

• 研究论文 •

基于网络药理学葛根解热作用机制研究

李冰涛¹, 翟兴英¹, 李 佳², 涂 珺¹, 张启云¹, 徐国良¹, 黄丽萍², 邵 峰²,
朱卫丰², 刘荣华^{2*}

(江西中医药大学 1. 中医基础理论分化发展研究中心, 2. 药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 采用活性成分筛选、靶点预测技术, 确定葛根解热作用有效成分及作用靶点, 生物信息技术富集通路及生物过程, 分子对接验证网络分析结果, 阐述葛根解热作用的作用机制。结果显示, 葛根 49 个有效成分可能调控 PTGS2 和 EGFR 等 21 个靶点, 显著影响环氧化酶通路、前列腺素合成、正向调节发热、炎症反应等 11 条生物过程及花生四烯酸代谢、5 羟色胺突触、HIF-1 信号等 7 条代谢通路。分子对接验证显示, 65% 以上的有效成分与关键靶点具有结合活性, 相关文献也显示结果所得活性成分能够抑制关键靶点 PTGS2 表达, 说明结果可靠性较高。研究结果表明, 葛根可能通过“多成分、多靶点和多通路”作用发挥解热作用, 为葛根的进一步研究及其产品开发提供了科学依据。

关键词: 葛根; 发热; 网络药理学; 分子对接; 生物过程; 通路分析

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)08-1409-08

Network pharmacology-based study on mechanisms of antipyretic action of Pueraria radix

LI Bing-tao¹, ZHAI Xing-ying¹, LI Jia², TU Jun¹, ZHANG Qi-yun¹, XU Guo-liang¹,
HUANG Li-ping², SHAO Feng², ZHU Wei-feng², LIU Rong-hua^{2*}

(1. Research Center for Differentiation and Development of TCM Basic Theory, 2. School of Pharmacy,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

Abstract: This study was designed to explore the antipyretic mechanism of Pueraria radix. The method of network pharmacology was used to determine the known ingredients corresponding to Pueraria radix, predict the drug-related gene/protein targets, and analyze the interplay between key ingredients and targets. Biological Information Annotation Databases (DAVID) was used to enrich the biological processes and pathways. The result of network analysis was validated by molecular docking. It was found that 49 active ingredients of Pueraria radix not only regulate 21 targets (e.g. PTGS2, EGFR), but also affect 11 biological processes (e.g. oxidation-reduction process, prostaglandin synthesis, positive regulation of fever generation and inflammatory response) and 7 metabolic pathways (arachidonic acid metabolism, serotonergic synapse and HIF-1, et al). Molecular docking results showed that more than 65% of the active ingredients could be well docked with key targets, and the relevant literatures indicated that the active components could inhibit the expression of PTGS2, which means the result has a high reliability. These results indicated that Pueraria radix may carry its pyretic action *via* a "multi-ingredients-multi-targets-multi-pathways" mode, which provides a scientific basis for further research and drug development.

Key words: Pueraria radix; fever; network pharmacology; molecular docking; biology process; pathway analysis

收稿日期: 2018-12-09; 修回日期: 2019-01-04.

基金项目: 国家科技支撑计划 (2017YFC1702902); 江西省中医药科技计划项目 (2018A309); 江西中医药大学博士启动基金 (2015BS010).

*通讯作者 Tel: 86-791-87118992, E-mail: rhliu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1098

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根^[1]。习称野葛。甘、辛、凉。归脾、胃、肺经。具有解肌退热,生津止渴,透疹,升阳止泻,通经活络,解酒毒。用于外感发热头痛、项背强痛、口渴、消渴、麻疹不透、热痢、泄泻、眩晕头痛、脑卒中偏瘫、胸痹心痛、酒毒伤中。化学成分主要包括异黄酮类、葛根苷类、三萜皂苷类及其他化合物,其中葛根素、大豆苷元和大豆苷等异黄酮类化合物可能是主要有效成分^[2,3]。

文献记载葛根主治消渴、身大热、呕吐、诸痹、起阳气、解诸毒。现代药理学研究表明,葛根主要成分葛根素具有解热作用。实验以大肠杆菌内毒素所致家兔发热模型为研究对象,基于整体家兔直肠温度测定方法,研究葛根素注射剂对发热家兔的解热作用。结果表明,葛根素水溶液静脉注射对发热模型家兔具有明显的解热作用,而且解热作用呈现剂量相关性^[4,5]。葛根素解热作用机制可能是通过某些环节抑制了下丘脑视前区 (preoptic hypothalamic area, POAH) 神经元内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的产生和释放,从而抑制了体温定点上移而达到解热效应^[5]。但是研究未阐述葛根解热作用介质的影响及具体作用方式。葛根解热作用机制仍是需要进一步研究的关键科学问题。

网络药理学是一种基于受体理论和生物网络技术,阐述药物作用及其作用机制的新技术。其“多成分网络靶点作用”的研究模式,为多成分、多靶点协同作用的中药及其复方作用机制研究提供了新的研究思路和研究方法^[6]。本研究基于中药多成分、多靶点作用的研究思路,应用网络药理学技术,通过对葛根解热作用靶点属性、生物功能及通路分析,阐述葛根解热作用的生物学机制,为实验研究及产品开发提供科学依据。

材料与方法

葛根药材化学成分收集 化学专业数据库由中国科学院上海有机化学研究所承担建设,服务于化学化工研究和开发的综合性信息系统。本研究依据化学专业数据库的二级数据库植物化学成分数据库检索葛根化学成分^[7]。检索词为“葛”,物种名称 *Pueraria lobata*, 学名 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi。检索时间: 2018年8月1日。删除来源于茎、叶的化学成分,保留来源于地下根化学成分。使用 PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 和 ChemicalBook (<http://www.chemicalbook.com/>) 平台对其分子结构进行确证,最后将化合物保存为 SDF 或 Mol 格式文件。

活性成分筛选^[8-10] 类药性分析是分析化合物成为药物的可能性, Linpinski 五规则是类药性分析的经

典方法,也是对口服药物类药性经验型规律总结。具体内容包括分子质量小于 500; 氢键给体数目小于 5; 氢键受体数目小于 10; 脂水分配系数小于 5。符合 Lipinski 规则的化合物会有更好的药代动力学性质,在生物体内代谢过程中会有更高的生物利用度。如果化合物违背五规则中的 2 个以上,该化合物成药的可能性就比较低。葛根传统的给药方式是口服用药,因此本研究依据 Linpinski 五规则进行类药性分析,以获取葛根的活性成分。

葛根解热作用靶点分析 药材化学成分通过与人体特定靶点相结合,通过调节靶点生物活性或转录水平,使药物发挥治疗疾病的作用。依据分子相似性原理,应用化学计量学方法,预测化学成分的作用靶点,是化合物作用靶点预测的有效方法。Swiss Target Prediction 一款小分子作用靶点预测的在线分析软件,能够基于分子相似性原理预测小分子化合物的作用靶点^[11]。本研究 Swiss Target Prediction 在线分析工具,预测葛根中活性成分的作用靶点,并将概率值大于 0.5 的大分子作该成分的潜在有效靶点,提取作用靶基因名称构建葛根化学成分靶点交互作用网络。具体方法是将所有化合物都转化为标准的 SMILES 格式 (Canonical SMILES),将 SMILES 格式文件导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 在线分析平台,设置属性为“Homo sapiens”,预测活性成分靶点并以 csv 格式文件导出作用靶点。

在线文本挖掘服务器 CoolGeN (<http://ci.smu.edu.cn/CoolGeN/>) 可以通过输入关键词查找分析和关键词相关人类基因。本研究以发热的医学主题词 (MESH) fever 为关键词,检索发热相关的人类基因。具体设置为以 fever 为关键词,为了避免检索靶点的假阳性,将杂志影响因子选择 3~40,发表年限为 1988~2018 年,检索数据库为 Medline,物种设置为 all human genes。检索日期: 2018 年 11 月 14 日。去除重复基因,并搜索文献验证。最后分别和葛根活性成分潜在靶点对比,获得葛根解热作用靶点。

葛根解热作用关键有效成分分析 作用于葛根解热作用的类药性成分为葛根解热作用的有效成分。本研究基于葛根解热作用靶点-活性成分网络分析葛根解热作用的有效成分。依据活性成分-作用靶点网络的中心性参数分析葛根解热作用的主要有效成分。Cytoscape 是一款图形化软件,可以依据节点的网络关系构建活性成分-作用靶点网络,并对网络进行编辑和分析。本研究用“节点”(node) 表示活性成分、作用靶点,用“边”(edge) 表示活性成分与靶点之间关系,依据葛根活性成分与作用靶点的对应关系,应用 Cytoscape 3.2.1 构

建葛根活性成分-作用靶点网络。中心性 (centrality) 是生物网络中任意节点在整个网络中所在中心的程度, 度 (degree) 是在网络节点中心性指标。节点度值越大这个节点的中心性越高。本研究以活性成分在网络中的度值分析葛根解热作用的主要有效成分。

葛根解热作用靶点属性 DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>) 是包含人类疾病基因与变体的平台。基于此数据库可以方便地获取基因相关的疾病信息, 同时也可以获取与该疾病相关的基因信息。DisGeNET 不仅支持疾病名称检索, 也支持基因名称检索。本研究基于 DisGeNET 数据库基因名称检索功能, 获取葛根解热作用靶点的属性 (protein class), 具体方法是葛根解热作用靶点基因导入 DisGeNET 数据库中, 获取靶点对应蛋白类型信息。

生物功能与通路富集分析 生物学信息注释数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>, Version 6.8) 为大规模的基因或蛋白富集工具, 提供系统综合的生物功能注释信息, 能够找出最显著富集的生物学注释^[12]。将葛根解热作用靶点导入 DAVID 数据库, Select identifier 设置为 official gene symbol, List type 设置为 gene list, 限定物种为 homo sapiens, 阈值 $P < 0.05$ 。对葛根解热作用靶点进行 GO 分析生物过程 (biology process) 和 KEGG 通路 (pathway) 分析。

葛根解热作用关键靶点分析 葛根通过多个靶点发挥解热作用, 关键节点在葛根治疗网络中发挥重要作用。本研究基于葛根解热作用靶点交互网络, 以网络关键节点分析其作用的关键靶点。度中心性 (degree centrality) 是网络节点重要性最直接度量指标, 节点度值越大, 该节点在网络中就越重要。本研究以节点度值分析葛根解热作用关键靶点, 度值较大的靶点为葛根解热作用的关键靶点。STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 旨在提供多物种蛋白质相互作用的数据, 基于 STRING 数据库可以获得高质量的蛋白质相互作用数据。STRING 数据库中蛋白质相互作用可信度分为多个等级, 交互作用评分 0.15~0.4 为低可信度, 0.4~0.7 之间为中等可信度, 大于 0.7 为高可信度^[13]。本研究选择交互作用大于中等可信度的靶点构建葛根解热作用靶点交互作用网络。将葛根解热作用靶点导入 STRING 数据库, 物种选择 homo sapiens, 构建解热作用靶点相互作用网络, 将网络中节点交互作用关系参数导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络, 获得最终的蛋白相互作用网络。通过关键节点分析工具 Cytohubba, 基于作用靶点在交互作用网络中的度 (degree) 值分析葛根解热作用的关键靶点。

葛根解热作用关键靶点验证 受体理论是药效学

的基本理论, 该理论认为药物与作用靶点相结合是药效产生的基础。分子对接是评价药物活性成分与药物靶点结合能力方法。在网络药理学研究中, 分子对接常用来研究活性小分子与网络关键靶点的交互作用, 从活性成分与靶点交互作用角度验证交互作用网络的关键靶点^[14,15]。

Systems Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp>, Version 2.0) 是在线分子对接工具, Systems Dock Web Site 以对接打分 (docking score) 评价活性成分与靶点交互作用。一般认为打分值在 4.25 以上是表示分子与靶点之间有一定的结合活性, 大于 5.0 分表明分子与靶点有较好的结合活性, 大于 7.0 则说明具有强烈的结合活性^[16]。多结合活性成分的靶点, 产生药效的可能性越大, 成为关键节点可能性越高。本研究基于分子对接技术分析葛根活性成分与关键节点的交互作用, 验证葛根解热作用交互作用网络关键靶点。

结果

1 葛根化学成分及活性成分

通过检索化学专业数据库, 本研究共检测到葛根化学成分 157 种, 其中无机物及金属离子 6 种, 22 个化学成分来源于葛根花、叶, 10 个化学成分结构信息尚在更新中。对其余 119 个化学成分使用 Pubmed 和 Chemicalbook 进行结构确认, 另有 19 个化学成分结构信息无法确认。去除葛中金属离子、结构无法确认化合物及来源于花叶中的化学成分, 获得葛根化学成分 100 个, 6 个化学成分违背 Linpinski 五规则, 94 个成分符合 Linpinski 五规则, 可能是葛根解热作用的活性成分。

2 葛根解热作用靶点

基于 Swiss target prediction 预测活性成分的作用靶点, 共获得作用靶点 1 305, 删除重复项, 保留概率值 ≥ 0.5 靶点为作用靶点, 获取葛根活性成分作用靶点 188 个。以 fever 为关键词, 基于 CoolGeN 在线分析工具, 检索发热疾病基因 678 个。将葛根活性成分作用靶点基因与发热疾病基因进行比对, 获取葛根与发热共有靶点 21 个 (表 1), 这 21 个靶点可能是葛根解热的作用靶点。

3 葛根解热作用的关键活性成分分析

依据葛根解热作用靶点-成分关系, 应用 Cytoscape 将靶点-成分对应关系可视化葛根解热作用靶点-有效成分网络。该网络共包括 70 个节点, 76 条边。其中 21 个节点为葛根解热作用靶点, 49 个节点为与葛根解热作用靶点有直接作用关系的活性成分, 葛根解热作用成分如表 2 所示。该网络说明葛根解热作用可能是多

Table 1 Potential targets of Pueraria radix against fever

No.	Gene name	Uniprot ID	Protein name
1	MMP2	P08253	Matrix metalloprotein 2
2	PRKCE	Q02156	Protein kinase C epsilon type
3	NOS2	P35228	Nitric oxide synthase, inducible
4	GRIK1	P39086	Glutamate receptor ionotropic, kainate 1
5	EGFR	P00533	Epidermal growth factor receptor
6	ERBB2	P04626	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
7	SLC1A1	P43005	Excitatory amino acid transporter 3
8	IL5	P05113	Interleukin-5
9	ALOX15	P16050	Arachidonate 15-lipoxygenase
10	TERT	O14746	Telomerase reverse transcriptase
11	CNR1	P21554	Cannabinoid receptor 1
12	ALPP	P05187	Alkaline phosphatase, placental type
13	GFER	P55789	FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR
14	LDLR	P01130	Low-density lipoprotein receptor
15	PTGS2	P35354	Prostaglandin G/H synthase 2
16	MIF	P14174	Macrophage migration inhibitory factor
17	PTGS1	P23219	Prostaglandin G/H synthase 1
18	CA1	P00915	Carbonic anhydrase 1
19	ACHE	P22303	Acetylcholinesterase
20	PAH	P00439	Phenylalanine-4-hydroxylase
21	CBR1	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1

成分、多靶点作用的结果。在葛根解热作用网络中,度排列前4的成分是槲皮素 (M17, 4)、3'-甲氧基大豆甙元 (M33, 4)、染料木素 (M39, 3) 和芒柄花素 (M42, 3), 这些成分是葛根解热作用的关键活性成分 (图1)。

4 葛根解热作用靶点属性

将葛根解热作用的21个靶点依次导入 DisGeNET

Table 2 Bioactive ingredients of Pueraria radix against fever

NO.	Name	CAS	NO.	Name	CAS
M7	Phenol	108-95-2	M46	Baicalein	491-67-8
M9	Methyl decanoate	110-42-9	M47	4'-Methyl genistein	491-80-5
M11	Methyl octanoate	111-11-5	M50	Apigenin	520-36-5
M12	Methyl dodecanoate	111-82-0	M51	Flavone	525-82-6
M13	Methyl palmitate	112-39-0	M52	Genistin	529-59-9
M14	Methyl stearate	112-61-8	M53	Lupeol	545-47-1
M15	Ferulic acid	1135-24-6	M54	Tectorigenin	548-77-6
M17	Quercetin	117-39-5	M56	Prunetin	552-59-0
M19	Scoparone	120-08-1	M57	Daidzin	552-66-9
M21	Methyl tetradecanoate	124-10-7	M62	Glutamic acid	56-86-0
M22	Octanal	124-13-0	M66	Liquiritigenin	578-86-9
M26	Gallic acid	149-91-7	M69	Sissotrin	5928-26-7
M27	Methyl tridecanoate	1731-88-0	M71	Tyrosine	60-18-4
M28	Methyl heptadecanoate	1731-92-6	M72	Leucine	61-90-5
M29	Dimethyl octanedioate	1732-09-8	M74	Phenylalanine	63-91-2
M30	Dimethyl nonanedioate	1732-10-1	M76	Salicylic acid	69-72-7
M31	Monopalmitin	19670-51-0	M77	Histidine	71-00-1
M33	3'-Methoxy daidzein	21913-98-4	M78	Methyl pentadecanoate	7132-64-1
M38	Glycitin	40246-10-4	M79	Valine	72-18-4
M39	Glycitein	40957-83-3	M81	Isoleucine	73-32-5
M40	Genistein	446-72-0	M82	Arginine	74-79-3
M42	Formononetin	485-72-3	M88	Beta-sitosterol	83-46-5
M43	Formononetin glucoside	486-62-4	M89	Thymol	89-83-8
M44	Isoformononetin	486-63-5	M91	Isoliquiritigenin	961-29-5
M45	Daidzein	486-66-8			

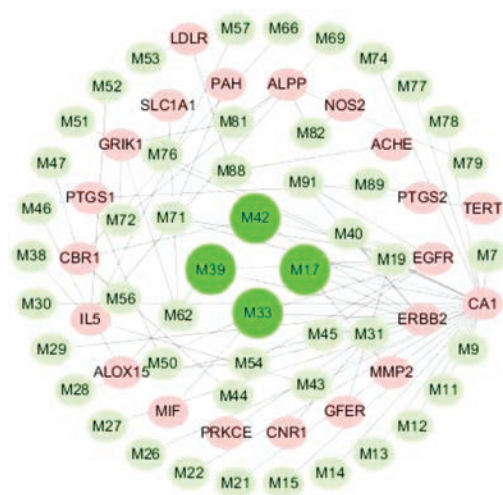


Figure 1 Ingredients-targets network of Pueraria radix against fever (light green represents ingredients, pink represents targets, bright green represents key ingredients)

数据库,提取靶点对应的类型 (表3)。葛根解热作用的作用靶点主要蛋白类型为传导因子、受体、氧化还原酶、水解酶和信号分子等,说明葛根解热作用与这些蛋白参与有关。

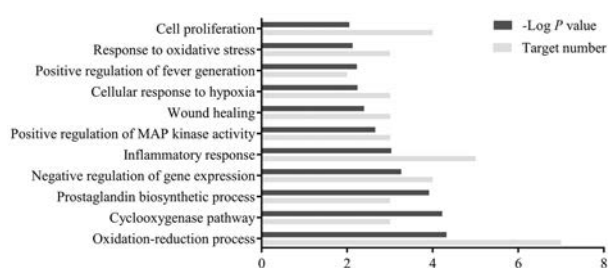
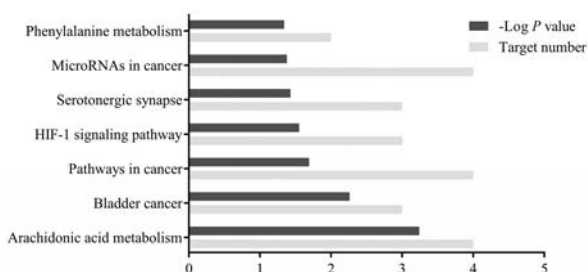
5 生物过程 (biology process, BP) 与通路富集分析 (pathway)

Gene ontology (GO) 生物功能分析是从生物功能上对基因产物进行标准化注释。通过GO富集分析可

Table 3 The protein class of potential targets of bioactive ingredients from Pueraria radix

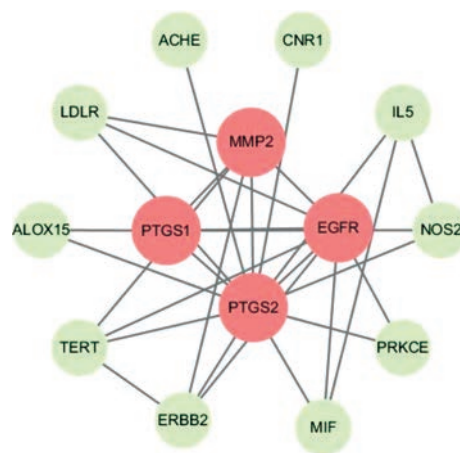
Target name	Protein class	Target name	Protein class
MMP2	Null	GFER	Oxidoreductase
TERT	Nucleic acid binding	CBR1	Oxidoreductase
NOS2	Null	PTGS2	Oxidoreductase
GRIK1	Transporter; receptor	MIF	Null
EGFR	Null	ERBB2	Null
ALPP	Hydrolase; phosphatase	PTGS1	Oxidoreductase
SLC1A1	Transporter	CA1	Lyase
IL5	Signaling molecule	ACHE	Hydrolase
ALOX15	Oxidoreductase	PAH	Null
CNR1	Receptor	LDLR	Extracellular matrix protein; receptor
PRKCE	Transfer/carrier protein; transferase; calcium-binding protein; kinase		

以获得基因的生物学功能。DAVID 是大规模基因生物过程及通路富集在线分析工具, 通过将研究基因导入 DAVID 可以方便地分析和获取基因对应的生物过程、生物功能和通路等信息^[7]。本研究将 21 个靶点的基因名称导入 DAVID 数据库, 进行生物过程和通路富集分析。生物过程富集结果 ($P < 0.01$) 见图 2, 统计结果显示氧化还原过程是最显著的生物过程, 该过程涉及 7 个作用靶点, 可能是葛根解热作用最重要的生物过程。其他生物过程包括环氧化酶通路、前列腺素合成、炎症反应、激活 MAPK 激酶活性、正向调节发热过程和氧化应激损伤等; 通路富集结果 ($P < 0.05$) 见图 3, 统计结果显示, 花生四烯酸代谢通路是最显著的代谢通路, 该通路涉及 4 个作用靶点, 可能是葛根解热作用最重要的代谢通路。其他通路包括 5 羟色胺突触、HIF-1 信号通路和膀胱癌通路等。

**Figure 2** Biology processes perturbed by bioactive ingredients of Pueraria radix**Figure 3** Pathways perturbed by bioactive ingredients of pueraria radix

6 葛根解热作用关键靶点分析

本研究基于 STRING 数据库分析葛根解热作用靶点之间的交互作用, 以交互作用可信度大于中等以上靶点构建葛根解热作用靶点交互作用网络 (图 4), 该网络包括 14 个节点和 29 条边。在蛋白质交互作用网络中, 节点蛋白在网络中的地位不相同, 较重要的节点为关键节点 (key nodes)。网络节点度参数是网络关键节点评价的常用方法。在葛根解热作用蛋白质交互作用网络中, PTGS2 (13)、EGFR (8)、MMP2 (6)、PTGS1 (5) 是度值最大的前 4 个节点, 这 4 个节点是葛根解热作用的关键靶点, 可能在葛根解热过程中发挥重要作用。

**Figure 4** The protein-protein interaction network of targets of Pueraria radix against fever (circle represents targets, pink circle represents key targets)

7 葛根解热作用关键靶点验证

采用 Systems Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp>, Version 2.0) 在线分子对接工具, 基于葛根活性成分进行分子对接验证。以成分及对应靶点对接打分构建热图 (图 5), 热图分析发现与 PTGS2 (PDB ID:4PH9) 对接打分大于 7.0 的活性成分 1 个 (2.1%), 介于 5.0~7.0 之间的活性成分 29 个 (61.7%), 介于 4.25~5.0 之间的活性成分个数 13 个 (27.6%), 小于 4.25 的活

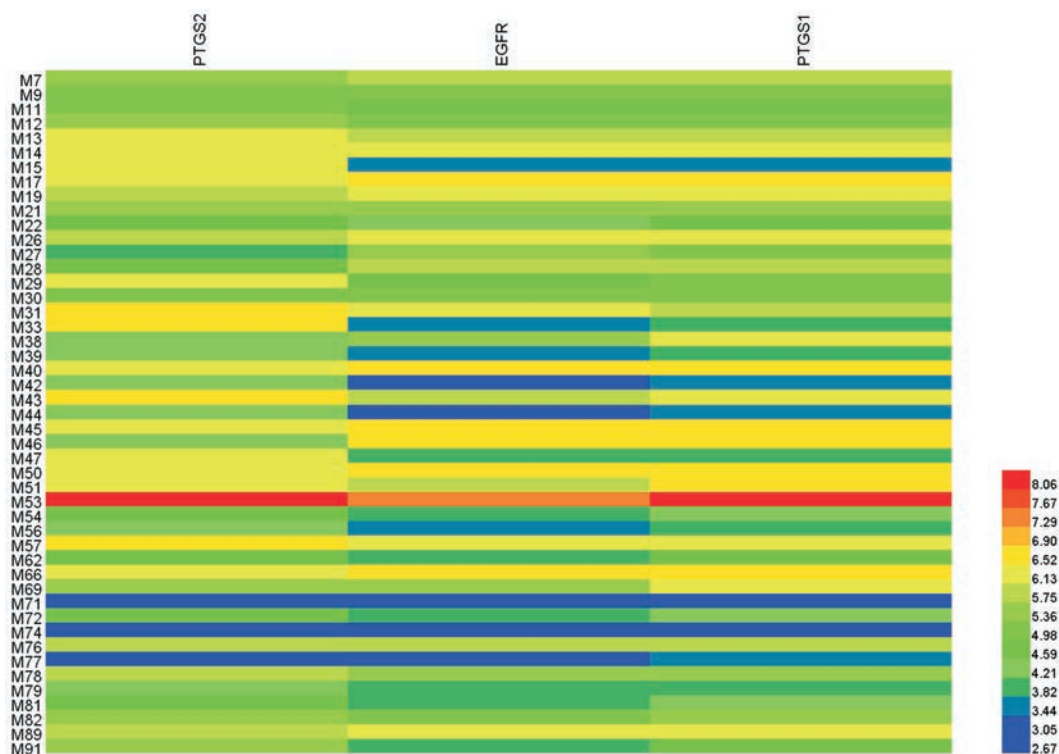


Figure 5 Heatmap for docking score of key targets with active ingredients of Pueraria radix

性成分4个(8.5%); EGFR (PDB ID:4LDK) 对接打分大于7.0的活性成分1个(2.1%), 介于5.0~7.0之间的活性成分28个(59.5%), 介于4.25~5.0之间的活性成分个数7个(14.8%), 小于4.25的活性成分11个(23.4%); PTGS1 (PDB ID:3N8Z) 对接打分大于7.0的活性成分2个(2.1%), 介于5.0~7.0之间的活性成分27个(57.4%), 介于4.25~5.0之间的活性成分个数3个(6.3%), 小于4.25的活性成分16个(34%); MMP2由于缺少相应的晶体结构未进行分子对接分析。分子对接结果表明, 多数葛根有效成分与网络关键靶点具有较好的结合能力。基于已发表文献实验研究结果, 有效成分阿魏酸(ferulic acid, M15)、芹菜素(apigenin, M50)、黄酮(flavone, M51)、异甘草素(isoliquiritigenin, M91)能够抑制炎症模型细胞或实验动物PTGS2的表达^[18-21], 从实验角度说明网络节点的可靠性。分子对接和文献研究分别从小分子与靶点相互作用及实验研究进展方面证实网络关键节点的可靠性。

讨论

葛根是中医解表药, 具有解肌退热的功效, 临床葛根及其配伍方用于外感病引起的发热, 具有较好的临床效果。现代研究表明, 葛根具有较好解热作用。本研究基于多成分、多靶点作用的研究思路, 应用网络药理学技术, 分析葛根解热作用靶点, 构建葛根解热作用

靶点的交互作用网络, 分子对接技术及已有文献报道结果验证网络关键节点, 富集解热作用相关的生物过程和通路, 阐述葛根解热作用机制, 为葛根实验研究及产品开发提供科学依据。

通过葛根作用靶点及发热疾病相关基因比对分析, 发现葛根与发热共有21个基因, 这21个基因可能是葛根解热作用靶点。对这21个靶点蛋白属性进行归属, 葛根解热作用靶点主要是酶类物质, 同时也包括细胞膜受体、离子通道和传导因子等。基于STRING交互作用网络数据库构建葛根解热靶点交互作用网络, 分析发现PTGS2、EGFR、PTGS1和MMP2是网络关键靶点, 这4个靶点可能在葛根解热作用中发挥重要作用。分子对接结果显示66%的有效成分与PTGS1具有结合活性, 76.6%的有效成分与EGFR具有结合活性, 91.5%的活性成分与PTGS2具有结合活性, 说明多数成分与网络关键靶点具有结合活性, 从小分子与关键靶点作用角度说明关键节点的重要性。文献报道有效成分阿魏酸、芹菜素、黄酮、异甘草素能够抑制炎症模型细胞或实验动物PTGS2的表达, 进一步说明网络关键节点分析结果可靠。EGFR是一种跨膜糖蛋白, 属蛋白激酶家族的成员。具有诱导受体二聚和酪氨酸自磷酸化并导致细胞增殖。这个基因的突变与原发性和继发性乳腺癌发生、生长及转移有关^[22]。前列腺素-内环氧合酶(PTGS), 又称为环氧酶, 是前列腺素合成的关键酶,

能够促进花生四烯酸转化为PGH₂,进一步合成前列腺素E₂(PGE₂)。前列腺素E₂介导发热反应,能够提高人体体温调定点,使体温升高。人体环氧酶主要包括两种亚型分别是PTGS1及PTGS2。环氧酶是非甾体抗炎药物作用靶点,环氧酶抑制剂具有解热镇痛抗炎等广泛的药理活性^[23]。同时PTGS1调节内皮细胞的血管生成,可促进肿瘤进展过程中的细胞增殖。PTGS2可以促进癌症生成和生长^[24]。MMP2是基质金属蛋白水解酶,该蛋白通过多种通路参与中枢神经系统的作用、子宫内膜月经破裂、调节血管化和转移等生理功能。在炎症和发热过程中,MMP2能够使心脏器官减少磷脂酶A2的分泌,从而调节炎症和发热^[25]。

基于葛根活性成分-作用靶点网络分析,度排列靠前4个成分是槲皮素、3'-甲氧基大豆苷元、染料木素和芒柄花素。槲皮素是一种黄酮类化合物,目前研究槲皮素具有抗炎和抗病毒的活性^[26]。3'-甲氧基大豆苷元可能具有抗缺氧、抗缺血作用^[27]。染料木素是一种O甲基化的异黄酮,具有降低丙二醛(MDA)水平、抗氧化、抑制乳腺癌细胞分化和抗癌的作用^[28,29]。芒柄花素是一种异黄酮,具有抗肿瘤的活性,具有抑制膀胱癌细胞增殖及癌细胞侵袭性作用^[30]。

HIF-1是个重要的调节因子,通过激活能量代谢、血管再生、凋亡等生物过程使机体或细胞适应缺氧环境。下调HIF-1途径可能是以后癌症治疗的新方法^[31]。下丘脑的前部和视前区(POAH)具有体温信息整合的作用,建立调定点,并通过产热和散热机制实现体温调节,5-羟色胺为POAH的神经介质,是体温调节的物质基础^[32,33]。花生四烯酸通路在链接热原与发热的关键通路,其代谢产物前列腺素E₂是下丘脑体温调节介质,具有升高体温调定点,引起发热反应的作用^[34]。发热是恒温动物在致热原作用下,体温调节中枢功能异常,而引起的体温高于正常体温范围的现象。引起发热作用的物质成为热原,常见热原包括脂多糖(LPS)、IL-6、IL-1、IL-8、干扰素- γ 、TNF α 等^[35,36]。肿瘤内白细胞浸润引起炎症反应、恶性肿瘤细胞内释放抗原物质引起免疫反应而发热,同时肿瘤细胞能分泌一些活性物质,如5-羟色胺、嗜铬细胞瘤产生儿茶酚胺及肿瘤凋亡过程中产生的肿瘤坏死因子(TNF)都可以作为热原引起发热。

综上所述,本研究应用网络药理学方法研究了葛根解热主要作用靶点,构建了葛根解热作用的靶点交互作用网络,运用分子对接方法对葛根解热作用关键靶点进行验证,通过对葛根活性成分解热作用靶点的生物过程及通路富集,阐述了葛根通过多靶点、多通路作用发挥解表退热作用机制,为葛根解热作用机制的

实验研究及产品开发提供了科学依据。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [2] Li G, Zhang Q, Wang Y. Chemical constituents from roots of *Pueraria lobata* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 3156-3159.
- [3] Li X, Pan JX, Chen SG, et al. Research progress of chemical components and pharmacological action of *Pueraria lobata* [J]. *J Chin Institute Food Sci Technol* (中国食品学报), 2017, 17: 189-195.
- [4] Fan SD, Sun LH, Liang Q, et al. Experimental study of antipyretic effect of puerarin fevered rabbits [J]. *J China Med Univ* (中国医科大学学报), 1991, 20: 250-252.
- [5] Wang XR, Wu W. Experimental research on puerarin injection in the treatment of endotoxic fever [J]. *China Naturopathy* (中国民间疗法), 1998, (2): 53-55.
- [6] Yan L, He XY, Gao Y, et al. An exploration into mechanism of leukocyte elevation activity of Lvjiao Buxue granules based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 1660-1669.
- [7] Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences. Chemical Database [DB/OL]. <http://www.organchem.csdb.cn>. [1978-2016].
- [8] Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2004, 1: 337-341.
- [9] Yang EB, Li ZM. Linpinski rules in drug molecular design [J]. *Chemistry* (化学通报), 2006, 69: 16-19.
- [10] Zhang J, Tan CB, Xu WR. Advances in studies on Lipinski's five rules [J]. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2011, 34: 451-455.
- [11] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 32-38.
- [12] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2008, 4: 44-57.
- [13] Mering CV, Jensen LJ, Snel B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D433-D437.
- [14] Feng W, Ao H, Yue S, et al. Systems pharmacology reveals the unique mechanism features of Shenzhu Capsule for treatment of ulcerative colitis in comparison with synthetic drugs [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1-12.
- [15] Wu D, Gao Y, Xiang H, et al. Exploration into mechanism of antidepressant of *Bupleuri radix* based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 210-219.

- [16] 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.
- [17] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: 1-13.
- [18] Wu JL, Shen MM, Yang SX, et al. Inhibitory effect of ferulic acid on neuroinflammation in LPS-activated microglia [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2015, 31: 97-102.
- [19] Wang J, Liu YT, Xiao L, et al. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway [J]. Inflammation, 2014, 37: 2085-2090.
- [20] Hämäläinen M, Nieminen R, Asmawi MZ, et al. Effects of flavonoids on prostaglandin E-2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages [J]. Planta Med, 2011, 77: 1504-1511.
- [21] Kim JY, Park SJ, Yun KJ, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression *via* the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 584: 175-184.
- [22] Wendt MK, Williams WK, Pascuzzi PE, et al. The antitumorigenic function of EGFR in metastatic breast cancer is regulated by expression of Mig6 [J]. Neoplasia, 2015, 17: 124-133.
- [23] Shi W, Wang YM. Progresses in biological research of the cyclooxygenase (COX) family [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2004, 40: 246-249.
- [24] Williams CS, Mann M, Dubois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development [J]. Oncogene, 1999, 18: 7908-7916.
- [25] Berry E, Hernandez-Anzaldo S, Ghomashchi F, et al. Matrix metalloproteinase-2 negatively regulates cardiac secreted phospholipase A2 to modulate inflammation and fever [J]. J Am Heart Assoc, 2015, 4: e002553.
- [26] Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, inflammation and immunity [J]. Nutrients, 2016, 8: 167-180.
- [27] Zhang ZT, Liu QG, Liu XH, et al. Synthesis, crystal structure and biological activity of monomethylated daidzein sulfonates [J]. Acta Chimica Sinica (化学学报), 2002, 60: 1846-1853.
- [28] Hu YJ, Gao KG, Zheng CT, et al. Effect of dietary supplementation with glycitein during late pregnancy and lactation on antioxidative indices and performance of primiparous sows [J]. J Anim Sci, 2015, 93: 2246-2254.
- [29] Zhang B, Su JP, Bai Y, et al. Inhibitory effects of *O*-methylated isoflavone glycitein on human breast cancer SKBR-3 cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 7809-7817.
- [30] Wu Y, Zhang X, Li Z. Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness *via* regulation of miR-21 and PTEN [J]. Food Funct, 2017, 8: 1061-1066.
- [31] Ajduković J. HIF-1 — a big chapter in the cancer tale [J]. Exp Oncol, 2016, 38: 9-12.
- [32] Lin MT, Pang IH, Chern SI, et al. Effects of increasing serotonergic receptor activity in brain on prostaglandin E1-induced fever in rabbits [J]. Pharmacology, 1979, 18: 188-194.
- [33] Yin SM. An Investigation into the Thermoregulatory Mechanism of Hypothalamus in Lizard *Phrynocephalus Przewalski* (下丘脑在荒漠沙蜥体温调节中的作用及其机制初探) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2004.
- [34] Tao YQ, Liang T, Zhou KY. Three arachidonic acid metabolic pathways involved in inflammation [J]. Int J Immunol, 2010, 33: 303-306.
- [35] Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach [M]. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2003.
- [36] Stefferl A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, et al. The role of TNF- α in fever: opposing actions of human and murine TNF- α and interactions with IL- β in the rat [J]. Br J Pharmacol, 2012, 118: 1919-1924.