

基于网络药理学研究豆腐果苷抗抑郁作用机制

蒋臻熠¹, 张远¹, 李泽朋¹, 张晓彤¹, 张袁祥¹, 童九翠²

摘要 目的 基于网络药理学和分子对接技术筛选豆腐果苷干预抑郁症的作用靶点, 研究豆腐果苷对慢性不可预知温和应激(CUMS)大鼠海马、前额叶皮质、纹状体及缰核中相关靶点表达水平的影响。方法 通过 SwissTargetPrediction 数据库预测豆腐果苷的作用靶点, 利用 GeneCards、DisGeNet、TTD、DRUGBANK 数据库筛选抑郁症相关靶点, 取两者交集靶点; 使用 Metascape 平台进行基因富集分析, 并构建“豆腐果苷-抑郁症-通路”网络; 采用 AutoDock vina 进行分子对接研究; qRT-PCR 检测豆腐果苷对大鼠各组织中 5-羟色胺 1A 受体(HTR1A)、腺苷 A1 受体(ADORA1)、腺苷 A2A 受体(ADORA2A) mRNA 表达水平的影响。结果 获得豆腐果苷靶点 81 个, 抑郁症靶点 1 640 个, 两者交集靶点共 40 个; 交集靶点主要被富集于环磷酸腺苷(cAMP)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路; 分子对接结果显示豆腐果苷与大部分靶点的结合活性较好; 豆腐果苷上调 CUMS 大鼠海马、前额叶皮质、纹状体及缰核中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 的表达水平。结论 豆腐果苷可能通过 HTR1A、ADORA1、ADORA2A 等靶点, 作用于 cAMP、PI3K-Akt、MAPK 等信号通路干预抑郁症。

关键词 豆腐果苷; 抑郁症; 网络药理学; 药物靶点

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1896-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.009

抑郁症是一种严重危害人类身心健康的常见精神类疾病, 具有高患病率、易复发和高自杀率等特点。据统计, 全球约有 3.1% 的人罹患重度抑郁症^[1]。在中国, 抑郁症一直是致残的第 2 大原因, 其终生患病率约为 3.4%^[2]。

豆腐果苷(helicid, HEL)是从山龙眼科植物萝

卜树的果实中提取的有效单体成分, 临床上应用于神经衰弱、头痛、失眠等症状的治疗^[3]。课题组前期研究^[4]表明豆腐果苷可明显改善慢性不可预知温和应激(CUMS)大鼠的抑郁样行为, 其功能包括抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度亢进、下调炎症因子的水平和增加脑源性神经营养因子的表达。该研究基于网络药理学与分子对接技术, 筛选豆腐果苷的抗抑郁作用靶点, 并进行初步验证, 旨在为豆腐果苷的后续研究提供新方向。

1 材料与方法

1.1 动物组织 大鼠海马、前额叶皮质、纹状体及缰核等组织均来自该课题组前期建立的 CUMS 模型大鼠, 分组为正常组(Control 组)、慢性不可预测温和应激组(CUMS 组)、慢性不可预测温和应激+豆腐果苷组(CUMS+HEL 组)。

1.2 豆腐果苷相关靶点筛选 通过 PubChem 数据库获得豆腐果苷 2D 与 3D 结构的 SDF 格式文件, 将 SDF 格式文件导入 SwissTargetPrediction 网站, 设置属性为“Homo sapiens”进行靶点预测, 获取豆腐果苷的相关靶点, 并查阅相关文献补充豆腐果苷已得到验证的靶点。筛选结束后, 使用 Uniprot 数据库将豆腐果苷的作用靶点进行规范。豆腐果苷 2D 与 3D 结构见图 1。

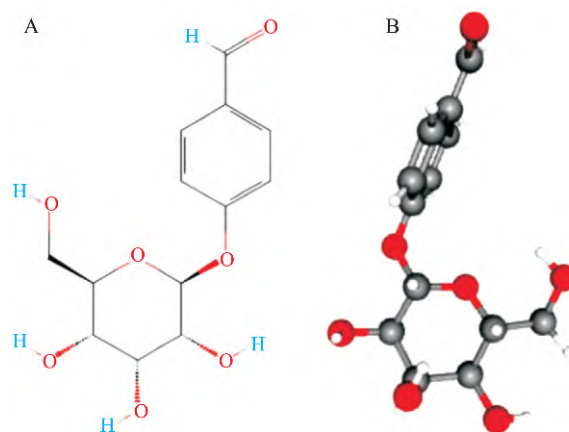


图 1 豆腐果苷化学结构

A: 豆腐果苷 2D 结构; B: 豆腐果苷 3D 结构

2022-09-07 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH290); 安徽省教育厅自然重点项目(编号: KJ2021A0858); 弋矶山医院引进人才科研基金(编号: YR202113); 皖南医学院教学质量与教学改革工程项目(编号: 2020kcbz12)

作者单位: ¹皖南医学院研究生学院, 芜湖 241002

²皖南医学院弋矶山医院临床药学部, 芜湖 241001

作者简介: 蒋臻熠, 男, 硕士研究生;

童九翠, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: tongjiucui@wnmc.edu.cn

1.3 抑郁症相关靶点筛选 以“depression”为关键词,通过 GeneCards 数据库、DisGeNet 数据库及 TTD 数据库搜集与抑郁症相关的靶点,并通过 DRUGBANK 数据库寻找临床一线抗抑郁药的作用靶点予以补充。汇总上述数据库所获取的靶点,并删除重复值,得到抑郁症的相关靶点。

1.4 豆腐果苷 - 抑郁症靶点 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 将交集靶点提交至 Metascape 平台,设置 $P < 0.01$ 进行 GO 和 KEGG 富集分析,保存数据结果并对其进行可视化分析。同时将药物、靶点、通路信息导入 Cytoscape3.8.2 软件,构建豆腐果苷 - 抑郁症 - 通路网络图。

1.5 分子对接验证 通过 PDB 数据库下载靶蛋白的三维晶体结构,并以 pdb 格式进行保存。采用 PyMol 软件对靶蛋白三维结构进行去水、加氢、分离配体等处理,并导入 AutoDock Tools 软件保存为 pd-bqt 格式文件。同时对豆腐果苷 3D 结构进行能量最小化处理,并保存为 pdbqt 格式文件。采用 AutoDock vina 进行豆腐果苷与靶蛋白的模拟对接,选取自由结合能最低的结合构象,使用 PyMol 软件进行可视化处理。

1.6 qRT-PCR 检测海马、前额叶皮质、纹状体、缰核中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达

从各组织中提取总 RNA 逆转录为 cDNA,而后进行 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理,并采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
HTR1A	F: ACGTGACCTTCAGCTACCAA R: AGCACCAGCACTGATACCAT
ADORA1	F: CCACCTTCTGCTTCATCGTG R: GGAGGTATCGATCCACAGCA
ADORA2A	F: CCTTCGCTATCACCATCAGC R: CAAGCCATTGTACCGGAGTG
GAPDH	F: GAACGGGAAGCTCACTGG R: GCCTGCTTCACCACCTTC

2 结果

2.1 豆腐果苷与抑郁症交集靶点的获取 利用 SwissTargetPrediction 网站对豆腐果苷进行靶点预测,以 Probability > 0 为标准,得到 49 个靶点,并加入查阅文献所得靶点,共得到 81 个靶点。合并从 Genecards、DisGeNet、TTD 和 DRUGBANK 数据库中获得的靶点,删除重复值,最终得到 1 640 个抑郁症相关靶点。取豆腐果苷 - 抑郁症靶点交集,得到交集靶点 40 个,并绘制韦恩图,见图 2。

2.2 GO、KEGG 富集分析 应用 Metascape 数据库对豆腐果苷干预抑郁症相关靶点进行基因富集分析,并借助 bioinformatics 平台对结果进行可视化处理。豆腐果苷主要参与的生物学进程包括化学突触传递 (chemical synaptic transmission)、跨突触信号 (trans-synaptic signaling)、突触信号 (synaptic signaling)、行为 (behavior)、分泌调节 (regulation of secretion); 豆腐果苷干预抑郁症的功能主要富集于 G 蛋白偶联腺苷受体活性 (G protein-coupled adenosine receptor activity)、受体配体活性 (receptor ligand activity)、信号受体激活剂活性 (signaling receptor activator activity)、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活

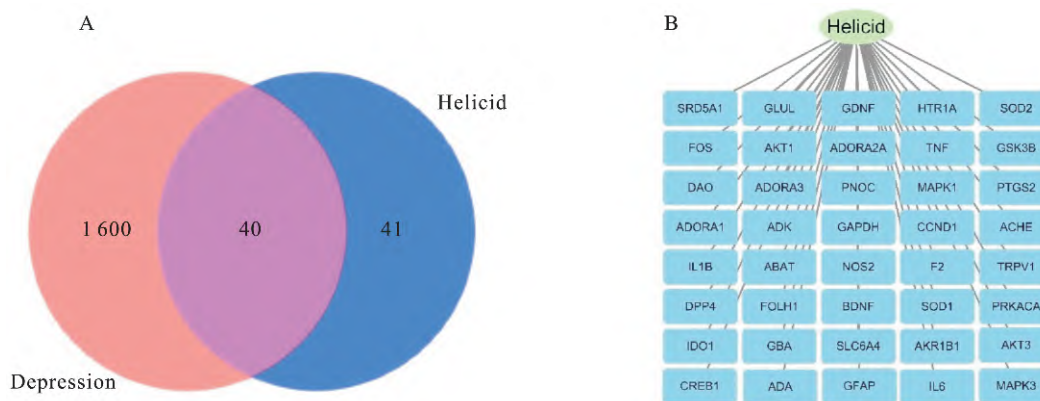


图 2 豆腐果苷治疗抑郁症潜在靶点

A: 豆腐果苷 - 抑郁症交集靶点韦恩图; B: 豆腐果苷 - 抑郁症交集靶点

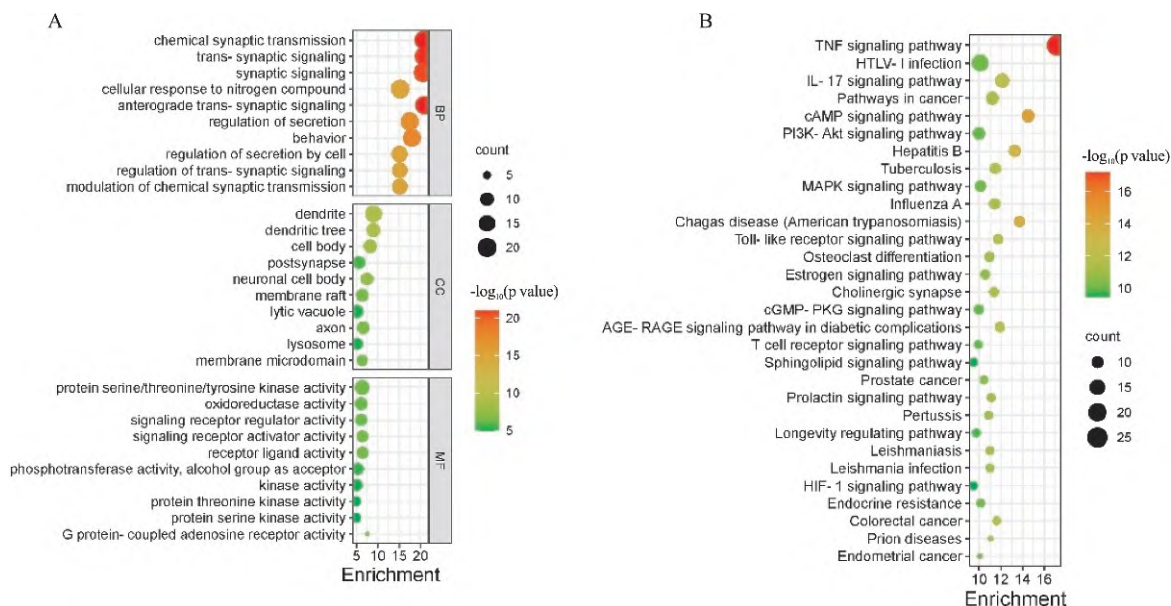


图3 豆腐果苷治疗抑郁症潜在靶点基因富集分析
A: GO 富集分析; B: KEGG 富集分析

性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)。见图 3A。

图 3B 为 KEGG 通路分析结果 图中显示了豆腐果苷干预抑郁症排名前 30 的信号通路 关键通路包括 cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway) 等与抑郁症相关的经典通路。

2.3 豆腐果苷 - 抑郁症 - 通路网络的构建 选取 KEGG 分析中排名前 10 的信号通路 见表 2 并运用

CytoScape3. 8. 2 软件构建豆腐果苷 - 抑郁症 - 通路网络 见图 4。

2.4 分子对接验证 依据经验 结合能 < - 4. 25 kcal/mol 者有一定的结合活性 而 < - 5. 0 kcal/mol 则有较好的结合活性。分子对接结果显示豆腐果苷与所有靶点的结合能均 < - 4. 25 kcal/mol 其中结合能排名前 15 的靶点见表 3。豆腐果苷与 HTR1A、ADORA1、ADORA2A 的分子对接结果见图 5。

2.5 大鼠海马、前额叶皮质、纹状体、缰核中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达 与正

表 2 KEGG 分析中排名前 10 信号通路的富集结果

GO	描述	P 值	数量	基因名称
hsa04668	TNF signaling pathway	6. 75E-18	26	AKT1 ,CREB1 ,FOS ,GDNF ,IL1B ,IL6 ,MAPK1 ,MAPK3 ,PTGS2 ,TNF ,AKT3 ,ADORA1 ,ADORA2A ,BDNF ,HTR1A ,PRKACA ,NOS2 ,CCND1 ,GSK3B ,ACHE ,ADORA3 ,GAPDH SOD2 SLC6A4 F2 ,GLUL
hsa05166	HTLV-1 infection	7. 88E-11	17	AKT1 ,CCND1 ,CREB1 ,FOS ,GSK3B ,IL6 ,PRKACA ,TNF ,AKT3 ,GDNF ,SOD1 ,SOD2 ,IL1B ,PTGS2 ,ADORA1 ,NOS2 ,GFAP
hsa04657	IL-17 signaling pathway	7. 34E-13	13	FOS ,GSK3B ,IL1B ,IL6 ,MAPK1 ,MAPK3 ,PTGS2 ,TNF ,PRKACA ,SOD1 ,NOS2 ,GAPDH ,IDO1
hsa05200	Pathways in cancer	5. 78E-12	11	AKT1 ,CCND1 ,FOS ,GSK3B ,IL6 ,NOS2 ,PRKACA ,MAPK1 ,MAPK3 ,PTGS2 ,AKT3
hsa04024	cAMP signaling pathway	3. 04E-15	11	ADORA1 ,ADORA2A ,AKT1 ,BDNF ,CREB1 ,FOS ,HTR1A ,PRKACA ,MAPK1 ,MAPK3 ,AKT3
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	1. 05E-10	10	AKT1 ,CCND1 ,BDNF ,CREB1 ,GDNF ,GSK3B ,IL6 ,MAPK1 ,MAPK3 ,AKT3
hsa05161	Hepatitis B	5. 36E-14	10	AKT1 ,CCND1 ,CREB1 ,FOS ,GDNF ,IL6 ,MAPK1 ,MAPK3 ,TNF ,AKT3
hsa05152	Tuberculosis	3. 19E-12	9	AKT1 ,CREB1 ,IL1B ,IL6 ,NOS2 ,MAPK1 ,MAPK3 ,TNF ,AKT3
hsa04010	MAPK signaling pathway	7. 61E-11	9	AKT1 ,BDNF ,FOS ,IL1B ,PRKACA ,MAPK1 ,MAPK3 ,TNF ,AKT3
hsa05164	Influenza A	3. 71E-12	9	AKT1 ,GDNF ,GSK3B ,IL1B ,IL6 ,MAPK1 ,MAPK3 ,TNF ,AKT3

表3 分子对接中结合能排名前15的靶点

基因名称	PDB ID	蛋白名称	亲和力 (kcal/mol)
NOS2	3E7G	Nitric oxide synthase, inducible	-8.2
FOLH1	5O5T	Glutamate carboxypeptidase 2	-8.1
PTGS2	5F19	Prostaglandin G/H synthase 2	-8.0
GBA	6TN1	Lysosomal acid glucosylceramidase	-7.9
SRD5A1	7C83	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	-7.8
ACHE	6O5V	Acetylcholinesterase	-7.7
AKR1B1	6Y1P	Aldo-keto reductase family 1 member B1	-7.5
AKT1	7NH5	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	-7.4
GLUL	2OJW	Glutamine synthetase	-7.3
HTR1A	7E2Y	5-hydroxytryptamine receptor 1A	-7.3
GSK3B	6Y9S	Glycogen synthase kinase-3 beta	-7.1
ADK	4O1L	Adenosine kinase	-6.9
ADORA2A	5NM4	Adenosine receptor A2a	-6.9
ADORA1	5UEN	Adenosine receptor A1	-6.8
F2	3K65	Prothrombin	-6.8

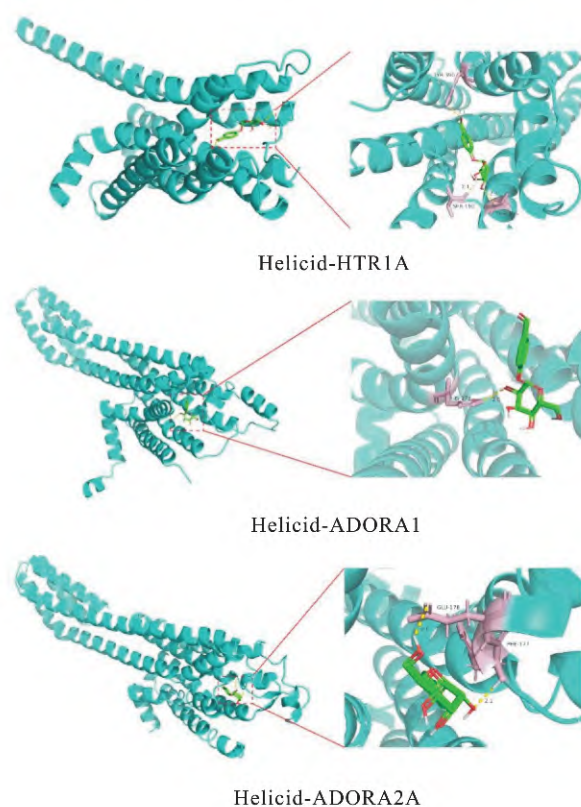


图5 分子对接结果

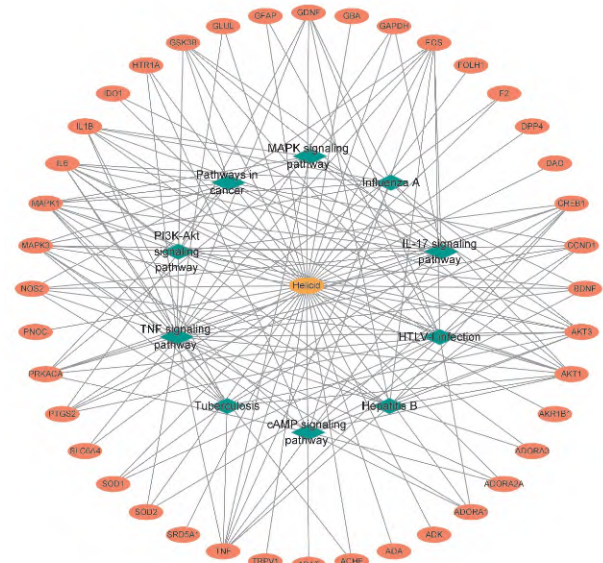


图4 豆腐果苷-抑郁症-通路网络图

常组相比, CUMS 组各组织中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达均下调, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 CUMS 组相比, CUMS + HEL 组各组织中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达均上调, 且除纹状体中 ADORA1、ADORA2A 外差异均有统计学意义。qRT-PCR 结果见图 6。

3 讨论

该研究通过网络药理学方法筛选豆腐果苷与抑郁症的相关靶点, 使用分子对接技术探究豆腐果苷与相关靶点的结合能力, 并进行初步验证。GO 富集分析结果显示, 豆腐果苷的功能富集于 G 蛋白偶

联腺苷受体活性、受体配体活性以及信号受体激动剂活性。豆腐果苷的脂溶性较低, 难以通过细胞膜, 因此推测豆腐果苷的主要作用靶点为膜受体^[5]。对豆腐果苷干预抑郁症相关靶点进行 KEGG 富集分析, 结果包括 cAMP、PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路等与抑郁症相关的经典通路, 这与课题组前期研究^[6] 成果高度一致。即豆腐果苷可通过 cAMP/PKA/CREB、ERK/CREB 和 Akt 信号通路刺激海马神经元的增殖、抑制海马神经炎症, 从而改善 CUMS 模型大鼠的抑郁样行为。cAMP 信号通路是最早发现的抑郁症相关通路, 研究^[7] 显示, 其激活可明显改善抑郁小鼠的抑郁样行为。PI3K-Akt 信号通路参与细胞生长、分化、增殖和凋亡的调控, 部分抗抑郁药可通过激活 PI3K-Akt 信号通路发挥抗抑郁作用^[8]。MAPK 信号通路与细胞生长、炎症、凋亡有关, 其中 ERK1/2 通路能够介导神经营养因子、生长因子发挥抗抑郁作用^[9]。

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 是人体内分布最广的细胞膜受体, 数据显示, GPCRs 约占美国食品药品监督管理局批准药物靶点中的 35%^[10]。GPCRs 与抗抑郁治疗密切相

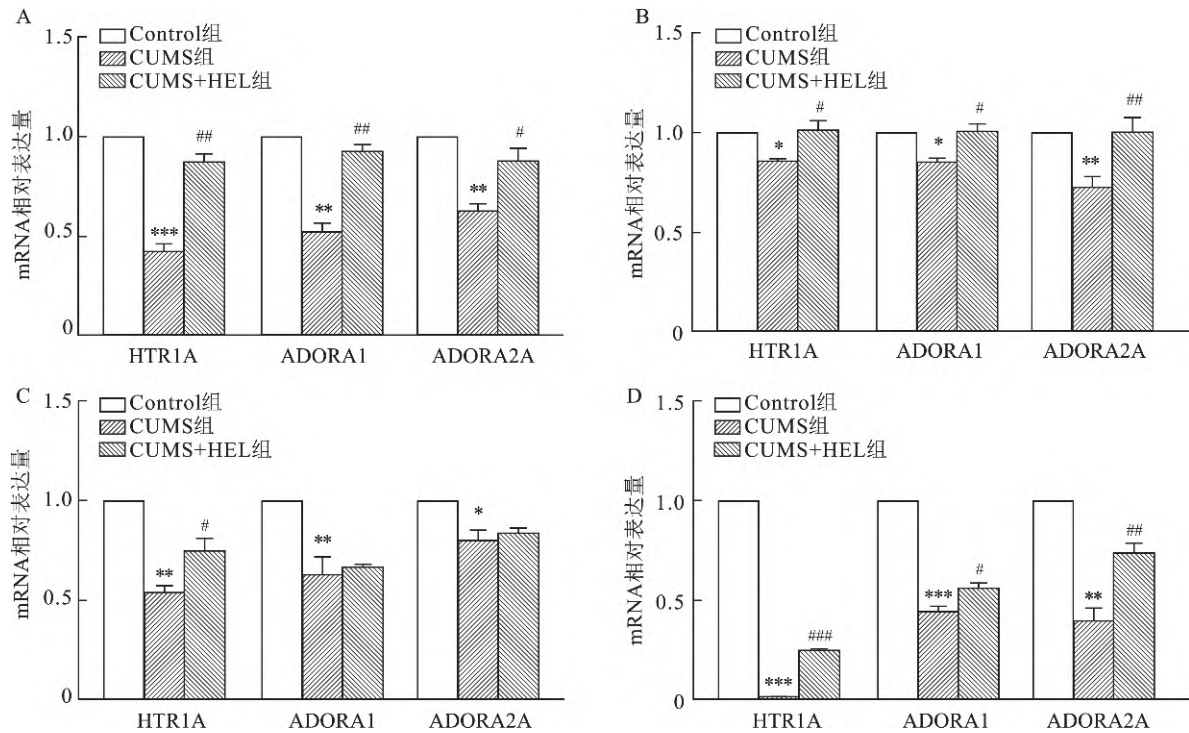


图6 各组织中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达

A: 海马; B: 前额叶皮质; C: 纹状体; D: 缰核; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 CUMS 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

关 在抑郁症中参与的信号通路主要包括 cAMP、MAPK、PI3K-Akt 和 JAK-STAT 信号通路^[11]。据此，该课题组推测豆腐果苷主要作用于 GPCRs 发挥抗抑郁作用。根据网络药理学及分子对接的研究结果，该实验筛选出 HTR1A、ADORA1、ADORA2A 这 3 个 G 蛋白偶联受体进行初步验证。HTR1A 即 5-HT1A 受体，根据其定位分为突触前自受体和突触后异受体。5-HT1A 自受体主要位于中脑中缝核内 5-HT 能神经元的树突和胞体上，对 5-HT 能系统具有负反馈调节作用，其激活可抑制 5-HT 的释放；5-HT1A 异受体广泛分布于海马、前额叶皮质和杏仁核等脑组织，是治疗抑郁症的经典靶点，抗抑郁药激活 5-HT1A 受体后可明显改善抑郁行为^[12-13]。ADORA1、ADORA2A 即腺苷 A1、A2A 受体。A1 受体被激活时，可减少 Ca^{2+} 内流，抑制谷氨酸释放，并促进 K^+ 的外流，产生神经保护作用^[14]。A2A 受体可促进 cAMP 的合成，据文献^[15]报道，A2A 受体激动剂可上调大鼠原代皮层神经元中 BDNF 的表达，发挥神经保护作用。豆腐果苷可上调 CUMS 大鼠海马、前额叶皮质、纹状体、缰核中 HTR1A、ADORA1、ADORA2A mRNA 表达水平，可能介导 5-HT1A 受体、腺苷 A1 受体和腺苷 A2A 受体发挥抗抑郁作用。

综上所述，豆腐果苷可能通过 HTR1A、ADORA1、ADORA2A 等靶点，作用于 cAMP、PI3K-Akt、MAPK 等信号通路改善抑郁症。

参考文献

- [1] COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic [J]. Lancet, 2021, 398(10312): 1700-12.
- [2] Huang Y, Wang Y, Wang H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiatry, 2019, 6(3): 211-24.
- [3] 刘桂艳, 王钢力, 马双成, 等. 山龙眼属药用植物有效成分研究概况 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 593-5.
- [4] Tong J, Zhou Z, Qi W, et al. Antidepressant effect of helicid in chronic unpredictable mild stress model in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 13-21.
- [5] 陶云海, 刘俊华, 杨祥良. 豆腐果苷磷脂复合物的制备及理化性质研究 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(22): 1720-2, 1737.
- [6] 童九翠. 豆腐果苷抗抑郁作用的分子机制研究 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2019.
- [7] Li Y F, Huang Y, Amsdell S L, et al. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-

- mediated neurogenesis in the hippocampus [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(11): 2404–19.
- [8] Nazeem M, Wahdan S A, El-Naga R N, et al. Saxagliptin ameliorated the depressive-like behavior induced by chronic unpredictable mild stress in rats: impact on incretins and AKT/PI3K pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174602.
- [9] Sun Y, Liu W, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600–4.
- [10] Alexander S P, Christopoulos A, Davenport A P, et al. The concise guide to pharmacology 2021/22: G protein-coupled receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178 Suppl 1: S27–156.
- [11] Grammatopoulos D K. Regulation of G-protein coupled receptor signalling underpinning neurobiology of mood disorders and depression [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 449: 82–9.
- [12] 杨欣, 全睿, 王慧, 等. 微透析法研究 NG2 细胞功能变化对大鼠中缝核兴奋性和抑制性递质含量的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(6): 894–8.
- [13] Chilmonczyk Z, Bojarski A J, Pilc A, et al. Functional selectivity and antidepressant activity of serotonin 1A receptor ligands [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 18474–506.
- [14] Van Calker D, Biber K, Domschke K, et al. The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders [J]. *J Neurochem*, 2019, 151(1): 11–27.
- [15] Jeon S J, Rhee S Y, Ryu J H, et al. Activation of adenosine A2A receptor up-regulates BDNF expression in rat primary cortical neurons [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12): 2259–69.

Study on antidepressant mechanism of helicid based on network pharmacology

Jiang Zhenyi¹, Zhang Yuan¹, Li Zepeng¹, Zhang Xiaotong¹, Zhang Yuanxiang¹, Tong Jiucui²
(¹The Graduate School of Wannan Medical College, Wuhu 241002; ²Clinical Pharmacy Department of Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001)

Abstract Objective To screen the target of helicid in the intervention of depression based on network pharmacology and molecular docking, and to study the effect of helicid on the expression level of related targets in hippocampus, prefrontal cortex, striatum and habenular nucleus of chronic unpredictable mild stress (CUMS) rats. **Methods**

The target of helicid was predicted by SwissTargetPrediction database, and the depression related targets were screened by GeneCards, DisGeNet, TTD and DRUGBANK databases; the metasplice platform was used for gene enrichment analysis, and the "helicid-depression-pathway" network was constructed; Autodock Vina was used for molecular docking research; qRT-PCR was used to detect the effect of helicid on the mRNA expression of HTR1A, ADORA1 and ADORA2A in rat tissues. **Results** The 81 helicid targets and 1 640 depression targets were obtained, including 40 intersecting targets; the key targets were mainly enriched in cAMP signal pathway, PI3K-Akt signal pathway, MAPK signal pathway and so on; the results of molecular docking showed that the binding activity of helicid with most targets was good; helicid up-regulated the expression levels of HTR1A, ADORA1 and ADORA2A mRNA in hippocampus, prefrontal cortex, striatum and habenular nucleus of CUMS rats. **Conclusion**

Helicid may act on cAMP, PI3K-Akt, MAPK and other signal pathways to intervene depression through HTR1A, ADORA1 and ADORA2A.

Key words helicid; depression; network pharmacology; drug targets