

钩藤散活性成分治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学分析

宋祯彦, 陈易璇, 余靖萍, 贺 旭, 成绍武*

湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 利用网络药理学方法研究钩藤散治疗阿尔茨海默病(AD)的作用机制。方法 从中药系统药理学数据库(TCSMP)、中药信息数据库(TCMID)中筛选钩藤散治疗 AD 的活性成分,并构建药物-靶标-疾病网络、蛋白与蛋白相互作用(PPI)网络,运用生物信息学分析方法进行 GO 分析、通路富集分析和 PPI 网络分析。结果 通过网络药理学方法筛选出钩藤散活性成分 65 种,显示其活性化合物的预测靶点 473 个,215 个靶点与 AD 相关,钩藤散活性化合物的药效作用靶点高度富集到与 AD 相关的信号通路和生物学过程,PPI 网络结果显示 JUN、TNF、VEGFA、ESR1、APP 可能是钩藤散治疗 AD 的重要作用靶点。结论 钩藤散活性化合物以协同的方式与多个靶点、多种途径相互作用,主要通过抗炎、抗凋亡、增强代谢和增强免疫系统途径对 AD 产生重要的治疗作用。

关键词:网络药理学;钩藤散;阿尔茨海默病;作用机制;靶点

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2018)24-5854-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.019

Network pharmacological approach to investigate mechanism of active ingredients in Gouteng Powder for Alzheimer's disease

SONG Zhen-yan, CHEN Yi-xuan, YU Jing-ping, HE Xu, CHENG Shao-wu

Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** To confirm evidence regarding the potential therapeutic effect of Gouteng Powder (GTP) on Alzheimer's disease (AD) using a network pharmacological approach. **Methods** The active ingredients of GTP on AD were screened from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and Traditional Chinese Medicine Integrative Database (TCMID) by network pharmacology method, and the drugs-targets-diseases network and PPI network were built. These findings were confirmed by compound-target network, PPI network, gene ontology (GO) analysis, and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** A total of 65 active ingredients from GTP were selected from TCMSP, which were interacted with 473 target proteins, and 215 potential targets related to AD were selected. Results showed that the compounds in GTP were highly connected to AD related signaling pathways and biological processes. PPI network results showed that JUN, TNF, VEGFA, ESR1, and APP might be important therapeutic targets of GTP in the treatment of AD. **Conclusion** Our results indicated that active compounds in GTP interacted with multiple targets in a synergetic way. The anti-inflammatory, anti-apoptosis, metabolic enhancement, and immune system enhancing effects of active ingredients in GTP might contribute its major therapeutic effects on AD.

Key words: network pharmacology; Gouteng Powder; Alzheimer's disease; mechanism; target

随着人口老龄化日益增加,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)已上升为仅次于心血管疾病和癌症的第 3 大死亡杀手,发病率呈现出逐年上升趋势^[1],我国现有约 1 000 万 AD 患者,保守估

计每年耗费约 60 亿美元^[2]。AD 主要表现为认知功能下降、精神症状和行为障碍、日常生活能力下降,对老年人健康和生活质量造成重大威胁,给社会带来沉重的经济负担。目前西医治疗主要从加强中枢胆碱

收稿日期:2018-07-11

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774129);湖南省中医药管理局科研项目(2018025);湖南省中医药管理局重点项目(201609);湖南省教育厅开放基金重点项目(15K088);湖南省自然科学基金面上项目(2018JJ2296);湖南省科技厅重点专项(2017SK2111);2018 年湖南中医药大学大学生研究性学习和创新性实验计划课题(2018017)

作者简介:宋祯彦(1988—),男,理学硕士,实验师,专业方向为中西医结合防治老年性疾病基础研究。E-mail: songzhenyan2103@hnucm.edu.cn

***通信作者** 成绍武,教授。Tel: (0731)88458257 E-mail: scheng@hnucm.edu.cn

能活动和减少 β -淀粉样蛋白沉积 2 个方面进行治疗,但效果甚微^[3]。中医药因其多途径、多靶点的作用特点,在治疗 AD 等复杂的神经退行性疾病方面具有优势。

钩藤散是传统中医名方,出自《本事方》,由钩藤、石膏、陈皮、麦冬、半夏、茯苓、人参、防风、生姜、甘草、菊花 11 味药组成。该方原为治疗肝厥头晕之症的经典方剂,近代医者常将钩藤散用于老年性痴呆的防治,该方在日本医界被视为治疗痴呆的常用方,对 AD 患者认知行为和神经保护方面有部分改善^[4-5]。研究证明钩藤散能有效降低脑组织 β -淀粉样蛋白含量、促进突触形成、降低谷氨酸兴奋性毒性、调节乙酰胆碱酯酶含量和抗氧化应激等途径改善 AD 患者的认知功能^[6-9],但其药理作用尚未完全阐明。

中药方剂通过其多种成分作用于多种靶点,在疾病发生发展的关键生物学过程中起重要的作用。由于生物信息学的快速发展,网络药理学方法已成为一种高效、系统地揭示中药方剂分子机制的新手段^[10-11]。网络药理学研究药物、靶标和疾病之间的关系,并通过系统的思想展示药物-靶标网络,将相互作用关系可视化网络模型,并从整体的角度研究药物对生物网络的影响^[12]。因此,本研究采用网络药理学方法,探讨钩藤散对 AD 的影响及其作用机制,为 AD 的临床治疗提供有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 药物数据库的建立

钩藤散的化合物信息来源于中药系统药理学数据库 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 和中药信息数据库 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>) 数据库,运用 TCMSP 数据库提供的化合物药动学性质相关参数包括口服生物利用度 (OB)、类药性 (DL)、血脑屏障通透性 (BBB) 等对每个化合物进行筛选^[13]: ①钩藤散汤剂以口服作为主要服药形式,因此设置 $OB \geq 30\%$ ^[14]; ②中枢神经系统的靶向药物必须通过血脑屏障才能产生药效作用,因此设置 $BBB \geq 0.3$ 为筛选参数^[15]; ③对于口服药物来说,达到作用靶点需要经过体内较多的生物学过程,具有较高的类药性的化合物才能被安全送达靶器官、靶细胞发挥其生物学效应,因此设置 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件^[16]。筛选出的化合物通过 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对结构式进行标准化查询并获取化合物的 SMILES 表达式。

1.2 活性化合物的靶点预测

钩藤散活性化合物预测主要通过数据库收集、文献查找和基于配体结构特征的靶点预测,从 TCMSP 中获取活性化合物的基因靶点信息,通过基于化学结构相似性预测的网站 (SEA, <http://sea.bkslab.org>) 和 the Binding Database (<http://www.bindingdb.org>) 收集可能的靶点,使用 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 对所有靶点信息进行标准化。

1.3 AD 相关基因的筛选

通过治疗靶点数据库 (TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>)、Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) 对 AD 相关的基因进行筛选,将钩藤散预测的相关靶点网络映射到 AD 相关靶点网络中,2 个网络中重叠的基因即被认为是钩藤散中药成分治疗 AD 的作用靶点。

1.4 可视化网络构建

为了可视化呈现钩藤散活性化合物和靶点的相互作用及钩藤散活性化合物、预测靶点和 AD 相关靶点的关系,使用 Cytoscape-v3.6.1^[17] 构建了活性化合物-靶点网络 (compounds-targets network, C-T) 和活性化合物-靶点-AD 靶点网络 (compounds-targets-AD network, C-T-AD)。

1.5 Gene Ontology (GO) 分析和通路分析

GO 是基因功能国际标准分类,对选定的基因按 GO 分类,通过离散分布的显著性分析、误判率分析和富集分析,对其重要生物学功能进行富集显示。利用 GO 在线分析工具 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>),以 $P < 0.5$ 、Benjamini < 0.5 为参数获得钩藤散治疗 AD 相关基因的 GO 富集信息。

通路分析是通过对选定的基因按照公共数据库 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 进行分类,通过离散分布的显著性分析,得到与实验目的有显著相关的通路分类,本研究利用通路在线分析平台 Omicshare (<http://www.omicshare.com>) 以 $P < 0.5$ 、 $FDR < 0.05$ 为参数获得钩藤散治疗 AD 相关基因的通路富集信息,并使用 Cytoscape-v3.6.1 构建靶点-通路 (T-P) 网络图。

1.6 AD 相关靶点的蛋白与蛋白相互作用 (PPI) 网络分析

1.6.1 PPI 网络构建 在分子生物学中,相互作用基因/蛋白质检索工具 STRING (<https://string-db.org/>) 是根据生物数据库和 Web 资源对基因/蛋白相

互作用进行检索和预测^[18]。PPI 网络是系统理解细胞过程的重要工具。这种网络可用于过滤和评估功能基因组数据,并为注释蛋白质的结构、功能提供一个可视化的平台^[19]。探索钩藤散治疗 AD 相关靶点的 PPI 网络可以为寻找钩藤散治疗 AD 重要药效靶点以及未来的实验验证提供新的方向。本研究利用在线数据库 STRING 获得钩藤散治疗 AD 相关靶点的 PPI 网络数据 (score ≥ 0.9), 并使用 Cytoscape-v3.6.1 构建可视化 PPI 网络图。

1.6.2 拓扑(Cluster)模块构建 在同一个网络中, 类似或相关功能的节点聚集称为 Cluster 模块。在 PPI 网络中, Cluster 模块可能代表分子复合物的紧密联系。因此对 PPI 网络进行 Cluster 模块构建能够为研究疾病的发病机制和药物的作用途径提供信息^[20-21]。本研究使用 Cytoscape-v3.6.1 的插件 MCODE 对钩藤散治疗 AD 相关靶点的 PPI 网络进行分析, 得到了 Cluster 模块的网络集群。

2 结果

2.1 活性化合物筛选

从 TCMSP 数据库中收集到钩藤散方剂中 10 味中药的活性化合物, 其中钩藤 65 种、陈皮 63 种、半夏 116 种、茯苓 34 种、人参 190 种、防风 173 种、生姜 265 种、甘草 280 种、菊花 359 种、麦冬 8 种, TCMID 查询到麦冬成分 40 种、石膏成分 1 种, 根据设置的筛选条件 OB $\geq 30\%$ 、BBB ≥ 0.3 、DL ≥ 0.18 , 筛选钩藤散上述化学成分, 其中石膏主要成分硫酸钙因无有效预测靶点被剔除, 40 种麦冬有效成分没有 AMDE 数据, 从中选择文献报道具有药物活性的化合物 8 种^[22-24], 最终筛选出钩藤散的 65 个活性化合物进行后续分析, 化合物信息见表 1。

2.2 活性化合物的靶点预测

65 个活性化合物中除 M46 没有预测靶点, 剩下 64 个活性化合物共预测靶点 473 个, 与 TTD、Drugbank、DisGeNET 数据库中所获得的 2 245 个 AD 相关性基因网络进行映射, 473 个预测靶点中有 215 个与钩藤散防治 AD 密切相关。

2.3 网络关系构建

2.3.1 药物-化合物-靶点网络(H-C-T) 根据钩藤散中 10 种中药、64 个活性化合物与 473 个靶点之间的相互作用关系构建了 H-C-T 网络图(图 1)。该网络由 535 个节点(nodes)和 2 874 条边(edges)组成, 位于外圈的靶点与至少 2 个化合物连接, 内圈的靶点则与更多的化合物相连, 平均每个节点都

与 7.87 个相邻节点存在联系。64 个活性化合物中, 33 个化合物都具有 20 个以上的作用靶点, 提示这些成分可能在钩藤散药效中起主要作用。

2.3.2 C-T-AD 网络 将获取的 64 个活性化合物、215 个与 AD 相关的潜在靶点构建成 C-T-AD 网络图, 将钩藤散与 AD 相关靶点与活性化合物相互关系可视化(图 2)。C-T-AD 网络图中所有活性化合物都与至少 2 个靶点相连, 网络中的度(degree)指与该节点相关联边的条数, 度高表明该化合物关联的靶点越多^[17], 其中 7-methoxy-2-methyl isoflavone (M22, 度值=56)、butyl octyl phthalate (M50, 度值=54)、 β -sitosterol (M5, 度值=45)、eicosadienoic acid (M4, 度值=43)、gondoic acid (M3, 度值=42)、icos-5-enoic acid (M33, 度值=41)、9-eicosenoic acid (M35, 度值=41)、dihydrocapsaicin (M57, 度值=40)、arachidonate (M54, 度值=37)的度较高, 在网络中处于中心位置, 可能是钩藤散治疗 AD 的重要成分。同时, 215 个潜在靶点中有 137 个靶点与至少 2 个化合物相连, 其中 PTGS2 (度值=41)、PTGS1 (度值=32)、AR (度值=29)、CHRM1 (度值=27)、ADRB2 (度值=26)、RXRA (度值=25)、ESR1 (度值=24)、ESR2 (度值=21)、NOS2 (度值=20)、PRKACA (度值=20)等具有较高的度, 靶点度越高, 说明其参与网络中的生物功能越多, 提示这些靶点与防治 AD 密切相关。

2.4 GO 分析

对 215 个与 AD 相关的靶点进行 GO 富集分析, 挑选排名前 20 个生物学过程, 结果表明钩藤散治疗 AD 的作用途径主要与信号传导、对药物的反应、炎症反应、应对缺氧、凋亡过程、衰老、记忆等有关(图 3)。其中富集到“炎症反应”的基因有 33 个, 富集到“凋亡过程”的基因有 20 个, 钩藤散潜在靶点中有 CASP4、NLRP1、NLRP3、NFKB1、TLR2 参与这 2 个生物学过程, 说明钩藤散治疗 AD 的机制可能与炎症与凋亡途径密切相关, 上述基因可能是重要作用靶点。“衰老”和“记忆”是 AD 发病的主要生物学过程, 有 19 个基因富集到“衰老”, 9 个基因富集到“记忆”, 其中钩藤散的预测靶点中 CREB1 和 HTR2A 与这 2 个生物学过程相关。

2.5 通路富集分析

将 215 个与 AD 相关基因与人类基因组背景基因导入到 OmicShare 在线分析软件中, 进行目的基因相对于背景基因的富集统计, 同时对这些基因富

表 1 钩藤散 65 种活性化合物信息

Table 1 Sixty-five potential active compounds of Gouteng Powder

编号	药材来源	化合物	OB/%	BBB	DL
M1	半夏	卡维丁 (cavidine)	35.64	0.63	0.81
M2	半夏	环木菠萝烯酸 (cycloartenol)	38.69	1.33	0.78
M3	半夏	二十碳-11-烯酸 (gondoic acid)	30.70	0.80	0.20
M4	半夏	二十碳二烯酸 (eicosadienoic acid)	39.99	0.82	0.20
M5	半夏、防风、钩藤、菊花、 人参、生姜	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.99	0.75
M6	半夏、菊花	谷甾酮 (sitostenone)	36.08	1.22	0.76
M7	麦冬、半夏、人参、生姜	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	1.00	0.76
M8	钩藤、甘草、陈皮、防风	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.87	0.75
M9	防风	十八碳-9,12-二烯酸乙酯 (mandenol)	42.00	1.14	0.19
M10	防风	欧前胡素 (imperatorin)	34.55	0.92	0.22
M11	防风	异欧前胡素 (isoimperatorin)	45.46	0.66	0.23
M12	防风	珊瑚菜素 (phellopterin)	40.19	0.48	0.28
M13	防风	别欧前胡素 (alloimperatorin)	36.31	0.50	0.22
M14	防风	methyl-(11 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)-icosa-11,14-dienoate	39.67	1.10	0.23
M15	防风	珊瑚菜内酯 (phellopterin)	43.39	0.43	0.28
M16	茯苓	星鱼甾醇 (stellasterol)	43.51	0.91	0.72
M17	茯苓	麦角甾醇过氧化物 (ergosterol peroxide)	40.36	0.34	0.81
M18	茯苓	常春藤皂苷元 (hederagenin)	36.91	0.96	0.75
M19	甘草	维斯体素 (vestitol)	74.66	0.30	0.21
M20	人参、甘草	inermine	65.83	0.36	0.54
M21	甘草	美迪紫檀素 (medicarpin)	49.22	0.53	0.34
M22	甘草	7-methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.56	0.20
M23	甘草	euchrenone	30.29	0.39	0.57
M24	甘草	菜豆异黄酮 (phaseolinisoflavan)	32.01	0.46	0.45
M25	甘草	glabrocoumarone A	58.44	0.34	0.38
M26	甘草	shinpterocarpin	80.30	0.68	0.73
M27	甘草	光甘草定 (glabridin)	53.25	0.36	0.47
M28	甘草	光甘草宁 (glabranin)	52.90	0.31	0.31
M29	甘草	1-甲氧基菜豆素 (1-methoxyphaseollidin)	69.98	0.48	0.64
M30	甘草	3'-hydroxy-4'- <i>O</i> -methylglabridin	43.71	0.73	0.57
M31	甘草	3'-甲氧基光甘草定 (3'-methoxyglabridin)	46.16	0.47	0.57
M32	甘草	4'-甲氧基光甘草定 (4'-methoxyglabridin)	36.21	0.61	0.52
M33	甘草	icos-5-enoic acid	30.70	1.09	0.20
M34	甘草	kanzonol F	32.47	0.56	0.89
M35	甘草	9-eicosenoic acid	30.70	0.94	0.20
M36	甘草	licoagrocarpin	58.81	0.61	0.58
M37	甘草	xambioona	54.85	0.52	0.87
M38	钩藤	四氢鸭脚木碱 (tetrahydroalstonine)	32.42	0.33	0.81
M39	钩藤	毛钩藤碱 (hirsutine)	32.75	0.82	0.64
M40	钩藤	缝籽嗉甲醚 (geissoschizine methyl ether)	56.83	0.37	0.64
M41	钩藤	钩藤碱 (rhynchophylline)	41.82	0.38	0.57

续表 1

编号	药材来源	化合物	OB/%	BBB	DL
M42	钩藤	异钩藤碱 (isorhynchophylline)	47.31	0.33	0.57
M43	钩藤	柯诺辛碱 (corynoxine)	57.85	0.33	0.57
M44	钩藤	去氢钩藤碱 (corynoxine)	57.13	0.50	0.57
M45	钩藤	柯楠因碱 (corynantheine)	31.94	0.61	0.64
M46	钩藤	(2 <i>S</i> ,12 <i>bR</i>)-methyl-2-[(<i>E</i>)-1-oxobut-2-en-2-yl]-1,2,6,7,12,12 <i>b</i> -hexahydroindolo [2,3- <i>a</i>] quinolizine-3-carboxylate	42.07	0.63	0.60
M47	钩藤	去氢毛钩藤碱 (hirsutine)	34.44	0.78	0.43
M48	钩藤	delta (sup 18)-hirsutine	41.64	0.76	0.64
M49	菊花	角鲨烯 (squalene)	33.55	1.73	0.42
M50	菊花	邻苯二甲酸正丁异辛酯 (butyl octyl phthalate)	43.74	0.60	0.24
M51	菊花	chrysanthediacetate B	37.02	0.31	0.19
M52	菊花、生姜	γ -谷甾醇 (gamma-sitosterol)	36.91	1.14	0.75
M53	人参	aponorhyscine	66.65	0.40	0.22
M54	人参	花生四烯酸 (arachidonate)	45.57	0.58	0.20
M55	人参	灌木远志酮 A (frutinone A)	65.90	0.46	0.34
M56	生姜	二氢辣椒碱 (dihydrocapsaicin)	47.07	0.47	0.19
M57	人参	吉九里香碱 (girinimbine)	61.22	1.22	0.31
M58	麦冬	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine	—	—	—
M59	麦冬	短葶山麦冬皂苷 (DT-13)	—	—	—
M60	麦冬	甲基麦冬黄烷酮 A (methylophiopogonanone A)	—	—	—
M61	麦冬	nolinospiroside F	—	—	—
M62	麦冬	麦冬二氢高异黄酮 G (ophiopogonanone G)	—	—	—
M63	麦冬	麦冬皂苷 B (ophiopogonin B)	—	—	—
M64	麦冬	麦冬皂苷 D (ophiopogonin D)	—	—	—
M65	麦冬	鲁斯可皂苷元 (ruscogenin)	—	—	—

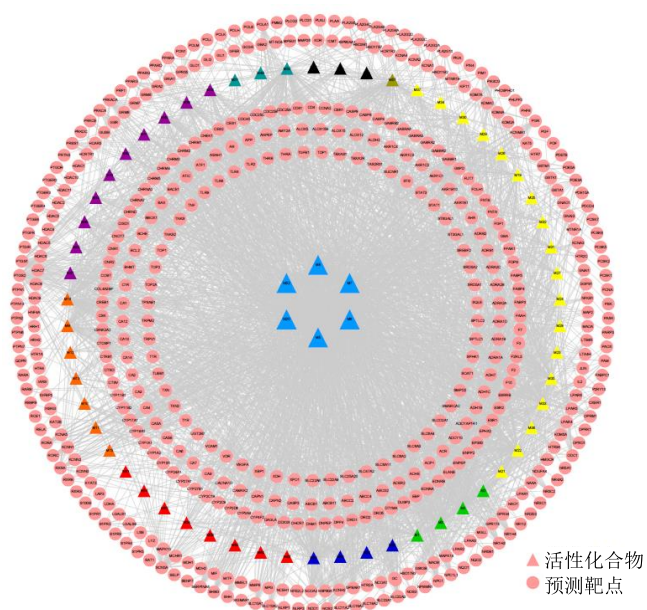
集的信号通路数据构建了靶点-信号通路网络图 (T-P, 图 4)。结果显示较多的靶点被富集到 cAMP signaling pathway (27 个基因)、PI3K-Akt signaling pathway (20 个基因) 和 calcium signaling pathway (19 个基因), 富集到的信号通路中大多数与炎症和凋亡相关, 如 PI3K-Akt signaling pathway、NF- κ B signaling pathway、TNF signaling pathway、mTOR signaling pathway、Wnt signaling pathway 等, 说明钩藤散可能主要通过调控炎症和凋亡信号通路来防治 AD。

2.6 AD 相关靶点的 PPI 网络分析

2.6.1 PPI 网络 将 215 个与 AD 相关性蛋白靶点导入到 STRING 数据库获取这些靶点的 PPI 网络, 其中 206 个蛋白之间存在 1 876 种相互作用关系(图 5)。其中处于 PPI 网络中心的蛋白 JUN(度值=74)、TNF(度值=72)、VEGFA(度值=69)、ESR1(度

值=64)、APP(度值=60)等拥有最多的蛋白相互作用, 提示钩藤散治疗 AD 的药效机制可能与这些蛋白密切相关。

2.6.2 PPI 网络 Cluster 模块 为了进一步了解 PPI 网络中的生物作用, 使用 Cytoscape 的插件 MCODE 对网络进行 Cluster 模块分析, 共获得 5 个 Cluster 模块(表 2、图 6)。对 5 个 Cluster 模块分别进行 GO 分析, 了解其生物学功能, Cluster1 主要与凋亡、凋亡信号通路、炎症反应以及血管生成等生物学过程相关, 与 TNF signaling pathway 和 apoptosis pathway 作用途径密切相关; Cluster2 主要与 G 蛋白偶联受体信号通路和对腺苷酸环化酶活性调节相关; Cluster3 与腺苷酸环化酶激活 G 蛋白偶联受体信号通路相关; Cluster4 与类固醇激素介导信号通路、维甲酸受体信号通路、多巴胺的分解过程相关; Cluster5 与类固醇代谢有关。



紫色三角形代表化合物来源于钩藤，墨绿色三角形代表化合物来源于菊花，黑色三角形代表化合物来源于茯苓，棕黄色三角形代表化合物来源于生姜，黄色三角形代表化合物来源于甘草，草绿色三角形代表化合物来源于半夏，深蓝色三角形代表化合物来源于人参，红色三角形代表化合物来源于麦冬，橙色三角形代表化合物来源于防风，位于圆心的蓝色三角形代表来源于多种中药，图 2 同
purple, dark green, black, brown-yellow, yellow, grass green, dark blue, red, orange triangles indicate that compounds were from *Uncariae Ramulus Cum Uncis*, *Chrysanthemi Flos*, *Poria*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Pinelliae Rhizoma*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Ophiopogonis Radix*, *Saposhnikoviae Radix*, respectively, and light blue triangles indicate that common compounds were from a variety of herbs, same as fig. 2

图 1 H-C-T 网络
Fig. 1 H-C-T network

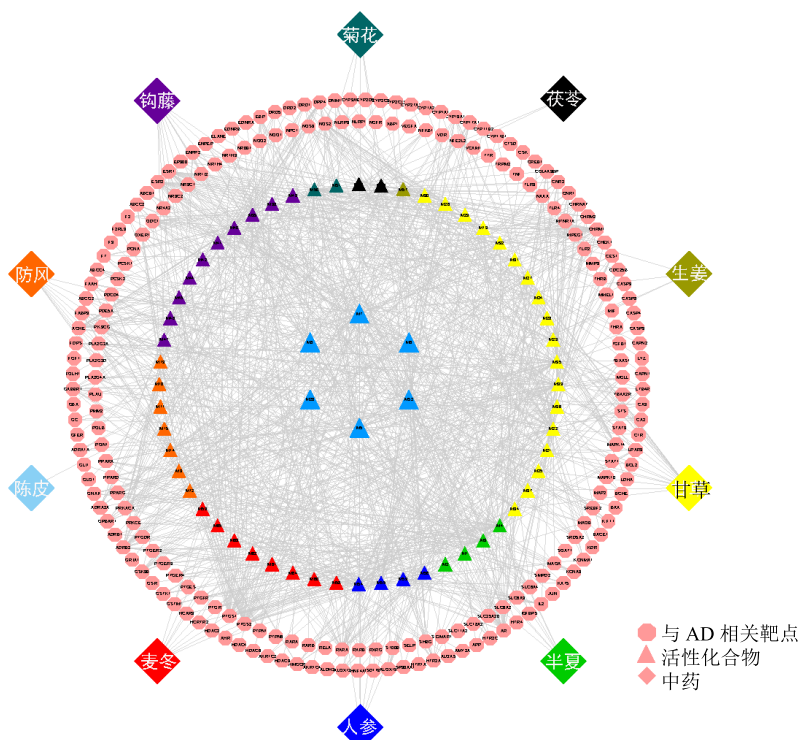


图 2 C-T-AD 网络
Fig. 2 C-T-AD network

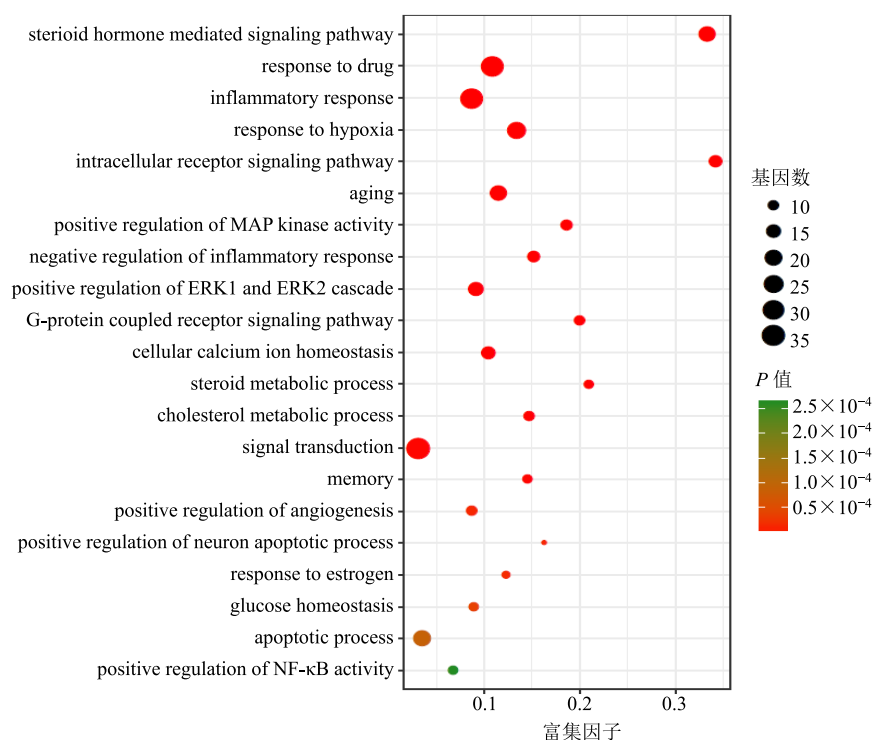


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

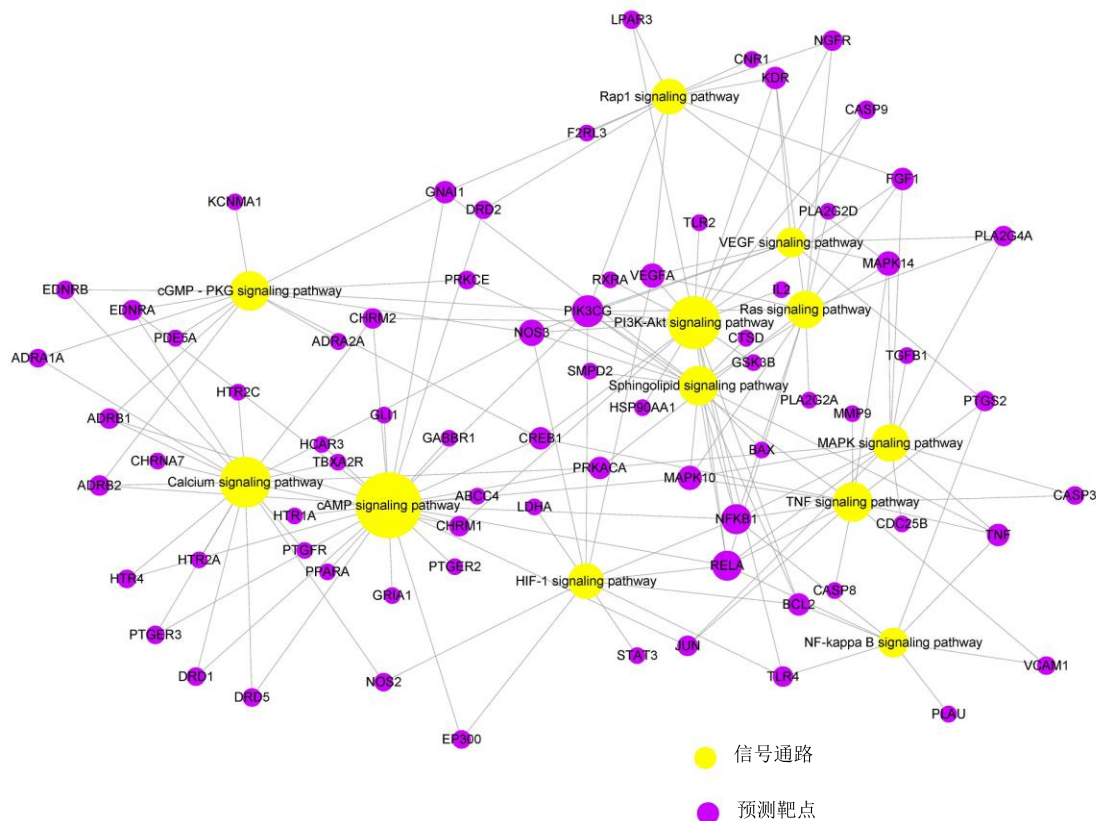
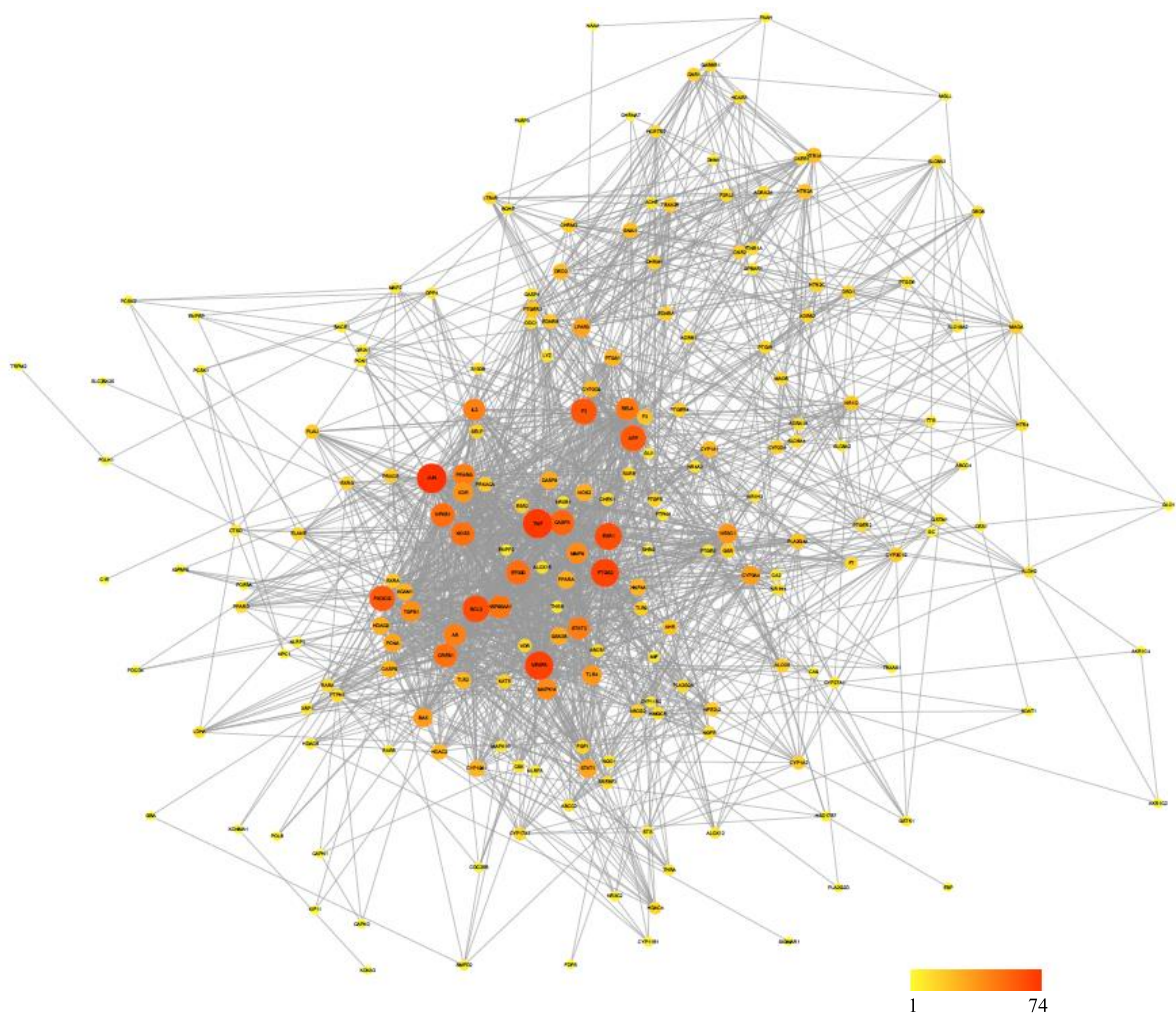


图 4 T-P 网络

Fig. 4 Targets-pathways network



圆形节点代表蛋白靶点，圆圈大小和颜色深浅代表靶点蛋白相互作用的密切程度
Circle nodes represent protein targets, circle size and color depth represent closeness interaction between targets and proteins .

图 5 AD 相关性蛋白靶点 PPI 网络
Fig. 5 PPI network of AD related protein targets

表 2 AD 相关靶点的 PPI 网络 Cluster 数据
Table 2 Cluster data of AD related protein targets

Cluster	节点	边	节点 ID
1	32	416	TLR4、IL2、NOS2、BAX、PPARG、NOS3、MMP9、ESR1、TNF、NR3C1、PCNA、TGFB1、STAT1、MAPK14、NFKB1、RELA、HDAC9、F2、STAT3、PIK3CG、CREB1、JUN、PTGS2、KDR、VEGFA、AR、CASP8、CASP9、CASP3、BCL2、GSK3B、TLR2
2	27	153	HTR1A、F2RL3、GABBR1、CHRM2、CNR2、PTGFR、EDNRA、SELP、TBXA2R、OXER1、PTGER3、GNAI1、HTR2C、LTB4R、VCAM1、MTNR1A、HTR2A、EDNRB、CHRM1、APP、CNR1、HCAR3、ADRA2A、ADRA1A、DRD2、F3、HCRTR2
3	17	71	PLA2G2A、ADRB1、CYP2C19、GPBAR1、PTGDR、DRD5、PTGS1、PLA2G4A、DRD1、ALOX5、ALOX12、PTGIR、PTGER2、PTGER4、ALOX15、ADRB2、HTR4
4	19	42	HSD17B7、RXRG、GSTM1、NR1H3、MAOA、CYP1A1、CYP3A4、PPARD、RXRA、MAOB、NR4A2、RARB、SLC6A2、RXRB、SLC6A3、GSTK1、ALDH2、SLC6A4、RARA
5	6	11	CYP2D6、ABCC2、NR1I2、CYP2C9、ABCB1、F7

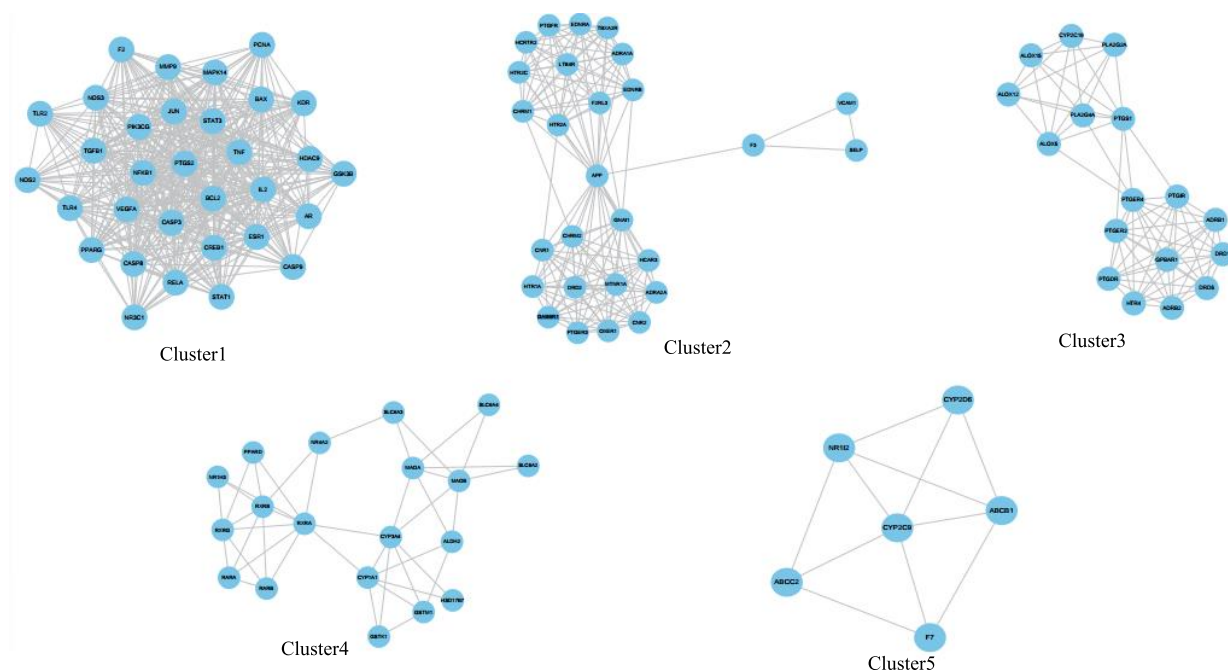


图 6 AD 相关蛋白靶点 Cluster 模块的 PPI 网络

Fig. 6 PPI network of AD related protein target Clusters.

3 讨论

中药网络药理学是基于计算机网络的建模分析和靶点预测,从系统层面上分析中药方剂或单味药的作用机制,不再将单一蛋白或者单一信号通路作为研究重点,而是全面分析复杂网络的调控机制,体现了中医的整体思维^[25]。近年来很多学者使用网络药理学方法研究中药治疗 AD, Luo 等^[26]建立了多个中药-化合物-靶点-信号通路互作网络模型分析钩藤散治疗神经退行性疾病的作用机制,其中报道了钩藤散主要通过抗炎、抗凋亡等途径治疗 AD。Fang 等^[27]通过文献挖掘 PubMed 报道的前 10 种抗 AD 植物,基于系统的药理分析,从多个角度解释这些中药抗 AD 的作用机制。这些研究从中药方剂和多种中药联合应用研究中医药治疗复杂疾病的作用机制,从整体层面进行系统分析,为研究中医药防治 AD 和探索中医药药效的作用途径提供了很多有价值的信息参考。本研究基于网络药理学分析方法对钩藤散活性成分进行筛选,靶点预测和疾病相关性分析,可视化构建了 H-C-T 网络、C-T-AD 网络和钩藤散 AD 相关性靶点的 PPI 网络分析钩藤散治疗 AD 的作用机制,共获得了钩藤散 65 种活性化合物的 473 个预测靶点,其中不同化合物可作用于相同的靶点,同一靶点也可能来自不同化合物,平均一种活性化合物对应约 45 个靶点,这充分印证了

钩藤散的多靶点作用。通过 AD 疾病靶点映射筛选出 215 个预测靶点与 AD 相关,发现钩藤散的主要活性成分中 7-methoxy-2-methyl isoflavone、butyl octyl phthalate、beta-sitosterol、eicosadienoic acid 等拥有较多的预测靶点,表明这些化合物可能是钩藤散药理作用的重要化合物。其中已有报道证明 eicosadienoic acid 能调节炎症反应^[28]; β -sitosterol 能影响凋亡、炎症、血管生成等多种信号通路^[29],对胆固醇代谢和抗衰老方面体现出很好的生物活性^[30-31]。

为了更好地了解钩藤散治疗 AD 的生物学过程和可能的信号途径,将获得的钩藤散与 AD 相关的基因进行 GO 分析和通路分析。GO 分析和通路富集结果均显示钩藤散治疗 AD 的作用途径主要与炎症反应、凋亡过程、衰老、记忆等有关。小胶质细胞特异性炎症小体激活引起神经炎症发生是 AD 重要的病理机制^[32], $A\beta$ 激活小胶质细胞产生 NLRP3 炎症小体引起神经炎症表现为神经元丢失、 $A\beta$ 清除障碍和记忆丧失,其过程与激活核转录因子- κB (NF- κB) 通路和 caspase 凋亡通路有关^[33]。钩藤散 C-T-AD 网络中 CASP4、NLRP1、NLRP3、NFKB1、TLR2 是炎症和凋亡生物学过程富集的关键基因,提示钩藤散可能通过抑制炎症小体激活减少神经炎症发生来防治 AD。

细胞内的分子过程是由许多蛋白共同作用完成的, 这些蛋白相互作用而形成 PPI 网络, 而 PPI 网络中某一蛋白的异常影响与其相互作用的其他蛋白, 导致一系列功能的异常, 从而导致疾病的产生^[34]。本研究构建了钩藤散与 AD 相关的靶点 PPI 网络, 结果显示 JUN、TNF、VEGFA、ESR1、APP 拥有最多的蛋白相互作用, 可能是钩藤散药效作用的关键靶点, 主要调控炎症、血管生成、G 蛋白偶联受体信号通路、类固醇代谢和腺苷酸环化酶活性。

本研究通过网络药理学方法对钩藤散进行了系统分析, 发现了其潜在的作用靶点, 了解了其治疗 AD 的作用机制, 但仍需要进一步实验数据支持, 包括对预测靶点和生物学途径的确认。此外, 研究还需要进行体内活性化合物的药理毒理测试来评估其应用于临床的可能性。

参考文献

- [1] Lane C A, Hardy J, Schott J M. Alzheimer's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.
- [2] Umar T, Hoda N. Alzheimer's Disease: A systemic review of substantial therapeutic targets and the leading multi-functional molecules [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(31): 3370-3389.
- [3] Bhardwaj D, Mitra C, Narasimhulu C A, et al. Alzheimer's disease-current status and future directions [J]. *J Med Food*, 2017, 20(12): 1141-1151.
- [4] Watanabe H, Zhao Q, Matsumoto K, et al. Pharmacological evidence for antidementia effect of Choto-san (Gouteng-san), a traditional Kampo medicine [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75(3): 635-643.
- [5] Hayashi H, Tohda M, Watanabe H, et al. The effects of Choto-san on the mRNA expression of Alzheimer's disease related factors in the permanent ischemic rat brain [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(4): 744-746.
- [6] 黄厚才, 胡春萍, 彭蕴茹, 等. 钩藤散浸膏对小鼠记忆障碍模型的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(1): 56-59.
- [7] 钟荣玲, 黄厚才, 夏智, 等. 钩藤散对 AD 模型大鼠海马 CA1 区相关指标的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(12): 211-214.
- [8] Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, et al. Preventive effect of chotosan, a Kampo medicine, on transient ischemia-induced learning deficit is mediated by stimulation of muscarinic M1 but not nicotinic receptor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1873-1878.
- [9] Itoh T, Shimada Y, Terasawa K. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death [J]. *Mech Ageing Dev*, 1999, 111(2/3): 155-173.
- [10] 章亮, 陈泽慧, 陈韩英, 等. 基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 646-657.
- [11] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [12] 李静, 高丽, 高耀, 等. 基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 179-187.
- [13] Yamashita F, Hashida M. In silico approaches for predicting ADME properties of drugs [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 19(5): 327-338.
- [14] Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [15] Wang Y, Zheng C, Huang C, et al. Systems pharmacology dissecting holistic medicine for treatment of complex diseases: An example using cardiocerebrovascular diseases treated by TCM [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/980190.
- [16] Shen M, Tian S, Li Y, et al. Drug-likeness analysis of traditional Chinese medicines: 1. property distributions of drug-like compounds, non-drug-like compounds and natural compounds from traditional Chinese medicines [J]. *J Cheminform*, 2012, doi: 10.1186/1758-2946-4-31.
- [17] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [18] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, doi: 10.1093/nar/gku1003.
- [19] Schwartz A S, Yu J, Gardenour K R, et al. Cost-effective strategies for completing the interactome [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 55-61.
- [20] Bader G D, Hogue C W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, doi: 10.1186/1471-2105-4-2.
- [21] Barabási A L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: A network-based approach to human disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1): 56-68.

- [22] Chen M H, Chen X J, Wang M, *et al.* Ophiopogon japonicus—A phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2016.01.037.
- [23] You W T, Zhou T, Ma Z C, *et al.* Ophiopogonin D maintains Ca^{2+} homeostasis in rat cardiomyocytes *in vitro* by upregulating CYP2J3/EETs and suppressing ER stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(3): 368-381.
- [24] Fang J, Wang X, Lu M, *et al.* Recent advances in polysaccharides from *Ophiopogon japonicus* and *Liriope spicata* var. *prolifera* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.022.
- [25] Fang J, Liu C, Wang Q, *et al.* In silico polypharmacology of natural products [J]. *Brief Bioinform*, 2017, doi: 10.1093/bib/bbx045.
- [26] Luo Y, Wang Q, Zhang Y. A systems pharmacology approach to decipher the mechanism of Danggui-Shaoyao-San decoction for the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, doi: 10.1016/j.jep.2015.12.011.
- [27] Fang J, Wang L, Wu T, *et al.* Network pharmacology-based study on the mechanism of action for herbal medicines in Alzheimer treatment [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2016.11.034.
- [28] Huang Y S, Huang W C, Li C W, *et al.* Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 358(1/2): 85-94.
- [29] Bin S M S, Ameen S S. Beta-sitosterol: A promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(8): 1214-1220.
- [30] Chang R C, So K F. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 643-652.
- [31] Whittaker M H. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence [J]. *Am J Med*, 2000, 109(7): 600-601.
- [32] Tan M S, Yu J T, Jiang T, *et al.* The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 875-882.
- [33] Heneka M T, Kummer M P, Stutz A, *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [34] de Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: Key concepts to building and analyzing interactome networks [J]. *PLoS Comput Biol*, 2010, 6(6): e100080.