

佛手散治疗阿尔茨海默病分子机制的系统药理学研究

冯丽旋, 郭鹏飞, 周丽桂, 谢清华, 张永斌, 郭学军 (广州中医药大学实验动物中心, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 利用系统药理学方法和体外实验探究佛手散治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的分子机制。**方法** 利用 TCMSp、TCM-Mesh、ETCM 和 TCMID 数据库筛选佛手散的活性成分; 利用 TCMSp、ETCM 和 PharmMapper 数据库对活性成分进行作用靶点预测。利用 DisGeNet、GAD、CTD、TTD、HPO 和 Orphadata 数据库筛选出 AD 疾病相关靶点, 并与佛手散活性成分作用靶点映射取交集, 交集基因即为佛手散治疗 AD 的潜在作用靶点。通过 String 数据库构建佛手散治疗 AD 潜在作用靶点的蛋白互作 (PPI) 网络; 利用 Cytoscape 3.6.1 软件构建“活性成分-潜在作用靶点”网络。通过 WebSestalt 及 David 分析平台对潜在作用靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 并进行体外实验验证。**结果** 共筛选出佛手散 52 个活性成分, 预测得到 185 个共同靶点, 最终确定 31 个佛手散治疗 AD 的潜在作用靶点。GO 功能富集分析结果表明, 潜在作用靶点参与生物调控、刺激反应、细胞间通讯等生物学过程; 细胞膜、蛋白复合物、囊泡参与等细胞组分; 蛋白结合、离子结合、分子转导活性、水解酶活性等分子功能。KEGG 富集分析得到 13 条信号通路。体外实验结果表明, 佛手散对谷氨酸钠诱导损伤的 PC12 细胞有保护作用, 可通过降低胞内 Ca^{2+} 浓度和 NO 含量达到降低细胞凋亡率的效果。**结论** 佛手散在治疗 AD 方面具有多成分、多靶点、多途径的整体调控特点, 可能与其通过豆甾醇、Z-藁本内酯、藁本内酯、 β -谷甾醇等活性成分调控 5-羟色胺能突触通路、神经配体-受体交互作用通路、 Ca^{2+} 信号通路以及 cGMP-PKG 信号通路等多通路有关。

关键词: 佛手散; 阿尔茨海默病; 系统药理; 钙离子; 一氧化氮; 神经细胞凋亡

中图分类号: R285.5; R857.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1622-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.005

An Insight into the Molecular Mechanism of *Foshou* Powder against Alzheimer's Disease Based on Systems Pharmacology and Experimental Validation

FENG Lixuan, GUO Pengfei, ZHOU Ligui, XIE Qinghua, ZHANG Yongbin, GUO Xuejun (Laboratory Animal Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease (AD) by systematic pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** The active ingredients of *Foshou* powder were screened by TCMSp, TCM-Mesh, ETCM and TCMID database, and the targets of the active ingredients were predicted by TCMSp, PharmMapper and the MedChem Studio of ETCM database. The targets related to AD were screened by DisGeNet, GAD, CTD, TTTD, HPO and Orphadata database, and then the compound-target network was obtained by mapping AD related targets with active ingredients targets. Subsequently, candidate targets and components were screened by PPI network constructed using String database, and drug-target network was built using Cytoscape 3.6.1 software. Finally, GO analysis and KEGG enrichment analysis were carried out using WebSestalt and David tools, and verified by *in vitro* experiments. **Results** There were 52 active ingredients

收稿日期: 2021-04-13

作者简介: 冯丽旋, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合基础研究。Email: debbie40@163.com。通信作者: 张永斌, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 动物模型研究。Email: yongbinzhang@gzucm.edu.cn。郭学军, 男, 副研究员, 研究方向: 中西医结合基础研究。Email: dwzxgj@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省科学技术厅项目(2015A030302072); 广州中医药大学 2017 年度“高水平大学建设”面上项目(A1-AFD018171Z11029)。

corresponding to 185 targets and finally narrowed down to 31 targets related to AD in *Foshou* powder. Results of enrichment analysis showed that the targets were involved in biological processes such as biological regulation, response to stimulus and cell communication; cellular component such as membrane, protein-containing complex, cell projection and vesicle participate; and molecular functions such as protein binding, ion binding, molecular transducer activity and hydrolase activity. KEGG enrichment analysis revealed 13 signaling pathways. *In vitro* experiments showed that *Foshou* powder could protect neurons by reducing the apoptosis, the concentration of Ca^{2+} and the content of NO in monosodium glutamate-induced PC12 cells. **Conclusion** *Foshou* powder has the characteristics of overall regulation by multi component-multi-target-multi-channel in the treatment of AD, acts on the serotonergic synapse pathway, neuroactive ligand-receptor interaction pathway, Ca^{2+} signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway, etc., through stigmasterol, (Z)-ligustilide, ligustilide, sitosterol and other active ingredients.

Keywords: *Foshou* powder; Alzheimer's disease; systems pharmacology; calcium ion; nitric oxide; neuronal apoptosis

65 岁以上人群容易患上阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)而导致残疾。我国老年痴呆症患者数量约占全球患者总数的 25%^[1-2]。AD 是一种神经退行性疾病,可恶化记忆、认知、行为并导致痴呆^[3-4]。为了阐明其发病机制,研究人员提出与 AD 有关的 Tau 假说、胆碱能假说和氧化应激等假说^[5-7],但其机制仍不清楚。

近年来,中医药在改善 AD 症状方面取得了一定进展,越来越多学者对中医药治疗 AD 的作用机制进行了深入研究^[8-10]。佛手散由当归、川芎组成,具有活血化瘀的功效,广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[11-13]。在体外实验^[14]中,佛手散中的当归、川芎能够通过显著的协同作用发挥防治帕金森病的作用。佛手散水煎剂可改善实验性脑缺血所致大鼠神经行为学障碍、脑水肿程度以及脑梗死体积^[15]。此外,佛手散还可通过调节肠-肝-脑轴改善 APP/PS1 小鼠肠道微生物群的失调,调节碱性磷酸酶活性及脂多糖、丙二醛水平,从而改善 AD 小鼠的认知功能^[16]。然而,佛手散治疗 AD 的生物活性物质和作用机制尚不明确。

系统药理学是从整体角度解释传统中药治疗疾病复杂机制的有效手段,尤其是对中药“多成分、多靶点”的网络机制分析^[17-18]。因此,本研究拟基于系统药理学方法构建活性成分-靶点网络,通过蛋白互作(PPI)网络筛选治疗 AD 的候选靶点,结合 GO 功能及 KEGG 通路富集分析探讨佛手散治疗 AD 的物质基础和作用机制,并以体外实验对相关通路进行验证。

1 材料

1.1 仪器 超净工作台,苏州净化设备公司;Multiscan MK3 型酶标仪,美国 Thermo Fisher 科技公司;FACSCalibur 型流式细胞仪,美国 BD 公司;INC108 型细胞培养箱,德国 Memmert 公司。

1.2 药品及试剂 当归(批号:161101)、川芎(批号:170401)饮片,均购自广州中医药大学第一附属医院,经广州中医药大学喻良文副教授鉴定分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根和伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。CCK-8 试剂盒,批号:CK04,日本同仁化学研究所;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒,批号:AP101,杭州联科生物技术股份有限公司;一氧化氮测定试剂盒,批号:A013-2,南京建城生物工程研究所;Fluo-3 AM 钙离子荧光探针,批号:S1056,上海碧云天生物技术公司;胎牛血清,批号:10099-141,美国 Thermo Fisher 科技公司;RPMI-1640 培养基,批号:SH30809.01B,美国 HyClone 公司;胰蛋白酶,批号:9002-07-7,澳大利亚 GENVIEW 公司;其他试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 细胞 PC12 细胞,购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.4 数据库及软件 TCMS 数据库(<https://tcmsp.com/tcmsp.php/>), TCM-Mesh 数据库(<http://mesh.tcm.microbioinformatics.org/>), ETCM 数据库(<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>), TCMID 数据库(<http://www.megabionet.org/tcmid/>), PharmMapper 数

数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>), UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>), DisGeNet 数据库(<http://www.disgenet.org>), GAD 数据库(<https://geneticassociationdb.nih.gov/>), CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>), TTD 数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/>), HPO 数据库(<http://human-phenotype-ontology.github.io/>), Orphadata 数据库(orphadata.org/cgi-bin/i), VENN 2.1 可视化平台(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), String 数据库(<https://www.string-db.org/>), David 6.8 在线分析软件(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), WebSestalt(<http://www.webgestalt.org>) 在线分析软件, 微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>), Cytoscape 3.6.1 软件。

2 方法

2.1 活性成分筛选 利用 TCMSp、TCM-Mesh、ETCM 及 TCMID 数据库检索“当归”和“川芎”的化学成分, 筛选符合 $OB \geq 30\%$ 、 $Caco-2 \geq -0.4$ 、 $BBB \geq -0.3$ 、 $HL \geq 4$ 和 $180 \leq Mw \leq 500$ 条件的活性成分, 并根据文献进行补充。

2.2 活性成分作用靶点预测 通过 TCMSp、ETCM 和 PharmMapper 数据库对“2.1”项下筛选得到的活性成分进行靶点预测。其中 PharmMapper 数据库基于药效团模型进行预测, 选择 Norm Fit > 0.7 的靶点作为佛手散有效成分的潜在作用靶点。然后, 利用 UniProt 数据库确认靶点信息, 限定物种为“Homo sapiens”, 剔除非人源靶点和重复靶点。

2.3 AD 疾病相关靶点预测 利用 DisGeNet、GAD、CTD、TTD、HPO 和 Orphadata 数据库检索 AD 疾病相关靶点, 检索关键词为“Alzheimer's disease”。将“2.2”项下获得的活性成分作用靶点与 AD 疾病相关靶点通过 VENN 平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)映射取交集, 所得交集基因即为佛手散治疗 AD 的潜在作用靶点。

2.4 潜在作用靶点的 PPI 网络构建 通过 String 数据库构建佛手散治疗 AD 潜在作用靶点的 PPI 网络。设置置信度(Medium_confidence) ≥ 0.4 作为筛选条件, 获得潜在作用靶点的互作关系, 并通过 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化处理。

2.5 佛手散治疗 AD 的活性成分-潜在作用靶点网络构建 将佛手散活性成分信息与潜在作用靶点信息导入 Cytoscape 3.6.1 软件中, 构建“活性成分-潜在作用靶点”网络。不同节点代表活性成分和靶点,

节点之间的连线代表活性成分与靶点的相互作用。以度(Degree)值筛选佛手散治疗 AD 的关键活性成分及关键作用靶点。

2.6 潜在作用靶点的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将“2.3”项下获得的潜在作用靶点导入 WebSestalt 及 David 分析平台, 分别进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析包括生物学过程分析、分子功能分析和细胞组分分析, KEGG 主要包括信号通路分析, 通过微生信在线平台对 KEGG 通路富集分析结果进行可视化。

2.7 佛手散药液的制备^[15] 按 3:2 的质量比称取当归、川芎, 加入 8 倍体积的水煎煮 2 h, 收集药液; 再加入 6 倍体积的水继续煎煮 2 h, 收集药液; 混合 2 次药液, 以 60 ℃浓缩药液至终浓度为 $0.64 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, -20 ℃下保存备用。使用前将浓缩药液从冰箱中取出, 解冻, 用蒸馏水稀释至所需浓度。

2.8 细胞培养及分组 PC12 细胞用含有 10% FBS 及 1% PS 的 RPMI-1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2 相对饱和湿度条件下培养, 每 2~3 d 更换 1 次培养基。当细胞生长至 80% 时, 用胰酶消化后, 制备成单细胞悬液进行实验。将细胞随机分为正常组、模型组及佛手散高、中、低剂量组(128 、 64 、 $32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[19]。

2.9 CCK-8 法测定细胞活力 调整 PC12 细胞密度为每孔 8×10^3 个, 接种于 96 孔板中过夜; 佛手散高、中、低剂量组按照“2.8”项下分组及预给药孵育 1 h 后, 除正常组外, 每组加入 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠孵育 24 h。弃去培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 检测工作液, 培养箱内孵育 1 h, 采用酶标仪于 450 nm 处测定 OD 值。

2.10 流式细胞术检测细胞凋亡 调整 PC12 细胞密度为每孔 1×10^5 个, 接种到 6 孔板中过夜; 佛手散高、中、低剂量组按照“2.8”项下分组及预给药孵育 1 h 后, 除正常组外, 每组加入 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠孵育 24 h。弃去培养液, 用 PBS 润洗细胞后, 每孔加入 0.5 mL 0.25% 胰酶消化; 以 $100 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬细胞后转移至流式管; 以 $100 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 $200 \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC/PI, 室温下避光孵育 15 min; 最后, 采用流式细胞仪检测细胞悬液。

2.11 流式细胞术检测 Ca^{2+} 浓度 调整 PC12 细胞密度为每孔 1×10^5 个, 接种到 6 孔板中过夜; 佛手散高、中、低剂量组按照“2.8”项下分组及预给药孵育 1 h 后, 除正常组外, 每组加入 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠

孵育 24 h。弃去培养液, PBS 润洗细胞后, 用含 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fluo-3 AM 的无血清培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h; PBS 适当洗涤后, 加入新的无血清培养基再孵育 20 min, 以确保 Fluo-3 AM 完全转变成 Fluo-3; PBS 润洗细胞后, 每孔加入 0.5 mL 0.25% 胰酶消化; 以 $100\times g$ 离心 5 min, 弃上清; PBS 重悬细胞后转移至流式管, 以 $100\times g$ 离心 5 min, 弃上清; 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS 重悬细胞后, 采用流式细胞仪检测 Ca^{2+} 浓度。

2.12 NO 浓度检测 将 PC12 细胞接种到 48 孔板中过夜, 佛手散高、中、低剂量组按照“2.8”项下分组及预给药孵育 1 h 后, 除正常组外, 每组加入 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠孵育 24 h; 收集各孔细胞培养液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 按 NO 检测试剂盒说明书步骤进行检测。

2.13 统计学处理方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 佛手散的活性成分 通过 TCMSP、TCM-Mesh、ETCM、TCMID 4 个数据库分别检索到佛手散 157、20、26、159 种化学成分, 经筛选后得到当归、川芎中的活性成分为 19、40 个, 去除重复后共得到 52 种活性成分, 见表 1。其中的藁本内酯虽然 OB 值相对较低 (23.5%), 但其为中药当归、川芎中含量较高的活性成分之一, 药理作用众多^[20]。体内实验^[21]证明, 藁本内酯可通过改善线粒体动力学和形态学的功能, 降低脑内 β -淀粉样蛋白 ($\text{A}\beta$) 水平和恢复突触结构, 从而改善 APP/PS1 模型小鼠的认知功能障碍。体外实验^[22]证明, 藁本内酯可通过提高细胞活力, 降低 LDH 的释放和细胞内活性氧 (ROS) 的积累, 以及抑制 p38 和激活 PI3-K/Akt 信号通路, 保护 SH-SY5Y 细胞和 PC12 细胞免受的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 纤维聚集物诱导的神经毒性。因此, 将藁本内酯也纳入佛手散活性成分中。

表 1 佛手散中当归、川芎的活性成分

Table 1 The active ingredients of Angelicae sinensis radix and Chuanxiong rhizoma in Foshou powder

Mol ID	活性成分	中文名称	CAS 号	分子量	OB/%	BBB	Caco2	HL	来源
MOL002122	(Z)-Ligustilide	Z-藁本内酯	551-08-6	188.24	53.72	1.25	1.30	5.61	当归/川芎
MOL002098	Senkyunolide B	-	93236-67-0	204.24	62.68	0.90	1.00	4.66	当归/川芎
MOL002143	Senkyunolide C	洋川芎内酯 C	91652-78-7	204.24	46.80	0.50	0.87	5.80	当归/川芎
MOL000359	β -sitosterol	β -谷甾醇	64997-52-0	414.79	36.91	0.87	1.32	5.37	当归/川芎
MOL002208	Senkyunolide A	(3S)-3-丁基-4,5-二氢-1(3H)-异苯并呋喃酮	63038-10-8	192.28	68.28	1.40	1.28	5.49	当归/川芎
MOL000937	(-)-Isolene	(-)-异喇唎烯	95910-36-4	204.39	49.01	2.08	1.82	12.47	当归
MOL000208	(+)-Aromadendrene	(+)-香橙烯	489-39-4	204.39	55.74	2.06	1.81	11.84	当归
MOL002204	Linolyl alcohol	亚麻醇	506-43-4	266.52	37.76	1.02	1.41	6.14	当归
MOL002201	Ligustilide A	藁本内酯 A	81944-09-4	190.26	51.30	1.24	1.30	5.53	当归
MOL002150	1-acetyl- β -carboline	1-乙酰基- β -咔啉	50892-83-6	210.25	67.12	0.81	1.18	23.47	当归
MOL002096	(+)- α -funebrene	α -柏木萜烯	50894-66-1	204.39	52.87	2.08	1.79	4.89	当归
MOL002181	4-hydroxy-3-butylphthalide	4-羟基-3-丁基苯酞	74459-23-7	206.26	70.31	0.69	0.90	4.81	当归
MOL002178	4,7-dihydroxy-3-butylphthalide	4,7-二羟基-3-丁基苯酞	-	222.26	106.09	0.44	0.69	4.63	当归
MOL002112	α -Selinene	α -芹子烯	473-13-2	218.42	31.81	2.14	1.82	9.15	当归
MOL002165	Benzoic acid	苯甲酸	64624-87-9	220.29	69.28	0.91	0.91	18.16	当归
MOL002124	β -asarone	β -细辛脑	5273-86-9	208.28	35.61	1.24	1.45	4.46	当归
MOL002120	β -cubebene	β -草澄茄烯	13744-15-5	204.39	32.16	2.13	1.82	6.68	当归
MOL000196	L-bornyl acetate	左旋乙酸冰片酯	5655-61-8	196.32	65.52	1.59	1.29	6.94	当归
MOL002190	Cedrene	雪松烯	11028-42-5	204.39	51.14	2.12	1.82	5.04	当归
MOL002127	Cnidilide	川芎内酯 A	3674-03-1	194.30	77.55	1.41	1.21	6.05	当归
MOL001494	Ethyl linoleate	亚油酸乙酯	544-35-4	308.56	42.00	1.14	1.46	5.39	当归
MOL001390	(-)-Globulol	蓝桉醇	489-41-8	222.41	85.51	1.46	1.29	12.06	当归
MOL002136	Neocnidilide	新蛇床内酯	4567-33-3	194.30	83.83	1.32	1.23	5.38	当归
MOL000131	Linoleic acid	亚油酸	2197-37-7	280.50	41.90	0.90	1.16	7.50	当归
MOL001641	Methyl linoleate	亚油酸甲酯	112-63-0	294.53	41.93	1.08	1.44	6.05	当归

(续表 1)

Mol ID	活性成分	中文名称	CAS 号	分子量	OB/%	BBB	Caco2	HL	来源
MOL002203	Exceparl M-OL	-	61788-34-9	296.55	31.90	1.08	1.39	5.43	当归
MOL000675	Oleic acid	油酸	17156-84-2	282.52	33.13	0.78	1.17	4.99	当归
MOL002142	Sedanoic acid	瑟丹酸	6697-07-0	210.30	44.69	0.37	0.37	4.75	当归
MOL002146	Senkyunolide F	洋川芎内酯 F	94530-84-4	206.26	40.35	0.35	0.61	7.36	当归
MOL002209	Senkyunolide G	洋川芎内酯 G	94530-85-5	208.28	39.52	0.48	0.63	6.13	当归
MOL002153	Spathulenol	桉油烯醇	6750-60-3	220.39	82.33	1.49	1.37	12.04	当归
MOL000302	Hendecanoic acid	十一烷酸	112-37-8	186.33	30.14	0.94	0.98	4.93	当归
MOL002189	3-N-Butylphthalid	正丁基苯酞	6066-49-5	190.26	47.90	1.32	1.30	5.75	当归
MOL002157	Wallichilide	川芎萜内酯	93236-64-7	412.57	42.31	0.73	0.82	6.85	当归
MOL000165	2-[(2S, 5S, 6S)-6, 10-dimethylspiro [4.5]dec-9-en-2-yl]propan-2-ol	-	1460-73-7	222.41	37.62	1.53	1.44	7.67	当归
MOL002140	Perlyolirine	川芎噻	29700-20-7	264.30	65.95	0.15	0.88	12.62	当归
MOL011770	Senkyunolide J	-	94530-86-6	226.30	42.34	-0.13	0.06	4.17	当归
MOL001193	Caryophyllene oxide	石竹素	1139-30-6	235.38	45.75	1.27	1.09	7.08	当归
MOL008285	Butylphthalide	芹菜甲素	6066-49-5	190.26	55.05	1.37	1.30	5.65	川芎
MOL008259	2,6-diphenyl-4H-thiopyran-4-thione	-	1029-97-6	280.43	69.13	1.29	1.74	6.76	川芎
MOL008277	7,10-pentadecadiynoic acid	-	22117-06-2	234.37	41.50	0.57	1.32	6.38	川芎
MOL008287	3-butylidene-7-hydroxy-2-benzofuran-1-one	-	103659-69-4	204.24	42.17	0.94	1.03	4.75	川芎
MOL008256	Cedrene epoxide	环氧柏木烯	29597-36-2	204.39	55.56	2.05	1.79	4.82	川芎
MOL000162	(-)-β-Chamigrene	花柏烯	18431-82-8	204.39	31.99	2.07	1.82	8.59	川芎
MOL008251	Sedanolid	芹菜子交酯	6415-59-4	194.30	62.46	1.40	1.24	5.05	川芎
MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	83-48-7	412.77	43.83	1.00	1.44	5.57	川芎
MOL008265	Methyl 2-pentanoylbenzoate	2-戊酰基苯甲酸	64624-87-9	206.26	78.26	0.45	0.61	17.78	川芎
MOL010553	β-bisabolene	β-红没药烯	495-61-4	186.32	33.46	1.97	1.93	5.17	川芎
MOL008286	Camphoric acid	L-樟脑酸	560-09-8	200.26	99.13	0.13	0.1	12.15	川芎
MOL011445	α-cedrene	α-柏木烯	469-61-4	204.39	50.90	2.17	1.85	5.51	川芎
MOL005021	Mipax	邻苯二甲酸二甲酯	131-11-3	194.20	57.40	0.63	0.64	5.56	川芎
MOL011782	Ligustilide	藁本内酯	4431-01-0	190.26	23.50	1.20	1.28	-	当归/川芎

2.2 佛手散治疗 AD 的潜在作用靶点及其 PPI 网络构建 佛手散的 52 个有效活性成分共预测得到 346 个作用靶点，其中当归、川芎的共同靶点 185 个。将 185 个共同靶点与 236 个 AD 疾病相关靶点映射取交集，最终确定 31 个佛手散治疗 AD 的潜在作用靶点，见图 1。将 31 个靶标进行 PPI 网络构建，见图 2。该网络包括 31 个节点，84 条边，且置信度 ≥ 0.4 。其中，连接分数排前 5 位的 PPI 分别是 PPARG-RXRA、ESR1-IGF1R、ESR1-NOS3、PPARA-RXRA 和 PPARD-RXRA。

2.3 佛手散治疗 AD 的“活性成分-潜在作用靶点”网络 结果见图 3。该网络由 83 个节点和 401 条边组成。度值(Degree 值)为节点所连接边的数量，Degree 值越大提示节点枢纽性越强，说明该成分在整个网络中的调控作用越强，Degree 值排前 10 位的活性成分为豆甾醇、亚油酸、3-butylidene-7-

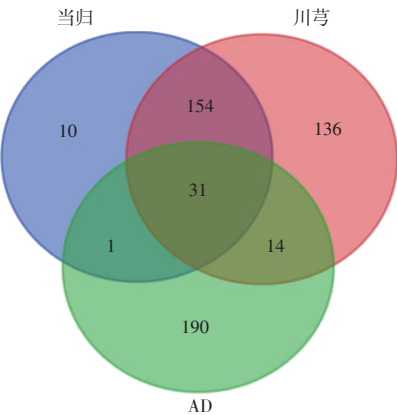


图 1 佛手散治疗阿尔茨海默病(AD)的潜在作用靶点
Figure 1 Potential therapeutic targets of Foshou powder in the treatment of Alzheimer's disease

hydroxy-2-benzofuran-1-one、Z-藁本内酯、2-戊酰基苯甲酸、β-谷甾醇、α-芹子烯、油酸、十一烷酸和 Exceparl M-OL。另外，31 个靶标可同时参与多个

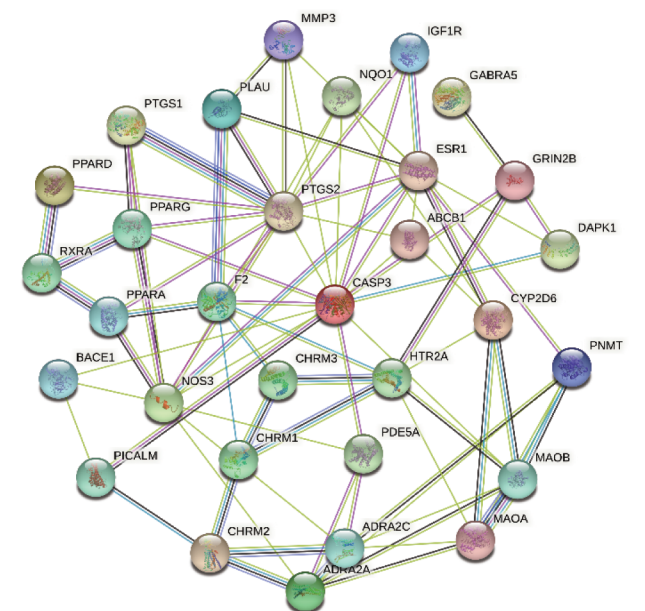


图 2 佛手散治疗阿尔茨海默病潜在作用靶点的蛋白互作 (PPI) 网络

Figure 2 Protein-protein interaction network for the potential targets of *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease

活性成分的调控, Degree 值排前 10 位的潜在作用靶点为 PTGS2、PPARD、ESR1、BACE1、CHRM1、PTGS1、CHRM3、CHRM2、RXRA 和 ADRA2A。结果表明, 上述活性成分和靶点在佛手散治疗 AD 过程中可能发挥关键调控作用。

2.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析结果见图 4。31 个潜在作用靶点富集得到 12 个生物学过程 (BP) 条目, 主要涉及生物调控

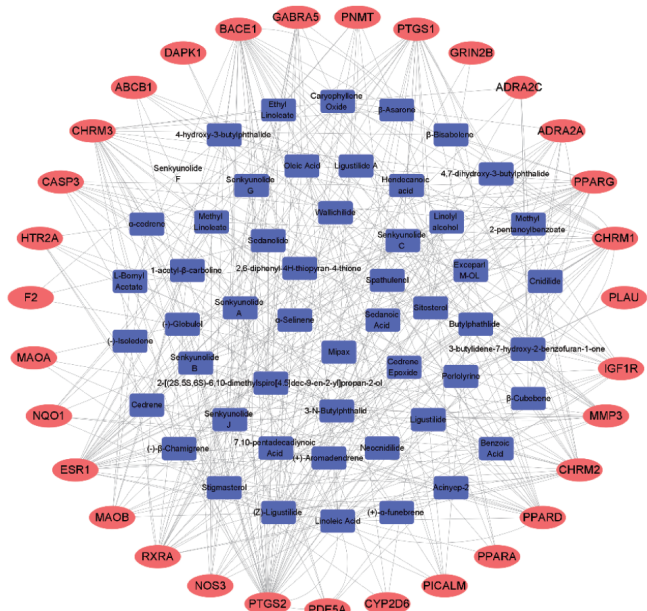


图 3 佛手散治疗阿尔茨海默病的“活性成分-潜在作用靶点”网络

Figure 3 Network of “Active components-potential therapeutic target” for *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease

(Biological regulation)、刺激反应 (Response to stimulus)、细胞间通讯 (Cell communication) 等相关作用; 细胞组分 (CC) 共富集得到 18 个条目, 主要涉及膜 (Membran)、蛋白质复合物 (Protein-containing complex)、细胞突起 (Cell projection)、囊泡参与

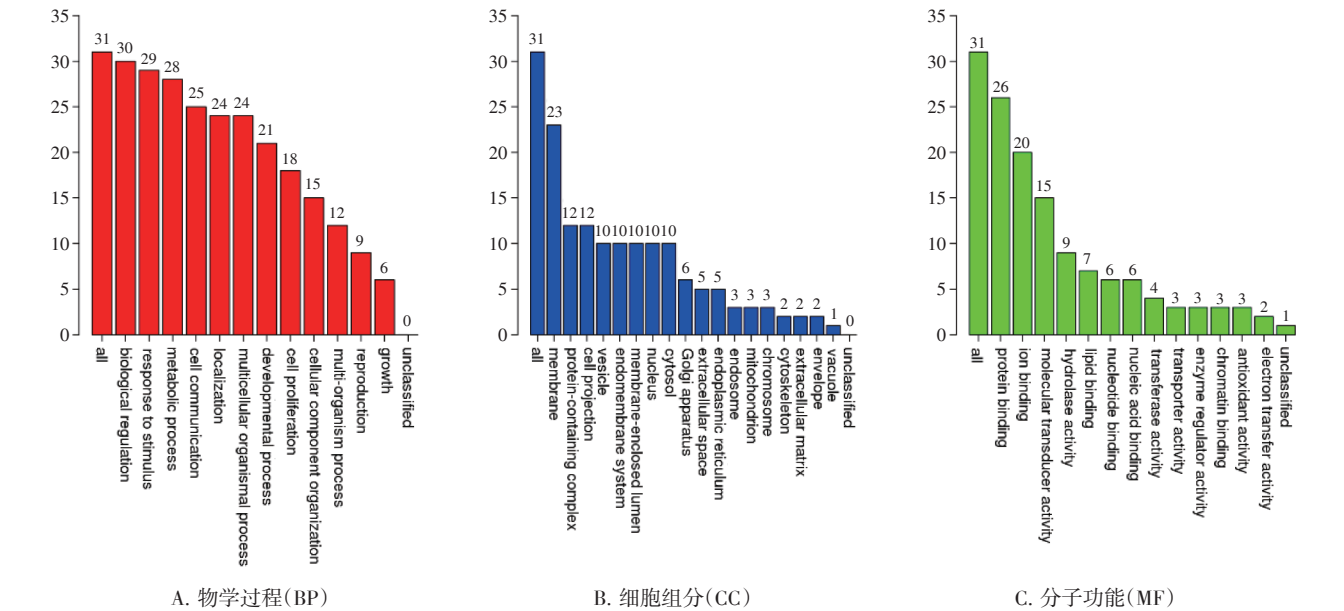


图 4 佛手散治疗阿尔茨海默病的 GO 功能富集分析

Figure 4 Gene ontology enrichment analysis of *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease

(Vesicle participate)等; 分子功能(MF)共富集得到14个条目, 主要涉及蛋白结合(Protein binding)、离子结合(Ion binding)、分子转导活性(Molecular transducer activity)、水解酶活性(Hydrolase activity)等。

KEGG 富集分析得到13条信号通路, 见图5、表2。排前5位的通路包括5-羟色胺能突触(Serotonergic synapse)、神经配体-受体交互作用(Neuroactive ligand-receptor interaction)、PPAR 信号通路(PPAR signaling pathway)、癌症中的转录失调(Transcriptional misregulation in cancer)和癌症中的通路(Pathways in cancer)。将13条信号通路映射到KEGG 数据库进行分类, 发现主要涉及神经系统、内分泌系统、信号转导和癌症等。其中, 5-羟色胺能突触和神经配体-受体交互作用这2条通路是富集显著性最大的通路, 同时也是潜在作用靶点参与最多的通路。其中, 5-羟色胺能突触属于人类神经系统, 涉及的基因包括 CASP3、PTGS2、MAOA、PTGS1、MAOB、CYP2D6、HTR2A; 神经配体-受体交互作用涉及的基因包括 GRIN2B、CHRM3、CHRM2、CHRM1、F2、GABRA5、ADRA2A、ADRA2C、HTR2A。

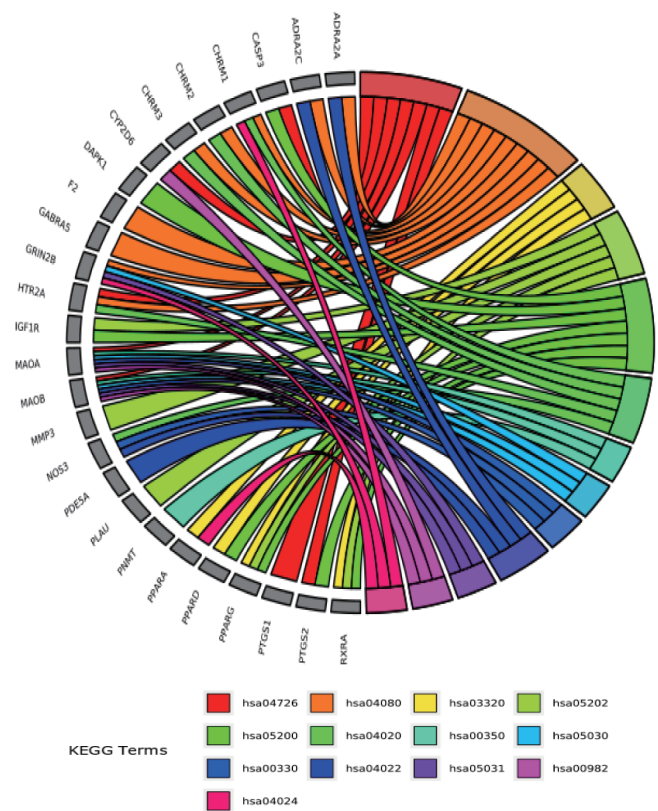


图5 佛手散治疗阿尔茨海默病的 KEGG 通路富集分析
Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease

表2 佛手散治疗阿尔茨海默病的 KEGG 通路富集分析

Table 2 KEGG pathway enrichment analysis of *Foshou* powder in the treatment of Alzheimer's disease

KEGG 编号	KEGG 通路	中文注释	靶点数/个	P 值	基因
hsa04726	Serotonergic synapse	5-羟色胺能突触	7	0.000 005 4	CASP3、PTGS2、MAOA、PTGS1、MAOB、CYP2D6、HTR2A
hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	神经配体-受体交互作用	9	0.000 012 8	GRIN2B、CHRM3、CHRM2、CHRM1、F2、GABRA5、ADRA2A、ADRA2C、HTR2A
hsa03320	PPAR signaling pathway	PPAR 信号通路	4	0.002 692 6	PPARA、PPARD、RXRA、PPARG
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	癌症中的转录失调	5	0.004 954 5	IGF1R、RXRA、PPARG、MMP3、PLAU
hsa05200	Pathways in cancer	癌症中的通路	7	0.005 172 6	IGF1R、CASP3、PPARD、PTGS2、RXRA、PPARG、DAPK1
hsa04020	Calcium signaling pathway	钙离子信号通路	5	0.006 330 7	CHRM3、CHRM2、CHRM1、NOS3、HTR2A
hsa00350	Tyrosine metabolism	酪氨酸代谢	3	0.009 368 2	PNMT、MAOA、MAOB
hsa05030	Cocaine addiction	可卡因成瘾	3	0.017 854 8	GRIN2B、MAOA、MAOB
hsa00330	Arginine and proline metabolism	精氨酸和脯氨酸代谢	3	0.018 550 6	MAOA、MAOB、NOS3
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	cGMP-PKG 信号通路	4	0.028 062 5	PDE5A、ADRA2A、NOS3、ADRA2C
hsa05031	Amphetamine addiction	安非他命成瘾	3	0.031 165 1	GRIN2B、MAOA、MAOB
hsa00982	Drug metabolism-cytochrome P450	药物代谢-细胞色素 P450	3	0.032 927 0	MAOA、MAOB、CYP2D6
hsa04024	cAMP signaling pathway	cAMP 信号通路	4	0.049 578 0	PPARA、GRIN2B、CHRM2、CHRM1

2.5 佛手散对谷氨酸钠诱导损伤 PC12 细胞的影响
结果见表3。与正常组比较, 模型组细胞的存活率明显下降($P<0.01$), 细胞凋亡率、胞内 Ca^{2+} 浓度及 NO 含量明显升高($P<0.01$)。与模型组比较, 佛手散低、中、高剂量组的细胞存活率明显升高($P<0.05$,

$P<0.01$), 细胞凋亡率、胞内 Ca^{2+} 浓度及 NO 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 并呈现浓度依赖性。结果表明, 佛手散对谷氨酸钠诱导损伤的 PC12 细胞有保护作用, 可通过降低胞内 Ca^{2+} 浓度及 NO 含量达到降低细胞凋亡率的效果。

表 3 佛手散对谷氨酸钠诱导损伤 PC12 细胞的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 The effects of *Foshou* powder on monosodium glutamate-induced PC12 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/(mg·mL ⁻¹)	存活率/%	凋亡率/%	Ca ²⁺ 荧光强度	NO/(μmol·L ⁻¹)
正常组	-	92.80 ± 0.53	7.20 ± 0.53	13.07 ± 1.80	3.74 ± 0.25
模型组	-	66.00 ± 3.58 ^{##}	36.93 ± 1.95 ^{##}	83.23 ± 2.08 ^{##}	10.62 ± 0.44 ^{##}
佛手散低剂量组	32	70.00 ± 0.66 [*]	30.00 ± 0.66 ^{**}	73.13 ± 2.28 ^{**}	8.15 ± 0.29 ^{**}
佛手散中剂量组	64	79.03 ± 2.94 ^{**}	20.97 ± 2.94 ^{**}	58.20 ± 1.97 ^{**}	4.67 ± 0.15 ^{**}
佛手散高剂量组	128	83.77 ± 1.05 ^{**}	16.13 ± 1.05 ^{**}	27.70 ± 2.15 ^{**}	3.82 ± 0.59 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人痴呆的主要原因,其病理特征为细胞内神经原纤维缠结和细胞外淀粉样蛋白沉积,但发病机制尚不清楚,目前也没有完全有效的预防药物^[23]。中药佛手散能够改善 AD 小鼠的认知功能^[16],然而其治疗 AD 的生物活性物质和作用机制尚不明确。因此,本研究基于系统药理学方法初步探讨了佛手散治疗 AD 的机制,并基于体外实验进行验证,结果表明佛手散可通过降低胞内 Ca²⁺浓度和 NO 含量保护谷氨酸钠诱导损伤的 PC12 细胞,降低细胞凋亡率。

本研究筛选出的佛手散主要活性成分中,藁本内酯能改善线粒体功能,降低大脑中 Aβ 水平和恢复突触结构,改善 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠的认知功能障碍^[21]。Z-藁本内酯可通过抑制 p38 和激活 PI3-K/Akt 信号通路保护 SH-SY5Y 细胞和 PC12 细胞免受 Aβ 原纤维诱导的神经毒性^[22]。亚油酸能抑制 TLR4 及其下游靶点(涉及神经炎症、凋亡细胞丢失、淀粉样蛋白生成和记忆功能障碍),显著改善 Aβ 和 α-亚麻酸诱导的小鼠大脑记忆和突触功能^[25]。油酸可降低淀粉样前体蛋白 695 转染 Cos-7 细胞的 Aβ 水平,增加 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠的 Aβ₄₀/Aβ₄₂比值,降低 BACE 和老年蛋白水平,以及减少大脑中淀粉样斑块^[26]。有研究^[27]通过行为学实验(浅水迷宫、Y 迷宫和平衡木实验)、体内外胆碱酯酶抑制试验及分子对接证实 β-谷甾醇也是一种潜在的治疗 AD 药物。此外,通过对 PubMed 数据库的大规模检索,发现豆甾醇也具有治疗 AD 的作用^[28]。

佛手散遵循中药配伍中的“相使”法则,将功效相近的当归、川芎进行配伍可以增强治疗效果。佛手散 52 个有效成分的作用靶点中,当归、川芎的共同靶点 185 个。通过对“活性成分-潜在作用靶点”网络分析发现,当归和川芎不仅在调节 Aβ 和中枢神经系统(ABCB1、BACE1、NQO1、NOS3)中起关键作

用,而且间接调节神经细胞凋亡(CASP3、CASP7)、炎症反应(PTGS2)、代谢与能量(PTGS2、NOS3),以及 G 蛋白偶联受体蛋白(CHRM2、CHRM)。

KEGG 通路富集结果显示,佛手散可通过 5-羟色胺能突触通路(CASP3、PTGS2、MAOA、PTGS1、MAOB、CYP2D6、HTR2A)和神经配体-受体交互作用通路(GRIN2B、CHRM3、CHRM2、CHRM1、F2、GABRA5、ADRA2A、ADRA2C、HTR2A)的相关基因发挥治疗 AD 的效果。一方面,5-羟色胺能突触通路上的 PTGS2 基因表达可抑制 AD 神经元凋亡和炎症反应,促进神经元突起的生长^[29];AD 发病过程中 MAOA 和 MOAB 的活性显著提高^[30]。另一方面,神经配体-受体交互作用通路上的 GRIN2B 基因的遗传变异是 AD 发病的潜在调控因子^[31];CHRM2 基因参与神经元兴奋性、突触可塑性、乙酰胆碱释放和认知功能,CHRM3 基因表达有抗凋亡作用^[32]。同时,佛手散还能通过 Ca²⁺信号通路和 cGMP-PKG 信号通路调节细胞的 Ca²⁺浓度及 NO 含量,发挥保护细胞的作用。AD 患者的淀粉样斑块和神经原纤维缠结与细胞内 Ca²⁺浓度动态平衡紊乱有关^[33]。cGMP-PKG 信号通路在细胞内 Ca²⁺释放和细胞外 Ca²⁺内流中起着重要作用。此外,NO-cGMP-PKG-BKCa 通道的开放也可降低细胞内 Ca²⁺浓度^[34]。研究^[35]表明, iNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路与 NO 含量降低密切相关。

本研究通过体外实验对系统药理学分析结果进行验证,结果表明,佛手散可有效降低谷氨酸钠诱导损伤的 PC12 细胞的凋亡率,并通过调控 Ca²⁺及 NO 发挥对神经细胞的保护作用。细胞内 Ca²⁺浓度与细胞的生存状态密切相关,内质网是胞内 Ca²⁺的主要储存区域。当内质网内 Ca²⁺耗尽,线粒体基质则可通过单向载体通道积累 Ca²⁺。当线粒体内 Ca²⁺超负荷时,线粒体会产生大量活性氧(ROS)^[36-37]。而大量的 Ca²⁺和 ROS 可诱导线粒体通透性转换孔打开,改变线粒体膜通透性,降低线粒体膜电位,诱发细胞凋亡或坏

死^[38-39]。而佛手散活性成分可有效调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度。研究表明, 藁本内酯可以有效降低 OGD/R 诱导海马神经元的 Ca^{2+} 内流^[40], 当归根水提物可以有效抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞 Ca^{2+} 释放^[41]。因此, 佛手散保护 PC12 细胞的机制可能与降低及稳定胞内 Ca^{2+} 浓度有关。

另外, ROS 的积累可能会伴随着活性氮(RNS)的产生, NO 为其中产物之一^[42]。高浓度的 NO 可转化为过氧亚硝酸盐离子 (ONOO^-) 和过氧亚硝酸 (ONOOH), 而 ONOO^- 和 ONOOH 可分别进一步裂解成 NO_2^- 、 $\text{OH}^\bullet$, 或 NO_2^+ 、 OH^- , 可对大脑产生比过氧亚硝酸盐更大的神经毒性^[43-44]。而当归根水提物可以有效抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO 释放^[41]。本研究结果也表明, 含有当归的佛手散可能发挥抑制 NO 过量释放的作用以保护神经细胞。

综上所述, 佛手散对 AD 的治疗作用可能与其通过豆甾醇、Z-藁本内酯、藁本内酯、 β -谷甾醇等多种活性成分, 作用于 PTGS2、ABCB1、BACE1、NQO1、NOS3、ESR1 等多靶点, 并与 5-羟色胺能突触通路、神经配体-受体交互作用通路、 Ca^{2+} 信号通路以及 cGMP-PKG 信号通路等多通路密切相关。本研究为佛手散治疗 AD 提供了参考依据和新的思路, 但有关结果需要通过进一步的体内外实验加以验证。

参考文献:

- [1] SORIA LOPEZ J A, GONZÁLEZ H M, LÉGER G C. Alzheimer's disease[J]. Handb Clin Neurol, 2019, 167: 231-255.
- [2] OBOUDIYAT C, GLAZER H, SEIFAN A, et al. Alzheimer's disease[J]. Seminars in Neurology, 2013, 33(4): 313-329.
- [3] LONG J M, HOLTZMAN D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies[J]. Cell, 2019, 179(2): 312-339.
- [4] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?[J]. Nature Reviews Neurology, 2021, 17(3): 157-172.
- [5] HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [6] BARAGE S H, SONAWANE K D. Amyloid cascade hypothesis: pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease[J]. Neuropeptides, 2015, 52: 1-18.
- [7] TÖNNIES E, TRUSHINA E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2017, 57(4): 1105-1121.
- [8] 钱颖, 邵钰柔, 卢圣锋, 等. 中医药治疗阿尔茨海默症的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 761-766.
- [9] 谢丽媛, 吴明安, 李伟荣, 等. 从调节胆固醇代谢角度探讨阿尔茨海默病及中医药的防治[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(1): 144-148.
- [10] 张森, 张思琪, 逢静, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 河北中医, 2020, 42(11): 1746-1750.
- [11] WEI H, XIAO Y, TONG Y, et al. Therapeutic effect of angelica and its compound formulas for hypertension and the complications: evidence mapping[J]. Phytomedicine, 2019, 59: e152767.
- [12] CHEN R, WU P, CAI Z, et al. Puerariae Lobatae Radix with Chuanxiong Rhizoma for treatment of cerebral ischemic stroke by remodeling gut microbiota to regulate the brain-gut barriers[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 65: 101-114.
- [13] LAI X, XIU C, WANG X, et al. Efficacy of Renshen Sangi Chuanxiong formula for preventing vascular aging[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 39(6): 780-793.
- [14] 曹方引, 向菊芳, 唐大轩, 等. 基于析因设计的佛手散防治帕金森病作用机制探讨[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1559-1566.
- [15] 贾智若. 佛手散化学成分分析及其抗脑缺血作用的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [16] LU J, GUO P, LIU X, et al. Herbal formula Foshou San attenuates Alzheimer's disease-related pathologies via the gut-liver-brain axis in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2019, 2019(20): 1-14.
- [17] 郭鹏飞, 方坚松, 刘艾林. 基于网络药理学的生脉散用于 COVID-19 恢复期治疗的物质基础与作用机制研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(12): 1669-1681.
- [18] 马颖, 陈琛, 郑雅, 等. 橘皮汤降逆止呕作用机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(2): 226-233.
- [19] ZHANG Y, BAI M, ZHANG B, et al. Uncovering pharmacological mechanisms of Wu-tou decoction acting on rheumatoid arthritis through systems approaches: drug-target prediction, network analysis and experimental validation[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): e9463.
- [19] 杨从. 当归芍药散及拆方对痴呆小鼠学习记忆的影响及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [20] 何树苗, 陈元堃, 曾奥, 等. 藁本内酯药理作用及机制研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(2): 152-156.
- [21] XU Y J, MEI Y, QU Z L, et al. Ligustilide ameliorates memory deficiency in APP/PS1 transgenic mice via restoring mitochondrial dysfunction[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: e4606752.
- [22] XU W, YANG L, LI J. Protection against β -amyloid-induced neurotoxicity by naturally occurring Z-ligustilide through the concurrent regulation of p38 and PI3-K/Akt pathways[J]. Neurochemistry International, 2016, 100: 44-51.
- [23] KUMAR A, SINGH A, EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update[J]. Pharmacological Reports, 2015, 67(2): 195-203.
- [24] FUJITA Y, KANO K, KISHINO S, et al. Dietary cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid reduces amyloid β -protein accumulation and upregulates anti-inflammatory cytokines in an Alzheimer's disease mouse model. [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 9749-

- 9749.
- [25] ALI W, IKRAM M, PARK H Y, et al. Oral administration of alpha linoleic acid rescues A β -induced glia-mediated neuroinflammation and cognitive dysfunction in C57BL/6N mice[J]. Cells, 2020, 9 (3): e9030667.
- [26] AMTUL Z, WESTAWAY D, CECETTO D F, et al. Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's disease[J]. Brain Pathology, 2011, 21(3): 321-329.
- [27] AYAZ M, JUNAID M, ULLAH F, et al. Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from polygonum hydropiper L[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: e00697.
- [28] BRIMSON J M, BRIMSON S J, BRIMSON C A, et al. Rhinacanthus nasutus extracts prevent glutamate and amyloid- β neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: possible active compounds include lupeol, stigmasterol and β -sitosterol[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(4): 5074-5097.
- [29] MA P, LI Y, ZHANG W, et al. Long non-coding RNA MALAT1 inhibits neuron apoptosis and neuroinflammation while stimulates neurite outgrowth and its correlation with MiR-125b mediates PTGS2, CDK5 and FOXQ1 in Alzheimer's disease[J]. Current Alzheimer Research, 2019, 16(7): 596-612.
- [30] EMILSSON L, SAETRE P, BALCIUNIENE J, et al. Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients[J]. Neuroscience Letters, 2002, 326(1): 56-60.
- [31] ANDREOLI V, DE MARCO E V, TRECROCI F, et al. Potential involvement of GRIN2B encoding the NMDA receptor subunit NR2B in the spectrum of Alzheimer's disease[J]. Journal of Neural Transmission, 2014, 121(5): 533-542.
- [32] CHEE L Y, CUMMING A. Polymorphisms in the cholinergic receptors muscarinic (CHRM2 and CHRM3) genes and Alzheimer's disease[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2018, 10 (3): 196-199.
- [33] HÖLSCHER C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis[J]. Neurobiology of Disease, 1998, 5(3): 129-141.
- [34] GAI X, WEI Y, ZHANG W, et al. Echinacoside induces rat pulmonary artery vasorelaxation by opening the NO-cGMP-PKG-BKCa channels and reducing intracellular Ca²⁺ levels[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2015, 36(5): 587-596.
- [35] LIU F, NI W, ZHANG J, et al. Administration of curcumin protects kidney tubules against renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) by modulating nitric oxide (NO) signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 44(1): 401-411.
- [36] RIMESSI A, PREVIATI M, NIGRO F, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: molecular mechanisms, diseases and promising therapies[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016, 81: 281-293.
- [37] MARCHI S, PATERGNANI S, MISSIROLI S, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death[J]. Cell Calcium, 2018, 69: 62-72.
- [38] BONORA M, PINTON P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death[J]. Frontiers in Oncology, 2014, 17(4): 302-314.
- [39] XUE Z, GUO Y, FANG Y. Moderate activation of autophagy regulates the intracellular calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential in beta-amyloid-treated PC12 cells[J]. Neuroscience Letters, 2016, 618: 50-57.
- [40] WU Q, MAO Z, LIU J, et al. Ligustilide attenuates ischemia reperfusion-induced hippocampal neuronal apoptosis via activating the PI3K/Akt pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: e00979.
- [41] KIM Y J, LEE J Y, KIM H J, et al. Anti-inflammatory effects of angelica sinensis (Oliv.) diels water extract on RAW 264.7 induced with lipopolysaccharide[J]. Nutrients, 2018, 10(5): e10050647.
- [42] LUBOS E, HANDY D E, LOSCALZO J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis[J]. Frontiers in Bioscience, 2008, 13(14): 5323-5344.
- [43] MALINSKI T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2007, 11(2): 207-218.
- [44] THATCHER G, BENNETT B, REYNOLDS J. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease[J]. Current Alzheimer Research, 2005, 2(2): 171-182.

(编辑: 邹元平)