

基于网络药理学香青兰防治痴呆的机制探讨

刘蜜敏, 赵凯悦, 姜海伦, 李卓荣*, 刘睿*

中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 采用网络药理学技术探讨香青兰防治痴呆的物质基础和作用机制。**方法** 通过文献挖掘和药动学参数筛选香青兰含有的活性化合物, 通过检索 DrugBank、GeneCards 和 OMIM 数据库收集与痴呆相关的靶标; 运用 Cytoscape 软件构建香青兰防治痴呆的蛋白质相互作用网络; 进行基因本体和信号通路富集分析; 构建香青兰化合物-关键靶标-通路网络。**结果** 筛选得到香青兰中药物活性成分 42 种, 获得香青兰防治痴呆的潜在药物靶标 90 个, 于蛋白质互作网络中进一步筛选得到 74 个主要靶标, 富集得到 300 条信号通路、1 465 个生物学过程、104 个细胞组分和 108 个分子功能, 通过化合物-靶标-通路网络中获得香青兰发挥防治痴呆作用的关键化合物, 如金合欢素、芹菜素、金圣草(黄)素等黄酮类化合物, 以及对应的关键靶标与关键信号通路, 如 MAPK、APP、MAPT、PI3K 等靶标与阿尔茨海默病、神经营养蛋白等通路。**结论** 香青兰防治痴呆具有多成分、多靶标、多通路的作用特点。

关键词: 香青兰; 痴呆; 网络药理学; 靶标; 作用机制; 金合欢素; 芹菜素; 金圣草(黄)素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 10-2203-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.023

Study on mechanism of prevention and treatment of dementia of *Dracocephalum moldavica* based on network pharmacology

LIU Mimin, ZHAO Kaiyue, JIANG Hailun, LI Zhuorong, LIU Rui

Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To explore the material basis and mechanism of *Dracocephalum moldavica* L. in the prevention and treatment of dementia. **Methods** The active compounds contained in *D. moldavica* were screened by literature mining and pharmacokinetic parameters, and the targets related to dementia were collected by searching drugbank, genecards and OMIM databases. Cytoscape software was used to construct the protein interaction network of *D. moldavica* for the prevention and treatment of dementia. Gene ontology and signal pathway enrichment were analyzed. The key target pathway network of *D. moldavica* compounds was constructed. **Results** 42 active components were screened, 90 potential drug targets for the prevention and treatment of dementia were obtained, 74 main targets were further screened in the protein-protein interaction network, and 300 signal pathways, 1 465 biological processes, 104 cell components and 108 molecular functions were enriched. Through the compound-target-pathway network, the key compounds that play a role in the prevention and treatment of dementia, such as acacetin, apigenin, chrysoeriol and other flavonoids, as well as the corresponding key targets and key signal pathways, such as MAPK, APP, MAPT, PI3K and Alzheimer's disease, neurotrophic protein and other pathways were obtained. **Conclusion** *D. moldavica* has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel in the prevention and treatment of dementia.

Key words: *Dracocephalum moldavica* L.; dementia; network pharmacology; targets; mechanism of action; acacetin; apigenin; chrysoeriol

痴呆(dementia)是一类以独立生活能力下降和社会功能减退为特征的认知障碍综合征^[1],可由多种因素或疾病共同导致。受人口老龄化的影响,痴呆的患病率不断上升,预计至2050年,全球痴呆患

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金NSFC-新疆联合基金重点支持项目(U1803281); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(重大协同创新项目,2017-I2M-1-016)

第一作者: 刘蜜敏(1998—),女,硕士研究生,研究方向为神经药理学。E-mail: liumimin@imb.pumc.edu.cn

*通信作者: 刘睿,研究方向为神经药理与新药研发。E-mail: liurui@imb.pumc.edu.cn

李卓荣,研究方向为微生物与生化药学。E-mail: lizhuorong@imb.pumc.edu.cn

病人数将达到1.52亿^[2]。现阶段,痴呆的病因及病理机制复杂未明,临床缺乏有效的治疗药物,临床试验中基于神经保护假说的候选药物尚未取得理想的结果^[3],因而,治疗痴呆的药物研究亟待新的探索模式。

我国中药蕴含着丰富多样的天然产物,在痴呆的防治方面具有得天独厚的资源和优势。香青兰 *Dracocephalum moldavica* L. 为唇形科青兰属植物,全草可药用,具有数百年的药用历史,具有益心护脑、疏风清热、开通闭塞等功效^[4]。以其为单药组方的益心巴迪然吉布亚颗粒,临床用于神疲失眠、心烦气喘、神经衰弱等症的治疗^[5]。本课题组前期研究表明,香青兰有效部位具有提高学习记忆与防治老年痴呆的药理作用,能够提高认知能力、抑制神经细胞凋亡、减少淀粉样蛋白沉积,表现出多途径、多环节、多层面的作用特点^[6],但其发挥防治作用的物质基础、潜在靶标及相互作用机制仍需进一步阐明。本研究拟采用网络药理学方法,分析香青兰防治痴呆的潜在机制,为其作用机制的研究与深度开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 香青兰有效成分的收集与筛选

以香青兰 *Dracocephalum moldavica* L. 为关键词,通过文献检索、BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 及化源网 (<https://www.chemsrc.com/>) 收集香青兰化学成分,在 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) 数据库中根据药动学相关参数筛选潜在有效成分。筛选依据^[7-8]为:(1)定义 pharmacokinetics 中肠胃吸收 (gastrointestinal absorption/GI absorption) 为“high”作为化学成分可被吸收的条件;(2)定义血脑屏障渗透 (blood brain barrier permeant, BBB permeant) 为“yes”作为有血脑屏障通透特性的化学成分;(3)类药性 (druglikeness) 五项规则中至少有两项显示为“yes”;(4)生物利用度值 (bioavailability score) ≥ 0.5 。

1.2 靶标的预测与筛选

1.2.1 香青兰活性化合物作用靶标的预测 采用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库,导入化合物结构式,物种限定为“人类(Homo sapiens)”,获取香青兰成分对应的潜在作用靶标。

1.2.2 疾病相关靶标的收集 以 dementia(痴呆)为关键词检索 DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)、

OMIM (<https://www.omim.org/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库,收集痴呆相关基因。在 Uniprot 数据库中,物种选择“人类(Homo sapiens)”,将疾病相关基因靶标名称校准为 Uniprot 官方基因名称 (gene name)。

1.3 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与分析

利用 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库对香青兰活性成分和痴呆的交集靶标获取 PPI 相关信息;采用 Cytoscape 3.7.0 软件,构建 PPI 可视化网络,并对 PPI 网络进行拓扑参数分析,选择 Degree 数值高的生物靶标作为香青兰的主要生物靶标。

1.4 基因功能富集分析

通过 Metascape (www.metascape.org/) 在线基因功能富集分析工具对香青兰防治痴呆的靶标进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和全基因组及代谢途径 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。选择 P 值 ≤ 0.01 进行个性化分析。根据数据信息,计算出对应的富集因子 (rich factor),选择按照 $\lg q$ 值升序排列的前 15 条基因功能,以名称、富集因子、 $-\lg q$ 值和基因数 (count) 4 项数据,可视化作图得到分子生物学功能 (molecular function, MF)、生物学过程 (biological process, BP) 和细胞学组分 (cellular components, CC) 的气泡图。选择按照 $\lg q$ 值升序排列前 15 条的基因通路制作气泡图,并以这 15 条通路作为关键通路对比对香青兰的主要靶标,去重得到关键靶标。

2 结果

2.1 香青兰活性化合物的获得

共检索到香青兰相关化合物 80 个,并通过 ADME 参数筛选,得到活性分子 42 个。化合物信息见表 1。

2.2 靶标预测与筛选

对香青兰中 42 个活性化合物进行靶标预测,合并后删除重复值,共获得 431 个人源靶标。对于痴呆相关靶标,经由 DrugBank、OMIM、GeneCards 数据库进行收集,将 3 个数据库收集到的疾病靶标合并去重后,共得到 736 个与痴呆有关的疾病靶标。将香青兰活性化合物的药物靶标与痴呆相关的疾病靶标取交集并制作韦恩图,得到 90 个香青兰防治痴呆的潜在作用靶标。如图 1 所示。

2.3 PPI 网络构建与主要靶标分析

将 90 个潜在靶标导入 STRING 数据库,选择 combined_score ≥ 0.9 的 261 组靶标间相互作用关系

表1 香青兰中筛选得到的活性化合物

Table 1 Active compounds screened from *D. moldavica*

化合物中文名称	化合物英文名称	PubChem CID
5,7,4'-三羟基-3'甲氧基黄酮	5,7,4'-trihydroxy-3'methoxy flavone	N/A
8-羟基-鼠尾草素	8-hydroxy-salvigenin	3083783
丹酚酸B	salvianolic acid B	11629084
迷迭香酸乙酯	ethyl-rosmarinate	44437692
23-羟基熊果酸	23-hydroxyursolic acid	14136881
3,7-二甲基-3-乙酰氧基-7-羟基-1,5-辛二烯	3,7-dimethyl-3-acetoxy-7-hydroxy-1,5-octadiene	N/A
3 β ,20 α -二羟基乌苏烷-21(22)en-28-酸	3 β ,20 α -dihydroxyurs-21(22)en-28-oic acid	N/A
乌苏烷-12-烯-28-酸-2 α ,3 β -二醇	2 α ,3 β -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid	45481653
玄参黄酮	scrophulein	188323
亚柠檬酸丙二酸	citrylidene malonic acid	N/A
金合欢素	acacetin	5280442
芹菜素	apigenin	5280443
木犀草素	luteolin	5280445
咖啡酸	caffeic-acid	689043
金圣草素	chrysoeriol	5280666
β -橙色素	citraurin Beta	9845703
胡萝卜苷	daucosterol	5742590
香叶木素	diosmetin	5281612
D-柠檬烯	D-limonene	440917
6,7-二羟基香豆素,即七叶内酯	esculetin	5281416
阿魏酸	ferulic-acid	445858
栀子素甲	gardenin A	261859
栀子素乙	gardenin B	96539
异鼠李素	isorhamnetin	5281654
山柰酚	kaempferol	5280863
柠檬烯 二戊烯	limonene dipentene	22311
迷迭香酸甲酯	methyl-rosmarinate	6479915
对-香豆酸	<i>p</i> -coumaric-acid	637542
槲皮素	quercetin	5280343
鼠尾草素	salvigenin	161271
丁香脂素	syringaresinol	100067
百里香酮	thymonin	442662
2,5-二羟基苯甲酸	2,5-dihydroxybenzoic acid	3469
对羟基桂皮酸甲酯	methyl 4-hydroxycinnamate	5319562
黄酮醇	3-hydroxyflavone	11349
田菊苷	moldavoside、acacetin 7-O-glucoside	5321954
芹菜素-7-O- β -D-半乳糖苷	apigenin-7-O- β -D-galactoside	44257799
金合欢素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	acacetin 7-O- β -D-glucopyranoside	44257884
金合欢素-7-O-(6"-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷	acacetin-7-O-(6"-acetyl)-glucopyranoside	52929806
金合欢素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷	acacetin-7-O- β -D-glucuronide	44257886
芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷	apigenin-7-O- β -D-glucoside	5280704
二氢咖啡酸	dihydrocaffeic-acid	348154

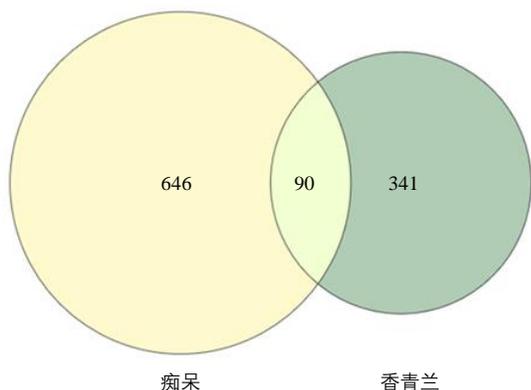


图 1 药物和疾病靶标交集韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection of drug and disease targets

数据,通过 Cytoscape 3.7.0 软件绘制 PPI 网络,以 Degree 值表示可视化靶标的重要程度,以 combined_score 值表示靶标间互作关系的强弱。如图 2 所示,该网络由 74 个节点(靶标)和 261 条边(靶标间相互作用关系)组成,提示有 74 个与其直接或间接相关的主要靶标,以及 261 条靶标与靶标之间的相互关系,这些主要靶标包括淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha, PIK3R1)、磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸 3 激酶催化亚基 α 亚型(phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PIK3CA)、丝裂原激活的蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase, MAPK1)、转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、丝裂原激活的蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、热休克蛋白 90- α (heat shock protein, HSP 90-alpha、HSP90AA1)、丝裂原激活的蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine-protein kinase Fyn, FYN)、富含脯氨酸的 AKT1 底物 1 (proline-rich AKT1 substrate 1, Akt1) 等。

2.4 靶标的 GO 功能注释

GO 功能注释包括 3 个方面,即 74 个主要靶标的 BP、CC 和 MF 的富集结果。气泡图的纵坐标表示富集条目,横坐标表示权重大小。如图 3 所示,香青兰 74 个主要靶标对应的 BP 主要涉及突触信号 (synaptic signaling)、调节神经递质水平 (regulation of neurotransmitter levels) 及蛋白激酶活性的正调控 (positive regulation of protein kinase activity) 等。在 CC 中,靶标富集的条目主要分布在

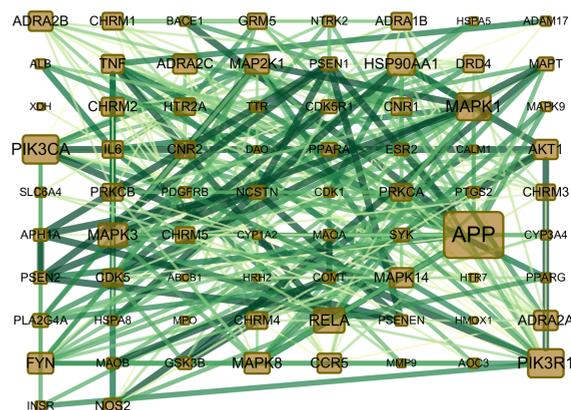


图 2 74 个主要靶标的 PPI 网络

Fig. 2 Network diagram of protein-protein interactions of 74 main targets

细胞的轴突(axon)、突触前(presynapse)、突触后(postsynapse)等区域(图4)。在 MF 中,主要靶标富集的条目涉及 G 蛋白偶联的神经递质受体活性 (G protein-coupled neurotransmitter receptor activity)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity) 和 G 蛋白偶联的乙酰胆碱受体活性 (G protein-coupled acetylcholine receptor activity) 等(图 5)。综合生物功能的富集分析结果,可见香青兰的 74 个主要靶标与神经系统的生物信息传递过程密切相关。

2.5 靶标信号通路富集分析

对香青兰的 74 个主要靶标的通路富集分析如图 6 所示,结果表明主要靶标涉及 Fc ϵ RI 信号通路 (Fc epsilon signaling pathway)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease)、神经营养蛋白信号通路 (neurophin signaling pathway)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 等与神经退行性疾病、学习记忆能力、免疫炎症、激酶系统等信号转导相关的 300 条信号通路。

2.6 化合物-靶标-通路网络构建与分析

将 KEGG 分析得到前 15 条信号通路及其富集的关键靶标与对应的化合物数据导入 Cytoscape 软件构建“化合物-靶标-通路”的加权网络,如图 7 所示,绿色矩形表示 15 条关键通路,红色菱形表示 48 个关键靶标,黄色椭圆形表示靶标对应的 39 个活性化合物,点的大小表示特征向量中心性 (eigenvector centrality) 值,点越大则节点越重要;线越粗、颜色越深则权重值越大,节点间的作用关系越强。排名前 20 位化合物的节点网络拓扑参数、关键靶标网络拓扑参数及关键信号通路网络拓扑参数见表 2~4。

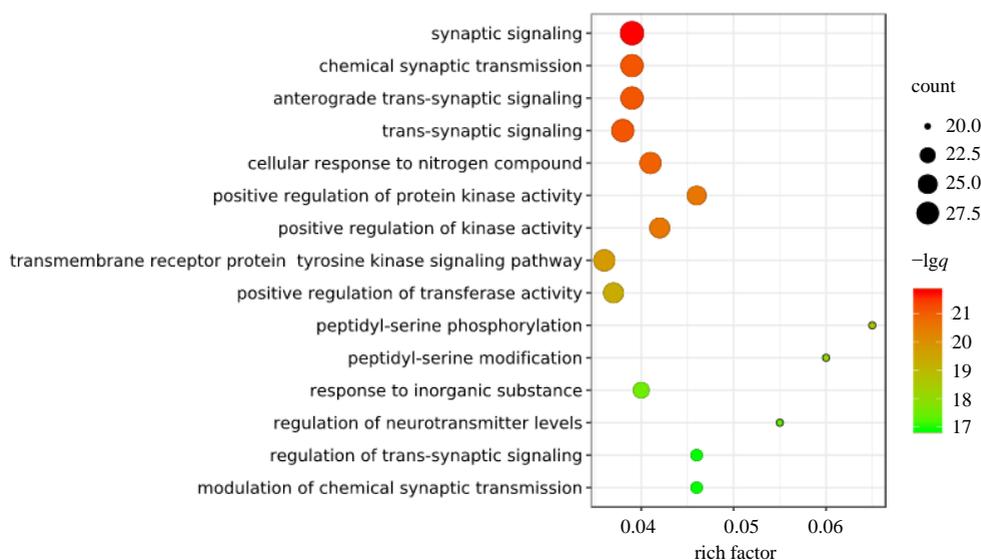


图3 GO富集得到的前15个生物学过程

Fig. 3 The first 15 biological processes obtained by GO enrichment

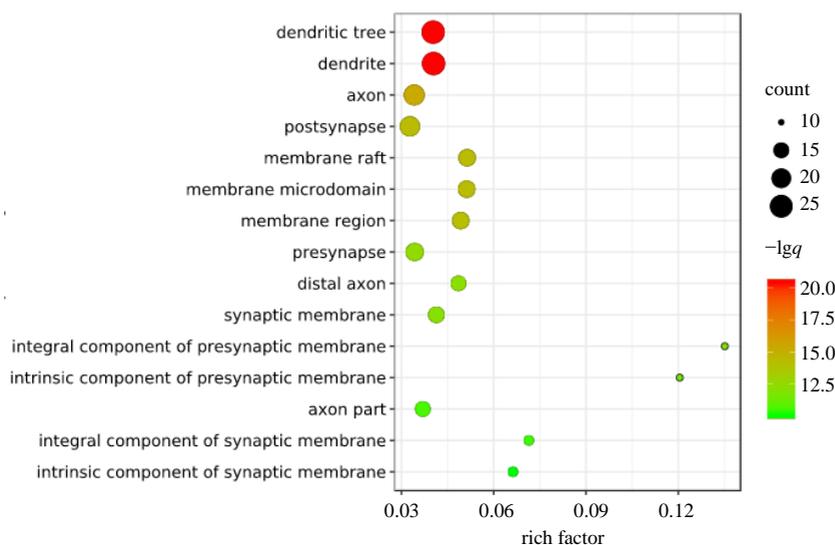


图4 GO富集得到的前15个细胞学组分

Fig. 4 The first 15 cellular components obtained by GO enrichment

通过网络拓扑分析可以推测金合欢素(acacetin)、芹菜素(apigenin)、金圣草(黄)素(chrysoeriol)、山柰酚(kaempferol)、三裂鼠尾草素(salvigenin)、麝香草素(thymonin)、栀子(黄)素A/B(gardenin A/B)、木犀草素(luteolin)、香叶木素(diosmetin)等活性化合物为香青兰防治痴呆的关键化合物,此类活性化合物主要为黄酮类。丝裂原激活的蛋白激酶类(MAPK)、淀粉样前体蛋白(APP)、微管相关蛋白tau(MAPT)、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)等为关键化合物的关键作用靶标。Ras信号通路(Ras signaling pathway)、TNF信号通

路(TNF signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、神经营养蛋白信号通路(neurotrophin signaling pathway)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)等为发挥防治痴呆作用的关键信号通路。

3 讨论

痴呆是由于脑功能障碍而产生的获得性、进行性智能损害综合征,主要表现为学习记忆能力下降、认知功能损害及语言、思维和社交能力障碍等^[9]。痴呆由各种脑部疾病所致,其中,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆类疾

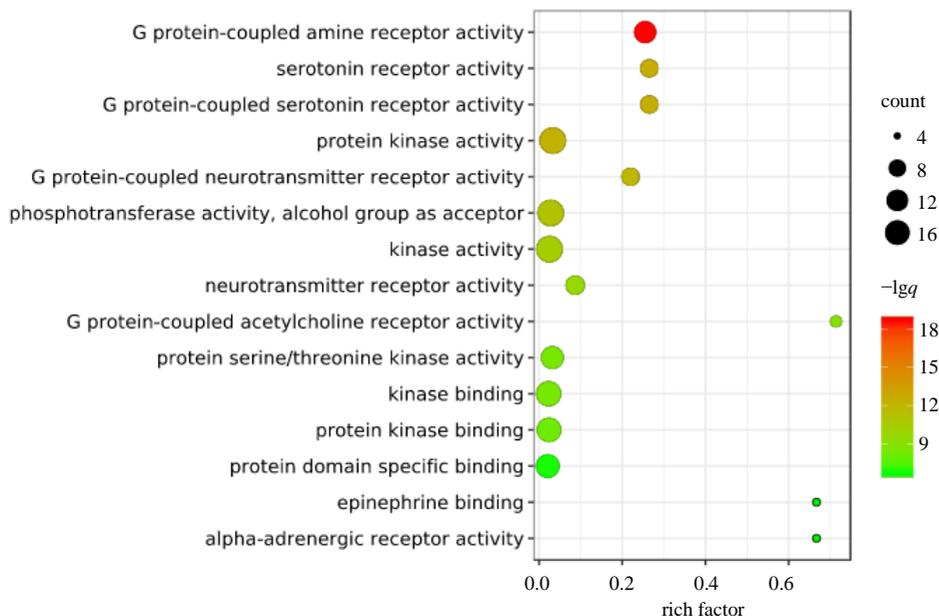


图 5 GO 富集得到的前 15 分子生物学功能

Fig. 5 The first 15 molecular functions obtained by GO enrichment

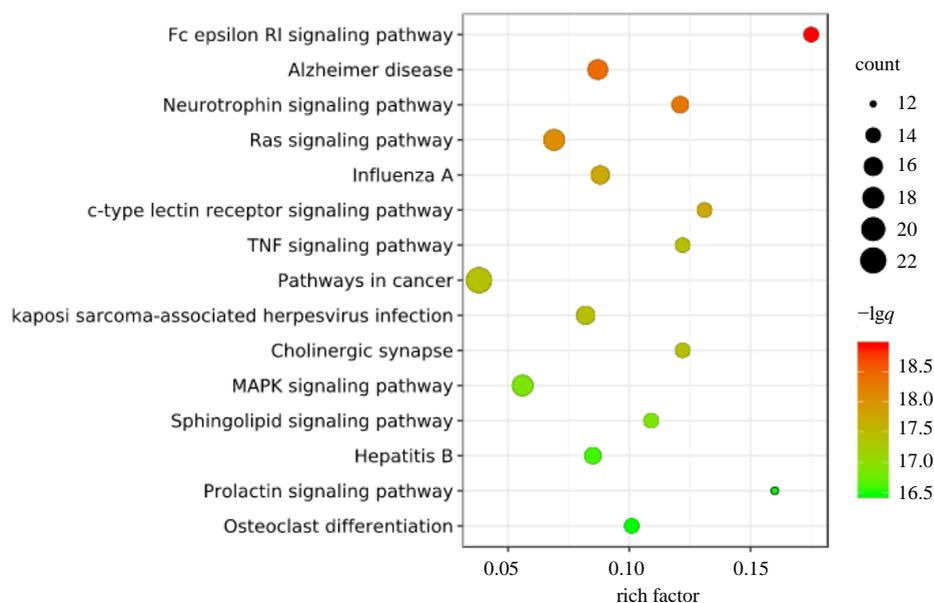


图 6 74 个主要靶标的 KEGG 富集分析得到的前 15 个通路

Fig. 6 The first 15 pathways obtained by KEGG enrichment analysis of 74 main targets

病,约占 60%^[10]。针对 AD 复杂的病理机制,目前提出了 A β 假说、tau 蛋白假说、神经递质失调假说、神经炎症假说等^[11]。在美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的治疗药物中,他克林、多奈哌齐、加兰他敏和卡巴拉汀以胆碱能障碍作为药物靶标^[12],美金刚则以神经递质紊乱为药物靶标^[13]。由脑缺血、缺氧或出血所致的血管性痴呆(vascular dementia, VD)是继 AD 的第二大痴呆类型,至今尚未有被 FDA 批准用于治疗 VD 的药物^[14],临床上治疗 VD 的药物与 AD 基本相同,同时以改善脑循环、调血

脂、稳定斑块等措施治疗原发性脑血管病^[15]。鉴于当前的防治药物对于痴呆类疾病的疗效均不理想,研究者致力于发现多靶标、多环节协同作用的新型抗痴呆类药物^[16]。

从祖国医药中寻找安全有效、多途径协同作用的脑保护天然产物已成为防治痴呆的新药研究方向。香青兰中分离得到黄酮类、三萜类、甾体类、苯丙素类等多种化学成分,研究表明具有调血脂、抗动脉粥样硬化的作用,以及对缺血心肌和脑的保护作用^[17]。香青兰总黄酮提取物可通过减轻 A β 沉

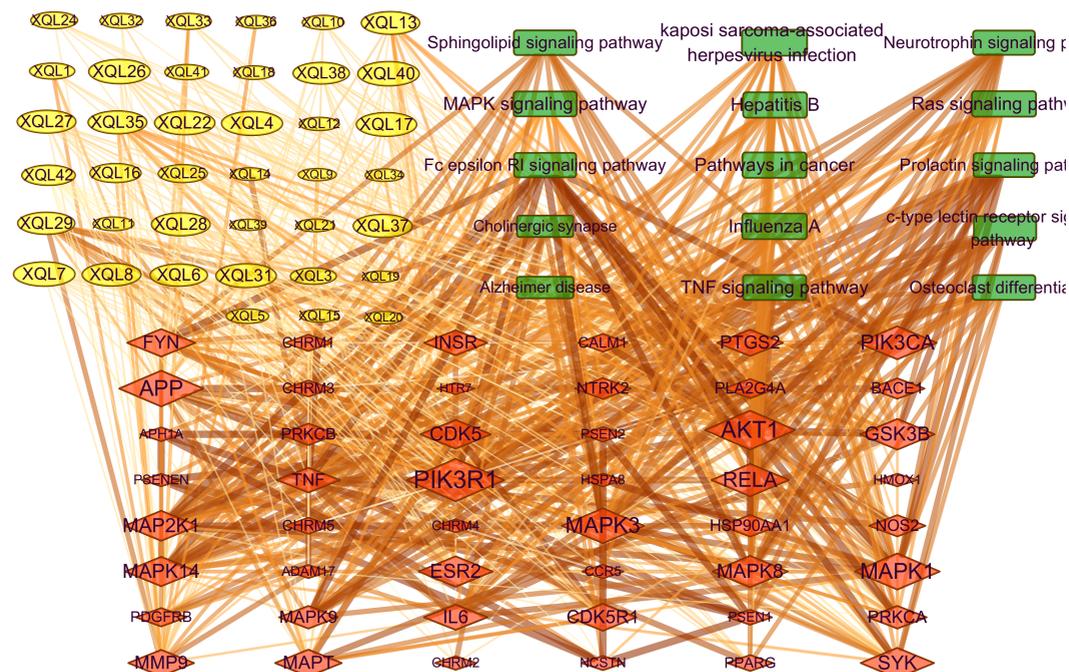


图7 化合物-靶标-通路网络

Fig. 7 Network of compound-target-pathway

表2 Eigenvector centrality值Top20化合物节点网络拓扑参数

Table 2 Eigenvector centrality value Top20 compound node network topology parameters

ID	化合物	eigenvector centrality	closeness centrality	degree
XQL7	8-hydroxy-salvigenin	0.43	0.50	14
XQL40	thymonin	0.43	0.50	14
XQL26	gardenin A	0.43	0.50	14
XQL4	3-hydroxyflavone	0.42	0.47	14
XQL31	luteolin	0.41	0.49	13
XQL22	diosmetin	0.41	0.49	13
XQL17	chrysoeriol	0.41	0.49	13
XQL35	quercetin	0.38	0.48	12
XQL28	isorhamnetin	0.38	0.48	12
XQL8	acacetin	0.38	0.50	13
XQL37	salvigenin	0.38	0.50	13
XQL27	gardenin B	0.38	0.50	13
XQL13	apigenin	0.38	0.50	13
XQL6	5,7,4'-trihydroxy-3'methoxy flavone	0.36	0.49	11
XQL29	kaempferol	0.36	0.49	11
XQL38	scrophulein	0.34	0.49	12
XQL42	1,7-octadiene	0.30	0.51	20
XQL16	caffeic-acid	0.26	0.49	8
XQL25	ferulic-acid	0.23	0.47	8
XQL24	esculetin	0.19	0.44	7

积,降低不溶性Aβ水平,改善AD模型小鼠的认知障碍和抗氧化防御系统的失调^[6]。另外香青兰总黄

酮提取物还可以通过相关的线粒体依赖性途径保护星形胶质细胞^[18]。

表3 Eigenvector centrality值Top20关键靶标网络拓扑参数
Table 3 Top 20 key target network topology parameters with eigenvector centrality value

靶标	eigenvector centrality	closeness centrality	degree
PIK3R1	1.00	0.61	44
AKT1	0.89	0.58	37
MAPK1	0.80	0.59	35
APP	0.79	0.59	42
MAPK3	0.76	0.58	31
PIK3CA	0.71	0.56	29
RELA	0.68	0.55	26
MAPK8	0.65	0.56	25
GSK3B	0.64	0.52	29
ESR2	0.63	0.55	32
SYK	0.62	0.51	27
MAP2K1	0.61	0.52	23
MAPK14	0.59	0.56	27
CDK5	0.57	0.53	26
FYN	0.54	0.51	22
CDK5R1	0.52	0.51	24
MAPT	0.51	0.51	21
MMP9	0.50	0.51	28
PTGS2	0.50	0.50	29
IL6	0.46	0.53	17

本研究通过网络药理学的手段,发现了香青兰中能够吸收入血的活性化合物共计42个,能够

发挥防治痴呆作用的活性化合物39个;香青兰防治痴呆的潜在作用靶标有90个,其中,与神经系统的生物信息传递密切相关的主要靶标74个、关键靶标48个,说明香青兰防治痴呆的作用不是单一的信号途径,其主要活性分子可通过多靶标的协调干预作用缓解痴呆的病理进程。

本研究构建了香青兰潜在靶标之间的相互作用网络,发现了261个靶标与靶标之间的相互关系,涉及了淀粉样蛋白异常代谢与神经纤维缠结发生的联系、tau蛋白过度磷酸化与激酶系统异常激活的关联,以及炎症介质的产生与胶质细胞极化的相互作用,提示香青兰防治痴呆的多靶标特征并非独立的药理作用,这些靶标之间存在着密切的相互作用关系,香青兰的多靶标干预作用形成了复杂的生物调控网络,为后续香青兰的基因功能注释、信号通路富集分析和化合物-靶标-通路网络研究奠定了良好的基础。

GO分析结果证实,香青兰防治痴呆的基因功能主要分布在细胞的树突、轴突和胞浆等细胞组分中,表现为调控突触信号转导、神经递质水平及蛋白激酶活性等生命过程。在香青兰的通路分析中,以APP代谢为代表的AD通路、神经营养蛋白通路、Ras通路、TNF通路、MAPK通路是细胞内的主要调控通路,这些信号通路所涉及的关键基因、功能分布和生命过程,与不同活性化合物的作用机制密切相关。

表4 关键信号通路网络拓扑参数

Table 4 Key signaling pathway network topology parameters

通路	eigenvector centrality	closeness centrality	degree
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	0.49	0.50	16
Influenza A	0.48	0.51	16
Ras signaling pathway	0.47	0.50	18
Pathways in cancer	0.47	0.51	18
Hepatitis B	0.47	0.50	15
TNF signaling pathway	0.46	0.50	14
MAPK signaling pathway	0.46	0.50	18
Osteoclast differentiation	0.45	0.50	14
Sphingolipid signaling pathway	0.45	0.50	14
c-type lectin receptor signaling pathway	0.45	0.49	14
Fc epsilon RI signaling pathway	0.44	0.50	14
Neurotrophin signaling pathway	0.44	0.50	15
Prolactin signaling pathway	0.42	0.48	12
Alzheimer's disease	0.35	0.52	17
Cholinergic synapse	0.35	0.48	14

APP是预测到的关键靶标,在神经细胞表面执行与轴突生长、神经细胞黏附和轴突生成有关的生物功能,同时促进邻近细胞的突触形成,然其异常代谢造成了A β 的沉积,被认为是驱动AD发病的主要因素^[19]。香青兰可通过抑制APP的异常代谢,减少淀粉样斑块的形成^[6],而通过网络药理学分析发现,香青兰中的金合欢素、麝香草素、黄酮素、槲子(黄)素A和槲子(黄)素B等20种活性化合物作用于APP这一靶标,协同发挥抑制APP异常代谢的作用。

MAPT是预测的另一个关键基因,能够促进微管组装和稳定性,其C末端结合轴突微管,N末端结合神经质膜成分,参与神经元极性的建立和维持。在多种痴呆疾病中,MAPT在细胞内丝状内含物中发生异常磷酸化。预测结果提示香青兰对tau蛋白异常磷酸化有调控作用,参与这一机制的有香叶木素、木犀草素、金圣草(黄)素等13种活性化合物。

MAPK级联途径是通过靶标功能富集到的关键基因通路,该信号级联主要包括p38 MAPK^[20]、JNK、Ras/ERK^[21]等信号通路,与神经细胞膜表面受体、神经递质转导、神经炎症和细胞凋亡等过程有关^[22]。预测出香青兰中的活性化合物黄酮醇、田蓟苷、芹菜素和异鼠李素等化合物与MAPK家族的活化密切相关,同时发现其多种活性化合物具有抑制MAPK上游信号分子的作用^[23],由此推断,香青兰发挥抗痴呆作用与MAPK级联途径密切相关。

神经营养蛋白(Neurotrophin)级联通路是拓补网络中预测到的重要靶标,涉及神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)及神经营养蛋白3和4(NT3和NT40)介导的多种生物学功能^[24]。在痴呆患者脑中,含量降低的BDNF无法通过与酪氨酸激酶受体结合及促使磷酸化CREB促进相关蛋白的转录,从而造成记忆能力的降低^[25]。预测到香青兰对多条神经营养蛋白级联信号通路的激活具有调控作用,如PI3K、MAPK,因此,前期实验发现的香青兰提高小鼠空间学习记忆能力的作用,与促进神经营养蛋白级联通路的调节密不可分。

本课题组近年来致力于寻找天然来源的多靶标抗痴呆药物。前期研究不仅发现了香青兰中有效提取物能够发挥抗AD作用,还证实了其多种单体化合物也具备抵抗A β 损伤、提高胆碱能功能、抑制氧化应激及慢性炎症损伤等神经保护作用。例如,槲皮素通过抑制晚期糖基化终末产物受体减少

血脑屏障的炎症反应,提高胆碱能神经细胞功能,从而保护血脑屏障免受A β 损伤^[26]。芹菜素具有抑制淀粉样蛋白的生成和神经营养作用,因而提高了AD小鼠的空间认知能力^[27]。木犀草素通过抑制MAPK/NF- κ B级联信号通路减少AD小鼠脑组织的氧化应激和炎症反应^[28]。此外,香青兰的有效成分在VD的疗效也得到了实验证据的支持,表现为田蓟苷通过同时抑制CaMKII介导的氧化与磷酸化信号通路对缺血性神经细胞发挥抗氧化及抗炎保护作用^[29]。上述实验研究与本研究通过网络药理学方法分析得到的多种药物靶标和信号通路的干预作用高度一致,为香青兰及来源于香青兰的天然产物在防治AD和VD的药物开发提供了实验依据和生物信息学的药效物质基础。

本研究采用网络药理学的方法^[30]对香青兰防治痴呆的作用机制进行分析,获得了香青兰防治痴呆的物质基础和药物靶标,聚焦了香青兰的药物靶标互作网络,预测了有效化合物的靶标-通路作用机制,明确了其多成分、多靶标、多通路及整合调控作用的特点,为香青兰用于防治痴呆的研究提供了理论依据,为抗痴呆药物研究提供了新的思路和方法。后续,课题组将基于此研究,针对APP、MAPT、MAPK、Neurotrophin等关键基因与级联通路进行整体水平、细胞水平及基因分子水平的实验验证,深入探讨香青兰抗痴呆的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gale S A, Acar D, Daffner K R. Dementia [J]. Am J Med, 2018, 131(10): 1161-1169.
- [2] Patterson C. World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers [M]. London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2018.
- [3] Panza F, Lozupone M, Dibello V, et al. Are antibodies directed against amyloid- β (A β) oligomers the last call for the A β hypothesis of Alzheimer's disease? [J]. Immunotherapy, 2019, 11(1): 3-6.
- [4] 谢宗万, 范崔生, 朱兆仪. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
Xie Z W, Fan C S, Zhu Z Y. The Compilation of Chinese Herbal Medicines [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [5] 吴明如, 王丹, 赵剑. 香青兰的化学成分及广泛应用的药理学基础 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(3): 79-82.

- Wu M R, Wang D, Zhao J. Chemical constituents of *Cymbidium odoratum* L. and pharmacological basis of its wide application [J]. *Chin Med J Res Pract*, 2014, 28(3): 79-82.
- [6] Liu Q S, Jiang H L, Wang Y, et al. Total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. attenuates β -amyloid-induced toxicity through anti-amyloidogenic and neurotrophic pathways [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 214-225.
- [7] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [8] 李建良, 王朝鲁, 蔡淑珍, 等. 基于网络药理学探讨全石榴"助胃火"治疗功能性胃肠病的作用机制 [J]. *中成药*, 2019, 41(9): 2240-2245.
- Li J L, Wang C L, Cai S Z, et al. Study on the mechanism of *Punica granatum* "zhuweihuo" in the treatment of functional gastrointestinal diseases based on network pharmacology [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2019, 41(9): 2240-2245.
- [9] 付文宁, 刘巧燕, 柴云, 等. 国内老年痴呆护理研究进展 [J]. *中国社会医学杂志*, 2015, 32(5): 393-395.
- Fu W N, Liu Q Y, Chai Y, et al. Research progress of nursing on Alzheimer's disease in China [J]. *Chin J Soc Med*, 2015, 32(5): 393-395.
- [10] Revi M. Alzheimer's disease therapeutic approaches [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1195: 105-116.
- [11] 韩宛盈, 岳少乾, 朱金墙. 阿尔茨海默病与血管性痴呆发病过程中血管因素的作用及其药物治疗 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(1): 216-220.
- Han W Y, Yue S Q, Zhu J Q. The role of vascular factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease and vascular dementia and their drug treatment [J]. *Chin J Gerontol*, 2017, 37(1): 216-220.
- [12] Sharma P, Tripathi M K, Shrivastava S K. Cholinesterase as a target for drug development in Alzheimer's disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2089: 257-286.
- [13] Matsunaga S, Kishi T, Nomura I, et al. The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(10): 1053-1061.
- [14] O'Brien J T, Thomas A. Vascular dementia [J]. *Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [15] Nucera A, Hachinski V. Cerebrovascular and Alzheimer disease: fellow travelers or partners in crime? [J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5): 513-516.
- [16] O'Brien J T, Holmes C, Jones M, et al. Clinical practice with anti-dementia drugs: a revised (third) consensus statement from the British Association for Psychopharmacology [J]. *J Psychopharmacol*, 2017, 31(2): 147-168.
- [17] 杨丽娜, 邢建国, 何承辉, 等. 维药香青兰的化学成分与药理作用评价 [J]. *世界临床药物*, 2013, 34(4): 226-231.
- Yang L N, Xing J G, He C H, et al. Chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. and their pharmacological activities [J]. *World Clin Drugs*, 2013, 34(4): 226-231.
- [18] Zheng R F, Du Y W, Zeng C, et al. Total flavones of *Dracocephalum moldavica* L. protect astrocytes against H_2O_2 -induced apoptosis through a mitochondria-dependent pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 78.
- [19] Ristori E, Donnini S, Ziche M. New insights into blood-brain barrier maintenance: the homeostatic role of β -amyloid precursor protein in cerebral vasculature [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 1056.
- [20] Lee J K, Kim N J. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): E1287.
- [21] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [22] 宋锦秋, 陈晓春. MAPK 信号通路阿尔茨海默病中 tau 蛋白磷酸化的关系 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2006, 33(4): 339-343.
- Song J Q, Chen X C. Relationship between MAPK signaling pathway and tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease [J]. *J Int Neurol Neurosurg*, 2006, 33(4): 339-343.
- [23] Jiang H, Fang J, Xing J, et al. Tiliainin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- κ B signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 216: 233-245.
- [24] Huang E J, Reichardt L F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 609-642.
- [25] Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, et al. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(3): 579-593.
- [26] Liu R, Zhang T T, Zhou D, et al. Quercetin protects against the $A\beta(25-35)$ -induced amnesic injury: involvement of inactivation of rage-mediated pathway and conservation of the NVU [J]. *Neuropharmacology*,

- 2013, 67: 419-431.
- [27] Zhao L, Wang J L, Liu R, et al. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Mol Basel Switz*, 2013, 18(8): 9949-9965.
- [28] Zhang J X, Xing J G, Wang L L, et al. Luteolin inhibits fibrillary β -Amyloid1-40-induced inflammation in a human blood-brain barrier model by suppressing the p38 MAPK-mediated NF- κ B signaling pathways [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 334.
- [29] Jiang H L, Fang J S, Xing J G, et al. Tilianin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- κ B signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 216: 233-245.
- [30] 任 艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4789-4797.
- Ren Y, Deng Y J, Ma H B, et al. Research progress and challenges of network pharmacology in field of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(18): 4789-4797.

[责任编辑 刘东博]