

基于网络药理学探讨国医大师张磊运脾汤 治疗高脂血症的分子机制^{*}

林远茂¹, 施荣聪¹, 黄宝特¹, 徐世安¹, 孙玉信^{3**}, 姜 枫^{2**}

(1. 广西中医药大学研究生院 南宁 530011; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院 南宁 530011;
3. 河南中医药大学第三附属医院 郑州 450003)

摘 要:目的 基于网络药理学探讨运脾汤治疗高脂血症的分子作用机制。方法 通过TCMSP、Pharm Mapper、GeneCards、DisGeNET等多个数据库检索,预测并收集运脾汤的有效化学成分和对应的靶蛋白以及高脂血症的相关疾病基因,筛选关键靶点,对关键靶点及相关有效化学成分做分子对接验证,利用DAVID数据库的富集分析功能,得到运脾汤的有效化学成分干预高脂血症的过程中涉及的相关功能和通路,并构建“中药材-有效化学成分-靶点-通路”综合网络。结果 运脾汤干预高脂血症的核心成分为木犀草素、槲皮素、山奈酚、柚皮素等;核心靶点PPARG、NOS3、EGFR、APOB和ESR1,分子对接验证,大部分靶点与化合物有结合活性较好;DAVID富集分析,运脾汤可能通过细胞内外刺激、脂多糖反应和调节凋亡等生物过程和HIF-1信号通路、AGE-RAGE信号通路、胰岛素信号通路、TNF信号通路等途径干预高脂血症。结论 本研究初步预测了运脾汤干预高脂血症的多成分、多靶点、多通路的作用机制,为进一步实验研究提供理论依据。

关键词:网络药理学 高脂血症 运脾汤 分子作用

doi: 10.11842/wst.20200227005 中图分类号: R259 文献标识码: A

高脂血症(Hyperlipidemia)是人体脂质代谢的异常的一种表现,其特征在总胆固醇、甘油三酸酯和低密度脂蛋白胆固醇的升高,或伴随着高密度脂蛋白胆固醇的循环水平降低^[1]。高脂血症相关的脂质疾病被认为是动脉粥样硬化性心血管疾病的主要原因,高脂血症已被列为导致冠心病患病率和严重性的最大危险因素之一^[2]。随着生活习惯的改变和膳食营养的提高,人体摄入高脂肪和高糖分含量的食物越来越多,高脂血症患者数量逐年上升,高脂血症已经成为危害全球健康的危险因素^[3]。目前,国内外对中草药降低血浆胆固醇水平的作用做了充分研究,证实中草药在降低胆固醇水平方面的有效性和安全性^[4]。古代

中医书籍中,可见“膏粱”“高脂”等关于现代高脂血症的相关记载;中医认为,高脂血症常伴有“血瘀”“痰浊”“湿阻”等特征,在中医理论的指导下,中医药在临床上已广泛应用于高脂血症及其相关并发症的治疗,具有疗效明显、毒副作用小的优点^[5]。

运脾汤是国医大师张磊教授“临证八法”中“运通法”的代表方,在“腑以通为顺”“脾以运为健”的基本思想上立法组方,其主要药物组成有槟榔、炒牵牛子、豆蔻、茯苓、炒麦芽、炒神曲、炒山楂等药物,具有运脾化积,消食导滞等功效,临床多用于治疗饮食失节、脾湿过盛,运化失常所致的诸多病症^[6]。本研究通过运用网络药理学等数据挖掘和分析的方法,探讨“中药

收稿日期:2020-02-27

修回日期:2020-11-10

^{*} 全国中医药创新骨干人才培养项目(国中医药办人教函[2019]91号),负责人:姜枫;广西壮族自治区第二批广西医学高层次骨干人才培养“139”计划项目(桂卫科教发[2018]22号),负责人:姜枫;广西中医药大学附属瑞康医院中医名医工程项目(院字[2019]41号),负责人:姜枫。

^{**} 通讯作者:孙玉信,主任医师,河南中医药大学第三附属医院消化科主任,主要研究方向:中医药防治消化系统疾病;姜枫,主任医师,广西中医药大学附属瑞康医院科技部主任,主要研究方向:仲景学术的整理与应用。

4126〔Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology〕

有效成分-靶点-疾病”之间的复杂作用关系,从而挖掘国医大师张磊运用运脾汤治疗高脂血症的现代药理作用机制,为运脾汤治疗高脂血症的进一步探讨提供参考。

1 资料与方法

1.1 运脾汤有效化学成分收集和筛选及靶点预测

通过检索TCMSP数据库(<http://tcmospw.com/tcmosp.php>),将同时满足口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 的化合物作为纳入标准^[7],得到山楂、麦芽、莱菔子、陈皮、半夏、茯苓、连翘、槟榔、牵牛子、甘草的潜在活性化合物成分及相关靶点;查阅相关文献对神曲的潜在活性成分进行补充。Pharm Mapper数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>),对已筛选出的部分潜在有效化学成分进行靶点预测补充,在数据库中不能预测到作用靶点的成分则剔除。通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)筛选人源靶点并进行基因注释。

1.2 高脂血症疾病靶点的收集

在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)这两个数据库中,以“Hyperlipidemia”为检索词检索,综合获取的数据,去除重复值,取并集,得到高脂血症疾病的相关疾病基因。

1.3 预测运脾汤治疗高脂血症的相关靶点

运用Venny平台(2.1, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)将运脾汤中有效化学成分所对应的相关靶点与高脂血症的疾病靶点取交集,得到运脾汤治疗高脂血症的相关靶点。

1.4 运脾汤治疗高脂血症相关靶点的PPI网络图与分析

将运脾汤的靶点基因和高脂血症疾病基因取的交集,导入STRING数据库(<https://string-db.org/>)构建其蛋白互相作用(PPI)网络图,分析运脾汤治疗高脂血症相关靶点之间的相互作用关系。使用Cytoscape(3.6.0)软件进行蛋白互作网络可视化处理,并通过Network Analyzer分析网络中节点的拓扑参数。

1.5 化合物与靶点分子对接

iGEMDOCK是通用进化方法用于计算相对于靶蛋白活性位点的配体构象和方向的软件。可以用于初步筛选和精度对接。其结果以能量的高低去判断

靶蛋白与配体的结合程度,通常靶蛋白与化合物配体结合的构象稳定时的能量越低,说明发生作用的可能性越大。根据1.4中通过计算拓扑学参数得到的degree值排名前10类的靶蛋白,在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)检索,并保持其pdb格式文件。根据1.4中度值(degree) ≥ 5 的化合物在TCMSP数据库获取其化合物配体mol2格式文件。

1.6 生物信息学分析

运用DAVID生物信息学资源平台6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)做交集基因的GO富集分析与KEGG富集分析。限定研究物种为人类,选择Gene Ontology下的分子功能(Molecular Function)、生物过程(Biological Process)和细胞组成(Cellular Component)3个部分进行GO富集分析,选择Pathway分析中KEGG Pathway,设定显著性为 $P < 0.05$,进一步寻找活性成分作用靶点显著富集的主要功能注释与信号转导通路。

1.7 构建“中药材-有效化学成分-靶点-通路”综合网络

将所有分析结果整理并导入Cytoscape(3.6.0)软件,处理得到“中药材-有效化学成分-靶点-通路”综合网络图。

2 结果

2.1 运脾汤有效化合物和相关靶点

在运脾汤中,去除鸡内金和鳖甲两味未检索到对应化合物信息,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 为标准,筛选得到山楂有6种有效化合物及其对应的人源靶点144个、麦芽18种对应56个、莱菔子3种对应4个、陈皮5种对应41个、半夏13种对应73个、茯苓15种对应15个、连翘23种对应219个、槟榔8种对应13个、牵牛子22种对应111个、甘草92种对应720个、神曲8种对应146个,去除重复化合物及重复靶点,运脾汤共计128种有效成分对应人源靶点142个。

2.2 高脂血症疾病靶点数据库

在GeneCards数据库中,初步筛选获得1164个与高脂血症相关的候选基因,根据“Relevance score”度值,选取相关度较高的前600个结果,在DisGeNET数据库中检索,发现231个相关基因,经合并数据库查询,去除重复共筛选出718个与高脂血症高度相关性靶点。

2.3 运脾汤治疗高脂血症的相关靶点和活性化学成分

通过 Venny 平台分析得到运脾汤中干预高脂血症

的靶点 40 个(图 1), 其中共涉及 128 个有效化学成分(表 1)。在运脾汤所有有效化学成分中, 与关键靶点关系密切的前 10 的有效化学成分的结构(图 2)。

表 1 运脾汤有效化学成分详细信息

序号	来源中药	平台编号	化合物	分子式
1	半夏	MOL000519	coniferin	C ₁₆ H ₂₂ O ₈
2	半夏	MOL002670	Cavidine	C ₂₁ H ₂₃ N ₀₄
3	半夏	MOL002714	baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
4	半夏	MOL005030	gondoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
5	半夏	MOL006936	10,13-eicosadienoic	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
6	半夏、牵牛子、连翘、麦芽	MOL000358	beta-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀
7	槟榔	MOL000004	Procyanidin B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
8	槟榔	MOL010485	EPA	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
9	槟榔	MOL010489	Resivit	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
10	陈皮	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
11	陈皮	MOL005815	Citromitin	C ₂₁ H ₂₄ O ₈
12	陈皮	MOL005828	nobiletin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈
13	陈皮、甘草	MOL004328	naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
14	茯苓	MOL000296	hederagenin	C ₃₀ H ₄₈ O ₄
15	甘草	MOL000239	Jaranol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
16	甘草	MOL000392	formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
17	甘草	MOL000417	Calycosin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
18	甘草	MOL000497	licochalcone a	C ₂₁ H ₂₂ O ₄
19	甘草	MOL000500	Vestitol	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
20	甘草	MOL001484	Inermine	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
21	甘草	MOL001792	DFV	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
22	甘草	MOL002311	Glycyrol	C ₂₁ H ₁₈ O ₆
23	甘草	MOL002565	Medicarpin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄
24	甘草	MOL003656	Lupiwighteone	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
25	甘草	MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₃
26	甘草	MOL004805	Shinflanone	C ₂₅ H ₂₆ O ₄
27	甘草	MOL004808	glyasperin B	C ₂₁ H ₂₂ O ₆
28	甘草	MOL004810	glyasperin F	C ₂₀ H ₁₈ O ₆
29	甘草	MOL004811	Glyasperin C	C ₂₁ H ₂₄ O ₅
30	甘草	MOL004814	Isotrifoliol	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
31	甘草	MOL004815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
32	甘草	MOL004820	kanzonols W	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
33	甘草	MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	C ₂₁ H ₂₀ O ₇
34	甘草	MOL004827	Semilicoisoflavone B	C ₂₀ H ₁₆ O ₆
35	甘草	MOL004828	Glepidotin A	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
36	甘草	MOL004829	Glepidotin B	C ₂₀ H ₂₀ O ₅
37	甘草	MOL004833	Phaseolinisoflavan	C ₂₀ H ₂₀ O ₄
38	甘草	MOL004835	Glypallichalcone	C ₁₇ H ₁₆ O ₄
39	甘草	MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	C ₁₉ H ₁₆ O ₄

下转续表

续表1

序号	来源中药	平台编号	化合物	分子式
40	甘草	MOL004841	Licochalcone B	C16H14O5
41	甘草	MOL004848	licochalcone G	C21H22O5
42	甘草	MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	C21H20O6
43	甘草	MOL004855	Licoricone	C22H22O6
44	甘草	MOL004856	Gancaonin A	C21H20O5
45	甘草	MOL004857	Gancaonin B	C21H20O6
46	甘草	MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	C20H18O6
47	甘草	MOL004864	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	C21H20O5
48	甘草	MOL004866	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	C20H18O6
49	甘草	MOL004879	Glycyrin	C22H22O6
50	甘草	MOL004882	Licocoumarone	C20H20O5
51	甘草	MOL004883	Licoisoflavone	C20H18O6
52	甘草	MOL004884	Licoisoflavone B	C20H16O6
53	甘草	MOL004885	licoisoflavanone	C20H18O6
54	甘草	MOL004891	shinpterocarpin	C20H18O4
55	甘草	MOL004898	5-Prenylbutein	C20H20O5
56	甘草	MOL004903	liquiritin	C21H22O9
57	甘草	MOL004904	licopyranocoumarin	C21H20O7
58	甘草	MOL004907	Glyzaglabrin	C16H10O6
59	甘草	MOL004908	Glabridin	C20H20O4
60	甘草	MOL004910	Glabranin	C20H20O4
61	甘草	MOL004911	Glabrene	C20H18O4
62	甘草	MOL004912	Glabrone	C20H16O5
63	甘草	MOL004913	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	C16H10O6
64	甘草	MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	C17H12O7
65	甘草	MOL004915	Eurycarpin A	C20H18O5
66	甘草	MOL004924	(-)-Medicocarpin	C22H24O9
67	甘草	MOL004935	Sigmoidin-B	C20H20O6
68	甘草	MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	C15H12O4
69	甘草	MOL004945	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	C20H20O4
70	甘草	MOL004948	Isoglycyrol	C21H18O6
71	甘草	MOL004949	Isolicoflavanol	C20H18O6
72	甘草	MOL004957	HMO	C16H12O4
73	甘草	MOL004959	1-Methoxyphaseollidin	C21H22O5
74	甘草	MOL004961	Quercetin der.	C17H14O7
75	甘草	MOL004966	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin	C21H22O5
76	甘草	MOL004974	3'-Methoxyglabridin	C21H22O5
77	甘草	MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	C21H22O4
78	甘草	MOL004980	Inflacoumarin A	C20H18O4
79	甘草	MOL004988	Kanzonol F	C26H28O5
80	甘草	MOL004989	6-prenylated eriodictyol	C20H20O6
81	甘草	MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	C16H12O6
82	甘草	MOL004991	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	C18H14O4
83	甘草	MOL004993	8-prenylated eriodictyol	C20H20O6
84	甘草	MOL005000	Gancaonin G	C21H20O5

下转续表

续表1

序号	来源中药	平台编号	化合物	分子式
85	甘草	MOL005001	Gancaonin H	C25H24O6
86	甘草	MOL005003	Licoagrocarpin	C21H22O4
87	甘草	MOL005007	Glyasperins M	C21H20O6
88	甘草	MOL005008	Glycyrrhiza flavonol A	C20H18O7
89	甘草	MOL005012	Licoagroisoflavone	C20H16O5
90	甘草	MOL005013	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	C30H46O4
91	甘草	MOL005016	Odoratin	C17H14O6
92	甘草	MOL005017	Phaseol	C20H16O5
93	甘草	MOL005018	Xambioona	C25H24O4
94	甘草	MOL005020	dehydroglyasperins C	C21H22O5
95	连翘	MOL000173	wogonin	C16H12O5
96	连翘	MOL000791	bicuculline	C20H17NO6
97	连翘	MOL003283	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	C20H24O6
98	连翘	MOL003290	Dimethylmatairesinol	C22H26O6
99	连翘	MOL003295	(+)-pinoresinol monomethyl ether	C21H24O6
100	连翘	MOL003306	ACon1_001697	C21H24O6
101	连翘	MOL003347	hyperforin	C35H52O4
102	连翘	MOL003370	Onjixanthone I	C16H14O6
103	连翘、甘草、山楂、神曲	MOL000098	quercetin	C15H10O7
104	连翘、甘草、山楂、神曲	MOL000422	kaempferol	C15H10O6
105	连翘、麦芽	MOL000006	luteolin	C15H10O6
106	麦芽	MOL000492	(+)-catechin	C15H14O6
107	麦芽	MOL000569	digallate	C14H10O9
108	麦芽	MOL004798	delphinidin	C15H11O7+
109	麦芽	MOL010857	Sterigmato-cystin	C18H12O6
110	麦芽	MOL010864	5,7-Dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon	C18H16O7
111	牵牛子	MOL000457	Phaseollidin	C20H20O4
112	牵牛子	MOL002268	rhein	C15H8O6
113	牵牛子	MOL003542	8-Isopentenyl-kaempferol	C20H18O6
114	牵牛子	MOL004373	Anhydroicaritin	C21H20O6
115	牵牛子	MOL005257	Penniclavine	C16H18N2O2
116	牵牛子	MOL005260	CHANOCLAVINE	C16H20N2O
117	牵牛子	MOL005261	LYSERGOL	C16H18N2O
118	牵牛子	MOL005266	AGROCLAVIN	C16H18N2
119	牵牛子	MOL005267	elymoclavine	C16H18N2O
120	山楂、半夏	MOL000449	Stigmasterol	C29H48O
121	山楂、槟榔、麦芽	MOL000073	ent-Epicatechin	C15H14O6
122	山楂、甘草	MOL000354	isorhamnetin	C16H12O7
123	神曲	MOL000114	vanillic acid	C8H8O4
124	神曲	MOL000415	rutin	C27H30O16
125	神曲	MOL000701	quercitrin	C21H20O11
126	神曲	MOL002665	Ferulic Acid	C10H10O4
127	神曲	MOL004368	Hyperin	C21H20O12
128	神曲	MOL007424	artemisinin	C15H22O5

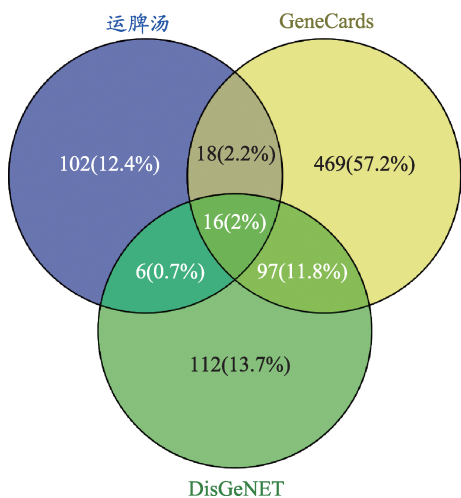


图1 运脾汤作用靶点与高脂血症靶点韦恩图

2.4 运脾汤治疗高脂血症相关靶点的PPI网络图与分析

将运脾汤干预高脂血症的40个靶点导入STRING数据库进行蛋白质相互作用分析,设置可信度为0.4,得到靶点之间相互作用关系。导入Cytoscape(3.6.0)软件进行可视化(图3)。在Cytoscape(3.6.0)软件中,通过Network Analyzer功能分析网络中的拓扑参数,根据degree结果显示,胰岛素(INS)、白介素6(IL6)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、过氧化物酶体增殖物激活的受体 γ (PPARG)、一氧化氮合酶(NOS3)、表皮生长因子受体(EGFR)、载脂蛋白B(APOB)、细胞间粘附分子1(ICAM1)、CAV1和雌激素受体(ESR1)为运脾汤干预高脂血症的核心靶点;且运脾汤中干预高脂血症的

表2 运脾汤干预高脂血症蛋白互作拓扑学分析
(按度值排序取前10个)

蛋白名称	平均最短路径	介数中心性	中心接近度	聚类系数	连通度
INS	1.051	0.162	0.951	0.372	37
IL6	1.128	0.095	0.886	0.424	34
VEGFA	1.205	0.074	0.830	0.449	31
PPARG	1.282	0.052	0.780	0.479	28
NOS3	1.359	0.034	0.736	0.520	25
EGFR	1.385	0.023	0.722	0.583	24
APOB	1.436	0.030	0.696	0.532	22
ICAM1	1.462	0.020	0.684	0.581	21
CAV1	1.487	0.017	0.672	0.595	20
ESR1	1.487	0.013	0.672	0.616	20

活性化学成分 naringenin、quercetin、kaempferol 和 luteolin主要来源于连翘、山楂、神曲、陈皮、甘草。

2.5 分子对接结果

iGEMDOCK 分子对接结果将运脾汤干预高脂血症的10个关键靶点与运脾汤中经拓扑学参数计算的22个关键化合物进行分子对接,靶蛋白与化合物配体结合的构象稳定时能量越低发生的作用可能性越大^[8],分析结合力具体参数(图4)和具体分子对接参数(表3),其中结合性最强的是NOS3与nobiletin(图5)。

2.6 运脾汤主要活性成分对高脂血症作用靶点的生物信息学分析结果

通过DAVID数据库进行GO功能富集分析,结果得到48个GO功能富集条目,其中涉及生物过程(BP)的相关条目最多,共计30条,主要包括一氧化氮生物

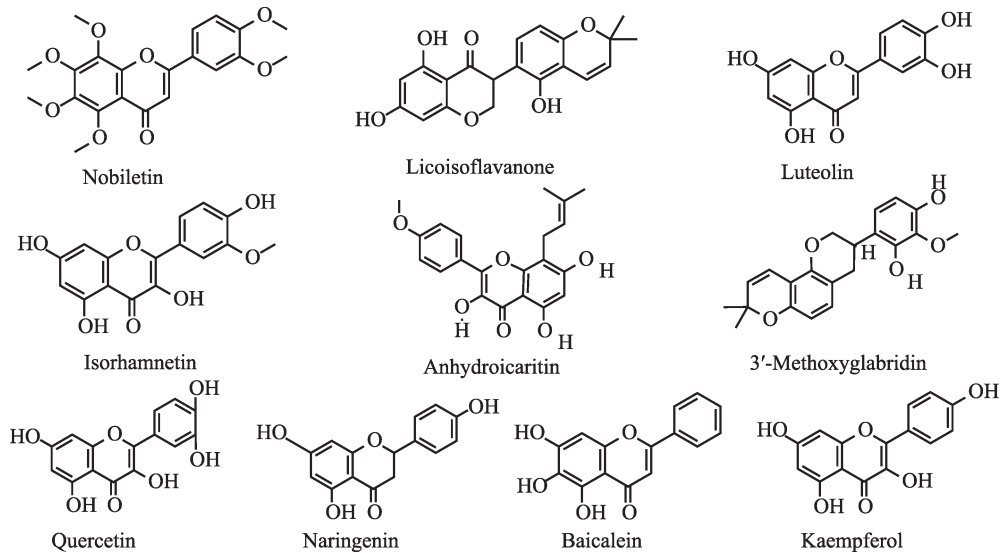


图2 网络中度值排名前10的有效化学成分结构

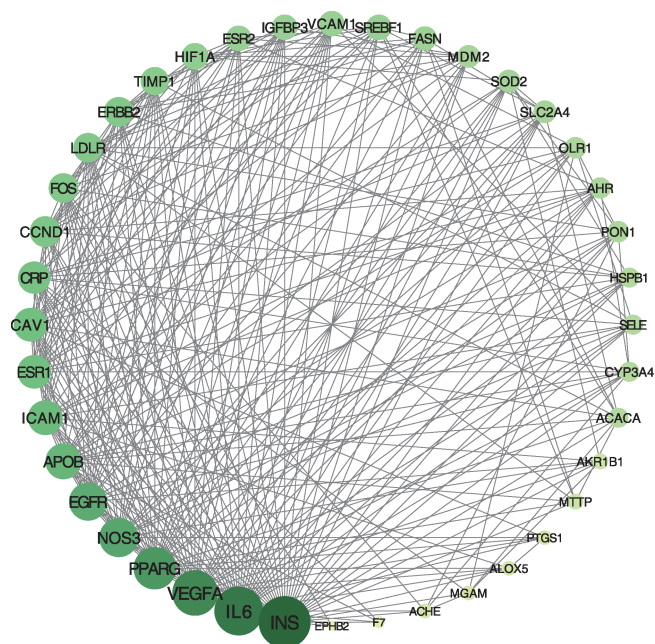


图3 运脾汤干预高脂血症相关靶点间蛋白互作关系

合成过程的正调控、细胞对肿瘤坏死因子的反应、上皮细胞增殖的正调控、肽基酪氨酸磷酸化的正调控、

RNA聚合酶II启动子转录的正调控、蛋白质磷酸化的正调控、蛋白激酶B信号转导的正调控和凋亡过程的负调控等方面;其中有7条细胞组成(CC),主要包括膜筏、受体复合体、基底外侧质膜、质膜的外侧和内体膜等方面;并有11条分子功能(MF),主要包括类固醇激素受体活性、酶结合和蛋白质酪氨酸激酶活性等方面(图6)。

KEGG通路富集分析得到48条信号通路,其中按Gene Ratio值选取25条富集结果最相关的信号通路,导入RSudio软件制作高级气泡图进行分析(图7、表3)。包括HIF-1信号通路、胰岛素信号通路、PI3K-Akt信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、Fox O信号通路、TNF信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化和卵巢类固醇生成等通路。分析靶点与相关性较大的通路HIF-1信号通路的作用关系(图8),红色为表达促进作用。

2.7 构建“中药材-有效化学成分-靶点-通路”综合网络

根据上述结果,绘制网络药理学分析运脾汤干预

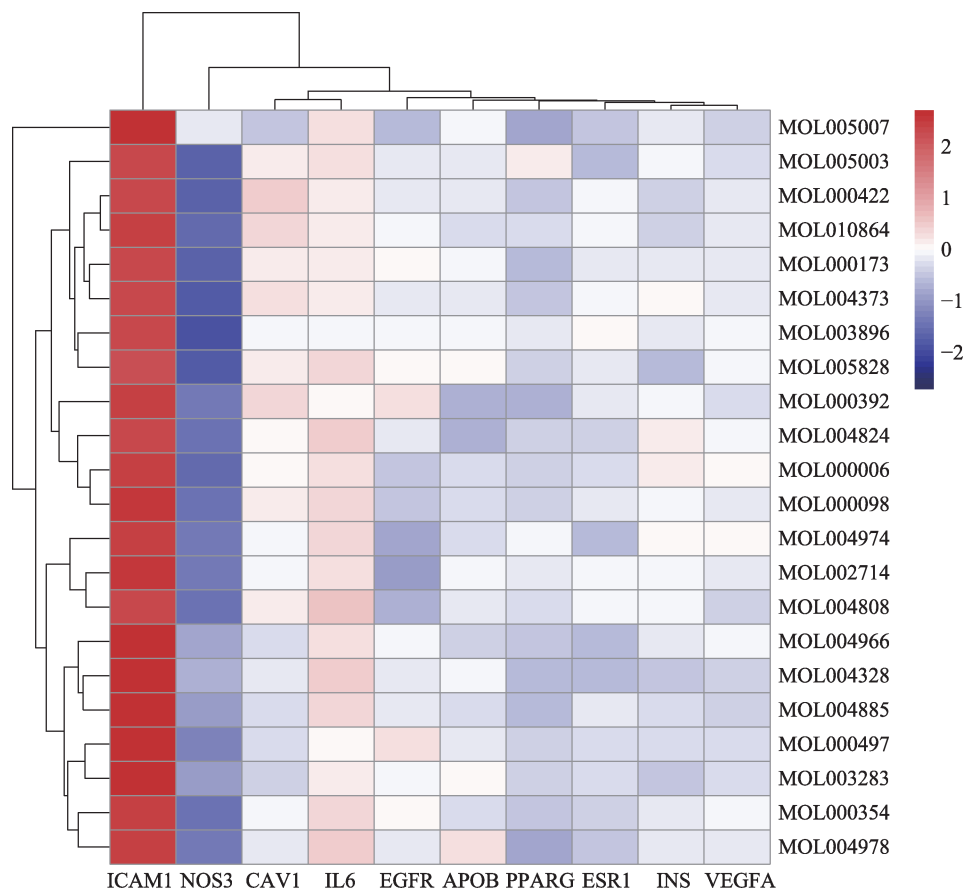


图4 运脾汤主要化学成分与关键靶点对接结果

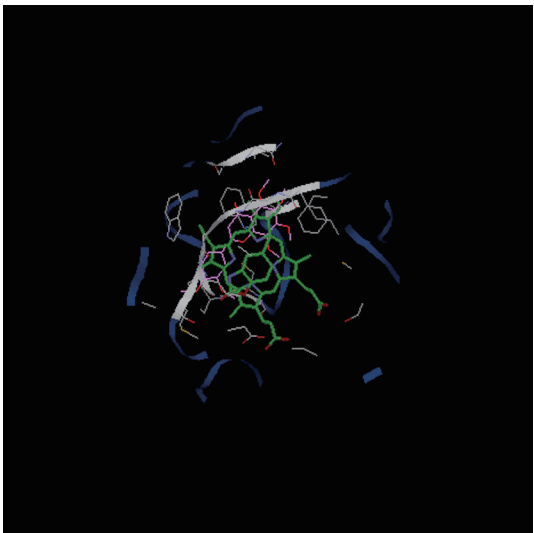


图5 NOS3与nobiletin

高脂血症的各元素综合网络图,根据 degree 调节节点大小,使核心靶点和主要有效化学成分在网络图中突出表现(图9)。网络图中共包括 249 个节点、680 条边;图中左侧的模块分别为运脾汤各组成中药及其主要化学成分,其中红色六边形节点为中药,蓝色菱形为其化学成分;右侧的模块为绿色圆形为 40 个关键靶点,最右侧外方的紫色三角形模块为 KEGG 分析排名前 10 的信号通路。

3 讨论

高脂血症是由血脂代谢异常引起的较为常见的代谢性疾病,亦是目前公认的动脉粥样硬化性心血管疾病的高危诱导因素。生活水平和饮食结构的改变,越来越多的人存在血脂异常症状。长期高水平的血脂容易诱冠心病、胰腺炎和高血压等疾病。传统的活血化瘀型中药针对伴有“血瘀”“痰浊”“湿阻”等特征的高脂血症,具有“活血化瘀、滋阴化浊”的显著优势。国医大师张磊教授以运脾“汤运脾化积,消食导滞”治疗临床上诸多脾胃运化失司导致的病症,亦见于高脂血症的治疗,体现了中医学异病同治的辨证论治思想。本研究借助网络药理学的方法,初步挖掘、分析运脾汤治疗高脂血症的可能作用机制和物质基础。

本研究通过系统药理学的方法分析了运脾汤中 11 味中草药的有效化学成分,及各化学成分与靶点的关系,128 个有效化学成分主要是木脂素和黄酮等几类化学物质。大部分化合物与关键靶点之间的相互作用经过分子对接验证,都具有较强的结合能力。通

表3 运脾汤作用高脂血症靶点的部分富集通路

Term	Count	%	P value
HIF-1 signaling pathway	8	21	3.14E-08
Proteoglycans in cancer	8	21	3.89E-06
PI3K-Akt signaling pathway	8	21	0.000203965
Endocrine resistance	7	18	3.04E-07
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	7	18	3.50E-07
AMPK signaling pathway	7	18	1.21E-06
Fox O signaling pathway	7	18	2.19E-06
Fluid shear stress and atherosclerosis	7	18	3.26E-06
Breast cancer	6	16	5.84E-05
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	6	16	0.000214206
Bladder cancer	5	13	1.21E-06
Prolactin signaling pathway	5	13	1.76E-05
Prostate cancer	5	13	8.56E-05
Insulin resistance	5	13	0.000142522
TNF signaling pathway	5	13	0.000169182
Insulin signaling pathway	5	13	0.00043229
Estrogen signaling pathway	5	13	0.000447002
African trypanosomiasis	4	11	2.54E-05
Malaria	4	11	8.46E-05
Pancreatic cancer	4	11	0.000431409
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	4	11	0.000500115
Rheumatoid arthritis	4	11	0.000926823
Th17 cell differentiation	4	11	0.001562314
Thyroid hormone signaling pathway	4	11	0.002308321
Ovarian steroidogenesis	3	8	0.001749678

过对化合物与靶点的网络拓扑学分析,发现木犀草素(luteolin)、槲皮素(querctetin)、山奈酚(kaempferol)、柚皮素(naringenin)和川陈皮素(nobiletin)在网络中有较高的度值和中心性,说明这些化合物在网络中具有较重要的作用^[9]。研究发现^[10],木犀草素可以通过与NPC1L1结合直接抑制NPC1L1的表达,发挥降低血液胆固醇的作用;并且抑制促炎性细胞因子TNF- α 、IL-6的分泌,通过作用于TLR4/NF- κ B信号通路发挥抗炎效应。木犀草素通过减少降低巨噬细胞中AMPK-SIRT1信号传导的机制抑制LDL受体缺陷小鼠的动脉粥样硬化^[11]。槲皮素单独使用或作为铁络合物使用,可以防止脂肪堆积,并降低血糖、血脂,减轻肝脂肪变性和氧化应激反应^[12]。山奈酚可以通过多种机制抑制蛋白激酶B(AKT)和SREBP-1的活性,并对激活PPAR α 和PPAR δ ,同时促进与脂肪酸氧化和肝细胞

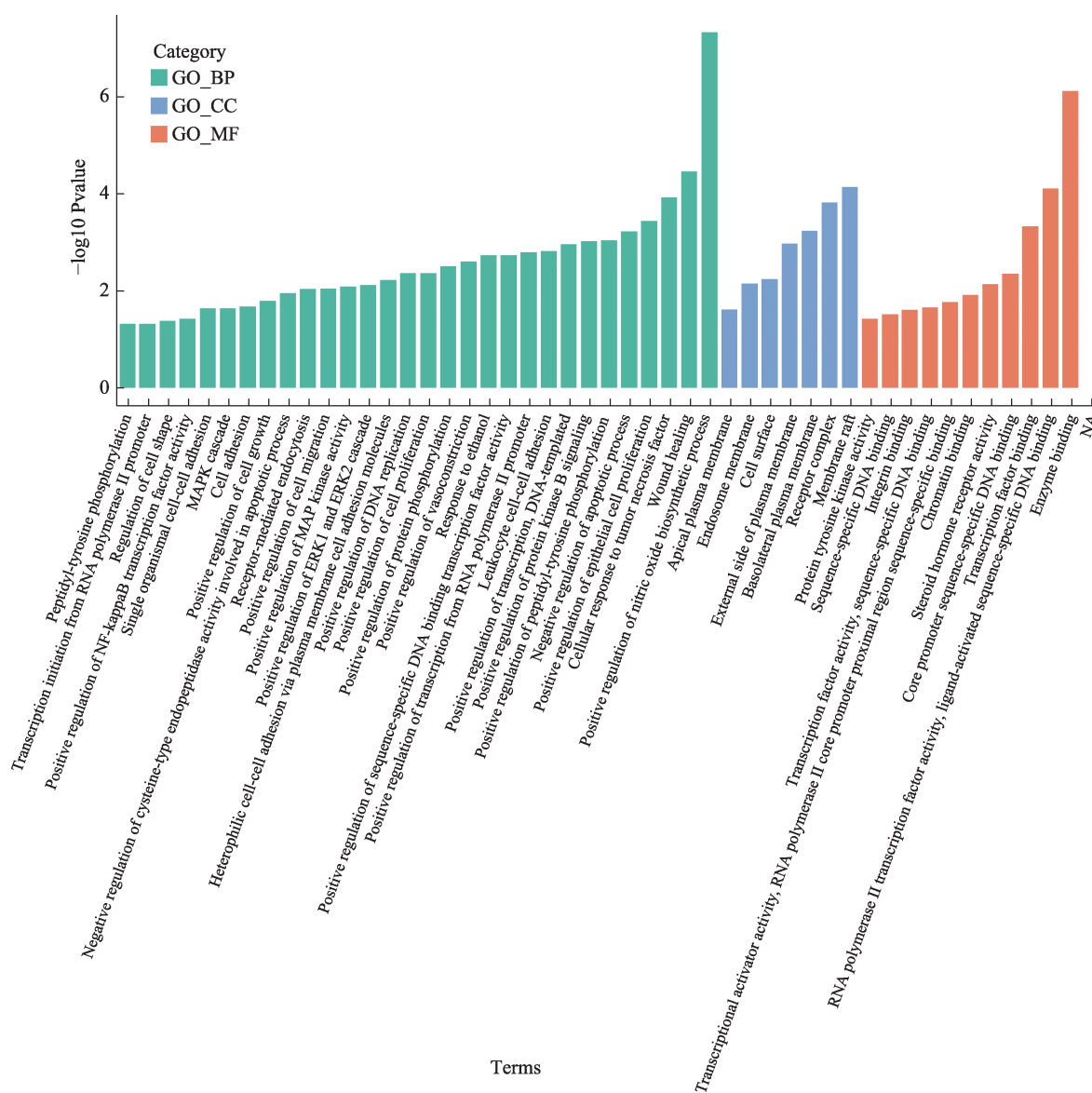


图6 运脾汤对高脂血症作用靶点的GO功能富集分析柱状图

摄取脂肪有关基因的表达,从而降低血液中甘油三酯的水平^[13]。柚皮素和川陈皮素属于柑桔类黄酮,柚皮素通过诱导肝脂肪酸(FA)的氧化和减弱FA的合成,预防肝组织脂肪样变性、肝脏中极低密度脂蛋白(VLDL)的生成和高脂血症的形成,并减轻胰岛素抵抗、缓解脂肪组织扩张和炎症^[14]。

在靶点蛋白互作网络中,网络拓扑学分析参数显示,INS、IL6、VEGFA、PPARG、NOS3、EGFR、APOB和ESR1等靶点在网络中体现较高的连通特性,其在运脾汤治疗高脂血症的过程可能发挥较重要作用。分子对接结果显示,木犀草素、槲皮素、山奈酚、柚皮素、川陈皮素与NOS3、PPARG、APOB、ESR1、VEGFA均有

较强的结合活性,因此运脾汤可能是通过作用这些靶点对高脂血症发挥作用。研究发现,VEGFA具有调节内皮细胞增殖,促进细胞迁移,抑制细胞凋亡并调节血管通透性的作用^[15],NOS3可以产生一氧化氮(NO),其通过cGMP介导的信号转导途径参与使血管平滑肌松弛,并介导冠状血管中VEGF的血管生成^[16]。PPARG是PPARs家族中最具脂肪细胞专一性的因子,是脂肪细胞分化和葡萄糖稳态的关键调节者^[17],可以通过结合过降血脂药和脂肪酸的核受体,调控过氧化物酶体脂肪酸 β 的氧化途径,促进滋养细胞中性脂质的积累以及游离脂肪酸的摄取,也增加了脂肪分化相关蛋白与脂肪酸转运蛋白的合成^[18]。ESR1在调节

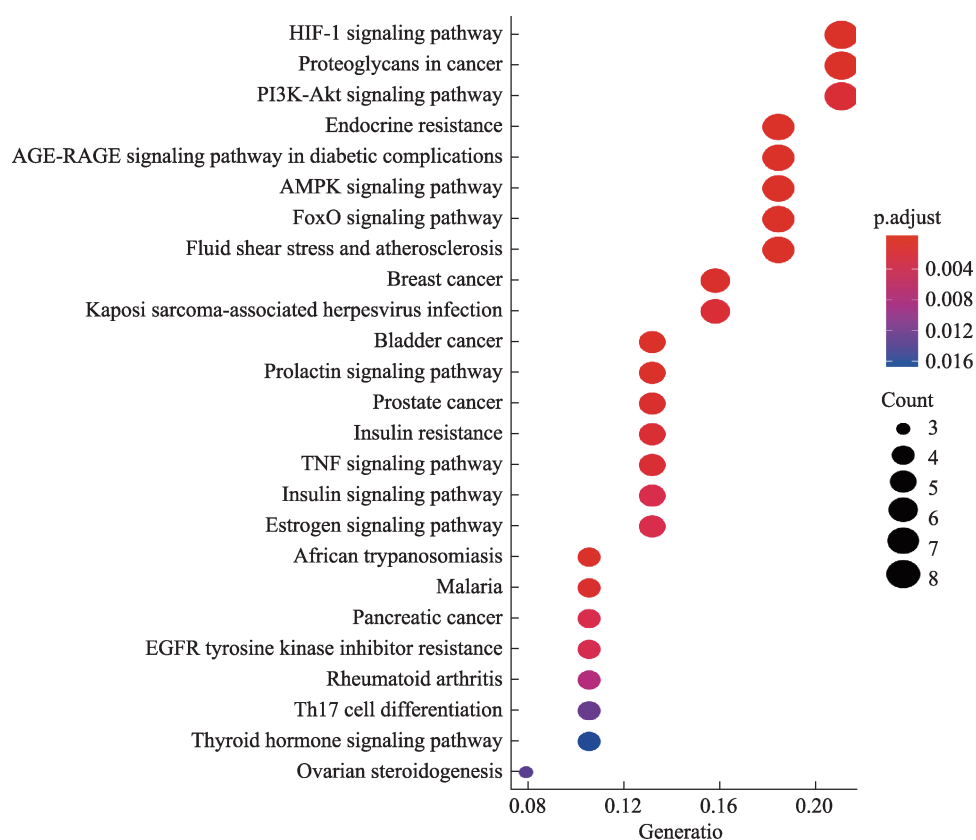


图7 运脾汤对高脂血症作用靶点KEGG通路富集分析气泡图

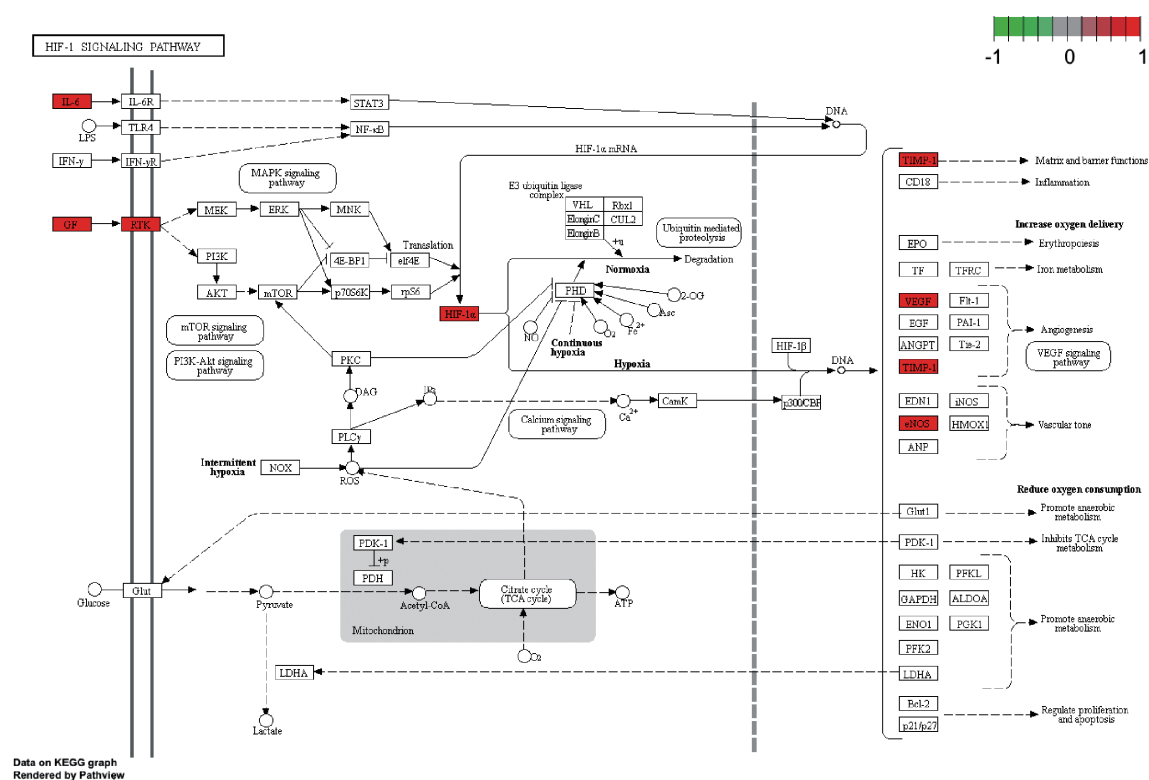


图8 运脾汤中 HIF-1 信号通路潜在靶基因的 KEGG 通路分析

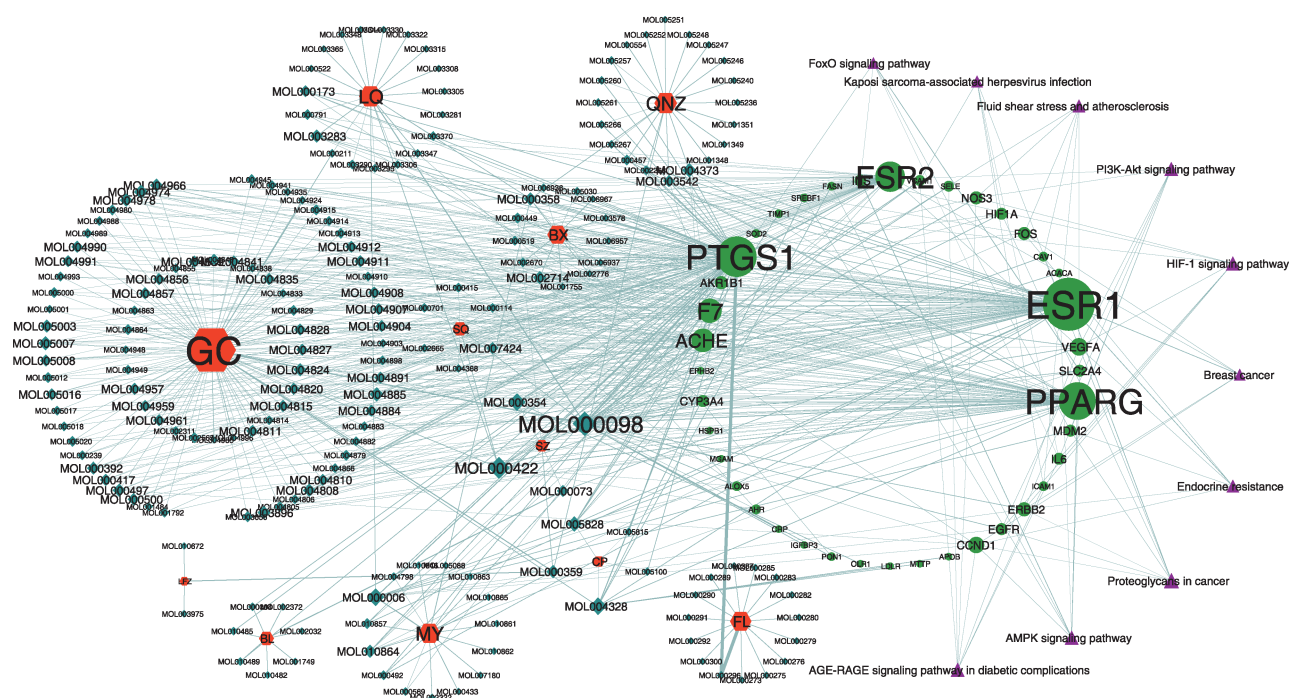


图9 运脾汤干预高脂血症“中药材-有效化学成分-靶点-通路”综合网络图

脂肪组织中的 VEGFA 介导的血管生成具有重要作用^[19],可抑制血管平滑肌增殖和迁移,保护血管内皮的结构和功能,预防动脉脂质和复合糖类的形成^[20]。

运脾汤治疗高脂血症的关键靶点 GO 功能富集显示,运脾汤可能通过药物反应、细胞内外刺激、脂多糖反应和反向调节凋亡等生物学过程来干预高脂血症,这些靶点主要位于膜筏、基底外侧质膜、顶体膜、细胞表面等处;具有抗氧化活性和酶结合等分子功能。KEGG 结果分析,运脾汤干预高脂血症的主要通过有 HIF-1 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、胰岛素信号通路、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路。HIF-1 信号通路中的低氧诱导因子 1(HIF-1),是一种转录因子,调节细胞在低氧环境下的反应,在过氧化物酶体脂质代谢的调节中起着关键作用^[21],HIF-1 通过激活肝组织中脂素 lipin 1 的表达,从而导致活性氧的减少和防止肝脂质沉积^[22]。AGE-RAGE 信号通路的激活能够通过调节 NF- κ B、VCAM-1 和炎症因子的产生,诱导炎症和氧化应激反应^[23]。是众多糖脂代谢疾病如糖尿病、高胆固醇血症和动脉粥样硬化等高度相关的靶点

信号通路^[24]。胰岛素信号通路主要调节脂肪细胞中葡萄糖转运和脂肪分解,与胰岛素抵抗密切相关^[25]。研究发现^[26],高脂血症在诱发动脉粥样硬化的过程中,炎症细胞因子,如 VEGF 和 TNF- α 会诱发血管血栓的形成,同时导致大量正常的细胞凋亡,加剧病情的发展。

综上所述,运脾汤中的多个有效化学成分能同时作用于2个以上的靶点,并对应多条信号通路,在抗炎、氧化和诱导细胞凋亡等方面具有一定效果,体现了运脾汤从多靶点、多途径干预高脂血症的分子机制,主要作用为改善细胞代谢、调节血管活性和糖脂代谢等多个方面。并且对冠心病等心血管及糖尿病、胰岛素拮抗等内分泌系统疾病有着多重协同效应。网络药理学结合分子生物学、生物信息学等学科,本着整体性和动态性的特点,倡导多靶点、多途径的研究分析的思路与中医治疗的整体观念、辨证论治指导思想相符,也是目前研究中药作用机制较为全面的方法^[27]。本研究预测了运脾汤干预高脂血症的物质基础和分子机制并挖掘潜在的作用靶点,为下一步深入实验验证奠定了理论基础和方向。

参考文献

- 1 Teramoto T, Sasaki J, Ueshima H, *et al.* Primary hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb*, 2008, 15(2): 49–51.

- 2 ŁBuddak, Marek B, Kajdaniuk D, *et al.* Endocrine diseases as causes of secondary hyperlipidemia. *Endokrynol Pol*, 2019, 70(6): 511–519.
- 3 Taghizadeh E, Esfehiani R J, Sahebkar A, *et al.* Familial combined hyperlipidemia: An overview of the underlying molecular mechanisms and therapeutic strategies. *IUBMB Life*, 2019, 71(9): 1221–1229.
- 4 El-Tantawy W H, Temraz A. Natural products for controlling hyperlipidemia: review. *Arch Physiol Biochem*, 2019, 125(2): 128–135.
- 5 Xie W D, Zhao Y N, Du L J. Emerging approaches of traditional Chinese medicine formulas for the treatment of hyperlipidemia. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(2): 345–367.
- 6 张磊. 张磊医学全书. 郑州: 河南科学技术出版社, 2017: 413.
- 7 Lee W Y, Lee C Y, Kim Y S, *et al.* The methodological trends of traditional herbal medicine employing network pharmacology. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 362.
- 8 Khan T, Lawrence A J, Azad I, *et al.* Computational drug designing and prediction of important parameters using in silico methods—a review. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2019, 15(5): 384–397.
- 9 Aziz N, Kim M Y, Cho J Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *J Ethnopharmacol*, 2018, 225: 342–358.
- 10 Kobayashi S. The effect of polyphenols on hypercholesterolemia through inhibiting the transport and expression of Niemann–Pick C1–Like 1. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4939.
- 11 Li J, Dong J Z, Ren Y L, *et al.* Luteolin decreases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice via a mechanism including decreasing AMPK–SIRT1 signaling in macrophages. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2593–2599.
- 12 Imessaoudene A, Merzouk H, Berroukeche F, *et al.* Beneficial effects of quercetin–iron complexes on serum and tissue lipids and redox status in obese rats. *J Nutr Biochem*, 2016, 29: 107–115.
- 13 Hoang M H, Jia Y Y, Lee J H, *et al.* Kaempferol reduces hepatic triglyceride accumulation by inhibiting Akt. *J Food Biochem*, 2019, 43: e13034.
- 14 Burke A C, Sutherland B G, Telford D E, *et al.* Intervention with citrus flavonoids reverses obesity, and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese Ldlr^{−/−} mice. *J Lipid Res*, 2018, 59(9): 1714–1728.
- 15 Abbasalizad Farhangi M, Vajdi M, Nikniaz L, *et al.* Interaction between vascular endothelial growth factor- α (rs2010963) gene polymorphisms and dietary diversity score on cardiovascular risk factors in patients with metabolic syndrome. *Lifestyle Genom*, 2020, 13(1): 1–10.
- 16 Oliveira–Paula G H, Riccardo L, Tanus–Santos J E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*, 2016, 575(3): 584–599.
- 17 Nilsson E, Jansson P A, Perfilyev A, *et al.* Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2014, 63(9): 2962–2976.
- 18 Kokosar M, Benrick A, Perfilyev A, *et al.* Epigenetic and transcriptional alterations in human adipose tissue of polycystic ovary syndrome. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 22883.
- 19 Fatima L A, Campello R S, de Souza Santos R, *et al.* Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16716.
- 20 Rudnicki M, Abdifarkosh G, Rezvan O, *et al.* Female mice have higher angiogenesis in perigonadal adipose tissue than males in response to high-fat diet. *Front Physiol*, 2018, 9: 1452.
- 21 Shi X J, Sung S H P, Lee M M S, *et al.* A lipophilic AIE gen for lipid droplet imaging and evaluation of the efficacy of HIF-1 targeting drugs. *J Mater Chem B*, 2020, 8(7): 1516–1523.
- 22 Takatomo A, Masako T, Nobuhito G. HIF-1-dependent lipin1 induction prevents excessive lipid accumulation in choline-deficient diet-induced fatty liver. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14230.
- 23 Wang X L, Liu J J, Yang Y, *et al.* An update on the potential role of advanced glycation end products in glycolipid metabolism. *Life Sci*, 2020, 245: 117344.
- 24 Uekita H, Ishibashi T, Shiomi M, *et al.* Integral role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in nondiabetic atherosclerosis. *Fukushima J Med Sci*, 2019, 65(3): 109–121.
- 25 Chan H, Bhide K P, Vaidyam A, *et al.* Proteomic analysis of 3T3–L1 adipocytes treated with insulin and TNF- α . *Proteomes*, 2019, 7(4): 35.
- 26 An H J, Kim J Y, Gwon M G, *et al.* Beneficial effects of SREBP decoy oligodeoxynucleotide in an animal model of hyperlipidemia. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 552.
- 27 Luo T T, Lu Y, Yan S K, *et al.* Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective. *Chinese journal of integrative medicine*, 2020, 26(1): 72–80.

Molecular Mechanism of Yunpi Decoction in the Treatment of Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology

Lin Yuanmao¹, Shi Rongcong¹, Huang Baote¹, Xu Shian¹, Sun Yuxin³, Jiang Feng²

(1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 3. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: Objective To explore the pharmacological mechanism of Yunpi Decoction in the treatment of hyperlipidemia by using the network pharmacological method. Methods Firstly, the effective chemical components and corresponding target proteins of Yunpi Decoction and related disease genes of hyperlipidemia were retrieved and predicted by consulting multiple databases, such as TCMSP, Pharm Mapper, GeneCard, and DisGeNET, etc. Secondly, The String platform was used for protein interaction analysis to construct key proteins in the PPI network mining network. the verification in molecular docking was performed by iGEMDOCK. Finally, The DAVID platform was adopted to analyze the “medicinals+components+targets+pathways” and the involved biological processes and pathways. Then, Cytoscape (3.6.0) software was used to construct the integrated network. Results The core components of Yunpi Decoction for intervening hyperlipidemia were luteolin, quercetin, kaempferol, and naringenin, etc. The main targets were PPARG, NOS3, APOB and ESR1; The verification in molecular docking verification also showed that most targets had a good binding activity with compounds. According to DAVID enrichment analysis, Yunpi Decoction might interfere with hyperlipidemia through biological processes such as intracellular and extracellular stimulation, lipopolysaccharide response, and HIF-1 signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, and insulin signaling pathway. Conclusion This study preliminarily predicted the multi-component, multi-target, and multi-path action mechanism of Yunpi Decoction in the intervention of hyperlipidemia, and provided a theoretical basis for further experimental research.

Keywords: Network pharmacology, Hyperlipidemia, Yunpi Decoction, Molecular mechanism

(责任编辑: 马丽安, 责任译审: 周阿剑)