

◆ 中药民族药 ◆

基于网络药理学的蒲黄对血瘀证的作用靶点与代谢通路研究^{*}黄晓霞, 赵唯君, 吴相亲, 王凯洋, 曾露, 王红刚, 梁生旺, 罗兰^{**}

(广东药科大学中药学院, 广东广州 510006)

摘要:本研究利用网络药理学探讨蒲黄(*Pollen typhae*)治疗血瘀证的作用靶点与代谢通路。研究首先通过 PharmGKB、TTD 和 CTD 数据库筛选出与血瘀证相关的靶点;接着利用 String 平台构建蛋白质相互作用 (PPI)网络,并挖掘 PPI 网络中潜在的蛋白质功能模块,通过 Metascape 平台分析蒲黄活性成分作用靶点所参与的生物过程及通路;然后采用 Cytoscape3.7.2 软件构成分-靶点网络、疾病-靶点网络、成分-靶点-通路网络;最后通过 AutoDock Vina 软件将蒲黄活性成分、阳性药阿司匹林(Aspirin)与核心靶点进行分子对接验证,并比较各自之间的对接强度。结果表明,槲皮素、山奈酚、异鼠李素、异鼠李素-3-O-新橙皮苷等在参与的成分-靶点网络、疾病-靶点网络、成分-靶点-通路网络中联系密切,其与人体相互作用强,可能是治疗血瘀证的活性成分;核心作用靶点有血管内皮生长因子(VEGFA)、蛋白激酶(AKT1)、雌激素受体(ESR1)、肿瘤坏死因子(TNF)、转录因子(JUN)、有丝分裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14)等。蒲黄治疗血瘀证的生物学通路主要涉及 VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway),IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway),NF-κB 信号通路(NF-kappa B signaling pathway)等,其治疗方面主要涉及血管内皮生长因子、血管功能和血液循环等。分子对接验证显示,活性成分和作用靶点的结合能小于-5 的占 85.88%,即大部分靶点与槲皮素、山奈酚、异鼠李素、异鼠李素-3-O-新橙皮苷的结合活性较好;而 Aspirin 与靶点的结合强度较蒲黄活性成分异鼠李素-3-O-新橙皮苷、(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮、儿茶素和表儿茶素的差。通过网络药理学初步揭示蒲黄多成分、多靶点、多通路的作用特点,预测了蒲黄治疗血瘀证的可能作用靶点和代谢通路;且从分子对接结果来看,蒲黄活性成分异鼠李素-3-O-新橙皮苷、(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮、儿茶素和表儿茶素等与核心靶点的对接效果均优于阳性药 Aspirin。

关键词:蒲黄 网络药理学 血瘀证 靶点 分子对接

中图分类号:R96 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)06-0634-12

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20220117.006

收稿日期:2021-06-21

* 国家自然科学基金项目(81803728)资助。

【作者简介】

黄晓霞(1994-),女,在读硕士研究生,主要从事中药质量分析与评价研究。

【**通信作者】

罗兰(1980-),女,博士,高级实验师,硕士生导师,主要从事中药质量控制及药效物质基础研究,E-mail:luolan1105@126.com。

【引用本文】

黄晓霞,赵唯君,吴相亲,等.基于网络药理学的蒲黄对血瘀证的作用靶点与代谢通路研究[J].广西科学,2021,28(6):634-645.

HUANG X X,ZHAO W J,WU X Q,et al. Study on Targets and Metabolic Pathways of *Pollen typhae* on Blood Stasis Syndrome Based on Network Pharmacology [J]. Guangxi Sciences,2021,28(6):634-645.

0 引言

血瘀证是由瘀血内阻引起的病症,是中医证候研究领域的热点^[1]。现代医学认为,血瘀证主要表现在血流动力学、血液流变学、血栓、微循环障碍、血管内皮损伤、炎症等方面,会导致各组织器官水肿、炎症渗出、血栓形成、组织变性、结缔组织增生等病理变化,是临床上常见的证候之一^[2-4]。有研究表明,蒲黄(*Pollen typhae*)对血瘀证具有比较明确的治疗作用,如孔祥鹏等^[5]通过对血瘀模型大鼠的研究,认为蒲黄可改变异常的血液流变学,降低纤维蛋白原含量从而起到化瘀的作用;刘鹏和周军^[6]认为蒲黄可以改变局部血液循环,促进血管及纤维组织增生;杨梓超等^[7]研究发现,蒲黄提取物可以下调糖尿病视网膜病变中的炎症水平;过鑫昌等^[8]通过临床双盲实验证实蒲黄能影响血脂,降低血清总胆固醇含量,降低血小板黏附率,从而影响血小板功能,对血管内皮细胞具有修复作用并抑制粥样斑块的形成。目前,作为活血化瘀药,蒲黄对血液流变学指标有改善作用^[9],且可改善糖尿病大鼠血液中炎症因子的水平^[10],对急性血瘀大鼠的药代动力学作用明显^[11],但其发挥治疗作用的可能药效物质基础及作用机制尚不明确。

蒲黄主要含有黄酮类、甾体、有机酸、烷烃、挥发油、多糖等化学物质^[12],具有止血、化瘀、通淋等功效。蒲黄总黄酮可显著改善急性血瘀证家兔的血液流变学,并抑制血小板聚集^[13];Wang等^[14]研究表明,蒲黄总黄酮是活血化瘀的主要活性成分。蒲黄黄酮类成分槲皮素、异鼠李素、柚皮素等均可抑制血小板聚集^[15-17];花生四烯酸在体内被迅速代谢,其代谢物参与细胞免疫及炎症反应^[18];山奈酚可抑制炎症因子,具有抗炎作用^[19]。上述研究成果揭示以上化合物可能是治疗血瘀证的主要活性成分。

网络药理学(Network pharmacology)基于在线的数据库、平台和作图软件等,依据中药多成分、多靶点、多途径的整体研究思路,通过数据挖掘、分析以及数据可视化等阐明药物的分子作用机制网络。前期本实验课题组采用LC-MS方法对蒲黄中的主要化学成分进行定量分析^[20],本实验基于整体观,在前期研究基础上采用网络药理学方法,筛选蒲黄活性成分及其作用靶点、通路,保留与血瘀证相关的靶点,并与阳性药阿司匹林分子对接强度比较,以此探讨其治疗血瘀证的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 蒲黄活性成分和作用靶点的筛选

通过中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform,TCMSP)搜索蒲黄全部的化学成分,以口服利用度(Oral Bioavailability,OB) $\geq 30\%$ 和类药性(Drug-Likeness,DL) ≥ 0.18 两个ADME(药物在体内的吸收 Absorption、分布 Distribution、代谢 Metabolism、排泄 Excretion 过程)参数为筛选条件,初步筛选出蒲黄活性成分及其作用靶点,并根据潘祥龙等^[2]的研究成果补充蒲黄中具有活血化瘀功效的化合物。经文献筛选补充的化合物在TCMSP数据库进行检索匹配,若TCMSP未收录,则利用Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载化合物分子的3D结构并导入Swiss TargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测活性成分的作用靶点。对获得的蛋白质靶点统一使用Uniprot蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行规范。

1.2 蒲黄活性成分作用靶点的筛选

将1.1节初步筛选出的作用靶点输入PharmGKB数据库(<https://org//www.Pharmgkb.org/>)、TTD数据库(<http://db.i-drblab.net/ttd/>)、CTD数据库(<http://ctdbase.org/>),筛选出蒲黄活性成分的作用靶点,保留与血瘀证相关的靶点,舍去非相关靶点。

1.3 蒲黄成分-靶点图的构建

运用Cytoscape3.8.2对结果进行可视化,构建蒲黄成分-靶点图,用“节点(node)”表示成分或靶点或通路,用“边(edge)”表示节点之间的关系。利用Cytoscape3.8.2软件内置工具(network analyzer)分析网络拓扑结构,以连接度(Degree)、介度(Betweenness Centrality)与紧密度(Closeness Centrality)的数值为主要参考,识别活性成分、作用靶点和通路。

1.4 蒲黄活性成分作用靶点的PPI网络构建

为明晰靶点间的相互作用,将1.2节筛选出的蒲黄活性成分作用靶点提交到STRING11.0数据库(<https://string-db.org/>),以“Homo sapiens”为筛选条件,构建蛋白质相互作用(PPI)网络,设定阈值“highest confidence” > 0.9 ,其余条件均为默认。利用Metascape平台(<https://metascape.org/gp/index.html>)挖掘PPI网络中潜在的功能模块,并对功

能模块进行描述。

1.5 疾病-靶点图构建

运用 Cytoscape3. 8. 2 对结果进行可视化, 构建疾病-靶点图, 其他步骤与 1. 3 节一致。

1.6 蒲黄活性成分作用靶点功能与通路富集分析

利用 Metascape 平台将蒲黄活性成分作用靶点进行基因本体论 GO 生物过程分析 (GO Biological Processes)、GO 分子功能分析 (GO Molecular Functions)、GO 细胞组分分析 (GO Cellular Components)、KEGG 通路富集分析 (KEGG Pathway), 分析条件均为默认参数, 并对所得结果进行可视化。

1.7 蒲黄成分-靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape3. 8. 2 对结果进行可视化, 构建成分-靶点-通路图, 其他步骤与 1. 3 节一致。

1.8 分子对接分析

为进一步明晰化合物与靶点结合的活性, 利用 AutoDock Vina (v4. 2. 6) 软件对蒲黄的活性成分和关键作用靶点进行分子对接, 同时将阳性药阿司匹林 Aspirin 与关键作用靶点进行分子对接。分子对接的

表 1 蒲黄活性成分

Table 1 *Pollen typhae* active ingredients

CAS 号 CAS No.	ID	成分 Ingredients	口服利用度 Oral bioavailability (OB, %)	类药性 Drug-Likeness (DL)	连接度 Degree
117-39-5	PH1	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	130
520-18-3	PH2	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	51
506-32-1	PH3	花生四烯酸 Arachidonic acid	45.57	0.20	34
480-19-3	PH4	异鼠李素 Isorhamnetin	49.60	0.31	28
474-58-8	PH5	西托糖苷 Sitogluside	20.63	0.62	13
99-50-3	PH6	原儿茶酸 Protocatechuic acid	25.37	0.04	10
112-39-0	PH7	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	18.09	0.12	8
204127-54-8	PH8	(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮 (2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21	6
480-41-1	PH9	柚皮素 Naringenin	59.29	0.21	10
154-23-4	PH10	儿茶素(-)-catechin	49.68	0.24	14
490-46-0	PH11	表儿茶素(-)-epicatechin	28.93	0.24	11
4382-17-6	PH12	槲皮素-3,3'-二甲醚 Quercetin-3,3'-dimethyl ether	46.45	0.33	6
501-98-4	PH13	对香豆酸 4-Hydroxycinnamic acid	45.98	0.04	5
104472-68-6	PH14	香蒲新苷 Typhaneoside	-	-	8
55033-90-4	PH15	异鼠李素-3-O-新橙皮苷 Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	-	-	8
54377-24-1	PH16	7-羟基-5,8-二甲氧基-黄烷酮 7-Hydroxy-5,8-dimethoxyflavane	-	-	19

注:“-”表示 TCMSP 数据库未收录,从潘祥龙等^[2]报道中得到

Note:“-” indicates that the TCMSP database is not included, which is from Pan Xianglong, et al^[2] report

步骤主要如下:①收集蒲黄活性成分作用的关键靶点的结构和活性成分的结构——从 PDB 数据库下载关键作用靶点的 3D 结构,从 TCMSP 和 Pubchem 数据库下载活性成分的 mol2 或 3D 结构;②对关键作用靶点和活性成分进行预处理——使用 Discovery Studio 4.5 对蛋白质结构进行处理,删除水分子、配体、离子,加极性氢和电荷等,并将化合物转成 PDB 文件;③配体(活性成分)和分子(靶点)的对接——对接过程中,将蒲黄活性成分和关键作用靶点的 PDB 文件转化成 pdbqt 文件,通过查阅文献设置盒子参数,而后进行柔性对接;④对接结果的可视化——使用 PyMOL(2.4.1)将对接结果可视化。

2 结果与分析

2.1 蒲黄活性成分的获取

利用 TCMSP 数据库收集 33 个化学成分,经 ADME 筛选得到 8 个活性成分,加上潘祥龙等^[2]报道的活性成分 8 个,总共 16 个活性成分(表 1)。

2.2 蒲黄活性成分作用靶点的确定

通过在线数据库对蒲黄活性成分的作用靶点进行收集,共获得 539 个靶点,去除重复靶点后为 310 个。将 310 个靶点录入 CTD、TTD 和 PharmGKB 数据库,对靶点进行分类,主要根据改善血流动力学、抗凝血、抗炎和调控细胞凋亡(增殖)等 4 个方向进行分类^[21]。最终确定与血瘀证相关的作用靶点 83 个,并与蒲黄 16 个活性成分相互作用。

2.3 蒲黄成分-靶点网络图

为观察蒲黄活性成分和靶点之间的关系,使用 Cytoscape3.8.2 软件对数据进行可视化,获得成分-靶点网络图,其中节点 98 个,边 166 条(图 1)。拓扑属性分析显示,槲皮素、7-羟基-5,8-二甲氧基-黄烷酮、山奈酚的连接度较高(表 2)。

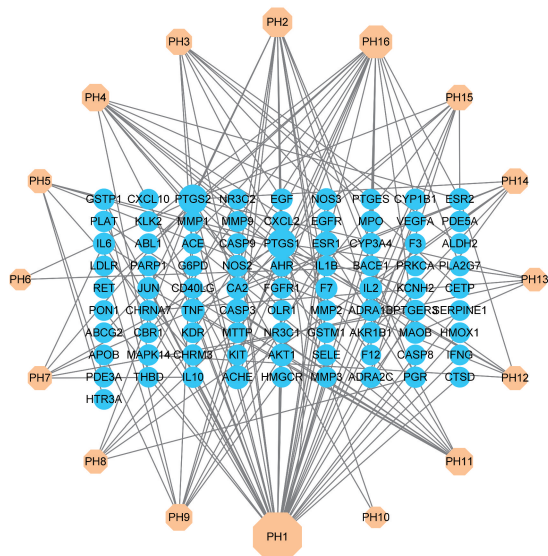


图 1 蒲黄成分-靶点网络图

Fig.1 Ingredients-target network diagram of *Pollen typha*

2.4 蒲黄活性成分作用靶点 PPI 网络的构建

通过提交靶点至 STRING 11.0 数据库,获得蒲黄活性成分作用靶点的 PPI 网络(图 2)。同时分析 PPI 网络拓扑属性,以连接度(Degree)为指标,连接度值越大,说明靶点连接越紧密,进而说明靶点越重要。分析结果显示,处于蒲黄活性成分作用靶点中心的蛋白,肿瘤坏死因子(TNF,度值=15)、血管内皮生长因子(VEGFA,度值=14)、转录因子(JUN,度值=14)、有丝分裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14,度值=14)、蛋白激酶(AKT1,度值=13)、雌激素受体(ESR1,度值=10)等相互联系较为紧密,揭示蒲黄的活血化瘀网络中存在连线密度较高的子网(module),子网由具有生物学意义的蛋白质复合体和功能

表 2 蒲黄活性成分的拓扑属性

Table 2 Topological properties of the active ingredients of *P. typhae*

ID	成分 Ingredients	连接度 Degree	介度 Between- ness centrality	紧密度 Close- ness centrality
MOL000098	槲皮素 Quercetin	43	0.47	0.49
54377-24-1	7-羟基-5,8-二甲氧基-黄烷酮 7-Hydroxy-5,8-di- methoxyflavane	19	0.22	0.39
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	14	0.08	0.39
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	11	0.06	0.37
MOL001439	花生四烯酸 Arachidonic acid	9	0.08	0.36
MOL006505	表儿茶素 (-)-epicatechin	11	0.04	0.37
MOL004328	柚皮素 Naringenin	10	0.08	0.37

模块组成^[22],同时表明 TNF、VEGFA、JUN、MAPK14、AKT1、ESR1 可能为蒲黄活性成分作用的关键靶点。上述蛋白质涉及细胞增殖和凋亡、血管内皮生成、癌细胞生长的抑制、免疫反应和炎症反应的参与等方面。采用分子复合物检测算法(MCODE)对相互作用关系进行分析,得到 4 个 module,选取与蒲黄活血化瘀药理相关的 3 个 module(图 3)进行描述,结果发现这些 module 主要涉及对脂多糖的应答、炎症反应和对细菌起源分子的应答等生物过程(表 3)。推测蒲黄活血化瘀作用可能与上述过程有关。

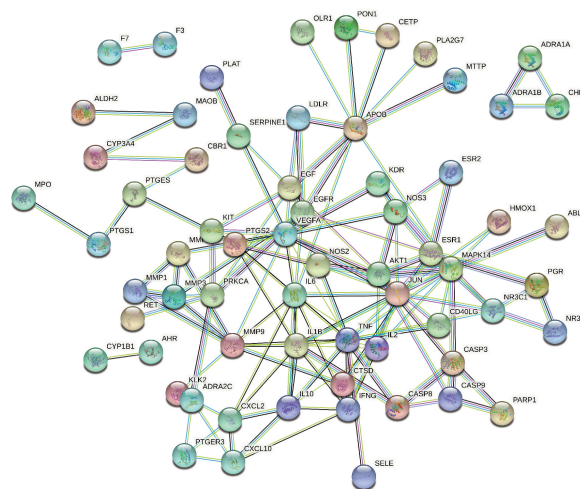
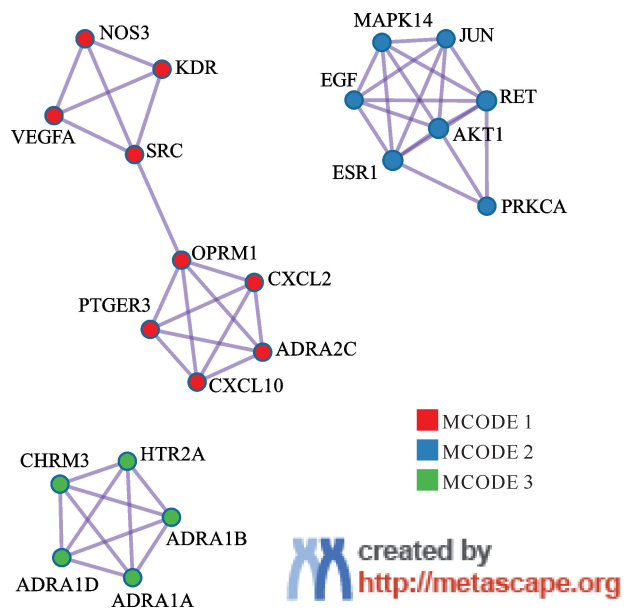


图 2 蒲黄活性成分作用靶点 PPI 网络图

Fig.2 PPI network diagram of the active ingredients action targets of *P. typhae*



红色表示 module 1, 蓝色表示 module 2, 绿色表示 module 3

Red represents module 1, blue represents module 2, green represents module 3

图3 蒲黄活性成分作用靶点 PPI 网络中的 module

Fig. 3 Modules of PPI network of action targets in *P. typhae* active ingredients

表3 蒲黄活性成分作用靶点 PPI 网络功能描述

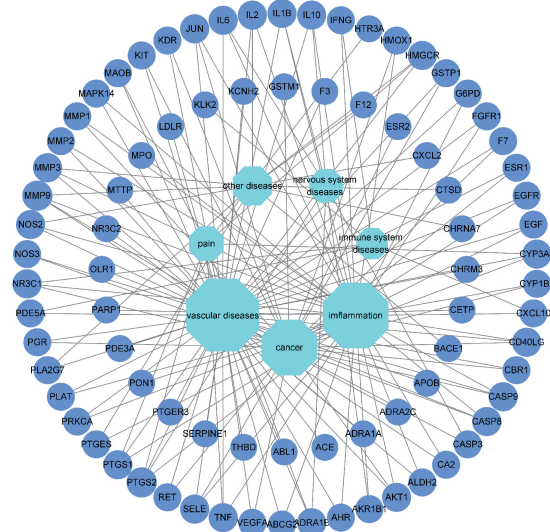
Table 3 Function description of PPI network of the active ingredients action targets in *P. typhae*

编号 GO	描述 Description	LgP
GO:0032496	对脂多糖的应答 Response to lipopolysaccharide	- 25.4
GO:0002237	细菌起源分子的应答 Response to molecule of bacterial origin	- 24.8
GO:0006954	炎症反应 Inflammatory response	- 24.5

2.5 疾病 - 靶点的网络图构建

为了更直观地观察靶点和疾病的关系, 构建疾病 - 靶点网络图, 如图 4 所示。将靶点分为 7 个特征病症(这 7 个特征病症与血瘀证对应的 4 个模块关联): 癌症(Cancer)、血管疾病(Vascular diseases)、免疫系统疾病(Immune system diseases)、神经系统疾病(Nervous system diseases)、炎症(Imflamation)、疼痛(Pain)及其他疾病(Other diseases), 与传统的血流动力学异常、凝血异常、炎症反应和肿

瘤对应。表明蒲黄治疗血瘀证可能与 7 个方面的病症相关。



圆形表示靶点, 八边形表示疾病

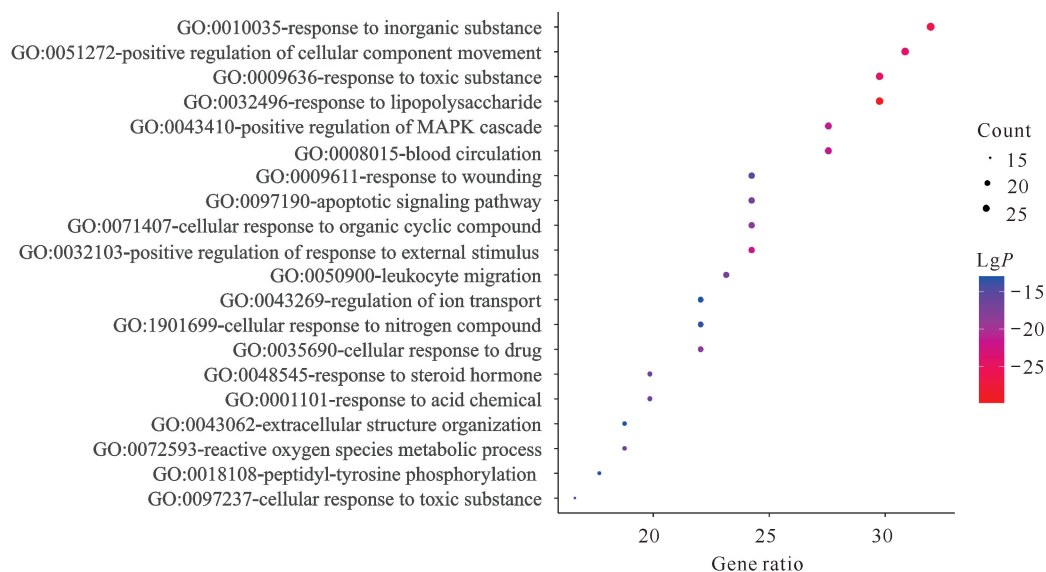
A circle represents a target, an octagon represents disease

图4 蒲黄活性成分的疾病 - 靶点网络图

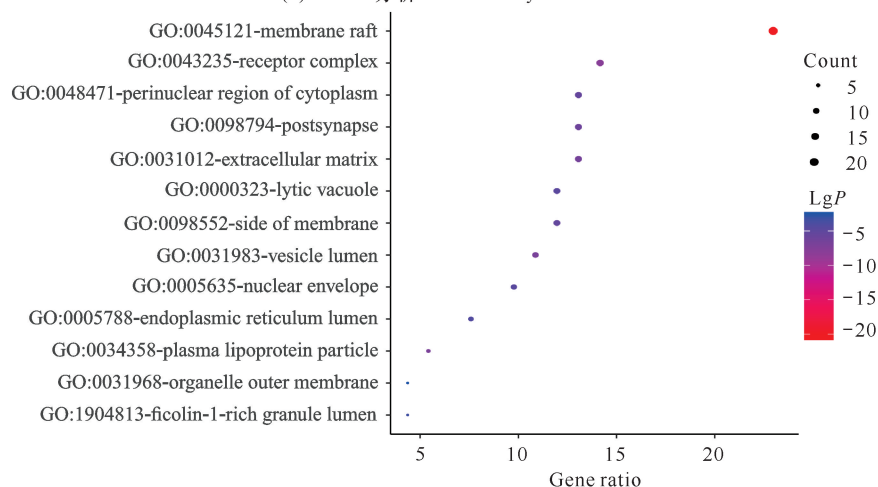
Fig. 4 Disease-target network diagram of active ingredients of *P. typhae*

2.6 蒲黄活性成分作用靶点功能和通路的富集分析

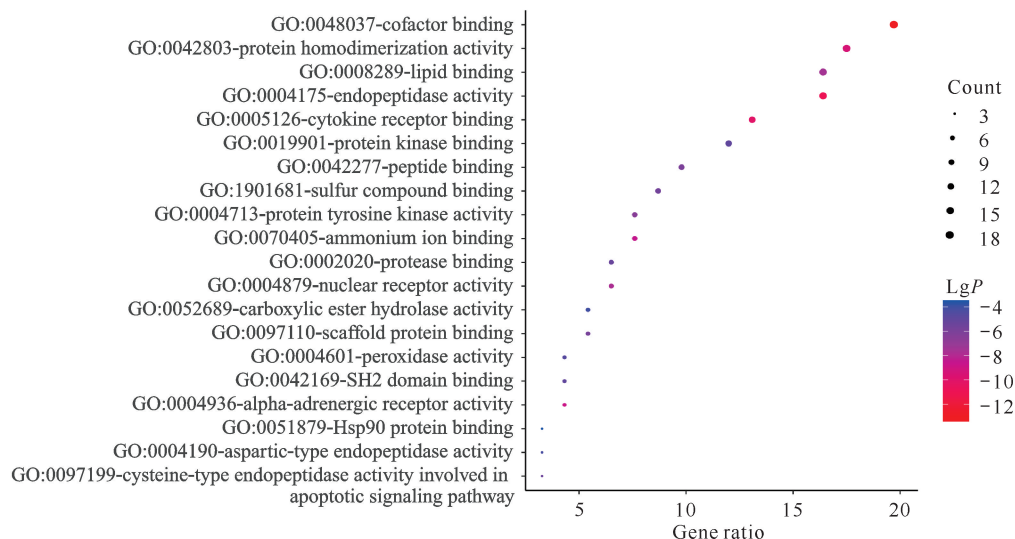
通过 Metascape 平台对蒲黄活性成分作用的 83 个靶点进行通路富集分析, 并使用在线平台对前 20 条结果进行可视化(图 5)。蒲黄治疗血瘀证相关的生物过程主要有对脂多糖的应答(Response to lipopolysaccharide)、对受伤的反应(Response to wounding)和血液循环(Blood circulation)等(图 5a)。与血瘀证有关的通路有血管新生相关的 VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway), IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway), NF- κ B 信号通路(NF-kappa B signaling pathway)等(图 5d)。与血瘀证有关的靶点功能主要体现在蛋白激酶(Protein kinase binding)、内肽酶活性(Endopeptidase activity)、细胞因子受体结合(Cytokine receptor binding)等方面(图 5c)。与血瘀证相关的细胞组分有细胞器外膜(Organelle outer membrane)、血浆脂蛋白颗粒(Plasma lipoprotein particle)、核膜(Nuclear envelope)等(图 5b)。表明蒲黄治疗血瘀证可能与以上描述有关。



(a) GO-BP分析 GO-BP analysis



(b) GO-CC分析 GO-CC analysis



(c) GO-MF分析 GO-MF analysis

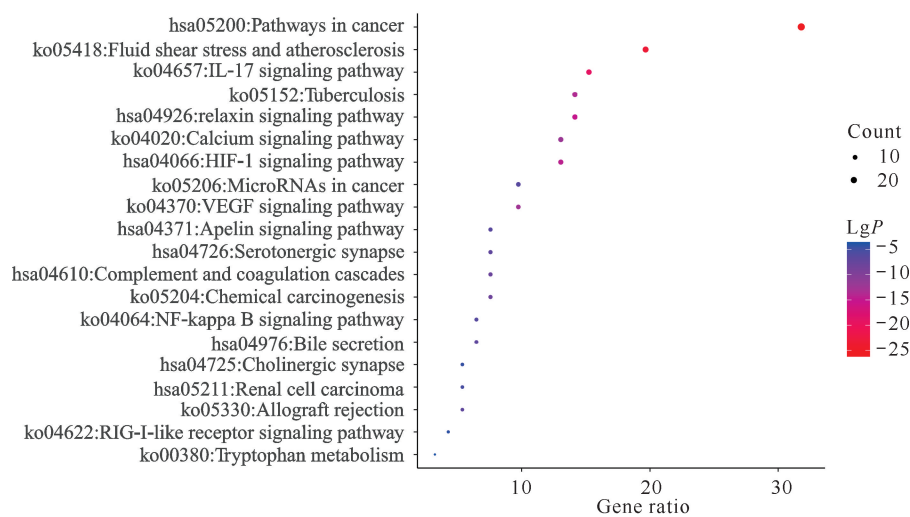


图5 蒲黄活性成分作用靶点通路富集分析

Fig. 5 Target pathway enrichment analysis of the active ingredients action targets of *P. typhae*

2.7 蒲黄成分-靶点-通路网络图的构建

为系统地剖析蒲黄治疗血瘀证的潜在机制,将83个蛋白质靶点映射到前20条KEGG通路上(图6)。结果显示,VEGF信号通路富集靶点15个,IL-17信号通路富集靶点13个,NF- κ B信号通路富集靶点13个,这3个通路与血瘀证关联较紧密。这些富集多靶点的通路与血管、中枢神经系统、炎症密切相关,通路富集的靶点信息见表4。

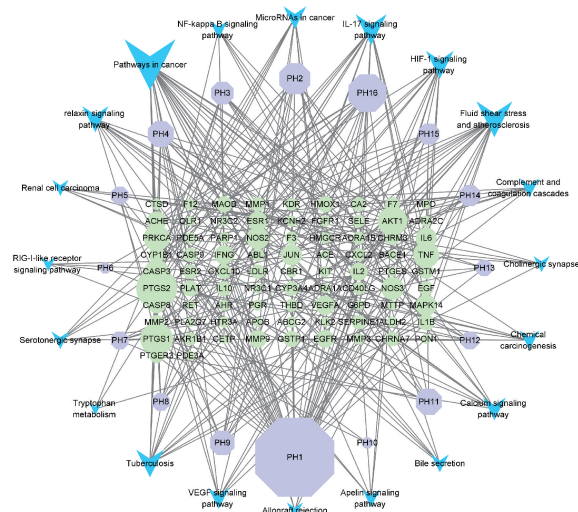
2.8 分子对接结果分析

选取PPI网络中连接度值排前5的靶点,TNF、VEGFA、JUN、MAPK14和AKT1分别与16个与血瘀证相关的蒲黄活性成分、Aspirin进行分子对接。经研究发现,受体和配体的结合能小于-7,表示两者间具有较好的结合作用;结合能数值越低,产生相互作用所需的能量就越低^[23]。图7为16个化合物分别与5个核心靶点进行对接的结合能。由图7可知,结合能小于-7的有42种(49.41%),位于-5与-7之间的有31种(36.47%),在-1与-4.9之间的有12种(14.12%)。蒲黄成分异鼠李素-3-O-新橙皮苷、(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮、儿茶素和表儿茶素等与受体结合可产生5个以上的氢键作用(图8),具有良好的活性。Aspirin与TNF的

表4 主要通路富集的靶点信息

Table 4 Target information enriched by main pathways

编号 GO	描述 Description	总数 Count	对数 LgP	作用靶点 Action targets
GO:0071396	Cellular response to lipid	20	-27	ABL1, AHR, AKT1, CASP9, MAPK14, CYP1B1, ACE, EGFR, ESR1, ESR2, NR3C1, CXCL2, GSTP1, IL1B, IL6, IL10, CXCL10, LDLR, NR3C2, MMP2, NOS2, NOS3, SERPINE1, PGR, PLAT, RET, TNF



不同的颜色表示不同的类型,浅绿色为靶点,浅紫色为蒲黄活性成分,蓝色为通路。图形面积越大,表示该节点越重要

Different colors indicate different types. Light green is the target, light purple is the active ingredient of *P. typhae*, blue is the pathway. The larger the graphic area, the more important the node is

图6 蒲黄成分-靶点-通路网络图

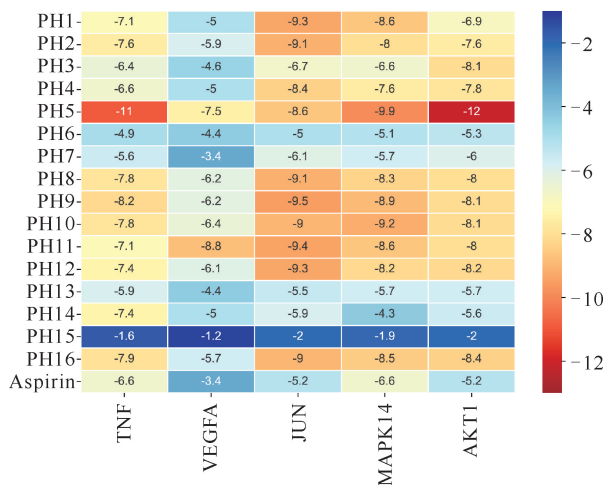
Fig. 6 Component-target-pathway network of *P. typhae*

续表 4

Continued table 4

编号 GO	描述 Description	总数 Count	对数 LgP	作用靶点 Action targets
hsa05200	Pathways in cancer	19	-27	PARP1, AKT1, CASP3, CASP8, CASP9, EGF, EGFR, ESR1, ESR2, FGFR1, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IFNG, IL2, IL6, JUN, KIT, MMP1, MMP2, MMP9, NOS2, PRKCA, PTGER3, PTGS2, RET, VEGFA
GO:0032496	Response to lipopolysaccharide	27	-26	ABL1, AKT1, APOB, CASP3, CASP8, CASP9, MAPK14, ACE, CXCL2, GSTP1, IL1B, IL6, IL10, CXCL10, MAOB, MPO, NOS2, NOS3, SERPINE1, PTGS2, SELE, THBD, TNF
WP4754	IL-18 signaling pathway	29	-26	AKT1, CASP3, CASP8, CETP, CXCL2, HMOX1, IFNG, IL1B, IL6, IL10, JUN, KCNH2, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, NOS2, PRKCA, PTGS2, TNF, VEGFA, PLA2G7
GO:0002237	Response to molecule of bacterial origin	25	-25	CD40LG, AKT1, APOB, CASP3, CASP8, CASP9, MAPK14, ACE, CXCL2, GSTP1, IL1B, IL6, IL10, CXCL10, MAOB, MPO, NOS2, NOS3, SERPINE1, PTGS2, SELE, THBD, TNF
hsa05417	Lipid and atherosclerosis	34	-25	ABL1, APOB, CASP3, CASP8, CASP9, CD40LG, MAPK14, CXCL2, IL1B, IL6, JUN, LDLR, MMP1, MMP3, MMP9, NOS3, OLR1, PRKCA, SELE, TNF
WP3617	Photodynamic therapy - induced NF- κ B survival signaling	13	-25	ABL1, CXCL2, IL1B, IL2, IL6, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, PTGS2, SELE, TNF, VEGFA
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	17	-24	ABL1, AKT1, CYP1B1, EGF, EGFR, F3, F7, FGFR1, HMOX1, IFNG, IL1B, IL6, CXCL10, JUN, KDR, KIT, MMP2, MMP9, NOS3, SERPINE1, PRKCA, PTGS2, RET, TNF, VEGFA, PLA2G7
GO:2000147	Positive regulation of cell motility	16	-24	ABL1, AKT1, CYP1B1, EGF, EGFR, F3, F7, FGFR1, HMOX1, IFNG, IL1B, IL6, CXCL10, JUN, KDR, KIT, MMP2, MMP9, NOS3, SERPINE1, PRKCA, PTGS2, RET, TNF, VEGFA, PLA2G7
GO:0010035	Response to inorganic substance	18	-24	ABL1, PARP1, AKT1, APOB, CASP3, CASP8, CASP9, CYP1B1, EGF, G6PD, HMOX1, IL6, JUN, KDR, KIT, MAOB, MMP2, MMP3, MMP9, MPO, MTPP, NOS3, PON1, PTGS2, BACE1
GO:0051272	Positive regulation of cellular component movement	16	-24	AKT1, AKT1, CYP1B1, EGF, EGFR, F3, F7, FGFR1, HMOX1, IFNG, IL1B, IL6, CXCL10, JUN, KDR, KIT, MMP2, MMP9, NOS3, SERPINE1, PRKCA, PTGS2, RET, TNF, VEGFA, PLA2G7
GO:0040017	Positive regulation of locomotion	16	-24	PARP1, AKT1, CYP1B1, EGF, EGFR, F3, F7, FGFR1, HMOX1, IFNG, IL1B, IL6, CXCL10, JUN, KDR, KIT, MMP2, MMP9, NOS3, SERPINE1, PRKCA, PTGS2, RET, TNF, VEGFA, PLA2G7
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	45	-23	ABL1, MAPK14, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IFNG, IL1B, JUN, KDR, MMP2, MMP9, NOS3, PLAT, SELE, THBD, TNF, VEGFA
GO:0009725	Response to hormone	13	-23	AKT1, ADRA1A, AKT1, APOB, CA2, CASP3, CASP9, MAPK14, CYP1B1, ACE, ESR1, ESR2, F7, NR3C1, HMOX1, IL6, IL10, KIT, MAOB, NR3C2, MMP2, NOS2, NOS3, PGR, PLAT, PTGS2, TNF
GO:0009410	Response to xenobiotic stimulus	20	-22	CASP3, ADRA1A, AHR, CASP3, CBR1, CYP1B1, CYP3A4, ACE, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IL1B, IL10, JUN, KCNH2, MAOB, MMP2, NOS2, PDE3A, PTGS2, RET, TNF
hsa04933	AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complications	55	-22	ABL1, CASP3, MAPK14, F3, IL1B, IL6, JUN, MMP2, NOS3, SERPINE1, PRKCA, SELE, THBD, TNF, VEGFA
hsa04657	IL-17 signaling pathway	55	-20	MAPK14, CASP8, MAPK14, CXCL2, IFNG, IL1B, IL6, CXCL10, JUN, MMP1, MMP3, MMP9, PTGS2, TNF
GO:0071407	Cellular response to organic cyclic compound	16	-20	AKT1, AHR, CASP3, CASP8, CASP9, CHRM3, CYP1B1, ACE, EGFR, ESR1, ESR2, NR3C1, HTR3A, IL1B, IL10, NR3C2, MMP2, PDE3A, PGR, PLAT, PTGS2, TNF
GO:0050727	Regulation of inflammatory response	19	-19	MAPK14, ACE, ESR1, F12, GSTP1, IFNG, IL1B, IL2, IL6, IL10, LDLR, MMP3, MMP9, SERPINE1, PTGER3, PTGS2, SELE, TNF, PLA2G7, PTGES
WP5055	Burn wound healing	47	-19	ABL1, AHR, AKT1, CASP9, MAPK14, CYP1B1, ACE, EGFR, ESR1, ESR2, NR3C1, CXCL2, GSTP1, IL1B, IL6, IL10, CXCL10, LDLR, NR3C2, MMP2, NOS2, NOS3, SERPINE1, PGR, PLAT, RET, TNF

结合能最低为-6.6,与蒲黄活性成分相比稍差。结合能小于-5的表示结合活性良好^[24],占总数的85.88%。经过分子对接验证,说明蒲黄活性成分对治疗血瘀证具有较好的活性。



颜色越红,对应的值越小,说明对接强度越大

The redder the color, the smaller the corresponding value, indicating the greater the docking strength

图7 分子对接结果图

Fig. 7 Results of molecule docking

3 讨论

随着现代医学的进步,对血瘀证研究越来越深入,较古代判断疾病的“问、闻、望、切”,现代医学更多的是研究疾病的发病机制以及药物对疾病的作用机制,并已经发展到分子层面。由表1可知,蒲黄的活性成分有81.25%是黄酮类化合物。本课题组前期实验表明,生蒲黄和蒲黄炭炭后黄酮类成分变化具有明显差异,并与药效的变化有关^[25],可推断蒲黄总黄酮是重要的活性成分,与本文推断的结果一致。

研究分析 PPI 网络可知, VEGFA、AKT1、ESR1、TNF、JUN、MAPK14 的连接度值在 PPI 网络中排名前6,说明蒲黄活性成分与这些靶点具有较高的结合活性。VEGFA 是参与血管新生的相关因子,该因子可刺激血管内皮细胞分裂增殖,并与炎症指标、疾病活动及血管通透性呈正相关关系,参与固有的免疫调节^[26]。AKT1 在血管细胞中是以亚型存在,影响血管化反应的多个调控途径,包括抗血管生成、调节血管通透性、血管生成反应和血管成熟^[27]。靶点 ESR1 调节血管系统,促进损伤血管功能的恢复,并在中枢神经系统中起保护神经的作用^[28]。以上研究成果证实 PPI 网络筛选的靶点可能与血瘀证密切相关,其中 VEGFA、AKT1、ESR1、TNF、JUN、MAPK14 可能是治疗血瘀证的关键靶点。

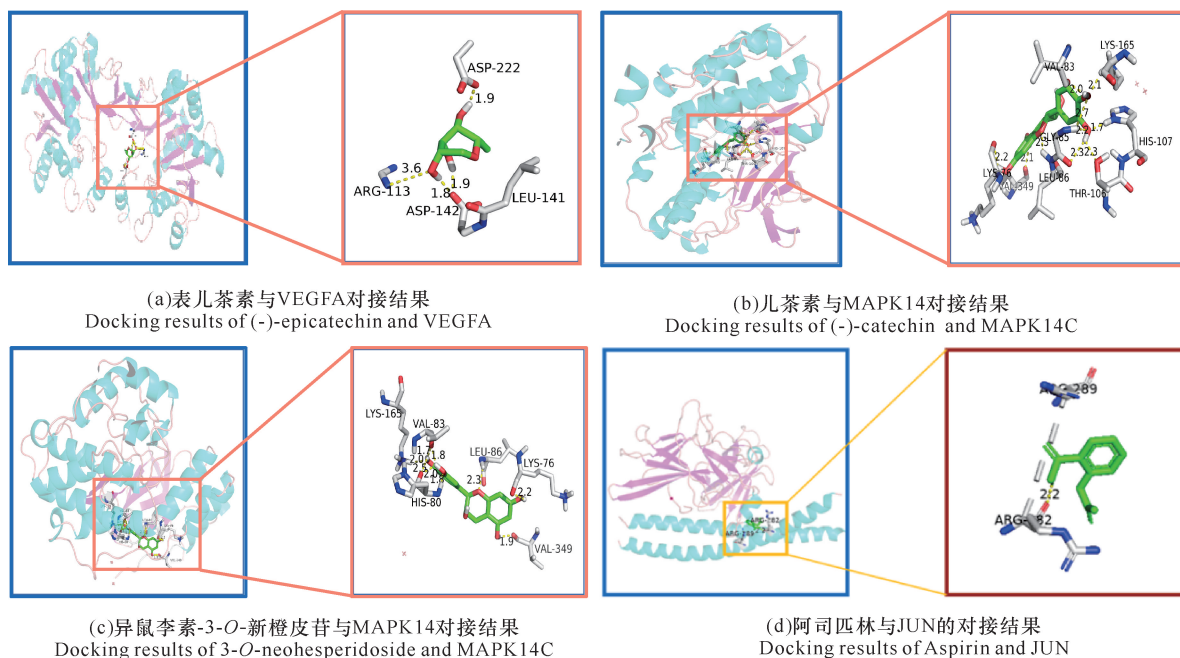


图8 蒲黄主要成分和靶点的对接结果

Fig. 8 Docking results of main ingredients and targets of *P. typhae*

KEGG 通路富集结果可知,在蒲黄治疗血瘀证过程中涉及的通路可能与 VEGF 信号通路、IL-17 信号通路、NF- κ B 信号通路有关。如 NF- κ B 信号通路中的促炎因子、TNF- α 、Ang II 等多种刺激因子被诱导后,在下游调节白细胞介素相关基因、凋亡抑制因子、编码黏附因子相关基因等多种基因的表达,涉及机体免疫调节、炎症反应、细胞周期调控、细胞分化及凋亡等,与 Notch 信号通路有关,与 IKK 激酶、I κ B 激酶的细胞内信号有关。在炎症中,TNF- α 、IL-6、NF- κ Bp65 等促炎细胞因子增加,NF- κ B 炎症基因的表达增加。IL-17 信号通路中的 IL-17F、IL-25 也具有促炎作用^[29]。VEGF 信号通路与下游信号级联反应,包括 PI3K-Akt 通路、p38-MAPK 通路及 Raf 通路,进而控制血管内皮细胞的存活、增殖和迁移,促进血管新生并提高血管通透性。血管生成是肿瘤发生发展的重要因素,新生血管不仅为病变组织提供养分,保证其生长繁殖,而且使得肿瘤细胞与个体血液循环直接相通,进而导致恶性肿瘤的发生。上述结果表明,蒲黄治疗血瘀证可能与 VEGF 信号通路、IL-17 信号通路、NF- κ B 信号通路等有关。

通过网络药理学的筛选,选取 PPI 网络中联系紧密的 VEGFA、AKT1、TNF、JUN、MAPK14 5 个靶点,分别与蒲黄活性成分对接,进一步验证其结合活性,同时将阳性药 Aspirin 与上述 5 个靶点进行对接。可视化对接结果显示,表儿茶素与 VEGFA、异鼠李素-3-O-新橙皮苷与 MAPK14、儿茶素与 MAPK14 的结合强度较好,Aspirin 与 5 个靶点的结合强度较表儿茶素、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、儿茶素弱。Aspirin 在治疗血瘀证方面疗效明确且显著,而蒲黄活性成分的对接结果优于阳性药 Aspirin,表明蒲黄在治疗血瘀证方面具有极大的潜力,开发价值较大,后续可对其进一步研究。

4 结论

通过网络药理学初步揭示蒲黄多成分、多靶点、多通路的作用特点,发现蒲黄活性成分作用靶点可分为 7 个病症,这 7 个特征病症与血瘀证的 4 个模块相关联,预测蒲黄治疗血瘀证的可能作用靶点和代谢通路;从分子对接结果来看,蒲黄活性成分异鼠李素-3-O-新橙皮苷、(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮、儿茶素和表儿茶素等的对接效果均优于阳性药 Aspirin。本研究粗略说明了蒲黄治疗血瘀证的分子机制,不仅为蒲黄的活血化瘀作用提供了理论

依据,为将来相关研究提供了基础,而且为传统中药材作用机制的研究提供新的思路。

参考文献

- [1] 赵颖. 血瘀证的视网膜血管及血氧特征及其临床应用研究[D]. 成都:成都中医药大学,2020.
- [2] 潘祥龙,郝二伟,谢金玲,等. 活血化瘀中药调节血瘀证的分子机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24):227-234.
- [3] GUO S, CHEN J, CHUO W, et al. A new biomarkers feature pattern consisting of TNF- α , IL-10, and IL-8 for blood stasis syndrome with myocardial ischemia [J]. Evidence-based Complementray and Alternative Medicine, 2013, 2013(7):130702.
- [4] CHO K H, KIM K P, WOO B C, et al. Relationship between blood stasis syndrome score and cardioankle vascular index in stroke patients [J]. Evidence-based Complementray and Alternative Medicine, 2012, 2012(3):696983.
- [5] 孔祥鹏,陈佩东,张丽,等. 蒲黄与蒲黄炭对血瘀大鼠血液流变性及凝血时间的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):129-132.
- [6] 刘鹏,周军. 蒲黄压疮散对大鼠压疮模型创面血管内皮生长因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2015(15):1606-1608.
- [7] 杨梓超,王育良,左晶. 蒲黄提取物对糖尿病视网膜病变大鼠的保护作用[J]. 国际眼科杂志,2021,21(3):406-410.
- [8] 过鑫昌,丁怀翌,龚兰生,等. 蒲黄对血脂、血小板功能影响的研究——附 112 例分析[J]. 上海中医药杂志,1985,19(10):44-46.
- [9] 李芳,孔祥鹏,陈佩东,等. 蒲黄炭对血瘀大鼠血液流变性、凝血时间及舌象体征的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):154-157.
- [10] 冯晓桃,陈群,梁霄. 蒲黄总黄酮对 2 型糖尿病大鼠炎症因子和胰岛素敏感性的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(6):936-938,943.
- [11] PAN Y N, ZHANG W J, ZHANG W, et al. Pharmacokinetic comparison of two phenolic acids after oral administration of Typhae pollen to normal rats and rats with acute cold blood stasis [J]. Biomedical Chromatography, 2017, 31(12):1-7.
- [12] 陈瑾,郝二伟,冯旭,等. 蒲黄化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药,2019,50(19):4729-4740.
- [13] 杨慧玲,李军. 蒲黄总黄酮对家兔血液流变学参数和血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,

- 18(17):244-246.
- [14] WANG X Y, LI J, YANG X J, et al. A rapid and efficient extraction method based on industrial MCM-41-miniaturized matrix solid-phase dispersion extraction with response surface methodology for simultaneous quantification of six flavonoids in *Pollen typhae* by ultra-high-performance liquid chromatography [J]. Journal Separation Science, 2019, 42(14):2426-2434.
- [15] 梁艳玲, 蒋威. 槲皮素的心血管保护作用研究进展[J]. 解剖学研究, 2018, 40(5):444-448.
- [16] 马悦, 闫姗, 晓东, 等. 异鼠李素的心血管药理作用研究进展[J]. 甘肃科技, 2020, 36(19):158-160.
- [17] 廖霞, 刘文, 丁航. 柚皮素对凝血酶诱导的兔血小板聚集的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11):2909-2910.
- [18] 罗大力, 张幼怡, 韩启德. 花生四烯酸的生物活性及其钙信号转导作用[J]. 生理科学进展, 2002, 33(3):251-254.
- [19] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展[J]. 广东医学, 2010, 31(8):1064-1066.
- [20] 赵唯君. 基于数字化技术对蒲黄炮制品的质量评价研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [21] 杨凯麟, 曾柳庭, 葛安琪, 等. 基于网络药理学探讨桃仁-红花药对活血化瘀的分子机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(12):2208-2216.
- [22] VELLA D, MARINI S, VITALI F, et al. MTGO; PPI Network analysis via topological and functional module identification [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):5499.
- [23] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. Plos One, 2013, 8(12):e83922.
- [24] 卜雕雕, 苏卓, 张丹, 等. 基于网络药理学左金丸治疗胃溃疡的机制[J]. 中成药, 2019, 41(6):1264-1271.
- [25] 黄晓霞, 张舒, 叶栩萌, 等. 蒲黄炒炭前后总黄酮的含量变化[J]. 广东化工, 2021, 48(15):57-58.
- [26] 方妍妍, 刘健, 万磊, 等. 新风胶囊含药血清通过抑制 VEGFA/SDF-1/CXCR4 通路缓解强直性脊柱炎患者血小板活化的机制[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(8):691-696.
- [27] CHEN J, SOMANATH P R, RAZO-RENOVA O, et al. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo* [J]. Nature Medicine, 2005, 11(11):1188-1196.
- [28] BURNS K A, KORACH S K. Estrogen receptors and human disease: An update [J]. Archives of Toxicology, 2012, 86(10):1491-1504.
- [29] DENG C, PENG N, TANG Y, et al. Roles of IL-25 in type 2 inflammation and autoimmune pathogenesis [J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12:691559.

Study on Targets and Metabolic Pathways of *Pollen typhae* on Blood Stasis Syndrome Based on Network Pharmacology

HUANG Xiaoxia, ZHAO Weijun, WU Xiangqin, WANG Kaiyang, ZENG Lu, WANG Honggang, LIANG Shengwang, LUO Lan

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, 510006, China)

Abstract: The targets and metabolic pathways of *Pollen typhae* were explored to treat blood stasis syndrome by network pharmacology in this study. Firstly, the targets related to blood stasis syndrome were screened out through PharmGKB, TTD and CTD databases. Then, the protein-protein interaction (PPI) network was constructed by String platform, and the potential protein function modules in PPI network were mined. The biological processes and pathways involved in the targets of active components of *Pollen typhae* were analyzed by Metascape platform. And Cytoscape3. 7. 2 software was used to construct the network of ingredient-target, disease-target and ingredient-target-pathway. Finality, AutoDock Vina software was used to verify the molecular docking of active ingredients, Aspirin and core targets, and the docking strength between them was

compared. The results showed that quercetin, kaempferol, isorhamnetin and isorhamnetin 3-*O*-neohesperidin were closely related in the participating ingredient-target network, disease-target network and ingredient-target-pathway network. And they had strong interaction with the human body, which might be active ingredients in the treatment of blood stasis syndrome. The core targets included vascular endothelial growth factor (VEGFA), protein kinase (AKT1), estrogen receptor (ESR1), tumor necrosis factor (TNF), transcription factor (JUN) and mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), etc. The biological pathways of *Pollen typhae* in the treatment of blood stasis syndrome mainly involved VEGF signaling pathway, IL-17 signaling pathway and NF-kappa B signaling pathway, and its treatment mainly involved vascular endothelial growth factor, vascular function and blood circulation. Molecular docking verification showed that the binding energy of active ingredients and targets less than -5 accounted for 85.88%, that is, most of the targets had good binding activity with quercetin, kaempferol, isorhamnetin and isorhamnetin-3-*O*-neohesperidin. While the binding strength of aspirin to the target was lower than that of the active ingredients of *Pollen typhae*: isorhamnetin-3-*O*-neohesperidin, (2*R*)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) benzopyran-4-one, catechin and epicatechin. The characteristics of multi-ingredient, multi-target and multi-pathway of *Pollen typhae* were preliminarily revealed by network pharmacology, and the main possible targets and metabolic pathways of *Pollen typhae* in the treatment of blood stasis syndrome were predicted. Moreover, according to the molecular docking results, isorhamnetin-3-*O*-neohesperidin, (2*R*)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) benzopyran-4-one, catechin and epicatechin were the active components of *Pollen typhae*, and their docking effect with the core target was better than that of aspirin.

Key words: *Pollen typhae*, network pharmacology, blood stasis syndrome, target, molecular docking

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>