### ・论 著・

# 基于UHPLC-QE-MS分析结合网络药理学探讨小叶黄杨生物碱治疗阿尔茨海默病的作用机制

肖倩倩<sup>1</sup>, 王晓红<sup>1</sup>, 刘晓利<sup>2</sup>, 李爱倩<sup>3</sup>, 孟莹<sup>1</sup>, 宋安妮<sup>1</sup>, 程忠哲<sup>1\*</sup>(1.潍坊医学院药学院,山东 潍坊 261053; 2.淄博市疾病预防控制中心,山东 淄博 255000; 3.青岛大学附属医院,青岛 266500)

摘要:目的 鉴定小叶黄杨中生物碱类化学成分,探讨治疗阿尔茨海默病的物质基础和作用机制。方法 表征小叶黄杨生物碱成分,并利用 PubChem、SwissADME、Swiss Target Prediction、Genecards 和 OMIM 等数据库获取小叶黄杨生物碱的活性成分和对应靶点,以及阿尔茨海默病的相关靶点;运用 Cytoscape 3.9.0 软件绘制 "成分-靶点"网络图;运用 String 平台构建蛋白互作网络图;运用微生信在线绘图工具进行通路富集分析可视化;用 AutodockTools-1.5.6 软件对筛选出的核心成分做分子对接。结果 鉴定小叶黄杨生物碱成分 23 个,筛选有效成分 19 个,对应靶点 216 个;筛选阿尔茨海默病靶点 880 个,药物-疾病交集靶点 49 个;GO 富集分析主要相关的生物过程有化学性突触传递,顺行跨突触信号,跨突触信号等;KEGG 通路富集分析中神经活性配体-受体相互作用,5-羟色胺能突触, cAMP 信号等为主要信号通路。分子对接显示筛选的核心靶点和核心成分均有较强结合力。结论 本研究初步证明了小叶黄杨生物碱成分可以多成分、多靶点、多通路共同作用治疗阿尔茨海默病,为进一步深入研究小叶黄杨生物碱对阿尔茨海默病作用的物质基础以及作用机制提供参考。

关键词:小叶黄杨;生物碱;液相色谱-质谱联用;网络药理学;分子对接

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)23-3045-10 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.23.001

引用本文:肖倩倩,王晓红,刘晓利,等.基于 UHPLC-QE-MS 分析结合网络药理学探讨小叶黄杨生物碱治疗阿尔茨海默病的作用机制[J].中国现代应用药学,2022,39(23):3045-3054.

## Study on Mechanism of Alkaloids Therapy of *Buxus Microphylla* in Treating Alzheimer's Disease Based on UHPLC-QE-MS Analysis Combined with Network Pharmacology

XIAO Qianqian<sup>1</sup>, WANG Xiaohong<sup>1</sup>, LIU Xiaoli<sup>2</sup>, LI Aiqian<sup>3</sup>, MENG Ying<sup>1</sup>, SONG Anni<sup>1</sup>, CHENG Zhongzhe<sup>1\*</sup> (1.School of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; 2.Zibo Center for Disease Control and Prevention, Zibo 255000, China; 3.The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the chemical constituents of alkaloids in Buxus microphylla, and to explore the material basis and mechanism of action in the treatment of Alzheimer's disease. METHODS The alkaloid components of Buxus microphylla were characterized, and the active components and corresponding targets of Buxus microphylla alkaloids and related targets of Alzheimer's disease were obtained by PubChem, SwissADME, Swiss Target Prediction, Genecards and OMIM databases. Cytoscape 3.9.0 software was used to draw the "component-target" network diagram. The protein-protein interaction network was constructed by String platform. The visualization of pathway enrichment analysis was carried out by using the on-line drawing tool of bioinformatics. Molecular docking was performed on the screened core components with AutodockTools-1.5.6 software. **RESULTS** Twenty-three alkaloid components of *Buxus microphylla* were identified, 19 active components and 216 corresponding targets were screened. Eight hundred and eighty Alzheimer's disease targets and 49 drug disease intersection targets were screened. The main biological processes related to GO enrichment analysis include chemical synaptic transmission, anterograde cross synaptic signal, cross synaptic signal and so on. In KEGG pathway enrichment analysis, neuroactive ligand receptor interaction, serotonergic synapse and cAMP signal were the main signal pathways. Molecular docking showed that the screened core targets and core components had strong binding force. CONCLUSION This study preliminarily proves that the alkaloid components of Buxus microphylla can act together in multiple components, multiple targets and multiple pathways to treat Alzheimer's disease. It provides a reference for further research on the material basis and mechanism of the effect of Buxus microphylla alkaloids on Alzheimer's disease.

KEYWORDS: Buxus microphylla; alkaloids; LC-MS; network pharmacology; molecular docking

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803704)

作者简介:肖倩倩,女,硕士生 E-mail: xiaoqianqian3424@163.com 共同第一作者:王晓红,女,硕士,讲师 E-mail: wangxh@wfmc.edu.cn \*通信作者:程忠哲,男,博士,副教授 E-mail: chengzhzh@wfmc.edu.cn

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2022 December, Vol.39 No.23  $\cdot$  3045  $\cdot$ 

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是在 老年人口中最为普遍的一种不可逆的神经退行性 疾病,其特征是大脑海马区和皮质中乙酰胆碱浓 度较低<sup>[1]</sup>,临床主要表现为认知功能减退,语言和 行为障碍等,是痴呆症的最常见原因。目前研究 认为 AD 是一种多病因性疾病,其发病原因综合年 龄、遗传及环境等多种因素,并且发病率还在逐 年提高。虽然 AD 的确切发病机制仍不清楚,但是 淀粉样蛋白斑块沉积和 tau 蛋白过度磷酸化被认 为是 AD 发病的主要原因<sup>[2-3]</sup>。目前已上市的药物 多奈哌齐、加兰他敏可以改善 AD 的症状,提高患 者生活质量,但是目前没有药物能够治愈。因此, 寻找治疗 AD 药物的研究具有重要意义。

小叶黄杨(Buxus sinica var.parvifolia M.Cheng) 又名瓜子黄杨,为黄杨科黄杨属常绿灌木或小乔 木,国内主要分布在安徽、浙江、江西、湖北等地。 早在《本草纲目》中就有记载,黄杨木属于中国的 一种传统药用植物,具有行气活血、祛湿通络等功 效。小叶黄杨含有多种化学成分,如生物碱类、黄 酮类、香豆素类、甾醇类和酚酸类化合物等[4]。已 有研究从黄杨属中分离出 200 多种生物碱成分, 如 (+)-buxabenzamidienine、(+)-buxamidine、环黄杨碱 D 以及环维黄杨星 D 等<sup>[5-6]</sup>。研究证实,小叶黄杨 生物碱通过抑制 AChE 和 BChE 在抗 AD 中发挥重 要作用<sup>[7-10]</sup>。诸多证据表明, AD 患者的记忆缺陷 与中枢神经系统胆碱能神经传递障碍之间可能存 在联系[11-14]。胆碱能假说认为,恢复胆碱能神经 传递是一种增强突触乙酰胆碱可用性和改善 AD 患者受损记忆的有益策略。因此通过抑制 AChE 和 BChE,恢复胆碱能神经传递,可以改善患者的 症状。研究发现多种黄杨生物碱成分具有不同程 度的 AChE 和 BChE 抑制作用[15-17]。Ata 等[15]以阳 性药物石杉碱甲和加兰他敏作对照,证明黄杨中的 生物碱成分(E)-Buxenone、(Z)-Buxenone 和 Cyclobuxophylline O 均对 AChE 具有中度抑制作 用。Atta-ur-Rahman 等<sup>[16]</sup>发现 Cyclovirobuxeine A 和Cyclomicrophylline A能够抑制 AChE。Choudhary 等<sup>[17]</sup>鉴定出来的生物碱 Buxippine K 和 Buxidine 也 是 AChE 及 BChE 的抑制剂。虽然多种黄杨生物碱 表现出抗 AD 的药效作用,但至今其抗 AD 的机制 还尚未明确。

最近网络药理学已用于肿瘤、AD 等复杂疾病的中医药研究中,可以预测中药化合物的靶标和

。 水为娃哈哈纯净水;甲醇、乙腈(色谱级, M.Cheng) Sigma-Aldrich);二氯甲烷(分析纯,天津市华东试 剂厂);甲酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限 湖北等地。 公司);小叶黄杨(*Buxus microphylla*)样品于潍坊医 掌院校园中采集,经药学院许崇梅副教授鉴定,

值的研究提供科学依据。

1 仪器与试剂

确定为黄杨科黄杨属小叶黄杨(Buxus sinica var. parvifolia M.Cheng);环维黄杨星 D(成都普思生物科技股份有限公司,批号: PS020065;纯度: 98.0%)。
2 方法

药理作用,揭示药物-基因-疾病的关系<sup>[18]</sup>。因此,

本研究首先利用 UHPLC-QE-MS 技术分析黄杨生

物碱成分,并结合网络药理学方法对治疗 AD 的作

用靶点和主要通路进行预测,通过分子对接进行

初步的验证, 期望为黄杨生物碱的开发和药用价

technologies 公司); Q Exactive Orbitrap 高分辨质谱

仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ3200DE

型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); AR153CN 型

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent

2.1 小叶黄杨生物碱的 LC-MS 鉴定

电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司)。

**2.1.1** 供试品的制备 精密称定小叶黄杨粉末 0.02 g, 加 1 mL 80%乙醇超声提取 20 min, 二氯 甲烷 1 mL 萃取 3 遍, 氮气吹干后, 精密吸取 1 mL 甲醇溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 待 LC-MS 分析。

**2.1.2** 对照品溶液的配制 取环维黄杨星 D 适量,精密称定,加甲醇配制成浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>储备液,稀释成浓度为 50 ng·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液,待 LC-MS 分析。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate XB C<sub>18</sub>
色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1%
甲酸水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~5 min, 20%
B, 5~30 min, 20%→50%B, 30~35 min, 50%→95%
B, 35~40 min, 95%B, 40~45 min, 20%B; 流速:
0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL。

2.1.4 质谱条件 Q-Exactive 四级杆-静电场轨道 阱高分辨质谱采用电喷雾离子源(ESI)正离子全扫 描模式。电喷雾电压: 3.8 kV; 毛细管温度: 280 ℃; 辅助气温度: 280 ℃; 鞘气流速(Arb): 35 psi; 辅 助气体流量(Arb): 10 psi; 一级质谱分辨率(Full ms resolution): 60 000; 二级质谱(MS/MS)分辨率:

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

30 000; 扫描碰撞能量(CE): 40 eV, 数据采集范围 *m/z* 100~1 500。

**2.2** 小叶黄杨中生物碱活性成分及其类药性筛选 以及靶点预测

**2.2.1** 小叶黄杨生物碱活性成分的筛选 通过 中国知网(CNKI, https://kns.cnki.net/)和 PubMed 数 据 库 (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) 检 索 1970年—2022年4月黄杨生物碱的化学成分活性 研究的文献<sup>[15-17,19-22]</sup>,进行小叶黄杨生物碱活性 成分的筛选。

2.2.2 小叶黄杨生物碱活性成分类药性筛选 运用 SwissADME 数据库<sup>[23]</sup>预测其 ADME 参数。以 药动学参数胃肠吸收度为 "high" 及药物相似性满 足>2 项的 "Yes" 为筛选标准,来筛选小叶黄杨生 物碱活性成分的类药性。

**2.2.3** 小叶黄杨生物碱活性成分的靶点预测 通 过 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih. gov/)查询成分对应的 SMILES 号,进一步采用 TargetNet 数据库<sup>[24]</sup>(http://targetnet.scbdd.com/), Swiss Target Prediction 数据库<sup>[25]</sup>(http://www. swisstargetprediction.ch/),PharmMapper 数据库<sup>[26]</sup> (http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/)进行靶点预测 补充。运用 Uniport 数据库将 TargetNet 数据库(选 择值>0 的)、PharmMapper 数据库得到的且去重后 的所有靶点名称转化为标准基因名称。

2.3 AD 靶点的提取及药物治疗疾病靶点的筛选 通过 GeneCards<sup>[27]</sup>(https://www.genecards.org/),
OMIM(https://omim.org/)以及 Therapeutic Target Database(TTD, http://db.idrblab.net/ttd/)数据库<sup>[28]</sup>,
以 "Alzheimer's disease" 为关键词检索疾病相关
靶点,其中 Genecards 数据库将检索结果按 score>
20 的原则进行筛选,将 3 个数据库得到的疾病靶

点合并,去除重复靶点。将得到的有效成分靶点 和疾病靶点导入 Venny2.1.0 在线工具(https:// bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)绘制 Venn 图,获 取相交靶点,从而初步得到小叶黄杨生物碱治疗 AD 的潜在作用靶点。

2.4 "成分-靶点"的网络构建

通过 TargetNet、Swiss Target Prediction 和 PharmMapper 数据库筛选药物作用靶点,并借助 Uniport 数据库进行基因校正。将筛选得到的小叶 黄杨生物碱成分及相关作用靶点结果输入 Excel 表格,然后导入 Cytoscape(Version 3.9.0)软件,筛

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

选其主要活性成分及核心靶点。本研究基于参数 平均最短路径、介数中心性、中心接近度、聚类 系数、网络度值来评估节点重要性。构建"成分-靶点"网络图。以不同可视化效果表达成分和相 交靶点的相互关系,并进行网络拓扑分析,根据 自由度大于均值来筛选关键活性成分。

**2.5** 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建

将交集基因导入 String 在线数据库<sup>[29]</sup>(https:// string-db.org/),限定物种选"Homo sapiens",置 信度>0.4 为条件进行筛选,隐藏离散节点,构建 PPI 网络关系图,将获得的结果保存为 tsv 格式。 通过 Cytoscape 3.9.0 软件对网络互作关系进行拓 扑分析,筛选核心靶点。

2.6 交集靶点的富集分析及可视化

将筛选得到的交集靶点导入 Metascape 在线数 据库<sup>[30]</sup>(https://metascape.org/)进行基因本体(gene ontology,GO)富集分析和京都基因与基因组百科全 书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,设定物种为"H.sapiens", 阈值 P<0.05。其中 GO 富集分别选取生物学过程 (biological process, BP)、分子功能(molecular funtion, MF)、细胞组成(cellular component, CC) 进行富集,将结果按照 P 值排序,3 个方面各取前 10 位结果,并使用微生信在线绘制工具平台绘制三 合一柱状图。KEGG 富集分析选取与 AD 相关的且 显著性较高的信号通路使用微生信在线绘制工具 平台制作 KEGG 富集气泡图。

2.7 活性成分与靶点的分子对接验证

对"2.4"项下筛选出的主要活性成分和筛选 出的核心靶点进行分子对接验证。将主要活性成 分输入到 PubChem 数据库,下载其 3D 结构图, 保存为"sdf"格式。从 RCSB PDB 数据库<sup>[31]</sup> (https://www.rcsb.org/)下载核心靶点对应的大分子 受体蛋白的 3D 结构,保存"pdb"格式文件。并 通过 PyMOL 软件对其去水,添加非极性氢,去除 孤对电子,计算 Gasteiger 电荷,将预处理后的靶 蛋白存为"pdbqt"文件。采用 Open Bable GUL 软 件将小分子活性化合物转化为"pdbqt"格式,导 入 AutoDockTools 添加原子电荷,分配原子类型, 所有柔性键均默认可旋转,并存为"pdbqt"文件。 利用 AutoDockTools 工具寻找蛋白活性位点参数, 设置 Grid box 坐标及大小,确定受体蛋白的活性对 接区域后,运行 AutoDock Vina 1.5.6 对大分子蛋白 和配体进行分子对接,并计算其结合能<sup>[32]</sup>,利用 PyMOL 对模型进行可视化。

#### 3 结果

3.1 小叶黄杨中生物碱成分分析

定性分析小叶黄杨中的生物碱成分,总离子 流图见图 1。结合对照品环维黄杨星 D 的裂解规 律以及相关文献<sup>[33-35]</sup>进行化合物结构解析,鉴定 出小叶黄杨生物碱成分23个,见表1<sup>[15-17,19-22,36-38]</sup>。

HY1的保留时间为 1.10 min,与对照品环维黄 杨星 D 的保留时间一致,观察到准分子离子峰 m/z 403.367 6[M+H]<sup>+</sup>及特征碎片 m/z 372.325 6 [M+H-NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, m/z 354.314 1(372.325 6 脱水), 341.302 8 [M+H-NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, m/z 323.272 6 (341.302 8 脱水), 203.179 2(C 环开裂), 135.116 9, 121.101 3(B 环开裂)。其精确分子质量及特征碎片离子与文献 [33-34]报道基本一致,因此 HY1 鉴定为环维黄杨 星 D,二级质谱图及质谱裂解途径见图 2。代表 化合物 HY22 的保留时间为 25.37 min,可观察到 准分子离子峰 *m*/*z* 356.294 4[M+H]<sup>+</sup>及特征碎片 *m*/*z* 339.267 7[M+H-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, *m*/*z* 203.142 7,137.095 9 (C 环开裂),135.080 5,121.101 3(B 环开裂),根据 精确分子质量及特征碎片,并结合文献<sup>[34]</sup>及对照品 的裂解规律,推测该成分为 cyclobuxophylline O, 其裂解途径及二级质谱图见图 3。

**3.2** 小叶黄杨中生物碱活性成分及其类药性筛选 以及靶点预测

3.2.1 小叶黄杨生物碱活性成分筛选 通过 LC-MS 分析并与黄杨生物碱的相关文献比对,本 研究尝试鉴定出小叶黄杨生物碱成分 23 个。通过 对 1970 年—2022 年 4 月的文献检索<sup>[15-17,19-22]</sup>,其 中 19 个为活性成分,见表 1。



图1 小叶黄杨生物碱的 LC-MS 总离子流图

Fig. 1 LC-MS total ion flow diagram of Buxus microphylla alkaloids

表1 小叶黄杨生物碱成分 Tab.1 Alkaloid constituents of *Buxus microphylla* 

序号	<i>t</i> <sub>R</sub> /min	化合物	分子式	理论值 [M+H] <sup>+</sup>	实测值 [M+H] <sup>+</sup>	MS/MS 裂解碎片	$\Delta_{\rm ppm}$	参考 文献
HY1*	1.10	环维黄杨星 D	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O	403.361 0	403.367 6	372.325 6, 354.314 1, 341.302 8, 323.272 6, 203.179 2, 135.116 9, 121.101 3	-1.46	[19,36]
$HY2^*$	1.88	环黄杨碱 D	$C_{25}H_{42}N_2O$	387.329 7	387.337 3	342.278 9, 324.268 4, 241.195 0, 189.151 5, 119.085 7	0.80	[19,37]
HY3	2.54	cycloprotobuxine	$C_{26}H_{46}N_2O$	403.361 0	403.367 9	385.357 7, 340.299 3, 323.272 9, 189.163 7, 173.132 8, 135.116 9, 121.101 3	-1.07	[38]
$HY4^*$	3.46	buxmicrophylline O	$C_{28}H_{48}N_2O_2$	445.371 6	445.378 7	400.320 8, 382.311 3, 189.163 8, 184.968 4, 262.920 2, 121.101 4	-0.30	[38]
HY5	3.70	buxmicrophylline D	$C_{29}H_{50}N_{2}O_{2} \\$	459.387 2	459.394 0	414.335 2, 396.326 0, 330.278 9, 121.101 3	-1.10	[36]
$\mathrm{HY6}^{*}$	4.86	cyclovirobuxeine A	$\mathrm{C}_{28}\mathrm{H}_{48}\mathrm{N}_{2}\mathrm{O}$	429.3767	429.384 0	384.325 4, 366.313 8, 339.267 7, 255.210 7, 201.163 9, 121.101 3	0.07	[16,38]
HY7	14.57	cycloprotobuxinamine	$C_{29}H_{46}N_2O_5$	503.340 7	503.346 0	398.304 6, 339.266 9, 189.163 4, 168.091 9, 151.148 0, 121.101 3	-3.73	[36]
$HY8^*$	16.47	cyclobuxoxazine	$C_{27}H_{46}N_2O_2$	431.355 9	431.362 6	413.3507, 368.2939, 189.1639, 161.1325, 121.1014	-1.52	[20,36]
$HY9^*$	17.39	cyclomicrophylline A	$C_{28}H_{48}N_2O_2$	445.371 6	445.378 0	427.3677, 382.3099, 271.2409, 311.6926, 121.1014	-2.01	[16,38]
$HY10^{*}$	17.44	buxippine K	C25H39NO2	386.298 1	386.305 0	368.293 6, 241.158 6, 187.148 0, 137.096 1, 119.085 6	-0.92	[17]
HY11*	18.22	cyclosuffrobuxinine M	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO	354.271 9	354.278 3	323.237 0, 187.147 8, 241.158 6, 137.096 0, 119.085 7, 105.070 1	-2.38	[21,36]

· 3048 · Chin J Mod Appl Pharm, 2022 December, Vol.39 No.23

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

续表1

序号	t <sub>R</sub> /min	化合物	分子式	理论值 [M+H] <sup>+</sup>	实测值 [M+H] <sup>+</sup>	М	S/MS 裂解碎片	$\Delta_{\text{ppm}}$	参考 文献
HY12*	18.50	cyclomicrobuxinine	C24H37NO2	372.282 4	372.290 1	323.235 3, 119.085 6,	187.148 3, 137.095 9, 105.070 1	1.06	[19,36]
$\mathrm{HY13}^{*}$	19.55	buxbodine B	$C_{26}H_{41}NO_2 \\$	400.313 7	400.321 0	382.2741, 189.1634,	149.096 1, 121.101 4, 135.080 5	-0.02	[17,36]
$\mathrm{HY14}^{*}$	21.11	17-oxocycloprotobuxine	C23H37NO	344.287 5	344.294 7	313.234 1, 203.142 4,	111.107 9, 135.080 4, 179.085 6,	-0.41	[16,38]
	121.101 3								
$\mathrm{HY15}^{*}$	21.95	buxmicrophylline C	$C_{30}H_{50}N_{2}O_{3} \\$	487.382 1	487.388 7	469.3793, 424.3206,	354.279 3, 337.251 8, 121.101 2	-1.48	[19,36]
$\mathrm{HY16}^{*}$	22.48	demethylcyclomikuranine	$C_{25}H_{41}NO_2$	388.313 7	388.320 6	370.311 2, 339.267 6,	121.101 3, 151.111 9, 189.163 8	-1.05	[22,36]
HY17	23.36	buxmicrophylline K	$\mathrm{C}_{25}\mathrm{H}_{43}\mathrm{NO}_{2}$	390.329 4	390.336 0	372.325 0, 323.272 8,	203.178 7, 135.116 8, 121.101 3	-1.68	[36]
$\mathrm{HY18}^{*}$	23.65	buxmicrophylline G	$C_{36}H_{54}N_2O_5$	595.403 3	595.410 0	577.400 2, 550.354 5,	532.340 5, 339.267 6, 194.081 1,	-0.92	[17,36]
						137.132 5			
$\mathrm{HY19}^{*}$	23.82	16-deacetoxyhyrcamine	$C_{31}H_{52}N_{2}O_{3} \\$	501.397 8	501.404 3	483.393 8, 438.336 6,	339.267 0, 356.293 9, 189.163 7,	-1.60	[16,38]
	121.101 4								
$\mathrm{HY20}^{*}$	24.47	cyclobuxophylline-K	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO	384.318 8	384.325 1	339.267 5, 203.143 0,	137.132 4, 135.080 5, 121.101 3	-2.50	[21,38]
$\mathrm{HY21}^{\ast}$	24.80	N-Acetyldihydrocyclomi	$C_{28}H_{48}N_2O_3\\$	461.366 5	461.373 2	443.362 6, 416.315 6,	339.267 2, 321.257 3, 137.132 1,	-1.24	[21,36]
crophylline F 121.101 4									
$\mathrm{HY22}^{*}$	25.37	cyclobuxophylline O	$\mathrm{C}_{24}\mathrm{H}_{37}\mathrm{NO}$	356.287 5	356.294 4	339.2677, 203.1427,	137.095 9, 135.080 5, 121.101 3	-1.18	[15]
$\mathrm{HY23}^{*}$	25.38	(E)-buxenone	$C_{25}H_{39}NO$	370.303 2	370.310 5	339.268 8, 203.142 9,	137.096 0, 135.080 5, 121.101 3	0.16	[17]

注:\*代表活性生物碱成分。

Note: \*Represented active alkaloid ingredient.



图2 对照品环维黄杨星 D(HY1)的裂解途径

Fig. 2 Cleavage pathway of reference substance cyclovirobuxine D(HY1)



Fig. 3 Cleavage pathway of compound cyclobuxophylline O(HY22)

3.2.2 小叶黄杨生物碱活性成分类药性筛选 通过 SwissADME 数据库筛选 19 个化合物成分的胃 肠吸收度为 "high"。进一步筛选活性成分的类药 性,药物相似性均满足>2 项的 "Yes"。因此 19 个 化合物成分具有类药性。

**3.2.3** 小叶黄杨生物碱活性成分靶点预测 通过 PubChem 数据库查询成分对应的 SMILES 号,将 TargetNet 数据库, Swiss Target Prediction 数据库, PharmMapper 数据库检索出的成分靶点去除重复 项,共得到 216 个成分靶点。

3.3 疾病靶点的提取及药物治疗疾病靶点的筛选
 经多个数据库分别筛选去重后得到 AD 相关靶点 880 个,活性成分靶点和疾病靶点的交集靶点 49
 个,通过 Venny 在线工具绘图,绘制结果见图 4。



图 4 小叶黄杨生物碱活性成分与疾病交集靶点 Fig. 4 Alkaloid active components and disease intersection targets of *Buxus microphylla* 

3.4 "活性成分-靶点"网络构建与分析

将上述得到的交集靶点与药物活性成分信息 导入 Cytoscape3.9.0 进行可视化,得到"成分-靶 点"网络图见图 5。图中的节点表示活性成分和交 集靶点,靶点节点的大小和颜色的深浅表示其度 值的高低。边表示活性成分与靶点之间的相互关 系,该网络共有 68 个节点,其中包含 19 个药物 节点和 49 个靶点节点,共有 256 条边,平均度值 为 7.5。大于平均度值的活性成分有 16 个,其中 HY11 能与 21 个靶点蛋白发生作用,HY8 能与 20 个靶点蛋白发生作用,说明黄杨生物碱活性成分 的多靶点,多层次的特点。



图 5 "生物碱活性成分-靶点"相互作用网络图 Fig. 5 Interaction network diagram of "alkaloid active component-target"

#### 3.5 PPI 网络拓扑分析

通过 PPI 网络分析见图 6, 共有 49 个节点, 248 条边,平均度值为 10.33。MC4R 未参与 PPI, 予以剔除。度值越大说明与其他蛋白作用更强一 些,其中度值≥5 的靶点占总靶点的 81%,度值>18 的靶点主要有白蛋白、蛋白激酶、淀粉样蛋白前 体蛋白基因,这些靶点可能在发挥药理作用中起 着非常重要的作用,可能是小叶黄杨生物碱活性 成分发挥治疗 AD 的重要靶点。

#### 3.6 GO 功能分析

对生物碱活性成分治疗 AD 疾病的 49 个交集 靶点使用 Metascape 在线数据库进行 GO 富集分析, 共得到 804 个条目,其中 BP 功能条目有 642 个, CC 功能条目 69 个,MF 功能条目 93 个(结果满足 P<0.05)。分别选择 3 组 P 值排名前 10 的利用微生 信在线绘图工具进行可视化<sup>[39-40]</sup>,见图 7,生物碱

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

活性成分治疗 AD 疾病主要涉及的 BP 有化学性突触传递, 跨突触信号的调节,循环系统过程等; 涉及的 CC 主要有突触后膜,神经元细胞体,轴突等; 涉及的 MF 主要有神经递质受体活性,G 蛋白偶联 胺受体活性,G 蛋白偶联 5-羟色胺受体活性等。



图 6 相交靶点 PPI 网络图 Fig. 6 PPI network of intersecting targets



图7 GO 富集分析条形图

Fig. 7 Bar chart of GO enrichment analysis

#### 3.7 KEGG 靶点通路富集分析

通过将 49 个交集靶点使用 Metascape 在线数 据库进行 KEGG 富集分析,共得到 109 个条目(结 果满足 P<0.05),对其按 P 值由小到大排名前 20 的结果用微生信在线绘图工具进行可视化,见图 8,生物碱活性成分治疗 AD 涉及的调控通路主要 与神经活性配体-受体相互作用,5-羟色胺能突触, cAMP 信号通路等有关。





3.8 主要活性成分与核心靶点的分子对接

为了进一步验证小叶黄杨生物碱治疗 AD 的 核心靶点与活性成分间的相互作用,筛选"成分-靶点"网络图中度值相对较高的 4 个活性成分 (HY1,HY10,HY12,HY22)与 4 个核心靶点 (AChE,NOS2,ADRA2C,AR)进行分子对接验 证,4个活性成分的度值分别为 14,16,16,15, 4 个核心靶点的度值分别为 19,19,17,16。其 中结合能越低,表明配体与蛋白间的亲和力越高, 构象匹配越高越稳定,结合能<--5 kJ·moL<sup>-1</sup>表示配 体与蛋白具有较高的亲和性,结果见表 2。选取与 4 个活性成分相结合具有较低结合能的核心靶点 对接结果进行可视化,分子对接示意图见图 9。 4 讨论

本研究利用 LC-MS 分析小叶黄杨生物碱,根据 TIC 图中的色谱峰的精确分子量,结合其二级碎片离子峰以及各峰的保留时间进行分析,通过查找相关文献以及根据对照品解析鉴定出 23 个小叶黄杨生物碱化学成分,均为环孕甾烷型生物碱。 其中 Cyclovirobuxeine A(HY6),Cyclomicrophylline A(HY9), Buxippine K(HY10),Cyclobuxophylline O(HY22)和(E)-Buxenone(HY23)具有抑制 AChE 和BChE 的作用<sup>[11,15-16]</sup>。HY22 因其良好的生物活性及在网络药理学筛选中的较高度值,作为环孕甾烷型生物碱的代表成分进行质谱解析。同时分子对接表明 HY22 与 AChE 的结合能最低,结合能力最高(表 2)。 表 2 小叶黄杨生物碱活性成分和关键活性靶点对接的结 合能

 Tab. 2
 Binding energy of docking between alkaloid active components and key active targets of *Buxus microphylla*

-		
成分	靶点	结合能/kJ·moL <sup>-1</sup>
HY1	AChE	-8.48
	NOS2	-8.02
	ADRA2C	-8.87
	AR	-6.39
HY10	AChE	-9.25
	NOS2	-6.73
	ADRA2C	-6.60
	AR	-6.62
HY12	AChE	-7.39
	NOS2	-7.50
	ADRA2C	-7.20
	AR	-6.93
HY22	AChE	-9.55
	NOS2	-7.29
	ADRA2C	-6.95
	AR	-7.55



图 9 分子对接示意图 Fig. 9 Molecular docking schematic diagram

中国现代应用药学 2022 年 12 月第 39 卷第 23 期

本研究构建的"成分-靶点"网络图,筛选出 了度值较高的 AChE, NOS2, ADRA2C, AR 等靶 点, 生物碱活性成分与其结合度较高, 可作为治 疗 AD 的潜在核心靶点。AChE 是一种具有水解乙 酰胆碱作用的特异性酶,通过破坏乙酰胆碱的正常 生理结构使其失活,从而发挥治疗 AD 的作用<sup>[41]</sup>。 NOS2 主要是由星形胶质细胞,小胶质细胞和血液 来源的巨噬细胞响应异物和组织损伤而产生的, 能激活先天性免疫系统,释放出更高浓度的 NO, 进而调节大脑的病变<sup>[42]</sup>。ADRA2C属于肾上腺素 能受体,调节去甲肾上腺素能活性,是疼痛感知 和镇痛的重要介质<sup>[43]</sup>。雄激素受体 AR 是一种转 录调节因子,调节许多生物作用。编码 AR 的基因 位于 X 染色体长臂(Xq11~12)上, AR 的 N 端的转 录激活区内含有多聚谷氨酰胺(Gln)n重复片段<sup>[44]</sup>。 KEGG 信号通路富集显示,其作用机制与神经活 性受体相互作用通路,胆碱能突触信号通路,钙 信号通路,胰岛素抵抗通路等相关,这与已知的 AD 发病机制基本相符<sup>[45]</sup>。此外,近几年关注的焦 点主要集中在神经炎症[46-47]和胰岛素抵抗[48],这2 种途径都在突触功能障碍和神经退行性病变中发 挥作用,可能阻碍疾病发展的进展,因此它们也成 为治疗 AD 的新思路。分子对接显示, HY10 主要 与AChE的组氨酸区域相结合,使其发挥抑制作用; HY22 与 AR 也有较稳定的结合, AR 基因第1外显 子上的 CAG 重复多态性调节雄激素敏感性, 延长 重复序列导致雄激素受体作用降低, 雄激素应答基 因转录活性降低会影响大脑 β-淀粉样蛋白水平和 沉积[49]。

本研究基于 LC-MS 结合网络药理学探讨了小 叶黄杨生物碱治疗 AD 的物质基础及分子机制。

"成分-靶点"网络图和拓扑分析结果显示 HY10, HY12, HY16, HY22 等活性物质可能是其治疗 AD 的物质基础,研究发现与黄杨生物碱具有相似 结构的甾体生物碱,在 C-3 或 C-20 位置的氨基是 决定生物碱发挥抑制能力的最重要的结构特征, 具有抑制 AChE 和 BChE 的作用<sup>[50]</sup>,推测含有这 个结构的 HY1, HY2, HY6 等活性物质也可能具 有一定的治疗作用。GO,KEGG 富集与分子对接 显示,AChE,NOS2,AR 以及 MAPK1 等靶点作 用于胆碱能突触信号通路,雄激素信号通路<sup>[51]</sup>和 胰岛素抵抗通路,来发挥治疗 AD 的作用。因此, 推测生物碱活性成分可能是通过这几个机制来发 挥治疗 AD 的作用。 本研究发现小叶黄杨生物碱对治疗 AD 有多 成分,多靶点,多通路相结合的特点,为黄杨生 物碱治疗 AD 的潜在的物质基础和分子作用机制 提供参考,进一步对黄杨生物碱的开发以及对 AD 的治疗作用提供了一定的理论依据。由于网络药 理学与分子对接预测的局限性,基于其预测结果 未来将进行深入的分析和实验验证。

#### REFERENCES

- TERRY A V, BUCCAFUSCO J J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(3): 821-827.
- [2] BLOOM G S. Amyloid-β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis[J]. JAMA Neurol, 2014, 71(4): 505-508.
- [3] 王超楠,赵大庆,王健,等.人参皂苷 Rg1 治疗阿尔茨海默 病作用及机制的研究进展[J].中成药,2021,43(4):984-987.
- [4] LV X, HU M T, YU X. Research advances in the chemical constituents of *Buxus*[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2012, 40(24): 12028-12030, 12034.
- [5] ABRAMSON D, KNAPP F F, GOAD L J, et al. Biogenesis of cyclobuxine-D and cyclovirobuxine-D in *Buxus sempervirens* [J]. Phytochemistry, 1977, 16(12): 1935-1937.
- [6] ORHAN I E, KHAN M T H, ERDEM S A, et al. Selective cholinesterase inhibitors from *Buxus sempervirens* L. and their molecular docking studies[J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2011, 7(4): 276-286.
- [7] KVALTÍNOVÁ Z, LUKOVIC L, MACHOVÁ J, et al. Effect of the steroidal alkaloid buxaminol-E on blood pressure, acetylcholinesterase activity and (3H)quinuclidinyl benzilate binding in cerebral cortex[J]. Pharmacology, 1991, 43(1): 20-25.
- [8] KALAUNI S K, CHOUDHARY M I, KHALID A, et al. New cholinesterase inhibiting steroidal alkaloids from the leaves of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2002, 50(11): 1423-1426.
- [9] KHALID A, ZAHEER-UL-HAQ, GHAYUR M N, et al. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 92(5): 477-484.
- [10] KHALID A, AZIM M K, PARVEEN S, et al. Structural basis of acetylcholinesterase inhibition by triterpenoidal alkaloids[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(4): 1528-1532.
- [11] SCHLIEBS R, ARENDT T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm (Vienna), 2006, 113(11): 1625-1644.
- [12] CUMMINGS J L. Treatment of Alzheimer's disease: Current and future therapeutic approaches[J]. Rev Neurol Dis, 2004, 1(2): 60-69.
- [13] CUMMINGS J L. The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2000, 3(7): 21-29.
- [14] LAHIRI D K, FARLOW M R, GREIG N H, et al. Current drug targets for Alzheimer's disease treatment[J]. Drug Dev Res, 2002, 56(3): 267-281.
- [15] ATA A, IVERSON C D, KALHARI K S, et al. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana* and their enzyme inhibitory,

anti-fungal and anti-leishmanial activities[J]. Phytochemistry, 2010, 71(14/15): 1780-1786.

- [16] ATTA-UR-RAHMAN, SHEHNAZ P, ASAAD K, et al. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*[J]. Phytochemistry,2001, 58(6): 963-968.
- [17] CHOUDHARY M I, SHAHNAZ S, PARVEEN S, et al. New cholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus hyrcana*[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(9): 1039-1052.
- [18] MENG X L, LIU X N, ZHANG X, et al. Study on the mechanisms of chemical components for *Lotus*(*Nelumbo nucifera* gaertn.)seed embryo in preventing and treating Alzheimer's disease based on network pharmacology[J]. J Liaoning Univ Nat Sci Ed(辽宁大学学报: 自然科学版), 2021, 48(4): 289-299.
- [19] BAILLY C, ZHANG J H. A new horizon for the steroidal alkaloid cyclovirobuxine D(Huangyangning) and analogues: Anticancer activities and mechanism of action[J]. J Tradit Chin Med Sci, 2020, 7(4): 337-344.
- [20] YAN Y X, SUN Y, CHEN J C, et al. A new triterpenoid alkaloid from *Buxus sempervirens*[J]. Z Naturforsch B, 2011(66): 1076.
- [21] MATOCHKO W L, JAMES A, LAM C W, et al. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus* natalensis and their acetylcholinesterase inhibitory activity[J]. J Nat Prod, 2010, 73(11): 1858-1862.
- [22] YAN Y X, CHEN J C, SUN Y, et al. Triterpenoid alkaloids from *Buxus microphylla*[J]. Chem Biodivers, 2010, 7(7): 1822-1827.
- [23] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. Sci Rep, 2017(7): 42717.
- [24] YAO Z J, DONG J, CHE Y J, et al. TargetNet: a web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models[J]. J Comput Aided Mol Des, 2016, 30(5): 413-424.
- [25] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [26] DAI C F, ZOU H M, MA T T, et al. Network pharmacology to unveil the biological basis of gy ii in breast cancer treatment[J]. J Clin Oncol Cancer Ther, 2021, 1(1): 1-11.
- [27] SAFRAN M, SOLOMON I, SHMUELI O, et al. GeneCards<sup>™</sup> 2002: Towards a complete, object-oriented, human gene compendium[J]. Bioinformatics, 2002, 18(11): 1542-1543.
- [28] WANG Y X, ZHANG S, LI F C, et al. Therapeutic target database 2020: Enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [29] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [30] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.
- [31] 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 Res, 2019, 47(D1): D464-D474.
- [32] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient

· 3054 · Chin J Mod Appl Pharm, 2022 December, Vol.39 No.23

optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.

- [33] ATTA-UR-RAHMAN, NOOR-E-AIN F, CHOUDHARY M I, et al. New steroidal alkaloids from *Buxus* longifolia[J]. J Nat Prod, 1997, 60(10): 976-981.
- [34] LEUTHARDT F L G, GLAUSER G, BAUR B. Composition of alkaloids in different box tree varieties and their uptake by the box tree moth *Cydalima perspectalis*[J]. Chemoecology, 2013, 23(4): 203-212.
- [35] DU J, CHIU M, NIE R. Three steroidal alkaloids from *Buxus* microphylla[J]. J Asian Nat Prod Res, 1999, 1(4): 239-244.
- [36] ZHANG J, QIN X Y, ZHANG S D, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Buxus*[J]. Chem Biodivers, 2015, 12(9): 1289-1306.
- [37] LEE J H , PARK Y H , CHO B H , et al. Effects of cyclobuxine D on the biosynthesis of prostaglandins *in vitro*, prostaglandins production and leukocyte migration *in vivo*[J]. Korean J Pharmacol, 1987, 23(1): 51-56.
- [38] 柏石头.小叶黄杨的生物碱化学成分及其细胞毒活性研究 [D]. 昆明:云南中医学院,2015.
- [39] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS A J Integr Biol, 2012, 16(5): 284-287.
- [40] LUO W J, BROUWER C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization[J]. Bioinformatics, 2013, 29(14): 1830-1831.
- [41] WANG H, ZHANG H Y. Reconsideration of anticholinesterase therapeutic strategies against Alzheimer's disease[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(2): 852-862.
- [42] DUBEY H, GULATI K, RAY A. Alzheimer's disease: A contextual link with nitric oxide synthase[J]. Curr Mol Med, 2020, 20(7): 505-515.
- [43] KOHLI U, MUSZKAT M, SOFOWORA G G, et al. Effects of variation in the human alpha2A- and alpha2C-adrenoceptor genes on cognitive tasks and pain perception[J]. Eur J Pain, 2010, 14(2): 154-159.
- [44] 王晓明. 雄激素受体基因(CAG)。重复多态性与前列腺癌患病风险相关性研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.
- [45] CHEN Y G. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Chin Med J(Engl), 2018, 131(13): 1618-1624.
- [46] FAN L Y, MAO C Y, HU X C, et al. New insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Front Neurol, 2020(10): 1312.
- [47] MA Y Y, YAO X Y, TAN Z C, et al. Effects and mechanism of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on improving scopolamine-induced learning and memory impairment of mice[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2021, 43(6): 1462-1466.
- [48] NETH B J, CRAFT S. Insulin resistance and Alzheimer's disease: Bioenergetic linkages[J]. Front Aging Neurosci, 2017(9): 345.
- [49] GARDINER S L, HARDER A V E, CAMPMAN Y J M, et al. Repeat length variations in ATXN<sub>1</sub> and AR modify disease expression in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2019(73): 230.e9-230.e17.
- [50] KHALID A, ZAHEER-UL-HAQ, ANJUM S, et al. Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases[J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(9): 1995-2003.
- [51] CARROLL J C, ROSARIO E R, KREIMER S, et al. Sex differences in β-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: Role of neonatal sex steroid hormone exposure[J]. Brain Res, 2010(1366): 233-245.

收稿日期: 2022-02-17 (本文责编:沈倩)