

·数字中医药·

本文引用:杨梦琳,周小青,伍大华,张运辉,郑彩杏,童天昊.基于网络药理学探讨何首乌-丹参治疗阿尔茨海默病的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2021,41(4):558-565.

基于网络药理学探讨何首乌-丹参治疗 阿尔茨海默病的作用机制

杨梦琳^{1,2}, 周小青^{1,2*}, 伍大华^{1,3}, 张运辉^{1,2}, 郑彩杏^{1,2}, 童天昊^{1,2}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.2011 数字中医药协同创新中心,湖南 长沙 410208;

3.湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙 410006)

〔摘要〕 **目的** 应用网络药理学方法预测何首乌-丹参抗阿尔茨海默病(AD)的作用靶点及相关信号通路,挖掘其抗 AD 的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学技术平台(TCMSP)网站检索何首乌-丹参的活性成分及对应的作用靶点,再通过 Drugbank 数据库、Dis Ge NET 数据库和 TTD 数据库获得 AD 的主要致病靶点,采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物活性成分-靶点网络图,利用 STRING 数据库构建蛋白与蛋白相互作用网络,然后运用生物信息学的方法对关键靶点进行基因功能分析和通路富集分析,最后采用 MTT 法、ELISA 法、比色法和实时荧光定量 PCR 法对网络药理学主要预测的生物过程与信号通路进行验证。**结果** 研究共筛选出何首乌-丹参药对的有效成分 24 个,对应靶点 274 个,与 AD 相关靶点共 107 个,相关信号通路前 10 条,GO 分析相关度前 20 个靶点分子功能。细胞实验证实了何首乌-丹参能有效提高 PC12 细胞的细胞存活率及抑制 PC12 细胞的炎症反应和氧化应激反应,并促进 Nrf2/HO-1 信号通路的激活。**结论** 何首乌-丹参主要是通过抗炎和抗氧化应激对 AD 产生重要的治疗作用,为后续临床治疗 AD 提供新的思路。

〔关键词〕 何首乌;丹参;阿尔茨海默病;网络药理学;作用机制

〔中图分类号〕 R285

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.012

Mechanism of Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)-Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) in the Treatment of Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology

YANG Menglin^{1,2}, ZHOU Xiaoqing^{1,2*}, WU Dahua^{1,3}, ZHANG Yunhui^{1,2}, ZHENG Caixing^{1,2}, TONG Tianhao^{1,2}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. 2011 Digital Traditional Chinese

Medicine Collaborative Innovation Center, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Affiliated Hospital of Hunan Provincial

Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

〔Abstract〕 **Objective** To predict the anti-Alzheimer's disease (AD) target and related signaling pathways, and explore the anti-AD mechanism of Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)-Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) by network pharmacology. **Methods** The Chinese medicine system pharmacology technology platform (TCMSP) was used to search the active ingredients and corresponding targets of Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)-Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma). The Drugbank database, the Dis Ge NET database and the TTD database were used to obtain the main pathogenic targets of AD. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the active ingredient-target network diagram. STRING database was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network. The bioinformatics method was used to analyze the gene function and pathway enrichment analysis of key targets. Finally, the MTT, ELISA, colorimetry method and qRT-PCR were used to verify the main biological processes and signal pathways predicted by network pharmacology. **Results** A total of 24 active

〔收稿日期〕 2020-10-27

〔基金项目〕 国家自然科学基金资助项目(81373702,81874462)。

〔作者简介〕 杨梦琳,女,在读博士研究生,研究方向:心脑血管疾病证治研究与数字中医药。

〔通讯作者〕 *周小青,男,教授,博士研究生导师, E-mail:zxq5381@sohu.com。

ingredients of Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)–Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) were screened , 274 corresponding targets, 107 targets related to AD, top 10 related signaling pathways, and top 20 target molecular functions by GO analysis. Cell experiments also proved that Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)–Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) could effectively improve the cell survival rate of PC12 cells and inhibit inflammation and oxidative stress response of PC12 cells, and promote the activation of Nrf2/HO–1 signaling pathway. **Conclusion** Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata)–Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) has an important therapeutic effect on AD mainly through anti-inflammatory and anti-oxidative stress, which provides a new idea for subsequent clinical treatment of AD.

[**Keywords**] Heshouwu (Polygoni Multiflori Radix Praeparata); Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma); Alzheimer’s disease; network pharmacology; mechanism of action

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 是一种以认知功能下降、精神行为功能障碍为主要表现的神经系统退行性病变^[1]。随着全球人口老龄化,AD 发病率不断升高,已成为现代医学亟需解决的难题^[2]。目前,西医对 AD 病因及发病机制仍未完全阐明,尚无根治 AD 的药物^[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]。

前期运用中医传承辅助系统进行数据分析发现,中医治疗 AD 证候组合中,以肾虚血瘀型最多,肾精亏虚、瘀血阻络是 AD 的主要病机,补肾活血法是治疗 AD 的基本方法^[5]。提取肾虚血瘀型方剂核心药对何首乌–丹参,采用网络药理学方法分析药物的化学成分、靶点和通路之间的关系,试图从整体层面揭示中药治疗 AD 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 AD 核心药对挖掘及其化学成分筛选

借助中国中医科学院研制的中医传承辅助平台 (2.5 版本) 建立 AD 方剂数据库并进行数据挖掘^[6],数据库收集 120 位现代医家的 214 个方剂,通过组方规律分析,获得肾虚血瘀型方剂 26 个,涉及药物 164 味,其中补肾药中,何首乌出现 20 次,使用频次最高;活血化瘀药中,丹参出现 16 次,使用频次最高。设置支持度为 0.09,置信度为 0.85 时,何首乌–丹参配伍频次最高 (见表 1)。关联规则分析,出现何首乌时,出现丹参的概率为 88.6%。因此,选取何首乌–丹参为肾虚血瘀型 AD 的核心药对进行网络药理学分析。

1.2 何首乌和丹参有效成分及其靶点的筛选

以“何首乌”“丹参”为关键词,从 TCMSP 数据库 (中药系统药理学分析平台, <http://lsp.nwu.edu.cn/>

表 1 药物配伍模式

配伍模式	频次
何首乌,丹参	14
熟地黄,丹参	12
何首乌,川芎	12
何首乌,三七	11
何首乌,当归	11
熟地黄,川芎	10
熟地黄,三七	10
熟地黄,当归	9
益智仁,丹参	9
益智仁,三七	9
益智仁,川芎	9
益智仁,当归	8

[tcmsp.php](#)) 查询何首乌–丹参 2 味中药的有效成分,本研究基于 ADME (药物吸收、分布、代谢、排泄) 模型,运用 OBioavail 1.1 来预测有效成分的口服利用度 (oral bioavailability, OB),对何首乌–丹参的化学组分进行 OB 和类药性 (drug likeness, DL) 筛选,并设置 $OB \geq 20\%$ 及 $DL \geq 18\%$ 作为筛选条件。借助美国国家生物技术信息中心数据库 (NCBI) 和 Uniprot 数据库,将物种限定为“Homo sapiens”,将靶点转换成对应的基因。

1.3 AD 疾病相关基因检索

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

1.4 何首乌–丹参有效成分与 AD 共同靶点筛选及 PPI 网络构建

将何首乌–丹参有效成分的相关靶点和 AD 的靶点导入 OmicShare 平台 (<https://www.omicshare.com/>)

找出何首乌-丹参活性成分与 AD 的交集靶点,再将这些交集靶点导入到 STRING 数据库,选择物种为“Homo sapiens”进行操作,最小相互作用阈值设为“medium confidence=0.4”,得到 PPI 网络,即“何首乌-丹参-靶点-AD”网络。

1.5 关键靶基因的筛选

应用 Cytoscape 3.7.1 软件对 PPI 网络进行拓扑属性分析,计算 PPI 网络整体的度(degree)、紧密度(closeness)和中介性(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。

1.6 关键靶基因的代谢通路与生物过程分析

为进一步研究何首乌-丹参抗 AD 的作用情况,采用 Metascape 平台对何首乌-丹参的 AD 靶点群进行 KEGG 代谢通路富集分析,研究何首乌-丹参靶点的主要抗 AD 代谢通路;再进行 GO 分子功能富集分析,诠释何首乌-丹参靶点的抗 AD 生物过程,Metascape 的平台列表与背景均选择“Homo Sapiens”进行操作。筛选出 AD 与何首乌-丹参有效组分相关性前 20 的分子功能和前 10 的信号通路。

1.7 网络构建

将何首乌-丹参有效成分、对应靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建何首乌-丹参有效成分-基因靶点网络。

1.8 体外验证实验

1.8.1 细胞与试剂 大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞(长沙赢润生物技术有限公司,批号 2015032007);A β 25-35(美国 Sigma 公司,批号 053M4804V);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号 A00512)、丙二醛(MDA,批号 A00312)和超氧化物歧化酶(SOD,批号 A00112)(均购自南京建成生物研究所);ELISA 测定试剂盒(南京建成生物研究所南京建成生物研究所,IL-1 β 批号 Y16036021, TNF- α 批号 Y17036022,IL-6 批号 Y14036607);Nrf2、HO-1 引物合成(由上海生工生物工程有限公司提供);qRT-PCR 试剂盒(中国北京康为世纪公司,批号 50445);总 RNA 抽提试剂 Trizol(中国北京康为世纪公司,批号 36320);DMEM 细胞培养液(默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 SH3002201);10%新生小牛血清(Hyclone Lab,批号 220118612);

PBS(北京索莱宝科技有限公司,批号 SH30256);FBS(吉泰远成生物科技有限公司,批号 10099141)。何首乌和丹参饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,经鉴定为正品。

1.8.2 药物制备 采用水提醇沉法制备何首乌-丹参水提物:何首乌-丹参质量比 1:2,水和药材质量比 9:1,煎煮 3 次,每次 50 min,合并药液,加入 75%乙醇定容置于 4℃冰箱过夜,过滤杂质,低温旋转蒸发得到药物干燥粉末(每克含生药 3.6 g),4℃密封避光保存。

1.8.3 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℃、5% CO₂ 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、PS 的 DMEM 中孵育 24 h;模型组:予 A β 25-35(20 μ mol/L)孵育 24 h^[7];何首乌-丹参低剂量组(20 μ g/mL)、中剂量组(40 μ g/mL)、高剂量组(80 μ g/mL)孵育 24 h。

1.8.4 MTT 法检测细胞存活率 将 5 $\times$ MTT 用稀释液稀释成 1 $\times$ MTT 溶液;每孔加 50 μ L 1 $\times$ MTT 溶液,37℃孵育 4 h;弃上清液,每个孔加入 200 μ L DMSO,在平板摇床上摇 2~3 min 使其均匀。酶标仪在 570 nm 波长处检测每个孔 PC12 细胞的吸光度值。计算 PC12 细胞的存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

1.8.5 ELISA 法检测 PC12 细胞上清液 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 PC12 细胞以 1 $\times$ 10⁷ 接种于 96 孔板中,100 μ L/孔,当 80%融合时,分别给予各组处理因素,每组 3 个复孔。按实验要求处理完成后,收集上清液留作待测标本。采用 ELISA 测定进行检测,按照 ELISA 测定试剂盒的说明进行操作。

1.8.6 比色法检测 PC12 细胞培养上清液 SOD、GSH-Px 和 MDA 冰上裂解细胞,离心,取上清,制成样品溶液,按 GSH-Px、MDA 和 SOD 试剂盒说明书操作,检测各项指标。

1.8.7 实时荧光定量 PCR 法检测 PC12 细胞上清液 Nrf2、HO-1 mRNA 表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,根据试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 检测。预变性引物见表 2。

1.8.8 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

表 2 引物序列

基因名称	引物(5'→3')	产物长度/bp
β-actin	正向引物:CGCGAGTACAACCTTCTTGC	70
	反向引物:CGTCATCCATGGCGAACTGG	
Nr12	正向引物:TAGATGACCATGAGTCGCTTGC	156
	反向引物:GCCAAACTTGCTCCATGTCC	
HO-1	正向引物:AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA	100
	反向引物:GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA	

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 何首乌-丹参有效成分的筛选

本研究共筛选出何首乌-丹参药对中含有的 24 个有效化学组分,其中何首乌有效成分 9 个(HSW1-9),丹参有效成分 15 个(DS10-24)。见表 3。

2.2 有效成分-基因靶点网络的构建

将筛选后的 24 个有效组分及 274 个相关靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建“有效成分-靶点网络”

(图 1)。24 个椭圆形表示何首乌-丹参的有效成分,274 个“V”形为有效成分作用靶点,共有 1 610 条边代表靶点和化学成分之间的相互作用,体现了何首乌-丹参多成分、多靶点的特点。

2.3 AD 相关基因

在 Drugbank、DisGeNET 和 TTD 数据库 AD 的靶基因,共得到 2 245 个基因。

2.4 蛋白互作网络构建图

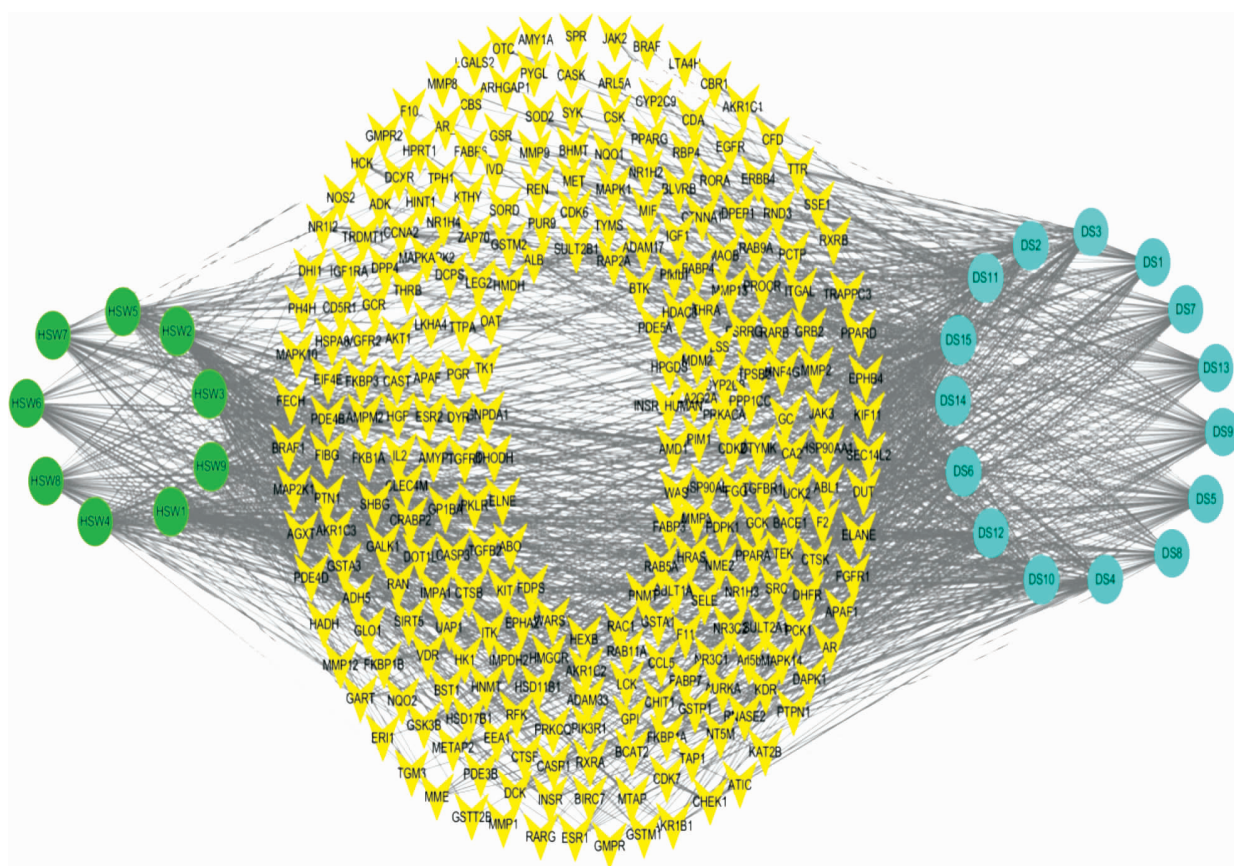
在 Drugbank、DisGeNET 和 TTD 数据库检索 AD 的靶点与何首乌-丹参作用的靶点有 107 个重复,这 107 个靶基因可能为何首乌-丹参抗 AD 的靶点。为研究各靶点在体内的相互作用关系,寻找核靶点,将潜在靶点蛋白群进行 PPI 网络分析,结果共发现 107 个靶蛋白发生相互作用,产生 786 条代表蛋白之间相互作用的边。见图 2。

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 15.5,平均介数为 3.66×10^{-2} ,平均紧密度为 0.52,度值、介数和紧密度均超过平均值的靶蛋白共 8 个,依次

表 3 何首乌-丹参有效成分

编号	化学成分(英文名称)	化学成分(中文名称)	OB/%	DL
HSW1	Rhein	大黄酸	47.07	0.28
HSW2	Tetrahydroxy stilbene glycoside	二苯乙烯苷	36.08	0.56
HSW3	Guajavarin	扁蓄苷	29.65	0.70
HSW4	Tricin	麦黄酮	27.86	0.34
HSW5	Questinol	奎硫醇	24.49	0.30
HSW6	Emodin	大黄素	24.40	0.24
HSW7	Physcion	大黄素甲醚	22.29	0.27
HSW8	Polydatin	虎杖苷	21.44	0.50
HSW9	Questin	单甲醚	20.44	0.27
DS1	1,2,5,6-tetrahy drotanshinone	1,2,5,6-四氢丹参酮	38.75	0.36
DS2	Sugiol	柳杉酚	36.11	0.28
DS3	5,6-dihydroxy-7-isopropyl, 1-dimethyl-2,3-Dihydrophenanthren-4-one	鼠尾草酮	33.77	0.29
DS4	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	2-异丙基-8-甲基菲-3,4,-二酮	40.86	0.23
DS5	4-methylenemiltirone	4-亚甲丹参新酮	34.35	0.23
DS6	Methylenetanshinquinone	亚甲基丹参醌	37.07	0.36
DS7	Salvilenone	丹参酮酚	30.38	0.38
DS8	Cryptotanshinone	隐丹参酮	52.34	0.40
DS9	Danshenspiroketalactone	表丹参螺缩酮内脂	50.43	0.31
DS10	Dihydrotanshinone I	二氢丹参酮 I	45.04	0.36
DS11	Isocryptotanshi-none	异隐丹参酮	54.98	0.39
DS12	Isotanshinone II	异丹参酮 II	9.92	0.40
DS13	Miltirone	丹参新酮	38.76	0.25
DS14	NSC122421	122421,10-脱氧代黄桉醇	34.49	0.28
DS15	Tanshinone IIA	丹参酮 IIA	49.89	0.40



注:绿色椭圆形:何首乌有效成分;蓝色椭圆形:丹参有效成分;黄色“V”形:靶点

图 1 有效成分-基因靶点网络

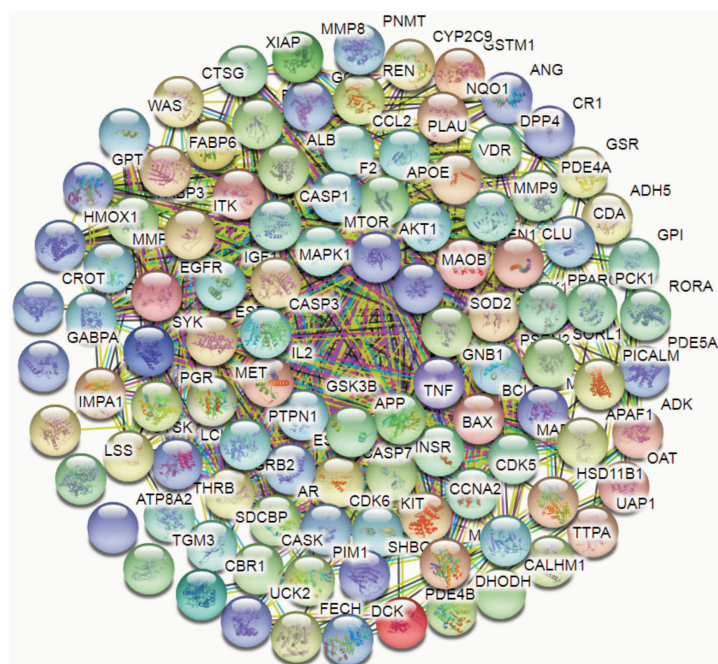


图 2 靶蛋白 PPI 网络图

为 GNB1、MAOB、SOD2、APP、Caspase-3、AKT1、GSK3 β 、MAPK1,说明以上 8 个靶点在 PPI 网络中处于关键位置,很可能是何首乌-丹参抗 AD 的关键靶点。

2.6 KEGG 和 GO 分析结果

通过 GO 数据库分析,何首乌-丹参有效成分靶

标与 AD 疾病靶标基因功能有炎症反应、氧化应激反应、炎症反应的负调节、老化、记忆、凋亡过程等条目。见图 3。

通过 KEGG 数据库富集何首乌-丹参治疗 AD 关键靶标所参与的通路主要涉及 Nrf2/HO-1 信号通

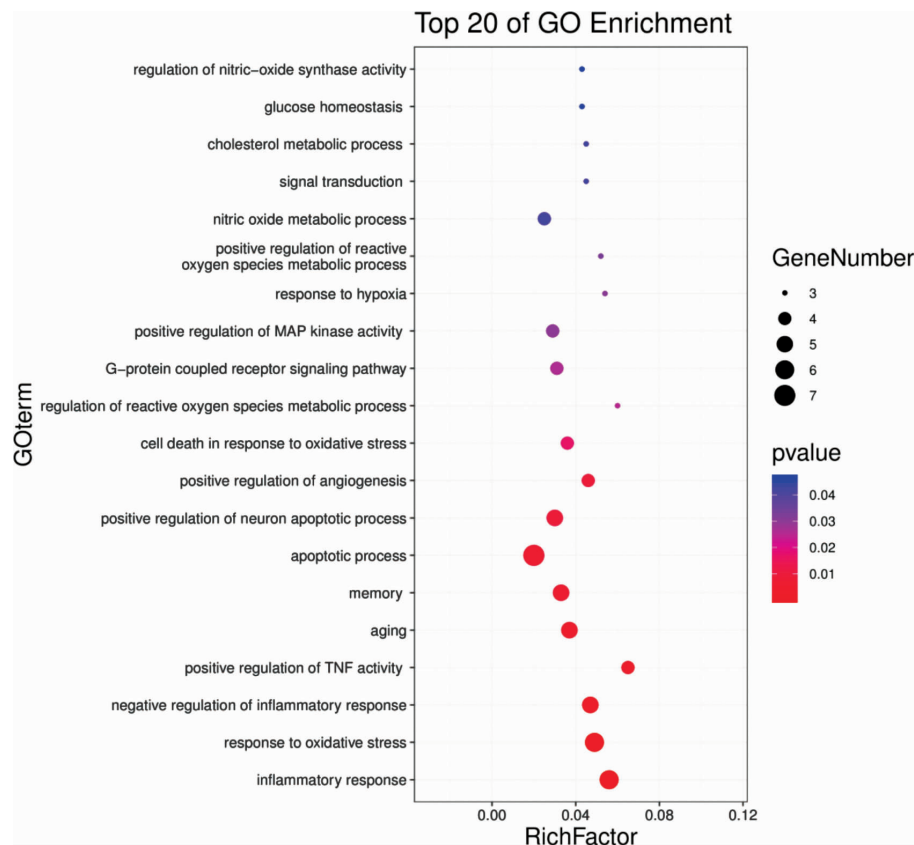


图 3 有效组分-基因靶点-分子功能的 GO 富集气泡图

路、MAPK 信号通路、Toll-like receptor 信号通路、NF- κ B 信号通路、AD 等,说明何首乌-丹参可能主要通过调控炎症反应、氧化应激、凋亡信号通路来防治 AD。

2.7 各组 PC12 细胞存活率比较

与对照组比较,模型组的 PC12 细胞的存活率明显降低,有显著性差异 ($P<0.01$);与模型组相比,随着何首乌-丹参浓度增加,PC12 细胞存活率显著上升 ($P<0.05, P<0.01$),表明何首乌-丹参对 PC12 细胞具有明显保护作用。见表 4。

表 4 各组 PC12 细胞存活率的比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	细胞存活率/%
对照组	99.96 $\pm$ 0.80
模型组	64.53 $\pm$ 0.04**
低剂量组	82.76 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$
中剂量组	85.37 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle$
高剂量组	91.06 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle\blacktriangle$

注:与对照组比较,** $P<0.01$,与模型组比较, $\blacktriangle P<0.05, \blacktriangle\blacktriangle P<0.01$

2.8 各组 PC12 细胞上清液 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

何首乌-丹参作用 PC12 细胞 24 h 后,与对照组比较,模型组 PC12 细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α

水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,何首乌-丹参中、高剂量组的 PC12 细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.05, P<0.01$),表明何首乌-丹参对 PC12 细胞的炎症反应具有明显的抑制作用。见表 5。

表 5 各组 PC12 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=8, \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	12.66 $\pm$ 1.53	84.63 $\pm$ 0.46	125.86 $\pm$ 9.87
模型组	35.87 $\pm$ 1.48**	127.78 $\pm$ 5.25**	145.88 $\pm$ 14.07**
低剂量组	19.24 $\pm$ 2.66	119.56 $\pm$ 13.08	135.94 $\pm$ 13.98
中剂量组	17.08 $\pm$ 2.34 $\blacktriangle$	116.15 $\pm$ 11.76 $\blacktriangle$	130.67 $\pm$ 23.75 $\blacktriangle$
高剂量组	14.06 $\pm$ 1.75 $\blacktriangle\blacktriangle$	107.56 $\pm$ 10.15 $\blacktriangle\blacktriangle$	126.32 $\pm$ 20.67 $\blacktriangle\blacktriangle$

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P<0.05, \blacktriangle\blacktriangle P<0.01$

2.9 各组 PC12 细胞培养上清液 SOD、GSH-Px 和 MDA 比较

与对照组比较,模型组 SOD、GSH-Px 明显活力降低,MDA 含量显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,何首乌-丹参各组 SOD、GSH-Px 活力升高,MDA 含量显著降低 ($P<0.05, P<0.01$),表明何首乌-丹参对 PC12 细胞的氧化应激反应具有明显的抑制作用。见表 6。

表 6 各组 PC12 细胞中 SOD、GSH-Px 和 MDA

比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(mU·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照组	324.88±8.56	366.15±6.40	600.96±28.94
模型组	156.10±5.60**	96.72±13.28**	1 294.48±26.45**
低剂量组	192.06±21.45**	174.75±11.17 [▲]	1 054.78±22.96 [▲]
中剂量组	276.57±4.26 [▲]	236.45±3.56 [▲]	426.97±15.48 ^{▲▲}
高剂量组	284.75±4.53 ^{▲▲}	264.85±9.35 ^{▲▲}	406.36±2.85 ^{▲▲}

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$

2.10 各组 PC12 细胞上清液 Nrf2、HO-1 mRNA 的表达

与对照组比较,模型组细胞 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,何首乌-丹参各组能够明显提高 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$),说明何首乌-丹参能够明显促进 Nrf2、HO-1 基因的表达。见表 7。

表 7 各组 PC12 细胞中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA
对照组	1.00±0.12	1.00±0.15
模型组	0.76±0.22**	0.75±0.26**
低剂量组	1.86±0.17 [▲]	1.72±0.15 [▲]
中剂量组	2.57±0.16 [▲]	2.56±0.18 [▲]
高剂量组	3.06±0.15 ^{▲▲}	3.02±0.19 ^{▲▲}

注:与对照组比较,** $P<0.05$;与模型组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$

3 讨论

AD 属于中医学“痴呆”“呆证”等范畴,清代程国彭《医学心悟》云:“肾主智,肾虚则智不足,故喜忘其前言”。脑为髓之海,髓海的充养依靠肾的藏精,肾中精气充盈,髓海得养^[8]。张景岳在《景岳全书》中说:“凡心有瘀血,亦令健忘。”肾虚可致血瘀。而血瘀又进一步影响气血运行,且“瘀血不去,新血不生”,血瘀可致血虚;又“精血同源”,血虚可致肾精衰少,因而血瘀也可致肾虚。现代医学研究亦表明肾虚与血瘀常相伴而行:肾虚时血液处于高凝状态,肾虚者常兼有血液流变学及微循环不同程度的异常^[9]。全血黏度、血浆比黏度、红细胞电泳、纤维蛋白原等与年龄的增加呈正比,血液朝着浓、黏、凝、聚的方向变化发展,微循环障碍遍及全身,出现不同程度的血瘀^[10]。故 AD 其本为肾虚,其标为血瘀,肾虚血瘀为其主要证型,补肾活血为基本治法。

本研究通过数据挖掘找出了治疗肾虚血瘀型 AD 的一组核心药对何首乌-丹参,该药对是中医临

床家广泛使用的补肾活血药物。《本草纲目》记载何首乌,气温,味苦涩,能固精益肾、养血益肝、健筋骨、乌须发,为滋补肾精良药。据《何首乌录》记载,何首乌能“长筋益精……延年”。丹参具有活血祛瘀、安神之功效。《滇南本草》曰:“补心定志,安神宁心,治健忘怔忡,惊悸不寐。”^[11]何首乌、丹参配伍可补肾填精、活血化瘀,其功效契合 AD 肾虚血瘀的基本病机。研究借助系统药理学、药代动力学和生物信息学方法来确定何首乌-丹参的活性化合物及与 AD 相关的靶点和通路。通过 TCMSP 平台的 OB 和 DL 筛选,获得何首乌-丹参的 24 个化合物,其中何首乌的有效成分中二苯乙烯苷的活性最高,可以作用 39 个靶点,而在丹参中活性最高的是丹参酮 IIA,作用靶点达到了 36 个。研究发现^[23],二苯乙烯苷可降低 BACE1、Caspase-3 表达,减少 A β 产生,改善神经元损伤,以及增加突触相关蛋白的表达,从而发挥对 AD 的治疗作用。研究^[14-15]显示,丹参酮 IIA 可抑制小胶质细胞增生,并进一步降低 IL-1 β 、TNF- α 炎性细胞因子的表达以及抑制 Tau 蛋白过度磷酸化对抗神经细胞凋亡,从而发挥治疗 AD 的作用。

将潜在有效成分和 AD 共同靶点相映射,得到药物-疾病共同作用靶点 107 个。关键靶点居前三位的是 GNB1、MAOB、SOD2。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^[16]。MAOB 基因的异常表达或突变与 AD 的发生具有密切关系^[17]。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^[18]。基于对抗氧化应激损伤的 AD 治疗研究中发现,SOD-2 基因多态性与 AD 的发生发展有关^[19]。GO 富集分析结果表明,“何首乌-丹参”药对的作用靶点分布在多种细胞组分中,以胞质为主,通过多种结合方式参与生物进程,包括炎症反应、氧化应激反应、凋亡过程、积极调节白细胞激活等。随着近年对 AD 发病机制的研究,许多学者指出,脑内炎症反应是 AD 发病的重要环节^[20]。氧化应激反应在 AD 的发生和发展的过程中扮演着极其重要的角色^[21]。在本研究筛选出的信号通路中,与何首乌-丹参有效靶点的关联度最高的是 Nrf2/HO-1 信号通路。研究发现^[22-24],Nrf2/HO-1 信号通路是调控 AD 过程中炎症反应、氧化应激的重要信号通路,Nrf2/HO-1 信号通路的激活可以显著增加大脑皮质

和海马组织的抗炎和抗氧化应激反应能力,发挥神经保护作用。

为了验证网络药理学的分析结果,本研究选择了何首乌-丹参对 A β 25-35 诱导的 PC12 细胞的细胞存活率、炎症反应、氧化应激反应、Nrf2/HO-1 信号通路的调控作用进行了实验验证。验证结果表明何首乌-丹参能有效抑制 A β 25-35 诱导的 PC12 细胞的炎症反应、氧化应激反应,并提高其细胞存活率,上调 Nrf2/HO-1 信号通路,最终抑制 AD 的发展。

综上,何首乌-丹参具有多成分、多靶点协同治疗 AD 的作用。本文基于系统药理学研究何首乌-丹参对 AD 的具体作用靶点及机制,对今后临床运用中药治疗 AD 具有重要指导意义。

参考文献

- [1] MURPHY KELSEY E, PARK JOSHUA J. Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer's disease?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(6): 1168.
- [2] 王莎莎,张 钊,张 欣,等.中药免疫治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 药理学报,2018,53(7):1023-1029.
- [3] 杨婷婷,周红静,曾晨叶,等.新型大麻素衍生物对阿尔茨海默病模型小鼠的保护作用[J].中国现代应用药学,2019,36(5):537-541.
- [4] 张海波,孙 阳.石杉碱甲对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内 β -淀粉样蛋白表达的影响[J].天然产物研究与开发,2017,29(2):290-293,254.
- [5] 吴 岳,张 婷.董克礼教授运用补肾活血法治疗中老年疾病经验介绍[J].中医药导报,2007,13(2):23-24,38.
- [6] 宋克立,张琼琼,王晓晗,等.基于数据挖掘研究现代中医治疗阿尔茨海默病用药规律[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(7):1424-1429.
- [7] 张运辉,伍大华,袁春云,等.二苯乙烯苷和三七总皂苷配伍对 A β 25-35 致 PC12 细胞损伤影响的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(9):20-22.
- [8] 袁德培,邱幸凡,王 平,等.肾虚髓衰、脑络痹阻是老年性痴呆的基本病机[J].中华中医药杂志,2008,23(8):732-734.
- [9] 何成奇,易文远,熊素芳,等.男性原发性骨质疏松肾虚三证与血液流变学变化关系的临床研究[J].四川医学,2001(10):892-893.
- [10] 成绍武.中医对动脉粥样硬化的认识及防治研究进展[J].湖南中医药大学导报,2003,9(7):66-68.
- [11] 兰 茂,于乃义,于兰馥整理.滇南本草[M].昆明:云南科技出版社,2004:218.
- [12] 刘 宁,杨晓颖,黄 健,等.二苯乙烯苷对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区病理形态学及脑 BACE1 表达的影响[J].右江民族医学院学报,2016,38(6):559-562.
- [13] 张 旭.二苯乙烯苷对 α -突触核蛋白过表达和聚集的影响及其作用机制[D].北京:首都医科大学,2017.
- [14] 李 辰.丹参酮 II A 对伴有肠源性内毒素血症的阿尔茨海默病样大鼠的作用探讨[D].太原:山西医科大学,2016.
- [15] JADOON SARMAD SHERAZ.丹参酮 IIA 对阿尔茨海默病的防治作用及机制研究[D].武汉:湖北中医药大学,2019.
- [16] YANG M, HE R L, BENOVIĆ J L, et al. B-Arrestin1 interacts with the G-protein subunits β 1 γ 2 and promotes β 1 γ 2-dependent Akt signalling for NF- κ B activation[J]. Biochemical Journal, 2009, 417(1): 287-296.
- [17] 谢 宁,宋琳莉,牛英才,等.地黄饮子影响阿尔茨海默病模型大鼠大脑单胺氧化酶 B 基因的表达[J].中国临床康复,2006,10(23):57-59.
- [18] NICOTRA A, PIERUCCI F, PARVEZ H, et al. Monoamine oxidase expression during development and aging[J]. NeuroToxicology, 2004, 25(1/2): 155-165.
- [19] WIENER H W, PERRY R T, CHEN Z, et al. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease[J]. Genes, Brain and Behavior, 2007, 6(8): 770-776.
- [20] DI MARCO L Y, FARKAS E, MARTIN C, et al. Is vasomotion in cerebral arteries impaired in Alzheimer's disease?[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2015, 46(1): 35-53.
- [21] UMENO A, BIJU V, YOSHIDA Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes[J]. Free Radical Research, 2017, 51(4): 413-427.
- [22] 王凯华.基于线粒体功能失调与 Nrf2 介导的抗氧化应激探索柚皮素对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[D].广州:南方医科大学,2017.
- [23] 苏永兴,马争飞,张 蕾,等.青蒿素通过 Nrf2/HO-1 通路改善 A β 1-42 对 SH-SY5Y 细胞的细胞毒性作用[J].中风与神经疾病杂志,2018,35(7):591-594.
- [24] YU N H, HUANG Y P, JIANG Y, et al. Ganoderma lucidum triterpenoids (GLTs) reduce neuronal apoptosis via inhibition of ROCK signal pathway in APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease mice[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 9894037.

(本文编辑 苏 维)