

# 基于网络药理学的大黄治疗阿尔茨海默病作用机制研究

张运辉<sup>1,2,3</sup>, 周小青<sup>1,2\*</sup>, 伍大华<sup>1,4</sup>, 杨梦琳<sup>1,2,3</sup>, 郑彩杏<sup>1,2</sup>, 童天昊<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学; <sup>2</sup>2011 数字中医药协同创新, 长沙 410208;

<sup>3</sup>重庆三峡医药高等专科学校中医学院, 重庆 404120;

<sup>4</sup>湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006

**摘要:** 基于网络药理学探讨大黄治疗阿尔茨海默病(AD)的作用机制。借助 TC MSP 数据库及 Uniprot 数据库筛选出大黄有效成分及靶点基因。通过 Drugbank、Dis Ge NET 和 TTD 数据库筛选出阿尔茨海默病的靶点基因;成分靶点与疾病靶点映射后使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物有效成分-靶点蛋白相互作用网络,使用 String 数据库绘制靶点蛋白-靶点蛋白相互作用网络;对靶点蛋白利用 Metascape 数据库进行 GO 分析和 KEGG 分析,最后采用 MTT 实验、ELISA 法、比色法和荧光实时定量 PCR 对网络药理学主要分析结果进行验证。研究共筛选出大黄的有效成分 17 个,对应靶点 276 个,与阿尔茨海默病相关靶点共 107 个,KEGG 相关信号通路前 10 条,GO 分析前 20 个生物学过程。细胞实验证实了大黄能有效提高 PC12 细胞的细胞存活率及抑制 PC12 细胞的炎症反应、细胞凋亡、氧化应激反应,并促进 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 信号通路的激活,下调 NF- $\kappa$ B 信号通路。大黄主要是通过抗炎、抗凋亡、抗氧化应激等对阿尔茨海默病产生重要的治疗作用,为后续临床治疗阿尔茨海默病提供新的思路。

**关键词:** 大黄;阿尔茨海默病;网络药理学;作用机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)1-0127-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.016

## Study on mechanism of Radix et Rhizoma Rhei in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology

ZHANG Yun-hui<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Xiao-qing<sup>1,2\*</sup>,

WU Da-hua<sup>1,4</sup>, YANG Meng-lin<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Cai-xing<sup>1,2</sup>, TONG Tian-hao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hunan University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>2011 Digital Traditional Chinese Medicine Collaborative Innovation, Changsha 410208, China; <sup>3</sup>Chongqing Three Gorges Medical College of Chinese Medicine, Chongqing 404120, China;

<sup>4</sup>Affiliated Hospital of Hunan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China

**Abstract:** To explore the mechanism of Radix et Rhizoma Rhei in the treatment of Alzheimer's disease(AD) based on network pharmacology. The effective components and target genes of Radix et Rhizoma Rhei were screened by TC MSP database and Uniprot database. The target genes of AD were screened by Drugbank, Dis Ge NET and TTD databases. After mapping the component target with the disease target point, Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the drug active component-target protein interaction network, and at the same time, the String database was used to draw the target protein-target protein interaction network; The target protein was analyzed by GO and KEGG using Metascape database. Finally, the main results of network pharmacology were verified by MTT, ELISA and real-time quantitative PCR. The research screened out that 17 active ingredients of Radix et Rhizoma Rhei, 276 corresponding targets, included 107 targets related to AD, the top 10 KEGG-related signal pathways, and the first 20 biological processes for GO analysis. Cell experiment showed that Radix et Rhizoma Rhei effectively improved the cell survival rate of PC12 cells, inhibited the inflammation, apoptosis, oxidative stress of PC12 cells, and promoted the activation of PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathways, meanwhile, down-regulated NF- $\kappa$ B signaling pathway. Radix et Rhizoma Rhei has an important therapeutic effect on AD mainly through anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-

oxidative stress. This provided new ideas for subsequent clinical treatment of AD.

**Key words:** Radix et Rhizoma Rhei; Alzheimer's disease; Network pharmacology; mechanism of action

收稿日期:2020-07-28 接受日期:2020-11-13

基金项目:国家自然科学基金(81373702,81874462)

\* 通信作者 E-mail:zxq5381@sohu.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 多发生于老年和老年前期,是一种以进行性记忆力丧失、认知功能下降、精神行为功能障碍为主要表现的神经系统退行性病变<sup>[1]</sup>,是当今全球医学界研究的重点之一<sup>[2]</sup>。随着全球老龄化进程加快,AD 患病数逐年增加,今后将以每 20 年递增 1 倍的速度增加,预计到 2050 年全世界 AD 患者将达 1.315 亿,严重威胁着老年人的健康与生命安全,同时给社会和家庭带来沉重的经济负担<sup>[3,4]</sup>。目前美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市的抗 AD 药物主要是 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸 (NMDA) 受体阻滞剂和乙酰胆碱酯酶 (ACHE) 抑制剂,但由于上述两类药物作用靶点广泛,虽可适度改善患者的症状,但仍不能根治、逆转 AD 的发展,且长期服用会引起严重的副作用<sup>[5]</sup>。目前,越来越多的学者关注中药及其活性成分抗 AD 效应,中医药具有整体性和多样性的特点,可发挥多成分、多层次、多环节、多靶点、双向调节的综合作用,且毒性明显小于化学药,与 AD 发病机制的复杂性和综合性的特征非常契合。

大黄始载于《神农本草经》,是蓼科植物药用大黄、唐古特大黄、掌叶大黄的干燥根和根茎,性寒,味苦,归脾、胃、大肠、肝、心经。具有泻下攻积、清热泻火、解毒、活血祛瘀之效。中医对 AD 的病机认识,认为“脑消髓减”为疾病基础,“痰瘀阻络”为标,近年更发展 AD 的“毒损脑络”的病机。Wang 等<sup>[6]</sup> 实验研究发现,(1) AD 大鼠伴有肠源性内毒素,其脑组织及血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ 、IL-10 含量明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ),说明可能肠源性内毒素参与了 AD 的病理反应过程,促成慢性炎症及氧化应激反应;(2) AD 模型大鼠血脑屏障下降,通透性增高,使得正常情况下不能通过血脑屏障的内毒素进入脑内,引发局部炎症;研究结果提示肠源性内毒素在 AD 形成中有重要作用。大黄具有“以通为补”的作用,并能通腑降浊、活血祛瘀、清热解毒,有“荡涤肠胃”、“推陈致新”的作用,减少体内肠源性内毒素的集聚,能针对 AD“脑消髓减、痰瘀阻络、毒损脑络”的病机,可以很好的运用于认知功能的改善。因此,深入探讨大黄的作用靶点,分析其可能抗 AD 的作用机制,对于阐述大黄的科学内涵具有重要作用。

网络药理学可研究药物、靶标和疾病之间的关系,可通过整合中药化学成分、疾病靶标构建“化学成分-作用靶标-疾病靶标-蛋白质相互作用网络<sup>[7]</sup>”,将相互作用关系可视化成网络模型,并从分

子层面和整体的角度研究药物对生物网络的影响。本研究借助网络药理学方法,构建有效成分-靶标作用网络,结合体外细胞实验深入探讨大黄治疗 AD 的作用机制,为今后治疗 AD 中药研究提供方向和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 大黄有效成分及其靶点的筛选

以“Radix et Rhizoma Rhei”为关键词,从 TCMSPP 数据库(中药系统药理学分析平台,<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)查询大黄的有效成分,本研究基于 ADME(药物吸收、分布、代谢、排泄)模型,运用 OBioavail 1.1 来预测有效成分的口服利用度(oral bioavailability, OB),对大黄的化学成分进行 OB 和类药性(drug likeness, DL)筛选,并设置  $OB \geq 30\%$  及  $DL \geq 18\%$  作为筛选条件<sup>[8]</sup>。最后,使用 Uniprot 数据库并借助 Perl 语言,将靶点的“蛋白名(protein name)”统一转换为“基因名(genename)”,得到的信息用于后续的网络药理学数据分析。

### 1.2 AD 疾病相关基因检索

在 Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)、Dis Ge NET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)和 TTD 数据库(<https://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)中筛选治疗阿尔茨海默病的相关靶点,以“Alzheimer”为检索关键词,并对检索到的靶点进行处理,之后将三个数据库重复项去除从而获得最终的疾病靶点。

### 1.3 大黄有效成分与 AD 共同靶点筛选及 PPI 网络构建

将大黄有效成分的相关靶点和 AD 的靶点导入 OmicShare 平台(<https://www.omicshare.com/>)找出大黄有效成分与 AD 的交集靶点,再将这些交集靶点导入到 STRING 数据库,选择物种为“Homo sapiens”(人源)进行操作,最小相互作用阈值设为“medium confidence = 0.4”,得到蛋白互作 PPI 网络,即“大黄-靶点-阿尔茨海默病”网络。

### 1.4 关键靶基因的筛选

应用 Cytoscape 3.7.1 软件对 PPI 网络进行拓扑属性分析,计算 PPI 网络整体的点度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)和中介中心性(betweenness centrality, BC),以 betweenness、closeness 和 degree 的均数为“阈值”,选取 betweenness、closeness 和 degree 同时在阈值之上的靶点为“关键靶基因”,明确 PPI 网络中的关键靶基因。

## 1.5 关键靶基因的代谢通路与生物过程分析

为进一步研究大黄抗 AD 的作用情况,采用 Metascape 平台对大黄的 AD 靶点群进行 KEGG 代谢通路富集分析,研究大黄靶点的主要抗 AD 代谢通路;再进行 GO 生物过程富集分析,诠释大黄靶点的抗 AD 生物过程, Metascape 的平台列表与背景均选择“Homo Sapiens”(人源)进行操作。筛选出 AD 与大黄有效成分相关性前 20 的分子功能和前 10 的信号通路。

## 1.6 网络构建

将大黄有效成分、对应靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建大黄有效成分-基因靶点网络。

## 1.7 体外验证实验

### 1.7.1 细胞与试剂

大鼠肾上腺髓质嗜络细胞瘤细胞株 PC12 细胞(长沙赢润生物技术有限公司); $\text{A}\beta_{25-35}$ (美国 Sigma 公司);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(均购自南京建成生物研究所);ELISA 测定试剂盒、生化试剂(南京建成生物研究所);Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒(晶美公司);PI3K、Akt、Nrf2、HO-1、NF- $\kappa$ Bp65 引物合成(由上海生工生物工程有限公司提供);TB Green Premix Ex Taq PCR 试剂盒(TAKARA 公司);总 RNA 抽提试剂(Trizol)(宝生物工程(大连)有限公司);DMEM 细胞培养液(默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司);10% 新生小牛血清(Hyclone Lab);PBS(北京索莱宝科技有限公司);FBS(吉泰远成生物科技有限公司)。大黄,购自湖南中医药大学第一附属医院,经鉴定为蓼科植物大黄的干燥块根,取 100 g 经水提、蒸发、浓缩至不流动的清膏,使用时称取适量,溶解,过滤膜除菌后于-20℃保存。

### 1.7.2 细胞培养及分组干预

PC12 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% P/S),37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,细胞贴壁后取对数生长期细胞,分为 5 组。对照组:加入不含 FBS、P/S 的 DMEM 中孵育 24 h;模型组:予  $\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 24 h<sup>[9]</sup>;大黄低剂量组(1 mg/mL)、大黄中剂量组(2 mg/mL)、大黄高剂量组(4 mg/mL)孵育 24 h。

### 1.7.3 MTT 比色法检测细胞存活率

将 5 × MTT 用稀释液稀释成 1 × MTT 溶液;每孔加 50  $\mu\text{L}$  1 × MTT 溶液,37℃孵育 4 h;弃上清液,每个孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO,在平板摇床上摇 2~3 分

钟使其均匀。酶标仪在 570 nm 波长处检测每个孔 PC12 细胞的吸光度值。

根据公式计算 PC12 细胞的存活率:

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

### 1.7.4 ELISA 检测 PC12 细胞上清液 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 含量

PC12 细胞以  $1 \times 10^7$  接种于 96 孔板中,100  $\mu\text{L}$ /孔,当 80% 融合时,分别给予各组处理因素,每组 3 个复孔。按实验要求处理完成后,收集上清液留作待测标本。采用酶联免疫吸附测定进行检测,按照 ELISA 测定试剂盒的说明进行操作。

### 1.7.5 比色法检测 PC12 细胞培养上清 SOD、GSH-Px 和 MDA

冰上裂解细胞,离心,取上清,制成样品溶液,按谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒说明书操作,检测各项指标。

### 1.7.6 流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡率

按凋亡检测试剂盒说明操作,培养的 PC12 细胞经不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化处理,冰上裂解、离心收集细胞,沉淀加入结合缓冲液后加入 FITC-AnnexinV 和 PI,室内避光孵 15 min 后流式细胞仪检测 10 000 个细胞,用凋亡分析软件计算 PC12 细胞凋亡率,每一时相点重复检测 5 次。

### 1.7.7 荧光定量法检测 PC12 细胞上清 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达

采用 Trizol 抽提各组总 RNA,超微量核酸检测仪测定总 RNA 浓度,利用 Ta Ka Ra 试剂盒根据说明书逆转录为 cDNA,SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 、双蒸水 6  $\mu\text{L}$ ,共 20  $\mu\text{L}$ ,混合均匀,进行逆转录,将得到的 cDNA 产物根据试剂盒说明书配制如下反应体系:预变性 95℃、30 s;PCR 反应 95℃、5 s,60℃、30 s,72℃、15 s,反应重复 35 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析基因表达量。引物序列见表 1。

### 1.7.8 统计学处理

实验数据以均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS 24.0 软件做统计分析,组间差异比较用单因素方差分析统计,方差齐者用 LSD 检验(方差不齐者先将数据转换后使之方差齐), $P < 0.05$  有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物(5'→3') Primer (5'→3')	产物长度 Product length(bp)
$\beta$ -Actin	F:CGCGAGTACAACCTTCTTGC R:CGTCATCCATGGCGAACTGG	70
PI3K	F:TGTGGCACAGACTTGGTGT R:TTCCTCCCTTGAGATGCTCCTCC	153
Akt	F:TGTCTCGTGAGCCGCTGTT R:CCGTTATCTTGATGTGCCCGTC	161
Nrf2	F:TAGATGACCATGAGTCGCTTGC R:GCCAAACTTGCTCCATGTCC	156
HO-1	F:AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA R:GCCGTGTAGATATGCTACAAGGA	100
NF- $\kappa$ B p65	F:CTGCGATACCTTAATGACAGCG R:AATTTGGCTTCCTTCTTGGCT	194

## 2 结果

个有效成分(M1~M17)。

### 2.1 大黄有效成分的筛选

如表 2 所示,本研究共筛选出大黄中含有的 17

表 2 大黄有效成分

Table 2 Effective ingredients of Radix et Rhizoma Rhei

编号 No.	成分 Ingredient	分子量 Molecular weight	OB (%)	DL
M1	紫杉醇 Eupatin	360.34	50.8	0.41
M2	柠檬黄质 Mutatochrome	552.96	48.64	0.61
M3	大黄素甲醚二葡萄糖苷 Physciondiglucoside	608.6	41.65	0.63
M4	原花青素 B-5,3'-O-没食子酸酯 Procyanidin B-5,3'-O-gallate	730.67	31.99	0.32
M5	大黄酸 Rhein	284.23	47.07	0.28
M6	番泻苷 E Sennoside E	524.5	50.69	0.61
M7	大黄酚-8-O- $\beta$ -葡萄糖苷 Torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside	480.46	43.02	0.74
M8	决明内脂 Toralactone	272.27	46.46	0.24
M9	单甲醚 Questin	284.28	20.44	0.27
M10	大黄素-1-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 Emodin-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	432.41	44.81	0.8
M11	番泻苷 D Sennoside D	524.5	61.06	0.61
M12	胡萝卜苷 Daucosterol	386.73	35.89	0.7
M13	掌叶二萜酉同 Palmidin A	510.52	32.45	0.65
M14	$\beta$ -谷甾醇 Beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
M15	芦荟大黄素 Aloe-emodin	270.25	83.38	0.24
M16	没食子酸-3-O-(6'-O-galloyl)-葡萄糖苷 Gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	484.4	30.25	0.67
M17	(-)-儿茶素 (-)-Catechin	290.29	49.68	0.24

### 2.2 有效成分-基因靶点网络的构建

将筛选后的 17 个有效成分及 276 个相关靶点

导入 Cytoscape 3.7.1 构建“大黄有效成分-基因靶点网络”(图 1)。17 个红色菱形表示大黄的活性成

分,276 个绿色三角形为活性成分作用靶点,共有 1 211条边代表靶点和化学成分之间的相互作用,体现了大黄多成分、多靶点的特点。

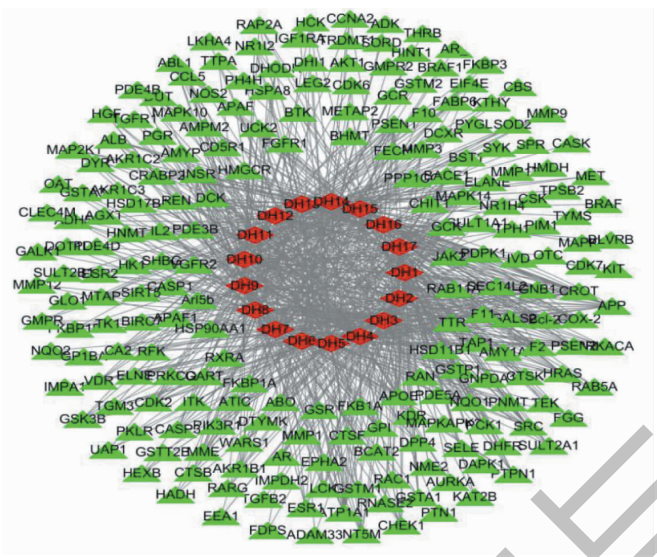


图 1 大黄有效成分-基因靶点网络

Fig. 1 The gene target network of the effective components of Radix et Rhizoma Rhei

注:红色菱形:大黄活性成分;绿色三角形:靶基因。Note:Red diamond:Active components of Radix et Rhizoma Rhei;Green triangle:Target gene.

2.3 阿尔茨海默病相关基因

在 Drugbank、Dis Ge NET 和 TTD 数据库检索 AD 的靶基因,共得到 2 245 个基因。

107 个靶基因可能为大黄抗阿尔茨海默病的靶点。为研究各靶点在体内的相互作用关系,寻找核靶点,将潜在靶点蛋白群进行 PPI 网络分析(见图 2),结果共发现 107 个靶蛋白发生相互作用,产生 786 条代表蛋白之间相互作用的边。

2.4 蛋白互作网络构建图

在 Drugbank、Dis Ge NET 和 TTD 数据库检索 AD 的靶基因与大黄作用的靶基因有 107 个重复,这

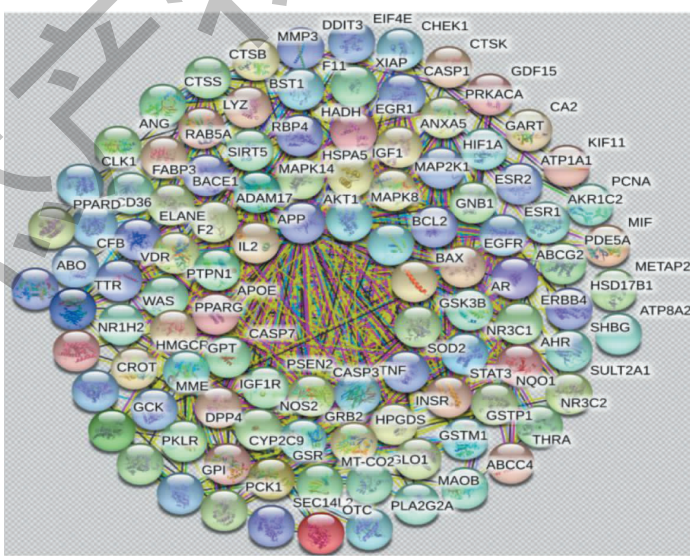


图 2 靶蛋白 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of target protein

2.5 核心靶点分析结果

Cytoscape 3. 7. 1 计算得到,PPI 网络平均度值

为 14. 32,平均介数为  $3. 72 \times 10^{-2}$ ,平均紧密度为 0. 67,度值、介数和紧密度均超过平均值的靶蛋白共

8 个,依次为 APP、TNF、SOD2、CASP3、CASP7、BAX、Bcl-2、IL2,说明以上 8 个靶点在 PPI 网络中处于关键位置,很可能是大黄抗 AD 的关键靶点。

## 2.6 Metascape 分析的 KEGG 和 GO 结果

通过 GO 数据库分析,大黄有效成分靶标与 AD 疾病靶标基因功能有炎症反应、氧化应激反应、炎症反应的负调节、MAPK 活性的正调控、老化、记忆、凋亡过程、神经元凋亡过程的正调控、信号转导、cAMP 生物合成过程、调节活性氧代谢过程、细胞内受体信

号通路、缺氧反应等条目(见图 3),说明大黄治疗 AD 的机制可能与炎症反应、细胞凋亡、氧化应激反应、细胞内受体信号通路、cAMP 生物合成过程等密切相关。

通过 KEGG 数据库富集大黄治疗 AD 关键靶标所参与的通路主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、Nrf2/HO-1 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、MAPK 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、mTOR 信号通路、TLR4 信号通路、Wnt 信号通路、阿尔茨海默病等(见

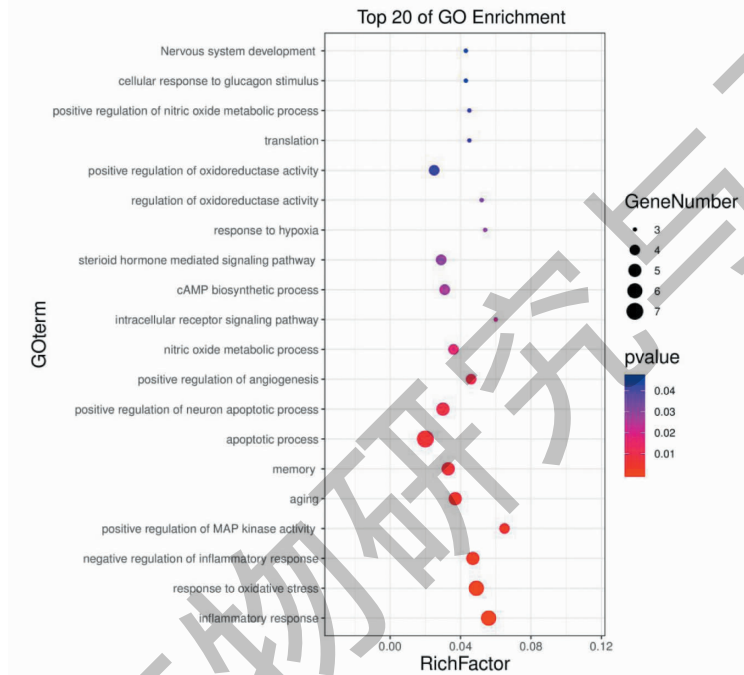


图 3 有效组分-基因靶点-分子功能的 GO 富集气泡图

Fig. 3 Bubble chart of GO enrichment of effective components-gene targets-molecular functions

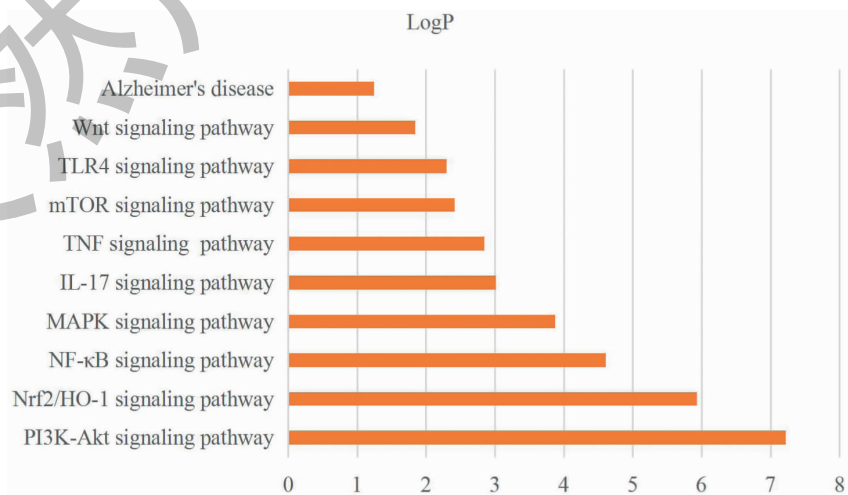


图 4 前 10 个代表性的通路

Fig. 4 Top 10 representative pathways

图4),说明大黄可能主要通过调控炎症反应、细胞凋亡、氧化应激反应来防治AD。

## 2.7 MTT法检测各组PC12细胞的细胞存活率比较

采用MTT法检测各组细胞存活率,统计分析结果如表3所示:与对照组比较,模型组的PC12细胞的存活率明显减低,有显著性差异( $P < 0.01$ );与模型组相比,随着大黄浓度增加,PC12细胞存活率显著上升( $P < 0.05, P < 0.01$ ),表明大黄对PC12细胞

具有明显保护作用。

## 2.8 ELISA检测PC12细胞上清液IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量

结果见表4,大黄作用PC12细胞24h后,与对照组比较模型组PC12细胞IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,大黄中、高剂量组的PC12细胞IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量均显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),表明大黄对PC12细胞的炎症反应具有明显的抑制作用。

表3 各组细胞存活率的比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Comparison of cell survival rate in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	样本数 Number of sample	细胞存活率 Cell survival rate (%)
对照组 Control	8	99.9 $\pm$ 0.7
模型组 Model	8	63.5 $\pm$ 0.5 *
大黄低剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-L	8	81.9 $\pm$ 0.2 $\blacktriangle$
大黄中剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-M	8	84.4 $\pm$ 0.8 $\blacktriangle$
大黄高剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-H	8	91.1 $\pm$ 0.9 $\blacktriangle\blacktriangle$

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

Note: Compared with control group, \*  $P < 0.01$ ; Compared with model group,  $\blacktriangle P < 0.05, \blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ .

表4 各组PC12细胞上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Comparison of the contents of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the supernatant of PC12 cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
对照组 Control	12.5 $\pm$ 1.5	85.7 $\pm$ 0.5	126.8 $\pm$ 9.8
模型组 Model	36.8 $\pm$ 1.4 * *	128.8 $\pm$ 5.3 * *	146.8 $\pm$ 14.1 * *
大黄低剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-L	20.3 $\pm$ 2.7	120.6 $\pm$ 14.1	135.9 $\pm$ 13.9
大黄中剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-M	18.1 $\pm$ 2.3 $\blacktriangle$	117.1 $\pm$ 11.7 $\blacktriangle$	130.7 $\pm$ 23.7 $\blacktriangle$
大黄高剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-H	14.1 $\pm$ 1.7 $\blacktriangle\blacktriangle$	107.5 $\pm$ 10.1 $\blacktriangle\blacktriangle$	126.3 $\pm$ 20.7 $\blacktriangle\blacktriangle$

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

Note: Compared with control group, \*  $P < 0.05, ** P < 0.01$ ; Compared with model group,  $\blacktriangle P < 0.05, \blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ , the same below.

表5 各组PC12细胞上清液中SOD、GSH-Px和MDA比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Comparison of SOD, GSH-Px and MDA in PC12 cell supernatant of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (mU/mg)	MDA (nmol/mg prot)
对照组 Control	326.8 $\pm$ 8.5	366.1 $\pm$ 64	602.9 $\pm$ 28.9
模型组 Model	155.1 $\pm$ 5.6 * *	96.7 $\pm$ 14.2 * *	1283.5 $\pm$ 26.5 * *
大黄低剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-L	194.2 $\pm$ 22.5 $\blacktriangle$	175.7 $\pm$ 11.1 $\blacktriangle$	1051.7 $\pm$ 22.9 $\blacktriangle$
大黄中剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-M	277.5 $\pm$ 4.3 $\blacktriangle$	235.5 $\pm$ 3.5 $\blacktriangle$	428.9 $\pm$ 15.4 $\blacktriangle\blacktriangle$
大黄高剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-H	285.7 $\pm$ 4.5 $\blacktriangle\blacktriangle$	265.8 $\pm$ 9.4 $\blacktriangle\blacktriangle$	406.5 $\pm$ 2.8 $\blacktriangle\blacktriangle$

## 2.9 各组PC12细胞培养上清SOD、GSH-Px和MDA比较

结果见表5,与对照组比较,模型组SOD、GSH-

Px活力下降,MDA含量增高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,大黄各组SOD、GSH-Px活力均明显升高,MDA含量减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ),表明大黄对

PC12 细胞的氧化应激反应具有明显的抑制作用。

## 2.10 流式细胞仪检测各组 PC12 细胞的凋亡率比较

结果见表 6, 正常 PC12 细胞也有一定比例的凋亡率, 与对照组比较, 模型组 PC12 细胞凋亡率明显

升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 随着大黄浓度增加, PC12 细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明大黄对 PC12 细胞的凋亡具有明显的抑制作用。

表 6 各组 PC12 细胞凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 6 Comparison of PC12 cell apoptosis rate in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	凋亡率 Apoptosis rate
对照组 Control	1.9 ± 1.9
模型组 Model	29.8 ± 1.5**
大黄低剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-L	20.2 ± 2.6 <sup>▲</sup>
大黄中剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-M	14.1 ± 2.1 <sup>▲</sup>
大黄高剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-H	8.1 ± 3.2 <sup>▲▲</sup>

## 2.11 各组 PC12 细胞上清液 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1、NF-κB p65 mRNA 的表达

结果见表 7, 与对照组比较, 模型组细胞 NF-κB p65 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), PI3K、Akt、Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 大黄各组能够显著降低 NF-

κB p65 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 显著提高 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。说明大黄能够明显抑制 NF-κB p65 基因的表达, 促进 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1 基因的表达。

表 7 各组 PC12 细胞 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1、NF-κB p65 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 7 Comparison of PI3K, Akt, Nrf2, HO-1, and NF-κB p65 mRNA expression in PC12 cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	PI3KmRNA	AktmRNA	Nrf2mRNA	HO-1mRNA	NF-κB p65
对照组 Control	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.01	1.0 ± 0.11	1.0 ± 0.13	1.0 ± 0.2
模型组 Model	0.7 ± 0.1*	0.7 ± 0.5*	0.7 ± 0.2*	0.7 ± 0.3*	3.5 ± 0.5**
大黄低剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-L	1.4 ± 0.1 <sup>▲</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>▲</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>▲</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>▲</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>▲</sup>
大黄中剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-M	2.1 ± 0.1 <sup>▲</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>▲</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>▲</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>▲</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>▲</sup>
大黄高剂量组 Radix et Rhizoma Rhei-H	2.3 ± 0.1 <sup>▲▲</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>▲▲</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>▲▲</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>▲▲</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>▲▲</sup>

## 3 讨论与结论

AD 是老年痴呆中最常见的一种类型, 是神经系统至今仍未解决的重大难题, 目前仍缺乏有效的治疗方法。随着全球人口老龄化进程加快, 发病率呈逐年上升趋势, 对老年人健康和生活质量造成巨大威胁, 并给全世界带来沉重的经济负担。Su 等<sup>[10]</sup>研究发现, “毒损脑络” 已经成为 AD 发生发展的关键, 贯穿于整个 AD 的病理演变过程。大黄始载于《神农本草经》, 归脾、胃、大肠、肝、心经。具有泻下攻积、清热泻火、解毒、活血祛瘀之功。Tian<sup>[11]</sup>认为大黄有以通为补的功效, 促进胃肠系统降浊受纳, 并认为“浊” 是肠道内毒素, 可能损伤机体, 大黄

能够促进补益药物的补益作用, 更好的发挥“补肾填精” 的作用, 而且大黄具有活血化瘀的功效, 能消痰浊瘀血通络, 能通腑降浊, 解火热毒邪, 对应中医“脑消髓减、痰瘀阻络、毒损脑络” 的 AD 病机。

本研究通过 TCMS 平台的 OB 和 DL 筛选, 共筛选出大黄 17 个有效成分, 涉及 107 个 AD 靶点及相关信号通路 162 个。网络分析结果表明大黄可能通过作用于 APP、TNF、SOD2、CASP3、CASP7、BAX、Bel-2 等关键靶点。

在本研究筛选出的信号通路中, 与大黄有效靶点的关联度最高的是 PI3K-Akt 信号通路, 其次是 Nrf2/HO-1 信号通路和 NF-κB 信号通路。PI3K/Akt



通路是一条经典且重要的信号途径,参与了包括细胞增殖、细胞凋亡、炎症反应等重要的细胞活动。许多研究发现,神经元的氧化损伤是AD发病极早期的重要病理事件,AD患者脑内PI3K/Akt通路抑制,并且促进细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>,而激活PI3K/Akt信号通路可抑制细胞凋亡和氧化应激反应<sup>[14,15]</sup>。Qi等<sup>[16]</sup>研究发现,激活PI3K/Akt信号途径可降低AD模型小鼠tau蛋白磷酸化水平,提高其学习记忆能力。Nrf2/HO-1信号通路是调控AD过程中炎症反应和氧化应激的重要信号通路,Nrf2/HO-1信号通路的激活可以显著增加大脑皮质和海马组织的抗炎和抗氧化应激反应能力,抑制神经元凋亡,发挥神经保护作用<sup>[17-20]</sup>。近年来关于PI3K/Akt信号通路的多项研究发现其信号途径与HO-1的表达存在密切关系,PI3K/Akt信号通路的激活能明显促进Nrf2/HO-1基因表达上调,激活Nrf2/HO-1信号通路,从而发挥抑制细胞凋亡、氧化应激反应和炎症反应的作用<sup>[21-24]</sup>。NF- $\kappa$ B信号通路不仅参与学习记忆、机体免疫、神经元可塑性调节,还参与神经系统中多种基因的调控、细胞凋亡的信号传导过程<sup>[25,26]</sup>,在一定程度上影响AD的发生和发展。近年来研究发现Nrf2/HO-1与NF- $\kappa$ B介导的炎症反应关系密切,Nrf2和NF- $\kappa$ B在保持细胞氧化还原平衡及对抗氧化应激和炎症反应中是两条关键的信号通路,两条信号通路借由一序列复杂的分子间作用互相影响<sup>[27]</sup>。NF- $\kappa$ B与Nrf2负性相关,Nrf2的增多会致使NF- $\kappa$ B表达下调,从而拮抗炎症反应。

为了验证网络药理学的分析结果,本研究选择了大黄对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞的细胞存活率、凋亡率、炎症反应、氧化应激反应、PI3K/Akt/Nrf2/HO-1信号通路及NF- $\kappa$ B信号通路的调控作用进行了实验验证。验证结果表明大黄能有效抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞的炎症反应、氧化应激反应、细胞凋亡和提高其细胞存活率,上调PI3K、Akt、Nrf2、HO-1基因,下调NF- $\kappa$ B基因。

综上,大黄具有多成分、多靶点协同治疗阿尔茨海默病的作用。本文基于系统药理学研究大黄对阿尔茨海默病的具体作用靶点及机制,对今后临床运用大黄治疗阿尔茨海默病具有重要指导意义。

#### 参考文献

1 Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future [J]. *Neuropharmacology*,

2014, 76 (Pt A): 27-50.

2 Ren ST, Wang L, Wu YR, et al. Research progress of active ingredients of traditional Chinese medicine for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Jiangsu Ocean Univ (江苏海洋大学学报)*, 2018, 27(3): 28-33.

3 Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015-The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends [R]. (2015-08-25) [2019-11-07]. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.

4 Wang JY, Wang XC, Zhai JW, et al. Analysis of the economic burden level and influencing factors of Alzheimer's disease [J]. *Chin Public Health Manage (中国公共卫生管理)*, 2016, 32(1): 4-7.

5 Zhu J, Zhao Z, Dong YX, et al. Research progress of Alzheimer's disease and its therapeutic drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2018, 34: 1629-1634.

6 Ding C, Sun L, Zhang Y, et al. The relationship between cognitive dysfunction after general anesthesia and changes in intraoperative cerebral oxygen saturation in elderly patients with esophageal cancer [J]. *Chin J Med (中国医刊)*, 2012, 47(4): 42-44.

7 Wang P, Tang SH, Sun J, et al. Modern research progress of traditional Chinese medicine based on integrated pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 1297-1302.

8 Ma Y, Wang WJ, Huang SJ, et al. Study on the mechanism of Danshen-Gegen in treating coronary heart disease based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31(2): 209-223.

9 Zhang YH, Wu DH, Yuan CY, et al. Study on the effects of the compatibility of stilbene glycosides and *Panax notoginseng* saponins on  $A\beta$  (25-35)-induced PC12 cell damage [J]. *J Hunan Univ Chin Med (湖南中医药大学学报)*, 2015, 35(9): 20-22.

10 Su R, Han ZY, Fan JP et al. Significance of the theory of "toxicity damages brain network" in the field of Alzheimer's disease research in traditional Chinese medicine [J]. *J Chin Med (中医杂志)*, 2011, 52: 1370-1371.

11 Tian JZ, Du CHT, Yang HM, et al. Clinical study of compound rhubarb preparations on improving memory function of the elderly [J]. *J Chin Med (中医杂志)*, 1995, 36: 545-547.

12 Gao YM. Recent development of traditional Chinese medicine treatment of senile dementia [J]. *J Beijing Chin Tradit Med (北京中医药)*, 2002, 21: 58-60.

13 Nunonura A, Perry G, Aliev G, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease [J]. *J Neuropathol Exp*

- Neurol, 2001, 60: 759-767.
- 14 Wang PJ, Song RR, He DD. The role of PI3K/Akt signaling pathway in Alzheimer's disease-like cells and the effect of edaravone on it [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2010, 27(1): 12-15.
  - 15 Ma T, Yan Y, Zhang YL, et al. Effect of tonifying kidney and filling essence method on PI3K/Akt pathway activation and oxidative stress in Alzheimer's disease mice [J]. *J Beijing Chin Tradit Med* (北京中医药), 2014, 33: 492-495.
  - 16 Qi Y, Qin WY, Kang K, et al. The effect of Wenyujin volatile oil on the phosphorylation expression of Tau protein in Alzheimer model mice through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2017, 24(1): 45-48.
  - 17 Wang KH. Based on mitochondrial dysfunction and Nrf2-mediated anti-oxidative stress to explore the neuroprotective effect of naringenin on cerebral ischemia-reperfusion injury [D]. Guangzhou: Southern Medical University (南方医科大学), 2017.
  - 18 Su YX, Ma ZH, Zhang L, et al. Artemisinin improves the cytotoxicity of A $\beta$ (1-42) on SH-SY5Y cells through the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2018, 35: 591-594.
  - 19 Yu NH, Huang YP, Jiang Y, et al. *Ganoderma lucidum* triterpenoids (GLTs) reduce neuronal apoptosis via inhibition of ROCK signal pathway in APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9894037.
  - 20 Wang XR, Shi GX, Yang JW, et al. Acupuncture ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia through Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 1077-1084.
  - 21 La WF, Hong HJ, Zhang XQ, et al. Salidroside reduces neuronal apoptosis in MCAO rats by activating the PI3K/AKT/NRF2 pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2016, 31: 1883-1886.
  - 22 Hou WT. Galloylpaconiflorin reduces inflammation and oxidative stress injury after cerebral ischemia and reperfusion through PI3K/Akt/Nrf2 pathway [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2017.
  - 23 Wu YL. Cytoplasmic M-CSF increases the apoptosis resistance of adenocarcinoma MCF-7 cells by activating the PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway [D]. Hengyang: Nanhua University (南华大学), 2017.
  - 24 Zhao J, Yuan RH, Wang HF, et al. Huoxue Capsule activates PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathway to exert anti-oxidative damage on vascular endothelial cells [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医药学院学报), 2019, 42(3): 10-16.
  - 25 Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38079-38086.
  - 26 O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(6): 252-258.
  - 27 Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43: 621-626.
- 
- (上接第 78 页)
- 15 Peng Y, Gao P, Shi L, et al. Central and peripheral metabolic defects contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease: targeting mitochondria for diagnosis and prevention [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32: 1188-1236.
  - 16 Wang BZ, Yang JJ, Zhang H, et al. AMPK signaling regulates the age-related decline of hippocampal neurogenesis [J]. *Aging Dis*, 2019, 10: 1058-1074.
  - 17 Gao J, Xu Y, Zhang J, et al. *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves aqueous extract protects against hydrogen peroxide-induced SH-SY5Y cells injury through activation of Sirt3 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42: 3485-3494.
  - 18 Gao JM, Li DF, Niu S, et al. Protective effect of hyperoside on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage of A549 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 128-133.
  - 19 Yin J, Li S, Nielsen M, et al. Sirtuin 3 attenuates amyloid- $\beta$  induced neuronal hypometabolism [J]. *Aging*, 2018, 10: 2874-2883.