

- ence on nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 20(2): 225-243.
- [14] Nandipati K C, Subramanian S, Agrawal D K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 426(1-2): 27-45.
- [15] 唐辰义, 周后德. 胰岛素受体底物家族成员的结构和组织特异性与功能的关系[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(3): 295-302.
- [16] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circu Res*, 2000, 87: e1-e9.
- [17] Tipnis S R, Hooper N M, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33238-33243.
- [18] Paizis G, Tikellis C, Cooper M E, et al. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2[J]. *Gut*, 2005, 54(12): 1790-1796.
- [19] Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, et al. Losartan, an angiotensin-II type 1 receptor blocker, attenuates the liver fibrosis development of non-alcoholic steatohepatitis in the rat[J]. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 70.
- [20] Shimamoto K, Miura T. Metabolic syndrome [J]. *Nihon Rinsho*, 2009, 67(4): 771-776.
- [21] Giani J F, Mayer M A, Muñoz M C, et al. Chronic infusion of angiotensin- (1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(2): E262-E271.
- [22] Giani J F, Gironacci M M, Muoz M C, et al. Angiotensin- (1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart *in vivo*: role of the AT1 and Mas receptors[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(2): H1154-H1163.
- [23] Santos S H, Braga J F, Mario E G, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin- (1-7) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(5): 953-961.
- [24] Abuissa H, Jones P G, Marso S P, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(5): 821-826.
- [25] Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, et al. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(9-10): 1346-1355.
- [26] 刘月涛, 贾璐, 秦雪梅. 多效黄芪物质基础的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1476-1480.
- [27] Mao X Q, Yu F, Wang N, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of *Astragalus membranaceus* in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(5): 416-425.

## 黄连解毒汤含药血清对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HT22 细胞损伤的影响

张茹兰<sup>1</sup>, 黄启辉<sup>1\*</sup>, 黄秀芳<sup>2</sup>, 李建军<sup>1</sup>, 陶彦谷<sup>2</sup>

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广东 广州 510300; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510080)

**摘要:** 目的 探讨黄连解毒汤含药血清对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 HT22 细胞损伤的影响。方法 HT22 细胞随机分为空白组、模型组、多奈哌齐组 (0.9 mg/kg) 及黄连解毒汤低、高剂量组 (2.7、8.1 g/kg), 空白组、模型组加入空白血清, 给药组加入含药血清 1 h 后, 加入  $A\beta_{25-35}$  (40  $\mu$ mol/L)。24 h 后, MTT 法检测 HT22 细胞活性, 比色法检测 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平, Western blot 检测 Bax、Bcl-2、Cyt C、Caspase-3 蛋白表达。结果 与模型组比较, 黄连解毒汤组 HT22 细胞活性、Bcl-2/Bax 显著升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), MDA 水平及 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 并呈剂量依赖性, 其中高剂量组 SOD、GSH-Px 活性也显著升高 ( $P<0.01$ )。结论 黄连解毒汤含药血清可减轻  $A\beta_{25-35}$  诱导 HT22 细胞毒性作用, 降低细胞凋亡, 其作用机制可能与减少氧化应激和线粒体凋亡途径有关。

**关键词:** 黄连解毒汤; 含药血清;  $A\beta_{25-35}$ ; HT22 细胞

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2019)05-1017-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.012

收稿日期: 2018-07-10

基金项目: 广东省自然科学基金自由申请项目 (2014A030313147); 广东省中医药局科研项目 (20171065)

作者简介: 张茹兰 (1992—), 女, 硕士生, 从事中西医结合防治老年病研究。Tel: 18826404829, E-mail: zhangrulan1992@163.com

\* 通信作者: 黄启辉 (1964—), 男, 副教授, 从事中西医结合防治老年病研究。Tel: 13710913213

# Effects of serum containing Huanglian Jiedu Decoction on HT22 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$

ZHANG Ru-lan<sup>1</sup>, HUANG Qi-hui<sup>1\*</sup>, HUANG Xiu-fang<sup>2</sup>, LI Jian-jun<sup>1</sup>, TAO Yan-gu<sup>2</sup>

(1. Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510300, China; 2. The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510080, China)

**KEY WORDS:** Huanglian Jiedu Decoction; medicated serum;  $A\beta_{25-35}$ ; HT22 cells

阿尔茨海默病是以记忆丧失、认知障碍为临床表现的神经退行性疾病,主要病理特征之一是细胞外  $A\beta$  沉积形成老年斑,导致广泛海马神经元缺失<sup>[1]</sup>,  $\beta$  淀粉样蛋白<sub>25-35</sub> ( $A\beta_{25-35}$ ) 是  $A\beta$  毒性片段之一,对体外培养、在体神经细胞均具有毒性作用<sup>[2]</sup>,在发病过程中神经元损伤与氧化应激和线粒体凋亡途径密切相关<sup>[3]</sup>。阿尔茨海默病属中医“痴呆”范畴,王永炎院士“毒损脑络”理论认为,脑为“清灵之府”,受秽气浊毒侵袭,体内痰浊、瘀血等化热成毒,导致脑窍壅塞、神机失用而发为痴呆<sup>[4]</sup>。

黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,功效清热解毒。为了探究该方含药血清的神经保护作用,阐明其治疗阿尔茨海默病的作用机制,本实验采用  $A\beta_{25-35}$  建立细胞模型,观察它对 HT22 细胞(是小鼠海马神经元细胞系,分化后的 HT22 细胞是具有功能性的胆碱能神经元,是能够很好地进行认知功能障碍研究的体外模型<sup>[5]</sup>) 存活率,氧化应激关键指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA),线粒体凋亡关键指标 Bcl-2、Bax、Cyt C、Caspase-3 的影响,初步探讨其神经保护作用及机制,为相关临床应用提供依据。

## 1 材料

1.1 动物 3月龄 SPF级雄性 SD大鼠40只,体质量(200±20)g,购自中山大学实验动物中心,清洁级饲养,实验动物许可证号 SCXK(粤)2004-0011,本实验经中山大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物 黄连解毒汤由黄连9g、黄芩6g、黄柏6g、栀子9g组成,由中山大学孙逸仙纪念医院中药制剂中心提供(批号分别为20110802、20110413、20110616、20110919)。按处方量称取药材,蒸馏水煎煮,水煎液浓缩至1:2时停止,

待药液放冷后,边搅拌边缓慢加入乙醇使含醇量达50%,静置48h后滤取上清液,回收乙醇,蒸馏水配制成生药量为6.48g/mL,临用前加蒸馏水分别稀释成0.27、0.81g/mL溶液。盐酸多奈哌齐(5mg/片,卫材中国药业有限公司,批号100801053),临用前加蒸馏水稀释成0.09mg/mL溶液(它为乙酰胆碱酯酶抑制剂,具有神经保护作用<sup>[6]</sup>,为临床治疗阿尔茨海默病常用药物,故选择其作为阳性对照)。

1.3 试剂  $A\beta_{25-35}$ 、DMSO(美国Sigma公司);DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司);PBS缓冲液(北京索莱宝科技有限公司);SOD、GSH-Px、MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所); $\beta$ -action, Bax, Bcl-2, Cyt C、Caspase-3抗体(美国Proteintech公司)。

1.4 仪器 Galaxy 170S CO<sub>2</sub>细胞培养箱(德国Eppendorf公司);Reader M3多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);HWS-12电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-1F超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

## 2 方法

2.1  $A\beta_{25-35}$ 溶液制备  $A\beta_{25-35}$ 溶于去离子水中,0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤,37℃下于孵化器中孵育7d后,-20℃下避光保存。文献[7]报道,40  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ 作用于分化及未分化的HT22细胞24h时约为半抑制浓度,故可建立较理想的阿尔茨海默病细胞模型。

2.2 含药血清制备 40只大鼠随机分为空白组、模型组、多奈哌齐组及黄连解毒汤低、高剂量组,每组8只,用药剂量按动物体表面积比率换算等剂量法,黄连解毒汤低、高剂量组大鼠分别以成人等效剂量的1、3倍灌胃给药,即2.7、8.1g/kg,多奈哌齐组大鼠灌胃给予0.09mg/mL药物,空白组、模型组大鼠灌胃给予蒸馏水,各组大鼠每次灌

胃 2 mL, 1 次/d, 连续 7 d。最后 1 次给药 3 h 后, 大鼠腹主动脉穿刺取血, 离心, 取上清, 除菌, 灭活, -20 °C 下保存备用。

2.3 细胞培养 HT22 细胞由中山大学孙逸仙纪念医院神经内科刘军教授惠赠, 培养于中山大学孙逸仙纪念医院实验室, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养, 每 2 d 更换 1 次培养基。将细胞随机分为空白组、模型组, 多奈哌齐组及黄连解毒汤低、高剂量组, 其中空白组、模型组大鼠给予含 10% 空白血清的 DMEM 培养基, 多奈哌齐组给予含 10% 药物血清的 DMEM 培养液, 黄连解毒汤低、高剂量组大鼠分别给予含 10% 药物低、高剂量血清培养基。培养 1 h 后, 空白组加无血清 DMEM 培养液, 其他各组加 Aβ<sub>25-35</sub> 使其终浓度为 40 μmol/L, 孵育 24 h。

2.4 细胞活性检测 采用 MTT 法。取 HT22 细胞, 以 2.5×10<sup>3</sup>/孔密度接种于 96 孔板中 (100 μL/孔), 分组同上, 接种 12 h 后给予含药血清、Aβ<sub>25-35</sub> 处理, 24 h 后各组均加入 20 μL MTT (5 mg/mL, 溶于 0.01 mol/L PBS 缓冲液中), 继续培养 4 h 后测定各孔光密度 (OD 值), 检测波长为 570 nm。

2.5 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平检测 采用比色法。取 HT22 细胞, 以 5×10<sup>3</sup>/孔密度接种于 96 孔板中培育 12 h, 每孔体积 100 μL, 分组同上, 12 孔/组, 含药血清、Aβ<sub>25-35</sub> 处理 24 h 后, 取各组细胞上清液, 4 °C、1 500 r/min 下离心 10 min, 严格按照试剂盒说明书检测。

2.6 Bax、Bcl-2、Cyt C、Caspase-3 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。HT22 细胞于 6 孔板中培养 12 h, 密度为 1×10<sup>5</sup>/孔, 含药血清、Aβ<sub>25-35</sub> 处理后, 按照文献[8]方法提取蛋白, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 浓缩胶 90 V, 分离胶 120 V; 电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, TBST (含 10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.5% Tween-20, pH 7.5) 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加抗体 Bax、Bcl-2、Cyt C、Caspase-3 (1 : 2 000)、β-actin (1 : 2 000), 4 °C 冰箱中过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 加兔二抗 (1 : 2 000), 室温下反应 2 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 滴加 ECL 发光液, GE 凝胶成像系统测量各目的条带灰度值, 计算其与内参 β-actin 蛋白灰度值之比。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组比较采用单因素方差分析, 组间差异多重比较采用 SNK 法, 检验水平  $\alpha =$

0.05。P<0.05 差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 黄连解毒汤对 HT22 细胞活性的影响 表 1、图 1 显示, 与空白组比较, 模型组 HT22 细胞活性显著降低 (P<0.01); 与模型组比较, 黄连解毒汤组其活性显著升高 (P<0.05, P<0.01), 以高剂量组更明显 (P<0.01)。

表 1 黄连解毒汤对 HT22 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=12)  
Tab. 1 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on HT22 cell viability ( $\bar{x} \pm s$ , n=12)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	存活率/%
空白组	—	100.00±0.15
模型组	—	45.51±3.87**
多奈哌齐组	0.000 9	65.56±2.51 <sup>△△</sup>
黄连解毒汤低剂量组	2.7	49.36±3.95 <sup>△</sup>
黄连解毒汤高剂量组	8.1	67.53±4.62 <sup>△△△▲</sup>

注:与空白组比较,\*\*P<0.01;与模型组比较,<sup>△</sup>P<0.05,<sup>△△</sup>P<0.01;与黄连解毒汤低剂量组比较,<sup>▲▲</sup>P<0.01

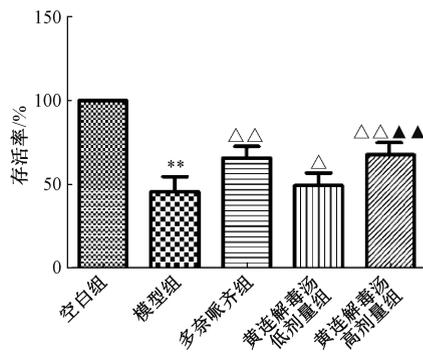


图 1 黄连解毒汤对 HT22 细胞活性的影响  
Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on HT22 cell viability

3.2 黄连解毒汤对 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 表 2 显示, 与空白组相比较, 模型组 SOD、GSH-Px 活性显著降低 (P<0.01), MDA 水平显著升高 (P<0.01); 与模型组比较, 黄连解毒汤组 SOD、GSH-Px 活性显著升高 (P<0.01), MDA 水平显著降低 (P<0.01), 以高剂量组更明显 (P<0.05, P<0.01)。

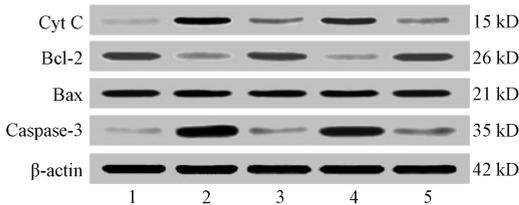
3.3 黄连解毒汤对 Cyt C、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响 图 2~3 显示, 与空白组比较, 模型组 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达显著升高 (P<0.01), Bcl-2/Bax 显著降低 (P<0.01); 与模型组比较, 黄连解毒汤组 Cyt C、Caspase-3 蛋白表达显著降低 (P<0.05, P<0.01), Bcl-2/Bax 显著升高 (P<0.05, P<0.01), 以高剂量组更明显 (P<0.05)。

表2 黄连解毒汤对SOD、GSH-Px活性及MDA水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

Tab. 2 Effects of Huanglian Jiedu Decoction on SOD, GSH-Px activities and MDA level ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
空白组	—	163.56±65.34	563.64±64.34	14.43±2.54
模型组	—	88.32±55.64**	332.64±97.24**	35.32±3.43**
多奈哌齐组	0.000 9	128.65±32.34 <sup>△△</sup>	502.76±75.28 <sup>△△</sup>	18.54±4.75 <sup>△△</sup>
黄连解毒汤低剂量组	2.7	103.64±65.65	355.96±54.43	27.54±3.64 <sup>△△</sup>
黄连解毒汤高剂量组	8.1	135.65±54.49 <sup>△△▲</sup>	512.64±33.96 <sup>△△▲▲</sup>	19.64±2.75 <sup>△△▲▲</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与黄连解毒汤低剂量组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P<0.01$



注:1~5分别为空白组、模型组、多奈哌齐组、黄连解毒汤低剂量组、黄连解毒汤高剂量组

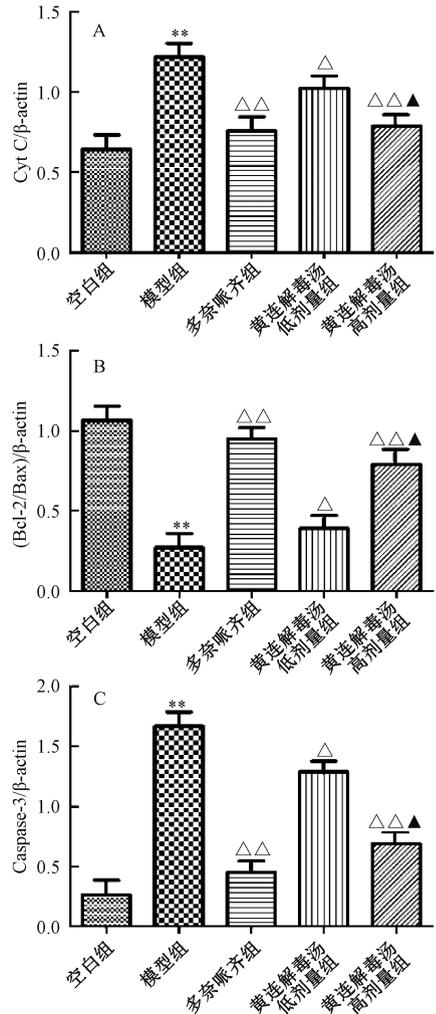
图2 各组Cyt C、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达

Fig. 2 Cyt C, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expressions in various groups

#### 4 讨论

在阿尔茨海默病的发生与进展中,神经元细胞凋亡参与其中<sup>[9-10]</sup>。A $\beta$ 可通过改变凋亡相关基因Bcl-2家族的表达来诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>,激活存活信号通路是保护A $\beta$ 诱导的神经元凋亡途径<sup>[12]</sup>。Bcl-2家族成员中的Bcl-2、Bax是线粒体膜渗透性的主要调节因子,前者是一种抗凋亡蛋白,可维持线粒体膜通透性,从而稳定线粒体完整性,减少细胞色素C释放,抑制细胞凋亡<sup>[13]</sup>;后者是一种促凋亡蛋白,可影响线粒体膜渗透性,诱导细胞色素C从线粒体膜间隙进入胞浆释放,从而引起细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。另外,细胞色素C可通过激活Caspase-9进而激活Caspase-3,最终导致细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。

氧化应激是由于机体活性氧产生、抗氧化失衡所致,自由基生成过多或机体清除能力受限时,可引起脂质过氧化,使得神经元细胞受损。SOD是一种抗氧化酶,可通过清除超氧阴离子来保护组织免受损伤,间接反映了组织抗氧化能力;GSH-Px是一种催化过氧化氢分解的酶,可通过催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,起到保护细胞膜结构、功能完整的作用;MDA是一种脂质过氧化产物,可反映组织氧化程度,故三者可间接反应机体受自由基攻击的严重程度及清除自由基的能力<sup>[18]</sup>。同时,氧化应激可作为各种形式的细胞死亡中一种常见的最终途径,A $\beta$ 引起阿尔茨海默病也与其有关,氧化应激产物对患者具有毒性作用,



注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与黄连解毒汤低剂量组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$

图3 黄连解毒汤对Cyt C (A)、Bcl-2/Bax (B)、Caspase-3 (C)蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of Huanglian Jiedu Decoction on Cyt C (A), Bcl-2/Bax (B) and Caspase-3 (C) protein expressions

可通过激发氧自由基的产生,脂质过氧化,损伤神经元细胞,诱导凋亡相关基因的表达,最终激活Caspase,使神经元细胞大量凋亡流失<sup>[19]</sup>,并诱发该疾病。

黄连解毒汤为清热解毒的代表方剂,源于唐代

王焘《外台秘要》，基于“痰、瘀、火”为阿尔茨海默病的病机基础，由清热解毒药材黄连、黄芩、黄柏、栀子组成。方青等<sup>[20]</sup>报道，黄连解毒汤可能通过干预 A $\beta$  沉积对神经细胞的作用来显著改善阿尔茨海默病动物模型的记忆障碍和学习能力；陈国华等<sup>[21]</sup>发现，黄连解毒汤可减少 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马 CA1 区 SP 数量和胞外诱捕网 (NETs) 形成，并降低 IL-6、IL-1 $\beta$  水平，表明该方能保护神经细胞，减少老年斑生成，从而起到防治作用；柴山周乃等<sup>[22]</sup>临床研究显示，黄连解毒汤可增加阿尔茨海默病患者脑部血流量，对其认知功能有明显的改善作用；付晓春等<sup>[23]</sup>指出，黄连解毒汤可抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡，其作用机制是通过下调 Caspase-3 表达来实现；龙建飞等<sup>[24]</sup>研究表明黄连解毒汤水提物可通过抑制 Caspase-3 活性，降低 PARP 过度表达，从而降低大鼠缺血半暗带皮层 NeuN 阳性细胞凋亡，保护缺血半暗带神经元。

课题组前期发现，黄连解毒汤含药血清可改善氧化应激对神经的毒性作用，从而改善 SAM-P/8 小鼠学习记忆能力<sup>[25]</sup>，为了进一步探究其神经保护作用，本实验采用 A $\beta_{25-35}$  建立阿尔茨海默病细胞模型，观察其对 A $\beta_{25-35}$  诱导 HT22 细胞活性的影响。结果，A $\beta_{25-35}$  (40  $\mu$ mol/L, 24 h) 诱导 HT22 细胞阿尔茨海默病模型时，细胞活性明显下降，提示造模成功；细胞上清液中 SOD、GSH-Px 活性明显降低，MDA 活性明显升高，提示出现氧化应激；Bcl-2/Bax 比值明显降低，Cyt C、Caspase-3 蛋白表达明显升高，提示线粒体凋亡途径被激活，而黄连解毒汤含药血清可减轻 A $\beta_{25-35}$  诱导的 HT22 细胞氧化应激反应，逆转 Bcl-2/Bax，抑制细胞色素 C 释放，同时下调 Caspase-3 蛋白表达，从而抑制细胞凋亡，对细胞神经毒性起到保护作用。因此，黄连解毒汤可能成为预防或治疗阿尔茨海默病的潜在药物，但由于该方所含药材成分复杂，作用环节多，故对其作用机制的研究还需进一步深入。

#### 参考文献:

[ 1 ] Gandy S. Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(6): 1009-1016.  
[ 2 ] 张萌涛, 钱亦华, 杨杰, 等. 丹参酮 II A 对谷氨酸联合淀粉样蛋白诱导细胞损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(19): 2465-2468.  
[ 3 ] Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, et al. Proteinopathy,

oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 797-810.  
[ 4 ] 王永炎. 关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(4): 195-196.  
[ 5 ] Liu J, Li L, Suo W Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties[J]. *Life Sci*, 2009, 84(9-10): 267-71.  
[ 6 ] 石秋艳, 张琪, 孙鹏, 等. 多奈哌齐对血管性痴呆大鼠海马 CA<sub>1</sub> 区 NF- $\kappa$ B 及 COX-2 表达的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(12): 1093-1096.  
[ 7 ] 孙凤芹, 罗红波, 张菲菲, 等.  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导 HT22 细胞建立阿尔茨海默病细胞模型[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(3): 521-522.  
[ 8 ] Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology [J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1): 7-35.  
[ 9 ] Anderson A J, Stoltzner S, Lai F, et al. Morphological and biochemical assessment of DNA damage and apoptosis in Down syndrome and Alzheimer disease, and effect of postmortem tissue archival on TUNEL [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(4): 511-524.  
[ 10 ] Gervais F G, Xu D G, Robertson G S, et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- $\beta$  precursor protein and amyloidogenic A $\beta$  peptide formation [J]. *Cell*, 1999, 97(3): 395-406.  
[ 11 ] Yao M, Nguyen T V, Pike C J.  $\beta$ -Amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(5): 1149-1158.  
[ 12 ] Di Segni A, Shaharabani E, Stein R, et al. Neuregulins rescue PC12-ErbB-4 cells from cell death induced by  $\beta$ -amyloid peptide: involvement of PI3K and PKC [J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 26(1): 57-69.  
[ 13 ] Jang J H, Surh Y J. Bcl-2 protects against A $\beta_{25-35}$ -induced oxidative PC<sub>12</sub> cell death by potentiation of antioxidant capacity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 880-886.  
[ 14 ] Kostic V, Przedborski S, Flaster E, et al. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease[J]. *Neurology*, 1991, 41(2 Pt 1): 202-205.  
[ 15 ] Yang L, Matthews R T, Schulz J B, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2 [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(20): 8145-8152.  
[ 16 ] Cardone M H, Roy N, Stennicke H R, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1318-1321.  
[ 17 ] Zörnig M, Hueber A, Baum W, et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1551(2): F1-F37.  
[ 18 ] Querfurth H W, LaFerla F M. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 329-344.

- [19] Islam M T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. *Neurol Res*, 2017, 39(1): 73-82.
- [20] 方青, 詹小萍, 莫剑翎, 等. 黄连解毒汤对AD大鼠的治疗作用及对细胞因子含量的影响[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(6): 575-578.
- [21] 陈国华, 梅瑰, 邱昕, 等. 黄连解毒汤对APP/PS1双转基因AD小鼠脑组织IL-6I、L-1 $\beta$ 水平及SP、NFTs数量的干预作用[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(5): 352-356.
- [22] 柴山周乃, 杜武勋, 朱明丹, 等. 日本老年期认知症常用汉方制剂的研究[J]. *湖南中医杂志*, 2010, 26(1): 104-106.
- [23] 付晓春, 徐哲, 何影, 等. 黄连解毒汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注后的保护作用及其对Caspase-3蛋白表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(14): 1598-1599.
- [24] 龙建飞, 张弛, 张秋霞, 等. 黄连解毒汤有效部位对脑缺血大鼠半暗带神经元NeuN、Caspase-3、PARP表达的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(2): 90-93, 98, 插页1.
- [25] 黄秀芳, 陶彦谷, 张茹兰, 等. 黄连解毒汤对SAM-P/8小鼠行为学作用及机制初探[J]. *中成药*, 2017, 39(12): 2585-2588.

## 左金丸活性成分-靶点-多维作用机制

李跃文, 刘志强, 易增兴, 秦后响, 王博龙\*  
(宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

**摘要:** 目的 分析左金丸活性成分-靶点-多维作用机制。方法 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库获取左金丸活性成分及对应靶点, TTD数据库预测分析左金丸潜在治疗疾病, Cytoscape软件分别构建活性成分-靶点、靶点-疾病网络, STRING平台构建靶蛋白互作网络, BINGO和MCODE插件对靶基因进行GO生物过程富集和聚类分析, 生物学信息注释数据库(DAVID)对靶点进行KEGG信号通路分析。结果 左金丸中13种活性成分作用于49个潜在靶点, 涉及炎症反应调节、突触传递、细胞分化、凋亡等19个生物子簇; KEGG富集得到消化液分泌、癌症、内分泌、神经递质、炎症、信号转导、心血管7大类22条信号通路, 在消化、神经、心血管系统疾病以及炎症、癌症等方面具有治疗价值。结论 本研究揭示了左金丸活性成分-靶点-多维作用机制, 可为其临床治疗价值拓展提供新的线索。

**关键词:** 左金丸; 活性成分; 靶点; 多维作用机制; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-1022-10

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.013

## Active ingredients-targets-multidimensional action mechanisms of Zuojin Pills

LI Yue-wen, LIU Zhi-qiang, YI Zeng-xing, QIN Hou-xiang, WANG Bo-long\*

(School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

**KEY WORDS:** Zuojin Pills; active ingredients; targets; multidimensional action mechanisms; network pharmacology

左金丸始载于元代著名医家朱震亨所撰《丹溪心法》, 由黄连、吴茱萸用量按6:1比例组成, 以水丸或汤剂入药, 具有清肝泻火、降逆和胃、开郁散结等功效, 临床大多用于胃炎、食道炎、胃溃疡等属肝火犯胃者。现代药理研究<sup>[1-4]</sup>发现, 左金丸中黄连、小檗碱可显著诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制

肿瘤细胞的信号转导; 小檗碱起到质子泵抑制剂, 即H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶抑制剂的作用, 从而抑制胃酸分泌; 小檗碱、吴茱萸次碱直接拮抗胆碱受体或抑制胆碱酯酶的活性, 具有抑制小鼠胃肠道蠕动的的作用, 还可抑制炎症细胞因子的产生和分泌, 从而发挥抗炎作用, 故该制剂临床应用也扩展到肿瘤、炎

收稿日期: 2018-04-26

作者简介: 李跃文(1993—), 男, 硕士生, 从事临床药学研究。Tel: 17879551765, E-mail: 1297513234@qq.com

\*通信作者: 王博龙(1977—), 男, 博士, 副教授, 主治医师, 硕士生导师, 从事药物临床前研究、临床有效性及安全性评价。Tel: 13607059805, E-mail: wblong77@126.com