



药学报

Acta Pharmaceutica Sinica

ISSN 0513-4870, CN 11-2163/R

《药学报》网络首发论文

题目: 基于网络药理学的黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应和代谢的作用机制研究
作者: 衡霞, 朱宝杰, 孙莉敏, 潘林梅, 段金廛, 张启春, 朱华旭
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0276
收稿日期: 2018-03-29
网络首发日期: 2018-08-27
引用格式: 衡霞, 朱宝杰, 孙莉敏, 潘林梅, 段金廛, 张启春, 朱华旭. 基于网络药理学的黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应和代谢的作用机制研究. 药学报. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2018-0276>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于网络药理学的黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应和代谢的作用机制研究

衡霞^{1,2}, 朱宝杰^{1,2}, 孙莉敏^{1,2}, 潘林梅^{1,2}, 段金厥^{1,2}, 张启春^{1,2*}, 朱华旭^{1,2*}

(南京中医药大学 1. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 2. 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: 运用网络药理学方法探究黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应、糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢等方面的多成分、多靶点、多通路的相互作用规律和调控网络, 为创新药物研究奠定基础。通过 TCMSP 数据库筛选黄连解毒汤活性成分, PharmMapper 数据库预测靶点蛋白, DAVID 数据库进行通路注释和分析, Cytoscape 3.2.1 软件构建“活性成分-靶点-通路”网络图, GENEMANIA 数据库进行蛋白相互作用分析, Systems Dock Web Site 数据库进行分子对接验证。预测结果表明, 黄连解毒汤中共筛选出 84 个活性成分, 作用靶点 111 个, 其中与巨噬细胞炎症相关的靶点蛋白 13 个, 涉及代谢通路 14 条; 与糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关的靶点蛋白 34 个, 涉及代谢通路 8 条。炎症相关蛋白和代谢相关蛋白通过物理相关性、蛋白共表达等方式互相作用, 小檗碱、黄芩苷和栀子苷与 5 个重要靶点均能较好结合。黄连解毒汤可能通过作用于糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢的相关靶点, 影响其代谢过程中的代谢产物和酶, 从而调节巨噬细胞炎症反应。

关键词: 网络药理学; 黄连解毒汤; 炎症; 代谢

中图分类号: R966

文献标识码: A

Network pharmacology-based study on mechanisms of Huanglian Jiedu Decoction impact on macrophage inflammation response

HENG Xia^{1,2}, ZHU Bao-jie^{1,2}, SUN Li-min^{1,2}, PAN Lin-mei^{1,2}, DUAN Jin-ao^{1,2},
ZHANG Qi-chun^{1,2*}, ZHU Hua-xu^{1,2*}

(1. Jiangsu Collaboration Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, 2. Jiangsu Province Key Laboratory of High Technology Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: This study was designed to explore the impact of Huanglian Jiedu Decoction (HLJDT) on macrophage inflammation reaction using the network pharmacology method. Glycolysis, sphingolipid metabolism and glutamine metabolism were also investigated for “multi-component, multi-target and multi-pathway”, which supports a foundation for drug innovative research. The TCMSP database was used to screen the active components of HLJDT, the target protein predicted by PharmMapper database and the DAVID database for pathways annotation and analysis. The Cytoscape 3.2.1 software was used to construct the active component-target-pathway network map and GENEMANIA database for protein interaction analysis. System Dock Database Site is used in verification of molecular docking. The results showed that 84 active ingredients were screened in HLJDT with a total of 111 target targets. Fourteen pathways are affected according to 13

收稿日期: 2018-03-29; 修回日期: 2018-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573635).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811509, E-mail: zhangqc@njucm.edu.cn;

Tel / Fax: 86-25-85811509, E-mail: huaxu72@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0276

macrophage-related inflammatory proteins, and 8 pathways including 34 target proteins from glycolysis, sphingolipid metabolism and glutamine metabolism. Inflammation-related proteins and metabolism-related proteins can interact with each other through physical correlation, protein co-expression etc. Berberine, baicalin and geniposide combined well with 5 important targets. Huanglian Jiedu Decoction may act on the glycolysis and sphingolipid pathways to regulate macrophage inflammatory responses.

Key words: network pharmacology; Huanglian Jiedu Tang; inflammation; metabolism

中药复方基于“整体观”、“辨证论治”的理论,具有多成分、多靶点、多途径协同作用的特点,作用机制复杂,采用“一靶点、一药物”的模式阐述其作用机制困难较多^[1]。然而,随着公共生物学数据的迅速发展,网络药理学方法应运而生,为阐明中药复方作用机制提供了一条新途径^[2]。网络药理学是基于系统生物学、多向药理学和分子网络分析的一门新兴学科,网络药理学技术的运用对于理解中药复方的整体性、互补性和协同性具有重要作用。

黄连解毒汤是清热解毒的传统名方,该方由黄连、黄芩、黄柏和栀子四味中药组成,具有清热泻火、解毒的功效。大量研究表明,黄连解毒汤在肿瘤、糖尿病、关节炎、缺血性脑卒中和肝脏疾病等多种疾病中发挥着重要作用,而代谢重编程启动的免疫细胞活化和炎症反应则参与了上述疾病的发生发展过程^[3-6]。基于代谢调控网络调节免疫细胞功能有可能是黄连解毒汤抗炎作用的潜在生化机制,本文将利用网络药理学分析技术,对黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应、糖酵解、鞘磷脂代谢和谷氨酰胺代谢等方面的多成分、多靶点、多通路的相互作用规律和调控网络进行了挖掘和分析,以期为后续深入研究黄连解毒汤调控炎症的作用机制和发展新的有价值的药物奠定基础。

材料与方法

软件与数据库 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)、Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PharmMapper 数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路数据库 (<http://www.Genome.jp/kegg/>)、GENEMANIA 数据库 (<http://genemania.org/>)、System Dock Database Site 数据库 (<http://systemsdock.unit.oist.jp>)、Cytoscape 3.2.1 软件。

黄连解毒汤中活性成分的筛选 黄连解毒汤包含黄连、黄芩、黄柏、栀子四味中药,将这四味中药

以中文名称作为关键词分别输入 TCMSP 数据库进行检索,所得结果按照口服吸收利用度 (OB) > 30%、药物相似性 (DL) > 0.18 进行筛选,筛选后所得成分作为黄连解毒汤的活性成分。

黄连解毒汤中活性成分潜在靶点预测 将黄连解毒汤中筛选得到的活性成分以成分名作为关键词输入 Pubchem 数据库中进行检索,查找并保存各活性成分的 3D 结构式为 SDF (.sdf) 格式,再将各活性成分的 3D 结构式提交到 PharmMapper 数据库中进行靶点预测,依次选择参数^[7]: Generate Conformers-Yes; Maximum Generated Conformations-100; Select Targets Set-Human Protein Targets Only (2 241); Number of Reserved Matched Targets (Max 1 000)-100,得到与各化合物相关的靶点名称 (target name)、基因名称 (gene)、Uniprot ID、匹配值 (fit score) 等结果。根据匹配值筛选前 10 个靶点作为该化合物的重要靶点蛋白。

炎症巨噬细胞靶点和代谢靶点预测 分别将“inflammation”、“macrophages”作为关键词输入 OMIM 数据库检索与炎症、巨噬细胞相关的靶点蛋白,将“glycolysis”、“sphingolipid metabolism”、“glutamine metabolism”作为关键词输入 OMIM 数据库检索与糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关的靶点蛋白,整理这些靶点蛋白并与筛选得到的活性成分的靶点蛋白进行匹配,得到黄连解毒汤中与炎症巨噬细胞相关靶点和代谢靶点。

相关通路的注释和分析 以标准基因名的形式将活性成分的相关靶点基因列表导入 DAVID 数据库,依次勾选 OFFICIAL_GENE_SYMBOL (官方基因标志)、Gene list、Submit list,选择基因功能分类工具,修改背景为人类,选择 Pathway 得到“KEGG-Pathway”相关数据,保存数据并挑选 $P < 0.01$ 的通路作为可靠通路,结合 KEGG 数据库进行通路注释和分析。

构建黄连解毒汤中抗炎和代谢作用的“药效成分-靶点-通路”网络关系图 将黄连解毒汤中的活性成分、对应预测靶点和通路分析结果,在 Excel 表

中分别构建“活性成分-靶点”、“靶点-通路”之间的相互关系, 然后将其导入 Cytoscape 软件中建立“活性成分-靶点”、“靶点-通路”网络关系图, 利用软件中 Merge 功能, 将两个网络图合并得到“活性成分-靶点-通路”网络。图中以活性成分、靶点蛋白和通路为 3 类节点 (node), 它们之间的相互关系分别用边 (edge) 相连表示。利用软件中网络分析功能对所得网络进行分析, 以度 (degree)、边介数 (edge betweenness) 分别反映网络中节点的大小和边的粗细。

蛋白质相互作用关系分析 将筛选得到的炎症巨噬细胞靶点蛋白和代谢靶点蛋白以标准基因名的形式上传到 GENEMANIA 数据库, 进行蛋白与蛋白之间的相互作用分析, 得到蛋白质相互作用网络图, 整理网络布局并保存图片。

主要活性成分-靶点分子对接 利用 Systems Dock Web Site 数据库, 将黄连解毒汤中主要药效成分小檗碱、黄芩苷和栀子苷与蛋白相互作用分析得到的 5 个共有靶点进行分子对接验证。登陆 Systems Dock Web Site 数据库, 依次上传靶点名称/PDB ID、小檗碱、栀子苷、黄芩苷 SDF (.sdf) 格式的 3D 结构式, 成功后开始对接, 整理对接结果中的 Docking Score 并分析。

结果

1 黄连解毒汤中有效成分筛选

将黄连、黄芩、黄柏和栀子作为关键词分别输入 TCMSP 数据库进行检索后, 共得到 429 个成分, 其中黄连 48 个、黄芩 143 个、黄柏 140 个、栀子 98 个。根据各个成分的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME)

参数中口服吸收利用度 $OB > 30\%$ 、药物相似性 $DL > 0.18$ 进行筛选, 共得到 84 个活性成分。将这 84 个活性成分进行结构分类, 其中属于生物碱类的成分有 17 个, 包括小檗碱、表小檗碱、巴马汀等; 属于环烯醚萜类成分有 1 个, 为京尼平 1- β -龙胆二糖苷; 属于黄酮类的成分有 33 个, 包括汉黄芩苷、去甲基汉黄芩苷、槲皮素等; 其他类成分有 33 个, 包括豆甾醇、谷甾醇、山奈酚等。

2 黄连解毒汤中活性成分潜在靶点蛋白信息

黄连解毒汤中筛选得到的 84 个活性成分共涉及 111 个靶点蛋白, 与炎症相关的靶点蛋白有 20 个, 其中炎症靶点中与巨噬细胞相关的靶点蛋白有 13 个, 出现频度最多的靶点蛋白为丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)、氧化型胆固醇受体 LXR β (oxysterols receptor LXR-beta) 等, 详细信息见表 1。将这 13 个靶点蛋白对应 84 个活性成分, 其中有 38 个活性成分可作用于这些靶点。

与糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢相关的靶点共有 34 个, 出现频度最多的靶点蛋白为醛-酮还原酶家族 1 成员 C2 (AKR1C2)、雄激素受体 (AR) 等, 详细信息见表 2。将这 34 个靶点对应 84 个活性成分, 显示 84 个活性成分都可作用于这些靶点。

3 黄连解毒汤中活性成分潜在靶点蛋白的作用通路注释和分析

将黄连解毒汤中与巨噬细胞炎症相关的 13 个靶点蛋白以标准基因名的形式输入 DAVID 数据库中进行 KEGG 通路注释和分析, 筛选 P 值小于 0.01 的通路作为潜在通路, 共得到 14 条代谢通路, 涉及 4 种类别, 其中与疾病相关的通路有 4 条, 与信号转导相关的通路有 7 条, 与细胞过程相关的通路有 2 条,

Table 1 Target proteins associated with inflammation in Huanglian Jiedu Decoction (HLJDT)

Protein target	Common name	Uniprot ID	Frequency
Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	P45983	13
Oxysterols receptor LXR-beta	NR1H2	P55055	7
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC	P12931	5
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	LCN2	P80188	4
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	PIK3CG	P48736	4
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174	3
Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	TREM1	Q9NP99	3
Hematopoietic prostaglandin D synthase	HPGDS	O60760	3
Plasminogen	PLG	P00747	2
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Q16539	1
Cathepsin K	CTSK	P43235	1
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARD	Q03181	1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	1

Table 2 Target proteins associated with metabolism in HLJDT

Protein target	Common name	Uniprot ID	Frequency
Aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2	P52895	30
Androgen receptor	AR	P10275	24
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	PTPN1	P18031	21
Serum albumin	ALB	P02768	20
Prothrombin	F2	P00734	20
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	P28482	19
Glutathione S-transferase P	GSTP1	P09211	19
Aldose reductase	AKR1B1	P15121	17
Aromatase	CYP19A1	P11511	15
cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	PDE5A	O76074	15
Amine oxidase [flavin-containing] B	MAOB	P27338	14
Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	P45983	13
Thyroid hormone receptor beta	THRB	P10828	13
Liver carboxylesterase 1	CES1	P23141	12
Complement factor B	CFB	P00751	10
Glucosylceramidase	GBA	P04062	10
Estrogen receptor beta	ESR2	Q92731	8
Oxysterols receptor LXR-beta	NR1H2	P55055	6
Glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM	P50440	6
Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	NR1I3	Q14994	4
Vitamin D-binding protein	GC	P02774	4
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174	3
Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	PCK1	P35558	2
Nuclear receptor ROR-alpha	RORA	P35398	2
Estrogen-related receptor gamma	ESRRG	P62508	2
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	P07900	2
Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	P49841	2
Retinoic acid receptor RXR-alpha	RXRA	P19793	1
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	P11586	1
cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase B	PDE3B	Q13370	1
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARD	Q03181	1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	1
Dihydrofolate reductase	DHFR	P00374	1
Arylsulfatase A	ARSA	P15289	1

与感官系统相关的通路有 1 条，详细信息见表 3。

采用相同的方法对与糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关的靶点蛋白进行通路注释和分析，得到 8 条代谢通路，涉及 3 种类别，其中与疾病相关的通路有 4 条，与信号转导相关的通路有 3 条，与细胞过程相关的通路有 1 条，详细信息见表 4。

4 黄连解毒汤中“活性成分-靶点-通路”网络模型图构建

采用 Cytoscape 3.2.1 软件分别构建炎症巨噬细胞相关“活性成分-靶点-通路”网络模型图 (图 1)、代谢相关“活性成分-靶点-通路”网络模型图 (图 2)，以度 (degree) 的大小反映节点的大小，以边介数 (betweenness) 反映边的粗细。

如图 1 所示为炎症巨噬细胞相关“活性成分-靶点-通路”网络模型图，图中共有 65 个节点，其中 38 个为活性成分，13 个为靶点蛋白，14 个为代谢通路，它们由 202 条边相连构成一个完整的网络。如图 2 所示为代谢相关“活性成分-靶点-通路”网络模型图，图中共有 126 个节点，其中 84 个为活性成分，34 个为靶点蛋白，8 个为代谢通路，它们通过 354 条边相连构成一个完整的网络。

5 蛋白质相互作用关系分析

将 13 个与巨噬细胞相关的靶点蛋白和 34 个与糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关的靶点蛋白以标准基因名的形式输入 GENEMANIA 数据库，得到蛋白质相互作用关系网络图，如图 3 所示，位于图片最

Table 3 Classification and information of macrophage-related pathways in HLJDT

Classification	Pathway	P-value	Count
Diseases	Influenza A	0.001 7	4
	Shigellosis	0.003 6	3
	Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	0.004 0	3
	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.009 3	3
Signal transduction	Prolactin signaling pathway	0.000 1	4
	Toll-like receptor signaling pathway	0.000 3	4
	VEGF signaling pathway	0.003 3	3
	Fc epsilon RI signaling pathway	0.004 1	3
	ErbB signaling pathway	0.006 6	3
	GnRH signaling pathway	0.007 2	3
	TNF signaling pathway	0.009 7	3
	Osteoclast differentiation	0.000 1	5
	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.006 6	3
Sensory system	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0.000 3	4

Table 4 Classification and information on metabolism-related pathways in HLJDT

Classification	Pathway	P-value	Count
Diseases	Pathways in cancer	0.001 0	8
	Insulin resistance	0.001 0	5
	Prostate cancer	0.005 7	4
	Thyroid cancer	0.006 4	3
Signal transduction	Insulin signaling pathway	0.000 2	6
	PPAR signaling pathway	0.002 7	4
	Prolactin signaling pathway	0.003 1	4
Cell processes	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.005 6	4

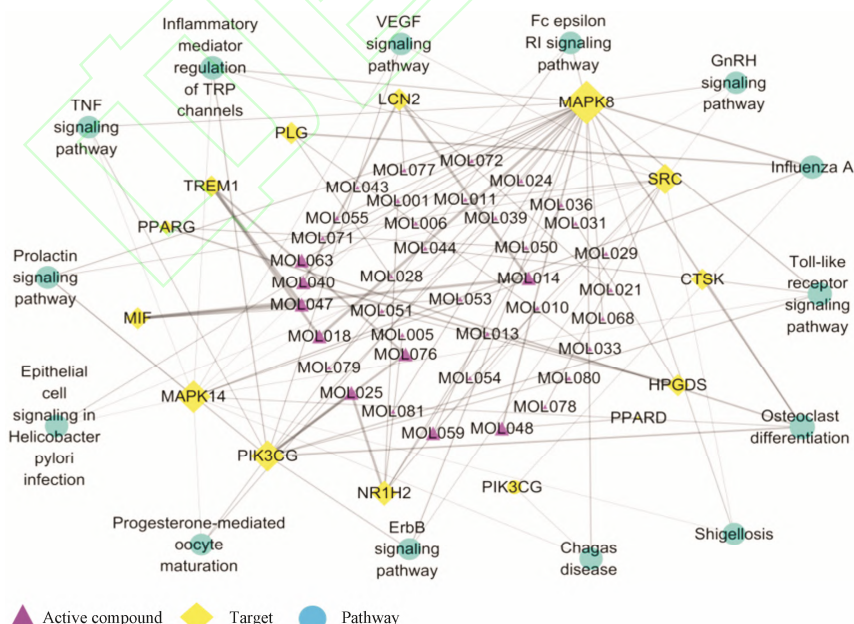
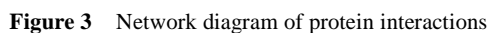


Figure 1 The “active compound-target-pathway” network of anti-inflammatory from HLJDT

内侧的为巨噬细胞炎症相关靶点蛋白,最外侧为糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关靶点蛋白,中间5个靶点蛋白为炎症和代谢共有的靶点蛋白,分别为丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、氧化型胆固醇受体

LXR β (NR1H2)、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (PPARD)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)。蛋白之间相互作用主要通过物理相关性、蛋白共表达、共享蛋白域、预测、



6 黄连解毒汤中主要活性成分-靶点分子对接结果分析

选择黄连解毒汤中主要的药效成分小檗碱、栀子苷和黄芩苷,与结果 5 中得到的 5 个靶点 MAPK8、

NR1H2、MIF、PPARD、PPARG 分别进行分子对接, 对接结果如表 5 所示。一般认为 Docking Score 值大于 4.25 表示对接分子与靶点之间有一定的结合活性, 大于 5.0 表明对接分子与靶点之间有较好的结合活性, 大于 7.0 则说明具有强烈的结合活性^[8]。分子对接结果显示小檗碱、黄芩苷、栀子苷与 MAPK8、NR1H2、MIF、PPARD、PPARG 的 Docking Score 值均大于 5.0, 并且黄芩苷与 PPARD 的 Docking Score 值为 7.024>7.0, 由此表明小檗碱、黄芩苷和栀子苷与这 5 个靶点均有较好的结合活性, 并且黄芩苷与 PPARD 有强烈的结合活性。

讨论

黄连解毒汤是清热解毒的传统名方, 具有保护脑神经元、降血糖、抗炎、抗肿瘤等作用^[9-12], 本文利用网络药理学分析技术, 对黄连解毒汤调节巨噬细胞炎症反应、糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢等方面的多成分、多靶点、多通路的相互作用规律和调控网络进行了挖掘和分析。由黄连解毒汤“活性成分-靶点-通路”网络可知: 同一个活性成分可以通过同一个靶点与不同的代谢通路相连, 也可以通过不同的靶点与相同的代谢通路相连, 这与黄连解毒汤“多成分、多靶点、多途径”的特点符合。

黄连解毒汤中发挥药效作用的成分主要为生物碱、环烯醚萜和黄酮类成分, 本文筛选得到的 84 个活性成分中属于生物碱类的成分有 17 个, 环烯醚萜类成分有 1 个, 黄酮类的成分有 33 个, 其他类成分有 33 个。小檗碱、栀子苷和黄芩苷是黄连解毒汤的主要药效成分, 本课题组^[13]在前期对小檗碱、栀子苷和黄芩苷在脑组织中的分布进行研究, 研究表明黄连解毒汤的主要药效成分可以透过血脑屏障进入脑组织发挥作用。

靶点预测结果显示, 黄连解毒汤中与巨噬细胞炎症相关的靶点有丝裂原活化蛋白激酶 8、氧化型胆固醇受体 LXR β 、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src、中

性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ 同种型等 13 个靶点蛋白, 涉及 14 条代谢通路, 其中与炎症相关的通路有 Toll 样受体信号通路、Fc ϵ RI 信号通路、ErbB 信号通路、TNF 信号通路。与糖酵解、鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢相关的靶点有醛-酮还原酶家族 1 成员 C2、雄激素受体、酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 1 型、血清白蛋白、凝血酶原等 34 个靶点, 涉及 8 条通路, 其中与三大代谢相关的通路有胰岛素信号通路、PPAR 信号通路、催乳素信号通路。

黄连解毒汤巨噬细胞炎症相关靶点和代谢相关靶点的蛋白质相互作用网络结果显示, 巨噬细胞炎症靶点与代谢靶点可以通过多种途径相互作用, 其中 MAPK8、NR1H2、MIF、PPARD、PPARG 这 5 个靶点在巨噬细胞炎症靶点和鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢靶点中都存在, 利用分子对接技术, 将黄连解毒汤中的主要药效成分小檗碱、栀子苷和黄芩苷与这 5 个靶点进行分子对接。对接结果表明小檗碱、栀子苷和黄芩苷与这 5 个靶点都具有较好的结合活性, 并且黄芩苷与 PPARD 有强烈的结合活性, 提示黄连解毒汤可能通过这 5 个靶点影响鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢过程, 影响代谢调控网络从而对免疫细胞功能进行调节, 发挥抗炎作用。

通路结果也显示, MAPK8 参与调控 Toll 样受体信号通路、Fc ϵ RI 信号通路、ErbB 信号通路、GnRH 信号通路、TNF 信号通路等炎症通路, 同时, 还参与调控胰岛素信号通路、催乳素信号通路等能量代谢通路; PPARD 和 PPARG 调控 PPAR 信号通路。MAPK8 是 c-Jun 氨基末端激酶 1 (JNK1), 属于丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶, 应激反应发生时主要通过 JNK1 调节实现对 JNK 整个信号通路的调控。研究表明, 炎症状态下可以活化巨噬细胞炎症标志物 JNK 蛋白磷酸化^[14-16], Guo^[17]研究发现小檗碱可以抑制 JNK 蛋白磷酸化, 并且通过小檗碱干预后的巨噬细

Table 5 Molecular docking results between major drug ingredients and targets

Target name	PDB ID	Ingredient	Docking score	Target name	PDB ID	Ingredient	Docking score
MAPK8	1UKI	Berberine	6.374	PPARD	3DY6	Berberine	6.527
		Geniposide	6.403			Geniposide	7.024
		Baicalin	6.207			Baicalin	6.640
NR1H2	1PQ9	Berberine	6.397	PPARG	3B3K	Berberine	6.550
		Geniposide	6.747			Geniposide	6.470
		Baicalin	6.397			Baicalin	6.641
MIF	1CA7	Berberine	6.209				
		Geniposide	6.395				
		Baicalin	6.439				

胞调节液与脂肪细胞作用等表明小檗碱可能通过抑制巨噬细胞炎症信号通路及炎症基因表达和分泌,改善胰岛素抵抗。由此推测,黄连解毒汤可能通过小檗碱与 MAPK8 蛋白作用抑制其磷酸化,从而调控 JNK 信号通路抑制巨噬细胞炎症发生,进而影响机体的能量代谢过程。PPARD 和 PPARG 是过氧化物酶体增殖物激活受体 PPARs 的两种亚型,是参与体内脂质代谢调节的核转录因子^[18],不仅广泛参与机体的脂质代谢、糖代谢、能量代谢过程,在炎症过程中也发挥重要作用^[19]。Jin 等^[20]研究表明,黄连解毒汤干预后的高脂血症大鼠肝脏中 PPARG 的 mRNA 表达水平明显升高;Liu 等^[21]研究也表明小檗碱可以抑制脂肪细胞分化相关基因 PPARG 的 mRNA 和蛋白表达,抑制脂肪细胞活化,进而减少脂肪的积聚。并且,脂肪细胞是产生促炎细胞因子的重要场所,在肥胖状态下,脂肪细胞会分泌一系列细胞因子从而诱发免疫和炎症过程^[22]。因此,黄连解毒汤可能通过上调组织中 PPARG 的 mRNA 表达从而调节脂质代谢紊乱,或者通过抑制脂肪组织中 PPARG 的 mRNA 表达,减少脂肪组织的分化,从而减少促炎细胞因子的分泌进而减少炎症过程的发生。

上述得出的 5 个重要靶点均为鞘脂代谢、谷氨酰胺代谢和巨噬细胞炎症中共有的靶点,因此猜测黄连解毒汤可能通过影响鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢过程中代谢产物或相关酶从而影响炎症过程。鞘脂是一类以鞘氨醇为骨架的较复杂的化合物,在维持细胞生长、信号转导、炎症过程中发挥重要作用,鞘脂代谢异常会产生包括阿尔兹海默病、动脉粥样硬化、糖尿病、心肌病、癌症等多种疾病^[23-25]。神经酰胺 (Cer) 是细胞内鞘脂代谢的中心^[26],具有诱导细胞凋亡、调节细胞分化、细胞免疫、炎症反应^[27]等生物学功能。脑组织中 Cer 水平的升高,一方面会对神经元产生毒性作用;另一方面也会促进细胞因子 IL-2 和 IL-6 的产生,引起神经炎症^[28, 29],而实验室前期研究^[30]结果表明,黄连解毒汤可以显著下调 APP/PS1 模型小鼠血浆和脑组织代谢物中 Cer 的含量。1-磷酸鞘氨醇 (S1P) 是具有生物活性的鞘脂代谢产物,研究表明,1-磷酸鞘氨醇受体激动剂 TFY720 可能通过与巨噬细胞表面的 S1P 受体结合,抑制 IL-23 产生,进而减少 IL-17、IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 表达,从而调控炎症反应^[31],实验室前期研究表明,小檗碱预处理后的神经元中 S1P 发生显著上调^[32]。谷氨酰胺是谷氨酰胺代谢的重要代谢物质,为供能和生物合成提供主要的碳源和氮源。研究表明,经脂多糖 (LPS) 刺激

的巨噬细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的多少依赖于细胞外谷氨酰胺的可用量^[33],并且多项动物研究也表明谷氨酰胺的利用可以提高动物感染后的存活率,体外研究和临床结果均表明谷氨酰胺对人免疫细胞数量和功能有促进作用^[34]。由此推测,黄连解毒汤可能通过调节鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢过程中代谢产物的含量,进而调控炎症过程的发生。

结论

通过网络药理学技术,将黄连解毒汤中四味中药进行活性成分筛选,根据得到的活性成分进行靶点预测、通路分析、蛋白相互作用分析和分子对接分析,构建“活性成分-靶点-通路网络”和蛋白相互作用网络,发现黄连解毒汤可能通过作用于 MAPK8、NR1H2、MIF、PPARD、PPARG 等糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢的相关靶点,影响代谢过程中的有关代谢产物或酶而影响代谢调控网络,从而对巨噬细胞炎症反应进行调节。

References

- [1] Liu AL, Du GH. Network pharmacology: new guidelines for drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1472-1477.
- [2] Liu ZH, Sun XB. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sinica (药学报), 2012, 47: 696-703.
- [3] Wang PR, Wang JS, Yang MH, et al. Neuroprotective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on ischemic stroke rats revealed by H NMR metabolomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 106-116.
- [4] Hsu YL, Kuo PL, Tzeng TF, et al. Huang-lian-jie-du-tang, a traditional Chinese medicine prescription, induces cell-cycle arrest and apoptosis in human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Gastroenterol Hepatol, 2008, 23: 290-299.
- [5] Zhang XJ, Deng YX, Shi QZ, et al. Hypolipidemic effect of the Chinese polyherbal Huanglian Jiedu decoction in type 2 diabetic rats and its possible mechanism [J]. Phytomedicine, 2014, 21: 615-623.
- [6] Hu Y, Hu Z, Wang S, et al. Protective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang and its component group on collagen-induced arthritis in rats [J]. Ethnopharmacol, 2013, 150: 1137-1144.
- [7] Sun LM, Liu LF, Zhu HX, et al. Network pharmacology-based study on intervention mechanism of Huanglian Jiedu decoction in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1268-1275.

- [8] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS One, 2013, 8: e83922.
- [9] Qian ZL, Li H, Zhu HX, et al. Preliminary study on the correlation between pharmacokinetics and pharmacodynamics of index components in Huanglian Jiedu decoction [J]. Chin J Exp Form (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 122–128.
- [10] Xiao YL, Lu FE, Xu LJ, et al. Effect of Huanglian Jiedu decoction on vascular endothelial function in type 2 diabetic rats [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2005, 30: 1767–1770.
- [11] Ma YL, Wang BB, Han JY, et al. Effect of Huanglian Jiedu decoction on local and aortic vascular local immune response in high-fat diet *ApoE*^{−/−} mice [J]. Chin J Integr Tradit Chin Western Med (中国中西医结合杂志), 2013, 33: 1520–1525.
- [12] Sun Y, Wang JP, Zhang YL, et al. The inhibitory effect of Huanglian Jiedu Tang on mouse S180 transplanted tumor [J]. J Northeast Agric Univ (东北农业大学学报), 2013, 44: 63–67.
- [13] Peng SL, Liu LF, Zhu HX, et al. Effects of combination drugs and Huanglian Jiedu decoction on the bioactivity of berberine in rat brain [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2877–2882.
- [14] Ho YT, Yang JS, Li TC, et al. Berberine suppresses *in vitro*, migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitions of FAK, IKK, NF- κ B, u-PA and MMP-2 and -9 [J]. Cancer Lett, 2009, 279: 155–162.
- [15] Bae DS, Kim YH, Pan CH, et al. Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages [J]. BMB Rep, 2012, 45: 108–113.
- [16] Akhter MH, Sabir M, Bhide NK. Possible mechanism of antidiarrhoeal effect of berberine [J]. Indian J Med Res, 1979, 70: 233–241.
- [17] Guo C. Berberine Improves Insulin Resistance by Inhibiting Infiltration of Adipose Tissue Macrophages (小檗碱通过抑制脂肪组织巨噬细胞浸润改善胰岛素抵抗的研究) [D]. Nanjing: Nanjing Univ Chin Med, 2015.
- [18] Curi TC, Melo MP, Azevedo RB, et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate dependent glutaminase [J]. Am J Physiol, 1997, 273: 1124–1129.
- [19] Yassad A, Lavoinne A, Bion A, et al. Glutamine accelerates IL-6 production by rat peritoneal macrophages in culture [J]. FEBS Lett, 1997, 413: 81–84.
- [20] Jin J. Analysis of Chemical Constituents of Huanglian Jiedu Decoction and Its Effect on Anti-hyperlipidemia (黄连解毒汤化学成分分析及其抗高血脂症作用的研究) [D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [21] Liu Y, Lou SY, He YM, et al. Effects of berberine on the proliferation and differentiation-related genes PPAR γ C/EBP α mRNA and protein expression in 3T3-L1 preadipocytes [J]. Chin J Integr Tradit Chin Western Med (中国中西医结合杂志), 2008, 28: 1005–1009.
- [22] Piao CL, Yang SY, Tong XL, et al. Discussion on prevention and treatment of obesity type 2 diabetes by Chinese medicine from the mechanism of adipose tissue inflammation [J]. J Rehabil (康复学报), 2009, 19: 61–63.
- [23] He X, Huang Y, Li B, et al. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2010, 31: 398–408.
- [24] Gemma C, Smith MA, Samar B, et al. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease [J]. Mol Neurodegener, 2007, 2: 2.
- [25] Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, et al. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801: 878–886.
- [26] Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 25847–25850.
- [27] Nakao S, Moriyama S, Segawa M, et al. C-2-ceramide inhibits the prostaglandin E-2-induced accumulation of cAMP in human gingival fibroblasts [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9: 1378–1395.
- [28] Ballou LR, Lauderkind SJ, Rosloniec EF, et al. Ceramide signalling and the immune response [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1301: 273–287.
- [29] Cutler RG, Kelly J, Storie K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2004, 101: 2070–2075.
- [30] Sun LM, Zhu BJ, Cao HT, et al. Explore the effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on Alzheimer's disease by UPLC-QTOF/MS-based plasma metabolomics study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 151: 75–83.
- [31] Sun GL, Sun W, Lan Q, et al. The sphingomyelin metabolism of cerebral ischemia [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2015, 15: 1566–1569.
- [32] Zhang QC, Bian HM, Guo LW, et al. Berberine preconditioning protects neurons against ischemia *via* sphingosine-1-phosphate and hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Am J Chin Med, 2016, 44: 927–941.
- [33] Murphy CJ, Newsholme P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to *L*-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production [J]. Clin Sci, 1998, 95: 397–407.
- [34] Ziegler TR, Daignault NM. Glutamine regulation of human immune cell function [J]. Nutrition, 2000, 16: 458–459.