

基于网络药理学研究当归芍药散防治阿尔茨海默病的作用机制

尹 芳, 宋祯彦, 李富周, 成绍武*

湖南中医药大学 中西医结合学院 心脑血管防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410073

摘要: **目的** 探究当归芍药散防治阿尔茨海默病的作用机制。 **方法** 选取当归芍药散中的当归、白芍、白术、川芎、茯苓、泽泻为研究对象, 应用 TCMSP 数据库对 6 味中药主要化学成分进行筛选; 使用 TCMSP 数据库, 对筛选出的化合物及阿尔茨海默病进行靶点预测, 选取当归芍药散与阿尔茨海默病一致的 6 个靶点蛋白作为后续研究对象, 通过生物分子功能注释系统 (MAS 3.0) 及 KEGG 通路数据库进行通路注解及分析, 得到当归芍药散治疗阿尔茨海默病的相关靶点通路预测图及相关信号通路。 **结果** 从当归芍药散中筛选出 35 个化合物, 可作用于阿尔茨海默病 6 个潜在的蛋白靶点, 找出靶点的相关通路 22 条。作用通路涉及阿尔茨海默病发病机制相关的钙信号途径、炎症、免疫调节、细胞与细胞之间的信号交流、肌动蛋白细胞骨架的调节等各个环节, 6 味中药既有共同的成分及作用靶点、通路, 又各有偏重, 各通路间通过共有靶点连接, 显示出不同成分间的多靶点、多途径的协同作用。 **结论** 预测出当归芍药散治疗阿尔茨海默病可能与其调节炎症、免疫系统、钙信号、细胞与细胞之间的信号交流等机制有关。

关键词: 当归芍药散; 阿尔茨海默病; 网络药理学

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 02-0210-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.007

Study on Danggui-Shaoyao-San for treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology

YIN Fang, SONG Zhenyan, LI Fuzhou, CHENG Shaowu

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

Abstract: Objective To explore the mechanism of Danggui-Shaoyao-San (DSS) for the treatment of Alzheimer's disease. **Methods** *Angelicae Sinensis Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Atractylodes Macrocephala Koidz*, *Poria Cocos*, and *Alisma Orientale* were selected as the research object. TCMSP database was applied to screening the main chemical components of DSS. Forecast the potential targets using TCMSP database for Alzheimer's disease and the main chemical components, and selected six consistent target proteins as a follow-up object. Through the MAS 3 and KEGG pathway database, path annotation and analysis were carried out. Finally, DSS related target pathway for the treatment of Alzheimer's disease prediction map and the related signaling pathways were obtained. **Results** Six potential protein targets and 22 targets related pathways related with Alzheimer's disease were identified in DSS 35 components, including calcium signaling pathways, inflammation, immune system, signal exchange between cells and cells, the regulation of actin cytoskeleton, and so on. The targets and signaling pathways among the six flavour Chinese drug components, and each have lay particular stress on, through mutual targets for connections between various pathways, shows a different composition between the target and way of synergy. **Conclusion** Danggui-Shaoyao-San for treatment of Alzheimer's Disease may be linked to regulate inflammation, immune system, calcium signal and signal exchange between cells and cell life activities.

Key words: Danggui-Shaoyao-San; Alzheimer's disease; network pharmacology

收稿日期: 2017-10-9

基金项目: 湖南省教育厅开放基金项目 (15k088); 湖南中医药大学科技创新团队项目 (201609)。

第一作者: 尹 芳 (1987-), 女, 湖南省长沙市人, 硕士研究生。

*通信作者: 成绍武 Tel: (0731)88459522 E-mail: docshwcheng@hotmail.com

阿尔茨海默病属中医学“老年呆证”“文痴”“癫”“言语错乱”“郁证”等范畴，是一种全身性疾病，其病位在脑，但总因情志失调，肝失疏泄，肝气郁滞，或肝血虚衰，而致痰、湿、火、瘀，蒙蔽清窍，心脑失养成病。在脑-心-肝的关系中，肝气郁滞，肝血虚衰为本，痰湿火瘀阻窍为标^[1]。

当归芍药散是中医传统的妇科名方，出自东汉张仲景的《金匮要略》，主要由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻 6 味药组成。方中重用白芍以养血调肝，为君药；当归补血活血，且气香可理气，为血中之气药，川芎辛温香窜，走而不守，尤能上行头目，可以活血通络，引血上行，二者均为臣药；白术、茯苓健脾益气，泽泻既可利湿又可透达郁热，共为佐使药。诸药合用具有补血活血化痰、健脾利湿化痰功效，其补中寓泻，又泻中求补，既益气养血，又化痰逐瘀，切中虚、痰、瘀。前期研究发现^[2]，该方对神经元的作用是多重的，可显著改善认知功能、减轻 A β 诱导的突触损伤，为阿尔茨海默病患者治疗带来新的希望；同时当归芍药散能提高阿尔茨海默病模型小鼠的记忆和认知功能^[3]。大量临床实验表明，该方对中、重度阿尔茨海默病患者有一定的治疗作用，能显著改善患者的认知功能^[4]。但目前对当归芍药散多成分、多靶点及多途径治疗阿尔茨海默病的机制尚需进一步明确。

中医药的特色体现在中药复方对复杂疾病的辨证论治，强调整体性，同时方剂的配伍组方注重“君、臣、佐、使”，通过多味中药的协调配合实现对机体的调节，体现了多成分、多靶点、多途径调控的理念。网络药理学融合了系统生物学、计算生物学、多向药理学、网络分析等多学科的技术和内容，从整体的角度探索药物与疾病的关联，具有整体性、系统性的特点，与中医药理念一致^[5-6]。因此，利用网络药理学的方法，通过分析网络中的关键节点和功能模块，可以探究复方中药的药效物质基础及作用机制^[7]。

本研究利用网络药理学，选取了当归芍药散中的当归 2 个、白芍 8 个、川芎 6 个、茯苓 12 个、白术 4 个和泽泻 7 个药物成分进行潜在靶点预测，得到“中药-化合物-靶点”网络图，再将其与阿尔茨海默病的 28 个靶点图相整合。通过分析实验数据，获取了当归芍药散作用于阿尔茨海默病的 6 个特异性靶点和 22 条信号通路，解析了当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机制，为后续研究提供参考。

1 材料

网络药理实验研究的主要材料是分析软件和数据库，主要包括 TCMSP 数据库 (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)、UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>)、生物分子功能注释系统 (Molecule Annotation System, MAS 3.0) 数据库 (<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/analysis/>)、KEGG 通路数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>)、Cytoscape 3.5.1 软件。

2 方法

2.1 目标化合物的选取

从 TCMSP 数据库中搜索中药的成分信息，得出当归 250 个、白芍 170 个、川芎有 378 个、白术 110 个、茯苓 68 个、泽泻 92 个成分。成分众多，目标化合物的选取主要根据 TCMSP 数据库中的建议药物筛选标准：口服生物利用度 (Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ^[8]、类药性 (Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[9]、药物半衰期、血脑屏障等，最后选取了当归中的 2 个、白芍中的 8 个、川芎中的 6 个、白术中的 4 个、茯苓中的 12 个和泽泻中的 7 个成分为研究对象，共 39 个，由于白术和白芍都有 M3、白芍和当归都有 M15，白芍、川芎和泽泻都有 M32，一共 35 个化合物，具体信息见表 1。

2.2 目标化合物作用靶点及阿尔茨海默病靶点的预测

以 35 个代表性化合物及阿尔茨海默病为研究对象，找到其潜在的作用靶点，具体方法如下：

(1) 使用 TCMSP 数据库，进行化合物及阿尔茨海默病靶点的预测。

(2) 各自得到的靶点经 Cytoscape3.5.1^[10]软件处理，得到当归芍药散中的 6 味中药-化合物成分-靶点预测图及阿尔茨海默病-靶点预测图。

(3) 筛选出当归芍药散与阿尔茨海默病相一致的 6 个靶点，将这 6 个靶点投入 UniProt 数据库，得到所有靶点对应编号。

(4) 将这 6 个靶点编号投入 MAS 3.0，得到与靶点相关的通路，筛选出相关的通路进行下一步分析。

(5) 综合以上计算出的数据，再通过 KEGG 数据库及相关文献的查阅对计算出的通路进行分析，找到和钙信号途径、神经活性的配体-受体相互作用、炎症、肌动蛋白细胞骨架的调节、细胞免疫等相关的通路，经 Cytoscape 3.5.1 软件处理，得到当归芍药散治疗阿尔茨海默病的相关靶点通路预测图。

表1 化合物信息
Table 1 Compounds information

编号	化合物	OB/%	相对分子质量	DL
M1	(+)-catechin	54.83	290.29	0.24
M2	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	484.79	0.82
M3	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	358.52	0.53
M4	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	514.82	0.81
M5	14-acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	356.45	0.30
M6	16 β -methoxyalisol B monoacetate	32.43	544.85	0.77
M7	1-Monolinolein	37.18	354.59	0.30
M8	3 β -Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	470.81	0.81
M9	3 β -acetoxyatractylone	54.07	274.39	0.22
M10	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	526.83	0.81
M11	8 β -ethoxyatractylenolideIII	35.95	276.41	0.21
M12	alisol b	34.47	472.78	0.82
M13	alisol C	32.70	486.76	0.82
M14	alisol,b,23-acetate	32.52	446.74	0.82
M15	beta-sitosterol	36.91	414.79	0.75
M16	cervisterol	37.96	430.74	0.77
M17	ergosta-7, 22E-dien-3 β -ol	43.51	398.74	0.72
M18	ergosterol peroxide	40.36	430.74	0.81
M19	FA	68.96	441.45	0.71
M20	hederagenin	36.91	414.79	0.75
M21	kaempferol	41.88	286.25	0.24
M22	mairin	55.38	456.78	0.78
M23	mandenol	42.00	308.56	0.19
M24	myricanone	40.60	356.45	0.51
M25	pachymic acid	33.63	528.85	0.81
M26	paeoniflorgenone	87.59	318.35	0.37
M27	paeoniflorin	53.87	480.51	0.79
M28	perlolyrine	65.95	264.30	0.27
M29	poricoic acid A	30.61	498.77	0.76
M30	poricoic acid B	30.52	484.74	0.75
M31	poricoic acid C	38.15	482.77	0.75
M32	sitosterol	36.91	414.79	0.75
M33	stigmasterol	43.83	412.77	0.76
M34	trametenolic acid	38.71	456.78	0.80
M35	wallichilide	42.31	412.57	0.71

3 结果

3.1 目标化合物潜在作用靶点

通过 TCMSP 数据库分别得到了 35 个化合物及阿茨海默病的潜在作用靶点, 选取当归芍药散与阿茨海默病相一致的 6 个靶点蛋白作为后续研究对象。将预测出的靶点蛋白通过 MAS 3.0 及 KEGG 进行通路注解及分析, 得到当归芍药散治疗阿茨海默病的相关靶点通路预测图。最后利用 Cytoscape 3.5.1 软件, 分别构建当归芍药散 6 味中药的“中药-化合物-靶点”(图 1)、“当归芍药散-靶点-阿茨海默病”(图 2) 网络药理图。

3.2 目标化合物潜在作用靶点的通路预测

选取当归芍药散与阿茨海默病相一致的 6 个靶点蛋白, 通过 MAS 3.0 及 KEGG 进行通路注解及分析, 6 个靶蛋白得到 22 条相关信号通路, 信息见表 2。

3.3 当归芍药散治疗阿茨海默病的分析

分析、整合数据发现, 当归芍药散中的 6 味中

药既有共同的作用靶点群及通路群, 又各有偏重, 作用通路涉及阿尔茨海默病、钙信号途径、神经性的配体-受体相互作用、炎症、肌动蛋白细胞骨架的调节及免疫、炎症等各个环节, 各通路群间通过共有靶点连接, 显示出不同成分间的多靶点、多途径的协同作用。

4 讨论

通过网络药理学分析, 得到当归芍药散多个化学成分、靶蛋白和分子网络, 每个分子网络调节多个生物功能, 这些结果映射了中药成分多、靶点多、作用途径多、功能多的特点。当归芍药散中的 6 个潜在的阿尔茨海默病蛋白靶点, 涉及钙信号通路、肌动蛋白骨架调节、神经受体-配体相互作用、VEGF 信号通路、B 细胞和 T 细胞信号通路、细胞循环、轴突导向、Wnt 信号通路等相关通路 22 条。我们预测出当归芍药散治疗阿茨海默病可能与调节炎症、免疫系统、钙信号、细胞与细胞之间的信号交流等生命活动有关。本实验通过网络药理学的方法, 筛

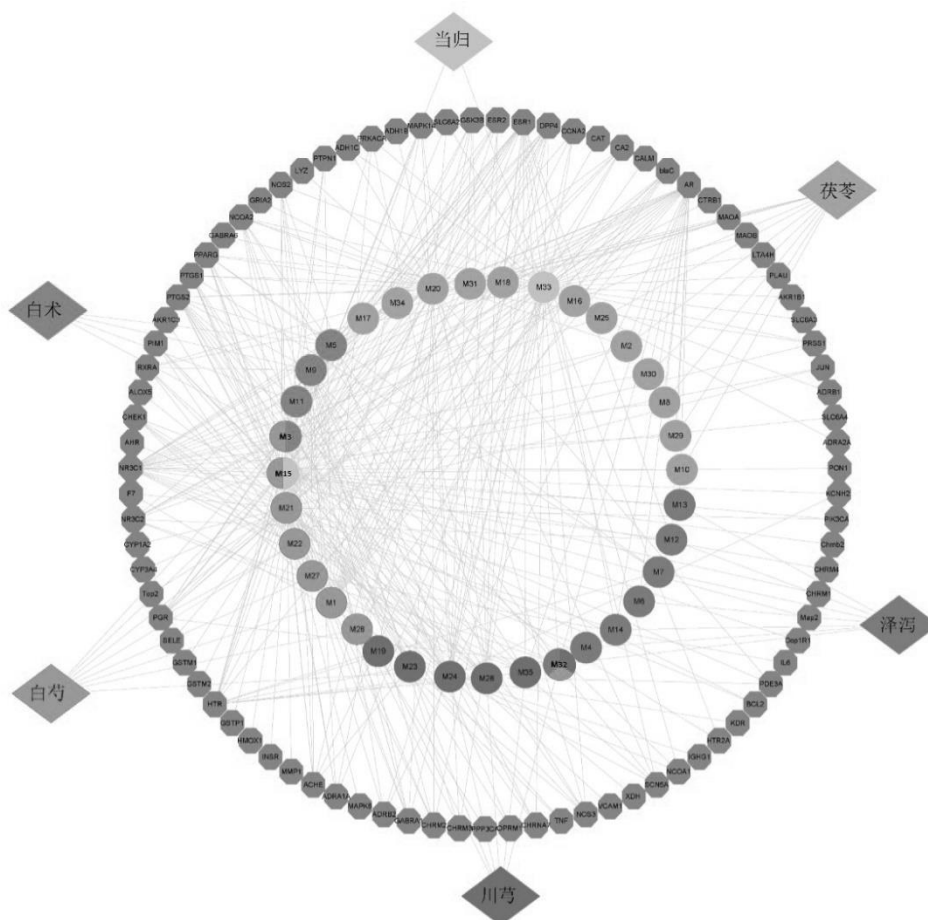


图 1 当归芍药散“中药-化合物-靶点”网络图

Fig. 1 DSS traditional Chinese medicine-compounds-targets network

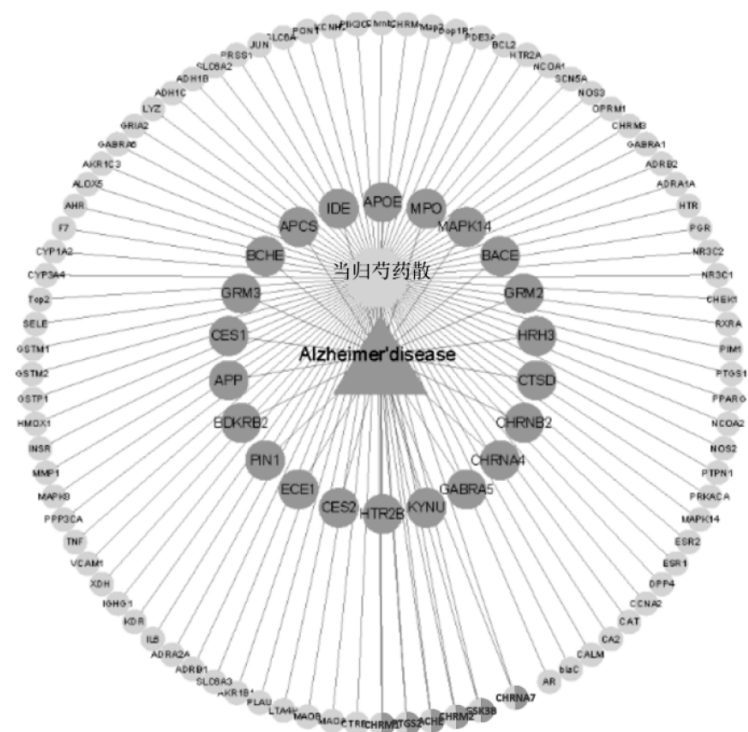


图 2 “当归芍药散-靶点-阿尔茨海默病”网络图

Fig. 2 DSS – targets - disease network

表 2 相关通路信息

Table 2 Related signaling pathway

通路	次数	P 值	Q 值	基因
钙信号途径	3	2.21×10^{-6}	1.47×10^{-6}	CHRM1; CHRM2; CHRNA7
肌动蛋白细胞骨架的调节	2	4.66×10^{-4}	7.84×10^{-5}	CHRM1; CHRM2
神经性的配体-受体相互作用	2	6.41×10^{-4}	7.84×10^{-5}	CHRM1; CHRM2
子宫内膜癌	1	0.007 92	3.77×10^{-4}	GSK3B
基底细胞癌	1	0.008 375	3.90×10^{-4}	GSK3B
花生四烯酸代谢	1	0.008 679	3.90×10^{-4}	PTGS2
Hedgehog 信号通路	1	0.008 679	3.90×10^{-4}	GSK3B
甘油磷脂代谢	1	0.010 498	4.42×10^{-4}	ACHE
B 细胞受体信号通路	1	0.011 406	4.53×10^{-4}	GSK3B
VEGF 信号通路	1	0.011 557	4.53×10^{-4}	PTGS2
结直肠癌	1	0.012 767	4.74×10^{-4}	GSK3B
小细胞肺癌	1	0.013 069	4.74×10^{-4}	PTGS2
ErbB 信号通路	1	0.013 221	4.74×10^{-4}	GSK3B
前列腺癌	1	0.013 372	4.74×10^{-4}	GSK3B
黑素合成	1	0.015 786	4.87×10^{-4}	GSK3B
T 细胞受体信号通路	1	0.016 54	4.87×10^{-4}	GSK3B
细胞周期	1	0.018 045	5.01×10^{-4}	GSK3B
轴突导向	1	0.019 699	5.29×10^{-4}	GSK3B
胰岛素信号转导通路	1	0.020 901	5.33×10^{-4}	GSK3B
Wnt 信号通路	1	0.023	5.75×10^{-4}	GSK3B
阿尔茨海默病	1	0.026 39	6.22×10^{-4}	GSK3B
黏着斑	1	0.030 912	6.79×10^{-4}	GSK3B

选出关键靶点蛋白并构建当归芍药散“中药-化合物-靶点-通路”网络药理图,初步阐释了其合理性,但欠缺实验角度的验证。前期研究已经证实川芎中的阿魏酸是一个天然的抗氧化剂以及对阿尔茨海默病有神经保护作用,可以恢复线粒体膜电位,阻碍凋亡通路^[11]。白芍中含有的儿茶素抗氧化、抗炎、调节 α 、 β 和 γ 分泌酶活性、减少tau的过度磷酸化及聚集、减少细胞死亡^[12]。因此,后续会从实验的角度以化合物、关键靶点和信号通路为研究切入点,对当归芍药散治疗阿尔茨海默病进行深入研究。

参考文献

- [1] 秦祖杰, 秦祥仁. 阿尔茨海默病从肝论治探微 [J]. 右江民族医学院学报, 2009, (6): 1076-1077.
- [2] Fu X, Wang Q H, Wang Z B. Danggui - Shaoyao - San: New Hope for Alzheimer's Disease [J]. Aging Dis, 2015, 20, 7(4): 502-513.
- [3] 孙 华, 胡 愉, 张建民, 等. 一种对阿尔茨海默病模型小鼠认知和记忆功能具有明显改善作用的中药方剂 [J]. 中国中药杂志, 2003, (8): 751-754.
- [4] 赵义纯, 陆 曙. 当归芍药散在中枢神经系统作用的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(12): 1993-1994.
- [5] Opkins A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [6] Zhang G B, Li Q Y, Chen Q L, et al. Network pharmacology: a new approach for chinese herbal medicine research [J]. Evid-Based Compl Alt, 2013, doi:10.1155/2013/621423.
- [7] Li S, Fan T P, Jia W, et al. Network pharmacology in traditional Chinese medicine [J]. Evid-Based Compl Alt, 2014, doi: 10.1155/2014/138460.
- [8] 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.
- [9] Tao W, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 1-10.
- [10] 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
- [11] Picone P, Nuzzo D, Di Carlo M. Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo [J]. Biol Bull, 2013, 224: 18-28.
- [12] 刘彦霞, 黄汉昌, 常 平, 等. 儿茶素类物质在阿尔茨海默病中的神经保护作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 1607-1613.