

基于网络药理学研究甘草-石榴皮复配抗紫外线致皮肤光损伤的保护作用机制

苟军丽¹, 杨程², 李元杰^{1*}, 雍婧姣¹, 赵建军¹, 张霞¹, 高晓娟¹, 王建寰¹,
陶伟伟³, 王汉卿^{1*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 基础医学院, 宁夏特色中医药协同创新中心, 回医药现代化教育部重点实验室, 银川 750004; 2. 银川市口腔医院, 银川 750004;
3. 南京中医药大学基础医学院 中医脑病学重点实验室, 南京 210023)

[摘要] 目的:应用网络药理学的方法及工具研究甘草-石榴皮复配的潜在协同保护皮肤光损伤作用机制,为中药复方现代化及新药创新发现提供依据。方法:利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库结合所查文献,获得甘草-石榴皮复配后的活性成分及所对应的靶标;将所得靶标输入蛋白质数据库(UniProt)中,查询靶标对应的基因名称。通过检索疾病相关网站CTD数据库, GeneCards数据库以及OMIM数据库,获取防晒相关靶标;通过在线String数据库分析作用靶标之间的相互作用关系,筛选出预测的核心作用靶标。利用DAVID数据库,进行预测靶标的基因本体(GO)基因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。利用Cytoscape 3.6.1软件做网络图;利用在线网站Draw Venn Diagram将疾病靶标与药物预测靶标之间的关系用Venn图呈现;利用R Studio软件绘制GO富集和KEGG通路富集分析图。通过GOLD软件进行活性成分与核心靶标之间的分子对接。结果:收集到甘草-石榴皮复配活性成分16个,包括甘草素、甘草苷、山柰酚、槲皮素等。主要涉及蛋白激酶B1(AKT1),白细胞介素(IL)-6,血管内皮生长因子A(VEGFA),肿瘤坏死因子(TNF),抑癌基因(TP53)这5个核心靶点,涉及乙型肝炎,癌症信号通路,弓形虫病,美国锥虫病,肿瘤坏死因子信号通路等通路发挥防晒作用。结论:该研究基于网络药理学的方法,初步探究了甘草-石榴皮复配后的皮肤光保护作用靶标与通路,进一步印证了中药多成分、多靶点治疗疾病的特点,为中药复方的现代化研究提供一定的科学思路。

[关键词] 网络药理学; 甘草; 石榴皮; 光损伤; 协同作用机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0178-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210117

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201130.1012.001.html>

[网络出版日期] 2020-11-30 11:12

Protective Effect of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium Formula on Ultraviolet-induced Skin Damage

GOU Jun-li¹, YANG Cheng², LI Yuan-jie^{1*}, YONG Jing-jiao¹, ZHAO Jian-jun¹, ZHANG Xia¹,
GAO Xiao-juan¹, WANG Jian-huan¹, TAO Wei-wei³, WANG Han-qing^{1*}

(1. College of Pharmacy, College of Basic Medical, Ningxia Collaborative Innovation Center of Regional Characteristic Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Yinchuan Stomatological Hospital, Yinchuan 750004, China;

3. Key Laboratory for Encephalopathy of China Medicine, School of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[收稿日期] 20200811(009)

[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2018BEG03015);国家自然科学基金项目(81603227);宁夏重点研发计划项目(东西部合作)项目(2017BY079);中央本级重大增减支项目(2060302);宁夏青年科技人才托举工程项目(TJGC2018016)

[第一作者] 苟军丽,在读硕士,从事新药研发与保健产品开发,E-mail:2212228650@qq.com

[通信作者] *王汉卿,教授,硕士生导师,从事中药资源开发与利用研究,E-mail:wwwhhq@163.com;

*李元杰,副教授,从事中药功效物质基础研究,E-mail:zhenzhen1081@163.com

[Abstract] **Objective:** To explore the potential synergistic protective mechanism of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound by using the methods and tools of network pharmacology, and provide a basis for the modernization of traditional Chinese medicine(TCM) compounds and the discovery of new drugs. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to obtain the active components of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula and their corresponding targets. The obtained targets were input to the UniProt database to inquire the gene names corresponding to the targets. By searching the CTD database, Genecards database and OMIM database of disease-related websites, the anti-sunburn targets were obtained. The interaction of the active targets was analyzed with online STRING database to screen the predicted core targets. The gene ontolog(GO) gene function enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway enrichment analysis of the predictive targets were performed by using DAVID database. Cytoscape 3.6.1 software was used to make "drug-component-target" network diagram, "protein-protein interaction" network diagram and "component-target-pathway" network diagram. Online website Draw Venn Diagram was used to show the relationship between disease targets and drug predicted targets. R Studio software was used to draw the functional enrichment analysis diagram of GO gene and KEGG pathway. Molecular docking between the active ingredients and the core targets was performed using GOLD software. **Result:** The 16 active compounds were collected, such as liquiritin, glycyrrhizin, kaempferol and quercetin. The active components mainly acted on 5 core targets: protein kinase B1(AKT1), interleukin(IL)-6, vascular endothelial growth factor(VEGFA), tumor necrosis factor(TNF) and tumor suppressor gene(TP53) and played a role in anti-sunburn effect primarily through these pathways such as hepatitis B, pathways in cancer, toxoplasmosis, chagas disease(American trypanosomiasis), and TNF signaling pathway. **Conclusion:** Based on the method of network pharmacology, the present study has preliminarily explored the anti-sunburn targets and pathways of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula, and further verified the characteristics of multi-component and multi-target treatment of diseases in TCM, so as to provide certain scientific ideas for the modernization research of Chinese herbal compound prescriptions.

[Key words] network pharmacology; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; Granati Pericarpium; light damage; synergy mechanism

皮肤癌是常见的恶性肿瘤之一,流行病学研究表明,三种主要类型的皮肤癌(基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑素瘤)均是由紫外线照射引起的^[1]。相关研究表明,皮肤白皙、对阳光敏感的人相较于肤色黝黑者发病率更高。引起该现象的原因是UVB波段(280~320 nm)和UVA波段(320~400 nm)紫外线照射到人体皮肤时,刺激皮肤启动自我防御功能。通常,肤色黑的人表皮黑素细胞逐渐通过合成黑色素并转移至角质层,能够起到一定的光保护作用,从而使皮肤免受紫外线损伤。但是,受到长期过量紫外线刺激后,不仅会晒黑,还会出现炎症反应、氧化损伤及光致癌等损伤反应。为了保持皮肤的美观和健康,减少皮肤癌的发病率,使用对皮肤具有光保护作用的制剂是必不可少的^[2]。

中药具有多方位多靶点、药性温和等优势,已被用于抗紫外线研究^[3]。然而,大多数具有抗紫外

线作用的单味中药存在稳定性差、仅对某个波段的紫外线有吸收等问题。复方研究具有疗效高、毒副作用小的特点。但是,目前用于抗紫外线的复方研究较少^[4]。研究表明,甘草中黄酮类成分对皮肤具有很好的美白和防护作用^[5-6];石榴皮中含有丰富的多酚类物质^[7],为紫外线吸收剂的主要成分之一^[8]。但是,目前对于二者抗紫外线致光损伤的皮肤保护作用机制尚未开展相关研究,且缺少相关产品开发。据文献报道,利用黄酮、多酚紫外光区吸收的差异,通过复配可以得到广谱抗紫外致皮肤光损伤,预防皮肤癌^[9]。研究表明,多酚类化合物在270~280 nm段有强吸收峰^[10],在305~310 nm段有较弱吸收峰;大多数黄酮类化合物的紫外吸收光谱在240~280 nm和300~400 nm有强吸收,因此从紫外光谱的峰值吸收可以推测富含黄酮和多酚化合物的中药配伍可以协同抗UVB和UVA波段的紫外

线。课题组前期采用快速筛选中药紫外线吸收剂的方法紫外分光光度法^[11],对甘草-石榴皮混合提取液进行了紫外光谱测定,发现两药合用具有较好的紫外吸收作用,可用于防治皮肤光损伤。

网络药理学是采用大数据挖掘的方式,分析药物活性成分与靶点、疾病之间相互作用关系,进而阐述药物防治疾病可能的作用机制^[12]。本研究旨在通过网络药理学的工具和方法,探究甘草-石榴皮复配抗紫外线致光损伤的皮肤保护作用机制,为进一步开发中药复配制剂提供科学依据。

1 网站及方法

1.1 甘草-石榴皮复配活性成分的检索与收集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[13],对甘草和石榴皮中的活性成分进行检索,以“甘草”和“石榴皮”为检索关键词,根据药物代谢动力学的特点,将筛选条件设定为“口服生物利用度(OB)≥30%”且“类药性(DL)≥0.18”。并结合相关文献,收集甘草与石榴皮中符合条件的活性成分。

1.2 甘草-石榴皮复配防护皮肤晒伤的预测作用靶标的获取 根据TCMSP获得的活性成分,进一步收集活性成分所对应靶标,利用UniProt网站(<https://www.uniprot.org/>),将其活性成分的靶标导入,获得预测靶标的人源基因及UNIPROTKB,通过Cytoscape 3.6.1软件绘制“药物-成分-靶标”网络图;利用疾病数据库CTD(<http://ctdbase.org/>), GeneCard(<https://www.genecards.org/>)以及OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库检索与防晒相关靶标基因,检索关键词为“sunburn”和“Light allergy”,将获得的疾病靶标和活性成分预测的靶标做对比,共同基因即为甘草-石榴皮复配后的活性成分防护皮肤晒伤的预测作用靶标基因,利用在线网站Draw Venn Diagram(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>),将疾病靶标与药物预测靶标之间的关系用Venn图呈现。

1.3 核心蛋白质-蛋白质相互作用(PPI) 利用STRING(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)数据库,将甘草-石榴皮预测的作用靶标导入,将物种来源选择为“Homo species”,获得PPI网络图,保存为TSV格式文件,利用Cytoscape 3.6.1软件对TSV格式的核心靶标文件绘制网络图,根据各节点的“Combined degree”值的大小,调节各节点的颜色深浅和大小。

1.4 靶点基因功能分析的基因本体(GO)富集及通

路分析的京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集 本研究利用较具权威性的在线网站DAVID, DAVID是由美国Leidos生物医学研究公司的LHRI团队开发的一个在线基因注释及功能富集的网站(<http://david.nifcrf.gov/>)。将预测的作用靶标基因上传至DAVID网站,分别进行GO基因功能在生物过程、分子功能以及细胞组成3个水平上的富集分析和KEGG通路分析;筛选出 $P<0.01$ 的通路,并根据富集的基因数量选择前20个,使用R Studio软件绘制GO基因功能富集分析和KEGG通路富集分析图进行可视化分析。

1.5 构建“成分-靶标-通路”网络图 对KEGG通路前20的富集结果中排名前5的通路,作为甘草-石榴皮复配防晒的主要通路,整理富集在这5条通路的基因,利用Cytoscape 3.6.1软件绘制“成分-靶标-通路”网络图。

1.6 活性成分与核心靶标的分子对接 分子对接技术是利用计算机模拟核心受体与配体间的结合方式以及两者之间的结合力的大小。利用GOLD软件对PPI中的5个核心蛋白与活性成分之间进行分子对接,根据得分结果,分析之间的作用力大小。

2 结果

2.1 甘草-石榴皮复配的活性成分的检索结果 在TCMSP中根据设定的条件筛选出的甘草活性成分较多,结合相关文献,根据甘草中的活性成分及在化妆品中的应用报道,有美白和防晒效能的活性成分有甘草素、甘草苷、异甘草素、异甘草苷、光甘草定、光甘草素、甘草酸和甘草甜素;文献报道对含甘草黄酮有效成分防晒霜的制备工艺研究^[5],发现甘草中具备防晒功效的活性成分主要是的黄酮类物质。因此,本研究从设定条件下综合文献筛选出了甘草的黄酮类成分共11个,石榴皮中的活性成分7个,其中有2个共同成分,最终获得甘草黄酮醇,异甘草黄酮醇,甘草查儿酮A,甘草查儿酮等16成分,山柰酚、槲皮素为共有成分。见表1。

2.2 甘草-石榴皮的“药物-成分-靶标”网络图及分析 在TCMSP中收集到甘草活性成分所对应的靶标181个,石榴皮活性成分所对应的靶标191个,去除重复靶标后,最终获得甘草-石榴复配的活性成分的靶标共208个。将成分与靶标数据导入Cytoscape 3.6.1软件绘制“药物-成分-靶标”网络图,见图1。图中共包含节点225个,边线725个。其中蓝色矩形代表甘草的活性成分,紫色三角形代表石榴皮的活性成分,粉色圆圈代表两者的共有成分,

表1 甘草-石榴皮复配的活性成分

Table 1 Active ingredients of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound

No.	分子ID	分子名称	OB /%	DL	药物归属
1	MOL001002	鞣花酸 ellagic acid	43.06	0.43	石榴皮
2	MOL000358	β -谷甾醇 beta-sitosterol	36.91	0.75	石榴皮
3	MOL000422	山柰酚 kaempferol	41.88	0.24	石榴皮、甘草
4	MOL000492	(+)-儿茶素 (+)-catechin	54.83	0.24	石榴皮
5	MOL000006	木犀草素 luteolin	36.16	0.25	石榴皮
6	MOL009274	鄂见新醇 fritillaziebinol	55.05	0.34	石榴皮
7	MOL000098	槲皮素 quercetin	46.43	0.28	石榴皮、甘草
8	MOL004903	甘草苷 liquiritin	65.69	0.74	甘草
9	MOL001789	异甘草素 isoliquiritigenin	85.32	0.15	甘草
10	MOL004853	甘草黄酮醇 licoflavonol	8.75	0.4	甘草
11	MOL004949	异甘草黄酮醇 isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
12	MOL000497	查儿酮 A licochalcone a	40.79	0.29	甘草
13	MOL004855	查儿酮 licoricone	63.58	0.47	甘草
14	MOL004911	光甘草素 glabrene	46.27	0.44	甘草
15	MOL004910	光甘草宁 glabranin	52.9	0.31	甘草
16	MOL004841	查儿酮 B licochalcone B	76.76	0.19	甘草

红色矩形代表成分所对应的靶标;灰色的边线代表药物对应的活性成分以及成分与靶标之间的相互联系。结果表明,一个活性成分对应多个靶点,反过来,一个靶点亦对应多个成分;体现了中药多成分,多靶点治疗疾病的作用机制复杂的特点。

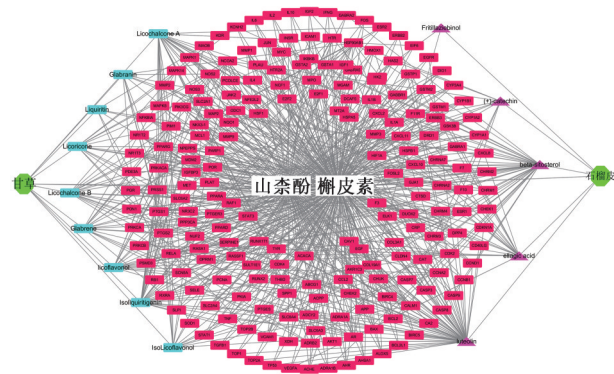


图1 甘草-石榴皮中“药物-成分-靶标”网络

Fig. 1 Network diagram of "drug-component-target" of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Granati Pericarpium

2.3 甘草-石榴皮复配防晒靶标的预测 通过CTD数据库,OMIM数据库以及GeneCards数据库中筛选出每个库里的前300个靶标,OMIM库中相关靶标较少,因此,共获得防晒靶标656个,将其与208个成分靶标作对比,获得共同靶标74个,即为甘草-石榴皮复配的活性成分防晒的预测作用靶标基

因。利用在线网站 Draw Venn Diagram,将疾病靶标与药物预测靶标之间的关系用 Venn 图呈现,见图2。

2.4 潜在作用靶标相互作用网络图及分析 将STRING数据库获得的数据导入Cytoscape 3.6.1软件绘制预测作用靶标的PPI网络图,见图3;该图共包含节点74个,表示预测的作用靶标,边线1348条,表示蛋白之间的相互作用关系。节点的圆圈越大,颜色越深,代表连接度(combined degree)的值越大。可视化后由图3可知,磷酸化蛋白激酶(AKT1),白细胞介素(IL)-6,血管内皮生长因子A(VEGFA),肿瘤坏死因子(TNF)以及抑癌基因(TP53)这5个靶标的连接度值最大,表明这5个之间的相关性最大;可认为这5个靶标即为甘草-石榴皮复配防护皮肤晒伤的核心靶标。

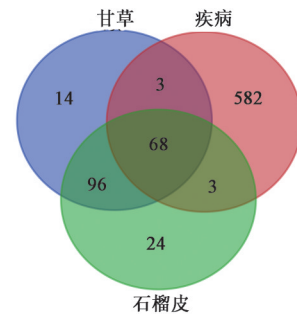


图2 甘草-石榴皮复配靶标与防护皮肤晒伤靶标的匹配

Fig. 2 Match between Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound composite target and sunburn protection target

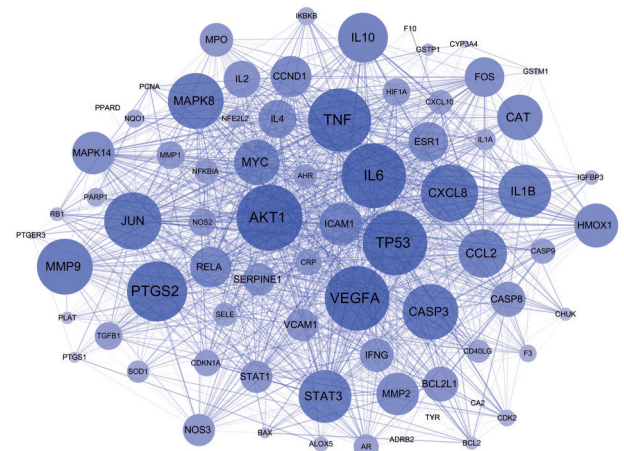


图3 预测作用靶标的PPI

Fig. 3 PPI diagram of predicted target

2.5 甘草-石榴皮复配活性成分防晒潜在靶点蛋白的功能注释 将获得的74个靶点蛋白利用DAVID数据库中的功能注释工具进行KEGG通路分析和GO富集分析。通过KEGG通路分析得到($P < 0.01$)

的重要通路乙型肝炎 (hepatitis B), 癌症信号通路 (pathways in cancer), 形虫病 (Toxoplasmosis), 美国锥虫病 Chagas disease (American trypanosomiasis), 肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway) 等 77 条重要通路, 见表 4。通过 R Studio 软件将分析结果的排名前 20 的结果绘制得到高级气泡图, 见图 4~7。GO 富集分析结果显示, 在生物过程 (BP) 分析中富集基因数量较多的是 RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控, 炎症反应, DNA 为模板的转录正调控等, 在分子功能

(MF) 分析中 DNA 结合 (DNA binding), 转录因子活性 (transcription factor activity), 序列特异性 DNA 结合 (sequence-specific DNA binding)、细胞因子活性 (cytokine activity) 等富集基因数较多以及在细胞组分 (CC) 分析中细胞外空间 (extracellular space), 细胞核 (nucleus), 细胞质 (cytoplasm) 等排名靠前。甘草-石榴皮复配活性成分的潜在靶点作用于不同的代谢通路, 相互协调, 防护皮肤免受紫外线的损伤, 符合中药作用的“多成分, 多靶点”的特性, 见图 8。

表 4 甘草-石榴皮复配活性成分防晒相关通路(前 20 条)

Table 4 Sunscreen related pathways of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound active ingredients(top 20)

No.	通路名称	ID	靶点 数/个	通路分类
S1	乙型肝炎 (hepatitis B)	hsa05161	27	human diseases, infectious disease
S2	癌症的途径 (pathways in cancer)	hsa05200	36	human diseases, cancer
S3	恰加斯病 (Chagas disease, American trypanosomiasis)	hsa05142	21	human diseases, infectious disease
S4	TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)	hsa04668	21	environmental information processing, signal transduction
S5	弓形虫病 (Toxoplasmosis)	hsa05145	21	human diseases, infectious disease
S6	利什曼病 (Leishmaniasis)	hsa05140	15	human diseases, infectious disease
S7	胰腺癌 (pancreatic cancer)	hsa05212	14	human diseases, cancer
S8	小细胞肺癌 (small cell lung cancer)	hsa05222	15	human diseases, cancer
S9	Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)	hsa04620	16	organismal systems, immune system
S10	HTLV-I 感染 (HTLV-I infection)	hsa05166	21	human diseases, infectious disease
S11	细胞凋亡 (apoptosis)	hsa04210	13	cellular processes, cell growth and death
S12	EB 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)	hsa05169	16	human diseases, infectious disease
S13	甲型流感 (influenza A)	hsa05164	18	human diseases, infectious disease
S14	炎症性肠炎 [inflammatory bowel disease (IBD)]	hsa05321	13	human diseases, immune disease
S15	疟疾 (malaria)	hsa05144	12	human diseases, infectious disease
S16	结核 (tuberculosis)	hsa05152	18	human diseases, infectious disease
S17	NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)	hsa04621	12	organismal systems, immune system
S18	百日咳 (pertussis)	hsa05133	13	human diseases, infectious disease
S19	T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)	hsa04660	14	organismal systems, immune system
S20	大肠癌 (colorectal cancer)	hsa05210	12	human diseases, cancer

2.6 分子对接结果与分析 利用 GOLD 软件, 对潜在靶点相互作用网络图中 combined degree 值最大的 5 个靶点蛋白 (AKT1, TNF, TP53, IL6, VEGFA), 与甘草-石榴皮复配的 16 个活性成分分子对接结果及得分较高的分子与蛋白上氨基酸氢键形成情况见表 5, 图 9, 10。其中 7 个 Gold score > 60 分以上 (占 9%), 表示结合能力很强, 有 54 个 Gold score 值在 40~60 (占 68%), 说明结合能力较强, 有 17 个 Gold score 值在 30~40 (占 21%), 表明有一定结合能力, 仅

有 2 个 Gold score 值在 30 以下 (占 3%)。总体表明, 核心靶点蛋白和绝大部分活性成分之间结合能力较好, 这也说明甘草-石榴皮复配的活性成分可能主要作用于这 5 个靶点蛋白起到防晒的作用。

3 讨论

本研究采用网络药理学的方法, 从整体的角度对甘草-石榴皮复配防护皮肤抗紫外线光损伤的作用机制进行探讨, 预测发现甘草-石榴皮复配共获得 16 种活性成分, 具备防晒作用的 74 个潜在靶点通过

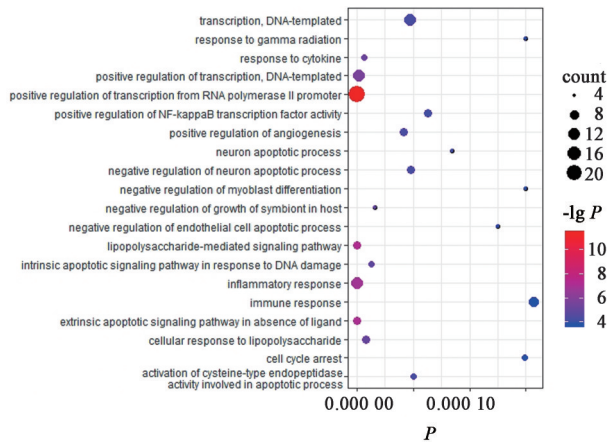


图 4 甘草-石榴皮复配潜在作用靶标的 GO 通路富集的 BP 分析
Fig. 4 BP analysis of GO pathway enrichment of potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound

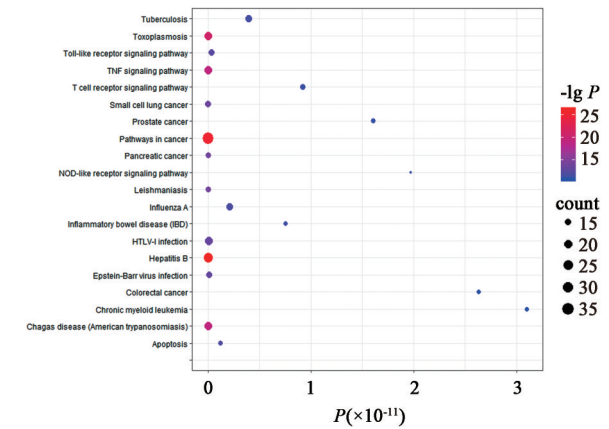


图 7 甘草-石榴皮复配潜在作用靶标的 KEGG 通路富集分析
Fig. 7 KEGG analysis of GO pathway enrichment of potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound

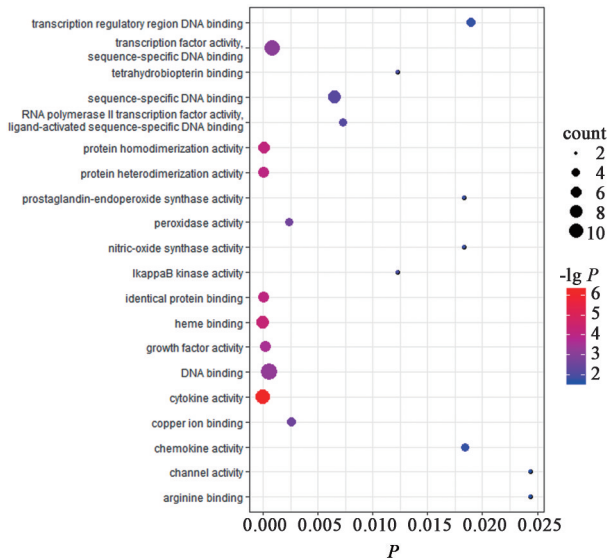


图 5 甘草-石榴皮复配潜在作用靶标的 GO 通路富集的 MF 分析
Fig. 5 MF analysis of GO pathway enrichment of potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound

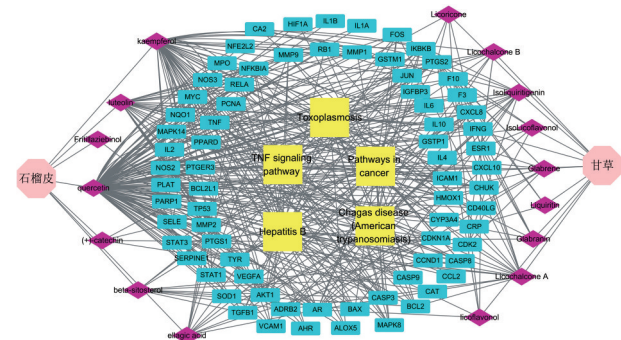


图 8 甘草-石榴皮“成分-靶标-通路”网络
Fig. 8 Network diagram of "component-target-pathway" of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Granati Pericarpium

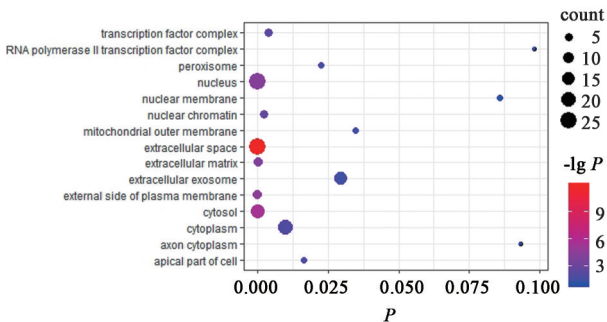


图 6 甘草-石榴皮复配潜在作用靶标的 GO 通路富集的 CC 分析
Fig. 6 CC analysis of GO pathway enrichment of potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Granati Pericarpium formula compound

干预肿瘤坏死因子信号通路和 Toll 样受体信号途径等 77 条相关代谢途径发挥作用,其中主要作用于这 5 个 (AKT1, TNF, TP53, IL6, VEGFA) 核心蛋白。最后结合分子对接的软件,通过甘草-石榴皮复配活性成分与核心靶标蛋白之间的结合活性高低,进一步验证了绝大多数活性成分与靶标之间的有较好相互作用能力。通过甘草-石榴皮复配活性成分与靶点蛋白和信号通路之间的复杂的网络关系,表明了中药“多成分,多靶点”治疗疾病的特点。随着人们健康意识的提升和回归自然的趋势,植物化妆品原料越来越受到青睐,上市产品中大多数添加的植物原料都是通过复配,并不单一。但是复配作用有协同,有相消,盲目复配几种中药或植物提取物添加到化妆品中,缺乏科学解释,难以获得消费者的认可。外用药膏及化妆品类制剂仅能用于局部且轻症的皮肤光损伤,因光过敏出现大面积或者全身性皮肤光损伤,甚至出现轻微皮肤癌导致免疫功能受损,建议服用药物进行治疗。本文从中药复配的网络

表5 核心靶点蛋白与活性成分分子对接得分(Gold score)

Table 5 Gold score of core target protein docking with active ingredient molecules(Gold score)

核心靶点	活性成分	分子对接得分	核心靶点	活性成分	分子对接得分	核心靶点	活性成分	分子对接得分
AKT1	甘草苷	68.39	VEGFA	查儿酮A	37.04	TNF	光甘草素	50.10
AKT1	异甘草黄酮醇	62.32	VEGFA	木犀草素	35.94	TNF	β -谷甾醇	47.34
AKT1	甘草黄酮醇	58.12	VEGFA	(+)-儿茶素	35.58	TNF	查儿酮B	47.26
AKT1	查儿酮	57.08	VEGFA	鞣花酸	32.74	TNF	异甘草素	45.26
AKT1	查儿酮A	56.00	VEGFA	鄂贝新醇	28.98	TNF	木犀草素	44.86
AKT1	β -谷甾醇	54.39	TP53	异甘草黄酮醇	66.75	TNF	山柰酚	44.76
AKT1	光甘草素	53.48	TP53	甘草黄酮醇	64.40	TNF	(+)-儿茶素	44.63
AKT1	查儿酮B	52.94	TP53	光甘草宁	62.68	TNF	槲皮素	44.10
AKT1	异甘草素	51.01	TP53	查儿酮B	62.59	TNF	鞣花酸	42.01
AKT1	木犀草素	50.47	TP53	查儿酮A	62.12	TNF	鄂贝新醇	40.44
AKT1	鞣花酸	49.76	TP53	异甘草素	58.98	IL-6	甘草黄酮醇	58.41
AKT1	光甘草宁	49.12	TP53	木犀草素	58.20	IL-6	异甘草黄酮醇	50.60
AKT1	山柰酚	48.84	TP53	光甘草素	57.53	IL-6	查儿酮	46.43
AKT1	槲皮素	48.84	TP53	查儿酮	57.31	IL-6	查儿酮B	44.12
AKT1	(+)-儿茶素	47.89	TP53	鞣花酸	56.74	IL-6	槲皮素	43.83
AKT1	鄂贝新醇	40.12	TP53	槲皮素	56.14	IL-6	β -谷甾醇	43.58
VEGFA	异甘草黄酮醇	42.71	TP53	山柰酚	54.97	IL-6	木犀草素	43.30
VEGFA	查儿酮	42.23	TP53	(+)-儿茶素	50.57	IL-6	异甘草素	41.95
VEGFA	甘草黄酮醇	39.64	TP53	甘草苷	50.03	IL-6	查儿酮A	41.60
VEGFA	查儿酮B	39.35	TP53	鄂贝新醇	35.46	IL-6	(+)-儿茶素	41.56
VEGFA	甘草黄酮醇	39.02	TP53	β -谷甾醇	14.39	IL-6	光甘草素	41.16
VEGFA	β -谷甾醇	38.87	TNF	查儿酮A	57.39	IL-6	甘草苷	40.69
VEGFA	异甘草素	38.75	TNF	光甘草素	55.17	IL-6	山柰酚	40.38
VEGFA	光甘草宁	38.62	TNF	甘草苷	53.76	IL-6	鞣花酸	39.61
VEGFA	槲皮素	37.73	TNF	查儿酮	52.92	IL-6	光甘草宁	36.08
VEGFA	光甘草素	37.39	TNF	异甘草黄酮醇	51.39	IL-6	鄂贝新醇	31.53
VEGFA	山柰酚	37.13	TNF	甘草黄酮醇	51.39			

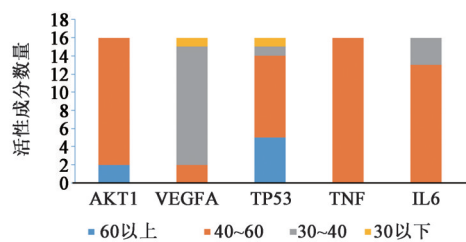


图9 Gold score值堆积柱状

Fig. 9 Stacked histogram of Gold score values

络药理学阐明其内在的作用机制,为今后天然中药活性成分复配制剂治疗光过敏导致的皮肤损伤,及添加到化妆品中的应用提供一定的科学参考。

王建国等^[5]报道了甘草中甘草素、甘草苷、异甘草素、异甘草苷、光甘草定、光甘草素、甘草酸和甘草甜素有美白和防晒效能。陈家欢等^[14]进行了含

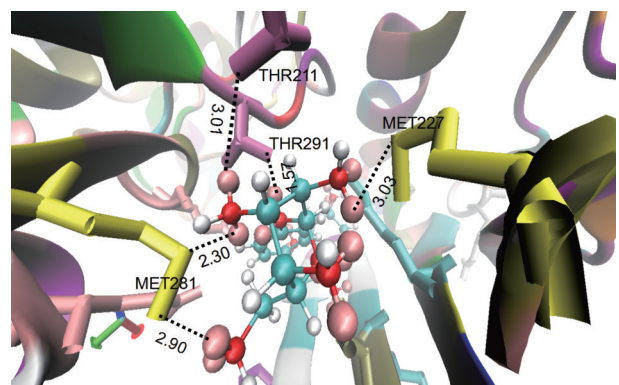


图10 AKT1与liquiritin的对接,氢键的形成

Fig. 10 Docking of AKT1 and liquiritin, the formation of hydrogen bond

甘草黄酮有效成分的O/W型防晒霜的制备,发现有较好防晒作用。帅友霞^[15]采用免疫荧光法和蛋白

免疫印迹法发现,甘草酸在一定浓度下能提高亚硝酸盐, ZnO-50 和中长波段紫外线光催化损伤下 HaCaT 细胞的存活率,说明甘草酸对人皮肤光损伤具有一定保护作用。UMAR 等^[16]研究发现甘草酸通过皮肤成纤维细胞中的自噬调节作用来防止 UVB 诱导的氧化应激介导的 DNA 损伤反应。甘草和石榴皮等植物均已报道过具有美白、防晒作用,但为进一步研究其相互作用。本研究将甘草和石榴皮复配进行研究其活性成分的防晒性能及可能的作用机制,网络分析结果显示,甘草中的 isolicoflavonol, liquiritin, licoflavonol 等大多数黄酮类成分与核心靶点蛋白的分子对接结果 >50,石榴皮中的活性成分 luteolin, (+)-catechin 等成分结合能力较好,两者共有的成分山柰酚,槲皮素也有较好的结合能力,提示甘草和石榴皮复配得到的活性成分均有良好的防晒作用。近年来深入研究发现,槲皮素能抑制酪氨酸酶的活性,还可以激活蛋白激酶(ERK), cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)等黑色素合成的胞外信号相关通路,减少黑色素合成来达到美白的功效^[17]。由于中药提取物颜色深,成分复杂,不适宜直接添加到化妆品中。从“药物-成分-靶点”网络图可以看出,槲皮素和山柰酚 2 个成分作用于多个靶点蛋白起作用,可以通过从富含槲皮素和山柰酚的中药中提取分离出其单体,制备防晒霜或者用于皮肤光损伤的制剂。

人体接受适量的紫外线照射会对皮肤中的维生素 D₃ 的合成起促进作用,也可以促进体内某些激素分泌,可使交感-肾上腺系统和应激能力的兴奋性增强^[18]。但在受 UVB 长时间的照射后,皮肤会出现红、肿、热、痛等反应,皮肤毛细血管扩张表现为肉眼可见的红斑,红斑通常被认为紫外线致皮肤损伤的一个标志,与 DNA 损伤相关^[19-20]。通常情况下,紫外线诱导的轻微 DNA 损伤能被有效的修复,但在 UVB 所致 DNA 损伤较严重时,由于修复系统不能及时修复和偶然出现的错误,将会导致看门基因如 P53, Patched 和 Ras 等的基因突变,诱发皮肤癌^[21-22]。

通过靶点研究表明,甘草-石榴皮复配抗紫外线致皮肤光损伤的靶基因有 AKT1, TP53, IL10, FOS, JUN, CASP8 (CASP8) 及 BCL2 等 74 个基因,主要通过 AKT1, TNF, TP53, IL6 以及 VEGFA 这 5 个核心靶点。人类 P53 基因是调控细胞周期的重要因子,也是人类抗癌研究的热点基因,TP53 则是其突变型。正常情况下, P53 基因会通过活化周期蛋白激酶抑制物 P21 因子的转录,从而抑制 DNA 损伤的

角质细胞的生长;也可通过 BAX 蛋白诱导角质细胞凋亡。突变型 TP53 蛋白不能使受损 DNA 停止复制,角质细胞可能会出现恶性转化和克隆增生^[23]。山柰酚具有抗癌作用,可以抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡,可能会下调 TP53 蛋白。免疫系统缺陷的人受紫外线诱导患皮肤癌的风险更高,例如像慢性淋巴细胞白血病(CLL),艾滋病患者等应接受避免日光照射和使用防晒霜的建议^[24]。朗格汉斯细胞(LC)是表皮特有的发挥正常免疫作用的抗原呈递细胞,长期 UVR 照射会通过 TNF- γ 诱导等不同机制,减少表皮中 LC 细胞数量并损伤抗原呈递功能。角质形成细胞在受到 UVR 照射后,也会启动免疫系统做出反应,释放血小板激活因子(PAF)促进 TNF- α , IL-6/8/10, 环氧合酶(COX)-2, 血管内皮生长因子以及诱导性一氧化氮合酶等炎性因子与介质的表达^[25-26]。IL-10 是一种强有力的抗炎细胞因子,它可以抑制 IL-6 的生成^[27]。SHEN 等^[28]发现 UVR 诱导的免疫抑制与 IL-10/4 的增加和 IL-12/2 的不足有关,槲皮素、山柰酚等成分可能会增加 IL-12 和减少 IL-10 的表达,对预防皮肤癌有一定的作用。综上所述,甘草-石榴皮中的活性成分作用的靶点蛋白与报道的紫外线致皮肤光损伤的作用机制中的部分靶点一致,但还有之前尚未报道的作用靶标,说明甘草-石榴皮还可以通过其他的作用靶点起到抗紫外线致皮肤光损伤的保护作用。

长期 UVR 照射诱导的 DNA 损伤和细胞氧化损伤,会引起多种免疫因子表达水平的上调或下调,通过多种途径引起皮肤免疫功能异常、炎症反应及损伤的 DNA 修复功能异常导致相关基因突变,增加皮肤癌的风险。目前报道的甘草、石榴皮等中药药理作用大部分是以中药的某一部位或某一类成分,针对某一单体成分的研究报道较少,本研究采用网络药理学的方法,通过数据挖掘发现甘草-石榴皮复配后两者的共用成分槲皮素及山柰酚作用于多个靶点起主要作用。上述预测靶点与部分已知文献报道的靶点相吻合,还预测到了其可通过其他尚未报道的靶点起作用。研究中药成分抗紫外线治皮肤光损伤的保护作用过程和机制,针对皮肤光损伤,开发添加中药成分防晒产品及中药制剂,将有助于预防皮肤癌的发生并为皮肤癌患者提供有效的治疗方案。

[参考文献]

[1] ARMSTRONG B K, KRICKER A. The epidemiology

- of UV induced skin cancer[J]. *J Photochem Photobiol, B: Biol*, 2001, 63(1/3): 8-18.
- [2] 李红艳, 李德冠. 太阳辐射对皮肤损伤及其损伤机制的研究进展[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2019, 43(6): 561-568.
- [3] 胡念芳, 李利. 植物防晒剂的古籍及现代文献筛选研究[J]. *中医杂志*, 2012, 53(22): 1973-1974.
- [4] 余阳洋, 袁征, 徐笑飞, 等. 防晒中药的筛选及防晒霜的制备[J]. *中国美容医学*, 2010, 19(Z4): 152-153.
- [5] 王建国, 周忠, 刘海峰, 等. 甘草的活性成分及其在化妆品中的应用[J]. *日用化学工业*, 2004(4): 249-251.
- [6] 杨莎, 袁军, 杨超, 等. 复方桔梗止咳片中远志、甘草的含量测定及质量情况分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(21): 155-161.
- [7] 杨筱静, 赵波, 那可, 等. 石榴皮中多酚类物质的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(5): 509-514.
- [8] 刘文, 刁海鹏, 王浩江, 等. 一种绿色生物防晒剂在化妆品中的应用[J]. *化学工程师*, 2014, 28(11): 62-64.
- [9] 洪晓云. 几种植物天然产物在化妆品上的应用[J]. *亚热带植物科学*, 2017, 46(3): 297-300.
- [10] 吴建华, 吴志瑰, 裴建国, 等. 多酚类化合物的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2015, 17(6): 630-636.
- [11] 徐鹏, 章克昌, 王玉红, 等. 紫外光谱法评价27种中药的防晒效果[J]. *精细化工*, 2006(4): 375-377, 385.
- [12] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [13] RU J L LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6(1): 1-6.
- [14] 陈家欢, 王婴, 陈雅灵, 等. 含甘草黄酮有效成分的防晒霜制备工艺的研究[J]. *广东化工*, 2015, 42(22): 53-54.
- [15] 帅友霞. 甘草酸对纳米氧化锌导致的人皮肤细胞光损伤的保护作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [16] UMAR S A, TANVEER M A, NAZIR L A, et al. Glycyrrhizic acid prevents oxidative stress mediated DNA damage response through modulation of autophagy in ultraviolet-b-irradiated human primary dermal fibroblasts[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(1): 242-257.
- [17] 钱文慧, 刘文雅, 龚光明, 等. 榭-芦美白防晒凝胶的制备及体外透皮行为考察[J]. *中国药师*, 2020, 23(6): 1102-1106.
- [18] 金锡鹏, 帕它木, 吴玉霞. 紫外辐射对人体健康的不良影响[J]. *环境与职业医学*, 2002(1): 44-45, 48.
- [19] SHINYA K, HISAKAZU M, YASUKAZU S, et al. Fish collagen-containing drink is subcutaneously absorbed and attenuates the UVA-induced tissue-integrity destruction and DNA damages in 3D-human skin tissue model[J]. *J Funct Foods*, 2010, 3(1): 50-55.
- [20] MUKHER J, MAITY N, NEMA N K, et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging[J]. *Phytomedicine*, 2011, 19(1): 64-73.
- [21] 刘宁, 张淑娟, 代晓明, 等. 紫外线引发皮肤鳞癌的机制研究[J]. *昆明医学院学报*, 2009, 30(S2): 112-116.
- [22] EHRHART J C, GOSSELET F P, CULERRIER R M, et al. UVB-induced mutations in human key gatekeeper genes governing signalling pathways and consequences for skin tumorigenesis[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2003, 2(8): 825-834.
- [23] TOMAS D. Apoptosis, UV-radiation, precancerosis and skin tumors[J]. *Acta Med Croatica*, 2009, 63(Suppl 2): 53-58.
- [24] LINDSEY C, ANDREW Q, THOMAS S. Skin cancer and immunosuppression[J]. *Dermatol Clin*, 2019, 37(1): 83-94.
- [25] MELNIKOVA V O, BAR-ELI M. Inflammation and melanoma metastasis[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22(3): 257-267.
- [26] BYUN S, PARK J, LEE E, et al. Src kinase is a direct target of apige-nin against UVB-induced skin inflammation[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(2): 397-405.
- [27] DINANT S, VETELAINEN R L, FLORQUIN S, et al. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation[J]. *J Surgical Res*, 2007, 141(2): 176-182.
- [28] SHEN J, BAO S, REEVE V E. Modulation of IL-10, IL-12, and IFN-gamma in the epidermis of hairless mice by UVA (320-400 nm) and UVB (280-320 nm) radiation[J]. *J Investigative Dermatol*, 1999, 113(6): 1059-1064.

[责任编辑 顾雪竹]