

基于网络药理学和分子对接技术探讨当归四逆汤治疗系统性硬化症的作用机制

李世哲^{1,2}, 王蕾^{1,2}, 宋光富³

1. 吉林工程技术师范学院 化学与工业生物工程交叉学科研究院, 吉林 长春 130052

2. 新型分子功能材料吉林省校企联合技术创新实验室, 吉林 长春 130052

3. 吉林工程技术师范学院 生物与食品工程学院, 吉林 长春 130052

摘要: **目的** 基于网络药理学与分子对接技术探讨当归四逆汤治疗系统性硬化症的作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库检索当归四逆汤中的活性成分并以 Swiss Target Prediction 数据库预测各活性成分的靶点, 采用 GeneCards 数据库收集系统性硬化症疾病靶点, 取其中共同靶点作为潜在的作用靶点并导入 String 数据库建立蛋白相互作用 (PPI) 网络, 以 Cytoscape 软件进行网络拓扑分析。将 PPI 靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析并以 OmicShare 平台将结果可视化。构建“通路-靶点”网络并筛选其中关键靶点, 并采用 CB-Dock 平台将作用靶点与活性成分进行分子对接以筛选潜在药效成分。**结果** 收集得到 141 个当归四逆汤活性成分及 1 047 个相关靶点, 系统性硬化症疾病靶点 1 568 个。筛选出潜在作用靶点 266 个, 其中关键靶点 6 个, 分别为蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子受体 2 (KDR)、V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS)、促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、促分裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)。主要涉及 MAPK 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、Rap1 信号通路、黏着斑、脂质和动脉粥样硬化、流体剪切应力和动脉粥样硬化等通路的调节。分子对接结果显示, 水鬼蕉甙碱、芍药苷、酸枣仁皂苷 A 等活性成分为治疗中的潜在药效成分。**结论** 当归四逆汤以多组分、多靶点、多通路干预系统性硬化症, 其机制涉及免疫、血管损伤和细胞外基质合成等的调节。

关键词: 当归四逆汤; 系统性硬化症; 网络药理学; 分子对接; 水鬼蕉甙碱; 芍药苷; 酸枣仁皂苷 A; 血管内皮生长因子受体 2; V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物; 血管内皮生长因子 A

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)01-0057-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.008

Mechanism of Danggui Sini Decoction in treatment of systemic sclerosis based on network pharmacology and molecular docking

LI Shizhe^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, SONG Guangfu³

1. Institute of Chemical and Industrial Bioengineering, Jilin Engineering Normal University, Changchun 130052, China

2. School-enterprise Joint Technology Innovation Laboratory of Novel Molecular Functional Materials of Jilin Province, Changchun 130052, China

3. College of Biological and Food Engineering, Jilin Engineering Normal University, Changchun 130052, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Danggui Sini Decoction in treatment of systemic scleroderma based on network pharmacology and molecular docking method. **Method** Active substances of Danggui Sini Decoction and related targets were obtained from TCMSP database and Swiss Target Prediction database, the disease targets of systemic scleroderma were acquired from GeneCards database. The intersection targets were selected as potential active targets and import String database to construct PPI network. The network topology analysis was performed by Cytoscape software. The PPI targets were input DAVID database to perform GO and KEGG enrichment analysis and visualized by OmicShare platform. The “targets - pathway” network was construct to screening the key targets. CB-dock platform was utilized to perform the molecular docking between active targets and active substances to screen potential pharmacodynamic components. **Results** A total of 141 active substances and 1 047 related targets were acquired, and 1 568

收稿日期: 2023-09-20

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202201ZYTS292); 吉林工程技术师范学院校级科研项目 (BSKJ202002)

作者简介: 李世哲, 男, 讲师, 研究方向为天然药物分析。E-mail: lishizhe_2008@126.com

diseases targets of systemic scleroderma were obtained. There were 266 potential active targets, including 6 key targets, namely Akt1, KDR, HRAS, MAPK1, MAPK3, and VEGFA. It's mainly involving MAPK signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, Rap1 signaling pathway, focal adhesion, lipid and atherosclerosis and fluid shear stress, and atherosclerosis. Molecular docking results showed that caribine, paeoniflorin, and jujuboside A were potential pharmacodynamic components. **Conclusion** Danggui Sini Decoction might intervene systemic scleroderma by multi- components, multi-targets, and multi-pathways, the mechanism involves the regulation of immunity, vascular injury, and extracellular matrix synthesis.

Key words: Danggui Sini Decoction; systemic scleroderma; network pharmacology; molecular docking; caribine; paeoniflorin; jujuboside A; KDR; HRAS; VEGFA

系统性硬化症又称硬皮病，是一种罕见且病因不明的自身免疫性疾病。其主要特征为广泛血管病变和多器官组织的进行性纤维化，可累及皮肤、心脏、胃肠道和肾脏等多器官组织，严重影响患者生活质量甚至危及生命^[1-3]。本病发病机制尚不明确，且缺少公认有效治疗方法^[4]。现有研究表明系统性硬化症发病过程与免疫异常、血管损伤及细胞外基质合成过多密切相关^[5-6]。西医治疗多采用钙离子拮抗剂、糖皮质激素、结缔组织抑制剂和免疫抑制剂等控制病情发展，但疗效不佳且不良反应较大^[7]。在中医领域中，系统性硬化症属于“痹证”范畴，《素问·痹论》记载有“风湿寒三气杂至，合而为痹也，”并认为该病是由阳虚凝寒、痰瘀互结、血脉不通所致^[8]。

当归四逆汤出自《伤寒论》：“手足厥寒，脉细欲绝者，当归四逆汤主之。”^[9]。该方剂由当归、桂枝、芍药、细辛、通草、大枣、炙甘草组成，具有温经散寒，养血通脉之功效^[9-10]。方中当归为君药补血，芍药为臣滋养营气，佐以桂枝、细辛温散寒邪，大枣、甘草为使甘温健脾补中，通草通行脉道^[10]。现代临床研究表明，当归四逆汤对系统性硬化症具有确实疗效，且不良反应较少，与西药联用能提高疗效，并减轻西药的不良反应^[11-12]。现代药理学研究表明，当归四逆汤具有抗凝及抗血栓形成、扩张血管末梢、镇痛、抗炎及解痉等作用^[10, 13-15]；能够明显改善系统性硬化症模型小鼠的皮肤硬化情况，并能降低组织中结缔组织生长因子（CTGF）和转化生长因子- β （TGF- β ）的含量^[16]；但当归四逆汤对系统性硬化症的治疗机制尚待研究。

网络药理学是一门基于数据库挖掘和高通量组学分析的交叉学科，并被广泛用于药物活性物质的整体作用机制研究^[17]。据此，本研究采用网络药理学和分子对接技术系统分析当归四逆汤对系统性硬化症的治疗过程，为将来进一步的实验研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 当归四逆汤活性成分的获取与靶点的预测

分别以“当归”“桂枝”“白芍”“细辛”“通草”“甘草”“大枣”为关键词，以口服生物利用度（OB） $\geq 30\%$ 和类药性（DL） ≥ 0.18 为标准，在中药系统药理数据库和分析平台（TCMSP，<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>）中检索当归四逆汤的活性成分。

1.2 潜在作用靶点的获取

利用 PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>）获得各活性成分 SMILES 式。将各 SMILES 式输入 SwissTargetPrediction 数据库预测各活性成分的药物靶点。在 GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org>）中以“systemic scleroderma”为关键词检索获得相关疾病靶点。利用 UniProt 数据库将所得药物靶点和疾病靶点转化为标准化基因名称，再利用 OmicShare 平台（<https://www.omicshare.com/>）的韦恩图工具绘制韦恩图，并获得药物靶点和疾病靶点的交集，所得交集即为当归四逆汤治疗系统性硬化症的潜在作用靶点。

1.3 蛋白质相互作用（PPI）网络和“化合物-靶点”网络

将所得潜在作用靶点导入 String 数据库（<https://www.omicshare.com>），并将物种设定为“Homo Sapiens”，置信度设置为 0.4，构建 PPI 网络并获得与治疗相关性更强的 PPI 靶点，同时以 Cytoscape 3.7.2 软件将 PPI 网络可视化，再利用 Cytoscape 软件中的 network analyzer 插件进行网络拓扑分析获得各靶点的 degree 值，并以 degree 值为标准筛选 PPI 网络中的核心靶点（degree 值 > 2 倍平均值）。将 PPI 靶点及相关活性物质信息导入 Cytoscape 软件中构建“化合物-靶点”网络，用于分析当归四逆汤中活性成分与潜在作用靶点之间的关系，并通过网络拓扑分析获得各活性成分靶点在“化合物-靶点”网络中的 degree 值。

1.4 富集分析和关键靶点筛选

将 PPI 靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov>) 中进行基因本体 (GO) 功能和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 选择物种“Homo Sapiens”, 设定阈值错误发现率 (FDR) < 0.01。其中 GO 功能富集分析包括细胞组分 (CC)、生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 3 个部分。以 FDR 值排序后选择排名前 20 位的条目用于下一步分析, 用 OmicShare 平台中高级气泡图工具实现可视化。

根据现有临床研究和药理学研究对 KEGG 通路分析所得结果进行筛选, 剔除不相关通路。将筛选所得通路和其相关靶点信息输入 Cytoscape 软件, 建立“通路-靶点”网络进行拓扑网络分析获得各靶点的 degree 值, 并以 degree 值为标准筛选网络核心靶点 (degree 值>2 倍平均值)。筛选 PPI 网络核心靶点和“通路-靶点”网络核心靶点的交集, 作为当归四逆汤治疗系统性硬化症的关键靶点。

1.5 分子对接

基于当归四逆汤对系统性硬化症治疗关键靶点筛选结果, 以相关活性物质为配体, 关键靶点作为受体进行分子对接, 验证分析结果并预测治疗中的潜在药效成分。从 RSDb PDB 数据库 (<https://www1.rcsb.org>) 获取关键靶点结构, 通过 TCMSP 数据库获得相关活性物质的 mol2 格式分子式, 导入 CB-Dock 网站 (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php>) 进行分子对接并将结果可视化, 以 Vina Score 作为结合能力评价指标筛选潜在药效成分 (低于平均 Vina Score)。

2 结果

2.1 活性物质的筛选和靶点预测

分别检索当归、桂枝、白芍、细辛、通草、甘草、大枣中有效成分, 筛选得到 2、7、13、8、4、92、29 个活性成分, 去重后共计得到 141 个活性成分, 见表 1。

表 1 当归四逆汤活性成分
Table 1 Active ingredient of Danggui Sini Decoction

MOL ID	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	当归、桂枝、白芍、大枣
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	大枣
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	桂枝
MOL000359	3-epi- β -sitosterol	36.91	0.75	桂枝、白芍、通草、甘草
MOL000492	cianidanol	54.83	0.24	桂枝、白芍、大枣
MOL000073	(+)-epicatechin	48.96	0.24	桂枝
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	桂枝
MOL011169	ergosterol peroxide	44.39	0.82	桂枝
MOL001910	CID 77916097	64.77	0.38	白芍
MOL001918	paeoniflorigenone	87.59	0.37	白芍
MOL001919	palbinone	43.56	0.53	白芍
MOL001921	(+)-lactiflorin	49.12	0.80	白芍
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	白芍
MOL001928	albiflorin	66.64	0.33	白芍
MOL001930	[(2R,3S,4S,5R,6S)-6-[[[(1R,2S,3S,5S,6R,8S)-2-(benzoyloxymethyl)-6-hydroxy-8-methyl-9,10-dioxatetracyclo [4.3.1.02,5.03,8] decan-3-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl] methyl benzoate	31.27	0.75	白芍
MOL000211	betulinic acid	55.38	0.78	白芍、大枣、甘草
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍、细辛、甘草
MOL012140	4,9-dimethoxy-1-vinyl-beta-carboline	65.30	0.19	细辛
MOL012141	caribine	37.06	0.83	细辛
MOL001460	cryptopine	78.74	0.72	细辛
MOL001558	sesamin	56.55	0.83	细辛
MOL002501	(1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxo-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid (S)-3-(2-butenyl)-2-methyl-4-oxo-2-cyclopenten-1-yl	62.52	0.31	细辛
MOL002962	3-O-methylviolanone	48.23	0.33	细辛
MOL009849	(-)-asarinin	31.57	0.83	细辛

表 1 (续)

MOL ID	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL008006	papyriogenin A	41.41	0.76	通草
MOL008020	3 α -hydroxy-28-noroleana-11,13(18),17(22)-triene-21-one	45.26	0.79	通草
MOL008025	14-(5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-5-hydroxy-2,15-dimethyltetracyclo [8.7.0.0{2,7}.0{11,15}] heptadec-7-en-9-one	40.93	0.79	通草
MOL001484	maackiain	75.18	0.54	甘草
MOL001792	liquiritigenin	32.76	0.18	甘草
MOL002311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
MOL000239	kumatakenin	50.83	0.29	甘草
MOL002565	medicarpin	49.22	0.34	甘草
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	甘草
MOL003656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草
MOL003896	7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-4 <i>H</i> -chromen-4-one	42.56	0.20	甘草
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	甘草
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	甘草
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	甘草
MOL004805	shinflavanone	31.79	0.72	甘草
MOL004806	(2 <i>R</i>)-7-hydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-2-[4-propan-2-yloxy-3-[(<i>Z</i>)-prop-1-enyl] phenyl]-2,3-dihydrochromen-4-one	30.29	0.57	甘草
MOL004808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
MOL004810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
MOL004811	glyasperin C	45.56	0.40	甘草
MOL004814	isotrifoliol	31.94	0.42	甘草
MOL004815	kanzonol B	39.62	0.35	甘草
MOL004820	kanzonol W	50.48	0.52	甘草
MOL004824	(2 <i>S</i>)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2- <i>g</i>] chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
MOL004827	semilicoisoflavone B	48.78	0.55	甘草
MOL004828	glepidotin A	44.72	0.35	甘草
MOL004829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草
MOL004833	phaseollinisoflavan	32.01	0.45	甘草
MOL004835	4-hydroxy-2,4'-dimethoxychalcone	61.60	0.19	甘草
MOL004838	kanzonol U	58.44	0.38	甘草
MOL004841	licochalcone B	76.76	0.19	甘草
MOL004848	licochalcone G	49.25	0.32	甘草
MOL004849	licoarylcoumarin	59.62	0.43	甘草
MOL004855	licoricone	63.58	0.47	甘草
MOL004856	gancaonin A	51.08	0.40	甘草
MOL004857	gancaonin B	48.79	0.45	甘草
MOL004860	[(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-[4-[(2 <i>S</i>)-7-hydroxy-4-oxo-2,3-dihydrochromen-2-yl] phenoxy] oxan-3-yl] oxy-3,4-dihydroxyoxolan-3-yl] methyl 1 <i>H</i> -indole-3-carboxylate	32.89	0.27	甘草
MOL004863	gancaonin L	66.37	0.41	甘草
MOL004864	gancaonin M	30.49	0.41	甘草
MOL004866	6-prenylluteolin	44.15	0.41	甘草
MOL004879	glycyrin	52.61	0.47	甘草
MOL004882	licocoumarone	33.21	0.36	甘草
MOL004883	licoisoflavone A	41.61	0.42	甘草
MOL004884	licoisoflavone B	38.93	0.55	甘草
MOL004885	licoisoflavanone	52.47	0.54	甘草
MOL004891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
MOL004898	5-prenylbutein	46.27	0.31	甘草
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
MOL004905	glyuranolide	34.32	0.55	甘草

表 1 (续)

MOL ID	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL004907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
MOL004908	glabridin	53.25	0.47	甘草
MOL004910	glabranin	52.90	0.31	甘草
MOL004911	glabrene	46.27	0.44	甘草
MOL004912	glabrone	52.51	0.50	甘草
MOL004913	hedysarimcoumestan B	48.14	0.43	甘草
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-[1]benzofuro[3,2-c]chromen-6-one	62.90	0.53	甘草
MOL004915	eurycarpin A	43.28	0.37	甘草
MOL004917	CID 101939210	37.25	0.79	甘草
MOL004924	medicarpin 3-O-glucoside	40.99	0.95	甘草
MOL004935	sigmoidin B	34.88	0.41	甘草
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	71.12	0.18	甘草
MOL004945	isobavachin	36.57	0.32	甘草
MOL004948	isoglycyrol	44.70	0.84	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
MOL004957	isoformononetin	38.37	0.21	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
MOL004961	quercetin 3,3'-dimethyl ether	46.45	0.33	甘草
MOL004966	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	43.71	0.57	甘草
MOL000497	licochalcone a	40.79	0.29	甘草
MOL004974	3'-methoxyglabradin	46.16	0.57	甘草
MOL004978	4'-methoxyglabridin	36.21	0.52	甘草
MOL004980	4-(4'-hydroxy-phenyl)-6-prenyl-7-hydroxy-coumarin	39.71	0.33	甘草
MOL004985	5E-eicosenoic acid	30.70	0.20	甘草
MOL004988	(1R,13S)-15-methoxy-7,7-dimethyl-16-(3-methylbut-2-enyl)-8,12,20-trioxapentacyclo [11.8.0.02,11.04,9.014,19] henicosa-2(11),3,5,9,14(19),15,17-heptaen-17-ol	32.47	0.89	甘草
MOL004989	(2R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	39.22	0.41	甘草
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-phenylcoumarin	83.71	0.27	甘草
MOL004991	7-acetoxy-2-methylisoflavone	38.92	0.26	甘草
MOL004993	(2R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	53.79	0.40	甘草
MOL004996	9-eicosenoic acid	30.70	0.20	甘草
MOL000500	(+)-vestitol	74.66	0.21	甘草
MOL005000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
MOL005001	gancaonin H	50.10	0.78	甘草
MOL005003	licoagrocarpin	58.81	0.58	甘草
MOL005007	(3R)-7-hydroxy-3-(5-hydroxy-2,2-dimethylchromen-6-yl)-5-methoxy-2,3-dihydrochromen-4-one	72.67	0.59	甘草
MOL005008	3,5,7-trihydroxy-2-[(3R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-yl]chromen-4-one	41.28	0.60	甘草
MOL005012	licoagroisoflavone	57.28	0.49	甘草
MOL005013	(3 β ,18 α ,20 β)-3,18-dihydroxy-11-oxoolean-12-en-29-oic acid	41.16	0.71	甘草
MOL005016	odoratin	49.95	0.30	甘草
MOL005017	phaseol	78.77	0.58	甘草
MOL005018	(2S)-2-(2,2-dimethylchromen-6-yl)-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one	54.85	0.87	甘草
MOL005020	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-6-(3-methylbut-2-enyl)-2H-chromene-5,7-diol	53.82	0.37	甘草
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	大枣、甘草
MOL012921	stepharine	31.55	0.33	大枣
MOL012940	spiradine A	113.52	0.61	大枣
MOL012946	(2R,7S,10R)-2,6,6,10,16-pentamethyl-18-(2-methylprop-1-enyl)-19,21-dioxahexacyclo [18.2.1.01,14.02,11.05,10.015,20] tricosane-7,16-diol	32.69	0.62	大枣

表 1 (续)

MOL ID	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL012961	(2S,3R,4R,5R,6S)-2-[(2S,3R,4S,5S)-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy methyl]-3-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-[[[(1S,2R,5R,7S,10R,11R,14R,15S,16S,18R,20S)-16-hydroxy-2,6,6,10,16-pentamethyl-18-(2-methylprop-1-enyl)-19,21-dioxahexa cyclo [18.2.1.01,14.02,11.05,10.015,20]tricosan-7-yl]oxy]oxan-3-yl]oxy-6-methyloxane-3,4,5-triol	36.67	0.62	大枣
MOL012976	coumestrol	32.49	0.34	大枣
MOL012980	daechuine S6	46.48	0.79	大枣
MOL012981	daechuine S7	44.82	0.83	大枣
MOL012986	jujubasaponin V	36.99	0.63	大枣
MOL012989	jujuboside C	40.26	0.62	大枣
MOL012992	mauritime D	89.13	0.45	大枣
MOL001454	berberine	36.86	0.78	大枣
MOL001522	coclaurine	42.35	0.24	大枣
MOL003410	jujuboside B	66.95	0.62	大枣
MOL004350	ruvoside	36.12	0.76	大枣
MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	大枣
MOL000627	(+)-stepholidine	33.11	0.54	大枣
MOL007213	nuciferine	34.43	0.40	大枣
MOL000783	protoporphyrin IX	30.86	0.56	大枣
MOL000787	protopine	59.26	0.83	大枣
MOL008034	ceanothic acid	73.52	0.77	大枣
MOL008647	moupinamide	86.71	0.26	大枣
MOL002773	β-carotene	37.18	0.58	大枣
MOL000096	(-)-catechin	49.68	0.24	大枣
MOL013357	stigmast-4-ene-3,6-diol	34.37	0.78	大枣

2.2 疾病靶点的获取

将活性成分 SMILES 式导入 SwissTarget Prediction 数据库预测靶点,共得到 1 047 个靶点。以“systemic scleroderma”为关键词在 GeneCards 数据库检索,经过去重后共获得 1 568 个与系统性硬化症相关的疾病靶点。经筛选后共得到当归四逆汤治疗系统性硬化症的潜在作用靶点 266 个,图 1。

2.3 PPI 网络和“化合物-靶点”网络

将 266 个交集靶点导入 String 数据库中生成

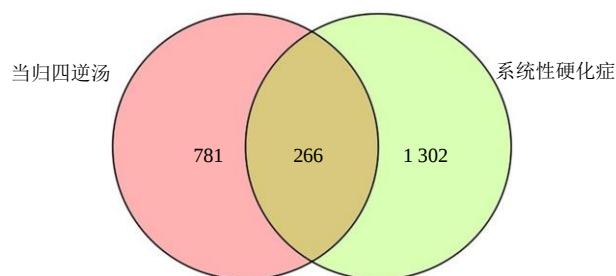


图 1 当归四逆汤与系统性硬化症靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets of Danggui Sini Decoction and systemic sclerosis

PPI 网络,并以 Cytoscape 软件实现可视化,见图 2A。PPI 网络中共包含 261 个节点和 4 992 条边,节点平均 degree 值 38.25。图中节点代表靶点,边代表靶点之间相互关联。经拓扑网络分析筛选出 29 个靶点作为 PPI 网络的核心靶点,见图 2B,如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-6(IL-6)、蛋白激酶 B1(Akt1)、白蛋白(ALB)等。基于所得 PPI 靶点及相关活性成分信息,以 Cytoscape 软件构建“化合物-靶点”网络,见图 3,其中包含 125 个活性成分节点和 261 个靶点节点。“化合物-靶点”网络表示了当归四逆汤治疗系统性硬化症的多组分作用于多靶点的治疗特点,活性成分的 degree 值越高,说明其能够作用于更多的靶点并可能在治疗中发挥更多的作用。

2.4 富集分析和关键靶点筛选

将所得 PPI 靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析,在 FDR<0.01 条件下筛选得到 520 条 GO 条目,其中 BP 条目 399 条,CC 条目 48 条, MF 条目 73 条,以 FDR 值排序后取各项前 20 位的条目绘制气泡图,见图 4。其中 BP 分析结果显示,

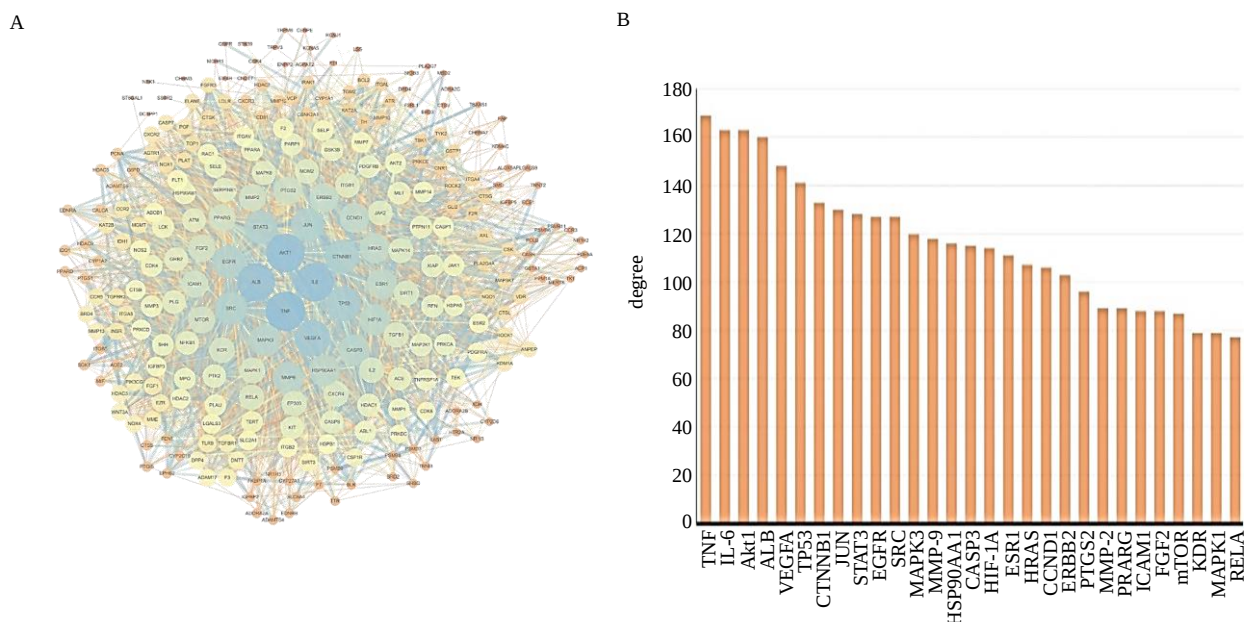


图 2 当归四逆汤治疗系统性硬化症靶点 PPI 网络图 (A) 和 PPI 网络的核心靶点 (B)

Fig. 2 PPI network of therapeutic targets of Danggui Sini Decoction for systemic sclerosis (A) and core targets of PPI network (B)

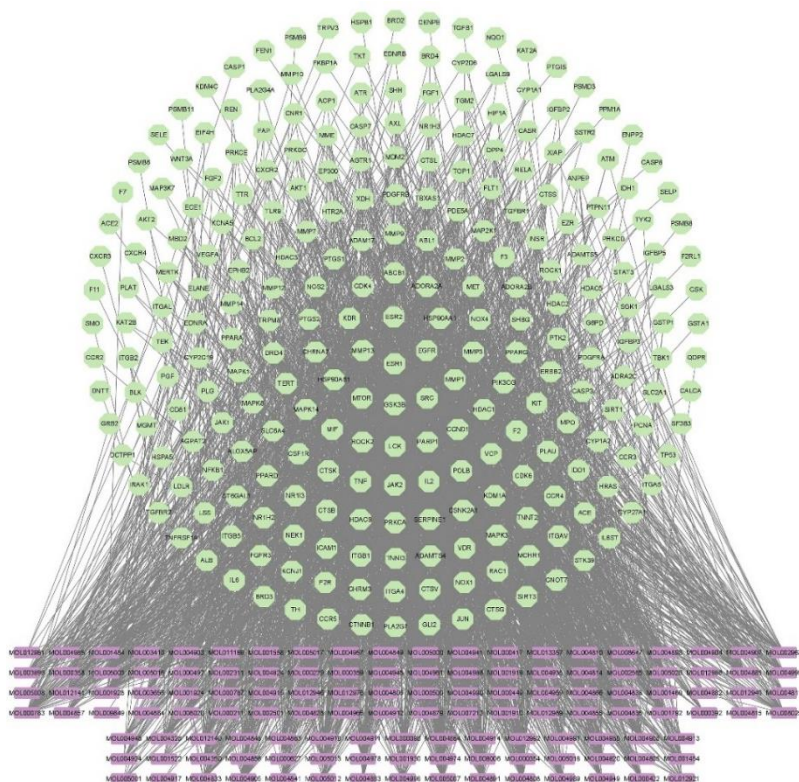


图 3 “化合物-靶点”网络

Fig. 3 “Compound - target” network

作用靶点主要富集于细胞增殖、细胞迁移、炎症响应、血管病变、蛋白质磷酸化、细胞外基质、信号

传导、蛋白质水解等。CC 分析结果说明，作用靶点广泛富集于细胞核、细胞质、细胞膜等部位。MF 分

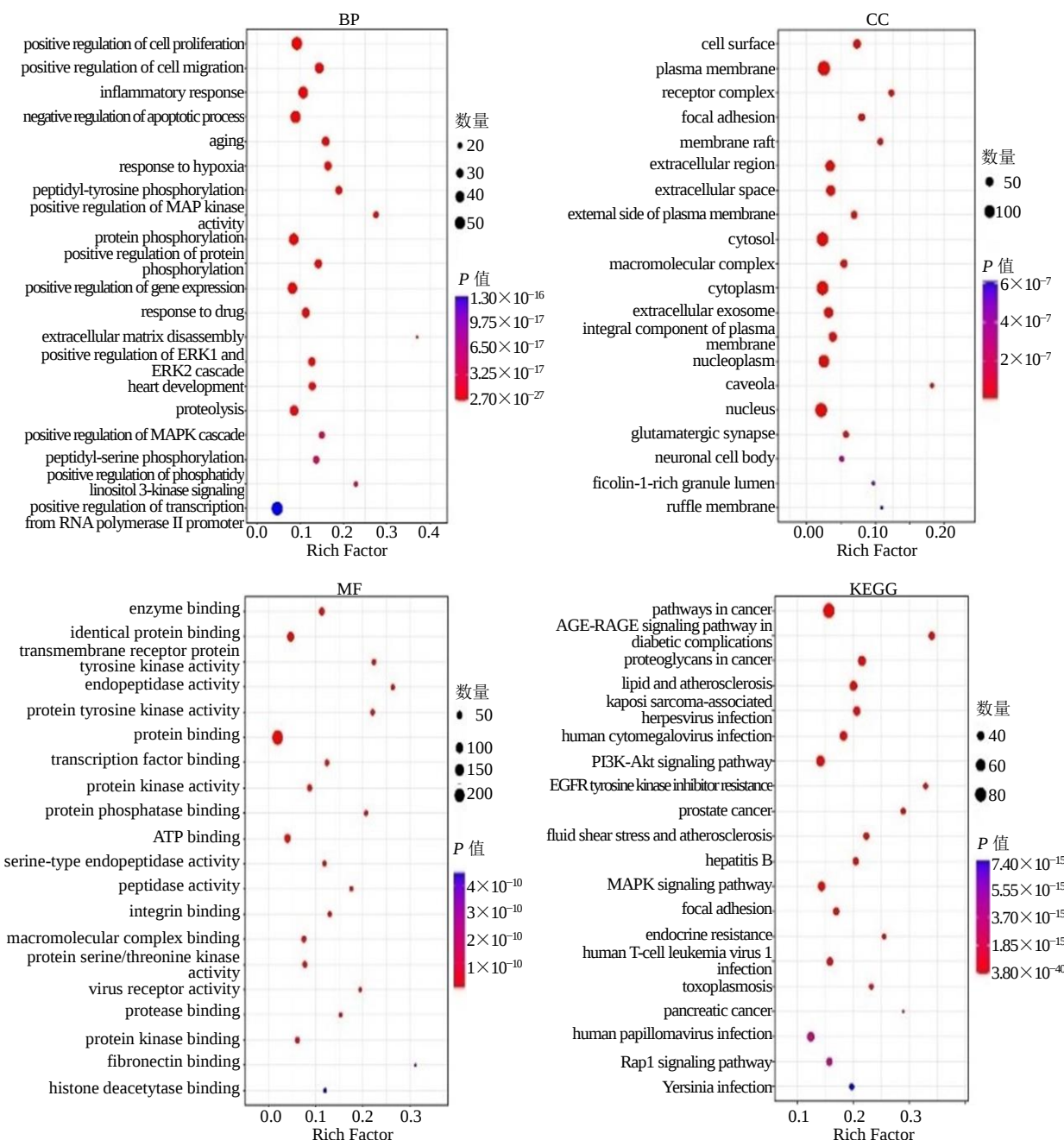


图 4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析
Fig. 4 GO enrichment and KEGG pathway enrichment analysis

析结果表明,作用靶点可影响蛋白激酶活性和蛋白结合。

将所得 PPI 靶点导入 DAVID 数据库进行 KEGG 通路富集分析,在 $FDR < 0.01$ 条件下共筛选得到 148 条信号通路,按照 FDR 值排序后取前 20 位的信号通路绘制气泡图,见图 4。剔除与系统性硬化症不相关通路后,筛选得到促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt 信号通路、Rap1 信号通路、黏着斑(focal

adhesion)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、流体剪切应力和动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis) 等关键通路,见表 2,这些通路主要涉及免疫、血管损伤和细胞外基质等调节。

基于信号通路筛选结果,将所得通路及相关靶点信息输入 Cytoscape 软件建立“通路-靶点”网络,见图 5。如图所示,“通路-靶点”网络包含 6 个信号通路节点和 98 个靶点节点。经网络拓扑分

表 2 关键通路信息
Table 2 Information of key pathways

通路	靶点
PI3K-Akt signaling pathway	ITGB1、GSK3B、FLT1、HSP90AB1、ITGB5、FGF1、FGF2、PIK3CG、CCND1、AKT2、KDR、Akt1、ITGAV、RAC1、JAK2、HRAS、JAK1、PDGFRB、PDGFRA、MAP2K1、HSP90AA1、ITGA4、F2R、PRKCA、PGF、KIT、ITGA5、SGK1、MET、TP53、CSF1R、EGFR、RELA、ERBB2、MAPK1、MAPK3、INSR、MTOR、NFKB1、IL-2、PTK2、VEGFA、IL-6、CDK6、CDK4、BCL2、MDM2、GRB2、TEK、FGFR3
lipid and atherosclerosis	GSK3B、HSP90AB1、ROCK2、SRC、TNF、RELA、ICAM1、CASP7、MAPK8、CASP8、TBK1、IRAK1、CASP3、Akt2、CASP1、Akt1、MAPK1、RAC1、JAK2、HRAS、MAP3K7、LDLR、MAPK3、JUN、HSP90AA1、HSPA5、MMP1、MMP3、STAT3、PRKCA、MAPK14、SELE、MMP9、PTK2、NFKB1、TNFRSF1A、SELP、IL-6、CYP1A1、BCL2、PPARG、TP53、NOX1
MAPK signaling pathway	CSF1R、FLT1、HSPB1、FGF1、FGF2、TNF、RELA、EGFR、MAPK8、IRAK1、CASP3、Akt2、ERBB2、KDR、Akt1、MAPK1、RAC1、HRAS、MAP3K7、MAPK3、PDGFRB、PDGFRA、JUN、MAP2K1、TGFB1、INSR、PLA2G4A、PRKCA、MAPK14、TGFB1、PGF、NFKB1、TGFB2、TNFRSF1A、VEGFA、PPM1A、KIT、GRB2、TEK、MET、FGFR3、TP53
focal adhesion	ITGB1、GSK3B、FLT1、ROCK1、ITGB5、ROCK2、SRC、XIAP、EGFR、MAPK8、CCND1、Akt2、ERBB2、KDR、Akt1、MAPK1、ITGAV、RAC1、HRAS、MAPK3、PDGFRB、PDGFRA、JUN、MAP2K1、ITGA4、PRKCA、PGF、PTK2、VEGFA、BCL2、CTNNB1、GRB2、ITGA5、MET
Rap1 signaling pathway	ITGB1、CSF1R、FLT1、SRC、ITGB2、FGF1、ITGAL、FGF2、EGFR、CNR1、Akt2、KDR、Akt1、MAPK1、RAC1、HRAS、MAPK3、PDGFRB、PDGFRA、MAP2K1、INSR、F2R、PRKCA、MAPK14、PGF、VEGFA、ADORA2A、ADORA2B、KIT、CTNNB1、TEK、MET、FGFR3
fluid shear stress and atherosclerosis	HSP90AB1、SRC、GSTP1、PLAT、TNF、RELA、ICAM1、MAPK8、CTSL、Akt2、KDR、Akt1、ITGAV、RAC1、MAP3K7、NQO1、JUN、HSP90AA1、MMP2、MAPK14、SELE、MMP9、PTK2、NFKB1、TNFRSF1A、VEGFA、GSTA1、BCL2、CTNNB1、TP53、NOX1

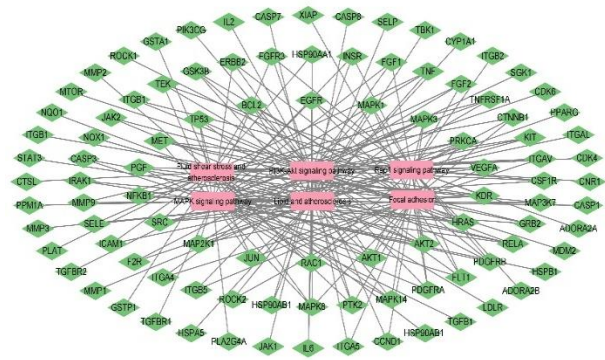
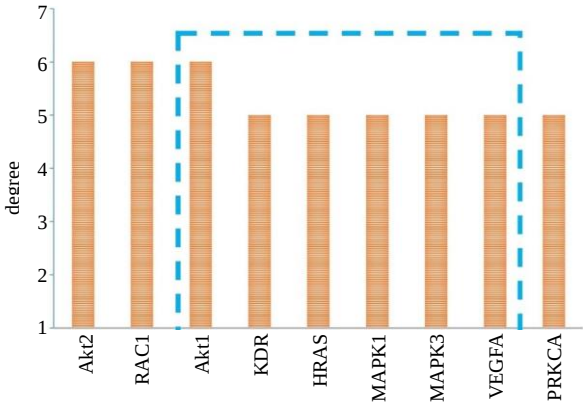


图 5 “通路 - 靶点”网络图
Fig. 5 Network of “pathways - targets”
析获得各靶点节点的 degree 值,并以 degree 值为标准筛选出“通路 - 靶点”网络的核心靶点,比对 PPI 网络核心靶点和“通路 - 靶点”网络核心靶点后得到交集,见图 6,交集靶点即为当归四逆汤治疗系统性硬化症的关键靶点。

2.5 分子对接

基于关键治疗靶点筛选结果将 Akt1、血管内皮



框内为交集靶点
Targets in box are intersection targets

图 6 “通路 - 靶点”网络的核心靶点
Fig. 6 Core targets of “pathways - targets” network

生长因子受体 2 (KDR)、V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS)、MAPK1、MAPK3、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 作为大分子受体,将相关活

性成分作为配体,采用 CB-Dock 进行分子对接。CB-Dock 使用基于空腔检测法和配体结合姿态的 AutoDock Vina 来预测蛋白的结合位点,Vina score 是对受体和配体以相应参数对接而得到复合物的评分,评分越低说明二者结合越稳定^[18-19]。分子对接结果显示,与 Akt1、KDR、HRAS、MAPK1、MAPK3、VEGFA 结合能力较强的活性成分(低于平均 Vina score)分别有 6、18、2、6、5、4 个,这些结合能力较强的活性成分也可能是治疗中发挥作用的潜在药效成分。在这些药效成分中,与 Akt1、KDR、HRAS、VEGFA 结合能力最强的药效成分分别是 shinpterocarpin、水鬼蕉宾碱、芍药苷、酸枣仁皂苷 A,而原卟啉与 MAPK1 和 MAPK3 结合能力最强,见图 7。

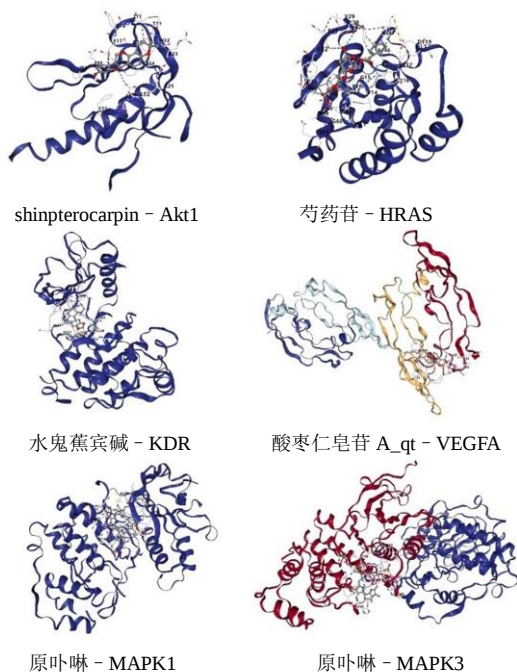


图 7 分子对接结果可视化分析图

Fig. 7 Visual analysis diagram of molecular docking results

3 讨论

本研究结果表明,当归四逆汤对系统性硬化症的治疗具有多组分通过多靶点调节多通路的特点。经过一系列网络分析后得出当归四逆汤对系统性硬化症治疗的关键靶点为 Akt1、KDR、HRAS、MAPK1、MAPK3、VEGFA。其中 Akt1 是一种调控免疫和炎症的激酶,Akt1 蛋白水平可以影响系统性硬化症模型小鼠皮肤硬化、间质性纤维化和炎症情况^[20-21]。VEGFA 是影响血管内皮细胞增殖、迁移和

存活的主要生长因子之一,KDR 为其主要受体,VEGF/KDR 信号能够促进内皮细胞的增殖、存活、黏附和迁移等,并与各类涉及病理性血管生成的疾病相关^[22-23]。同时,KDR 和 VEGFA 的表达上调和对 VEGF/KDR 信号的激活也被认为在系统性硬化症的血管损伤中发挥重要作用^[23]。MAPK 能够连接细胞外刺激和细胞内调节过程,协调环境变化对细胞反应和细胞信号间的影响^[24]。有研究表明,MAPK3/MAPK1 信号的抑制能够用于各类炎症性疾病的治疗^[25]。此外,在对系统性硬化症模型动物组织中 mRNAs 的 N6-甲基腺苷甲基化研究中发现,HRAS 在甲基化和表达中发生明显变化,说明其在表观遗传机制中发挥重要作用,预示着其可能作为系统性硬化症疾病的治疗靶点^[26]。

根据分子对接结果,共筛选出芍药苷、shinpterocarpin、水鬼蕉宾碱、酸枣仁皂苷 A_{qt}、原卟啉等 57 个与关键靶点结合能力较强的活性成分。因其与靶点良好的结合能力,这些活性成分也可能是当归四逆汤治疗系统性硬化症的潜在药效成分。这些成分可通过对相关靶点的作用从而调节相关通路,进而发挥药效功能。芍药苷在“化合物-靶点”网络中具有高于平均水平的 degree 值,说明其能与更多的药物靶点对应并发挥更广泛的药效作用。分子对接结果显示,芍药苷是与 HRAS 结合能力最强的药效组分;同时也与 KDR 和 VEGFA 具有较强的结合能力,说明芍药苷能通过调节多靶点并发挥广泛的药效功能。有研究表明,芍药苷能够抑制 VEGF 及相关受体表达进而抑制血管增生,从而实现对慢性炎症的治疗^[27]。此外,芍药苷还能通控制血管内皮细胞产生一氧化氮(NO)实现对内皮细胞的保护作用^[28]。“通路-靶点”网络指出,芍药苷能同时通过 HRAS、KDR、VEGFA 参与 MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、Rap1 信号通路和黏着斑的调节,即芍药苷可能通过 HRAS、KDR、VEGFA 调节上述通路实现对系统性硬化症治疗药效作用。

KEGG 通路富集分析结果显示,MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、Rap1 信号通路、黏着斑、脂质和动脉粥样硬化和流体剪切应力和动脉粥样硬化等为当归四逆汤治疗系统性硬化症的关键通路,这些通路主要涉及免疫、血管损伤和细胞外基质等调节。有研究表明,KDR 可以激活 PI3K/Akt 信号通路并调节内皮细胞的增殖过程^[29];VEGFA 通过 KDR 介导激活 MAPK 信号通路从而促进内皮细

胞的迁移^[30]。内皮细胞间连接处的 KDR 蛋白受应力刺激激活后可激活下游的 Akt 和 MAP 激酶并产生 NO, 进而影响系统性硬化症血管损伤病变^[31-32]。Rap1 在 VEGF 诱导的内皮细胞迁移过程中发挥重要的介导作用^[33]。细胞外基质累积是系统性硬化症的主要治病机制, 黏着斑在细胞外基质累积过程中发挥重要作用^[34]; 而受 KDR 介导的信号可以影响内皮细胞的迁移和增殖, 进而影响病情发展^[35-36]。

综上所述, 当归四逆汤可以通过芍药苷、shinpterocarpin、水鬼蕉宾碱等成分作用于多靶点进而调节多条通路发挥对系统性硬化症的治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈明, 向阳. 中药治疗系统性硬化症的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(7): 124-126.
- [2] 李端, 冯志颖, 谭仔龙, 等. 中药复方治疗硬皮病的临床疗效及作用机制研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(8): 72-75.
- [3] 杨雪圆, 闫小宁, 蔡宛灵. 中药治疗硬皮病用药规律的文献分析 [J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(4): 31-34.
- [4] 杨书琦, 张慧芳, 宋书林, 等. 系统性硬化症发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(1): 17-21.
- [5] Chuang L, Lin J, E Furst D, et al. Systemic and localized scleroderma [J]. *Clin Dermatol*, 2006, 24(5): 374-392.
- [6] Wu M, Schneider D J, Mayer M D, et al. Osteopontin in systemic sclerosis and its role in dermal fibrosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(6): 1605-1614.
- [7] 吴靖雨, 熊文倩, 陈琳琦, 等. 硬皮病中西医结合治疗的研究发展 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(2): 452-458.
- [8] 李颖, 周平安. 周平安教授治疗硬皮病经验浅析 [J]. 新中医, 2012, 44(3): 154-156.
- [9] 冷启宁, 温娟, 李庆亮, 等. 当归四逆汤药理研究及临床应用新进展 [J]. 中国临床研究, 2015, 7(36): 108-110.
- [10] 郑华, 苏志恒. 当归四逆汤的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(1): 40-43.
- [11] 朴勇洙, 张岩, 齐明明. 当归四逆汤治疗系统性硬化症的疗效及对生存质量的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(27): 2982-2984.
- [12] 朴勇洙, 于洋洋. 当归四逆汤对系统性硬化病患者抗核抗体及抗 Scl-70 抗体影响的研究 [J]. 中医药导报, 2017, 23(13): 93-95.
- [13] 熊俊闯. 当归四逆汤对硬皮病小鼠循环血中 AECA、vWF、TXB2、6-keto-PGF1 α 含量的影响 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.
- [14] 阮叶萍, 金铭. 当归四逆汤镇痛作用实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(10): 1108-1111.
- [15] 王明慧, 马飞, 田崇姬, 等. 当归四逆汤化学成分、药理作用和临床应用的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 991-1001.
- [16] 王振亮, 宋建平, 张晓艳, 等. 当归四逆汤对 BLAB/c 硬皮病小鼠皮肤组织中 CTGF, TGF- β 含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 179-182.
- [17] 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.
- [18] Liu Y, Grimm M, Dai W T, et al. CB-Dock: A web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 138-144.
- [19] Wu Q, Hu Y. Systematic evaluation of the mechanisms of mulberry leaf (*Morus alba* Linne) acting on diabetes based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2021, 24(5): 668-682.
- [20] Zhang L, Zheng D, Yan Y, et al. Myeloid cell-specific deletion of Capns1 prevents macrophage polarization toward the M1 phenotype and reduces interstitial lung disease in the bleomycin model of systemic sclerosis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 148.
- [21] Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(24): 9517-9522.
- [22] Jinnin M, Makino T, Kajihara I, et al. Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162(4): 751-758.
- [23] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 549-560.
- [24] Ronkina N, Gaestel M. MAPK-activated protein kinases: Servant of partner [J]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 505-540.
- [25] Di Paola R, Crisafulli C, Mazzon E, et al. Effect of PD98059, a selective MAPK3/MAPK1 inhibitor, on acute lung injury in mice [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009, 22(4): 937-950.
- [26] Shen L, Yu Y, Jiang M, et al. Alteration of the m6Amethylation landscape in a mouse model of scleroderma [J]. *Epigenomics*, 2021, 13(23): 1867-1883.
- [27] 李娜, 赵颖, 张晓杰, 等. 芍药苷对银屑病小鼠皮损的治疗作用及机制探讨 [J]. 山东医药, 2018, 58(18): 33-35.
- [28] 傅保娣, 刘玉娥, 张岫美, 等. 芍药苷对缺氧损伤内皮细胞产生 NO、eNOS 和细胞粘附分子的影响 [J]. 药物分析杂志, 2007(4): 555-557.

- [29] Wang F, Yamauchi M, Muramatsu M, *et al.* RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9097-9106.
- [30] Wu L W, Mayo D, Dunbar J D, *et al.* Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 5096-5103.
- [31] Conway D, Schwartz M A. Lessons from the endothelial junctional mechanosensory complex [J]. *F1000 Biol Rep*, 2012, 4: 1.
- [32] Pagkopoulos E, Soulaïdopoulos S, Katsiki N, *et al.* The role of asymmetric dimethylarginine in endothelial dysfunction and abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: Results from a pilot study [J]. *Clin Rheumatol*, 2023, 42(4): 1077-1085.
- [33] Stoleto V K, Terman B I. Bmx is a downstream Rap1 effector in VEGF-induced endothelial cell activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(1): 70-75.
- [34] Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, *et al.* Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(5): 886-892.
- [35] Kanno S, Oda N, Abe M, *et al.* Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells [J]. *Oncogene*, 2000, 19(17): 2138-2146.
- [36] Trollmann R, Amann K, Schoof E, *et al.* Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system *in vitro* and *in vivo*: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(2): 517-523.

【责任编辑 高源】