

基于网络药理学分析大柴胡汤治疗高脂血症的作用机制

梁天坚^{1,2}，李黎明²，李本杰²，秦燕琼²，吕金燕²，曹云¹，陈睿^{1,2*}，梁燕³

(1. 广西中医药大学基础医学院, 广西南宁 530001; 2. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西南宁 530222; 3. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

摘要: 目的 基于网络药理学方法研究大柴胡汤对高脂血症 (HLP) 治疗的作用机制。方法 检索 TCMSP 数据库, 获取大柴胡汤的主要活性成分和潜在作用靶点。通过 Genecards 数据库和 NCBI 数据库获得 HLP 相关靶点, 并与大柴胡汤所对应靶标取交集, 筛选出大柴胡汤治疗 HLP 的潜在靶标。使用 String 数据库对大柴胡汤治疗 HLP 作用潜在靶标进行蛋白质相互作用分析, 筛选出核心靶标。通过 DAVID 数据库, 对核心靶标进行 KEGG 通路富集分析和 GO 分类富集分析。利用 Cytoscape 3.6.0 软件, 绘制“药物-成分-作用靶标”网络图、核心靶标相互作用网络图及“成分-靶标-通路”网络关系图。利用分子对接软件 SYBYL, 对主要活性成分与其主要信号通路进行对接验证。结果 从大柴胡汤中共筛选得到 133 种活性成分、核心靶点 46 个。经 GO 注释及 KEGG 富集分析发现, 靶点主要涉及氨基酸磷酸化、趋化作用、细胞分裂、呼吸急促正调控等生物过程, 并通过 HIF-1 signaling pathway、TNF signaling pathway 和 Insulin resistance 等 15 条主要信号通路来发挥治疗 HLP 的作用。分子对接结果显示, 主要活性成分槲皮素与 HIF-1 signaling pathway 相关靶点均有结合活性较好。结论 大柴胡汤对高血脂症的治疗具有多成分-多靶点-多途径共同作用的特点, 本研究可为该方临床应用提供科学依据。

关键词: 大柴胡汤; 高脂血症; 信号通路; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)06-1645-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.050

高脂血症 (Hyperlipidemia, HLP) 是导致心脑血管疾病的重要诱因, 其发生发展多与患者饮食、作息及情志等多方面因素有关^[1], 当前治疗多用西药干预, 但常伴有一定不良反应, 因此, 需要寻找更为安全有效的方法^[2]。大柴胡汤是中医经典名方, 由柴胡、黄芩、大黄、枳实、半夏、白芍、大枣、生姜组成^[3], 临床治疗 HLP 具有显著疗效^[4-5]。

网络药理学 (Network pharmacology) 基于系统生物学及药理学范畴, 通过构建药物与靶点、靶点和疾病等之间的关联互作网络, 从整体来预测中药活性成分及其药理机制^[6-7], 这一整体网络策略十分契合中药整体作用特点, 与中药精准应用的过程一致。

为了进一步研究大柴胡汤治疗 HLP 的作用机制, 本研究拟通过网络药理学发现大柴胡汤的活性成分-关键靶标-信号通路的关联性, 发掘其治疗 HLP 的作用机制, 以期为该方临床精准应用提供方法支持和理论依据。

1 方法

1.1 活性成分筛选和潜在靶点收集 利用 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>) 数据库^[8], 收集大柴胡汤组方中各单味药的化学成分并进行 ADME 分析, 根据口服利用度 (OB \geq 30%) 和类药性 (DL \geq 0.18)

初步筛选出该复方的主要活性成分, 收集活性成分对应的潜在药效靶点, 并利用 Uniprot 数据库, 将靶点名称 (Protein name) 统一为基因名称 (Gene name)。

1.2 HLP 作用靶点的预测与筛选 以“hyperlipidemia”为关键词, 利用人类基因组注释数据库^[9] Genecards (<https://www.genecards.org>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 数据库^[10] 进行检索, 获取 HLP 相关疾病靶标。将疾病靶标与上述活性成分潜在药效靶点相匹配, 所得共同靶标即为潜在作用靶点。

1.3 蛋白互作网络构建及核心靶点筛选 利用 String (<https://string-db.org/>) 在线数据库^[11] 对大柴胡汤治疗 HLP 潜在靶蛋白之间相互作用 (Protein protein interaction, PPI) 进行分析, 选择关联度大的互作蛋白作为核心靶点, 并利用 Cytoscape3.7.1 网络可视化软件构建 PPI 网络。

1.4 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析 将 PPI 网络中筛选所得核心靶点导入生物学信息注释数据库^[12] DAVID 6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>) 中进行基因本体 (Gene ontology, GO) 注释分析和京都基因与基因百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 并限定靶基因名称列表为人。

收稿日期: 2020-04-15

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (2017JJA10613); 广西中青年教师基础能力提升项目 (KY2016YB830); 大学生创新课题 (201913643001, 201913643003, 201913643035); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院课题 (ZXKC201801, 2019ZD01)

作者简介: 梁天坚 (1964—), 硕士, 教授, 从事中医基础理论研究。Tel: 1307813348, E-mail: 593596134@qq.com

*通信作者: 陈睿 (1980—), 博士, 教授, 从事药物生物活性及构效关系研究。Tel: 19907716887, E-mail: 58251323@qq.com

1.5 网络模型构建及分析 将收集到的活性成分及其潜在靶点筛选结果, 利用 Cytoscape3.7.1 网络可视化软件构建“活性成分-靶点”(Compound-Target, C-T) 网络图; 根据 KEGG 通路富集分析结果中 *P* 值大小, 选择显著富集的前 15 条信号通路, 构建“活性成分-靶点-通路”(Compound-Target-Pathway, C-T-P) 网络图。基于度值 (degree) 和介数 (betweenness) 设置节点 (node) 颜色和大小, 活性成分与其作用靶点、靶点与其相关信号通路之间用边 (edge) 相连, 以反映大柴胡汤治疗 HLP 的主要活性成分及其潜在作用靶点和相关通路。

1.6 分子对接验证活性成分-核心靶点 基于上述分析结果, 选择关联度最高的活性成分作为配体, KEGG 富集结果中最为显著的信号通路所涉及靶点蛋白作为受体, 经 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>

home/home.do) 平台^[13]筛选并下载关键蛋白及其共结晶, 利用 Sybyl2.0 软件对受体蛋白及配体小分子进行准备工作, 删除水分子, 添加极性氢原子, 构建活性口袋, 选择柔性对接模式, 对活性成分与核心靶蛋白进行分子对接。对接结果利用 LigPlus 软件进行分析, 其氢键和疏水键, 预测二者的结合性能, 从而验证本研究结果的可靠性。

2 结果

2.1 活性成分筛选及潜在靶点预测 经 TCMSP 数据库筛选, 共收集到大柴胡汤活性成分 133 种, 有 9 种共有成分, 均表现出较高的口服生物利用度和类药性。其中, 柴胡活性成分 17 种, 黄芩活性成分 36 种, 大黄活性成分 15 种, 枳实活性成分 22 种, 半夏活性成分 13 种, 白芍活性成分 13 种, 大枣活性成分 29 种, 生姜活性成分 5 种, 具体信息见表 1。

表 1 大柴胡汤活性成分

编号	名称	来源	编号	名称	来源	编号	名称	来源
MOL004644	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-6-甲氧基-1-苯呋喃-5-酮 sainfurane	柴胡	MOL012246	5, 7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone 5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	黄芩	MOL001918	芍药吉酮 Paeoniflorgenone	白芍
MOL013187	荜澄茄苦素 cubebin	柴胡	MOL002932	榄核莲黄酮 panolin	黄芩	MOL001925	芍药苷 Paeoniflorin	白芍
MOL000354	异鼠李素 isorhamnetin	柴胡	MOL002934	黄芩新素 neobaicalin	黄芩	MOL001928	芍药内酯苷 Albilorin	白芍
MOL004598	3, 5, 6, 7, 3', 4', 5'-七甲氧基黄酮 5'-heptamethoxyflavone 3,5,6,7,3',4',5'-heptamethoxyflavone	柴胡	MOL002911	2, 6, 2', 4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone 2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基查耳酮	黄芩	MOL001910	11 α ,12 α -Epoxy-3 β -23-Dihydroxy-30-Norolean-20-En-28,12 β -Olide 11 α ,12 α -环氧-3 β ,23-二羟基-30-去甲齐墩果-20-烯-28,12 β -内酯	白芍
MOL004624	长贝壳杉素 A longikaurin A	柴胡	MOL002915	三裂鼠尾草素 salvigenin	黄芩	MOL001924	芍药苷 Paeoniflorin	白芍
MOL004628	羟基羽扇豆烷宁 octalupine	柴胡	MOL002937	二氢木蝶素 dihydrooroxin	黄芩	MOL001921	芍药新苷 Lactiflorin	白芍
MOL004609	茵陈黄酮 areapillin	柴胡	MOL000228	(2R)-alpinetin (2R)-山姜素	黄芩	MOL001919	芍药二酮 Palbinone	白芍
MOL004653	(+)-含白芷灵 (+)-anomalin	柴胡	MOL002927	黄芩黄酮 II skullcapflavone II	黄芩	MOL001930	苯甲酰芍药苷 Benzoyl Paeoniflorin	白芍
MOL004718	α -蒎烯醇 α -spinasterol	柴胡	MOL000073	(+)-表儿茶精 (+)-epicatechin	黄芩	MOL006129	6-甲基姜二醇双乙酸 6-Methylgingediacetate 2	生姜
MOL001645	乙酸亚油醇酯 limoleyl Acetate	柴胡	MOL002917	粘毛黄芩素 II viscidulin II	黄芩	MOL008698	二氢辣椒碱 Dihydrocapsaicin	生姜
MOL004648	曲克芦丁 troxerutin	柴胡	MOL008206	苏茅黄酮 moslosoolavone	黄芩	MOL001771	γ -谷甾醇 γ -Sitosterol	生姜
MOL004702	柴胡皂苷 C saikosaponin C	柴胡	MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯 diop	黄芩	MOL012921	光千金藤碱 Stepharine	大枣
MOL000490	牵牛花色素 petunidin	柴胡	MOL002897	表小檗碱 epiberberine	黄芩	MOL000783	原卟啉 Protoporphyrin	大枣
MOL002288	大黄素-1-O- β -D-葡萄糖苷 Emodin-1-O- β -D-Glucopyranoside	大黄	MOL001490	(2S)-1,2-苯二甲酸双(2-乙基己基)酯 Bis[(2S)-2-Ethylhexyl] Benzene-1,2-dicarboxylate	黄芩	MOL005360	马尔肯久纳醇苯酯 malkangunin	大枣
MOL000471	芦荟大黄素 Aloe-Emodin	大黄	MOL002928	千层纸素 A oroxolin A	黄芩	MOL000787	原阿片碱 fumarine	大枣
MOL002293	番泻苷 D sennoside D	大黄	MOL002910	红花素 carthamidin	黄芩	MOL012976	拟雌内酯 coumestrol	大枣
MOL002235	泽兰黄醇 eupatin	大黄	MOL002913	二氢黄芩素 dihydrobaicalin	黄芩	MOL000096	(-)-儿茶素 (-)-catechin	大枣
MOL002276	番泻叶苷 E sennoside E	大黄	MOL000525	去甲汉黄芩素 norwogonin	黄芩	MOL012980	无刺枣因 S6 daechuine S6	大枣

续表1

编号	名称	来源	编号	名称	来源	编号	名称	来源
MOL002251	柠黄质 mutatochrome	大黄	MOL010415	methyl 11,13-icosadienoate 11,13-二十碳二烯酸甲酯	黄芩	MOL012981	无刺枣因 S7 daechuine S7	大枣
MOL002268	大黄酸 rhein	大黄	MOL002926	二氢木蝴蝶素 A dihydroxylin A	黄芩	MOL001522	(S)-乌药碱 (S)-coclaurine	大枣
MOL002281	决明内酯 toralactone	大黄	MOL012266	半枝莲种素 rivularin	黄芩	MOL012989	酸枣仁皂苷 C jujuboside C	大枣
MOL002297	胡萝卜苷 daucosterol	大黄	MOL001689	刺槐素 acacetin 5, 8, 2'-trihydroxy- 7-methoxyflavone	黄芩	MOL002773	β-胡萝卜素 β-Carotene	大枣
MOL002259	大黄素甲醚双葡萄糖苷 physcion diglucoside	大黄	MOL002908	5, 8, 2'-三羟基-7-甲氧基黄酮 5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	黄芩	MOL012986	枣树皂苷 V jujubasaponin V	大枣
MOL002280	6'-草酰基芦荟大黄素 8-O-β-D-葡萄糖苷 Torachrysone-8-O-β-D-(6'-Oxayl)-Glucoside	大黄	MOL002925	5,7,2',6'-四羟基黄酮 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	黄芩	MOL013357	豆甾-4-烯-3,6-二酮 stigmast-4-ene-3,6-diol	大枣
MOL000554	没食子酸-3-O-(6'-O-没食子酰)葡萄糖苷 gallic acid-3-O-(6'-O-Galloyl)-glucoside	大黄	MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮 5, 7, 4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	黄芩	MOL012961	酸枣仁皂苷 A jujuboside A	大枣
MOL002260	原花青素 B5-3,3'-二-O-没食子酸酯 procyanidin B-5,3'-O-Gallate	大黄	MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮 5, 7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	黄芩	MOL004350	黄夹次苷丙 ruvoside	大枣
MOL002303	palmidin A 掌叶二蒽酮 A	大黄	MOL001506	鲨烯 supraene	黄芩	MOL007213	荷叶碱 nuciferin	大枣
MOL013435	枸橼苦素 poncimarin	枳实	MOL000552	韧黄芩素 I tenaxin I	黄芩	MOL001454	小檗碱 berberine	大枣
MOL001798	新橙皮苷 neohesperidin	枳实	MOL000173	汉黄芩素 wogonin	黄芩	MOL000627	千金藤碱 stepholidine	大枣
MOL013433	普郎内酯 水合物 prangenin hydrate	枳实	MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 5, 7, 2, 5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	黄芩	MOL012946	大枣皂苷 I zizyphus saponin I	大枣
MOL013436	异枸橼苦素 isoponcimarin	枳实	MOL001458	黄连碱 coptisine	黄芩	MOL012940	绣线菊碱 A spiradine A	大枣
MOL005828	川陈皮素 nobiletin	枳实	MOL003578	环阿屯醇 cycloartenol	半夏	MOL012992	滇刺枣碱 D mauritine D	大枣
MOL013428	香蜂草苷 isosakuranetin-7-rutinoside	枳实	MOL006957	环(L-苯丙氨酸-L-酪氨酸)二肽 cyclo(L-phenylalanyl-L-tyrosyl)	半夏	MOL008647	穆坪马兜铃酰胺 moupinamide	大枣
MOL013277	异橙黄酮 isosinenetin	枳实	MOL005030	巨头鲸鱼酸 gondoic acid	半夏	MOL008034	美洲茶酸 ceanothic acid	大枣
MOL009053	去氢二松柏醇 5-O-methylhierochin D	枳实	MOL006967	黄嘌呤核苷 xanthosine	半夏	MOL003410	(氨基-3,5-二氯苯基)羟基乙酸 ziziphin	大枣
MOL001803	甜橙黄酮 sinensetin	枳实	MOL006936	10, 13-二十碳二烯酸 10, 13-eicosadienoic	半夏	MOL013279	5, 7, 4'-三甲基芹菜素 5, 7, 4'-trimethylapigenin	枳实
MOL005849	香风草苷 didymin	枳实	MOL006937	12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸 12, 13-epoxy-9-hydroxynonadeca-7,10-dienoic acid	半夏	MOL007879	四甲氧基黄酮 tetramethoxylyteolin	枳实
MOL004328	柚皮素 naringenin	枳实	MOL002670	卡文定碱 cavidine	半夏	MOL000006	毛地黄黄酮 luteolin	枳实
MOL013430	普郎内酯 prangenin	枳实	MOL000519	松柏苷 coniferin	半夏	MOL013276	枳属苷 poncirus	枳实
MOL013352	黄柏酮 obacunone	枳实	MOL001755	24-乙基-4-胆甾烯-3-酮 24-ethylcholest-4-en-3-one	半夏	MOL013437	甲氧基葡萄柚内酯 6-methoxy aurapten	枳实
MOL013440	柑属苷 B citrusin B	枳实	MOL001941	前胡内酯 ammidin	枳实	MOL005100	橙皮素 hesperetin	枳实
MOL000422	山柰酚 kaempferol	柴胡			黄芩	MOL000492	(+)-儿茶素 (+)-catechin	白芍
MOL002776	黄芩苷 baicalin	半夏	MOL000359	谷甾醇 sitosterol	大枣			黄芩
MOL000098	槲皮素 quercetin	柴胡			半夏			大枣
MOL000211	丁子香萜 mairin	白芍			柴胡	MOL000358	β-谷固醇 β-sitosterol	生姜
MOL002714	黄芩素 baicalein	黄芩	MOL002914	黄烷酮 eriodyctiol	枳实			白芍
		半夏						大黄

通过 TCMSP 数据库预测得到柴胡的潜在作用靶标 314 个, 黄芩 507 个, 大黄 306 个, 枳实 306 个, 半夏 174 个

生姜 75 个, 大枣 281 个, 白芍 123 个, 得到大柴胡汤 133 种活性成分对应的潜在作用靶点 288 个, 共有靶见表 2。

表 2 大柴胡汤所含中药之间的共有靶标数量 (个)

药物	柴胡(314)	白芍(123)	黄芩(507)	枳实(306)	大黄(306)	半夏(174)	生姜(75)	大枣(281)
柴胡(314)	—	79	88	77	44	69	47	69
白芍(123)	79	—	63	47	49	54	75	61
黄芩(507)	88	63	—	59	55	89	56	73
枳实(306)	77	47	59	—	34	44	25	73
大黄(306)	44	49	55	34	—	48	42	52
半夏(174)	69	54	89	44	48	—	56	72
生姜(75)	47	43	56	25	42	56	—	56
大枣(281)	69	61	73	73	52	72	56	—

2.2 疾病靶点筛选及 PPI 网络构建 经 Genecards 数据库和 NCBI 数据库检索, 共得到 249 个 HLP 相关疾病靶标。将以上 249 个疾病靶标与大柴胡汤活性成分相对应的 288 个潜在作用靶点取交集进行分析, 得到 55 个共有靶标 (图 1), 共有靶标即为大柴胡汤治疗 HLP 的潜在作用靶点。将 55 个潜在靶点信息导入 STRING 数据库, 物种选择 “*Homosapiens*”, 以蛋白相互作用综合得分 >0.9 作为筛选条件, 得到 46 个靶点的蛋白互作结果, 将结果文件导入 Cytoscape。

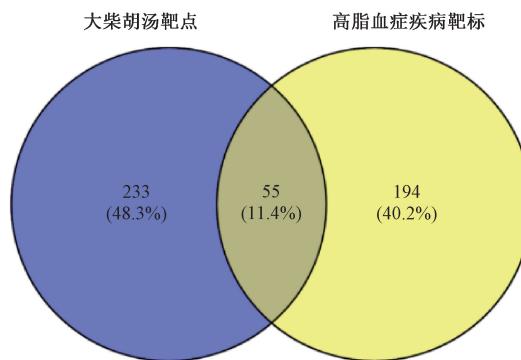


图 1 大柴胡汤疾病-成分靶点韦恩图

2.3 活性成分-核心靶点网络构建 运用 Cytoscape 3.1.1 软件将筛选所得大柴胡汤活性成分及其治疗 HLP 相关联的核心靶点相连构建“活性成分-靶点”（C-T）网络图，如

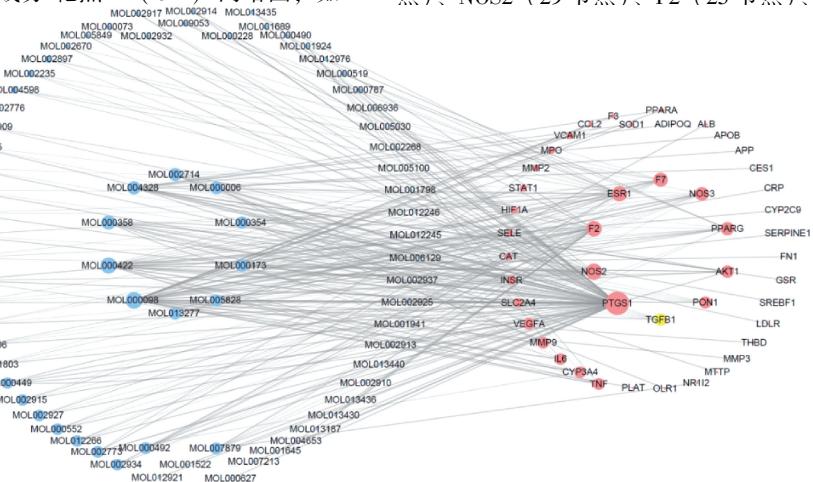


图 3 大柴胡汤治疗高脂血症 C-T 网络图

表3 大柴胡汤治疗HLP核心靶点

编号	靶点	蛋白名	编号	靶点	蛋白名
1	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	24	MMP2	72 kDa type IV collagenase
2	IL6	Interleukin-6	25	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1- α / β
3	TNF	Tumor necrosis factor	26	LDLR	Low-density lipoprotein receptor
4	THBD	Thrombomodulin	27	INSR	Insulin receptor
5	TGF β 1	Transforming growth factor β -1	28	VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1
6	MMP3	Stromelysin-1	29	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-A
7	SREBF1	Sterol regulatory element-binding protein 1	30	GSR	Glutathione reductase, mitochondrial
8	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	31	FN1	Fibronectin
9	SLC2A4	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4	32	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor α
10	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	33	F3	Tissue factor
11	SELE	E-selectin	34	F2	Thrombin
12	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1	35	ESR1	Estrogen receptor
13	F7	Coagulation factor VII	36	CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
14	PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	37	OLR1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1
15	PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	38	CRP	C-reactive protein
16	PLAT	Tissue-type plasminogen activator	39	MMP9	Matrix metalloproteinase-9
17	CES1	Liver carboxylesterase 1	40	CCL2	C-C motif chemokine 2
18	NR112	Pregnane X receptor	41	CAT	Catalase
19	CYP2C9	Cytochrome P450 2C9	42	APP	Amyloid beta A4 protein
20	NOS3	Nitric oxide synthase, endothelial	43	APOB	Apolipoprotein B-100
21	NOS2	Nitric oxide synthase, inducible	44	ALB	Serum albumin
22	MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	45	AKT1	RAC- α serine/threonine-protein kinase
23	MPO	Myeloperoxidase	46	ADIPOQ	Adiponectin

表4 大柴胡汤治疗HLP活性成分及核心靶点的网络度和介数

节点(活性成分)	网络度	介数	节点(关键靶点)	网络度	介数
MOL000098	31	0.275 426 28	PTGS1	67	0.534 282 38
MOL000422	28	0.064 561 2	NOS2	29	0.071 778 01
MOL000358	18	0.007 017 82	F2	25	—
MOL004328	13	0.139 644 81	ESR1	23	0.082 134 88
MOL002714	12	0.015 285 2	F7	18	0.036 566 03
MOL000006	10	0.041 278 05	NOS3	15	0.021 723 11
MOL000173	9	0.044 045 69	PPARG	14	0.038 454 11
MOL000354	8	0.031 114 86	AKT1	9	0.034 580 06
MOL005828	7	0.017 845 64	PON1	7	0.001 139 86
MOL013277	7	0.014 020 84	TGFB1	7	0.001 139 86

2.4 GO 基因功能注释分析和KEGG通路富集分析 将46个核心靶点导入DAVID数据库进行GO基因功能注释分析和KEGG通路富集分析,共映射到172个GO term,包括124个生物过程(Biological Process, BP)、19个细胞组分(Cellular Component, CC)和29个分子功能(Molecular Function, MF)。按照P值大小($P>0.01$),挑选出最显著富集的15个GO term进行作图,结果如图4所示。在分子功能中,丝氨酸内肽酶活性(serine-type endopeptidase activity)和血红素结合(heme binding)相关性最大;在细胞组分中,细胞外空腔(extracellular space)和细胞表面(cell surface)相关性最大;在生物过程中,葡萄糖稳态(glucose homeostasis)与蛋白质磷酸化正调控(positive regulation of protein phosphorylation)相关性最大。

通过KEGG富集分析,活性成分潜在药效靶点共参与48条信号通路,根据P值大小($P>0.01$),挑选出最显著

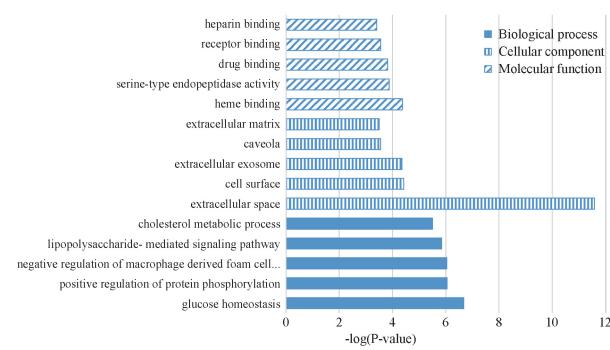


图4 GO富集图

富集的15个KEGG通路进行作图,获得相关基因31个。如图5所示,最显著富集的通路是HIF-1 signaling pathway、TNF signaling pathway和Insulin resistance,相关靶点包括AKT1、SREBF1、PPARA、IL6、SLC2A4、NOS3、

PTPN1、INSR、HIF1A、VEGFA、SERPINE1、NOS2、VCAM1、CCL2、MMP9、MMP3、SELE。

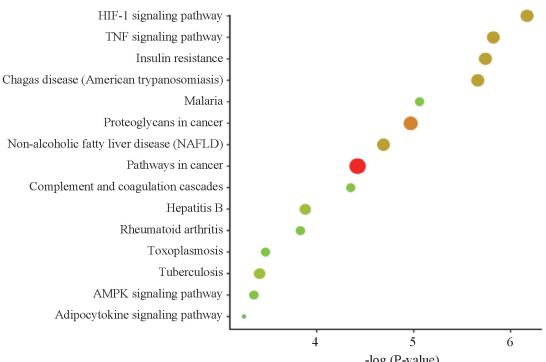


图 5 KEGG 富集图

2.5 活性成分-靶点-通路网络构建 为了直观地反映活性成分与靶点和主要通路之间的关系,根据KEGG通路富集分析结果,选择富集度最高的前15条信号通路为研究对象,采用Cytoscape3.7.1软件构建大柴胡汤治疗HLP“活性成分-靶点-主要通路”(C-T-P)网络模型。如图6所示,大柴胡汤8个组分(橙色节点)的52个活性成分(蓝色节点)共对应到30个潜在作用靶点(绿色节点),主要生物信号通路15条(黄色节点),节点颜色越深表示与此节点相连的边越多,它的度数越大,节点也就越大。从C-T-P网络可以发现,活性成分MOL000098(querceatin)作为关联度最高的活性成分,可作用于NOS2、F2、ESR1、AKT1和F7等多个高关联靶点,涉及多条信号通路,各靶点相互协调,共同参与其药理作用的发挥。

2.6 分子对接验证关键通路 通过GO基因功能注释分析

表5 分子对接结果

化合物	靶点	PDB ID	Total score	化合物	靶点	PDB ID	Total score
槲皮苷(querceatin)	NOS2	2nsi	7.73	山柰酚(kaempferol)	NOS2	2nsi	8.09
5280343	HIF1A	3hqu	5.65	5280863	HIF1A	3hqu	4.98
	SERPINE1	1aj7	5.8816		SERPINE1	1aj7	4.93
	INSR	1gag	5.53		INSR	1gag	5.18
	IL6	1n26	4.99		IL6	1n26	4.11
	VEGFA	5t89	4.94		VEGFA	5t89	2.28
	NOS3	1m9j	7.24		NOS3	1m9j	7.46
	AKT1	1h10	4.01		AKT1	1h10	4.40
汉黄芩素(wogonin)	NOS2	2nsi	5.23	毛地黄黄酮(luteolin)	NOS2	2nsi	8.08
5281703	HIF1A	3hqu	5.93	5280445	HIF1A	3hqu	5.73
	SERPINE1	1aj7	5.93		SERPINE1	1aj7	5.82
	INSR	1gag	1.79		INSR	1gag	6.25
	IL6	1n26	4.08		IL6	1n26	4.89
	VEGFA	5t89	5.59		VEGFA	5t89	4.10
	NOS3	1m9j	6.09		NOS3	1m9j	7.60
	AKT1	1h10	4.85		AKT1	1h10	4.05
异鼠李素(isorhamnetin)	NOS2	2nsi	10.00	异鼠李素(isorhamnetin)	IL6	5t89	4.30
5281654	HIF1A	3hqu	6.47	5281654	VEGFA	1m9j	3.24
	SERPINE1	1aj7	6.47		NOS3	1h10	8.69
	INSR	1gag	8.1332		AKT1	2nsi	4.30

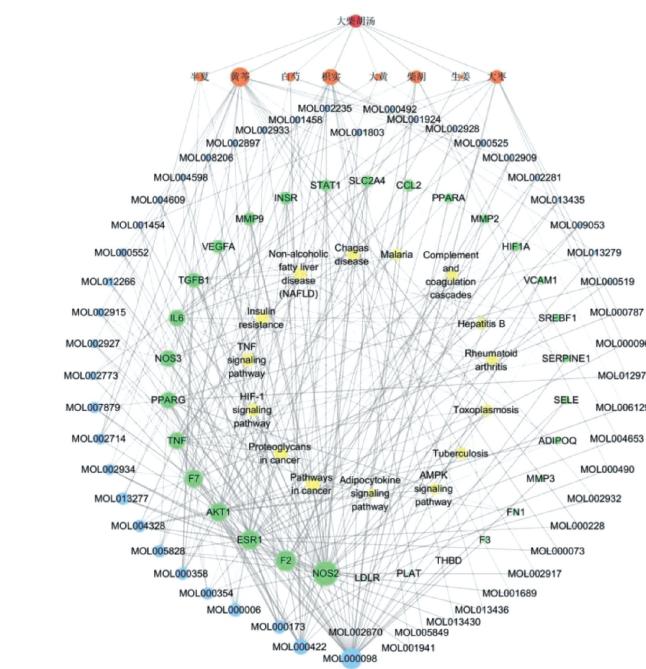


图 6 大柴胡汤治疗高脂血症 C-T-P 网络图

和KEGG通路富集分析,得到最显著富集的通路是HIF-1 signaling pathway,相关基因IL6、HIF1A、VEGFA、SERPINE1、NOS3、NOS2、INSR、AKT1,与关联度最高的5种活性成分槲皮苷(querceatin)、山柰酚(kaempferol)、汉黄芩素(wogonin)、毛地黄黄酮(luteolin)和异鼠李素(isorhamnetin)进行分子对接,结果如表5所示,可知5种活性成分与HIF-1 signaling pathway的绝大部分相关基因获得较好的对接分数,验证了本研究结果的可靠性。

NOS2 靶点是 C-P-T 网络图的核心节点，分子对接结果显示，关联度最高的 5 种活性成分与 NOS2 对接活性均高于其他靶点。其中，关键节点 quercetin（槲皮苷）能稳定地接入 NOS2 蛋白的活性口袋，通过与蛋白活性中心口袋

的卟啉基团和 GLU377 氨基酸形成分子间氢键，与 PRO350、TYR373 和 VAL352 形成分子间疏水键，维持 NOS2 蛋白活性口袋的稳定，如图 7 所示。

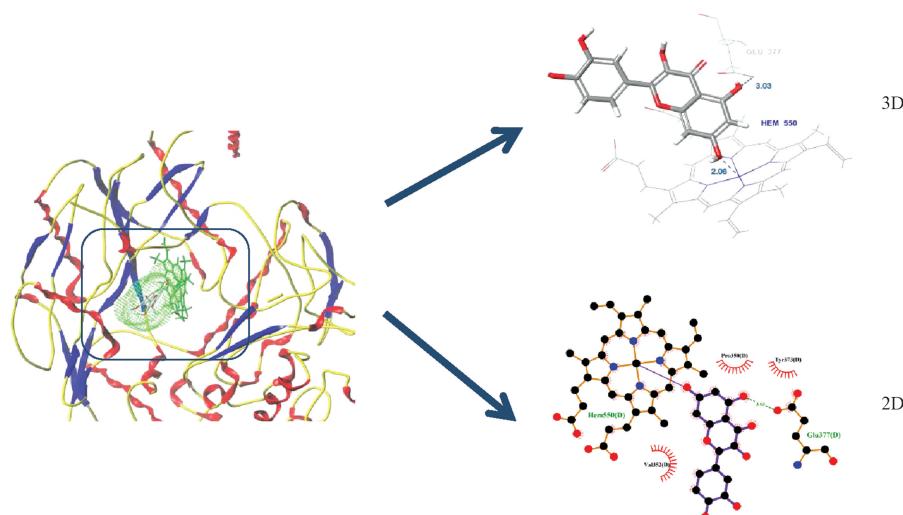


图 7 活性成分 quercetin（槲皮苷）与 NOS2（PDB: 2nsi）相互作用的分子对接图

3 讨论

高脂血症可直接引发多种严重危害人体健康的疾病，如动脉粥样硬化、冠心病、胰腺炎等，中医通常采用健脾益气、补益肝肾、化湿泄浊、祛瘀化痰等方法进行治疗^[14]。大柴胡汤为治疗少阳阳明合病方，有清利肝胆、通腑泄浊、和中健脾的作用，因此很多医家用其治疗高脂症，并取得很好的疗效^[15]。本研究通过 TCMPS 数据库，筛选出大柴胡汤 8 种组分的化学成分 133 个，大柴胡汤相对应的疾病靶点 288 个，通过共有靶标分析，8 味中药均存在多个共同靶标，说明它们之间存在多种协同或拮抗作用，多味药中不同的化学成分可以相继与靶点分子结合，形成叠加效应共同发挥作用，不同的靶点又可能隶属同一通路，彼此交织形成网络，可能是大柴胡汤治疗高血脂症的原因所在。

通过对口服利用度和类药性筛选，得到大柴胡汤活性成分 133 个，槲皮苷在 C-T 网络和 C-T-P 网络中均为关键节点，并且经过分子对接证明了其与多个关键靶标均具有良好的对接活性。槲皮苷是一种黄酮类单体化合物，广泛存在于植物中，药理研究表明，其具有降血糖、降血脂、抗氧化和抗肿瘤等多种药理作用^[16]，邢影等^[17]发现槲皮苷能显著降低高脂血症大鼠血清和肝脏中总胆固醇和甘油三酯水平，调节高脂血症大鼠的血脂代谢，抑制肝脏脂肪沉积。

通过对大柴胡汤 C-T 网络、C-T-P 及 PPI 网络进行分析，认为 PTGS1、NOS2、VEGFA、IL6 等靶点是大柴胡汤治疗高血脂症的关键靶点。PTGS1（环氧化酶），可调节花生四烯酸类物质的生成，后者调节可促进血管壁动脉粥样硬化和血栓形成的生理过程，包括血小板聚集、控制血管张力及局部炎症反应^[18]。NOS2（一氧化氮合酶）和 IL6

（白细胞介素 6）是两个重要的炎症因子，研究表明高血脂症与主要炎症因子具有一定相关性，常一川等研究发现大柴胡汤对高脂高胆固醇大鼠心肌组织内 TNF- α 、IL-6 蛋白表达均显著上调^[19-20]；VEGFA（血管内皮生长因子 A）是 PDGF/VEGF 生长因子家族的成员，在血管生成、血管发生和内皮细胞生长中发挥重要作用，可以诱导内皮细胞增殖、促进细胞迁移、抑制凋亡并诱导血管通透性，可以调节脂肪组织分化、基因表达和生物学功能的平衡^[21]。

经 GO 基因功能注释，发现大柴胡汤活性成分对葡萄糖稳态、蛋白质磷酸化的正调控、巨噬细胞衍生泡沫细胞分化的负调控、脂多糖介导的信号通路和胆固醇代谢过程等生物学过程有一定影响，并在大柴胡汤治疗高血脂症所涉及的作用靶点及相关通路中有所体现。KEGG 通路富集显示，HIF-1 signaling pathway（低氧诱导因子 1 信号通路）、TNF signaling pathway（肿瘤坏死因子信号通路）和 Insulin resistance（胰岛素抵抗）通路是主要的富集通路，研究表明，通过 HIF-1 signaling pathway 可以调节 HIF-1 的活性，能激活多种缺氧反应基因的表达，组织缺氧可诱导 HIF-1 的活性上调并激活其下游因子内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）的高表达，促进血管内皮细胞的增殖和分化，减小高血脂症对血管内皮细胞的损失^[22]；TNF signaling pathway 中的 TNF- α 是脂肪细胞的分泌产物之一，其可促进前体脂肪细胞、脂肪细胞凋亡，抑制前体脂肪细胞分化，抑制脂肪合成，也可以刺激脂肪细胞脂质分解加速，导致游离脂肪酸升高，并抑制胰岛素信号通路，导致胰岛素抵抗^[23-24]；Insulin resistance 与高血脂症关系密切，高血脂患者容易导致胰岛素抵抗，同时，胰岛素抵抗使胰岛素靶细胞对胰岛素不敏感，血浆葡萄糖不能被靶细胞摄取导致血浆葡萄糖水平升高，机体需要摄取血

浆中过多的葡萄糖合成脂肪储存于靶细胞, 维持着糖代谢平衡, 引起高血脂症^[25-26]。

综上所述, 本研究利用网络药理学方法挖掘大柴胡汤治疗高血脂症的活性成分, 通过网络构建及通路富集阐述了活性成分与作用靶点和通路之间的联系, 揭示了大柴胡汤治疗高血脂症的潜在分子机制, 为该方临床应用及深入研究提供了理论依据。

参考文献:

[1] 尚菊菊. 黄丽娟教授学术思想临床经验总结及治疗高脂血症的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[2] 张立新. 加味半夏白术天麻汤合温胆汤治疗高血压并高脂血症的效果观察[J]. 中外医学研究, 2019, 17(25): 140-141.

[3] 刘晓晴. 大柴胡汤和桂附地黄方的化学成分指纹图谱研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.

[4] 陈 健. 大柴胡汤加味治疗高脂血症45例临床观察[J]. 中医临床研究, 2019, 11(1): 65-67.

[5] 史萍慧, 温 翔. 加味山楂大柴胡汤治疗高脂血症性胰腺炎36例[J]. 光明中医, 2017, 32(19): 2793-2795.

[6] Hopkins A L. Network pharmacology[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.

[7] Zhang R Z, Yu S J, Bai H, et al. TCM-Mesh: the database and analytical system for network pharmacology analysis for TCM preparations[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2821.

[8] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.

[9] 杨释岑, 刘志强, 刘和波, 等. 利用网络药理学方法研究交泰丸治疗糖尿病的作用机制[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 69-74.

[10] 张玉宁, 高 耀, 李 科, 等. 基于网络药理学的黄芪总黄酮治疗肾病综合征的机制研究[J]. 药学学报, 2018, 53(09): 1429-1441.

[11] Damian S, Andrea F, Michael K, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(suppl 1): 561-568.

[12] Huang D, Sherman B, Lempicki R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2008, 4(1): 44-57.

[13] 吕金燕, 黄嘉咏, 袁彩英, 等. 基于网络药理学的罗汉果止咳化痰活性成分靶点研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2019, 42(01): 40-48.

[14] 林玉慧. 益气养血、化痰祛瘀通络法治疗麻木的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[15] 陈靖雯. 李赛美柴胡类方临床运用多媒体数据库建立与研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[16] 杨 琳. 槲皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.

[17] 邢 影, 孙继泽, 牟凤辉, 等. 槲皮苷对实验性高脂血症大鼠血脂代谢的影响[J]. 特产研究, 2014(2): 43-46.

[18] Linton M, Sergio F. 环氧化酶-2与动脉粥样硬化[J]. 世界医学杂志, 2003, 7(13): 57-60.

[19] 沈正军. 冠心病合并高脂血症患者血脂水平与主要炎症因子的相关性[J]. 心血管康复医学杂志, 2017, 26(4): 388-390.

[20] 常一川, 王凤荣. 大柴胡汤对高脂高胆固醇大鼠TNF- α 、IL-6表达水平的影响[J]. 中国中西医结合儿科学, 2015, 7(1): 17-19.

[21] 金红红. VEGFA 和 VEGFB 调节脂肪组织分化、基因表达和生物学功能的平衡[D]. 长春: 东北师范大学, 2018.

[22] 金永娟, 李宏妹, 朱文云, 等. 高血脂对血细胞和血管内皮细胞的损伤[J]. 中国微循环, 2002, 6(1): 22-24.

[23] 李虹仪, 习欠云, 张永亮. TNF- α 在脂肪中的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2012, 41(S1): 75-77.

[24] 郑 娜, 谢烨明, 余 海, 等. TNF- α 与肥胖相关胰岛素抵抗的研究进展[J]. 中西医结合研究, 2012, 4(4): 199-202.

[25] 袁 红, 袁 劳. 单纯高脂血症与胰岛素抵抗指数的关系研究[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(S1): 246-247.

[26] 陈建国. 高脂血症与胰岛素抵抗[J]. 青海医药杂志, 2000, 30(6): 17-18.