

## 网络药理学预测黄芪治疗帕金森病作用机制及实验验证

王开达, 王兴臣\*, 姬琳

(山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014)

**[摘要]** **目的:**通过网络药理学分析黄芪治疗帕金森病的作用机制,并通过大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系(PC-12)帕金森病体外细胞模型对相关靶点蛋白进行验证。**方法:**使用中药系统药理学数据库(TCMSP),CD-HIT数据库筛选出黄芪候选和作用靶点,使用GENECARDS数据库,在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库中筛选帕金森病相关的疾病靶点,绘制成分-靶点网络,使用STRING数据库构建蛋白互作网络,使用Bioconductor clusterProfiler进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。通过PC-12帕金森病体外细胞模型对网络药理学部分靶点蛋白进行验证。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化-细胞外调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2),ERK1/2,B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax),Bcl-2,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),剪切的Caspase-3(c-Caspase-3)蛋白的表达情况,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测白细胞介素-6(IL-6),IL-10,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。**结果:**网络药理学发现,黄芪中芒柄花黄素、槲皮素等14种化合物通过多靶点、多通路协同作用发挥治疗帕金森病的作用,涉及ERK信号通路,及Bax,Bcl-2,Caspase-3,IL-6,IL-10,TNF- $\alpha$ 等靶点蛋白。与模型组比较,Western blot结果显示,黄芪提取物组降低Bax,p-ERK1/2,c-Caspase-3表达,升高Bcl-2表达( $P<0.05$ );ELISA结果显示,黄芪水提取物能够降低IL-6,TNF- $\alpha$ 的表达,并增加IL-10表达( $P<0.05$ )。**结论:**研究阐述了黄芪多靶点、多通路治疗帕金森病的机制,证实了黄芪提取物能够影响ERK1/2,Bax,Bcl-2,Caspase-3,IL-6,IL-10,TNF- $\alpha$ 靶点蛋白的表达,验证了网络药理学结果,为深入研究黄芪治疗帕金森病提供了依据。

**[关键词]** 黄芪; 帕金森病; 网络药理学; 细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0178-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201880

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1009.006.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-27 11:22

### Study on Mechanism and Validation of Effect of Astragali Radix in Treatment of Parkinson's Disease by Network Pharmacology

WANG Kai-da, WANG Xing-chen\*, JI Lin

(The First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the mechanism of Astragali Radix in the treatment of Parkinson's disease by network pharmacology and PC-12 extracellular model. **Method:** Traditional Chinese medicines systems pharmacology platform (TCMSP) and CD-HIT databases were used to screen out active components and targets of Astragali Radix, GENECARDS and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases were used to screen out targets relating to Parkinson's disease and draw component-target network, STRING database was used to build the protein-protein interaction network, Bioconductor Cluster Profiler was applied in Gene Ontology (GO) enrichment analysis, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. PC-12 cells were pretreated with water extract of Astragali Radix, and Western blot was

**[收稿日期]** 20200511(018)

**[基金项目]** 山东省中医药科技发展计划项目(2013Z003-4);山东省中医药科技发展计划项目(2019-0957)

**[第一作者]** 王开达,在读博士,从事中西医结合防治神经系统疾病研究工作,E-mail:baoyushou2@163.com

**[通信作者]** \*王兴臣,博士,主任医师,教授,从事中西医结合防治神经系统疾病研究工作,E-mail:xingchen\_wangzy@163.com

used to assess the expression of phosphorylation extracellular regulatory protein kinase 1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, B cell lymphoma -2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), Bcl-2, cysteine aspartic acid protease -3 (Caspase-3) and cleaved-Caspase3 (c-Caspase-3). The levels of interleukin-6 (IL-6), IL-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). **Result:** Network pharmacology showed that 14 compounds in Astragali Radix, including emodin and quercetin, played a role through multi-target and multi-channel synergy, involving ERK signal pathway, Bax, Bcl-2, Caspase-3, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and other target proteins. Western blot showed that the expressions of Bax, p-ERK1/2, c-Caspase-3 and Bcl-2 in Astragali Radix Extract group decreased, while the expressions of Bcl-2 in Astragali Radix Extract group was significantly higher than that in model group ( $P < 0.05$ ). There were statistical differences between the two groups. ELISA showed that Astragali Radix water extract could reduce the expressions of IL-6, TNF- $\alpha$ , but increase the expression of IL-10, with statistical differences from the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** This study shows that Astragali Radix can affect the expressions of these proteins, and verify the results of network pharmacology, so as to provide a basis for further study of Astragali Radix in the treatment of Parkinson's disease.

**[Key words]** Astragali Radix; parkinson disease; network pharmacology; extracellular regulatory protein kinase 1/2 (ERK1/2)

帕金森病是仅次于阿尔茨海默病的第二大神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。帕金森病在全人群中的发病率为0.3%<sup>[2]</sup>,在85~89岁的人中,帕金森病的发病率上升到3.5%<sup>[3]</sup>,是老年群体的常见病之一。帕金森病的主要病理改变为黑质、纹状体区域的多巴胺能神经元变性死亡,黑质、纹状体区域的促凋亡环境是帕金森重要病理机制<sup>[4]</sup>。当前帕金森病的治疗仍然以对症治疗为主,尚无药物能够阻止或延缓帕金森病的进展<sup>[5]</sup>。因此,具有神经保护、抗凋亡作用的药物研发是当前帕金森病的研究热点之一<sup>[6]</sup>。黄芪是豆科黄耆属植物黄芪的根。具有抗氧化、抗凋亡、神经保护作用<sup>[7]</sup>。当前的研究表明,黄芪能够降低大鼠视网膜神经节细胞的氧化应激水平,起到神经保护作用<sup>[8]</sup>;黄芪甲苷能够减轻1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的氧化应激,抑制活性氧的生成,减轻多巴胺能神经元变性<sup>[9]</sup>;LIU等<sup>[10]</sup>的研究表明,黄芪多糖能够减轻MPTP诱导的线粒体结构损伤,促进大鼠黑质神经元的存活。是当前帕金森病研究十分有潜力的药物之一<sup>[11]</sup>。但是当前黄芪的研究较多集中在肿瘤<sup>[12]</sup>、心脑血管病<sup>[13]</sup>等方面,黄芪治疗帕金森病相关的研究仍然较少,具体机制仍然不明。

网络药理学是整合化学信息学、生物信息学、生物网络、网络分析和传统药理学的新的药理学研究方法<sup>[14]</sup>。网络药理学研究方法符合中医整体观念,是阐明的活性化合物和中药潜在机制的可行策略。本研究旨在利用网络药理学识别和预测黄

芪治疗帕金森病潜在的活性成分、作用靶点和通路,并使用蛋白免疫印迹法(Western blot)和酶联免疫吸附测定(ELISA)对PC-12帕金森病体外模型半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-10(IL-10),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )靶点蛋白的表达进行验证,探讨黄芪治疗帕金森病的作用机制。

## 1 材料

**1.1 数据库中化合物的提取** 黄芪(Astragali Radix)涉及化学化合物的数据,从中国中医药系统药理学数据库(TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/index.php>)中提取。根据口服利用度(OB)和类药性(DL)两个属性对化合物进行筛选。类药性是指化合物与已知药物的相似性<sup>[15]</sup>。口服生物利用度,是药物由胃肠道吸收,经过肝脏而到达体循环血液中的药量占口服剂量的比例<sup>[16]</sup>。依据既往文献与平台的推荐<sup>[15,17-18]</sup>,选择OB>30%,DL>0.18为候选化合物的筛选条件。

**1.2 与化合物相关的靶点检索** 使用TCMSP数据库中的Target功能来检索黄芪中化合物的作用靶点。TCMSP数据库药物靶点的来源有两个。实验验证药物靶点从HIT数据库<sup>[19]</sup>中检索。对于没有验证目标的那些化合物,基于SysDT模型<sup>[20]</sup>预测化合物的潜在目标。SysDT模型有着82.83%的一致性,81.33%的灵敏度,和93.62%的特异性,表现出

较好的预测效能。

**1.3 与帕金森病相关的疾病靶点** 使用GeneCards数据库,OMIM数据库对帕金森病相关疾病靶点进行检索。GeneCards(<http://www.genecards.org/>)是注解和预测的基因的综合数据库,OMIM(<https://omim.org/>)是人类基因和遗传表型的综合数据库,使用“Parkinson disease”作为关键词进行检索。

**1.4 化合物-靶点网络以及靶点-靶点网络进行构建** 通过Cytoscape对化合物-靶点网络进行可视化处理。Cytoscape是一个将数据网络可视化的工具,使用的版本为3.7.1(<http://www.cytoscape.org/>)。基于string数据库(<https://string-db.org/>)对疾病与药物的重合靶点进行蛋白互作网络(PPI)分析,以探求重合靶点之间的相互作用。

**1.5 基因本体论(GO)和基因的京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析** 本研究中使用R语言的clusterProfiler插件进行GO富集分析和KEGG富集分析。其中pvaluecutoff和qvaluecutoff参数值设定为0.05。

**1.6 细胞系** 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞细胞系(PC-12 高分化,CAT NO.CL-0481),购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.7 药物与试剂** 黄芪,由山东中医药大学第二附属医院中药房提供,经山东中医药大学第二附属医院副主任药师王雷鉴定为正品,符合2015年版《中国药典》规范。将药材洗净后晒干,并粉碎,煎煮2次,第1次加水10倍量,煎煮2 h,过滤,滤液备用;随后将中药水提液浓缩至1:1~1:2(mL:g),药液放冷后,边搅拌边缓慢加入乙醇使达75%,密闭冷藏24 h,滤过,滤液回收乙醇,得到精制液,制成冻干粉,-20℃保存;蛋白裂解缓冲液,聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶制备试剂盒,Tris-甘氨酸转膜缓冲液,Tris-甘氨酸蛋白电泳液,磷酸盐缓冲液(PBS),洗涤缓冲液(TBST)聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液(批号)(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为CW23333S, CW0022M, CW0044, CW0045, CW0040S, CW0043S, CW0027);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒(美国MCE公司,批号42367);Bcl-2, p-ERK1/2, ERK1/2 抗体,大鼠IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-0032R, bs-3016R, bsm-33232M, bsk13005, bsk13014, bsk13003);Bax, Caspase-3,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为60267-1-Ig, 66470-2-Ig,

60008-1-Ig);改良伊格尔培养基(DMEM)高糖培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号WH011119 128P);胎牛血清(美国Gibco公司,批号42G4196 K);胰蛋白酶(苏州百拓生物技术有限公司,批号JY1003-Q160)。

**1.8 仪器** MINI PROTEAN型转膜系统(美国Bio-Rad公司),CKX53型倒置显微镜(Olympus公司),6孔板,96孔板(德国Eppendorf公司),SW-CJ-1G型超净工作台(苏州净化公司),MCO-18AC型二氧化碳培养箱(三洋公司),WTC2000型分析天平(波兰RADWAG公司),Multiskan Sky型酶标仪(美国Thermo Fisher公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** PC-12细胞培养于培养皿中,使用DMEM高糖培养基,10%胎牛血清和青霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,链霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行培养。隔天换液,3 d后胰酶消化传代,传代3次后接种到6孔板中,接种密度为 $1\times 10^5$ 个/mL,培养24 h后给予不同的处理因素。

**2.2 PC-12 帕金森病体外模型构建** 细胞接种到96孔板,每孔容量 $100\text{ }\mu\text{L}$ ,接种密度 $1\times 10^5$ 个/mL,培养24 h后,在培养基中加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,终浓度分别为0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,然后在二氧化碳培养箱中培养2 h,使用CCK-8法检测细胞活力。选取最接近半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度。根据前期实验,结合既往文献<sup>[21-22]</sup>,选择 $\text{H}_2\text{O}_2$ 为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 模型浓度。

**2.3 细胞分组和给药** 共分为空白组、模型组、黄芪提取物组(300, 600  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )共4组。其中黄芪提取物组先加入不同浓度黄芪提取物共孵育24 h,然后更换含有 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$ 培养基继续培养2 h后用于后续检测。

**2.4 细胞活性检测** 在96孔板中接种细胞悬液( $100\text{ }\mu\text{L}$ /孔)。按照上述给药方法进行处理,黄芪浓度梯度选择0, 300, 600, 1 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。向每孔加入CCK-8溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。将培养板在培养箱内孵育2 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A,选择与模型组有统计学差异的浓度进行后续蛋白检测。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 p-ERK1/2, ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达** 加入细胞裂解液 $300\text{ }\mu\text{L}$ ,冰上裂解30 min,然后使用细胞刮刀将细胞刮下,加入空白离心管内,使用离心机 $12\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,取上清液,按照4:1加入蛋白上样缓冲液, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 或沸水浴加热3~5 min,以充分变性蛋

白。然后使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,电泳条件80 V 30 min, 30 mA 1 h, 转模恒压110 V, 60 min, 取出聚偏二氟乙烯膜于5%的脱脂牛奶中室温封闭1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min,  $\beta$ -actin (1:5 000), p-ERK1/2, ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3 (1:2 000) 4 °C 孵育过夜, 次日取出洗膜后于二抗 (1:5 000) 孵育1 h 根据相对分子质量选择切胶范围, 使用ECL发光法显影, 实验重复3次, 使用Image J软件计算条带灰度值进行分析。

**2.6 ELISA 检测 IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  含量** 收集上述4组细胞上清, 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液100  $\mu$ L, 余孔分别加标准品或待测样品100  $\mu$ L, 每个孔中加入工作液100  $\mu$ L, 酶标板上加上覆膜, 37 °C 温育1 h。弃去孔内液体, 甩干, 洗板, 并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。每孔加工作液100  $\mu$ L, 加上覆膜, 37 °C 温育30 min。甩干, 洗板, 每孔加底物溶液90  $\mu$ L, 酶标板上加上覆膜37 °C 避光孵育15 min。每孔加终止液50  $\mu$ L, 终止反应。然后使用酶标仪在450 nm 波长测量各孔的吸光度A。

**2.7 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件对实验数据进行处理, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 化合物筛选** 以  $OB > 30\%$ ,  $DL > 0.18$  为筛选原

则对TCMSP数据库进行检索, 共检索到黄芪治疗帕金森病的候选成分共14个, 具体名称见表1。

表1 黄芪主要候选成分

Table 1 Main candidate components of Astragali Radix

黄芪主要成分
quercetin
1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene
FA
kaempferol
calycosin
formononetin
bifendate
(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol
9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-beta-D-glucoside
7-O-methylisomucronulatol
3,9-di-O-methylinissolin
isorhamnetin
hederagenin
Jaranol

**3.2 化合物靶点检索与疾病靶点检索** 通过TCMSP数据库, TCMSP数据库进行检索, 共检索得到180个不同的化合物作用靶点。通过genecards数据库和OMIM数据库进行检索, 共检索得到7 057个与帕金森病相关的不重复的疾病靶点。其中与黄芪相重合的靶点共146个(图1)。

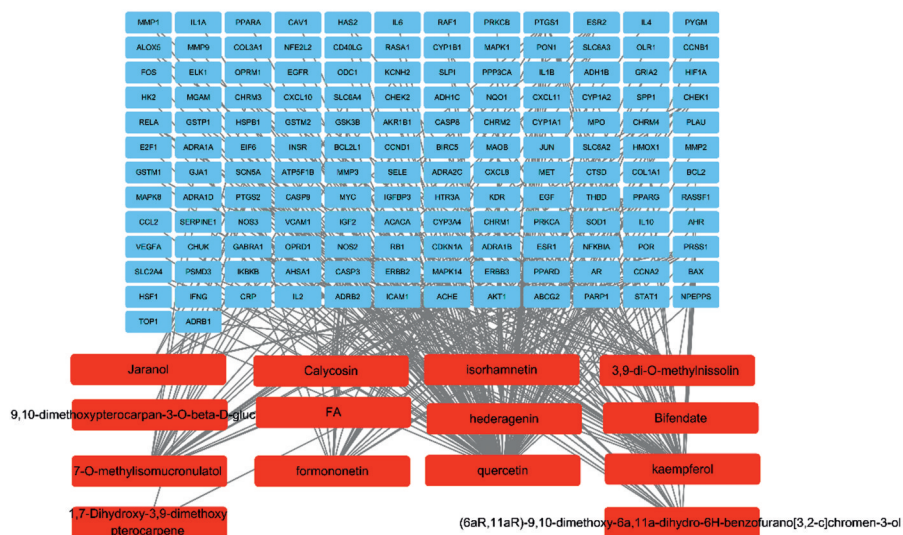


图1 化合物-靶点网络

Fig. 1 Compound-target network

**3.3 蛋白互作网络构建** 蛋白互作网络的构建基于STRING数据库。STRING(<https://string-db.org/>)

是一个在线搜索蛋白互作关系的数据库<sup>[23]</sup>。基于数据库0.95信度进行构图(图2)。

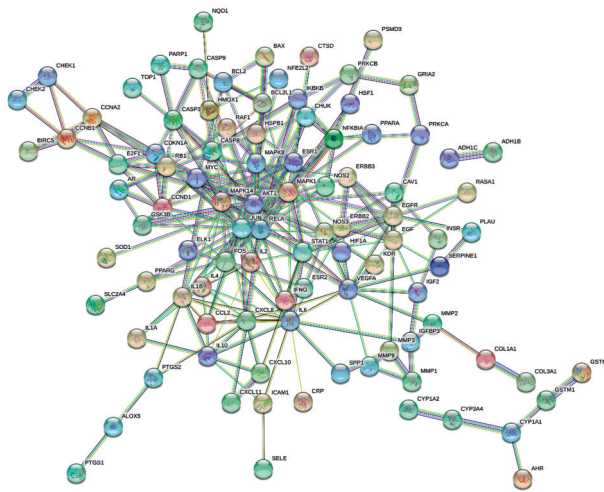


图2 蛋白互作网络  
Fig. 2 PPI network

3.4 GO富集分析 通过GO富集分析,共富集了174个生物过程(图3)。这些生物过程包括G蛋白偶联胺受体活性,细胞因子受体结合,RNA聚合酶II转录因子结合,肾上腺素能受体活性,细胞因子活性,泛素样蛋白连接酶结合,磷酸酶结合,泛素蛋白连接酶结合等。这些生物过程可能与黄芪治疗帕金森病密切相关。

3.5 KEGG富集分析 通过KEGG富集分析,共富集了共富集了126个通路(图4)。包括IL-17信号通路,查加斯病流体剪切应力与动脉粥样硬化,肿瘤坏死因子信号通路,T细胞受体信号通路,乙型肝炎, Toll样受体信号通路,缺氧诱导因子-1信号通路等。

3.6 细胞活力检测 经CCK-8检测,300,600 mg·L<sup>-1</sup> 2个浓度的细胞活性与模型组存在统计学差异。见表2。

3.7 黄芪提取物对细胞ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3, IL-6, IL-10, TNF-α表达的影响 通过网络药理学预测, ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3, IL-6, IL-10, TNF-α可能属于是黄芪治疗帕金森病的重要靶点。通过Western blot及ELISA对相关靶点进行分析,以验证黄芪是否可以影响上述蛋白的表达。与空白组比较,模型组的Bax, p-ERK1/2, c-Caspase-3, IL-6, TNF-α表达明显升高, Bcl-2, IL-10表达明显降低(P<0.05);与模型组比较,黄芪提取物组Bax, p-ERK1/2, c-Caspase-3, IL-6, TNF-α表达明显降低, Bcl-2, IL-10表达明显升高(P<0.05)。见图5,表3,4。

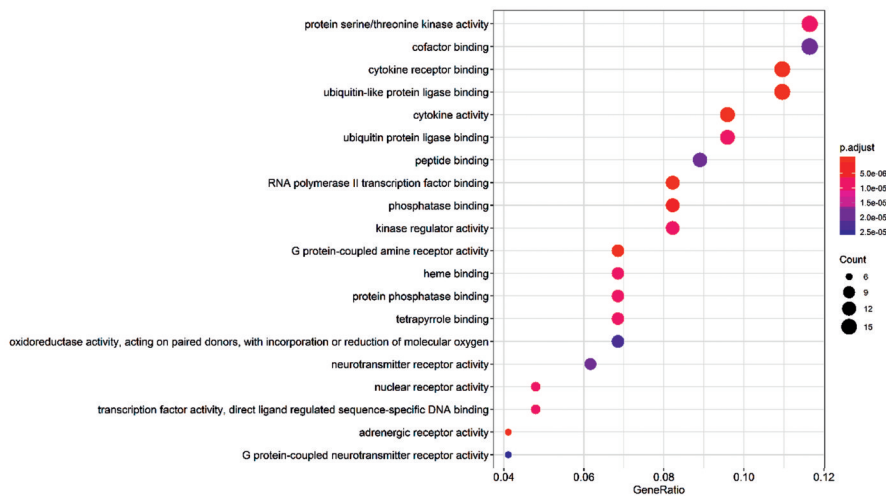


图3 GO富集分析  
Fig. 3 GO enrichment analysis

#### 4 讨论

通过网络药理学对黄芪的14个候选成分及其靶点通路进行了网络药理学分析。本次实验验证的ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3, IL-6, IL-10, TNF-α等靶点都通过网络药理学富集的网络、通路信息得到。ERK信号通路是哺乳动物经典的MAPK信号通路,可以由细胞因子,G蛋白偶联受体<sup>[24]</sup>等激活<sup>[25]</sup>。在帕金森病中ERK信号通路起着

较为重要的作用。有研究表明,帕金森病患者黑质中存在磷酸化ERK的颗粒状胞质聚集体,而在正常人群黑质中则几乎没有<sup>[26]</sup>。ERK1/2信号通路参与神经元凋亡<sup>[27]</sup>,ERK的磷酸化激活导致PC12帕金森病模型细胞的凋亡<sup>[28]</sup>,ERK1/2信号通路抑制剂PD98059可以防止H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的少突胶质细胞系帕金森病模型细胞的死亡<sup>[29]</sup>。氧化应激和线粒体功能障碍,细胞凋亡,炎症等多种途径可能通过ERK

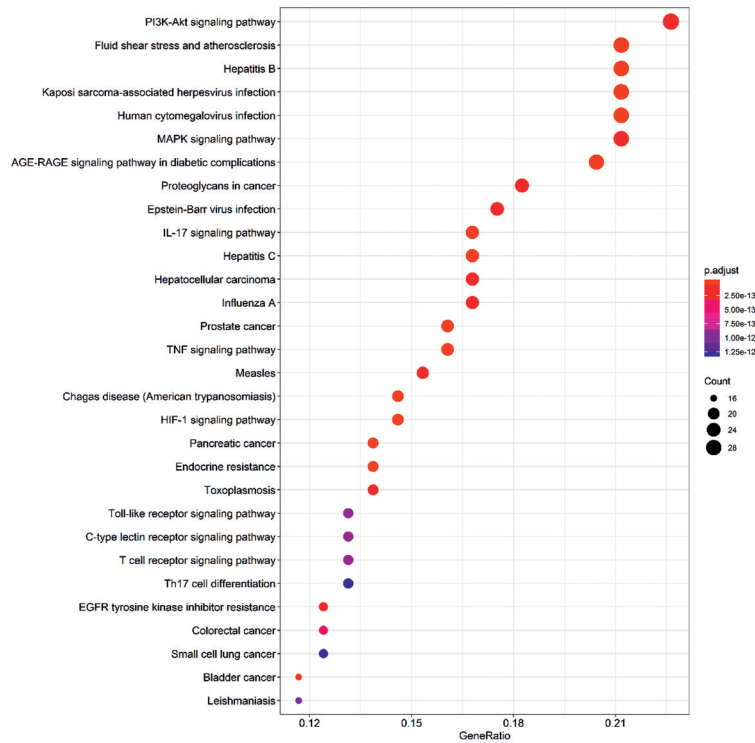


图 4 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis

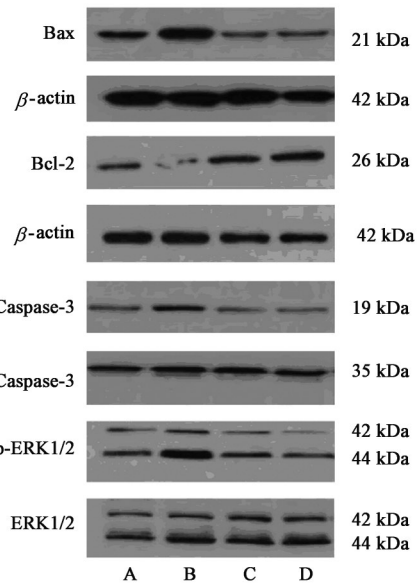
表 2 细胞活力检测 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Cell viability test ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>A</i>
空白	-	1.68±0.16
模型	-	0.77±0.03 <sup>1)</sup>
黄芪提取物	300	1.15±0.08 <sup>2)</sup>
	600	1.22±0.09 <sup>2)</sup>
	1 200	0.74±0.09

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 3, 4 同)。

信号通路干预帕金森病病理过程<sup>[29]</sup>。TNF- $\alpha$ 在帕金森病患者外周血中水平升高<sup>[30]</sup>,具体致病机制可能与激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶加剧活性氧的形成,从而诱导超氧化物的产生<sup>[31]</sup>,导致慢性神经变性。IL-6是重要的促炎因子,可能由活化的小胶质细胞,星形胶质细胞等释放,并导致神经炎症与变性<sup>[32]</sup>。帕金森病患者的黑质纹状体区域存在促凋亡环境是帕金森病的重要病因<sup>[4]</sup>。Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 都是凋亡相关的重要因子,在多巴胺能神经元凋亡过程中起关键作用。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族的 2 个重要成员, Bcl-2 能够抑制细胞凋亡, Bax 能够促进细胞凋亡<sup>[33]</sup>。Caspase-3 是细胞凋亡的关键分子,能够抑制多聚(ADP-核糖)聚合酶活性,增加核酸内切酶的活



A. 空白组; B. 模型组( $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); C. 黄芪低剂量组( $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +黄芪提取物 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); D. 黄芪高剂量组( $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +黄芪提取物 600  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 5 各组细胞 ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达电泳  
Fig. 5 Electrophoretic of ERK1/2, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in each group of cells

性,导致 DNA 片段化,引起细胞凋亡。黄芪可能通过上述靶点和通路起到治疗帕金森病的作用。

除上述靶点之外,通过网络药理学还得到了一些黄芪治疗帕金森病的潜在的、尚需验证的靶点和

表3 黄芪提取物对Bax, Bcl-2, Caspase-3, ERK表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Astragali Radix on expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and ERK ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	c-Caspase-3/Caspase-3	p-ERK/ERK
空白	-	1.19±0.07	0.65±0.07	0.81±0.09	0.79±0.04
模型	-	3.12±0.11 <sup>1)</sup>	0.25±0.02 <sup>1)</sup>	1.37±0.06 <sup>1)</sup>	1.14±0.05 <sup>1)</sup>
黄芪提取物	300	0.57±0.10 <sup>2)</sup>	1.06±0.05 <sup>2)</sup>	0.80±0.04 <sup>2)</sup>	0.67±0.04 <sup>2)</sup>
	600	0.81±0.01 <sup>2)</sup>	1.44±0.18 <sup>2)</sup>	0.79±0.03 <sup>2)</sup>	0.38±0.03 <sup>2)</sup>

表4 黄芪提取物对IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Astragali Radix on expression of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$
空白	-	40.88±2.87	51.06±1.50	87.95±9.60
模型	-	198.43±7.67 <sup>1)</sup>	20.74±0.35 <sup>1)</sup>	312.28±11.26 <sup>1)</sup>
黄芪提取物	300	142.19±5.78 <sup>2)</sup>	32.50±0.83 <sup>2)</sup>	307.41±19.16
	600	117.87±4.31 <sup>2)</sup>	39.90±1.24 <sup>2)</sup>	238.11±14.63 <sup>2)</sup>

通路,当前研究表明,这些信号通路和靶点参与了帕金森病的发病过程。如晚期糖基化终产物及其受体(AGE-RAGE)信号通路可能通过诱导一系列信号转导级联反应,导致核转录因子- $\kappa$ B激活以及TNF- $\alpha$ , IL-1等细胞因子的表达增加导致黑质神经元的凋亡<sup>[34]</sup>; $\beta_2$ 肾上腺素能受体(ADRB2)被认为是 $\alpha$ -突触核蛋白基因表达的调节因子,ADRB2激活剂能够降低帕金森病发病的风险<sup>[35]</sup>。雌激素受体(ESR1, ESR2)的激活可以抑制小胶质细胞和星形胶质细胞活化导致的神经炎症<sup>[36]</sup>,并通过激活PI3K/Akt信号通路起到抗凋亡作用<sup>[37]</sup>。黄芪可能通过抑制神经炎症、抗凋亡等多种机制起到治疗帕金森病的作用。

本次研究表明,黄芪能够影响ERK1/2, Bax, Bcl-2, Caspase-3, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 等蛋白的表达,验证了网络药理学结果,为深入研究黄芪治疗帕金森病提供了依据。

[参考文献]

[1] CALABRESE V P. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030[J]. Neurology, 2007, 69(2): 223-224.  
 [2] 刘疏影, 陈彪. 帕金森病流行现状[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2016, 16(2): 98-101.  
 [3] RIZEK P, KUMAR N, JOG M S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease [J]. CMAJ, 2016, 188(16): 1157-1165.  
 [4] LEV N, MELAMED E, OFFEN D. Apoptosis and Parkinson's disease [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 245-250.

[5] SAVITT D, JANKOVIC J. Targeting  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: progress towards the development of disease-modifying therapeutics [J]. Drugs, 2019, 79(8): 797-810.  
 [6] SARKAR S, RAYMICK J, IMAM S. Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: recent perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 904.  
 [7] 黎晨, 尤培蒙, 王晨曦, 等. 黄芪多糖抗氧化作用的分子机制研究进展[J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2019, 40(4): 78-82.  
 [8] 羊燕华, 方华. 黄芪对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞的保护作用及氧化应激的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(20): 2574-2576.  
 [9] YANG C, MO Y, XU E, et al. Astragaloside IV ameliorates motor deficits and dopaminergic neuron degeneration via inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in a Parkinson's disease mouse model [J]. Int Immunopharmacol, 2019, doi: 10.1016/j.intimp. 2019. 05. 036.  
 [10] LIU H, CHEN S, GUO C, et al. Astragalus polysaccharide protects neurons and stabilizes mitochondrial in a mouse model of Parkinson disease [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5192-5199.  
 [11] LI X Z, ZHANG S N, LIU S M, et al. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease [J]. Fitoterapia, 2013, 84: 273-285.  
 [12] 魏房, 周勇. 黄芪甲苷对黑色素瘤细胞生长和迁移的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(3): 263-267.  
 [13] 王凯, 雷露, 曹金一, 等. 中药红花和黄芪对脑缺血损伤保护作用的研究进展[J]. 中国医药导报, 2020, 17

- (3):22-25.
- [14] BERGER S I, IYENGAR R. Network analyses in systems pharmacology [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2009, 25(19):2466-2472.
- [15] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [16] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [17] 马迪, 马桂琴. 基于网络药理学探讨四妙勇安汤治疗银屑病关节炎的作用机制预测研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11):2611-2618.
- [18] 程亚伟, 林道斌, 倪雅丽, 等. 基于网络药理学对滋脾通络方治疗糖尿病肾病机制分析 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(2):224-230.
- [19] YE H, YE L, KANG H, et al. HIT: linking herbal active ingredients to targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39:D1055-D1059.
- [20] YU H, CHEN J, XU X, et al. A systematic prediction of multiple drug-target interactions from chemical, genomic, and pharmacological data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e37608.
- [21] FUJITA Y, IZAWA Y, ALI N, et al. Pramipexole protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell death [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006, 372(4):257-266.
- [22] MA S, LIU X, XUN Q, et al. Neuroprotective effect of Ginkgolide K against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(2): 217-225.
- [23] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D362-D368.
- [24] NAOR Z, BENARD O, SEGER R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11(3):91-99.
- [25] 王洪财, 王涛. 细胞外信号调节激酶(ERK1/2)与帕金森病 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(2):145-148.
- [26] LEE W C, CHOI C H, CHA S H, et al. Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells [J]. *Neurochem Res*, 2005, 30(2):263-270.
- [27] CHEUNG E C, SLACK R S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis [J]. *Sci STKE*, 2004, doi:10.1126/stke.2512004pe45.
- [28] PARK K H, SHIN K S, ZHAO T T, et al. L-DOPA modulates cell viability through the ERK-c-Jun system in PC12 and dopaminergic neuronal cells [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101:87-97.
- [29] BOHUSH A, NIEWIADOMSKA G, FILIPEK A. Role of mitogen activated protein kinase signaling in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2973.
- [30] 管小亭, 王春雪, 龙洁, 等. 帕金森病患者外周血 TNF- $\alpha$  浓度和 IL-6 质量浓度的检测及分析 [J]. *首都医科大学学报*, 2004, 25(2):233-235.
- [31] BRANDES R P, WEISSMANN N, SCHRODER K. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 76: 208-226.
- [32] KEMPURAJ D, THANGAVEL R, NATTERU P A, et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration [J]. *J Neurol Neurosurg Spine*, 2016, 1(1):1003.
- [33] EMI M, KIM R, TANABE K, et al. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(6):R940-R952.
- [34] JIANG X, WANG X, TUO M, et al. RAGE and its emerging role in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 672:65-69.
- [35] MITTAL S, BJØRNEVIK K, IM D S, et al.  $\beta$ -Adrenoreceptor is a regulator of the  $\alpha$ -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease [J]. *Science (New York, NY)*, 2017, 357(6354):891-898.
- [36] CHAKRABARTI M, HAQUE A, BANIK N L, et al. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 109:22-31.
- [37] NAKASO K, TAJIMA N, HORIKOSHI Y, et al. The estrogen receptor  $\beta$ -PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(9):1303-1312.

[责任编辑 周冰冰]