

葛根主要活性成分及作用机制的网络药理学研究

郭丽娜, 王单单, 裴媛, 王瑞*, 陈雪平, 田会东, 张锐

漯河市中心医院 药学部, 河南 漯河 462300

摘要: 目的 采用网络药理学的方法和思路研究葛根, 探讨葛根成分-靶点、成分-疾病、基因-通路和基因-疾病的关联性, 揭示其主要活性成分和药理作用机制。方法 针对葛根中的活性成分, 根据PubMed、中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库中获得葛根的化学成分和相关作用靶点, 构建“成分-靶点”网络; 运用UniProt和CTD数据库提取作用靶点的基因名称、信号通路、心血管疾病相关的基因和靶点数据进行富集分析。结果 共获得刺芒柄花素、葛根素等10个主要活性成分; 这些成分可作用于112个靶点, 其主要靶点有PTGS2、PTGS1、HSP90AB1等, 这些靶点与肿瘤、高血压、糖尿病等436种疾病相关, 涵盖肿瘤、心脑血管疾病等33大类疾病。葛根主要活性成分作用于心血管疾病的有48个靶点, 这些靶点参与肿瘤、高血压等多种生理及病理的生物学过程, 如肿瘤坏死因子(TNF)等相关靶点, 说明葛根是通过多成分、多靶点的协调作用发挥治疗疾病的作用。结论 葛根具有抗肿瘤、降血压、降血脂等生物活性, 具有较好的应用价值, 为接下来的药效试验研究提供科学依据。

关键词: 葛根; 网络药理学; 活性成分; 作用机制; 心血管疾病

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)09-1741-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.006

Investigating main components and action mechanism of *Pueraria lobata* based on pharmacology network

GUO Lina, WANG Dandan, PEI Yuan, WANG Rui, CHEN Xueping, TIAN Huidong, ZHANG Rui

Pharmacy Department of Luohe Central Hospital, Luohe 462300, China

Abstract: Objective To study the *Pueraria lobata* by system network pharmacology method, investigate the relations between main components-targets, targets-diseases and by analyzing the relationship of compounds-targets-gene-diseases, and reveal the multidimensional action pharmacology mechanism of *Pueraria lobata*. **Methods** The components of *Pueraria lobata* action targets and were obtained from TCMSP database and PubMed, and The components with OB $\geq$ 20% and DL $\geq$ 0.18 were the main active. The gene names of the targets, the pathways and corresponding diseases related with the targets were extracted from Uniprot database and CTD analysis platform online, respectively. At last, the components-targets, targets-diseases. **Result** The analysis of several networks pharmacological maps showed that The 10 active components were obtained, such as formononetin, puerarin, daidzein-4', 7-diglucoside, beta-sitosterol, 3'-methoxydaidzein, daidzein, daidzin, ononin. There were 112 targets related with the 10 active components, and the main targets were PTGS2, PTGS1, HSP90AB1 and so on. Those targets were related with 436 diseases including cancer, hypertension, diabetes mellitus, containing 33 kinds of diseases such as cancer, cardiovascular disease and so on. The main active components of *Pueraria lobata* have 48 targets acting on Cardiovascular disease. Those targets involved in various physiological and pathological processes such as cancer, Hypertension, Brain Ischemia, and inflammatory reaction in body, indicating that *Pueraria lobata* has multiple components and targets providing synergistic effects in the treatment of diseases. **Conclusion** *Pueraria lobata* has anti-cancer, lower blood pressure, and lower blood lipid activities, and could be used for treating cancer, cardiovascular disease, diabetes and so on, suggesting that *Pueraria lobata* has better application prospects.

Key words: *Pueraria lobata*; pharmacology network; active components; cardiovascular disease; action mechanism

网络药理学是在系统生物学和计算机技术的基础上发展起来的, 融合生物信息学和药理学的知识, 通过构建“成分-靶点-基因-疾病”网络, 综合分析药物对机体的作用及影响, 揭示多成分、多靶点

收稿日期: 2018-11-09

第一作者: 郭丽娜, 硕士, 药师, 从事个体化用药工作。Tel: 0395-3356189 E-mail: gngn2010@163.com

*通信作者: 王瑞, 硕士, 主任药师, 从事中药制剂研发工作。Tel: 0395-3356189 E-mail: yaoxuebu116@163.com

作用于机体的机制^[1]。近年来,随着生物信息学的迅速发展,网络药理学在预测和辨识中药活性成分、作用靶点、相关疾病及药理作用机制方面发挥了举足轻重的作用,已经形成了一系列数据库,如TCMSP、CTD、UniProt等数据库。中药及其复方化学成分复杂,具有多成分、多靶点发挥协同作用,表现出整体治疗的优势,克服了西药针对单靶点药效差的不足。葛根是豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 的干燥根,是我国重要的传统中药之一,具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻的功效^[2]。研究表明葛根的化学成分主要有4类,异黄酮类、三萜类、香豆素类、生物碱类,具有扩张冠状动脉、降血压、降血脂、减少心肌耗氧量等生物活性,临床上广泛用于治疗糖尿病^[3-4]。由于葛根成分复杂,其治疗心血管疾病的主要物质基础和分子机制尚不清楚。因此,本研究通过TCMSP等数据库,采用网络药理学的方法对葛根的主要活性成分进行筛选,并综合分析活性成分的作用靶点、相关生物信号通路和疾病,研究了葛根治疗心血管疾病的主要物质基础和分子机制,为葛根的进一步开发应用提供数据支撑。

1 方法

1.1 筛选活性成分、相关疾病及作用靶点

从中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库获得葛根的化学成分18个。把口服生物利用度(OB)≥20%和药物相似性(DL)≥0.18作为筛选葛根活性成分的条件,结合文献报道的葛根的主要有效成分,共获得10个活性成分。共获得对应的作用靶点112个,相关疾病231种,为构建“成分-靶点”和“成分-疾病”网络图提供基础数据。

1.2 获得心血管疾病相关的靶点

在CTD数据库中输入cardiovascular disease“心血管类疾病”检索,得到心血管类疾病相关的基因2 758 470个,通过实验验证的相关基因有2 687个,选择已经由实验证实且相关性较高的基因有2 360个,包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、内皮素-1(EDN-1)等,主要涉及到心律失常、高血压、脑梗死、再灌注损伤等20种心血管疾病,见表1。

1.3 “活性成分-靶点”网络图构建和分析

利用Cytoscape 3.6.1构建葛根“活性成分-靶点”的网络图,用网络拓扑学分析网络图的特征,并研究其主要活性成分与作用靶点之间的关系;构

表1 与心血管疾病关联性较高的基因统计
Table 1 Gene statistics with high association with cardiovascular diseases

心血管相关疾病	相关基因数
心肌缺血(Myocardial Ischemia)	486
心肌疾病(Cardiomyopathies)	339
心律失常(Arrhythmias)	270
高血压(Hypertension)	206
心脏肥大(Cardiomegaly)	170
再灌注损伤(Reperfusion Injury)	164
脑梗塞(Brain Ischemia)	110
心力衰竭(Heart Failure)	99
中风(Stroke)	95
心肌梗死(Myocardial infarction)	82
血栓(Thrombosis)	64
低血压(Hypotension)	50
动脉粥样硬化(Atherosclerosis)	49
心动过速(Tachycardia)	39
复极延迟综合征(Long QT Syndrome)	28
脑溢血(Cerebral Hemorrhage)	23
心室功能障碍(Ventricular Dysfunction)	18
心动过缓(Bradycardia)	17
尖端扭折(Torsades de Pointes)	3

建“靶点-信号通路”网络图,研究靶点与信号通路的相互作用关系;构建“靶点-疾病”网络图,分析靶点与疾病的相互作用关系。运用Cytoscape 3.6.1的Network Analyzer插件分析以上网络图研究葛根活性成分、作用靶点、信号通路和相关疾病的相互作用关系,寻找其主要活性成分作用于心血管疾病的相关靶点。

2 结果

2.1 葛根活性成分-靶点-疾病信息统计

以OB≥20%和DL≥0.18作为筛选葛根活性成分的条件获得7个主要活性成分,如刺芒柄花素、葛根素、大豆苷元-4',7-二葡萄糖苷、β-谷甾醇、3'-甲氧基大豆苷元等。大豆苷元、大豆苷和芒柄花苷不符合活性成分的筛选条件,但文献报道其药理活性较好,因此本研究也把这3种成分作为有效成分进一步分析^[2]。共获得葛根的主要活性成分10个,见表2。表2显示了活性成分相关的靶点数和疾病数,其中作用靶点数和相关疾病数量最多是刺芒柄花素,3'-甲氧基大豆苷元、葛根素、大豆苷元等作用靶点和相关疾病相对较多,作用靶点和相关疾病最少的为大豆苷元-4',7-二葡萄糖苷。多个活性成分通过多个靶点发挥协同作用治疗相关疾病,有些成分的

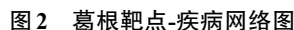


Fig. 2 Target-disease network of *Pueraria lobata*

“心血管疾病-靶点”网络模型见图3,通过CTD在线数据库筛选的通过实验验证的2360个基因进行关联性分析后发现TNF、AGT、SOD2、IL6、IL1B、NOS2、ICAM1、NOS3、NPPA、TNNT2、EDN1、ACE、CCL2、MMP9、F5出现的频率相对较高,主要关系

2.5 葛根信号通路富集分析

通过CTD在线分析平台分析与靶点有关的生物信号通路,通过Cytoscape 3.6.1构建“靶点-生物通路”网络图,见图4。“靶点-生物通路”网络图包含82个节点(60个靶点和22条生物信号通路)和254条线,其菱形代表生物信号通路,V形代表相关靶点,线代表活性成分与相关靶点的关系。其度值较

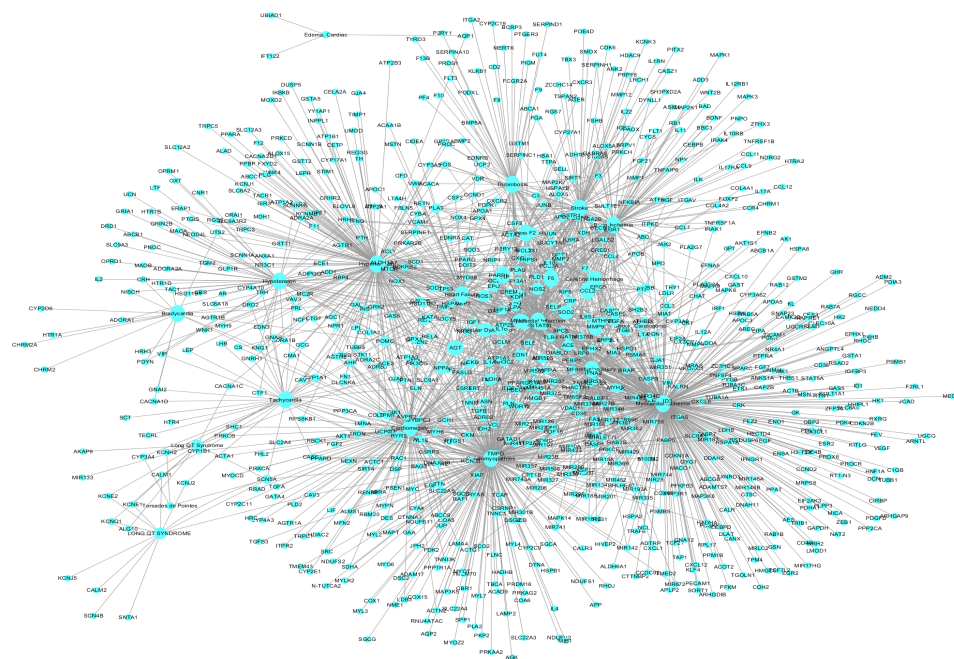


图3 葛根基因-疾病网络模型图

Fig. 3 Gene-disease network model of *Pueraria lobata*

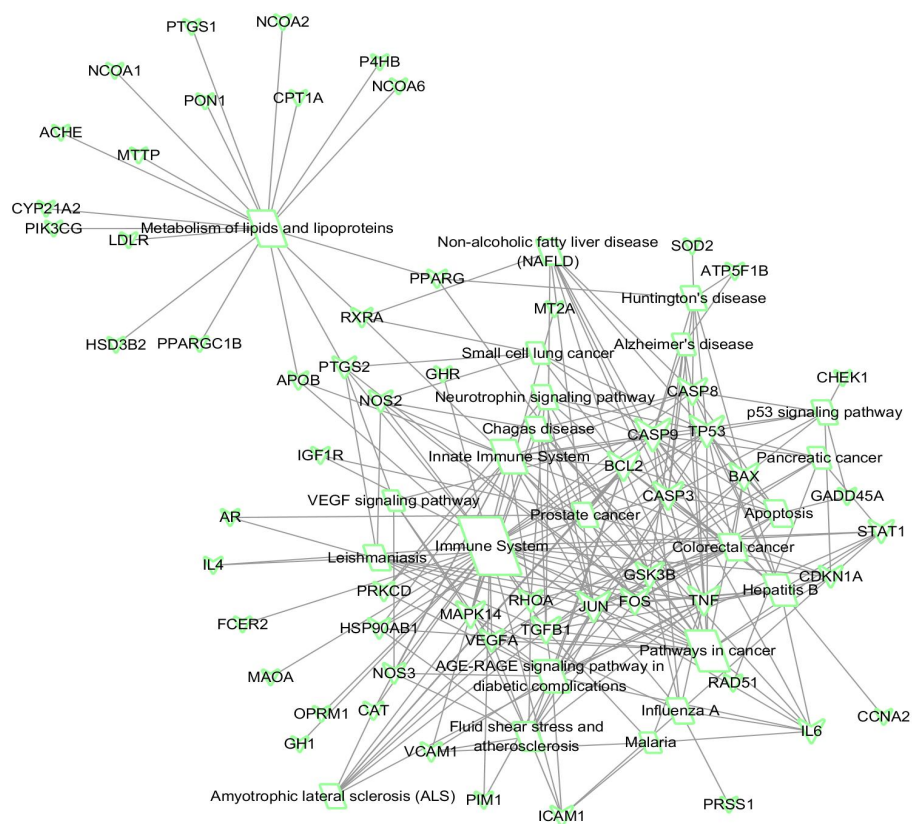


图4 葛根靶点-生物通路网络图

Fig. 4 Target-biological pathway network of *Pueraria lobata*

大的靶点有 CASP9、TP53、JUN、TNF, 度值分别为 15、14、13、12, 其分别与 15、14、13、12 条信号通路相关。研究表明 CASP9 基因是主要参与肿瘤细胞形成凋亡复合体的重要蛋白之一^[15]; 徐明义等报道了 TP53 作为一个抑癌基因, 能够调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、DNA 代谢及修复, 从而抑制肿瘤的形成和发展^[16-18], 如可以抑制头颈部鳞状癌细胞的异常增殖^[19]。这些靶点大部分都与 2 个以上信号通路相连接, 说明葛根活性成分通过作用多成分、多靶点、多信号通路发挥药效。度值较大的信号通路如 pathways in cancer、metabolism of lipids and lipoproteins、innate immune system 是治疗肿瘤、代谢相关疾病、免疫系统疾病的关键生物信号通路, 信号通路的种类见表 3。葛根活性成分的作用靶点、信号通路和相互疾病中, 主要涉及肿瘤、心血管疾病、糖尿病免疫系统等几类疾病, 表明葛根在治疗这些疾病中具有潜在的优势。

2.6 心血管疾病相关生物通路富集及功能分析

与心血管疾病相关的基因众多, 对已经通过实

验验证且与葛根的作用靶点基因相同的心血管疾病相关基因有 48 个, 进行通路和功能富集分析。得到 111 个相关的通路和涉及生物过程、细胞组分、分子功能的 887 种功能集合。与心血管疾病相关的信号通路包括免疫系统 (Immune System)、白介素-4/13 (interleukin-4 and 13 signaling)、癌症 (Pathways in cancer)、磷脂酰肌醇 3 激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶 (PI3K-Akt signaling pathway)、乙型肝炎 (Hepatitis B)、白细胞介素-17 (IL-17 signaling pathway)、内分泌 (IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子 (TNF signaling pathway) 等。对相关基因进行功能富集分析发现, 评分较高的功能包括钙离子转运 (calcium ion transport)、正调控蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶的活性 (positive regulation of protein serine/threonine kinase activity)、激活蛋白激酶 (activation of protein kinase activity)、肽-丝氨酸磷酸化的调控 (regulation of peptidyl-serine phosphorylation)、肽-酪氨酸磷酸化的调控 (regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation)

表 3 葛根的相关信号通路

Table 3 Related signaling pathways of *Pueraria lobata*

通路	ID	Degree
Colorectal cancer	R-HSA-168256	10
Metabolism of lipids and lipoproteins	R-HSA-556833	18
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	hsa05014	8
Leishmaniasis	hsa05140	9
p53 signaling pathway	hsa04115	8
Prostate cancer	hsa05215	8
Apoptosis	R-HSA-109581	10
Small cell lung cancer	hsa05222	6
Pancreatic cancer	hsa05212	6
VEGF signaling pathway	hsa04370	8
Malaria	hsa05144	5
Neurotrophin signaling pathway	hsa04722	8
Pathways in cancer	hsa05200	23
Chagas disease	hsa05142	8
Hepatitis B	hsa05161	14
Immune System	R-HSA-168256	33
Fluid shear stress and atherosclerosis	hsa05418	12
Influenza A	hsa05164	9
Huntington's disease	hsa05016	8
Innate Immune System	R-HSA-168249	16
Alzheimer's disease	hsa05010	6
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	hsa04932	9
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	hsa04933	15

等涉及心脏病、神经系统等生物功能。如果研究如何治疗心血管疾病和增强机体功能,可选择药物作用的相关信号通路,以期达到理想的治疗作用。

2.7 多靶点的作用研究

通过构建主要活性成分-靶点-疾病-基因网络模型图,分析葛根中作用较大的成分和相关靶点,探讨葛根活性成分的多靶点作用模式和潜在的药理作用。葛根作用的心血管疾病相关的靶点有ADRA1B、ADRB2、APOB、AR、BAX、BCL2、PTGS1、PTGS2等48个。葛根活性成分作用于TNF主要有活化的单核/巨噬细胞产生,是一种具有多功能的炎症因子,能杀伤并抑制肿瘤细胞、诱导肝细胞急性期蛋白质合成、抗感染,并参与一些自身免疫的病理性损伤。TNF的水平与先天性心脏病肺动脉高压发病机制有关^[20]。血管细胞黏附分子1(VCAM1)参与细胞之间及细胞与细胞外基质之间相互作用,通过识别与其黏附的特异性受体而相互黏附。类风湿性关节炎患者血清中的VCAM1和IL6含量明显高于健康者^[21]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(CDKN1A)是一个蛋白编码基因,CDKN1A基因的表达可以抑制前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[22]。雌激素受体2(ESR2)基因多态性与脑梗死发生风险显著相关^[23]。CYP3A4是细胞色素P450家族里a亚家族的第4种酶,是药物和外源性物质的主要代谢酶。对CYP3A4基因多态性进行研究,有助于提高药物疗效,降低不良反应,预防和治疗肿瘤、高血压等疾病^[24]。PTGS包括PTGS1和PTGS2两种异构酶,是花生四烯酸合成前列腺素的关键酶,参与肿瘤、血压、炎症反应等多种生理和病理过程^[25]。

3 讨论

葛根多成分-靶点、靶点-疾病、心血管疾病-基因网络分析结果预测葛根的作用机制可能包括其主要活性成分分别作用于TNF、VCAM1、IL6、ESR2、CYP3A4等多个靶点,提示葛根在肿瘤、高血压、脑梗死、炎症反应等方面具有一定的预防和治疗作用。同时,通过系统网络药理学研究,预测心血管疾病的发病可能与TNF、PTGS1、PTGS2、ESR2、CYP3A4等基因的表达有关,后续可以通过研究葛根的主要成分葛根素、刺芒柄花素、大豆苷元等作用于相关的靶点和相应的信号通路,影响基因的表达,从而预防和治疗心血管疾病,起到潜在的治疗效果。后续研究可以以本次实验结果作为参考设计实验,使中药的药理研究实验更加合理,

对中药的临床前实验研究具有重要的参考价值。

由于中药成分的复杂性和有关基础研究较为薄弱,需要深入应用系统网络药理学研究中药的主要活性成分、作用机制、药物之间的相互作用等。此外,充分应用网络大数据的有利资源,结合中医药在临床用药的丰富数据资源,发掘中药新的作用机制,为中药的进一步开发应用打下坚实的基础。

参考文献

- [1] 解静,高杉,李琳,等.网络药理学在中药领域的研究进展及应用策略[J].中草药,2019,50(10):2257-2265.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] 孙婷,李新民,孙丹,等.基于整合药理学平台研究葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用机制[J].药物评价研究,2019,42(1):78-83.
- [4] Liu J, Shi Y C, Lee D Y, et al. Application of Pueraria lobata in treating diabetics and reducing alcohol drinking[J]. Chin Herb Med, 2019, 11(2): 141-149.
- [5] 李昕,潘俊娴,陈士国,等.葛根化学成分及药理作用研究进展[J].中国食品学报,2017,17(9):189-195.
- [6] 薛潇春,胡晋红.网络药理学研究方法与应用进展[J].药学实践杂志,2015,33(5):401-405.
- [7] 韩晓乐,滕晓涵,许怡,等.大豆苷元防治心脑血管疾病的研究进展[J].国际药学研究杂志,2017,44(12):1093-1097,1124.
- [8] Jin S E, Son Y K, Min B, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from Pueraria Lobata roots[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(5): 823-837.
- [9] Cherdshewasart W, Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich Pueraria mirifica and Pueraria Lobata tubers[J]. Phytomedicine, 2008, 15(1/2): 38-43.
- [10] Kim D H, Jung H A, Park S J, et al. The effects of daidzin and its aglycon, daidzein, on the scopolamine-induced memory impairment in male mice[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(10): 1685-1690.
- [11] Lowe E D, Gao G Y, Johnson L N, et al. Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase §[J]. J Med Chem, 2008, 51(15): 4482-4487.
- [12] 曾莉萍,徐贤柱,饶华,等.杜仲叶β-谷甾醇对成骨细胞和卵巢颗粒细胞的影响[J].时珍国医国药,2012,23(5):1051-1053.
- [13] 郭旭,郭凤静,王晓鸥,等.血脂水平对稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病合并糖尿病患者炎症的影响[J].中国医科大学学报,2018,47(11):999-1002.

- [14] 沈丽莎, 彭文芳, 夏莉莉, 等. 2型糖尿病肾病患者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平的表达及临床意义 [J]. 实用预防医学, 2018, 25(10): 1252-1255.
- [15] 刘亚丽, 熊贤兵, 苏丹, 等. 丰城鸡血藤中刺芒柄花素的大鼠肠吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3571-3575.
- [16] 张蕾, 任中海, 薛永飞. 刺芒柄花素对老年晚期肺癌患者胸水及血清中内皮抑素、VEGF、MMP-2、bFGF 及肿瘤标志物的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(8): 154-157.
- [17] 杨勤兴, 马春霞, 陆成龙, 等. 梯度浓度顺铂处理对6种肿瘤细胞中 CASP9 的 mRNA 选择性剪接的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(9): 1003-1009.
- [18] 徐明义, 郑艳秋, 孙娟, 等. 头颈部鳞癌中 TP53 基因的调控网络分析 [J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(12): 863-867.
- [19] Leroy B, Girard L, Hollestelle A, et al. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: A reassessment [J]. Hum Mutat, 2014, 35(6): 756-765.
- [20] 宁巧明, 欧阳碧山, 张慧君, 等. 血管生成素-1 和 TNF- α 在先天性肺动脉高压发病机制中的作用 [J]. 海南医学, 2018, 29(19): 2682-2684.
- [21] 刘莲, 易宋, 梁官丽. ROS、IL-6、VCAM-1 在 RA 患者血清中的表达及意义 [C]// 2017 中国医院药学杂志学术年会. 2017.
- [22] 王勇, 郭永连, 陈琳, 等. miR-1180-5p 通过激活 CDKN1A 基因表达抑制前列腺癌细胞增殖迁移和侵袭 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(7): 698-703.
- [23] 许珍林. COC 暴露及 ESR2 基因多态性与女性脑卒中发病风险的关联研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [24] 李艳梅, 王刚, 黄志, 等. 细胞色素氧化酶 CYP3A4 基因多态性研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2011, 17(6): 49-52.
- [25] 刘鑫旭, 吴嘉瑞, 蔺梦娟, 等. 基于网络药理学的吴茱萸汤作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 203-210.
-
- (上接第1740页)
- [31] Semba S, Itoh N, Ito M, et al. Down-regulation of PIK3CG, a catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-OH kinase, by CpG hypermethylation in human colorectal carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(12): 3824-3831.
- [32] Zhang L S, Wang H M, Li C H, et al. VEGF-A/neuropilin 1 pathway confers cancer stemness via activating wnt/ β -catenin axis in breast cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(3): 1251-1262.
- [33] Ajdukovic J. Hif-1: a big chapter in the cancer tale [J]. Exp Onc, 2016, 38(1): 9-12.
- [34] Wei H, Wang N, Zhang Y, et al. Wnt-11 overexpression promoting the invasion of cervical cancer cells [J]. Tumor Biol, 2016, 37(9): 11789-11798.
- [35] Tran A N, Boyd N H, Walker K, et al. NOS expression and NO function in glioma and implications for patient therapies [J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(17): 986-999.
- [36] Cheng C, Chang J, Huang S C C, et al. YM155 as an inhibitor of cancer stemness simultaneously inhibits autophosphorylation of epidermal growth factor receptor and G9a-mediated stemness in lung cancer cells [J]. Plos One, 2017, 12(8): e0182149. DOI: 10.1371/journal.pone.0182149.
- [37] Yu T T, Lao X Z, Zheng H. Influencing COX-2 activity by COX related pathways in inflammation and cancer [J]. Mini - Rev Med Chem, 2016, 16(15): 1230-1243.
- [38] 洪梓德, 莫志贤. 中药抗肿瘤机制中的 11 种信号通路 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 205-218.