

基于网络药理学和分子对接技术探讨如意金黄散 抗炎作用的分子机制[△]

许坤^{1,2*}, 张洁帆^{1,2}, 王用玉^{1,2}, 马威^{1,2}, 吴玉云^{1,2}, 陈博^{1,2}, 曹月龙^{1,2}, 赵咏芳^{1,2}, 詹红生^{1,2}, 庞坚^{1,2#}(1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 200120; 2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 200120)



中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)11-1281-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.11.001

摘要 目的:通过数据挖掘,运用网络药理学方法探讨如意金黄散抗炎作用的分子机制。方法:利用 GeneCards 数据库获取炎症相关靶点,运用 BATMAN-TCM 数据库获取如意金黄散中药物的活性成分及其相对应的靶点;将疾病靶点和药物靶点取交集后,构建药物-成分-靶点调控网络和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;运用 R 软件进行基因本体(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,最后使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,验证结果的可靠性。结果:经过筛选共得到 217 个药物活性成分,159 个炎症-如意金黄散交集基因,通过 GO 功能和 KEGG 通路富集分析得到 2 051 个 GO 条目和 149 条信号通路。如意金黄散可能是通过香芹酮、黄体酮和姜黄素等多种酮类活性成分参与动脉粥样硬化信号通路、神经活性配体-受体相互作用信号通路、雌激素信号通路和肿瘤坏死因子(TNF)信号通路等多个途径作用于胰岛素、蛋白激酶 B1、白蛋白、丝裂原激活的蛋白激酶 1 和 TNF 等多个关键靶点,从而发挥抗炎作用。分子对接结果显示,研究结果具有一定的可靠性。结论:本研究初步揭示了如意金黄散发挥抗炎作用的分子机制,为后续更深一步的基础及临床研究提供了新的理论依据。

关键词 网络药理学; 分子对接; 如意金黄散; 中医外科; 分子机制; 炎症

Molecular Mechanism of Anti-Inflammatory Effects of Ruyi Jinhuang Powder Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology[△]

XU Kun^{1,2}, ZHANG Jiefan^{1,2}, WANG Yongyu^{1,2}, MA Wei^{1,2}, WU Yuyun^{1,2}, CHEN Bo^{1,2}, CAO Yuelong^{1,2}, ZHAO Yongfang^{1,2}, ZHAN Hongsheng^{1,2}, PANG Jian^{1,2}(1. Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China; 2. Institute of Traumatology & Orthopedics, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the molecular mechanism of anti-inflammatory effects of Ruyi Jinhuang powder based on network pharmacology and data mining. **METHODS:** The inflammatory targets were obtained from GeneCards database, the active components and relative targets of Ruyi Jinhuang powder were obtained from BATMAN-TCM database. After the intersection of disease target and drug target, the regulation network and protein-protein interaction (PPI) network were constructed. R software was used for gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, AutoDock Vina was used for molecular docking to verify the reliability of the results. **RESULTS:** A total of 217 active components and 159 intersection genes of inflammation-Ruyi Jinhuang powder were obtained after screening. Totally 2 051 GO items and 149 signal pathways were obtained through GO and KEGG enrichment analysis. Ruyi Jinhuang powder might act on insulin, protein kinase B1, albumin, mitogen-activated protein kinase 1 and tumor necrosis factor (TNF) through a variety of ketone active components such as carvone, progesterone and curcumin, which were involved in the atherosclerosis signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathway, estrogen signaling pathway

[△] 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81674003, No. 81774340);上海市慢性筋骨病临床医学研究中心(No. 20MC1920600);上海市临床重点专科“中医骨伤科学”(No. shslczdk03901);上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2018年—2020年)海派中医流派传承工程[No. ZY(2018—2020)-CCCX-1010];上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2018年—2020年)中医药传承创新平台建设[No. ZY(2018—2020)-CCCX-2003-05]

* 住院医师, 硕士。研究方向:中医药防治骨与关节病损的基础与临床研究。E-mail: xk_shutcm@163.com

通信作者: 主任医师, 博士, 硕士生导师。研究方向:中医药防治骨与关节病损的基础与临床研究。E-mail: lidazul@126.com

and TNF signaling pathway, thereby exerting anti-inflammatory effects. The molecular docking results showed that the results of the network pharmacology study had certain reliability. CONCLUSIONS: This study preliminarily reveals the molecular mechanism of anti-inflammatory effects of Ruyi Jinhuang powder, and provides a new theoretical basis for further basic and clinical research

KEYWORDS Network pharmacology; Molecular docking; Ruyi Jinhuang powder; Surgery of traditional Chinese medicine; Molecular mechanism; Inflammation

如意金黄散首见于明代著名医家陈实功所编著的《外科正宗》：“如意金黄散大黄，姜黄黄柏芷陈苍，南星厚朴天花粉，敷之百肿自当安。”所谓“百肿”，《外科正宗》释为“痈疽发背、诸般疔肿、跌扑损伤、湿痰流毒、大头时肿、漆疮火丹、风热天泡、肌肤赤肿、干湿脚气、妇女乳痈、小儿丹毒，凡外科一切诸般顽恶肿毒”。陈实功又谓之“凡外科一切诸般顽恶肿毒，随手用之，无不效验，诚为疮家良便方也”，以其效验。清代吴谦将如意金黄散收入《医宗金鉴》。现代研究结果显示，如意金黄散作为外用制剂被广泛应用于静脉炎、网状淋巴管炎、痛风性关节炎、急性乳腺炎、阑尾周围脓肿、流行性腮腺炎、肱骨外上髁炎、膝骨关节炎和类风湿关节炎等感染与非感染性炎症疾病，可见其局部外用抗炎与抗感染的效用得到了临床医师的广泛肯定。然而，关于如意金黄散的效应机制与有效成分研究却鲜见于报道，限制了其组方配伍优化与制剂的改进。既往药理学研究结果显示，如意金黄散中的大黄^[1]、黄柏^[2]、姜黄^[3]和白芷^[4]等多种药物均具有抗炎作用。但是，由于如意金黄散组方中所含药味多样、成分复杂，作为外用制剂又涉及药物透皮吸收的生物利用度等问题，使得基于传统药理学研究思路的研究开展颇多局限。

2007年，Hopkins^[5]率先提出并系统地阐述了网络药理学的概念，将药物作用网络与机体生物网络结合在一起，分析药物在网络中与特定节点或模块的相互作用关系，从而理解药物与机体的相互关系。近年来，采用网络药理学的方法来进行中医病症的分析以及中药药理机制探讨已成为中医药研究的重要方法^[6]。本研究尝试采用网络药理学方法与生物信息学技术，运用多个网络数据库和数据分析软件等研究工具，从分子层面探讨如意金黄散抗炎作用的活性成分与潜在机制，为后续的药理与制剂研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 筛选炎症的疾病靶点

运用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[7]，以“inflammation”为关键词，搜索与炎症相关的疾病靶点基因，并将数据导出，并以“相关性分数^[8]>5”为筛选条件进行筛选，筛选时间范围为自建库至2021年12月20日。

1.2 筛选如意金黄散的成分及靶点

在 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>)^[9]中分别检索大黄、黄柏、姜黄、白芷、天南星、陈皮、苍术、厚朴、甘草和天花粉，筛选如意金黄散中药物的活性成分及其相对应的靶点，筛选标准为 score cutoff ≥ 30 且 $P < 0.05$ ，筛选时间范围为自建库至2021年12月20日。

1.3 获取“炎症-如意金黄散”交集基因

运用 R 软件 (v4.0.0)，将“1.1”中筛选出的炎症相关疾病的靶点基因与“1.2”中筛选出的如意金黄散相关靶点基因取

交集，并绘制出韦恩图。

1.4 绘制“药物-成分-靶点”网络图

运用 perl 软件 (v5.28.1)，将如意金黄散靶点基因与“炎症-如意金黄散”交集靶点基因一一映射，再用 Cytoscape 软件 (v3.7.0) 将相关数据进行可视化处理，绘制出“药物-成分-靶点”调控网络图。

1.5 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并筛选核心靶点基因

将“1.3”中获取的“炎症-如意金黄散”交集基因导入 String 在线软件 (<https://string-db.org/>, v11.0)，Organism 选项设置为“Homo sapiens”，将最小互作得分设置为 0.6，绘制出 PPI 网络图。从 String 在线软件获得的数据中，筛选出连接节点最多的 30 个基因，并绘制出条形图。

1.6 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

为了进一步明确如意金黄散抗炎的作用机制，运用 R 软件将“炎症-如意金黄散”交集基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，并绘制出相关柱状图和气泡图， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.7 分子对接验证

在“1.4”获得的“药物-成分-靶点”调控网络图中，筛选与靶蛋白连接节点最多的 10 个主要活性成分，从中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 中找出这 10 个主要活性成分的 3D 结构，并保存为 mol2 格式；筛选出连接节点排序居前 10 位的靶蛋白，从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中找出这 10 个靶蛋白的 3D 结构，并保存为 PDB 格式。运用 AutoDock 软件 (v1.5.6) 将活性成分及靶蛋白转换成 pdbqt 格式，最后使用 Vina 将 10 个活性成分与 10 个靶蛋白一一进行对接。

2 结果

2.1 筛选炎症的疾病靶点

运用 GeneCard 数据库搜索出炎症相关的疾病靶点基因 9 921 个，以“相关性分数>5”为筛选条件进行筛选后获得 1 648 个炎症相关疾病靶点基因。

2.2 筛选如意金黄散的成分及靶点，获取“炎症-如意金黄散”交集基因

通过 BATMAN-TCM 数据库检索筛选，共得到 283 种如意金黄散的活性成分，共涉及 793 个相关靶点，见表 1；将其与 1 648 个炎症相关疾病靶点取交集，结果显示共有 159 个“炎症-如意金黄散”交集靶点基因，见图 1。如意金黄散主要活性成分见表 2。

表 1 如意金黄散成分靶点数量

Tab 1 Target quantity of Ruyi Jinhuang powder

中药名称	成分数量/个	靶点数量/个
大黄	14	63
黄柏	20	34
姜黄	16	51
白芷	47	90
天南星	5	28
陈皮	26	41
苍术	15	25
厚朴	36	54
甘草	27	54
天花粉	36	72

表 2 如意金黄散主要活性成分

Tab 2 Main active components of Ruyi Jinhuang powder

编号	成分	所属中药	靶点数量/个
001	L-carvone	白芷	25
002	(S)-carvone	白芷	20
003	progesterone	大黄	20
004	turmerone	姜黄	19
005	(E)-4-phenyl-3-buten-2-one	大黄	18
006	10-undecenoic acid	白芷	18
007	1-methyl-2-[(z)-6-pentadecenyl]-4(1h)-quinolone	白芷	18
008	3-methyl-6,7,8-trihydropyrrolo[1,2-a]pyrimidin-2-one	甘草	17
009	dehydrocurdione	姜黄	17
010	geranylacetone	天花粉	17
011	2-furancarboxaldehyde	天花粉	16
012	angelicin	白芷	15
013	coprine	厚朴	15
014	serotonine	大黄	15
015	caprylic acid	姜黄	13
016	lauric acid	姜黄、白芷和陈皮	13
017	methyl pentadecanoate	天花粉	13
018	pentadecanoic acid	姜黄	13
019	tetrahydropalmatine	甘草	13
020	1-nonanol	天花粉	12
021	adenine	天南星	12
022	benzeneethanol	天花粉	12
023	phenethyl alcohol	白芷	12
024	ethyl linoleate	天花粉	11
025	ethyl linolenate	天花粉	11
026	gamma-aminobutyric acid	天花粉	11

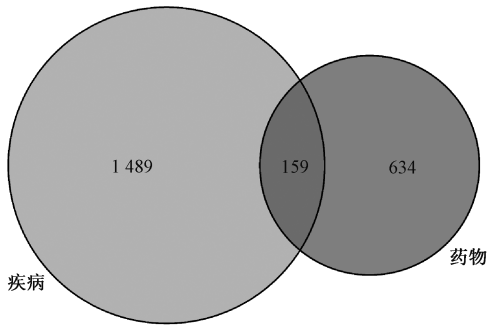


图 1 如意金黄散-炎症交集靶基因

Fig 1 Intersection target genes of Ruyi Jinhuang powder-inflammation

2.3 绘制“药物-成分-靶点”网络图

运用 Cytoscape 软件将相关数据进行可视化处理,绘制出“药物-成分-靶点”调控网络图,见图 2。图中,菱形表示如意

金黄散中所含的中药名称,圆形表示如意金黄散中所含的中药活性成分,长方形表示“炎症-如意金黄散”交集靶点基因。图中显示,如意金黄散主要通过 217 个药物活性成分作用于 159 个靶点,从而发挥抗炎作用。

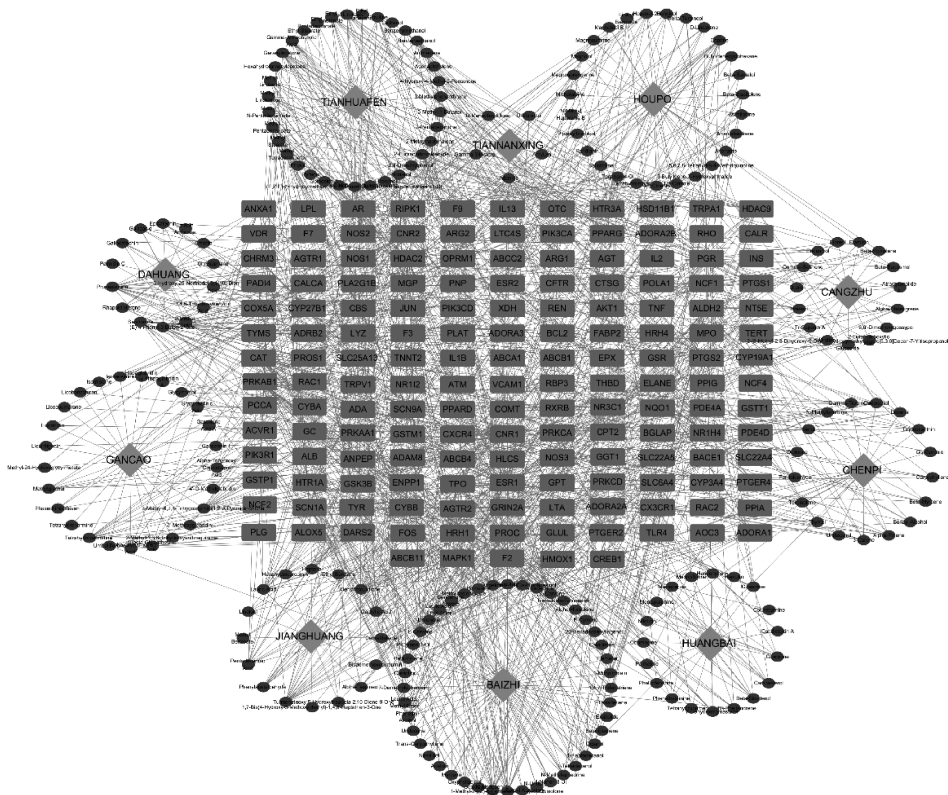


图 2 药物-成分-靶点调控网络图

Fig 2 Regulatory network of drug-component-target

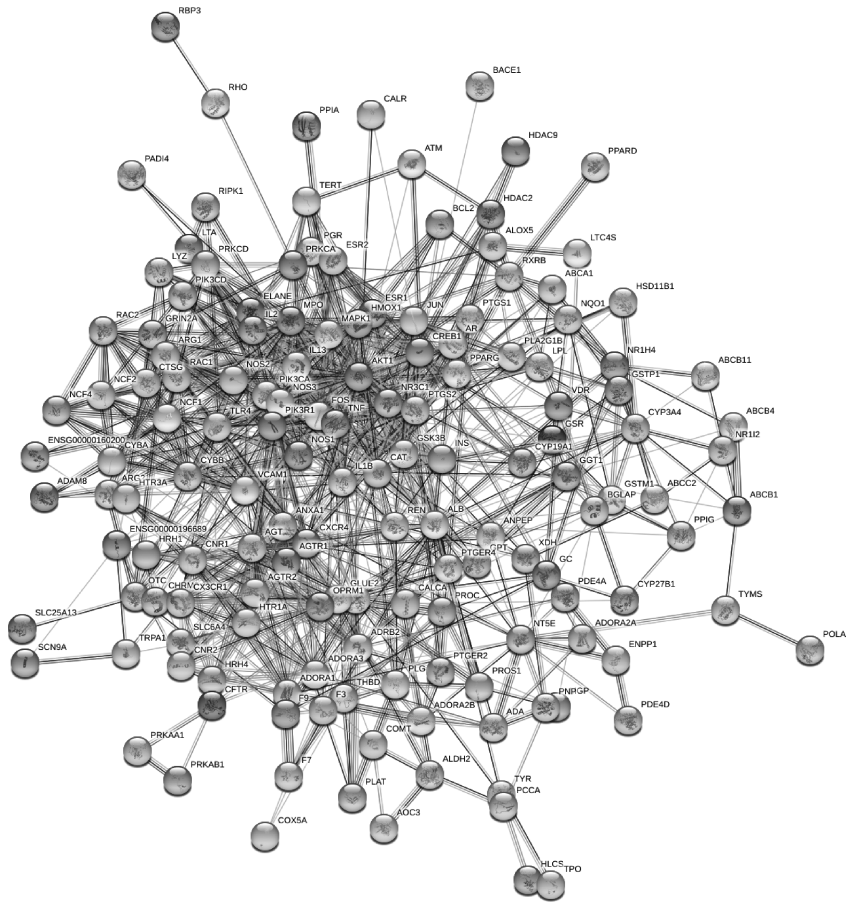


图3 炎症-如意金黄散交集靶点基因 PPI 网络图

Fig 3 PPI network of target genes at the intersection of inflammation-Ruyi Jinhuang powder

2.4 构建 PPI 网络并筛选核心靶点基因

通过 String 在线软件构建出“炎症-如意金黄散”交集靶点基因的 PPI 网络,见图 3。图中共有 149 个节点(隐藏 10 个游离节点),862 条相互作用关系。将连接次数最多的 30 个靶点基因筛选出来,绘制出条形图,见图 4。

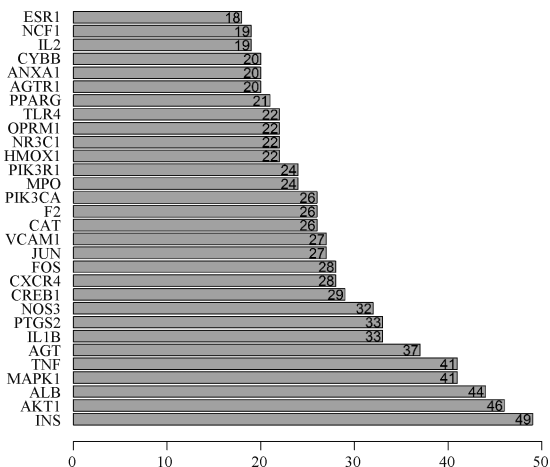


图4 核心靶基因条形图

Fig 4 Core target gene bar chart

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

将如意金黄散治疗炎症的核心靶点基因运用 R 软件进行

GO 功能富集分析,得到 GO 条目 2 051 个($P < 0.05$),其中涉及生物过程(BP)的条目 1 844 个,占 89.9%;涉及细胞组成(CC)的条目 78 个,占 3.8%;涉及分子功能(MF)的条目 129 个,占 6.3%。各排序居前 20 位的条目见图 5。

进行 KEGG 通路富集分析共得到 145 条($P < 0.05$)信号通路,主要包括流体剪切应力与动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)、神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物(AGE)-RAGE 受体信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)等。选择富集基因最多的前 20 个信号通路绘制气泡图,见图 6;并绘制出靶点-通路网络图,见图 7。

2.6 分子对接验证

将与靶基因连接节点最多的 10 个主要活性成分和连接节点排序居前 10 位的靶蛋白进行分子对接,结果见表 3、图 8。部分分子对接效果图见图 9。一般认为,受体与配体直接的结合能越低,则两者结合的稳定性越高。当结合能 ≤ -20.9200 kJ/mol 时,说明受体和配体可以自由结合;当结合能 ≤ -29.2880 kJ/mol 时,说明受体和配体结合后有较强的稳定性。本次分子对接结果显示,结合能 ≤ -29.2880 kJ/mol 的占 20%,结合能 ≤ -20.9200 kJ/mol 的占 86%,表明本次网络药理学研究结果具有一定的可靠性。

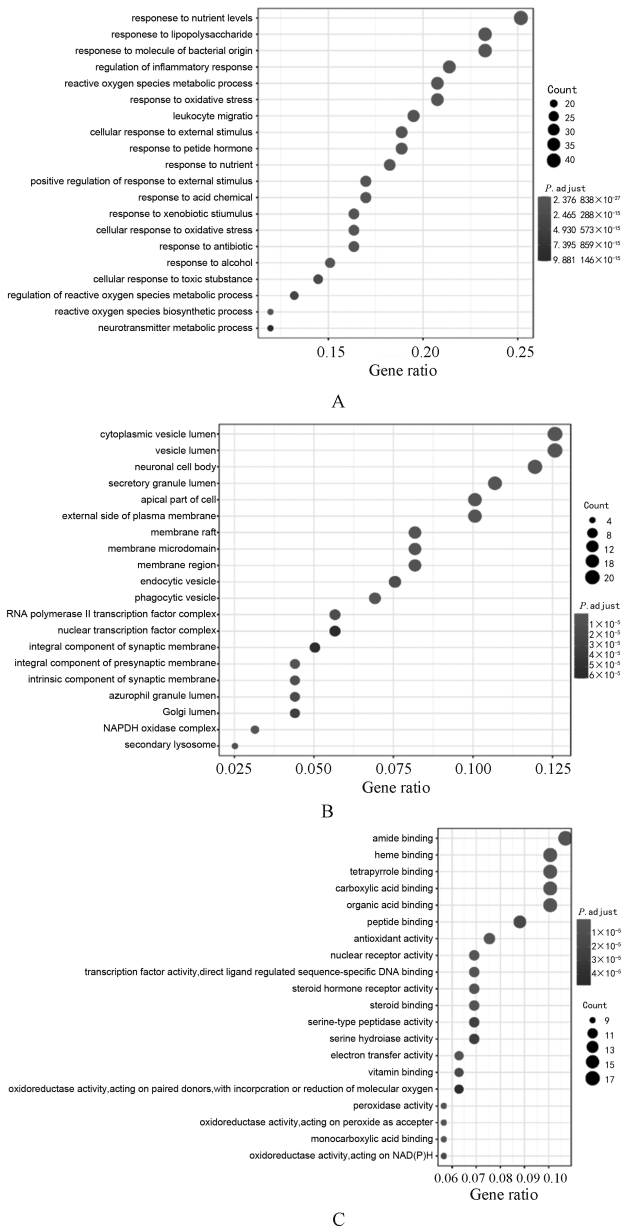
3 讨论

既往已有众多学者通过网络药理学等方法对中药治疗各种疾病的机制进行了探究,但研究对象绝大多数为内服药物。中医外用药物在临床应用广泛且取得了较好的疗效^[10],但对其药效机制的研究报道却并不多见。究其原因,可能与相关中药数据库中的筛选方式有关,如在 TCMS 数据库中,人们常用于筛选中药成分的指标口服生物利用度只适用于筛选口服中药,而不适用于筛选外用中药。因此,建议进行外用药物的网络药理学分析时,可选用 BATMAN-TCM 或 TCMID 等数据库进行成分筛选。

中医学认为,炎症反应的过程即为正邪斗争的过程^[11]。持续的炎症反应在不同程度上影响着人们的生活质量。中医药通过扶正祛邪的方式治疗炎症已有悠久历史,有着成本低、疗效佳、不良反应小和不易产生耐药性等优点,且注重辨证论治和整体观念,可在消除局部炎症的同时调节全身的免疫状况^[12]。

本研究结果提示,香芹酮、黄体酮、姜黄酮、反式苯亚甲基丙酮、10-十一烯酸、去氢莪术二酮和香叶基丙酮等化合物可能是如意金黄散抗炎作用的主要活性成分。“炎症-如意金黄散”交集靶点基因的 PPI 关系显示,INS、蛋白激酶 B (Akt1)、白蛋白 (ALB)、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 1 和肿瘤坏死因子 (TNF) 等是如意金黄散发挥抗炎作用的核心靶点基因。有研究表明,患者在遭受重症创伤的同时,常会产生应激性高血糖,从而加大感染的风险,INS 可以通过调控血糖水平来抑制炎症反应从而降低感染概率^[13]。李坤等^[14]通过动物实验研究发现,上调 Akt1 的表达水平,可以下调 TNF- α 、白细胞介素 6 等炎症因子的表达。MAPK1 是丝裂原活化蛋白激酶中的一种,与细胞分化、凋亡和炎症密切相关。

研究发现,如意金黄散抗炎机制的相关通路主要涉及流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、神经活性配体-受体相互作用信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、环磷酸腺苷信号通路、人巨细胞病毒感染信号通路破骨细胞分化信号通路、雌激素信号通路和 TNF 信号通路等。(1) 流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路:动脉粥样硬化为常见的慢性疾病,其发病具有与炎症相似的变质、渗出及增生等特点,抗炎也已成为治疗动脉粥样硬化疾病的新思路^[15-16]。(2) 神经活



A. BP; B. CC; C. MF

A. BP; B. CC; C. MF

图 5 GO 功能富集分析

Fig 5 Go enrichment analysis

表 3 分子对接结果 (kJ/mol)

Tab 3 Molecular docking results (kJ/mol)

成分	靶点									
	ESR1	AR	PGR	PRKAB1	ALDH2	CAT	TPO	HDAC2	TYR	NR3C1
L-carvone	-25.104 0	-16.736 0	-24.267 2	-20.920 0	-23.012 0	-25.522 4	-26.777 6	-19.246 4	-24.685 6	-24.685 6
(S)-carvone	-25.522 4	-17.154 4	-25.104 0	-21.338 4	-24.685 6	-24.267 2	-25.940 8	-19.246 4	-23.848 8	-23.430 4
progesterone	-29.288 0	-27.614 4	-36.819 2	-36.400 8	-37.656 0	-33.472 0	-43.513 6	-25.522 4	-33.890 4	-41.421 6
turmerone	-26.777 6	-17.572 8	-28.451 2	-20.501 6	-21.338 4	-29.706 4	-26.777 6	-18.409 6	-25.104 0	-25.940 8
(E)-4-phenyl-3-buten-2-one	-25.104 0	-18.409 6	-25.940 8	-21.756 8	-28.869 6	-25.522 4	-26.777 6	-26.359 2	-25.940 8	-23.848 8
10-undecenoic acid	-20.920 0	-17.154 4	-21.338 4	-20.920 0	-22.593 6	-23.012 0	-23.430 4	-25.940 8	-24.267 2	-18.828 0
1-methyl-2-[(Z)-6-pentadecenyl]-4(1h)-quinolone	-30.961 6	-22.593 6	-32.216 8	-24.267 2	-25.522 4	-26.777 6	-29.706 4	-17.991 2	-21.338 4	-31.798 4
3-methyl-6,7,8-trihydropyrrolo[1,2-A]pyrimidin-2-one	-24.685 6	-20.501 6	-26.359 2	-26.359 2	-29.288 0	-26.359 2	-27.614 4	-25.522 4	-28.451 2	-24.267 2
dehydrocurdione	-37.237 6	-22.593 6	-34.727 2	-28.451 2	-29.706 4	-31.798 4	-33.053 6	-24.267 2	-28.451 2	-33.472 0
geranylacetone	-25.522 4	-19.246 4	-26.777 6	-20.083 2	-22.593 6	-26.777 6	-25.940 8	-25.522 4	-26.777 6	-24.685 6

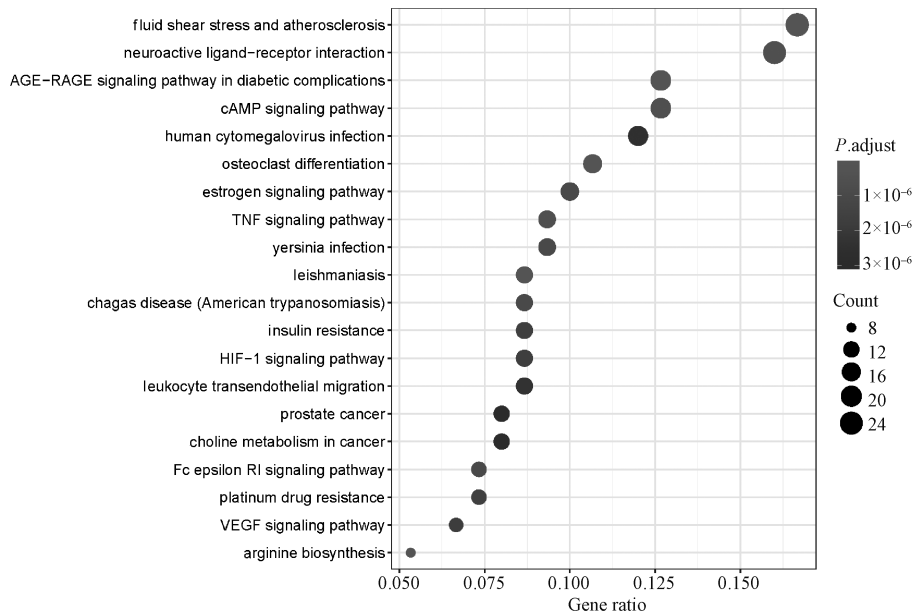


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig 6 KEGG enrichment analysis

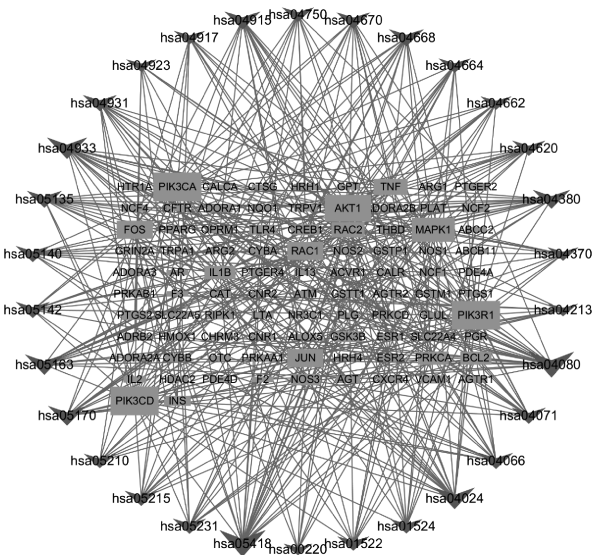


图 7 靶点-通路网络图

Fig 7 Target-pathway network

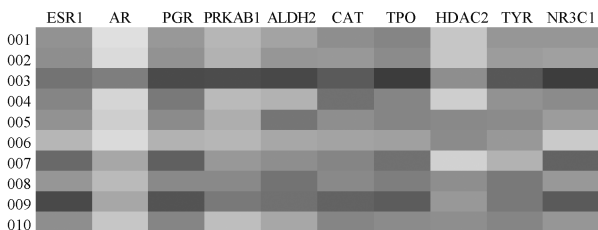
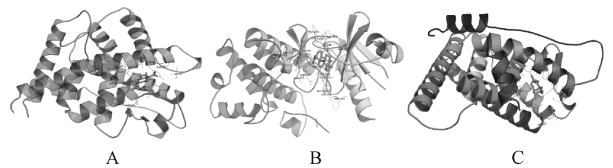


图 8 分子对接评分热力图

Fig 8 Thermodynamic diagram of molecular docking score

性配体-受体相互作用信号通路;研究结果表明,神经系统对炎症反应的调控具有重要作用,交感神经的过度激活会加重炎症



A. 黄体酮-NR3C1; B. 黄体酮-TP0; C. 去氢二酮-ESR1

A. progesterin-NR3C1; B. progesterin-TP0; C. dehydrodione-ESR1

图 9 部分分子对接效果图

Fig 9 Effect of partial molecular docking

反应,而副交感神经可以通过降低肿瘤坏死因子受体 1 的表达,进而发挥抗炎作用^[17]。(3) 雌激素信号通路:雌激素的作用具有多效性,影响着机体多个系统。有文献报道,雌激素的急性丢失会增加活性氧的水平,并激活核因子 κB 和促炎细胞因子的产生,表明雌激素具有明显的抗炎特性^[18]。(4) 环磷酸腺苷信号通路:环磷酸腺苷是稳定内皮细胞屏障的最有效的信号分子之一,环磷酸腺苷的刺激可以有效阻断大多数炎症介质所致内皮细胞通透性增加^[19]。(5) 糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路和 TNF 信号通路:Tang 等^[20]的研究结果发现,高水平的 TNF- α 显著促进了 2 型糖尿病患者机体内的慢性炎症,该过程可能由糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路和 TNF 信号通路等多个通路完成,而 TNF- α 下调的分子机制有待进一步研究。

综上所述,如意金黄散可能是通过香芹酮、黄体酮和姜黄素等多种酮类活性成分参与流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、神经活性配体-受体相互作用信号通路、雌激素信号通路和 TNF 信号通路等多个途径作用于 INS、Akt1、ALB、MAPK1 和 TNF 等多个靶点,从而发挥抗炎作用,且运用分子对接技术

(下转第 1293 页)