

· 方药研究 ·

基于网络药理学与分子对接挖掘地锦草 抗类风湿关节炎的作用机制[※]

刘守才¹ 廖承谱² 赵小超^{1▲} 商 勋¹ 丁美婷¹ 吴 玲¹

摘 要 目的:通过网络药理学和分子对接实验挖掘地锦草对类风湿关节炎的作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中药分子作用机制的生物信息学分析工具(Batman-TCM)、基因组注释数据库(GeneCard)、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)以及文献检索获取地锦草的活性成分、作用靶点、类风湿关节炎相关靶点, String 数据库构建蛋白互作网络, Cytoscape 3.8.0 构建成成分-靶点-疾病网络, Bioconductor 进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析, AutoDock Vina 分子对接验证。结果:共获得 15 个主要活性成分和 38 个关键靶点。GO 功能富集分析得到 53 个分子功能条目, 主要涉及 DNA 结合转录因子结合、核糖核酸聚合酶 II 特异性脱氧核糖核酸结合转录因子结合受体配体活性、泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、核受体活性; KEGG 通路富集分析得到 89 条信号通路, 主要包含脂质与动脉粥样硬化、流体切应力与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子信号通路、细胞凋亡、化学致癌-受体激活、白细胞介素-17 信号通路等; 分子对接验证发现槲皮素、山奈酚、4', 5-二羟基黄酮与关键抗类风湿关节炎靶点蛋白结合较好, 4', 5-二羟基黄酮与 AR 靶点形成最佳结合。结论:地锦草主要通过 PTGS1、AR、DPP4、HSP90AA1、RELA 等靶基因对炎症因子、细胞凋亡及相关功能进行调节而发挥治疗类风湿关节炎的作用。

关键词 地锦草; 类风湿关节炎; 分子机制; 网络药理学; 分子对接

地锦草为大戟科植物地锦或斑地锦的干燥全草, 记载于历代版《中国药典》, 具有清热解毒、凉血止血、利湿退黄的功效。现代中药药理研究^[1-5]表明其具有抗菌、抗炎、镇痛、抗肿瘤、免疫调节、解毒、抗过敏、抗氧化、保肝、止血与止泻等作用, 临床主要用于痢疾、上呼吸道感染、肺炎、病毒性肝炎、肾盂肾炎、肠炎、皮肤湿疹等疾病。地锦草的民间应用也较为广泛, 研究小组在走访收集民间验方期间发现有 2 名类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)患者使用地锦草鲜草捣成泥外敷关节处, 3~5 天换药一次, 1 个月左右关节处肿胀已经全部消失, 疼痛消失, 行走自如。关于地锦草对 RA 的作用研究暂无报道, 故本研究通过网络药理学初步探讨其对 RA 的作用机制, 并通过分子

对接模拟实验验证, 为进一步深入研究开发提供参考依据。

1 方法

1.1 地锦草的活性成分及靶点的收集和筛选 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, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、中药分子作用机制的生物信息学分析工具(Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine, Batman-TCM, <http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>), 再结合《中国知网》等文献检索进行地锦草的活性化学成分收集和靶点预测工作, 设置条件为生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug likeness, DL)≥0.18, 筛选出符合条件的活性成分。

1.2 类风湿关节炎疾病靶点预测 通过基因组注释数据库(genome annotation database platform,

※基金项目 宿迁市科技局自然科学基金青年科技人才项目(No. k202011)

▲通讯作者 赵小超, 男, 主管中药师。研究方向: 中药药效物质基础及药理研究。E-mail: 515532094@qq.com

• 作者单位 1. 江苏省宿迁市中医院(江苏 宿迁 223800); 2. 湖北省通城县公共检验检测中心(湖北 咸宁 437000)

GeneCard, <https://auth.lifemapsc.com/>)、人类孟德尔遗传数据库 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, <https://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/>)、药物靶点数据库 (Therapeutic Target Database, TTD, <http://db.idrblab.net/web/>)，关键词“Rheumatic Arthritis”，获得疾病相关靶点基因，利用 Venny 2.1.0 软件获得交集靶点。

1.3 地锦草调控网络构建 利用 cytoscape 3.7.1 软件将药物-疾病交集靶点进行可视化处理，构建药物-疾病-靶点网络关系图。

1.4 药物-疾病靶点蛋白间互作网络 将交集靶标基因复制到 String 数据库 (<http://stringdb.org/>)，以人为研究对象，设置条件为 mendium confidence>0.9，剔除游离的蛋白靶点，构建出蛋白相互作用 PPI 网络。“节点”代表靶点蛋白，“边”表示有效成分与靶点之间的联系。

1.5 靶点功能和通路富集分析 利用 Bioconductor 软件，借助 clusterprofiler 包、pathview 包、Dose 包，通过 R4.4.1 软件运行获得基因本体论及通路富集数据并可视化，进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析， $P<0.01$ 为筛选阈值，取校正 P 值前 10 的条目。

1.6 分子对接 通过有机小分子生物活性数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取小分子数据，利用 openbabel 转化为 mol 2 格式，使用 prepare_ligand4.py 脚本为小分子添加电荷，分配原子类型，均设置为半柔性键，将小分子保存为 pdbqt 格式，便于分子对接。PDB 蛋白结构数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载蛋白受体数据，采用 pymol1.7 程序将受体蛋白结构中的结晶水和其他小分子删除，并添加氢原子后保存。载入 autodocktool 1.5.6 程序，添加电荷，分配原子类型，保存为 pdbqt 格式，作为分子对接受体，采用 vina 1.1.2 软件进行分子对接。对接盒子大小设置为能够恰好包含蛋白的结合位点，选取对接最佳构象作为分子对接结果，结合能评分并进行排序。结合能数值越低，表明结合越好。

2 结果

2.1 地锦草的活性成分及靶点的收集和筛选 共收集到 51 种活性成分，经筛选获得 15 种有效活性成分，包含 4',5-二羟基黄酮、槲皮素、鞣花酸、山奈酚、紫云英苷、谷甾醇等，其中，已有研究表明槲皮素、山奈酚

对 RA 作用良好^[6-9]。活性成分对应的作用靶点共筛选出 102 个。

2.2 类风湿关节炎疾病靶点预测 共筛选出 1184 个疾病靶点，通过 Venny 软件最终获得 38 个共同靶点，见图 1。

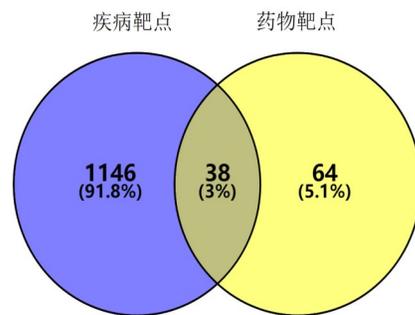
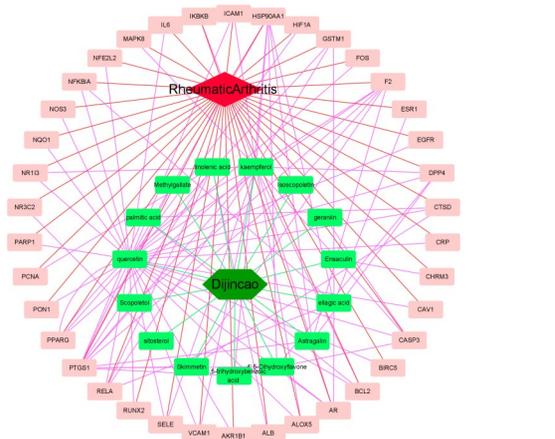


图 1 药物-疾病靶点图

2.3 地锦草调控网络构建 药物-疾病-靶点网络包含节点 138 个及相互联系的边 191 条，其中表现活跃的成分是槲皮素、山奈酚、4',5-二羟基黄酮。见图 2。



注：粉色长方形为疾病靶点基因，红色菱形为疾病，绿色六边形为地锦草，淡绿色长方形为地锦草主要活性成分

图 2 药物-疾病-靶点网络图

2.4 药物-疾病靶点蛋白间互作网络 PPI 网络图显示，共有 67 个节点及其相互联系的 277 条边。Degree 值排名前 20 位的潜在抗类风湿关节炎靶点为 IL-6、ALB、CASP3、NOS3、PPARG 等。见图 3。

2.5 靶点功能和通路富集分析

2.5.1 GO 功能富集分析 通过 GO 富集分析，筛选出 53 个分子功能条目 ($P<0.05$)，包括 DNA 结合转录

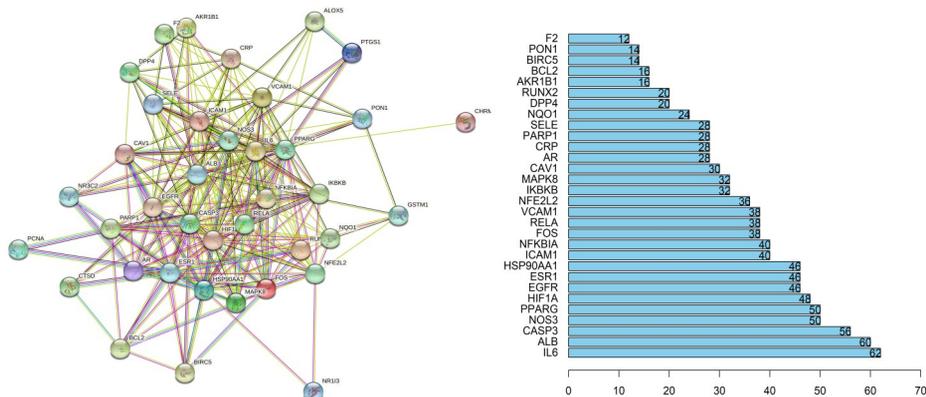


图3 药物-疾病蛋白间互作网络图(PPI)

因子结合、泛素蛋白连接酶结合、配体激活的转录因子活性、泛素样蛋白连接酶结合、核受体活性、核糖核酸聚合酶 II 特异性脱氧核糖核酸结合转录因子结合受体配体活性、组蛋白脱乙酰酶结合、核激素受体结合等,其中多个条目均有报道与RA关系密切^[10-11],关联度较高的20条分子功能如图4。

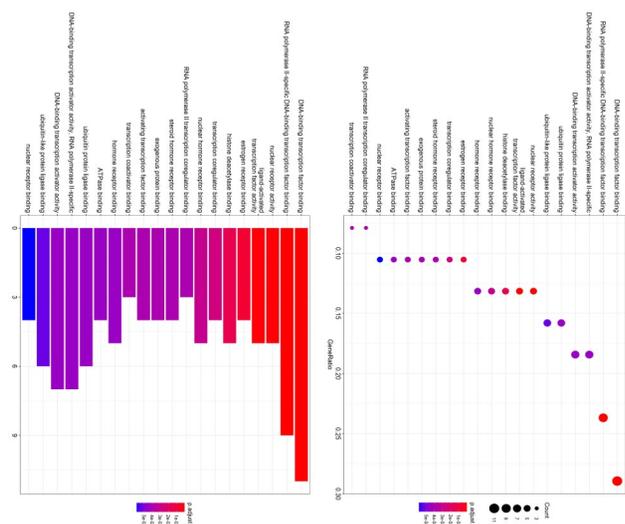


图4 地锦草GO分析及气泡图

2.5.2 KEGG 通路富集分析 通过KEGG 通路富集分析将38个核心靶点筛选出89条信号通路,包括脂质与动脉粥样硬化、流体切应力与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、化学致癌-受体激活、白细胞介素-17信号通路、细胞凋亡、NOD样受体信号通路等,其中多条通路均有报道与RA关系密切^[11-12],比较关键的20条信号通路见图5。

2.6 分子对接 本研究通过以上综合评比分析选择

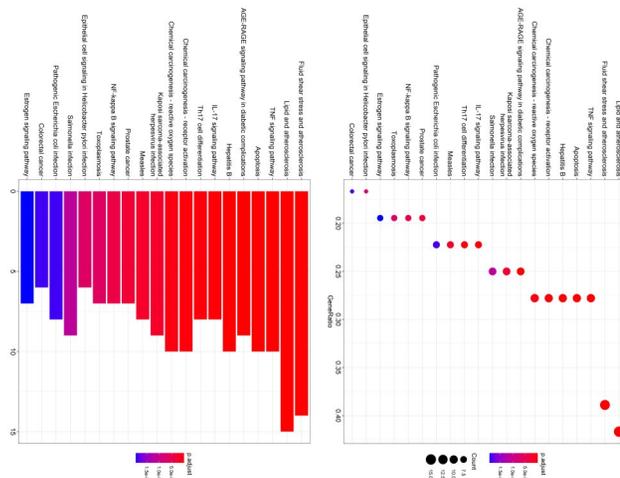


图5 地锦草KEGG分析及气泡图

地锦草5种主要活性成分与5个关键抗RA靶点蛋白进行分子对接。如表1所示,结合能数值越低,表明结合越好。其中,4',5-二羟基黄酮与AR关键靶点蛋白结合最优,槲皮素、山奈酚与PTGS1、AR、DPP4、HSP90AA1、RELA关键靶点蛋白结合评分均较良好,结合能≤-9的强结合共有6组。整体结合评分均较良好,分子对接情况见图6、图7。

3 讨论

民间资料收集发现,地锦草对RA具有明显的治

表1 分子对接结合能评分情况表(kcal/mol)

成分	AR	HSP90AA1	PTGS1	RELA	DPP4
山奈酚	-9.7	-7.4	-8.2	-6.4	-8
槲皮素	-9.3	-7.4	-8.1	-6.3	-7.9
4',5-二羟基黄酮	-9.9	-7.3	-9.2	0	-7.6
紫云英苷	0	-7.8	-9	0	-9.2
鞣花酸	-8	-7.9	0	-6.8	0

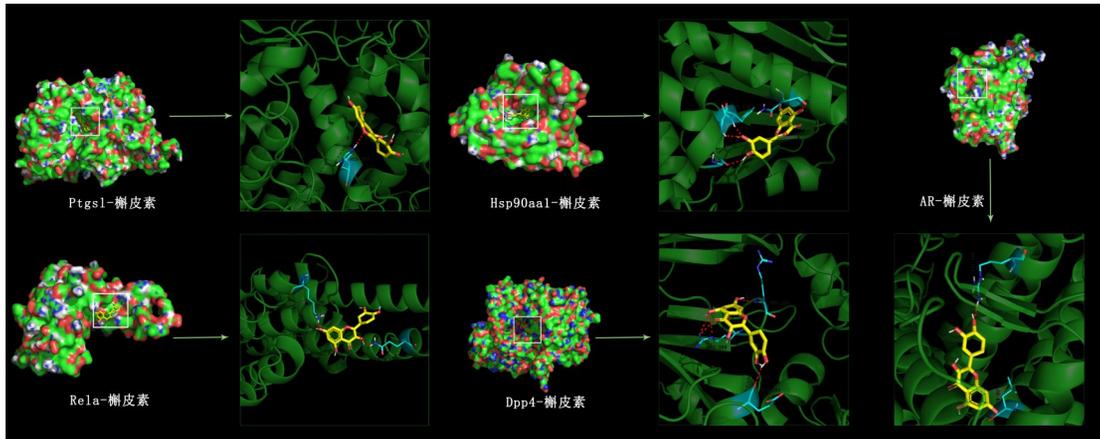


图6 槲皮素与5个靶点蛋白分子对接模型图

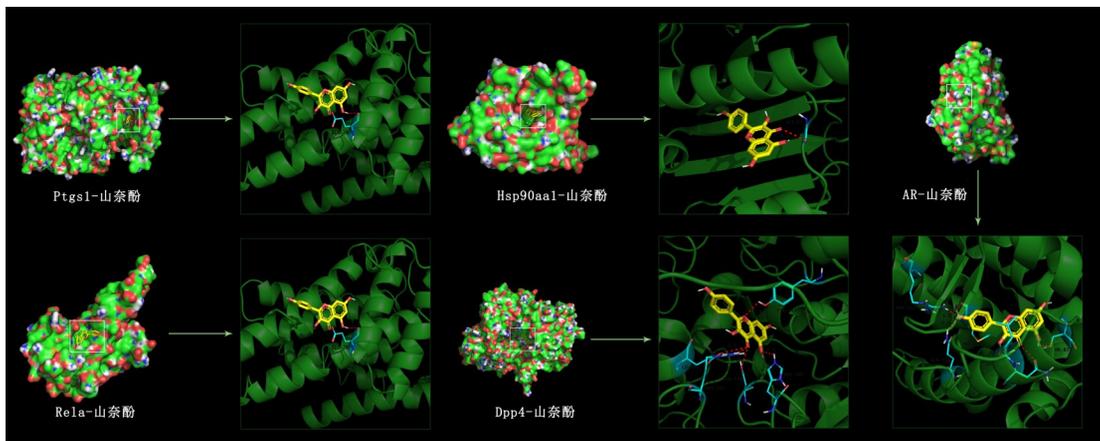


图7 山奈酚与5个靶点蛋白分子对接模型图

疗作用,两位RA患者在使用地锦草鲜草捣泥外敷后, RA症状明显减轻,生活能力有一定的恢复。为进一步证实其作用,本文通过网络药理学和分子对接模拟实验初步探讨地锦草对RA的分子作用机制,结果显示其对RA有一定的治疗作用,主要与DNA结合转录因子结合、核受体活性、泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、RNA聚合酶II特异性脱氧核糖核酸结合转录因子结合受体配体活性、配体激活的转录因子活性等分子功能有关,涉及脂质与动脉粥样硬化、化学致癌-受体激活、流体切应力与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素-17信号通路、细胞凋亡、糖尿病并发症中的AGE-RAGE等众多信号通路。

目前,关于地锦草化学成分方面的研究较为广泛,数据文献统计汇总为51种,其中槲皮素、山奈酚对RA的作用研究较为全面。槲皮素是一种黄酮醇类的天然产物,主要通过抑制血管生成、滑膜增生、炎症因子浸润、中性粒细胞胞外诱捕网生成,调节破/成骨

细胞和Th17/调节性T细胞之间的平衡发挥治疗作用,涉及TNF- α 、MCP-1、IL-6、IL-1 β 、IL-17、IL-10、NF- κ B、CXCL1、CXCL5、LTB4、TGF- β 、Th17细胞、中性粒细胞以及巨噬细胞等^[13-19]细胞因子。山奈酚主要通过抑制FGFR3激酶活性、降低体内外破骨细胞分化、抑制破骨细胞标志物,如抗酒石酸酸性磷酸酶、整合素 β 3、MMP9等发挥抗RA作用^[6]。另外山奈酚具有较强的抗炎作用,主要涉及MAPK、PKC、PI3K、IL-1、IL-8、IP-10、PGE2、IL-2、TNF- α 、NF- κ B、AP-1等^[20-22]因子,同时这些因子也均属于与RA关系密切的重要因子,因此其作用可能与调节炎症因子水平有关。

RA是一种常见的慢性多系统自身免疫性疾病,周期较长,易造成残疾,此病可发生于任何年龄段,常见于青壮年,发病率高达0.2%~0.4%,严重影响患者生活质量。其发病机制^[23]主要包含:①免疫细胞感染引起炎症局部产生大量的炎性细胞、ROS、炎症因子,从而激活核因子 κ B、蛋白激酶B、JNK等信号通路导致RA形成;②刺激MMPs促使MMP-2的产生,导致

软骨、骨骼等损伤加剧RA的发展;③氧化应激异常;④遗传和生存环境等因素。发病过程主要涉及PGs、IL-2、IL-6、IL-8、IFN- γ 、COX-2、LTs、5-LOX、AA、LTB4、TNF- α 、IL-1 β 、ROS、MMPs、MMP-2、NF- κ B、T细胞等因子、蛋白酶、细胞^[24-27]。目前抗RA药物主要包括非甾体消炎药、抗风湿药、糖皮质激素、TNF抑制剂、B细胞耗竭剂、T细胞阻断剂、IL-6受体单克隆抗体、IL-1受体拮抗剂、靶向小分子抑制剂等^[28]药物,均存在一定的优缺点,疗效好的价格昂贵,价格便宜的不良反应多等等,尚存在不足,因此需要医药研究者们继续深入开发挖掘,以造福人类。

综上所述,地锦草活性成分、作用靶点、RA疾病靶点基因蛋白三者存在着诸多交集与联系,可以推断地锦草具有一定的抗RA作用,主要与肿瘤坏死因子信号通路、细胞凋亡、化学致癌-受体激活、白细胞介素-17信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路等有关,可为今后进一步研究开发提供参考。

参考文献

[1]曾晓涛,陈艳琰,乐世俊,等.基于网络药理学-分子对接-实验验证的地锦草效应物质基础与作用机制研究[J].中药新药与临床药理,2022,33(9):1205-1217.

[2]WANG TT, WEN JF, JIN SN. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Euphorbia humifusa*[J]. Journal of Taishan Medical College, 2012, 33(8):629.

[3]侯静,黎理,蔡毅.地锦草组药植物的研究进展[J].华西药理学杂志,2020,35(2):218-224.

[4]安惠霞,李治建,古丽娜·达吾提,等.地锦草的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(12):2866-2868.

[5]梁生林,李庆耀,钟卫华,等.地锦草提取物对小鼠镇痛作用的实验研究[J].中成药,2011,33(5):880-882.

[6]LEECHOL-JUNG, MOONSU-JIN, JEONGJEONG-HEE, et al. Kaempferol targeting on the fibroblast growth factor receptor 3-ribosomal S6 kinase 2 signaling axis prevents the development of rheumatoid arthritis[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(3):252-270.

[7]蒋海旭,许杰,陆清怡.槲皮素治疗类风湿关节炎的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):243-250.

[8]叶香兰,郑钰铮,邱志伟,等.槲皮素治疗类风湿关节炎的作用机制探讨[J].风湿病与关节炎,2021,10(2):47-50,54.

[9]王友庆,陈士芳,梅珏.槲皮素通过抑制NF- κ B减弱类风湿关节炎大鼠软骨细胞基质降解和细胞凋亡[J].免疫学杂志,2019,35(6):485-491.

[10]王炳花.类风湿关节炎多水平潜在生物标志物的筛选与评价[D].苏州:苏州大学,2019.

[11]池里群,周彬,高文远,等.治疗类风湿关节炎常用药物的研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(15):2851-2858.

[12]何培.多组学鉴定类风湿关节炎相关基因及其表达调控网络[D].苏州:苏州大学,2019.

[13]HALEAGRAHARANAGARAJA, MIRANDA-HERNANDEZSOCORRO, MD ABDUL ALIM, et al. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90:38-46.

[14]肖鹏.槲皮素对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡及其机制的研究[D].郑州:郑州大学,2013.

[15]YUAN K, ZHU Q, LU Q, et al. Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 84:108454.

[16]YAMAGUCHI M, WEITZMANN M N. Quercetin, a potent suppressor of NF- κ B and Smad activation in osteoblasts[J]. International journal of molecular medicine, 2011, 28(4):521-525.

[17]HAE-RIM KIM, BO-MI KIM, JI-YEON WON, et al. Quercetin, a plant polyphenol, has potential for the prevention of bone destruction in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Medicinal Food, 2019, 22(2):152-161.

[18]JI J, LIN Y, HUANG S, et al. Quercetin: a potential natural drug for adjuvant treatment of rheumatoid arthritis[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(3):418-421.

[19]LIN XX, PENG QZ, ZHANG JJ, et al. Quercetin prevents lipopolysaccharide-induced experimental preterm labor in mice and increases offspring survival rate[J]. Reprod Sci, 2020, 27(4):1047-1057.

[20]唐敏芳.豹皮樟化学成分分离及其体外抗炎免疫活性筛选研究[D].合肥:安徽医科大学,2010.

[21]TANG XL, LIU JX, DONG W, et al. Protective effect of kaempferol on LPS plus ATP-induced inflammatory response in cardiac fibroblasts[J]. Inflammation, 2015, 38(1):94-101.

[22]HUANG C, JAN RL, KUO CH, et al. Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(8):H254-9.

[23]杨丽,刘荣华,黄四碧,等.类风湿关节炎的发病机制及治疗药物研究进展[J].中国药房,2021,32(17):2154-2159.

[24]杨晓珊,王瑞瑞,李英,等.IL-6介导JAK/STAT信号通路在胶原诱导性关节炎大鼠抑郁发生中的作用机制研究[J].中国免疫学杂志,2021,37(17):2053-2058.

[25]丁锐.预测类风湿关节炎患者对TNF- α 拮抗剂治疗反应性的研究[D].长春:吉林大学,2016.

[26]刘娟.Th17细胞相关基因(DPP4、CCR6、IL6R、IL23R)交互作用与类风湿关节炎和系统性红斑狼疮的关联性研究[D].合肥:安徽医科大学,2016.

[27]SINGHSHAREEN, THAKUR GURJEET SINGH, MAHAJANKRITI, et al. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2020, 72(10):1306-1327.

[28]许海艳,况南珍,张瑜娟,等.类风湿关节炎治疗方法的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2020,60(5):97-102.

(收稿日期:2022-04-24)

(本文编辑:蒋艺芬)