A(SSA,货号 B20146,质量分数≥98%)、柚皮苷(货号 B21594,质量分数≥98%)、甘草苷(货号 B20414,质量分数≥98%)、阿魏酸(货号 S31399,质量分数≥99%)、洋川芎内酯 A(货号 B21461,质量分数≥98%)、芍药苷(货号 B21148,质量分数≥98%),购自上海源叶生物科技有限公司。氟西汀(货号 230204)购自宝鸡辰光生物公司。 $\beta$ -actin 单克隆抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X(Bax)抗体、半胱天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)抗体、Caspase-3 抗体(货号 BM3873、BA1054、A00040、BA0315-2、BM461、Bs-0081R),均购自武汉博士德生物工程有限公司;GACPHA、BeyoECL Plus、TUNEL 染色试剂盒、JC-1 试剂盒(货号 AF0006、P0018S、C1088、C2003S),均购自

上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.4 仪器

SCIEX ExionLC AD 液相色谱仪、SCIEX 5600+Q-TOF 质谱仪(美国 AB sciex 公司);Bionoon-VAC1 型真空浓缩仪(上海般诺生物科技有限公司);HH.CP-160Q 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);STL-CKXRFA4 型 Olympus 倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社);ST-360 型酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司);JY-SCZ2<sup>+</sup>通用电泳仪电源、垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);Tanon 5200 Multi 型化学发光成像仪(上海天能生命科学有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠模型构建与分组

**2.1.1 慢性社交挫败应激(CSDS)模型构建** 筛选实验动物时剔除体质量偏差显著的 C57BL/6 小鼠,剩余 48 只小鼠随机分为 2 组:对照组 12 只,模型组 36 只。模型组的小鼠接受 CD1 小鼠为期 10 d 的攻击后,采用社交互动(SI)实验验证抑郁模型的构建是否成功<sup>[6]</sup>

**2.1.2 分组** 选择未经造模的 C57BL/6 小鼠作为对照组,CSDS 模型鼠随机分为模型组、CSP 组和氟西汀组,每组各 12 只。CSP 的成人临床用药剂量为 0.525 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,参照《药理实验方法学》<sup>[7]</sup>,等效剂量换算系数为 12.3,CSP 组 ig 给药 CSP (0.6 g·mL<sup>-1</sup>) 剂量为 6.46 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,氟西汀组 ig 给药氟西汀药液剂量为 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>。对照组及模型组均 ig 给予等量蒸馏水,各组连续给药 21 d,第 22 天进行动物行为学实验。

### 2.2 行为学实验

参考常欣等<sup>[9]</sup>的行为学检测方法,进行 SI 实验、悬尾实验(TST)和强迫游泳实验(FST),分别记录小鼠的社交互动时间和不动时间,评价小鼠的抑郁程度。

### 2.3 HE 染色和尼氏染色

行为学实验结束后,各组随机选取 6 只小鼠,麻醉后经心脏灌注取脑组织。脑组织经 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后,切成 4~6 μm 厚切片。按照说明书进行 HE 与尼氏染色,以观察各组海马神经元形态学变化,并评估海马损伤程度。

### 2.4 脑组织样品的采集和处理

精密称取 25 mg 脑组织,加入 500 μL 预冷的匀浆溶液(甲醇-乙腈-水 2:2:1),匀浆后 4 °C 超声

15 min,于-20 °C 冰箱中静置 1 h,4 °C、13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液,干燥后用 200 μL 50%的乙腈溶液复溶,待上机进样。

### 2.5 混合对照品溶液的配制

精密称取甘草次酸、SSA、柚皮苷、甘草苷、阿魏酸、洋川芎内酯 A、芍药苷于量瓶中,用纯甲醇溶液定容至刻度线。稀释成合适的浓度放于进样小瓶中,待上机检测。

### 2.6 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱(0~4 min, 95%~85% A; 4~8 min, 85%~70% A; 8~16 min, 70%~30% A; 16.0~16.5 min, 30%~15% A; 16.5~20.5 min, 15%~10% A; 20.5~30.0 min, 10%~95% A);柱温 40 °C;体积流量 0.4 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 5 μL。

### 2.7 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,分别用 *m/z* 100~1 200、*m/z* 50~1 200 进行一级质谱和二级质谱扫描,各气路使用氮气。扫描类型 TOF;离子化电压 5 500 V/-4 500 V;喷雾气、辅助加热气 344.74 kPa;气帘气 241.32 kPa;温度 550 °C;锥孔电压 90 V;一级质谱碰撞能量 10 V/-10 V;二级质谱碰撞能量 40 V/-40 V。

### 2.8 数据处理

通过检索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)、Pumchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、中国学术期刊全文数据库(CNKI),将文献中 CSP 组方药材相关的化合物进行收集整理。利用 sdf studio 软件建立化学成分数据库,包括化合物的名称、结构、化学式、精确相对分子质量等信息。利用 Progenesis QI 软件将质谱数据按脑样、体外及混和对照品分别进行峰对齐、峰提取、鉴定标志物等处理,得到包含离子碎片、保留时间、质核比以及峰面积数据。将色谱图导入 Peakview 软件,将化合物的保留时间、精确相对分子质量、元素组成、同位素丰度和一级质谱图(误差 5×10<sup>-6</sup>)、二级质谱图(误差 10×10<sup>-6</sup>)等信息作为成分鉴定的依据,进行化学成分确定。

### 2.9 网络药理学分析

**2.9.1 CSP 入脑成分抗抑郁疾病的靶点预测** 在 Pubchem (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、

SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库整合本研究鉴定的 CSP 入脑成分的作用靶点。以“depression”为关键词,在 GeneCards 人类基因数据库 (<https://www.genecards.org/>) 筛选出抑郁症相关靶点,将得到的结果与 CSP 入脑成分的作用靶点进行对比取交集,绘制 Venn 图。

**2.9.2 CSP 主要作用成分筛选** 将 CSP 入脑成分及其作用靶点制作 NetWork 和 Type 文件,导入 Cytoscape3.9.1 软件中,运用软件中 Import Network from File 进行分析,制作成分-靶点网络图,推测 CSP 入脑成分中抗抑郁的关键成分。

**2.9.3 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图与成分-靶点通路** 在 STRING 数据库输入交集靶点,设置物种为“人类 (Homo sapiens)”,置信度 0.4,获取靶蛋白相互作用数据,将数据导入 Cytoscape3.9.1 软件构建 PPI 网络。调用 Centiscape 2.2 插件对网络节点进行拓扑分析,计算各节点的关键中心性参数。以各参数的平均值为筛选阈值 [度 (Degree) 值 > 33.87,介数中心性 (BC) > 556.26,接近中心性 (CC) > 0.001 02],筛选满足 3 项阈值条件的节点作为本研究的核心靶点。

**2.9.4 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析** 将核心靶点基因列表导入微生信在线平台,采用平台默认参数进行 GO 和 KEGG 富集分析,以  $P < 0.05$ 、 $FDR < 0.05$  为筛选标准,根据自动生成导出的可视化结果分析 CSP 入脑成分治疗抑郁的主要信号通路及生物过程。

## 2.10 细胞培养

SH-SY5Y 神经元细胞用含 14%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 完全培养基置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,当细胞密度达到 80%~90%进行细胞传代。

## 2.11 细胞分组

SH-SY5Y 神经元细胞分为对照组、模型组、SSA 组和氟西汀组。

## 2.12 细胞给药和 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,调整细胞悬液浓度为每 mL  $5 \times 10^4$  个,接种于 96 孔板中,每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液 (每孔  $5 \times 10^3$  个细胞),培养 24 h 后,加入不同浓度的皮质酮 (0~800  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 或 SSA (0.3~10.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 处理 24 h,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8,37 °C 避光孵育 1 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值,根据细胞活力筛选出皮质酮适宜的造模浓度以及 SSA 的安全给药范围。根

据筛选结果模型组最终加入浓度为 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的皮质酮溶液,SSA 组在此培养 24 h 的基础上继续加入不同浓度的 SSA 含药培养基 (0.3~5.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),计算各组的细胞活力筛选出 SSA 的最佳有效浓度。氟西汀组加入的完全培养液含有浓度为 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的氟西汀。

## 2.13 TUNEL 染色

取各组 SH-SY5Y 细胞重悬于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,吸取 50~100  $\mu$ L (每毫升  $2 \times 10^7$  个细胞) 悬液滴于多聚赖氨酸包被的载玻片上。4 °C 下,4%多聚甲醛固定 25 min,0.2% Triton X-100 透化细胞,在 PBS 溶液中浸没清洗样本 2~3 次后,放在湿盒中保存。根据说明书进行后续步骤,通过显微镜观察和拍照。

## 2.14 JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位

按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书配制并稀释工作液,稀释后的工作液加入接种了细胞的 24 孔板中,培养箱中避光孵育 30 min。用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤 2 次,通过显微镜观察和拍照。

## 2.15 Western blotting 法检测蛋白表达情况

使用 BCA 试剂盒检测各组细胞蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 法分离蛋白,转移至 PVDF 膜,室温封闭 2 h,与适量稀释的一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜,洗去一抗,将膜与二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,使用超敏发光液曝光蛋白条带,采用 Image J 软件进行蛋白质定量分析。

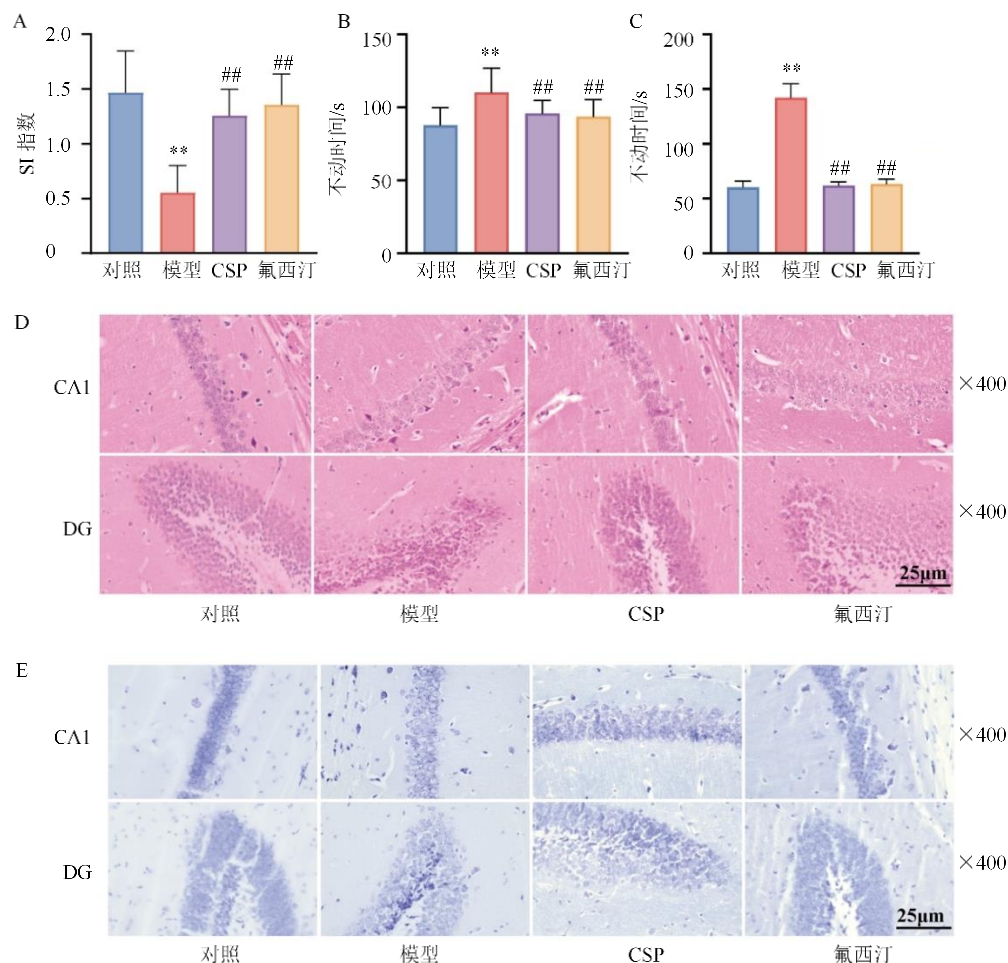
## 2.16 统计学处理

采用 GraphPad 统计软件对数据进行处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布和方差齐性检验,采用单因素方差分析 (Oneway-ANOVA),组间两两比较应采用 LSD 检验,统计后采用 S-N-K 进行校正。

## 3 结果

### 3.1 CSP 对模型小鼠抑郁样行为与海马组织形态学的影响

通过 SI、TST 和 FST 行为学测试评估小鼠的抑郁样行为,与对照组相比,模型组表现出抑郁样行为,但与模型组相比,CSP 组和氟西汀组的 SI 指数显著增加,TST、FST 不动时间显著减少 ( $P < 0.01$ ) (图 1-A、C)。表明 CSP 可以改善 CSDS 模型小鼠的抑郁行为。HE 染色结果发现,与对照组相比,模型组海马 DG 和 CA1 区神经元数量较少且排列松散无序,细胞核有核固缩现象,与模型组相比,CSP 组和氟西汀组海马 DG 和 CA1 区细胞排列稍整齐、



A-各组小鼠社交互动率; B-各组小鼠在 TST 中不动时间; C-各组小鼠在 FST 中不动时间; D-各组小鼠海马 DG、CA1 区神经元形态; E-各组小鼠海马 DG、CA1 区尼氏小体形态; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

A-social interaction rate of mice in each group; B-immobility time of mice in each group during TST; C-immobility time of mice in each group during FST; D-neuron morphology in DG and CA1 regions of the hippocampus of mice in each group; E-Nissl body morphology in DG and CA1 regions of the hippocampus of mice in each group; \*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group.

图 1 CSP 抗抑郁药效评价结果 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Fig. 1 Results of anti-depressive efficacy evaluation of CSP ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

细胞间隙缩小, 深染或固缩的细胞减少 (图 1-D)。尼氏染色结果发现, 与对照组相比, 模型组小鼠海马 DG 和 CA1 区细胞排列松散无序, 胞体内尼氏体数量明显减少, 着色淡, 与模型组相比, CSP 组和氟西汀组海马 DG 和 CA1 区细胞胞体内尼氏体丰富致密, 数量明显增加, 着色深 (图 1-E)。表明 CSP 对小鼠海马区细胞的病理损伤有改善作用。以上结果证明 CSP 能改善模型小鼠的抑郁样行为和海马区神经元的病理损伤。

### 3.2 CSP 入脑成分分析

按“2.6”和“2.7”项方法进行数据采集与分析, CSP 供试品溶液、对照组小鼠以及 CSP 组小鼠的脑组织的质谱基峰色谱图见图 2。按“2.8”项方法分

析, 最终从 CSP 中鉴定出原型入脑成分共 9 个, 包括原儿茶酸、阿魏酸、橙皮素、丹皮酚、柚皮素、甘草酸、毛蕊异黄酮、洋川芎内酯 A、SSA, 其质谱信息见表 1。

### 3.3 基于网络药理学预测 CSP 入脑成分治疗抑郁的相关靶点

**3.3.1 CSP 主要作用成分筛选** 数据库收集原儿茶酸、阿魏酸、橙皮素、丹皮酚、柚皮素、甘草酸、毛蕊异黄酮、洋川芎内酯 A、SSA 的作用靶点, 去重后共 494 个, 将成分靶点与 17 618 个抑郁有关的疾病靶点取交集, 交集靶点共有 447 个。根据筛选得到的活性成分及对应的靶点基因制作成分-靶点网络图, 发现 SSA 调控靶点数量最多、核心靶点占

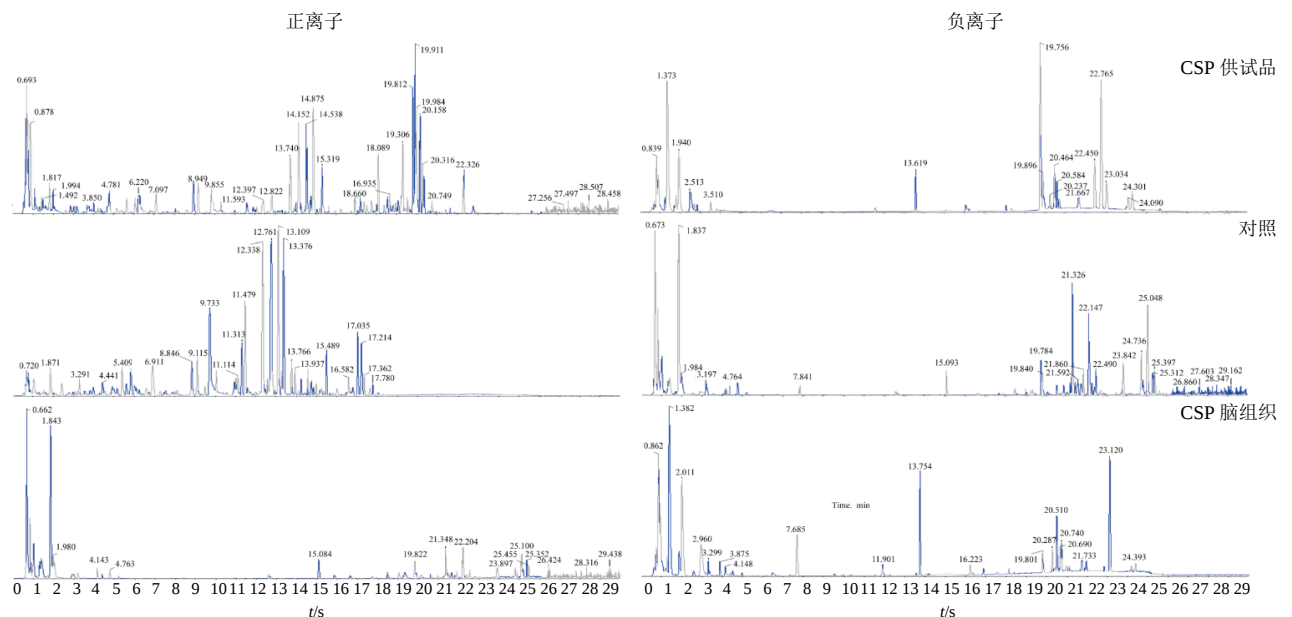


图 2 正、负离子模式下脑组织 BPC 图  
Fig. 2 BPC image of brain tissue in positive and negative ion mode

表 1 CSP 原型入脑的化学成分信息

Table 1 Chemical composition information of CSP prototype entering brain

| 序号 | <i>t</i> <sub>R</sub> /min | 分子式                                             | 误差 (×10 <sup>-6</sup> ) | 质荷比       | 电离模式               | 主要二级碎片 ( <i>m/z</i> )         | 成分     | 化合物类型 |
|----|----------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------|--------------------|-------------------------------|--------|-------|
| P1 | 3.42                       | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | -2.82                   | 153.021 5 | [M-H] <sup>-</sup> | 109.021 8、91.019 6、65.003 0   | 原儿茶酸   | 酚酸类   |
| P2 | 6.12                       | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | -3.09                   | 193.051 7 | [M-H] <sup>-</sup> | 178.026 9、149.995 0、134.036 6 | 阿魏酸    | 酚酸类   |
| P3 | 11.59                      | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 4.29                    | 283.062 5 | [M-H] <sup>-</sup> | 242.122 6、164.010 5           | 橙皮素    | 黄酮类   |
| P4 | 12.37                      | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>   | -3.05                   | 167.048 6 | [M+H] <sup>+</sup> | 136.701 2、120.803 1           | 丹皮酚    | 酚类    |
| P5 | 12.69                      | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 4.21                    | 271.062 3 | [M-H] <sup>-</sup> | 137.023 3、119.048 7、151.002 4 | 柚皮素    | 黄酮类   |
| P6 | 15.78                      | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub> | 1.19                    | 822.394 0 | [M-H] <sup>+</sup> | 453.336 3、435.325 7、317.212 6 | 甘草酸    | 皂苷类   |
| P7 | 15.92                      | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | -4.12                   | 285.074 6 | [M+H] <sup>+</sup> | 137.023 3、211.039 2           | 毛蕊异黄酮  | 黄酮类   |
| P8 | 20.37                      | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 1.24                    | 193.122 4 | [M+H] <sup>+</sup> | 175.113 0、147.117 4           | 洋川芎内酯A | 苯酚类   |
| P9 | 21.12                      | C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> | 4.78                    | 779.471 7 | [M-H] <sup>-</sup> | 617.415 0                     | SSA    | 皂苷类   |

比最高，其作用靶点与改善氧化应激损伤、减少神经元凋亡、增强神经保护作用有关，推测 SSA 可能是 CSP 发挥抗抑郁作用主要活性成分（图 3）。

**3.3.2 构建 CSP-抑郁症的 PPI 网络图** CSP 潜在作用靶点的 PPI 网络图发现 TNF、IL1B、SRC、ALB、EGFR、ESR1、STAT3、CTNNB1、BCL2 等靶点的 degree 值最高，为网络核心枢纽靶点（图 4）。

**3.3.3 构建 CSP 入脑成分靶点通路图** 成分-靶点通路图发现 CSP 的 9 个入脑成分主要通过靶向炎症调控、抗凋亡、神经递质调节、雌激素调节等多维度的 86 个潜在靶点，协同调控 Lipid and atherosclerosis、Hepatitis B、AGE-RAGE signaling

pathway in diabetic complications、Prostate cancer 等 10 条核心信号通路，从多个层面发挥对抑郁的治疗作用（图 5）。

**3.3.4 核心靶点 GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析结果** GO 和 KEGG 通路富集分析结果可知，GO 分析中，生物过程（BP）主要包括对外源生物的反应、对脂多糖的反应等；细胞组成（CC）主要包括膜筏、膜微区等；分子功能（MF）则主要涉及与 RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、与 DNA 结合转录因子结合等。KEGG 结果则显示，CSP 的潜在作用靶点主要富集于 Hepatitis C、MAPK signaling pathway 等信号通路（图 6、7）。

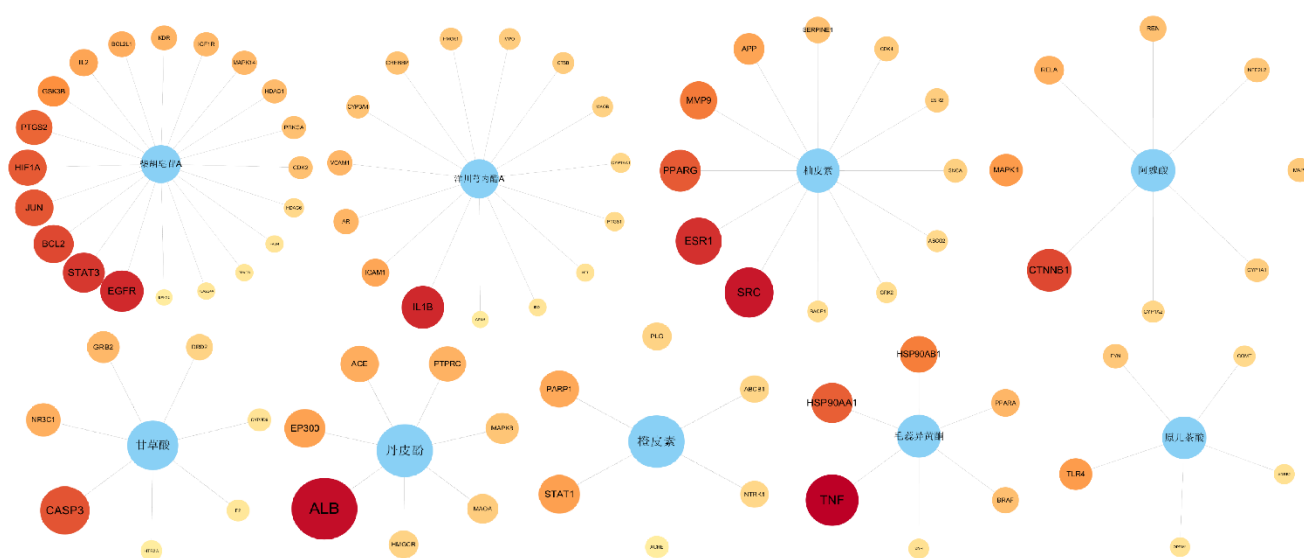


图 3 成分-靶点网络图

Fig. 3 Component-target network diagram

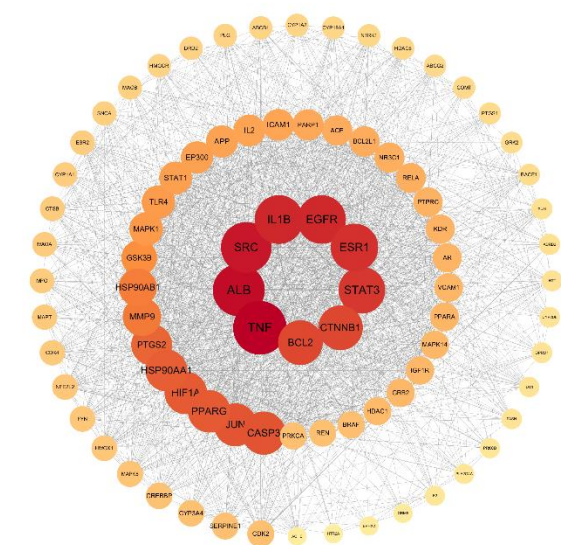


图 4 CSP-抑郁症 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of CSP-depression

### 3.4 SSA 对皮质酮诱导的 SH-SY5Y 神经元具有保护作用

**3.4.1** 皮质酮诱导 SH-SY5Y 神经元应激模型建立 使用不同浓度的皮质酮处理 SH-SY5Y 神经元细胞, 皮质酮浓度为  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 SH-SY5Y 细胞的存活率约为 50% ( $P<0.01$ ), 接近半数致死量, 因此选取此浓度作为造模处理浓度 (图 8-A)。

**3.4.2** SSA 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 使用不同浓度 SSA 处理 SH-SY5Y 细胞, 当 SSA 的浓度为

$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率低于 90% ( $P<0.01$ ), 因此选择浓度  $0.3\sim 5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SSA 进行后续实验 (图 8-B)。

**3.4.3** 不同浓度 SSA 对皮质酮损伤 SH-SY5Y 细胞活力的影响 观察  $0.3\sim 5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SSA 对造模处理后的 SH-SY5Y 细胞的影响, 其中在浓度为  $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  是最为显著, 因此选取  $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SSA 用于后续研究 (图 8-C)。

**3.4.4** TUNEL 染色法检测细胞凋亡 TUNEL 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组凋亡的 SH-SY5Y 细胞显著增加; 与模型组相比, SSA 及氟西汀组凋亡的 SH-SY5Y 细胞显著减少 ( $P<0.01$ ) (图 9-A、B)。

**3.4.5** JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位 JC-1 荧光探针检测结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞线粒体膜电位降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, SSA 组及氟西汀组线粒体膜电位升高 ( $P<0.01$ ) (图 9-C、D)。

**3.4.6** Western blotting 检测细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平 与对照组相比, 模型组 SH-SY5Y 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白的表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。与模型组相比, SSA 组 SH-SY5Y 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白的表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。见图 10。



图 5 CSP 入脑成分靶点通路

Fig. 5 CSP brain-penetrating component target pathway diagram

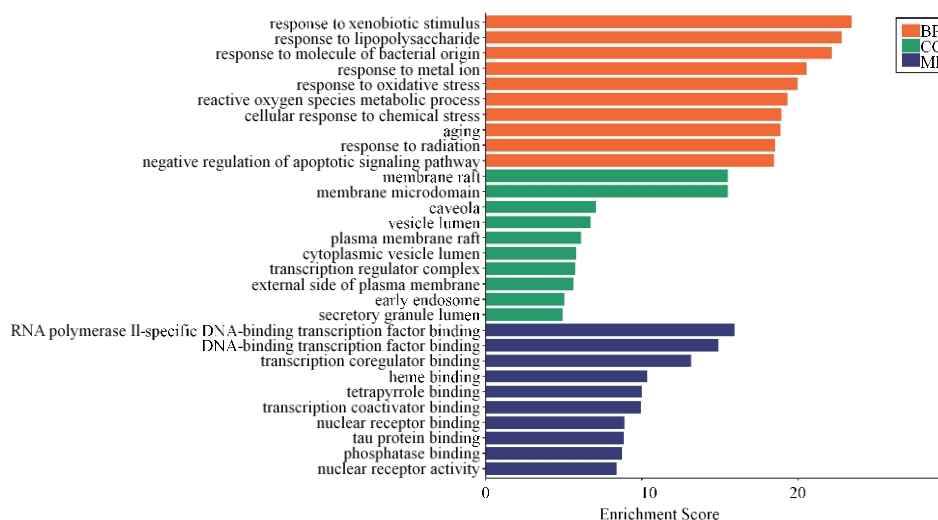


图 6 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis

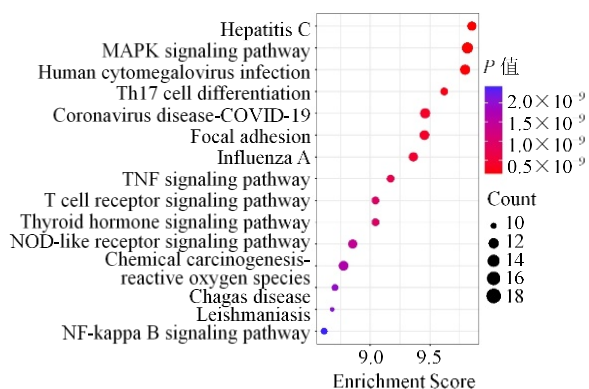


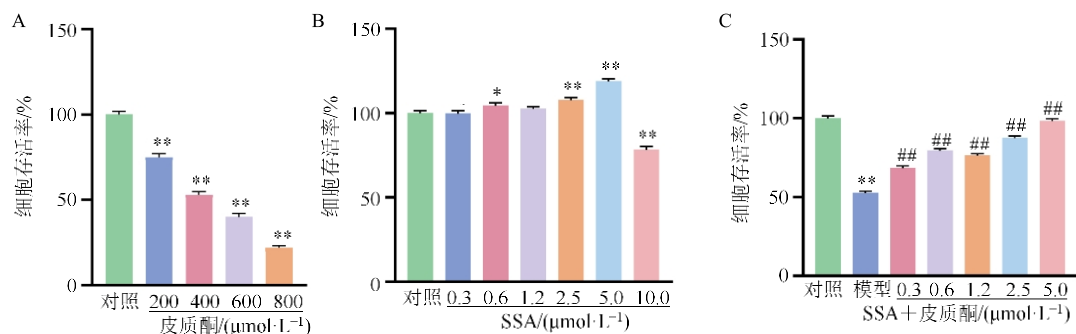
图 7 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis

## 4 讨论

CSP 含有黄酮类、皂苷类、酚酸类、萜类等多种成分可以发挥抗抑郁作用<sup>[10]</sup>, 但是抗抑郁的关键成分及作用机制研究鲜有报道, 因此本研究综合运用成分分析、网络药理学与体内外实验, 系统分析该方治疗抑郁症的关键成分与潜在机制。

本研究通过行为学测试、HE 与尼氏染色确定了 CSP 的抗抑郁药效, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 CSP 进行成分分析, 鉴定出原型入脑成分共 9 个, 包括原儿茶酸、阿魏酸、橙皮素、丹皮酚、柚皮素、甘草酸、毛蕊异黄酮、洋川芎内酯 A、SSA。经查阅文献发现 CSP 具有调控神经递质、纠正下丘脑-

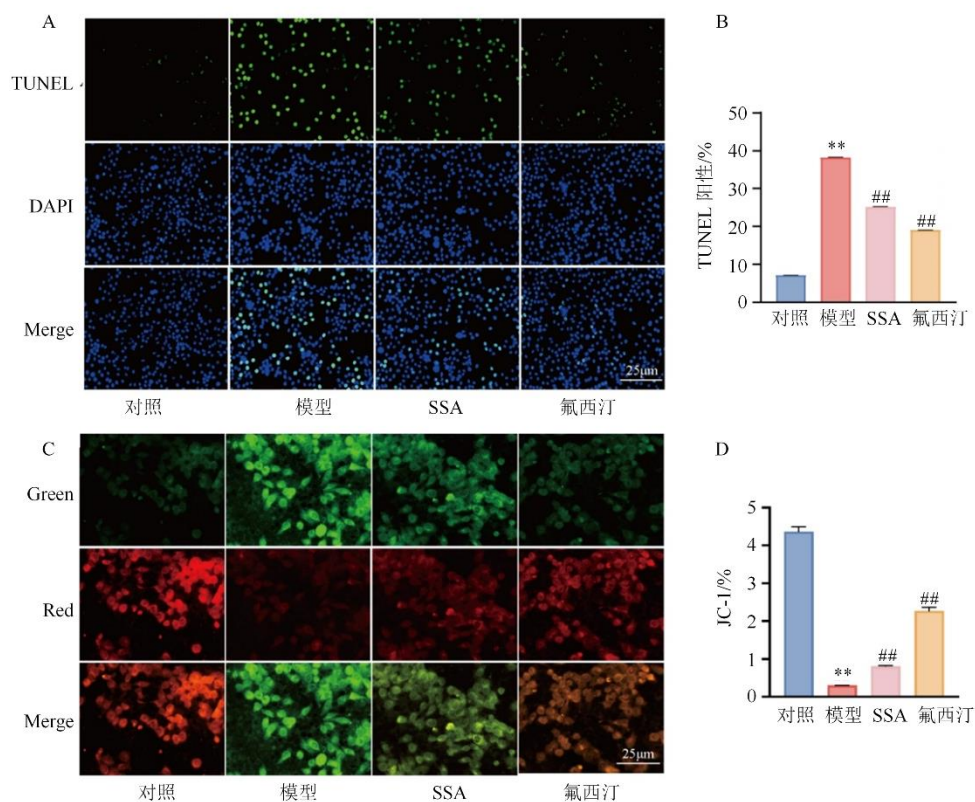


A-不同浓度的皮质酮对 SH-SY5Y 细胞活力的影响; B-SSA 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响; C-不同浓度 SSA 对皮质酮损伤 SH-SY5Y 细胞活力的影响; 与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: ## $P<0.01$ 。

A-Effect of different concentrations of CORT on viability of SH-SY5Y cells; B-Effect of SSA on viability of SH-SY5Y cells; C-Effect of different concentrations of SSA on viability of SH-SY5Y cells damaged by CORT; \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group; ## $P<0.01$  vs model group.

图 8 SSA 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 8 Effect of SSA on survival of SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )



与对照组比较: \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: ## $P<0.01$ 。

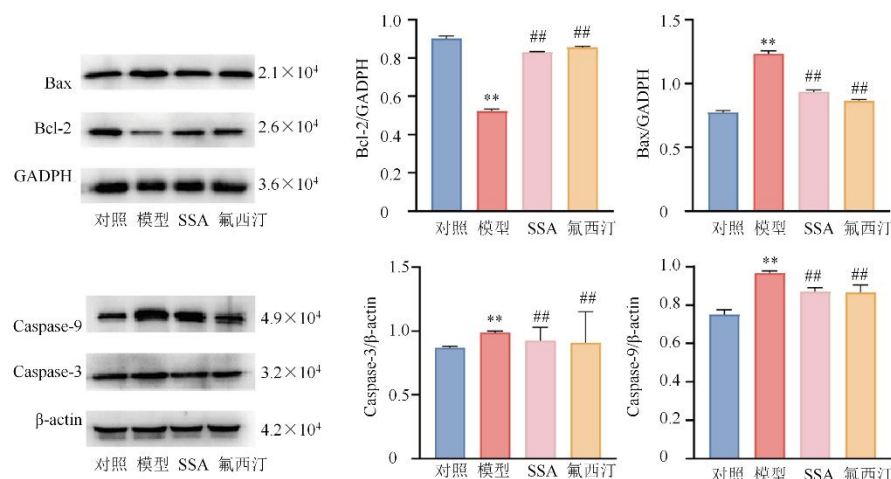
\*\* $P<0.01$  vs control group; ## $P<0.01$  vs model group.

图 9 SSA 对各组神经元凋亡 (A、B) 及线粒体膜电位 (C、D) 的影响 ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 9 Effect of SSA on neuronal apoptosis (A, B) and mitochondrial membrane potential (C, D) experimental groups ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$ )

垂体-肾上腺 (HPA) 轴紊乱、保护细胞损伤等作用<sup>[11-12]</sup>, 与入脑成分相符, 初步确定其抗抑郁的药效物质基础。因此, 本研究基于 9 个原型入脑成分

构建成分-靶点-通路网络进行网络药理学分析, 共筛选出 CSP 治疗抑郁症的潜在关键靶点 447 个, 揭示了该方多靶点的协同抗抑郁的作用。在 CSP 的众



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

图 10 SSA 对 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 10 Effect of SSA on expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

多入脑成分中,发现 SSA 可能是抗抑郁的关键药效物质。拓扑分析和核心靶点筛选表明,SSA 作用靶点最多,且靶点网络中的 EGFR、STAT3、BCL2、JUN、Casp3 等凋亡相关靶点<sup>[13-14]</sup>居于核心位置,提示其作用机制可能与调控神经元凋亡密切相关。GO 分析发现靶点主要影响信号传导、凋亡过程的负调控、结合核受体与转录因子,且广泛分布于细胞质及核内。KEGG 富集到了 MAPK signaling pathway、TNF signaling pathway、NF-kappa B signaling pathway 等免疫炎症、凋亡调控、氧化应激相关核心通路<sup>[15-17]</sup>。这些结果表明 CSP 的入脑成分分别从抗凋亡、抗氧化、抗炎、保护神经元等不同层面协同增效,形成多层次、多靶点的综合保护网络,改善神经功能。

CSP 由君药柴胡、臣药香附与川芎、佐药陈皮、枳壳与白芍、使药甘草组成,从配伍机制来看,“疏肝”主要通过柴胡发挥核心作用,SSA 作为其主要活性成分,通过抗凋亡、抗炎、促进神经发生等机制发挥中枢神经保护作用,体现了“疏肝”在分子层面的内涵。现还有大量研究证实,SSA 能通过增强神经营养因子表达,改善神经递质水平和下调 HPA 轴功能发挥抗抑郁作用<sup>[18]</sup>。“理气”则由川芎、香附、陈皮、枳壳等理气药协同完成,这些药材中富含的洋川芎内酯 A、阿魏酸、丹皮酚等活性成分。研究表明,洋川芎内酯 A 显著保护大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 (PC12) 神经细胞免于皮质酮诱导的细

胞凋亡,发挥神经保护作用<sup>[19]</sup>。阿魏酸具有显著的抗氧化和抗炎活性,同时,阿魏酸还能上调神经生长因子 (NGF) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达,增强海马神经发生<sup>[20]</sup>。丹皮酚可通过 TLR4-NF-κB 信号通路抑制神经炎症反应,并激活 BDNF-Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Rac1) /RhoA 信号通路减轻慢性应激诱导的神经元损伤,发挥抗抑郁作用<sup>[21]</sup>。这些发现符合本研究的网络药理学预测,体现了中医“气行则血行,气畅则神安”的理论精髓。

细胞凋亡早期的一个显著标志便是线粒体膜电位的降低,在细胞凋亡的线粒体途径中,Bcl-2 家族蛋白的动态平衡决定细胞命运<sup>[22]</sup>。Bcl-2 作为主要的抗凋亡成员,其作用是维护线粒体的正常形态与功能,确保细胞的稳态和存活。相反,当细胞接收到凋亡信号时,主要促凋亡蛋白 Bax 会破坏线粒体膜的完整性,导致线粒体结构和功能严重紊乱<sup>[23]</sup>,从而进一步激活 Caspase 蛋白,Caspase 正是细胞凋亡的核心执行者,上游的 Caspase-9 通过信号传递作用,激活中下游的 Caspase-3 活性,最终诱导细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究采用皮质酮复制神经元应激模型,通过 TUNEL 染色和 JC-1 试剂盒结果分析,相较于模型组,添加 SSA 组的凋亡荧光强度显著减弱,线粒体膜电位上升,这些结果都表明 SSA 可逆转细胞凋亡状态。Western blotting 结果显示,SSA 组的神经元细胞中的 Bcl-2 蛋白表达上调,而 Bax、

Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达下调,这意味着 SSA 抑制神经元的凋亡是经线粒体途径,并受 Bcl-2/Bax 蛋白质家族调控。本研究结果表明 CSP 复方治疗抑郁症多成分多靶点效应,并初步明确了关键活性成分 SSA 的机制为通过 Bcl-2/Bax 途径抑制神经元细胞的凋亡,但研究仍存在一定局限与不足,仅验证了关键成分 SSA 的作用机制,其他有效成分的作用机制未进行验证,在后续的研究中,将继续对网络药理学的预测结果进行验证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Cui R J. Editorial: A systematic review of depression [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2015, 13(4): 480.
- [2] 陈伟康, 令狐婷, 任燕. 中药治疗抑郁症作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(11): 4090-4102.  
Chen W K, Linghu T, Ren Y. Research progress on traditional Chinese medicine in treatment of depression [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(11): 4090-4102.
- [3] 杨洋, 李晓飞, 潘建涛. 针刺结合柴胡疏肝散加减治疗肝气郁结型抑郁症的临床观察 [J]. *中国民间疗法*, 2019, 27(6): 52-53.  
Yang Y, Li X F, Pan J T. Clinical observation of acupuncture combined with Chaihu Shugan Powder in treating depression of liver-qi stagnation [J]. *China's Naturopathy*, 2019, 27(6): 52-53.
- [4] 吴萍洲, 梁晓霞, 王术玲. 柴胡疏肝散中色氨酸-2,3-双加氧酶抑制剂的筛选及抗抑郁药效研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2812-2821.  
Wu P Z, Liang X X, Wang S L. Screening of tryptophan-2,3-dioxygenase inhibitors in Chaihu Shugan Powder and its antidepressant efficacy [J]. *Tradit Chin Herb Drugs*, 2023, 54(9): 2812-2821.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2025.  
*Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [S]. Volume I. 2025
- [6] Golden S A, Covington H E 3rd, Berton O, et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(8): 1183-1191.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 138-145.  
Wei W, Wu X M, Li Y J. *Pharmacological Experimental Methodology* [M]. 4th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 138-145.
- [8] Jin H, Xu G, Lu Y, Niu C, Zhang X, Kan T, Cao J, Yang X, Cheng Q, Zhang J, Dong J. Fluoxetine partially alleviates inflammation in the kidney of socially stressed male C57 BL/6 mice [J]. *FEBS Open Bio*, 2023, 13(9): 1723-1736.
- [9] 常欣, 沈伟, 吴燕, 等. 小鼠慢性社交挫败应激模型的建立及评价研究 [J]. *军事医学*, 2019, 43(12): 947-953.  
Chang X, Shen W, Wu Y, et al. Construction and evaluation of a chronic social defeat stress rodent model [J]. *Mil Med Sci*, 2019, 43(12): 947-953.
- [10] 王常麟, 高冬梅, 高明周, 等. 柴胡疏肝散化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(11): 124-131, I0023.  
Wang C L, Gao D M, Gao M Z, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Chaihu Shugan Powder (柴胡疏肝散) and predictive analysis of its quality markers [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(11): 124-131, I0023.
- [11] 胡仁春, 岳小强. 柴胡疏肝散抗抑郁临床和作用机制研究进展 [J]. *新中医*, 2026, 58(5): 221-225.  
Hu R C, Yue X Q. Research progress on clinical effect and mechanism of Chaihu Shugan Powder in antidepressant treatment [J]. *New Chin Med*, 2026, 58(5): 221-225.
- [12] Song J, Li D Y, Zhang X L, et al. Chaihu-Shugan-San ameliorates chronic atrophic gastritis by inhibiting nuclear factor-kappa B-mediated inflammation and apoptosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2026, 32(10): 115957. DOI:10.3748/WJG.V32.I10.115957.
- [13] 邓淑文, 夏红星. GTPBP4 基因沉默介导 EGFR/PI3K/AKT 信号通路对顺铂诱导的胃癌细胞凋亡的调控机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(22): 2747-2752.  
Deng S W, Xia H X. Regulatory mechanism of GTPBP4 silencing on apoptosis of gastric cancer cells induced by cisplatin via EGFR/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(22): 2747-2752.
- [14] 朱钦敏, 杨东林, 吴春蓉, 等. 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在结直肠癌细胞对微管蛋白抑制剂耐药中的作用机制 [J]. *重庆医学*, 2026, 55(3): 521-530.  
Zhu Q M, Yang D L, Wu C R, et al. Study on the effect of anti-apoptotic protein Bcl-2 on resistance to tubulin inhibitors in colorectal cancer cells [J]. *Chongqing Med J*, 2026, 55(3): 521-530.
- [15] 邓显光, 裴晓华, 刘丽芳, 等. 防己黄芪汤调控 JNK/p38 MAPK 信号通路对三阴性乳腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2026, 33(4): 80-85.  
Deng X G, Pei X H, Liu L F, et al. Effects of Fangji Huangqi Decoction regulating JNK/p38 MAPK signaling pathway on apoptosis of xenograft tumor cells in nude mice with triple-negative breast cancer [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2026, 33(4): 80-85.

- [16] Ying C, Wang D, Zeng S Y, et al. Alkalization of the intracellular pH reprograms TNF- $\alpha$  signaling from inflammatory NF- $\kappa$ B activation to tumoricidal RIP kinase-dependent necroptosis in cancer cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2026: 1-14.
- [17] Hu R Y, Chen Z H, Chen T, et al. Phycion-8-*O*- $\beta$ -D-monoglucoside protects hepatocytes from TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis by suppressing the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2026, 16: 12716.
- [18] 刘敏, 孙亚南, 于春月, 等. 柴胡皂苷 A 抗抑郁作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(3): 867-871.
- Liu M, Sun Y N, Yu C Y, et al. Research progress on antidepressant mechanism of saikosaponin A [J]. *Drugs Clin*, 2019, 34(3): 867-871.
- [19] Gong S L, Zhang J, Guo Z K, et al. Senkyunolide a protects neural cells against corticosterone-induced apoptosis by modulating protein phosphatase 2A and  $\alpha$ -synuclein signaling retraction [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2022, 16: 2187-2188.
- [20] 邹春明, 孙亚南, 王琪, 等. 阿魏酸抗抑郁作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(2): 569-576.
- Zou C M, Sun Y N, Wang Q, et al. Research progress on antidepressant mechanism of ferulic acid [J]. *Drugs Clin*, 2019, 34(2): 569-576.
- [21] Tao W W, Wang H Q, Su Q, et al. Paeonol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice [J]. *Psychiatry Res*, 2016, 238: 116-121.
- [22] Willis S, Day C L, Hinds M G, et al. The bcl-2-regulated apoptotic pathway [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(20): 4053-4056.
- [23] Jensen K, WuWong D J, Wong S, et al. Pharmacological inhibition of Bax-induced cell death: Bax-inhibiting peptides and small compounds inhibiting Bax [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(8): 621-629.
- [24] Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.

[责任编辑 齐静雯]