

二至丸抗肝纤维化活性成分-靶点-通路的网络预测

李跃文, 王博龙*

(宜春学院 化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] **目的:**筛选二至丸抗肝纤维化主要活性成分,预测其抗肝纤维化的作用靶点及信号通路。**方法:**利用 ADME 计算方法,并依据中药系统药理学技术平台(TCMSP)等数据库、反向分子对接服务器(DRAR-CPI)预测二至丸的活性成分及抗肝纤维化的潜在靶点,通过与人类基因组注释数据库(GeneCards)中抗肝纤维化的作用靶点进行映射,筛选出二至丸抗肝纤维化的作用靶点。借助 Cytoscape 3.5.1 软件构建二至丸活性成分-作用靶点网络,通过生物学信息注释数据库(DAVID)对靶点进行基因本体(GO)生物过程及京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路富集分析。**结果:**从二至丸中筛选得到18个活性成分,作用于114个靶点,主要涉及8个信号通路,参与10个生物过程。**结论:**二至丸活性成分主要通过转化生长因子- β (TGF- β),丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路(PI3K/Akt),核转录因子- κ B(NF- κ B),过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)等信号通路以及蛋白磷酸化、信号转导等生物过程发挥抗肝纤维化作用,体现了中药多成分、多靶点、多途径的作用特点,该研究为进一步深入开展二至丸抗肝纤维化药效基础研究和阐释其抗肝纤维化的作用机制提供理论依据。

[关键词] 二至丸; 肝纤维化; 网络药理学; 反向分子对接; 靶点; 通路

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0201-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181130

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1024.041.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 16:31

Network Prediction of Active Ingredient-target-pathway of Erzhiwan Against Liver Fibrosis

LI Yue-wen, WANG Bo-long*

(School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the main active components of Erzhiwan against liver fibrosis, and predict the targets and signal pathways for anti-hepatic fibrosis. **Method:** Based on the ADME computing method, Traditional Chinese Medicine System Pharmacology platform (TCMSP) and other databases, as well as reverse molecular docking server (DRAR-CPI), the active ingredients and the potential targets of of Erzhiwan for anti-hepatic fibrosis effects were predicted. Then by mapping with the anti-hepatic fibrosis targets in Human Genome annotation database (GeneCards), the anti-hepatic fibrosis targets of Erzhiwan were screened. Cytoscape 3.5.1 software was used to construct the active ingredient-target network of Erzhiwan was constructed; the biological information annotation database (DAVID) was used for enrichment analysis of gene ontology (GO) biological process and *Kyoto Encyclopedia of genes and genomes* (KEGG) metabolic pathway. **Result:** The 18 active components were screened from Erzhiwan, which acted on 114 targets, mainly involving 8 signaling pathways and 13 biological processes. **Conclusion:** The bioactive components of Erzhiwan can play an anti-hepatic fibrosis role through transforming growth factor- β (TGF- β), mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphatidyl inositol 3-

[收稿日期] 20171225(006)

[基金项目] 江西省教育厅青年基金项目(GJJ09607)

[第一作者] 李跃文,在读硕士,从事临床药学研究,Tel:0795-3201985,E-mail:1297513234@qq.com

[通信作者] *王博龙,博士,副教授,硕士生导师,从事药物临床前研究及药物临床有效性及安全性评价,Tel:0795-3201985,E-mail:wblong77@126.com

kinase (PI3K) /serine/threonine protein kinase (Akt) signal pathway (PI3K/Akt), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) and other signal pathways, protein phosphorylation, signal transduction and other biological processes, embodying the characteristics of multiple components, multiple targets and pathways of traditional Chinese medicine. This study provides a theoretical basis for further research on the efficacy of Erzhiwan against liver fibrosis and the explanation on its mechanism of anti-hepatic fibrosis.

[Key words] Erzhiwan; liver fibrosis; network pharmacology; reverse molecular docking; target; pathway

肝纤维化是各种肝病发展成肝硬化的必经阶段,防止肝纤维化以及肝硬化的发生、发展已成为国内外肝病研究的重点^[1]。目前治疗主要从两方面着手:一是病因治疗,如慢性病毒性肝炎所致的肝纤维化采用抗病毒疗法;二是肝纤维化本身的治疗,由于肝纤维化病理机制复杂,传统单靶点、单通路作用的药物干预效果不理想,临床上仍然没有特异有效的治疗药物^[2-3]。

二至丸原名“女贞丹”,出自明代吴旻辑的《扶寿精方》,由女贞子(酒蒸)和墨旱莲两味中药等量组成。其性平和、偏寒,补阴而不滋腻,为平补肝肾之良剂,广泛用于急性化学性肝损伤、氧化性肝损伤、药物性肝损伤、缺血再灌注性肝损伤、酒精性肝损伤等各型肝损伤以及肝纤维化的治疗^[4]。现代药理学研究表明,二至丸具有保肝护肝降低各种转氨酶、抑制肝纤维化、增强机体免疫力、抗氧化等作用,其保肝、抗肝纤维化作用确切^[5]。然而,目前对二至丸的药理作用机制研究尚不够深入,即使积累较多的保肝机制研究方面,也只是分散地研究了二至丸对肝细胞损伤的形态学变化,以及调节免疫和抗炎作用机制,二至丸具体如何降低转氨酶,抑制肝纤维化的机制尚不清楚,体内效应成分也尚未完全明确。当前研究主要集中在体外提取的活性成分组群上,没有对二至丸有效成分在体内保肝降酶抗纤维化的多靶点整合协同作用机制进行深入研究^[6-7]。

网络药理学是经典药理学、分子生物学、生物信息学、计算机技术等多学科交叉的产物,它突破了传统“单靶点、单途径”的研究理念,从整体性、系统性的角度研究中药及其复方成分、靶点、疾病之间的网络关系,为阐明中医药科学内涵提供了新的思路与方法^[8]。黄丽萍等^[9]最新利用网络药理学探究了二至丸防治阿尔茨海默病的物质基础与作用机制,全面阐述了其多组分、多靶点、多途径防治阿尔茨海默病的显著优势。基于二至丸抗肝纤维化系统药理机制未见报道,本研究应用网络药理学方法,将分子计算、网络分析、文本挖掘等组合起来,多靶点、

多方位、多层次地对二至丸的化学成分、作用靶点和肝纤维化信号通路进行深入分析,既能解决实验筛选物质基础成本高、周期长的问题,也化解了作用机制探寻时单靶点局限性问题,系统阐释二至丸抗肝纤维化的科学内涵,为进一步的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 中药化学成分收集与筛选 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP),中药综合数据库(TCMID),文献检索等,收集女贞子、旱墨莲两味中药的主要化学成分。通过ADME原则计算得出每一化合物的口服生物利用度(OB) > 30% 和类药性(DL) > 0.18,初步筛选出候选化学成分,再结合文献报道最终确定二至丸的主要活性成分。

1.2 分子对接与药物靶点筛选 利用DRAR-CPI服务器对候选化合物进行模拟分子-靶蛋白对接,综合对接分数Z'-score 越小表示化合物和靶点的结合越牢固,本研究选择Z'-score < -1.0的结合度较高的靶点作为候选药物靶点。利用UniProt数据库将得到的药物靶点PDB ID转换成Genecards数据库的Gene name。利用Genecards数据库以“Liver fibrosis”为关键词,收集与肝纤维化相关的靶点基因,并与二至丸中活性成分靶点基因映射筛选出共同靶点,采用Cytoscape 3.5.1软件建立二至丸活性成分-肝纤维化靶点网络。

1.3 代谢通路生物过程分析 本研究采用DAVID 6.8数据库对二至丸的肝纤维化靶点,进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路富集分析和基因本体(GO)生物过程富集分析,研究二至丸抗肝纤维化靶点的主要代谢通路及生物过程。

2 结果

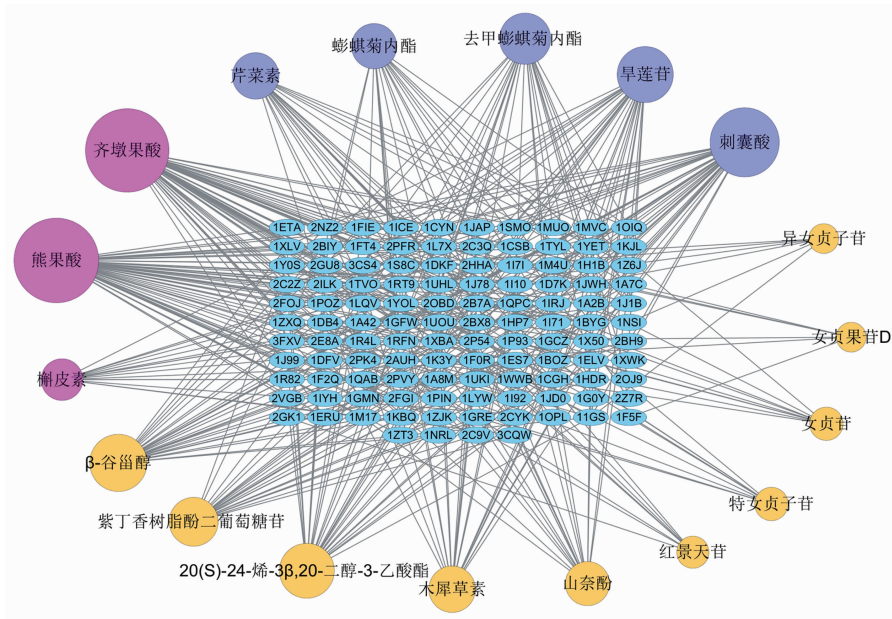
2.1 二至丸抗肝纤维化有效成分的筛选 通过TCMSP,TCMID和文献数据库挖掘,根据DL > 0.18, OB > 30%的原则,再综合文献报道的二至丸中抗肝纤维化的主要活性成分,最终筛选出18个化学成分。见表1。

表 1 二至丸中候选活性成分及部分药动学参数

Table 1 Active compounds in Erzhiwan with corresponding pharmacokinetic parameters

来源	TCMSP 编号	化合物名称	OB/%	DL
女贞子	MOL000006	木犀草素	36.16	0.25
	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL000422	山奈酚	41.88	0.24
	MOL003341	红景天苷	15.96	0.20
	MOL005147	女贞果苷	54.41	0.47
	MOL005150	异女贞苷	27.46	0.73
	MOL005169	20(S)-24-烯-3 β , 20-二 醇-3-乙酸酯	40.23	0.82
	MOL005185	女贞苷	15.92	0.35
	MOL005189	特女贞苷	20.00	0.43
	MOL005195	紫丁香树脂酚二葡萄糖苷	83.12	0.80
早墨莲	MOL000008	芹菜素	23.06	0.21
	MOL003385	早莲苷	17.72	0.34
	MOL003396	刺囊酸	24.43	0.74
	MOL003402	去甲螫菊内酯	72.13	0.43
	MOL003404	螫菊内酯	49.60	0.48
共有	MOL000511	熊果酸	16.77	0.75
	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
	MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76

2.2 二至丸靶点预测及活性成分——靶点网络图的构建 DRAR-CPI 分子-靶蛋白对接结果中的 Z'-score < -1.0 的共有 238 个靶蛋白,将 238 个靶蛋白利用 UniProt 数据库转换成对应的基因名称,共得到 238 个人源基因。将 238 个靶基因与利用 Genecards 数据库挖掘到的 2 138 个肝纤维化相关基因映射,得到共同靶基因 114 个。以 114 个靶基因对应的蛋白作为二至丸抗肝纤维化的靶点,建立二至丸活性成分-肝纤维化靶点网络图,共有 132 个节点,403 条边。不同颜色的节点分别代表女贞子、墨旱莲中的潜在活性成分和肝纤维化靶点。化合物节点度值 (Degree) 表示化合物抗肝纤维化的靶点个数,其中具有较大度值 (Degree > 15) 的活性成分有 12 个,分别为熊果酸 (Degree = 52),齐墩果酸 (Degree = 51),木犀草素 (Degree = 20), β -谷甾醇 (Degree = 29),山奈酚 (Degree = 18),20(S)-24-烯-3 β , 20-二醇-3-乙酸酯 (Degree = 27),紫丁香树脂酚二葡萄糖苷 (Degree = 22),芹菜素 (Degree = 20),早莲苷 (Degree = 28),刺囊酸 (Degree = 39),去甲螫菊内酯 (Degree = 24),螫菊内酯 (Degree = 19)。见图 1。



黄色为女贞子化学成分,紫色为墨旱莲化学成分,粉色为女贞子和墨旱莲共有化学成分

图 1 二至丸活性成分-作用靶点网络

Fig. 1 Components-targets network of major active ingredients of Erzhiwan

2.3 KEGG 代谢通路分析 将二至丸 114 个肝纤维化靶基因在 KEGG 代谢通路富集,根据 $P < 0.05$ 其中与肝纤维化明显相关的,富集基因数目较多的主要代谢通路 8 条,分别为 16 个靶点参与了丝裂原

活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路,18 个靶点参与了磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路 (PI3K/Akt),7 个靶点参与了谷胱甘肽 (glutathione metabolism) 代谢通路,11 个靶点参

与了黏着斑(focal adhesion)信号通路,6个靶点参与了过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路,6个靶点参与了核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,7个靶点参与了Wnt信号通路以及5个靶点参与了转化生长因子(TGF)- β 信号通路,见表2。

表 2 KEGG 代谢通路信息

Table 2 Information of KEGG metabolic pathways

KEGG 代谢通路	靶点数 (n)	百分率 /%	P
MAPK signaling pathway	16	14.0	1.3×10^{-6}
PI3K/Akt signaling pathway	18	15.8	2.7×10^{-6}
Glutathione metabolism	7	6.1	5.6×10^{-5}
Focal adhesion	11	9.6	4.2×10^{-4}
PPAR signaling pathway	6	5.3	2.3×10^{-3}
NF- κ B signaling pathway	6	5.3	6.1×10^{-3}
Wnt signaling pathway	7	6.1	1.0×10^{-2}
TGF- β signaling pathway	5	4.4	2.6×10^{-2}

2.4 GO 生物过程分析 二至丸活性成分抗肝纤维化靶点的 GO 生物学过程富集分析结果显示,二至丸 114 个肝纤维化靶基因在 GO 生物过程中富集,根据 $P < 0.05$ 筛选得到 10 个 GO 生物过程,分别为 16 个靶点参与了蛋白自身磷酸化,10 个靶点参与了肽酪氨酸磷酸化的正调控,8 个靶点参与了肽酪氨酸自身磷酸化,18 个靶点参与了蛋白磷酸化,24 个靶点参与了 RNA 聚合酶 II 启动子调控,8 个靶点参与了肽的丝氨酸磷酸化的正调节,8 个靶点参与了凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性的激活,10 个靶点参与了 ERK1/ERK2 级联正向调节,8 个靶点参与了磷脂酰肌醇介导的信号转导,21 个靶点参与了信号转导等。见表 3。

3 讨论

肝纤维化主要病理特征为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分泌增加以及降解减少,引起 ECM 大量沉积,而活化的肝星状细胞是分泌 ECM 的主要效应细胞,在肝纤维进程中起着关键作用。何义华等^[10]观察二至丸治疗酒精性肝病的临床疗效,结果二至丸可明显降低透明质酸(HA),Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ),Ⅳ型胶原(Ⅳ-C),层粘连蛋白(LN)4 项纤维化指标,具有抗肝纤维化作用。Lee 等^[11]发现二至丸中三萜皂苷类化合物可抑制肝星形细胞增殖,有治疗肝纤维化的价值。此外,墨旱莲中的蟛蜞菊内酯与刺囊酸也可显著抑制人肝星状细胞 LX-2 活性以及大鼠肝星状细胞 T6 的增殖^[12-13]。本研究显示二至丸中三萜皂苷类的齐墩果酸、

表 3 GO 生物过程

Table 3 GO biological processes

GO 生物过程	靶点数 (n)	百分率 /%	P
protein autophosphorylation	16	14.0	5.1×10^{-13}
positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	10	8.8	3.7×10^{-9}
peptidyl-tyrosine autophosphorylation	8	7.0	7.6×10^{-9}
protein phosphorylation	18	15.8	8.9×10^{-9}
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	24	21.1	1.0×10^{-7}
positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	8	7.0	4.1×10^{-7}
activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	8	7.0	11.3×10^{-6}
positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	10	8.8	2.6×10^{-6}
phosphatidylinositol-mediated signaling	8	7.0	6.9×10^{-6}
signal transduction	21	18.4	7.6×10^{-5}

熊果酸、刺囊酸的度值最大,类药性也较高,依次为 0.76,0.75,0.74,这就从理论上印证上述研究结果。此外,笔者还发现女贞子中未见报道的紫丁香树脂酚二葡萄糖苷,20(S)-24-烯-3 β ,20-二醇-3-乙酸酯、 β -谷甾醇的类药性也非常高,依次为 0.82,0.80,0.75,OB > 30%,Degree 也较大,提示这 3 种化合物也可能是二至丸潜在的抗肝纤维化活性成分,有必要进一步实验验证。

肝纤维化是多种细胞因子和信号通路参与的复杂过程,如图 2 所示^[14],众多细胞因子通过相应信号通路将刺激信号传递至效应细胞,且各信号通路之间也存在相互影响,使得单靶点、单通路治疗难以凑效,只有干预多种细胞因子及其信号通路才有可能逆转肝纤维化。卢玮等^[14]综述肝纤维化相关重要细胞因子及信号通路,发现 TGF- β_1 ,MAPK,PI3K/Akt,NF- κ B,PPAR 等信号通路是肝纤维化发生发展过程中的主要信号通路,这与二至丸肝纤维化靶点的 KEGG 代谢通路富集结果几乎一致,表明二至丸具有多靶点、多通路抗肝纤维化的潜能。上述信号通路中的 TGF- β_1 /Smads 是产生促纤维化效应的最重要通路,而实验研究证实作为二至丸主要成分的熊果酸可以下调 TGF- β_1 水平,抑制 HSC 活化增殖,减少 ECM 在肝内的合成与沉积^[15-16]。NF- κ B 是不同炎症因子发挥促炎反应导致纤维化的共同信号通路,尤其是乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV)导致的慢性肝脏炎症及肝纤维化,陆扬^[17]发现蟛蜞菊内酯通过调节细胞外信号调节激

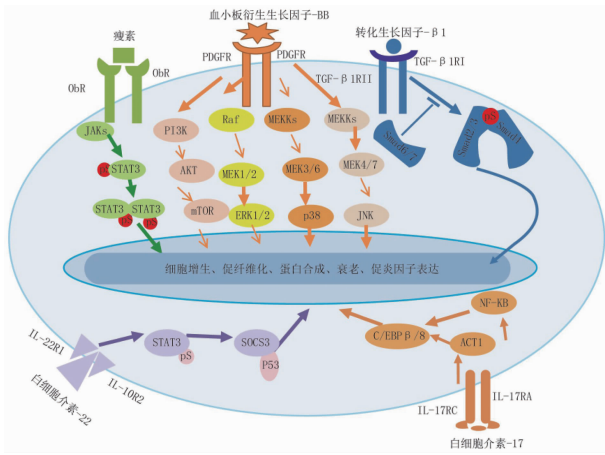


图 2 肝纤维化相关细胞因子及信号通路
Fig. 2 Cytokines and signaling pathways associated with liver fibrosis

酶(ERK), JNK 磷酸化, 抑制 NF-κB 核转移产生抗炎作用。PPAR-γ 信号通路是抗肝纤维化的重要信号通路, PPAR-γ 可维持 HSC 处于静止状态, 一旦 PPAR-γ 基因被抑制, PPAR-γ 的表达减少, HSC 转变为激活状态。此外, 还有研究表明, PPAR-γ 激动剂可以抑制 TGF-β₁ 所诱导的 ECM 表达上调, 发挥其抗纤维化作用^[18]。血小板源性生长因子(PDGF)-BB/MAPK 和 PDGF-BB/PI3K/Akt 信号通路是促进 HSC 增殖的重要信号通路, 研究发现 MAPK 信号通路可以通过 RAF, MEK, ERK 等关键酶的磷酸化瀑布效应, 引起诱生型转录因子如 EIK-1, c-Fos, c-Jun 等激活, 调节下游基因转录, 引起一系列细胞增殖、凋亡以及细胞因子和胶原合成等效应^[19]。而特异性阻断 PI3K/Akt 信号通路能够抑制 HSC 的增殖、迁移, 促进 HSC 的凋亡^[20]。信号通路发挥作用离不开生物过程, GO 生物过程分析显示二至丸抗纤维的信号通路主要涉及蛋白磷酸化、信号转导等生物过程。

综上所述, 肝纤维化的形成涉及多条通路、多个靶点以及多个生物过程, 而网络药理学分析预测出的靶点及信号通路, 为未来实验验证二至丸抗纤维化关键靶蛋白及作用机制提供了思路与线索。

【参考文献】

[1] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状 [J]. 中国医药导报, 2014, 11 (18): 162-168.
[2] 王美玲, 陆伦根. 肝纤维化治疗研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16 (4): 369-371.
[3] 裴小静. 对于治疗肝纤维化中药新药临床试验的几点考虑 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (13):

1460-1461.
[4] 王馨, 赵海梅, 邹勇, 等. 二至丸不同时相对损伤后肝细胞再生障碍大鼠肝细胞凋亡水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 11 (34): 2620-2622.
[5] 赵海梅, 周步高, 王馨, 等. 二至丸预防和治疗性给药对大鼠损伤后肝细胞再生障碍的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (16): 128-132.
[6] 胡冬梅, 陈小玲, 陆杨, 等. 二至丸及其组成药味保肝药理作用研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2016, 34 (4): 289-291, 296.
[7] 王浩, 庄威, 薛晓鸥. 中药复方二至丸考源、沿革及现代药理研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 12 (19): 93-97.
[8] 刘鑫馗, 吴嘉瑞, 蔺梦娟, 等. 基于网络药理学的四君子汤作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (16): 194-202.
[9] 黄丽萍, 燕波, 侯敏, 等. 网络药理学探究二至丸防治阿尔茨海默病的物质基础与作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (21): 4211-4217.
[10] 何义华, 潘志恒, 李力强. 二至丸治疗酒精性肝病的临床研究 [J]. 新中医, 2010, 42 (3): 27-29.
[11] Lee M K, HA N R, YANG H, et al. Antiproliferative activity of triterpenoids from *Eclipta prostrata* on hepatic stellate cells [J]. Phytomedicine, 2008, 15 (9): 775-778.
[12] 许静, 陈杰, 孙萍萍, 等. 蟛蜞菊内酯抗大鼠肝缺血再灌注损伤作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25 (9): 2058-2059.
[13] WU J, LI J, ZHU Z, et al. Protective effects of echinocystic acid isolated from *Gleditsia sinensis* Lam. against acute myocardial is-chemia [J]. Fitoterapia, 2010, 81 (1): 8-10.
[14] 卢玮, 刘学恩, 庄辉. 肝纤维化相关细胞因子和信号通路研究进展 [J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6 (5): 385-390.
[15] 王博龙. 乌索酸对人肝星状细胞凋亡及 TGF-β₁ mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26 (3): 417-418.
[16] 周娟娟, 何文华, 甘达凯, 等. 熊果酸对 TGF-β₁ 诱导肝细胞凋亡的抑制作用及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2017, 42 (5): 383-388.
[17] 陆杨. 蟛蜞菊内酯对四氯化碳引起的小鼠急性肝损伤保护作用及其机制研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2016.
[18] 马晶晶, 章涛. PPARγ 功能与疾病关系研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28 (5): 601-604.
[19] 叶蕾, 陈芝芸, 严茂祥, 等. 肝纤维化大鼠肝组织 MAPKs 信号通路的活化及意义 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (12): 2748-2750.
[20] 黄成, 李俊, 马陶陶. PI3K/Akt 信号通路与肝纤维化 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27 (8): 1037-1041.

【责任编辑 周冰冰】