

从凋亡网络的调控研究地黄饮子治疗阿尔兹海默病的分子机制

江建锋¹, 白 强¹, 宋祯彦², 贺春香², 成绍武², 游柏稳^{1*}

1. 湖南中医药大学第二附属医院 老年病科, 湖南 长沙 410005

2. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 利用中药网络药理学和分子生物学从凋亡网络的调控研究地黄饮子(DHYZ)治疗阿尔兹海默病(AD)的分子机制。**方法** 利用网络药理学方法筛选和预测 DHYZ 的活性成分治疗 AD 的潜在作用靶点, 构建药物-靶标-疾病网络和蛋白与蛋白相互作用网络, 运用生物信息学分析 DHYZ 调控凋亡网络的主要靶点和信号途径; A β 1-42 处理构建 AD 细胞模型, 使用不同浓度含药血清处理, 运用 MTT 法检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, qPCR 和 Western blotting 检测细胞凋亡相关基因和蛋白的表达。**结果** 筛选出 DHYZ 中 108 种活性成分有 222 个 AD 的潜在治疗靶点, 其中有 202 个靶点之间存在的 3 737 种蛋白蛋白相互作用关系, DHYZ 对凋亡网络的调控是其防治 AD 的重要生物学途径, 预测其核心调控靶点有 TNF、AKT1、MAPK3、NFKB1、TP53、CASP3 等, qPCR 和 Western blotting 验证了预测结果。细胞实验证明不同浓度 DHYZ 含药血清呈浓度依赖性抑制 A β 1-42 处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 且与调控细胞凋亡相关基因和蛋白有关。**结论** DHYZ 活性化合物对细胞凋亡相关的多个靶点和多条信号通路的调控是其防治 AD 的重要作用机制。

关键词: 地黄饮子; 阿尔兹海默病; 网络药理学; 细胞凋亡; 分子机制

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5548-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.019

Researches on molecular mechanism of Dihuang Yinzi Decoction for application to Alzheimer's disease from regulation of apoptotic network

JIANG Jian-feng¹, BAI Qiang¹, SONG Zhen-yan², HE Chun-xiang², CHENG Shao-wu², YOU Bai-wen¹

1. Department of Geriatrics, The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China

2. Hunan Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To confirm evidence regarding the potential therapeutic effect of Dihuang Yinzi Decoction (DHYZ) on Alzheimer's disease (AD) from the regulation of apoptotic network using network pharmacology and molecular biology. **Methods** The active ingredients of DHYZ were screened and the potential therapeutic targets on AD were predicted, and the drug-target-disease network and protein-protein interactions (PPI) network were built by using network pharmacology. The main targets and signaling pathways of apoptotic networks of DHYZ were performed by bioinformatics analysis. AD cell model was built by A β 1-42 treating serum containing different concentrations. The cell viability was detected by MTT assay. The cell apoptosis was detected by flow cytometry. The cell apoptosis related gene and protein express were detected by qPCR and Western blotting. **Results** A total of 108 active ingredients of DHYZ were screened out, and 222 potential therapeutic targets for AD were predicted by network pharmacology. Among the 222 potential therapeutic targets, 202 of them had 3 737 kinds of PPI network, which were closely related to the apoptotic network signaling pathways and biological processes regulation, involving TNF, AKT1, MAPK3, NFKB1, TP53, CASP3, etc. The predicted results were verified by qPCR and Western blotting. Meanwhile, cell experiments showed that DHYZ contained serum of different concentrations inhibited apoptosis of A β 1-42-induced SH-SY5Y cells in a concentration-dependent, which was related to the regulation of apoptosis related genes and proteins. **Conclusion** The results indicated

收稿日期: 2020-01-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81774129); 国家自然科学基金青年项目(82004184); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ8023); 湖南省中医药管理局科研项目(2018025, 201609); 湖南省教育厅科研项目(15K088, 18B246)

作者简介: 江建锋, 副主任医师, 医学博士, 从事中西医结合防治神经退行性疾病的研究。Tel: 15873173372 E-mail: jiangjf2014@163.com

*通信作者 游柏稳, 主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 从事中西医结合防治神经退行性疾病的研究。

Tel: 1397495546 E-mail: huxiangzhongyi2019@126.com

that the active compounds in DHYZ interact with apoptosis-related multiple targets and multiple pathways, which is an important mechanism of DHYZ for application to AD.

Key words: Dihuang Yinzi Decotion; Alzheimer's disease; network pharmacology; apoptosis; molecular mechanism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性神经退行性疾病, 是老年性痴呆的一种最常见病因, 它的主要临床特征是学习和记忆功能障碍, 导致生活自理能力的不可逆转的渐进性损伤, 这严重影响 AD 患者及其照顾者的生活质量^[1-2]。据报道, 我国现有约 1 000 万 AD 患者, 到 2030 年, 预计消耗年社会经济总成本 5 074.9 亿美元, 2050 年将达到 1.89 万亿美元^[3]。AD 的发病机制涉及多种机制, 为开发有效的治疗方法带来了相当大的困难。美国 FDA 批准的 AD 药物包括乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDAR) 拮抗剂, 但目前的药物只能暂时改善症状, 没有一种药物能够阻止或逆转 AD 的进展^[4]。中药具有多成分、多靶点的作用, 特别是对神经退行性病变、癌症、炎症、糖尿病等复杂疾病具有较好疗效, 因而中药已成为潜在治疗 AD 药物开发的重要资源。

地黄饮子 (DHYZ) 出自刘河间《皇帝素问宣明论方》, 由熟地黄、巴戟天、大枣、山茱萸、石斛、肉苁蓉、附子、五味子、肉桂、茯苓、麦冬、石菖蒲、远志、薄荷、生姜组成, 具有滋肾阴、补肾阳、开窍化痰之功效。临床和实验研究显示 DHYZ 对改善 AD 认知功能具有较好的疗效^[5-7]。但是大多数的研究工作都集中在 DHYZ 从单一途径或单一靶点对 AD 治疗效果的研究, 并没有报道系统分析 DHYZ 的所有组成在治疗 AD 的潜在作用机制。本研究利用网络药理学方法从整体层面上分析了 DHYZ 治疗 AD 的作用机制, 并从凋亡网络出发, 探讨了 DHYZ 对 AD 治疗的潜在作用机制。

1 材料与试剂

1.1 细胞

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自武汉普诺赛生物有限公司 (CL-0208), 用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。

1.2 动物

SD 大鼠, 10 只, SPF 级, 雄性, 体质量 250~300 g, 购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2013-0004,

饲养于湖南中医药大学实验动物中心。动物实验方案通过湖南中医药大学伦理委员会的批准。

1.3 药物

DHYZ 方内所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院, 药材鉴定由湖南中医药大学第一附属医院药剂科戴冰教授鉴定, 分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的根茎、茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根、鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujube* Mill. 的干燥果肉、山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥果肉、兰科石斛属植物石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 的干燥茎、列当科肉苁蓉属植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Ma 的干燥茎、毛茛科乌头属植物的附子 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥根、木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实、樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker-Gawl. 的块根、天南星科菖蒲属植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根、远志科远志属植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd 的干燥根、野芝麻亚科薄荷属植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥茎、姜科姜属植物生姜 *Zingiber officinale* Roscoe 的干燥根。按《中国药典》2015 年版熟地黄、巴戟天、大枣、山茱萸、石斛、肉苁蓉、附子、五味子、肉桂、茯苓、麦冬、石菖蒲、远志、薄荷、生姜项下检查, 符合各项规定。

1.4 主要试剂

β 淀粉样蛋白 1-42 (Aβ1-42) 购自美国 Thermo Scientific 公司 (批号 03112), 噻唑蓝 (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT, 批号 ST316) 购自碧云天生物技术有限公司; Annexin-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 CA1020) 购自索莱宝公司; TRIzol (批号 15596-026) 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录 cDNA 试剂盒 (RR047A) 和 SYBR 染料 (RR820L) 购自日本 TaKaRa 公司; 引物由上海生工生物有限公司根据引物序列合成; 一抗 Cleaved caspase-3

(9661) 购自美国 CST 公司, Bax (bs-0127M)、Bcl-2 (bs-0032R) 和 β -actin (bs-0061R) 购自北京博奥森公司; 山羊抗兔二抗 (AP132P) 和山羊抗小鼠二抗 (AP124) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法

2.1 DHYZ 中药活性化合物数据的整理

DHYZ15 味中药的所有活性化合物信息从中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中药信息数据库 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid>) 和中药分子机制的生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 获取。以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 对每个化合物进行筛选, 无药物动力学参数的化合物通过查阅文献进行筛选。最后利用 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取化合物结构式。

中药活性化合物的靶点预测使用 TCMSP、Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)、SEA (<http://sea.bkslab.org>) 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 根据化合物结构相似性和分子对接特性进行预测并结合文献进行补充, 预测靶点分数阈值设置 ≥ 0.6 ^[8]; 使用 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 进行除重及标准化命名。

AD 疾病相关靶点的获取使用 TTD (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>) 和 DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) 数据库, 将 DHYZ 的预测靶点映射到 AD 相关靶点以获取 DHYZ 治疗 AD 的潜在作用靶点。

2.2 化合物-靶点-AD 网络和蛋白与蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

为了可视化的展示中药、活性化合物、作用靶点和疾病之间的相互作用关系, 利用 Cytoscape-v3.6.1 软件构建活性化合物-靶点-AD 网络可视化网络图。使用在线的蛋白相互作用的检索和预测数据库 STRING (<https://string-db.org/>) 对 DHYZ 抗 AD 的预测靶点进行 PPI 网络构建, 选择系统默认分值 score ≥ 0.4 , 并使用 Cytoscape-v3.6.1 构建可视化 PPI 网络图。

2.3 PPI 网络拓扑学分析

在网络中, 根据中间中心性 (betweenness centrality, BC) 和接近中心性 (closeness centrality, CC), 度中心性 (degree centrality, DC) 等网络拓

扑学特性将功能相似或联系紧密的节点聚集进行拓扑模块 (Cluster) 分类, 以反映这些蛋白相互作用影响的生物学功能^[9]。本研究使用 Cytoscape-v3.6.1 的插件 MCODE 对 DHYZ 治疗 AD 的预测靶点的 PPI 网络进行拓扑学分析。

2.4 GO 功能和 Pathway 富集分析

将“2.3”项中获得的 DHYZ 治疗 AD 的蛋白相互作用重要拓扑模块中的靶点导入在线基因功能富集工具 DAVID 6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), 以人类基因为背景, 以 $P < 0.05$, FDR < 0.05 进行 GO 富集分析; 同时将这些靶点导入生物信息分析云平台 OmicShare (www.omicshare.com/tools) 的 Pathway 富集分析工具, 以 $P < 0.05$, FDR < 0.05 进行 Pathway 富集分析, 并获取凋亡网络的网络图。

2.5 DHYZ 含药血清的制备和保存

DHYZ 含药血清制备参照高俊峰等^[10]报道的方法。DHYZ 各药用量按《圣济总录》比例配伍用水提法获得 DHYZ 水煎剂, 采用旋转蒸发器浓缩中药水提液, 使药物终浓度调整为相当于含生药 5.0 g/mL。大鼠给药剂量根据人服药剂量换算约为 25 g/(kg·d), 每日 ig 2 次, 对照组 ig 同体积的生理盐水, ig 7 d, 末次 ig 2 h 后, 用 10%水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 4 °C 静置 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min 后取血清, 使用 0.22 μ m 过滤器滤过灭菌, 56 °C 灭活血清后, -80 °C 保存备用。

2.6 A β 1-42 处理构建 AD 细胞模型及 DHYZ 含药血清干预

SH-SY5Y 细胞生长处于对数期时, 接种到培养板中培养 24 h 贴壁, 根据文献报道^[11]和前期浓度摸索加入 10 μ mol/L A β 1-42 处理 24 h 构建 AD 细胞模型。细胞分为对照组 (空白血清), 模型组 (10 μ mol/L A β 1-42 + 空白血清), DHYZ 含药血清高、中、低干预组 (10 μ mol/L A β 1-42 造模后分别给予 10%、5%、2.5%含药血清)。

2.7 MTT 法检测细胞存活率

96 孔板中按 8×10^3 个/孔密度接种细胞培养贴壁, 按“2.6”项分组处理 24 h 后, 根据 MTT 试剂盒说明书检测方法检测每个孔的细胞存活情况。

2.8 流式细胞术 Annexin-FITC/PI 双染法检测凋亡

6 孔板按 4×10^5 个/孔密度接种, 按“2.6”项分组进行处理后, 胰酶消化收集细胞, PBS 漂洗, 1 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 弃上清。按试剂盒

说明书用 200 μ L binding buffer 重悬细胞, 加入 10 μ L Annexin V-FITC 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 加入 300 μ L Binding Buffer (总反应体积 500 μ L) 以及 5 mL 碘化丙啶 (PI), 在 1 h 内用 MoFlo XDP 超高速流式细胞分选系统检测, 使用 FITC (激发波长 $E_x=488$ nm, 发射波长 $E_m=520$ nm) 和 PE_{cy5} (激发波长 $E_x=488$ nm, 发射波长 $E_m=670$ nm) 通道进行检测, 计算凋亡细胞比例。

2.9 qPCR 检测网络核心基因的表达情况

6 孔板细胞经试验处理后使用 TRIzol 法提取细

胞总 RNA, 按照逆转录 cDNA 试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。采用 SYBR 染料法使用伯乐公司 CFX96 Real-time PCR 系统按照试剂盒说明书所述方法进行实时荧光定量 PCR 检测, 所用引物序列见表 1。

2.10 Western blotting 检测凋亡相关蛋白

6 孔板细胞经处理后使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 30 Hz 超声 10 s, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 法检测蛋白浓度, 上样 30 μ g/孔, 100 V 电泳 100 min, 0.45 μ m PVDF 膜 200 A 湿转 90 min,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	上游引物	下游引物	长度/bp
TNF	CGAGTGACAAGCCTGTAGC	CTGATGGCACCACCAACTG	135
NFKB1	AGCAATCATCCACCTTCATTCT	AATCCTCCACCACATCTTCCT	155
AKT1	GACAACCGCCATCCAGACT	TCCTCCTCCTCCTGCTTCTT	61
TP53	CTGAGGTTGGCTCTGACTGT	GTGTGATGATGGTGAGGATGG	102
CASP3	TTGTGAGGCGGTTGTAGAAGA	CGGATACACAGCCACAGGTA	64
GAPDH	AGTCCACTGGCGTCTTCAC	GAGGCATTGCTGATGATCTTGA	163

5%脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 法显影, 伯乐公司 BIO-RAD Gel Doc XR+凝胶成像系统成像计算灰度值统计分析。

2.11 统计分析

采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先检查正态性和方差齐性, 采用单因素方差分析, 方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Tamhane's T2 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

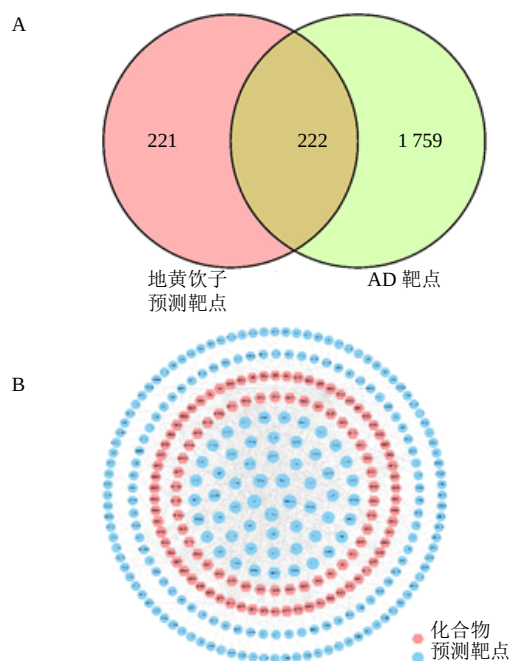
3.1 DHYZ 活性化合物筛选

从 TCMSP 数据库中获取了 DHYZ 方剂中 11 味中药的化合物成分, 以 AMED 参数 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件筛选这些药物的活性化合物 140 种, 其中没有预测靶点的化合物 59 种予以剔除, 有 15 种化合物虽不符合筛选条件但文献报道具有药物活性予以补充^[12-19]。石斛、远志和麦冬的化合物成分从 TCMID 和 BATMAN-TCM 数据库以及文献中获得^[20-23], 并基于文献的实验数据共收集这 3 种草药的活性成分 12 种^[9,24-29]。最终筛选出 DHYZ 的活性化合物 108 种成分作为后续分析使用。

3.2 DHYZ 活性化合物抗 AD 的作用靶点预测和可视化网络构建

地黄饮子 108 种活性化合物共获得 443 个作用靶点, 且它们之间存在 1 785 个相互作用关系, 其中每个活性化合物都有 2 个以上的作用靶点, 平均 1 种活性化合物约有 16.5 个靶点。从 TTD、Drugbank、DisGeNET 3 个数据库中共获得与 AD 相关的疾病靶点 1 981 个, 将 DHYZ 的预测靶点与 AD 相关的疾病靶点相互映射, 从地黄饮子 443 个预测靶点中获取 222 个 AD 潜在的作用靶点 (图 1)。

将 DHYZ 的 108 种活性化合物与 222 个 AD 潜在靶点构建了化合物-靶点-疾病网络图 (Compounds-Targets-AD network, C-T-AD, 图 1)。C-T-AD 网络可视化呈现了 108 个活性化合物与 222 个作用靶点之间的 1 019 种相互作用关系。网络中化合物与靶点相连的连线称之为自由度 (degree), 自由度越高表明该节点 (化合物或靶点) 存在的相互作用关系越多^[30]。图中与 5 种以上化合物存在关联的靶点放置于中央区域, 代表它们可能在 DHYZ 防治 AD 过程参与更多的生物学过程, 是重要的药效靶点, 其中位于最中心拥有较高自由度的靶点包括 PTGS2 (degree=57)、PTGS1 (degree=41)、



A-DHYZ 预测靶点与 AD 相关的靶点的韦恩图 B-化合物-靶点-AD 网络图, 其中圆形节点表示蛋白靶点, 六边形节点表示活性化合物

A-Venn diagram of predicted target of DHYZ related to AD
B-Compound-target-AD network diagram, the circle node represents the protein target, and the hexagon node represents the active compound

图 1 DHYZ 活性化合物抗 AD 的作用靶点预测 (A) 和可视化网络构建 (B)

Fig. 1 Target prediction (A) and visualization network construction (B) of DHYZ active compound on AD

HSP90AA1 (degree=30)、PRKACA (degree=22)、AR (degree=21)、ADRB2 (degree=18)、ESR1 (degree=16)。同时, 本研究发现 DHYZ 化合物中拥有较多预测靶点的化合物有 quercetin (M93, degree=121)、luteolin (M72, degree=66)、kaempferol (M67, degree=62)、acacetin (M25, degree=421)、naringenin (M79, degree=34) 等, 其可能是 DHYZ 防治 AD 的重要药效成分。

3.3 PPI 网络构建和网络拓扑学分析

将 DHYZ 的 222 个 AD 潜在靶点构建了 PPI 网络 (图 2-A), 该网络包含 202 个蛋白之间存在的 3 737 种相互作用关系。其中处于 PPI 网络中心拥有较多的蛋白相互作用的靶点有 AKT1 (degree=128)、ALB (degree=122)、TP53 (degree=117)、IL6 (degree=113)、MAPK3 (degree=110)、TNF (degree=101)、CASP3 (degree=99) 等, 提示这些蛋白可能是 DHYZ 药效作用的重要效应蛋白。

对 PPI 网络进行拓扑模块 (Cluster) 分析, 获取含 10 个基因以上的 Cluster 3 个 (图 2-B), 其中 Cluster1 位于 PPI 网络中心, 由 55 个蛋白靶点相互作用形成 1 220 种相互作用关系, PPI 网络中的核心靶点都富集于 Cluster1 中。因此认为 Cluster1 中的蛋白靶点可能是 DHYZ 治疗 AD 的重要药效靶点, DHYZ 治疗 AD 的作用机制可能与这些蛋白参与和影响的生物学功能和信号途径有关。

3.4 GO 功能和 Pathway 富集分析

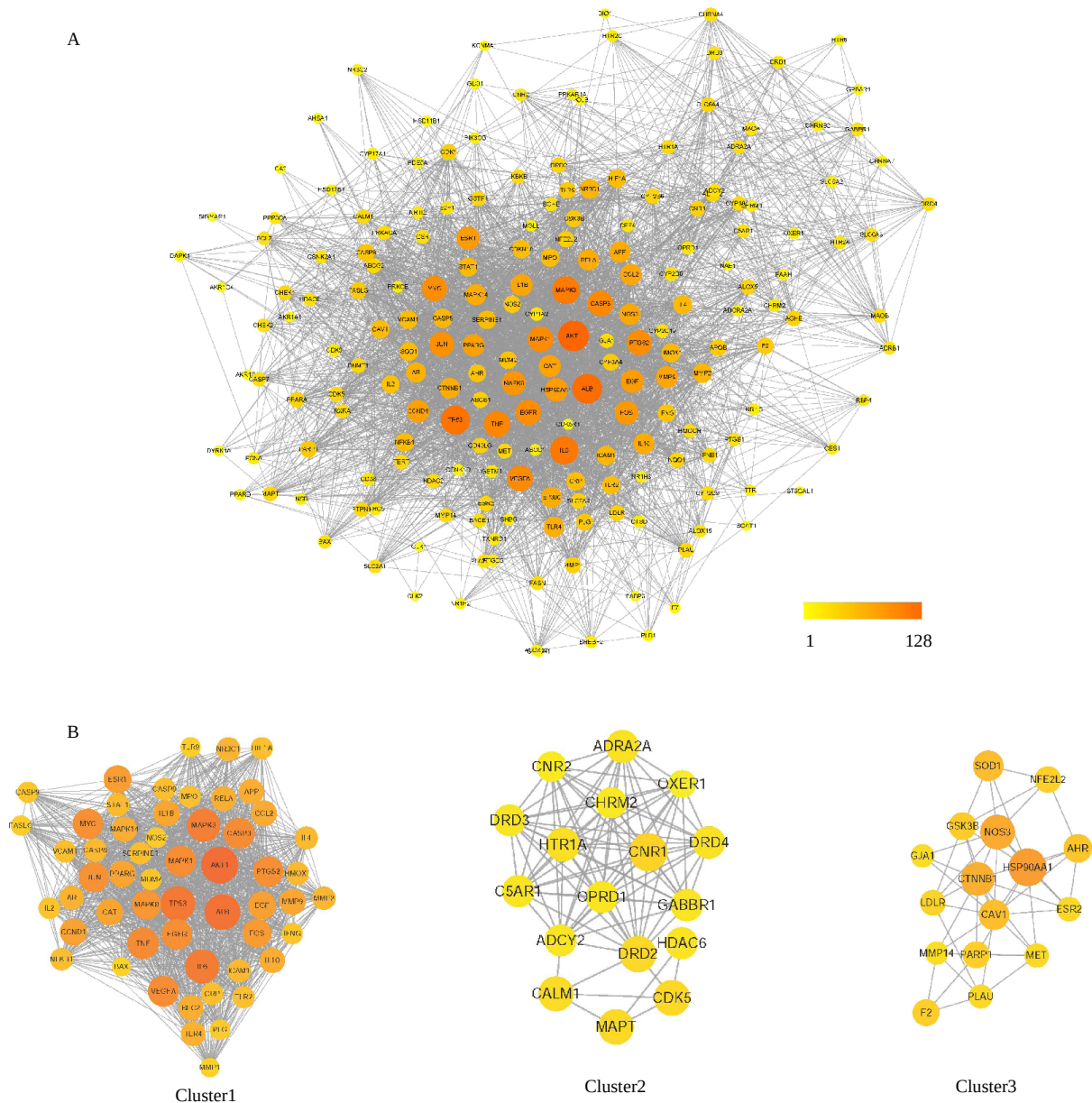
对 PPI 网络核心模块 Cluster1 进行 GO 功能富集分析 (图 3-A), 结果表明 DHYZ 核心作用靶点主要影响凋亡过程、衰老、缺氧反应、炎症和神经元凋亡过程等。其中对生物学过程“凋亡过程”的影响最为密切 (P 值最小) 且有 26 个靶点富集, 另外, DHYZ 预测靶点中有 17 个靶点富集到“神经元凋亡”生物学过程, 说明 DHYZ 对凋亡过程的调控抑制神经元凋亡可能是 DHYZ 治疗 AD 的主要作用机制。进一步通过 KEGG 富集分析发现 (图 3-B), DHYZ 参与 AD 的凋亡途径、脂质代谢途径、炎症等信号途径的调控, 它还参与了多条凋亡相关信号通路的调控, 包括 TNF signaling pathway、PI3K-Akt signaling pathway、p53 signaling pathway 和 NF-kappa B signaling pathway 等。

3.5 DHYZ 对凋亡网络调控的预测

从 GO 和 KEGG 富集结果发现, DHYZ 核心靶点对凋亡网络的调控是最显著的 (P 值最小, 富集靶点数最多), 因此进一步研究利用 KEGG 数据库将 Cluster1 中的蛋白靶点映射到 KEGG Apoptosis (hsa04210) 中, 获得 DHYZ 对细胞凋亡过程调控的网络图 (图 3-C)。结果显示, DHYZ 对凋亡网络的调控主要通过对 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路和 p53 信号通路的调控, 其主要调控的靶点有 TNF、AKT1、MAPK3、NFKB1、TP53、FASL 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3 和 caspase-9 等。

3.6 DHYZ 调控 AD 凋亡网络的实验验证

3.6.1 DHYZ 含药血清对 AD 细胞模型细胞活率和凋亡的影响 MTT 检测结果 (表 2) 显示, 与对照组比, 10 μ mol/L A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后细胞活率显著降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, DHYZ 含药血清能提高 A β 1-42 处理的 SH-SY5Y 细胞的细胞活率, 并呈现出一定的剂量相关性 ($P<0.01$)。流式细胞术检测凋亡结果 (图 4) 显示, 与



A-AD 潜在蛋白靶点的 PPI 网络, 其中圆形节点代表蛋白靶点, 圆圈大小和颜色深浅代表靶点蛋白相互作用的多少 B-PPI 网络的拓扑学分析
A-PPI network of potential protein targets in AD, the circular nodes represent protein targets, and circle size and color depth represent the amount of protein interaction between target proteins B-Topological analysis of PPI network

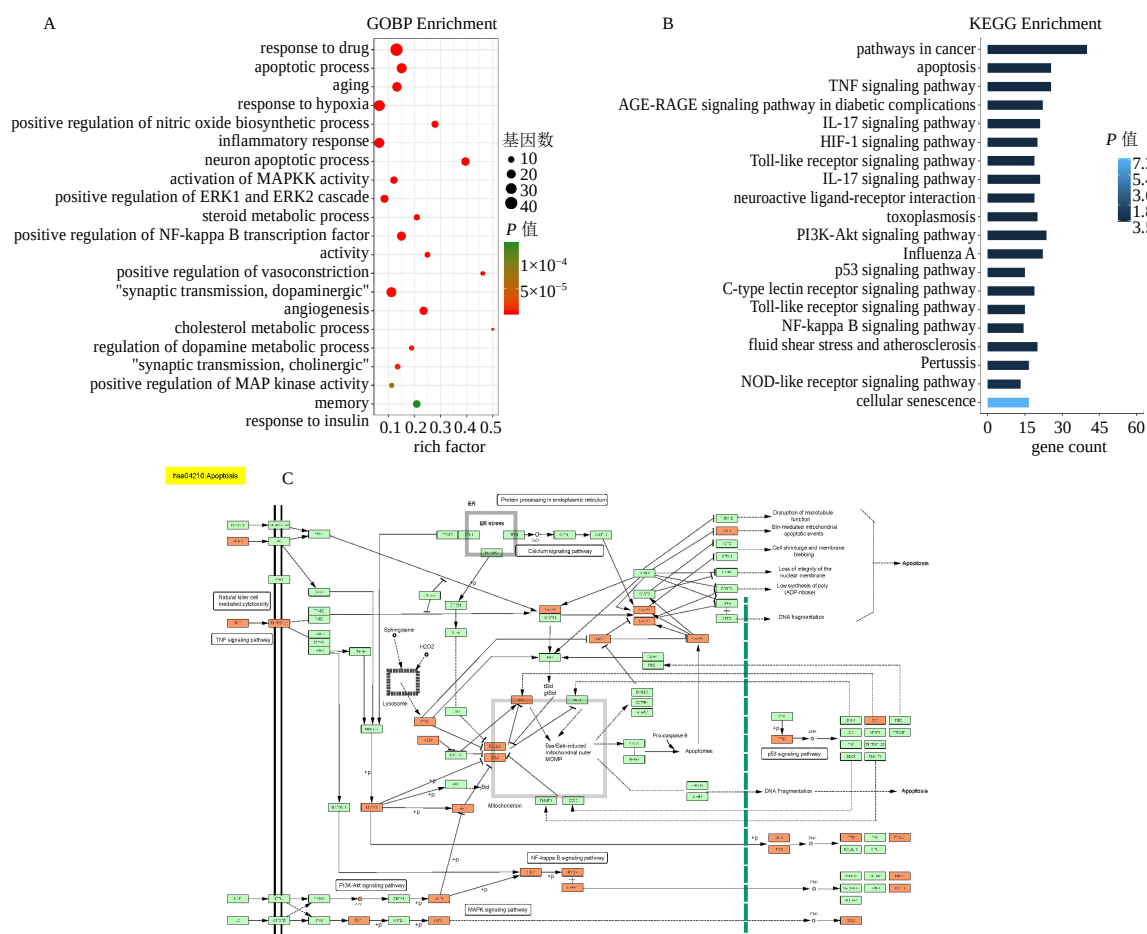
图 2 PPI 网络构建和网络拓扑学分析

Fig. 2 PPI network construction and network topology analysis

空白对照组比, 10 $\mu\text{mol/L}$ A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率为 $(34.80 \pm 6.28) \%$ 。与模型组比, 不同浓度 DHYZ 含药血清干预后, 细胞凋亡率出现不同程度下降, 其中 5% DHYZ 含药血清和 10% DHYZ 含药血清干预后细胞凋亡率为 $(20.20 \pm 4.13) \%$ 、 $(16.50 \pm 3.56) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6.2 DHYZ 治疗 AD 核心靶点的 qPCR 验证和对凋亡相关蛋白的影响 根据“3.5”项结果预测对

DHYZ 凋亡网络的调控预测, 挑选了 TNF、AKT1、NFKB1、TP53 和 CASP3 等基因进行 qPCR 验证。结果显示 (图 5-A), 与对照组比较, A β 1-42 处理后 TNF、NFKB1、TP53 和 CASP3 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$), AKT1 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 不同浓度 DHYZ 含药血清干预后呈现出浓度相关性的逆转, 其中 5% DHYZ 含药血清和 10% DHYZ 含药血清干预后 TNF、NFKB1、TP53 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$),



A-GO 富集分析前 20 个生物学过程 (BP) 按 P 值排序, y 轴表示生物学过程 (BP) 条目, x 轴表示富集到 BP 条目的基因数 B-前 20 名 pathway 富集分析情况, x 轴表示富集到特定通路的基因数量, y 轴表示 pathway 的分类 C-凋亡途径富集分析

A-Top 20 biological processes (BP) of gene ontology (GO) terms sorted by P -value. The y -axis represents BP terms, and the x -axis shows counts of genes were annotated to the BP terms B-Top 20 of pathway enrichment. The x -axis shows the gene number in the given gene set that were annotated to the certain pathways, y -axis represents B level classification of pathways C-Apoptosis pathway enrichment analysis

图 3 DHYZ 治疗 AD 潜在靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of potential target of DHYZ for AD

表 2 不同浓度 DHYZ 含药血清对 $A\beta 1-42$ 处理后 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of DHYZ containing serum of different concentrations on cell viability of $A\beta 1-42$ -induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mL·L ⁻¹)	细胞活率/%
对照	—	1.010 ± 0.021
模型	—	0.579 ± 0.024 ^{##}
2.5% DHYZ	25	0.603 ± 0.022
5% DHYZ	50	0.840 ± 0.019 ^{**}
10% DHYZ	100	0.852 ± 0.019 ^{**}

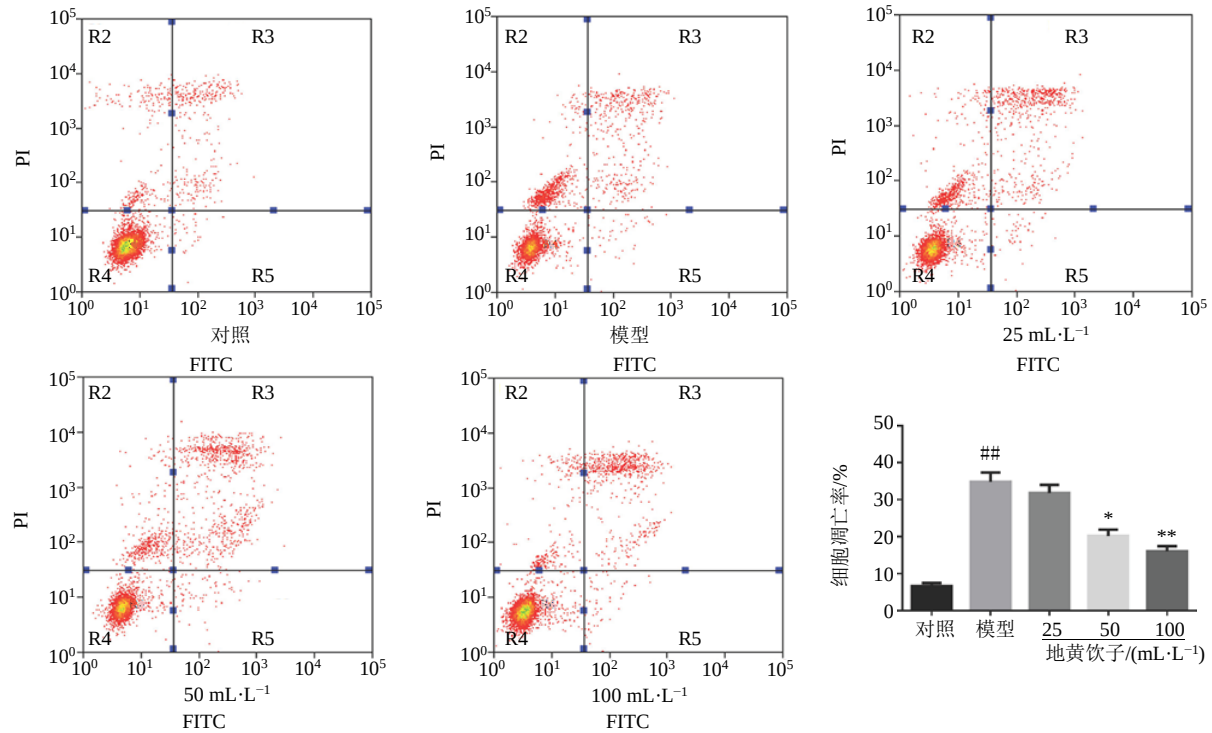
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

AKT1 mRNA 表达呈浓度相关性上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。同时, 检测了 DHYZ 对凋亡相关蛋白的影响, Western blotting 结果 (图 5-B) 显示, 与模型组比较, DHYZ 含药血清干预后 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达出现不同程度下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达显著上升 ($P < 0.01$)。

4 讨论

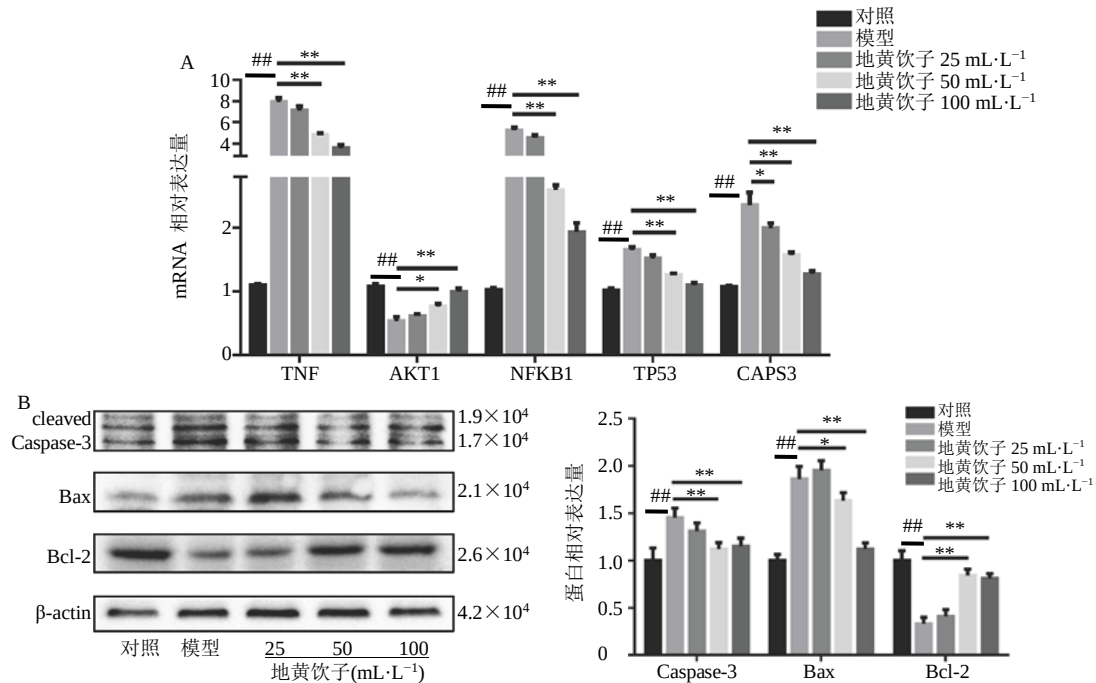
网络药理学和系统药理学可以揭示中药方剂与潜在作用靶点之间潜在的复杂关系, 这与中医药理论的现代化理念相切合^[31]。然而, 由于中药化学成分复杂性, 在实验水平上确定成分-靶点相互作用仍然是非常具有挑战性和费时的, 中药网络药理学研究提供了一种快速高效的方法, 同时它还为确定复杂的发病机制、系统治疗策略和新药开发提供



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as figures below

图 4 DHYZ 对 A β 1-42 处理后 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of DHYZ on apoptosis rate of A β 1-42-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-qPCR 检测细胞凋亡相关基因的表达 ($n = 6$) B-Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白的表达 ($n = 3$)

A-The expression of apoptosis-related genes by qPCR ($n = 6$) B-The expression of apoptosis-related proteins by Western blotting ($n = 3$)

图 5 DHYZ 对 A β 1-42 处理后 SH-SY5Y 细胞凋亡相关基因和蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effect of DHYZ on apoptosis related genes and proteins of A β 1-42-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s$)

指导, 这些策略将有助于缩小中医理论与现代临床应用的差距^[32]。本研究首先利用中药网络药理学方法从系统层面上分析了 DHYZ 多靶点/多途径相互作用治疗 AD 的作用机制, 在此基础上, 根据网络药理学分析结果重点研究了 DHYZ 活性化合物对 AD 细胞凋亡网络的多个靶点和多条信号通路的调控机制。

在分子生物学中, 药物引起机体生物功能的变化需要蛋白的参与, 蛋白质-蛋白质相互作用网络是系统理解药物在细胞中影响生物学过程的重要分析途径。PPI 网络还可用于过滤和评估生物功能的基因组和蛋白组数据, 并能可视化注释蛋白质的功能和它们之间的相互作用关系^[33]。本研究构建了 DHYZ 的 202 个 AD 潜在靶点的 PPI 网络关系图并进行了网络拓扑分析, 从 PPI 网络拓扑学分析结果发现包含 55 个预测靶点的 Cluster1 是 PPI 网络的核心模块, 对凋亡过程的影响是 Cluster1 参与和影响最为密切的生物学过程, 该网络的中心靶点 TNF、AKT1、NFKB1、TP53 和 CAPS 等可能是 DHYZ 调控 AD 凋亡网络的重要作用靶点。研究表明, DHYZ 可以抑制 AD 模型大鼠海马神经元 TNF- α 的表达, 减轻海马神经元的炎症和凋亡^[34], 可以上调 AD 果蝇模型 PI3K、AKT 的表达抑制细胞凋亡来改善 Tau 转基因果蝇的学习记忆能力^[35], 也可以影响抑凋亡基因 Bcl-2 及促凋亡基因 Bax、Caspase-3 的表达^[36]。本实验证实了在 A β 1-42 诱导的 AD 细胞模型中, 地黄饮子含药血清能上调 AKT1 mRNA 的表达, 下调 TNF、NFKB1、TP53 和 CASP3 基因的表达, 这充分证明了网络药理学预测的准确性, 同时也提示地黄饮子抗凋亡的作用机制是通过多靶点、多途径的网络调控实现的。

AD 的主要病理特征是细胞内的神经原纤维缠结和细胞外的 β 淀粉样蛋白沉积而引起如细胞内 Ca^{2+} 超载、氧化应激、神经炎症等最终导致神经元丢失, 而细胞凋亡是导致神经元丢失的重要机制^[37]。多条信号通路参与 AD 脑内神经元凋亡过程, 研究表明, AD 大鼠脑组织中 MAPK、ERK 蛋白表达明显升高, 激活一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)和超氧化物歧化酶(SOD)等氧化应激源导致神经元凋亡, 抑制 MAPK 的转录和翻译可实现对脑内细胞凋亡的抑制作用^[38]。在 AD 中, PI3K 通过其中枢下游靶点 Akt 介导的抗凋亡作用来保护神经元, PI3K-Akt 信号通路通过抑制糖原合成酶激酶-3 β

(GSK-3 β) 蛋白来干扰上游凋亡小体的固有凋亡信号和炎症因子的产生而提供神经保护, PI3K-Akt 信号通路的激活还可以抑制 GSK-3 β 介导的 NF- κ B 激活后炎症反应引起的神经元凋亡^[39]。在 AD 脑内神经元凋亡过程中, JNK/c-Jun 信号通路激活, 促进下游靶蛋白 Bim 和 p53 的表达介导神经元凋亡, 在体外实验中抑制该通路能减少 A β 诱导的神经元凋亡^[40]。基于这些报道和本研究网络药理学的分析结果, 预测 DHYZ 对凋亡网络的调控主要通过: (1) 通过抑制 MAPK 信号通路 Raf、ERK1/2 来促进 Bcl-2 表达从而抑制凋亡; (2) 通过调控 PI3K-Akt 信号通路及下游的 NF- κ B 信号通路抑制凋亡蛋白的表达; (3) 通过调控 JNK/c-Jun 信号通路抑制 p53 和 Fas 介导的凋亡。

另外 GO 和 KEGG 富集分析发现 DHYZ 还参与调控 AD 的炎症反应, 突触传导, 血管生成等, 这些结果表明, DHYZ 多靶点多途径防治 AD 具有广阔的临床应用前景。为了进一步揭示 DHYZ 防治 AD 的具体机制, 从神经元炎症, 突触传递, 脂质代谢过程, 胰岛素抵抗等途径进行进一步的实验验证是值得关注的。总之, 本研究以 DHYZ 防治 AD 为例, 从分子水平到系统水平论证了中医药在治疗复杂疾病方面的有效性, 并从凋亡网络的调控角度预测了地黄饮子防治 AD 的分子机制。

参考文献

- [1] Matej R, Tesar A, Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: A clinical and neuropathological overview [J]. *Clin Biochem*, 2019, 73: 26-27.
- [2] Cai D. Alzheimer's Disease: Advances in molecular pathogenesis [J]. *Neurosci Lett*, 2019, doi: 10.1016/j.neulet.2019.134418.
- [3] Jia J, Wei C, Chen S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491.
- [4] Chu S, Liu S, Duan W, et al. The anti-dementia drug candidate, (-)-clausenamide, improves memory impairment through its multi-target effect [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 162: 179-187.
- [5] 陈刚, 周海娟, 符文雄, 等. 加味地黄饮子治疗脑小血管病所致认知障碍患者的临床疗效及其对神经功能、炎症反应、氧化应激的影响 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(6): 78-81.
- [6] 张丽, 汪园园, 周静波, 等. 地黄饮子干预阿尔茨海默病患者的疗效观察及作用机制探讨 [J]. *中华中医药*

- 杂志, 2018, 33(11): 4948-4952.
- [7] 张志辰, 温彬宇, 高俊峰, 等. 地黄饮子调节 PERK/eIF2 α 通路抑制能量代谢障碍 AD 小鼠脑内 β 淀粉样蛋白累积的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 91-98.
- [8] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, *et al.* Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
- [9] 宋祯彦, 陈易璇, 余婧萍, 等. 钩藤散活性成分治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学分析 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5854-5864.
- [10] 高俊峰, 张志辰, 温彬宇, 等. 地黄饮子对能量障碍致 SH-SY5Y 细胞内质网应激的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 118-123.
- [11] 莫玉言, 侯加卫, 周张玖智, 等. 红花黄色素对 A β _(1-42)诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 40-44.
- [12] Kang P, Kim K Y, Lee H S, *et al.* Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Life Sci*, 2013, 93(24): 955-61.
- [13] Jia C, Zhang J, Yu L, *et al.* Antifungal activity of coumarin against candida albicans is related to apoptosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 445.
- [14] Harini R, Pugalendi K V. Antioxidant and antihyperlipidaemic activity of protocatechuic acid on streptozotocin-diabetic rats [J]. *Redox Rep*, 2010, 15(2): 71-80.
- [15] Doss H M, Samarpita S, Ganesan R, *et al.* Ferulic acid, a dietary polyphenol suppresses osteoclast differentiation and bone erosion via the inhibition of RANKL dependent NF- κ B signalling pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 207: 284-295.
- [16] Zhang W, Liu X, Jiang Y, *et al.* 6-Gingerol attenuates ischemia-reperfusion-induced cell apoptosis in human AC16 cardiomyocytes through HMGB2-JNK1/2-NF- κ B Pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 8798653.
- [17] Choi Y K, Cho G S, Hwang S, *et al.* Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(8): 925-35.
- [18] Yang S, Li L, Zhu L, *et al.* Aucubin inhibits IL-1 β - or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/ CREB1 axis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13639-13648.
- [19] Li Y, Wang H, Yang X. Effects of catalpol on bronchial asthma and its relationship with cytokines [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 8992-8998.
- [20] 马海波. 麦冬化学成分的研究. [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [21] 李曼曼, 张百霞, 何帅兵, 等. 基于“中药作用机理辅助解析系统”的金钗石斛降糖作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3709-3712.
- [22] 王 昊, 赵振宇, 沈 霞, 等. 基于系统药理学研究远志治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 药学报, 2017, 52(10): 1554-1561.
- [23] 贾 皓, 庞晓丛, 赵 赢, 等. 远志治疗阿尔茨海默病的网络药理学作用机制 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(04): 398-404.
- [24] Lu Z, Wang H, Zhu M, *et al.* Ophiopogonin D', a natural product from *Radix Ophiopogonis*, induces *in vitro* and *in vivo* RIPK1-dependent and caspase-independent apoptotic death in androgen-independent human prostate cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 432.
- [25] Zhang Y, Han Y, Zhao Y, *et al.* DT-13 Ameliorates TNF- α -induced vascular endothelial hyperpermeability via non-muscle myosin IIA and the Src/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 925.
- [26] Chen C Y, Wei X D, Chen C R. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae Radix* exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 131(1): 1-5.
- [27] Li C, Wang Y, Wang C, *et al.* Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2017, 28: 10-18.
- [28] Li X, Cui J, Yu Y, *et al.* Traditional Chinese nootropic medicine *Radix Polygalae* and its active constituent onjisaponin B reduce β -amyloid production and improve cognitive impairments [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151147.
- [29] Yousof A M, Jung H A, Choi J S. Anti-diabetic and anti-Alzheimer's disease activities of *Angelica decursiva* [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(12): 2216-2227.
- [30] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-504.
- [31] Ehrman T M, Barlow D J, Hylands P J. In silico search for multi-target anti-inflammatories in Chinese herbs and formulas [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(6): 2204-2218.
- [32] Fang J, Liu C, Wang Q, *et al.* In silico polypharmacology of natural products [J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(6): 1153-1171.
- [33] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* STRING

- v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 447-452.
- [34] 宋琳, 安平, 朴钟源, 等. 地黄饮子对老年性痴呆模型大鼠的学习记忆及炎症反应的影响 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1654-1656.
- [35] 关慧波, 刘莹, 徐丽, 等. 地黄饮子对转 tau 基因果蝇 AD 模型 PI3K/AKT/dTOR 信号通路基因表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(10): 85-88.
- [36] 周妍妍, 刘艳丽, 董春雪. 地黄饮子对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠细胞凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014(10): 3306-3308.
- [37] Jeon S G, Hong S B, Nam Y, *et al.* Ghrelin in Alzheimer's disease: Pathologic roles and therapeutic implications [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55: 100945.
- [38] Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 108: 21-43.
- [39] Kamarudin M N, Mohd Raflee N A, Hussein S S, *et al.* (R)-(+)- α -lipoic acid protected NG108-15 cells against H₂O₂-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3 β pathway and suppression of NF- κ B-cytokines [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1765-1780.
- [40] Akhter R, Sanphui P, Das H, *et al.* The regulation of p53 up-regulated modulator of apoptosis by JNK/c-Jun pathway in β -amyloid-induced neuron death [J]. *J Neurochem*, 2015, 134(6): 1091-1103.