百合地黄汤加味用于卒中后抑郁症的潜在作用靶点及机制Δ

黄思行[1,2*]，吴书祎[1,2]，张　平[1]，罗金萍[1]，王　敏[1]，郭延垒[1]，李　浩[3]，张　莉[1]，强　喆[1,2#]（1.重庆市中药研究院，重庆　400065；2.重庆中医药学院中药系，重庆　402760；3.重庆医科大学中医药学院，重庆　400016）

中图分类号　R964；R966　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）20-2483-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.20.07

摘　要　目的　探讨百合地黄汤加味（MBD/BDD）用于卒中后抑郁症（PSD）的潜在作用靶点及机制。**方法**　通过网络药理学方法挖掘MBD/BDD治疗PSD的潜在靶点和关键途径。以局灶性脑缺血手术结合慢性不可预见的温和应激建立PSD模型大鼠，并随机分为PSD模型组、MBD/BDD组（12.6 g/kg，以生药总量计）、盐酸氟西汀（FLX）组（阳性对照，2.3 mg/kg），另设空白对照组，每组8只。各药物组大鼠灌胃相应药液，每天1次，连续21 d。通过旷场实验、强迫游泳实验评价MBD/BDD对模型大鼠抑郁样症状的干预效果；剖取各组大鼠脑组织并提取总RNA，进行转录组测序和生物信息学分析，并基于上述结果对变化显著的基因和常见神经营养因子进行mRNA和蛋白水平表达验证。**结果**　共获得MBD/BDD抗抑郁相关靶基因131个（如*IL1B*、*AKT1*等），涉及神经活性配体-受体相互作用、环磷酸腺苷等信号通路。MBD/BDD可显著延长或增加PSD模型大鼠在中心方格花费的总时间及行进的总距离，显著缩短累计不动时间（$P<0.05$）。经MBD/BDD干预后，大鼠脑组织中发生变化的基因远多于FLX组，且PSD模型组、MBD/BDD组、FLX组的基因谱存在明显差异；MBD/BDD组与PSD模型组之间的差异表达基因（DEGs）共1 351个，其中178个显著下调、1 173个显著上调（$P<0.05$）；这1 351个DEGs涉及神经元分化、化学突触传递调节等，并在轴突引导、胆碱能突触和神经活性配体-受体相互作用方面显著富集；MBD/BDD组大鼠脑组织中上调幅度排名前30位的基因均与神经元增殖、发育、分化和迁移有关。经MBD/BDD干预后，大鼠脑组织中*Fezf2*、*Arx*、*Ostn*、*Nrgn*基因和脑源性神经营养因子、酪氨酸激酶受体B蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　MBD/BDD的抗PSD作用可能与上调神经元增殖、发育、分化和迁移相关基因的表达，促进神经结构和功能的修复有关。

关键词　百合地黄汤加味；卒中后抑郁；网络药理学；转录组学；神经保护作用

The potential targets and mechanisms of modified Baihe dihuang decoction applied in post-stroke depression

HUANG Sixing[1,2], WU Shuyi[1,2], ZHANG Ping[1], LUO Jinping[1], WANG Min[1], GUO Yanlei[1], LI Hao[3], ZHANG Li[1], QIANG Zhe[1,2]（1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the potential targets and mechanisms of the modified Baihe dihuang decoction (MBD/BDD) applied in post-stroke depression (PSD). **METHODS** Network pharmacology was used to mine the potential targets and key pathways of MBD/BDD in the treatment of PSD. PSD model rats were induced by focal cerebral ischemia surgery combined with chronic unforeseen mild stress, and then were randomly divided into PSD model group, MBD/BDD group (12.6 g/kg, by raw drug), and fluoxetine hydrochloride (FLX) group (positive control, 2.3 mg/kg); a blank control group was also set up, with 8 rats in each group. Each administration group was given a corresponding medication solution by gavage once a day for 21 consecutive days. The intervention effect of MBD/BDD on depression-like symptoms in model rats was evaluated by open field and forced swimming tests. The brain tissues of rats in each group were dissected and total RNA was extracted for transcriptome sequencing and bioinformatics analysis. The mRNA and protein expressions of genes with significant changes and common neurotrophic factors were verified based on the above results. **RESULTS** A total of 131 MBD/BDD antidepressant-related target genes were obtained (such as *IL1B* and *AKT1*, etc.), which were closely related to neural active ligand-receptor interactions and cyclic adenosine monophosphate signaling pathway. MBD/BDD could significantly prolong or increase the total time spent and distance traveled in the central grid of PSD model rats, and significantly shorten the cumulative

Δ **基金项目**　重庆市基本科研业务费项目（No. cstc2020jxjl-jbky10004）

＊**第一作者**　副研究员，硕士。研究方向：中药药理学。E-mail：25967952@qq.com

＃**通信作者**　副研究员，博士。研究方向：分子药理学。E-mail：qiangzhe@cqtcm.edu.cn

immobility time ($P<0.05$). After treatment with MBD/BDD, the number of genes that changed in rat brain tissue was much higher than that in the FLX group, and there were significant differences in gene profiles among the PSD model group, MBD/BDD group, and FLX group. There were 1 351 differentially expressed genes (DEGs) between the MBD/BDD group and the PSD model group, of which 178 were significantly down-regulated and 1 173 were significantly up-regulated ($P<0.05$). Above 1 351 DEGs were involved in neuronal differentiation, chemical synaptic transmission regulation. They were significantly enriched in axonal guidance, cholinergic synapses and neuroactive ligand-receptor interactions. The top 30 genes in terms of up-regulation in the brain tissue of rats of MBD/BDD group were all associated with neuronal proliferation, development, differentiation, and migration. After MBD/BDD intervention, the expressions of *Fezf2*, *Arx*, *Ostn*, *Nrgn* genes, brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B protein in brain tissue of rats were significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The anti-PSD effect of MBD/BDD may be related to the up-regulation of the expression of genes related to neuronal proliferation, development, differentiation and migration, as well as the promotion of neural structural and functional repair.

KEYWORDS modified Baihe dihuang decoction; post-stroke depression; network pharmacology; transcriptomics; neuroprotection

卒中后抑郁（post-stroke depression，PSD）是一种以脑卒中后持续抑郁、认知障碍和躯体化症状为特征的临床综合征。PSD是脑卒中后的常见并发症，约1/3的卒中幸存者会出现不同程度的抑郁[1]。与重度抑郁不同，PSD患者缺乏活动能力且精神不振、运动迟缓[2]；同时，其焦虑症状明显，主要表现为对卒中复发的恐惧，并会产生强烈的自杀念头，甚至发展为自杀行为[3－6]。近年来，已有不少学者从不同角度对PSD的发病机制进行了讨论[4,7－8]，但尚未形成统一观点。

相关研究证实，传统药食同源药材百合属植物及其提取物具有有效的抑郁治疗作用[9－11]。百合地黄汤源自《金匮要略》，是治疗精神类疾病的经典方之一，其临床应用历史悠久，疗效确切且安全性高，是目前治疗PSD的常用传统方剂[12－13]。百合地黄汤加味（modified Baihe dihuang decoction，简称“MBD/BDD”）是基于传统医学理论的临床验方，是在百合地黄汤的基础上添加柴胡、郁金、远志、合欢花、香附5味中药而得。临床实践表明，MBD/BDD对PSD患者病情有明显的改善作用，可有效减轻其抑郁症状，改善其神经功能，提升其生活质量[14－15]。尽管该方的临床疗效已被证实，但其发挥上述作用的机制尚不明确。为此，本研究在网络药理学分析的基础上，拟以PSD模型大鼠为对象，初步揭示MBD/BDD用于PSD的潜在作用靶点和机制，旨在为阐明该方的药效机制、开发PSD治疗新药提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用仪器主要包括StepOnePlus实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative PCR，qPCR）仪、QuantStudio™ 3荧光实时qPCR仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），Universal Hood Ⅱ型凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司）等。

1.2 主要药品与试剂

百合、地黄、柴胡、郁金、远志、合欢花、香附饮片（批号分别为200901、200501、190901、200801、190801、200701、200901）均由重庆市中药研究院门诊部提供，经重庆市中药研究院王昌华研究员鉴定为真品。

盐酸氟西汀（fluoxetine hydrochloride，FLX）片（阳性对照，批号20200511，规格10 mg）购自常州四药制药有限公司；总RNA提取试剂（批号9109Q）购自日本Takara公司；cDNA第一链合成试剂盒（去除gDNA）、实时定量PCR扩增预溶液（批号分别为11139ES10、11184ES03）均购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；RNA文库制备试剂盒、去核糖体试剂盒（批号分别为#E7530L、MRZMB126）均购自美国Illumina公司；兔源脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）单克隆抗体、兔源酪氨酸激酶受体B（tyrosine kinase receptor B，TrkB）单克隆抗体（批号分别为ab108319、ab187041）均购自艾博抗（上海）贸易有限公司；兔源β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号ET1702-52）购自杭州华安生物技术有限公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号A0208）购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠32只，体重180～220 g，由重庆市中药研究院实验动物研究所提供，动物生产许可证号为SCXK（渝）2017-0003。所有动物均饲养于重庆市中药研究院中药药理三级实验室（每12 h明暗交替，室温约22 ℃，相对湿度约55%），自由摄食、饮水。本研究方案经重庆市中药研究院实验动物福利伦理委员会批准（伦理批号YLS2020-11），并严格遵循实验动物管理和使用的相关规定。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 MBD/BDD活性化合物的鉴定及其靶基因集的筛选

使用ETCM数据库（http://tcmspw.com/）分析MBD/BDD的化合物组成，并鉴定7种组方药材中包含的所有化合物。以每味中药的名称作为关键词，在ETCM数据库中检索MBD/BDD的活性成分及其相关靶点，去重后分别得到MBD/BDD的活性化合物及其靶基因集。

2.1.2 MBD/BDD抗抑郁相关基因集的筛选

以“depression”“antidepressants”“depressive disorder”等为检索词，通过GeneCards数据库（https://genecards.org/）和OMIM数据库（https://omim.org/）获取抑郁症相关靶点。对GeneCard数据库中相关性得分大于10的基因和OMIM数据库中的所有基因进行筛选，得到抑郁症相关靶基因集，并将其与“2.1.1”项下所得MBD/BDD靶基因集进行交叉，取交集，即得MBD/BDD抗抑郁相关基因集。

2.1.3 组分-靶点网络与蛋白质-蛋白质相互作用网络的构建

将“2.1.1”项下的MBD/BDD活性化合物靶基因和“2.1.2”项下的MBD/BDD抗抑郁相关基因作为节点，使用Cytoscape可视化软件构建组分-靶点网络（网络中，连线表示节点间的相互作用）。以“2.1.2”项下MBD/BDD抗抑郁相关基因集对应的靶蛋白为对象，借助STRING数据库（https://cn.string-db.org/），限定物种为“homo sapiens”，采用Cytoscape可视化软件构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，并以“TSV”格式保存。

2.1.4 京都基因和基因组数据库通路富集分析

京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路分析可用于发现药物作用的关键信号通路。本研究使用R 3.4.0软件中的“clusterprofile”包，以$P<0.05$为标准进行KEGG通路的富集、筛选。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药

首先，对大鼠进行局灶性脑缺血手术：大鼠禁食、不禁水12 h，经0.9%戊巴比妥钠（5 mL/kg，腹腔注射）麻醉，以仰卧位固定，对其颈部皮肤消毒后于颈部中线切口，暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉；结扎颈外动脉，用动脉夹夹闭左侧颈总动脉及颈内动脉，于左侧颈总动脉作一楔形切口，将带有略微扩大的圆形尖端（直径0.235～0.260 mm）的尼龙单丝缝线从颈外动脉轻轻推入颈内动脉管腔并固定，造成缺血[16]。随后，取脑缺血术后存活的大鼠，常规饲养1周后，分笼（每笼1只）喂养，并给予慢性不可预见的温和应激，即随机接受不同刺激源[夹尾1 min、禁水24 h、禁食24 h、45 ℃下静置5 min、明暗颠倒24 h、水平振荡30 min（频率160次/min）、4 ℃冰水中游泳5 min]刺激，每天1～2种，每种3次，连续21 d，以复制PSD模型大鼠。

将所得PSD模型大鼠随机分为PSD模型组、MBD/BDD组[12.6 g/kg，以生药总量计，按照成人临床用量1.8 g/（kg·d）的7倍换算而得]、FLX组[阳性对照，2.3 mg/kg，按照成人临床用量0.33 mg/（kg·d）的7倍换算而得]，另设空白对照组（该组大鼠接受相同的手术操作但不插入缝线，亦不接受任何刺激），每组8只。MBD/BDD组和FLX组大鼠灌胃相应药液（以水为溶媒），空白对照组和PSD模型组大鼠灌胃等体积水，每天1次，连续21 d。

2.2.2 行为学测试

（1）旷场实验（open field test，OFT）：于第20天给药结束后进行OFT。实验装置为100 cm×100 cm×60 cm的开放式盒子，盒子底部被分成25个面积相等的正方形。将所有大鼠放置在盒子的中心，记录其5 min内在中心方格花费的总时间及其行进的总距离。每只大鼠单独测试1次。

（2）强迫游泳实验（forced swimming test，FST）：于第21天给药结束后，将所有大鼠置于装满水的独立玻璃圆柱体[圆柱体高60 cm，直径40 cm；水温（20±2）℃，水位高30 cm]中，待其游泳适应2 min后，记录其5 min内的累计游泳不动时间（以活动减少且间断出现不动或飘浮状态仅露出口鼻为“不动”）。

2.2.3 转录组测序与生物信息学分析

FST后，各组大鼠经0.9%戊巴比妥钠（5 mL/kg，腹腔注射）麻醉后处死，剖取其脑组织并提取总RNA，进行样品制备、文库构建和DNA成簇扩增。对脑组织中的RNA进行高通量测序以获得所有转录本序列信息，从而挖掘差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）；对所得DEGs进行基因本体（gene ontology，GO）富集分析，基于DisGeNET数据库（https://www.disgenet.org/）进行疾病相关性富集分析，基于美国国立卫生研究院基因数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene）进行生物信息学分析[17]。转录组测序由北京诺禾医学检验实验室有限公司完成。

2.2.4 靶基因及蛋白表达的验证

结合上述转录组测序和生物信息学分析结果，选取其中上调较显著的基因进行mRNA水平表达验证（实时qPCR法），选取2个常见的神经营养因子进行蛋白水平表达验证（Western blot法）。

（1）mRNA水平检测：提取MBD/BDD组和PSD组大鼠脑组织总RNA，进行qPCR分析。反应体系包括cDNA模板1 μL，SYBR Green Master Mix 5 μL，上、下游引物（具体序列及产物长度见表1）各0.4 μL，加无RNase水至10 μL。反应条件为95 ℃预变性2 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火/延伸30 s，共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法检测各目的基因的相对表达量。

表1　目的基因的引物序列和产物长度

基因名称	序列（5′→3′）	产物长度/bp
GAPDH	上游：TGTGAACGGATTTGGCCGTA	183
	下游：ACCAGCTTCCCATTCTCAGC	
BDNF	上游：CAGGTTCGAGAGGTCTGACG	122
	下游：CAAGTCCGCGTCCTTATGGT	
TrkB	上游：ACCAAACCAATCGGGAGCAT	107
	下游：ATGTCTCGCCAACTTGAGCA	
Fezf2	上游：CCACTTACCCACCATCGGAG	108
	下游：CCAGCAGAAAAAGCTTGGGG	
Arx	上游：GGCCCGAGTGCAAGAGTAAA	86
	下游：CATTTTGCACGGGCTTCTCC	
Ostn	上游：CCACCCACAACCAGAGAAGA	142
	下游：TGTCAAGGGGAGACCCGAAG	
Nrgn	上游：CTGCTCCAAGCCAGACGAC	101
	下游：CCATGTGGCCCCGAAAACT	

（2）蛋白水平检测：提取PSD组、FLX组和MBD/BDD组大鼠脑组织总蛋白，经浓度测定和变性处理后，进行电泳分离并转膜、封闭，随后加入BDNF、TrkB、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度1∶1 000），室温孵育1 h，用ECL显色后成像，以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.3　统计学方法

采用GraphPad Prism v9软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单向或双向方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　网络药理学分析结果

3.1.1　靶点筛选结果

共筛选得MBD/BDD活性化合物132种，潜在靶基因493个；共筛选得抑郁症相关靶基因1 333个。将活性化合物潜在靶基因和抑郁症相关靶基因进行交叉，最终获得MBD/BDD抗抑郁相关靶基因131个。

组分-靶点网络（图1A）展示了相关性较强的前20个化合物与其潜在靶点的关系，这些成分在MBD/BDD抗抑郁中发挥了重要作用。所构建的PPI网络（图1B）中，有节点（即存在相互作用的蛋白）124个和边1 024条，节点度值由大到小排序的前9个蛋白对应基因依次是*IL1B*、*AKT1*、*INS*、*ESR1*、*CASP3*、*GAPDH*、*IL6*、*CREB1*、*TNF*，表明这些基因参与了MBD/BDD抗抑郁作用的发挥。

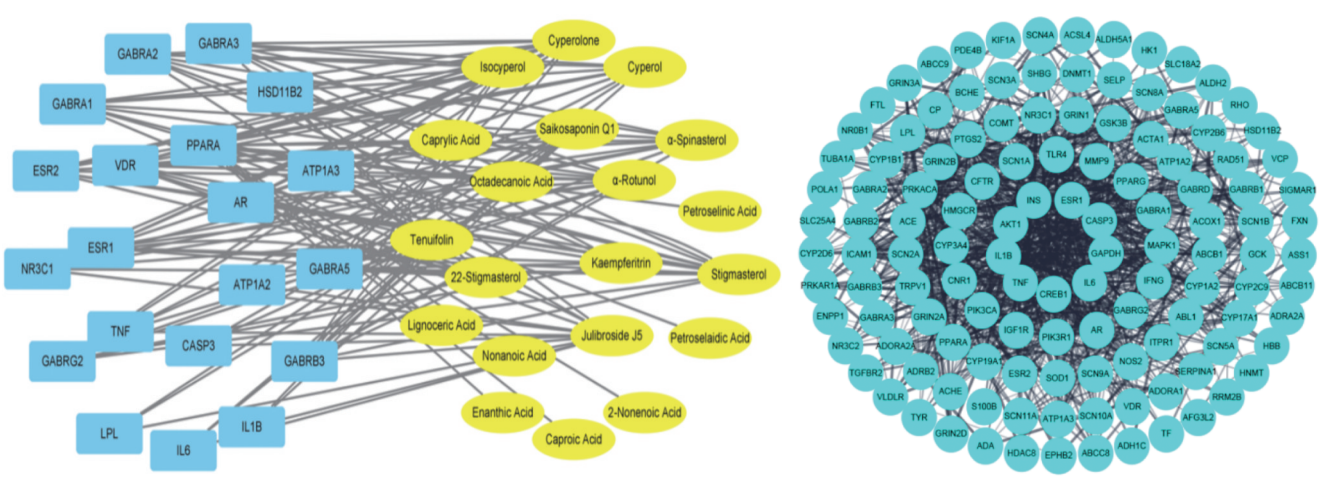
3.1.2　KEGG通路富集结果

131个相关靶基因主要富集于神经活性配体-受体相互作用、环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）、尼古丁成瘾、逆行内源性大麻素信号转导、缺氧诱导因子1（hypoxia-inducible factor-1，HIF-1）等信号通路。上述信号通路分别富集到靶基因21、20、14、14、14个，可能是MBD/BDD发挥抗抑郁作用的关键途径。

3.2　动物实验结果

3.2.1　行为学测试结果

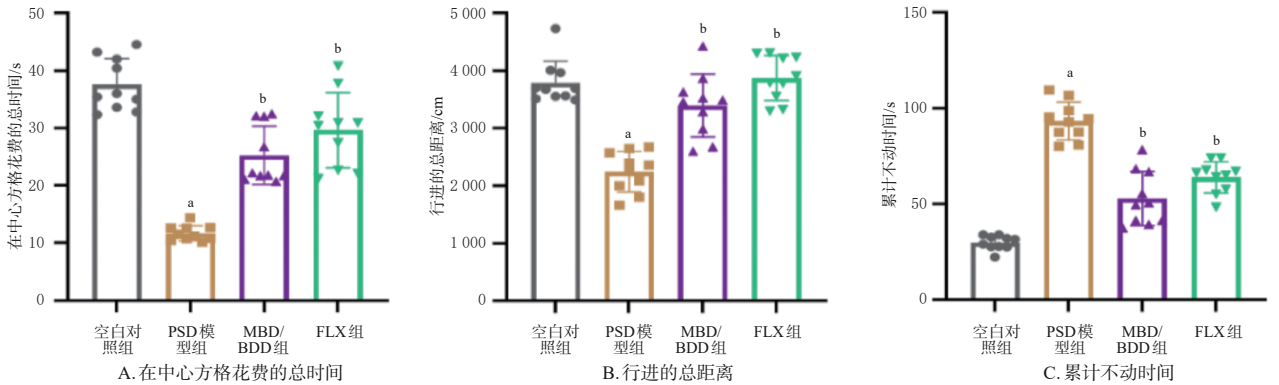
OFT结果显示，与空白对照组比较，PSD模型组大鼠在中心方格花费的总时间及其行进的总距离均显著缩短或减少（$P<0.05$）；与PSD模型组比较，各药物组大鼠上述指标均显著延长或增加（$P<0.05$）。FST结果显示，与空白对照组比较，PSD模型组大鼠的累计不动时间显著延长（$P<0.05$）；与PSD模型组比较，各药物组大鼠的累计不动时间均显著缩短（$P<0.05$）。结果见图2。



A. 组分-靶点网络　　B. PPI网络

黄色椭圆：主要活性成分；蓝色方块：靶基因；蓝色圆形：靶基因对应蛋白。

图1　MBD/BDD抗抑郁相关靶点筛选结果



a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与PSD模型组比较，$P<0.05$。

图2　MBD/BDD对PSD模型大鼠行为学的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.2.2　转录组测序与生物信息学分析结果

转录组测序结果显示，经MBD/BDD干预后，大鼠脑组织中表达发生变化的基因远多于FLX组，其中表达上调的基因超过FLX组的2倍（图3A），且PSD模型组、MBD/BDD组、FLX组的基因谱存在明显差异（图3B）。MBD/BDD组与PSD模型组之间的DEGs共1 351个，其中178个显著下调[$\log_2$FC＜－1.0，$P<0.05$；FC为差异倍数（fold change）]、1 173个显著上调（$\log_2$FC＞1.0，$P<0.05$）（图3C）。

针对上述DEGs的GO富集结果显示，这1 351个DEGs涉及神经元分化、化学突触传递调节、跨突触信号调节、投射神经元发育调节等；基于DisGeNET数据库的富集结果显示，这些DEGs主要与精神障碍、记忆障碍、神经发育障碍、智力障碍和单极性抑郁症等疾病相关，并在与创伤性脑损伤修复有关的轴突引导、胆碱能突触和神经活性配体-受体相互作用方面显著富集，提示MBD/BDD对PSD的治疗作用可能与影响神经结构及功能的修复有关。

查询美国国立卫生研究院基因数据库可知，与PSD模型组比较，MBD/BDD组大鼠脑组织中显著上调且上调幅度排名前30位的基因（如*Fezf2*、*Arx*、*Ostn*、*Nrgn*、*Emx1*、*Foxg1*、*Emx2*、*Nr2e1*、*Dlx*）均与神经元增殖、发育、分化和迁移有关，但本研究并未在FLX组中发现上述基因的显著变化；MBD/BDD组大鼠脑组织中显著下调且下调幅度排名前30位的基因（如*Fgf20*、*Rlim*、*Robo4*、*Lat*、*Tstd1*）均与炎症反应、信号转导和血管生成有关，且大部分基因亦在FLX组中明显下调。进一步的GO分析表明，MBD/BDD组大鼠脑组织中前30个表达上调的基因与端脑发育、大脑皮质γ氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）能中间神经元分化、前脑细胞迁移、边缘系统发育、前脑区域化和认知相关；MBD/BDD组和FLX组大鼠脑组织中前30个下调的基因则与基于微管的生物过程调控、适应性免疫系统调节、脊髓损伤、凋亡信号通路调控和营养水平调节有关。

3.2.3　靶基因及蛋白表达的验证结果

对转录组测序结果中上调较显著的4个基因（*Fezf2*、*Arx*、*Ostn*、*Nrgn*）进行mRNA表达验证，对2个常见神经营养因子（BDNF、TrkB）[18]进行蛋白表达验证，结果（图4）显示，经药物干预后，大鼠脑组织中上述基因及蛋白的相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。

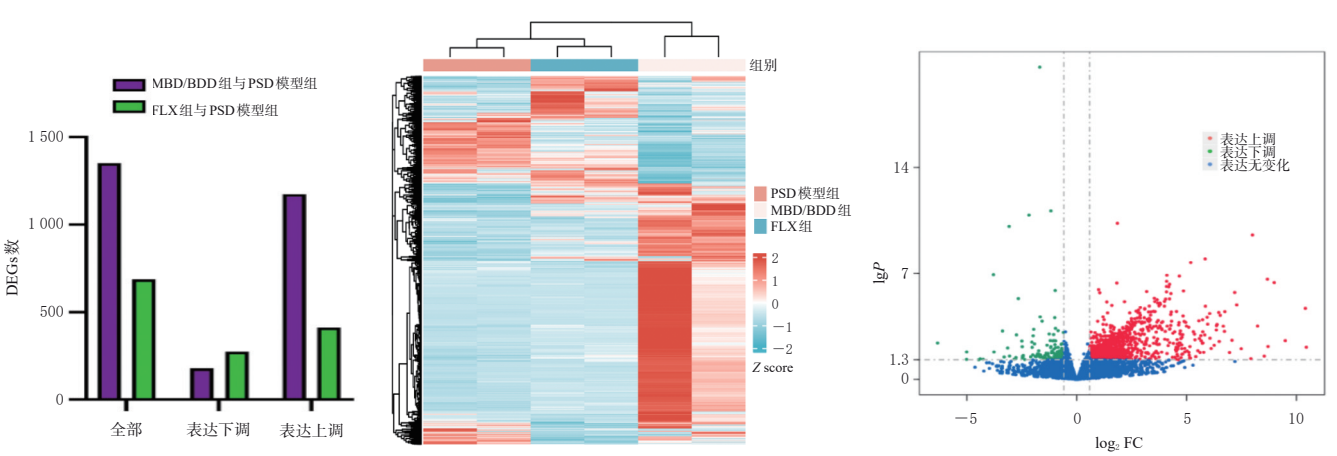
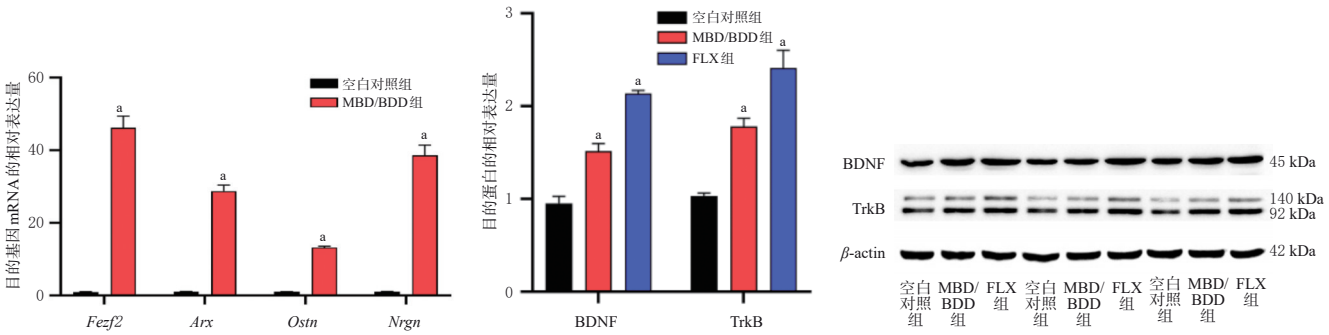


图3　各组大鼠脑组织中相关基因表达的变化情况



A.各组基因组表达变化情况($\bar{x}\pm s$,$n=8$)　B.蛋白表达验证柱形图($\bar{x}\pm s$,$n=8$)　C.蛋白表达验证电泳图

a:与空白对照组比较,$P<0.05$。

图4　靶基因mRNA及蛋白表达的验证

4　讨论

PSD是脑血管疾病的常见并发症之一。作为抗抑郁药,5-羟色胺选择性重摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors,SSRIs)是临床治疗PSD的一线药物。然而临床实践显示,SSRIs会增加患者的出血风险,包括胃肠道出血和脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)风险[19]。相关数据显示,服用SSRIs者的出血风险比未服用SSRIs者高50%,其中发生ICH的风险高40%[20]。因此,有必要寻找新的且安全性更高的治疗方案。

中药具有不良反应少、疗效持久等优点,其应用价值得到了临床的广泛认可[21]。MBD/BDD由经典名方百合地黄汤加味而成,用于PSD的疗效确切,但具体作用机制尚不明确。由于中药复方在疾病治疗过程中具有多靶点、多途径、整体协调的特点,故本研究首先使用网络药理学方法对MBD/BDD治疗PSD的活性成分及潜在靶点进行了分析,最终获得了MBD/BDD抗抑郁相关靶基因131个。随后,本研究通过构建组分-靶点网络、PPI网络,并进行KEGG通路富集分析发现,MBD/BDD治疗PSD的机制可能涉及*IL1B*、*AKT1*等多个基因,与神经活性配体-受体相互作用、cAMP等信号通路密切相关。

为了进一步探讨MBD/BDD的抗抑郁机制,本研究通过局灶性脑缺血手术结合慢性不可预见的温和应激建立PSD大鼠模型,以FLX为阳性对照,通过OFT和FST初步证实了MBD/BDD能显著减轻模型大鼠的抑郁样行为。随后,本研究进行了转录组测序和生物信息学分析,结果显示,MBD/BDD组大鼠脑组织中发生变化的基因远多于FLX组,其中上调基因数超过FLX组的2倍,说明与FLX相比,MBD/BDD能通过调控更多相关基因的表达来发挥治疗作用。基因变化热图分析结果显示,MBD/BDD组和FLX组的基因谱差异明显,提示两者治疗PSD的分子机制可能不同。MBD/BDD组与PSD模型组之间的DEGs共1 351个,涉及神经元分化、化学突触传递调节等,与精神障碍、记忆障碍、神经发育障碍等疾病有关,提示神经结构及功能的修复可能是MBD/BDD治疗PSD的分子基础。

目前,关于PSD的生理病理机制还没有统一结论,其潜在机制包括单胺类水平降低,促炎细胞因子过量,谷氨酸介导的兴奋性毒性,脑轴、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能障碍和异常神经营养反应等,是多种因素共同作用的结果[22-23]。本研究结果显示,经MBD/BDD干预后,PSD模型大鼠脑组织中显著上调的DEGs共1 173个,其中*Fezf2*、*Arx*、*Emx1*、*Foxg1*、*Emx2*、*Nr2e1*、*Dlx*等基因变化尤为明显。经查询美国国立卫生研究院基因数据库可知,上述基因大多与神经元增殖、发育、分化和迁移密切相关,涉及V层锥体神经元树突变化和棘发育、轴突生长等生理功能,提示MBD/BDD的抗PSD作用可能与促进神经结构、功能修复和神经元增殖等有关。本研究对转录组测序结果中上调较显著的4个基因(*Fezf2*、*Arx*、*Ostn*、*Nrgn*)进行mRNA表达验证,对2个常见神经营养因子(BDNF、TrkB)进行蛋白表达验证,结果显示,经MBD/BDD治疗后,大鼠脑组织中上述基因及蛋白的相对表达量均显著升高,初步验证了前述研究结果。

综上所述,MBD/BDD的抗PSD作用可能与上调神经元增殖、发育、分化和迁移相关基因的表达,促进神经结构和功能的修复有关,是多成分、多靶点、多途径共同作用的结果。本研究可为MBD/BDD及相关中药在神经发育和神经精神疾病中的药理作用及其分子机制分析提供参考。

参考文献

[1] DAS J, RAJANIKANT G K. Post stroke depression: the sequelae of cerebral stroke[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 90: 104-114.

[2] GUO J L, WANG J J, SUN W, et al. The advances of post-stroke depression: 2021 update[J]. J Neurol, 2022, 269(3): 1236-1249.

[3] CAI W, MUELLER C, LI Y J, et al. Post stroke depression and risk of stroke recurrence and mortality: a systematic review and meta-analysis[J]. Ageing Res Rev, 2019, 50: 102-109.

[4] HU J J, WANG L Y, FAN K L, et al. The association between systemic inflammatory markers and post-stroke

depression：a prospective stroke cohort[J]. Clin Interv Aging，2021，16：1231-1239.

[5] 宋敏，左政，李亚楠，等. 中西医治疗中风后抑郁症的概况[J]. 世界中医药，2021，16(10)：1638-1642.
SONG M，ZUO Z，LI Y N，et al. Overview of traditional Chinese and western medicine in the treatment of post-stroke depression[J]. World Chin Med，2021，16(10)：1638-1642.

[6] 王蕾，郑昌吉，崔然吉. 芍药苷作为抗抑郁药的神经保护作用机制[J]. 人参研究，2023，35(1)：29-31.
WANG L，ZHENG C J，CUI R J. Neuroprotective mechanism of paeoniflorin as an antidepressant[J]. Ginseng Res，2023，35(1)：29-31.

[7] 丁志敏，苏凯奇，高静，等. 线粒体功能障碍与脑卒中后抑郁的关系研究进展[J]. 中国全科医学，2022，25(12)：1528-1532.
DING Z M，SU K Q，GAO J，et al. Research progress on the relationship between mitochondrial dysfunction and post-stroke depression[J]. Chin Gen Pract，2022，25(12)：1528-1532.

[8] WEN H M，WEYMANN K B，WOOD L，et al. Inflammatory signaling in post-stroke fatigue and depression[J]. Eur Neurol，2018，80(3/4)：138-148.

[9] SIM W S，CHOI S I，JUNG T D，et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Lilium lancifolium* bulbs extract[J]. J Food Biochem，2020，44(5)：e13176.

[10] CHI X S，XUE X Y，PAN J，et al. Mechanism of lily bulb and *Rehmannia* decoction in the treatment of lipopolysaccharide-induced depression-like rats based on metabolomics study and network pharmacology[J]. Pharm Biol，2022，60(1)：1850-1864.

[11] WANG H Q，LIU H T，WANG L，et al. Uncovering the active components，prospective targets，and molecular mechanism of Baihe zhimu decoction for treating depression using network pharmacology-based analysis[J]. J Ethnopharmacol，2021，281：114586.

[12] 张永莉，陈清智，耿文慧，等. 百合皂苷类化学成分提取及药理活性研究进展[J]. 亚热带植物科学，2022，51(3)：233-240.
ZHANG Y L，CHEN Q Z，GENG W H，et al. Research advances on extraction and pharmacological effects of lily saponins[J]. Subtrop Plant Sci，2022，51(3)：233-240.

[13] ZHOU J，AN R F，HUANG X F. Genus *Lilium*：a review on traditional uses，phytochemistry and pharmacology[J]. J Ethnopharmacol，2021，270：113852.

[14] 张芳. 百合地黄汤治疗脑卒中后抑郁症的分析[J]. 中国医药指南，2019，17(7)：159-160.
ZHANG F. Analysis of Baihe dihuang decoction in treating post-stroke depression[J]. Guide China Med，2019，17(7)：159-160.

[15] 潘艳芳. 柴胡加龙骨牡蛎汤合百合地黄汤治疗人工绝经后失眠症的临床观察[J]. 新疆中医药，2015，33(6)：24-26.
PAN Y F. Clinical observation of Chaihu plus Longgu muli decoction combined with Baihe dihuang decoction in the treatment of artificial postmenopausal insomnia[J]. Xinjiang J Tradit Chin Med，2015，33(6)：24-26.

[16] 周海燕，周俐红，张彩霞，等. 吴茱萸次碱对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织病理、免疫失衡和氧化应激的调节作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志，2020，36(6)：677-681.
ZHOU H Y，ZHOU L H，ZHANG C X，et al. Regulatory effect and mechanism of rutaecarpine on brain histopathology，immune imbalance and oxidative stress in rats with focal cerebral ischemia[J]. Chin J Immunol，2020，36(6)：677-681.

[17] 刘珍，刘永壮. 高通量测序数据的基因组拷贝数变异检测方法综述[J/OL]. 生物信息学，2023：1-11(2023-03-03)[2023-03-31]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20230302.1743.002.html.
LIU Z，LIU Y Z. A review of the methods for copy number variation detection using high-throughput sequencing data[J/OL]. Chin J Bioinform，2023：1-11(2023-03-03)[2023-03-31]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20230302.1743.002.html.

[18] FRANK D，GRUENBAUM B F，ZLOTNIK A，et al. Pathophysiology and current drug treatments for post-stroke depression：a review[J]. Int J Mol Sci，2022，23(23)：15114.

[19] 胡晓东，席燕晴，王宗琦，等. 5-羟色胺选择性再摄取抑制剂抗抑郁药物对首发抑郁障碍病人认知功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2022，20(21)：4019-4021.
HU X D，XI Y Q，WANG Z Q，et al. Effect of 5-hydroxytryptamine selective reuptake inhibitor antidepressants on cognitive function of patients with first-episode depressive disorder[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis，2022，20(21)：4019-4021.

[20] BIXBY A L，VANDENBERG A，BOSTWICK J R. Clinical management of bleeding risk with antidepressants[J]. Ann Pharmacother，2019，53(2)：186-194.

[21] YANG Y H，ZHANG M，ZHAO J J，et al. Effect of traditional Chinese medicine emotional therapy on post-stroke depression：a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine，2021，100(14)：e25386.

[22] 高甲. 针灸治疗中风后抑郁症疗效评价[J]. 亚太传统医药，2013，9(11)：74-75.
GAO J. Evaluation of therapeutic effect of acupuncture and moxibustion on post-stroke depression[J]. Asia Pac Tradit Med，2013，9(11)：74-75.

[23] STARKSTEIN S E，HAYHOW B D. Treatment of post-stroke depression[J]. Curr Treat Options Neurol，2019，21(7)：31.

（收稿日期：2023-04-05　修回日期：2023-08-29）
（编辑：张元媛）