

# 基于网络药理学的金匱肾气丸治疗阿尔茨海默病机制研究

罗燕燕<sup>1</sup>, 季文莹<sup>2</sup>, 孙倩<sup>3</sup>, 马琴国<sup>1</sup>, 张柏桃<sup>4</sup>, 王婷婷<sup>1</sup>

(1. 甘肃省中医院药学部, 甘肃 兰州 730050;

2. 兰州大学第二医院药剂科, 甘肃 兰州 730030;

3. 甘肃省中医院心功能检查科, 甘肃 兰州 730050;

4. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**目的 采用网络药理学技术探究金匱肾气丸治疗阿尔茨海默病(AD)的潜在作用机制。方法 利用 TCMSP 数据库,以口服生物利用度  $OB \geq 30\%$  和类药性指数  $DL \geq 0.18$  筛选金匱肾气丸治疗 AD 的相关活性化学成分,组方化学成分靶点,通过 Genecards 数据库获取与 AD 疾病相关的靶标,使用韦恩分析筛选化学成分靶点与疾病靶点二者治疗 AD 的潜在作用靶点;采用 Cytoscape 构建构建“活性成分-作用靶点”作用网络图,采用 R 软件中的“ClusterProfiler”软件包进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。**结果** 共得到金匱肾气丸 131 个活性成分,216 个化学成分靶点,如谷甾醇、玉兰脂素 B、海风藤酮、汉辛酚、亚麻酸乙酯、泽泻醇 B、黄连碱等;Genecards 数据库获取到 8718 个 AD 相关蛋白基因;韦恩分析得到金匱肾气丸与 AD 的 176 个共同靶点,包括 HSP90AA1、MAPK1、AKT1、JUN、RELA、FOS、ESR1、MAPK14、MYC 等。GO 分析显示共同靶点的生物功能主要涉及对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、酰胺结合等过程;KEGG 富集主要涉及体剪切应力与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等。**结论** 金匱肾气丸的主要活性成分为谷甾醇、玉兰脂素 B、海风藤酮、汉辛酚、亚麻酸乙酯、泽泻醇 B、黄连碱等,这些成分可通过 HSP90AA1、MAPK1、AKT1、JUN、RELA、FOS、ESR1、MAPK14 等关键靶点作用于体剪切应力与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路发挥治疗 AD 的作用。

**关键词:**金匱肾气丸;阿尔茨海默病;网络药理学

中图分类号:R259

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.06.004

文章编号:1006-1959(2024)06-0022-06

## Study on the Mechanism of Jinkui Shenqi Pill in the Treatment of Alzheimer's Disease Based on Network Pharmacology

LUO Yan-yan<sup>1</sup>, JI Wen-ying<sup>2</sup>, SUN Qian<sup>3</sup>, MA Qin-guo<sup>1</sup>, ZHANG Bo-tao<sup>4</sup>, WANG Ting-ting<sup>1</sup>

(1. Pharmacy Department of Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu, China;

2. Pharmacy Department of the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;

3. Cardiac Function Examination Department of Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine,  
Lanzhou 730050, Gansu, China;

4. Gansu Provincial Institute of Drug Control, Lanzhou 730070, Gansu, China)

**Abstract: Objective** To explore the potential mechanism of Jinkui Shenqi pills in the treatment of Alzheimer's disease (AD) by network pharmacology. **Methods** The TCMSP database was used to screen the active chemical components of Jinkui Shenqi pills in the treatment of AD with oral bioavailability  $OB \geq 30\%$  and drug-like index  $DL \geq 0.18$ , and the chemical component targets were composed. The targets related to AD disease were obtained by Genecards database, and the potential targets of chemical component targets and disease targets in the treatment of AD were screened by Wayne analysis. Cytoscape was used to construct the "active ingredient-target" action network diagram, and the "ClusterProfiler" software package in R software was used for GO and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** A total of 131 active ingredients and 216 chemical targets of Jinkui Shenqi pills were obtained, such as sitosterol, magnolin B, kadsura ketone, octylphenol, ethyl linolenic acid, alisol B, coptisine, etc. 8718 AD-related protein genes were obtained from Genecards database. The 176 common targets of Jinkui Shenqi pills and AD were obtained by Wayne analysis, including HSP90AA1, MAPK1, AKT1, JUN, RELA, FOS, ESR1, MAPK14, MYC, etc. GO analysis showed that the biological functions of the common targets were mainly involved in the response to oxidative stress, cell response to chemical stress, amide binding and other processes. KEGG enrichment mainly involved AGE-RAGE signaling pathway in body shear stress, atherosclerosis and diabetic complications. **Conclusion** The

基金项目:中医药人才培养重点学科项目(编号:甘财社[2022]48号)

作者简介:罗燕燕(1992.1-),女,甘肃武威人,硕士,中药师,主要从事中药制剂工艺研究

通讯作者:王婷婷(1986.7-),女,甘肃庆阳人,硕士,主管中药师,主要从事中药品种鉴定与质量控制研究

main active components of Jinkui Shenqi pill are sitosterol, magnolin B, kadsura ketone, wogonol, ethyl linolenic acid, alisol B, coptisine, etc. These components can play a role in the treatment of AD by HSP90AA1, MAPK1, AKT1, JUN, RELA, FOS, ESR1, MAPK14 and other key targets in the body shear stress and AGE-RAGE signaling pathway in atherosclerosis and diabetic complications.

**Key words:** Jinkui Shenqi pill; Alzheimer's disease; Network pharmacology

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是首次被德国精神病学家和神经发病学家 Alzheimer Alois 发现并命名。AD 又称老年痴呆,多发于 65 岁以上人群,是一种慢性神经退行性疾病,以记忆力逐渐减退、认知功能发生障碍、行为异常和社交障碍为临床表现<sup>[1,2]</sup>。据报道<sup>[3]</sup>,至 2050 年,全世界范围内 AD 患者从当前的 360 万将增至 3 倍。随着不断深入研究,AD 的发病机制逐渐明了,主要包括:胆碱能神经元假说、 $A\beta$ ( $\beta$ -淀粉样蛋白)毒性假说、Tau 蛋白假说、炎症假说、胰岛素假说、氧化不平衡假说和基因突变假说等<sup>[4,5]</sup>,但其易受自然环境因素,比如:过渡金属元素、空气污染,人文环境因素,遗传等多因素,具有难治愈性。虽然卡巴拉汀、加兰他敏及多奈哌齐等乙酰胆碱酯酶拮抗剂的出现填补了治疗 AD 无效的空白,但此类药物仅可以适度改善患者的症状,均达不到治愈病情的效果,且易产生耐药性及副作用<sup>[6]</sup>。因此寻找毒副作用较小、能够发挥多层次、多靶点的药物也是当务之急,而中医药的整体性和多成分性的特点与 AD 发病机制复杂性、综合性的特征相吻合。淫羊藿苷、栀子苷、五味子藤茎提取物、积雪草乙醇提取物、荔枝核皂苷、枸杞子、六味地黄丸、滋养心脏汤、天麻钩藤饮、还脑益聪方、开心散、六位地黄汤经实验证实均对 AD 有一定疗效<sup>[6]</sup>。因此开展对中药及其复方的研究治疗 AD 具有广阔的研究前景。

金匱肾气出自汉代医圣张仲景的《金匱要略》,由桂枝、附子、熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻组成<sup>[7]</sup>,在 1998 年出版的《中华人民共和国卫生部药品准则·中药成方制剂》中收录的中成药金匱肾气丸增加了牛膝(去头)和车前子<sup>[8]</sup>,其具有“温补肾阳,化气行水”之功效,临床常用于治疗肢体浮肿、肾阳不足、生殖功能减退、腰膝酸软等疾病。现代药理作用研究表明,其可通过调节 AD 患者的神经系统及其机体激素水平<sup>[9]</sup>来发挥治疗 AD 的作用,但其物质基础及作用机制仍不完全清楚。本研究通过构建“活性成分-靶点”多层次网络,利用网络分析并阐述金匱肾气丸对 AD 的干预及影响,从而更好地了解对金匱肾气丸对 AD 的治疗作用。

## 1 资料与方法

1.1 金匱肾气丸中化合物及靶点收集 借助中药系统药理分析平台(TCMSP, <http://old.tcmsp-e.com/index.php>),分别以金匱肾气丸全方的“熟地黄”“山药”“牛膝”“车前子”“桂枝”“附子”“山茱萸”“牡丹皮”“茯苓”“泽泻”为关键词搜索化合物成分及其靶点,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性指数(DL) $\geq 0.18$ 为条件筛选活性成分。

1.2 AD 靶点集的获取及金匱肾气丸治疗 AD 的潜在作用靶点预测 通过 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>),以“Alzheimer's Disease”作为关键词,获得疾病靶点集。利用 R 软件,将疾病靶点集与药物靶点进行映射,提取二者交集靶点。

1.3 韦恩分析和蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 通过 R 软件中的“VennDiagram packages”分析活性成分靶标和疾病靶标的筛选结果,获得治疗 AD 的靶标蛋白基因,将其输入到 String 数据库(<http://cn.string-db.org/>)进行蛋白质相互作用分析并构建 PPI 网络。

1.4 金匱肾气丸治疗 AD 网络建设与分析 利用 Cytoscape 3.7.0 软件构建“组分-靶标网络”,以更直观地分析用于疾病的药物(化合物)的治疗机制。

1.5 GO 分析和 KEGG 分析 Gene Ontology (GO)数据库(<http://geneontology.org/>)包括分子功能(MF)、生物过程(BP)、细胞成分(CC),可用于识别高通量基因组的生物学机制或转录组数据。本研究利用 R 软件中的“ClusterProfiler”软件包进行 GO 和 KEGG 分析。GO 和 KEGG 富集分析结果中,Y 轴代表途径名称,X 轴代表富集因子(目标基因中属于该途径的基因数量/背景基因集中所有途径基因的数量)。气泡大小表示属于目标基因中途径的基因数量。研究将阈值设置为  $P < 0.05$ 。最后,再将 KEGG 结果利用 Cytoscape 构建 KEGG 网络,节点的大小代表富集的数量。

## 2 结果

2.1 金匱肾气丸及四逆散活性成分及靶点预测 TCMSP 数据库得到金匱肾气丸 131 个活性化合物,

Vol. 37 No.6  
Mar. 2024

如谷甾醇(sitosterol)、豆甾醇(Stigmasterol)、玉兰脂素 B (Denudatin B)、海风藤酮(Kadsurenone)、汉辛酚(hancinol)、亚麻酸乙酯(Ethyl linolenate)、丁子香酚(Mairin)、山奈酚(kaempferol)、儿茶素(catechin)、泽泻醇 B (alisol B)、泽泻醇 C(alisol C)、黄连素(berberine)、黄连碱(coptisine)、汉黄芩素(wogonin)、二氢杨梅素(Dihydrotricetin)、羟基芜花素(Hydroxy - genkwanin)、远华蟾毒精(Telocinobufagin)、四氢鸡脚木碱(Tetrahydroalstonine)、恹碱(gnavine)、菊石碱(jesaconitine)等,共得 216 个化学成分靶点。

2.2 AD 蛋白基因靶点预测 利用 GeneCards 数据库得到 8718 个 AD 相关蛋白基因。

2.3 韦恩分析与 PPI 网络构建 将 216 个靶点与 AD 靶点进行韦恩分析,得 176 个共同靶点。其后



图 1 韦恩分析

2.4 金匱腎氣丸活性成分-靶点网络分析 用 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点网络,见图 3。结果表明,金匱腎氣丸活性成分有谷甾醇、豆甾醇、三萜脂素 B、海风藤酮、汉辛酚、亚麻酸乙酯、丁子香酚、山奈酚、泽泻醇 C、黄连素、黄连碱、汉黄芩素、二氢杨梅素、羟基茛菪花素、远华蟾毒精、四氢鸡脚木碱、脞碱、菊石碱等,化学成分靶点有 NOS2、PTGS1、PTGS2、DPP4、HSP90AA1、PRSS1、NCOA2、NCOA1、CALM1、HTR、ACHE、PGR NCOA2、NR3C2、PGR、NCOA2、AR、PPARG、DPP4、RXRA 等,活性化合物可以作用于多个靶点,多个生物活性化合物也可以作用于一个靶点。

将 176 个共同靶点输入到 String 分析并构建 PPI 网络 (图 1)。在 PPI 网络中, 以最低要求互动得分 (minimum required interaction score) 大于 0.9 为筛选条件, 节点代表由单个蛋白质编码基因位点产生的所有蛋白质, 边代表蛋白质-蛋白质存在关联, 得到金匱肾气丸蛋白质相互作用网络图涉及 175 个节点, 567 条边, 该网络的平均度值为 6.48, 其后利用 Cytoscape 软件的 NetworkAnalyzer 功能分析网络中的拓扑参数, 依据拓扑参数连接度 (degree)、介度 (betweenness) 和紧密度 (closeness) 对化合物或靶点的重要性进行评估, 度值越大表明参与生物功能越多, 如 HSP90AA1、MAPK1、AKT1、JUN、RELA、FOS、ESR1、MAPK14、MYC 等靶标, 见图 2。

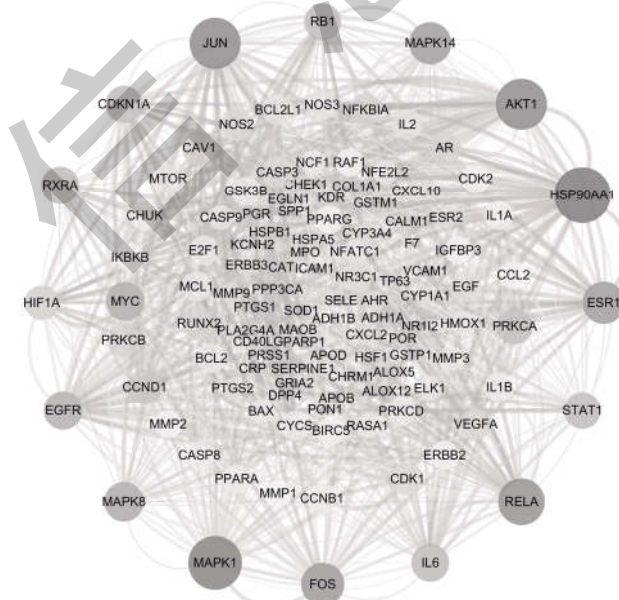
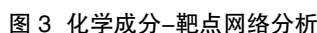


图 2 PPI 拓扑网络分析

2.5 GO 分析和 KEGG 分析 对排在前 10 的富集条目通过进行展示, 见图 4, 金匱肾气丸共富集到 176 个生物过程, 主要参与对药物的反应(Reactions to drugs)、对氧化应激的反应(response to oxidative stress)、细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、细菌起源分子的反应, 膜筏(membrane raft)、膜微域(membrane microdomain)、膜区(membrane region)、DNA 结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合(RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding)、酰胺结合(amide binding)等。KEGG 通路



前列腺癌(Prostate cancer)等相关,见图 5。上述分析结果表明,金匱肾气丸的主要活性成分的作用靶点分布在不同的代谢途径中,“多成分、多靶点、多途径”的相互调节是治疗 AD 机制。



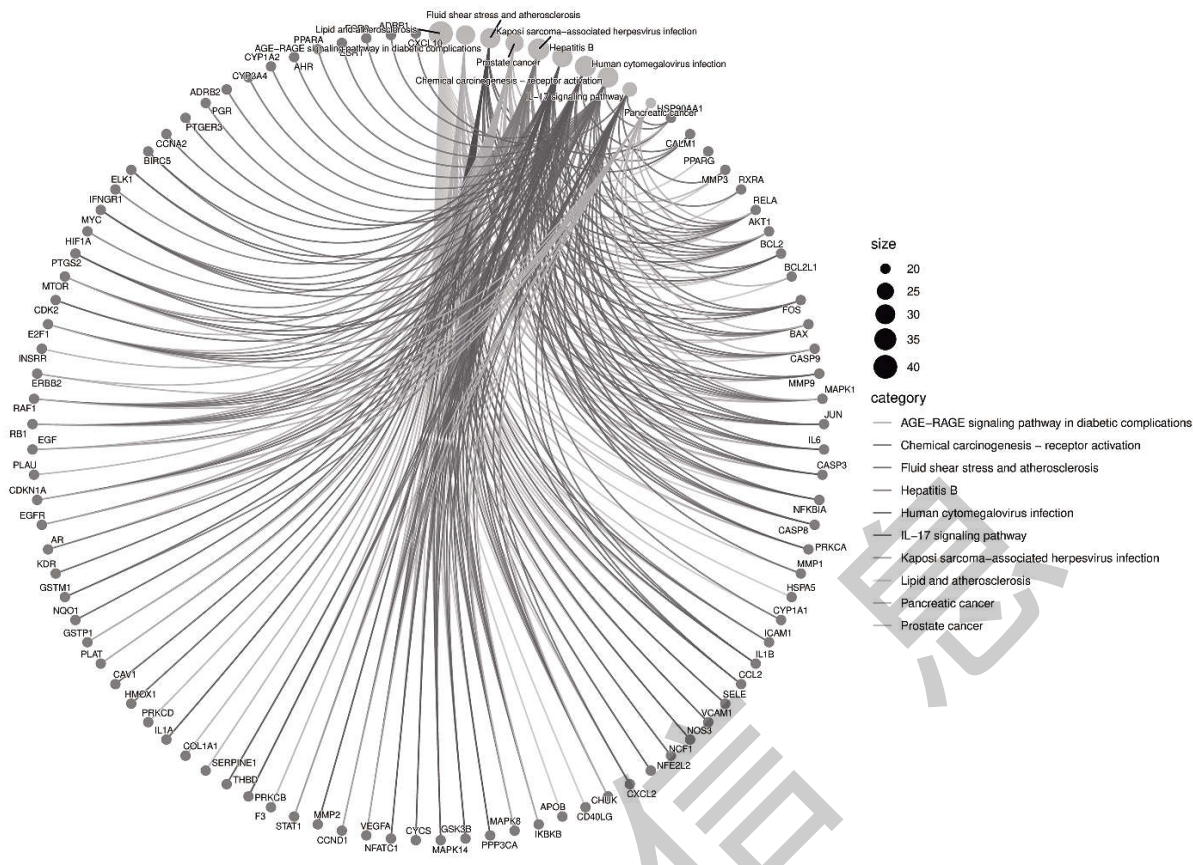


图 5 KEGG 分析

### 3 讨论

网络药理学是基于大数据融合,利用生物系统结合计算机网络分析以了解药物活性成分、靶标蛋白和疾病之间的潜在通路机制,这符合中医药治疗疾病的整体观念,为中药的作用机制和药效物质基础研究提供了一个全新的视角和解决对策。研究发现,AD 发病机制与胆碱能神经元假说、A $\beta$ ( $\beta$ -淀粉样蛋白)毒性假说、Tau 蛋白假说、炎症假说、胰岛素假说、氧化不平衡假说和基因突变假说相关<sup>[4-5]</sup>,且具有难治愈性。当前,乙酰胆碱酯酶拮抗剂虽填补了治疗 AD 无效空白,但此类药物只能适度改善患者症状,但均达不到治愈病情的效果,且易产生耐药性及副作用<sup>[4]</sup>。成分-靶点网络显示,去氧穿心莲内酯、水黄皮素、小檗碱、黄芩素、菠菜甾醇、谷甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、白芥子苷等活性成分均可作用于 HSP90AA1、MAPK1、AKT1、JUN、RELA、FOS、ESR1、MAPK14、MYC、EGFR、RXRA、IL6 等多个靶标,涉及脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化等。研究也表明小檗碱可降低人神经胶质瘤 H4 细胞及

AD 兔模型中的  $\beta$  淀粉样蛋白含量,逆转 AD 转基因小鼠模型中神经元突触中的 A $\beta$  淀粉样的病理状态、神经胶质增生及海马神经变性<sup>[10]</sup>。也有研究发现<sup>[11]</sup>,小檗碱可有效降低诱癌素 A 诱导的 Tau 蛋白的过磷酸化,而磷酸化的过度表达会导致细胞内神经原纤维缠结(NFTs)破坏其调节轴突运输的正常功能,并导致可溶性 Tau 蛋白和有毒物质的形成。黄芩苷可影响抑郁症病理生理学中脑结构中神经元活力和脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平,通过调节 Bax、Bcl-2 和裂解的 caspase-3 的表达,激活 ACE2/Ang-(1-7)/Mas 轴来保护内皮细胞免受 Ang II 诱导的内皮功能紊乱和氧化应激<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇还可增加超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,在抗氧化酶合成时不产生急性、亚慢性毒性或异常,还可通过 GABA/BDZR 机制降低过氧化氢酶活性表现出明显的抗焦虑和抗惊厥作用<sup>[13]</sup>。

金匱肾气丸作为温补肾阳的经典方剂之一,中医认为肾为先天之本,五脏阳气之根,中医学中所论述的“肾藏精”“主骨生髓”“肾主水”“肾主纳气”等功能、而肾阳虚的动物会出现一些未老先衰的症状如



体质量下降、耐力低下、精神萎靡不振、反应迟钝等一系列症状。近年来研究发现该方对 AD 有一定疗效,即“从肾论治”<sup>[14,15]</sup>。该方可通过调节下丘脑-垂体-性腺轴调节由氢化可的松建立肾阳虚模型大鼠血清中雌二醇(estrogen, E<sub>2</sub>)及 T 的激素水平、干预期间精神萎靡不振及反应迟钝等症状改善。与之类似,该方还可通过下丘脑-垂体-肾上腺轴,逆转“劳倦过度、房室不节”肾阳虚小鼠的促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)含量的降低,促使皮质类固醇激素水平正常化<sup>[16]</sup>。还可逆转 Aβ<sub>25~35</sub> 建立老年性痴呆大鼠模型皮质内支持感觉和运动神经元的存活等功能的 NT-3 阳性神经元数目减少,起到防治老年性痴呆作用<sup>[17-20]</sup>。

综上所述,金匱肾气丸治疗 AD 的机制可能与脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化等相关信号通路相关。目前在治疗 AD 表现出一定的疗效,但是通过具体哪些通路尚未完全明确,而且对 AD 致病机制目前还不明确,后续将结合药效及临床研究对化合物、靶点和通路,进行进一步验证。

#### 参考文献:

- [1]顾晓群.基于网络药理学探讨补肾益智方经 PI3K/Akt/GSK3β 信号通路干预轻度认知障碍小鼠的作用及机制[D].南京:南京中医药大学,2020.
- [2]曹甜甜,王亚飞,张文龙,等.经颅交流电刺激对阿尔兹海默病小鼠双侧海马有效连接的干预研究[J].西安交通大学学报,2023,57(4):80-87.
- [3]崔舒鹏,高敏.阿尔兹海默病患者血清 MCP-1、ZO-1 的表达与认知功能的相关性[J].海军医学杂志,2023,44(4):411-413.
- [4]罗连响,黄芳芳,吴锐剑,等.花青素对阿尔兹海默病关键药理途径的生物信息学分析及实验验证[J].中国免疫学杂志,2021,37(18):2217-2224.
- [5]刘雨欣,秦雪梅,高丽.脑细胞衰老在阿尔茨海默症发病机制中的潜在作用[J].药科学报,2022,57(7):1946-1953.
- [6]林凯莉,张世卿.去甲氧基姜黄素通过促进海马神经发生对阿尔兹海默症认知损伤的改善作用[J].中成药,2022,44(8):2476-2482.
- [7]李安祥,谢冉.解读金匱肾气丸及其成药的演变与应用[J].中医药通报,2020,19(2):18-20,23.
- [8]朱丽红,黄庆田.中成药金匱肾气丸组方认知状况的数据挖掘[J].江西中医药,2019,50(9):20-21.
- [9]张倩,杨旭,王媛,等.金匱肾气丸对去势大鼠骨微结构及 ALP、OPG、IL-6 的影响[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(10):1475-1480.
- [10]Singh AK, Singh SK, Nandi MK, et al. Berberine: A Plant-derived Alkaloid with Therapeutic Potential to Combat Alzheimer's disease[J]. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 2019, 19:1.
- [11]夏金婵,从人愿,袁静,等.黄芩苷通过 p38 MAPK/NLRP3 通路对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(2):79-86.
- [12]赵帅,陈冬梅,虎娜,等.β-谷甾醇通过 PI3K/AKT 通路影响颗粒细胞增殖及凋亡[J].宁夏医科大学学报,2021,43(4):339-344.
- [13]严宁,杨春霞,马娟,等.β-谷甾醇对大鼠心肌缺血再灌注损伤和 ERK1/2 信号通路的影响[J].心血管病学进展,2020,41(3):321-325.
- [14]叶蓉,唐春风,刘道光,等.金匱肾气丸与补中益气丸联用对自然衰老 C57 小鼠运动及代谢的影响[J].中国老年学杂志,2021,41(3):600-603.
- [15]刘冬梅,林钟鸿.金匱肾气丸对阴阳两虚型糖尿病肾病患者血糖水平及肾功能的改善效果[J].内蒙古中医药,2022,41(7):18-19.
- [16]冯楚辉.加味金匱肾气丸联合温针灸治疗脾肾阳虚型早泄的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2021.
- [17]程艳,李扬,郭建伟,等.SOD 融合蛋白降低阿尔兹海默症小鼠脑内氧化水平及改善认知功能[J].现代生物医学进展,2022,22(19):3634-3639,3679.
- [18]王准,孙瑜莹,黄汉昌.氧化应激与阿尔茨海默病的病理关系及干预措施[J].生命科学,2023,35(4):519-528.
- [19]邵思迈,史泓,余婧阳,等.阿尔茨海默病中的 β 淀粉样肽与氧化应激[J].中国比较医学杂志,2021,31(10):131-135.
- [20]赵丽萍,缪林清,蒋鹭莲,等.针刺改善阿尔茨海默病氧化应激机制的研究现状与思考[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(8):2670-2678.

收稿日期:2023-06-28;修回日期:2023-07-22

编辑/成森