

基于网络药理学的开心散治疗阿尔茨海默病的作用机制分析

时悦, 姚瓊珈, 蔺莹, 梁喜才, 倪颖男, 吴雨桐, 杨静娴*

(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

摘要: 采用网络药理学方法筛选开心散治疗阿尔茨海默病的主要活性成分并研究其作用机制。利用中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 和 TTD 数据库查找阿尔茨海默病的靶标蛋白, 取两种方法交集得到的靶蛋白确定为阿尔茨海默病的靶蛋白; 基于 ADME 算法筛选开心散药效成分并利用反向药效团匹配方法 (PharmMapper) 进行开心散靶点预测, 运用 Uniprot 数据库查询靶蛋白对应的基因名称并选择人源蛋白最终得到开心散调控的阿尔茨海默病靶蛋白; 运用 Cytoscape 3.5.1 软件构建开心散活性成分-阿尔茨海默病靶标网络并进行网络拓扑学分析; 通过 STRING 数据库和 DAVID 数据库对靶点进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析及基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析。通过 Discovery Studio 分子对接软件对网络药理学分析结果进行验证。研究得到开心散中满足类药性、口服生物利用度和入血的药效成分有 31 个, 与阿尔茨海默病相关的靶点有 8 个。GO 条目 31 个, 其中生物过程条目有 13 个, 分子功能条目 7 个, 细胞组成条目 11 个。KEGG 通路 5 条, 包括钙信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等。Discovery Studio 分子对接结果表明, 开心散活性成分与重要靶点结合活性较好, 且阳性药与靶点的结合有很高的评分。开心散治疗阿尔茨海默病具有多成分、多靶点的优点, 通过网络药理学方法研究开心散治疗阿尔茨海默病的活性成分和作用机制, 为进一步揭示其作用机制提供了新的思路。

关键词: 开心散; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 靶点; 分子对接

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1458-09

Mechanism of Kai Xin San in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology

SHI Yue, YAO Ying-jia, LIN Ying, LIANG Xi-cai, NI Ying-nan, WU Yu-tong, YANG Jing-xian*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: The study was designed to explore the active components and mechanism of Kai Xin San in the treatment of Alzheimer's disease (AD) based on network pharmacology. All targets related to AD were researched in the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Therapeutic Targets Database (TTD). The common targets obtained by two databases were determined as candidate proteins involved in AD. All active components related to Kai Xin San were researched from ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion). PharmMapper was used to obtain the primary candidate targets of Kai Xin San. The corresponding gene name of each target protein was obtained from the UniProt database and selected human target proteins. Finally, the target proteins related to AD by Kai Xin San were acquired; Cytoscape 3.5.1 was used to construct the topology analysis for the active ingredient-AD target interaction network of Kai Xin San. According to STRING database and DAVID annotation databases, Gene Ontology enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis of

收稿日期: 2018-05-21; 修回日期: 2018-06-25.

*通讯作者 Tel: 86-411-87586009, E-mail: jinxiangyang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0474

the targets was performed. The network pharmacology analysis results were verified by Discovery Studio molecular docking software. There were 31 components meeting the conditions of ADME and 8 targets relating to AD. Thirteen kinds of biological process, 7 related to molecular function and 11 related to cellular components, were included in 31 GO entries. There were 5 KEGG pathways, involving the calcium signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway. The docking results of Discovery Studio showed that active ingredients of Kai Xin San and the positive controls all have good binding activity with important targets. In conclusion, the Kai Xin San as applied for treating AD has the advantages of multi-components and targets, to investigate the active components and mechanism of Kai Xin San for treating AD based on network pharmacology to elucidate possible studies of the mechanisms of action.

Key words: Kai Xin San; Alzheimer; network pharmacology; target; molecular docking

阿尔茨海默病是 (Alzheimer's disease, AD) 中枢退行性疾病, 与年龄有关, 多发于老年人^[1]。关于 AD 发病机制有许多假说, 如炎症反应、淀粉样蛋白 (A β) 沉积、tau 蛋白异常磷酸化、胆碱能假说、氧化应激反应和细胞凋亡学说等^[2]。当今治疗 AD 的临床药物存在较多不良反应, 而中药毒副作用小, 可以安全有效地治疗 AD。

开心散是治疗老年痴呆的经典方剂, 首见于《备急千金要方》。开心散由人参、茯苓、远志和石菖蒲 4 味药组成。君药为人参具有补益元气、补五脏之功; 臣药为茯苓具有养心安神功效; 佐药为远志有宁心化痰之效; 使药为石菖蒲具有益智醒神和引药入经功效^[3]。研究表明, 开心散主要活性成分具有改善学习和记忆的作用。人参皂苷 Rg2 抑制乙酰胆碱酯酶活性改善 AD 小鼠的学习记忆功能^[4]。远志茯苓醇提物能改善东莨菪碱模型小鼠的学习记忆能力, 可能通过提高脑内乙酰胆碱水平而发挥改善学习记忆的作用^[5]。石菖蒲挥发油的主要活性成分 β -细辛醚能够增强突触功能可塑性而改善 A β ₁₋₄₂ 导致的大鼠认知功能障碍状况^[6]。

网络药理学通过检索网络数据库、构建“药物-靶点-疾病”网络关系并进行网络拓扑学分析, 是一种从整体层次来预测药物治疗疾病作用机制的新方法^[7]。中药复方通过君臣佐使多味中药协同作用治疗疾病, 强调系统性和整体性。中药复方治疗疾病的理论同网络药理学相似。开心散成分复杂, 治疗 AD 具有多成分、多靶点的优点, 但开心散治疗 AD 的有效活性成分及作用机制不明确, 因此应用网络药理学方法筛选中药复方开心散治疗 AD 的活性成分及其靶点具有重要意义。

材料与方法

查找阿尔茨海默病相关靶蛋白 Therapeutic

target database (TTD) 数据库^[8]是一个提供了已知或正在探索的可用作治疗的蛋白质靶点的信息, 以及与之相对应的靶疾病、靶通路和相应的药物/配体信息的数据库。中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP)^[9, 10]是一个整合药物代谢动力学、药物化学和药物-靶点-疾病网络的平台。在 TTD 和 TCMSP 数据库中输入“Alzheimer”关键词搜索与 AD 相关的蛋白。将两种方法得到的靶蛋白信息合并, 取两个数据库交集的靶蛋白确定为阿尔茨海默病靶蛋白。同时使用蛋白质数据库 (Uniprot Database) 选择物种为“human”的靶点, 将蛋白名称和基因名称进行转换。

根据 ADME 筛选开心散的活性成分 ADME 是药物动力学, 指机体对外源化学物的吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 及排泄 (excretion) 过程。ADME 的 3 个关键参数为血脑屏障 (blood brain barrier, BBB)、口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 和类药性 (druglikeness, DL)^[11, 12]。根据 ADME (BBB \geq -0.3、OB \geq 30% 和 DL \geq 0.18) 筛选开心散活性化合物。

筛选开心散治疗阿尔茨海默病的靶点 PharmMapper 是通过反向分子对接预测靶点的服务平台, 以活性小分子为探针, 通过对 Targetbank、Drugbank、Binding DB 和 PDTD 4 个数据库进行检索找到最佳靶点信息^[13]。将满足 OB、BBB 和 DL 的化合物, 以 SDF 格式上传到 Pharammapper 服务平台, 参数选择: select targets set 选 human protein targets only (v2010, 2241), 其他参数默认, 得到开心散活性成分的靶蛋白。由于部分靶点名称不规范, 所以将靶点名称输入 Uniprot 数据库中统一为基因名。将预测的开心散靶点信息与 TTD 和 TCMSP 数据库中阿尔茨海默病靶点进行验证, 筛选出开心散治疗阿尔茨海默病的作用靶点。

构建开心散活性成分与 AD 疾病相关靶点网络

图 根据开心散化学成分-靶点预测结果和靶点-疾病预测结果,应用 Cytoscape 3.5.1 中的 Merge 功能,将两个预测结果合并成化学成分-靶点-疾病网络图,并通过 network analysis 计算网络参数,分析相互关系。Cytoscape3.5.1 是一种可视化软件,能更直观地分析药物治疗疾病的作用机制^[14]。其中的节点 (node) 是化合物、靶蛋白或疾病。其中的边 (edge) 代表这些分子之间的互作关系,即某个成分与靶点或靶点与疾病存在联系。

GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 利用 STRING 数据库对开心散调控的阿尔茨海默病靶蛋白进行 GO 功能富集分析,将开心散治疗阿尔茨海默病涉及的 8 个蛋白输入到检索框中,选择“homo sapiens”开始分析。DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 是整合生物学信息和分析工具的生物信息数据库,可以从多个基因或蛋白质中提取生物学信息并提供系统的生物功能注释信息^[15]。打开 DAVID 数据库,在基因列表中输入与 AD 有关的靶点基因名称,在基因标识符栏中选择“official-gene-symbol”,基因背景栏选择“homo sapiens”,最后分析工具选择“functional annotation tool”。根据 $P < 0.05$ 作为筛选条件得到 KEGG 通路富集分析结果。

Discovery Studio 分子对接软件验证网络药理学筛选结果 Discovery Studio (DS) 主要应用于蛋白质结构功能的研究、药物发现和结构生物学等领域。DS 基于结构药物设计工具,包括配体-蛋白质相互作用和分子对接,基于小分子药物设计工具包括定量构效关系、药效团和 ADMET 等。

将阿尔茨海默病靶蛋白糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3 β) 和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 作为分子对接的受体,再对蛋白质晶体结构数据库 PDB 中的目标蛋白的三维结构活性部位进行分析,采用 Discovery Studio 分子对接软件 (版本 3.0) 中的 LibDock 模块将 degree > 5 的成分 beta-sitosterol 和 stigmasterol (配体)、阳性药盐酸多奈哌齐 (donepezil)、GSK3 β 抑制剂与受体蛋白分子对接来验证网络药理学筛选结果。

用 ChemDraw 软件绘制 beta-sitosterol、stigmasterol、donepezil 和 GSK3 β 抑制剂的化学结构,作为对接的配体。配体和受体分子在对接前需要进行能量最小化处理,删除受体分子 (PDB 文件中) 水分子,加上极性氢原子,赋予电荷,添加磁场。以原配体化合物所在的位置作为结合位点,半径为 0.65 nm

内的所有子结构作为结合位点的活性口袋部分。采用 LigandDock 方法采集配体分子在受体活性口袋中的构象模式。

结果

1 阿尔茨海默病相关的靶蛋白

在 TTD 中与阿尔茨海默病有关的靶点共 95 个,在 TCMSP 中与阿尔茨海默病相关的靶点有 30 个,将两种方法得到的靶点取交集即确定为阿尔茨海默病相关的靶点。将靶点与阿尔茨海默病建立联系,共得到 14 个阿尔茨海默病靶点 (表 1)。

Table 1 Fourteen proteins relating to Alzheimer

TTD/TCMSP	Uniprot
Acetylcholinesterase	AchE
Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1
Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-5	GABRA5
Glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3 β
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7	CHRNA7
Beta-secretase-1	BACE1
5-Hydroxytryptamine receptor 4	HTR4
Prostaglandin G/H synthase 2	COX2
Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-2	CHRN2
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4	CHRNA4
Histamine H3 receptor	Hrh3
Amyloid beta A4 protein	APP
Butyrylcholinesterase	BCHE

2 符合 ADME 的开心散活性成分

符合 ADME (BBB ≥ -0.3 、OB $\geq 30\%$ 和 DL ≥ 0.18) 筛选条件的共 31 种,其中人参 18 种、茯苓 6 种、远志 4 种、石菖蒲 3 种。开心散活性成分信息见表 2。

3 开心散中抗 AD 作用的活性成分潜在靶蛋白信息

将上述 31 个开心散活性成分,通过 Phammapper 服务器与 TCMSP、TTD 数据库验证后,预测关于 AD 的作用靶点共 8 个: 环氧合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, COX2)、AchE、胆碱能受体 M1 (muscarinic acetylcholine receptor M1, CHRM1)、胆碱能受体 M2 (muscarinic acetylcholine receptor M2, CHRM2)、GSK3 β 、丁酰胆碱酯酶 (bcetylcholinesterase, BCHE)、 γ -氨基丁酸受体 $\alpha 5$ 亚基 (gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-5 subunit, GABRA5)、神经元乙酰胆碱受体蛋白 α -7 链 (neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain, CHRNA7) (表 3)。分析发现,化合物 onjixanthone I 的口服生物利用度最高 (79.16%),

Table 2 Information sheet of active compound of Kai Xin San. OB: Bioavailability; DL: Drug-likeness; BBB: Blood brain barrier level

MOLNAME	Ingredient	Medicine	OB%	BBB	DL
MOL002879	Diop	Renshen	43.59	0.26	0.39
MOL000449	Stigmasterol	Renshen	43.83	1.00	0.76
MOL000358	Beta-sitosterol	Renshen	36.91	0.99	0.75
MOL003648	Inermin	Renshen	65.83	0.36	0.54
MOL005308	Aposiopolamine	Renshen	66.65	0.40	0.22
MOL005314	Celabenzine	Renshen	101.88	0.05	0.49
MOL005317	Deoxyharringtonine	Renshen	39.27	-0.25	0.81
MOL005320	Arachidonate	Renshen	45.57	0.58	0.20
MOL005321	Frutinone A	Renshen	65.90	0.46	0.34
MOL005348	Ginsenoside-Rh4_qt	Renshen	31.11	-0.18	0.78
MOL005356	Girinibin	Renshen	61.22	1.22	0.31
MOL005357	Gomisin B	Renshen	31.99	0.18	0.83
MOL005360	Malkangunin	Renshen	57.71	-0.17	0.63
MOL005376	Panaxadiol	Renshen	33.09	0.23	0.79
MOL005384	Suchilactone	Renshen	57.52	0.28	0.56
MOL005399	Alexandrin_qt	Renshen	36.91	0.88	0.75
MOL005401	Ginsenoside Rg5_qt	Renshen	39.56	0.21	0.79
MOL000787	Fumarine	Renshen	59.26	-0.13	0.83
MOL003370	Onjixanthone I	Yuanzhi	79.16	0.04	0.3
MOL002140	Perlolyrine	Yuanzhi	65.95	0.15	0.27
MOL004718	α -Spinasterol	Yuanzhi	42.98	0.79	0.76
MOL008570	Harmine	Yuanzhi	56.8	0.79	0.13
MOL000275	Trametenolic acid	Fuling	38.71	-0.14	0.80
MOL000282	Ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	Fuling	43.51	0.91	0.72
MOL000283	Ergosterol peroxide	Fuling	40.36	0.34	0.81
MOL000287	3Beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	Fuling	38.70	-0.04	0.81
MOL000296	Hederagenin	Fuling	36.91	0.96	0.75
MOL000300	Dehydroeburicoic acid	Fuling	44.17	-0.16	0.83
MOL003576	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan	Shichangpu	52.35	0.05	0.62
MOL003578	Cycloartenol	Shichangpu	38.69	1.33	0.78
MOL002124	Beta-asarone	Shichangpu	35.61	1.24	0.06

说明该化合物经口服后能被胃肠道较好地吸收。化合物 dehydroeburicoic acid、fumarine、gomisin B 的类药性最好,表明这 3 个化合物被开发为药物的可能性最高;化合物 beta-asarone 能较好地通过血脑屏障,且有实验表明该化合物能够影响海马神经元的突出可塑性而改善大鼠的认知功能^[6]。

4 网络特征分析

运用 Cytoscape 3.5.1 构建成分-靶点-疾病网络(图 1),包含 23 个化学成分,8 个靶点及 1 个疾病,其中粉色菱形代表阿尔茨海默病,绿色圆形代表靶蛋白,正方形代表开心散的活性成分,浅绿色为人参,黄色为茯苓,蓝色为远志,紫色为石菖蒲。Network analysis 发现(表 4),网络中的网络度(degree)越大,说明开心散通过该靶点治疗疾病的可能性越大。COX2 与 AchE 为 C-T-D 网络中的核心靶点,23 个活

性成分均与这两个靶点有潜在的结合作用,其次分别为 CHRM1、CHRM2、GSK3 β 、BCHE、CHRNA7 和 GABRA5。开心散可能通过多个发病机制治疗 AD:胆碱能学说是 AD 发病学说的假说之一,研究表明^[16],开心散能够抑制乙酰胆碱酯酶的表达从而改善大鼠的学习记忆能力; $A\beta$ 沉积是 AD 的主要发病机制, $A\beta$ 聚集可引起神经系统炎症反应,造成神经元凋亡,认知系统受损^[17]。COX2 是 PGE2 合成的关键酶,PGE2 是重要的炎症介质,可直接引起血管渗透性增加,促进相关组织分泌 IL-6 等炎症因子诱导炎症反应发生^[18];tau 蛋白磷酸化引起的神经纤维缠结也是 AD 发病公认学说,GSK3 β 调控 tau 蛋白磷酸化^[19]且 GSK3 β 参与细胞凋亡,因此开心散可能通过 GSK3 β 调控 tau 蛋白磷酸化从而治疗 AD。CHRM1 和 CHRM2 为胆碱能受体,BCHE 为丁酰胆碱酯酶,三者都属于胆碱能系

Table 3 Information of protein targets from active ingredients of Kai Xin San. COX2: Prostaglandin G/H synthase 2; AchE: Acetylcholinesterase; CHRM1: Muscarinic acetylcholine receptor M1; CHRM2: Muscarinic acetylcholine receptor M2; GSK3 β : Glycogen synthase kinase-3 beta; BCHE: Bcetylcholinesterase; GABRA5: Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-5 subunit; CHRNA7: Neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain

MOLNAME	Ingredient	Medicine	Degree	Target
MOL000449	Stigmasterol	Renshen	7	CHRM1, COX2, AchE, GABRA5, CHRM2, GSK3 β , CHRNA7
MOL000358	Beta-sitosterol	Renshen	6	CHRM1, COX2, AchE, CHRM2, CHRNA7, GSK3 β
MOL004718	α -Spinasterol	Yuanzhi	4	BCHE, AchE, CHRM2, CHRM1
MOL000296	Hederagenin	Fuling	4	CHRM1, COX2, AchE, CHRM2
MOL005360	Malkangunin	Renshen	4	AchE, BCHE, CHRM1, CHRM2
MOL000787	Fumarine	Renshen	4	CHRM1, COX2, AchE, GSK3 β
MOL005308	Aposiopolamine	Renshen	4	CHRM1, AchE, BCHE, CHRM2
MOL005321	Frutinone A	Renshen	4	COX2, AchE, GSK3 β , CHRNA7
MOL005356	Girinimbin	Renshen	4	COX2, AchE, GSK3 β , CHRNA7
MOL003576	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>aS</i>)-1,4-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3 <i>a</i> ,4,6,6 <i>a</i> -hexahydrofuro[4,3- <i>c</i>]furan	Shichangpu	3	COX2, AchE, GSK3 β
MOL002124	Beta-asarone	Shichangpu	3	CHRM1, COX2, CHRM2
MOL003370	Onjixanthone I	Yuanzhi	3	COX2, AchE, BCHE
MOL003648	Inermin	Renshen	3	COX2, GSK3 β , CHRNA7
MOL000283	Ergosterol peroxide	Fuling	2	CHRM1, CHRM2
MOL000282	Ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3beta-ol	Fuling	2	CHRM1, CHRM2
MOL005317	Deoxyharringtonine	Renshen	2	BCHE, AchE
MOL002879	Diop	Renshen	2	BCHE, AchE
MOL005384	Suchilactone	Renshen	2	COX2, GSK3 β
MOL005320	Arachidonate	Renshen	2	COX2, AchE
MOL008570	Harmine	Yuanzhi	1	COX2
MOL002140	Perlolyrine	Yuanzhi	1	COX2
MOL000300	Dehydroeburicoic acid	Fuling	1	COX2
MOL005357	Gomisin B	Renshen	1	COX2

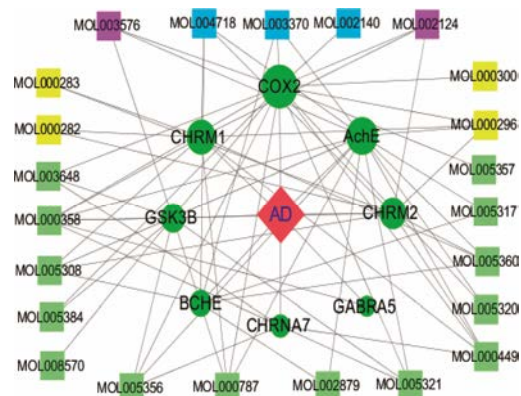


Figure 1 Components-targets-disease network. The size of the graphic area indicates the importance of the nodes in the network. (■) Main active ingredients of Renshen; (■) Main active ingredients of Fuling; (■) Main active ingredients of Shichangpu; (■) Main active ingredients of Yuanzhi; (●) Targets; (◆) Disease

统, 与胆碱能学说有关。CHRNA7 是乙酰胆碱受体亚基 $\alpha 7$, 实验证明^[20–22], CHRNA7 的基因多态性与 AD 有关, CHRNA7 多态性可以调节突触前神经递质的释放和胆碱能神经传递来增强记忆功能。综上所述,

Table 4 Targets of Kai Xin San related to Alzheimer in the network characteristics

Number	Gene name	Degree
1	COX2	16
2	AchE	14
3	CHRM1	10
4	CHRM2	9
5	GSK3 β	7
6	BCHE	6
7	CHRNA7	5
8	GABRA5	1

开心散可能通过减少炎症因子的释放减轻 $A\beta$ 沉积、平衡胆碱能系统和抑制 tau 蛋白过度磷酸化等多个靶点治疗阿尔茨海默病。

5 GO 功能富集分析

利用 STRING 数据库进行 GO 功能富集分析, 对开心散治疗阿尔茨海默病涉及的 8 个蛋白在基因功能中的作用进行了分析。根据错误发现率 (false discovery rate, FDR) 确定 31 个 GO 富集分析结果 (FDR < 0.05, 表 5)。其中生物学过程的结果最多, 有

Table 5 List of GO enrichment results to target network of Kai Xin San related to Alzheimer. BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component; FDR: False discovery rate

Category	GO ID	Description	Count in gene set	FDR
BP	0050890	Cognition	5	0.000 126
	0007271	Synaptic transmission, cholinergic	3	0.000 308
	0007611	Learning or memory	4	0.002 28
	0050805	Neurological system process	6	0.002 28
	0007197	Negative regulation of synaptic transmission	3	0.002 37
	0007207	Adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	2	0.003 07
	0009820	Phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	2	0.003 95
	0051222	Alkaloid metabolic process	2	0.011 3
	0007399	Positive regulation of protein transport	4	0.011 3
	0007399	Nervous system development	6	0.011 9
	0007612	Learning	3	0.011 9
	0007268	Synaptic transmission	4	0.026 4
	0090257	Regulation of muscle system process	3	0.034
	MF	0015464	Acetylcholine receptor activity	3
0001540		Beta-amyloid binding	3	0.000 219
0003990		Acetylcholinesterase activity	2	0.000 219
0050997		Quaternary ammonium group binding	3	0.000 219
0070405		Ammonium ion binding	3	0.000 739
0016907		G-protein coupled acetylcholine receptor activity	2	0.000 786
0042166		Acetylcholine binding	2	0.004 76
CC	0044456	Synapse part	5	0.000 483
	0045211	Postsynaptic membrane	4	0.000 483
	0032279	Asymmetric synapse	2	0.001 26
	0043005	Neuron projection	5	0.001 26
	0098590	Plasma membrane region	5	0.001 26
	0098794	Postsynapse	4	0.001 26
	0030425	Dendrite	4	0.002 14
	0030054	Cell junction	5	0.002 36
	0036477	Somatodendritic compartment	4	0.005 5
	0098805	Whole membrane	5	0.023 1
	0043025	Neuronal cell body	3	0.038 8

13 个, 主要涉及认知学习或记忆过程、胆碱能过程、神经系统过程、突触传递、代谢过程等方面; 分子功能结果有 7 个, 主要包括乙酰胆碱受体活性、乙酰胆碱酯酶活性和 β -淀粉样蛋白结合等方面; 细胞组成结果有 11 个, 主要关于突触部分、树突部分和神经元细胞体等方面。

6 KEGG 富集分析

通过 DAVID 数据库对开心散治疗阿尔茨海默病涉及的 8 个蛋白在信号通路中的作用进行研究, 根据 $P < 0.05$ 得到 5 条通路 (表 6), 包括胆碱能突触、钙信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等通路。研究表明^[23], 胆碱能突触传递和 $A\beta$ 对记忆的神经毒性之间可能存在联系, $A\beta_{42}$ 过度表达能明显减少神经元的胆碱能突触传递, 结果造成短期记忆损害。有文献表明, 激活钙

信号通路可以对抗 $A\beta$ 的神经毒性保护神经细胞^[24]。此外, $A\beta$ 可以通过抑制 PI3K-Akt 信号通路激活 GSK3 β , 增加 tau 蛋白磷酸化加重 AD 发病。所以激活 PI3K-Akt 信号通路抑制 tau 蛋白磷酸化治疗 AD 具有重要意义^[25]。Li^[26]发现, 开心散能降低快速老化小鼠模型 AchE 活性, 减少 $A\beta$ 沉积, 降低 tau 蛋白和

Table 6 List of pathway enrichment results to target network of Kai Xin San related to alzheimer

Category	Gene	P-Value
Cholinergic synapse	4	7.8×10^{-5}
Neuroactive ligand-receptor interaction	4	1.2×10^{-3}
Calcium signaling pathway	3	9.3×10^{-3}
PI3K-Akt signaling pathway	3	3.3×10^{-2}
Nicotine addiction	2	3.4×10^{-2}

p-tau 蛋白含量来改善学习记忆功能。

7 Discovery Studio 分子对接验证网络药理学

Beta-sitosterol、stigmasterol、donepezil 和 GSK3 β 抑制剂的分子结构如图 2; 开心散活性成分与阿尔茨海默病蛋白受体的对接结果如表 7; 分子对接过程如图 3; LibDockscore 代表分子对接吻合度, 分数越高代表配体与受体蛋白结合性越好。分子对接结果表明, 开心散活性成分与 AchE 蛋白分子对接吻合度大于与 GSK3 β 蛋白分子对接吻合度, 网络药理学筛选结果中 AchE 蛋白的网络度也高于 GSK3 β 蛋白, 而且在富集分析中胆碱能通路排名也在 PI3K-Akt 信号

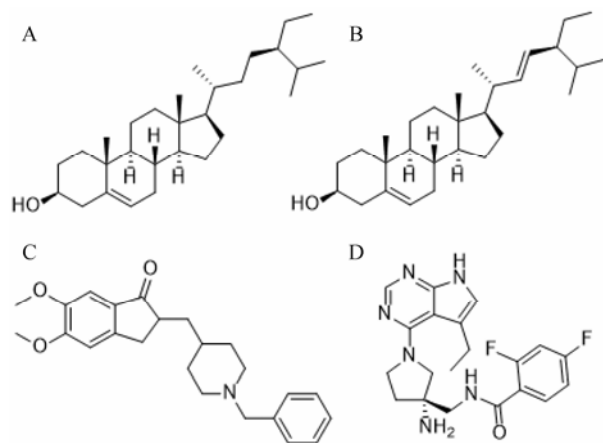


Figure 2 Chemical structures of beta-sitosterol (A), stigmasterol (B), donepezil (C) and GSK3 β inhibitor (D)

Table 7 Results of ligand-receptor protein molecular docking

Ligand	Receptor	LibDockscore
Donepezil	AchE (4EY7)	156.845
Stigmasterol	AchE (4EY7)	152.551
Beta-sitosterol	AchE (4EY7)	149.007
GSK3 β inhibitor	GSK3 β (3MVH)	137.723
Stigmasterol	GSK3 β (3MVH)	122.658
Beta-sitosterol	GSK3 β (3MVH)	119.696

通路之前, 该结果说明分子对接结果与网络药理学筛选结果一致, 用分子对接的方式验证了网络药理学的可靠性。但是开心散活性成分与阳性药盐酸多奈哌齐和 GSK3 β 抑制剂相比, 分子对接吻合度不如上市的阳性药物效果好。

讨论

通过网络药理学分析发现, COX2 和 AchE 是成分-靶点-疾病网络中网络度最好的靶点, 说明 COX2 和 AchE 可能是核心靶点。在动物实验中发现鼠模型脑中的 COX2 过度表达可促进 A β 的产生从而出现记忆能力衰退^[27]。乙酰胆碱 (Ach) 是胆碱能传导通路重要的神经递质。AchE 是 Ach 水解酶, 研究表明^[28]在 AD 患者大脑中 Ach 含量降低, 则表现为 AchE 活性增高。参芪醒脑方可通过降低脑内 AchE 的含量来治疗阿尔茨海默病^[29]。开心散也可以通过抑制 GSK3 β 防止 tau 蛋白过度磷酸化, 通过 CHRNA7 多态性调节突触前神经递质的释放和胆碱能神经传递等多途径治疗 AD。反向药效团匹配结果表明: beta-sitarone、onjixanthone I、perlolryne、dehydroeburicoic acid、beta-sitosterol 等 16 个活性成分与 COX2 对接, 预测该 16 个活性成分通过减少 COX2 的释放, 减轻炎症反应治疗 AD; α -spinasterol、onjixanthone I、ergosterol peroxide、deoxyharringtonine、stigmasterol 等活性成分与 AchE 和胆碱能受体相互作用, 预测可能通过胆碱能信号通路治疗 AD; beta-sitosterol、suchilactone、fumarine、inermin、frutinone A、girinimbin 等成分与 GSK3 β 对接, 预测其可能抑制 tau 蛋白过度磷酸化, 减少 A β 沉积治疗 AD。

通过 GO 功能和 KEGG 富集分析发现, 开心散治疗阿尔茨海默病主要通过胆碱能突触信号通路, 可能降低乙酰胆碱酯酶活性, 也可能作用于 CHRM1 和

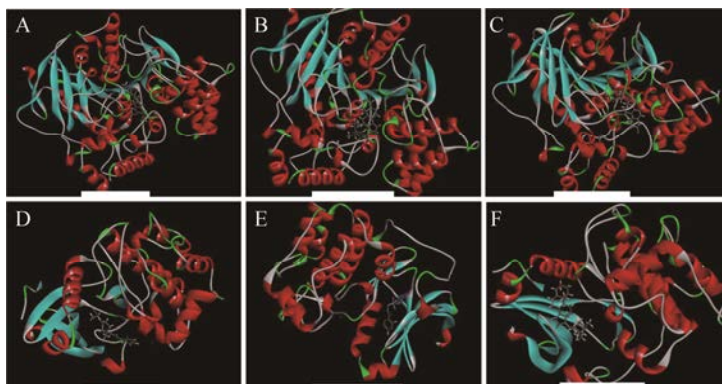


Figure 3 Results of molecular docking. A: Donepezil and AchE; B: Stigmasterol and AchE; C: Beta-sitosterol and AchE; D: GSK3 β inhibitor and GSK3 β ; E: Stigmasterol and GSK3 β ; F: Beta-sitosterol and GSK3 β

CHRM2 胆碱能受体和 CHRNA7 来治疗 AD。同时 GSK3 β 与 PI3K-Akt 信号通路有关, Qi 等^[30]发现, 温郁挥发油通过 PI3K-Akt 信号通路, 降低 AD 模型小鼠脑内 tau 蛋白磷酸化发挥抗 AD 的疗效。因此, 开心散可能通过 PI3K-Akt 信号通路抑制 tau 蛋白过度磷酸化治疗 AD。钙信号通路在 AD 发病进展中有重要作用, A β 沉积导致神经元钙离子浓度升高, 引发神经元凋亡而使记忆下降, 因此平衡钙离子浓度稳定治疗 AD 具有研究意义^[31]。

结论

本研究基于网络药理学方法对开心散治疗阿尔茨海默病的活性成分和作用机制进行了分析, 并通过 Discovery Studio 分子对接软件验证开心散活性成分与重要靶点之间存在较好的结合活性, 验证了网络药理学预测靶点的可靠性。建立成分-靶点-疾病网络图发现, 开心散中三萜类化合物、吡啶酮类化合物、挥发油类化合物和甾类化合物等药效成分可能通过减轻炎症反应, 降低乙酰胆碱酯酶活性, 通过 PI3K-Akt 信号通路抑制 tau 蛋白过度磷酸化, 稳定钙离子浓度减少神经元凋亡而发挥治疗 AD 的作用, 说明中药多成分-多靶点-多通路治疗疾病, 为发病机制复杂的阿尔茨海默病提供了研究方向。

References

- [1] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 741-766.
- [2] Yang L, Chai Y, Fang F, et al. The pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Yunnan J Trad Chin Med Mat Med* (云南中医中药杂志), 2014, 35: 88-90.
- [3] Wang TT. Kaixinsan Ingredients on Behalf of BDNF Signal Transduction Pathways Activated Drug-Confirm Network Target (开心散代表性成分激活 CREB-BDNF 信号转导通路的药物—网络靶标研究) [D]. Beijing: School of Military Medicine, PLA General Hospital, PLA Medical College, 2014.
- [4] Shang CM, Zhao ML. Influence of ginsenoside-Rg2 on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice and its mechanism [J]. *J Pract Diagn Ther* (中华实用诊断与治疗杂志), 2017, 31: 444-447.
- [5] Li FR, Chou LL, Fan XT. Experimental studies on effects of EEPF on learning and memory dysfunctions [J]. *J Beihua Univ* (北华大学学报), 2011, 12: 172-176.
- [6] Ma YX, Li GY, Liu J, et al. Effect of β -asarone on synaptic plasticity of hippocampal neurons in rats with Alzheimer's disease [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2017, 38: 1489-1492.
- [7] Hopkins AL. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1110-1111.
- [8] Pang XC, Liu AL, Du GH. Review on the application of drug target database [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2014, 49: 1969-1972.
- [9] Ru JL. Construction and Utilization of Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015.
- [10] Zheng C, Pei T, Huang C, et al. A novel systems pharmacology platform to dissect action mechanisms of traditional Chinese medicines for bovine viral diarrhea disease [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 94: 33-45.
- [11] Qin W, Ho L, Pompl PN, et al. Cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 potentiate β -amyloid peptide generation through mechanisms that involve γ -secretase activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 50970-50977.
- [12] Um HS, Kang EB, Koo JH, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Res*, 2011, 69: 161-173.
- [13] Gao Y, Gao L, Gao XX, et al. An exploration in the action targets for antidepressant bioactive components of Xiaoyaosan based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50: 1589-1595.
- [14] Zhang WJ, Wang YH. The theory and methods of systems pharmacology and its application in traditional Chinese medicine [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2015, 10: 280-286.
- [15] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4: 44.
- [16] Li ZQ. Effects of Modified Kaixin Powder on Behavior and Acetylcholine Esterase Mrna in Vascular Dementia Rat. MS Thesis (开心散加减对血管性痴呆大鼠行为学和 AchE mRNA 的影响) [D]. Guangzhou: Ji'nan University, 2007.
- [17] Zhang JJ, Meng FX, Ma T, et al. Protective effect of Tianqi Yizhi granule on inflammatory reaction in rats with Alzheimer's disease [J]. *Glob Tradit Chin Med* (环球中医药), 2017, 10: 688-691.
- [18] Bao J, Wang GX. Mechanism of COX-2/PGE-2 and IL-6 in Wnt/ β -catenin-bone metabolism signaling pathway [J]. *Chin J Sports Med* (中国运动医学杂志), 2012, 31: 76-81.
- [19] Wang JJ, Tian Q. Excessive phosphorylation of Tau protein and its role in neuronal degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2012, 39: 771-777.
- [20] Ancin I, Barabash A, Vázquez-Álvarez B, et al. Evidence

- for association of the non-duplicated region of CHRNA7 gene with bipolar disorder but not with schizophrenia [J]. *Psychiatr Genet*, 2010, 20: 289–297.
- [21] Braga IL, Silva PN, Furuya TK, et al. Effect of APOE and CHRNA7 genotypes on the cognitive response to cholinesterase inhibitor treatment at different stages of Alzheimer's disease [J]. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2015, 30: 139–144.
- [22] Joo EJ, Lee KY, Kim HS, et al. Genetic association study of the alpha 7 nicotinic receptor (CHRNA7) with the development of schizophrenia and bipolar disorder in Korean population [J]. *Psychiatr Investig*, 2010, 7: 196–201.
- [23] Fang LQ, Xu JJ, Fu SB. Toxic effects of amyloid- β peptides on cholinergic synapses in transgenic *Drosophila* models of Alzheimer's disease [J]. *J Int Neurol Neurosurg (国际神经病学神经外科学杂志)*, 2013, 4: 299–303.
- [24] Wang XL, Deng YX, Guan ZZ, et al. Effects of $\alpha 7$ neurotype nicotine receptor on synaptic function and calcium signaling pathway and neuroprotective mechanism in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropharmacol (神经药理学报)*, 2018, 8: 35–37.
- [25] Yin G. PI3K/Akt Signaling Pathway in Alzheimer's Disease (PI3K/Akt 信号通路在 AD 发病中的作用) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
- [26] Li MH. The Pharmacological Action and Mechanism of Six Kaixinsan Prescriptions on Alzheimer's Disease (6 首开心散类方对阿尔茨海默症的药理作用及机制初探) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [27] Sheng T. Drug-likeness Analysis on the Compounds in Traditional Chinese Medicines [C]. Summary of the 14th Session of the 28th Annual Academic Meeting of the Chinese Chemical Society (中国化学会第 28 届学术年会第 14 分会场摘要集). Chengdu: Chinese Chemical Society, 2012: 23.
- [28] Kwakowsky A, Milne MR, Waldvogel HJ, et al. Effect of estradiol on neurotrophin receptors in basal forebrain cholinergic neurons: relevance for Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: E2122.
- [29] Jia XY, Zhang L, Luo Y. Effects of shenqi xingnao prescription on learning and memory ability, contents of choline acetyltransferase and acetylcholine esterase in brain tissue of mice models with Alzheimer disease [J]. *Chin J Inf Tredit Chin Med (中国中医药信息杂志)*, 2018, 25: 56–61.
- [30] Qi Y, Qin WY, Kang K, et al. Effects of Wenyujin essential oil on tau protein phosphorylation in mice with $A\beta$ -induced Alzheimer disease through PI3k/Akt pathway [J]. *Chin J Inf Tredit Chin Med (中国中医药信息杂志)*, 2017, 24: 45–48.
- [31] Lu BL, Li WW, Zhou J. Progress in calcium signaling and Alzheimer's disease research [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2017, 37: 104.