

- rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway[J/OL]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:384627. DOI: 10.1155/2011/384627.
- [9] QI ZP, XIA P, HOU TT, et al. Characteristics of mRNA dynamic expression related to spinal cord ischemia/reperfusion injury: a transcriptomics study[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(3):480-486.
- [10] KUNECKI M, PLAZAK W, PODOLEC P, et al. Effects of endogenous cardioprotective mechanisms on ischemia-reperfusion injury[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71(2):20-31.
- [11] 陈香红, 张艳. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤代谢障碍的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(22):15-17.
- [12] 高婷, 王子旭, 陈祝茗, 等. ROS介导的氧化应激与自噬[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3):656-662.
- [13] 刘莹, 卢环宇, 薛冲, 等. NRF2-SOD2途径参与高海拔暴露引起的肝脏氧化应激及炎症损伤[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(12):18-21.
- [14] 黄鑫. 核因子 $\kappa$ B1调控奶牛乳腺上皮细胞乳合成和细胞增殖的作用机理[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2017.
- [15] 范宗静, 吴暘, 唐杰, 等. 缺血再灌注损伤人心脏微血管内皮细胞凋亡基因Bel-2、Bax的表达及黄芪多糖干预研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12):5603-5606.
- [16] 罗菲, 梅燕. 原花青素对急性痛风性关节炎大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 2(1):41-46.
- [17] 赵海, 陈明飞, 钱宁, 等. Caspase-3参与调节孕鼠中后期胎盘细胞凋亡的机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 9(15):234-236.
- [18] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中Caspase-3和Caspase-9活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2):13-15.
- [19] 李浩, 石胜良, 吴岚, 等. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤Caspase-3和Caspase-9活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):317-319.

(收稿日期:2019-11-25,修回日期:2020-01-21)

引用本文:王博,王瑞,郭丽娜,等.基于网络药理学的双黄连抗炎作用机制分析[J].安徽医药,2021,25(3):435-440.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.003.

◇ 药学研究 ◇



## 基于网络药理学的双黄连抗炎作用机制分析

王博,王瑞,郭丽娜,田会东,王单单,吴作敏,裴媛

作者单位:漯河市中心医院药学部,河南 漯河 462000

通信作者:王瑞,男,主任药师,硕士生导师,研究方向为临床药理学,Email:wangrui56116@163.com

基金项目:河南省中药制剂现代化技术研发与临床应用工程研究中心(豫发改高技[2019]569号)

**摘要:** **目的** 探讨双黄连抗炎的主要活性成分和药理作用机制。**方法** 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)检索“金银花”“黄芩”“连翘”三味药材的化学成分和作用靶点,构建化合物-靶点网络;通过比较毒物基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)检索炎症相关基因,构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络,进而在DAVID平台进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和KEGG通路富集分析,推测双黄连抗炎的作用机制。**结果** 筛选得到与炎症有关的36个化合物和53个潜在靶点,关键靶点为前列腺素G/H合成酶2(Prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、前列腺素G/H合成酶1(Prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1)、诱导型一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, inducible, NOS2)、转录因子p65(Transcription factor p65, RELA)、外消旋- $\alpha$ 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC- $\alpha$  serine/threonine-protein kinase, AKT1)。GO功能富集分析筛选得到GO条目77个,KEGG通路富集筛选得到46条信号通路。**结论** 初步预测了双黄连抗炎的药效成分和药理作用机制,为进一步深入研究其作用机制提供基础。

**关键词:** 中草药; 药理作用; 忍冬属; 黄芩; 连翘属; 炎症; 双黄连; 网络药理学

### Anti-inflammatory mechanism analysis of *Shuanghuanglian* based on network pharmacology

WANG Bo, WANG Rui, GUO Lina, TIAN Huidong, WANG Dandan, WU Zuomin, PEI Yuan

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Luohe Central Hospital, Luohe, Henan 462000, China

**Abstract:** **Objective** To study the main active components and pharmacological mechanisms of the anti-inflammatory function of *Shuanghuanglian*. **Methods** The chemical constituents and target proteins of "Lonicerae Japonicae Flos", "Scutellariae Radix" and "Forsythiae Fructus" were indexed by the traditional Chinese medicine system pharmacology platform (TCMSP) to construct the compounds-targets network. The genes related to inflammation were screened by the comparative Toxicogenomics Database (CTD) and protein and protein interaction (PPI) network was constructed. Then the Gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis was carried out on the DAVID platform to predict the action mechanism related to anti-inflammation of *Shuanghuanglian*. **Results** 36 compounds and 53 potential targets were screened. The key targets were Prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), Prostaglandin G/H synthase 1 (PTGS1), Nitric oxide synthase, inducible (NOS2), Transcription factor p65 (RELA), RAC- $\alpha$  serine/threonine-protein kinase (AKT1). 77 GO items were obtained by GO function enrichment analysis, and 46 signaling pathways were acquired by KEGG pathway

enrichment analysis. **Conclusion** The active ingredients and pharmacological mechanisms of *Shuanghuanglian* in treatment of inflammation were preliminarily predicted, which has provided a basis for further in-depth study on the mechanism.

**Key words:** Drugs, Chinese herbal; Pharmacologic actions; Lonicera; Scutellaria baicalensis; Forsythia; Inflammation; *Shuanghuanglian*; Network pharmacology

炎症反应与机体息息相关,既是人体重要的自我防御机制,也是大多数慢性疾病的来源。研究表明,炎症参与了临床大多数疾病的发展变化,包括肺炎、脓毒血症、酒精性肝炎、动脉粥样硬化、糖尿病和肿瘤等<sup>[1-5]</sup>。双黄连由金银花、黄芩、连翘三味药材组成,广泛应用于临床。现代药理学研究表明,三味药材都具有抗菌抗病毒,解热抗炎,保肝抗氧化,免疫调节等作用<sup>[6-9]</sup>;其中,据报道黄芩和连翘还具有抗肿瘤作用<sup>[10-11]</sup>;黄芩具有抗缺血再灌注损伤的作用<sup>[12]</sup>。尽管目前对于双黄连制剂抗炎作用机制的研究已有大量报道,但在有效成分、靶点以及通路上对其整体的药理作用机制尚未完全阐明。

中药所含成分复杂,多个靶点协同发挥作用,在治疗很多疾病方面有不可取代的作用<sup>[13]</sup>。正因为多组分协同作用的特点,其发挥药效的物质基础和作用机制更为复杂,如何科学系统地研究其药理作用机制是中药现代化的难点之一<sup>[14]</sup>。网络药理学基于多向药理学、系统生物学<sup>[15]</sup>,利用网络建模的方法,从系统的角度出发,综合分析主要药效成分、潜在作用靶点和分子机制之间的相互联系,与中医整体观念相呼应<sup>[16-17]</sup>。本研究于2018年8月至2019年11月根据网络药理学研究思路综合分析双黄连口服制剂的主要药效成分和可能的分子机制,以期为后续的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 构建双黄连口服制剂的化学成分数据库** 根据中药系统药理学分析平台(traditional Chinese medicine system pharmacology platform, TCMSP)(<https://tcmssp.com/tcmssp.php>),以“金银花”“黄芩”“连翘”为关键词检索这三味药材的全部化学成分,其中金银花含有236个,黄芩含有143个,连翘含有150个,金银花和黄芩含有的相同成分18个,金银花和连翘含有的相同成分21个,黄芩和连翘含有的相同成分11个,三味药材共有的化学成分有4个,故而“金银花-黄芩-连翘”中含有的所有相关化学成分共482个。

**1.2 活性化合物的筛选** 药物在体内需经过吸收、分布、代谢、排泄的过程,口服生物利用度(oral bioavailability, OB)是指药物口服后到达体循环的相对量,高口服生物利用度是药物是否具有生物性的一个重要指标;类药性代表化合物与已知药物的相似性,类药性 $\geq 0.18$ 表示该成分与Drugbank数据库

里药物具有一定的相似性;Caco-2细胞结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞,Caco-2细胞渗透率决定人体吸收药物的生物利用度<sup>[18-19]</sup>。本研究以口服生物利用度阈值 $OB \geq 30\%$ ,类药性 $\geq 0.18$ ,Caco-2细胞渗透率 $\geq 0.4$ 作为筛选条件,通过评价化合物的体内过程选择生物活性较高的化合物。

**1.3 网络构建与分析** 通过TCMSP数据库寻找42个活性成分的潜在作用靶点,并将靶点数据通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>),选择物种为人,进行归一化和标准化命名,最终得到三味药材活性成分的潜在靶点为141个。利用Cytoscape 3.6.1软件将活性化合物与其潜在靶点蛋白生成(Compound-target, C-T)网络图。通过网络拓扑学分析,探究三味药材的药理作用机制及机理。

**1.4 炎症疾病靶点的筛选** 通过比较基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)(<https://ctdbase.org/>),以“inflammation”为关键词检索与炎症相关的基因。

**1.5 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建** 在生化过程中,蛋白往往通过相互作用形成大分子复合物来完成其生物学过程。通过STRING数据库(<https://string-db.org/>),获取上述双黄连和炎症相关的交集靶蛋白在系统水平的相互作用信息。将可信度设为 $\geq 0.7$ ,得到PPI网络图,并对结果进行分析。

**1.6 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和KEGG通路富集分析** 采用DAVID 6.8数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对PPI网络中的蛋白进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,用FDR错误控制法( $FDR < 0.05$ )对P值做检验校正,设定阈值 $P < 0.05$ ,得到潜在靶点参与表达的生物学通路,探究双黄连的药理作用机制。

**1.7 成分-靶点-信号通路网络构建** 将交集蛋白与其相关联的药对成分,构建成与炎症相关的双黄连化学成分-靶点网络图。交集蛋白与KEGG富集出的生物通路构建出炎症靶点-通路网络图。利用Cytoscape 3.6.1软件中的合并功能将以上两种网络合并,从而得出成分-靶点-信号通路网络图。

## 2 结果

**2.1 化合物的筛选** 符合筛选条件的化合物共有55个。其中,JYH7(豆甾醇, Stigmasterol)是金银花和黄芩共有成分, HQ2(汉黄芩素, wogonin)是黄芩

和连翘共有成分,三者都含有JYH6( $\beta$ -谷甾醇, beta-sitosterol)。有9个化学成分没有相应的作用靶点,所以共有42个化学成分符合筛选条件,其中金银花7个,黄芩24个,连翘11个,见表1。

**2.2 化合物靶点筛选** 通过TCMSP平台检索这42个活性化合物的潜在作用靶点,共得到141个靶点。将这些成分与靶点通过Cytoscape 3.6.1软件构建网

络图,得到的网络图包括163个节点。节点的度(degree)表示网络中和节点相连的路线的条数,度值越大表明节点越重要。从表2中可以看出,度值较大(度值 $\geq 25$ )的化合物为HQ2, HQ4(黄芩素, baicalein), JYH6, JYH7;度值较大的边(度值 $\geq 25$ )前列腺素G/H合成酶2(Prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2),前列腺素G/H合成酶1(Prostaglandin G/H

表1 双黄连中含有的42个与炎症相关的化合物信息

| 编号   | 名称   | OB/%   | 类药性  | Caco-2 |
|------|--|--------|------|--------|
| JYH1 | Mandenol   | 42.00  | 0.19 | 1.46   |
| JYH2 | Ethyl linolenate   | 46.10  | 0.20 | 1.54   |
| JYH3 | beta-carotene  | 37.18  | 0.58 | 2.25   |
| JYH4 | ZINC03978781   | 43.83  | 0.76 | 1.32   |
| JYH5 | 5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone   | 51.96  | 0.41 | 0.88   |
| JYH6 | beta-sitosterol  | 36.91  | 0.75 | 1.32   |
| JYH7 | Stigmasterol   | 43.83  | 0.76 | 1.44   |
| HQ1  | acacetin   | 34.97  | 0.24 | 0.67   |
| HQ2  | wogonin  | 30.68  | 0.23 | 0.79   |
| HQ3  | (2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one           | 55.23  | 0.20 | 0.87   |
| HQ4  | baicalein  | 33.52  | 0.21 | 0.63   |
| HQ5  | Dihydrobaicalin_qt                                       | 40.04  | 0.21 | 0.56   |
| HQ6  | Salvigenin   | 49.07  | 0.33 | 0.86   |
| HQ7  | 5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone                  | 45.05  | 0.33 | 0.48   |
| HQ8  | Skullcapflavone II                                       | 69.51  | 0.44 | 0.68   |
| HQ9  | oroxilin a   | 41.37  | 0.23 | 0.76   |
| HQ10 | Panicolin  | 76.26  | 0.29 | 0.84   |
| HQ11 | 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone                       | 36.56  | 0.27 | 0.46   |
| HQ12 | NEOBAICALEIN   | 104.34 | 0.44 | 0.74   |
| HQ13 | DIHYDROOROXYLIN  | 66.06  | 0.23 | 0.67   |
| HQ14 | sitosterol   | 36.91  | 0.75 | 1.32   |
| HQ15 | Norwogonin   | 39.40  | 0.21 | 0.60   |
| HQ16 | 5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone                   | 31.71  | 0.35 | 0.93   |
| HQ17 | coptisine  | 30.67  | 0.86 | 1.21   |
| HQ18 | bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate         | 43.59  | 0.35 | 0.98   |
| HQ19 | Diop   | 43.59  | 0.39 | 0.79   |
| HQ20 | epiberberine   | 43.09  | 0.78 | 1.17   |
| HQ21 | Moslosooflavone  | 44.09  | 0.25 | 1.01   |
| HQ22 | 11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester                   | 39.28  | 0.23 | 1.46   |
| HQ23 | 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone                     | 36.63  | 0.27 | 0.43   |
| HQ24 | rivularin  | 37.94  | 0.37 | 0.65   |
| LQ1  | (3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one | 52.30  | 0.48 | 0.78   |
| LQ2  | (+)-pinoresinol monomethyl ether                         | 53.08  | 0.57 | 0.69   |
| LQ3  | ACon1_001697   | 85.12  | 0.57 | 0.76   |
| LQ4  | (+)-pinoresinol monomethyl ether-4-D-beta-glucoside_qt   | 61.20  | 0.57 | 0.70   |
| LQ5  | 3beta-Acetyl-20,25-epoxydammarane-24alpha-ol             | 33.07  | 0.79 | 0.75   |
| LQ6  | Mairin   | 55.38  | 0.78 | 0.73   |
| LQ7  | FORSYTHINOL  | 81.25  | 0.57 | 0.59   |
| LQ8  | (-)-Phillygenin  | 95.04  | 0.57 | 0.75   |
| LQ9  | hyperforin   | 44.03  | 0.60 | 0.87   |
| LQ10 | Onjixanthone I   | 79.16  | 0.30 | 0.84   |
| LQ11 | bicuculline  | 69.67  | 0.88 | 0.72   |

注:OB为口服生物利用度。

synthase 1, PTGS1)等。

**2.3 双黄连与炎症交集靶点** 分别利用 TC MSP 和 CTD 数据库查询出双黄连候选化合物 141 个靶点, 炎症 417 个相关基因。其中双黄连与炎症的共有基因 53 个, 即双黄连候选化合物作用靶点与炎症共有 53 个交集蛋白。

**2.4 PPI 网络的构建** 利用 STRING 11.0 数据库, 通过相关设置, 得到 53 个交集蛋白的 PPI 网络图, 见图 1。图中共有 53 个节点, 397 条边, 平均度值为 15。其中节点代表交集蛋白, 边则表示蛋白间的关联作用, 线条的粗细表示关联度的大小。

**2.5 GO 功能富集分析** 在 DAVID 6.8 数据库中对 PPI 网络中得到 53 个靶点进行 GO 功能富集分析, 共得到 519 条 GO 条目。在这些生物过程里, 根据 FDR 错误控制法 (FDR ≤ 0.05) 确定了 77 个 GO 条目。其中, 这些条目中包含 58 个生物过程的条目, 11 个分子功能的条目, 8 个细胞组成的条目, 主要参与酶结合, 血管生成, 激素调节, 细胞凋亡, 转录调节, 缺氧, 衰老等。见图 2。

**2.6 KEGG 通路富集分析** 利用 David 6.8 数据库对 PPI 网络中 53 个靶蛋白基因进行 KEGG 通路富集分析, 共有 90 条生物通路, 其中错误发现率 FDR ≤ 0.05 的有 46 条。其中包括 Pathways in cancer, Hepatitis B, Colorectal cancer, Proteoglycans in cancer, TNF signaling pathway, Apoptosis, Small cell lung cancer, p53 signaling pathway 等。根据 P 值排序, 前 30 个生物通路见图 3。

**2.7 成分-靶点-信号通路网络构建** 整理炎症相关的成分靶点关联信息及靶点通路关联信息, 并

将关联信息上传至 Cytoscape 3.6.1 软件中, 并利用该软件的合并功能构建双黄连活性成分-作用靶点-信号通路网络图, 见图 4。图中包括成分 36 种, 用三角形表示; 炎症相关靶点 53 个, 用椭圆形表示; 信号通路 30 条, 用长方形表示。筛选出的双黄连候选活性成分的作用靶点分布在不同的信号通路, 相互协调, 通过调控不同的信号通路发挥抗炎作用。

其中, 根据度值前五位的化合物为 HQ2, HQ4, JYH3(β-胡萝卜素, beta-carotene), HQ1(金合欢素, acacetin), HQ9(千层纸素 A, oroxylin A), 见表 3; 度值前五位的靶点为 PTGS2, PTGS1, 诱导型一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, inducible, NOS2), 转录因子 p65 (Transcription factor p65, RELA), 外消旋-α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1), 见表 4。

**3 讨论**

本研究通过网络药理学研究方法, 筛选出双黄连抗炎的 36 个活性成分、53 个交集靶点和 30 条信号通路。通过分析成分-靶点-信号通路网络图发现度值前五位的化学成分为黄芩素、汉黄芩素, β-胡萝卜素, 金合欢素, 千层纸素 A, 可能是双黄连抗炎的物质基础。黄芩素快速抑制肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 的释放, 导致白细胞介素-6 (IL-6) 和一氧化氮的减少发挥抗炎作用<sup>[20]</sup>。黄芩素通过 PI3K / Akt 信号通路, 保护糖尿病心肌病大鼠免受氧化应激和心肌组织炎症的损害<sup>[21]</sup>。汉黄芩素通过抑制一氧化氮, 细胞因子, 趋化因子和生长因子在巨噬细胞中发挥抗炎作用<sup>[22]</sup>。汉黄芩素通过抑制 Akt 磷酸化, 减少中性粒细胞浸润, 促炎细胞因子的产生, 黏附分子

表 2 双黄连化合物-炎症靶点网络中的关键节点及拓扑学性质

| 名称                     | 度值 | 介数        | 名称  | 度值 | 介数        |
|------------------------|----|-----------|---|----|-----------|
| wogonin (HQ2)          | 42 | 0.218 600 | 核受体共激活因子-2  | 25 | 0.081 017 |
| baicalein (HQ4)        | 34 | 0.196 251 | oroxylin a (HQ9)  | 23 | 0.062 818 |
| PTGS2                  | 33 | 0.188 162 | acacetin (HQ1)  | 23 | 0.056 484 |
| beta-sitosterol (JYH6) | 31 | 0.145 091 | beta-carotene (JYH3)  | 21 | 0.128 579 |
| Stigmasterol (JYH7)    | 28 | 0.144 292 | 5, 7, 4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone (LQ11)                     | 21 | 0.138 112 |
| PTGS1                  | 27 | 0.097 916 | 5-hydroxy-7-methoxy-2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)chromone (JYH5) | 20 | 0.017 397 |
| 钠通道蛋白 5 型亚基            | 26 | 0.077 704 | Moslosooflavone (HQ21)  | 20 | 0.022 987 |

表 3 双黄连抗炎成分-靶点-信号网络中化学成分的节点及拓扑学性质 (前 12)

| 名称  | 度值 | 介数           | 名称  | 度值 | 介数           |
|---|----|--------------|---|----|--------------|
| HQ2 (wogonin)                               | 22 | 0.075 037 99 | HQ14 (sitosterol)   | 8  | 0.013 173 15 |
| HQ4 (baicalein)                             | 18 | 0.088 808 78 | JYH5 (5-hydroxy-7-methoxy-2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)chromone) | 8  | 0.009 488 09 |
| JYH3 (beta-carotene)                        | 16 | 0.093 882 41 | HQ23 (5, 7, 4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone)                   | 7  | 0.007 037 15 |
| HQ1 (acacetin)                              | 11 | 0.038 609 35 | HQ8 (Skullcapflavone II)  | 5  | 0.003 037 53 |
| HQ9 (oroxylin A)                            | 9  | 0.023 327 46 | HQ12 (NEOBAICALEIN)   | 5  | 0.003 115 64 |
| HQ11 (5, 7, 4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone) | 8  | 0.009 023 54 | HQ16 (5, 2'-Dihydroxy-6, 7, 8-trimethoxyflavone)                | 5  | 0.002 918 18 |

表4 双黄连抗炎成分-靶点-信号网络中靶点的节点及拓扑学性质(前12)

| 名称    | 度值 | 介数          | 名称    | 度值 | 介数          |
|-------|----|-------------|-------|----|-------------|
| PTGS2 | 36 | 0.219 382 6 | CASP3 | 20 | 0.036 462 7 |
| PTGS1 | 27 | 0.092 066 1 | BCL2  | 19 | 0.032 426 3 |
| RELA  | 24 | 0.038 643 6 | CASP9 | 18 | 0.023 887 1 |
| NOS2  | 24 | 0.068 880 1 | JUN   | 18 | 0.023 679 5 |
| AKT1  | 23 | 0.042 598 6 | TNF   | 18 | 0.017 195 8 |
| TP53  | 21 | 0.033 842 8 | IL6   | 17 | 0.019 894 8 |

表达来治疗急性肺损伤<sup>[23]</sup>。β-胡萝卜素能够抑制活性氧(ROS)介导的炎症信号,并减少炎症介质在感染组织中的表达,包括白细胞介素-8(IL-8),NOS2和环氧化酶-2(COX-2)<sup>[24-25]</sup>。金合欢素通过干扰PI3K / Akt / IKK和MAPK的活化,从而下调巨噬细胞中炎症NOS2和COX-2基因的表达来预防炎症相关肿瘤发生<sup>[26]</sup>。金合欢素通过抑制炎症细胞因子Toll样受体4(TLR4),IL-6和TNF-α的释放,从而减少缺血/再灌注诱导的心肌细胞凋亡,表明其可作为治疗急性冠状动脉综合征患者的新药<sup>[27]</sup>。千层纸素A通过抑制COX-2蛋白的表达,一氧化氮、前列腺素E2的产生来抑制炎症反应<sup>[28]</sup>。以上报道证实了双黄连中黄芩素、汉黄芩素,β-胡萝卜素,金合欢素,千层纸素A五种成分的抗炎活性,我们的研究结果与其一致。度值前五位的靶点为PTGS2、PTGS1、NOS2、RELA、AKT1。PTGS前列腺素内环氧化物合成酶,分为结构型PTGS1和诱导型PTGS2,PTGS1参与机体正常的生理功能;PTGS2作为炎症诱导的氧化应激关键酶,在多种体内因素诱导下生成的主要产物前列腺素,是重要的炎症介质,参与炎症发生的重要环节。NOS2在细胞受到细胞因子或免疫微生物刺激时,催化产生大量一氧化氮,过多的一氧化氮通常会引致炎症、疼痛、免疫紊乱等症状。RELA基因在调控炎症的NF-κB信号通路中起着极其重要的作用<sup>[29]</sup>,但尚未有研究报道双黄连通过对RELA基因的调控来发挥药理作用,因此此结果待进一步确认。AKT1基因调节细胞增殖和生长,参与包括细胞凋亡和葡萄糖代谢在内的细胞过程,AKT1的异常表达与癌症有关<sup>[30]</sup>。除RELA基因外,已有研究<sup>[20-28]</sup>显示其他几个基因与双黄连发挥抗炎作用息息相关。

通过对53个交集靶点的GO功能和KEGG通路富集分析发现,GO功能富集主要表现在对酶和激素的调节、血管生成,细胞凋亡,转录调节等生物过程和分子功能上。KEGG通路富集分析中,很多基因富集到癌症信号通路上如Pathways in cancer,Proteoglycans in cancer,Colorectal cancer,Small cell lung cancer。已有研究表明双黄连中黄芩素通过降低基

质金属蛋白酶2(MMP-2)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)的表达和上调P53途径相关蛋白来抑制结肠癌细胞的增殖<sup>[31-32]</sup>。汉黄芩素能够上调凋亡蛋白的表达,抑制PI3K / AKT和STAT3信号转导途径通过自噬和凋亡细胞死亡抑制结肠癌细胞的生长<sup>[33]</sup>。千层纸素A能使细胞周期停滞在G2 / M期来抑制结肠癌的发展<sup>[34]</sup>。目前,未曾有双黄连治疗小细胞肺癌的报道,此结果有待进一步临床验证。在Hepatitis B信号通路中,Guo等<sup>[35]</sup>研究发现双黄连中黄芩素可显著抑制乙型肝炎病毒DNA聚合酶,在体内和体外均具有抗乙型肝炎病毒的活性。本研究可能为其治疗乙型肝炎进一步的分子机制研究提供了基础。本研究显示,还有一些基因富集到了Apoptosis信号通路,p53 signaling pathway,TNF signaling pathway中。李彦林等<sup>[36]</sup>研究发现双黄连通过引起细胞凋亡的途径来抑制大鼠白血病细胞增殖。双黄连中汉黄芩素和黄芩素降低抗凋亡因子B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的表达,通过p53依赖性方式通过人结肠癌细胞的Akt激活诱导凋亡<sup>[37]</sup>。汉黄芩素具有抑制肿瘤细胞生长,诱导细胞凋亡和抑制血管生成的能力,其分子机制涉及活性氧,Ca<sup>2+</sup>,NF-κB,肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体和肿瘤坏死因子<sup>[38]</sup>。在激素相关的信号通路Thyroid hormone signaling pathway和Estrogen signaling pathway中,有结果表明双黄连中黄芩素通过诱导凋亡和自噬来抑制未分化的甲状腺癌细胞的生长<sup>[39]</sup>。但未见双黄连通过调节甲状腺激素发挥作用的报道,因此此结果仍需进一步验证。双黄连中汉黄芩素通过抑制雌激素受体和刺激内皮细胞中一氧化氮和NOS2的表达而发挥抗炎作用<sup>[40]</sup>。此项结果显示双黄连通过抑制雌激素受体来发挥抗炎作用。

综上所述,由于中药发挥药效通过多成分、多靶点、多途径的特点,本研究通过网络药理学思路,对双黄连的复杂网状关系进行分析。预测了双黄连的主要药效成分、潜在作用靶点和机制,对双黄连进一步的分子机制研究具有参考价值。然而,由于化合物筛选没有考虑到量的影响和配伍变化,获取信息的数据库不全面性和滞后性,本研究存在一定的局限性。

(本文图1~4见插图3-1)

## 参考文献

- [1] SHEN X,ZHAO Z,WANG H, et al.Elucidation of the anti-inflammatory mechanisms of Bupleuri and Scutellariae Radix using system pharmacological analyses[J].Mediators Inflamm,2017,2017: 3709874.DOI:10.1155/2017/3709874.
- [2] 黄朋,方恋,陈波,等.重症肺炎患者血清降钙素原、C-反应蛋白、D二聚体及炎症因子水平变化及其临床意义[J].安徽医

- 药, 2018, 22(3): 478-482.
- [3] 韩孝先, 刘泽宇, 周庆彪, 等. 线粒体在炎症调控中的作用研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(6): 467-470.
- [4] 刘文斌, 曹广文. 癌症进化发育学: 基于炎-癌转化研究的新学说[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 103-111.
- [5] 殷媛, 王成, 戴欣, 等. 肠炎和肠炎相关结肠癌 miRNA 表达检测及生物信息学分析[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(11): 916-921.
- [6] 李聪, 李鹏, 纪春草, 等. “武当二号金银花”和“武当三号金银花”不同药用部位中木犀草素的含量测定[J]. 安徽医药, 2019, 23(7): 1320-1323.
- [7] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [8] 史志辉, 肖会敏, 何悦, 等. 皮肤病病毒片制备中 7 种成分转移率研究[J]. 安徽医药, 2017, 21(7): 1204-1209.
- [9] 郭洁, 宋殿荣. 双黄连的药理作用和临床应用及不良反应研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(21): 161-163.
- [10] WANG HW, LI HL, CHEN FQ, et al. Baicalin extracted from Huangqin (*Radix Scutellariae Baicalensis*) induces apoptosis in gastric cancer cells by regulating B cell lymphoma (Bcl-2)/Bcl-2-associated X protein and activating caspase-3 and caspase-9[J]. J Tradit Chin Med, 2017, 37(2): 229-225.
- [11] LEE SE, LIM C, AHN SC, et al. A study of the anti-cancer effects of the hexane fraction of the methanol extract of *Forsythiae Fructus* [J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(52): 719-724.
- [12] 王文娟, 任欢欢, 韩吉春, 等. 黄芩苷抗脑缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 113-116.
- [13] 韦明婵, 林江, 莫明月, 等. 网络方剂学特征的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 218-224.
- [14] 王忠, 陈寅莹, 张盈颖, 等. 多组分多靶点中药药理作用机制研究中的问题和解决策略[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 1-6.
- [15] 蔡甜甜, 潘华峰, 王奇, 等. 中药复方在病证基础上的网络药理学研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4746-4748.
- [16] 薛潇春, 胡晋红. 网络药理学的方法与应用进展[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 401-405.
- [17] 周文霞, 王同兴, 程肖蕊, 等. 网络药理学研究中的网络构建技术[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(5): 797-812.
- [18] 章亮, 陈泽慧, 陈韩英, 等. 基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(3): 646-657.
- [19] 赵金龙, 汤顺莉, 陈国铭, 等. 基于系统药理学的葛根苓连汤治疗 2 型糖尿病作用机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 199-209.
- [20] XIANG L, HU YF, WU JS, et al. Semi-mechanism-based pharmacodynamic model for the anti-inflammatory effect of baicalin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 793.
- [21] MA L, LI XP, JI HS, et al. Baicalin protects rats with diabetic cardiomyopathy against oxidative stress and inflammation injury via phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT pathway[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5368-5375.
- [22] LEE JY, PARK W. Anti-inflammatory effect of wogonin on RAW 264.7 mouse macrophages induced with polyinosinic-polycytidylic acid[J]. Molecules, 2015, 20(4): 6888-6900.
- [23] YEH YC, YANG CP, LEE SS, et al. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is inhibited by wogonin in mice via reduction of Akt phosphorylation and RhoA activation[J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(2): 257-263.
- [24] ZHOU LH, OUYANG L, LIN SZ, et al. Protective role of  $\beta$ -carotene against oxidative stress and neuro inflammation in a rat model of spinal cord injury[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61: 92-99.
- [25] KANG H, KIM H. Astaxanthin and  $\beta$ -carotene in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Inflammation: A Mini-review on Action Mechanisms[J]. J Cancer Prev, 2017, 22(2): 57-61.
- [26] PAN MH, LAI CS, WANG YJ, et al. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(10): 1293-1303.
- [27] LIU H, YANG L, WU HJ, et al. Water-soluble acacetin prodrug confers significant cardioprotection against ischemia/reperfusion injury[J]. Sci Rep, 2016, 6: 36435. DOI: 10.1038/srep36435.
- [28] SHIMIZU T, SHIBUYA N, NARUKAWA Y, et al. Synergistic effect of baicalin, wogonin and oroxylin A mixture: multistep inhibition of the NF-kappa B signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of *Scutellaria* root flavonoids[J]. J Nat Med, 2018, 72(1): 181-191.
- [29] PARKER M, MOHANKUMAR K, PUNCHIHEWA C, et al. C11orf95 - RELA fusions drive oncogenic NF-kB signalling in ependymoma[J]. Nature, 2014, 506(7489): 451-455.
- [30] LI J, SU W, ZHANG S, et al. Epidermal growth factor receptor and AKT1 gene copy numbers by multi-gene fluorescence in situ hybridization impact on prognosis in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2015, 106(5): 642-649.
- [31] CHAI YX, XU JH, YAN BJ. The anti-metastatic effect of baicalin on colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2317-2323.
- [32] CHEN Z, HOU RZ, GAO SH, et al. Baicalin inhibits proliferation activity of human colorectal cancer cells HCT116 through downregulation of Ezrin[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(5): 2035-2046.
- [33] TAN H, LI X, YANG WH, et al. A flavone, Wogonin from *Scutellaria baicalensis* inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells by inducing of autophagy, apoptosis and G2/M cell cycle arrest via modulating the PI3K/AKT and STAT3 signalling pathways[J]. J BUON, 2019, 24(3): 1143-1149.
- [34] NI T, HE ZH, DAI YY, et al. Oroxylin A suppresses the development and growth of colorectal cancer through reprogram of HIF1 $\alpha$ -modulated fatty acid metabolism[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2865. DOI: 10.1038/cddis.2017.261.
- [35] GUO QL, ZHAO L, YOU QD, et al. Anti-hepatitis B virus activity of wogonin in vitro and in vivo[J]. Antiviral Res, 2007, 74(1): 16-24.
- [36] 李彦林, 周云丰, 李琳, 等. 双黄连注射液及其中间品对 RBL-2H3 细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 116-119.
- [37] KIM SJ, KIM HJ, KIM HR, et al. Antitumor actions of baicalin and wogonin in HT-29 human colorectal cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(6): 1443-1449.
- [38] WU X, ZHANG HJ, SALMANI J MM, et al. Advances of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, for the treatment of multiple tumors[J]. OncoTargets Ther, 2016, 9: 2935-2943.
- [39] WANG M, QIU S, QIN J. Baicalin induced apoptosis and autophagy of undifferentiated thyroid cancer cells by the ERK/PI3K/AKT pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3341-3352.
- [40] OCHE B, CHEN L, MA YK, et al. Cryptotanshinone and wogonin up-regulate eNOS in vascular endothelial cells via ER $\alpha$  and down-regulate iNOS in LPS stimulated vascular smooth muscle cells via ER $\beta$ [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(2): 249-258.