

# 基于网络药理学的丹参-川芎药对治疗阿尔茨海默病的作用机制分析

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

<sup>1</sup>重庆三峡医药高等专科学校中医学院,重庆 404120; <sup>2</sup>湖南中医药大学;

<sup>3</sup>2011 数字中医药协同创新,长沙 410208; <sup>4</sup>湖南省中医药研究院附属医院,长沙 410006

**摘要:**利用网络药理学方法研究丹参-川芎药对治疗阿尔茨海默病(AD)的作用机制。经数据库查找及文献检索,获得丹参和川芎的有效成分,利用 STITCH 与 TCMSP 数据库得到有效成分作用靶点,并构建药物-靶标网络、PPI 网络,利用 Metascape 数据库对丹参-川芎作用靶点进行 GO 分析以及 KEGG 代谢通路富集分析。最后利用 MTT 实验、ELISA 法、流式细胞仪和荧光定量 PCR 实验验证丹参-川芎对 PC12 细胞的保护作用。结果显示筛选出丹参-川芎药对 25 个活性成分和作用于 AD 的靶点 105 个,GO 分析相关度前 20 个靶点分子功能,前 10 条重要信号通路。细胞实验证实了丹参-川芎可显著提高 PC12 细胞的细胞存活率和拮抗 PC12 细胞的炎症反应及降低 PC12 细胞的凋亡率,并抑制 p38MAPK/NF-κB 信号通路的激活。丹参-川芎药对具有多种有效成分以协同的方式与多个靶点、多种途径相互作用,主要通过抗细胞凋亡、抑制炎症反应等对 AD 发挥主要的治疗作用,为其临床应用提供了理论依据。

**关键词:**丹参;川芎;阿尔茨海默病;网络药理学;信号通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)8-1382-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.8.014

## Mechanism research of Danshen-Chuanxiong in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology

YANG Meng-lin<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Xiao-qing<sup>2,3\*</sup>, WU Da-hua<sup>2,4</sup>,  
ZHANG Yun-hui<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Cai-xing<sup>2,3</sup>, TONG Tian-hao<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Three Gorges Medical College of Chinese Medicine, Chongqing 404120, China;

<sup>2</sup>Hunan University of Chinese Medicine; <sup>3</sup>2011 Digital Traditional Chinese Medicine Collaborative Innovation, Changsha 410208, China;

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

**Abstract:** To study the mechanism of Danshen-Chuanxiong (DS-CX) in the treatment of Alzheimer's disease (AD) by using network pharmacology. Through database search and literature retrieval, the effective ingredients of DS and CX were obtained, and the targets of active ingredients were obtained through STITCH and TCMSP databases. And the drugs-targets network and PPI network were built. Then, gene ontology (GO) analysis and KEGG metabolic pathway enrichment analysis were performed on the action targets of DS-CX were performed using Metascape database. Finally, MTT, ELISA, flow cytometer and fluorescence quantitative PCR experiment were carried out to verified the protective effect of DS-CX on PC12 cells. The results showed that 25 active components of DS-CX were screened and 105 targets for the treatment of Alzheimer's disease, top 20 target molecular functions by GO analysis, and top 10 important signaling pathways. Cell experiments also proved that DS-CX significantly increased the cell survival rate of PC12 cells and antagonize the inflammatory response of PC12 cells and reduce the apoptosis rate of PC12 cells, and inhibited the activation of p38MAPK/NF-κB signaling pathway. DS-CX couplet medicines had a variety of active ingredients that interact with multiple targets and multiple pathways in a synergistic manner to play a major therapeutic role on AD by anti-apoptosis and anti-inflammatory, which provides the theoretical basis for its clinical application.

收稿日期:2020-11-18 接受日期:2021-07-05

基金项目:国家自然科学基金(81373702);国家自然科学基金(81874462);重庆市中医药重点学科(中医基础理论)建设项目(渝中医[2021]16号)

\*通信作者 E-mail:zxq5381@sohu.com

**Key words:** Danshen; Chuanxiong; Alzheimer's disease; pharmacology; signaling pathway

随着世界人口老龄化增加,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病率也逐年升高,到2050年估计会增至1.15亿<sup>[1]</sup>,对老年人的健康和生活质量造成重大威胁,给家庭和社会带来巨大压力。由于AD发病隐匿、病程长、临床表现和发病机制复杂,现代西药对其治愈率极低,且易耐药、副作用较多<sup>[2,3]</sup>。传统中医治疗AD历史悠久,其疗效已获得认可<sup>[4]</sup>。

清代唐容川《血证论》言“血在上,则浊蔽而不明矣”,王清任《医林改错》云:“凡有瘀血也,令人善忘”。故瘀血是痴呆的重要致病因素,活血化瘀是治疗AD的基本治法之一<sup>[5]</sup>。Yan等<sup>[6]</sup>研究中医文献中医药治疗老年痴呆常用药对发现,从活血化瘀立论治疗老年痴呆90首基本方中丹参与川芎配伍频率最高,推测丹参-川芎可能具有较好的治疗AD的作用。本研究应用网络药理学方法,探讨丹参-川芎药对治疗AD的作用机制,以期为阐述活血化瘀法治疗AD的临床治疗提供有价值的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 丹参-川芎有效成分库的建立

在TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)和BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batmantcm/>)中筛选丹参-川芎两味中药的有效成分,根据口服利用度(oral bioavailability, OB)≥30%及类药性(drug-like, DL)≥0.18进行筛选<sup>[7]</sup>。同时,通过文献检索补充丹参和川芎的其他有效成分。一些有效成分如川芎嗪、阿魏酸虽不满足上述筛选条件,但通过文献检索发现这类有效成分有明确治疗AD的作用,因此这类有效成分也将作为本研究的候选有效成分。例如,川芎嗪能通过作用PI3K/Akt通路,调节Bcl-2、Bax、caspase-3的表达,从而拮抗Aβ<sub>25-35</sub>诱导的细胞凋亡<sup>[8]</sup>;阿魏酸可通过抗氧化作用降低AD小鼠脑内的氧化应激效应和凋亡相关蛋白的表达,从而发挥对AD的治疗作用<sup>[9]</sup>。

### 1.2 有效成分作用靶点库的建立

借助TCMSP数据库、Drug Bank(<https://www.drugbank.ca/>)数据库和STITCH(<http://stitch.embl.de/>)数据库查询有效成分的作用靶点。

### 1.3 AD疾病相关基因检索

在DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)、TTD数据库(<https://bidd.nus.edu.sg/group/cjtd/>)和Drugbank数据库中检索AD的靶基因,去除三个数据库重复项。

cjtd/)和Drugbank数据库中检索AD的靶基因,去除三个数据库重复项。

### 1.4 丹参-川芎有效成分与AD共同靶点筛选及PPI网络构建

将“1.2”和“1.3”项获得的靶点进行比对,找出共同靶点,将这些共同靶点上传至STRING数据库,构建靶点群蛋白质相互作用(PPI)网络。

### 1.5 筛选PPI网络的关键靶基因

借助Cytoscape 3.7.1的插件Centiscape 2.2算出PPI网络的点度中心性(degree)、接近中心性(closeness)和中介中心性(betweenness)的中位数,选择degree、betweenness和closeness均在中位数之上的靶点为“关键靶基因”。

### 1.6 关键靶点的代谢通路与生物过程分析

丹参-川芎治疗AD靶基因通过Metascape平台进行GO分析和KEGG通路分析。获取丹参-川芎有效成分与AD相关性前20位的生物学过程和前10位的通路。

### 1.7 体外验证实验

#### 1.7.1 细胞与试剂

PC12细胞(长沙瀛润生物技术有限公司,批号2015032007);Aβ<sub>25-35</sub>(美国Sigma公司,批号053M4804V);Annexin-V/PI凋亡检测试剂盒(KeyGEN BioTRCH,批号20201204);ELISA测定试剂盒(南京建成生物研究所,IL-1β批号Y16036021,TNF-α批号Y17036022,IL-6批号Y14036607);p38MAPK、NF-κBp65引物合成(由上海生工生物工程有限公司提供);qRT-PCR试剂盒(中国北京康为世纪公司,批号50445);总RNA抽提试剂(Trizol)(中国北京康为世纪公司,批号36320)。丹参100g购自湖南中医药大学第一附属医院;川芎100g购自湖南中医药大学第一附属医院,按1:1称取丹参、川芎,通过水提、蒸发、浓缩成不流动的浸膏,过滤膜灭菌后放至-20℃冰箱贮藏。

#### 1.7.2 仪器

Galaxy 170R型二氧化碳培养箱(上海百赛生物技术有限公司);Eppendorf 5804R型低温高速离心机(德国Eppendorf 5810R);Primo Vert型倒置显微镜(德国Carl Zeiss Jena)等。

#### 1.7.3 细胞培养及分组干预

PC12细胞于37℃、95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>培养箱生

长至对数生长期,分为5组。对照组:在不含FBS、PBS的DMEM中孵育24 h;模型组:用A<sub>β</sub><sub>25-35</sub>(20 μmol/L)孵育24 h<sup>[10]</sup>;丹参-川芎低剂量组(10 μg/mL)、丹参-川芎中剂量组(20 μg/mL)、丹参-川芎高剂量组(40 μg/mL)孵育24 h。

#### 1.7.4 丹参-川芎对PC12细胞的细胞存活率的影响

每个孔加入1×MTT溶液50 μL,在37 °C、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养4 h;终止培养吸去孔内的培养液,各孔加入DMSO 200 μL,置摇床上低速振荡3 min。酶标仪上测各孔在570 nm吸光度的OD值。

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

#### 1.7.5 丹参-川芎对PC12细胞炎症反应的影响

采用ELISA法检测各组PC12细胞培养液中IL-1β、IL-6和TNF-α含量,测量步骤严格按照使用说明书进行。

#### 1.7.6 丹参-川芎对PC12细胞凋亡率的影响

按Annexin V FITC/PI试剂盒说明操作,流式

细胞仪上检测PC12细胞凋亡率,每组试验重复5次,用凋亡分析软件对数据进行统计。

#### 1.7.7 丹参-川芎对PC12细胞p38MAPK/NF-κB信号通路的影响

荧光定量法检测PC12细胞上清p38MAPK、NF-κB p65mRNA表达,利用Trizol法提取PC细胞总RNA,反转录合成cDNA,按照试剂盒说明书进行荧光实时定量PCR检测。预变性引物见表1。

#### 1.7.8 统计学处理

实验数据结果采用SPSS 24.0软件进行分析,组间比较用单因素方差分析,P<0.05表示差异有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 丹参-川芎药对活性成分的收集与筛选

本研究通过TCMSP平台的OB和DL筛选,以及查找相关文献对中药中的特征化合物予以补充,获得丹参-川芎的25个化合物包括丹参15(DS1~15)个,川芎10(CX1~10)个(见表2)。

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)
β-actin	F:CGCGAGTACAACCTTCTTGC R:CGTCATCCATGGCGAACTGG	70
p38MAPK	F:GCACTACAACCAGACAGTGG R:GTCCCCGTCAGACGCCATTAT	129
NF-κB p65	F:CTGGGATACTTAATGACAGCG R:AATTTGGCTTCCTTCTTGGCT	194

表2 丹参-川芎活性成分  
Table 2 Active ingredients of DS-CX

编号 No.	成分 Compound	生物利用度 OB (%)	类药性 DL
DS1	1,2,5,6-Tetrahydrotanshinone	38.75	0.36
DS2	柳杉酚 Dugiol	36.11	0.28
DS3	5,6-Dihydroxy-7-isopropyl,1-dimethyl-2,3-Dihydrophenanthren-4-one	33.77	0.29
DS4	2-Isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.86	0.23
DS5	4-Methylenemiltirone	34.35	0.23
DS6	亚甲基丹参醌 Methylenetanshinquinone	37.07	0.36
DS7	丹参酮酚 Salvilenone	30.38	0.38
DS8	隐丹参酮 Cryptotanshinone	52.34	0.40

续表2(Continued Tab. 2)

编号 No.	成分 Compound	生物利用度 OB (%)	类药性 DL
DS9	表丹参螺缩酮内脂 Danshenespiroketalactone	50.43	0.31
DS10	二氢丹参酮 I Dihydrotanshione I	45.04	0.36
DS11	异隐丹参酮 Isocryptotanshi-none	54.98	0.39
DS12	异丹参酮 II Isotanshinone II	9.92	0.40
DS13	丹参新酮 Miltirone	38.76	0.25
DS14	NSC122421	34.49	0.28
DS15	丹参酮 IIA Tanshinone iia	49.89	0.40
CX1	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
CX2	杨梅酮 Myricanone	40.60	0.51
CX3	扁桃醇 Mandenol	41.99	0.19
CX4	川芎哚呋内酯 Wallichilide	42.31	0.71
CX5	洋川芎酮 Senkyunone	47.66	0.24
CX6	含川哚 Perlolyrine	65.95	0.27
CX7	FA	68.96	0.71
CX8	藁本内酯 Ligustilide	53.72	0.07
CX9	阿魏酸 Ferulic acid	39.56	0.06
CX10	川芎嗪 Tetramethylpyrazine	20.01	0.03

## 2.2 丹参-川芎药对活性成分-靶点网络

通过 Cytoscape 3.7.1 获得“活性成分-靶点网络”(见图 1)。25 个菱形代表丹参-川芎的有效成

分,224 个三角形代表有效成分靶标,872 条边代表了有效成分和靶点两者的互相作用,展现了丹参-川芎多成分、多靶点的特点。

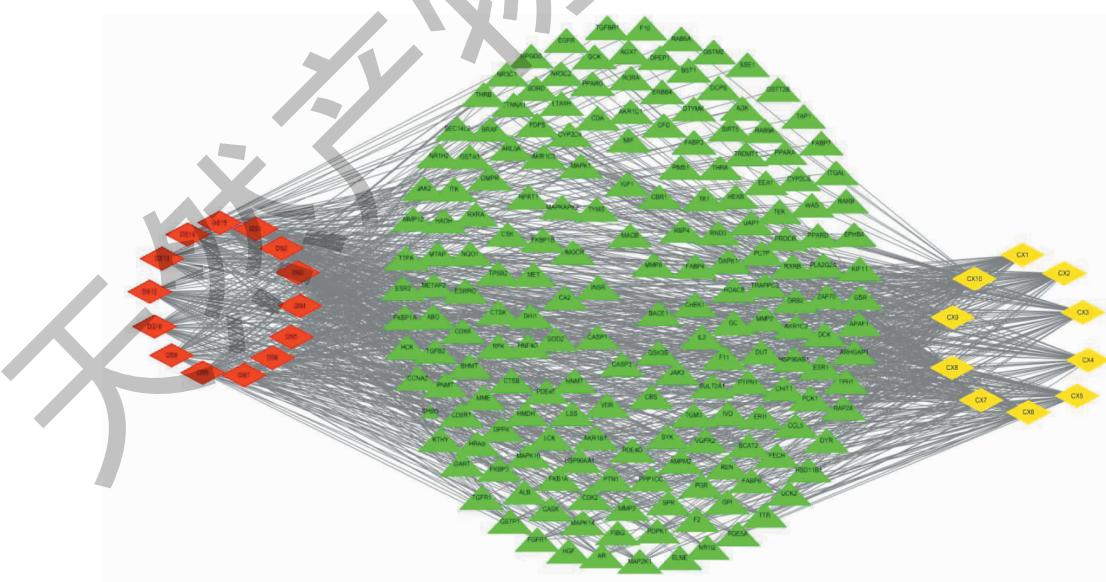


图 1 “活性成分-靶点”网络

Fig. 1 The target network of the active ingredients

注:红色菱形:丹参有效成分;黄色菱形:川芎有效成分;绿色三角形:靶点。Note: Red diamond: Active ingredients of DS; Yellow diamond: Active ingredients of CX; Green triangle: Target.

## 2.3 AD 相关靶点

在 DisGeNET、TTD 和 Drugbank 数据库查找 AD 的靶点,共获得 2 245 个靶点。

## 2.4 PPI 网络构建图

在 DisGeNET、TTD 和 Drugbank 数据库查找 AD

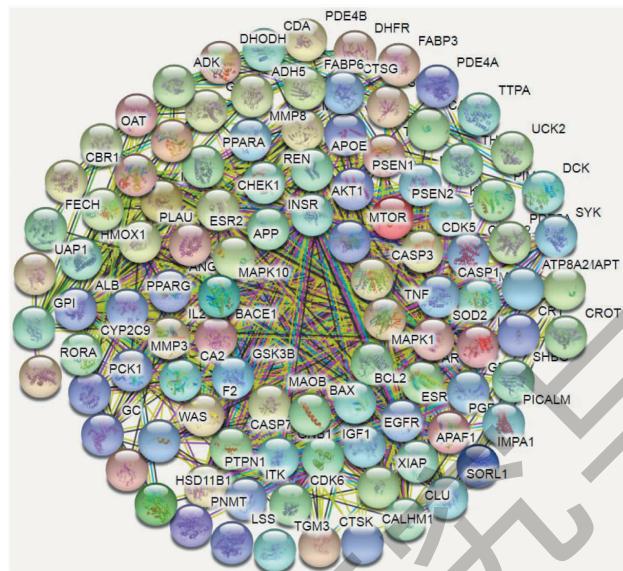


图 2 靶基因 PPI 网络图  
Fig. 2 PPI network diagram of target gene

## 2.5 关键靶基因筛选结果

利用 Cytoscape 3.7.1 的插件 Centiscape 2.2 算出了网络 closeness 的中位数为 0.53, degree 的中位数为 15.3, betweenness 的中位数为  $3.48 \times 10^{-2}$ , closeness、degree 和 betweenness 均在平均值以上的靶点为 9 个, 按次序是 MAPK1、MAPK10、APP、AKT1、GSK3 $\beta$ 、Caspase-3、MAOB、TNF、MTOR, 表示以上 9 个靶点很可能是丹参-川芎治疗 AD 的关键靶基因。

## 2.6 GO 功能分析和 KEGG 通路分析结果

丹参-川芎治疗 AD 的 105 个靶点 GO 分子功能富集分析结果如图 3 所示, 主要关联炎症反应、凋亡、氧化应激反应、MAPK 级联反应等方面。

Metascape 数据库中的 KEGG 分析结果如图 4 所示, 从图中可以看出包括 MAPK 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、凋亡、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 提示丹参-川芎治疗 AD 的主要作用过程是通过这些信号通路来完成的。

## 2.7 丹参-川芎对 PC12 细胞的细胞存活率影响

与对照组对比, 模型组 PC12 细胞的细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组对比, 丹参-川芎

的靶点与丹参-川芎作用的靶点有 105 个交集靶点, 这 105 个靶标可能是丹参-川芎治疗 AD 的靶基因。通过 PPI 网络分析寻找关键靶基因(见图 2)。

中、高剂量组的细胞存活率显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 提示丹参-川芎能保护 PC12 细胞(见表 3)。

## 2.8 丹参-川芎对 PC12 细胞炎症反应的影响

与对照组对比, 模型组 PC12 细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量均明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组对比, 随着丹参-川芎浓度增加, PC12 细胞培养液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 提示丹参-川芎能抑制 PC12 细胞的炎症反应(见表 4)。

## 2.9 丹参-川芎对 PC12 细胞凋亡率的影响

结果见表 5, 与对照组对比, 模型组细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组对比, 丹参-川芎中、高剂量组的 PC12 细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

## 2.10 丹参-川芎对 PC12 细胞 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路主要基因表达的影响

与对照组对比, 模型组 p38MAPK、NF- $\kappa$ B mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组对比, 丹参-川芎各组均能明显降低 p38MAPK、NF- $\kappa$ B mRNA 的表达水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (见表 6)。提示丹参-川芎可下调 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 抑制细胞炎症反应和凋亡, 减轻神经元损伤。

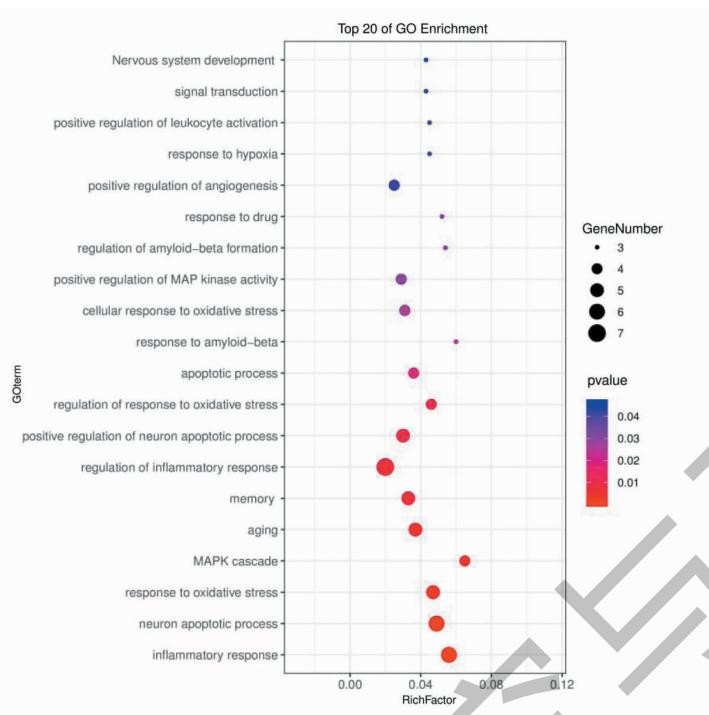


图3 生物过程  
Fig. 3 Biological process

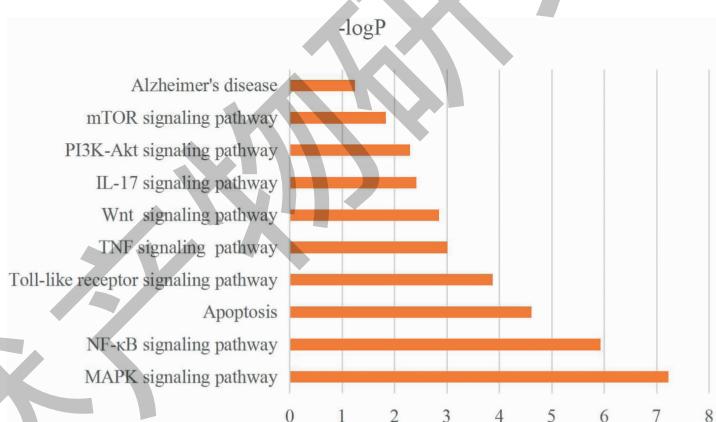


图4 前10个主要的通路  
Fig. 4 Top 10 main pathways

表3 丹参-川芎对PC12细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effects of DS-CX on the survival rate of PC12 cells( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group	细胞存活率 Cell survival rate(%)
对照组 Control	$99.94 \pm 0.06$
模型组 Model	$64.63 \pm 0.03^{**}$
DS-CX 低剂量组 DSCX-L	$80.66 \pm 0.05^{\Delta}$
DS-CX 中剂量组 DSCX-M	$85.48 \pm 0.08^{\Delta}$
DS-CX 高剂量组 DSCX-H G	$90.45 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$

注:与对照组对比, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ;与模型组对比,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,下同。

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

表 4 丹参-川芎对 PC12 细胞炎症反应的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 4 Effect of DS-CX on the inflammation of PC12 cells( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
对照组 Control	12.57 ± 1.12	84.68 ± 0.48	124.84 ± 1.16
模型组 Model	36.82 ± 1.16 *	128.75 ± 1.23 *	148.82 ± 1.08 **
DSCX-L	20.16 ± 1.20	120.54 ± 1.18	140.04 ± 1.12
DSCX-M	17.23 ± 1.14 ▲	115.13 ± 1.16 ▲	135.33 ± 1.02 ▲
DSCX-H	15.12 ± 1.17 ▲▲	108.58 ± 1.12 ▲▲	129.36 ± 1.11 ▲▲

表 5 丹参-川芎对 PC12 细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 5 Effect of DS-CX on the apoptosis rate of PC12 cells( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group	凋亡率 Apoptosis rate (%)
对照组 Control	1.96 ± 1.16
模型组 Model	29.56 ± 1.56 **
DSCX-L	20.16 ± 1.20 ▲
DSCX-M	17.24 ± 1.12 ▲
DSCX-H	15.16 ± 1.13 ▲▲

表 6 丹参-川芎对 PC12 细胞 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 6 Effects of DS-CX on p38MAPK/NF- $\kappa$ B in PC12 cells( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group	p38MAPK mRNA	NF- $\kappa$ B p65 mRNA
对照组 Control	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.08
模型组 Model	7.80 ± 0.06 *	3.58 ± 0.54 **
DSCX-L	5.72 ± 0.18 ▲	2.12 ± 0.08 ▲
DSCX-M	4.85 ± 0.15 ▲	1.76 ± 0.03 ▲
DSCX-H	3.14 ± 0.18 ▲▲	1.29 ± 0.16 ▲▲

### 3 讨论

AD 属中医学之“呆证”、“痴呆”等,老年人五脏功能渐衰,气虚无力推动血行,血液运行不畅,易瘀滞脉络,瘀血阻于脑窍,元神失养,神机失用,终成呆证。如《医学衷中参西录》言:“脑络瘀阻可直接损伤脑髓,使脑窍渐空,灵机记忆渐失,终成呆证。”故瘀血是 AD 重要致病因素,活血化瘀法是防治 AD 的重要治法之一。丹参具有活血祛瘀、安神之功效。《滇南本草》曰:“补心定志,安神宁心,治健忘怔忡,惊悸不寐”<sup>[11]</sup>。川芎具有活血行气,祛风止痛功效。《本草通玄》记载其可“除湿止泻,行气开郁,去瘀生

新”。“血大动,则走而不能生;血不动,则止而不能生”,虽川芎辛散,其生血妙在动,不在散。行气开郁,升清阳之气,去头之湿气,善于疏通,可清神生新。二者配伍,可使血行流畅,脑络通畅,精得上乘而充髓,血得上行而养脑,以奏活血祛瘀,开窍醒神之效。

本研究通过 TCMSP 平台的 OB 和 DL 筛选,以及查找相关文献对中药中的特征化合物予以补充,获得丹参-川芎的 25 个化合物,其中丹参的有效成分中丹参酮 IIA 的活性最高,可以作用 32 个靶点,而在川芎中活性最高的是川芎嗪,作用靶点达到了

27个。研究显示<sup>[12,13]</sup>,丹参酮 IIA 可抑制小胶质细胞增生,并进一步降低 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  炎性细胞因子的表达和抑制 Tau 蛋白过度磷酸化对抗神经细胞凋亡,从而发挥治疗 AD 的作用。研究发现<sup>[8]</sup>,川芎嗪可通过作用 PI3K/Akt 通路,调节 Bcl-2、Bax、caspase-3 的表达,从而拮抗 A $\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡。

GO 富集分析结果表明,“丹参-川芎”药对的作用靶点分布在多种细胞组分中,以胞质为主,通过多种结合方式参与生物进程,包括炎症反应、凋亡过程、氧化应激反应、老化、记忆、MAPK 级联反应、神经元凋亡过程的正调控、对炎症反应的调节、积极调节白细胞激活、神经系统发育等等。研究显示<sup>[14]</sup>,脑内炎性反应是 AD 发病的重要环节。研究证实<sup>[15,16]</sup>,细胞凋亡和氧化应激反应在 AD 的发生和发展的过程中扮演着极其重要的角色。提示“丹参-川芎”药对可能通过多靶点、多通路发挥治疗 AD 的作用。为了验证网络药理学的分析结果,本研究选择丹参-川芎对 A $\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的细胞存活率、炎症反应、凋亡率进行了实验验证。结果表明丹参-川芎能显著提高 PC12 细胞的细胞存活率和抑制 PC12 细胞的炎症反应及降低 PC12 细胞的凋亡率,发挥治疗 AD 的作用。

KEGG 富集通路分析表明,居第一位的是 MAPK 信号通路,居第二位的是 NF- $\kappa$ B 信号通路。MAPK 信号通路在哺乳动物类细胞主要由 p38 信号通路、ERK 信号通路和 JNK 信号通路组成。研究发现<sup>[17]</sup>,p38 在脑组织中表达水平的高低与痴呆的严重程度有极大的关联。研究发现<sup>[18]</sup>,p38MAPK 通路可通过促使 Bax 发生转位及激活 Caspase-3 活性而参与到神经元细胞凋亡的进程当中。研究表明<sup>[19]</sup>,抑制 p38MAPK 通路可抑制 A $\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 模型大鼠脑组织细胞发生凋亡。NF- $\kappa$ B 信号通路可参与神经系统中炎症反应、神经元凋亡、多种基因调控的信号转导过程<sup>[20]</sup>。研究指出<sup>[21]</sup>,p38MAPK 与 NF- $\kappa$ B 关系密切,活化的 p38 MAPK 能诱使炎症细胞因子的表达从而活化 NF- $\kappa$ B,若抑制 p38MAPK 的表达,也会抑制 NF- $\kappa$ B 的活化。丹参-川芎可能通过调控 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制炎症反应和细胞凋亡,从而延缓 AD 的发生和发展。

本研究选择丹参-川芎对 A $\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路的调控作用进行网络药理学研究结果的实验验证。实验结果表明丹参-川芎可明显下调 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路,最终

抑制 AD 的发展。

本研究应用网络药理学研究丹参-川芎对 AD 的具体作用靶点及分子机制,结果发现丹参-川芎治疗 AD 是通过多成分、多靶点、多通路协同产生主要的治疗作用,为临床深入研究丹参-川芎治疗 AD 作用机制提供重要的指导意义。

## 参考文献

- 1 Berrocal M, Corbacho I, Sepulveda MR, et al. Phospholipids and calmodulin modulate the inhibition of PMCA activity by tau[J]. BBA -Mol Cell Res, 2016, 1864:1028-1035.
- 2 Lv XQ, Hu TX, Liu SY, et al. 240 statistical analysis of adverse reactions caused by donepezil[J]. Chin J Clin Pharm (中国临床药学杂志). 2018, 27:346-351.
- 3 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.
- 4 Chen BW, Zheng P, Yi J, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of Liuwei Dihuang Decoction in the treatment of Alzheimer's disease[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2019, 30:1274-1277.
- 5 Li C, Liang LP, Chen XQ. Research progress in the treatment of Alzheimer's disease with the method of promoting blood circulation and removing blood stasis[J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2018, 36:219-222.
- 6 Yan JL, Chen YQ. A Study on the commonly used drug pairs of traditional Chinese medicine in the treatment of Alzheimer's disease[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2008, 26:1495-1496.
- 7 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), 2020, 32:209-223.
- 8 Yin SJ, Liu CY, Ren YB, et al. The mechanism of ligustrazine on the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by  $\beta$ -amyloid 25-35[J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2016, 36:4151-4153.
- 9 Wang Y, Wang X, Yu S, et al. Effects of ferulic acid on oxidative stress and apoptosis related proteins in Alzheimer's disease transgenic mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:762-766.
- 10 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.

- 11 Lan M. Southern Yunnan Materia Medica(滇南本草)[M]. Kunming:Yunnan Science and Technology Press,2004:218.
- 12 Li C. The effects of tanshinone II A on Alzheimer's diseased rats model with intestinal endotoxemia[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University(山西医科大学),2016.
- 13 Jadoon SS. Role and mechanism of tanshinone II A in the prevention and treatment of Alzheimer's diseased[D]. Wuhan:Hubei University of Traditional Chinese Medicine(湖北中医药大学),2019.
- 14 Di Marco LY, Farkas E, Martin C, et al. Is vasomotion in cerebral arteries impaired in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 46(1):35-53.
- 15 Liang K, Zhang J, Yin C, et al. Protective effects and mechanism of TPX2 on neurocyte apoptosis of rats in Alzheimer's disease model[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13:576-580.
- 16 Umeno A, Biju V, Yoshida Y. *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes[J]. *Free Radic Res*, 2017, 25:1-15.
- 17 Hou DR, Chen K, Wang Y, et al. Efficacy and mechanism of butylphthalide in the treatment of vascular dementia[J]. *J South Med Univ*(南方医科大学学报), 2009, 29:574-575.
- 18 Xu F. The experimental study of the effect of Kaixin Powder on the expression of proteins related to neuron apoptosis and P38MAPK in the hippocampus tissue of Alzheimer's diseased rats[D]. Harbin:Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine(黑龙江中医药大学), 2017.
- 19 Liang KS. Protective effects of P38MAPK, estradiol and TPX2 in the hippocampal apoptosis and their effect on cognitive in mouse models of dementia[D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2019.
- 20 Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38079-38086.
- 21 Guo YH. The effect of annexin A1 mimetic peptide Ac2-26 on pulmonary injury and p38MAPK/NF- $\kappa$ B induced by cardiopulmonary bypass in rats[D]. Zunyi: Zunyi Medical University(遵义医科大学), 2020.

## 高效液相色谱—串联质谱法鉴定桂花根中的生物活性成分

桂花以其宜人的气味而闻名,在中国的园林绿化中被广泛栽种。桂花通常用于生产芳香精油,以及用于保健品和食品添加剂。到目前为止,大多数的研究重点是探索花的生物活性和实际应用。

事实上,桂花的资源利用不仅限于花果,其根还可作为功能性饮料和茶。在中药使用中,桂花根常用于缓解胃痛、牙痛、风湿麻木、筋骨疼痛等。为了了解桂花根作为中药应用的物质基础,来自武汉大学药学院的陈子林团队对桂花根的化学成分进行了研究。已发现黄酮类、木脂素类、环烯醚萜类和苯乙醇类化合物较多,但对桂花根化学成分的研究还很有限。该课题组通过 HPLC-MS/MS 对桂花根中的苯乙醇苷和木脂素进行了鉴定,并建立了高灵敏度的 HPLC-MS/MS 分析方法,测定了不同品种桂花根中的毛蕊花糖苷、异果胶苷、橄榄苦苷和连翘苷的含量,并从中首次发现了 32 种成分,其中一种化合物被首次报道。此外,网络药理学分析表明,桂花根可能对炎症、心血管疾病、癌症和类风湿性关节炎的治疗有效,这与桂花根的传统药效学一致。该研究成果将为桂花根的成分鉴定提供参考,为桂花根的开发利用奠定基础。该项成果目前发表在《Journal of Pharmaceutical Analysis》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8264379/>

原文标题:Identification and quantification of the bioactive components in *Osmanthus fragrans* roots by HPLC-MS/MS