

基于 UPLC-Orbitrap-MS/MS、GNPS 分子网络、网络药理学的开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病物质基础研究

安若凡, 高艳华, 毛樱璐, 万会花, 孙 伟, 郑 颖*, 杨 维*

中国中医科学院中药研究所, 道地药材与品质保障全国重点实验室 北京 100700

摘要: **目的** 建立基于高分辨质谱、全球天然产物分子网络 (global natural products social molecular networking, GNPS) 和网络药理学的中药治疗共病物质基础研究策略, 并对开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病的物质基础进行系统分析。**方法** 采用超高效液相色谱-轨道阱串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-orbitrap tandem mass spectrometry, UPLC-Orbitrap-MS/MS) 对开心散提取物及其血浆和脑组织暴露样品进行非靶向二级质谱分析。然后, 利用 GNPS 平台, 基于开心散提取物和血浆样品所得质谱数据构建分子网络, 结合化合物的精确质量数、保留时间、碎片信息、质谱裂解规律, 快速鉴定开心散血浆暴露成分。基于血浆暴露成分, 结合脑组织样品的高分辨质谱数据, 鉴定开心散入脑成分。结合脑组织暴露成分和网络药理学技术探究开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病物质基础。**结果** 从血浆中鉴定出开心散暴露成分共 34 个, 从脑组织中鉴定出开心散暴露成分共 21 个, 并筛选出开心散中具有治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病活性的成分共 19 个, 涉及皂苷类成分 9 个、寡糖酯类成分 9 个、吡啶类成分 1 个。**结论** 建立了中药共病物质基础快速发现的新策略, 为中药“异病同治”研究提供方法支撑, 且为开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病的物质基础阐释及其临床应用提供数据支撑。

关键词: 开心散; UPLC-Orbitrap-MS/MS; GNPS 分子网络; 网络药理学; 抑郁症-阿尔茨海默病共病; 物质基础

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)21-7690-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.004

Material basis of Kaixinsan in treating depression-Alzheimer's disease comorbidity based on UPLC-Orbitrap-MS/MS, GNPS molecular networking, and network pharmacology

AN Ruofan, GAO Yanhua, MAO Yinglu, WAN Huihua, SUN Wei, ZHENG Ying, YANG Wei

State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish a research strategy for the material basis of traditional Chinese medicine treatment of comorbidities based on high-resolution mass spectrometry, the global natural products social molecular networking (GNPS), and network pharmacology, and conduct a systematic analysis of the material basis of Kaixinsan (开心散) treatment for depression and Alzheimer's disease. **Methods** First, ultra-high-performance liquid chromatography-orbitrap tandem mass spectrometry (UPLC-Orbitrap-MS/MS) was used to perform non-targeted secondary mass spectrometry analysis on the extracts of Kaixinsan and its plasma and brain tissue exposure samples. Then, using the GNPS platform, molecular networks were constructed based on the mass spectrometry data obtained from the Kaixinsan extract and plasma samples. Combining the precise mass numbers, retention times, fragmentation information, and mass spectrometry fragmentation patterns of the compounds, the plasma exposure components of Kaixinsan were rapidly identified. Subsequently, based on the plasma exposure components, combined with the high-resolution mass spectrometry data from the brain tissue samples, the brain-penetrating components of Kaixinsan were identified. Finally, the material basis for treatment of depression-Alzheimer's disease comorbidity by the Kaixinsan was explored by combining brain tissue exposure components and

收稿日期: 2025-07-09

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目资助 (CI2023E002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (ZXKT25014); 四大慢病重大专项 (2023ZD0509300)

作者简介: 安若凡, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: anruof@126.com

*通信作者: 杨 维, 副研究员, 从事药动学研究。E-mail: wyang@icmm.ac.cn

郑 颖, 助理研究员, 从事中药药理学研究。E-mail: yzheng@icmm.ac.cn

network pharmacology techniques. **Results** A total of 34 components exposed to Kaixinsan were identified in plasma, and a total of 21 components exposed to Kaixinsan were identified in brain tissue. A total of 19 components with therapeutic activity for depression-Alzheimer's disease comorbidity were screened from Kaixinsan, including 9 saponins, 9 oligosaccharide esters, and 1 xanthone. **Conclusion** This study established a new strategy for rapidly identifying the material basis of concomitant diseases in traditional Chinese medicine, providing methodological support for research on treatment of different diseases with the same treatment in traditional Chinese medicine. It also provided data support for explaining the material basis of the treatment of depression and Alzheimer's disease concomitant diseases with Kaixinsan and its clinical application.

Keywords: Kaixinsan; UPLC-Orbitrap-MS/MS; GNPS molecular networking; network pharmacology; depression-Alzheimer's comorbidity; material basis

抑郁症与阿尔茨海默病是 2 种高发的神经系统疾病，在老年人群中常呈现共病现象^[1]。开心散是我国古代治疗情志病的基方，始记载于唐代《备急千金要方》，由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成，是传统中医用于“益气养心、安神定志”的经典名方^[2]。临床经验证实其具有显著的抗抑郁及改善认知功能的作用，可有效治疗抑郁症和阿尔茨海默病^[3-4]。但是，目前尚未有关于开心散治疗抑郁症与阿尔茨海默病共病的药效物质基础研究。

中药以多成分协同起效为特征，其全成分或体外单一活性物质均不等于药效物质基础，唯有能够被机体充分吸收的化学成分方可能成为药效物质。因此，快速鉴定中药体内暴露成分对于阐明其药效物质基础至关重要。近年来，超高效液相色谱-轨道阱串联质谱（ultra-performance liquid chromatography-electrostatic orbital ion trap tandem mass spectrometry, UPLC-Orbitrap-MS/MS）技术因其高分辨率、高灵敏度和强大的化合物鉴定能力^[5-6]，已成为中药复杂体系成分分析的有力工具。全球天然产物分子网络（global natural products social molecular networking, GNPS）平台，可通过质谱数据聚类实现同系物及结构类似物的快速筛选，显著提升成分鉴定效率^[7]。目前，已有将 UPLC-Orbitrap-MS/MS 与 GNPS 分子网络技术联合用于中药化学成分研究^[8]，但尚无用于中药体内暴露成分研究的报道。网络药理学通过构建“成分-靶点-通路”多维网络，能够系统揭示中药多成分、多靶点、多通路的协同作用机制^[9-10]。

本研究拟创新性地整合 UPLC-Orbitrap-MS/MS、GNPS 分子网络及网络药理学技术，快速鉴定开心散在大鼠血浆和脑组织中的暴露成分，并基于网络药理学筛选其作用于抑郁症-阿尔茨海默病共病的药效物质基础。本研究建立中药共病物质基础快速发现的新策略，为中药“异病同治”研究提供方法支撑，

且为开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病的物质基础阐释及其临床应用提供有力的数据依据。

1 仪器与试剂

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，7~8 周龄，动物合格证号 110011241104669138。均购买于北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（京）2021-0006。本实验经中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会批准通过，伦理审查编号为 2024B101。动物饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK（京）2023-0077]，动物房设定温度（24±2）℃，相对湿度 40%~70%。

1.2 药物与试剂

人参（江西百仁中药饮片有限公司，批号 211103），远志（四川同创康能药业有限公司，批号 200701），茯苓（安徽人民中药饮片有限公司，批号 220301），石菖蒲（安徽人民中药饮片有限公司，批号 210801）。经中国中医科学院中药研究所孙伟研究员鉴定，人参为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根及根茎、远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根、茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、石菖蒲为天南星科植物 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎。

甲醇、甲酸，质谱级，均购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；屈臣氏蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。对照品西伯利亚远志糖 A5（批号 H-179800-NU1）和远志吡啶 III（批号 H-167100-NU1）购于美国 CFW Labs 公司。对照品 3,6'-二芥子酰基蔗糖（批号 CHB201113）、人参皂苷 Rb₂（批号 CHB201106）、人参皂苷 Rb₁（批号 CHB210113）、人参皂苷 Rg₁（批号 CHB201101）、人参皂苷 Rg₂（批号 CHB201113）、人参皂苷 Re（批号 CHB201110）购于

成都克洛玛生物科技有限公司。对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

1.3 仪器

电子分析天平(赛多利斯科学仪器,北京有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DK-3450 Mini 型高速离心机(丹麦 Labogene 公司);Concentrator plus 离心浓缩机(德国 Eppendorf 公司);Blue Pard 型恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司);FD-1A-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);赛默飞世尔科技 Q Exactive 超高效液相色谱-离子质谱仪(美国);DG-10KVA 隔离变压器(上海图冠机电设备制造有限公司);NM32LA 型氮气发生器[毕克气体仪器贸易(上海)有限公司];液相系统配置脱气泵、自动进样器、四元泵、Compound Discoverer 软件(美国赛默飞世尔科技)。

2 方法

2.1 开心散提取物制备

按照人参、远志、茯苓和石菖蒲 3:2:3:2 比例混合药材,加入 10 倍体积的 60%乙醇,煮沸回流提取 2 h,滤过,收集滤液作为第 1 煎液。向滤渣中再加入 10 倍 60%乙醇,煮沸回流提取 2 h,滤过得到第 2 煎液。将第 1 煎液和第 2 煎液混合,减压浓缩至适当体积后,冷冻干燥,得到开心散冻干粉^[11]。

2.2 动物实验

12 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为对照组(6 只)和给药组(6 只),给药组按照 100 g/kg 开心散(按生药量计算)ig 给药,给药前禁食 12 h(自由饮水)。基于开心散复方成分入血达峰时间^[12],本研究于给药后 30 min 时摘眼球取血并取脑组织,10 000 r/min 离心 3 min($r=6.0$ cm)分离血浆,均放置于 -80°C 保存备用。

2.3 样品制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备及稀释 精密称量西伯利亚远志糖 A5、远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 Re,分别配制成 1 mg/mL 对照品储备液。各对照品溶液均用甲醇稀释至 100、10 $\mu\text{g/mL}$,按等体积混合后,再以甲醇稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$,上机检测。

2.3.2 开心散样品制备 精确称量开心散冻干粉 0.2 g,加入到 10 mL 量瓶中,加 75%甲醇 4 mL,超声提取 30 min,混匀,取上清 1 mL,12 000 r/min

离心 5 min,取上清,使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过溶液,上机检测。

2.3.3 血浆样品前处理 精密吸取血浆 50 μL ,加入甲醇 200 μL ,涡旋 2 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清离心浓缩至无液体。进样前用 50 μL 50%甲醇复溶,涡旋 1 min、超声 1 min,12 000 r/min 离心 5 min,分取上清液进样分析。

2.3.4 脑组织样品前处理 取脑组织与纯净水按 1:9 比例匀浆,移取 50 μL 匀浆,加入 200 μL 甲醇,涡旋混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清离心浓缩至无液体,进样前用 50 μL 50%甲醇复溶,涡旋 1 min,超声 1 min,12 000 r/min 离心 5 min,分取上清液进样分析。

2.4 液质联用条件

2.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm,1.8 μm ,Waters 公司,美国)为色谱柱,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B)。洗脱梯度:0~2 min,2% B;2~8 min,2%~40% B;8~18 min,40%~60% B;18~24 min,60%~98% B;24~28 min,98% B;28~28.1 min,98%~2% B;28.1~30 min,2% B。体积流量 0.3 mL/min;进样量 3 μL 。

2.4.2 质谱条件 全扫/二级质谱扫描(Full MS-ddMS²)。ESI 源作为采集的离子源,采用正负模式分别采集的方式。鞘气流量 60 arb;辅助气体流量 10 arb;喷雾电压 3.8 kV;毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$;辅助燃气加热器温度 320 $^{\circ}\text{C}$;碰撞能量 25、30、35 V;扫描范围 m/z 150~2 000;全毫秒分辨率 35 000。

2.5 分子网络构建方法

使用 MS Convert 软件将开心散样品及血浆样品的质谱数据文件转换为 mzML 格式文件。将开心散样品和血浆样品的 mzML 文件通过 WinSCP 客户端上传到 GNPS 网站中,构建分子网络(molecular networking, MN)。GNPS 的参数如下:Precursor Ion Mass Tolerance 和 Fragment Ion Mass Tolerance 均为 0.02。余弦分数阈值设置为 0.6,最小匹配碎片离子为 3。使用 Cytoscape 3.10.3 软件对 GNPS 分析结果进行可视化处理。

2.6 基于 GNPS 和 UPLC-Orbitrap-MS/MS 的开心散入血成分鉴定

依托 GNPS 平台对所得质谱数据构建分子网络,通过谱图相似性实现化合物家族的自动聚类,并高效筛选结构类似物。在网络分析过程中,优先鉴定与公共数据库匹配的节点,然后进一步推断同一网络

中未被鉴定节点的结构特征。同时,结合化合物的准分子离子、保留时间、碎片离子信息,以及对照品对小鼠 ig 给予开心散后的血浆暴露成分进行鉴定。

2.7 基于 GNPS 和 UPLC-Orbitrap-MS/MS 的脑组织暴露成分鉴定

基于 GNPS 快速鉴定开心散入血成分,采用 Thermo Xcalibur 4.1 对脑组织样品质谱数据进行处理分析,通过比对空白脑组织样品和给药 30 min 后脑组织样品中色谱峰的保留时间、准分子离子、碎片信息等,对小鼠 ig 开心散后的脑组织中暴露成分进行鉴定。

2.8 基于网络药理学探究入脑成分治疗慢性疾病的作用机制

2.8.1 开心散入脑成分靶点预测 基于脑组织中开心散暴露成分鉴定结果,在 PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索开心散的脑中暴露成分对应的 Canonical SMILES 格式,得到相应的分子结构,导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)、Similarity ensemble approach (<https://sea.bkslab.org/>)、ChemMapper (<http://lilabecust.cn/chemmapper/>) 和 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 数据库,检索单个化合物作用的靶点,选择预测概率大于 0 的靶点作为开心散成分的潜在靶点。将所有获得的成分关联靶点合并后去除重复项,得到开心散的靶点预测结果。通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 数据库对所获得靶点的来

源和基因信息进行校正。

2.8.2 疾病靶点的收集 通过 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<https://omim.org>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd>) 数据库,以“Depression”“Alzheimer’s disease”为关键词,搜索疾病靶点。选取 GeneCards 中靶点相关得分大于 2 以及 OMIM、TTD 数据库的全部靶点,进行去重处理后获得靶点数据集。

2.8.3 开心散“活性成分-靶点”网络构建 利用 Cytoscape 3.10.0 生物网络分析软件将开心散脑中暴露成分、关键靶点及其关键靶点的相互作用关系进行系统可视化分析,构建“活性成分-靶点”互作网络。

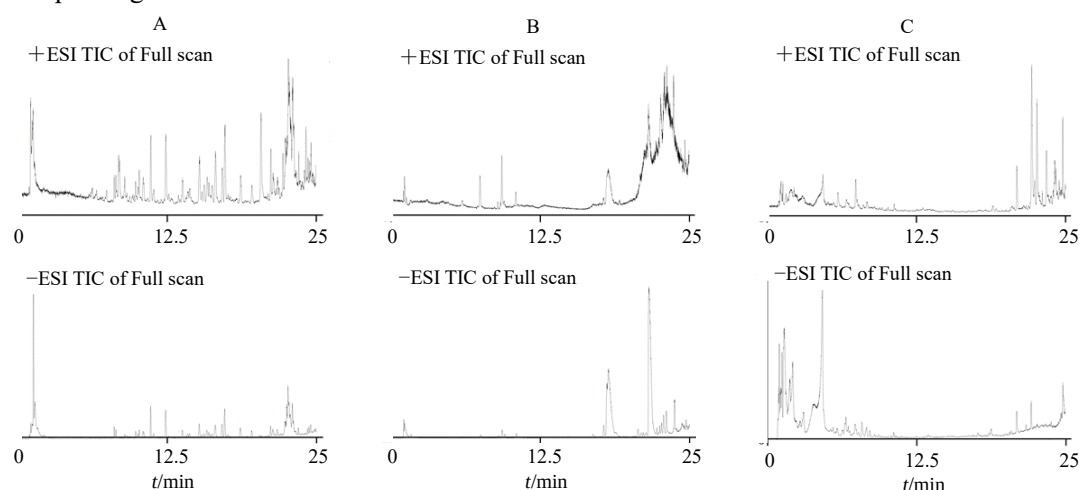
3 结果与分析

3.1 开心散化学成分-体内暴露成分的质谱成分分析

利用 UPLC-Orbitrap-MS/MS 技术,在正、负离子模式下对开心散提取物、小鼠 ig 开心散 30 min 后的血浆和脑组织样品进行检测。采用 Thermo Xcalibur 4.1 软件对开心散提取物、血浆和脑组织样品质谱数据进行处理分析。开心散提取物、血浆和脑组织样品在正、负离子模式下的总离子流图见图 1。

3.2 基于 GNPS 分子网络分析开心散入血成分

本研究通过采集正、负离子模式下的高分辨质谱数据,通过 MS/MS 碎片离子的相似性构建 GNPS 可视化分子网络,见图 2。基于 GNPS 分子网络与 UPLC-Orbitrap-MS/MS,从血浆中检测到 34 个成分,涉及皂苷类成分 20 个、寡糖酯类成分 10 个、吡啶酮类成分 4 个,化合物结构式如图 3 所示。



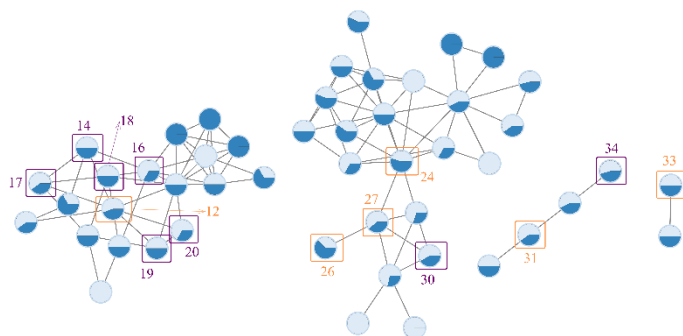
A-开心散提取物; B-血浆样品; C-脑组织样品。

A-Kaixinsan extract; B-plasma sample; C-brain tissue sample.

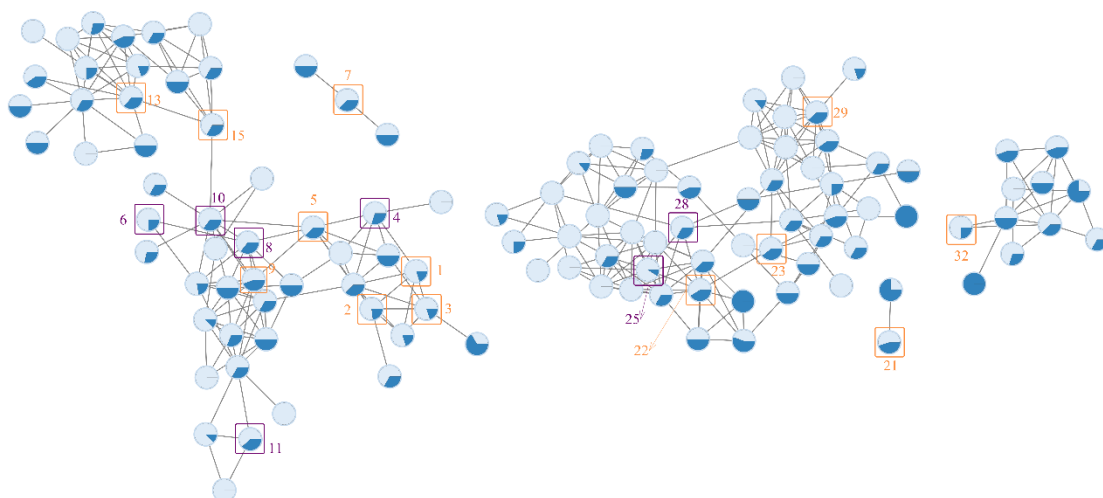
图 1 开心散提取物、血浆和脑组织样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagrams of Kaixinsan extract, plasma and brain tissue samples

正离子模式



负离子模式



图中浅蓝色代表开心散提取物, 深蓝色代表小鼠血浆样品, 其比例为该化合物在 2 个样品中的相对丰度; 黄框表示由 GNPS 直接鉴定化合物, 紫框表示结合 MS/MS 间接鉴定化合物。

The light blue color represents Kaixinsan extract, and the dark blue color represents mouse plasma sample, with the ratio representing the relative abundance of the compound in the two samples; yellow boxes indicate compounds identified directly by GNPS, while purple boxes indicate compounds identified indirectly by MS/MS.

图 2 正、负离子模式下开心散提取物及小鼠血浆暴露成分分子网络图

Fig. 2 Molecular networking diagram of Kaixinsan extract and mouse plasma exposure components in positive and negative ion modes

3.2.1 借助 GNPS 分子网络直接鉴定化合物 借助 GNPS 分子网络谱图相似性聚类与共享数据库比对鉴定 19 个化合物, 包括皂苷类化合物 9 个 (1~3、5、7、9、12、13、15), 寡糖酯类化合物 7 个 (21~24、26~27、29), 呋酮类化合物 3 个 (31~33)。其中, 7 个化合物 (化合物 3、5、9、12、15、22、29) 已通过对照品比对确认。具体成分质谱信息和名称见表 1。

3.2.2 基于 GNPS 分子网络间接鉴定化合物 通过 UPLC-Orbitrap-MS/MS 质谱分析 GNPS 鉴定节点同一网络的未鉴定的节点, 同时结合化合物的精确质量数、保留时间、二级碎片信息、质谱裂解规律, 共鉴定 15 个化合物 (化合物 4、6、8、10~11、14、

16~20、25、28、30、34), 其中化合物远志呋酮 III 已通过对照品比对确认。具体成分质谱信息和名称见表 1。

共推断出 11 个皂苷类化合物, 涉及化合物 4、6、8、10~11、14、16~20。皂苷类化合物在正离子模式下主要生成加合离子 $[M+Na]^+$, 易发生糖基侧链的断裂, 且出现糖基加 Na 离子等特征离子, 如 $[C_{11}H_{20}O_{10}+Na]^+$ m/z 335.094 9, $[C_{12}H_{22}O_{11}+Na]^+$ m/z 365.105 4。在负离子模式下主要生成加合离子 $[M+HCOO]^-$ 和 $[M-H]^-$, 易发生糖基侧链的断裂。以化合物 19 为例, 其在 GNPS 分子网络与化合物 12 化合物直接相连, 化合物 12 在 GNPS 中被标注为人参皂苷 Rb₂, 推测化合物 12 可是能皂苷类化

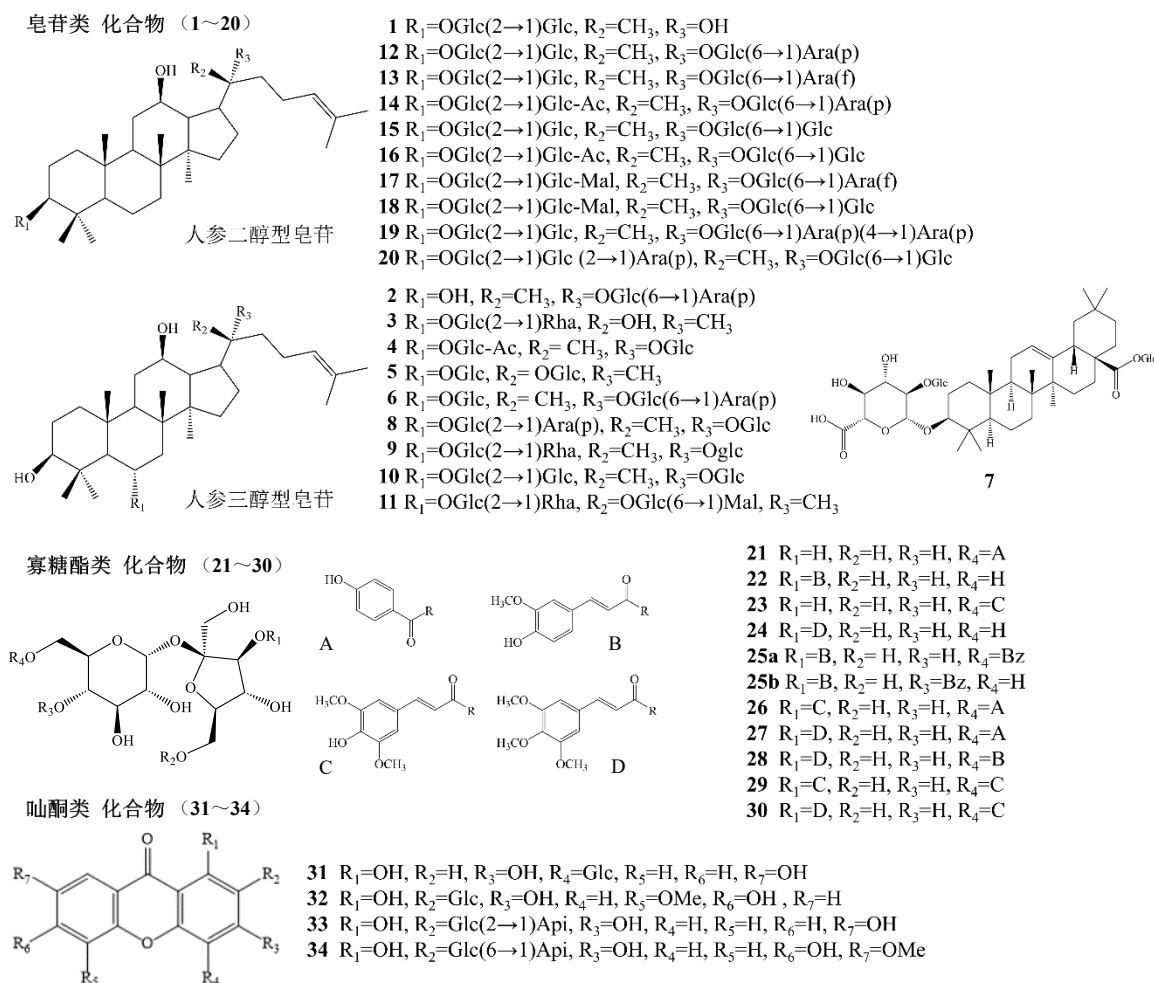


图 3 血浆中鉴定的化学成分的结构

Fig. 3 Structures of chemical compositions in plasma

合物。考虑到化合物 19 的 $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$ 1233.621 5, 以及碎片离子 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{14}]^+ m/z$ 789.473 6、 $[\text{Glc}-\text{Ara}-\text{Ara}+\text{Na}]^+ m/z$ 467.136 2, 推断化合物 19 为人参皂苷 Ra_1 。

推断出 3 个寡糖酯类化合物, 涉及化合物 25、28、30。寡糖酯类化合物在正离子模式下主要生成加合离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 易发生糖苷键和酯键的断裂, 呈现 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_7]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9]^+$ 等特征离子。在负离子模式下主要生成加合离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 易发生脱糖基、脱酯基反应, 同时出现有机酸特征离子 $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3^- m/z$ 137.024 4、 $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_3^- m/z$ 175.040 1、 $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_4^- m/z$ 205.050 6 等。以化合物 30 为例, 其在 GNPS 分子网络中与化合物 27 直接相连, 化合物 27 在 GNPS 中被标注为细叶远志苷 A, 推测 m/z 791.235 3 可能是寡糖酯类化合物。化合物 30 $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$ 791.235 3, 结合碎片离子 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9]^+ m/z$

423.125 2, 推断化合物 30 可能为细叶远志苷 C。

推断出 1 个呋酮类化合物, 即化合物 34。呋酮类化合物在正离子模式下生成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 准分子离子峰, 易在糖基上发生断裂。在负离子模式下主要生成加合离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 同样易在糖基上发生断裂。以化合物 34 为例, 其在 GNPS 分子网络中与化合物 31 直接相 12 连, 其在 GNPS 中被标注为 lancerin, 推测 m/z 569.149 4 同样为呋酮类化合物。化合物 34 的 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 569.149 4, 结合碎片离子 $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_7^+ m/z$ 317.065 6、 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6^+ m/z$ 287.054 7, 基于对照品推断化合物 34 为远志呋酮 III。

3.3 开心散脑内暴露成分分析

基于 GNPS 快速鉴定到的 34 个入血成分, 结合脑组织样品的高分辨质谱数据, 共鉴定出脑组织暴露成分 21 个, 其中包括 9 个皂苷类化合物 (化合物 5、7、9~10、12~13、15、18、19), 9 个寡

表 1 GNPS 快速鉴定小鼠体内开心散暴露成分
Table 1 Rapid identification of exposed components of Kaixinsan in mice by GNPS

编号	m/z	tr/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物名称	分子式	加合方式	暴露位置
1	783.488 1	21.73	-2.43	475.378 8, 101.024 2, 71.013 6, 59.013 8	20(R)-人参皂苷Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	血浆
2	815.479 8	19.32	0.00	607.421 1, 475.378 0, 327.365 8, 89.024 2	人参皂苷F ₃	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	[M+HCOO] ⁻	血浆
3*	829.494 6	21.74	-1.09	592.370 8, 475.379 5, 458.397 6, 101.024 1	人参皂苷Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	[M+HCOO] ⁻	血浆
4	841.494 6	17.62	-1.07	637.432 8, 619.421 4, 475.378 3, 113.024 3	6'-O-乙酰基-人参皂苷Rg ₁	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	血浆
5*	845.489 4	17.34	-1.18	637.424 1, 475.379 8, 410.483 5, 89.024 3	人参皂苷Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻	血浆、脑组织
6	931.526 5	15.39	-0.75	737.353 7, 637.433 0, 475.377 1, 89.024 3	三七皂苷Fp ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	血浆
7	955.489 4	22.55	-1.47	793.434 9, 569.380 9, 523.377 6, 89.024 4	人参皂苷Ro	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
8	977.531 4	15.97	-1.33	931.531 3, 637.430 4, 475.378 5, 89.024 2	三七皂苷R ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	[M+HCOO] ⁻	血浆
9*	991.547 2	17.13	-1.11	945.537 8, 637.431 1, 475.378 1, 89.024 3	人参皂苷Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	[M+HCOO] ⁻	血浆、脑组织
10	1 007.541 6	15.82	-1.59	961.528 4, 637.429 9, 475.381 3, 89.024 3	20-葡萄糖基-人参皂苷Rf	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	[M+HCOO] ⁻	血浆、脑组织
11	1 031.542 5	18.15	-0.68	945.542 0, 637.435 9, 475.378 5, 113.024 3	丙二酰人参皂苷Re	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	[M-H] ⁻	血浆
12*	1 101.580 0	23.02	-1.45	789.475 2, 365.104 8, 335.094 2	人参皂苷Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
13	1 123.588 5	22.74	-1.87	1 077.584 4, 945.539 9, 621.437 0, 89.024 2	人参皂苷Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	[M+HCOO] ⁻	血浆、脑组织
14	1 143.590 3	23.09	-1.66	831.484 6, 407.114 0, 335.094 3	人参皂苷Rs ₁	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	[M+Na] ⁺	血浆
15*	1 153.599 1	22.66	-1.73	1 107.594 6, 945.541 6, 621.435 7, 89.024 2	人参皂苷Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	[M+HCOO] ⁻	血浆、脑组织
16	1 173.601 6	23.00	-0.94	831.484 4, 407.115 1, 365.104 7	西洋参皂苷R ₁	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	[M+Na] ⁺	血浆
17	1 187.580 1	22.51	-1.6	875.474 9, 831.485 2, 407.114 7, 335.094 1	丙二酰人参皂苷Rc	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	[M+Na] ⁺	血浆
18	1 217.590 7	22.41	-1.56	875.474 7, 831.484 6, 407.115 1, 365.104 7	丙二酰人参皂苷Rb ₁	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
19	1 233.621 5	22.44	-1.95	789.473 6, 467.136 2, 407.112 9, 335.094 9	人参皂苷Ra ₁	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
20	1 263.633 4	22.08	-0.79	789.477 8, 497.146 5, 437.125 4, 365.103 9	三七皂苷Fa	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	[M+Na] ⁺	血浆
21	461.129 3	7.47	0.00	281.066 8, 239.055 9, 179.034 7, 137.023 9	西伯利亚远志糖A ₃	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	血浆、脑组织

表 1 (续)

编号	m/z	tr/min	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子 (m/z)	化合物名称	分子式	加合方式	暴露位置
22*	517.155 3	8.09	-1.93	341.108 2, 193.050 1, 175.039 8, 160.016 2	西伯利亚远志糖 A5	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
23	547.165 9	8.24	-1.64	341.108 3, 223.061 2, 205.050 0, 190.026 4	西伯利亚远志糖 A1	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
24	585.178 1	9.88	-1.54	423.124 4, 405.116 2, 195.105 9, 167.030 0	球腺糖苷 A	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₅	[M+Na] ⁺	血浆
25	621.181 8	12.50	-1.13	549.097 4, 193.049 9, 175.039 8, 160.016 3	reinirose B/C	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
26	691.183 2	10.09	-1.88	409.109 7, 391.098 5, 323.073 5, 167.031 4	细叶远志苷 B	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₇	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
27	705.198 2	12.42	-2.69	423.124 6, 405.114 2, 323.072 7, 167.031 1	细叶远志苷 A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
28	737.229 1	14.14	-0.95	499.144 2, 237.076 0, 193.050 3, 175.039 9	reinirose A	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
29*	753.223 8	11.15	-1.19	547.162 8, 223.060 8, 205.050 1, 190.027 0	3,6'-二芥子酰基蔗糖	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	[M-H] ⁻	血浆、脑组织
30	791.235 3	13.81	-2.02	423.125 2, 409.108 9, 405.113 8, 167.031 5	细叶远志苷 C	C ₃₅ H ₄₄ O ₁₉	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
31	407.096 7	9.63	-1.47	311.054 4, 287.054 4, 257.043 8, 171.112 6	lancerin	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	血浆、脑组织
32	435.092 5	10.51	-1.84	345.060 5, 315.050 6, 272.032 1	鸢尾吡酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	血浆
33	561.120 7	10.19	-1.43	429.078 2, 411.068 0, 339.046 7, 245.062 7	西伯利亚远志吡酮 B	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₄	[M+Na] ⁺	血浆、脑组织
34*	569.149 4	10.58	-1.23	341.066 3, 317.065 6, 287.054 7	远志吡酮 III	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₅	[M+H] ⁺	血浆、脑组织

*经对照品比对的化合物。
 * Compound compared with reference substance.

糖酯类化合物（化合物 21~23、25~30）和 3 个吡酮类化合物（化合物 31、33~34），信息见表 1。

3.4 开心散抗抑郁-阿尔茨海默病共病活性成分研究

通过 OMIM、GeneCards 和 TTD 数据库获取抑郁症和阿尔茨海默病疾病相关靶点，并取其交集，最终确定了 2 040 个同时与抑郁症、阿尔茨海默病相关的靶点，见图 4。针对开心散在鼠脑中暴露的 21 个成分并基于 Swiss Target Prediction 和 Similarity Ensemble Approach 数据库，获得 141 个开心散预测靶点。将开心散相关基因与抑郁症、阿尔茨海默病共有相关基因取交集，最终筛选得到 58 个共有靶点，见图 5。如图所示，与这 58 个靶点相关的脑内暴露化合物共 19 个，即除 lancerin、西伯利亚远志吡酮 B 外的开心散入脑成分可能是开心散治疗抑郁-阿尔茨海默病共病的活性物质。其中拥

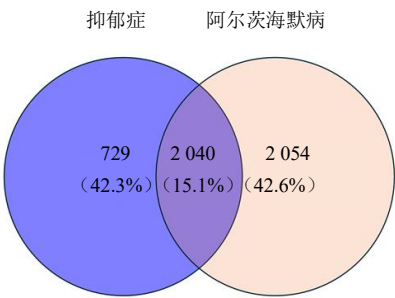
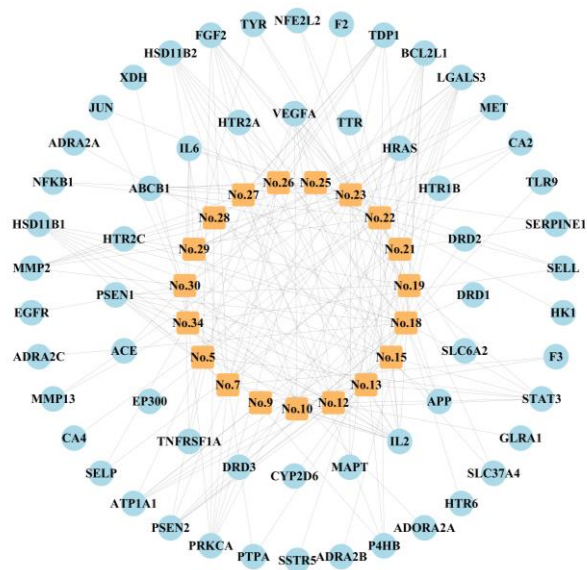


图 4 抑郁症和阿尔茨海默病相关靶点韦恩图
 Fig. 4 Venn diagram of depression and Alzheimer's disease related targets

有超过 20 个作用靶点的成分有 11 个，涉及人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₁、丙二酰人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ra₁、西伯利亚远志糖 A3、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A1、



圆形为基因，方形为表 1 中开心散化学成分。

Circles represent genes, and squares represent the chemical components of Kaixinsan in table 1.

图5 开心散活性成分与疾病靶点相关图

Fig. 5 Correlation diagram between active ingredients of Kaixinsan and disease targets

3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 C。

利用 DAVID 数据库对 58 个靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共获得 102 条相关通路。筛选 $P < 0.05$ 的前 20 条通路并进行可视化展示, 见图 6。其中与抑郁症-阿尔茨海默病共病高度相关的通路主要包括高级糖基化终末产物-受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、神经活动配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction) 通路等。

4 讨论

抑郁症与阿尔茨海默病是老年人群中常见的共病。本研究提出中药共病物质基础的快速发现策略：首先，采用 UPLC-Orbitrap-MS/MS 技术对中药提取物及其血浆暴露样品进行非靶向二级质谱分析，获取全面的成分信息。随后，依托 GNPS 平台对所得质谱数据构建分子网络，以及化合物质谱信息鉴定中药血浆暴露成分。最后，联合网络药理学

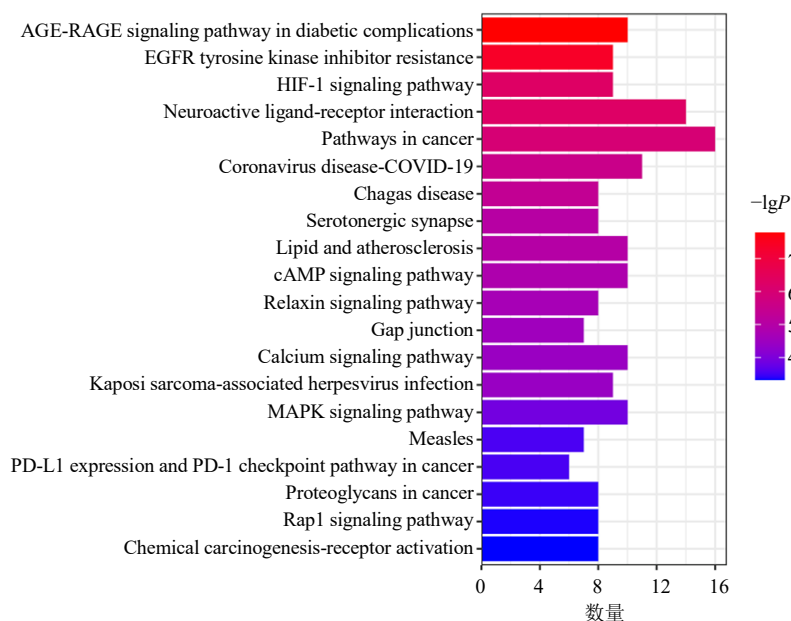


图 6 开心散与抑郁症和阿尔茨海默病 KEGG 信号通路分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis of Kaixinsan, depression, and Alzheimer's disease

方法,构建“成分-靶点”关系网络,系统阐释中药治疗共病的作用机制。相较传统 LC-MS/MS 主要依赖手动比对碎片离子和标准品的方式,本研究策略显著提升了鉴定通量与速度。网络药理学的虚拟“成分-靶点”网络,可快速定位关键药效组分及其

靶点。因此,对于临床广泛应用但物质基础不明的中药复方,该策略能系统高效地解析其药效物质基础及作用机制。

GNPS 是一种可视化计算策略,可以快速直观地观察到样品 LC-MS/MS 实验中检测到的所有分

子离子以及这些分子离子之间的化学关系,对于化合物的快速而大规模地鉴定及新颖化合物发现具有重要的作用^[7]。而本研究首次将 GNPS 分子网络技术用到中药体内暴露成分鉴定研究,快速发现大鼠血浆暴露开心散成分 34 个。同时,该方法有望应用于尿液、胆汁等生物样品中,实现药物原型及其代谢产物的快速识别。

本研究发现开心散在治疗阿尔茨海默病与抑郁症时,可同时调控 AGE-RAGE 通路、HIF-1 信号通路及神经活动配体-受体相互作用等多条关键信号通路。其中,神经活动配体-受体相互作用、环核苷酸系统(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、HIF-1、钙离子、血清素能突触及促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路可调控神经递质、突触可塑性及神经炎症等关键病理环节^[13-15]。这不仅体现了中药多成分、多靶点协同作用的独特优势,也为临床防治抑郁症-阿尔茨海默病共病提供了有力的理论依据。

5 结论

基于本研究提出的结合高分辨质谱、GNPS 分子网络与网络药理学的新策略,筛选出开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病的活性成分共 19 个,这些成分通过协同作用构成其治疗共病的物质基础。同时,在本研究中首次将 GNPS 分子网络技术应用到中药体内暴露成分的鉴定,为复杂中药组分体内的快速、系统鉴定提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu Y L, Xiao X W, Yang Y, *et al.* The risk of Alzheimer's disease and cognitive impairment characteristics in eight mental disorders: A UK Biobank observational study and Mendelian randomization analysis [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(7): 4841-4853.
- [2] 尚炳娴, 戴子琦, 吴倩文, 等. 经典名方开心散的处方与本草考证 [J]. *西北药学杂志*, 2022, 37(3): 12-19.
- [3] 包祖晓, 赵国平, 孙伟, 等. 开心散治疗轻、中度抑郁症临床观察 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(5): 987-988.
- [4] 汪海芹, 刘彦廷, 蔡忠明, 等. 开心散联合盐酸多奈哌齐治疗老年相关性痴呆的临床分析 [J]. *老年医学与保健*, 2022, 28(2): 242-245.
- [5] Lin R M, Yin J X, Wu M F, *et al.* Global identification and determination of the major constituents in Kai-Xin-San by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 206: 114385.
- [6] 张岩钊, 李映, 郭康雅, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS/MS 的糖尿灵片成分鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2025, 27(2): 391-403.
- [7] Xu Q J, Liu J C, Wang X, *et al.* Characterization, target isolation of triterpenes in the anti-inflammatory fraction of *Salvia rosmarinus* via UPLC-orbitrap MS/MS coupled with GNPS [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(18): 10985-10997.
- [8] 白云凤, 黄智兴, 唐雅楠, 等. 基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS 和分子网络技术快速鉴定开心散化学成分 [J]. *中国现代中药*, 2025, 27(2): 258-273.
- [9] Liu Y S, Li X, Chen C, *et al.* Exploration of compatibility rules and discovery of active ingredients in TCM formulas by network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 572-588.
- [10] 何梓龙, 任睿楠, 汪芳, 等. 基于 UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS 成分分析、网络药理学与实验验证桑菊饮治疗急性肺损伤作用机制 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(10): 2227-2240.
- [11] Reeru Maharjan, Chiranjivi Thapa, 汪娜, 等. 开心散乙醇提取物中远志皂苷的入血成分及体内代谢产物分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 118-123.
- [12] Chen L P, Jiang L, Shi X Y, *et al.* Constituents, pharmacological activities, pharmacokinetic studies, clinical applications, and safety profile on the classical prescription Kaixinsan [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1338024.
- [13] Zhang S L, Hu Y L, Zhao Y N, *et al.* Molecular mechanism of Chang Shen Hua volatile oil modulating brain cAMP-PKA-CREB pathway to improve depression-like behavior in rats [J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155729.
- [14] Chen Z W, Gu J P, Lin S S, *et al.* Saffron essential oil ameliorates CUMS-induced depression-like behavior in mice via the MAPK-CREB1-BDNF signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115719.
- [15] Sushma, Mondal A C. Role of GPCR signaling and calcium dysregulation in Alzheimer's disease [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2019, 101: 103414.

[责任编辑 王文倩]