

# 基于网络药理学探讨乌灵菌粉抗阿尔兹海默症的作用机制

孙娟<sup>1,2</sup>, 陈建<sup>2</sup>, 冯国富<sup>2</sup>, 姚瑶<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浙江科技学院, 浙江 杭州

<sup>2</sup>浙江佐力药业股份有限公司, 浙江 湖州

收稿日期: 2022年8月5日; 录用日期: 2022年9月2日; 发布日期: 2022年9月13日

## 摘要

阿尔兹海默症对患者的正常生活及家庭造成严重影响, 已经成为神经医学亟需解决的难题。本文运用网络药理学探究乌灵菌粉抗阿尔兹海默症的作用机制。数据库筛选阿尔茨海默症相关治疗靶点及乌灵菌粉关键活性成分, 获取交集靶点, 软件构建交集靶点蛋白相互作用网络, 挖掘互作网络中的核心靶点, 最终获得乌灵菌粉抗阿尔兹海默症的潜在信号通路。网络药理学结果表明, 乌灵菌粉可能作用于ACE、HSD17B1、NOS2和BACE1靶点调控甾类激素生物合成信号通路, 发挥抗阿尔兹海默症作用。

## 关键词

乌灵菌粉, 阿尔兹海默症, 网络药理学, 信号通路

# Study on the Mechanism of Action of Wuling against Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology

Juan Sun<sup>1,2</sup>, Jian Chen<sup>2</sup>, Guofu Feng<sup>2</sup>, Yao Yao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Zhejiang Jolly Pharmaceutical Co., Ltd., Huzhou Zhejiang

Received: Aug. 5<sup>th</sup>, 2022; accepted: Sep. 2<sup>nd</sup>, 2022; published: Sep. 13<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Alzheimer's disease has a serious impact on the normal life of patients and their families, which

has become an urgent problem to be solved in neuromedicine. In this paper, network pharmacology was used to explore the action mechanism of Wuling against Alzheimer's disease. The database was used to screen the Alzheimer's disease-related therapeutic targets and the key active ingredients of Wuling, and the intersection targets were obtained. Then, the protein interaction network of intersection targets was constructed, and the core targets in the interaction network were excavated, and the potential signaling pathway of Wuling powder against Alzheimer's disease was finally obtained. The results of network pharmacology showed that Wuling may act on ACE, HSD17B1, NOS2 and BACE1 targets to regulate steroid hormone biosynthesis signaling pathway and play an anti-Alzheimer's effect.

## Keywords

Wuling, Alzheimer's Disease, Network Pharmacology, Signaling Pathway

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆, 是慢性的中枢神经系统退行性疾病[1] [2], 多发于老年和老年前期, 主要临床表现为脑萎缩、认知能力减退、记忆力下降、生活不能自理, 最后死亡[3]。随着老龄化社会的发展, 阿尔兹海默症已经成为除心血管疾病、肿瘤之外的最严重疾病和死亡原因, 对患者的正常生活及家庭造成严重影响, 已经成为神经医学亟需解决的难题。

临床上对阿尔兹海默症的治疗仍未发现特效药[4] [5]。乌灵胶囊属于国家一类新药, 是一种纯中药制剂, 在临床上广泛用于焦虑、抑郁、神经衰弱、帕金森病等的治疗[6] [7] [8]。除此之外, 乌灵胶囊也能明显改善各种记忆障碍, 如记忆获得、记忆巩固、记忆再现缺失等, 具有益智健脑功能[9] [10]。然而目前为止乌灵菌粉治疗阿尔兹海默症的作用机制尚不明确。

网络药理学融合了生物信息学和药理学的方法, 通过数据整合与计算分析, 可系统性地阐明中药及化合物与诸多疾病的相互关系, 探究药物作用机制[11] [12] [13]。因此, 本研究拟采用网络药理学预测、细胞实验验证乌灵菌粉治疗阿尔兹海默症的作用靶点及可能机制, 为乌灵胶囊的应用提供一定理论支持。

## 2. 实验数据库及软件

中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP, 化学绘图工具 ChemBioDraw Ultra 14.0, 化合物结构数据库 Pubchem, 小分子药物靶点预测在线平台 SwissTargetPrediction, 人类在线孟德尔遗传数据库 OMIM, DrugBank 数据库, 蛋白质数据库 Uniprot, RSCB PDB 数据库, 在线 venn 图绘制网站, 生物信息注释数据库 Metascape, 计算机辅助药物设计软件 Discovery Studio 2019, 软件 Cytoscape 3.7.1。

## 3. 网络药理学方法

### 3.1. 乌灵菌粉主要活性成分获取

采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库, 以“OB > 30%和 DL ≥ 0.18”筛选乌灵菌粉的主要成分。基于 TCMSP 数据库筛选所得数据, 同时查阅相关文献进行补充, 最终确定乌灵菌粉活性成分。随后, 使用 3D Viewer 建立所有化合物的 3D 结构, 并保存为 mol2 文件格式, 用于目标预测。

### 3.2. 乌灵菌粉主要活性成分靶点获取

从数据库中确定的乌灵菌粉活性成分，首先使用 TCMSP 数据库，根据特征信息及理化参数，获取相应靶点；然后利用 PubChem 数据库获得这些活性成分的 SMILES 文件，将 SMILES 文件导入 SwissTargetPrediction 网站，进行靶点预测。TCNSP 数据库及 STP 数据库获得的所有靶点取并集，即为乌灵菌粉主要活性成分的靶点。

### 3.3. 阿尔兹海默症 AD 相关靶点收集

首先，利用关键词“Alzheimer”从 OMIM 数据库和 DrugBank 数据库中筛选阿尔兹海默症已知的治疗靶点。其次，将这些已知的阿尔兹海默症治疗靶点的基因名称导入 Uniport 数据库，寻找“Homo sapiens”蛋白。然后从 RCSB PDB 数据库中下载这些蛋白的 3D 结构。利用这四个数据库获得潜在的已知人源阿尔兹海默症靶蛋白。

### 3.4. 药物与疾病共同靶点筛选及互做网络构建

使用 Venn 图在线网站对 AD 靶点和活性成分靶点取交集，获取药物与疾病的共同靶点，绘制 Venn 图，交集基因即代表乌灵菌粉治疗炎症的潜在作用靶点。对筛选的活性化合物和 AD 预测靶点进行统一的标准命名(基因名)。将筛选的 AD 靶蛋白导入 Cytoscape 3.7.1 软件，获得化合物-靶点图网络。

### 3.5. GO 和 KEGG 富集分析

将筛选得到的靶蛋白输入 Metascape 数据库进行 GO 基因生物过程富集和 KEGG 信号通路富集。

### 3.6. 分子对接

我们将乌灵菌粉的主要活性成分分别与高频靶蛋白进行模拟对接。首先把从 RCSB PDB 数据库中下载这些蛋白的 3D 结构导入 Discovery Studio 软件，去除原始配体，去除水、添加氢，优化和填充氨基酸。然后把保存为.mol2 格式的活性成分结构导入软件，能量最小化。最后，选取 CDocker 板块进行模拟对接，计算结合能。

## 4. 结果

### 4.1. 乌灵菌粉主要活性成分

筛选获得 10 种乌灵菌粉主要活性成分，如表 1 所示。

**Table 1.** Main active ingredient of Wuling  
**表 1.** 乌灵菌粉主要活性成分

化合物名称	化合物简称
5,7-Dihydroxy-2-methyl-4-dihydrochromone	A1
5,8-dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin	A2
5-carboxymellein	A3
5-hydroxy-2-methyl-4-dihydrochromone	A4
5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-4-dihydrochromone	A5
5-hydroxymellein	A6

Continued

5-methylmellein	A7
5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ alcohol	A8
beta-Sitosterol	A9
Genistein	A10

#### 4.2. 乌灵菌粉主要活性成分靶点获取

利用 TCMSP 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库对乌灵菌粉 10 种主要成分进行靶点预测, 获得潜在靶点图 1 所示。

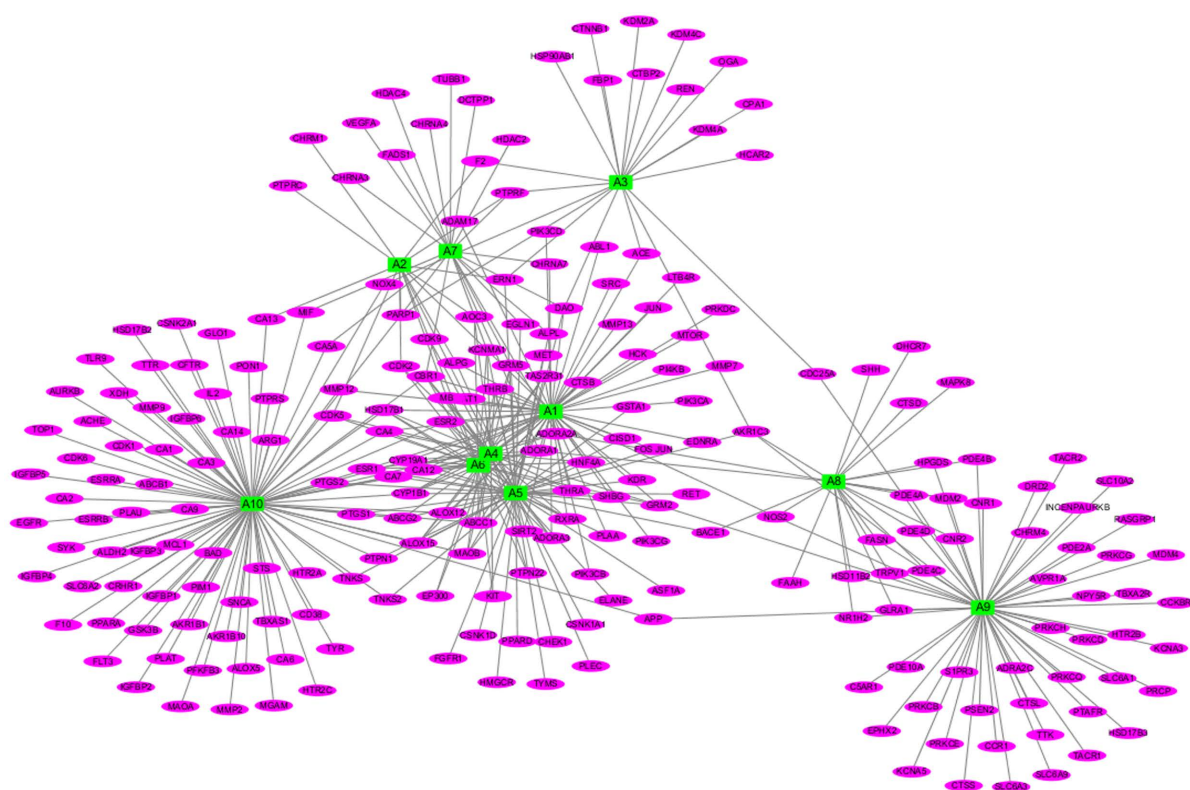


Figure 1. Targets corresponding to the main components of Wuling  
图 1. 乌灵菌粉主要成分对应的靶点

#### 4.3. AD 潜在靶点获取

筛选并得到 66 个潜在的已知人源阿尔茨海默症靶蛋白, 如图 2 所示。

#### 4.4. 共同靶点获取及 PPI 网络构建

通过匹配 66 个药物靶点和 399 个活性化合物对应的靶点, 筛选出 32 个共同靶点。这 32 个共同靶点是乌灵菌粉抗阿尔茨海默症的潜在靶点。将 32 个靶点导入 STRING 数据库, 得到 PPI 网络, 如图 3 所示。通过观察化合物与靶蛋白之间的相互作用关系我们发现, 化合物(A1、A3、A4、A5、A7、A8、A9 和 A10)对高频靶蛋白 ACE、HSD17B1、NOS2 和 BACE1 均具有明显的作用。

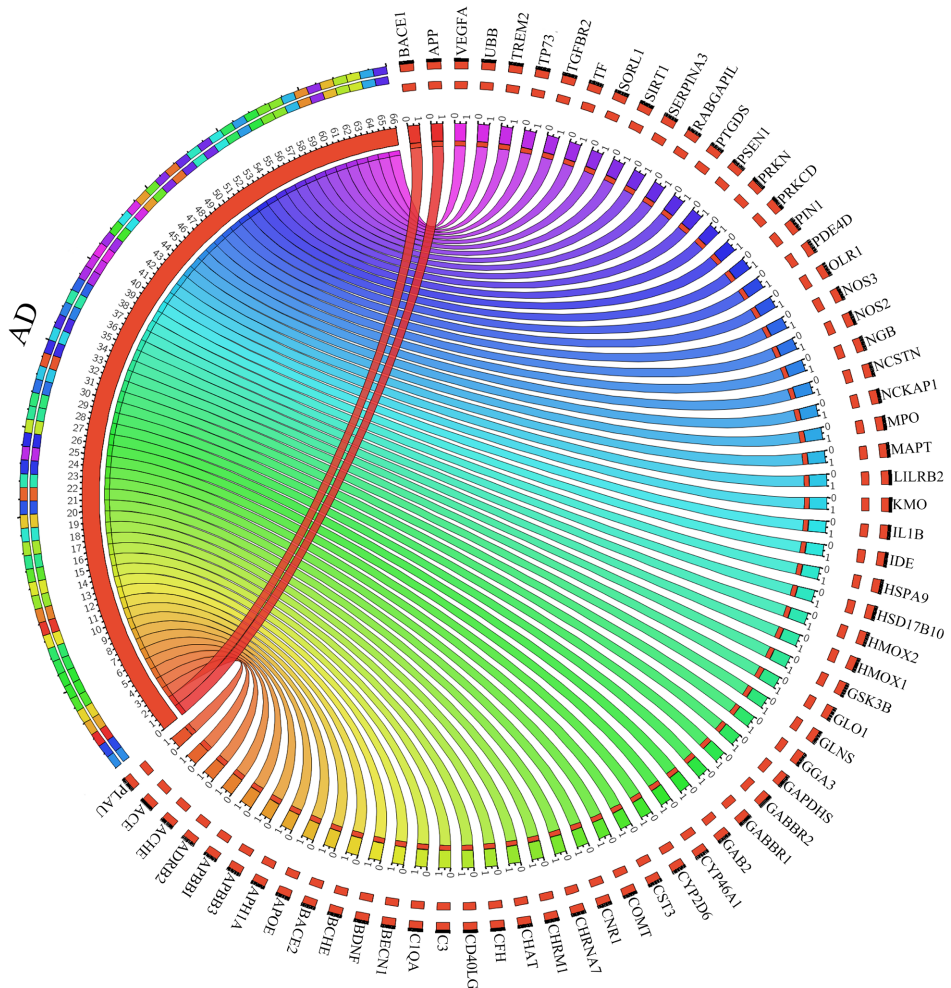


Figure 2. Potential AD targets  
 图 2. 潜在的 AD 靶点

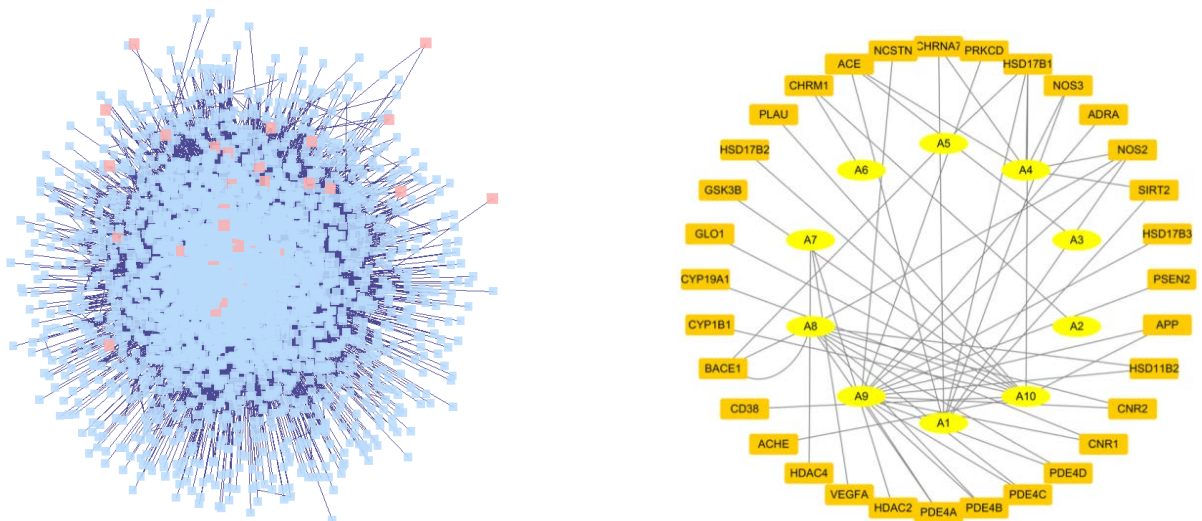


Figure 3. Interaction diagram of flexibility components-potential AD targets  
 图 3. 乌灵活性成分 - 潜在 AD 作用靶点相互作用图

#### 4.5. KEGG 富集分析结果

KEGG 信号通路富集如图 4 所示, 分析结果表明, 乌灵菌粉治疗 AD 的靶点主要富集在 12 条信号通路上。主要涉及甾类激素生物合成(Steroid hormone biosynthesis)、阿尔兹海默症(Alzheimer disease)、钙离子(Calcium signaling pathway)等信号通路。甾类激素生物合成信号通路富集靶点最多, 说明该信号通路与乌灵菌粉抗 AD 作用较为密切, 因此后续实验选择甾类激素生物合成信号通路进行验证探讨。

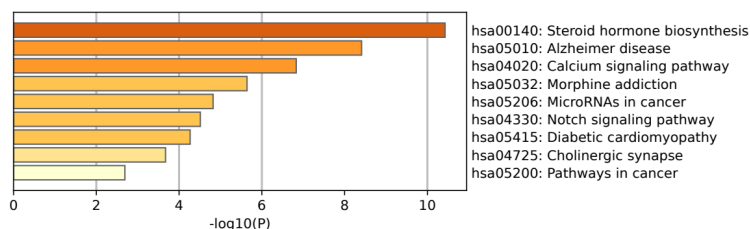


Figure 4. KEGG analysis of potential AD targets of flexibility components in Wuling

图 4. 乌灵活性成分潜在 AD 作用靶点的 KEGG 分析

#### 4.6. GO 富集分析结果

GO 基因生物过程富集如图 5 所示, 具有生物学过程 20 条, 细胞成分 9 条, 分子功能 9 条。BP 主要涉及细胞对氮化合物的反应、对氧气水平的反应、cAMP 的分解过程等; CC 主要涉及细胞质的核周区域、膜筏、树突等; MF 主要涉及 3', 5'环腺苷酸磷酸二酯酶活性、类固醇脱氢酶活性、氧化还原酶活性等。

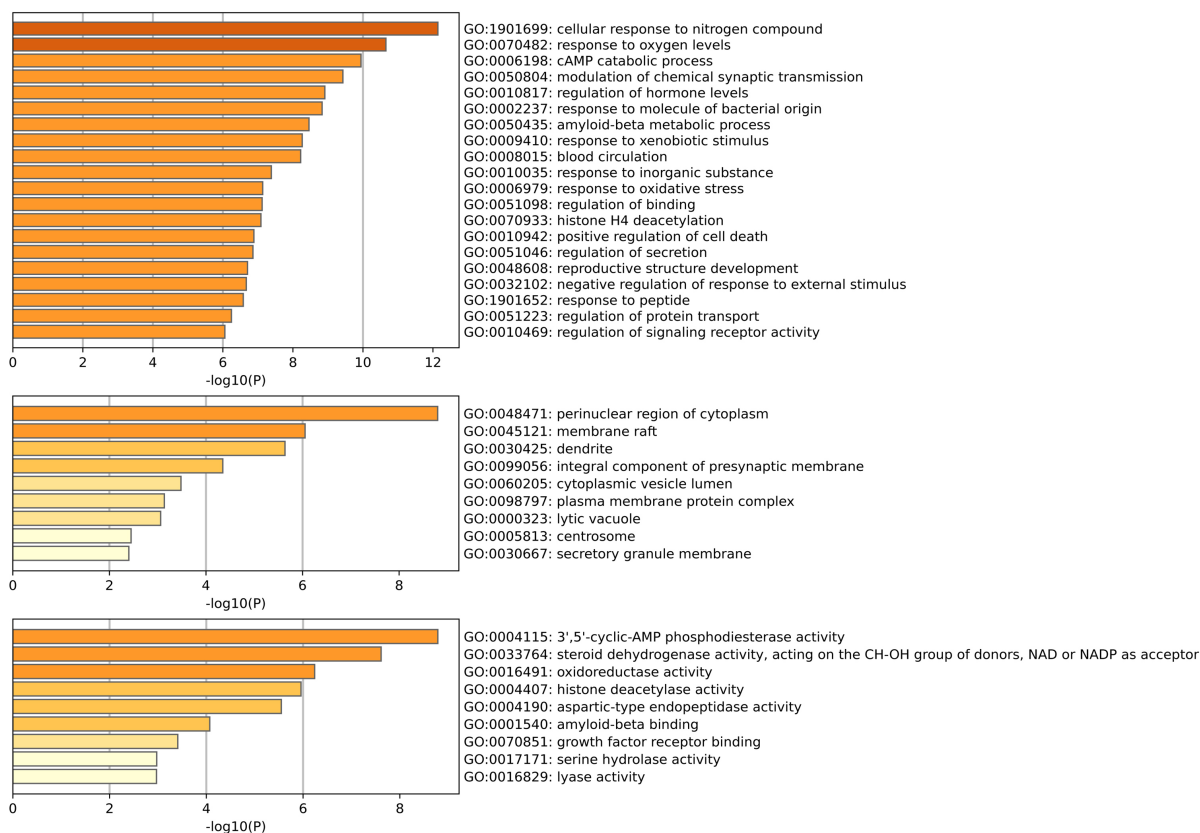


Figure 5. GO gene biological process enrichment

图 5. GO 基因生物过程富集

#### 4.7. 分子对接结果

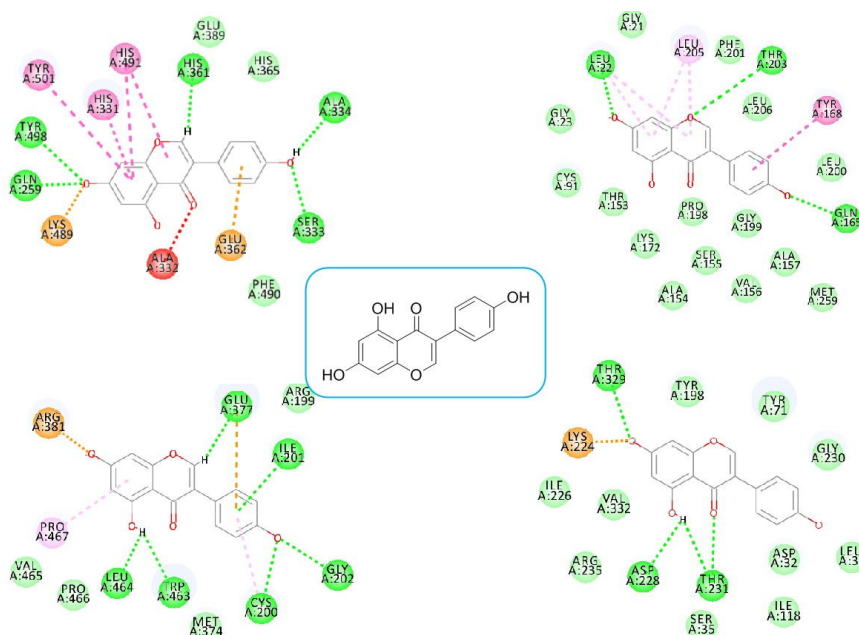
使用 Discovery Studio 2019 软件对乌灵菌粉十种主要活性成分及高频靶蛋白 ACE、HSD17B1、NOS2 和 BACE1 分别进行对接, 获得结合能, 如表 2 所示。

**Table 2.** Docking scores of 10 compounds and 4 AD proteins

**表 2.** 10 种化合物和 4 种 AD 蛋白的对接打分

化合物	基因名	结合能	基因名	结合能	基因名	结合能	基因名	结合能
A1	ACE	26.2212	HSD17B1	31.7922	NOS2	23.1932	BACE1	26.5912
A2	ACE	32.1273	HSD17B1	32.261	NOS2	25.6728	BACE1	29.3775
A3	ACE	35.3558	HSD17B1	45.7851	NOS2	26.327	BACE1	28.3794
A4	ACE	25.235	HSD17B1	29.2815	NOS2	20.1684	BACE1	22.1679
A5	ACE	27.5672	HSD17B1	32.8295	NOS2	25.0202	BACE1	25.4211
A6	ACE	30.6994	HSD17B1	36.2635	NOS2	29.4619	BACE1	27.8957
A7	ACE	28.4334	HSD17B1	32.4207	NOS2	26.2927	BACE1	25.54
A8	ACE	\	HSD17B1	\	NOS2	50.1319	BACE1	52.8908
A9	ACE	46.7776	HSD17B1	50.8646	NOS2	55.9355	BACE1	54.1413
A10	ACE	54.6682	HSD17B1	53.0898	NOS2	37.6244	BACE1	48.1969

从表 2 可以看出, 化合物 A9 和 A10 具有较好的广谱抗 AD 活性, 我们以 A10 为例, 进一步分析了其对接作用力, 如图 6 所示。



**Figure 6.** Simulation diagram of compound A10 docking with four AD-related proteins

**图 6.** 化合物 A10 与四种 AD 相关蛋白的对接模拟图

从图6我们可以看出,化合物A10与这四种关键AD蛋白具有很好的相互作用模式。化合物A10喹啉骨架上的氧原子可以与活性位点氨基酸Gln259, Tyr498, Leu22, Thr203, Thr231, Thr329形成氢键相互作用力;喹啉骨架上的氢原子可以与活性位点氨基酸His361, Glu377, Leu463, Leu464, Asp228形成氢键相互作用力;苯环结构上的羟基与活性位点氨基酸Ser333, Ala334, Gln165, Cys200, Gly202形成氢键作用力。此外,化合物A10与活性位点氨基酸还具有Pi-Pi或Pi-Cation相互作用力。这些作用力进一步的表明化合物A10具有较好的抗AD活性,即乌灵菌粉具有很好的抗AD活性。

## 5. 结论

本文基于网络药理学的方法对乌灵菌粉所含有的化合物进行了抗AD活性筛选,靶点分析和相关靶点通路预测,筛选得到10个活性物质和32个潜在的抗AD靶点蛋白以及相关靶蛋白信号通路。结果表明乌灵菌粉具有抗阿尔兹海默症的功效,可能是通过ACE、HSD17B1、NOS2和BACE1靶蛋白调控甾类激素生物合成信号通路。

## 参考文献

- [1] Zhao, L. (2020) 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's and Dementia*, **16**, 391-460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- [2] 汪睿彤, 刘珏. 阿尔茨海默病的流行病学研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2021, 29(9): 707-710.
- [3] 田文国, 王春芳, 陈金鹏, 刘毅, 盖晓红, 任涛, 田成旺. 中药抗阿尔茨海默病的作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3195-3208.
- [4] Nazarko, L. (2019) Dementia 2. Alzheimer's Disease: Diagnosis, Treatment and Management. *British Journal of Healthcare Assistants*, **13**, 329-335. <https://doi.org/10.12968/bjha.2019.13.7.329>
- [5] 孙雪莲, 邓一平, 董碧蓉. 痴呆及阿尔茨海默病进展要点简析[J]. 现代临床医学, 2022, 48(4): 310-313.
- [6] 王蓓芸, 钟远, 燕虹. 乌灵胶囊治疗伴抑郁状态的老年轻度认知功能障碍患者的临床疗效观察[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2082-2085.
- [7] 吴文涛, 李雷俊, 文飞, 龚梅恩. 乌灵胶囊联合重复经颅磁刺激治疗老年抑郁症的效果及对认知功能的影响[J]. 中国医药导报, 2016, 13(17): 65-68.
- [8] 李中春, 李德强. 乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠学习记忆障碍的影响[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(6): 629-632.
- [9] 黎功炳, 雷宁, 覃树勇, 龙军, 陈德书, 易伟. 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中乙酰化H3及5-HTT、TH表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3642-3644.
- [10] 邹小冬, 张震中, 程有根, 李中春, 王海, 胡智伟. 乌灵胶囊对小鼠认知功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(20): 2421-2423.
- [11] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇[J]. 药学报, 2012, 47(6): 696-703.
- [12] 解静, 高杉, 李琳, 徐一兰, 高树明, 于春泉. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [13] 杨梦, 鲜慈英, 黄斌, 凌志峰, 赵倩, 詹杰, 罗洪斌. 基于网络药理学探讨枸杞子-山药防治阿尔茨海默病的作用机制[J]. 湖北民族大学学报: 医学版, 2021, 38(2): 18-22.