

文章编号: 1004-4353(2022)02-0132-06

基于网络药理学探讨水红花子抗肝硬化机制

杨涵, 崔银峰, 范忠义, 朴燕, 张昌浩, 金莉莉

(延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 为进一步研究水红花子的药用物质基础,利用网络药理学和分子对接技术探讨了水红花子治疗肝硬化的作用机制.首先利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、人类基因数据库(GeneCards)、蛋白质-蛋白质相互作用网络功能富集分析平台(String)建立了水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络,然后利用基因本体(gene ontology,GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析和分子对接手段研究了水红花子的抗肝硬化机制.研究结果显示:水红花子治疗肝硬化的成分可能是具有保肝功能的 β -谷甾醇、山奈酚、儿茶素、圣草酚、槲皮素,作用靶点可能为 IL-6、VEGFA、AKT1、TP53、CXCL8、TNF;水红花子参与抗肝硬化的生物学过程可能有凋亡负调控、程序性细胞死亡负调控、细胞增殖调控等,相关信号通路可能包括癌症通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路等;槲皮素、山奈酚与 AKT1 的结合能和呋塞米与 AKT1 的结合能相似.该研究结果可为后续研究水红花子抗肝硬化的机制提供理论依据.

关键词: 网络药理学; 水红花子; 肝硬化; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

Mechanism of *Fructus polygoni orientalis* in treatment of liver cirrhosis based on network pharmacology

YANG Han, CUI Yinfeng, FAN Zhongyi, PIAO Yan, ZHANG Changhao, JIN Lili

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: To further investigate the medicinal substance basis of *Fructus polygoni orientalis*, the mechanism of action of *Fructus polygoni orientalis* in the treatment of liver cirrhosis was explored using network pharmacology and molecular docking technique. Firstly, using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Human Gene Database (GeneCards), Protein-Protein Interaction Networks Function Enrichment Analysis Platform (STRING) to establish the effective component of *Fructus polygoni orientalis*-target genes of liver cirrhosis network, the anti-liver cirrhosis mechanism of *Fructus polygoni orientalis* was then investigated by GO (gene ontology) and KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) enrichment analysis of the intersecting genes of *Fructus polygoni orientalis* and liver cirrhosis, combined with molecular docking method. The results of the study show that the effective components for the treatment of liver cirrhosis of the *Fructus polygoni orientalis* may be β -sitosterol, kaempferol, catechin, eriodictyol, quercetin, which have the function of protecting the liver, the targets of action may be IL-6, VEGFA, AKT1, TP53, CXCL8, TNF; *Fructus polygoni orientalis* is involved in the biological processes of treating liver cirrhosis, which may include negative regulation of apoptosis, negative regulation of programmed

收稿日期: 2021-09-12

基金项目: 延边大学校企合作项目(延大科合字(2019)第 40 号)

第一作者: 杨涵(1997—),女(满族),硕士研究生,研究方向为天然药物活性成分.

通信作者: 金莉莉(1978—),女(朝鲜族),博士,副教授,研究方向为天然药物活性成分.

cell death, regulation of cell proliferation and so on. The signal pathways related to the treatment of liver cirrhosis by *Fructus polygoni orientalis* may include pathways in cancer, cytokine-cytokine receptor interaction, toll-like receptor signaling pathway and so on. In addition, the binding energies of quercetin and kaempferol with AKT1 are similar to those of furosemide. The results of this study may provide a theoretical basis for subsequent in-depth studies on the mechanism of *Fructus polygoni orientalis* against liver cirrhosis.

Keywords: network pharmacology; *Fructus polygoni orientalis*; liver cirrhosis; molecular docking

0 引言

肝硬化(liver cirrhosis, LC)是坏死肝脏纤维组织弥漫性增生而导致肝脏的正常结构遭到破坏的一种疾病^[1]. 目前,肝硬化的发病机制尚不明确,西医对其治疗仍不理想. 近年来一些学者采用传统中医治疗肝硬化取得了一定疗效^[2-4]. 临床研究^[5-6]显示,水红花子(*Fructus polygoni orientalis*)可用于治疗胃脘胀痛、散血消淤、消积止痛等,且对慢性肝炎、肝硬化以及肝纤维化等也有一定的治疗效果. 基于此,本文基于系统生物学理论,利用网络药理学和分子对接方法探讨水红花子治疗肝硬化的作用机制,并通过构建药物-靶点-疾病网络对其进行系统的网络分析,进而对药物作用的机制进行预测,以期为水红花子治疗肝硬化提供理论依据和临床参考.

1 实验方法

1.1 水红花子治疗肝硬化的网络药理学研究的基本思路

水红花子治疗肝硬化的网络药理学研究的基本思路见图 1,具体为:①利用 TCMSP 数据库对水红花子的活性成分进行筛选;②利用 Uniprot 数据库对水红花子活性成分的基因进行注释,以此获得水红花子活性成分的靶点基因名;③利用 GeneCards 数据库筛选出肝硬化的靶点基因;④在获得水红花子与肝硬化交集基因的基础上,利用 Cytoscape 3.8.0 软件和 String 数据库构建水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络、蛋白质相互作用网络;⑤利用 DAVID 数据库对水红花子与肝硬化的交集基因进行 GO 与 KEGG 富集分析;⑥利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件对水红花子有效成分的配体小分子与受体蛋白的分子进行对接.

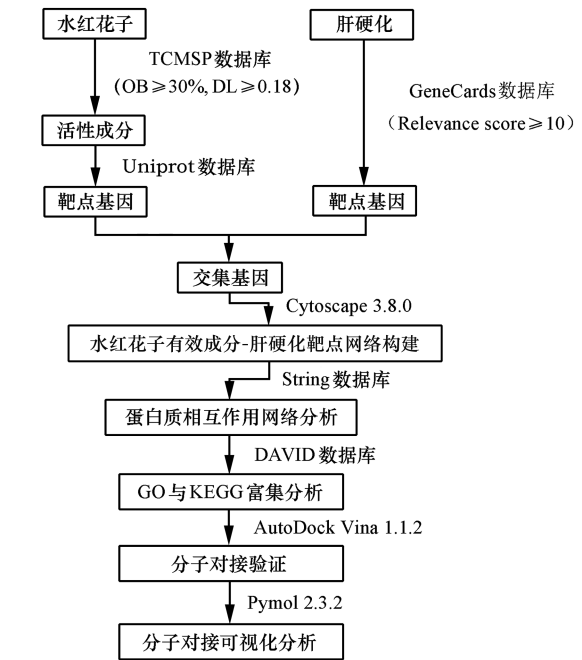


图 1 水红花子治疗肝硬化的网络药理学研究的思路图

1.2 水红花子活性成分与候选靶点的收集

TCMSP 数据库(<http://tcmspw.com/>)是中药系统药理学数据库和分析平台,可用于分析药物、靶标和疾病之间的关系. 在 TCMSP 数据库中“Herb name”项中输入“水红花子”进行检索即可在“Latin name”项中获得水红花子所有活性成分的信息. 文献^[7-8]研究表明,对药物的口服生物利用度(OB)和类药性(DL)进行评估有助于优化药代动力学和药物性质. 因此本文以生物利用度和类药性作为评价基准,筛选出 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ ^[9]的水红花子活性成分,并将其对应的潜在靶点作为候选靶点.

按上述条件筛选后,在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中的“UniProtKB”项中检索水红花子活性成分的靶点蛋白名称(限定物种为人“Homo sapiens”),以此校正上述候选靶点所对应的基因名.

1.3 肝硬化相关基因、水红花子与肝硬化交集基因的筛选

首先,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中检索与肝硬化相关的靶基因,并筛选出符合“Relevance score ≥ 10 ”条件的与肝硬化相关的基因.然后,利用 Venny 2.1.0 平台获取水红花子有效成分与肝硬化的交集基因.交集基因中的水红花子活性成分均有可能是治疗肝硬化的有效成分.

1.4 水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络与蛋白质相互作用网络的构建

首先利用 Cytoscape 3.8.0 软件建立水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络,然后利用“Tools”项中的“Analyze Network”对该网络进行可视化分析,最后通过编排 degree 值筛选出水红花子治疗肝硬化的主要作用靶点.

将水红花子与肝硬化的交集基因导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),以此获取蛋白质的相互作用信息,最后导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建蛋白质间的相互作用网络.

1.5 水红花子对肝硬化相关靶点的 GO 与 KEGG 富集分析

将水红花子与肝硬化的交集基因导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)中,然后通过选择“OFFICIAL-GENE SYMBOL”项中的基因列表(限定物种为人“Homo sapiens”)对其进行 GO 与 KEGG 富集分析.

1.6 水红花子对肝硬化相关靶点的分子对接验证

首先在 TCMSP 数据库中检索并下载水红花子治疗肝硬化的 5 种有效成分(β -谷甾醇、山奈酚、儿茶素、圣草酚、槲皮素)的分子结构(mol2 格式),然后在 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中获取上述 5 种成分所对应的 6 个靶点(IL-6、VEGFA、AKT1、TP53、CXCL8、TNF)的 3D 分子结构(pdb 格式),最后利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件对配体小分子与受体蛋白进行分子对接.

2 结果与分析

2.1 水红花子活性成分与作用靶点的收集

在 TCMSP 数据库中共筛选出 10 个水红花

子的活性成分(见表 1)和与其对应的 340 个潜在靶点.

表 1 水红花子的活性成分

序号	活性成分	生物利用度/%
1	柚皮素	42.36
2	金圣草黄素	35.85
3	N-反式对香豆酰基酪胺	85.63
4	β -谷甾醇	36.91
5	山奈酚	41.88
6	花旗松素	57.84
7	(+)-儿茶素	54.83
8	圣草酚	71.79
9	2-(4-羟基苯基)乙基(E)-3-(4-羟基苯基)丙-2-烯酸酯	93.36
10	槲皮素	46.43

2.2 肝硬化相关基因、水红花子与肝硬化交集基因的筛选结果

利用 GeneCards 数据库共筛选出 284 个与肝硬化相关的靶基因.利用 Venny 2.1.0 平台共筛选出 39 个水红花子与肝硬化靶点基因的交集基因,如图 2 所示.

水红花子活性成分靶点基因 肝硬化靶点基因

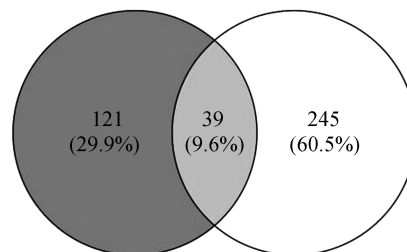


图 2 水红花子与肝硬化的靶点基因 Venn 图

2.3 水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络与蛋白质相互作用网络的构建结果

水红花子与肝硬化的交集基因对应水红花子中的 6 种化合物,分别是金圣草黄素、 β -谷甾醇、山奈酚、儿茶素、圣草酚、槲皮素.水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络如图 3 所示.由图可以看出,6 种化合物中槲皮素(degree 值为 20)和山奈酚(degree 值为 14)对治疗肝硬化具有较好的药效.但考虑水红花子中的金圣草黄素含量极少,其对疾病的治疗效果较低,因此推断水红花子治疗肝硬化的有效成分可能是 β -谷甾醇、山奈酚、儿茶素、圣草酚、槲皮素.

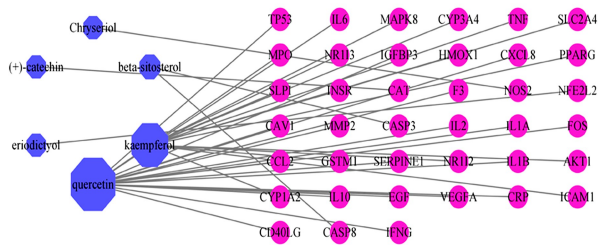


图 3 水红花子有效成分-肝硬化的靶点基因网络图
(蓝色代表水红花子有效成分,玫红色代表靶点)

图 4 为水红花子治疗肝硬化的蛋白质相互作用网络图,图中节点代表蛋白(共有 39 个靶基因节点(node)),边代表蛋白质间的相互作用关系(共有 440 条边(edge)). degree 值越大表示该蛋白在网络中发挥的作用越大,节点颜色越深表示节点间的相互作用越强. 根据 degree 值选取出的前 6 位靶点分别是 IL-6、VEGFA、AKT1、TP53、CXCL8、TNF. 研究显示,AKT2^[10]、PI3K/Akt1^[11]、TNF- α ^[12]、IL-1 β ^[13]是参与肝纤维化形成过程中的重要细胞因子,因此可推测水红花子可能通过上述靶点发挥了其治疗肝硬化的作用.

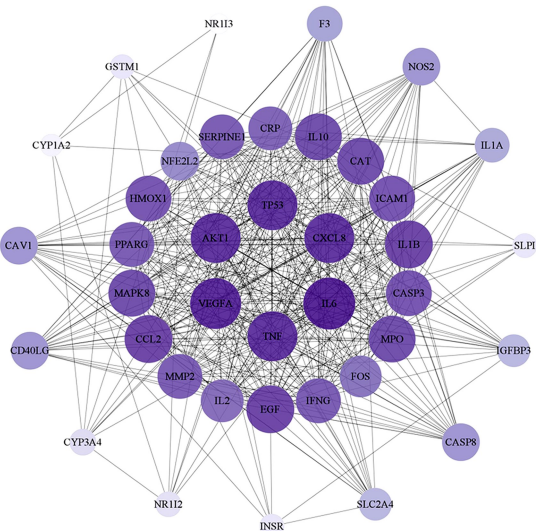


图 4 蛋白质间相互作用的网络图

2.4 水红花子对肝硬化相关靶点的 GO 与 KEGG 富集分析结果

GO 富集包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF). 研究^[14]显示,数据中错误发现率(FDR)小于 0.05 即表示该数据具有显著性,因此本文选用 $P < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$

作为水红花子对肝硬化相关靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析的判定基准. 取 BP 过程的前 14 条条目、CC 过程的 3 条条目、MF 过程的 3 条条目进行 GO 富集分析,结果见图 5. 由图 5 可知,水红花子治疗肝硬化所涉及的生物过程可能包括凋亡负调控、程序性细胞死亡负调控、细胞增殖调控等,细胞组分可能包括细胞外间隙、胞外区部分等,分子功能可能包括细胞因子活性、血红素结合、四吡咯结合等.

按上述筛选条件($P < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$)在水红花子与肝硬化的交集基因中共筛选出 7 条水红花子治疗肝硬化相关的信号通路,见图 6. 由图可以看出,水红花子治疗肝硬化的相关信号通路可能有癌症通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路等.

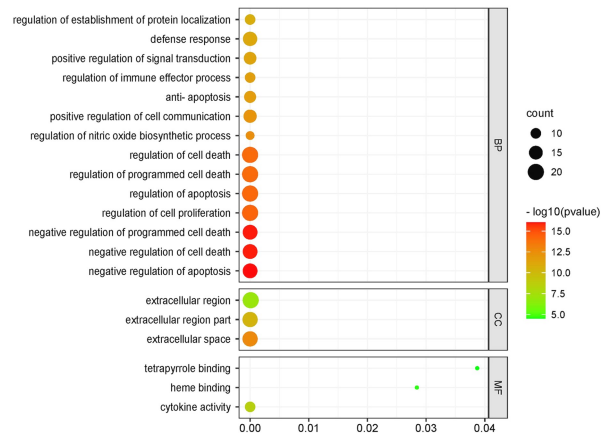


图 5 水红花子对肝硬化相关靶点的 GO 分析气泡图

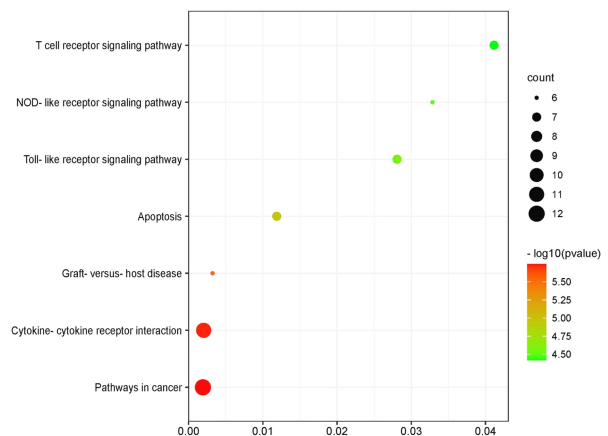


图 6 水红花子对肝硬化相关靶点的 KEGG 富集分析气泡图

2.5 水红花子对肝硬化相关靶点的分子对接验证结果

本文研究结果显示,水红花子有效成分与肝硬化相关靶蛋白的结合能小于 -5.0 kcal/mol 时可使配体小分子与受体蛋白较好地结合,且结合能越小其结合得越好.该结果与文献[15-16]的研究结果一致.水红花子的有效成分和靶蛋白的结合能见表 2.由表 2 可以看出,槲皮素、儿茶素、山奈酚、圣草酚、 β -谷甾醇分别与 IL-6、VEGFA、AKT1、TP53、CXCL8、TNF 这 6 个靶点蛋白的结合能均小于 -5.0 kcal/mol ,说明它们之间均具有较好的结合活性.另有研究^[17]显示,银杏叶中的活性成分槲皮素、山奈酚与受体蛋白 AKT1 的结合能和临床推荐用药呋塞米与受体蛋白 AKT1 的结合能相近.由以上分子对接结果及文献[17]可推断,水红花子对肝硬化具有一定的治疗效果.另外,文献[18-27]也证实了上述 5 种有效成分具有保肝作用.

表 2 水红花子有效成分与靶蛋白的结合能

有效成分	结合能/($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)					
靶点名称 (PDB ID)	IL-6 (1il6)	VEGFA (3qtk)	AKT1 (3mv5)	TP53 (2pcx)	CXCL8 (6n2u)	TNF (4twl)
槲皮素	-7.7	-7.4	-10.7	-7.3	-6.6	-9.4
山奈酚	-8.0	-7.6	-10.5	-7.0	-6.6	-9.2
儿茶素	-7.3	-7.4	-10.2	-6.9	-6.9	-9.1
圣草酚	-7.3	-8.3	-9.7	-7.1	-6.7	-9.3
β -谷甾醇	-8.2	-8.5	-7.6	-6.5	-7.0	-8.2

3 结论

本文利用网络药理学和分子对接对水红花子抗肝硬化机制进行了研究,初步探讨了水红花子治疗肝硬化的有效成分、作用靶点以及相关的生物学过程和相关信号转导通路.研究结果显示水红花子治疗肝硬化是通过多成分、多靶点、多通路来发挥药效的,该研究结果可对后续深入研究水红花子抗肝硬化机制提供参考.目前,利用网络药理学研究中药对疾病的治疗机制仍存在一定的局限性,如受现有疾病数据库对疾病基因的收录不全等原因,因此本文的研究结果还需与临床及药理试验相结合.

参考文献:

- [1] 苏林红,柳侠平,林军.茵陈五苓散对肝硬化腹水大鼠模型的影响[J].中国现代应用药学,2020,37(2):161-164.
- [2] 于聪聪.水红花子汤治疗血瘀型肝硬化腹水的疗效研究[D].济南:山东中医药大学,2013.
- [3] 杨白苗.分析血瘀型肝硬化腹水采用水红花子汤治疗的临床效果[J].航空航天医学杂志,2014,25(11):1587-1588.
- [4] 张宇雪,李勇.水红花子汤治疗代偿期肝硬化验案[J].内蒙古中医药,2018,37(3):26-27.
- [5] 孙洁,姚晓泉,刘永铭,等.水红花子名称及其与蓼实关系的本草考证[J].中药材,2019,42(4):931-934.
- [6] 杜宇琼,车念聪,高彦彬,等.水红花子现代药理作用研究进展[J].北京中医药,2015,34(12):993-995.
- [7] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. International Journal of Molecular, 2012,13(6):6964-6982.
- [8] TAO W, XU X, WANG X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013,145(1):1-10.
- [9] HUANG J, CHEUNG F, TAN H Y, et al. Identification of the active compounds and significant pathways of yinchenhao decoction based on network pharmacology [J]. Molecular Medicine Reports, 2017,16(4):4583-4592.
- [10] XIAO Q, YU H B, ZHU X. The associations of hub gene polymorphisms in PI3K/AKT/mTOR pathway and Schistosomiasis Japonica infection and hepatic fibrosis [J]. Infection Genetics and Evolution, 2020,85:104423.
- [11] 周晓玲,韦宛华,陈峭,等.麻黄升麻汤对肝硬化腹水并感染大鼠血清炎性因子的干预作用[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1409-1414.
- [12] CHEN X, ZHANG L, CHANG Y, et al. Association of TNF- α genetic polymorphisms with hepatocellular carcinoma susceptibility: a case-control study in a Han Chinese population[J]. The International Journal of Biological Markers, 2011,26(3):181-187.
- [13] WU K, KRYCZEK I, CHEN L P, et al. Kupffer cell suppression of CD8(+) T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions [J]. Cancer Research, 2009,69(20):8067-8075.
- [14] 王璐,张礼欣,贾奥蒙,等.基于指纹图谱和网络药

- 理学对经典名方竹茹汤中葛根的质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(20): 6197-6207.
- [15] 宗阳, 丁美林, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.
- [16] 裴超, 邵霖霖, 刘晶, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨红花治疗视网膜静脉阻塞的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1844-1851.
- [17] 刘翠翠, 杨晨, 杨涛, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨银杏叶治疗高血压病潜在作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 468-478.
- [18] 陈廷玉, 陈德顺, 何帅兵, 等. ROS/JNK 通路在槲皮素抑制异烟肼诱导肝细胞凋亡中的作用[J]. 湖州师范学院学报, 2021, 43(8): 59-64.
- [19] 费曜, 段恒, 牛亚珍, 等. 藏药“松蒂”(篦齿虎耳草)中黄酮类成分对 L02 肝细胞氧化损伤的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(9): 1260-1267.
- [20] HUNG W L, YANG G, WANG Y C, et al. Protective effects of theasinensin A against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. Food & Function, 2017, 8(9): 3276-3287.
- [21] BINMOWYNA M N, ALFARIS N A. Kaempferol suppresses acetaminophen-induced liver damage by upregulation/activation of SIRT1[J]. Pharmaceutical Biology, 2021, 59(1): 146-156.
- [22] WANG H, CHEN L, ZHANG X, et al. Kaempferol protects mice from d-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Grp78-CHOP signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 111: 468-475.
- [23] XU T, HUANG S, HUANG Q, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(9): 6403-6410.
- [24] 张亦凡, 刘功关, 刘茜, 等. 圣草酚抑制自由基诱导的生物大分子损伤及对肝癌细胞 HepG2 毒性的作用[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 126-130.
- [25] 王招玉. 葡萄糖醛酸化代谢在圣草酚减弱对乙酰氨基酚肝毒性中的作用研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [26] 李庆勇, 姜春菲, 张黎, 等. β -谷甾醇、豆甾醇诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1173-1175.
- [27] 张忠泉, 邢煜君, 胡国强, 等. β -谷甾醇诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2145-2148.

~~~~~  
(上接第 122 页)

## 参考文献:

- [1] FREEDMAN H I. Deterministic Mathematical Models in Population Ecology[M]. New York: Marcel Dekker, 1980: 119.
- [2] LESLIE P H, GOWER J C. The properties of a stochastic model for the predator-prey type of interaction between two species[J]. Biometrika, 1960, 47: 219-234.
- [3] HSU S B, HUANG T W. Global stability for a class of predator-prey system[J]. SIAMJ Appl Math, 1995, 55: 763-783.
- [4] HUANG J, RUAN S, SONG J. Bifurcations in a predator-prey system of Leslie type with generalized Holling type III functional response[J]. J Differential Equations, 2013, 257: 1721-1752.
- [5] 张丽娜, 李月霞. 修正的 Leslie-Gower 捕食者-食饵扩散模型正平衡点的全局渐近稳定[J]. 应用数学, 2014, 27(2): 381-386.
- [6] 鲁引儿, 徐菲, 张丽娜. 具有非线性收获的 Leslie-Gower 捕食者-食饵扩散模型的 Hopf 分支分析[J]. 高校应用数学学报 A 辑, 2019, 34(1): 101-106.
- [7] BASHEER A, QUANSAH E, PARSHAD R. The effect of additional food in Holling Tanner type models[J]. Int J Dyn Control, 2019, 7: 1195-1212.
- [8] PERKO L. Differential Equations and Dynamical Systems, in Texts in Applied Mathematics[M]. New York: Springer-Verlag, 2001: 338.