

基于网络药理学和实验验证探讨黄芪散治疗阿尔茨海默病的作用机制

张运辉^{1,2}, 杨梦琳^{1,2*}, 周小青², 伍大华^{2,3}, 刘霞¹, 李祥¹

¹重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; ²湖南中医药大学, 长沙 410208;

³湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006

摘要:运用网络药理学方法探讨黄芪散治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的作用机制。通过TCMSP数据库检索黄芪散的有效成分及相关靶点;采用DisGeNET和GeneCards数据库搜集AD靶点,通过String在线数据库构建靶蛋白相互作用网络,采用R语言对关键靶点进行GO和KEGG富集分析。采用A β_{25-35} 诱导PC12细胞损伤作为AD细胞模型,通过MTT法检测细胞存活率,采用显微镜观察细胞形态和突触生长,通过透射电镜观察PC12细胞自噬小体,利用试剂盒检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量;最后采用ELISA法和Western blot实验对网络药理学主要预测的生物过程与信号通路进行验证。结果共获得黄芪散44个有效成分,对应靶点134个,与AD相关靶点共102个,KEGG相关信号通路前20条,GO分析前20个生物学过程。细胞实验证实了黄芪散能有效增加PC12细胞的存活率和突触长度,有效促进A β_{25-35} 诱导的PC12细胞自噬小体包裹受损线粒体,降低其炎症因子IL-1 β 、IL-18、TNF- α 的含量,降低ROS水平,升高LC3 II/I比值,上调PINK1、parkin、BDNF蛋白表达,下调p62、NLRP3蛋白表达。黄芪散可能是通过激活PINK1/parkin通路促进线粒体自噬,降低ROS水平进而抑制NLRP3炎症小体的活化和改善突触可塑性而发挥治疗AD作用。

关键词:黄芪散;网络药理学;阿尔茨海默病;线粒体自噬

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)12-2119-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.12.016

Study on the mechanism of Huangqisan in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental verification

ZHANG Yun-hui^{1,2}, YANG Meng-lin^{1,2*}, ZHOU Xiao-qing², WU Da-hua^{2,3}, LIU Xia¹, LI Xiang¹

¹Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

²Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

³Affiliated Hospital of Hunan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: To study the mechanism of Huangqisan in treating Alzheimer's disease (AD) by network pharmacology. To search the active ingredients and corresponding targets of Huangqisan through the TCMSP databases, Then obtained the targets of AD through the DisGeNET and GeneCards database. Constructed protein interaction network map by String online database. At the same time GO and KEGG enrichment analysis of key targets were carried out by using R language. Induction of PC12 cell injury by adopted A β_{25-35} as AD cell model. Detection of cell viability by MTT assay. Observation of cell morphology and synaptic growth by microscope. Observation of Autophagosomes in PC12 cells by transmission electron microscopy. Detection of reactive oxygen species (ROS) content by using Kits. Finally, ELISA and Western blot were used to verify the main biological processes and signaling pathways predicted by network pharmacology. A total of 44 active ingredients of Huangqisan were screened, 134 corresponding targets, 102 targets related to Alzheimer's disease. The top 20 KEGG related signaling pathways and GO analysis of the top 20 biological processes. Cell experiments proved that Huangqisan effectively increased the survival

收稿日期:2022-05-02 接受日期:2022-07-01

基金项目:湖南省研究生创新课题(2020CX10);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: yangmengling42@163.com

rate and synaptic length of PC12 cells, effectively promoted $A\beta_{25-35}$ induced PC12 cells autophagosome wrapped damaged mitochondria, reduced the content of inflammatory factors IL-1 β , IL-18, TNF- α , reduced ROS level, increased LC3 II/I ratio, up-regulated PINK1, parkin, BDNF protein expression, down-regulated p62, NLRP3 protein expression. Huangqisan had a therapeutic effect on AD by activated PINK1/parkin pathway to promoted mitophagy and reduced ROS levels, thereby inhibited the activation of NLRP3 inflammasome and improved synaptic plasticity.

Key words: Huangqisan; network pharmacology; Alzheimer's disease; mitophagy

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能障碍和精神行为损害为主要表现的中枢神经变性病。随着人口老龄化的进程加快,我国AD的发病率逐年升高,严重威胁中老年人的健康,给社会、家庭造成了沉重的负担。目前美国FDA批准上市的抗AD药物主要是N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体阻滞剂和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)抑制剂,虽可适度改善患者的症状,但仍不能根治、逆转AD的发展。中药复方具有多成分、多靶点、多途径的协同作用特点,在改善AD患者认知功能、提高日常生活能力与生活质量方面具有显著的疗效,且毒副作用小,长期服用不易耐药^[1]。

有学者将AD称为脑内的3型“糖尿病”并指出AD的核心可能是由于脑胰岛素和胰岛素样生长因子信号传导通路障碍所引起的^[2]。研究证实,糖尿病是AD的一个非常重要的高危因素,糖尿病患者并发AD的风险也非常高,且有不少AD患者同时合并糖尿病^[3],这极大增加了患者的痛苦,并给临床治疗带来更大的难度。黄芪散源自《圣济总录》,是治疗消渴病的经典方,由葛根、黄芪、桑白皮组成。研究发现^[4],黄芪散可降低糖尿病小鼠的空腹血糖、糖耐量,并降低肾上腺素引起的高血糖。实验证明黄芪散可改善5×FAD小鼠的学习记忆、空间认知功能障碍和AD样病理^[5]。中药复方具有多成分-多靶点-多途径的协同作用特点,很难从整体到细胞再到分子水平进行系统全面地阐释。网络药理学是结合计算机技术、系统生物学及生物信息学的新兴学科,可整体系统地分析“药物-靶点-通路-疾病”之间的相互关系,能从分子层面和整体的角度阐明中药复方的药效物质基础和作用机制^[6],从而为中药复方有效成分的筛选和作用机制的研究提供技术支撑,且与中医治病整体原则及中药复方多成分、多靶点、多通路协同作用特点高度契合。

黄芪散有效成分众多,作用靶点丰富,但黄芪散治疗AD的有效成分及作用机制尚不明确。因此,本研究采用网络药理学的方法,对黄芪散的有效成

分、靶点、信号通路进行预测及分析,并借助细胞试验加以验证,试图在分子水平探究黄芪散治疗AD的作用机制,以期为深入开展黄芪散基础实验研究以及临床合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 黄芪散有效成分及靶点的筛选

从TCMSP数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-sp.php>)筛选黄芪散(葛根、黄芪、桑白皮)中各味中药的化学成分,根据口服生物利用度(oral bio-availability, OB)和类药性(drug likeness, DL)筛选出符合条件的候选活性成分及其对应靶点,将OB \geq 30%及DL \geq 0.18设为筛选条件,并根据文献检索补充黄芪散中有明确治疗AD药理活性的有效成分,将检索所得各个主要成分于TCMSP数据库、ETCM数据库中筛选相关靶点。采用Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)将获得的黄芪散有效成分对应的靶蛋白名转换为标准基因靶点名称。

1.2 AD疾病相关基因检索

以“阿尔茨海默病”的英文“Alzheimer's disease”为关键词在DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)和GeneCards数据库(<https://geneacart.genecards.org/>)中筛选AD相关的基因,在DisGeNET数据库中以得分 >0.1 作为筛选条件选择相关基因,在GeneCards数据库则选择相关性分数(relevance score \geq 30)的基因,并对检索到的靶点进行处理,之后将两个数据库合并去重从而获得最终AD的相关靶点。

1.3 PPI网络构建

将黄芪散的有效成分与AD作用靶点上传OmicShare平台(<https://www.omicshare.com/>)进行配对,得到疾病靶点与有效成分交集的靶点,再将这些交集靶点导入到STRING数据库,选择物种为“Homo sapiens”进行操作,最小相互作用阈值设为“medium confidence=0.4”,得到PPI网络。

1.4 关键靶点的筛选

将候选作用靶点PPI文件中的node1、node2、combined score上传至Cytoscape 3.7.1软件进行

PPI 网络的可视化处理,并使用工具中的 Network Analysis 进行网络拓扑分析,主要根据结果中的 degree 值的大小筛选,获得关键靶点。

1.5 GO 和 KEGG 分析

用 R 语言软件及 Bioconductor 插件,导入 Venn 图共同靶点,使用 cluster Profiler 等处理数据,取 $P < 0.05$ 标准,以涉及的靶点数目多少进行排序,选择排名前 20 的进行可视化展示,运行 R 语言得到 GO 和 KEGG 富集分析的气泡图。

1.6 网络构建

将黄芪散有效成分、对应靶点导入 Cytoscape 3.7.1 构建黄芪散有效成分-靶点网络。

1.7 体外验证实验

1.7.1 细胞与试剂

大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞(长沙赢润生物技术有限公司,批号 2015032007); $A\beta_{25-35}$ (美国 Sigma 公司,批号 053M4804V);多奈哌齐(卫材药业有限公司,批号 190804);ELISA 测定试剂盒(武汉塞培生物科技有限公司,批号 20190213);ROS 试剂盒(碧云天生物,批号 041720200803);PINK1 抗体、parkin 抗体、p62 抗体、脑源性神经生长因子(BDNF)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G(Ig G)、HRP 标记的山羊抗兔 Ig G(美国 Proteintech 公司,批号分别为 00047643、00091761、00098963、00047316、SA00001-1、SA00001-2);LC3 II/I 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 11);NL-RP3 抗体(Abcclonal,批号 3561487002);DMEM 细胞培养液(默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 SH3002201);10%新生小牛血清(Hyclone Lab,批号 220118612)。黄芪散购自湖南中医药大学第一附属医院,取 1 剂,置于圆底烧瓶中,混匀,加入 10 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 30 min,收集药液,用 4~6 层纱布过滤,收集滤液,倒入容器。剩余药渣再加入 8 倍量水,煎煮 2 次,每次各 20 min,过滤,收集滤液。合并 3 次滤液,浓缩至生药含量质量浓度为 1.0 g/mL 的黄芪散水煎剂,冷冻干燥成冻干粉,保存备用。

1.7.2 MTT 法检测细胞存活率

采用对数生长期的 PC12 细胞进行试验,分为 4 组。对照组(加入不含 FBS、PBS 的 DMEM 培养基孵育 48 h)、模型组(加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ ^[7] 孵育 48 h)、多奈哌齐组(20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ + 15 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸多奈哌齐)及黄芪散治疗组(细胞

模型 + 黄芪散处理组)。黄芪散组分别加入 10、20、40、80、160、320 mg/L 黄芪散继续培养 48 h,采用 MTT 法用酶标仪在 570 nm 波长处检测每个孔 PC12 细胞的吸光度值,计算细胞活率。

1.7.3 用显微镜观察各组的细胞形态学和突起长度

取对数生长期的 PC12 细胞培养 24 h 后在培养基中加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$,显微镜下观察处理后各组 PC12 细胞形态和统计细胞突起的长度。

1.7.4 透射电镜观察 PC12 细胞自噬小体

PC12 细胞以 1×10^6 接种于 6 孔板中,按照“1.7.2”项分组方法处理 24 h 后,弃掉培养液,PBS 浸洗细胞 3 次,用 0.25% 胰酶消化后收集细胞悬于 PBS 中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 3% 透射电镜专用戊二醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜避光固定 PC12 细胞 4 h,透射电子显微镜观察、照相。

1.7.5 ELISA 检测 PC12 细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 含量

PC12 细胞以 1×10^7 接种于 96 孔板中,100 μL /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 ELISA 测定进行检测,按照 ELISA 测定试剂盒的说明进行操作。

1.7.6 黄芪散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 ROS 含量的影响

PC12 细胞按照“1.7.2”项方法经药物作用 48 h 后,3 000 r/min 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min 后,取上清,按照试剂盒操作测定 ROS 含量。

1.7.7 Western blot 法检测相关蛋白表达

PC12 细胞按照“1.7.2”项方法经药物处理 48 h 后,提取各组细胞总蛋白,SDS-PAGE 电泳,将蛋白质转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 $1 \times$ TBST 封闭。分别加入 PINK1、parkin、p62、LC3 II/I、NL-RP3、BDNF 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤膜后加 HRP 标记的二抗,避光室温孵育 1~2 h,采用 ECL 法检测目的条带,胶片曝光,显影,以 β -actin 为内参,分析结果。

1.7.8 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析统计,两两比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪散有效成分的筛选和靶点预测

从 TCMS 中以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为条件, 对黄芪散的有效成分进行筛选, 结合文献查阅结果^[8-10], 补充纳入有较好治疗 AD 药理活性成分的

黄芪甲苷 (astragaloside IV)、葛根素 (puerarin)、白藜芦醇 (resveratrol)。最终筛选出 44 个有效成分 (见表 1)。其中黄芪 12 个, 葛根 5 个, 桑白皮 32 个, 重复成分 5 个。

表 1 黄芪散有效成分
Table 1 Effective ingredients of Huangqian

序号 No.	成分 Ingredient	OB (%)	DL	来源 Source
M1	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	AR, MC
M2	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	AR, MC
M3	毛蕊异黄酮 Calycosin	47.75	0.24	AR
M4	异鼠李素 Isorhamnetin	49.60	0.31	AR
M5	华良姜素 Jaranol	50.83	0.29	AR
M6	常春藤皂苷元 Hederagenin	36.91	0.75	AR
M7	丁香香萜 Mairin	55.38	0.78	AR, MC
M8	叶酸 Folic acid	68.96	0.71	AR
M9	芒柄花素 Formononetin	69.67	0.21	AR, PLR
M10	异黄酮 Isoflavone	109.99	0.30	AR
M11	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇 7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30	AR
M12	AR 甲苷 Astragaloside IV	22.50	0.15	AR
M13	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75	PLR, MC
M14	3'-甲氧基大豆苷元 3'-Methoxydaidzein	48.57	0.24	PLR
M15	黄豆苷元葡萄糖苷 Daidzein-4,7-diglucoside	47.27	0.67	PLR
M16	PLR 素 Puerarin	24.03	0.69	PLR
M17	鸢尾黄酮甲素(9CI) Iristectorigenin (9CI)	71.55	0.34	MC
M18	桑辛素 B Moracin B	55.85	0.23	MC
M19	桑辛素 C Moracin C	82.13	0.29	MC
M20	桑辛素 D Moracin D	60.93	0.38	MC
M21	桑辛素 F Moracin F	53.81	0.23	MC
M22	光果甘草酮 Glabrone	52.51	0.50	MC
M23	天竺葵苷元 Pelargonidin	37.99	0.21	MC
M24	3,5,7-三羟基-2-(3-羟基苯基)色酮 3,5,7-Trihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromone	59.71	0.24	MC
M25	性角拉汀 Sexangularetin	62.86	0.30	MC
M26	Campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	MC
M27	没食子酸 3-O-(6'-O-四聚基)-葡萄糖苷 Gallicacid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	MC
M28	二甲基(甲基,4,1-苯)二氨基甲酸酯 Dimethyl(methylenedi-4,1-phenylene)biscarbamate	50.84	0.26	MC
M29	7-甲氧基-5,4'-二羟基黄酮醇 7-Methoxy-5,4'-dihydroxyflavanonol	51.72	0.26	MC
M30	环桑皮色烯素 Cyclomulberochromene	36.79	0.87	MC
M31	桑皮酮 Kuwanon D	31.09	0.80	MC
M32	桑辛素 A Moracin A	64.39	0.23	MC
M33	桑辛素 M-6,3'-di-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 Moracin M-6,3'-di-O- β -D-glucopyranoside	37.81	0.74	MC

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	成分 Ingredient	OB(%)	DL	来源 Source
M34	桑辛素 O Moracin O	62.33	0.44	MC
M35	马尔伯罗夫兰 Mulberrofuran G	92.19	0.24	MC
M36	马尔伯罗赛德 Mulberroside C _{qt}	71.39	0.46	MC
M37	白藜芦醇-3,4'-di-O-β-D-葡萄糖苷 Resveratrol-3,4'-di-O-β-D-glucopyranoside	35.08	0.76	MC
M38	血根酮 B Sanggenone B	115.44	0.30	MC
M39	血根酮 F Sanggenone F	62.42	0.54	MC
M40	血根酮 H Sanggenone H	37.50	0.53	MC
M41	血根酮 M Sanggenone M	68.29	0.85	MC
M42	血根碱 Sanguinarine	37.81	0.86	MC
M43	环桉烯醇 Cycloeucaleanol	39.73	0.79	MC
M44	白藜芦醇 Resveratrol	19.07	0.11	MC

注:AR:黄芪;MC:桑白皮;PLR:葛根;

Note:AR;Astragali Radix;MC;Mori Cortex;PLR;Puerariae Lobatae Radix.

2.2 “有效成分-靶点”网络构建

利用 Perl 软件整理数据,导入 Cytoscape 3.7.1 软件,构建黄芪散及 AD 的有效成分-靶点网络图

(见图 1)。利用 Cyto Hubb 插件得出排名前 4 位的核心有效成分为槲皮素、葛根素、黄芪甲苷和白藜芦醇。

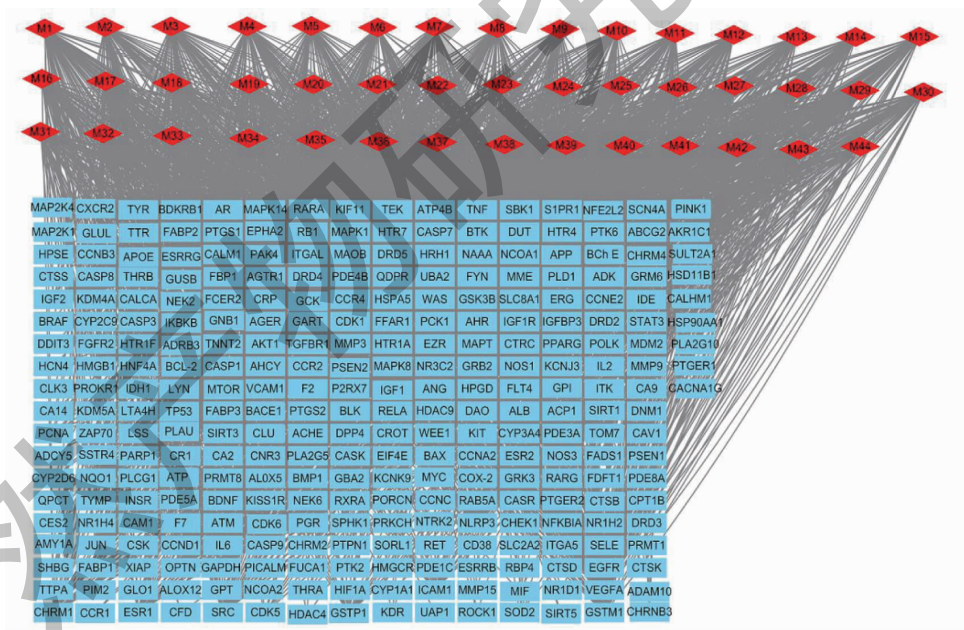


图 1 黄芪散有效成分-靶点网络

Fig. 1 Effective ingredients of Huangqisan-target network

注:红色菱形表示黄芪散的有效成分;蓝色长方形:靶基因。Note:Red diamond;Huangqisan compound;Blue rectangle;Target gene.

2.3 AD 相关基因

在 DisGeNET 和 GeneCards 数据库 AD 的靶基因,共得到 2 894 个基因。

2.4 PPI 网络构建图

将黄芪散-AD 交集靶点导入 String 网站,获得 PPI 图(见图 2),其中节点数 102、边数 1 124、平均

节点度 8.46、平均局部聚类系数 0.588;网络节点代表蛋白质,连线代表蛋白质之间的相互作用。邻接节点个数越多,成为关键基因的概率越大。其中排名前 10 的基因为 PINK1、NLRP3、BDNF、INSR、MTOR、OPTN、APP、CASP3、SOD2、GSK3B。

2.5 GO 和 KEGG 结果

GO 富集分析包括细胞成分、分子功能和生物过程 3 部分。将 GO 富集排名前 20 位制成气泡图(见图 3),富集的 GO 功能主要包括自噬、炎症反应、对突触可塑性的调节、对胰岛素的反应、神经元

凋亡过程、氧化应激反应等。行 KEGG 通路富集分析制成气泡图(见图 4)。富集的 KEGG 通路主要包括线粒体自噬信号通路、胰岛素抵抗、自噬、胰岛素信号通路、阿尔茨海默病等。

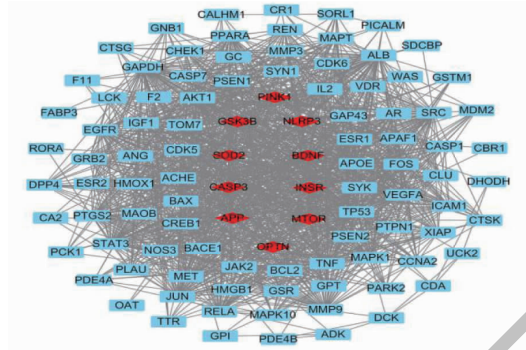


图 2 靶蛋白 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of target protein

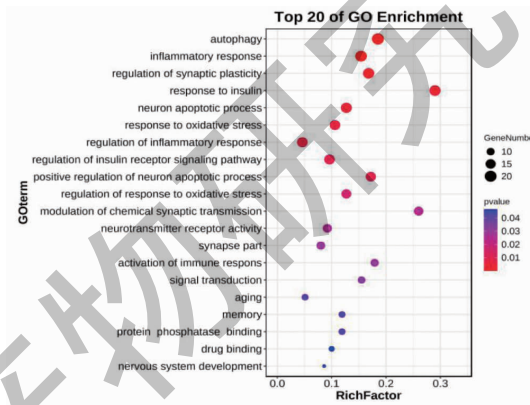


图 3 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO function enrichment analysis

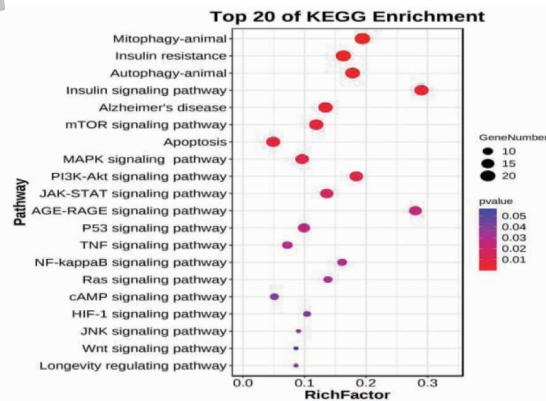


图 4 KEGG 通路分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis

2.6 黄芪散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响

与空白组比较,模型组 PC12 细胞活率明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪散组作用后,细胞活率显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。黄芪散各给药组(10 ~ 80 mg/L)与模型组比较,细胞存活率均明显升高。结果显示黄芪散在 80 mg/L 具有统计学差异,且之后随着浓度的升高其存活率增加幅度不明显,因此后续研究中采用黄芪散 80 mg/L 进行给药(见表 2)。

2.7 各组 PC12 细胞形态学和突起长度的改变

与对照组相比,模型组的细胞数量显著减少,且模型组细胞的突起明显缩短甚至消失,外缘形状变成钝圆形,提示 AD 细胞模型构建成功。与模型组比较,黄芪散组、多哌奈齐组的细胞细胞数量明显增加,形状为不规则多边形,与对照组的细胞形态相似(见图 5)。与模型组比较,黄芪散组、多哌奈齐组的 PC12 细胞突起长度明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)(见表 3)。

表 2 黄芪散对 $A\beta_{25-35}$ 损伤

PC12 细胞活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Huangqisan on the viability of PC12 cells injured by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/L)	存活率 Survival rate (%)
对照组 Control group	-	100.00 ± 0.18
模型组 Model group	-	65.48 ± 5.16 [#]
黄芪散组 Huangqisan group	10	75.68 ± 3.24 [*]
	20	81.54 ± 2.66 [*]
	40	88.88 ± 3.28 [*]
	80	94.46 ± 4.32 ^{**}
	160	95.24 ± 6.28 ^{**}
	320	96.78 ± 5.62 ^{**}

注:与对照组比较,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ (表 3、4、5 和图 7 同)。

Note: Compared with control group,[#] $P < 0.01$; Compared with model group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ (Tables 3, 4, 5 and Fig. 7 are the same).

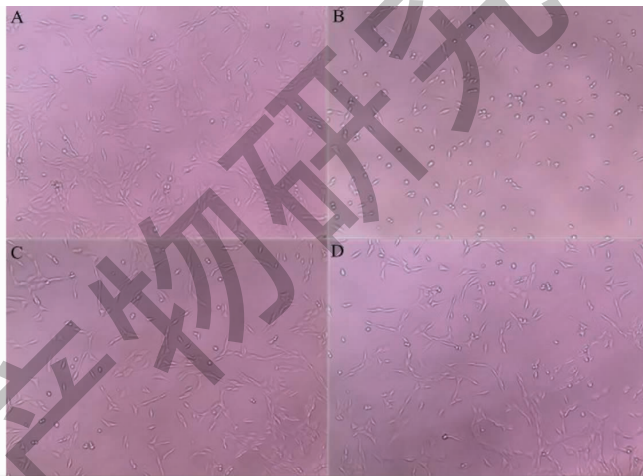


图 5 各组 PC12 细胞的形态($\times 800$)

Fig. 5 The morphology of PC12 cells in each group ($\times 800$)

注:A:对照组;B:模型组;C:多哌奈齐组;D:黄芪散组,下同。Note:A:Control group;B:Model group;C:Donepezil group;D:Huangqisan group, the same below.

表 3 各组 PC12 细胞突起生长的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison of synaptic growth of PC12 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	突起长度 Protrusion length (μm)
对照组 Control group	64.78 ± 2.75
模型组 Model group	7.68 ± 0.98 [#]
多哌奈齐组 Donepezil group	28.64 ± 3.34 [*]
黄芪散组 Huangqisan group	46.58 ± 3.64 ^{**}

2.8 黄芪散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞自噬小体的影响

对照组 PC12 细胞内可明显观察到完整形态线粒体,同时整体细胞形态完整。与对照组比较,模型组细胞经 $A\beta_{25-35}$ 损伤后没有出现典型的自噬小体,并且线粒体呈现空腔化改变,细胞整体形态发生变化。与模型组比较,黄芪散组、多哌奈齐组的 PC12 细胞自噬小体显著增加,同时可观察到较多被自噬小体包裹的受损线粒体,提示黄芪散可显著激活 PC12 细胞的自噬(见图 6)。

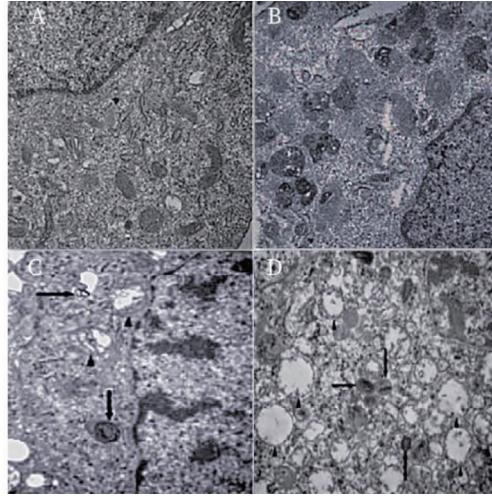


图6 透射电镜检测各组细胞自噬小体($\times 30\ 000$)

Fig. 6 Transmission electron microscope for observing autophagosomes in all groups($\times 30\ 000$)

2.9 各组 PC12 细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平

与对照组比较,模型组 PC12 细胞 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平均明显增高($P < 0.01$);与模型组比

较,黄芪散组、多哌奈齐组 PC12 细胞的 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平显著减低($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示黄芪散对 PC12 细胞的炎症反应具有明显的抑制作用(见表4)。

表4 各组 PC12 细胞 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Comparison of the levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α in the supernatant of PC12 cells in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组 Control group	12.52 \pm 1.48	86.18 \pm 0.58	124.72 \pm 8.78
模型组 Model group	36.84 \pm 1.46 [#]	126.84 \pm 5.42 [#]	145.26 \pm 13.54 [#]
多哌奈齐组 Donepezil group	20.12 \pm 2.38 [*]	118.36 \pm 12.28 [*]	134.84 \pm 13.68 [*]
黄芪散组 Huangqisan group	16.18 \pm 2.56 ^{**}	115.18 \pm 11.64 ^{**}	128.68 \pm 24.58 ^{**}

2.10 黄芪散对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞 ROS 含量的影响

与对照组相比,模型组 PC12 细胞 ROS 含量明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪散组、多哌奈齐组的 PC12 细胞 ROS 含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见表5)。

表5 黄芪散对 ROS 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of Huangqisan on contents of ROS($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	ROS 含量 ROS content(IU/mL)
对照组 Control group	16.68 \pm 1.66
模型组 Model group	52.84 \pm 3.64 [#]
多哌奈齐组 Donepezil group	34.82 \pm 1.46 [*]
黄芪散组 Huangqisan group	26.24 \pm 1.88 ^{**}

2.11 黄芪散对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞中自噬相关蛋白及 NLRP3、BDNF 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组细胞 PINK1、parkin、BDNF 蛋白表达显著降低,p62、LC3 II/I、NLRP3 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪散组、多哌奈齐组的 PINK1、parkin、LC3 II/I、BDNF 蛋白表达显著升高,p62、NLRP3 蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图7)。

3 讨论与结论

AD 因其具有和 1、2 型糖尿病相似的发病机制,即主要体现在脑胰岛素缺乏和胰岛素抵抗,已被学术界称为“3 型糖尿病”。糖尿病属于中医学的消渴,以气阴两虚、燥热内盛为主,发展至后期则气阴两伤,阴阳俱虚,变证百出。因此,益气、养阴、清热是治疗消渴病的基本法则。黄芪散是治疗消渴的经

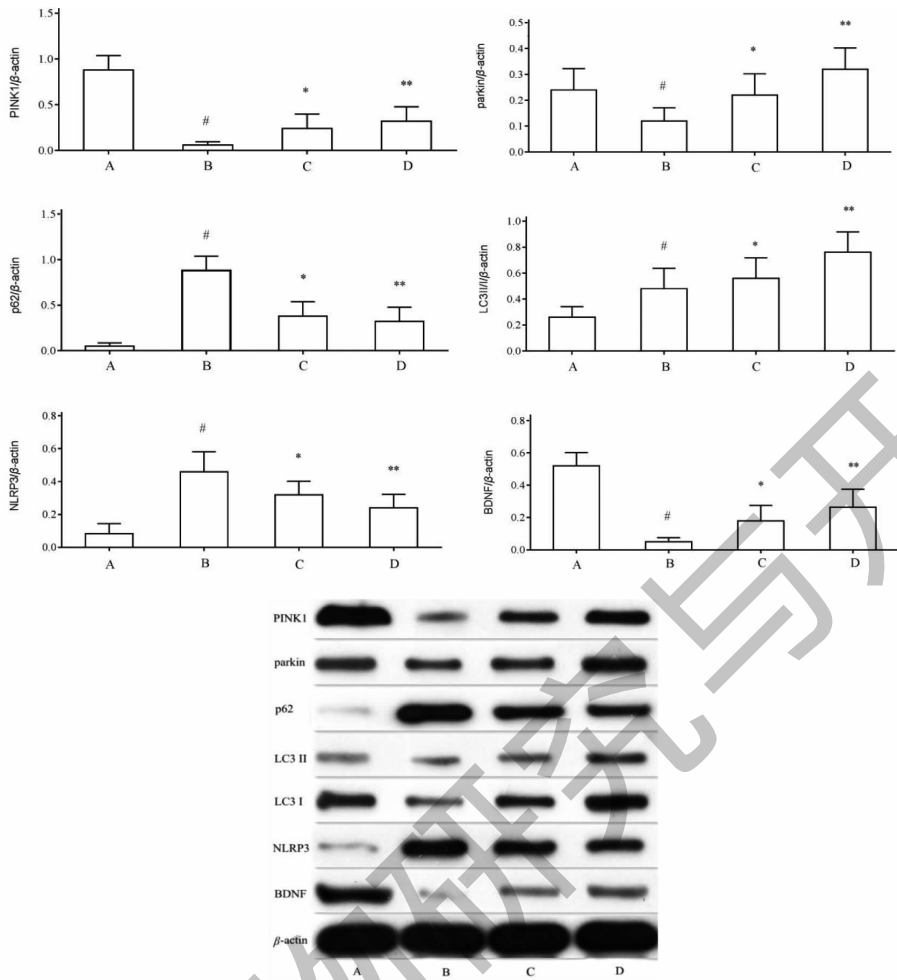


图7 黄芪散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞自噬相关蛋白及 NLRP3、BDNF 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of Huangqisan on the proteins expression of autophagy-related proteins and NLRP3, BDNF in $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 cells

典方,方中葛根生津止渴升脾中清阳,输津液以溉五脏而滋阴清热;黄芪有补气健脾,取其气复津还,云行而雨施之意;桑白皮甘寒泻火,滋阴润燥,且其甘寒之性以制黄芪稍热之性;三药配伍,共奏益气健脾,养阴清热,生津止渴之效,三消并治,从而起到标本兼顾之效。

有效成分-作用靶点网络显示黄芪散治疗 AD 具有多成分、多靶点的特点,结果显示槲皮素、葛根素、黄芪甲苷和白藜芦醇是其关键有效成分。研究证实槲皮素可通过经典的雌激素受体通路及 MAPK 途径增加 Bcl-2/Bax 表达比值及下降 Caspase-3 蛋白表达,从而减弱凋亡发生^[11]。研究证明葛根素可有效减缓 AD 模型大鼠嗅球内 tau 蛋白磷酸化水平的增加,其作用机制可能与其降低 GSK-3 β 活性水平有关^[12]。研究证明基于 MEK5 /ERK5 信号通路

对 AD 大鼠小胶质细胞的活性具有抑制作用,可拮抗 AD 大鼠神经细胞的凋亡^[13]。研究发现^[14],白藜芦醇可能通过促使海马小胶质细胞 M2 型极化进而减轻炎症损伤改善 AD 小鼠的认知功能障碍。

将有效成分和 AD 共同靶点相映射,得到药物-疾病共同作用靶点 102 个。黄芪散关键靶点居前三位的是 PINK1、NLRP3、BDNF。PINK1 是 PINK1/parkin 信号通路的主要成员,研究发现^[15],激活 PINK1-Parkin 介导的线粒体自噬而影响 AD 病理,改善 AD 模型小鼠的认知和记忆障碍功能。研究表明^[16],NLRP3 炎症小体可能通过调节炎症反应在 AD 发生发展中扮演十分重要的角色,NLRP3 炎症小体激活的两个关键标志物 IL-1 β 和 IL-18 在 AD 患者脑内处于高水平状态。BDNF 作为一个重要的神经细胞营养因子,在突触可塑性、神经发生和神经细胞存活中发挥关键作用^[17]。

GO 富集分析显示黄芪散治疗 AD 的基因功能主要体现在自噬、炎症反应、对突触可塑性的调节、对胰岛素的反应、神经元凋亡过程、氧化应激反应等过程。在本研究筛选出的信号通路中,与黄芪散有效靶点的关联度最高的是线粒体自噬信号通路,其次是胰岛素抵抗。在本研究中,结合 AD 的发病机制,筛选出预测结果中的线粒体自噬、炎症反应、突触可塑性的调控机制为黄芪散对 AD 干预的可能机制开展体外细胞实验。PINK1/parkin 信号通路是调控线粒体自噬的关键通路,其作用方式为通过泛素化 parkin 以激活自噬^[18]。PINK1 为线粒体受损的主要探测器,当线粒体受损时,PINK1 在线粒体外膜磷酸化 parkin 将其从细胞质内募集至受损线粒体,进而磷酸化胞浆中的 E3 泛素蛋白连接酶 parkin 诱导其从细胞质内向受损的线粒体外膜上募集,活化的 parkin 将泛素连接到底物蛋白上形成泛素链,与 p62 等结合以募集胞质中的自噬标志物 LC3,形成具有双层膜结构的自噬小体^[19]。自噬小体最后通过融合溶酶体将受损的线粒体完全降解,完成线粒体自噬的过程。LC3-II 的转化的程度越高,自噬小体数量就越多,自噬水平可以通过 LC3-II/LC3-I 判断^[20]。p62 能直接与 LC3 蛋白特定区域结合,并最终被自噬溶酶体选择性降解,自噬发生时 p62 蛋白在自噬小体内被降解^[21],因此 p62 蛋白的降解也是反映自噬水平的标志之一。研究显示^[22],线粒体自噬受损可能会引起 A β 和 tau 蛋白的积累,加剧氧化损伤,导致突触功能障碍和认知障碍。因此,线粒体自噬对 AD 具有十分重要的作用。研究证实通过激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬可改善 AD 模型小鼠的认知功能障碍、增强线粒体的功能、起到神经元保护的作用^[23]。本研究结果表明黄芪散能增加自噬小体数量,促进自噬小体包裹受损线粒体,升高 LC3 II/I 比值,上调 PINK1、parkin 蛋白表达,下调 p62 蛋白表达,提示黄芪散可能通过激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬水平。研究表明^[24],ROS 是促进 NLRP3 小体活化及其下游 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 等炎症分子的表达的关键信号。实验证实通过激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬可降低 ROS 水平,抑制 NLRP3 炎症小体活性,减少下游的 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子水平,在 AD 中发挥保护作用^[25]。本研究结果表明黄芪散能显著降低 ROS 水平,抑制 NLRP3 炎症小体活性,并降低炎症因子 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平,可能与黄芪散激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬水平有关。

神经元是神经系统的结构单元,神经系统中神经元之间通过突触紧密联系。神经元中的神经突向外生长是神经退行性和神经保护的标志^[26]。神经突起生长是神经元发育,突触形成和神经再生的重要前提。所以促进神经突起的生长和神经细胞损伤后的修复在中枢神经系统疾病中的治疗显得尤为重要。BDNF 作为一个重要的神经细胞营养因子,在突触可塑性、神经发生和神经细胞存活中发挥关键作用^[17]。研究证明激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬可改善 3xTg-AD 小鼠学习记忆认知障碍和突触、树突棘结构及功能损伤^[27]。在我们的研究中,发现黄芪散可升高 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞的存活率、增加细胞突起长度、提高 BDNF 蛋白表达,可能与黄芪散激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬有关。

综上,本研究运用网络药理学和实验验证的方法分析了黄芪散治疗 AD 的作用机制,得出的结论是:黄芪散可能是通过激活 PINK1/parkin 通路促进线粒体自噬清除 ROS 进而抑制 NLRP3 炎症小体的活化和改善突触可塑性而发挥治疗 AD 作用。从分子、细胞水平进行阐述,为深入开展黄芪散基础实验研究以及临床合理应用提了供参考。

参考文献

- 1 Tian JZ, Shi J, Ni JN, et al. Sequential therapy based on evolution of patterns. a new model for treatment of Alzheimer's disease[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25:565-573.
- 2 Xu BL, Wang R, Zhang Z. Alzheimer's disease and type 3 diabetes[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis(中华老年心脑血管病杂志), 2012, 14:1338-1340.
- 3 Geng YN, Chen QG, Zhang BY, et al. Research progress on the relationship between diabetes and Alzheimer's disease[J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2017, 37:2063-2065.
- 4 Chen YF, Wang CY, Li WM, et al. The experimental study on hypoglycemic effect of ancient prescription Huangqisan[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2010, 26:73-76.
- 5 Sang XC. Prevention and treatment of Huangqisan and disassembled prescriptions on Alzheimer's disease[D]. Shanghai: Shanghai University of Chinese Medicine(上海中医药大学), 2019.
- 6 Zhang YH, Zhou XQ, Wu DH, et al. Study on mechanism of Sijunzi decoction in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:313-321.

- 7 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: 20-22.
- 8 Wang XC. Effect of astragaloside IV on Alzheimer's disease-like phenotypes induced by $A\beta_{1-42}$ and its mechanism [D]. Hefei: Anhui Medicine University(安徽医科大学), 2020.
- 9 Pang GF, Li H, Xie JS, et al. The puerarin consociation of Wuyuan Buxue oral liquid on rat model of Alzheimer's disease treatment [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2019, 30:1064-1066.
- 10 Chen XX. Protective effect of resveratrol on memory impairment in a mice model of Alzheimer's disease induced by hippocampal injection of streptozocin and its potential mechanism [D]. Hefei: Anhui Medicine University(安徽医科大学), 2020.
- 11 Liu Y. The neuroprotective effect of quercetin on beta-amyloid-induced PC12 cells injury and potential related mechanism [D]. Zhangjiakou: Hebei North University(河北北方学院), 2017.
- 12 Yu YL. Effect of puerarin on Tau hyperphosphorylation in the Alzheimer's and type 2 diabetes rat brain and the underlying mechanisms [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine(湖北中医药大学), 2017.
- 13 Fang J, Li XH, Chen WW. Effect of astragaloside IV on microglia activity in Alzheimer's disease rats based on MEK5 / ERK5 signaling pathway [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 2021, 55: 73-78.
- 14 Chen XY, Wang L, Li X. Resveratrol improves cognitive function of APP / PS1 mice via regulating polarization status of microglia cell in hippocampus [J]. *Chongqing Med J*(重庆医学), 2021, 50: 1441-1445.
- 15 Wang NP, Wang ZF, Han YF, et al. β -Asarone improves cognitive and memory impairment in APP/PS1 mice by activating PINK1/Parkin mediated mitochondrial autophagy [J]. *J Hunan Univ Chin Med*(湖南中医药大学学报), 2021, 41: 1178-1187.
- 16 Mezzasoma L, Antognelli C, Talesa VN. Atrial natriuretic peptide down-regulates LPS/ATP-mediated IL-1 β release by inhibiting NF- κ B, NLRP3 inflammasome and caspase-1 activation in THP-1 cells [J]. *Immunol Res*, 2015, 64: 303-312.
- 17 Vaynman S, Ying Z, Gomez-pinilla F. Hippocampal bdnf mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 20: 2580-2590.
- 18 Lin QS, Li S, Jiang N, et al. PINK1-parkin pathway of mitophagy protects against contrast-induced acute kidney injury via decreasing mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101254.
- 19 Sliter DA, Martinez J, Hao L, et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation [J]. *Nature*, 2018, 561: 258-262.
- 20 Xiao Y. The influence of exercise on autophagy in hippocampus of APP/PS1 transgenic AD mice [D]. Shanghai: East China Normal University(华东师范大学), 2016.
- 21 Zhai QL, Hu XD, Xiao J, et al. Astragalus polysaccharide may increase sensitivity of cervical cancer HeLa cells to cisplatin by regulating cell autophagy [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2018, 43: 805-812.
- 22 Fang EF, Hou Y, Palikaras K, et al. Mitophagy inhibits Amyloid-B and Tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 401-412.
- 23 Quan QH. "Mutual assistance of kidney and brain" electroacupuncture therapy for Alzheimer's effects of PINK1 and PARKIN in mice [D]. Shenyang: Liaoning University of Chinese Medicine(辽宁中医药大学), 2019.
- 24 Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, et al. ROS-Mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5: 126-137.
- 25 Li F. The protective mechanism of melatonin promoting mitochondrial autophagy in regulating NLRP3 inflammasome activity in AD [D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2020.
- 26 Hamamcioglu B, Kocanci FG, Aslim B. Phytochemical screening and evaluation of neuroprotective, anti-mutagenic and anti-genotoxic effects of Turkish endemic *Glaucium acutidentatum* [J]. *S Afr J Bot*, 2018, 117: 232-239.
- 27 Yang D. The study on mechanism of DA4-JC in improving cognitive behavioral disorder and pathological damage in APP/PS1/tau transgenic mice [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University(山西医科大学), 2021.