◆网络药理学◆

基于网络药理学及实验验证研究地黄饮子防治阿尔茨海默病作用机制

王金龙[1]，王艺蓉[1]，李景全[1]，闫黎[2]，王昊[3]，刘晴[2]，张永芳[3]，董杨[1]

1. 上海中医药大学中西医结合学院，上海 201203
2. 上海中医药大学中医学院，上海 201203
3. 上海交通大学医学院药理学与化学生物学系，上海 200025

［摘要］**目的：**采用网络药理学结合实验验证，探讨地黄饮子防治阿尔茨海默病（AD）的作用机制。**方法：**利用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）、HERB数据库获取地黄饮子化学成分，基于药代动力学信息与文献检索筛选符合条件的有效成分，综合TCMSP、SwissTargetPrediction、STITCH数据库获取对应靶点。利用Therapeutic Target Database、GeneCards、DisGeNET数据库收集AD靶点。利用Cytoscape 3.7.1软件构建“中药-成分-靶点”网络。利用Metascape在线工具对靶点进行GO和KEGG通路富集分析。利用东莨菪碱构建AD小鼠模型，采用Y迷宫、新物体识别、Morris水迷宫评价小鼠学习记忆能力，酶联免疫吸附法（ELISA）检测海马组织乙酰胆碱酯酶（AChE）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）的水平，Western Blot检测海马组织核因子κB（NF-κB）和磷酸化核因子κB（p-NF-κB）蛋白表达。**结果：**通过中心网络拓扑分析筛选出地黄饮子中61个关键有效成分，作用于AD的关键靶点106个。GO富集分析发现关键靶点参与肽结合（淀粉样蛋白）、胆碱能结合、神经递质受体的活动，炎症反应的调节、行为活动调控等。KEGG通路富集分析发现AChE、CHRNA7、RELA、TNF等关键靶点富集于胆碱能突触、NF-κB信号通路。体内实验表明地黄饮子预处理能够改善AD模型小鼠的认知功能障碍；抑制小鼠AChE、IL-6、TNF-α水平；抑制p-NF-κB蛋白表达。**结论：**地黄饮子可能通过抑制小鼠海马AChE的水平，减轻胆碱能损伤，抑制由NF-κB介导的神经炎症，恢复“胆碱能抗炎途径”，改善小鼠认知功能障碍，起到防治AD的作用。

［关键词］阿尔茨海默病；网络药理学；实验验证；地黄饮子；胆碱能；神经炎症
［中图分类号］R285 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）19-0008-08
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.19.002

Network Pharmacology-Based and Experimental Validation Approach to Investigate the Mechanism of Dihuang Yinzi in Treating Alzheimer´s Disease

WANG Jinlong[1], *WANG Yirong*[1], *LI Jingquan*[1], *YAN Li*[2], *WANG Hao*[3], *LIU Qing*[2], *ZHANG Yongfang*[3], *DONG Yang*[1]

1. School of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract: Objective: To explore the mechanisms of prevention and treatment of Alzheimer's Disease (AD) by Dihuang Yinzi using network pharmacology combined with experimental verification. **Methods:** All

［收稿日期］2023-04-11
［修回日期］2023-07-13
［基金项目］国家自然科学基金项目（81573401）
［作者简介］王金龙（1993-），男，在读硕士研究生，E-mail：wjlshutcm2020@163.com。
［通信作者］董杨（1980-），女，副教授，E-mail：dongyang1980@163.com。张永芳（1976-），女，副研究员，E-mail：zhangyongfang1@yahoo.com。

chemical components of Dihuang Yinzi were obtained by TCMSP and HERB databases, and the eligible active components were screened based on the pharmacokinetic information of chemical components and literature search, and the corresponding predicted targets were further obtained by TCMSP, SwissTargetPrediction and STITCH databases. AD-related targets were collected using the Therapeutic Target Database, GeneCards and DisGeNET database. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the "herb-component-target" network. The Metascape web tool was used to analyze the targets for GO and KEGG pathway enrichment. The mouse model of AD was constructed by scopolamine. Y-maze, new object recognition and Morris water maze were used to evaluate the learning and memory ability of the mice. The levels of acetylcholinesterase (AChE), tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-6 (IL-6) in the hippocampus were detected by ELISA. The expressions of nuclear factor (NF-κB) and phospho-NF-κB (p-NF-κB) in the hippocampus were detected by Western Blot. **Results:** A total of 61 key active components in Dihuang Yinzi were screened by central network topology analysis, and 106 key targets were identified in AD. GO enrichment analysis revealed that key targets were involved in peptide binding (amyloid), acetylcholine binding, neurotransmitter receptor activity, regulation of inflammatory response, behavior, etc. KEGG pathway enrichment analysis revealed that AChE, CHRNA7, RELA, and TNF and other key targets were enriched in cholinergic synapses, NF-κB signaling pathway. *In vivo* experiments showed that Dihuang Yinzi pretreatment improved the cognitive function of AD mice, inhibited the levels of AChE, IL-6 and TNF-α, and inhibited the expression levels of p-NF-κB proteins. **Conclusion:** Dihuang Yinzi may reduce cholinergic damage by inhibiting the level of AChE in the mouse hippocampus, further inhibiting NF-κB-mediated neuroinflammation and restoring the "cholinergic anti-inflammatory pathway", thus improve the cognitive dysfunction in mice and preventing AD.

Keywords: Alzheimer's disease; Network pharmacology; Experimental verification; Dihuang Yinzi; Cholinergic; Neuroinflammation

阿尔茨海默病(AD)是由多种原因引起的一种复杂的神经退行性疾病，会导致患者记忆障碍、学习能力下降、人格和行为改变等[1]。其发病机制尚不十分清楚，主要涉及淀粉样蛋白假说、神经递质假说、神经炎症假说等[2]。目前治疗AD的药物利凡斯的明、多奈哌齐、美金刚等虽然可以一定程度的减轻认知障碍等症状，但都无法真正抑制、逆转病情进展[3]。地黄饮子作为经典的中药方剂之一，具有补肾填精、化痰开窍的功效，切中AD的中医病机。有临床研究显示，地黄饮子能够改善AD患者学习记忆及认知功能障碍[4]，但其具体作用机制仍不十分清楚。本研究通过网络药理学探讨地黄饮子防治AD的潜在机制，并结合整体动物实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 地黄饮子有效成分搜集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP，https://tcmspw.com/)搜集熟地黄、山茱萸、巴戟天、肉苁蓉、肉桂、五味子、附子、茯苓、石菖蒲、生姜、大枣、薄荷的化学成分，根据药代动力学相关信息筛选有效成分。设置条件为口服生物利用度(OB)≥30%，类药性(DL)≥0.18，血脑屏障(BBB)≥-0.3[5]；TCMSP中未包含的中药远志、石斛、麦冬则通过HERB数据平台(http://herb.ac.cn/)进行化学成分搜集，利用pkCSM数据平台(http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/)对成分进行分析，收集BBB≥-1并且满足Lipinski's法则(LR)中至少4项的作为有效成分[6]；此外，通过文献检索纳入部分不符合上述筛选条件但有文献报道具有抗AD活性的有效成分。

1.2 有效成分靶点预测与疾病靶点获取 通过TCMSP、SwissTargetPrediction(http://www.swisstargetprediction.ch/)、STITCH(http://stitch.embl.de/)获取有效成分潜在靶点。其中SwissTargetPrediction数据库

中选取概率值≥0.5的预测靶点，STITCH数据库中选取置信分数≥0.7的预测靶点。利用Therapeutic Target Database(TTD，http://db.idrblab.net/ttd/)、GeneCards(https://www.genecards.org/)、DisGeNET(https://www.disgenet.org/)3个数据库以“Alzheimer's disease”为关键词获取AD相关靶点。其中DisGeNET数据库选取score≥0.3的靶点，GeneCards数据库选择score≥20的靶点。

1.3 网络构建与拓扑分析 将地黄饮子和AD相关靶点导入bioinformatics在线工具(http://www.bioinformatics.com.cn/)Venn图模块，获取交集靶点。利用Cytoscape 3.7.1软件构建“中药-成分-靶点”网络，CytoNCA功能模块对网络进行拓扑分析。网络中的节点代表化学成分、靶点或者中药，边表示它们之间的连接，“Degree”用来计算连接到每个节点的边的数量，“Degree”值越高表示给定节点在网络中越重要[7]。

1.4 GO及KEGG通路富集分析 利用Metascape在线工具对关键靶点进行GO和KEGG通路富集分析，并利用bioinformatics将结果可视化，P值＜0.05的富集条目具有显著统计学差异。

1.5 实验验证

1.5.1 实验动物 8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠40只，体质量(22±2)g，均购自上海灵畅生物科技有限公司，实验动物[许可证号：SYXK(沪)2018-0027]饲养于标准条件下[室温控制在(24±2)℃，12 h黑暗/光照]，可自由进食和饮水。实验通过上海交通大学医学院伦理审批(A-2021-019)。

1.5.2 药物及制备 地黄饮子处方：熟地黄18 g，山茱萸、巴戟天、肉苁蓉、石斛各9 g，附子、五味子、肉桂、茯苓、麦冬、石菖蒲、远志各6 g，薄荷2 g，生姜5片，大枣1枚。按处方剂量称取药材加入8倍体积的水，砂锅中浸泡12 h，大火煮沸，转文火0.5 h；重复煎煮1次，合并药液，过滤、浓缩至1.32 g/mL，4 ℃保存备用。中药饮片均购自上海康桥中药饮片有限公司。

1.5.3 试剂与仪器 小鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、小鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司，批号：EK282、EK206)；乙酰胆碱酯酶(AChE)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：E-EL-M2637c)；核因子κB(NF-κB)、磷酸化核因子κB(p-NF-κB)(Cell Signaling Technology公司，批号：3033S、8242S)；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体(碧云天生物技术有限公司，批号：A0208)；氢溴酸东莨菪碱(批号：xw080081)，购自国药集团化学试剂有限公司。Y迷宫设备购自张家港市生物医学仪器厂，新物体识别设备、水迷宫设备购自上海移数信息科技有限公司。

1.5.4 动物分组与给药 实验将小鼠随机分为4组，每组10只。分别为对照组、模型组、地黄饮子低剂量(6 g/kg)组和高剂量组(12 g/kg)。地黄饮子的剂量根据临床等效剂量进行换算[8]。小鼠适应环境5 d后，地黄饮子低、高剂量组分别按照6 g/kg和12 g/kg灌胃24 d(直到行为学实验结束)，对照组和模型组同时灌胃等量0.9 %氯化钠溶液。在中药灌胃14 d后，模型组和地黄饮子低、高剂量组按照3 mg/kg腹腔注射剂量东莨菪碱，对照组腹腔注射等量0.9%氯化钠溶液，30 min后进行行为学实验[9]。

1.5.5 Y迷宫实验 用Y迷宫观察小鼠自发交替行为，不设置奖励或惩罚，评估小鼠短期空间工作记忆[10]。迷宫架分为3个臂(30 cm×8 cm×15 cm)，夹角为120°。将小鼠随机置于1个臂，进入每1个臂且不同于前2个臂则标记为正确选择(例：A-B-C或A-C-B)，否则标记为错误选择。自发交替行为=正确进臂次数/(总进臂次数-2)×100%。

1.5.6 新物体识别实验 Y迷宫实验结束后第2天进行新物体识别实验，评估小鼠对新旧物体的识别记忆能力[11]。第1天适应阶段，小鼠在实验箱中自由活动5 min。第2天熟悉阶段，在箱底部一条对角线上间隔相同距离放置2个相同物体，小鼠面朝实验箱壁放入，自由活动5 min，期间记录小鼠对2个物体的探索次数。第3天测试阶段，用1个新物体替换旧物体，同样方法放入箱体并自由探索5 min，记录小鼠分别对两物体的探索次数。识别指数(RI)=探索新物体次数/(探索新物体次数+探索旧物体次数)×100%。

1.5.7 Morris水迷宫实验 新物体识别实验结束后第2天进行水迷宫实验，评估小鼠学习和空间记忆能力[12]。水迷宫系统由摄像记录设备和圆形水池组成。水面分为4个象限，平台置于第Ⅱ象限水下1 cm，依次从第Ⅰ～Ⅳ象限放入小鼠。定位航行阶

段，记录 60 s 内小鼠寻找平台所需时间，即逃避潜伏期，每天每个象限各训练 1 次。第 6 天撤掉平台进行空间探索实验，记录 60 s 内小鼠在目标象限停留时间。

1.5.8　ELISA 检测 AChE 及相关促炎细胞因子水平　行为学实验全部结束，处死小鼠。将小鼠海马组织匀浆于混有 PMSF 的 4 ℃预冷的 PBS 中(质量∶体积=1∶9)，12 000 r/min 离心 15 min 后取上清，按照 ELISA 试剂盒说明检测 AChE、IL-6、TNF-α 的水平。

1.5.9　Western Blot 检测 NF-κB、p-NF-κB 蛋白表达　将小鼠海马组织匀浆于含有 PMSF 和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液中，离心后取上清，BCA 法测定蛋白浓度。将等量的蛋白在 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离，将蛋白转移到 PVDF 膜(Millipore)上，快速封闭液封闭 1 h 后加入 NF-κB 和一抗(1∶1 000，CST)4 ℃孵育过夜，洗膜 3 次，每次 10 min，二抗室温孵育 2 h，采用 ECL 化学发光剂显影，Image Studio Lite 软件对蛋白条带进行灰度值分析并定量。

1.6　统计学方法　使用 GraphPad Prism 8.0.2 版本对上述实验结果进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据符合正态分布并通过方差检验后，使用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Bonferroni 检验进行多组间比较。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　地黄饮子有效成分及靶点信息　见图 1。利用 TCMSP、HERB 数据平台筛选有效成分。剔除未获得潜在靶点的成分后剩余 89 个有效成分，文献检索补充 50 个有效成分，共获得地黄饮子有效成分 139 个。结合 TCMSP、SwissTargetPrediction 和 STITCH 数据平台获得上述有效成分对应的 832 个潜在靶点。从 TTD、DisGeNET、GeneCards 数据平台共获取 570 个 AD 相关靶点，取地黄饮子与 AD 共有靶点 197 个，即地黄饮子防治 AD 的潜在靶点。

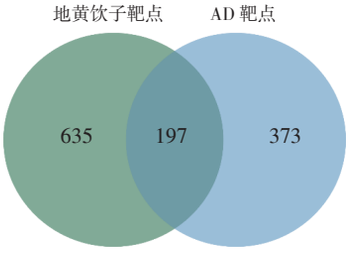
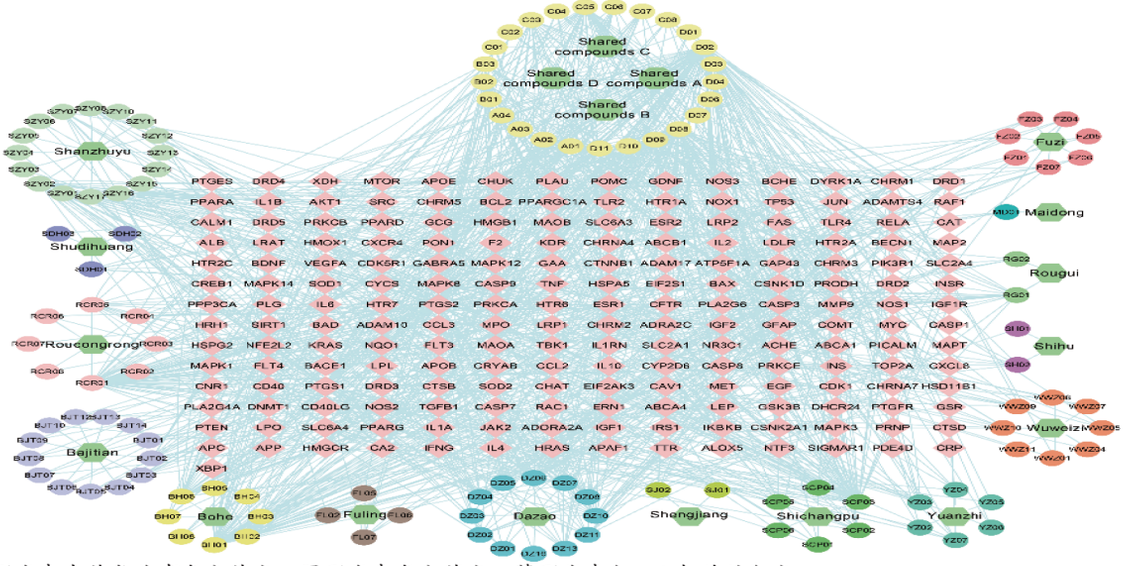


图 1　地黄饮子与 AD 共有靶点 Venn 图

2.2　共有靶点的网络构建与分析　见图 2、表 1。利用 Cytoscape 3.7.1 构建“中药-成分-靶点”网络，该网络共包含 339 个节点，涉及 1 336 条边，其中 123 个中药化学成分节点连接了 197 个 AD 相关靶点。利用网络拓扑分析上述网络节点之间的联系，根据中位数度值进行限定，获得 61 个地黄饮子防治 AD 的关键有效成分，展示其中度值最高的前 20 个成分。对关键有效成分对应靶点进行中位数度值限定，获得度值最高的前 106 个靶点，作为地黄饮子防治 AD 的关键靶点。



注：五边形代表中药或共有成分节点，圆形代表成分节点，菱形代表与 AD 相关的靶点

图 2　地黄饮子防治 AD 的中药-成分-靶点网络

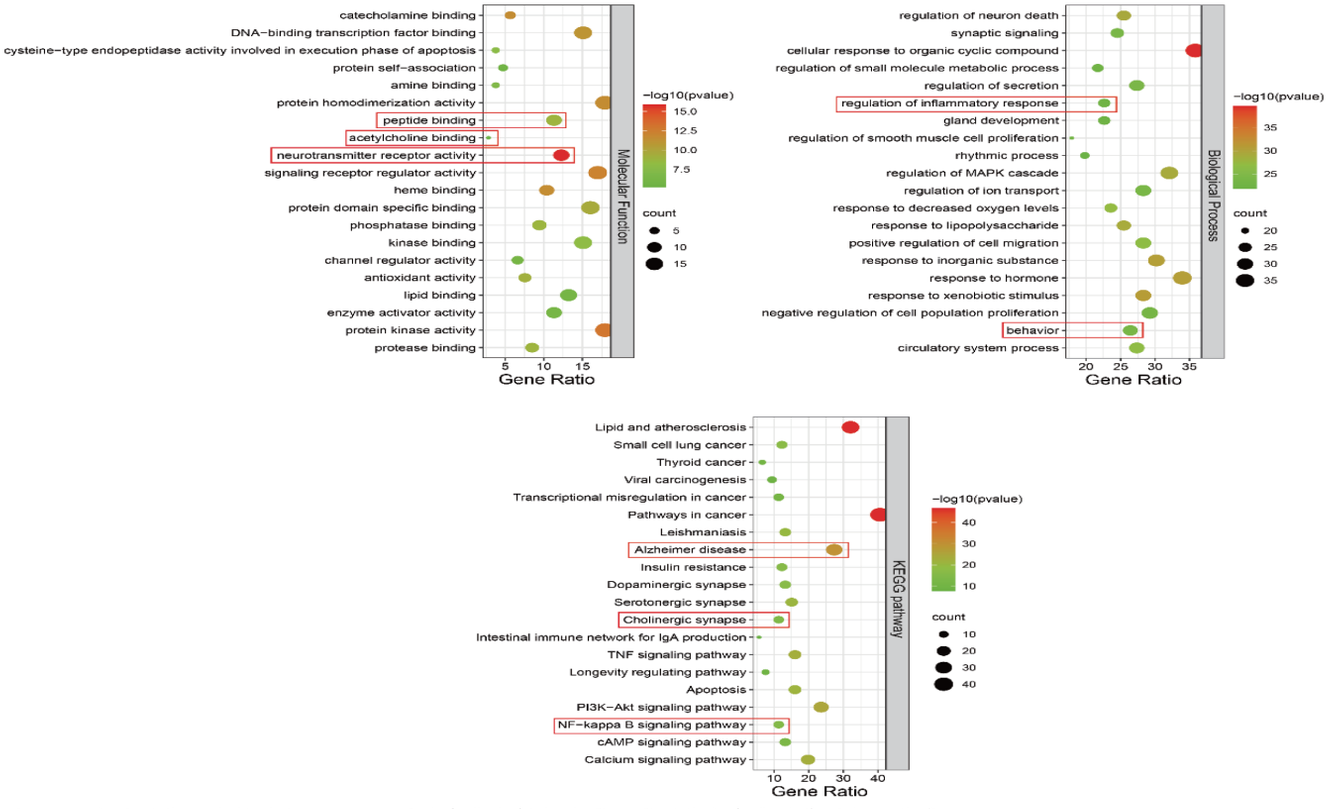
表 1　地黄饮子关键有效成分 TOP 20

化合物	OB(%)	DL	Degree	来源
槲皮素	46.43	0.28	105	肉苁蓉、大枣
芹菜素	23.06	0.21	68	石菖蒲、薄荷
染料木素	17.93	0.21	66	肉苁蓉
木犀草素	36.16	0.25	59	薄荷
山柰酚	41.88	0.24	57	石菖蒲
大黄素	24.40	0.24	37	石菖蒲、薄荷
熊果酸	16.77	0.75	34	山茱萸、大枣、薄荷
黄连素	36.86	0.78	32	大枣
柚皮素	59.29	0.21	29	薄荷
左旋千金藤啶碱	33.11	0.54	24	大枣
β-谷甾醇	36.91	0.75	23	巴戟天、山茱萸、肉苁蓉、生姜、大枣
丁香酚	56.24	0.04	22	肉苁蓉、肉桂、生姜
荷叶碱	34.43	0.40	22	大枣
亚麻油酸	41.90	0.14	21	山茱萸
咖啡酸	25.76	0.05	20	巴戟天、山茱萸、石菖蒲、薄荷
反式肉桂醛	31.99	0.02	18	肉桂
视黄醇	19.53	0.16	18	山茱萸
没食子酸	31.69	0.04	18	山茱萸
芦荟大黄素	83.38	0.24	17	薄荷
花生四烯酸	45.57	0.20	17	肉苁蓉

2.3　地黄饮子防治 AD 关键靶点 GO 及 KEGG 通路富集分析　见图 3。GO 分子功能富集分析结果显示，关键靶点与肽结合(淀粉样蛋白)、胆碱能结合、神经递质受体的活动等有关；GO 生物过程富集分析结果表明，这些靶点主要与炎症反应的调节、行为活动调控等相关。KEGG 通路富集分析结果发现，关键靶点主要富集在 AD、胆碱能突触、NF-κB 等与 AD 相关的信号通路中，其中胆碱突触通路富集靶点有 AChE、CHRNA7 等；NF-κB 通路富集的靶点有 TNF、RELA 等。

2.4　地黄饮子对 AD 小鼠短期空间工作记忆的影响　见表 2。Y 迷宫实验结果显示，模型组较对照组小鼠迷宫臂的正确选择次数降低($P<0.05$)，地黄饮子低剂量和高剂量能够增加 AD 模型小鼠的正确交替行为($P<0.05$)。提示地黄饮子可以改善小鼠短期空间工作记忆能力。

2.5　地黄饮子对 AD 小鼠识别记忆的影响　见表 3。熟悉阶段各组小鼠对 2 个相同物体的识别指数约 50%，组间无显著差异，提示各组小鼠对 2 个相同物体的位置及环境无选择性偏好。新物体识别测试阶



注：GO 分子功能、生物进程、KEGG 通路富集分析气泡图，圆形越大富集的基因数目越多

图 3　地黄饮子防治 AD 关键靶点富集分析

段，模型组小鼠对新物体识别能力下降（$P<0.05$）；与模型组比较，地黄饮子低剂量和高剂量组给药后小鼠对新物体识别指数均升高（$P<0.05$）。表明地黄饮子能够一定程度改善 AD 模型小鼠对新物体和旧物体的识别记忆能力，恢复小鼠对新物体的正常偏好。

表 2　地黄饮子对 AD 小鼠短期空间工作记忆的影响（$\bar{x}\pm s$）

组　别	鼠数	自发交替行为（%）
对照组	10	63.6 ± 4.3
模型组	10	53.3 ± 6.8①
地黄饮子低剂量组	10	60.8 ± 5.5②
地黄饮子高剂量组	10	65.6 ± 5.4②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

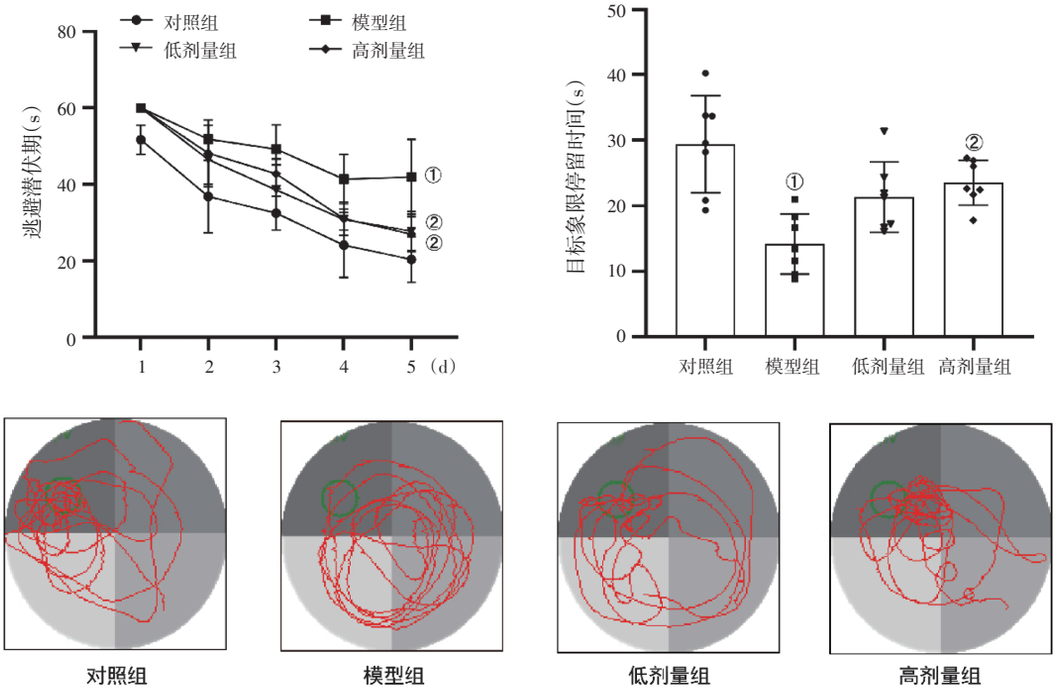
表 3　地黄饮子对 AD 小鼠识别记忆的影响（$\bar{x}\pm s$）　%

组　别	鼠数	熟悉阶段 RI	测试阶段 RI
对照组	10	50.6 ± 3.9	62.3 ± 8.1
模型组	10	52.9 ± 5.8	50.4 ± 5.1①
地黄饮子低剂量组	10	54.3 ± 4.5	57.1 ± 3.7②
地黄饮子高剂量组	10	50.5 ± 4.9	60.1 ± 4.5②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

2.6　地黄饮子对 AD 小鼠学习及空间记忆能力的影响　见图 4。在 5 d 的定位航行训练过程中，各组小鼠找到平台的逃避潜伏期逐渐缩短；第 5 天，模型组小鼠的逃避潜伏期相较于对照组增加（$P<0.05$），与模型组相比，地黄饮子低、高剂量组的逃避潜伏期缩短（$P<0.05$）；空间探索阶段，模型组小鼠与对照组小鼠相比目标象限活动时间减少（$P<0.05$），地黄饮子高剂量组小鼠目标象限停留时间增加（$P<0.05$）。以上结果表明，地黄饮子可以改善 AD 模型小鼠学习和空间记忆能力。

2.7　各组小鼠海马组织中 AChE 及促炎细胞因子比较　见表 4。ELISA 检测结果显示，模型组 AChE 的水平高于对照组（$P<0.05$），地黄饮子低、高剂量组 AChE 的水平低于模型组（$P<0.05$）。模型组 IL-6、TNF-α 水平高于对照组（$P<0.05$），地黄饮子高剂量组 IL-6 水平低于模型组（$P<0.05$），低、高剂量组 TNF-α 水平低于模型组（$P<0.05$）。提示“胆碱能抗炎途径”可能与地黄饮子改善小鼠认知功能障碍有关。



注：Morris 水迷宫定位航行阶段小鼠逃避潜伏期，空间探索阶段小鼠目标象限停留时间与游泳路线轨迹。①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

图 4　地黄饮子对 AD 小鼠学习及空间记忆能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=7）

表4 各组小鼠海马组织中AChE及促炎细胞因子比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠数	AChE(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
对照组	6	2.56±0.38	36.71±2.71	31.81±2.53
模型组	6	3.25±0.28①	46.57±4.24①	38.37±3.38①
地黄饮子低剂量组	6	2.75±0.32②	40.90±5.56	33.86±2.28②
地黄饮子高剂量组	6	2.68±0.28②	38.84±2.27②	33.45±2.33②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

2.8 各组小鼠海马组织中磷酸化NF-κB蛋白表达比较 见图5、表5。Western Blot检测结果表明，模型组p-NF-κB蛋白表达高于对照组($P<0.05$)。低、高剂量地黄饮子均可以降低p-NF-κB蛋白的表达($P<0.05$)。

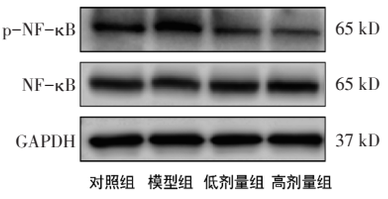


图5 各组小鼠海马组织中NF-κB及其磷酸化蛋白表达

表5 各组小鼠海马组织中磷酸化NF-κB蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	鼠数	p-NF-κB/NF-κB
对照组	3	1.04±0.12
模型组	3	1.91±0.42①
地黄饮子低剂量组	3	0.91±0.36②
地黄饮子高剂量组	3	0.72±0.19②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

3 讨论

本研究基于网络药理学分析发现地黄饮子防治AD有效成分中度值较高的包括槲皮素、芹菜素、染料木素、反式肉桂醛等。有研究表明，槲皮素具有神经保护作用，包括抑制AChE和BChE活性，减轻胆碱能系统功能障碍[13]。芹菜素、染料木素能够调节胆碱能系统，对α7烟碱乙酰胆碱受体(α7nAChR)具有正向变构调节的作用，抑制TFN-α、IL-6的产生[14-15]。反式肉桂醛是肉桂中的一种醛类有机化合物，Zhao Y等[16]发现其可以阻断NF-κB的激活，抑制神经炎症反应，改善早老素1和2条件双敲除(PS cDKO)小鼠认知功能障碍。GO和KEGG通路富集分析表明，地黄饮子防治AD的关键靶点参与肽结合(淀粉样蛋白)、胆碱能结合、炎症反应调节、行为活动调控等；AChE、CHRNA7、RELA、TNF等关键靶点富集于胆碱能突触、NF-κB等与AD相关的信号通路中。提示地黄饮子防治AD的作用与调控胆碱能和神经炎症途径有关。

东莨菪碱是一种公认的抗胆碱能药物，常被用作诱发动物认知障碍的实验标准药物[17]。本研究借助东莨菪碱诱导小鼠AD模型，通过行为学实验发现地黄饮子可以有效改善小鼠的认知功能障碍。胆碱能突触普遍存在于人类的中枢神经系统，胆碱能传递在学习记忆和其他高级大脑功能中发挥着重要的作用。有研究表明，配体门控的α7烟碱乙酰胆碱受体(α7nAChR)是炎症反应的效应点，参与突触功能、神经保护、神经元存活和炎症反应的调节[18]。迷走神经通过主要的神经递质乙酰胆碱(Ach)调节α7nAChR在炎症细胞中的激活减弱TNF-α、IL-6等促炎细胞因子的释放，这种效应被称为“胆碱能抗炎途径”[19-20]。存在于胆碱能突触间的AChE是生物神经传导中的一种关键性酶，可将ACh水解成胆碱和乙酸。一旦胆碱能系统功能障碍，AChE与ACh之间平衡被打破，“胆碱能抗炎途径”将遭到破坏。而胆碱酯酶抑制剂可以抑制AChE，防止ACh的分解，进而保护胆碱能突触的活性[21]。本研究发现，地黄饮子能够显著降低东莨菪碱AD模型小鼠海马组织中异常升高的AChE水平，可能恢复“胆碱能抗炎途径”。

胆碱能抗炎途径能够通过影响促炎细胞因子的产生与释放，以及抑制NF-κB的活化发挥作用。NF-κB是细胞内重要的核转录因子，能够引起胶质细胞激活，增加炎症介质的释放并进一步诱发神经炎症[22]。有研究表明，NF-κB通路参与神经炎症的调控，与认知功能的损伤有关[23]。本研究中发现，地黄饮子可以降低AD小鼠海马组织中IL-6、TNF-α水平以及p-NF-κB蛋白的表达水平，提示地黄饮子可能通过抑制NF-κB蛋白的磷酸化进而抑制神经炎症反应。

综上，本研究通过网络药理分析结合动物实验验证发现，地黄饮子可以改善东莨菪碱AD模型小鼠的认知功能障碍，其作用机制可能是通过抑制小鼠海马AChE的水平，减轻胆碱能损伤，抑制NF-κB介导的神经炎症，恢复“胆碱能抗炎途径”，从而改善小鼠认知功能障碍。

[参考文献]

[1] LIU Q，WANG S C，DING K. Research advances in the treatment

of Alzheimer's disease with polysaccharides from traditional Chinese medicine[J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(9): 641-652.

[2] LIU P P, XIE Y, MENG X Y, et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease[J]. Signal Transduct Target Ther, 2019, 4: 29.

[3] VAZ M, SILVESTRE S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 887: 173554.

[4] 张丽, 汪园园, 周静波, 等. 地黄饮子干预阿尔茨海默病患者的疗效观察及作用机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 4948-4952.

[5] YUE S J, LIU J, FENG W W, et al. System Pharmacology-Based Dissection of the Synergistic Mechanism of Huangqi and Huanglian for Diabetes Mellitus[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 694.

[6] NGO F Y, WANG W, CHEN Q, et al. Network Pharmacology Analysis and Molecular Characterization of the Herbal Medicine Formulation Qi-Fu-Yin for the Inhibition of the Neuroinflammatory Biomarker iNOS in Microglial BV-2 Cells: Implication for the Treatment of Alzheimer's Disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 5780703.

[7] LUO Y, LI D, LIAO Y, et al. Systems Pharmacology Approach to Investigate the Mechanism of Kai-Xin-San in Alzheimer's Disease[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 381.

[8] HU R, YIN C L, WU N, et al. Traditional Chinese herb Dihuang Yinzi (DY) plays neuroprotective and anti-dementia role in rats of ischemic brain injury[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(3): 444-450.

[9] JIN X, WANG M, SHENTU J, et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity and beta-amyloid oligomer formation by 6-bromotryptamine A, a multi-target anti-Alzheimer's molecule[J]. Oncol Lett, 2020, 19(2): 1593-1601.

[10] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1916: 105-111.

[11] ANTUNES M, BIALA G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[J]. Cogn Process, 2012, 13(2): 93-110.

[12] D'HOOGE R, DE DERN P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2001, 36(1): 60-90.

[13] KHAN H, ULLAH H, ASCHNER M, et al. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease[J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 59.

[14] SHABBIR W, YANG K S, SADEK B, et al. Apigenin and Structurally Related Flavonoids Allosterically Potentiate the Function of Human alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in SH-EP1 Cells[J]. Cells, 2021, 10(5): 1110.

[15] GUO J, YANG G, HE Y, et al. Involvement of alpha7nAChR in the Protective Effects of Genistein Against beta-Amyloid-Induced Oxidative Stress in Neurons via a PI3K/Akt/Nrf2 Pathway-Related Mechanism[J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(2): 377-393.

[16] ZHAO Y, DENG H, LI K, et al. Trans-cinnamaldehyde improves neuroinflammation-mediated NMDA receptor dysfunction and memory deficits through blocking NF-kappaB pathway in presenilin1/2 conditional double knockout mice[J]. Brain Behav Immun, 2019, 82: 45-62.

[17] MORE S V, KUMAR H, CHO D Y, et al. Toxin-Induced Experimental Models of Learning and Memory Impairment[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1447.

[18] SINKUS M L, GRAW S, FREEDMAN R, et al. The human CHRNA7 and CHRFAM7A genes: A review of the genetics, regulation, and function[J]. Neuropharmacology, 2015, 96 (Pt B): 274-288.

[19] TRACEY K J. The inflammatory reflex[J]. Nature, 2002, 420(6917): 853-859.

[20] VAN MAANEN M A, VERVOORDELDONK M J, TAK P P. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(4): 229-232.

[21] FERREIRA-VIEIRA T H, GUIMARAES I M, SILVA F R, et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System[J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(1): 101-115.

[22] MAQBOOL A, LATTKE M, WIRTH T, et al. Sustained, neuron-specific IKK/NF-kappaB activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging[J]. Mol Neurodegener, 2013, 8: 40.

[23] MUHAMMAD T, ALI T, IKRAM M, et al. Melatonin Rescue Oxidative Stress-Mediated Neuroinflammation/Neurodegeneration and Memory Impairment in Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2019, 14(2): 278-294.

(责任编辑：吴凌，李海霞)