

网络药理学联合 GEO 测序数据和分子对接探索大黄素治疗急性胰腺炎的作用机制

邓弘扬, 魏丰贤, 马尚贤, 韩伟, 王满才, 徐小东, 张有成*

兰州大学第二医院 普通外科, 甘肃 兰州 730030

摘要: **目的** 利用网络药理学联合 GEO 测序数据、分子对接技术探索大黄素治疗急性胰腺炎的潜在作用机制。**方法** 借助 PubChem、SwissTargetPrediction、DrugBank、PharmMapper、TTD、CTD 数据库获取大黄素作用靶点, 通过 GeneCards、OMIM、DrugBank、CTD 数据库以及 GSE194331 数据集差异分析结果获取急性胰腺炎疾病靶点, 二者取交集得到大黄素治疗急性胰腺炎靶点。使用 String 数据库和 Cytoscape 软件构建靶点蛋白互作网络, R 软件 ClusterProfiler 包对靶点功能富集分析, Cytoscape 的 CytoNCA 插件筛选核心靶点。使用 PyMOL 和 Autodock 软件进行分子对接和结果可视化。**结果** 大黄素治疗急性胰腺炎的潜在作用靶点有 246 个, 主要涉及脂质与动脉粥样硬化、P13K-AKT 信号通路、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路以及 IL-17 信号通路等。其中 20 个核心靶点与大黄素均有结合潜力, CTNNB1、HIF1A 和 IL1B 等 9 个靶点与大黄素有良好的结合潜力。**结论** 大黄素通过多靶点、多通路发挥治疗急性胰腺炎的作用。

关键词: 大黄素; 急性胰腺炎; 网络药理学; GEO 数据库; 分子对接; 靶点

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)06-1189-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.004

Mechanism of emodin in treatment of acute pancreatitis by network pharmacology combined with GEO sequencing data and molecular docking

DENG Hong-yang, WEI Feng-xian, MA Shang-xian, HAN Wei, WANG Man-cai, XU Xiao-dong, ZHANG You-cheng
Department of General Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of emodin in treatment of acute pancreatitis by network pharmacology, GEO sequencing data, and molecular docking. **Method** Emodin targets were obtained from PubChem, SwissTargetPrediction, DrugBank, PharmMapper, TTD, and CTD databases. The disease targets of acute pancreatitis were obtained from GeneCards, OMIM, DrugBank, CTD, and GSE194331 data sets. The intersection of the two data sets was used to obtain emodin targets for acute pancreatitis. The target protein interaction network was constructed using String database and Cytoscape software, R software ClusterProfiler package was used for target enrichment analysis, and Cytoscape CytoNCA plug-in was used to screen core targets. Molecular docking and result visualization were performed using PyMOL and Autodock software. **Results** There are 246 potential targets of emodin in treatment of acute pancreatitis, mainly involving lipids and atherosclerosis, P13K-Akt signaling pathway, FoxO signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and IL-17 signaling pathway. Among them, 20 core targets showed good binding potential with emodin, and 9 targets including CTNNB1, HIF1A and IL1B showed good binding potential with emodin. **Conclusion** Emodin plays a role in treatment of acute pancreatitis through multi-target and multi-pathway.

Key words: emodin; acute pancreatitis; network pharmacology; GEO database; molecular docking; targets

急性胰腺炎是一种组织损伤相关的胰腺炎性疾病, 严重可导致全身炎症反应和器官衰竭, 有着较高的致死率和不良预后^[1]。大承气汤、柴芩承

气汤和清胰汤在治疗急性胰腺炎方面有一定的疗效^[2-5], 而大黄是 3 种方剂的君药, 有泻下攻积、荡涤胃肠积滞的功效。大黄素 (1,3,8-三羟基-6-甲基

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060800); 甘肃省自然科学基金资助项目 (21JR7RA402); 甘肃省青年科技基金计划项目 (21JR1RA149, 21JR1RA161, 21JR11RA114); 兰州大学第二医院萃英科技创新计划项目 (CY2019-BJ02)

作者简介: 邓弘扬, 博士研究生, 主要从事消化系统疾病的研究工作。E-mail: denghy21@lzu.edu.cn

***通信作者:** 张有成, 主要从事消化系统疾病的临床和科研工作。E-mail: zhangychmd@126.com

蒽醌，分子式 $C_{15}H_{10}O_5$ ）是一种从大黄中提取的主要生物活性蒽醌衍生物，被认为是大黄的主要药效成分，已经证实其在抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节以及抗感染等方面有一定的作用^[6-7]。有研究表明^[8]，大黄素可以作为 NF- κ B 抑制剂发挥抗氧化作用并抑制促炎细胞因子表达，从而起到缓解急性胰腺炎的作用，并对急性胰腺炎相关继发性器官功能障碍有一定的保护作用^[9]，因此进一步了解大黄素治疗急性胰腺炎的确切作用机制是有必要的。本研究旨在利用网络药理学方法结合急性胰腺炎患者全血高通量测序结果以及分子对接技术探索大黄素干预急性胰腺炎的潜在靶点，为大黄素在急性胰腺炎中的作用机制研究提供新的思路。

1 方法

1.1 大黄素相关靶点获取

以“emodin”为检索词从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[9]检索大黄素的 SMILES 结构，后根据其 SMILES 结构依次导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>)^[10]、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)^[11]、PharmMapper 数据库 (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)^[12]预测大黄素的结构作用靶点，再以“emodin”作为检索词于 TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)^[13]、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/about/>)^[14]、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 获取大黄素作用靶点，将结果取交集得到大黄素所有可能的作用靶点。

1.2 急性胰腺炎相关靶点获取

以“Acute pancreatitis”为检索词，于 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[15]、OMIM 数据库、DrugBank 数据库、CTD 数据库、TTD 数据库检索急性胰腺炎相关治疗靶点。

1.3 基于 GEO 数据库的急性胰腺炎差异表达基因

GSE194331 数据集包含了 87 例急性胰腺炎和 32 例健康人外周血的转录组高通量测序数据，用 4.1.2 版本 R 软件中的 DESeq2 包对急性胰腺炎和健康对照进行基因表达差异分析，其差异标准为 $|\log_{2}FC| \geq 1$ 且 $P < 0.01$ ，结果以火山图和热图呈现。

1.4 大黄素作用急性胰腺炎相关靶点预测

急性胰腺炎治疗靶点与 GSE194331 数据集差异基因合并，尽可能得到更多的急性胰腺炎治疗靶点，并与大黄素治疗靶点取交集，于 Draw Venn Diagram 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制交集韦恩图，交集即为大黄素可能的治疗急性胰腺炎作用靶点。

webtools/Venn/) 绘制交集韦恩图，交集即为大黄素可能的治疗急性胰腺炎作用靶点。

1.5 靶点的网络构建和富集分析

使用 STRING 数据库构建靶点蛋白互作网络，结果导入 3.8.2 版本 Cytoscape 软件中可视化，利用 Cytoscape 软件 cytoHubba 插件计算关键靶点。R 软件 (4.1.2 版) 中 ClusterProfiler 包对预测靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析，结果以条形图和气泡图可视化。

1.6 分子对接

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)^[16]获取靶点对应的 PDB-ID，然后使用 PyMOL (2.5.2 版本) 获取靶点三维结构。把 Pubchem 数据库获取的大黄素 SDF 格式结构转换成 PDB 格式。然后 Autodock 软件 (4.2.6 版本) 对蛋白加氢、计算电荷等处理，再把大黄素和相关靶点进行对接，记录对接分数最低构象的结合能。结合能 < 0 表示受体和配体有结合，结合能越低则构象越稳定，结合可能性越大。如结合能 < -6.0 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$)，则表明受体和配体之间有良好的亲和力。故选取结合能 < -6.0 kcal/mol 的靶点与大黄素结合构象在 PyMOL 软件中可视化。

2 结果

2.1 大黄素靶点筛选结果

PubChem 中获取大黄素结构模式图见图 1。从 SwissTargetPrediction、DrugBank、PharmMapper、TTD、CTD、OMIM 数据库分别获取了 100、3、783、1、228、19 个大黄素作用靶点，取并集后共得到了 1 043 个靶点。

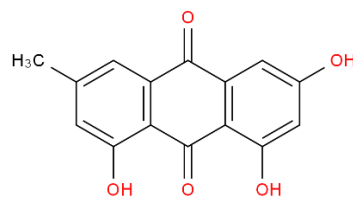


图 1 大黄素结构式

Fig. 1 Chemical structure of emodin

2.2 急性胰腺炎靶点数据库筛选结果

从 CTD 数据库共获得 73 034 个靶点，筛选“Inference Score ≥ 30 ”的共 857 个靶点，从 GeneCards 数据库共获得 9 071 个靶点，筛选“Relevance.score ≥ 10 ”共 747 个靶点，另从 OMIM、TTD 和 Drugbank 数据库分别获得 557、6、81 个靶点，取并集后共得到 1 711 个急性胰腺炎治疗靶点。

2.3 急性胰腺炎和健康对照基因表达差异分析

以 $P < 0.01$ 和 $|\lg FC| \geq 1$ 为临界值, 从 GSE194331 数据集中共筛选出 801 个急性胰腺炎差异基因, 其中 692 个上调基因 109 个下调基因, 把上调和下调的各前 25 个基因以热图表示, 见图 2。

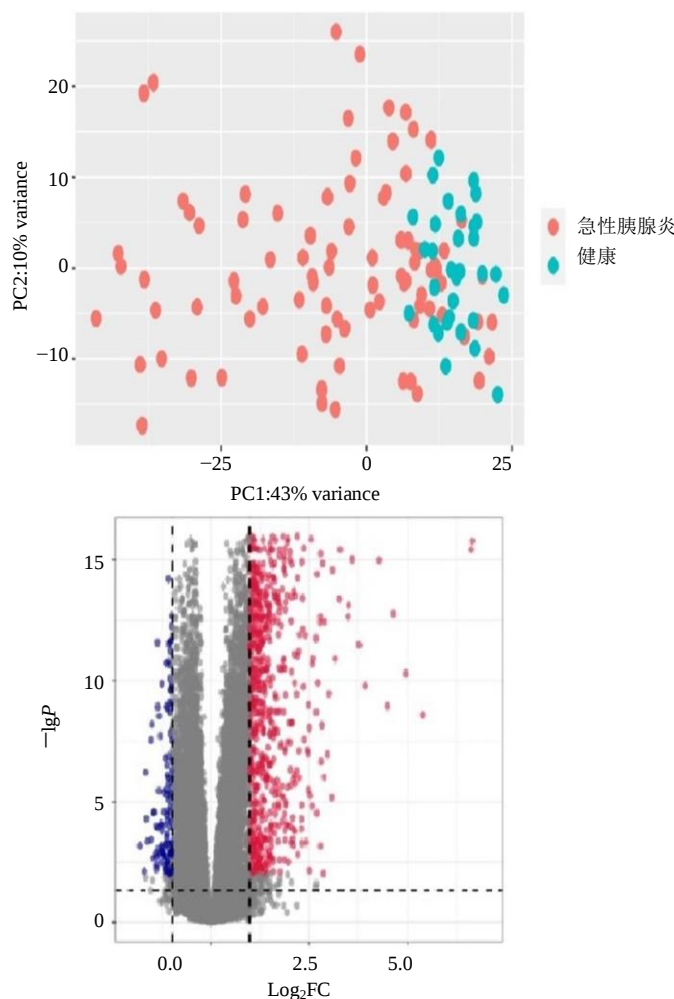


图 2 GSE194331 数据集差异分析结果

Fig. 2 GSE194331 dataset difference analysis results

2.4 大黄素治疗急性胰腺炎靶点预测

把急性胰腺炎相比健康对照的差异基因与数据库预测急性胰腺炎靶点取并集, 得到了治疗靶点 2 382 个, 再与大黄素靶点取交集, 共预测到 246 个大黄素治疗急性胰腺炎潜在靶点, 见图 3。

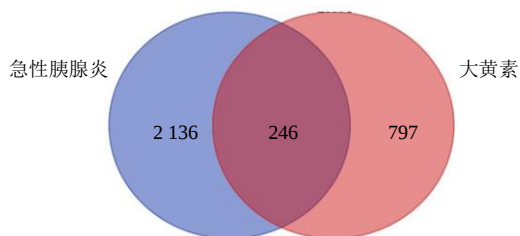
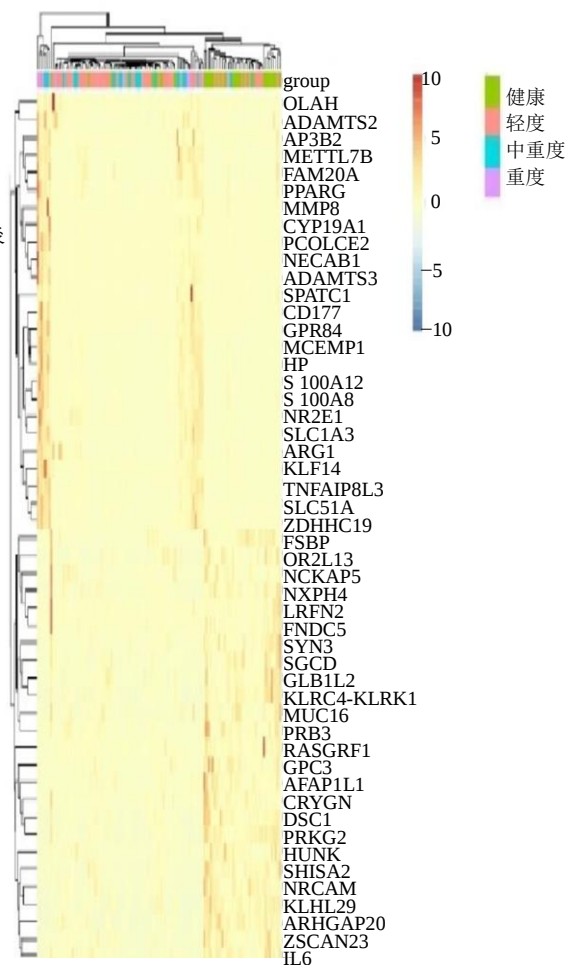


图 3 急性胰腺炎和大黄素靶点交集韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of acute pancreatitis and emodin target intersection

2.5 靶点的网络构建

把 246 个靶点导入 String 数据库构建蛋白互作 (PPI) 网络, 下载该网络的 TSV 文件, 导入 Cytoscape 软件中可视化, 共得到 242 个节点和 5 369 条边。使用 CytoNCA 插件计算各个节点的中介中心性 (BC)、接近中心性 (CC)、点度中心性 (DC)、特征向量中心性 (EC)、局部边连通性 (LAC) 和网络中心性 (NC) 值, 筛选出大于以上所有值中位数的靶点, 经 3 轮筛选共得到 20 个关键靶点, 见图 4。

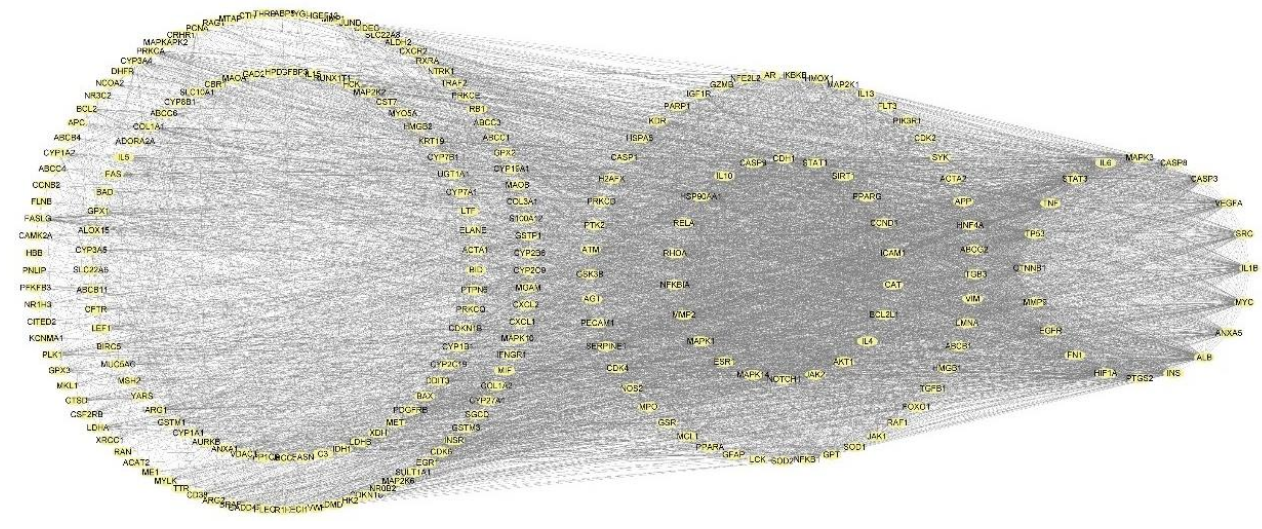
2.6 富集分析结果

由图 5、6 可知, 对 246 个靶点富集分析的结果可知, 生物过程 (BP) 显著富集了异源刺激的反应、对脂多糖的反应、对细菌源性分子的反应以及应答氧化压力等。细胞组分 (CC) 显著富集了囊腔、胞质囊腔、脂筏以及膜微区等。分子功能 (MF) 显著富集了脱氧核糖核酸 - 结合转录因子结合、血

素结合、细胞因子受体结合以及 RNA 聚合酶 II - 特异性 DNA - 结合转录因子结合等。KEGG 富集分析显著富集了脂质与动脉粥样硬化、P13K-AKT 信号通路、卡波西肉瘤 - 相关疱疹病毒感染、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路以及 IL-17 信号通路等。

2.7 分子对接

对 20 个关键靶点完成模拟分子对接操作后,



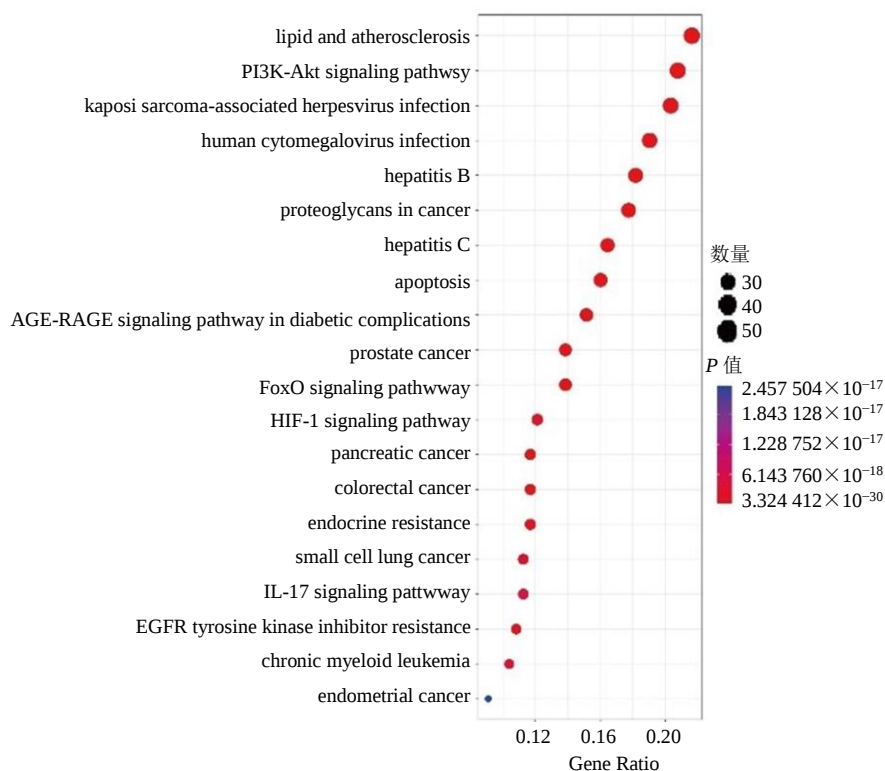


图 6 KEGG 分析

Fig. 6 KEGG analysis results

发现它们与大黄素均有结合潜力, 见表 1。其中 β -连环蛋白 (CTNNB1)、缺氧诱导因子-1 α (HIF1A)、白介素-1 β (IL1B)、MYC 原癌基因蛋白 (MYC)、肿瘤坏死因子 (TNF)、细胞凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 (CASP8)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、纤连蛋白 1 (FN1) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 与大黄素有良好的结合能力, 见图 7。

3 讨论

本研究共发现了 246 个大黄素作用急性胰腺炎的潜在治疗靶点, 表明大黄素可能介导多靶点发挥着缓解急性胰腺炎的作用。GO 富集分析可知这些潜在作用靶点主要涉及异源刺激的反应、对脂多糖的反应、对细菌源性分子的反应以及应答氧化压力等, 且很可能发生于囊腔、胞质囊腔、脂筏以及膜微区等, 分子功能主要包括脱氧核糖核酸 - 结合转录因子结合、血红素结合、细胞因子受体结合以及 RNA 聚合酶 II - 特异性 DNA - 结合转录因子结合等。KEGG 富集分析表明大黄素治疗急性胰腺炎与 P13K-AKT 信号通路、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路以及 IL-17 信号通路密切相关。根据 6 项拓扑参数中位值, 鉴定出了 20 个关键靶点, 经过分子对

表 1 20 个核心靶点的分子对接结果

Table 1 Docking results of 20 core targets

靶点名称	靶点 PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
IL6	4O9H	-4.76
CASP3	1CP3	-5.83
CTNNB1	5IVN	-7.01
VEGFA	7VSW	-3.79
STAT3	4ZIA	-4.73
HIF1A	3HQU	-6.27
ALB	5HOZ	-5.16
TP53	6IUA	-4.74
IL1B	4X3A	-6.81
MYC	6AU4	-6.92
ANXA5	2H0K	-5.17
EGFR	3G5Z	-5.77
TNF	1TNR	-6.20
MAPK3	2ZOQ	-5.83
CASP8	2F1S	-6.13
SRC	2JYQ	-6.81
INS	5JYQ	-5.07
PTGS2	1PXX	-4.50
FN1	2HAZ	-6.53
MMP9	5TH6	-6.32

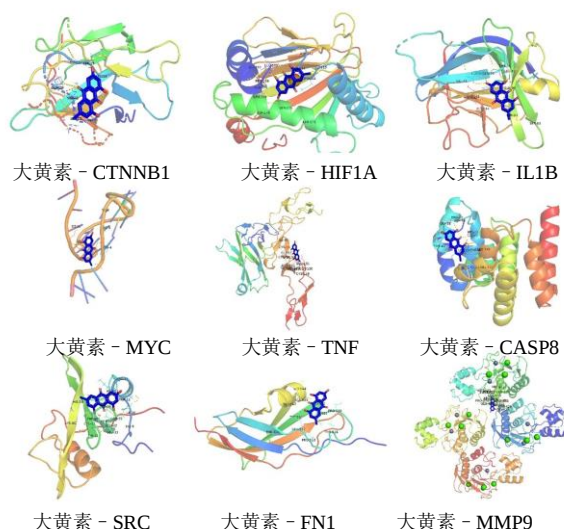


图 7 核心靶点分子对接结果

Fig. 7 Molecules docking results of core target

接模拟验证，它们与大黄素均可结合，其中 CTNNB1、HIF1A、IL1B、MYC、TNF、CASP8、SRC、FN1 和 MMP9 与大黄素有良好的结合能力。CTNNB1 又名 β -catenin，是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键分子，近几年的研究发现，Wnt 信号通路在调节炎症反应中发挥重要作用，可能是控制炎症反应的一个靶通路^[17]。HIF1A 在多种免疫细胞中表达，如巨噬细胞、树突状细胞以及中性粒细胞等，也是参与控制细胞代谢途径的分子，与糖酵解和促炎基因的表达密切相关^[18]。IL1B 是无菌坏死过程中最重要的炎症介质，它受到炎症小体和中性粒细胞的调控，是介导急性胰腺炎早期炎症和传播到胰腺外组织的主要细胞因子^[19]。MYC 则是一种原癌基因^[20]，调控细胞周期、细胞黏附等功能，同时也是促炎因子，炎症细胞在扩增时，有 MYC 的激活^[21]。TNF 是一种多效性细胞因子，是其他促炎因子和白细胞黏附分子的关键调节剂，也是免疫细胞的激活剂，在急性胰腺炎的发病机制中起关键作用，推动了炎症反应的全身进展和器官功能障碍^[22]。CASP8 是 Caspase 基因家族成员，是细胞凋亡、坏死性凋亡和细胞焦亡的分子开关^[23-24]。SRC 是第一个被发现具有酪氨酸激酶活性的基因，在细胞黏附、增殖、存活和侵袭中具有关键作用，也可以激活细胞因子受体，在慢性胰腺炎的单核/巨噬细胞中有 SRC 的活化，同时它也被发现可能是慢性胰腺炎和胰腺癌之间的关键机制联系^[25]。FN1 是纤连蛋白家族成员，是基质糖蛋白之一，它可以刺激巨噬细胞释放

炎症因子^[26]。MMP9 是一种含有 Zn^{2+} 的基质金属蛋白酶，在炎症反应中降解基底膜，促进急性胰腺炎的恶化，已被报道其是一种有价值的急性胰腺炎严重程度的早期预测指标^[27]。总之，本研究最终筛选的靶点都在炎症的进展扮演重要角色，尤其 IL1B、TNF 和 MMP9 对推动急性胰腺炎的进展起到重要作用^[27]。

综上，本研究采用网络药理学方法联合 GEO 测序数据发现大黄素缓解急性胰腺炎是通过多靶点和多通路实现，分子对接进一步验证了关键靶点与大黄素结合的可能性，为大黄素辅助治疗急性胰腺炎提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li G, Chen H, Liu L, *et al.* Role of Interleukin-17 in acute pancreatitis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 674803.
- [2] 许永豪, 罗艳霞, 陈巧. 大承气汤保留灌肠对脓毒症胃肠功能障碍患者炎症反应的影响 [J]. *中西医结合研究*, 2021, 13(6): 398-401.
- [3] 艾萍. 柴芩承气汤灌肠治疗肝胆湿热型急性胰腺炎的临床观察 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14(5): 64-66.
- [4] 栾晓峰, 王磊, 盖雪峰. 清胰汤加减辅助治疗重症胰腺炎及对血淀粉酶、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 的水平影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 50-53.
- [5] Xiang H, Zhang Q, Qi B, *et al.* Chinese herbal medicines attenuate acute pancreatitis: Pharmacological activities and mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 216.
- [6] Zheng Q, Li S, Li X, *et al.* Advances in the study of emodin: An update on pharmacological properties and mechanistic basis [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 102.
- [7] 孙攀兴, 邱春光. 大黄素通过调控 TLR4/NF- κ B 通路对脂多糖诱导血管内皮细胞氧化损伤的保护作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(6): 1040-1045.
- [8] Yao W Y, Zhou Y F, Qian A H, *et al.* Emodin has a protective effect in cases of severe acute pancreatitis via inhibition of nuclear factor- κ B activation resulting in antioxidation [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1416-1420.
- [9] Kim S, Chen J, Cheng T, *et al.* PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-d1395.
- [10] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [11] Wishart D S, Knox C, Guo A C, *et al.* DrugBank: A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database

- issue): D668-D672.
- [12] Liu X, Ouyang S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.
- [13] Zhou Y, Zhang Y, Lian X, *et al.* Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D1398-D1407.
- [14] Grondin C J, Davis A P, Wieggers J A, *et al.* Predicting molecular mechanisms, pathways, and health outcomes induced by Juul e-cigarette aerosol chemicals using the Comparative Toxicogenomics Database [J]. *Curr Res Toxicol*, 2021, 2: 272-281.
- [15] Zhang W, Bojorquez-Gomez A, Velez D O, *et al.* A global transcriptional network connecting noncoding mutations to changes in tumor gene expression [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(4): 613-620.
- [16] Burley S K, Bhikadiya C, Bi C, *et al.* RCSB protein data bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D437-D451.
- [17] Jridi I, Canté-Barrett K, Pike-Overzet K, *et al.* Inflammation and Wnt signaling: Target for immunomodulatory therapy? [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 615131.
- [18] Corcoran S E, O'Neill L A. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10): 3699-3707.
- [19] Ferrero-Andrés A, Panisello-Roselló A, Roselló-Catafau J, *et al.* NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Acute Pancreatitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5386.
- [20] Sipos F, Firneisz G, Müzes G. Therapeutic aspects of c-MYC signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(35): 7938-7950.
- [21] Mckeown M R, Bradner J E. Therapeutic strategies to inhibit MYC [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(10): a014266.
- [22] Malleo G, Mazzon E, Siriwardena A K, *et al.* Role of tumor necrosis factor- α in acute pancreatitis: From biological basis to clinical evidence [J]. *Shock*, 2007, 28(2): 130-140.
- [23] Fan T J, Han L H, Cong R S, *et al.* Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11): 719-727.
- [24] Fritsch M, Günther S D, Schwarzer R, *et al.* Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 683-687.
- [25] Liu S T, Pham H, Pandol S J, *et al.* Src as the link between inflammation and cancer [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 416.
- [26] Schmidt D R, Kao W J. The interrelated role of fibronectin and interleukin-1 in biomaterial-modulated macrophage function [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(3): 371-382.
- [27] Al Mofleh I A. Severe acute pancreatitis: Pathogenetic aspects and prognostic factors [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(5): 675-684.

[责任编辑 高源]