

基于网络药理学的黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化的潜在分子机制研究

何信用, 郑思成, 王 群, 吴佳蔓, 陈文娜, 张 哲*

辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

摘要: 目的 通过网络药理学方法探讨黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化(AS)的潜在分子生物学机制。方法 从中药系统药理学分析平台(TCMSP)及文献资料中寻找与黄连解毒汤中4味中药相关的所有成分和作用靶点,并构建药物分子-靶点网络;通过TTD、DrugBank、DisGeNET数据库筛选与AS相关的靶标,利用STRING平台构建药物-疾病靶点交互网络;对核心靶点进行网络拓扑分析,利用DAVID数据库对核心靶点蛋白进行GO生物过程分析及KEGG通路富集分析,并构建黄连解毒汤活性成分-AS靶点-KEGG通路多维网络关系图。结果 根据筛选条件[口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18]及查阅文献资料共得到71个活性成分,165个药物潜在靶点。黄连解毒汤中活性成分主要有谷甾醇、槲皮素、小檗碱、去氢丹参酮II_A、黄芩新素等能够干预AS形成。3个疾病数据库以“atherosclerosis”为搜索条件共收集到175个疾病靶点。根据度(degree)值筛选出黄连解毒汤干预AS的核心靶标蛋白223个,主要涉及NOS2、NOS3、PTGS2、TNF、CYP2C9、HMOX1等。GO生物过程分析根据错误发现率(FDR)≤0.05,确定50个条目,主要包括SRP依赖的靶向膜转运蛋白、核转录的mRNA分解代谢过程、病毒转录、核糖体核糖核酸处理、翻译等生物分析过程。KEGG富集结果显示有74条通路与AS相关,主要涉及到核糖体通路、病毒致癌通路、参与细胞周期通路、雌激素信号通路等。结论 黄连解毒汤治疗AS是多成分、多靶点、多途径相互作用的结果,为黄连解毒汤的临床应用以及AS相关疾病的基础或临床研究提供一定的理论依据,同时对新药的研发与应用具有一定的参考价值。

关键词: 黄连解毒汤;网络药理学;动脉粥样硬化;谷甾醇;槲皮素;小檗碱;去氢丹参酮II_A;黄芩新素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0687-010

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.019

Potential molecular mechanisms of Huanglian Jiedu Decoction in treatment of atherosclerosis based on network pharmacology

HE Xin-yong, ZHENG Si-cheng, WANG Qun, WU Jia-man, CHEN Wen-na, ZHANG Zhe

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: Objective To explore the potential molecular mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of atherosclerosis (AS) through pharmacology network. **Methods** By identifying all the composition and effect targets of four herbal ingredients in Huanglian Jiedu Decoction from TCMSP platforms and literatures, and the pharmaceutical molecular-target network was constructed. The interaction network of drug-disease target by STRING platform was constructed by screening AS related targets through TTD, DrugBank and DisGeNET databases. The centre targets were analyzed by network topology. DAVID database was used to perform GO biological process analysis and KEGG pathway enrichment analysis of centre target proteins, and further construct a multi-dimensional network relationship diagram of the active component-AS target-KEGG pathway of Huanglian Jiedu Decoction. **Results** A total of 71 active ingredients and 165 potential drug targets were obtained according to the screening conditions ($OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$) and accessing literatures. The main active ingredients in Huanglian Jiedu Decoction included sitosterol, quercetin, berberine, dehydrotanshinone IIA and neobaicalein, which could interfere with the formation of AS. A total of 175 disease targets were collected from the three disease databases under the search criteria of “atherosclerosis”. According to Degree, 223 centre target proteins of

收稿日期: 2019-08-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81874372); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金项目(zyzx1501); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金项目(zyzx1902)

作者简介: 何信用(1991—),男,安徽亳州人,博士研究生,研究方向为中西医结合防治心血管病。

Tel/Fax: (024)31207185 E-mail: xinyong_he@163.com

*通信作者 张 哲(1976—),女,辽宁阜新人,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为心血管疾病中西医结合防治及临床疗效评价研究。Tel/Fax: (024)31207358 E-mail: pedtrainzhzh7676@163.com

Huanglian Jiedu Decoction were screened, mainly involving NOS2, NOS3, PTGS2, TNF, CYP2C9 and HMOX1, *et al.* GO biological process analysis identified 50 entries based on false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 , mainly including SRP-dependent targeting membrane transporters, nuclear-transcribed mRNA catabolic process, viral transcription, rRNA processing, translation and other bioanalysis process. The result of KEGG enrichment analysis showed 74 pathways were associated with AS, mainly involved in ribosome pathway, viral carcinogenesis pathway, cell cycle pathway, estrogen signaling pathway, *et al.* **Conclusion** Huanglian Jiedu Decoction can treat AS through multi-ingredient, multi-target and multi-pathway interaction, which provides a theoretical basis for the clinical application of Huanglian Jiedu Decoction and the basic or clinical research of AS-related diseases. Meanwhile, it has a certain reference value for the research and development of new drugs and its application.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; network pharmacology; atherosclerosis; sitosterol; quercetin; berberine; dehydrotanshinone IIA; neobaicalein

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是指血管内皮上的炎性因子侵袭、脂质沉积、血小板及白细胞等聚集、纤维组织增生而形成血栓斑块, 引起动脉管腔的狭窄至闭塞, 甚至破裂出血的病理现象^[1]。AS 作为冠心病发病的独立危险因素, 一直受到广泛关注, 近年来, 随着人们生活水平的不断提高, AS 的发病率也在逐年上升, 且该病发病趋势愈加年轻化^[2]。祖国医学并没有 AS 之称, 但根据其病理过程及临床特征, 可归属于“胸痹”“痹症”“痰瘀”等范畴^[3], 由于炎症反应始终贯穿其病理过程, 又可归为“热毒”之邪, 但又不尽相同^[4]。

黄连解毒汤源自葛洪的《肘后备急方》, 而《外台秘要》中始见其方名, 具有泻火解毒、治疗三焦火毒之效。该方由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味药组成, 君以黄连入上焦而清心除烦、入中焦而祛湿热之邪, 正如《珍珠囊》中记载: “其用有六: 泻心脏火, 一也; 去中焦湿热, 二也……”; 臣以黄芩、黄柏相伍, 黄芩以攻中上焦湿热, 善清肺止咳而除胸闷痞满, 黄柏以走下焦而除湿热诸证; 佐以栀子通泻三焦湿热, 引火下行, 4 药相辅相成, 为清热解暑经典用方之一。现代药理学研究表明黄连解毒汤中黄连和黄柏主要成分是生物碱类, 包括小檗碱 (berberine)、黄连碱 (coptisine)、甲基黄连碱 (worenine) 等, 具有抗炎、抗菌、抗病毒等作用^[5-6]; 黄芩主要成分为黄酮类, 包括黄芩苷 (baicalin)、黄芩素 (baicalein) 等, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒等作用^[7]; 栀子成分是环烯醚萜类、酸类及黄酮类, 包括栀子苷 (gardenoside)、绿原酸 (chlorogenic acid)、熊果酸 (ursolic acid)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol) 等, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[8]。近来有研究表明黄连解毒汤能够通过改善血脂、保护血管内皮细胞、调节巨噬细胞分化、抗氧化应激/抗炎等方式来预防及治疗 AS^[9-11]。

经典方剂是目前中医临床上治疗疾病的首选方式, 但其无论是从整体到局部层面, 还是从细胞到分子层面都缺乏一种可以合理解释中药组方作用机制的科学依据^[12]。网络药理学是一种基于大数据时代背景下融合系统生物学、分子生物学、药理学以及多种网络计算平台等的新兴学科, 它从宏观到微观角度, 进行多层次的网络筛选及构建, 利用多种数据库平台及计算机软件, 把数据可视化, 更加直接地向人们阐释了中药复方与疾病的关联性, 即多分子、多靶点、多途径的分子机制^[13]。中药组方各药味之间相互配伍、相互作用, 达到治疗疾病的目的, 其过程与网络药理学研究过程不谋而合。因此, 本研究通过网络药理学, 构建“成分-靶点-通路-疾病”多维网络, 探索黄连解毒汤治疗 AS 的潜在分子机制, 为黄连解毒汤的临床应用以及 AS 相关疾病基础与临床研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

中药系统药理学分析平台 (Traditional Chinese Medicines Systems Pharmacology, TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、台湾中医药资料数据库 (Traditional Chinese Medicine Database@ Taiwan, <http://tcm.cmu.edu.tw/>)、疾病靶点数据库 (Therapeutic Target Database, TTD 4.3.02, <https://db.idrblab.org/ttd/>)、DisGeNET Database v5.0 (<http://www.disgenet.org/>)、Drugbank Database v5.1.2 (<https://www.drugbank.ca/>)、疾病靶点标准化数据库 (Uniprot, <https://www.uniprot.org/>)、Venny 2.1 软件 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)、蛋白-蛋白相互作用网络平台 STRING v11.0 (<https://string-db.org/>)、生物信息注释数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>)、进步源自共享云平台 (OmicShare, <http://www.omicshare.com/>)。

com/tools/)、Cytoscape 3.2.1 软件 (<http://www.cytoscape.org/>)。

1.2 药物相关活性成分及药物靶点的筛选

通过 TCMSP 数据库^[14]以及台湾中医药资料数据库平台,输入黄连解毒汤中 4 味中药名称,即黄连、黄柏、黄芩、栀子,搜索得到各药化学成分,通过口服生物利用度 (OB) 及类药性 (DL) 的筛选条件 ($OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$) 进行筛选。除此之外,查阅文献资料,找到黄连解毒汤中因上述筛选条件而被删除但对 AS 的研究有一定潜在价值的化学成分。再通过 TCMSP 数据库,将搜索的结果进行筛选,得到药物潜在靶点。

1.3 药物分子-靶点构建及疾病相关靶点的筛选

将上述黄连解毒汤各药物的化学成分及药物潜在靶点,上传至 Cytoscape 3.2.1 软件进行黄连解毒汤成分-靶点网络的构建。通过 TTD^[15]、DisGeNET^[16]、Drugbank^[17]数据库分别以疾病名称“atherosclerosis”进行检索,根据不同数据库的筛选条件,将筛选结果归纳一起,得到 AS 疾病的靶标。

1.4 药物靶点与疾病靶点标准化及网络构建

利用疾病靶点标准化数据库 Uniprot,分别上传上述得到药物潜在靶点与疾病相关靶点的名称 (target name),蛋白种属设置为“Homo sapiens (Human)”,获取其靶点的标准基因名。为进一步明确黄连解毒汤潜在靶点与 AS 疾病靶点之间的相互作用,将二者筛选之后的靶点取交集,并上传至 Venny 2.1 软件绘制韦恩图,再将筛选得到的共有靶标蛋白上传至 STRING 平台,选择“multiple proteins”模式,蛋白种属设为“Homo sapiens”,建立药物靶蛋白-疾病靶蛋白 (PPI) 相互作用网络,且筛选条件为最低相互作用阈值取最高等“highest confidence (≥ 0.9)”,其余参数默认,得到 PPI 相互作用关系网络,之后将 STRING 平台筛选出来的相互作用的蛋白基因输入 Cytoscape 3.2.1 软件 BisoGenet 插件中,筛选条件为 Identifiers 下选择“Homo sapiens (Human)”“Gene identifiers only”,Data Settings 下只选择“Protein Protein Interaction”,进一步分析蛋白质相互作用关系。

1.5 PPI 网络的拓扑分析和核心靶点的筛选

先将上述 BisoGenet 插件所得到的 PPI 网络进行功能分析,点击“Tools-NetworkAnalyzer-Network Analysis-Analyze Network”,然后使用 Cytoscape 软件中 CytoNCA 插件,Centralities 下除“degree (DC)”

项外全部选取,点击 analyze 进行拓扑分析,分析结果以.csv 格式导出,之后用 excel 打开,选取平均自由度的 2 倍作为 Cytoscape 软件 select 选项下 degree 的最小值,再进行筛选核心靶点^[18],如果得到 PPI 网络基数过多,调节 degree 下限值至合适的数值,多次筛选之后,按顺序点击“File-new-network-from selected nodes, all edges”,选取新的核心 PPI 网络,最后导出图片。

1.6 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

将上述筛选出的 PPI 网络核心靶标导入 DAVID 6.8 数据库中,选择“OFFICE_GENE_SYMBOL”“gene list”,种属选为“Homo sapiens”,之后选取“gene ontology”下的“GOTERM_BP_DIRECT”以及“pathways”下的“KEGG_PATHWAY”进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析以及 GO (Gene Ontology) 生物过程的富集分析。以 $P \leq 0.01$ 且从小到大排序作为筛选条件,选取符合条件的前 20 的 KEGG 通路及 GO 生物过程。并将前 20 条 KEGG 信号通路通过 excel 文件格式编排,上传至 OmicShare 云平台,进行数据可视化处理,以 P 值作为参数,按照从小到大的顺序进行操作。

1.7 黄连解毒汤活性成分-AS 靶点-KEGG 通路 PPI 网络构建

得到参与 AS 的 20 条 KEGG 通路后,与黄连解毒汤活性成分、药物及疾病共有靶点一起按照数据文件和属性文件进行 excel 文件格式的数据编排,将其共同上传至 Cytoscape 3.2.1 软件,得到黄连解毒汤活性成分-AS 靶点-KEGG 通路多维网络关系图。

2 结果

2.1 黄连解毒汤活性成分

通过 TCMSP 数据库以及台湾中医药资料数据库平台,输入黄连解毒汤中 4 味中药名称,即黄连、黄柏、黄芩、栀子,搜索后共得到其化学成分 168 个,删除重复项后,通过 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 筛选条件,得到 60 个化学成分。查阅文献资料发现^[19],黄连解毒汤中有一些成分因其筛选条件被删除,但对疾病的研究有一定的潜在价值,因此将这 11 个化学成分归纳其中,共得到 71 个活性成分,包括多种生物碱、黄酮类、脂类等。再将 71 个化学成分输入 TCMSP 数据库,搜索的结果经过筛选后共得到 165 个药物潜在靶点。黄连解毒汤主要活性成分见表 1 (由于筛选结果过多,因此根据 OB 值仅列出前 20 项),黄连解毒汤成分靶标见表 2 (由于筛选结果过多,只展示其中的部分结果)。

表 1 黄连解毒汤部分活性成分基本信息

Table 1 Basic information of some active components in Huanglian Jiedu Decoction

分子 ID	分子名	OB/%	DL
MOL002907	黄麻苷 A (corchoroside A)	104.954 242 90	0.775 99
MOL002934	黄芩新素 (neobaicalein)	104.344 605 20	0.439 17
MOL004561	苏丹 III (sudan III)	84.065 925 77	0.590 97
MOL002932	黄芩黄酮 I (panicolin)	76.257 049 89	0.291 50
MOL002927	黄芩黄酮 II (skullcapflavone II)	69.510 433 98	0.437 90
MOL002911	2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基氯环 (2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone)	69.039 875 57	0.219 94
MOL002937	二氢木蝴蝶素 A (dihydrooroxylin)	66.061 738 72	0.230 57
MOL000785	巴马汀 (palmatine)	64.601 112 94	0.645 24
MOL000622	广玉兰内酯 (magnograndiolide)	63.708 884 36	0.188 33
MOL000787	蓝堇碱 (fumarine)	59.262 504 58	0.826 94
MOL000228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基黄酮 [(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one]	55.233 173 89	0.201 63
MOL002652	Δ^7 -去氢槐胺碱 (delta7-dehydrosophoramine)	54.450 265 28	0.252 96
MOL002915	鼠尾草素 (salvigenin)	49.065 926 06	0.332 79
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.433 348 12	0.275 25
MOL002668	甲基黄连碱 (worenine)	45.833 181 00	0.865 52
MOL002917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮 (5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone)	45.047 428 02	0.330 57
MOL002651	去氢丹参酮 II _A (dehydrotanshinone II _A)	43.762 285 99	0.400 19
MOL013352	黄柏酮 (obacunone)	43.286 253 65	0.767 24
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.913 905 83	0.751 20
MOL001454	小檗碱 (berberine)	36.861 245 04	0.776 65

表 2 黄连解毒汤部分靶点基本信息

Table 2 Basic information on some targets of Huanglian Jiedu Decoction

分子 ID	靶标 ID	靶标名	基因
MOL002668	TAR00003	诱导型一氧化氮	NOS2
MOL002668	TAR00006	前列腺素 G/H 合成酶 1	PTGS1
MOL000787	TAR00007	多巴胺 D1 受体	DRD1
MOL000098	TAR00011	胰岛素受体	INSR
MOL000787	TAR00016	毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3	CHRM3
MOL002668	TAR00017	凝血酶	F2
MOL001458	TAR00037	电压门控型钾离子通道亚家族 H 成员 2	KCNH2
MOL000787	TAR00038	毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1	CHRM1
MOL002668	TAR00046	雌激素受体	ESR1
MOL002668	TAR00048	雄激素受体	AR
MOL002903	TAR00056	多巴胺 D5 受体	DRD5
MOL002670	TAR00063	β -1 肾上腺素能受体	ADRB1
MOL001458	TAR00070	钠通道蛋白 5 型亚单位 α	SCN5A
MOL002668	TAR00078	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma\alpha$	PPARG
MOL000787	TAR00079	凝血因子 Xa	F10
MOL000358	TAR00086	凋亡调节因子 Bcl-2	BCL2
MOL000787	TAR00087	毒蕈碱乙酰胆碱受体 M5	CHRM5
MOL000098	TAR00088	花生四烯酸盐 5-脂氧合酶	ALOX5
MOL002668	TAR00094	前列腺素 G/H 合成酶 2	PTGS2
MOL001458	TAR00095	内皮一氧化氮合酶	NOS3

2.2 成分-药物靶点网络构建

将上述 71 个药物活性成分与 165 个潜在靶点以 excel 文件格式分别定义数据和属性文件,通过 Cytoscape 3.2.1 软件进行数据编排,得到黄连解毒汤成分-靶点网络图,其中菱形代表药物分子,圆形代表药物作用的靶点,共得到 227 个节点,1 734 条边。见图 1。

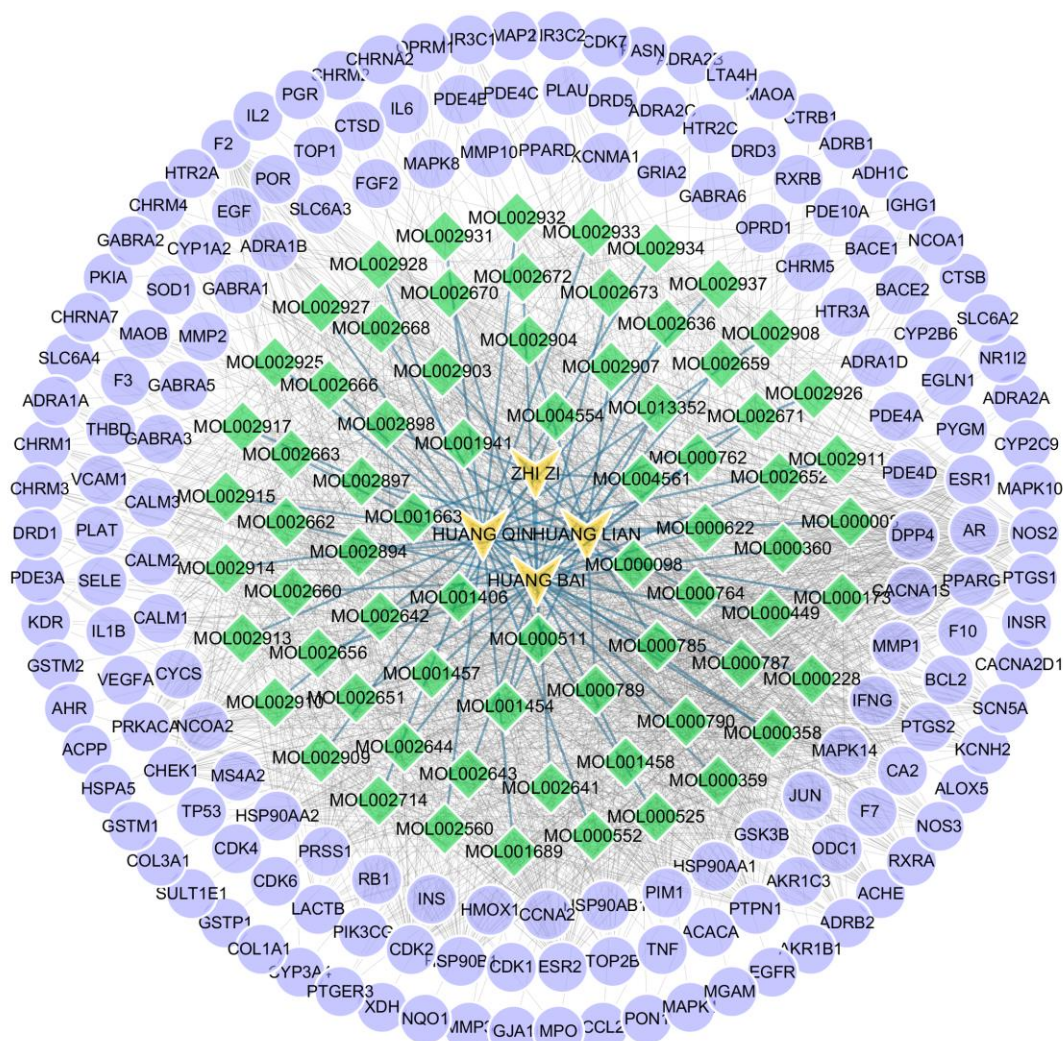
2.3 疾病靶点的筛选

通过 TTD、DisGeNET、Drugbank 数据库分别以疾病名称为“atherosclerosis”进行检索,其中 TTD 数据库获得治疗 AS 的疾病靶点 24 个,Drugbank 数据库筛选得到 45 个疾病靶点,DisGeNET 数据库筛选后得到疾病靶点 122 个,3 个数据库结果去重后共得到 175 个 AS 相关靶点,包括花生四烯酸盐

5-脂氧合酶 (arachidonate 5-lipoxygenase)、血纤蛋白溶酶原 (plasminogen)、串珠素 (perlecan)、磷脂酶 A2 (phospholipase A2 group II_A)、C 反应蛋白 (C-reactive protein)、低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 等。

2.4 药物及 AS 靶点标准化及共有靶点 PPI 网络构建

将上述药物及 AS 靶点依次上传至靶点标准化数据库 Uniprot 进行蛋白的基因化,得到基因名。之后,通过 Venny 2.1 绘制蛋白韦恩图,优化后得到图 2,成分与疾病共有靶点 33 个蛋白,主要涉及到血红素加氧酶 1 (HMOX1)、诱导型一氧化氮合酶 (NOS2)、肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、血管细胞黏附蛋白 1 (VCAM1),



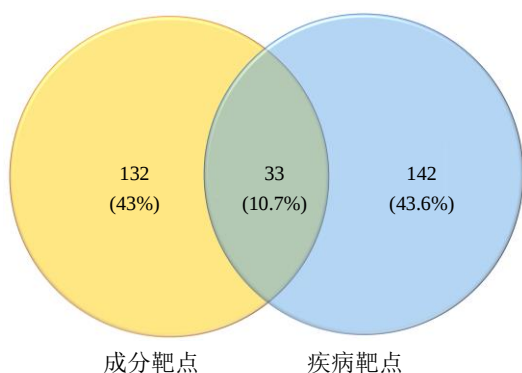


图 2 药物靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of targets of herbs and disease

前列腺素 G/H 合成酶 2 (PTGS2)、白细胞介素 1 β (IL1 β) 等。将交叉共有的靶蛋白基因名上传至 STRING 平台, 根据最高级筛选条件 “highest confidence (≥ 0.9)”, 得到联系紧密的 PPI 网络图, 见图 3。

2.5 网络拓扑分析

为进一步探究黄连解毒汤对 AS 药理机制, 将共有蛋白基因输入 Cytoscape 3.2.1 软件的

BisoGenet 插件中, 并进行网络分析, 之后打开 CytoNCA 插件, 根据 “1.5” 项筛选条件, 初步得到一个 2 478 个节点、78 109 条边的 PPI 网络图, 以平均 degree 值的 2 倍进行 2 次筛选, 得到一个 542 个节点、18 992 条边的 PPI 网络图, 3 次筛选得到一个 223 个节点以及 8 631 条边的 PPI 网络图, 其过程见图 4。

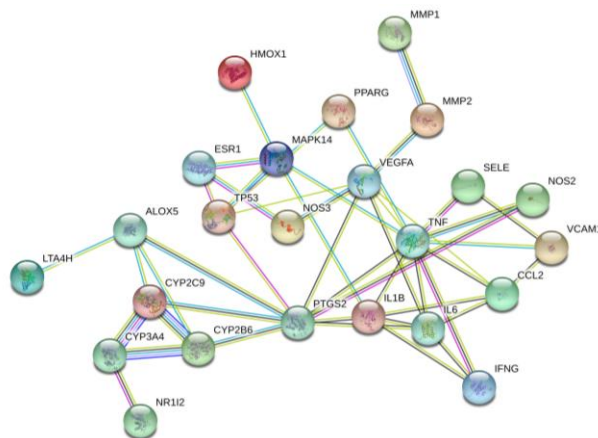


图 3 STRING 平台共有靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of common targets from STRING

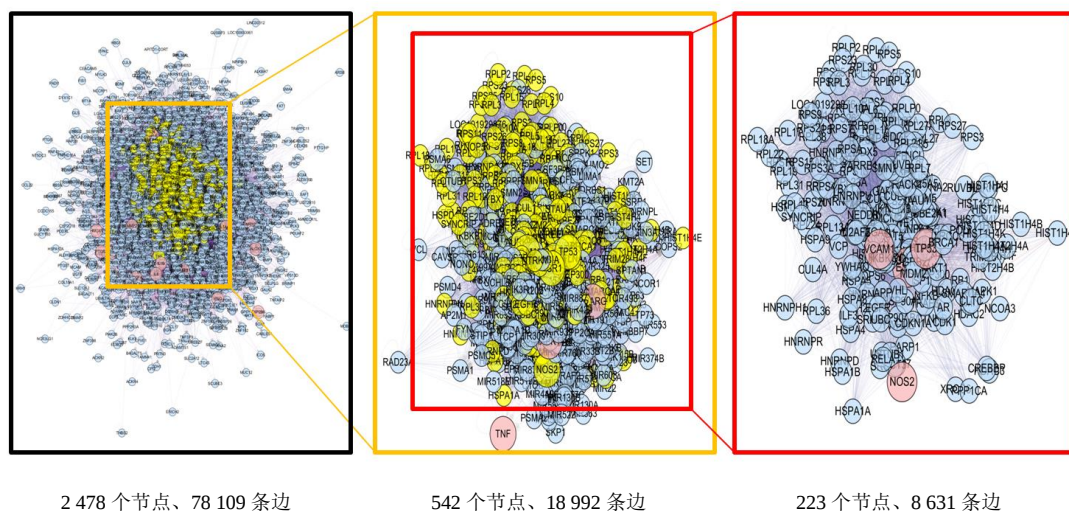


图 4 PPI 网络拓扑分析

Fig. 4 Network topology analysis of PPI

2.6 GO 生物过程和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 6.8 数据库, 将 “2.5” 项核心靶蛋白基因上传并进行 GO 生物过程及 KEGG 信号通路的富集分析。其中共得到 358 个 GO 条目, 再根据错误发现率 (FDR) ≤ 0.05 , 确定 50 个条目与生物过程相关, 再根据 P 值从小到大的顺序, 选取前 20 个 GO 生物过程分析条目, 主要包括 SRP 依赖的靶

向膜转运蛋白 (SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane)、核转录的 mRNA 分解代谢过程 (nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay)、病毒转录 (viral transcription)、翻译起始 (translational initiation)、核糖体核糖核酸处理 (rRNA processing)、翻译 (translation) 等生物分析过程。具体见表 3。同样,

共得到 74 条 KEGG 信号通路, 按照 P 值从小到大的顺序筛选前 20 条, 主要涉及到核糖体通路 (ribosome)、病毒致癌通路 (viral carcinogenesis)、参与细胞周期通路 (cell cycle)、前列腺癌通路 (prostate cancer)、慢性髓性白血病通路 (chronic

myeloid leukemia)、雌激素信号通路通路 (estrogen signaling pathway)、乙醇代谢通路 (alcoholism) 等, 再将上述信号通路上传至 OmicShare 云平台, 进行数据可视化处理, 其中气泡的大小代表该通路的基因数量, 颜色代表富集显著性, 见图 5。

表 3 黄连解毒汤调控 AS 的核心网络 GO 生物过程分析

Table 3 Entry of GO biological process analysis in core network of AS regulated by Huanglian Jiedu Decoction

编号	名称	富集基因数	相关基因数	P 值	错误发现率
GO: 0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	63	94	2.84×10^{-96}	4.82×10^{-93}
GO: 0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	65	119	5.49×10^{-91}	9.31×10^{-88}
GO: 0019083	viral transcription	63	112	3.75×10^{-89}	6.37×10^{-86}
GO: 0006413	translational initiation	65	137	1.18×10^{-85}	2.00×10^{-82}
GO: 0006364	rRNA processing	66	214	4.23×10^{-72}	7.18×10^{-69}
GO: 0006412	translation	67	253	2.70×10^{-68}	4.58×10^{-65}
GO: 1904837	beta-catenin-TCF complex assembly	22	43	1.08×10^{-28}	1.84×10^{-25}
GO: 0045653	negative regulation of megakaryocyte differentiation	14	18	2.13×10^{-21}	3.62×10^{-18}
GO: 0016233	telomere capping	15	23	2.41×10^{-21}	4.09×10^{-18}
GO: 0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining	20	63	3.30×10^{-21}	5.60×10^{-18}
GO: 0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic	18	50	4.06×10^{-20}	6.90×10^{-17}
GO: 0016032	viral process	32	299	4.01×10^{-19}	6.80×10^{-16}
GO: 0006336	DNA replication-independent nucleosome assembly	14	26	2.34×10^{-18}	3.97×10^{-15}
GO: 0034080	CENP-A containing nucleosome assembly	16	43	4.37×10^{-18}	7.43×10^{-15}
GO: 0032200	telomere organization	14	27	4.45×10^{-18}	7.56×10^{-15}
GO: 0006352	DNA-templated transcription, initiation	15	36	9.51×10^{-18}	1.61×10^{-14}
GO: 0006335	DNA replication-dependent nucleosome assembly	14	32	7.25×10^{-17}	1.89×10^{-13}
GO: 0051290	protein heterotetramerization	15	42	1.23×10^{-16}	1.89×10^{-13}
GO: 0000183	chromatin silencing at rDNA	14	37	6.98×10^{-16}	1.13×10^{-12}
GO: 0045815	positive regulation of gene expression, epigenetic	16	62	2.23×10^{-15}	3.77×10^{-12}

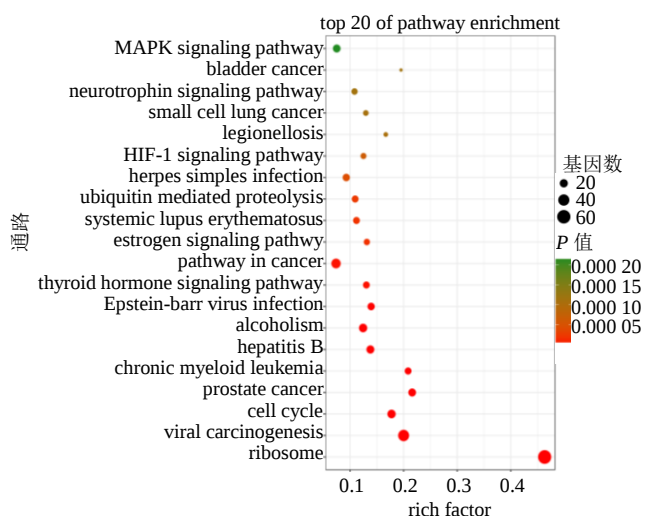


图 5 KEGG 信号通路可视化结果

Fig. 5 Visualization results of KEGG signaling pathway

2.7 网络拓扑图构建

结合黄连解毒汤成分-靶点网络、核心靶蛋白 PPI 网络, 将上述可能参与到 AS 过程的前 20 条 KEGG 信号通路, 一起进行 excel 的数据及属性文件编排,

通过 Cytoscape 3.2.1 软件得到“黄连解毒汤成分-药物靶点-AS 靶点-KEGG 信号通路”的多维网络, 见图 6。结果可以明显看出黄连解毒汤的各有效成分是通过多靶点、多信号通路共同起到治疗 AS 的作用。

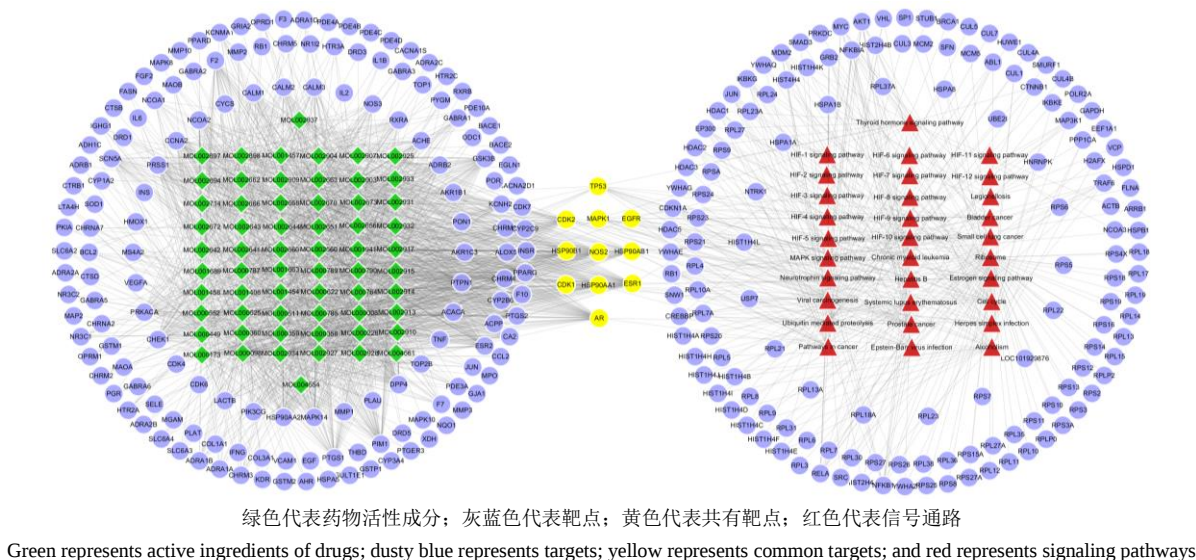


图 6 黄连解毒汤成分-药物靶点-动脉粥样硬化靶点-信号通路网络

Fig. 6 Network of compounds of Huanglian Jiedu Decoction-drug targets-atherosclerosis targets-signaling pathway

3 讨论

中药复方治疗疾病的机制尚不完全清楚, 总而言之, 君、臣、佐、使各药物之间相互作用, 通过多分子、多靶点、多途径作用于疾病, 而起到一定的治疗效果。网络药理学的提出为中药复方作用于疾病的研究提供了一种新的思路, 它是基于大数据时代背景下的一种整体联系微观的, 从各层面系统分析分子作用机制的科学, 这与中医整体观及辨证论治思想相统一。黄连解毒汤为经典清热解毒方剂, 临床应用广泛, 研究表明黄连解毒汤能够通过改善血管内脂质沉积、降低炎症反应而发挥抗 AS 的作用^[20-23]。黄连解毒汤的抗炎作用显然, 而炎症反应始终贯穿 AS 病理过程, 且具有红、肿、热、痛的临床特点, 这与祖国医学的“热毒”之邪致病特点极为相似, 而黄连解毒汤是清热解毒经典用方, 因此本研究借助网络药理学, 同时整合文献资料, 从微观角度分析黄连解毒汤作用于 AS 的具体分子机制。

网络分析结果显示, 黄连解毒汤中活性成分主要含有谷甾醇、槲皮素、小檗碱、去氢丹参酮 II_A、黄芩新素等能够干预 AS 形成。有研究显示, 槲皮素不仅通过下调 CD80、CD86、MHC-II、IL-6 和 IL-12

表达, 还通过降低刺激 T 细胞异基因增殖的能力, 来抑制树突细胞 (dendritic cell, DC) 成熟, 除此之外, 槲皮素能够上调 Dabs 蛋白表达来抑制 DC 成熟, 从而下调 SRC/PI3K/Akt NF-κB 炎症途径来抑制炎症反应和 AS 的形成^[24]。小檗碱通过下调 p38-MAPK 介导的 NF-κB 信号通路, 能够降低炎症细胞因子的表达, 从而起到抗 AS 的作用^[25]。

蛋白质相互作用网络显示黄连解毒汤中有效成分可能是通过 HMOX1、NOS2、TNF、VEGFA、VCAM1、PTGS2、IL1B 等药物-疾病共有靶点网络起作用。PTGS2 又称为环氧合酶-2 (COX-2), 而 COX-2 是花生四烯酸代谢过程中调节前列腺素合成的限速酶, 主要参与到机体的各种炎症反应^[26]。一氧化氮合酶 2 (NOS2) 是一氧化氮 (NO) 生物合成的关键酶, 主要存在于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞。而 NO 是体内调节心血管系统功能的重要信号分子, 在血管的收缩与舒张、血小板活性调节、氧化应激及炎症反应等过程中发挥了重要的作用^[27]。除此之外, 核心蛋白网络拓扑分析结果显示该过程还可能与多种脂蛋白或血管内皮炎症因子等相关, 如血纤维蛋白溶酶原、磷脂酶 A2、C 反应蛋白、白细胞介素 6 等, 而 AS 形成恰好与脂质代

谢紊乱以及炎症反应相关。充分证明了黄连解毒汤治疗 AS 是多分子、多靶点、多途径相互作用的结果。

GO 生物过程分析主要涉及到核糖体核酸的处理、mRNA 的转录、蛋白的合成及转运等翻译过程。KEGG 通路分析结果显示, 主要涉及到 MAPK 通路、核糖体通路等多种代谢通路, 本研究发现 TP53、MAKP、EGFR、ESR1、NOS2 等基因主要富集于 MAPK 信号通路上, 而 MAPK 通路主要参与细胞增殖、分化和凋亡的调控, 且 Shi 等^[28]发现黄连解毒汤中栀子苷不仅可以抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平, 同时可以抑制 NOS2、COX-2 两种炎症反应的关键酶, 抗炎作用与 MAPK 信号通路密切相关, 除此之外, 王青等^[29]也进一步验证了清热解毒药的抗炎作用与 MAPK 信号通路的相关性, 这与本研究所预测的结果一致, 再次说明黄连解毒汤治疗 AS 是通过多生物途径、多信号通路共同起作用。

本研究借助网络药理学, 分析黄连解毒汤作用于 AS 的潜在分子机制, 结果显示, 黄连解毒汤治疗 AS 是通过多成分、多靶点、多通路来发挥作用, 但网络药理学只是基于大数据时代背景下新兴的学科, 多种数据库资料没有实时更新, 且黄连解毒汤及 AS 在不同数据库下所得出的结果与最新前沿知识仍有些许差别。本研究旨在借助他人研究成果分析预测黄连解毒汤治疗 AS 可能存在的靶点、通路等, 并没有加以实验验证, 本课题组将进一步对筛选出来的相关基因及蛋白进行验证, 从细胞及分子层面明确黄连解毒汤通过抗氧化应激、抗炎等信号通路调控 AS 的作用机制, 来证实该方的有效性, 为黄连解毒汤治疗 AS 的基础和临床研究以及中药组方的新药研制提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Robinson J G, Fox K M, Bullano M F, et al. Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events: A population-based survey [J]. *BMC Cardiovasc Disorders*, 2009, doi:10.1186/1471-2261-9-46.
- [2] 魏艾贞, 杨建飞. 浅谈动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2014, 1(10): 1866-1867.
- [3] 何信用, 王俊岩, 贾连群, 等. 浅谈从“心脾论治”防治冠心病 [J]. *中医药导报*, 2016, 22(16): 12-14.
- [4] 张莹, 马晓娟, 史大卓. 冠心病瘀毒理论与血小板-血栓-炎症网络 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(3): 375-378.
- [5] 董芹. 基于效应成分当量的黄连质量一致性评价 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [6] 陈阳峰, 钟晓红. 黄柏的药理作用及其活性成分提取 [J]. *作物研究*, 2015, 29(5): 564-568.
- [7] 刘金欣, 孟繁蕴, 张胜海, 等. UPLC 同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A [J]. *中草药*, 2014, 45(10): 1477-1480.
- [8] 史永平, 孔浩天, 李昊楠, 等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(2): 281-289.
- [9] 项瑞, 姜丽. 黄连解毒汤抗动脉粥样硬化物质基础和药理作用研究概况 [J]. *中国药房*, 2016, 27(4): 547-549.
- [10] 张扬, 金瑾, 张莲珠, 等. 黄连解毒汤对高脂血症大鼠血脂及氧自由基代谢的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(2): 169-172.
- [11] 李淑玲, 马春, 杨丽华. 黄连解毒汤对颈动脉粥样硬化作用的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(3): 746-747.
- [12] 邓冬, 王伟, 李雪丽, 等. 中药复方治疗高血压机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(21): 4565-4570.
- [13] Li S. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [14] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [15] Li Y H, Yu C Y, Li X X, et al. Therapeutic target database update 2018: Enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1121-D1127.
- [16] Piñero J, Bravo À, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: A comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D833-D839.
- [17] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 50: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [18] Zhang Y, Li Y, Mao X, et al. Thyroid hormone synthesis: A potential target of a Chinese herbal formula Haizao Yuhu Decoction acting on iodine-deficient goiter [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51699-51712.
- [19] 张晓因, 张军平, 徐士欣, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗高血压潜在机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5865-5875.
- [20] 桑文凤, 桑桂梅, 赵习德. 黄连解毒汤对冠心病患者颈总动脉粥样硬化斑块及炎症因子的影响 [J]. *中药材*, 2014, 37(2): 356-358.
- [21] 周凤华, 程赛博, 张宇, 等. 黄连解毒汤通过调节性

- T 细胞产生抗动脉粥样硬化作用 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 233-238.
- [22] 朱 娜. 黄连解毒汤对冠心病心绞痛患者纤维蛋白原和肿瘤坏死因子- α 影响的研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(6): 33-34.
- [23] 李 彤, 韩俊燕, 王蓓蓓, 等. 黄连解毒汤调控单核、巨噬细胞及泡沫细胞分化的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(9): 1096-1102.
- [24] Lin W, Wang W, Wang D. Quercetin protects against atherosclerosis by inhibiting dendritic cell activation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, doi: 10.1002/mnfr.201700031.
- [25] Zhao Y, Tian X, Liu G, *et al.* Berberine protects myocardial cells against anoxia-reoxygenation injury via p38 MAPK-mediated NF- κ B signaling pathways [J]. *Exper Ther Med*, 2019, 17(1): 230-236.
- [26] 覃芳敏. 水栀子化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2014.
- [27] 马雯旻, 韩 丹, 方伟蓉, 等. 一氧化氮在心肌缺血再灌注损伤中的调节作用及相关治疗药物研究进展 [J]. 药学进展, 2016, 40(2): 96-103.
- [28] Shi Q, Cao J, Fang L, *et al.* Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(2): 298-306.
- [29] 王 青, 苏聪平, 张惠敏, 等. 从炎症反应角度探讨清热解毒药的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3787-3794.