

复方苳蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学研究

王旭, 姚璇, 马素亚, 时晶(北京中医药大学东直门医院脑病三科, 北京 100700)

摘要: **目的** 利用网络药理学技术研究复方苳蓉益智胶囊(CCYC)治疗阿尔茨海默病(AD)的潜在作用机制。**方法** 利用 TCMSP、BATMAN-TCM 数据库、TCMID 数据库、化学专业数据库查找复方苳蓉益智胶囊中 5 味中药的化学成分并进行活性成分筛选; 利用 SwissTargetPrediction 数据库获取活性成分的作用靶点, 搜索 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库结合文献查找获取阿尔茨海默病的疾病靶点。取活性成分靶点和阿尔茨海默病疾病靶点的交集, 得到复方苳蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点。利用 String 数据库构建蛋白质-蛋白质互作网络。采用 Metascape 平台进行靶点 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 通过 Cytoscape 3.7.1 软件构建“单味药-关键成分-靶点-通路”网络并进行分析。**结果** 肉苳蓉含有最多的关键成分, 荷叶有最多的潜在靶点。APP、MAPK1、MAPK3、ESR2、ESR1、EGFR、DRD2、ACHE 可能是复方苳蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的重要靶点, 涉及的主要通路和过程主要包括神经递质受体活性、神经递质水平调控、多巴胺能突触、胆碱能突触等。**结论** 肉苳蓉和荷叶在复方苳蓉益智胶囊复方中占主要地位, 复方苳蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的机制可能是减少 A β 的产生及 tau 蛋白形成、调节雌激素受体及表皮生长因子受体、调控多巴胺能及胆碱能系统。

关键词: 复方苳蓉益智胶囊; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 靶点; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)02-0172-10

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.02.004

Network Pharmacological Study on Mechanism of Compound *Congrong Yizhi* Capsule in Treatment of Alzheimer's Disease

WANG Xu, YAO Xuan, MA Suya, SHI Jing(The Third Department of Encephalopathy, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: **Objective** To study the potential mechanism of Compound *Congrong Yizhi* Capsule (CCYC) in the treatment of Alzheimer's disease (AD) by using network pharmacology. **Methods** The compounds in five traditional Chinese medicines of CCYC were searched from TCMSP, BATMAN-TCM, TCMID and Chemical Database, and then the active compounds were screened. The SwissTargetPrediction database was used to obtain the targets of the active compounds. The targets of AD were searched from GeneCards, OMIM and TTD database besides published literature. Potential targets of CCYC to treat AD were obtained by taking the intersection of active compound targets and AD disease targets. A protein-protein interaction (PPI) network was built by the String database. The gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment were carried out on the Metascape platform, and the drugs-key compounds-targets-pathways network was constructed and analyzed through Cytoscape 3.7.1 software. **Results** Cistanche deserticola had the most key compounds and lotus leaf had the most potential targets. APP, MAPK1, MAPK3, ESR2, ESR1, EGFR, DRD2 and AChE may be the important targets of CCYC in the treatment of AD. The pathways and processes involved mainly include neurotransmitter receptor activity, neurotransmitter level regulation, dopaminergic synapse, cholinergic synapse,

收稿日期: 2020-08-28

作者简介: 王旭, 女, 博士研究生, 研究方向: 神经变性病的中医药防治。Email: 714430532@qq.com。通信作者: 时晶, 女, 教授, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 神经变性病的中医药防治。Email: sshijing87@163.com。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金支持项目(2019-JYB-TD-007、2019-JYB-JS-066); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0810); 中医药传承与创新“百千万”人才工程项目(岐黄工程)岐黄学者项目。

etc. **Conclusion** Cistanche deserticola and lotus leaf play a vital important role in CCYC. The mechanism of CCYC in the treatment of AD may be related to reduce A β production and tau protein formation, regulate estrogen receptor and epidermal growth factor receptor, and regulate dopaminergic and cholinergic systems.

Keywords: Compound *Congrong Yizhi* Capsule; Alzheimer's disease; network pharmacology; targets; mechanism

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,记忆力下降是其最常见的症状,涉及多个认知领域的损害^[1]。阿尔茨海默病的发病机制非常复杂,目前相关假说包括胆碱能假说、淀粉样 β 蛋白(A β)假说、Tau 蛋白假说、兴奋性毒性假说、氧化应激假说、载脂蛋白 E(ApoE)假说、CREB 信号通路、3 型糖尿病假说等^[2]。迄今为止美国食品与药品管理局仅批准了 5 种药物用于阿尔茨海默病的治疗,包括 4 种胆碱酯酶抑制剂(他克林,多奈哌齐,卡巴拉汀,加兰他敏)和一种 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(美金刚)^[3]。但以上药物只能改善阿尔茨海默病的临床症状,不能阻止或逆转疾病的进展^[4],仍需要探索预防及延缓其发病、减缓其进展或改善阿尔茨海默病症状的药物。

复方苁蓉益智胶囊是王永炎院士研发的复方中成药,用于轻、中度血管性痴呆肝肾亏虚兼痰瘀阻络证,现已广泛应用于临床^[5]。复方苁蓉益智胶囊由肉苁蓉、制首乌、荷叶、漏芦、地龙 5 味中药组成,具有益智养肝,活血化浊,健脑增智的功效。将复方苁蓉益智胶囊用于阿尔茨海默病所致的认知功能障碍也具有一定的疗效^[6]。

网络药理学是一门新兴的药理学分支学科,通过检索网络数据库,构建“药物-靶点-疾病”网络关系,从整体层次来预测药物治疗疾病的作用机制^[7-8]。网络药理学与中医药的整体观念及中药方剂的多组分、多靶点有许多相似之处,为研究中药复方的作用机制和药效物质基础提供了全新的视角和解决方案。现用网络药理学的方法,挖掘复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在作用机制,以期为其临床应用提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件 中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSp(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[9]; BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/index.php>)^[10]; TCMID 数据库(<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>)^[11]; 化学专业数据库([\[csdb.cn/scdb/default.asp\]\(http://csdb.cn/scdb/default.asp\)\)^{\[12\]}; PubChem 数据库\(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>\); SwissADME 数据库\(<http://www.swissadme.ch/>\)^{\[13\]}; SwissTargetPrediction 数据库\(<http://www.swisstargetprediction.ch/>\)^{\[14\]}; UniProt 数据库\(<http://www.uniprot.org/>\)^{\[15\]}; GeneCards 数据库\(<https://www.genecards.org/>\)^{\[16\]}; OMIM 数据库\(<http://www.omim.org/>\)^{\[17\]}; TTD 数据库\(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>\)^{\[18\]}; Cytoscape 软件\(Version 3.7.1\); String 数据库\(<https://string-db.org/>\); 微生信平台\(<http://www.bioinformatics.com.cn/>\); Metascape 平台\(<https://metascape.org/>\); ImageGP 平台\(<http://www.ehbio.com/ImageGP/>\)。](http://www.organchem.</p></div><div data-bbox=)

1.2 复方苁蓉益智胶囊化学成分收集及活性成分的筛选 从 TCMSp、BATMAN-TCM 数据库、TCMID 数据库、化学专业数据库中收集肉苁蓉、荷叶、漏芦、何首乌、地龙 5 味中药的化学成分,并从中国知网、Pubmed 数据库搜索文献加以补充。

药物的药代动力学特性包括吸收、分布、代谢和排泄(absorption、distribution、metabolism、excretion, ADME),是现代研发药物的重要参数^[19]。筛选具有良好 ADME 特性的活性成分对于开发抗阿尔茨海默病药物至关重要。

将化合物输入 PubChem 数据库搜索,得到标准 SMILES 并导入 SwissADME 数据库。评估 2 个与 ADME 相关的参数,GI (Gastrointestinal) 吸收和 Lipinski,以筛选出潜在的活性成分。筛选标准为: a. GI 吸收为“High”; b. Lipinski 为“Yes, 0 violation”。复方苁蓉益智胶囊为口服给药,主要通过胃肠道吸收,因此将 GI absorption 为“High”作为筛选标准一。Lipinski “5 规则”是根据化合物的理化性质判断类药性的一种方法,广泛应用于药物设计和药物筛选^[20],将此规则作为筛选标准二。

1.3 复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的靶点预测 将 ADME 筛选后的化合物的二维结构文件(.sdf)导入 SwissTargetPrediction 数据库,设置属性为“homo sapiens”,选择 Probability > 0 的预测靶点。使用 UniProt 数据库对目标靶点名称进行统一标准化,

得到基因名(gene symbol)。删除重复值后,最终得到活性成分的靶点。

以“Alzheimer”“Alzheimer disease”为关键词,挖掘 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库中潜在靶点,并在已发表的文献中检索美国 FDA 批准用于阿尔茨海默病的治疗的 5 种药物(他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏、美金刚)涉及的靶点。在 Genecards 数据库中, relevance score 值越高代表该靶点与疾病联系密切,设定 relevance score>10 的目标靶点为阿尔茨海默病的潜在靶点^[21]。合并 4 个疾病数据库以及文献搜索获得的靶点后,将所有靶点进入 uniprot 数据库统一为基因名(gene symbol),删除重复值得到阿尔茨海默病的靶点。用韦恩图取活性成分靶点和阿尔茨海默病疾病靶点的交集,得到复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点。

1.4 潜在靶点蛋白质-蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将上述得到的复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点输入到 String 数据库中,限定物种为人,最小相互作用阈值设置为“highest confidence”(> 0.9),获得 PPI 网络,并用 cytoscape 3.7.1 内置的 Network Analyzer 功能分析网络。利用 Metascape 平台对 PPI 网络进一步分析,应用分子复杂检测(MCODE)算法识别密集连接的网络模块。

1.5 潜在靶点 gene ontology (GO) 分析与 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 通路富集分析 将复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点录入 Metascape 平台,设置 $P < 0.01$,进行 GO 分析和 KEGG 通路分析,并对结果进行富集。保存数据结果并利用 ImageGP 平台对数据进行可视化。

1.6 单味药-关键成分-潜在靶点-通路网络的构建

根据活性成分靶点和疾病靶点的交集靶点,对所有活性成分进行进一步筛选,得到与潜在靶点有关联的化合物,称为“关键成分”。将单味药、关键成分、潜在靶点及 KEGG 通路富集分析的前 20 个集合进行数据处理,导入 Cytoscape 3.7.1 软件,构建单味药-关键成分-潜在靶点-通路网络,再利用 Cytoscape 3.7.1 内置的 Network Analyzer 功能分析网络拓扑参数,获得度(degree)、中介度(betweenness centrality)、紧密度(Closeness)等参数,并根据这些参数判断药物作用的核心靶点。

2 结果

2.1 复方苁蓉益智胶囊化学成分及活性成分 从数据库及文献中共收集到肉苁蓉化学成分 207 个、荷叶 117 个、漏芦 59 个、地龙 28 个、何首乌 25 个。经过 SwissADME 筛选后,符合筛选标准的成分中,肉苁蓉 64 个、荷叶 44 个、漏芦 19 个、地龙 20 个、何首乌 29 个。其中,肉苁蓉与地龙有 3 个共有成分,肉苁蓉与漏芦有 1 个共有成分。

2.2 复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点 得到活性成分靶点 942 个,阿尔茨海默病疾病靶点 1 543 个。将活性成分靶点与阿尔茨海默病靶点取交集,得到 207 个复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点,见图 1。

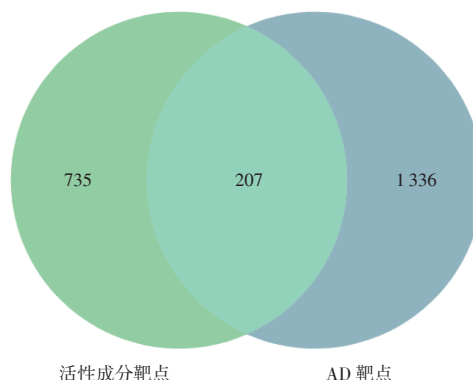


图 1 复方苁蓉益智胶囊活性成分靶点-阿尔茨海默病(AD)靶点韦恩图

Figure 1 Venn diagram of active compounds targets of CCYC-AD targets

2.3 潜在靶点 PPI 网络分析 将 207 个复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点导入 String 数据库中,得到 PPI 网络,隐藏 31 个网络中无连接的节点,见图 2。度表示连接到该节点的边的个数,平均局部聚类系数表示节点的聚集程度。该网络包含 176 个节点,752 条边,平均节点度值为 7.27,平均局部聚类系数为 0.49。说明每个靶点平均有 7.27 个靶点与之相连,且网络中各个靶点之间的关联性较强。利用 Cytoscape 3.7.1 内置的 Network Analyzer 功能分析网络,度值较大的靶点是 APP、MAPK1、MAPK3,分别为 51、32、30。

由于 PPI 网络及其复杂,可通过识别子网络或者模块(module)来分析,以显示特定的拓扑特征和功能特性。PPI 模块代表一组参与特定功能的蛋白质,如构成蛋白质复合体、参与代谢途径或信号转导系统^[22],可认为同个 module 之内的蛋白质相互作用更加紧密。图 3 利用 Metascape 平台对 PPI 网络进行分

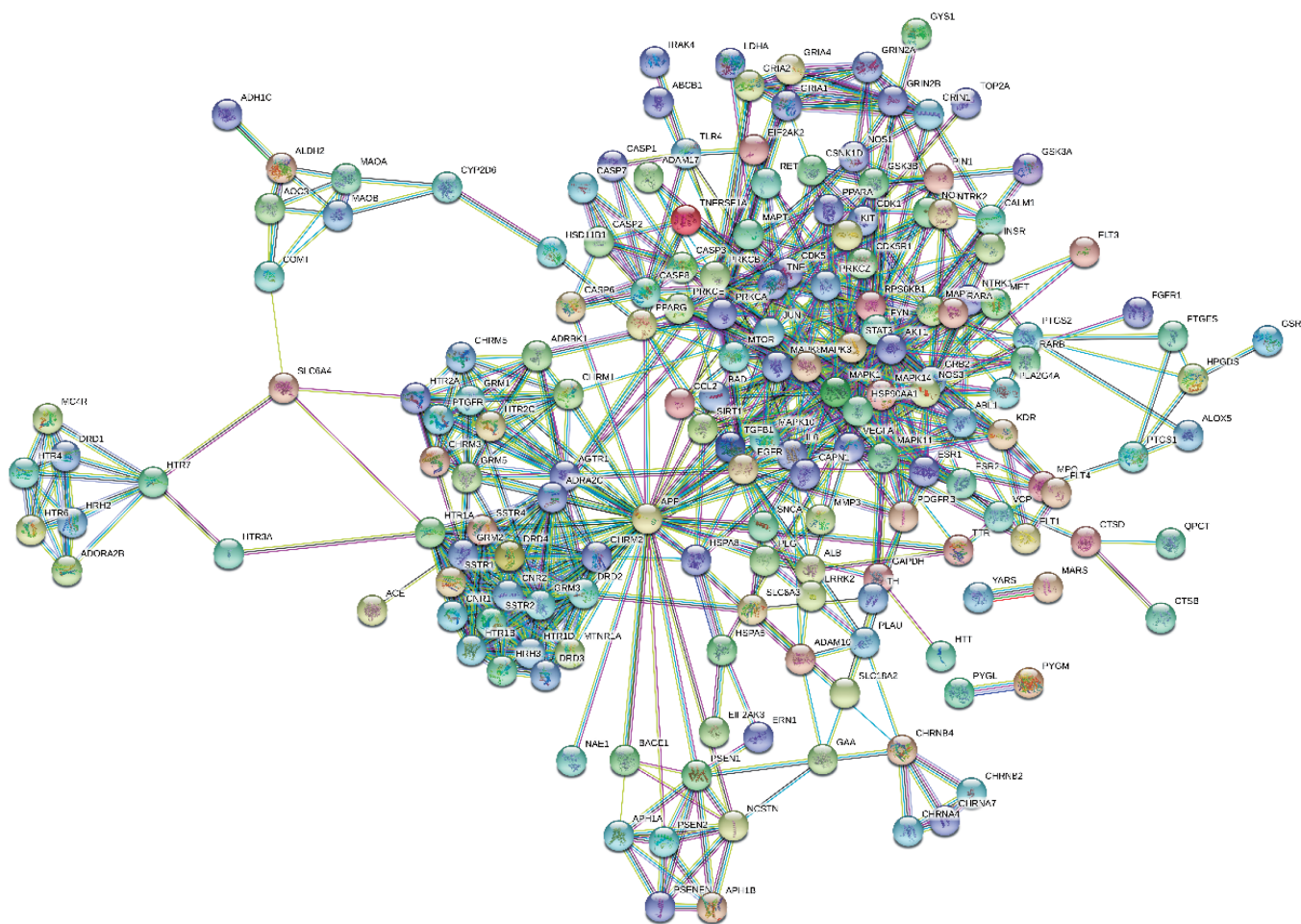


Figure 2 PPI network of potential targets of CCYC for treatment of AD

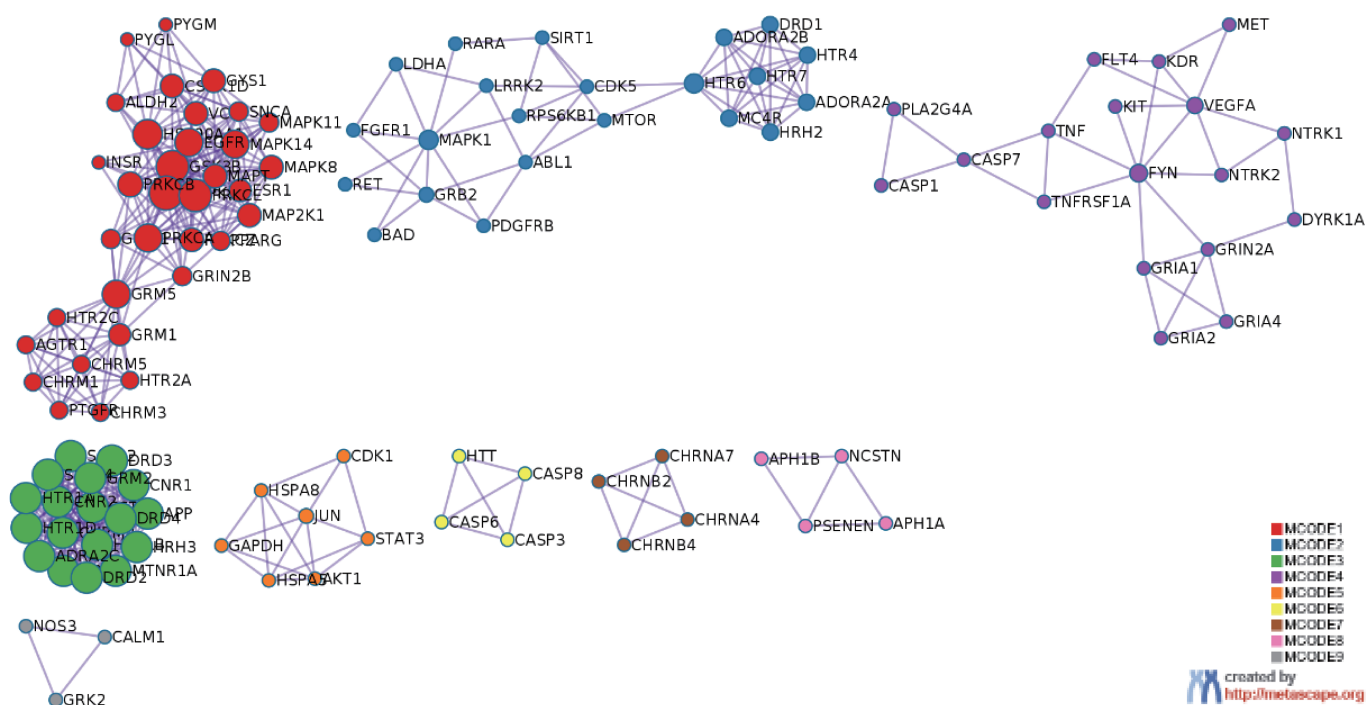


Figure 3 Modules in PPI network of CCYC for treatment of AD

析,应用分子复杂检测(MCODE)算法识别 PPI 网络内的模块。对每个模块进行通路和过程富集分析,对其进行功能进行描述。根据 P 值,保留 3 个最佳评分项描述相应模块的功能,见表 1。

表 1 PPI 网络模块功能

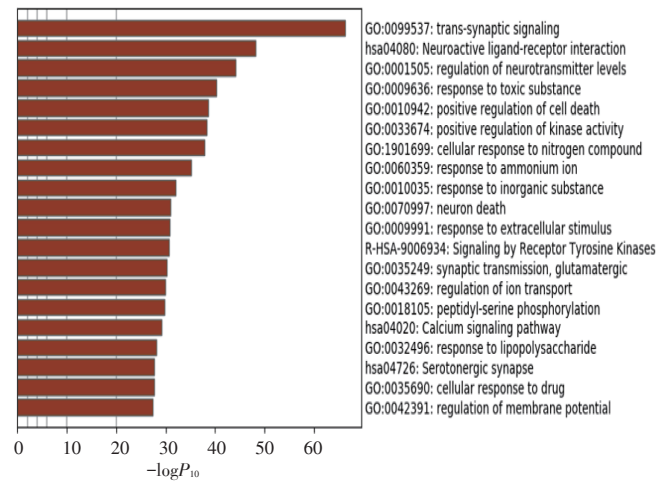
Table 1 Functions of PPI network modules

序号	模块	富集分析(GO)	描述	$-\log P_{10}$
1	MCODE_1	hsa04020	Calcium signaling pathway	-18.9
2	MCODE_1	R-HSA-416476	G alpha(q) signalling events	-17.9
3	MCODE_1	hsa04540	Gap junction	-16.5
4	MCODE_2	R-HSA-658195	Leishmania infection	-16.0
5	MCODE_2	GO:0007268	chemical synaptic transmission	-14.3
6	MCODE_2	GO:0098916	anterograde trans-synaptic signaling	-14.3
7	MCODE_3	GO:0007187	G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	-32.4
8	MCODE_3	hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	-32.0
9	MCODE_3	R-HSA-500792	GPCR ligand binding	-31.0
10	MCODE_4	GO:0018108	peptidyl-tyrosine phosphorylation	-15.6
11	MCODE_4	GO:0018212	peptidyl-tyrosine modification	-15.5
12	MCODE_4	hsa05014	Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)	-11.9
13	MCODE_5	hsa05169	Epstein-Barr virus infection	-9.1
14	MCODE_5	GO:0070997	neuron death	-7.9
15	MCODE_5	GO:0072594	establishment of protein localization to organelle	-6.9
16	MCODE_6	R-HSA-264870	Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	-9.4
17	MCODE_6	M197	PID HIV NEF PATHWAY	-8.0
18	MCODE_6	R-HSA-111465	Apoptotic cleavage of cellular proteins	-7.8
19	MCODE_7	R-HSA-629594	Highly calcium permeable postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors	-13.5
20	MCODE_7	R-HSA-622327	Postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors	-13.0
21	MCODE_7	R-HSA-181431	Acetylcholine binding and downstream events	-13.0
22	MCODE_8	GO:0035333	Notch receptor processing,ligand-dependent	-14.6
23	MCODE_8	R-HSA-017802	Noncanonical activation of NOTCH3	-14.3
24	MCODE_8	GO:0007220	Notch receptor processing	-13.8
25	MCODE_9	GO:0008016	regulation of heart contraction	-5.9
26	MCODE_9	GO:0090257	regulation of muscle system process	-5.9
27	MCODE_9	GO:0060047	heart contraction	-5.8

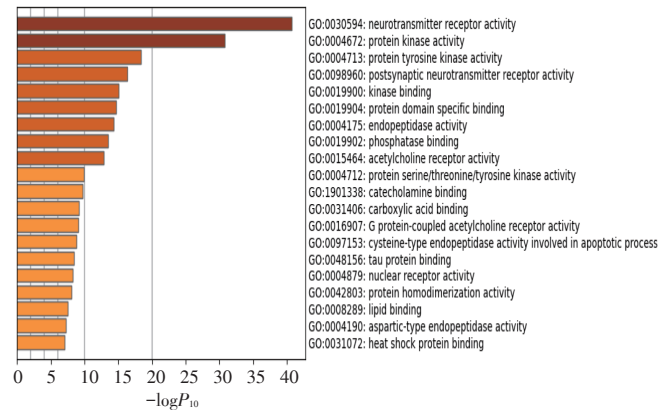
2.4 潜在靶点 GO 分析与 KEGG 通路富集分析

应用 Metascape 数据平台对复方苻蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点进行 GO 分析与 KEGG 通路富集分析,选择每个富集结果的前 20 条,见图 4、5。潜在靶点涉及的生物过程包括跨突触信号、神经活性配体-受体相互作用、神经递质水平调控等,涉及的分子功能包括神经递质受体活性、突触后神经递质活性、乙酰胆碱受体活性、tau 蛋白结合等,相关的细胞成分包括突触后、突触前、突触小泡、多巴胺能突触、胆碱能突触等,参与的通路包括神经活性配体-受体相互作用、阿尔茨海默病、5-羟色胺能突

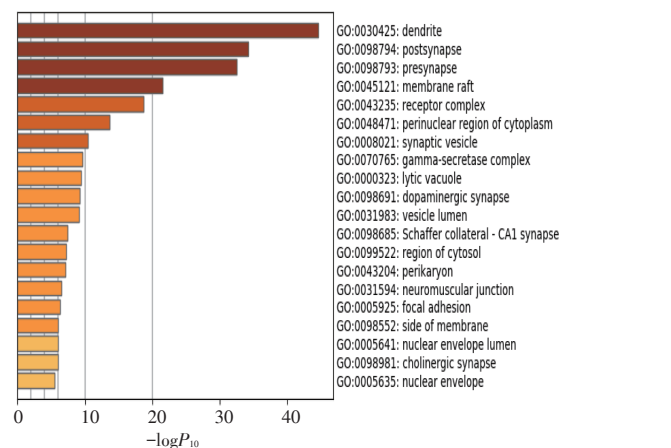
触、cAMP 信号通路、多巴胺能突触、胰岛素抵抗、谷氨酸能突触、胆碱能突触等。



a. GO 生物过程富集



b.GO 分子功能富集



c. GO 细胞组分富集

图 4 复方苻蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在靶点 GO 生物过程富集、GO 分子功能富集、GO 细胞组分富集

Figure 4 Biological process, molecular function and cellular component GO enrichment of CCYC for treatment of AD

2.5 单味药-关键成分-潜在靶点-通路网络 根据活性成分靶点和疾病靶点的 207 个交集靶点,对所有活性成分进行筛选,得到与潜在靶点有关联的化合

物，即关键成分 146 个，每味中药所含关键成份比例见图 6，每味中药所含潜在靶点比例见图 7。利用 Cytoscape 3.7.1 建立单味药-关键成分-潜在靶点-通路网络，见图 8，用内置的 Network Analyzer 功能分析网络拓扑参数。结果 146 个关键成分中有 98 个度值大于 5，占约 67%，提示大部分关键成分通过作用于多个靶点发挥药效，体现了中药多靶点的特点。介度表示节点出现在其他节点间最短路径中的比例，介度越高，代表在保持网络紧密连接性中节点越重要。紧密度衡量节点接近网络中心的程度，节

点到达各个节点的距离之和越短，紧密度越高，相应的节点更接近网络的中心。网络中热嗉碱 (rhazine)、荷叶碱 (nuciferine)、亚美罂粟碱 (armepavine)、O-去甲基荷叶碱 (O-nornuciferine)、北美鹅掌楸尼定碱 (lirinidine) 的度、介度、紧密度均较高，见表 2。潜在靶点 ESR2、ESR1、EGFR、DRD2、ACHE 在网络中的度、介度、紧密度较高，表明这些靶点可能是复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的主要靶点，SLC6A4、HTR2A、MAOA、HTR2C、GSK3B 也是相对重要的靶点，见表 3。

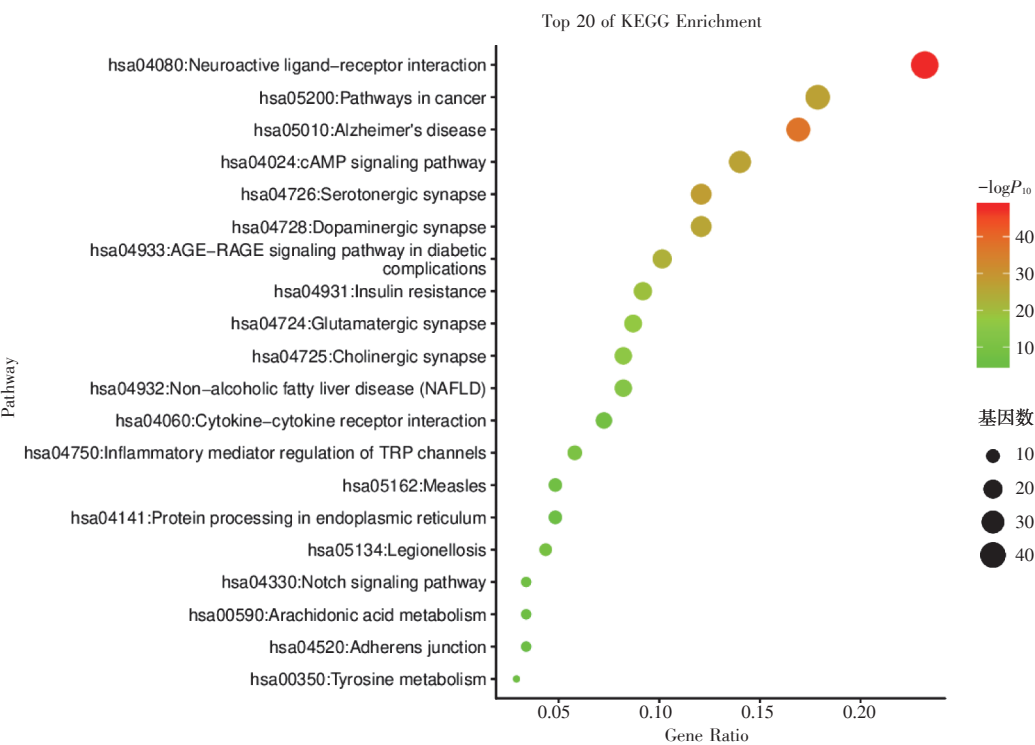


图 5 复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病潜在靶点 KEGG 通路富集分析前 20 项
Figure 5 Top 20 of KEGG pathway of CCYC for treatment of AD

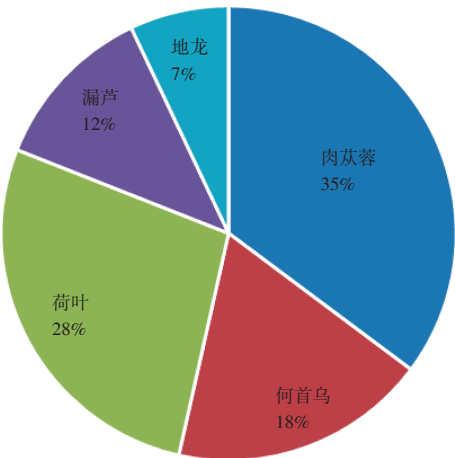


图 6 复方苁蓉益智胶囊 5 味中药关键成分比例
Figure 6 Proportion of key components of five traditional Chinese medicines in CCYC

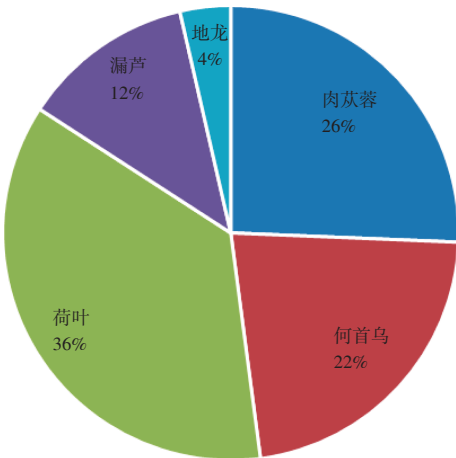
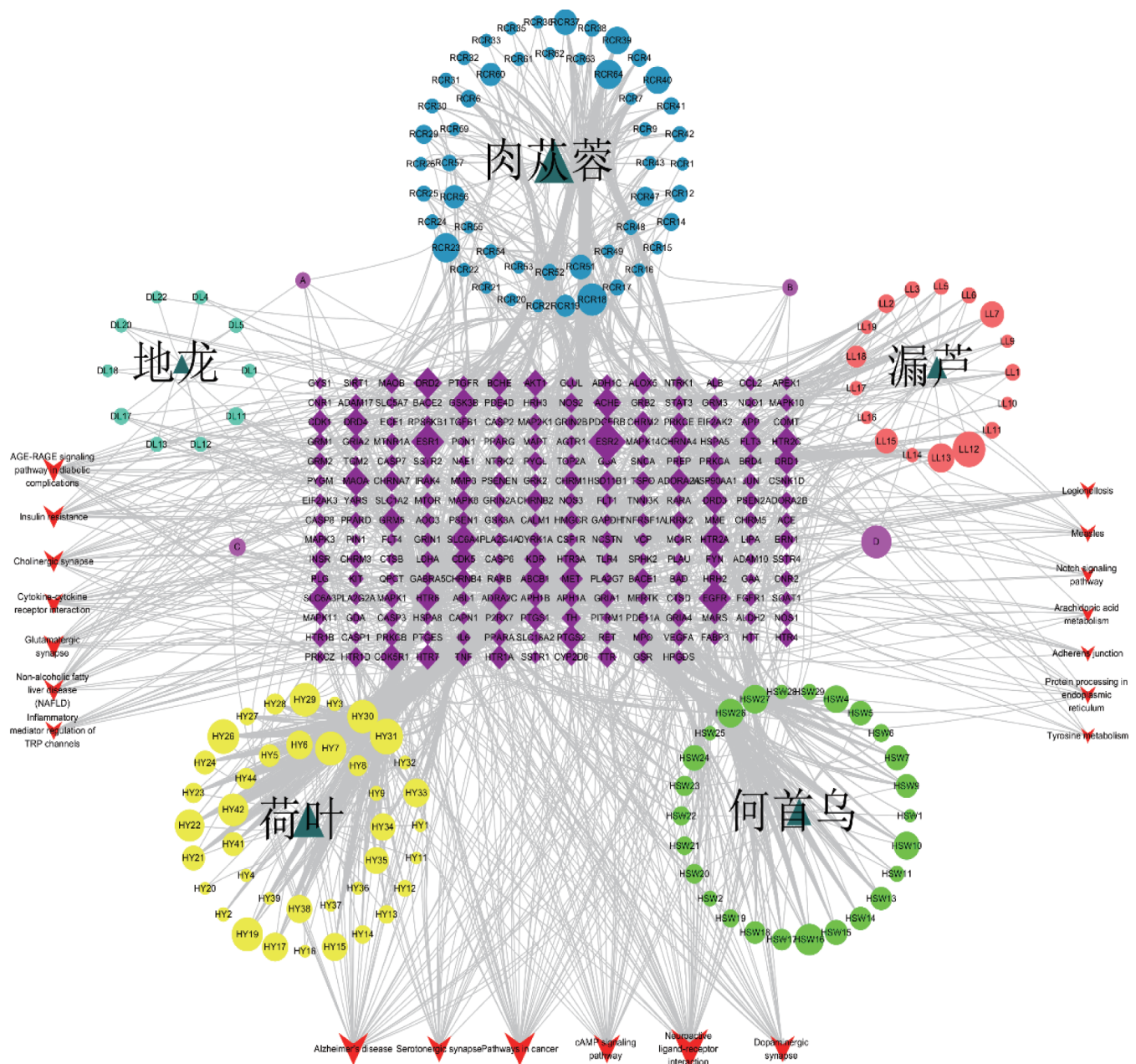


图 7 复方苁蓉益智胶囊 5 味中药潜在靶点比例
Figure 7 Proportion of potential targets of five traditional Chinese medicines in CCYC



注：三角形代表药物；圆形代表关键成分；菱形代表靶点；箭头形代表通路；图标越大代表度值越大

图 8 复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的药物-关键成分-靶点-通路网络图

Figure 8 Drugs-key compounds-targets-pathways network of CCYC for treatment of AD

表 2 复方苁蓉益智胶囊主要活性成分网络节点参数

Table 2 Network node parameters of main active compounds in CCYC

序号	来源	活性成分	度值	介度值	紧密度
1	漏芦	热嗒碱	41	0.036 454	0.393 528
2	荷叶	荷叶碱	41	0.016 460	0.389 463
3	荷叶	亚美罂粟碱	39	0.019 574	0.391 892
4	荷叶	O-去甲基荷叶碱	38	0.012 548	0.381 579
5	荷叶	北美鹅掌楸尼定碱	37	0.011 051	0.378 514

表 3 复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病主要靶点网络节点参数

Table 3 Network node parameters of main targets of CCYC to treat AD

序号	靶点	度值	介度值	紧密度	序号	靶点	度值	介度值	紧密度
1	ESR2	51	0.048 461	0.411 572	6	SLC6A4	32	0.016 996	0.368 164
2	ESR1	42	0.026 651	0.400 212	7	HTR2A	32	0.015 641	0.392 708
3	EGFR	41	0.048 004	0.416 115	8	MAOA	31	0.014 318	0.379 276
4	DRD2	34	0.017 129	0.394 351	9	HTR2C	30	0.015 268	0.388 660
5	ACHE	33	0.030 723	0.383 130	10	GSK3B	29	0.018 375	0.391 079

3 讨论

作为临床实践中最重要的补充和替代疗法之一, 中医药在治疗各种复杂疾病, 特别是慢性和非传染性疾病方面具有巨大的潜力^[23]。复方苳蓉益智胶囊用于阿尔茨海默病^[24]及血管性痴呆^[5]、脑白质疏松认知障碍^[25]、帕金森性痴呆^[26]等认知障碍的治疗, 具有与西药协同增效的优势, 体现了中西医联合治疗的优越性。

本研究对复方苳蓉胶囊的关键成分和潜在靶点在 5 味中药中的分布比例分析提示, 复方中肉苳蓉和荷叶在复方中占主要地位。而从配伍原则来看, 本复方以肉苳蓉和何首乌合用为君药。肉苳蓉味甘、咸, 性温, 入肾、大肠经, 《本草经疏》云“肉苳蓉, 滋肾补精之要药”。何首乌味甘、苦、涩, 性微温, 入肝、肾经, 《玉楸药解》曰“滋益肝血”。二药合用, 共奏补肾益精养血之功, 此乃治病之肾虚之本。网络药理学的视角和中医理论在复方苳蓉益智胶囊方剂配伍层面具有统一性。

从网络中筛选出了几个重要成分。热噤碱是一种生物碱^[27], 对热噤碱的研究较少, 本研究显示其对 41 个阿尔茨海默病靶点有作用, 在治疗阿尔茨海默病方面有潜力, 后续可对其药理作用进一步研究。荷叶碱(nuciferine)、O-去甲基荷叶碱(O-nornuciferine)、亚美罂粟碱(armepavine)、北美鹅掌楸尼定碱(lirinidine)是从荷叶中提取的生物碱, 是荷叶的主要活性成分^[28]。既往研究发现, 荷叶碱具有明显的抗炎活性^[29], 荷叶碱衍生物具有较高的抗乙酰胆碱酯酶活性^[30], 荷叶醇提取物对缺血脑组织具有抗自由基损伤的作用^[31], 可能对阿尔茨海默病有一定的治疗作用。

在 PPI 网络中, APP 是该网络的中心节点, 度值最大, MAPK1、MAPK3 也是度值较大的重要节点。对 PPI 的模块分别进行富集分析, 评分最高的是模块 3, 涉及 G 蛋白偶联受体信号通路(与 cAMP 第二信使偶联)、神经活性配体-受体相互作用。在药物-关键成分-靶点-通路网络中, 度、介度、紧密度较高的靶点有 ESR2、ESR1、EGFR、DRD2、ACHE, 这些靶点与关键成分及主要通路的联系较多且关联密切, 提示上述靶点及其参与的通路可能是复方苳蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在机制。

APP 即淀粉样 β 前体蛋白(amyloid beta precursor protein), β 淀粉样蛋白($A\beta$)的积累和老年斑/神经炎性斑块的形成是阿尔茨海默病的显著特征, 并广泛用于阿尔茨海默病的神经病理学诊断^[32]。 $A\beta$ 级联假说是关于阿尔茨海默病发病机制的重要假说之一,

该假说认为, $A\beta$ 沉积驱动 tau 蛋白磷酸化、缠结形成、突触丢失、神经元死亡和认知损害^[33]。正常情况下, β -分泌酶(BACE1)和 γ -分泌酶对 APP 的顺序切割产生 $A\beta$ 肽链。生理条件下, $A\beta$ 保持稳定水平, 是多种生理功能所必需的。在阿尔茨海默病中, 由于 APP 和(或)早老素(PSEN1 和 PSEN2)基因的突变, $A\beta$ 的产生增加^[32, 34]。在 PPI 网络中, APP 与 BACE1、PSEN1、PSEN2 相连, 提示复方苳蓉益智胶囊可能通过影响 $A\beta$ 的产生发挥抗阿尔茨海默病的作用。

MAPK1、MAPK3 基因编码 MAP 激酶家族的成员。MAP 激酶也称为细胞外信号调节激酶(ERK), 参与多种细胞过程, 是 tau 蛋白激酶的一种^[16]。微管是维持细胞完整性的关键因素之一, tau 蛋白在微管的稳定性中起着重要作用^[35]。在阿尔茨海默病中, tau 蛋白被过度磷酸化, 形成神经纤维缠结, 并失去了与脑细胞微管结合的韧性, 破坏了神经元的可塑性并导致神经退行性变^[36]。微管相关 tau 蛋白(MAPT)基因表达水平与阿尔茨海默病神经退行性严重程度有关, 并且与已知的 tau 激酶(CDK5, MAPK1/ERK2)以及细胞内(Ras-ERK)激活途径有关^[37]。推测复方苳蓉益智胶囊可能通过降低 MAPK 的表达减少 tau 蛋白的形成, 进而减轻神经退行性变的程度。在对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析的 20 类主要通路中, MAPK1、MAPK3 分别与 8 类通路有关, 是涉及最多主要通路的潜在靶点, 说明 MAPK1、MAPK3 是复方苳蓉益智胶囊发挥药效的重要靶点。

ESR2、ESR1 基因分别编码雌激素受体 β (ER β)、雌激素受体 α (ER α)。ESR1 基因变异与女性患阿尔茨海默病的风险增加有关^[38], 年龄相关的雌激素丢失是女性特有的阿尔茨海默病风险因素^[39]。雌激素可增加脑血流量, 充当抗炎药, 增强神经元突触的活性, 并对脑组织产生直接的神经保护作用 and 神经营养作用, 女性雌激素替代疗法可能会降低阿尔茨海默病的风险^[40]。复方苳蓉益智胶囊可能通过调节雌激素受体的表达及其下游效应产生疗效。

表皮生长因子受体(EGFR)是一种受体酪氨酸激酶, 在细胞黏附、增殖、迁移和凋亡等过程中发挥重要作用^[41], 具有神经保护作用, 其下调可能与阿尔茨海默病有关^[42]。EGFR 的功能也受到早老素 1(PSEN1)表达的影响^[43]。推测复方苳蓉益智胶囊可能通过调节 EGFR 及其上下游途径发挥神经保护作用。

多巴胺受体 D2(DRD2)是 G 蛋白偶联受体家族的成员, 参与运动、奖励、强化、记忆与学习的调节^[44]。海马 D2 受体在阿尔茨海默病的记忆和命名功

能中发挥作用^[45]，多巴胺能神经递质水平的降低与阿尔茨海默病的病理生理学有关^[46]。一些研究表明，多巴胺在突触可塑性机制中起主要作用^[47]，进行性突触紊乱、神经传递障碍和细胞丢失将进一步引起淀粉样蛋白、老年斑的细胞外沉积和细胞内的纤维缠结，从而诱发痴呆前症状，如活动减少，步态障碍和认知功能下降^[48]。乙酰胆碱(ACh)在突触间隙与其受体结合，在外周和中枢神经系统中起重要作用。突触丢失是阿尔茨海默病进展的主要相关因素^[49]。动物实验研究显示，复方苻蓉益智胶囊能增加血管性痴呆大鼠大脑皮层区多巴胺的含量，提高大鼠海马区ACh含量，而降低乙酰胆碱酯酶(AChE)含量，改善血管性痴呆大鼠海马神经元突触的超微结构^[50]，从而改善其学习记忆功能。可见，复方苻蓉益智胶囊可能通过作用于多巴胺能系统及胆碱能系统改善阿尔茨海默病患者的认知功能。

本研究基于网络药理学方法对复方苻蓉益智胶囊活性成分进行靶点预测和通路分析，通过建立“关键成分-靶点-通路”网络图，探索复方苻蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的潜在作用机制。研究结果表明肉苻蓉和荷叶在复方中占主要地位，复方苻蓉益智胶囊的同一化合物可作用于不同靶点，而同一靶点可调控不同的生物学过程及信号通路，具有多靶点、多通路联合作用的特点。这提示通过网络中的单个或多个重要靶点，可对整个网络进行调节，为临床运用复方苻蓉益智胶囊提供了科学依据，为后续进行药物临床疗效评价提供了可能的指标。

通过网络得到的重要活性成分主要是以荷叶碱为代表的生物碱，但对荷叶碱的药代动力学研究表明，其在体内的吸收相对较迅速，但吸收率较低，体内组织分布较为广泛，消除过程较迅速，生物利用度也较低^[51]。这提示在筛选化合物时，需要对化合物的药代动力学及类药性进行更严格的规定。然而，中药成分的含量、浓度对药效有影响，筛选活性成分时可能剔除了复方中含量高但胃肠道吸收较差的药物。此外，中药发挥疗效不是单一化学成分作用的简单相加，可能是一个由多种化学成分构成的药效组分群^[52]，所以从“关键成分-靶点-通路”网络中将每个化合物割裂开来分析是不够全面的。并且中药复方内多种化学成分可能会发生复杂的化学反应，产生新的衍生物或有效成分，网络药理学技术并未涉及这一部分。这些问题需要更先进的实验技术以及数据库、算法来不断完善，以对中药及复方的药效及作用机制进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] MCKHANN G M, KNOPMAN D S, CHERTKOW H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 263-269.
- [2] SHARMA P, SRIVASTAVA P, SETH A, et al. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 174: 53-89.
- [3] CACABELOS R, TEJIDO O, CARRIL J C. Can cloud-based tools accelerate Alzheimer's disease drug discovery?[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(3): 215-223.
- [4] 王晓珍, 王蓉. 阿尔茨海默病的药物治疗及研发进展[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(24): 2960-2964.
- [5] 苟金, 杨昊昕, 于姚, 等. 复方苻蓉益智胶囊治疗血管性认知障碍的疗效和安全性系统评价及Meta分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(8): 1924-1932.
- [6] 王水洪. 复方苻蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病34例临床观察[J]. *浙江中医杂志*, 2015, 50(5): 386-387.
- [7] 时悦, 姚璿珈, 蒯莹, 等. 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[J]. *药学报*, 2018, 53(9): 1458-1466.
- [8] 曾端, 李利民, 金宇, 等. 基于网络药理学研究芍药防治老年痴呆的作用机制[A]. 中国中西医结合学会第八届虚证与老年医学专业委员会. 中国中西医结合学会第八届虚证与老年医学专业委员会、中国老年学和老年医学学会中西医结合分会、江苏省中医药学会老年医学专业委员会2019年学术年会论文集[C]. 中国中西医结合学会第八届虚证与老年医学专业委员会: 中国中西医结合学会, 2019: 8.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.
- [10] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a Bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 21146.
- [11] XUE R, FANG Z, ZHANG M, et al. TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic acids research*, 2013, 41(Database issue): D1089-D1095.
- [12] 中国科学院上海有机化学研究所. 化学专业数据库[DB/OL]. <http://www.orgchem.csdb.cn>.
- [13] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 42717.
- [14] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTarget Prediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [15] Uniprot Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [16] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards Suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1-30.

- [17] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online mendelian inheritance in man (omim®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789–D798.
- [18] CHEN X, JI Z L, CHEN Y Z. TTD: Therapeutic Target Database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 412–415.
- [19] DAINA A, ZOETE V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules[J]. *ChemMed Chem*, 2016, 11(11): 1117–1121.
- [20] 杨二冰, 李正名. 药物分子设计中的Lipinski规则[J]. *化学通报*, 2006(1): 16–19.
- [21] LI H, ZHANG X, GU L, et al. Network pharmacology study of heat-clearing and detoxifying Traditional Chinese Medicine for Alzheimer's Disease[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 7831675.
- [22] VELLA D, MARINI S, VITALI F, et al. MTGO: PPI network analysis via topological and functional module identification[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5499.
- [23] LI S, HU Y. Network Pharmacology: An approach to the analysis of complex systems underlying Traditional Chinese Medicine[J]. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 4(4): 135–136.
- [24] 李紫丞, 王艳华. 复方苳蓉益智胶囊联合多奈哌齐对阿尔兹海默病的疗效[J]. *河南医学研究*, 2020, 29(5): 873–874.
- [25] 宋秀娟, 林永坚, 王丽娜, 等. 奥拉西坦联合复方苳蓉益智胶囊治疗脑白质疏松认知障碍的临床效果观察[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(2): 184–189.
- [26] 吴晶晶, 张临洪. 苳蓉益智胶囊治疗帕金森性痴呆的临床研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 158–160.
- [27] MARKEY S, BIEMANN K. Isolation of rhazidine and akuamidine from *aspidosperma quebracho blanco*. The structure of rhazidine[J]. *Tetrahedron Lett*, 1967, 2: 157–160.
- [28] 杨菲, 徐新, 唐良秋, 等. 荷叶生物碱的研究进展[J]. *现代医院*, 2012, 12(6): 93–94.
- [29] CHEN X, ZHENG X, ZHANG M, et al. Nuciferine alleviates LPS-induced mastitis in mice via suppressing the TLR4–NF- κ B signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11–12): 903–911.
- [30] 宋柱文. 薄层色谱生物自显影新方法的建立及荷叶碱衍生物抗乙酰胆碱酯酶活性评价[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2011.
- [31] 张燕, 李俊. 荷叶醇提取物对脑缺血再灌注抗氧化作用的实验研究[J]. *食品与药品*, 2012, 14(1): 29–31.
- [32] WANG D S, DICKSON D W, MALTER J S. beta-amyloid degradation and Alzheimer's disease[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2006(3): 58406.
- [33] PANZA F, LOZUPONE M, SERIPA D, et al. Amyloid- β immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot?[J]. *Ann Neurol*, 2019, 85(3): 303–315.
- [34] EVIN G, WEIDEMANN A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides[J]. *Peptides*, 2002, 23(7): 1285–1297.
- [35] KADAVATH H, HOFER R V, BERNAT J, et al. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(24): 7501–7506.
- [36] ŠIMIĆ G, BABIĆ L M, WRAY S, et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's Disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies[J]. *Biomolecules*, 2016, 6(1): 6.
- [37] GROTHE M J, SEPULCRE J, GONZALEZ-ESCAMILLA G, et al. Molecular properties underlying regional vulnerability to Alzheimer's disease pathology[J]. *Brain*, 2018, 141(9): 2755–2771.
- [38] PIRSKANEN M, HILTUNEN M, MANNERMAA A, et al. Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women[J]. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13(9): 1000–1006.
- [39] RYAN J, CARRIÈRE I, CARCAILLON L, et al. Estrogen receptor polymorphisms and incident dementia: the prospective 3C study[J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1): 27–35.
- [40] SHEPHERD J E. Effects of estrogen on cognition mood, and degenerative brain diseases[J]. *J Am Pharm Assoc (Wash)*, 2001, 41(2): 221–228.
- [41] KARGBO R B. Treatment of cancer and Alzheimer's Disease by PROTAC degradation of EGFR[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 10(8): 1098–1099.
- [42] SHAFI O. Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16(1): 236.
- [43] LIU Q F, JEONG H, LEE J H, et al. Coriandrum sativum suppresses A β 42-induced ROS increases, Glial cell proliferation, and ERK activation[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(7): 1325–1347.
- [44] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The genecards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1–30.
- [45] KEMPPAINEN N, LAINE M, LAAKSO M P, et al. Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(1): 149–154.
- [46] PAN X, KAMINGA A C, WEN S W, et al. Dopamine and dopamine receptors in Alzheimer's Disease: A systematic review and network meta-analysis[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 175.
- [47] HAGENA H, MANAHAN-VAUGHAN D. Dopamine D1/D5, But not D2/D3, receptor dependency of synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses that is enabled by patterned afferent stimulation, or spatial learning[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2016, 8: 31.
- [48] MATTSOON N, ANDREASSON U, ZETTERBERG H, et al. Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with alzheimer disease[J]. *JAMA Neurol*, 2017, 74(5): 557–566.
- [49] FERREIRA-VIEIRA T H, GUIMARAES I M, Silva F R, et al. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(1): 101–115.
- [50] 彭艳. 加味益气聪明汤对VD大鼠海马神经元突触可塑性的影响[D]. 泸州: 四川医科大学, 2015.
- [51] 欧焕芳, 葛建, 林芳, 等. 荷叶碱的药物动力学特征及对代谢性疾病药理活性研究进展[J]. *海峡药学*, 2020, 32(2): 1–4.
- [52] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望[J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2232–2237.

(编辑: 修春)