

基于网络药理学及分子对接技术研究灵芝治疗抑郁症的活性成分及其作用机制

付裕^{1,2*}, 王冬梅^{3*}, 木本荣^{1,4#}, 吕美红^{1,4#}

¹成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都

²成都中医药大学药学院, 四川 成都

³成都中医药大学基础医学院, 四川 成都

⁴川渝共建感染性疾病中西医结合诊治重庆市重点实验室, 四川 成都

收稿日期: 2022年7月22日; 录用日期: 2022年8月18日; 发布日期: 2022年8月26日

摘要

目的: 基于网络药理学方法与分子对接技术对灵芝发挥抗抑郁作用的活性成分及其作用机制进行研究。
方法: 通过TCMSP、BATMAN-TCM数据库检索得到灵芝活性成分及相关靶点, 通过DisGeNET、GeneCards、OMIM、DrugBank、TTD数据库以获取抑郁症的相关靶点。利用Venny2.1.0在线软件取抑郁症与灵芝靶点的交集, 将共有靶点输入STRING在线分析平台得到灵芝与抑郁症蛋白质相互作用网络, 再导入Cytoscape3.8.0软件构建灵芝活性成分-灵芝与抑郁症共有靶点关系网络, 并进行模块化分析。利用DAVID6.8软件进行GO生物进程与KEGG通路富集分析, 并使用R Studio软件画出通路的气泡图。最后通过分子对接验证网络分析结果, 在已有数据中筛选灵芝抗抑郁作用的关键成分及靶点。
结果: 通过构建灵芝活性成分-灵芝与抑郁症共有靶点网络分析发现: 灵芝与抑郁症相关的活性成分有40种, 对应的基因靶点有210个, 为潜在的抗抑郁靶点。根据PPI网络可知: 灵芝发挥抗抑郁作用主要与INS、TNF、FOS、PPARG、IL1B、ESR1、JUN、SLC6A4、LEP、CASP3 10个靶点有关。麦角胺、灵芝醇D、富马酸、灵芝酸甲酯F、5,6-麦角淄醇、赤灵芝酸D2甲酯、灵芝酸C、甲基灵芝F、麦角固醇、灵芝萜酮三醇10种为主要的活性成分。通过GO功能富集得到细胞组成73个, 生物进程692个, 分子功能131个, KEGG通路分析获得76条。GO与KEGG通路主要富集于信号传导、质膜的组成部分、药物反应、细胞增殖的正调控、c-AMP信号通路、神经活性配体-受体相互作用, 提示灵芝可能通过以上多种通路达到治疗抑郁症的效果。分子对接结果提示麦角胺、灵芝醇D作为灵芝潜在的活性成分, 与靶点FOS均有良好的结合力。
结论: 根据本次研究结果推测灵芝治疗抑郁症主要与其活性成分麦角胺、灵芝醇D有关。并且, 首次将灵芝发挥抗抑郁作用与麦角胺、灵芝醇D和FOS的良好结合能力联系起来, 预测麦角胺可作用于FOS以调节单胺类神经递质假说5-HT而发挥作用, 灵芝醇D可作用于FOS以调控胆碱能肾上腺素能功能平衡失调而发挥作用。

关键词

灵芝, 抑郁症, 麦角胺, 灵芝醇D, FOS, 网络药理学, 分子对接

*第一作者。

#通讯作者。

Study on the Active Components and Mechanism of *Ganoderma* in the Treatment of Depression Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

Yu Fu^{1,2*}, Dongmei Wang^{3*}, Benrong Mu^{1,4##}, Meihong Lv^{1,4##}

¹College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

²College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

³School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

⁴Chongqing Key Laboratory of Sichuan-Chongqing Co-Construction for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu Sichuan

Received: Jul. 22nd, 2022; accepted: Aug. 18th, 2022; published: Aug. 26th, 2022

Abstract

Objective: To study the antidepressant active components of *Ganoderma* and their mechanism based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods:** the active ingredients and related targets of *Ganoderma* were retrieved from TCMSP and BATMAN-TCM databases, and the related targets of depression were obtained from DisGeNET, GeneCards, OMIM, DrugBank and TTD databases. Take the intersection of depression and *Ganoderma* targets by using Venny2.1.0 online software, input the common targets into STRING online analysis platform to obtain the protein interaction network between *Ganoderma* and depression, and then import Cytoscape3.8.0 software to construct the *Ganoderma* and depression common target network, and conduct modular analysis. DAVID6.8 software is used for GO and KEGG pathway enrichment analysis, and R Studio software is used to draw the bubble diagram of the pathway. Finally, the results of network analysis were verified by molecular docking, and the key components and targets of *Ganoderma* anti depression were screened from the existing data. **Results:** through the construction of *Ganoderma* active components-*Ganoderma* and depression common target network analysis, it was found that there were 40 *Ganoderma* and depression related active components, corresponding to 210 gene targets, which were potential anti depression targets. According to PPI network, the antidepressant effect of *Ganoderma* is mainly related to 10 targets: INS, TNF, FOS, PPARG, IL1B, ESR1, JUN, SLC6A4, LEP and CASP3. Ergotamine, Fumaric Acid, Ganoderiol D, Methyl Ganoderate F, Methyl Lucidenate D2, Methyl Lucidenate F, Ganoderic Acid C, Ganodermanontriol, 5,6-Dihydroergosterol, Ergosterol are the main active ingredients. 73 cell components, 692 biological processes and 131 molecular functions were obtained by GO functional enrichment, and 76 KEGG pathways were obtained by KEGG pathway analysis. GO and KEGG pathways are mainly concentrated in signal transduction, components of plasma membrane, drug response, positive regulation of cell proliferation, c-AMP signal pathway, and neuroactive ligand receptor interaction, suggesting that *Ganoderma* may achieve the effect of treating depression through the above multiple pathways. The results of molecular docking showed that Ergotamine, Ganoderiol D, as potential active components of *Ganoderma*, had good binding ability with the target FOS. **Conclusion:** according to the results of this study, it is speculated that the treatment of depression by *Ganoderma* is mainly related to Ergotamine and Ganoderiol D. Moreover, for the first time, the antidepressant effect of

***Ganoderma* was linked with the good binding ability of Ergotamine, Ganoderiol D and FOS. It was predicted that Ergotamine could act on FOS to regulate the monoamine neurotransmitter hypothesis 5-HT, and Ganoderiol D could act on FOS to regulate the imbalance of cholinergic and adrenergic functions.**

Keywords

Lucidum, Depression, Ergotamine, Ganoderiol D, FOS, Network Pharmacology, Molecular Docking

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

抑郁障碍即抑郁症是一种精神类疾病, 现已在世界各国之中广泛存在[1]。抑郁症患者的心境相对低落, 其认知功能下降、睡眠功能障碍和明显的躯体症状表现明显[2]。据世界卫生组织调查发现, 世界各国抑郁症患者总和近 3.22 亿之多, 在世界人口占比达 4.4%, 并且有着相当高的致残率[3]。抑郁症的发病是多因素、多途径、多机制所导致的。其中, 受广大学者支持的莫过于神经内分泌学说, 该学说认为抑郁症的发生与下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis, HPA 轴)的过度激活有关, 而致抑郁的关键则与下丘脑过度分泌促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin Releasing Hormone, CRH)密不可分[4]。氟西汀作为目前临床治疗抑郁症的常用药物, 在起效速度、副作用、耐药性、复发率方面的治疗弊端越发显著[4]。中医药独具特色的理论体系来自于日积月累的实践经验, 其多样的治疗手段以及显著的临床效果在现代医学进程中有着得天独厚的影响作用[5]。因此, 从中医药角度探索抑郁症发病的新机制, 寻找中药抗抑郁的新途径, 开发抗抑郁症的新药物是极其重要且必要的。

灵芝从古至今一直是中华民族医药宝库中珍贵的药食同源真菌, 属担子菌纲多孔菌科[6]。具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗菌、提高免疫力、保肝多种药理作用, 在临床治疗中被广泛使用[7]。灵芝的主要有效成分是灵芝三萜、多肽、灵芝多糖[8]。

网络药理学通过构建药物 - 基因 - 靶点 - 疾病相互作用网络, 从系统和整体层面上揭示了药物分子作用机制、药物与治疗对象之间相互作用规律, 这与中药具有多成分、多靶点、整体性的特点不谋而合[9]。基于网络药理学方法不仅可以挖掘中药潜在活性物质, 筛选药物与疾病作用靶点, 揭示药物作用于疾病途径, 还可以探索中药毒性作用机制、解析药物组合和方剂配伍规律, 有助于推动中医药现代化进程[10]。

因此, 本文基于网络药理学方法加以分子对接技术对灵芝治疗抑郁症的作用机制进行研究, 以期找到灵芝抗抑郁作用的活性成分, 以及相关成分在人体中发挥抗抑郁作用的具体机制, 为临床治疗抑郁症的研究另辟新方向, 扩展新途径。

2. 方法

2.1. 中药灵芝活性成分的获取与筛选

灵芝的活性成分和靶点通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmssp.php>)、中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)获取。并设置吸收、分布、代谢、排泄(Absorb Distribution Metabolize Excretion, ADME)药代动力学参数: 口服生物利用度

(Oral Bioavailability, OB) \geq 30%, 类药性(Drug Likeness, DL) \geq 0.18 对来源于 TCMSP 的活性成分进行筛选, 然后在蛋白质数据库 Uniport 中转化为基因靶点。设置物种来源为“Human”, 并选择 Reviewed、Swiss-Port 基因。

2.2. 疾病抑郁症相关靶点信息

抑郁症的靶点信息通过 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.com/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM (<https://omim.org/>)数据库检索得到, 并设置 Score 值 \geq 20 对来自 DisGeNET 和 GeneCards 数据库中的靶点进行筛选, DrugBank 数据库中得到的蛋白基因需要在 Uniport 数据库中转化为基因靶点。

2.3. 灵芝 - 活性成分 - 靶点 - 抑郁症网络构建

先将灵芝全部靶点与抑郁症相关靶点输入 Venny2.1.0 网络在线平台, 绘制韦恩图, 得到灵芝和抑郁症共有靶点信息。然后将灵芝与抑郁症的共有靶点与灵芝活性成分呈映射关系相互对应, 通过 Cytoscape3.8.0 软件以构建灵芝活性成分 - 灵芝与抑郁症共有靶点关系网络。

2.4. 蛋白质相互作用网络(PPI)的构建

在已有灵芝与抑郁症共有靶点的基础上, 通过 STRING 在线分析平台得到蛋白网络互作图(Protein Protein Interaction, PPI)。除部分参数为默认值外, 将选择 Multiple proteins 栏物种设置为“Homo Sapiens”, 阈值设置为中等置信度 medium confidence = 0.400, 并隐藏单个节点。通过 Cytoscape3.8.0 软件对 PPI 进行处理, 利用“Network Analysis”功能对网络拓扑属性分析, 根据其节度值(Degree)筛选重要的网络拓扑参数获得灵芝靶点与抑郁症的关系, 再利用 MCODE 插件进行模块化分析, 并选取排名前 4 的模块进行分析, 从而得到药物治疗疾病的可能作用机理。

2.5. GO 富集分析和 KEGG 通路分析

通过 DAVID6.8 在线分析平台(<https://david.ncifcrf.gov/>)对药物与疾病共同靶点进行基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析, 得到生物过程(Biological Process, BP)、细胞组成(Cellular Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)以及 KEGG 通路分析气泡图。

2.6. 分子对接验证灵芝活性成分与关键靶点结合活性

分子对接技术是通过模拟配体与受体之间氢键、疏水、范德华等作用, 预测蛋白质之间、小分子与蛋白质之间的结合方式以及亲和能力, 从而虚拟地筛选药物的靶点及药物的潜在活性成分[11]。在 TCMSP 数据库中得到所需的化学成分, 并通过 RCSB PDB 数据库获取蛋白质结构, 再利用 PyMol2 软件对蛋白质进行去水分子、加氢、补全不完整残基等操作, 然后对构象进行可视化, 加以验证。用 AutoDockTools1.5.6 进行对接并借助 Vina 工具进行打分, 当靶点与活性成分具有一定的结合活性时, 对接打分值 < -5 ; 当靶点与活性成分具有较好的结合活性时, 对接打分值 < -7 ; 当靶点与活性成分结合活性强烈时, 对接打分值 < -9 , 关键靶点与化合物交互作用跟对接打分值呈现负相关性[12]。

3. 结果

3.1. 灵芝活性成分及靶点的获取

在 TCMSP、BATMAN-TCM 数据库中得到灵芝的活性成分、靶点信息, 并进行相应处理, 最终得到

40 种活性成分, 502 个基因靶点。

3.2. 抑郁症靶点获取

通过检索 DisGeNET、GeneCards、DrugBank、TTD、OMIM 数据库以获取抑郁症相关靶点, 并进行规范化处理后得到最终靶点 2201 个。

3.3. 灵芝与抑郁症共有靶点

将 502 个灵芝靶点和 2201 个抑郁症相关靶点分别导入到 Venny2.1.0 在线统计平台, 得到药物与疾病共有靶点 210 个, 说明灵芝药物活性成分与抑郁症相关靶点有 210 个, 整理得到灵芝治疗抑郁症的潜在靶点具体信息。然后利用 Venny2.1.0 在线画图软件绘制灵芝与抑郁症共有靶点韦恩图, 如图 1 所示。

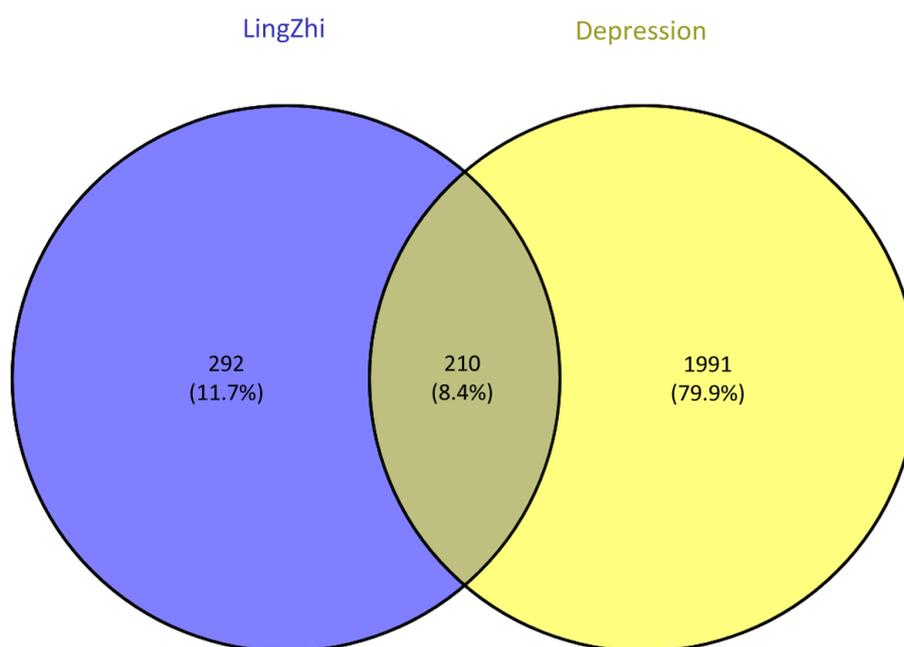


Figure 1. Venn of common targets of Lucidum and depression

图 1. 灵芝与抑郁症共有靶点韦恩图

3.4. 灵芝 - 活性成分 - 靶点 - 抑郁症网络构建

将 210 个灵芝和抑郁症的共有靶点与 40 种灵芝活性成分对接, 并通过 Cytoscape3.8.0 软件进行可视化处理, 得到灵芝 - 活性成分 - 靶点 - 抑郁症网络(图 2)。菱形和圆圈分别代表灵芝活性成分和共有靶点, 图形的大小与 Degree 值正相关。其中, 外圈为 Degree ≥ 3 的比较重要的靶点, 内圈为 Degree < 3 的靶点。Degree 值与该节点的度中心性有关, Degree 值越大说明该节点的度中心越高, 该靶点在网络中的作用就越重要。

3.5. 灵芝治疗抑郁症潜在靶标互作网络分析

基于灵芝与抑郁症共有靶点得到蛋白互作 PPI 网络, 如图 3 所示。利用 Cytoscape3.8.0 软件进行网络拓扑学分析可知, PPI 网络共存在 210 个节点, 包含 1903 条边, 筛选出 Degree 值前 10 的相比较重要的靶点, 预测这些靶点在灵芝抗抑郁作用中具有不容忽视的价值, 如表 1 所示。得到的 10 种灵芝发挥抗抑郁作用主要活性成分, 如表 2 所示。

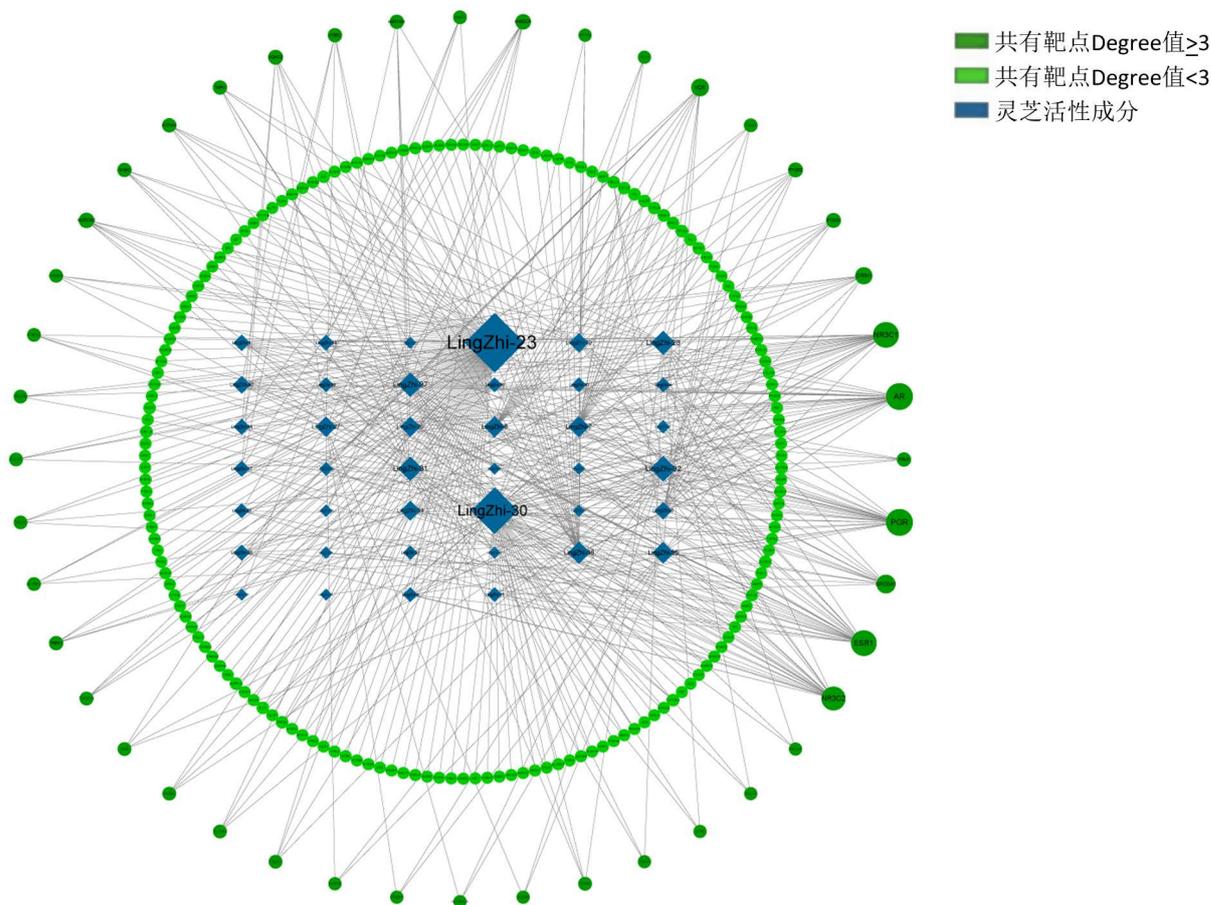


Figure 2. Common target map of active components of Lucidum and depression

图 2. 灵芝与抑郁症活性成分共有靶点图

Table 1. Topological analysis of potential antidepressant targets of Lucidum (Top 10 for medium)

表 1. 灵芝抗抑郁潜在靶点(介度前十)的拓扑分析

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
基因靶点	SLC6A4	FOS	ESR1	JUN	LEP	CASP3	PPARG	IL1B	INS	TNF
介度 Degree	50	65	53	51	49	49	61	60	87	75

Table 2. Analysis of antidepressant active components of Lucidum

表 2. 灵芝抗抑郁有效成分分析

化学成分	中文名	Degree	Type
Ergotamine	麦角胺	85	LingZhi-23
Fumaric Acid	富马酸	62	LingZhi-30
Ganoderiol D	灵芝醇 D	25	LingZhi-32
Methyl Ganoderate F	灵芝酸甲酯 F	23	LingZhi-37
Methyl Lucidenate D2	赤芝酸 D2 甲酯	23	LingZhi-31
Methyl Lucidenate F	甲基灵芝 F	22	LingZhi-28
Ganoderic Acid C	灵芝酸 C	19	LingZhi-38

Continued

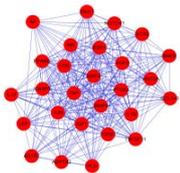
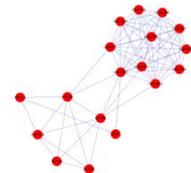
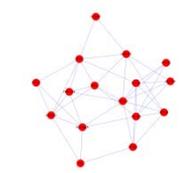
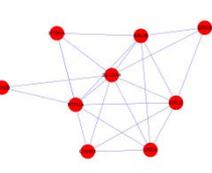
Ganodermanontriol	灵芝萜酮三醇	18	LingZhi-35
5,6-Dihydroergosterol	5,6-麦角甾醇	17	LingZhi-8
ergosterol	麦角固醇	17	LingZhi-7

3.6. 蛋白质互作网络聚类模块分析

将 PPI 蛋白网络相互作用图导入 Cytoscape3.8.0 软件, 采用 MCODE 算法, 并根据 Degree 值得到聚类模块分析图。选取 4 个度值相对较大的模块进行分析, 如表 3 所示。

Table 3. Analysis of common target modules

表 3. 共有靶点模块分析

序号	模块	Score	通路
1		22.53 8	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), TNF signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction, MAPK signaling pathway, Leishmaniasis, Rheumatoid arthritis, Hepatitis B
2		8.706	Nicotine addiction, Retrograde endocannabinoid signaling, GABAergic synapse, Morphine addiction, Neuroactive ligand-receptor interaction
3		5.6	Neuroactive ligand-receptor interaction, cAMP signaling pathway, Calcium signaling pathway, Alcoholism
4		5.5	Serotonergic synapse, Neuroactive ligand-receptor interaction, Dopaminergic synapse, cAMP signaling pathway

3.7. GO 和 KEGG 通路分析

将灵芝与抑郁症共有靶点输入 DAVID6.8 数据库中, 利用 R Studio 绘制得到 BP、CC、MF 和 KEGG 的气泡图(图 4), 图 A 为 BP 富集气泡图、图 B 为 CC 富集气泡图、图 C 为 MF 富集气泡图、图 D 为 KEGG 通路富集气泡图。气泡图中横坐标代表富集指数, 纵坐标代表 P value < 0.05 的项目名称。该项目所含的靶点数目用圆圈大小表示, 而 $-\log_{10}(P \text{ value})$ 值的大小以颜色的深浅变化表示。这些靶点经该通路发挥作用的重要性随着颜色加深, 圆圈变大而增加。根据 GO 和 KEGG 富集分析显示: KEGG 通路 76 条, CC 通路 73 条, BP 通路 692 条, MF 通路 131 条, 获得 GO 与 KEGG 通路共 972 条。结果如图 4 显示: 灵芝治疗抑郁症的生物进程主要体现在对药物的反应(response to drug)、信号传导(signal transduction)、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正负调控(positive/negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、细胞增殖的正调控(positive regulation of cell proliferation); 细胞组成主要体现在质膜的组成部

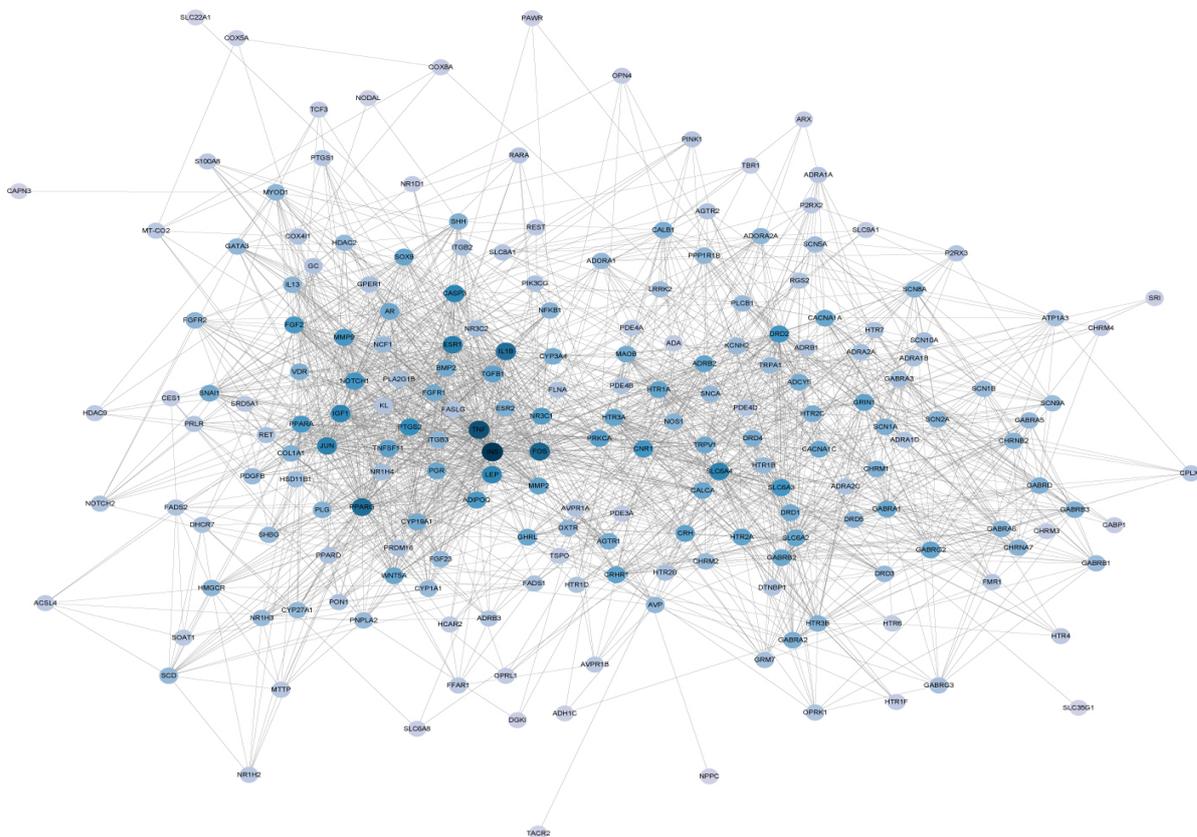


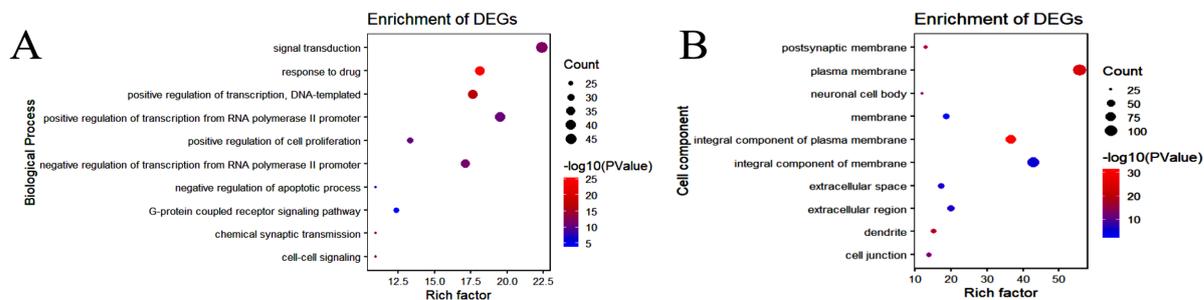
Figure 3. Lucidum depression common target protein-protein interaction network (PPI)

图 3. 灵芝抑郁症共有靶点蛋白质 - 蛋白质互作网络(PPI)图

分(integral component of plasma membrane); 分子功能主要集中在药物结合(drug binding); 通路集中在神经活性配体 - 受体相互作用(Neuroactive ligand-receptor interaction)、cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)以及钙信号通路(Calcium signaling pathway)。

3.8. 灵芝抗抑郁症成分与关键靶点分子对接验证

选取 PPI 网络图中度值前 5 的靶点 INS、TNF、FOS、PPARG、IL1B 作为候选基因, 与 Cytoscape3.8.0 度值前 5 的活性成分麦角胺、富马酸、灵芝醇 D、灵芝酸甲酯 F、赤芝酸 D2 甲酯进行分子对接验证得到关于靶点与化合物分子对接打分详情表(表 4), 以及灵芝治疗抑郁症潜在关键靶点与其活性较好化合物对接示意图 5。根据分子对接结果显示: 灵芝活性成分麦角胺与 TNF、FOS、PPARG 均有强烈或较好的结合活性, 而麦角胺、灵芝三醇 D、赤芝酸 D2 甲酯与 FOS 也有较好的结合活性。此外, 富马酸、灵芝三醇 D、灵芝酸甲酯 F、赤芝酸 D2 甲酯都存在与之具有结合活性的潜在或较好蛋白。



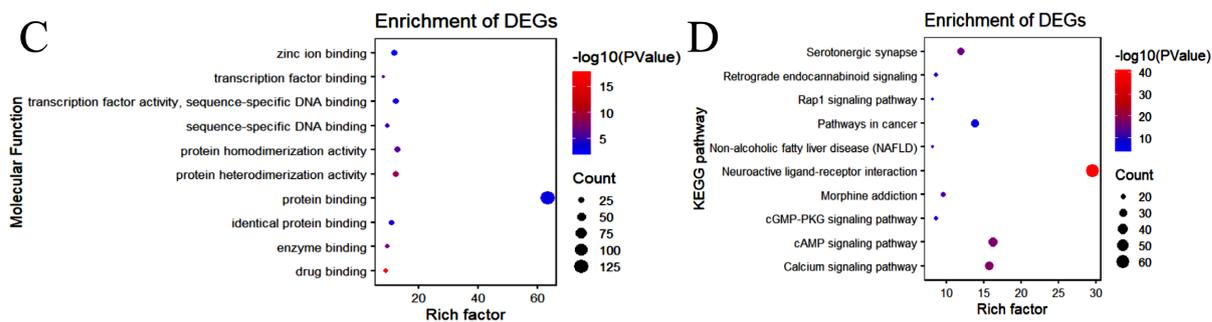


Figure 4. Bubble diagram of GO and KEGG path analysis
图 4. GO 与 KEGG 通路分析气泡图

Table 4. Scoring table of target and active ingredients
表 4. 靶点与活性成分打分表

靶点 \ 活性成分	麦角胺	富马酸	灵芝醇 D	灵芝酸甲酯 F	赤芝酸 D2 甲酯
INS	-8	-2.9	-6.7	-5.1	-6.1
TNF	-9.1	-4.9	-6.7	-6.1	-7
FOS	-8.4	-5.1	-8.9	-8	-8.5
PPARG	-8.6	-4.3	-7.4	-7.3	-7.1
IL1B	-7.4	-4.2	-5.9	-5.9	-6.3

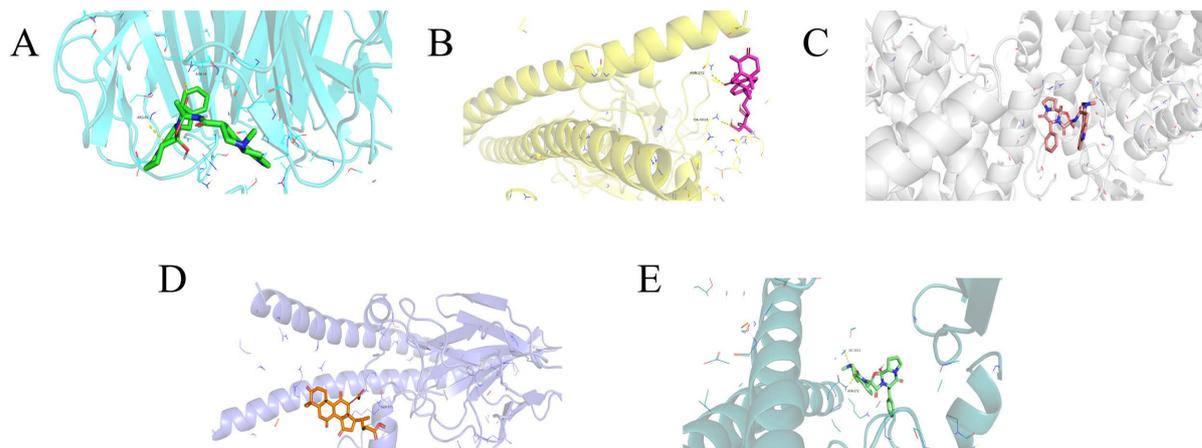


Figure 5. Docking diagram of potential key targets of Lucidum in the treatment of depression and their compounds with good activity

图 5. 灵芝治疗抑郁症潜在关键靶点与其活性较好化合物对接示意图

4. 讨论

临床中有刘勳等学者以大鼠为研究对象, 研究灵芝多糖辅助治疗抑郁症的作用及机制, 结果表明灵芝多糖能够通过提高大鼠脑内单胺类神经递质多巴胺(Dopamine, DA)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量, 从而改善抑郁症症状, 提高对抑郁症的治疗效果[13]。无独有偶, 张天柱等研究人员在研究灵芝孢子粉抗抑郁作用机制的相关实验中, 发现灵芝孢子粉能通过抑制脑内炎症因子、调节神经递质, 增加海马源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达, 从而改善抑郁大鼠行为学, 说明了灵芝孢子粉具有抗抑郁作用, 其机制可能与调节海马区 BDNF 有

关[14]。胡宇等研究者将雄性大鼠分为3组进行实验,通过蛋白质印迹 Western blot 法检测各组大鼠海马马组织样品 IL-1 β 与自噬相关蛋白相对表达量,经 ECL 显色和凝胶成像系统显像后进行统计学分析得到,灵芝孢子粉组 IL-1 β 蛋白表达水平相较于癫痫组降低至与对照组相似,灵芝孢子粉组 LC3B、Beclin-1 蛋白表达量相对于癫痫组上升至与对照组相近[15],具体实验数据见表 5。袁群等学者研究结果发现破壁灵芝孢子粉能够提高下丘脑与血浆中 5-HT 胺含量,有效调节下丘脑 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyrate, GABA)与血糖(Glucose, Glu)的含量,维持 Glu/GABA 平衡,降低血浆中 DA 水平[16]。但现有研究都未提到灵芝中具体是哪些成分发挥抗抑郁作用。因此,本文基于网络药理学方法分析灵芝发挥抗抑郁作用的主要活性成分,及其发挥抗抑郁作用的机理。

Table 5. Expression of hippocampal autophagy protein in rat brain [15]

表 5. 大鼠脑内海马神经自噬体蛋白表达情况[15]

分组	蛋白相对表达量	IL-1 β	LC3B	Beclin-1
正常对照组		0.2~0.3	2~3	0.5~1.0
癫痫组		0.3~0.4	0~1	0.0~0.5
灵芝孢子粉组		0.2~0.3	1~2	0.5~1.0

此次研究经 TCMSp、BATMAN-TCM 数据库中筛选获得 40 种灵芝活性成分与 502 个蛋白靶点,转换成基因靶点后与抑郁症疾病相关靶点相互映射,最后得到 40 种活性成分和 210 个靶点。通过 PPI 网络预测 INS、TNF、FOS、PPARG、IL1B 是灵芝治疗抑郁症的关键靶点,麦角胺、富马酸、灵芝醇 D、灵芝酸甲酯 F、赤酯酸 D2 甲酯为灵芝发挥抗抑郁作用重要活性成分。而在关键靶点与重要活性成分的分子对接验证结果中提示,麦角胺与 TNF、FOS、PPARG 均有强烈或较好的结合活性,灵芝醇 D 和灵芝酸甲酯 F 分别与 FOS、PPARG 有很好的结合活性,而麦角胺、灵芝醇 D、灵芝酸甲酯 F、赤酯酸 D2 甲酯与 FOS 也有较好的结合活性。根据 GO 和 KEGG 富集分析显示:灵芝治疗抑郁症的生物进程主要体现在对药物的反应、信号传导、细胞增殖的正调控;细胞组成主要体现在质膜的组成部分;分子功能主要集中在药物结合;通路集中在神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路以及 c-AMP 信号通路。

抑郁症的发病机制十分复杂,尚未完全阐述清楚。根据研究结果,本文主要侧重于麦角胺、灵芝醇 D、FOS 进行说明。

目前,关于抑郁症发病机制较为流行的假说有单胺类神经递质假说、胆碱能肾上腺素能功能平衡失调假说、脑源性神经营养因子假说、血管内皮生长因子假说、炎症介质假说、脑肠轴假说等[3] [17] [18] [19]。

单胺类神经递质假说被视为相对经典的假说之一,即抑郁症发病机制与单胺类神经递质 5-HT、DA 浓度的降低密切相关[20]。分子对接结果显示麦角胺与 FOS 结合性最强烈。陈丽娟等学者有研究指出麦角胺和双氢麦角胺跟 5-HT_{1D} 受体结合具有高亲和力[21],杜建红等学者也指出麦角胺和二氢麦角胺与 5-HT_{1D} 受体具有高亲和力[22],联系抑郁症 5-HT 发病机制,可预测麦角胺是通过与 5-HT_{1D} 受体高度结合而发挥抗抑郁作用。由此可证实麦角胺为灵芝治疗抑郁症的主要活性成分这一预测的合理性,也有关于麦角胺制剂治疗焦虑抑郁的案例进一步证实[23]。

分子对接另一结果提示基因靶点 FOS 与灵芝发挥抗抑郁作用具有重大意义,FOS 可能作为一个保护性基因抑制抑郁症的发生[24]。FOS 基因属于 FOS 基因家族的一员,其编码蛋白 c-FOS 为一种核蛋白转录因子[24]。根据郭文成等学者研究可知 c-FOS 基因可调节杏仁核基底外侧核 BLA 内 NA、DA、5-HT 含量[25],张轶等学者发现海马和杏仁体 pCREB 及 c-FOS 的表达与抑郁症相关[26],安锋利等学者发现

海马区、杏仁区 FOS 蛋白高度表达, 而海马区、杏仁区与应激性抑郁症的发生有关[27]。徐民等学者研究发现激活在海马区 5-HT₃ 受体的信号可通过海马、皮质、下丘脑等神经元的上升和下降投射进行传递, 并且 FOS 阳性细胞海马、皮质、下丘脑处均表达[28]。同样联系抑郁症发病机制预测 FOS 基因可通过可调节海马区、杏仁区 NE、DA、5-HT 含量抑制抑郁症的发生。朱文婷等学者研究发现 c-FOS 在信号传导、细胞增殖和细胞分化中起着重要作用[29], 曹建忠等学者研究发现在海马 CA1 区, c-FOS 的表达能阻断细胞内信号的转道而产生一些死亡因子, 在细胞通路中有 c-FOS 的表达[30]。而本文也通过 GO 通路分析发现 FOS 与信号传导、细胞增殖的正调控等生物进程有关。秦亚静等学者在研究中提到 5-HT 在海马神经细胞的增殖和分化上起重要作用[31]。由此推测 FOS 可能通过阻断细胞内信号传导, 调节海马神经细胞的凋亡进程, 直接或间接调控体内 5-HT 水平含量从而抑制抑郁症的发生。此外, 麦角胺与 FOS 均与抑郁症 5-HT 发病机制有关, 推测灵芝发挥抗抑郁作用可能与麦角胺和 FOS 相互作用, 调节体内 5-HT 水平含量有关。

张晓杰等研究学者发现, 抑郁症的发病机制与脑内海马胆碱能神经系统乙酰胆碱(ACh)代谢亢进有关[32]。董海影等研究学者发现海马乙酰胆碱酯酶(AChE)活性是抑郁症发病原因之一[33]。喻南慧等学者研究发现灵芝三萜类化合物(GLT)能够通过抑制 AI3 侧脑室注射所致中枢胆碱能神经系统损伤所引起的 AChE 活性的升高, 从而恢复胆碱能神经系统的功能[34]。张玥等研究学者发现, GLT 可降低自然衰老模型大鼠脑内 AChE 活性, 升高乙酰胆碱转移酶(Choline Acetyl Transferase, CHAT)活性, 使胆碱能神经递质系统功能恢复[35]。罗云等研究学者对灵芝三萜药理活性的研究中提到灵芝酸和灵芝醇是灵芝三萜的主要化合物, 灵芝醇类包括麦角甾醇和灵芝甾醇 B [7]。曾瑾等研究学者发现灵芝醇提取物可有效提高脑内 ACh 水平, 可能通过作用中枢胆碱能系统改善学习作用[36]。陈静涛等学者研究发现尼古丁可通过烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 亚型调节 c-FOS 表达及活性从而在吸烟相关性牙周炎中产生破坏作用[37]。崔建梅等学者研究发现 c-FOS 的表达可纠正下丘脑胆碱能系统功能紊乱[38]。由此推测灵芝醇 D 可能通过与 FOS 作用, 直接或间接调节脑内乙酰胆碱水平从而发挥抗抑郁作用。

本文研究推测灵芝治疗抑郁症可能和以下因素较大关系: 麦角胺与灵芝醇 D 均可通过直接或间接作用于 FOS 从而达到治疗抑郁症的效果, 前者可能通过调节体内 5-HT 含量达到抗抑郁作用, 后者发挥抗抑郁作用可能与调控脑内乙酰胆碱水平有关。

5. 研究的局限性

此次研究为灵芝治疗抑郁症的作用机制研究提供新的途径。网络药理学与分子对接技术是通过计算机对数据分析处理之后得到的理论结果, 需要大量的数据进行支撑。但是, 与灵芝治疗抑郁症相关的文献报道数量较少且出现时间较早。并且, 来源于个数据库的数据信息不时进行更新。因此, 本次研究预测灵芝作用于抑郁症的机制以及物质基础需加以实验验证。此外, 网络药理学和分子对接技术是通过计算机模拟体内受体与配体之间结合情况以揭示药物干预治疗疾病的作用机制, 两种研究方法局限与生物大分子水平, 故也需后续开展与之相关的临床实验从更深层次上揭示灵芝发挥抗抑郁作用的机制。

基金项目

四川省自然科学基金(2022NSFSC0758); 四川省中医药管理局 2021 年度中医药科研专项课题(2021MS108); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划(ZRQN2020001)。

参考文献

- [1] 秦浩方, 黄蓉, 贾世伟. 反馈相关负波: 一种抑郁症的生物标记物[J]. 心理科学进展, 2021, 29(3): 404-413.

- [2] 黄挚靖, 李旭. 抑郁症患者工作记忆内情绪刺激加工的特点及其机制[J]. 心理科学进展, 2021, 29(2): 252-267.
- [3] 陈敏, 张晓波, 罗玉珍, 胡智强, 孙景权. 运动锻炼改善抑郁症的神经生物学相关机制研究进展[J]. 中国体育科技, 2021, 57(4): 89-96.
- [4] 刘威, 晋倩, 郝选明. 有氧运动干预对抑郁症大鼠HPA轴激活状态的影响及其上游调控机制[J]. 体育学刊, 2021, 28(2): 138-144.
- [5] 袁培, 周昌乐, 许家伦. 中医情志疗法在抑郁症诊疗中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4853-4856.
- [6] 李欣. 黑灵芝多糖缓解运动性疲劳的效果[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 59-65.
- [7] 罗云, 陈霖, 张雪涟, 兰进, 魏菲, 孙晓波. 灵芝三萜类成分药理活性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1185-1188.
- [8] 江和栋, 牛仙, 万仁口, 邓泽元, 李红艳. 灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 159-167.
- [9] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 156-160.
- [10] 牛明, 张斯琴, 张博, 杨扩, 李梢. 《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [11] 王欢欢, 吴宏伟, 李欣, 张晓, 许静, 郭非非, 张红, 范建伟, 杨洪军. 基于网络药理学分析厚朴抗抑郁的物质基础及其作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 162-169.
- [12] 刘毓, 刘鹏, 韩晶雪, 胡琳, 李平, 李淑菊, 赵婷婷. 基于网络药理学大黄治疗慢性肾脏病机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 32-36+后插 4-后插 6.
- [13] 刘勰, 居春阳, 朱延梅, 朱雨岚. 灵孢多糖辅助治疗抑郁症的作用及机制[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(4): 656-662.
- [14] 张天柱, 赵婉君, 吴国梁, 姚金福. 灵芝孢子粉抗抑郁作用机制研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 16-18.
- [15] 胡宇, 王淑湘, 吴可佳, 秦丽红, 王辰, 石瑞平, 秦丽微, 王天驰, 张鑫, 王淑秋. 灵芝孢子粉对戊四氮致痫大鼠海马区IL-1 β 及自噬水平变化的影响[J]. 广东化工, 2021(1): 113-114.
- [16] 袁群, 胡海林, 毛欣, 王能, 曹淼, 何清湖. 破壁灵芝孢子粉对大鼠睡眠功能改善效果及机制的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7): 1037-1041.
- [17] 刘文雯, 木本荣, 钟馨, 黄志航, 刘文萱, 卢长青, 梁小清, 王冬梅, 国锦琳. 基于网络药理学和生物信息学探索逍遥散和柴胡疏肝散“同病异治”抑郁症的作用机制[J]. 中医学, 2021, 10(2): 200-215.
<https://doi.org/10.12677/TCM.2021.102028>
- [18] 王帅, 罗素兰. α -芋螺毒素在抑郁症研究和治疗中的应用前景[C]//第12届生物毒素研究及医药应用学术大会论文集. 2015: 86.
- [19] 许鹏, 章程鹏, 周童. 中医药改善抑郁症发病机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 244-250.
- [20] 高贵元, 黄捷, 刘丹, 张芳, 张超群, 张国利, 陈丽华, 邵迎新. 抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(1): 52-55+70.
- [21] 陈丽娟, 金国章. 治疗偏头痛药物与5-HT受体[J]. 国外医学: 药学分册, 1995, 22(1): 20-24.
- [22] 杜建红, 姜玉, 李亚兰. 抗偏头痛药物的研究进展[J]. 西藏医药, 1998, 19(3): 40-42.
- [23] 陈倩, 蓝晓芳, 李陈渝. 103例原发性头痛病人睡眠障碍及焦虑抑郁相关性分析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(12): 935-938.
- [24] 陈盛, 王高华. 基于生物信息学方法对抑郁症小鼠脑组织差异基因表达的分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(3): 125-129.
- [25] 郭文成, 刘斌, 张丽娟, 王艳艳, 黄莉莉, 李廷利. 朱砂安神丸对条件性恐惧模型大鼠单胺类神经递质表达及其神经元c-FOS蛋白表达的影响[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 84-90.
- [26] 张轶, 贺芳, 何叶成, 宋悦宁. 薰衣草精油对抑郁症大鼠海马、杏仁核pCREB及c-FOS表达影响的研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 194-198+后插 27-后插 28.
- [27] 安锋利, 安书成. 应激性抑郁症大鼠眶额叶FOS蛋白表达的变化[J]. 动物医学进展, 2010, 31(10): 51-54.
- [28] 徐民, 陈伟强, 王基平, Foster, D.J.R., 许德义. 大鼠中央杏仁核5-HT₃受体参与胸腺功能调制(英文)[J]. 生理学报, 2007(1): 42-50.
- [29] 朱文婷, 赵瑞珍, 程翰林, 吕亚红, 孙铭浚. 基于网络药理学分析越鞠丸治疗抑郁症的分子机制[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(6): 530-535.

- [30] 曹建忠, 杨光田, 刘书山. 葛根素对脑缺血-再灌注时海马 CA1 区细胞凋亡和 c-FOS 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(4): 238-240.
- [31] 秦亚静, 曾园山, 周春春, 李燕, 钟志强. 红景天对慢性应激导致的抑郁大鼠大脑海马 5-羟色胺水平及其细胞增殖、分化和神经元数量的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2842-2846.
- [32] 张晓杰, 兴桂华, 董海影, 吴淑琴. 不同年龄组抑郁症模型大鼠脑乙酰胆碱酯酶及乙酰胆碱转移酶活性的变化[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6): 1191-1193.
- [33] 董海影, 兴桂华, 刘得水, 张晓杰. 柴胡疏肝散对抑郁症模型大鼠海马单胺氧化酶与乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(5): 809-811.
- [34] 喻南慧, 黄勇攀, 罗俊. 灵芝三萜类化合物对 AD 模型大鼠脑组织中 CAT, ACHE, SOD, MDA 的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(6): 640-642+651.
- [35] 张玥, 陈林, 谢春, 杨小雪, 罗俊, 罗喜荣. 灵芝三萜类化合物对砷中毒大鼠海马组织形态学及脑组织中 AChE 和 ChAT 含量的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(7): 781-785.
- [36] 曾瑾, 罗霞, 郑林用, 江南, 余梦瑶. 灵芝醇提物对记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 42-44.
- [37] 陈静涛, 周志斐, 王燕, 宋薇, 李保东, 陈新钊, 卫克文. 尼古丁作用下牙周膜细胞 c-FOS 通路表达变化的相关研究[J]. 空军医学杂志, 2021, 37(2): 138-141+170.
- [38] 崔建梅, 郭旭玥, 于芳, 药宏慧, 苏晓云, 庞立杰, 赵行瑞. 自愿转轮运动对慢性应激大鼠下丘脑乙酰胆碱代谢及室旁核 c-FOS 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(13): 3095-3098.