

基于网络药理学与分子对接技术研究黄精抗动脉粥样硬化的作用机制

高凤凤¹, 裴艳玲², 任越¹, 陈紫军¹, 卢建秋^{1*}, 张燕玲^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 河北鑫民和质检技术服务有限公司, 河北 安国 071200)

摘要: 利用网络药理学和分子对接技术从整体层面阐释黄精治疗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的作用机制。通过中药化学成分数据库 (TCMD) 和中药系统药理学数据库 (TCMSP) 收集黄精化学成分并利用 PharmaDB、Swiss TargetPrediction 预测其作用靶点集, 借助 OMIM、DisGeNET 及 NCBI 基因数据库检索 AS 相关靶点集。取两靶点集交集获取黄精治疗 AS 的潜在作用靶点, 基于 STRING 平台构建交集靶点相互作用网络并在 Cytoscape 中进行可视化分析。根据拓扑参数筛选黄精治疗 AS 的关键靶点, 采用 Clue GO 对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。最后利用 Discovery Studio 4.0 对关键靶点进行分子对接验证。结果筛选获得 45 个黄精活性成分和 51 个黄精治疗 AS 的潜在作用靶点, 拓扑分析结果包含的 5 个关键靶点为血清白蛋白、丝裂原活化蛋白激酶 3、丝裂原活化蛋白激酶 1、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src 和基质金属蛋白酶-9。GO 富集分析得到 131 个 GO 条目, 主要涉及类固醇激素受体的活性、细胞对类固醇激素刺激的反应和磷脂酰肌醇-3 激酶信号通路等生命过程。KEGG 通路分析得到 37 条主要信号通路, 主要涉及过氧化物酶体增殖激活受体信号通路、血小板激活信号通路、血管内皮生长因子信号通路、低氧诱导因子信号通路和黏着连接信号通路。分子对接结果显示, 黄精成分与潜在关键靶点具有较好的结合活性。本研究从网络药理学的角度初步阐释了黄精治疗动脉粥样硬化的作用机制, 旨在为其进一步的临床研究提供科学依据。

关键词: 黄精; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 分子对接技术; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)11-2642-09

Possible mechanisms by which *Polygonati rhizoma* opposes atherosclerosis based on network pharmacology and molecular docking analyses

GAO Feng-feng¹, PEI Yan-ling², REN Yue¹, CHEN Zi-jun¹, LU Jian-qiu^{1*}, ZHANG Yan-ling^{1*}

(1. School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. XinMinHe Testing (HeBei) Co. Ltd., Anguo 071200, China)

Abstract: Possible mechanisms by which *Polygonati rhizoma* opposes atherosclerosis (AS) were identified by network pharmacology and molecular docking analyses. The Traditional Chinese Medicine Database (TCMD) and the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP) were utilized to identify the likely active components of *Polygonati rhizoma*. The potential targets set of *Polygonati rhizoma* were predicted with the PharmaDB database and the Swiss TargetPrediction database. The targets set for AS was retrieved by OMIM, DisGeNET and NCBI Gene database. We used the STRING platform to construct a protein-protein interaction network of the intersectional targets and performed visual analysis in Cytoscape. The key targets of *Polygonati rhizoma* in AS were searched by network topology and the resulting GO and KEGG enrichment was analyzed by

收稿日期: 2020-03-11; 修回日期: 2020-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573831); 保定市科技支撑计划项目 (中药质量评价与控制科技研发平台).

*通讯作者 Tel: 13810778920, E-mail: zhangyanling@bucm.edu.cn;

Tel: 13911855396, E-mail: lujq@vip.sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0299

Clue GO. In addition, the key targets were verified by molecular docking in Discovery Studio 4.0. A total of 45 active ingredients and 51 potential targets were obtained in the treatment of AS. The results of the topology analysis included five key targets: serum albumin, mitogen-activated protein kinase 3, mitogen-activated protein kinase 1, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src and matrix metalloproteinase-9. The 131 GO items showed that the biological process mainly involved the steroid receptor, cell response to steroid stimulation, the phosphatidylinositol-3 kinase signal pathway, and others. The KEGG pathway analysis included 37 pathways, which were closely related to peroxisome proliferation activated receptor signaling pathway, platelet activation pathway, vascular endothelial growth factor pathway, hypoxia inducible factor pathway and adhesion connection pathway. The results of molecular docking proved that the combined activity of the components with potential key targets is excellent. This study proposes mechanisms by which *Polygonati rhizoma* might act to reverse or minimize AS and provides a scientific basis for clinical research on *Polygonati rhizoma*.

Key words: *Polygonati rhizoma*; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking technology; mechanism of action

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 以血管内膜下纤维斑块或粥样为其典型特征, 主要累及大、中动脉, 受累动脉内膜先后发生脂质聚集、纤维增生及钙质沉淀, 导致血管壁增厚和硬化的一个渐进性过程^[1]。AS 作为冠心病发病的独立危险因素, 一直以来受到广泛关注^[2]。临床上常采取他汀类等降血脂药物治疗 AS, 但临床数据显示, 他汀类药物具有较强的肌毒性, 且与其他药物联用时横纹肌溶解的发生率大幅提升^[3]。因此, 研究开发新型治疗动脉粥样硬化药物具有重要意义。

黄精 *Polygonati rhizoma*. 为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum Coll. Et Hemsl.*、黄精 *Polygonatum sibiricum Red.* 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma Hua* 的干燥根茎。黄精最早见于晋代陶弘景的《名医别录》, 黄精性甘、平, 质滋润, 归肾、脾、肺经, 用于治疗阴虚燥咳、咳嗽久咳、脾胃虚弱、肾精亏虚、腰膝酸软等证。现代药理研究表明, 黄精具有增强免疫功能、降低血脂、保护心肌细胞、调节血糖及抗肿瘤等作用^[4]。近

年研究指出, 黄精通过降低血清中氧化应激标记物及炎症因子的水平发挥治疗 AS 的作用, 通过调节血栓素及组织纤溶酶原的水平抑制血小板活动进而改善 AS 病程^[5]。此外, 李友元等^[6]研究发现, 黄精化学成分可通过调节血脂代谢, 保护动脉血管发挥抗 AS 的药效。以上研究结果表明黄精治疗 AS 的疗效确切, 但目前研究多从单一成分或单一通路阐释黄精治疗 AS 的作用机制, 并且主要停留在动物层面, 无法以整体性及系统性的角度阐释黄精治疗 AS 的作用模式。因此本研究旨在运用网络药理学技术, 构建“成分-靶点-通路-疾病”多维网络, 阐释黄精抗 AS 的生物学机制, 为黄精临床试验研究及产品开发提供科学依据^[7]。本研究的思路流程图见图 1。

材料与方法

黄精化学成分获取 本研究利用中药化学成分数据库 (Traditional Chinese Medicine Database, TCMD

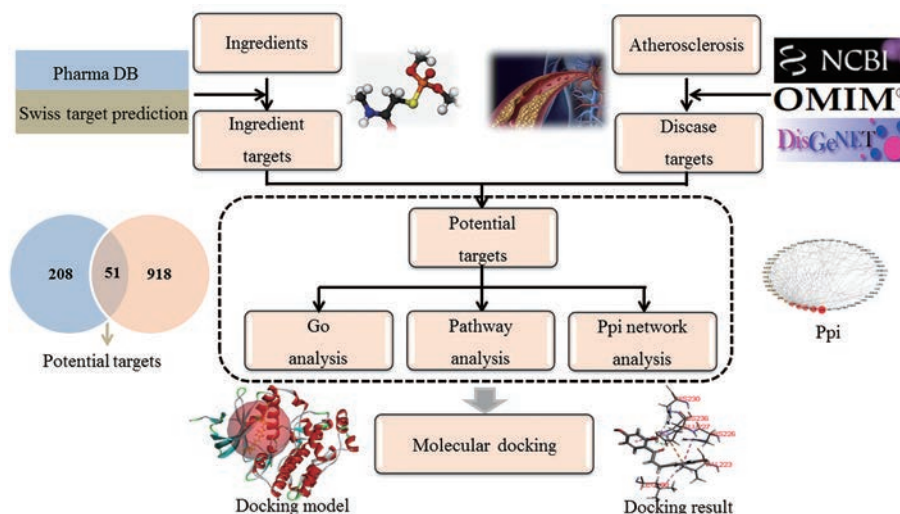


Figure 1 Flow chart of research

2009) 和中药系统药理学数据库 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), 以黄精为关键词检索获得黄精全部成分, 去重并校正, 以口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性指数 (drug like index, DL) ≥ 0.18 作为筛选条件, 获取黄精的活性成分用于后续研究^[8]; 并通过文献检索获取黄精活性成分, 补充上述数据库检索结果。

黄精化学成分反向找靶研究 利用 Discovery Studio 4.0 (DS 4.0) 对黄精成分进行预处理。通过 Minimize ligands 模块在 CHARMM 力场下采用最陡下降法和共轭梯度法相结合的能量优化算法, 对成分进行能量最小化分析。随后对分子进行多构象的生成, 选择 BEST 模式, 从而生成黄精成分三维结构数据库, 基于 PharmaDB 数据库 (共 2 676 个靶点, 5 780 个晶体结构的基于受体结构的药效团模型) 进行黄精活性成分的反向找靶研究, 搜索方式选择柔性搜索, 以匹配打分值 (已归一化, 即完全匹配打分值最高为 1) 0.9 为截断值, 获得其作用靶点。同时基于 Swiss TargetPrediction 数据库预测黄精潜在作用靶点, 设置 Probability ≥ 0.9 , 获得预测结果。将 PharmaDB 数据库及 Swiss TargetPrediction 数据库靶点预测结果取交集, 最终获得黄精潜在作用靶点集。

黄精抗 AS 潜在作用靶点研究 在人类基因和基因型数据库 OMIM (<http://www.omim.org/>)、疾病相关的基因与突变位点数据库 DisGeNET (<http://disgenet.org/>) 及 NCBI 基因数据库 (<https://ncbi.org/>) 中以“atherosclerosis”为关键词进行检索, 获得 AS 相关的疾病靶点。将黄精潜在作用靶点与 AS 疾病靶点取交集, 最终获得黄精抗 AS 的潜在作用靶点。

药物-疾病靶点网络构建 将黄精治疗 AS 的潜在作用靶点导入 STRING (<http://string-db.org>) 平台中获得靶点之间的相互作用关系, 物种选择“homo sapiens”, 构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络模型。将建立的蛋白相互作用关系导入 Cytoscape 3.6.1 中进行可视化分析并进行筛选, 去除孤立点、重复边和自环边, 取最大连通子图, 最终获得黄精抗 AS 的蛋白互作网络。

关键靶点、基因功能富集分析与通路分析 利用 cytoHubba 插件, 计算黄精抗 AS 蛋白互作网络中各节点的度值 (degree), 度值的大小表示对应节点在网络中的关键度^[9], 选取度值较高的靶点作为黄精抗 AS 的关键靶点。Clue GO^[10] 是一种基因富集工具, 常用于网络药理学研究中。本文采用 Clue GO 中的 biological process、molecular function、cellular component, 从生物过程、分子功能以及细胞构成 3 个方面对黄精抗 AS 的潜在作用靶点进行 GO 富集分析, 使用 Clue GO 中

KEGG 对黄精抗 AS 中潜在作用靶点进行通路分析^[11]。在 Clue GO 的基因列表面板中输入靶点的基因 ID, 同时为所提交的靶点列表选择对应的物种“homo sapiens”, 选择“ $P \leq 0.05$ ”表示差异具有统计学意义^[12], 获得 GO 功能富集分析与通路分析结果。

关键靶点分子对接验证 利用 Discovery Studio 4.0 软件构建关键靶点的分子对接模型, 进而与黄精成分及抗 AS 阳性药分子进行分子对接, 分析对接结果从而验证网络分析结果的可靠性。首先在 Protein Database (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载黄精治疗 AS 的关键靶点的蛋白晶体结构, 选择解析度小于 3\AA 并具有配体的蛋白复合物, 以保证对接的精度^[13]。采用 DS 4.0 中 Clean Protein 工具对 PDB 中下载的蛋白进行预处理, 根据 PDB 晶体的原配体的空间位置定义活性口袋, 将 Conformation Method 参数设置为“BEST”, Docking Preferences 参数设置为“High Quality”, 其余参数为默认。将原配体抽出后重新对蛋白的活性口袋中, 根据对接后的配体分子与原配体分子的均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD) 大小判断对接程序参数设置的合理性以及对该晶体复合物的实用性, 一般认为当 $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ 时说明分子对接模型能够较好地重现原配体与蛋白的结合模式, 对接结果有较高的可靠性。随后, 将黄精潜在活性成分及抗 AS 阳性药分子导入 DS 4.0 中进行分子对接, 计算对接打分值 (-CDOCKER ENERGY)。当 -CDOCKER ENERGY 值高于原配体时, 可认为成分与靶标具有较高的结合活性, 以此作为标准对分子对接结果进行评价, 并与阳性药分子对比分析对接结果。

结果

1 黄精化学成分及反向找靶研究

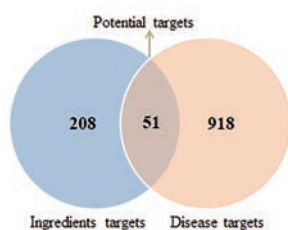
本研究基于 TCMD 和 TCMSP 数据库收集整理获得黄精有效成分, 并以口服利用度及类药性指数筛选得到 45 个成分, 其中苯丙素类 4 个、黄酮类 14 个、糖类 4 个、有机酸类 4 个、甾体类 3 个、皂苷类 14 个、其他类成分 2 个。通过文献检索获得黄精活性成分为: 黄精多糖、薯蓣皂苷、甘草素、丁香脂素和鹅掌楸碱。将上述成分与数据库检索结果比对, 结果发现上述成分已包含于数据库检索获得的 45 个成分中。分别以匹配值 0.9 及 Probability 值 0.9 截取 PharmaDB 和 Swiss TargetPrediction 数据库的黄精作用靶点预测结果, 分别获得 193 和 63 个人源靶点, 将两个数据库获得的人源靶点进行汇总并去除重复靶点, 最终获得与黄精化学成分相关的 208 个人源靶点。将同一成分靶点匹配值进行加和, 加和值排在前 10 的黄精化学成分信息见表 1。

Table 1 Part of *Polygonati rhizoma* chemical constituents

Component	CAS number	Molecular formula
Oroxin A	57396-78-8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
Methylprotodioscin	54522-52-0	C ₅₂ H ₈₆ O ₂₂
Apigenin	520-36-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
(+)-Syringaresinol	21453-69-0	C ₂₂ H ₂₆ O ₈
Baicalein	491-67-8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Liriodendrin	66791-77-3	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈
Sitogluside	474-58-8	C ₃₅ H ₆₀ O ₆
Vitexin xyloside	-	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅
Liquiritigenin	578-86-9	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
Salicylic acid	69-72-7	C ₇ H ₆ O ₃

2 黄精抗AS潜在作用靶点获取研究

通过反向找靶研究, 获得打分值大于0.9的黄精潜在作用靶点208个。在OMIM、DisGeNET和NCBI基因数据库中, 以“atherosclerosis”为关键词进行检索, 分别获得202、52和847个人源靶点, 将3个数据库获得的人源靶点汇总后并去除重复靶点, 最终获得与AS相关的918个人源靶点。将黄精成分作用的208个潜在作用靶点映射到918个AS疾病靶点集中, 最终获得黄精抗AS的潜在作用靶点为51个, 见图2。靶点详细信息, 见表2。

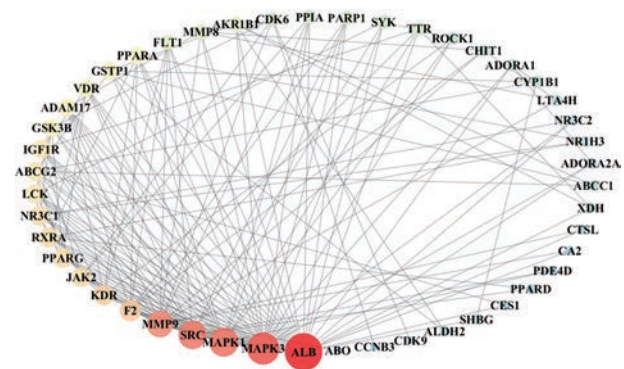
**Figure 2** Venn diagram of targets of *Polygonati rhizoma* and atherosclerosis

3 靶点蛋白相互作用网络构建

基于STRING平台获取黄精抗AS潜在作用靶点间的蛋白互作信息, 并在Cytoscape中进行可视化, 得到黄精抗AS蛋白互作网络如图3所示。该网络包含47个节点, 171条边, 其中节点代表黄精抗AS的潜在作用靶点, 节点越大表明其度值越高, 边为潜在作用靶点间的相互作用关系。

4 关键靶点、GO富集与KEGG通路分析

利用度中心性筛选蛋白互作网络中的关键靶点, 靶点的度中心性越大, 说明该靶点在网络中越重要。PPI图中根据度值将节点分为不同的大小, 其中节点越大, 度中心性越高, 靶点在网络中也就越关键。经计算, 排名前5位的关键靶点分别为血清白蛋白 (serum albumin, ALB)、丝裂原活化蛋白激酶3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、丝裂原活化蛋白激酶1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、原癌基

**Figure 3** Protein-protein interaction network of *Polygonati rhizoma* for the treatment of atherosclerosis. The larger the node, the higher the centrality of the node degree

因酪氨酸蛋白激酶 Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9)。根据显著性程度, GO功能富集分析与KEGG通路分析均以 $P \leq 0.05$ 表示具有统计学意义^[14]。GO富集分析共获得131条GO条目, 结果显示, 黄精治疗动脉粥样硬化交集蛋白主要通过调节类固醇激素受体的活性、细胞对类固醇激素刺激的反应、磷脂酰肌醇-3激酶信号通路等生物过程发挥作用; 在细胞构成方面主要与三级颗粒内腔有关; 在分子功能方面主要涉及了类固醇结合、脂肪酸结合以及雌激素受体结合等。分别从生物学过程、细胞构成、分子学功能3个层面选取 P 值排名前10的功能信息, 结果见表3。KEGG通路注释分析结果显示, 潜在靶点涉及37条相关信息通路, 经调研发现其中与动脉粥样硬化密切相关的信号通路有5条, 包括过氧化物酶体增殖激活受体信号通路 (peroxisome proliferation activated receptor signaling pathway, PPAR signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路 (vascular endothelial growth factor signaling pathway, VEGF signaling pathway)、血小板激活信号通路 (platelet activation signaling pathway)、黏着连接信号通路 (adhesive connection signaling pathway)、低氧诱导因子信号通路 (hypoxia inducible factor signaling pathway, HIF-1 signaling pathway)。 P 值较小的前10条相关通路信息见表4。

5 分子对接验证

分子对接即把配体分子放在受体活性位点的位置, 按照几何互补和能量互补的原则来实时评价配体和受体的相互作用, 寻找最佳结合模式。为验证本研究网络分析结果的准确性, 针对网络分析获得黄精治疗AS的5个关键靶点MAPK3、MAPK1、MMP9、ALB、SRC分别建立分子对接模型, 将原配体从活性口袋中抽离并重新对接, 计算对接后的RMSD及-CDOCKER

Table 2 Potential targets of *Polygonati rhizoma* for the treatment of atherosclerosis

Number	Uniprot	Gene	Target name
1	P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
2	P03372	ESR1	Estrogen receptor
3	P09960	LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase
4	P37231	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
5	P02766	TTR	Transthyretin
6	P19793	RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha
7	Q03181	PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
8	Q08499	PDE4D	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D
9	P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9
10	P00734	F2	Prothrombin
11	P23141	CES1	Liver carboxylesterase 1
12	Q13133	NR1H3	Oxysterols receptor LXR-alpha
13	P11473	VDR	Vitamin D3 receptor
14	O60674	JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2
15	P28482	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
16	P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P
17	P04150	NR3C1	Glucocorticoid receptor
18	Q92731	ESR2	Estrogen receptor beta
19	P08069	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
20	P12931	SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
21	P27361	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
22	P35968	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2
23	P02768	ALB	Serum albumin
24	P05091	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
25	P17948	FLT1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
26	Q07869	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
27	P43405	SYK	Tyrosine-protein kinase SYK
28	P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
29	P78536	ADAM17	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17
30	P04278	SHBG	Sex hormone-binding globulin
31	Q13464	ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
32	P16442	ABO	Histo-blood group ABO system transferase
33	P50750	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9
34	P08235	NR3C2	Mineralocorticoid receptor
35	P00918	CA2	Carbonic anhydrase 2
36	P07711	CTSL	Cathepsin L1
37	P22894	MMP8	Neutrophil collagenase
38	P15121	AKR1B1	Aldose reductase
39	Q13231	CHIT1	Chitotriosidase-1
40	P35398	RORA	Nuclear receptor ROR-alpha
41	P06239	LCK	Tyrosine-protein kinase Lck
42	Q13627	DYRK1A	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
43	Q8WWL7	CCNB3	Cyclin-dependent kinase 1
44	P47989	XDH	Xanthine dehydrogenase
45	P30542	ADORA1	Adenosine A1 receptor
46	Q00534	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
47	P29274	ADORA2A	Adenosine A2a receptor
48	P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
49	P33527	ABCC1	Multidrug resistance-associated protein 1
50	Q16678	CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
51	Q9UNQ0	ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2

ENERGY 值。结果显示, MAPK3、MAPK1、MMP9、ALB、SRC 分子对接模型 RMSD 值分别为 0.781 3、0.563 9、0.343 2、1.113 9、1.301 8, 均小于 2Å, 认为能够较好地重现原配体与蛋白的结合模式, 对接结果具有较高可靠性。5 个靶点分子对接模型见图 4, 信息如表 5 所示。将上述 5 个模型与黄精 45 个潜在活性成分及

3 个治疗 AS 的阳性药成分卡托普利、辛伐他汀、华法林进行对接, 对接结果如表 6 所示, 与原配体的对接结果见图 5。结果显示, 在黄精的 45 个潜在活性成分中有 73% 与靶点 MAPK3 对接成功, 其中 24% 的成分 -CDOCKER ENERGY 值高于原配体, 具有较高的结合活性; 73% 的成分与靶点 MAPK1 对接成功, 其中 60%

Table 3 Analysis of GO enrichment *Polygonati rhizoma* in the treatment of atherosclerosis

Type	Term	P value
Biological process	Steroid hormone receptor activity	1.18×10 ⁻¹¹
	Steroid hormone mediated signaling pathway	1.37×10 ⁻¹¹
	Nuclear receptor activity ligand-activated transcription factor activity	1.28×10 ⁻¹⁰
	Ligand-activated transcription factor activity	1.28×10 ⁻¹⁰
	Cellular response to steroid hormone stimulus	1.28×10 ⁻¹⁰
	Hormone-mediated signaling pathway	9.20×10 ⁻⁸
	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	1.00×10 ⁻⁷
	Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	3.70×10 ⁻⁷
	Phosphatidylinositol 3-kinase signaling	6.41×10 ⁻⁷
	Maternal process involved in female pregnancy	7.99×10 ⁻⁷
Cellular component	Tertiary granule lumen	2.01×10 ⁻⁵
Molecular function	Steroid binding	3.64×10 ⁻¹³
	Monocarboxylic acid binding	7.27×10 ⁻⁸
	Transcription coactivator binding	6.02×10 ⁻⁷
	Phosphotyrosine residue binding	3.75×10 ⁻⁶
	Phosphoprotein binding	3.81×10 ⁻⁶
	Fatty acid binding	4.40×10 ⁻⁶
	SH2 domain binding	4.75×10 ⁻⁶
	Estrogen receptor binding	6.82×10 ⁻⁶
	Transcription cofactor binding	6.82×10 ⁻⁶
	Protein phosphorylated amino acid binding	8.36×10 ⁻⁶

Table 4 Analysis on the KEGG pathway of *Polygonati rhizoma* in the treatment of atherosclerosis

Number	GO term	P value	Associated genes found
1	Thyroid cancer	8.30×10 ⁻⁵	MAPK1, MAPK3, PPARG, RXRA
2	Hormone signaling pathway	8.61×10 ⁻⁵	GSK3B, MAPK1, MAPK3, RXRA, SRC
3	PPAR signaling pathway	3.72×10 ⁻⁵	NR1H3, PPARA, PPARG, PPARG, RXRA
4	Platelet activation	1.25×10 ⁻⁴	F2, MAPK1, MAPK3, ROCK1, SRC, SYK
5	VEGF signaling pathway	5.16×10 ⁻⁴	KDR, MAPK1, MAPK3, SRC
6	Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	5.38×10 ⁻⁴	MAPK1, MAPK3, PDE4D, RXRA, VDR
7	Shigellosis	7.47×10 ⁻⁴	MAPK1, MAPK3, ROCK1, SRC
8	Adherens junction	1.10×10 ⁻³	IGF1R, MAPK1, MAPK3, SRC
9	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	1.63×10 ⁻³	MAPK1, MAPK3, NR3C2
10	HIF-1 signaling pathway	3.67×10 ⁻³	FLT1, IGF1R, MAPK1, MAPK3

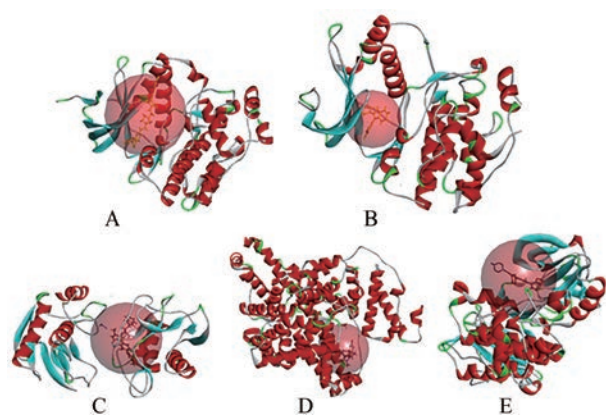


Figure 4 Molecular docking models of MAPK3 (A), MAPK1 (B), MMP9 (C), ALB (D) and SRC (E). MAPK3: Mitogen-activated protein kinase 3; MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1; MMP9: Matrix metalloproteinase-9; ALB: Serum albumin; SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

的成分-CDOCKER ENERGY 值高于原配体, 具有较高的结合活性; 69% 的成分与靶点 MMP9 对接成功, 但

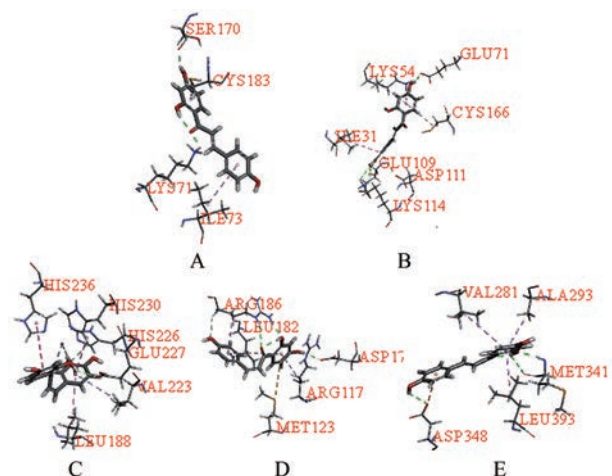


Figure 5 Molecular docking results of MAPK3 (A), MAPK1 (B), MMP9 (C), ALB (D) and SRC (E) with original ligands

-CDOCKER ENERGY 值均低于原配体; 76% 的成分与靶点 ALB 对接成功, 其中 49% 的成分-CDOCKER ENERGY 值高于原配体, 具有较高的结合活性;

Table 5 The related information of molecular docking models. PDB: Protein data bank; RMSD: Root-mean-square deviation

Target	PDB	Resolution/Å	Active pocket radius/Å	Active pocket coordinates	RMSD/Å
MAPK3	4QTB	1.40	12.987	36.971, 54.765, 50.206	0.781 3
MAPK1	1TVO	2.50	7.450	6.697, -4.223, 16.561	0.563 9
MMP9	4WZV	1.65	11.516	3.243, 7.905, 22.173	0.343 2
ALB	5UJB	2.70	9.892	23.636, 10.575, 13.152	1.113 9
SRC	2H8H	2.20	9.938	21.035, 20.199, 58.549	1.301 8

Table 6 Molecular docking results of MAPK3, MAPK1, MMP9, ALB and SRC with active components of *Polygonati rhizoma*

Target	Total number of components	The number of successful components	-CDOCKER ENERGY of the primary ligand	The number of -CDOCKER ENERGY higher than primary ligand	The number of -CDOCKER ENERGY higher than captopril	The number of -CDOCKER ENERGY higher than simvastatin	The number of -CDOCKER ENERGY higher than warfarin
MAPK1	45	33 (73%)	-28.395	27 (60%)	13 (29%)	19 (42%)	14 (31%)
MAPK3	45	33 (73%)	27.019	11 (24%)	12 (27%)	26 (58%)	13 (29%)
MMP9	45	31 (69%)	63.650	0	12 (27%)	27 (60%)	9 (20%)
ALB	45	34 (76%)	2.482	22 (49%)	15 (33%)	21 (47%)	13 (29%)
SRC	45	43 (96%)	-1.103	19 (42%)	14 (31%)	21 (47%)	15 (33%)

96%的成分与靶点SRC对接成功,其中42%的成分-CDOCKER ENERGY值高于原配体,具有较高的结合活性。各靶点与阳性药分子对接结果显示,黄精中部分潜在活性成分与靶点-CDOCKER ENERGY值高于阳性药。结合上述结果,黄精成分与潜在关键靶点具有较好的结合活性,提示黄精可能通过作用于潜在关键靶点产生抗AS的作用。

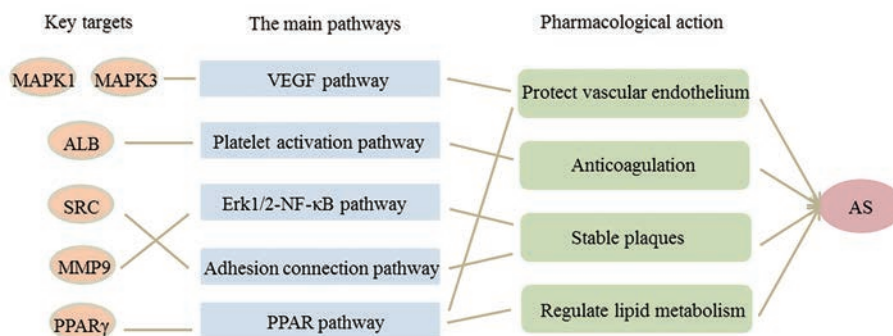
讨论

综合分析关键靶点、KEGG、GO富集结果,黄精可能通过作用于MAPK1、MAPK3、ALB、SRC、MMP9以及PPAR γ 等关键靶点,调控VEGF通路、血小板激活通路、ERK1/2-NF- κ B通路、黏着连接通路以及PPAR通路,产生调节脂质代谢、调节凝血、保护血管及促进血管新生、抑制AS斑块形成的药理作用从而发挥治疗AS的作用。黄精治疗AS的潜在作用靶点、通路及发挥药理作用如图6所示。

ALB靶点蛋白是血液系统的重要组成部分,参与血小板激活信号通路,在维持血液胶体渗透压、抑制血

小板功能和抗凝血以及影响动脉血管的渗透性等方面发挥着重要的生理功能^[15]。预测黄精活性成分通过调节ALB抑制血小板激活信号通路发挥凝血作用,从而间接参与AS的治疗过程。董娉婷^[16]通过分析98例进行血液透析AS患者的血液指标,发现血液中ALB水平与AS形成发展高度相关。郭焕等^[17]研究发现血液钙结合蛋白S100A12与血液透析患者的动脉粥样硬化有密切联系,而血液中的ALB蛋白是影响S100A12浓度的重要因素之一。这为ALB是抗AS关键靶点的预测结果提供佐证。

关键靶点SRC在纤维整合素诱导的信号链中起作用,作为一衔接蛋白将特异蛋白定位于黏附结构上,从而参与黏着连接信号通路^[18],而黏着连接信号通路在AS斑块形成及稳定过程中起到关键作用^[19]。此外,关键靶点MMP9是一类依赖锌的内肽酶,参与ERK1/2-NF- κ B信号通路,活化后能够降解除多糖以外的所有细胞外基质,使AS斑块的稳定性降低甚至导致斑块破裂,同时MMP9能够增大血管内径、内膜面积以及细胞核密度,为斑块的生长提供空间^[20]。因此,黄精可能

**Figure 6** Schematic diagram of target-pathway-pharmacological effects of *Polygonati rhizoma* for the treatment of atherosclerosis

通过作用于以上靶点和通路,产生稳定动脉斑块的药理作用,从而发挥抗AS的疗效。孙劼等^[21]研究表明,在AS疾病大鼠模型中,斑块中MMP9的含量随斑块的进展逐渐增加。何宏涛等^[22]收集了360例AS患者的颈动脉彩色多普勒超声结果,观察AS斑块稳定性状况,同时采用酶联免疫法检测患者血清MMP9水平,研究发现MMP9在AS形成及斑块的稳定性改变中发挥重要作用。石惠等^[23]研究发现甘草素能显著下调MMP9的表达水平且呈剂量效应关系,当甘草素剂量为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,MMP9蛋白表达均降低将近50% ($P<0.01$);而甘草素是黄精主要活性成分之一,这为MMP9是黄精抗AS关键靶点的预测结果提供佐证。

丝裂原活化蛋白激酶MAPK1和MAPK3均为VEGF信号通路中的关键靶点,该通路参与血管内皮细胞的分裂、迁徙,对血管生成具有重要促进作用^[24];此外,PPAR信号通路也参与保护动脉血管内皮^[25]。因此,黄精活性成分可能通过调节上述两条信号通路,产生保护动脉血管内皮、促进血管新生的药理作用从而发挥治疗AS的疗效。伏有为^[26]在探究黄精速溶粉对肝病小鼠的保护机制过程中发现,黄精速溶粉及黄精多糖均能显著上调小鼠肝脏中MAPK1、MAPK3靶点蛋白的表达。以上结果在一定程度上,对黄精通过作用于MAPK1、MAPK3发挥抗AS作用的预测结果提供佐证。

PPAR γ 是脂肪细胞分化过程和脂肪生成过程关键的转录因子,参与脂肪的形成,包括前体脂肪细胞的募集、分化及甘油三酯的合成等过程^[27],从而出现脂肪堆积。

本研究KEGG分析结果显示,黄精活性成分与PPAR信号通路密切相关,由此推测黄精可能通过调节PPAR信号通路参与脂质代谢过程发挥治疗AS作用。孔瑕等^[28]以高脂大鼠为模型,探讨了黄精多糖通过调节PPAR信号通路的降脂作用,结果显示,高脂条件下PPAR γ 的表达上调,而黄精多糖作用后其表达量显著下调,说明黄精多糖通过调节PPAR通路起到降脂作用,参与AS治疗。以上结果与本研究预测黄精通过调节PPAR信号通路参与脂质代谢过程发挥治疗AS作用的结论相一致。

AS严重影响人类的身体健康和生活质量,虽然他汀类药物已广泛应用,但心脑血管疾病的发生率仍在持续上升。因此,有必要研究开发新型抗AS药物^[6]。

近年来,较多研究在动物层面揭示了黄精具有抗AS疗效,发现其主要通过保护血管组织、抑制血小板活动及调节脂质代谢发挥作用,但研究多从单一成分

或单一通路进行研究。而中药具有多成分,作用于多靶点,调控多条通路发挥药效的特点,从单一方面的研究难以阐明黄精抗AS的整体性与系统性,并且难以阐释黄精抗AS的药效物质基础及作用机制。因此,本研究运用网络药理学技术,在整体层面阐释黄精活性成分、靶点、通路及AS疾病之间的关系,发现黄精可能通过调节脂质代谢、调节凝血、保护血管及抑制AS斑块发挥治疗AS作用,目前已有研究也印证了本研究的预测结果。本研究揭示了黄精抗AS的活性成分及其作用机制,但活性成分只有在体内达到一定浓度才能成为药效物质,因此有待进一步研究以揭示其药效物质基础,为抗AS药物研发提供指导。

作者贡献: 高凤凤负责撰写文章,绘制插图;裴艳玲、任越、陈紫军、卢建秋、张燕玲负责修改文章。

利益冲突: 本文章不存在利益冲突。

References

- [1] Mao JM, Wang G. Atherosclerosis and inflammation [J]. Chin Circ J (中国循环杂志), 2006, 21: 405-406.
- [2] Wei AZ, Yang JF. Discussion on the research progress of atherosclerosis [J]. J Clin Med (临床医药文献杂志), 2014, 14: 1866-1867.
- [3] Li P, Wang CY. Analysis of the interaction between statins and common cardiovascular drugs [J]. Chin Pharm (中国药业), 2019, 28: 82-84.
- [4] Zhao WL, Zhao Y, Teng Y. Progress in pharmacological studies of huangjing [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 240-246.
- [5] Fukuba N, Ishihara S, Sonoyama H, et al. Antiatherosclerotic potential of Rhizoma Polygonati polysaccharide in hyperlipidemia-induced atherosclerotic hamsters [J]. Drug Res (Stuttg), 2015, 65: 479-483.
- [6] Li YY, Deng HB, Xiang DX, et al. The antiatherogenic and anti-lipidemic effects of xanthomonas polysaccharide [J]. Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志), 2005, 4: 429-431.
- [7] Shi Y, Yao YJ. An analysis of the mechanism of kaixin powder in the treatment of alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 76-84.
- [8] Ren JZ, Zhang Z, Li B. To explore the antitumor mechanism of paitouweng decoction based on network pharmacology [J]. World Clin Drugs (世界临床药物), 2019, 40: 27-34.
- [9] Shi S, Hu YH, Wu HQ, et al. Discussion on network pharmacology of action mechanism of salvia miltiorrhiza panax notoginseng [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 192-197.
- [10] Gabriela B, Bernhard M, Hubert H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and path-

- way annotation networks [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1091-1093.
- [11] Zhao S, Wu DX, Chen X, et al. Mechanism of action of herba siegesbeckiae in treating ischemic stroke based on network pharmacology [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 2727-2735.
- [12] Huang XF, Gao YJ, Liao G, et al. To explore the mechanism of treating asthma with shenma antiasthmatic fluid based on network pharmacology [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 25: 187-195.
- [13] Zheng YF, Jia H, Zhang BY, et al. Pharmacology of antiapoplexy prescription based on compound - target interaction prediction model [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 256-264.
- [14] Ouyang XQ, Rao L, Lei M, et al. To explore the mechanism of Jiawei Erzhi wan in the treatment of atherosclerosis based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2020, 26: 175-182.
- [15] Zhang YX, Zhang Y. Function and application of serum albumin [J]. *Nat Sci J Hainan Univ (海南大学学报)*, 2007, 23: 833.
- [16] Dong PT. The relationship between malnutrition and atherosclerosis in hemodialysis patients [J]. *Int J Urol (国际泌尿系统杂志)*, 2017, 37: 28-31.
- [17] Guo H, Lu B. Study on the influencing factors of blood calcium binding protein S100A12 in hemodialysis patients and its relationship with arteriosclerosis [J]. *Lab Med (检验医学)*, 2014, 29: 930-934.
- [18] Qiu Y, Rui YC. Research progress of Src family kinases [J]. *Drug Appl Monit China (中国药物应用与监测)*, 2004, 2: 37-40.
- [19] Wang XK, Sun F, Ma SJ, et al. Atherosclerosis and inflammation [J]. *Gansu Sci Technol (甘肃科技)*, 2019, 35: 129-131, 100.
- [20] Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the *Ldlr^{-/-}Apob^{100/100}* mouse [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28: 247-253.
- [21] Sun J, Dong JT, Deng ZH, et al. Effects of amlodipine on the stability of atherosclerotic plaque and the expression of MMP-9 and its inhibitor in rats [J]. *Hainan Med J (海南医学)*, 2016, 27: 867-869.
- [22] He HT, Yang XP, Zhang ZM. Study on the relationship between MMP-9, TIMP-1 and VEGF and the stability of carotid atherosclerotic plaque [J]. *Hebei Pharm (河北医药)*, 2016, 38: 555-557.
- [23] Shi H, Wu YC, Cai YQ. Effect of glycyrrhizin on invasion and metastasis of B16F10 melanoma cells and its mechanism [J]. *Chin J Nutr (营养学报)*, 2014, 36: 486-490.
- [24] Wang YD, Hu Y, Sun CY. The role of Akt and erk1/2 activation in promoting angiogenesis of BDNF [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2007, 23: 833.
- [25] Hu ZP. Effects of Telmisartan on Vascular Endothelial Function in Hypertension and Atherosclerosis and Its Mechanism (替米沙坦对高血压和动脉粥样硬化血管内皮功能的影响及其机制) [D]. Anhui: Anhui Medical University, 2011.
- [26] Fu YW. Nrf 2/ARE Pathway to Explore the Protective Effect of Huangjing Instant Powder on Mice with Alcoholic Liver Disease and Its Possible Mechanism (基于Nrf2/ARE通路探究黄精速溶粉对酒精性肝病小鼠的保护作用及可能机制) [D]. Anhui: Anhui Medical University, 2019.
- [27] Eurlings PM, Vanderkallen CJ, Veemeulen VM, et al. Variants in the PPARgamma gene affect fatty acid and glycerol metabolism in familial combined hyperlipidemia [J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80: 296.
- [28] Kong X, Liu JJ, Li H, et al. Effect of xanthan polysaccharide on mRNA and protein expression of lipid metabolism-related genes in hyperlipidemia mice [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 3740-3747.