

基于网络药理学及分子对接的丹参抗缺血性中风的作用机制研究

叶玉清 胡丙成 黄琪

(黑龙江省中医药科学院 黑龙江哈尔滨 150000)

摘要: 目的: 基于网络药理学及分子对接探究丹参抗缺血性中风的作用机制。方法: 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索丹参的有效成分及相关靶点,以“ischemic stroke”、“cerebral infarction”为关键词在 GeneCards 数据库搜索缺血性脑卒中的相关靶点,去除重复项后利用 Venny 2.1.0 在线工具将药物靶点与疾病靶点取交集,获得丹参治疗缺血性脑卒中的潜在靶点,采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建药物有效成分-疾病靶点调控网络。并利用 STRING 网站来构建丹参与脑梗死之间的蛋白质-蛋白质相互作用关系(PPI)网络,并进行相应的 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析,用 Autodock 进行分子对接。结果: 筛选出丹参有效成分 35 个,与疾病相关成分 30 个,核心成分为丹参酮 II A,作用于 76 个靶点。利用 STRING 网站来构建丹参与缺血性中风之间的 PPI 网络,获得核心靶点 TNF、TP53、FOS、MYC、CASP3,经分子对接发现靶点蛋白 TNF、TP53、CASP3 均存在很好的结合作用且匹配度高(结合能小于-6 kcal/mol),其中,丹参酮 II A 与 TNF 打分值最高,结合最良好。主要通过 TNF 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等通路发挥作用。对丹参治疗缺血性中风的活性组分和机理进行了初步的预测,为丹参在临床治疗缺血性中风进一步提供更多可行性。

关键词: 中风; 脑卒中; 丹参; 网络药理学; 分子对接

缺血性中风又称为“缺血性脑卒中”,缺血性脑卒中是由大脑中一条或多条动脉的局灶性闭塞或狭窄(颅内闭塞)或导致大脑(颅外颈动脉闭塞)引起的^[1],是一种高发于合并肥胖、冠心病、高血压、糖尿病等基础疾病中老年人的脑血管疾病,患者主要表现为恶心、头痛、头晕、眩晕等症状,甚至引起肢体偏瘫等后遗症,从而增加患者死亡风险^[2]。缺血性脑卒中属中医“中风”的范畴,中风的发病与风、火、痰、虚、瘀等因素密切相关,其中“瘀”贯穿缺血性脑卒中发病发展的全过程^[3]。因此,在治疗缺血性脑卒中过程中,活血化瘀法占很大比重。丹参是治疗淤血症的著名中药,具有活血祛瘀、通经止痛等功效。据现代药理学研究显示,丹参具有改善血液循环、抗凝血、抗肿瘤、抗炎、抗心血管疾病、抑制炎症反应、扩张冠状动脉等作用,目前临床上主要用于防治冠心病、心肌梗死、缺血性脑卒中等心脑血管疾病^[4,5,6]。网络药理学是首先由英国药理学家 ANDREW L.HOPKINS 提出,基于系统生物学原理,通过对生物系统进行网络分析,选择特定的信号节点,进行多靶点药物分子设计的学科,其采用多成分和多靶点的研究方法,寻找潜在的活性成分和作用靶点,构建“成分-靶点-通路”网络,为中药活性成分筛选和药物研发提供了新的策略^[7,8,9]。本研究基于网络药理学,探索丹参抗缺血性中风的作用机制,为丹参的进一步临床应用提供依据。

1. 资料与方法

1.1 丹参有效成分获取、靶点收集及蛋白质获取

在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)检索中药丹参,根据文献查阅设置口服利用率(OB)≥30%,血脑屏障(BBB)>0,类药性(DL)≥0.18 为标准以获取有效成分。使用 TCMSP 进行有效成分的靶点预测,将有效成分靶点通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)进行蛋白质 ID 转换。

1.2 丹参-缺血性中风共同靶点的筛选

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)搜索缺血性中风关键词(ischemic stroke、cerebral infarction)来获取疾病相关靶点,将得到的结果去重后使用在线工具 Venny 2.1.0 在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将丹参有效成分靶点与疾病相关靶点取重合,获得 76 个靶点。

1.3 药物成分-疾病靶点网络构建与分析

将筛选出的丹参作用于缺血性中风的潜在靶点用 Cytoscape 3.8.0 构建药物有效成分-疾病靶点互作网。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网构建及核心靶点的筛选

将获取到的丹参有效成分靶点与缺血性中风疾病靶点去交集后靶点导入 STRING 网站(<https://string-db.org>),在物种设置处将物种设置为“Homo sapiens”,得到 PPI 互作图。将 PPI 互作图导入 Cytoscape 3.8.0 软件,利用 Analyze Network 工具和 Centiscape 2.2 插件分析得到其核心靶点。

1.5 丹参治疗缺血性中风 GO 分析和 KEGG 信号通路分析

采用 Metascape 在线分析工具(<https://metascape.org>)对丹参与疾病的 76 个共同靶点进行 GO 分析及 KEGG 信号通路分析,设置参数为“Homo sapiens”,获得生物过程(BP)、分子功能(CC)、细胞组分(MF)、KEGG 信号通路分析结果,并通过微生信在线绘图工具(www.bioinformatics.com.cn)将得到的 GO 富集信息和 KEGG 分析结果绘制成图。

1.6 核心靶点与关键成分的对接

小分子结构的准备: Tanshitone IIA 分子结构来自于 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 Chem3D 进行格式转化以及能量最小化,之后将所有的结构导入 Autodock 软件,通过加氢、结构优化、能量最小化,保存后作为分子对接的配体分子数据库。

靶点蛋白结构的准备: TNF/TP53/FOS/MYC/CASP3 蛋白结构来自 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)。蛋白结构在 Pymol2.1 平台进行处理,去除结晶水,补加缺失的氢原子,并修复缺失键信息,修补缺失肽段,最后对蛋白进行能量最小化、以及几何结构的优化。

分子对接: 使用 Autodock 完成。对受体和配体进行预处理、优化和最小化。对接盒选取全蛋白,最后通过半柔性对接方法进行分子对接。

2. 结果

2.1 丹参有效成分及靶点

依照上述筛选标准,得到丹参有效成分共 35 个(表 1),有效成分靶点去重后经 Uniprot 数据库的蛋白质 ID 转换,得到 94 个药物成分靶点。

2.2 丹参治疗缺血性中风作用靶点的预测

GeneCards 数据库以关键词“ischemic stroke”、“cerebral infarction”搜索缺血性中风相关靶点,合并去重后得到疾病靶点 5867 个。通过 Venny 2.1.0 在线工具将药物成分靶点与疾病靶点取交集,得到共同靶点 76 个(图 1)。

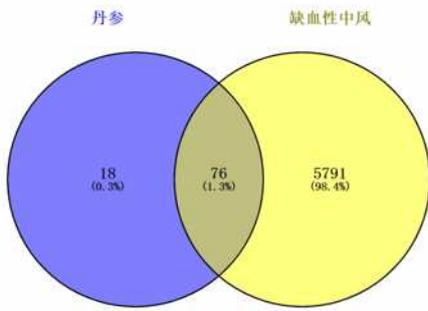


图 1 丹参作用于缺血性中风靶点韦恩图

2.3 药物有效成分 - 疾病靶点构建及核心成分筛选

上述韦恩图得到药物、疾病共同靶点 76 个，表明丹参通过这 76 个靶点对缺血性中风发挥作用，将数据导入 Cytoscape3.8.0 绘制成网络图（图 2），共包含 108 个节点和 578 条边。利用平均值度的 2 倍选出药物的核心成分为丹参酮 II A，故推断该成分为丹参治疗缺血性中风的核心成分。

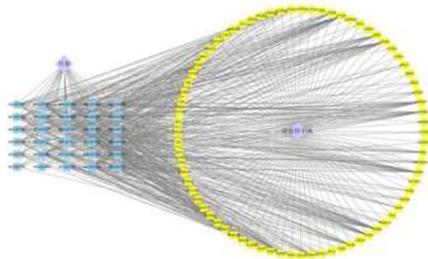


图 2 丹参治疗缺血性中风有效成分-疾病靶点网络

2.4 PPI 网络构建及其关键靶点

丹参作用于缺血性中风的靶点共有 76 个，将共有靶点导入 STRING 网站，在物种设置处将物种设置为“Homo sapiens”，得到 PPI 互作图（图 3）。将 PPI 互作图导入 Cytoscape 3.8.0 软件使其可视化，颜色越深表示靶点度值越大。将同时满足靶点度值大于平均值 2 倍、介度中心性、接近中心性均大于平均值的靶点作为丹参治疗缺血性中风的关键靶点，满足此标准的靶点一共有 5 个，分别是肿瘤坏死因子（TNF）、TP53、FOS、MYC、CASP3 等。

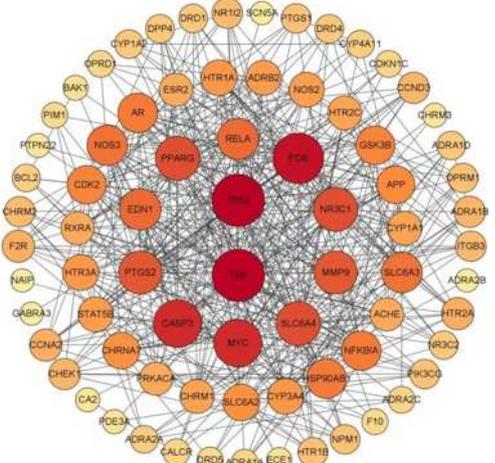


图 3 丹参治疗缺血性中风靶点 PPI 网络

2.5 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析结果

使用 Metascape 在线工具对丹参作用于缺血性中风的核心靶点进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析，GO 富集分析中得到生物过程条目 20 条，细胞组分条目 7 条，分子功能条目 6 条。以基

因为筛选标准，整合生物过程条目（前 10 条）、细胞组分条目、分子功能条目，并利用微生信在线绘图工具绘制 GO 富集分析柱状图（图 4）。得到 KEGG 信号通路 8 条（图 5），丹参治疗缺血性中风可能通过以下通路发挥作用：TNF 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等，提示丹参在治疗缺血性中风过程中是多途径效应机制在发挥作用。

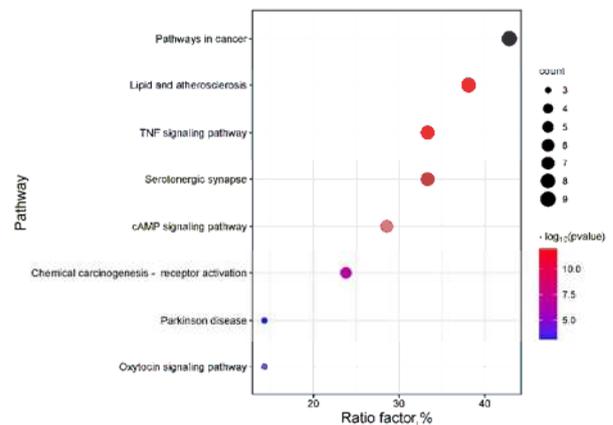
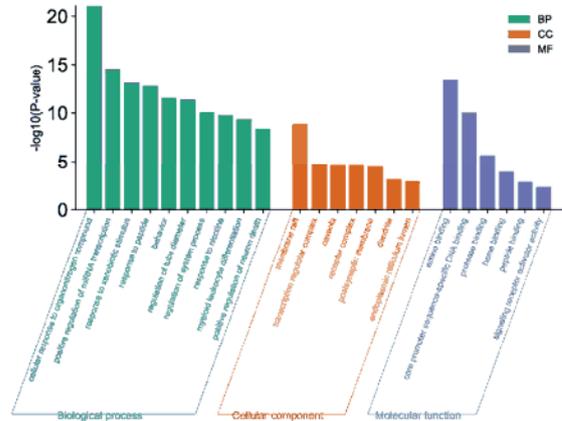


图 5 丹参治疗脑梗死靶点京都基因与基因组百科全书信号通路富集分析

2.6 核心靶点与关键成分的对接

利用 Autodock 将丹参酮 II A 与 TNF、TP53、FOS、MYC、CASP3 进行分子对接，得到结合能，如表 2 所示。将对接后 Tanshitone IIA 与靶点蛋白形成的复合物利用 Pymol2.1 软件进行可视化，得到核心成分与靶点蛋白的结合模式得到的分子对接结果，如图 6。分子对接结果表明，Tanshitone IIA 与靶点蛋白 TNF、TP53、CASP3 均存在很好的结合作用且匹配度高(结合能小于-6 kcal/mol)。其中，Tanshitone IIA 与 TNF 打分值最高，结合最良好。

表 2 丹参治疗缺血性中风中核心成分和关键靶点对接打分值

化合物	靶点	结合能
Tanshitone IIA	TNF	-8.25
	TP53	-7.43
	FOS	-5.09
	MYC	-5.59
	CASP3	-7.46

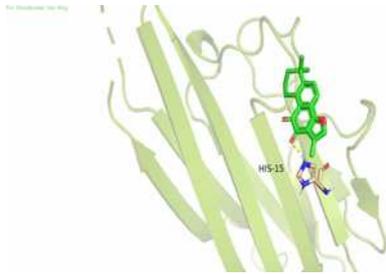


图 6-1 TNF

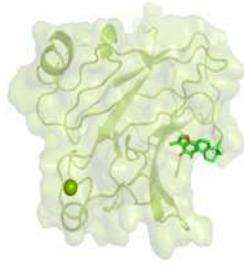


图 6-2 TP53

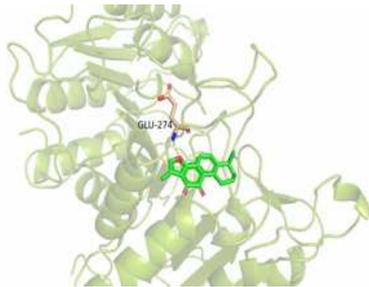


图 6-3 CASP3

3.讨论

该研究基于网络药理学,通过分析丹参化学成分,预测靶点,分析信号通路,对丹参治疗缺血性中风进行探索,为丹参在临床上的进一步应用提供依据。

丹参中共发现有效成分 35 个,其中作用于缺血性中风最核心的成分为丹参酮 II A。丹参酮 II A 是丹参中脂溶性成分的代表,具

表 1TCMSP 数据库收集的丹参有效成分

TCMSP ID	Name	OB(%)	BBB	DL
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	38.75	0.39	0.36
MOL001659	Poriferasterol	43.83	1.03	0.76
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	1.14	0.75
MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.66	0.23
MOL002222	sugiol	36.11	0.7	0.28
MOL002651	Dehydrotanshinone II A	43.76	0.52	0.4
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	33.77	0.8	0.29
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.86	0.81	0.23
MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	44.93	0.22	0.44
MOL007049	4-methylenemiltirone	34.35	0.87	0.23
MOL007061	Methylenetanshinquinone	37.07	0.46	0.36
MOL007064	przewalskin b	110.32	0.22	0.44
MOL007077	sclareol	43.67	0.51	0.21
MOL007081	Danshenol B	57.95	0.11	0.56
MOL007085	Salvilenone	30.38	1.07	0.38
MOL007088	cryptotanshinone	52.34	0.51	0.4
MOL007094	danshenspiroketallactone	50.43	0.51	0.31
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	49.4	0.24	0.29
MOL007100	dihydrotanshinlactone	38.68	0.81	0.32
MOL007101	dihydrotanshinone I	45.04	0.43	0.36

有天然抗氧化作用,大量的研究表明丹参酮 II A 在抗肿瘤、心脑血管疾病、抗菌消炎等方面均有良好的治疗作用^[10]。张民等^[11]实验研究也表明丹参酮 II A 通过促进机体对氧自由基代谢、降低自由基水平的作用,明显减轻大鼠局灶性脑缺血 24 小时后脑组织充血、水肿和缺血坏死。

运用网络药理学得到丹参作用于缺血性中风的靶点共 76 个,其中与 TNF、TP53、FOS、MYC、CASP3 等靶点关系密切。在 PPI 互作网中中度值大于 2 倍且介度中心性、接近中心性均大于平均值的丹参有效成分-疾病靶点中, FOS 是蛋白-蛋白交互作用网络中最多种,介度中心性最大。FOS 是 c-fos 基因转录产生的成熟 mRNA 编码的一个核磷蛋白。c-fos 基因是人或动物细胞中固有的正常基因,属于即刻早期应答基因,FOS 蛋白参与细胞的正常分化、生长以及学习、记忆等过程,在脑内与皮层、海马、边缘系统、背海马、纹状体内 FOS 蛋白的表达密切相关^[12]。KEGG 富集分析显示主要丹参可能通过 TNF 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等对缺血性中风发挥作用。TNF- α 在巨噬细胞、自然杀伤细胞、T 细胞和 B 细胞中均有表达。研究显示,急性缺血性脑卒中病人血清中 TNF- α 水平会升高,并且与病人神经功能的缺损程度和梗死范围密切相关^[13]。TNF- α 能诱导炎症胶质细胞的生成,并在缺血性脑组织中起重要作用。脂质和动脉粥样硬化与缺血性中风的发生关系密切,既往研究发现,动脉粥样硬化本质上是一种慢性的炎症过程,其主要原因是血管壁细胞受到多种有害物质的刺激,而血脂的异常与动脉粥样硬化的发展有着密切的关系。颈动脉狭窄、中、重度颈动脉狭窄是发生进行性脑梗塞的主要原因^[14]。cAMP 是细胞内重要的二次信使之一,在细胞信号转导中起着关键作用,调节着许多生理和病理过程^[15],通过活化 PKA 信号途径,介导 CREB 蛋白与 cAMP 反应因子的结合,调控神经元产生再生突触,起保护大脑的作用^[16]。

综上所述,丹参中的丹参酮 II A 等多种有效成分可能通过 TNF、TP53、FOS、MYC、CASP3 等核心靶点对 TNF 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等多条通路发出调控,进而对缺血性中风发挥多成分、多靶点、多通路的治疗作用,为丹参在临床治疗缺血性中风进一步提供更多可行性。

MOL007105	epidanshenspiroketallactone	68.27	0.61	0.31
MOL007107	C09092	36.07	1.54	0.25
MOL007108	isocryptotanshi-none	54.98	0.34	0.39
MOL007111	Isotanshinone II	49.92	0.45	0.4

续表 1 TCMSP 数据库收集的丹参有效成分

TCMSP ID	Name	OB(%)	BBB	DL
MOL007115	manool	45.04	1.16	0.2
MOL007120	miltionone II	71.03	0.03	0.44
MOL007121	miltipolone	36.56	0.17	0.37
MOL007122	Miltirone	38.76	0.87	0.25
MOL007124	neocryptotanshinone ii	39.46	0.16	0.23
MOL007143	salvilenone I	32.43	0.77	0.23
MOL007145	salviolone	31.72	0.72	0.24
MOL007154	tanshinone iia	49.89	0.7	0.4

参考文献:

[1]Zerna C, Thomalla G, Campbell BCV, Rha JH, Hill MD. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. *Lancet*. 2018 Oct 6;392(10154):1247-1256.

[2]穆克代思·哈木扎,阿司匹林联合硫酸氢氯吡格雷口服治疗脑梗塞的有效性和安全性研究[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(57):152.

[3]安佰海,吉中强,唐明.从热、毒、痰、瘀互结论治中风病先兆证[J].中医杂志,2012,53(09):744-746.

[4]王梦梦,吉兰芳,崔树娜.丹参功效的物质基础研究进展[J].中医学报,2019,34(05):944-949.

[5]王冰瑶,吴晓燕,樊官伟.丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展[J].中草药,2014,45(17):2571-2575.

[6]Xue J, Shi Y, Li C, Song H. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients, potential targets, and signaling pathways in compound Lian-Ge granules for treatment of diabetes. *J Cell*

Biochem. 2019 Apr;120(4):6431-6440.

[7]Niu B, Zhang H, Li C, Yan F, Song Y, Hai G, Jiao Y, Feng Y. Network pharmacology study on the active components of *Pterocypsela elata* and the mechanism of their effect against cerebral ischemia. *Drug Des Devel Ther*. 2019 Sep 5;13:3009-3019.

[8]薛金涛,黄宁,孔文艳,李春燕,荆云,张铭湘,李鹏.基于网络药理学探讨葛根降糖活性成分及作用机制的研究[J].中国药学杂志,2018,53(20):1748-1754.

[9]蔡丽萍,刁志刚,杨红.丹参酮的药理作用和临床研究进展[J].广东药学院学报,2008(03):321-324.

[10]张民,张骅,徐鹏,苏仁意.丹参酮 II A 的药理作用研究进展[J].医药导报,2008(10):1237-1239.

[11]涂冬萍,马小军,莫长明,覃喜军,黄杰.FOS 蛋白的研究进展及生物信息学分析[J].湖北农业科学,2015,54(07):1537-1542.

[12]Bokhari FA, Shakoori TA, Butt A, Ghafoor F. TNF-alpha: a risk factor for ischemic stroke. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2014 Apr-Jun;26(2):111-4.

[13]刘晓玲.动脉粥样硬化与缺血性卒中的相关性研究[J].中国高等医学教育,2013(02):136-137.

[14]Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2020 Nov 24;9(1):32.

[15]Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):605-23.