

基于网络药理学和分子对接方法研究山花晶颗粒抗视疲劳的作用机制

李蕊^{1,2}, 赵金伟^{1,2}, 宁停波^{1,2}, 姚景春^{1,2}, 梁红宝^{1,2*}

1. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

2. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 276006

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨山花晶颗粒抗视疲劳的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)和中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN)筛选山花晶颗粒的活性成分和潜在作用靶点,通过 STRING 数据库富集信号通路;采用 Cytoscape 软件分析蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络中的关键靶点,采用分子对接实验对主要活性成分和关键靶点的结合能力进行验证。**结果** 山花晶颗粒筛选出槲皮素、熊果酸、大黄素等 66 个主要活性成分以及多巴胺受体 D2(dopamine receptor D2, DRD2)、5-羟色胺受体 1A(5-hydroxytryptamine receptor 1A, HTR1A)、毒蕈碱型胆碱受体 M2(cholinergic receptor muscarinic 2, CHRM2)等 34 个潜在作用靶点,富集分析出神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、环单磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路等 35 条相关信号通路,分子对接结果表明主要活性成分与关键作用靶点的对接构象合理。**结论** 山花晶颗粒能够通过“多成分-多靶点-多通路”抑制细胞凋亡和炎症因子的产生,从而减轻眼部细胞氧化和损伤,发挥抗视疲劳的作用。

关键词: 山花晶颗粒; 视疲劳; 网络药理学; 分子对接; 山柰酚; 芹菜素; 槲皮素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4921-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.017

Mechanism of Shanhuajing Granules on reliving visual fatigue based on network pharmacology and molecular docking method

LI Rui^{1,2}, ZHAO Jin-wei^{1,2}, NING Ting-bo^{1,2}, YAO Jing-chun^{1,2}, LIANG Hong-bao^{1,2}

1. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Shanhuajing Granules (山花晶颗粒) on reliving visual fatigue based on network pharmacology. **Methods** TCMSP and BATMAN databases were used to obtain the active components and potential action targets, STRING database was utilized to gain interaction network information. The key targets of protein-protein interaction (PPI) network were analyzed by Cytoscape software, molecular docking was used to identify the binding ability between main active components and key targets. **Results** A total of 66 main active components such as quercetin, ursolic acid and emodin, 34 potential targets such as dopamine receptor D2 (DRD2), 5-hydroxytryptamine receptor 1 (AHTR1A), cholinergic receptor muscarinic 2 (CHRM2) and 35 related signaling pathways such as neuroactive ligand-receptor interaction, calcium signaling pathway, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway were obtained. Molecular docking results showed that the main active components docked into key targets. **Conclusion** Shanhuajing Granules may inhibits cells apoptosis and production of inflammatory factors, reduce the oxidation and injury of eye cells by “multi-ingredient-multi-target-multi-pathway” mode, thereby relive visual fatigue.

Key words: Shanhuajing Granules; visual fatigue; network pharmacology; molecular docking; kaempferol; apigenin; quercetin

随着现代生活节奏的加快,以及手机、电脑的普及应用,人们用眼时间不断延长,视疲劳已成为目前眼科常见的临床疾病之一^[1]。视疲劳又称眼疲劳,主要以视物模糊、不耐久视、干涩不适、酸胀

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201010)

作者简介: 李蕊(1992—),女,硕士,从事天然产物的提取研究。Tel: 18560512583 E-mail: yuxuanliunian928@163.com

*通信作者: 梁红宝,硕士,高级工程师,从事中药的研究与开发。E-mail: lianghongbao1985@163.com

流泪等为临床表现。中医学将视疲劳称为肝劳，病因为过用目力、情志内伤、外感湿邪、饮食偏嗜，其中以过用目力为最主要因素；病机以虚为主，虚实夹杂；常夹郁夹湿，病位以肝、肾、气为主，证候大致可分为肝肾阴虚、肝肾阴虚夹气滞、肝肾阴虚夹湿 3 型，其中以肝肾阴虚最为多见^[2]。

菊花和枸杞子作为清肝明目的著名药对，出现在石斛夜光丸、枸菊地黄丸等多个经典方中^[3]。菊花具有清热解毒、去肝火的功效^[4]；枸杞具有滋补肝肾、养肝明目的功效^[5]。现代药理学研究发现，菊花、枸杞子中含有丰富的多糖、黄酮类、叶黄素等多种活性成分，具有清除自由基、改善眼部不适的作用^[6-11]。山花晶颗粒是在菊花和枸杞子的基础上增加 1 味山楂而成，山楂具有调血脂、抗癌、抗氧化和增强免疫力的药理作用^[12]，且山楂与枸杞子配伍可以协同调血脂和抗氧化^[13]。山花晶颗粒具有滋补肝肾、清肝明目的功效，临床上主要用于治疗肝肾阴虚引起的眼睛干涩、视力模糊、目赤肿痛等视疲劳症状，亦可用于高血压、高血脂症，但其抗视疲劳的药效成分及关键作用靶点尚不清楚。本研究基于网络药理学对山花晶颗粒中的活性成分及作用机制进行预测，并通过分子对接方法验证活性成分与靶点的结合能力，以期如山花晶颗粒的进一步开发及应用提供依据。

1 方法

1.1 山花晶颗粒活性成分收集及靶点筛选

借助中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>)^[14-15]，以“菊花”“枸杞子”“山楂”为关键词，以口服生物利用度 $\geq 20\%$ 、类药性 ≥ 0.1 为筛选条件^[16-17]，并结合文献整理菊花、枸杞子和山楂的活性成分，根据筛选后的化学成分收集对应的药物靶点；借助中药分子机制的生物信息学分析工具 (BATMAN, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)^[18]，以“菊花”“枸杞子”“山楂”为关键词，收集山花晶颗粒中的活性成分，以 Target score ≥ 20 为筛选条件，保留符合条件的活性成分对应的药物靶点^[19]。

1.2 “中药-活性成分-药物靶点”网络的构建

通过 TCMSP 和 BATMAN 在线数据库筛选药物作用靶点，借助 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 校正靶点对应的基因名，限定物种为人。采用 Cytoscape 3.6 软件构建“中药-活性成分-药物靶点”网络图，用 Network Analyzer 插件分析山花晶颗粒

的活性成分和药物靶点。

1.3 抗视疲劳潜在作用靶点的获取

由于收集到的疾病靶点与视疲劳的相关性较差，本研究选择从药物靶点出发，寻找潜在作用靶点。从 TCMSP 数据库^[20]中筛选出菊花、枸杞子、山楂所对应的靶点，整合后删除重复项，得到 TCMSP 数据库药物总靶点；从 BATMAN 数据库^[21]中筛选出 3 味药材对应的靶点，整合后删除重复项，得到 BATMAN 数据库药物总靶点。为避免单个数据库收录药物靶点的偏向性，提高与抗视疲劳功效的相关性，将 2 个数据库中筛选出的药物总靶点同时在线导入 Venn 在线软件作图工具平台进行 Venn 分析，获得的交集靶点即为抗视疲劳潜在作用靶点。

1.4 抗视疲劳潜在作用靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

将抗视疲劳潜在作用靶点在线导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)，限定物种为人，得到蛋白与蛋白间的相互作用信息^[22-23]，将获得的数据导入 Cytoscape 3.6 软件，生成 PPI 网络图。通过 CytoNCA 插件对网络进行拓扑分析，分析内容包括中心性 (degree centrality, DC)、介度中心性 (betweenness centrality, BC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、接近中心性 (closeness centrality, CC)。

1.5 关键靶点的富集分析

将关键靶点在线导入 STRING 网站，得到基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析^[24-25]。以 $P < 0.01$ 为基本标准，按由小到大的顺序选择前 20 条基因注释目录和信号通路目录进行分析，运用 R 软件对分析结果进行可视化处理。

1.6 活性成分与靶点的分子对接验证

选择 PPI 网络中度值排名靠前的 5 个靶点作为关键靶点，将整理的所有活性成分与关键靶点进行对接。从 TCMSP 数据库下载活性成分的分子结构，导入 Sybyl-X 2.0 软件，运用 Minimize 模块进行能量优化，获得稳定的分子构象，mol2 格式输出保存。通过蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>)^[26]下载靶点的结晶复合物，格式选择 pdb，采用 Sybyl-X 2.0 软件的标准对接模块进行分子对接，删除靶点内的水分子，添加非极性氢原子，抽取蛋白原配体，以

便生成对接位点空腔进行对接。对接完成后, 根据低能量和构象合理的原则选择最佳对接构象。

1.7 中药-归经网络的构建

通过检索《中国药典》2020 年版^[27], 获得山花晶颗粒中山楂、菊花、枸杞子 3 味中药的归经, 构建山花晶颗粒中药-归经网络。

2 结果

2.1 山花晶颗粒活性成分收集及靶点筛选

通过数据库检索以及文献查阅^[28-31], 共得到 66 个活性成分见表 1, 其中山楂有 15 个、菊花 36 个、枸杞子 24 个, 有 7 个重复活性成分, 有 2 个活性成分存在于 3 味药材中。

表 1 山花晶颗粒中的活性成分

Table 1 Active components of Shanhuajing Granules

编号	活性成分	CAS 号	来源
MOL1	槲皮素	117-39-5	山楂、菊花、枸杞子
MOL2	芹菜素	520-36-5	菊花
MOL3	山柰酚	520-18-3	山楂
MOL4	木犀草素	491-70-3	菊花
MOL5	熊果酸	77-52-1	山楂
MOL6	4-[(Z1R)-3-(4-甲氧基苯基)-1-乙烯基丙-2-烯基]苯酚	79004-25-4	枸杞子
MOL7	柚皮素	480-41-1	菊花
MOL8	异鼠李素	480-19-3	山楂
MOL9	β -谷甾醇	83-46-5	山楂、菊花、枸杞子
MOL10	豆甾醇	83-48-7	山楂
MOL11	泽兰林素	22368-21-4	菊花
MOL12	阿托品	51-55-8	枸杞子
MOL13	金合欢素	480-44-4	菊花
MOL14	黄豆黄素	40957-83-3	枸杞子
MOL15	艾黄素	479-90-3	菊花
MOL16	邻苯二甲酸二丁酯	84-74-2	枸杞子
MOL17	芦丁	153-18-4	山楂
MOL18	对甲基苯甲酸乙酯	94-08-6	枸杞子
MOL19	金圣草(黄)素	491-71-4	菊花
MOL20	大黄素甲醚	521-61-9	枸杞子
MOL21	亚油酸	60-33-3	枸杞子
MOL22	半齿泽兰素	855-96-9	菊花
MOL23	西托糖苷	474-58-8	菊花
MOL24	石竹素	1139-30-6	菊花
MOL25	香叶木素	520-34-3	菊花
MOL26	花青素	13306-05-3	山楂
MOL27	金丝桃苷	482-36-0	山楂
MOL28	α -柏木烯	469-61-4	菊花
MOL29	橙皮素	520-33-2	菊花
MOL30	α -蒎烯	3856-25-5	枸杞子
MOL31	香橙醇	56297-98-4	菊花
MOL32	莪术呋醚酮	7727-79-9	枸杞子
MOL33	牡荆素	3681-93-4	山楂
MOL34	β -广藿香	514-51-2	菊花
MOL35	蓝桉醇	489-41-8	菊花
MOL36	植物醇	150-86-7	菊花
MOL37	石竹烯醇	472-97-9	菊花
MOL38	β -葑烯茄油烯	13744-15-5	菊花
MOL39	柳杉二醇	4666-84-6	菊花
MOL40	邻苯二甲酸正丁异辛酯	84-78-6	菊花
MOL41	荭草苷	28608-75-5	山楂
MOL42	(+)-表儿茶素	35323-91-2	山楂
MOL43	桉油烯醇	6750-60-3	菊花
MOL44	亚麻酸甲酯	301-00-8	菊花
MOL45	柠檬二烯醇	474-40-8	枸杞子
MOL46	维生素 B ₁	59-43-8	山楂
MOL47	亚油酸甲酯	112-63-0	菊花
MOL48	反式亚油酸甲酯	2566-97-4	菊花
MOL49	棕榈油酸甲酯	1120-25-8	菊花
MOL50	(-)-香橙烯	489-39-4	菊花
MOL51	(-)-A-古芸烯	489-40-7	菊花
MOL52	α -香附酮	473-08-5	菊花

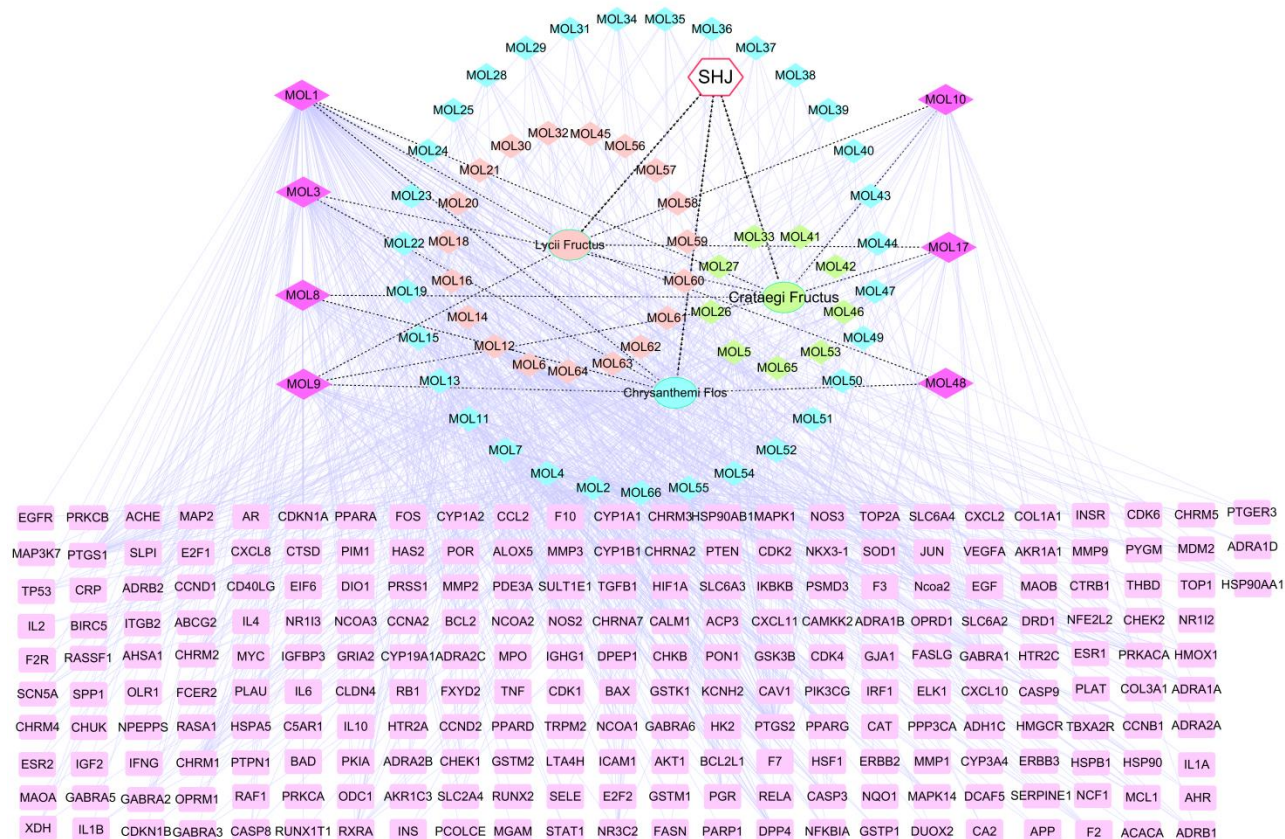
续表 1

编号	活性成分	CAS 号	来源
MOL53	异荛草素	4261-42-1	山楂
MOL54	长叶蕨烯	5989-08-2	菊花
MOL55	γ -广藿香	508-55-4	菊花
MOL56	羊毛甾醇	79-63-0	枸杞子
MOL57	胆固醇	57-88-5	枸杞子
MOL58	落花生油酸	2416-19-5	枸杞子
MOL59	野芝麻新苷	27934-98-1	枸杞子
MOL60	岩皂甾醇	17605-67-3	枸杞子
MOL61	二氢胆固醇	29466-38-4	枸杞子
MOL62	钝叶醇	16910-32-0	枸杞子
MOL63	亚油酸乙酯	544-35-4	枸杞子
MOL64	禾本甾醇	1176-52-9	枸杞子
MOL65	24-乙基胆甾-4-烯-3-酮	67392-96-5	山楂
MOL66	维生素 B ₂	83-88-5	菊花

2.2 “中药-活性成分-药物靶点”网络的构建

“中药-活性成分-药物靶点”网络见图 1，包含 303 个节点和 1062 条边。通过 Network Analyzer 插件分析网络的拓扑学性质，BC、CC 和 DC 均较大的活性成分为槲皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、

β -谷甾醇，分别对应 147、63、60、50、43 个靶点，为网络的中心节点，表明这些活性成分与靶点的相互作用在网络中起到了关键作用，不同活性成分作用于多个不同靶点，同一靶点也对应不同活性成分，体现出山花晶颗粒是多成分、多靶点的网络体系。



“SHJ”表示山花晶颗粒；橘色椭圆形表示枸杞子，绿色椭圆形表示山楂，蓝色椭圆形表示菊花；红色菱形表示共有成分，橘色菱形表示枸杞子活性成分，绿色菱形表示山楂活性成分，蓝色菱形表示菊花活性成分；粉色长方形表示靶点

“SHJ” represents Shanhuajing Granules; orange ellipse represents Lycii Fructus, green ellipse represents Crataegi Fructus, blue ellipse represents Chrysanthemi Flos; red diamond represents common components, orange diamond represents active components of Lycii Fructus, green diamond represents active components of Crataegi Fructus, blue diamond represents active components of Chrysanthemi Flos; pink rectangle represents target

图 1 “中药-活性成分-药物靶点”网络

Fig. 1 Network of “traditional Chinese medicine-active components-drug target”

2.3 作用靶点的 Venn 分析

将 TCMSP 和 BATMAN 数据库中中共有的药物靶点作为潜在作用靶点，即 233 个药物靶点和 528 个药物靶点同时在线导入 Venn 在线软件作图工具平台进行 Venn 分析，获得交集靶点 68 个见图 2，即可能为山花晶颗粒抗视疲劳的潜在作用靶点。

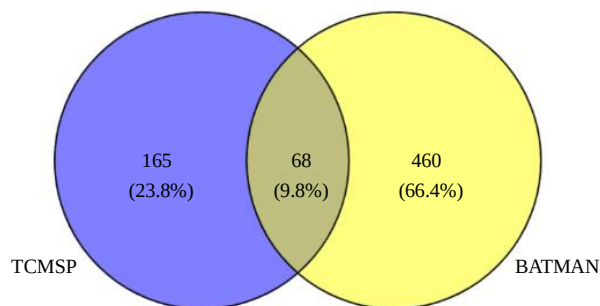


图 2 TCMSP 与 BATMAN 数据库药物靶点交集分析

Fig. 2 Intersection analysis of drug targets between TCMSP and BATMAN database

2.4 PPI 网络的构建

将 68 个交集靶点在线导入 STRING 数据库，得到蛋白间的相互作用信息和 KEGG 信号通路，在逐个筛查前 30 条中，找到 4 条与肝脏、眼睛相关的信号通路。将此 4 条通路上的靶点进行富集，得到 34 个靶点，导入 STRING 数据库得到蛋白间相互作用信息，运用 Cytoscape 3.6 软件，通过插件 cytoNCA 对网络进行拓扑分析，计算得到 DC、BC、EC、CC 的中位数分别为 7、21.994 42、0.117 226 253、0.488 915 71。根据大于中位数的筛选标准，选出 13 个关键节点，对 PPI 进行网络清晰化，见图 3。越靠近中心区域的靶点相互作用越强，最内圈的多巴胺 D2 受体 (dopamine receptor D2, DRD2)、5-羟色胺受体 1A (5-hydroxytryptamine receptor 1A, HTR1A)、胆碱能毒蕈碱受体 2 (muscarinic acetylcholine receptors, CHRM2)、一氧化氮合成酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3)、毒蕈碱型胆碱受体 M1 (cholinergic receptor muscarinic 1, CHRM1)、 μ -阿片受体 (μ -opioid receptor, OPRM1)、肾上腺素能受体 α 2a (adrenergic receptor α 2a, ADRA2A)、谷氨酸受体 2 (glutamate receptor 2, GRIA2)、ADRA2C、ADRA2B、 γ -氨基丁酸 A 受体 α 1 (gamma aminobutyric acid A receptor α 1, GABRA1)、肾上腺素能受体 β 2 (adrenergic receptor β 2, ADRB2)、GABRA2 为山花晶颗粒抗视疲劳的潜在作用靶点。

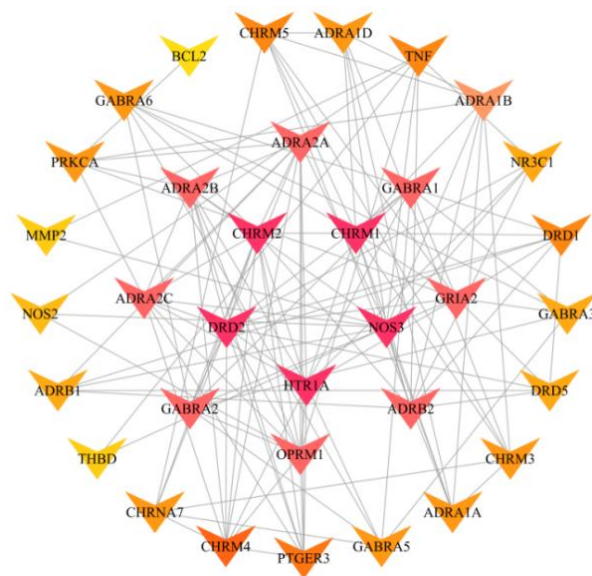


图 3 34 个富集靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of 34 enrichment targets

2.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将 34 个靶点在线导入 STRING 网站，得到 GO 和 KEGG 富集分析数据。GO 功能注释包括细胞组分、分子功能和生物过程 3 个方面，分别得到 42、58、437 个目录，细胞组分主要涉及质膜组成、突触后膜和 γ -氨基丁酸- α 受体复合物；分子功能主要与 G 蛋白偶联受体活性、神经递质受体活性、跨膜信号受体活性、信号受体活性、肾上腺素能受体活性等相关；山花晶颗粒的生物过程主要涉及腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、管径调节、血管直径的调节、磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号通路、信号转导、G 蛋白偶联受体信号通路、血液循环、系统过程调节、腺苷酸环化酶激活 G 蛋白偶联受体信号通路、平滑肌收缩的调节。KEGG 富集分析有 60 个目录，以 $P < 0.01$ 为标准进行富集分析，主要涉及到神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、环单磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-cGMP 依赖性蛋白激酶 (cGMP-dependent protein kinase, PKG) 信号通路、胆碱能突触、糖尿病并发症中的年龄-晚期糖基化终产物受体 (receptor of advanced glycosylation end-products, RAGE) 信号通路、心肌细胞中的肾上腺素能信号、逆行内源性大麻素信号、 γ -氨基丁酸能突触、多巴胺能突触、缺氧诱导因子-1 信号通路、肌动蛋白细胞骨架的调节等信号通路。GO 和 KEGG 前 20 条目录见图 4、5。

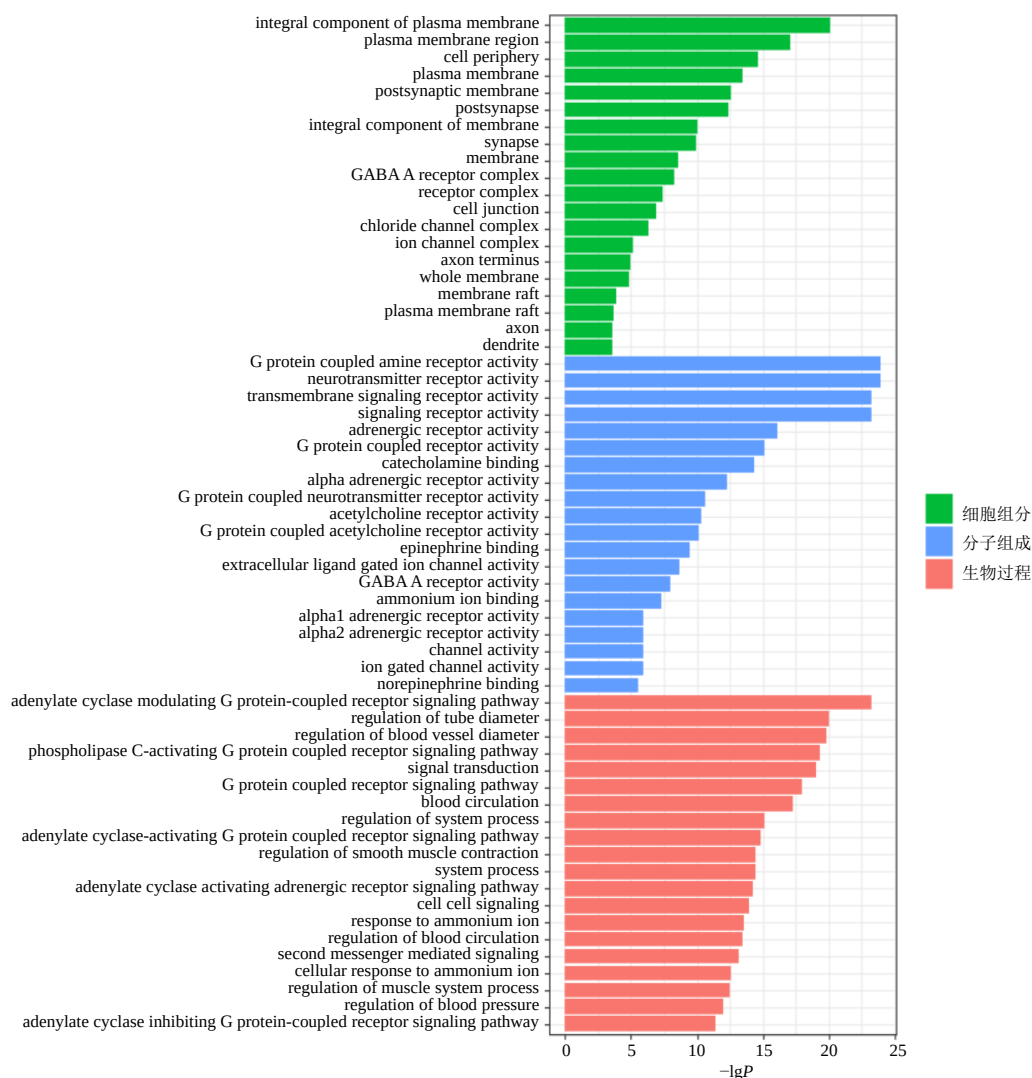


图 4 山花晶颗粒 GO 功能富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of GO function of Shanhuajing Ganules

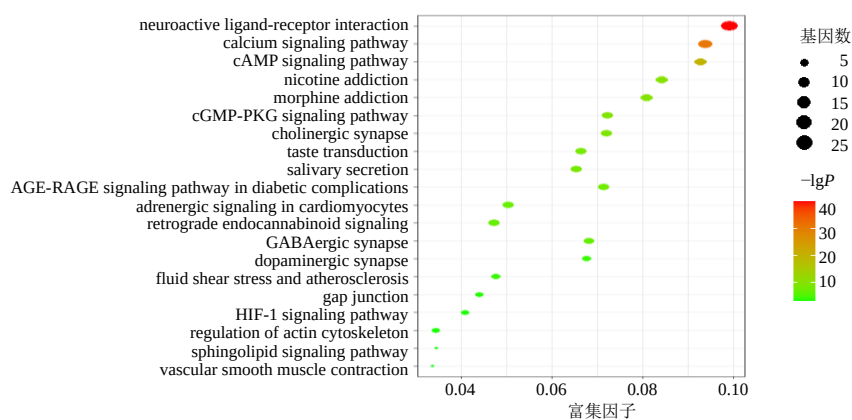


图 5 山花晶颗粒 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG pathway of Shanhuajing Ganules

2.6 分子对接验证

以靶蛋白结构内的原配体作为对照，将筛选出的所有活性成分与 5 个关键靶点 (DRD2、HTR1A、

CHRM2、NOS3、CHRM1) 对应的活性位点 (6CM4、5V54、5YC8、1M9J、5CXV) 进行分子对接，结果见表 2。小分子与受体结合时的能量越低、构象

表 2 山花晶颗粒主要活性成分与关键靶点的分子对接

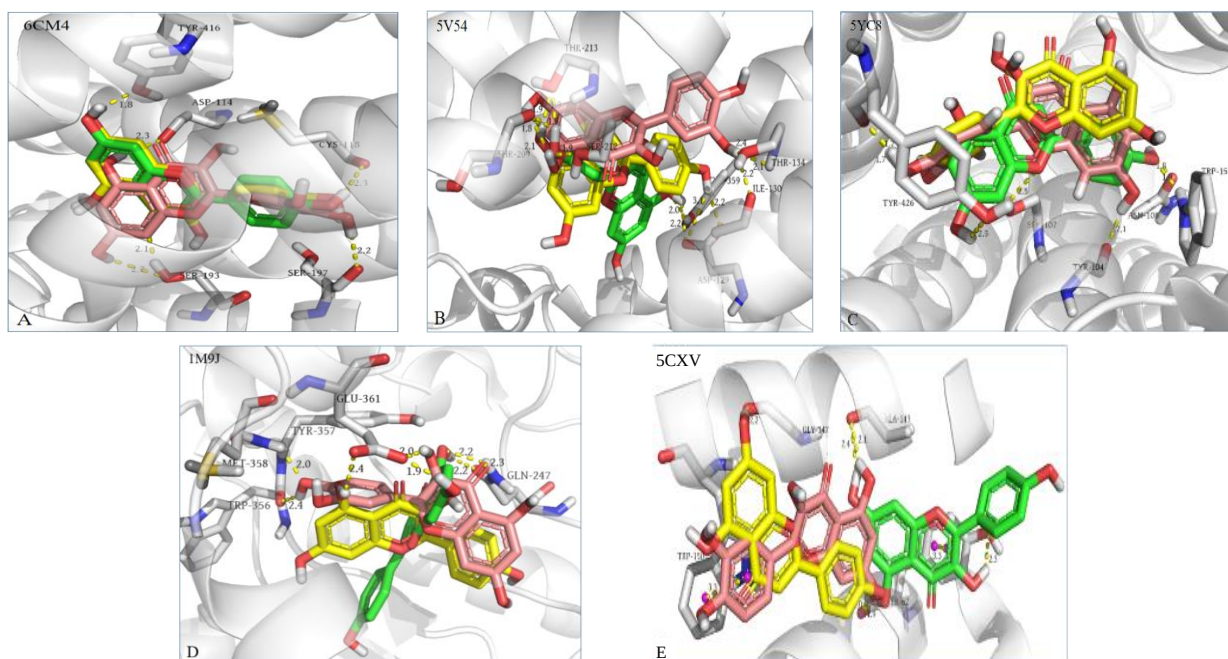
Table 2 Molecular docking between main active components and key targets of Shanhuajing Granules

活性成分编号	对接打分值				
	DRD2	HTR1A	CHRM2	NOS3	CHRM1
原配体	5.121 5	5.887 8	6.780 8	3.373 2	6.493 0
MOL1	4.538 9	5.378 2	5.656 4	3.932 7	5.036 4
MOL2	4.757 1	4.122 7	6.601 6	3.927 0	4.490 7
MOL3	4.317 0	4.692 8	6.889 9	4.218 3	3.267 7
MOL4	3.497 5	3.817 8	3.199 5	4.572 1	3.344 1
MOL5	2.933 2	4.007 0	4.967 6	4.012 4	4.482 4
MOL6	6.265 8	6.025 5	6.156 0	5.160 4	4.839 4
MOL7	5.712 1	4.267 0	5.606 7	3.972 7	3.182 0
MOL8	5.537 2	5.152 3	5.835 4	5.902 6	3.589 5
MOL9	5.781 4	6.639 2	4.405 1	6.814 3	6.423 0
MOL10	4.344 9	5.018 7	6.394 6	6.559 4	6.385 7
MOL11	4.626 5	6.374 5	1.302 1	4.148 2	4.510 0
MOL12	5.733 7	5.996 4	8.132 1	5.115 4	5.551 4
MOL13	3.374 4	3.859 2	3.897 1	4.011 7	4.315 7
MOL14	6.040 4	4.750 4	4.397 8	4.704 7	4.282 4
MOL15	5.749 1	8.230 3	1.271 2	5.212 1	4.595 4
MOL16	6.985 1	6.346 6	7.694 5	7.094 3	4.290 8
MOL17	10.138 1	2.497 4	3.256 1	6.419 8	4.048 1
MOL18	3.557 0	3.294 9	4.406 9	3.054 8	2.758 2
MOL19	4.186 4	4.275 5	3.920 2	3.807 4	4.005 1
MOL20	3.585 0	4.294 1	2.742 8	3.839 4	4.392 2
MOL21	9.303 1	8.781 8	9.206 6	10.237 2	6.482 5
MOL22	4.942 6	5.699 0	1.321 8	5.293 2	5.602 9
MOL23	4.603 3	4.491 2	3.058 6	5.279 1	4.265 2
MOL24	3.313 5	4.831 4	4.768 8	3.097 4	3.022 0
MOL25	4.826 2	4.604 4	5.455 0	3.917 7	2.842 8
MOL26	6.471 8	5.304 1	4.541 7	4.126 7	4.274 8
MOL27	5.866 8	5.261 8	6.266 6	4.836 6	4.238 6
MOL28	3.412 1	3.043 9	4.440 5	3.945 6	2.758 9
MOL29	3.794 2	4.846 2	4.651 0	3.692 5	3.777 3
MOL30	4.400 9	5.098 4	5.664 2	3.260 1	3.417 7
MOL31	4.409 7	5.504 0	4.914 7	3.895 7	2.586 6
MOL32	4.968 5	3.666 3	4.902 3	3.332 9	3.103 2
MOL33	5.346 0	4.150 8	1.021 5	5.334 3	3.179 0
MOL34	3.688 5	1.842 8	4.227 8	3.719 4	3.445 6
MOL35	3.198 6	3.874 2	4.395 0	2.967 5	2.719 0
MOL36	8.300 7	8.332 8	7.143 6	6.495 9	5.319 5
MOL37	3.102 9	2.649 5	5.875 6	3.948 7	3.497 5
MOL38	4.311 6	4.589 1	4.522 7	2.939 7	3.339 9
MOL39	2.842 3	3.019 6	6.778 8	3.773 1	3.421 4
MOL40	7.928 1	8.640 8	10.085 5	6.821 5	5.275 8
MOL41	6.737 8	5.651 2	1.115 6	4.542 9	3.954 1
MOL42	5.858 0	4.860 2	4.494 3	3.542 0	5.613 9
MOL43	3.758 8	4.875 0	5.831 7	3.990 2	3.685 6
MOL44	7.371 1	9.361 7	9.108 2	9.648 3	6.742 5
MOL45	5.402 4	2.033 0	4.172 4	6.486 5	6.523 0
MOL46	6.026 9	4.609 5	6.313 6	4.436 3	5.114 5
MOL47	9.312 8	8.241 4	9.075 8	9.637 8	7.065 0
MOL48	10.752 0	9.332 8	9.558 1	9.133 1	5.900 5
MOL49	10.752 0	9.295 4	2.859 4	8.687 6	5.900 5
MOL50	8.541 5	8.080 1	8.260 4	9.394 2	6.571 1
MOL51	3.722 8	1.633 5	5.304 8	2.978 4	4.042 7
MOL52	4.182 7	3.191 7	5.959 6	3.249 1	3.755 3
MOL53	3.251 4	5.461 4	4.742 5	4.111 9	2.995 9
MOL54	6.353 8	5.418 7	1.792 9	5.149 5	3.610 4
MOL55	4.040 9	2.106 9	5.279 1	3.099 3	3.182 3
MOL56	2.933 2	1.304 0	4.222 6	2.912 5	2.644 5
MOL57	4.178 0	3.173 8	1.410 9	5.989 6	6.150 7
MOL58	6.588 8	4.614 5	4.252 4	5.371 4	5.958 1
MOL59	8.345 3	8.861 5	9.879 0	9.046 9	5.974 1
MOL60	3.870 4	3.716 5	4.080 4	2.990 3	2.126 6
MOL61	4.881 5	7.284 0	3.705 2	5.312 1	6.563 9
MOL62	5.211 9	3.913 1	3.152 6	6.693 1	6.040 3
MOL63	5.278 9	2.566 3	5.242 8	6.533 1	4.496 7
MOL64	9.039 6	9.150 1	9.805 1	8.736 4	7.337 0
MOL65	6.368 9	4.078 9	1.265 3	5.283 1	6.552 8
MOL66	5.284 4	5.609 9	4.192 4	4.675 6	4.459 2

形状匹配度越高,则对接打分值越高,表明小分子具有的潜在作用活性越强。3个小分子对比原配体,对接打分值十分接近,表明筛选出的活性成分具有与原配体相当的作用活性。

选取度值排名靠前的活性成分槲皮素、芹菜素

和山柰酚进行结果展示见图6,槲皮素、芹菜素和山柰酚在DRD2、HTR1A、CHRM2、NOS3和CHRM1靶点蛋白活性位点内的对接构象稳定、匹配度良好,均可与靶蛋白形成氢键作用,结合活性良好。



粉色棍状结构代表槲皮素,绿色棍状结构代表芹菜素,黄色棍状结构代表山柰酚,白色彩带表示靶点蛋白结构,黄色虚线表示氢键相互作用
Pink stick structure represents quercetin, green stick structure represents apigenin, yellow stick structure represents kaempferol, white color band indicates target protein structure, and yellow dotted line indicates the hydrogen bond interaction

图6 山花晶颗粒中3个活性成分与关键靶点DRD2(A)、HTR1A(B)、CHRM2(C)、NOS3(D)和CHRM1(E)的分子对接
Fig. 6 Docking results of three active components of Shanhuajing Ganules and key targets DRD2 (A), HTR1A (B), CHRM2 (C), NOS3 (D) and CHRM1 (E)

2.7 中药-归经网络的分析

如图7所示,中药-归经网络中肝经的连接数为3,其余肾经、肺经、胃经、脾经的连接数均为1,可见山花晶颗粒的主要作用部位在肝。

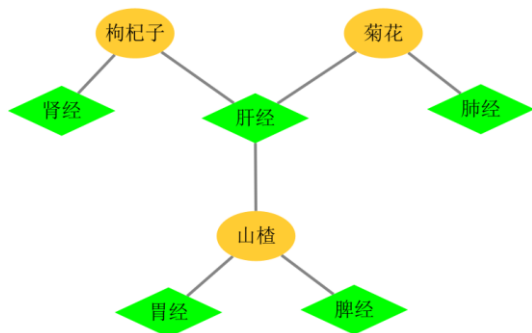


图7 中药-归经网络

Fig. 7 Traditional Chinese medicine-meridian network

3 讨论

早在2000年前,《黄帝内经》就论述了肝与目的关系,其后又得到了历代医家的补充和临床验证。《黄帝内经》曰:“肝气通于目,肝和则目能辨五色矣”;明·缪希雍《本草经疏·卷二》云:“肝虚十证……目光短属肝血虚肾水真阴不足”;清·林之翰《四诊抉微》亦有云:“眼赤多泪积热,头眩不能俯视肝火……羞明怕日,肝肾并见”;由此可见中医讲眼病从肝治的道理所在。通过中药-归经网络的分析结果可知,山花晶颗粒中3味药材均入肝经,枸杞、菊花滋补肝肾、清热解毒,山楂健脾消食、酸甘化阴,3药合用,则可发挥养肝、泻火、明目之功效。与临床上治疗肝肾阴虚引起的眼睛干涩、视力模糊、目赤肿痛等视疲劳症的功效基本吻合。

本研究运用网络药理学的方法对山花晶颗粒所

含成分及靶点进行分析,发现3味药材共含66个活性成分,作用于233个药物靶点;其中筛选出34个关键靶点,具有多成分、多靶点、多途径发挥作用的特点。GO功能及KEGG通路富集分析可知,山花晶颗粒可能通过激活钙信号通路和cAMP信号通路等激活下游磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路,调控凋亡通路,抑制各种凋亡蛋白,减少细胞凋亡,并抑制炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)等的产生,减轻眼部细胞的氧化和损伤,保护视网膜色素上皮细胞,与目前研究所证实的车前子、青葙子、熟地等归肝经中药发挥明目功效的作用机制基本相符^[32-36]。分子对接结果表明,来自于山楂、菊花和枸杞子中度值较高的山柰酚、芹菜素和槲皮素3种黄酮成分与关键作用靶点蛋白匹配良好,提示该类化合物可能为核心活性成分群。

本研究应用网络药理学和分子对接的方法,对山花晶颗粒的多成分-多靶点与抗视疲劳靶点之间复杂网络关系进行探究及验证,初步阐释了基于炎症细胞因子信号通路发挥抗视疲劳功效的作用机制,充分体现了中药多组分、多靶点、多层次的整体调节作用,为进一步深入探讨其作用机制奠定了基础,为探索抗视疲劳的药效物质基础和作用机制提供了方向,同时为山花晶颗粒的进一步开发及应用提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 严令耕. 中医药治疗视疲劳和干眼症的研究概况 [J]. 国医论坛, 2009, 24(5): 50-52.
- [2] 王超, 李翔, 姜世怀, 等. 视频终端视疲劳的中医辨证分型探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(4): 732-734.
- [3] 曲燕磊, 张唯. 石斛夜光丸配合按摩治疗视疲劳的临床观察 [J]. 现代中医药, 2017, 37(5): 63-64.
- [4] 林佑. 菊花活性物质及其作用机制研究 [J]. 植物学研究, 2012, 1: 47-53.
- [5] 王莎莎, 张钊, 陈乃宏. 枸杞子主要活性成分及药理作用研究进展 [J]. 神经药理学报, 2018, 8(6): 53.
- [6] 王瑞雅, 王惠平, 赵薇, 等. 野菊花的生物活性成分及药理作用研究 [J]. 甘肃科技, 2020, 36(14): 52-54.
- [7] 廖铁松, 沈云亨, 李影, 等. 巴西甘菊花化学成分研究 (II) [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2551-2556.
- [8] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4785-4795.
- [9] 李智勤, 李秀芹. 药用菊花中化学成分的含量测定及主成分分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(72): 141-142.
- [10] 刘倩, 余意, 梁琰, 等. 枸杞子活性成分及分析方法研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(11): 56-59.
- [11] 付文昊, 于梅. 枸杞子的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(98): 104.
- [12] 封若雨, 朱新宇, 张苗苗. 近五年山楂药理作用研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(5): 715-718.
- [13] 史国玉, 武卫红, 商庆节, 等. 药食两用山楂的药理作用及保健应用研究进展 [J]. 现代食品, 2020(15): 126-128.
- [14] 赵苗青, 李丰, 石彬彬, 等. 系统药理学 (VI): TCMSP 数据库及其应用 [J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 22-29.
- [15] 解晶, 李丰, 石彬彬, 等. 系统药理学: TCMSP 解析中医基础理论研究进展 [J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2627-2635.
- [16] 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.
- [17] 陈启洪, 李晓飞, 段灿灿, 等. 网络药理学探讨杜仲主要活性成分及药理作用机制 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 419-426.
- [18] 孙波, 李文, 秦忠, 等. 基于 BATMAN-TCM 平台探讨刘尚义国医大师抗瘤四味方干预前列腺癌机制 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 131-133.
- [19] 谢静, 田野, 刘杨, 等. 基于网络药理学探讨痰咳净方防治新型冠状病毒肺炎的可行性 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 591-600.
- [20] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [21] Liu Z, Guo F, Wang Y, et al. BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
- [22] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: D561-D568.
- [23] Jensen L J, Kuhn M, Stark M, et al. STRING 8: A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: D412-D416.
- [24] 吴磊宏, 王毅, 范晓辉. 网络药理学技术工具: 网络可视化及网络分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2923-2925.
- [25] 赖轲, 郑雪, 鲁卫星. 基于网络药理学探讨灯盏细辛治疗冠心病的作用机制 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(5):

- 802-805.
- [26] Sussman J L, Lin D, Jiang J, *et al.* Protein Data Bank (PDB): Database of three-dimensional structural information of biological macromolecules [J]. *Acta Crystallogr D*, 1998, 54: 1078-1084.
- [27] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 33.
- [28] 刘荣华, 邵峰, 邓雅琼, 等. 山楂化学成分研究进展 [J]. *中药材*, 2008, 31(7): 1100-1103.
- [29] 张健, 李友宾, 钱大玮, 等. 菊花化学成分及药理作用研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(10): 1941-1942.
- [30] 冯美玲, 王书芳, 张兴贤. 枸杞子的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 265-268.
- [31] 于宏. 枸杞子的化学成分与生物活性 [J]. *国外医药: 植物药分册*, 2007, 22(2): 51-54.
- [32] 黄秀榕, 汪朝阳, 王勇, 等. 四种归肝经明目中药防护晶状体氧化损伤和上皮细胞凋亡的研究 [A] // 第三次全国中医、中西医结合眼科学术交流会论文汇编 [C]. 长沙: 中华中医药学会, 2003: 23-24.
- [33] 黄秀榕, 祁明信, 严京, 等. 细胞凋亡抑制剂防护晶状体上皮细胞氧化损伤及信号转导机制 [J]. *光明中医*, 2008, 23(10): 1407-1410.
- [34] 黄秀榕, 祁明信, 汪朝阳, 等. 4 种归肝经明目中药对晶状体上皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的调控 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(3): 322-325.
- [35] 黄秀榕, 祁明信, 严京, 等. 车前子对晶状体上皮细胞氧化损伤防护作用的信号转导机制 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(7): 768-771.
- [36] 祁明信, 黄秀榕, 严京, 等. 菊花防护晶状体上皮细胞氧化损伤及信号转导机制的实验研究 [J]. *福建中医学院学报*, 2008, 18(6): 26-29.

[责任编辑 李亚楠]