

基于网络药理学和实验验证探讨小柴胡汤治疗 阿尔茨海默病的作用机制

彭伟¹, 夏军¹, 陈云慧^{1,2*}, 淮文英¹, 谢永美², 田小平¹, 张天娥^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川大学, 成都 610041)

【摘要】 目的:运用网络药理学结合生物信息学探讨小柴胡汤治疗阿尔茨海默病(AD)的潜在作用机制。方法:利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选小柴胡汤的可能活性化合物及其潜在治疗靶标,从基因表达综合数据库(GEO)中获取与AD相关的差异表达基因,取交集筛选出小柴胡汤可能的靶点;对交集靶点基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;构建化合物-靶点网络、蛋白互作(PPI)网络,进行KEGG和GO富集分析。采用 β 淀粉样蛋白₁₋₄₀(A β ₁₋₄₀)诱导PC12细胞制备AD细胞模型,以小柴胡汤干预处理后,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞活率,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色观察细胞形态、细胞膜电位检测、流式细胞术检测细胞凋亡、细胞荧光免疫检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达,初步验证网络药理学预测结果。结果:小柴胡汤共收集到190个化学成分和41个AD相关靶点,包括丁香萜,槲皮素,小檗碱,原卟啉,24-Ethylcholest-4-en-3-one, β -D-呋喃核糖苷等关键化合物及Sigma非阿片类细胞内受体1(SIGMAR1),细胞周期检测点激酶1(CHEK1),非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶6(PTPN6),蛋白激酶C(PRKCH),核转录因子 κ B激酶亚单位 β 抑制蛋白(IKKB),组织蛋白酶D(CTSD),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),Bax,Bcl-2样蛋白1(Bcl-2L1)等核心靶点。GO富集分析获得302个条目($P<0.05$),主要与调控神经元细胞凋亡相关;KEGG通路富集获得相关通路73条($P<0.05$),涉及的主要通路和生物过程包括细胞凋亡通路、脂质和动脉粥样硬化相关通路、癌症相关通路等。细胞实验表明,与空白组比较,模型组细胞活率降低($P<0.05$),凋亡率升高($P<0.05$)、线粒体膜电位降低,Bcl-2/Bax下调;与模型组比较,小柴胡汤组细胞活率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$)、线粒体膜电位升高,Bcl-2/Bax上调,验证了预测结果的可靠性。结论:本研究揭示了小柴胡汤治疗AD多成分、多靶点、多途径的作用特点,为进一步阐释其物质基础和机制奠定了一定基础。

【关键词】 小柴胡汤; 阿尔茨海默病(AD); 作用机制; 网络药理学

【中图分类号】 R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2022)05-0169-09

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20220406 **【增强出版附件】** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211223.1858.001.html>

【网络出版日期】 2021-12-24 16:00

Mechanism of Xiao Chaihutang in Treatment of Alzheimer's Disease: Based on Network Pharmacology and *in vitro* Experimental Verification

PENG Wei¹, XIA Jun¹, CHEN Yun-hui^{1,2*}, HUAI Wen-ying¹, XIE Yong-mei²,
TIAN Xiao-ping¹, ZHANG Tian-e^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【收稿日期】 20210924(005)

【基金项目】 成都中医药大学青年学者人才项目(QNXZ2019043);四川省科技厅国际合作与交流项目(2017HH0004);国家自然科学基金项目(81603537);四川省中医药管理局项目(2021MS464);四川省省中医工作室建设项目(川中医药办202120);成都中医药大学双一流建设项目

【第一作者】 彭伟,博士,副教授,从事中药物质基础及其机制研究,Tel:028-61800000,E-mail:pengwei@cdutcm.edu.cn

【通信作者】 *陈云慧,博士,副教授,从事经方配伍规律与作用机制、中医药数据挖掘及分析、中医经典国际传播研究,Tel:028-61800000,E-mail:chenyunhui@cdutcm.edu.cn;

*张天娥,博士,教授,从事证候生物学与经典方剂应用基础研究,Tel:028-61800000,E-mail:zhte2003@cdutcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential mechanism of Xiao Chaihutang (XCHT) in the treatment of Alzheimer's disease (AD) based on network pharmacology and bioinformatics. **Method:** The active components of XCHT and corresponding targets were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the differentially expressed genes related to AD were searched from Gene Expression Omnibus (GEO). Thereby, the common targets of XCHT and AD were yielded, followed by Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the common targets. The component-target network and protein-protein interaction (PPI) network were constructed. Furthermore, amyloid β -protein ($A\beta$)₁₋₄₀ was used to induce AD in PC12 cells and then the AD cells were intervened with XCHT. Afterward, cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and cell morphology was observed based on 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Cell membrane potential was determined and apoptosis was detected by flow cytometry, and cellular immunofluorescence detects the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)/Bcl-2-related X protein (Bax). Moreover, immunofluorescence assay was performed. **Result:** A total of 190 active components and 41 anti-AD targets of XCHT were screened out. The key components included mairin, quercetin, berberine, protoporphyrin, 24-ethylcholest-4-en-3-one, and β -D-ribofuranoside, and the core targets were sigma non-opioid intracellular receptor 1 (SIGMAR1), checkpoint kinase 1 (CHEK1), protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6), protein kinase C (PRKCH), inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta (IKKB), cathepsin D (CTSD), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), Bax, and Bcl-2-like protein 1 (Bcl-2L1). The anti-AD targets of XCHT were involved in 302 GO terms ($P < 0.05$), particularly the regulation of neuronal cell apoptosis, and 73 KEGG pathways ($P < 0.05$). The major pathways and biological processes included the apoptosis pathway, virus infection pathway, lipid and atherosclerosis pathway, and cancer-related pathways. In the *in vitro* experiment, the model group demonstrated the decrease in cell survival rate ($P < 0.05$), increase in apoptosis rate ($P < 0.05$), and down-regulation of mitochondrial membrane potential and Bcl-2/Bax ratio compared with the blank control. Compared with the model group, XCHT group showed the increase in cell survival rate ($P < 0.05$), decrease in apoptosis rate ($P < 0.05$), and up-regulation of mitochondrial membrane potential and Bcl-2/Bax ratio. **Conclusion:** Based on network pharmacology, this study reveals the multi-component, multi-target, and multi-pathway characteristics of XCHT in the treatment of AD, laying a foundation for further research on the material basis and mechanism of this prescription.

[Keywords] Xiao Chaihutang (XCHT); Alzheimer's disease (AD); network pharmacology

阿尔茨海默病(AD)是一种渐进性神经系统退行性病变,主要表现为认知功能障碍、记忆障碍、智力减退及人格改变^[1]。多发于65岁以上老年人群,随着全球人口老龄化现象日趋严重,其发病率逐年上升,已成为全球面临的重大医疗卫生和社会经济问题。AD特征性病理改变主要是 β 淀粉样蛋白($A\beta$)沉积形成的老年斑、过度磷酸化Tau蛋白引起的神经原纤维缠结和神经元细胞大量损伤死亡^[2]。其病因病机十分复杂,目前尚未明确,存在 $A\beta$ 级联、脂代谢紊乱、感染、炎症、自由基损伤、氧化应激及APP基因突变等数十种假说^[3-4]。迄今为止,临床用药包括他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏等胆碱酯酶抑制剂与美金刚等N-甲基-D-天冬氨酸受

体拮抗剂,均只能改善AD症状,不能逆转或阻止其进展,仍需积极探索其治疗药物^[1]。

中医学认为,AD属于“好忘、喜忘、健忘、呆、呆痴、愚痴”等病范畴,其病复杂,但总不离虚实两端。究其病因病机,与少阳枢机不利密切相关。“少阳为枢”“主发之机”“制动之主曰枢机”。少阳开合内外,通达上下,阴阳燮理;少阳枢机不利,气机升降失度,开合失常,阴阳逆乱,实可为风、火、痰、瘀之有余,虚则为气、血、阴、阳之不足,导致AD发生发展。经典方剂小柴胡汤出自汉代张仲景所著《伤寒论》,药用柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、大枣和炙甘草,功善“和枢机、解郁结”,柯韵伯言其为“少阳枢机之剂,和解表里之总方”。近年来,临床研究表明

从“少阳枢机不利”论治AD为有效治疗策略^[5-6],实验研究揭示小柴胡汤能下调白细胞介素(IL)-1 β , IL-6及p-p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MARK),核转录因子- κ B(NF- κ B)表达水平,对AD模型小鼠发挥脑保护作用^[7-8]。然而鉴于中药方剂具有多成分、多途径、多靶点作用的特点,目前该方治疗AD潜在的物质基础、作用机制及环节尚未明确。网络药理学研究理念强调从系统层次和生物网络的整体角度出发,解析药物及治疗对象之间的分子关联规律,为开展中药复方作用机制研究提供了新思路。因此,本研究拟采用网络药理学和生物信息学的方法,分析小柴胡汤的有效成分、筛选小柴胡汤抗AD的作用靶点、挖掘其潜在通路,并辅以细胞实验进行初步验证,以期为进一步开展相关实验验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 小柴胡汤化学成分检索与筛选 经典方剂小柴胡汤药用柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、大枣、炙甘草。基于中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)在线数据库(<http://tcmispw.com/tcmisp.php>)收集和筛选小柴胡汤有效成分和相关靶点。该数据库包含499种中药品种,并提供各种成分吸收、分布、代谢及排泄(ADME)特性信息^[9],其中口服生物利用度(OB)和类药性(DL)是最重要的药代动力学指标^[10]。本研究将筛选OB \geq 30%和DL \geq 0.18的化合物作为候选成分,并检索PharmMapper(http://www.lilab-ecust.cn/pharm_mapper/) and SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库预测其对应的靶点蛋白。

1.2 AD相关靶点预测 基于基因表达综合数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)在线检索人源AD芯片相关数据集^[11],挖掘差异表达基因,根据研究样本及研究方向,最终选择编号为GSE4226的芯片,该芯片数据的原始文件包含了28个患者血液样本,其中正常对照组14个(男女各7人),AD患者样本14个(男女各7人)。采用R语言(3.6.3)对芯片集数据进行二次分析,log₂算法对数据进行归一化和变换,倍性变化(FC)法检测AD和正常基因的差异表达。以 $|\log FC| > 1$ 且adj.P < 0.01 为标准,筛选差异表达基因,并运用R语言绘制热图和火山图。

1.3 蛋白质-蛋白质(PPI)互作网络构建 将处理好的数据集导入Cytoscape 3.7.1软件和STRING 11.0在线数据库(<https://string-db.org>)创建蛋白质

—蛋白质相互作用网络(PPI);使用Cyto hubba插件筛选核心关键基因(Hub基因)^[12-13]。

1.4 “化合物-交集靶点”互作网络构建 采用Perl语言工具处理数据以获得AD差异表达基因与小柴胡汤化合物对应靶点的交集;将处理好的数据导入Cytoscape 3.7.1软件构建“小柴胡汤化合物-AD交集靶点”网络。

1.5 功能富集分析 采用DAVID (<http://david.nifcrf.gov/>)在线对网络合并后获得的靶点蛋白进行基因本体论(GO)富集分析^[14],并运用R语言工具包,绘制生物过程、细胞组分及分子功能条形图、气泡图及圈图。采用DAVID工具结合R语言对小柴胡汤化合物-AD交集蛋白靶标基因进行京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析^[15],探讨小柴胡汤潜在靶标的生物学功能及参与的生物学通路。

1.6 试剂与仪器 细胞株高分化型PC12细胞株(湖南丰晖生物科技有限公司,批号CL0256);胎牛血清(美国Thermo Scientific公司,批号10099141C); $\text{A}\beta_{1-40}$ (美国Sigma-aldrich公司,批号A1075);JC-1探针(苏州宇恒生物科技有限公司,批号J6004);细胞增殖与活性检测(CCK-8)细胞增殖检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号AR1199);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI),Annexin V-APC, Triton X-100的封闭液进行封闭(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C1002, C1067S, ST797-500ml);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)一抗,PVDF膜(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BM0200, BA0315-2, AR0136-02);羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,羊抗小鼠IgG H&L(英国Abcam公司,批号分别为Wieab150077, ab97035);311型CO₂细胞培养箱, Multiskan Go型全波长酶标仪(美国Thermo公司);DMi8型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司)。

1.7 CCK-8法检测细胞活率 小柴胡汤(XCHT)由柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、大枣、炙甘草组成,购自于四川(北京同仁堂)大药房有限公司。按照《伤寒论》中原方药物比例(柴胡-黄芩-半夏-生姜-人参-甘草-大枣8:3:3:3:3:3:2)称取药物,置于圆底烧瓶中,混匀,加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 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XCHT 水煎剂, 冷冻干燥成冻干粉, 保存备用。AD 细胞 PC12 模型造模方法参考文献资料^[16-17]。实验分为空白组 (PC12 细胞组)、模型组 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{1-40}$ 处理 AD 细胞模型组) 及 XCHT 治疗组 (AD 细胞模型+XCHT 处理组)。PC12 细胞接种于 96 孔板 (1×10^5 个/mL), 加入终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 诱导 48 h 后, 空白组和模型组加入培养基孵育, XCHT 组分别加入 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}$ XCHT 继续培养 48 h, 采用 CCK-8 法于 450 nm 下测定吸光度 A , 计算细胞活率。

1.8 DAPI 染色观察细胞形态 将细胞接种于 6 孔板, 孔内放置一圆形盖玻片, 培养 48 h 后, 移除培养液, PBS 洗涤 3 遍, 加入 4% 多聚甲醛固定, 移除多聚甲醛, PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 染色, PBS 洗涤 3 次, 加入荧光淬灭液封片, 荧光倒置显微镜观察细胞形态。

1.9 细胞膜电位检测 将细胞接种于 6 孔板, 培养 48 h 后, 移除培养液, PBS 洗涤 3 次, 加入 JC-1 探针进行孵育, 激光共聚焦显微镜观察细胞绿色/红色荧光比率。

1.10 流式细胞术检测细胞凋亡 收集接种于 T25 培养瓶的细胞, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 15 cm, 下同), 移除上清, 加入 PBS 2 mL 重悬洗涤, 混匀后吸取 1 mL 转移至 1.5 mL 尖底微型离心管, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 移除上清, 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞, 加入 Annexin V-APC 5 μL /孔吹匀, 再加入 PI 5 μL /孔混匀; 室温避光反应 15 min 后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.11 细胞荧光免疫检测 将细胞接种于 6 孔板, 培养 48 h 后, 移除培养液, PBS 洗涤 3 次, 加入含有 3% Triton X-100 的封闭液进行封闭, Bcl-2, Bax 一抗 (1:300) 进行孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入荧光二抗 (1:1 万) 室温避光孵育 1 h。加入 DAPI 进行细胞核染色, 激光共聚焦显微镜观察细胞荧光表达情况。

1.12 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件分析处理实验数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较运用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小柴胡汤活性成分预测 通过对 TCMSP 数据库的检索, 根据 $\text{OB} \geq 30\%$ 及 $\text{DL} \geq 0.18$ 要求, 筛选出 209 种有效化合物, 其中柴胡 19 种, 黄芩 34 种, 半夏 13 种, 生姜 5 种, 人参 22 种, 炙甘草 91 种, 大枣 25

种, 去除重复后共获得 190 种有效成分。见增强出版附件材料。

2.2 小柴胡汤治疗 AD 的潜在靶点预测 基于 GEO 数据库检索“Alzheimer's disease”筛选并下载符合标准的 GSE 4226 独立数据集, 运用 R 语言对其进行差异表达分析。根据 FC 分析 (筛选条件 $|\log \text{FC}| > 1$ 且 $\text{adj.}P < 0.01$) 获得 687 个 DEGs, 其中表达上调的基因 399 个, 表达下调的基因 288 个。小柴胡汤活性成分靶点 1 229 个, AD 疾病靶点 687 个。将活性成分靶点与 AD 靶点取交集, 获得 41 个小柴胡汤治疗 AD 的潜在靶点。见增强出版附件材料。

2.3 潜在靶点 PPI 网络分析 将 41 个小柴胡汤改善 AD 的潜在靶点导入 String 数据库, 获得 PPI 网络。该网络具有 34 个节点, 192 条边, 平均节点度值为 5.65, 局部聚类平均系数为 0.39。Cytoscape 3.7.1 内置 Network Analyzer 功能分析网络显示, 度值较大的靶点为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3), Bcl-2 样蛋白 1 (Bcl-2L1), Caspase-9, 热休克蛋白家族 A (Hsp70) 成员 8 (HSPA8), 分别是 21, 17, 12, 10, 10, 提示小柴胡汤治疗 AD 的药效机制可能与这些蛋白密切相关。见增强出版附件材料。

2.4 潜在靶点 GO 富集分析 使用 DAVID 工具和 R 语言对小柴胡汤治疗 AD 的潜在靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路注释分析。GO 富集结果涉及的生物过程 (BP) 主要包括: 配体缺乏时信号转导 (signal transduction in absence of ligand), 配体缺乏时外源性凋亡 (extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand), 凋亡执行期 (execution phase of apoptosis), 神经元死亡 (neuron death), 神经元死亡正向调控 (positive regulation of neuron death), 放射反应 (response to radiation), 外源性凋亡 (extrinsic apoptotic signaling pathway), 神经元凋亡过程 (neuron apoptotic process) 等; 相关的细胞成分 (CC) 包括: 膜筏 (membrane raft), 膜微区 (membrane microdomain), 膜区 (membrane region), 核被膜 (nuclear envelope), 分泌颗粒腔 (secretory granule lumen), 胞质泡腔 (cytoplasmic vesicle lumen), 囊腔 (vesicle lumen), 溶酶体腔 (lysosomal lumen), 黑色素体 (melanosome), 色素颗粒 (pigment granule); 涉及的分子功能 (MF) 包括半胱氨酸型内肽酶活性参与细胞凋亡过程 (cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process), 半胱氨酸型内肽酶活性 (cysteine-type endopeptidase activity),

酰胺结合 (amide binding), BH 区域结合 (BH domain binding), 死亡结构域结合 (death domain binding)等。GO 富集结果表明,小柴胡汤治疗 AD 的机制可能主要和调控凋亡诱导的神经元细胞死亡信号和过程相关。见增强出版附件材料。

2.5 潜在靶点 KEGG 通路富集分析 应用 DAVID 数据库和 R 语言进行 KEGG 生物途径富集分析,小柴胡汤改善 AD 具有显著影响的生物途径共 73 条。提取 P 值靠前关键通路,其机制主要涉及细胞凋亡通路 (apoptosis), 人类免疫缺陷病毒 1 感染通路 (human immunodeficiency virus 1 infection), 脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis) 通路、致病性大肠杆菌感染 PI3K/Akt (pathogenic escherichia coli infection PI3K/Akt) 信号通路,小细胞肺癌 (small cell lung cancer) 通路,胰腺癌 (pancreatic cancer), 结肠直肠癌 (colorectal cancer) 等。结合本研究疾病为 AD 和文献报道,排除其他不相关的通路机制,结合 GO 的富集结果,笔者推测小柴胡汤治疗 AD 的可能机制主要与调节凋亡相关。见增强出版附件材料。

2.6 小柴胡汤治疗 AD 的关键成分-靶点网络构建 采用 Perl 语言分析小柴胡汤化合物对应靶点与 AD 差异表达基因,应用 Venny 2.1 求 1 229 个小柴胡汤作用靶点与 687 个 AD 相关靶点的交集,获得小柴胡汤治疗 AD 的靶点 41 个,提示这些蛋白是小柴胡汤治疗 AD 成分的潜在相关靶点。应用 Cytoscape 3.7.1 对小柴胡汤治疗 AD 的化合物-靶点网络进行可视化处理。该网络由 190 个节点和 407 条边组成。根据节点的 Degree 和 Betweenness Centrality 大小,进一步的拓扑学分析显示该网络的核心作用靶点为 Sigma 非阿片类细胞内受体 1 (SIGMAR1), 细胞周期检测点激酶 1 (CHEK1), 前列腺素 E 合成酶 (prostaglandin E synthase, PTGES), 钾电压门控通道亚家族 H 成员 2 (KCNH2), 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 6 (PTPN6), 蛋白激酶 C (PRKCH), 核转录因子 κ B 激酶亚单位 β 抑制蛋白 (I κ BKB), 组织蛋白酶 D (CTSD), Caspase-3, 微管相关蛋白 Tau (MAPT), 花生四烯酸 5-脂氧合酶活化蛋白 (ALOX5AP), Bcl-2L1, N-乙酰基乙醇胺酸酰胺酶 (NAAA), 整合素亚基 β_1 (ITGB1), Caspase-6; 关键化学成分为丁子香蓆 (Mairin, C73-MOL000211, 来源:甘草、大枣), 槲皮苷 (quercetin, C67-MOL000098, 来源:柴胡、甘草、大枣), 小檗碱 (berberine, C187-MOL001454, 来源:大枣、黄芩), 原卟啉 (Protoporphyrin, C179-

MOL000783, 来源:大枣), 24-Ethylcholest-4-en-3-one (C155-MOL001755, 来源:半夏), β -D-呋喃核糖苷 (β -D-Ribofuranoside, C156-MOL006967, 来源:半夏)等。见增强出版附件材料。

2.7 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞的保护作用

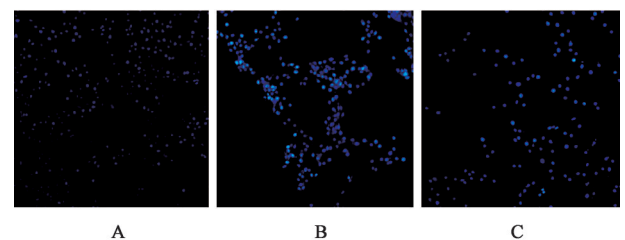
2.7.1 对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞活率的影响 与空白组比较,模型组 PC12 细胞活率明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,小柴胡汤干预后,细胞活率明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Table 1 Effect of Xiao Chaihutang on viability of PC12 cells injured by $A\beta_{1-40}$ ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活率/%
空白		100.0 \pm 1.9
模型		78.0 \pm 5.2 ¹⁾
小柴胡汤	10	81.7 \pm 3.3 ¹⁾
	20	83.3 \pm 2.4 ¹⁾
	40	88.2 \pm 3.1 ¹⁾
	80	94.9 \pm 4.2 ²⁾
	160	95.1 \pm 6.2 ²⁾
	320	94.8 \pm 5.6 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

2.7.2 对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞凋亡和膜电位的影响 与空白组比较,模型组 PC12 细胞明显变亮、变圆,染色质浓度升高,提示细胞发生凋亡;与模型组比较,小柴胡汤 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预后,细胞凋亡情况有所改善。见图 1。流式细胞术检测结果与 DAPI 染色一致,与空白组比较,模型组 PC12 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,小柴胡汤干预后,细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。



A. 空白组; B. 模型组; C. 小柴胡汤组(图 3 同)

图 1 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞核形态变化的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Xiao Chaihutang on nuclear morphometry of PC12 cells injured by $A\beta_{1-40}$ (IF, $\times 400$)

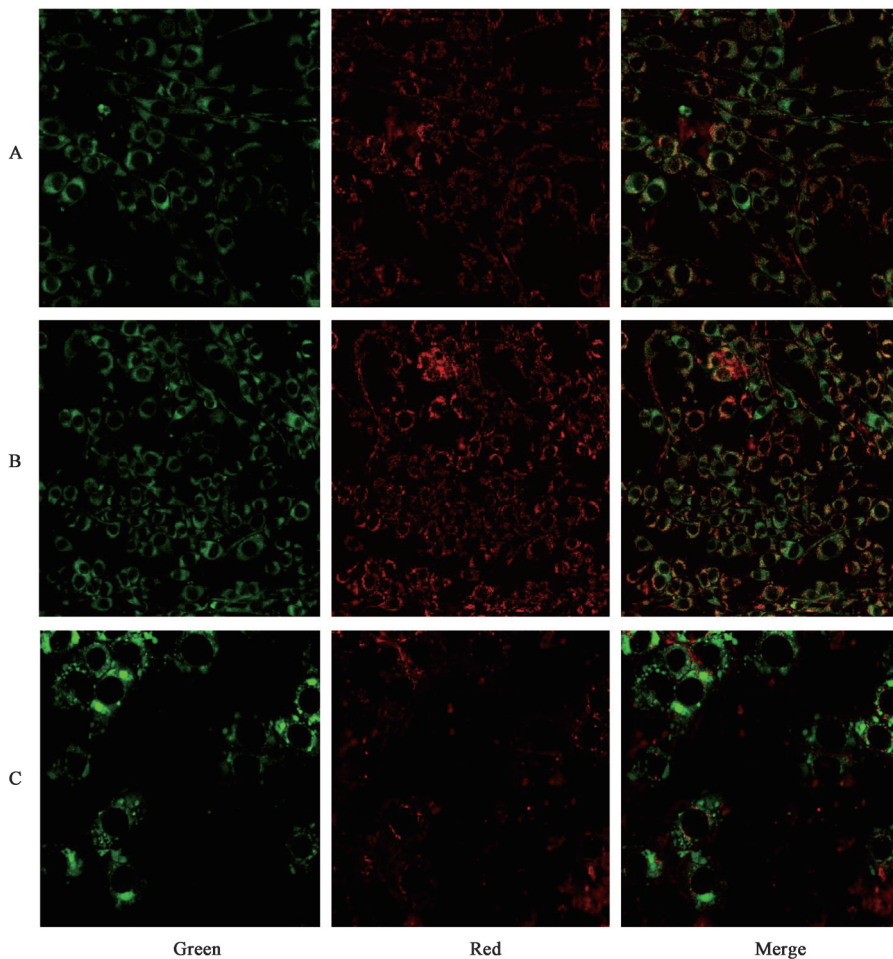
线粒体膜电位 (MMP) 下降是凋亡发生的早期事件。当线粒体膜通透性发生改变时,膜电位会降

表2 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)
Table 2 Effect of Xiao Chaihutang on apoptosis of PC12 cells injured by $A\beta_{1-40}$ ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白		5.31 ± 1.49
模型		$24.81\pm 2.94^{1)}$
小柴胡汤	80	$11.82\pm 4.02^{2)}$

低。这种改变是由于细胞膜表面 Bcl-2/Bax 的比例降低,引起线粒体膜 PT 孔打开,线粒体中细胞色素

C 释放到细胞质中,导致凋亡发生。JC-1 是检测 MMP 的理想荧光探针。MMP 较高时,JC-1 以聚合物存在,产生红色荧光;MMP 较低时,JC-1 以单体存在,产生绿色荧光,因此检测荧光颜色可用于评价 MMP 的变化。空白组 PC12 细胞主要为红色荧光,提示细胞线粒体膜电位较高;与空白组比较,模型组 PC12 细胞主要表现为绿色荧光,提示 MMP 明显下降、细胞产生了凋亡;与模型组比较,小柴胡汤 ($80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 干预后,细胞红色荧光比例增高,提示 MMP 明显增加、细胞凋亡有所减轻。见图 2。



A. 小柴胡汤组;B. 空白组;C. 模型组

图2 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞膜电位的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Xiao Chaihutang on mitochondrial membrane potential of PC12 cells injured by $A\beta_{1-40}$ (IF, $\times 400$)

2.7.3 对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞 Bcl-2/Bax 的影响
上述结果表明,小柴胡汤干预后,细胞凋亡和 MMP 情况有所改善,提示小柴胡汤可能抑制了细胞 PT 孔的打开,从而抑制凋亡的发生。结合网络药理学的预测结果,推测小柴胡汤可能改善 Bcl-2/Bax 的比例进而影响 PC12 细胞 MMP,抑制细胞凋亡,因此,进一步探讨了小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤 PC12 细胞 Bcl-2/

Bax 的影响。细胞免疫荧光结果表明,与模型组比较,小柴胡汤 ($80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的干预可以上调 Bcl-2/Bax,从而抑制细胞凋亡。见图 3。

3 讨论

AD 是一种多因素全身性复杂疾病,与少阳枢机不利密切相关。少阳为枢转之机,是人体气机升降、出入之枢,亦为表里、阴阳之枢。且少阳在腑为

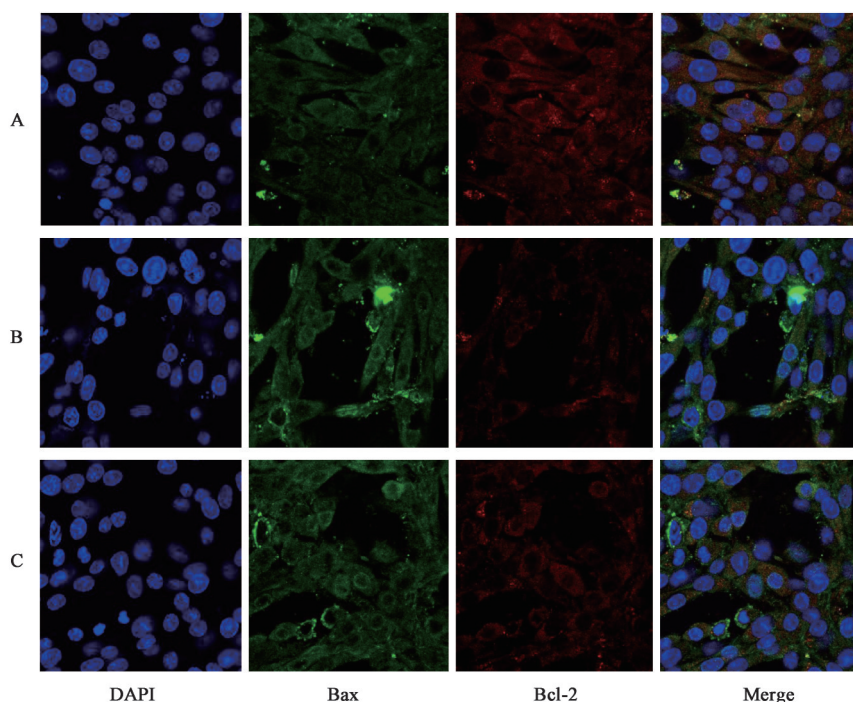


图3 小柴胡汤对 $A\beta_{1-40}$ 损伤PC12细胞Bcl-2/Bax的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Xiao Chaihutang on Bcl-2/Bax of PC12 cells injured by $A\beta_{1-40}$ (IF, $\times 400$)

胆和三焦,“凡十一脏皆取决于胆”,三焦为“脏腑之外,躯体之内,包罗诸脏,一腔之大腑也。”对全身气血津液的运行敷布和各个脏腑功能的正常发挥具有重要作用。少阳枢机不利,可致气郁、气滞、气逆,或郁而化火,亦可生湿生痰,或阻滞经络而成瘀,又或克伐太阴脾土、致气血生化乏源,又或累及多脏、阴阳逆乱,五脏之精、六腑之清皆不能上达清窍而致AD的发生发展^[7]。若论其治,当以“和枢机”为要。小柴胡汤方中柴胡、黄芩外透少阳之邪、内泄少阳之热以疏泄气机之郁滞;半夏与生姜辛散气滞、功善化痰散饮,人参、大枣、炙甘草鼓舞脾胃之气,以助少阳转枢之力。现代药理学研究表明该方具有调节免疫、抗肿瘤、调节内分泌等作用^[18-19],在体内、外实验中均具有抗AD的作用^[7-8]。因此,本研究以小柴胡汤为研究对象。

根据OB和DL参数,本研究共筛选出小柴胡汤可能的活性成分190个,基于TCMSP和GEO芯片数据集分析,获得小柴胡汤治疗AD可能的靶点41个,包括SIGMAR1, CHEK1, PTGES, KCNH2, PTPN6, PRKCH, IKBKB, CTSD, CASP3, BAX, BCL2L1等核心靶点,提示小柴胡汤治疗AD具有多成分、多靶点的特点。对上述成分和靶点的关系网络分析结果显示, Mairin, quercetin, berberine, Protoporphyrin, 24-Ethylcholest-4-en-3-one, β -D-Ribofuranoside等成分拥有较多的预测靶点,表明这

些化合物可能是小柴胡汤治疗AD的重要活性成分。其中,已有报道证实丁子香藜(mairin,又名betulinic acid)能抑制炎症反应、保护微循环,有效改善AD大鼠模型空间学习和记忆障碍功能、减轻其海马组织 $A\beta$ 纤维斑块^[20];槲皮素(quercetin)可保护神经元,抑制氧化应激和神经炎症,改善乙酰胆碱酯酶活性,降低脂质过氧化,减少 $A\beta$ 异常沉积,抑制tau蛋白异常磷酸化^[21];小檗碱(berberine)可抑制AD氧化应激和神经炎症,延缓细胞外 $A\beta$ 斑块和细胞内NFTs的形成,并改善动脉粥样硬化以降低AD相关风险因素^[22-23]。为了分析小柴胡汤治疗AD的生物学过程和潜在信号途径,将获得的小柴胡汤与AD相关的基因进行GO分析和KEGG通路分析。GO富集分析得到302个条目,其中BP 263个条目,CC 22个条目,MF 17个条目,KEGG通路富集得到相关通路73条。通路富集结果均提示小柴胡汤治疗AD的潜在机制主要与细胞凋亡、病毒感染通路、脂质和动脉粥样硬化相关通路、癌症相关通路等相关,具有多靶点、多途径的特点。

现代研究表明,AD是导致进行性认知功能减退的最常见原因,神经元丢失是其主要病理改变,凋亡是引起神经元丢失最主要的病理机制^[24-26]。提示抑制神经元凋亡是防治AD的有效途径。凋亡是最主要的细胞程序性死亡途径,其发生与细胞内促凋亡基因和已凋亡基因的比例密切相关。本研究

结果显示,小柴胡汤治疗AD的靶点与SIGMAR1, CHEK1, PTPN6, PRKCH, I κ BKB, CTSD, CASP3, BAX, BCL2L1等凋亡相关基因联系紧密。SIGMAR1基因编码的 σ 1R蛋白,是一种主要分布于线粒体相关内质网膜的受体蛋白,其功能主要与细胞膜离子通道调控、线粒体Ca²⁺稳态维持和信号转导相关,近年来有报道 σ 1R蛋白也与调控肿瘤凋亡关系密切^[27]。CHEK1为与细胞周期调控相关的基因,能直接调控细胞的凋亡和生存^[28]。PTPN6编码的是蛋白酪氨酸磷酸酶家族蛋白PTP,与细胞生长、分化、有丝分裂周期等相关^[29]。PRKCH编码的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶对细胞功能包括增殖、分化和凋亡有重要的调控作用^[30]。研究发现IKKB与炎症、细胞生存和凋亡密切相关的基因^[31]。组织蛋白酶D(CTSD)的高表达能抑制细胞的增殖,促进细胞凋亡,还能调控Bcl-2, Bax, Caspase-3及周期相关蛋白表达^[32]。CASP3编码凋亡执行蛋白Caspase-3;而BAX和BCL2L1分别编码Bax和Bcl-2, Bax/Bcl-2是调控线粒体PT孔打开的关键,PT孔打开后,线粒体中细胞色素C释放到细胞质引起线粒体凋亡的发生^[33]。在本研究中,结合AD的发病机制,筛选出预测结果中的凋亡调控机制为小柴胡汤对AD干预的可能机制开展体外细胞实验。结果表明小柴胡汤能显著抑制A β 引起的细胞死亡,其机制可能是通过上调Bcl-2/Bax的比例升高细胞膜电位、降低A β 引起的细胞线粒体依赖的相关凋亡,初步验证了网络药理学预测结果,并提示小柴胡汤治疗AD的作用可能与其对神经细胞的保护作用与凋亡抑制有关。

综上,本研究采用网络药理学结合生物信息学的方法探讨了小柴胡汤治疗AD可能的潜在作用机制,初步阐释了小柴胡汤治疗AD多成分、多靶点、多途径的作用机制特点,课题组拟在后续研究中基于方证组学进一步探讨小柴胡汤治疗AD的作用机制、物质基础及现代剂型开发。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BREIJYEH Z, KARAMAN R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5789.
[2] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.

[3] NAUGHTON S X, RAVAL U, PASINETTI G M. The viral hypothesis in Alzheimer's disease: novel insights and pathogen-based biomarkers [J]. *J Pers Med*, 2020, 10(3): 74.
[4] AGARWAL M, ALAM M R, HAIDER M K, et al. Alzheimer's disease: an overview of major hypotheses and therapeutic options in nanotechnology [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 11(1): 59.
[5] 仲海红,徐进友. 从少阳论治呆病 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(6): 835-837.
[6] 吕小亮,余尚贞,石青. 论张仲景伤寒脑病思想 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(9): 850-852.
[7] 陈靖,韩兆丰,付彦君,等. 经方小柴胡汤化裁方对阿尔茨海默病小鼠海马组织细胞炎症因子IL-1 β 、IL-6及p-p38 MARK、NF- κ B表达水平的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(12): 217-220, 299.
[8] 陈靖,王卉,刘晓丹,等. 小柴胡汤化裁方对AD小鼠记忆认知能力及海马神经元形态的影响 [J]. *西部中医药*, 2021, 34(5): 32-35.
[9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
[10] HUANG C, YANG Y, CHEN X, et al. Large-scale cross-species chemogenomic platform proposes a new drug discovery strategy of veterinary drug from herbal medicines [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184880.
[11] CHEN G, RAMÍREZ J C, DENG N, et al. Restructured GEO: restructuring Gene Expression Omnibus metadata for genome dynamics analysis [J]. *Database (Oxford)*, 2019, doi: 10. 1093/database/bay145.
[12] DEMCHAK B, HULL T, REICH M, et al. Cytoscape: the network visualization tool for GenomeSpace workflows [J]. *F1000Res*, 2014, 3: 151.
[13] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
[14] MARTUCCI D, MASSEROLI M, PINCIROLI F. Gene ontology application to genomic functional annotation, statistical analysis and knowledge mining [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2004, 102: 108-131.
[15] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D353-D361.
[16] 杨贤志,陈勤,陈庆林,等. 远志皂苷对 β 淀粉样蛋白片段1-40诱导PC12细胞凋亡的抑制作用 [J]. *中国*

- 药理学与毒理学杂志,2013,27(3):379-384.
- [17] 陈云慧,夏军,刘兴隆,等. 当归芍药散含药血清调控UPP途径对 $A\beta_{1-40}$ 损伤PC12细胞的保护作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20211207.
- [18] 张志雄,刘春芳,刘明洋,等. 小柴胡汤的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药临床杂志,2021,33(3):580-584.
- [19] 冯振兴,强胜. 小柴胡汤的药理作用及临床应用简况[J]. 中国医药科学,2020,10(22):49-51.
- [20] NAVABI S P, SARKAKI A, MANSOURI E, et al. The effects of betulinic acid on neurobehavioral activity, electrophysiology and histological changes in an animal model of the Alzheimer's disease [J]. Behav Brain Res,2018,337:99-106.
- [21] KHAN H, ULLAH H, ASCHNER M, et al. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease[J]. Biomolecules,2019,10(1):59.
- [22] FANG Z, TANG Y, YING J, et al. Traditional Chinese medicine for anti-Alzheimer's disease: berberine and evodiamine from *Evodia rutaecarpa* [J]. Chin Med, 2020,15:82.
- [23] CAI Z, WANG C, YANG W. Role of berberine in Alzheimer's disease [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016,12:2509-2520.
- [24] CALVO-RODRIGUEZ M, BACSKAI B J. Mitochondria and calcium in Alzheimer's disease: from cell signaling to neuronal cell death [J]. Trends Neurosci,2021,44(2):136-151.
- [25] YI J, CHEN B, YAO X, et al. Upregulation of the lncRNA MEG3 improves cognitive impairment, alleviates neuronal damage, and inhibits activation of astrocytes in hippocampus tissues in Alzheimer's disease through inactivating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):18053-18065.
- [26] 王国权,周鹏,谢道俊,等. 黄蒲通窍胶囊对阿尔茨海默病大鼠海马EGFR-PLC γ 信号通路的影响[J]. 中国中药杂志,2020,45(9):2165-2171.
- [27] 邓亚勤,周新欢,姜李乐,等. σ 1受体在子宫颈癌组织中高表达的意义及其配体化合物对子宫颈癌细胞生长的作用[J]. 中华妇产科杂志,2017,52(7):473-482.
- [28] 王方,王昕,王亚文. 去磷酸化抑制CHEK1可破坏S期限制点并诱导CML细胞凋亡[J]. 肿瘤,2020,40(11):758-766.
- [29] 吾甫尔·卡德尔,王磊,多尔坤·沙衣热木. PTPN6通过抑制SP1/p38 MAPK信号通路促进前列腺癌细胞的化疗敏感性[J]. 现代肿瘤医学,2020,28(16):2764-2769.
- [30] 程虹,王枫,丁新生. 蛋白激酶C η 基因与腔隙性脑梗死[J]. 国际脑血管病杂志,2009,17(2):153-156.
- [31] 齐康,李洋,李雪冰,等. IKBKB在人肺腺癌细胞株A549及其耐药细胞株A549/DDP中的表达和意义[J]. 中国肺癌杂志,2014,5:363-368.
- [32] 周志楠,陈祥,敖叶,等. 黔北麻羊CTSB、CTSD基因的克隆、生物信息学分析及在不同组织中的表达[J]. 中国兽医学报,2020,40(9):1836-1846.
- [33] PENG W, WU J, JIANG Y, et al. Antitumor activity of 4-O- (2''-O-acetyl-6''-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl) -p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis [J]. Chem Biol Interact,2015,233:8-13.

[责任编辑 周冰冰]