

基于网络药理学的牛膝防治阿尔茨海默病的物质基础与作用机制研究

熊 婷¹, 何 堃¹, 孙梦盛¹, 燕 波¹, 朱卫丰^{1,3}, 刘红宁^{1,4}, 黄丽萍^{1,2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 江西省中药药理重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 现代制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

4. 江西中医药大学院士工作站, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 基于网络药理学及分子对接技术预测牛膝防治阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的主要活性成分及作用靶点, 探讨其“多成分-多靶点-多通路”的作用机制。方法 收集 DrugBank 和文献报道中 AD 的治疗靶点, 依据中药系统药理学技术平台 (TCMSP) 构建牛膝的化学成分库; 运用 Discovery Studio 3.5 软件进行分子对接, 虚拟筛选牛膝中与 AD 的靶点结合的化学成分集; 通过 KEGG 数据库对虚拟筛选到的关键靶点进行通路富集分析, 采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建牛膝的“成分-靶点-通路”网络。结果 从牛膝中筛选出 58 个化合物, 多为小分子烷烃、酯类和羧酸类化合物, 其次为黄酮类、蒽醌类等。这些有效成分可能通过调节 CaMK-II α 、CaMK-II β 、CaMK-II γ 、Akt1 和 TNF- α 等 36 个 AD 发病机制的潜在靶蛋白而发挥作用, 涉及 MAPK signaling pathway、Wnt signaling pathway 等 12 条通路。结论 牛膝中黄酮类、蒽醌类等活性成分可能是其治疗 AD 的物质基础, 其作用机制涉及抗炎、抗细胞凋亡等。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 牛膝; 阿尔茨海默病; 抗炎; 槲皮素; 汉黄芩素; 山柰酚; 大黄酚; 黄芩素; 海棠果素 E
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0142-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.022

Network pharmacology-based study on material basis and mechanism of *Achyranthis Bidentatae Radix* in treatment of Alzheimer's disease

XIONG Ting¹, HE Kun¹, SUN Meng-sheng¹, YAN Bo¹, ZHU Wei-feng^{1,3}, LIU Hong-ning^{1,4}, HUANG Li-ping^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology of Jiangxi Province, Nanchang 330004, China

3. Key Laboratory of Modern Preparations Ministry of Education, Nanchang 330004, China

4. Academician Workstation, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective This study was designed to predict the main targets of Alzheimer's disease (AD) in *Achyranthis Bidentatae Radix* based on network pharmacology and molecular docking methods, and to explore its “multi-component, multi-target, and multi-pathway” mechanism. **Methods** According to the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), the library of chemical constituents of *Achyranthis Bidentatae Radix* was established by referring to Chinese and foreign literature reports and collecting targets for treating AD in DrugBank. The Discovery Studio 3.5 software was used to carry out molecular docking, virtual screening of the chemical composition set of *Achyranthis Bidentatae Radix* combined with AD target, and KEGG database was used to enrich and analyze the key target of virtual screening. The active compounds of *Achyranthis Bidentatae Radix* with anti-AD activities were yielded to Discovery Studio 3.5 software and molecular docking to predict the potential proteins and carry out related KEGG pathways notation separately. Finally, the network of “active compound-target proteins-pathway” was built and analyzed using the Cytoscape 3.2.1 software. **Results** The 58 active compounds were selected from *Achyranthis Bidentatae Radix*, of which were mostly small alkanes, esters, and carboxylic acids followed by flavonoids and terpenoids. These active ingredients may regulate 36 potential target proteins such as CaMK-II α , CaMK-II β , CaMK-II γ , Akt1, and TNF- α to play a role in the pathogenesis of AD. The results also suggested that 12 signaling pathways

收稿日期: 2018-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660713); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302); 江西省中药学高水平学科国拔经费课题子课题项目 (074973)

作者简介: 熊 婷 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 专业方向药剂学。Tel: 18279108018 E-mail: ChristinaXiong0928@126.com

***通信作者** 黄丽萍 (1972—), 女, 教授, 主要从事中药神经药理学研究。Tel: (0791)87118919 E-mail: jxnchlp@126.com

were involved in the pathogenesis of AD, such as MAPK signaling pathway, Wnt signaling pathways and so on. **Conclusion** This research method initially revealed that the active ingredients of flavonoids and glycosides in *Achyranthis Bidentatae Radix* are the material basis for the treatment of AD. Its mechanism of action involved anti-inflammatory, anti-apoptosis and so on.

Key words: network pharmacology; molecular docking; *Achyranthis Bidentatae Radix*; Alzheimer's disease; anti-inflammatory; quercetin; wogonin; kaempferol; crysophanol; baicalein; inophyllum E

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以认知、行为功能障碍为主要表现的神经系统退行性病变^[1]。其病因尚不明确, 病机假说有多种, 如胆碱能系统功能障碍、A β 毒性学说、Tau 蛋白磷酸化学说、血清素激活的系统功能障碍、氧化应激学说、细胞凋亡学说等^[2]。目前, 针对其机制假说, 临床多以“单靶标”药物治疗 AD, 如乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂多奈哌齐、加兰他敏等, N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗药美金刚, 但治疗效果不理想。中药及复方含有大量的化学物质, 可作用于疾病相关的多个靶点, 对于 AD 这种多因素、复杂性疾病的治疗具有优势。牛膝属于苋科牛膝属 *Achyranthes* L. 植物牛膝 *A. bidentata* Blume 的干燥根, 具有补肝肾、强筋骨、引血下行及逐瘀通经等作用^[3]。研究表明牛膝可以减少晚期糖基化终产物的积累, 预防神经元变性, 改善卵巢切除大鼠的认知功能^[4], 并且常与其他中药配伍共同治疗 AD。可见其在治疗 AD 方面具有广阔的应用前景, 但其物质基础与作用机制尚不清楚, 需进一步研究。

网络药理学具有整体性、系统性的特点, 与中医药辨证论治的整体思想不谋而合, 能够在诠释中药活性成分和作用靶点、阐明作用机制、预测新的并发症、发现中药的组效关系、优化复方和寻找新药等方面发挥重大作用。本研究以牛膝为对象, 利用网络药理学工具, 构建牛膝“成分-靶点-通路-机制-AD”复杂网络, 进一步阐明牛膝防治 AD 多成分、多靶点和多通路的特点, 为拓宽中药牛膝临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org>); Pubmed 数据库 (<http://pubmed.cn>); 中药系统药理学技术平台 (TCMSP) 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>); PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>); DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca>); Discovery Studio 3.5; Cytoscape 3.2.1。Discovery Studio 3.5 软件运行环境: Microsoft Windows 7 Home Basic 操作系统。其余软件运行环

境: Microsoft Windows 8 Home Basic 操作系统。

1.2 方法

1.2.1 牛膝化学成分收集及前处理 TCMSP 数据库可以用于有效成分鉴定、药物靶点筛选和化合物靶标-疾病网络构建^[5-6]。通过文献调研与查阅 TCMSP 共获得了牛膝的 176 个化学成分, 下载并将其保存为 mol2 文件格式, 导入软件 Discovery Studio 3.5 中, 利用里宾斯基 (Lipinski) 类药性五原则筛选符合临床给药的化学成分集, 后经赋 CHARMM 力场、能量最小化处理, 即可用于分子对接。

1.2.2 靶蛋白的收集及前处理 查阅有关 AD 发病机制的中外文献, 并收集 DrugBank 数据库^[7]中与 AD 发病密切相关的靶蛋白。在 PDB 数据库^[8]下载所选靶蛋白, 将靶蛋白导入 Discovery Studio 3.5 软件, 进行可靠性验证, 将验证通过的靶蛋白分子的二级结构显示方式取消, 以线状方式显示, 并删除靶蛋白水分子, 给蛋白分子加氢, 对非标准名称、非完整的氨基酸及某一残基同时存在多个构象等一系列问题进行校正, 将靶蛋白定义为对接体系中受体分子。通过 PDB 数据库对该靶蛋白小分子配体的文献说明并通过 Pubmed 靶蛋白中配体对 AD 的影响, 选择与 AD 相关或该靶蛋白特有的小分子配体作为活性中心, 删除位于活性口袋位置的配体小分子, 暴露靶蛋白的活性口袋, 为牛膝化学成分对接靶蛋白做准备。

1.2.3 牛膝化学成分与关键蛋白对接 利用 Discovery Studio 3.5 的 cdocker 模块, 将牛膝 176 个化学成分与靶蛋白进行半柔性对接, 将 SDS Site Sphere 半径设为 9, Top Hit 设为 3, Pose Cluster Radius 设为 0.5, 其他参数设置为默认值, 打分函数选取 -cdocker energy。

1.2.4 分子对接评价标准 通过查阅相关文献, 在 Discovery Studio 3.5 的 cdocker 模块中, cdocker energy 的值越低 (即 -cdocker energy 越高), 说明化学分子与蛋白受体对接体系越稳定, 对接结果越可靠^[9]。对接靶蛋白的数目越多, 与靶蛋白相对应疾病的关系越密切。故选定 -cdocker energy ≥ 0 且作用靶蛋白数目 ≥ 5 作为活性分子与 AD 关键蛋白靶点

是否存在较强结合活性的评价标准。

1.2.5 网络构建 根据分子对接评价标准, 得出牛膝治疗 AD 的有效成分。通过查阅 Uniprot 数据库, 得到 36 个靶蛋白的基因名, 并依据 KEGG 数据库 Mapper 中的 Search Pathway 模块, 将筛选的靶蛋白进行通路富集, 设置参与信号通路的靶蛋白数 ≥ 3 且与 AD 发病机制相关^[10], 得到与 AD 相关的信号通路集。将牛膝有效成分、筛选的靶蛋白和通路信息导入 Cytoscape 3.2.1 软件中, 网络中节点 (node) 表示化合物、靶点以及作用通路, 分子与靶蛋白、

靶蛋白与信号通路之间的联系则以边 (edge) 相连。经处理后, 得到相关的分子-靶标-通路富集图, 表示牛膝“成分-靶点-通路-AD”间的相互关系。

2 结果

2.1 对接可靠性验证

将蛋白晶体结构中的原配体位置作为参考, 将原配体抽离出来, 再重新对接回靶蛋白的活性口袋, 将晶体结构中的配体位置作为参考来计算对接得到的 10 个配体与其的 RMSD 值。若得到的 RMSD 值小于 0.2 nm, 说明此对接方法可靠。结果 (表 1)

表 1 与 AD 发病机制相关靶蛋白及其 RMSD 值和基因名称

Table 1 Target proteins associated with AD pathogenesis and their RMSD values and gene name

蛋白分类	靶蛋白	全称	PDB ID	RMSD 值/nm	Uniprot ID	基因
胆碱能系统功能障碍	AChE	acetylcholinesterase	4EY5	0.019	P22303	ACHE
	BChE	butyrylcholinesterase	4B0O	0.112	P06276	BCHE
A β 聚集	APP	amyloid beta A4 precursor binding protein	5W3P	0.068	P05067	APP
	γ secretase	gamma secretase	5A63	0.086	P49768	PSEN1
	BACE1	β -secretase-1	3UFL	0.027	P56817	BACE1
Tau 蛋白过度磷酸化	Cdk5	cyclin-dependent kinase 5	3O0G	0.021	Q00535	CDK5
GABA 系统功能障碍	GABA A	gamma-aminobutyric acid A receptor	5O8F	0.123	P28472	GABRB3
	AMPA1	glutamate receptor ionotropic AMPA1 receptor	3SAJ	0.174	P19490	Gria1
	AMPA2	glutamate receptor ionotropic AMPA2 receptor	3H5V	0.127	P19491	Gria2
血清素激活的系统功能障碍	5HT4	5-hydroxytryptamine 4	5EM9	0.146	Q12639	HTR4
氧化应激	MAO B	monoamine oxidase B	1GOS	0.127	P27338	MAOB
	HO-1	heme oxygenase-1	3HOK	0.041	P09601	HMOX1
	PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	3H0A	0.021	P37231	PPARG
凋亡	Caspase-3	cysteine aspartic protease 3	1GFW	0.031	P42574	CASP3
	Caspase-7	cysteine aspartic protease 7	1SHL	0.037	P55210	CASP7
	Bcl-2	apoptosis regulator bcl-2	2W3L	0.038	P10415	BCL2
	Akt1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	4EKL	0.030	P31749	AKT1
炎症	GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 beta	3I4B	0.038	P49841	GSK3B
	iNOS	nitric oxide synthase, inducible	4NOS	0.015	P35228	NOS2
	COX-2	cyclooxygenase-2/prostaglandin G/H synthase 2	6COX	0.024	Q05769	Ptgs2
	PDE4A	phosphodiesterase type 4A	3I8V	0.153	P27815	PDE4A
	PDE4B	phosphodiesterase type 4B	1XMU	0.131	Q07343	PDE4B
	TNF- α	tumor necrosis factor- α	2AZ5	0.039	P01275	TNF
	IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase	2D0T	0.016	P14902	IDO1
	ATP	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2W6E	0.049	P00829	ATP5F1B
能量代谢障碍	GLP-1R	glucagon-like peptide-1 receptor	3C59	0.041	P43220	GLP1R
	GPI	glucose-6-phosphate isomerase	1U0F	0.036	P06745	Gpi
	COMT	catechol O-methyltransferase	3BWM	0.058	P21964	COMT
其他	PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	3V9V	0.024	P37231	PPARG
		calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	3BHH	0.022	Q12554	CAMK2B
	CaMK-II γ	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	2V7O	0.036	Q12555	CAMK2G
	CaMK-II δ	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	2VN9	0.045	Q12557	CAMK2D
	CaMK-II α	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	3SOA	0.050	Q9UQM7	CAMK2A
	HSP70	heat shock protein 70	1XQS	0.018	P0DMV8	HSPA1A
	mTOR	serine/threonine-protein kinase mtor	1FAP	0.027	P42345	MTOR
	ER α	estrogen receptor α	2QXS	0.016	P03372	ESR1

表明所选用的靶蛋白都较可靠，可用于虚拟筛选。

2.2 分子对接结果

通过 Lipinski 类药性五原则和分子对接评价后，依据对接成功靶点数 ≥ 5 且 $-cdocker\ energy \geq 0$ 共筛选出 58 个分子（表 2），其中有 57 个分子与 20 个以上靶蛋白有强烈的相互作用，30 个分子与 30 个以上靶蛋白有强烈的相互作用。

2.3 牛膝“成分-靶蛋白-通路”网络

2.3.1 网络特征分析 通过分子-靶蛋白网络与靶蛋白-信号通路网络基本属性（表 3）总体分析可得，

牛膝中不仅有多化合物作用于同一个靶蛋白，还有单个化合物作用于多个靶蛋白、多个通路，这正体现了牛膝中药“多成分、多靶点、多通路”协同作用的特点。

2.3.2 化学成分分析 根据 Lipinski 类药性五原则及与靶蛋白分子对接后结果分析，可以确定牛膝靶标成分有 58 个。其中多为小分子烷烃（庚烷、癸烷、十四烷、十六烷、二十三烷等）、酯类化合物（邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、醋酸乙酯、棕榈酸甲酯等）、羧酸类化合物（棕榈酸、辛酸、琥

表 2 依据对接成功靶点数 ≥ 5 且 $-cdocker\ energy \geq 0$ 筛选出牛膝 58 个化合物及其 TCMSP 编号

Table 2 Fifty-eight compounds with their TCMSP number successfully docked with five or more targets and $-cdocker\ energy \geq 0$ in *Achyranthes Bidentata Radix*

TCMSP 编号	化合物	TCMSP 编号	化合物
MOL000057	DIBP	MOL001314	azelex
MOL000069	palmitic acid	MOL001393	myristic acid
MOL000098	quercetin	MOL001394	oktadekan
MOL000172	furol	MOL001399	TWT
MOL000173	wogonin	MOL001619	UPL
MOL000303	caprylic acid	MOL001729	crysophanol
MOL000346	succinic acid	MOL001747	tetracosane
MOL000383	D-galacturonic acid, homopolymer	MOL001836	n-butyl- β -D-fructopyranoside
MOL000422	kaempferol	MOL002046	hexanoic acid
MOL000666	hexanal	MOL002347	(R)-allantoin
MOL000667	1-hexanol	MOL002379	PTL
MOL000676	DBP	MOL002714	baicalein
MOL000703	2-heptanone	MOL003040	amylol
MOL000708	WLN: VHR	MOL003091	pent-3-en-2-one
MOL000713	(E)-oct-3-en-2-one	MOL003507	heptanol
MOL000748	HMF	MOL003847	inophyllum E
MOL000775	EEE	MOL004664	heptanoic acid
MOL000776	OXA	MOL004686	nonenone
MOL000860	stearic acid	MOL006731	areginal
MOL000863	dekan	MOL007891	2,6-dimethylpiazine
MOL000865	hexadecane	MOL008279	amyl ketone
MOL000867	heptadekan	MOL008653	acetyl furan
MOL000869	henicosane	MOL008671	PRZ
MOL000876	(6R,10R)-6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	MOL008680	acetaldehyde
MOL000879	methyl palmitate	MOL011944	IPZ
MOL000880	tricosane	MOL012455	oct-1-en-2-ol
MOL000885	dodekan	MOL012462	2-octenal, 2-butyl-
MOL000886	tetradecane	MOL012470	6-dodecanone
MOL001285	octanol	MOL012524	hmp-hmpep

表 3 分子-靶蛋白网络与靶蛋白-信号通路网络基本属性

Table 3 Basic properties of molecular-target protein network and target protein-signal pathway network

网络	节点数目	平均相邻节点数	网络度	网络中心度	网络异质性
分子-靶蛋白	94	37.766	0.406	0.222	0.328
靶蛋白-通路	34	3.471	0.105	0.178	0.614

珀酸、硬脂酸等);其次为黄酮类(槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、黄芩素)、蒽醌类(大黄酚)、香豆素类(海棠果素 E)等化合物。基于样本数据复杂性与 TCMSP 数据库用户指南考虑,按照口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 筛选条件对接后活性成分进一步验证分析,结果表明有 6 个化合物有较好的 OB 与类药性,其中黄酮类化合物(槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、黄芩素)具有较高的 OB 和 DL 值,且文献报道这些化合物均具有治疗 AD 的活性^[11-14]。在数据处理过程中发现蒽醌类化合物大黄酚^[15]虽然 OB $\leq 30\%$,但根据文献调研,其对防治 AD 有药理活性。此 6 个活性成分基本信息见表 4。

表 4 牛膝对接后活性化合物根据 OB 和 DL 验证的 6 个化合物

Table 4 Six compounds validated in *Achyranthes Bidentata Radix* through OB and DL

TCMSP 编号	化合物	OB/%	DL	度
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	26
MOL000173	汉黄芩素	30.68	0.23	26
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	28
MOL001729	大黄酚	18.64	0.21	28
MOL002714	黄芩素	33.52	0.21	28
MOL003847	海棠果素 E	38.81	0.85	15

2.3.3 化合物-靶蛋白网络分析 如图 1 所示,矩形代表牛膝活性成分,菱形代表活性化合物潜在靶点,如果多个活性成分都落在这个点上,则菱形就较大,圆形代表通路,每条边则代表之间的相互作用关系。本研究建立的牛膝化合物-靶蛋白网络是由 58 个活性分子及与之相连的 36 个靶蛋白构成。在筛选后 6 个化合物中,具有文献支持治疗 AD 的 5 个黄酮和蒽醌类化合物约占总活性成分的 8.6%,与潜在 AD 靶点的相互作用数大于 20。此 5 个核心活性成分除了作用于 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II α (CaMK-II α)、CaMK-II β 、CaMK-II γ , 凋亡类靶蛋

白糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、Caspase-3、Caspase-7、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、蛋白激酶 B1 (Akt1) 外,也都作用于热休克蛋白 70 (HSP70),胆碱能系统功能蛋白乙酰胆碱酯酶 (AChE)、丁酰胆碱酯酶 (BChE),炎症类靶蛋白肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、磷酸二酯酶 4B (PDE4B),氧化应激类靶蛋白血红素氧合酶 1 (HO-1)、单胺氧化酶 B (MAO B)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR γ), γ -氨基丁酸 (GABA) 系统功能类蛋白 γ -氨基丁酸 A 型受体 (GABAA) 等。

2.3.4 靶蛋白-信号通路网络分析 治疗 AD 的 36 个靶蛋白在 KEGG 通路富集中,有 23 个靶蛋白 (CaMK-II α 、CaMK-II β 、CaMK-II γ 、Caspase-3、Caspase-7、Bcl-2、Akt1、GSK-3 β 等)能够映射到治疗 AD 相关的 12 条通路中,其中信号通路相对接蛋白约占总靶蛋白的 64%。这 12 条通路包括胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway)、Wnt 信号通路 (Wnt signaling pathway)、有丝分裂原激活的蛋白激酶通路 (MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等,说明靶点蛋白在不同通路间互相调节并进行信号传递。

3 讨论

结合分子对接结果本实验共筛选出 58 个牛膝化学成分,进一步根据 OB 和 OL 进行筛选,预测出牛膝中 6 个治疗 AD 的活性成分,其中黄酮类(槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、黄芩素)、蒽醌类(大黄酚)化合物有相关文献报道,说明该研究方法的合理性。而海棠果素 E 缺乏文献支持,故药效学与作用机制需进一步验证。

根据“化合物-靶蛋白”分子对接结果显示,5 个黄酮类和蒽醌类化合物都对接 AD 相关的靶蛋白共 24 个,其中 CaMK-II α 、CaMK-II β 、CaMK-II γ , 是脑组织中极其丰富的一种蛋白激酶,在学习、记忆中发挥着至关重要的作用,可通过影响 tau 蛋白过度磷酸化和淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的磷酸化,进一步影响细胞内的钙离子浓度,激活蛋白激酶 C 和其他钙离子依赖性蛋白激酶以发挥抗 AD 作

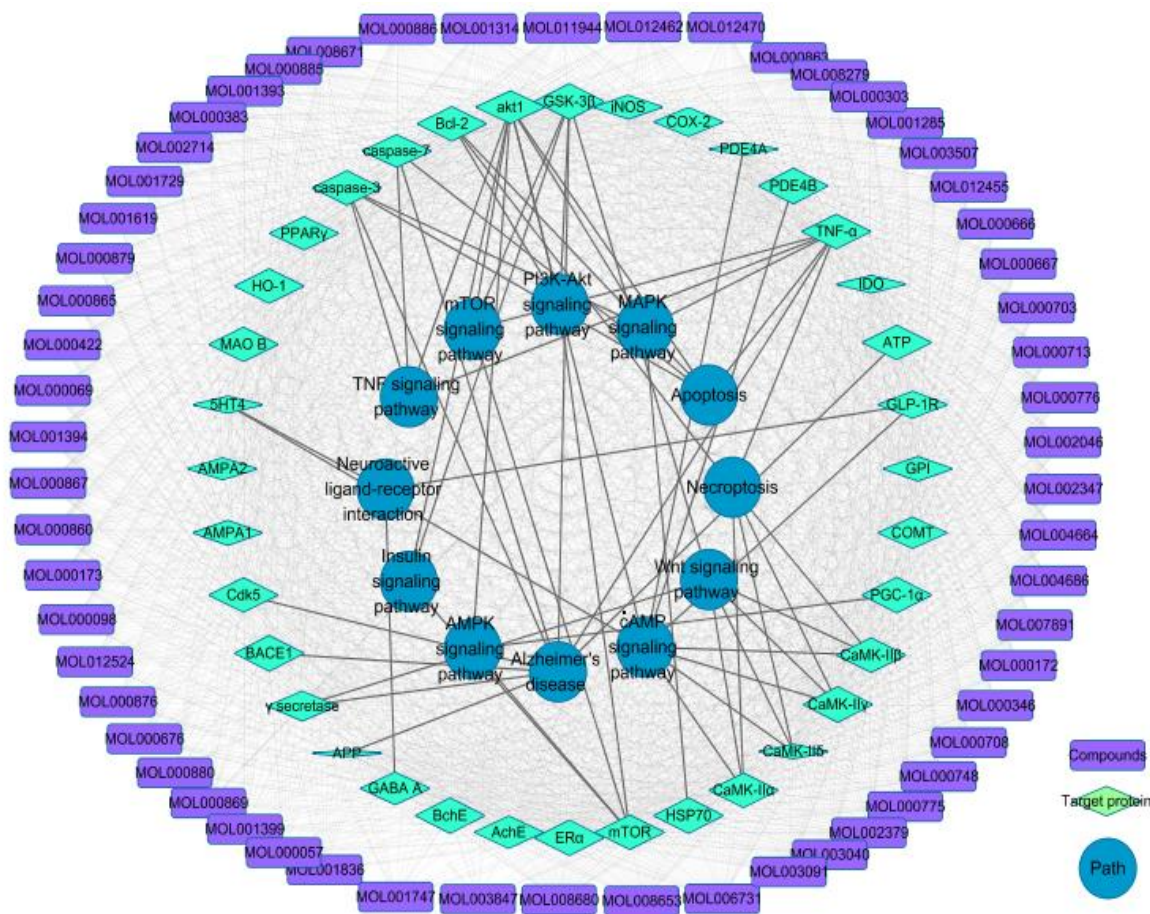


图 1 牛膝“成分-靶蛋白-通路”网络图

Fig. 1 Network diagram of “component-target protein-pathway” in *Achyranthes Bidentata Radix*

用^[16]。凋亡类靶蛋白 GSK-3 β 在 AD 病理发展中(如记忆障碍、tau 蛋白磷酸化、小胶质细胞介导的炎症、炎性因子的释放等)发挥着关键作用,而 Caspase-7、Caspase-3、Bcl-2 可以激活由 A β 蛋白毒性导致的 AD^[17]。另外,这些成分均相对接于 HSP70 蛋白,胆碱能系统功能蛋白 AchE、BchE,炎症类靶蛋白 TNF- α 、PDE4B,氧化应激类靶蛋白 HO-1、MAO B、PPAR γ , GABA 系统功能类蛋白 GABA A 等,预测牛膝活性成分可通过 TNF- α 、HSP70、Caspase-3 激活 MAPK 激酶调节神经元细胞的凋亡,减少氧化自由基的生成和增强抗氧化酶的活性,拮抗由兴奋性氨基酸介导的神经毒性,抑制乙酰胆碱酯酶活性等,进而有效的治疗 AD。

MAPK 是一组脯氨酸依赖的蛋白激酶,参与了细胞增殖、氧化和凋亡等多种生理功能^[18]。MAPK signaling pathway 在哺乳动物类细胞主要由 p38 signaling pathway、ERK signaling pathway 和 JNK

signaling pathway 组成。由靶点-信号通路网络图可知,与 MAPK signaling pathway 相接的靶蛋白有 Akt1、Caspase-3、HSP70 和 TNF- α , 主要与 p38 与 JNK 通路相关。p38 与 JNK 都是应激激活蛋白激酶, TNF- α 会激活 p38。p38 是神经炎症机制的重要调控蛋白,在 A β 介导的氧化应激时可促进炎症因子的生成,加速诱导 tau 蛋白磷酸化,进而引起细胞的凋亡^[18]。研究表明,槲皮素^[19]、汉黄芩素^[20]、黄芩素^[21]和山柰酚^[22]可通过下调 p38MAPK 磷酸化,减少炎症反应,抑制细胞凋亡。

Wnt signaling pathway 在中枢神经系统对细胞间黏附和细胞分化方面发挥着十分重要的作用^[23]。靶蛋白 CaMK-II α 、CaMK-II β 、CaMK-II γ 、 γ secretase 和 GSK-3 β 富集于 Wnt signaling pathway 中。 β -catenin 为 Wnt 下游的调控因子,研究表明 Wnt/ β -catenin signaling pathway 可保护神经元细胞,并调节细胞内钙离子的浓度,防止钙离子浓度增加进一

步激活 CaMK 导致 Tau 蛋白过度磷酸化,抑制神经元细胞的凋亡^[24]。据报道,黄芩素^[25]、汉黄芩素^[26]、槲皮素^[27]和山柰酚^[28]可通过激活 Wnt/ β -catenin signaling pathway 使细胞再生。

PI3K-Akt signaling pathway 与 mTOR signaling pathway 相互交叉,经典 mTOR signaling pathway 由 PI3K-Akt-mTOR signaling pathway 多层次调节神经元细胞发育、学习与记忆。在此通路中,Akt 发挥着关键的作用,Akt 磷酸化可以正反馈地刺激 mTOR signaling pathway 活化,mTOR signaling pathway 的活化对 Akt 有负反馈抑制作用^[29]。各种细胞因子可以使 PI3K 磷酸化,进而将 2 个 Akt 激酶磷酸化,引起 Akt 活化与细胞膜结合。mTOR 是非经典苏氨酸/丝氨酸的蛋白激酶,也是 Akt 下游的靶点之一,不仅可以促进 A β 的形成,还通过调节 Tau 蛋白的 3 个磷酸化位点控制 Tau 蛋白的合成和聚集^[30]。据文献报道,槲皮素^[31]、汉黄芩素^[32]诱导 PI3K-Akt-mTOR signaling pathway 蛋白的表达,促进细胞增殖。

Insulin signaling pathway 受损也是 AD 发病机制之一,研究显示^[33]AD 患者患病早期会出现葡萄糖利用率降低,由于胰岛素抵抗导致神经元缺少糖分而能量不足。脑内 insulin signaling pathway 减弱,不仅使脑内 p-Akt 水平和 PI3K/Akt 信号转导下调,导致 GSK-3 β 活性增强,tau 蛋白过度磷酸化,还进一步导致神经原纤维缠结(NFT)形成和神经元细胞凋亡。KEGG“成分-靶蛋白-通路”富集网络图中,虽然出现 insulin signaling pathway,但经文献检索,暂未发现牛膝活性成分通过抑制胰岛素代谢障碍来防治 AD,说明其活性成分需要进一步实验支撑。

本研究基于网络药理学方法对牛膝药效成分进行靶标预测和通路分析,通过建立药效成分-靶点-通路网络图,多角度探索牛膝治疗 AD 潜在的作用机制,发现牛膝中黄酮类和蒽醌类药效成分可能通过抗细胞凋亡、抗氧化应激、减少炎症反应等机制发挥抗 AD 作用,为其后续临床试验疗效评价指标的筛选提供依据和方向。同时,对于文献中证明有治疗 AD 作用的生物碱类、甾醇类化合物,本研究并未筛选得到,说明实验方法还存在一些局限性,网络药理学研究结果仍需要后续实验的验证与支持,并使其相关数据库建设、算法创建、分子筛选依据等不断完善。

参考文献

- [1] Anand R, Gill K D, Mahdi A A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(Pt A): 27-50.
- [2] 应侠,吴振,雷严,等. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展 [J]. *中国药房*, 2014, 25(33): 3152-3155.
- [3] 沈舒,王琼,李友宾. 牛膝的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *海峡药学*, 2011, 23(11): 1-6.
- [4] Wang Y, Xu Y, Pan Y, et al. *Radix Achyranthis Bidentatae* improves learning and memory capabilities in ovariectomized rats [J]. *Neural Regener Res*, 2013, 8(18): 1644-1654.
- [5] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [6] 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 Compl Alter Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/938764.
- [7] Law V, Knox C, Djoumbou Y, et al. DrugBank 4.0: Shedding new light on drug metabolism [J]. *Nucl Acid Res*, 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1068.
- [8] 黄涛. 蛋白质结构数据库的信息挖掘 [D]. 上海: 同济大学, 2006.
- [9] 刘美凤,蒋利荣,刘华鼎,等. 番石榴叶抗 II 型糖尿病活性成分的虚拟筛选 [J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(3): 28-31.
- [10] 黄丽萍,燕波,侯敏,等. 网络药理学探究二至丸防治阿尔茨海默病的物质基础与作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4211-4217.
- [11] Zhang X, Jin H, Li Z, et al. Quercetin stabilizes apolipoprotein E and reduces brain A β levels in amyloid model mice [J]. *Neuropharmacology*, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.032.
- [12] Huang D S, Yu Y C, Wu C H, et al. Protective effects of wogonin against Alzheimer's disease by inhibition of amyloidogenic pathway [J]. *Evid-Based Compl Alter Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/3545169.
- [13] 张君,程笑,杨欢,等. 山柰酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1): 39-44.
- [14] Wang W, Wang F, Yang Y J, et al. The flavonoid baicalein promotes NMDA receptor-dependent long-term potentiation and enhances memory [J]. *Brit J Pharmacol*, 2011, 162(6): 1364-1379.
- [15] Chae U, Min J S, Leem H H, et al. Chrysophanol

- suppressed glutamate-induced hippocampal neuronal cell death via regulation of dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission [J]. *Pharmacology*, 2017, 100(3/4): 153-160.
- [16] Kobayashi S, Tanaka T, Soeda Y, *et al.* Local somatodendritic translation and hyperphosphorylation of tau protein triggered by AMPA and NMDA receptor stimulation [J]. *Ebiomedicine*, 2017, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.012.
- [17] 陈雪, 孙婧霞, 蒋常文. Bcl-2、Caspase-3 与阿尔茨海默病关系的研究进展 [J]. 临床医学工程, 2013, 20(9): 1177-1179.
- [18] 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.
- [19] 李杰. 大黄素和槲皮素对 LRRK2 突变致 PD 果蝇的治疗作用探讨 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [20] 王慧莲, 孟庆良, 李伟松, 等. 汉黄芩素通过激活活性氧簇介导的 P38MAPK 信号通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7): 890-895.
- [21] 陈炜平. 黄芩素抗骨性关节炎的作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [22] Suchal K, Malik S, Gamad N, *et al.* Kaempferol attenuates myocardial ischemic injury via inhibition of MAPK signaling pathway in experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, doi: 10.1155/2016/7580731.
- [23] 曹燕, 王旭, 梁枫. 认知功能障碍相关信号通路 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6295-6297.
- [24] 张跃其, 王培昌. 阿尔茨海默病相关信号转导通路研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(10): 1748-1750.
- [25] 江华基, 江小成, 贺飞林, 等. 黄芩素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进大鼠腱骨愈合 [J]. 分子影像学杂志, 2016, 39(3): 297-301.
- [26] He L, Lu N, Dai Q, *et al.* Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2013, 312(1): 36-47.
- [27] Kim H, Seo E M, Sharma A R, *et al.* Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(4): 1319-1325.
- [28] 焦红蕾. 山柰酚通过 Wnt3a/ β -catenin 信号通路促进实验性脑缺血小鼠神经功能改善及神经再生 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [29] 屈岭, 顾蓓, 张宏, 等. 中药筋脉通对糖尿病周围神经组织雪旺细胞自噬与凋亡的影响 [A] // 全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨中德代谢综合征高层论坛 [C]. 北京: 中国中西医结合学会, 2013.
- [30] Wang C, Yu J T, Miao D, *et al.* Targeting the mTOR signaling network for Alzheimer's disease therapy [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 120-135.
- [31] Granato M, Rizzello C, Montani M S, *et al.* Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.011.
- [32] 高平章, 韩旭花, 白赛赛, 等. 汉黄芩素抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响急性白血病 HL-60 细胞增殖 [J]. 泉州师范学院学报, 2017, 35(6): 1-6.
- [33] Han X, Ma Y, Liu X, *et al.* Changes in insulin-signaling transduction pathway underlie learning/memory deficits in an Alzheimer's disease rat model [J]. *J Neural Transm*, 2012, 119(11): 1407-1416.