

黄芪-百合-沙棘联用治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学分析

赵宏, 于登君, 汤威威, 孔令洲, 高琪, 张宇, 王丽红 (佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: **目的** 基于网络药理学方法探讨黄芪-百合-沙棘(ALH)联用治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的可能作用机制。**方法** 利用 TCMS 数据库筛选 ALH 的活性成分及作用靶点, 通过 GeneCards、OMIM 数据库收集 AD 相关靶点, 将药物活性成分靶点与 AD 疾病相关靶点取交集, 获得药物-疾病共同靶点; 采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-活性成分-靶点-疾病网络, 并采用 STRING 平台构建蛋白互作(PPI)网络, 筛选关键活性成分和靶点; 采用 Autodock 软件对关键活性成分与核心靶点进行分子对接; 采用 Clue GO 插件进行 KEGG 通路富集分析。采用 D-半乳糖联合氯化铝诱导 AD 小鼠模型, 通过 Morris 水迷宫实验、海马组织病理学观察(HE 染色法)及 ELISA 法检测海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量, 对 ALH 治疗 AD 的作用机制进行初步验证。**结果** 经筛选共获得 ALH 活性成分 39 个, 如槲皮素、山柰酚、7-O-甲基异丙醇胺、芒柄花黄素、异鼠李素等, 主要作用于 ATK1、MAPK1、JUN、TP53、TNF 等靶点, 涉及 PI3K-Akt、MAPK、AGE-RAGE、IL-17、TNF 等信号通路, 共同发挥治疗 AD 的作用。药理学实验结果显示, ALH 可显著提高小鼠学习记忆能力($P < 0.05$, $P < 0.01$), 减轻海马组织损伤, 降低海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** ALH 治疗 AD 是多成分、多靶点、多通路相互作用的结果, 其机制与抑制炎症因子表达, 减轻炎症损伤有关。

关键词: 黄芪; 百合; 沙棘; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 炎症因子

中图分类号: R285.5; R857.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1817-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.011

Network Pharmacological Analysis of the Mechanism of Astragalus Radix-Lilii Bulbus-Hippophae Fructus Combination for Treatment of Alzheimer's Disease

ZHAO Hong, YU Dengjun, TANG Weiwei, KONG Lingzhou, GAO Qi, ZHANG Yu, WANG Lihong (College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007 Heilongjiang, China)

Abstract: **Objective** To investigate pharmacological mechanism of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus (ALH) in treating Alzheimer's disease(AD) by network pharmacology and molecular docking. **Methods** The active components and targets of ALH were obtained by TCMS database, and AD related targets were collected by GeneCards and OMIM database. The intersection of drug active component targets and AD related targets were used to obtain drug-disease common targets. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct drug-active ingredient-target-disease network, and STRING platform was used to construct PPI network to screen key active components and targets. Autodock software was used for molecular docking of key active components and targets. KEGG pathway enrichment analysis was performed using Clue GO. The AD mice model were induced by D-galactose combined with $AlCl_3$, then the Morris water maze test, pathological observation of hippocampal tissue(HE staining method) and ELISA were used to preliminarily verify the mechanism of ALH in treating AD. **Results** There are 39 active

收稿日期: 2021-01-26

作者简介: 赵宏, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药化学结构及药理活性研究。Email: zhaohong1981@jmsu.edu.cn。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金青年项目(QC2018119); 中央支持地方高校改革发展基金项目(2019zyzcd-01); 黑龙江省博士后专项经费资助项目(LBH-Q20185); 黑龙江省北药与功能食品特色学科建设项目(2018-TSXX-02); 佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019005)。

components in ALH were involved, such as quercetin, kaempferol, 7-*O*-methylisomucronulatol, formononetin, isorhamnetin. The active components mainly target ATK1, MAPK1, JUN, TP53, TNF, and so on, which involving PI3K-Akt, MAPK, AGE-RAGE, IL-17, TNF, and other signaling pathways, to play a role in treatment of AD. The results of validation experiment showed that ALH could significantly improve the learning and memory abilities of AD mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decrease the damage of hippocampal tissue, and reduce the contents of TNF- α , IL-6 and IL-17 in hippocampal tissue in mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The results of this study preliminarily revealed the effective mechanism of ALH for AD, which is inhibiting the expression of inflammatory factors, and alleviating inflammatory damage by the combination of multi-components, multi-targets, and multi-pathways.

Keywords: Astragalus radix; Lili bulb; Hippophae fructus; Alzheimer's disease; network pharmacology; inflammatory factor

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以渐进性记忆障碍、认知功能障碍及语言障碍等症状为特征的神经退行性疾病。目前临床上主要采用他克林、盐酸多奈哌齐等单靶点药物改善或缓解AD患者症状,但不能根治且不良反应明显^[1]。中医多以补虚、益气生津、活血化瘀、化痰开窍药为主治疗AD^[2],具有多靶点、副作用小等优点。因此,基于中医药理论探寻有效的抗AD中药具有重要意义。

黄芪为常用补虚类中药,味甘而薄,具有补气升阳、生津养血、利水消肿之功效^[3],其多糖、黄酮类成分可通过抗神经炎症、抑制神经细胞凋亡与抗氧化应激等多重效应改善老年大鼠的学习记忆能力^[4-5]。百合具有养阴润肺、清心安神之功,属药食同源中药,其多糖和酚类成分可改善睡眠、提高免疫力、预防老年痴呆等^[6-7]。沙棘具有补气健脾、化痰祛浊、活血化瘀之功效,全果具有免疫调节、改善抑郁症^[8]、抗氧化等药理作用。本课题组前期研究发现,黄芪可通过调节肠道微生态起到营养脑神经、抗氧化等作用^[9];百合多糖可缓解抑郁症模型小鼠症状并提高记忆力^[10];沙棘果多酚及多糖具有良好的抗AD作用^[11-13]。本课题组拟选取黄芪、百合、沙棘提取物开展关于治疗AD的物质基础特点、药效学和分子机制的系列研究,为中药的创新开发提供理论研究基础。故本研究拟通过网络药理学方法探讨黄芪-百合-沙棘(Astragalus radix-lilii bulb-hippophae fructus, ALH)联用治疗AD的作用机制,并采用动物实验进行初步验证,为课题组深入开展该中药组合的抗AD药学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物 6周龄雄性昆明小鼠,SPF级,体质量(20 ± 2) g,由佳木斯大学实验动物中心提供,动物质量合格证号:201800033458,动物生产许可证号:SCXK(吉)-2018-0007。

1.2 药物及试剂 黄芪(批号:180406)、百合(批号:180715)、沙棘(批号:180312),均购自佳木斯民生药行,经佳木斯大学药学院王丽红教授鉴定合格。将上述中药材分别煎煮、过滤、浓缩至含药材 $120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,得黄芪、百合、沙棘水煎液。取各药物水煎液等量混合,浓缩为原体积的1/3,得ALH水煎液。

氯化铝(AlCl_3),天津市凯通化学试剂有限公司,批号:170814;D-半乳糖,北京化学试剂公司,批号:1711016;奥拉西坦胶囊,石药集团欧意药业有限公司,批号:059171153;TNF- α 试剂盒(批号:2018011)、IL-6试剂盒(批号:2018031)、IL-17试剂盒(批号:2017125),均购自上海碧云天生物科技公司。

1.3 仪器 FA2004型电子分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Morris水迷宫视频跟踪分析系统,成都泰盟科技有限公司;FC型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;XH-C型旋涡混合器,无锡莱浦仪器设备有限公司;JJ-12J型脱水机、JB-L7型包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;XSP-13C-LP型显微镜,上海精密仪器仪表有限公司。

1.4 ALH活性成分及其作用靶点的获取 利用TCMSP数据库(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>)分别检

索“黄芪”“百合”“沙棘”的化学成分,以口服生物利用度(Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(Drug-like, DL) ≥ 0.18 为条件对化学成分进行筛选,获得 ALH 活性成分及其作用靶点信息,并利用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)查询靶点对应的基因名称。

1.5 药物-活性成分-靶点-疾病网络的构建 在 GeneCards (<http://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库中检索 “Alzheimer’s disease”, 将检索到的疾病靶点合并后去重, 获得 AD 疾病相关靶点。将药物活性成分作用靶点与 AD 疾病相关靶点进行韦恩分析, 取交集, 获得药物-疾病共同靶点, 即 ALH 治疗 AD 的潜在作用靶点。将共同靶点信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件中, 构建药物-活性成分-靶点-疾病网络, 筛选出 ALH 治疗 AD 的关键活性成分。

1.6 蛋白互作(PPI)网络的构建 将药物-疾病共同靶点导入 STRING 平台(<http://string-db.org/>), 物种设为 “Homo sapiens(人)”, 最低相互作用评分设为最高等置信度 “Highest confidence(0.900)”, 构建 PPI 网络。将网络数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中分析, 筛选出 ALH 治疗 AD 的核心靶点, 并绘制 PPI 网络图。

1.7 KEGG 通路富集分析 利用 Cytoscape 3.7.2 软件的 Clue GO 插件对药物-疾病共同靶点进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析, 并将结果可视化。

1.8 关键活性成分与核心靶点的分子对接 在 TCSP 数据库中将药物-活性成分-靶点-疾病网络中的关键活性成分的三维结构以 mol2 格式导出。在 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载 PPI 网络中核心靶点的结构文件。利用 PyMOL 软件将靶蛋白的配体分离并进行去水等操作后, 将小分子成分和靶蛋白受体使用 AutoDock 软件处理并进行对接验证, 评价关键活性成分与核心靶点间的对接情况。

1.9 药理实验

1.9.1 分组、模型^[4]复制及给药 将 70 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白组、模型组[皮下注射 5% D-半乳糖溶液($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)+灌胃 AlCl_3 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、奥拉西坦组($260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、黄芪组(黄芪水煎液, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、百合组(百合水煎液, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、沙棘组(沙棘水煎液, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 ALH 组(ALH 水煎液, $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。各给药组小鼠分别灌胃给予相应药物的同时给予造模剂, 空白组给予等体积蒸馏水($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每天 1 次, 连续给药 60 d。

1.9.2 Morris 水迷宫实验 给药结束后第 2 天, 对各组小鼠进行定位航行实验, 共 5 d, 每天训练 1 次。实验开始前, 先将小鼠置于站台上适应 30 s, 然后将小鼠面向池壁轻轻放入水中。若小鼠 60 s 内能找到水池中的平台, 则记录时间, 即为逃避潜伏期。若小鼠 60 s 内未找到平台, 则引导小鼠至平台并停留 30 s, 逃避潜伏期计为 60 s。于第 5 天记录各组小鼠的逃避潜伏期。定位航行实验结束后, 于次日进行空间探索实验。先撤去水中的平台, 将小鼠面向池壁放入水池中游泳 60 s, 记录 60 s 内小鼠穿越原来平台位置的次数。

1.9.3 海马组织病理学观察 水迷宫空间探索实验结束后, 禁食、自由饮水 24 h 后将小鼠处死, 于冰台上迅速剥离大脑并取出海马组织。取海马体的一半用 4%多聚甲醛固定, 采用 HE 法染色, 于 $\times 100$ 显微镜下进行图像采集、分析, 观察其组织病理变化。

1.9.4 ELISA 法检测海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量 取另一半海马体制成 10%海马组织匀浆液, 4°C 下以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 8 cm)离心 10 min, 取上清液于 4°C 下保存。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测各组小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 的含量。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 26.0 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-*t* 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALH 活性成分及其靶点 结果见表 1。通过 TCSP 平台共检索、筛选出黄芪活性成分 16 个, 百合活性成分 7 个, 沙棘活性成分 22 个, 去重后共得到 39 个活性成分, 包括槲皮素、山柰酚等。39 个活性成分共对应 216 个作用靶点, 包括 AKT1、JUN、MAPK1 等。

2.2 药物-活性成分-靶点-疾病网络的构建与分析 筛选获得 AD 疾病相关靶点 8 819 个, 其中药物-疾病共同靶点共 180 个。将活性成分和药物-疾病共同靶点信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件中, 构建药物-活性成分-靶点-疾病网络, 见图 1。该网络中共有节点 223 个(药物 3 个, 红色; 疾病 1 个, 紫色; 活性成分 39 个, 黄色; 靶点 180 个, 蓝色), 边线 711 条, 其中槲皮素(Quercetin)、山柰酚(Kaempferol)、7-*O*-甲基异丙醇胺(7-*O*-methylisomucronulatol)、芒柄花黄

表 1 黄芪-百合-沙棘的活性成分信息

Table 1 Information of active components in Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus

中药	活性成分	中文名	编号	靶点数/个	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)
黄芪	Mairin	白桦脂酸	AR1	1	55.38	0.78
黄芪	Jaranol	华良姜素	AR2	12	50.83	0.29
黄芪	Hederagenin	常春藤皂苷元	AR3	21	36.91	0.75
黄芪	(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R) - 10, 13-dimethyl-17-[(2R, 5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	-	AR4	1	36.23	0.78
黄芪	3,9-di-O-methylisolin	3,9-二-O-甲基尼森香碗豆紫檀酚	AR5	22	53.74	0.48
黄芪	7-O-methylisomucronulatol	7-O-甲基异丙醇胺	AR6	41	74.69	0.30
黄芪	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	黄芪异黄烷苷	AR7	2	36.74	0.92
黄芪	(6aR, 11aR)-9,10-dimethoxy-6a, 11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	美迪紫檀素	AR8	19	64.26	0.42
黄芪	Bifendate	联苯双酯	AR9	5	31.10	0.67
黄芪	Formononetin	芒柄花黄素	AR10	36	69.67	0.21
黄芪	Calycosin	毛蕊异黄酮	AR11	19	47.75	0.24
黄芪	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯	AR12	3	41.88	0.24
百合	Isopimaric acid	异海松酸	LB1	5	68.96	0.71
百合	26-O-β-D-glucopyranosyl-3β,26-dihydroxy-cholesten-16,22-dioxo-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside_qt	-	LB2	1	32.43	0.80
百合	3-Demethylcolchicine	3-去甲基秋水仙碱	LB3	7	39.34	0.57
百合	26-O-β-D-glucopyranosyl-3β,26-dihydroxy-5-cholesten-16,22-dioxo-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside_qt	-	LB4	1	35.11	0.81
百合	26-O-β-D-glucopyranosyl-3β,26-dihydroxy-cholestan-16,22-dioxo-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside_qt	26-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3β,26-二羟基-胆甾烯-16,22-二氧代-3-O-α-L-鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷	LB5	1	32.43	0.80
沙棘	Pelargonidin	天竺葵素	HF1	13	37.99	0.21
沙棘	14-methyl-α-sitosterol	14-甲基-α-谷甾醇	HF2	1	43.49	0.78
沙棘	Ergosterol	麦角甾醇	HF3	2	35.41	0.71
沙棘	LAN	羊毛甾醇	HF4	3	42.12	0.75
沙棘	ZINC04073977	β-谷甾酮	HF5	4	38.00	0.76
沙棘	Mandenol	亚油酸乙酯	HF6	3	42.00	0.19
沙棘	24-epicampesterol	24-表氨酯	HF7	2	37.58	0.71
沙棘	Rhein	大黄酸	HF8	6	47.07	0.28
沙棘	(3S, 5R, 10S, 13R, 14R, 17R) - 17-[(1R) - 1, 5-dimethyl-4-methylenhexyl]-4, 4, 10, 13, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	齿孔醇	HF9	1	42.37	0.77
沙棘	Beta-carotene	β-胡萝卜素	HF10	20	37.18	0.58
沙棘	Sitosterol	谷甾醇	HF11	3	36.91	0.75
沙棘	(+)-catechin	(+)-儿茶素	HF12	8	54.83	0.24
沙棘	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	橙皮苷	HF13	6	47.74	0.27
沙棘	Schottenol	肖特醇	HF14	2	37.42	0.75
沙棘	ent-Epicatechin	表儿茶素	HF15	4	48.96	0.24
沙棘	CLR	胆甾醇	HF16	3	37.87	0.68
黄芪、沙棘	Isorhamnetin	异鼠李素	A	34	49.60	0.31
黄芪、沙棘	Kaempferol	山柰酚	B	58	41.88	0.24
黄芪、沙棘	FA	叶酸	C	3	68.96	0.71
黄芪、沙棘	Quercetin	槲皮素	D	158	46.43	0.28
百合、沙棘	Stigmasterol	豆甾醇	E	29	43.83	0.76
百合、沙棘	Beta-sitosterol	β-谷甾醇	F	34	36.91	0.75

素(Formononetin)、异鼠李素(Isorhamnetin)的度值(Degree值)较高,且具有神经保护、减缓AD发病进程的作用^[15-17],可能是ALH治疗AD的关键活性成分。

2.3 药物-疾病共同靶点的PPI网络构建 将180个药物-疾病共同靶点导入STRING数据库,获取ALH治疗AD潜在靶标之间的相互关系,将网络数据导入

Cytoscape 3.7.2 软件, 绘制 PPI 网络, 结果见图 2。PPI 网络中共有 157 个节点 (23 个靶点未参与相互作用), 718 条边, 平均度值为 9.15。节点越大、颜色越深, 则节点度值越大。度值 ≥ 20 的靶点信息见表 2, 其中 AKT1、MAPK1、JUN、TP53、TNF 的度

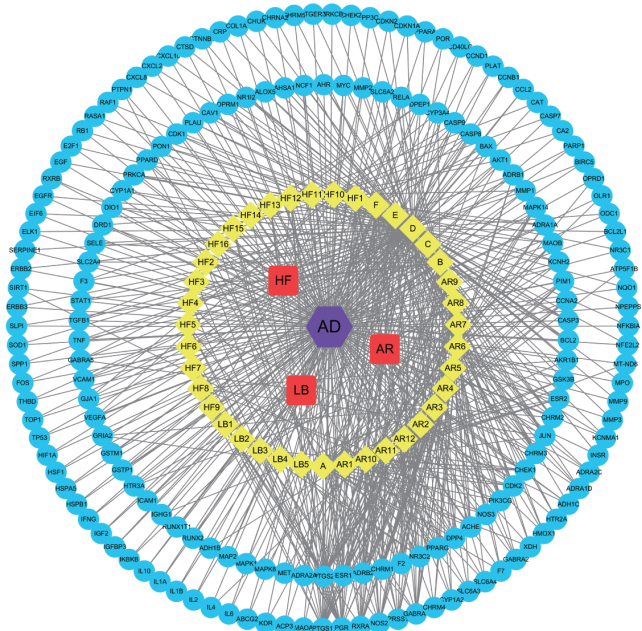


图 1 黄芪-百合-沙棘治疗阿尔茨海默病的药物-活性成分-靶点-疾病网络
Figure 1 Drug-active component-target-disease network of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus in treating Alzheimer's disease

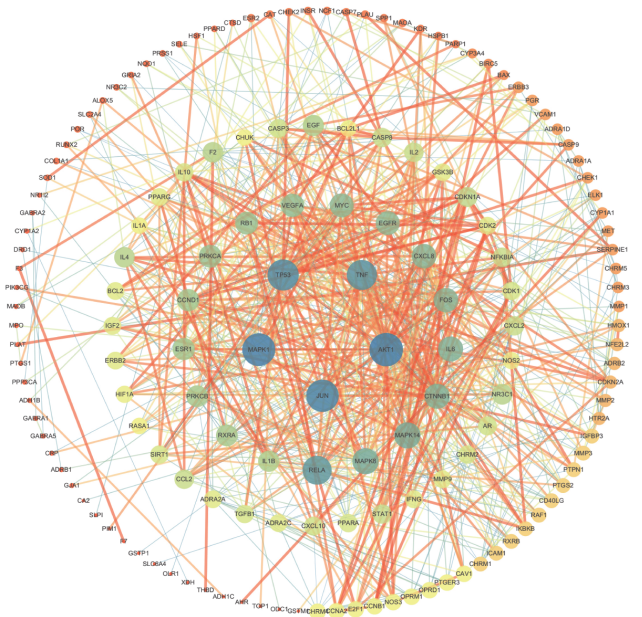


图 2 黄芪-百合-沙棘治疗阿尔茨海默病潜在作用靶点的 PPI 网络
Figure 2 PPI network of potential targets of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus in treating Alzheimer's disease

值最高, 与 AD 发病机制密切相关^[18-22], 是 ALH 治疗 AD 的核心靶点。

2.4 KEGG 通路富集分析 应用 Cytoscape 3.7.2 的 Clue GO 插件对 180 个药物-疾病共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 结果显著富集在 126 条通路上 ($P < 0.05$), 选取 Count 值前 20 位的通路绘制气泡图, 见图 3。结果表明, ALH 治疗 AD 可能是通过调

表 2 黄芪-百合-沙棘治疗阿尔茨海默病关键靶点信息
Table 2 Information of key targets of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus in treating Alzheimer's disease

序号	靶点名称	中文名称	度值
1	AKT1	蛋白激酶 B	39
2	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	38
3	JUN	转录因子 AP1	37
4	TP53	细胞肿瘤抗原 p53	35
5	TNF	肿瘤坏死因子	33
6	RELA	转录因子 p65	31
7	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	26
8	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14	26
9	CTNNB1	连环蛋白 β 1	24
10	IL6	白细胞介素 6	24
11	FOS	原癌基因 c-Fos	23
12	CXCL8	白细胞介素 8	23
13	EGFR	表皮生长因子受体	22
14	MYC	Myc 原癌基因蛋白	22
15	VEGFA	血管内皮生长因子 A	21
16	RB1	视网膜母细胞瘤相关蛋白	20
17	PRKCA	蛋白激酶 C α 型	20

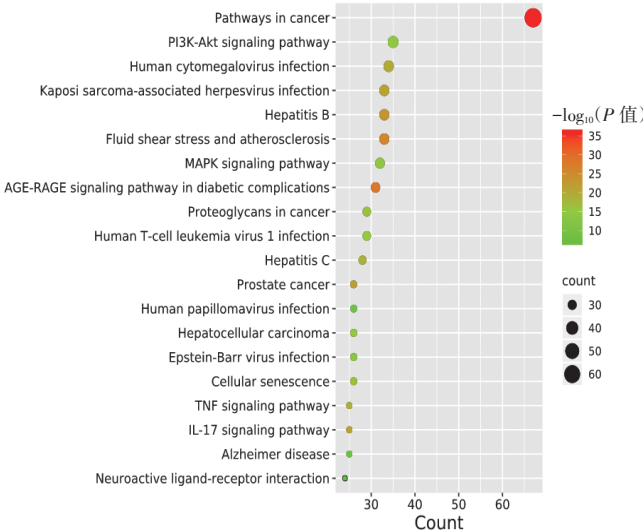


图 3 黄芪-百合-沙棘治疗阿尔茨海默病潜在作用靶点的 KEGG 通路富集分析
Figure 3 KEGG pathway enrichment analysis for key targets of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus in treating Alzheimer's disease

控 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、糖尿病并发病的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等发挥的作用。

2.5 ALH 关键成分与核心靶点的分子对接 利用 AutoDock 软件对药物-活性成分-靶点-疾病网络中的关键活性成分槲皮素、山柰酚、7-O-甲基异丙醇胺、芒柄花黄素、异鼠李素和 PPI 网络中的核心靶点蛋白 AKT1、MAPK1、JUN、TP53、TNF 进行分子对接,结果见表 3。结果表明,ALH 活性成分与 AD 靶蛋白结合能均小于 $-5.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,能够较好地对接,潜在生物活性高。

表 3 黄芪-百合-沙棘治疗阿尔茨海默病关键成分与核心靶点分子对接结果

Table 3 Molecule docking results of key components and targets of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus in treating Alzheimer's disease

靶点	对接能量(Binding energy)/($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)				
	槲皮素	山柰酚	7-O-甲基异丙醇胺	芒柄花黄素	异鼠李素
AKT1	-7.81	-7.40	-6.19	-7.09	-6.89
MAPK1	-6.32	-6.36	-6.05	-6.61	-6.15
JUN	-5.20	-5.32	-5.73	-6.70	-5.58
TP53	-6.44	-5.14	-5.21	-5.79	-6.01
TNF	-6.54	-6.19	-6.04	-6.00	-6.47

2.6 ALH 对 AD 模型小鼠的药理作用

2.6.1 ALH 对 AD 模型小鼠学习记忆能力的影响 结果见表 4。与空白组比较,模型组小鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台次数显著减少($P<0.01$),表明学习记忆出现障碍,造模成功。与模型组比较,各给药组小鼠逃避潜伏期明显缩短($P<$

0.05 , $P<0.01$),穿越平台次数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 4 黄芪-百合-沙棘(ALH)对阿尔茨海默病模型小鼠水迷宫逃避潜伏期、穿越平台次数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus on the escape latency and platform crossing frequency of water maze in Alzheimer's disease mice($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
空白组	-	29.98 ± 4.42	3.10 ± 0.57
模型组	-	$56.18\pm 4.43^{**}$	$1.10\pm 0.32^{**}$
奥拉西坦组	0.26	$38.13\pm 3.73^{\#}$	$2.50\pm 0.71^{**}$
黄芪组	1.20	$41.24\pm 6.09^{\#}$	$2.10\pm 0.88^{**}$
百合组	1.20	$42.39\pm 4.24^{\#}$	$1.90\pm 0.32^{\#}$
沙棘组	1.20	$41.91\pm 5.49^{\#}$	$2.00\pm 0.47^{\#}$
ALH 组	3.60	$40.73\pm 4.28^{**}$	$2.30\pm 0.48^{**}$

注:与空白组比较, $^{**}P<0.01$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

2.6.2 ALH 对 AD 模型小鼠海马组织病理变化的影响 结果见图 4。空白组小鼠海马齿状回(DG)区细胞排列均匀整齐,细胞层次较多、结构清楚,未见明显的细胞丢失。模型组小鼠海马齿状回区细胞排列较稀疏,出现大面积细胞坏死,具有明显的细胞丢失。与模型组比较,各给药组小鼠海马细胞排列整齐、紧密,细胞层次增多,局部有少量细胞核染色加深,细胞整体状态较好。

2.6.3 ALH 对 AD 模型小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量的影响 结果见表 5。与空白组比较,模型组小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 水平明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠海马组织中的 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

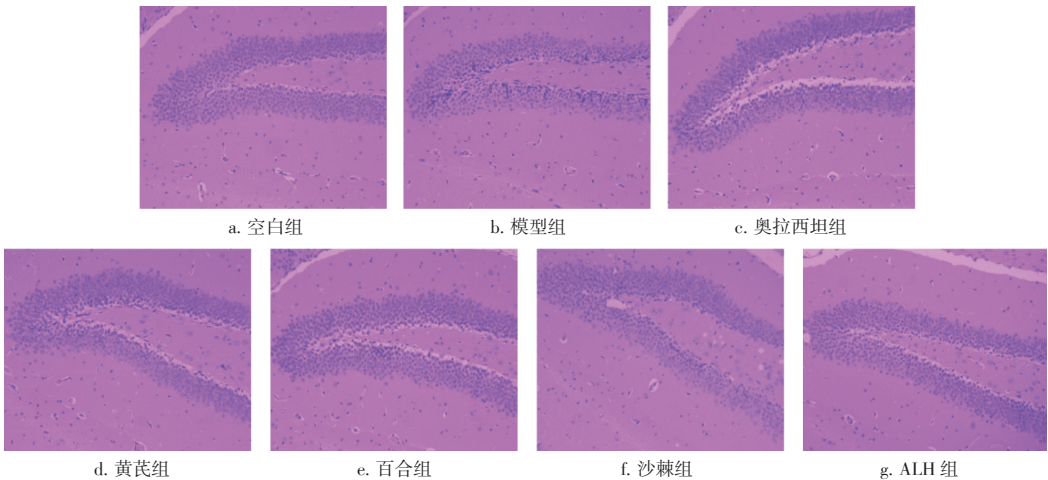


图 4 黄芪-百合-沙棘(ALH)对阿尔茨海默病模型小鼠海马组织病理变化的影响(HE 染色, $\times 100$)
Figure 4 Effects of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus on pathological changes of hippocampal tissues in Alzheimer's disease mice(HE staining, $\times 100$)

表 5 黄芪-百合-沙棘(ALH)对阿尔茨海默病模型小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of Astragalus radix-Lilii bulbus-Hippophae fructus on the contents of TNF- α , IL-6 and IL-17 in hippocampal tissue of Alzheimer's disease mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	IL-17/ (pg·mL ⁻¹)
空白组	-	31.93 ± 2.56	48.16 ± 5.21	37.28 ± 6.21
模型组	-	87.27 ± 4.85*	90.26 ± 3.61*	76.12 ± 5.55*
奥拉西坦组	0.26	34.81 ± 3.61 ^{##}	51.08 ± 6.45 [#]	44.49 ± 4.63 [#]
黄芪组	1.20	44.28 ± 4.91 ^{##}	65.55 ± 4.61 [#]	52.39 ± 7.11 [#]
百合组	1.20	54.32 ± 5.42 [#]	73.11 ± 4.99 [#]	59.56 ± 5.91 [#]
沙棘组	1.20	50.06 ± 5.14 [#]	65.84 ± 6.61 [#]	54.06 ± 4.23 [#]
ALH 组	3.60	37.16 ± 4.86 ^{##}	57.16 ± 6.12 ^{##}	46.88 ± 4.50 [#]

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3 讨论

中医认为阿尔茨海默病(AD)以虚为本,加之老年人因脏腑功能失调,气血运行失常,阴阳失衡而产生的痰、瘀等病理产物不能及时排出体外,蓄积日久,化热成毒,导致 AD 的发生或加重,因此治疗 AD 以补虚祛瘀化痰为主^[23]。黄芪补气养血、活血化瘀;百合安神益智、滋阴益气;沙棘止咳化痰、活血散瘀。三药配伍益气滋阴、活血散瘀、化痰开窍,共同发挥治疗 AD 的作用。本研究利用网络药理学方法,探讨了黄芪-百合-沙棘(ALH)抗 AD 的潜在活性成分、作用靶点、作用通路等分子机制,并初步进行了实验验证。

根据药物-活性成分-靶点-疾病网络,度值较高的成分为槲皮素、山柰酚、7-*O*-甲基异丙醇胺、芒柄花黄素、异鼠李素。槲皮素和山柰酚为常见黄酮类化合物,可通过抗凋亡活性对神经细胞发挥保护作用^[15]。芒柄花黄素可通过调节 A β 转运蛋白和炎性介质水平来改善 AD 小鼠学习记忆能力和海马毛细血管超微结构^[16]。异鼠李素可清除氧自由基,减少由衰老引起的细胞和组织损伤,抑制细胞凋亡,发挥神经细胞保护作用^[17]。由此可见,以上活性成分具有抗炎、抗氧化等作用,参与机体细胞凋亡及免疫调节,影响 AD 的发生发展。

PPI 分析结果表明,度值较高的靶点为 AKT1、MAPK1、JUN、TP53、TNF。AKT1 可通过对抗细胞凋亡机制而促进神经元存活^[18]。MAPK1 是 MAPK 家族中的重要一员,参与细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡等过程^[19]。JUN 是一种重要的转录因子,对细胞增殖、存活与凋亡等生理过程具有调控作用,

抑制其基因表达可减少神经元凋亡^[20]。p53 是多种细胞过程的关键调节因子,抑制其表达可发挥抗神经细胞凋亡作用,改善脑组织损伤^[21]。TNF 是一种参与维持机体稳态的重要细胞因子,可促进 T 细胞产生各种炎性因子,导致炎性反应的发生^[22]。因此,ALH 可能通过调控以上核心靶点,影响相关激酶活性、细胞凋亡及炎性反应,发挥治疗 AD 的作用。分子对接结果表明,ALH 活性成分与受体蛋白稳定结合。

KEGG 通路富集分析结果表明,ALH 可通过影响 PI3K-Akt、MAPK、AGE-RAGE、IL-17、TNF 等多条信号通路发挥治疗 AD 的作用。PI3K-Akt、TNF 信号通路可参与炎性反应及细胞凋亡相关过程,调节相关细胞因子,发挥神经保护作用^[24-25]。MAPK 信号通路参与细胞的生长、发育、增殖及分化等多种生理过程,通过抑制 MAPK 的过度激活,可减少 A β 沉积、Tau 过度磷酸化、神经元凋亡和记忆损害^[26]。AGEs(糖化终末产物)是蛋白质非酶促糖化的最终产物,在脑内沉积可引起胆碱能神经元的损伤,阻断其与特异性受体 RAGE 的结合可以减弱其损伤作用^[27]。IL-17 通路参与 AD 的免疫炎性反应,其可直接诱导神经元和神经胶质细胞凋亡,加重 AD 的病理损伤,可间接通过 NF- κ B 信号通路激活胶质细胞,诱导神经元和胶质细胞凋亡^[28]。上述通路可能通过介导炎性反应或抑制神经元凋亡,发挥抗 AD 的作用,可能是 ALH 治疗 AD 的关键信号通路。

通过动物实验发现,ALH 可缩短 AD 模型小鼠的逃避潜伏期,增加穿越平台次数,减轻脑海马组织损伤,降低模型小鼠脑海马组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量。证明 ALH 可改善 AD 模型小鼠学习记忆能力,其机制与抑制炎性因子表达,减轻炎症损伤有关。

综上所述,本研究采用网络药理学和分子对接方法初步预测了 ALH 治疗 AD 的关键活性成分、靶点及通路,并通过体内药理实验初步验证了其药效及作用机制。黄芪-百合-沙棘治疗 AD 的作用可能是通过槲皮素、山柰酚等多种活性成分,AKT1、MAPK1、JUN、TP53、TNF 等多靶点,以及 PI3K-Akt、MAPK、AGE-RAGE、IL-17、TNF 等多条信号通路相互作用的结果,其机制与抑制炎性因子表达,减轻炎症损伤有关。

参考文献:

- [1] SHOJI M. Drug therapy for Alzheimer's disease[J]. Brain and Nerve & Shinkei Kenkyu No Shinpo, 2010, 62(7): 777-785.

- [2] 钱颖, 邵钰柔, 卢圣锋, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 761-766.
- [3] 王玲丽, 丰华玲, 杨柯, 等. 黄芪生物学及化学成分研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2581-2585.
- [4] 姚惠, 顾丽佳, 郭建友. 黄芪多糖改善老年大鼠的学习记忆水平及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2071-2075.
- [5] 周龙云, 田子睿, 刘书芬, 等. 黄芪对中枢神经系统的药理作用及毒理研究现状[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4935-4944.
- [6] 罗林明, 裴刚, 覃丽, 等. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 824-837.
- [7] 李银, 杨灿明, 戴丽琴, 等. 百合食疗对老年性痴呆症预防作用的实验研究[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(24): 2989-2990, 2994.
- [8] 赵思俊, 赵晓喆, 向欢, 等. 基于代谢通路调控的沙棘籽油抗抑郁作用机制研究[J]. 中草药, 2017, 48(13): 2682-2690.
- [9] 张宇, 沈宇, 胡新俊, 等. 黄芪多糖对微生态调节作用的物质基础研究初探[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 113-116, 119.
- [10] 赵芷萌, 赵宏, 王宇亮, 等. 百合多糖的纯化及其对肠道菌群失调小鼠的调节作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 295-300, 306.
- [11] 王伟铎, 张宇, 王宇亮, 等. 沙棘果多酚提取工艺优化及其抗阿尔茨海默病活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 135-141.
- [12] 汤威威, 张宇, 王宇亮, 等. 硫酸酯化沙棘叶多糖的制备及其解酒作用[J]. 食品研究与开发, 2019, 49(17): 47-51.
- [13] 赵统超, 张宇, 王丽红, 等. 沙棘果油索氏提取及体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(22): 145-148.
- [14] 汤威威, 赵宏, 孔令洲, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨沙棘治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国药房, 2020, 31(19): 2325-2332.
- [15] KIM J H, LEE S, CHO E J, et al. Neuroprotective effects of kaempferol, quercetin, and its glycosides by regulation of apoptosis[J]. Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society, 2019, 20(2): 286-293.
- [16] 费洪新, 李春旭, 李林, 等. 芒柄花黄素对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及海马毛细血管超微结构的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(20): 5051-5054.
- [17] 张雯, 宋俊科, 朱晓瑜, 等. 异鼠李素激活Sirt1/PGC-1 α 信号通路抑制MPP+诱导的SH-SY5Y细胞损伤[J]. 药学报, 2019, 54(11): 1976-1981.
- [18] 林慧慧, 刘艳青, 刘森, 等. Akt1在颞叶癫痫(癇)大鼠海马中的表达变化[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2012, 12(5): 581-588.
- [19] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 600-604.
- [20] 毛晓霞, 夏爱华, 吴晓光, 等. 山楂叶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡和c-fos, c-jun表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 174-177.
- [21] 陈媛, 吴海金, 黄晓松, 等. 葛根素对脑缺血再灌注大鼠海马组织P-STAT3、P53表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(1): 36-39.
- [22] STEELAND S, GORLÉ N, VANDENDRIESSCHE C, et al. Counteracting the effects of TNF receptor-1 has therapeutic potential in Alzheimer's disease[J]. EMBO Molecular Medicine, 2018, 10(4): e8300.
- [23] 侯江淇, 郭蕾, 张俊龙. 阿尔茨海默病中医辨治探析[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 262-264.
- [24] 顾志荣, 许爱霞, 李芳, 等. 基于PI3K/Akt信号通路研究中药及其活性成分的中枢神经保护作用最新进展[J]. 中国新药杂志, 2019(13): 1593-1599.
- [25] 杨擎, 李娜, 隋欣, 等. 五味子乙素靶向调节A β 及下游NF- κ B/TNF- α 信号通路保护受损神经元的分子机制[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2064-2069.
- [26] DU Y, DU Y, ZHANG Y, et al. MKP-1 reduces A β generation and alleviates cognitive impairments in Alzheimer's disease models[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2019, 4(1): 1-12.
- [27] 殷青青, 刘雪平, 董传芳, 等. 糖基化终末产物对大鼠基底前脑胆碱能神经元的损伤作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 50(8): 20-25.
- [28] 方杰. IL-17在阿尔茨海默病中的作用及机制研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.

(编辑: 邹元平)