

基于UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS技术的酸枣仁化学成分分析及其抗阿尔茨海默病机制的网络药理学研究

曲彤, 李宁, 鲁文静, 任慧, 崔小敏, 胡静, 陈志永*, 张红*

陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

摘要: **目的** 通过超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS)分析酸枣仁中的化学成分, 依据解析的化学成分及中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、本草组鉴数据库(HERB)获取的酸枣仁主要成分结合网络药理学和分子对接技术初步预测其抗阿尔茨海默病(AD)的药效物质基础, 筛选出潜在功效成分, 预测作用机制。**方法** 采用UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS对酸枣仁进行化学成分分析, 分别在正、负离子模式下扫描, 结合对照品、文献中的碎片离子信息、保留时间进行匹配, 确认化学成分。利用TCMSP、HERB数据库获取酸枣仁的主要成分及其对应作用靶点信息; 通过GeneCards、OMIM数据库获得AD相关疾病靶点; 将酸枣仁主要成分对应靶点与AD靶点取交集, 借助String 11.5平台和Cytoscape 3.7.2软件绘制交集基因蛋白质相互作用(PPI)网络; 利用DAVID 6.8对核心靶点进行基因本体(GO)功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 通过微生信云平台对富集结果可视化; 借助AutoDock Tools软件对核心成分及关键靶点基因进行分子对接。**结果** 酸枣仁定性分析中共鉴定出40个化合物, 主要包括3个有机酸类、28个黄酮类、8个生物碱类、1个皂苷类; 筛选出发挥改善AD作用的核心成分5个, 包括拟雌内酯、油酸、山柰酚、乌药碱、酸李碱; 酸枣仁改善AD的核心靶点有JUN、AKT1、STAT3、MAPK14、ESR1、IL16等; KEGG通路分析共得到157条通路, 其中PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路、HIF-1信号通路排名靠前; GO富集分析得到生物过程(BP)条目336个、细胞组分(CC)条目45个、分子功能(MF)42个。分子对接结果显示, 酸枣仁的4个核心成分与关键靶点间存在分子结合位点且结合能较强, 均小于 $-20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。**结论** 通过UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS解析的化学成分结合网络药理学、分子对接预测了酸枣仁是通过多成分、多靶点、多途径来发挥抗AD作用的。

关键词: 酸枣仁; UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS; 成分分析; 网络药理学; 阿尔茨海默病; 拟雌内酯; 山柰酚; 乌药碱; 酸李碱
中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)12-2563-17

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.011

Analysis on chemical constituents in *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS and network pharmacology study on anti-Alzheimer's disease mechanism

QU Tong, LI Ning, LU Wenjing, REN Hui, CUI Xiaomin, HU Jing, CHEN Zhiyong, ZHANG Hong

Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

Abstract: Objective To analyze the chemical components of *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) by UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS, then predict the pharmacodynamic substance basis of treating Alzheimer's disease (AD) based on its chemical components, its main active components obtained from TCMSP and HERB database, network pharmacology and molecular docking technology, checking out the potential efficacy ingredients and mechanism of action. **Methods** UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS was used to analyze the chemical components of ZSS, which were scanned in positive and negative modes respectively. The chemical components was

收稿日期: 2023-07-29

基金项目: 陕西省中医药管理局中医药全省性专款专项项目(2021-QYZL-01); 陕西省重点研发计划一般项目(2022-SF-315); “陕西省中医药管理局双链融合”中青年科研创新团队(2022-SLRH-YQ-003); 陕西省中医药管理局“医研校企”中医药传承创新平台(中医药创新药物/器械“研发-转化-推广”平台); 陕西省中医药研究院“苗圃计划”一般项目(2021-26)

第一作者: 曲彤(1995—), 女, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: 328127279@qq.com

***共同通信作者:** 陈志永, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: 18829014325@163.com

张红, 女, 博士, 研究员, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhanghong919919@163.com

confirmed by matching the reference substance with the fragment ion information and retention time. The active ingredients and action targets of ZSS were obtained through TCMSP databases and HERB databases, AD targets were obtained from GeneCards and OMIM databases. The corresponding targets of the main ingredients of ZSS were intersected with the AD targets, and the protein-protein interaction (PPI) network of the intersected genes was mapped with the help of STRING 11.5 platform and Cytoscape 3.7.2 software. The analysis of gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed by the DVIAD 6.8 online database and visually presented through the platform of bioinformatics. Furthermore, molecular docking technology was performed to validate the binding pattern and affinity between the key ingredients and the crucial targets by using AutoDock Tools software. **Results** There were 40 chemical components analyzed by qualitative analysis of ZSS, including three organic acids, 28 flavonoids, eight alkaloids, one saponin. Screening out five core components that play a therapeutic role in AD, including coumestrol, oleic acid, kaempferol, coclaurine and zizyphusine, etc. The core targets of ZSS for treating AD include JUN, AKT1, STAT3, MAPK14, ESR1, IL16, etc. A total of 157 pathways were identified through KEGG pathway analysis, with PISK-Akt, MAPK and HIF-1 response related signaling pathways ranking high. GO enrichment analysis yielded 336 entries for biological processes (BP), 45 entries for cellular components (CC), and 42 entries for molecular functions (MF). The molecular docking results showed that the binding energy between the key biotargets and the four potential active components were much less than $-20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. **Conclusion** Based on the chemical components analyzed by UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS combined with network pharmacology, molecular dock, ZSS plays a role in anti-Alzheimer's disease through multi-components, multi-targets, and multi-pathways.

Key words: *Ziziphi Spinosa Semen*; UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS; component analysis; network pharmacology; Alzheimer's disease; coumestrol; kaempferol; coclaurine; zizyphusine

阿尔茨海默病(AD)是一种常见的老年人群高发疾病,可导致记忆减退、认知和行为退化,最终导致死亡^[1]。其主要症状表现为短期记忆丧失、语言困难,并伴有抑郁、情感淡漠或焦躁不安、注意力涣散等精神障碍^[2-3]。随着社会老龄化的加速,AD患者也会成倍地增加,预计到2050年,全球将会有超过1亿的AD患者,甚至已经成为最严重最痛苦的世界负担疾病之一^[4]。因此AD的治疗也成为亟待解决的难题^[5]。

酸枣仁 *Ziziphi Spinosa Semen* 为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。性平,味甘、酸,归肝、胆、心经,具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津的功效。到目前为止,已从酸枣仁中提取了130余种小分子化合物,主要为黄酮类、生物碱类、皂苷类、脂肪酸类化合物^[6-8]。现代药理学研究表明,酸枣仁具有抗惊厥、镇静催眠、抗焦虑、改善认知功能、增强免疫功能、抗动脉粥样硬化、抗炎、心肌保护作用等生物学活性^[9-10]。酸枣仁皂苷A是酸枣仁的主要有效成分之一,Zhang等^[11]研究表明酸枣仁皂苷A通过酪氨酸蛋白激酶受体/热休克蛋白90/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Ax1/HSP90/PPAR γ)途径上调HSP90 β 的表达,促进表达嵌合的小鼠/人淀粉样蛋白前体蛋白和突变的人早老蛋白1(APP/PS1)双转基因小鼠与 β -淀粉样肽(A β)处理的小胶质细胞的A β_{42} 清除,改善认知功能。Liu等^[12]研究表明酸枣仁皂苷A通过降低海马体中A β_{1-42} 的水平,显著降低海

马和大脑皮层中丙二醛(MDA)含量,抑制乙酰胆碱酯酶(AChE)和一氧化氮(NO)活性,缓解A β_{1-42} 诱导的小鼠学习记忆障碍。这些研究均表明,酸枣仁具有显著的改善认知功能障碍的药理活性,具有一定的开发应用前景。本研究首先采用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS)对酸枣仁化学成分进行快速分析。在此基础上,充分利用网络药理学及分子对接技术,从药物、化学成分、靶点、疾病间相互作用的整体性和系统性出发,探究酸枣仁治疗AD的靶点和分子机制,为酸枣仁在治疗AD中的应用提供参考,为酸枣仁药用资源的合理开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

酸枣仁采于陕西省延安市酸枣仁规范化种植基地,经陕西省中医药研究院陈志永副研究员鉴定为鼠李科植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子;对照品斯皮诺素(批号wkq21070707,质量分数>98%)购自四川维克奇生物科技有限公司。

1.2 仪器

UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS型高分辨质谱仪、UltiMate 3000型超高效液相色谱系统(ThermoFisher Scientific公司);BT25S型0.01 mg电子分析天平及BS210S型0.1 mg电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-100型超

声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);电热套(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.3 数据库与软件

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.com/index.php>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); 本草组鉴数据库(HERB, <http://herb.ac.cn/>); 在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); KEGG 数据库(<http://www.kegg.jp/>); UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>); DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>); Cytoscape 3.7.2 软件。

2 方法

2.1 酸枣仁化学成分分析

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Accucore aQ C₁₈(150 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~45 min, 5%~95%A; 45.01~50 min, 5%A; 体积流量: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 3 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为加热电喷雾离子源(HESI), 正、负离子检测模式。正、负离子模式喷雾电压均为 3.5 kV, 鞘气体积流量 45 arb, 辅助气体体积流量 15 arb, 毛细管温度 320 °C, 雾化温度 350 °C, 透镜电压为 50 V。扫描模式 Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 *m/z* 80~1 200; 碰撞能量(CE)设定 30 eV。数据分析采用 Xcalibur 4.0 软件。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取斯皮诺素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 混匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得质量浓度为 0.225 mg·mL⁻¹ 对照品溶液, 置于冰箱中 4 °C 保存。

2.1.4 供试品溶液的制备 取酸枣仁药材粉末(过四号筛)约 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加石油醚(60~90 °C)适量, 加热回流 4 h, 弃去石油醚液, 药渣挥去溶剂, 转移至锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 20 mL, 加热回流 2 h, 滤过, 滤渣用 70% 乙醇 5 mL 洗涤, 合并洗液与滤液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.5 测定及数据处理 取酸枣仁供试品溶液及对照品溶液适量, 按上述液质联用分析条件操作进样分析, 采用 Xcalibur 4.0 软件计算出高分辨精确质

量数, 拟合分子式, 与自建酸枣仁化学成分数据库进行匹配, 按照实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量二者偏差 < 1.0 × 10⁻⁶ 的原则对目标化合物进行初步快速鉴定, 推测色谱峰相对应的化合物分子式, 再通过二级碎片的信息、相关文献及与对照品比较, 确认并推导出化合物的结构及裂解规律。

2.2 酸枣仁治疗 AD 作用机制的网络药理学预测

2.2.1 酸枣仁主要成分及其作用靶点预测 通过 TCMSP、HERB 数据库收集除 UPLC-Q-Exactive Focus MS/MS 鉴定成分外的其余酸枣仁的主要成分, 并通过文献检索对成分进行补充, 收集所有靶点后, 在 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)中对其名称进行矫正。

2.2.2 AD 疾病靶点筛选 以“Alzheimer's disease, AD”为关键词通过 GeneCards 数据库、OMIM 数据库中搜索与 AD 相关的作用靶点, 将收集到的靶点合并、去重。

2.2.3 Venny 分析共有靶点 为了进一步得到酸枣仁有效成分治疗 AD 的潜在靶点, 将筛选得到的 AD 相关蛋白与酸枣仁活性成分治疗靶点信息导入 Venny 2.1.0(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)软件, 取交集筛选获得靶基因。

2.2.4 中药-成分-靶点网络的构建 将酸枣仁活性成分、成分-疾病共同靶点导入 Cytoscape 3.7.2, 构建酸枣仁治疗 AD 的“中药-成分-靶点”网络图。

2.2.5 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建及核心靶点筛选 将交集基因导入 String 11.5 数据库, 将物种范围限定为“homo sapiens”, 设定置信度阈值 ≥ 0.9, 再去除网络中的游离节点, 构建蛋白互作可视化网络, 得到靶点间相互作用关系, 保存为 TSV 文件。进一步将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建 PPI 网络, 利用软件的 Network Analyzer 工具计算网络拓扑参数, 并筛选关键靶点, 构建 PPI 网络图, 将结果可视化。

2.2.6 共有靶点基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 采用生物学信息注释数据库 DAVID 6.8 生物信息学分析平台(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)将潜在作用靶点的 symbol 录入后, 将 identifier 选择为“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”, 物种为“Homo sapiens”, 列表类型为“gene list”进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 根据 *P* 值由小到大进行排序, 选取靠前的条目利用微生信网(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)在线作图工具分析绘制气泡

图和柱状图。利用KEGG富集的信号通路和信号通路中的基因信息,使用Cytoscape 3.7.2软件构建“成分-靶点-疾病-通路”网络图,将其可视化。

2.3 分子对接分析

为了进一步探讨酸枣仁活性成分与AD靶点的结合模式,在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载[JUN(PDB ID: 5FV8)、AKT1(PDB ID: 6HHH)、STAT3(PDB ID: 4ZIA)、MAPK14(PDB ID: 6SFO)、ESR1(PDB ID: 5ACC)]的PDB文件,TCMSP数据库(<https://tcmsp-e.com/>)下载拟雌内酯、油酸、山柰酚、乌药碱的mol2格式文件,运用PyMOL2.4.0软件对受体蛋白进行去水、去配体等操作,AutoDock Tools-1.5.6软件对蛋白进行加氢以及计算电荷处理等处理,将受体蛋白和配体小分子分别转化为pdbqt格式,利用插件“autogrid”及“autodock”进行活性位点对接,对接过程中使用La-marckian genetic algorithm(LGA)算法。计算结合能来评估成分小分子与蛋白之间的结合活性,一般小于 $-20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)的对接结合能被认为具有良好的结合相互作用。最后运用

PyMOL2.4.0软件、Discovery studio展示其结构模式。

3 结果

3.1 酸枣仁化学成分鉴定结果

采用UPLC-Q-Exactive-MS/MS技术对酸枣仁中的化学成分进行定性分析,得到正、负离子流图,见图1。通过对酸枣仁化合物一级、二级质谱裂解规律的分析,最终共鉴定出40个化合物,包括有机酸类3个、黄酮类28个、生物碱类8个、皂苷类1个,其中1个成分通过与对照品比对后确认。化合物保留时间、分子式、相对分子质量、一级质谱及二级质谱碎片离子信息见表1。

3.2 成分解析

从解析得到酸枣仁的40种化合物中,选取斯皮诺素(黄酮类)、乌药碱(生物碱类)、酸枣仁皂苷B(皂苷类)3种代表性化合物进行波普解析。

3.2.1 斯皮诺素 化合物16的保留时间为16.24 min,在正离子模式下,产生 m/z 609.180 5 $[M+H]^+$ 一级准分子离子峰,经Xcalibar 4.0软件拟合其分子式为 $C_{28}H_{32}O_{15}$ 。二级质谱中,准分子离子 m/z 609.180 5

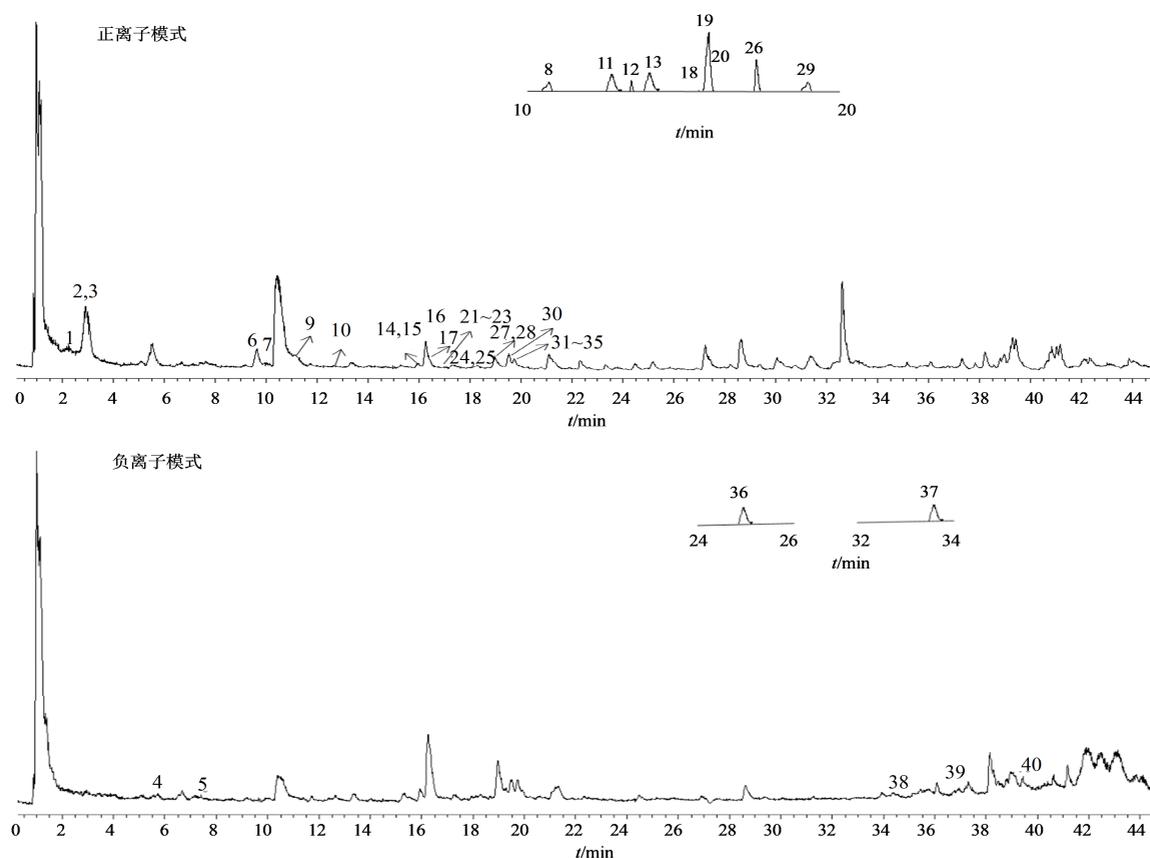


图1 酸枣仁的UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of *Ziziphi Spinosa Semen* by UPLC-Q-Exactive-Focus-MS/MS

表1 酸枣仁的化学成分鉴定结果

Table 1 Identification of chemical constituents of *Ziziphi Spinosae Semen*

峰号	t_R / min	离子模式	分子式	m/z		误差($\times 10^{-6}$)	MS/MS	化合物
				理论值	实测值			
1	3.31	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{19}NO_9$	370.113 3	370.112 7	-1.6	212.070 1、188.070 4、 146.059 8	3R-N-glc-3-hydroxy indoleacetic acid ^[13]
		$[M-H]^-$	$C_{16}H_{19}NO_9$	368.098 7	368.098 6	-0.3	176.071 4、158.060 9、 144.045 5	
2	3.63	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{19}NO_9$	370.113 3	370.112 7	-1.6	212.070 2、188.070 2、 146.059 8	3S-1-N-β-D-glucopyranosyl-3- hydroxy-indole-3-acetic acid ^[14] /3R-1-N-β-D- glucopyranosyl-3-hydroxy- indole-3-acetic acid ^[14]
3	3.63	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{19}NO_9$	370.113 3	370.112 7	-1.6	212.070 3、188.070 4、 146.059 9	3R-1-N-β-D-glucopyranosyl- 3-hydroxy-indole-3-acetic acid ^[14] /3S-1-N-β-D- glucopyranosyl-3-hydroxy- indole-3-acetic acid ^[14]
4	5.71	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{19}NO_8$	352.103 8	352.103 8	0.0	188.071 7、146.061 1	N-glc-indoleacetic acid ^[15]
5	7.61	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{14}O_6$	289.071 8	289.071 9	0.3	221.082 0、203.071 6、 109.029 5、97.029 6	儿茶素/表儿茶素 ^[15]
6	9.67	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{19}NO_3$	286.143 8	286.145 7	6.6	237.091 2、209.097 1、 191.086 5、175.075 7、 143.049 7、107.049 4	乌药碱 ^[14]
7	10.16	$[M+H]^+$	$C_{19}H_{21}NO_4$	328.154 3	328.154 8	1.5	328.154 8、265.086 6、 237.090 0	去甲异紫堇啡碱 ^[13]
8	10.42	M^+	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.170 5	342.169 9	-1.8	297.111 7、282.088 3、 265.085 5、237.090 6、 219.080 0、191.085 2、 179.084 7、165.070 4	异喹啉类酸李碱 ^[15]
9	11.26	M^+	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.175 6	314.175 0	-1.9	237.091 1、209.095 9	木兰箭毒碱/莲心季铵碱 ^[15]
10	12.67	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 8	595.165 0	-1.3	559.142 3、457.119 4、 379.080 6、337.070 3、 325.069 7、295.059 9	维采宁II ^[16]
11	14.72	$[M+H]^+$	$C_{28}H_{32}O_{16}$	625.176 3	625.175 8	-0.8	463.122 7、445.112 5、 367.080 7、343.080 8、 313.070 1	斯皮诺素羟基化产物 ^[16]
12	15.14	$[M+H]^+$	$C_{44}H_{50}O_{23}$	947.281 6	947.280 2	-1.5	327.086 0、177.054 5	6'''-(4''''-(O-葡萄糖)-阿魏酰 斯皮诺素 ^[13]
13	15.52	$[M+H]^+$	$C_{42}H_{48}O_{23}$	921.265 9	921.264 2	-1.8	429.117 5、351.085 8、 327.085 9、151.038 9	6'''-(4''''-O-葡萄糖)-香草酰 斯皮诺素 ^[13]
14	15.93	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 8	595.165 0	-1.3	433.112 5、337.070 2、 283.060 3	异牡荆素-2''-O-β-D-吡喃葡 萄糖苷 ^[13]
15	15.95	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.112 9	433.112 4	-1.2	397.092 3、337.070 0、 313.070 3、295.060 1、 283.059 8	牡荆素 ^[14]
16	16.24	$[M+H]^+$	$C_{28}H_{32}O_{15}$	609.181 4	609.180 5	-1.5	447.127 8、429.117 6、 351.085 8、327.085 9、 297.075 2、285.075 6	斯皮诺素 ^[16]

续表1

峰号	t_R / min	离子模式	分子式	m/z		误差/($\times 10^{-6}$)	MS/MS	化合物
				理论值	实测值			
17	16.46	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.112 9	433.112 4	-1.2	397.092 3、337.070 0、 313.070 3、295.060 1、 283.059 8	异牡荆素 ^[13]
18	16.74	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.181 4	609.180 9	-0.8	447.127 8、327.085 9、 297.075 2、285.075 6、 85.028 2	异斯皮诺素 ^[13]
19	17.27	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	727.208 0	727.207 2	-1.1	287.054 6、129.054 4、 97.028 2、85.028 3、 71.049 1	山茶苷B ^[13]
20	17.60	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	282.148 9	282.148 4	-1.8	282.111 9、250.879 7	去甲荷叶碱 ^[13]
21	17.63	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	759.213 1	759.212 3	-1.1	429.117 5、351.085 9、 327.085 9、151.038 8	6'''-香草酰斯皮诺素 ^[13]
22	17.90	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₄₈ O ₂₁	961.276 1	961.274 9	-1.2	393.096 9、351.085 5、 327.085 9、177.054 5	6'',6'''-对阿魏酰斯皮诺素 ^[13]
23	17.96	[M+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	729.202 6	729.201 4	-1.6	429.116 6、351.086 1、 327.085 9、297.075 1、 121.028 3	6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素 ^[13]
24	18.31	[M+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	741.202 5	741.201 5	-1.3	433.112 4、337.069 7、 313.070 1、283.058 1、 147.043 9	异牡荆素-2''-O-(6-对香豆酰)-吡喃葡萄糖苷 ^[13]
25	18.65	[M+H] ⁺	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	815.239 3	815.238 4	-1.1	351.085 3、327.085 9、 297.076 0、207.065 0	6'''-芥子酰斯皮诺素 ^[13]
26	18.94	[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	785.228 7	785.227 4	-1.7	351.085 6、327.085 8、 297.075 0、177.054 4、 145.028 4	6'''-阿魏酰斯皮诺素 ^[13]
27	18.94	[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	785.228 7	785.227 4	-1.7	665.182 9、605.164 4、 489.139 5、447.127 7、 429.117 2、351.085 8、 327.085 7、285.075 5、 177.054 4	6''-P-阿魏酰斯皮诺素 ^[13]
28	19.06	[M+H] ⁺	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	755.218 2	755.216 5	-2.3	429.117 4、351.085 7、 327.085 8、147.043 9	6'''-对香豆酰斯皮诺素 ^[13]
29	19.24	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.165 8	595.165 2	-1.0	449.108 6、287.054 6、 85.028 3	山柰酚-3-O-芸香糖苷 ^[13,16]
30	19.26	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.107 8	449.107 0	-1.8	287.054 7、145.049 5	山柰酚葡萄糖基化产物 ^[16]
31	19.31	[M+H] ⁺	C ₄₃ H ₅₂ O ₁₉	873.317 6	873.316 5	-1.3	351.085 8、327.085 9、 297.076 8	6'''-二羟基苯基酰斯皮诺素 ^[13]
32	19.71	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₄₉ NO ₂₂	944.281 9	944.281 1	-0.8	764.217 2、489.138 5、 393.096 1、327.085 8、 297.074 1	<i>epi</i> -6'''-(<i>N</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl)-2''',3'''-dihydro-2''''-oxo-3''''-yl-acetate spinosin ^[14]
33	19.87	[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	785.228 7	785.227 4	-1.7	447.126 9、327.085 9、 285.075 6、145.028 7	6''-阿魏酰异斯皮诺素 ^[13]

续表1

峰号	t_R /min	离子模式	分子式	m/z		误差/($\times 10^{-6}$)	MS/MS	化合物
				理论值	实测值			
34	19.94	$[M+H]^+$	$C_{37}H_{38}O_{17}$	755.218 2	755.216 5	-2.3	447.127 5、429.117 4、351.085 7、327.085 8、285.076 3、147.043 9	6''-阿魏酰斯皮诺素去甲氧基产物 ^[16-17]
35	19.97	$[M+H]^+$	$C_{43}H_{50}O_{19}$	871.301 9	871.301 5	-0.5	429.117 6、351.085 7、327.085 9、297.073 8	6'''-(一)-phaseoylspinosin ^[13]
36	24.97	$[M-H]^-$	$C_{46}H_{46}O_{21}$	933.245 9	933.246 5	0.6	577.133 5、235.059 3	6''-阿魏酰-6'''-香草酰斯皮诺素 ^[13]
37	33.93	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_5$	485.327 2	485.327 2	0.0	485.327 7、423.326 9	表美洲茶酸 ^[13]
38	35.31	$[M-H]^-$	$C_{52}H_{84}O_{21}$	1 043.543 2	1 043.548 8	5.0	911.506 7、749.453 3、603.392 1	酸枣仁皂苷 B ^[13]
39	37.18	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_5$	485.327 2	485.327 2	0.0	485.327 7、423.326 9、60.993 0	美洲茶酸 ^[13]
40	39.39	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_3$	453.337 4	453.339 5	4.6	255.232 8、180.973 2	桦木酮酸 ^[13]

*经对照品比对确认

*Identified by comparison with the reference substance.

$[M+H]^+$ 失去1分子 $C_6H_{10}O_5$ 得到碎片离子 m/z 447.127 8 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$, 碎片 m/z 447.127 8 丢失1分子 H_2O 形成 m/z 429.117 6 $[M+H-H_2O]^+$, 碎片 m/z 429.117 6 丢失1分子 $C_2H_6O_3$ 形成碎片离子 m/z 351.085 8 $[M+H-C_2H_6O_3]^+$; 碎片 m/z 447.127 8 丢失1分子 $C_4H_8O_4$ 形成 m/z 327.085 9 $[M+H-C_4H_8O_4]^+$ 。准分子离子 m/z 609.180 5 $[M+H]^+$ 脱去2分子 $C_6H_{10}O_5$ 形成碎片 m/z 285.076 6 $[M+H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^+$ 。结合对照品及相关文献报道^[12], 鉴定此化合物为斯皮诺素。化合物16的二级图谱及可能的裂解途径见图2。

3.2.2 乌药碱 化合物6的保留时间为9.67 min, 在正离子模式下, 产生 m/z 286.145 7 $[M+H]^+$ 一级准分子离子峰, 经Xcalibur 4.0软件拟合其分子式为 $C_{17}H_{19}NO_3$ 。二级质谱中, 准分子离子 m/z 286.145 7经CID碰撞通过C1-C α 键断裂形成 m/z 107.049 4, 准分子离子相继丢失1分子 NH_3 和1分子 H_2O 分别生成碎片 m/z 269.118 1 $[M+H-NH_3]^+$ 和碎片 m/z 237.091 2 $[M+H-H_2O]^+$, 碎片 m/z 237.091 2继续丢失1分子CO生成碎片 m/z 209.097 1 $[M+H-CO]^+$ 。碎片 m/z 269.118 1相继丢失1分子 C_6H_6O 和1分子 CH_4O 分别生成碎片 m/z 175.075 7 $[M+H-C_6H_6O]^+$ 和碎片 m/z 143.049 7 $[M+H-CH_4O]^+$, 结合文献报道^[18], 推测化合物6为乌药碱。化合物6的二级图谱及可能的裂解途径见图3。

3.2.3 酸枣仁皂苷 B 化合物38的保留时间为35.31 min, 在负离子模式下, 产生 m/z 1 043.543 2

$[M-H]^-$ 一级准分子离子峰, 经Xcalibur 4.0软件拟合其分子式为 $C_{52}H_{84}O_{21}$ 。准分子离子 m/z 1 043.543 2依次脱掉1分子木糖(xyl)、1分子葡萄糖(glu)、1分子木糖(xyl), 产生碎片离子 m/z 911.506 7 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$ 、749.453 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、603.392 1 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$ 。结合文献报道^[19]推测化合物38可能为酸枣仁皂苷B。其二级图谱及可能的裂解途径如图4。

3.3 网络药理学结果分析

3.3.1 Venny分析共有靶点 通过调研文献、实验数据、搜索TCMSP及Herb得到酸枣仁44种活性成分(表2), 进一步通过UniProt(<https://www.uniprot.org/>)、Herb数据库搜集并校正得到1 544个靶点。以“Alzheimer's disease, AD”为关键词通过GeneCards数据库、OMIM数据库中搜索与AD相关的作用靶点, 合并2个数据库的结果, 并删除重复项后得到598个靶点。采用Venny2.1.0在线平台将成分靶点与疾病靶点取交集, 获得交集靶点112个, 作为酸枣仁治疗AD的潜在靶点(图5)。

3.3.2 中药-成分-靶点网络的构建和拓扑分析 利用Cytoscape 3.7.2软件, 将112个交集靶点及对应的成分输入其中, 分析数据并对其进行可视化, 得到网络图(图6)。该网络图共由157个节点、400条边构成。将导入Cytoscape 3.7.2软件中的数据利用NetworkAnalyzer工具网络拓扑分析, 筛选度值(degree)排名靠前的成分作为核心活性成分, 包括拟雌内酯(coumestrol)、油酸(oleic acid)、山奈

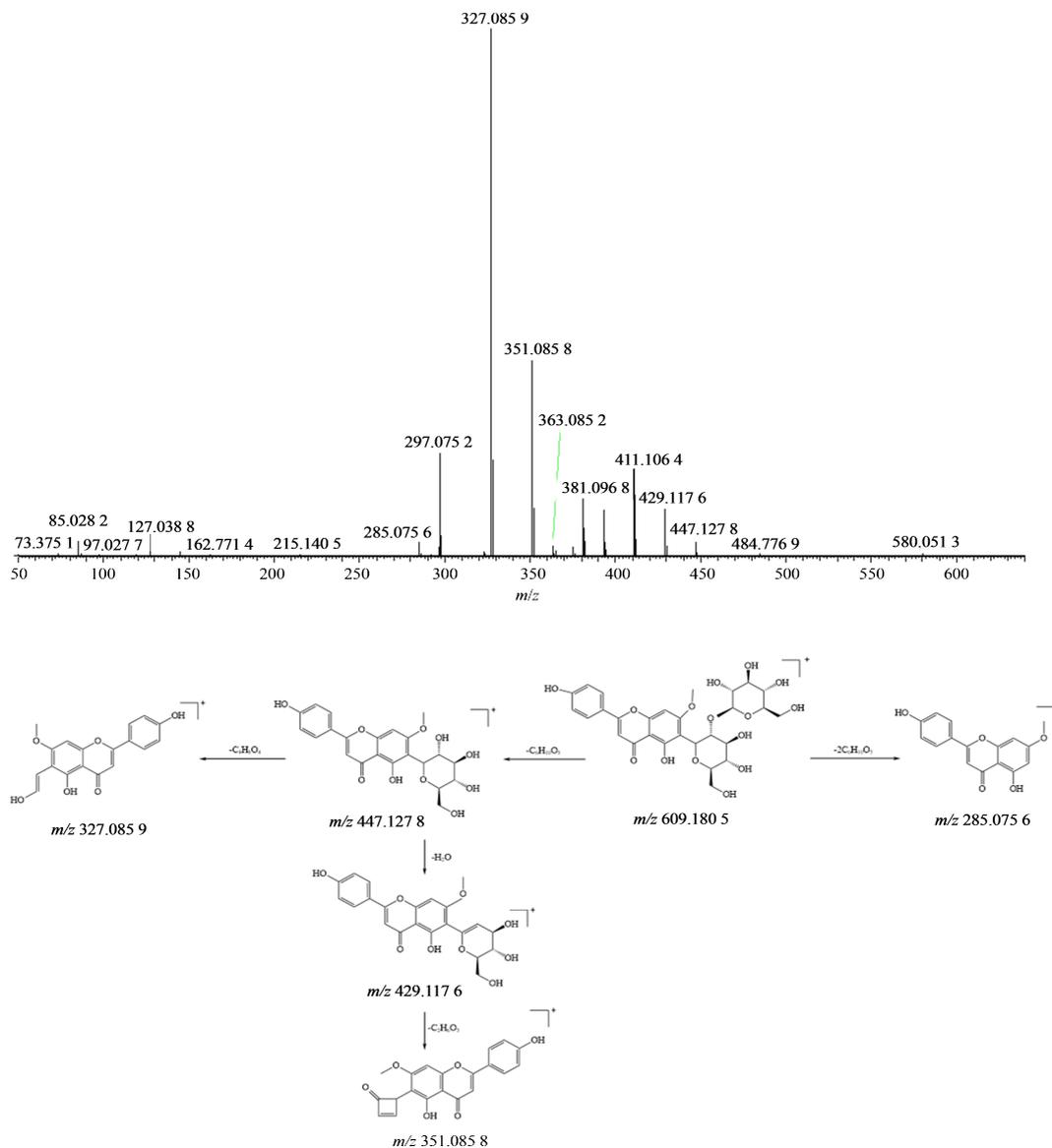


图2 斯皮诺素的二级质谱图及裂解途径

Fig. 2 Secondary mass spectra and cleavage pathway of spinosin

酚 (kaempferol)、乌药碱 (coclaurine)、酸李碱 (zizyphusine), 度值均大于20。该网络体系中, 交集靶点中度值排名前10的分别是 PTGS2、AR、ESR1、NOS2、ACHE、GSK3B、SLC6A3、ADRB2、ESR2、PPARG, 这些关键靶点可能在酸枣仁治疗AD中发挥重要作用。该网络也表明酸枣仁治疗AD是基于多成分、多靶点、多途径的协同复杂作用。

3.3.3 PPI网络构建与分析 将112个交集靶点导入String 11.5数据库“Multiple proteins”窗口中, Organism选择“Homo sapiens”, 最低交互分数“minimum required interaction score”设置为

0.900, 保存为TSV文件。进一步将数据导入Cytoscape 3.7.2软件, 使用CytoHubba插件进行拓扑学分析, 计算度值, 根据节点度值对靶点进行排序, 在图中表现出的颜色越深, 靶点与疾病之间的相关性越强, 绘制PPI分析网络图(图7), 其中节点共有106个, 共有366条线。取度值大小排名前10的蛋白作为核心靶点蛋白, 并根据度值大小, 取排名前10制作条形图(图7)。其中JUN原癌基因(JUN)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、丝裂原激活蛋白激酶14(MAPK14)为排名前4位的靶点, 这4个靶点为酸枣仁治疗AD的核心靶点, 可能发挥着重要作用。

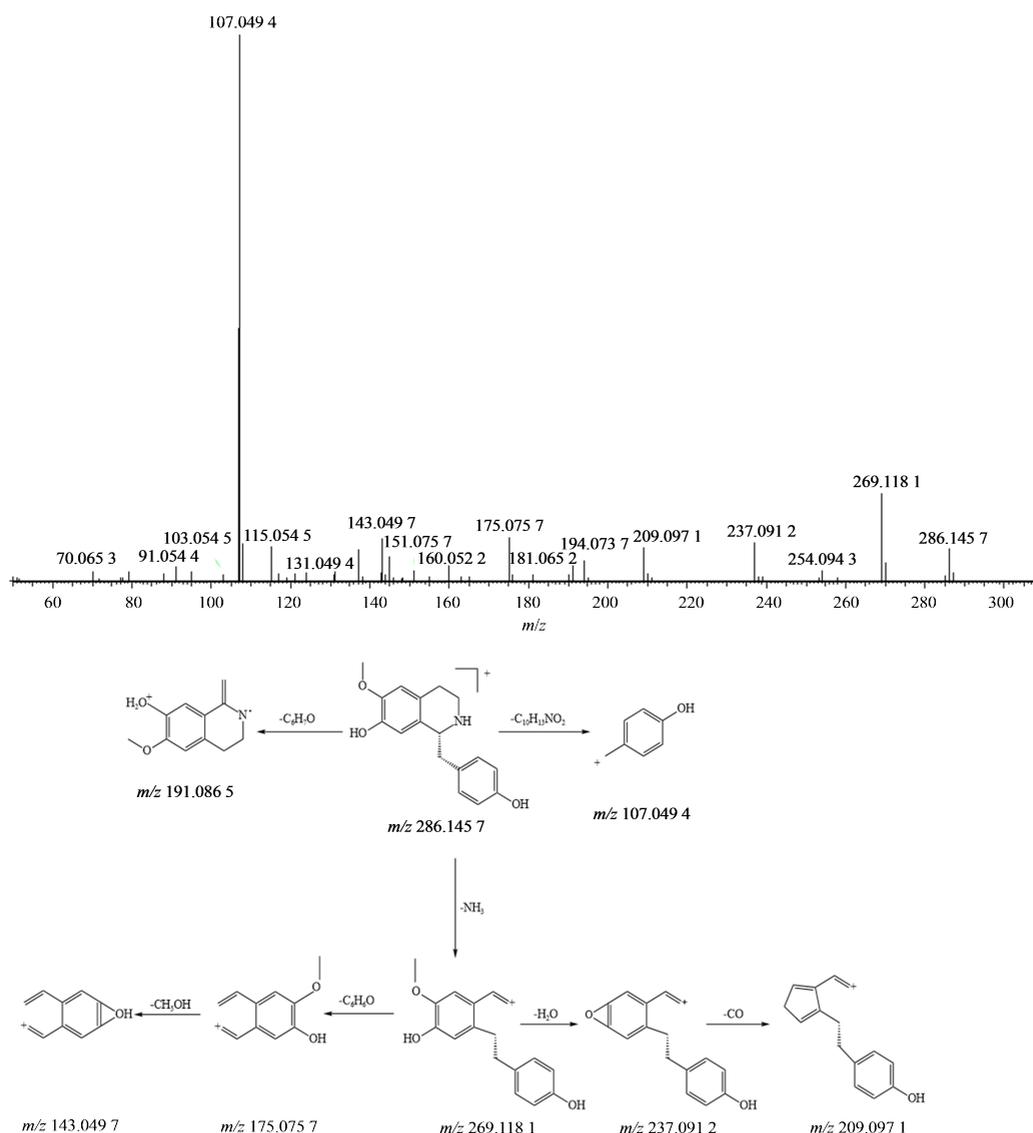


图3 乌药碱二级质谱图及裂解途径

Fig. 3 Secondary mass spectra and cleavage pathway of coclaurine

3.3.4 GO与KEGG通路分析 将“3.3.3”项中的关键靶点导入到DAVID 6.8数据库对酸枣仁治疗AD的112个核心靶点进行GO^[20]功能富集分析和KEGG通路分析。根据 $P \leq 0.05$ 筛选共获得了423个GO条目,包括336个生物学过程(BP)条目,45个细胞组分(CC)条目和42个分子功能(MF)条目,取前10个条目上传至微生信网(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化。GO分析结果显示酸枣仁中有效成分可能通过基因表达的正调控(positive regulation of gene expression)、一氧化氮生物合成过程的正调控(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、对雌二醇的反应(response to estradiol)等生物过程发挥治疗AD作

用,结果见图8。通过KEGG的功能性富集分析共获得 $FDR \leq 0.05$ 的通路157条,取前20条最显著的通路进行可视化分析,绘制气泡图,结果见图9,气泡面积代表通路富集基因数,面积越大,则参与该功能的靶基因越多,气泡颜色代表 P 值大小,颜色越红, P 值越小^[21]。结果表明,与酸枣仁治疗AD作用密切相关的信号通路主要包括PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、FoxO信号通路(FoxO signaling pathway)、HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等。进一步构建了酸枣仁治疗AD作用的“成分-靶点-通路-疾病”关联网络,见图10。

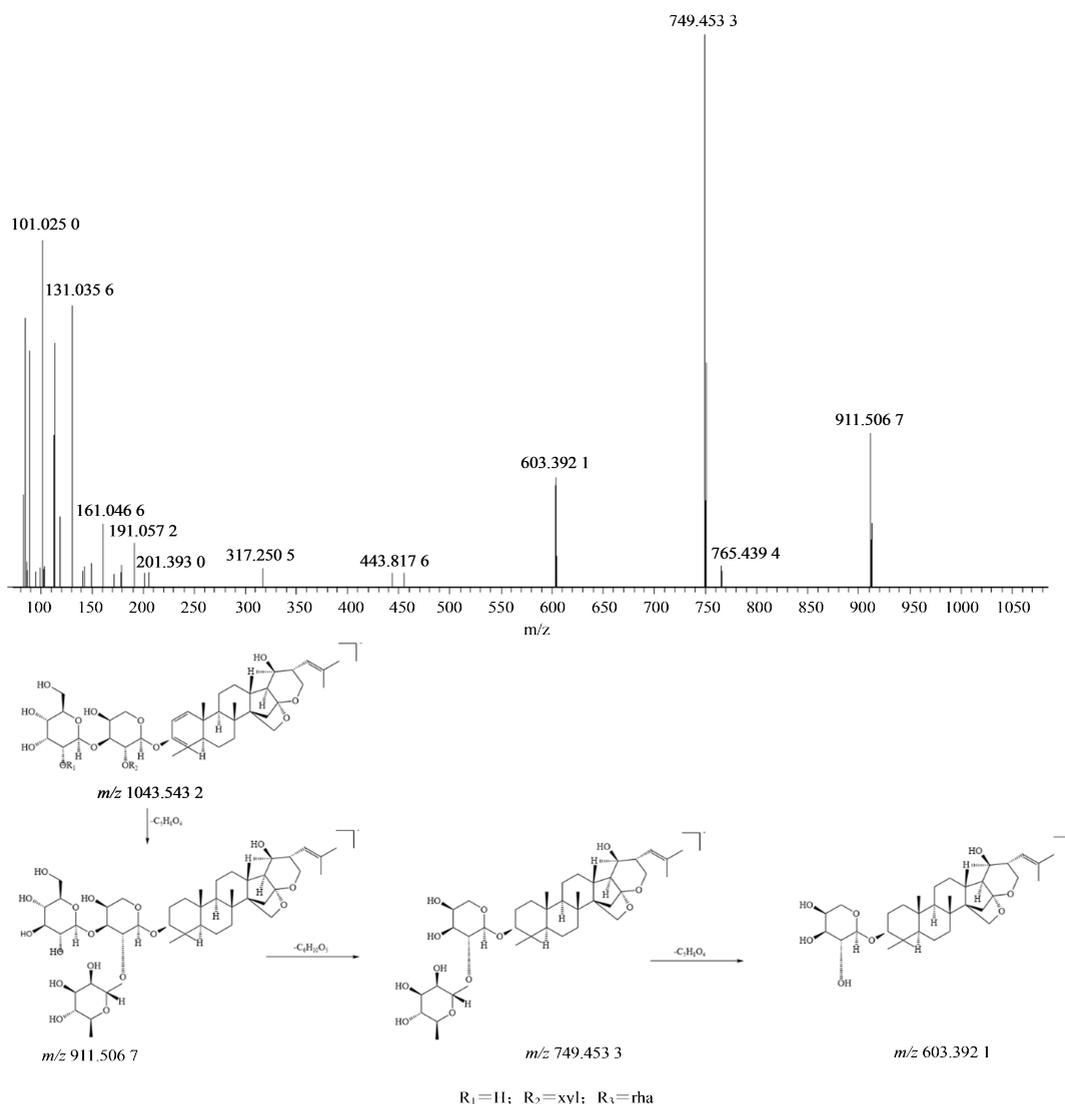


图 4 酸枣仁皂苷 B 的二级质谱图及裂解途径

Fig. 4 Secondary mass spectra and cleavage pathway of jujuboside B

3.4 分子对接结果

从度值排名靠前的核心靶点蛋白中选取 JUN、AKT1、STAT3、MAPK14、ESR1 与拟雌内酯、山柰酚、乌药碱、酸李碱进行分子对接,运行 AutoDock 软件分别与拟雌内酯、山柰酚、乌药碱、酸李碱进行 20 次分子对接。具体对接结合能结果见表 3,由表可知,所有对接结合能均小于 $-20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中拟雌内酯与 AKT1 结合能最低,其次是拟雌内酯与 MAPK14、ESR1,乌药碱与 AKT1,山柰酚与 AKT1,山柰酚与 MAPK14,对接结合能越低表明与靶点结合亲和力越高,提示其有更大可能作用于以上靶点,影响靶点蛋白结构和功能,进而调控相应的信号通路。使用 PyMol 和 Discovery studio 软件对与 JUN、AKT1、STAT3、MAPK14、ESR1

核心靶点结合较好的代表活性成分的分子结果进行可视化分析,部分可视化分析结果见图 11。图 11 展示了结合的较好的成分与各核心靶点的对接结构图,可知,拟雌内酯、山柰酚、乌药碱与核心靶点均有氢键相连,与 ALA-19、LYS-29、THR-211、ILE-290、GLU-71、ASP-168、ARG-394 等残基有氢键相连,说明拟雌内酯、山柰酚、乌药碱小分子与各核心靶点结合紧密,进而表明酸枣仁中改善 AD 可能通过调节以上靶点来实现。

4 讨论

UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 联用技术具有高分辨率、高灵敏度等特点,结合文献报道和自建数据库,可以较为准确且快速的对化学成分进行定

表2 酸枣仁活性成分信息

Table 2 Information of active components from *Ziziphi Spinosae Semen*

序号	活性成分名称	英文名称	分子式	CAS号	度值
1	拟雌内酯	coumestrol	C ₁₅ H ₈ O ₅	479-13-0	49
2	油酸	oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	112-80-1	29
3	山柰酚	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	520-18-3	24
4	乌药碱	coclaurine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	486-39-5	22
5	酸李碱	zizyphusine	C ₂₀ H ₂₄ N ₄ O ₄	107446-79-7	21
6	维生素C	L-ascorbic acid	C ₆ H ₈ O ₆	50-81-7	20
7	芦丁	rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	153-18-4	19
8	N-甲基巴婆碱	N-methylasimilobine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	6545-25-1	18
9	齐墩果酸	oleanolic acid	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	28283-45-6	17
10	荷叶碱	nuciferine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	475-83-2	17
11	β-胡萝卜素	β-carotene	C ₄₀ H ₅₆	7235-40-7	15
12	原荷叶碱	normuciferine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	54750-04-8	13
13	棕榈酸	palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1957/10/3	13
14	儿茶素	catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	154-23-4	12
15	FER	ferrostatin-1	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	347174-05-4	9
16	菜油甾醇	campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	474-62-4	9
17	阿魏酸	ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1135-24-6	8
18	观音莲明碱	lysicamine	C ₁₈ H ₁₃ NO ₃	15444-20-9	8
19	酸枣黄素	zivilgarin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	108657-24-5	7
20	白桦脂醇	betulin	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	473-98-3	6
21	6-O-E-阿魏酰筋骨草醇	6-O-E-Feruloylajugol	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	—	5
22	芥子醇	sinapyl alcohol	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	537-33-7	5
23	异牡荆素	isovitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	29702-25-8	5
24	谷氨酰胺	glutamine	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	—	5
25	酸枣仁碱G2	sanjoinine G2	C ₃₀ H ₄₂ N ₄ O ₅	107494-21-3	4
26	酸枣仁碱B	sanjoinine B	C ₃₀ H ₄₀ N ₄ O ₄	107462-33-9	4
27	胡萝卜苷	daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	474-58-8	3
28	白化脂酸	mairin	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	472-15-1	3
29	豆甾醇	phytosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	83-48-7	3
30	当药黄素	swertisin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	6991/10/2	3
31	枞油烯	sylvestrene	C ₁₀ H ₁₆	38738-60-2	3
32	白桦脂醇	trochol	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	473-98-3	3
33	dl-nuciferine	—	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	5868-18-8	3
34	麦珠子酸	alphaltolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	19533-92-7	2
35	美洲茶酸	ceanothic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	21302-79-4	2
36	酸枣仁皂苷元	jujubogenin	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	54815-36-0	2
37	酸枣仁皂苷A	jujuboside A	C ₃₈ H ₉₄ O ₂₆	55466-04-1	2
38	酸枣仁皂苷B	jujuboside B	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	55466-05-2	2
39	环磷腺苷	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate	CHN ₅ O ₆ P	114697-05-1	2
40	酸枣仁碱F	sanjoinine F	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₅	107462-35-1	1
41	酸枣仁碱G1	sanjoinine G1	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	107462-36-2	1
42	酸枣仁碱A	sanjoinine A	—	—	1
43	斯皮诺素	spinosin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	72063-39-9	1
44	维采宁-II	vicenin-II	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	23666-13-9	1

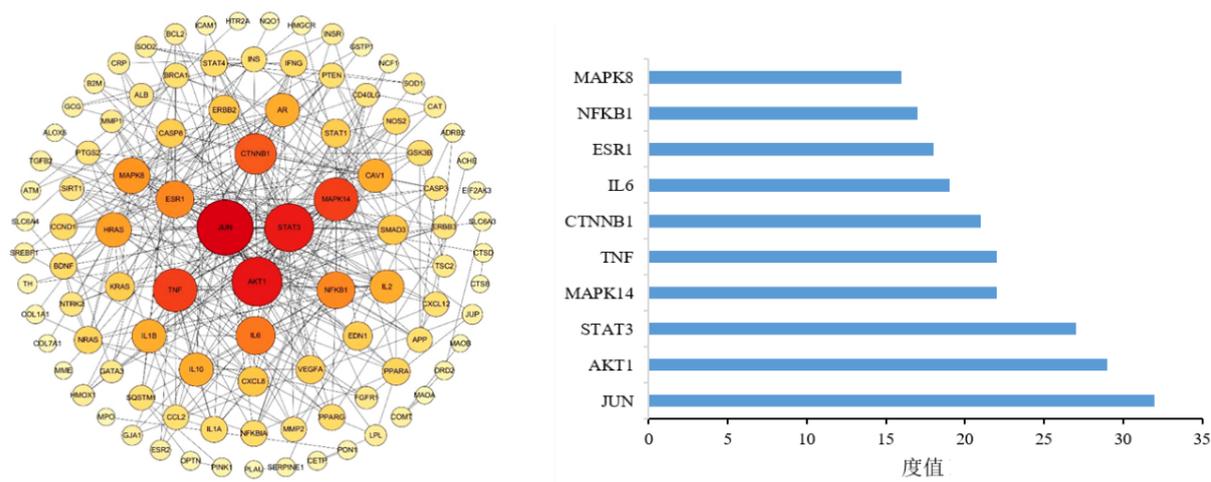


图7 共有靶点PPI网络
Fig. 7 PPI network of common targets

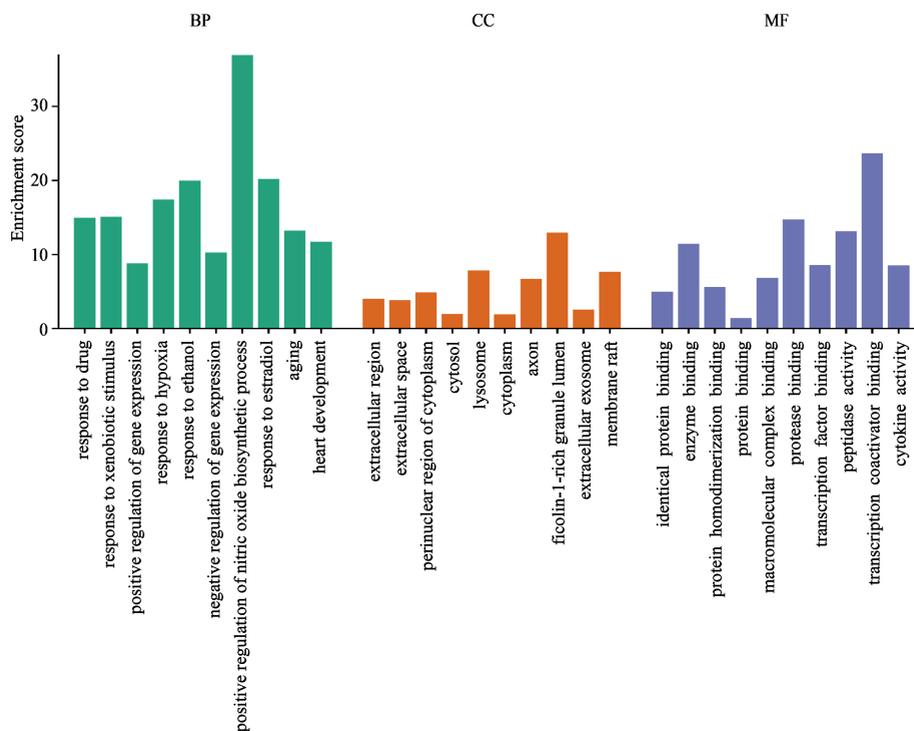


图8 关键靶基因GO富集分析(前10)
Fig. 8 Histogram of key target gene GO enrichment analysis items (top 10)

离子的强度较高,可作为鉴别的特征碎片。酸枣仁中所含生物碱大概可分为3类:苜基异喹啉生物碱、阿朴菲生物碱和环肽类生物碱^[24]。其中以乌药碱为代表的苜基异喹啉生物碱,通过总结它的裂解途径,发现 m/z 107、 m/z 143、 m/z 175、 m/z 237 和 m/z 269 可作为鉴别它的特征碎片离子。酸枣仁皂昔B属于达玛烷型四环三萜,酸枣仁皂昔B依次脱掉3个糖分子,产生 m/z 911、 m/z 749、 m/z 603 碎片离子,这3个碎片离子可作为鉴别酸枣仁皂昔B的特征

碎片。

本研究采用网络药理学方法筛选酸枣仁的潜在活性成分并预测其作用靶点,其中度值较大的JUN、AKT1、STAT3、MAPK14、ESR1等靶蛋白可能是酸枣仁防治AD的关键作用靶点,基于这些核心靶点及度值找到可能发挥治疗作用的活性成分,包括雌内酯、山柰酚、乌药碱、酸李碱等为酸枣仁防治AD的主要活性成分,阐明酸枣仁治疗AD的“多成分-多靶点-多途径”的作用机制。其中STAT3是

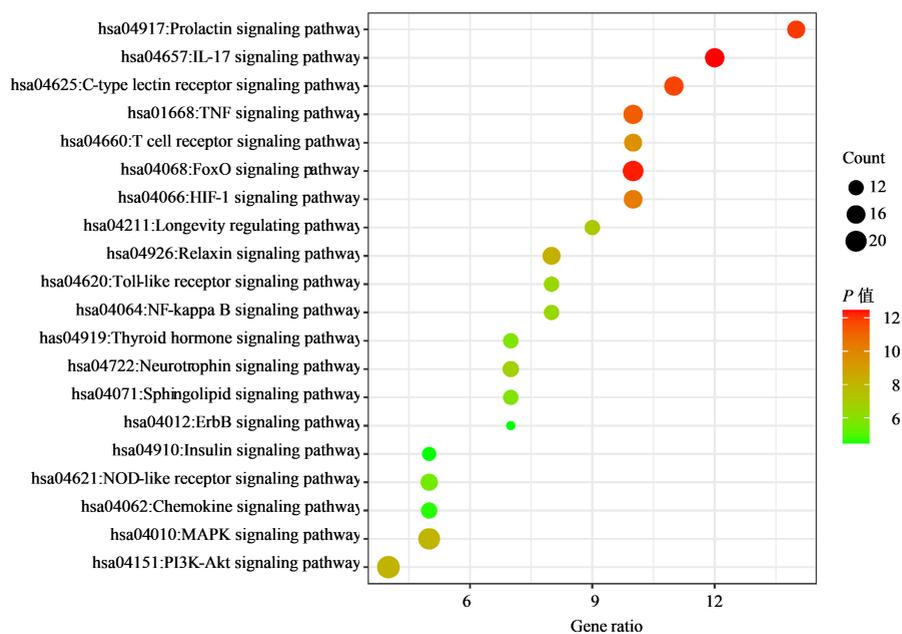


图 9 KEGG 富集分析气泡图(前 20)

Fig. 9 Bubble diagram of KEGG analysis (top 20)

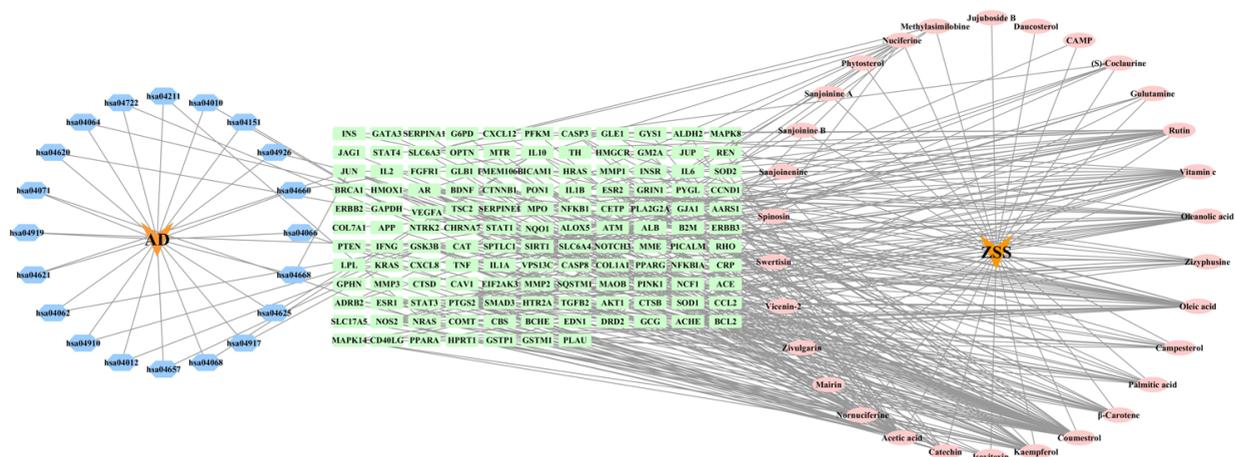


图 10 成分-靶点-疾病-通路网络

Fig. 10 Network of component-target-disease pathway

表 3 关键成分与核心靶点分子对接结合能

Table 3 Docking and binding energy of key component and core target molecules

靶点名称	PDB 号	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
		拟雌内酯	山柰酚	乌药碱	酸李碱
JUN	5FV8	-23.44	-21.77	-23.44	-23.02
AKT1	6HHH	-43.95	-39.77	-38.93	-38.93
STAT3	4ZIA	-32.65	-30.14	-31.81	-30.98
MAPK14	6SFO	-38.51	-38.93	-36.84	-37.26
ESR1	5ACC	-38.51	-35.16	-30.98	-28.47

JAK2/STAT3 信号通路的重要成员,与胆碱能功能障碍导致记忆丧失密切相关^[25]。JUN、MAPK14 是

丝裂原活化蛋白激酶重要成员,在细胞增殖、分化、存活和死亡等过程中发挥重要作用,与 AD 病程的发展密切相关^[26]。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(又称蛋白激酶 B),其能够通过丝氨酸和/或苏氨酸磷酸化介导调节细胞代谢、增殖、存活、生长和血管生成过程^[27]。雌激素受体属于核激素受体的超家族,作为配体激活的转录因子发挥作用。雌激素受体有 2 种亚型:ER α 和 ER β 。每个基因都由 2 个独特的基因(分别是 ESR1 基因和 ESR2 基因)编码。ER α 和 ER β 在大脑中广泛分布,参与情绪、情感、行为和认知的调节,在 AD 中受到影响^[28]。IL16 的基因多态性可能影响 AD 的易感性信号通路^[29]。

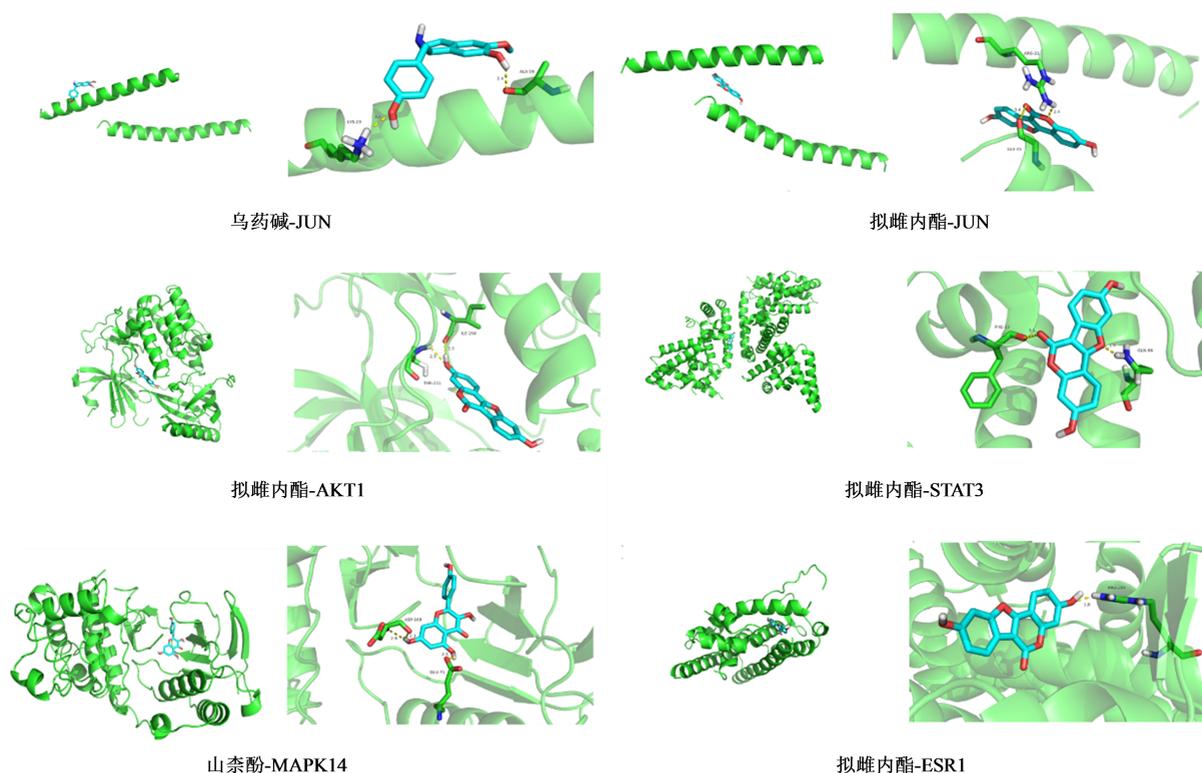


图11 核心成分与核心靶点分子对接模式

Fig. 11 Docking mode of core components and target molecules

KEGG 富集显示酸枣仁干预AD的重要通路包括PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路、HIF-1信号通路等。其中MAPK信号通路可调节细胞生长分化增殖、细胞迁移和细胞骨架重构,在中枢神经系统广泛分布和表达,通过调节炎症因子、氧化应激影响海马中学习和记忆形成的大脑长时程增强。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B信号通路是促进神经细胞生存、抑制神经元自噬的转导途径,可以保护神经细胞^[30]。能量或氧供应不平衡状态时,包括MAPK/PI3K-Akt信号通路、谷氨酸能突触形成的信号机制可能通过氧化应激导致神经退行性变,充分激活HIF-1 α 可以诱导神经保护与修复^[31]。酸枣仁还可调节其他多条通路,在趋化因子信号通路、胰岛素信号转导通路、神经营养因子等信号通路中均发挥着重要作用,符合中药多成分、多靶点、多通路综合治疗疾病的特征。

本研究中,为进一步验证酸枣仁抗AD的潜在活性成分,将关键化合物拟雌内酯、山柰酚、乌药碱与JUN、AKT1、STAT3、MAPK14、ESR1进行分子对接,结果显示酸枣仁的关键活性成分与关键蛋白具有较强亲和力,进一步提示上述成分可能是酸枣仁发挥抗AD作用的有效成分,并通过影响PI3K-Akt、

MAPK、HIF-1等多条信号通路,从促进神经细胞生存、抑制神经元自噬、促进神经保护与修复等方面协同发挥抗AD作用,体现了酸枣仁抗AD的多成分、多靶点、多通路特点。酸枣仁作为产地分布范围广的大宗药材之一,本研究为酸枣仁的进一步实验研究和临床应用提供了思路并指明了方向,为后续深入研究提供了理论基础以及参考依据。后续研究团队将围绕其抗AD药效物质及机制开展进一步研究,包括活性成分的作用靶点、信号通路及体内实验的验证等,以期为酸枣仁改善AD的临床应用提供理论依据,为以酸枣仁及其活性成分为组方的创新中药新药的开发奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang B, Xia Z A, Zhong B W, et al. Distinct hippocampal expression profiles of long non-coding RNAs in an Alzheimer's disease model [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 (7): 4833-4846.
- [2] Wu K M, Zhang Y R, Huang Y Y, et al. The role of the immune system in Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 70: 101409.
- [3] 楼倩颖, 曹程, 王青青, 等. 开心散与生脉散抗阿尔茨海

- 默病"同病异治"作用机制网络药理学分析与中枢神经免疫调控效用验证 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 98-112.
- Lou Q Y, Cao C, Wang Q Q, et al. Network pharmacological analysis of the mechanism of Kai-Xin-San and Sheng-Mai-San against Alzheimer's disease with "same disease with different treatments" and effect verification of central nervous inflammation regulation [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(1): 98-112.
- [4] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [5] 夏玲, 郭盛, 钱大玮, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究八珍益智方治疗阿尔茨海默病的潜在作用机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 876-881.
- Xia L, Guo S, Qian D W, et al. Exploration on the mechanism of Bazhen Yizhi prescription in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(6): 876-881.
- [6] 刘世军, 唐志书, 崔春利, 等. 酸枣仁化学成分的研究进展 [J]. 西部中医药, 2016, 29(9): 143-146.
- Liu S J, Tang Z S, Cui C L, et al. The research progress of chemical composition of SuanZaoRen [J]. West J Tradit Chin Med, 2016, 29(9): 143-146.
- [7] 闫艳, 张敏, 崔小芳, 等. 酸枣仁化学成分体内过程及其质量标志物研究思路探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 299-309.
- Yan Y, Zhang M, Cui X F, et al. Discussion on research ideas for process *in vivo* of chemical compositions from *Ziziphi Spinosae Semen* and its quality marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(2): 299-309.
- [8] 闫艳, 李强, 杜晨晖, 等. 基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 283-290.
- Yan Y, Li Q, Du C H, et al. Investigation of the potentially effective components of *Semen Ziziphi Spinosae* based on "*in vitro* to *in vivo*" translation approach [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(2): 283-290.
- [9] 谭云龙, 孙晖, 孙文军, 等. 酸枣仁化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 186-188.
- Tan Y L, Sun H, Sun W J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ziziphus jujuba* seed [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(1): 186-188.
- [10] Ghimire S, Kim M S. Jujube (*Ziziphus Jujuba* Mill.) fruit feeding extends lifespan and increases tolerance to environmental stresses by regulating aging-associated gene expression in *Drosophila* [J]. Biogerontology, 2017, 18(2): 263-273.
- [11] Zhang M, Qian C, Zheng Z G, et al. Jujuboside A promotes A β clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPAR γ pathway [J]. Theranostics, 2018, 8(15): 4262-4278.
- [12] Liu Z, Zhao X, Liu B, et al. Jujuboside A, a neuroprotective agent from semen *Ziziphi Spinosae* ameliorates behavioral disorders of the dementia mouse model induced by A β 1-42 [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 738: 206-213.
- [13] 李泽, 杜鹤, 解玉军, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的炒酸枣仁饮片质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4811-4824.
- Li Z, Du H, Xie Y J, et al. Prediction and analysis of Q-Markers of fried *Ziziphi Spinosae Semen* pieces based on multivariate statistical analysis and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(16): 4811-4824.
- [14] 刘佳星, 魏洁, 武锦春, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 1-12.
- Liu J X, Wei J, Wu J C, et al. Identification of chemical constituents in Suanzaoren Tang Granules by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(12): 1-12.
- [15] 梁雨璐, 李忆红, 雷艳, 等. 基于LC-MS法分析宁夏贺兰山野生酸枣不同部位化学成分 [J]. 中南药学, 2022, 20(4): 823-832.
- Liang Y L, Li Y H, Lei Y, et al. Chemical constituents from different parts of wild sour jujube at Helan Mountains in Ningxia based on LC-MS [J]. Cent South Pharm, 2022, 20(4): 823-832.
- [16] 段慧竹, 刘佳星, 闫艳, 等. 肠道菌群介导的酸枣仁总黄酮体内代谢轮廓研究 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4376-4387.
- Duan H Z, Liu J X, Yan Y, et al. *In vivo* metabolic profile of total flavonoids in *Ziziphi Spinosae Semen* mediated by gut microbiota [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(14): 4376-4387.
- [17] 杨兴晶, 刘妍如, 唐志书, 等. 基于主成分分析的青熟酸枣果肉初生及次生代谢产物差异变化的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(5): 824-835.
- Yang X J, Liu Y R, Tang Z S, et al. Study on the differential changes of primary and secondary metabolites between green and ripe *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* fruits based on principal component analysis [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(5): 824-835.

- [18] Poeknapo C, Fisinger U, Zenk M H, et al. Evaluation of the mass spectrometric fragmentation of codeine and morphine after ^{13}C -isotope biosynthetic labeling [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(10): 1413-1420.
- [19] 李强. 酸枣仁潜在效应成分研究 [D]. 太原: 山西大学, 2017.
- Li Q. Study on the potential effective constituent of *Semen Ziziphi Spinosae* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017.
- [20] 孔苑琳, 张剑光, 苏宏娜, 等. UPLC-Q-Exactive-MS/MS 结合网络药理学分析五脉绿绒蒿的化学成分及其抗肝纤维化作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(22): 6097-6116.
- Kong Y L, Zhang J G, Su H N, et al. Chemical constituents and anti-liver fibrosis mechanism of *Meconopsis quintuplinervia* based on UPLC-Q-Exactive-MS/MS and network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(22): 6097-6116.
- [21] 管怡晴, 郑鑫楠, 颜梦秋, 等. 超高效液质联用技术分析黄芩-槐花药对活性成分及其治疗慢性肾脏病的网络药理学研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6388-6400.
- Guan Y Q, Zheng X N, Yan M Q, et al. Analysis of effective components of *Scutellaria Baicalensis-Sophora japonica* drug pair by UPLC-ESI-TOF/MS and network pharmacology analysis of its effect on chronic kidney disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(20): 6388-6400.
- [22] 胡萌, 付娟, 胡军华, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学小儿佛苕和中颗粒成分解析及治疗功能性腹痛药效物质基础及机制预测 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(5): 997-1011.
- Hu M, Fu J, Hu J H, et al. Component analysis and pharmacological mechanism prediction of Xiaoyer Foshao Hezhong Granules in treatment of functional abdominal pain based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(5): 997-1011.
- [23] 刘茜, 付娟, 胡军华, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术咳喘宁颗粒化学成分分析及多指标定量测定 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(5): 1012-1023.
- Liu X, Fu J, Hu J H, et al. Chemical composition analysis and multi-index content determination of Kechuanning Granules based on HPLC-Q-TOF-MS/MS technology [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(5): 1012-1023.
- [24] 申晨曦. 酸枣仁和理枣仁化学成分系统表征及对比研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- Shen C X. Comprehensive chemical characterization and comparison of *Ziziphi Spinosae Semen* and *ziziphi mauritiana Semen* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.
- [25] Chiba T, Yamada M, Sasabe J, et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons [J]. *Mol Psychiatry*, 2009, 14(2): 206-222.
- [26] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [27] 刘改枝, 朱奕林, 许杜娟, 等. 山药活性成分抗老年痴呆症的网络药理学作用机制探讨 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(3): 374-382.
- Liu G Z, Zhu Y L, Xu D J, et al. Mechanism exploration of active ingredients of Chinese yam in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(3): 374-382.
- [28] Elcoroaristizabal Martín X, Fernández Martínez M, Galdos Alcelay L, et al. Progression from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: *ESR1* and *ESR2* polymorphisms and *APOE* gene [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2012, 32(5): 332-341.
- [29] King E, O'Brien J T, Donaghy P, et al. Peripheral inflammation in mild cognitive impairment with possible and probable Lewy body disease and Alzheimer's disease [J]. *Int Psychogeriatr*, 2019, 31(4): 551-560.
- [30] Revest J M, Le Roux A, Roullot-Lacarrière V, et al. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids [J]. *Mol Psychiatry*, 2014, 19(9): 1001-1009.
- [31] Merelli A, Rodríguez J C G, Folch J, et al. Understanding the role of hypoxia inducible factor during neurodegeneration for new therapeutics opportunities [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(10): 1484-1498.

[责任编辑 刘东博]