

基于网络药理学及分子对接技术探讨丹参治疗缺血性肠病的作用机制

陈淑妮¹, 何海滨¹, 雷孝文¹, 何国新¹, 王春鹏¹, 李峰^{1,2*}

1. 北京中医药大学深圳医院(龙岗), 广东 深圳 518100

2. 北京中医药大学, 北京 100029

摘要: **目的** 采用网络药理学及分子对接技术探讨丹参治疗缺血性肠病的作用机制。**方法** 运用 TCMSP 数据库获得丹参的有效成分和预测靶点, 并在 UniProt 数据库中进行标准化处理, 从而获得相应的药物靶点基因。利用 GeneCards 和 OMIM 数据库获得缺血性肠病的靶点基因。将药物的靶点基因及疾病的靶点基因导入韦恩图制作分析平台获得丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点。利用 Cytoscape3.8.2 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。将潜在的作用靶点导入 STRING 数据库进行蛋白质相互作用(PPI)网络分析。运用 Metascape 数据库对潜在作用靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。最后运用 AutoDock vina、PyMOL 等软件对丹参有效化学成分和关键的靶点基因进行对接验证。**结果** 共获得了 65 个丹参的活性化合物成分, 139 个丹参的作用靶点基因和 2 799 个缺血性肠病的作用靶点基因, 其中丹参与缺血性肠病共同作用靶点为 84 个。构建网络发现木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 等为丹参作用于缺血性肠病的主要化合物成分。通过 PPI 网络分析发现蛋白激酶 B1 (Akt1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、雌激素受体 1 (ESR1)、原癌基因 (JUN) 和溶质载体家族 6 成员 3 (SLC6A3) 等为关键的靶点基因。富集结果显示细胞对氮化合物的反应、细胞对有机环化化合物的反应和细胞对有机氮化合物的反应等生物学过程调控脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、环鸟苷酸-蛋白激酶 G (cGMP-PKG) 信号通路、TNF 信号通路等信号通路对缺血性肠病起到治疗作用。分子对接的结果表明丹参的有效化学成分和缺血性肠病的靶点基因具有良好的结合性。**结论** 丹参可能通过木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 等有效成分, 作用于 Akt1、TNF 和 ESR1 等核心靶点基因, 调控脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化等信号通路对缺血性肠病起到治疗作用。

关键词: 丹参; 缺血性肠病; 网络药理学; 分子对接; 木犀草素; 丹参酮 II_A; 新隐丹参酮 II

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)09-2243-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.006

Mechanism of action of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of ischemic enteropathy based on network pharmacology and molecular docking technology

CHEN Shuni¹, HE Haibin¹, LEI Xiaowen¹, HE Guoxin¹, WANG Chunpeng¹, LI Feng^{1,2}

1. Shenzhen Hospital (Longgang), Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518100, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Objective: To investigate the mechanism of action of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of ischemic enteropathy by using network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active components and predicted targets of *Salvia miltiorrhiza* were obtained by TCMSP database, and standardized in UniProt database to obtain the corresponding drug target genes. Target genes of ischemic bowel disease were obtained by GeneCards and OMIM databases. Drug target genes and disease target genes were introduced into the Venn diagram analysis platform to obtain potential targets of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of ischemic bowel disease. Build a “Drug - ingredient - target - disease” network using Cytoscape3.8.2 software. Potential targets were imported into STRING database for protein interaction (PPI) network analysis. Metascape database was used for GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis for potential targets. Finally, AutoDock vina, PyMOL and other software were used to analyze and verify the effective chemical components and key target genes of *Salvia miltiorrhiza*. **Results** A total of 65 active compounds of

收稿日期: 2024-07-15

基金项目: 深圳市龙岗区经济与科技发展专项资金医疗卫生科技计划项目 (LGWJ2021-75)

作者简介: 陈淑妮, 主治医师, 研究方向为中医药防治消化疾病。E-mail: csnsyn@163.com

*通信作者: 李峰, 研究方向为中医药防治消化疾病。E-mail: 1756277075@qq.com

Salvia miltiorrhiza, 139 target genes of *Salvia miltiorrhiza* and 2 799 target genes of ischemic bowel disease were obtained, among which 84 target genes of *Salvia miltiorrhiza* and ischemic bowel disease were combined. Network construction revealed that luteolin, tanshinone II_A, and neocryptotanshinone II were the main compound components of *Salvia miltiorrhiza* acting in ischemic bowel disease. *Akt1*, *TNF*, *ESR1*, *JUN*, and *SLC6A3* were identified as key target genes by PPI network analysis. The enrichment results showed that biological processes such as cellular response to nitrogen compounds, cellular response to organocyclic compounds, and cellular response to organic nitrogen compounds regulated lipids and atherosclerosis, fluid shear stress and atherosclerosis, PI3K/Akt signaling pathway, cGMP PKG signaling pathway, and TNF signaling pathway signaling pathways play a therapeutic role in ischemic bowel disease. The results of molecular docking indicated that the active chemical components of *Salvia miltiorrhiza* and the target genes of ischemic enteropathy have good binding. **Conclusion** *Salvia miltiorrhiza* may act on core target genes such as *Akt1*, *TNF*, and *ESR1* to regulate lipids and atherosclerosis, fluid shear stress and atherosclerosis, through the active ingredients such as luteolin, tanshinone II_A and neocryptotanshinone II and other signaling pathways play a therapeutic role in ischemic bowel disease.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; ischemic enteropathy; network pharmacology; molecular docking; luteolin; tanshinone II_A; neocryptotanshinone II

缺血性肠病是由于肠壁的含氧血液供应不足引起的最常见的胃肠道血管性疾病。其症状有突发的严重剧烈腹痛,通常伴有恶心和呕吐、餐后上腹或中腹剧烈疼痛、害怕进食、非血性或血性腹泻及慢性体质量减轻等^[1]。缺血性肠病常见的非医源性危险因素有肠系膜血管粥样硬化、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病、肠易激综合征、镰状细胞微血管阻塞危机、全身性或感染性血管炎、纤维肌肉发育不良、辐射和淀粉样变性等^[2-4]。医源性发病因素可能是手术后血管移位或某些药物的使用^[5-6]。虽然缺血性肠病的发病率并不算高,但是如果未被得到及时的诊断和治疗,将会导致许多的并发症,甚至会提高其死亡率。因此寻找新的治疗缺血性肠病的方法是很有必要的。

中医药具有悠久的历史,在治疗缺血性肠病方面有着独特的优势。丹参属活血化瘀类中药的一种,具有活血、通经络、止痛等功效^[7]。有研究表明其不仅有降低血液黏稠度,改善血流动力学,加速纤维蛋白降解的作用,还有抗氧化、抗感染等作用^[8-10]。常见的丹参制剂有丹参注射液、丹红注射液和复方丹参滴丸等。有临床研究表明丹参制剂辅助治疗缺血性肠病,能改善患者的凝血状态,减少患者肠道供血及肠道功能的恢复时间,且能有效的提高患者治疗的有效率和降低患者不良反应的发生率^[11-14]。对于丹参治疗缺血性肠病的机制还不明确,需要进一步探索。

网络药理学是由化学信息学、生物信息学、网络生物学和药理学等学科知识组合而来,其是一种有效的阐明药物作用机制的方法,为中医药治疗疾病机制的研究提供了一种新的方法^[15-16]。分子对接是通过受体的特征以及受体和药物分子之间的相互

作用方式来预测药物与受体之间结合的亲和力,是计算机辅助药物研究领域的一项重要技术。本研究将采用网络药理学及分子对接技术探讨丹参治疗缺血性肠病的作用机制。从而为丹参治疗缺血性肠病有效成分的筛选提供依据,为缺血性肠病的治疗提供新的思路。

1 方法

1.1 丹参活性化合物及相关靶点的收集与筛选

本研究采用 TCMSP 数据库 (<https://tcmssp.com/tcmssp.php>) 检索丹参的活性化合物,将筛选条件设定为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$,类药性 (DL) ≥ 0.18 获得中药的活性化合物及相关靶点。并将筛选后的靶点信息在 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中进行标准化处理,获得相应的药物靶点基因。

1.2 缺血性肠病的靶点基因收集

在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://www.omim.org>) 数据库中以 “ischemic bowel disease” 为关键词,获得疾病的相关靶点基因,去除重复值,获得与缺血性肠病相关的最终靶点基因。

1.3 丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点的获得

将所获得的丹参所用靶点基因及缺血性肠病的相关靶点基因导入微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制韦恩图,取交集从而获得丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点。

1.4 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建

将丹参、中药活性成分、丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点以及缺血性肠病导入 Cytoscape 3.8.0 软件,构建 “药物-成分-靶点-疾病” 网络。网络中的节点代表药物、成分、靶点或疾病,

而节点之间的边则代表两者之间相互作用。节点的 degree 值由它连接的边数所决定, degree 值越大节点越重要。

1.5 丹参治疗缺血性肠病潜在作用靶点的蛋白相互作用 (PPI) 网络图

STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 是预测蛋白质相互作用的数据库。将丹参治疗缺血性肠病潜在作用靶点导入 STRING 数据库, 设定最小相互作用阈值 ≥ 0.4 , 物种为人, 得到 PPI 网络。将获得的 PPI 网络结果以 TSV 格式导出, 再用 Cytoscape 3.8.2 软件对其进行可视化。计算 PPI 网络中每个节点的 degree 值, 该值的大小由节点连接的边数决定。节点的 degree 值越大, 表明该节点越重要。

1.6 丹参治疗缺血性肠病作用靶点的基因本体 (GO) 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

Metascape 数据库是整合了 GO、KEGG、UniProt、DrugBank 等数据库的基因功能注释分析工具。将丹参治疗缺血性肠病的作用靶点导入 Metascape 数据库, 设置 “inputasspecies” 和 “analysisasspecies” 为 “homosapiens”, 阈值为 $P < 0.01$, 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分

析。其中 GO 功能富集分析包括生物过程、细胞组分及分子功能的分析。将所得的结果导入微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化。

1.7 核心成分与靶点的分子对接

用 AutoDock vina 软件对丹参治疗缺血性肠病的核心成分和靶点进行分子对接。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获得核心成分的 sdf 格式, 再将其导入 ChemBio 3D 软件计算获得 mol2 格式的结构。在 RCSB PDB 数据库 (<https://www.pdbus.org/>) 中下载核心靶点的三维结构, 并用 PyMOL 软件对其进行去除水分子、分离蛋白和小分子处理。在 Autodock 软件中进行加氢荷量计算和对接活性口袋的构建。然后利用 Autodock Vina 软件进行分子对接, 得出核心成分与靶点的结合能。最后在 PyMOL 软件中对结果进行可视化。

2 结果

2.1 丹参潜在活性化合物收集及筛选

在 TCMSP 数据库中共检索到 202 个丹参的化学成分, 筛选条件设定为 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$, 共获得 65 个活性化合物成分, 见表 1。去除无效和重复靶点后, 得到 139 个丹参的有效成分作用靶点基因。利用 Uniprot 数据库对作用靶点的基因名称进行标准化处理。

表 1 丹参的潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of *Salvia miltiorrhiza*

Mol ID	活性成分	相对分子质量	OB/%	DL
MOL007064	przewalskin b	330.46	110.32	0.44
MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxypropionic acid	360.34	109.38	0.35
MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	314.31	88.54	0.26
MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	312.34	75.39	0.46
MOL007058	formyltanshinone	290.28	73.44	0.42
MOL007120	miltionone II	312.39	71.03	0.44
MOL007105	epidanshenspiroketallactone	284.38	68.27	0.31
MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	310.37	65.26	0.45
MOL007130	prolithospermic acid	314.31	64.37	0.31
MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	356.40	62.78	0.4
MOL007068	przewaquinone B	292.30	62.24	0.41
MOL000569	digallate	322.24	61.85	0.26
MOL007081	danshenol B	354.48	57.95	0.56
MOL007082	danshenol A	336.41	56.97	0.52
MOL007069	przewaquinone c	296.34	55.74	0.40
MOL007108	isocryptotanshinone	296.39	54.98	0.39
MOL007125	neocryptotanshinone	314.41	52.49	0.32
MOL007079	tanshinaldehyde	308.35	52.47	0.45

表 1 (续)

Mol ID	活性成分	相对分子质量	OB/%	DL
MOL007088	cryptotanshinone	296.39	52.34	0.40
MOL007094	danshenspiroketallactone	282.36	50.43	0.31
MOL007111	isotanshinone II	294.37	49.92	0.40
MOL007154	tanshinone II _A	294.37	49.89	0.40
MOL007119	miltionone I	312.39	49.68	0.32
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	298.41	49.4	0.29
MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	312.29	48.24	0.31
MOL007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester	628.64	46.69	0.71
MOL007156	tanshinone VI	296.34	45.64	0.30
MOL007141	salvianolic acid g	340.30	45.56	0.61
MOL001942	isoimperatorin	270.30	45.46	0.23
MOL007101	dihydrotanshinone I	278.32	45.04	0.36
MOL007115	manool	304.57	45.04	0.20
MOL007123	miltirone II	272.32	44.95	0.24
MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	310.37	44.93	0.44
MOL001659	poriferasterol	412.77	43.83	0.76
MOL002651	dehydrotanshinone II _A	292.35	43.76	0.40
MOL007077	sclareol	308.56	43.67	0.21
MOL007142	salvianolic acid J	538.49	43.38	0.72
MOL007152	przewaquinone E	312.34	42.85	0.45
MOL007151	tanshindiol B	312.34	42.67	0.45
MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	312.34	41.31	0.45
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	264.34	40.86	0.23
MOL007071	przewaquinone f	312.34	40.31	0.46
MOL002776	baicalin	446.39	40.12	0.75
MOL007118	microstegiol	298.46	39.61	0.28
MOL006824	α -amyrin	426.80	39.51	0.76
MOL007124	neocryptotanshinone II	270.35	39.46	0.23
MOL007093	dan-shexinkum d	336.41	38.88	0.55
MOL007122	miltirone	282.41	38.76	0.25
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	280.34	38.75	0.36
MOL007100	dihydrotanshinlactone	266.31	38.68	0.32
MOL007063	przewalskin a	398.49	37.11	0.65
MOL007061	methylenetanshinquinone	278.32	37.07	0.36
MOL001771	poriferast-5-en-3 β -ol	414.79	36.91	0.75
MOL007121	miltipolone	300.43	36.56	0.37
MOL000006	luteolin	286.25	36.16	0.25
MOL002222	sugiol	300.48	36.11	0.28
MOL007107	(4bS,8aS)-4b,8,8-trimethyl-2-propan-2-yl-5,6,7,8a,9,10-hexahydrophenanthren-3-ol	286.50	36.07	0.25
MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	280.29	34.72	0.37
MOL007149	(4aS,10aS)-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-propan-2-yl-3,4,10,10a-tetrahydro-2H-phenanthren-9-one	300.48	34.49	0.28
MOL007049	4-methylenemiltirone	266.36	34.35	0.23
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	298.41	33.77	0.29
MOL007143	salvilenone I	270.40	32.43	0.23
MOL007059	3- β -hydroxymethylenetanshinquinone	294.32	32.16	0.41
MOL007145	salviolone	268.38	31.72	0.24
MOL007085	salvilenone	292.40	30.38	0.38

2.2 丹参有效成分治疗缺血性肠病的潜在作用靶点的预测

从 Gene Cards 数据库共获得缺血性肠病的 2 325 个靶点, 结合 OMIM 数据库的 547 个缺血性肠病的

作用靶点, 去除重复值, 共获得 2 799 个作用靶点。将筛选出的丹参有效成分靶点与缺血性肠病的作用靶点取交集, 绘制韦恩图, 得到丹参有效成分与缺血性肠病共同作用靶点 84 个, 见图 1。

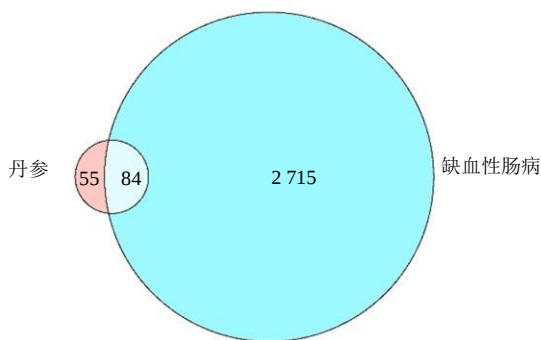


图 1 丹参与缺血性肠病交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of *Salvia miltiorrhiza* and ischemic bowel disease

2.3 “药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”关键靶点网络的构建分析

将丹参、活性成分、丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点导入 Cytoscape3.8.2 软件, 构建“药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”网络。得到的网络中有 144 个节点和 832 条边。其中 degree 值排名前 10 位的活性成分为木犀草素、二氢丹参内酯、丹参酮 II_A、4-甲亚基丹参新酮、新隐丹参酮 II、鼠尾草酚酮、2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮、隐丹参酮、异隐丹参酮、四氢丹参酮 I, 见图 2。

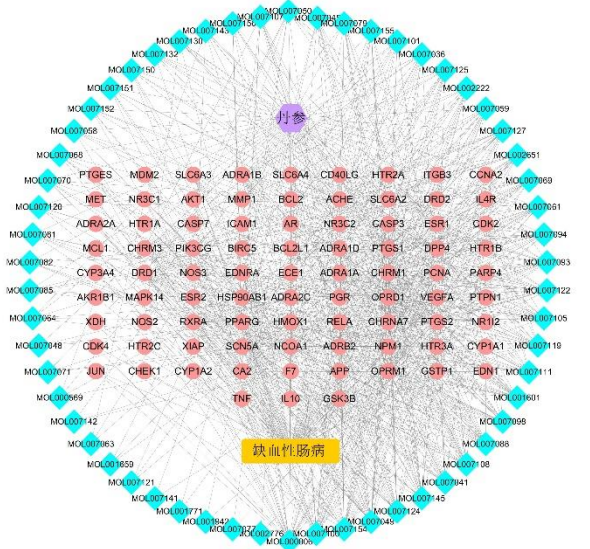


图 2 “药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”关键靶点网络图

Fig. 2 Key target network diagram of “drug - ingredient - target - disease”

2.4 关键靶点基因的 PPI 网络分析

运用 STRING 数据库构建 PPI 网络, 结果显示网络中包含 83 个节点和 701 条边。然后应用 Cytoscape 3.8.2 软件对其进行可视化, 见图 3。选取

度中心性、紧密中心性及介数中心性均较大的 6 个蛋白为核心靶点蛋白即蛋白激酶 B1 (Akt1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、雌激素受体 1 (ESR1)、原癌基因 (JUN)、溶质载体家族 6 成员 3 (SLC6A3) 和溶质载体家族 6 成员 4 (SLC6A4)。

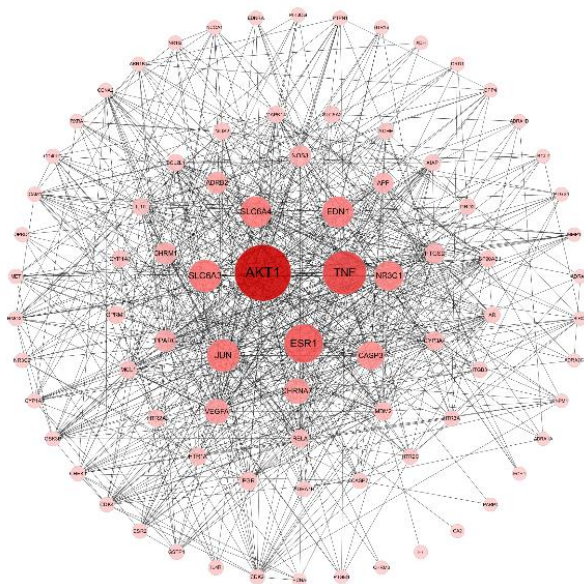


图 3 关键靶点基因的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of key target genes

2.5 丹参治疗缺血性肠病作用靶点的 GO 分析

将 84 个作用靶点导入 Metascape 数据库进行 GO 富集分析。 $P < 0.05$ 的 GO 条目被认为是显著的。将排名前 10 位的条目以功能注释, 绘制气泡图, 见图 4。从 GO 生物过程 (BP) 分析过程中共得到 1 191 个条目, 主要包括细胞对氮化合物的反应、细胞对有机环化合物的反应、细胞对有机氮化合物的反应、对激素的反应、对异种生物刺激的反应、血液循环、循环系统过程、管径调节、血管直径维持和管径调节等; GO 细胞成分 (CC) 分析中共获得了 80 个条目, 主要包括膜筏、膜微域、突触前膜的组成部分、突触前膜的内在组成部分、突触膜、突触前膜等; GO 分子功能 (MF) 分析中, 获得了 139 个条目, 主要有 G 蛋白偶联受体活性、胺结合、核受体活性、蛋白同源二聚化活性、儿茶酚胺结合、蛋白激酶结合、蛋白结构域特异性结合、肽结合、血红素结合和蛋白酶结合等。

2.6 丹参治疗缺血性肠病作用靶点的 KEGG 分析

KEGG 分析得到 152 条通路, 取排名前 20 条通路并绘制气泡图, 见图 5。主要富集的通路有癌症发生途径、化学致癌 - 受体激活、脂质与动脉粥

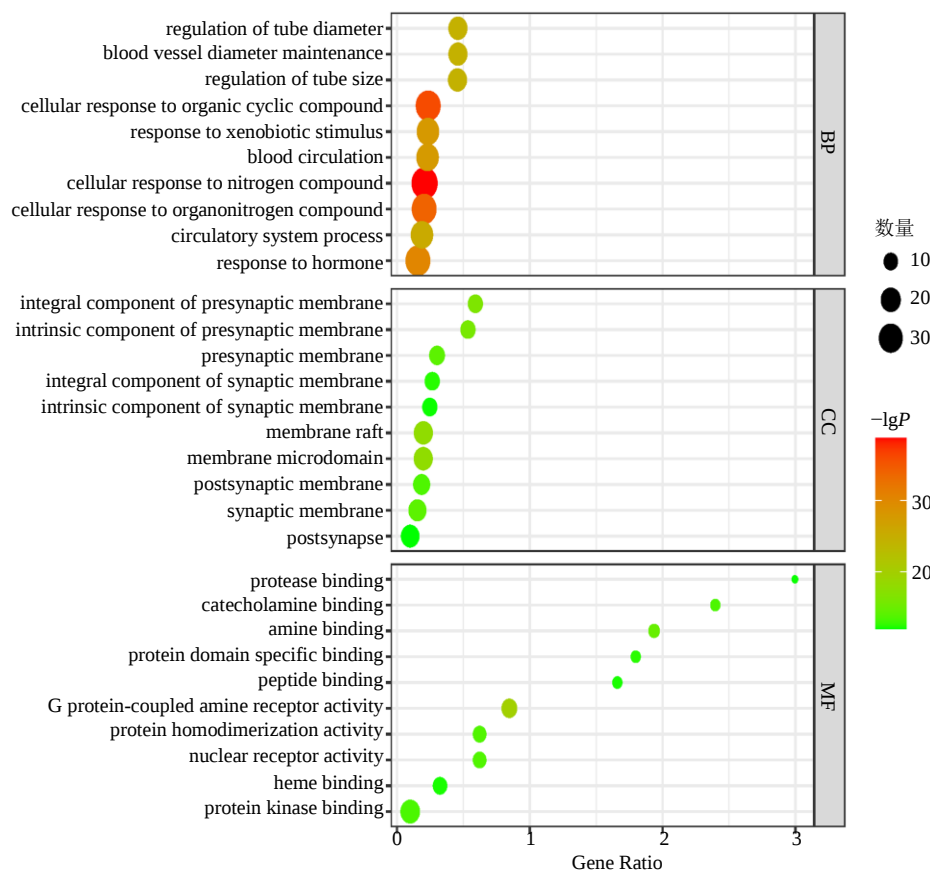


图 4 GO 功能分析

Fig. 4 GO function analysis

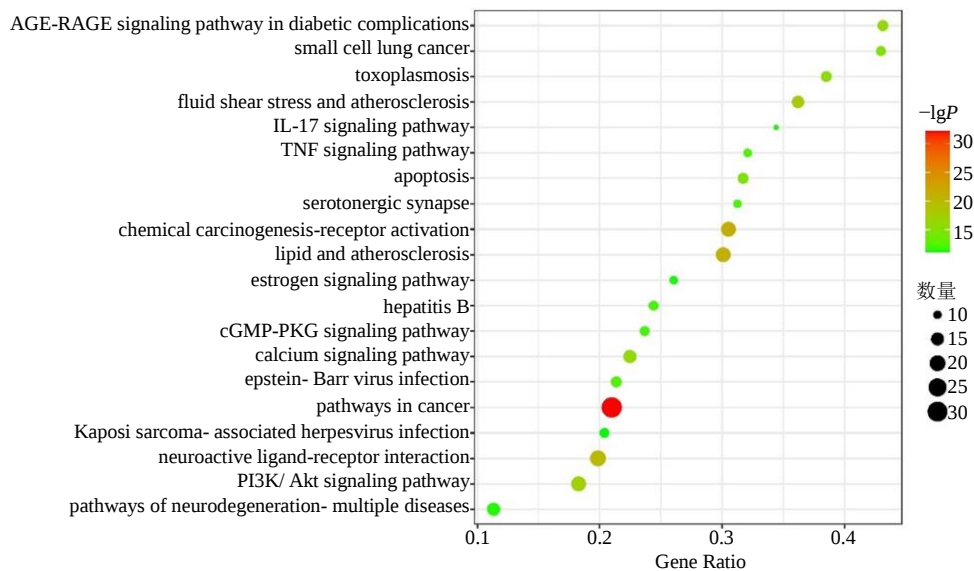


图 5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG channel analysis

样硬化、神经活性配体 - 受体相互作用及流体剪切应力与动脉粥样硬化等，其中与缺血性肠病相关的通路有脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉

粥样硬化、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、环鸟苷酸 - 蛋白激酶 G (cGMP-PKG) 信号通路、TNF 信号通路。

2.7 核心化合物与靶点的分子对接验证

对丹参的核心成分和缺血性肠病的核心靶点进行分子对接,以明确它们之间的相互作用。所筛选出来的核心成分和核心靶点在网络中均具有较高的度中心性和(或)介数中心性。一般认为,结合能 <-5.0 kcal/mol ($1\text{ cal}=4.2\text{ J}$),表明这种成分与核心靶点蛋白结合性较好;结合能 <-7.0 kcal/mol,表明此种物质与核心靶点蛋白有很强的结合活性。对 PPI 分析网络中的核心蛋白 Akt1、TNF、ESR1 与“药物-成分-靶点-疾病”网络中与缺血性肠病治疗相关的核心成分木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 进行分子对接验证。结果显示所筛选出来的核心成分与核心靶点的结合能均 ≤ -6.0 kcal/mol,见表 2。其中木犀草素与 TNF 结合能最低,为 -9.2 kcal/mol,提示丹参核心成分与核心靶点蛋白结合良好,见图 6。

表 2 分子对接结合能

Table 2 Molecular docking binding energy

靶点	结合能/(kcal mol ⁻¹)		
	木犀草素	丹参酮 II _A	新隐丹参酮 II
Akt1	-6.0	-8.3	-6.4
TNF	-9.2	-7.0	-6.6
ESR1	-8.2	-8.5	-6.8

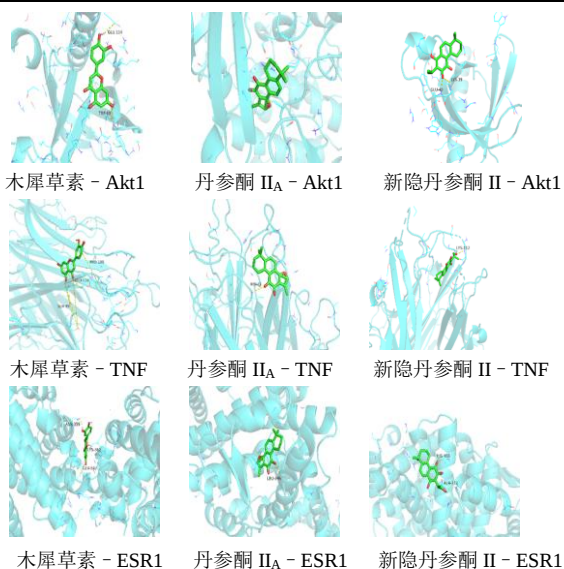


图 6 核心成分与核心靶点的分子对接

Fig. 6 Molecular docking between core components and core targets

3 讨论

缺血性肠病是一项重大的公共卫生挑战,如果未能得到及时的治疗会产生严重的并发症。目前针对

缺血性肠病以对症治疗为主,中医药具有悠久的历史,可为缺血性肠病的治疗提供新的思路。许多随机对照的临床试验研究表明,加用丹参制剂辅助治疗,能显著提高缺血性肠病患者的有效率。本研究通过网络药理学,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络,并对丹参治疗缺血性肠病的潜在作用靶点进行 PPI 分析、GO 分析及 KEGG 分析以明确其作用机制,最后运用分子对接技术进行验证。

本研究通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络并进行分析,结果筛选出的 58 个有效成分对 84 个靶点产生影响。其中木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 在缺血性肠病的治疗中发挥了重要的作用。木犀草素是存在于多种植物中的一种天然黄酮类化合物。有研究表明,其具有抗肿瘤、抗氧化和抗炎等特性^[17]。木犀草素可显著抑制脂多糖诱导的白细胞黏附、过氧化氢产生和肥大细胞脱颗粒,增加肠道微循环血流,改善肠系膜动脉和小肠的病理变化^[18]。同时也有研究表明,木犀草素可直接作用于血管内皮细胞,刺激一氧化氮依赖性血管扩张,从而对血管起到保护作用^[19]。丹参酮 II_A 是丹参的主要成分之一,具有很好的脂溶性。有研究表明,丹参酮 II_A 具有很好的抗炎作用,其作用机制是通过减少白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等来介导的^[20],也可部分归因于其调节 TNF 受体相关因子 (TRAF) 2/3/6 与 Toll 样受体 (TLR) 信号级联的能力^[21]。此外丹参酮 II_A 不仅可通过调节血管生成素/酪氨酸蛋白激酶-2 (Ang2/Tie2) 信号通路使肿瘤和缺血性损伤中的血管正常化,还可通过抑制氧化低密度脂蛋白的产生来显著改善血管的损伤^[22-23];也可通过调节 TLR4/髓样分化因子 88 (MyD88)/核因子- κ B (NF- κ B) 信号级联对动脉粥样硬化斑块发挥抗炎和免疫调节作用^[24]。Li 等^[25]通过网络药理学及试验验证推测出新隐丹参酮 II 是作用于炎症、脂肪酸氧化、TNF 产生和细胞增殖等途径的重要靶点。有研究表明,新隐丹参酮 II 可抑制 NF- κ B 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 信号通路来发挥其抗炎作用^[26]。丹参中木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 等通过抗炎、抗氧化、降低动脉粥样硬化、促进血管扩张、改善肠系膜动脉及小肠病理等作用对缺血性肠病起到治疗作用。

对丹参作用于缺血性肠病的 84 个靶点进行 PPI 分析的网络中,排名靠前的包括 Akt1、TNF、ESR1、

JUN、SLC6A3 等。这些都是丹参作用于缺血性肠病的核心蛋白,其中 Akt1、TNF 和 ESR1 与缺血性肠病的治疗密切相关。Akt1 在细胞增殖、迁移、生长和代谢等多种功能中起着重要作用^[27]。有研究表明, Akt 可以通过表达 FLICE 抑制蛋白 (FLIP) 来抑制内皮细胞的凋亡^[28]。此外, Akt 可促进血管内皮生长因子 (VEGF) 的分泌,进一步来介导血管的生成^[29-30]。在调节血管舒缩张力方面, Akt 可通过对 eNOS 磷酸化和活化的影响来增强血管的舒张^[31-32]。特利加压素可通过 PI3K/Akt 通路升高血压并抑制缺血性肠病模型的肠上皮细胞凋亡和巨噬细胞 M1 极化^[33]。TNF 是一种重要的炎性细胞因子,具有免疫调节和促炎作用^[34]。TNF- α 是 TNF 家族成员中的一种,不仅可通过诱导内皮细胞的黏附和趋化因子的合成来介导炎症反应^[35],也可诱导金属蛋白酶的产生,通过中性粒细胞活化参与内皮细胞死亡^[36]。有研究指出,抗 TNF- α 与膜相关的 TNF- α 结合的过程可能是治疗血管炎的一个潜在的靶点^[35,37]。用 TNF- α 抗体预处理可显著减少肠道充血或淤血后再流出后的黏膜凋亡^[38]。ESR1 可以编码雌激素受体 α (ER α)。ER α 对血管炎症和动脉粥样硬化的发生和发展具有深远的影响^[39-40]。雌激素可通过刺激前列环素和一氧化氮的合成和减少血管收缩剂的产生来促进血管舒张,从而对缺血性肠病起到一定的治疗作用^[41]。

通过对丹参治疗缺血性肠病的 84 个作用靶点基因进行 GO 富集分析。结果表明,在丹参治疗缺血性肠病的过程中,所包含的 BP 有细胞对氮化合物的反应,细胞对有机环化化合物的反应,细胞对有机氮化合物的反应,对激素的反应和对异种刺激物的反应等,CC 主要涉及到膜筏,膜微域,突触前膜的组成部分、突触前膜的内在成分和突触膜等,而参与的 MF 方面则主要包括 G 蛋白偶联胺受体活性、胺结合、核受体活性、蛋白质同源二聚化活性和儿茶酚胺结合等。

为了进一步探索丹参治疗缺血性肠病的潜在作用机制,本研究对丹参作用于缺血性肠病的 84 个潜在靶点进行了 KEGG 分析。在排名前 20 位的通路中,与缺血性肠病相关的通路有脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、PI3K/Akt 信号通路等,分别富集了 18 个靶点和 14 个靶点,是治疗缺血性肠病的重要途径。缺血性肠病是由于肠道缺血缺氧所引起的,动脉栓塞是常见的病因,患

者多具有动脉粥样硬化血管疾病病史(如既往心肌梗死和/或心绞痛、充血性心力衰竭、中风或外周血管疾病等)^[42-44]。同时也有研究表明,局部动脉粥样硬化伴或不伴这些动脉的血栓形成可能会导致胃肠道缺血症状^[45]。PI3K/Akt 信号通路富集了 18 个靶点,是一条与磷脂酰肌醇有关的经典信号通路。他汀类药物可通过 PI3K/Akt 依赖性途径诱导内皮细胞一氧化氮合成(eNOS)mRNA 的稳定性和促进 eNOS 活性来起到保护血管的作用^[46]。VEGF 可通过 PI3K/Akt 途径来诱导内皮细胞迁移,从而实现对血管的保护作用^[47-49]。Liu 等^[33]的研究表明 PI3K/Akt 通路可调节缺血性肠病模型的肠上皮细胞的凋亡和巨噬细胞 M1 极化。cGMP-PKG 信号通路富集了 11 个靶点,介导许多 BP,包括调节血管平滑肌细胞的松弛和收缩,抗心脏肥大,抗动脉粥样硬化和抗血管损伤/再狭窄等。有研究表明,动脉粥样硬化患者的新生内膜纤维增生性血管平滑肌细胞中 PKG 免疫反应染色与正常人相比显著减少^[50]。研究发现 cGMP 可通过激活 PKG 来抑制血管平滑肌细胞(VSMC)增殖并调节成纤维增殖表型,完整的一氧化氮(NO)/cGMP-PKG 通路在 VSMC 中发挥抗动脉粥样硬化的作用^[51]。有许多动物试验研究也显示,NO/cGMP 途径的激活可以抑制和逆转动脉粥样硬化病变的发展,改善血管的血流动力学,从而对缺血性肠病模型的肠道微血管起到一定的改善作用^[52-57]。TNF 信号通路富集了 10 个靶点,与炎症反应的介导密切相关。持续激活 TNF 信号通路会导致细胞生长失控,抑制细胞凋亡,促进肿瘤转移和血管生成^[58]。同时, TNF- α 不仅可以介导炎症反应,还可参与内皮细胞死亡,是治疗血管炎的一个潜在的突破点^[33-36];抑制 TNF- α 可减少缺血性肠病肠道充血或淤血后再流出后的黏膜凋亡^[48]。通过分子对接技术,发现丹参的关键活性成分木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 与缺血性肠病的核心靶点蛋白 Akt1、TNF、ESR1 能够成功对接。结合的键能均小于-6.0 kcal/mol,表明这些丹参的关键活性成分与缺血性肠病治疗的核心靶点蛋白具有很强的结合力,丹参从多成分及多靶点治疗缺血性肠病提供了重要的依据。

综上,本研究发现丹参通过多成分作用多靶点对缺血性肠病起到治疗作用,其作用的关键成分是木犀草素、丹参酮 II_A、新隐丹参酮 II 等,作用机制主要与抗炎、抗氧化、降低动脉粥样硬化以及促进

血管扩张等密切相关。这些为研发治疗缺血性肠病新药提供了重要的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Musil F, Kouhout P, Eliáš P, et al. Chronic mesenteric ischemia [J]. *Vnitr Lek*, 2000, 46(7): 418-422.
- [2] Greenwald D A, Brandt L J, Reinus J F. Ischemic bowel disease in the elderly [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2001, 30(2): 445-473.
- [3] Acosta S, Alhadad A, Svensson P, et al. Epidemiology, risk and prognostic factors in mesenteric venous thrombosis [J]. *Br J Surg*, 2008, 95(10):1245-1251.
- [4] Uberti G, Goldblum J R, Allende D S. Ischemic enterocolitis and its differential diagnosis [J]. *Semin Diagn Pathol*, 2014, 31(2): 152-164.
- [5] Vodusek Z, Feuerstadt P, Brandt L J. Review article: The pharmacological causes of colon ischaemia [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 49(1): 51-63.
- [6] Patil P, Panarelli N C. Educational case: Ischemic disorders of the gut in adult patients [J]. *Acad Pathol*, 2019, 6: 2374289519888709.
- [7] Wei X M, Bai X J, Cao P, et al. Bacillus and microalgae biofertilizers improved quality and biomass of *Salvia miltiorrhiza* by altering microbial communities [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(1): 45-56.
- [8] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(2): 609-618.
- [9] Nickavar B, Rezaee J, Nickavar A. Effect-directed analysis for the antioxidant compound in *Salvia verticillata* [J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(1): 241-246.
- [10] Liu X X, Meng J. RETRACTED: Tanshinone II_A ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bronchial epithelium cell line BEAS-2B by down-regulating miR-27a [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 158-164.
- [11] 贾国青, 李春涛. 丹参酮联合前列地尔治疗缺血性肠病患者的疗效及对血清肠脂肪酸结合蛋白与 D-二聚体的影响 [J]. *中国药物经济学*, 2023, 18(4): 62-64.
- [12] 李峰, 胡世平, 薛鸿鹏, 等. 丹参注射液辅助治疗缺血性肠病有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2022, 27(11): 1432-1436.
- [13] 杨波, 黎静, 陈治熙, 等. 丹参注射液辅助治疗缺血性肠病的效果分析 [J]. *北方药学*, 2020, 17(4): 109-110.
- [14] 邵秉政, 姜琦, 徐康, 等. 丹参注射液联合前列地尔对缺血性肠病患者疗效及血浆 D-二聚体的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2018, 46(6): 643-645.
- [15] 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.
- [16] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [17] López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(1): 31-59.
- [18] Su J, Xu H T, Yu J J, et al. Luteolin ameliorates lipopolysaccharide-induced microcirculatory disturbance through inhibiting leukocyte adhesion in rat mesenteric venules [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 33.
- [19] Si H W, Wyeth R P, Liu D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation [J]. *Eur J Nutr*, 2014, 53(1): 269-275.
- [20] Fan G W, Gao X M, Wang H, et al. The anti-inflammatory activities of Tanshinone II_A, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of Inos [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 113(3-5): 275-280.
- [21] Zheng S C, Ren Z Z, Zhang Y L, et al. Anti-inflammatory mechanism research of tanshinone II_A by module-based network analysis [J]. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24(6): 3815-3824.
- [22] Zou W, Qian C, Zhang S, et al. Targeting the Ang2/Tie2 axis with tanshinone II_A elicits vascular normalization in ischemic injury and colon cancer [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7037786.
- [23] Niu X L, Ichimori K, Yang X, et al. Tanshinone II_A inhibits low density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. *Free Radic Res*, 2000, 33(3): 305-312.
- [24] Chen Z, Gao X, Jiao Y, et al. Tanshinone II_A exerts anti-inflammatory and immune-regulating effects on vulnerable atherosclerotic plaque partially via the TLR4/MyD88/NF-κB signal pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 850.
- [25] Li S, Wang N, Hong M, et al. Hepatoprotective effects of a functional formula of three Chinese medicinal herbs: Experimental evidence and network pharmacology-based identification of mechanism of action and potential bioactive components [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 352.
- [26] Wu C H, Zhao W W, Zhang X N, et al. Neocryptotanshinone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by suppression of NF-κB and iNOS signaling pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 323-329.
- [27] Abeyrathna P, Su Y C. The critical role of Akt in cardiovascular function [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 38-48.
- [28] Suhara T, Mano T, Oliveira B E, et al. Phosphatidylinositol

- 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP) [J]. *Circ Res*, 2001, 89(1): 13-19.
- [29] Laughner E, Taghavi P, Chiles K, *et al.* HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(12): 3995-4004.
- [30] Ackah E, Yu J, Zoellner S, *et al.* Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2119-2127.
- [31] Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, *et al.* Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(4): 493-499.
- [32] Scotland R S, Morales-Ruiz M, Chen Y, *et al.* Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion [J]. *Circ Res*, 2002, 90(8): 904-910.
- [33] Liu Z M, Lai H J, Guan X D, *et al.* Terlipressin relieves intestinal and renal injuries induced by acute mesenteric ischemia via PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(17): 2751-2762.
- [34] Yi H Y, Zhang Y, Yang X F, *et al.* Hepatitis B core antigen impairs the polarization while promoting the production of inflammatory cytokines of M2 macrophages via the TLR2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 535.
- [35] Mackay F, Loetscher H, Stueber D, *et al.* Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55 [J]. *J Exp Med*, 1993, 177(5): 1277-1286.
- [36] Aringer M, Smolen J S. SLE-complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: Tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5(4): 172-127.
- [37] Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, *et al.* Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: Comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1248-1257.
- [38] Wu B, Fujise T, Iwakiri R, *et al.* Venous congestion induces mucosal apoptosis via tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death in the rat small intestine [J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39(11): 1056-1062.
- [39] Kassi E, Spilioti E, Nasiri-Ansari N, *et al.* Vascular inflammation and atherosclerosis: The role of estrogen receptors [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(22): 2651-2665.
- [40] Novella S, Heras M, Hermenegildo C, *et al.* Effects of estrogen on vascular inflammation: A matter of timing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 2035-2042.
- [41] Tostes R C, Nigro D, Fortes Z B, *et al.* Effects of estrogen on the vascular system [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36(9): 1143-1158.
- [42] Rhee R Y, Gloviczki P, Mendonca C T, *et al.* Mesenteric venous thrombosis: Still a lethal disease in the 1990s [J]. *J Vasc Surg*, 1994, 20(5): 688-697.
- [43] Reiner L, Jimenez F A, Rodriguez F L. Atherosclerosis in the mesenteric circulation. Observations and correlations with aortic and coronary atherosclerosis [J]. *Am Heart J*, 1963, 66: 200-209.
- [44] Reinus J F, Brandt L J, Boley S J. Ischemic diseases of the bowel [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 1990, 19(2): 319-443.
- [45] Clair D G, Beach J M. Mesenteric ischemia [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(10): 959-668.
- [46] Walter D H, Zeiher A M, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells [J]. *Coron Artery Dis*, 2004, 15(5): 235-242.
- [47] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals [J]. *Nat Med*, 2000, 6(9): 1004-1010.
- [48] Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, *et al.* Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt [J]. *Circ Res*, 2000, 86(8): 892-896.
- [49] Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher A M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration [J]. *FEBS Lett*, 2000, 477(3): 258-262.
- [50] Anderson P G, Boerth N J, Liu M, *et al.* Cyclic GMP-dependent protein kinase expression in coronary arterial smooth muscle in response to balloon catheter injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(10): 2192-2197.
- [51] Lincoln T M, Wu X, Sellak H, *et al.* Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 356-367.
- [52] Cayatte A J, Palacino J J, Horten K, *et al.* Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(5): 753-759.

- [53] McNamara D B, Bedi B, Aurora H, *et al.* L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 193(1): 291-296.
- [54] Böger R H, Bode-Böger S M, Brandes R P, *et al.* Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin [J]. *Circulation*, 1997, 96(4): 1282-1290.
- [55] Napoli C, Ackah E, De Nigris F, *et al.* Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epitopes, and atherogenesis in hypercholesterolemic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(19): 12467-12470.
- [56] Thakur N K, Hayashi T, Sumi D, *et al.* Anti-atherosclerotic effect of beta-blocker with nitric oxide-releasing action on the severe atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(2): 298-309.
- [57] de Berrazueta J R, Sampedro I, Garcia-Unzueta M T, *et al.* Effect of transdermal nitroglycerin on inflammatory mediators in patients with peripheral atherosclerotic vascular disease [J]. *Am Heart J*, 2003, 146(4): E14.
- [58] 赵轶峰. miR-433 靶向 JNK1 促进细胞凋亡抑制胃癌细胞增殖和迁移的实验研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2019.

【责任编辑 高源】