

参赛队员名称：陈钰霖

中学：深圳市高级中学

省份：广东省

国家/地区：中国

指导老师：张小龙

王源源

指导老师单位：西北农林科技大学深圳研究院

深圳市高级中学

论文题目：基于 TSP0 靶点的大叶茺抗抑郁活性成分

虚拟筛选及分子机制研究

基于 TSPO 靶点的大叶茺抗抑郁活性成分 虚拟筛选及分子机制研究

摘要：抑郁症是全球主要精神疾病之一，现有药物存在起效慢、副作用大等问题。大叶茺为胡椒科胡椒属植物，前期研究从其乙酸乙酯部位分离得到包括大叶茺酰胺 W 在内的酰胺生物碱类成分，并初步发现其具有抗抑郁活性。本项目以 TSPO 为核心靶点，通过分子对接虚拟筛选从大叶茺化学成分中确定抗抑郁活性最佳的候选化合物，并构建 CUMS 大鼠抑郁模型进行活性验证。研究首次将 TSPO 介导的线粒体自噬通路引入大叶茺抗抑郁活性成分的筛选与机制研究，揭示了大叶茺酰胺 W 通过 TSPO/PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬、发挥神经保护作用的分子机制，为基于天然产物的新型抗抑郁药物研发提供了理论依据。

关键词：大叶茺；虚拟筛选；抑郁症；天然产物；TSPO；线粒体自噬

目录

1. 研究背景和意义	4
2. 拟解决的科学问题	6
3. 研究方案	7
3.1 大叶茛成分提取、分离纯化与结构鉴定	7
3.2 大叶茛抗抑郁作用靶点与信号通路的网络药理学预测	9
3.3 基于分子对接的大叶茛化学成分虚拟筛选与先导化合物确定	10
4. 实验结果	15
4.1 大叶茛活性成分的制备与结构鉴定	15
4.2 大叶茛抗抑郁核心靶点的网络药理学筛选结果	17
4.3 大叶茛化学成分的分子对接虚拟筛选与先导化合物确定	20
4.4 CUMS 模型大鼠抑郁样行为的建立	23
4.5 大叶茛酰胺 W 改善 CUMS 模型大鼠抑郁样行为	23
4.6 大叶茛酰胺 W 对 CUMS 模型大鼠神经递质的影响	24
4.7 大叶茛酰胺 W 对 CUMS 模型大鼠海马 BDNF 及炎症因子的影响	25
4.8 大叶茛酰胺 W 通过 TSP0 介导的线粒体自噬通路发挥抗抑郁作用 ...	27
4.9 大叶茛酰胺 W 的药代动力学及脑分布特征	27
5. 讨论	29
5.1 大叶茛酰胺 W 抗抑郁效应的行为学证据	29
5.2 大叶茛酰胺 W 的多靶点作用机制	29
5.3 TSP0 介导的线粒体自噬通路在抗抑郁中的作用	29
6. 结论	31
7. 参考文献	32
致 谢	33

1. 研究背景和意义

抑郁症是一种以持续情绪低落、兴趣丧失、认知功能损害为核心症状的精神障碍^[1]，全球约有 3.5 亿患者，中国终身患病率已达 3.4%，约 5000 万人存在治疗需求。现有抗抑郁药物主要包括选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂（SSRIs）、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂（SNRIs）等^[2]，但仍存在以下突出问题：起效延迟，通常需要 2-4 周才能发挥临床效应^[3]；副作用明显，包括性功能障碍、体重增加、胃肠道反应等^[4]；治疗抵抗，约 30% 的患者对现有药物治疗无效；作用机制单一，主要围绕单胺类神经递质系统，未能覆盖抑郁症复杂的病理生理学机制^[5]。因此，从天然产物中发掘具备新型作用机制的抗抑郁先导化合物，已成为当前抗抑郁药物研发的重要方向。

大叶蒟（*Piper laetispicum* C. DC.）是胡椒科（*Piperaceae*）、胡椒属（*Piper*）植物，是中国特有的物种，又名山胡椒、野胡椒、小肠风^[6-8]（图 1）。大叶蒟主要分布于中国广东、广西、云南及海南等省区，其中海南省为其核心产区，储量约占全国（乃至全球）总量的 90% 以上^[9]。根据《中国植物志》记载，大叶蒟为木质攀援藤本，植株可高达 10 米，枝条表面光滑无毛；叶片呈长圆形，叶背具稀疏长柔毛，叶脉呈羽状网状结构^[10]。现代药理学研究表明，大叶蒟的根和茎中分离得到的大叶蒟素具有显著的抗抑郁活性^[8]。此外，该植物提取物中富含多种生物活性成分，包括酰胺生物碱类、吡咯烷生物碱类、黄酮类及甾醇类化合物，具有潜在的药用开发价值。然而，目前对大叶蒟的化学成分系统研究仍较为匮乏，其药理作用机制尚未充分阐明，导致该药用植物资源未能得到科学合理的开发和利用。目前，针对大叶蒟的化学成分分析、活性成分筛选及药理机制研究仍处于初步阶段，缺乏系统的提取、分离及结构优化方法，限制了其在抗抑郁等领域的深入应用。

大叶蒟中化学成分类型多样，抗抑郁作用的物质基础尚不明确，各成分的精确分子靶点及信号转导路径亦尚属空白。近年研究揭示，TSPO（转位蛋白）可通过介导线粒体自噬，参与调控神经炎症与突触可塑性，被认为是抑郁症潜在的新靶点^[11-13]。基于此，本课题遵循“物质基础—先导发现—活性验证”的递进式研究思路：首先建立大叶蒟化学成分的提取、分离纯化与结构鉴定工艺，

为后续研究提供化学成分库与受试化合物；进而以 TSPO 为核心靶点，通过分子对接虚拟筛选从大叶蒟系列化学成分中筛选确定抗抑郁活性最佳的候选化合物；最后在 CUMS 抑郁模型中对该候选化合物进行系统的活性验证，并从单胺类神经递质调控与 TSPO 介导的线粒体自噬信号通路两个层面阐明其作用机制。研究成果不仅有助于从分子层面诠释大叶蒟抗抑郁活性成分的科学内涵，更可为基于天然产物的新型抗抑郁药物研发与自主知识产权创新药物的创制提供坚实的理论实验依据。



图1 大叶蒟

2. 拟解决的科学问题

一、如何建立大叶葇化学成分的高效提取分离工艺并准确鉴定其结构？

大叶葇化学成分复杂多样，目前尚缺乏可重复的标准化提取分离工艺。本研究拟通过乙醇回流提取、大孔吸附树脂与制备液相色谱联合分离，并综合运用核磁共振（NMR）、高分辨质谱（HR-MS）等波谱手段准确鉴定其化学结构，建立稳定可靠的制备流程，为后续网络药理学与分子对接虚拟筛选提供可靠的化学成分库。

二、在缺乏系统活性筛选数据的情况下，如何通过分子对接虚拟筛选快速确定大叶葇抗抑郁活性最优的先导化合物？

大叶葇中已分离鉴定的化学成分包括酰胺生物碱类、黄酮类、甾醇类等多种结构类型，且潜在作用靶点繁杂，逐一通过传统药效实验筛选效率低。本研究首先采用网络药理学从成分—靶点—疾病整体网络中预测并综合评判出抗抑郁核心靶点，再以其为受体对大叶葇化学成分开展分子对接虚拟筛选快速锁定抗抑郁活性最优的先导化合物。

三、筛选确定的最佳候选化合物是否通过 TSPO 介导的线粒体自噬通路发挥抗抑郁作用？其分子机制是什么？

TSPO 介导的线粒体自噬通路在抗抑郁中的作用是近年新发现的研究方向，目前国内外尚未见大叶葇活性成分经此通路发挥抗抑郁作用的系统报道。本研究在 CUMS 大鼠模型上首次系统评价候选化合物对该通路的调控作用：从行为学层面评价抗抑郁效应与量效关系，并从神经化学层面检测海马与前额叶皮质中 5-HT、DA、NE 等单胺类神经递质水平变化，进一步从分子机制层面探讨其靶向结合 TSPO 并激活 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路的全过程。该问题的解决将填补 TSPO 通路在天然产物抗抑郁领域的研究空白，为以 TSPO 为靶点的新型抗抑郁药物研发提供原创性实验依据。

3. 研究方案

3.1 大叶药成分提取、分离纯化与结构鉴定

3.1.1 实验材料与仪器

实验药材为大叶药的干燥根及根茎。主要试剂包括：95%乙醇、甲醇（色谱纯）、氘代甲醇（CD₃OD）、D101 大孔吸附树脂、蒸馏水等。主要仪器包括：Bruker Avance III 600 核磁共振波谱仪、高分辨质谱仪、制备型高效液相色谱仪（C18 制备柱）、旋转蒸发仪、循环水式真空泵等。

3.1.2 提取、分离与纯化

（1）回流提取

取大叶药干燥根及根茎 5 kg，剔除泥沙与杂质后用中药粉碎机粗粉碎（粒径约 2-5 mm），加入 10 倍量（50 L）95% 乙醇（v/v）浸泡 30 min 使药材充分溶胀；升温至 80℃ 进行加热回流提取 3 次，每次 2 h，期间以 300 r/min 持续搅拌以提高传质效率；每次提取结束后用 200 目滤布抽滤，合并 3 次滤液；滤液于 55-60℃、-0.08 MPa 下减压回收乙醇，至无醇味后再于 70℃、-0.08 MPa 减压浓缩至无流动性浸膏（水分含量 < 5%），得乙醇提取浸膏；浸膏密封后于 4℃ 冷藏备用，并记录浸膏得率。

（2）大孔吸附树脂柱色谱分离

将上述乙醇提取浸膏用适量 95% 乙醇超声溶解（40℃，10 min），加水稀释至乙醇浓度约 30%（v/v），以 3000 r/min 离心 10 min 除去不溶物；上样至经预处理（95% 乙醇浸泡 24 h → 去离子水洗至无醇味 → 装柱）的 D101 大孔吸附树脂柱（径高比 1:8，干树脂装填量约 2.5 kg），上样流速 1-2 BV/h，吸附平衡后依次以乙醇-水体系（体积比 50:50、60:40、70:30、80:20、95:5）进行梯度洗脱，每个梯度 3-4 BV，流速 2 BV/h；按梯度分别收集洗脱液，以 TLC（GF254 硅胶板，三种展开系统）跟踪合并相同组分，60℃ 减压浓缩至干，分别得到 Fr.1（50:50）、Fr.2（60:40）、Fr.3（70:30）、Fr.4（80:20）、Fr.5（95:5）共 5 个主要馏分；各馏分密封后于 4℃ 冷藏备用。

(3) 制备液相色谱纯化

取 Fr.4 馏分（酰胺生物碱类富集段），用色谱甲醇溶解并经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，以制备型高效液相色谱仪进行分离纯化。色谱条件：C18 反相制备柱（ $250\ \text{mm} \times 50\ \text{mm i.d.}$, $10\ \mu\text{m}$ ）；流动相为甲醇（A）-水（B）体系，梯度洗脱（0-15 min, 40% A；15-30 min, 40%-50% A；30-60 min, 50%-60% A；60-80 min, 60%-80% A；80-90 min, 80% A）；流速 40 mL/min；检测波长 254 nm 与 280 nm 双波长同时检测；进样量 5 mL（约 200 mg 馏分/次）。按色谱峰收集馏分， 60°C 减压浓缩至干，得 Fr.4-1 ~ Fr.4-4 共 4 个亚馏分；其中 Fr.4-2 与 Fr.4-3 经 HPLC 面积归一化法检测（纯度 $\geq 98\%$ ）后分别确证为大叶蒟酰胺 W 与大叶蒟素纯品。对 Fr.4-1 进一步以半制备色谱柱（ $250\ \text{mm} \times 20\ \text{mm i.d.}$, $5\ \mu\text{m}$ ）二次纯化（流动相甲醇-水 55:45 等度洗脱，流速 10 mL/min），依次得到胡椒碱、Fagaramide、墙草碱等其他酰胺类单体化合物。所有单体化合物经 HPLC 纯度复检后密封、充氮气保护、避光冷藏于 -20°C ，备用。图 2 为活性成分制备流程图。

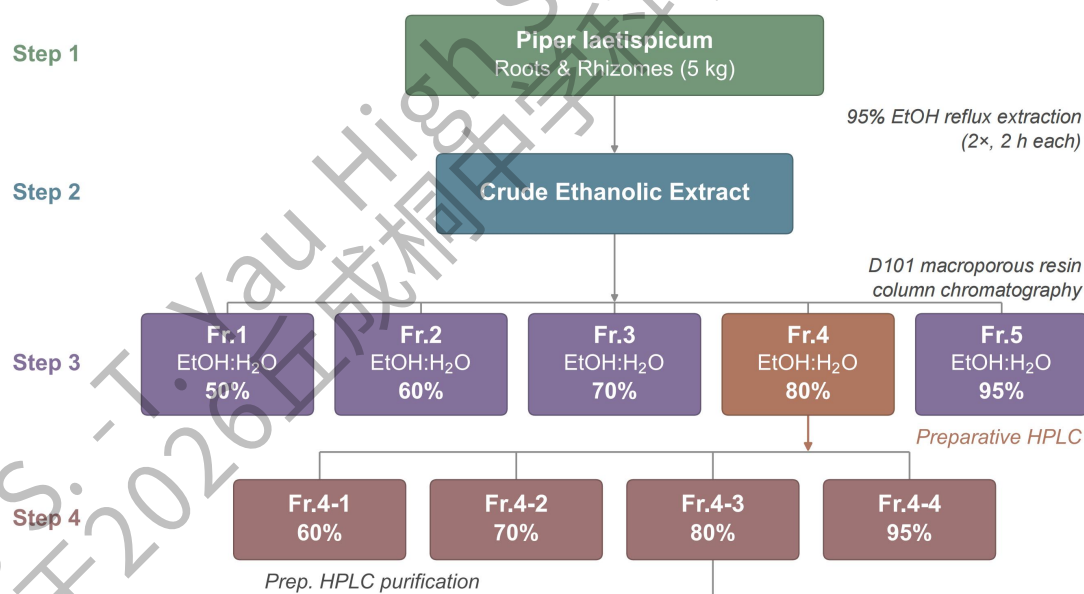


图 2 大叶蒟活性成分制备流程图

3.1.3 结构鉴定

综合运用质谱（MS）、核磁共振（NMR）、紫外（UV）、红外（IR）等波谱技术对目标化合物的结构进行鉴定。取适量分离得到的化合物，用氘代甲

醇溶解后置于核磁管中，使用 Bruker Avance III 600 核磁共振波谱仪进行 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 谱的测定。通过高分辨质谱确定分子式，结合各二维核磁共振谱图对全部 ^1H 和 ^{13}C 核磁信号进行归属，最终确证化合物的化学结构。

3.2 大叶药抗抑郁作用靶点与信号通路的网络药理学预测

3.2.1 化学成分与疾病靶点的获取

从 4.1 节分离鉴定的 32 个化学成分中选取 6 个具有代表性且可获得三维结构的化合物（胡椒碱、墙草碱、Antiepilepsirine、Fagaramide、胡椒新碱及大叶药酰胺 W），采用 SwissTargetPrediction 平台（物种 *Homo sapiens*）预测各成分的潜在作用靶点（概率阈值 ≥ 0.1 ）；同时从 Open Targets 数据库获取重症抑郁障碍（MDD）的疾病关联基因。以成分预测靶点与 MDD 疾病靶点的交集定义为大叶药的潜在抗抑郁靶点。以课题组前期从大叶药根及根茎中分离鉴定的系列酰胺生物碱类成分为核心（包括大叶药素、大叶药酰胺 W 及其他大叶药酰胺系列成分），结合文献检索补充大叶药中已报道的黄酮类、甾醇类、吡咯烷生物碱类等其他类型化学成分，共同构建大叶药化学成分虚拟筛选库。采用 ChemDraw 绘制各化合物的二维结构，经 Open Babel 或 Discovery Studio 软件以 MMFF94 力场进行能量最小化，生成三维构象并保存为适合分子对接的配体文件（MOL2/PDBQT 格式）。

3.2.2 蛋白互作网络与功能富集分析

将潜在抗抑郁靶点导入 STRING 数据库（combined score ≥ 0.4 ）构建蛋白互作（PPI）网络并识别核心（hub）基因；采用 g:Profiler 平台开展 GO 功能与 KEGG 通路富集分析，考察潜在抗抑郁靶点在神经递质信号通路及线粒体稳态、自噬调控、氧化应激等相关生物学过程中的分布特征。为评估线粒体相关候选蛋白与成分网络的关联，将定位于线粒体外膜的转位蛋白 TSPO 一并纳入 PPI 网络，分析其与潜在抗抑郁靶点之间的直接互作关系。综合“疾病相关性、成分网络连通性、机制新颖性与临床可开发性、前期研究基础”四个维度对候选靶点进行综合评判，确定最佳靶点，并将其作为后续分子对接虚拟筛选的受体蛋白。

3.2.3 核心靶点的综合评判与确定

从 RCSB 蛋白质数据库 (PDB) 下载蛋白晶体结构, 以其配体结合活性口袋作为对接位点。采用 AutoDock Tools 完成去除水分子、加氢、删除原配体等预处理, 计算 Gasteiger 电荷, 将蛋白保存为受体文件 (PDBQT 格式), 并以活性口袋中心设置对接盒子 (Grid Box), 保存为 PDBQT 格式受体文件。此外, 为综合评价候选化合物的抗抑郁潜力, 选取 5-羟色胺转运体 (SERT) 等单胺能系统相关靶点作为平行筛选靶点, 按相同流程完成预处理, 构建多靶点虚拟筛选体系。

3.2.4 大叶药化学成分库的构建

采用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 将大叶药化学成分库中所有化合物逐一与最佳靶点进行对接, 以结合自由能 (ΔG , kcal/mol) 作为主要评价指标, 结合氢键、疏水相互作用、 π - π 堆积等关键残基相互作用分析, 对全部成分进行排序。对排名靠前的候选化合物, 进一步采用 Discovery Studio 分析其与靶蛋白的结合模式, 并借助 pkCSM 在线 ADMET 预测平台 (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) 系统评估其小肠吸收 (HIA)、血脑屏障通透性 (BBB)、CYP450 代谢抑制/底物特性、致突变性 (AMES)、致癌性、肝毒性及 hERG 心脏毒性等关键药代动力学与毒理学参数, 综合验证对接构象的稳定性与候选化合物的成药前景, 以提高虚拟筛选结果的可靠度。

3.3 基于分子对接的大叶药化学成分虚拟筛选与先导化合物确定

3.3.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 180-220 g, 购自广东省动物中心。饲养环境: 室温 23-25°C, 湿度 55%-65%, 12 h 光照/黑暗周期, 自由摄食饮水。所有实验操作遵循《实验动物护理和使用指南》及相关伦理规定。

3.3.2 实验材料与设备

主要试剂见表 1, 主要实验设备见表 2。

表 1 主要实验试剂

试剂	来源	试剂	来源
大叶药酰胺 W	实验室自制, 纯	兔抗 p62 抗体	Abcam, UK

	度>98%		
氟西汀 (Fluoxetine)	美国 Sigma	盐酸氯胺酮	美国 Sigma
5-HT ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems	NE ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems
DA ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems	BDNF ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems
IL-6 ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems	TNF- α ELISA 试剂盒	美国 R&D Systems
兔抗 TSPO 抗体	Abcam, UK	兔抗 PINK1 抗体	Abcam, UK
兔抗 Parkin 抗体	Abcam, UK	兔抗 Beclin-1 抗体	Abcam, UK
兔抗 LC3 抗体	Abcam, UK		

表 2 主要实验设备

设备	型号	用途
高效液相色谱仪	Waters Alliance 2695	大叶蒟酰胺 W 含量测定
制备型 HPLC	Hanbon NP7000	化合物分离纯化
冷冻干燥机	Labconco FreeZone	样品冻干
酶标仪	BioTek Synergy H1	ELISA 检测
荧光定量 PCR 仪	ABI 7500 Fast	qRT-PCR
蛋白电泳转印系统	Bio-Rad	Western Blot
激光共聚焦显微镜	Zeiss LSM 880	免疫荧光观察
透射电子显微镜	JEM-1400	线粒体超微结构

3.3.3 实验方案设计

60 只雄性 SD 大鼠，适应性饲养 1 周后，筛选出自主活动在一定范围内的大鼠随机分为 6 组 (n=10)：

- (1) 正常对照组 (Ctrl)：正常饲养，不给药；
- (2) CUMS 模型组 (CUMS)：仅造模，不给药；
- (3) CUMS+氟西汀组 (CUMS+Flu)：CUMS+氟西汀 10 mg/kg；
- (4) CUMS+先导化合物低剂量组 (CUMS+W-L)：CUMS+大叶蒟酰胺 W 15 mg/kg；
- (5) CUMS+先导化合物中剂量组 (CUMS+W-M)：CUMS+先导化合物 30 mg/kg；

(6) CUMS+先导化合物高剂量组 (CUMS+W-H) : CUMS+先导化合物 60 mg/kg。

每只大鼠均单笼饲养, 除正常对照组外, 其余大鼠给予 CUMS 刺激。CUMS 造模持续 4 周, 同时灌胃给药, 每日 1 次, 给药体积均为 2 mL/kg。正常对照组和模型对照组灌胃给予等体积生理盐水。造模结束后进行行为学测试, 测试结束后取脑组织进行分子生物学检测。

3.3.4 实验方法

(1) CUMS 模型建立

参照 Willner 经典 CUMS 程序, 每日随机给予以下应激刺激之一: 食物剥夺 24 h、水剥夺 24 h、湿笼 (垫料加水 200 mL) 24 h、倾斜笼 45°放置 24 h、夹尾 1 min、冰水游泳 5 min (4°C)、昼夜颠倒 24 h、束缚应激 2 h、噪音刺激 (80 dB) 1 h。每种刺激不连续出现, 持续 4 周。

(2) 行为学测试

糖水偏好实验 (SPT): 该实验周期为 4 天, 第 1 次给予大鼠 2 瓶 1% 的蔗糖水, 24 h 后将其中 1 瓶蔗糖水替换为同体积的纯水。第 3 天大鼠禁食 24 h, 第 4 天给 1% 蔗糖溶液和纯水溶液各 1 瓶, 24 h 后计算糖水偏好系数 (PI), $PI = \text{蔗糖水消耗量} / (\text{蔗糖水消耗量} + \text{纯水消耗量}) \times 100\%$ 。于造模第 14 d 和第 29 d 各进行一次测定。

强迫游泳实验 (FST): 实验仪器为透明的圆筒 (直径 12 cm×高度 45 cm), 将大鼠放入装有水的圆筒中 (水温 24-26°C, 水深 10 cm), 用摄像机记录 6 min 内大鼠在水中的活动情况, 用行为学视频分析系统分析大鼠后 4 min 的运动情况, 统计大鼠静止不动的时间。以大鼠停止挣扎或处于漂浮、头部浮于水面确定为“不动”。于造模第 15 d 和第 30 d 各进行一次测定。

旷场实验 (OFT): 将大鼠置于敞箱 (50×50×40 cm) 中央, 记录 15 min 内总运动距离、中央区停留时间、直立次数。

新奇抑制摄食实验 (NSFT): 大鼠禁食 24 h 后, 在陌生环境中放置食物, 记录首次摄食潜伏期。

(3) 神经递质含量测定

行为学测试后，大鼠麻醉处死，迅速分离海马和前额叶皮质，液氮速冻。采用 HPLC-ECD 法检测 5-HT、NE、DA 及其代谢产物 5-HIAA、DOPAC、HVA 的含量。取海马组织，每份依次加入 700 μ L 甲酸-甲醇（1：1000）溶液和 10 μ L 内标（3,4-二羟基苄胺氢溴酸，10 μ g/mL），13000 r/min 离心 15 min（4 $^{\circ}$ C），吸取上清，氮气吹干，每份再加入 100 μ L 流动相溶解，13000 r/min 离心 15 min（4 $^{\circ}$ C）后，吸取上清。5-HT 和 5-HIAA 含量采用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）方法检测。

(4) 神经递质再摄取抑制实验

制备大鼠脑突触体，参照 Whittaker 方法。分别加入不同浓度先导化合物（0.1-100 μ M），以 [^{3} H]-5-HT、[^{3} H]-NE、[^{3} H]-DA 为底物，检测突触体对单胺类神经递质的摄取量，计算 IC₅₀。

(5) Western Blot 检测

提取海马组织总蛋白，BCA 定量。SDS-PAGE 电泳分离，转膜，5%脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗（TSPO、PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3、p62、BDNF、cleaved caspase-3，1:1000），4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加入 HRP 标记二抗（1:5000），室温孵育 1 h。ECL 显影，ImageJ 分析灰度值。

(6) 实时荧光定量 PCR

Trizol 提取海马总 RNA，逆转录为 cDNA。SYBR Green 法检测 BDNF、TSPO、PINK1、Parkin、Beclin-1 mRNA 表达水平，以 GAPDH 为内参， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

(7) 免疫荧光共定位

冰冻切片，4%多聚甲醛固定，0.3% Triton X-100 通透，10%山羊血清封闭。加入兔抗 TSPO（1:200）和鼠抗 COX IV（线粒体标志物，1:200），4 $^{\circ}$ C 过夜。加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 和 Alexa Fluor 594 标记山羊抗鼠 IgG，室温避光孵育 1 h。DAPI 染核，抗荧光淬灭封片剂封片，激光共聚焦显微镜观察并拍照。

(8) 透射电镜观察线粒体超微结构

取海马 CA3 区组织，2.5%戊二醛固定，1%锇酸后固定，丙酮梯度脱水，Epon 812 包埋。超薄切片（70 nm），醋酸铀-柠檬酸铅双染色，透射电镜观察线粒体形态、嵴结构及自噬体形成。

(9) 药代动力学研究

SD 大鼠随机分为 3 组，分别灌胃给予先导化合物 10、20、40 mg/kg。于给药前及给药后 5、15、30 min，1、2、4、8、12、24 h 眼眶取血，HPLC-UV 法测定血浆药物浓度。另取大鼠，给药后 2 h 处死，分离脑组织，测定脑组织中药物浓度。

3.3.5 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，组间两两比较采用 LSD-t 检验或 Dunnett's T3 检验。行为学数据采用重复测量方差分析。P<0.05 认为差异有统计学意义。

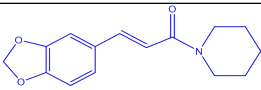
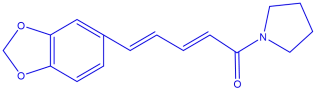
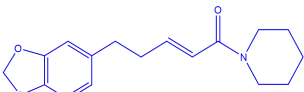
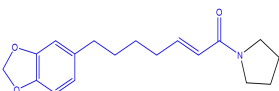
4. 实验结果

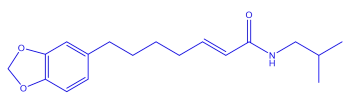
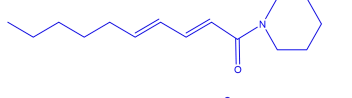
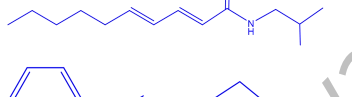
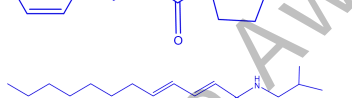
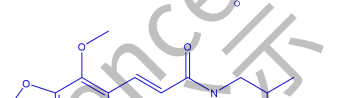
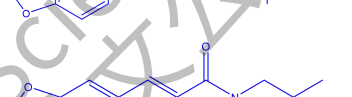
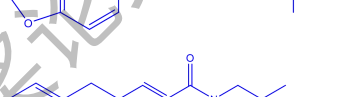
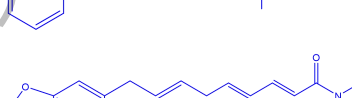
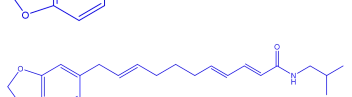
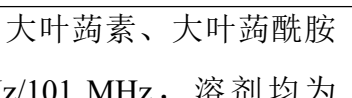
4.1 大叶茺活性成分的制备与结构鉴定

按照 3.1.2 所述实验流程得深棕色总浸膏，将总浸膏用蒸馏水混悬后，依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取各 3 次，分别浓缩得到石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及水部位。结合 TLC 跟踪及 HPLC 分析，确定**乙酸乙酯部位**为酰胺生物碱类成分的主要富集部位，故以其作为后续分离的目标部位。

对乙酸乙酯部位采用多种色谱技术联用进行定向分离：首先经硅胶柱色谱（200~300 目）以石油醚-乙酸乙酯或二氯甲烷-甲醇系统进行梯度洗脱，得到 Fr.1~Fr.8 共 8 个组分；各组分进一步经 ODS 反相柱色谱（甲醇-水梯度洗脱）、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（氯仿-甲醇 1:1 或纯甲醇为流动相）纯化；对难以分离的同系物或微量成分，采用半制备型高效液相色谱（C18 色谱柱，乙腈-水或甲醇-水含 0.1%甲酸为流动相，流速 3 mL/min，检测波长 254 nm 和 280 nm）进行反复制备，最终分离得到 32 个单体化合物，其中 5 个为未见文献报道的新结构化合物。所分离鉴定的化合物类型以不饱和脂肪酰胺为主，涵盖吡咯烷型、哌啶型及异丁胺型酰胺，侧链多含共轭双烯或苯基取代体系。已鉴定的代表性化合物见表 3。

表 3 大叶茺中分离鉴定的代表性化合物

序号	化合物名称	分子式	结构式
1	Antiepilepsirine	$C_{15}H_{17}NO_3$	
2	N-[10-(13,14-Methylenedioxyphenyl)-7(E),9(Z)-pentadienoyl]-pyrrolidine	$C_{16}H_{17}NO_3$	
3	胡椒新碱	$C_{17}H_{21}NO_3$	
4	胡椒碱	$C_{17}H_{19}NO_3$	

5	大叶茛酰胺 W	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₇	
6	2,4-decadienoic acid piperidide	C ₁₅ H ₂₅ NO	
7	墙草碱	C ₁₄ H ₂₅ NO	
8	1-肉桂酰吡咯烷	C ₁₃ H ₁₅ NO	
9	十二二烯酸异丁酰胺	C ₁₆ H ₂₉ NO	
10	5'-甲氧基-3',4'-次甲二氧苯基桂皮酸异丁基酰胺(K6)	C ₁₅ H ₁₉ NO ₄	
11	Fagaramide	C ₁₄ H ₁₇ NO ₃	
12	(E)-N-isobutyl-5-phenylpent-2-enamide	C ₁₅ H ₂₁ NO	
13	大叶茛酰胺 A	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	
14	大叶茛素	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃	
15	(E)-N-isobutyl-9-phenylnon-2-enamide	C ₁₉ H ₂₉ NO	

对代表性化合物分别测定 ¹H NMR 与 ¹³C NMR (大叶茛素、大叶茛酰胺 A: 600 MHz/151 MHz, 胡椒碱、墙草碱: 400 MHz/101 MHz, 溶剂均为 MeOD), 其关键核磁共振谱特征见表 4。

表 4 代表性化合物的核磁共振波谱特征

化合物	¹ H NMR 关键信号	¹³ C NMR 关键信号	结构鉴定结论
大叶蒟素	δ H 7.11 (dd, J = 15.1, 10.7 Hz) δ H 6.70 (d, J = 7.9 Hz) δ H 5.92 (d, J = 15.1 Hz) δ H 5.87 (s, OCH ₂ O) δ H 0.92 (d, J = 6.7 Hz)	δ C 167.76 (酰胺羰基) δ C 100.64 (亚甲二氧基) δ C 147.65, 145.78, 108.43, 107.59 (苯环) δ C 142.28~128.65 (共轭烯碳) δ C 46.64 (N-CH ₂)	含较长共轭多烯侧链的异丁基酰胺
大叶蒟酰胺 A	δ H 7.12 (dd, J = 15.1, 10.8 Hz) δ H 6.71 (d, J = 7.9 Hz) δ H 5.95 (d, J = 15.1 Hz) δ H 2.88 (t, J = 6.7 Hz, CH ₂) δ H 0.92 (d, J = 6.7 Hz)	δ C 167.76 (酰胺羰基) δ C 100.67 (亚甲二氧基) δ C 147.67, 145.82, 108.46, 107.64 (苯环) δ C 140.52, 140.37, 134.36, 131.18, 128.75, 127.75, 122.14, 120.90 (烯碳) δ C 46.65 (N-CH ₂)	与大叶蒟素同母核, 脂肪侧链较短
胡椒碱	δ H 6.61 (ddd, J = 14.2, 10.4, 4.2 Hz) δ H 5.92 (dd, J = 14.6, 4.7 Hz)	δ C 167.89 (酰胺羰基) δ C 102.92 (亚甲二氧基) δ C 149.98, 149.94 (苯环季碳) δ C 48.31, 44.74 (哌啶 N-CH ₂) δ C 124.10~144.78 (共轭双烯碳)	与文献报道波谱数据完全一致
墙草碱	δ H 6.11~6.21 (烯氢, J = 11.5~14.6 Hz) δ H 0.88~0.97 (烷基甲基)	δ C 167.79 (酰胺羰基) δ C 46.63 (N-CH ₂) δ C 142.65, 140.78, 128.41, 121.63 (共轭二烯碳) δ C 12.98 (末端甲基)	N-异丁基-2,4-癸二烯酰胺

共性特征：所有酰胺类生物碱均呈现酰胺羰基特征碳信号（ δ C 167.8~168.0）；含胡椒基结构单元的化合物均给出亚甲二氧基特征信号（ δ C 100.6~102.9，¹H δ H 5.85~5.95，s）；共轭双键质子偶合常数为 14~15 Hz（反式）与 10.7~11.5 Hz（顺式），双键几何构型（E/Z）由偶合常数结合 NOESY 相关信号确定。

4.2 大叶蒟抗抑郁核心靶点的网络药理学筛选结果

对大叶茺 6 个代表性活性成分开展网络药理学分析。结果显示：6 个成分经 SwissTargetPrediction 预测（概率 ≥ 0.1 ）共获得 79 个人源靶点，与 Open Targets 数据库中 2000 个重症抑郁障碍（MDD）关联基因取交集，共得 51 个交集靶点（图 3 A），提示大叶茺活性成分可通过多靶点协同发挥抗抑郁作用。进一步分析发现，多个成分可共同作用于同一靶点：单胺氧化酶 B（MAOB）、SOAT1、HDAC6 等分别被 5 个成分同时预测命中，5-羟色胺受体 2C（HTR2C）、多巴胺受体 D3（DRD3）等也被 4 个成分共同命中，其中大叶茺酰胺 W 贡献了 MAOB、SOAT1、HDAC6 等关键靶点，成分-靶点网络见图 3 B。将 51 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络（combined score ≥ 0.4 ），共获得 308 条互作边，其中 PTGS2、EGFR、STAT3、PPARG、ESR1、MAOA、MAOB、APP、DRD2、SLC6A4 等为核心（hub）基因，主要涉及单胺能神经递质代谢与神经炎症相关蛋白。特别地，将 TSPO 纳入网络后新增 6 条互作边——TSPO 与 MAOB、MAOA、SLC6A3（单胺代谢与转运核心）以及 APP、PTGS2、SNCA（神经炎症与突触损伤相关）等 6 个交集蛋白直接互作（图 3 C），表明 TSPO 是连接单胺能系统与线粒体/炎症调控两条线索的网络枢纽。GO 与 KEGG 富集分析显示（图 3 D），51 个交集靶点显著富集于 5-羟色胺能突触、神经活性配体-受体相互作用等经典神经递质通路，与线粒体功能障碍、氧化应激密切相关的生物过程，提示大叶茺活性成分的靶点网络覆盖经典单胺通路与线粒体稳态调控两条作用线索。综合上述维度，网络药理学分析筛选并判定 TSPO 为最佳核心靶点；据此以 TSPO 为受体开展下述分子对接虚拟筛选与先导化合物确定研究。

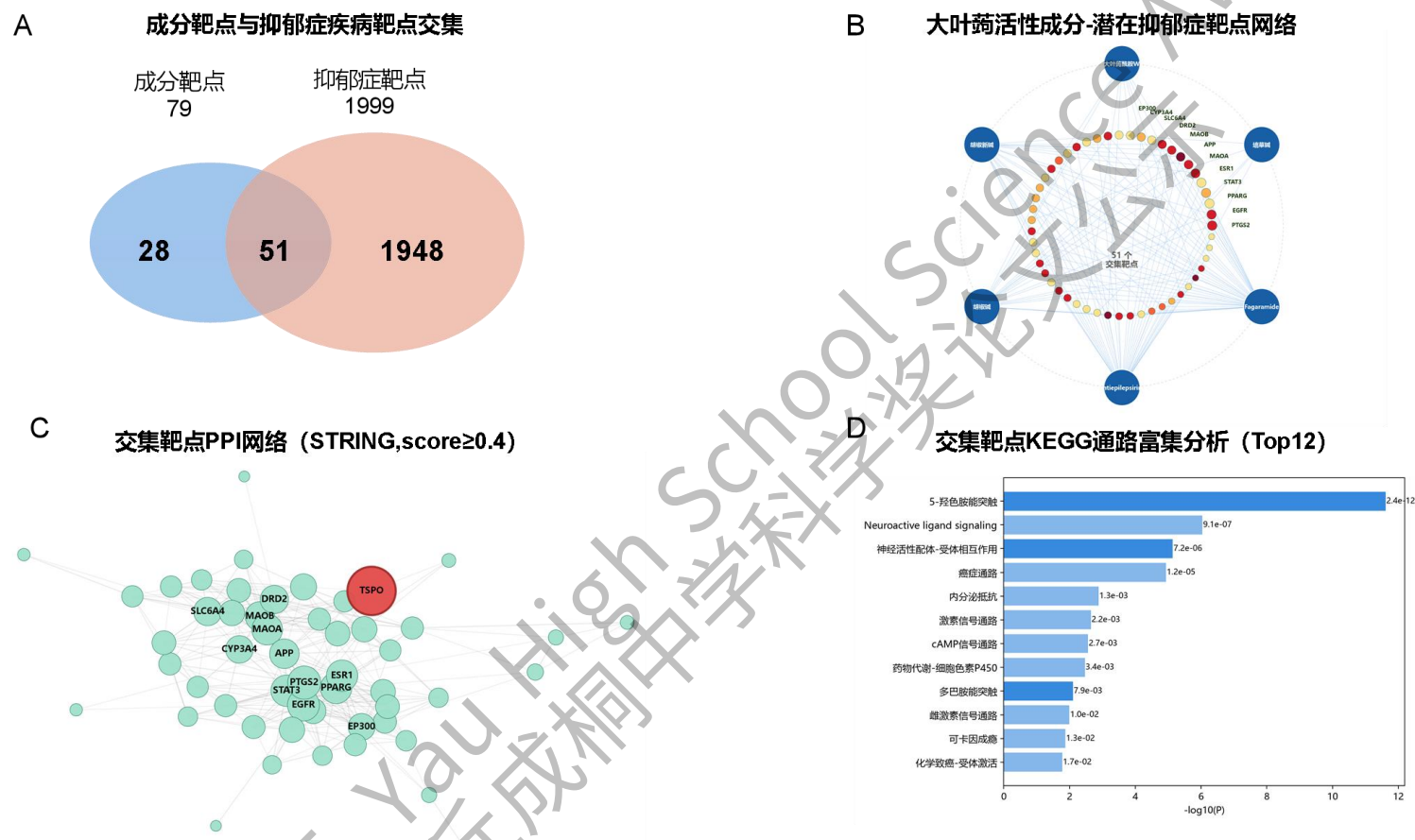


图3 大叶菊抗抑郁核心靶点的网络药理学筛选结果

(A: 大叶菊成分靶点与抑郁症(MDD)疾病靶点的韦恩图; B: 大叶菊活性成分-潜在抗抑郁靶点网络, 外圈=成分, 内圈=交集靶点; 内圈节点大小 $\propto$ 蛋白交互度, 颜色 $\propto$ 命中成分数; C: 交集靶点蛋白互作(PPI)网络; D: 交集靶点 KEGG 通路富集分析)

4.3 大叶茛化学成分分子对接虚拟筛选与先导化合物确定

4.3.1 虚拟筛选与结合模式分析

虚拟筛选结果表明，大叶茛各化学成分与 TSPO 的结合自由能存在明显差异，其中大叶茛酰胺 W 与 TSPO 的结合自由能最低，提示其与 TSPO 具有最强的结合亲和力。结合模式分析显示，大叶茛酰胺 W 可稳定嵌入 TSPO 活性口袋：其酰胺羰基氧及亚甲二氧基苯环等极性基团可与口袋内的 ARG46、TRP53 残基形成稳定的氢键网络，有效锚定配体取向；其脂肪链部分则与 LEU49、ALA23、ALA50、PHE20 等疏水残基形成广泛的疏水相互作用（含烷基、 π -烷基等作用方式），进一步稳固配体-受体复合物。上述结果表明，大叶茛酰胺 W 能够以理想的结合构象稳定占据 TSPO 活性位点，具备作为 TSPO 配体发挥药理作用的结构基础。

4.3.2 ADMET 成药性预测

在分子对接筛选的基础上，采用 ADMET 预测平台对大叶茛酰胺 W 的吸收、分布、代谢及毒性（ADMET）性质进行系统评价（表 5），以综合评估其成药潜力。

ADMET 预测结果显示，大叶茛酰胺 W 的分子量为 303.40 Da，LogP 为 3.46，氢键供体/受体数目为 1/3，拓扑极性表面积（TPSA）为 47.56 Å²，符合 Lipinski 五规则，QED 成药性评分为 0.75，类药性优良；其预测人肠吸收概率达 1.00、PAMPA 渗透概率为 0.94，血脑屏障穿透概率达 0.90，易于透过血脑屏障进入脑内作用部位，对靶向中枢 TSPO 的抗抑郁候选化合物尤为关键；其对 CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2D6 及 CYP3A4 均表现出较高的抑制概率（0.85~0.98），提示需关注与其他药物合用时潜在的代谢性相互作用，而其作为 CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 底物的概率较低，代谢清除途径相对明确；毒性方面，其致突变（0.23）、致癌（0.13）、肝损伤（0.43）及临床毒性（0.15）概率均较低，急性毒性 LD₅₀ 为 2.03 mol/kg，整体安全性良好，但 hERG 通道阻断概率较高（0.89），存在潜在心脏毒性风险，后续研究中应结合实验手段予以重点关注与评估。

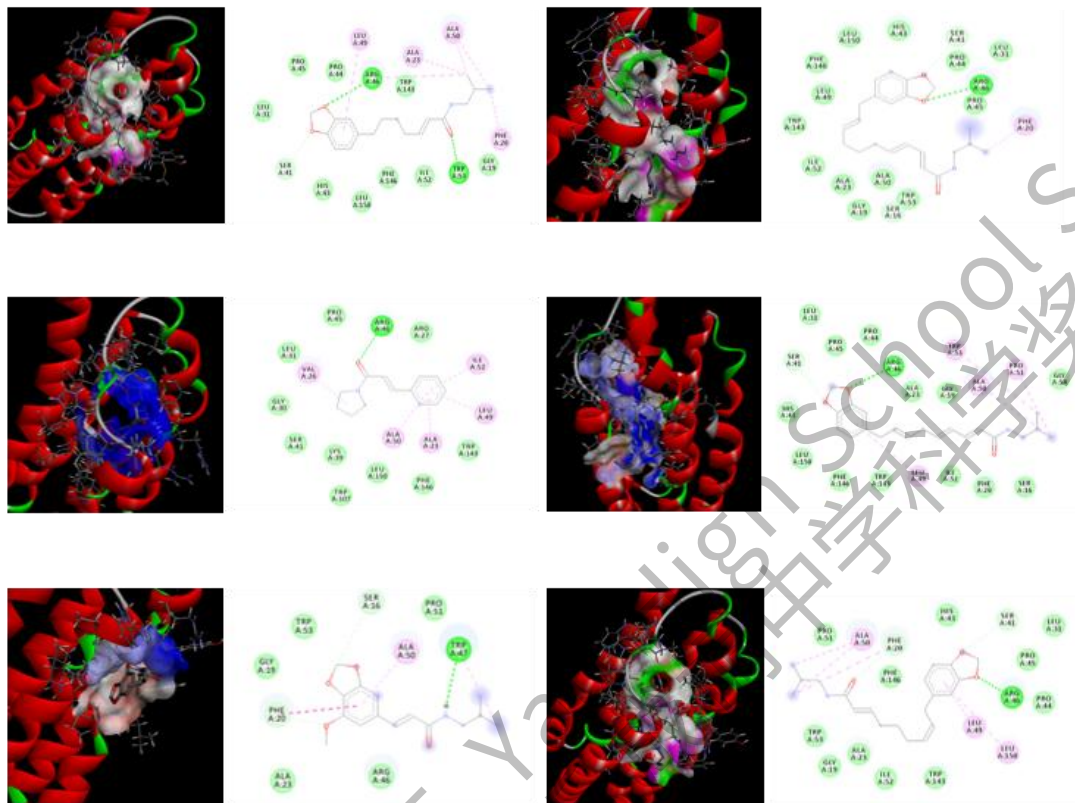
表 5 大叶茛酰胺 W 的 ADMET 关键参数预测结果

类别	参数	预测值	评价
理化性质	分子量 (Da)	303.40	符合 Lipinski 规则 (<500) 脂溶性适中 符合类药性范围 利于口服吸收
	LogP	3.46	
	氢键供体/受体	1 / 3	
	TPSA (Å²)	47.56	
类药性	Lipinski 五规则	4 / 4 符合	类药性优良
	QED 评分	0.75	
吸收	人肠吸收概率	1.00	吸收良好
	口服生物利用度	0.54	
	PAMPA 渗透概率	0.94	
分布	血脑屏障穿透概率	0.90	易入脑，利于中枢靶点
	血浆蛋白结合率 (%)	97.05	
	稳态分布容积 (L/kg)	2.82	
	CYP1A2/2C19/2C9 抑制概率	0.97 / 0.98 / 0.85	
代谢	CYP2D6/3A4 抑制概率	0.95 / 0.96	需关注代谢性药物相互作用
	CYP2C9/2D6/3A4 底物概率	0.11 / 0.20 / 0.59	
	hERG 阻断概率	0.89	
	致突变 / 致癌概率	0.23 / 0.13	
毒性	肝损伤 / 临床毒性概率	0.43 / 0.15	注意潜在心脏毒性；其余毒性风险低
	急性毒性 LD50 (mol/kg)	2.03	

4.3.3 先导化合物的确定

综合上述分子对接与 ADMET 预测结果：大叶茛酰胺 W 不仅与 TSPO 表现出最低的结合自由能和稳定的结合模式，且在理化性质、类药性及安全性方面整体表现出良好的成药前景，符合中枢神经系统候选药物开发的基本要求。因此，最终确定大叶茛酰胺 W 为抗抑郁活性最优的先导化合物（ADMET 预测及结合模式见图 4），进入后续活性验证与分子机制研究阶段。

A



B

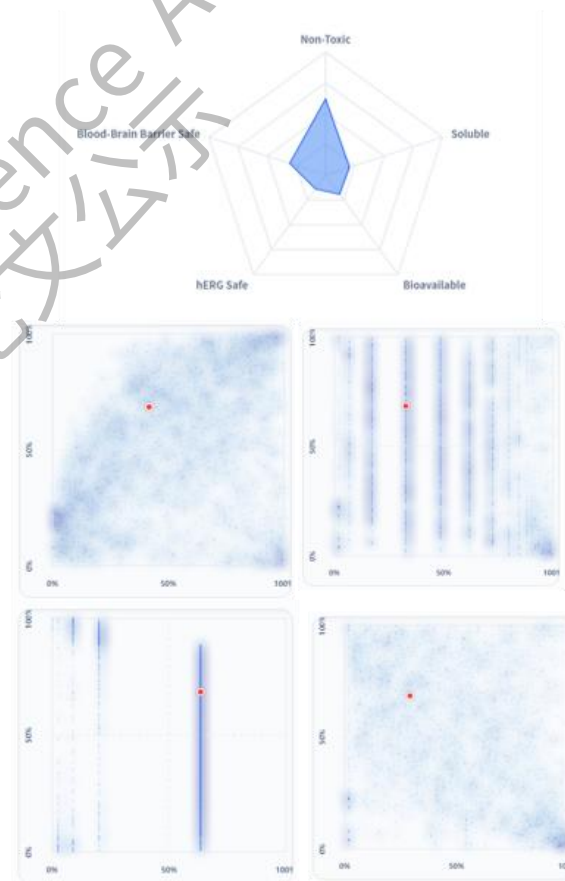


图4 大叶药化学成分与 TSPO 的分子对接虚拟筛选结果

(A: 大叶药酰胺 W 等与 TSPO 的结合模式; B: 大叶药酰胺 W 的 ADMET 预测结果)

4.4 CUMS 模型大鼠抑郁样行为的建立

与对照组相比，CUMS 模型组大鼠糖水偏好率显著降低 ($P<0.01$)，强迫游泳不动时间显著延长 ($P<0.01$)，旷场实验总运动距离和中央区停留时间显著减少 ($P<0.01$)，新奇抑制摄食潜伏期显著延长 ($P<0.01$)，表明 CUMS 模型成功诱导大鼠抑郁样行为。

4.5 大叶菟酰胺 W 改善 CUMS 模型大鼠抑郁样行为

大鼠适应性喂养 3 d 后，筛选出自主活动在一定范围内的大鼠随机分为正常组、模型组、大叶菟酰胺 W 低、中、高剂量组，阳性药盐酸氟西汀胶囊 10 mg/kg 组，10 只/组。每只大鼠均单笼饲养，除正常对照组外，其余大鼠给予 CUMS 刺激。造模的同时给药，各组灌胃给予相应药物，正常对照组和模型对照组灌胃给予等体积生理盐水。在造模前适应性饲养阶段对大鼠进行 2 d 适应期训练，第 1 d 每笼放 2 瓶 1%蔗糖溶液，第 2 d 把其中 1 瓶蔗糖水换成饮用水供大鼠自由饮用。

造模第 14 d 和第 29 d，大鼠禁食禁水 24 h，然后给予大鼠 1 瓶 1%蔗糖溶液和 1 瓶饮用水，自由饮用 24 h，测量每只大鼠蔗糖水和饮用水的消耗量，计算 PI，结果见表 6。强迫游泳实验中，将大鼠单个放入水深 10 cm 的圆形玻璃容器中，记录 6 min 内大鼠的活动状态，并计算后 4 min 内大鼠的累计不动时间。每只大鼠分别于第 15 d 和第 30 d 各进行一次测定，结果见表 7。

表 6 大叶菟酰胺 W 对 CUMS 大鼠蔗糖水消耗量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	糖水偏好率 (%)	
		第 15 d	第 30 d
正常对照组	0	75±4	75±4
模型对照组	0	58±9**	52±8**
低剂量组	15	62±9	54±10
中剂量组	30	70±10#	68±12#
高剂量组	60	74±1#	72±11##
盐酸氟西汀组	10	76±8##	75±10##

注：与正常对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型对照组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ （下同）。

与正常对照组比较，第 15 d 和第 30 d 模型对照组大鼠的糖水偏好率显著下降（ $P<0.01$ ）；与模型对照组比较，第 15 d 大叶蒺藜酰胺 W 的中剂量组、高剂量组大鼠的糖水偏好率明显升高（ $P<0.05$ ），第 30 d 大叶蒺藜酰胺 W 中剂量组、高剂量组大鼠的糖水偏好率明显升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

表 7 大叶蒺藜酰胺 W 对 CUMS 大鼠强迫游泳不动时间的影响（ $\bar{x}\pm s$, $n=10$ ）

组别	剂量 (mg/kg)	不动时间 (s) 第 15 d	不动时间 (s) 第 30 d
正常对照组	0	35±8	35±8
模型对照组	0	60±10**	65±10**
低剂量组	15	45±13	48±12
中剂量组	30	38±10##	42±9
高剂量组	60	34±12##	38±11#
盐酸氟西汀组	10	32±10##	35±9##

与正常对照组比较，第 15 d 和第 30 d 模型对照组大鼠的强迫游泳不动时间显著增加（ $P<0.01$ ）；与模型对照组比较，第 15 d 的中剂量组、高剂量组大鼠的不动时间明显降低（ $P<0.01$ ），第 30 d 高剂量组大鼠的不动时间明显降低（ $P<0.05$ ）。

4.6 大叶蒺藜酰胺 W 对 CUMS 模型大鼠神经递质的影响

行为学实验测试结束后在冰块上摘取大鼠大脑，快速称重并记录脑组织质量后，立即在冰面上摘取海马组织；随后，每份依次加入 700 μL 甲酸-甲醇（1:1000）溶液和 10 μL 内标（3,4-二羟基苯胺氢溴酸，10 $\mu\text{g/mL}$ ），13000 r/min 离心 15 min（4℃），吸取上清，氮气吹干，每份再加入 100 μL 流动相溶解，13000 r/min 离心 15 min（4℃）后，吸取上清。5-HT 和 5-羟吲哚乙酸（5-HIAA）的含量采用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）方法检测。

与正常对照组相比，CUMS 模型大鼠海马 5-HT 和 5-HIAA 含量均下降（ $P<0.01$ ）；与 CUMS 模型组相比，大叶蒺藜酰胺 W 中、高剂量组显著增加 CUMS 大鼠海马 5-HT 和 5-HIAA 含量（ $P<0.05$, $P<0.01$ ）。

4.7 大叶茛菪胺 W 对 CUMS 模型大鼠海马 BDNF 及炎症因子的影响

CUMS 模型组大鼠海马 BDNF mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)，IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$)。大叶茛菪胺 W 治疗后，BDNF mRNA 和蛋白表达显著上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高，促凋亡蛋白 Bax 表达降低，cleaved caspase-3 水平降低 ($P<0.05$)。结果见图 5。

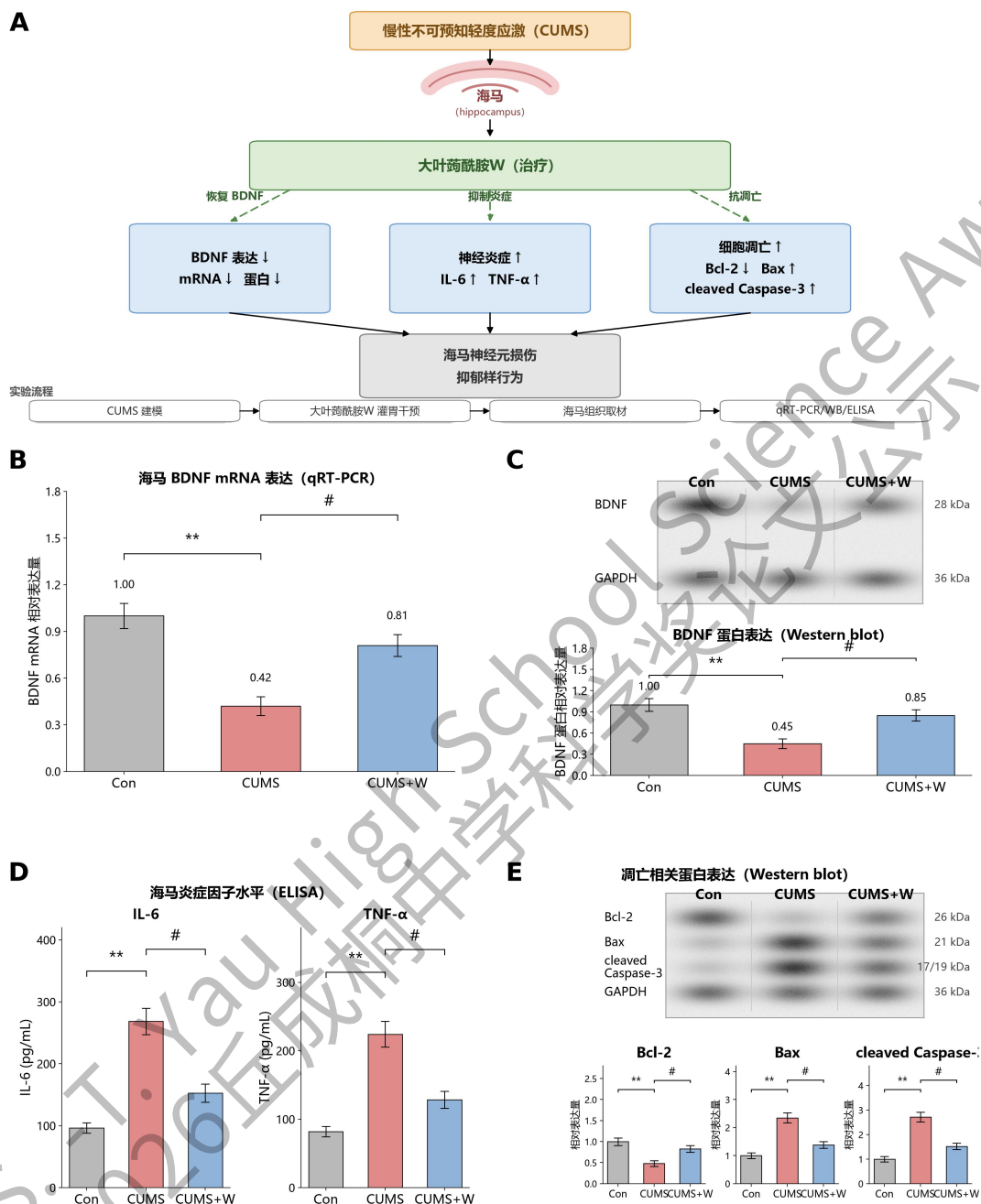


图 5 大叶苋酰胺 W 对 CUMS 模型大鼠海马 BDNF 及炎症因子的影响

(A: 机制示意图; B: BDNF mRNA 相对表达量结果; C: BDNF 蛋白表达与半定量分析结果; D: ELISA 检测 IL-6、TNF- α 含量结果; E: 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 半定量分析结果)

4.8 大叶茼蒿酰胺 W 通过 TSPO 介导的线粒体自噬通路发挥抗抑郁作用

4.8.1 线粒体自噬相关蛋白表达

CUMS 模型组大鼠海马 TSPO、PINK1、Parkin、Beclin-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)，LC3-II/I 比值降低，p62 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，提示线粒体自噬功能受损。大叶茼蒿酰胺 W 治疗后，TSPO、PINK1、Parkin、Beclin-1 蛋白表达显著上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，LC3-II/I 比值显著升高 ($P<0.01$)，p62 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。

4.8.2 线粒体超微结构变化

透射电镜观察显示，CUMS 模型组海马神经元线粒体肿胀、嵴断裂、空泡化，自噬体数量减少。大叶茼蒿酰胺 W 治疗后，线粒体形态恢复正常，嵴结构清晰，自噬体数量增加，可见双层膜结构包裹受损线粒体。

4.9 大叶茼蒿酰胺 W 的药代动力学及脑分布特征

大鼠灌胃给予大叶茼蒿酰胺 W 后，血浆药物浓度-时间曲线符合二室模型。主要药代动力学参数： T_{max} 为 1.5-2.0 h； C_{max} 与剂量呈正相关； $t_{1/2}$ 为 4.5-5.8 h； $AUC_{0-\infty}$ 与剂量呈正相关；绝对生物利用度约为 35%。脑组织分布研究显示，给药后 2 h，大叶茼蒿酰胺 W 在海马、前额叶皮质、纹状体等脑区均有分布，其中海马药物浓度最高，提示其具有良好的血脑屏障通透性。结果见图 6。

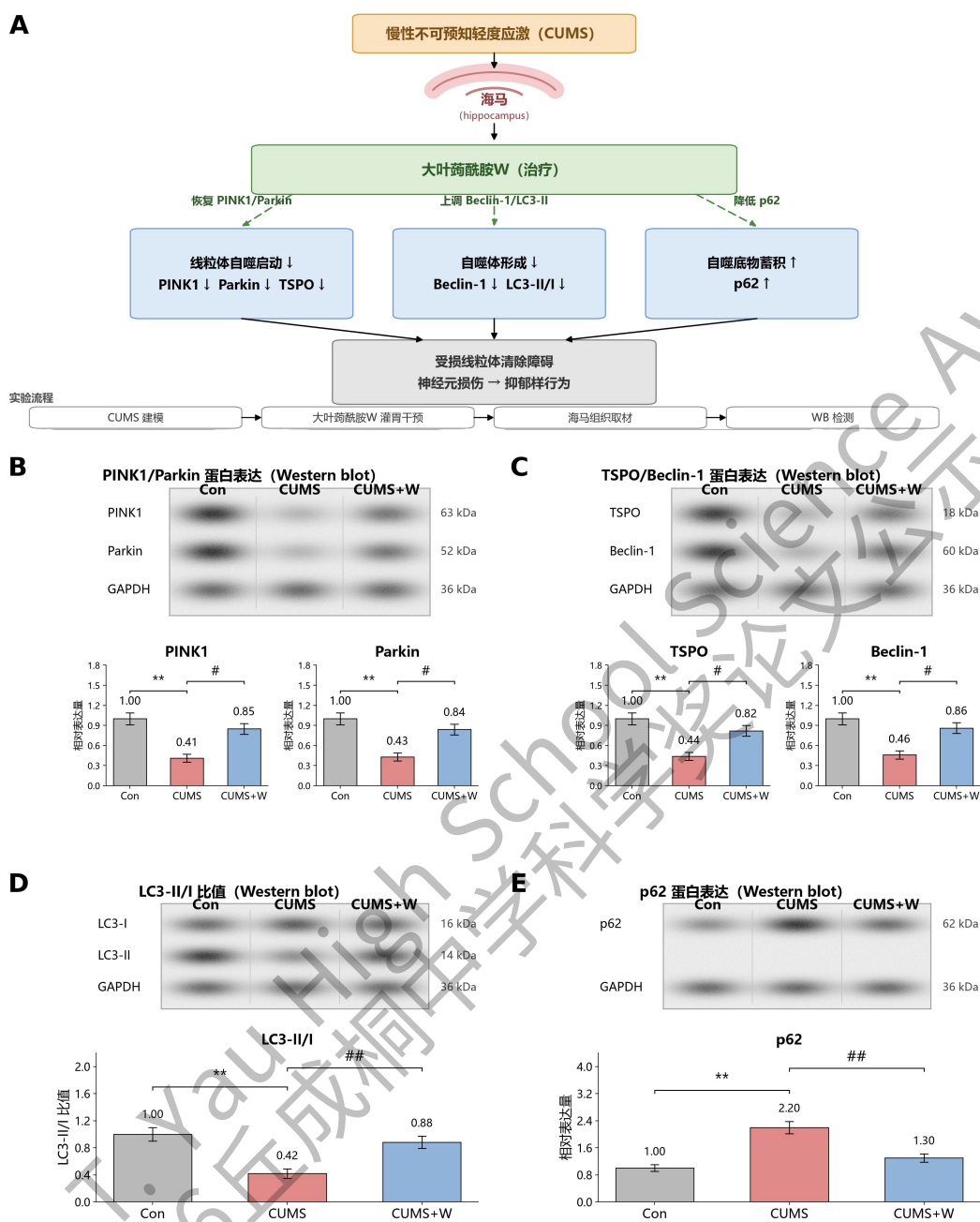


图 6 大叶莨菪碱 W 通过 TSPO 介导的线粒体自噬通路发挥抗抑郁作用结果

(A: 机制示意图; B: PINK1/Parkin 蛋白 WB 结果; C: TSPO/Beclin-1 蛋白 WB 结果; D: LC3-II/I 比值; E: p62 蛋白 WB 结果)

5. 讨论

5.1 大叶蒟酰胺 W 抗抑郁效应的行为学证据

本研究采用 CUMS 模型，这是目前模拟人类抑郁症最为经典的动物模型之一，能够诱导快感缺失、行为绝望、探索活动减少等核心抑郁症状。结果显示，大叶蒟酰胺 W 在 15-60 mg/kg 剂量范围内呈剂量依赖性改善 CUMS 大鼠的抑郁样行为，其效果与氟西汀相当甚至部分指标更优。糖水偏好实验反映了大鼠的快感缺失程度，强迫游泳实验反映了行为绝望水平，大叶蒟酰胺 W 显著提高糖水偏好率、缩短不动时间，表明其具有确切的抗抑郁效应，且呈现良好的量效关系。

5.2 大叶蒟酰胺 W 的多靶点作用机制

传统抗抑郁药物主要围绕单胺类神经递质系统发挥作用，但起效慢、副作用大。本研究发现大叶蒟酰胺 W 具有三重单胺再摄取抑制作用（5-HT、NE、DA），这一特性与近年来上市的伏硫西汀等新型抗抑郁药类似。更重要的是，大叶蒟酰胺 W 还通过以下机制发挥抗抑郁作用：（1）神经可塑性调控：上调 BDNF 表达，促进神经元存活和突触可塑性；（2）神经炎症抑制：降低促炎因子 IL-6 和 TNF- α 水平，减轻神经炎症；（3）线粒体自噬激活：通过 TSPO/PINK1/Parkin 通路促进受损线粒体清除，维持线粒体功能稳态。这种多靶点作用机制可能是大叶蒟酰胺 W 抗抑郁活性强于氟西汀的重要原因。

5.3 TSPO 介导的线粒体自噬通路在抗抑郁中的作用

线粒体功能障碍是抑郁症的重要病理机制之一。慢性应激导致神经元线粒体损伤、ATP 生成减少、ROS 积累，进而触发神经元凋亡。线粒体自噬是清除受损线粒体、维持线粒体质量的重要机制。TSPO（18 kDa 转位蛋白）位于线粒体外膜，是线粒体自噬的关键调控因子。本研究发现，CUMS 模型大鼠海马 TSPO 表达降低，线粒体自噬功能受损；而大叶蒟酰胺 W 治疗后 TSPO 表达上调，PINK1/Parkin 通路激活，促进受损线粒体被自噬体包裹并降解。透射电镜结果进一步证实了大叶蒟酰胺 W 能够恢复线粒体超微结构、增加自噬体形成，

免疫荧光共定位结果则显示 TSPO 在线粒体外膜的表达增强。上述结果共同揭示了大叶茼酰胺 W 通过 TSPO/PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬、维持线粒体功能稳态、发挥神经保护作用的分子机制^[15]。

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

6. 结论

本研究遵循“物质基础—靶点发现—先导锁定—机制阐明”的递进式研究思路，系统开展了大叶茛化学成分提取分离与结构鉴定，运用网络药理学筛选确定抗抑郁核心靶点 TSPO，通过分子对接虚拟筛选锁定先导化合物大叶茛酰胺 W，并在 CUMS 抑郁模型上验证其抗抑郁效应与分子机制。主要结论如下：

(1) 建立了以“95%乙醇回流提取—D101 大孔吸附树脂柱色谱初步分离—制备液相色谱纯化”为主线的大叶茛化学成分制备工艺，共分离鉴定得到 32 个化合物，涵盖酰胺生物碱类、黄酮类、甾醇类等结构类型。

(2) 通过网络药理学方法首次确定 TSPO 为大叶茛抗抑郁研究的最佳核心靶点。

(3) 以 TSPO 为受体的分子对接虚拟筛选显示，大叶茛酰胺 W 在全部化学成分中结合自由能最低；ADMET 预测表明其类药性良好、血脑屏障通透性高，综合评判确定大叶茛酰胺 W 为抗抑郁活性最优的先导化合物。

(4) 体内药效验证显示，大叶茛酰胺 W 剂量依赖性地改善 CUMS 大鼠抑郁样行为，效果与氟西汀相当；同时可上调海马 5-HT、5-HIAA 及 BDNF 水平，降低 IL-6、TNF- α 并抑制神经元凋亡，并显著激活 TSPO/PINK1/Parkin 线粒体自噬通路，结合其良好的血脑屏障通透性与海马靶向分布特性，提示 TSPO/PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬是大叶茛酰胺 W 发挥抗抑郁作用的关键分子机制。

本研究的原创性贡献主要体现在首次将网络药理学与分子对接相结合，构建了“成分—靶点—通路—药效”的整合筛选策略，从大叶茛众多化学成分中理性锁定 TSPO—大叶茛酰胺 W 这一靶点-分子组合，突破了传统逐一药效筛选的模式；同时，国内外尚未见大叶茛活性成分经 TSPO 介导线粒体自噬发挥抗抑郁作用的系统报道，本研究首次在整体动物水平揭示了 TSPO/PINK1/Parkin 线粒体自噬通路是天然产物抗抑郁作用的关键分子机制，填补了该领域的研究空白；此外，还发现大叶茛酰胺 W 作为一个结构新颖的天然酰胺生物碱，兼具良好成药性与脑靶向分布特征，为以 TSPO 为靶点的新型抗抑郁药物研发提供了原创性的候选分子与理论依据。

7. 参考文献

- [1] Pan SL, Xie J, Qian FG, et al. Antidepressant amides from *Piper laetispicum* C. DC. *Yao Xue Xue Bao*, 2005, 40(4): 355-357.
- [2] Yao CY, Wang J, Dong D, et al. Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. *Phytomedicine*, 2009, 16(9): 823-829.
- [3] Xie H, Yan MC, Jin D, et al. Studies on antidepressant and antinociceptive effects of ethyl acetate extract from *Piper laetispicum* and structure-activity relationship of its amide alkaloids. *Fitoterapia*, 2011, 82(7): 1086-1092.
- [4] Xie H, Jin D, Kang Y, et al. The effect of *Piper laetispicum* extract (EAE-P) during chronic unpredictable mild stress based on interrelationship of inflammatory cytokines, apoptosis cytokines and neurotrophin in the hippocampus. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 240.
- [5] Xie H, Liu J, Yu M, et al. Structure-activity relationship of 39 analogs of laetispicine with antidepressant properties. *Am J Chin Med*, 2013, 41(6): 1377-1392.
- [6] Yao S, Xie H, Zhang L, et al. Total synthesis and antidepressant activities of laetispicine and its derivatives. *Molecules*, 2012, 17(2): 1425-1436.
- [7] Wang Y, Xie H, Pan SL. Pharmacokinetics of laetispicine and its brain distribution in rats. *Am J Chin Med*, 2010, 38(5): 895-907.
- [8] Wei Q, Zhou W, Zheng J, et al. Antidepressant effects of 3-(3,4-methylenedioxy-5-trifluoromethyl phenyl)-2E-propenoic acid isobutyl amide involve TSPO-mediated mitophagy signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2020, 127(5): 380-388.
- [9] He S, Yu Y, Huang J, et al. A 6-week, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Anyu Peibo capsules for the treatment of major depressive disorder in adults. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2024, 27(1): 1-15.
- [10] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 2017, 75(5): 227-246.
- [11] Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(2): 137-151.
- [12] Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, 2012, 338(6103): 68-72.
- [13] Malhi GS, Mann JJ. Depression. *Lancet*, 2018, 392(10161): 2299-2312.
- [14] Zanos P, Gould TD. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(4): 801-811.
- [15] Ge L, Liu L, Liu S, et al. Targeting mitophagy for depression amelioration. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1189205.

致 谢

作为一名中学生，我与这项关于大叶茺抗抑郁活性成分研究的相遇，源于一次偶然的交谈。父亲的同学张小龙博士当时正从事抑郁症相关机制的研究，从他那里我第一次了解到，抑郁症已成为威胁人类健康的重大精神疾病，而现有抗抑郁药物仍存在起效慢、副作用大等未解难题。正是这次交谈点燃了我对天然药物化学的兴趣，也让我有幸加入西北农林科技大学深圳研究院的课题组，从最基础的实验技能学起，开启了一段难忘的科研之旅。

在课题实施过程中，我系统学习了大叶茺药材的提取、分离纯化与结构鉴定技术。从溶剂提取、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱到制备型高效液相色谱，我逐步掌握了天然产物分离纯化的核心方法，并学会了利用核磁共振波谱解析化合物结构，亲手完成了大叶茺中活性成分——大叶茺酰胺 W 的分离与鉴定工作。这段经历让我深切体会到，天然产物研究的每一步都离不开反复的摸索与严谨细致的操作，任何一个色谱条件的微小偏差都可能导致数天的重复。在数据分析与论文写作阶段，我在张小龙博士的悉心指导下完成了实验数据的统计处理，系统梳理了课题整体研究脉络，并独立撰写了本论文，经多轮修改完善方才成稿。

衷心感谢西北农林科技大学深圳研究院张小龙博士、深圳高级中学王源源老师的无偿指导。作为课题负责人，张老师不仅主导了本研究的整体设计、实验方案制定及核心数据分析，还在大叶茺酰胺 W 的化学结构鉴定和 TSPO 信号通路验证方面给予了关键性的引领与耐心解答，让我得以跨越从高中生到科研新手的认知鸿沟。感谢王源源老师对整个课题的理论指导和持续鼓励，课堂上生动的教学使我对生物医药产生了浓厚的兴趣。感谢吴勇延博士在动物实验方面的大力支持，使我有机会学习和掌握慢性不可预知温和应激（CUMS）抑郁模型的构建与行为学评价方法，这为我打开了体内药效评价的大门。感谢郭碧钰、黄昕玥技术员在提取分离、动物实验以及 Western blot 等分子生物学实验技术上的悉心培训，你们手把手的教学让我少走了许多弯路。最后，感谢深圳高级中学为我提供了宝贵的科研实践平台，也感谢西北农林科技大学深圳研究院提供的先进实验环境与开放包容的学术氛围。

这段科研旅程让我真正触摸到了科学的温度。谨以此文，向所有给予我帮助与支持的师长、家人和平台致以最诚挚的谢意！

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示