

· 葛根芩连汤治疗动脉粥样硬化机制研究专题 ·

[编者按] 动脉粥样硬化(AS)是一种与免疫和炎症密切相关的慢性疾病,是心血管疾病的重要病理基础之一。巨噬细胞是人体重要的免疫调节细胞,参与机体的炎症调节、免疫应答等。巨噬细胞从AS早期的脂质蓄积,形成泡沫细胞、富集堆积,到晚期AS斑块易损性增强,最终坏死破裂,在AS的全过程中起着至关重要的作用。因此,探究巨噬细胞在AS过程中的表型变化,有助于明晰AS的发病机制,进而找到更有效的治疗靶点,为临床开发有效的治疗药物助力。有研究表明,巨噬细胞在体内不同环境的刺激下会发生不同的变化,这一过程被称作极化(polarization)。在AS中,一般会极化为M1、M2两种表型,其中M1为促炎表型,M2则为抑炎表型,二者之间的动态平衡影响AS的转归。细胞焦亡(pyroptosis)是一种炎性的细胞程序性死亡方式,其特点是细胞膜完整性被破坏,炎症因子及细胞内容物经膜孔释放,伴随剧烈而持续的炎症反应。有研究显示,在AS晚期斑块中,巨噬细胞会发生焦亡,同时大量与焦亡相关的炎症因子释放。由此,本系列研究旨在从巨噬细胞极化和焦亡两种表型对AS斑块易损性的角度展开研究,并选择了《伤寒论》中的经典名方葛根芩连汤(GQL)进行干预,探究其治疗AS,稳定易损斑块的作用机制,进而通过网络药理学联合分子对接的方法进一步挖掘了GQL治疗AS的相关通路和靶点及之间的互作关系等,以期为临床中医药治疗AS提供新的研发思路和实验证据。

基于网络药理学联合分子对接探究葛根芩连汤干预 动脉粥样硬化的潜在分子机制

郑一, 郭鹤, 罗曦, 王艳杰, 赵丹玉, 冯晓帆, 李宝坤, 王靖宇,
张林, 刘羽茜, 于睿*, 孟宪生*
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:基于网络药理学联合分子对接探究葛根芩连汤(GQL)干预动脉粥样硬化(AS)的潜在分子机制。方法:从中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选GQL中各药材的活性成分及靶点,从7个数据库中查找AS相关基因,确定GQL治疗AS的靶基因。利用Cytoscape 3.8.0构建“成分-靶点”网络。利用STRING建立蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并通过CytoNCA拓扑分析筛选核心靶点。运用R clusterProfiler对目标基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析,预测其富集的信号通路并以多种图可视化展示。最后将活性强度前10位的成分作为配体,与筛选得到AS核心靶点进行分子对接分析,并与阿托伐他汀的结合度进行对比。结果:得到GQL活性成分150个,AS疾病靶点20289个,交集靶点213个。经过筛选,获取核心交集靶点48个,GO和KEGG富集分析发现其功能主要与细胞核受体活动、配体的激活、转录因子活动等有关,富集在流体剪切力与AS、晚期糖基化终产物及其受体(AGE/RAGE)、白细胞介素-17(IL-17)、肿瘤坏死因子(TNF)、Toll样受体通路等与AS关系密切的信号通路。分子对接结果显示GQL效应成分与AS核心靶点结合较好,甚至优于阿托伐他汀,结合度最好的5组关系分别是葛根素-TNF,黄芩素-诱导型一氧化氮合酶(NOS2),葛根素-NOS2,芒柄花黄素-NOS2,汉黄芩素-NOS2。结论:以上研究为该经典名方日后进一步探索提供了新思路。

[关键词] 葛根芩连汤; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 分子对接; 机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)11-0051-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220412 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220124.1722.010.html>

[网络出版日期] 2022-01-26 16:00

[收稿日期] 2021-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874342);辽宁省重点研发计划项目(2020JH2/10300088);辽宁省科学技术计划项目——工业重大专项(2020JH1/10100022);辽宁省教育厅科学技术研究项目(L202044);辽宁中医药大学自然科学类项目(2021LZY026)

[第一作者] 郑一, 讲师, 博士, 从事中药药效物质组学与作用机理整合研究, E-mail: zydg90@vip.qq.com

[通信作者] * 于睿, 教授, 博士生导师, 博士后合作导师, 从事中西医结合防治心血管疾病, E-mail: yurui1969@163.com;

* 孟宪生, 教授, 博士生导师, 博士后合作导师, 从事中药药效物质组学与作用机理整合研究, E-mail: mxsvvv@126.com

Explore Potential Molecular Mechanism of Gegen Qinliantang in Intervention of Atherosclerosis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

ZHENG Yi, GUO He, LUO Xi, WANG Yan-jie, ZHAO Dan-yu, FENG Xiao-fan, LI Bao-kun, WANG Jing-yu, ZHANG Lin, LIU Yu-xi, YU Rui*, MENG Xian-sheng*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shneyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the potential molecular mechanism of Gegen Qinliantang (GQL) in the intervention of atherosclerosis (AS) based on network pharmacology and molecular docking. **Method:** The active components and targets of each medicinal in GQL were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and AS-related genes from 7 databases. Thereby, the anti-AS targets of GQL were screened out. Cytoscape 3.8.0 was employed to construct the "component-target" network, and STRING the protein-protein interaction (PPI) network. Core targets were screened out with CytoNCA. R clusterProfiler was used for Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of target genes, which were then visualized. Finally, molecular docking of the top ten active components with the core targets of AS was performed and the binding affinity was compared with that between atorvastatin and the core targets. **Result:** In the end, 150 active components of GQL, 20 289 AS targets, and 213 common targets were retrieved, and 48 core common targets were screened out. They were mainly involved in the GO terms of nuclear receptor activity, ligand activation, and transcription factor activity and the pathways of fluid shear force and AS, advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products (AGE/RAGE), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor (TNF), Toll-like receptor pathways and other signaling pathways closely related to AS. The molecular docking results showed that the effective components of GQL had high binding affinity to core targets of AS, and the binding affinity was even higher than that between the atorvastatin and core targets. The five groups with high binding affinity were puerarin-TNF, baicalein-inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2), puerarin-NOS2, and formononetin-NOS2, wogonin-NOS2. **Conclusion:** The above result provides new ideas for further exploration of this classical decoction.

[Keywords] Gegen Qinliantang; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking; mechanism

经典名方是我国中医药文化的瑰宝,扩大其应用范围及“古方今用”是国家所大力倡导的。现代药理技术通过色谱、质谱等技术手段实现了对中药^[1-2]及复方^[3]成分更加准确和系统地分析。葛根芩连汤(GQL)源自于《伤寒杂病论》,由葛根、黄芩、黄连、甘草组成。此前多用于治疗消化系统及内分泌疾病,如2型糖尿病^[4]、溃疡性结肠炎等,临床及机制方面的研究均卓有成效,经现代研究已证实了其具有抗炎、抗氧化应激、保护肠黏膜屏障、调节肠道菌群、免疫反应等多种药理作用^[5]。动脉粥样硬化(AS)是一种好发于大中型动脉的慢性炎症反应性疾病,具备优良抗炎作用的GQL针对AS的治疗鲜有报道,深入讨论其作用机制、进一步地探究亟待进行。他汀类药物是临床最常用的调脂药物,有

稳定斑块、降低心梗发生率等作用,常用的有阿托伐他汀、瑞舒伐他汀等,是《2016年中国成人血脂异常防治指南》推荐临床上首选的药物(I类推荐,A级证据)。日前,网络药理学技术的兴起为探究中药复方的作用机制及新药开发带来了曙光。笔者根据此前提出的AS“阳明热毒致瘀”的中医病机,借助网络药理学方法从分子调控网络层面研究GQL治疗AS的潜在靶点及富集通路情况,将GQL的主要成分及代表性他汀类药物——阿托伐他汀,分别与AS核心靶点进行分子对接,并比较结合程度,为日后进一步开展实验研究提供依据,希望对丰富GQL在AS方面的临床应用及转化起到抛砖引玉的作用。

1 材料

Cytoscape 3.8.0、R (x64) 4.0.3、Strawberry Perl 5.32.0.1、PyMOL 2.4.0、AutoDockTools 1.5.6、Autodock vina 1.1.2、Ligplot 2.2软件;中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(<http://tcmsp.w.com/tcmspsearch.php>), UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)等。

2 方法

2.1 GQL有效成分及靶点的筛选 在TCMSP^[6]中检索GQL组成药物的所有有效成分,并按照ADME参数进行筛选,筛选标准为口服生物利用度(OB)≥30%;类药性(DL)≥0.18,继续检索数据库及相关文献对有效成分进行补充^[7-12]。获取GQL成分的相关作用靶点,应用Strawberry Perl软件,通过UniProt数据库进行过滤,标准化处理后,获得与有效成分相关的潜在靶点。

2.2 AS疾病相关靶点的获取及整合 以“atherosclerosis”和“arteriosclerosis”为检索词在DisGeNET、GeneCards、CTD、TTD、PharmGkb、DrugBank、NCBI Gene数据库检索并获取AS的基因靶点,去除重复部分并对其名称标准化,获取交集基因。

2.3 药物有效成分和AS交集基因的获取及韦恩图的制作 运用R x64软件将GQL有效成分作用靶点与AS的疾病靶点进行匹配,获得交集基因,制作出Venn图将结果可视化^[13]。

2.4 GQL有效成分-交集靶点调控网络的构建 使用Cytoscape 3.8.0软件,进行有效成分-交集靶点的调控网络构建。

2.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点筛选 将GQL主要成分靶点与AS靶点的交集基因导入STRING 11.0,获取PPI网络,使用CytoNCA插件centrality原则里的6个维度进行打分,筛选出核心靶点。

2.6 GQL有效成分-AS功能及通路的富集分析 运用R x64软件对交集基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,通过细胞组成(CC),生物过程(BP)和分子功能(MF)3个层次对基因功能注释。过滤条件 P 、 Q 均 <0.05 ,输出分析结果。

2.7 分子对接

2.7.1 配体的筛选及文件准备 将获得的药物活性成分网络,以靶点数目评价活性强度。将其排序并选择前十位的成分作为配体,从PubChem数据库

获取对应配体的2D结构,使用ChEMBL3D转换为最小自由能的3D空间构象,进行格式转换。

2.7.2 靶点蛋白受体文件准备 选取2.5项下获得的与AS相关的核心靶点蛋白,结合CTD数据库中AS疾病靶基因的检索结果,根据是否有直接医学证据和inference score排名情况,综合考量后选择肿瘤坏死因子(TNF)、信号传导与转录激活因子3(STAT3)、雌激素受体 α (ESR1)、趋化因子(C-C基元)配体2(CCL2)、一氧化氮合酶2(NOS2)、血管内皮生长因子A(VEGFA)作为GQL活性成分的蛋白受体。从UniProt数据库查找带“Human”标识的对应靶点受体蛋白ID,复制ID后进入RCSB PDB蛋白质数据库下载对应的蛋白受体结构;将获得的受体蛋白文件导入PyMOL进行去水、去配体、加氢、合并非极性氢等处理,然后转换格式保存。

2.7.3 分子对接 通过AutoDockTools 1.5.6软件的Grid功能来确定蛋白受体上可以与药物成分配体相结合的结构域,即活性口袋。根据上一步获得的参数,使用Autodock vina 1.1.2软件进行分子对接,使用PyMOL等软件分析对接强度,氢键, Pi-Pi共轭键,氨基酸残基疏水情况等,最后选择结合度最佳的5组结果制图呈现。

3 研究结果

3.1 GQL主要有效活性成分及靶点 通过TCMSP数据库初筛到410个GQL的有效成分,复筛去除重复值后得到141个,继续检索TCMID等数据库并结合相关文献检索结果补充有效成分9个,合计150个。从TCMSP数据库中获取GQL药物成分的作用靶点共213个,应用Strawberry Perl软件进行药物靶点ID转换。根据OB列举出排名前40的有效成分,见表1。

3.2 AS疾病靶点的获取 按2.2项下研究方法去除重复,共计获取AS疾病靶点20 289个,见增强出版附加材料。

3.3 GQL-AS作用靶点的交集 将GQL-AS的作用靶点用R x64软件取交集并制作韦恩图,交集靶点213个,见增强出版附加材料。

3.4 GQL成分与AS交集靶基因的网络分析 GQL有效成分与其靶基因的网络关系图,见增强出版附加材料。共计343个节点,2 038条边,343个节点中有药物成分节点130个(20个药物成分与靶点作用关系不详),交集靶点节点213个。

3.5 PPI网络构建及核心靶点筛选 PPI网络图见增强出版附加材料,导入Cytoscape 3.8.0软件获取

表1 GQL40种有效活性成分信息

Table 1 Information table of 40 active ingredients of GQL

分子编码	药物成分	OB/%	DL
MOL004924	苜蓿紫檀素	40.99	0.95
MOL004988	kanzonol F	32.47	0.89
MOL005018	xambioona	54.85	0.87
MOL002668	甲基黄连碱	45.83	0.87
MOL001458	黄连碱	30.67	0.86
MOL004948	异甘草醇	44.70	0.84
MOL002904	小檗浸碱	36.68	0.82
MOL004953	甘草苷芹糖	29.23	0.82
MOL004917	黄甘草苷	37.25	0.79
MOL002907	黄麻苷 A _{qt}	104.95	0.78
MOL000211	丁子香酚	55.38	0.78
MOL005001	甘草宁H	50.10	0.78
MOL002897	表小檗碱	43.09	0.78
MOL001454	小檗碱	36.86	0.78
MOL002903	(R)-氢化小檗碱	55.37	0.77
MOL013352	黄柏酮	43.29	0.77
MOL002935	黄芩苷	29.53	0.77
MOL000449	豆甾烯醇	43.83	0.76
MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
MOL004901	甘草皂苷 K2 _{qt}	27.79	0.75
MOL004903	甘草苷	65.69	0.74
MOL004897	甘草皂苷 J2 _{qt}	28.30	0.74
MOL004891	shin-紫檀素	80.30	0.73
MOL002894	小檗红碱	35.74	0.73
MOL004805	山豆根色满二氢黄酮 I	31.79	0.72
MOL004963	24-羟基甘草次酸	24.17	0.72
MOL005013	18 α -羟基甘草次酸	41.16	0.71
MOL012297	葛根素	24.03	0.69
MOL002311	新甘草酚	90.78	0.67
MOL003629	大豆苷元-4,7-二葡萄糖苷	47.27	0.67
MOL004904	甘草吡喃香豆素	80.36	0.65
MOL000785	非洲防己碱	64.60	0.65
MOL000762	掌叶二萜酮 A	35.36	0.65
MOL004959	1-甲氧基菜豆素	69.98	0.64
MOL004889	甘草皂苷 F3 _{qt}	27.53	0.64
MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63
MOL005008	甘草黄酮醇 A	41.28	0.60
MOL005007	粗毛甘草素 M	72.67	0.59

核心靶点,按 CytoNCA 插件中 centrality 的六个维度打分,经中位值过滤后最终获得 48 个核心靶点,细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、蛋白激酶 1(RASA1)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)样蛋白 1(BCL2L1)、表皮生长因子受体(EGFR)、C-X-C 基序趋化因子 8(CXCL8)、CXCL10、CXCL2、周期蛋白 A2(CCNA2)、表皮生长因子(EGF)、原癌基因蛋白(FOS)、酪氨酸激酶受体 2(ERBB2)、TP53、视网膜母细胞瘤蛋白 1(RB1)、NF κ BIA、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、STAT1、白细胞介素-4(IL-4)、IL-1B、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、MAPK14、MAPK1、MAPK8、趋化因子 2(CCL2)、骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(MYC)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、低氧诱导因子-1 α (HIF1A)、细胞周期素 D1(CCND1)、类视黄醇 X 受体 A(RXRA)、RXRB、蛋白激酶 B1(Akt1)、雌激素受体 1(ESR1)、肿瘤坏死因子(TNF)、重组周期蛋白依赖蛋白激酶抑制剂 1(CDKN1A)、金属基质蛋白酶-9(MMP-9)、Bcl-2、V-REL 网状内皮增生病毒癌基因同源物 A(RELA)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)、核受体共激活因子-2(NCOA2)、原癌基因蛋白(JUN)、NCOA1、Caspase-8、蛋白激酶 C α (PRKCA)、PRKCB、NOS2、周期素依赖性激酶 2(CDK2)、毒蕈碱型胆碱受体 M2(CHRM2)。

3.6 GQL 药物成分-AS 功能及通路的富集分析

3.6.1 GO 及 KEGG 富集分析概况 BiocManager 的 clusterProfiler 包由南方医科大学余光创教授团队设计,更新迅速,功能日臻完善,支持基因和基因簇功能图谱的统计分析及可视化处理^[14]。运用此包将 213 个 GQL 治疗 AS 的作用靶点进行 GO 注释及 KEGG 通路富集分析,结果显示 GO 注释中,与 CC 相关($P < 0.05$)的条目共有 81 个,与 BP 相关($P < 0.05$)的条目共有 2 421 个,与 MF 相关($P < 0.05$)的条目共有 256 个;KEGG 分析($P < 0.05$)的通路共有 178 个,见增强出版附加材料。

3.6.2 GO 富集分析结果 分析出 GQL 治疗 AS 的作用靶点对药物的反应、细胞对化学刺激的反应及对脂多糖的反应等在 BP 中富集程度最高;CC 中,细胞膜上的膜筏的富集程度最高,膜性结构域、膜区与小凹(细胞膜穴样内陷)次之;在 MF 中,富集程度高的注释结果主要有细胞核受体活动、配体的激活、转录因子活动等。

3.6.3 KEGG 富集分析 GQL 的药物成分主要富

集在流体剪切力与 AS、晚期糖基化终产物及其受体(AGE/RAGE)、IL-17、TNF、Toll 样受体(TLR)通路等与 AS 关系密切的信号通路,除此之外还有一些肿瘤通路及内分泌代谢性疾病通路,涉及与 AS 密切相关多种细胞因子、功能蛋白等,如丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPK1、3、4、8、10、14 等)、基质金属蛋白酶(MMP-1、3 等)、TNF、白细胞介素家族(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4 等)、PPARA、表皮细胞生长因子受体家族(EGFR、VEGFR 等)、一氧化氮合酶家族(NOS2、NOS3 等)、信号传导与转录激活因子家族(STAT1、STAT3 等)、趋化因子(CCL2 等)、含胱天蛋白酶家族(Caspase-8、Caspase-9 等)。

3.7 分子对接

3.7.1 GQL 成分配体筛选 利用 2.7 项下方法选择配体见表 2;从 PubChem 数据库及 960 化工网获取其对应的小分子配体,并与阿托伐他汀进行比较。阿托伐他汀 2D 结构见增强出版附加材料。

表 2 筛选后配体中英文名称一览

Table 2 List of Chinese and English names of ligands after screening

配体英文名称	中文名称
quercetin	槲皮素
kaempferol	山柰酚
puerarin	葛根素
wogonin	汉黄芩素
7-methoxy-2-methyl isoflavone	7-甲氧基-2-甲基异黄酮
naringenin	柚皮素
baicalein	黄芩素
formononetin	刺芒柄花素
licochalcone A	甘草查尔酮 A
isorhamnetin	异鼠李素
atorvastatin	阿托伐他汀

3.7.2 分子对接及结果分析 经 Autodock vina 1.1.2 软件分子对接后,得到每种活性成分配体与受体蛋白之间的结合能,由于化合物 7-methoxy-2-methyl isoflavone 在 Pubchem 及其他相关网站无法查找到合适的 2D 结构受体文件,故无法进一步对接操作。本部分将展示其余 9 个中药活性成分配体、阿托伐他汀配体与 6 个靶点受体对接的情况。

配体和受体对接结合能越低表示分子结合越稳固,交互作用可能性越高,结合能 ≤ -5.0 kcal \cdot mol⁻¹ 时结合的较好^[15],结合能 ≤ -7.5 kcal \cdot mol⁻¹ 结合的非常好^[16],将结合能最低的 5 组以红色标记,分别是葛

根素-TNF, 黄芩素-NOS2, 葛根素-NOS2, 芒柄花素-NOS2, 汉黄芩素-NOS2, 以 PyMOL、Discovery Studio 2019、Ligplot+ 软件将对接结果可视化处理, 结果制表汇总见表3。

表3 中药活性成分与靶点对接结合能
Table 3 Table of binding energy of active ingredients of traditional Chinese medicine and target point kcal·mol⁻¹

配体\受体	TNF	STAT3	ESR1	CCL2	NOS2	VEGFA
槲皮素	-9.2	-8.2	-7.2	-8.2	-9.6	-6.7
山柰酚	-9.2	-8.0	-8.1	-7.8	-9.7	-6.4
葛根素	-10.3	-7.2	-6.9	-8.4	-10.0	-7.2
汉黄芩素	-8.7	-7.3	-9.1	-7.5	-9.8	-6.6
7-甲氧基-2-甲基异黄酮	-	-	-	-	-	-
柚皮素	-8.8	-7.8	-9.0	-7.6	-9.8	-6.6
黄芩素	-9.1	-7.6	-8.8	-8.3	-10.3	-7.0
刺芒柄花素	-8.7	-7.3	-7.3	-8.0	-10.0	-7.3
甘草查尔酮A	-8.6	-6.4	-6.6	-5.7	-7.4	-6.1
异鼠李素	-9.2	-8.2	-7.0	-8.0	-9.8	-6.8
阿托伐他汀	-6.0	-7.1	-6.9	-8.7	-10.2	-7.3

4 讨论

本研究应用网络药理学的方法, 通过参照和检索多种数据集得到海量的 GQL-AS 的成分-疾病靶点相关信息, 进行网络构建及梳理, 直观而多元地显示了该方中各有效成分之间的联系和差异性, 及核心成分、与疾病靶点互作、生物基因注释和通路之间等复杂的分子网络^[17-18]。

GQL 是由4味药构成的复方, 由于每种药物都有多种活性成分及多个作用靶点, 因此构成复方后对 AS 的治疗作用也不是单一功效的简单叠加, 一定存在相互之间的协同作用, 具有多通路多靶点调控的特点。AS 的主要病机之一是气血不畅, 瘀血壅塞脉道, 阳明经多气多血, 易于化热, 热毒致瘀壅塞脉道是 AS 的中医病机之一, 而 GQL 能清解阳明热毒, 其干预 AS 的潜在机制亟待探索。

本研究共筛选出 GQL 成分与 AS 的交集靶点 213 个, 经筛选最终获得 48 个作用的核心靶点, 有 TNF、IL-1 β 、核转录因子(NF)- κ B、STAT3、CCL2、VEGFA、NOS2 等。CCL2 可以促使白细胞等迁移至动脉壁, 并调节炎症细胞的运输, 在病变的血管中表达会明显增加^[19], 且 CCL2 与 AS 相关心血管疾病的昼夜节律关系密切, 为从时辰药理学角度治疗 AS 提供了依据^[20]。CXCL2 也是一种强有力的趋化

因子, 促进中性粒细胞的募集和粘附, 从而促进 AS 斑块的形成。且其能在肥胖进程中诱导慢性炎症, 加速 AS 病理过程。此外, 在心肌中过表达还会导致心肌细胞损伤^[21]。STAT3 是 STAT 家族的重要成员之一, 对 AS 影响十分广泛, 可以通过促进血管新生、增加内皮细胞增殖迁移的水平^[22-23]、调控巨噬细胞极化^[24]、磷酸化^[25]等途径加速 AS 斑块的进展^[26]。

GO 分析结果显示 GQL 对 AS 的作用靶点主要通过调控氧化应激、对脂多糖的反应、对毒性物质的反应等 BP, 涉及的 CC 有细胞膜内外的结构、各类蛋白复合体等, MF 富集最高的是核受体活动、配体激活及转录因子活动。这 3 个层次是 GO 富集分析对基因描述的顶层, 反映了不同的分子或基因在不同的细胞结构/区域进行了多样的生物学过程。

KEGG 分析中富集程度较高的有剪切应力与 AS 通路、IL-17 通路、TNF 通路、细胞衰老、细胞凋亡、TLR 通路等。研究发现, 血管壁的剪切应力可以通过诱导内皮细胞机械转导和控制参与 AS 的近壁运输过程; 研究者通过进行特定受试者的计算流体动力学模拟发现高剪切应力震级能通过增加 AS 保护性生物化学物质的产生或通量并减少致 AS 生物化学物质的近壁聚集化来防止 AS, 低剪切应力级则通过增加致 AS 的生物物质而促进 AS 进展^[27], 剪切应力和血压与斑块易损性关系密切, 流体动力学模型分析显示随着管腔狭窄程度的增加, 最大剪切应力和压降的相对值增大, 超过 50% 狭窄的陡度显著增大^[28]; 此外, 在人类冠状 AS 早期, 心外膜内皮细胞和微血管的功能障碍与局部低内皮切应力有关^[29]。IL-17 是一种多功能的免疫调控关键因子, 在多种 BP 中至关重要, 包括对组织修复、慢性炎症、宿主防御等发病机制的调控^[30-31]。TNF 可以引起炎症及内皮功能障碍, 是 AS 中的“明星”炎症分子^[32-33], 在 NF- κ B、IL-17、细胞焦亡等多条 AS 相关通路都有一席之地。细胞衰老是一个伴随着结构和功能的进行性退化的生物学过程, 涉及细胞间的协调修饰, 已被证明与 AS 发展的不同阶段, 包括调控抗凋亡通路、促进过度衰老细胞清除等基于衰老的治疗策略正被用于治疗 and 预防 CVD^[34], 如衰老的人血管内皮细胞通过调节内皮素-1、一氧化氮、血管紧张素 II 和单核细胞趋化蛋白-1 的水平参与 AS; 衰老的人血管平滑肌细胞通过调节炎症分子等表达水平介导斑块不稳定和血管钙化; 衰老的巨噬细胞则通过调节炎症分子等表达水平抑制胆固醇外流^[35]; 有学者发现晚期斑块中的血管平滑肌细胞

(VSMC)和斑块中培养的VSMC出现VSMC衰老和DNA损伤现象,斑块VSMCs出现端粒缩短迹象,会导致AS斑块易损性上升^[36]。TLR是模式识别受体中最具特征的家族成员,能多方面调节先天免疫^[37]。实验证实通过干预TLR4途径可以减轻内皮细胞凋亡,降低TNF- α 、IL-6水平和氧化应激损伤,减少主动脉斑块及巨噬细胞浸润等改善AS^[38];有研究者发现对ApoE^{-/-}小鼠在ECV刺激干预前给予TLR-9拮抗剂不仅可以减轻AS及斑块中TLR-9的表达,还可以减轻血浆炎症细胞因子水平的升高,减少脂质和巨噬细胞在斑块中的积聚,降低血CCR2经典单核细胞的比例^[39]。

分子对接技术起源于1980年代^[40],后来对接研究被广泛应用于药物开发研究的酶-肽作用等宏观方面。在微观水平上则可以分析结构以确定药物的生物利用度等方面的应用^[41]。这些优势对于探究中药对疾病的多靶点、多途径治疗作用大有裨益,为揭开中医药调控机制的神秘面纱奠定了一定基础。

本次研究是将GQL有效成分中靶点数排名前十的成分与AS相关受体对接,发现所有对接结合能均 $<-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,结合能 $<-7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的数目在与TNF对接中占比100%,在与STAT3对接中占比约56%,与ESR1对接中占比约44%,与CCL2对接中占比约89%,与NOS2对接中占比约89%,与VEGFA对接中占比0%,综合统计占比接近50%,一定程度上能说明GQL与AS作用靶点受体蛋白结合的非常不错;与阿托伐他汀-受体结合能相比,GQL-受体结合能大部分成分结合能均高出,6组高出或等于阿托伐他汀-受体结合能的比率分别为100%、89%、89%、0%、11%、11%,后3组从比例上低于前者,但究其数值差距微乎其微,因此对于这6个受体而言,GQL活性成分对接结合程度总体上要优于阿托伐他汀。

选择结合最好的5组中药成分-AS靶点受体制图,对接作用关系见增强出版附加材料,结合状态最佳即结合能最低的是NOS2-黄芩素,黄芩素是黄芩中的重要活性成分之一,可以通过调控MAPK、mTOR、Akt、PARP、以及MMP-2、MMP-9等因子在抗炎、抗血管生成方面发挥作用^[42];此外,baicalein还可以通过清除活性氧来发挥抗氧化活性,并通过降低NF- κ B的活性和抑制MCP-1、NOS、脂氧合酶、细胞黏附分子等多种炎症细胞因子和趋化因子的表达来改善抗氧化状态^[43]。结合最好的5组对接关

系中,4组是与NOS2之间产生的,NOS2与NF- κ B、TLR多条关联介导多种炎症反应进程,研究表明NOS2的上调可能参与了表征早期AS形成的炎症反应^[44-45]。ESR1基因与血小板、红细胞压积、CD4⁺CD8⁺CD3⁺细胞数、血小板压积、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白浓度等多种免疫指标有显著的相关性^[46],还可能通过多效能作用增加心血管疾病风险^[47]。VEGFA能促进内皮细胞增殖、巨噬细胞浸润和泡沫细胞形成^[48],参与炎症介导的损伤,对血管和造血系统有多元的作用^[49]。GQL的活性成分能与上述受体对接良好,说明这些受体可能是GQL对AS作用的重要潜在靶点,为未来研究提供了依据。

综上所述,本研究基于网络药理学联合分子对接的方法,从成分到靶点,从靶点到通路,从通路到对接,逐步阐明经方GQL有效成分对AS的分子机制是通过多靶点结合,多通路协作而产生作用,为后续的针对该经方治疗AS的实验机制研究带来了新的角度和方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] QIAO X, QU C, LUO Q, et al. UHPLC-qMS spectrum-effect relationships for Rhizoma Paridis extracts[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113770.
- [2] NAHAR L, ONDER A, SARKER S D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019)[J]. Phytochem Anal, 2020, 31(4): 413-457.
- [3] SANG Q, JIA Q, ZHANG H, et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113771.
- [4] 陈俊, 钱紫星, 朱梦杨, 等. 基于GPR119/cAMP/GLP-1通路探讨葛根芩连汤的降糖机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 25-30.
- [5] 马靖, 王凤云, 张佳琪, 等. 基于细胞信号通路探讨葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 186-192.
- [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] 杨碧穗, 黄秋连, 谢璐欣, 等. 葛根分子药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2149-2157.
- [8] 李树欣. 葛根的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 辽宁化工, 2020, 49(11): 1412-1413.

- [9] 任正肖,车萍,李紫薇,等. 黄芩化学成分和药理作用的研究进展[J]. 山东化工,2021,50(3):65-67.
- [10] 付琳,付强,李冀,等. 黄连化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2021,49(2):87-92.
- [11] 邓桃妹,彭灿,彭代银,等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J]. 中国中药杂志,2021,46(11):2660-2676.
- [12] ZHOU Y X, ZHANG H, PENG C. Puerarin: A review of pharmacological effects[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7):961-975.
- [13] OLIVEROS J C. VENNY: An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams [Z]. 2007: https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny_old/venny.php.
- [14] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284-287.
- [15] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.
- [16] KHAN H, JAISWAL V, KULSHRESHTHA S, et al. Potential angiotensin converting enzyme inhibitors from *Moringa oleifera* [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2019, 13(3):239-248.
- [17] LI J, QI X, SUN Y, et al. Network pharmacology analysis on zhichan powder in the treatment of Parkinson's disease[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2020, 23(1):28-40.
- [18] LIU T H, CHEN W H, CHEN X D, et al. Network pharmacology identifies the mechanisms of action of TaohongSiwu decoction against essential hypertension [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26:e920682.
- [19] HERNÁNDEZ-AGUILERA A, FIBLA M, CABRÉ N, et al. Chemokine (C-C motif) ligand 2 and coronary artery disease: Tissue expression of functional and atypical receptors[J]. *Cytokine*, 2020, 126:154923.
- [20] WINTER C, SILVESTRE-ROIG C, ORTEGA-GOMEZ A, et al. Chrono-pharmacological targeting of the CCL2-CCR2 axis ameliorates atherosclerosis [J]. *Cell Metab*, 2018, 28(1):175-182.
- [21] GUO L Y, YANG F, PENG L J, et al. CXCL2, a new critical factor and therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2020, 42(5):428-437.
- [22] LUO P, SHI W, WANG Y, et al. Raloxifene inhibits IL-6/STAT3 signaling pathway and protects against high-fat-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Life Sci*, 2020, 261:118304.
- [23] XIE Q, LI F, SHEN K, et al. LOXL1-AS1/miR-515-5p/STAT3 positive feedback loop facilitates cell proliferation and migration in atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 76(2):151-158.
- [24] CHEN Q, LV J, YANG W, et al. Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22):6424-6442.
- [25] YANG X, JIA J, YU Z, et al. Inhibition of JAK2/STAT3/SOCS3 signaling attenuates atherosclerosis in rabbit[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1):133.
- [26] 许爽,倪焕尔,陈航炜,等. STAT3与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 医学新知,2020,30(5):383-388.
- [27] MAHMOUDI M, FARGHADAN A, MCCONNELL D R, et al. The story of wall shear stress in coronary artery atherosclerosis: Biochemical transport and mechanotransduction [J]. *J Biomech Eng*, 2021, 143(4):041002.
- [28] CHEN Z, QIN H, LIU J, et al. Characteristics of wall shear stress and pressure of intracranial atherosclerosis analyzed by a computational fluid dynamics model: A pilot study[J]. *Front Neurol*, 2019, 10:1372.
- [29] SIASOS G, SARA J D, ZAROMYTIDOU M, et al. Local low shear stress and endothelial dysfunction in patients with nonobstructive coronary atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(19):2092-2102.
- [30] EYERICH K, DIMARTINO V, CAVANI A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(4):607-614.
- [31] LI X, BECHARA R, ZHAO J, et al. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12):1594-1602.
- [32] LEE J, HA S J, PARK J, et al. Arctium lappa root extract containing L-arginine prevents TNF- α -induced early atherosclerosis in vitro and in vivo [J]. *Nutr Res*, 2020, 77:85-96.
- [33] ORTOLAN A, RAMONDA R, LORENZIN M, et al. Subclinical atherosclerosis evolution during 5 years of anti-TNF-alpha treatment in psoriatic arthritis patients [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39(1):158-161.
- [34] MACHADO-OLIVEIRA G, RAMOS C, MARQUES A, et al. Cell senescence, multiple organelle dysfunction and atherosclerosis [J]. *Cells*, 2020, 9(10):2146.
- [35] WU C M, ZHENG L, WANG Q, et al. The emerging role of cell senescence in atherosclerosis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 59(1):27-38.

- [36] WANG J, URYGA A K, REINHOLD J, et al. Vascular smooth muscle cell senescence promotes atherosclerosis and features of plaque vulnerability[J]. *Circulation*, 2015, 132(20):1909-1919.
- [37] LI B, XIA Y, HU B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(14):2751-2769.
- [38] XIONG X, LU W, ZHANG K, et al. Pterostilbene reduces endothelial cell apoptosis by regulation of the Nrf2-mediated TLR-4/MyD88/NF- κ B pathway in a rat model of atherosclerosis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3):2090-2098.
- [39] LI J, HUYNH L, CORNWELL W D, et al. Electronic cigarettes induce mitochondrial dna damage and trigger TLR 9 (Toll-Like Receptor 9) -mediated atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020:A120315556.
- [40] MORRIS G M, LIM-WILBY M. Molecular docking [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 443:365-382.
- [41] KAUR T, MADGULKAR A, BHALEKAR M, et al. Molecular docking in formulation and development [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2019, 16(1):30-39.
- [42] TULI H S, AGGARWAL V, KAUR J, et al. Baicalein: A metabolite with promising antineoplastic activity[J]. *Life Sci*, 2020, 259:118183.
- [43] DINDA B, DINDA S, DASSHARMA S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131:68-80.
- [44] VEETIL A T, ZOU J, HENDERSON K W, et al. DNA-based fluorescent probes of NOS2 activity in live brains [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(26):14694-14702.
- [45] WELCH G N, UPCHURCH G R, FARIVAR R S, et al. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of NOS2[J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110(1):22-31.
- [46] WU Y, ZHANG W, ZHANG L, et al. Characterization of immune pleiotropy of ESR1 gene in pigs [J]. *Immunogenetics*, 2020, 72(8):413-422.
- [47] GALLAGHER C J, LANGEFELD C D, GORDON C J, et al. Association of the estrogen receptor-alpha gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: The insulin resistance atherosclerosis family study [J]. *Diabetes*, 2007, 56(8):2135-2141.
- [48] ZHAO N, ZHANG J. Role of alternative splicing of VEGF-A in the development of atherosclerosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(10):2695-2708.
- [49] CARRIZZO A, PAGANO F. Circulating VEGF and atherosclerosis risk: Is it perhaps the case to reevaluate association with the inflammatory state? [J]. *Minerva Cardiol Angiol*, 2021, 69(2):114-116.

[责任编辑 顾雪竹]