

本文引用: 王彤, 蓝青, 马官迪, 等. 基于网络药理学和分子对接研究钩藤治疗动脉粥样硬化的有效成分和作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(2): 110-121. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.02.003.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2023)31-02-0110-12

基于网络药理学和分子对接研究钩藤治疗动脉粥样硬化的有效成分和作用机制

王彤, 蓝青, 马官迪, 雷谊宁, 张又枝

(湖北科技学院药学院, 湖北省咸宁市 437100)

[摘要] [目的] 基于网络药理学和分子对接研究钩藤治疗动脉粥样硬化的有效成分、靶点及通路。[方法]

利用 TC MSP 数据库并结合筛选条件, 确定钩藤的主要有效成分和有效成分相应的靶点, 构建有效成分-靶点网络; 利用 GeneCards、DisGeNET、OMIM 及 TTD 数据库确定动脉粥样硬化的疾病靶点, 获取药物靶点与疾病靶点的交集, 并对交集靶点进行 PPI 网络分析、GO 生物功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 应用 Cytoscape 3.9.0 软件中的“Analyze Network”工具, 构建有效成分-靶点-通路网络, 筛选出核心成分、核心靶点、核心通路, 并对核心成分与核心靶点之间的亲和力进行分子对接验证。[结果] 筛选出 33 种有效成分, 其中一种有效成分没有相应的靶点, 筛选出 1 608 个疾病靶点和 115 个药物与疾病的交集靶点。PPI 分析得到的主要靶点为 AKT1、TNF、IL-6、IL-1 β 、TP53、JUN、CASP3、MMP9、PTGS2 等。GO 生物功能富集分析获得生物过程条目 22 个、细胞成分条目 57 个、分子功能条目 100 个。KEGG 通路富集分析筛选出 20 条信号通路, 主要为脂质和动脉粥样硬化、MAPK、癌症信号通路等。“Analyze Network”工具构建的有效成分-靶点-通路网络, 筛选出钩藤治疗动脉粥样硬化的核心成分为槲皮素、山奈酚; 核心靶点为 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1; 核心通路为脂质和动脉粥样硬化、MAPK 信号通路。分子对接表明槲皮素和山奈酚与 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 靶点有很好的亲和力, 尤其是 PTGS2 与槲皮素和山奈酚具有强烈的结合活性。[结论] 钩藤中的核心成分槲皮素、山奈酚可能通过脂质和动脉粥样硬化、MAPK 信号通路, 作用于 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 靶点, 在蛋白质结合、酶结合、可识别蛋白结合的生物学功能中发挥抗动脉粥样硬化作用。

[关键词] 动脉粥样硬化; 钩藤; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

[中图分类号] R9;R5

[文献标识码] A

Study on the effective components and mechanism of Uncaria in the treatment of Atherosclerosis based on network pharmacology and molecular docking

WANG Tong, LAN Qing, MA Guandi, LEI Yining, ZHANG Youzhi

(School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China)

[ABSTRACT] **Aim** To study the effective components, targets and pathways of Uncaria for the treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** Using TC MSP database and screening conditions, the main effective components and corresponding targets of Uncaria were determined, and the effective component-target network was constructed. GeneCards, DisGeNET, OMIM and TTD databases were used to identify disease targets of atherosclerosis, and the intersection of drug targets and disease targets were obtained. PPI network analysis, GO biological function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the intersection targets. Using “Analyze Network” tool in Cytoscape 3.9.0, an active component-target-pathway network was constructed and the core components, core targets and core pathways were screen out. The affinity between core components and core targets were verified by molecular docking. **Results** Thirty-three active components were screened out, one of which had no corresponding target. A total of 1 608 disease targets and 115 drug-disease intersection targets were screened. The main targets of PPI analysis were AKT1, TNF, IL-6, IL-1 β , TP53, JUN, CASP3, MMP9 and PTGS2, etc. GO biological

[收稿日期] 2022-04-06

[修回日期] 2022-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603110)

[作者简介] 王彤, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学, E-mail: wangtongjuly@163.com。通信作者张又枝, 博士, 教授, 研究方向为心血管药理学, E-mail: yzzhang242@hbust.edu.cn。

function enrichment analysis obtained 22 items of biological processes, 57 items of cell components and 100 items of molecular function. KEGG pathway enrichment analysis screened 20 signaling pathways, mainly including lipid and atherosclerosis, MAPK, cancer signaling pathways, etc. In the effective component-target-pathway network constructed by "Analyze Network" tool, the core components of Uncaria in the treatment of atherosclerosis were selected as quercetin and kaempferol. The core targets were PTGS2, HSP90AA1 and PTGS1. The core pathways were lipid and atherosclerosis, MAPK signaling pathway. Molecular docking showed that quercetin and kaempferol had good affinity with PTGS2, HSP90AA1 and PTGS1 targets, especially PTGS2 had strong binding activity with quercetin and kaempferol. **Conclusion** Quercetin and kaempferol, the core components of Uncaria, may act on PTGS2, HSP90AA1 and PTGS1 targets through lipid and atherosclerotic and MAPK signaling pathways, and play an anti-atherosclerotic role in the biological functions of protein binding, enzyme binding and recognized protein binding.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; Uncaria; network pharmacology; molecular docking; mechanism

《黄帝内经》中的《灵枢·经脉篇》记载：“经脉者，所以能决死生，处百病，调虚实，不可不通。”经脉维系人的腑脏，经脉不通，百病丛生。中医学认为痰湿体质之人，痰浊气滞血瘀，痰瘀阻于血脉而致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)，表现为头晕、痰多、胸闷等；气虚体质之人，元气不足，气不化津，蒙蔽清窍而致 As，表现为头痛、眩晕；气血不畅，脉络不通，表现为胸痛；气郁体质之人，肝脾失和，体内血液与津液运行不畅，阻于脉络而致 As^[1]。As 是现代医学的概念，根据 As 的常见临床症状，中医学将其归为头痛、眩晕、血痹、胸痹、中风等疾病的范畴^[2]。中医临床治疗中对 As 的早期评估和干预治疗，能使不稳定斑块的形成减少，从而有效降低急性心血管事件的发生^[3]。

钩藤为茜草科植物钩藤、大叶钩藤、毛钩藤、华钩藤或无柄果钩藤的干燥带钩茎枝。钩藤有息风定惊，清热平肝的作用，用于肝风内动，惊痫抽搐，高热惊厥，感冒夹惊，小儿惊啼，妊娠子痫，头痛眩晕^[4]。研究人员以 120 例颈动脉粥样硬化患者作为研究对象，将同服中药汤剂“化痰祛瘀方”和阿托伐他汀钙片的患者作为治疗组，单服阿托伐他汀钙片的患者作为对照组，结果表明，治疗组颈动脉内膜中膜厚度和斑块面积显著降低。该化痰祛瘀方由半夏 10 g、炒白术 15 g、茯苓 15 g、胆南星 10 g、天竺黄 10 g、丹参 15 g、钩藤 15 g、川芎 10 g、桃仁 10 g 及红花 10 g 组成，其中，钩藤、丹参、川芎、桃仁、红花发挥活血通络祛痰之功效，并且，该方作为其科室用来治疗脑血管病的常用方剂，疗效显著^[5]。

综上所述，一方面，钩藤可治疗头痛眩晕；另一方面，钩藤复方汤剂可通过降低人颈动脉内膜中膜厚度及斑块面积来发挥抗 As 作用。因此，钩藤可能有治疗 As 的功效。随着研究的逐步深入，为了更好地预防与治疗 As，并减轻西药治疗而无法避免的不良反应，越来越多的学者围绕中药治疗疾病的机制

展开探究，但对于钩藤治疗 As 的机制研究目前尚未有新的进展。

网络药理学作为生物信息学的分支，凭借公共数据库平台、先进的计算机软件和数据分析技术，挖掘医学生物信息，构建并分析药物与疾病之间的复杂网络关系^[6]。本研究以钩藤与 As 作为研究对象，应用网络药理学的方法并结合分子对接技术，使用数据库及软件筛选并分析钩藤治疗 As 所涉及的有效成分、靶点、通路和功能，通过 GO 生物功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，构建有效成分-交集靶点-通路网络，将其之间的相互作用关系进行可视化，并对核心成分与核心靶点之间的相互作用通过分子对接进行验证，最终找出钩藤治疗 As 的潜在的核心成分、核心靶点、核心通路与核心功能。

1 材料和方法

1.1 使用的数据库网址及软件

TCMSP (<https://tcmsp-e.com>)、GeneCards (<https://www.genecards.org>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org>)、OMIM (<https://www.omim.org>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd>)、Uniprot (<https://www.uniprot.org>)、Jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>)、String (<http://string-db.org/cgi/input.pl>)、David (<http://David.ncicrf.gov>)、微生信 (www.bioinformatics.com.cn)、Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)，软件 Cytoscape 3.9.0 及其插件 CytoNCA 以及工具 Analyze Network、PDB (<http://www.rcsb.org/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、软件 Open Babel、Pymol 和 AutoDock Tools 1.5.7。

1.2 钩藤有效成分和靶点的筛选以及有效成分-靶点网络的构建

应用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP

(Traditional Chinese Medicine Database and Analysis Platform) 获取钩藤的有效成分和相应的靶点,以“钩藤”为关键词搜索,筛选出口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的信息。并应用蛋白质序列和功能信息资源数据库 Uniprot 将有效成分的靶点与基因名进行匹配,删除重复值,得到钩藤的靶点。将数据上传至 Cytoscape 3.9.0 软件中绘制有效成分-靶点网络图。

1.3 As 靶点的筛选

应用 GeneCards、DisGeNET、OMIM、TTD 疾病数据库,分别以“atherosclerosis”为关键词进行检索,先后计算两次 GeneCards 所得数据中 Relevance Score 的中位数,分别是 0.55 和 1.12,筛选出中位数 ≥ 1.12 的疾病靶点。同时,筛选出 DisGeNET 所得数据中 score ≥ 0.02 的疾病靶点,取 4 个数据库所得疾病靶点的交集并去除重复项后,得到 As 的靶点。

1.4 钩藤有效成分和 As 交集靶点的获取及蛋白互作网络的构建

将钩藤有效成分和 As 的靶点导入 Jvenn 中制作韦恩图,得到钩藤有效成分与 As 的交集靶点。并将交集靶点导入 String 数据库中进行蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)分析,限定物种为“Homo Sapiens”,设置最低置信度为 0.4,同时勾选“隐藏游离的点”,构建 PPI 网络。将 PPI 网络图下载“TSV”格式并上传至 Cytoscape 3.9.0 软件中,应用 CytoNCA 插件计算各节点的 BC、CC、DC、EC、LAC 及 NC 值,筛选主要靶点。

1.5 GO 生物功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用 David 数据库进行 GO 生物功能富集分析,得到生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular composition, CC)、分子功能(molecular

function, MF) 三组条目,将这三组数据以 $P < 0.05$ 的条件分别进行筛选,并各取前十个条目,即组成 30 个条目在“微生信”在线绘图工具中进行可视化。利用 Metascape 数据库进行 KEGG 通路富集分析,限定物种为“Homo Sapiens”,制作 KEGG 富集条形图。

1.6 制作有效成分-靶点-通路网络图

将相关数据导入 Cytoscape 3.9.0 软件中作图,并应用“Analyze Network”工具进行可视化。

1.7 核心成分与核心靶点的分子对接

将 Cytoscape 3.9.0 软件中筛选出的度值(Degree 值)排名前三位的靶点 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 作为对接受体,将排名前二位的有效成分槲皮素和山奈酚作为配体,采用 AutoDock Tool 对接。从蛋白质数据库 PDB 和 PubChem 数据库分别下载“PDB”格式的蛋白结构和槲皮素、山奈酚的 3D 结构,并将其保存为“SDF”格式,然后使用 Open Babel 软件将槲皮素、山奈酚的“SDF”格式转化为“PDB”格式。使用 Pymol 软件去除溶剂分子与配体,使用 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行加氢、加电子、加 ROOT 等分子前处理,同时使用 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行分子柔性对接,选择其中结合能最小的对接模型,最后使用 Pymol 软件绘制钩藤核心成分与核心靶点蛋白之间的模式图,将其进行可视化。

2 结果

2.1 钩藤的有效成分

利用 TCMSP 数据库搜索“钩藤”,以 OB $\geq 30\%$ 且 DL ≥ 0.18 为条件,筛选出 33 个有效成分,按 Degree 值大小排列,包括槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇等(表 1)。

表 1. 钩藤有效成分的预测结果

Table 1. Prediction results of effective components of Uncaria

编码	有效成分	Degree 值	OB/%	DL
MOL000098	quercetin	141	38.27	0.81
MOL000422	kaempferol	59	41.88	0.24
MOL000358	beta-sitosterol	37	36.91	0.75
MOL008468	methyl (E)-2-[(2S,3Z,12bS)-3-ethylidene-2,4,6,7,12,12b-hexahydro-1H-indolo[3,2-h]quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate	36	56.83	0.64
MOL008488	yohimbine	34	46.41	0.81
MOL008465	(E)-16,17-didehydro-17-methoxy-17,18-seco-3-beta-yohimban-16-carboxylic acid methyl ester	31	32.75	0.64
MOL008489	delta(sup 18)-hirsutine	30	41.64	0.64

续表

编码	有效成分	Degree 值	OB/%	DL
MOL008457	tetrahydroalstonine	28	32.41	0.81
MOL008635	coryincine	27	38.27	0.81
MOL008478	methyl (E)-2-[(2S, 3R, 12bS)-3-vinyl-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12b-octahydroindolo [3, 2-h] quinolizin-2-yl]-3-methoxy-prop-2-enoate	26	31.94	0.64
MOL008490	isocorynantheic acid	25	72.36	0.60
MOL008460	geissoschizine acid	23	49.92	0.60
MOL008482	(2S, 12bR)-methyl 2-[(E)-1-oxobut-2-en-2-yl]-1, 2, 6, 7, 12, 12b-hexahydroindolo [2, 3-a] quinolizine-3-carboxylate	22	42.07	0.60
MOL008487	hirsutine	22	34.44	0.43
MOL008467	rhynchophylline A	20	68.68	0.69
MOL008481	(1'R, 3S, 4a'S, 5a'S, 10a'R)-1'-methyl-2-oxo-1', 4a', 5', 5a', 7', 8', 10', 10a'-octahydrospiro [indoline-3, 6'-pyrano [3, 4-f] indolizine]-4'-carboxylic acid	20	105.22	0.70
MOL008456	(3E, 4R)-4-(1, 3-benzodioxol-5-ylmethyl)-3-[(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) methylidene] oxolan-2-one	17	51.78	0.65
MOL008470	SMR000232333	17	78.38	0.75
MOL008475	mitraphyllic acid	17	31.70	0.70
MOL008463	SMR000232338	16	56.74	0.75
MOL008471	isorhynchophylline	16	47.31	0.57
MOL008474	(E)-2-[(3R, 6'S, 7'S, 8'aS)-6'-ethyl-2-keto-spiro [indoline-3, 1'-indolizidine]-7'-yl]-3-methoxy-acrylic acid methyl ester	15	54.47	0.57
MOL008458	angustidine	14	51.85	0.66
MOL008477	corynoxine	14	57.13	0.57
MOL008469	rhynchophylline	13	41.82	0.57
MOL008484	vincoside lactam_qt	13	50.81	0.82
MOL008473	(E)-2-[(3S, 6'S, 7'S, 8'aS)-6'-ethyl-2-keto-spiro [indoline-3, 1'-indolizidine]-7'-yl]-3-methoxy-acrylic acid methyl ester	11	57.85	0.57
MOL008472	hirsutaside A	10	70.34	0.81
MOL008476	Hirsutaside B	9	40.21	0.80
MOL000073	(E)-2-[(3S, 6'S, 7'S, 8'aS)-6'-ethyl-2-keto-spiro [indoline-3, 1'-indolizidine]-7'-yl]-3-methoxy-acrylic acid methyl ester	6	57.85	0.57
MOL000359	sitosterol	3	36.91	0.75
MOL008485	hirsutaside C	1	34.27	0.75
MOL008455	3-oxo-22 α -hydroxyurs-12-en-27, 28-dioic acid		32.33	0.68

注:3-oxo-22 α -hydroxyurs-12-en-27, 28-dioic acid 这一有效成分没有相应的靶点, 所以没有 Degree 值。

2.2 钩藤有效成分的靶点

利用 TCMSP 数据库获取了钩藤的 33 个有效成分及其对应的 782 个靶点(其中 3-oxo-22 α -hydroxyurs-12-en-27, 28-dioic acid 这一有效成分没有对应的靶点)。利用 Uniprot 数据库将有效成分的靶点与人类基因名进行匹配, 删除重复值, 成功匹配到 199 个靶点(图 1)。

2.3 钩藤有效成分-靶点网络

用 Cytoscape 3.9.0 软件中的“Analyze Network”工具进行可视化(图 1), 通过这个图可以看出, 外圈的蓝色代表钩藤的有效成分, 有 32 个; 中间的绿色

代表钩藤有效成分对应的靶点, 有 199 个; 图形和字体大小按 Degree 值大小依次排列。据 Degree 值显示, 钩藤有效成分对应靶点最多的前三位分别是: MOL000098、MOL000422、MOL000358, 即槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇, Degree 值分别是: 141、59、37, 表明这 3 个成分与靶点的关联度较高。

2.4 As 的靶点

分别应用 GeneCards、DisGeNET、OMIM、TTD 数据库, 以“atherosclerosis”为关键词进行检索, 分别得到 4 682、2 044、3 及 35 个靶点。将 GeneCards 和 DisGeNET 得到的靶点数据进行筛选, 分别得到 As 靶点

1 176 个和 1 016 个,此时,四个数据库共得到 2 230 个靶点,将其合并去重后,得到 1 608 个 As 靶点。

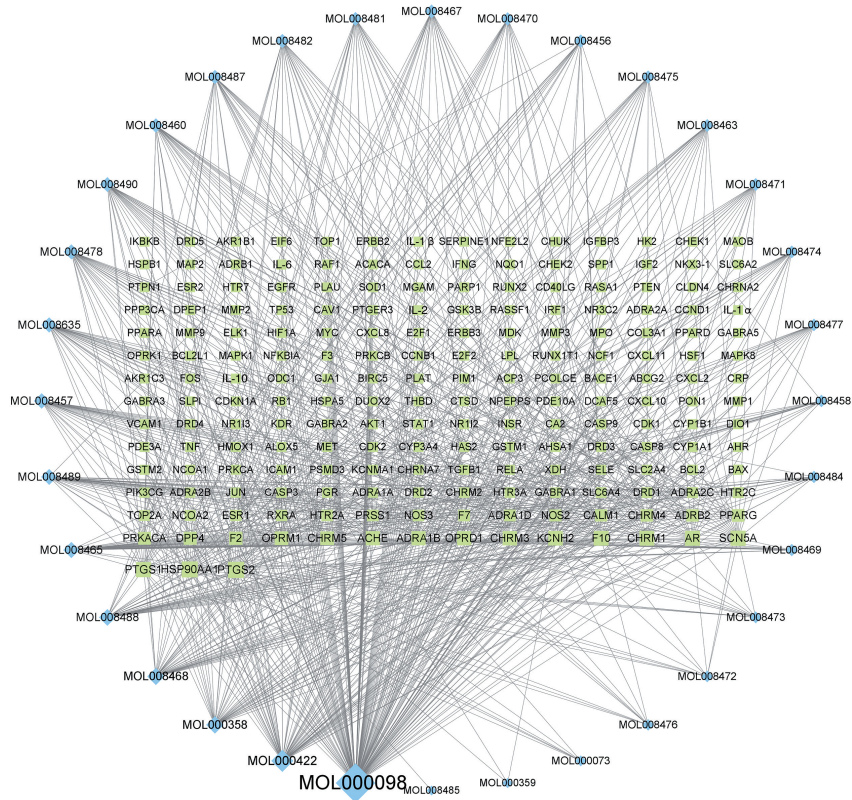


图 1. 钩藤有效成分-靶点网络图

Figure 1. Effective component-target network diagram

2.5 钩藤与 As 的交集靶点

利用 Jvenn 作图,粉色代表钩藤有效成分的作用靶点,有 199 个;蓝色代表 As 的作用靶点,有 1 608 个;中间重合部分为钩藤有效成分与 As 的交集靶点,有 115 个(图 2)。

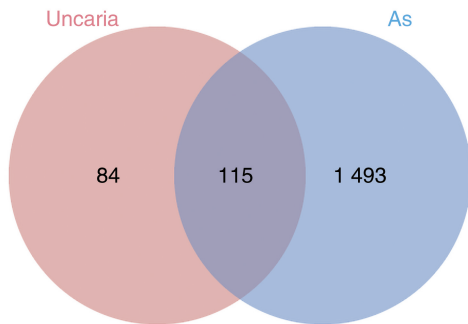


图 2. 钩藤与 As 的交集靶点

Figure 2. Intersection targets of Uncaria and As

2.6 钩藤有效成分与 As PPI 网络以及主要靶点

将钩藤有效成分与 As 的 115 个交集靶点导入

String 数据库中,构建 PPI 网络并进行 PPI 分析。结果显示,网络共包含 115 个节点,2 044 条边,平均节点 Degree 值为 35.5。其中,115 个节点代表 115 个蛋白质,2 044 条边代表蛋白质之间有 2 044 个关联信息,平均节点 Degree 值为 35.5 代表有效成分靶点-疾病靶点网络中的每个节点平均相连 35.5 条边(图 3A)。将 PPI 网络图下载“TSV”格式并上传至 Cytoscape 3.9.0 软件中,应用 CytoNCA 插件计算各节点的 BC、CC、DC、EC、LAC 及 NC 值,对结果进行拓扑分析后得到关联度最大的前 15 个靶点,依次为: AKT1、TNF、IL-6、IL-1 β 、TP53、JUN、CASP3、MMP9、PTGS2、PPARG、CXCL8、EGFR、HIF1A、MYC、CCL2, Degree 值分别为 93、92、91、83、81、78、75、71、71、70、68、68、68、66、65,这些靶点可能是钩藤治疗 As 的主要靶点。其中,丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是关联度最高的前 3 个靶点, Degree 值分别为 93、92、91(图 3B)。

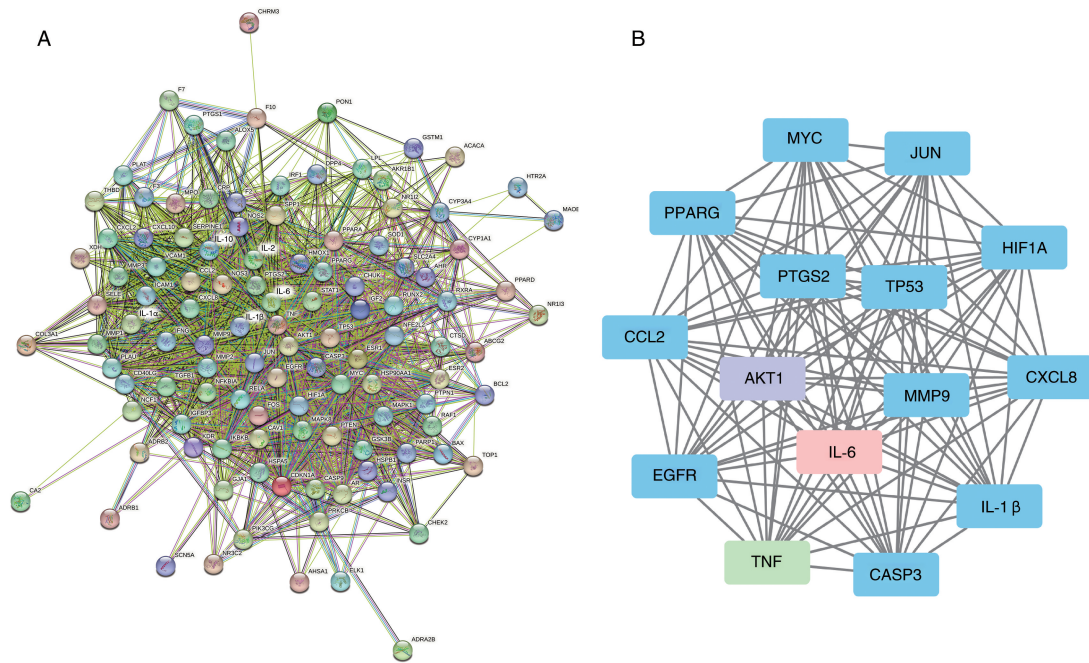


图 3. 钩藤与 As 的交集靶点的可视化图

A 为钩藤有效成分与 As 的 PPI 网络图, B 为钩藤治疗 As 的主要靶点网络图。

Figure 3. Visualization of intersection targets of Uncaria and As

2.7 GO 生物功能富集分析

将钩藤有效成分和 As 的 115 个交集靶点上传至 David 数据库,进行 GO 生物功能富集分析,得到 BP 条目 22 个,CC 条目 57 个,MF 条目 100 个,将这 3 组数据以 $P < 0.05$ 的条件分别进行筛选,各取前 10 个条目,并将组成的 30 个条目在“微生信”在线绘图工具中进行可视化。结果显示,在钩藤有效成分与 As 的

交集靶点中, BP 主要集中在刺激反应 (response to stimulus)、生物调节 (biological regulation) 和代谢过程 (metabolic process) 等; CC 主要集中在细胞核 (nucleus)、细胞膜 (plasma membrane) 和胞质溶胶 (cytosol) 等; MF 主要集中在蛋白质结合 (protein binding)、酶结合 (enzyme binding) 和可识别蛋白结合 (identical protein binding) 等(图 4)。

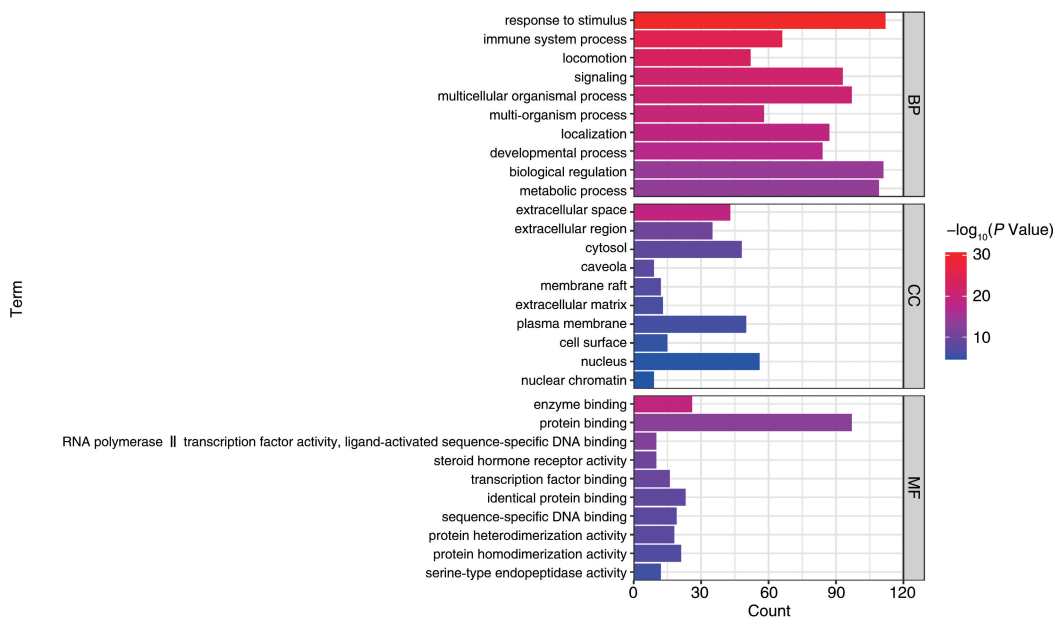


图 4. GO 生物功能富集分析图

Figure 4. GO biological functional enrichment analysis diagram

2.8 KEGG 通路富集分析

将钩藤有效成分和 As 的 115 个交集靶点上传至 Metascape 数据库,进行 KEGG 通路富集分析,得到相关性最高的前 20 条信号通路 ($P < 0.01$), P 值代表富集显著性,富集通路以 P 值从小到大为序排列。结果显示,富集显著性最高的前 3 条通路分别是:癌症通路 (pathways in cancer)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、流体剪切力和动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis); 节点表示交集靶点,线表示靶点之间相互关联,节点颜色显示 20 条通路,其中,红色、蓝色、绿色是富集显著性最高的前 3 条通路。同时,从 Metascape 数据库中得到了 5 个分子复合检测 (molecular complex detection, MCODE) 图,每个 MCODE 图中显示 $\log_{10}(P)$ 值最小的前 3 条通路。MCODE 1 (红色) 中的靶点主要富集于癌症通路 (pathways in cancer)、前列腺癌 (prostate cancer)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染

(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection), $\log_{10}(P)$ 值分别为 -28.9、-21.3、-17.9。MCODE 2 (蓝色) 中的靶点主要富集于癌症通路 (pathways in cancer)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway), $\log_{10}(P)$ 值分别为 -14.9、-12.6、-9.6。MCODE 3 (绿色) 中的靶点主要富集于白细胞介素 17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、百日咳 (pertussis), $\log_{10}(P)$ 值分别为 -22.3、-22.0、-20.3。MCODE 4 (紫色) 中的靶点可能不富集于通路中。MCODE 5 (橙色) 中的靶点主要富集于钙信号通路 (calcium signaling pathway)、神经活动配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction), $\log_{10}(P)$ 值分别为 -6.3、-5.8 (图 5)。

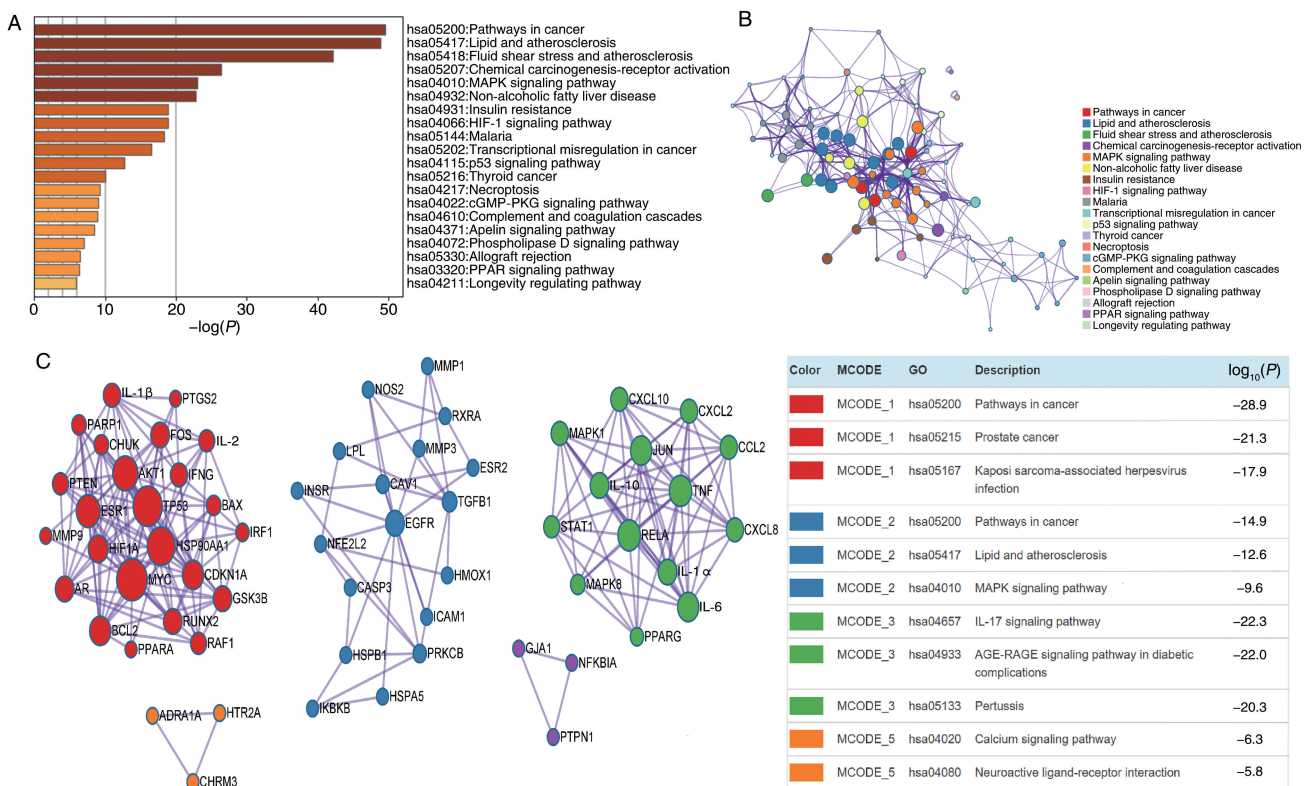


图 5. KEGG 及 MCODE 通路图

A 为 KEGG 富集条形图, B 为 KEGG 富集网络图, C 为 MCODE 图及相关通路。

Figure 5. Diagram of KEGG and MCODE pathway

2.9 钩藤有效成分-交集靶点-通路网络

通过“Analyze Network”工具得到钩藤有效成分-交集靶点-通路网络图 (图 6)。根据 Degree 值显

示,前 3 位有效成分是: MOL000098 (槲皮素)、MOL000422 (山奈酚)、MOL008468 [methyl (E)-2-[(2S,3Z,12bS)-3-ethylidene-2,4,6,7,12,12b-hexa-

hydro-1H-indolo[3,2-h]quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate}, Degree 值分别是 100、37、18, 其他主要有效成分 Degree 值见表 2; 前 3 位靶点是环加氧酶 2 (PTGS2)、热休克蛋白 90 α (HSP90AA1)、环加氧酶 1 (PTGS1), Degree 值分别为 36、36、29, 其他主要靶点 Degree 值见表 3; MAPK 信号通路居第 2 位,

Degree 值为 66, 其他主要通路 Degree 值见表 4。另外, 通过 KEGG 通路富集分析发现, 上述的前 3 位靶点 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 均富集于 MAPK 信号通路中, 由此可见, MAPK 信号通路是探究钩藤治疗 As 机制的重要通路之一(图 7)。

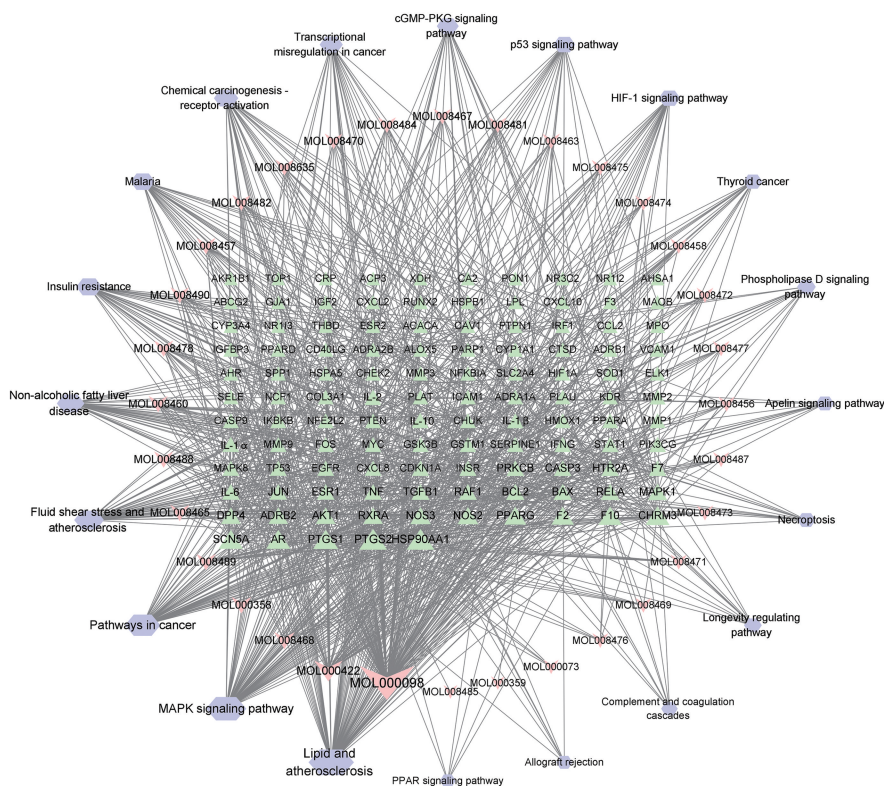


图 6. 钩藤有效成分-交集靶点-通路网络图

紫色代表通路, 粉色代表钩藤有效成分, 绿色代表钩藤与 As 的交集靶点, 图形按 Degree 值大小依次排列。

Figure 6. Uncaria effective component-intersection target-pathway network diagram

表 2. 钩藤主要有效成分网络节点特征表

Table 2. Node characteristics of Uncaria main active components network

编码	有效成分	Degree 值
MOL000098	quercetin	100
MOL000422	kaempferol	37
MOL008468	methyl (E)-2-[(2S, 3Z, 12bS)-3-ethylidene-2, 4, 6, 7, 12, 12b-hexahydro-1H-indolo [3, 2-h] quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate	18
MOL000358	beta-sitosterol	16
MOL008489	delta(sup 18)-Hirsutine	15
MOL008465	yohimban-16-carboxylic acid methyl ester	15
MOL008488	yohimbine	14
MOL008478	methyl (E)-2-[(2S, 3R, 12bS)-3-vinyl-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12b-octahydroindolo [3, 2-h] quinolizin-2-yl]-3-methoxy-prop-2-enoate	14
MOL008460	geissoschizinc acid	14
MOL008490	isocorynantheic acid	13

表 3. 主要靶点网络节点特征表

Table 3. Main target network node characteristics table

靶点	PTGS2	HSP90AA1	PTGS1	SCN5A	AR	CHRM3	F10	F2	PPARG	NOS2
Degree 值	36	36	29	27	27	26	25	23	22	19

表 4. 主要通路网络节点特征表

Table 4. Main path network node characteristics table

通路	Degree 值	通路富集基因
Lipid and atherosclerosis	78	AKT1, BAX, BCL2, CASP3, CASP9, CD40LG, CHUK, CYP1A1, FOS, CXCL2, GSK3B, HSPA5, HSP90AA1, ICAM1, IKKBK, IL-1 β , IL-6, CXCL8, JUN, MMP1, MMP3, MMP9, NFE2L2, NFKBIA, NOS3, PPARG, MAPK1, MAPK8, RELA, RXRA, CCL2, SELE, TNF, TP53, VCAM1, NCF1, IFNG, CXCL10, PTGS2, IRF1, CDKN1A, ELK1, MYC, PRKCB, RAF1, STAT1, TGFB1, HIF1A, PIK3CG, IL-2, IL-10, NOS2, SERPINE1, EGFR, PPARA, ALOX5, IL-1 α , AHR, PTEN, CHEK2, GSTM1, HMOX1, PTPN1, SOD1, F2, PARP1, CTSD, PLAU, SPP1, COL3A1, MMP2, ACACA, SLC2A4, MPO, PPARG, ABCG2, ADRB1, ADRB2
MAPK signaling pathway	66	AKT1, CASP3, CHUK, EGFR, ELK1, FOS, HSPB1, IGF2, IKKBK, IL-1 α , IL-1 β , INSR, JUN, KDR, MYC, PRKCB, MAPK1, MAPK8, RAF1, RELA, TGFB1, TNF, TP53, BAX, BCL2, CASP9, CDKN1A, GSK3B, CAV1, ESR1, HIF1A, MMP2, MMP9, PLAU, ESR2, GSTM1, HMOX1, NFE2L2, PTEN, CXCL8, MMP1, CTSD, NOS3, IRF1, STAT1, IL-6, SPP1, RXRA, PTGS2, PIK3CG, RUNX2, ALOX5, HTR2A, MAOB, PTGS1, IGFBP3, ADRB1, GJA1, CHRM3, ICAM1, IFNG, MPO, NCF1, NR3C2, HSP90AA1, ADRA1A
Pathways in cancer	54	AKT1, AR, BAX, BCL2, CASP3, CASP9, CDKN1A, CHUK, EGFR, ELK1, ESR1, ESR2, F2, FOS, GSK3B, GSTM1, HIF1A, HMOX1, HSP90AA1, IFNG, IGF2, IKKBK, IL-2, IL-6, CXCL8, JUN, MMP1, MMP2, MMP9, MYC, NFE2L2, NFKBIA, NOS2, PPARG, PRKCB, MAPK1, MAPK8, PTEN, PTGS2, RAF1, RELA, RXRA, STAT1, TGFB1, TP53, MMP3, PLAT, PLAU, INSR, KDR, NOS3, PIK3CG, SPP1
Fluid shear stress and atherosclerosis	40	AKT1, BCL2, CAV1, CHUK, FOS, GSTM1, HMOX1, HSP90AA1, ICAM1, IFNG, IKKBK, IL-1 α , IL-1 β , JUN, KDR, MMP2, MMP9, NFE2L2, NOS3, PLAT, MAPK8, RELA, CCL2, SELE, THBD, TNF, TP53, VCAM1, NCF1, BAX, CASP3, COL3A1, F3, IL-6, CXCL8, SERPINE1, PRKCB, MAPK1, STAT1, TGFB1
Non-alcoholic fatty liver disease	35	AKT1, BAX, CASP3, FOS, GSK3B, IKKBK, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, INSR, JUN, PPARA, PPARG, MAPK8, RELA, RXRA, TGFB1, TNF, IL-10, IRF1, NOS2, MAPK1, CASP9, CHRM3, CHUK, LPL, PTGS2, RAF1, BCL2, HSPA5, PRKCB, SOD1, CAV1, NCF1
Insulin resistance	30	AKT1, GSK3B, IKKBK, IL-6, INSR, NFKBIA, NOS3, PPARA, PRKCB, MAPK8, PTEN, PTPN1, RELA, SLC2A4, TNF, PARP1, COL3A1, CTSD, MMP2, MMP9, TGFB1, NCF1, CDKN1A, CHUK, EGFR, IL-10, MAPK1, RAF1, ACACA, ELK1
Malaria	27	CD40LG, ICAM1, IFNG, IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10, CCL2, SELE, TGFB1, TNF, VCAM1, FOS, CXCL2, IL-1 α , JUN, MMP1, MMP3, CASP3, COL3A1, HSPB1, NOS2, PRKCB, RELA, IL-2, STAT1, CXCL10
Chemical carcinogenesis-receptor activation	27	ADRB1, ADRB2, AHR, AKT1, AR, BCL2, CYP1A1, CYP3A4, EGFR, ESR1, ESR2, FOS, GSTM1, HSP90AA1, JUN, MYC, PPARA, PRKCB, MAPK1, RAF1, RELA, RXRA, NR1B3, CTSD, MMP2, MMP9, NOS3
Transcriptional misregulation in cancer	24	BAX, RUNX2, CDKN1A, IGFBP3, IL-6, CXCL8, MMP3, MMP9, MPO, MYC, PLAT, PLAU, PPARG, RELA, RXRA, TP53, AKT1, IL-1 α , SERPINE1, MAPK1, PTEN, RAF1, TGFB1, CHEK2
cGMP-PKG signaling pathway	21	ADRA1A, ADRA2B, ADRB1, ADRB2, AKT1, INSR, NOS3, PIK3CG, MAPK1, RAF1, CHRM3, EGFR, HTR2A, KDR, NOS2, PRKCB, PTGS1, PTGS2, BCL2, SCN5A, F2

2.10 分子对接

将钩藤治疗 As 的两个核心成分槲皮素和山奈酚分别与 3 个核心靶点 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 进行分子对接,根据阈值得到 6 组配体-受体对接结果,以结合能来筛选结合活性较好的靶点,其中结合能 ≤ -5 kJ/mol 认为配体与靶点之间具有较好的结合活

性^[7]。槲皮素与 PTGS2、PTGS1、HSP90AA1 的结合能依次为 -36.15 kJ/mol、 -32.64 kJ/mol、 -24.98 kJ/mol,山奈酚与 PTGS2、PTGS1、HSP90AA1 的结合能依次为 -35.40 kJ/mol、 -24.39 kJ/mol、 -20.88 kJ/mol,因此,PTGS2、HSP90AA1 和 PTGS1 与槲皮素和山奈酚均具有很好的结合活性(结合能远小于 -5 kJ/mol),其

中,槲皮素与 PTGS2、山奈酚与 PTGS2 的结合活性 最强,其结合位点三维图见图 8。

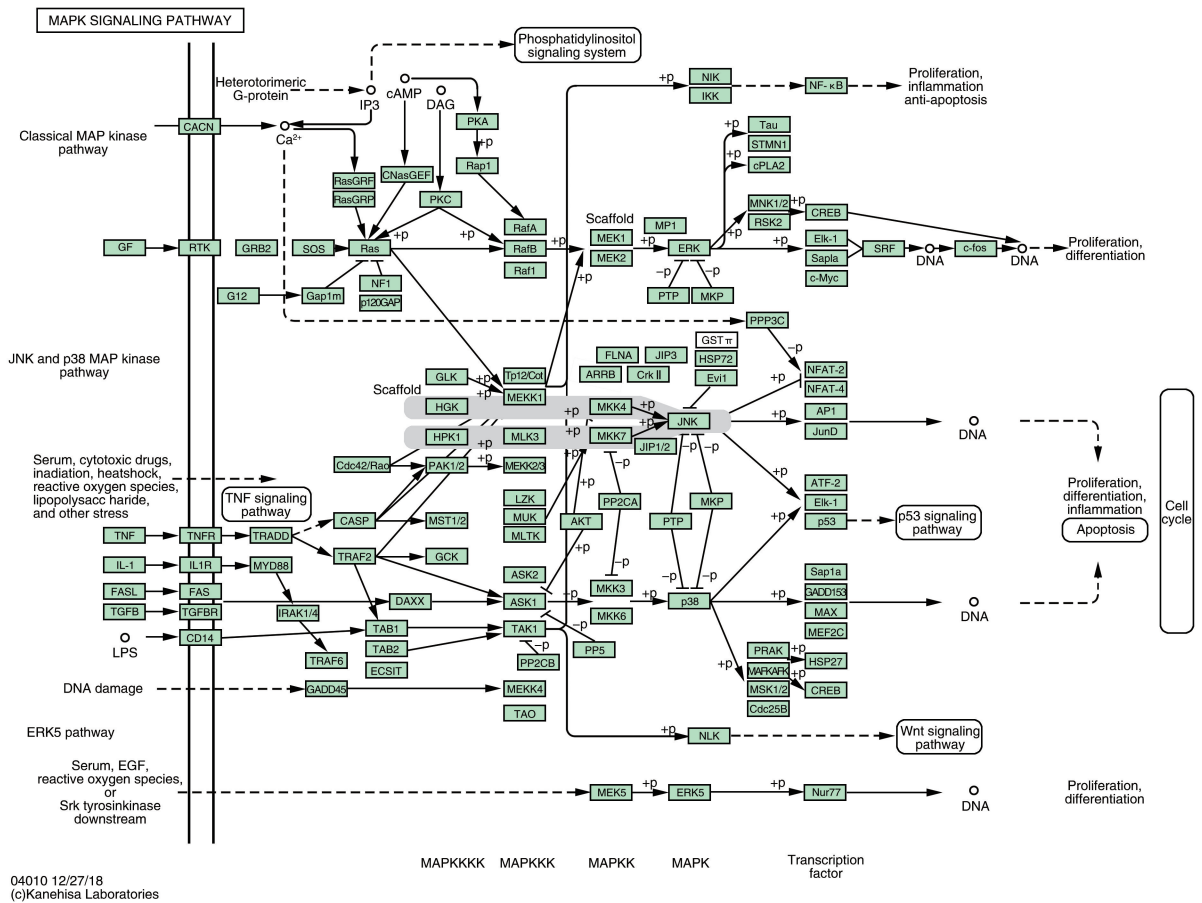


图 7. MAPK 信号通路图

该图来源于 <https://www.kegg.jp/pathway/hsa04010>。

Figure 7. Map of MAPK signaling pathway

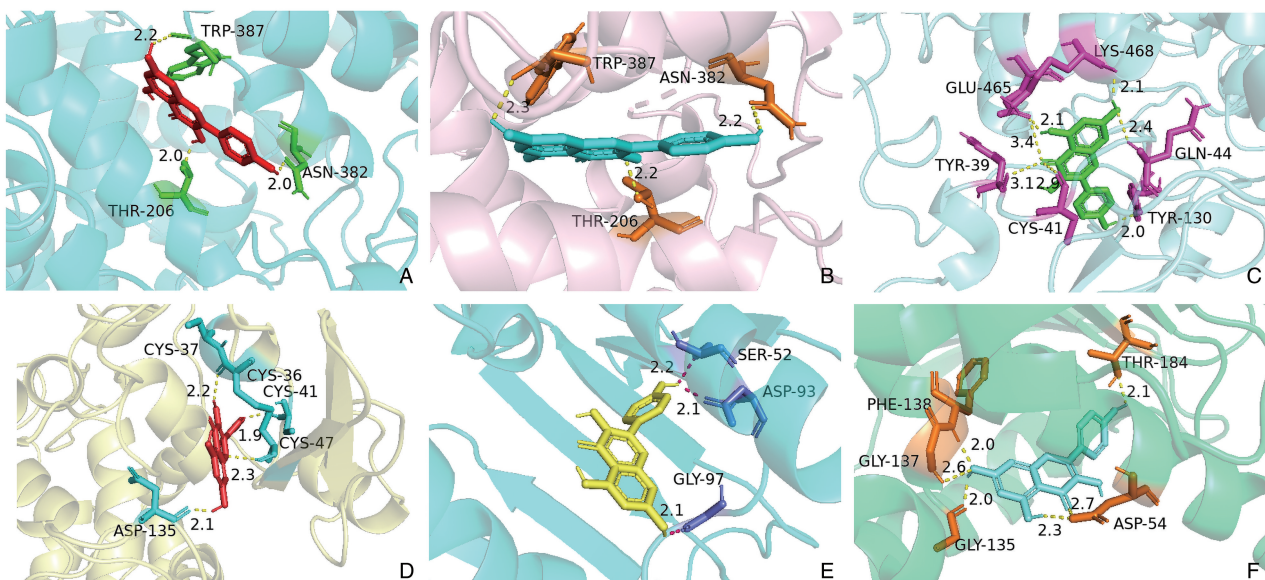


图 8. 钩藤治疗 As 的核心成分与核心靶点分子对接可视化图

A 为槲皮素和 PTGS2 靶点对接, B 为山奈酚和 PTGS2 靶点对接, C 为槲皮素和 PTGS21 靶点对接, D 为山奈酚和 PTGS1 靶点对接, E 为槲皮素和 HSP90AA1 靶点对接, F 为山奈酚和 HSP90AA1 靶点对接。

Figure 8. Visualization of docking between core components and core target molecules of Uncaria for treatment of As

3 讨论

本研究采用网络药理学的方法,使用多种数据库及软件进行相关数据的收集、筛选与分析,对钩藤有效成分与 As 的交集靶点进行 PPI 网络分析、GO 生物功能富集分析以及 KEGG 通路富集分析,构建有效成分-交集靶点-通路网络等,实现数据的可视化,从而预测钩藤治疗 As 的核心成分、核心靶点、核心通路与核心功能。利用以上数据库筛选去重后得出钩藤有 33 种有效成分,对应 199 个靶点,As 的靶点数为 1 608 个,钩藤与 As 的交集靶点数为 115 个,并得到 20 条通路。最后,通过分子对接验证了核心成分槲皮素和山奈酚与核心靶点 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 之间的相互作用关系,尤其是 PTGS2 与槲皮素、山奈酚具有较强的结合活性,进一步说明了钩藤核心成分可通过作用于上述靶点对 As 起到治疗作用。

As 是一种慢性炎症性病变,多种炎症细胞和炎症因子通常被认为在其发病机制中起重要作用^[8]。在有效成分-交集靶点-通路网络中,筛选出钩藤治疗 As 的前两个有效成分是槲皮素和山奈酚,这可能是钩藤治疗 As 的核心成分。在体外,槲皮素不仅减少细胞凋亡和增加线粒体膜电位,而且减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,从而有效缓解了人主动脉内皮细胞的衰老;在体内,槲皮素给药能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠动脉腔的脂质沉积,并通过降低主动脉中 IL-6、人可溶性细胞间黏附分子 1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的水平以及增加沉默信息调节因子 1(sirtuin 1, SIRT1)的密度来减轻血管老化和 As^[9];另外,槲皮素可通过调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/SIRT1/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路,改善高脂饮食糖尿病大鼠的高脂血症、氧化应激水平,通过降低 NF- κ B 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平、升高白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)水平来抑制炎症反应^[10]。而山奈酚不仅可以减轻氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞炎症、氧化应激和凋亡^[11],还可以使高脂饮食-卵巢切除术诱导的 ApoE^{-/-}小鼠的血管形态和脂质水平正常化,并显著降低炎症因子的水平以及血管黏附分子的表达,从而抑制炎症的产生和氧化应激,缓解绝经后 As^[12]。这与本研究通过网络药理学的方法筛选出的钩藤治疗 As 的核心成分相一致,因此,槲皮素和山奈酚是治疗 As 的重要有效成分。

PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 是本研究通过有效成分-交集靶点-通路网络筛选出的钩藤治疗 As 的核心靶点,其 Degree 值分别是 36、36、29,在所有交集靶点中排在前三位。PTGS2 参与前列腺素的合成,其上调与细胞黏附增加、表型变化、抗细胞凋亡和肿瘤血管生成有关,其表达还与 As 的严重程度呈正相关,结合基因共表达和 PPI 网络分析结果,PTGS2 与 As 相关的其他一些蛋白相互作用,因此,PTGS2 可能是 As 的中枢基因^[13]。HSP90AA1 能促进特定靶蛋白成熟、维持结构和参与调控,例如,HSP90AA1 参与细胞周期调控和信号转导,能增强脂肪吞噬功能,促进泡沫细胞中的胆固醇外流,从而发挥抗 As 的作用^[14]。PTGS1 参与前列腺素的合成,在血小板中参与血栓素 A2(thromboxane A2, TXA2)的生成,促进血小板活化、血管收缩和血管平滑肌细胞增殖。在动物和人类模型中发现 PTGS1 产生的 TXA2 导致血小板活化,从而促进 As 血栓形成^[15]。因此,PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 是治疗 As 的重要靶点,而钩藤可能是通过增加 HSP90AA1 的表达,抑制 PTGS2、PTGS1 的表达来缓解 As 的。

KEGG 通路富集分析表明,脂质和 As 是最主要的富集通路,该通路涉及 78 个靶点,本研究筛选出的核心靶点 PTGS2、HSP90AA1 也富集在脂质和 As 通路中;其次是 MAPK 信号通路,该通路涉及 66 个靶点,本研究中 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 三个核心靶点都富集在 MAPK 信号通路中。脂质和 As 通路主要涉及磷酸肌醇 3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinase, PI3K)/Akt、TNF、c-Jun N 端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路^[16]。上调 PI3K/Akt 信号通路,从而降低 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR 4)的表达,可以减少泡沫细胞的形成,防止 As 斑块的形成和不稳定^[17]。而下调 ERK1/2 和 JNK 通路,可以缓解 As 大鼠的肝脂肪变性,最终恢复肝脏中的脂质代谢并缓解 As 病变^[18]。MAPK 信号通路参与多种细胞功能,包括细胞增殖、分化、凋亡和应激反应,主要涉及四种通路:ERK1/2、JNK、p38 MAPK 和 ERK5^[19]。槲皮素通过下调 TLR4 介导的 MAPK 通路以及 p38 MAPK、ERK 1/2、JNK 信号通路来抑制炎症反应,从而发挥抗 As 的作用^[20]。山奈酚不仅可以通过下调小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)中 JNK/p38 MAPK 信号通路来抑制促炎因子的释放和体内炎症反应^[21],还可以通过上调 ERK1/2 通路刺激肝细胞中 Sp1 磷酸化,进而诱导低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的表达并增加其活性,发挥抗 As 作

用^[22]。由此可见,脂质和 As 通路、MAPK 通路是治疗 As 非常重要的通路;槲皮素和山奈酚可能通过下调 MAPK 通路并作用于 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 靶点延缓 As 的形成。因此,钩藤可能是通过调控脂质和 As 通路、下调 MAPK 通路来发挥抗 As 作用。

综上所述,本研究应用网络药理学的方法构建钩藤与 As 的有效成分-交集靶点-通路网络,分析相互作用关系,并将核心成分与核心靶点之间的相互作用通过分子对接进行验证,从而预测钩藤治疗 As 的机制可能是:槲皮素、山奈酚这两个潜在有效成分通过脂质和 As 通路、MAPK 信号通路作用于 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1 靶点,在蛋白质结合、酶结合和可识别蛋白结合的生物学功能中发挥作用。虽然本研究体现了多成分、多靶点、多通路的特点,并可为钩藤治疗 As 提供新思路,但目前网络药理学仍然存在一定的局限性,本研究结果除已有文献依据外,部分结果依然需要通过相关实验进一步研究证实,以期为今后深入研究钩藤治疗 As 的关键机制提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 徐学功,程雪. 试论中医体质学与动脉粥样硬化的相关性[J]. 新中医, 2014, 46(9): 231-233.
XU X G, CHENG X. Discussion on the correlation between traditional Chinese medicine constitution and atherosclerosis [J]. New Chin Med, 2014, 46(9): 231-233.
- [2] 侯仙明,司秋菊,贾云芳,等. 动脉粥样硬化中医病因病机浅论[J]. 河北中医学报, 2018, 33(6): 9-11.
HOU X M, SI Q J, JIA Y F, et al. A brief discussion on etiology and pathogenesis of atherosclerosis in traditional Chinese medicine [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2018, 33(6): 9-11.
- [3] 彭春丽,梁东辉,黄曾艳,等. 冠心病患者血瘀证积分联合超敏 C 反应蛋白对动脉粥样硬化斑块性质的初步评价[J]. 广东医学, 2018, 39(1): 143-147.
PENG C L, LIANG D H, HUANG Z Y, et al. Preliminary evaluation of blood stasis syndrome integral combined with high sensitivity C-reactive protein on the properties of atherosclerotic plaque in patients with coronary heart disease[J]. Guangdong Med, 2018, 39(1): 143-147.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 第 11 版,北京: 中国医药科技出版社, 2020: 268.
NATIONAL PHARMACOPOEIA COMMISSION. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. 11 th Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 268.
- [5] 陈杰东,赵茜. 化痰祛瘀法对颈动脉粥样硬化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(11): 1383-1385.
CHEN J D, ZHAO Q. Effect of huatan dispelling blood stasis method on carotid atherosclerosis[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis, 2017, 15(11): 1383-1385.
- [6] 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.
YANG Y X, ZHANG F, CUI Q H, et al. Application of bioinformatics in atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(3): 185-192.
- [7] 鄢海燕,邹妍,邹纯才. 基于网络药理学和分子对接技术分析清肺排毒汤治疗 COVID-19 的机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(5): 616-623.
YAN H Y, ZOU Y, ZOU C C. Analysis of the mechanism of Qingfei Didu Decoction in the treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. J South Med Univ, 2020, 40(5): 616-623.
- [8] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. Biomolecules, 2018, 8(3): 80.
- [9] JIANG Y, JIANG L, WANG Y, et al. Quercetin attenuates atherosclerosis via modulating oxidized LDL-induced endothelial cellular senescence[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 512.
- [10] ZHANG F F, FENG J J, ZHANG J J, et al. Quercetin modulates AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling to inhibit inflammatory/oxidative stress responses in diabetic high fat diet-induced atherosclerosis in the rat carotid artery[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 280.
- [11] LI S, HAO M, WU T, et al. Kaempferol alleviates human endothelial cell injury through circNOL12/miR-6873-3p/FRS2 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137: 111419.
- [12] FENG Z, WANG C Y, YIN Y, et al. Kaempferol-induced GPER upregulation attenuates atherosclerosis via the PI3K/AKT/Nrf2 pathway[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 1106-1116.
- [13] ZHOU Y, ZHOU H, HUA L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 55-68.
- [14] ROBICHAUD S, FAIRMAN G, VIJITHAKUMAR V, et al. Identification of novel lipid droplet factors that regulate lipophagy and cholesterol efflux in macrophage foam cells[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3671-3689.
- [15] BADIMON L, VILAHUR G, ROCCA B, et al. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(9): 2001-2015.
- [16] WEI F, SONG Y, GONG A, et al. Investigating the molecular mechanism of Xijiao Dihuang Decoction for the treatment of SLE based on network pharmacology and molecular docking analysis [J]. BioMed Res Int, 2022, 2022: 1-20.
- [17] ZHENG Y, LV P, HUANG J, et al. GYY4137 exhibits anti-atherosclerosis effect in apolipoprotein E^{-/-} mice via PI3K/Akt and TLR4 signalling[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(7): 1231-1239.
- [18] CUI H, LIN Y, XIE L, et al. Urantide decreases hepatic steatosis in rats with experimental atherosclerosis via the MAPK/Erk/JNK pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 284.
- [19] GUO Y, PAN W, LIU S, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [20] BHASKAR S, HELEN A. Quercetin modulates Toll-like receptor-mediated protein kinase signaling pathways in oxLDL-challenged human PBMCs and regulates TLR-activated atherosclerotic inflammation in hypercholesterolemic rats[J]. Mol Cell Biochem, 2016, 423(1-2): 53-65.
- [21] YU Q, ZENG K, MA X, et al. Resokaempferol-mediated anti-inflammatory effects on activated macrophages via the inhibition of JAK2/STAT3, NF- κ B and JNK/p38 MAPK signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 38: 104-114.
- [22] OCHIAI A, MIYATA S, IWASE M, et al. Kaempferol stimulates gene expression of low-density lipoprotein receptor through activation of Sp1 in cultured hepatocytes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24940.