

## • 药理与临床 •

## 基于靶点筛选探讨京尼平龙胆双糖苷抗抑郁的作用机制

肖洋<sup>1,4</sup>, 杨琴<sup>2</sup>, 谢肖瑶<sup>1</sup>, 荆继虎<sup>3</sup>, 江玉翠<sup>1</sup>, 陈飞燕<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学中医学院, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023

3. 南京西麦大健康科技有限公司, 江苏 南京 210000

4. 南京中医药大学中西医结合学院, 江苏 南京 210023

**摘要:** **目的** 基于药物亲和反应的靶点稳定性 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 技术筛选京尼平龙胆双糖苷 (genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside, GG) 脑内抗抑郁靶点, 并探讨 GG 基于靶点发挥抗抑郁作用的潜在机制。**方法** 通过 DARTS 联合无标记液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 蛋白质组学筛选 GG 在脑组织内潜在蛋白质靶点, 再将给药组特有的差异表达基因与抑郁症疾病靶点数据库取交集, 共交集出 1 个潜在抗抑郁靶点蛋白激酶 C 相互作用蛋白 1 (protein interacting with C kinase 1, PICK1)。通过生物层干涉技术 (biolayer interferometry, BLI)、分子对接和氨基酸定点突变对潜在靶标 PICK1 与 GG 之间的亲和力和结合位点进行分析。通过 qRT-PCR 和 Western blotting 考察 GG 对慢性不可预见性轻度应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 小鼠海马组织 PICK1、谷氨酸受体 A2 (glutamate receptor A2, GluA2) 和突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95) 表达的影响, 阐释 GG 基于靶点 PICK1 发挥抗抑郁作用的潜在机制。**结果** 基于 DARTS 联合无标记 LC-MS 蛋白质组学共获得 29 个潜在靶点, 将 29 个潜在靶点与抑郁症靶点数据库交集获得 1 个 GG 在脑内的潜在抗抑郁靶标 PICK1。BLI 结果显示, GG 与 PICK1 存在相互作用, 亲和力 ( $K_D$ ) 值为  $1.915 \times 10^{-5}$  mol/L。分子对接结果显示, GG 与 PICK1 存在相互作用, GLN91、LYS83、ILE37、SER36 和 ILE35 与 GG 形成的氢键为主要作用力。氨基酸定点突变结果显示, 突变 SER36、GLN91、LYS83 后 GG 与 PICK1 之间的亲和力变化显著, SER36、GLN91、LYS83 为 GG 与 PICK1 结合的关键位点。qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, GG 显著下调抑郁模型小鼠海马组织中 PICK1、GluA2 和 PSD95 的 mRNA 和蛋白表达 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** GG 可能通过结合 PICK1 影响突触可塑性相关蛋白的表达水平, 进而改善 CUMS 小鼠海马突触可塑性, 发挥抗抑郁作用。

**关键词:** 药物亲和反应的靶点稳定性; 京尼平龙胆双糖苷; 抑郁; PICK1; 突触可塑性

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)21-7772-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.011

## Study on mechanism of genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside against depression based on target screening

XIAO Yang<sup>1,4</sup>, YANG Qin<sup>2</sup>, XIE Xiaoyao<sup>1</sup>, JING Jihu<sup>3</sup>, JIANG Yucui<sup>1</sup>, CHEN Feiyan<sup>1</sup>

1. School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. The First Clinical Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Nanjing Seamild Grand Health Technology Co., Ltd., Nanjing 210000, China

4. School of Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To screen the anti-depressant targets of genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside (GG) in brain by drug affinity responsive target stability (DARTS) technique, and explore the potential mechanism of GG exerting anti-depressant effect based on target.

**Methods** DARTS combined with label-free liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) proteomics were used to screen

收稿日期: 2025-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82204647, 82404886, 82574611); 南京中医药大学国自然青年基金经费配套项目 (XPT82204647)

作者简介: 肖洋, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治抑郁。E-mail: 2500381972@qq.com

\*通信作者: 陈飞燕, 高级实验师, 主要从事中药靶点研究。E-mail: feiyan88121@njucm.edu.cn

potential protein targets of GG in brain tissues, and the differentially expressed genes specific to drug groups were intersected with the depression disease target database to identify a potential anti-depression target protein kinase C interaction protein 1 (PICK1). Affinity and binding sites between the potential target PICK1 and GG were analyzed by biolayer interference (BLI), molecular docking and site-specific mutation of amino acids. The effect of GG on expressions of PICK1, glutamate receptor A2 (GluA2) and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in hippocampus of mice with chronic unpredictable mild stress (CUMS) was investigated using qRT-PCR and Western blotting, and the potential mechanism of GG exerting anti-depressant effect based on target PICK1 was elucidated. **Results** Based on DARTS combined with label-free LC-MS proteomics, 29 potential targets were obtained, and a potential anti-depressive target PICK1 of GG was obtained by intersecting them with the depression target database. The BLI result showed that GG interacted with PICK1, with affinity ( $K_D$ ) value of  $1.915 \times 10^{-5}$  mol/L. Molecular docking showed that PICK1 interacted with GG, and the hydrogen bond formed by GLN91, LYS83, ILE37, SER36 and ILE35 with GG was the main force. The results of amino acid site-directed mutagenesis showed that the affinity between GG and PICK1 significantly changed after mutations at positions SER36, GLN91 and LYS83. SER36, GLN91 and LYS83 were the key sites for the binding of GG to PICK1. qRT-PCR and Western blotting results showed that GG could significantly down-regulated the mRNA and protein expressions of PICK1, GluA2 and PSD95 in hippocampus of depression model mice ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** GG may affect the expression levels of synaptic plasticity-related proteins by binding to PICK1, thereby improving the synaptic plasticity of hippocampus in CUMS mice and exerting an anti-depressant effect.

**Key words:** drug affinity responsive target stability; genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside; depression; PICK1; synaptic plasticity

抑郁症是全球范围内最为常见、由多因素导致的精神障碍类疾病，以情绪低落、不安、失眠为主要临床特点，严重者可出现自杀倾向<sup>[1]</sup>。抑郁症的高患病率和低治愈率，不仅严重影响了患者的日常生活质量和身心健康，也给家庭和社会带来了严重负担<sup>[2]</sup>。中药治疗抑郁症的效果优、历史久，临床和实验研究均显示中药治疗抑郁症具有良好的效果<sup>[3]</sup>。梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实<sup>[4]</sup>，文献报道显示梔子在抑郁症治疗方剂中的应用频率高达 14.87%<sup>[5]</sup>。其中环烯醚萜苷类成分梔子苷及其苷元京尼平等是主要抗抑郁成分<sup>[6]</sup>。京尼平龙胆双糖苷 (genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside, GG) 是梔子的主要有效成分<sup>[7]</sup>，其化学结构与梔子苷相似，只是多了 1 个糖苷基团。一般来说，结构相似的化合物具有相似的生物效应，因此，GG 可能具有与梔子苷相同的抗抑郁活性。课题组前期研究证实了 GG 的抗抑郁药效<sup>[8]</sup>，为其能够发挥抗抑郁作用提供了实验依据。

中药药效物质和作用靶点不清晰是阻碍中药现代化与国际化的重要因素，利用现代化技术阐明中药有效成分的作用靶点以及基于靶点的作用机制是中药研究的关键<sup>[9]</sup>。目前，关于中药靶点筛选的方法主要分为 2 类：①标记法，通过化学改造将中药有效成分进行标记，进而通过荧光或富集，对其靶蛋白进行鉴定，如亲和垂钓<sup>[10]</sup>；②非标记法，不需要对中药有效成分进行任何修饰，主要基于中药有效成分和靶标蛋白结合后会对靶标蛋白物理性质的影响，进而识别中药活性成分作用靶点，如

药物亲和反应的靶点稳定性 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 技术、细胞热位移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA) 技术<sup>[11]</sup>等。其中，非标记法中的 DARTS 技术早在 2009 年就已经在 *PNAS* 上提出<sup>[12]</sup>，且已被多项研究利用，包括靶点的筛选和验证。该技术的主要原理是当药物小分子和靶蛋白结合后靶蛋白的结构可被稳定，从而有效避免靶蛋白质被蛋白酶降解。该技术完整的方法被发表在 *Curr Protoc Chem Biol* 杂志上<sup>[13]</sup>，且研究者在方法中推荐了 2 种蛋白酶——链霉菌蛋白酶 (pronase) 和嗜热菌蛋白酶 (thermolysin)。另外，通过液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 可以定量复杂生物基质中的蛋白质，进而对差异蛋白进行精确筛选<sup>[14]</sup>。通过以上方法可以对药物小分子体内潜在靶点进行筛选，进而为进一步了解药物作用机制提供依据。

鉴于此，本研究首先基于 DARTS 联合无标记 LC-MS 蛋白质组学对 GG 脑内潜在作用靶点进行筛选，再将筛选获得的潜在靶点与抑郁症疾病靶点数据库进行交集，从而获得 GG 脑内抗抑郁潜在作用靶点。接着，对 GG 与潜在靶点之间的作用进行验证，最后基于靶点初步探讨 GG 发挥抗抑郁作用的机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 63 只，体质量 20~22 g，购自杭州医学院，许可证号 SCXK (浙) 2019-0002。动物实验经南京中医药大学伦理委员会批准

(批准号 202302A060)。

## 1.2 药品与试剂

GG (批号 B20637, 质量分数为 98%)、氟西汀 (批号 S71089, 质量分数为 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司; His-蛋白激酶 C 相互作用蛋白 1 (protein interacting with C kinase 1, PICK1) 融合蛋白由本实验室自行纯化; 同源重组酶 (批号 017E2211BA) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; HisTrap HP (批号 10327780) 购自美国 Cytiva 公司; DNA 胶回收试剂盒 (批号 230720KE1) 购自美国 Axygen 公司; 高保真 Mix、Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)、琼脂糖、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox)、DNA marker、质粒提取试剂盒、YeaRed 核酸染料购自上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为 H6011030、11141ES60、A4013900、11201ES08、G0023741、M1127970、G1921261; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、琼脂、硫酸卡那霉素、PBS 溶液、甘氨酸、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 1028F0510、1113G034、928E047、20200818、814E064、1121E0316; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 040223230407)、RIPA 裂解液 (批号 061919190814) 购自上海碧云天生物技术有限公司; PICK1 抗体 (批号 ab3420) 购自英国 Abcam 公司; 突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95) 抗体 (批号 3450)、谷氨酸受体 A2 (glutamate receptor A2, GluA2) 抗体 (批号 13607)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 14708) 购自美国 CST 公司; β-actin 抗体 (批号 AF7018) 购自美国 Affinity 公司。

## 1.3 仪器

PowerPacTM Basic 电泳仪及制胶设备 (美国 Bio-Rad 公司); IKA T10 ULTRA-TURRAX 型高速分散匀质机 (德国 IKA 公司); AKTA pure M1 型蛋白中压层析系统 (美国 GE 公司); Universal Hood II 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); Octet Red 96 型 Octet 分子相互作用仪 (美国 ForteBio 公司); LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

## 2 方法

### 2.1 DARTS 技术

DARTS 技术的实验方法主要参见文献报道<sup>[15]</sup>。

具体步骤为: 用 PBS 溶液灌注 3 只小鼠, 取出脑组织, PBS 溶液清洗后, 用剪刀剪碎脑组织, 放入预冷的离心管中, 加入适量含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 用匀浆仪对脑组织进行匀浆。匀浆后在冰上充分裂解 30 min, 转移至预冷的 1.5 mL 离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 将上清转移至预冷的 1.5 mL 离心管中, 加入 TNC (100 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、500 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl, pH 8.0)。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 将上清液稀释成 2 μg/μL, 给药组加入 GG (20 μmol/L), 对照组加入与等体积的 DMSO, 室温孵育 20 min。将经 GG 或 DMSO 处理的上清溶液 40 μL 分别加入到 PCR 管中, 每组 3 管, 并添加 4 μL 链霉菌蛋白酶溶液 (链霉菌素: 蛋白质 = 1: 800), 25 °C 消化 25 min。待消化结束后, 分别在每个 PCR 管加入相应体积的蛋白酶抑制剂混合物终止消化反应, 并在冰上孵育 10 min 使终止反应更加充分, 终止后的反应液进行送样处理。

### 2.2 无标记 LC-MS 和数据分析

使用无标记 LC-MS<sup>[12]</sup>进行蛋白质组学定量分析, 由上海中科新生命生物科技有限公司检测。

### 2.3 网络药理学分析

通过疾病靶点数据库 DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 提取抑郁症靶点的相关基因 (每个数据库取前 300 个), 合并后去重, 共获得 400 个基因。再通过 Venn 分析, 将无标记 LC-MS 蛋白质组学获得的给药组特有的差异表达蛋白的基因与抑郁症疾病靶点基因取交集, 从而获得 GG 脑内抗抑郁潜在靶点。

### 2.4 PICK1 融合蛋白的表达与纯化

通过 NCBI 检索小鼠 *PICK1* 基因完整的 CDS 序列, 通过检索获得的 CDS 序列设计上下游引物, *PICK1* 上游引物 5'-TAAGAAGGAGATATACCATGGGCCACCACCATCACCACCACATGTTTGCAGACTTA-3', 下游引物 5'-TTGTCGACGGAGCTCGAATTCTCAGGAGTCACACCA-3'。利用引物以及小鼠脑组织的 cDNA 对 *PICK1* 基因进行 PCR 扩增, 获得 N 端带有 His-tag 的 *PICK1* 基因序列。利用同源重组酶通过同源重组的方式将 *PICK1* 基因连接到 pET-28a (+), 进而成功构建重组原核表达载体。

将构建好的重组表达载体 pET28a-PICK1 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 并涂在含有卡那霉素的固体 LB 培养基, 第 2 天挑取单菌落接种于含卡那

霉素的 LB 液体培养基中培养,待 600 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值达到 0.7 左右时,加入 1 mol/L 的 IPTG 使终浓度为 0.5 mmol/L,放入摇床,22 °C、200 r/min 过夜诱导表达。收集过夜诱导表达的菌体,用含有 Cocktail 的裂解缓冲液 (500 mmol/L NaCl、50 mmol/L HEPES、5 mmol/L 异吡唑、5%甘油, pH 7.5) 对菌体进行重悬。使用高压细胞破碎仪破碎 (4 °C、1 100 Pa, 5 min),破碎后对细胞裂解液进行高速离心 (4 °C、20 000 r/min, 30 min),用 0.45  $\mu$ m 滤膜对离心后获得的上清进行滤过。将上清上样到 HisTrap HP 亲和色谱柱中,通过 AKTA 纯化 PICK1 融合蛋白。收集 100% 的 Buffer B (500 mmol/L NaCl、50 mmol/L HEPES、250 mmol/L 异吡唑, pH 7.5) 洗脱的样品,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,检测 PICK1 蛋白表达。

### 2.5 生物层干涉技术 (biolayer interferometry, BLI) 检测 GG 与 PICK1 的亲合力

采用双扣除的方式对 GG 与 PICK1 之间的亲合力进行检测,即药物溶剂以及空白传感器的双重扣除,从而尽可能地排除 GG 与 PICK1 之间的非特异性结合。实验步骤如下:对传感器进行预湿,然后将 PICK1 蛋白固化到传感器上,经过 PBS 和 PBST 的平衡后,浸入已知浓度的 GG 中进行结合,结合后再次浸入 PBST 中,从而使结合到 PICK1 蛋白上的小分子解离下来,这样就会形成不同浓度的分析物的结合和解离过程。对空白传感器进行同样的步骤处理,最后用于双扣除。其中平衡、结合与解离步骤连续检测 4 次,多个浓度进行拟合,从而计算动力学参数。

### 2.6 分子对接实验

从 AlphaFoldDB 数据库中下载小鼠源 PICK1 蛋白 3D 结构 (AF-Q62083-F1) PDB 文件,使用 Schrodinger 软件的 Protein Preparation Wizard 模块优化蛋白结构,包括加氢、修复缺失残基、优化氢键网络和能量最小化。通过 PubChem 数据库下载 GG 的 2D SDF 格式文件,用 LigGprep 模块对小分子进行能量最小化生成 3D 构象。使用 Schrodinger 软件的 Ligand Docking 模块进行分子对接。

### 2.7 PICK1 突变体蛋白的表达与纯化

以“2.4”项下重组表达载体 pET28a-PICK1 为模板,利用突变引物进行突变重组表达载体的构建。将构建成功的突变重组表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行原核表达和纯化,具体步骤同

“2.4”项。

### 2.8 慢性不可预见性轻度应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 抑郁模型小鼠的构建与给药

60 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分成对照组、模型组及 GG 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg)<sup>[8]</sup> 组和氟西汀 (10 mg/kg) 组,每组 10 只。除对照组外,其余小鼠每天给予 12 种刺激方式 (鼠笼侵袭、禁水、禁食、噪声、潮湿垫料、冰水游泳、明暗颠倒、夹尾、热刺激、灯光频闪、束缚、摇笼) 中的任意 2 种进行刺激。每天的 2 种刺激方式为随机选取,同一刺激方式不同时出现,并且连续 2 d 的刺激方式不重复,以确保不可预测性,给予小鼠 8 周的持续刺激建立 CUMS 抑郁模型。造模第 6 周开始,各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 3 周<sup>[8]</sup>。给药结束后,收集各组小鼠海马组织,进行 qRT-PCR 和 Western blotting 检测。

### 2.9 qRT-PCR 检测 GG 对 CUMS 小鼠海马组织 PICK1 以及突触可塑性相关基因表达的影响

取各组小鼠海马组织,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。根据 Hifair<sup>®</sup> III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 逆转录试剂盒合成 cDNA。使用 Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 试剂盒的预混试剂和样品,采用罗氏 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪进行分析。以 GAPDH 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各基因的相对表达量。引物由擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

### 2.10 Western blotting 检测 GG 对 CUMS 小鼠海马组织 PICK1 以及突触可塑性相关蛋白表达的影响

取各组小鼠海马组织,加入含有磷酸酶抑制剂剂

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
PICK1	F: AGAAGGATGCCAAGAACC R: TTGACTTGCCATTGACCC
GluA2	F: CTCCTCCTACACGGCTAACTT R: GACTCTGGCTACTCCTTCTGCG
PSD95	F: ATCCTGTCCGGTCAATGGTG R: ATCGGCTATACTCTTCTGGTTT
GAPDH	F: GCACAGTCAAGCCGAGAAT R: GCCTTCTCCATGGTGGTGAA

和蛋白酶抑制剂的 RIPA 组织裂解液进行匀浆，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清，使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5% 牛血清白蛋白，室温封闭 1 h，加入一抗，4 ℃ 孵育过夜。次日，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入二抗，室温孵育 1 h，洗膜后，使用增强型化学发光显色液显影，采用 Image J 软件分析条带的灰度值。

### 2.11 统计学分析

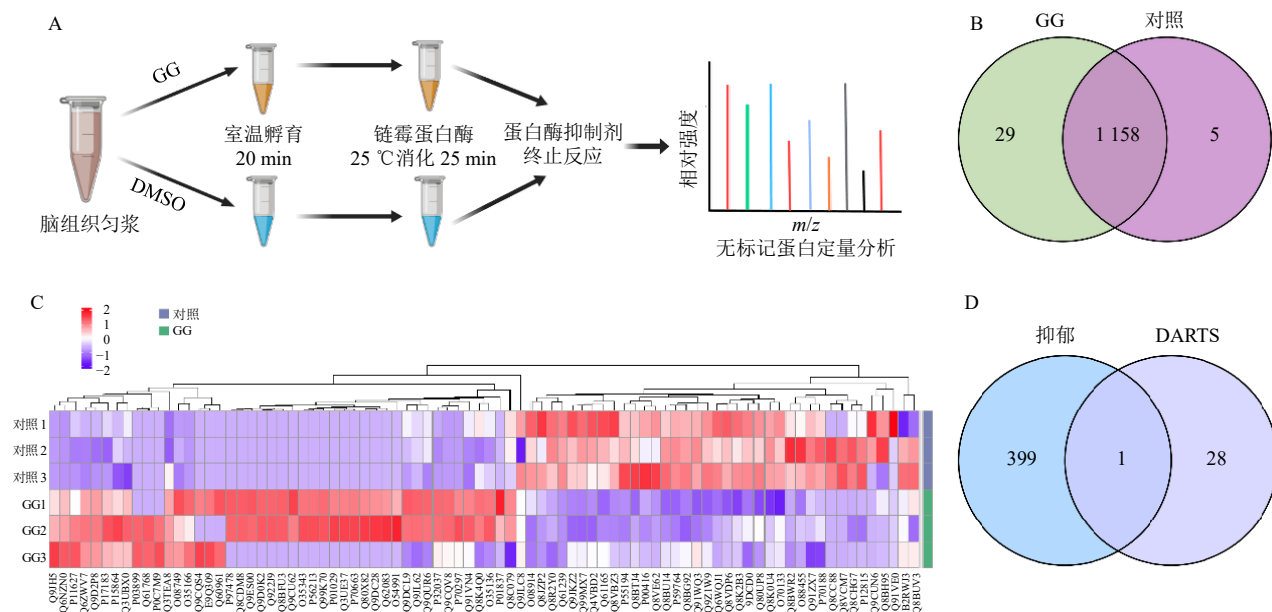
采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行统计学分析。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用单因素方差分

析 (One-way ANOVA) 进行统计学处理。

## 3 结果

### 3.1 GG 脑内抗抑郁潜在靶点的筛选

基于 DARTS 联合无标记 LC-MS 蛋白质组学 (图 1-A)，筛选出 GG 在小鼠脑组织内的潜在蛋白质靶点，根据有/无的标准，通过与对照组进行 Venn 分析，GG 组特有 29 个潜在蛋白质靶点 (图 1-B)。对蛋白质组学差异表达蛋白进行热图分析，结果见图 1-C。搜索 DisGeNET 数据库和 GeneCards 数据库的前 300 个抑郁症靶点，去重后共得到 400 个疾病靶点，将其与 29 个潜在蛋白靶点交集，共获得 1 个潜在抗抑郁蛋白质靶点 PICK1 (图 1-D)。



A-DARTS 技术示意图; B-无标记 LC-MS 蛋白质组学 Venn 图; C-蛋白质组学差异表达蛋白的热图; D-给药组特有差异蛋白与抑郁靶点交集的 Venn 图。

A-schematic diagram of DARTS technology; B-Venn diagram of label-free LC-MS proteomics; C-heatmap of differentially expressed proteins by proteomics; D-Venn diagram of drug group-specific differentially expressed proteins and depression targets.

图 1 GG 脑内抗抑郁靶点的筛选

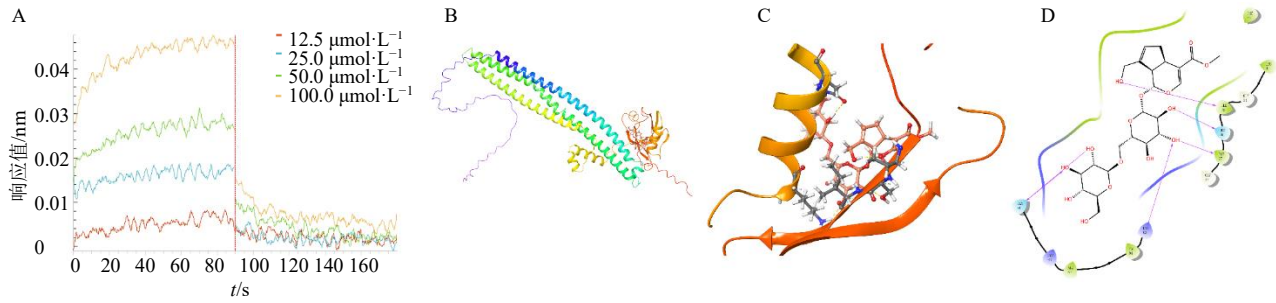
Fig. 1 Screening of anti-depressive targets of GG in brain

### 3.2 GG 与 PICK1 间相互作用分析

使用 BLI 检测 GG 与 PICK1 之间的亲和力，结果如图 2-A 和表 2 所示，GG 与 PICK1 之间存在较强的相互作用，两者之间的亲和力 ( $K_D$ ) 值为  $1.915 \times 10^{-5}$  mol/L。采用分子对接对两者之间的结合模式和结合位点进行分析，结果如图 2-B~D 所示，GG 与 PICK1 之间存在相互作用，且主要由 GLN91、LYS83、ILE37、SER36、ILE35 与 GG 间形成的氢键发挥作用。

### 3.3 氨基酸定点突变

基于分子对接结果，GG 与 PICK1 之间的结合位点主要为 ILE35、SER36、ILE37、LYS83 和 GLN91。对这 5 个关键氨基酸分别进行氨基酸定点突变，如图 3-A~E 所示，突变后通过测序比对确定突变载体构建成功。将构建的突变表达载体分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，通过原核表达纯化获得突变体蛋白，结果如图 3-F 所示，成功表达并纯化获得所需蛋白。



A-BLI 检测 GG 与 PICK1 间的亲和力; B-GG 结合 PICK1 活性口袋的三维整体示意图; C-GG 结合 PICK1 活性口袋的 3D 局部放大图; D-PICK1 与 GG 之间分子对接的二维图。

A-affinity between GG and PICK1 measured by BLI; B-3D total schematic of GG docking active pocket of PICK1; C-3D local magnification of GG docking active pocket of PICK1; D-2D diagram of molecular docking between PICK1 and GG.

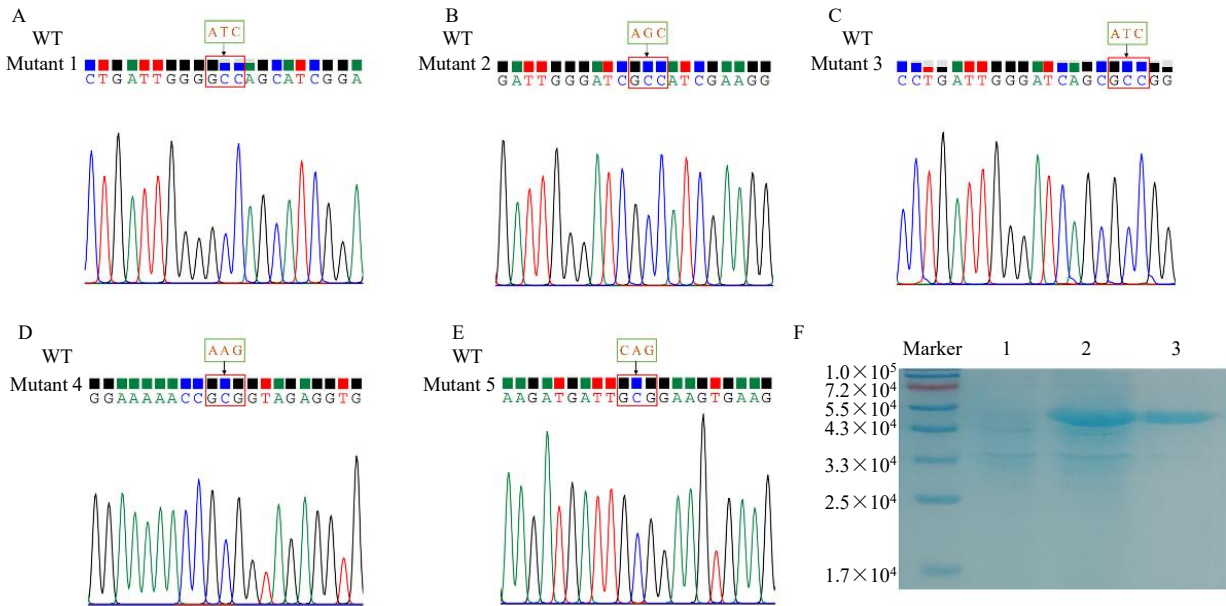
图 2 GG 与 PICK1 之间相互作用分析

Fig. 2 Analysis of interaction between GG and PICK1

表 2 GG 与 PICK1 的亲和力测试结果

Table 2 Affinity test result of GG with PICK1

样品	浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	响应值/nm	$K_{\text{on}}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_{\text{off}}/(\text{s}^{-1})$	$K_D/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
GG	12.5	0.006 9	$1.31\times 10^4$	0.251	$1.915\times 10^{-5}$
	25.0	0.016 7			
	50.0	0.028 1			
	100.0	0.046 5			



A~E-突变氨基酸 ILE35、SER36、ILE37、LYS83 和 GLN91 后的测序比对图; F-纯化 PICK1 突变体的 SDS-PAGE 凝胶电泳图 (1 为未诱导, 2 为 22 °C 诱导过夜, 3 为 PICK1 突变体的纯化蛋白)。

A—E-sequence alignment diagram after separate mutations of amino acids ILE35, SER36, ILE37, LYS83 and GLN91; F-SDS-PAGE gel electrophoresis diagram of purified PICK1 mutants (1 is not induced, 2 is induced at 22 °C overnight, 3 is PICK1 mutant's purified protein).

图 3 PICK1 突变载体测序以及纯化蛋白 SDS-PAGE 示意图

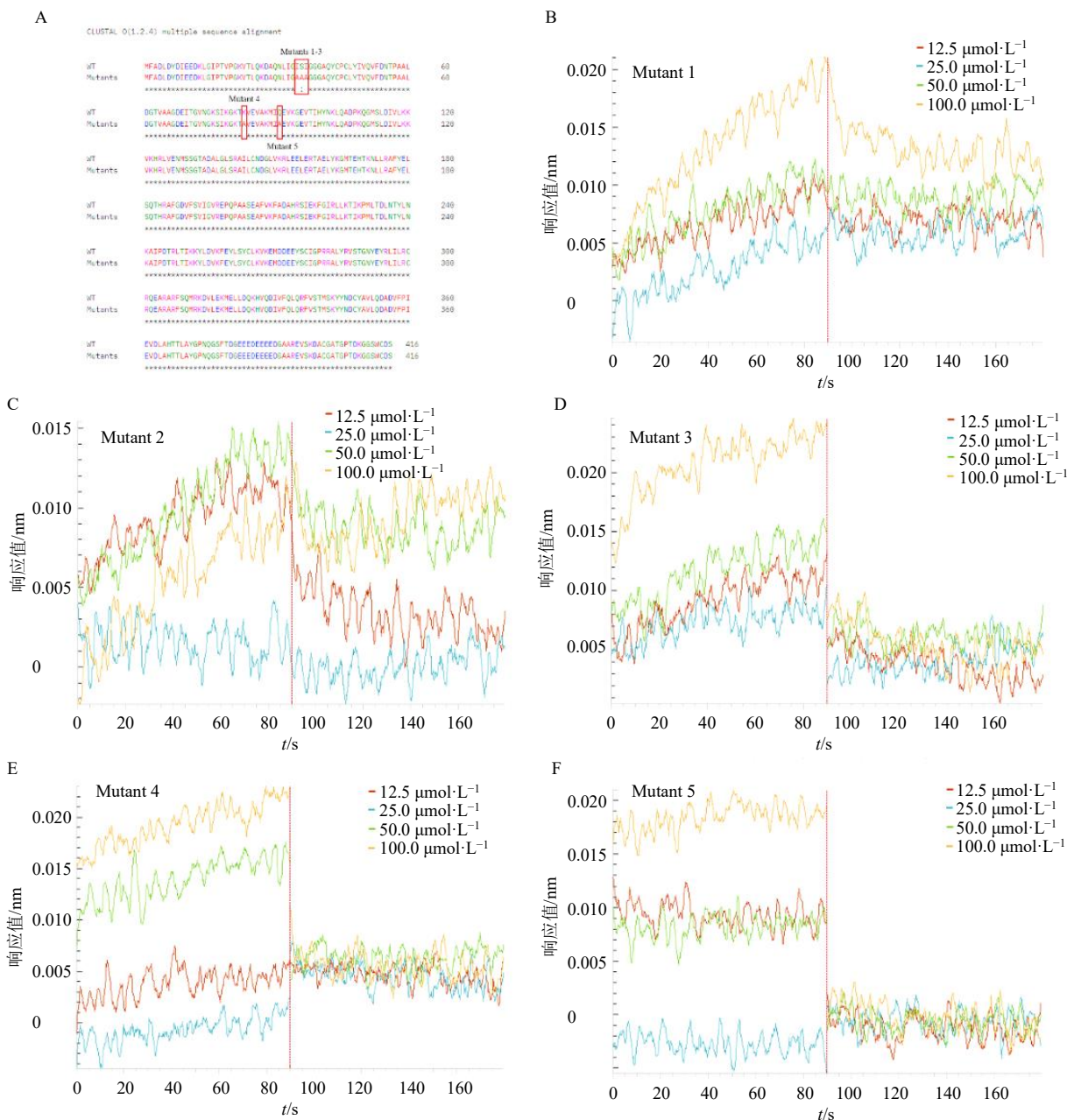
Fig. 3 Vector sequencing of PICK1 mutant and SDS-PAGE diagram of purified protein

### 3.4 GG 与 PICK1 突变体之间的亲和力分析

获得 5 个关键氨基酸的突变体后 (图 4-A), 通

过 BLI 分别检测 GG 与 PICK1 突变体之间的亲和

力。结果见图 4-B~F 和表 3, ILE35、SER36、ILE37、



A-氨基酸定点突变示意图; B~F-BLI 检测 GG 与 PICK1 突变体 (突变体 1~5) 间的亲和力。

A-schematic diagram of site-directed mutagenesis of amino acids; B—F-affinity between GG and PICK1 mutants (Mutants 1 to 5) detected by BLI.

图 4 PICK1 突变体与 GG 之间结合解离图

Fig. 4 Binding and dissociation diagram between PICK1 mutant and GG

表 3 PICK1 突变体与 GG 间的亲和力

Table 3 Affinity between PICK1 mutant and GG

PICK1 突变体	$K_D/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Mutant 1	$1.161 \times 10^{-5}$
Mutant 2	无浓度相关
Mutant 3	$2.633 \times 10^{-5}$
Mutant 4	无浓度相关
Mutant 5	$1.475 \times 10^{-1}$

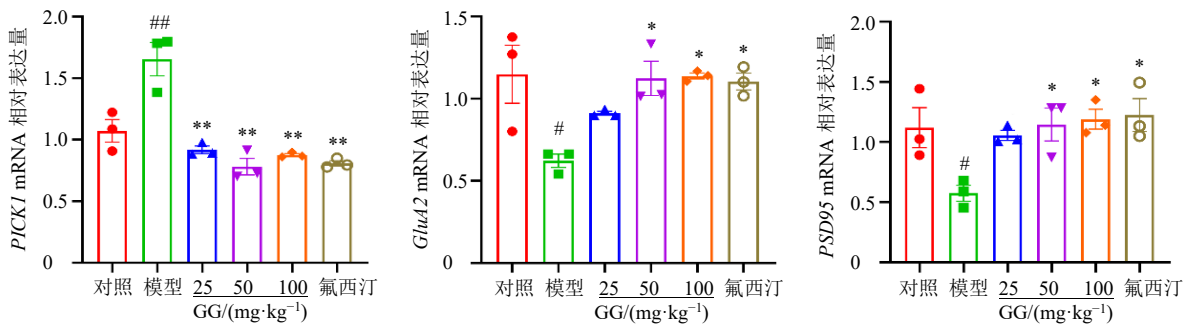
LYS83 和 GLN91 5 个关键氨基酸分别突变成丙氨酸, 并分别命名为 Mutant 1、Mutant 2、Mutant 3、Mutant 4、Mutant 5。采用 BLI 检测突变体与 GG 之间的亲和力, Mutant 2 和 Mutant 4 与 GG 之间的  $K_D$  值虽然相对于野生型升高但失去剂量相关性, 说明突变后改变了其与 GG 之间的相互作用, Mutant 5 与 GG 之间的  $K_D$  值显著降低, Mutant 1 和 Mutant

3 与 GG 之间的  $K_D$  值虽无太大变化,但结合解离曲线也不如野生型的明显。以上结果表明 SER36、LYS83 和 GLN91 这 3 个氨基酸在 GG 与 PICK1 之间的相互作用中起关键作用,ILE35 和 ILE37 发挥部分作用但并未起关键作用。

### 3.5 GG 对抑郁模型小鼠海马组织中 PICK1、GluA2、PSD95 mRNA 和蛋白表达的影响

PICK1 在突触可塑性中发挥关键作用,其能够与  $\alpha$ -氨基羟甲基异噻唑丙酸 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid, AMPA) 受体亚基

GluA2 结合,调控 AMPA 受体的内吞和膜表达,从而影响突触可塑性<sup>[6]</sup>。本研究采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 GG 对 CUMS 小鼠海马组织中 PICK1、GluA2、PSD95 的 mRNA 和蛋白表达的影响,结果如图 5、6 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马组织中 PICK1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), GluA2、PSD95 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠海马组织中 PICK1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), GG 中、



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 图 6 同。  
# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as Fig. 6.

图 5 GG 对 CUMS 小鼠海马组织中 PICK1、GluA2、PSD95 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 5 Effect of GG on mRNA expressions of PICK1, GluA2 and PSD95 in hippocampus of CUMS mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

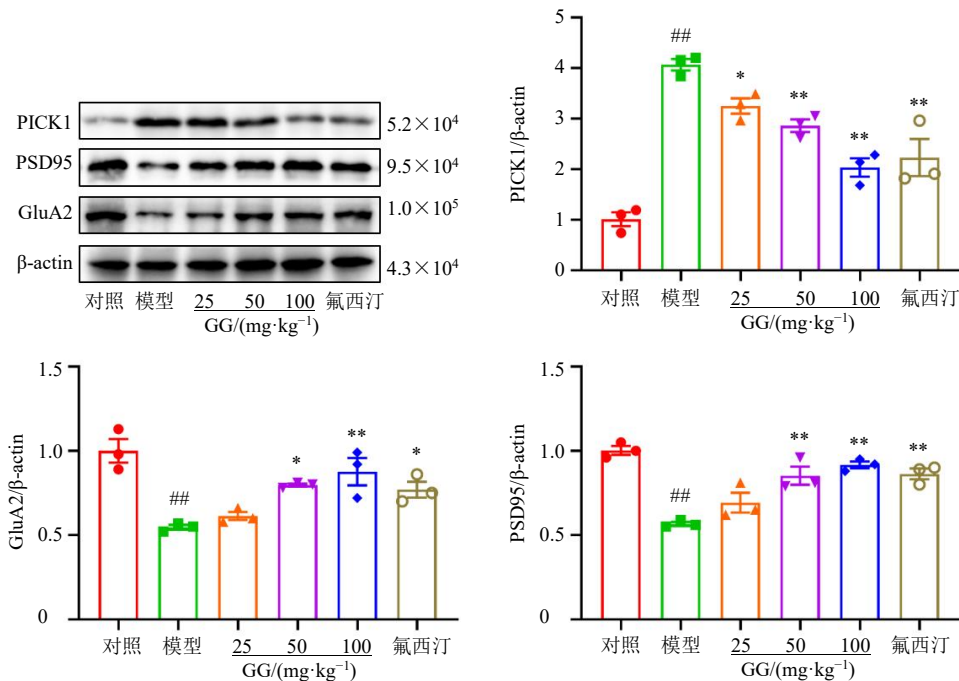


图 6 GG 对 CUMS 小鼠海马组织中 PICK1、GluA2、PSD95 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 6 Effect of GG on protein expressions of PICK1, GluA2 and PSD95 in hippocampus of CUMS mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



高剂量组和氟西汀组小鼠海马组织中 GluA2、PSD95 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。表明 GG 可能通过结合 PICK1, 改变 PICK1、GluA2、PSD95 的 mRNA 和蛋白表达水平, 从而改变突触可塑性, 进而发挥抗抑郁作用。

#### 4 讨论

抑郁症的治疗是全球公共卫生重点问题。目前, 治疗抑郁症的药物多而复杂, 且一般疗程较长, 存在较多的不良反应<sup>[17]</sup>, 致使抑郁症患者的治疗效果相对较差。中医药在抑郁症的治疗上有其独特的优势<sup>[18]</sup>, 栀子已被广泛用于各种抗抑郁中药方剂中, 包括栀子厚朴汤、越鞠丸等<sup>[19-20]</sup>。大量临床数据及实验研究证明, 栀子具有抗抑郁症、抗焦虑症等精神性疾病作用, 效果良好<sup>[21]</sup>。以栀子苷和 GG 为主的环烯醚萜类是栀子的主要活性成分, 研究表明, 栀子提取物、栀子苷均具有抗抑郁作用<sup>[22-23]</sup>, 作为与栀子苷结构类似的 GG 在本课题组的前期研究中也证明具有抗抑郁作用<sup>[8]</sup>。

中医药治疗抑郁症的物质基础、药效以及机制的研究已较多, 但关于中药尤其中药有效成分抗抑郁靶点的研究进展却相对较缓慢。本研究采用 DARTS 联合无标记 LC-MS 蛋白质组学筛选 GG 在脑组织内的潜在蛋白质靶点。由于前期研究中, 已经通过对差异上调基因的分析获得了 1 个潜在抗抑郁靶点, 但亲和力不是很高<sup>[8]</sup>。因此, 本研究将筛选出的 GG 特有的 29 个差异蛋白的基因与抑郁症靶点数据库进行交集处理, 获得了 GG 在脑组织内的另一个潜在抗抑郁靶点 PICK1。BLI 作为一种免标记的检测分子间相互作用的实验技术, 不仅可以实现高通量, 还可以对分子间结合、解离的过程进行实时监测, 因此被广泛用于分子间相互作用的研究<sup>[24]</sup>。分子对接是通过计算机模拟方法研究分子间的相互作用, 寻找分子结合最优方式的过程, 目前在药物研究与设计中已经广泛应用<sup>[25]</sup>。本研究在筛选出 GG 脑内潜在抗抑郁靶点 PICK1 后, 利用 BLI 技术检测了 PICK1 与 GG 之间的亲和力, 结果表明两者之间的  $K_D$  值为  $1.915 \times 10^{-5}$  mol/L, 存在较强相互作用, 且相比于前期研究的潜在靶标与 GG 之间的亲和力 ( $7.25 \times 10^{-5}$  mol/L)<sup>[8]</sup>, PICK1 与 GG 间的亲和力明显高。此外, 已有研究表明脑组织内高含量的 PICK1 在抑郁症的发病中发挥潜在作用<sup>[26]</sup>, 这可能比前期研究的潜在靶标更具有研究价值。利用分子对接进一步对 GG 和 PICK1 之间的结

合模式和结合位点进行研究, 结果显示两者之间存在较强的结合作用, GLN91、LYS83、ILE37、SER36 和 ILE35 与 GG 之间形成的氢键为两者相互作用的主要作用力。为了进一步确证两者结合的关键结合位点, 使用氨基酸定点突变对 5 个关键氨基酸分别进行突变, 再通过 BLI 检测 PICK1 突变体蛋白与 GG 之间的亲和力, 结果表明 SER36、LYS83 和 GLN91 这 3 个氨基酸在 GG 与 PICK1 之间的结合中起关键作用, ILE35 和 ILE37 发挥部分作用但并未起关键作用。

PICK1 是一种含有 PSD-95/Dlg/ZO1 (PDZ) 结构域的转运蛋白。在中枢神经系统中, PICK1 与许多神经递质受体、转运体、离子通道和酶相互作用, 并控制它们的运输<sup>[27]</sup>。其最具特色的功能是调节 AMPA 受体亚基 GluA2 在长期抑制和长期增强过程中的转运<sup>[28]</sup>, 且 PICK1 在突触可塑性表达过程中调控 GluA2 的转运。研究表明, 电刺激通过上调 GluA2、PICK1 和 PSD95 等基因和蛋白质的水平, 增强突触可塑性, 进而改善 CUMS 所致抑郁样行为, 而 AMPA 受体拮抗剂则对行为表现、突触可塑性以及上述基因和蛋白质产生了相反的影响<sup>[29]</sup>。突触可塑性是抑郁症的重要机制, 多项研究显示可以通过调控突触可塑性治疗抑郁症<sup>[30-32]</sup>。为了探究 GG 是否通过结合 PICK1 改变突触可塑性进而发挥抗抑郁作用, 本研究检测了 GG 对 CUMS 小鼠海马组织 PICK1、GluA2、PSD95 的 mRNA 和蛋白表达水平, 结果显示 GG 显著调控 CUMS 小鼠海马组织中 PICK1、GluA2、PSD95 的表达, 表明 GG 可能通过结合 PICK1 改变突触可塑性进而发挥抗抑郁作用, 但 GG 如何通过结合 PICK1 改变突触可塑性的作用机制有待进一步研究。

本研究通过 DARTS 技术联合无标记 LC-MS 蛋白质组学筛选出栀子的主要活性成分 GG 脑内潜在蛋白质靶点, 再将 GG 组特有的 29 个差异表达蛋白的基因与抑郁症靶点数据库交集处理获得了 GG 脑内潜在抗抑郁蛋白质靶点 PICK1。通过 BLI 技术、分子对接和氨基酸定点突变对 PICK1 和 GG 之间的相互作用和结合位点进行确证, 最后基于靶点 PICK1 初步阐释了 GG 抗抑郁的可能机制。本研究不仅为基于 PICK1 探究 GG 抗抑郁的具体作用机制提供了实验依据, 也为基于靶点抑郁症创新中药的开发提供了思路, 但未来仍需进一步探讨 GG 发挥抗抑郁的具体作用机制, 为其临床应用提供研究基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

- [1] 朱岳, 吴睿, 金灵泰, 等. 基于网络药理学探讨鱼油抗抑郁作用机制 [J]. 中国食品学报, 2023, 23(8): 114-123.
- [2] 傅春燕, 陈宇, 刘永辉, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨百合治疗抑郁症的作用机制 [J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2024, 21(6): 105-116.
- [3] 许梦丽, 朱悦, 李乐军. 近三年抑郁症的中医研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(8): 1608-1613.
- [4] 饶志, 张帆, 董毓松, 等. 栀子“辨状论质”及其品质成因研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1998-2004.
- [5] 曲艺, 崔向宁, 但文超, 等. 基于中医传承辅助平台挖掘中药复方专利中治疗抑郁的用药规律 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(8): 1670-1675.
- [6] 张慧慧, 童应鹏, 江瑜, 等. 栀子抗抑郁作用实验研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2019, 29(6): 522-525.
- [7] Zhou T T, Zhao W Q, Fan G R, *et al.* Isolation and purification of iridoid glycosides from *Gardenia jasminoides* Ellis by isocratic reversed-phase two-dimensional preparative high-performance liquid chromatography with column switch technology [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 858(1/2): 296-301.
- [8] Xiao Y, Gu L, Zhang W J, *et al.* Identification of prolyl endopeptidase as a novel anti-depression target of genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside in brain tissues [J]. *Behav Brain Res*, 2025, 484: 115511.
- [9] 赵玉男, 谢伟东, 邢东明, 等. 中药有效成分作用靶点研究的策略与实践 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(6): 1005-1011.
- [10] Chen F Y, Zhu K X, Chen L, *et al.* Protein target identification of ginsenosides in skeletal muscle tissues: Discovery of natural small-molecule activators of muscle-type creatine kinase [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(3): 461-474.
- [11] Chen F Y, Li C, Cao H Y, *et al.* Identification of adenylate kinase 5 as a protein target of ginsenosides in brain tissues using mass spectrometry-based drug affinity responsive target stability (DARTS) and cellular thermal shift assay (CETSA) techniques [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(8): 2741-2751.
- [12] Lomenick B, Hao R, Jonai N, *et al.* Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21984-21989.
- [13] Lomenick B, Jung G, Wohlschlegel J A, *et al.* Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Curr Protoc Chem Biol*, 2011, 3(4): 163-180.
- [14] 高宇雄, 钟大放. 抗体药物 LC-MS 法生物分析进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(3): 453-462.
- [15] 陈飞燕, 秦微, 李瑞梅, 等. 基于 DARTS 技术人参皂苷脑内蛋白质作用位点 AK1 的发现和确证 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1336-1342.
- [16] Hanley J G, Henley J M. PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking [J]. *EMBO J*, 2005, 24(18): 3266-3278.
- [17] 唐梅, 李向平. 抗抑郁药的不良反应及其在心血管病患者中的应用 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2020, 45(10): 1228-1233.
- [18] Zhao W D, Ji C, Zheng J, *et al.* Effects of Xiaoyao San on exercise capacity and liver mitochondrial metabolomics in rat depression model [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(1): 132-142.
- [19] 罗凯文, 徐晨阳, 孙雯, 等. 栀子厚朴汤中 *p*-香豆酸在正常及抑郁大鼠尿液中排泄动力学差异研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(12): 44-48.
- [20] 陶伟伟, 肖东, 吴浩然, 等. 基于药对探讨中药复方越鞠丸抗抑郁作用配伍规律 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1314-1320.
- [21] 孙晨曦, 韩欣园, 叶田园. 栀子化学成分改善阿尔茨海默病的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2969-2983.
- [22] 王婷, 赵娜. 栀子提取物对抑郁症小鼠的治疗作用及机制研究 [J]. 中国社区医师, 2023, 39(16): 18-21.
- [23] 陈光辉, 陈强, 张玲莉, 等. 栀子苷及其昔元京尼平的抗抑郁作用及其潜在分子机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(10): 1877-1882.
- [24] Chen F Y, Zhang W J, Xu S Y, *et al.* Discovery and validation of PURA as a transcription target of 20(S)-protopanaxadiol: Implications for the treatment of cognitive dysfunction [J]. *J Ginseng Res*, 2023, 47(5): 662-671.
- [25] 赵丽琴, 肖军海, 李松. 分子对接在基于结构药物设计中的应用 [J]. 生物物理学报, 2002, 18(3): 263-270.
- [26] Anggono V, Koç-Schmitz Y, Widagdo J, *et al.* PICK1

- interacts with PACSIN to regulate AMPA receptor internalization and cerebellar long-term depression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34): 13976-13981.
- [27] Li Y H, Zhang N, Wang Y N, *et al.* Multiple faces of protein interacting with C kinase 1 (PICK1): Structure, function, and diseases [J]. *Neurochem Int*, 2016, 98: 115-121.
- [28] Terashima A, Pelkey K A, Rah J C, *et al.* An essential role for PICK1 in NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 2008, 57(6): 872-882.
- [29] Jiang L, Zhang H, Zhou J H, *et al.* Involvement of hippocampal AMPA receptors in electroacupuncture attenuating depressive-like behaviors and regulating synaptic proteins in rats subjected to chronic unpredictable mild stress [J]. *World Neurosurg*, 2020, 139: e455-e462.
- [30] 潘薇, 王明星, 张广芬, 等. 大麻素受体 1 介导的突触可塑性在神经病理性疼痛及其所致抑郁中的作用 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2017, 42(3): 340-345.
- [31] Wu Y H, Zhu Z P, Lan T, *et al.* Levomilnacipran improves lipopolysaccharide-induced dysregulation of synaptic plasticity and depression-like behaviors via activating BDNF/TrkB mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(7): 4102-4115.
- [32] Duman R S, Aghajanian G K, Sanacora G, *et al.* Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants [J]. *Nat Med*, 2016, 22(3): 238-249.

[责任编辑 李亚楠]