

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学和实验验证探讨阿里红治疗阿尔茨海默病的作用机制

依木然·马瑞士, 陈春丽, 开沙尔江·买买提吐逊, 丛媛媛, 帕丽达·阿不力孜*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:利用网络药理学结合实验验证探讨阿里红治疗阿尔茨海默病(AD)可能的作用机制。方法:借助中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)平台及公开报道的文献数据获得阿里红化学成分;利用PharmMapper药效团匹配平台和TargetNet数据库综合筛选出成分预测靶点;通过基因表达综合数据库(GEO)、DrugBank数据库等获取AD疾病靶点,取交集得出阿里红可能的作用靶点,并对其使用STRING数据库和Cytoscape 3.7.1网络可视化软件分别构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络和成分-靶点网络,且对网络进行拓扑分析;进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析筛选出阿里红主要作用通路及相关靶点蛋白,并用分子对接和体外细胞实验验证其结果。结果:共收集到阿里红24个候选成分和242个预测靶点,并得到与AD共同靶点96个,包括阿里红氨酸、3-酮基-去氢硫色多孔菌酸、齿孔酸等关键化合物和白蛋白(ALB)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、雌激素受体 α 基因(ESR1)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、淀粉样前体蛋白裂解酶1(BACE1)等潜在的作用靶点;GO富集分析获得392个条目,主要跟 β -淀粉样蛋白代谢途径和胆碱酯酶活性有关,KEGG富集分析获得77个条目,主要涉及雌激素信号通路、胆碱能突触、AD等生物学过程及通路;分子对接结果显示,阿里红7个关键成分与淀粉样前体蛋白(APP), BACE1, AChE, Caspase-3之间表现出良好的自发结合能力。体外细胞验证实验显示,与模型组比较,不同剂量阿里红组细胞存活率均显著上升($P<0.01$)且具有浓度依赖性,同时可下调APP、BACE1、AChE、Caspase-3 mRNA和蛋白表达量($P<0.05$)。结论:该研究结果首次揭示了阿里红对AD治疗具有多成分、多靶点、多途径相互作用的特点,为后续阿里红防治AD作用机制研究提供了参考依据。

[关键词] 阿里红; 阿尔茨海默病; SHSY5Y人神经母细胞瘤细胞; 网络药理学; 作用机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0173-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220812

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220331.1001.001.html>

[网络出版日期] 2022-04-01 10:42

Mechanism of Dried Fruiting Bodies of *Fomes officinalis* Against Alzheimer's Disease: Based on Network Pharmacology and *In Vitro* Experimental Verification

Emran·Maris, CHEN Chun-li, Kaysar·Mamattursun, CONG Yuan-yuan, Parida·Abulizi*
(College of Pharmacy of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of dried fruiting bodies of *Fomes officinalis* (FOA) against Alzheimer's disease (AD) based on network pharmacology and experimental verification. **Method:** The effective components of FOA were retrieved from a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) and previous reports. The targets of the components were searched from PharmMapper and TargetNet, and the targets related to AD from Gene Expression Omnibus (GEO), DrugBank, among other databases. Thereby, the common targets of FOA and AD

[收稿日期] 2022-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760755)

[第一作者] 依木然·马瑞士,在读硕士,从事天然药物抗神经退行性疾病研究,E-mail:13009614648@163.com

[通信作者] *帕丽达·阿不力孜,博士,教授,博士生导师,从事天然药物抗神经退行性疾病研究,E-mail:palida3345@163.com

were obtained, and the protein-protein interaction (PPI) network and component-target network were established based on STRING and Cytoscape 3.7.1, followed by the topology analysis of the networks, and Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the common targets. The results were verified by the molecular docking and the *in vitro* cell experiment. **Result:** A total of 24 candidate components and 242 predicted targets of FOA, and 96 common targets of FOA and AD were screened out. The key components included [2-(1-carboxyhexadecylamino)-2-aminosuccinic acid], 3-keto-dehydrosulfurenic acid, and eburicoic acid, and the active targets were albumin (ALB), acetylcholinesterase (AChE), estrogen receptor 1 (ESR1), cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), and beta-secretase1 (BACE1). The common targets were involved in 392 GO terms, and the key terms were the β -amyloid metabolic process and cholinesterase activity. A total of 77 KEGG pathways were obtained, which mainly included estrogen signaling pathway, cholinergic synapse, and AD. The results of molecular docking showed that 7 components of FOA had high binding affinity to amyloid precursor protein (APP), BACE1, AChE, and Caspase-3. The cell survival rate rose ($P<0.01$) and the mRNA and protein expression of APP, BACE1, AChE, and Caspase-3 reduced in FOA groups in a dose-dependent manner compared with those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** This study reveals for the first time that FOA has multi-component, multi-target, and multi-pathway characteristics in the treatment of AD, which serves as a reference for further explaining the mechanism of FOA against AD.

[Keywords] dried fruiting bodies of *Fomes officinalis*; Alzheimer's disease (AD); human neuroblastoma (SHSY5Y) cell; network pharmacology; mechanism of action

阿尔茨海默病(AD)是以进行性记忆减退,从而发展为认知障碍甚至到行为损害等为主要症状的一种神经系统退行性疾病,也是老年痴呆症最常见的一种形式;与遗传及年龄有着密切关系^[1-2]。老年痴呆在中医学中归类在“痴呆、善忘、愚痴、呆病”等范畴,其病位在于脑,是由髓减脑消、神机失用等基本病机导致的一种神志疾病^[3]。AD典型的临床病理特征主要包括 β -淀粉样蛋白(A β)的积累、突触及神经元功能障碍及大脑长期的慢性炎症等^[4]。因AD发病机制复杂,在临床上仅限于应用乙酰胆碱酯酶抑制剂和N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂两种类型药物,但无法阻止或根治AD发生发展,由此开发治疗AD的新方法、新药物成为了AD研究的热点及备受关注的社会问题^[5-7]。

近年来,通过中药及成分寻找改善AD症状的研究越来越多,如沙棘果多酚及多糖^[8]、大黄^[9]、姜黄素^[10]、灵芝多糖^[11]等取得了很好的治疗效果。阿里红(FOA)是多孔菌科药用层孔菌的干燥子实体,在《全国中草药汇编》《中药大辞典》等均收录记载,在新疆地区医院有一定的临床应用基础,常应用于治疗呼吸系统的疾病,如慢性气管炎、肺结核等,其复方安斯乐合剂具有清肺、燥湿退烧、平喘、化痰、疏通肝肾阻滞、祛除寒邪等功效;阿里红咳喘口服液在临床上用于急性慢性支气管炎,哮喘及咳痰不爽

等疾病。另外阿里红也可用于治疗黄疸、痛经、癌症、风湿、药物中毒等病证^[12-16]。相关药理学研究表明,阿里红提取物具有抗衰老、清除氧自由基、免疫调节、平喘祛痰^[17-19]等作用。课题组前期研究结果中,发现阿里红提取物对淀粉样蛋白(A β_{25-35})诱导损伤的PC12细胞具有神经保护作用^[20]。但目前阿里红治疗AD的作用机制尚未完整。网络药理学是以生物数据库资源及组学实验数据为基础,融合多学科原理和技术,建立“药物-基因-靶标-疾病”相互作用网络,并以网络拓扑和统计学分析,预测出药物成分活性及参与机体生物学过程中的作用靶点和通路途径,以期从系统网络层面揭示药物对复杂的生物机体所产生的作用,最终阐明药物改善或恢复生物网络平衡的机制^[21]。而且网络药理学具有与中医药整体理论相似的观点,为揭示中医药治疗AD的多靶点机制研究提供了新的方法和思路^[22]。因此,本研究拟基于课题组前期研究结果,采用网络药理学技术与方法,筛选和预测阿里红候选成分及潜在的作用靶点,并与AD疾病靶标构建相互作用网络,进行拓扑分析得到关键化学成分及潜在作用机制,最终以分子对接和体外细胞实验进行进一步验证,为阿里红成分抗AD作用机制研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 阿里红候选成分筛选及药代动力学参数评价

阿里红化学成分的收集按照以下2个途径进行：①以“阿里红”或“*Fomes officinalis* Ames”为关键词，通过中国知网(CNKI)、美国国家生物技术信息中心(NCBI)等平台搜索已公开报道的阿里红成分；②在中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)平台(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)数据库^[23]中，输入“A LI HONG”，检索出阿里红化学成分，并对结果数据合并及去重，利用 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库逐一检索出标准化成分名称、规范化 SMILES 结构符。利用 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)数据库对所收集到的成分进行药代动力学参数评价，该数据库可以根据成分化学结构，预测该成分在体内各项药代动力学相关信息，其中胃肠道吸收和 Lipinski 五规则是最重要的指标^[24]。根据输出结果，可对阿里红化学成分进行初步筛选。

1.2 阿里红候选成分靶标的预测 TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com>)数据库通过 QSAR 模型预测候选成分的 药物靶点相互作用结果^[25]。Phammapper (<http://www.lilab-ecust.cn/phammapper/>)数据库使用药效团映射方法为目标化合物识别潜在的候选靶标^[26]。根据 1.1 项下筛选出的候选成分 SMILES 结构符输入到 TargetNet 数据库中，同时将活性成分三维立体结构文件上传到 Phammapper 数据库中，依次根据结果中 Prob 值和 Norm Fit 值 >0.7 ，筛选出高可靠性预测靶标。

1.3 阿里红治疗 AD 的潜在靶点筛选 为了收集 AD 潜在的靶点，以“Alzheimer's disease”为关键词，通过基因表达综合数据库(GEO)、DrugBank、TTD、DisGeNET 和 GeneCard 等数据库，检索出相关 AD 靶点。基于 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)在线检索人源 AD 芯片相关数据集^[27]，故根据研究样本和研究方向进行筛选，选择编号 GSE28146 的芯片，该芯片数据的原始文件包含了 30 个病人海马组织样本，其中正常组 8 个，AD 病人样本 22 个。采用 R 语言(4.0.4)对芯片集数据进行分析，以 $|\log_2 FC| > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为标准，筛选差异表达基因；DrugBank(<https://go.drugbank.com/>)数据库^[28]中检索出目前临床上应用于治疗 AD 的药物靶点；利用 TTD(<https://idrblab.org/>)数据库^[29]检索结果，筛选出成功运用在临床上的治疗性靶标为潜在 AD 靶标；GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数

据库^[30]和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)数据库基于科学文献及组学等数据^[31]；以结果相关性分数(Relevance score)排序，以分值大于 3 倍中位数为筛选条件，删除重复项，得到 AD 高相关性疾病靶点。将筛选的候选成分靶点和疾病靶点利用在线 Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)分析，获得交集靶点。

1.4 “成分-靶点”互作网络的构建 将处理好的数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分-靶点”网络。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 使交集靶点输入到 STRING 11.0(<https://string-db.org/>)在线数据库和 Cytoscape 3.7.1 网络可视化软件中^[32-33]，构建 PPI 网络，并进行网络拓扑分析。根据结果中节点连接度、接近中心性和中介中心性的数值，选择数值大于其中位数为筛选条件，获得高可靠性的核心靶点基因。

1.6 交集靶点的功能富集分析 采用 DAVID (<http://david.nifcrf.gov/>)数据库对交集靶点蛋白进行基因本体(GO)富集分析^[34]、基因组学百科全书(KEGG)通路富集分析^[35]，绘制富集分数(Fold Enrichment)靠前的生物过程、细胞组分、分子功能及信号通路气泡图，获得阿里红潜在靶点的生物学功能及参与的信号通路。

1.7 分子对接 根据 1.6 项分析结果，将靶点映射到相应作用通路中，筛选出其核心靶点和相对应的成分；结合文献报道含量明确的阿里红化学成分与 C-T 网络关键成分进行整理筛选，并从有机小分子生物活性数据库(PubChem)数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 RCSB PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中分别下载其 3D 结构 Sdf 格式文件，并用 Open Babel 软件将文件转化为 pdb 格式，将文件导入到 PyMOL 软件去除金属离子、水分子及结合的配体小分子，再通过 Autodock Vina 1.2.0 对其进行分子对接模拟，评价候选成分与相关核心靶点之间的结合能力，并选取其中最佳对接模式(结合能 <0 ，可认为小分子配体和靶点蛋白能自发结合)导出结果，以结合能 $\leq -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$)为评选标准，结合能越小，结合能力越强。

2 体外验证

2.1 细胞 人神经母细胞瘤细胞株 SHSY5Y 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库，批号 20210415)。

2.2 药材与主要试剂 阿里红药材经新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为阿里红

(*Fomes officinalis*); $A\beta_{25-35}$ (美国 MCE 公司, 批号 HY-P0128); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1807622); 盐酸多奈哌齐 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 B25489); 细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂盒 (博奥森生物有限公司, 批号 BA00208); 全反式维甲酸粉末 (北京索莱宝有限公司, 批号 A9120); β -肌动蛋白 (β -actin) 引物 [生工生物工程 (上海) 有限公司, 批号 BM3873]; 细胞总 RNA 提取试剂盒、RT OR-Easy™ Mix 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) Easy™-SYBR Green I 试剂盒 (成都福际生物技术有限公司, 批号 RE-03111、RT-01021、QP-01011); 淀粉样前体蛋白 (APP) 一抗 (稀释度 1:2 000)、BACE1 一抗 (稀释度 1:1 000)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 一抗 (稀释度 1:1 000)、胱天蛋白酶 (Caspase)-3 一抗 (稀释度 1:5 000) (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab126732、ab108394、ab253201、ab32351); β -actin 内参 (稀释度 1:5 000)、山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig)G 二抗 (稀释度 1:10 000) (博奥森生物技术有限公司, 批号分别为 BM3873、BA1054)。

2.3 仪器 Multiskan Go 型全波长酶标仪、371 型 CO₂ 细胞培养箱、QuantStudio™ 6 Flex Real-time PCR 仪 (美国赛默飞世尔科技公司), TS2 型号倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), Azure 600 系列多功能分子成像分析系统 (美国 Azure Biosystems 公司)。

2.4 药物处理及实验分组

2.4.1 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备 称取药物 $A\beta_{25-35}$ 10 mg, 用溶剂水 4.716 mL 溶解成浓度为 2 mmol·L⁻¹ 的母液待用, 母液分装于 -80 °C 保存, 使用前需在 37 °C 孵育 14 d, 使多肽聚集^[36]。

2.4.2 阿里红提取物的制备 取 500 mg 经 95% 乙醇提、蒸发、浓缩至干燥的浸膏, 使浸膏粉碎成粉末, 在水中分散, 用三氯甲烷 (500 mL×3 次) 萃取, 萃取部分蒸发、浓缩至干燥的浸膏^[14], 在 -20 °C 保存, 使用时称取适量, 溶于二甲基亚砜 (DMSO), 过滤膜除菌后于 -20 °C 保存。给细胞干预时, 用完全培养基稀释到所需浓度。

2.4.3 实验分组 用含 10% 血清的 MEM/F12 完全培养基中培养 SH-SY5Y 细胞, 药物处理前用 10 μ mol·L⁻¹ 全反式维甲酸分化 6 d。AD 分化型 SH-SY5Y 细胞造模方法参考文献^[37]资料, 实验分为空白组 (只加培养基)、模型组 (加入 60 μ mol·L⁻¹ $A\beta_{25-35}$, 下同)、盐酸多奈哌齐组 ($A\beta_{25-35}$ +15 μ mol·L⁻¹ 盐酸多奈哌齐) 及阿里红组 ($A\beta_{25-35}$ +10、20、

40 mg·L⁻¹ 阿里红), 实验剂量均根据预实验所得。

2.5 CCK-8 法检测细胞存活率 将 SH-SY5Y 细胞接种至 96 孔板 (1×10⁵ 个/mL), 根据 2.4.3 项下实验分组培养 48 h, 按照 CCK-8 法在 450 nm 下测定吸光度 A, 并计算细胞存活率。

2.6 细胞形态学的观察 将细胞接种于 6 孔板培养 48 h 后, 根据 2.4.3 实验分组进行干预 48 h, 用倒置显微镜观察细胞形态变化。

2.7 Real-time PCR 法检测 SHSY5Y 细胞 APP、BACE1、AChE 及 Caspase-3 mRNA 表达 将细胞接种于 6 孔板, 按照 2.4.3 处理各实验组 48 h 后, 按照试剂盒说明提取各组总 RNA, 定量, 使其 RNA 逆转为 cDNA, 最后进行荧光定量 PCR 反应, 反应体系: 95 °C 预变性 3 min; PCR 反应 95 °C 变性 10 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 反应重复 45 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析基因表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
APP	上游 CGTCACGTGTTCAATATGCTAA	164
	下游 TTCATGCGCTCATAAATCACAC	
BACE1	上游 CAGACAAGTTCTTCATCAACGG	118
	下游 GTCTGCTTTACCAGAGAGTCAA	
AChE	上游 CTACACGGCAGAGGAGAAAATC	154
	下游 CAGGTCCAGACTAACGTACTG	
Caspase-3	上游 CCAAAGATCATAATGGAAGCG	185
	下游 CTGAATGTTCCCTGAGGTTTG	
β -actin	上游 CCTGGCACCCAGCACAAAT	144
	下游 GGGCCGGACTCGTCATAC	

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞中 APP、BACE1、AChE 及 Caspase-3 蛋白表达水平 用高效 RIPA 细胞裂解液提取各实验组样本总蛋白, 并用 BCA 法测定总蛋白浓度。根据目的蛋白相对分子质量大小制备合适浓度 SDS-PAGE 凝胶, 等量上样 (40 μ g), 恒压 80 V、30 min, 120 V、70 min 两步进行蛋白电泳, 用恒流 300 mA, 70 min 电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 °C 孵育一抗过夜, 在室温孵育二抗 1 h, 注意在每次孵育后用 TBST (1×) 洗膜 3 次, 最后用 ECL 试剂显色, 于凝胶成像系统曝光检测蛋白条带, 用 Image J 定量测定条带灰度值, 以 APP、BACE1、AChE 及 Caspase-3 蛋白与 β -actin 灰度值的比值计算目的蛋白相对表达含量。

2.9 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果采用 GraphPad Prism 8 软件统计处理,多组间比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阿里红化学成分筛选 根据 1.1 化学成分筛选

表2 阿里红活性成分

Table 2 Active ingredients of *Fomes officinalis*

No.	化合物名称	胃肠道吸收	Lipinski五规则	活性
1	albicanic acid	high	yes	good
2	fomlactone B	high	yes	good
3	阿里红酸	high	yes	good
4	阿里红醇 B	high	yes	good
5	阿里红酸 F	high	yes	good
6	落叶松脂酸	high	yes	good
7	3-酮基-去氢硫色多孔菌酸	low	yes	moderate
8	Fomlactone C	low	yes	moderate
9	阿里红氨酸	low	yes	moderate
10	阿里红素	low	yes	moderate
11	阿里红酸 A	low	yes	moderate
12	阿里红酸 B	low	yes	moderate
13	阿里红酸 C	low	yes	moderate
14	阿里红酸 D	low	yes	moderate
15	阿里红酸 G	low	yes	moderate
16	齿孔醇	low	yes	moderate
17	齿孔酸	low	yes	moderate
18	硫色多孔菌酸	low	yes	moderate
19	麦角甾-5,22二烯-3 β 醇	low	yes	moderate
20	麦角甾-7,22二烯-3 β 醇	low	yes	moderate
21	麦角甾醇	low	yes	moderate
22	去氢齿孔酸	low	yes	moderate
23	去氢齿孔酮酸	low	yes	moderate
24	去氢硫色多孔菌酸	low	yes	moderate
25	阿里红醇 A	high	no	week
26	阿里红酸	high	no	week
27	阿里红酸 E	low	no	N/A
28	变孔孢孔菌酸 C	low	no	N/A
29	变孔孢孔菌酸 D	low	no	N/A
30	fomitopsins C	low	no	N/A

注: Lipinski 五规则为相对分子质量(MW) < 500、脂水分配系数($A_{log_2 P}$) < 5、氢键供体数(Hdon) < 5、氢键受体数(Hacc) < 10和旋转键(RBN) < 10;阿里红化学成分符合 Lipinski 五规则,则输出结果为“yes”,反之则为“no”

3.2 阿里红治疗 AD 潜在靶点的预测 将阿里红候选成分预测的靶点,整理剔除重复项,共得到了 242

条件,获取了 30 个阿里红成分;将其成分结构导入到 SwissADME 中,分析出成分药代动力学参数,根据胃肠道吸收和 Lipinski 五规则评估成分的药代动力学性质,并分为“good”“moderate”“week”“N/A”等。见表 2。根据结果、选择“Good”和“moderate”的 24 个化合物为后续研究的候选成分。

个靶点蛋白。根据 1.3 项下方法共获得 AD 潜在靶点基因 2 736 个,将预测基因与疾病靶点基因取交

集,得到了阿里红候选成分可能作用于AD的潜在靶点96个,见增强出版附加材料。

3.3 阿里红关键成分与治疗AD潜在靶点网络 利用上述结果中治疗AD的潜在交集靶点,找出与之对应阿里红关键成分,并应用Cytoscape v3.7.1可视化软件创建成分-靶点网络,并进行拓扑分析,得出网络共由120个节点及722条连边组成。根据拓扑分析节点连接度值大小,设置网络节点颜色深浅及圆形大小,则该网络中显示着关键化学成分有阿里红氨酸、3-酮基-去氢硫色多孔菌酸、阿里红酸G、阿里红酸F、阿红酸、硫色多孔菌酸、齿孔酸等;该结论提示着阿里红可能通过多成分、多靶点共同作用达到治疗AD的疗效。见增强出版附加材料。

3.4 交集靶点PPI网络的构建 将96个潜在靶点导入到STRING数据库中,获得PPI网络,该网络共具有88个节点,628条边,借助Cytoscape v3.7.1构建PPI网络并对其进行拓扑分析,结果显示,接近中心性中位数为0.47,中介中心性中位数为0.003 6,节点连接度值中位数为11,符合条件的靶点共32个,见表3。在网络中靶点连接度值(Degree)值越大,节点越大,颜色越深,并说明这些靶点在网络中会起到关键作用,可能会是阿里红候选成分作用于AD的核心靶点。

3.5 潜在靶点基因的GO富集分析 将交集靶点基因输入到DAVID数据库中,进行GO富集分析,共获得290个GO功能富集结果。主要涉及的生物过程(BP)是A β 代谢过程、髓鞘形成的调节、G-蛋白偶联乙酰胆碱受体信号通路、突触传递、胆碱能等;细胞组成(CC)包括钙通道复合物、髓鞘、细胞器膜及生长锥等;相关的分子功能(MF)包括胆碱酯酶活性、胰岛素受体结合、类固醇激素受体活性、天冬氨酸型内肽酶活性等;GO富集结果表明,阿里红治疗AD的机制可能主要和A β 代谢过程及胆碱酯酶活性相关。见增强出版附加材料。

3.6 潜在靶点基因的KEGG富集分析 利用DAVID数据库对潜在的交集靶点进行KEGG富集分析,剔除 $P < 0.05$ 的条目,获得阿里红治疗AD潜在的生物学途径及信号通路共69个。其机制主要涉及雌激素信号通路、多巴胺能突触信号通路、胰岛素抵抗、胆碱能突触、AD等。结合本课题组前期研究^[20]和AD有关文献报道^[38],保留对AD研究较多的通路机制,并结合GO的富集结果,笔者推测阿里红治疗AD的可能机制主要与A β 代谢途径和胆碱能通路相关,见增强出版附加材料。

3.7 阿里红活性成分与核心靶点分子对接 通过网络药理学结果预测出阿里红防治AD的4个核心靶点蛋白,靶点分别是APP(PDB ID: 4PQD)、BACE1(PDB ID: 2Q11)、AChE(PDB ID: 4M0E)、Caspase-3(PDB ID: 1QX3);综合网络关键成分与阿里红含量明确的化学成分^[39-41],预测出可能的7个关键成分,并与核心靶点进行分子对接,结果见表4,发现阿里红成分与4个核心靶点结合能力都较强,此结果初步验证了网络药理学结果,并为后续验证实验提供了参考依据。

3.8 体外验证实验结果

3.8.1 阿里红提取物对各组细胞存活率的影响 实验结果显示,与空白组比较,模型组的细胞存活率显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,阿里红组细胞存活率显著提高($P < 0.01$),且具有浓度依赖性,见表5。

3.8.2 各组细胞形态学变化 与空白组比较,模型组SH-SY5Y细胞形态皱缩、细胞突出缩短、存在细胞脱落及死细胞较多;与模型组比较,阿里红提取物干预后,明显改善了细胞损伤状态,见图1。

3.8.3 阿里红提取物对SHSY5Y细胞中APP、BACE1、AChE、Caspase-3 mRNA表达水平的影响 结果显示,与空白组比较,模型组APP、BACE1、AChE、Caspase-3 mRNA表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,20、40 mg·L⁻¹阿里红提取物干预后,均能明显降低APP、BACE1、AChE、Caspase-3 mRNA的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),10 mg·L⁻¹阿里红能明显降低APP、BACE1、Caspase-3 mRNA的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表6。

3.8.4 阿里红提取物对SHSY5Y细胞中APP、BACE1、AChE、Caspase-3的蛋白表达的影响 结果显示,与空白组比较,模型组APP、BACE1、AChE及Caspase-3蛋白的表达量明显增多($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,10、20、40 mg·L⁻¹阿里红提取物干预后APP、BACE1、AChE、Caspase-3蛋白表达均有下降,其中40 mg·L⁻¹阿里红组APP、BACE1、AChE、Caspase-3蛋白表达均有明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表7、图2。

4 讨论

随着全球人口老龄化的进程变快,老年痴呆已成为一个重大的医学和社会问题,对老年生活质量造成巨大威胁。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

表3 阿里红治疗AD核心靶点

Table 3 Core targets of *Fomes officinalis* for AD

序号	基因名	靶点名	连接度值	接近中心性	中介中心性
1	ALB	白蛋白	57	0.716 54	0.204 49
2	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶1	46	0.645 39	0.086 23
3	EGFR	表皮生长因子受体	41	0.619 05	0.070 39
4	ESR1	雌激素受体 α 基因	40	0.623 29	0.050 78
5	NOS3	一氧化氮合酶3	32	0.587 10	0.050 07
6	Caspase-3	胱天蛋白酶-3	41	0.631 94	0.047 94
7	ACE	血管紧张素转换酶	28	0.568 75	0.044 85
8	SRC	原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src	36	0.602 65	0.043 74
9	SIRT1	NAD依赖性蛋白去乙酰化酶1	33	0.594 77	0.036 34
10	HPGDS	造血前列腺素D合酶	26	0.568 75	0.032 21
11	AChE	乙酰胆碱酯酶	16	0.505 56	0.029 54
12	HSP90AA1	热休克蛋白90 α 家族A类成员1	34	0.594 77	0.026 24
13	GSK3B	糖原合成酶3	18	0.517 05	0.025 92
14	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶8	34	0.587 10	0.025 30
15	PRKACA	蛋白激酶cAMP激活催化亚基 α	16	0.489 25	0.022 63
16	IGF1	胰岛素样生长因子1	32	0.579 62	0.022 56
17	BCHE	丁酰胆碱酯酶	14	0.489 25	0.021 92
18	PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体 γ	24	0.554 88	0.020 08
19	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶14	29	0.561 73	0.018 30
20	F2	凝血酶原	17	0.529 07	0.015 61
21	CTSD	组织蛋白酶D	11	0.489 25	0.015 01
22	RELA	转录因子p65	24	0.558 28	0.013 89
23	KDR	血管内皮生长因子受体2	21	0.544 91	0.011 94
24	HSPA8	71 kDa同源热休克蛋白8	18	0.517 05	0.010 87
25	GSTP1	谷胱甘肽S-转移酶P1	15	0.497 27	0.009 89
26	SOD2	锰超氧化物歧化酶	23	0.551 52	0.008 00
27	DNMT1	DNA甲基转移酶1	18	0.514 12	0.007 90
28	CALM1	钙调素-1	15	0.514 12	0.005 68
29	PARP1	磷酸腺苷核糖聚合酶1	17	0.505 56	0.005 01
30	CYP19A1	卵巢芳香化酶	13	0.502 76	0.004 29
31	ADAM17	解整合素样金属蛋白酶17	14	0.511 24	0.004 05
32	BACE1	淀粉样前体蛋白裂解酶1	12	0.508 38	0.003 75

缺乏全面有效的治疗方法^[42]。AD复杂的病理过程不仅让研究者们联想到中药治疗疾病的“整体论”及“辨证论治”的中医理念。而且诸多研究揭示,中药在治疗AD方面,具有神经保护及营养、神经修复及对神经元突触和线粒体损伤起到保护作用,目前可用于AD早期预防及治疗^[43]。网络药理学的整体性和系统性研究方法恰好与AD的复杂病理机制和中医药整体论及辨证论症理念可以相互匹配。故本研究基于网络药理学的研究思路与方法对阿里

红防治AD的作用机制进行研究^[44]。

在研究中,通过网络药理学预测阿里红成分治疗AD可能的作用机制。结果表明,阿里红成分治疗AD可能是作用于A β 代谢途径和胆碱能通路相关靶点蛋白,并筛选出了APP、BACE1、AChE、Caspase-3 4个核心的靶点基因;综合成分-靶点网络关键成分和阿里红公开报道及含量明确的化学成分^[39-41]筛选出7个可能的关键成分,且与核心靶点之间的分子对接结合能分数都 ≤ -5 kcal \cdot mol⁻¹,自发

表4 阿里红成分与核心靶点分子对接结合能

Table 4 Docking binding energy of *Fomes officinalis* components and core target molecules

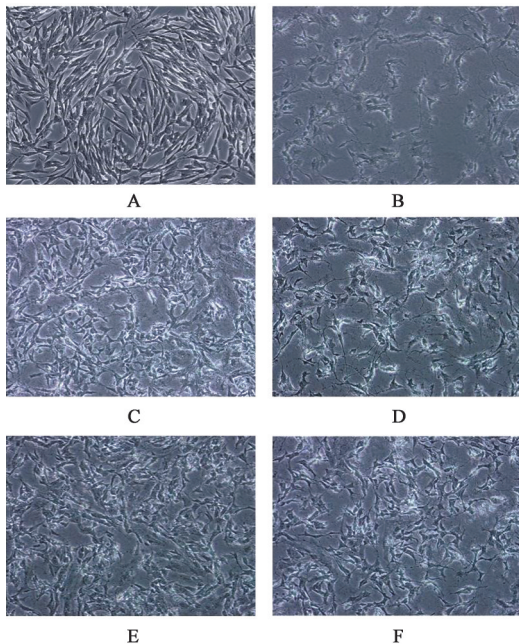
活性成分	结合能/kcal·mol ⁻¹			
	APP	BACE1	AChE	Caspase-3
阿里红氨酸	-5.4	-5.8	-7.7	-5.7
3-酮基-去氢硫色多孔菌酸	-7.8	-7.6	-9.5	-7.7
阿里红酸G	-7.0	-8.0	-8.6	-7.0
阿里红酸F	-7.4	-7.1	-8.4	-7.2
阿红酸	-6.0	-6.2	-7.5	-5.4
硫色多孔菌酸	-7.2	-7.4	-8.6	-7.3
齿孔酸	-7.8	-7.5	-8.7	-6.8

表5 各组细胞存活率的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of cell survival rate in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.0±0.0
模型组		58.0±2.3 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组		92.7±0.5 ²⁾
阿里红组	10	67.0±0.2 ²⁾
	20	79.2±1.2 ²⁾
	40	91.3±0.3 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 盐酸多奈哌齐组;D. 阿里红组(10 mg·L⁻¹);E. 阿里红组(20 mg·L⁻¹);F. 阿里红组(40 mg·L⁻¹)(图2同)

图1 阿里红提取物对Aβ₂₅₋₃₅损伤的SH-SY5Y细胞形态的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of *Fomes officinalis* extractions on morphology of SHSY5Y cells induced by Aβ₂₅₋₃₅(inverted microscope, ×200)

结合能力较强,故为了验证网络药理学预测结果中阿里红多成分、多靶点治疗AD的作用模式特点,选取阿里红提取物和4个核心靶点及相关通路作为研究目标,进一步用体外细胞实验加以验证。

Aβ代谢途径是研究AD病理机制的一个经典学说,而APP是Aβ代谢途径中研究较多的一种跨膜蛋白,它经BACE1切割,生成Aβ的N末端和C-端残基C99,随后C99被γ-分泌酶切割形成Aβ^[45-46]。而Aβ的过度沉积会进一步提高神经元中BACE1的水平,从而进一步增加Aβ生成,这一恶性循环还会加重神经元凋亡,恶化AD病情^[47]。故降低APP和BACE1蛋白表达水平,可以减少Aβ的沉积,从而减轻神经元细胞的凋亡。

Caspase-3作为在执行细胞凋亡机制上起着关键作用,可调控神经元细胞的凋亡^[48],而神经元细胞凋亡是导致AD记忆力衰退、认知障碍的主要病理特征。DAS等^[49]发现二氢猕猴桃内脂可以通过降低细胞凋亡相关基因Caspase-3及相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白水平,保护SH-SY5Y细胞免受神经毒物诱导的细胞凋亡,从而达到神经保护作用。故下调Caspase-3蛋白表达,对减轻神经损伤及神经元细胞的凋亡有着重要的意义。

认为AD早期表现的认知障碍的可能发病机制部分与胆碱能神经传递功能的低下有关^[50]。而AChE是神经递质乙酰胆碱水解的关键酶^[51]。SHEN等^[51]在研究中发现,小续命汤成分中,防己诺林碱和蝙蝠葛碱对AChE的活性有很强的抑制作用,可能是小续命汤中潜在治疗AD的成分;故抑制AChE,减少乙酰胆碱的水解,减缓AD早期病症。

课题组前期研究发现,阿里红提取物可以通过下调Bax及Bcl-2表达,从而保护PC12细胞的损伤,起到神经保护作用^[20]。在本研究中,通过网络药理

表 6 各组细胞 APP、BACE1、AChE、Caspase-3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of APP, BACE1, AChE, Caspase-3 mRNA expression in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	APP	BACE1	AChE	Caspase-3
空白组		1.0±0.0	1.0±0.0	1.01±0.1	1.0±0.0
模型组		1.6±0.5 ¹⁾	2.2±0.1 ²⁾	2.2±0.4 ²⁾	2.3±0.3 ²⁾
盐酸多奈哌齐组		0.5±0.1 ⁴⁾	0.6±0.1 ⁴⁾	0.4±0.3 ⁴⁾	0.8±0.3
阿里红组	10	0.9±0.1 ³⁾	1.7±0.3 ³⁾	2.1±0.2	1.8±0.4 ⁴⁾
	20	0.8±0.2 ⁴⁾	1.2±0.1 ⁴⁾	1.4±0.3 ³⁾	1.4±0.2 ⁴⁾
	40	0.6±0.1 ⁴⁾	1.1±0.2 ⁴⁾	1.1±0.4 ⁴⁾	0.9±0.3 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表7同)

表 7 各组细胞 APP、BACE1、AChE、Caspase-3 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of APP, BACE1, AChE, Caspase-3 protein expression in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	APP/ β -actin	BACE1/ β -actin	AChE/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白组		1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
模型组		6.3±1.5 ¹⁾	1.5±0.3 ²⁾	4.3±2.5 ¹⁾	1.6±0.6 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组		1.1±0.4 ⁴⁾	0.6±0.0 ⁴⁾	0.7±0.3 ³⁾	0.9±0.2 ³⁾
阿里红组	10	4.9±1.1	1.1±0.2 ³⁾	2.4±1.6	1.3±0.2
	20	3.9±1.0 ⁴⁾	0.9±0.1 ⁴⁾	2.1±1.5	1.1±0.3
	40	3.0±0.8 ⁴⁾	0.7±0.1 ⁴⁾	1.3±1.7 ³⁾	0.9±0.3 ³⁾

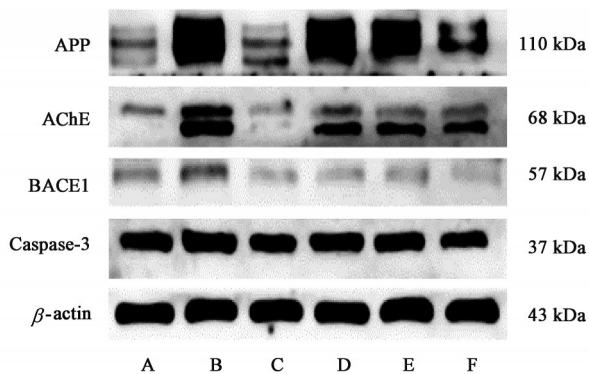


图 2 各组细胞 APP、BACE1、AChE 和 Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoretic of APP, BACE1, AChE, Caspase-3 in each group of cells

学更加全面探讨了阿里红治疗 AD 的作用机制,并利用 A β_{25-35} 诱导 SHSY5Y 细胞损伤建立 AD 体外细胞模型,通过阿里红提取物干预 AD 模型,检测相关通路指标,验证了网络药理学预测的结果。结果表明,阿里红提取物能提高 A β_{25-35} 诱导的 SHSY5Y 细胞存活率,能下调 A β 淀粉样代谢途径相关 APP、BACE1 蛋白、胆碱能通路 AChE 蛋白及细胞凋亡有关 Caspase-3 蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平,从而对 SHSY5Y 细胞损伤起到保护作用。该结论为阿里红治疗 AD 的作用机制、物质基础及临床应用研究提供了理论及实验依据。

[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] SENGOKU R. Aging and Alzheimer's disease pathology [J]. Neuropathology, 2020, 40(1): 22-29.
- [3] 唐诗, 杜怡峰. 阿尔茨海默病患者睡眠障碍早期诊断与管理进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2021, 21(12): 1042-1045.
- [4] 高岩, 张兰. 中药在阿尔茨海默病中的治疗作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 432.
- [5] GRONEK P, BALKO S, GRONEK J, et al. Physical activity and Alzheimer's disease: A narrative review [J]. Aging Dis, 2019, 10(6): 1282-1292.
- [6] 王晶莹, 王晓成, 翟俊伟, 等. 阿尔茨海默病经济负担水平及影响因素分析 [J]. 中国公共卫生管理, 2016, 32(1): 4-7.
- [7] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 5541-5554.
- [8] 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症活性 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 135-141.

- [9] 张运辉,周小青,伍大华,等. 基于网络药理学的大黄治疗阿尔茨海默病作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(1):127-136.
- [10] 孙婷,张丹参,景永帅. 姜黄素对阿尔茨海默病治疗作用及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2021,35(9):641.
- [11] 肖玉焕,韩丽,李浩然,等. 灵芝多糖防治中枢神经系统疾病的研究进展[J]. 中草药,2020,51(24):6391-6395.
- [12] GRIENKE U, ZÖLL M, PEINTNER U, et al. European medicinal polypores—a modern view on traditional uses [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3):564-583.
- [13] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:33卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:195-196.
- [14] 刘纪杉. 阿里红药材质量标准研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2013.
- [15] 乌云娜,刘颖,池梦怡,等. 菌物药阿里红的研究进展[J]. 食用菌学报,2021,28(3):154-162.
- [16] NARANMANDAKH S, MURATA T, ODOBAYAR B, et al. Lanostane triterpenoids from *Fomitopsis officinalis* and their trypanocidal activity [J]. J Nat Med, 2018, 72(2):523-529.
- [17] 周昱,帕丽达·阿不力孜,依力奴尔·艾尼瓦尔,等. 阿里红多糖体外免疫活性的研究[J]. 西部中医药, 2017,30(8):5-7.
- [18] 王佩佩,许培源,王哲,等. 药用拟层孔菌石油醚提取物的GC-MS分析及各相提取物生物活性[J]. 菌物学报,2015,34(3):482-489.
- [19] SHA A L, HAO H Y. Effects of the *Fomes officinalis* Ames. polysaccharides on anti-fatigue and hypoxia tolerance in mice [J]. Chin J Appl Physiol, 2019, 35(5):418-421.
- [20] 艾合麦提·图尔贡,帕丽达·阿不力孜,哈丽旦·阿布力孜,等. 阿里红不同极性萃取物对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导PC-12细胞损伤的保护作用[J]. 新疆医科大学学报, 2016,39(5):573-577.
- [21] 毛丽斯,朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展[J]. 中医药管理杂志,2021,29(13):98-102.
- [22] 朱晓芳,第五永长,周源,等. 基于网络药理学的中药复方防治阿尔茨海默病研究进展[J]. 陕西中医, 2021,42(4):537-539.
- [23] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
- [24] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. Sci Rep, 2017, 7:42717.
- [25] YAO Z J, DONG J, CHE Y J, et al. TargetNet: A web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models [J]. J Comput Aided Mol Des, 2016, 30(5):413-424.
- [26] WANG X, SHEN Y, WANG S, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1):W356-W360.
- [27] CHEN G, RAMÍREZ J C, DENG N, et al. Restructured GEO: Restructuring gene expression omnibus metadata for genome dynamics analysis [J]. Database (Oxford), 2019, 2019:145.
- [28] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1):D1074-D1082.
- [29] ZHOU Y, ZHANG Y, LIAN X, et al. Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D1398-D1407.
- [30] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54:1.30.1-1.30.33.
- [31] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÛCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1):D845-D855.
- [32] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1):D605-D612.
- [33] DEMCHAK B, HULL T, REICH M, et al. Cytoscape: The network visualization tool for GenomeSpace workflows [J]. F1000Res, 2014, 3:151.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 阿依江·哈拜克,王晓梅,闫冬,等. 靶向探针追踪

- $A\beta_{(25-35)}$ 的亚细胞定位并基于Nrf2通路探讨阿里红多糖对线粒体损伤的保护机制[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7):1213-1218, 1243.
- [37] LUO Y, ZHOU S, HAEIWA H, et al. Role of amber extract in protecting SHSY5Y cells against amyloid β_{1-42} -induced neurotoxicity[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141:111804.
- [38] 周阳,王啸晨. 阿尔茨海默病遗传及信号通路研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6):994-1000.
- [39] 尤努斯江·吐拉洪,木妮热·依布拉音,吐尔洪·买买提. 阿里红中总三萜酸的提取工艺优选及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):24-27.
- [40] 冯薇. 层孔菌属药用真菌阿里红和木蹄的化学成分与生物活性研究[D]. 北京:中国协和医科大学, 2010.
- [41] 张慧锋. 阿里红三萜酸类化合物抗肿瘤作用及分子机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [42] ZHANG Y, LI Y, MA L. Recent advances in research on Alzheimer's disease in China[J]. J Clin Neurosci, 2020, 81:43-46.
- [43] 鲍倩,苏志伟,姬梦丽,等. 中西医治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 河北中医, 2020, 42(3):470-476.
- [44] 韩利文,陈善军,董榕,等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展[J]. 山东科学, 2021, 34(6):22-31.
- [45] 崔莹雪,哈略,刘钧天,等. 艾灸早期干预对SAMP8小鼠学习记忆行为及APP、BACE1表达影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(6):112-116.
- [46] 田甜,孙杨,王渭诗,等. 叶酸对AD模型小鼠脑内 $A\beta$ 沉积及BACE1表达影响[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(3):368-372.
- [47] 付文君,代渊,魏江平,等. 基于转基因细胞模型研究通络醒脑泡腾片对 $A\beta$ 代谢的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11):1571-1577, 1578.
- [48] 杨敬华,吕丹,孙文昌,等. 孕哺期及断乳后氯化镉暴露对大鼠大脑皮质神经细胞钙稳态及Bcl-2蛋白家族和Caspase蛋白表达的影响[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(6):471-474.
- [49] DAS M, DEVI K P. Dihydroactinidiolide regulates Nrf2/HO-1 expression and inhibits caspase-3/Bax pathway to protect SH-SY5Y human neuroblastoma cells from oxidative stress induced neuronal apoptosis[J]. Neurotoxicology, 2021, 84:53-63.
- [50] 省格丽,胡琴,阿布都沙拉木,等. 益智治呆方对阿尔茨海默病乙酰胆碱酯酶和过氧化氢酶浓度的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1):22-25, 259.
- [51] SHEN Y, ZHANG B, PANG X, et al. Network pharmacology-based analysis of Xiao-Xu-Ming decoction on the treatment of Alzheimer's disease[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:595254.

[责任编辑 顾雪竹]