

温胆汤改善脑白质疏松症致认知功能障碍的网络药理学研究

智璇 贺程蓓

晋中市中医院 山西晋中 030600

摘要: 目的: 利用网络药理学探索经典名方温胆汤改善认知功能障碍的机制。方法: 在中药系统药理学分析平台(TCMSP)、Genecards 数据库, 筛选并预测温胆汤的活性成分及认知功能障碍的作用靶点。借助 Cytoscape 软件构建温胆汤活性成分-认知功能障碍网络。在 STRING 数据库构建靶蛋白相互作用网络(PPI)。通过生物学信息注释数据库(DAVID)对靶点进行 GO 分析和 KEGG 代谢通路分析。结果: 温胆汤改善认知功能障碍相关的潜在靶点有 224 个, 筛选出核心靶点 41 个。对其核心靶点 PPI 分析, 靶点 HSP90AB1、GRB2、KDR 和 MCL1 位列前四。GO 分析结果显示核心靶点参与生物过程(BP) 69 条, 细胞组分(CC) 24 条, 细胞质分子功能(MF) 31 条。通过 DAVID 平台筛选出 27 条富集度较高的通路。结论: 温胆汤的活性成分通过多靶点、多通路发挥改善认知功能障碍的作用, 本研究结果为进一步研究温胆汤提供了参考依据。
关键词: 温胆汤; 脑白质疏松症; 认知功能障碍; 网络药理学; 作用机制

随着时代的发展, 人们面临压力大, 不良情绪得不到疏泄, 加之生活习惯不规律, 脑白质疏松症^[1](leukoaraiosis, LA) 的发病率逐年增高。脑白质疏松症与认知障碍^[2]密切相关, 是脑小血管病的重要影像学表现之一。最新流行病学数据显示, LA 不仅发病率随年龄增长而增加, 其 LA 和认知损害程度也随年龄增长而增加。部分患者后期会发展为痴呆症, 将严重影响他们的生活质量。脑白质疏松轻度认知障碍(LAMCI) 可视为痴呆的早期阶段, 提前干预可减轻病情加重对患者造成的伤害, 体现了中医“治未病”思想中未病先防。现代医学对于脑白质疏松症认知障碍的治疗, 由于发病机制不明确, 缺乏统一推荐的药物, 临床上也没有针对脑白质疏松症认知障碍的规范化治疗。美金刚、多奈哌齐等药物对认知障碍虽有一定效果, 但长期服用会引起一定的副作用, 局限性明显。

本课题基于“百病皆由痰作祟”中医理论, 运用温胆汤联合头针治疗痰浊蒙窍型脑白质疏松轻度认知障碍。温胆汤^[3]来源于唐代《千金方》, 为中医学经典方剂之一, 该方由半夏、陈皮、竹茹、枳实、甘草、茯苓组成, 有理气化痰、利胆合胃的功效。本文旨在通过网络药理学手段初步探索温胆汤改善认知功能的作用机制^[4], 为进一步拓展温胆汤在脑病科临床应用提供依据^[5]。

1. 材料与方法

1.1 温胆汤化学成分的收集与确定

通过国内外文献调研和中药系统药理学分析平台(TCMSP)、Pubchem 数据库, 并结合《中国药典》2020 版一部, 收集温胆汤 8 味中药的化学成分, 并以口服生物利用度(OB \geq 30%) 和类药性(DL \geq 0.18) 为限定条件对所收集到的化学成分进行筛选, 筛选出符合条件的化学成分。

1.2 温胆汤化学成分潜在作用靶点的筛选

将筛选所得的化学成分的 Canonical SMILES 值输入到 Swiss Target Prediction^[6] 数据库中, 进一步查询其作用靶点信息, 并将所得到的活性成分靶点合并删除重复值, 获得温胆汤化学成分潜在作用靶点信息。

1.3 认知功能障碍潜在作用靶点的预测

通过在线数据库 Genecards^[7], 以 cognitive function、cognitive dysfunction、cognitive disorder 为关键词进行搜索, 查找归纳其中有明确与认知功能障碍相关的作用靶点, 删除重复靶点, 得到与认知功能障碍相关的作用靶点。

1.4 交集靶点相互作用网络及筛选核心靶点

将“1.2”和“1.3”收集的温胆汤主要活性成分和认知功能障碍相关疾病靶点取交集靶点, 绘制交集靶点 Venn 图, 即潜在作用靶点。

将温胆汤改善认知功能障碍的潜在靶点导入 String 数据库, 限定研究物种为人类, 潜在靶点的蛋白质-蛋白质相

相互作用 (protein-protein interaction, PPI)。将 PPI 网络信息文件导入 Cytoscape3.10.3 软件, 利用工具中将网络图中节点 (node) 大小和颜色设置为反映 Degree 值大小, 将边 (edge) 的粗细反映 Combined score 大小, 最终获得蛋白质相互作用网络。利用插件计算分析介数中心性 (betweenness centrality, BC) 度中心性 (degree centrality, DC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 的平均值筛选出核心靶点, 构建核心靶点的 PPI 网络。

1.5 关键靶点的生物过程分析和代谢通路分析

将筛选得到的温胆汤改善认知功能障碍的核心靶点导入生物学信息注释数据库^[8] (DAVID), “Select Identifier” 选择 “OFFICIAL-GENE-SYMBOL”, “Select species” 选择 “Homo sapiens” 选择基因本体论 (gene ontology, GO) 中分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell component, CC) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行富集分析, 富集结果 P 值越小表明相关程度越高。分别选取 P 值最小的前 20 条结果, 在微生物平台对各富集结果进行可视化。

1.6 靶点间相互作用网络关系图构建

将温胆汤化学成分作用靶点、认知功能障碍疾病作用靶点以及通路信息, 导入 Cytoscape 软件, 构建其相互作用网络, 即: 温胆汤活性成分-作用靶点-通路-认知功能障碍症。采用 Cytoscape 软件中, 对相互作用网络中的分析节点度 (Degree) 和中介中心度 (Betweenness Centrality) 这两个重要的网络拓扑参数进行分析。

2. 结果与分析

2.1 温胆汤活性成分的筛选

根据 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$, 筛选得到半夏活性成分 11 个, 陈皮 5 个, 大枣 17, 茯苓 12 个, 甘草 75 个, 生姜 5 个, 枳实 15 个, 结合文献报道, 补充明确具有活性的成分, 最终确定温胆汤活性成分 131 个 (半夏 11 个, 陈皮 5 个, 大枣 17 个, 茯苓 12 个, 甘草 75 个, 生姜 5 个, 枳实 15 个, 竹茹 2 个)。

2.2 温胆汤化学成分潜在作用靶点预测结果

温胆汤活性成分在 SEA 数据库预测靶点, 汇总, 删除重复值后, 获得靶点共有 962 个, 导入 Cytoscape 软件, 构建 “药味-成分-靶点” 网络图, 详见图 1。图中共 1101

个节点, 8575 条边, 节点代表药物、成分与靶点, 边代表其间的相互关联。从图中可以看出同一成分可以作用于多种靶点, 同一靶点也可归属于不同成分。体现了温胆汤多成分、多靶点的特点。

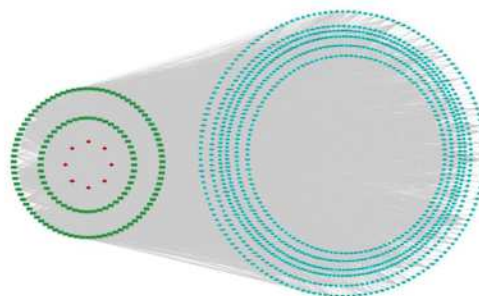


图 1 药味-成分-靶点图

2.3 认知功能障碍潜在作用靶点的预测

通过 Genecards 在线数据库检索得到与认知功能障碍相关的靶点为 5876 个。将靶点信息进一步汇总, 按相关度 (Relevance score) 数值大小进行排序, 得到 2900 个相关度大于 2 的靶点。

2.4 温胆汤改善认知功能障碍的潜在靶点与核心靶点的 PPI 分析

通过 TCMSp 数据库和 SwissTargetPrediction 共收集到 131 个成分, 962 个药物靶点。GenCards 数据库收集到 2900 个疾病靶点。将温胆汤与认知功能障碍的预测靶点做 Venn 图, 得到 224 个交集靶点即潜在靶点 (见图 2)。

将 224 个交集靶点导入 String 数据库得到靶点互作关系, 使用 Cytoscape3.10.3 绘制 PPI 图。该网络图共有 214 个节点, 875 条边。(见图 3)

利用插件 Centiscape2.2 根据中介中心度 (BetweennessCentrality) 和接近中心性 (ClosenessCentrality) 分析筛选出 41 个温胆汤改善认知功能障碍的核心靶点, 41 个核心靶点 PPI 图 (见图 4)。核心靶点 Degree 值 (括号内为 Degree 值) 从大到小依次为 HSP90AB1 (53)、GRB2 (29)、KDR (29)、MCL1 (28)、ITGB1 (26)、NCOR1 (26)、RXRA (26)、PTK2 (24)、LYN (24)、KAT2B (21)、NCOR2 (21)、HDAC3 (20)、PGR (19)、PLCG1 (18)、CCNA2 (18)、CYP2C9 (17)、PPARD (17)、EPHA2 (16)、FABP4 (16)、STAT6 (16)、RPS6KB1 (16)、NR1H2 (15)、APEX1 (15)、EIF4A1 (15)、EZR (15)、PTPN1 (14)、

ANPEP (14)、(14)、ALK (13)、SCD (13)、FLT3 (13)、FKBP1A (12)、PTGS1 (12)、EPHX2 (12)、EPAS1 (10)、DGAT1 (10)、ALOX5 (10)、CD81 (10)、GLO1 (9)、IMPDH2 (9)、CAMK4 (9)。在度值排名中，HSP90AB1、GRB2、KDR 和 MCL1 位列前四，节点的大小和颜色的深浅直观地反映了这一点：蛋白颜色越深、节点越大，其在网络中的重要性就越高。

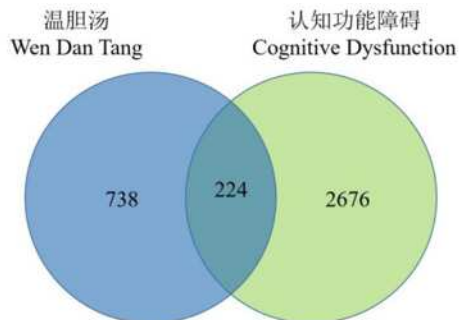


图 2 成分靶点和疾病靶点韦恩图

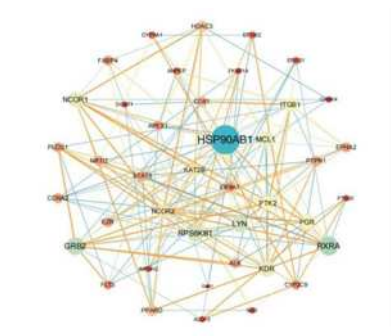


图 3 潜在靶点的 PPI 网络

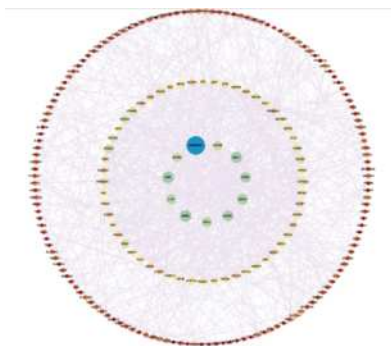


图 4 核心靶点的 PPI 网络

2.5 GO 生物过程分析和 KEGG 代谢通路分析

GO 分析结果显示核心靶点参与生物过程 (biological process, BP) 69 条, 包括通过 JAK-STAT 调节的生长激素受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号转导等;

细胞组分 (cellular component, CC) 24 条, 涉及细胞核、细胞质、膜及胞浆等; 细胞质分子功能 (molecular function, MF) 31 条, 主要关系到酶、生长因子和蛋白激酶结合。说明温胆汤可以通过多个生物学过程、细胞组分和分子功能发挥改善认知功能障碍的作用。按照 P 值由小到大选取前 20 条结果, 并利用微信信在线作图平台实现结果的可视化 (见图 5)。

通过 DAVID 平台对 41 个核心靶点进行富集分析, 为了确保分析的准确性, 筛选 $P < 0.05$ 的条目, 最终获得了 27 条 KEGG 富集通路, 其中高度富集的通路包括 PI3K-AKT 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway) 等。选取排名前 20 位的通路建立气泡图 (见图 6)。

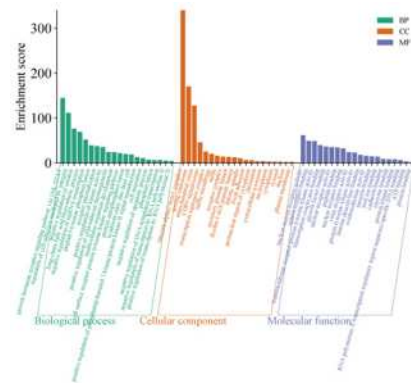


图 5 GO 功能富集条形图

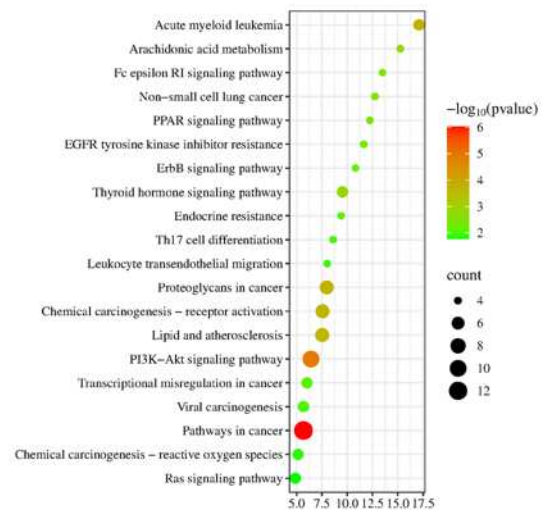


图 6 KEGG 富集分析气泡图

2.6 温胆汤 - 活性成分 - 靶点 - 通路” 的网络分析

利用 Cytoscape3.10.1 软件将 131 个活性成分、41 个潜在靶点和 20 条信号通路构建“温胆汤-活性成分-靶点-通路”的网络(见图 7)。该网络有 200 个节点及 953 条边。从图 7 可以看出,温胆汤中的化学成分能够与多个靶点结合,而不同的生物通路也会通过某些关键的靶点产生相互影响。这直观地展示了温胆汤在改善认知功能障碍作用中的多成分、多靶点、多通路的协同作用机制。

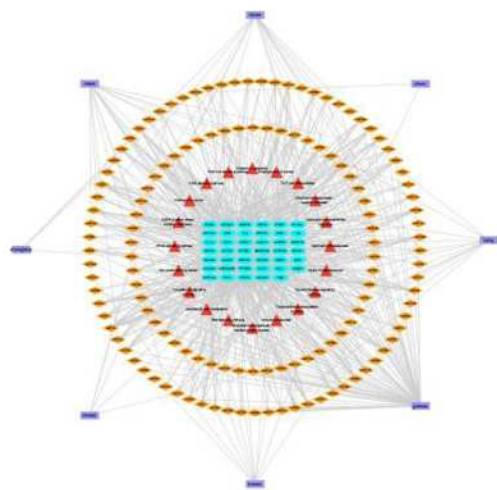


图 7 温胆汤-活性成分-靶点-通路

(紫色为药物,橘色为主要成分,红色为通路,蓝色为核心靶点)

3. 讨论与总结

温胆汤活性成分 131 个(半夏 11 个,陈皮 5 个,大枣 17 个,茯苓 12 个,甘草 75 个,生姜 5 个,枳实 15 个,竹茹 2 个)。通过对药物活性化学成分和靶点进一步的检索筛选,得出 OB 值排名前十的活性成分:甘草酚(甘草)、毛瑞丁 D(大枣)、二氢川陈皮素;(陈皮)、N-反式阿魏酰酪胺(大枣)、7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳基香豆素(甘草)、甘草吡喃香豆素(甘草)、shimpterocarpin(甘草)、phaseolin(甘草)、甘草查尔酮 B(甘草)、粗毛甘草素 F(甘草),这些成分可能在温胆汤口服时发挥一定的药理作用。另外,Licoricone 是竹茹、甘草的共有活性化学成分;naringenin 是枳实、陈皮、甘草的共有活性化学成分;Mairin、quercetin 是甘草、大枣的共有活性化学成分;Nobiletin、5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one 是枳实、陈皮的共有活性化学成分;Stigmasterol、beta-sitosterol 是半夏、生姜、大枣的共有活性化学成分;sitosterol 是陈皮、甘草的共有活性化学成分。这

些药物之间所共有的化学成分可能是在温胆汤治疗认知功能障碍中发挥药理作用的主要成分。

通过 KEGG 通路富集分析结果可知温胆汤治疗认知功能障碍涉及多种信号通路,主要包括 PI3K-AKT 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)。PI3K-AKT 信号通路^[9]是一种细胞内信号转导途径,响应细胞外信号,调节多种细胞功能,例如代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成等。而且 PPI 分析中 degree 值较高的核心靶点 HSP90AB1、GRB2 等均在此通路富集。GO 分析结果说明温胆汤可以通过多个生物学过程,JAK-STAT 调节的生长激素受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号转导等,调控 DNA 及 RNA 聚合酶转录过程,激活蛋白酪氨酸激酶、氧化还原酶等酶的活性,促使钾离子结合、蛋白质结合等细胞功能的有序进行,直接或者间接改善认知功能障碍。由温胆汤核心靶点 PPI 网络图可知,基因靶点 HSP90AB1、GRB2、KDR 和 MCL1 位列前四,提示下一步研究的验证方向。

本文通过对温胆汤治疗认知功能障碍进行网络药理学分析,证实温胆汤可能通过多途径、多靶点、多通路发挥作用,主要表现在温胆汤药物的每一活性化学成分都对应不同靶点,而每一靶点又参与不同生物过程功能和通路。在未来的研究中可进一步验证某个靶点或某条通路在改善认知功能障碍中的具体机制^[10],为后续研究提供了方向和依据。不足之处在于中药复方网络药理学得到的靶点主要是由各单味中药成分的预测靶点取交集得到的,靶点选取受各种因素影响,因此不能全面体现中药复方的作用。另外,网络药理学只能定性地预测各味中药可能的活性成分和靶点通路,而具体机制还需要进一步动物实验或细胞实验验证^[11]。

参考文献:

- [1] 张国新.脑白质疏松患者认知功能障碍相关预测模型比较研究[D].扬州大学,2024.
- [2] 曾莉莉,黄红梅,罗友悟.温胆汤加减结合杵针治疗非痴呆型血管性认知障碍临床研究[J].实用中医杂志,2018,34(07):763-764.
- [3] 王海彬,温俊凯,胡婷婷,等.温胆汤加减方临床应用规律探讨[J].中成药,2024,46(10):3496-3501.
- [4] 祁祥,卢健棋,温志浩,等.基于网络药理学与分子对接的温胆汤治疗冠心病合并抑郁作用机制探讨[J].药物评

价研究,2022,45(08):1540-1548.

[5] 张明瑞,陈国华.温胆汤在精神科临床中的应用[J].中国医药指南,2018,16(16):39-40.

[6] Gfeller D, Aurelien Grosdidier, Wirth M, et al. Swiss Target Prediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1).

[7] Rebhan M, Chalifacspi V, Prilusky J, et al. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases.[J]. Trends in Genetics Tig, 1997, 13(4):163.

[8] Huang Da W. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1):44-57.

[9] 黄子轩,杨硕,周家琪,等.基于PI3K/Akt信号通路探讨酸枣仁皂苷A改善VCI模型大鼠认知功能的作用机制[J/

OL].中国实验方剂学杂志,1-9[2024-12-04].

[10] 高喜梅,贾萌,池玉梅,等.温胆汤治疗神经系统疾病的物质基础及作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(10):188-196.

[11] 陶婧娜.基于数据挖掘和网络药理学的刘汶教授治疗PBC的经验和机制分析[D].北京中医药大学,2023.

作者简介:

智璇,(1994—),女,汉,山西省晋中市人,硕士研究生,晋中市中医院,医师,脑血管病的中西医结合诊治

作者简介:贺程蓓,(1995—),女,汉,山西省晋中市人,硕士研究生,晋中市中医院,主管中药师,中药临床合理用药

基金项目:

山西中医药大学2023年度山西教育厅项目(2023L197)