

· 方药研究 ·

药对“虎杖-土茯苓”治疗痛风性关节炎的网络药理学研究

刘 强¹ 张开伟^{2*}

摘要 目的:采用网络药理学、分子对接技术预测药对“虎杖-土茯苓”治疗痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)的潜在机理。方法:利用TCMSP平台检索收集药对化学成分、对应靶点;借助五大疾病数据库获取GA已知靶点;利用Venny 2.1.0得到药对与GA两者间的交集靶点;运用SRTING数据库、CytoHubba插件构建交集靶点PPI网络;采用DAVID平台对交集靶点进行GO、KEGG通路富集分析;最后将筛选出的核心成分、关键靶点进行分子对接。结果:共获得23个化学成分,199个靶点,其中治疗GA的潜在靶点有76个。预测得知核心成分为槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇,关键靶点为JUN、TNF、RELA、IL6。GO功能富集分析显示,药对治疗GA的生物功能共287个(生物过程172个、细胞组分42个、分子功能73个);KEGG通路富集共筛选出信号通路共122条。分子对接结果显示,槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇与JUN、TNF有良好的结合活力。结论:药对“虎杖-土茯苓”通过槲皮素、木犀草素等成分,作用于JUN、TNF等靶点,在癌症通路、TNF信号通路等通路的参与下,发挥了抗炎、抗凋亡等治疗GA的作用。

关键词 网络药理学;分子对接;虎杖;土茯苓;痛风性关节炎

痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)是常见的关节炎性病变,与嘌呤异常代谢/尿酸排泄障碍有关,以受累关节发生急性晶体滑膜炎为典型特征^[1]。流行病学调查显示,全球GA的患病率呈逐年增长的趋势^[2],目前临床一线药物长期服用均有不同程度的不良反应,如不加以控制,则会严重影响患者的生活质量,甚至致残。因此,“治未病”“整体观”“辨证审因”等中医理念则显得格外重要。相关研究显示,中医药在治疗GA方面具有效果独特、成本低且安全性高等多项优势,为GA的防治做出了独特贡献^[3]。

虎杖源自蓼科植物虎杖的根茎及根,味苦、性微冷,入肝、胆、肺经,以解毒镇痛、祛风利湿为功效,现代研究表明虎杖治疗GA具有确切的疗效^[4];土茯苓源自百合科植物土茯苓的根茎,味甘、淡,性平,入肝、胃经,以除湿止痛、解毒利关节见长,善治筋骨挛痛,为临床防治GA的常用中药^[5]。一项中医药防治GA的临床用药规律研究显示“虎杖-土茯苓”两味药物为治疗

GA的常见核心药物组合之一^[6],但该药对潜在作用机理及核心成分尚未完全清楚。因此,本研究选取药对“虎杖-土茯苓”,基于网络药理学多中心-多途径的思路,预测该药对治疗GA的潜在作用机理,以期为该药对治疗GA的后期实验研究提出科学理论支撑,丰富中医药治疗GA的现代药理内涵。

1 资料及方法

1.1 数据库及软件工具 如表1所示。

1.2 化学成分及靶基因的获取 在中药药理学分析平台(TCMSP)中,分别以虎杖、土茯苓为检索词,将挑选标准设置为OB(%) \geq 30, DL \geq 0.18;获取满足标准的化学成分及其对应的蛋白靶点。在Uniprot数据库中查询并获得蛋白靶点的对应靶基因名称,在Cytoscape 3.7.2中构建“药物-活性成分-靶点”图。

1.3 GA相关靶标预测 选择GeneCards、OMIM、DisGeNET、Drugbank、CTD数据库,以“gouty arthritis”或“GA”为关键词,检索GA的相关靶标基因,整理并删除重复项。通过Venny 2.1.0绘制药对靶点与GA靶点韦恩图,取交集靶点,并将其视为该药对治疗GA的潜在作用靶点。

▲通讯作者 张开伟,男,医学博士,教授,博士研究生导师。研究方向:中医药防治骨与关节退行性疾病。E-mail: zkw1973@aliyun.com
 *作者单位 1. 贵州中医药大学研究生院(贵州 贵阳 550025); 2. 贵州中医药大学第一附属医院(贵州 贵阳 550001)

表1 数据库及软件工具

数据库名称	网址	数据分析软件
TCMSP	https://lsp.nwu.edu.cn/tcmssp.php	Cytoscape 3.7.2
Uniport	https://www.uniprot.org	CytoHubba 插件
GeneCards	https://www.genecards.org/	R 语言 4.0.2 软件
OMIM	https://www.omim.org	Autodock 4.2.6 分子对接软件
DisGeNET	https://www.disgenet.org	Pymol 2.0.1 可视化软件
Drugbank	https://go.drugbank.com/	
CTD	https://ctdbase.org/	
STRING	https://string-db.org	
DAVID	https://david.ncifcrf.gov/	
Venny 2.1.0	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html	
PDB	https://www.rcsb.org/	

1.4 构建“化学成分-交集靶点”网络图 整合 1.3 中交集靶点所映射出的化学成分, 选用 Cytoscape 3.7.2 构建“化学成分-交集靶点”关系图, 以便阐明“虎杖-土茯苓”化学成分与 GA 靶点间的联系。使用 Network Analyzer 功能, 以度值(Degree)为衡量标准, 评估关系网络中治疗 GA 的核心化学成分。

1.5 蛋白质相互作用(PPI)的构建 在 STRING 数据库中输入交集靶点, 物种限定为“人类”, 筛选阈值条件为 >0.900, 创建蛋白互作网络(PPI)。将 tsv 格式数据导入 Cytoscape 3.7.2, 利用 CytoHubba 插件分析数据。

1.6 基因富集分析 DAVID 平台对交集靶点进行

GO、KEGG 通路富集分析($P < 0.05$), 将排名前 10 的 GO、排名前 20 的 KEGG 导入 R 语言 4.0.2 可视化; 筛选排名前 20 通路所对应核心靶点, 依托 Cytoscape 3.7.2 绘制“核心靶点-通路”图。

1.7 分子对接 运用分子对接技术预测分析核心化合物作用于核心靶点的结合活力。在 TCMSP 平台下载核心化合物 mol 2 格式 3D 结构; 在 PDB 数据库下载关键靶点蛋白结构; Autodock 4.2.6 对两者进行分子对接; 利用 Pymol 2.0.1 进行可视化处理。

2 结果

2.1 “虎杖-土茯苓”活性成分及靶基因 通过 TCMSP 平台挑选出“虎杖”治疗 GA 的有效活性成分 10 个, 相应靶点 168 个; “土茯苓”治疗 GA 的有效成分 15 个, 相应靶点 177 个, 两者共同拥有有效活性成分为槲皮素和 β -谷甾醇, 去重后靶基因共 199 个(见表 2)。利用 Cytoscape 3.7.2 构建包括 220 个节点、534 条边的“药物-活性成分-靶点”网络图(见图 1)。

2.2 GA 相关靶点 五大疾病数据库共筛选出 GA 已知疾病靶点 823 个, 取交集后获得交集靶点 76 个(见图 2), 这些交集靶点可能是“虎杖-土茯苓”治疗 GA 的潜在靶点。构建“化学成分-交集靶点”网络图(见图 3), 左侧菱形代表交集靶点, 右侧圆形代表对应药效化合物, 共 17 个。本研究将“化学成分-交集靶点”网络图中 Degree 值排名前三的化合物视为核心化合物, 分别是槲皮素(MOL000098, 度值 125)、木犀草素(MOL000006, 度值 27)、 β -谷甾醇(MOL000358, 度值 22), 研究结果表明了药对治疗

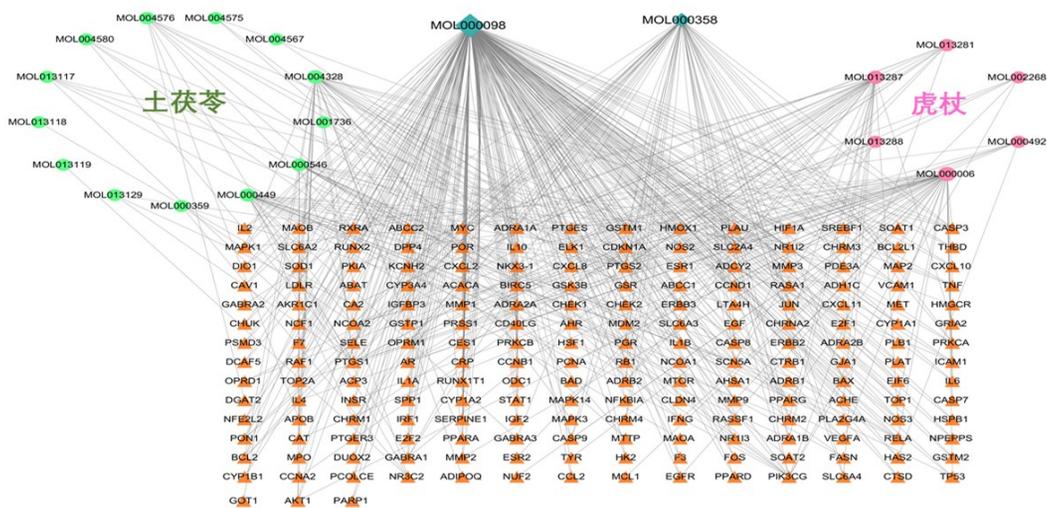


图1 “虎杖-土茯苓”药物-活性成分-靶点网络图

表2 “虎杖-土茯苓”潜在活性化合物

来源	Mol ID	Molecule Name	OB (%)	DL	Degree
土茯苓	MOL013118	Neoastilbin	40.54	0.74	1
土茯苓	MOL013119	Enhydrin	40.56	0.74	1
土茯苓	MOL004567	isoengelitin	34.65	0.7	1
土茯苓	MOL013129	(2R,3R)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychroman-4-one	63.17	0.27	3
土茯苓	MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	3
土茯苓	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	3
土茯苓	MOL004575	astilbin	36.46	0.74	3
土茯苓	MOL004580	cis-Dihydroquercetin	66.44	0.27	4
虎杖	MOL013288	Picalinal	58.01	0.75	4
土茯苓	MOL013117	4,7-Dihydroxy-5-methoxyl-6-methyl-8-formyl-flavan	37.03	0.28	5
虎杖	MOL002268	rhein	47.07	0.28	5
虎杖	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	7
土茯苓	MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	9
虎杖	MOL013281	6,8-Dihydroxy-7-methoxyxanthone	35.83	0.21	10
土茯苓	MOL000546	diosgenin	80.88	0.81	16
土茯苓	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	26
虎杖	MOL013287	Physovenine	106.21	0.19	30
土茯苓	MOL004328	naringenin	59.29	0.21	32
虎杖	MOL000006	luteolin	36.16	0.25	51
两者共有	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	58
两者共有	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	262
虎杖	MOL002259	Physciondiglucoside	41.65	0.63	
虎杖	MOL002280	Torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74	

GA“多成分-多靶点”的特点。

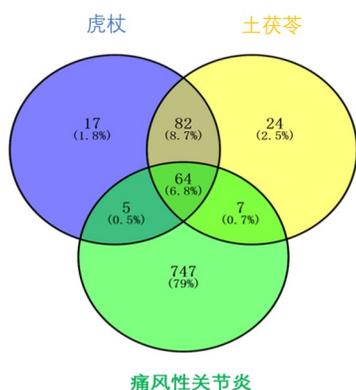


图2 “虎杖-土茯苓”与GA的交集靶点韦恩图

2.3 靶点 PPI 网络分析 76 个交集靶点输入 STRING 平台, 获取 tsv 格式的蛋白互作网络, 利用 Cytoscape 3.7.2 的 CytoHubba 插件获得核心靶点, Hubba nodes 设置为 Degree 值排名前 10 的节点, 得到核心靶点 (见图 4): JUN (度值 27)、TNF (度值 27)、RELA (度值 24)、IL6 (度值 22)、MAPK1 (度值 19)、MAPK3 (度值 19)、MAPK14 (度值 17)、IL1B (度值 17)、

FOS (度值 15)、CXCL8 (度值 15)。图中颜色深浅与节点度值呈正比, 中心位置节点代表度值前 10 的核心基因。

2.4 GO、KEGG 富集分析结果 DAVID 平台对交集靶点进行 GO、KEGG 分析, 挑选出富集度靠前的分子功能 (MF)、生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 以及信号通路, 使用 R 语言 4.0.2 可视化 (见图 5)。MF 共 73 个, 靠前的为蛋白结合 (61 个靶点/80.2%), 相同蛋白质结合 (16 个靶点/21.1%), 酶结合 (14 个靶点/18.4%) 等分子功能; BP 共 172 个, 靠前的为 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控 (27 个靶点/35.5%), 对药物的反应 (23 个靶点/30.2%), 正调控转录-DNA 模板化 (20 个靶点/26.3%) 等生物过程; CC 共 42 个, 靠前的为细胞溶质 (36 个靶点/47.4%), 细胞质 (33 个靶点/43.4%), 细胞核 (33 个靶点/43.4%) 等细胞组分。“虎杖-土茯苓”治疗 GA 的主要信号通路包括 122 条, 如癌症通路 (31 个靶点/40.8%)、TNF 信号通路 (22 个靶点/28.9%)、乙肝 (22 个靶点/28.9%)、PI3K-Akt 信号通路 (22 个靶点/28.9%)、MAPK 信号通路 (17 个靶点/22.4%) 等。由此可推测出, “虎杖-土茯苓”治疗 GA 可能是通过上述通

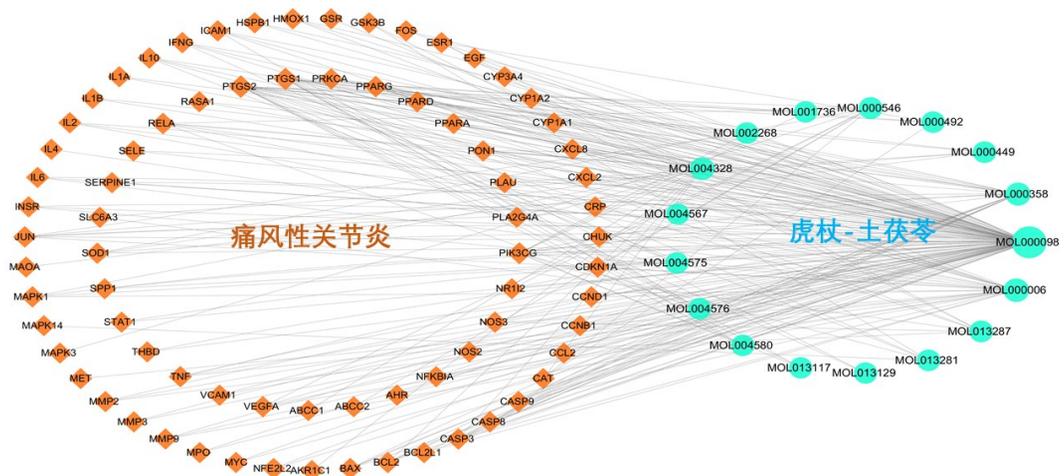


图3 “虎杖-土茯苓”化学成分-交集靶点网络图

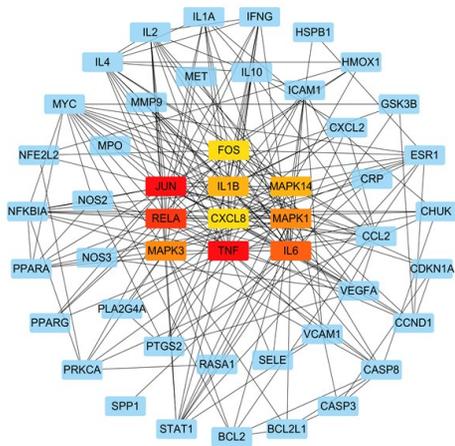


图4 交集基因蛋白互作关系图

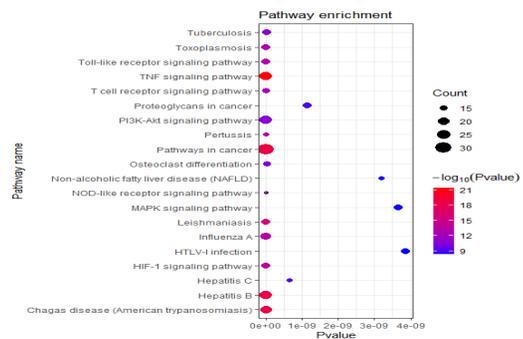
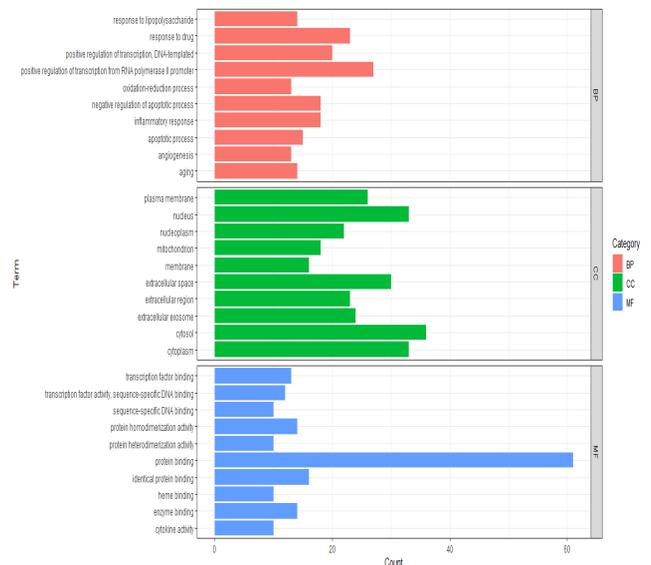


图5 GO、KEGG 富集分析图

路完成。基于显著富集通路与控制基因的关联性,构建“核心靶点-通路”图(见图6),这些显著富集于核心通路的基因可能是药对治疗GA的关键作用点。

2.5 分子对接结果 主要核心化合物为槲皮素、木犀草素、β-谷甾醇与关键靶基因 JUN(5t01)、TNF(4g3y)进行分子对接(见图7)。结合能越低,两者之间的作用越好。结果显示,所有对接结合能均<0 KJ/mol,表示配体与受体均可自发结合。其中,β-谷甾醇与 JUN(23.3)结合最好,其他依次为木犀草素与 JUN(19.4)、β-谷甾醇与 TNF(19.0)、木犀草素与 TNF(17.4)、槲皮素与 JUN(17.4)、槲皮素与 TNF(13.6)。

3 讨论

本研究以筛选药对“虎杖-土茯苓”治疗GA的潜在核心成分为切入点,构建“药物-化合物-靶点-疾病”网络图,探寻潜在作用机理。研究结果显示“虎

杖-土茯苓”有效化合物共23个,治疗GA的药效化合物有17个,将槲皮素、木犀草素及β-谷甾醇视为治疗GA核心化合物。槲皮素已被证明具有良好的消炎活性且作用长久^[7]。槲皮素对 COX-2、NF-κB、AP-1、

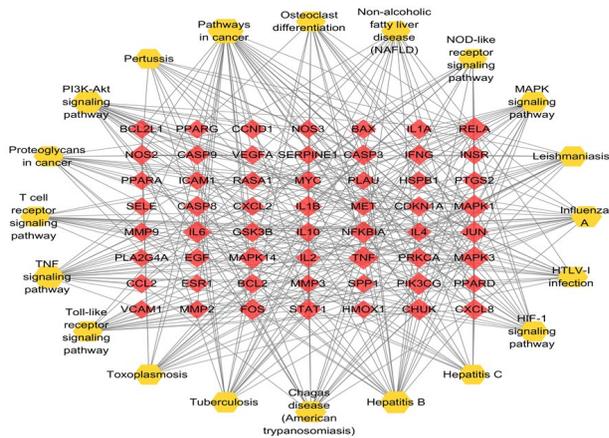


图6 “核心靶点-信号通路”相互作用网络图

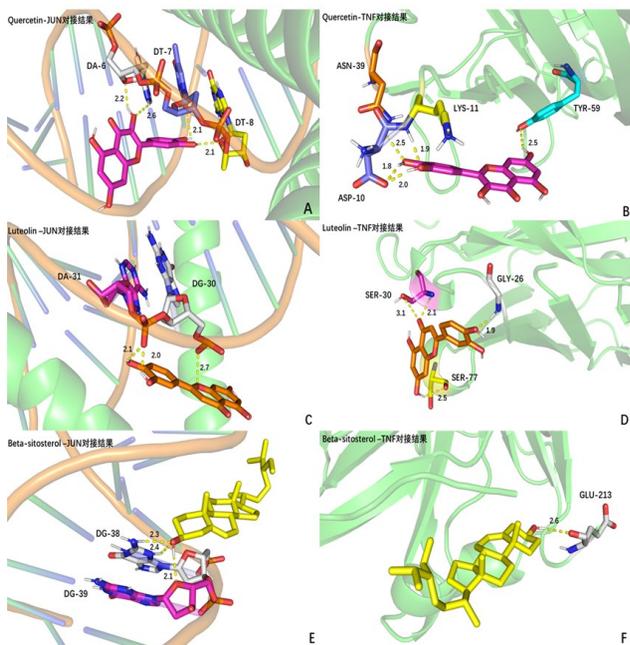


图7 分子对接结果

MAPK等多种炎症因子具有抑制表达的作用^[8]。既往研究已表明槲皮素在治疗GA方面药效显著^[9]，其表现出很强的抗炎镇痛作用^[10]。槲皮素的肝肾保护作用可能对阻止GA的肝肾损害进程有效^[11]。木犀草素与槲皮素均为黄酮类代表化合物，具有理想的抗炎效果^[12]。木犀草素可以通过调控炎症因子控制GA炎症反应^[13]。β-谷甾醇属于甾醇类化合物，具有理想的抗氧化、抗炎作用^[14]。由此可见，“虎杖-土茯苓”核心化合物能从多个方面发挥治疗GA作用。

本研究共获得76个“虎杖-土茯苓”治疗GA的潜在作用靶点，根据PPI网络分析结果提示JUN、TNF、RELA、IL6为关键靶点。JUN作为MAPK通路的重要成员之一，与炎症及细胞凋亡关系紧密。研究表明当

GA发作时ERK1/2通路可以降低JUN激活，缓解MSU晶体引起的炎症^[15]。TNF与IL6均是炎症细胞因子家族中的关键成员，常被作为衡量GA炎症程度的检测指标，近期研究发现IL6的表达水平与GA的疼痛程度具有较好的相关性^[16]。既往实验发现TNF与体内尿酸水平、GA的疾病进展及预后关系紧密^[17]。RELA是炎症通路NF-κB家族关键成员，具有调节炎症、中性粒细胞凋亡的重要作用^[18]。本研究发现的靶点可以考虑为未来研究“虎杖-土茯苓”治疗GA机制的主要关注靶点。

通过对“虎杖-土茯苓”治疗GA的GO及KEGG分析结果可知，癌症通路、TNF信号通路、乙肝、PI3K-Akt信号通路为药对治疗GA的关键信号通路。癌症通路是条与多条信号通路均存在联系的代谢通路，同时本研究中排名前20通路中的PI3K-Akt信号通路、MAPK通路、HIF-1信号通路与之皆有关联，由此可说明此通路可能是“虎杖-土茯苓”治疗GA机制中起到枢纽作用的关键通路。TNF信号通路与细胞凋亡、存活，以及免疫和炎症相关，TNF-α参与关节滑膜炎反应，可以控制GA受累关节的急性炎症^[19]。乙肝病毒可干扰细胞的凋亡^[20]。PI3K-Akt信号通路可被多种类型的细胞刺激激活，具有抗细胞凋亡、增殖及分化功能^[21]。研究发现通过抑制该通路可以改善大鼠关节软骨细胞破坏，减轻关节炎^[22]。该结果提示“虎杖-土茯苓”可依托上述关键通路抗击GA关节炎的作用。

综上所述，本研究利用网络药理学和分子对接技术初步预测了“虎杖-土茯苓”治疗GA的机理。从结果可知，“虎杖-土茯苓”通过槲皮素、木犀草素等成分，作用于JUN、TNF等靶点，在癌症通路、TNF信号通路等通路参与下，发挥抗炎、抗凋亡等治疗GA的作用，为后期实验进一步研究打下基础。

参考文献

[1] ABHISHEK A, RODDY E, DOHERTY M. Gout—a guide for the general and acute physicians[J]. Clinical medicine (London, England), 2017, 17(1): 54–59.
 [2] SINGH JA, GAFFO A. Gout epidemiology and comorbidities[J]. Seminars in arthritis and rheumatism, 2020, 50(3):s11–s16.
 [3] 赵欣禹, 李可大. 痛风性关节炎急性期的中医药治疗进展[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(7): 11–13.
 [4] 谢招虎, 解静, 李兆福, 等. 虎杖治疗痛风的作用机制及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2019; 46(5): 1111–1113.
 [5] 王特, 张晓宇, 张薇, 等. 土茯苓防治痛风的作用机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(1): 215–217.

(下转第45页)