

抑肝散治疗阿尔茨海默病的作用及机制探讨

张 然¹, 焦 扬², 邹爱英³, 李 睿⁴, 张秋阳⁵, 商 倩^{6*}

1. 天津医学高等专科学校 药学与生物技术学院, 天津 300222

2. 天津中医药大学第一附属医院 药学部, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193

3. 天津中医药大学第二附属医院 药学部, 天津 300250

4. 天津大学 化工学院, 天津 300073

5. 天津市海河医院 基础医学实验部, 天津 300350

6. 天津药物研究院有限公司 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300462

摘要: 目的 探究抑肝散对阿尔茨海默病(AD)的治疗作用, 通过网络药理学方法预测其机制, 并进行实验验证。方法 以D-半乳糖诱导AD小鼠模型, 通过水迷宫和八臂迷宫实验考察抑肝散(400、800 mg·kg⁻¹)对AD小鼠学习记忆功能的影响, 并通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法分析AD小鼠脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)的mRNA表达变化。通过中药系统药理学数据分析平台(TCMSP)对抑肝散的组方药材柴胡、甘草、川芎、当归、白术、茯苓和钩藤进行活性成分筛选, 采用GeneCards等数据库获取AD疾病靶点, 筛选其核心靶点, 并对核心靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 分别获取核心靶点涉及的生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC)以及KEGG信号通路。小鼠神经母细胞瘤Neuro-2a细胞和RAW264.7巨噬细胞分别与H₂O₂和抑肝散(3、6 μ g·mL⁻¹)共培养, 观察抑肝散对Neuro-2a细胞体外增殖和凋亡的影响, 及对Neuro-2a细胞Caspase-3和Caspase-8活性、活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和线粒体膜电位(MMP)的影响; 观察抑肝散对RAW264.7细胞TNF- α 和IL-1 β 、IL-2、IL-6表达的影响, 对网络药理学结果进行验证。**结果** 抑肝散可缓解AD小鼠学习记忆功能损伤, 通过网络药理学技术筛选得到抑肝散治疗AD的活性成分159个, 度值前10位的化合物分别是槲皮素、山柰酚、异鼠李素、 β -谷甾醇、豆甾醇、7-甲氧基异黄酮、芒柄花素、柚皮素、美迪紫檀素和甘草查尔酮A, 筛选得到核心靶点227个, 度值排名前10的核心靶点为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素6(IL6)、肿瘤蛋白P53(TP53)、白细胞介素1 β (IL1B)、雌激素受体1(ESR1)、原癌基因(JUN)、前列腺素氧化环化酶2(PTGS2)、半胱氨酸蛋白酶3(CASP3)和信号转导和转录激活因子3(STAT3)。生物信息学分析发现抑肝散治疗AD与糖基化终末产物/糖基化终末产物受体和脂质和动脉粥样硬化等信号通路有关。动物实验结果显示, 抑肝散可改善AD模型小鼠学习记忆功能损伤, 下调AD小鼠脑组织中IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α mRNA表达; 细胞实验结果显示, 抑肝散显著缓解H₂O₂对Neuro-2a细胞的增殖抑制作用和凋亡诱导作用($P < 0.05$), 降低Caspase-3、Caspase-8活性($P < 0.05$), 降低细胞MDA和ROS水平($P < 0.05$), 升高MMP及GSH水平; 抑肝散对H₂O₂诱导的RAW264.7细胞TNF- α 和IL-1 β 、IL-2、IL-6升高具有显著抑制作用($P < 0.05$)。**结论** 抑肝散通过缓解学习记忆功能损伤和氧化损伤发挥治疗AD作用。

关键词: 抑肝散; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 氧化损伤; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)08-1749-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.009

Treatment and mechanism of Yigansan on Alzheimer's disease

ZHANG Ran¹, JIAO Yang², ZOU Aiyang³, LI Rui⁴, ZHANG Qiuyang⁵, Shang Qian⁶

1. School of Pharmacy and Biotechnology, Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

2. Department of Pharmacy, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193, China

3. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China

收稿日期: 2024-04-14

基金项目: 天津市中医药重点领域科研项目(2022008)

*通信作者: 商 倩, 副研究员, 研究方向为中药药理。 E-mail: shangq@tjipr.com

4. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300073, China

5. Department of Basic Medicine, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China

6. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of Yigansan on Alzheimer's disease (AD), to predict its mechanism through network pharmacology, and to carry out experimental verification. **Methods** The effects of Yigansan (400 and 800 mg·kg⁻¹) on the learning and memory function of AD mice were investigated in a D-galactose-induced AD mouse model, and the mRNA expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2) and interleukin-6 (IL-6) in the brain tissues of AD mice were analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Through the TCM Systematic Pharmacology Data Analysis Platform (TCMSP), the active ingredients of the herbal medicines *Bupleuri Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, *Poria* and *Uncariae Ramulus cum Uncis* were screened, and the AD targets were obtained by GeneCards and other databases, and the core targets were enriched by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. The biological processes (BP), molecular function (MF) and cellular composition (CC) and KEGG signaling pathway involved in the core targets were obtained, respectively. Mouse neuroblastoma Neuro-2a cells and RAW264.7 macrophages were co-cultured with H₂O₂ and hepatosuppress san (3 and 6 μ g·mL⁻¹), respectively, to observe the effects of Yigansan on the proliferation and apoptosis of Neuro-2a cells *in vitro*, and the activity of Caspase-3 and Caspase-8, reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), effects on superoxide dismutase (SOD) and mitochondrial membrane potential (MMP). The effects of Yigansan on the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 in RAW264.7 cells were observed, and the network pharmacology results were verified. **Results** A total of 159 active ingredients were screened for the treatment of AD by network pharmacology technology, and the top 10 compounds were quercetin, kaempferol, isorhamnetin, β -sitosterol, stigmasterol, 7-methoxyisoflavone, mangopertin, naringenin, meditalpin, and licochalcone A, and 227 core targets were screened, and the top 10 core targets were serine/threonine kinase 1 (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL6), tumor protein P53 (TP53), interleukin 1 β (IL1B), estrogen receptor 1 (ESR), proto-oncogene (JUN), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS), caspase 3 (CASP3), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Bioinformatics analysis showed that the treatment of AD was related to glycosylation end products/glycation end product receptors and lipid and atherosclerosis signaling pathways. The results of animal experiments showed that Yigansan could improve the impairment of learning and memory function in AD model mice, and down-regulate the mRNA expression of IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α in the brain tissues of AD mice. The results of cellular experiments showed that Yigansan significantly alleviated the proliferation inhibitory and apoptosis-inducing effects of H₂O₂ on Neuro-2a cells ($P < 0.05$), decreased the activities of Caspase-3 and Caspase-8 ($P < 0.05$), lowered the levels of cellular MDA and ROS ($P < 0.05$), and elevated the levels of MMP as well as GSH. Yigansan significantly suppressed the H₂O₂-induced elevation of TNF- α and IL-1 β , IL-2 and IL-6 in RAW264.7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Yigansan exerts therapeutic effects on AD by alleviating learning memory impairment and oxidative damage.

Key words: Yigansan; Alzheimer's disease; network pharmacology; oxidative damage; inflammatory factors

阿尔茨海默病(AD)是一种认知障碍性疾病,其发病过程为神经元变性死亡,从而吞噬记忆、认知等功能^[1]。目前我国约有2 500万AD患者,严重影响患者的生活质量,给社会和家庭带来沉重的负担。AD临床治疗常采用多奈哌齐等胆碱酯酶抑制剂及盐酸美金刚、奥拉西坦、银杏叶提取物等神经保护和改善认知类药物,这些药物能改善患者认知和行为症状,但不会改变疾病的潜在病程。

中医古籍中具有大量与认知障碍症状有关的论述,古代文献记于“文痴”“善忘”“郁症”“癫疾”和“呆病”等症候,与现代医学中AD的症状具有一

定相合性^[2]。抑肝散出自明代薛铠所著《保婴撮要》,日本等国家率先将抑肝散应用于临床,Masayuki等^[3]报道了抑肝散可以明显改善AD症状。国内外多项研究已证实,抑肝散对AD等神经失能症的疗效已被临床实践以及体内外研究所证实,可有效缓解失能临床症状及神经细胞损伤,不但可以延缓病程,还可以缓解AD引起的精神症状^[4]。但是由于其活性成分复杂,作用机制尚未完全明确。本研究拟考察抑肝散对AD的治疗作用,通过网络药理学技术预测其机制,并进行体内、外验证,为其临床用于治疗AD及深入开发提供参考依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

抑肝散由钩藤、柴胡、茯苓、白术、川芎、当归、甘草按3:4:2:4:1.5:3:3比例组成,组方药材均购自天津中医药大学第一附属医院,并经该院药学部鉴定符合《中国药典》2020年版要求。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、活性氧(ROS)、线粒体膜电位(MMP)检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒、细胞计数试剂盒(CCK-8)以及半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)活性检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA检测试剂盒均购自美国R&D Systems公司;H-DMEM培养基、DMEM培养基和胎牛血清均购自美国Gibco公司;D-半乳糖购自上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 动物与细胞

雄性SPF级C57BL小鼠,8周龄,体质量20~30 g,购自北京斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,所有动物实验在天津市海河医院实验动物委员会的批准下进行,动物伦理编号:2021HHKT(A)-011。小鼠Neuro-2a神经母细胞瘤细胞和小鼠RAW264.7巨噬细胞购自北京协和细胞资源中心。

1.3 仪器

Varioskan ALF酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Calibur流式细胞仪购自美国BD公司。

2 方法

2.1 抑肝散对AD模型小鼠的影响

2.1.1 抑肝散乙醇提取物制备 将抑肝散组方药材打成细粉(细粉全部通过5号筛,通过6号筛不少于95%),加10倍量70%乙醇加热回流提取3次,每次2 h,抽滤,取滤液,减压浓缩并经冷冻干燥制成冻干粉(槲皮素质量分数不低于0.15 mg·kg⁻¹)。用前加入溶剂(玉米油用于体内实验或PBS溶液用于细胞实验)摇匀溶解,用于后续实验。

2.1.2 AD小鼠模型制备、分组及给药 C57BL小鼠实验前适应性饲养1周,饲养温度20~25℃,湿度40%~70%,自由饮食。小鼠每日经颈后部sc D-半乳糖(200 mg·kg⁻¹),连续60 d。当小鼠表现出迟钝和缓慢运动等AD症状,经水迷宫和八臂迷

宫实验验证(潜伏时间、工作记忆错误和参考记忆错误显著增加),表明模型制备成功。造模成功小鼠随机分为模型组及抑肝散低、高剂量[400、800 mg·kg⁻¹,根据日本《汉方药事典》(2012修订版)建议:成人抑肝散提取物用量为每天7.5 g,根据人和小鼠间按体表面积折算等效剂量比值表换算抑肝散小鼠等效剂量为650 mg·kg⁻¹)]组,每组12只,正常饲养小鼠为对照组。抑肝散组造模同时每天ig给予抑肝散乙醇提取物(溶于玉米油),模型组和对照组仅ig给予等量玉米油,每天1次,连续60 d,

2.1.3 水迷宫实验 实验装置为直径120 cm的圆形水池,划分为4个象限(1~4象限),将平台所在象限第3象限为目标象限。经6 d适应性训练后,将小鼠面朝池壁分别按1~4象限顺序放入水中,持续90 s,记录小鼠找到目标象限所需时间(潜伏时间)和目标象限时间占比。

2.1.4 八臂迷宫实验 经6 d适应性训练后,小鼠禁食24 h,放入八臂迷宫中适应迷宫环境,仅在1、2、6、7臂末端放置1粒饵料,将小鼠置于中央区域内,15 s后打开各臂入口,自由探索食物5 min,记录小鼠再次进入已经吃过饵料的臂(工作记忆错误)和未放入饵料的臂(参考记忆错误)的次数。

2.2 抑肝散治疗AD网络药理学预测

2.2.1 抑肝散活性成分和靶点筛选 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com>),分别以抑肝散组方药材钩藤、柴胡、茯苓、白术、川芎、当归、甘草为关键词,设置口服生物利用度(OB)≥30%以及药类药性(DL)≥0.18为筛选条件,获取活性成分,并通过TCMSP获取靶点。

2.2.2 AD疾病靶点筛选 通过Swiss Target Prediction (www.swisstargetprediction.ch)、GeneCards (www.genecards.org)、Uniprot (<https://www.uniprot.org>)数据库,以“Alzheimer's disease”为关键词进行靶点匹配,获得AD靶点信息。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络及“成分-靶点”网络构建 通过R语言软件(4.1.2版)“venn”包将抑肝散活性成分靶点与AD疾病靶点取交集,得到抑肝散和AD共同靶点,STRING数据库(<https://www.string-db.org/>)以物种为人类,最小交互评分≥0.7为条件,度值越高则被认为是网络中越关键的节点,通过Cytoscape 3.8.0软件构建所有共同靶点PPI网络,围绕活性成分及共同靶点通过Cytoscape 3.8.0软件构建“成分-靶点”网络。

2.2.4 共同靶点的基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 为进一步明确抑肝散治疗AD的潜在机制,将上述共同靶点导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov>),设定物种为人类,GO分析抑肝散治疗AD的相关生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC),KEGG通路富集分析抑肝散治疗AD相关信号通路,选择GO分析和KEGG通路前10项进行可视化呈现。

2.3 验证实验

2.3.1 细胞培养 小鼠Neuro-2a神经母细胞瘤细胞培养于H-DMEM培养基(含10%胎牛血清),条件为37℃、5%CO₂、饱和湿度,经0.25%胰蛋白酶溶液(含EDTA)消化传代。小鼠RAW264.7巨噬细胞培养于DMEM培养基(含10%胎牛血清),条件为37℃、5%CO₂、饱和湿度。上述细胞均采用对数生长期细胞进行后续研究。

2.3.2 体外增殖实验 将Neuro-2a细胞培养于96孔板中(每孔3 000个),给药组经H₂O₂(100 μmol·L⁻¹)与3.6 μg·mL⁻¹抑肝散乙醇提取物共培养72 h,模型组用H₂O₂(100 μmol·L⁻¹)处理72 h,相同实验条件下加入磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照组,通过CCK-8检测试剂盒按照说明书方法,应用酶标仪检测吸光度(A)值(450 nm波长)以反映活细胞数量。

$$\text{细胞相对活力} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将Neuro-2a细胞培养于24孔板中(每孔1×10⁵个),分组及给药同“2.3.2”项,细胞经药物处理24 h后,通过胰酶消化收集。按照Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒说明书方法,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.3.4 ELISA实验检测相关指标 将Neuro-2a细胞培养于24孔板中(每孔1×10⁵个),分组及给药同“2.3.2”项,细胞经药物处理24 h后,通过胰酶消化收集。将Neuro-2a经液氮反复冻融裂解,4℃、12 000×g离心10 min,取上清,按照试剂盒说明书方法,通过酶标仪检测上清中Caspase-3、Caspase-8活性及ROS、GSH、MDA和SOD水平。将Neuro-2a经液氮反复冻融裂解,4℃、1 000×g离心5 min,离心2次,均取上清,再以4℃、12 000×g离心10 min,取沉淀(即线粒体),PBS洗涤后再次4℃、12 000×g离心10 min,取沉淀。按照试剂盒说明书方法,通过酶标仪检测MMP。

将RAW264.7细胞培养于24孔板中(每孔1×10⁵个),分组及给药同“2.3.2”项,细胞经药物处理

24 h后,取培养液,经1 000×g离心5 min后,通过IL-1β、IL-2、IL-6和TNF-α试剂盒检测上清液中细胞因子浓度。

2.3.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测AD模型小鼠脑组织中相关基因表达 Trizol法提取“2.1”项各组小鼠脑组织(行为学指标测定后取材)总RNA,通过逆转录试剂盒进行逆转录,得到cDNA,进行PCR反应(95℃、10 min后,95℃、10 s,60℃、30 s,共进行40个循环),GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法分析各个样品TNF-α和IL-1β、IL-2、IL-6基因相对表达量,PCR引物序列见表1。

表1 PCR引物序列
Table 1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'→3')
TNF-α	上游:AGCACAGAAAGCATGATCCG
	下游:CTGATGAGAGGGAGGCCATT
IL-1β	上游:CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG
	下游:CTTCTTTGGGTATTGCTTGGGATC
IL-2	上游:CCCACTTCAAGCTCCACTTC
	下游:ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT
IL-6	上游:TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC
	下游:TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
GAPDH	上游:ATGGGTGTGAACCACGAGA
	下游:CAGGGATGATGTTCTGGGCA

2.4 统计学分析

定量数据至少3次重复,采用SPSS 11.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验,组间多重比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抑肝散对AD小鼠学习记忆功能的改善作用

水迷宫实验结果显示,与对照组比较,模型组小鼠寻找平台潜伏时间显著延长($P < 0.05$),目标象限时间占比有减少趋势;与模型组比较,抑肝散高剂量组小鼠寻找平台潜伏时间显著缩短($P < 0.05$),目标象限时间占比有增加趋势。八臂迷宫实验显示,与对照组比较,模型组小鼠工作记忆错误次数和参考记忆错误次数均显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,抑肝散高、低剂量组小鼠工作记忆错误次数和参考记忆错误次数均显著减少($P < 0.05$),说明抑肝散可改善AD模型小鼠学习记忆功能损伤情况,结果见表2。

PTGS2、CASP3 和 STAT3(表3),“成分-靶点”网络见图3,与靶点相互作用度值前10位的化合物见表4。

3.2.3 GO 和 KEGG 分析 将抑肝散潜在靶点进行GO分析发现,BP涉及条目743个($P<0.05$),如对外源性刺激的反应(response to xenobiotic

stimulus)、对缺氧的反应(response to hypoxia)和凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)等;CC涉及条目95个($P<0.05$),如细胞外空间(extracellular space)、质膜的组成部分(integral component of plasma membrane)、突触前膜的组成部分(integral component of presynaptic membrane)

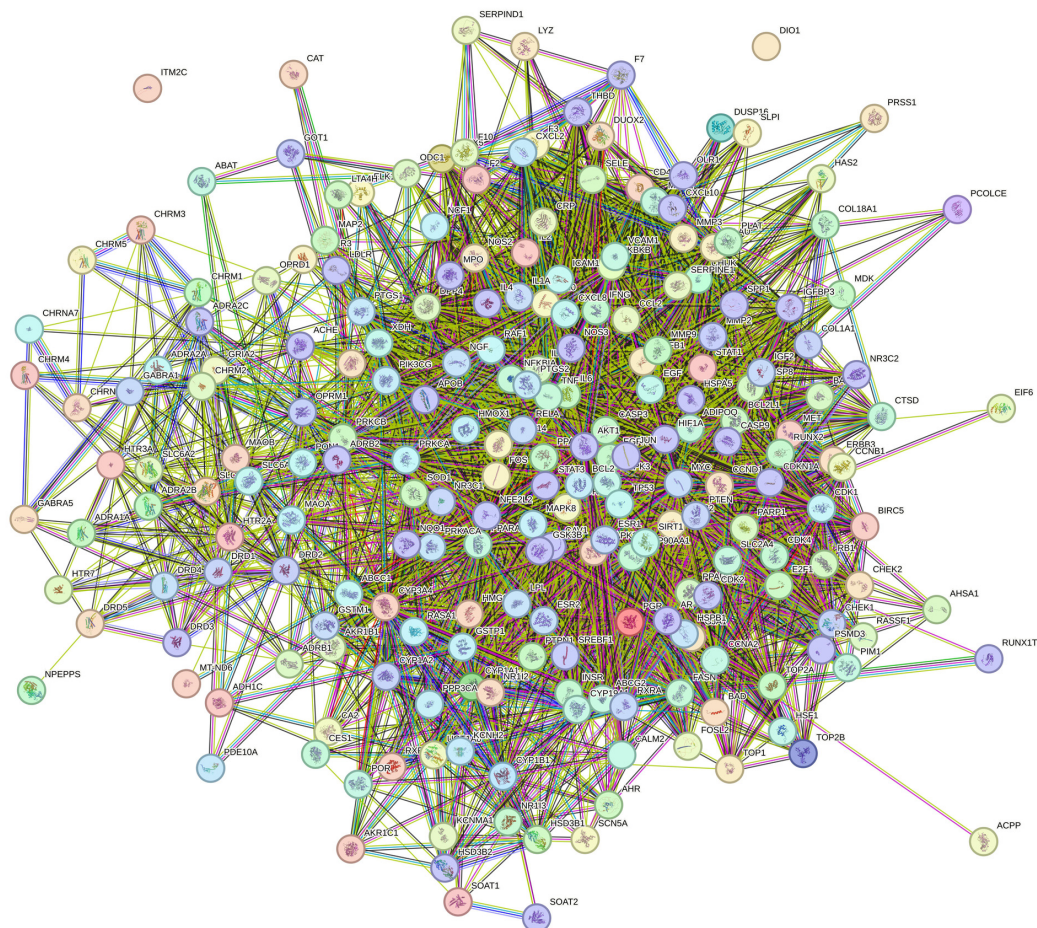


图2 抑肝散治疗AD潜在靶点PPI网络

Fig. 2 PPI network of targets of Yigansan in treatment of AD

表3 抑肝散与AD的交集靶点(度值前10位)

Table 3 Intersection target of Yigansan and AD (top 10 in degree)

靶点	全称	Uniprot ID	度值
AKT1	Serine/Threonine Kinase 1	P31749	147
TNF	Tumor Necrosis Factor	P01375	138
IL6	Interleukin 6	P05231	138
TP53	Tumor Protein p53	P04637	131
IL1B	Interleukin 1, beta	P01584	129
ESR1	Estrogen Receptor 1	P03372	127
JUN	Proto-oncogene c-Jun	P05412	123
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	P35354	123
CASP3	Caspase 3	P42574	123
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	P40763	121

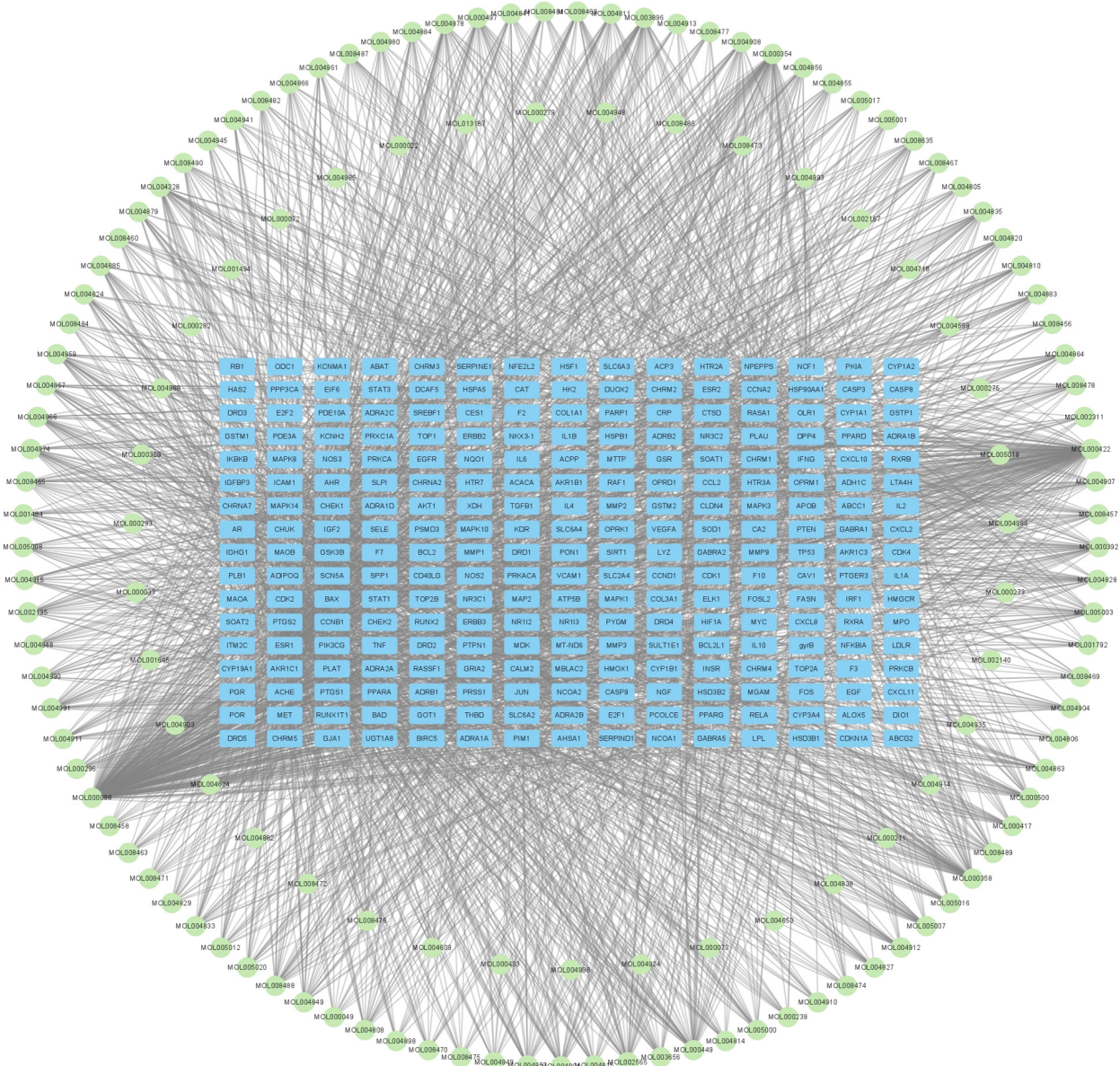


图3 抑肝散活性成分-靶点网络图
Fig. 3 Network of component-target of Yigansan

表4 抑肝散与交集靶点相互作用度值前10位的化合物

Table 4 Top 10 compounds in Yigansan of degree of interaction with targets

Mol编号	化合物	度值	CAS	归属药材
MOL000098	槲皮素(quercetin)	280	117-39-5	钩藤、甘草
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	161	520-18-3	钩藤、柴胡、甘草
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	61	480-19-3	柴胡、甘草
MOL000358	β -谷甾醇(β -sitosterol)	60	83-46-5	钩藤、当归
MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	48	83-48-7	柴胡、当归
MOL003896	7-甲氧基异黄酮(7-methoxyisoflavone)	43	1621-56-3	甘草
MOL000392	芒柄花素(formononetin)	39	485-72-3	甘草
MOL004328	柚皮素(naringenin)	37	480-41-1	甘草
MOL002565	美迪紫檀素(medicarpin)	34	32383-76-9	甘草
MOL000497	甘草查尔酮A(licochalcone A)	32	58749-22-7	甘草

等; MF 涉及条目 154 个 ($P < 0.05$), 如酶结合 (enzyme binding)、同种蛋白结合 (identical protein binding) 和 RNA 聚合酶 II 转录因子活性 (RNA polymerase II transcription factor activity) 等。KEGG 通路富集分析共得到 181 条通路 ($P < 0.05$), 涉及脂质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、糖基化终末产物/糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications) 及流体剪切应力与动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis) 等信号通路 (图 4)。神经突触凋亡、脂类代谢紊乱以及 AGE-RAGE 信号通路诱导的细胞凋亡及炎症反应已被证实同 AD 发生发展密切相关。GO 和 KEGG 分析显

示, 抑肝散对 AD 的治疗作用, 可能与缓解氧化应激、神经元损伤及炎症因子表达有关。

3.3 抑肝散治疗 AD 机制验证

3.3.1 抑肝散对 Neuro-2a 细胞体外增殖和凋亡的影响 CCK-8 实验结果表明, H_2O_2 可抑制 Neuro-2a 细胞体外增殖并诱导凋亡 ($P < 0.05$), 升高 Caspase-3、Caspase-8 活性 ($P < 0.05$); 抑肝散可缓解 H_2O_2 对细胞增殖的抑制作用和凋亡的诱导作用 ($P < 0.05$), 降低 Caspase-3、Caspase-8 活性 ($P < 0.05$), 见表 5, 表明抑肝散可能通过缓解神经元凋亡发挥治疗 AD 作用。

3.3.2 抑肝散对 Neuro-2a 细胞氧化损伤和 MMP 的影响 H_2O_2 可诱导 Neuro-2a 细胞 MDA 和 ROS 水平

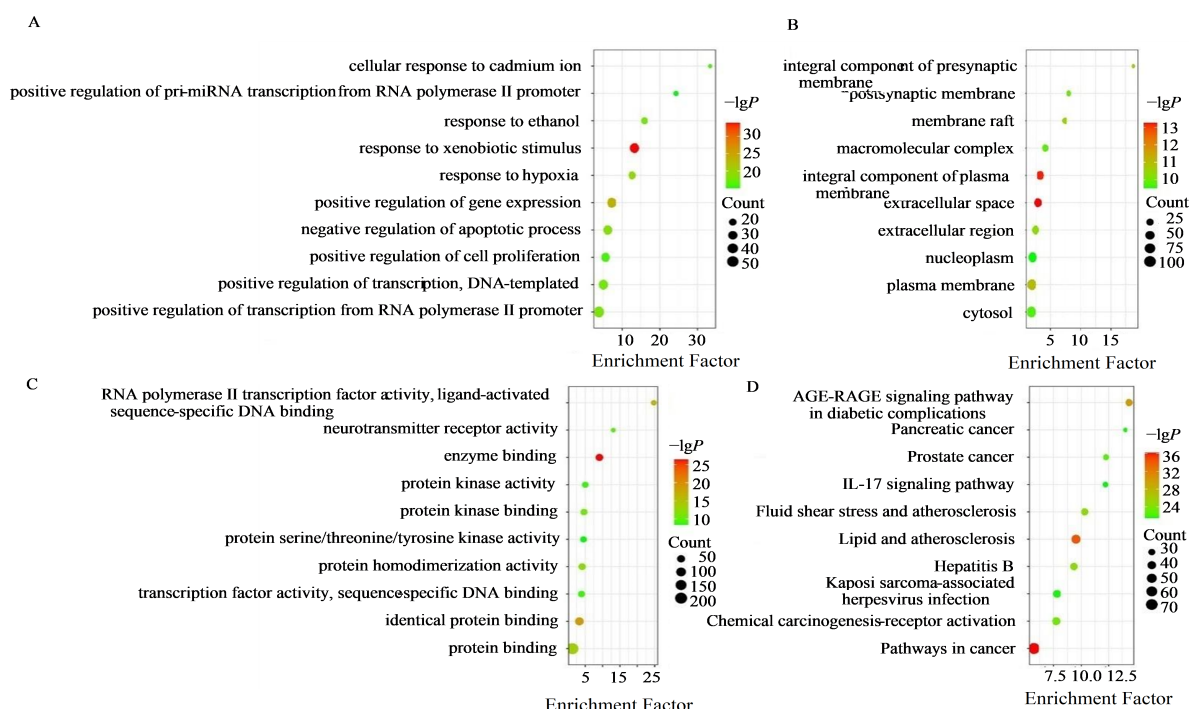


图 4 抑肝散治疗 AD 靶点 GO (A-BP, B-CC, C-MF) 和 KEGG 通路 (D) 富集分析

Fig. 4 Analysis of GO (A-BP, B-CC, C-MF) and KEGG pathway (D) of therapeutics target of Yigansan in treatment of AD

表 5 抑肝散对 Neuro-2a 细胞体外增殖和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Yigansan on proliferation and apoptosis of Neuro-2a cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞相对活力	凋亡率/%	Caspase-3 活性 (相对表达)	Caspase-8 活性 (相对表达)
对照	—	1.00±0.21	4.0±1.6	1.00±0.26	1.00±0.21
模型	—	0.56±0.10*	25.4±9.5*	2.69±0.86*	3.31±1.10*
抑肝散	3	0.65±0.07	18.7±2.4*	1.63±0.25*	2.51±0.59*
	6	0.86±0.11#	9.2±1.9**	1.28±0.07#	1.42±0.25#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

上调($P<0.05$),下调MMP、GSH和SOD水平($P<0.05$),抑肝散可显著缓解细胞氧化损伤以及MMP、ROS、GSH和MDA异常($P<0.05$),见表6,表明抑肝散可能通过缓解神经元线粒体失能和氧化损伤治疗AD。

3.3.3 抑肝散对RAW264.7巨噬细胞炎症因子表达的影响 H_2O_2 可诱导小鼠RAW264.7巨噬细胞TNF- α 和IL-1 β 、IL-2、IL-6表达上调($P<0.05$),抑肝散可抑制RAW264.7细胞中上述炎症因子水平上

调,见表7。

3.3.4 抑肝散对AD模型小鼠脑组织炎症因子基因表达的影响 qRT-PCR实验发现,D-半乳糖诱导小鼠出现AD症状后,其脑组织TNF- α 和IL-1 β 、IL-2、IL-6 mRNA表达显著上调($P<0.05$),抑肝散治疗后AD小鼠脑组织上述细胞因子mRNA表达下调($P<0.05$),见表8,表明抑肝散可能通过缓解炎症反应发挥治疗AD作用。

表6 抑肝散对Neuro-2a细胞MMP和氧化损伤的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Yigansan on mitochondrial membrane potential and oxidation-injury in Neuro-2a cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MMP (相对值)	ROS (相对值)	GSH/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	SOD/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照	—	1.00 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.22	18.30 $\pm$ 4.25	2.44 $\pm$ 0.77
模型	—	0.56 $\pm$ 0.08*	2.83 $\pm$ 0.42*	0.47 $\pm$ 0.09*	8.67 $\pm$ 3.00*	5.34 $\pm$ 1.07*
抑肝散	3	0.68 $\pm$ 0.15	2.18 $\pm$ 0.41*	0.72 $\pm$ 0.13	10.87 $\pm$ 2.51	5.04 $\pm$ 0.43*
	6	0.78 $\pm$ 0.11 [#]	1.77 $\pm$ 0.24 [#]	0.76 $\pm$ 0.09 [#]	13.73 $\pm$ 2.10	2.83 $\pm$ 0.90 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group.

表7 抑肝散对RAW264.7细胞炎症因子表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Yigansan on cytokine expression in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-2/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	TNF- α /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	—	47.0 $\pm$ 8.2	47.7 $\pm$ 17.0	17.3 $\pm$ 3.2	713.3 $\pm$ 120.1
模型	—	77.7 $\pm$ 12.1*	83.7 $\pm$ 4.9*	33.0 $\pm$ 4.4*	1 446.7 $\pm$ 210.3*
抑肝散	3	55.3 $\pm$ 6.5 [#]	58.0 $\pm$ 8.5 [#]	23.7 $\pm$ 4.9	1 243.3 $\pm$ 365.0
	6	49.0 $\pm$ 7.5 [#]	55.3 $\pm$ 7.1 [#]	18.0 $\pm$ 3.0 [#]	760.0 $\pm$ 205.2 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group.

表8 抑肝散对AD小鼠脑组织炎症因子mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 8 Effect of Yigansan on mRNA expression of cytokine in brain tissue of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	mRNA 相对表达量			
		IL-1 β	IL-2	IL-6	TNF- α
对照	—	1.00 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.12
模型	—	3.31 $\pm$ 0.34*	3.56 $\pm$ 0.69*	2.87 $\pm$ 0.19*	3.34 $\pm$ 0.82*
抑肝散	400	2.08 $\pm$ 0.21* [#]	1.86 $\pm$ 0.64 [#]	1.86 $\pm$ 0.19* [#]	2.53 $\pm$ 0.60* [#]
	800	1.80 $\pm$ 0.25* [#]	1.58 $\pm$ 0.46 [#]	1.49 $\pm$ 0.23* [#]	1.85 $\pm$ 0.17* [#]

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group.

4 讨论

AD是一种神经系统退行性疾病,记忆障碍、失语、失认和行为改变等是其主要临床特征^[4-5]。许多古代医籍具有与痴呆症相似临床表现的记载,

如“心神失常”“善忘”“呆病”及“郁证”等描述符合AD症状^[6]。抑肝散被证实可缓解AD部分症状,延缓疾病进展^[3-4,7]。本研究通过水迷宫和八臂迷宫实验发现,抑肝散提取物可改善AD小鼠的学习记忆

能力,验证了上述结论。

本研究通过网络药理学方法对抑肝散进行活性成分和靶点筛选预测。抑肝散治疗AD度值排名前10位的靶点分别为AKT1、TNF、IL6、TP53、IL1B、ESR1、JUN、PTGS2、CASP3和STAT3。异常免疫应答已被证实是神经系统退行性病变的重要诱因,TNF、IL6和IL1B是重要的炎症因子靶点,IL-1 β 、IL-6还可诱导AKT1/JUN/STAT3轴活化,促进炎症细胞募集和细胞因子释放,进一步激活免疫应答^[8-11]。P53/CASP3与神经元凋亡与损伤密切相关,其异常表达也是神经失能的重要机制^[12-14]。从靶点分析中可以发现,抑肝散可通过抑制异常免疫应答及细胞凋亡缓解神经元损伤,从而治疗神经失能。细胞实验发现,抑肝散可缓解H₂O₂诱导的小鼠神经母细胞瘤细胞增殖抑制及凋亡,下调小鼠巨噬细胞TNF- α 等细胞因子表达,证实了抑肝散网络药理学分析的上述预测。

脑组织代谢紊乱引起ROS表达升高(即氧化应激)被认为是导致神经失能的重要原因^[15]。氧化应激可激活炎症反应,引起炎症细胞的浸润和炎症介质的释放,同时炎症反应也可引起氧化应激,形成恶性循环,破坏神经元正常功能。氧化应激还可通过DNA损伤激活p53基因诱导神经元凋亡。因此,抑制氧化应激是治疗AD的关键。本研究通过网络药理学方法发现与靶点相互作用度值前10位的化合物分别是槲皮素、山柰酚、异鼠李素、 β -谷甾醇、豆甾醇、7-甲氧基异黄酮、芒柄花素、柚皮素、美迪紫檀素和甘草查尔酮A,这些成分均具有抗炎、抗氧化、调节免疫等作用,可通过减轻炎症反应、抑制氧化损伤缓解神经元损伤。

为了证实网络药理学预测结果,本研究通过将抑肝散和H₂O₂与Neuro-2a细胞共培养的方式考察抑肝散对氧化应激的作用,发现抑肝散可缓解H₂O₂诱导的细胞ROS异常升高,上调GSH和SOD水平。线粒体失能与神经功能损伤具有密切联系,MMP下降是线粒体失能的重要体现^[16],本研究发现抑肝散可缓解H₂O₂造成的MMP下降,因此提示缓解线粒体失能也是抑肝散治疗AD的潜在机制。

以往抑肝散治疗AD等神经失能症状的研究主要关注 β -淀粉样蛋白等靶点^[17]。本研究采用网络药理学方法发现并验证抑肝散治疗AD的机制与缓解氧化损伤有关。今后将通过动物模型进一步验证其体内活性,为抑肝散的临床应用提供理论

依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yan L, Li H, Qian Y L, et al. Acupuncture modulates the gut microbiota in Alzheimer's disease: Current evidence, challenges, and future opportunities [J]. Front Neurosci, 2024, 18: 1334735.
- [2] 毕信亚, 刘坤, 周建英, 等. 基于"脑-肠轴"理论探究温脾开窍通络方治疗老年性痴呆的临床疗效及与肠道菌群的相关性 [J/OL]. 中华中医药学刊. [2024-07-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240327.0855.002.html>.
- [3] Bi X Y, Liu K, Zhou J Y, et al. Based on the theory of "brain-gut axis" to explore the clinical efficacy of Wenpi Kaiqiaotongluo prescription in the treatment of senile dementia and its correlation with intestinal flora [J/OL]. Chin Arch Tradit Chin Med. [2024-07-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240327.0855.002.html>.
- [4] Izumi M, Seki T, Iwasaki K, et al. Chinese herbal medicine Yi-Gan-San decreases the lipid accumulation in mouse 3T3-L1 adipocytes by modulating the activities of transcription factors SREBP-1c and FoxO1 [J]. Tohoku J Exp Med, 2009, 219(1): 53-62.
- [5] 刘海洋, 闫姝, 徐红丹, 等. 抑肝散治疗痴呆症的临床及实验研究现状 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(22): 40-42.
- [6] Liu H Y, Yan S, Xu H D, et al. Research status of Yigansan in the treatment of dementia [J]. China Med Her, 2015, 12(22): 40-42.
- [7] 索宗武, 魏凯欣, 徐依, 等. 天然产物通过调控神经炎症改善阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2284-2300.
- [8] Suo Z W, Wei K X, Xu Y, et al. Research progress on natural products improving Alzheimer's disease by regulating neuroinflammation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(7): 2284-2300.
- [9] Chen Z H, Wang X R, Du S M, et al. A review on traditional Chinese medicine natural products and acupuncture intervention for Alzheimer's disease based on the neuroinflammatory [J]. Chin Med, 2024, 19(1): 35.
- [10] 熊赞, 吴鹏. 从肝论治痴呆的精神行为症状 [J]. 中国民间疗法, 2024, 10(2): 10-11, 82.
- [11] Xiong Y, Wu P. Treating psychobehavioral symptoms of dementia from liver [J]. China's Naturopathy, 2024, 10(2): 10-11, 82.
- [12] Fergany A, Zong C, Ekuban F A, et al. Transcriptome analysis of the cerebral cortex of acrylamide-exposed

- wild-type and IL-1 β -knockout mice [J]. Arch Toxicol, 2024, 98(1): 181-205.
- [9] Zabot G C, Medeiros E B, Macarini B M N, et al. The involvement of neuroinflammation in an animal model of dementia and depression [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2024, 133: 110999.
- [10] Afsar A, Zhang L. Putative molecular mechanisms underpinning the inverse roles of mitochondrial respiration and heme function in lung cancer and Alzheimer's disease [J]. Biology, 2024, 13(3): 185.
- [11] Yang H, Niu L, Jia J, et al. Extracellular vesicles: Mediators of microenvironment in hypoxia-associated neurological diseases [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2024, 240: 108250.
- [12] Nguyen H D, Kim M S. Exposure to a mixture of heavy metals induces cognitive impairment: Genes and microRNAs involved [J]. Toxicology, 2022, 471: 153164.
- [13] Wang S E, Wu C H. Tau phosphorylation and cochlear apoptosis cause hearing loss in 3 $\times$ Tg-AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. Chin J Physiol, 2021, 64(2): 61-71.
- [14] Qian Q, Luo W L. A network pharmacology method explores the molecular mechanism of *Coptis chinensis* for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Medicine, 2024, 103(5): e37103.
- [15] Olesen M A, Pradenas E, Villavicencio-Tejo F, et al. Mitochondria-tau association promotes cognitive decline and hippocampal bioenergetic deficits during the aging [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 217: 141-156.
- [16] Kulkarni P G, Mohire V M, Waghmare P P, et al. Interplay of mitochondria-associated membrane proteins and autophagy: Implications in neurodegeneration [J]. Mitochondrion, 2024, 76: 101874.
- [17] Su M T, Jheng Y S, Lu C W, et al. Neurotherapy of Yi-Gan-San, a traditional herbal medicine, in an Alzheimer's disease model of *Drosophila melanogaster* by alleviating A β_{42} expression [J]. Plants (Basel), 2022, 4: 572.

[责任编辑 刘东博]