

## · 研究论文 ·

## 基于网络药理学的柴胡抗抑郁作用机制研究

吴丹<sup>1,2</sup>, 高耀<sup>1,2</sup>, 向欢<sup>3</sup>, 邢婕<sup>1,2</sup>, 韩雨梅<sup>3</sup>, 秦雪梅<sup>1,2\*</sup>, 田俊生<sup>1,2\*</sup>(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室,  
3. 体育学院, 山西 太原 030006)

**摘要:** 构建柴胡活性成分-作用靶点网络和蛋白相互作用网络, 对靶点涉及的功能和通路进行分析, 探讨柴胡抗抑郁的作用机制。通过 TCMSP 数据库、文献挖掘和本实验室已有研究获取柴胡主要活性成分, 利用 DRAR-CPI 服务器、GeneCards 和 OMIM 数据库预测和筛选柴胡活性成分抗抑郁的作用靶点。采用 Cytoscape 软件构建活性成分-作用靶点网络, 采用 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制蛋白相互作用网络, 通过 Systems Dock Web Site 对成分与靶点进行分子对接验证。采用 DAVID 数据库对靶点进行 GO 及 KEGG 通路分析, 通过 DisGeNET 数据库对靶点所属的类型进行归属。筛选得到柴胡 15 个活性成分, 涉及 50 个作用靶点。网络分析结果表明, 柴胡主要涉及细胞过程、代谢过程、对应激的应答等生物过程, 通过调节 PI3K-AKT、MAPK、Rap1、Ras、FoxO 和 neurotrophin 等信号通路来发挥抗抑郁作用。本研究体现了柴胡多成分-多靶点-多途径的作用特点, 为进一步开展柴胡抗抑郁作用机制的研究提供了新思路和新方法。

**关键词:** 柴胡; 抑郁症; 网络药理学; 分子对接; 作用靶点; 蛋白相互作用

中图分类号: R964

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0210-10

## Exploration into mechanism of antidepressant of Bupleuri radix based on network pharmacology

WU Dan<sup>1,2</sup>, GAO Yao<sup>1,2</sup>, XIANG Huan<sup>3</sup>, XING Jie<sup>1,2</sup>, HAN Yu-mei<sup>3</sup>,  
QIN Xue-mei<sup>1,2\*</sup>, TIAN Jun-sheng<sup>1,2\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, 3. School of Physical Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** This study was designed to explore the antidepressant mechanism of Bupleuri radix through establishing the active components-targets network and protein interactions network and analyzing the functions and pathways of targets. The main active ingredients of Bupleuri radix were obtained by TCMSP, literature study and the results of our own work. Based on the DRAR-CPI, GeneCards and OMIM were used to predict and screen the active components of Bupleuri radix. The Cytoscape software was used to construct the active components-targets network of Bupleuri radix. The protein interactions network was constructed using the String database and Cytoscape software. The relation of the main active ingredients and targets were validated by Systems Dock Web Site. The GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by DAVID. Using DisGeNET database to attribute the type of targets. The results showed that 15 active components and 50 targets of Bupleuri radix were involved. The network results showed that the process of metabolism, regulation

收稿日期: 2017-09-14; 修回日期: 2017-10-16.

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目 (2016M602414); 山西省科技重点研发计划 (201603D3113013, 201603D321077, 201701D22111344);

地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目 (201605D111004); 山西省科技创新重点团队项目 (201605D131045-18).

\*通讯作者 Tel: 86-351-7019297, E-mail: jstian@sxu.edu.cn;

Tel: 86-351-7018379, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0914

and response to stress were mainly involved, by adjusting the PI3K-AKT, MAPK, Rap1, Ras, FoxO, neurotrophin and other signaling pathways to play its antidepressant effect. This study reflects the characteristics of multi-components-multi-targets and multi-pathways of Bupleuri radix, which provides new ideas and clues for further research on the mechanism of anti-depressive effects of Bupleuri radix.

**Key words:** Bupleuri radix; depression; network pharmacology; molecular docking; target; protein interaction

抑郁症为一种常见的情感性精神疾病, 具有高发率、高复发率、高致残率等特点, 其临床主要表现为情绪低落、快感缺失、精力丧失, 世界卫生组织预言其将成为仅次于心脏病的第二大疾病负担<sup>[1, 2]</sup>。目前, 全世界至少有 20% 的人受到抑郁症的困扰, 其中男性约为 7%~12%, 女性约为 20%~25%<sup>[3]</sup>。在西方, 抑郁症的疾病负担预计到 2030 年将居于首位<sup>[4]</sup>, 在我国, 抑郁症的发病率约为 3%<sup>[5]</sup>, 抑郁症的发生不仅降低了患者的生活质量, 同时给家庭和社会带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>。抑郁症治疗的药物仍以化学药物为主, 但是一些抗抑郁西药有毒副作用、依从性较差, 而中药注重整体调节, 毒副作用较少, 对抑郁症的疗效越来越受到重视, 特别是具有疏肝解郁作用的中药柴胡及其复方(如逍遥散、丹栀逍遥散、小柴胡汤、柴胡舒肝散、柴胡加龙骨牡蛎汤等) 在临床上广泛使用并取得了较好的效果<sup>[6]</sup>。

柴胡 (*Bupleuri radix*) 为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.) 的干燥根, 辛、苦, 微寒; 归肝、胆、肺经; 具有疏散退热、舒肝解郁、升举阳气等作用<sup>[7]</sup>。柴胡主要成分包括柴胡皂苷和黄酮类等。一般认为柴胡皂苷 A 和 D 为其抗抑郁的主要有效活性成分<sup>[8]</sup>, 但其结构不稳定, 在煎煮或炮制的过程中易转化为柴胡皂苷 B1、B2, 且仍具有较好的生理活性<sup>[9, 10]</sup>。柴胡中的黄酮类成分主要为黄酮醇, 如山奈酚 (kaempferol)、槲皮素 (quercetin)、异鼠李素 (isorhamnetin) 等, 文献报道均具有抗抑郁作用<sup>[8, 11-13]</sup>。此外, 本课题组前期从柴胡中分离得到的 8 个多炔化合物在体外单胺类神经递质再摄取抑制实验中, 表现出明显的抗抑郁活性<sup>[14-16]</sup>。

2007 年 Hopkins 等提出了“网络药理学”的概念, 通过分析药物对疾病网络的干预, 构建“药物-靶点-疾病”网络, 为药物研发提供了新的策略<sup>[17, 18]</sup>。中药因其成分复杂、系统庞大而不易研究, 网络药理学则为复杂中药系统的研究提供了新的思路和视角<sup>[19]</sup>。Ding 等<sup>[20]</sup>采用蛋白相互作用网络对肾小球病的关键细胞骨架组分进行了预测。Zhang 等<sup>[21]</sup>通过网络药理学方法对乌头汤治疗类风湿关节炎的关键靶标进行

了预测。Chen 等<sup>[22]</sup>通过网络药理学方法对复方柴胡方超临界 CO<sub>2</sub> 萃取组分抗抑郁作用机制进行了预测。Zhang 等<sup>[23]</sup>通过 DRAR-CPI 结合文本挖掘对交泰丸抗抑郁作用靶点进行预测, 采用 DAVID 数据库进行生物功能和通路分析, 探讨了交泰丸的抗抑郁机制。网络药理学研究策略的整体性、系统性与中医学从整体、辨证论治的角度诊治疾病的理论以及中药及其复方的多成分、多途径、多靶点协同作用的原理不谋而合<sup>[24]</sup>。

本文采用网络药理学方法从整体性的角度对柴胡的抗抑郁作用机制进行探讨, 为深入研究柴胡及含柴胡的中药复方的抗抑郁作用提供了参考依据。

## 材料与方法

**化学成分的获取与活性成分的筛选** 从 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/>, Version 2.3) 中获取柴胡的化学成分。根据柴胡中的化合物含量、相关生物功能(抗抑郁作用)、研究热度并结合本实验室前期的研究基础, 通过大量文献挖掘与整理获取已报道的柴胡的抗抑郁活性成分。

**活性成分作用靶点的获取** 将上述柴胡活性成分在 ChemBiodraw Ultra 12.0 软件中绘制出各自的结构图, 并以 mol2 格式存储。利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、TCMSP 数据库、ChemicalBook (<http://www.chemicalbook.com/>) 对其分子结构进一步确证。

**DRAR-CPI** (<http://cpi.bio-x.cn/drar>, update in 2017-7-26) 为一种基于反向分子对接的服务器, 它可以将药物分子和蛋白的三维结构特征进行对接, 用基于蛋白-配体相互作用的亲合性打分函数进行打分并排序, 预测出药物的潜在作用靶点<sup>[25]</sup>。Z-score 代表成分与蛋白相互作用的强度, 该服务器建议选取 Z-score < -0.5 为潜在靶点, 因此, 登陆 DRAR-CPI 服务器上传柴胡活性成分的 mol2 格式文件, 选取 Z-score < -0.5 为柴胡的潜在作用靶点。利用 UniProt 数据库的 UniProt KB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>, update in 2017-6-22) 搜索功能, 导入柴胡蛋白靶点的 PDB ID 号, 限定物种为人, 经过检索和转化操作

得到柴胡活性成分的基因靶点。

**抑郁症相关作用靶点的筛选** 通过在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>, Version 4.5.0) 和 OMIM 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, update in 2017-7-23) 中输入关键词 depression、depressive、depressed 和 antidepressant 搜索已报道的、与抑郁症相关的基因, 去除重复基因和假阳性基因, 与上述作用靶点进行匹配, 得到柴胡活性成分抗抑郁的潜在作用靶点。

**成分-作用靶点网络构建与分析** 将柴胡的活性成分和抗抑郁作用靶点导入 Cytoscape Version 3.4.0 软件, 构建柴胡活性成分-作用靶点网络。

**蛋白相互作用网络构建与分析** String 数据库 (<https://string-db.org/>, Version 10.5)<sup>[26]</sup> 是一种包含已知和预测的蛋白质-蛋白质相互作用的数据库, 其中收集了大量的蛋白相互作用关系, 共涉及 9 643 763 个蛋白, 1 380 838 440 个相互作用, 包括实验检测得到的和通过生物信息学方法预测得到的数据。将柴胡的蛋白靶点导入 String 数据库, 限定物种为人, 获取蛋白相互作用关系, 结果保存成 TSV 格式, 保留文件中 node1、node2 和 Combined score 信息并导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络, 并对网络进行分析 (Cytoscape→Tools→Network analyzer→Network analysis→Analyze network), 保存网络分析结果, 使用 Cytoscape 中的 Generate style from statistics 工具 (Cytoscape→Tools→Network analyzer→Network analysis→Generate style from statistics) 将节点大小和颜色设置用于反映 Degree 的大小, 边的粗细设置用于反映 Combine score 的大小, 获得最终的蛋白相互作用网络。

**分子对接** Systems Dock Web Site 是一个基于网络药理学预测和分析的网络服务器, 可以用于说明配体如何作用于复杂的分子网络。它通过 DocK-IN 评分的分子对接功能评估蛋白质-配体结合潜力<sup>[27]</sup>。采用 Systems Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp>, Version 2.0) 对相互作用网络中 Degree 值靠前的 5 个分子与柴胡的活性成分进行分子对接验证。保存分子对接结果, 并对其 Docking Score 进行分析, 用以评价柴胡活性成分与靶点之间的结合活性。

**生物过程与通路分析** 生物信息学注释数据库 (DAVID, <https://david.ncicrf.gov/>, Version 6.8) 为大规模的基因或蛋白提供系统综合的生物功能注释信息, 能够找出最显著富集的生物学注释<sup>[28]</sup>。将柴胡的作用靶点导入 DAVID 数据库, Select Identifier 设置为

OFFICIAL GENE SYMBOL, List Type 设置为 Gene List, 限定物种为人, 对柴胡作用靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析, 保存结果。设定阈值  $P < 0.05$ , 并按照涉及的靶点数目多少进行排序, 筛选排名靠前的生物过程或通路, 用 GraphPad Prism 5.0 软件绘图。

**作用靶点类型归属** DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>, Version 5.0) 是包含与人类疾病相关的基因和变体的平台之一。在基因和疾病关系中, 该数据库一方面可以通过输入基因获取该基因相关的疾病信息, 另一方面还可以通过输入疾病获取与该疾病相关的基因信息。在 DisGeNET 数据库中选择基因进行检索, 将上述柴胡的作用靶点依次导入数据库中, 获取靶点类型信息 (Protein Class)。

**通路图绘制** 利用 UniProt 数据库的 UniProt KB 搜索功能分别获取柴胡 50 个抗抑郁靶点的 Uniprot ID。利用 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/>) KEGG mapping 中的 KEGG Mapper 工具, 将上述柴胡的 UniProt ID 导入, 限定物种为人, 获取柴胡抗抑郁作用的通路图, 筛选靠前的几条通路并进行整合绘制最终的通路图。

## 结果

### 1 柴胡活性成分的筛选

TCMSP 数据库获得柴胡化学成分 349 个, 经大量文献挖掘与整理, 根据柴胡各成分的含量、生物学功能、研究热度结合本实验室的研究筛选出具有抗抑郁作用的活性成分 15 个, 除了 8 个多炔类成分外, 其余在 TCMSP 数据库中均有收录。分别为山奈酚、异鼠李素、槲皮素、柴胡皂苷 B2、柴胡皂苷 B1、柴胡皂苷 D、柴胡皂苷 A 及 8 个柴胡多炔, 详见表 1。

### 2 靶点预测

柴胡的 15 个活性成分在 DRAR-CPI 服务器中 Z-score  $< -0.5$  的靶点共有 1 131 个, 去除重复后得到 265 个靶点。通过向 Uniprot 数据库 UniProt KB 搜索功能中输入蛋白靶点的 PDB ID, 共得到 264 个基因靶点。通过与 GeneCards 和 OMIM 数据库中与抑郁症相关的基因进行比对, 筛选出 50 个可能与柴胡治疗抑郁症相关的作用靶点, 详见表 2。

### 3 活性成分-作用靶点网络构建

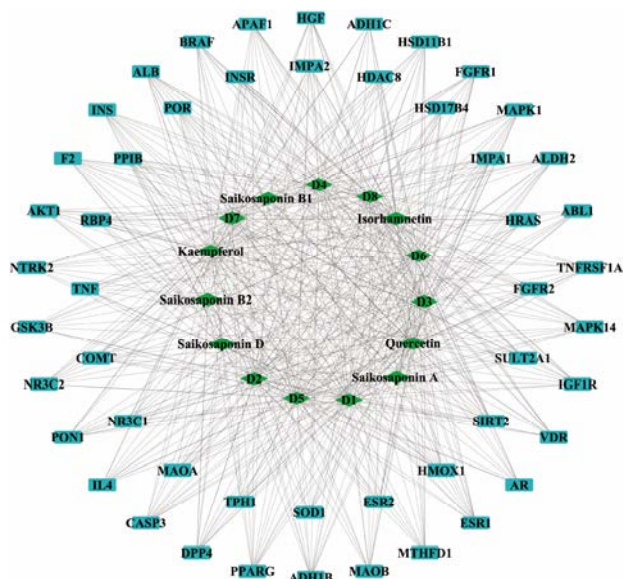
将柴胡活性成分和作用靶点的信息导入 Cytoscape 软件构建活性成分-作用靶点网络, 详见图 1。图中共涉及 65 个节点, 561 个边。不同颜色和形状 of 节点分别代表柴胡潜在活性成分和靶点, 蓝色矩形节点代

**Table 1** Main active ingredients in Bupleuri radix. D1: (2Z,8Z,10E)-Pentadeca-2,8,10-triene-4,6-diyn-1-ol; D2: (2Z,8E,10E)-Pentadeca-2,8,10-triene-4,6-diyn-1-ol; D3: (2Z,8Z,10E)-Heptadeca-2,8,10-triene-4,6-diyn-1-ol; D4: Bupleurynol; D5: (2E,8E,10E)-Pentadeca-2,8,10-triene-4,6-diyn-1-ol; D6: (2Z,8E,10E)-Pentadeca-2,8,10-triene-4,6-diyn-1-yl acetate; D7: (2E,8E,10E)-Pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-yl acetate; D8: (2E,8E,10E)-Heptadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol

NO.	Name	Chemical formula
1	Isorhamnetin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
2	Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
3	Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
4	Saikosaponin D	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>
5	Saikosaponin B1	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>
6	Saikosaponin B2	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>
7	Saikosaponin A	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>
8	D1	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O
9	D2	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O
10	D3	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O
11	D4	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O
12	D5	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O
13	D6	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
14	D7	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
15	D8	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O

**Table 2** Information of potential antidepressant targets from Bupleuri radix

NO.	PDB ID	Target	NO.	PDB ID	Target
1	1A8M	TNF	26	1FT4	TNFRSF1A
2	3BWY	COMT	27	1OPL	ABL1
3	1P93	NR3C1	28	1OF7	ALDH2
4	2Z5X	MAOA	29	1TVO	MAPK1
5	1MLW	TPH1	30	2FGI	FGFR1
6	3CQW	AKT1	31	1XU9	HSD11B1
7	1WWB	NTRK2	32	1HT0	ADH1C
8	1J1B	GSK3B	33	1GMN	HGF
9	2A3I	NR3C2	34	1Z6T	APAF1
10	1V04	PON1	35	1J8F	SIRT2
11	2CYK	IL4	36	1J99	SULT2A1
12	1GFW	CASP3	37	2PVY	FGFR2
13	2HHA	DPP4	38	1UWJ	BRAF
14	1ZEO	PPARG	39	5P2I	HRAS
15	1HSZ	ADH1B	40	2BX8	ALB
16	1GOS	MAOB	41	1TYL	INS
17	1DIA	MTHFD1	42	1IMB	IMPA1
18	1R5K	ESR1	43	1ZBQ	HSD17B4
19	1E3G	AR	44	1W22	HDAC8
20	1DB1	VDR	45	2CZH	IMPA2
21	2C9V	SOD1	46	2AUH	INSR
22	1QKM	ESR2	47	1B1C	POR
23	1S8C	HMOX1	48	1CYN	PPIB
24	2OJ9	IGF1R	49	1A3B	F2
25	1A9U	MAPK14	50	1QAB	RBP4

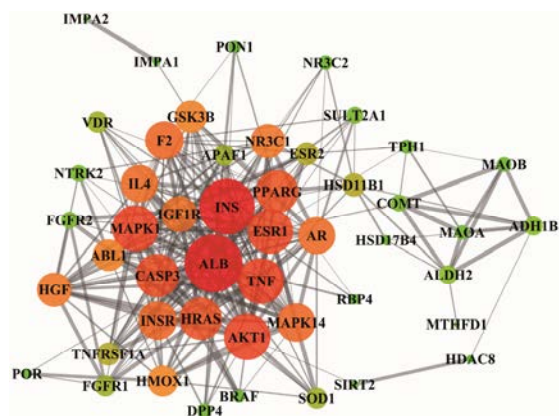


**Figure 1** Components-targets network of Bupleuri radix. The green diamond (◆) is the main active ingredients of Bupleuri radix, the blue rectangle (■) is the potential antidepressant targets of Bupleuri radix

表作用靶点, 绿色菱形节点代表柴胡的活性成分, 边代表活性成分和作用靶点间的相互关联。从图中可看出同一靶点可对应于不同的活性成分, 也可对应于相同的活性成分, 充分体现了柴胡多成分、多靶点的作用特点。

#### 4 蛋白相互作用网络构建与分析

将上述作用靶蛋白导入 String 数据库, 限定物种为人, 获取蛋白相互作用关系, 保存其 TSV 格式文件, 导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络, 详见图 2。图中节点表示蛋白, 边表示蛋白之间的关联, 共涉及 48 个节点, 281 个边 (其中 ADH1C 未在数据库中找到, PPIB 与其他蛋白没有相互作用, 这两个蛋白不在相互作用网络中体现)。节点的大小和颜色表示



**Figure 2** Protein interaction network of Bupleuri radix. The size and the color of the node represents the value of the Degree, the thickness of the side indicates the value of the Combine score

Degree 值的大小, 节点越大, 颜色由绿变红对应的 Degree 值越大。边的粗细表示 Combine score, 边越粗 Combine score 值越大。

## 5 分子对接

上述相互作用网络中 Degree 表示某个蛋白具有相互作用的蛋白的数目。一般而言, 在一个网络中, 只有少数的节点具有很高的 Degree, 这些节点为“中枢节点”, 在整个网络中占据重要的地位。也就是说, 在蛋白相互作用网络中筛选出的 Degree 排名靠前的靶蛋白在柴胡抗抑郁过程中发挥着重要的作用。对上述 Degree 数值排名前 5 位的重要靶点 (表 3) 进行分子对接验证。将其 PDB ID 号导入 Systems Dock Web Site 分子对接软件并与柴胡的 15 个成分进行对接, 对接结果详见表 4。分子对接结果显示, Docking Score 值大于 7.0 的有 2 个 (3.3%), 介于 7.0~5.0 之间的有 18 个 (30%), 介于 5.0~4.25 之间的有 28 个 (46.7%), 小于 4.25 的有 12 个 (20%)。一般认为 Docking Score

值在 4.25 以上时表示分子与靶点之间有一定的结合活性, 大于 5.0 表明分子与靶点有较好的结合活性, 大于 7.0 则说明具有强烈的结合活性<sup>[29]</sup>。分子对接结果表明, 柴胡 15 个活性成分与重要靶点的结合活性较好。

## 6 基因功能与通路分析

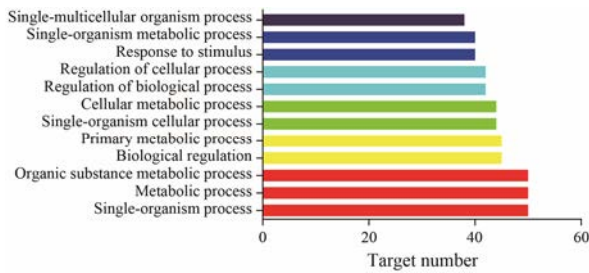
使用 DAVID 数据库对柴胡活性成分对应靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 设定阈值  $P < 0.05$ , 并筛选靠前的生物过程或通路, 用 GraphPad Prism 5.0 绘图, 详见图 3~6。

**Table 3** Five important targets with big Degree of Bupleuri radix

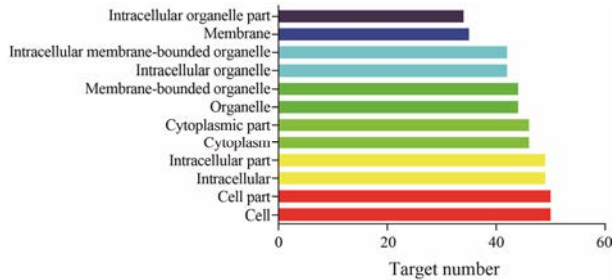
NO.	Degree	PDB ID	Target name
1	34	2BX8	ALB
2	32	1TYL	INS
3	25	1A8M	TNF
4	25	3CQW	AKT1
5	25	1TVO	MAPK1

**Table 4** Molecular docking of five important targets from Bupleuri radix

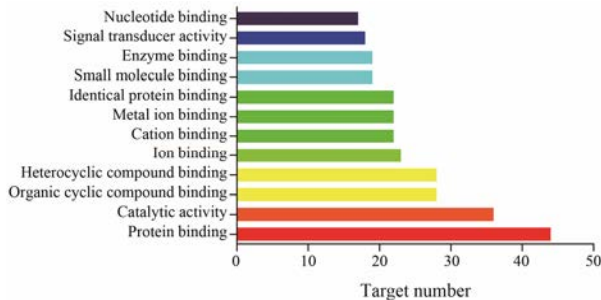
Target name	PDB ID	Ingredient	Docking score	Target name	PDB ID	Ingredient	Docking score
AKT1	3CQW	Isorhamnetin	3.679	AKT1	3CQW	D6	5.042
ALB	2BX8	Isorhamnetin	3.112	ALB	2BX8	D6	4.731
INS	1TYL	Isorhamnetin	2.944	INS	1TYL	D6	4.411
MAPK1	1TVO	Isorhamnetin	2.465	MAPK1	1TVO	D6	4.344
TNF	1A8M	Isorhamnetin	3.099	TNF	1A8M	D6	4.732
AKT1	3CQW	Kaempferol	6.604	AKT1	3CQW	D5	4.492
ALB	2BX8	Kaempferol	5.064	ALB	2BX8	D5	4.402
INS	1TYL	Kaempferol	5.248	INS	1TYL	D5	4.081
MAPK1	1TVO	Kaempferol	7.877	MAPK1	1TVO	D5	4.083
TNF	1A8M	Kaempferol	6.709	TNF	1A8M	D5	4.312
AKT1	3CQW	Quercetin	6.636	AKT1	3CQW	D4	5.159
ALB	2BX8	Quercetin	4.812	ALB	2BX8	D4	4.96
INS	1TYL	Quercetin	5.106	INS	1TYL	D4	4.633
MAPK1	1TVO	Quercetin	7.888	MAPK1	1TVO	D4	4.714
TNF	1A8M	Quercetin	6.574	TNF	1A8M	D4	4.964
ALB	2BX8	Saikosaponin D	6.804	AKT1	3CQW	D3	4.954
TNF	1A8M	Saikosaponin D	5.054	ALB	2BX8	D3	4.75
AKT1	3CQW	Saikosaponin B2	5.907	INS	1TYL	D3	4.635
ALB	2BX8	Saikosaponin B2	6.823	MAPK1	1TVO	D3	4.712
ALB	2BX8	Saikosaponin B1	6.828	TNF	1A8M	D3	5.154
AKT1	3CQW	D8	5.16	AKT1	3CQW	D2	4.55
ALB	2BX8	D8	4.833	ALB	2BX8	D2	4.343
INS	1TYL	D8	4.674	INS	1TYL	D2	4.078
MAPK1	1TVO	D8	4.716	MAPK1	1TVO	D2	4.082
TNF	1A8M	D8	5.172	TNF	1A8M	D2	4.264
AKT1	3CQW	D7	5.034	AKT1	3CQW	D1	4.319
ALB	2BX8	D7	4.856	ALB	2BX8	D1	4.531
INS	1TYL	D7	4.415	INS	1TYL	D1	4.044
MAPK1	1TVO	D7	4.224	MAPK1	1TVO	D1	4.084
TNF	1A8M	D7	4.706	TNF	1A8M	D1	4.491



**Figure 3** Enriched gene ontology terms for biological process (BP) of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix



**Figure 4** Enriched gene ontology terms for cellular component (CC) of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix



**Figure 5** Enriched gene ontology terms for molecular function (MF) of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix

GO 富集分析指在某一功能层次上统计蛋白或者基因的数目组成的一个有向无环图, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function,

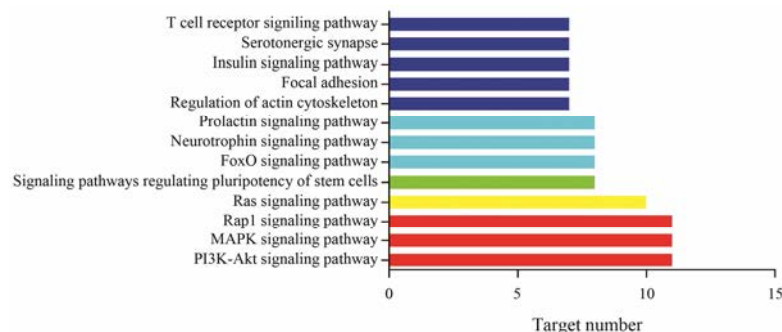
MF) 和细胞组分 (cellular component, CC) 3 个分支。其中, BP 分析 (图 3) 中排名靠前的有 single-organism process (50 个靶点/100%)、metabolic process (50 个靶点/100%)、organic substance metabolic process (50 个靶点/100%)、primary metabolic process (45 个靶点/90%)、biological regulation (45 个靶点/90%)。CC 分析 (图 4) 中排名靠前的有 cell (50 个靶点/100%)、cell part (50 个靶点/100%)、intracellular (49 个靶点/98%)、intracellular part (49 个靶点/98%)。MF 分析 (图 5) 中排名靠前的有 protein binding (44 个靶点/88%)、catalytic activity (36 个靶点/72%)、heterocyclic compound binding (28 个靶点/56%)。通路分析结果如图 6 所示, 柴胡抗抑郁的靶点主要涉及 PI3K-AKT (11 个靶点/22%)、MAPK (11 个靶点/22%)、Rap1 (11 个靶点/22%)、Ras (10 个靶点/20%)、FoxO (8 个靶点/16%)、neurotrophin (8 个靶点/16%) 等信号通路。

## 7 作用靶点类型归属

将柴胡的 50 个作用靶点依次导入 DisGeNET 数据库, 获取靶点对应的类型, 详见表 5。结果表明柴胡抗抑郁过程中有信号分子、转录因子、受体、蛋白 (转运蛋白、载体蛋白、钙结合蛋白等)、酶 (氧化还原酶、激酶、磷酸酶、水解酶等) 等物质的参与。

## 8 靶点通路分析图

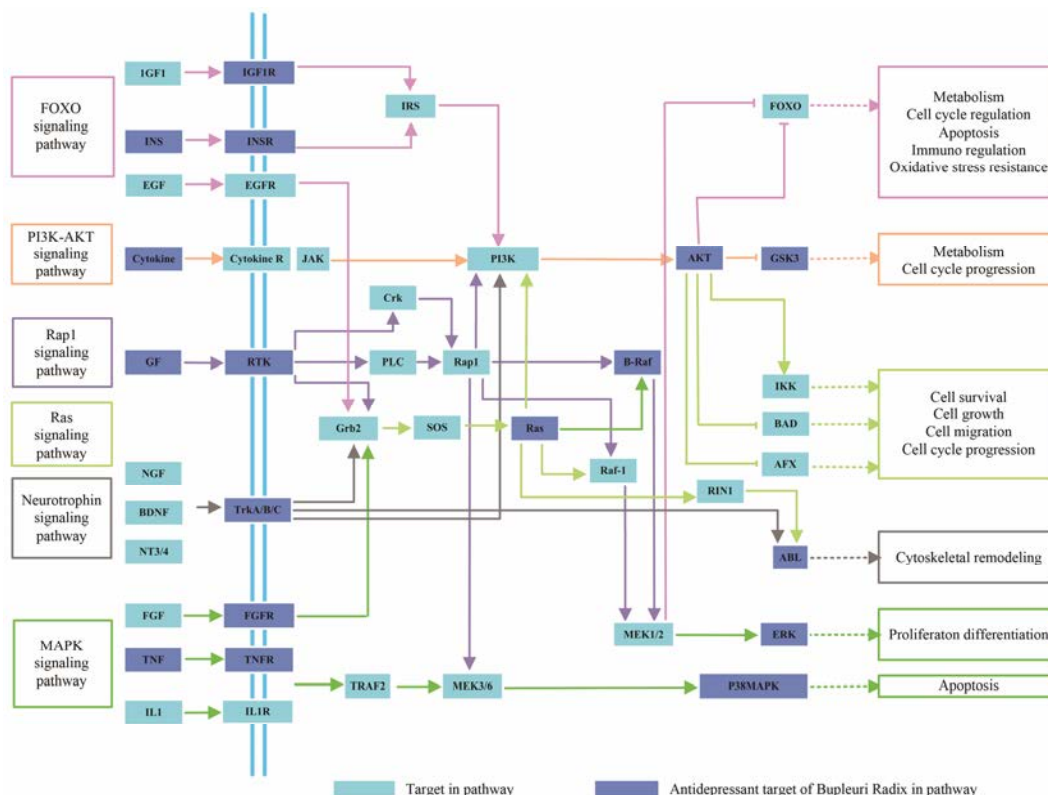
利用 KEGG Mapper 工具获取柴胡抗抑郁作用的通路图, 筛选靠前的几条通路并进行整合绘制最终的通路图 (图 7)。图中箭头表示促进作用, T-箭头表示抑制作用, 不同颜色箭头表示不同的通路。通路靶点标记为浅蓝色, 柴胡抗抑郁靶点标记为深蓝色。图中显示出了 PI3K-AKT、MAPK、Rap1、Ras、FoxO 和 neurotrophin 信号通路, 涉及 19 个柴胡的抗抑郁靶点 (占柴胡抗抑郁靶点的 38%)。提示柴胡抗抑郁靶点分散于这几条通路中, 通过调节其中的几个环节发挥作用, 绝大多数靶点在多条通路中发挥作用, 如 Ras、B-Raf、AKT 和 ABL 等。



**Figure 6** Enriched KEGG pathways of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix

**Table 5** The protein class of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix

Gene name	Protein class	Gene name	Protein class
<i>TNF</i>	Signaling molecule	<i>TNFRSF1A</i>	Receptor
<i>COMT</i>	Transferase	<i>ABL1</i>	Transferase; kinase
<i>NR3C1</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>ALDH2</i>	Oxidoreductase
<i>MAOA</i>	Transferase; oxidoreductase; nucleic acid binding	<i>MAPK1</i>	Transferase; kinase
<i>TPH1</i>	Null	<i>FGFR1</i>	Null
<i>AKT1</i>	Transfer/carrier protein; transferase; calcium-binding protein; kinase	<i>HSD11B1</i>	Oxidoreductase
<i>NTRK2</i>	Null	<i>ADH1C</i>	Oxidoreductase
<i>GSK3B</i>	Transferase; kinase	<i>HGF</i>	Protease; enzyme modulator; hydrolase; signaling molecule; calcium-binding protein; receptor
<i>NR3C2</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>APAF1</i>	Null
<i>PON1</i>	Null	<i>SIRT2</i>	Nucleic acid binding; hydrolase
<i>IL4</i>	Signaling molecule	<i>SULT2A1</i>	Transferase
<i>CASP3</i>	Protease; enzyme modulator; hydrolase	<i>FGFR2</i>	Null
<i>DPP4</i>	Protease; enzyme modulator; hydrolase	<i>BRAF</i>	Transferase; kinase
<i>PPARG</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>HRAS</i>	Enzyme modulator
<i>ADH1B</i>	Oxidoreductase	<i>ALB</i>	Transfer/carrier protein
<i>MAOB</i>	Transferase; oxidoreductase; nucleic acid binding	<i>INS</i>	Null
<i>MTHFD1</i>	Ligase	<i>IMPA1</i>	Phosphatase; hydrolase
<i>ESR1</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>HSD17B4</i>	Null
<i>AR</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>HDAC8</i>	Oxidoreductase; hydrolase; nucleic acid binding
<i>VDR</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>IMPA2</i>	Phosphatase; hydrolase
<i>SOD1</i>	Oxidoreductase	<i>INSR</i>	Null
<i>ESR2</i>	Transcription factor; receptor; nucleic acid binding	<i>POR</i>	Null
<i>HMOX1</i>	Oxidoreductase	<i>PPIB</i>	Isomerase
<i>IGF1R</i>	Null	<i>F2</i>	Protease; hydrolase
<i>MAPK14</i>	Transferase; kinase	<i>RBP4</i>	Transfer/carrier protein



**Figure 7** Antidepressant pathways of potential antidepressant targets from main active ingredients of Bupleuri radix

## 讨论

柴胡具有疏肝解郁作用, 是治疗郁证的要药, 以其为主要药物的复方在抑郁症治疗中占了绝大比例, 因此, 柴胡的抗抑郁机制的研究具有重要意义。

柴胡中的山奈酚、异鼠李素、槲皮素、柴胡皂苷 D、柴胡皂苷 A 及 8 个多炔成分均为已报道的具有抗抑郁作用的活性成分。其中柴胡皂苷 D 和 A 不稳定, 容易转化成柴胡皂苷 B1、B2。Liu 等<sup>[30]</sup>研究表明, 柴胡饮片经水煎煮后柴胡皂苷 B2 大幅度增加, 柴胡皂苷 A 和 D 逐渐减少, 本实验室<sup>[31]</sup>前期研究表明柴胡醋制后皂苷 A 和 D 的含量下降, B1 和 B2 的含量升高, 醋制后保肝作用优于生品, 肝肾毒性略低于生品, 提示可能是 B1、B2 发挥了作用, 因此, 在本研究中将柴胡皂苷 B1、B2 考虑在内。网络分析结果显示柴胡皂苷 B1、B2 连接的靶点数目分别为 13、10, 且与重要靶点的分子对接结果均大于 5, 提示柴胡皂苷 B1、B2 可能具有抗抑郁作用。

成分靶点网络显示了柴胡多成分、多靶点的抗抑郁作用特点。蛋白相互作用网络结果显示柴胡靶蛋白间存在着相互关系, 是一个复杂交互的网络而并非单独起作用。分子对接结果显示 15 个成分与重要靶蛋白之间存在较好的结合活性, 为后续的网络分析奠定了好的基础。

靶点 GO 分析和靶点归属分析结果表明, 柴胡治疗抑郁症涉及细胞过程、代谢过程和对应激的应答等生物过程, 涉及细胞器、细胞膜和细胞质等细胞组分, 涉及小分子、阳离子、金属离子等分子, 有信号分子、转录因子、受体、蛋白和酶等多种物质的参与, 是一个复杂的过程。靶点通路分析结果显示, 柴胡抗抑郁的靶点主要涉及 PI3K-AKT、MAPK、Rap1、Ras、FoxO 和 neurotrophin 等信号通路。

神经营养因子 (NTF) 是一类由神经支配的组织和星形胶质细胞产生的对中枢和外周神经系统均有营养活性的蛋白, 在抑郁症的发病中也发挥了重要作用, 其中 BDNF 的研究较多<sup>[32]</sup>。通路图中显示, 柴胡通过影响神经营养因子 (BDNF、NGF 和 NT3/4) 的受体发挥作用。

PI3K-AKT 信号通路广泛存在于细胞中, 是介导多种生长因子促存活的重要通路<sup>[33]</sup>, 该通路在抑郁症的发生中, 为一个连接神经递质和抑郁症状的重要纽带。通路图中显示 PI3K-AKT 通路 with Rap1、Ras、FoxO、neurotrophin 通路均有关联, 提示该通路在柴胡发挥抗抑郁过程中发挥纽带作用。MAPK 信号转

导通路存在于大多数细胞内, 在细胞增殖、分化、转化及凋亡等过程中具有重要的作用<sup>[34]</sup>, 其中 ERK1/2 通路 with 抑郁症关系最为密切。在通路图中已显示柴胡对 ERK 的作用。Ras 基因编码一种膜结合型的 GTP/GDP 结合蛋白, 在进化中相当保守, 广泛存在于各种真核生物, 具有重要的生理功能。Ras 相关信号通路功能异常与抗抑郁治疗、抑郁状态、神经可塑性及神经营养因子均有很强的相关性, 在细胞内信号通路调节中起着至关重要的作用<sup>[35]</sup>。Rap 属于 Ras 家族, 含有 Rap1 和 Rap2 两个亚类。通路图中显示, Ras 和 Rap1 通路 with PI3K-AKT、MAPK、FoxO、neurotrophin 信号通路均有关联。提示 Ras 和 Rap1 通路在柴胡抗抑郁过程中发挥纽带作用。FoxO 家族是 Fox 基因家族中的一个亚族, 为细胞核内一种转录因子, 参与调节细胞增殖、分化和凋亡等过程<sup>[36]</sup>。5-羟色胺可通过影响 FoxO3a 的活化调节应激状态<sup>[37]</sup>, FoxO3a 基因缺陷型小鼠表现出抑郁样行为<sup>[38]</sup>, 表明 FoxO3a 与抑郁症有紧密关联。靶点通路分析图中显示, 柴胡可作用于 FoxO 相关的受体/蛋白发挥作用。

综上所述, 网络药理结果显示柴胡的 15 个活性成分作用于 50 个靶点, 涉及多种过程、分子和通路, 体现了柴胡多成分-多靶点-多途径的作用特点, 上述结果与文献报道基本一致。本文通过蛋白相互作用网络预测了柴胡抗抑郁作用的 5 个重要靶蛋白, 并对其进行了分子对接验证, 一方面从某种程度上验证了 DRAR-CPI 预测靶点的可靠性, 另一方面为后续进一步验证奠定了基础。此外, 本文还对作用靶点的位置进行了归属, 并绘制通路图, 提示 PI3K-AKT 信号通路、Ras 和 Rap1 通路的枢纽作用, 对柴胡抗抑郁的机制进一步研究提供了方向, 相关的靶点验证实验正在进行中。

## References

- [1] Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387: 2383–2401.
- [2] Ferrari AJ, Stockings E, Khoo JP, et al. The prevalence and burden of bipolar disorder: findings from the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Bipolar Disord*, 2016, 18: 440–450.
- [3] Thompson SM, Kallarackal AJ, Kvarita MD, et al. An excitatory synapse hypothesis of depression [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38: 279–294.

- [4] Marie NG, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2014, 384: 766–781
- [5] Aleman A, Denys D. A road map for suicide research and prevention [J]. *Nature*, 2014, 509: 421–423.
- [6] Zhang Y, Chen YX, Huang SJ. Research status of radix Bupleuri and radix Bupleuri compounds in antidepressant [J]. *World J Integr Tradit West Med (世界中西医结合杂志)*, 2014, 9: 985–988.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. 2015ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 280.
- [8] Li X, Gong WX, Zhou YZ, et al. Research progress on antidepressive active ingredients of Xiaoyaosan and their mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 3109–3116.
- [9] Tian W, Zhen YQ, Cao WL, et al. Simultaneous determination of saikosaponin a,b1,b2 and c in radix Bupleuri formula granules by HPLC-MS/MS [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2016, 51: 2068–2071.
- [10] Jiang H, Li J, Shi RB, et al. Influence of processing on four saikosaponins in radix Bupleuri [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2009, 44: 1618–1621.
- [11] Paulke A, Nöldner M, Schubert-Zsilavecz M, et al. St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses [J]. *Die Pharmazie*, 2008, 63: 296–302.
- [12] Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11: 298–344.
- [13] Chen QY, Gan X. The protective effect of quercetin on the cultured PC12 cells lesioned by corticosterone [J]. *Chem Bioeng (化学与生物工程)*, 2009, 26: 47–49.
- [14] Fang Y, Zhang F, Liu JL, et al. Isolation and quantitative determination of polyacetylenes in Bupleuri radix [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 2365–2370.
- [15] Fang Y. Studies on the Chemical Constituents and Anti-depression Activity of the Petroleum Ether Fraction of Radix [D]. Taiyuan: Shanxi Univ, 2016.
- [16] Liu JL, Fang Y, Yang L, et al. A qualitative, and quantitative determination and pharmacokinetic study of four polyacetylenes from radix Bupleuri by UPLC-PDA-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111: 257–265.
- [17] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 682–690.
- [18] Liu AL, Du GH. Network pharmacology: new guidelines for drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1472–1477.
- [19] Wang YH, Yang L. Systems pharmacology-based research framework of traditional Chinese medicine [J]. *World Chin Med (世界中医药)*, 2013, 8: 801–808.
- [20] Ding F, Tan A, Ju W, et al. The prediction of key cytoskeleton components involved in glomerular diseases based on a protein-protein interaction network [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0156024.
- [21] Zhang Y, Mao X, Guo Q, et al. Pathway of PPAR- $\gamma$  coactivators in thermogenesis: a pivotal traditional Chinese medicine-associated target for individualized treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 15885.
- [22] Chen JL, Gao Y, Qin XM, et al. Anti-depression mechanism of supercritical CO<sub>2</sub> extract from Compound Chaigui Fang based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 388–395.
- [23] Zhang X, Gao Y, Xiang H, et al. An exploration on mechanism of antidepressant of Jiaotai Pills based on network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 1584–1590.
- [24] Sun LM, Liu LF, Zhu HX, et al. Network pharmacology-based study on intervention mechanism of Huanglian Jiedu decoction in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1268–1275.
- [25] Luo H, Chen J, Shi L, et al. DRAR-CPI: a server for identifying drug repositioning potential and adverse drug reactions via the chemical-protein interactome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: W492–W498.
- [26] Von Mering C, Jensen LJ, Snel B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D433–D437.
- [27] Hsin KY, Matsuoka Y, Asai Y, et al. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: W507–W513.
- [28] Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4: R60.
- [29] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83922.
- [30] Liu SQ, Wang SL, Gao XL, et al. Variation of saponins in radix Bupleuri during decoction process [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm (中药新药与临床药理)*, 2013, 24: 602–

- 606.
- [31] Sun HM. Chemical and Pharmacological Comparison of Raw and Vinegar-baked Radix Bupleuri [D]. Taiyuan: Shanxi Univ (山西大学), 2015.
- [32] Li XM, Xu SX, Zhou ZQ, et al. Effects of neurotrophic factors in depression [J]. *Pharm Clin Res (药学与临床研究)*, 2012, 20: 52–55.
- [33] Yu ZH, Cai M, Xiang J, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neuroprotective effect of Tongxinluo against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 181: 8–19.
- [34] Shen C, Tsimberg Y, Salvatore C, et al. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions [J]. *BMC Neurosci*, 2004, 5: 36.
- [35] Wang F, Zhang C, Fang YR. Ras signaling pathway and neural plasticity mechanism of depression [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci (上海交通大学学报 (医学版))*, 2015, 35: 1556–1559.
- [36] Wang H, Quirion R, Little PJ, et al. Forkhead box O transcription factors as possible mediators in the development of major depression [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 99: 527–537.
- [37] Liang B, Moussaif M, Kuan CJ, et al. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses [J]. *Cell Metab*, 2006, 4: 429–440.
- [38] Polter A, Yang S, Zmijewska AA, et al. Forkhead box, class O transcription factors in brain: regulation and behavioral manifestation [J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65: 150–159.