

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、Aβ 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

疗 AD^[10]。动物实验研究表明, 还少丹能够改善氢溴酸东莨菪碱诱导模型小鼠的认知能力^[11]。现代药理学表明还少丹具有抗氧化和抗衰老作用^[12]。还少丹组方中熟地黄活性成分梓醇对 AD 大鼠大脑皮质具有保护作用^[13]; 山茱萸环烯醚萜苷能够改善 AD 小鼠行为学异常^[14]; 肉苁蓉总苷能够改善 AD 大鼠学习认知功能^[15]。然而, 还少丹治疗 AD 的作用机制尚未完全阐明。本研究采用网络药理学方法^[16], 结合动物实验初步探讨还少丹治疗 AD 的潜在作用机制, 以期为还少丹在临床上的进一步应用提供科学依据, 为进一步探究还少丹治疗 AD 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 还少丹活性成分与靶点预测 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) 预测还少丹中 15 味中药有效活性成分及其对应的靶点。

1.1.2 AD 靶点预测及蛋白质互作网络构建 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, 获得还少丹与 AD 共有靶点。将得到的交集靶点导入 STRING 11.5 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 进行 PPI 分析。运用 Cytoscape 3.8.2 制作关键靶点调控网络。

1.1.3 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 生物富集分析 使用 Metascape (<https://metascape.org/>) 数据库, 以 $P<0.01$ 为筛选条件, 对交集靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。利用基迪奥生信云工具 Omicshare Tools (<https://www.omicshare.com/tools/>) 和 Metascape 将 GO、KEGG 通路富集结果分别绘制成气泡图和柱状图。

1.2 动物实验

1.2.1 试剂与药物 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 货号 S0130); 柠檬酸、柠檬酸钠 (天津恒兴集团有限公司); 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 货号 R510-22); 苏木精伊红 HE 染色试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1120、BC0175、BC1175); β -肌动蛋白抗体 (β -actin, 武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BM0627); p^{Ser404} -Tau 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 20194T、14796S); B 淋巴瘤细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 GB114830); RNA 提取和反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号 Q711-02、R323-01); 还少丹 (太极集团重庆桐君阁药厂有限公司, 批号 21050005)。

1.2.2 仪器 脑立体定位仪 (型号 LEGATO 130, 瑞士 Hamilton 公司); 麻醉机、Morris 水迷宫、Y 迷宫、旷场 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 低温研磨机 (型号 KZ-III-F, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 多功能酶标仪、

低温高速离心机 (型号 1510、Heraeus Fresco 21, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 恒温加热仪 (型号 GL-150, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 蛋白质凝胶电泳系统 (型号 DYY-6C, 北京六一生物科技有限公司); 凝胶成像系统 (型号 Universal Hood III, 美国 Bio-Rad 公司); 全自动组织脱水机 (型号 Donatello, 意大利 DIAPATH 公司); 组织包埋机 (型号 JB-P5, 武汉俊杰电子有限公司); 组织切片机 (型号 RM2016, 上海徕卡仪器有限公司); 正置荧光显微镜 (型号 Axiocam 506 color, 德国蔡司公司)。

1.2.3 动物 6~8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠, 体重 (22 $\pm$ 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006, 饲养于室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 60%、12 h/12 h 光照/黑暗循环的条件, 自由饮食及饮水, 动物实验设计符合河南中医药大学实验动物伦理委员会要求。

1.2.4 造模、分组、给药及取样 适应性喂养 1 周后, 采用侧脑室注射 STZ 诱导常见散发的 AD 小鼠模型^[17-18], 小鼠固定于脑立体定位仪, 麻醉后侧脑室头顶正中切口, 暴露前囟, 于前囟后 0.3 mm, 中线右侧 1.0 mm 处, 微量注射器自脑表面垂直进针 2.5 mm, 向右侧脑室缓慢注入 3 mg/kg STZ, 留针 5 min。所有操作均在无菌条件下进行, 皮肤切开处用青霉素抗菌, 缝合伤口, 假手术组注射等量柠檬酸钠缓冲液。设立还少丹高、中、低剂量 (5.4、2.7、1.35 g/kg) 组, 每组 10 只, 将还少丹溶于生理盐水中, 每天灌胃给药 1 次, 连续 21 d, 假手术组和模型组给予同等剂量生理盐水。

1.2.5 行为学实验 灌胃结束前 6 d 进行行为学实验。(1) Morris 水迷宫实验: 将小鼠从 4 个不同入水点面向池壁放入水中, 记录小鼠爬上平台所需的时间 (即逃避潜伏期), 连续测试 5 d。第 6 天撤除平台, 同一入水点将小鼠面向池壁放入水中, 记录小鼠 60 s 内在目标象限停留时间以及穿越平台次数。(2) Y 迷宫实验: 在 3 个迷宫臂的交汇处将小鼠依次放入, 自由活动 5 min, 系统记录小鼠进臂总数及进臂顺序并计算小鼠自发交替准确率, 小鼠连续进入 3 个不同的臂视为准确交替 1 次。(3) 旷场实验: 让小鼠在旷场内自由活动 5 min, 记录小鼠的移动总距离及理毛次数。

1.2.6 HE 染色观察脑组织病理形态 取各组小鼠脑组织进行常规石蜡包埋, 冠状切片。二甲苯脱蜡后, 经苏木精染色, 0.1% 盐酸乙醇分化, 洗涤后采用伊红液染色, 脱水, 树脂封片, 显微镜观察, 拍片。

1.2.7 Western blot 法检测海马组织 Tau 蛋白磷酸化水平 取小鼠海马组织, 加入适量组织裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 研磨, 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 收集总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 常规 Western blot 法检测 p^{Ser404} -Tau 蛋白表达, 以 β -actin 为内参进行数据分析。

1.2.8 免疫组化法检测海马组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达 取“1.2.6”项下石蜡切片, 行常规免疫组化染色, 显微镜观

察拍片，通过 ImagePro Plus 软件统计海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 蛋白表达平均光密度值。

1.2.9 海马组织 SOD 活性和 GSH 水平检测 采用 ELISA 检测试剂盒检测各组海马组织 SOD 活性和 GSH 水平，实验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.10 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 还少丹与 AD 共有靶点筛选 共筛选出还少丹 243 个活性化合物，对应靶点 725 个。通过数据库检索得到 AD 相应靶点 11 404 个，通过 Venny 2.1 在线工具绘制 Venn 图，获得还少丹与 AD 的交集靶点基因 562 个，见图 1。



图 1 还少丹成分靶点与 AD 靶点交集 Venn 图

2.2 蛋白质互作网络图 将“2.1”项下筛选到的 562 个作用靶点导入 STRING 数据库，对交集靶点进行 PPI 分析，筛选出关键基因靶点，构建 PPI 网络图（图 2），其中节点 561 个，边 632 条，平均节点度 2.25，平均局部聚类系数 0.328，预期边数 246，PPI 富集 $P<1.0\times10^{-16}$ 。再利用 Cytoscape 中的 CytoNCA 插件，设置 DC 值>2 倍中位数值和 BC、CC、EC 均大于中位数，即 $DC>54$ 、 $BC>226.896$ 、 $CC>0.438$ 、 $EC>0.0126$ ，筛选出该网络核心节点 123 个，把 123 个核心节点导入 STRING 数据库，构建核心节点 PPI 网络，利用 Cytoscape 3.8.2 软件进行美化（图 3），面积越大、颜色越深代表 Degree 值越高，该靶点与其他靶点的相关性就越明显。

2.3 GO 和 KEGG 通路富集分析 得到 GO 功能富集条目 3 566 条，其中生物过程 2 858 条，主要涉及调节激素水平（regulation of hormone levels）、炎症反应（inflammatory response）等；细胞组成 249 条，主要涉及突触后膜（postsynaptic membrane）、树突（dendrite）、线粒体呼吸链复合体（mitochondrial respiratory chain complex IV）、转录调控复合物（transcription regulator complex）和蛋白激酶复合物（protein kinase complex）等；分子功能 459 条，主要涉及氧化还原酶活性（oxidoreductase activity）、神经递质受体活性（neurotransmitter receptor activity）、核受体活性（nuclear receptor activity）、蛋白结构域特异性结合（protein domain specific binding）、乙酰胆碱受体活性（acetylcholine receptor activity）等，对 P 值排名前 20 的条目绘制柱状图，

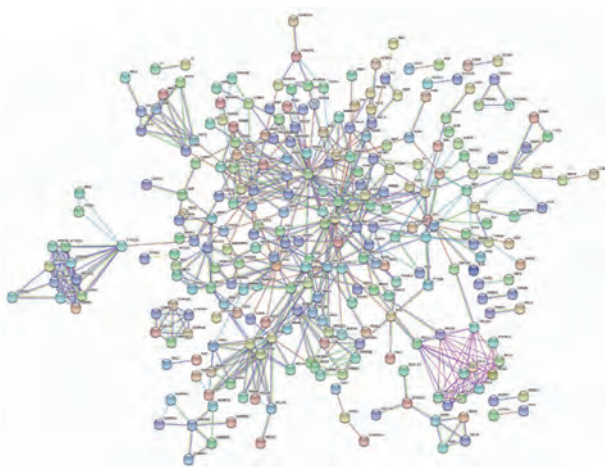


图 2 交集靶点 PPI 网络图

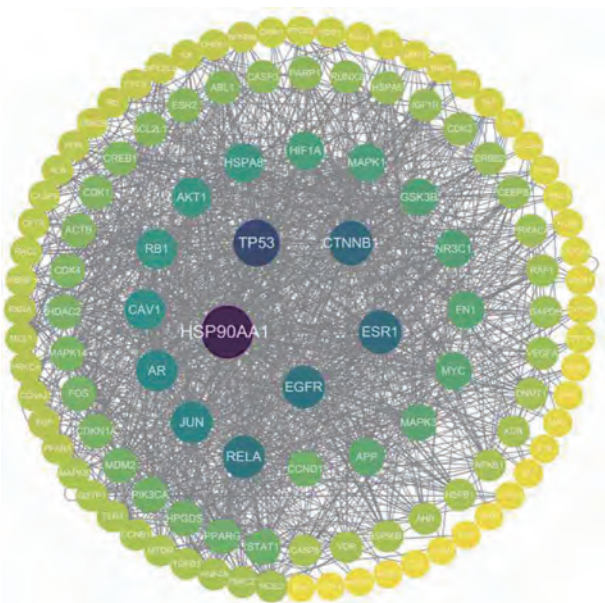


图 3 Cytoscape 关键靶点调控网络

见图 4。得到 KEGG 通路 247 条，主要涉及 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，根据 P 值绘制排名前 20 的气泡图，见图 5。

2.4 还少丹对 AD 小鼠学习记忆和空间探索能力的影响 Morris 水迷和空间探索实验结果显示，与假手术组比较，模型组在第 4、5 天逃避潜伏期延长 ($P<0.01$)，穿越平台次数减少 ($P<0.01$)；与模型组比较，还少丹高剂量组逃避潜伏期在第 4、5 天缩短 ($P<0.05$)，穿越平台次数增加 ($P<0.05$)，见图 6、表 1。Y 迷宫实验结果显示，与假手术组比较，模型组自发交替准确率降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，还少丹各剂量组自发交替准确率均升高 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)，见图 7、表 2。旷场实验结果显示，与假手术组比较，模型组理毛次数、移动总距离减少 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)；与模型组比较，还少丹各剂量组理毛次数、移动总距离增加 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)，见图 8、表 3。

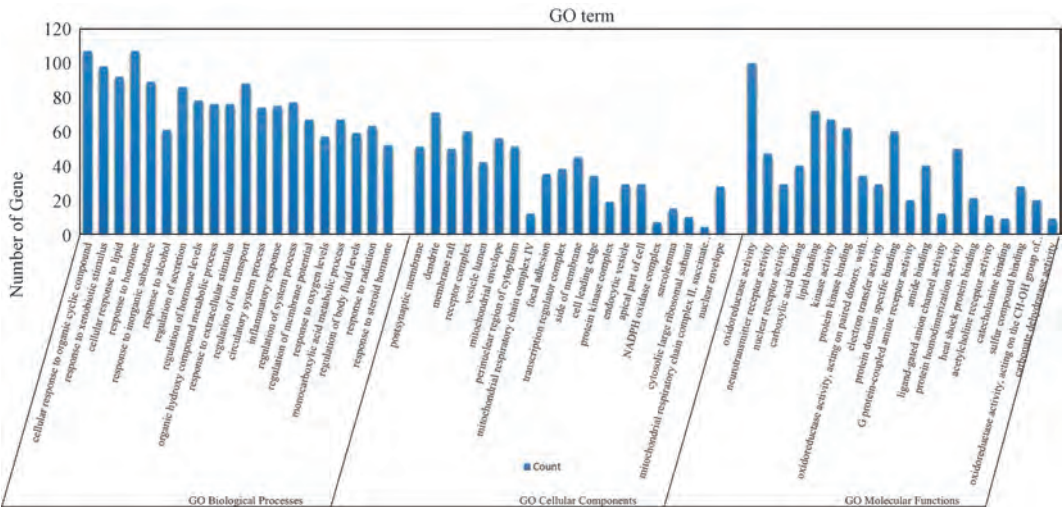


图4 还少丹成分-AD 交集靶基因 GO 分析

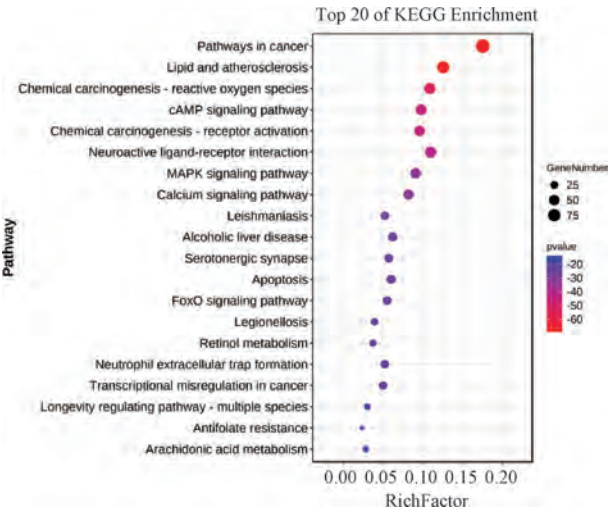


图5 还少丹成分-AD 交集靶基因 KEGG 分析

2.5 还少丹对 AD 小鼠脑组织病理变化的影响 如图 9 所示,假手术组小鼠海马 CA1、CA3、齿状回和皮层中神经元结构完整、排列整齐、核染色清晰;而模型组小鼠海马各区和皮层出现神经细胞数量减少、排列疏松、核固缩等神经病理改变;还少丹各剂量组海马和皮层组织病理变化均有所改善,神经细胞数量增多、排列较为规则紧密,细胞核固缩较为少见。

2.6 还少丹对 AD 小鼠海马组织 Tau 蛋白磷酸化水平的影响 与假手术组比较,模型组小鼠海马组织 p^{Ser404}-Tau 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,还少丹高剂量组小鼠海马组织 p^{Ser404}-Tau 蛋白表达降低 ($P<0.05$),见图 10 表 4。

2.7 还少丹对 AD 小鼠海马 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响
与假手术组比较, 模型组海马 CA1 区 Bcl-2 表达降低 ($P<0.01$), Bax 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 还少丹

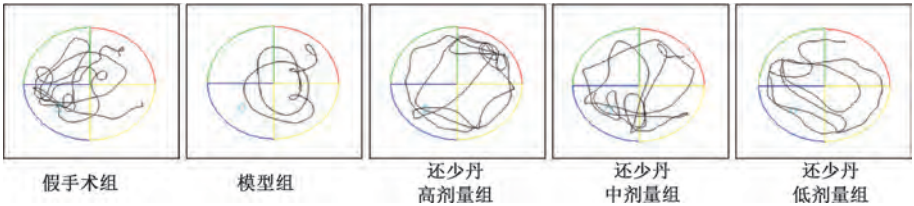


图 6 各组小鼠 Morris 水迷宫游动轨迹图

表1 各组小鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期和穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	逃避潜伏期/s					穿越平台次数/次
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
假手术组	56.80±5.49	45.05±7.81	42.01±4.39	28.85±13.57	25.50±6.81	2.17±1.17
模型组	55.37±8.74	52.25±9.26	48.10±14.32	54.40±6.92 ^{##}	53.06±10.02 ^{##}	0.25±0.51 ^{##}
还少丹高剂量组	51.95±9.19	50.12±5.48	52.09±10.58	36.51±9.12 [*]	30.93±15.21 [*]	1.40±0.55 [*]
还少丹中剂量组	59.04±1.80	51.73±10.88	48.69±13.57	45.83±16.88	40.99±21.59	1.00±0.63
还少丹低剂量组	55.02±7.72	45.28±17.17	45.75±12.29	54.17±6.47	47.52±11.10	1.00±0.89

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

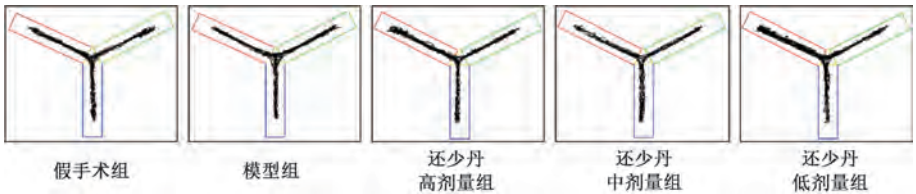


图 7 各组小鼠 Y 迷宫活动轨迹图

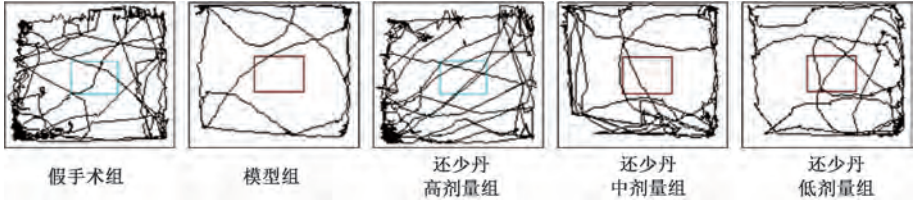


图 8 各组小鼠旷场活动轨迹图

表 2 各组小鼠 Y 迷宫总进臂次数和自发交替准确率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

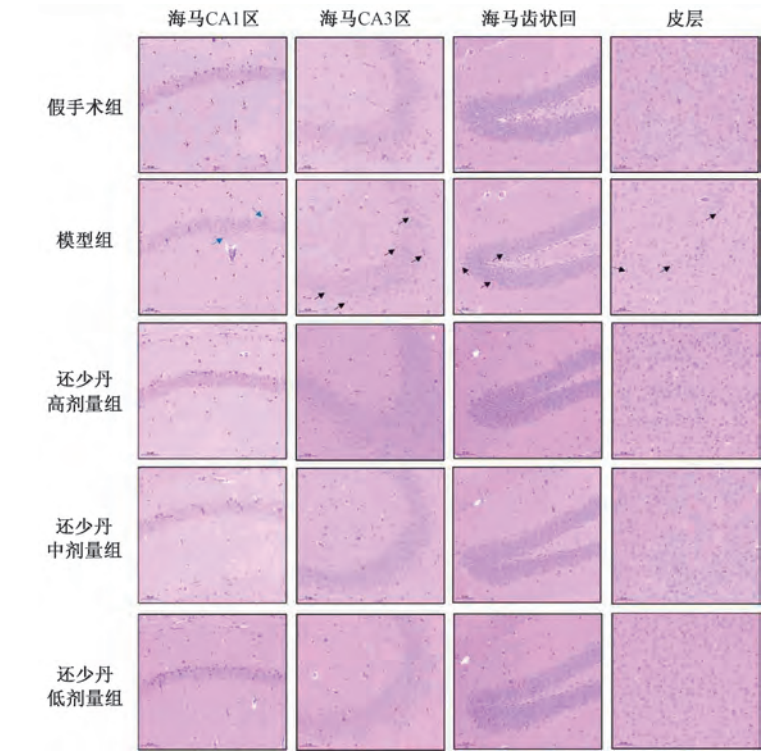
组别	总进臂次数/次	自发交替准确率/%
假手术组	20.67±11.06	50.53±13.15
模型组	21.17±11.74	32.68±6.91 [#]
还少丹高剂量组	18.17±7.81	47.05±6.61 [*]
还少丹中剂量组	18.67±5.82	49.12±12.98 [*]
还少丹低剂量组	17.50±7.69	55.74±10.29 ^{**}

注：与正常组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠旷场活动理毛次数和移动总距离 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	理毛次数/次	总距离/cm
假手术组	98.87±47.92	1 198.76±201.15
模型组	48.53±16.10 [#]	608.81±243.53 ^{##}
还少丹高剂量组	119.25±42.19 ^{**}	1 064.54±377.55 [*]
还少丹中剂量组	99.41±37.27 [*]	897.41±173.18
还少丹低剂量组	93.60±29.41 [*]	1 094.22±226.03 ^{**}

注：与正常组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。



注：蓝色箭头指示神经元排列疏松，黑色箭头指示核固缩。比例尺为 50 μm 。

图 9 各组小鼠脑组织 HE 染色 ($\times 400$)

2.8 还少丹对 AD 小鼠海马组织 SOD 活性和 GSH 水平的影响 与假手术组比较，模型组小鼠海马组织 SOD 活性和 GSH 水平均降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，还少丹高剂

量组小鼠海马组织 SOD 活性升高 ($P<0.05$)，中、低剂量组 GSH 水平升高 ($P<0.01$)，见表 6。

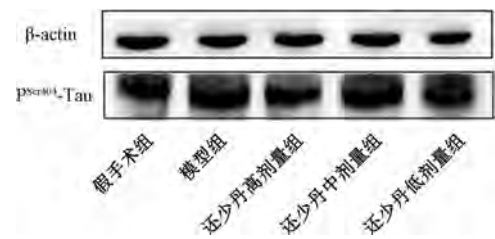


图 10 各组小鼠海马组织 p^{Ser404}-Tau 蛋白条带图

表 4 各组小鼠海马组织 p^{Ser404}-Tau 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	p ^{Ser404} -Tau/ β -actin
假手术组	100.00 $\pm$ 15.65
模型组	160.71 $\pm$ 10.98 ^{##}
还少丹高剂量组	121.70 $\pm$ 9.08 ^{**}
还少丹中剂量组	181.12 $\pm$ 2.86
还少丹低剂量组	204.03 $\pm$ 18.86

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

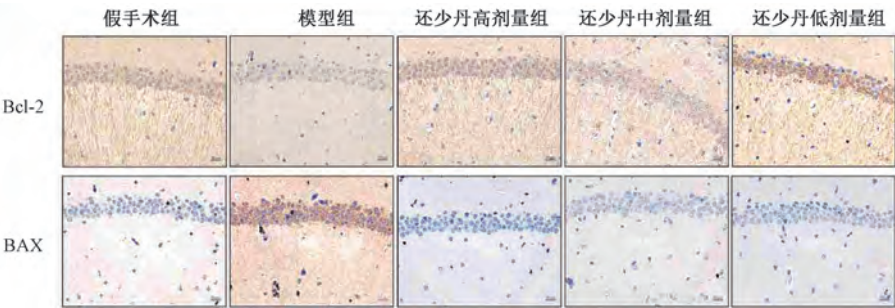


图 11 各组小鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色 ($\times 400$)

表 5 各组小鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Bcl-2 平均光密度值	Bax 平均光密度值
假手术组	156.09 $\pm$ 10.65	111.55 $\pm$ 1.53
模型组	85.76 $\pm$ 35.79 ^{##}	183.51 $\pm$ 34.57 ^{##}
还少丹高剂量组	161.05 $\pm$ 10.48 ^{**}	99.74 $\pm$ 6.78 ^{**}
还少丹中剂量组	159.40 $\pm$ 2.56 ^{**}	90.25 $\pm$ 28.36 ^{**}
还少丹低剂量组	163.28 $\pm$ 10.15 ^{**}	111.14 $\pm$ 12.49 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠海马组织 SOD 活性和 GSH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	SOD/($U\cdot mg^{-1}$)	GSH/($\mu g\cdot mg^{-1}$)
假手术组	0.81 $\pm$ 0.07	6.99 $\pm$ 0.31
模型组	0.42 $\pm$ 0.00 ^{##}	5.00 $\pm$ 0.01 ^{##}
还少丹高剂量组	0.63 $\pm$ 0.07 [*]	5.21 $\pm$ 0.15
还少丹中剂量组	0.47 $\pm$ 0.14	6.26 $\pm$ 0.27 ^{**}
还少丹低剂量组	0.57 $\pm$ 0.09	9.39 $\pm$ 0.21 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3 讨论

辨证论治是中医认识疾病和治疗疾病的基本原则，脾肾论治治疗痴呆由来已久^[19]，临床经验证明脾肾功能失调与痴呆密切相关^[20]。早在 1991 年，还少丹被报道用于治疗老年性痴呆^[21]。30 余年来，还少丹治疗老年性痴呆、轻度认知障碍或 AD 在临床中均有报道，且疗效显著^[10,22-24]。本研究动物实验结果表明，还少丹能够改善 STZ 诱导的 AD 小鼠学习记忆和空间探索能力，且能明显改善 AD 小鼠脑内神经细胞排列疏松、核固缩等病理变化及抑制 AD 病理产物 Tau 蛋白过度磷酸化，确证了还少丹治疗 AD 的药效。网络药理学结合实验验证为探索中药复方的作用机制提供了一种新的思路^[25]。通过网络药理学方法预测还少丹

活性成分与 AD 靶点交集到靶点基因共 562 个，Cytoscape 筛选出核心节点 123 个，提示还少丹治疗 AD 具有多靶点的特点。对 562 个靶点基因进行 GO 生物富集分析，结果显示还少丹治疗 AD 涉及多种生物过程、细胞组分和分子功能，表明还少丹治疗 AD 具有多途径的特点。KEGG 富集到的信号通路主要涉及 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，提示还少丹治疗 AD 具有多通路的特点。

从 GO 和 KEGG 富集结果选取部分关键分子，通过动物实验，考查了各小鼠海马组织中细胞凋亡相关分子 Bcl-2 和 Bax 表达以及氧化应激相关分子 SOD 活性和 GSH 水平，结果表明还少丹对以上分子具有一定的潜在调控作用，这与网络药理学 GO 和 KEGG 分析的部分结果相一致。细胞凋亡和氧化应激是 AD 主要病理特征，也是药物筛选的重要指标^[26]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 位于线粒体膜上，抑制异常条件下离子通道的形成，维持正常的线粒体膜电位。氧化损伤时 Bcl-2 下调，促凋亡蛋白 Bax 形成的孔道的活性使细胞色素 C (Cyt C) 等从线粒体内释放，引起细胞凋亡。SOD 和 GSH 是重要的抗氧化酶和抗氧化物，使细胞免受活性氧等氧自由基的氧化损伤。因此，还少丹的抗凋亡和抗氧化作用在其抗 AD 机制中发挥了重要作用，同时为还少丹治疗 AD 药效物质基础研究提供了思路 and 方向。

综上所述，还少丹可能通过多靶点、多途径、多通路发挥治疗 AD 作用，其机制可能与调控细胞凋亡、氧化应激等有关。此外，本研究仅对还少丹治疗 AD 中部分靶点和分子进行了动物实验验证，有待进一步挖掘更多的靶分子及进行体内外反向验证，以阐明还少丹治疗 AD 的具体分子机制，为临床治疗 AD 积累经验 and 提供新思路。近年来，肠-脑轴被认为是 AD 发病的潜在机制^[27]，文献报道还

少丹能够改善轻度认知功能障碍患者肠道菌群丰富变化^[28]，而还少丹是否通过肠-脑轴发挥治疗 AD 作用需要进一步的研究。

参考文献：

[1] 国家卫生健康委办公厅. 阿尔茨海默病的诊疗规范（2020 年版）[J]. 全科医学临床与教育, 2021, 19(1): 4-6.

[2] Anon. 2021 Alzheimer’s disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(3): 327-406.

[3] Jia J, Wei C, Chen S, *et al.* The cost of Alzheimer’s disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491.

[4] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020-2050 年中国阿尔茨海默病患者情况预测研究 [J]. 阿尔茨海默病及相关病, 2019, 2(1): 289-298.

[5] Cummings J, Lee G, Ritter A, *et al.* Alzheimer’s disease drug development pipeline; 2020 [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2020, 6(1): e12050.

[6] Gong C X, Liu F, Iqbal K. Multifactorial hypothesis and multi-targets for Alzheimer’s disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 64 (s1): S107-S117.

[7] 李一平, 谢 宁, 王 素. 中医辨证论治阿尔茨海默病研究进展 [J]. 中医学报, 2020, 35(3): 559-563.

[8] 田金洲, 时 晶. 阿尔茨海默病的中医诊疗共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(5): 523-529.

[9] 杨 芳, 杨雪萍, 徐 月, 等. 还少丹治疗脾胃亏虚型轻、中度阿尔茨海默病临床观察 [J]. 河北中医, 2020, 42(4): 538-542.

[10] 乔丽君, 李炜弘, 陈卫银, 等. 还少丹治疗阿尔兹海默病方证效相应的理论探析与医案举隅 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(4): 92-94.

[11] 龚梦鹃, 邹忠杰, 谢媛媛. 还少丹对记忆障碍模型小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1912-1913.

[12] 吴翠芳. 还少丹对雌、雄老龄大鼠抗衰老作用的探究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2016.

[13] 刘倩倩, 刘 倩, 李文涛, 等. 梓醇对阿尔茨海默病大鼠模型大脑皮质保护作用 [J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1934-1938; 2122.

[14] 马登磊, 罗 艺, 李 林, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对 tau 蛋白转基因小鼠精神症状的影响及其机制 [J]. 中国药理学与

毒理学杂志, 2021, 35(9): 687.

[15] 王 璐, 白雨朦, 李晓宇, 等. 肉苁蓉总苷对阿尔茨海默病模型大鼠学习认知功能和氧化应激的影响 [J]. 解剖学杂志, 2020, 43(3): 194-199; 275.

[16] 覃楚悦, 罗 玺, 詹燕珊, 等. 基于网络药理学探讨月泰贴脐方治疗排卵障碍性不孕症的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(5): 674-681.

[17] 李少创, 韩 诚, 秦亚莉, 等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 131-145.

[18] Ravelli K G, Rosário B D, Camarini R, *et al.* Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer’s disease; Neurochemical and behavioral characterization in mice [J]. *Neurotox Res*, 2017, 31(3): 327-333.

[19] 杨佳一, 赵 俊, 田会玲, 等. “脾肾互赞”理论在阿尔茨海默病治疗中的应用 [J]. 世界科学技术（中医药现代化）, 2020, 22(8): 2607-2614.

[20] 张珊珊, 郭锦晨, 王艳昕. 王艳昕从脾肾论治阿尔茨海默病经验 [J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(8): 1076-1078.

[21] 马凤友. 还少丹治疗老年性痴呆 14 例 [J]. 湖南中医杂志, 1991, 7(2): 44.

[22] 陈瑞敏, 李知文. 还少丹治疗老年期痴呆 36 例 [J]. 山东中医杂志, 1997, 16(6): 16.

[23] 李爱华. 加味还少丹治疗老年性痴呆 30 例 [J]. 新中医, 2001, 33(3): 22.

[24] 赵 欢, 史 敏, 杨东东, 等. 还少丹治疗轻度认知功能障碍 90 例临床研究 [C] //四川省医学会第十三次神经病学学术会议论文集. 成都: 四川省医学会, 2014: 242-242.

[25] Zhou W, Zhang H, Wang X, *et al.* Network pharmacology to unveil the mechanism of Moluodan in the treatment of chronic atrophic gastritis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153837.

[26] Chen S Y, Gao Y, Sun J Y, *et al.* Traditional Chinese medicine: Role in reducing β -amyloid, apoptosis, autophagy, neuroinflammation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction of Alzheimer’s disease [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 497.

[27] Choi H, Lee D, Mook-jung I. Gut microbiota as a hidden player in the pathogenesis of Alzheimer’s disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 86(4): 1501-1526.

[28] 陈 颖, 刘雪辉. 轻度认知功能障碍患者肠道菌群丰度变化及健脾补肾中药复方还少丹干预效果观察 [J]. 山东医药, 2022, 62(8): 19-24.