山西大学学报(自然科学版)49(5):752—770,2026
Journal of Shanxi University(Nat. Sci. Ed.)

DOI:10.13451/j.sxu.ns.2026023

基于网络药理学探讨赖氨酸结合五音疗愈改善抑郁的作用

刘熙[1],何佳蔚[2],何瑞怡[2],刘明艳[2],胡玉娇[2],陈舒雅[2],曹晓琴[2*]

(1.江汉大学 音乐学院音乐学系,湖北 武汉 430100;
2.江汉大学 医学部药学系 认知与情感障碍湖北省重点实验室,湖北省医学实验教学示范中心,湖北 武汉 430100)

摘 要:本研究旨在综合运用网络药理学、动物实验,系统探究赖氨酸(Lysine,Lys)结合五音疗愈在治疗抑郁症(Major Depressive Disorder, MDD)过程中的具体作用机制。首先,基于基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据集GSE53987,使用 DESeq2 的 Wald 检验方法计算氟西汀组和抑郁组的三个脑部区域样本的基因表达差异。其次,通过相互作用基因/蛋白质的搜索工具(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, STRING)构建差异基因蛋白质-蛋白质相互作用网络(Protein-protein Interaction Network, PPI),利用 Cytoscape 筛选关键基因,采用网络药理学方法计算药物逆转评分(Drug Reversal Score, Dsig评分),筛选出赖氨酸作为候选药物。随后,联合SwissTargetPrediction与SuperPred预测药物靶点,与脑区差异基因取交集后,通过STRING平台构建核心靶点PPI网络,并经京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析解析机制。最后,通过分子对接验证,从蛋白质数据银行(Protein Data Bank, PDB)/美国国家生物技术信息中心PubChem数据库(NCBI PubChem Database, PubChem)获取靶蛋白与配体结构,经PyMOL预处理后,用AutoDock Vina计算结合自由能。同时,为提高治疗依从性并探索协同干预策略,本研究在评估赖氨酸抗抑郁作用的基础上,引入五音疗愈以构建联合治疗方案。在动物实验中,采用慢性不可预知温和应激(Chronic Unpredictable Mild Stress,CUMS)抑郁模型,设立音乐组、模型组、氟西汀组、赖氨酸组及赖氨酸联合五音疗愈组。通过糖水偏好实验、强迫游泳实验、悬尾实验、高架十字迷宫实验和旷场实验系统评估小鼠抑郁样行为。通过高效液相色谱-串联质谱法(High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS)检测5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素水平,采用硝酸还原酶法检测脑组织一氧化氮(Nitric Oxide, NO)含量,并利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-time PCR, qPCR)和蛋白质印迹法(Western Blot,WB)检测核心靶点的基因与蛋白表达。网络药理学筛选出雄激素受体(Androgen Receptor, AR)、间质-上皮细胞转化因子(Mesenchymal-epithelial Transition Factor, MET)和内皮型一氧化氮合酶(Endothelial Nitric Oxide Synthase, NOS3)为关键靶点,分子对接结果显示赖氨酸与这些靶点具有良好结合活性。动物实验表明,与模型组相比,赖氨酸组和联合组在行为学测试中表现显著改善,包括糖水偏好率提高、强迫游泳和悬尾不动时间缩短、高架十字迷宫开放臂停留时间延长及旷场中央区域活动距离增加。且两组小鼠均提高了脑内5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素的水平,回调了大脑中NO含量。qPCR和WB结果也显示两组均提高了*NOS3*基因和蛋白的表达,且上述实验联合疗法优于赖氨酸单一治疗组。赖氨酸联合五音疗愈可能通过调控NOS3-NO轴发挥抗抑郁作用。这一发现为赖氨酸结合五音疗愈在MDD治疗领域的临床应用提供了坚实的理论基础和研究方向。

关键词:NOS3-NO轴;慢性不可预知温和应激;分子对接;行为学评估;联合干预

中图分类号:R749.4　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**0253-2395(2026)05-0752-19

收稿日期:2025-10-30;**修回日期:**2026-04-15

基金项目:江汉大学2025年省级大学生创新训练项目(S202511072087)

作者简介:刘熙(1986—),女,湖北武汉人,硕士,研究方向为钢琴演奏及音乐疗愈研究。E-mail:395505155@qq.com

* **通信作者:**曹晓琴(Cao Xiaoqin),E-mail:caoxiaoqin012@jhun.edu.cn

引文格式:刘熙,何佳蔚,何瑞怡,等.基于网络药理学探讨赖氨酸结合五音疗愈改善抑郁的作用[J].山西大学学报(自然科学版),2026,49(5):752-770. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2026023.

Exploring the Role of Lysine Combined with Five-element Music Therapy in Improving Major Depressive Disorder Based on Network Pharmacology

Liu Xi[1], He Jiawei[2], He Ruiyi[2], Liu Mingyan[2], Hu Yujiao[2], Chen Shuya[2], Cao Xiaoqin[2*]

(1. *Department of Musicology, School of Music, Jianghan University, Wuhan* 430100*, China*;
2. *College of Pharmacy, School of Medicine, Hubei Key Laboratory of Cognitive and Affective Disorders, Hubei Provincial Demonstration Center for Experimental Medicine Education, Jianghan University, Wuhan* 430100*, China*)

Abstract: The aim of this study was to synthesize and apply network pharmacology and animal experiments to systematically investigate the specific role of lysine (Lys) combined with five-element music therapy in the treatment of major depressive disorder (MDD). First, based on the gene expression omnibus (GEO) dataset GSE53987, gene expression differences in three brain region samples from healthy control and MDD groups were calculated using the Wald test of DESeq2. Next, the differential gene protein-protein interaction (PPI) network was constructed by Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING), and the key genes were screened using Cytoscape, and the drug reversal score (Dsig score) was calculated using the network pharmacology method to screen lysine as a drug candidate. Subsequently, the drug targets were predicted by combining SwissTargetPrediction and SuperPred, and after taking the intersection with the differential genes in the brain region, the core target PPI network was constructed through the STRING platform and the mechanism was analyzed and resolved by KEGG pathway enrichment analysis. Finally, the target protein and ligand structures were obtained from Protein data bank (PDB) and PubChem, respectively. They were pre-processed by PyMOL program and their binding free energies were calculated by AutoDock Vina. Meanwhile, in order to improve treatment adherence and explore synergistic intervention strategies, this study introduced Five-Element Music therapy to construct a combined treatment program based on the evaluation of the antidepressant effect of lysine. In the animal experiments, the chronic unpredictable mild stress chronic unpredictable mild stress (CUMS) MDD model was used, and the control group, model group, fluoxetine group, lysine group and lysine combined with five-tone healing group were established. The depression-like behavior of mice was assessed by sugar water preference experiment, forced swimming experiment, hanging tail experiment, elevated cross maze experiment and open field experiment system. The levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine were detected by HPLC-MS/MS, the nitric oxide content of brain tissue was detected by nitrate reductase assay, and the core targets were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction quantitative real-time PCR (qPCR) and Western Blot (WB). Cyberpharmacology screening identified AR, MET and NOS3 as key targets, and molecular docking results showed that lysine had good binding activity to these targets. Animal experiments showed that compared with the model group, the lysine group and the combined group showed significant improvement in behavioral tests, including increased sugar-water preference, shorter forced swimming and tail suspension immobility time, longer stay in the open arm of the elevated cross maze, and increased distance of activity in the central area of the open field. Both groups of mice increased brain levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and norepinephrine, and regressed brain NO levels. The qPCR and WB results also showed that both groups increased *NOS3* gene and protein expression, and that the combination therapy in the above experiments was superior to the lysine monotherapy group. In conclusion, lysine combined with Five-Element Music Therapy may exert antidepressant effects by modulating the NOS3-NO axis. This finding provides a solid theoretical foundation and research direction for the clinical application of lysine combined with Five-Element Music Therapy in the treatment of MDD.

Keywords: NOS3-NO axis; chronic unpredictable mild stress; molecular docking; behavioral assessment; combined intervention

0 引言

抑郁症(Major Depressive Disorder, MDD)是一种全球范围内高发病率的精神障碍,其病理机制复杂,涉及神经递质失调、炎症反应、神经可塑性损伤等多个环节[1]。值得关注的是,全球疾病、伤害和风险因素负担研究(Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study, GBD)2019显示,包含抑郁症的精神障碍仍然是全球疾病负担十大主要原因之一[2]。而且大约一半的首次MDD发作个体会在五年内复发[3]。根据文献预测,到2030年,其经济影响将达到6.0万亿美元[4]。

尽管目前已有多种抗抑郁药物(如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、单胺氧化酶抑制剂等)被广泛应用于临床,但其疗效有限,且存在耐药性和副作用等问题[5-6]。同时学界普遍认为,MDD等复杂疾病并非由单一基因缺陷引起,而是整个生物分子网络失调的结果[7]。因此,探索新型治疗策略,尤其是多靶点、多机制的联合治疗方案,已成为MDD研究的重要方向。然而,实现多靶点治疗的关键难点在于如何系统地识别疾病的关键靶点组合,并筛选出能协同调控这些靶点的药物。基于这一共识,网络药理学作为一种新兴的研究框架,应运而生。该方法通过系统构建并分析"疾病-基因-药物"之间的复杂相互作用网络,为阐明复杂疾病机制和发现新型治疗候选物提供了强有力的工具[8-9]。

本研究通过这一方法初步将赖氨酸(Lysine,Lys)锁定为一个具有多靶点治疗潜力的候选分子。值得关注的是,这一计算发现与日益增长的理论和临床证据不谋而合,均提示氨基酸作为合成神经递质必不可少的营养补充剂,在精神疾病干预中可能扮演重要角色,其水平直接影响情绪调节功能[10-11]。且体内微离子电渗实验表明,赖氨酸完全阻断谷氨酸诱发的神经元兴奋,表明赖氨酸抑制谷氨酸能神经元活动,从而调节大脑活动[12]。因此,纠正赖氨酸缺乏是否可作为一种有效的MDD辅助干预策略,这是一个值得深入探究的科学问题。

同时,为了阐释其机制,本研究进一步借助网络药理学方法,参考文献[13]的思路,通过系统收集赖氨酸的药物作用靶点与MDD的病理靶点,构建蛋白质相互作用网络、筛选共有关键靶点,并分析后续通路富集结果。另一方面,在药物干预之外,非药物疗法如基于中医"天人合一"整体观与五行理论所构建的传统音乐疗愈体系的五行音乐,也展现出调控情绪的潜力[14]。例如,刘丽等发现"五音调神法"能调节脑卒中后抑郁患者体内5-羟色胺等神经递质水平[15]。现有临床研究进一步表明,药物联合音乐疗法的协同干预相较于单一药物治疗更具增效作用,其机制可能与音乐改善睡眠、缓解焦虑情绪有关[16-17]。基于上述理论与实验线索,赖氨酸补充与五音疗愈的联合干预在MDD治疗中展现出潜在的协同价值。然而需要明确指出的是,截至目前,国内外尚未见任何将赖氨酸与五音疗愈联合应用于MDD的临床研究报告,该联合治疗方案的疗效尚未得到任何临床验证。这一现状既构成了本研究的局限性,也恰恰凸显了其创新动机。事实上,网络药理学不仅适用于验证已知有效的干预手段,更日益被用于探索未经临床验证但具有理论合理性的创新组合[18]。在此,为验证赖氨酸联合五音疗愈策略的有效性及网络药理学预测结果的可靠性,本研究通过构建慢性不可预知温和应激(Chronic Unpredictable Mild Stress,CUMS)小鼠抑郁模型,开展系统的动物实验验证。

本研究旨在通过网络药理学方法筛选治疗MDD的候选药物及潜在靶点,并在此基础上结合五音疗愈探究其协同增效作用,最终通过动物实验对预测结果进行实证检验以期为药物联合音乐疗法在抑郁领域的应用提供坚实的科学基础,并为开发新型抗抑郁症药物提供潜在的靶点和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康无特定病原体(Specific Pathogen-free,SPF)级雄性昆明(Kunming,KM)小鼠50只(体重18~20 g,6~8周龄),由斯克贝斯生物科技股份有限公司(中国河南)提供[SCXK(豫)2020-0005]。实验期间,动物饲养于江汉大学医学部实验动物中心[SYXK(鄂)2021-0042],自由进食饮水,饲养环境维持温度(24±2)℃、湿度(60±10)%,每12 h循环一次光/暗环境。本实验获得江汉大学学术伦理审查委员会(IACUC)批准(JHDXLL2024-016),符合动物实验伦理学标准。

1.1.2 实验仪器与试剂

赖氨酸(Lys,质量分数99%)购自山东泽恩达食品原料公司,盐酸氟西汀胶囊(fluoxetine,FXT,20 mg/粒),购自PatheonFrance公司;RNA提取液、SYBRGreenqPCRMasterMix(2×UniversalBlue)和RT-qPCR预混液购自武汉赛

维尔生物科技有限公司;NOS3、p-NOS3、GAPDH兔多克隆抗体、BCA蛋白定量检测试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒均购自Servicebio。

冷冻组织研磨仪、涡旋振荡器及高速冷冻离心机(DragonLab)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;PCR仪购自北京东胜创新生物科技公司;荧光定量PCR仪(Bio-Rad);旷场实验(XR-XZ301)和强迫游泳实验(XR-XQ202)系统购自上海欣软信息科技公司;酶标仪购自Rayto。

1.2 实验方法

1.2.1 基于Bulk RNA-seq的疾病差异表达基因筛选

本研究使用公开的转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)数据集GSE53987,选取海马(Hippocampus, HIP)、前额皮质(Prefrontal Cortex, PFC)和纹状体(Striatum, STR)三个脑部区域的样本进行差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs)分析。原始数据从Gene Expression Omnibus(GEO)数据库下载后,使用R软件(v4.3.1)中的DESeq2包(v1.42.0)进行处理。首先,对原始计数数据进行了标准化,包括样本间计数归一化和方差稳定化变换,同时过滤掉平均计数低于10的低表达基因。随后,使用DESeq2的Wald检验方法计算健康氟西汀组和MDD组的三个脑部区域样本的基因表达差异,由于在该数据集参考文献中选用的标准$|logFC| > 0.263$且$P \leqslant 0.05$,为了得到更多的潜在阳性结果,将筛选标准设为$P < 0.05$且$|logFC| > 0.063$,结合药物研究文献选择潜在有效药物,最终筛选出的DEGs用于后续的网络分析和药物筛选。

1.2.2 通过网络药理学与计算筛选发现候选药物

筛选得到的DEGs通过STRING数据库(v11.5)构建蛋白质-蛋白质相互作用(Protein-protein Interaction, PPI)网络,阈值设定为$C > 0.4$,以确保高质量的互作关系。网络数据导入Cytoscape软件(v3.10.0)进行可视化和拓扑分析,根据Degree中心性指标筛选网络中Degree $\geqslant 10$的基因作为关键基因集。随后,将关键基因集应用于Guney等提出的网络生物学药物筛选方法(Network-based in Silico Drug Efficacy Screening)[19],通过计算药物靶点对这些基因表达扰动的逆转评分,筛选潜在有效药物。其中药物靶点数据来源于DrugBank(v5.1.10)与比较毒物基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)数据库,并限定靶点物种为Homo sapiens。计算时采用1 000次随机置换检验评估Dsig评分的统计显著性($P < 0.05$)。筛选的药物按照Dsig评分排序,选择评分最高的药物用于后续分析。仅保留在多个脑区结果中均呈一致逆转方向的药物,用于后续功能预测阶段。

1.2.3 候选药物的作用靶点与机制富集分析

为了进一步探讨通过网络筛选获得的候选药物在MDD治疗中的潜在机制,本研究结合多种工具和数据库进行了靶点预测与功能富集分析。首先,利用SwissTargetPrediction和SuperPred两种工具预测候选药物的潜在作用靶点,其中SwissTargetPrediction基于药物的化学结构相似性和已知靶点关联进行预测,而SuperPred则通过整合靶点与药物之间的机器学习模型进行推断,并设置信心阈值为$P \geqslant 0.7$,仅保留置信度较高的结果。

其次,将预测得到的候选药物靶点与从HIP、PFC和STR三个脑区DEGs分析中筛选出的基因集合取交集,识别出可能与MDD相关的交集靶点。这些靶点可能反映了候选药物在MDD治疗中作用的关键分子机制。随后,将交集得到的靶点导入STRING v12.0平台(https://cn.string-db.org/),将分析结果导入Cytoscape,利用cytoHubba计算Degree构建前8位靶点PPI网络。随后将核心8个基因导入京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库,使用R包clusterProfiler进行通路富集分析。分析中,选取P值< 0.05且富集比(Enrichment Ratio)较高的信号通路作为显著富集通路,并详细考察这些通路在抑郁症中的病理机制及候选药物的治疗潜力。通过KEGG分析揭示候选药物靶点可能参与的分子信号通路,为其潜在的治疗作用机制提供理论支持。

1.2.4 分子对接预测效应成分

从蛋白质数据银行(Protein Data Bank, PDB)数据库(https://www.rcsb.org/)下载靶点蛋白三维(Three-dimensional, 3D)结构,在Py-

MOL2.5软件中移除配体、非蛋白分子和水分子,在AutoDock Vina软件中进行加氢、加电荷和修复残基。从PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)下载活性成分分子3D结构,在AutoDock Vina中进行加氢和能量最小化。利用AutoDock Vina软件的半柔性分子对接计算功能,预测活性成分与靶点之间的结合亲和力,通过输出的结合自由能数据判断亲和力大小。

1.2.5 小鼠分组及慢性应激抑郁模型的构建

小鼠适应性饲养2周后随机分组:选8只小鼠作为正常组(Normal)进行常规饲养不造模,其余小鼠为造模组进行单笼饲养,并施加CUMS程序进行造模,每日随机给予2种不可预测单因子刺激或复合因子刺激,相邻2 d刺激不重复,刺激因子包括:禁食禁水(18 h),潮湿垫料(24 h),束缚(5 h),冷水游泳(4 ℃,5 min),尾部夹持(5 min),电刺激(3 V, 60 s),笼具45°倾斜饲养(24 h),持续35 d。造模前1天测小鼠糖水偏好率,连续造模3周后,再次测量,造模组偏好率显著低于正常组,表明造模成功。随后按照糖水偏好率相近原则重新对造模小鼠进行分组,每组10只,分为五组:模型组、音乐组、氟西汀组(FXT,10 mg/kg)、赖氨酸组(Lys,参考文献剂量为625 mg/kg),以及赖氨酸联合音乐疗愈组(简称联合组,Lys+Music,625 mg/kg)音乐干预:将动物笼置于独立隔音房间内,声源置于距笼具中心1 m~2 m处,播放时长为每日30 min,播放强度控制在60 dB~70 dB(以声级计于笼具中心位置测量),随机播放曲目合集(见表1)。根据小鼠体重,连续灌胃给药2周(0.1 mL/10 g),将盐酸氟西汀胶囊内容物溶解于去离子水制成0.29 g/mL药液给予氟西汀组,正常组和模型组给予蒸馏水,其间持续CUMS刺激,每周测体重(图1),给药结束后进行第三次糖水偏好率测定。

表1 音乐疗愈曲目合集

Table 1 Music used for therapy

木音(对应肝)	火音(对应心)	土音(对应脾)	金音(对应肺)	水音(对应肾)
《茉莉花》(赵健钢琴演奏2021年版) *Jasmine Flower*	《太阳照常升起》(久石让作曲2009年电影《太阳照常升起》原声版) *The Sun Also Rises*	《稻香》(周杰伦演唱2008年《魔杰座》专辑) *Rice Fragrance*	《月光》(降D大调《贝加莫组曲》2007年版) *Clair de Lune*	《大鱼》(周深演唱2017年录音室版) *Big Fish*
《更好的日子》(Dermot Kennedy演唱2021年版) *Better Days*	《星空》(五月天演唱2011年《第二人生专辑》) *A Sky Full of Stars*	《卡农》(网易云2017年经典钢琴版) *Canon*	《日落》(Gus Dapperton演唱2023年版) *Sunset*	《海洋之眼》(Billie Eilish演唱2016年录音室版) *Ocean Eyes*
《花海》(周杰伦演唱2008年《魔杰座》专辑) *Sea of Flowers*	《勇敢》(Sara Bareilles演唱2013年《The Blessed Unrest》专辑) *Brave*	《成都》(赵雷演唱2016年《无法长大》专辑) *Chengdu*	《爱人》(Madilyn Paige演唱2019年录音室版) *Someone You Loved*	《航行》(蒋小呢演唱2021年录音室版) *Sail*
《风吹麦浪》(李健演唱2007年《想念你》专辑) Wind Dancing with Golden Crops	《现在知道》(KnowKnow演唱2019年《mr. bentley》专辑) *knowknow*	《柠檬》(米津玄师演唱《非自然死亡》主题曲) *Lemon*	《缘分一道桥》(电影《长城》片尾曲) *Bridge of Fate*	《水星记》(郭顶演唱2016年版) *Mercury Records*
《绿光森林》(Steve Middleton演唱2006年版) *Emerald Forest*	《牢记你》(Coldplay2005年录音室版) *Fix You*	《小幸运》(电影《我的少女时代》主题曲) *Little Luck*	《繁星之城》(电影《长城》主题曲) *City of Stars*	《雨》(动画电影《言叶之庭》片尾曲) *Rain*

1.2.6 行为学实验

第50天进行小鼠行为学评估,选择安静、低照度且适合鼠类活动的环境,并维持温度在(22±2)℃。测试前3 h将动物移入实验室以适应环境。所有测试于12:00—14:00(昼夜节律活动期)完成,以避免睡眠和休息的影响。单次测试结束后,使用体积分数75%医用酒精对测试区域进行清洁。

糖水偏好实验,在第13、35、49天开展糖水偏好实验,测试前72 h对小鼠进行适应性训练:每笼同时放置质量分数1%蔗糖水和纯水各一瓶,每12 h调换水瓶位置,训练结束后禁食、禁水22 h。正式实验期间,将小鼠单笼放置,并给予1%蔗糖水和纯水,自由进食饮水

2 h,记录糖水、纯水消耗量,并根据计算公式:糖水偏好率(%)=$V_{蔗糖溶液}/(V_{蔗糖溶液}+V_{普通水})\times 100\%$,计算糖水偏好率。

强迫游泳实验(Forced Swim Test,FST),实验第50天参考文献[20]方法执行。透明圆柱形容器直径20 cm,高40 cm,内注水深20 cm。视频记录系统拍摄小鼠6 min行为表现,分析后4 min内累计静止时间(判定标准:漂浮于水面、无明显挣扎、仅维持肢体轻微摆动)。测试结束后立即用无菌吸水纸吸干小鼠体表水分,并转移至红外保温灯下保暖,防止低温死亡。

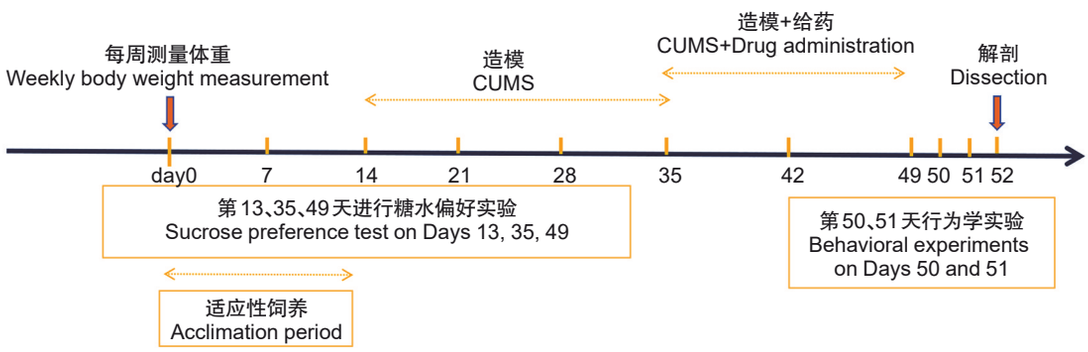


图1 动物实验流程

Fig. 1 Animal experiment protocol

悬尾实验(Tail Suspension Test,TST),实验第50天参考文献[20]方法执行。测试箱为长30 cm,宽26 cm,高60 cm的长方体箱体,其顶部含有一横杆,箱内背景设置为黑色,以增强与白色小鼠的视觉对比效果。将小鼠尾端后1/3处用医用胶带固定,悬吊于测试箱顶杆下方1 cm~2 cm处。小鼠适应2 min后,视频系统追踪记录小鼠在6 min内的静止时间(定义为:小鼠处于完全静止的悬挂状态,停止来回摆动时)以及挣扎时间。

高架零迷宫实验(Elevated Zero Maze,EZM)第51天参照文献[21]方法执行,迷宫为直径45 cm、宽6 cm、高40 cm的环形平台,分为四个相等的象限,含交替分布的开放区域与闭合区域(各占50%)。小鼠适应环境3 min后,视频追踪系统记录5 min内追踪小鼠进入开放臂的次数、开放臂停留时间及封闭臂停留时间等数据。

旷场实验(Open Field Test,OFT),第51天参照文献[21]方法执行。箱底划分为25个等面积方格(含中央区域与外周区域)。拍摄时长为13 min,前3 min使小鼠适应环境随后10 min内记录系统自动追踪并分析小鼠运动轨迹、总穿越次数、中央区域停留时间及运动时间等,每只小鼠测试完毕后彻底清洁旷场箱消除小鼠气味。

1.2.7 样本采集及脏器指数的测定

实验第52天对各组小鼠进行取血并处死,随后立即进行解剖,分别取其胸腺组织、脾脏组织、肝组织、脑组织。用滤纸吸除残血后称重,按以下公式计算脏器指数:脏器系数(g/g)=100×脏器湿重/小鼠体质量。

1.2.8 小鼠神经递质含量测定

在小鼠被处死后,立即采集其脑组织样本,随后使用冰水进行冲洗,并通过滤纸移除表面残留的水分,之后将样本储存于−80 ℃环境中,用于检测脑组织中的多巴胺(Dopamine,DA)、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine,5-HT)和去甲肾上腺素(Norepinephrine,NE)的含量。

取脑组织样本0.5 g置于2 mL的微量离心管中,依据1∶2的质量体积比,加入1 mL体积分数80%水和20%甲醇组成的溶液,制备成匀浆。随后,在4 ℃条件下以12 000 r/min的转速离心10 min。精确移取400 μL的上清液,向其中加入100 μL浓度为4 mg/L的γ-氨基丁酸内标工作液及1.5 mL预冷的体积分数0.1%甲酸水与乙腈按2∶3比例混合的溶液。混合物经涡旋混合2 min后,再次于4 ℃条件下以12 000 r/min的转速离心10 min。上清液经0.22 μm的微孔滤膜过滤后进样分析。

色谱分离条件：采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(规格为2.1 mm×100 mm，粒径1.7 μm)；流动相由体积分数0.3%甲酸水溶液(A)与乙腈(B)按67.5∶32.5的体积比组成；流速设定为0.5 mL/min；进样体积为2 μL。关于保留时间的记录如表2。

表2 神经递质检测离子对及质谱离子化条件

Table 2 Ion pairs and ionization conditions for mass spectrometry for neurotransmitter detection

组别	保留时间/min	母离子	子离子	驻留时间/ns	电压/V
去甲肾上腺	2.106	170.2	152.2	50	15
			107.2	50	25
五羟色胺	6.919	177.1	160.1	50	10
			115.1	50	30
多巴胺	13.580	154	137	50	15
			90.6	50	25
γ-氨基丁酸(内标)	5.112	105	87.9	50	10

质谱检测条件：采用电喷雾电离(Electrospray Ionization，ESI)电喷雾离子源，正离子模式，多反应监测(Multiple Reaction Monitoring，MRM)扫描。毛细管电压设置为4 kV，离子源温度为400 ℃，脱气流速为800 L/h，锥体流速为150 L/h，喷雾气压设定为0.7 MPa。

1.2.9 硝酸还原酶法测定小鼠大脑中NO含量

将小鼠大脑从−80 ℃冰箱取出后称重，按重量与生理盐水体积比1∶9的比例进行机械匀浆，于离心机内3 500 r/min离心10 min，离心后取质量浓度为0.1 g/mL上清匀浆300 μL分装后，按照试剂盒说明书操作步骤进行，以检测各组小鼠大脑中NO含量。

1.2.10 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative Real-time PCR，qPCR)

小鼠海马组织研磨碎，依照说明书，使用Trizol法提取实验小鼠总RNA，使用Nanodrop 2000测定总RNA纯度和质量。使用逆转录试剂盒合成互补DNA(Complementary DNA，cDNA)，通过PCR仪进行数据分析并绘制溶解曲线，以GAPDH表达做内部参照。用$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算出内皮型一氧化氮合酶(Endothelial NOS，NOS3)、间质表皮转化因子(Mesenchymal-epithelial Transition Factor，MET)与雄激素受体(Androgen Receptor，AR)的相对表达量，所用引物见表3。

表3 计算一氧化氮合酶、间质表皮转化因子及雄激素受体等蛋白相对表达量的引物信息

Table 3 Primer sequences for calculating relative expression of Endothelial NOS (NOS3), Mesenchymal-epithelial Transition factor (MET), and Androgen Receptor (AR)

引物名称	引物序列(5′—3′)	片段长度/bp	退火温度/℃
M-AR(1)-S	GGATGGCTCCAAATAACCCC	297	60
M-AR(1)-A	TTCAGGAAAGTCCACGCTCAC	297	60
M-MET-S	GAGTGCCCTGAAGTGGATGG	127	60
M-MET-A	TGCTGGGACATCATCACTCC	127	60
M-NOS3-S	CTGCCACCTGATCCTAACTTGC	110	60
M-NOS3-A	AGCCCTTTGATCTCAATGTCGT	110	60
M-GAPDH-S	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133	60
M-GAPDH-A	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	133	60

1.2.11 蛋白表达检测(Western Blot，WB)

用电动研磨器将实验小鼠海马组织研磨碎，RIPA裂解液提取总蛋白质，BCA方法检测总蛋白的浓度，再经过蛋白质变性，加样和电泳，转膜，封闭，一抗孵育、二抗孵育，最后通过ECL化学显影并拍照。蛋白表达检测使用β-actin作为内参。

1.2.12 统计学分析组间差异

本文采用Graphpad Prism9.3软件进行统计分析。数据均以(均数 ± 标准差)表示。多组之间

比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异t检验(Least Significant Difference T-test, LSD-t),$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 Bulk RNA-seq分析结果

通过对GSE53987数据集中HIP、PFC和STR三个脑区样本的RNA-seq数据分析,其中,HIP区显著差异基因数量为523,PFC区为924,STR区为753。尽管本研究选择的阈值相较于常规分析过于宽松,但是结合药物筛选以及文献的三角验证,可以得到有潜力的药物,见图2。

2.1.2 基于网络的计算药物疗效筛选药物

通过STRING以及Cytoscape的筛选,在HIP一共获得了6个关键基因,在PFC共获得了32个关键基因,在STR共获得了25个关键基因。随后通过Network-based in silico drug efficacy screening分别分析三个组织的关键基因集,以阈值为$P\leqslant0.05$筛选Dsig预测的关键基因相关联药物。同时基于现有文献,氨基酸作为神经递质合成不可或缺的营养成分,在精神疾病干预中具有重要作用,其体内水平与情绪调节功能密切相关[22]。因此本研究认为,赖氨酸展现出改善抑郁症状的潜在药物特性,见图3。

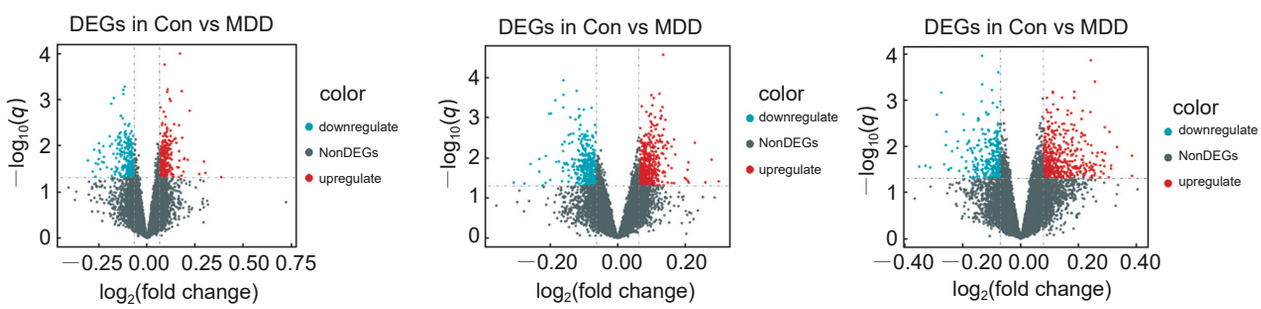


图2 Bulk RNA-seq分析HIP、PFC和STR三个脑区差异基因结果的火山图

Fig. 2 Volcano plots displaying the differential gene expression analysis in the HIP, PFC, and STR from Bulk RNA-seq

2.1.3 网络药理学预测赖氨酸改善抑郁症的机制

通过SwissTargetPrediction和SuperPred预测,共获得赖氨酸作用靶点152个,随后与抑郁症三个组织的DEGs共2 078个基因取交集,通过Venny 2.1.0作图,得到10个基因。将交集基因导入STRING v 12.0平台(https://cn.string-db.org/),将物种限制为“Homo sapiens”,选取互助评分0.150,得到10个节点和14条边。将分析结果导入Cytoscape,利用Cytohubba构建前8位靶点PPI网络,颜色越深,表明该节点与其他节点作用关系越密切,在交集网络中越重要。从中可以看出NOS3、MET、AR在网络图中排名靠前,与赖氨酸对青少年抑郁的治疗有着密切联系。通过KEGG富集分析得到六条与赖氨酸治疗重症抑郁有关的通路,钙信号通路、鞘脂信号通路、精氨酸脯氨酸代谢、血管内皮生长因子、神经活性配体-受体相互作用、Apelin信号通路,见图4。

2.1.4 分子对接分析

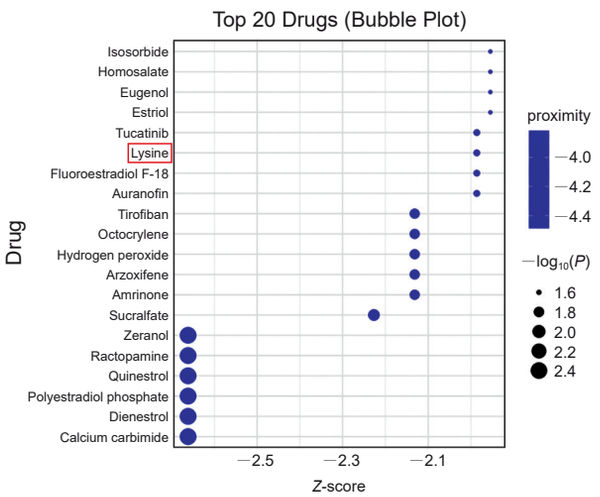
对赖氨酸作用于NOS3、AR、MET的结合能进行测定。从PubChem数据库中下载赖氨酸的PDB文件;NOS3、AR和MET的PDB文件从RCSB PDB数据库中下载,蛋白质序列号分别为7TSG、5V8Q、7B3Q。将赖氨酸与NOS3、AR、MET的结合能进行分析(见表4),结合能数值越小,表明两者结合性越好,所有结合能均小于16.74 kJ/mol,表明结合性良好,其中赖氨酸与NOS3结合能力最好。最后制备这3种靶点和赖氨酸的结合模式图(见图5)。

2.2 动物实验

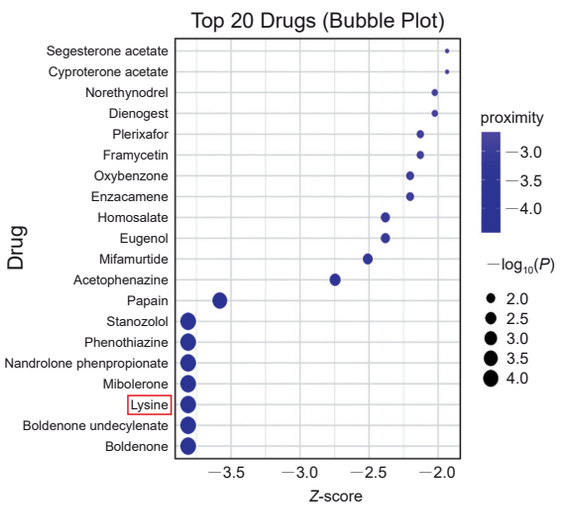
2.2.1 体重变化和脏器指数

由图6(b)可知,模型组小鼠体重变化趋势平缓,体重增长缓慢;其余各组小鼠体重明显呈增长趋势,与模型组差异显著($P<0.05$),各组之间无明显差异。与正常组相比,模型组小鼠胸腺指数显著降低($P<0.01$)而脾脏指数也显著降低($P<0.01$),肝脏指数差异无统计学意义($P>0.05$);

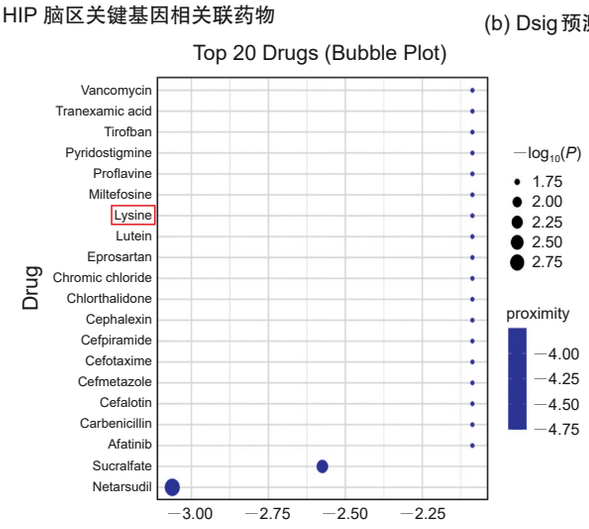
氟西汀组胸腺指数和脾脏指数明显降低($P<0.01$),而联合组的三组指数均无显著差异($P>0.05$)。与模型组相比,音乐组、赖氨酸组和联合组小鼠胸腺指数显著升高($P<0.01$),脾脏指数显著升高($P<0.01$),肝脏指数差异不明显($P>0.05$);与赖氨酸组相比,联合组小鼠胸腺指数增高($P<0.05$),脾脏及肝脏指数差异均无统计学意义($P>0.05$, $P>0.05$)。见表5。



(a) Dsig预测的HIP脑区关键基因相关联药物



(b) Dsig预测的PFC脑区关键基因相关联药物



(c) Dsig预测的STR脑区关键基因相关联药物

图3 Dsig预测的HIP、PFC和STR三个脑区关键基因相关联药物

Fig. 3 Drugs associated with key genes predicted by Dsig in three brain regions HIP, PFC, and STR

2.2.2 Lys+Music对CUMS模型小鼠行为学的影响

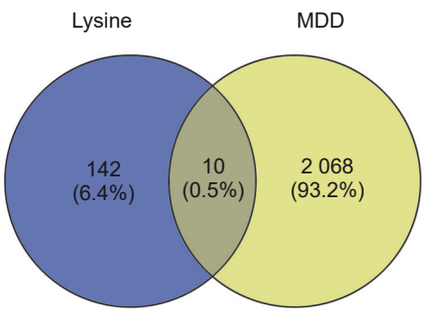
糖水实验

在第13、35、49天进行糖水实验,观察抑郁型小鼠的造模过程。由表6可知,从第2周开始,模型组小鼠的糖水摄入率较正常组持续降低。第35天,相比正常组,模型组小鼠糖水摄入率继续降低,差异显著($P<0.01$),提示造模成功。第49天,相比模型组,音乐组、赖氨酸组和联合组糖水摄入率显著升高,且联合组改善效果优于单一治疗组。

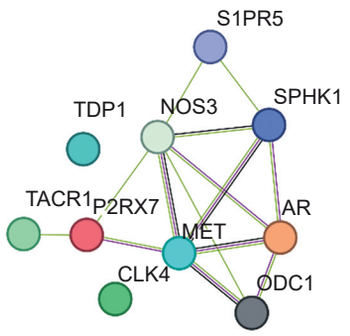
强迫游泳(FST)、悬尾实验(TST)

在第50天进行强迫游泳和悬尾实验,观察抑郁型小鼠的抑郁样情绪,如图6(c)、(i)所示,与正常组比较,模型组小鼠强迫游泳及悬尾实验中的挣扎时间分别缩短($P<0.01$, $P<0.01$),表明CUMS模型小鼠出现行为学异常。与模型组比较,氟西汀和联合组小鼠强迫游泳及悬尾实验中的挣扎时间明显延长,差异显著($P<0.01$ 或 0.05),表明小鼠抑郁症状得到缓解;赖氨酸组小鼠强迫游泳挣扎时间明显延长,差异显著($P<0.05$),悬尾实验中的挣扎时

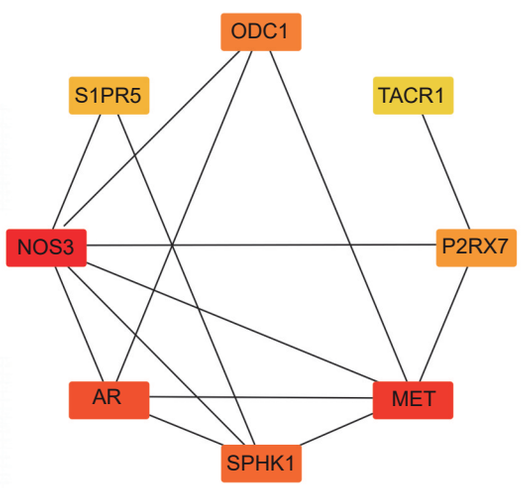
间也呈现延长趋势但不显著($P>0.05$);音乐组小鼠强迫游泳和悬尾实验挣扎时间变化均没有显著性差异($P>0.05$)。与赖氨酸组相比,联合组小鼠强迫游泳挣扎时间相近无统计学差异($P>0.05$),悬尾实验中的挣扎时间更长,差异明显($P<0.05$)。综上所述,赖氨酸联合五音疗愈显著改善了抑郁小鼠的抑郁样行为,并且在改善效果上联合组比赖氨酸组更为显著。



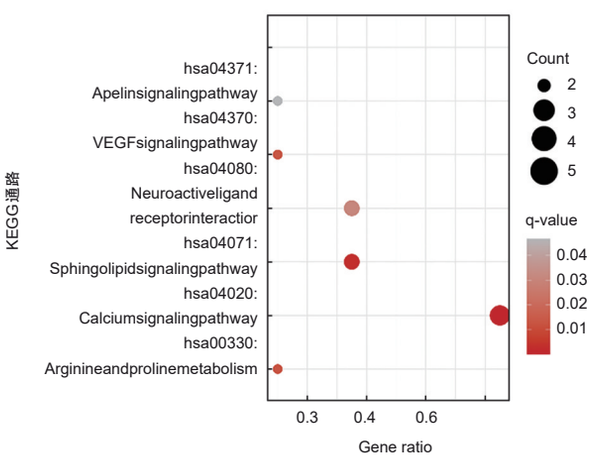
(a) 抑郁症三个组织的DEGs与Lysine的交集基因



(b) Lysine治疗抑郁症的潜在作用靶点PPI网络图Dsig预测的PFC脑区关键基因相关联药物



(c) cytohubba MCC前8位靶点预测的前8位靶点PPI网络



(d) Lysine治疗抑郁症的KEGG通路富集分析

图4 网络药理学揭示赖氨酸改善抑郁症的机制探索

Fig. 4 The underlying mechanism of Lysine in ameliorating depression revealed by network pharmacology

表4 活性成分和靶点分子对接结合能

Table 4 Binding Energies of molecular docking between active ingredients and targets

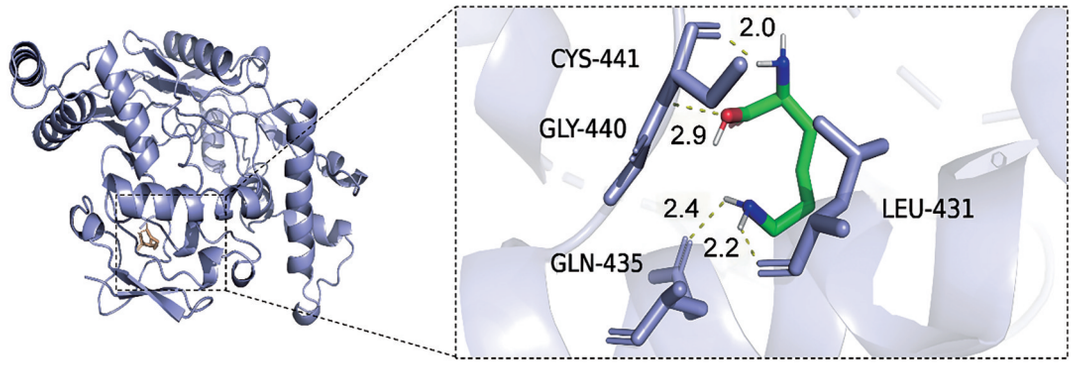
靶点	活性成分	结合能/(kJ/mol)
NOS3	Lysine	−21.34
	KLO	−25.52
AR	Lysine	−18.83
	97A	−26.78
MET	Lysine	−19.25
	SV5	−25.52

旷场实验(OFT)

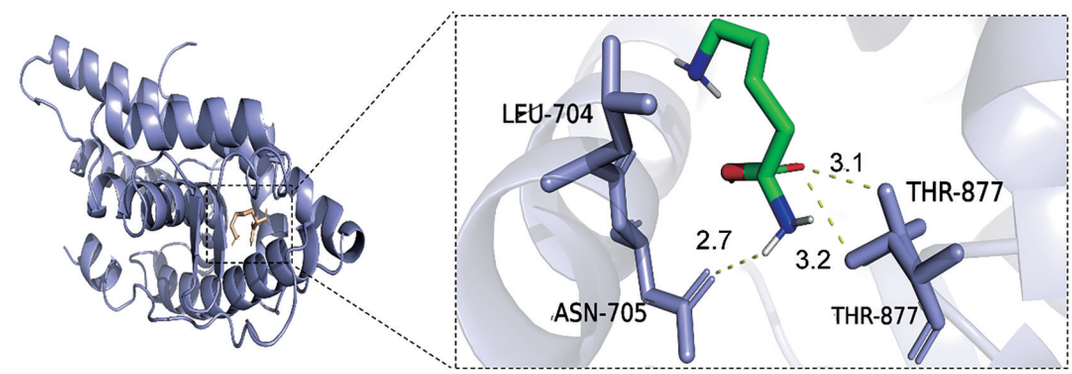
在第51天进行旷场实验,观察抑郁型小鼠的焦虑样情绪,如图6(a)、(d)、(e)所示,通过OFT的观察结果得知,与正常组小鼠相比,模型组小鼠显著缺乏探索旷场中心的倾向,其在旷场中央区域的滞留时间明显减少($P<0.01$),且因焦虑情绪导致在该区域的静止时间显著降低($P<0.01$),表明CUMS模型小鼠行为学异常。相反,与模型相比,氟西汀、音乐、赖氨酸和联合组小鼠在旷场中央区域的滞留时间显著增加($P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.01$),且与赖氨酸组相比,联合组小鼠在旷场中央区域的滞留时间增加更为明显($P<0.05$),并且在OFT中央区域静止时间中,除音乐组无显著差异外,氟西汀、赖氨酸和联合组表现出相同的趋势($P<0.01$、$P<0.01$、$P<0.01$),但赖氨酸和联合组差异不明显($P>0.05$)。综上赖氨酸及其联合五音疗愈均可显著改善抑郁型小鼠的焦虑样行为且联合组的改善效果比赖氨酸组更为显著。

高架零迷宫实验(EZM)

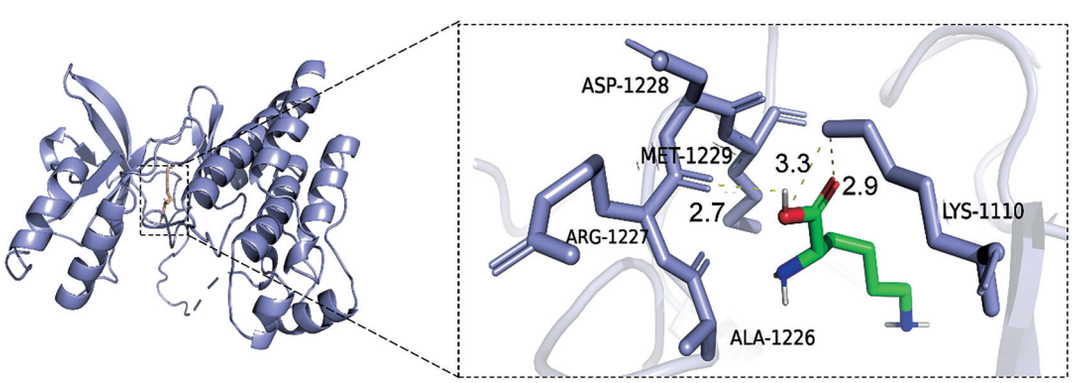
在第51天进行高架零迷宫实验,观察抑郁模



(a) Lysine-NOS3分子对接模型



(b) Lysine-AR分子对接模型



(c) Lysine-MET分子对接模型

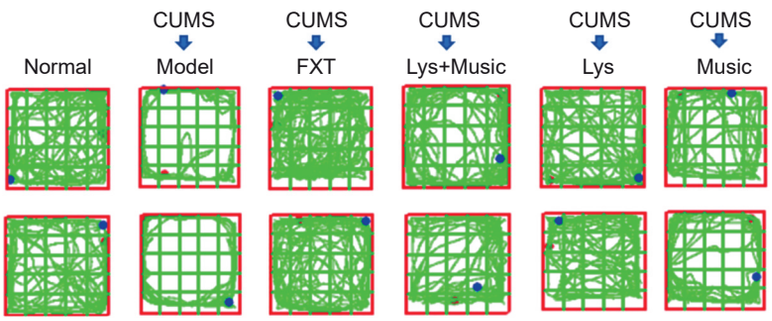
图5 治疗抑郁症的“重要有效成分-核心靶点”分子对接模型

Fig. 5 Molecular docking models of key active component-core target interactions in depression treatment

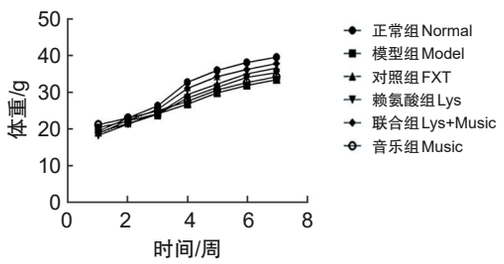
型小鼠的焦虑样行为。如图6(g)、(h)所示,在EZM中,与正常组小鼠相比,模型组小鼠进入开放臂的次数以及在开放臂的活动时间均显著减少($P<0.01$、$P<0.01$),在闭合臂的活动时间显著增加($P<0.01$)。与模型组小鼠相比,氟西汀、赖氨酸和联合组小鼠进入开放臂的次数显著增加($P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.01$),在开放臂的活动时间也呈现相同趋势($P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.01$),而在闭合臂的活动时间显著减少($P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.01$),音乐组仅进入开放臂的次数显著增加($P<0.05$)。同时,与赖氨酸组相比,联合组小鼠进入开放臂的次数增加更为明显($P<0.05$)。综上所述,赖氨酸及其联合中医五行音乐疗愈均显著改善了抑郁小鼠的焦虑样行为,并且在改善效果上联合组比赖氨酸更为显著。

2.2.3 Lys+Music对CUMS模型小鼠神经递质水平的影响

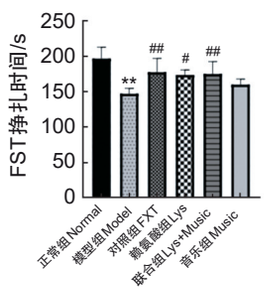
如图7(a)—(c)所示,与正常组相比,模型组小鼠大脑中的多巴胺、5-羟色胺和去甲肾上腺素浓度均显著下降($P<0.01$)。联合组在音乐组显著回调抑郁小鼠大脑中的5-羟色胺、去甲肾上腺素水平($P<0.05$)的基础上,还升高



(a) OFT期间各组的代表性运动轨迹

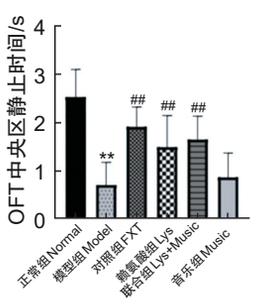


(b) 各组小鼠体重随时间的变化

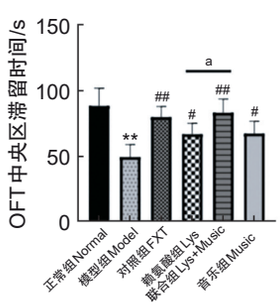


组别

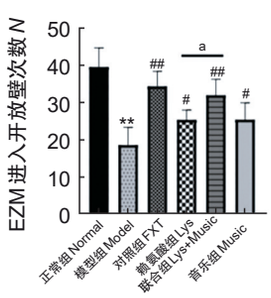
(c)小鼠在 FST 中的挣扎游泳时间(s)



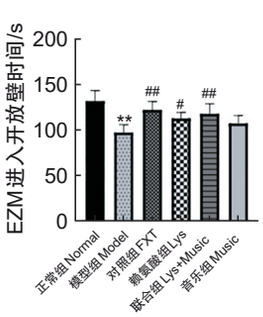
(d) OFT 中央区域静止时间(s)



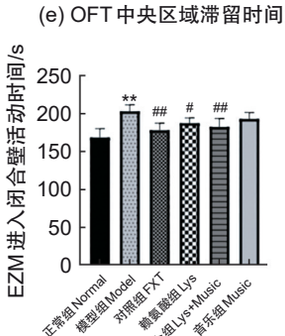
(e) OFT 中央区域滞留时间(s)



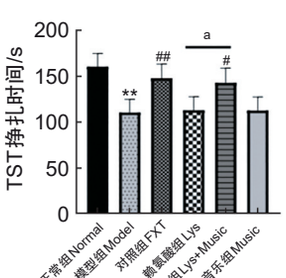
(f) 在EZM中进入开放臂的次数



(g) 在EZM中开放臂活动时间(s)



(h) 在EZM中闭合臂活动时间(s);



(i) 小鼠在TST中的挣扎游泳时间(s)

注:与正常组比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$;赖氨酸组与联合组相比,$^{a}P<0.05$,$^{aa}P<0.01$。

Note: Compared with the Normal group, the $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with the Model group, $^{\#}P<$ was 0.05, $^{\#\#}P<0.01$ and group Lys compared with the Lys+Music group, the $^{a}P<0.05$, $^{aa}P<0.01$.

图6 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠焦虑和抑郁样行为的影响($n=8$)

Fig. 6 Effect of the Lys+Music on anxiety and depression-like behaviors in CUMS mice ($n=8$)

了多巴胺水平($P<0.05$)。与赖氨酸组相比,联合组对于多巴胺和去甲肾上腺素升高效果更加显著($P<0.05$),显示联合疗法优于单一药物治疗和音乐疗愈。

表5 各组小鼠脏器(胸腺、脾脏、肝脏)指数(n=8)

Table 5 The organ (thymuses, livers and spleens) coefficients in mouse among each group (n=8)

组别	胸腺指数	脾脏指数	肝脏指数
正常组	0.126 9±0.006 2	0.170 6±0.005 3	2.081 0±0.048 3
模型组	0.076 3±0.016 9**	0.143 2±0.006 8**	2.152 8±0.058 7
氟西汀组	0.074 1±0.016 2**	0.161 7±0.003 9**##	2.176 6±0.060 2
赖氨酸组	0.101 4±0.016 8**##	0.174 6±0.003 0##	2.125 5±0.077 3
联合组	0.124 7±0.010 4##a	0.176 2±0.004 6##	2.168 8±0.083 8
音乐组	0.101 1±0.015 5##	0.161 1±0.007 3##	2.145 7±0.052 3

注:与正常组比,*P<0.05,**P<0.01;与模型组相比,#P<0.05,##P<0.01;赖氨酸组与联合组相比,aP<0.05,aa$P$<0.01。

Note: Compared with the Normal group, the *P<0.05, **P<0.01, compared with the Model group, #P< 0.05, ##P<0.01 and group Lys compared with the Lys+Music group, the aP<0.05, aa$P$<0.01.

表6 各组小鼠糖水偏好率(%)(n=8)

Table 6 Sucrose preference (%) in each group (n=8)

组别	第13天	第35天	第49天
正常组	89.21±3.45	90.61±4.16	93.10±4.72
模型组	88.62±2.71	41.73±3.39**	38.26±1.53**
氟西汀组	92.06±4.85	41.27±2.50**	79.39±1.45**##
赖氨酸组	90.74±4.87	42.67±3.04**	68.57±3.49**##
联合组	91.76±4.59	40.54±3.54**	88.51±2.22##aa
音乐组	89.36±3.32	42.09±2.61**	52.89±3.04**##

注:与正常组比,*P<0.05,**P<0.01;与模型组相比,#P<0.05,##P<0.01;赖氨酸组与联合组相比,aP<0.05,aa$P$<0.01。

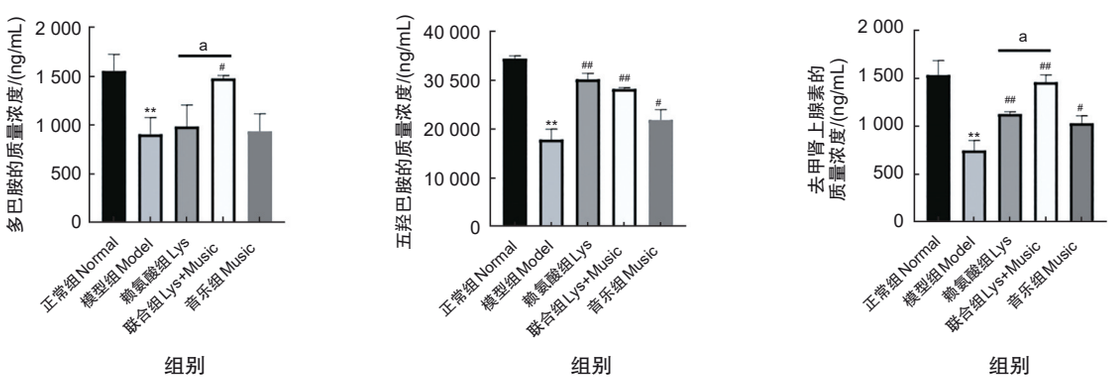
Note: Compared with the Normal group, the *P<0.05, **P<0.01, compared with the Model group, #P< 0.05, ##P<0.01 and group Lys compared with the Lys+Music group, the aP<0.05, aa$P$<0.01.

2.2.4 Lys+Music对CUMS模型小鼠NO含量的影响

如图8所示,与正常组比较,模型组小鼠脑组织NO含量显著降低(P<0.001);与模型组比较,其他各组小鼠脑组织NO含量均升高(P<0.01);与赖氨酸组相比,联合组NO含量显著提高(P<0.01)。这些数据表明,联合组在NO含量的回调中效果占优,显示了联合疗愈的协同作用。

2.2.5 Lys+Music对CUMS模型小鼠RNA相对表达量的影响

如图9(a)—图9(c)所示,与正常组比较,模型组小鼠脑组织NOS3 mRNA表达显著降低(P<0.05),AR、MET有下降趋势(P>0.05);与模型组比较,音乐组脑组织NOS3 mRNA表达无明显变化(P>0.05)而赖氨酸组和联合组小鼠脑组织NOS3 mRNA表达均提高,且联合组升高更为明显(P<0.05),各组AR、MET mRNA表达变化不显著(P>0.05)。这提示赖氨酸作用于NOS3改善抑郁的可能性更高,且



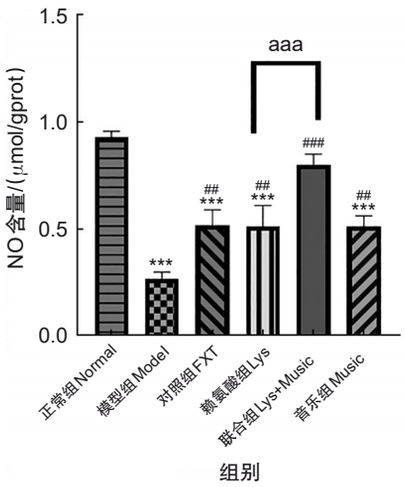
(a) Lys+Music对小鼠大脑DA水平的影响 (b) Lys+Music对小鼠大脑5-HT水平的影响 (c) Lys+Music对小鼠大脑NE水平的影响

注:与正常组比,*P<0.05,**P<0.01;与模型组相比,#P<0.05,##P<0.01;赖氨酸组与联合组相比,aP<0.05,aa$P$<0.01。

Note: Compared with the Normal group, the *P<0.05, **P<0.01, compared with the Model group, #P< was 0.05, ##P<0.01 and group Lys compared with the Lys+Music group, the aP<0.05, aa$P$<0.01.

图7 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠神经递质的影响(n = 3)

Fig. 7 Effects of Lys+Music on Neurotransmitters in CUMS Mice (n = 3)



注:与正常组比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.01$;赖氨酸组与联合组相比,$^{a}P<0.05$,$^{aa}P<0.01$,$^{aaa}P<0.01$。

Note: Compared with the Normal group, the $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.01$; compared with the Model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.01$ and group Lys compared with the Lys+Music group, the $P<0.05$, $^{aa}P<0.01$, $^{aaa}P<0.01$.

图8 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠NO含量的影响($n=3$)

Fig. 8 Effect of Lys+Music on NO content in CUMS Mice ($n=3$)

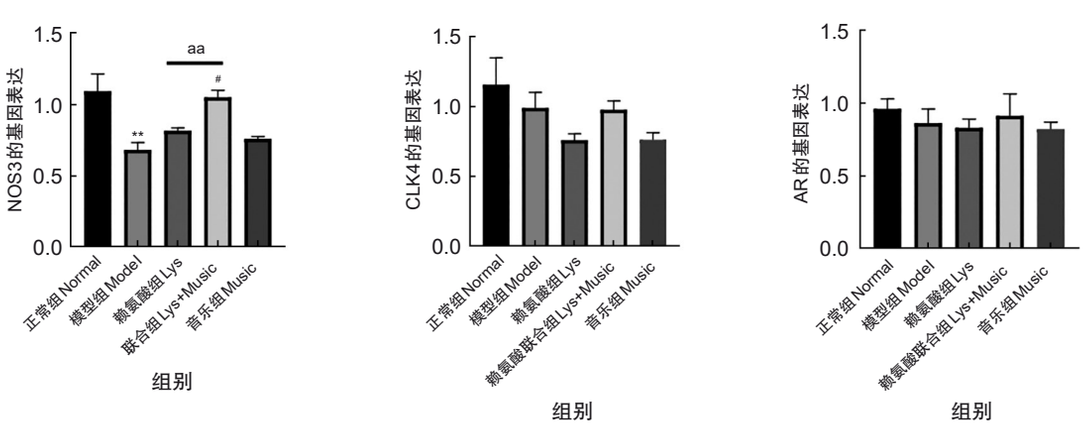
联合疗法优于单一药物治疗。

2.2.6 Lys+Music对CUMS模型小鼠蛋白表达的影响

为确定小鼠脑组织中NOS3信号的表达,本实验进行了WB,如图10(a)—图10(c)所示。与正常组相比,模型组NOS3、p-NOS3的表达水平在小鼠的脑组织之中显著降低($P<0.001$)。与模型组相比,各治疗组的小鼠脑组织中NOS3、p-NOS3的表达水平在小鼠的脑组织之中升高,且联合组比赖氨酸组升高程度更显著($P<0.05$)。这些发现表明,赖氨酸有可能在抑郁的进展过程中激活了NOS3及其下游通路来达到改善抑郁的效果,五音疗愈协同其作用,效果优于单一药物治疗。

3 讨论

MDD是一种严重的心理障碍,除导致情绪与认知功能的损害外,还伴随社交回避与长期躯体化等健康症状,严重影响患者的日常社会活动[23]。根据最新的临床诊治统计数据,全球范围内大约有3.0亿人患有MDD,且每年患病人数仍在增多,给社会以及家庭带来沉重负担[24-25]。目前一线的抗MDD药物以及心理治疗虽然在临床上取得一定成效,但仍存在药物不良反应明显、个体疗效差异大等局限[26]。同时鉴于MDD等复杂疾病被视为生物分子网络整体失调的结果,探索多靶点、多机制的联合治疗策略已成为重要方向。为识别与MDD相关的关键基因网络并从中筛选具有调控潜力的候选药物,本研究整合了公共数据库与网络药理学方法。首先,基于GEO数据集GSE53987,使用DESeq2对HIP、PFC及STR的RNA-seq数据进行差异基因分析,其中,HIP区显著差异基因数量



(a) Lys+Music对小鼠大脑中NOS3 mRNA表达的影响 (b) Lys+Music对小鼠大脑中MET mRNA表达的影响 (c) Lys+Music对小鼠大脑中AR mRNA表达的影响

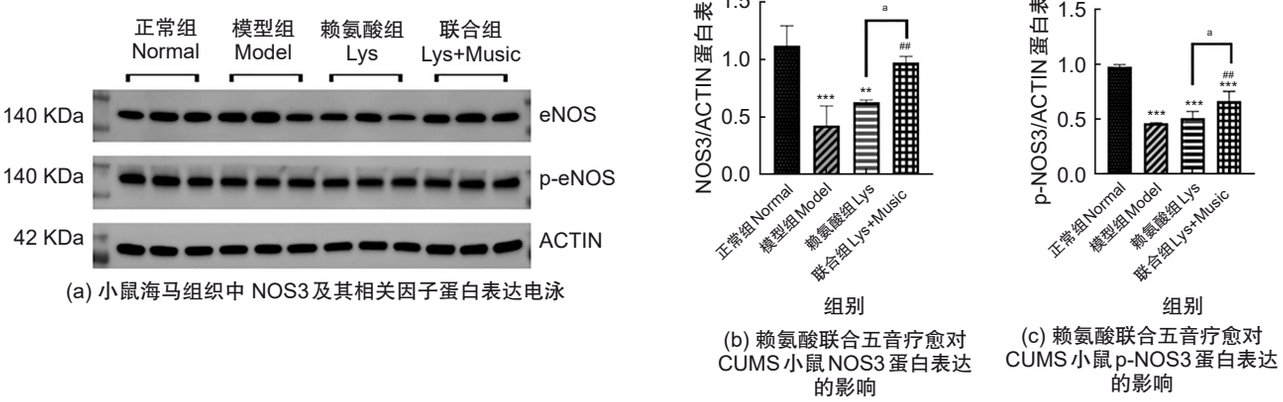
注:与正常组比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$;赖氨酸组与联合组相比,$^{a}P<0.05$,$^{aa}P<0.01$。

Note: Compared with the Normal group, the $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with the Model group, $^{\#}P<$ was 0.05, $^{\#\#}P<0.01$ and group Lys compared with the Lys+Music group, the $^{a}P<0.05$, $^{aa}P<0.01$.

图9 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠mRNA表达的影响($n=3$)

Fig. 9 Effects of Lys+Music on the mRNA expression in CUMS mice ($n=3$)

为523,PFC区为924,STR区为753。其次,通过STRING构建差异基因PPI网络,利用Cytoscape筛选关键基因,在HIP一共获得了6个关键基因,在PFC共获得了32个关键基因,在STR共获得了25个关键基因;随后通过Network-based in silico drug efficacy screening分别分析三个组织的关键基因集,采用网络药理学方法计算药物逆转评分(Dsig评分)筛选候选药物—赖氨酸。基于文献研究,赖氨酸是合成神经递质的关键前体,其水平直接影响情绪调节功能,因此本研究认为赖氨酸具有改善MDD的潜力。



(a) 小鼠海马组织中NOS3及其相关因子蛋白表达电泳

(b) 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠NOS3蛋白表达的影响

(c) 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠p-NOS3蛋白表达的影响

注:与正常组比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.01$;赖氨酸组与联合组相比,$^{a}P<0.05$,$^{aa}P<0.01$,$^{aaa}P<0.01$。

Note: Compared with the Normal group, the $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.01$; compared with the Model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.01$ and group Lys compared with the Lys+Music group, the $^{a}P<0.05$, $^{aa}P<0.01$, $^{aaa}P<0.01$.

图10 赖氨酸联合五音疗愈对CUMS小鼠NOS3表达的影响($n=3$)

Fig. 10 Effects of Lys+Music on the NOS3 expression in CUMS mice ($n=3$)

音乐疗法在抑郁症治疗中的应用已积累丰富的循证医学证据。最新发表的一项纳入多项随机对照试验的荟萃分析显示,音乐疗法在减轻抑郁症状方面显著优于对照组(标准化均数差=−0.97,95%置信区间:−1.23至−0.71,$P<0.01$),且这一获益在不同音乐疗法类型(主动式、接受式、音乐医学)、不同实施方式(个体或团体)及不同实施者(专业治疗师或非专业人员)中均保持一致。该研究进一步指出,音乐疗法还能显著改善抑郁症患者的生活质量(标准化均数差=0.51)和睡眠质量(标准化均数差=−0.61),提示其多维度的治疗价值[27]。动物研究为音乐疗法的神经生物学机制提供了深入见解:音乐干预可通过调节神经递质水平、促进神经可塑性、减轻神经炎症等多重途径改善抑郁样行为[28]。有研究表明古典音乐和轻音乐被发现能有效增加抑郁模型小鼠的蔗糖偏好和缩短不动时间,增强脑源性神经营养因子信号传导[29]。音乐疗法的核心优势在于其个性化潜力——可根据患者的文化背景、个人偏好及情绪状态选择不同风格、节奏和旋律的音乐,实现精准干预。本研究所采用的“五音-五脏-情志”理论框架,正是这一个性化理念在传统中医理论中的体现,通过将现代音乐元素与五行理论相结合,针对不同情绪状态匹配相应风格的音乐:针对愤怒情绪,采用《茉莉花》《Better Days》《Sea of Flowers》等节奏明快的曲目作为木系音乐,疏肝解郁;针对焦虑情绪,选用《A Sky Full of Stars》《Brave》《Fix You》等旋律舒缓的电子与流行音乐作为火系音乐,清心宁神;针对思虑过度,通过《稻香》《Canon》《成都》等民谣与轻音乐作为土系音乐,健脾安思;针对悲伤情绪,选取《Clair de Lune》《Sunset》《缘分一道桥》等具有开阔感的作品作为金系音乐,宣肺理气;针对恐惧情绪,以《大鱼》《航行》《水星记》等营造宁静氛围的曲目作为水系音乐,滋肾定志[30](表1)。既保留了传统智慧,又提升了现代患者的接受度[31]。

赖氨酸作为一种必需氨基酸,其在抑郁症

中的作用近年来越来越受到关注。传统研究多聚焦于神经递质失衡,而最新发表在《Microbiome》的一项多组学研究揭示了赖氨酸在抑郁症发病中的关键地位:儿童青少年抑郁症患者血浆中赖氨酸等13种氨基酸显著减少,肠道菌群分析显示赖氨酸等氨基酸的缺乏可能介导菌群对抑郁症状的影响。该研究通过粪菌移植实验证实,将抑郁患者的肠道菌群移植至无菌大鼠后,受体大鼠前额叶皮层氨基酸水平显著下降,并出现抑郁样行为;进一步饮食干预研究发现,限制赖氨酸摄入的青少年大鼠前额叶谷氨酸转运体表达减少,抑郁易感性显著升高。这些证据提示,赖氨酸缺乏可能是抑郁症的致病因素之一,而补充赖氨酸则具有治疗潜力[32]。赖氨酸作为合成神经递质的关键前体,可通过多种途径影响中枢神经系统功能:研究表明,赖氨酸能调节N-甲基-D-天冬氨酸受体活性,从而参与疼痛感知和情绪反应的调控,其给药可增强疼痛敏感性并影响脑内防御行为,显示其对特定脑区活动的选择性影响[33]。此外,赖氨酸还能通过抑制单胺氧化酶活性,提高脑内5-羟色胺(5-HT)水平,产生抗焦虑和镇痛效果,同时伴随体重下降,这表明赖氨酸在调节神经递质代谢和情绪行为中具有重要作用[34]。

为阐明赖氨酸抗MDD的作用机制,本研究进一步采用网络药理学方法进行探究。首先,通过SwissTargetPrediction与SuperPred平台预测获得赖氨酸的潜在作用靶点152个。将这些靶点与MDD疾病靶点取交集后,构建了蛋白质互作(PPI)网络。该网络包含10个节点与14条边,表明赖氨酸可能通过调节多个靶点发挥防治MDD的协同作用。进一步利用Cytohubba插件进行拓扑分析,筛选出关联度最高的三个核心靶点:NOS3、Met与AR(图4)。其中NOS3作为一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase,NOS)家族的重要成员,是催化左旋精氨酸生成一氧化氮(NO)的关键限速酶[35]。NO在中枢神经系统的生理学中起着重要作用,神经递质的生物合成可以受到NO调节。大脑中NO的功能障碍会导致MDD、BPD和焦虑等疾病的产生[36]。AR作为介导雄激素功能的关键蛋白,其信号通路可能通过干扰下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamic-pituitary-adrenal,HPA)轴的负反馈调节,导致应激反应无法适时关闭。这种持续性的HPA轴功能失调,被认为是AR促进焦虑与抑郁等情绪障碍发展的重要机制[37]。Met受体是一种受体酪氨酸激酶(Receptor Tyrosine Kinase,RTK),Xu等的体外研究表明,全身给予Met抑制剂可有效减弱海马小胶质细胞活化和神经炎症,并预防糖尿病小鼠的抑郁样行为[38]。基于网络药理学筛选结果及上述文献支持,本研究提示赖氨酸可能通过协同调控NOS3、MET及AR等关键靶点,在多靶点、多通路的层面上发挥改善MDD的潜在作用(图4)。接着,本研究通过KEGG通路富集分析表明,大多数靶点富集在钙信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)、Apelin信号通路等,其中细胞内钙离子(Calcium Ion,Ca^{2+})是激活eNOS(即NOS3)的经典上游信号。当细胞内Ca^{2+}水平升高,其与钙调蛋白(Calmodulin)结合后,可直接与NOS3相互作用,启动并增强NOS3的酶活性[39]。且VEGF与Apelin信号均可激活磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B,PI3K/AKT)信号通路,而AKT能直接磷酸化NOS3的特定氨基酸位点,从而显著增强其活性,促进NO的释放等[40-41]。这些通路再次印证了NOS3是介导赖氨酸抗抑郁作用的关键靶点。最后,对赖氨酸作用于NOS3、AR、MET的结合能进行测定,发现三者结合能均小于−16.74 kJ/mol,表明结合性良好,其中赖氨酸与NOS3结合能力最强(表2)。综合KEGG富集分析与分子对接结果,NOS3被识别为赖氨酸干预抑郁症(MDD)网络中的关键靶点,表明赖氨酸的抗抑郁作用可能主要由NOS3介导。

为验证赖氨酸联合五音疗愈策略的有效性及网络药理学预测结果的可靠性,本研究开展了体内动物实验。本研究采用CUMS建立MDD模型,模拟了临床人体MDD的缓慢进展过程。首先,本研究对小鼠进行行为学评估。与正常组比较,模型组小鼠糖水偏好率水平明显降低($P<0.01$),表明造模成功;与模型组比较,各给药组小鼠糖水偏好率水平明显升高

($P<0.01$),MDD明显改善,且联合组改善效果更优(表6)。同时,相比于模型组,赖氨酸组和联合组在旷场中央区停留时间($P<0.05$、$P<0.01$)、高架迷宫开放臂探索次数都显著增加($P<0.05$、$P<0.01$),表明焦虑样行为缓解且联合组改善效果更加显著;相比于模型组,赖氨酸组和联合组在强迫游泳实验中挣扎时间延长($P<0.05$),而在悬尾试验中,两组小鼠的挣扎时间虽然都显著延长,但联合组挣扎时间更长($P<0.05$),反映绝望感减轻且减轻效果在联合组中更为明显(图6)。由此初步验证赖氨酸联合五音疗愈可以有效改善MDD。其次,本研究对小鼠进行神经生化指标检测,结果发现相对于模型组,赖氨酸组和联合组均显著地回调了抑郁小鼠大脑中的多巴胺、5-羟色胺、去甲肾上腺素水平($P<0.01$或$P<0.05$),但联合组回调现象更加明显(图7)。与模型组比较,其他各组小鼠脑组织NO含量均升高($P<0.01$);与赖氨酸组相比,联合组NO含量显著提高($P<0.01$)(图8)。回调NO含量和神经递质水平,提示大脑血管和神经损伤减轻,再次印证了赖氨酸可以有效改善MDD,并且凸显五音疗愈的增效价值。

同时,赖氨酸组及联合组NO含量的回调也初步暗示了赖氨酸可能通过NOS3靶点改善MDD;为了进一步验证赖氨酸改善MDD的作用机制,本研究取小鼠海马组织进行qPCR,其结果显示NOS3 mRNA表达显著上调($P<0.05$),证实NOS3靶点发挥作用。值得深入思考的是,网络药理学预测的另外两个核心靶点MET与AR,在本研究的实验验证中未表现出显著变化(图9)。虽然已有研究表明AR通过调控下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的负反馈参与情绪调节,雄激素剥夺治疗可显著增加抑郁风险[42]。然而,本研究中赖氨酸给药后海马组织MET与AR的mRNA表达水平与预期不符。这一现象可能源于网络药理学预测与实验验证之间的差异,首先,分子对接虽显示赖氨酸与MET、AR具有理论结合能力,但结合能弱于NOS3,提示其在生理条件下的实际结合效率可能有限;其次,AR在下丘脑室旁核对HPA轴的抑制作用在雄性动物中更为显著,而本研究采用的检测脑区(海马)可能未能涵盖AR动态变化的关键位点。因此本研究后续将重点转移至对NOS3靶点的研究,即对NOS3和p-NOS3进行了WB。WB结果显示,模型组小鼠肝组织NOS3蛋白表达水平显著降低,赖氨酸组和联合组治疗后上述蛋白表达水平显著上调,且联合组上调更明显,再次表明赖氨酸通过NOS3-NO轴改善MDD且五音疗愈在治疗中具有增效作用(图10)。

综上所述,本研究通过整合网络药理学、动物行为学及分子生物学验证,系统性地阐释了赖氨酸作为一种营养补充剂在干预MDD中的治疗潜力以及五音疗愈在治疗MDD中的增效作用,并揭示了其核心作用机制是通过NOS3-NO轴改善MDD。下一步工作重点将围绕推动临床转化研究,通过随机对照试验在MDD人群中验证该联合策略的有效性与安全性,并探索其在不同抑郁亚型、不同年龄段人群中的个性化应用潜力,从而为MDD的整合干预提供更充分的证据支撑。

参考文献:

[1] Liu Q, Nie B W, Cui X M, *et al*. Inflammatory Factors: A Key Contributor to Stress-induced Major Depressive Disorder[J]. *Cells*, 2025, **14**(9): 629. DOI: 10.3390/cells14090629.

[2] Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990—2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Psychiatry*, 2022, **9**(2): 137-150. DOI: 10.1016/S2215-0366(21)00395-3.

[3] Desai Boström A E, Cars T, Hellner C, *et al*. Recovery and Recurrence from Major Depression in Adolescence and Adulthood[J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2025, **151**(5): 625-633. DOI: 10.1111/acps.13785.

[4] Lee K K C, Mohamed N N E, Abdul Aziz S, *et al*. Difference in Healthcare Resource Utilization and Health-related Quality of Life Between Patients with Major Depressive Disorder (MDD) and Treatment-resistant Depression (TRD) in a Public Hospital in Malaysia-A Retrospective Case-note Review and Cross-sectional Survey [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2025, **26**(5): 653-662. DOI: 10.1080/14656566.2025.2472976.

[5] Da Rocha Zurchimitten G, Camerini L, Izídio G S, *et al*. Identifying Genetic Variants Associated with Side Effects of Antidepressant Treatment: a Systematic Review

[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2025, **136**: 111154. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2024.111154.

[6] Kenda M, Kočevar Glavač N, Nagy M, *et al*. Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update[J]. *Molecules*, 2022, **27**(18): 6021. DOI: 10.3390/molecules27186021.

[7] Kendler K S. Toward a Philosophical Structure for Psychiatry[J]. *Am J Psychiatry*, 2005, **162**(3): 433−440. DOI: 10.1176/appi.ajp.162.3.433.

[8] Lee J H, Choi S, Lee D E, *et al*. Discovery of Herbal Remedies and Key Components for Major Depressive Disorder Through Biased Random Walk Analysis on a Multiscale Network[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, **26**(5): 2162. DOI: 10.3390/ijms26052162.

[9] Nogales C, Mamdouh Z M, List M, *et al*. Network Pharmacology: Curing Causal Mechanisms Instead of Treating Symptoms[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, **43**(2): 136−150. DOI: 10.1016/j.tips.2021.11.004.

[10] Ekinci G N, Sanlier N. The Relationship between Nutrition and Depression in the Life Process: A Mini-review [J]. *Exp Gerontol*, 2023, **172**: 112072. DOI: 10.1016/j.exger.2022.112072.

[11] Ross K, Vannortwick M. Managing Mood-related Symptoms Utilizing Diet, Targeted Nutrient Supplementation, and Lifestyle Changes: A Case Series[J]. *Explore*, 2022, **18**(5): 591−600. DOI: 10.1016/j. explore.2021.09.006.

[12] Cai K L, Chen X Y, Cao Y K, *et al*. Antidepressant Effect of *Radix* Bupleuri-*Radix* Paeoniae Alba Herb Pair on Chronic Unpredictable Mild Stress Rats Based on Cortical Metabolomics[J]. *BMC Complementary Med Ther*, 2025, **25**(1): 168. DOI: 10.1186/s12906-025-04898-8.

[13] Li X, Wei S Z, Niu S Q, *et al*. Network Pharmacology Prediction and Molecular Docking-based Strategy to Explore the Potential Mechanism of Huanglian Jiedu Decoction Against Sepsis[J]. *Comput Biol Med*, 2022, **144**: 105389. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2022.105389.

[14] Zhong K L, An X M, Kong Y. The Effectiveness of Five-element Music Therapy for Post-stroke Depression: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *Heliyon*, 2024, **10**(5): e26603. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e26603.

[15] 刘丽, 丁懿, 王健, 等. “五音调神法”治疗轻中度肝郁脾虚型卒中后抑郁患者的临床疗效及其对肠道菌群和血清5-羟色胺水平的影响研究[J]. 中国全科医学, 2021, **24**(30): 3882−3887. DOI: 10.12114/j. issn. 1007-9572.2021.02.025.
Liu L, Ding Y, Wang J, *et al*. Clinical, Gut Flora, and Serum Serotonin Responses to Wuyintiaoshen Therapy in Patients with Mild-to-moderate Post-stroke Depression and Liver Qi Stagnation and Spleen Deficiency Syndrome [J]. *Chin Gen Pract*, 2021, **24**(30): 3882−3887. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.02.025.

[16] 程虹毓, 姚雪莲, 熊雯雯. 中医五行音乐结合药物对焦虑模型大鼠行为及海马神经递质兴奋/抑制平衡系统的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, **13**(4): 492−496. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.180412.
Cheng H Y, Yao X L, Xiong W W. Effects of TCM Five-element Theory and Medicines on the Behavior and Hippocampal Neurotransmitter/Inhibitory Balance System in the Anxiety Rat Model[J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2018, **13**(4): 492−496. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.180412.

[17] 刘娟, 张小梅, 张帆, 等. 药物联合音乐疗法对缓解慢性神经病理性疼痛的有效性[J]. 昆明医科大学学报, 2020, **41**(4): 64−68. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4706.2020.04.012.
Liu J, Zhang X M, Zhang F, *et al*. Study on the Efficacy of Drug Combined with Music Therapy in Relieving Chronic Neuropathic Pain[J]. *J Kunming Med Univ*, 2020, **41**(4): 64−68. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4706.2020.04.012.

[18] Hopkins A L. Network Pharmacology: The Next Paradigm in Drug Discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, **4**(11): 682−690. DOI: 10.1038/nchembio.118.

[19] Guney E, Menche J, Vidal M, *et al*. Network-based *in silico* Drug Efficacy Screening[J]. Nature Communications, 2016, 7:10331. DOI: 10.1038/ncomms10331.

[20] Ueno H, Takahashi Y, Murakami S, *et al*. Effect of Simultaneous Testing of Two Mice in the Tail Suspension Test and Forced Swim Test[J]. *Sci Rep*, 2022, **12**: 9224. DOI: 10.1038/s41598-022-12986-9.

[21] Li X Y, Zhu Y C, Sun H J, *et al*. Electroacupuncture Inhibits Pain Memory and Related Anxiety-like Behaviors by Blockading the GABAB Receptor Function in the Midcingulate Cortex[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, **60**(11): 6613−6626. DOI: 10.1007/s12035-023-03467-9.

[22] Ekinci G N, Sanlier N. The Relationship between Nutrition and Depression in the Life Process: a Mini-review [J]. *Exp Gerontol*, 2023, **172**: 112072. DOI: 10.1016/j.exger.2022.112072.

[23] Boreham I D, Schutte N S. The Relationship between Purpose in Life and Depression and Anxiety: a Meta-analysis[J]. *J Clin Psychol*, 2023, **79**(12): 2736−2767. DOI: 10.1002/jclp.23576.

[24] Li M Y, Ding Y D, Ou Y P, *et al*. Multimodal Integration of Homotopic Connectivity and Transcriptomic Signatures in Major Depressive Disorder with Sleep Disorder Comorbidity[J]. *BMC Psychiatry*, 2025, **25**(1): 665. DOI: 10.1186/s12888-025-07084-9.

[25] Stachowicz K, Sowa-Kućma M. The Treatment of Depression: Searching for New Ideas[J]. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 988648. DOI: 10.3389/fphar.2022.988648.

[26] Kenda M, Kočevar Glavač N, Nagy M, *et al*. Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: an Update[J]. *Molecules*, 2022, **27**(18): 6021. DOI: 10.3390/molecules27186021.

[27] Lee Y J, Kim S J, Yoon J, *et al*. Music Therapy for Patients with Depression: Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Trials[J]. *Bjpsych Open*, 2025, **11**(5): e201. DOI: 10.1192/bjo.2025.10822.

[28] Fu Q, Qiu R, Chen L, *et al*. Music Prevents Stress-induced Depression and Anxiety-like Behavior in Mice [J]. *Transl Psychiatry*, 2023, **13**: 317. DOI: 10.1038/s41398-023-02606-z.

[29] Cheng H Y, Xie H X, Tang Q L, *et al*. Light and Classical Music Therapies Attenuate Chronic Unpredictable Mild Stress-induced Depression *via* BDNF Signaling Pathway in Mice[J]. *Heliyon*, 2024, **10**(13): e34196. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e34196.

[30] 谢小莹, 盛彬, 孙旭, 等. 音乐治疗在脑卒中后抑郁康复中的应用[J]. 心理学进展, 2025(5): 14−20. DOI: 10.12677/ap.2025.155264.
Xie X Y, Sheng B, Sun X, *et al*. Application of Music Therapy in the Rehabilitation of Post-stroke Depression [J]. *Adv Psychol*, 2025(5): 14−20. DOI: 10.12677/ap.2025.155264.

[31] 宋熠林, 苏晓兰, 郭宇, 等. 浅谈中医音乐疗法在功能性胃肠病治疗中的价值与展望[J]. 环球中医药, 2016, **9**(7): 802−804. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2016.07.007.
Song Y L, Su X L, Guo Y, *et al*. On the Value and Prospect of Music Therapy of Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Functional Gastrointestinal Diseases[J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2016, **9**(7): 802−804. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2016.07.007.

[32] Teng T, Huang F, Xu M, *et al*. Microbiota Alterations Leading to Amino Acid Deficiency Contribute to Depression in Children and Adolescents[J]. *Microbiome*, 2025, **13**(1): 128. DOI: 10.1186/s40168-025-02122-w.

[33] Alibrahem W, Kharrat Helu N, Törős G, *et al*. Exploring the Analgesic Potential of L-lysine: Molecular Mechanisms, Preclinical Evidence, and Implications for Pharmaceutical Pain Therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2025, **17**(5): 666. DOI: 10.3390/pharmaceutics17050666.

[34] Jalal K, Khan F, Nawaz S, *et al*. Anxiolytic, Antinociceptive and Body Weight Reducing Effects of L-lysine in Rats: Relationship with Brain Serotonin an *In-vivo* and In-Silico Study[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, **152**: 113235. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113235.

[35] Chrapko W E, Jurasz P, Radomski M W, *et al*. Decreased Platelet Nitric Oxide Synthase Activity and Plasma Nitric Oxide Metabolites in Major Depressive Disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 2004, **56**(2): 129−134. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.03.003.

[36] Kudlow P, Cha D S, Carvalho A F, *et al*. Nitric Oxide and Major Depressive Disorder: Pathophysiology and Treatment Implications[J]. *Curr Mol Med*, 2016, **16**(2): 206−215. DOI: 10.2174/1566524016666160126144722.

[37] Sheng J A, Tan S M L, Hale T M, *et al*. Androgens and Their Role in Regulating Sex Differences in the Hypothalamic/Pituitary/Adrenal Axis Stress Response and Stress-related Behaviors[J]. *Androg Clin Res Ther*, 2021, 2: andro.2021.0021. DOI: 10.1089/andro.2021.0021.

[38] Xu D H, Zhang X Y, Liu S Y, *et al*. KLK8/HGF/Met Signaling Pathway Mediates Diabetes-associated Hippocampal Neuroinflammation in Male Mice[J]. *Theranostics*, 2025, **15**(13): 6290−6312. DOI: 10.7150/thno.109513.

[39] Solone X K V, Caldara A L, Wells B, *et al*. MAP Kinases Differentially Bind and Phosphorylate NOS3 *via* Two Unique NOS3 Sites[J]. *FEBS Open Bio*, 2022, **12**(5): 1075−1086. DOI: 10.1002/2211-5463.13384.

[40] Guo G X, Wu K Y, Zhang X Y, *et al*. The Extract of Curcumae Longae Rhizoma Suppresses Angiogenesis *via* VEGF-induced PI3K/Akt-*ENOS*-NO Pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, **308**: 116299. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116299.

[41] Wang C, Wen J Y, Zhou Y, *et al*. Apelin Induces Vascular Smooth Muscle Cells Migration *via* a PI3K/Akt/FoxO3a/MMP-2 Pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, **69**: 173−182. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.10.015.

[42] Hauger R L, Saelzler U G, Pagadala M S, *et al*. The Role of Testosterone, the Androgen Receptor, and Hypothalamic-pituitary-Gonadal Axis in Depression in Ageing Men[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2022, **23**(6): 1259−1273. DOI: 10.1007/s11154-022-09767-0.