

## • 药理与临床 •

## 基于网络药理学及实验验证探究甘松治疗帕金森病伴发焦虑的作用机制

李佳园, 徐文, 万国慧, 魏晓嘉, 杨雪, 刘金凤, 于佳禾, 金重先, 吕研, 王雨青, 石晋丽\*  
北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:**目的 基于网络药理学方法预测甘松 *Nardostachys jatamansi* 治疗帕金森病伴发焦虑(Parkinson's disease with anxiety, PDA)的作用靶点和信号通路,并通过PDA模型大鼠进行药效学和关键靶点的验证。方法 通过中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP)和文献挖掘获得甘松主要化学成分,利用SwissTargetPrediction、GeneCards数据库获得甘松化学成分治疗PDA的潜在靶点,对其进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,利用Cytoscape 3.7.2构建“成分-靶点-通路”网络。大鼠采用颈背部sc鱼藤酮制备PD模型,并通过旷场实验筛选出PDA模型大鼠;设置对照组、模型组、甘松(620 mg/kg)组、左旋多巴(49 mg/kg)组,利用转棒实验、旷场实验和免疫组化法对甘松治疗PDA的药效学进行评价;并对关键蛋白和大鼠脑内神经递质含量进行测定。结果 “成分-靶点-通路”网络中包含甘松抗PDA的12个有效成分如甘松新酮、诺卡酮、金合欢素、 $\beta$ -谷甾醇等,丝裂原活化蛋白激酶3(mitogen-activated protein kinases 3, MAPK3)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)等99个靶点,主要涉及神经活性配体-受体相互作用、雌激素、FoxO、TNF等信号通路。实验结果显示,甘松延长了PDA大鼠在转棒上的停留时间,增加了其在旷场的总活动距离及在中央区的活动时间和距离,提高了黑质区酪氨酸羟化酶阳性表达( $P < 0.05$ );甘松显著降低大鼠纹状体MAPK3、TNF- $\alpha$ 含量以及STAT3蛋白表达水平( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),提高了多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟色胺和5-羟吲哚乙酸水平( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。结论 甘松中的有效成分可能是通过MAPK3、TNF- $\alpha$ 、STAT3等靶点调控多条信号通路来抑制神经炎症反应,提高神经递质水平以治疗PDA疾病。

**关键词:** 甘松; 网络药理学; 帕金森病伴发焦虑; 炎症因子; 神经递质; 丝裂原活化蛋白激酶3; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 信号传导与转录激活因子3; 甘松新酮; 诺卡酮; 金合欢素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)23-7192-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.013

## Effect of *Nardostachys jatamansi* in treatment of Parkinson's disease with anxiety based on network pharmacological analysis and experimental verification

LI Jia-yuan, XU Wen, WAN Guo-hui, WEI Xiao-jia, YANG Xue, LIU Jin-feng, YU Jia-he, JIN Zhong-xian, LYU Yan, WANG Yu-qing, SHI Jin-li

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To explore the targets and signal pathways of *Nardostachys jatamansi* in the treatment of Parkinson's disease with anxiety (PDA) by network pharmacology, and verified the pharmacodynamics and key targets through the PDA model rats.

**Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database and literature mining were used to obtain the main chemical ingredients of *N. jatamansi*. SwissTargetPrediction and GeneCards database were used to obtain potential targets for the treatment of PDA with the chemical components of *N. jatamansi*. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways enrichment analysis were performed for potential targets. “Ingredients-targets-pathways” network was constructed by using Cytoscape 3.7.2. The model rats of PD were

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073971)

作者简介: 李佳园(1997—),女,硕士研究生。E-mail: 20190935157@bucm.edu.cn

\*通信作者: 石晋丽, 博士生导师, 教授, 主要从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: shijl@vip.sina.com

established by sc rotenone on the back of neck, and the model rats of PDA were screened out by open field experiment. Conyrol group, model group, *N. jatamansi* (620 mg/kg) group and levodopa (49 mg/kg) group were set up respectively. The pharmacodynamics of *N. jatamansi* in the treatment of PDA was evaluated by rod rotation test, open field test and immunohistochemistry. The contents of key proteins and neurotransmitters in the brain of rats were detected. **Results** There were 12 active ingredients including narinone, nootkatone, acanthine and  $\beta$ -sitosterol of *N. jatamansi* anti-PDA in “ingredients-targets-pathways” network, 99 targets such as mitogen-activated protein kinases 3 (MAPK3), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), mainly involved in neuroactive ligand-receptor interaction, estrogen, FoXO and TNF signaling pathways. The results showed that *N. jatamansi* extended the PDA rats in turn on the rod retention time, increased the total activity distance of PDA rats in the open field and the activity time and distance in the central area, improved the substantia nigra area tyrosine hydroxylase positive expression ( $P < 0.05$ ). *N. jatamansi* also reduced MAPK3 and TNF- $\alpha$  levels and STAT3 protein expression ( $P < 0.05, 0.01$ ), increased the content of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid ( $P < 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** The active ingredients in *N. jatamansi* may regulate multiple signal pathways through MAPK3, TNF- $\alpha$ , STAT3 and other targets to reduce neuroinflammatory response and increase neurotransmitters level to treat PDA disease.

**Key words:** *Nardostachys jatamansi* DC.; network pharmacology; Parkinson's disease with anxiety; inflammatory factors; neurotransmitters; MAPK3; TNF- $\alpha$ ; STAT3; narinone; nootkatone; acanthine

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是我国第 2 大类神经退行性疾病<sup>[1]</sup>, 主要临床表现为进行性运动迟缓、肌肉僵直、静止性震颤等运动障碍<sup>[2]</sup>。此外, 一些非运动症状如焦虑、失眠、抑郁等也经常伴随 PD 发生, 近期有学者研究发现, 这些非运动症状大多出现在整个病程中, 有些甚至出现在运动症状发病之前<sup>[3]</sup>。其中, 焦虑被认为是 PD 最常见且损伤性较大的非运动症状之一<sup>[4]</sup>, PD 伴发焦虑 (Parkinson's disease with anxiety, PDA) 的患者在 PD 患者中占 40%~50%<sup>[5]</sup>, 焦虑不仅降低了 PD 患者的生活质量, 还会加重 PD 患者的运动障碍和认知表现<sup>[6]</sup>, 严重阻碍 PD 患者身体健康的恢复。目前 PDA 的发病机制尚未阐明, 但随着研究的不断深入, 认为 PDA 的发病机制涉及炎性细胞因子的异常表达<sup>[7]</sup>, 下丘脑、黑质、纹状体的神经元功能退化及所含的多巴胺 (dopamine, DA)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 等神经递质的含量下降等方面<sup>[8]</sup>。临床上常用的一些药物如左旋多巴、美多芭、劳拉西泮和丁螺环酮等对 PDA 患者具有一定的缓解作用, 但长时间服用会引发异动症、睡眠障碍等不良反应, 无法真正治疗该疾病<sup>[9]</sup>。因此未来的研究应进一步明确 PDA 的发病机制, 找寻治疗 PDA 的有效靶点, 提高药物的临床有效性和安全性。

甘松为败酱科植物甘松 *Nardostachys jatamansi* DC. 的干燥根及根茎, 在藏药中又被称为邦贝, 具有理气止痛、开郁醒脾的功效<sup>[10-11]</sup>。李时珍在《本草纲目》中提出, 甘松之甘源于“其味甘”, 有补、

和、缓之效, 能理元气、去气郁、健脾胃<sup>[12]</sup>; 在藏药中, 甘松之松源于藏语 *bsung*, 意为“气味芳香”, 有清热、解毒、消炎之效<sup>[13]</sup>。《中国药典》2020 年版规定, 甘松用量为 3~6 g, 且本品含甘松新酮 ( $C_{15}H_{22}O_3$ ) 不得少于 0.10%。根据成人最高用量换算, 得到大鼠口服剂量为 620 mg/kg。本课题组前期研究发现, 甘松 80% 乙醇的提取物 (620 mg/kg, 以生药量计) 及甘松新酮均有良好的抗 PD 效果, 其中甘松新酮治疗 PD 的机制可能与抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的激活, 抑制线粒体凋亡途径, 减少细胞的损伤有关<sup>[14]</sup>。现代药理学研究表明, 甘松提取物具有潜在的抗焦虑活性并具有剂量相关性<sup>[15]</sup>; 甘松提取物能够抑制脂多糖诱导的巨噬细胞凋亡, 抑制炎性细胞因子, 从而发挥抗炎作用<sup>[16]</sup>; 此外, 甘松还具有抗癫痫<sup>[17]</sup>、抗抑郁<sup>[18]</sup>等作用。综合甘松的传统功效和现代药理研究结果, 推测甘松具有治疗 PDA 的潜力, 但目前尚未有学者对甘松治疗 PDA 的药效和作用机制展开深入研究。因此本研究基于网络药理学方法, 对甘松治疗 PDA 的关键靶点和信号通路进行预测, 并利用 PDA 模型大鼠对其药效学和关键靶点进行验证, 以期对甘松治疗 PDA 的临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学预测甘松治疗 PDA 的作用机制

**1.1.1 甘松化学成分的筛选** 利用中药系统药理学数据库分析平台 (TCMSP, <https://tcmspw.com/tcmspsearch.php>), 以口服生物利用度 (oral

bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 、化合物类药性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$  为条件, 对甘松的化学成分进行筛选; 同时采用文献挖掘的方式收集甘松中的化学成分; 将检索到的化学成分进行整合并去重, 得到最终化学成分。

**1.1.2 化学成分和 PDA 的相关靶点收集** 利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得上述化合物的 SMILES 号, 通过 SwissTarget Prediction 网站 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测甘松化学成分的潜在靶点。利用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), 以“Parkinson’s disease with anxiety”为检索词获取相关性得分  $\geq 10$  的 PDA 靶点。应用 R 语言软件对甘松化学成分和 PDA 的相关靶点取交集, 得到两者的共同靶点, 即甘松治疗 PDA 的潜在作用靶点。

**1.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建与分析** 在 STRING 平台 (<https://STRING-db.org/>) 输入潜在作用靶点, 获得 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.7.2 软件, 对 PPI 网络进行可视化操作, 根据 Network Analyzer 插件中的度值和介数评估每个靶点的重要性, 得到关键靶点。

**1.1.4 靶点功能富集分析与网络构建** 通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对甘松治疗 PDA 的潜在靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 利用 SangerBox 平台 (<http://sangerbox.com/>) 的高级气泡图对排名前 20 的通路进行可视化分析。利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“成分-靶点-通路”网络, 根据 Network Analyzer 插件对该网络进行拓扑学分析, 确定关键化学成分。

## 1.2 实验验证

**1.2.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 200~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2016-0006。大鼠

饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验中心, 环境温度 (20~22) °C, 湿度 (40~60) %, 12 h 光暗周期, 自由进食饮水。动物实验方案符合国家实验动物福利伦理的相关要求, 并获得北京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 2020091406-3054)。

**1.2.2 甘松药材及其提取物制备** 甘松购自四川阿坝若尔盖县, 经北京中医药大学石晋丽教授鉴定为败酱科植物甘松 *N. jatamansi* DC. 的干燥根及根茎。将药材粉碎成粗粉, 称取 300 g, 依次用 10、8、8 倍量 80% 乙醇超声提取 3 次, 温度控制在 35 °C 以下, 时间分别为 60、45、45 min, 静置, 滤过, 合并滤液, 冷冻干燥后于干燥器中保存。依据《中国药典》2020 年版和文献方法<sup>[4]</sup>, 测得甘松 80% 乙醇提取物中甘松新酮的质量分数为 5.2%, 甘松的出膏率为 10.7%, 即甘松生药中含甘松新酮 0.56%, 符合药典标准, 见图 1。

**1.2.3 试剂与仪器** 甘松新酮对照品 (批号 P19A10L86397, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 购自上海源叶生物科技有限公司; DA ELISA 试剂盒、3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) ELISA 试剂盒、高香草酸 (homovanillic acid, HVA) ELISA 试剂盒、5-HT ELISA 试剂盒、5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindolacetic acid, 5-HIAA) ELISA 试剂盒、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinases 3, MAPK3) ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (批号 202103D) 购自江苏酶免生物科技有限公司; 酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 抗体 (批号 GB11181)、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (批号 GB12176)、 $\beta$ -actin 抗体 (批号 GB12001)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 GB23301) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 鱼藤酮 (批号 R105076) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 葵花籽油 (批号 W24A11L122237) 购自上海源叶生物

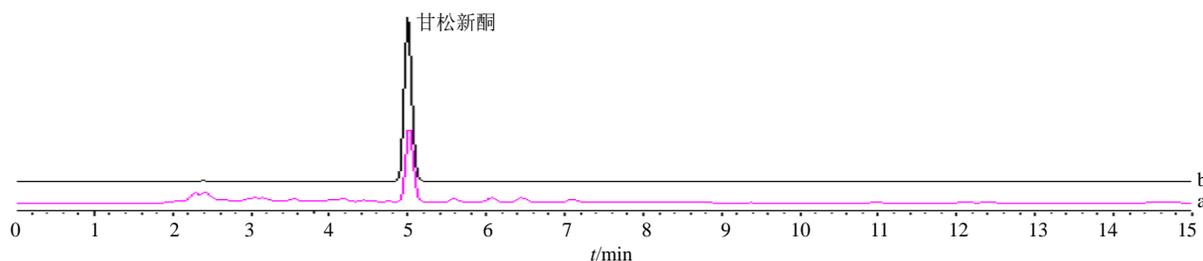


图 1 甘松 80% 乙醇提取物 (a) 及对照品 (b) 中甘松新酮的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of nardosinone in 80% ethanol extract of *N. jatamansi* (a) and reference substance (b)

科技有限公司；左旋多巴购自北京曙光药业有限责任公司；乌拉坦（批号 C10821103）购自上海麦克林生化科技有限公司。

SB-5200DTD 型超声波清洗机、JY96-IIN 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；RE-52AA 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；RT-6100 型多功能酶标仪（深圳雷杜生命科学股份有限公司）；电热恒温培养箱（武汉一恒苏净科学仪器有限公司）。

**1.2.4 PDA 大鼠模型建立及分组、给药** 51 只 SD 大鼠在 SPF 级条件下适应性饲养 1 周后，采用颈背部交替 sc 鱼藤酮法建立 PD 模型。取 40 只大鼠 sc 鱼藤酮葵花油溶剂（1.5 mL/kg）制备 PD 模型，取 11 只大鼠 sc 不含鱼藤酮的葵花油溶剂作为对照组，1 次/d，连续 14 d。当大鼠出现毛色发黄、精神萎靡不振、弓背和四肢力量减弱等症状时，表明造模成功<sup>[19]</sup>，共得到 35 只 PD 大鼠，造模成功率为 87.5%。将造模成功的 PD 大鼠采用旷场实验筛选得到 PDA 大鼠 33 只。将筛选的 PDA 大鼠随机分为甘松（620 mg/kg）组、左旋多巴（49 mg/kg）组和模型组，每组 11 只，对照组 11 只。各给药组 ig 相应药物（0.2 mL/kg），1 次/d，连续 14 d。

**1.2.5 转棒实验** 末次给药次日进行转棒实验，检测大鼠的运动状态和平衡能力。在测试之前，先对大鼠进行为期 3 d 的训练实验，训练时将大鼠尾朝外侧放置在旋转棒上，适应环境 20 s 后，将转棒的转速由 4 r/min 匀速增加至 20 r/min，加速度为 6 r/min，最长训练时间为 3 min。若大鼠中途掉落，将其再次放置转棒上，确保训练时间为 3 min。正式测试时，转速和加速度与训练时一致，记录大鼠第 1 次从转棒上的掉落时间，每只大鼠检测 3 次，每次间隔 2 h，取 3 次测试时间的平均值<sup>[20]</sup>。

**1.2.6 旷场实验** 转棒实验结束次日进行旷场实验，旷场实验为考察动物焦虑样行为的经典实验。将旷场（长 100 cm、宽 100 cm、高 50 cm）放置在灯光较暗、环境安静的场所。旷场底面为黑色，被均分为 25 个方格，中间的 9 个方格为旷场的中央区，其余为边缘区。实验时先将大鼠放置在空旷的环境中适应 5 min，然后将其放置在旷场的中央区，并记录大鼠在旷场 5 min 内的活动情况。每测试完 1 只大鼠，对旷场进行酒精消毒，待酒精挥发后进行下一只大鼠的测试。检测指标为大鼠在旷场中的活动总距离（cm），以及在中央区的活动距离（cm）

和停留时间（s）。

**1.2.7 TH 免疫组化染色** 旷场实验结束后，大鼠禁食不禁水 12 h，ip 20% 乌拉坦麻醉。剪开大鼠的胸腔，将灌注针插入心脏左心室，剪开右心耳进行心脏灌注操作。在冰上迅速剥离出完整的大脑，浸泡于 10 倍体积的多聚甲醛溶液中静置 24 h。然后进行石蜡包埋，冠状面切片，梯度酒精脱水，染色，拍照，并将图片导入至 Image J 软件中，对阳性细胞的吸光度（A）及区域总面积的比值进行分析，得到 TH 的平均 A 值，以确定其表达情况。

**1.2.8 纹状体 MAPK3、TNF- $\alpha$  含量的测定** 大鼠麻醉后，在冰上迅速取出纹状体，称定质量，采用超声波粉碎机进行匀浆，离心机离心，将采集到的上清液按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

**1.2.9 纹状体 STAT3 蛋白表达的检测** 取各组大鼠纹状体，使用 RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法定量，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 30 min，加入 STAT3 抗体（1:1000）和  $\beta$ -actin 抗体，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜；加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗（1:5000），室温孵育 30 min，然后利用化学发光成像系统，对 ECL 发光检测成像，拍照，AlphaEase FC 软件计算条带灰度值。

**1.2.10 纹状体神经递质水平的检测** 取各组大鼠纹状体，采用超声波粉碎机进行匀浆，离心机离心，将采集到的上清液按照 ELISA 试剂盒说明书测定 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 含量。

**1.2.11 统计学分析** 各组数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 GraphPad Prism6.0 软件对数据进行分析，利用单因素方差进行多组间比较，Tukey 检验进行两组间比较。

## 2 结果

### 2.1 甘松治疗 PDA 的网络分析结果

**2.1.1 甘松化学成分及治疗 PDA 的潜在靶点** 通过检索 TCMSP 数据库（OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18）得到 4 个化合物，即表 1 中 1~4。通过文献挖掘<sup>[21]</sup>，同时利用 TCMSP 考察这些化合物的 OB 值和 DL 值（OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.10），共得 8 个化合物，即表中的 5~12。利用 SwissTargetPrediction 平台预测出甘松潜在靶点 297 个。通过 GeneCards 数据库得到与 PDA 相关的 1114 个作用靶点。R 语言软件对甘松化学成分和 PDA 的相关靶点进行分析，共获得 99 个甘松治疗 PDA 的潜在作用靶点。

表 1 甘松的主要活性成分

Table 1 Main active ingredients of *N. jatamansi*

序号	化合物 ID	化合物名称	OB/%	DL
1	MOL010543	刺槐苷	39.84	0.71
2	MOL001689	金合欢素	34.97	0.24
3	MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75
4	MOL007088	隐丹参酮	52.34	0.40
5	MOL010540	甘松新酮	66.34	0.17
6	MOL004067	诺卡酮	33.04	0.10
7	MOL000695	广藿香醇	101.96	0.14
8	MOL000935	α-古芸烯	53.83	0.10
9	MOL001566	白菖烯	52.16	0.11
10	MOL001298	去氢木香内酯	58.57	0.14
11	MOL012168	马兜铃烯	56.06	0.11
12	MOL010534	青木香酮	20.69	0.15

2.1.2 共同靶点的 PPI 网络构建 利用 STRING 平台构建甘松治疗 PDA 潜在靶点的 PPI 网络, 将该网络导入 Cytoscape 3.7.2, 通过 Network Analyzer 插件对潜在靶点的拓扑参数度值和介数进行分析, 确定关键靶点 (图 2)。网络图由节点代表的靶点和边代表的靶点之间的相互作用所组成, 当靶点的度值和介数越大, 节点越大, 表明该靶点越重要。由图可知, 关键靶点主要为与神经炎症有关的蛋白, 如 MAPK3、TNF-α、STAT3 和酪氨酸专一性蛋白激酶 (tyrosine specific protein kinase, Src), 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2,

PTGS2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor, ESR1) 等。

2.1.3 GO 富集分析 应用 DAVID 对 99 个潜在靶点进行 GO 功能富集分析, 以  $P \leq 0.001$  且  $FDR \leq 0.001$  为筛选条件, 共获得 67 个 GO 条目, 生物过程 (biological process, BP) 条目 33 个、细胞组成 (cell composition, CC) 条目 20 个、分子功能 (molecular function, MF) 条目 14 个, 对排名前 10 的 GO 条目进行可视化处理, 结果见图 3。BP 主要包括一氧化氮生物合成过程的正调控、凋亡过程的负调控、运动行为、细胞外信号调节激酶 1 (extracellular regulated protein kinases, ERK1) 和 ERK2 级联阳性调节及 MAPK 活性的激活等。MF 主要涉及酶结合位点、药物结合、配体门控离子通道活性和 RNA 聚合酶 II 转录因子活性等。CC 主要涉及细胞膜、突触后膜、细胞表皮、细胞融合和树突等。表明甘松可能通过促进细胞增殖、调控细胞凋亡、调节机体协调能力、抵抗神经炎症和参与核质间信号传导等<sup>[22]</sup>治疗 PDA。

2.1.4 KEGG 富集分析 在 KEGG 通路富集分析中, 共得到 28 条通路 ( $P \leq 0.001$  且  $FDR \leq 0.001$ ), 利用 SangerBox 分析平台对前 20 条信号通路进行可视化处理, 结果见图 4。与神经炎症相关通路有 4 条: Rap1 信号通路、FoxO 信号通路、TNF 信号通路和炎症介质对色氨酸通道的调节; 与神经递质相关通路有 2 条: 神经活性配体-受体相互作用和含血清素的神经突触; 与激素调节相关通路有 2 条: 雌激素信号通路和催乳素信号通路; 与信号传导相关通路有 2 条: 逆行神经信号和生成信号通路; 与氧

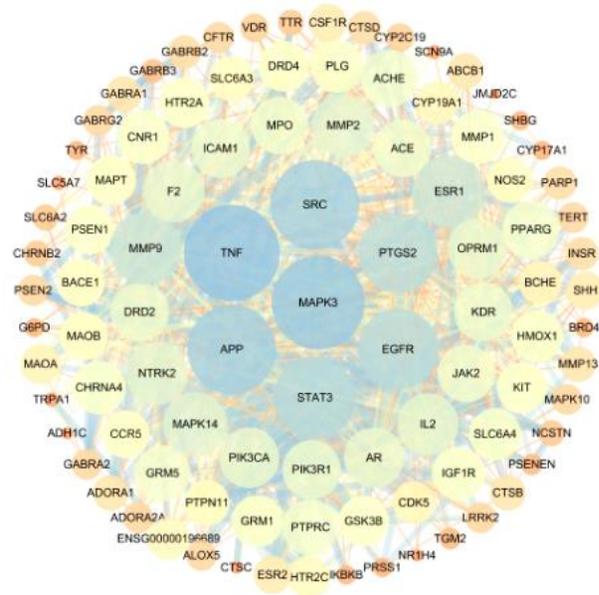


图 2 甘松治疗 PDA 潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of potential targets of *N. jatamansi* in treatment of PDA

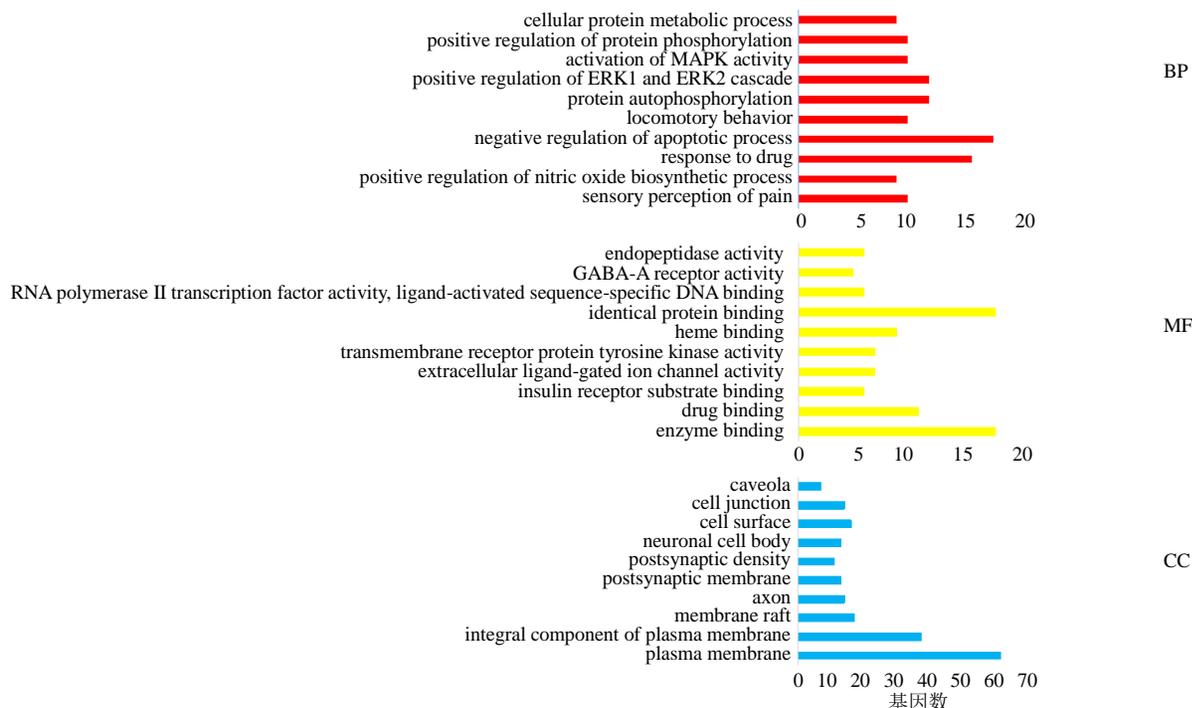


图 3 甘松治疗 PDA 相关靶点的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of related targets of *N. jatamansi* in treatment of PDA

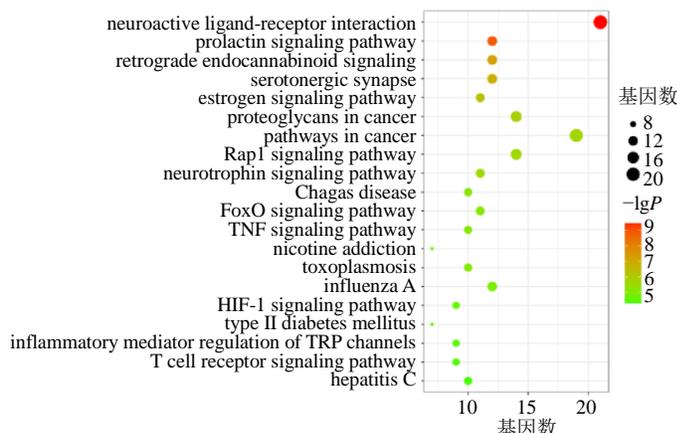


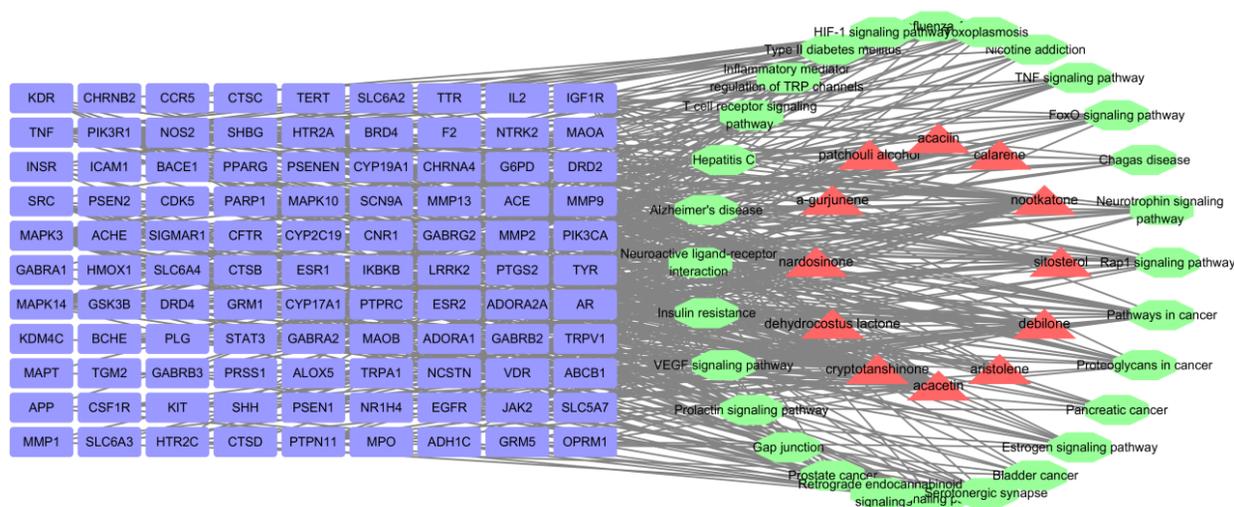
图 4 甘松治疗 PDA 相关靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathways enrichment analysis of related targets of *N. jatamansi* in treatment of PDA

化应激相关通路有 1 条：HIF-1 信号通路；其他少数通路与免疫系统、癌症等相关。表明甘松化学成分主要分布于多条代谢通路，通过它们之间的相互协调作用，发挥抵抗神经炎症、调控体内激素水平和调节神经递质水平等<sup>[23-24]</sup>作用来治疗 PDA。

**2.1.5 “成分-靶点-通路”网络的构建** 根据 KEGG 富集分析得到的结果，筛选出与治疗 PDA 最相关的通路，并将其与甘松化学成分和治疗 PDA 的潜在靶点对应，应用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“成分-靶点-通路”网络，见图 5。该网络包含 12 种化学成分、99 个作用靶点及 28 条重要通路。利用 Network

Aanalyzer 插件对网络中的成分进行分析，根据度值排序得到甘松治疗 PDA 的化学成分主要为金合欢素、诺卡酮、甘松新酮、青木香酮、隐丹参酮等；这些活性成分作用的靶点有 MAPK3、TNF- $\alpha$ 、STAT3、Src、APP、PTGS2、EGFR、ESR1 等；这些靶点主要集中在神经活性配体-受体相互作用、雌激素信号通路、Rap1 信号通路、FoxO 信号通路、TNF 信号通路及含血清素的神经突触等信号通路中。甘松中的每个化学成分都对应着多个靶点及通路，进一步证明甘松是通过多组分、多靶点的协同作用来治疗 PDA。



三角形节点代表活性成分，矩形节点代表作用靶点，八边形节点代表重要通路

Triangular nodes represent active ingredients, rectangular nodes represent target points, octagonal nodes represent important pathways

图 5 甘松治疗 PDA 的“成分-靶点-通路”网络

Fig. 5 “Ingredients-targets-pathways” network of *N. jatamansi* in treatment of PDA

## 2.2 实验结果验证

**2.2.1 转棒实验** 如表 2 所示，与对照组相比，模型组大鼠在转棒上的停留时间显著减少 ( $P < 0.01$ )，表明模型组大鼠活动能力和平衡能力均减弱；与模型组相比，各给药组大鼠在转棒上的停留时间均显著提高 ( $P < 0.05$ )，表明甘松和左旋多巴对 PDA 大鼠的运动障碍具有改善作用。

表 2 甘松对 PDA 大鼠在转棒上停留时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 2 Effect of *N. jatamansi* on residence time in rotating rod of PDA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	停留时间/s
对照	—	100.40 ± 13.42
模型	—	42.00 ± 8.31 <sup>##</sup>
甘松	620	88.00 ± 11.03 <sup>*</sup>
左旋多巴	49	81.43 ± 6.96 <sup>*</sup>

与对照组比较：<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ；与模型组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ，下表同

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group, same as below tables

表 3 甘松对 PDA 大鼠旷场总活动距离、中央区的活动距离和停留时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of *N. jatamansi* on total open field activity distance, activity distance and activity time in central area of PDA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	旷场总活动距离/m	中央区活动距离/cm	中央区停留时间/s
对照	—	26.22 ± 2.11	259.82 ± 36.44	14.46 ± 2.24
模型	—	13.33 ± 2.33 <sup>##</sup>	87.77 ± 12.67 <sup>#</sup>	5.27 ± 1.62 <sup>#</sup>
甘松	620	24.37 ± 2.86 <sup>*</sup>	205.57 ± 40.81	14.63 ± 3.47 <sup>*</sup>
左旋多巴	49	23.60 ± 2.65 <sup>*</sup>	120.62 ± 43.73	10.18 ± 2.98

**2.2.2 旷场实验** 如表 3 所示，与对照组相比，模型组大鼠在旷场中的总活动距离显著减少 ( $P < 0.01$ )，在中央区的活动距离和进入中央区的活动时间均减少 ( $P < 0.05$ )，表明模型组大鼠的活动能力减弱，且具有焦虑症状；与模型组相比，甘松组显著增加了大鼠在旷场的总活动距离 ( $P < 0.05$ )，表明甘松对 PDA 大鼠的运动症状具有改善作用，与转棒实验结果一致；甘松组大鼠在中央区的活动时间明显提高 ( $P < 0.05$ )，在中央区的活动距离也有增加的趋势，表明甘松对大鼠的焦虑情绪具有缓解作用。

**2.2.3 TH 免疫组化染色** 如图 6 和表 4 所示，模型组 TH 阳性表达显著下降 ( $P < 0.001$ )，胞体轮廓不清晰且胞体显著缩小；与模型组相比，甘松组 TH 阳性表达显著升高 ( $P < 0.05$ )，胞体缩小较少，表明甘松可增加大鼠黑质 TH 阳性细胞的表达量。

**2.2.4 甘松对 PDA 大鼠脑内 MAPK3 和 TNF- $\alpha$  含量以及 STAT3 蛋白表达的影响** 如表 5、6 和图 7

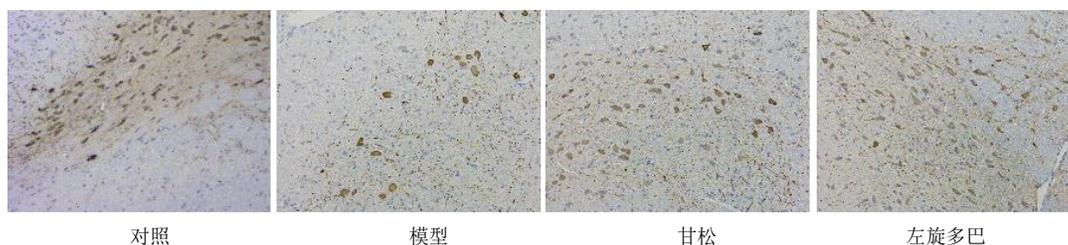


图6 各组大鼠脑内黑质中 TH 的表达 (×200)

Fig. 6 Expression of TH in substantia nigra of rats in each group (×200)

表4 各组大鼠脑内黑质 TH 平均 A 值 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Average optical density of TH in substantia nigra of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	A 值
对照	—	0.51 ± 0.02
模型	—	0.35 ± 0.01 <sup>###</sup>
甘松	620	0.42 ± 0.01*
左旋多巴	49	0.41 ± 0.02*

表5 甘松对 PDA 大鼠纹状体中 MAPK3、TNF-α 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of *N. jatamansi* on MAPK3 and TNF-α contents in striatum of PDA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	MAPK3/(ng·mg <sup>-1</sup> )	TNF-α/(pg·mg <sup>-1</sup> )
对照	—	61.55 ± 4.34	48.23 ± 4.91
模型	—	133.80 ± 8.22 <sup>###</sup>	103.50 ± 6.40 <sup>###</sup>
甘松	620	91.99 ± 5.71**	79.79 ± 5.81*
左旋多巴	49	103.60 ± 11.02*	78.76 ± 6.13*

表6 甘松对 PDA 大鼠纹状体 STAT3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of *N. jatamansi* on STAT3 protein expression in striatum of PDA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	STAT3 蛋白相对表达量
对照	—	0.53 ± 0.03
模型	—	1.21 ± 0.14 <sup>##</sup>
甘松	620	0.52 ± 0.10*
左旋多巴	49	0.64 ± 0.28

表7 甘松对 PDA 大鼠纹状体中 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 7 Effect of *N. jatamansi* on levels of DA, DOPAC, HVA, 5-HT and 5-HIAA in striatum of PDA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	DA/(pg·mg <sup>-1</sup> )	DOPAC/(ng·mg <sup>-1</sup> )	HVA/(ng·mg <sup>-1</sup> )	5-HT/(ng·mg <sup>-1</sup> )	5-HIAA/(ng·mg <sup>-1</sup> )
对照	—	405.60 ± 27.50	30.04 ± 1.60	51.56 ± 3.85	6.46 ± 0.56	9.51 ± 0.73
模型	—	192.00 ± 19.84 <sup>###</sup>	15.39 ± 1.13 <sup>###</sup>	24.60 ± 4.13 <sup>###</sup>	3.18 ± 0.53 <sup>###</sup>	3.77 ± 0.40 <sup>###</sup>
甘松	620	384.70 ± 29.86 <sup>***</sup>	27.61 ± 2.31 <sup>***</sup>	45.75 ± 3.24 <sup>**</sup>	5.48 ± 0.39 <sup>**</sup>	7.38 ± 0.68 <sup>**</sup>
左旋多巴	49	313.90 ± 35.15*	21.69 ± 1.14*	36.84 ± 4.10	3.71 ± 0.13	6.29 ± 0.70*

### 3 讨论

本研究通过检索甘松的化学成分, 基于网络药理学的方法, 挖掘甘松治疗 PDA 的关键作用靶点及信号通路, 探索甘松治疗 PDA 的潜在作用机制。

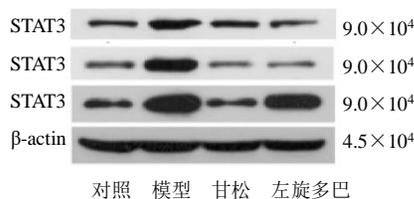


图7 各组大鼠纹状体 STAT3 蛋白表达情况

Fig. 7 Expression of STAT3 in striatum of rats in each group

所示, 与对照组相比, 模型组大鼠纹状体 MAPK3 和 TNF-α 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ), STAT3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 甘松组大鼠纹状体 MAPK3 和 TNF-α 含量显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), STAT3 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.5 甘松对 PDA 大鼠脑内神经递质的影响**  
PDA 的主要病理特征为纹状体中 DA、5-HT 等神经递质的显著性丧失, 因此纹状体中 DA、5-HT 及其代谢产物的含量可以反映该疾病的发展进程<sup>[25-26]</sup>。如表 7 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 含量均显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 甘松组大鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 含量均显著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ )。

结果显示, 甘松治疗 PDA 的有效成分为倍半萜类、黄酮类和甾醇类。倍半萜类成分包括纳多西烷型化合物(甘松新酮、诺卡酮)及愈创木烷型化合物(α-古芸烯、去氢木香内酯)和马兜铃烷型化合物(马

甾铃烯、青木香酮、广藿香醇、白菖烯), 黄酮类化合物为隐丹参酮、刺槐苷、金合欢素, 甾醇类化合物为 $\beta$ -谷甾醇, 通过构建“成分-靶点-通路”网络, 识别甘松化学成分治疗 PDA 的关键靶点 8 个 (MAPK3、TNF- $\alpha$ 、STAT3、Src、APP、PTGS2、EGFR、ESR1), 涉及的关键通路为神经活性配体-受体相互作用、雌激素、FoxO、TNF 和 Rap1 等信号通路。表明甘松治疗 PDA 的可能作用机制是通过多成分、多靶点的相互调节作用实现的。

鱼藤酮是目前 PD 模型大鼠制备中常用的一种神经毒素, 相比于 6-OHDA<sup>[27]</sup>、MPTP<sup>[28]</sup>等神经毒素, 具有容易穿透血脑屏障、造模成功率高、价廉易得等优势, 且鱼藤酮致 PD 模型行为学改变和病理学特征也与临床 PD 相似<sup>[29]</sup>, 因此本研究采用鱼藤酮进行 PD 模型大鼠的制备。根据网络预测结果, 利用旷场实验对 PD 模型大鼠筛选得 PDA 模型大鼠, 并利用 PDA 模型大鼠对甘松治疗 PDA 的药效和作用机制进行验证。

### 3.1 甘松主要活性成分分析

甘松主要含有萜类、黄酮类、甾醇类、香豆素和木质素类化合物。其中萜类化合物是甘松的主要活性成分且含量较高, 目前已从甘松中分离得到的萜类化合物有倍半萜类、环烯醚萜类、单萜类、二萜类、三萜类, 但以倍半萜类化合物为主, 其主要包括纳多西烷型、愈创木烷型和马兜铃烷型 3 种类型。现代药理学研究表明, 倍半萜类化合物如甘松新酮能诱导神经干细胞选择性分化为神经元和少突胶质细胞, 在增殖和分化过程中, 还能增加磷酸化 ERK 的表达, 对脑损伤和神经退行性疾病的治疗具有重要意义<sup>[30]</sup>; 诺卡酮可通过抑制诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 等促炎细胞因子的表达, 激活 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) /NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) /血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗氧化通路, 上调 NADPH 醌氧化还原酶 1 (NADPH quinone acceptor oxidoreductase 1, NQO1) 和 HO-1 的表达改善神经炎症和氧化应激<sup>[31]</sup>, 还可进一步诱导血清丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶活性的升高, 增强血清和大脑中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽的活力, 对肝损伤引起的小鼠焦虑和抑郁样行为具有抑制作用<sup>[32]</sup>。黄酮类化合物如金合欢素-7-O-葡萄糖苷

能延缓癫痫样危险的潜伏期和持续时间, 具有抗惊厥、镇静作用, 可能成为治疗神经手术引起的焦虑的药物<sup>[33]</sup>。甾醇类化合物 $\beta$ -谷甾醇对腹腔巨噬细胞和其他外周组织有广泛的抗炎作用, 可通过抑制 p38、ERK 和核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路的激活来影响小胶质细胞的活性, 保护神经元, 从而改善神经退行性疾病<sup>[34]</sup>。

### 3.2 甘松治疗 PDA 关键靶点分析

研究表明, MAPK3 是 MAPK 信号通路的重要组成部分, 在调控靶细胞的神经炎症、细胞凋亡等病变过程中均有参与<sup>[35]</sup>, 可引发 PD 患者线粒体钙单一转运 (mitochondrial calcium uniporter, MCU)、线粒体钙摄取 1 蛋白 (mitochondrial calcium uptake 1, MICU1) 的转录上调, 加剧神经炎症<sup>[36]</sup>; 另一项研究表明, 在阿尔茨海默症等神经退行性疾病伴失眠及焦虑患者血清中, MAPK 的表达常伴随升高现象, 但当焦虑症状缓解后, MAPK 的表达也会随之降低<sup>[37]</sup>。TNF- $\alpha$  作为一种炎症因子, 在 PDA 患者的脑脊液及外周血中含量普遍异常增加, 其致病机制可能与激活机体自由基的生成, 激发神经炎症反应导致的慢性神经变性有关<sup>[38]</sup>, 且 PDA 患者的焦虑程度与 TNF- $\alpha$  在外周血中的水平呈正相关<sup>[39]</sup>。STAT3 在细胞增殖、神经炎症、细胞凋亡等方面均具有调节作用<sup>[40]</sup>, 在很多人类疾病中, STAT3 多处于持续激活的状态<sup>[41]</sup>, STAT3 激活后会导致神经功能的下降, 但阻断该途径后对神经功能有更好的保护作用; 此外, STAT3 作为与炎症基因表达密切相关的分子, 在促进神经胶质细胞对脑损伤引起的炎症反应中具有重要的促进作用<sup>[42]</sup>; 在抗焦虑方面, 下调 TNF- $\alpha$ /Janus 激酶 (Janus kinases, JAK2)-STAT3 通路中的蛋白, 也可减轻大鼠的焦虑行为<sup>[43]</sup>。Src 蛋白是一类重要的转录调节因子, 广泛存在于神经元和胶质细胞中, 在神经损伤后会使其上调, 并激活促炎细胞因子的转录以及自由基的产生, 加剧神经退行性变<sup>[44]</sup>; 此外, Src 失调还会引起焦虑情绪, 其机制可能与 Src 过度活化导致谷氨酸信号减少有关<sup>[45]</sup>。

### 3.3 甘松治疗 PDA 主要通路分析

神经活性配体-受体相互作用通路与相应的受体结合后可参与机体的生理节律、情绪、学习和记忆等生物功能的调节<sup>[46]</sup>, 如与 Chrm3 受体结合, 可增强胆碱能功能, 促进学习和记忆能力的提高; 与 Drd5 受体结合, 可参与认知、情感以及运动的调节,

缓解焦虑情绪和运动障碍<sup>[47]</sup>；经典的雌激素信号通路受体包括雌激素受体  $\alpha$ 、 $\beta$  2 种类型<sup>[48]</sup>，雌激素通过与这 2 个受体结合对个体情绪产生重要影响<sup>[49]</sup>，如对 C57BL/6J 母鼠进行母婴分离实验，通过旷场、高架十字研究动物的焦虑样行为，发现产后母子分离对母本情绪的变化与 2 种雌激素受体的表达下降具有直接关系<sup>[50]</sup>。TNF 信号通路在细胞生存、死亡和分化过程中具有重要作用，经 TNF- $\alpha$  处理的人类星形胶质细胞显示出强烈的反应性促炎表型，促炎基因网络上调，还会导致 NF- $\kappa$ B 通路的激活<sup>[51]</sup>。另一项研究表明，NF- $\kappa$ B 通路的激活与氧化炎症损伤导致的小鼠焦虑和抑郁样行为有关，可通过降低小鼠脑内丙二醛、TNF- $\alpha$  水平，增加脑源性神经营养因子表达，改善神经炎症和氧化应激反应，减少杏仁核神经元细胞的丢失。

### 3.4 神经递质在 PDA 中的作用

研究表明，纹状体中 DA 能神经元退行性病变是 PD 的主要病理特征和发病原因，且 DA 能神经元的 NADH 脱氢酶铁硫蛋白含量下降还会引起小鼠产生焦虑行为<sup>[52]</sup>；对未接受治疗的 PDA 患者 DA 能进行测定，对比发现其黑质纹状体 DA 神经通路功能状态较治疗组明显减退，这可能和 PDA 患者早期焦虑情绪所导致的功能异常有关<sup>[53]</sup>，而上调患者血清中 DA 的含量可有效缓解焦虑症状<sup>[54-55]</sup>；除 DA 外，5-HT 系统也与 PDA 有关，可调控人的运动障碍、认知及情绪，研究发现，5-HT 能神经系统损伤在 PD 形成的早期阶段就已经出现，并且在患有焦虑、抑郁等联合症状的患者身上体现得更为显著<sup>[56]</sup>，可通过调控 5-HT 及其代谢产物的表达，有效改善焦虑症状<sup>[57-58]</sup>。因此，提高 PDA 患者 DA、5-HT 等神经递质的含量对该疾病的治疗具有重要意义。

### 3.5 甘松治疗 PDA 的药效学验证

在 PDA 大鼠模型基础上，通过转棒实验、旷场实验和 TH 免疫组化实验验证甘松治疗 PDA 的药效，结果表明，甘松可提高大鼠在转棒上的停留时间及在旷场中的活动距离，对其运动症状具有改善作用；增加了大鼠在旷场中央区的活动时间和活动距离，对其焦虑情绪具有缓解作用；TH 免疫组化染色结果表明，甘松提高了 PDA 大鼠黑质区 TH 阳性神经元的数量，TH 为合成多巴胺的前体物质，其含量升高对 DA 神经元的合成具有重要作用。因此，甘松对治疗 PDA 具有较强的药效学作用，为

后续机制的研究奠定了基础。

### 3.6 甘松治疗 PDA 的机制验证

通过网络预测得出 MAPK3、TNF- $\alpha$ 、STAT3 蛋白与 PDA 的发病机制最为密切，对关键蛋白进行含量测定，结果显示，甘松降低了 PDA 大鼠脑中 MAPK3、TNF- $\alpha$  含量和 STAT3 蛋白表达水平，与网络药理学预测结果一致。神经递质的含量测定结果显示，甘松可提高 PDA 大鼠脑中 DA、5-HT 及其代谢产物水平，改善 PDA。

综上所述，本研究通过网络药理学方法，筛选出了甘松治疗 PDA 的主要化学成分、关键靶点和信号通路，并通过动物实验进行验证，证明甘松治疗 PDA 的机制是通过下调 MAPK3、TNF- $\alpha$ 、STAT3 等靶蛋白，抑制神经炎症来调控 DA、5-HT 等神经递质水平，达到治疗 PDA 的作用。本研究为甘松治疗 PDA 的临床应用及药理机制提供了参考依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Xu W, Zheng D, Liu Y, et al. Glucocalyxin B alleviates lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease by inhibiting TLR/NF- $\kappa$ B and activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2091-2104.
- [2] 许薇. 蓝萼乙素对脂多糖诱导的帕金森病模型的神经保护作用及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [3] Antunes M S, Cattelan Souza L, Ladd F V L, et al. Hesperidin ameliorates anxiety-depressive-like behavior in 6-OHDA model of Parkinson's disease by regulating striatal cytokine and neurotrophic factors levels and dopaminergic innervation loss in the striatum of mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(7): 3027-3041.
- [4] Carey G, Lopes R, Viard R, et al. Anxiety in Parkinson's disease is associated with changes in the brain fear circuit [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, 80: 89-97.
- [5] Leentjens A F G, Dujardin K, Marsh L, et al. Symptomatology and markers of anxiety disorders in Parkinson's disease: A cross-sectional study [J]. *Mov Disord*, 2011, 26(3): 484-492.
- [6] Lo Buono V, Palmeri R, De Salvo S, et al. Anxiety, depression, and quality of life in Parkinson's disease: The implications of multidisciplinary treatment [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(3): 587-590.
- [7] 刘越存, 黎展鸿, 陈雄辉. 美多芭联合盐酸普拉克索治疗对帕金森病患者焦虑抑郁状态及血清炎症因子水平的影响 [J]. *中国医药科学*, 2017, 7(7): 12-15.
- [8] 柴滨, 马惠姿, 冯涛. 帕金森病患者伴发焦虑抑郁的影

- 响因素分析 [J]. 中国医药, 2021, 16(1): 71-74.
- [9] 石松鑫, 孙正芹, 张永志, 等. 帕金森病伴发焦虑的研究进展 [J]. 四川精神卫生, 2017, 30(5): 481-484.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 87-88.
- [11] 饶瑶, 李冉, 王晓雯, 等. 甘松中医药用药规律的数据挖掘 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3331-3343.
- [12] 明·李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 58.
- [13] 刘铁程. 甘松芳草的地名记录及汉、藏文化交流 [J]. 中国历史地理论丛, 2016, 31(4): 143-152.
- [14] 王胜男. 甘松对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [15] Velpandian V, Mohamed M M, Elangovans S, et al. Evaluation of anti-anxiety and anti-depressant activities of Sadamanjil Chooranam Extract (*Nardostachys jatamansi*) in mice [J]. *Pharm Health Res*, 2014, 2(9): 167.
- [16] Li C M, Wang M H. *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC prevents LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating inflammatory gene expression [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2014, 23(3): 903-909.
- [17] Rao V S, Rao A, Karanth K S. Anticonvulsant and neurotoxicity profile of *Nardostachys jatamansi* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 102(3): 351-356.
- [18] 武姣姣, 石晋丽, 唐民科, 等. 甘松对动物行为绝望模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 205-207.
- [19] 李亚楠, 马骏, 余沛豪, 等. 鱼藤酮帕金森病模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 175-179.
- [20] 刘鲁冰. 脊髓背角 5-HT<sub>3</sub> 受体在帕金森病模型大鼠疼痛中的作用机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [21] 南笑珂, 张鲁, 罗琳, 等. 中药甘松化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(10): 1312-1318.
- [22] 夏艳. 有氧运动对 6-OHDA 帕金森大鼠纹状体突触可塑性及其 MAPK/ERK 通路的影响 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
- [23] 王越. 鱼藤酮诱导 SH-SY5Y 帕金森模型中对 FOXO3a 在自噬凋亡中作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [24] 苏晓云, 贺继平, 郑华. 雌激素对去卵巢大鼠焦虑行为及杏仁核 c-fos 表达的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(8): 791-794.
- [25] Kline E M, Houser M C, Herrick M K, et al. Genetic and environmental factors in Parkinson's disease converge on immune function and inflammation [J]. *Mov Disord*, 2021, 36(1): 25-36.
- [26] 刘椰, 姜依凡, 刘鑫, 等. 背侧海马齿状回 5-HT<sub>1A</sub> 受体在帕金森病大鼠焦虑行为中的作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2017, 38(3): 402-409.
- [27] 崔晓萍, 陈建梅, 穆军山, 等. PI3K-AKT 通路对脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用 [J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(2): 154-159.
- [28] Euteneuer S, Yang K H, Chavez E, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces neuritegenesis in the cochlear spiral ganglion via neural cell adhesion molecule (NCAM) [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 54: 30-43.
- [29] Klein A, Gidyk D C, Shriner A M, et al. Dose-dependent loss of motor function after unilateral medial forebrain bundle rotenone lesion in rats: A cautionary note [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 222(1): 33-42.
- [30] Li Z H, Li W, Shi J L, et al. Nardosinone improves the proliferation, migration and selective differentiation of mouse embryonic neural stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91260.
- [31] Park J E, Park J S, Leem Y H, et al. NQO1 mediates the anti-inflammatory effects of nootkatone in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by modulating the AMPK signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 164: 354-368.
- [32] Yan T, Li F, Xiong W, et al. Nootkatone improves anxiety-and depression-like behavior by targeting hyperammonemia-induced oxidative stress in D-galactosamine model of liver injury [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(4): 694-706.
- [33] Gálvez J, Estrada-Reyes R, Benítez-King G, et al. Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33(5): 683-700.
- [34] Sun Y N, Gao L, Hou W, et al.  $\beta$ -sitosterol alleviates inflammatory response via inhibiting the activation of ERK/p38 and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-exposed BV2 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1-10.
- [35] 毕殿勇, 张蕾, 王利, 等. 帕金森病相关细胞信号通路及中医药干预作用的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(22): 3817-3819.
- [36] Verma M, Callio J, Otero P A, et al. Mitochondrial calcium dysregulation contributes to dendrite degeneration mediated by PD/LBD-associated LRRK2 mutants [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(46): 11151-11165.
- [37] 刘飞祥, 林子璇, 张怀亮, 等. 基于网络药理学分析加味归脾汤治疗阴火失眠伴焦虑的机制 [J]. 中国实验方

- 剂学杂志, 2020, 26(20): 161-168.
- [38] Brandes R P, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 76: 208-226.
- [39] Wang X M, Zhang Y G, Li A L, et al. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the peripheral blood and the severity of depression and anxiety in patients with Parkinson's disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(18): 3853-3856.
- [40] Madani A Y, Majeed Y, Abdesselem H B, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) suppresses STAT1/interferon signaling pathway and inflammation in senescent preadipocytes [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 334.
- [41] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1139-1142.
- [42] Satriotomo I, Bowen K K, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(5): 1353-1368.
- [43] Li X J, Ma Q Y, Jiang Y M, et al. Xiaoyaosan exerts anxiolytic-like effects by down-regulating the TNF- $\alpha$ /JAK2-STAT3 pathway in the rat hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 353.
- [44] Gage M C, Thippeswamy T. Inhibitors of src family kinases, inducible nitric oxide synthase, and NADPH oxidase as potential CNS drug targets for neurological diseases [J]. *CNS Drugs*, 2021, 35(1): 1-20.
- [45] Ward K R, Featherstone R E, Naschek M J, et al. Src deficient mice demonstrate behavioral and electrophysiological alterations relevant to psychiatric and developmental disease [J]. *Prog Neuro Psychoph*, 2019, 93: 84-92.
- [46] 郭志云, 张怀渝, 王月兰, 等. 生物胺受体配基结合区域及其位点的预测 [J]. *生物物理学报*, 2005, 21(2): 95-102.
- [47] 王红艳, 赵淑梅, 岳启安, 等. 中药呆聪液对老龄痴呆大鼠模型脑组织 M1, M3 受体 mRNA 水平影响的研究 [J]. *潍坊医学院学报*, 2007, 29(5): 392-393.
- [48] Burris T P, Solt L A, Wang Y, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(2): 710-778.
- [49] He F. The relationship of prenatal ethanol exposure and anxiety-related behaviors and central androgen receptor and vasopressin expression in adult male mandarin voles [J]. *Neuroscience*, 2014, 266: 224-234.
- [50] 何凤琴, 郁兵, 向全丽, 等. 雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$  表达变化与 C57BL/6J 小鼠母婴分离所致焦虑样行为相关 [J]. *解剖学报*, 2021, 52(1): 30-35.
- [51] Russ K, Teku G, Bousset L, et al. TNF- $\alpha$  and  $\alpha$ -synuclein fibrils differently regulate human astrocyte immune reactivity and impair mitochondrial respiration [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(12): 108895.
- [52] Choi W S, Kim H W, Tronche F, et al. Conditional deletion of Ndufs4 in dopaminergic neurons promotes Parkinson's disease-like non-motor symptoms without loss of dopamine neurons [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44989.
- [53] Erro R, Pappatà S, Amboni M, et al. Anxiety is associated with striatal dopamine transporter availability in newly diagnosed untreated Parkinson's disease patients [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(9): 1034-1038.
- [54] 吴修敏. 督灸联合柴胡舒肝丸对气郁质失眠患者焦虑状态及血清多巴胺的影响 [J]. *河南中医*, 2021, 41(5): 766-769.
- [55] 刘苹, 常延河, 杨莹, 等. 运动干预对苯二氮卓类药物依赖伴焦虑症患者血清多巴胺、五羟色胺及生活质量的影响 [J]. *中国药物依赖性杂志*, 2021, 30(2): 112-117.
- [56] Grosch J, Winkler J, Kohl Z. Early degeneration of both dopaminergic and serotonergic axons — A common mechanism in Parkinson's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 293.
- [57] 张洁, 王强, 梁雨璐, 等. 丁香酚与甲基丁香酚的抗焦虑作用机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(6): 1259-1265.
- [58] 李瑞洁, 张月月, 崔瑛. 黄连总碱片对实热焦虑模型的抗焦虑作用及机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 2268-2272.

[责任编辑 李亚楠]