

- [3] Sobel J D. Recurrent vulvovaginal candidiasis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214(1): 15-21.
- [4] Bradshaw C S, Vodstrcil L A, Hocking J S, et al. Recurrence of bacterial vaginosis is significantly associated with posttreatment [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 56(6): 777-786.
- [5] 朱红梅, 温海, 李斌. 外用抗真菌中草药的研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(5): 316-320.
- [6] 曲芯瑶, 李珊山, 曲悦, 等. 10种中药单体对球形孢子丝菌的体外抗真菌作用研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2020, 15(3): 145-149.
- [7] 梅龙, 林蓉, 卢朝辉. 红核妇洁洗液体外抗菌实验研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2014, 15(2): 145-147.
- [8] 谭梅珍, 唐丽萍. 洁尔阴洗液外用治疗滴虫性阴道炎的临床观察 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(6): 144-145.
- [9] Wu H, Teng C, Liu B, et al. Characterization and long term antimicrobial activity of the nisin anchored cellulose films [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 487-493.
- [10] Qu P, Gao W, Chen H, et al. The central hinge link truncation of the antimicrobial peptide fowlicidin-3 enhances its cell selectivity without antibacterial activity loss [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(5): 2798-2806.
- [11] Ma L, Xie X, Liu H, et al. Potent antibacterial activity of MSI-1 derived from the magainin 2 peptide against drug-resistant bacteria [J]. *Theranostics*, 2020, 10(3): 1373-1390.
- [12] Ma L, Wang Y, Wang M, et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-14, derived from a cathelin-like domain, against penicillin-resistant bacteria [J]. *Biomaterials*, 2016, 87: 32-45.
- [13] Wang J, Li B, Li Y, et al. BF-30 effectively inhibits ciprofloxacin-resistant bacteria *in vitro* and in a rat model of vaginosis [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(7): 927-936.
- [14] Xiang N, Yin T, Chen T. *Gardnerella vaginalis* induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophages and THP-1 monocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1174.
- [15] Redelinghuys M J, Geldenhuys J, Jung H, et al. Bacterial vaginosis: current diagnostic avenues and future opportunities [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 354.
- [16] Denning D W, Kneale M, Sobel J D, et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): e339-e347.
- [17] Ficker C E, Smith M L, Susiarti S, et al. Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 85(2-3): 289-293.
- [18] Darvishi E, Omid M, Bushehri A A, et al. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76028.
- [19] Wen L, Xia N, Chen X, et al. Activity of antibacterial, antiviral, anti-inflammatory in compounds andrographolide salt [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 421-427.
- [20] 岳红霞. 妊娠期阴道内环境改变与霉菌性阴道炎的相关性分析 [J]. 首都食品与医药, 2019, 26(10): 19.

乙酰紫草素对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及周期的影响

李亚威¹, 穆立芹¹, 刘世君², 王娜¹, 谢磊^{1*}

(1. 河北医科大学第一医院妇科, 河北石家庄 050000; 2. 河北省高邑县医院检验科, 河北高邑 051330)

摘要: 目的 探讨乙酰紫草素对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及周期的影响。方法 将对数生长期 HeLa 细胞随机分为对照组及乙酰紫草素低、中、高剂量组, 分别给予 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰紫草素干预, MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡及周期, Western blot 法检测细胞 cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、Cyclin A、CDK2、p21 蛋白表达。结果 与对照组比较, 乙酰紫草素各剂量组 24、48、72 h 时细胞存活率均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 细胞凋亡率、 G_0/G_1 期细胞比例升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), S 期及 G_2/M 期细胞比例降低 ($P < 0.01$); 细胞 cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 Bcl-2、Cyclin A、CDK2 和 p21 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 乙酰紫草素具有抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的作用, 该作用与诱导细胞凋亡及周期阻滞有关。

关键词: 乙酰紫草素; 宫颈癌; 增殖; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-2028-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.048

收稿日期: 2021-10-13

作者简介: 李亚威 (1979—), 女, 副主任技师, 从事妇科肿瘤的诊断及治疗研究。E-mail: lywydy@163.com

* 通信作者: 谢磊 (1979—), 女, 副主任医师, 从事妇科肿瘤的诊断及治疗研究。Tel: 13833139256, E-mail: 41507427@qq.com

宫颈癌发病率仅次于乳腺癌，高居女性肿瘤患病第二位，对女性生命及健康危害严重^[1]。随着医疗技术的发展及癌症发病分子机制研究的深入，化放疗结合手术的治疗方案能够使宫颈癌患者的生存期有效延长并提高患者生活质量，但其5年生存率仍低于50%^[2]。因此，寻找新的宫颈癌治疗药物仍是当前关注的焦点^[3]。乙酰紫草素是我国传统中药紫草 *Lithospermum erythrorhizon* 的有效成分之一，具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、神经保护、抗糖尿病等多种作用^[4]。乙酰紫草素对 Hep-2、HT29 及 SKOV3 等多种肿瘤细胞均有抑制作用，然而其对入宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及机制研究未见报道^[5-7]。本研究主要探讨乙酰紫草素对入宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及周期的影响，以期为抗宫颈癌药物的开发奠定理论及实验基础。

1 材料

1.1 细胞株 人宫颈癌 HeLa 细胞株购自上海弘顺生物科技有限公司，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养。

1.2 试剂与药物 乙酰紫草素（纯度 ≥ 98%，批号 190816），购自上海吉至生化科技有限公司；DMEM 高糖培养基（批号 AD21573271），购自美国 Gibco 公司；溴化噻唑蓝四氮唑（MTT）检测试剂盒（批号 C0009S），购自上海碧云天生物技术有限公司；V 型膜联蛋白-异硫氰酸荧光素（Annexin V-FITC）/碘化丙啶（PI）检测试剂盒（批号 20190509），购自南京恩晶生物科技有限公司；兔抗人剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved caspase-3）、B 细胞淋巴瘤-2 蛋白（Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）、细胞周期蛋白 A（Cyclin A）、周期蛋白依赖性激酶 2（CDK2）、p21、β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号 190715、190826、191121、191024、190908、191220、190417），购自北京索莱宝科技有限公司；二喹啉甲酸（BCA）蛋白测定试剂盒、辣根过氧化物酶标记的二抗（批号 20191018、20190813），购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器 BB5060U 型 CO₂ 培养箱（德国 Hereaus 公司）；TS100 型显微镜（日本 Nikon 公司）；Filter MAX F5 型酶标仪（美国 Molecular Device 公司）；FACS Calibur 型流式分析仪（美国 BD 公司）；DYCZ-25D 型蛋白电泳及转印设备（北京六一生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 细胞分组及增殖能力检测 取对数生长期 HeLa 细胞，调整密度为 5×10⁴/mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μL，分为对照组及乙酰紫草素低、中、高剂量组，分别给予 0、5、10、20 μmol/L 乙酰紫草素干预，继续培养 24、48、72 h 后，每孔加入 MTT 溶液 20 μL，放入培养箱中继续培养 4 h，再加入二甲基亚砷 150 μL，室温下避光振荡 15 min，用酶标仪测定 492 nm 波长处光密度（OD）值。

2.2 细胞凋亡检测 细胞按“2.1”项下分组给药，培养 48 h 后离心收集细胞，用 PBS 漂洗 2 次，重悬后调整细胞密度为 1×10⁶/mL。取 0.5 mL 细胞悬液，先加入 5 μL Annexin V-FITC，再加入 5 μL PI，4℃ 避光孵育 10 min，充分混合后于 1 h 内用流式细胞分析仪检测细胞凋亡情况。

2.3 细胞周期检测 细胞按“2.1”项下分组给药，培养 48 h 后离心收集细胞，用 PBS 漂洗 2 次，加入 75% 乙醇于 -20℃ 冰箱中固定 1 h。再次离心收集细胞，用 PBS 漂洗 2 次，加入 RNase 溶解酶 5 μL，37℃ 下放置 1 h，加入 PI 染液避光孵育 0.5 h，用流式细胞分析仪测定细胞周期。

2.4 Western blot 法检测细胞凋亡与周期相关蛋白表达 细胞按“2.1”项下分组给药，培养 48 h 后离心收集细胞，超声破碎处理后提取总蛋白，并用 BCA 法定量，蛋白煮沸 10 min 进行变性。蛋白经凝胶电泳、转膜、封闭后，加入 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、Cyclin A、CDK2、p21、β-actin 多克隆抗体（1:1 000）孵育过夜，次日洗膜后孵育二抗，增强化学发光法（ECL）显色后，Image J 软件分析目的条带灰度值。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 乙酰紫草素对 HeLa 细胞增殖的影响 如表 1 所示，与对照组比较，随着作用时间的延长及乙酰紫草素浓度的升高，HeLa 细胞存活率逐渐降低，除乙酰紫草素低剂量组作用 24 h 时细胞存活率无明显变化外 (*P* > 0.05)，其余各剂量组在 24、48、72 h 时细胞存活率均降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。以上结果表明，乙酰紫草素具有抑制入宫颈癌 HeLa 细胞增殖的作用。

表 1 乙酰紫草素对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照组	0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.00
乙酰紫草素低剂量组	5	92.09 ± 10.67	88.12 ± 8.57*	76.70 ± 7.56**
乙酰紫草素中剂量组	10	87.53 ± 8.85*	65.93 ± 8.32**	52.48 ± 5.07**
乙酰紫草素高剂量组	20	72.36 ± 9.02**	57.35 ± 6.94**	43.82 ± 6.41**

注：与对照组比较，* *P* < 0.05，** *P* < 0.01。

3.2 乙酰紫草素对 HeLa 细胞凋亡率的影响 如图 1、表 2 所示，与对照组比较，乙酰紫草素各剂量组细胞凋亡率均升高 (*P* < 0.01)，表明乙酰紫草素可以诱导入宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡。

3.3 乙酰紫草素对 HeLa 细胞 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 如图 2、表 3 所示，与对照组比较，乙酰紫草素各剂量组细胞 cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达升高 (*P* < 0.01)，而 Bcl-2 蛋白表达降低 (*P* < 0.05,

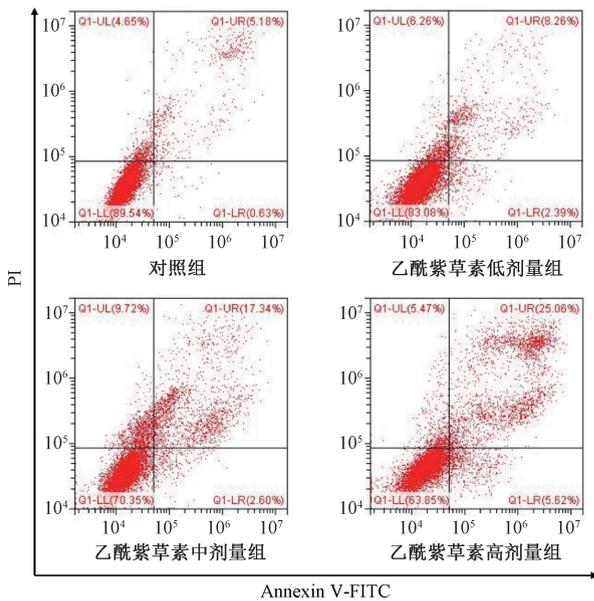


图1 各组 HeLa 细胞凋亡情况

$P < 0.01$), 进一步表明乙酰紫草素可以促进人宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡。

表3 乙酰紫草素对 HeLa 细胞 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	cleaved caspase-3	Bax	Bcl-2
对照组	0	0.15 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02	0.84 \pm 0.15
乙酰紫草素低剂量组	5	0.21 \pm 0.03**	0.25 \pm 0.04**	0.75 \pm 0.10*
乙酰紫草素中剂量组	10	0.44 \pm 0.06**	0.49 \pm 0.05**	0.56 \pm 0.08**
乙酰紫草素高剂量组	20	0.53 \pm 0.08**	0.60 \pm 0.07**	0.41 \pm 0.06**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

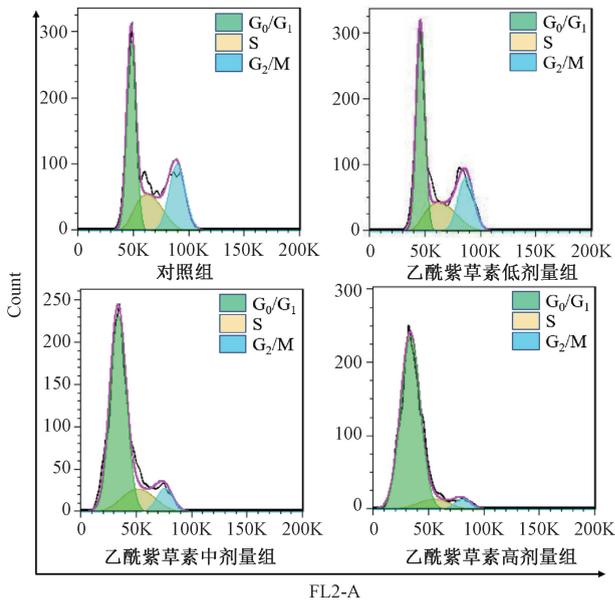


图3 各组 HeLa 细胞周期分布

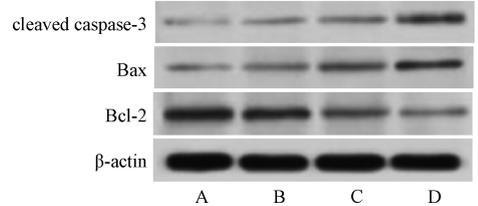
使 HeLa 细胞阻滞在 G_0/G_1 期。

3.5 乙酰紫草素对 HeLa 细胞 Cyclin A、CDK2 和 p21 蛋白表达的影响 如图4、表5所示, 与对照组比较, 乙酰紫草素各剂量组细胞 Cyclin A、CDK2、p21 蛋白表达均呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表2 乙酰紫草素对 HeLa 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照组	0	5.72 \pm 0.84
乙酰紫草素低剂量组	5	10.30 \pm 1.22**
乙酰紫草素中剂量组	10	21.08 \pm 2.61**
乙酰紫草素高剂量组	20	32.15 \pm 4.19**

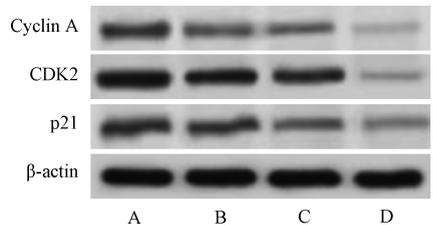
注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。



注: A~D 为对照组, 乙酰紫草素低、中、高剂量组。

图2 各组 HeLa 细胞 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白条带图

3.4 乙酰紫草素对 HeLa 细胞周期的影响 如图3、表4所示, 与对照组比较, 乙酰紫草素各剂量组 G_0/G_1 期细胞比例呈剂量依赖性升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), S 期及 G_2/M 期细胞比例降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明乙酰紫草素可以



注: A~D 为对照组, 乙酰紫草素低、中、高剂量组。

图4 各组 HeLa 细胞 Cyclin A、CDK2 和 p21 蛋白条带图

4 讨论

细胞增殖能力检测是评估抗肿瘤药物药效的最基本方法^[8]。本研究发现, 乙酰紫草素可以有效抑制 HeLa 细胞的增殖, 且该作用具有剂量及时间依赖性。Zeng 等^[9]报道, 乙酰紫草素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性。此外, Cho 等^[10]也观察到, 乙酰紫草素对人胰腺癌 PAN-1 细胞生长有明显的抑制作用。这些研究表明, 乙酰紫草素可以在体外对多种肿瘤细胞的生长与增殖产生抑制作用, 提示其具有良好的抗肿瘤活性。

肿瘤细胞凋亡是一种精确的程序化、主动性的细胞死亡过程, 受多种基因调控, 而诱导凋亡是抗肿瘤药物研发的重要途径^[11]。诱导凋亡蛋白 Bax 和抑制凋亡蛋白 Bcl-2 在调控肿瘤细胞增殖及凋亡进程中具有重要作用, Bax 表达

表4 乙酰紫草素对 HeLa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	0	44.26±3.19	25.93±2.12	28.62±2.04
乙酰紫草素低剂量组	5	49.08±4.38*	22.74±3.67*	25.11±4.61*
乙酰紫草素中剂量组	10	72.89±3.62**	17.28±2.34**	8.57±0.63**
乙酰紫草素高剂量组	20	85.23±5.35**	8.76±0.70**	5.65±0.87**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表5 乙酰紫草素对 HeLa 细胞 Cyclin A、CDK2 和 p21 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Cyclin A	CDK2	p21
对照组	0	0.77±0.10	1.21±0.14	0.72±0.12
乙酰紫草素低剂量组	5	0.58±0.08**	0.84±0.11**	0.64±0.07*
乙酰紫草素中剂量组	10	0.43±0.05**	0.70±0.09**	0.46±0.06**
乙酰紫草素高剂量组	20	0.11±0.03**	0.15±0.02**	0.23±0.04**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

量减少、Bcl-2 表达量增加可以阻断肿瘤细胞凋亡进程,进而导致增殖异常的发生;反之,则可以有效诱导肿瘤细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用^[12]。在细胞凋亡过程中,caspase-3 是关键的执行蛋白分子,多种植物有效成分均可通过促进 caspase-3 表达,诱导肿瘤细胞凋亡^[13-14]。本研究发现,乙酰紫草素可以诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡,上调 cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达。

细胞周期的正常调控对细胞的凋亡、分化、再生和衰老均具有重要意义^[15]。细胞周期异常是多数肿瘤细胞的特征,通过阻滞肿瘤细胞周期来发挥抗肿瘤作用也是多数抗肿瘤药物的作用机制^[16-17]。细胞周期主要包括 G₀/G₁、S、G₂/M 等 3 个基本调控点,其中 Cyclin A、CDK2、p21 等蛋白在调控肿瘤细胞周期进程中具有重要作用^[18]。本研究发现,乙酰紫草素可以使人宫颈癌 HeLa 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,能够降低 Cyclin A、CDK2、p21 等周期相关蛋白表达。

综上所述,乙酰紫草素具有抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的作用,该作用与诱导凋亡及细胞周期阻滞有关,但乙酰紫草素抑制 HeLa 细胞增殖的分子机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] 魏丽惠. 面向加速消除宫颈癌的挑战[J]. 中国妇产科临床杂志, 2021, 22(1): 1-2.

[2] Kilic C, Yuksel D, Cakir C, et al. Pulmonary recurrence after radical hysterectomy for uterine cervical carcinoma[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2020, 40(8): 1155-1159.

[3] 黄 珊, 万 飞, 孙景环, 等. 白桦脂醇对宫颈癌裸小鼠移植瘤的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(23): 3930-3933.

[4] Zhang Z Q, Bai J, Zeng Y W, et al. Pharmacology, toxicity and pharmacokinetics of acetylshikonin: A review[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 950-958.

[5] 张 萍, 潘芳名, 肖洪彬. 乙酰紫草素对人喉癌 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 国际免疫学杂志, 2020, 43(4): 366-370.

[6] 赵景明, 李 惠, 李国峰. 乙酰紫草素联合奥沙利铂对人

结肠癌 HT29 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中成药, 2020, 42(4): 883-886.

[7] 何茂旭, 韩丽丽, 王 佩, 等. 乙酰紫草素诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(9): 1632-1633.

[8] 石妍妍, 周广舟, 李阿芳, 等. 姜黄素类似物抑制肿瘤细胞增殖的细胞学机制研究进展[J]. 生物技术, 2017, 27(2): 192-197.

[9] Zeng Y, Liu G, Zhou L M. Inhibitory effect of acetylshikonin on human gastric carcinoma cell line SGC-7901 *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(15): 1816-1820.

[10] Cho S C, Choi B Y. Acetylshikonin inhibits human pancreatic PANC-1 cancer cell proliferation by suppressing the NF- κ B activity[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2015, 23(5): 428-433.

[11] 王启海, 梁 枫, 张梦雨, 等. 短叶松素-3-乙酸钠对人神经胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12): 1394-1400.

[12] Sajedi N, Homayoun M, Mohammadi F, et al. Myricetin exerts its apoptotic effects on MCF-7 breast cancer cells through evoking the BRCA1-GADD45 pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21(12): 3461-3468.

[13] 王 剑, 张 轶, 刘月芬, 等. 加味四君子对宫颈癌大鼠模型癌组织中 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达的干预作用[J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 3118-3121.

[14] Nazeri M, Mirzaie-Asl A, Saidijam M, et al. Methanolic extract of *Artemisia absinthium* prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio, cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(11): 8831-8840.

[15] 赵耘佩, 徐 颢, 许桂莲, 等. 细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂与女性恶性肿瘤的研究进展[J]. 重庆医学, 2020, 49(8): 1354-1357.

[16] 李 萍, 姬白嫣, 魏 娟, 等. 藏红花素对人宫颈癌 HeLa 细胞活力、凋亡和细胞周期分布的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(35): 3886-3890; 3900.

[17] Stefanowicz-Hajduk J, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, et al. Bersaldegennin-1, 3, 5-orthoacetate induces caspase-

independent cell death, DNA damage and cell cycle arrest in human cervical cancer HeLa cells[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 54-65.

[18] 高 杨, 刘 岩, 丛力宁, 等. 去甲斑蝥素对人黑色素瘤 A375 细胞周期、活性氧自由基及细胞凋亡的影响[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(12): 1433-1437.

基于网络药理学及动物实验探讨还少丹治疗阿尔茨海默病的作用机制

苏运芳^{1,2}, 刘宁宁¹, 马金莲¹, 张紫娟³, 郝 莉³, 宋军营¹, 张振强^{1*}

(1. 河南中医药大学中医药科学院, 河南省中医药防治重大慢病工程研究中心, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450099; 3. 河南中医药大学医学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 目的 基于网络药理学及动物实验探讨还少丹治疗阿尔茨海默病(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)和中医药百科全书数据库(ETCM)预测还少丹有效成分及其对应的靶点;运用 Drugbank、DisGeNET、GeneCards 数据库筛选 AD 相关靶点;通过 Venny 在线工具绘制 Venn 图,获得 AD 与还少丹共有靶点;采用 Metascape 和 Omicshare Tools 进行 GO 和 KEGG 富集分析,筛选出还少丹主要作用途径和信号通路;通过 STRING 制作“还少丹有效活性成分-AD 靶点”的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图谱, Cytoscape 绘制关键靶点调控网络。采用侧脑室注射链脲佐菌素(STZ)诱导建立 AD 小鼠模型,行为学实验评价小鼠学习记忆和空间探索能力, HE 染色观察小鼠脑组织病理形态, Western blot 法检测小鼠脑组织 Tau 蛋白磷酸化水平,免疫组化法检测小鼠脑组织 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达, ELISA 法检测小鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和还原型谷胱甘肽(GSH)水平。结果 共筛选得到还少丹活性成分 243 种,还少丹与 AD 共有靶点 562 个,核心节点 123 个。还少丹干预 AD 生物过程包括调节激素水平、炎症反应等;细胞组分包括突触后膜、树突、线粒体呼吸链复合体、转录调控复合物和蛋白激酶复合物等;分子功能包括氧化还原酶活性、神经递质受体活性、核受体活性、蛋白结构域特异性结合、乙酰胆碱受体活性等。还少丹对 AD 的治疗作用可能通过 cAMP 信号通路、MAPK 信号通路、钙信号通路、细胞凋亡、FoxO 信号通路等途径。动物实验结果表明,还少丹能够改善 AD 小鼠的认知能力及脑内病理变化,抑制海马组织 Tau 蛋白过度磷酸化,调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达,提高 SOD 活性和 GSH 水平。结论 还少丹通过多靶点、多途径、多通路发挥抗 AD 作用,其机制可能与调控细胞凋亡、氧化应激等有关。

关键词: 还少丹;阿尔茨海默病;网络药理学;实验验证;凋亡;氧化应激

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-2032-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.049

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿和进行性发展的神经退行性疾病,以认知障碍、精神行为异常和社会生活功能减退为主要临床特征^[1]。随着人口老龄化加剧,AD 发病率逐年上升^[2]。预计到 2050 年,全球 AD 患病人数将达 1.31 亿^[3],我国 60 岁以上老年人 AD 患病人数将达 3 003 万^[4]。目前,临床上治疗 AD 的药物有限,且仅能在一定程度上缓解症状,而不能阻止疾病的进展^[5]。AD 已严重危害人类健康,阻碍社会经济发展。

AD 发病机制高度复杂,目前有多种假说,包括细胞凋亡、神经炎症、氧化应激、线粒体功能障碍、细胞自噬、A β 沉积、Tau 蛋白假说等^[6]。中医对 AD 的认识历史悠久,

中药在改善 AD 患者认知障碍、延缓病情发展等方面具有一定的优势。AD 属于中医“痴呆”范畴,医家普遍认为痴呆病位在脑,与各脏腑机能衰退密切相关,尤其以肾虚为最^[7]。根据 AD 中医诊疗联合共识小组(the Joint Consensus Group, JCG)治疗方案,补肾为治疗 AD 最基本原则。

还少丹源于宋代《洪氏集验方》,由熟地黄、山药、肉苁蓉、巴戟天、楮实子、枸杞、茴香、杜仲、牛膝、山茱萸、五味子、茯苓、远志、石菖蒲、大枣,共 15 味药组成。该方具有温补脾肾功效^[8],可有效改善 AD 患者认知功能及日常生活能力^[9]。国医大师郭子光常运用还少丹治

收稿日期: 2022-12-05

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划(21HIRTSTHN026); 河南省科技攻关项目(222102310313); 河南中医药大学博士科研启动经费项目(00104311-2022-1-1-26)

作者简介: 苏运芳(1985—),女,博士,助理研究员,从事中西医结合防治神经退行性疾病研究。E-mail: suyunfang18@hactcm.edu.cn

* 通信作者: 张振强(1971—),男,博士,教授,从事中西医结合防治神经退行性疾病研究。E-mail: 13333719963@126.com