

基于网络药理学探讨复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病的机制研究

姚凤红¹, 杨福生², 苗阳³

(1. 北京市中关村医院 神经内科, 北京 100190; 2. 北京市中关村医院 医务科;
3. 中国中医科学院西苑医院 心内科)

摘要:目的:采用网络药理学的方法对复方苁蓉益智胶囊的主要活性成分、作用靶点、信号通路及对阿尔茨海默病的作用进行关联性探讨,预测该药在阿尔茨海默病治疗中的分子作用机制。方法:从中药系统药理学数据库(TCMSP, <http://www.tcmssp.com/tcmssp.php>)检索复方苁蓉益智胶囊的中药成分(荷叶、肉苁蓉和漏芦)及从文献中获得制首乌的化学成分,并从OMIM数据库获取阿尔茨海默病靶基因,在STRING数据库构建核心化合物-靶点网络,使用CytoscapeV 3.7.2对STRING的PPI进行分析。结果:TCMSP数据库筛选出24个化合物。制何首乌文献中获得10个化合物,一共入组34个化合物。通过TCMSP和SwissTargetPrediction数据库获得34种活性化合物潜在靶标438个。与AD相关的182个靶基因进行比对交集后,最终获得了23个交集基因,经GO富集分析和KEGG通路富集分析,筛选出34种核心组分、23个疾病相关靶点和排名前20条KEGG通路富集。结论:复方苁蓉益智胶囊治疗阿尔茨海默病主要通过调节神经递质水平、AGE-RAGE信号通路(KEGG),参与抗炎抗氧化、神经保护等作用,为阿尔茨海默病的临床治疗提供了科学依据。

关键词:复方苁蓉益智胶囊;阿尔茨海默病;网络药理学;核心组分;靶点

中图分类号: R742

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)02-0180-04

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中引起痴呆最常见的疾病,临床上表现为近期记忆的减退,常常伴有行为、定向力和判断等多种功能障碍,且进行性加重,晚期会影响日常生活功能,出现严重的失能及失智。主要病理改变为大脑皮质和海马等处的以 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)为核心的细胞外老年斑(senile plaques, SP)和以异常磷酸化的Tau蛋白为核心的细胞内神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT),同时还伴有神经元和突触的丢失等^[1]。根据国际AD协会报道,预计到2050年全球AD患者将达到1.15亿^[2]。

目前临床上治疗AD的药物主要是乙酰胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂、脑-肠轴调节的国产新药甘露特纳、Ca²⁺通道抑制剂及石杉碱甲。石杉碱甲作为我国的传统药物,近年来中药成分的研究取得了显著的成效,在治疗阿尔茨海默病方面发挥着越来越重要的作用。复方苁蓉益智胶囊是王永炎院士通过多年临床实践基础上研发的,在北京、天津等多家医院对AD患者治疗后发现该中成药能够改患者^[3-5]认知功能。

本研究采用网络药理学的活性成分-作用靶点-通路-疾病网络研究思路,探讨复方苁蓉益智胶囊核心组分与AD之间可能存在的相互关系,进一步阐明该中成药抗阿尔茨海默病的作用机制。

1 资料与方法

1.1 复方苁蓉益智胶囊主要化学成分的获取

从中药系统药理学数据库^[5](TCMSP, <http://www.tcmssp.com/tcmssp.php>)中检索复方苁蓉益智胶囊的中药成分,该数据库可获得荷叶、肉苁蓉和漏芦这3种药物的成分信息,其中制何首乌从已经发表的CNKI文献^[6]和硕博学位论文数据库^[7]中查询其主要的化学成分。地龙属于动物类药,由于其为异源蛋白,本研究舍弃了此种药物成分的分析。

1.2 化学成分潜在作用靶标库的构建

荷叶、肉苁蓉和漏芦使用TCMSP数据库查询其主要的化学成分,通过口服生物利用度(oral bio-availability, OB)≥30和类药性(drug-like, DL)≥0.18进行筛选,纳入进一步研究。制首乌的化学成分从

收稿日期: 2020-09-26; 修回日期: 2021-01-15

作者简介: 姚凤红(1981-),女,北京市中关村医院神经内科主治医师。

通讯作者: 苗阳,主任医师, E-mail: miaoyangbj@163.com 中国中医科学院西苑医院心内科, 100091

文献中获得后,利用Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、化源网(<https://www.chemsrc.com/>)等数据库获得化学成分数据。大部分候选化合物的靶点可通过TCMSP检索到,部分该库没有的靶点信息,利用化合物的SMILES作为检索词,通过SwissTargetPredictiong数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)预测靶点信息。获得以上4种药物的所有靶点信息后,去除掉所有的重复项,利用最新版Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>),将所用的靶蛋白名称转化为相应的标准基因名,个别找不到对应的条目去除掉。

1.3 疾病相关靶点库的建立

疾病相关靶点通过关键词“Alzheimer”在OMIM数据库(Online Mendelian Inheritance in Man[®], <https://www.omim.org/>)进行获取。

1.4 靶点通路注释分析

成分潜在靶点库和AD疾病库中的靶点之间进行比对,获得化合物-靶基因-AD疾病之间的共同靶点(交集基因)。蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建:共同靶点输入STRING数据库(<https://string-db.org/>),以“homo sapiens”作为唯一筛选参数,其余使用数据中的默认值进行获取,得到蛋白的相互作用结果。输出文件使用CytoscapeV 3.7.2对STRING的PPI进行分析。交集基因导入Metascape数据库(<https://metascape.org/gp/index.html>)进行GO富集分析(gene ontology, GO)和KEGG通路富集分析。

2 结果

2.1 活性成分筛选

TCMSP数据库获得荷叶的组分包含化合物为93个,肉苁蓉为75个,漏芦为25个,共193个,按照参数OB \geq 30%和DL \geq 0.18筛选,得24个化合物。制何首乌文献中获得10个化合物,一共入组34个化合物(见表1)。

2.2 活性成分的潜在靶标和疾病相关靶基因

通过TCMSP和SwissTargetPredictiong数据库获得了以上34种活性化合物的潜在靶标843个,经过去重复处理后的得到了438个靶标信息。对他们进行Uniprot数据,获得靶蛋白名称和对应基因名信息,最终得到425个靶标结果。OMIM数据库中获得与AD相关的靶基因182个。两个结果比对取之间的交集后,最终获得了23个交集基因(见表2)。

表1 复方苁蓉益智胶囊中4种药物的主要化学成分

Mol编号	化合物名称	药物名称
MOL000073	(+)-表儿茶素(ent-Epicatechin)	荷叶
MOL000096	(-)-儿茶素(-)(catechin)	荷叶
MOL000098	槲皮素(querceetin0)	荷叶, 肉苁蓉
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	荷叶
MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	肉苁蓉, 漏芦
MOL000359	豆甾醇(sitosterol)	荷叶, 漏芦
MOL000422	山奈酚(kaempferol)	荷叶
MOL001792	甘草素(DFV)	漏芦
MOL003578	环阿屯醇(Cycloartenol)	荷叶
MOL004903	甘草苷(liquiritin)	漏芦
MOL005320	花生四烯酸(arachidonate)	肉苁蓉
MOL005384	苏齐内酯(suchilactone)	肉苁蓉
MOL006405	(1S)-1-(4-hydroxybenzyl)-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinoline-6,7-diol	荷叶
MOL007206	亚美罂粟碱(Armepevine)	荷叶
MOL007207	乌药碱(Machiline)	荷叶
MOL007210	O-去甲荷叶碱(o-Nornuciferine)	荷叶
MOL007213	荷叶碱(Nuciferin)	荷叶
MOL007214	白矢车菊素(Leucocyanidin)	荷叶
MOL007217	无色飞燕草素(leucodelphinidin)	荷叶
MOL007218	莲碱(Remerin)	荷叶
MOL007563	鹅掌楸树脂酚B二甲醚(Yangambin)	肉苁蓉
MOL007939	黄独素(Bdiosbulbin B)	漏芦
MOL008864	7-羟基-5,6,7,8-四氢-3H-吡咯里嗪-1-基)甲基-2-羟基-2-(1-羟基乙基)-3-甲基-丁酸酯[(7S,8R)-7-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrrolizin-1-yl]methyl (2R)-2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methylbutanoate	肉苁蓉
MOL008871	Marekine	肉苁蓉
MOL000472	大黄素(emodin)	制何首乌
MOL000476	大黄素甲醚(Physcion)	制何首乌
MOL000346	丁二酸(succinic acid)	制何首乌
MOL000748	5-羟甲基糠醛 HMF (5-Hydroxy-methylfurfural)	制何首乌
MOL001843	对羟基苯甲醛 HBA (4-Hydroxy-benzaldehyde)	制何首乌
MOL000513	没食子酸(garlic acid)	制何首乌
MOL000579	对苯二酚(hydroquinone)	制何首乌
MOL007287	二苯乙烯苷(2,3,5,4'-Tetrahydroxy stilbene 2-O- β -D-glucoside)	制何首乌
MOL007287	大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷(emodin-8-o-beta-d-glucopyranoside)	制何首乌
MOL002257	大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷(Physcion-8-O-beta-D-glucopyranoside)	制何首乌

表2 活性成分-疾病相关靶标信息

靶标名称	蛋白编号	基因名称	来源的药物
Type I iodothyronine deiodinase	P49895	DIO1	荷叶,肉苁蓉
Interleukin-10	P22301	IL10	荷叶,肉苁蓉
Interleukin-1 beta	P01584	IL1B	荷叶,肉苁蓉
Caspase-8	Q14790	CASP8	荷叶,肉苁蓉
Caspase-3	P42574	CASP3	荷叶,肉苁蓉
Beta-2 adrenergic receptor	P07550	ADRB2	荷叶,肉苁蓉
Tumor necrosis factor	P01375	TNF	荷叶,肉苁蓉
Vascular endothelial growth factor A	P15692	VEGFA	荷叶,肉苁蓉
Acetylcholinesterase	P22303	ACHE	荷叶,肉苁蓉
Caveolin-1	Q03135	CAV1	荷叶,肉苁蓉
Nitric oxide synthase, endothelial	P29474	NOS3	荷叶,肉苁蓉
Arachidonate 5-lipoxygenase	P09917	ALOX5	荷叶,肉苁蓉
Urokinase-type plasminogen activator	P00749	PLAU	荷叶,肉苁蓉
Cholinesterase	P06276	BCHE	制何首乌
Alcohol dehydrogenase 1C	P00326	ADH1C	制何首乌
Glycogen synthase kinase-3 beta	P49841	GSK3B	荷叶
Protein kinase C epsilon type	Q02156	PRKCE	荷叶,制何首乌
Protein kinase C delta type	Q05655	PRKCD	荷叶,制何首乌
Dopamine D3 receptor	P35462	DRD3	荷叶
Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	P08908	HTR1A	荷叶
Sigma opioid receptor	Q99720	SIGMAR1	荷叶
Endothelin-converting enzyme 1	P42892	ECE1	制何首乌
Nepilysin	P08473	MME	制何首乌

2.3 蛋白质相互作用的注释

STRING 数据库中构建蛋白质相互作用 PPI 网络,共获得 58 个连接,平均节点度是 5.04, PPI 富集 p 值是 7.12e-13。Cytoscape 处理后的结果见图 1。其中每个节点(node)代表的蛋白,图中圆圈部分,连接度(degree)大小以不同颜色和大小显示。节点与节点之间的连接(edge)代表两个蛋白之间的相互作用,combined score 值的大小以线条粗细来凸显。其中依据连接度排名前 5 的基因为 TNF(12), IL1B(11), VEGFA(11), CASP3(11)和 NOS3(9)。

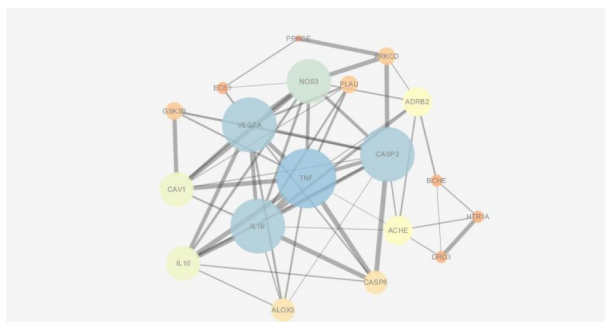


图1 复方苁蓉益智胶囊主要化学成分蛋白质相互作用网络图

2.4 作用通路注释分析

Metascope 数据库中共得到 667 个 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果,依据默认的参数进行筛选,最终排名前 20 位的通路注释结果见图 2。依次为调节神经递质水平、AGE-RAGE 信号通路 (KEGG)、调节化学突触传递、调节解剖结构的大小、对有毒物质的反应、激素水平调节、体外凋亡信号通路、突触传递的负调控、淀粉样前体蛋白代谢过程等。

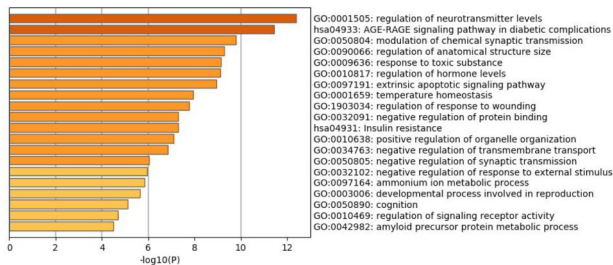


图2 排名前 20 名的 GO 和 KEGG 通路富集分析

3 讨论

关于 AD 的发病机制,国际上提出众多的假说,得到认可的主要有 β 淀粉样蛋白 (Beta amyloid protein, Aβ) 异常沉积、tau 蛋白的过度磷酸化、氧化应激、细胞凋亡以及肠道菌群失调等^[8]。本研究通过 TCMSP 数据库发现复方苁蓉益智胶囊主要活性成分 34 个,分别是:二苯乙烯苷类、蒽醌类及卵磷脂、环烯醚萜类、木脂素类、多糖、生物碱、槲皮素等。这些有效化学成分存在一对多、一对一及多对一作用特点。证实了复方苁蓉益智胶囊确实具有多成分,多靶点协同的特性。检索阿尔茨海默病的相关基因,与复方苁蓉益智胶囊活性成分作用靶交集,得到 23 个交集基因,包括 IL10、IL1B、CASP8、CASP3、TNF、VEGFA、CAV1、NOS3 等,分别作用于神经元细胞外淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein,

APP)的形成、氧化应激、神经递质调节以及凋亡等神经元损伤通路。依据连接度排名前5的基因分别为TNF、IL1B、VEGFA、CASP3和NOS3,主要参与调节神经递质水平、AGE-RAGE信号通路(KEGG)等。

在AD患者的脑内, β -淀粉样蛋白在细胞外大量聚集形成老年斑。在高糖状态及老年体内糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)及晚期糖化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)也明显增加。近年来许多研究表明,AGEs的存在与AD、糖尿病关系密切^[9-12]。 $A\beta$ 的不断积累,一方面通过RAGE下游信号通路激活氧化应激、炎症反应等损伤途径,激活小胶质细胞和星形胶质细胞释放出炎症介质,如IL-1 β ^[13]、IL-6、IL-18、TNF- α ^[14]等,引起局部的炎症反应;另一方面, $A\beta$ -RAGE相互作用还能激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B),引起RAGE表达增加,从而激活 $A\beta$ 介导的正反馈损伤效应,加重 $A\beta$ 毒性效应^[15],最终加剧 $A\beta$ 的沉积和老年斑的形成,进而形成恶性循环。通过PPI分析,推测复方苻蓉益智胶囊主要活性成分可能会降低RAGE表达、阻断RAGE与 $A\beta$ 结合的信号通路从而减轻AD患者炎症反应损伤。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种低氧诱导的分泌性蛋白质,是调节血管功能的主要细胞因子,与内皮细胞表面受体酪氨酸激酶结合促进血管生成并参与血管重建;也可直接作用于神经元,起到营养神经和保护脑神经元的作用;VEGF亦参与内源性胆碱系统通路,在阿尔茨海默病等神经变性病和脑血管病中起关键作用。CASP3全称caspase3,是细胞凋亡的主要执行者。通过特异地裂解DNA依赖性蛋白激酶等,改变其结构而导致细胞凋亡。Caspase3不仅在脑内海马区和皮层神经元的凋亡过程中发挥效应器的作用,而且还直接作用于阿尔茨海默病形成相关的APP等。中枢神经系统的NOS至少有三型包括神经元型(nNOS或NOS1),诱导型(iNOS)和内皮型(eNOS或NOS3),前两种具有毒性作用,而来源于eNOS的NO具有神经保护作用。上述研究结果提示复方苻蓉益智胶囊可能通过参与血管重建、细胞凋亡来发挥神经保护作用,延缓AD病情进展。

本研究基于网络药理学和信息工程学技术手段,建立复方苻蓉益智胶囊活性成分-靶标-阿尔茨

海默病-信号通路分子生物网络,探究复方苻蓉益智胶囊治疗AD的潜在机制,发现复方苻蓉益智胶囊通过参与细胞氧化应激、细胞保护、调节脑血供等途径发挥延缓AD不可逆的病理进展,为后续分子机制研究和实验设计提供理论依据。

参考文献

- [1]Selkoe D J. Normal and Abnormal[J]. Annual review of biochemistry, 1994; 17:489-517
- [2]Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimers Dement. 2020; 16:391-460
- [3]陈国超,张根明,陈璐,等.复方苻蓉益智胶囊的临床应用及实验研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016; 14(5):510-512
- [4]李刚.肉苻蓉苯乙醇苷促智作用实验研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2011; 33(2):141-143
- [5]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
- [6]Ru J, Li P, Wang J, et al. TC MSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014; 6(1):1-6
- [7]李林福. 制何首乌化学成分及其质量标准研究[D]. 中国中医科学院, 2008; 1-65
- [8]Šer O, Povov J, M í šek I, et al. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: A review[J]. Folia Neuropathologica, 2013; 51(1):1-9
- [9]Sim ó -Servat O, Planas A, Ciudin A, et al. Assessment of advanced glycation end-products as a biomarker of diabetic outcomes[J]. Endocrinol Diabetes Nutr, 2018; 65(9):540-545
- [10]侯芳玉,郭焱. 晚期糖基化终末产物的检测和临床意义[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 1999; (6):256-258
- [11]Carvalho C, Machado N, Mota P C, et al. Type 2 diabetic and Alzheimer's disease mice present similar behavioral, cognitive, and vascular anomalies[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2013; 35(3):623-635
- [12]Dan J, Zhou QJ, Xie LX. The research progress of relationship between advanced glycation end products and diabetic keratopathy[J]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2018; 54(6):475-480
- [13]Forloni G, Balducci C. Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation[J]. Alzheimers Dis. 2018; 2(3):1261-1276
- [14]Ge YW, Lahiri DK. Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002; 973:463-467
- [15]Chan Y, Chen W, Wan W, et al. $A\beta$ 1-42 oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd.3 cells[J]. Exp Cell Res. 2018; 369(2):266-274