

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.09.015

基于网络药理学探讨当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机理

周成成, 梁幼雅, 刘四军, 吴庆光*

(广州中医药大学中药学院, 广东省广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号, 510006)

摘要 目的 探讨当归芍药散治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。方法 采用网络药理学研究方法, 应用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 数据库, 对当归芍药散和阿尔茨海默病进行靶标预测。采用 STRING 在线数据库, 对二者交集的靶点蛋白构建蛋白相互作用网络, 并在 Cytoscape 3.6.1 软件中进行可视化处理。在 Uniprot 数据库查询靶标蛋白的基因名, 使用 DAVID 工具对查到的基因进行基因本体论 (GO) 富集分析以及 KEGG 通路富集分析, 探讨潜在靶标可能具有的生物学功能及通路。结果 从当归芍药散中筛选出 38 个化合物, 涉及治疗阿尔茨海默病的 9 个靶点, 网络分析结果表明靶点该方可能通过胆碱能突触传递、乙酰胆碱受体信号通路、神经系统发育、信号转导等生物过程, 并结合 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体活性、过氧化物酶活性、细胞外配体门控离子信号通路、淀粉样 β 结合蛋白等分子功能发挥作用; 其作用机制主要与胆碱能突触通路、神经配体-受体相互作用通路、钙信号通路、尼古丁成瘾相关的信号通路、PI3K-Akt 信号通路等有关。结论 当归芍药散治疗阿尔茨海默病具有多靶点、多通路的特点。

关键词 阿尔茨海默病; 当归芍药散; 网络药理学

阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD) 是一种慢性的神经退行性疾病, 多发于老年人, 临床主要特征是不可逆的记忆减退, 认知、语言功能障碍以及人格改变等^[1]。相关流行病学研究显示, AD 患者已有 2400 万, 并且预测每 20 年会翻一倍^[2]。中医古籍对本病均有所论述, 如“呆症” (《华佗神医外传·治痴呆神方》)、“文痴”“善忘”“癡证”“神呆” (《临证指南医案》) 等。AD 的根本病机是脾胃虚弱、气血虚衰, 由气血亏虚而致痰浊血瘀, 阻塞清窍^[3-4]。当归芍药散首载于东汉张仲景的《金匮要略·妇人妊娠病脉证并治》, 曰“妇人腹中诸疾病, 当归芍药散主之”具有养血调肝、行气利水、健脾利湿、缓急止痛之效^[5]。日本学者于 1989 年首次报道了当归芍药散改善 AD 症状的临床观察^[6]。藤原道弘^[7]研究发现, 此方可以改善大鼠空间识别和被动的回避反射障碍, 进而认为本方可被视为与以往药物不同的有效抗痴呆药。亦有研究证实, 当归芍药散确实能有效改善 AD 患者的临床症状^[8-9]。目前对此方治疗

AD 的作用靶点和机制尚未明确。网络药理学是一种结合系统网络分析和药理学的新方法, 从分子水平上来阐明靶标和疾病网络之间的协同效应和潜在机制^[10]。本研究采用网络药理学的方法, 对当归芍药散治疗 AD 的作用机制进行研究和探讨, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 当归芍药散作用靶标预测

当归芍药散由当归、芍药、川芎、白术、茯苓、泽泻 6 味中药构成, 其中芍药分白芍与赤芍, 唐末宋初始将二者区分。因此, 用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 进行成分及相应靶点的查询及筛选时, 将白芍与赤芍一同写入。该数据库中包含 499 种《中国药典》^[11] 收录的药物, 能够提供成分的药物动力学数据及靶标、疾病信息^[12], 包括化学物质、靶点和药物靶点网络, 相关的药物靶点-疾病网络, 以及涉及口服生物利用度的天然化合物的药代动力学特性、药物相似、肠上皮通透性、血脑屏障、水溶性等^[13]。口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 是评价一个化合物

基金项目: 国家自然科学基金 (81673619)

* 通讯作者: zyx321@gzhtcm.edu.cn, 13600052738

是否可发展成为一个药物的重要指标^[14]。本文将筛选后 (OB > 30% 及 DL ≥ 0.18) 的化合物作为候选成分, 查询其对应的靶标蛋白, 并在 Uniprot 数据库 (<http://www.Uniprot.org/>) 查询靶标蛋白的基因名称。

1.2 AD 疾病靶标预测

在 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 网页检索框输入 “Alzheimer’s Disease”, 获取 AD 疾病蛋白靶标, 并在 Uniprot 数据库 (<https://www.Uniprot.org/>) 查询靶标蛋白的基因名, 选择生物物种为 homo sapiens (human)。

1.3 药物-靶点相互作用网络构建

获得当归芍药散相关靶点以及 AD 的靶点之后, 取两者的交集靶点蛋白, 采用 STRING 在线数据库 (<http://string-db.org/>) 构建蛋白相互作用网络 (PPI), 用 Cytoscape 3.6.1 软件进行蛋白网络结构可视化处理。根据获得的靶标数据结果, 建立当归芍药散治疗 AD 药物-靶点相互作用网络。

1.4 基因本体论 (GO) 分析

使用 DAVID 在线分析工具 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对网络合并后获得的靶点蛋白进行 GO 富集分析, 用统计学超几何分布定量 (P 值) 评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群, 以 P 值反映蛋白质生物学功能的显著性。选择生物过程、分子功能和细胞组分 3 个模块绘制条形图。

1.5 KEGG 通路富集分析

应用 DAVID 工具对药物-疾病交集蛋白靶标基因进行 KEGG 通路富集分析^[15-16]。通过富集分析的功能条目, 考察中药的潜在靶标可能具有的生物学功能及参与的生物学通路, 进而得到当归芍药散

治疗 AD 的主要作用通路。

2 结果

2.1 药物-疾病靶标预测结果

从 TCMSP 数据库中搜索当归芍药散各味药的化合物成分, 得到结果: 当归 125 个, 白芍 85 个, 赤芍 119 个, 川芎 189 个, 茯苓 34 个, 白术 55 个, 泽泻 46 个。根据 OB > 30% 及 DL ≥ 0.18 要求, 删去重复、冗杂以及未找到对应靶点的化合物, 最终选定 38 个化合物, 其中来源于当归 2 个, 白芍 7 个, 赤芍 8 个, 川芎 5 个, 茯苓 6 个, 白术 4 个, 泽泻 6 个。从 TCMSP 数据库获取所选化合物的靶标蛋白, 同时检索 AD 疾病蛋白靶标, 取两者的交集靶点蛋白 9 个, 并在 Uniprot 数据库检索其对应的基因名, 分别是 CHRM1、PTGS2、ACHE、GABRA5、CHRM2、MAPK14、GSK3B、MPO、CHRNA7。

2.2 靶点-靶点相互作用网络构建

采用 STRING 在线数据库 (<http://string-db.org/>) 构建蛋白相互作用网络。利用 Multiple proteins 工具, 限定物种为人, 获取蛋白相互作用, 并保存其 TSV 格式文件。将文件信息导入 Cytoscape 3.6.1 软件绘制蛋白互作网络图, 使之产生更清晰的视觉效果, 见图 1。共涉及 13 个节点, 28 条边。图中的节点表示蛋白, 边表示蛋白间的相互关联。互作网络中图节点的大小与此节点的度成正比, 即与此节点相连的边越多, 它的度越大, 节点也就越大。边的宽度表示此边连接的两个节点间的互相作用的关系强弱, 互相作用的关系越强, 边越宽。

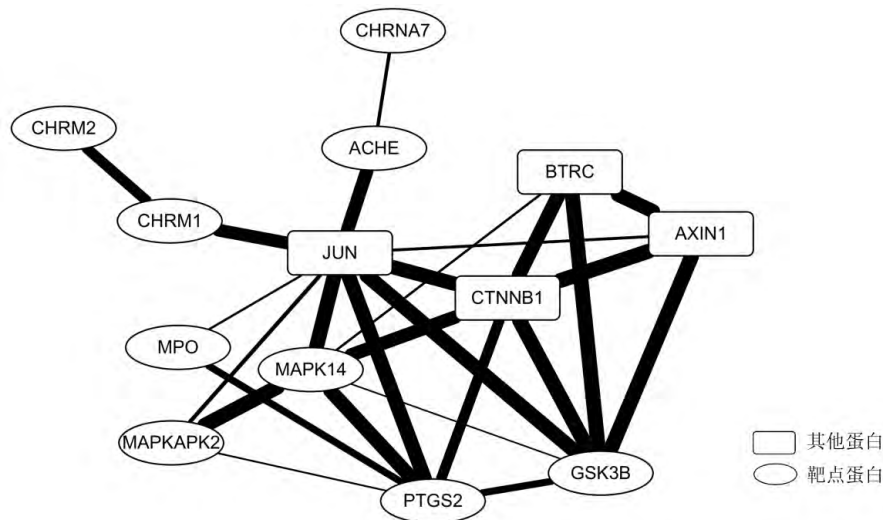


图 1 当归芍药散治疗阿尔茨海默病靶点蛋白互作网络图

2.3 当归芍药散化合物-靶点-通路

使用 Cytoscape 3.6.1 软件中对当归芍药散活性成分对应的 9 个靶点进行分析, 使用 Merge 功能整合当归芍药散主要成分和靶点网络, 构建当归芍药散治疗 AD 对应化合物-靶点-通路图, 结果见图 2。结果发现, 交集的靶标蛋白的关键基因有 9 个。

2.4 药物-疾病交集靶基因 GO 分析结果

为了进一步阐明候选靶点的可能作用, 使用 DAVID 工具对当归芍药散治疗 AD 的 9 个候选靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 生物途径分析。在生物过程、分子功能和细胞组成中的排列条目见图 3。在生物过程中, 胆碱能突触传递、乙酰胆碱受体信号通路、神经系统发育、对食物的反应、联想学习、信号转导、认知及记忆等排位靠前; 在分子功能中, G 蛋白偶联乙酰胆碱受体活性、过氧化物酶活性、细胞外配体门控离子信号通路、淀粉样 β 结合蛋白等排在前面; 在细胞组分中, 主要包括细胞连接、突触、突触后膜等。

2.5 KEGG 通路富集分析

应用 DAVID 数据库, 通过 KEGG 生物途径富集分析, 识别当归芍药散治疗阿尔茨海默病有显著影响的生物途径。结果显示, 其机制主要涉及胆碱能突触通路、神经配体-受体相互作用通路、钙离子信号通路、尼古丁成瘾相关的信号通路、PI3K-Akt 信号通路、血管内皮生长因子信号通路等, 详见表 1。

表 1 当归芍药散治疗阿尔茨海默病交集靶蛋白基因 KEGG 通路富集分析结果

通路名称	P 值
胆碱能突触通路	2.1×10^{-4}
神经配体-受体相互作用通路	3.1×10^{-3}
逆行神经的信号通路	5.6×10^{-3}
钙离子信号通路	1.7×10^{-2}
尼古丁成瘾相关的信号通路	4.5×10^{-2}
PI3K-Akt 信号通路	5.7×10^{-2}
血管内皮生长因子信号通路	6.9×10^{-2}
催乳素信号通路	7.9×10^{-2}
利什曼病信号转导途径	7.9×10^{-2}
化学致癌途径	8.9×10^{-2}

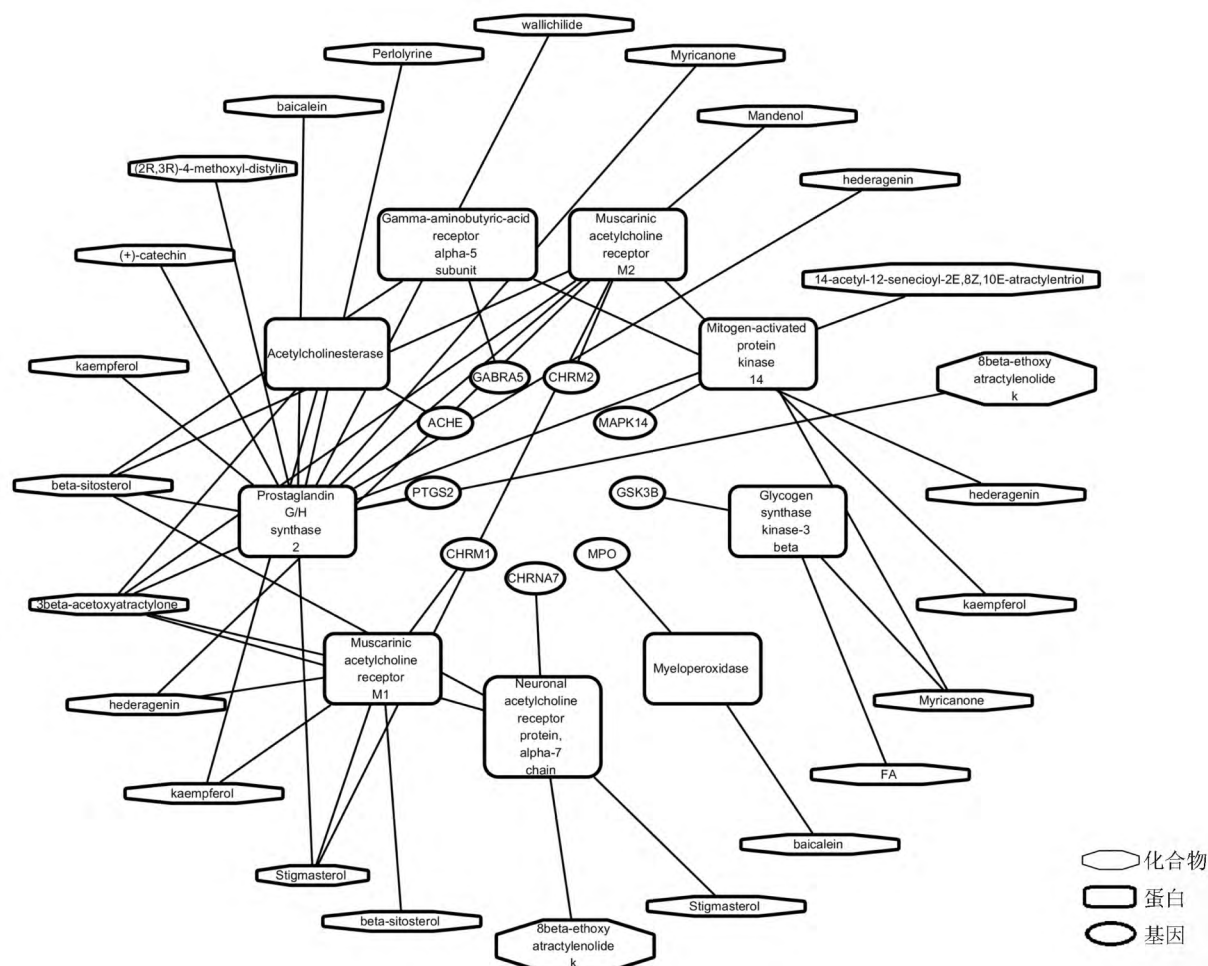


图 2 当归芍药散治疗阿尔茨海默病对应化合物-靶点-通路图

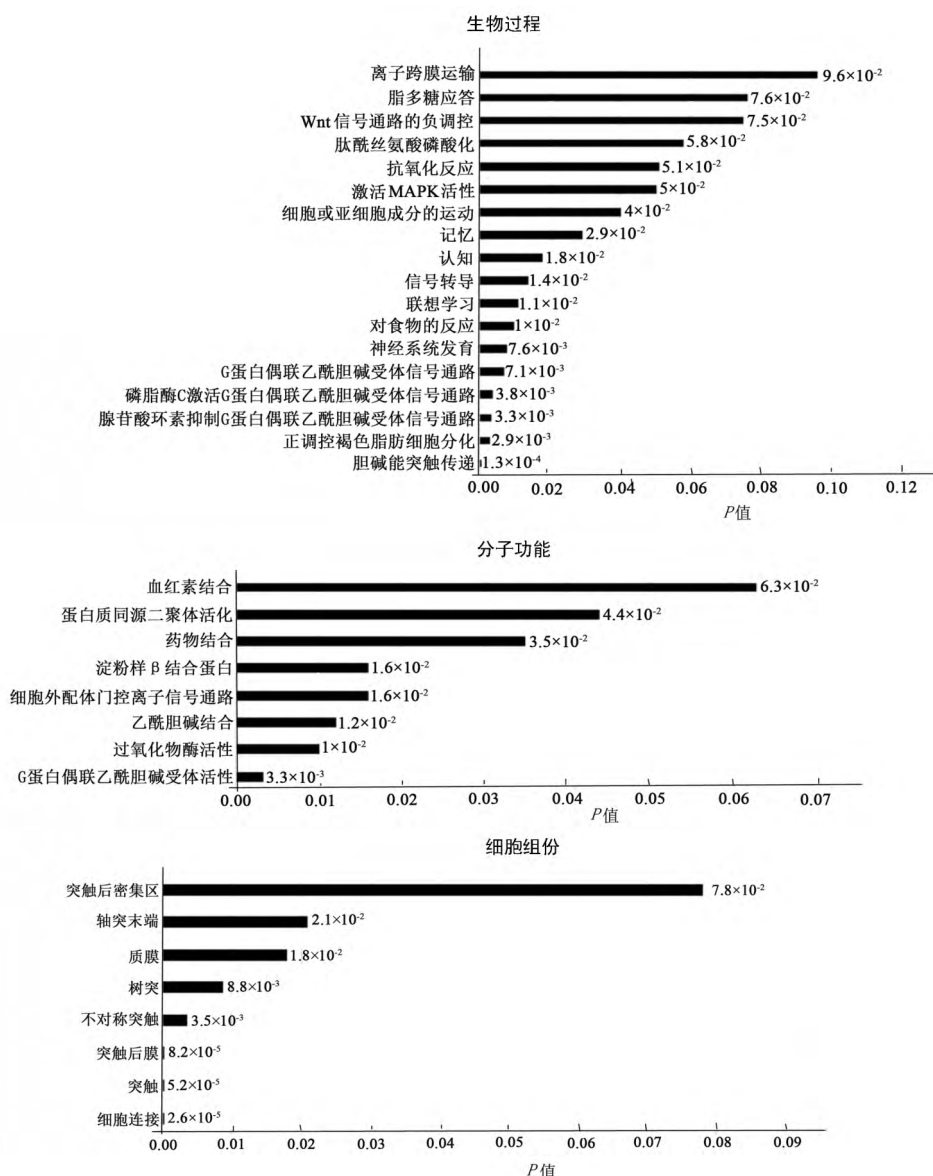


图 3 当归芍药散治疗阿尔茨海默病药物-疾病交集靶基因 GO 分析结果

3 讨论

中药复方对疾病的辨证论治，强调整体性，注重君、臣、佐、使的配伍，通过多味中药的协调配合一同实现对机体功能的调节，体现了多成分、多靶点、多途径调控的理念。为了揭示多成分药物协同作用的规律，研究者提出了网络药理学概念^[1]。网络药理学是一种结合系统网络分析和药理学的新方法^[2]，主要包括药物活性成分的筛选、作用靶点的获取、网络构建与分析 3 个部分。通过构建药物活性成分-靶点、靶点-靶点、成分-靶点-疾病、成分-靶点-通路等网络，从分子水平上来阐明靶标和疾病网络之间的协同效应和潜在机制，从而了解成分、蛋白质、基因和疾病之间的相互作用关系^[3]，非常适合于中药复方作用机制的研究^[4]。

本研究利用网络药理学的方法探讨了当归芍药散治疗 AD 的作用机制，发现该方可能通过突触传递、乙酰胆碱受体信号通路、神经系统发育、对食物的反应、信号转导等生物过程，并结合 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体活性、过氧化物酶活性、乙酰胆碱结合、细胞外配体门控离子信号通路、淀粉样 β 结合蛋白等分子功能发挥作用；其作用机制主要与胆碱能突触通路、神经配体-受体相互作用通路、钙信号通路、尼古丁成瘾相关的信号通路、PI3K-Akt 信号通路、血管内皮生长因子信号通路等有关，与目前研究所证实的某些药物^[21-22]作用于 AD 的信号通路可能通过上述报道结果基本相符，其中有关 PI3K-Akt 信号通路的研究^[23-24]相对较多。近年来，糖尿病脑病与 AD 相关^[25-26]的说法逐渐被

关注,而胰岛素受体底物的主要下游途径之一便是 PI3K/Akt 级联反应^[27]。综上所述,当归芍药散治疗 AD 具有多靶点、多通路的特点。本研究采用网络药理学方法对当归芍药散治疗 AD 的作用机制进行了探讨,为进一步验证其药理作用机制提供了理论基础。

参考文献

- [1] WOOD JG, MIRRA SS, POLLOCK NJ, et al. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(11): 4040-4043.
- [2] Alzheimer's Association. 2010 Alzheimer's disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2010, 6(2): 158-194.
- [3] 王中琳, 席加秋. 浅议脾胃与老年性痴呆的关系 [J]. 中医药现代远程教育, 2011, 9(19): 106.
- [4] 卢阳佳, 陈俊瑶, 黄泳, 等. 从脾胃论治阿尔茨海默病概述 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1217-1219.
- [5] 李佳曦. 当归芍药散组方配伍规律及其方证相关性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009: 11.
- [6] 水岛宣昭. 当归芍药散对老年痴呆的作用 [J]. 和汉医药学会志, 1989, 6(3): 456.
- [7] 藤原道弘. 当归芍药散对大鼠空间识别和被动回避反射障碍的影响 [J]. 和汉医药学会志, 1989, 6(3): 234-235.
- [8] 刘孟渊, 王达平, 刘玉平, 等. 加味当归芍药散治疗老年性痴呆的疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2001, 18(1): 30-33.
- [9] 林志宏, 朱丹妮, 严永清, 等. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机制研究 I: 组方作用协同性与选择性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 16-19.
- [10] HOPKINS AL. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [12] LIU J, PEI M, ZHENG C, et al. A systems-pharmacology analysis of herbal medicines used in health improvement treatment: predicting potential new drugs and targets [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 938764. doi: 10.1155/2013/938764.
- [13] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13. doi: 10.1186/1758-2946-6-43.
- [14] AHMED SS, RAMAKRISHNAN V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40654.
- [15] DENNIS G JR, SHERMAN BT, HOSACK DA, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. Genome Biol, 2003, 4(5): P3.
- [16] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(1): 1-13.
- [17] LIU H, ZENG L, YANG K, et al. Network pharmacology approach to explore the pharmacological mechanism of Xiaoyao powder on anovulatory infertility [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 2960372. doi: 10.1155/2016/2960372.
- [18] HOPKINS AL. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [19] XU T, LI S, SUN Y, et al. Systematically characterize the absorbed effective substances of Wutou decoction and their metabolic pathways in rat plasma using UHPLC-Q-TOF-MS combined with a target network pharmacological analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 141: 95-107. doi: 10.1016/j.jpba.2017.04.012.
- [20] LIU YF, AI N, KEYS A, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. Chin Herb Med, 2015, 7(1): 18-26.
- [21] 王晓玲, 邓于新, 官志忠, 等. $\alpha 7$ 神经型尼古丁受体对突触功能和钙信号通路的影响及在阿尔茨海默氏病中的神经保护作用机制研究 [J]. 神经药理学, 2018, 8(2): 35-36.
- [22] 郑桃林, 王哲, 刘超, 等. 淫羊藿苷对阿尔茨海默病细胞模型糖原合成酶激酶-3 β 表达的影响及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 800-803.
- [23] 张薇薇, 苗玲. PI3K/Akt 信号通路及其在神经疾病中的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(6): 755-757.
- [24] 代文博. PI3K/Akt 信号通路及阿尔茨海默病关系的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2014, 30(10): 1499-1501.
- [25] RAD SK, ARYA A, KARIMIAN H, et al. Mechanism involved in insulin resistance via accumulation of β -amyloid and neurofibrillary tangles: link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 22(12): 3999-4021.
- [26] LEE JH, JAHRLING JB, DENNER L, et al. Targeting insulin for Alzheimer's disease: mechanisms, status and potential directions [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 64(s1): S427-S453.
- [27] VADAS O, BURKE JE, ZHANG X, et al. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide

3-kinases [J]. Sci Signal, 2011, 4(195): re2. doi: 10.

1126/scisignal.2002165.

Study on the Action Mechanism of Danggui Shaoyao Powder (当归芍药散) in the Treatment of Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology

ZHOU Chengcheng, LIANG Youya, LIU Sijun, WU Qingguang

(College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006)

ABSTRACT Objective To investigate the possible action mechanism of *Danggui Shaoyao Powder* (当归芍药散) in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** The network pharmacology research method was used to predict the target of *Danggui Shaoyao Powder* and AD using traditional Chinese medicine system pharmacology (TCM-SP) database and analysis platform. The STRING online database was used to construct a protein interaction network for the target proteins at the intersection of the two sides, and visualized in Cytoscape 3.6.1 software. The gene name of the target protein was searched in the Uniprot database, and the genes were found to perform gene ontology (GO) enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis using the DAVID tool to explore the possible biological functions and pathways of potential targets. **Results** Totally 38 compounds were screened from *Danggui Shaoyao Powder* and involved 9 targets for the treatment of AD. The results of network analysis indicated that the target may play a role through cholinergic synaptic transmission, acetylcholine receptor signaling pathway, nervous system developmental, signal transduction and other biological processes, combined with G protein-coupled acetylcholine receptor activity, peroxidase activity, acetylcholine ligand-gated ion signaling pathway, amyloid β -binding protein and other molecular functions; The mechanism is mainly related to the cholinergic synaptic pathway, the neurotrophin receptor interaction pathway, the calcium signaling pathway, the signaling pathway related to nicotine addiction, and the PI3K-Akt signaling pathway. **Conclusion** *Danggui Shaoyao Powder* has the characteristics of multiple targets and multiple pathways in the treatment of AD.

Keywords Alzheimer's disease; *Danggui Shaoyao Powder* (当归芍药散); network pharmacology

(收稿日期: 2018-08-27; 修回日期: 2018-12-18)

编辑: 邓 媛

腰痛宁胶囊临床研究与应用征文通知

腰痛宁胶囊是颈复康药业集团有限公司生产的治疗腰腿痛的首选药品之一。为了总结腰痛宁胶囊多年来研究及临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合主办此次有奖征文活动,现将有关事项通知如下。

一、征文内容

1. 腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节炎、症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析; 2. 腰痛宁胶囊临床用量、用法的研究与经验总结; 3. 腰痛宁胶囊组方研究、药理研究与探讨; 4. 腰痛宁胶囊临床扩大应用范围的探讨与研究; 5. 名医名家应用腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症等腰腿痛经验总结与分析; 6. 包括但不限于以上内容文章。

二、征文要求

1. 来稿未公开发表,字数不低于 3000 字,请附单位介绍信,来稿不退; 2. 文章中涉及到的计量单位、实验数据等须采用法定标准方法表示; 3. 文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编、联系电话等,请以 Word 形式投送电子稿件,不接受纸质投稿。

三、奖励办法

由全国中医药界知名专家组成评审委员会,将评出一等奖 1~2 篇,每篇奖励 5000 元; 二等奖 5~10 篇,每篇奖励 4000 元; 三等奖 10~15 篇,每篇奖励 3000 元; 优秀奖若干篇,每篇奖励价值 500 元的精美礼品一份。获奖者将获得由主办单位颁发的获奖证书、奖金或礼品,获奖文章达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊上发表,其他获奖文章达到标准者将在《中医杂志》增刊发表,并赠送样刊 1 册。评选结果将在颈复康药业集团有限公司官网、《中医杂志》《中国医药报》《中国中医药报》等媒体上公布。主办单位将邀请部分获奖者免费参加颁奖大会及学术交流会与知名专家现场交流。颁奖大会具体时间、地点另行通知。

本次征文不收取任何费用,来稿请于 2019 年 12 月 31 日前发至邮箱: jtem@163.com。联系地址: 北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社,联系人: 22 号编辑,邮编: 100700,电话: (010) 64035632。