

# 基于网络药理学及分子对接分析熊果酸抗 类风湿性关节炎的分子机制

杨欣, 李亚辉, 钱海兵, 杨长福\*  
(贵阳中医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**通过网络药理学及分子对接探讨熊果酸抗类风湿性关节炎的分子机制。**方法:**基于毒性与基因比较数据库(comparative toxicogenomics database, CTD), Drug Bank 数据库, 中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology, TCMSP)等检索熊果酸的潜在治病靶点。通过 DAVID 生物信息学资源(DAVID bioinformatics resources)数据库对潜在靶点进行通路富集分析, STRING 进行蛋白相互作用, 采用分子对接技术(iGEMDOCK, SystemsDock)对熊果酸和类风湿性关节炎靶标蛋白进行能量匹配。筛选发挥抗类风湿性关节炎作用的潜在靶点。**结果:**收集相关靶标蛋白 66 个, DAVID 通路富集得到 27 条信号通路( $P < 0.01$ ), 其中类风湿性关节炎通路关键靶标蛋白 11 个(基质金属蛋白酶-1, 基质金属蛋白酶-3, 白细胞介素-6, 转录因子 AP-1, 肿瘤坏死因子, 血管内皮生长因子 A, 集落刺激因子-2, 白细胞介素-1 $\beta$ , 转化生长因子- $\beta_1$ , 细胞黏附分子-1, 原癌基因蛋白 c-Fos)。通过蛋白相互作用发现有 4 个靶标蛋白具有实验数据支持。通过分子对接表明熊果酸主要通过基质金属蛋白酶-1, 基质金属蛋白酶-3, 肿瘤坏死因子, 转录因子 AP-1, 白细胞介素-1 $\beta$  发挥抗类风湿性关节炎的作用。**结论:**本研究结果初步揭示熊果酸抗类风湿性关节炎的分子机制。

**[关键词]** 熊果酸; 网络药理学; 通路分析; 类风湿性关节炎; 分子对接

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0207-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181828

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180702.0928.009.html>

**[网络出版时间]** 2018-07-02 13:21

## Molecular Mechanism of Ursolic Acid Against Rheumatoid Arthritis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

YANG Xin, LI Ya-hui, QIAN Hai-bing, YANG Chang-fu\*  
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism of ursolic acid (UA) against rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking. **Method:** Potential therapeutic targets of UA were searched based on comparative toxicogenomics database (CTD), Drug Bank, traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP) and other databases. Pathway enrichment analysis of potential targets was conducted by DAVID (DAVID bioinformatics resources). Protein interaction was conducted by STRING, and energy matching between UA and 11 rheumatoid targets was done by molecular docking technique (iGEMDOCK, SystemsDock). The potential targets against rheumatoid arthritis were screened. **Result:** 66 corresponding targets were collected, and 27 signal pathways were obtained from the enrichment of DAVID pathway ( $P < 0.01$ ), including 11 key targets

**[收稿日期]** 20180325(004)

**[基金项目]** 2017年度贵阳中医学院博士启动项目(3043-043170016);贵州省普通高等学校治未病工程研究中心(黔教合KY[2016]013);贵州省普通高等学校特色重点实验室(黔教合KY字[2017]006)

**[第一作者]** 杨欣, 博士, 讲师, 从事中药天然药物药效物质基础研究, E-mail: yangxin9876@126.com

**[通信作者]** \*杨长福, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药及天然药物防治疾病的生化机制研究, Tel: 0851-88233089, E-mail: yangchangfu@126.com

proteins in rheumatoid arthritis pathway (matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3, interleukin-6, transcription factor AP-1, tumor necrosis factor, vascular endothelial growth factor A, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-1 beta, transforming growth factor beta-1, and proto-oncogene c-Fos). Through protein interaction, four target proteins were found to be supported by experimental data. The molecular docking showed that UA could resist rheumatoid arthritis mainly through matrix metalloproteinase-1, Matrix metalloproteinase-3, tumor necrosis factor, transcription factor AP-1 and interleukin-1 beta. **Conclusion:** The results of this study reveal the molecular mechanism of UA against rheumatoid arthritis.

[ **Key words** ] ursolic acid; network pharmacology; pathway analysis; rheumatoid arthritis; molecular docking

目前,网络药理学(network pharmacology),系统生物学(systematic biology),计算机辅助药物设计(computer aided drug design)等技术的出现,为中药的发展提供新的研究思想。网络药理学应用比较广泛,是从整体、系统、全面研究药物小分子和疾病之间的关系,是药物研究的新模式<sup>[1]</sup>。可以明确药物的作用机制,进一步明确小分子与大分子、大分子与疾病、小分子与疾病之间的相关性,疾病潜在靶点的筛选在网络药理学的推动下快速发展<sup>[2]</sup>。网络药理学为新药研发、复方用药提供理论依据和技术支撑<sup>[3]</sup>。同时,分子对接(molecular docking)也可揭示药物治疗疾病的分子机制,将药理作用上升到分子水平上。也为药物机制研究奠定物质基础<sup>[4]</sup>。熊果酸(ursolic acid, UA)的药理作用诸多,采用动物实验进行筛选实验周期长、成本相对较高、工作量大。因此,本研究基于网络药理学结合分子对接的方法,弥补片面、不系统的研究。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是全身性自身免疫疾病,严重影响患者生活质量。常表现为多关节炎、关节肿痛、软骨和骨破坏,甚至关节畸形和丧失功能<sup>[5]</sup>。到目前为止,其发病机制尚不明确,有效防治 RA 成为研究热点。研究者通过对发病机制的不断研究,开发出多种抗 RA 的药物<sup>[6]</sup>。其中包括中药及复方<sup>[7]</sup>。中药资源丰富、副作用少、种类繁多,在治疗 RA 上具有独特优势。目前抗 RA 的中药、单体、复方均有报道,钱鑫等<sup>[8]</sup>研究独活寄生汤联合美洛昔康对 RA 的临床疗效;黄明进等<sup>[9]</sup>采用黑骨藤抗 RA;熊江华等<sup>[10]</sup>探讨了中药复方对 RA 干预机制。但是对于发挥治疗作用的化学成分尚不明确。本研究发现具有抗 RA 抗炎的部分中药中含有 UA 化学成分。UA 在抗炎方面具有一定的代表性,应用前景十分广泛。UA 为游离酸或皂苷的苷元,在天然药用植物或酸味植物中广泛存在,其药理作用广泛,在各种疾病中都能发挥重要作用

用<sup>[11]</sup>。药理作用主要集中在抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗突变、抗风湿性关节炎、抗高血压、抗病毒<sup>[12]</sup>。本研究将从化学成分-靶标、靶标-通路等方面进行研究。采用常规实验评价化学成分活性实验费时、费力。网络药理学和计算虚拟平台为化合物的筛选提供了较好的补充和替代手段。基于毒性与基因比较数据库(comparative toxicogenomics database, CTD), Drug Bank 数据库、中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology, TCMSp)等检索熊果酸的潜在治病靶点。通过 DAVID 生物信息学资源(DAVID bioinformatics resources)数据库对潜在靶点进行通路富集分析,通过 STRING 进行蛋白相互作用,采用分子技术计算 UA 和类风湿潜在靶点的结合能,筛选发挥重要作用的潜在靶点。本研究结果初步揭示 UA 抗类风湿性关节炎的分子机制,为进一步深入探讨其作用机制提供先导信息和基础。

## 1 材料

**1.1 数据库与软件** DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>); DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>); Comparative Toxicogenomics Database: (<http://ctdbase.org/>); STRING (<https://string-db.org/>); TCMSp (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmspsearch>); UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/uniprot/>); Cytoscape 3.5.1 软件 (<http://www.cytoscape.org>); 软件运行于 Windows 操作系统平台下。处理器为 Inter(R) Core(TM) i5-7500 CPU@3.4GHz, 64 位操作系统。使用的相关软件已授权或开源软件。

**1.2 目标化合物的选取** TCMSp 平台主要通过数学和计算模型对中药、复方的化学成分进行吸收、分布、代谢、排泄进行预测。化学成分靶标筛选主要通过 SysDT 模型进行预测。

基于 TCMSp 对目标化合物 UA 相关信息进行

检索,TCMSP 有 6 种检索方式,选择中药成分名进行查找,口服生物利用度(oral bioavailability, OB),类药性(drug likeness, DL),分子量(molecular weight, MW),脂水分配系数(lipid-water partition coefficient)等参数基于 TCMSP 进行预测,基于多元线性回归、偏最小二乘法、支持向量机构建 OBioavail 模型,通过 OBioavail 模型对 OB 进行预测。化学成分的 DL 通过 Tanimoto 系数以及药物之间的 Tanimoto ( $f(A, B) = \frac{A \cdot B}{|A|^2 + |B|^2 - A \cdot B}$ ) 进行计算。一般认为 OB 大的化学成分具有好的口服生物利用度,DL > 0.18 的分子具有较好的类药性。基于 TCSMP 筛选得到 UA 的 OB 为 16.77%, DL 为 0.75; MW 为 456.78; 脂水分配系数(lipid-water partition coefficient)的对数值为 6.47。UA 采用 Chem Office, Open Babel 等构建成三维结构,并对其加氢、加电荷,保存为 mol2 格式。

## 2 方法

**2.1 熊果酸潜在靶标蛋白筛选** UA 基于 TCMSP 和 CTD 筛选人体靶标,TCMSP 可以与 Drug Bank 的人体靶标进行链接,该数据库中的人体靶标数据来自 DrugBank 数据库。利用 SysDT 模型进行药物打靶,查找 UA 的潜在作用靶点。SysDT 模型基于 Drug Bank 数据库中的药物和靶标和他们之前的关系,采用支持向量机(SVM)和随机森林(RF)建立预测模型。期望值 SVM > 0.7 或 RF > 0.8 的蛋白靶标被确定为药物的潜在靶标。UA 基于 TCMSP 在化学成分名称中输入熊果酸,相关指标中显示出靶标的名称。统计潜在蛋白靶标数目。通过 CTD 查找潜在基因靶标。CTD 是一个关于化学物质与基因的相互作用,化学物质在体内的运输和积累的数据库。可以提供相关基因和化合物相互作用的网络模型。打开 CTD,在化学成分名称中输入熊果酸,在基因中显示出潜在靶标基因名称。统计潜在靶标基因的数目。基因和蛋白名称输入 DrugBank<sup>[14]</sup> 和 UniProt 数据库查找 Uniport ID。Uniport ID 为通用蛋白数据库,可以查找靶标蛋白的三维结构、蛋白功能、蛋白序列等信息。

**2.2 潜在靶标通路分析** DAVID 是在线的功能注释系统,基于 WEB 服务器(Web Server)的基因功能富集分析软件。主要包括分析工具和生物学知识库。集中大量基因和蛋白的生物信息。可以用于靶标功能、通路、疾病分析等。基于 DAVID 中的京都基因与基因组百科全书通路分析(Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes pathway, KEGG) 可以直观检测靶标参与的通路,借助于统计分析方法对靶标进行富集分析。可以根据  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  且通路中的靶标蛋白数量 10 个及 10 个以上为重要的通路,对重要的通路进行重点分析,所以本研究选择通路中靶标 > 10 个且  $P < 0.01$  的为显著通路。

**2.3 RA 潜在靶标相互作用分析** STRING 可以通过蛋白名称(protein by name),蛋白序列(protein by sequence),多个蛋白名称(multiple proteins),多条蛋白序列(multiple sequences)进行相互作用分析。STRING 是用于字符串相关操作。其对已知和未知蛋白之间的关联性进行预测。基于实验数据,PubMed 文本数据挖掘的结果,其他数据库数据,采用基因融合、系统进化谱、染色体临近等生物信息学的方法进行预测。最后以综合打分形式衡量结果。对 11 个 RA 靶标蛋白进行蛋白互作网络(protein protein interaction network, PPI network)分析,将 RA 通路中的 11 个潜在靶标输入到 STRING 中,对基质金属蛋白酶-1(MMP-1), MMP-3, 白细胞介素-6(IL-6), 转录因子 AP-1(JUN), 肿瘤坏死因子(TNF), 血管内皮生长因子 A(VEGFA), 集落刺激因子-2(CSF-2), IL-1 $\beta$ , 转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ), 细胞黏附分子-1(ICAM-1), 原癌基因蛋白 c-Fos 之间进行相关性分析。输入潜在靶点名称,选择人源。每一个节点代表一个蛋白,节点右上方为基因名称,每一条边代表潜在靶点之间的功能性关联。

## 2.4 分子对接

**2.4.1 iGEMDOCK 分子对接** iGEMDOCK 是开源的分子对接软件,操作简单,可以直接导入配体分子进行对接,可以多个配体同时进行对接,一般用于活性筛选和快速对接。在进行构象搜索的过程中,该软件主要采用经验打分函数。其结果以能量的高低去判断与化合物结合程度,一般化合物分子与受体结合的构象稳定时能量比较低,发生的作用可能性大。配体支持蛋白质数据库(protein data bank, PDB), MOL 和 MOL2 3 种格式,运行 iGEMDOCK 主要设置对接的精确度和速度,如果做筛选选择快速对接,快速对接的软件自动默认参数:子代(Generation)70,解的个数(number of solution)2,群体大小(generic evolutionary method)200。iGEMDOCK 的结果保存在 output 文件夹下,最好的构象 pdb 在 output/best\_pose 下。运行 iGEMDOCK 软件,将加氢、加电荷 UA 结构输入准备化合物一栏中,将 RA

通路中的 10 个潜在靶点 (MMP-1, MMP-3, IL-6, JUN, TNF, VEGFA, CSF-2, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$ , ICAM-1) 的三维结构分别输入到对接一栏中。

**2.4.2 系统对接分析 (SystemsDock)** 系统对接网站 (Systems Dock Web Site) 可以对小分子靶点、配体与受体结合在线分析的服务器, 基于 Dock-IN 评分预测配体和受体结合潜力。系统对接应用 AutoDock Vina 对接模拟, 预测蛋白质和配体结合的性能, 调整 X-Y-Z 坐标和网格大小以细化绑定的位置。对接结果的分数是实验解离/抑制常数 (PKD/PKI) 的负对数, 通常为 0 至 10。靶标蛋白可以输入 PDB ID, 找活性位点, 计算格点, 可以调整 X-Y-Z 坐标来细化位置。小分子常用格式包括 2D, 3D, SDF, MOL2 和 SMILES<sup>[15]</sup>。输入靶标蛋白的 PDBID, 选择蛋白中的原配体, 默认坐标参数。MMP-1: 配体 (Ligand) 为 RS2, 坐标为 (X 为 10, Y 为 -10.3, Z 为 37.7); MMP-3: Ligand 为 MBS, 坐标为 (X 为 1.3, Y 为 49, Z 为 54.6); IL-6 为 Ligand 为 TLA, 坐标为 (X 为 -7.5, Y 为 -12.8, Z 为 0.1); 转录因子 AP-1 为 Ligand 为 QUP, Å, 坐标为 (X 为 32.5, Y 为 13.3, Z 为 -3.9); TNF: Ligand 为 307 (C), 坐标为 (X 为 -19.4, Y 为 74.7, Z 为 33.8); VEGFA: Ligand 为 GOL, 坐标为 (X 为 -49.8, Y 为 -55.4, Z 为 -0.8); CSF-2: Ligand 为 SO<sub>4</sub>, 坐标为 (X 为 44.6,

Y 为 -56.6, Z 为 -37.9); IL-1 $\beta$ : Ligand 为 4QB, 坐标为 (X 为 34.3, Y 为 66.5, Z 为 7.7); TGF- $\beta_1$ : Ligand 为 NAG (D), 坐标为 (X 为 -85.6, Y 为 17.6, Z 为 45.4); ICAM-1: Ligand 为 NAG (C), 坐标为 (X 为 3.7, Y 为 25.9, Z 为 -17)。在线打开 SystemsDock Web Site, 在 Proteins and binding sites 中输入 PDB ID。在准备小分子一栏中上传小分子 mol2 结构 (5 个/次)。一次最多 5 个小分子, 然后进行对接。

### 3 实验结果

**3.1 潜在靶标蛋白的筛选** 基于 CTD, DrugBank, TCMSp, 文献等查找熊果酸潜在靶标蛋白 66 个, 基于 Uniprot 数据库对靶标蛋白的基因名称, Uniport ID 信息进行完善。见表 1。

**3.2 潜在靶标通路分析** 采用 DAVID 6.8 在线数据库对靶标蛋白进行通路注释, 得到靶标蛋白所参与的所有途径, 筛选出靶标蛋白显著参与的途径 ( $P < 0.01$ ), 且通路中的蛋白数量  $> 10$ , 66 个潜在靶标共筛选出 27 条显著代谢途径。其中 11 个靶标 (MMP-1, MMP-3, IL-6, JUN, TNF, VEGFA, CSF-2, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$ , ICAM-1, FOS) 在 RA 通路中发挥显著作用。22 个蛋白 (基因) 在癌症中发挥作用; 24 个蛋白 (基因) 在乙型肝炎中发挥作用; PI3K/Akt 信号通路潜在靶标 21 个, 所有通路  $P < 0.01$ , 见图 1。

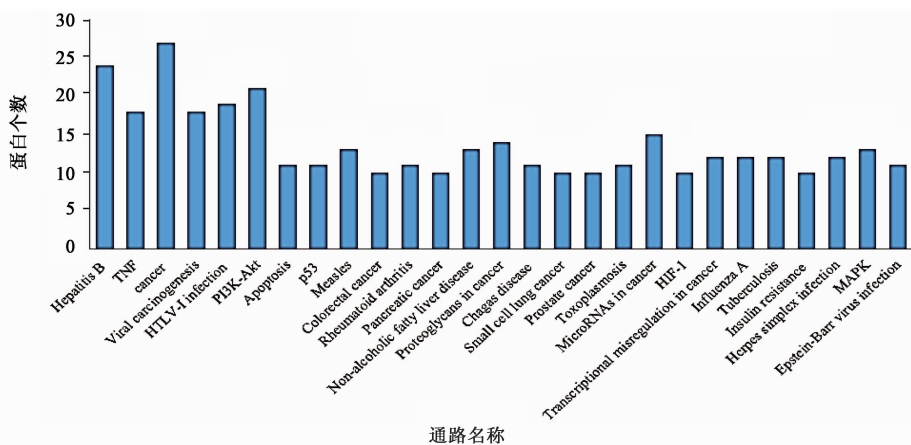


图 1 潜在靶点通路分析  
Fig. 1 Potential target pathway analysis

**3.3 RA 潜在靶标相互作用分析** 对 11 个类风湿关节炎中的靶标基因 (蛋白) 进行相互作用分析, 在 STRING 数据库中找到相应的蛋白与之对应, 结果显示整个网络 11 个蛋白 (MMP-1, MMP-3, IL-6, JUN, TNF, VEGFA, CSF-2, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$ , ICAM-1, FOS) 关联紧密。边的不同颜色代表不同作用关系,

红线代表两者存在融合的证据; 绿线代表有共同相邻蛋白; 蓝线代表两者伴随出现的证据存在; 紫色代表实验室数据支持; 黄线代表文献检索的证据证明关联性; 淡蓝色的线表示不同数据库中有相应的相关性联系存在; 黑色的线则表示共同表达的证据存在。见图 2。

表 1 熊果酸的潜在靶标蛋白

Table 1 Potential target protein of UA

蛋白名称	靶点名称	Uniport ID	蛋白名称	靶点名称	Uniport ID
Caspase-3	CASP3	P42574	tumor necrosis factor	TNF	P01375
DNA topoisomerase 2-alpha	TOP2 $\alpha$	P11388	transcription factor AP-1	JUN	P05412
Caspase-8	CASP8	Q14790	interleukin-6	IL-6	P05231
serine/threonine-protein kinase/ endoribonuclease IRE1	ERN1	O75460	cellular tumor antigen p53	TP53	P04637
DNA topoisomerase 1	TOP1	P11387	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	P45983
Bcl-2 homologous antagonist/killer	BAK1	A0A0A-0MRG8	prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2	P35354
cytochrome P450 2C19	CYP2C19	P33261	NF-kappa-B inhibitor alpha	NFKBIA	P25963
nuclear receptor ROR-gamma	RORC	P51449	fatty acid synthase	FASN	P49327
tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	PTPN2	P17706	matrix metalloproteinase 1	MMP-1	P03956
G-protein coupled bile acid receptor 1	GPBAR1	Q8TDU6	matrix metalloproteinase 3	MMP-3	P08254
aldo-keto reductase family 1 member B10	AKR1B10	O60218	stromelysin-2	MMP-10	P09238
corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	HSD11 $\beta$ <sub>1</sub>	A0A0A0MQV1	intercellular adhesion molecule 1	ICAM-1	P05362
ribosomal protein S6 kinase beta-1	RPS6K $\beta$ <sub>1</sub>	P23443	interleukin-1 beta	IL-1 $\beta$	P01584
DNA damage-inducible transcript 3 protein	DDIT3	P35638	cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	CREB1	P16220
transforming growth factor beta-1	TGF- $\beta$ <sub>1</sub>	P01137	E-selectin	SELE	P16581
eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	EIF4EBP1	Q13541	prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	PTGER3	P43115
cyclin-dependent kinase inhibitor 1	CDKN1A	P38936	prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1	P23219
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	P11802	induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	MCL-1	Q07820
endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	P11021	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2	ATF-2	P15336
G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-D3	CCND3	P30281	granulocyte-macrophage colony- stimulating factor	CSF-2	P04141
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	CDKN1B	P46527	platelet endothelial cell adhesion molecule	PECAM1	P16284
G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-E <sub>1</sub>	CCNE1	P24864	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 2	MAPK8IP2	Q13387
urokinase-type plasminogen activator	PLAU	P00749	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTPN6	P29350
cathepsin B	CTSB	P07858	neuromodulin	GAP43	P17677
transcription factor p65	RELA	Q04206	nitric oxide synthase, endothelial	NOS3	P29474
signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	PTPN1	P18031
vascular endothelial growth factor A	VEGFA	P15692	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5- phosphatase 2	INPPL1	O15357
G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-D <sub>1</sub>	CCND1	P24385	G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-D <sub>2</sub>	CCND2	P30279
apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	P10415	tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	FASLG	P48023
Bcl-2-like protein 1	BCL2L1	Q07817	Caspase-1	CASP1	P29466
proto-oncogene c-Fos	FOS	P01100	ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 7	ENPP7	Q6UWV6
apoptosis regulator BAX	BAX	Q07812			
Caspase-9	CASP9	P55211			
72 kDa type IV collagenase	MMP-2	P08253			
matrix metalloproteinase-9	MMP-9	P14780			

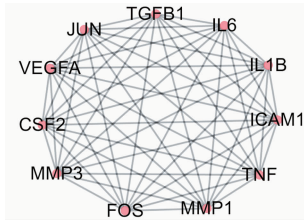


图 2 RA 潜在靶标相互作用分析

Fig.2 analysis of interaction of RA potential targets

### 3.4 分子对接

**3.4.1 iGEMDOCK 分子对接结果** 将 RA 的 11 个潜在靶标与 UA 进行分子对接,其中原癌基因蛋白 c-Fos 蛋白的 PDB 结构没有原配体,将不深入分析。以阳性对照药双氯芬酸钠的打分函数值为阈值,进行比较分析。结果以小分子和大分子匹配能量的大小决定结合的程度。如果匹配能量比较低,说明小分子和大分子结合的构象稳定。RA 的 10 个潜在靶点,其中 MMP-1, MMP-3, JUN, IL-1 $\beta$  与 UA 结合比阳性药好。其中作用最强的为 MMP-3。见表 2。

表 2 UA 与靶标蛋白分子对接

Table 2 Docking of UA with target protein molecules kcal·mol<sup>-1</sup>

靶点名称	PDB 编号	熊果酸	双氯芬酸
MMP-1	966C	-93.61	-105.88
MMP-3	1HY7	-111.43	-88.72
IL-6	1ALU	-75.90	-74.17
JUN	5AEP	-66.75	-65.61
TNF	2AZ5	-85.20	-88.49
VEGFA	3BDY	-72.58	-72.38
CSF2	5D28	-85.89	-82.57
IL-1 $\beta$	1RWN	-93.00	-92.61
TGF- $\beta_1$	3RJR	-64.37	-58.12
ICAM-1	1MQ8	-63.02	-68.25

**3.4.2 系统对接 (SystemsDock) 分析结果** 基于系统对接在线软件对 UA 与 10 个潜在的靶标进行分子对接见表 3。结果以分数值为判决配体与受体结合的程度。分数值一般从 0 到 10 (即从弱到强的结合),结果分数 >4.25 认为有一定的结合活性,大于 5 有较好的结合活性, >7 具有强烈的结合活性。UA 与 MMP-1, MMP-3, JUN, TNF 有强烈的结合活性;与 VEGFA, CSF-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 有较好的结合活性;与 TGF- $\beta_1$ , ICAM-1 有一定的结合活性。分子对接结果表明,UA 与重要靶点的结合活性较好。

表 3 UA 与靶标蛋白分子对接

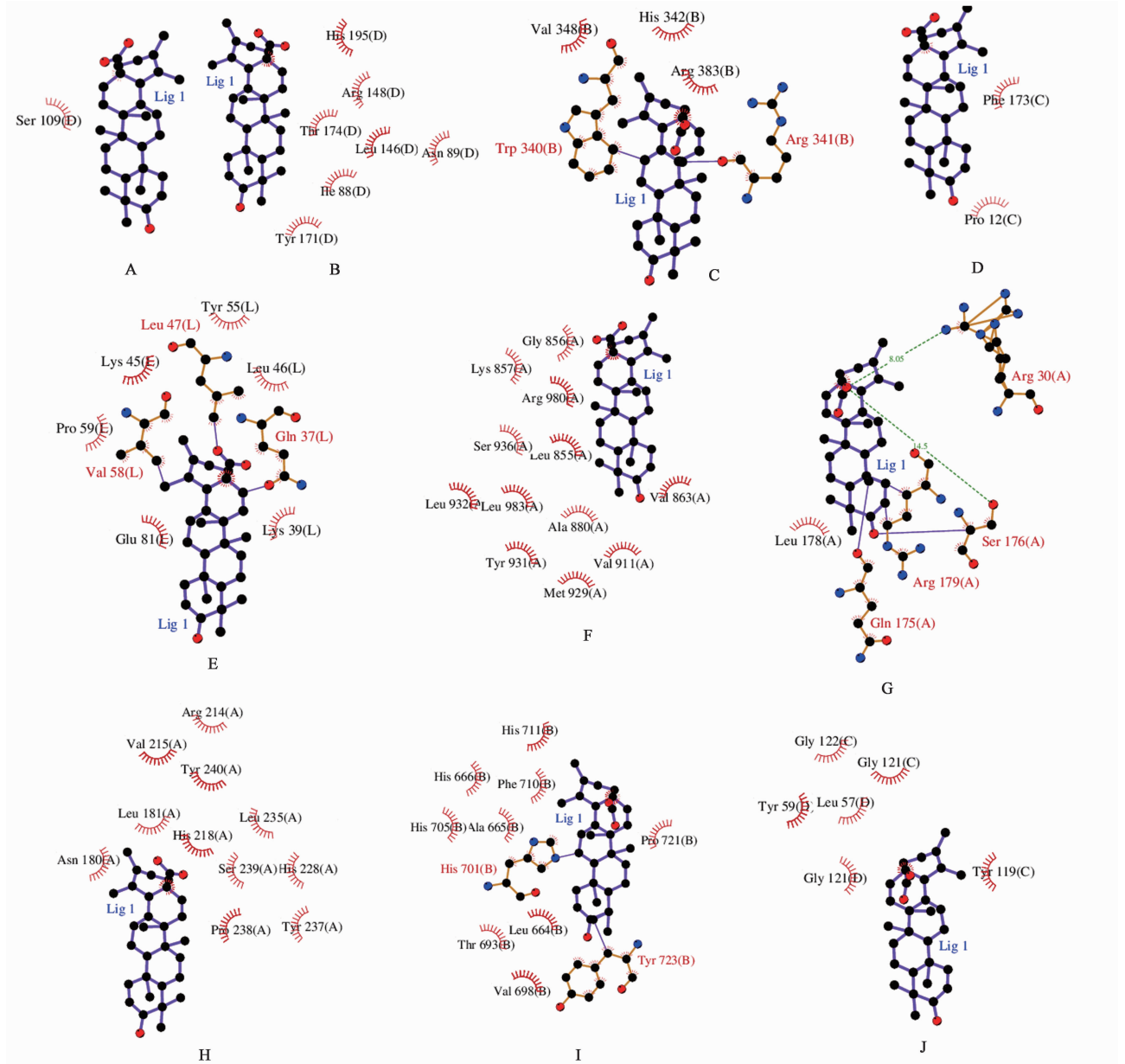
Table 3 Docking of UA with target protein molecules 3

靶点名称	PDB 编号	熊果酸	双氯芬酸
MMP-1	966C	7.58	2.09
MMP-3	1HY7	7.57	2.04
IL-6	1ALU	5.29	1.66
JUN	5AEP	8.15	2.78
TNF	2AZ5	7.12	2.83
VEGFA	3BDY	6.84	1.66
CSF2	5D28	5.30	1.51
IL-1 $\beta$	1RWN	6.55	1.60
TGF- $\beta_1$	3RJR	4.88	1.41
ICAM-1	1MQ8	4.92	1.45

**3.5 UA 和靶标蛋白形成的疏水作用分析** 基于 Ligplot 程序分析得到的 UA 与靶标蛋白相互作用。氢键通过原子间的虚线来表示,而疏水接触则用圆弧来表示。结合自由能受到非极性相互作用的影响,UA 可与靶标蛋白结合形成较多的疏水相互作用。通过 Ligplot 软件统计 UA 和 10 个蛋白相互作用的疏水氨基酸残基。分析可得 UA 与 10 个蛋白结合的重要氨基酸位点。例如 UA 与肿瘤坏死因子 (2AZ5) 结合的关键疏水氨基酸残基: TRD59, TRC119, GLYC121, LEUD57, LEUC57, TYRC59。见图 3。

### 4 讨论

近年来,RA 的治疗是通过多种生物制剂抑制炎症反应各环节发挥作用。但是 RA 疾病反复发作,为慢性炎性自身免疫性疾病,目前还没有很好的根治方法,临床上存在治疗难点。RA 的发病过程并不是单一通路,而是多个通路,所以需要不断研究新的靶向药物。近年来,网络药理学不断发展,在中医药现代化研究过程中发挥重要作用,网络药理学研究发现,疾病发展的不同阶段,其基因或蛋白也在发生变化,这与中医药的涵基本上大致相同<sup>[16]</sup>。已经有研究者发现 UA 可以控制大鼠关节炎炎症及骨质破坏,防止关节发生病变<sup>[17]</sup>。MMP-3 是基质金属蛋白酶家族中的一员,由滑膜、软骨细胞分泌,在骨侵蚀、RA 疾病中发挥重要作用<sup>[18]</sup>,MMP-3 是 RA 关节破坏的重要因素,能降解多种细胞外基质,MMP-3 可作为预测 RA 患者的指标。IL-6 是致炎因子,由 B 细胞, T 细胞, 成纤维细胞等分泌,可



A. TGF- $\beta_1$ ; B. CSF-2; C. IL-1 $\beta$ ; D. ICAM-1; E. VEGFA; F. JUN; G. IL-6; H. MMP-1; I. MMP-3; J. TNF

图 3 UA 与靶标蛋白相互作用分析

Fig. 3 Intermolecular interaction analysis between UA and target protein

以聚集大量炎症细胞,促进炎症介质的释放。抑制 IL-6 的表达已经成为治疗 RA 的新方法<sup>[19]</sup>。IL-1 $\beta$  是 RA 发病过程中的促炎因子之一,主要通过侵蚀骨质和刺激 B 型滑膜细胞,其分泌过量 MMPs,引起细胞外基质和关节破坏<sup>[20]</sup>。转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1) 是炎性细胞因子刺激所活化的另一重要核转录因子,在 RA 发病机制中发挥重要作用。TGF- $\beta_1$  为双向调节细胞因子,调节细胞生长、分化,TGF- $\beta_1$  能促进 RA 滑膜成纤维细胞的增殖。其在 RA 中的表达近几年受到重视。UA 可以影响 MMP-1, MMP-3, IL-6, JUN, TNF, VEGFA,

CSF-2, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta_1$ , ICAM-1, 原癌基因蛋白 c-fos 蛋白的表达。基于 iGEMDOCK 和 SystemsDock 对接结果整合发现 MMP-1, MMP-3, TNF, 转录因子 AP-1, IL-1 $\beta$  与 UA 有较好的结合。UA 在 RA 治疗中的价值则需进一步实验研究。

[参考文献]

[1] CHENG B F, HOU Y Y, JIANG M, et al. Anti-inflammatory mechanism of Qingfei Xiaoyan Wan studied with network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48:686-693.

- [ 2 ] Hopkins A L. Network pharmacology [ J ]. Nature Biotechnology, 2007, 25(10):1110-1111.
- [ 3 ] 李翔,吴磊宏,范晓辉,等. 复方丹参方主要活性成分网络药理学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(210):2911-2914.
- [ 4 ] 叶德永. 计算机辅助药物设计导论[M]. 北京:化学工业出版社,2004:52-56.
- [ 5 ] 赵东方. 中药汽浴治疗类风湿性关节炎 100 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2012,10(5):21.
- [ 6 ] Aletaha D, Ward M M, Machold K P, et al. Remission and active disease in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,2005,52(9):2625-2636.
- [ 7 ] 赵光智. 黄芪桂枝五物汤加味治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 山西中医,2010,26(3):22.
- [ 8 ] 钱鑫,陈璇,魏刚,等. 独活寄生汤联合美洛昔康治疗类风湿性关节炎临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):173-176.
- [ 9 ] 黄明进,罗春丽,郭刚,等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):175-177.
- [ 10 ] 熊江华,李艳. 中药复方对类风湿性关节炎干预机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(9):230-234.
- [ 11 ] 王婷,宋怀燕. 熊果酸药理作用研究进展[J]. 中华医学研究杂志,2005,9(5):1-8.
- [ 12 ] 孟艳秋,陈瑜,王赓,熊果酸的研究进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(1):25-27.
- [ 13 ] RU J, PENG L, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbalmedicines [ J ]. J Cheminform, 2014, 13(8):1498-1504.
- [ 14 ] Wishart D S, Knox C, GUO A C, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [ J ]. Nucleic Acids Res, 2008,36:901-906.
- [ 15 ] Hsin K Y, Matsuoka Y, Asai Y, et al. SystemsDock: A web server for network pharmacology-based prediction and analysis [ J ]. Nucleic Acids Res, 2016, 44: W507-W513.
- [ 16 ] 宋阔魁,毕天,展晓日,等. 网络药理学指导下的中药有效成分发现策略[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(1):27-31.
- [ 17 ] 曾光,陈芳,熊新贵,等. 熊果酸对 CIA 大鼠关节炎及骨质破坏的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2013,33(7):3-7.
- [ 18 ] 汤天凤,梁清华,罗徐,等. 活动期类风湿关节炎患者血清基质金属蛋白酶-3 及其组织抑制剂-1 水平的检测和意义 [ J ]. 中华风湿病学杂志,2005,9(5):291-293.
- [ 19 ] Tanaka Y, Martin M E. IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab [ J ]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(9):1595-1597.
- [ 20 ] 余建明,刘喜德,曲丕盛,等. 祛痹镇痛方对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 IL-1 $\beta$ , IL-8, VEGF 表达的影响 [ J ]. 中国中西医结合杂志,2013,33(1):105-109.

[ 责任编辑 周冰冰 ]