

引用本文:吴波,袁丽萍,朱德发.基于网络药理学及分子对接技术探讨大黄治疗急性胰腺炎的可能分子机制[J].安徽医药,2023,27(6):1103-1106.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.06.010.

◇ 药学研究 ◇



基于网络药理学及分子对接技术探讨大黄治疗急性胰腺炎的可能分子机制

吴波¹,袁丽萍^{2a},朱德发^{2b}

作者单位:¹中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)急诊医学科,安徽 合肥 230001;

²安徽医科大学第一附属医院,^a儿科,^b老年内分泌科,安徽 合肥 230022

通信作者:朱德发,男,主任医师,博士生导师,研究方向为内分泌,Email:Zdfa0168@sina.com

摘要: **目的** 应用现代网络药理学和分子模拟对接技术探索大黄在急性胰腺炎治疗中的作用机制。**方法** 2021年10月至2022年2月,从TCMSP数据平台检索提取大黄有效成分和药物靶标;Genecards、DisGeNET等数据平台检索提取急性胰腺炎的相关靶标。取得相关靶标的交集,以String数据库构造蛋白质作用网络,并找出关键靶点。R软件中“AnnotationHub”数据包对交集靶点进行交集基因本位(GO)及基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。Cytoscape软件建立药物-疾病靶点网络,并得到主要作用成分;Autodock Vina分析出主要作用成分与关键靶点的结合能。用Pymol软件对关键蛋白和主要成分进行分子对接。**结果** 共得到16个药物活性成分和62个药物靶点;疾病相关靶点7 111个,其中交集靶点55个。其中 β -谷甾醇、芦荟大黄素可能为主要有效成分;关键靶标为胱天蛋白酶8(CASP8)、胱天蛋白酶-3(caspase-3)、细胞周期蛋白依赖性抑制激酶1A(CDKN1A)、肿瘤蛋白p53(TP53)、原癌基因蛋白(JUN)、原癌基因蛋白(MYC)、热休克蛋白90 α (HSP90AA1)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)。通过分子对接显示 β -谷甾醇、芦荟大黄素与HSP90AA1、PTGS2、caspase-3等蛋白展现出较好的结合活性。**结论** 大黄可能通过其关键活性成分芦荟大黄素、 β -谷甾醇等成分与HSP90AA1、PTGS2等靶蛋白相结合进而发挥对急性胰腺炎的治疗作用。

关键词: 大黄属; 胰腺炎; 芦荟; 谷甾醇; HSP90热休克蛋白质类; 前列腺素内过氧化物合酶类; 网络药理学; 分子对接

Investigating the possible molecular mechanism of Rhubarb in the treatment of acute pancreatitis based on network pharmacology and molecular docking techniques

WU Bo¹,YUAN Liping^{2a},ZHU Defa^{2b}

*Author Affiliations:*¹Department of Emergency Medicine, First Affiliated Hospital, University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei, Anhui 230001, China;^{2a}Department of Pediatrics,

^{2b}Department of Geriatrics Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Rhubarb in treating acute pancreatitis (AP) based on modern network pharmacology and molecular docking techniques.**Methods** From October 2021 to February 2022, the effective ingredients of Rhubarb and drug targets were retrieved from the TCMSP database; the relevant targets of acute pancreatitis were collected from Genecards, DisGeNET, and other databases. The intersection of the appropriate targets was acquired. The protein interaction network in accordance with the String Database was constructed to locate the critical target. The GO and KEGG pathway enrichment on the intersecting targets were analyzed by the "AnnotationHub" package in R software. Cytoscape software was used to build the drug-disease target network and obtain the main components. Autodock Vina analyzed the significant components' binding energy and the key targets. The molecular docking of critical proteins and major components was performed by Pymol software.**Results** A total of 16 drug active ingredients and 62 drug targets were retrieved; 7111 disease-related targets, including 55 intersecting targets, were collected. The β -sitosterol and aloe-rhodopsin may be the main practical components; the key targets were CASP8, caspase-3, CDKN1A, TP53, JUN, MYC, HSP90AA1, PTGS2, and so forth. Molecular docking indicated that β -sitosterol and aloe-rhodopsin showed good binding activity with the proteins such as HSP90AA1, PTGS2, caspase-3.**Conclusion** Rhubarb may exerts its therapeutic effects on acute pancreatitis through binding of its key active components such as aloe-rhodopsin and β -sitosterol to the target proteins like HSP90AA1 and PTGS2.

Key words: Rheum; Pancreatitis; Aloe; Sitosterols; HSP90 Heat-shock proteins; Prostaglandin-endoperoxide synthases; Network pharmacology; Molecular docking

急性胰腺炎的西医治疗手段包括药物和手术治疗,其中药物治疗以抑制胰酶、维持循环和内环境、预防感染等为主。结合传统中医药可以提高对该病治疗的有效率,改善病人的临床症状、降低并发症的发生^[1-2]。其中治疗该病常用的中药主要有大黄、芒硝等,但是其作用机制尚未明确。

因为网络药理学可广泛应用于中药活性化合物发掘、整体作用机制阐释等方面^[3];分子对接技术可将化合物配体与蛋白受体模拟结合,预测其作用模式及结合能,进而实现药物的筛选与设计^[4-5]。所以,本研究采用网络药理学方法和分子模拟对接技术,探讨中药大黄在急性胰腺炎治疗中产生作用的有效成分和可能的分子作用机制。

1 资料与方法

1.1 检索大黄活性成分和药物靶标 2021年10月至2022年2月,以“大黄”为检索词,在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, <https://old.tcmsp-e.com/>)检索,以OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18为切点筛选有效成分^[3,6]。随后在该平台汲取有效成分相映射的基因靶标,通过比对 Universal Protein 平台数据(<https://www.uniprot.org/>),得到靶标基因简称。

1.2 检索疾病靶标 从 Genecards(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)、OMIM(<https://www.omim.org/>)、pharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)数据库中以“Acute pancreatitis”为检索词检索。

1.3 获取大黄-急性胰腺炎交集靶标 通过上述步骤得到药物靶标与疾病靶标取交集,绘制可视化的韦恩(Venn)图。

1.4 PPI网络的构建和关键靶标的获取 于String(<https://string-db.org/>)平台中,导入交集靶标,物种选择人类,得到蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)。然后通过 Cytoscape(3.8.2版)插件 CytoNCA 进行拓扑分析,计算网络中各节点的度中心性(DC)、接近中心性(CC)、介数中心性(BC)、特征向量中心性(EC)、局部连通性(LAC)、网络中心性(NC),找出关键靶标^[7]。

1.5 药物成分-疾病靶标网络的构建 Cytoscape 程序中输入前面得到的药物成分及交集靶标,构建“大黄活性成分-疾病靶标”网络,并剔除孤项,后选择插件 CytoNCA 计算节点度值,找出关键有效成分。

1.6 基因富集分析及可视化 交集基因本位(GO)功能富集分析、京都基因与基因组百科全书

(KEGG)通路富集分析,通过 R 软件“Annotation-Hub”“ggplot2”数据包运行并可视化。

1.7 分子对接及可视化 从 PubChem 平台(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索下载大黄成分的 2D 结构文件。运用 ChemOffice2014 处理后导出 3D 结构。从 PDB 数据平台(<http://www.rcsb.org>)获取关键蛋白 HSP90AA1(PDB ID 5J27)、caspase-3(PDB ID 1CP3)、CASP8(PDB ID 1F9E)、PTGS2(PDB ID 5F19)的 3D 结构文件,利用 Pymol 软件对 3D 结构去水分子等处理。再用 Autodock Tools 4.0 软件中“add hydrogen”命令对 3D 结构进行加氢处理。以 Autodock Vina 将处理后的药物 3D 结构与蛋白 3D 结构进行分子模拟对接,计算结合能。取结合能最低构象结果,导入 Pymol 进行可视化。

2 结果

2.1 大黄活性成分及作用靶标 共筛选活性成分 16 种(表 1)。数据库预测、删除重复项后,共得到 62 个大黄潜在作用靶标。包括:雄激素受体(AR),B 细胞淋巴瘤基因 2(BCL2),BCL2 相关 X 蛋白(BAX),乙酰胆碱 M3 受体(CHR3),乙酰胆碱 M1 受体(, CHR1),乙酰胆碱 M4 受体(CHR4),尼古丁性乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 亚型(CHRNA7),半胱氨酸蛋白酶 9(CASP9),胱天蛋白酶-3(caspase-3),CASP8,凝血因子 X(F10),凝血酶原(F2),PTGS2,凝血因子 VII(F7),雌激素受体 2(ESR2),二肽酰胺酶 4(DPP4),HSP90AA1,胰蛋白酶原 1(PRSS1),核受体共激活因子 2(NCOA2),DNA 拓扑异构酶 II α (TOP2A),钙/钙调素依赖激酶 MT(CAMKMT),钠离子通道 α 亚单位 5(SCN5A),血管内皮生长因子受体 2(KDR),过氧化物酶体素 H2 合酶 1(PTGS1),醛糖还原酶 1(AKR1B1),JUN,雌激素受体 1(ESR1),检查点激酶 1(CHEK1),蛋白激酶 A α 催化亚单位(PRKACA)微管相关蛋白 2(MAP2),蛋白激酶抑制剂 α (PKIA),免疫球蛋白 G1(IGHG1),CDKN1A,真核翻译起始因子 6(EIF6),肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 6(TNFAIP6),TP53,脂肪酸合酶(FASN),蛋白激酶 C ϵ (PRKCE),细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1),蛋白质紫外线过度表达诱导因子(PCNA),MYC,白细胞介素(IL)-1 β ,蛋白激酶 C δ (PRKCD),细胞周期蛋白 B1(CCNB1),二肽酶 1(DPEP1),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG),一氧化氮合酶 2(NOS2),克鲁伯因子 7(KLF7)。

2.2 急性胰腺炎疾病相关靶标 筛选了急性胰腺炎的相关基因靶标,其中 Genecards、DisGeNET、OMIM、DrugBank、PharmGkb 数据库分别得到 6 989、435、69、6、121 个靶标,合并去重后共得到 7 111 个

表1 大黄活性成分表

MoL ID	成分	OB/%	DL
MOL002235	泽兰黄醇	50.80	0.41
MOL002251	柠黄质	48.64	0.61
MOL002259	大黄素甲醚双葡萄糖苷	41.65	0.63
MOL002260	原花青素 B-5,3'-O-没食子酸酯	31.99	0.32
MOL002268	大黄酸	47.07	0.28
MOL002276	番泻苷 E _{qt}	50.69	0.61
MOL002280	决明素乙酰-8-O-β-D-(6'-草酰)-葡萄糖苷	43.02	0.74
MOL002281	决明内酯	46.46	0.24
MOL002288	大黄素-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	44.81	0.80
MOL002293	番泻苷 D _{qt}	61.06	0.61
MOL002297	胡萝卜苷 _{qt}	35.89	0.70
MOL002303	掌叶大黄二蒽酮 A	32.45	0.65
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75
MOL000471	芦荟大黄素	83.38	0.24
MOL000554	没食子酸-3-O-(6'-O-没食子酰)-葡萄糖苷	30.25	0.67
MOL000096	(-)-儿茶素	49.68	0.24

注:OB为口服生物利用度,DL为类药性,MoL ID为分子在TCMSP数据库中编号。

作用靶标。

2.3 大黄-急性胰腺炎交集靶标 综合分析药物和疾病靶标,发现大黄与急性胰腺炎相关交集靶标共55个,包括 NOS2, AR, F10, PTGS2, F7, TOP2A, ESR2, DPP4, HSP90AA1, PRSS1, NCOA2, F2, SCN5A, KDR, PPARG, PTGS1, AKR1B1, JUN, ESR1, CHEK1, PRKACA, PGR, KCNH2, DRD1, CHRM3, CHRM1, ADRA1A, CHRM2, ADRB2, CHRNA2, SLC6A4, OPRM1, CHRNA7, BCL2, BAX, CASP9, caspase-3, CASP8, PRKCA, PON1, MAP2, CDKN1A, EIF6, TNFAIP6, TP53, FASN, PRKCE, CDK1, PCNA, MYC, IL-1β, PRKCD, CCNB1, DPEP1, PPARG3。见图1。

2.4 PPI构建 STRING库中导入55个交集靶标生成的PPI包含55个节点288条边,见图2A。通过计算得到各节点的相关参数,其中BC中位数为13.50,CC中位数为0.46,DC中位数为16,EC中位数为0.08,LAC中位数为8.5,NC中位数为9.21。筛选出参数均大于中位数的节点并定义为核心基因靶点,随后进行拓扑分析,共提取到节点18个(见图2B黄色部分)。然后以上述方法再次拓扑分析,提取核心节点8个,分别为 CASP8、HSP90AA1、caspase-3、TP53、MYC、CDKN1A、JUN、PTGS2。以此作为下一步分析的核心靶标(图2C)。

2.5 “大黄有效成分-交集靶标”网络 度值分值高的潜在有效活性成分为β-谷甾醇(MOL000358)、芦荟大黄素(MOL000471)、泽兰黄醇(MOL002235),见图3。

2.6 富集分析 GO分析结果包括3项:生物过程(BP)结果1626条、细胞组分(CC)结果64条、分子功能(MF)结果160条,以P.adjust<0.01筛选差异结果,每项可视化差异显著的前10位结果。KEGG结果119条,以P.adjust<0.01筛选差异结果,并可视化前30条结果。可视化均以条形图表示。

GO分析提示,其参与的生物过程包括:细胞对药物的反应、节律过程、对氧水平的反应等;细胞组分包括膜筏、膜微区、膜区等;分子功能包括:核受体活化、转录因子活化,直接配体调控序列特异性脱氧核糖核酸(DNA)结合、乙酰胆碱受体活化等,见图4。KEGG富集通路包括p53信号通路、乙型肝炎、小细胞肺癌等,见图5。

2.7 分子对接 选取有效成分度值最高的β-谷甾醇、芦荟大黄素及与之对应的关键蛋白通过Autodock Vina 计算结合能(表2),可视化结果见图6。

表2 大黄活性成分与关键蛋白结合能/kcal/mol

关键蛋白	芦荟大黄素	β-谷甾醇
caspase-3	-7.7	-8.5
CASP8		-9.0
HSP90AA1	-9.4	-7.7
TP53		-7.3
MYC	-6.7	
CDKN1A	-7.6	
JUN	-7.6	-6.8
PTGS2	-9.1	

3 讨论

大黄是治疗急性胰腺炎的传统中医药物,既可以单独使用,也可以联合使用。大黄进行口服或鼻饲可以缩短病人的腹部症状的持续时间、大便再通时间以及血和尿淀粉酶恢复时间,并降低IL-8、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平以及死亡率^[1-2]。

大黄用以治疗胰腺炎时发挥治疗效果的活性成分,可能包括芦荟大黄素、泽兰黄醇、大黄酸、β-谷甾醇、决明内脂、儿茶素等^[8]。其中,芦荟大黄素可下调AP大鼠血清中血小板激活因子、IL-6、TNF-α浓度;调节Treg/Th17免疫细胞比例发挥治疗作用^[2,9]。β-谷甾醇作为植物甾醇,具有降低血脂水平、退热消炎、抗氧化应激、抗肿瘤、增强免疫系统等作用^[10-11]。决明内脂能抑制细菌中遗传物质的生物合成,对孢子菌、地丝菌等真菌有较强的抑制作用,同时可降血压、调血脂^[12]。儿茶素可产生H₂O₂,上调katB、sodM等基因,减轻氧化应激和DNA受损对细胞的损伤^[12]。泽兰黄醇具有明显的抗炎及神经细胞保护作用^[13]。大黄酸可通过抑制核因子κB

信号通路降低血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子的浓度,抑制炎症活化因子转录,改善炎症反应引起的血管并发症^[14]。

本研究进一步通过GO和KEGG分析后发现,大黄活性成分可能与分布在细胞不同部位的受体相互作用,进而参与多种生物过程、调控多种通路发挥作用。通过PPI,我们发现CASP8、HSP90AA1、caspase-3、TP53、MYC、CDKN1A、JUN、PTGS2可能是大黄治疗急性胰腺炎的关键蛋白。其中芦荟大黄素可能与CASP8、HSP90AA1、MYC、CDKN1A、JUN、PTGS2受体蛋白相互作用; β -谷甾醇可能与CASP8、HSP90AA1、caspase-3、TP53、JUN受体蛋白相互作用;且二者的分子对接能均<-5 kcal/mol。结合能表示蛋白受体与化合物结合是否稳定,结合能越低,结合活性越强。热休克蛋白(HSP)广泛存在各种生物细胞当中,当应激发生时,HSP可大量表达,起到抗炎、抗细胞凋亡及抗氧化作用。急性胰腺炎中HSP90的升高是诱发应激性溃疡的危险因素^[15]。HSP90AA1可以调节TNF- α 和IL-6水平,且有研究提示,抑制HSP90AA1表达,可降低小鼠体内巨噬细胞炎症小体活性,减少炎症因子分泌^[16]。PTGS2又称环氧合酶2(COX-2),调控其表达的水平可以改善疾病的炎症症状^[17]。COX-2高表达与急性胰腺炎发生相关,COX-2抑制剂可降低炎症细胞因子水平,进而减轻全身炎症反应并预防重症胰腺炎的发生^[18]。JUN参与激活蛋白-1复合物的形成,后者可被大黄抑制,进而减少炎症因子TNF- α 、IL-6生成,发挥治疗作用^[19]。Tp53基因参与细胞凋亡,AP可致胰腺TP53表达量上调,加速了胰腺细胞坏死凋亡^[20]。胱天蛋白酶8是TNF超家族成员,可与细胞膜表面的死亡受体信号通路结合形成多蛋白死亡诱导信号复合物,进而激活下游的凋亡执行因子caspase-3,诱导外源性刺激所致的细胞凋亡。AP小鼠肠道中caspase-3表达升高,大黄素可以下调该蛋白的表达,参与调节AP引起的肠道损伤^[21]。

综上所述,大黄治疗AP的作用机制可能与其活性成分芦荟大黄素、 β -谷甾醇等与靶蛋白(HSP90AA1、PTGS2、CASP8、caspase-3等)相互结合,进而通过多种途径发挥生物学作用。

(本文图1~6见插图6-4)

参考文献

- [1] 翁文辉. 中药大黄在重症急性胰腺炎治疗中的疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(11): 194-195.
- [2] 周雪珂, 刘春燕, 刘鸿雁. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的研究进展[J]. 四川中医, 2021, 39(5): 217-219.
- [3] 赵安兰, 许婧余, 姚亭屹, 等. 基于网络药理学及分子对接技

术探讨初期复方治疗新型冠状病毒肺炎分子机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(3): 202-208, 221.

- [4] 关宏伟, 徐丽君, 董慧. 反向分子对接技术在中药作用靶点预测、有效成分筛选及作用机制探索中的应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4537-4541.
- [5] 谢敏子, 钟彩婷, 纪树亮, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的分子机制[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 28-35.
- [6] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [7] 赵宇浩, 姚文强, 郑亚威, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨芦黄颗粒治疗冠心病动脉粥样硬化的作用机制[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(10): 97-104.
- [8] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [9] 伍洋, 刘英, 刘济滔, 等. 大黄素对重症急性胰腺炎小鼠Treg/Th17平衡的影响及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(5): 617-621.
- [10] 万星, 李相国, 李修贤, 等. Beta-谷甾醇通过抑制TNF- α -NF- κ B和T β R1-Smad2/3信号通路抗小鼠肝纤维化损伤[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(1): 75-80.
- [11] 孙玉成, 刘晓巍, 片光哲. β -谷甾醇诱导人胃癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 866-871.
- [12] 朱茜, 龙再菊. 基于网络药理学探讨大黄牡丹汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(12): 1775-1780.
- [13] HATTORI T, FUJITSUKA N, KUROGI A, et al. [Effect of Onpito (TJ-8117) on TGF- β 1 in rats with 5/6 nephrectomized chronic renal failure][J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1996, 38(11): 475-483.
- [14] ZHOU YX, XIA W, YUE W, et al. Rhein: a review of pharmacological activities [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 578107. DOI: 10.1155/2015/578107.
- [15] 王生锋, 祁绍艳. 急性胰腺炎患者血清HSP70、HSP90水平与应激性溃疡的相关性[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(2): 222-225.
- [16] CHOUDHURY A, BULLOCK D, LIM A, et al. Inhibition of HSP90 and activation of HSF1 diminish macrophage NLRP3 inflammasome activity in alcohol-associated liver injury[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2020, 44(6): 1300-1311.
- [17] LI XH, LIU YR, JIANG DH, et al. Research on the mechanism of Chinese herbal medicine Radix Paeoniae Rubra in improving chronic pelvic inflammation disease by regulating PTGS2 in the arachidonic acid pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110052. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110052.
- [18] 黄志寅, 金泓宇, 马骁, 等. 环氧合酶-2抑制剂预防重症急性胰腺炎的理论与实践[J]. 现代预防医学, 2021, 48(2): 359-362, 381.
- [19] 冯珍, 熊文坚, 金飞, 等. 大黄对重症急性胰腺炎大鼠AP-1活性的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(49): 28-29.
- [20] ZHAN L, PU J, HU Y, et al. Uncovering the pharmacology of Xiaochaihu Decoction in the treatment of acute pancreatitis based on the network pharmacology [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6621682. DOI: 10.1155/2021/6621682.
- [21] ZHOU Q, XIANG H, LIU H, et al. Emodin alleviates intestinal barrier dysfunction by inhibiting apoptosis and regulating the immune response in severe acute pancreatitis [J]. Pancreas, 2021, 50(8): 1202-1211.

(收稿日期: 2022-02-17, 修回日期: 2022-04-16)