【基础研究】

基于网络药理学的松香酸治疗银屑病的作用机制研究

刘 勇[1,2]，闫小宁[1]*
（1. 陕西省中医医院皮肤科，陕西西安 710004；2. 北京中医药大学生命科学学院，北京 100029）

摘要：目的 运用网络药理学的方法探讨松香酸治疗银屑病的分子作用机制。**方法** 采用STRING数据库和Cytoscape软件绘制蛋白质 - 蛋白质相互作用网络。借助 DAVID 数据库对靶点进行基因本体分析和京都基因与基因组的百科全书通路分析，将核心靶点与松香酸进行分子对接，以验证松香酸与核心靶点的结合能力。**结果** 筛选得到松香酸治疗银屑病的 60 个作用靶点，主要为肿瘤坏死因子、丝裂原活化蛋白激酶 3、肿瘤蛋白 53 和过氧化物酶体增殖物激活受体（peroxisome proliferation-activated receptor，PPAR）γ。靶点主要涉及细胞锌离子结合、类固醇激素受体活性、维甲酸受体活性等生物过程。PPAR 信号通路和花生四烯酸代谢信号通路为松香酸治疗银屑病的主要作用通路。**结论** 松香酸治疗银屑病体现了多靶点、多途径的作用特点，该研究为深入阐释松香酸治疗银屑病作用机制提供了科学依据。

关键词：松香酸；银屑病；网络药理学；蛋白质-蛋白质相互作用网络；分子机制
中图分类号：R758.63 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2022）01-0019-07
DOI：10.13683/j.wph.2022.01.005

Mechanism of anti-psoriasis of abietic acid based on network pharmacology

LIU Yong[1,2], YAN Xiaoning[1]*
（*1. Department of Dermatology, Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; 2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*）

Abstract: ***Objective*** To explore the molecular mechanism of abietic acid in the trearment of psoriasis by using a network pharmacology. ***Methods*** Proteinprotein interaction networks were mapped using STRING database and Cytoscape software. Gene Ontology analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis of targets were performed on the target with the help of DAVID database. Molecular docking was performed between the core target and abietic acid to verify the binding ability of abietic acid to the core target. ***Results*** Sixty targets for the treatment of psoriasis with abietic acid were screened, mainly tumor necrosis factor（TNF）, mitogen-activated protein kinase 3（MAPK3）, tumor protein 53（TP53）and peroxisome proliferation-activated receptor γ（PPAR）. The targets mainly involved in cell zinc ion binding, steroid hormone receptor activity, retinoic acid receptor activity and other biological processes. Peroxisome proliferation-activated receptor（PPAR） signaling pathway and arachidonic acid metabolism signaling pathway are the main action pathways of abietic acid in the treatment of psoriasis. ***Conclusion*** Abietic acid treatment of psoriasis reflects the characteristics of multi-target and multi-pathway. This study provides a scientific basis for further explaining the mechanism of abietic acid in the treatment of psoriasis.

Key words: abietic acid; psoriasis; network pharmacology; proteinprotein interaction networks; molecular mechanism

收稿日期：2021-08-14
作者简介：刘勇，博士研究生，住院医师，研究方向：中医治疗皮肤病的临床与基础研究。
通信作者：闫小宁，博士，主任医师，研究方向：中医治疗皮肤病的临床与基础研究。
基金项目：国家重点研发计划“中医药现代化研究重点专项”（2018YFC1705303）；陕西省重点产业创新链（2019ZDLSF04-08）；陕西省重点研发计划重点项目（2018ZDXM-SF-010，2017ZDXM-SF-018）；陕西省重点研发计划一般项目（2019SF-312）

银屑病是一种由遗传、环境、感染、免疫等多种因素综合介导的慢性、炎症性、鳞屑性皮肤病。其典型表现为鳞屑性红斑或斑块，具有冬季皮损加重和（或）复发与夏季缓解的特点，同时部分患者可伴随关节肿胀疼痛、指（趾）甲异常，中重度患者可合并代谢性疾病，如血脂紊乱、肥胖、高血压以及血糖异常，也会使心血管疾病、肿瘤患病风险增加。流行病学显示银屑病患病率为 2% ～ 3%，是一个严重的世界性问题。我国人口基数大，故患病人数可多达百万，目前仍缺少能治愈或长期缓解此病的药物[1-2]。

松香酸（abietic acid，AA）是一种三环二萜类含氧化合物，为松科植物马尾松（*Pinus massoniana* Lamb.）或其同属植物树干中所提取松香的主要成分，约占 85% ～ 90%[3]。使用松香治疗银屑病古今文献均有记载，陕西省中医医院皮肤科早在 20 世纪 80 年代研制的“银屑平片”为单味松香，其主要成分为松香酸，专门治疗血热及湿热证型银屑病，至今已在临床应用 30 余年，疗效好、安全性高，有效率达 95.64%[4]。有研究表明，松香主要含有松香酸和中性物质，前者可通过激活细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase，ERK）和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPKs）来促进创面愈合[5]。但松香治疗银屑病的分子机制至今尚未明确，同时未曾有过关于松香酸治疗银屑病作用机制的研究报道。网络药理学是基于计算生物学、系统生物学、网络分析、药理学等的一门交叉学科，有系统性和整体性的特点，可进行更系统的药物 - 疾病相关性研究[6]。借助网络药理学方法挖掘松香酸治疗银屑病的靶点与通路，从微观角度科学论证松香酸治疗银屑病的作用机制具有重要意义。

本研究通过对松香酸作用靶点和银屑病相关的疾病靶点进行筛选汇总，得出松香酸对银屑病的作用交联靶基因，并且进行生物信息学分析，得到松香酸治疗银屑病的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 松香酸化学成分靶点预测

使用 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获取松香酸的化学结构信息，并保存为 sdf 格式文件。将在 PubChem 中筛选出的松香酸化学成分分子结构，以 sdf 的格式上传 PharmMapper 数据库（http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/submit_file.php）。基于反向药效团匹配法，选择药物的药效团模型，设置最终产生 300 个蛋白构象，得到与化合物相关的靶点名称、Uniprot ID、基因名称等结果。删除与所预测化合物靶点相同的靶点，然后将其录入 UniProt（https://www.uniprot.org/）数据库中检索，选择物种为“Homo sapiens”，剔除重复、非人源与不规范的靶点，经检索和转化操作最终得到松香酸的基因靶点。结合文献报道，查找松香酸已报道的靶点进行筛选补充。

1.2 松香酸与银屑病相关靶点的收集

分别在 DisGeNET（http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home）、CTD（http://ctd.mdibl.org/）、GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（http://www.omim.org/）数据库检索银屑病相关靶点，合并各检索结果，然后剔除重复出现的靶点基因，将其与松香酸靶点基因取交集，即为松香酸治疗银屑病的潜在作用靶点。

1.3 松香酸作用银屑病靶点蛋白质 - 蛋白质相互作用（protein protein interaction，PPI）网络的构建

把松香酸治疗银屑病潜在靶点基因上传至 STRING10.5 在线软件（http://string-db.org），研究物种设定为“Homo sapiens”，限定置信系数为 0.7，获得 PPI 网络图，从而可呈现出在系统中靶点蛋白之间的互作关系。STRING 数据库为一个存储包含蛋白之间直接和间接相互作用数据的数据库，可预测出 PPI 信息，数据库中 PPI 置信度是通过具体参数表示的，参数值与 PPI 置信度成正相关[11]。将从 STRING 数据库导出的信息导入 Cytoscape3.6.1 软件进行可视化分析，利用“Network Analyzer”计算

松香酸 PPI 网络的拓扑学参数。松香酸靶点 PPI 网络中节点之间，如存在调控作用关系，则以边相连。本研究利用以下参数介数中心度和度值来评估节点在全网络中的关键性，进一步设置节点大小与颜色反映度值大小，最终获得 PPI 网络。

1.4 基因功能富集分析

将松香酸治疗银屑病潜在靶点基因上传至 DAVID6.8 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行基因本体（gene ontology，GO）分析，可得到生物过程（biological process，BP）、分子机制（molecular function，MF）、细胞成分（cellular component，CC）分析数据。KEGG 通路分析可通过 Cytoscape3.6.1 中 Clue GO 插件进行，选择“KEGG-Pathway”得到相关数据，提取相关基因所占通路基因百分数，目标基因集中属于该通路的基因数量 / 背景基因集中该通路所有基因的数量，将 GO 和 KEGG 分析结果导入 R 软件中绘制气泡图，最终以气泡图的形式呈现松香酸治疗银屑病基因功能富集的分析结果。

1.5 分子对接分析

选择 PPI 拓扑分析，筛选出核心网络上的靶基因及其对应的活性成分进行分子对接，在 Pubchem 数据库查松香酸 2D 构象，用 ChemBio3D Ultra14.0.0.117 软件转换为 3D 结构，并优化最小自由能，使用蛋白质结构数据库（protein data bank，PDB）查找靶蛋白，导入 PyMOL2.4.1 软件，去除水分子、分离原有配体，然后导入 AutoDockTools1.5.6 软件，使对接位点选择以原有配体为中心，设置网格箱为默认值，运用 Vina 进行分子对接，获得松香酸与靶蛋白的对接结果，将对接结果输出为 txt 文件和 pdbqt 文件，打开 txt 文件查看对接结果，用 PyMOL2.4.1 打开查看对接图像。一般认为当结合亲和力＜ −7.0 kcal/mol 时有强烈的结合活性 [6]。

2 结果

2.1 松香酸的化学结构及松香酸治疗银屑病潜在靶点信息

根据 PharmMapper 数据库以及经过文献检索查找松香酸已报道的靶点，最终得到松香酸的潜在靶点 100 个，在 CTD、OMIM、GeneCards 数据库共筛选出银屑病靶点 3 353 个，两者取交集最终得到 60 个作用靶点基因，其中包括 TNF、MAPK3、

表 1 松香酸治疗银屑病潜在作用靶点（按度值排序）

Table 1 Information of potential anti-psoriasis targets from abietic acid（sorted by degree）

编号	靶点	介数中心度/$\times10^{-3}$	度值	编号	靶点	介数中心度/$\times10^{-3}$	度值
1	TNF	243.61	29	16	PLA2G4A	39.77	11
2	MAPK3	152.63	29	17	PTGER4	30.02	11
3	PTGS2	131.47	27	18	AGTR1	26.64	11
4	TP53	106.21	23	19	BCL2L1	3.02	10
5	PPARγ	74.41	21	20	FABP4	13.83	10
6	RXRA	41.44	17	21	PTGES	5.27	10
7	ESR1	67.14	17	22	NOS2	6.53	10
8	MMP9	34.24	17	23	VDR	4.14	9
9	MDM2	14.11	13	24	PRKCA	14.47	9
10	ALOX5	11.52	13	25	PTPN1	28.77	9
11	RARA	15.16	12	26	RARB	9.30	8
12	PPARα	24.56	12	27	FABP1	2.60	8
13	MMP2	9.25	12	28	ALOX12	2.31	8
14	PTGS1	9.42	11	29	FABP5	7.10	8
15	NR3C1	11.38	11	30	CDC25B	10.45	8

PTGS2、TP53、PPARγ 等。松香酸的化学结构信息见图 1，松香酸靶点与银屑病相关靶点韦恩图见图 2，松香酸治疗银屑病潜在作用靶点按度值排名前 30 的见表 1，松香酸对银屑病作用靶点的 PPI 网络关系见图 3。

2.2 松香酸对银屑病作用靶点的生物信息学分析

经 DAVID 数据库 GO 分析以及 Bonferroni 校正（$P < 0.05$），得出 10 个 BP，包括 RNA 聚合酶 II 启动子对转录的负调控、炎症反应的负调控、甾体激素介导的信号通路等；6 个 CC，包括胞质、细胞外基质、核染色质等；10 个 MF，包括锌离子结合、类固醇激素受体活性、维甲酸受体活性等，见图 4。通过 Cytoscape3.6.1 中 ClueGO 插件分析，最终得到 20 条信号通路，其中包括 PPAR 信号通路和花生四烯酸代谢通路等，见图 4D。

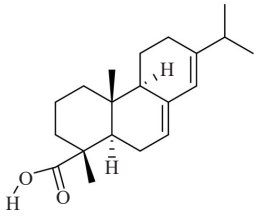


图 1 松香酸的化学结构

Figure 1 Chemical structure of abietic acid

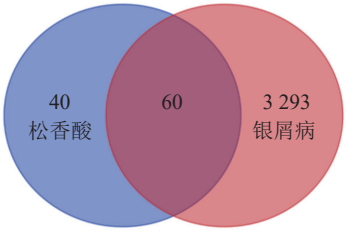


图 2 松香酸靶点与银屑病相关发病机制的靶点韦恩图

Figure 2 Venn diagram of abietic acid target and psoriasis related pathogenesis target

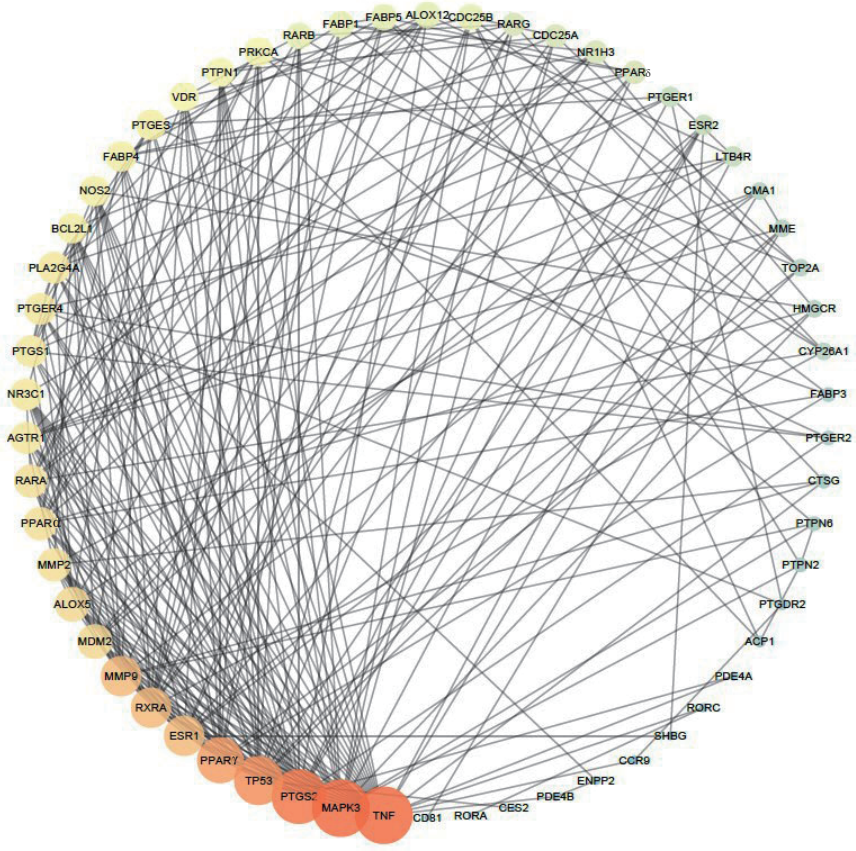


图 3 松香酸治疗银屑病潜在作用靶点之间的相互作用网络

Figure 3 Interaction network of potential targets of abietic acid for treatment of psoriasis

2.3 分子对接及结合自由能分析

由于本研究发现松香酸治疗银屑病靶点主要富集在 PPAR 信号通路上，PPI 分析结果也显示 PPARγ 为核心靶点，故选取核心靶点 PPARγ 与松香酸进行分子对接，以验证松香酸与靶点的对应关系，分子间的结合能力为 −7.4 kcal/mol，表明其结合活性强，见图 5。

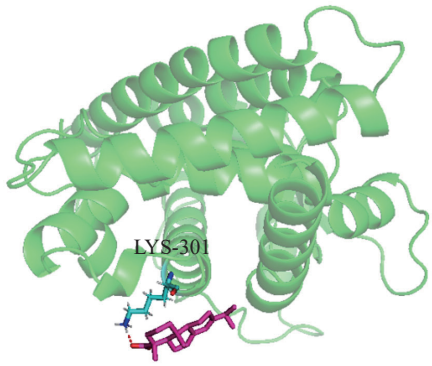


图 5 分子对接三维图

Figure 5 Three dimensional view of molecular docking

3 讨论

本研究借助网络药理学的方法，探讨松香酸治疗银屑病的物质基础及其分子机制，发现其通过调节 PPAR 信号通路和花生四烯酸代谢通路等多条通路发挥治疗银屑病的作用。此外，发现松香酸治疗银屑病靶点中 TNF、MAPK3、PTGS2、TP53、PPARγ 等具有较大的度值，故松香酸治疗银屑病的作用机制可能是通过以上通路靶点进行的。

《本草百种录》载“松之精气在皮，故其脂皆生于皮，其质黏腻似湿，而性极燥，故凡湿热在皮肤者，皆能治之”，由此推断松香适用于皮肤病湿热证型的治疗，陕西省中医医院皮肤科早在 20 世纪 80 年代

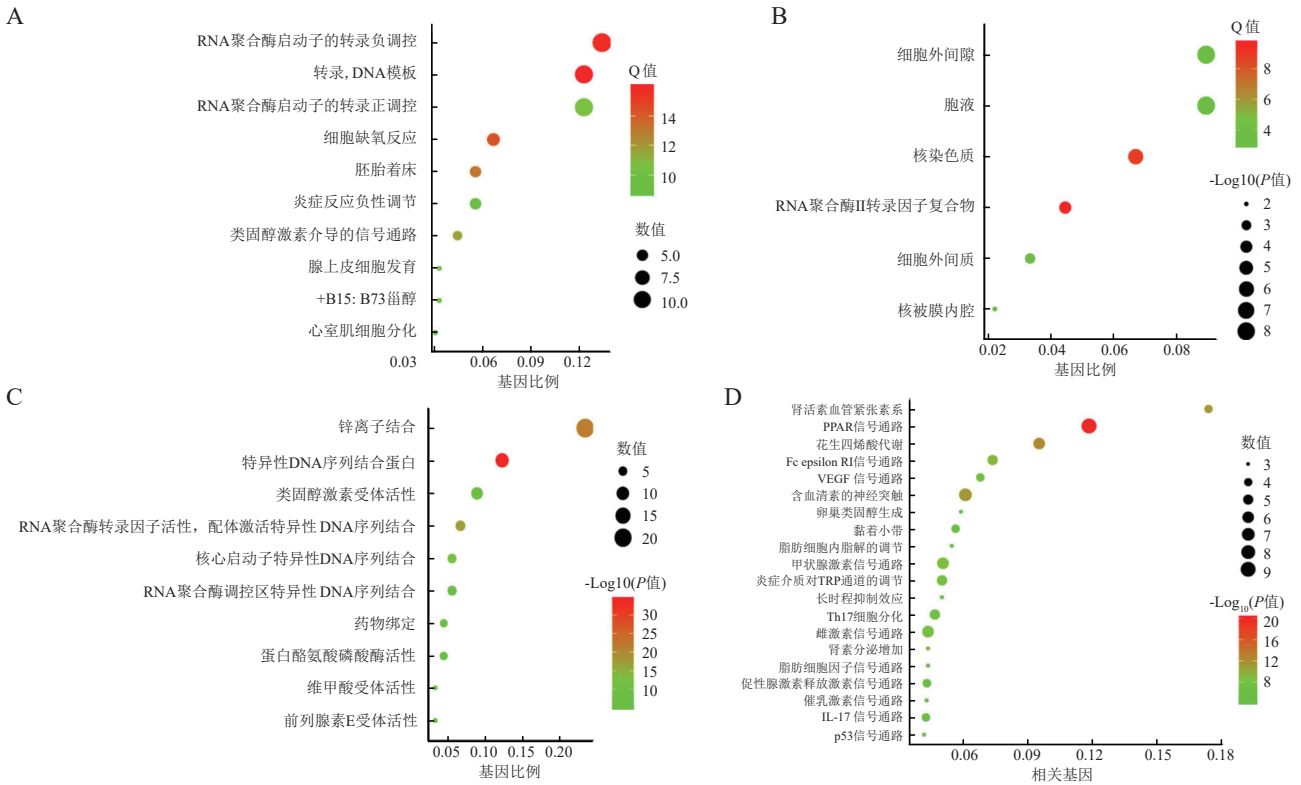


图 4 松香酸治疗银屑病靶点的 GO 富集分析（A: BP, B: CC, C: MF, D: KEGG）

Figure 4 Functional enrichment analysis of abietic acid targets in psoriasis treatment
(A: BP, B: CC, C: MF, D: KEGG)

就将老松香采用特殊工艺提取后制成片剂，内服用于治疗血热及湿热证型银屑病。

关于松香酸的生物效应研究，多集中在可改善过敏性哮喘治疗、伤口愈合、保护皮肤、抗肿瘤、抗炎、抗肥胖、抑制皮肤光老化等方面[7-9]，松香酸与氨基酸的结合增强了对人类癌细胞株的细胞毒活性，包括白血病、肺癌、胃癌和乳腺癌[10]。松香酸对C57BL/6J小鼠具有脂肪生成调节的抗肥胖作用[11]；体内、外研究表明松香酸具有抗炎作用[12]。银屑病为免疫介导的慢性炎症性皮肤病，与遗传、代谢、感染、免疫等都有关，以上研究虽非银屑病相关研究，但所研究的疾病、表型与银屑病较为类似，从侧面可反映出松香酸治疗银屑病的生物机制。

TNF为银屑病皮损中的主要炎性因子之一，TNF-α受体的激活诱导多种细胞内信号通路，包括NF-κB激活途径，MAPK通路（增殖蛋白激酶导致转录的基因编码的蛋白质参与细胞凋亡、增殖和炎症），以及PKB/Akt信号通路（蛋白激酶B负责调节增殖和炎症反应）。此外，TNF-α信号是激活神经磷脂酶的释放第二信使，这些通路均为银屑病重要致病途径[13]。松香酸通过激活PPARγ和抑制脂多糖诱导的巨噬细胞中前列腺素E2的产生，参与调控炎症和脂代谢相关的基因表达[12]。松香酸最近被报道为PPARα/γ双激活剂，通过选择性激活PPARα和PPARγ来降低NF-κB和AP-1信号，最终以剂量依赖的方式抑制UVB诱导的MMP-1表达，从而对皮肤光老化有益[9]。MAPK3广泛参与炎症反应、免疫反应及细胞增殖，可能是银屑病的药物作用靶点之一，MAPK3在中枢神经系统炎症过程中，可通过增加IL-23的分泌来调节Th17分泌，而Th17信号的激活在银屑病的发病机制中起重要作用[14-15]。TP53突变常发生在皮肤肿瘤过程中，并可能参与银屑病角质形成细胞的过度增殖[16]。故松香酸可通过作用于TNF、MAPK3、TP53等，达到抗炎、抗免疫、抑制细胞增殖以及改善皮肤屏障功能和防御功能的作用，进而治疗银屑病。

靶点GO富集分析结果表明，松香酸治疗银屑病可能与RNA聚合酶II启动子对转录的负调控、炎症反应的负调控、甾体激素介导的信号通路等有关，这些生物效应主要在胞质、细胞外基质、核染色质等分别进行，而其具体分子机制包括与锌离子结合、类固醇激素受体活性、维甲酸受体活性等。

KEGG通路分析得出，PPAR通路为松香酸作用银屑病的重要通路。PPAR是核激素受体家族中的配体激活转录因子[17]。其中还包括甲状腺激素受体、类维生素X受体、类固醇激素受体和维生素D受体。研究人员发现，在银屑病的病变中，PPARβ/δ升高[18]。表皮PPARβ/δ活化的小鼠模型发生银屑病样炎症性皮肤病，伴有角质形成细胞增生、树突状细胞积聚以及内皮细胞活化[19]。研究人员还观察了PPARβ/δ在活化的人T细胞在银屑病病变中的表达。PPARγ激动剂通过降低IL-2、TNF-α和IFN-γ等炎症细胞因子的水平，下调VCAM-1[20]等黏附分子的表达，来调节抗炎作用。花生四烯酸代谢异常是银屑病发病的重要因素，花生四烯酸5-脂氧合酶氧化花生四烯酸后，可产生两种二十烷类炎症介质白三烯D4和白三烯E3，白三烯可通过脂质信号传递信息给其细胞（自分泌信号）或邻近细胞（旁分泌信号）来调节免疫反应[21]。有研究表明银屑病患者血清中，白三烯D4和白三烯E3的含量明显高于健康对照组[22]。

4 结论

综上所述，本研究从网络药理学的角度证明了松香酸治疗银屑病的可靠性，结果显示松香酸治疗银屑病时作用于60个靶点和20条通路，体现了松香酸治疗银屑病的多靶点-多途径的作用特点，通过文献查阅对各条靶点、通路进行了验证，但由于本研究是单纯基于数据角度的分析，存在一定局限性，故对松香酸治疗银屑病的作用机制还需后期进一步的临床验证，使松香酸治疗银屑病作用机制的论证更为科学全面。

参考文献：

[1] Diani M, Altomare G, Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(4): 286-292.

[2] Sakkas LI, Zafiriou E, Bogdanos DP. Mini review: new treatments in psoriatic arthritis. Focus on the IL-23/17 Axis[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 872.

[3] 毕跃峰, 郑晓珂, 冯卫生, 等. 松香的化学研究与临床应用[J]. 河南中医药学刊, 2001, 2: 21-22.

[4] 董永丰, 李景霞, 韩世荣, 等. 银屑平治疗银屑病460例临床观察[J]. 陕西中医, 1987, 8(12): 9-10.

[5] Park JY, Lee YK, Lee DS, *et al*. Abietic acid isolated from pine resin(Resina Pini) enhances angiogenesis in HUVECs and accelerates cutaneous wound healing in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 203: 279-287.

[6] 刘沁, 段辛威, 李西海. 基于网络药理学和分子对接探讨白花蛇舌草治疗骨肉瘤的作用机制[J]. 康复学报, 2021, 31(4): 307-316.

[7] Gao Y, Zhaoyu L, Xiangming F, *et al*. Abietic acid attenuates allergic airway inflammation in a mouse allergic asthma model[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 38: 261-266.

[8] Kang S, Zhang J, Yuan Y. Abietic acid attenuates IL-1β-induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 64: 110-115.

[9] Jeon Y, Jung Y, Youm J, *et al*. Abietic acid inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblast cells through PPARα/γ dual activation[J]. Exp Dermatol, 2015, 24(2): 140-145.

[10] Ukiya M, Kawaguchi T, Ishii K, *et al*. Cytotoxic activities of amino acid-conjugate derivatives of abietane-type diterpenoids against human cancer cell lines[J]. Chem Biodivers, 2013, 10(7): 1260-1268.

[11] Hwang KH, Ahn JY, Kim S, *et al*. Abietic acid has an anti-obesity effect in mice fed a high-fat diet[J]. J Med Food, 2011, 14(9): 1052-1056.

[12] Takahashi N, Kawada T, Goto T, *et al*. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. FEBS Lett. 2003, 550(1-3): 190-4.

[13] Wcislo-Dziadecka D, Zbiciak-Nylec M, Brzezińska-Wcislo L, *et al*. TNF-α in a molecularly targeted therapy of psoriasis and psoriatic arthritis[J]. Postgrad Med J, 2016, 92(1085): 172-178.

[14] Liu H, Kang RS, Bagnowski K, *et al*. Targeting the IL-17 receptor using liposomal spherical nucleic acids as topical therapy for psoriasis[J]. J Invest Dermatol, 2020, 140(2): 435-444.

[15] Bendix I, Pfueller CF, Leuenberger T, *et al*. MAPK3 deficiency drives autoimmunity *via* DC arming[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(5): 1486-1495.

[16] Furue K, Ito T, Tanaka Y, *et al*. Cyto/chemokine profile of *in vitro* scratched keratinocyte model: implications of significant upregulation of CCL20, CXCL8 and IL36G in Koebner phenomenon[J]. J Dermatol Sci, 2019, 94(1): 244-251.

[17] Gómez-Mateo C, Avalos-Peralta SP, Ríos-Martín JJ, *et al*. Sequential histological and immunohistochemical assessment of proliferation and apoptotic markers during treatment of psoriasis with antitumor necrosis factor alpha (infliximab)[J]. Actas Dermosifiliogr, 2009, 100(5): 420-424.

[18] Montagner A, Wahli W. Contributions of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ to skin health and disease[J]. Biomol Concepts, 2013, 4(1): 53-64.

[19] Romanowska M, Reilly L, Palmer CN, *et al*. Activation of PPAR β/δ causes a psoriasis-like skin disease *in vivo*[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9701.

[20] Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, *et al*. PPAR activators as anti-inflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis[J]. Circ Res, 2002, 90(6): 703-710.

[21] Sorokin AV, Domenichiello AF, Dey AK, *et al*. Bioactive lipid mediator profiles in human psoriasis skin and blood[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(7): 1518-1528.

[22] Sasaki F, Yokomizo T. The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases[J]. Int Immunol, 2019, 31(9): 607-615.

（编辑：沈佳婕）