

基于中医药整合药理学和转录组学探究丹栀逍遥散防治焦虑肝郁化火证的作用机制

潘赐明^{1,2}, 任雪^{2,3}, 韦姗姗^{1*}, 曹蓓苓¹, 王维¹, 杨艳¹, 陈文慧¹, 徐宏喜²

1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500

2. 上海中医药大学, 上海 201203

3. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 基于中医药整合药理学和转录组学探究丹栀逍遥散防治焦虑肝郁化火证的作用机制。**方法** 采用中医药整合药理学研究平台 v2.0, 检索并获取丹栀逍遥散的活性成分及靶标、焦虑肝郁化火证靶标信息, 构建中药-成分-靶点-通路网络。将交集基因导入 String 数据库, 构建交集靶点的蛋白互作网络, 以确定最终需要验证的靶标。利用 GEO 数据库转录组学验证整合网络药理学结果, 同时采用动物实验进行验证。**结果** 共筛选出与焦虑肝郁化火证相关的靶标 13 个, 丹栀逍遥散活性成分 430 种。整合药理学结果显示, 丹栀逍遥散防治焦虑肝郁化火证主要通过调控 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor, AMPAR)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、N-甲基-D-天冬氨酸 (*N*-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体的激活及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等信号通路。GEO 微阵列芯片 GSE4035 数据集转录组学关键靶标雌激素受体 α (estrogen receptor 1, *ESR1*)、腺苷酸环化酶 5 (adenylate cyclase 5, *ADCY5*)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2A (glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A, *GRIN2A*) 基因为差异表达基因 (differential gene expression, DEGs)。实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 结果显示, *ADCY5* mRNA 表达上调和 *GRIN2A* mRNA 表达下调。**结论** 丹栀逍遥散可能是通过上调 *ADCY5* mRNA 表达和下调 *GRIN2A* mRNA 表达进而调节脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 与其受体的结合和谷氨酸神经传递介导, 进一步改善神经元生长、突触传导与突触的可塑性, 从而发挥其生物学效应。

关键词: 丹栀逍遥散; 焦虑; 肝郁化火证; 整合药理学; 转录组学

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3911-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.018

Discussion on mechanism of Danzhi Xiaoyao Powder in prevention and treatment of anxiety with liver depression transforming into fire syndrome based on integrative pharmacology of traditional Chinese medicine and transcriptomics

PAN Ci-ming^{1,2}, REN Xue^{2,3}, WEI Shan-shan¹, CAO Bei-ling¹, WANG Wei¹, YANG Yan¹, CHEN Wen-hui¹, XU Hong-xi²

1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Danzhi Xiaoyao Powder (丹栀逍遥散) in the prevention and treatment of anxiety with liver depression transforming into fire syndrome based on integrated pharmacology of traditional Chinese medicine and

收稿日期: 2023-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703964); 云南省科技厅科技计划项目 (202101AZ070001-021); 云南省教育厅基金项目: 基于 GC-NLRP3 炎症小体通路研究丹栀逍遥散干预肝郁化火型焦虑行为大鼠的作用机制 (2022Y332); 云南省科技厅科技人才与平台计划—云南省中医药学分子生物学重点实验室 [2019DG016BK-基于整合网络药理学探究丹栀逍遥散防治郁化火型焦虑行为的作用机制 (30172110174), BK-丹栀逍遥散通过 GC-NLRP3 信号通路干预焦虑行为大鼠的机制研究 (30172110179)]

作者简介: 潘赐明 (1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治肝胆及肿瘤疾病的应用基础研究。

E-mail: panciming@ynutcm.edu.cn

***通信作者:** 韦姗姗 (1987—), 女, 云南昆明人, 副教授, 博士学位, 主要从事证候的生物学基础研究。E-mail: weiss814@163.com

transcriptomics. **Methods** The integrated pharmacology research platform of traditional Chinese medicine v2.0 was used to retrieve and obtain the active ingredients and target information of Danzhi Xiaoyao Powder, and the target information of anxiety with liver depression transforming into fire syndrome, and construct the network of traditional Chinese medicine-component-target-pathway. The intersection genes were imported into the String database, and the protein interaction network of intersection targets was constructed to determine the target that needed to be verified. The transcriptomic of GEO database were used to verify the integrated network pharmacology results, and animal experiments were used to verify the results. **Results** A total of 13 targets related to anxiety with liver depression transforming into fire syndrome and 430 kinds of active ingredients of Danzhi Xiaoyao Powder were screened out, and the integrated pharmacological results showed that Danzhi Xiaoyao Powder prevented and treated anxiety with liver depression transforming into fire syndrome by mainly regulating the activation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor (AMPA), protein kinase A (PKA), *N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA) receptor, phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) of protein kinase B (Akt) and other signal pathways of anxiety liver depression and fire syndrome. The GEO microarray GSE4035 data set, the key targets of transcriptomics estrogen receptor 1 (*ESR1*), adenylate cyclase 5 (*ADCY5*) and glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A (*GRIN2A*) genes were differential gene expression (DEGs). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) results showed that *ADCY5* mRNA expression was up-regulated and *GRIN2A* mRNA expression was down-regulated. **Conclusion** Danzhi Xiaoyao Powder may regulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by up-regulating the expression of *ADCY5* mRNA and down-regulating the expression of *GRIN2A* mRNA, thus regulating the binding of BDNF and its receptors and the neurotransmission of glutamate, further improve neuron growth, synaptic conduction and synaptic plasticity, so as to exert its biological effects.

Key words: Danzhi Xiaoyao Powder; anxiety; liver depression transforming into fire syndrome; integrative pharmacology; transcriptomics

焦虑症 (anxiety) 是以广泛和持续性焦虑或反复发作的惊恐不安为主要特征, 常伴有自主神经紊乱及运动性不安的疾病。临床常分为广泛性焦虑与惊恐障碍 2 种主要形式。广泛性焦虑包括精神性焦虑、躯体性焦虑、心理性警觉、运动性不安和睡眠障碍; 惊恐障碍患者主要在日常活动中, 突然出现强烈恐惧的典型表现^[1]。中国国家卫生与健康调查统计数据显示, 在 2012—2013 年我国城市广泛性焦虑障碍 (36 086 例焦虑患者) 的发病率为 5.3%^[2]。在新型冠状病毒肺炎流行期间, 医护人员的焦虑患病率高达 40%^[3]。在后疫情时代, 新型冠状病毒疫情对人们的生活、出行、学习以及自由活动产生了较大影响, 从而产生负面情绪^[4]。因此, 对于焦虑症的研究, 特别是寻找中医药防治焦虑症的有效方药并阐明其机制是当前关键和热点, 甚至在未来几年将会是研究热点。

焦虑症实证层面的发病机制在于久郁化火, 诚如朱丹溪在《丹溪心法·六郁》中所言: “气血冲和, 万病不生, 一有怫郁, 诸病生焉” “凡郁病必先气病”; 刘河间曰: “六气皆从火化……五志所伤皆化为热”。可见 “气-郁-火” 是焦虑症发生发展的病理过程, 焦虑症实证患者临床症状表现为一派阳亢行为, 在精神上表现为提心吊胆、主观过虑, 但不能控制; 行为上表现为患者躯体性主观和客观不适, 如心悸、眩晕、多汗、呼吸困难等, 以及运动性不安; 除此之外, 还有睡眠障碍和心理警觉等^[5]。焦虑症患者从临床表现来看更符合 “阴不制阳” 的机制, “郁”

则是发病的一个不可或缺的枢纽环节。焦虑症虚证为主层面的发病机制在于心神耗损, 久病必虚, 《灵枢邪客》云: “心者, 五脏六腑之大主也, 精神之所舍也。” 焦虑患者长期的急躁易怒暗损人体的津液, 其中心阴首当其冲, 《灵枢经·口问》亦指出: “悲哀愁忧则心动, 心动则五脏六腑皆摇”。心血不足、心阴亏耗则心失所养, 阴不制阳, 阴阳皆损, 表现出心情郁闷、心慌多梦等。

焦虑证初期主要以肝郁气滞为主, 渐则痰凝、血郁、化热, 后期以气血不足、阴虚火旺为主, 病位主要在心、肝、肾, 尤以肝为甚, 气机失调是发病的关键。有研究显示焦虑证候要素频率高于 5% 的有火热、气滞、阴虚^[6]。丹栀逍遥散由牡丹皮、栀子、茯苓、白术、白芍、当归、甘草和柴胡组成, 出自明代薛己《内科摘要·卷下十一·各症方药》, 具有清热泻火、建中补脾、养血柔肝和疏肝调达的功效, 临床上丹栀逍遥散已经广泛运用在肝郁化火型广泛性焦虑症 (障碍) 的治疗中, 研究结果显示可有效改善患者的焦虑症状^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 丹栀逍遥散化学成分库的建立

利用中医药整合药理学平台^[9] (<http://www.tcmip.cn/>, TCMIP v2.0) 的中药材数据库和中药成分数据库, 检索 “牡丹皮” “栀子” “柴胡” “白芍” “白术” “茯苓” “当归” “甘草” 所包含的化学成分信息, 并建立 “丹栀逍遥散化学成分库”。

1.2 药物靶标预测

利用 TCMIP v2.0, 设置 Tanimoto Score 为 0.8 (高准确度), 提取“丹栀逍遥散化学成分库”中药物成分的化学分子指纹, 预测化学成分的候选靶点谱, 并将其与 Drug Bank (<http://www.drugbank.ca/>) 数据库中获美国食品药品监督管理局批准的抗焦虑药物指纹进行比对, 将选定评分 > 0.8 相似性药物靶点作为丹栀逍遥散药物组合的候选靶点^[10]。

1.3 疾病、证候靶标确定

在 TCMIP v2.0 的“疾病相关分子库”中, 以“anxiety”作为疾病关键词进行检索, 检索出的所有靶点作为焦虑症的候选靶点集。

2020 年《国际中医临床实践指南·焦虑症》将肝郁化火证临床表现定义为情绪不宁、郁闷烦躁、胸胁胀痛、脘闷暖气、不思饮食、大便不调, 或见急躁易怒、口苦而干, 或头痛、目赤、耳鸣, 或嘈杂吞酸、大便秘结, 舌质红、苔黄, 脉弦或弦数^[11]。《广泛性焦虑障碍中医证候辨证分型及量化分级标准专家共识》将肝郁化火证临床表现定义为主症烦躁易怒, 善太息, 咽中不适, 如物梗阻, 敏感多疑; 次症为头痛, 面红目赤, 口苦咽干, 两肋胀满, 脘腹不适, 痞满纳差, 失眠多梦, 女子月经不调, 舌质红或淡红、苔黄或苔白, 脉弦数^[12]。总结以上指南和专家共识, 最后确定肝郁化火证临床表型为烦躁、易怒、恐慌、紧张、担忧、紧张性头痛、头晕、呼吸急促、心动过速、坐卧不宁、出汗、上腹不适、注意力困难。在 TCMIP v2.0 平台数据库, 以 irritation、anger、panic、nervousness、worry、tension、headache、dizziness、shortness of breath、tachycardia、restlessness、sweating、upper abdominal discomfort、difficulty paying attention 为关键词, 获取肝郁化火证证候相关靶标。

1.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建、分析与可视化

通过 TCMIP v2.0 的“网络分析模块”对 PPI 网络进行拓扑分析, 选取中药靶点-疾病基因的关键节点 (hubs) 作为丹栀逍遥散活性成分的候选靶点, 然后对关键靶标网络进行通路富集分析, 选取 P 值 ($P < 0.05$) 排名前 20 的通路^[13], 构建完整的“中药-核心靶标-关键通路”多层次关联网络, 并进行可视化数据分析^[13]。

1.5 核心靶点的微阵列芯片验证

为检验中医药整合药理学得到的核心靶点的可

靠性, 以“anxiety”为关键词, 检索美国国立生物技术信息中心的 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 筛选 anxiety 相关的微阵列芯片数据集。采用 R 软件 (3.6.3 版本) 进行统计分析与可视化: 利用 GEOquery 包 (2.54.1 版本)^[14]下载数据, limma 包 (3.42.2 版本)^[15]进行差异表达基因分析, umap 包 (0.2.7.0 版本) 进行 UMAP (uniform manifold approximation and projection) 分析, ggplot2 包 (3.3.3 版本) 进行可视化, ComplexHeatmap 包 (2.2.0 版本)^[16]绘制热图。

1.6 实验动物

9 只雄性 SFP 级 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 11 周龄。动物来源于北京斯贝福生物技术科技有限公司, 生产许可证编号: SCXK (京) 2019-0010。在云南中医药大学动物房适应性饲养 3 d, 自由饮水和摄取食物 (普通饲料来源于云南楚商科技有限公司, 生产批号 20210711)。行为学实验前 1 d 搬至行为学实验室, 适应 24 h, 保持与动物房相同的温度 (25°C) 和湿度 ($60\% \sim 70\%$)。动物实验经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准文号 R-062021G106。

1.7 药物

丹栀逍遥散组成药物的饮片购买于云南中医药大学汇贤中医医院, 由主管药师闫永启主任鉴定, 均符合《中国药典》2020 年版规定。8 味中药, 每付共计 78 g, 见表 1。将全部饮片浸泡在 10 倍体积的纯水中, 浸泡 1 h, 先武火煮开, 后改用文火, 煮 1 h 后滤过药液。然后加入 10 倍体积的纯水继续二煎, 1 h 后混合 2 次滤过后的药液。最后再将药物浓缩成含生药 1.56 g/mL 的水煎液, 将煮好的水煎液放置冰箱保鲜层, 每天给药前 2 h 取出当天剂量, 放置常温环境待用。

表 1 丹栀逍遥散药物信息

Table 1 Drug information of Danzhi Xiaoyao Powder

药材	产地	生产批号	剂量/g
牡丹皮	安徽	01-21010101	6
栀子	江西	01-21010101	6
茯苓	云南	02-21110101	12
白术 (炒)	湖北	200601	12
当归	甘肃	01-22010101	12
白芍	江苏	210823	12
北柴胡	陕西	20210701	12
甘草 (炙)	内蒙古	20210701	6

1.8 动物分组、给药及模型制备

9 只大鼠适应性喂养 3 d, 按照随机数字表法分组, 分为丹栀逍遥散组、模型组和对照组, 每组 3 只。3 组均给予正常普通饲料和自由饮水, 每天 10:00 时, 丹栀逍遥散组大鼠给予丹栀逍遥散水提物(生药 15.6 g/kg), 对照组和模型组大鼠给予等量的生理盐水(10 mL/kg), 共 2 周。除了对照组外, 每天下午随机时间开始对丹栀逍遥散组和模型组大鼠连续 2 周给予随机慢性束缚应激(每天随机使用特制束缚架将模型组和丹栀逍遥散组大鼠固定在内不能活动, 束缚架如圆筒状, 大鼠头部和四肢从圆筒孔中暴露出来, 每天 1 次, 每次 2 h)进行造模。每隔 3 d 测 1 次体质量。第 14 天 19:00 时开始进行高架十字迷宫实验, 每只大鼠 5 min, 按时间顺序进行。

1.9 高架十字迷宫实验

采用高架十字迷宫实验测试动物焦虑程度。高架十字迷宫实验器材由 2 个开放臂(0.35 m×0.60 m)、2 个封闭臂(0.35 m×0.60 m)以及交叉连接部(0.05 m×0.05 m)的开阔平台组成。封闭臂有 0.15 m 高的黑色挡板, 十字迷宫平台离地面 0.5 m。保持昼夜节律的光暗调整, 实验室在实验过程中保持无灯光状态, 开始将大鼠面向开臂放在高架十字迷宫的交叉连接部中央, 同时开始软件记录大鼠在高架十字迷宫实验平台的运动轨迹以及在不同部位的时间和次数。①进入开放臂次数(open arm entry, OE): 即进入到任一开放臂的次数, 以大鼠 4 只爪子均进入到臂内为准, 中途 1 只爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动完成。②进入开放臂时间(open arm time, OT): 即进入开放臂的时间(s)。③进入封闭臂次数(close arm entry, CE): 即进入任一封闭臂的次数, 以大鼠 4 只爪子均进入到臂内为准。④进入封闭臂时间(close arm time, CT): 即进入封闭臂的时间(s)。由以上指标计算进入开放臂次数比例(OE%)、开放臂停留时间比例(OT%)。上述记录由 SuperMaze 动物行为学视频分析系统完成, 以排除测试过程的人为干扰因素。每次测试结束后清除粪便, 并用 75%乙醇清理迷宫, 以掩盖气味。待乙醇蒸发后方可开始下 1 只动物实验。

$$OE\% = OE / (OE + CE)$$

$$OT\% = OT / (OT + CT)$$

1.10 qRT-PCR 验证

1.10.1 主要仪器和材料 CFX Connect Real-Time System 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad), D3024R 型

离心机(美国 SCILOGEX), Analytikjena-Easycycler 普通 PCR 仪(德国 Analytik Jena), Scandrop100 型超微量核酸蛋白测定仪(德国 Analytik Jena), 移液器(美国 Bio-rad), M2 全自动加样仪(四川科劲生物科技有限公司)。Turescript 1st Stand cDNA SYNTHESIS Kit 反转录试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司, 货号 pc70); 2×SYBR® Green 预混液(成都丹凤科技有限公司, 货号 DF001)。

1.10.2 qRT-PCR 实验 各组大鼠麻醉后取脑组织, 在冰块上分离海马组织和前额叶皮质, 然后将海马组织、前额叶皮质和剩余脑组织分别装于 1.5 mL 离心管, 迅速在液氮中冻存, 放置于-80 °C 冰箱保存, 委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成测序验证。

提取对照组、丹栀逍遥散组和模型组大鼠海马组织的总 RNA, 采用 SYBR GREEN I 检测对照组、模型组和丹栀逍遥散组大鼠海马组织 RNA 样品 3 个目的基因腺苷酸环化酶 5(adenylate cyclase 5, ADCY5)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2A(GRIN2A-glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A Gene, GRIN2A)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的 mRNA 表达量, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因 mRNA 相对表达量。以磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因, 所有实验共进行 3 次, 引物合成信息见表 2。

1.11 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较若方差齐则采用 LSD 检验, 若方差不齐, 使用 Dunnett T3 检验方法。组间比较若方差齐采用单因素方差 One way ANOVA 分析; 若方差不齐采用 Dunnett-t 检验。P<0.05 表示差异有统计学差异。数据图采用生信工具-仙桃学术(<https://www.xiantao.love/products>)绘制。

2 结果

2.1 丹栀逍遥散成分靶标预测及分析

通过 TCMIPV2.0 平台对丹栀逍遥散化学成分的分析结果可知, 共包含 430 种成分, 候选靶标 520 个。对候选靶标进行基因功能分析和通路富集分析, 发现其功能大多与谷氨酸受体信号通路、谷氨酸代谢过程、离子型谷氨酸受体信号通路、视黄醇代谢过程、L-谷氨酸转运、兴奋性突触后电位、γ-氨基丁酸信号通路正向调节密切相关, 排名前 20 的功能和通路如图 1 所示。

表 2 引物信息

Table 2 Information of primer

基因	引物名称	序列 (5'-3')	退火温度/℃
GAPDH	GAPDH-F	GCCATCACTGCCACTCAGAAGAC	60
	GAPDH-R	ATGACCTTGCCACAGCCTTG	
ADCY	ADCY5-F	CCATAGACTTCAGCAACAAC	60
	ADCY5-R	CAGCACGAAGACAGAGAT	
GRIN2A	GRIN2A-F	CAAGTGTGATGCCTGTCT	60
	GRIN2A-R	GTGCTGTCGGTTAATCCT	
BDNF	BDNF-F	AGAGGCTTGACATCATTG	60
	BDNF-R	GTCTGCGTCCCTTATTGTT	

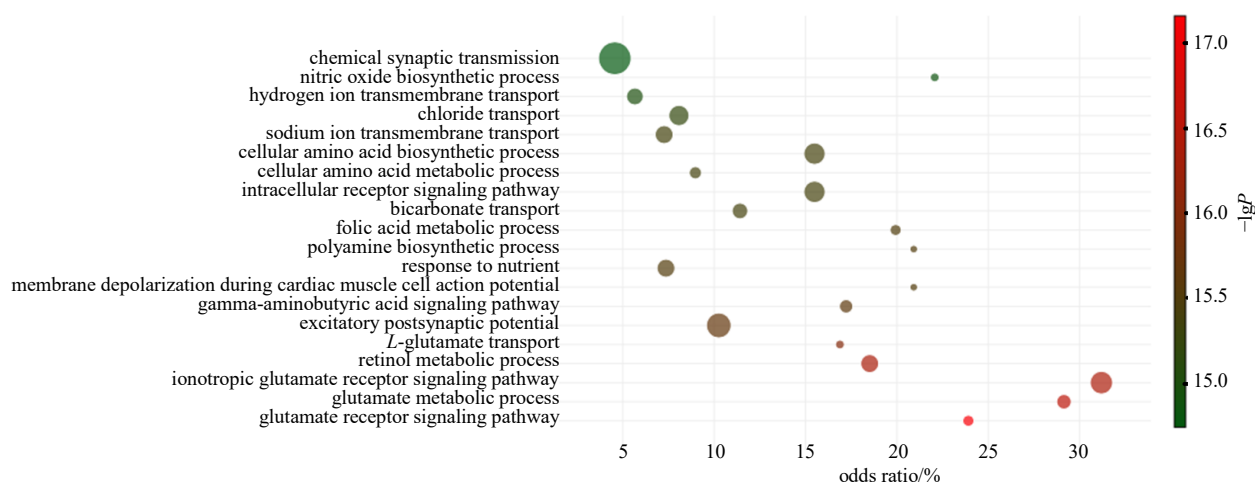


图 1 丹栀逍遥散成分候选靶标的功能和通路分析气泡图

Fig. 1 Bubble diagram of functional and pathway analysis of candidate targets for components in Danzhi Xiaoyao Powder

2.2 焦虑疾病靶标及相关基因

对全疾病相关潜在靶标合并去重后，共获得 209 个，其中与丹栀逍遥散密切相关的共同靶基因共 13 个，分别是长链酯酰辅酶 A 合成酶 4 (Acyl-CoA synthetase long chain family member 4, *ACSL4*)、*ADCY5*、醛脱氢酶 5 家族成员 A1 (aldehyde dehydrogenase 5 family member A1, *ALDH5A1*)、ATP 酶 Na^+/K^+ 转运亚基 $\alpha 3$ (ATPase Na^+/K^+ transporting subunit alpha 3, *ATP1A3*)、钙敏感受体 (calcium sensing receptor, *CaSR*)、儿茶酚-O-甲基转移酶 (catechol O-methyltransferase, *COMT*)、D-氨基酸氧化酶 (D-amino acid oxidase, *DAO*)、*GRIN2A*、*GNAS* (GNAS complex locus)、PI3K 催化亚基 p110alpha 的编码基因 (*PIK3CA*)、转化生长因子受体 2 (transforming growth factor beta receptor 2, *TGFBR2*)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, *ESR1*)、核受体亚家族 3 C 组成员 1 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, *NR3C1*)。

2.3 潜在靶点 PPI 分析

通过对 13 个靶点进行 PPI 分析，*PIK3CA*、*ACSL4*、*ALDH5A1* 与其他靶标无关联性。其他 10 个靶标体现出较高的中心度，其中以 *ESR1* 为主，见图 2。故在后续的验证中优先验证 *ADCY5*、*ATP1A3*、*CASR*、*COMT*、*DAO*、*GRIN2A*、*GNAS*、*TGFBR2*、*ESR1*、*NR3C1*。

2.4 丹栀逍遥散防治焦虑的“中药-靶点-通路”多维网络分析

TCMIP v2.0 平台采用人工智能、数据挖掘、网络计算及可视化等方法和技术，形成 7 大整合药理学分析模块，包括疾病相关分子集及其功能挖掘、证候相关分子挖掘及功能分析、中药 (含方剂) 靶标预测及功能分析、中药药性相关分子挖掘及功能分析、组方用药规律分析、中医药关联网络挖掘和反向查找中药 (含方剂)。丹栀逍遥散防治焦虑的“中药-靶点-通路”多维网络图是基于“中医药关联网络挖掘”构建，根据中药方剂、中药材、中药成分、核心靶标、

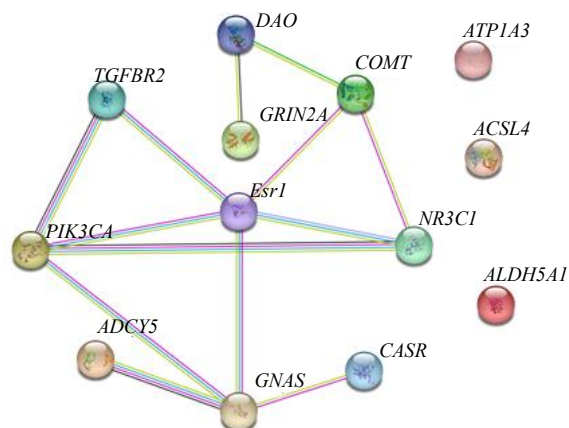


图 2 13 种关键靶点基因的 PPI 分析

Fig. 2 PPI analysis of 13 key target genes

通路、疾病和证候之间的关联性，可任意选择不同类型的节点，构建中药多维关联网络^[17]。

如图 3 所示，图中五角星表示方剂丹栀逍遥散，正方形表示中药，圆形表示靶标，椭圆形表示肝郁化火证临床表型，三角形表示丹栀逍遥散防治焦虑肝郁化火证的相关通路。通过网络图可以一目了然地发现丹栀逍遥散防治焦虑肝郁化火证的关键网络靶标及其作用机制，有助于揭示其科学内涵。

2.5 核心靶点微阵列芯片验证结果

最终选定微阵列芯片数据集 GSE4035。该数据集基于 GPL1261 [Mouse430_2] Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array 阵列平台，包含 12 例焦虑 RNA 样本（组 2）和 12 例健康 RNA 样本（组 1）。

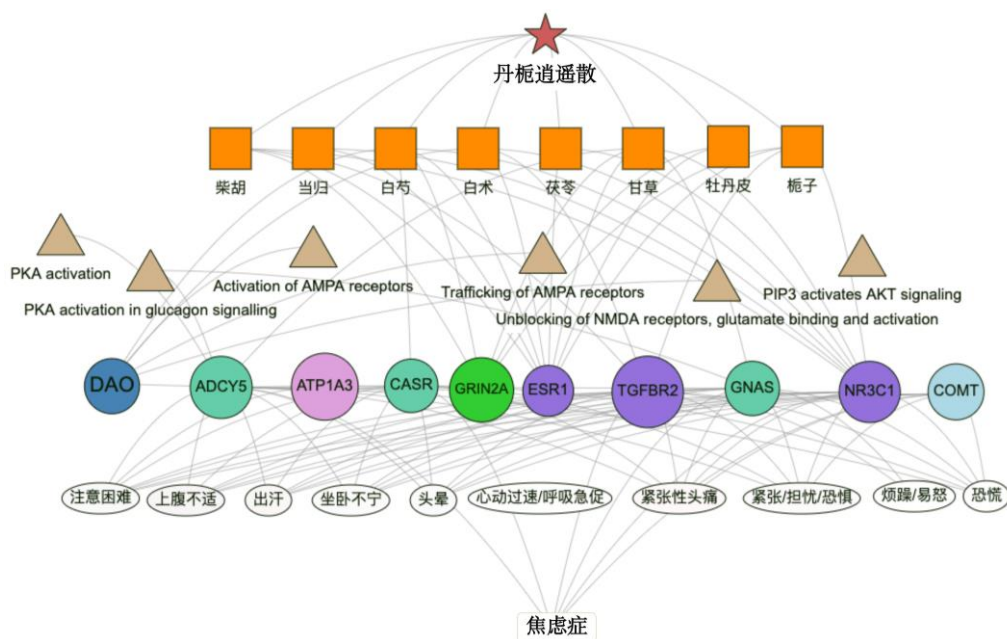


图 3 丹栀逍遥散防治焦虑的“中药-靶点-通路”多维网络分析

Fig. 3 Multidimensional network analysis of “traditional Chinese medicine-targets-pathways” of Danzhi Xiaoyao Powder in prevention and treatment of anxiety

由图 4 可见，基因表达谱区分度良好，保证了后续差异表达分析的准确性。去掉空值后的 ID 总数为 20 814 个，满足 $|\log_2(FC)| > 1$ 和 $P_{adj} < 0.05$ 阈值的 ID 有 972 个，在这阈值下，组 2 中高表达 ($\log_2FC$ 为正) 的数目有 501 个，组 1 中高表达 ($\log_2FC$ 为负) 的数目有 471 个；组间差异基因火山图见图 5，热图见图 6。

GSE4035 数据集的差异表达基因与 *ADCY5*、*ATP1A3*、*CASR*、*COMT*、*DAO*、*GRIN2A*、*GNAS*、*TGFR2*、*ESR1*、*NR3C1* 得到 3 个交集基因，分别是 *ESR1*、*GRIN2A* 和 *ADCY5*，证明了上述分析的可

靠性。

2.6 动物实验验证结果

2.6.1 一般情况和体质量 造模期间，丹栀逍遥散组与对照组的大鼠皮毛光泽顺滑，二便正常，日常活动灵敏。模型组大鼠变得较为暴躁，皮毛光泽暗淡。对照组大鼠体质量增长较快，丹栀逍遥散组和模型组大鼠的体质量增长较缓，与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6.2 高架十字迷宫实验 如图 7 所示，在 OT% 方面，模型组低于对照组，差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)；丹栀逍遥散组高于模型组，差异不具有统计

学意义 ($P=0.069$)。在 OE% 方面, 模型组高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 丹栀逍遥散组低于模型组, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

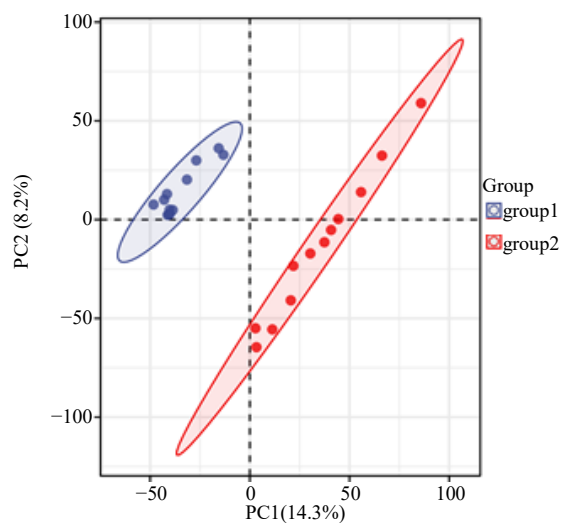
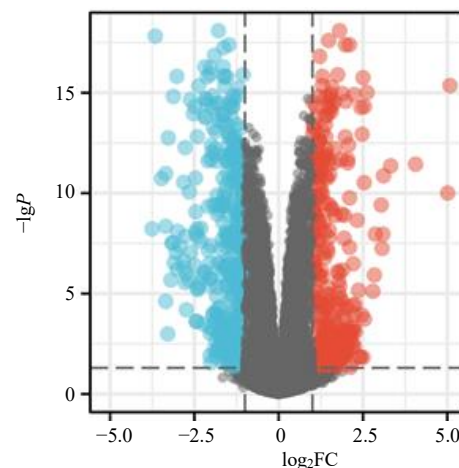


图 4 焦虑数据集主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis of anxiety dataset



上调基因用红色标记, 下调基因用蓝色标记, 无差异的基因用灰色标记

Up-regulated genes are marked in red, down-regulated genes in blue, and undifferentiated genes in gray

图 5 焦虑样本差异基因火山图

Fig. 5 Volcano plot of differentially expressed genes in anxiety samples

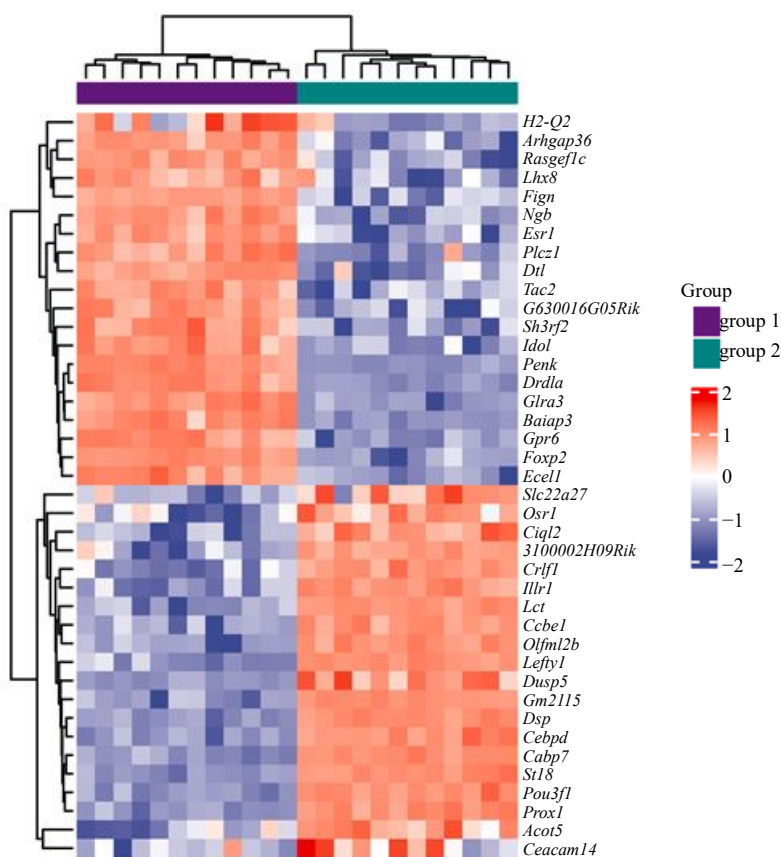


图 6 焦虑样本差异基因热图

Fig. 6 Heat map of differentially expressed genes in anxiety samples

2.6.3 qRT-PCR 实验结果 样品中 *ESR1* mRNA 表达丰度低, 有些样本没有 C_t 值, 无法进行后续计算。与对照组比较, 模型组 *ADCY5* mRNA 表达量升高, 但差异无统计学意义 ($P=0.0567$), *GRIN2A* mRNA 表达量显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 丹栀逍遥散组 *ADCY5* mRNA 表达量显著降低 ($P<0.05$), *GRIN2A* mRNA 表达量显著升高 ($P<0.001$) (图 8)。表明这 2 个核心靶点基因的相对定量值与整合网络药理学的数据趋势一致, 证明整合网络药理学和 GEO 数据挖掘结果的可靠且重复性好。

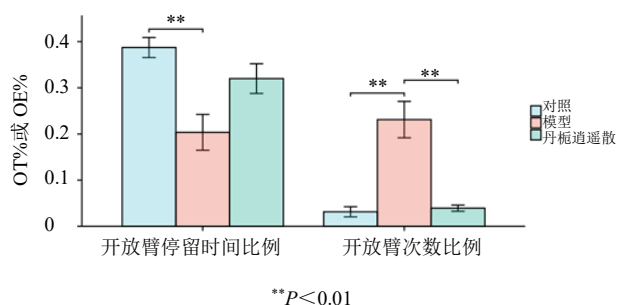


图 7 各组高架十字迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Results of elevated cross labyrinth in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

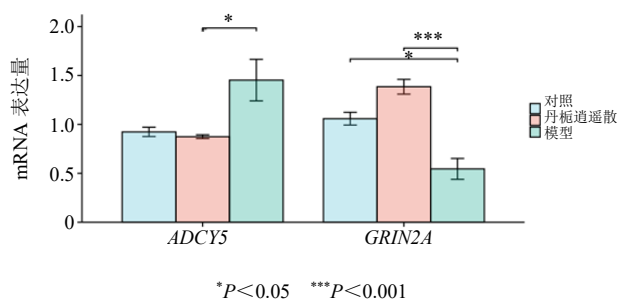


图 8 qRT-PCR 检测大脑海马组织中 *ADCY5* 和 *GRIN2A* 的 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 mRNA expression of *ADCY5* and *GRIN2A* in hippocampus detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

3.1 焦虑肝郁化火证中医病机与治疗策略

焦虑属于中医“郁”的范畴。南宋的陈言提出“脏气不行, 郁而生涎……皆七气所生所成”, 郁是疾病发生的罪魁祸首, 郁既有病的概念, 也是证的范畴; 明清时期, “郁”多被单列一门, 《医学正传》首用“郁证”作为病名进行论述^[5]。但对于“郁”的治疗不仅是疏散之法, 有研究显示古代医家治疗郁多以“培土”为基础, 辅以疏肝, 酌用清热、行气、

安神之品^[6]。

通过焦虑肝郁化火证的临床证候表型可以看出, 焦虑肝郁化火证患者实际临床中往往呈现虚实夹杂, 本虚标实, 阴虚阳亢的病机, 譬如运动性紧张、坐卧不宁、紧张性头痛、颤抖、心动过速或呼吸急促、无法放松属于虚阳外亢的临床表现; 担忧、注意困难、头重脚轻、出汗、头晕、口干属于正虚的临床表现。丹栀逍遥散组方和功效划分恰好符合焦虑肝郁化火证的整体病机, 其中丹皮、栀子清热泻火治疗阳亢于外, 茯苓、炒白术、炙甘草建中补脾治疗脾气亏虚, 当归、白芍、柴胡养血柔肝补肝体而疏肝用。总体而言, 焦虑肝郁化火证涉及主要病位在肝、脾, 主要病性虚、实, 丹栀逍遥散的组方符合焦虑肝郁化火证的发病机制。本研究借助 TCMIP v2.0 平台, 从中药成分、证候要素、疾病靶点的多层次研究以及从药物自身出发, 较为全面地展现了中药-证候-疾病-靶标-通路的衔接性研究, 形成中医药现代研发体系, 从分子角度解释了中医药疗效内涵^[18]。

3.2 整合网络药理学结果分析

丹栀逍遥散化学成分分析, 谷氨酸受体包括离子型受体和代谢性受体, 离子型谷氨酸受体包括 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartic acid, NMDA) 受体、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, AMPA) 受体和 Kainate 受体; 应激状态时, NMDARs 会被过度激活, Ca^{2+} 通道反复开放, 过多的 Ca^{2+} 内流使细胞内 Ca^{2+} 超载, 引起神经细胞死亡^[19]。应激状态下, 上调的 AMPAR 增加了脑内谷氨酸兴奋性毒性, 出现细胞内钙累积, 导致细胞稳态的破坏和脑组织的结构损伤^[20]。代谢型谷氨酸 2 型受体和 γ -氨基丁酸 B 受体属于 C 家族 G 蛋白偶联受体, 分别是兴奋性神经递质谷氨酸和抑制性神经递质 γ -氨基丁酸的代谢型受体, γ -氨基丁酸 B 受体在中枢神经系统中介导缓慢的抑制性神经传导和突触可塑性调控, 其活性的失调会导致细胞功能紊乱、损伤甚至细胞凋亡^[21]。

“中药-靶点-通路”多维网络分析显示, 丹栀逍遥散通过调控 AMPA 受体、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、AMPA 受体的转运、胰高血糖素信号中的 PKA 激活、NMDA 受体激活、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等信号通路,

对蛋白质结合、胞质溶胶、质膜、细胞质、线粒体等通路进行干预。

ADCY5 是一种腺苷酸环化酶,通过合成第 2 信使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)来介导 G 蛋白偶联受体的信号传导。此外, cAMP 也是一种典型的第 2 信使,其通过浓度的变化响应细胞外信号与细胞表面受体的结合,调节细胞内酶和非酶蛋白的活性,激活依赖于 cAMP 的 PKA 表达增加磷酸化水平,并调节 BDNF 等基因的表达,从而发挥生物学效应^[22]。

GRIN2A 是重要的谷氨酸离子向受体 NMDA 型亚基,焦虑样行为与海马中 GRIN2A 的上调有关,可通过调节与 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 的结合来影响突触的可塑性^[23]。DAO 是一种降解 D-丝氨酸的酶,是 NMDAR 的主要内源性共激动剂,灭活或缺失 DAO 将会加剧焦虑^[24]。

雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 二核苷酸重复等位基因与 90 项症状清单(symptom check list 90, SCL-90) 9 个亚分数和总分之间的关联结果显示,其与 SCL-90 评分中焦虑、恐惧焦虑和总症状有显著关联^[25]。已有的研究表明,ESR1 变异与认知结果之间具有密切关系,初步证据表明 ESR1 基因在某些情绪中的作用,发现 ESR1 多态性与焦虑或抑郁症状关联显著^[26]。

本研究旨在探讨丹栀逍遥散治疗焦虑的本质,完善和补充现有的研究。目前有诸多学者对丹栀逍遥散治疗焦虑展开了深入研究,在生物学机制方面丹栀逍遥散可以显著降低焦虑大鼠炎症反应、机制细胞凋亡和减轻神经损伤以及提高线粒体功能、提高脑源性神经营养因子和蛋白激酶蛋白表达,促进脑源性神经营养因子分泌,从而改善焦虑样行为。初步阐明了丹栀逍遥散治疗焦虑症的作用机制和主要成分协同作用的机制,同时支撑了丹栀逍遥散在防治焦虑症方面的应用。

3.3 GEO 数据库验证结果分析

GEO 数据库中转录组学验证结果显示, ESR1、ADCY5、GRIN2A 与焦虑肝郁化火证密切相关。雌激素在很大程度上通过其主要的 ESR1 和 ESR2 的细胞内激活来发挥其生物学作用。因此,雌激素受体的遗传变异可能会改变雌激素信号,从而影响女性患者抑郁症的易感性^[27]。也有研究显示,5-羟色胺基因与 ESR1 基因多态交互作用可能增加女性围

绝经期抑郁障碍患病的风险^[28]。进一步验证了 ESR1 基因是核心靶点基因之一。

ADCY5 可以通过调节 BDNF 基因的表达进而对谷氨酸损伤的神经元具有保护作用, BDNF 可增加谷氨酸损伤皮层神经元 NMDAR1 mRNA 及蛋白的表达,增强其 NMDA 受体活性。同时 GRIN2A 是谷氨酸离子向受体 NMDA 型重要亚基,亦影响着 NMDA 受体的活性。因此,推测丹栀逍遥散可能是通过下调 ADCY5 和上调 GRIN2A 基因的表达水平进一步上调 BDNF 表达和增加 NMDA 活性,发挥其生物学效应。

3.4 动物实验验证结果分析

高架十字迷宫实验结果显示,在 OT% 方面,虽然丹栀逍遥散组高于模型组,差异不具有统计学意义 ($P=0.069$),但通过统计结果可以看出具有明显的趋势,其原因可能与样本量少有关。在 OE% 方面,丹栀逍遥散组与模型组差异均具有统计学意义,说明丹栀逍遥散能改善焦虑模型大鼠进入开放臂的次数。

核心靶点基因验证结果显示, ADCY5 和 GRIN2A mRNA 表达量模型组与对照组、丹栀逍遥散组与模型组差异均具有统计学意义;核心靶点经 qPCR 实验验证,丹栀逍遥散能降低 ADCY5 mRNA 表达 ($P<0.05$),升高 GRIN2A mRNA 的表达 ($P<0.001$)。

4 结论

本研究对丹栀逍遥散组方候选靶标与焦虑症进行关联并以网络可视化形式展现,并预测其可能靶标和分子信号通路。丹栀逍遥散调控的主要通路有 AMPA 受体的激活、PKA 激活、胰高血糖素信号中的 PKA 激活、NMDA 受体激活、PI3K/Akt 等。中药整合药理学和 GEO 数据集获取交集基因,包括 ESR1、ADCY5、GRIN2A 基因;丹栀逍遥散可能通过上调 ADCY5 mRNA 表达和下调 GRIN2A mRNA 表达进一步调节 BDNF 表达和 NMDA 活性,进而调节 BDNF 与其受体的结合和 NMDA 活性,从而调节 BDNF 与其受体结合,进一步改善神经元生长、突触传导与突触的可塑性,从而发挥其生物学效应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南焦虑症 (2020-10-11) [J]. 世界中医药, 2021, 16(8): 1188-1191.

- [2] Yu W, Singh S S, Calhoun S, *et al.* Generalized anxiety disorder in urban China: Prevalence, awareness, and disease burden [J]. *J Affect Disord*, 2018, 234: 89-96.
- [3] Saragih I D, Tonapa S I, Saragih I S, *et al.* Global prevalence of mental health problems among healthcare workers during the Covid-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Nurs Stud*, 2021, 121: 104002.
- [4] 刘璇. 后疫情时代的情绪稳定技术 [J]. 东方养生, 2022(6): 138-139.
- [5] 王剑峰. 琥珀香附宽心汤联合盐酸帕罗西汀治疗肝郁气滞型广泛性焦虑症的疗效研究 [J]. 中国实用医药, 2020, 15(16): 148-149.
- [6] 耿东. 基于现代文献及临床调研的广泛性焦虑中医证候及证候要素研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [7] 王佳丽, 吴清明. 针刺联合加味丹栀逍遥散治疗气郁化火型广泛性焦虑症的疗效观察 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(7): 1334-1337.
- [8] 施丹. 丹栀逍遥散治疗广泛性焦虑症(障碍)肝郁化火型临床研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(17): 106-108.
- [9] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, *et al.* ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [10] Xue R C, Fang Z, Zhang M X, *et al.* TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D1089-D1095.
- [11] 刘志超, 陈金红, 高晟玮, 等. 基于整合药理学策略的黄芪-丹参抗心肌梗死作用机制研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(10): 1644-1648.
- [12] 中国中西医结合学会精神疾病专业委员会. 广泛性焦虑障碍中医证候辨证分型及量化分级标准专家共识 [J]. 中医杂志, 2022, 63(11): 1096-1100.
- [13] 刘志超, 高晟玮, 陈金红, 等. 基于整合药理学探究当归四逆汤抗寒凝心脉型心肌梗死的作用机制 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1121-1125.
- [14] Davis S, Meltzer P S. GEOquery: A bridge between the gene expression omnibus (GEO) and BioConductor [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(14): 1846-1847.
- [15] Gentleman R, Carey V J, Zhang J. Meta-data resources and tools in bioconductor [A] // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* [M]. New York: Springer-Verlag, 2005: 113-133.
- [16] Gu Z G, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(18): 2847-2849.
- [17] 吕佳. 焦虑症采用丹栀逍遥散治疗的效果 [J]. 中国医药指南, 2021, 19(32): 30-32.
- [18] 王玉, 杨雪, 靳晓杰, 等. 基于中医药整合药理学平台、GEO 数据库芯片及分子对接探讨大黄抗肝癌的作用机制 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5207-5219.
- [19] 宋文悦, 高明奇, 梁泽怀, 等. 作用于 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体的抗抑郁药物的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(15): 1396-1400.
- [20] 周珊珊, 刘晓朦, Elona Khasanova, 等. 大麻二酚通过调节脑内 AMPA 受体表达改善痴呆模型大鼠认知损害 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(7): 596-600.
- [21] 胡勇箭. 代谢型谷氨酸 2 型受体和 γ -氨基丁酸 B 受体信号通路研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [22] Wang W F, Wang Y C, Guo Q T, *et al.* Valerian essential oil for treating insomnia via the serotonergic synapse pathway [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 927434.
- [23] Xu K, Wang M Y, Zhou W, *et al.* Chronic *D*-ribose and *D*-mannose overload induce depressive/anxiety-like behavior and spatial memory impairment in mice [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11: 90.
- [24] Pritchett D, Hasan S, Tam S K E, *et al.* D-amino acid oxidase knockout (*Dao*^{-/-}) mice show enhanced short-term memory performance and heightened anxiety, but no sleep or circadian rhythm disruption [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 41(9): 1167-1179.
- [25] Comings D E, Muhleman D, Johnson P, *et al.* Potential role of the estrogen receptor gene (*ESR1*) in anxiety [J]. *Mol Psychiatry*, 1999, 4(4): 374-377.
- [26] Sundermann E E, Maki P M, Bishop J R. A review of estrogen receptor alpha gene (*ESR1*) polymorphisms, mood, and cognition [J]. *Menopause*, 2010, 17(4): 874-886.
- [27] Ryan J, Ancelin M L. Polymorphisms of estrogen receptors and risk of depression [J]. *Drugs*, 2012, 72(13): 1725-1738.
- [28] 陶晶, 仇剑崑, 顾红亮, 等. *ESR1* 基因与 5-HTT 基因多态性的交互作用对女性围绝经期抑郁障碍的影响 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 766-770.

[责任编辑 潘明佳]