

基于网络药理学探讨土茯苓治疗痛风的作用机制

郭璐, 夏道宗*, 骆叶姣, 张晓熙, 赵鑫钰

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 运用网络药理学预测土茯苓抗痛风有效成分的作用靶点及通路。方法 通过 TCMSP 数据库和 Drugbank 数据库获取土茯苓有效成分及作用靶点, 并运用 Cytoscape 软件构建靶点间相互作用网络并进行交联分析, 筛选出土茯苓治疗痛风的有效成分及作用靶点, 采用 MAS 3.0 生物分子功能系统获取通路的相关信息并制成靶点通路网络模型。结果 预测得到土茯苓治疗痛风的有效成分 11 个和有效靶点 39 个, 并推断其作用机制可能与脂肪细胞因子信号通路、ERbB 信号通路, Toll 样受体信号通路等有关, 且 MAPK1、RELA、PTGS2 等靶点基因可能起着关键性的作用。结论 基于网络药理学探讨了土茯苓治疗痛风多成分-多靶点-多通路的作用特点, 为进一步开展土茯苓治疗痛风作用机制研究提供了新的思路和方法。

关键词: 土茯苓; 网络药理学; 痛风; 脂肪细胞因子信号通路; ERbB 信号通路; Toll 样受体信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1413-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.023

Mechanism of *Smilax glabra* in treatment of gout based on network pharmacology

GUO Lu, XIA Dao-zong, LUO Ye-jiao, ZHANG Xiao-xi, ZHAO Xin-yu

College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To predict the targets and pathways for the main active components of *Smilax glabra* in the treatment of gout based on network pharmacology. **Methods** The active components and targets of the *S. glabra* were obtained by TCMSP database and Drugbank database. Furthermore, the interaction network among the targets was established by Cytoscape software. Meanwhile, crosslink analysis was performed to screen out the active components and potential targets. Finally, the information was obtained from the MAS 3.0 biomolecular function system, and then the target pathway network model was established. **Results** In this study, a total of 11 effective components and 39 effective targets were predicted, which related to adipocytokine signaling pathway, ERbB signaling pathway, and Toll like receptor signaling pathway. Among these pathways, MAPK1, RELA, PTGS2 genes may play a crucial role. **Conclusion** This study investigated the characteristics on multi-component, multi-target and multi-pathway of *S. glabra*, which provided a new idea and method for further study on anti-gout mechanism of *S. glabra*.

Key words: *Smilax glabra* Roxb.; network pharmacology; gout; adipocytokine signaling pathway; ERbB signaling pathway; Toll like receptor signaling pathway

土茯苓 *Smilax glabra* Roxb. 是治疗痛风的传统中药,《本草纲目》记载:“惟土茯苓气平味苦而淡,为阳明本药,能健脾胃去风湿。脾胃健则营卫从,风湿去则筋骨利,故诸证多愈”。现代研究表明,土茯苓含有黄酮、鞣质、生物碱等有效成分,可促进尿酸排出体外,也可缓解尿酸钠晶体诱导的关节炎症反应^[1]。然而,土茯苓成分复杂多样,仅研究其单体物质治疗痛风的作用只能阐释其部分药效物

质基础和作用机制,很难阐释其真正的科学内涵。

痛风作为一种尿酸钠晶体沉积于机体而引起的关节炎,与嘌呤代谢紊乱及尿酸排泄减少而形成的高尿酸血症直接相关。现已证实,促进尿酸排泄是控制血清尿酸水平和痛风风险的关键途径,并进一步确认了肾脏、肠道和肝脏是尿酸的调控位点^[2-3]。此外,有研究证实痛风相关的尿酸钠晶体是通过产生软骨降解酶和促炎细胞因子导致关节破坏^[4],这

收稿日期: 2018-10-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673656); 国家自然科学基金面上项目(81374048); 浙江省中医药科技计划项目(2015ZA062)

作者简介: 郭璐,女,在读硕士研究生,研究方向为中药代谢与抗炎药理。Tel: 15700069250 E-mail: LoisGuo0831@163.com

*通信作者 夏道宗,男,教授,博士生导师,研究方向为中药代谢与抗炎药理。Tel: (0571)86633367 E-mail: xiadaozong@zcmu.edu.cn

表明痛风的发病机制与免疫调节、炎症反应及多个机体调控位点都有一定的相关性,并非是单路径调节作用。因此,通过多路径对痛风进行研究显得尤为重要。

网络药理学是基于多向系统药理学和生物学提出的药物研究新方法,从多个角度将药物成分靶点网络与生物靶点网络相结合,更加系统全面地研究药物的作用机制^[5-6]。因此,本研究运用网络药理学的方法对土茯苓治疗痛风的成分及靶点进行归纳整理,并通过系统生物学分析,深入揭示土茯苓成分-靶点-通路之间的协同作用,为探索土茯苓治疗痛风的机制提供新的思路。

1 方法

1.1 土茯苓成分收集与筛选

以“土茯苓”为关键词在传统中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>) 中查找土茯苓所含成分,通过评价成分的体内过程,用口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-like, DL) ≥ 0.18 筛选中药的活性成分^[6]。其中 OB 值是评价药物能否发挥药效的重要指标,DL 值代表成分与已知化学药的相似性,对确定中药成分是否对机体产生活性具有重要参考价值^[7]。

1.2 相关靶点信息的收集

将收集到的土茯苓有效成分导入到 Drugbank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 中进行蛋白靶点的匹配,得到成分结构所对应的靶点蛋白,并通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 查询其蛋白所对应的基因,进行归纳整理^[7]。在 TTD 数据库 (<https://db.idrblab.org/ttd/>) 和 OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>) 检索与痛风相关的靶点基因^[7]。

1.3 网络模型的构建和分析

将所得到的土茯苓有效成分和 Drugbank 中得到的靶点进行归纳整理,所得数据导入到 Cytoscape 3.6.0 软件中进行网络构建,得到土茯苓有效成分靶点网络。在 TTD 数据库和 OMIM 数据库中搜索与痛风相关的基因导入到 Cytoscape 3.6.0 软件并运用 Bisogenet 插件构建疾病蛋白相互作用网络。同时,运用 Cytoscape 3.6.0 中的 Merge 功能将 2 个网络进行合并得到土茯苓可能对痛风起作用的靶点。将所得到的潜在靶点导入 MAS 3.0 系统 (<http://mas.capitalbiotech.com/mas3/>) 进行基因本体(GO)分类富集分析和 KEGG 通路分析。GO 分类富集分析

包括分子功能分析、生物学过程分析、细胞组分析^[8]。最后,将分析得到的靶点通路与土茯苓成分相对应,形成有效成分-靶点-通路网络。

2 结果

2.1 土茯苓活性成分的筛选

在 TCMSP 数据库中搜索土茯苓化学成分,共得到 74 个化学成分,以 OB $\geq 30\%$ 和 DL ≥ 0.18 为筛选条件,同时筛去无对应靶点的成分,最终共获得 14 个潜在的有效成分(表 1)。

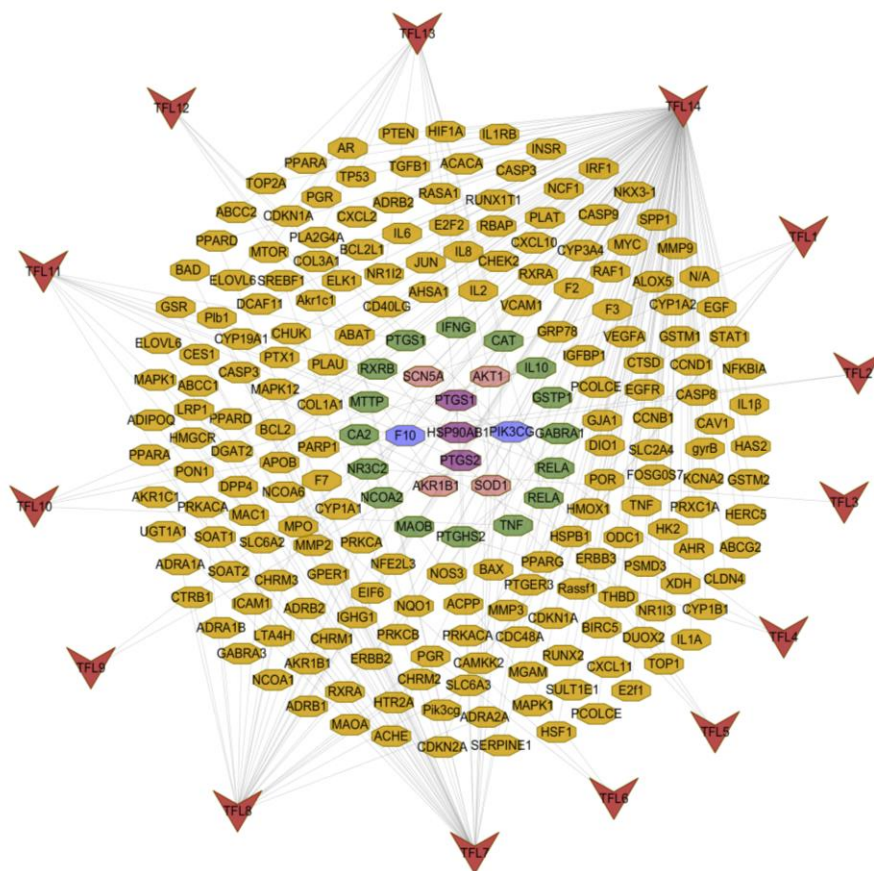
表 1 土茯苓潜在有效成分

Table 1 Potential effective ingredients of *S. glabra*

编号	化合物	OB/%	DL
TFL1	4,7-二羟基-5-甲氧基-6-甲基-8-甲酰基黄烷 (4,7-dihydroxy-5-methoxyl-6-methyl-8-formyl-flavan)	37.03	0.28
TFL2	新落新妇苷 (neoastilbin)	40.54	0.74
TFL3	沼菊素 (enhydrin)	40.56	0.74
TFL4	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
TFL5	(-)-花旗松素 [(-)-taxifolin]	60.51	0.27
TFL6	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75
TFL7	柚皮素 (naringenin)	59.29	0.21
TFL8	豆甾烯醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
TFL9	异黄杞苷 (isoengelitin)	34.65	0.70
TFL10	落新妇苷 (astibin)	36.46	0.74
TFL11	花旗松素 (taxifolin)	57.84	0.27
TFL12	顺式-二氢槲皮素 (cis-dihydroquercetin)	66.44	0.27
TFL13	薯蓣皂苷元 (diosgenin)	80.88	0.81
TFL14	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28

2.2 靶点信息的收集和筛选

2.2.1 成分对应靶点信息的收集和筛选 将收集得到的土茯苓 14 个潜在有效成分导入到 Drugbank 数据库中配对得到了 274 个蛋白,将所对应的靶点蛋白通过 Uniprot 数据库查询其对应的基因。将结果导入到 Cytoscape 3.6.0 软件中进行网络构建,得到土茯苓主要活性成分靶点网络(图 1)。图 1 共有 227 个节点、265 条边,红色箭头节点表示土茯苓活性成分,椭圆形节点表示作用靶点(黄色表示只有 1 个成分对应此靶点,绿色表示有 2 个成分作用于此靶点,蓝色表示有 3 个成分可作用于此靶点,粉红色表示有 4 个成分可作用于靶点,紫色表示有 5 个成分可作用于此靶点),越往中心其靶点所对应成分越多。从图 1 中可看出经筛选后 14 个土茯苓活性成分均具有多靶点,即相同的靶点对应于不同的活



红色箭头节点表示活性成分, 椭圆形节点表示靶点: 黄色表示 1 个成分对应此靶点, 绿色表示 2 个成分作用于此靶点, 蓝色表示 3 个成分可作用于此靶点, 粉红色表示 4 个成分可作用于此靶点, 紫色表示 5 个成分可作用于此靶点

red arrow node represents active component, elliptical node represents target: yellow represents connecting one component, green represents connecting two components, blue represents connecting three components, pink represents connecting four components, purple represents connecting five components

图 1 土茯苓主要活性成分-靶点网络

Fig. 1 Effective component-target network of *S. glabra*

性成分, 不同的靶点可以对应相同的活性成分, 体现出土茯苓具有多成分、多靶点的作用特点。

2.2.2 疾病靶点信息的收集和筛选 在 TTD 数据库和 OMIM 数据库检索与痛风相关的基因, 其中在 TTD 数据库中检索到 16 个靶点, 在 OMIM 数据库中检索到 36 个靶点, 合并筛去重复靶点后共得到 50 个靶点, 将这些靶点导入到 Cytoscape 3.6.0 软件, 运用 Bisogenet 插件构建疾病蛋白相互作用网络。将此网络与土茯苓主要活性成分靶点网络运用 Cytoscape 3.6.0 中的 Merge 功能相映射, 取交集部分最终获得 39 个土茯苓治疗痛风的靶点。将得到的 39 个靶点制成靶点间相互作用网络图, 结果见图 2。从图 2 中可看出这 39 个靶点间有相互作用, 表明可能在某种层面上这些靶点是相互联系的并通过多途径、多方面的协调起到抗痛风的作用。

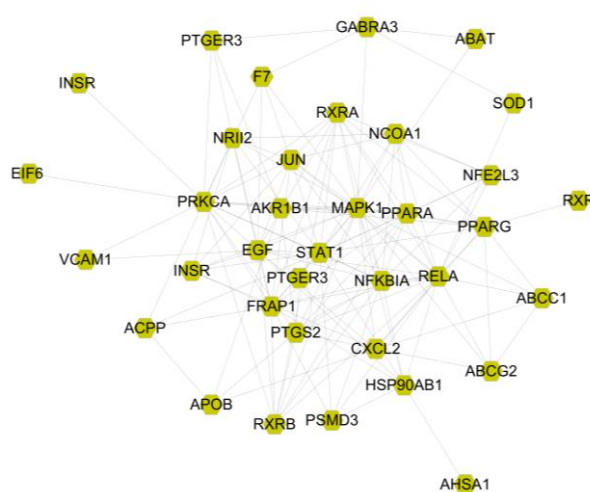


图 2 土茯苓治疗痛风的靶点相互作用网络

Fig. 2 Interaction network of targets for *S. glabra* against gout

2.3 生物功能通路分析

为进一步探究其作用通路,将所得的 39 个靶点导入到 MAS 3.0 系统中进行 GO 分类富集分析(图 3)和 KEGG 生物路径分析(图 4),列出分析结果排名前 15 的路径。其中 GO 分类富集分析包括

分子功能分析、细胞组分分析、生物学过程分析,从图 3 中可以看出在分子功能层面上,土茯苓对蛋白结合、转录因子活性、类固醇激素受体活性、ATP 结合等影响较大;在细胞组分中,土茯苓对细胞核、细胞质、细胞膜等影响较大;在生物学过程中,土

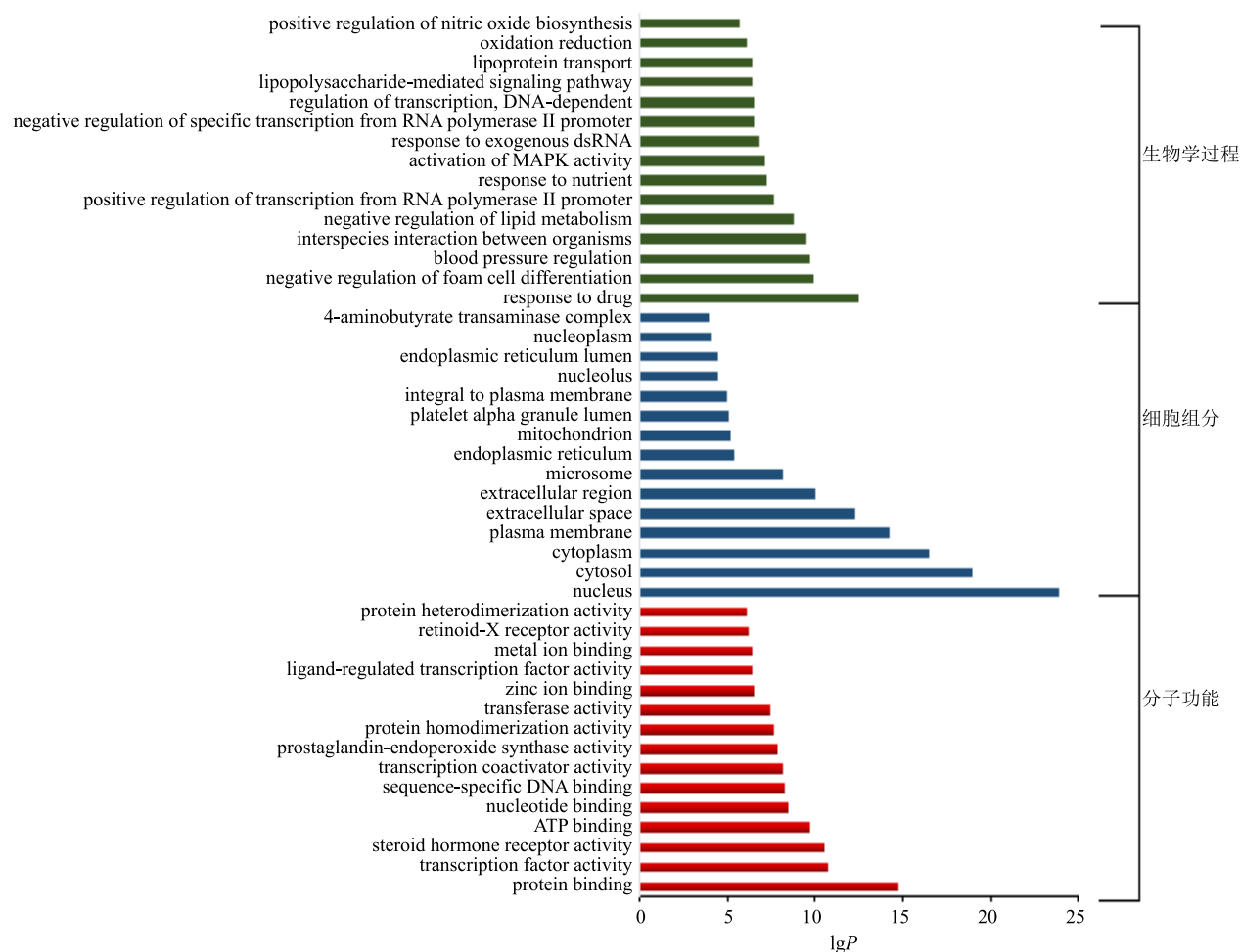


图 3 土茯苓治疗痛风候选靶点的 GO 富集

Fig. 3 Gene ontology terms of candidate targets of *S. glabra* against gout

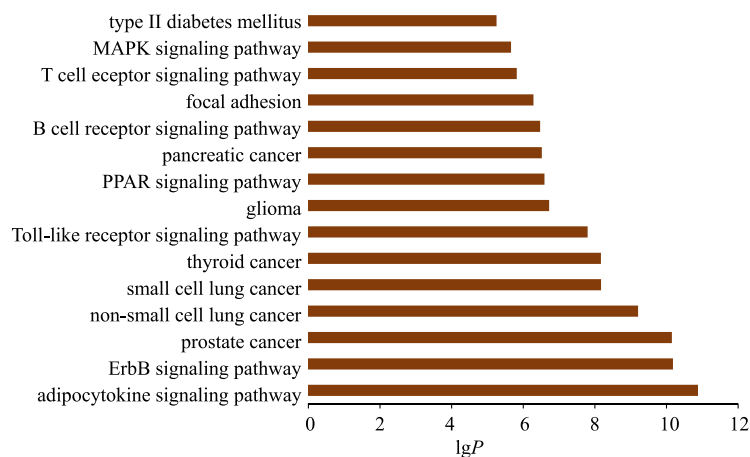


图 4 土茯苓治疗痛风 KEGG 通路富集

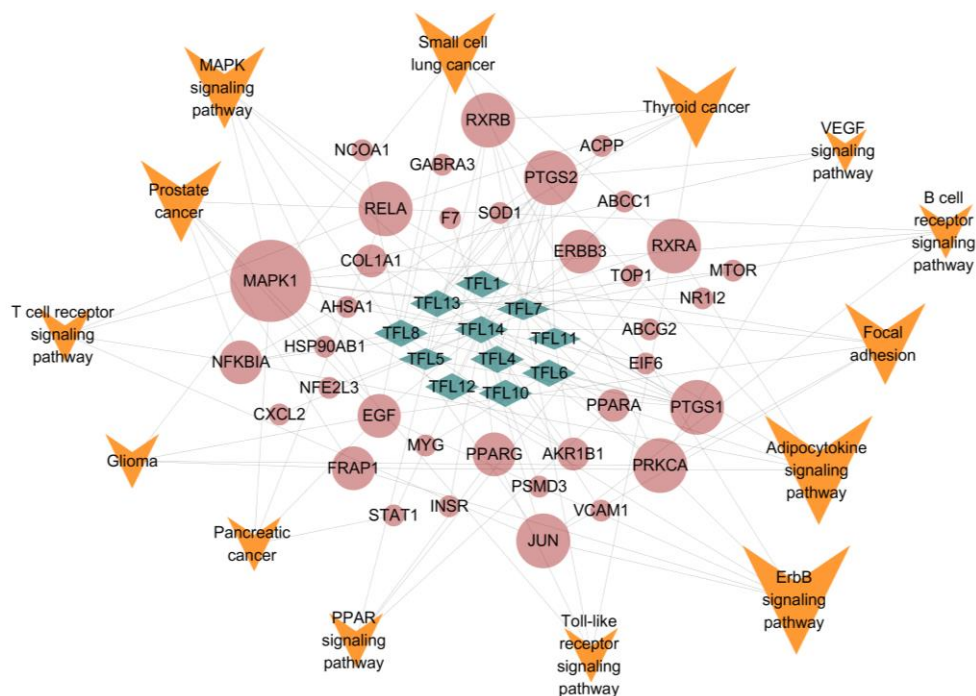
Fig. 4 KEGG pathway enrichment of *S. glabra* against gout

茯苓对药物反应、泡沫细胞分化的抑制、血压的调节、生物体之间的种间相互作用、脂质代谢的负反馈调节等影响较大。图 4 结果显示, 土茯苓治疗痛风主要涉及的排名前 15 的通路为脂肪细胞因子信号通路、表皮生长因子受体 (ERbB) 信号通路、Toll 样受体信号通路、B 和 T 细胞受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路等。

2.4 土茯苓活性成分-靶点-通路网络模型

将富集分析得到的排名前 15 的通路对应土茯苓治疗痛风的靶点及成分, 构建“成分-靶点-信号通路”网络模型。此网络由 61 个节点和 121 条边构成, 绿色节点代表土茯苓中的活性成分, 粉红色节

点代表潜在靶点, 黄色箭头节点代表调控通路, 边代表三者之间的相互作用, 图中节点越大表明其对痛风的影响越大 (图 5)。分析结果表明, MAPK1、核转录因子 65 (RELA)、前列素内环氧化物合成酶 2 (PTGS2) 这 3 个靶点基因的网络节点度排位靠前, 为网络中的关键节点, 表明它们可能是土茯苓治疗痛风的核心作用靶点。每种活性成分对应多个靶点, 每个靶点连接多种成分, 体现了土茯苓多成分、多靶点治疗痛风的作用机制。同时多条通路之间是通过共有靶点连接而非独立分开的, 表明各条通路之间可发挥协同作用起到治疗痛风的作用。



绿色节点表示活性成分; 粉红色节点表示潜在靶点; 黄色箭头表示通路; 边表示三者之间的相互作用

green node represents active component; pink node represents potential target; yellow arrow represents pathway; edge represents interaction among them

图 5 土茯苓治疗痛风活性成分-靶点-信号通路网络

Fig. 5 Active component-target-pathway network of *S. glabra* against gout

3 讨论

本研究通过 TCMSP 数据库共筛选出 14 个 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的土茯苓候选成分, 经痛风疾病靶点对接得到 11 个活性化学成分。其中, 8 个化合物有相关文献报道, 分别为 β -谷甾醇^[9]、谷甾醇^[10]、柚皮素^[11]、豆甾烯醇^[12]、落新妇苷^[13]、花旗松素^[14]、薯蓣皂苷元^[15]、槲皮素^[16]。除此之外, 存在一些尚未被报道的生物过程及有效成分, 这些生物过程和有效成分的功效将成为未来研究土茯苓抗痛风的潜在方向, 如 4,7-二羟基-5-甲氧基-6-甲基-8-甲酰基黄

烷、顺式-二氢槲皮素、(-)-花旗松素等, 其药效学及作用机制有待进一步验证。

痛风的发病机制与免疫调节、炎症反应及多个机体调控位点都有一定的相关性。因此, 本研究共预测得到 MAPK1、RELA、PTGS2 等 39 个土茯苓治疗痛风的关键靶点。其中, MAPK1 作为炎症常用通路中的一员, 其与炎症的严重程度有密切关系, 为重要的炎症评价指标^[17]。RELA 基因可编码产生核转录因子- κ B (NF- κ B) p65 亚基蛋白并参与 NF- κ B 二聚体的形成, 而 NF- κ B 几乎是所有细胞类型中都

存在的多效转录因子,是一系列信号转导事件的终点,许多生物过程如炎症、免疫、分化、细胞生长、凋亡等都与其具有非常密切的关系,所以常以此靶点作为评价药物抗痛风作用的指标^[18]。而 PTGS2 则负责炎症性前列腺素的产生,参与炎症和有丝分裂的发生,同时 PTGS2 与其他预测所得出的靶点都有密切联系。因此,这些靶点都在免疫调节、炎症反应、脂质代谢、细胞凋亡等生物过程中起着至关重要的作用,同样也是治疗痛风的重要靶点。

本研究将所得到的靶点通过 GO 富集化分析得到与痛风密切相关的通路,如 ErbB 信号通路、Toll 样受体信号通路、B 和 T 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路等。这些通路炎症以及代谢性障碍密切相关。本研究结果表明土茯苓治疗痛风具有多成分、多靶点、多通路的特点,下一步也将对所预测出来的靶点通路进行科学验证。

综上所述,本研究运用网络药理学的方法研究土茯苓治疗痛风的机制,阐述了多靶点与多成分间复杂网状相互作用关系,为进一步系统地开展土茯苓治疗痛风的实验研究及临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 范九梅, 马卓. 土茯苓药学研究概述 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 36-37.
- [2] 杨秀飞, 黄传兵, 徐慧敏, 等. 大黄治疗痛风的作用机制研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(4): 54-57.
- [3] Major T J, Dalbeth N, Stahl E A, *et al.* An update on the genetics of hyperuricaemia and gout [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(6): 341-353.
- [4] Mahon O R, Dunne A. Disease-associated particulates and joint inflammation, mechanistic insights and potential therapeutic targets [J]. *Front Immunol*, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01145.
- [5] 严诗楷, 赵静, 窦圣姍, 等. 基于系统生物学与网络生物学的现代中药复方研究体系 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(4): 249-259.
- [6] 张晓因, 张军平, 徐士欣, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗高血压潜在机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5865-5875.
- [7] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, *et al.* Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [8] 吴嘉瑞, 蔺梦娟, 刘鑫. 基于网络药理学的“金银花-板蓝根”药对作用机制研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(1): 12-17.
- [9] Rahimifard M, Manayi A, Baeri M, *et al.* Investigation of beta-sitosterol and prangol extracted from *Achillea tenuifolia* along with whole root extract on isolated rat pancreatic islets [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(1): 317-325.
- [10] Deng S S, Wei T, Tan K L, *et al.* Phytosterol content and the campesterol: sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(2): 183-193.
- [11] Zaidun N H, Thent Z C, Latiff A A. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin [J]. *Life Sci*, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.017.
- [12] Yadav M, Parle M, Jindal D K, *et al.* Protective effects of stigmasterol against ketamine-induced psychotic symptoms: Possible behavioral, biochemical and histopathological changes in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(3): 591-599.
- [13] Zhang J, Liu H, Song C, *et al.* Astilbin ameliorates pulmonary fibrosis via blockade of Hedgehog signaling pathway [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2018, doi: 10.1016/j.pupt.2018.03.006.
- [14] 赵鑫, 苟小军, 陈龙, 等. 花旗松素预防 CCl₄ 致大鼠急性肝损伤的代谢组学研究 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(8): 82-86.
- [15] Guo X, Ding X. Dioscin suppresses the viability of ovarian cancer cells by regulating the VEGFR2 and PI3K/AKT/MAPK signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9537-9542.
- [16] Ruiz-Miyazawa K W, Staurengo-Ferrari L, Mizokami S S, *et al.* Quercetin inhibits gout arthritis in mice: Induction of an opioid-dependent regulation of inflammasome [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, doi: 10.1007/s10787-017-0356-x.
- [17] Kong Q, Zhang S, Liang C, *et al.* LncRNA XIST functions as a molecular sponge of miR-194-5p to regulate MAPK1 expression in hepatocellular carcinoma cell [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4458-4468.
- [18] Tian B, Widen S G, Yang J, *et al.* The NFκB subunit RELA is a master transcriptional regulator of the committed epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(42): 16528-16545.