

基于液质联用法和网络药理学研究羌活治疗阿尔茨海默病的活性成分含量及作用机制



高 欢, 许子华, 胡 北, 陈 莹, 赵庆春

中国人民解放军北部战区总医院药剂科 (沈阳 110016)

【摘要】目的 研究羌活治疗阿尔茨海默病 (AD) 的活性成分及其潜在的作用机制, 并建立一个能同时测定羌活中 5 个成分含量的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法, 为阐明其药效物质基础及分子机制的实验研究提供基础。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 数据库获取羌活活性成分和作用靶点, GeneCards、人类在线孟德尔遗传 (OMIM) 及美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库预测 AD 相关靶点。利用 Cytoscape 软件构建药物-成分-靶点-疾病可视化网络, 借助 STRING 数据库在线平台构建蛋白互作网络, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 使用 Maestro 软件对主要活性成分与关键靶点进行分子对接来验证网络药理学结果。运用 HPLC-MS/MS 法同时测定紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素 5 个成分的含量, 采用 XTerra MS C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm), 以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 5 μL, 电喷雾离子源, 多反应监测正离子模式。**结果** 网络药理学共获取 13 个羌活活性成分及 36 个抗 AD 靶点; 基因富集分析显示, GO 功能条目 165 个、通路 89 条 ($P < 0.05$)。分子对接结果表明, 羌活的主要活性成分与关键靶点视黄酸 X 受体结合活性最好。紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素在浓度为 69.74~8 472.85、8.51~1 033.89、0.35~37.00、15.42~1 873.27、58.85~7 150.49 ng/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r > 0.990 0$)。**结论** 初步探究了羌活多成分多靶点多通路抗 AD 的潜在作用机制; 建立的 HPLC-MS/MS 法操作简便可靠、专属性强、重复性好, 可用于羌活的质量控制。本研究将为羌活抗 AD 的药效物质基础研究、作用机制研究、相关制剂的质量控制提供依据。

【关键词】 羌活; 网络药理学; 作用机制; 高效液相色谱-串联质谱; 含量测定; 阿尔茨海默病; 活性成分

【中图分类号】 R285.5

【文献标识码】 A

Study on the active ingredient content and molecular mechanism of *Notopterygii rhizoma et radix* in the treatment of Alzheimer's disease based on liquid chromatography-mass spectrometry and network pharmacology

GAO Huan, XU Zihua, HU Bei, CHEN Ying, ZHAO Qingchun

Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China

Corresponding author: ZHAO Qingchun, Email: zhaoqingchun1967@163.com

【Abstract】Objective To study the active ingredients and potential molecular mechanism of *Notopterygii rhizoma et radix* in treating Alzheimer's disease (AD), establish an high performance

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202408081

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973209)

通信作者: 赵庆春, 博士, 主任药师, Email: zhaoqingchun1967@163.com

liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method which can simultaneously determine the content of five components in *Notopterygii rhizoma et radix*, and provide a basis for experimental research on its pharmacological substance basis and molecular mechanism. **Methods** The active ingredients and targets of *Notopterygii rhizoma et radix* were obtained from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) database, and AD related targets were predicted from GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases. The Cytoscape software was used to construct a drug-ingredient-target-disease visualization network, the STRING database online platform was used to construct a protein-protein interaction network, and GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed. The main active ingredients and key targets were molecularly linked using Maestro software to validate the network pharmacology results. HPLC-MS/MS method was used to simultaneously determine the content of five components, namely, nodakenin, bergaptin, diosmetin, notopterol, and isoimperatorin. XTerra MS C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) was used. The methanol-water was used as the mobile phase with the gradient elution, and the flow rate was 0.3 mL/min. The column temperature was 30 °C, and the sample amount was 5 μL. The electric spray ion source and multi reaction monitoring positive ion mode were adopted. **Results** A total of 13 active ingredients in *Notopterygii rhizoma et radix* and 36 anti AD targets were obtained from network pharmacology. Gene enrichment analysis showed that there were 165 GO functional items and 89 pathways ($P < 0.05$). The molecular docking results indicated that the main active ingredients of *Notopterygii rhizoma et radix* had the best binding activity with the key target retinoic acid X receptor. There was a good linear relationship between the peak area and the concentrations of nodakenin, bergaptin, diosmetin, notopterol, and isoimperatorin in the ranges of 69.74-8 472.85, 8.51-1 033.89, 0.35-37.00, 15.42-1 873.27, and 58.85-7 150.49 ng/mL, respectively ($r > 0.990$). **Conclusion** The potential mechanism of multi-component, multi-target, and multi pathway anti-AD effects of *Notopterygii rhizoma et radix* has been preliminarily explored. The established HPLC-MS/MS method is easy to operate, reliable, highly specific, and reproducible, and can be used for quality control of *Notopterygii rhizoma et radix*. This study will provide a basis for the research on the pharmacological substance basis, molecular mechanism, and quality control of related preparations of *Notopterygii rhizoma et radix* against AD.

【Keywords】 *Notopterygii rhizoma et radix*; Network pharmacology; Mechanism; High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; Content determination; Alzheimer's disease; Active ingredient

羌活是伞形科羌活属植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H.T. Chang 的干燥根茎及根, 是我国传统中医药体系中常用的重要药材, 始载于《神农本草经》, 因产于羌地而得名^[1]。羌活性温味辛苦, 归膀胱、肾经, 具有散表寒、祛风除湿和止痛等功能, 主要用于风寒感冒头痛、风湿痹痛、肩背酸痛等症^[2]。国内外学者对羌活的化学成分进行了系统的研究, 分离出的化合物主要有香豆素类、挥发油及萜类、聚烯炔类、酚酸类、生物碱类等^[3]。现代药理活性研究发现羌活具有抗炎抗菌^[4]、抗氧化^[5]、抗病毒^[6]、抗癌细胞增殖^[7]、解热和镇痛^[8]的活性, 并且对中枢神经系统^[9-10]、心血管系统^[11-12]、呼吸系统^[13]、消化系统^[14]等有显著的影响。

本课题组前期探讨了羌活中的香豆素类成分羌活醇治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer's

disease, AD) 的作用机制^[9, 15], 但口服生物利用度低, 可能会使其活性受到限制。近年来, 许多中药采用网络药理学挖掘分析单味中药的活性成分, 检索与疾病的作用靶点, 探索中药的作用机制, 为相关实验及其临床研究提供理论依据, 从而达到减缓疾病发生和发展的效果^[16]。本研究利用网络药理学和分子对接技术, 预测羌活治疗 AD 的主要活性成分、潜在作用靶点及信号通路等, 探讨其作用机制, 为羌活抗 AD 的机制研究提供参考; 同时, 推测香豆素类成分可能是其发挥抗 AD 作用的潜在活性成分, 又因质谱技术专属性强等特点, 因此, 本研究又通过高效液相色谱-串联质谱 (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 法对筛选得到的多种潜在活性成

分进行定量分析，建立同时检测 5 个成分的含量测定方法。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪，包括 SIL-20AC 自动进样器和 CTO-20A 柱温箱（日本岛津）；API 3200MD 型三重四级杆质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）及配备的 Analyst MD Software1.6.2 数据采集和分析软件（MultiQuant MD 3.0.2 数据分析模块）；AUW120D 型十万分之一电子分析天平和 AEL-160 型万分之一电子分析天平购自日本 SHIMADZU 公司；XK 96-3 型微量振荡器（江苏新康医疗器械有限公司）；KQ3200 型超声波清洗机（杭州微米派科技有限公司）；FW100 型高速万能粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

异欧前胡素（批号：wkq23042509）、羌活醇（批号：wkq22102506）、香叶木素（批号：wkq23042302）、紫花前胡苷（批号：wkq22091312）、佛手柑内酯（批号：wkq22091305）对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司，纯度≥98%；卡马西平（四川省维克奇生物科技有限公司，批号：wkq23052503，纯度

≥98%）；甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为屈臣氏水。

羌活（批号：220902307）购自河北济鑫堂药业有限公司，经沈阳药科大学路金财教授鉴定为中药羌活，标本（批号：GH2023NR）保存于北部战区总医院药剂科实验室。

2 方法与结果

2.1 基于网络药理学和分子对接探讨羌活治疗AD的作用机制

2.1.1 羌活活性成分及潜在靶点的获取

在中药系统药理学数据库与分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP）数据库检索羌活的化学成分，设定筛选条件为口服生物利用度（oral bioavailability, OB）≥30%、类药性（drug like, DL）≥0.18，得到羌活潜在活性成分 15 个，并在此数据库对其活性成分进行靶点预测，其中 2 个化学成分 6'-feruloylnodakenin、coumarin glycoside 无靶标蛋白，予以删除，具体见表 1。将 TCMSP 数据库预测到的蛋白靶点名导入 UniProt 数据库，限定物种为人类（human），将作用人类蛋白名称转换成标准的基因名，共得到 55 个作用于人类的基因靶点。

表1 羌活中活性成分信息

Table 1. Information on active ingredients of Notopterygii rhizoma et radix

分子编号	分子名称	OB (%)	DL	靶点
MOL000358	β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.99	孕酮受体 (PGR)、核受体共激活因子2 (NCOA2)、环加氧酶 (PTGS) 1、PTGS2、90 kDa热休克蛋白 (HSP90) A B1、HSP90AA1、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚基γ (PIK3CG)、钾钙激活通道亚家族H成员2 (KCNH2)、cAMP依赖性蛋白激酶α催化亚基 (PRKACA)、多巴胺受体D1 (DRD1)、毒蕈碱型胆碱受体 (CHR) M3、CHRM1、钠电压门控通道α亚基5 (SCN5A)、γ-氨基丁酸受体α2亚单位 (GABRA2)、CHRM4、磷酸二酯酶3A (PDE3A)、5-羟色胺受体2A (HTR2A)、γ-氨基丁酸受体α5亚单位 (GABRA5)、肾上腺素能α1A受体 (ADRA1A)、γ-氨基丁酸受体α5亚单位 (GABRA3)、CHRM2、肾上腺素能受体β2 (ADRB2)、肾上腺素受体α1B (ADRA1B)、烟碱型胆碱受体α2 (CHRNA2)、溶质载体家族6 (神经递质转运蛋白, 血清素), 成员4 (SLC6A4)、μ1型阿片受体 (OPRM1)、γ-氨基丁酸受体α1亚单位 (GABRA1)、胆碱能受体烟碱α7亚单位 (CHRNA7)、B淋巴细胞瘤-2基因 (Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白 (Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (CASP) 9、V-Jun 肉瘤病毒癌基因同源物 (JUN)、CASP3、CASP8、蛋白激酶Ca (PRKCA)、转化生长因子β1 (TGFB1)、对氧磷酶1 (PON1)、微管关联蛋白2 (MAP2)
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.87	核受体亚家族3, 组C, 成员2 (NR3C2)、NCOA2、PGR

续表1

分子编号	分子名称	OB (%)	DL	靶点
MOL001941	欧前胡素 (ammidin)	34.55	0.92	HTR、CHRM1、PTGS2、GABRA1、二肽基肽酶-4 (DPP4)、PRKACA、单胺氧化酶B (MAOB)、PIK3CG
MOL001942	异欧前胡素 (isoimperatorin)	45.46	0.66	PTGS2
MOL001951	佛手柑内酯 (bergaptin)	41.73	0.70	KCNH2、SCN5A、ADRA1B、HSP90AB1、HSP90AA1、PRKACA
MOL001956	异珊瑚菜素 (cnidilin)	32.69	0.52	甲状腺激素受体 (THR)、CHRM1、PTGS2、类视黄醇X受体α (RXRA)、非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶1 (PTPN1)、ADRB2、DPP4、HSP90AB1、HSP90AA1、CHRNA7、SCN5A、GABRA1、PIK3CG
MOL002644	珊瑚菜素 (phellopterin)	40.19	0.48	THR、CHRM1、SCN5A、PTGS2、RXRA、ADRA1B、PTPN1、ADRB2、GABRA1、DPP4、HSP90AB1、HSP90AA1、CHRNA7
MOL002881	香叶木素 (diosmetin)	31.14	-0.66	诱导型一氧化氮合酶 (NOS2)、PTGS1、PTGS2、DPP4、HSP90AB1、HSP90AA1、PRKACA、丝氨酸蛋白酶1 (PRSS1)、NCOA1、NCOA2、钙调蛋白 (CALM) 1、CALM2
MOL004792	紫花前胡苷 (nodakenin)	57.12	-1.42	THR、雌激素受体1 (ESR1)、PTGS2、乙酰胆碱酯酶 (ACHE)、Pim-1原癌基因 (PIM1)
MOL011963	8-香叶氧基-5-甲氧基补骨脂素 (8-geranoxo-5-methoxypsoralen)	40.97	0.29	THR、KCNH2、F10、PTGS2、DPP4、NCOA1
MOL011969	去甲呋喃羽叶芸香素 (demethylfuropinnarin)	41.31	0.67	雄激素受体 (AR)、HSP90AB1、HSP90AA1、CHRNA7、GABRA1
MOL011971	diversoside_qt	67.57	-0.78	ADRB2
MOL011975	羌活酚 (notoptol)	62.97	-0.33	KCNH2、HSP90AB1、HSP90AA1、PRKACA

2.1.2 AD疾病靶点的预测

以“Alzheimer's disease”为关键词，分别在 GeneCards 数据库、人类孟德尔遗传数据库 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 及美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中在线检索 AD 相关靶点。其中，GeneCards 数据库靶点根据 Score 值进行排序，Score 值越大代表靶点与疾病越相关，并以 Score ≥ 10 为阈值筛选靶点，最终得到 1 443 个靶点；OMIM、NCBI 数据库分别得到 143、1 438 个相关靶点。汇总 3 个数据库得到的靶点并删除重复值，得到 2 297 个 AD 潜在靶点。利用 Venny 2.1.0 在线绘图软件讲获得 3 个数据库的交集靶点及羌活与 AD 的交集靶点 (即羌活抗 AD 的作用靶点) 进行映射，绘制韦恩图，获得羌活治疗 AD 的潜在作用靶点 36 个，具体见图 1 和表 2。

2.1.3 蛋白-蛋白相互作用网络构建

将 36 个羌活治疗 AD 的潜在靶点导入 STRING 11.5 (<https://www.string-db.org/>) 数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。物种类别设置为“Homo

sapiens”，网络类型为“full STRING network”，网络边缘的意义为“evidence”，主动交互源全选，阈值为“medium confidence (0.400)”，最大交互数无，网络交互模式为“interacitive svg”，蛋白名称字体大小为 12 号，隐藏没有相互作用的节点，进行 PPI 分析，构建 PPI 网络图 (图 2A)。网络中有 36 个节点，116 条边，其中节点表示蛋白，每条边代表 PPI 关系，线条越多表示两者之间的关联度越大，平均节点度值 (degree value, DV) 为 6.44，平均局部聚类系数为 0.513。将隐藏无连接节点 (F10、PRSS1) 后的 34 个潜在作用靶点的 PPI 网络导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化优化，优化后的网络图 (图 2B) 中节点的颜色和大小与 AD 靶点的 DV 成正相关，在 PPI 网络中颜色越深代表其之间的相互作用关系越强；再应用 CytoCNA 插件分别以前 10 名的接近中心性 (closeness centrality, CC)、介数中心性 (betweenness centrality, BC)、DV 得到网络中的 3 个核心靶点网络图 (图 3)，经 3 个参数综合筛选得到 6 个关联度最高的靶点：CASP3、SLC6A4、ESR1、JUN、PTGS2、HSP90AA1，提示这些靶点在整个网络中发挥着较为重要的作用。

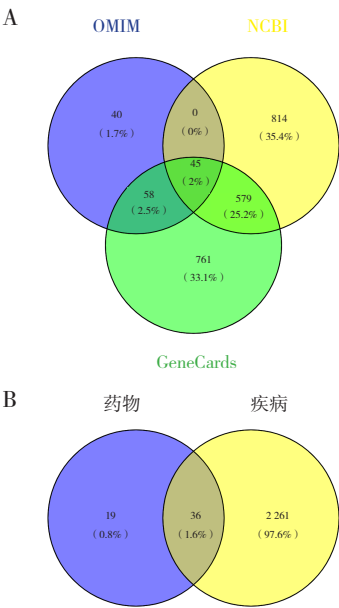


图1 韦恩图

Figure 1. Venn diagram

注：A. AD靶点的韦恩图；B. 药物靶点-AD相关靶点的韦恩图。

表2 36个羌活治疗AD的潜在作用靶点

Table 2. 36 potential therapeutic targets of Notopterygii rhizoma et radix for AD

序号	靶点	序号	靶点
1	TGFB1	19	CHRNA7
2	PON1	20	DPP4
3	ACHE	21	F10
4	AR	22	PRKACA
5	ESR1	23	HSP90AA1
6	CASP3	24	CHRM1
7	HTR2A	25	PRSS1
8	NOS2	26	PRKCA
9	PTGS2	27	CALM1
10	CASP8	28	RXRA
11	BCL2	29	HSP90AB1
12	SLC6A4	30	CHRM4
13	MAOB	31	CALM2
14	BAX	32	CHRM3
15	JUN	33	DRD1
16	CASP9	34	PTPN1
17	MAP2	35	NR3C2
18	ADRB2	36	PTGS1

2.1.4 “药材-活性成分-靶点-AD”网络构建及网络拓扑学分析

将 13 个羌活活性成分、34 个潜在作用靶点和疾病等信息导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络可视化分析，构建“羌活-活性成分-靶点-AD”网络（图 4）。网络中节点代表疾病、药物、靶点基因、活性成分；边用来连接疾病与基因、基因与活性成分、活性成分与药物的关系。该网络

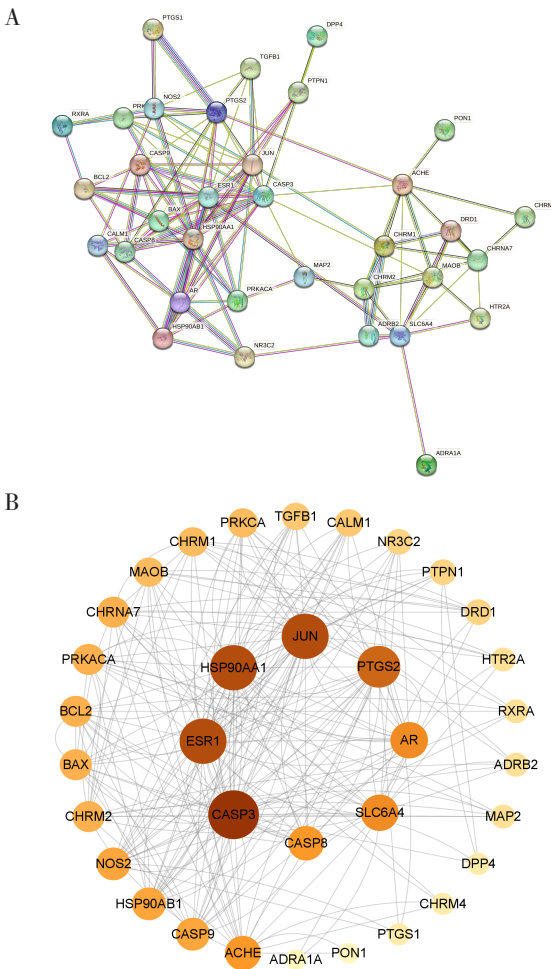


图2 PPI网络图

Figure 2. PPI network diagram

注：A. 初始PPI网络图；B. 优化PPI网络图。

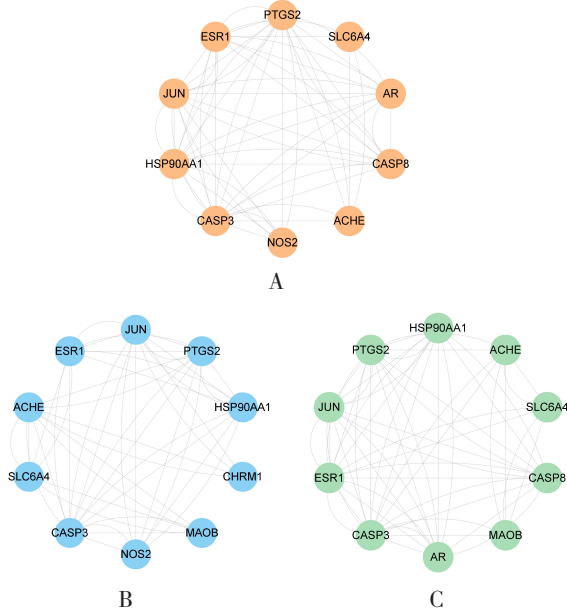


图3 核心靶点

Figure 3. Hub targets

注：A. DV；B. CC；C. BC。

由 49 个节点和 115 条边构成，正方形节点代表活性成分，圆形节点代表潜在靶点，菱形节点代表羌活，箭头形节点代表 AD。同一成分可作用于不同靶点，同一靶点也可对应多个成分，表明羌活治疗 AD 具有多成分、多靶点的特征。利用 Network Analyzer 功能进行网络拓扑学分析（表 3），通过参考节点 BC、CC 和 DV 等拓扑学参数对比化合物在网络中的重要性，这些数据越大，说明该节点在网络中更关键。其中 β -谷甾醇、香叶木素、珊瑚菜素、异珊瑚菜素这 4 个成分综合排名靠前，考虑到治疗 AD 的药物需要具有较好的血脑屏障通透性，因此，将香叶木素排除。综上， β -谷甾醇、

珊瑚菜素、异珊瑚菜素可作为羌活抗 AD 的主要活性成分。

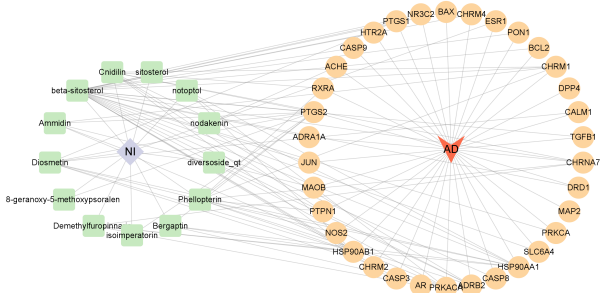


图4 “羌活-活性成分-靶点-AD”网络
Figure 4. "Notopterygii rhizoma et radix-active ingredient-target-AD" network

表3 “羌活-活性成分-靶点-AD”网络中的拓扑学数据

Table 3. Topological data in "Notopterygii rhizoma et radix-active ingredient-target-AD" network

成分	BC	CC	DV
β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	0.221170623	0.578313253	24
异珊瑚菜素 (cnidilin)	0.022435181	0.424778761	9
珊瑚菜素 (phellopterin)	0.022435181	0.424778761	9
香叶木素 (diosmetin)	0.025864635	0.417391304	8
欧前胡素 (ammidin)	0.010262227	0.396694215	5
去甲呋喃羽叶芸香素 (demethylfuropinnarin)	0.009215016	0.396694215	5
佛手柑内酯 (bergapten)	0.004584434	0.396694215	5
羌活酚 (notoptol)	0.002798089	0.390243902	4
紫花前胡苷 (nodakenin)	0.010905811	0.390243902	4
8-香叶氧基-5-甲氧基补骨脂素 (8-geranox-5-methoxypsoralen)	0.000362655	0.377952756	2
diversoside_qt	0.001012453	0.377952756	2
谷甾醇 (sitosterol)	0.00357536	0.377952756	2
异欧前胡素 (isoimperatorin)	0.000362655	0.377952756	2

2.1.5 生物功能预测

将羌活的潜在作用靶点录入用于生物学信息注释、可视化和集成发现的 DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 数据库中，Identifier 设为“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”，物种为“Homo sapiens”，列表类型为“Gene List”，提交目录，对 GO 功能和 KEGG 通路进行富集分析，背景为“Homo sapiens”，点击“Functional Annotation Tool”后得到分析结果，下载“Gene Ontology”项下的“GOTERM_BP_DIRECT”、“GOTERM_CC_DIRECT”、“GOTERM_MF_DIRECT”以及“Pathways”项下“KEGG_PATHWAY”的表格，数据筛选标准为“ $P < 0.05$ ”。GO 功能分析获得 165 个 GO 功能条目，包括 89 个生物过程 (biological process, BP)、34 个细胞组分 (cellular component, CC)、42 个分子功能 (molecular function, MF)，按 P 值大

小分别选取排名前 10 的条目绘制 GO 功能条形分析图 (图 5)。BP 主要涉及对外源性刺激的反应、对雌二醇的反应、对脂多糖的反应、细胞凋亡的调节、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性的正调节、磷蛋白磷酸酶活性的正调控等；CC 主要包括大分子复合物、神经元细胞体、质膜、突触后膜、突触后模、髓鞘、胱天蛋白酶复合物等；MF 主要有一氧化氮合酶调节活性、神经递质受体活性、酶结合等。KEGG 通路富集分析共得到 89 条通路，按 P 值大小取前 20 名绘制气泡图 (图 6)，涉及癌症途径、神经退行性变的途径-多种疾病、脂质与动脉粥样硬化、钙离子信号通路、化学致癌-受体激活、肺结核、人类免疫缺陷病毒 1 型感染、人巨细胞病毒感染、帕金森病、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、雌激素信号通路、cAMP 信号通路、5-羟色胺能突触、乙型肝炎、胆碱能突触、苯丙胺成瘾、心肌细胞中的肾上

腺素能信号传导、肺小细胞癌、唾液分泌、细胞凋亡-多种物种。

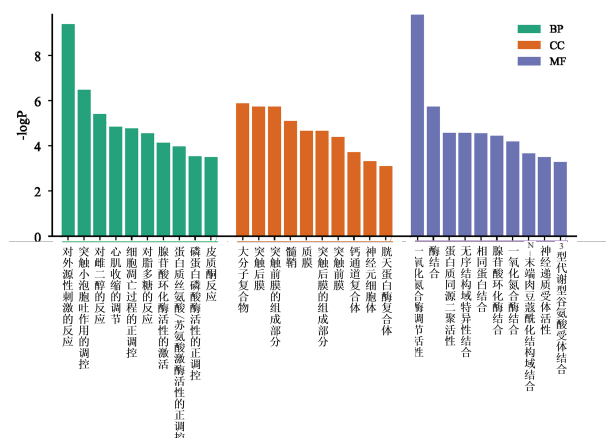


图5 GO功能富集分析

Figure 5. GO function enrichment analysis

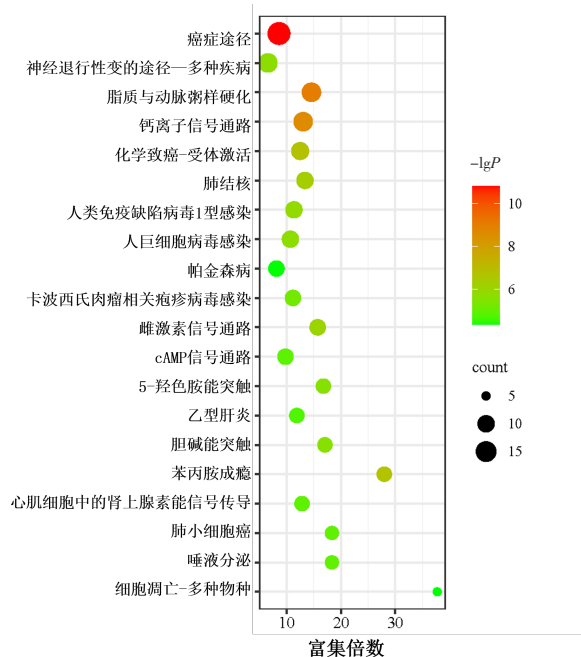


图6 KEGG通路富集分析

Figure 6. KEGG pathway enrichment analysis

2.1.6 羌活活性成分与关键靶点的分子对接

根据生物功能预测结果,选取“羌活-活性成分-靶点-AD”网络中度值较大的3个作用靶点(RXRA、SLC6A4、TGFB1)与3个DV较大的有效成分(β -谷甾醇、珊瑚菜素、异珊瑚菜素)进行分子对接。在PubChem数据库下载活性成分3D结构的SDF文件,再从蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB)中获得靶点的PDB文件。通过Maestro 11.5软件对蛋白结构进行删去配体分子和水分子、补全不完整的残基、加氢等优化处理,对化合物规定相应pH范围和

立体构型等。将准备好后的小分子配体和蛋白在Mmaestro中通过XP(extra precision)来“Ligand docking”,以“Docking score”来衡量结合活性(表4),再采用“Ligand Interaction”对对接结果进行可视化处理,产生2D作用图(图7)。通常通过结合能评估受体和配体之间的亲和性,一般结合能 ≤ -5.0 kcal/mol时,配体和受体结合较好,结合能 ≤ -7.9 kcal/mol时,说明配体与受体强烈结合^[17]。结果显示,异珊瑚菜素、珊瑚菜素均与视黄酸X受体具有强烈的结合,但与靶点自身配体相比结合能较弱, β -谷甾醇与视黄酸X受体未对接成功,考虑是由于 β -谷甾醇结构大无法进入活性口袋。3个成分与SLC6A4和TGFB1的结合能都较弱,但异珊瑚菜素与SLC6A4和TGFB1、珊瑚菜素与TGFB1的结合比其自身配体的结合活性还强。选取每个化合物与靶点自身配体的结合能之比最高的蛋白质进行可视化分析,可视化图(图7)提示活性成分与靶点之间存在氢键、 π - π 共轭等分子间作用力,其中分子与蛋白靶点产生作用的主要基团是氧原子。

2.2 基于HPLC-MS/MS法测定羌活中5个成分的含量

通过网络药理学筛选得到的13个成分里多数为香豆素类成分,而本课题组前期作为抗AD成分研究的羌活醇因OB差未被纳入,因此,选择了其中的紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素5个潜在活性成分进行了含量分析。

2.2.1 色谱条件

XTerra MS C₁₈柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m);流动相为甲醇(B)-水(A)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 53% B; 5~5.2 min, 53% $\rightarrow$ 80% B; 5.2~7 min, 80% $\rightarrow$ 70% B; 7~9 min, 70% $\rightarrow$ 60% B; 9~13 min, 60% $\rightarrow$ 53% B);流速为0.3 mL/min;柱温为30 $^{\circ}$ C;进样量为5 μ L。

2.2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子源,选择多反应监测模式进行离子扫描,干燥气和鞘气均为高纯度氮气,雾化气压为50 psi,加热气压为55 psi,气帘气压为30 psi,喷雾温度为500 $^{\circ}$ C,喷雾电压为5 500 V。质谱参数见表5。

表4 羌活活性成分与对应关键靶点的最低结合能
Table 4. Minimum binding energy of active components of Notopterygii rhizoma et radix and key targets

成分	RXRA (4PP3)	SLC6A4 (5I6X)	TGFB1 (6OM2)
β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-	-2.662	-3.099
珊瑚菜素 (phellopterin)	-9.978	-2.677	-5.246
异珊瑚菜素 (cnidilin)	-8.957	-3.690	-4.699
自带配体 (unique ligands)	-13.463	-3.278	-4.563

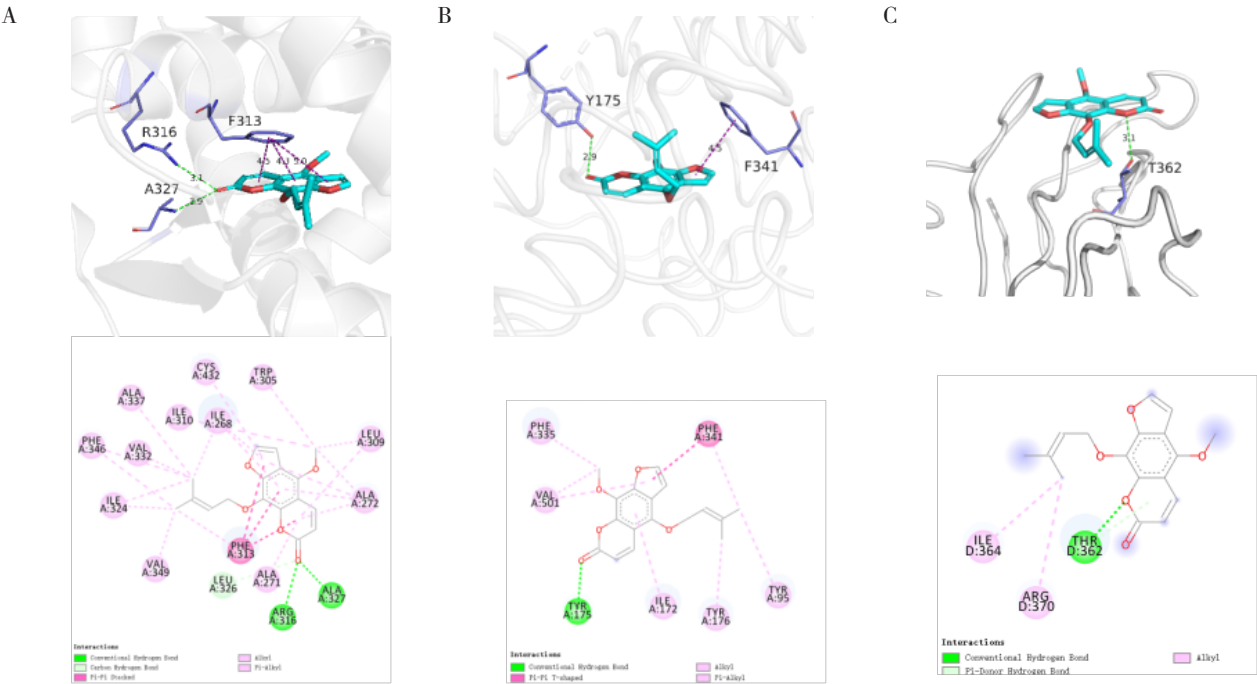


图7 羌活活性成分与关键靶点的相互作用图

Figure 7. Interaction diagrams of active components of Notopterygii rhizoma et radix and key targets
注：A~C分别为Phellopterin与视黄酸X受体、Cnidilin与SLC6A4、Phellopterin 与TGFB1的分子对接图。

表5 羌活中5个成分的质谱参数
Table 5. Mass spectrometry parameters of 5 components in Notopterygii rhizoma et radix

成分	分子式	保留时间 (min)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 (V)	裂解电压 (V)
紫花前胡苷	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	1.30	409.2/247.1	60	20
佛手柑内酯	C ₁₁ H ₆ O ₃	3.89	217.2/202.0	60	30
香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	5.15	301.1/286.0	77	35
羌活醇	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	7.94	377.0/377.0	75	10
异欧前胡素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	8.13	271.2/203.1	39	21
卡马西平 (内标)	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	3.00	237.1/194.2	59	25

2.2.3 对照品储备液的制备

精密称取上述 5 个对照品适量于 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解，摇匀并定容至刻度，得浓度约为 40 μg/mL 对照品储备液。

2.2.4 供试品溶液的制备

取羌活粉末（过三号筛）约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称重，超声处理（功率：250 W，频率：50 kHz）30 min，放冷至室温，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.3”项下的紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素各对照品储备液，用甲醇配得浓度依次为 5 648.57、689.26、224.82、1 248.85、4 767.00 ng/mL 的混合对照品，再用甲醇按不同比例稀释后，按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。以对照品的浓度为横坐标（X，ng/mL）、峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得到回归方程，结果见表 6。

表6 各成分的线性关系考察
Table 6. Investigation on the linear relationship of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 (ng/mL)
紫花前胡苷	$Y=7.734\ 22 \times 10^4 X+0.006\ 61$	0.999 0	69.74~8 472.85
佛手柑内酯	$Y=0.002\ 046 X+0.461\ 99$	0.999 0	8.51~1 033.89
香叶木素	$Y=0.004\ 81 X+0.002\ 50$	0.997 8	0.35~37.00
羌活醇	$Y=0.004\ 60 X+0.374\ 79$	0.996 4	15.42~1 873.27
异欧前胡素	$Y=0.004\ 61 X+2.310\ 69$	0.991 3	58.85~7 150.49

2.2.6 精密度试验

取“2.2.3”项下对照品储备液，用甲醇配得混合对照品溶液，紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素浓度依次为 5 648.57、19.15、6.24、104.07、2 383.50 ng/mL，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录色谱峰面积，计算得紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素峰面积的 *RSD* 分别为 3.11%、3.57%、3.47%、2.80%、2.92% (*n*=6)，表明该仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验

取同一羌活样品适量，按“2.2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素的平均含量分别为 5.590、0.035、0.020、0.130、4.340 mg/g，*RSD* 分别为 3.39%、4.65%、5.62%、3.29%、2.22% (*n*=6)，表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验

取供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、12、18、24 h 进样测定，计算得紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素峰面积的 *RSD* 分别为 1.70%、4.24%、5.04%、5.79%、3.86% (*n*=7)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验

精密称定 6 份已知 5 种成分含量的羌活粉末，每份约 0.5 g，根据样品中各成分含量，按 1:1 比例精密加入相应对照品，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素的平均回收率分别为 99.03%、96.73%、99.61%、99.26%、99.54%，*RSD* 分别为 4.47%、3.94%、3.11%、3.16%、2.93% (*n*=6)，表明该方法准确性良好。

2.2.10 样品含量测定

取 3 份羌活药材粉末，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得样品中紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素的平均含量分别为 5.556、0.035、0.020、0.129、4.321 mg/g (*n*=3)。

3 讨论

3.1 基于网络药理学与分子对接的抗AD作用机制预测分析

AD 是一种常见的神经退行性疾病，目前关于 AD 发病机理的假说主要有胆碱能假说、神经炎症假说、β-淀粉样蛋白 (amyloid β-protein, Aβ) 级联假说、Tau 病理假说等。中药含有多种有效成分，具有多靶点、多层次、多通路的治疗优势。近年来，有报道通过数据挖掘探讨了对 AD 具有防治作用的潜在中药，发现了羌活含有多个潜在成分，有望成为防治 AD 的最具潜力中药^[18]。中药网络药理学从系统层面上分析中药单味药或方剂的作用机制，全面分析复杂网络中的调控机制^[19]。因此，本文基于网络药理学方法筛选了羌活中抗 AD 的活性成分，预测了 AD 相关靶点，构建了“羌活-活性成分-靶点-AD”可视化网络和用于分析羌活治疗 AD 潜在靶点的 PPI 网络，并进行了生物功能预测，表明羌活在治疗 AD 方面具有临床前景。

本研究中，在羌活中筛选得到了 13 个活性成分，并通过分子对接比较了主要活性成分与关键靶点的作用情况。分子对接是研究分子间（如药物与靶标）相互作用，预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方式，对接分数用来评估化合物对特定蛋白的结合能力，分值越低代表两者之间相互作用越强，其值的高低对于药物设计和分子相互作用研究都非常重要。β-谷甾醇可以很好地与多个关键靶点相结合，被认为是最主要的生物活性成分。β-谷甾

醇是具有天然生物活性的甾体化合物中最有代表性的一种,参与植物细胞内各种生命活动^[20],且有文献报道 β -谷甾醇具有抗炎、调节免疫系统、抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗衰老等活性^[20-23],能影响凋亡、炎症等多种信号通路^[24-25],可用于治疗神经退行性疾病、心血管疾病等^[26-27]。此外,在已报道的网络药理学研究中, β -谷甾醇也被发现是一种治疗 AD 的重要化合物,参与多药协同作用^[28]。珊瑚菜素主要是可以从红藻中提取得到,其他植物中也含有,如白芷、羌活、防风,其生物活性是可抑制由白细胞介素-4 介导的炎症反应^[29]。紫花前胡苷最初是从当归根中分离出来,Dong 等^[30]证实紫花前胡苷通过增强胆碱能信号传导来逆转东莨菪碱诱导的认知功能障碍。但 β -谷甾醇药理作用多样,且在植物中广泛存在,所以香豆素类成分更有望成为治疗 AD 的潜在药物。

细胞内的分子过程是由多种蛋白协同作用完成,这种相互作用形成了 PPI 网络,网络中某个蛋白的异常将会导致一系列的功能异常,进而引发疾病^[31]。本研究构建了羌活活性成分的相关靶点与 AD 疾病靶点的 PPI 网络,结果显示 CASP3、SLC6A4、ESR1、JUN、PTGS2、HSP90AA1 蛋白互作关系最多的靶点,可能是羌活治疗 AD 的关键靶点。免疫、炎症变化及其相关的氧化、亚硝基化是神经退行性病变的关键病理生理机制,PTGS2 的转录是由与几种炎症信号级联相关的转录因子启动的,且在晚期 AD 患者中表达异常^[32-34]。在 AD 发展过程中,雌激素可以减轻神经元损伤,加强突触传递等,ESR1 是雌激素敏感组织上激素反应的重要介质,可以通过调节血清素受体的数量和功能、控制神经递质来激活神经元^[35-36]。抑郁症在 AD 患者中普遍存在,大脑通过调节 SLC6A4 甲基化程度来改善负面情绪,进而降低患抑郁症的风险^[37-38]。 $A\beta$ 在诱导细胞凋亡和 AD 发病机制中起着重要作用, $A\beta$ 积累会导致细胞色素 C 释放、CASP3 激活,进而使突出退化、神经元死亡^[39]。HSP90AA1 是热休克家族的成员,参与调节 AD 中 p-Tau 的稳定和功能^[40]。对比上述报道发现,本文所得羌活治疗 AD 的关键靶点确实在 AD 的发生发展中起着重要作用,研制靶向关键靶点的药物能更有效防治 AD。

为了更充分地了解羌活治疗 AD 的生物学过程和可能作用的信号通路,将得到的羌活治疗 AD

的潜在作用靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路分析。其结果显示羌活治疗 AD 的作用途径主要与神经退行性疾病途径-多种疾病、凋亡-多物种、5-羟色胺能突触、钙信号通路、胆碱能突触等相关。据报道,5-羟色胺受体 2A、5-羟色胺受体 2C 和 5-羟色胺受体 6 与 AD 有关^[41],且 5-羟色胺受体 6 拮抗剂可能刺激轴突生长并抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路^[42]。乙酰胆碱酯酶是一种神经递质受体,在 AD 的治疗中也发挥着重要作用,比如乙酰胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐和加兰他敏可以稳定或减缓认知功能的下降^[43]。 Ca^{2+} 在神经元发育、突触传递和许多神经元代谢途径的调节中发挥重要作用^[44]。这些报道均证明了 5-羟色胺能突触、钙信号通路、胆碱能突触等是防治 AD 的重要信号通路,可通过多条途径来影响 AD 的病理进程。

3.2 5个潜在活性成分的含量测定

经 TCMS 数据库发现,羌活中的香豆素类成分主要有紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素等。本研究通过 HPLC-MS/MS 法得到了可能具有抗 AD 作用的香豆素类成分在羌活中的含量,为后续羌活中活性成分研究提供依据。含量测定结果表明,不同香豆素类成分在羌活中的含量差异较大,紫花前胡苷和异欧前胡素是其他成分的几十倍至几千倍不等,含量的多少不代表活性的大小,后续可对其他成分的抗 AD 活性进行验证,如得到活性较突出的化合物,可通过药物化学的手段来大量合成,结构优化改善不足之处,以期得到抗 AD 的新药。

综上所述,本研究通过网络药理学方法对羌活中的成分和靶点进行了系统分析,发现了其治疗 AD 的潜在作用靶点,并探讨了相关信号通路,但对预测靶点和生物学途径需进一步实验验证。本研究还建立了 HPLC-MS/MS 法同时测定羌活中紫花前胡苷、佛手柑内酯、香叶木素、羌活醇、异欧前胡素的含量,该方法操作简便可靠、专属性强、重复性好,可用于羌活药材中多种化学成分的研究。

参考文献

- 1 蒋舜媛,周毅,孙辉,等.羌活属药用植物基源考证[C].生态文明建设中的植物学:现在与未来-中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会论文集-第4分会场:资源植物,2013:90.
- 2 中国药典 2020 版.二部[S].2020:190-191.

- 3 马丽梅, 杨军丽. 羌活药材的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(19): 6111–6120. [Ma LM, Yang JL. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Notopterygii Rhizoma et Radix*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(19): 6111–6120.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.034](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.034).
- 4 Blunder M, Liu X, Kunert O, et al. Polyacetylenes from *Radix et Rhizoma Notopterygii incis* with an inhibitory effect on nitric oxide production in vitro[J]. *Planta Med*, 2014, 80(5): 415–418. DOI: [10.1055/s-0034-1368196](https://doi.org/10.1055/s-0034-1368196).
- 5 刘卫根, 周国英, 徐文华, 等. 羌活种子挥发油的化学成分及抗氧化活性[J]. 光谱实验室, 2012, 29(6): 3364–3373. [Liu WG, Zhou GY, Xu WH, et al. Chemical compositions and antioxidant activity of essential oil from seeds of *Notopterygium incisum* Ting ex H.T.Chang[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, 29(6): 3364–3373.] DOI: [10.3969/j.issn.1004-8138.2012.06.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-8138.2012.06.022).
- 6 郭晏华, 沙明, 孟宪生, 等. 中药羌活的抗病毒研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3): 198–199. [Guo YH, Sha M, Meng XS, et al. The anti-viral studies of *Notopterygium incisum*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2005, 16(3): 198–199.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-0805.2005.03.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-0805.2005.03.005).
- 7 Wu SB, Pang F, Wen Y, et al. Antiproliferative and apoptotic activities of linear furocoumarins from *Notopterygium incisum* on cancer cell lines[J]. *Planta Med*, 2010, 76(1): 82–85. DOI: [10.1055/s-0029-1185971](https://doi.org/10.1055/s-0029-1185971).
- 8 周毅, 白筱璐, 孙洪兵, 等. 家种羌活的品质评价研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 95–99. [Zhou Y, Bai XL, Sun HB, et al. Study on quality evaluation of cultivated *Notopterygii Rhizoma et Radix*[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2017, 33(2): 95–99.] DOI: [10.13412/j.cnki.zyyl.2017.02.026](https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.2017.02.026).
- 9 Jiang XW, Liu WW, Wu YT, et al. *Notopterygium incisum* extract (NRE) rescues cognitive deficits in APP/PS1 Alzheimer's disease mice by attenuating amyloid- β , tau, and neuroinflammation pathology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112433. DOI: [10.1016/j.jep.2019.112433](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112433).
- 10 Skalikka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, et al. Implication of coumarins towards central nervous system disorders[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103: 188–203. DOI: [10.1016/j.phrs.2015.11.023](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.11.023).
- 11 张明发, 沈雅琴. 羌活药理学研究[J]. 中国执业药师, 2008, 5(5): 28–30. [Zhang MF, Shen YQ. Pharmacological research of *Rhizoma Seu Radix Notopterygii*[J]. China Licensed Pharmacist, 2008, 5(5): 28–30.] DOI: [10.3969/j.issn.1672-5433.2008.05.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-5433.2008.05.011).
- 12 李智勇, 张兴水, 王军练, 等. 羌活的研究进展[J]. 陕西中医学院学报, 2003, 26(6): 56–59. [Li ZY, Zhang XS, Wang JL, et al. Progress in researches on *Notopterygium root*[J]. Journal of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, 2003, 26(6): 56–59.] DOI: [10.3969/j.issn.1002-168X.2003.06.034](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-168X.2003.06.034).
- 13 李良昌, 朴红梅, 秦向征, 等. 羌活提取物对哮喘小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响及其对 p38 信号通路的作用[J]. 解剖学报, 2013, 44(6): 819–823. [Li LC, Piao HM, Qin XZ, et al. Effects of extract of *notopterygium* on Th1/Th2 cells balance and p38 signaling pathway in the asthma mouse model[J]. Acta Anatomica Sinica, 2013, 44(6): 819–823.] DOI: [10.3969/j.issn.0529-1356.2013.06.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-1356.2013.06.016).
- 14 巩子汉, 段永强, 付晓艳, 等. 羌活的药理作用研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(5): 192–194. [Gong ZH, Duan YQ, Fu XY, et al. Analysis of pharmacological effects of *Notopterygium incisum*[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2019, 15(5): 192–194.] DOI: [10.11954/ytcty.201905061](https://doi.org/10.11954/ytcty.201905061).
- 15 Jiang XW, Lu HY, Li JD, et al. A natural BACE1 and GSK3 β dual inhibitor *Notopterol* effectively ameliorates the cognitive deficits in APP/PS1 Alzheimer's mice by attenuating amyloid- β and tau pathology[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(3): e50. DOI: [10.1002/ctm2.50](https://doi.org/10.1002/ctm2.50).
- 16 杨力龙, 苏华珍, 卢新丽, 等. 网络药理学在中药及其复方中的应用的研究进展[J]. 大众科技, 2021, 23(259): 55–57. [Yang LL, Su HZ, Lu XL, et al. Research progress on application of network pharmacology in traditional Chinese medicine and its compound prescription[J]. Popular Science & Technology, 2021, 23(259): 55–57.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-1151.2021.03.015](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-1151.2021.03.015).
- 17 李晓玲, 贾鑫航, 董方昕, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨黄连治疗脓毒症的作用机制[J]. 特产研究, 2022, 44(6): 112–117, 148. [Li XL, Jia XH, Dong FX, et al. Study on the mechanism of action of *Coptidis* on the sepsis based on the network pharmacology and molecular docking[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2022, 44(6): 112–117, 148.] DOI: [10.16720/j.cnki.tcyj.2022.020](https://doi.org/10.16720/j.cnki.tcyj.2022.020).
- 18 向柳. 基于数据挖掘探析防治阿尔茨海默病的潜在中药[D]. 成都: 成都中医药大学, 2023. DOI: [10.26988/d.cnki.gcdzu.2023.000085](https://doi.org/10.26988/d.cnki.gcdzu.2023.000085).
- 19 Fang JS, Liu C, Wang Q, et al. In silico polypharmacology of natural products[J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(6): 1153–1171. DOI: [10.2174/1871530319666181217123357](https://doi.org/10.2174/1871530319666181217123357).
- 20 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148–153. [Chen YK, Zeng A, Luo Zh, et al. Advances on pharmacology of β -sitosterol[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2021, 37(1): 148–153.] DOI: [10.16809/j.cnki.2096-3653.2020040801](https://doi.org/10.16809/j.cnki.2096-3653.2020040801).
- 21 Alappatt L, Valerio M. Effect of vitamin D and β -sitosterol on immune function of macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(11): 1390–1396. DOI: [10.1016/j.intimp.2010.08.003](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.003).
- 22 Koo HJ, Park HJ, Byeon HE, et al. Chinese yam extracts containing β -sitosterol and ethyl linoleate protect against atherosclerosis in

- apolipoprotein E - deficient mice and inhibit muscular expression of VCAM-1 *in vitro*[J]. J Food Sci, 2014, 79(4): H719-H729. DOI: [10.1111/1750-3841.12401](#).
- 23 Shi C, Luo X, Wang J, et al. Incorporation of β -sitosterol into the membrane prevents tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B activation and gonadotropin-releasing hormone decline[J]. Steroids, 2015, 96: 1-6. DOI: [10.1016/j.steroids.2014.12.014](#).
- 24 Bin SMS, Ameen SS. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer[J]. Nutr Cancer, 2015, 67(8): 1214-1220. DOI: [10.1080/01635581.2015.1087042](#).
- 25 Liao PC, Lai MH, Hsu KP, et al. Identification of β -sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(41): 10748-10759. DOI: [10.1021/acs.jafc.8b04555](#).
- 26 Shi C, Wu F. Incorporation of β -sitosterol into mitochondrial membrane enhances mitochondrial function by promoting inner mitochondrial membrane fluidity[J]. J Bioenerg Biomembr, 2013, 45(3): 301-305. DOI: [10.1007/s10863-012-9495-3](#).
- 27 Gogoi D, Pal A, Chattopadhyay P, et al. First report of plant-derived β -sitosterol with antithrombotic, *in vivo* anticoagulant, and thrombus-preventing activities in a mouse model[J]. J Nat Prod, 2018, 81(11): 2521-2530. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.8b00574](#).
- 28 宋祯彦, 陈易璇, 余婧萍, 等. 钩藤散活性成分治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学分析[J]. 中草药, 2018, 49(24): 5854-5864. [Song ZY, Chen YX, Yu JP, et al. Network pharmacological approach to investigate mechanism of active ingredients in Gouteng powder for Alzheimer's disease[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(24): 5854-5864.] DOI: [10.7501/j.jissn.0253-2670.2018.24.019](#).
- 29 Chen X, Zhang YJ, Pei JX, et al. Phellopterin alleviates atopic dermatitis-like inflammation and suppresses IL-4-induced STAT3 activation in keratinocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112: 109270. DOI: [10.1016/j.intimp.2022.109270](#).
- 30 Dong HK, Do YK, Young CK, et al. Nodakenin, a coumarin compound, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice[J]. Life Sci, 2007, 80: 1944-1950. DOI: [10.1016/j.lfs.2007.02.023](#).
- 31 Rivas JDL, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks[J]. PLoS Comput Biol, 2010, 6(6): e1000807. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1000807](#).
- 32 Guan PP, Wang P. Integrated communications between cyclooxygenase-2 and Alzheimer's disease[J]. FASEB J, 2019, 33(1): 13-33. DOI: [10.1096/fj.201800355RRRR](#).
- 33 Hellmann J, Tang YN, Zhang MJ, et al. Atf3 negatively regulates Ptg2/Cox2 expression during acute inflammation[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2015, 116-117: 49-56. DOI: [10.1016/j.prostaglandins.2015.01.001](#).
- 34 Yermakova AV, Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2001, 22: 823-836. DOI: [10.1016/s0197-4580\(01\)00303-7](#).
- 35 Pirskanen M, Hiltunen M, Mannermaa A, et al. Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women[J]. Eur J Hum Genet, 2005, 13(9): 1000-1006. DOI: [10.1038/sj.ejhg.5201447](#).
- 36 Summer BE, Fink G. Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine (2A) receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995, 54(1-2): 15-20. DOI: [10.1016/0960-0760\(95\)00075-b](#).
- 37 Thomas F, Moshe S, Angela C, et al. DNA methylation of the serotonin transporter gene (SLC6A4) is associated with brain function involved in processing emotional stimuli[J]. J Psychiatry Neurosci, 2015, 40(5): 296-305. DOI: [10.1503/jpn.140180](#).
- 38 Satoshi O, Shigeru M, Manabu F, et al. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression[J]. J Psychiatr Res, 2014, 53: 47-53. DOI: [10.1016/j.jpsychires.2014.02.002](#).
- 39 Marzieh A, Saeed T, Elina K, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2021, 69(4): 1633-1645. DOI: [10.1002/bab.2233](#).
- 40 Sulistio YA, Heese K. The ubiquitin-proteasome system and molecular chaperone deregulation in Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 905-931. DOI: [10.1007/s12035-014-9063-4](#).
- 41 Wilkinson D, Windfeld K, Colding-Jørgensen E. Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(11): 1092-1099. DOI: [10.1016/S1474-4422\(14\)70198-X](#).
- 42 Claeysen S, Bockaert J, Giannoni P. Serotonin: a new hope in Alzheimer's disease[J]. ACS Chem Neurosci, 2015, 6(7): 940-943. DOI: [10.1021/acschemneuro.5b00135](#).
- 43 Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, et al. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Interv Aging, 2008, 3(2): 211-225. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18686744/>.
- 44 Missiaen L, Robberecht W, Bosch LVD, et al. Abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and disease[J]. Cell Calcium, 2000, 28(1): 1-21. DOI: [10.1054/ceca.2000.0131](#).

收稿日期: 2024 年 08 月 19 日 修回日期: 2024 年 10 月 29 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳