

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.03.027

药对丹参-当归作用阿尔茨海默病的 网络药理学机制研究

郭小岚, 李 迪, 汪先花, 颜学玲, 熊 航, 时 政
(成都大学四川抗菌素工业研究所 & 医学院, 成都 610106)

摘 要: 为了研究药对丹参-当归作用于阿尔茨海默病的可能机制,通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选出丹参、当归的活性成分,寻找其相关的潜在靶点;并通过预测平台人工检索候选化合物的潜在靶点是否与阿尔茨海默病相关;将靶点信息通过 DAVID 数据库、KEGG 数据库进行靶点和通路分析;构建化合物-靶点作用网络,靶点-通路网络图,化合物-靶点-通路图. 结果表明:药对丹参-当归中具有潜在作用阿尔茨海默病活性的成分有 β -谷甾醇,豆甾醇,丹参酮 II、丹参新酮、隐丹参酮、二氢丹参酮,其可能通过抗炎、抗氧化、免疫系统、细胞周期、钙信号通路、神经受体-配体相互作用等机制对阿尔茨海默病起作用.

关键词: 丹参-当归; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R288 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)03-0577-06

A study on the network pharmacological mechanism of *Salvia miltiorrhiza*-*Angelica*

GUO Xiao-Lan, LI Di, WANG Xian-Hua, YAN Xue-Ling, XIONG Hang, SHI Zheng
(Sichuan Industrial Institute of Antibiotics & Medical School, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: This study aimed to study the mechanism of the effect of *Salvia miltiorrhizae*-*Angelica*. The active ingredients of *Salvia* and *Angelica* and potential targets of candidate compounds were screened in TCMSP. And artificially retrieval of potential targets of candidate compounds through prediction platforms related to Alzheimer's disease. Target information was imported into the DAVID database and KEGG database for target and pathway analysis to construct the compound-target action network, target-pathway network graph, and compound-target-pathway graph. The results indicate that the active ingredients for Alzheimer's disease in *Salvia* and *Angelica* were β -sitosterol, stigmasterol, tanshinone II, tanshinone, cryptotanshinone and dihydrotanshinone, which may play a role in Alzheimer's disease through mechanisms such as anti-inflammatory, anti-oxidant, immune system, cell cycle, calcium signaling pathway and neural receptor-ligand interaction.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*-*Angelica*; Alzheimer's disease; Network pharmacology; Mechanism of action

1 引 言

药对,作为临床中医遣药组方常见的配伍形

式,组成精炼但基本具备中药配伍的特征,临床应用行之有效,按照一定的理论依据和组合原则,将 2 味相对固定药物的配伍组合,以发挥协同增效或

收稿日期: 2019-09-20
基金项目: 国家自然科学基金(81803561); 四川省杰出青年基金(2017JQ0060); 四川省科技厅苗子工程(2018141)
作者简介: 郭小岚(1993-),女,硕士研究生,研究方向为药理学. E-mail: 811390634@qq.com
通讯作者: 时政. E-mail: drshiz1002@hotmail.com

配伍减毒等的作用^[1-2]. 丹参, 双子叶植物唇形科. 其药理作用、临床应用广泛, 归纳得出, 在治疗心血管疾 病、消化系统疾病、神经系统疾病及抗菌、清除炎症方面具有重要疗效^[3]. 当归, 伞形科植物, 其主要化学成分对机体的造血系统、循环系统、神经系统、免疫系统等多个系统具有显著的药理作用^[4]. 丹参重在活血化瘀, 当归作用补益略偏补血^[5], 中药按照“君臣佐使”的原则配伍一组药, 可达到增效减毒的作用^[6-7], 药对丹参—当归在神经系统方面都有良好的临床作用, 配伍后体外抗氧化能力优于单味药材^[8], 既补益又活血化瘀. 众多发现, 丹参和当归作为单味药材作用阿尔茨海默病的机制有了一定进展, 但目前对于药对丹参—当归多成分、多靶点、多代谢途径作用阿尔茨海默病的机制尚需进一步明确.

阿尔茨海默病(Alzheimer’s disease, AD)是特征为进行性认知功能障碍和行为损害的中枢神经系统退行性病变, 临床表现为记忆障碍、失语、失用和失认, 以及视空间机能障碍、人格行为改变和执行功能障碍等. 现治疗阿尔茨海默病的常用临床药物有多奈哌齐、加兰他敏、利斯的明、他克林等, 但其毒副作用较强. 目前发现, 众多中药有效成分(如黄酮类、苷类、生物碱类等)对 AD 有较好的治疗作用且毒副作用弱^[9]. 在 AD 的发病机制方面存在着很多假说, 包括如下: ①金属离子的代谢紊乱和信号通路的改变; ②脑供血和营养的不足; ③淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、早老素基因(presenilin, PSEN)的突变和载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)等位基因的突变; ④线粒体紊乱; ⑤神经生长因子的缺乏; ⑥Aβ毒性假说; ⑦Tau 假说等^[10]. 虽有众多假说, 但关于 AD 的发病机制目前尚未完全明确. 现目前, 主要研究乙酰胆碱酯抑制剂和 N—甲基—D 天门冬氨酸受体阻滞剂干预阿尔茨海默病, 但其并不能逆转疾病过程, 且存在副作用较多. 因此, 对其治疗仍然存在很多问题. 单一靶点治疗疾病临床效果欠佳, 而中药具有多成分、多靶点、调节方式多样的特点, 其次相对比西医单靶标、单成分的传统研究思路来研究中药, 难以体现中药的系统性^[11]. 因此我们可以利用一个分析平台, 系统地研究中药作用某一疾病的机制, 进行探讨研究. 现目前网络药理学在我国已经被广泛应用, 包括数据收集、靶点预测、网络分析与可视化、多组分相互作用和信号通路预

测等^[12]. 其主要思想与传统中医药的整体观相互补, 系统而透彻的分析了中药治病的作用机制. 本文采用此想法, 对药对丹参—当归作用阿尔茨海默病的机制进行探讨研究.

本文采用类药性(drug-likeness, DL)评估, $DL \geq 0.18$, 口服利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 作为筛选标准, 然后通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)寻找与候选化合物相关的潜在靶点, 进而在数据库中查阅相关文献收集阿尔茨海默病相关靶点, 人工检索候选化合物的潜在靶点是否与阿尔茨海默病相关, 最后利用 Cytoscape 3. 5. 1 软件构建候选化合物—靶点网络、靶点—通路网络以及化合物—靶点—通路网络, 为药对丹参—当归作用阿尔茨海默病的网络药理学机制提供理论依据.

2 材料与方法

2.1 材 料

化学成分的筛选利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwsua.edu.cn/tcmsp.php>)得到丹参、当归两味中药相关的所有化学成分, 其中丹参有 202 个活性成分, 当归有 125 个活性成分. 目标活性成分的筛选标准主要依据 TCMSP 数据库中的建议药物筛选标准: 类药性(Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 、口服利用度(Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 等.

2.2 方 法

2.2.1 化学成分靶点预测和阿尔茨海默病靶点的收集 通过 TCMSP 平台寻找丹参、当归 18 个化学成分的相关潜在靶点. 根据 TCMSP 平台所提供的阿尔茨海默病潜在靶点, 以及对大量有关阿尔茨海默病发病机制文献的调研, 人工检索剔除无关靶点, 作用于阿尔茨海默病发病机制的相关靶点在 Uniprot 数据库将靶蛋白校正为官方名称, 潜在靶蛋白信息见表 3.

2.2.2 作用网络分析 将上一步骤获取的靶点蛋白信息通过注释、可视化和整合发现的数据库(database for annotation, visualization and integrated discovery, DAVID)数据库进行 GO(Gene Ontology)及 KEGG 通路注释. 候选化合物—靶点网络、靶点—通路网络以及化合物—靶点—通路网络的构建均使用 Cytoscape 软件.

3 结 果

3.1 化学成分的筛选

通过条件筛选,选取了丹参的 16 个化学成分,当归的 2 个化学成分,共有 18 个化学成分,当归的主要活性成分是 β -谷甾醇,豆甾醇,见表 1;丹参的主要有丹参酮 II、丹参新酮、隐丹参酮等,见表 2.

表 1 当归活性成分及类药性值

Tab. 1 The active components and medical value of Angelicasinisensis.

编号	Mol ID	Molecule Name	MW	OB/%
M01	MOL000358	beta-sitosterol	414. 79	36. 91
MO2	MOL000449	Stigmasterol	412. 77	43. 83

表 2 丹参活性成分及类药性值

Tab. 2 The active components and medical value of salvia.

编号	Mol ID	Molecule Name		MW	OB/%	DL
M03	MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	1,2,5,6-四氢丹参酮	280. 34	38. 75	0. 36
M04	MOL002222	sugiol	柳杉酚	300. 48	36. 11	0. 28
M05	MOL002651	Dehydrotanshinone II A	去氢丹参酮 II	292. 35	43. 76	0. 4
M06	MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	鼠尾草酮	298. 41	33. 77	0. 29
M07	MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮	264. 34	40. 86	0. 23
M08	MOL007049	4-methylenemiltirone	4-亚甲丹参新酮	266. 36	34. 35	0. 23
M09	MOL007061	Methylenetanshinquinone	亚甲基丹参醌	278. 32	37. 07	0. 36
M10	MOL007085	Salvilenone	丹参酮酚	292. 4	30. 38	0. 38
M11	MOL007088	cryptotanshinone	隐丹参酮	296. 39	52. 34	0. 4
M12	MOL007094	danshenspiroketallactone	表丹参螺缩酮内脂	282. 36	50. 43	0. 31
M13	MOL007101	dihydrotanshinone I	二氢丹参酮 I	278. 32	45. 04	0. 36
M14	MOL007108	isocryptotanshi-none	异隐丹参酮	296. 39	54. 98	0. 39
M15	MOL007111	Isotanshinone II	异丹参酮 II	294. 37	49. 92	0. 4
M16	MOL007122	Miltirone	丹参新酮	282. 41	38. 76	0. 25
M17	MOL007149	NSC 122421	122421,10-脱氧代黄桉醇	300. 48	34. 49	0. 28
M18	MOL007154	tanshinone iia	丹参酮 II A	294. 37	49. 89	0. 4

表 3 药对丹参-当归活性成分作用潜在靶蛋白的信息

Tab. 3 The information of salviamiltiorrhiza-angelica's active components in potential target

排序	Uniprot 号	基因	蛋白名称
1	P22303	ACHE	Acetylcholinesterase
2	P31644	GABRA5	Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-5 subunit
3	H08238	HAP90AB1	Heat shock protein HSP 90
4	P10636	MAPT	Microtubule-associated protein tau
5	P28223	HTR2A	5-hydroxytryptamine 2A receptor
6	P11229	CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1
7	P35354	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2
8	P08172	CHRM2	Muscarinic acetylcholine receptor M2
9	P36544	CHRNA7	Neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain
10	P46098	HTR3A	5-hydroxytryptamine receptor 3A
11	P05067	APP	Amyloid beta A4 protein

(续表 3)

排序	Uniprot 号	基因	蛋白名称
12	P35228	NOS2	Nitric oxide synthase, inducible
13	P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
14	P42892	ECE1	Endothelin-converting enzyme 1
15	Q99527	ESR1	Estrogen receptor
16	P37231	PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
17	Q07817	BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2
18	P53779	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10

3.2 化学成分靶点预测和阿尔茨海默病潜在靶点

丹参、当归 18 个化学成分通过 TCMSP 分析平台找到 430 个靶点, 筛选出丹参当归中与阿尔茨海默病相一致的靶点 18 个, 将这 18 个靶点投入到 Uniprot 数据库, 得到所有靶点对应编号。

3.3 作用网络分析

综合以上得到的数据, 用软件 Cytoscape3. 5. 1 构建候选化合物-靶点网络, 见图 1; 靶点-通路网络, 见图 2; 使用 Merge 功能将其合并成为化合物-靶点-通路图, 见图 3; 结合 KEGG 数据库进行通路分析。

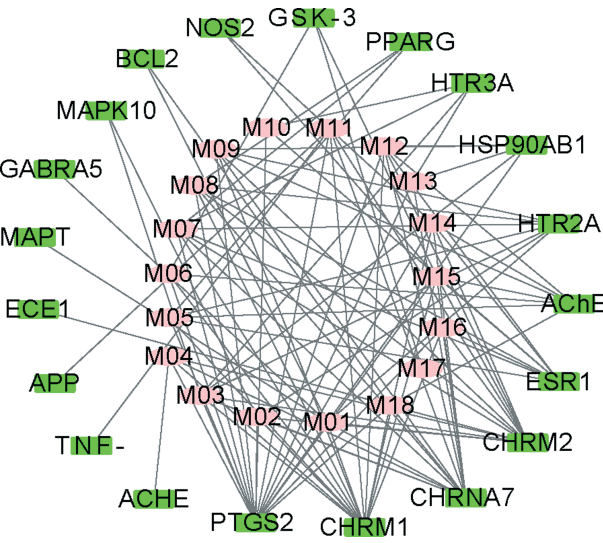


图 1 化合物-靶点作用网络图

Fig. 1 The network of compounds and target
内圈椭圆形表示的是药对中的活性成分, 外圈四边形表示靶点。

预测药对丹参-当归中具有潜在作用阿尔茨海默病活性成分的化合物-靶点作用网络图如图 1。当归中的主要作用成分为 β -谷甾醇, 豆甾醇, 丹参的主要有丹参酮 II、丹参新酮、隐丹参酮、二氢丹参酮等。这些化学成分当中含有 BCL2、NOS2、PTGS2、CHRM1、CHRM2、CHRNA7、HTA2、

HTA3 等 18 个靶点作用于阿尔茨海默病。分析发现得, 甾醇、丹参酮作为潜在化学成分在抗阿尔茨海默病作用中发挥着重要作用。

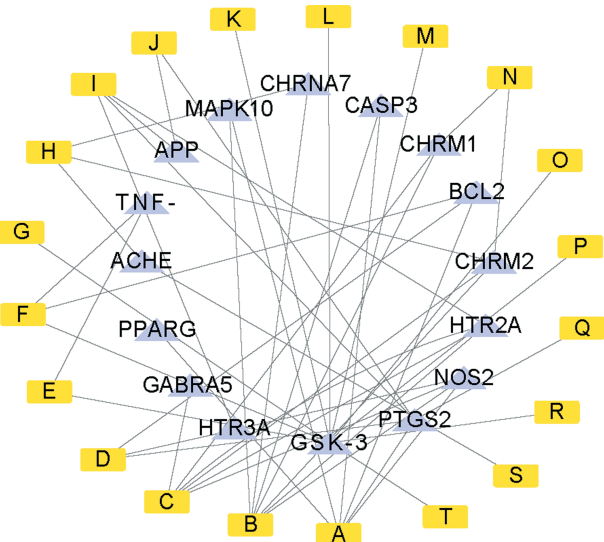


图 2 靶点-通路网络图

Fig. 2 The pathway and target relation network
外圈四边形表示作用通路, 内圈三角形表示靶点。

靶点-通路图可见图 2, GSK-3 β 参与 Wnt 信号通路、细胞周期、磷酸化途径、海马发育等通路; CHRM1、CHRM2、NOS2 参与钙离子信号途径, 神经受体-配体相互作用; CHRM1、CHRM2 作用肌动蛋白骨架调节; 还有作用于胆碱能突触的 ACHE、CHRNA7、CHRM2; 显示了不同通路之间也有共同作用的靶点, 结果映射了药对丹参-当归作用阿尔茨海默病多个靶点、多个代谢途径共同协调的特点。

从图 3 中可以看到, 药对丹参-当归中的 CHRNA7, CHRM1, PTGS2, ACHE, APP, GSK-3 β , HTR2A, NOS2 为高纬度节点, 这些节点在 AD 治疗过程中扮演者重要的角色。GO 生物学通路及 KEGG 代谢通路富集分析, 药对丹参-当归的活性成分主要作用通路为钙信号通路、Wnt 信号通路、

神经受体-配体相互作用、海马发育、胆碱能突触、血清能突触、磷酸化调控等. 说明药对丹参-当归通过多成分、多靶点、多种调节方式作用阿尔茨海默病.

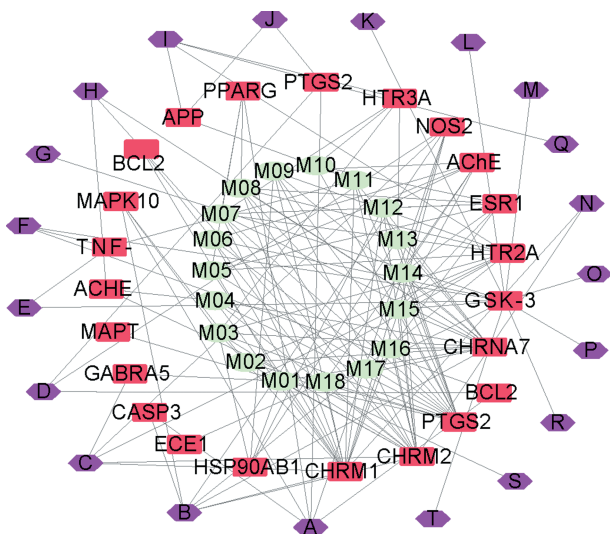


图 3 化合物-靶点-通路图

Fig. 3 The pathway between compounds and targets.

其中外圈六边形表示参与的通路, 中圈四边形表示作用的靶点, 内圈椭圆形表示药对的活性成分

4 讨论

目前, 乙酰胆碱酯酶是 AD 治疗的重要靶点. 已知美国 FDA 批准的 5 个 AD 治疗药物, 其中有 4 个为 AChE 抑制剂. 它们主要通过抑制 AChE 催化位点, 以减少突触间隙乙酰胆碱的降解, 从而进一步提高 ACh 水平, 促进胆碱能神经传递功能, 进而改善患者的认知和记忆功能^[13]. 治疗 AD 经典的靶蛋白胆碱酯酶(CHE)主要有两类: 一为乙酰胆碱酯酶(ACHE), 主要作用水解神经递质乙酰胆碱(ACH); 二为 BCHE. 因此存在一种假说: 应采用针对 ACHE 以及 BCHE 的胆碱酯酶抑制剂以治疗阿尔茨海默病.

M1 受体激动剂(CHRM1), 其通过干预 β 淀粉样蛋白的生长, 产生神经生长因子样作用, 减弱 CHRM1 产生的神经毒性和 tau 蛋白的过度磷酸化, 以及缩短后超极化的时间等途径来保护神经元细胞^[14]. M1 受体还可以通过与 BACE1 的直接相互作用, 作用 BACE1 蛋白, 降低 A β 的形成, 再经过蛋白酶体-泛素通路的降解, 进一步抑制 A β 的生成和累积, 减少具有神经毒性的淀粉样斑沉积^[15]. CHRM1 通过调节淀粉样 β 前体蛋白 APP 的代谢, 以及作用于 tau 蛋白, 减少过度磷酸化, 有

助于延缓 AD 的病情的的发展, 提高患者学习记忆能力^[16].

GSK-3 β 是 GSK-3 的一种亚型, GSK-3 作为主要的 tau 激酶, 在 AD 病程发展中的记忆障碍、小胶质细胞介导的炎症、tau 蛋白磷酸化、炎症因子的释放以及突触丢失和神经元死亡等方面, 从多途径发挥抗 AD 的作用^[15,17]. APP 代谢异常和 tau 蛋白异常磷酸化过度是影响阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发展的重要因素. GSK-3 β 在参与淀粉样蛋白质前体(amyloid precursor protein, APP)代谢的前提下, 还作用于 tau 蛋白过度磷酸化过程, GSK-3 β 的表达与活性的异常是导致神经元细胞凋亡的常见原因^[18-19]. 故 GSK-3 β 与 AD 的病理变化有密切的联系. APP 具有抗 A β 神经毒性作用, 阻止脑组织神经元数目的减少、斑块沉积与神经元凋亡.

KEGG 代谢通路富集分析结果见图 3, 主要作用通路为 MAPK 激酶途径, 钙离子信号途径、肌动蛋白细胞骨架的调节、神经性的配体-受体相互作用 Wnt 信号通路、细胞周期、细胞凋亡调控、磷酸化途径等^[20], 这代表药对丹参-当归中的活性成分作用于多个靶点及多条代谢通路来干预 AD 的发生发展. 在 MAPK 激酶途径中, MAPK 信号转导刺激引起细胞产生相应反应进而调节细胞分化、增殖、凋亡, 来保护神经元组织细胞^[21].

从靶点-通路网络作用图中看出 APP, GSK-3 β 对海马发育、细胞周期有一定的调节作用, 而 CHRM1, CHRM1, GABRA5, NOS2 在神经性的配体-受体相互作用上发挥着重要作用; Wnt 信号通路和钙离子信号途径, 减轻炎症反应, 加大细胞存活率, 中枢神经系统受到损伤后机体会启动 Wnt 信号通路, 进而促进中枢神经系统的再生修复^[22-23], 在某种程度上对阿尔茨海默病有着治疗作用.

中药成分多样, 多靶点多通路协同作用, 通过以上数据显示: 药对丹参-当归作用于钙信号通路、Wnt 信号通路、神经受体-配体相互作用、海马发育、胆碱能突触、血清能突触、磷酸化调控等代谢通路, 其可以调节细胞的周期、抗凋亡、抗炎、抗氧化及保护神经元细胞和抑制胆碱酯酶活性, 增强突触形态改善学习记忆障碍从而发挥改善学习记忆的能力, 发挥抗阿尔茨海默病作用, 但本研究预测的药对丹参-当归潜在化学成分及其靶点蛋白需要进一步的实验验证.

参考文献:

[1] 唐于平,束晓云,李伟霞,等. 药对研究(I)——药对的形成与发展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38: 4185.

[2] 张思原,刘兴隆,姚攀,等. 利用稀疏表达学习挖掘中医方剂功效配伍[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2018, 55: 54.

[3] 高兵. 丹参的药理作用及临床应用分析[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12: 196.

[4] 李曦,张丽宏,王晓晓,等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36: 1023.

[5] 谢娟. 基于数理统计的老年期痴呆方组方配伍规律研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.

[6] 李玥. 中药药对配伍后药效物质基础变化研究进展[J]. 海峡药学, 2017, 29: 72.

[7] 蔡琳,易小波,袁利邦,等. 丹参酮 II A 通过 NL-RP3 炎症体信号通路对小胶质细胞糖氧剥夺/再灌注损伤的保护作用[J]. 四川大学学报:医学版, 2016, 47: 660.

[8] 王海涛,刘博琳,王哲,等. 丹参当归不同配比抗氧化能力分析[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43: 1439.

[9] 任抒婷,王蕾,吴煜然,等. 治疗阿尔茨海默症的中药有效成分研究进展[J]. 淮海工学院学报:自然科学版, 2018, 27: 28.

[10] Pau P, Goate A M. Molecular genetics of Alzheimer's disease [J]. Aging Chin Exp Res, 2004, 6: 125.

[11] 李泮霖,苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药, 2016, 47: 2938.

[12] 李学军,许海玉. 网络药理学与中药研究[J]. 药学报, 2018, 53: 1385.

[13] Tayeb H O, Yang H D, Price B H, *et al.* Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors[J]. 2012, 134: 8.

[14] Colton C, Wilcock D D, Davis J, *et al.* The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human AbetaPP [J]. Alzheimers Dis, 2008, 15: 571.

[15] 姜尚彤. 人类 M1 Muscarinic 乙酰胆碱受体调控 BACE1 水平的新机制[D]. 厦门: 厦门大学, 2013.

[16] 马珂,陆阳. M1 受体激动剂介导的神经保护作用机制[J]. 国际药学研究杂志, 2008 (02): 96.

[17] 肖丽容,侯宸,郑仕洁,等. 组蛋白甲基化酶抑制剂对人淋巴瘤 Raji 细胞生存、凋亡及细胞周期的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2019, 50: 305.

[18] 吴兴军,陈红专. M₁ 胆碱受体激动剂治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003 (05): 485.

[19] Fernández J A, Rojo L, Kuljis R O, *et al.* The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2008, 104: 1433.

[20] 路书彦,黄汉昌,郭豫,等. GSK-3 β 在阿尔茨海默症病理特征形成中的作用[J]. 生命的化学, 2014, 34: 667.

[21] 贾皓,庞晓丛,赵赢,等. 远志治疗阿尔茨海默病的网络药理学作用机制[J]. 中国新药杂志, 2018, 27: 398.

[22] 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: 4211.

[23] 王学敏,张慧,安聪,等. Wnt 信号通路对中枢神经系统再生修复的作用及中医药研究近况[J]. 中医药临床杂志, 2018, 30: 1386.

引用本文格式:

中文: 郭小岚,李迪,汪先花,等. 药对丹参-当归作用阿尔茨海默病的网络药理学机制研究[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2020, 57: 577.

英文: Guo X L, Li D, Wang X H, *et al.* A study on the network pharmacological mechanism of *Salvia miltiorrhiza*-*Angelica* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2020, 57: 577.