基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术及网络药理学方法探讨六味地黄丸入脑成分改善 D-gal 模型大鼠学习记忆能力的作用机制[Δ]

邱　琦[1*]，徐艳明[2]，薛　傲[1]，王业秋[2]，孙　琪[2]，薛　慧[2]，徐红丹[2,3#1]，张　宁[1,2#2]（1. 黑龙江中医药大学药学院，哈尔滨　150040；2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院，黑龙江 佳木斯　154007；3. 无锡卫生高等职业技术学校，江苏 无锡　214028）

中图分类号　R96；R932　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-2124(2022)11-1294-09
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2022.11.003

摘　要　目的：应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）技术分析六味地黄丸的入脑成分，结合网络药理学及体外验证实验探讨该成分改善 D-半乳糖（D-gal）模型大鼠学习记忆能力的核心靶点、关键通路等潜在作用机制。方法：皮下注射 D-半乳糖 250 mg/（kg·d）构建模型。实验分为空白组、模型组和给药组［六味地黄丸，1.62 g/（kg·d）］。应用新物体识别、Morris 水迷宫 2 种行为学实验评估各组大鼠学习记忆能力；采用苏木精-伊红（HE）染色观察各组大鼠海马神经元形态；通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术对空白大鼠脑脊液样品及六味地黄丸给药后的大鼠脑脊液样品进行化学成分快速识别及鉴定，确定六味地黄丸原型入脑成分；通过中药系统药理学数据库与分析平台、Swiss Target Prediction 等数据库预测六味地黄丸入脑成分作用的潜在靶点，通过治疗靶点数据库、GeneCards 等数据库筛选阿尔茨海默病（AD）相关疾病靶点，取药物成分靶点与疾病靶点交集绘制韦恩图，通过 STRING 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络模型，使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建六味地黄丸“入脑成分-靶点-AD”网络关系图，通过 Metascape 数据库对交集靶点进行基因本体（GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，分析关键通路。通过体外细胞实验，检测六味地黄丸脑脊液对 D-gal 损伤 PC12 细胞增殖率及 β 淀粉样蛋白（Aβ）$_{1-42}$、活性氧（ROS）、白细胞介素 6（IL-6）、5-羟色胺（5-HT）和多巴胺（DA）水平的影响。结果：六味地黄丸可显著上调模型组大鼠新物体识别指数、穿越平台次数和靶象限停留时间，显著缩短定位潜伏期，差异均有极显著统计学意义（$P<0.01$），并恢复海马神经元形态。通过数据分析，六味地黄丸给药后在大鼠脑脊液中发现 7 个原型入脑成分，分别为莫诺苷、（-）-奎宁酸、阿魏酸、芍药苷、泛酸、5-羟甲基糠醛和尿苷。通过网络药理学筛选六味地黄丸入脑成分潜在作用靶点 102 个，与 AD 共同靶点 47 个，获得 44 条 GO 信号通路和 14 条 KEGG 信号通路，与 Aβ 沉积、Tau 蛋白磷酸化、氧化应激、炎症反应、能量代谢及神经递质水平密切相关。体外细胞实验结果显示，六味地黄丸脑脊液可显著升高 D-gal 损伤 PC12 细胞增殖率，5-HT、DA 水平，显著降低 Aβ$_{1-42}$、ROS 和 IL-6 水平，差异均有极显著统计学意义（$P<0.01$）。结论：六味地黄丸对 D-gal 模型大鼠的学习记忆能力具有改善作用，可能是六味地黄丸入脑成分通过抑制 Aβ 沉积、Tau 蛋白磷酸化和氧化应激，抗炎、改善能量代谢障碍及调节神经递质水平来实现的。

关键词　六味地黄丸；阿尔茨海默病；超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱；入脑成分；网络药理学

Mechanism of Brain-Absorption Components of Liuwei Dihuang Pills in Improving Learning and Memory Abilities of D-galactose Model Rats Based on UPLC-Q-TOF-MS Technology and Network Pharmacology[Δ]

QIU Qi[1], XU Yanming[2], XUE Ao[1], WANG Yeqiu[2], SUN Qi[2], XUE Hui[2], XU Hongdan[2,3], ZHANG Ning[1,2]（1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. College of Kiamusze, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang Kiamusze 154007, China; 3. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Jiangsu Wuxi 214028, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To analyze the brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills by applying ultra performance liquid chromatography-quadrupole rod-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technique,

Δ 基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 82174007）；黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划项目（No. 2018RCD19）；国家自然科学基金青年项目（No. 82003975）；黑龙江省卫生健康委科研课题（No. 2020-303, No. 2020-301）；黑龙江中医药大学基金项目（No. 2018pt04, No. 2019BJP01）

* 硕士研究生。研究方向：中药药效物质基础及体内代谢研究。E-mail：qiuqi1118@126.com
# 通信作者 1：副教授，博士，硕士生导师。研究方向：中药防治精神性疾病的作用及机制研究。E-mail：xuhd1984@126.com
# 通信作者 2：研究员，博士，博士生导师。研究方向：中药药效物质基础及体内代谢研究。E-mail：zhangning0454@163.com

and to explore the core targets, key pathways and other potential mechanisms of these components in improving learning and memory abilities of D-galactose (D-gal) model rats based on network pharmacology and extracorporal validation experiments. METHODS: The model was constructed by subcutaneous injection of D-galactose 250 mg/(kg·d). The experiments were divided into the blank group, model group and administration group [Liuwei Dihuang pills, 1.62 g/(kg·d)]. The learning and memory abilities of rats in each group were evaluated by two behavioral experiments including new object recognition and Morris water maze; the morphology of hippocampal neurons in each group was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; fast recognition and identification of chemical components were conducted on the cerebrospinal fluid samples of blank rats and rats treated with Liuwei Dihuang pills by UPLC-Q-TOF-MS technique, so as to determine the prototype brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills. The potential effect targets of the brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills were predicted through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform and Swiss Target Prediction database, the Alzheimer's disease (AD)-related disease targets were screened through the therapeutic target database and GeneCards databases, the intersection of drug component targets and disease targets was taken to draw the Venn diagram, the STRING was used to construct the protein-protein interaction network model, and the Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the "brain-absorption components-target-AD" network diagram of Liuwei Dihuang pills, the Metascape database was used to perform gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on the intersecting targets, the key pathways were analyzed. Through the extracorporal cell experiment, the effects of cerebrospinal fluid of Liuwei Dihuang pills on the proliferation rate in D-gal damaged PC12 cells and the levels of β-amyloid $(A\beta)_{1-42}$, reactive oxygen species (ROS), interleukin 6 (IL-6), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) were detected. RESULTS: Liuwei Dihuang pills can significantly up-regulated the new object recognition index, the number of platform crossing and dwell time of target quadrant, and significantly shorten the localization latency in the model group rats, with statistically significant differences ($P<0.01$), and restored hippocampal neuron morphology. By the data analysis, seven prototype brain-absorption components were found in the cerebrospinal fluid of rats treated with Liuwei Dihuang pills, including monosidine, (−)-quinic acid, ferulic acid, paeoniflorin, pantothenic acid, 5-hydroxymethylfurfural and uridine. Totally 102 potential effect targets of the brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills were screened out through network pharmacology, which shared 47 common targets with AD; 44 GO signaling pathways and 14 KEGG signaling pathways were obtained, which were closely related to Aβ deposition, Tau protein phosphorylation, oxidative stress, inflammatory response, energy metabolism and neurotransmitter levels. The results of extracorporal ell experiments showed that the cerebrospinal fluid of Liuwei Dihuang pills can significantly increased the proliferation rate of D-gal damaged PC12 cells, 5-HT and DA levels, and significantly decreased $A\beta_{1-42}$, ROS and IL-6 levels, with statistically significant differences ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Liuwei Dihuang pills has improved learning and memory abilities of D-gal model rats, and its effects may be achieved by the brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills through inhibiting Aβ deposition, Tau protein phosphorylation and oxidative stress, anti-inflammation, improving impaired energy metabolism and regulating neurotransmitter levels.

KEYWORDS Liuwei Dihuang pills; Alzheimer's disease; UPLC-Q-TOF-MS; Brain-absorption components; Network pharmacology

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种起病隐匿、与年龄相关的中枢神经退行性疾病[1]。目前,其发病机制尚未明确,而解释该病发病机制的假说较多,可能为多因素参与的结果[2]。但不论是现有AD治疗药物或其他候选药物,多仅针对AD的某个单一靶点或相关途径,只能短期改善症状,不能从根本上治疗AD[3]。相比于仅能调控单一靶点或途径的药物,中医药因其具有多成分、多靶点等优势,在发病机制复杂的AD等疾病的防治中有着巨大潜力[4]。中医学中,AD的发病与肾虚密切相关,认为"肾精虚,脑髓空"为其基本病机,"补肾填精益髓"为根本治法[5]。六味地黄丸由熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻和牡丹皮6味中药组成,是我国传承千年的经典补肾名方,AD正是六味地黄丸适应之证候。同时,六味地黄丸作为中药复方,具有成分多、靶点广等优点,能够针对疾病多个病理环节进行调控,与AD发病机制的复杂性和综合性特征契合。研究结果表明,六味地黄丸可改善快速老化小鼠学习记忆功能,其改善作用可能与影响白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素6(IL-6)在脑组织的表达有关[6];六味地黄丸可能通过影响中枢神经胆碱能系统,改善β淀粉样蛋白(Aβ)前体蛋白/早老蛋白-1(APP/PS1)双转基因小鼠学习记忆能力[7];六味地黄丸可对自然衰老大鼠海马CA1区、CA3区及大脑皮质初级躯体感觉皮质区(S1Tr)神经元起到一定保护作用[8];六味地黄丸脑脊液对$A\beta_{1-40}$诱导的细胞活力降低也有明显抑制作用[9]。目前,关于六味地黄丸在神经退行性疾病中的研究多集中于单靶点机制通路或环节,难以解释其多

成分、多靶点协同作用的问题；且现有研究结果也提示，六味地黄丸可通过血脑屏障发挥一定的中枢性药理作用，而其脑通透性特征亦尚不清楚。

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）技术灵敏度高、选择性好、分离准确，被广泛应用于中药复杂体系成分的定性鉴别研究[10]；网络药理学方法具有系统性及整体性的研究特点，可在一定程度上弥补单一机制通路研究方法的局限性[11]。本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析六味地黄丸入脑成分，并根据获得的入脑成分，应用网络药理学方法与体外验证实验，探讨六味地黄丸入脑成分改善 D-半乳糖（D-gal）模型大鼠学习记忆能力的潜在机制。

1 材料

1.1 实验动物与细胞

雌性 SD 大鼠 24 只（辽宁长生生物技术股份有限公司），体重 210～250 g，饲养于无菌环境，自然光源（12L∶12D），温度 20～22 ℃，相对湿度 55%～65%，自由给水进食，适应性饲养 1 周后开始实验，研究由黑龙江中医药大学伦理委员会批准（编号：2020021907）。高分化型 PC12 细胞（上海中乔新舟生物科技有限公司，批号：ZQ0150）。

1.2 仪器

SCIEX ExionLC AD 液相色谱仪、SCIEX 5600+Q-TOF 质谱仪（美国 AB sciex 公司）；RD-1121-NR-M 新物体识别（上海移数信息科技有限公司）；ZH-Morris 水迷宫设备（正华生物仪器设备有限公司）；MK3 型酶标仪（上海热电仪器有限公司）；HPC-150 型流式细胞仪（加拿大 Handyem 公司）。

1.3 药品与试剂

六味地黄丸浓缩丸购于北京同仁堂药店（佳木斯店），经黑龙江中医药大学陈效忠教授鉴定符合《中华人民共和国药典：一部》标准；D-gal（上海麦克林生化科技有限公司，批号：D810319）；色谱级甲醇（美国 Dikma 公司，批号：W-50102）；苏木精-伊红（HE）染液（碧云天生物技术研究所，批号：C0105 S）。噻唑蓝（MTT）粉末（美国 Sigma 公司，批号：20130716）；Aβ 酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：E-EL-R3030）；活性氧（ROS）试剂盒（碧云天生物技术研究所，批号：S0033）；IL-6 ELISA 试剂盒（上海西唐生物科技有限公司，批号：F15870）；5-羟色胺（5-HT）、多巴胺（DA）ELISA 试剂盒（广州佰而林生物科技有限公司，批号：BI140723059、BI140722023）。

2 方法

2.1 药液的配置

取六味地黄丸浓缩丸，研细，精密称定 20.25 g，置于具塞锥形瓶中加入去离子水 100 mL，超声（频率 40 kHz，功率 180 W）处理 1 h，搅拌，得六味地黄丸灌胃药液。按 89∶10∶1 比例混合 DMEM 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素，得 DMEM 培养液于 4 ℃备用；采用新鲜或保存时间较短的含药脑脊液进行实验，不做特殊处理。

2.2 分组及给药

（1）动物实验。将 24 只 SD 大鼠随机分为空白（Control）组、模型（Model）组和给药（LWDHW）组，每组 6 只。Model 组、LWDHW 组大鼠腹腔注射 D-gal 250 mg/（kg·d），连续 4 周，Control 组大鼠注射等量 0.9% 氯化钠溶液。同时，按人鼠等效剂量折算，LWDHW 组大鼠每日以给药量 1.62 g/（kg·d）六味地黄丸药液灌胃，Control 组和 Model 组以等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。（2）细胞实验。分为空白（Control）组、模型（Model）组和六味地黄丸含药脑脊液（LWDHW）组。将对数期细胞接种于 DMEM 培养液中培养 24 h。Control 组更换 DMEM 培养液，继续培养 24 h；Model 组更换 DMEM 培养液培养 2 h，再给予 20 mg/mL 的 D-gal 培养液，继续培养 24 h；LWDHW 组加入六味地黄丸脑脊液培养 2 h，再给予 20 mg/mL 的 D-gal 培养液，继续培养 24 h。

2.3 行为学实验

2.3.1 新物体识别实验：各组大鼠在箱体内熟悉 5 min 后，放置两个完全相同的小正方体到箱体一端，将大鼠背向小正方体放置在对侧箱壁中点熟悉 5 min。训练 1 h 后，用另外一个完全不同的球形物体替换其中一个小正方体。从相同位置放入大鼠，记录大鼠 5 min 内对新物体的接触时间（Tn）和对旧物体的接触时间（Tf）。识别指数=（Tn−Tf）/（Tn+Tf）。

2.3.2 Morris 水迷宫实验：整个实验区域被分为四个象限，实验包括定位航行实验（前 4 日）与空间探索实验（第 5 日）。定位航行实验，于第四象限水下 2 cm 处放入平台，保持平台位置不变。将大鼠面向池壁，于一、二、三象限规定点放入水中。90 s 内，找到目标平台的大鼠，在平台上停留 30 s，未找到平台的大鼠，人为将其放置在平台上 30 s，记录大鼠找到平台时间为逃避潜伏期。空间探索实验，移除平台，于一、二、三象限规定点将大鼠放入水迷宫中，记录大鼠 90 s 内在目标（第四）象限的停留时间，记录穿过平台位置及有效（2 倍平台直径）区域的次数。

2.4 样品的采集

行为学实验结束后，将 Control 组、LWDHW 组大鼠头部固定，用输液针抵达小脑延髓池，抽取脑脊液，3 500 r/min（离心半径 8.5 cm）离心 10 min，取上层脑脊液用于分析及细胞实验；并摘取各组大鼠新鲜大脑，洗去残留的血液，置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h，制 HE 染色病理切片。

2.5 HE 染色观察大鼠海马神经元状态

采用常规病理学方法对固定的脑组织进行脱水、包埋，制成蜡块，切成 4 μm 厚度的蜡片。依次用二甲苯脱蜡，95% 乙醇脱水，HE 染色，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性胶封片。

2.6 入脑成分分析

2.6.1 样品前处理：脑脊液样品进样前，取脑脊液 200 μL 于离心管中，加入甲醇 800 μL，涡旋混合 1 min，超声（频率 40 kHz，功率 180 W）1 min，13 000 r/min（离心半径 8.5 cm）离心 10 min，取上清液，氮吹后用甲醇溶液 60 μL 复溶，过 0.22 μm 微孔滤膜，进样 5 μL。

2.6.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析：（1）色谱条件。采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温 40 ℃；进样量 5 μL；流速 0.4 mL/min；检测时间 30 min，流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）-纯乙腈（B），进行梯度洗脱（0～12 min，0～70% B；12～12.5 min，70% B；12.5～16 min，70%～100% B；16～22 min，100% B）。（2）质谱条件。采用正、负离子检测模式，一级质谱（ESI-MS）和二级质谱（ESI-MS2）扫描范围分别

为 100~1 200、50~1 200 m/z；各气路均使用 He；离子化电压(ISVF)为 5 500 V，喷雾气(GS1)、辅助加热气(GS2)压力均为 50 psi(1 psi≈6.895 kPa)，气帘气压力(CUR)为 35 psi，离子源温度为 550 ℃，锥孔电压(DP)为 90 V，一级质谱碰撞能量(CE)为 10 V，二级质谱 CE 为 35 V、碰撞能量范围(CES)为 15 V。

2.7 网络药理学方法

2.7.1 六味地黄丸入脑成分靶点收集：选取鉴定的全部六味地黄丸入脑成分作为目标成分，在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库和 Swiss Target Prediction 数据库筛选六味地黄丸入脑成分的分子靶点。在 Uniprot(https://www.uniprot.org/)蛋白质数据库中将入脑成分所作用的靶点名称进行标准化。

2.7.2 AD 相关靶点收集：以“Alzheimer's disease”为关键词在治疗靶点数据库(TTD)(http://db.idrblab.net/ttd/)、GeneCards 数据库(http://genecards.org)检索 AD 疾病靶点，使用 UniProt 数据库校正检索靶点结果名称。

2.7.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)核心网络的构建：将六味地黄丸入脑成分靶点与 AD 疾病靶点取交集并绘制韦恩图。将交集靶点提交至 STRING(https://string-db.org/cgi/input.pl)在线网站，设定物种为人源基因“Homo sapiens”，构建 PPI 网络模型，保存 tsv 文件。

2.7.4 六味地黄丸“入脑成分-靶点-AD”的网络构建：将上述 tsv 文件导入 CytoScape 3.7.2 软件，构建六味地黄丸“入脑成分-靶点-AD”网络关系图。

2.7.5 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析：将交集靶点导入 Metascape 在线网站(http://metascape.org/gp/index.html)，选择对应的物种“H. sapinens”，对获取的靶点信息进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。最后，将得到的数据导入微生信在线网站(http://www.bioinformatics.com.cn/)可视化。

2.8 细胞实验

2.8.1 MTT 比色法检测细胞增殖率：收集依据不同分组情况处理后的细胞，在 96 孔板中加入 MTT(5 g/L)20 μL/孔，孵育 4 h，移除上清液，加入 DMSO 150 μL/孔摇晃 10 min，在 570 nm 下用酶标仪检测吸光度。

2.8.2 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 含量：收集依据不同分组情况处理后的细胞，移除培养液，在 6 孔板中加入 DCFH-DA(10 μmol/L)1 mL/孔，放入培养箱内静置 20 min 后，每 5 min 混匀 1 次。孵育结束，用无血清培养液洗涤细胞 3 次，收集细胞，加入无血清培养液 1 mL，上流式细胞仪检测。

2.8.3 ELISA 检测 $A\beta_{1-42}$、ROS、IL-6、5-HT 和 DA 的含量：收集依据不同分组情况处理后的细胞，采用常规双抗体夹心 ELISA 法测定，具体步骤按照各 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.9 统计学方法

(1)行为学及细胞实验数据用 SPSS 20.0 进行数据的统计学分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合正态分布且总体方差齐的数据采用单因素方差分析(oneway-ANOVA)，组间均数两两比较应用 *LSD* 检验，应用 S-N-K 进行统计后校正。方差不齐的数据采用 Tamhane'S T2 法进行组间比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。(2)入脑成分分析，首先通过中国知网、GeenMedical 和 TCMSP 等平台总结六味地黄丸整方及各单味药所含化学成分，建立六味地黄丸成分的一级质谱数据库。采用 PeakView 2.2 软件对入脑成分数据进行处理，导入各化合物的名称及分子式进行无目标筛查，再导入筛查所得化合物的 sdf 文件，根据匹配度及二级碎片裂解规律进行定性分析。

3 结果

3.1 行为学测试结果

3.1.1 对 D-gal 模型大鼠新物体识别实验中识别指数的影响：与 Control 组相比，Model 组大鼠新物体识别指数显著降低($P<0.01$)；与 Model 组相比，LWDHW 组大鼠新物体识别指数显著升高($P<0.01$)，上述差异均有统计学意义，见表 1。

表 1 新物体识别实验中三组大鼠识别指数比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 Comparison of recognition indexes among three groups of rats in the new object recognition test ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g/kg)	识别指数
Control 组		0.416±0.062
Model 组	0.25	0.229±0.023[1)]
LWDHW 组	1.62	0.373±0.007[2)]

注：与 Control 组相比，[1)]$P<0.01$；与 Model 组相比，[2)]$P<0.01$

Note：*vs.* Control group，[1)]$P<0.01$；*vs.* Model group，[2)]$P<0.01$

3.1.2 Morris 水迷宫实验结果：(1)对 D-gal 模型大鼠定位航行实验中逃避潜伏期的影响。与 Control 组相比，Model 组大鼠定位潜伏期显著延长($P<0.01$)；与 Model 组相比，LWDHW 组大鼠定位潜伏期显著缩短($P<0.01$)，上述差异均有统计学意义。各组大鼠在训练过程中寻找平台潜伏期逐渐缩短，但 Control 组和 LWDHW 组大鼠定位航行潜伏期缩短较快，Model 组潜伏期缩短幅度较小，见表 2。(2)对 D-gal 模型大鼠空间探索实验中穿越平台次数和靶象限停留时间的影响。与 Control 组相比，Model 组大鼠穿越平台次数显著减少，靶象限停留时间显著缩短($P<0.01$)；与 Model 组相比，LWDHW 组大鼠穿越平台次数显著增加，靶象限停留时间显著延长($P<0.01$)，上述差异均有统计学意义，见表 3。

表 2 定位航行实验中三组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2 Comparison of escape latency among three groups of rats in place navigation($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g/kg)	第 1 日潜伏期/s	第 2 日潜伏期/s	第 3 日潜伏期/s	第 4 日潜伏期/s
Control 组		45.166±2.400	40.329±0.917	34.981±1.226	27.142±1.246
Model 组	0.25	67.123±1.231[1)]	59.234±1.654[1)]	55.152±1.092[1)]	46.098±1.691[1)]
LWDHW 组	1.62	52.855±1.502[2)]	43.671±1.298[2)]	38.091±1.219[2)]	28.901±1.753[2)]

注：与 Control 组相比，[1)]$P<0.01$；与 Model 组相比，[2)]$P<0.01$

Note：*vs.* Control group，[1)]$P<0.01$；*vs.* Model group，[2)]$P<0.01$

表 3 空间探索实验中三组大鼠穿越平台次数和靶象限停留时间比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 3 Comparison of the number of platform crossing and dwell time of target quadrant among three groups of rats in the space exploration ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

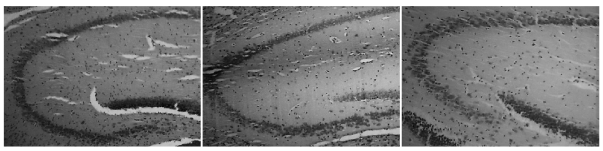
组别	剂量/(g/kg)	穿越平台次数	靶象限停留时间/s
Control 组		2.875±0.118	36.257±1.058
Model 组	0.25	0.949±1.009[1)]	18.106±1.109[1)]
LWDHW 组	1.62	2.471±0.017[2)]	29.333±1.591[2)]

注：与 Control 组相比，[1)]$P<0.01$；与 Model 组相比，[2)]$P<0.01$

Note：*vs.* Control group，[1)]$P<0.01$；*vs.* Model group，[2)]$P<0.01$

3.2 对 D-gal 模型大鼠海马神经元状态的影响

Control 组的大鼠海马区细胞排列规整，神经元数量较多，染色均一，核仁清晰可见，未见核固缩现象；与 Control 组相比，Model 组大鼠海马细胞排列紊乱，部分神经元丢失，神经元数目减少，细胞缩小，核仁不明显，核固缩现象明显；与 Model 组相比，LWDHW 组海马神经元排列较为规整，神经元数量较多，形态正常，核仁较清晰，没有明显核固缩现象，见图 1。



A　　B　　C

A. Control 组；B. Model 组；C. LWDHW 组

A. Control group; B. Model group; C. LWDHW group

图 1　三组大鼠海马神经元状态比较(HE，×40)

Fig 1　Comparison of morphology of hippocampal neurons among three groups of rats (HE, ×40)

3.3 六味地黄丸入脑成分分析结果

以峰面积的有无判断该离子是否为含药脑脊液中的特有成分即潜在入脑成分，通过质核比碎片的裂解规律以及数据库比对确定 7 个原型入脑成分，分别为莫诺苷、(-)-奎宁酸、阿魏酸、芍药苷、泛酸、5-羟甲基糠醛和尿苷，见表 4，总离子流图见图 2。

3.4 网络药理学研究结果

3.4.1　六味地黄丸入脑成分靶点与 AD 相关靶点的收集：根据表 4，在 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库筛选获取 102 个六味地黄丸入脑成分的分子靶点。以“Alzheimer's disease”为关键词在 TTD、GeneCards 数据库检索得到 1 560 个与 AD 相关的作用靶点。

3.4.2　PPI 网络的构建：将六味地黄丸入脑成分靶点与 AD 疾病靶点取交集，共得到 47 个交集靶点，韦恩图见图 3。采用 STRING 构建 PPI 网络模型，见图 4。图 4 中包括 46 个节点，136 条边；节点越大、颜色越暗，表示 Degree 值越大，高的 Degree 值可作为靶点预测的重点；边越粗，表示 Combine score 值越大，代表两种蛋白之间的相互作用关系越强，相互作用多的靶点可能是六味地黄丸抗 AD 的关键。

表 4　六味地黄丸入脑成分分析结果

Tab 4　Analysis results of brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills

峰号	分子式	保留时间/min	质荷比(m/z)	电离模式	误差/ppm	主要二级碎片/(m/z)	鉴定	化合物类型
1	$C_{17}H_{26}O_{11}$	15.02	407.143 6	$[M+H]^+$	-1.99	157.089 7、245.272 8	莫诺苷	环烯醚萜苷
2	$C_7H_{12}O_6$	7.13	192.049 1	$[M-H]^-$	-2.49	149.023 7	(-)-奎宁酸	有机酸
3	$C_{10}H_{10}O_4$	7.06	193.052 1	$[M-H]^-$	6.56	147.894 9、135.039 1	阿魏酸	有机酸
4	$C_{23}H_{28}O_{11}$	6.14	479.160 8	$[M-H]^-$	1.01	137.052 9、197.091 3、481.163 1	芍药苷	单萜
5	$C_9H_{17}NO_5$	2.22	218.103 4	$[M-H]^-$	0.04	200.083 9、122.062 4	泛酸	有机酸
6	$C_6H_6O_3$	1.28	127.036 5	$[M+H]^+$	-2.05	109.032 1、81.037 8	5-羟甲基糠醛	呋喃醛衍生物
7	$C_9H_{12}N_2O_6$	1.05	243.062 4	$[M-H]^-$	0.48	173.005 2、191.058 8	尿苷	核苷

3.4.3　六味地黄丸“入脑成分-靶点-AD”的网络构建：六味地黄丸“入脑成分-靶点-AD”网络关系图见图 5，获得的网络共包括 53 个节点，95 条边，7 个六味地黄丸入脑成分中 6 个与 AD 靶点有直接作用，说明六味地黄丸抗 AD 可能是多成分、多靶点作用的结果。其中可能起到关键作用的成分为泛酸(pantothenic acid)、尿苷(uridine)和(-)-奎宁酸[(-)-quinic acid]。

3.4.4　GO 功能和 KEGG 通路富集分析：GO 富集包括生物学过程(BP)、细胞组分(CC)以及分子功能(MF)，通过 GO 功能富集分析可以获得基因的生物学功能。本研究 GO 富集中富集到的主要条目 44 个，见图 6，其中 BP 主要涉及对 β 淀粉样蛋白的反应、活性氧代谢、炎症反应的调节、脂质分解代谢等；CC 主要涉及多巴胺能突触等；MF 主要涉及 β 淀粉样蛋白的结合、蛋白磷酸酶的结合、丝氨酸水解酶活性、神经递质受体活性等。利用 KEGG 数据库对代谢通路进行富集分析，气泡图见图 7，结果表明，除涉及“Alzheimer's disease”通路外，六味地黄丸入脑成分治疗 AD 还涉及了精氨酸和脯氨酸代谢通路、5-羟色胺能突触通路等 14 条信号通路。

3.5 细胞实验结果

3.5.1　对 D-gal 损伤 PC12 细胞增殖率的影响：与 Control 组比较，Model 组细胞的增殖率显著降低($P<0.01$)；与 Model 组比较，LWDHW 组细胞的增殖率显著升高($P<0.01$)，上述差异均有统计学意义，见表 5。

表 5　三组 PC12 细胞增值率比较($n=6$)

Tab 5　Comparison of proliferation rates among three groups of PC12 cells ($n=6$)

组别	吸光度/($\bar{x}\pm s$)	细胞增殖率/%
Control 组	0.557±0.002	100.000
Model 组	0.449±0.032[1)]	80.610[1)]
LWDHW 组	0.543±0.027[2)]	97.486[2)]

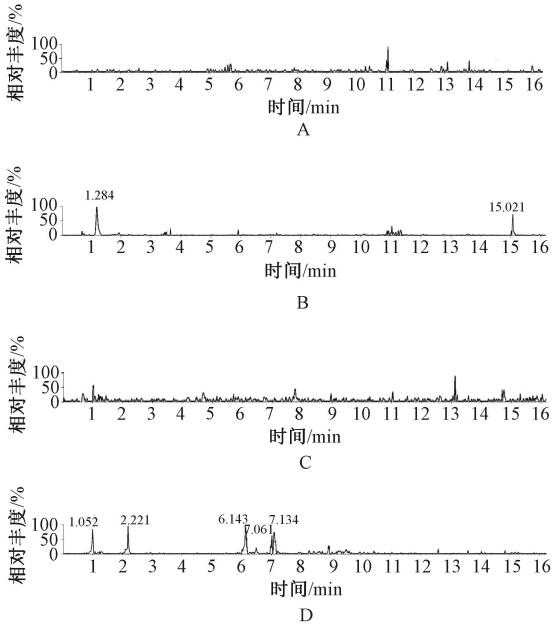
注：与 Control 组相比，[1)]$P<0.01$；与 Model 组相比，[2)]$P<0.01$

Note: *vs.* Control group, [1)]$P<0.01$; *vs.* Model group, [2)]$P<0.01$

3.5.2　对 D-gal 损伤 PC12 细胞中 $A\beta_{1-42}$、ROS、IL-6、5-HT 和 DA 的影响：与 Control 组比较，Model 组细胞的 $A\beta_{1-42}$、ROS 和 IL-6 水平显著升高($P<0.01$)，5-HT、DA 水平显著降低($P<0.01$)；与 Model 组比较，LWDHW 组细胞的 $A\beta_{1-42}$、ROS 和 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)，5-HT、DA 水平显著升高($P<0.01$)，上述差异均有统计学意义，见表 6。

4　讨论

老年斑(SPs)和神经原纤维缠结(NFTs)是被广泛接受的 AD 神经病理标志[12]。Aβ 沉积作为 SPs 的核心成分，主要来源于淀粉蛋白前 β-分解酶 1(BACE1)及 γ-分解酶对 Aβ 前体蛋白(APP)的不当剪切；Tau 蛋白在脑中促进微管的形成和稳定，过度磷酸化的 Tau 蛋白从微管分离、聚集形成 NFTs，二者均会改变神经元形态，诱导学习记忆能力损伤[13]。现有研究结果表明，Aβ 诱导的神经毒性主要由皮层和海马神经元中 Tau 蛋白磷酸化的升高介导，Tau 磷酸化水平的升高也被认为



A. Control 组(正离子模式);B. LWDHW 组(正离子模式);
C. Control 组(负离子模式);D. LWDHW 组(负离子模式)
A. Control group (positive ion model); B. LWDHW group (positive ion model); C. Control group (negative ion model); D. LWDHW group (positive ion model)

图 2 Control 组和 LWDHW 组大鼠脑脊液样品在正离子和负离子模式下的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图

Fig 2 Total ionization chromatography of UPLC-Q-TOF-MS of rats cerebrospinal fluid samples in Control group and LWDHW group under positive and negative ion model

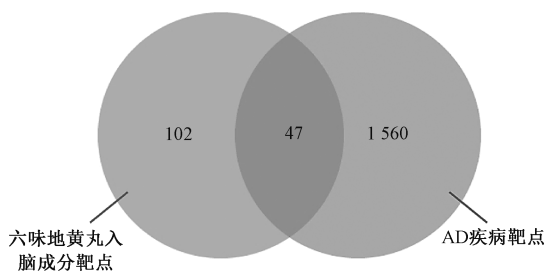


图 3 六味地黄丸入脑成分靶点与 AD 疾病靶点的韦恩图

Fig 3 Venn diagram of brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills and AD disease

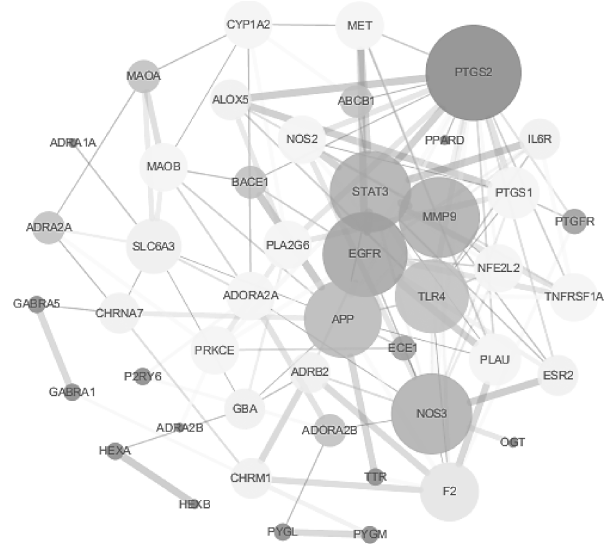


图 4 六味地黄丸入脑成分靶点与 AD 疾病靶点的 PPI 核心网络

Fig 4 PPI core network of brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills and AD disease

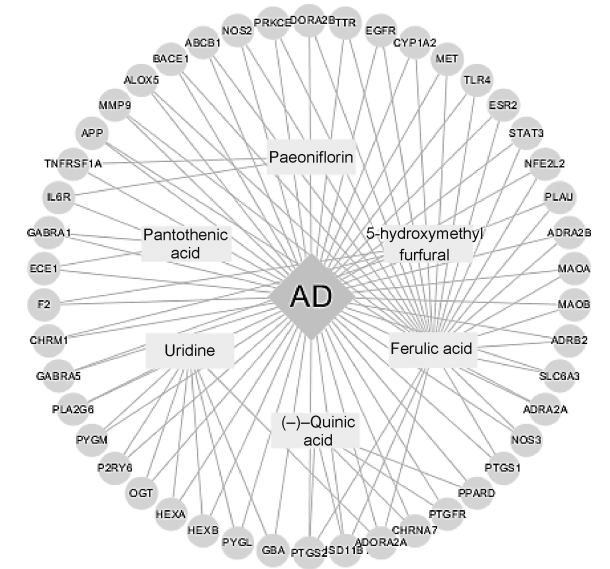


图 5 六味地黄丸入脑成分-靶点-AD 网络构建

Fig 5 Construction of "brain-absorption components-target-AD" network of Liuwei Dihuang pills

是 Aβ 诱导的神经毒性机制之一[14];Aβ 与 Tau 蛋白之间可能也存在一定的协同作用,二者可相互促进、共同发挥神经毒性,影响 AD 进展[15]。

在 Aβ 异常沉积情况下,Aβ 及其前体 APP 的 N 端金属结合域中的铜离子大量聚集,高效介导自由基氧化,导致脑中氧化应激等神经毒性的发生[16];有研究结果发现,Tau 的初期纤维化过程可能也与神经元中发生的氧化应激有关[17]。在氧化应激条件下,机体内 ROS 大量产生并蓄积[18],对神经元膜脂质、蛋白质及核酸造成破坏,是氧化应激发生的直接标志,抑制其积累可能是抑制 Aβ 诱导神经毒性的有效途径。同时,AD 发病过程与慢性缺氧状态密切相关,缺氧条件同样会使 ROS 的积累增加,缺氧条件下的鼠脑切片也显现出存在更多的 Aβ 斑块沉积[19]。缺氧诱导因子 1(HIF-1)与机体缺氧直接相关[20],可通过抑制其亚型之一的 HIF-1α 表达,改善 AD 缺氧相关的氧化应激损伤。

同时,Aβ 的异常沉积还可能是诱发 AD 中炎症反应的原因之一,可随着疾病的发展使小胶质细胞持续过度表达促炎因子,如 IL-6、诱导性一氧化碳酶(iNOS/NOS2)等[21],导致小胶质细胞对 Aβ 的清除减少,引起病变。Toll-Like 受体 4(TLR4)是小胶质细胞中表达最主要受体之一,丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)作为 TLR4 的下游,是炎症中主要的信号传导途径[22-23]。黄贞伟等[24]发现,抑制 TLR4/MAPK 信号通路激活可明显改善 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 IL-6 mRNA 及 iNOS 蛋白的高表达,降低炎症损伤。而炎症与氧化应激的关

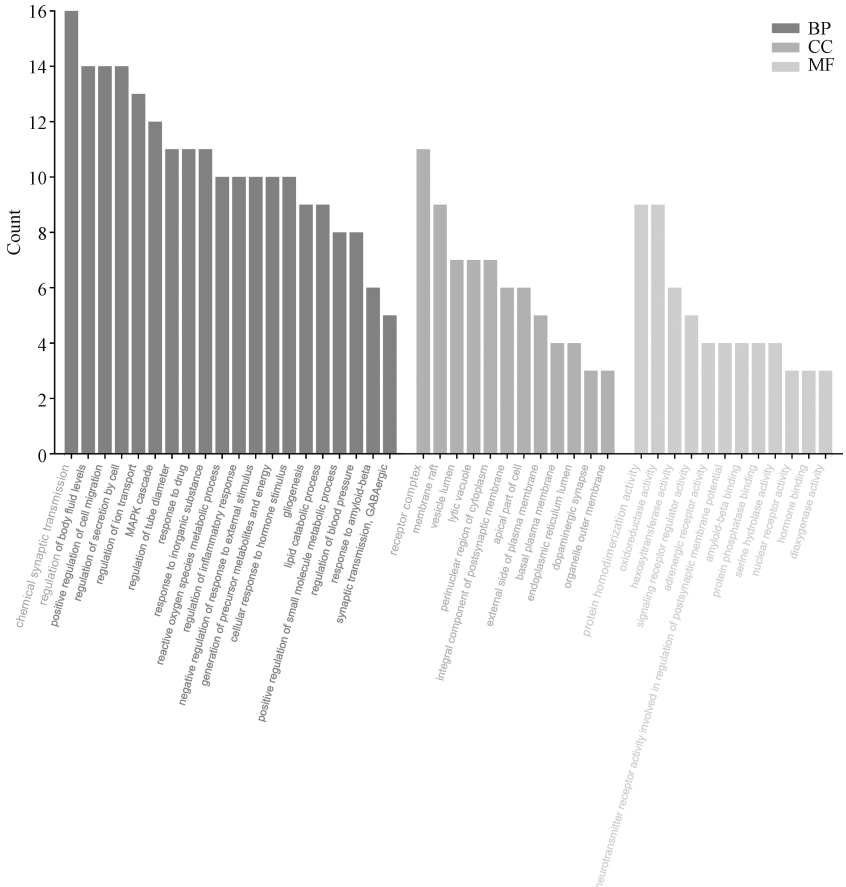


图 6　六味地黄丸入脑成分与 AD 疾病交集靶点的 GO 功能富集分析

Fig 6　GO functional enrichment analysis on the intersection targets of brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills and AD disease

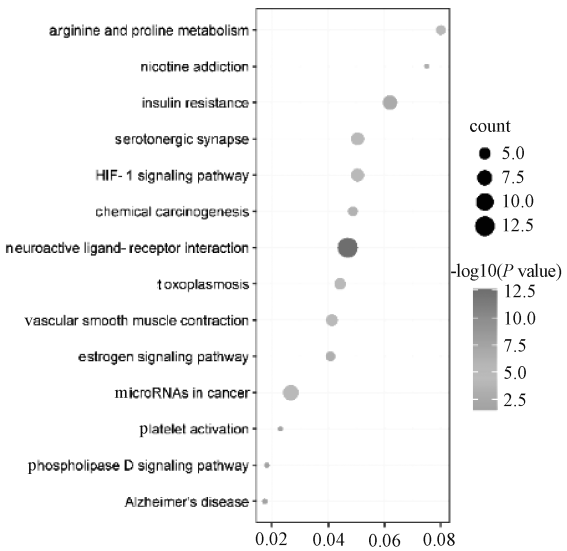


图 7　六味地黄丸入脑成分与 AD 疾病交集靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig 7　KEGG pathway enrichment analysis on the intersection targets of brain-absorption components of Liuwei Dihuang pills and AD disease

系也十分密切,研究结果表明,在炎症引发小鼠认知障碍过程中,ROS-p38 MAPK 系统可相互作用,通过影响小胶质细胞激活、炎症因子释放及氧化应激的发生,导致认知功能障碍[25]。

过多的 ROS 还会加剧线粒体功能损伤,导致能量代谢障碍[26]。能量代谢异常是 AD 的主要特征之一,机体内脂质及氨基酸代谢异常对 AD 相关的能量代谢障碍具有重要影响[27-28]。花生四烯酸(AA)是一种多不饱和必需脂肪酸,具有抑制脂肪生成、促进脂肪分解的作用。前列腺素 G/H 合酶 2(PTGS2)和多不饱和脂肪酸 5-脂氧合酶(ALOX5)分别是 AA 合成各种内源性前列腺素和白三烯类介质的限速酶,二者均可以通过 AA 途径参与机体的多种生理及病理过程,与 AA 共同在能量代谢(脂质代谢)的调节中发挥作用[29-30]。研究结果表明,机体内氨基酸对线粒体能量代谢同样有着重要的调控作用。如丝氨酸可促进脂肪和脂肪酸的新陈代谢,Le 等[31]发现通过给予营养的丝氨酸,AD 小鼠的记忆功能得以恢复;精氨酸代谢可以通过一氧化氮合酶生成的 NO,影响大鼠体内的脂类代谢,促进葡萄糖和脂肪酸的氧化分解以及脂肪细胞的脂解[32]。

此外,脑内神经递质作为突触间传递信息的重要媒介,是神经元发挥功能的基础,包括乙酰胆碱类、单胺类和氨类等多种,其中乙酰胆碱、DA、γ-氨基丁酸(GABA)、5-HT 及肾上腺素与 AD 密切相关[33]。而这些神经递质的功能状态也会受到 Aβ 和 Tau 的影响,Aβ 沉积和过度磷酸化 Tau 蛋白会阻碍神经递质的释放,干扰神经元突触蛋白活性、Ca^{2+} 和转录因子等重

表 6　三组 PC12 细胞 $A\beta_{1-42}$、ROS、IL-6、5-HT 和 DA 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 6　Comparison of $A\beta_{1-42}$, ROS, IL-6, 5-HT and DA levels among three groups of PC12 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	$A\beta_{1-42}$	ROS/%	IL-6/(pg/mL)	5-HT/(ng/L)	DA/(ng/L)
Control 组	9.879±0.781	100.000±2.097	10.951±3.674	0.627±0.102	201.801±39.217
Model 组	22.014±0.071[1)]	149.025±5.120[1)]	20.823±4.265[1)]	0.399±0.091[1)]	134.297±29.124[1)]
LWDHW 组	11.287±0.052[2)]	109.478±3.318[2)]	17.913±3.241[2)]	0.591±0.070[2)]	179.203±25.191[2)]

注:与 Control 组相比,[1)]$P<0.01$;与 Model 组相比,[2)]$P<0.01$

Note: *vs.* Control group, [1)]$P<0.01$; *vs.* Model group, [2)]$P<0.01$

要因子,促进 AD 发展[34]。

本实验利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定出 7 个入脑化合物成分,其中 6 个与 AD 靶点有直接作用,分别为(-)-奎宁酸、阿魏酸、芍药苷、泛酸、5-羟甲基糠醛和尿苷,可能在六味地黄丸治疗 AD 中发挥重要作用。其中,阿魏酸是熟地黄中的活性成分,已被证实具有抗氧化和神经保护特性,可改善认知障碍[35];5-羟甲基糠醛可通过提高脑组织抗氧化酶活力、降低脂质过氧化反应,改善学习记忆能力[36];芍药苷具有抗抑郁、抗炎和保护神经等多种药理作用[37];非腺苷核苷如尿苷,可对细胞外兴奋性神经递质谷氨酸或 GABA 水平起到一定的调节作用[38]。结合网络药理学结果,六味地黄丸入脑成分可对 Aβ 沉积相关的 BACE1、APP 等靶点参与的 Aβ 结合及反应过程;高度磷酸化 Tau 蛋白相关的蛋白磷酸酶的结合;氧化应激相关的 ROS 代谢过程、HIF-1 信号通路;炎症相关的 TLR4、IL-6R 和 NOS2 等靶点参与的 MAPK 级联、炎症反应的调节过程;能量代谢相关的 PTGS2、ALOX5 等靶点参与的脂质分解代谢过程、丝氨酸水解酶活性、精氨酸和脯氨酸代谢通路;神经递质相关的 α7 烟碱型乙酰胆碱受体(CHRNA7)、多巴胺转运体(SLC6A3)、α1 亚型 γ-氨基丁酸 A 受体(GABRA1)和 β2 肾上腺素受体(ADRB2)等靶点、参与突触后膜电位调节的神经递质受体活性、肾上腺素能受体活性、多巴胺能突触、5-羟色胺能突触通路和神经活性配体-受体相互作用通路等,起到一定调节作用。应用细胞实验对前期预测的部分结果进行验证,发现六味地黄丸脑脊液可对 D-gal 损伤 PC12 细胞增殖率及 $A\beta_{1-42}$、ROS、IL-6、DA 和 5-HT 水平起到一定的调节作用。但作为预测性实验及体外细胞实验,本实验结果可能存在一定局限性,未来将继续探索六味地黄丸在动物模型中发挥神经保护作用的相关机制。

综上所述,本实验结合 UPLC-Q-TOF-MS 技术与网络药理学方法,确定六味地黄丸入脑成分,并预测其改善学习记忆能力的相关机制,可为六味地黄丸在 AD 防治中的潜在应用提供参考。

参考文献

[1] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.

[2] ABEYSINGHE A A D T, DESHAPRIYA R D U S, UDAWATTE C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions[J]. Life Sci, 2020, 256: 117996.

[3] 姚璇,时晶,王旭,等. 基于网络药理学研究补肾方治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 世界中医药,2022,17(18):2556-2562.

[4] LI L, ZHANG L, YANG C C. Multi-target strategy and experimental studies of traditional Chinese medicine for Alzheimer's disease therapy[J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(5): 537-548.

[5] 灵枢经[M]. 北京:人民卫生出版社, 1963:73.

[6] 陈健. 六味地黄丸对快速老化小鼠学习记忆和细胞因子影响的初步研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2006.

[7] 崔勇, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 六味地黄丸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 148-151.

[8] 陈乔, 侯吉华, 李青, 等. 六味地黄丸对老年大鼠行为学的影响及对海马 CA1 区、CA3 区和 S1Tr 神经元的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1612-1614.

[9] 马锋, 田建英. 六味地黄丸对脑脊液神经保护作用的实验研究[J]. 宁夏医学杂志, 2006, 28(3): 165-167.

[10] 张杨, 冯宝民, 卢轩. UPLC/Q-TOF-MS 联用技术在药物分析中的应用进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1992-1996.

[11] JIAO X Y, JIN X, MA Y Y, et al. A comprehensive application: molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine[J]. Comput Biol Chem, 2021, 90: 107402.

[12] KENT S A, SPIRES-JONES T L, DURRANT C S. The physiological roles of tau and Aβ: implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics[J]. Acta Neuropathol, 2020, 140(4): 417-447.

[13] WU Z R, WANG Z H, LIU X, et al. Traumatic brain injury triggers APP and Tau cleavage by delta-secretase, mediating Alzheimer's disease pathology[J]. Prog Neurobiol, 2020, 185: 101730.

[14] MARON R, ARMONY G, TSOORY M, et al. Peptide interference with APP and Tau association: relevance to Alzheimer's disease amelioration[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3270.

[15] BUSCHE M A, HYMAN B T. Synergy between amyloid-β and tau in Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(10): 1183-1193.

[16] 邵思迈, 史洺, 余姊阳, 等. 阿尔茨海默病中的 β 淀粉样肽与氧化应激[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 131-135.

[17] BEYRENT E, GOMEZ G. Oxidative stress differentially induces tau dissociation from neuronal microtubules in neurites of neurons cultured from different regions of the embryonic *Gallus domesticus* brain[J]. J Neurosci Res, 2020, 98(4): 734-747.

[18] 邱琦, 胡中花, 徐红丹, 等. 柚皮素对 Aβ25-35 损伤 PC12 细胞氧化应激及 Tau 蛋白磷酸化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(21): 92-99.

[19] 陈娟, 王蓉. 缺氧与 AD 发病机制的关系[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(5): 547-549.

[20] 李绍慧, 高飞, 郝文霞, 等. 加味升降散调控 HIF-1α/NOX4 信号通路对膜性肾病大鼠氧化应激和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 66-72.

[21] 吴永康, 高洁, 卢志园, 等. 桂皮醛通过阻止海马神经炎症反应改善阿尔茨海默病老年小鼠记忆障碍的作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(5): 1627-1635.

(下转第 1305 页)