

## 基于网络药理学与分子对接技术探讨京尼平苷治疗脑缺血的作用机制

郝月<sup>1,2</sup>, 郎晋荣<sup>1</sup>, 王俊怡<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>, 王诗<sup>1\*</sup>, 刘昊<sup>2\*</sup>

1. 湖北科技学院 药学院, 湖北 咸宁 437100

2. 宁波大学 医学部基础医学院, 浙江 宁波 211315

**摘要:** 目的 运用网络药理学方法和分子对接方法研究京尼平苷治疗脑缺血潜在作用机制。方法 通过 PubChem、PharmMapper、GeneCards、OMIM 数据库分别对京尼平苷和疾病的靶点进行预测, 借助 Venny 2.1.0 工具将二者取交集获取共有靶点, 通过 STRING 数据库构建交集靶点的蛋白相互作用 (PPI) 网络, 随后通过 Cytoscape 3.7.2 软件对核心靶点进行网络拓扑分析; 基于核心靶点基因开展基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 基因富集分析。利用 AutodockTool 软件对所筛选的核心靶点分别与京尼平苷进行分子对接。结果 通过 STRING 数据库构建交集靶点的 PPI 网络, 获得 173 个交集靶点, 包括酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、蛋白激酶 B1 (AKT1)、热休克蛋白 90 $\alpha$  家族 A 级成员 1 (HSP90AA1)、PIK3R1、表皮生长因子受体 (EGFR) 等。京尼平苷治疗脑缺血可能通过调控磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) - 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末化产物 (AGE) - 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化通路、Ras 信号通路等多种信号通路发挥治疗脑缺血的作用。结论 预测了京尼平苷治疗脑缺血的潜在作用机制, 为后续实验研究提供理论依据和研究方向。

**关键词:** 京尼平苷; 脑缺血; 网络药理学; 分子对接; 酪氨酸蛋白激酶; 蛋白激酶 B1; 热休克蛋白 90 $\alpha$  家族 A 级成员 1

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)12-2724-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.007

## Mechanism of geniposide in treatment of cerebral ischemia based on network pharmacology and molecular docking

HAO Yue<sup>1,2</sup>, LANG Jin-rong<sup>1</sup>, WANG Jun-yi<sup>1</sup>, ZHAO Ting-ting<sup>1</sup>, WANG Shi<sup>1</sup>, LIU Hao<sup>2</sup>

1. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China

2. School of Basic Medicine, Ningbo University Health Science Center, Ningbo 211315, China

**Abstract: Objective** To study the potential mechanism of geniposide in treatment of cerebral ischemia by network pharmacology and molecular docking. **Methods** PubChem, PharmMapper, GeneCards, and OMIM databases were used to predict the targets of geniposide and disease respectively. Venny 2.1.0 tool was used to obtain the intersection of the two targets, and the protein interaction network of the intersection targets was constructed through STRING database. Cytoscape 3.7.2 software was used to analyze the network topology of the core target. GO and KEGG gene enrichment analysis was carried out based on the core target genes. AutodockTool software was used to dock the selected core targets with geniposide. **Results** The protein interaction network of intersection targets was constructed by STRING database, and 173 intersection targets were obtained, including SRC, AKT1, HSP90AA1, PIK3R1, EGFR, etc. Geniposide may regulate PI3K-Akt signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, fluid shear stress and atherosclerosis pathway, Ras in treatment of cerebral ischemia signaling pathway and other signaling pathways play a role in the treatment of cerebral ischemia. **Conclusion** This study predicts the potential mechanism of geniposide in the treatment of cerebral ischemia, and provides theoretical basis and research direction for subsequent experimental research.

**Key word:** geniposide; cerebral ischemia; network pharmacology; molecular docking; SRC; AKT1; HSP90AA1

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 浙江省基础公益研究计划 (LQ21H090002); 湖北省教育厅科研项目 (D20222802)

作者简介: 郝月, 女, 联培硕士研究生, 主要研究方向为心血管疾病相关药理学研究。E-mail: 1935243157@qq.com

\*通信作者: 王诗, 硕士生导师。E-mail: hkwangshi@hbust.edu.cn

刘昊, 硕士生导师。E-mail: liuhao@nbu.edu.cn

缺血性脑卒中已成为临床上致死致残和发病风险最大的急性脑血管疾病,给家庭和社会都带来了巨大的经济负担。脑缺血的病理过程十分复杂,目前主要的治疗策略为抗血小板聚集和抗血栓形成<sup>[1]</sup>。目前,天然产物在新药开发中的潜力已引起越来越多科学家的关注,天然产物已成为治疗各种疾病的重要来源或重要先导化合物。京尼平苷是一种新型环烯醚萜苷类化合物,是首次从栀子中分离得到的活性天然产物;也是栀子的主要活性成分,目前,京尼平苷已在 40 多种植物中发现,其中大部分来自茜草科植物,如栀子、杜仲、地黄等<sup>[2]</sup>。临床大量数据表明栀子有活血化瘀、止痛消炎等功效<sup>[3]</sup>。而京尼平苷作为栀子最主要的活性成分,同样表现出抗血栓形成、抑制血小板聚集和抗缺血性脑卒中的神经保护作用<sup>[4-6]</sup>。但其抗脑缺血的药理作用尚未完全明确,因此本文依托医学大数据、网络药理学手段和分子对接技术<sup>[7]</sup>,对京尼平苷治疗脑缺血的核心靶点及相关的信号通路进行预测,以便将中医理论与药理机制相结合进行深入研究,为临床应用提供參考。

## 1 资料与方法

### 1.1 京尼平苷靶点的预测

通过 PubChem 数据库查找京尼平苷的 3D 结构,PharmMapper 数据库预测其潜在靶点,物种选为“Homo sapiens”。将预测得到的京尼平苷靶点名借助 UniProt 数据库中的 UniProtKB 进行转换,最终得到京尼平苷相关靶点蛋白。

### 1.2 疾病靶点的获取

以“cerebral ischemia”为搜索关键词,通过 GeneCards、OMIM 数据库收集脑缺血的疾病靶点。

### 1.3 蛋白相互作用网络(PPI)构建与分析

通过 Venny 2.1 在线绘图工具获取京尼平苷与脑缺血共同靶点,通过 STRING 数据库构建二者共同靶点的 PPI。物种选为“Homo sapiens”,蛋白之间功能的关联性设置为 0.7,去掉相互之间没有联系的节点,其余参数默认。再使用 Cytoscape 3.7.2 进行网络拓扑分析,根据度(degree)值筛选核心靶点,degree 值越大表明其在 PPI 关系图中越重要<sup>[8]</sup>。

### 1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

将京尼平苷治疗脑缺血交集靶点上传至 DAVID 数据库,物种设定为“Homo sapiens”即可进行 GO 及 KEGG 分析,并通过使用微生信在线绘

图工具对上述所得的结果进行展示。

## 1.5 分子对接

利用 Autodock Vina 软件对京尼平苷以及重要靶点蛋白进行分子对接。在 PubChem 数据库及 PDB 数据库分别获取配体的 mol2 格式文件、受体的 pdb 格式文件。前期首先在 AutoDock-Tools-1.5.6 软件中对受体和配体进行去水、加氢、分配电荷、设置可旋转键等处理,其次通过 Aytodock Vina 进行分子对接,最后选取部分对接结果在 Pymol 软件中进行可视化分析。

## 2 结果

### 2.1 京尼平苷靶点的预测

通过借助 PubChem、PharmMapper 数据库筛选出了 299 个京尼平苷靶点。运用 UniProt 数据库校正靶点基因名,剔除无效靶点,最终获得 290 个有效靶点。

### 2.2 疾病靶点的预测

通过 2 个数据库的检索,获得脑缺血靶点 3 166 个。通过 Venny 2.1 工具获得二者的交集靶点 173 个,见图 1。

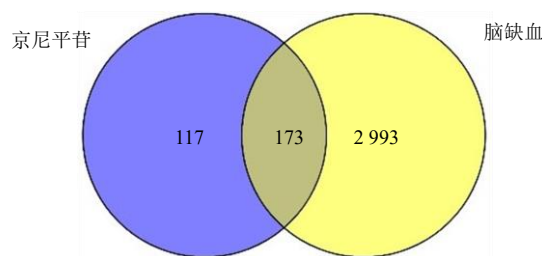


图 1 京尼平苷靶点与脑缺血交集靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of the intersection of geniposide target and cerebral ischemia

### 2.3 PPI 网络

将获取的共同靶点导入 STRING 数据库构建交集靶点蛋白的 PPI 网络(图 2A),在 PPI 网络图中,共有 173 个节点,601 条边。将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件,得到京尼平苷治疗脑缺血靶点的 PPI 网络(图 2B),各节点根据 degree 值大小进行有序排列,节点颜色越深、形状越大,代表度值越大,反之则代表度值越小。根据 degree 值大小筛选出前 5 个核心靶点,由大到小依次是酪氨酸蛋白激酶(SRC)、蛋白激酶 B1(AKT1)、热休克蛋白 90 $\alpha$  家族 A 级成员 1(HSP90AA1)、PIK3R1、表皮生长因子受体(EGFR),见表 1。

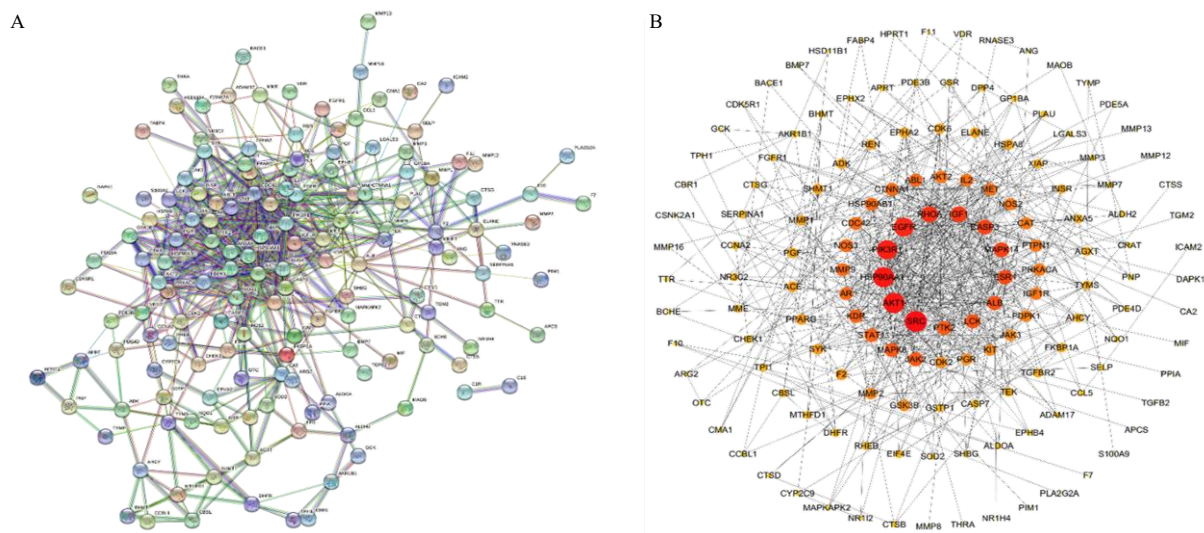


图 2 京尼平苷 - 脑缺血靶点 STRING (A) 和 Cytoscape (B) 软件 PPI 网络

Fig. 2 Geniposide - cerebral ischemia target STRING (A) and Cytoscape (B) software PPI network

表 1 度值前 Top 5 的靶点

Table 1 Top five targets by degree

| 排名 | 靶点       | degree | betweenness | closeness   |
|----|----------|--------|-------------|-------------|
| 1  | SRC      | 41.0   | 2 579.727   | 0.245 065 8 |
| 2  | AKT1     | 39.0   | 3 001.931   | 0.248 747 9 |
| 3  | HSP90AA1 | 39.0   | 2 265.445   | 0.241 100 3 |
| 4  | PIK3R1   | 36.0   | 1 341.827   | 0.235 759 5 |
| 5  | EGFR     | 35.0   | 1 180.519   | 0.238 019 1 |

## 2.4 KEGG 通路和 GO 功能富集分析

GO 分析得到 498 条生物功能条目, 69 条细胞组成条目, 129 条分子功能条目。选取  $P$  值前 10 位条目进行可视化分析 (图 3), 结果显示交集靶点主要参与蛋白水解 (proteolysis)、蛋白质自身磷酸化 (protein autophosphorylation)、凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process) 等生物过程, 主要分布于胞外区 (extracellular region)、胞外体 (extracellular exosome)、细胞外的空隙 (extracellular space)、胞质 (cytosol) 等细胞组分, 与丝氨酸型内肽酶活性 (serine-type endopeptidase activity)、相同蛋白结合 (identical protein binding)、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity) 等分子功能关联性较大。对交集靶点蛋白开展 KEGG 通路富集分析, 获得 136 条通路。根据  $P$  值的大小, 选取前 10 位关联性较大的通路进行可视化分析, 见图 4。京尼平苷治疗脑缺血的主要信号通路包括磷脂酰

肌醇-3-羟激酶 (PI3K) - 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末化产物 (AGE) - 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化通路 (lipid and atherosclerosis)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway) 等信号通路有关。

## 2.5 核心靶点分子对接验证

选取了 PPI 网络中 degree 值排名前 5 的核心靶点 (SRC、AKT1、HSP90AA1、PIK3R1、EGFR) 分别与京尼平苷进行模拟对接 (图 5、表 2)。配体与受体是否结合主要通过结合能的大小进行评价, 数值越小表示结合能力越强, 配体越容易与受体结合, 分子对接进一步验证了上述结果。

## 3 讨论

缺血性脑卒中已成为临床上致死致残和发病风险最大的急性脑血管疾病, 其病理过程复杂。京尼平苷药理作用广泛, 包括降糖<sup>[9-10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗氧化<sup>[12-15]</sup>、抗血栓<sup>[6]</sup>等, 能够通过血脑屏障对脑组织损伤起到保护作用<sup>[16-18]</sup>。京尼平苷在治疗脑缺血中的应用尚未见报道, 因此本研究充分利用网络药理学与分子对接技术分析了京尼平苷治疗脑缺血多靶点、多通路的作用机制。

### 3.1 京尼平苷治疗脑缺血的主要靶点

京尼平苷治疗脑缺血的核心靶点蛋白有 SRC、AKT1、HSP90AA1、PIK3R1、EGFR 等。分子对接表明, 京尼平苷与上述靶点结合活性较好。文献调研证实了上述靶点在脑缺血中的作用。如 AKT1 能

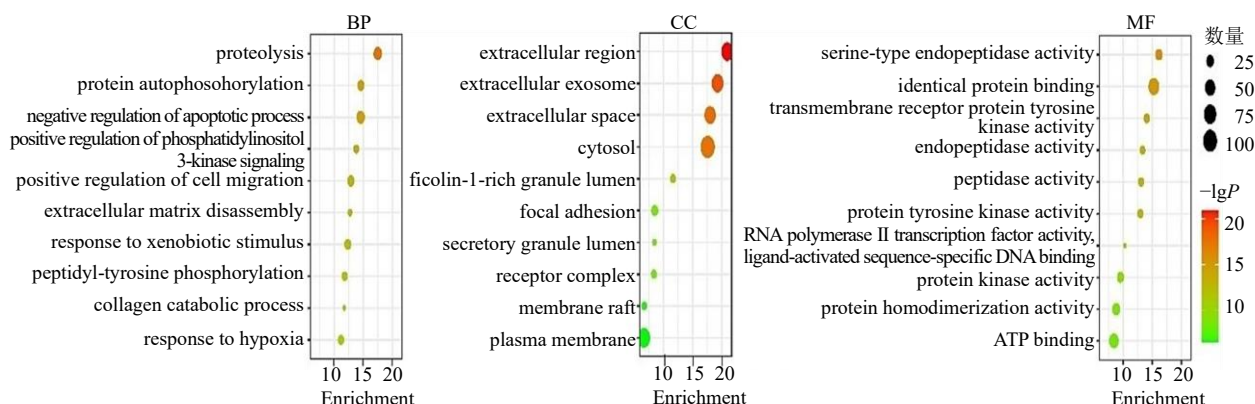


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

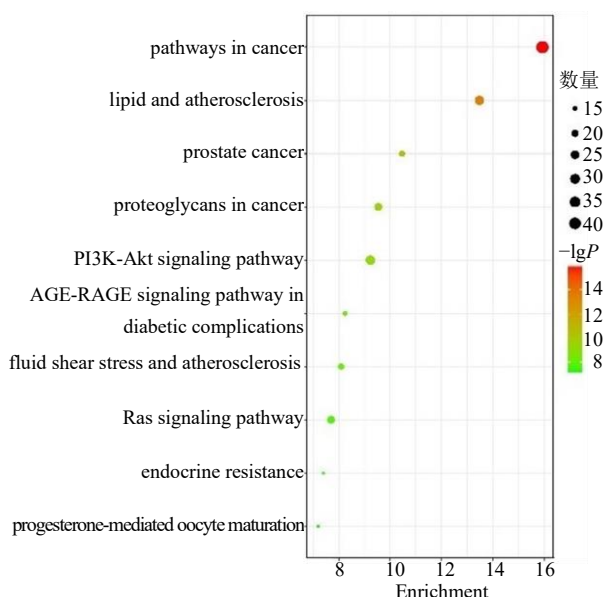


图 4 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis

表 2 京尼平苷与核心靶蛋白分子对接结果

Table 2 Docking results of results of geniposide with core target protein molecules

| 化合物  | 靶点蛋白     | 结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> ) |
|------|----------|-------------------------------|
| 京尼平苷 | SRC      | -7.3                          |
|      | HSP90AA1 | -6.2                          |
|      | AKT1     | -6.0                          |
|      | EGFR     | -8.0                          |
|      | PIK3R1   | -7.4                          |

够抑制小胶质细胞的活化、降低炎症反应<sup>[19]</sup>。HSP90AA1 属于热休克蛋白 90 (HSP90) 的 1 种亚型, 在缺血再灌注损伤相关机制研究中, HSP90 可能在 Akt/p-Akt 通路中通过抑制脑细胞的凋亡发挥神经保护的作用<sup>[20]</sup>。SRC 是一种非受体蛋白酪氨酸激酶, 在缺血脑组织中可调节细胞外信号调节激酶, 继而发挥脑保护作用<sup>[21]</sup>。

### 3.2 京尼平苷治疗脑缺血的主要通路

对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析发现, 京尼平苷可能通过 PI3K-Akt 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化通路、Ras 信号通路等多种信号通路发挥治疗脑缺血的作用。

PI3K-Akt 是细胞内重要存活和抗凋亡的信号转导通路广泛存在于脑组织中<sup>[22]</sup>, 其中 AKT 作为 PI3K 的下游靶点蛋白, 在细胞的增殖、生长及存活等方面发挥作用<sup>[23-24]</sup>。文献报道激活 PI3K-Akt 通路后可通过减少氧化应激、抑制炎症细胞因子表达、减少细胞凋亡, 从而改善脑缺血造成的脑损伤<sup>[25]</sup>。此外, AGE-RAGE 信号通路可促进炎症因子的表达

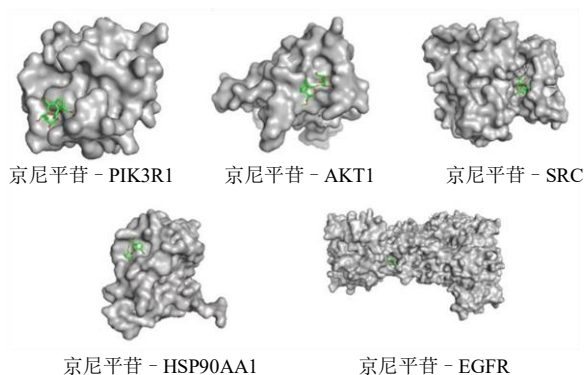


图 5 京尼平苷与核心靶点蛋白分子对接示意图

Fig. 5 Molecular docking diagram of geniposide and core target protein

和释放,诱导细胞凋亡和促进血管新生<sup>[26]</sup>。通过文献调研发现京尼平苷通过 PI3K-Akt 通路发挥对黑素细胞氧化损伤的保护作用,另外也有研究报道其通过 AGE-RAGE 信号通路对神经系统疾病(帕金森症、阿尔茨海默症)发挥保护作用等<sup>[27]</sup>。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 姜超,徐中菊,王婷.益气活血法在急性缺血性脑卒中治疗的应用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(18):2271-2273.
- [2] Liu L, Wu Q, Chen Y, et al. Updated pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of natural product geniposide [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3319.
- [3] 孙敏捷,游伟良,张杰,等.京尼平苷乳膏的制备和稳定性考察[J].中国药理学杂志,2013,48(6):455-460.
- [4] Zhang H Y, Liu H, Yang M, et al. Antithrombotic activities of aqueous extract from *Gardenia jasminoides* and its main constituent [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(2): 221-225.
- [5] Liu H, Chen Y F, Li F, et al. *Fructus Gardenia* (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(1): 94-110.
- [6] 刘昊,张海燕,宋伟,等.京尼平苷的抗血栓基础研究(英文)[J].现代生物医学进展,2012,12(19):3601-3604.
- [7] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J].中草药,2021,52(14):4119-4129.
- [8] Barabási A L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: A network-based approach to human disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1): 56-68.
- [9] 谢文利,李宏捷,晋玉章.京尼平苷的降血糖作用研究[J].武警医学院学报,2008(7):580-581.
- [10] 白涛,刘萌萌,刘涛,等.京尼平苷对 db/db 鼠的降糖减重作用研究[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1479-1481.
- [11] Liu H T, He J L, Li W M, et al. Geniposide inhibits interleukin-6 and interleukin-8 production in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells by blocking p38 and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(6): 451-461.
- [12] Yin F, Liu J, Zheng X, et al. Geniposide induces the expression of heme oxygenase-1 via PI3K/Nrf2-signaling to enhance the antioxidant capacity in primary hippocampal neurons [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1841-1846.
- [13] 王洪敏,周红敏,晋玉章.京尼平苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].武警医学院学报,2010,19(2):93-95.
- [14] 武海霞,张丹参,沈丽霞,等.栀子苷对急性乙醇中毒致小鼠学习记忆障碍的改善作用[J].河北北方学院学报:医学版,2010,27(2):18-20.
- [15] 丁嵩涛,刘洪涛,李文明,等.栀子苷对氧化应激损伤血管内皮细胞的保护作用[J].中国药理学通报,2009,25(6):725-729.
- [16] 朱晓磊,张娜,李澎涛,等.胆酸、栀子苷配伍对脑缺血时脑组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 含量的影响[J].北京中医药大学学报,2004(6):26-29.
- [17] 杨楠,刘雁勇,郝文宇,等.栀子粗提物对拟痴呆模型鼠学习记忆功能障碍的影响[J].中国康复理论与实践,2010,16(4):308-310.
- [18] 辛海涛,王卫宁.栀子苷对大鼠局灶性脑缺血模型缺血脑组织 HIF-1 $\alpha$  蛋白和 RTP801 的影响[J].当代医学,2010,16(36):25-26.
- [19] Chong Z Z, Li F, Maiese K. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury [J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(1): 299-315.
- [20] 刘湘玉,杨剑文,彭文娟,等.热休克蛋白 90 通过蛋白激酶 B 通路在局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用机制研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2017,19(12):1316-1319.
- [21] 徐愉林,秦莎莎,祝赫,等.补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血小板 Src, Akt 和 p38MAPK 蛋白的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):135-140.
- [22] Zhang W, Song J K, Yan R, et al. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8): 1259-1272.
- [23] Zhang H B, Tu X K, Chen Q, et al. Propofol reduces inflammatory brain injury after subarachnoid hemorrhage: Involvement of PI3K/Akt pathway [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(12): 104375.
- [24] Brazil D P, Yang Z Z, Hemmings B A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(5): 233-242.
- [25] 徐芳琴,郭超,王婧雯.山柰酚对脑缺血/再灌注损伤的体内外保护作用机制研究[J].中国药房,2022,33(17):2065-2071.
- [26] Li Z, Xu D, Jing J, et al. Network pharmacology-based study to explore the mechanism of the Yiqi Gubiao pill in lung cancer treatment [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4): 321.
- [27] 苏春贺.京尼平苷对帕金森病模型神经保护作用的研究[D].郑州:郑州大学,2018.

[责任编辑 高源]