

茯苓皮总三萜抗抑郁作用及机制研究^Δ

沈 丽^{1*}, 杨玉莹¹, 杨敬宇¹, 沈 月¹, 胡 鹏¹, 吴雨希¹, 刘 丹^{1,2}, 叶晓川^{1,2#}(1. 湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)15-2003-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.15.12



摘要 **目的** 探讨茯苓皮总三萜(PCTT)的抗抑郁作用及机制。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术分析PCTT的化学成分。运用网络药理学挖掘PCTT抗抑郁的活性成分、关键靶点及信号通路,并采用分子对接技术验证潜在活性成分和核心靶点的结合能力。动物实验中,分别灌胃80、160、320 mg/kg的PCTT 14 d后,以脂多糖诱导构建小鼠急性抑郁模型;而后进行行为学测试,检测血清中炎症因子及海马组织中神经递质和脑源性神经营养因子(BDNF)水平,并通过Western blot法和qPCR法验证PCTT的抗抑郁机制。**结果** 从PCTT中共鉴定出101个化学成分。网络药理学挖掘出10个潜在活性成分(如茯苓酮酸B、茯苓酮酸A、茯苓酸等)、6个核心靶点[如肿瘤坏死因子(TNF)、过氧化物酶体增殖物激活受体、胱天蛋白酶3等]以及TNF、白细胞介素17(IL-17)等多条信号通路。10个潜在活性成分与6个核心靶点均具有较强的结合能力。动物实验结果显示,320 mg/kg的PCTT能显著增加模型小鼠的运动距离、运动速度($P<0.05$),缩短悬尾不动时间、游泳不动时间($P<0.05$);降低血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平,海马组织中谷氨酸水平,前额叶皮质中TNF- α 、肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)mRNA相对表达量以及TNFR2蛋白表达水平和磷酸化PI3K/PI3K、磷酸化AKT/AKT比值;升高海马组织中5-羟色胺、多巴胺、BDNF水平。**结论** PCTT可能通过调控TNF- α /PI3K/AKT信号通路,下调促炎因子表达,从而调节神经递质及BDNF的释放,进而发挥抗抑郁作用。

关键词 茯苓皮;总三萜;抑郁症;网络药理学;TNF- α /PI3K/AKT信号通路

Study on antidepressant effects and mechanisms of total triterpenes from *Poriae Cutis*

SHEN Li¹, YANG Yuying¹, YANG Jingyu¹, SHEN Yue¹, HU Peng¹, WU Yuxi¹, LIU Dan^{1,2}, YE Xiaochuan^{1,2}
(1. Hubei Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Chemistry, School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the antidepressant effect and underlying mechanism of total triterpenes from *Poriae Cutis* (PCTT). **METHODS** UPLC-Q-TOF-MS technology was adopted to analyze the chemical constituents of PCTT. Network pharmacology was applied to screen the antidepressant active ingredients, key targets and signaling pathways of PCTT, and molecular docking was performed to verify the binding capacity between potential active ingredients and core targets. In animal experiment, mice were intragastrically administered PCTT at doses of 80, 160 and 320 mg/kg for 14 consecutive days. Lipopolysaccharide was used to establish an acute depression mouse model. Subsequently, behavioral assays were conducted. The levels of serum inflammatory factors, hippocampal neurotransmitters and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected. Western blot and qPCR assays were adopted to validate the antidepressant mechanism of PCTT. **RESULTS** A total of 101 chemical constituents were identified in PCTT. Network pharmacology screened out 10 potential active ingredients (including poriacosone B, poriacosone A, pachymic acid, etc.), six core targets [including tumor necrosis factor (TNF), peroxisome proliferator-activated receptor, caspase-3, etc.], as well as multiple signaling pathways including TNF and interleukin-17 (IL-17). All 10 potential active ingredients exhibited strong binding affinity to the six core targets. Animal experimental results demonstrated that 320 mg/kg PCTT markedly increased the movement distance and movement speed of depression model mice ($P<0.05$), and shortened immobility time in tail suspension test and forced swimming test ($P<0.05$). PCTT reduced serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α , decreased hippocampal glutamate level; it also downregulated the relative mRNA expression of TNF- α , tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT), as well as TNFR2 protein expression and the ratios of phosphorylated-PI3K/PI3K, phosphorylated-AKT/AKT in the prefrontal cortex. Meanwhile, PCTT elevated the levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and BDNF in the hippocampus. **CONCLUSIONS** PCTT exerts antidepressant effects possibly

by regulating the TNF- α /PI3K/AKT signaling pathway to downregulate the expression of pro-inflammatory factors, thereby modulating the release of neurotransmitters and BDNF.

KEYWORDS *Poriae Cutis*; total triterpenes; depression; network pharmacology; TNF- α /PI3K/AKT signaling pathway

^Δ 基金项目 湖北省技术创新专项(No.2019ACA121);武汉市科技计划项目(No.2025070604020037)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及作用机制。E-mail:1393908549@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质基础及作用机制。E-mail:yxxcc1965@163.com

抑郁症是一种常见的精神障碍疾病,主要表现为情绪持续低落、睡眠困难等,严重者有自杀倾向^[1]。随着人们生活节奏的不断加快,社会压力随之增加,抑郁症的发病率也呈逐年上升的趋势^[2]。世界卫生组织2025年公布的数据显示,全球大约有3.32亿人患有抑郁症,其中女性的发病率约为男性的1.5倍^[3]。目前,抑郁症的治疗方式主要包括药物治疗、物理治疗和心理治疗。临床常用抗抑郁药物主要为口服药,如三环类、单胺氧化酶抑制剂和选择性5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)再摄取抑制剂等^[4],但常伴有头痛、体重增加等不良反应,且存在起效慢、应答率低等问题^[5]。与化学药相比,天然药物具有多靶点、多通路协同作用及不良反应相对较小的特点。因此,临床急需从天然药物中开发新的抗抑郁药物。

抑郁症属中医“郁证”范畴,分为气郁、热郁、湿郁、痰郁、血郁、食郁六类,其中湿郁由水湿失衡、阻碍气机所致^[6]。基于“利水解郁”的治疗策略,可从利水渗湿类中药中筛选抗抑郁药物。茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。《神农本草经》记载其可治“忧悲,惊邪,恐悸……久服安魂养神”,《本草正》言其“开心益智”,说明茯苓具有补益心脾、安定神志之效,适用于心脾两虚所致神志失常。茯苓皮为茯苓的干燥外皮,具有利水渗湿之功效,但目前临床上茯苓皮使用量较少,在茯苓产地加工时常被丢弃,造成资源浪费。本课题组前期研究发现,茯苓总三萜为茯苓发挥利水渗湿、健脾、宁心作用的有效部位,且其可以通过调节神经递质水平、减轻神经炎症和脑组织神经损伤发挥抗抑郁作用^[7]。进一步研究发现,茯苓皮中三萜类成分含量远高于茯苓,且组成与茯苓相似^[8]。因此,笔者推测茯苓皮总三萜(total triterpenes from *Poriae* Cutis, PCTT)可能也具有抗抑郁作用,然而相关研究目前尚未见报道。基于此,本研究拟结合网络药理学和动物实验,探究PCTT改善抑郁症的作用及潜在机制,为充分利用茯苓皮资源和开发新型抗抑郁药物提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:Xevo G2-XS Q-TOF型液质联用仪(美国Waters公司)、BT25S型十万分之一分析天平(德国Sartorius公司)、Centrifuge 5810R型离心机(德国Eppendorf公司)、Spark 10M型酶标仪(瑞士Tecan公司)、DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂)、FluorChem FC3型凝胶成像仪(美国Proteinsimple公司)。

1.2 主要药品与试剂

PCTT(以茯苓酸计含量为89%,批号202307)为本课题组自制;盐酸氟西汀胶囊(批号230504,规格20 mg)购自山西仟源医药集团股份有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国Sigma公司;白细胞介素1 β

(interleukin-1 β , IL-1 β ;批号202311)、IL-6(批号202311)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α ;批号202311)、5-HT(批号202311)、多巴胺(dopamine, DA;批号202311)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF;批号202311)、谷氨酸(glutamic acid, Glu;批号202311)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒均购自上海抚生实业有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号E-BC-K318-M)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;磷酸酶抑制剂(批号P1260)购自北京普利莱基因技术有限公司;蛋白酶抑制剂(批号P1005)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,批号AC240915004)单克隆抗体购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司;兔抗磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K;批号00123655)、TNF- α (批号00142940)、肿瘤坏死因子受体2(tumor necrosis factor receptor-2, TNFR2;批号00149387)多克隆抗体以及兔抗磷酸化PI3K(p-PI3K,批号10052244)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT;批号10026612)、磷酸化AKT(p-AKT,批号10028150)单克隆抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号7074P2)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级C57BL/6小鼠,共48只,体重20~22 g,由三峡大学实验动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK(鄂)2020-0005。小鼠购入后,在湖北中医药大学实验动物中心SPF级动物房内饲养[使用许可证号为SYXK(鄂)2023-0067]。本研究动物实验方案已通过湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准[伦理证号:HUCMS23174778]。

2 方法与结果

2.1 PCTT的化学成分分析

采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术对PCTT中的化合物进行分析。

2.1.1 供试品溶液制备

精密称取PCTT粉末0.3 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,加入30 mL甲醇,超声30 min,放冷,摇匀,滤过。取续滤液,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,作为供试品溶液,待测。

2.1.2 色谱条件

采用ACQUITY UPLC HSS T₃色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.8 μ m),以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~2 min, 52%A; 2~6 min, 52%A $\rightarrow$ 60%A; 6~10 min, 60%A $\rightarrow$ 100%A; 10~15 min, 100%A);流速为0.3 mL/min;柱温为35 $^{\circ}$ C;进样量为2 μ L。

2.1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下扫描;毛细管电压为2 500 V;脱溶剂气体流速为500 L/h,

脱溶剂气体温度为500℃;离子源温度为100℃,扫描范围为质荷比(m/z)100~1 000。校正液为亮氨酸脑啡肽(500 pg/mL)。

2.1.4 样品进样及数据分析

将“2.1.1”项下供试品溶液,分别按“2.1.2”“2.1.3”项下条件进样分析,收集色谱图及质谱信息。采用MassLynx 4.1软件处理质谱数据,根据化合物质谱裂解规律,结合对照品及文献数据比对情况^[9],根据精确相对分子质量以及一、二级质谱碎片特征对化合物进行鉴定。结果显示,从PCTT中共鉴定出101种化学成分,主要包括羊毛甾-8-烯型三萜、羊毛甾-9,10(11-二烯型三萜)等(限于篇幅,相关图表略)。

2.2 网络药理学预测PCTT抗抑郁的活性成分及作用机制

2.2.1 活性成分与疾病交集靶点筛选

将“2.1.4”项下分析得到的101种化学成分的结构输入SwissADME平台^[10],按文献方法^[11]筛选出PCTT中具有类药性的活性成分25个。在TCMSP平台、BATMAN-TCM数据库分别输入PCTT的活性成分,设置靶点目标为“human protein targets only”,选择“norm fit”大于0.8的靶点,通过SwissTargetPrediction数据库筛选成分靶点,并通过UniProt数据库进行信息比对和标准化处理,剔除非人源基因,从而获得PCTT的潜在作用靶点180个。以“depression”为关键词,通过检索GeneCards数据库,获得疾病靶点1 858个。将成分靶点和疾病靶点取交集,获得PCTT治疗抑郁症的交集靶点66个。

2.2.2 “成分-靶点-疾病”网络构建

将PCTT活性成分、交集靶点与疾病导入Cytoscape 3.7.1软件,构建PCTT治疗抑郁症的“成分-靶点-疾病”网络。利用Cytoscape 3.7.1软件的Network Analyzer工具计算网络拓扑参数,筛选度值排前10位的化学成分。结果显示,“成分-靶点-疾病”网络中共有93个节点、623条边,说明PCTT治疗抑郁症是多成分、多靶点相互作用的结果。度值排前10位的化学成分包括茯苓酮酸B、茯苓酮酸A、茯苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸HM、松苓酸、茯苓酸B、茯苓酸GM、茯苓酸AM、6 α -羟基去氢茯苓酸,其可能为PCTT治疗抑郁症的潜在活性成分。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将66个交集靶点导入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,设置物种为“Homo sapiens”、置信值>0.9。将PPI网络导入Cytoscape 3.7.1软件进行可视化分析,利用该软件的Network Analyzer工具计算网络中各节点的度值(限于篇幅,相关图略)。结果显示,PPI网络中共有65个点、488条边,其中度值排前6位的核心靶点包括TNF、白蛋白(albumin, ALB)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARG)、酪氨酸蛋白激酶(tyrosine-protein kinase, TPK)、胱天蛋白

酶3(caspase-3)、雌激素受体1(estrogen receptor-1, ER1)等。

2.2.4 功能富集与通路富集分析

通过Metascape平台对66个交集靶点进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,分别将富集结果的条目绘制成条形图和气泡图,并运用微生信平台进行可视化处理。结果显示,GO功能富集分析共得到生物过程条目769项,包括激素应答、细胞脂质应答、系统过程调控等;细胞组成条目49项,包括囊泡腔、膜微区、胞质囊泡腔等;分子功能条目85项,包括类固醇结合、雌激素反应元件结合、核类固醇受体活性等。KEGG通路富集分析得到135条信号通路,主要包括TNF信号通路、IL-17信号通路、Pertussis信号通路、Fc epsilon RI信号通路、Toxoplasmosis信号通路等(限于篇幅,相关图略)。

2.2.5 潜在活性成分与核心靶点的分子对接验证

采用分子对接技术验证“2.2.2”项下得到的10个潜在活性成分与“2.2.3”项下得到的6个核心靶点的相互作用模式。从PubChem数据库下载潜在活性成分的3D结构文件作为配体,通过PDB数据库获取核心靶点的3D蛋白结构作为受体。使用AutoDock软件对受体和配体进行结构处理后,再使用AutoDock Vina软件完成两者的分子对接。结合能<-5 kcal/mol和<-7 kcal/mol分别表示药物-靶点具有较好和强烈的结合活性^[12]。结果显示,各复合物的结合能均<-5 kcal/mol,提示各潜在活性成分与核心靶点均具有较好的结合活性(限于篇幅,相关图略)。

2.3 动物实验验证PCTT的抗抑郁作用与机制

根据“2.2.3”“2.2.4”项下结果可知,TNF是度值排名第1位的核心靶点,TNF信号通路是KEGG富集的主要通路之一。TNF- α 是TNF家族的核心配体之一,PI3K/AKT是TNF- α 的下游信号通路,且研究表明PI3K/AKT信号通路参与了抑郁症的发病机制^[13]。因此,本研究在动物实验中选取TNF- α /PI3K/AKT信号通路进行机制验证。

2.3.1 实验动物分组与造模

小鼠适应性喂养1周后,按体重随机分为空白组(蒸馏水),模型组(蒸馏水),PCTT低、中、高剂量组(80、160、320 mg/kg,分别为临床等效剂量的1、2、4倍),氟西汀阳性药组(FXT组,20 mg/kg^[14]),每组8只。各组小鼠灌胃相应药物/蒸馏水,每日1次,持续14 d。第14天末次给药后,空白组小鼠腹腔注射等体积生理盐水,其余各组小鼠均腹腔注射0.83 mg/kg LPS(10 mL/kg)构建急性抑郁症模型^[14]。

2.3.2 行为学测试

腹腔注射LPS 12 h后,依次对各组小鼠进行以下行

为学测试。所有实验均在安静环境中完成,单次测试后均使用乙醇清洁设备以消除残留气味。(1)旷场实验:将小鼠置于旷场反应箱(40 cm×40 cm,划分为9个方格)中央,由摄像系统自动记录5 min内小鼠的运动轨迹、运动距离及运动速度,评估小鼠自主活动能力。(2)悬尾实验:将小鼠尾部悬挂于自制悬尾箱(30 cm×30 cm×60 cm)中,使其呈倒悬状态,观察6 min,记录后4 min内小鼠的悬尾不动时间(判断标准为小鼠静止不动、不挣扎或挣扎幅度很小)。(3)强迫游泳实验:将小鼠置于圆柱形水桶[高30 cm、直径14 cm、水深20 cm,水温(25±1)℃]中,进行6 min游泳测试,记录后4 min内小鼠漂浮或挣扎幅度很小并保持头部露出水面的时间(即游泳不动时间)。采用SPSS 22.0软件进行数据分析。所有实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果(表1)显示,与空白组相比,模型组小鼠运动距离、运动速度均显著缩短/减慢($P<0.05$),悬尾不动时间、游泳不动时间均显著延长($P<0.05$),提示造模成功;与模型组相比,除FXT组小鼠游泳不动时间外,其余各组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$)。各组小鼠的旷场运动轨迹图请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1。

表1 各组小鼠行为学测试结果比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	运动距离/cm	运动速度/(cm/s)	悬尾不动时间/s	游泳不动时间/s
空白组	1 593.12±305.39	4.59±1.36	102.75±15.80	108.38±24.71
模型组	566.26±61.90 ^a	1.90±0.19 ^a	150.63±7.87 ^a	170.00±24.59 ^a
FXT组	1 591.61±369.93 ^b	5.33±1.24 ^b	58.50±37.34 ^b	149.25±14.37
PCTT低剂量组	1 031.77±182.03 ^b	3.00±0.41 ^b	101.13±18.86 ^b	101.00±20.57 ^b
PCTT中剂量组	1 061.07±163.71 ^b	3.23±0.36 ^b	112.63±25.70 ^b	99.75±28.47 ^b
PCTT高剂量组	1 157.54±216.80 ^b	3.86±0.72 ^b	108.75±10.38 ^b	99.63±20.71 ^b

a:与空白组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

2.3.3 血清中炎症因子及海马组织中神经递质、BDNF水平检测

行为学实验结束后,收集小鼠血清及前额叶皮质组织、海马组织,置于-80℃冰箱中冻存。采用ELISA法,按试剂盒说明书操作,检测血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平及海马组织中5-HT、DA、Glu、BDNF水平。统计学方法同“2.3.2”项下。

结果(表2、表3)显示,与空白组相比,模型组小鼠血清中IL-6、IL-1 β 水平和海马组织中Glu水平均显著升高($P<0.05$),海马组织中5-HT、DA、BDNF水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,FXT组小鼠血清中IL-6及海马组织中各指标均显著改善($P<0.05$);PCTT低剂量组小鼠血清中IL-1 β 水平显著降低($P<0.05$);PCTT中剂量组小鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平和海马组织中Glu水平均显著降低($P<0.05$),海马组织中BDNF水平显著升高($P<0.05$);PCTT高剂量组小鼠血清和海马组织中各指标均显著改善($P<0.05$)。

表2 各组小鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$, pg/mL)

组别	IL-6	IL-1 β	TNF- α
空白组	73.73±2.88	49.53±2.95	608.23±47.27
模型组	101.17±7.80 ^a	55.39±0.47 ^a	626.25±8.27
FXT组	82.07±4.15 ^b	52.89±2.77	580.83±37.56
PCTT低剂量组	79.88±7.48	47.76±2.28 ^b	599.27±51.73
PCTT中剂量组	107.60±2.69	47.03±1.91 ^b	534.69±14.38 ^b
PCTT高剂量组	70.80±4.50 ^b	48.19±1.40 ^b	529.17±7.50 ^b

a:与空白组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠海马组织中5-HT、DA、Glu、BDNF水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	5-HT/(pg/mL)	DA/(pg/mL)	Glu/(μ mol/L)	BDNF/(ng/mL)
空白组	247.45±7.05	51.35±1.03	19.29±0.69	174.88±1.89
模型组	189.96±2.37 ^a	41.91±0.14 ^a	23.75±0.38 ^a	140.15±3.74 ^a
FXT组	230.24±2.29 ^b	49.40±0.66 ^b	21.66±1.08 ^b	155.98±8.84 ^b
PCTT低剂量组	193.03±6.20	36.50±0.41	22.26±0.79	150.80±7.66
PCTT中剂量组	202.89±11.28	42.81±1.20	19.96±1.60 ^b	179.76±15.41 ^b
PCTT高剂量组	228.81±4.01 ^b	44.21±1.05 ^b	20.25±2.14 ^b	160.89±6.21 ^b

a:与空白组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

2.3.4 前额叶皮质中TNF- α /PI3K/AKT信号通路相关基因mRNA表达检测

采用qPCR法检测。取“2.3.3”项下前额叶皮质50 mg(除FXT组外每组取3只小鼠样本),提取组织中总RNA,检测其浓度和纯度后,将样本稀释至500 ng/ μ L并进行反转录以获得cDNA,然后以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增反应条件为:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。扩增反应体系(总体积20 μ L)为:SYBR Green qPCR Premix 10 μ L,正、反向引物各0.4 μ L,cDNA模板0.1 μ L,无核酸酶水9.1 μ L。以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因mRNA的相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,引物序列及扩增产物长度见表4。统计学方法同“2.3.2”项下。

表4 各基因引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
GAPDH	正向:CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	反向:TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
TNF- α	正向:CAGGCGGTGCCTATGTCTC	89
	反向:CGATCACCCGGAAGTTCACTAG	
TNFR2	正向:TCGTGAACGTCTGTAGCAGC	146
	反向:GGACTGAGAGGGACACTCCT	
PI3K	正向:CCAGTGTCCAATACACAGCA	113
	反向:CAGGGAGTATTGATCTTCGGTATT	
AKT	正向:TTTGGAAGGTGATCTGGTG	131
	反向:CAGGACCGTTCTCAGTAAGC	

结果(表5)显示,与空白组相比,模型组小鼠前额叶皮质中TNF- α 、TNFR2、PI3K、AKT mRNA相对表达量均显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,PCTT低剂量组小鼠前额叶皮质中PI3K mRNA相对表达量,PCTT中剂量组小鼠前额叶皮质中TNF- α 、PI3K、AKT mRNA相对表达量,以及PCTT高剂量组小鼠前额叶皮质中TNF- α 、TNFR2、PI3K、AKT mRNA相对表达量均显著降低($P<0.05$)。

表5 各组小鼠前额叶皮质中 TNF-α/PI3K/AKT 信号通路相关基因 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

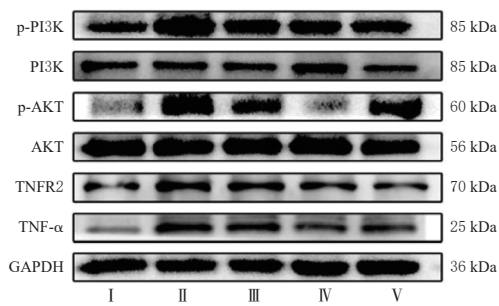
组别	TNF-α mRNA	TNFR2 mRNA	PI3K mRNA	AKT mRNA
空白组	1.04 ± 0.54	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.13
模型组	2.62 ± 0.75 ^a	1.78 ± 0.44 ^a	10.53 ± 1.24 ^a	1.55 ± 0.10 ^a
PCTT 低剂量组	2.16 ± 0.60	1.52 ± 0.04	3.10 ± 1.18 ^b	0.56 ± 0.37
PCTT 中剂量组	0.48 ± 0.03 ^b	1.37 ± 0.07	1.30 ± 0.97 ^b	0.46 ± 0.21 ^b
PCTT 高剂量组	0.45 ± 0.19 ^b	0.99 ± 0.18 ^b	1.68 ± 0.79 ^b	0.59 ± 0.18 ^b

a: 与空白组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.3.5 前额叶皮质中 TNF-α/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达检测

取“2.3.3”项下小鼠前额叶皮质组织 50 mg (除 FXT 组外每组取 3 只小鼠样本), 以 RIPA 裂解液提取组织中总蛋白, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度后将其加热变性。取变性后蛋白, 上样进行 SDS-PAGE 电泳 (先以电压 80 V 电泳 30 min, 再以电压 120 V 电泳 1 h), 然后以电流 400 mA 转膜 30 min 至 PVDF 膜, 用封闭液封闭 30 min; 加入一抗 (GAPDH 稀释比例为 1:20 000, TNF-α、TNFR2、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 稀释比例均为 1:1 000), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗 (稀释比例为 1:2 000), 室温孵育 1 h。ECL 显影扫描, 运用 ImageJ 软件计算蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白 (GAPDH) 条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平, 并计算 p-PI3K 与 PI3K、p-AKT 与 AKT 的比值。统计学方法同“2.3.2”项。

结果 (图 1、表 6) 显示, 与空白组相比, 模型组小鼠前额叶皮质中 TNF-α、TNFR2 蛋白表达水平和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, PCTT 低剂量组小鼠前额叶皮质中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值, PCTT 中剂量组小鼠前额叶皮质中上述 4 个指标的水平/比值, 以及 PCTT 高剂量组小鼠前额叶皮质中 TNFR2 蛋白表达水平和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值均显著降低 ($P < 0.05$)。



I: 空白组; II: 模型组; III: PCTT 低剂量组; IV: PCTT 中剂量组; V: PCTT 高剂量组。

图1 各组小鼠前额叶皮质中 TNF-α/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的电泳图

3 讨论

茯苓作为大宗常用中药一直是研究热点, 而茯苓皮受到的关注则较少, 对其药理作用及药效物质基础的研究均较为薄弱。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 从 PCTT 中共鉴定出 101 种化学成分, 为后续网络药理学

表6 各组小鼠前额叶皮质中 TNF-α/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF-α/GAPDH	TNFR2/GAPDH	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
空白组	0.29 ± 0.06	0.47 ± 0.20	0.92 ± 0.11	0.47 ± 0.05
模型组	0.93 ± 0.05 ^a	0.90 ± 0.05 ^a	1.57 ± 0.17 ^a	1.16 ± 0.08 ^a
PCTT 低剂量组	0.82 ± 0.10	0.83 ± 0.10	0.81 ± 0.10 ^b	0.70 ± 0.04 ^b
PCTT 中剂量组	0.60 ± 0.07 ^b	0.55 ± 0.07 ^b	0.73 ± 0.01 ^b	0.49 ± 0.05 ^b
PCTT 高剂量组	0.62 ± 0.22	0.40 ± 0.17 ^b	0.75 ± 0.14 ^b	0.76 ± 0.09 ^b

a: 与空白组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

研究提供了有效数据。网络药理学通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络, 对药物的药理作用及机制进行预测分析, 既可在药物治疗作用已知时, 预测其作用机制, 也可在药物治疗作用未知时, 筛选出预防某类疾病的活性成分或发现药物新的治疗作用^[15]。本研究通过网络药理学分析, 共获得 PCTT 中具有类药性的活性成分 25 个, 潜在作用靶点 180 个, 抑郁症相关作用靶点 1 858 个, 药物和疾病的交集靶点 66 个, 提示 PCTT 与抑郁症关联性较强。

抑郁症的发病机制复杂, 其病理生理机制有多种假说。近年来, 炎症免疫反应作为抑郁症的重要发病机制假说, 受到了广泛关注^[16]。本研究运用网络药理学分析 PCTT 抗抑郁的核心靶点及信号通路后发现, 其涉及的 TNF、PPARG、caspase-3 等核心靶点, 以及 IL-17、TNF 等主要信号通路均与炎症相关。

TNF-α 是炎症性抑郁症的核心上游促炎启动因子, 与抑郁严重程度、治疗响应程度密切相关; 其主要通过与 TNFR1 和 TNFR2 结合, 引起复杂的信号级联反应^[17-18]。据报道, 外周 TNF-α 可以通过受体介导的转运机制穿过完整的血脑屏障, 结合 TNFR1 并激活核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB), 上调 caspase-3 (PCTT 的核心作用靶点之一) 表达, 进而破坏紧密连接蛋白; 该过程不仅可促进抑郁表型产生, 还可以上调 5-HT 转运体的表达, 下调 Glu 转运体表达, 同时促进星形胶质细胞释放 Glu, 激活突触外 Glu 受体, 降低 BDNF 水平并诱导兴奋性毒性, 从而削弱抗抑郁药的疗效^[19-20]。中枢神经系统中 BDNF 和部分神经递质 (如 5-HT、DA、Glu 等) 的失衡, 也是抑郁症发生的重要原因^[21]。此外, 相关研究证实, PI3K/AKT 信号通路在抑郁症的发生发展中具有重要作用, 靶向激活该信号通路可能具有抗抑郁作用^[22]。因此, 在动物实验中, 本研究选择 TNF-α/PI3K/AKT 信号通路进行机制验证。

本研究动物实验结果显示, PCTT 可显著改善模型小鼠的抑郁样行为, 证实了 PCTT 的抗抑郁功效。在通常情况下, LPS 进入体内后会促进大量炎症介质 (如 IL-6、IL-1β、TNF-α 等) 释放; 而过量的 TNF-α 可竞争性结合 TNFR1, 抑制 TNFR2 表达, 进而直接抑制 PI3K、AKT 的磷酸化^[23]。本研究结果显示, PCTT 能降低抑郁模型小鼠血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平和海马组织中 Glu 水平, 升高海马组织中 5-HT、BDNF、DA 水平。这提示,

PCTT 可以抑制机体促炎因子生成,逆转炎症引发的 DA、5-HT(调控情绪的神经递质)合成减少和 Glu(兴奋性神经递质)过度释放;可通过上调 BDNF 表达,促进神经细胞存活,增加突触可塑性,促进神经新生,发挥抗抑郁作用。在蛋白与基因表达层面,与空白组相比,模型组小鼠前额叶皮质中 TNF- α /PI3K/AKT 信号通路相关蛋白或 mRNA 表达均显著上调,未出现“TNF- α 表达上调, TNFR2、p-PI3K、p-AKT 表达下调”的经典失衡表型。分析原因,可能是因为单次腹腔注射 LPS 属于急性短时炎症刺激,检测时间点落在炎症中晚期代偿窗口,表现为 LPS 诱导急性神经炎症中晚期的代偿性稳态应答,即 LPS 持续激活 Toll 样受体 4(Toll-like receptor-4, TLR4)/NF- κ B 信号通路,促使 TNF- α 大量合成,形成“TNF- α 升高 $\rightarrow$ 诱导 TNFR2 代偿性表达 $\rightarrow$ TNFR2 激活 PI3K/AKT 信号通路负反馈调控炎症”的固有免疫平衡环路。相较于模型组,PCTT 可抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性,降低 LPS 刺激后 TNF- α 释放水平,削弱机体应对炎症刺激的代偿性反应,最终使 TNF- α /PI3K/AKT 信号通路相关蛋白或 mRNA 表达下调。

综上所述,PCTT 可通过调控 TNF- α /PI3K/AKT 信号通路,下调促炎因子表达,调节 BDNF 释放,从而发挥抗抑郁作用。然而,本研究仍存在一定局限性,如针对 PCTT 发挥作用的效应成分,仅采用分子对接的方法考察了其核心靶点的结合能力,尚未对其进行实验验证及作用机制探讨,后续需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘悦,杨恬怡,齐鑫,等.基于肠-脑轴探讨肠道菌群调节抑郁症的机制及研究进展[J].牡丹江医学院学报,2024,45(6):135-139.
- [2] 梁晓涛,梁小珊,熊一凡,等.加味柴胡桂枝汤通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路改善慢性不可预见性温和应激模型小鼠的焦虑和抑郁状态[J].南方医科大学学报,2025,45(10):2146-2159.
- [3] 世界卫生组织.抑郁障碍:抑郁症[EB/OL].[2025-09-29].<https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail-depression>.
- [4] Smit A J T, Wu G W Y, Rampersaud R, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor, Val66Met polymorphism and open-label SSRI treatment response in major depressive disorder[J]. Psychoneuroendocrinology, 2024, 165: 107045.
- [5] Lasselin J. Is inflammation-associated depression atypical depression?[J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 193-194.
- [6] 周高梦,孔尚军,付明超,等.抑郁障碍的中西医研究进展[J].云南中医中药杂志,2025,46(9):91-96.
- [7] 潘翔.茯苓总三萜抗抑郁作用机制及效应成分研究[D].武汉:湖北中医药大学,2022:12-21.
- [8] 周旭香.基于“成分-药效”探讨茯苓空间部位的差异及加工方式对质量的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2024:15-16,19-20.

- [9] 冯桂芳.基于质谱技术的定志小丸治疗阿尔茨海默病的体内外化学物质组研究[D].合肥:中国科学技术大学,2019:30-39.
- [10] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.
- [11] 但文超,刘红旭,何庆勇,等.基于网络药理学与分子对接方法探讨黄山药干预冠心病的作用机制研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(6):1829-1843.
- [12] 沈月,潘翔,沈丽,等.血清药物化学结合网络药理学及实验验证探究茯苓总三萜抗抑郁效应成分及机制[J].中国中药杂志,2026,51(10):2867-2875.
- [13] 张丹妮,黄明玉,刘贵丽,等.基于网络药理学探讨黄芪甲苷对慢性社交挫败应激所致抑郁症的改善作用[J].广西医学,2025(8):1164-1172.
- [14] 罗心遥,张炼,邹忠梅,等.基于神经递质和炎症因子探讨茯苓对脂多糖诱导的小鼠急性抑郁样行为的改善作用[J].中华中医药杂志,2023,38(5):1989-1995.
- [15] 王子怡,王鑫,张岱岩,等.中医药网络药理学:《指南》引领下的新时代发展[J].中国中药杂志,2022,47(1):7-17.
- [16] 尹一淑,刘军莲,王佳平,等.抑郁症相关发病机制研究进展[J].医学综述,2022,28(12):2368-2372.
- [17] Treadway M T, Etuk S M, Cooper J A, et al. A randomized proof-of-mechanism trial of TNF antagonism for motivational deficits and related corticostriatal circuitry in depressed patients with high inflammation[J]. Mol Psychiatry, 2025, 30(4):1407-1417.
- [18] Kim J M, Kang H J, Kim J W, et al. Functional status modifies the impact of tumor necrosis factor- α on depression treatment response[J]. BJPsych Open, 2025, 11(5):e215.
- [19] Ma K, Zhang H X, Baloch Z. Pathogenetic and therapeutic applications of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in major depressive disorder: a systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5):733.
- [20] Tarwani R S, Awathale S N, Goyal S N, et al. Bempedoic acid mitigates BCG-induced depression in mice by modulating TNF- α /NF- κ B signaling and restoring brain serotonin contents[J]. Brain Res, 2025, 1869: 150031.
- [21] 陈刚,郑直,袁勇贵.难治性抑郁症的炎症机制研究进展[J].临床精神医学杂志,2023,33(3):242-245.
- [22] Guo N N, Wang X, Xu M R, et al. PI3K/AKT signaling pathway: molecular mechanisms and therapeutic potential in depression[J]. Pharmacol Res, 2024, 206: 107300.
- [23] Bi J J, Zhang H, Wei J, et al. Isoacteoside alleviates LPS-induced depressive-like behaviors in mice by inhibiting neuroinflammation through regulating microglial polarization and oxidative stress[J]. Behav Brain Funct, 2025, 21(1):30.

(收稿日期:2026-02-24 修回日期:2026-07-22)

(本文责编:林 静)