

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

吴萍洲, 梁晓霞, 王术玲*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510000

摘要:目的 筛选柴胡疏肝散中抑制色氨酸-2,3-双加氧酶 (tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO) 表达的活性组分, 探寻其抗抑郁药效作用。方法 双荧光素酶报告基因法检测化合物对 TDO 表达的影响; 分子对接虚拟评价化合物与 TDO 的结合能力, TDO 过表达人肝癌 HepG2 细胞株检测其抑制活性; 制备柴胡疏肝散各单味药的含药血清, 验证抑制 TDO 的显效药味; 将吲哚胺-2,3-双加氧酶 (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) 过表达慢病毒感染人源结肠癌 Caco-2 细胞, 检测活性组分的 IDO 抑制活性。采用三联一复合应激法构建抑郁样小鼠模型, 通过行为学观察、LC-MS/MS 检测血浆中犬尿氨酸含量、Western blotting 和 qRT-PCR 检测 TDO、IDO 表达等技术评价活性组分的抗抑郁作用。结果 双荧光素酶报告基因法筛选出芍药苷、橙皮苷、辛弗林、刺芒柄花苷均可抑制 TDO 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 分子对接发现上述 4 种化合物对 TDO 有亲和性; 过表达细胞证实芍药苷可抑制 TDO 和 IDO 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 刺芒柄花苷选择性抑制 TDO 表达 ($P < 0.001$); 抑郁样小鼠在给予芍药苷、刺芒柄花苷或两药联用后, 糖水偏嗜显著升高 ($P < 0.001$), 悬尾不动时间明显减少 ($P < 0.001$), 游泳不动时间明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.001), 自主活动显著增多, TDO 表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血中犬尿氨酸含量显著减少 ($P < 0.05$)。结论 芍药苷和刺芒柄花苷均可通过抑制 TDO 表达发挥抗抑郁作用。

关键词: 柴胡疏肝散; 色氨酸 2,3-双加氧酶; 抑制作用; 芍药苷; 刺芒柄花苷; 抑郁症

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)09-2812-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.014

Screening of tryptophan-2,3-dioxygenase inhibitors in Chaihu Shugan Powder and its antidepressant efficacy

WU Ping-zhou, LIANG Xiao-xia, WANG Shu-ling

School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To screen the active components that inhibit the expression of tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) in Chaihu Shugan Powder (柴胡疏肝散), and explore its anti-depressant effects. **Methods** Dual-luciferase reporter gene assay was used to detect the effect of compounds on TDO expression. The binding ability of the compound to TDO was evaluated by molecular docking, and the inhibitory activity of TDO-overexpressed human hepatoma HepG2 cell line was detected. The serum containing Chaihu Shugan Powder was prepared to verify its effective inhibition on TDO. Human colon cancer Caco-2 cells were infected by indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) overexpression of lentivirus to detect the IDO inhibitory activity of the active components. A depression-like mouse model was constructed by triple-combination stress method. Behavioral observation, LC-MS/MS detection of plasma canine urine content, Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of TDO and IDO to evaluate the antidepressant effect of the active components. **Results** Paeoniflorin, hesperidin, synephrine and formononetin could inhibit the expression of TDO by dual-luciferase reporter gene method ($P < 0.05$, 0.01). Molecular docking showed that the four compounds had affinity to TDO. The overexpressed cell lines showed that paeoniflorin could inhibit the expression of TDO and IDO ($P < 0.01$, 0.001), and formononetin selectively inhibited the expression of TDO ($P < 0.001$). After the treatment of paeoniflorin, formononetin or the combination of the two drugs, the sugar water bias of the mice was significantly increased ($P < 0.001$), the tail suspension immobility time was significantly decreased ($P < 0.001$), and the swimming immobility time was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.001), the autonomic activity was significantly increased, the expression of TDO was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), and the content of kynurenine in blood

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174257)

作者简介: 吴萍洲 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质与作用机制。E-mail: 1223087261@qq.com

*通信作者: 王术玲 (1977—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。E-mail: jingelwang@gzucm.edu.cn

was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Both paeoniflorin and formononetin can play an antidepressant role by inhibiting the expression of TDO.

Key words: Chaihu Shugan Powder; tryptophan 2,3-dioxygenase; inhibition effect; paeoniflorin; formononetin; depression

色氨酸-2,3-双加氧酶 (tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO) 和吲哚胺-2,3-双加氧酶 (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) 是催化色氨酸向犬尿氨酸通路 (kynurenine pathway, KP) 代谢的关键限速酶, 与抑郁症^[1]、癌症^[2]、中枢神经系统疾病^[3-4]等多种疾病相关。机体内约 95% 的色氨酸由 TDO 代谢为犬尿氨酸 (kynurenine, KYN), TDO 主要表达在肝脏中, 是一种具有特异性 L-色氨酸酶活性的含血红素四聚体蛋白, 其合成受糖皮质激素和 L-色氨酸的调节。前期研究发现抑郁样小鼠肝脏中 TDO 表达异常升高, 柴胡疏肝散可显著降低 TDO 表达^[5]。目前越来越多证据表明, TDO/IDO 介导的 KP 通路 with 抑郁症的病理生理学密切相关^[6]。因此, 利用现代高通量筛选手段从柴胡疏肝散中寻找具有 TDO 抑制剂的先导化合物具有重要意义。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 [体质量 (20±2) g], SPF 级雄性 KM 小鼠 [体质量 (20±2) g], 均购自广东省医学实验动物中心, 许可证号 SCXK (粤) 2018-0002。实验动物饲养于广州中医药大学中药学院 SPF 级动物房, 12 h 光昼交替, 自由进食饮水, 动物实验取得了广州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准 (批准号 ZYD-2022-119)。

人肝癌 HepG2 细胞、人胚肾上皮 HEK-293T 细胞、人结肠癌 Caco-2 细胞由广州中医药大学新药研发中心馈赠。

1.2 药材

柴胡、白芍、醋陈皮、麸炒枳壳、川芎、香附、炙甘草 (批号分别为 210301861、210801381、210900331、210801851、210629226、210300391、210802411) 均购自康美药业股份有限公司, 经广州中医药大学王术玲教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、毛茛科植物安徽芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、芸香科植物广东橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮、芸香科植物江西酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实、伞形科植物四川川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、莎草

科植物山东莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 符合《中国药典》标准。

1.3 药品与试剂

对照品柴胡皂苷 A、橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素、1-甲基-D,L-色氨酸 (1-methyltryptophan, 1-MT)、茶碱购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均 ≥ 98%, 批号分别为 PO3M9F50593、MO2J9S64781、120306、Z31J6L2067、P11N8L48150、MYN1103CA14、S14M6G2、M02J9S64781; 对照品刺芒柄花苷、芍药苷、(E)-6-氟-3-[2-(1H-四唑-5-基)乙烯基]-1H-吲哚 [(E)-3-(2-(1H-tetrazol-5-yl)vinyl)-6-fluoro-1H-indole, LM10] 购自成都曼思特生物科技有限公司 (质量分数均 ≥ 98%, 批号分别为 21080311、22042201、22060301); 对照品辛弗林、甘草素购自四川维克奇生物技术有限公司, 质量分数均 ≥ 98%, 批号分别为 21020905、140401; 对照品阿魏酸、槲皮素、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、柴胡皂苷 D 购自成都普菲德生物技术有限公司, 质量分数均 ≥ 98%, 批号分别为 17092501、18050901、18082704、18020501、18060501; CCK-8 试剂盒 (批号 17133EF5E) 购自 APEX BIO 公司; IDO 抗体 (#51851)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (14C10#2118)、山羊抗兔二抗 (#7074) 购自美国 CST 公司; TDO (批号 SAB2108726) 购自美国 Sigma 公司; 山羊抗鼠二抗 (批号 SA00001-1) 购自 Proteintech 公司; 小提质粒提取试剂盒 (批号 O41204) 购自北京全式金生物技术有限公司; qRT-PCR 试剂盒 (批号 A4A1395) 购自 AG 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 01222) 购自北京康为世纪生物技术有限公司; 慢病毒包装试剂盒 (批号 KLV3504) 购自重庆英茂盛生物科技有限公司; Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 双荧光素酶检测试剂盒 (批号 B13WP2201)、EndoFectin™ Max 转染试剂 (批号 EF031)、hTDO 重组双荧光素酶质粒、TDO 慢病毒过表达质粒、IDO 慢病毒过表达质粒订制于广州易锦生物技术有限公司。

1.4 仪器

EnSpire 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); SDS-PAGE 垂直电泳槽、Criterion 型转膜电泳槽蛋白转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); qTOWER3 型荧光定量 PCR 仪 (德国耶拿公司); 6460 型三重四极杆质谱仪 (美国 Agilent 公司); 全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); MCO-20AIC 型 CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

37 °C 复苏 HepG2、HEK-293T、Caco-2 细胞后, 用含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中恒温孵育。细胞密度达 80% 进行传代, 用对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 CCK-8 检测细胞毒性

已知 TDO 抑制剂 LM10 对 TDO 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 为 2 μmol/L^[7]。将 HEK-293T 细胞以 1×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞生长密度达 80% 时, 分别用 2 μmol/L 柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、槲皮素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、橙皮苷、辛弗林、柚皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷、阿魏酸、川陈皮素、甘草素、刺芒柄花苷干预 36 h, 随后加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 4 h, 使用酶标仪检测 450 nm 波长下各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 双荧光素酶报告基因筛选法

2.3.1 重组质粒的构建、转化与抽提 利用 UCSC Genome Browser 网站信息, 构建包含靶向结合位点序列的 hTDO 重组双荧光素酶质粒。将重组质粒转化至大肠杆菌 TransStbl3 感受态细胞, 涂布 LB 固体培养基, 次日挑取单菌落至 LB 抗性液培中振荡培养 16 h, 按照小提质粒提取试剂盒说明书裂解大肠杆菌, 超微量紫外分光光度计测定提取质粒的纯度与浓度。

2.3.2 引物设计与载体鉴定 引物序列: hTDO 重组双荧光素酶质粒上游引物 5'-GTCGTAG-AGCCAAGACTAGAAATCAGG-3', 下游引物 5'-AACAACAACAACAACAACAACAAGAACC-3'; PH2 上游引物 5'-ACAGGGTACACATATTGACCA-3', 下游引物 5'-GAACTTGCAATTCACCCCAA-3'; TDO 慢病毒过表达质粒上游引物 5'-TCCTCAGGC-

TATCACTACCTGC-3', 下游引物 5'-ATCTTCG-GTATCCAGTGTCCG-3'。PCR 反应程序: 94 °C、10 min; 94 °C、30 s, 57 °C、30 s, 72 °C、20 s, 30 个循环; 72 °C、10 min。对重组载体与空载体进行单酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外凝胶成像系统拍照与分析。

2.3.3 给药与检测 采用瞬时转染法, 将生长状态良好的 HEK-293T 细胞以适当比例接种至 96 孔板过夜培养, 次日用 EndoFectin™ Max 转染试剂按照使用说明进行转染, 报告质粒转染量为每孔 100 ng, 转染 8 h 后更换为完全培养基, 将候选化合物以 2 μmol/L 给药处理 36 h, 转染 44 h 后收集培养基, 按照 Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 双荧光素酶检测试剂盒制备工作液, 分别测定 Gaussia 荧光素酶 (Gaussia luciferase, GLuc) 和分泌型碱性磷酸酶 (secreted alkaline phosphatase, SEAP) 活性, 将 GLuc 强度值/SEAP 强度值进行标准化校正, 结果即为报告基因的相对表达水平。每组实验重复 4 次, 结果取平均值。

2.4 分子对接虚拟筛选

从 PDB 数据库下载蛋白结构, 与 PubChem 下载的三维配体一一对接, 使用 Chem 3D、PyMOL 等软件对蛋白结构进行优化, 程序定义蛋白活性位点, 使用 AutoDock vina 软件进行分子对接。分子间的结合能越小, 表示其对接性越好, 一般以结合能 ≤ -21.0 kJ/mol 表示具有较好的结合性^[8], 分析受体与配体相互作用并保存其结构图。

2.5 TDO 或 IDO 过表达细胞株的构建

将 TDO/IDO 慢病毒过表达质粒、辅助包装质粒 PH1、PH2, 按照慢病毒包装试剂盒说明书进行配制, 逐滴加入培养好的 HEK-293T 细胞中, 6 h 后换液, 分别收集 48、72 h 的细胞培养上清。用上述病毒液分别感染正常 HepG2 细胞或 Caco-2 细胞, 48 h 时后荧光显微镜下观察满视野有 70% 以上细胞发出绿色荧光, 表明此时 TDO/IDO 过表达细胞株构建成功。

2.6 含药血清的制备

参考文献方法^[9], 根据人与小鼠体表面积换算等效剂量法, 将 54 只雄性 KM 小鼠随机分为对照组、柴胡 (7.8 g/kg) 组、白芍 (5.85 g/kg) 组、陈皮 (7.8 g/kg) 组、枳壳 (5.85 g/kg) 组、川芎 (5.85 g/kg) 组、香附 (5.85 g/kg) 组、甘草 (1.95 g/kg) 组及全方 (41 g/kg) 组。按柴胡疏肝散处方比例, 称

取柴胡 6 g、白芍 4.5 g、醋陈皮 6 g、麸炒枳壳 4.5 g、川芎 4.5 g、生香附 4.5 g、炙甘草 1.5 g，制成粗粉，加 10 倍量的水（浸没药面约 2 cm）浸泡 30 min，煮沸后文火回流提取 30 min，8 层纱布滤过取滤液，滤渣再加 6 倍量水回流提取 20 min，合并 2 次水提液，减压浓缩至 50 mL。对照组 ig 生理盐水，各给药组 ig 相应药物（20 mL/kg），1 次/d，连续 3 d，末次给药 1 h 后摘眼球取血，室温静置，3000 r/min 离心 15 min，分离血清，同组血清混合，56 °C 水浴 30 min 灭活补体，0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌，置于 -80 °C 冰箱，备用。

2.7 Western blotting 检测过表达细胞株 TDO 和 IDO 蛋白表达

2.7.1 单体化合物对 TDO 表达的影响 将培养的 TDO 过表达 HepG2 细胞以 1×10^7 个/孔接种于 6 孔板中，设置过表达组、刺芒柄花苷组、芍药苷组、辛弗林组、橙皮苷组以及阳性药 LM10 组，每组 4 个复孔，以正常人 HepG2 细胞为空白对照，待细胞生长密度达 80% 时，分别用 2 μ mol/L 刺芒柄花苷、芍药苷、辛弗林、橙皮苷、LM10 干预 24 h，收集细胞，Western blotting 检测 TDO 表达情况。

2.7.2 柴胡疏肝散各单味药的含药血清对 TDO 表达的影响 培养的 TDO 过表达 HepG2 细胞以 1×10^7 个/孔接种于 6 孔板中，设置过表达组、柴胡组、白芍组、陈皮组、枳壳组、川芎组、香附组、甘草组以及全方组，每组 3 个复孔，以正常人 HepG2 细胞为对照，待细胞生长密度达 80% 时，给药组分别用柴胡疏肝散及其各单味药 10% 含药血清干预 24 h，对照组和过表达组加入含 10% 空白小鼠血清的同等体积的培养基，收集细胞，Western blotting 检测 TDO 表达情况。

2.7.3 单体化合物对 IDO 表达的影响 培养的 IDO 过表达 Caco-2 细胞以 1×10^7 个/孔接种于 6 孔板中，设置过表达组、刺芒柄花苷组、芍药苷组、刺芒柄花苷-芍药苷组以及阳性药 1-MT 组，每组 4 个复孔，以正常人 Caco-2 细胞为对照，待细胞生长密度达 80% 时，给药组分别用 2 μ mol/L 刺芒柄花苷、芍药苷、刺芒柄花苷-芍药苷、1-MT 干预 24 h，收集细胞，Western blotting 检测 IDO 表达情况。

2.7.4 Western blotting 检测 培养的细胞用 RIPA 裂解液（RIPA-PMPF=100:1）裂解获取总蛋白，使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度，经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至

PVDF 膜上，然后分别加入 TDO（1:500）、IDO（1:1000）、GAPDH（1:5000）抗体，4 °C 孵育过夜，次日加入二抗（1:3000）孵育 1 h，使用 ECL 化学发光液显影。

2.8 抑郁症小鼠模型的建立与给药

实验前对雄性 C57BL/6 小鼠进行完全随机化分组，设置对照组、模型组、刺芒柄花苷（160 mg/kg）组、芍药苷（160 mg/kg）组、刺芒柄花苷（80 mg/kg）-芍药苷（80 mg/kg）组和阳性对照 LM10（160 mg/kg）^[10]组。按照三联一复合应激法^[11]复制重度抑郁症小鼠模型，于造模第 31 天起，在给予刺激的同时，连续 ig 给药 7 d，对照组和模型组 ig 等体积生理盐水。

2.9 抑郁症小鼠行为学评价

参照文献方法^[12]，观察小鼠的行为状态，每周记录体质量变化，末次给药后连续 3 d 分别进行糖水偏好实验、悬尾实验、强迫游泳实验和旷场实验。

2.10 LC/MS/MS 检测抑郁症小鼠血浆中 KYN 含量

按前期建立的 LC-MS/MS 方法^[5]检测血浆中 KYN 的含量。色谱条件：Waters XSelect HSS T3 色谱柱（100 mm $\times$ 2.1 mm，2.5 μ m）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱：0~0.5 min，5% B；0.5~5 min，5%~15% B；5~7 min，15%~50% B；7~10 min，50%~90% B；10~11 min，90% B；11~12 min，90%~5% B；12~17 min，5% B；柱温 30 °C；体积流量 0.2 mL/min。

质谱条件：电喷雾（ESI）离子源；离子源温度 300 °C；扫描范围 m/z 100~1000；锥孔气和去溶剂气均为氮气，体积流量分别为 5 L/min 和 11 L/min，其中去溶剂气温度为 300 °C。正离子模式下毛细管电压为 3500 V，喷嘴电压为 500 V。血浆样品用 4 倍量乙腈沉淀蛋白，涡旋离心取上清，加入 5 μ L 内标茶碱溶液（9 μ g/mL）后，真空离心干燥，上机检测前用流动相（0.1% 甲酸水溶液）复溶，离心 15 min 取上清进样分析。

2.11 qRT-PCR 检测抑郁症小鼠肝组织 TDO 基因表达和结肠组织 IDO 基因表达

将小鼠肝和结肠组织剪碎后加入 TRIzol 常规提取总 RNA，利用反转录试剂盒合成 cDNA，以 cDNA 为模板，利用荧光定量试剂盒检测 TDO 和 IDO 的表达水平，以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各基因的相对表达水平。引物序列：TDO 上游引物 5'-AACATGCTCAAGGTGATAGCTC-3'，下游引物 5'-GAACCGAGAACTGCTGTACCA-3'；

IDO 上游引物 5'-ATGTGGGCTTTGCTCTACCA-3', 下游引物 5'-AAGCTGCCCGTTCTCAATCA-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3', 下游引物 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'。

2.12 Western blotting 检测抑郁症小鼠肝组织 TDO 和结肠组织 IDO 蛋白表达

取各组小鼠肝组织及结肠组织, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 按“2.7.4”项下方法检测肝组织 TDO 和结肠组织 IDO 蛋白表达。

2.13 统计学分析

实验数据通过 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 其中, 满足方差齐性的检验以单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行处理。

3 结果

3.1 CCK-8 法测定药物的细胞毒性

参照前期研究结果^[5], 选取柴胡疏肝散中与 TDO 表达关联度较大的化合物: 柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、槲皮素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药

药苷、橙皮苷、辛弗林、柚皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷、阿魏酸、川陈皮素、甘草素、刺芒柄花苷以及阳性药 LM10, 采用 CCK-8 法进行体外细胞药物毒性测定, 确定各化合物在给药剂量 2 $\mu\text{mol/L}$ 、作用 36 h 对细胞无毒。根据 GB/T16886.5-2017 规定, 细胞存活率大于 80% 为安全无毒。结果见表 1。

3.2 hTDO 启动子双荧光素酶报告系统

琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 扩增条带片段大小和预期值一致, 酶切产物电泳可见预期大小的目的条带, 表明目的基因克隆成功。经双荧光素酶报告系统检测, 发现 TDO 组与空载组相比具有显著性 ($P < 0.001$), 给药组中芍药苷、橙皮苷、辛弗林、刺芒柄花苷和阳性药 LM10 均可显著抑制 TDO 启动子的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见图 2。

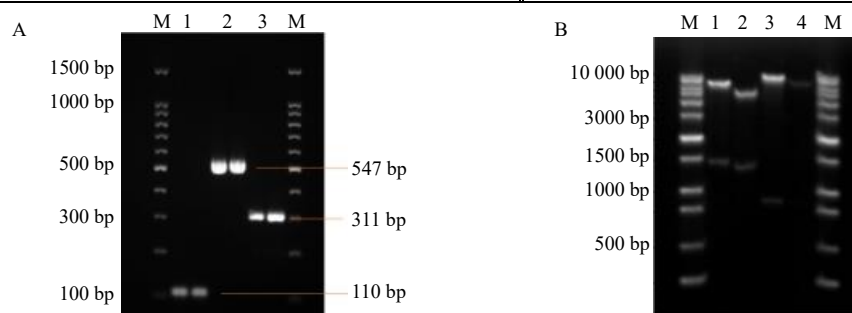
3.3 分子对接

分子对接结果如图 3 和表 2 所示, 刺芒柄花苷、辛弗林、芍药苷、橙皮苷与 TDO 有较好的结合活性且构象稳定。

表 1 单体化合物对 HEK-293T 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Effect of monomer compound on survival rate of HEK-293T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率/%	组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 2.91	柚皮苷	2	118.94 $\pm$ 13.07
柴胡皂苷 A	2	104.60 $\pm$ 10.01	新橙皮苷	2	106.83 $\pm$ 1.60
柴胡皂苷 D	2	97.37 $\pm$ 0.59	芸香柚皮苷	2	104.09 $\pm$ 1.49
槲皮素	2	91.99 $\pm$ 24.00	阿魏酸	2	115.21 $\pm$ 10.94
芍药苷	2	99.48 $\pm$ 1.41	川陈皮素	2	105.71 $\pm$ 4.01
芍药内酯苷	2	85.29 $\pm$ 14.19	甘草素	2	103.13 $\pm$ 0.92
苯甲酰芍药苷	2	100.98 $\pm$ 5.86	刺芒柄花苷	2	103.13 $\pm$ 0.69
橙皮苷	2	102.05 $\pm$ 4.90	LM10	2	116.68 $\pm$ 12.50
辛弗林	2	94.68 $\pm$ 0.74			

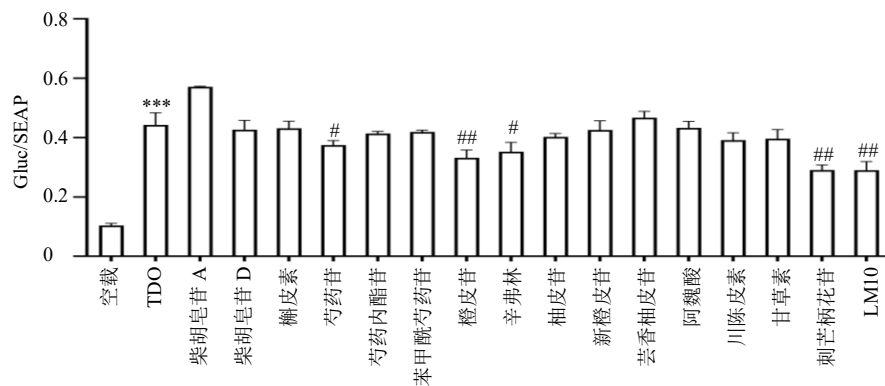


A-质粒 PCR 鉴定结果图, M-100 bp Marker, 1-TDO 慢病毒过表达质粒, 2-PH2 质粒, 3-hTDO 重组双荧光素酶质粒 B-酶切鉴定结果图, M-1 kb Marker, 1-hTDO 重组双荧光素酶质粒 (7044、1452 bp), 2-空载质粒 (5453、1452 bp), 3-TDO 慢病毒过表达质粒 (8972、902 bp), 4-慢病毒空载质粒 (7751、902 bp)

A-plasmid PCR identification results, M-100 bp Marker, 1-TDO lentivirus overexpression plasmid, 2-PH2 plasmid, 3-hTDO recombinant dual-luciferase plasmid B-restriction enzyme identification results, M-1 kb Marker, 1-hTDO recombinant dual-luciferase plasmid (7044, 1452 bp), 2-empty plasmid (5453, 1452 bp), 3-TDO lentivirus overexpression plasmid (8972, 902 bp), 4-lentivirus empty plasmid (7751, 902 bp)

图 1 目的基因电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoretic detection results of target genes



与空载组比较: *** $P < 0.001$; 与 TDO 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs empty group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs TDO group

图 2 候选化合物的双荧光素酶报告基因检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Results of dual-luciferase reporter gene assay for candidate compounds ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

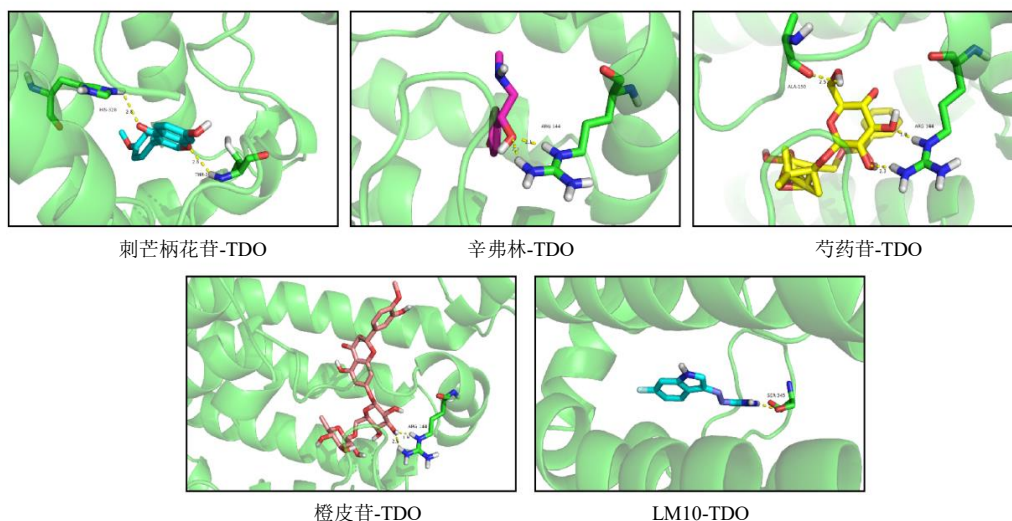


图 3 分子对接结果

Fig. 3 Molecular docking results

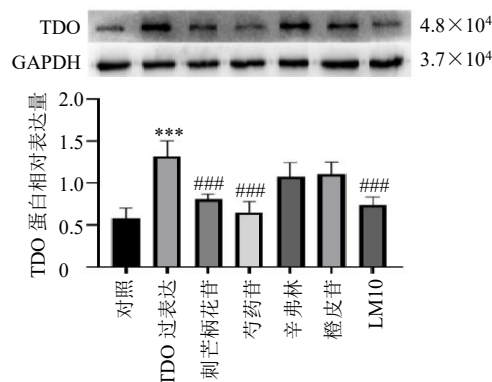
表 2 配体分子与 6UD5 蛋白对接结果

Table 2 Results of docking between ligand molecules and 6UD5 protein

化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	结合位点
刺芒柄花苷	-35.1	HIS-328
辛弗林	-22.2	ARG-144
芍药苷	-38.9	ALA-150
橙皮苷	-35.6	ARG-144
LM10	-40.0	SER-345

3.4 TDO 过表达稳转细胞株筛选活性组分

如图 4 所示,与对照组比较,过表达细胞的 TDO 表达显著升高 ($P < 0.001$),说明 TDO 过表达稳转细胞株构建成功。给药后,刺芒柄花苷、芍药苷与 LM10 可明显降低 TDO 表达 ($P < 0.001$),辛弗林、橙皮苷作用不明显。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 TDO 过表达组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs TDO overexpression group

图 4 单体化合物对 TDO 过表达 HepG2 细胞 TDO 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effect of monomer compounds on TDO expression in TDO-overexpressed HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

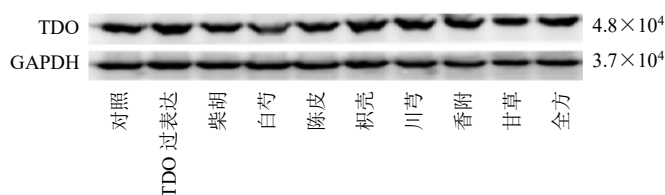
3.5 柴胡疏肝散各单味药的含药血清对 TDO 表达的影响

将柴胡疏肝散各单味药的含药血清以 10% 浓度与 TDO 过表达稳转细胞株共孵育 24 h 后, Western blotting 法检测 TDO 表达情况, 结果如图 5 所示, 与对照组比较, TDO 过表达细胞中 TDO 表达显著升高 ($P < 0.01$); 含药血清干预后, 白芍组、甘草组均可降低 TDO 的表达 ($P < 0.05$), 与前面单体成分筛选结果相吻合 (芍药含有芍药苷、甘草含有刺

芒柄花苷)。

3.6 芍药苷和刺芒柄花苷对 IDO 表达的影响

通过构建 IDO 过表达 Caco-2 细胞株检测芍药苷和刺芒柄花苷对 IDO 表达的影响。如图 6 所示, 与对照组比较, IDO 过表达细胞中 IDO 表达显著升高 ($P < 0.001$), 给药后, 芍药苷、阳性药 1-MT 均能明显降低 IDO 的表达 ($P < 0.01$), 刺芒柄花苷组对 IDO 表达作用不明显, 说明刺芒柄花苷是 TDO 选择性抑制剂, 而芍药苷是 TDO/IDO 双重抑制剂。

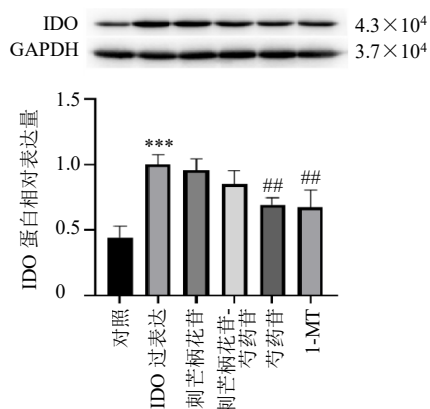


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 TDO 过表达组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TDO overexpression group

图 5 柴胡疏肝散各单味药的含药血清对 TDO 过表达 HepG2 细胞 TDO 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of drug-containing serum of each single drug of Chaihu Shugan Powder on TDO expression in TDO-overexpressed HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.01$; 与 IDO 过表达组比较: ## $P < 0.01$

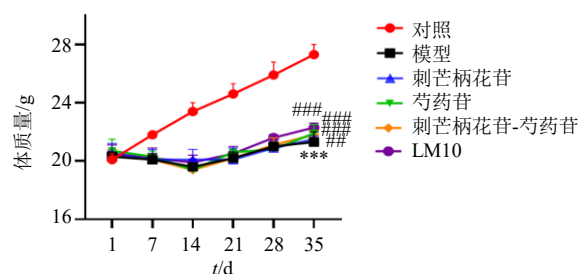
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs IDO overexpression group

图 6 单体化合物对 IDO 过表达 Caco-2 细胞 IDO 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of monomer compounds on IDO expression in IDO-overexpressed Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 抑郁症小鼠体型状态和体质量变化

与对照组比较, 三联一复合应激法造模 30 d 后小鼠体型瘦小、毛发发黄且干枯无光泽。给予活性组分干预后, 小鼠体型和精神状态较模型组都有一定的改善, 毛色和光泽度也有了明显改善。如图 7



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

$P < 0.001$, 下同

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 7 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

所示, 造模前各组小鼠体质量相近, 造模 35 d 后模型组小鼠比正常小鼠体质量显著降低 ($P < 0.001$), 给药 7 d 后, 刺芒柄花苷组、芍药苷组、刺芒柄花苷-芍药苷组、LM10 组小鼠体质量较模型组均明显上升 ($P < 0.01, 0.001$)。

3.8 抑郁症小鼠行为学分析

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组糖水消耗

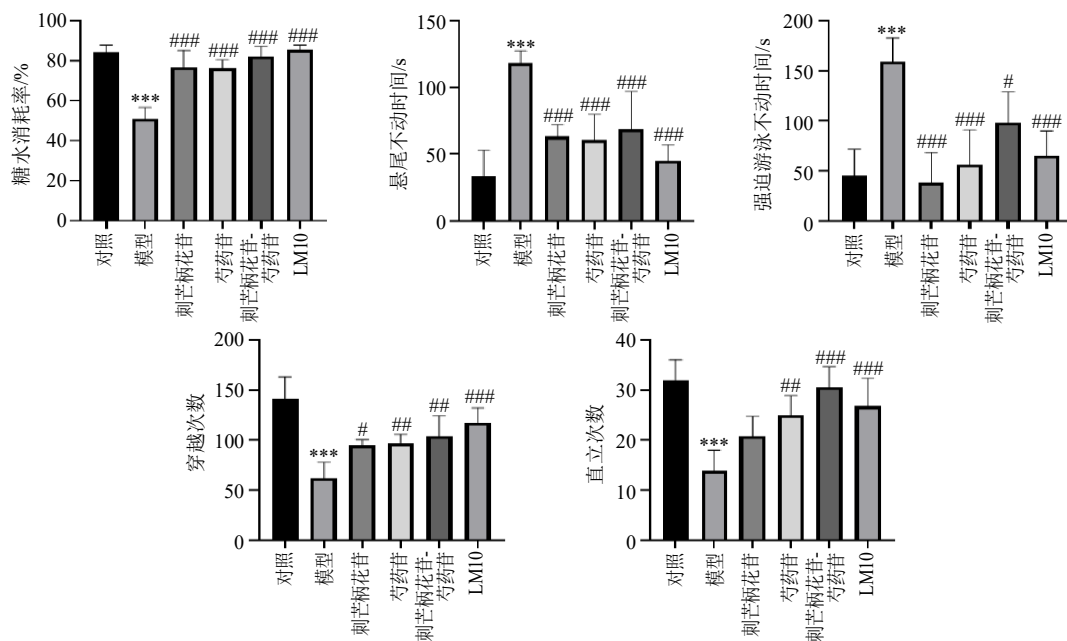


图 8 各组小鼠行为学分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Analysis of behavior in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

率显著降低 ($P < 0.001$), 给予活性组分干预后明显上升 ($P < 0.001$)。悬尾实验和强迫游泳实验中, 模型组的不动时间较对照组显著延长 ($P < 0.001$), 给予活性组分干预后不动时间显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.001)。旷场实验中, 与对照组比较, 模型组穿越次数和直立次数均显著减少 ($P < 0.001$), 给予活性组分干预后小鼠穿越次数和直立次数明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 自主活动水平明显提高。经上述行为学指标联合分析, 说明刺芒柄花苷、芍药苷及二者联用均有抗抑郁效果。

3.9 各组小鼠血浆中 KYN 含量

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组血浆中 KYN 含量明显升高 ($P < 0.05$), 给予刺芒柄花苷、芍药苷、刺芒柄花苷-芍药苷联用后, 血浆中 KYN 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠血浆中 KYN 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 KYN content in plasma of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	KYN/(mg·mL ⁻¹)
对照	—	0.001 5 ± 0.000 0
模型	—	0.002 9 ± 0.000 5*
刺芒柄花苷	160	0.001 5 ± 0.000 1#
芍药苷	160	0.001 7 ± 0.000 2#
刺芒柄花苷-芍药苷	80 + 80	0.001 5 ± 0.000 3#
LM10	160	0.002 0 ± 0.000 4#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

3.10 各组小鼠肝组织中 TDO 表达

如图 9 所示, 三联一复合应激法造模后小鼠肝脏中 TDO 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 给予刺芒柄花苷、芍药苷、刺芒柄花苷-芍药苷后, TDO 蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.001$)。

3.11 各组小鼠结肠组织中 IDO 表达

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠中 IDO 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.001$), 给予芍药苷后能明显下调 IDO 表达 ($P < 0.01$), 刺芒柄花苷和 LM10 对 IDO 表达作用不明显, 验证了芍药苷为 TDO/IDO 双重抑制剂, 而刺芒柄花苷为 TDO 选择性抑制剂。

4 讨论

研究显示, KP 的激活在情绪调节中起着至关重要的作用, 人们对 KP 参与抑郁症的研究可追溯至 20 世纪 70 年代, KP 存在于体内多个系统并相互影响, 很有可能成为抑郁症众多假说的贯通点^[13]。在压力增大、心情低落的抑郁状态下, 肾上腺会产生大量皮质醇, 激活 TDO 酶的活性^[14-16], 使色氨酸代谢从 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 途径转移到 KP 途径, 导致中枢 5-HT 不足加重抑郁病情。且 5-HT 不能通过血脑屏障, 要维持中枢 5-HT 浓度稳定, 只能调集外周色氨酸进入脑内, 但是机体内的色氨酸可利用量是一定的, 因此会形成色氨酸肝-脑

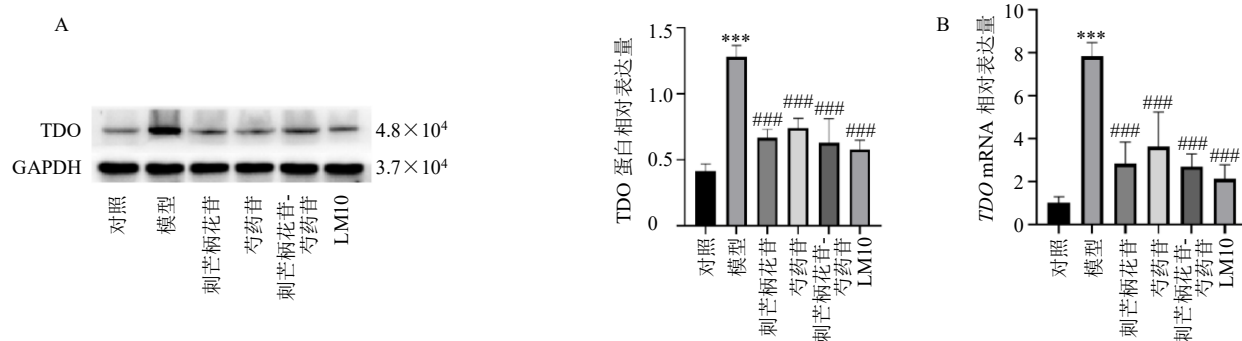


图9 各组小鼠肝组织中 TDO 蛋白 (A) 及 mRNA (B) 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 TDO protein (A) and mRNA (B) expressions in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

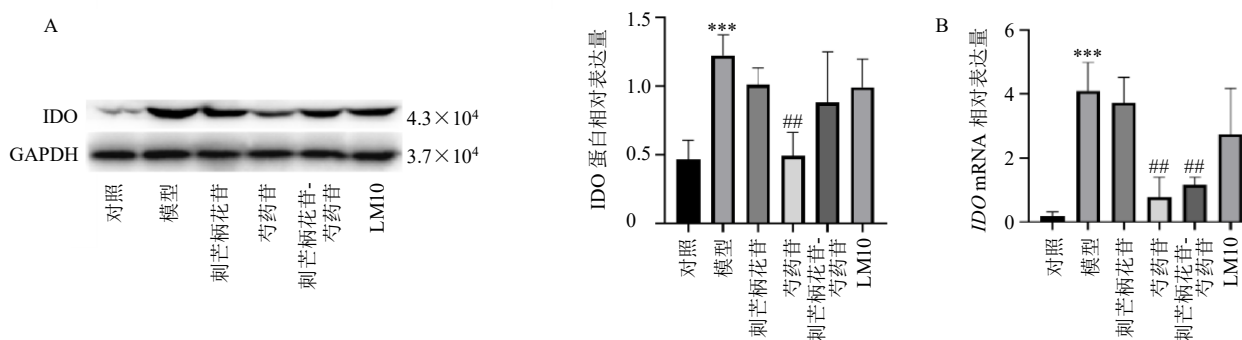


图10 各组小鼠结肠组织中 IDO 蛋白 (A) 及 mRNA (B) 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 10 IDO protein (A) and mRNA (B) expressions in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

轴代谢通路的竞争。TDO 是色氨酸代谢中 KP 途径的初始限速酶，因此，TDO 可能是潜在的抑郁症治疗靶点。

双荧光素酶报告基因是研究基因表达调控和基因工程的重要手段之一，荧光素酶的表达量与荧光的强度相关，可作为真核细胞中基因表达量及启动子活性的测定手段^[17]。本研究选择 LM10 作为 TDO 抑制剂的阳性对照药，发现 LM10 在体内外实验中均可降低 TDO 的表达，是 TDO 的选择性抑制剂，与 Dolusić 等^[7]的研究结果一致。本研究在细胞水平上采用双荧光素酶报告系统，确定了芍药苷、橙皮苷、辛弗林、刺芒柄花苷与靶基因 TDO 的负调控关系，未来可进一步研究 TDO 基因启动活性及转录调控元件，继续探讨基因表达的调控机制。TDO 启动子双荧光素酶报告基因表达载体的建立，为研究针对 TDO 靶点的天然活性抑制剂筛选奠定基础。

分子对接结果显示，刺芒柄花苷、辛弗林、芍药苷、橙皮苷与 TDO 有较好的结合活性且构象稳定，但过表达模型中只有芍药苷和刺芒柄花苷有显著性，说明关于 TDO 单一靶点的抑制剂，未涉及到 IDO 酶活抑制引起的负效应，筛选策略较为单一，预测精度有待提升。后续可以增加药动力学评估、酶

活抑制实验验证及分子动力学模拟技术，深度剖析活性成分与靶标 TDO 相互作用方式，可为研发新型 TDO 抑制剂提供参考。

与 TDO 相似，IDO 也是 KP 途径催化色氨酸降解的限速酶，但是 TDO 主要表达在肝脏，体内约 95% 的自由色氨酸是由 TDO 代谢的。本文通过构建 IDO 过表达细胞株发现，芍药苷为 TDO/IDO 双重抑制剂，而刺芒柄花苷为 TDO 选择性抑制剂，二者均可通过抑制 TDO 表达发挥抗抑郁作用。采用三联一复合应激法复制抑郁样小鼠模型，给予筛选到的化合物及组分合用，结果确认了芍药苷和刺芒柄花苷可通过抑制肝脏 TDO 表达，降低血中 KYN 含量，起到抗抑郁药效作用。

综上，本实验建立的 TDO 抑制剂筛选方法具有靶点明确、高效快速及反应灵敏等特点，可推广应用于其他中药活性组分筛选。与 IDO 相比，TDO 抑制剂多数仍处于探索和结构修饰阶段，存在溶解度低、生物利用度差等成药性问题，后期研究可考虑以芍药苷和刺芒柄花苷为先导化合物，对其化学结构进行修饰，以期获得活性更强、成药性更好、疗效更高的化合物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guan X T, Lin W J. An important regulation factor in depression: Indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Adv Psychol Sci*, 2013, 21(6): 951-957.
- [2] Kim M, Tomek P. Tryptophan: A rheostat of cancer immune escape mediated by immunosuppressive enzymes IDO1 and TDO [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 636081.
- [3] Yu C P, Pan Z Z, Luo D Y. TDO as a therapeutic target in brain diseases [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(4): 737-747.
- [4] 傅晓凤, 洪璐威, 王钰婷, 等. 色氨酸 2,3-双加氧酶在中枢神经系统疾病中的作用及其治疗策略思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 117-121.
- [5] 丛梦雨, 梁晓霞, 陈丰连, 等. 疏肝理脾类方调控色氨酸代谢的抗抑郁作用机制及共性药效物质 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3633-3642.
- [6] Brown S J, Huang X F, Newell K A. The kynurenine pathway in major depression: What we know and where to next [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 127: 917-927.
- [7] Dolusić E, Larrieu P, Moineaux L, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors 3-(2-(pyridyl)ethenyl) indoles as potential anticancer immunomodulators [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(15): 5320-5334.
- [8] 裴超, 邵霖霖, 刘晶, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨红花治疗视网膜静脉阻塞的作用机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1844-1851.
- [9] 李艳, 白明, 宋亚刚, 等. 中药标准汤剂的研究与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 3977-3980.
- [10] Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2497-2502.
- [11] 龚彦溶, 梁晓霞, 王术玲. 肝胃不和型功能性消化不良小鼠模型的建立 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 218-222.
- [12] Wang S L, Gao X L, Li P T, et al. Chronic unpredictable mild stress combined with a high-fat diets aggravates atherosclerosis in rats [J]. *Lipids Health Dis*, 2014, 13(1): 77.
- [13] 秦宇, 张永鹤. 犬尿氨酸代谢通路对抑郁症的影响机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(12): 1640-1644.
- [14] Keller J, Gomez R, Williams G, et al. HPA axis in major depression: Cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(4): 527-536.
- [15] Zhang Q Y, Sun Y M, He Z, et al. Kynurenine regulates NLRP2 inflammasome in astrocytes and its implications in depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 88: 471-481.
- [16] Sakurai M, Yamamoto Y, Kanayama N, et al. Serum metabolic profiles of the tryptophan-kynurenine pathway in the high risk subjects of major depressive disorder [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1961.
- [17] 杨念, 李琛, 李洪亮, 等. 基于双荧光素酶报告基因系统的人源 *SREBP1* 基因启动子的活性研究 [J]. 天津医药, 2019, 47(9): 897-902.

[责任编辑 李亚楠]