

基于网络药理学的清爽膏治疗银屑病的作用机制研究[△]

李洋^{1*}, 张林华², 曾祖平^{3#} (1. 首都医科大学附属北京中医医院药学部, 北京 100010; 2. 北京市临床药理学研究所成果转化促进中心, 北京 100035; 3. 北京市中医研究所中药室, 北京 100010)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)01-0010-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.01.002

摘要 目的:探讨清爽膏治疗银屑病的药效物质基础及其作用机制。方法:通过网络药理学方法,借助于中药系统药理学数据库与分析平台检索清爽膏中3味中药的活性化合物和作用靶点,通过GeneCards数据库检索银屑病的相关靶点,构建韦恩图,得到清爽膏治疗银屑病的作用靶点,应用Cytoscape 3.7.0软件构建“药物-化合物-靶点”网络图。针对清爽膏和银屑病的共同靶点,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,进而通过DAVID v6.8数据库完成基因本体(GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果:以类药性 ≥ 0.18 为标准,筛选出清爽膏的活性化合物108种,作用靶点150个;以高相关性为标准,筛选出与银屑病相关的靶点3881个。药物与疾病的共同靶点有82个。构建PPI网络,相互作用关系最多的靶点为IL-6、TP53、VEGFA、TNF、STAT3、PTGS2、CASP3、JUN和MAPK8。GO功能富集分析包含501条结果,KEGG通路富集分析得到98条信号通路。结论:本研究阐明清爽膏是通过多成分、多靶点发挥对银屑病的治疗作用,且作用机制主要集中在调节HIF-1信号通路、PI3K-Akt信号通路、p53信号通路、MAPK信号通路和血管内皮生长因子信号通路,为清爽膏的临床应用和实验研究提供了科学依据。

关键词 清爽膏;网络药理学;银屑病;蛋白质-蛋白质相互作用;作用靶点

Mechanism of Qingshuang Ointment in the Treatment of Psoriasis Based on Network Pharmacology[△]

LI Yang¹, ZHANG Linhua², ZENG Zuping³ (1. Dept. of Pharmacy, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China; 2. Center for the Promotion of Results Transformation, Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing 100035, China; 3. Room of Chinese Materia Medica, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effective material basis and mechanism of Qingshuang ointment in the treatment of psoriasis. **METHODS:** The active compounds and targets of three kinds of traditional Chinese medicine in Qingshuang ointment were searched by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, GeneCards database was used to retrieve the related targets of psoriasis, and Venn diagram was constructed to obtain the therapeutic targets of Qingshuang ointment in the treatment of psoriasis. Cytoscape 3.7.0 was used to perform the “drugs-compounds-targets” network. Protein-protein interaction network(PPI) was constructed based on the common targets of Qingshuang ointment and psoriasis. Gene ontology(GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway enrichment analysis were performed via DAVID v6.8 database. **RESULTS:** Taking drug-like properties ≥ 0.18 as criteria, 108 active compounds of Qingshuang ointment were screened, with 150 action targets. A total of 3881 targets related to psoriasis were screened based on high correlation criteria, there were 82 common targets of drugs and diseases. PPI network was constructed, the most common targets were respectively IL-6, TP53, VEGFA, TNF, STAT3, PTGS2, CASP3, JUN and MAPK8. A total of 501 results were included in the GO enrichment analysis. The KEGG signal pathway enrichment showed that the common target was expressed in 98 signal pathways. **CONCLUSIONS:** This study indicates that Qingshuang ointment exerts its therapeutic effects on psoriasis through multiple components and targets, and the mechanism mainly focuses

[△] 基金项目:“十二五”国家中医药管理局临床中药学重点学科项目;国家中医临床药学重点专科培育项目(No. ZP0101YX001);全国中药特色技术传承人才培养项目

* 主任药师。研究方向:中药药剂学。E-mail:li_111126@126.com

通信作者:主任药师,硕士,硕士生导师。研究方向:中药制剂研究及中药成分分析。E-mail:zengzuping@bjzhongyi.com

on the regulation of HIF-1 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, p53 signaling pathway, MAPK signaling pathway and vascular endothelial growth factor signaling pathway, which provides a scientific basis for the clinical application and experimental research of Qingshuang ointment.

KEYWORDS Qingshuang ointment; Network pharmacology; Psoriasis; Protein-protein interaction; Targets

清爽膏是首都医科大学附属北京中医医院的院内制剂(批准文号:京药制字 Z20073002),由紫草、大黄和当归 3 味中药组成,功效为清热解毒、凉血止痛,在临床上用于血热毒盛证,外用治疗局部潮红、灼痛、烫伤伤清洁疮面和银屑病等。网络药理学是基于系统生物学理论,利用网络分析方法,通过整体观的角度探讨药物、靶点和疾病间相互作用的药理学分支学科。网络药理学通过对药物分子、作用靶点及其疾病相关靶点等资料进行收集、分析,并利用计算机软件构建出“药物-靶点-疾病”间的相互关联网络。网络药理学具有整体性、系统性等特点,与中医药整体观、辨证论治的理论相一致,近年来已被广泛用于中药潜在活性成分的确证及其作用靶点的预测,以及中药复方制剂的作用机制研究^[1-5]。基于网络药理学方法,本研究对清爽膏治疗银屑病的可能机制进行了探讨,以期揭示清爽膏的药效物质基础和潜在的作用靶点奠定基础,为进一步研究其作用机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 清爽膏活性成分检索及作用靶点的筛选

以紫草、大黄和当归为关键词,在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)上检索清爽膏中 3 味中药所含的化学成分。以类药性(DL)≥0.18 为筛选条件,优选出各味中药潜在的化学成分;再通过化学成分检索到相应的靶点,借助于 Uniprot 数据库查询出靶标蛋白对应的基因名称。

1.2 疾病靶点的筛选

在 GeneCards 数据库中以“psoriasis”为关键词进行检索,筛选出与银屑病相关的疾病靶点基因信息。

1.3 疾病与药物共同靶点的筛选

将清爽膏中优选出的化学成分靶点及银屑病相关疾病靶点,输入到在线软件作图工具平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)中绘制韦恩图,两者的交集即可认为是“疾病-化学成分”的共同靶点。

1.4 “药物-成分-靶点”网络的构建

基于银屑病靶点与清爽膏中活性成分靶点之间的相互作用关系,通过 Cytoscape 3.7.0 软件构建“药物-成分-靶点”网络。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的建立

将筛选出的交集靶点基因导入 String 数据库中,分析靶点基因间的蛋白质相互作用,“Homo sapiens”为限定的物种,将置信度设定为“>0.4”,以代表两个蛋白间具有相互作用关系,进而构建药物化学成分靶点和银屑病靶点的 PPI 网络。并将结果导入到 Cytoscape 3.7.0 软件中,再以网络中各靶点基因节点的连接度值(Degree)作为指标,开展拓扑异构学的分析,以期筛选出网络中的核心蛋白质靶标。

1.6 靶点基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

依托 DAVID 数据库对共同靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析,并借助于 Omicshare 软件(<https://www.omicshare.com/tools/>)对所得结果展开可视化的处理。

2 结果

2.1 清爽膏活性成分及作用靶点

检索 TCMSP,筛选得到清爽膏的活性成分 108 种,去除部分没有靶点的化合物,得到 62 个化合物,以 ID 进行排序后,前 5 个化合物分别为儿茶素[(-)-catechin]、齐墩果酸(oleanolic acid)、长柄扁豆(sitoglusidebeta-sitosterol)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)和谷甾醇(sitosterol)。在此基础上进一步查找清爽膏中有效/活性成分的靶点,筛选后共得到 150 个靶点蛋白。在 UniProt 数据库中输入上述靶点蛋白,并查询其所对应的靶点简称,最终获得 127 个靶点基因。

2.2 疾病靶点

在 GeneCards 数据库中筛选得到与银屑病相关的疾病靶点基因共 3 881 条。

2.3 药物与疾病靶点的交集

通过在线软件作图工具平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>),绘制清爽膏中 127 个靶点基因以及银屑病相关 3 881 个靶点基因的韦恩图,两者的交集认定为“疾病-化学成分”的共同作用靶点,共 82 个,见图 1。

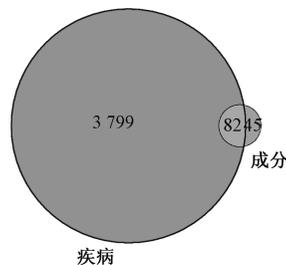
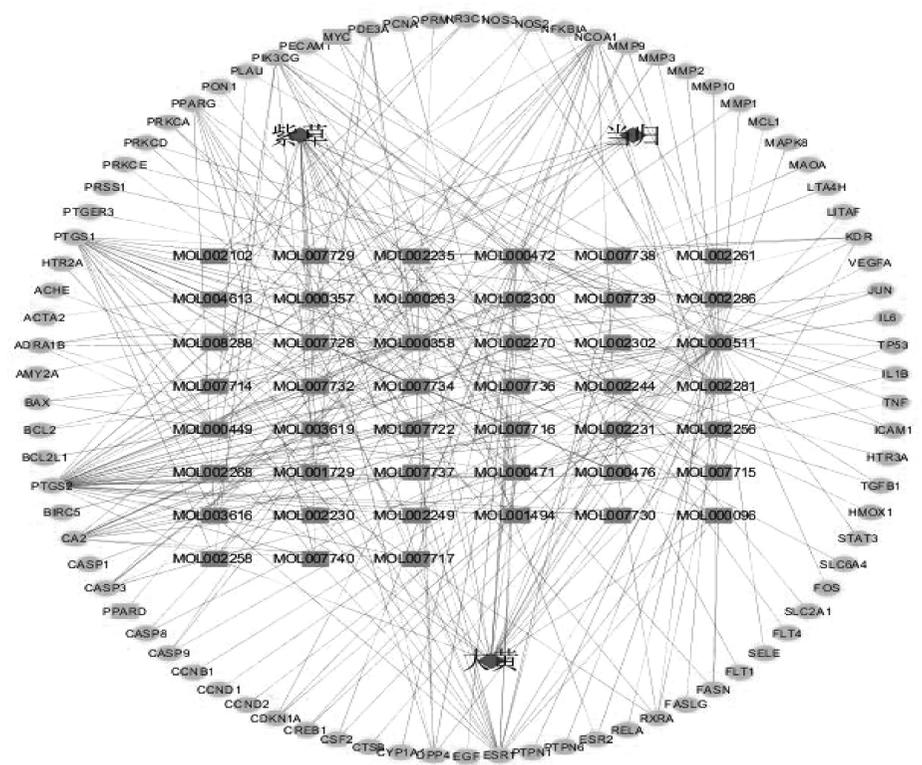


图 1 银屑病与清爽膏成分靶点的韦恩图

Fig 1 Venn diagram of compounds targets of psoriasis and Qingshuang ointment

2.4 “药物-成分-靶点”网络

通过 Cytoscape 3.7.0 软件构建清爽膏“药物-成分-靶点”网络,见图 2。图中共包含 130 个节点,310 条相互作用关系。清爽膏中作用于银屑病的化学成分有 45 个, Degree 排序居前 5 位的化合物为熊果酸(ursolic acid)、大黄素(emodin)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol)和芦荟大黄素(aloe-emodin),其中,熊果酸为紫草含有的成分,β-谷甾醇为当归、大黄共有的成分,大黄素、芦荟大黄素为大黄含有的成分,豆甾醇是当归含有的成分;化合物与疾病共同作用靶点 82 个, Degree 排序居前 5 位的靶点为 PTGS2、PTGS1、ESR1、NCOA1 和 CA2,见表 1。



菱形代表中药,矩形代表化合物,椭圆形代表靶点
rhombus represents Traditional Chinese medicine, rectangle represents compounds, ellipse represents targets

图 2 清爽膏“药物-成分-靶点”网络图

Fig 2 Qingshuang ointment “drugs-components-targets” network

表 1 清爽膏“药物-成分-靶点”网络拓扑图分析表
Tab 1 Qingshuang ointment “drugs-components-targets” network topology diagram

排序	类别	名称	Degree	类别	名称	Degree
1	成分	ursolic acid	46	靶点	PTGS2	41
2	成分	emodin	25	靶点	PTGS1	23
3	成分	beta-sitosterol	20	靶点	ESR1	17
4	成分	aloe-emodin	17	靶点	NCOA1	16
5	成分	stigmasterol	11	靶点	CA2	13

2.5 PPI 网络的建立

利用 String 数据库,将筛选出的清爽膏作用靶点与银屑病相关靶点的交集靶点基因导入其中,对靶基因间的 PPI 进行分析,构成“药物化学成分靶点-银屑病靶点”的 PPI 网络图,见图 3。网络中共有 82 个节点,1 036 条边;图中的节点表示蛋白质的靶点,每条边表示 PPI 关系。将其导入 Cytoscape 3.7.0 软件进行拓扑异构学分析,并绘制 Degree 排序居前 20 位的靶点柱状图,见图 4。Degree 排序居前 5 位的靶点分别为白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤抑制蛋白 p53 (TP53)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、肿瘤坏死因子 (TNF)、信号传导蛋白和转录激活物 (STAT3)。

2.6 GO 功能富集分析

依托 DAVID 平台进行 GO 功能富集分析,总共得到 501 条数据,将错误发现率 (FDR) < 0.05 作为标准,最终得到 203 条数据。其中,152 个条目与生物过程相关,32 个条目与

分子功能相关,19 个条目与细胞组成相关。表 2 列举了前 20 条 (以 FDR 从小到大排序) 显著的富集通路,主要涉及转录调控、凋亡过程和血管生成等。

2.7 KEGG 通路富集分析

依托 DAVID 平台进行通路富集分析,以 $P < 0.01$, $FDR < 0.05$ 作为条件进行筛选,共得 81 条结果,将结果通过 Omicshare 软件进行可视化。根据 P 值,选取前 20 个条目展示,见图 5。信号通路主要包括乙型肝炎、癌症的途径、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、结直肠癌、MAPK 信号通路、p53 信号通路和血管内皮生长因子信号通路等。

3 讨论

银屑病是一种慢性炎症性皮肤病,以表皮增厚、免疫反应和血管增生为特点。研究表明,银屑病的发生发展过程与免疫功能失调、信号转导通路紊乱、血管损伤和相关基因表达均有一定的相关性^[6-7]。现代医学治疗银屑病主要的药物包括保湿剂、润肤剂、糖皮质激素、维生素 D₃ 衍生物和钙调磷酸酶抑制剂等,但不良反应较多,无法长期使用^[8]。中医药治疗银屑病历史悠久,疗效确切,能够改善病情,延长缓解期,具有不良反应小的特点。清爽膏来源于赵炳南的临床经验方“清凉膏”^[9]。清爽膏由大黄、当归和紫草 3 味中药组成,其中大黄清热泻火、凉血解毒;当归补血活血;紫草清热凉血、活血解毒、透疹消斑。3 味药组合,具有清热凉血、活血解毒的作用,对银屑病的治疗有一定的疗效。

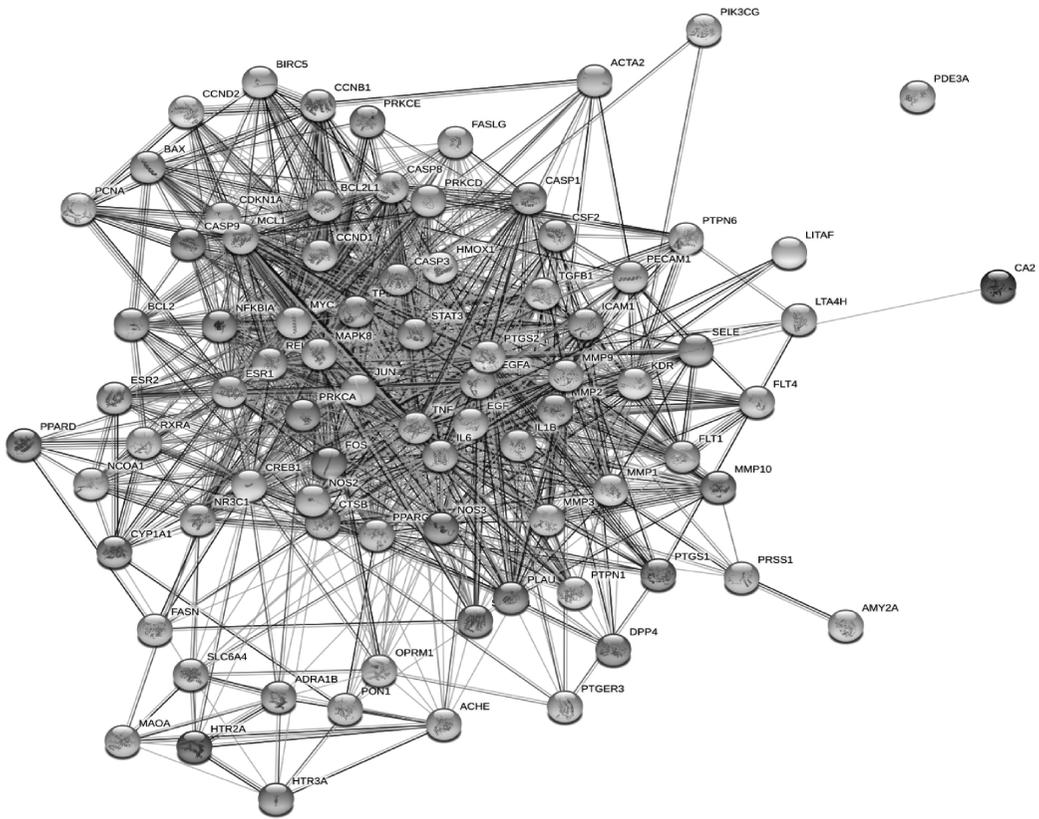


图3 清爽膏与银屑病共同靶点 PPI 网络图

Fig 3 PPI network of common targets of Qingshuang ointment and psoriasis

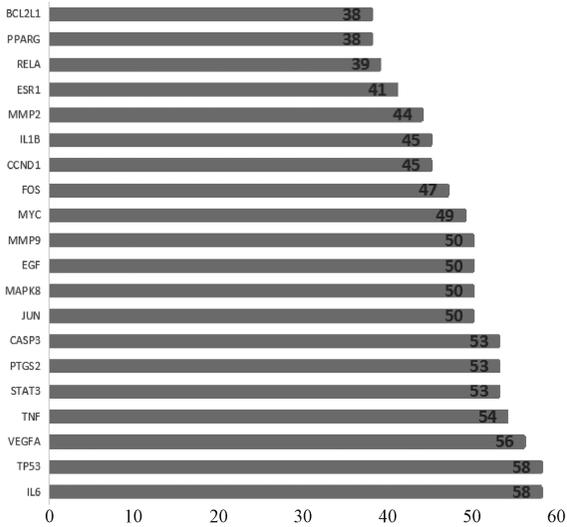


图4 Degree 排序居前 20 位的靶点柱状图

Fig 4 Histogram of the top 20 target points for Degree

本研究中，“药物-成分-共同靶点”网络图共获得 45 个清爽膏作用于银屑病的核心成分，以及对应的 82 个核心调控靶点。核心成分中最关键的成分包括熊果酸、大黄素、芦荟大黄素、 β -谷甾醇和豆甾醇。 β -谷甾醇参与炎症反应，同时可以减少 TNF、IL-6 和 IL-1 β 的释放，并据此改善银屑病的特征性皮损^[10-11]。芦荟大黄素具有抗炎的功效，能降低 IL-6 和 TNF- α

水平；能增加皮肤及皮肤血管相关生长因子的表达水平，促进创面愈合；能显著抑制人胶质细胞增殖且诱导角质细胞凋亡；还能增强巨噬细胞的吞噬作用，诱导 IL-1 β 增强机体免疫^[12]。

“药物-共同靶点-疾病”网络显示，Degree 排序居前 5 位的靶点分别为 PTGS2、PTGS1、ESR1、NCOA1 和 CA2，其中被药物调控最多的作用靶点为 PTGS2、PTGS1、ESR1 次之。前列腺素是一类具有生理活性的不饱和脂肪酸，参与介导细胞增殖、分化和凋亡等一系列细胞活动，参与炎症、恶性肿瘤和心血管疾病等多种病理过程。其中，PTGS2 参与前列腺素的合成，是前列腺素合成过程中的一种关键酶^[13]。ESR1 是雌激素受体，可调节脂肪组织的 VEGFA，增强血管生成，减少炎症和改善脂肪组织功能^[1]。

本研究构建的 PPI 网络图显示，清爽膏治疗银屑病的关键靶点包括 IL-6、TP53、VEGFA、TNF、STAT3、PTGS2、CASP3、JUN 和 MAPK8。IL-6 是一种多功能的促炎因子，在银屑病的发生发展中发挥重要作用，通过多条信号通路激活其受体，可对细胞的增殖、分化和凋亡等多种生理过程产生影响^[14]。TNF 由活化的巨噬细胞、自然杀伤细胞及淋巴细胞产生，具有广泛生物活性的细胞因子。TNF 参与了众多疾病的发生和发展，如肿瘤、感染、发热、内毒素性休克和自身免疫性疾病等。TNF 能促使炎症因子的合成与释放，可能与银屑病的炎症反应有关^[15]。银屑病的炎症过程主要通过树突状细胞 DCs 和 T 细胞介导，其与角质形成细胞 KCs 相互作用，使病灶部位皮肤出现表皮角化过度伴角化不全、淋巴细胞大量浸润和广泛血管生成的组织病理学特征。主要参与的关键靶点为 TNF、IL-17A、IL-12 和 IL-23^[16]。

表 2 清爽膏 PPI 网络中的 GO 条目

Tab 2 Go entries in PPI network of Qingshuang ointment

类别	编号	名称	基因个数	FDR
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0019899	enzyme binding	21	1.98×10^{-14}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042493	response to drug	20	3.41×10^{-13}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	20	2.71×10^{-10}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0032355	response to estradiol	12	2.73×10^{-10}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	19	2.28×10^{-9}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	9	1.09×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001666	response to hypoxia	12	1.49×10^{-7}
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005829	cytosol	40	9.93×10^{-8}
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005515	protein binding	69	2.33×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	17	5.38×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628	positive regulation of gene expression	13	8.00×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0032496	response to lipopolysaccharide	11	9.55×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007568	aging	11	9.55×10^{-7}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	12	1.23×10^{-6}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001525	angiogenesis	17	1.23×10^{-6}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006915	apoptotic process	11	1.29×10^{-6}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0070374	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	24	8.32×10^{-7}
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005615	extracellular space	19	1.17×10^{-6}
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0042802	identical protein binding	7	1.31×10^{-6}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0097192	extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	9	1.88×10^{-6}
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0071456	cellular response to hypoxia	21	1.98×10^{-14}

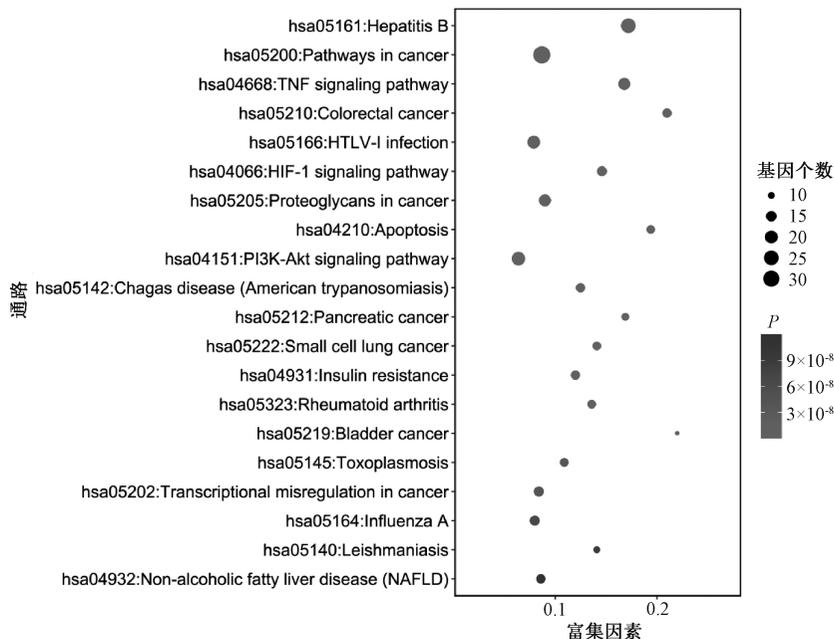


图 5 KEGG 通路富集的气泡图

Fig 5 Dotplot of KEGG pathway enrichment analysis

为了对共同作用靶点的机制作用进行深入探索,本研究开展了 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析结果显示,共同靶点的基因功能主要集中在细胞的增殖调控、基因的表达调控、细胞对缺氧的反应以及细胞凋亡调控等生物过程。通过 KEGG 信号通路分析可知,共同靶点作用通路包括 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、血管内皮生长因子信号通路和 p53 信号通路等。HIF-1 缺氧诱导因子是一种转录因子,缺氧条件下存在于人体内,是应答缺氧应急的关键因子, HIF-1 α 是 HIF-1 的一个亚单位,在银屑病皮损中高表达,可诱导血管内皮生长因子表

达,促进血管生长和表皮角质层过度增殖^[17]。PI3K/AKT 信号通路参与了细胞的增殖、分化和凋亡等过程,并参与表皮细胞的分化和存活过程^[10]。p53 信号通路是 DNA 损伤后介导细胞周期阻滞的关键路径,其异常可导致细胞凋亡或过度增殖。银屑病是一种具有特征性细胞过度增殖的慢性炎症性皮肤病,发病时可以检测到 p53 表达增多^[18]。该通路涉及的靶点有 CASP9、CDKN1A、CCNB1、CASP3、CASP8、BAX 和 TP53。有研究表明,银屑病角质形成细胞与 CASP3 活性有一定的相关性,可以增加 CASP3 蛋白表达。CASP3 是一种细胞凋亡标

(下转第 19 页)