

基于网络药理学研究六味地黄丸治疗阿尔茨海默病作用机制

张运辉^{1,2}, 周小青^{2*}, 伍大华^{2,3}, 杨梦琳^{1,2}, 郑彩杏², 童天昊²(1.重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2.湖南中医药大学, 长沙 410208; 3.湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

摘要: 目的 基于网络药理学探讨六味地黄丸治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的作用机制。方法 从 TCMSP 数据库筛选六味地黄丸治疗 AD 的活性成分, 并构建药物-靶标网络、蛋白与蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 运用生物信息学分析方法进行 GO 分析、KEGG 通路富集分析和 PPI 网络分析。采用荧光实时定量 PCR 对网络药理学主要分析结果进行验证。结果 分析结果表明, 六味地黄丸主要关联 AD 的 β 淀粉样蛋白聚集、Tau 蛋白的磷酸化、细胞凋亡、氧化应激反应、炎症反应、自噬、胰岛素代谢等; 体外实验提示, 六味地黄丸参与调控 APP 介导的 β 淀粉样蛋白聚集, GSK-3 β 介导的 Tau 蛋白磷酸化, GNB1 介导的炎症反应, Caspase-3 介导的细胞凋亡, MAOB 介导的氧化应激反应, mTOR 介导的自噬, 以及 INSR 介导的胰岛素代谢等通路。结论 六味地黄丸治疗 AD 具有多成分、多靶点的特点, 可为进一步研究其作用机制提供依据。

关键词: 六味地黄丸; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)02-0154-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.02.003

引用本文: 张运辉, 周小青, 伍大华, 等. 基于网络药理学研究六味地黄丸治疗阿尔茨海默病作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 154-160.

Study on Mechanism of Liuwei Dihuang Pills in Treating Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology

ZHANG Yunhui^{1,2}, ZHOU Xiaoqing^{2*}, WU Dahua^{2,3}, YANG Menglin^{1,2}, ZHENG Caixing², TONG Tianhao²
(1.Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3.Affiliated Hospital of Hunan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of Liuwei Dihuang pills in the treatment of Alzheimer's disease(AD) based on network pharmacology. **METHODS** The active ingredients of Liuwei Dihuang pills in the treatment of AD were screened from the TCMSP database, and the drugs-targets network and protein-protein interaction(PPI) network were constructed. GO analysis, KEGG pathway enrichment analysis and PPI network analysis were performed by bioinformatics analysis methods. The main results of network pharmacology were verified by real-time quantitative PCR. **RESULTS** The results showed that the targets of Liuwei Dihuang pills were mainly associated with in AD β amyloid protein aggregation, Tau protein phosphorylation, apoptosis, inflammation, oxidative stress response, autophagy and insulin metabolism regulation, etc. *In vitro* experiments indicated that Liuwei Dihuang pills was involved in the regulation of β amyloid protein aggregation by APP, Tau protein phosphorylation mediated by GSK-3 β , inflammation mediated by GNB1, apoptosis mediated by Caspase-3, oxidative stress response mediated by MAOB, autophagy mediated by mTOR, as well as insulin metabolism mediated by INSR. **CONCLUSION** Liuwei Dihuang pills applied for treating AD has the advantages of multi-components and targets, which can provide references for further research on mechanism.

KEYWORDS: Liuwei Dihuang pills; Alzheimer's disease; network pharmacology; mechanism of action

随着全球老龄化进程加快, 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病率也逐年上升^[1]。尽管现在已经有越来越多的 AD 候选药物的药效在动物或细胞上得到明确, 但离根治 AD 这一目标还有很长的路要走^[2-3]。中医通过辨病与辨证相结合, 抓住 AD 病机特点, 随证加减用药, 在改善 AD

患者学习记忆等认知功能、提高生活和社会交往能力方面具有较确切的疗效^[4]。

中医认为肾藏精, 主骨生髓, 脑为髓海, 乃元神之府, 其充盈与否主要取决于肾, 肾精充足, 则髓海盈余, 脑神充沛, 才能发挥脑主神明的正常功能。精不足, 则脑髓空虚, 神无所依, 发为

基金项目: 国家自然科学基金项目(81874462); 重庆市中医药重点学科(中医基础理论)建设项目(渝中医[2021]16 号)

作者简介: 张运辉, 男, 博士生 E-mail: 373620863@qq.com *通信作者: 周小青, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: 1470128077@qq.com

痴呆,可见肾精亏虚、髓海不足是导致 AD 的根本原因^[5]。六味地黄丸出自钱乙的《小儿药证直诀》,是补肾方中的经典方剂之一。方中熟地黄填精益髓,滋补肾阴,为君药;山药和山茱萸补益肝肾和脾阴,均为臣药,三药联合可共同滋补肾、肝、脾,配伍茯苓、牡丹皮和泽泻,为佐药,平其偏胜,三补三泻同起补肾阴益精髓,调和阴阳,填精养神之效^[6]。临床和实验研究表明,六味地黄丸能明显改善 AD 患者的智力情况和生活能力,同时还可显著改善患者的中医证候,具有较好的抑制细胞凋亡、抗细胞氧化损伤等作用^[7-8]。因此,深入探讨六味地黄丸的作用靶点及相关信号通路,分析其可能的抗 AD 作用机制,对于阐述六味地黄丸治疗 AD 的科学内涵具有重要作用。

中药复方成分复杂,是制约系统研究其药效成分和作用机制的关键因素。网络药理学作为中药研究的前沿科学,着眼于药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性,将药物-靶点网络与生物信息网络相结合,与中医学从整体观念、辨证论治的角度去诊治疾病相契合^[9]。因此,本研究借助网络药理学方法,探讨六味地黄丸治疗 AD 的作用机制,以期六味地黄丸的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 六味地黄丸有效成分及其靶点的筛选

从 TCMSp 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.Php>)获取六味地黄丸(熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮)中各味中药的化学成分,根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug like, DL)筛选出符合条件的候选活性成分及其对应靶点,将 $OB \geq 30\%$ 及 $DL \geq 0.18$ 设为筛选条件。同时,通过中国知网、万方数据库进行补充。一些化合物如 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)、梓醇虽不符合上述标准,但经过文献检索,发现这类化合物对于 AD 具有较好的治疗作用,故本研究也将其列为候选化合物。例如,5-HMF^[10]可以通过保护血管内皮细胞活性、抑制细胞凋亡、保护内皮细胞间的紧密连接蛋白和细胞膜上的转运蛋白,从而使血脑屏障正常生理功能免遭 A β 1-42 寡聚体的破坏。梓醇^[11]可能通过抑制 A β 1-42 诱导的 bEnd.3 细胞凋亡及过度自噬发挥其神经保护作用。

1.2 AD 疾病相关基因的筛选

在 Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)、

Dis Ge NET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)和 TTD 数据库(<https://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)中筛选治疗 AD 的相关靶点,以“Alzheimer”为检索关键词,其中在 Dis Ge NET 数据库中选择得分 >0.1 的靶点,并对检索到的靶点进行处理,之后将 3 个数据库重复项去除,从而获得最终的疾病靶点。

1.3 蛋白与蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络构建

将六味地黄丸预测的相关靶点网络映射到 AD 相关靶点网络中,2 个网络中交集基因即被认为是六味地黄丸中药成分治疗 AD 的作用靶点。将六味地黄丸有效成分与 AD 的交集基因导入到 STRING 数据库,选择物种为“Homo sapiens”(人源)进行操作,最小相互作用阈值设为“medium confidence=0.4”,得到蛋白互作 PPI 网络,即“六味地黄丸-靶点-AD”网络。

1.4 关键靶点的筛选

应用 Cytoscape 3.7.1 软件对 PPI 网络进行拓扑属性分析,计算 PPI 网络整体的点度中心性(degree)、接近中心性(closeness)和中介中心性(betweenness),以 betweenness、closeness 和 degree 的均数为“阈值”,选取 betweenness、closeness 和 degree 同时在阈值之上的靶点为“关键靶点”,明确 PPI 网络中的关键靶点。

1.5 关键靶点的代谢通路及生物过程分析

为进一步研究六味地黄丸抗 AD 的作用情况,采用 Metascape 平台对六味地黄丸的 AD 靶点群进行 KEGG 代谢通路富集分析,研究六味地黄丸靶点的主要抗 AD 代谢通路;再进行 GO 生物过程富集分析,诠释六味地黄丸靶点的抗 AD 生物过程,Metascape 的平台列表与背景均选择“Homo Sapiens”(人源)进行操作。筛选出 AD 与六味地黄丸有效成分相关性前 20 的分子功能和前 10 的信号通路。

1.6 网络构建

将六味地黄丸有效成分、对应靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建六味地黄丸-有效成分-基因靶点网络。

1.7 体外验证实验

1.7.1 细胞与试剂 PC12 细胞(长沙赢润生物技术有限公司,编号:2015032007);A β ₂₅₋₃₅(美国 Sigma

公司,批号:053m4804v);PCR 试剂盒(批号:50445)、总 RNA 抽提试剂(Trizol, 批号: 36320)均购自中国北京康为世纪公司; DMEM 细胞培养液[默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司, 批号: NZL1253]; 10%新生小牛血清(Gibco 公司, 批号: 10099141C); PBS (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20140605); FBS(吉泰远成生物科技有限公司, 批号: 1133067)。六味地黄丸 1 剂购自湖南中医药大学第一附属医院, 经水提、蒸发、浓缩至不流动的清膏, 使用时称取适量, 溶解, 过 0.22 μm 滤膜除菌后于 -20°C 保存。

1.7.2 细胞培养及分组干预 PC12 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10%FBS、1%P/S), 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 细胞贴壁后取对数生长期细胞, 分为 5 组。对照组: 加入不含 FBS、P/S 的 DMEM 中孵育 24 h; 模型组: 予 $\text{A}\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育 24 h^[12]; 六味地黄丸低剂量组、中剂量组、高剂量组分别予六味地黄丸 1, 2, 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 孵育 24 h。

1.7.3 检测指标及方法 Trizol 法提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 根据试剂盒说明书进行荧光实时定量 PCR 检测。预变性引物见表 1。

表 1 实时 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence of real-time PCR

基因	引物(5'→3')	产物长度/bp
β -actin	F: CGCGAGTACAACCTTCTTG	70
	R: CGTCATCCATGGCGAACTGG	
APP	F: TTCTGGGCTGACAAACATCAAGAC	193
	R: GGTGATGACAATCACGGTTGCTA	
GSK-3 β	F: ATTCCCTCAAATTAAGGCACATCC	133
	R: ATACTCCAGCAGACGGCTACACAG	
GNB1	F: CTGGATGACAATCAGATCGTCA	122
	R: AGAGAAAGGCTCATGACATCTC	
Caspase-3	F: CGAAACTCTTCATCATTCAGGC	129
	R: AGTAAGCATACAGGAAGTCGGC	
mTOR	F: ACACCCTCCATCCACCTCAT	128
	R: TAGCGGATATCAGGGTCAGGA	
MAOB	F: CTGCTGGACCAACTCTACCA	203
	R: CCTTTATCCGCTCACTCAC	
INSR	F: AAGGCGAGAAGACCATTGATT	185
	R: CACCAGAGCATAGGAGCGAC	

1.7.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 24.0 软件做统计分析, 组间差异比较用单因素方差分析统计, 方差齐者用 LSD 检验(方差不齐

者先将数据转换后使之方差齐), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六味地黄丸有效成分靶标预测及分析

从 TCMS 数据库中对六味地黄丸以 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 为参数进行筛选, 由于熟地黄中仅有 β -谷甾醇与豆甾醇符合标准, 且这 2 种成分在中药中较为普遍, 缺乏特异性。故本研究通过检索中国知网、万方数据库进行补充, 筛选符合熟地黄药理活性的特征化合物。补充纳入梓醇、5-HMF、毛蕊花糖苷等成分, 一共筛选出 47 个有效成分, 结果见表 2。其中熟地黄 7 个, 山茱萸 14 个, 山药 12 个, 茯苓 6 个, 泽泻 7 个, 牡丹皮 6 个, 重复成分 5 个。其中梓醇、5-HMF、海风藤酮、花旗松素、山奈酚等在活性成分中占主要比例。

2.2 有效成分-靶点网络的构建

将筛选后六味地黄丸的 47 个有效成分及 188 个相关靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建“有效成分-靶点网络”, 结果见图 1。47 个菱形表示六味地黄丸的有效成分, 188 个三角形为有效成分作用靶点, 共有 1 106 条边代表靶点和有效成分之间的相互作用, 体现了六味地黄丸多成分、多靶点的特点。

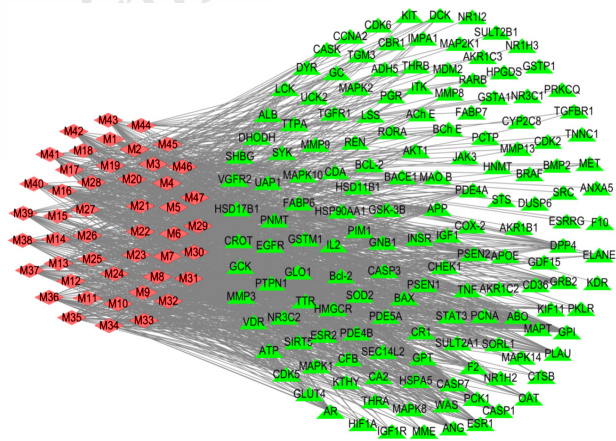


图 1 六味地黄丸有效成分-靶点网络

红色菱形表示六味地黄丸的有效成分; 绿色三角形表示靶基因。

Fig. 1 Effective ingredients of Liuwei Dihuang pills-target network

Red diamond meant Liuwei Dihuang pills compound; Green triangle meant target gene.

2.3 AD 相关基因

在 Drugbank、Dis Ge NET 和 TTD 数据库检索的 AD 靶基因, 去重后共得到 2 245 个基因。

表 2 六味地黄丸有效成分

Tab. 2 Effective ingredients of Liuwei Dihuang pills

编号	成分	OB/%	DL	中药
M1	豆甾醇	43.8	0.8	熟地黄、山茱萸、山药
M2	谷甾醇	36.9	0.8	熟地黄、山茱萸、牡丹皮、泽泻
M3	梓醇	5.07	0.44	熟地黄
M4	梓醇 _{qt}	44.69	0.10	熟地黄
M5	5-羟甲基糠醛	45.07	0.02	熟地黄
M6	毛蕊花糖苷	2.94	0.62	熟地黄
M7	桃叶珊瑚苷	4.17	0.33	熟地黄
M8	白花苷	32.1	0.8	山茱萸
M9	油酸乙酯	32.4	0.2	山茱萸
M10	四氢鸭脚木碱	32.4	0.8	山茱萸
M11	2,6,10,14,18-pentamethylcos-2,6,10,14,18-pentaene	33.4	0.2	山茱萸
M12	羟基茺花素	36.5	0.3	山茱萸
M13	poriferast-5-en-3beta-ol	36.9	0.8	山茱萸
M14	β -谷甾醇	36.9	0.8	山茱萸
M15	cornudentanone	39.7	0.3	山茱萸
M16	十八碳二烯	42.0	0.2	山茱萸
M17	邻苯二甲酸二异辛酯	43.6	0.4	山茱萸
M18	亚麻酸	46.1	0.2	山茱萸
M19	三羟基蟾蜍二烯羧酸内酯	70.0	0.8	山茱萸
M20	萆薢宁酰胺	30.7	0.2	山药
M21	黄山药皂苷 C	36.4	0.9	山药
M22	菜油甾醇	37.6	0.7	山药
M23	24-Methylcholest-5-enyl-3beta-O-glucopyranoside _{qt}	37.6	0.7	山药
M24	胆固醇	37.9	0.7	山药
M25	异岩藻酯醇	43.8	0.8	山药
M26	AIDS180907	45.3	0.8	山药
M27	海风藤酮	54.7	0.4	山药
M28	hancinone C	59.1	0.4	山药
M29	花旗松素	60.5	0.3	山药
M30	薯蓣皂苷配基	80.9	0.8	山药
M31	啤酒甾醇	37.96	0.77	茯苓
M32	常春藤皂苷元	36.9	0.8	茯苓
M33	酒酵母甾醇	38.0	0.8	茯苓
M34	氢化松苓酸 B	38.7	0.8	茯苓
M35	麦角固醇过氧化	40.4	0.8	茯苓
M36	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.5	0.7	茯苓
M37	泽泻醇 C	33.1	0.8	泽泻
M38	泽泻醇 B	34.5	0.8	泽泻
M39	泽泻醇 B 单乙酸酯	35.6	0.8	泽泻
M40	16 β -methoxyalisol B monoacetate	35.6	0.8	泽泻
M41	泽泻醇 B-23-醋酸酯	32.52	0.82	泽泻
M42	亚油酸单甘油酯	37.2	0.3	泽泻
M43	山奈酚	41.9	0.2	牡丹皮
M44	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene] barbituric acid	43.4	0.3	牡丹皮
M45	槲皮素	46.4	0.3	牡丹皮
M46	(+)-儿茶酸	54.8	0.2	牡丹皮
M47	丁子香酚	55.4	0.8	牡丹皮

2.4 蛋白互作网络构建图

在 Drugbank、Dis Ge NET 和 TTD 数据库检索 AD 的靶基因与六味地黄丸作用的靶基因有 103 个重复，这 103 个靶基因可能为六味地黄丸抗 AD 的靶点。为研究各靶点在体内的相互作用关系，寻找核靶点，将潜在靶点蛋白群进行 PPI 网络分析，结果共发现 103 个靶蛋白发生相互作用，产生 779 条代表蛋白之间相互作用的边，见图 2。其中疾病靶标主要有 APP、APOE、PSEN1 等，药物靶标主要有 GSK-3 β 、CASP3、GNB1、mTOR、INSR 等，这些药物靶标主要涉及 β 淀粉样蛋白的沉积、Tau 蛋白的磷酸化、凋亡、炎症反应、氧化应激反应、自噬、胰岛素代谢等。

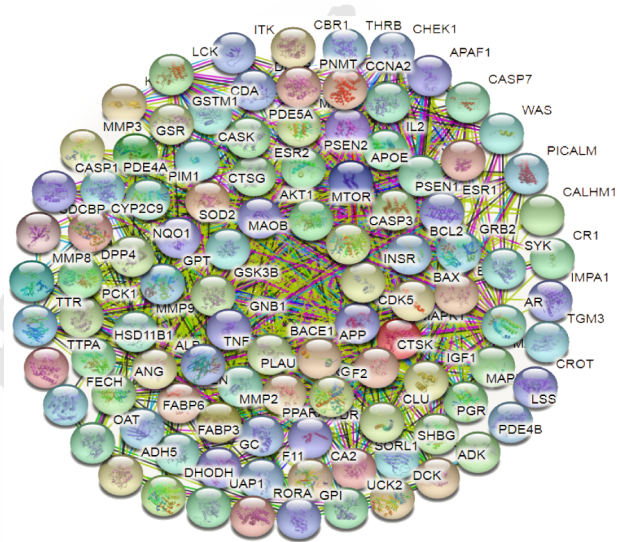


图 2 靶蛋白 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of target protein

2.5 核心靶点分析结果

Cytoscape 3.7.1 计算得到，PPI 网络平均度值为 15.10，平均介数为 3.66×10^{-2} ，平均紧密度为 0.53，度值、介数和紧密度均超过平均值的靶蛋白共 7 个，依次为 APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、mTOR、MAOB、INSR，说明以上 7 个靶点在 PPI 网络中处于关键位置，很可能是六味地黄丸抗 AD 的关键靶点。

2.6 Metascape 分析的 KEGG 和 GO 结果

通过 GO 数据库分析，六味地黄丸有效成分靶标与 AD 疾病靶标基因功能有对 β 淀粉样蛋白的反应、对 Tau 蛋白磷酸化的调节、神经元凋亡过程、氧化应激反应、炎症反应、自噬、对胰岛素的反应等，见图 3。

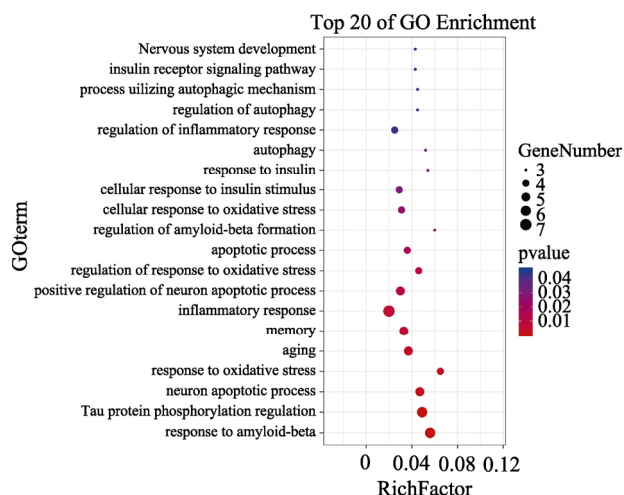


图3 有效组分-基因靶点-分子功能的GO富集气泡图
Fig. 3 Bubble chart of GO enrichment of effective components-gene targets-molecular functions

通过KEGG数据库富集六味地黄丸治疗AD关键靶标所参与的通路主要涉及凋亡、PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路、NF- κ B信号通路、胰岛素信号通路等,见图4,说明六味地黄丸可以用于这些信号通路来防治AD。

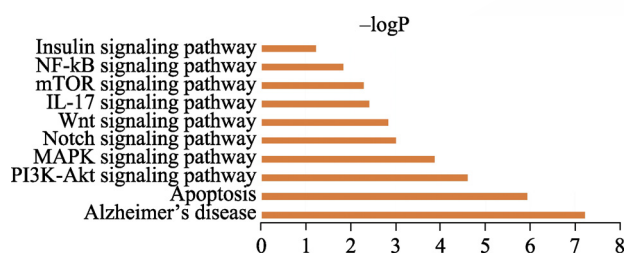


图4 前10个代表性的通路
Fig. 4 Top 10 representative pathways

2.7 六味地黄丸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、mTOR、MAOB、INSR mRNA的影响

与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 作用24 h,模型组APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、MAOB、mTOR、INSR

表达上调($P<0.01$),表明 $A\beta_{25-35}$ 可诱导活化各基因;六味地黄丸干预后,与模型组比较,六味地黄丸中、高剂量组APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、MAOB、mTOR、INSR表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

3 讨论

AD属于中医学“健忘”“痴呆”“呆证”等范畴,肾为先天之本,肾藏精、生髓、通脑,与脑髓的关系密切,因为先天不足,或后天脏腑虚衰,或年老体衰,致使肾精亏虚,脑髓渐空,而致痴呆。因此肾精亏虚、髓海不足是导致AD的根本原因^[13]。六味地黄丸是补肾方中的经典方剂之一,具有补肾阴益精髓,调和阴阳,填精养神之效,非常契合AD肾精亏虚、髓海不足的病机^[5]。临床和实验研究表明^[7-8],六味地黄丸能明显改善AD患者的智力情况和生活能力,同时还可显著改善患者的中医证候,具有较好的抑制细胞凋亡、抗细胞氧化损伤等作用。

本研究通过网络药理学研究平台收集六味地黄丸中47味中药有效成分和靶标,结果显示,每味中药可作用于多个靶标,多种中药可同时作用于一个靶点,说明药物间发挥作用有着密切的关系,各药相须相使相辅相成。对基因功能和通路富集的分析显示,六味地黄丸对AD的干预作用主要涉及淀粉样 β 蛋白聚集、Tau蛋白磷酸化、细胞凋亡、氧化应激反应、炎症反应、自噬、胰岛素代谢等。通过构建六味地黄丸潜在药物靶标与疾病靶标相互作用网络,筛选出关键靶标9个,依次为APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、MAOB、mTOR、INSR。构建疾病靶标与有效成分的网络,共有47种有效成分,六味地黄丸中与疾病靶标关系密切的有效成分主要为梓醇、5-HMF、海风藤酮、花旗松素、山奈酚、槲皮素等。研究发现^[10],

表3 PC12细胞APP、GSK-3 β 、GNB1、Caspase-3、mTOR、MAOB、INSR mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 3 Comparison of APP, GSK-3 β , GNB1, Caspase-3, mTOR, MAOB, INSR mRNA expression in PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	APP	GSK-3 β	GNB1	Caspase-3	MAOB	mTOR	INSR
对照组	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	2.84 $\pm$ 0.07 ¹⁾	3.13 $\pm$ 0.08 ¹⁾	2.91 $\pm$ 0.06 ¹⁾	2.75 $\pm$ 0.09 ¹⁾	2.83 $\pm$ 0.10 ¹⁾	2.87 $\pm$ 0.13 ¹⁾	2.89 $\pm$ 0.11 ¹⁾
六味地黄丸							
低剂量组	2.40 $\pm$ 0.16	2.42 $\pm$ 0.07	2.46 $\pm$ 0.15	2.43 $\pm$ 0.11	2.48 $\pm$ 0.18	2.45 $\pm$ 0.14	2.47 $\pm$ 0.08
中剂量组	1.72 $\pm$ 0.14 ²⁾	1.71 $\pm$ 0.13 ²⁾	1.75 $\pm$ 0.10 ²⁾	1.70 $\pm$ 0.09 ²⁾	1.69 $\pm$ 0.21 ²⁾	1.74 $\pm$ 0.14 ²⁾	1.68 $\pm$ 0.12 ²⁾
高剂量组	1.14 $\pm$ 0.12 ³⁾	1.25 $\pm$ 0.20 ³⁾	1.15 $\pm$ 0.16 ³⁾	1.32 $\pm$ 0.08 ³⁾	1.26 $\pm$ 0.22 ³⁾	1.24 $\pm$ 0.11 ³⁾	1.23 $\pm$ 0.13 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

5-HMF 可以通过保护血管内皮细胞活性、抑制细胞凋亡、保护内皮细胞间的紧密连接蛋白和细胞膜上的转运蛋白来保护血脑屏障正常生理功能免遭 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的破坏。实验发现^[11], 梓醇可能通过抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞凋亡及过度自噬发挥其神经保护作用。研究显示^[14], 海风藤酮可抑制老龄大鼠局灶性脑缺血神经元凋亡。曾志辉等^[15]发现, 花旗松素改善 H_2O_2 对细胞造成的形态学改变并减少细胞内氧化应激水平。闫姝^[16]发现, 山奈酚可激活细胞 ER/MAPK 信号转导通路, 并通过该途径促进 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达, 阻止 PC-12 细胞启动凋亡程序, 从而对受 $A\beta_{25-35}$ 损伤的 PC-12 细胞产生保护作用。鲁雅琴^[17]发现, 槲皮素可以通过增加 β 淀粉样蛋白沉积的清除, 减少星形胶质细胞增生, 提高空间学习和记忆能力, 延缓认知障碍发生发展。

采用六味地黄丸干预 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞模型验证网络药理学研究结果, 发现六味地黄丸可显著下调 APP、GSK3 β 、GNB1、Caspase-3、MAOB、mTOR、INSR mRNA 表达。 β 淀粉样蛋白是 APP 由 β -分泌酶和 γ -分泌酶通过连续的蛋白水解生成的^[18]。Tau 蛋白磷酸化最主要的酶是 GSK-3 β , β 淀粉样蛋白能够促进 GSK-3 β 的活性表达, 使其加深 Tau 蛋白的磷酸化程度^[19], 从而造成了 Tau 蛋白的过度磷酸化。Caspase-3 是 Caspases 级联反应中下行的最关键的凋亡执行蛋白酶, 在各种程序启动的细胞凋亡中起最后枢纽的作用^[20]。MAOB 活性下降有利于保持神经系统的正常功能, 对机体的抗氧化及抗衰老有促进作用^[21]。GNB1 参与炎症趋化因子调节通路, 研究发现 GNB1 介导 Akt 信号转导并促进 NF- κ B 的活化^[22]。mTOR 的活性是自噬体形成、成熟的关键^[23]。研究发现^[24], INSR 功能的异常可导致胰岛素抵抗的发生, 进而导致胰岛素信号通路的转导发生障碍, 并导致神经元的坏死以及 AD 病情的进展。六味地黄丸可下调 APP、GSK3 β 、GNB1、Caspase-3、MAOB、mTOR、INSR 表达, 与预测其参与调控 β 淀粉样蛋白聚集、Tau 蛋白磷酸化、凋亡、氧化应激反应、炎症反应、自噬、胰岛素代谢相吻合。故体外验证实验在一定程度上证实了网络药理学预测结果。

本研究基于网络药理学技术, 采用整合药理

学平台, 建立了六味地黄丸成分-基因靶标的分子生物网络、PPI 网络, 从多个角度探索六味地黄丸治疗 AD 的潜在分子机制。结果表明, 六味地黄丸可通过调控 β 淀粉样蛋白聚集、Tau 蛋白磷酸化、凋亡、氧化应激反应、炎症反应、自噬、胰岛素代谢等多靶点、多途径发挥治疗 AD 的作用, 为后续临床治疗 AD 提供新的思路。

REFERENCES

- [1] ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimer's Dement, 2017, 13(4): 325-373.
- [2] YANG T T, ZHOU H J, ZENG C Y, et al. Protective effect of novel gastrodin derivatives on Alzheimer's disease model mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(5): 537-541.
- [3] CHENG J A, YANG H, ZHANG J T. Study of the brain regional homogeneity changes in response to the treatment with rivastigmine in Alzheimer's disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(11): 1379-1385.
- [4] ZHANG H B, SUN Y. Effect of huperzine A on the expression of amyloid β -protein in transgenic mice brain of Alzheimer's disease[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29(3): 290-293, 254.
- [5] FANG L Y. The research of TCM consolidation treatment theory and its effects to new neurons in kidney deficiency AD rats[D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [6] WANG H M, SONG C M, LIU X M, et al. Effects of Liuwei Dihuang Wan on animal senile dementia models with deficiency of the kidney[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(5): 156-158.
- [7] ZHANG L, LI F L, MA L. Clinical observation on Liuwei Dihuang pill combined with Western medicine in the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease[J]. World Chin Med(世界中医药), 2017, 12(11): 2659-2661, 2665.
- [8] ZHU Z K, ZHANG L, LIU C, et al. Intervention effect of Kidney-tonifying and essence-filling therapy on hippocampal autophagy in kidney-deficiency Alzheimer mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(20): 43-48.
- [9] LIU X K, WU J R, LIN M J, et al. Mechanism of Si Junzitang based on network pharmacology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(16): 194-202.
- [10] CHEN B L. Study on the anti-apoptosis effect of 5-HMF in cooked rehnia glutinosa and the therapeutic effect of traditional chinese tonifying kidney medicine in the treatment of Alzheimer's disease[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.
- [11] LIU C Y, BAI K, YU G R. Protective effect of catalpol on bEnd.3 cell apoptosis and excessive autophagy induced by fibrous $A\beta_{1-42}$ [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(20): 108-113.
- [12] ZHANG Y H, WU D H, YUAN C Y, et al. Study of

- compatibility of TSG and PNS on PL12 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. J Hunan Univ Chin Med(湖南中医药大学学报), 2015, 35(9): 20-22.
- [13] HAN S J, GU Y, HUANG K, et al. The effect of Bushenyisui decoction on senile dementia kidney deficiency syndrome ADAS-cog points[J]. Acta Chin Med(中医学报), 2016, 31(6): 869-872.
- [14] XU G R, ZHANG D J, YANG Y, et al. Effect of Kadsurenone on the expression of DNA damage and repair related gene: GADD45 following focal cerebral ischemia in aged rats[J]. J Shandong Univ(Health Sci)(山东大学学报: 医学版), 2006(2): 146-149, 160.
- [15] ZENG Z H, WANG X L, YE Y Q, et al. Oxidative stress protection mechanism of taxifolin in H9C2 cells[J]. Chin Gener Prat(中国全科医学), 2019, 22(15): 1794-1799.
- [16] YAN S. Theresearching sanatory infulence and regulatory molecular mechanism of tho kinds of phytoestrogens from drynaria fortunei on PC-12 cell injured by $A\beta_{25-35}$ [D]. Harbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [17] LU Y Q. The effects and underlying mechanisms of quercetin enrich diet on cognitive improvement in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2019.
- [18] CUI H Q, YIN F. Advance of modification, trafficking and processing of amyloid precursor protein[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(3): 444-447.
- [19] RAMSER E M, GAN K J, DECKER H, et al. Amyloid- β oligomers induce tau-independent disruption of BDNF axonal transport via calcineurin activation in cultured hippocampal neurons[J]. MBoc, 2013, 24(16): 2494-2505.
- [20] D'AMELIO M, SHENG M, CECCONI F. Caspase-3 in the central nervous system: Beyond apoptosis[J]. Trends Neurosci, 2012, 35(11): 700-709.
- [21] NICOTRA A. Monoamine oxidase expression during development and aging[J]. NeuroToxicology, 2004, 25(1/2): 155-165.
- [22] YANG M, HE R L, BENOVIĆ J L, et al. B-Arrestin1 interacts with the G-protein subunits $\beta 1\gamma 2$ and promotes $\beta 1\gamma 2$ -dependent Akt signalling for NF- κ B activation[J]. Biochem J, 2009, 417(1): 287-296.
- [23] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. Cell, 2017, 168(6): 960-976.
- [24] 赵琳琳, 丁婧, 曲扬, 等. 葡萄糖代谢异常与阿尔茨海默病发病机制的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(6): 1057-1059.

收稿日期: 2020-11-22

(本文责编: 曹粤锋)