

本文引用:张卓,时晶,魏明清,李婷,侯敏哲,徐江林. 基于网络药理学及分子对接探讨熟地黄-山茱萸药对治疗阿尔茨海默病的潜在机制[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(7): 1139-1151.

基于网络药理学及分子对接探讨熟地黄-山茱萸药对治疗阿尔茨海默病的潜在机制

张卓,时晶*,魏明清,李婷,侯敏哲,徐江林
(北京中医药大学东直门医院,北京 100029)

[摘要] **目的** 采用网络药理学及分子对接技术探讨熟地黄-山茱萸药对治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的活性成分和潜在分子机制。**方法** 通过TCMSP数据库、SwissTargetPrediction平台、GeneCards和DisGeNET数据库及查阅文献收集并获取熟地黄和山茱萸的主要化学成分、作用靶点及AD疾病的相关靶点。将疾病靶点与药物靶点取交集获得熟地黄-山茱萸药对治疗AD的潜在靶点,将这些交集靶点导入STRING数据库,建立蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。利用Cytoscape软件对PPI网络进行拓扑分析并提取核心靶点,利用CytoNCA插件计算度值,筛选出药对的关键成分。通过Metascape平台进行GO和KEGG通路富集分析,并构建“中药-相关关键成分-关键靶点-通路”网络,然后使用AutoDock Vina和PyMOL软件对核心靶点和关键成分进行分子对接。**结果** 筛选出熟地黄-山茱萸药对治疗AD的10个关键成分、718个药物靶点和450个疾病靶点,药物与疾病的共同靶点120个。PPI网络最终筛选确定了7个关键核心靶点。GO生物过程分析发现关键核心靶点主要富集于Notch受体加工、生物碱代谢过程以及多巴胺分解代谢过程等。KEGG富集分析得到10条作用通路。在分子对接中,各核心靶点与各关键成分表现出较强的结合活性。**结论** 熟地黄-山茱萸药对可能依靠墙草碱、四氢鸭脚木碱和亚油酸乙酯等关键核心成分,通过对苏氨酸激酶1(AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、肿瘤蛋白P53(TP53)和肿瘤坏死因子(TNF)等靶点的调节,参与多个相关信号通路,发挥抑制神经凋亡、抗炎、增强突触可塑性等神经元保护作用以治疗AD。

[关键词] 阿尔茨海默病;熟地黄;山茱萸;网络药理学;分子对接;作用机制

[中图分类号]R285

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.013

Potential mechanism of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Zhuo, SHI Jing*, WEI Mingqing, LI Ting, HOU Minzhe, XU Jianglin
(Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To explore the active components and potential molecular mechanism of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** The main chemical components, action targets and related targets of AD of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) were collected through TCMSP database, SwissTargetPrediction platform, GeneCards, DisGeNET database and literature review. The potential targets of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) for the treatment of AD were obtained by intersection of disease targets and drug targets. Intersection targets were imported into STRING database to establish protein-protein interaction (PPI) network. The topology of PPI network was analyzed by Cytoscape software, and the CytoNCA plug-in was used to calculate

[收稿日期]2021-11-03

[基金项目]国家自然科学基金项目(82074362);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2019-JYB-TD-007);国家重点研发计划项目(2018YFC1704100);中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者。

[第一作者]张卓,女,博士研究生,研究方向:神经变性病中医药防治。

[通信作者]*时晶,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:sshijing87@163.com。

the degree value and screen out the key components of drug pairs. GO and KEGG pathways were enriched and analyzed through Metascape platform, and the "herb-compound-target-pathway" network was constructed. Autodock Vina and PyMol software were used for molecular docking of hub targets and key components. **Results** A total of 10 key components, 718 drug targets, 450 disease targets, and 120 common targets of Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*)-Shanzhuyu (*Corni Fructus*) for treating AD were screened out. PPI network finally screened and identified 7 key core targets. GO biological process analysis found that the hub targets were mainly concentrated in Notch receptor processing, alkaloid metabolic process and dopamine catabolic process. KEGG enrichment analysis showed 10 pathways. In molecular docking, the hub targets and key components showed strong binding activity. **Conclusion** Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*)-Shanzhuyu (*Corni Fructus*) may regulate multiple related signaling pathways through some key components such as *n*-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide, tetrahydroalstonine and mandenol, with the regulation of threonine kinase 1 (AKT1), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), tumor protein P53 (TP53) and tumor necrosis factor (TNF). It is involved in multiple related signaling pathways and plays a protective role in the treatment of AD, such as inhibiting neuronal apoptosis, anti-inflammatory and enhancing synaptic plasticity.

[**Keywords**] Alzheimer's disease; Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*); Shanzhuyu (*Corni Fructus*); network pharmacology; molecular docking; mechanism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性神经退行性疾病,是痴呆症最常见的病因。痴呆的主要临床特征是日常生活能力下降、行为异常和认知功能障碍。目前,该病发病率越来越高,其发病机制尚未明确,这不仅是患者及其家属面临的难题,也是整个社会关注的全球公共卫生问题。调查估计,全球目前有超过 5000 万痴呆症患者^[1]。2050 年,全球新发 AD 病例预计将达到 1 亿例^[2]。因此,AD 的防治是一个世界性亟待解决的问题。目前,针对 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 和 tau 蛋白治疗 AD 的疗效并不令人满意,临床用药如多奈哌齐和美金刚的疗效有限,毒副作用较明显,且各种新药的研发也遇到瓶颈。因此,有必要从多靶点的角度研究 AD 的治疗。

中医药治疗 AD 的优势在于能够改善并使患者认知功能维持更长时间,更能够针对一些西医难以解决的躯体症状(如幻觉、妄想、错认、抑郁等痴呆行为和食欲不振、失眠、便秘等精神症状),对肝、肾、胃肠道等脏器的毒副作用较西药少,且可通过多靶点、多种途径对疾病产生作用。因此,中医药已成为近年来治疗 AD 的研究热点。中医药治疗 AD 以补肾虚为本,即治法以“补肾填髓健脑”为主。有研究显示,通过药物关联规则分析,治疗 AD 的补肾中药中,关联最强的药对是熟地黄-山茱萸^[3]。熟地黄生精填髓,为补肾阴之要药;山茱萸滋补肝肾。从补肾益髓理论治疗老年痴呆的常用药对中,熟地黄-山茱萸的出现频率极高^[4]。熟地黄和山茱萸已被证明对神经系统具有一定的保护活性^[5]。熟地黄的有效成分

梓醇可通过减弱乙酰胆碱酯酶活性以保护胆碱能系统,对 AD 发挥治疗作用^[6],还可抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活从而减弱 A β 的神经毒性^[7]。山茱萸已被证明可通过增强记忆或认知来改善痴呆,已被广泛用作增强记忆或认知的药物^[8],其有效成分山茱萸多糖能够改善 AD 模型大鼠的学习和记忆能力^[9],另一有效成分山茱萸环烯醚萜苷可通过降低 tau 蛋白过度磷酸化及沉积来治疗 AD^[10]。以上研究表明,熟地黄-山茱萸药对在治疗 AD 中可能发挥关键的作用。

网络药理学作为传统药理学、分子生物学、生物信息学等学科交叉的产物,突破了传统的单靶点、单通路药物研究的概念,其整体性、系统性特征与中医整体观、辨证论治原则、方剂配伍原则相吻合。通过网络药理学对中药药效物质、药理作用的研究及中药新药的研发具有重要意义,同时也为阐释方剂配伍的科学内涵及中医药的现代化研究奠定了理论基础^[11]。分子对接技术可以模拟预测出小分子配体与受体化合物间相互作用的机制^[12]。网络药理学及分子对接技术对药物的研发和疾病的病理机制研究也具有重要价值^[13]。

本课题组前期研究已经提出,补肾疗法应贯穿治疗 AD 过程的始终^[14]。由于熟地黄或山茱萸单味药物治疗 AD 的机制研究较多,而两药配伍对 AD 的作用机制的研究尚少,且 AD 的发病机制目前尚未明确,故本研究旨在运用网络药理学方法和分子对接技术,筛选熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的主要物质基础、核心作用靶点,从而探索其潜在机制,为

进一步的体内外研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 熟地黄-山茱萸药对活性成分的筛选及靶点预测

在中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/>)中检索熟地黄和山茱萸,收集两种中药的活性成分。吸收-分布-代谢-排泄(absorption-distribution-metabolism-excretion, ADME)筛选模型是利用一系列吸收、分布、代谢和排泄等相关的药代动力学参数筛选中药数据库中主要有效成分的有效模型^[5]。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)、药物相似性(drug-likeness, DL)和血脑屏障(blood brain barrier, BBB)为3个评价参数,根据TCMSP数据库推荐的标准,筛选出 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 、 $BBB \geq -0.3$ 的潜在作用的活性化合物。

在TCMID数据库(<http://119.341.228.8000/tcmid/>)中搜索熟地黄和山茱萸,将查到的活性成分化合物名称输入PubChem数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索,得到化合物2D结构的SDF文件,导入SwissADME数据库(<http://www.swissadme.ch/>)后根据以下条件筛选出潜在作用的活性化合物:(1)药代动力学中胃肠道(Gastrointestinal, GI)吸收为“High”,用于筛选具有较好OB的活性化合物;(2)药代动力学中BBB渗透为“Yes”,由于本研究的AD是中枢神经疾病,所以筛选出的活性化合物必须能通过BBB;(3)药物相似性中的前5项即Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge,其中至少有两项为“Yes”则可作为药物的潜在作用化合物^[6]。同时,通过检索文献进行补充。有些化合物虽不符合以上标准,但为了使网络药理学分析结果更加准确可信,应将文献检索得到的对神经元功能有重要作用的化合物也列为潜在作用化合物。例如,松果菊苷^[17]可通过促进乙酰胆碱的合成和对海马神经元的保护,改善认知功能障碍;毛蕊花糖苷^[18]通过降低NO含量、NO合酶活性和Caspase-3蛋白表达来改善AD症状;梓醇^[19-20]能增强胆碱乙酰转移酶的活性,显著提高神经元存活率和轴突长度,同时还可增加A β 诱导的神经退行性变小鼠前脑神经中脑源性神经影响因子的表达,从而改善小鼠记忆力下降的症状。栀子苷可通过调节线粒体相关蛋白途径以提高APP/PS1小鼠的探索和记忆能力,有效改善认知障碍^[21],还可下调

mTOR信号以增强A β 的自噬和溶酶体清除治疗AD^[22]。

分别将两种中药在以上两个数据库筛选及文献检索得到的潜在作用化合物导入SwissTargetPrediction平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),根据已知化合物的2D或3D结构预测化合物靶点^[23],以属性为“智人(homo sapiens)”且概率值 ≥ 0 为预测靶点的设置标准。将所有得到的靶点合并后去掉重复值,最终得到中药药对的作用靶点。

1.2 阿尔茨海默病相关靶点筛选

通过DisGeNET基因-疾病关联数据库(<https://www.disgenet.org/>)和GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)筛选AD相关靶点基因。以“Alzheimer's disease”作为关键词,从以上两个数据库中搜索。在GeneCards数据库中,相关性得分越高,靶点与疾病的关系就越密切。根据经验,如果检索得到的靶点太多,则将相关性得分大于中位数的靶点作为潜在靶点。将两个数据库中得到的靶点合并,删除重复值,得到AD的相关靶点。

1.3 AD与熟地黄-山茱萸药对的共同靶点PPI网络构建

为了获得本研究药对治疗AD的潜在作用靶点,将AD相关的靶蛋白与中药药对的作用靶点取交集,通过微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)绘制的韦恩图对交集靶点进行可视化。然后将交集靶点导入STRING网站(<https://string-db.org/>),以建立PPI网络,用于随后的拓扑特性分析以确定治疗AD的中枢靶点,选择置信度最高(低: <0.4 ;中等: $0.4\sim 0.7$;高: >0.7 ;最高: >0.9)。

度(Degree)^[24]、中介中心度(betweenness centrality, BC)^[25]和接近中心度(closeness centrality, CC)是评估网络中节点中心属性的常用拓扑参数。这些参数值越高,节点在网络中越重要。利用Cytoscape 3.7.2软件(<http://www.cytoscape.org/>)的CytoNCA插件计算交集靶点的参数,然后筛选交集靶点中的关键靶点。筛选参数第一步为:度 \geq 二倍中位数;第二步筛选参数为:度 \geq 中位数,BC \geq 中位数,CC \geq 中位数。筛选出的关键靶基因用于进一步的分子对接研究。

1.4 药对的潜在靶点-关键成分-中药PPI网络构建

根据取交集后得到的熟地黄-山茱萸药对治疗AD的潜在作用靶点,对所有潜在作用化合物进行筛选,得到与潜在作用靶点关联的化合物作为关键

成分。使用 Cytoscape 3.7.2 软件将潜在靶点-关键成分-中药网络可视化。

1.5 潜在靶点的 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

Metascape 平台 (<http://metascape.org/gp/index.html>)^[26] 是一个旨在提供全面的基因列表注释和分析资源的门户网站,它结合了功能富集、互作组分析、基因注释和成员搜索。将潜在作用靶点导入 Metascape 平台,物种设置为“智人(homo sapiens)”,进行基因本体(gene ontology, GO)生物过程富集和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析^[27],修正的 Fisher 精确 P 值越小,富集程度越高。保存数据后利用微生物信在线平台绘制柱状图和气泡图,对数据进行可视化。

1.6 中药-相关关键成分-关键靶点-通路的网络构建

根据 KEGG 富集分析中富集程度前 10 通路中富集的关键靶点,筛选相关关键成分及中药进行数据处理,利用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“中药-相关关键成分-关键靶点-通路”网络图,集中展示熟地黄-山茱萸药对关键成分的作用靶点与前 10 通路的相互作用关系。

1.7 药对关键核心成分-核心靶点分子对接

在 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 中搜索关键靶点基因编码的受体蛋白。在 RCSBPDB 蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>)^[28] 下载蛋白质的 3D 结构。从 PubChem 数据库^[29] 下载分子配体的 2D 结构,受体蛋白的脱水用 PyMOL 2.4.0 软件 (<https://pymol.org/>) 进行,蛋白质的氢化用 AutoDock Tools 软件 (<http://mgltools.scripps.edu/downloads>) 进行。将小分子配体结合的活性口袋位点作为受体-蛋白质对接位点的参数。最后使用 AutoDock Vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/download.html>)^[30] 将受体蛋白与药对主要关键成分的小分子配体对接。

2 结果

2.1 熟地黄-山茱萸药对活性成分的筛选及靶点预测

从 TCMSp 和 TCMID 数据库中检索,经 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 、 $BBB \geq -0.3$ 和 SwissADME 筛选及文献检索,山茱萸共有 36 个活性成分,熟地黄共有 3 个活性成分。由于筛选所得熟地黄的 3 种成分在多种中药中普遍存在,特异性低,所以本研究通过检索中国

知网补充熟地黄的活性化合物。通过上述方法得到熟地黄-山茱萸药对的潜在活性化合物共 36 个,见表 1。两药有 2 个共有成分,通过 SwissTargetPrediction 平台预测活性成分的对应该靶点共有 718 个。

2.2 熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的潜在靶点

通过 DisGeNET 和 GeneCards 两个数据库筛选得到 AD 疾病靶点共 450 个。将预测得到的药对活性成分靶点与筛选出的 AD 疾病靶点取交集,得到 120 个熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的潜在靶点。详见图 1。

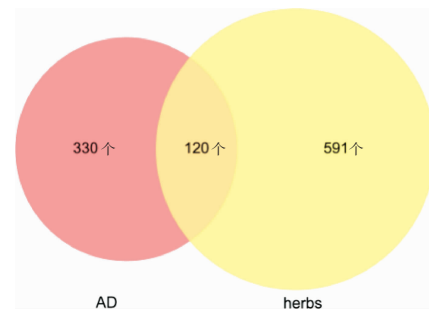


图 1 熟地黄-山茱萸药对活性成分靶点与 AD 共同靶点韦恩图

2.3 潜在靶点 PPI 网络构建

将以上潜在靶点导入 STRING 数据库中,选择最高置信度分数(即 0.9),得到描述了它们之间的 PPI 网络,如图 2 所示。利用 Cytoscape 3.7.2 软件的 CytoNCA 插件计算交集靶点的拓扑参数,筛选交集靶点中的关键靶点,参数设置如下。第一步筛选参数值为:度值 ≥ 46 ;第二步筛选参数为:度值 ≥ 63 , $BC \geq 0.025$ 279 23, $CC \geq 0.676$ 267 735。最终得到了 7 个关键靶点,按照度值从大到小分别为 AKT1、MAPK3、CASP3、TNF、TP53、VEGFA、MAPK1,详见图 3 及表 2。

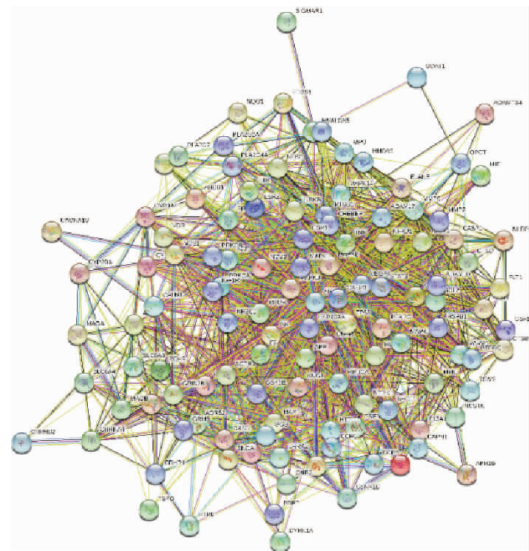


图 2 熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 潜在靶点的 PPI 网络图

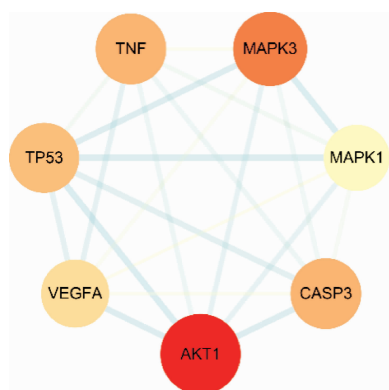


图3 熟地黄-山茱萸药对治疗AD核心靶点

注:节点大小代表核心靶点的度数值。

2.4 药对的潜在靶点-关键成分-中药 PPI 网络

根据熟地黄-山茱萸药对治疗AD的潜在靶点,对所有活性成分进行筛选,得到与潜在作用靶点关联的36个成分作为关键成分,用软件的Network Analyzer功能分析网络的拓扑参数,筛选出度值较大的前10个成分作为关键核心成分,详见表1。通过Cytoscape 3.7.2软件完成潜在靶点-关键成分-中药网络,详见图4。

2.5 潜在靶点的GO功能富集分析及KEGG通路富集分析

GO富集分析由生物过程(biological process,

表1 熟地黄-山茱萸药对治疗AD的关键成分相关信息

来源中药	关键成分名称	PubChem CID	ID	度值	关键靶点
熟地黄	rehmapicrogenin	15693863	SDH1	18	TNF,MAPK3
熟地黄	acteoside	5281800	SDH2	-	-
熟地黄	echinacoside	5281771	SDH3	-	-
熟地黄	catalpol	91520	SDH4	-	-
熟地黄	5-Hydroxymethylfurfural	237332	SDH5	-	-
熟地黄	geniposide	107848	SDH6	-	-
熟地黄/山茱萸	sitosterol	222284	A	13	-
熟地黄/山茱萸	stigmasterol	5280794	B	14	-
山茱萸	4-methoxy-1,2-benzodioxole	5319407	SZY1	18	-
山茱萸	aristolone	165536	SZY2	17	MAPK3
山茱萸	asaricin	4276	SZY3	16	AKT1
山茱萸	benzyl cinnamate	5273469	SZY4	16	-
山茱萸	benzyl ethyl alcohol	6054	SZY5	3	-
山茱萸	cornudentanone	442735	SZY6	3	-
山茱萸	dehydromorroniaglycone	104764	SZY7	2	-
山茱萸	elemicin	10248	SZY8	20	CASP3
山茱萸	elemol	92138	SZY9	19	-
山茱萸	eugenol methyl ether	7127	SZY10	9	VEGFA
山茱萸	eugenone	5317271	SZY11	23	-
山茱萸	isoamylamine	7894	SZY12	5	-
山茱萸	n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide	11368078	SZY13	29	-
山茱萸	p-methoxybenzylactone	61007	SZY14	26	-
山茱萸	retinol	445354	SZY15	6	MAPK1
山茱萸	tauremisin	94253	SZY16	29	AKT1
山茱萸	tetrahydroalstonine	72340	SZY17	26	-
山茱萸	trans-9-trans-12-linoleic acid	5282457	SZY18	21	TNF,TP53
山茱萸	verbenol	61126	SZY19	10	-
山茱萸	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	550101	SZY20	4	-
山茱萸	cornudentanone	442735	SZY21	19	MAPK1
山茱萸	diop	33934	SZY22	3	-
山茱萸	ethyl linolenate	5367460	SZY23	27	-
山茱萸	ethyl oleate (NF)	5363269	SZY24	18	-
山茱萸	lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate	11190577	SZY25	13	-
山茱萸	malkangunin	90473155	SZY26	33	-
山茱萸	mandenol	5282184	SZY27	23	-
山茱萸	tetrahydroalstonine	251561	SZY28	24	AKT1

表 2 熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的 7 个关键靶点相关信息

UniProt ID	Gene Symbol	靶点名称		度值
		英文名	中文名	
P31749	AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	苏氨酸激酶 1	87
P27361	MAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	丝裂原活化蛋白激酶 3	78
P42574	CASP3	Caspase-3	半胱天冬蛋白酶 3	73
P01375	TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子	73
P04637	TP53	Tumor Protein P53	肿瘤蛋白 P53	72
P15692	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	血管内皮生长因子 A	69
P28482	MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	丝裂原活化蛋白激酶 1	66

BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 组成。应用 Metascape 数据平台对熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的潜在靶点进行

GO 富集分析, 根据命中基因计数和 P 值的大小选择每个富集结果的前 10 条 (见图 5)。BP 方面, 潜在靶点主要富集在配体依赖性的 Notch 受体加工、

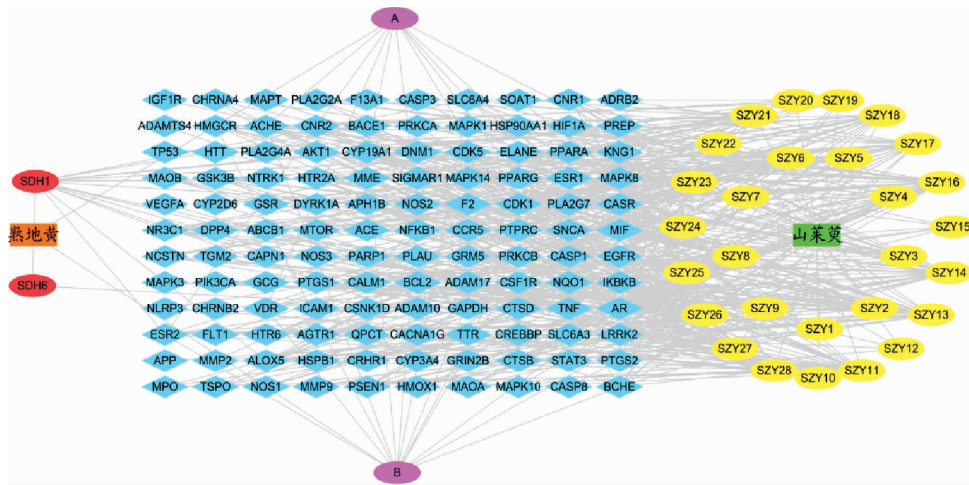


图 4 熟地黄-山茱萸药对的潜在靶点-关键成分-中药 PPI 网络图

注: 中央呈矩形分布的蓝色菱形节点代表潜在靶点, 周围呈同心圆分布的椭圆节点代表靶点对应的成分, 矩形节点代表两种中药。

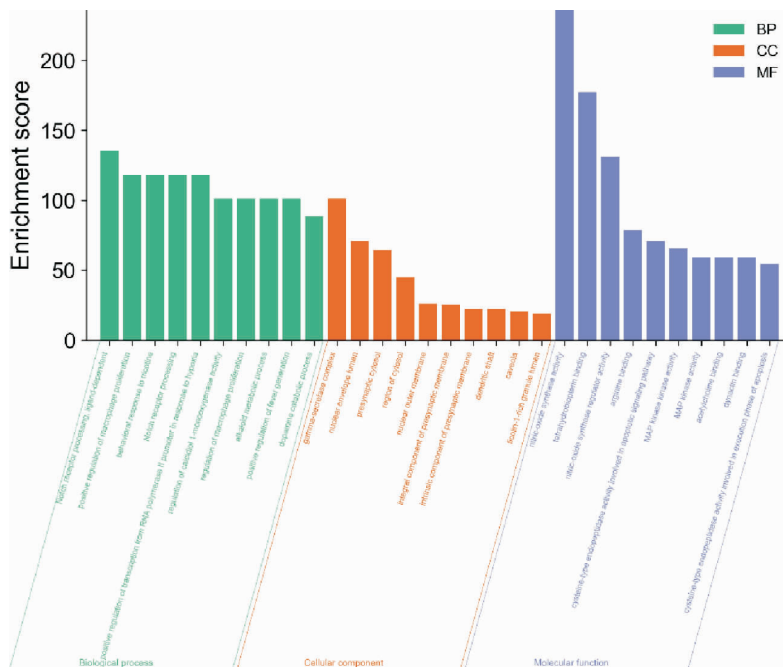


图 5 熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 的潜在靶点 GO 富集分析

生物碱代谢过程以及多巴胺分解代谢过程等;涉及的CC主要有 γ -分泌酶复合物、突触前细胞质、突触前膜的组成成分、突触前膜固有成分、树突轴、膜小凹及富含 ficolin-1 颗粒腔等;影响的MF包括半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡信号通路、MAPK 激酶活性、MAPK 活性、乙酰胆碱结合、动力蛋白激活蛋白的结合、半胱氨酸型内肽酶活性参与细胞凋亡的执行期等。

同样应用 Metascape 数据平台对熟地黄-山茱萸

萸药对治疗 AD 的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析,筛选度值前 20 的通路,运用富集气泡图展示,如图 6,主要参与的通路包括 AD、神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、细胞坏死性凋亡等。

2.6 中药-相关关键成分-核心靶点-通路网络构建
筛选出与前 10 通路相关的靶点共 82 个,其中包含先前筛选出的 7 个核心靶点,关键成分共 30 个,利用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“中药-相关关键成分-关键靶点-通路”网络(见图 7),用 Cytoscape 3.7.2 软件的 Network Analyzer 功能分析网络的拓

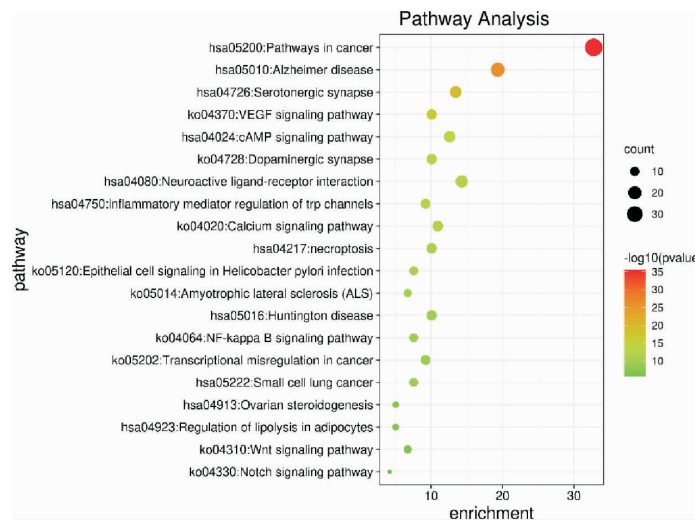


图 6 熟地黄-山茱萸萸药对治疗 AD 的潜在靶点 KEGG 通路富集分析(前 20 项)
注:气泡的大小代表该条目的基因数量,颜色代表富集显著性。

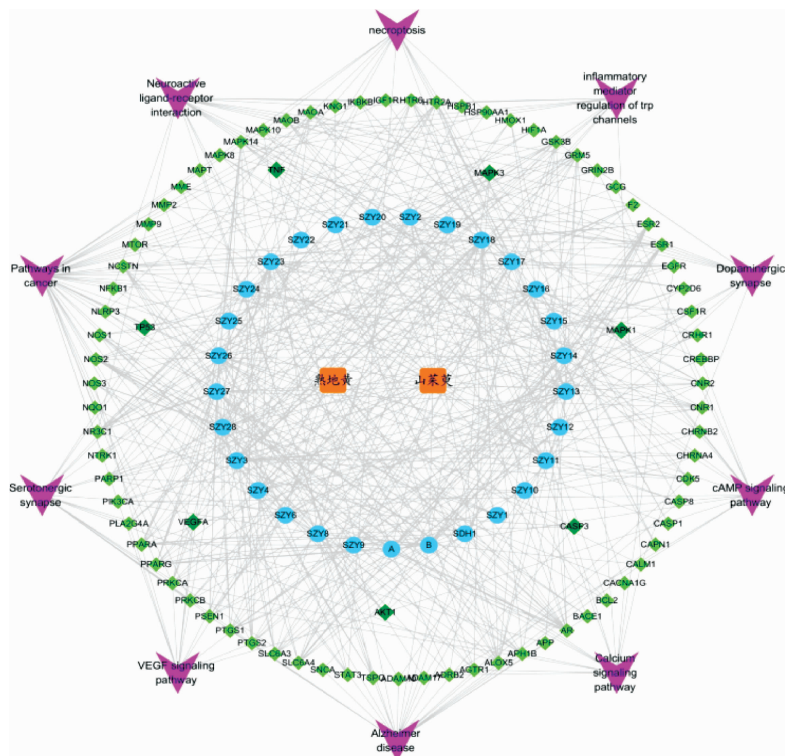


图 7 中药-相关关键成分-关键靶点-通路网络图

注:紫色 V 形节点代表 10 条富集通路;深绿色菱形节点表示 7 个核心靶点;浅绿色菱形节点表示其他相关靶点;蓝色圆形节点代表中药的相应关键成分;橙色矩形节点表示中药。

扑参数。结果 30 个关键成分中有 25 个度值>5, 约占 83%, 且先前潜在靶点-关键成分-中药 PPI 网络中筛选出的 10 个关键核心成分均在其中。这表明绝大多数的关键成分是通过作用于多个靶点发挥作用的, 体现了中药的多靶点药效特点。

2.7 药对关键核心成分-核心靶点分子对接

利用分子对接技术研究核心靶点基因与熟地黄-山茱萸药对关键成分之间可能的相互作用。共进行了 70 次对接模拟(见表 3)。AutoDock 和 AutoDock Vina 的评分函数规定, 当对接亲和力值<0 时, 配体和受体分子能稳定结合, 绝对值越大, 化合物与核心靶点活性部位的结合稳定性越强。根据对接结果,

大多数结合复合物具有较高的结合亲和力, 平均结合亲和力为-7.4 kcal/mol。此外, 每个目标配体与活性化合物残基之间至少有一个氢键形成。大多数氢键相互作用被认为是强相互作用, 平均距离为 2.7Å。9 对分子对接模型及其相互作用的氢键如图 8 所示。总的来说, 分子对接表明所有熟地黄-山茱萸药对的活性化合物都能较容易地进入并结合核心靶点的活性口袋。

3 讨论

中医药治疗 AD 的历史可以追溯到几千年前的《左传》, 有关其论述大多记载于“痴呆、呆病、健忘”

表 3 核心靶点与关键核心成分的分子对接结果

核心靶点	PDB ID	配体	关键核心成分	对接能/(kcal/mol)	氢键距离/Å
AKT1	6S9X	L1W	malkangunin	-7.8	3.0 和 2.8
			tauremisin	-9.2	
			<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-6.5	
			Ethyl linolenate	-6.7	
			tetrahydroalstonine	-10.2	
			<i>p-methoxybenzylacetone</i>	-6.3	
			Mandenol	-6.2	
			eugenone	-6.4	
			<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-6.1	
			Tetrahydroalstonine	-9.8	
			MAPK3	4QTB	
tauremisin	-8.9				
<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-6.8				
Ethyl linolenate	-7.2				
tetrahydroalstonine	-9.7				
<i>p-methoxybenzylacetone</i>	-6.3				
Mandenol	-7.0				
eugenone	-6.7				
<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-6.9				
Tetrahydroalstonine	-9.1				
CASP3	3DEJ	RXC			malkangunin
			tauremisin	-7.1	
			<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-5.4	
			Ethyl linolenate	-5.5	
			tetrahydroalstonine	-8.1	
			<i>p-methoxybenzylacetone</i>	-5.3	
			Mandenol	-5.1	
			eugenone	-5.1	
			<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-5.3	
			Tetrahydroalstonine	-7.6	

续表 3

核心靶点	PDB ID	配体	关键核心成分	对接能/(kcal/mol)	氢键距离/Å
TNF	6OP0	A7A	malkangunin	-8.1	2.4
			tauremisin	-9.9	
			<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-7.8	
			Ethyl linolenate	-7.9	
			tetrahydroalstonine	-7.7	
			<i>p-methoxybenzylactetone</i>	-7.1	
			Mandenol	-7.5	
			eugenone	-6.5	
			<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-7.4	
			Tetrahydroalstonine	-7.0	
			TP53	5MF7	
tauremisin	-10.3				
<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-7.5				
Ethyl linolenate	-7.3				
tetrahydroalstonine	-11.3				
<i>p-methoxybenzylactetone</i>	-6.7				
Mandenol	-6.7				
eugenone	-7.7				
<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-6.5				
Tetrahydroalstonine	-11.2				
VEGFA	4QAF	OMA			malkangunin
			tauremisin	-6.7	
			<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-6.7	
			Ethyl linolenate	-6.8	
			tetrahydroalstonine	-5.4	
			<i>p-methoxybenzylactetone</i>	-5.9	
			Mandenol	-6.0	
			eugenone	-6.6	
			<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-6.8	
			Tetrahydroalstonine	-10.4	
			MAPK1	6DCG	G67
tauremisin	-8.6				
<i>n-isobutyldeca-trans-2-trans-4-dienamide</i>	-6.9				
Ethyl linolenate	-6.9				
tetrahydroalstonine	-8.7				
<i>p-methoxybenzylactetone</i>	-6.2				
Mandenol	-6.7				
eugenone	-6.2				
<i>trans-9-trans-12-linoleic acid</i>	-6.1				
Tetrahydroalstonine	-9.5				

等相关文献中。肾藏精,精生髓,脑由髓聚而成,正如《素问·五藏生成》载“诸髓者,皆属于脑”。脑为髓海,元神之府,神机之用。人的记忆、学习、语言等认知功能是以脑髓为物质基础,与肾精的充足与否有密切关系。唐容川在《中西汇通医经精义·五脏所藏》中说:“事物之所以不忘,赖此记性,记在何处,则在肾精。”《医学心悟·健忘》也明确指出:“肾主智,肾

虚则智不足。”因此,肾精充足,髓海得养,则思维敏捷,精力充沛,认知功能正常;若肾精不足,髓海空虚,脑失所养,则见“脑转耳鸣,胫痠眩冒,目无所见,懈怠安卧”,认知功能障碍。来源天然、多靶点、辨证论治和整体观念等中医药的独特优势,在治疗复杂疾病尤其是使用西药效果欠佳且毒副作用明显的疾病方面是显而易见的。近年来,中医药网络药理学已

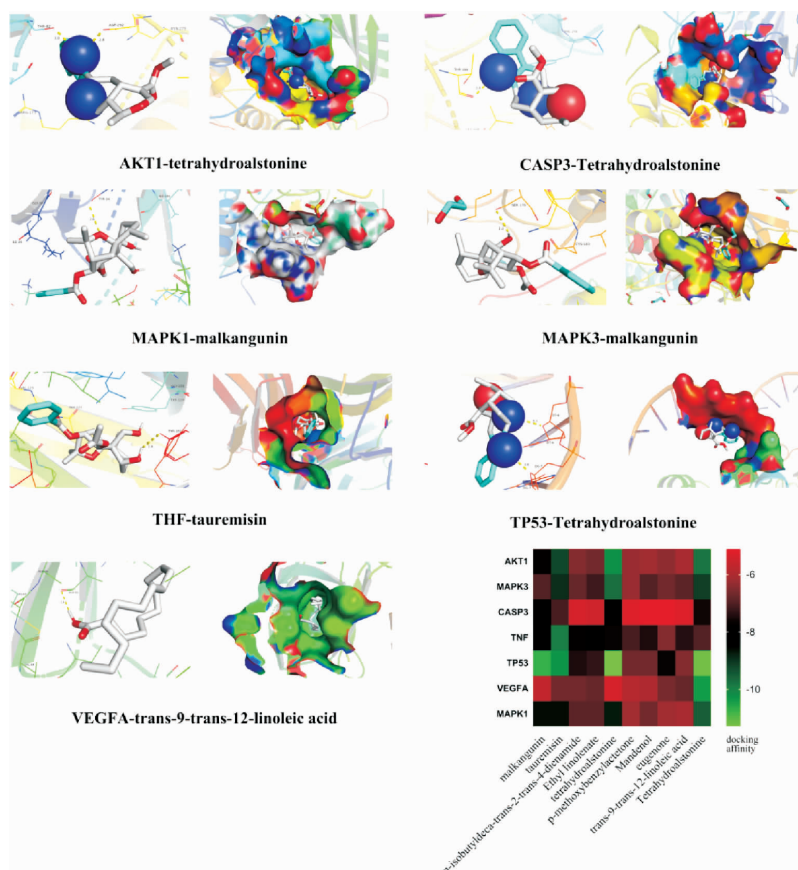


图8 核心靶点与关键成分分子对接模式图及对接能热图

注:(1)每组中左侧表示关键核心成分与核心靶点配体的相互作用,黄色虚线表示氢键,关键成分用青色或白色棒状模型表示,配体的氨基酸残基用彩色线状模型表示;(2)每组中右侧表示核心靶点结合口袋中关键核心成分的分子模型;(3)右下角热图表示各关键核心成分与各核心靶点的分子对接能。

成为从集成多组分网络的角度揭示复杂疾病病理过程的研究热点^[31]。本研究使用网络药理学方法探索了补肾药对熟地黄-山茱萸治疗AD的活性化合物和潜在机制,并通过分子对接技术进行了初步验证。

本研究筛选出熟地黄-山茱萸药对治疗AD的有效成分,并进一步通过拓扑参数筛选出关键核心成分。其中,墙草碱、四氢鸭脚木碱和亚油酸乙酯等关键核心成分在以往研究中已被证明可通过不同机制改善AD模型的记忆缺损。一项研究发现,包含墙草碱在内的黑胡椒果实提取物,可通过减轻雄性大鼠海马中的氧化应激来改善 $A\beta(1-42)$ 诱导的空间记忆损伤^[32]。四氢鸭脚木碱可通过调节肾上腺素受体影响AD患者 $A\beta$ 在中枢神经系统的清除^[33]以及海马CA1区神经元突触可塑性^[34]。研究显示,亚油酸乙酯通过靶向干预TNF参与抗炎过程^[35],发挥治疗AD的作用,还可以作用于线粒体呼吸链复合物I的核编码亚基,抑制氧化应激以维持线粒体的功能稳态,从而抑制神经元死亡^[36]。在以上研究基础上

进一步的分子对接分析结果,从另一方面验证了熟地黄-山茱萸药对的这些关键核心成分与核心靶点,尤其是AKT1、MAPK3、TP53和TNF等有强烈的结合活性^[37]。这些结果进一步验证了该网络药理学预测的可靠性。因此,以上化合物可能是熟地黄-山茱萸药对治疗AD发生作用的关键成分。

PPI网络筛选出的关键靶点与AD的病理过程密切相关,这与以往多项研究结果一致。AKT1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,该蛋白参与细胞存活、生长,胰岛素信号转导等生物学过程。研究发现,活性氧介导的AKT1氧化修饰导致APP/PS1转基因AD模型小鼠的突触功能障碍^[38]。AKT1基因的显著表达和磷酸化下调会损害海马神经元的增殖和分化,并促进神经退行性变^[39]。MAPK3是一种抗凋亡基因,也参与神经元的突触可塑性^[40]。相关研究表明,在STZ诱导的AD模型大鼠中有些AD相关蛋白激酶的基因表达有下调,但其中只有MAPK3的表达变化显著^[41]。Caspase-3是细胞凋亡途径中最为

关键的酶类之一。研究表明,APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠 Caspase-3 及裂解的 Caspase-3 蛋白表达显著升高^[42]。小胶质细胞慢性产生 TNF- α 引起与 AD 相关的神经炎症反应,可能导致 A β 和 tau 蛋白过度磷酸化^[43]。TNF 参与的神经炎症反应,可受筛选出的关键成分亚油酸乙酯的干预,从而发挥对 AD 的治疗作用^[35]。TP53 作为 DAPK-1 和 Ca²⁺/钙调蛋白依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径的下游效应器,在细胞凋亡中发挥重要作用,被认为是 AD 的潜在治疗靶点^[44]。VEGFA 已被作为 AD 的新兴治疗候选物研究,经 VEGFA 治疗的 AD 模型小鼠恢复认知^[45]。以往研究显示,MAPK1 与神经退行性变、突触可塑性、细胞存活和 AD 密切相关^[46]。

根据 GO 富集分析,潜在靶点主要富集在与 AD 等神经退行性变相关的 BP 中,如配体依赖性的 Notch 受体加工、生物碱代谢过程以及多巴胺分解代谢过程等。Notch 信号通路通过与跨膜 Notch 受体结合的 Notch 配体之间的相互作用被激活后,使该信号系统改变而导致如 A β 和 p-tau 沉积等病理变化,以及随后的认知能力下降^[47]。通过抑制乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶可治疗 AD 中重度阶段^[48]。多巴胺是公认的海马突触可塑性调节剂,其与背侧海马多巴胺能受体的结合是记忆编码的主要决定因素^[49]。AD 患者和 AD 实验模型中与该病相关的记忆功能障碍和多巴胺信号缺陷之间存在联系^[50]。

KEGG 富集分析得到 10 条与熟地黄-山茱萸药对治疗 AD 密切相关的通路。其中,AD 通路发挥的作用值得关注。该通路种不仅有关键核心靶点 AKT、CASP3、TNF 和 MAPK1,还包含了胰岛素信号通路。胰岛素信号通路与能量利用、线粒体功能和神经功能密切相关,氧化应激、突触可塑性和认知功能以及 AD 的发生和发展部分归因于胰岛素信号通路的损伤^[51]。神经活性配体-受体相互作用通路通过增强胆碱能功能调节学习和记忆能力^[52],并可能参与认知和情绪调节^[53]。Ca²⁺信号失调在 AD 的突触病理学中起着重要作用^[54]。CACCAMO 等^[55]证明,细胞坏死性凋亡在 AD 人类大脑及在 AD 小鼠模型中被激活,从而导致神经元丢失。

综上所述,本研究基于网络药理学和分子对接技术,初步探讨了熟地黄-山茱萸药对通过多靶点、多成分、多途径治疗 AD 的潜在作用机制,通过墙草碱、四氢鸭脚木碱和亚油酸乙酯等关键核心成分对

核心靶点 AKT1、MAPK3、CASP3、TNF、TP53、VEGFA 和 MAPK1 的表达以及不同 BP 的调控,最终作用于 AD、神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、细胞坏死性凋亡及炎症反应等相关通路,为进一步从熟地黄-山茱萸中提取活性成分提供了理论依据,也为中医药治疗 AD 的深入研究提供了重要参考。然而本研究仍存在一定局限性,如两药在复方中不同配伍时活性成分的差异及核心靶点是上调还是下调等具体作用,有待今后进一步的体内外实验来验证。

参考文献

- [1] HAINES J L. Alzheimer disease: Perspectives from epidemiology and genetics[J]. *Journal of Law, Medicine & Ethics*, 2018, 46(3): 694-698.
- [2] MASTERS C L, BATEMAN R, BLENNOW K, et al. Alzheimer's disease[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015, 1: 15056.
- [3] 李 玥,安红梅.补肾中药及其复方防治阿尔茨海默病用药规律及其配伍特点的文献研究[J].*现代临床医学*,2021,47(1):53-56.
- [4] 闫敬来,陈燕清.历代文献中医药治疗老年痴呆常用药对研究[J].*中华中医药学刊*,2008,26(7):1495-1496.
- [5] LIU J P, FENG L, ZHANG M H, et al. RETRACTED: Neuroprotective effect of Liuwei Dihuang Decoction on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(1): 371-381.
- [6] 张 欢.梓醇对拟老年性痴呆大鼠的保护作用研究[D].大连:大连理工大学,2008.
- [7] JIANG B, DU J, LIU J H, et al. Catalpol attenuates the neurotoxicity induced by β -amyloid1-42 in cortical neuron-Glia cultures[J]. *Brain Research*, 2008, 1188: 139-147.
- [8] KENNEDY D O, SCHOLEY A B, TILDESLEY N T J, et al. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm)[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002, 72(4): 953-964.
- [9] 苏亚楠,张晓波,姚海涛,等.山茱萸多糖对阿尔茨海默病模型大鼠认知能力和海马磷酸化-tau 蛋白表达的影响[J].*中国老年学杂志*,2017,37(13): 3152-3154.
- [10] 马登磊,罗 艺,李 林,等.山茱萸环烯醚萜苷以 tau 蛋白为靶点治疗阿尔茨海默病的研究[J].*中国药理学与毒理学杂志*,2019,33(9):714-715.
- [11] 席乐迎,任献青,许 爽,等.基于网络药理学的中药作用机制研究进展[J].*现代中西医结合杂志*,2020,29(29):3287-3290,3296.
- [12] 邓芳芳.药物分子的计算机辅助理论模拟及分子设计[D].兰州:兰州大学,2014.
- [13] 杨玉先,张 帆,崔庆华,等.生物信息学在动脉粥样硬化中的应用进展[J].*中国动脉硬化杂志*,2020,28(3):185-192.

- [14] 时晶,倪敬年,魏明清,等.阿尔茨海默病证候变化与认知结局的关联性[J].北京中医药大学学报,2017,40(4):339-343.
- [15] HUANG C, YANG Y, CHEN X T, et al. Large-scale cross-species chemogenomic platform proposes a new drug discovery strategy of veterinary drug from herbal medicines[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184880.
- [16] LIPINSKI C A, LOMBARDO F, DOMINY B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 23(1/2/3): 3-25.
- [17] CHEN Y, LI Y Q, FANG J Y, et al. Establishment of the concurrent experimental model of osteoporosis combined with Alzheimer's disease in rat and the dual-effects of echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 257: 112834.
- [18] PENG X M, GAO L, HUO S X, et al. The mechanism of memory enhancement of acteoside (verbascoside) in the senescent mouse model induced by a combination of d-gal and AlCl₃[J]. *Phytotherapy Research*, 2015, 29(8): 1137-1144.
- [19] WANG Z, LIU Q, ZHANG R, et al. Catalpol ameliorates beta amyloid-induced degeneration of cholinergic neurons by elevating brain-derived neurotrophic factors[J]. *Neuroscience*, 2009, 163(4): 1363-1372.
- [20] WANG Z, HUANG X S, ZHAO P, et al. Catalpol inhibits amyloid- β generation through promoting α -cleavage of APP in Swedish mutant APP overexpressed N2a cells[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2018, 10: 66.
- [21] ZHANG Z H, GAO W P, WANG X J, et al. Geniposide effectively reverses cognitive impairment and inhibits pathological cerebral damage by regulating the mTOR Signal pathway in APP/PS1 mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2020, 720: 134749.
- [22] ZHANG Z H, WANG X J, ZHANG D, et al. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging*, 2019, 11(2): 536-548.
- [23] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [24] MISSIURO P V, LIU K S, ZOU L H, et al. Information flow analysis of interactome networks [J]. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(4): e1000350.
- [25] RAMAN K, DAMARAJU N, JOSHI G K. The organisational structure of protein networks: Revisiting the centrality-lethality hypothesis[J]. *Systems and Synthetic Biology*, 2014, 8(1): 73-81.
- [26] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1523.
- [27] CHEN L, ZHANG Y H, WANG S P, et al. Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184129.
- [28] BURLEY S K, BERMAN H M, BHIKADIYA C, et al. RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(D1): D464-D474.
- [29] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(D1): D1102-D1109.
- [30] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455-461.
- [31] 张彦琼,李梢.网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*,2015,29(6):883-892.
- [32] HRITCU L, NOUMEDEM J A, CIOANCA O, et al. Methanolic extract of *Piper nigrum* fruits improves memory impairment by decreasing brain oxidative stress in amyloid beta (1-42) rat model of Alzheimer's disease[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2014, 34(3): 437-449.
- [33] KARCZEWSKI P, HEMPEL P, KUNZE R, et al. Agonistic autoantibodies to the α 1-adrenergic receptor and the β 2-adrenergic receptor in Alzheimer's and vascular dementia[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2012, 75(5): 524-530.
- [34] TAKAMATSU I, IWASE A, OZAKI M, et al. Dexmedetomidine reduces long-term potentiation in mouse Hippocampus[J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(1): 94-102.
- [35] 宋祯彦,陈易璇,余婧萍,等.当归芍药散活性成分治疗阿尔兹海默病作用机制的生物网络分析[J].*世界科学技术-中医药现代化*, 2018,20(6):834-846.
- [36] 罗云霞.基于网络药理学探索当归芍药散对缺血性中风的作用机制研究[D].广州:广州中医药大学,2019.
- [37] ISTYASTONO E P, RADIFAR M, YUNIARTI N, et al. PyPLIF HIPPOS: A molecular interaction fingerprinting tool for docking results of AutoDock vina and PLANTS[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2020, 60(8): 3697-3702.
- [38] AHMAD F, SINGH K, DAS D, et al. Reactive oxygen species-mediated loss of synaptic Akt1 signaling leads to deficient activity-dependent protein translation early in Alzheimer's disease[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 27(16): 1269-1280.
- [39] SINGH A K, KASHYAP M P, TRIPATHI V K, et al. Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid- β -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(8): 5815-5828.
- [40] BAZAZADEGAN N, DEGHAN SHASALTANEH M, SALIM-

- INEJAD K, et al. Effects of ectoine on behavior and candidate genes expression in ICV-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2017, 7(4): 629-636.
- [41] IQBAL K, LIU F, GONG C X, et al. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration[J]. *Acta Neuropathologica*, 2009, 118(1): 53-69.
- [42] YU N H, HUANG Y P, JIANG Y, et al. Ganoderma lucidum triterpenoids (GLTs) reduce neuronal apoptosis via inhibition of ROCK signal pathway in APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 9894037.
- [43] TORRES-ACOSTA N, O'KEEFE J H, O'KEEFE E L, et al. Therapeutic potential of TNF- α inhibition for Alzheimer's disease prevention[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2020, 78(2): 619-626.
- [44] PEI L, SHANG Y, JIN H J, et al. DAPK1-p53 interaction converges necrotic and apoptotic pathways of ischemic neuronal death[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2014, 34(19): 6546-6556.
- [45] GARCIA K O, ORNELLAS F L M, MARTIN P K, et al. Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the Hippocampus of murine model of Alzheimer's disease[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014, 6: 30.
- [46] LU N, MALEMUD C J. Extracellular signal-regulated kinase: A regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3792.
- [47] KAPOOR A, NATION D A. Role of Notch signaling in neurovascular aging and Alzheimer's disease[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2021, 116: 90-97.
- [48] PEŘINOVÁ R, MAAFI N, KORÁBEČNÝ J, et al. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 100: 103928.
- [49] BROUSSARD J I, YANG K C, LEVINE A T, et al. Dopamine regulates aversive contextual learning and associated in vivo synaptic plasticity in the Hippocampus[J]. *Cell Reports*, 2016, 14(8): 1930-1939.
- [50] MORENO-CASTILLA P, RODRIGUEZ-DURAN L F, GUZMAN-RAMOS K, et al. Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment[J]. *Neurobiology of Aging*, 2016, 41: 187-199.
- [51] AKHTAR A, SAH S P. Insulin signaling pathway and related molecules: Role in neurodegeneration and Alzheimer's disease[J]. *Neurochemistry International*, 2020, 135: 104707.
- [52] 王红艳,赵淑梅,岳启安,等.中药呆聪液对老龄痴呆大鼠模型脑组织 M1,M3 受体 mRNA 水平影响的研究[J].*潍坊医学院学报*, 2007,29(5):392-393,481.
- [53] ZHUANG X, GROSS C, SANTARELLI L, et al. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors[J]. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21(2 Suppl): 52S-60S.
- [54] SANMARTÍN C D, VELOSO P, ADASME T, et al. RyR2-mediated Ca^{2+} release and mitochondrial ROS generation partake in the synaptic dysfunction caused by amyloid β peptide oligomers[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017, 10: 115.
- [55] CACCAMO A, BRANCA C, PIRAS I S, et al. Necroptosis activation in Alzheimer's disease[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20(9): 1236-1246.

(本文编辑 匡静之)