

基于网络药理学的复方血栓通治疗糖尿病视网膜病的药理机制研究

宋勇丽¹, 王政霖¹, 邢玮¹, 吴晏², 王伟¹, 韩静^{2*}

(北京中医药大学 1. 中医学院, 2. 北京中医药研究院, 北京 100029)

摘要: 利用网络药理学发现复方血栓通治疗糖尿病视网膜病的药理机制。采用 TCMSP 软件检索复方血栓通的活性成分, 并且得到其活性成分对应的靶点; 然后通过 OMIM、TTD、pharmGkb、DiGSeE 和 GAD 5 个数据库检索糖尿病视网膜病相关靶点; 两者取交集得到 37 个相同的靶点。用 SystemsDock 在线分子对接工具验证结果。使用 DAVID 软件对 37 个靶点进行 GO 注释分析和 KEGG 通路分析。采用 Cytoscape 3.6.1 软件建立活性成分-靶点-通路网络模型。网络药理学研究提示, 复方血栓通可能通过血管内皮生长因子信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路和 Toll 样受体信号通路等多个通路治疗糖尿病视网膜病, 体现了中药复方多成分、多靶点、多通路的特点。此研究为进一步阐释复方血栓通治疗糖尿病视网膜病的药理机制提供了理论依据。

关键词: 网络药理学; 复方血栓通; 糖尿病视网膜病; 靶点

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1442-07

Pharmacological mechanism of Compound Xueshuantong in treatment of diabetic retinopathy based on network pharmacology

SONG Yong-li¹, WANG Zheng-lin¹, XING Wei¹, WU Yan², WANG Wei¹, HAN Jing^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: The aim of this study was to discover the pharmacological mechanism of Compound Xueshuantong in the treatment of diabetic retinopathy using network pharmacology. TCMSP software was used to search the active ingredients of Compound Xueshuantong, and the targets of its active ingredients were obtained. The targets of diabetic retinopathy were searched by OMIM, TTD, pharmGkb, DiGSeE and GAD database. The same 37 targets were analyzed by GO and KEGG using DAVID software. The results were verified using the SystemsDock. Cytoscape 3.6.1 software was used to establish an ingredient-target-pathway network model. Network pharmacological studies suggest that Compound Xueshuantong treated diabetic retinopathy through the vascular endothelial growth factor signaling pathways, mitogen-activated protein kinase signaling pathways and Toll-like receptor signaling pathways. Compound Xueshuantong alleviated diabetic retinopathy through multi-component, multi-target, and multi-pathway. This study provides a theoretical basis for further elucidation of the pharmacological mechanism of Compound Xueshuantong in the treatment of diabetic retinopathy.

Key words: network pharmacology; Compound Xueshuantong; diabetic retinopathy; target

糖尿病视网膜病 (diabetic retinopathy, DR), 是

糖尿病患者后期最严重的微血管并发症, 也是工作人群失明的首要原因^[1]。中医药在治疗 DR 方面的优势不断凸显, 已成为防治 DR 的重要组成部分^[2]。复方血栓通作为国家二级中药保护品种, 是眼底病用药的第一品牌。它是由三七、黄芪、丹参和玄参组

收稿日期: 2018-03-28; 修回日期: 2018-05-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673705).

*通讯作者 Tel: 86-10-64286404, E-mail: hanjing8585@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0270

成的中药复方, 功能为活血化瘀、益气养阴, 具有扩张血管、增加血流量、改善血液循环和微循环的药理作用, 能有效减轻黄斑水肿, 改善视力^[3]。复方血栓通的药理学机制包括扩张血管、提高抗缺氧能力、抑制氧化应激、减少凋亡、抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达、调控 Hippo 信号通路等^[4]。但是 DR 发病机制复杂, 因此复方血栓通的药理机制仍未完全阐明。

网络药理学是在高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索基础上, 从分子生物网络角度, 系统地揭示药物药理作用及其作用机制^[5]。中药复方多成分、多靶点、多途径的特征正是网络药理学研究的重点^[6]。

Cheng 等^[7]利用网络药理学的思路与方法, 建立了“药物-靶点-通路-网络”的研究模式, 预测清肺消炎丸的潜在靶标及作用途径, 初步揭示了其抗炎作用的多维调控网络。Liu 等^[8]首先收集了四君子汤的化学成分信息, 构建化合物-靶点和靶点-疾病网络, 然后采用网络药理学方法预测了四君子汤潜在的作用靶点与可能作用的疾病。但是在上述利用网络药理学研究中药复方药理机制的范例中, 靶点是由化学成分推导而来, 并没有考虑到靶点是否与特定疾病的核心发病机制密切相关, 这样将导致药物靶点广泛并且复杂。本文拟把中药复方的成分靶点与疾病靶点取交集进行分析, 这样取得的结果将对疾病更加有针对性, 更加明确可靠。

材料与方法

化学成分信息 从 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中分别检索三七、黄芪、丹参和玄参的化学成分, 收集化学成分-靶点信息。

DR 相关靶点的获得 从 OMIM (<http://www.omim.org/>)、TTD (<http://systemsdock.unit.Oist.jp/iddp/home/index>)、pharmGkb (<https://www.pharmgkb.org/>)、DiGSeE (<http://210.107.182.61/geneSearch/>)、GAD (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>) 5 个疾病相关靶点的数据库检索 DR 相关靶点, DiGSe (<http://210.107.182.61/geneSearch/>) 为在线文本挖掘工具, 可以挖掘疾病相关基因。

靶点名称矫正 利用 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库, 输入从 TCMSP 和 5 个数据库得到的靶点名称, 得到对应的基因名称, 对蛋白质名称进行矫正。优先选择 Swiss-prot 收录并且匹配程度高的基因名称。将复方血栓通和 DR 矫正后的基因取

交集。

靶点通路注释分析 利用 DAVID (<http://david.nifcrf.gov/>) 数据库对得到的交集基因进行 GO 注释分析 (Gene-Ontology) 和 KEGG 通路分析 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)。交集基因可以直接映射到通路上。

化学成分-交集基因-通路网络构建 根据上述复方血栓通化学成分的靶点预测结果, 采用 Cytoscape 3.6.1 软件构建化学成分-交集靶点-通路网络模型。网络中, 节点 (node) 表示化学成分、交集基因和通路。若某一靶点为某化合物的潜在作用靶点, 则以边 (edge) 相连, 该靶点参与某一通路时, 将靶点与作用通路也以边相连。通过构建网络揭示复方血栓通治疗 DR 多成分、多靶点、多通路的特点^[9]。

分子对接 利用 UniProt 检索, 选择合适的目标靶点的 PDB ID, 利用 RSCB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 下载对接蛋白和对照配体的 3D 结构文件, 对照配体由 RSCB PDB 系统自动匹配。利用 PubChem 下载化合物的 3D 结构文件。使用 SystemsDock 在线分子对接工具进行在线分子对接。

结果

1 化学成分和靶点基因的收集

检索得到复方血栓通中三七的化学成分有 119 种, 丹参 202 种, 黄芪 87 种, 玄参 47 种。删除重复项共 427 种化学成分, 包括黄酮、萜类、苷类、糖类、脂肪酸和氨基酸等化合物, 如木犀草素 (luteolin)、芹菜素 (apigenin)、丹参酮 II A (dehydrotanshinone II A)、丹酚酸 B (salvianolic acid b)、熊果酸 (ursolic acid)、L-赖氨酸 (L-lysine) (编号分别为 6、8、2651、7074、511、55) 等。Sun 等^[10]通过 UPLC-MS/MS 法对复方血栓通胶囊中的主要化学成分进行了含量测定, 发现其中丹参酮 II A、丹酚酸 B 和熊果酸等的含量分别为 1.135、2.343 和 0.560 mg·g⁻¹。复方血栓通的化学成分对应 376 个基因, 例如 VEGF、丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 等 (图 1)。

2 DR 相关靶点通路信息

从 5 个数据库得到 DR 相关基因共 247 个, 包括血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、MAPK1、MAPK8 等, DAVID 分析得到有 Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway, TLR)、MAPK 受体信号通路 (MAPK

signaling pathway)、VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway) 等通路信息 (表 1)。

3 交集基因的生物分子功能注释

将复方血栓通靶点基因和 DR 的相关基因取交集, 共有 37 个相同基因, 包括 VEGF、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP)、IL-1 β 、PTGS2 (别名环氧酶-2, cyclooxygenase 2, COX-2) 和 MAPK8 等。

将 37 个交集基因通过 DAVID 系统进行生物分子功能注释。对获取靶点信息进行 GO 注释分析和

KEGG 通路分析。其中 GO 注释分析分为三部分, 分别为生物过程分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 和生物过程 (biological process, BP) (图 2~4)。

交集基因在分子功能中对蛋白结合 (protein binding) 和肝素结合 (heparin binding) 功能参与最多, 相关基因包括转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosin e-protein kinase Src, SRC)、VEGFA

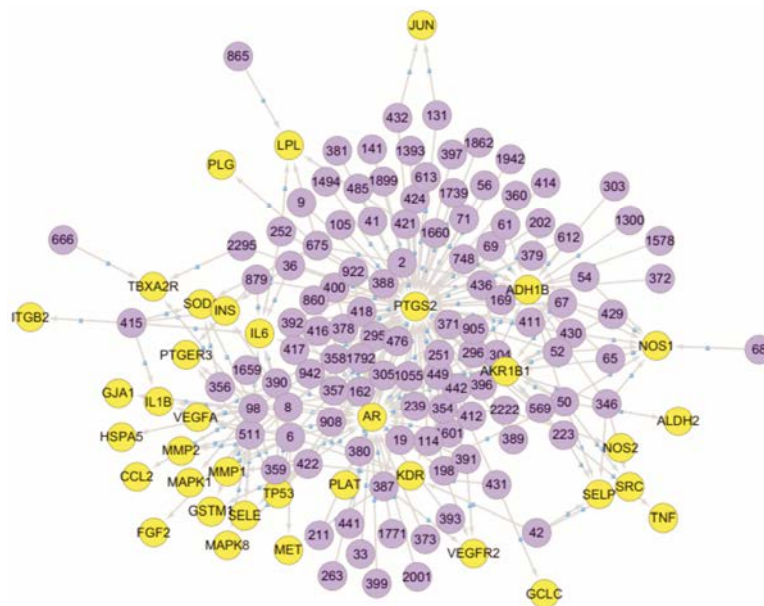


Figure 1 The part of compositions-genes network for potential targets from Compound Xueshuantong. The purple round means the number of chemical compound, and the yellow round means drug target

Table 1 The part of pathways and genes of diabetic retinopathy (DR)

| Pathway | Count | Gene |
|---|-------|--|
| Salmonella infection | 6 | MAPK1, IL6, JUN, IL1B, MAPK8, NOS2 |
| VEGF signaling pathway | 5 | MAPK1, PTGS2, VEGFA, SRC, KDR |
| Focal adhesion | 7 | MAPK1, JUN, VEGFA, MET, MAPK8, SRC, KDR |
| Influenza A | 6 | MAPK1, IL6, JUN, IL-1 β , MAPK8, PLG |
| GnRH signaling pathway | 5 | MAPK1, JUN, MAPK8, MMP2, SRC |
| Toll-like receptor signaling pathway | 5 | MAPK1, IL6, JUN, IL-1 β , MAPK8 |
| NOD-like receptor signaling pathway | 4 | MAPK1, IL6, IL-1 β , MAPK8 |
| MAPK signaling pathway | 6 | MAPK1, JUN, TP53, IL-1 β , MAPK8, FGF2 |
| ErbB signaling pathway | 4 | MAPK1, JUN, MAPK8, SRC |
| Herpes simplex infection | 5 | IL6, JUN, TP53, IL-1 β , MAPK8 |
| Cytokine-cytokine receptor interaction | 5 | IL6, VEGFA, MET, IL-1 β , KDR |
| Arginine and proline metabolism | 3 | NOS1, ALDH2, NOS2 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 5 | MAPK1, INS, ITGB2, FGF2, SRC |
| Cell adhesion molecules (CAMs) | 4 | SELP, ITGB2, SELE |
| FoxO signaling pathway | 4 | MAPK1, IL6, INS, MAPK8 |
| Glycerolipid metabolism | 3 | LPL, AKR1B1, ALDH2 |
| Adherens junction | 3 | MAPK1, MET, SRC |
| Progesterone-mediated oocyte maturation | 3 | MAPK1, INS, MAPK8 |

等 (图 2)。

交集基因在细胞外间隙 (extracellular space)、细胞溶质 (cytosol)、细胞表面 (cell surface) 3 个部位分布最多。超氧化物歧化酶 [Cu-Zn] (superoxide dismutase [Cu-Zn], SOD1)、IL-6 和 IL-1 β 等基因参与其中 (图 3)。

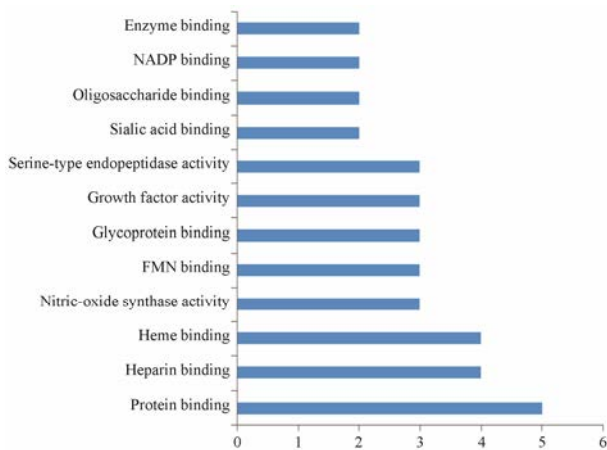


Figure 2 The count of genes and molecular function

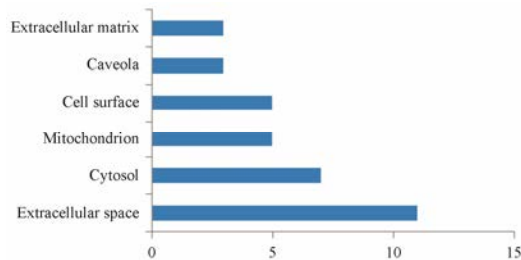


Figure 3 The count of genes and cellular component

交集基因参与炎症应答、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、内皮细胞增殖的正调控作用等生物过程最多。一氧化氮合酶 1 (nitric-oxide synthase 1, NOS1)、IL-6、IL-1 β 和 VEGFA 等基因参与其中 (图 4)。

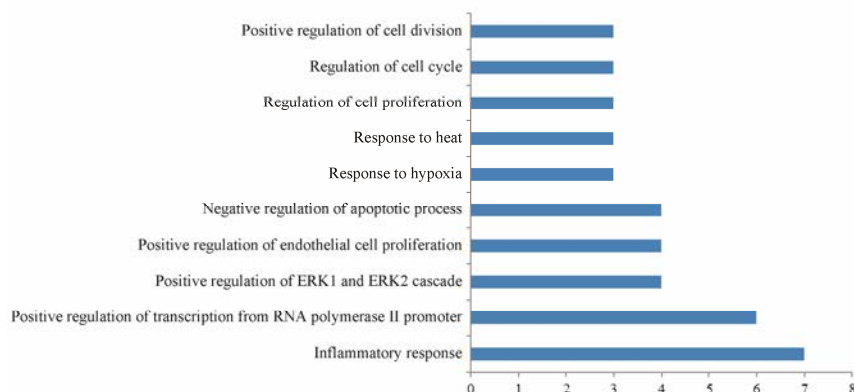


Figure 4 The count of genes and biological process (just show the top 10 of biological process)

4 化学成分-交集基因-通路网络的构建

由 KEGG 分析, 共得到 18 条通路, 包括 24 个交集基因, 以 $P \leq 0.05$ 为标准筛选通路, 最终得到 14 条通路 (FoxO 信号通路、甘油脂代谢、黏附连接和孕酮介导的卵母细胞成熟, $P > 0.05$ 剔除) 及 22 个基因 (LPL 和 AKR1B1 剔除)。

采用 Cytoscape 软件构建化学成分-基因-通路网络模型 (图 5)。共 169 个节点, 458 个边。作用于 MAPK8、IL-6、IL-1 β 、COX-2 的有效化学成分较多, 这些靶点涉及较多的通路有 TLR 信号通路、MAPK 信号通路和 VEGF 信号通路。作用于上述靶点和通路的化学成分有木犀草素、芹菜素、熊果酸、L-赖氨酸等。复方血栓通主要活性成分的作用靶点分布在不同的信号通路上, 相互协调, 共同发挥作用。并且文献^[4]报道复方血栓通治疗 DR 的机制主要有扩张血管、提高抗缺氧能力、抑制氧化应激、减少凋亡、抑制 VEGF 等, 也与本文网络预测结果符合。本研究可以从多角度揭示复方血栓通治疗 DR 的药理机制。

5 分子对接

选择 COX-2 和 VEGFR2 两个靶点, 木犀草素、芹菜素、槲皮素、山奈酚和熊果酸 (编号 6、8、98、422、511) 5 个化合物及 4 个靶点的对照配体进行分子对接 (表 2)。

Table 2 The result (docking score) of molecular docking

| Ligand | COX-2 | VEGFR2 |
|---|-------|--------|
| The control ligand of COX-2 (tolfenamic acid) | 1.504 | - |
| The control ligand of VEGFR2 (C ₁₄ H ₂₃ N ₅ O) | - | 3.244 |
| Luteolin (6) | 6.765 | 6.638 |
| Apigenin (8) | 6.793 | - |
| Quercetin (98) | 6.679 | 6.374 |
| Kaempferol (422) | 6.533 | 6.256 |
| Ursolic acid (511) | - | 7.458 |

点对上述的 3 条通路有作用。文献报道^[18]熊果酸对人脐静脉血管内皮细胞的增殖具有抑制作用, 而且显著减少 MAPK 信号通路中 ERK1、c-Jun 等相关基因的转录和翻译。Chen 等^[19]用 DR 大鼠模型, 研究了槲皮素治疗 DR 的作用机制, 发现槲皮素可以改善 DR 大鼠视网膜组织水肿和空泡化, 并且显著降低 MMP-9 和 VEGF 的转录和表达。槲皮素也抑制 COX-2 的表达^[20]。山奈酚抑制 IL-1 β 诱导的 MAPK 途径, 阻碍 MMP1、MMP3 和 COX-2 的表达^[21]。与本文网络药理学预测熊果酸、槲皮素和山奈酚的作用靶点有 IL-1 β 、IL-6、MAPK8 等结果一致。文献及网络药理学结果共同提示, 复方血栓通可能具有多种抗炎或抗血管增生机制防治 DR。

本文数据分析还发现, 在复方血栓通的化学成分中, 一种化学成分可以对应多个靶点, 参与多个信号通路。如玄参中的熊果酸对应的靶点有 IL-1 β 、MAPK8、JUN 和 MMP2 等, 调控 VEGF 信号通路、TLR 信号通路和局部黏连等。而且, 在 DR 的发病过程中, 复方血栓通的多个化学成分也可以对应一个共同靶点, 如木犀草素、芹菜素、和熊果酸等共同作用于 VEGFA。

总之, 本课题对复方血栓通进行成分和靶点分析, 收集 DR 的相关基因, 运用网络药理学的方法, 得到二者交集基因的相关通路, 预测复方血栓通通过熊果酸、槲皮素和山奈酚等多个化学成分作用于 VEGF、TLR 及 MAPK 等多个信号通路。此研究表明复方血栓通作为中药复方, 其化学成分可能直接作用于 DR 关键的通路靶点, 通过抑制炎症、血管增生等治疗 DR。本研究为进一步深入揭示复方血栓通治疗 DR 的药理机制奠定了基础。

References

- [1] Jin Y. Effect of traditional Chinese medicine of Qi and dissipating blood stasis on non-proliferative diabetic retinopathy and its effect on VEGF, Ang and ANGPT [J]. *Mod J Integr Trad Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2017, 35: 3923–3926.
- [2] Xiang PP, Xu W. Research progress on traditional Chinese medicine treatment of diabetic retinopathy [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2014, 29: 813–815.
- [3] Huang CX, Qiang Y, Xiao C, et al. Study on prevention and treatment of Fufang Xueshitong capsule on retinal microvascular changes in diabetic rats [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis* (中华眼底病杂志), 2008, 24: 272–275.
- [4] Jing C, Du JH, Sun ZH. Progress of Compound Xueshuan-tong in treating diabetic retinopathy [J]. *Chin J Clin (Electron Edit)* (中华临床医师杂志, 电子版), 2012, 22: 7373–7375.
- [5] Xu JJ, Mei BY, Nan Z. Clinical observation on early diabetic retinopathy with Compound Xueshuan-tong Capsule [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2012, 27: 3247–3249.
- [6] Li S, Zhang B, Jiang D, et al. Herb network construction and co-module analysis for uncovering the combination rule of traditional Chinese herbal formulae [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 11: S6.
- [7] Cheng BF, Hou YY, Min J, et al. Anti-inflammatory mechanism of Qingfei Xiaoyan Wan studied with network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2013, 4: 686–693.
- [8] Liu XK, Wu JR, Lin MJ, et al. Mechanism of Si Junzitang based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 194–202.
- [9] Yao G, Li G, Gao XX, et al. An exploration in the action targets for antidepressant bioactive components of Xiaoyaosan based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50: 1589–1595.
- [10] Sun Z, Hu YR, Zuo LH, et al. Simultaneous determination of 9 components in Compound Xueshuan-tong capsules by UPLC-MS/MS [J]. *China Pharm* (中国药房), 2017, 28: 2959–2963.
- [11] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 682–690.
- [12] Song E, Xu Q, Wang XR, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in the retina of diabetic rats [J]. *J Jilin Univ (Med Edit)* (吉林大学学报, 医学版), 2003, 29: 38–40, 44.
- [13] Zhao M, Li CH, Liu YL. Toll-like receptor (TLR)-2/4 expression in retinal ganglion cells in a high-glucose environment and its implications [J]. *Genet Mol Res*, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15026998.
- [14] Du Y, Tang J, Li G, et al. Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 2158–2164.
- [15] Dong Y, Zhang MC. Effect of COX-2 and its inhibitor celecoxib on corneal neovascularization [J]. *Chin Ophthalmol Res* (眼科研究), 2007, 25: 424–427.
- [16] Matsumoto T, Turesson I, Book M, et al. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis [J]. *J Cell*

- Biol, 2002, 156: 149–160.
- [17] Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1659–1673.
- [18] Li W, Liu Q, He L, et al. Effect of ursolic acid on proliferation of vascular endothelial cells and relevant mechanism [J]. *Chin J Biol (中国生物制品学杂志)*, 2011, 24: 157–162, 168.
- [19] Chen B, He T, Xing YQ, et al. Effects of quercetin on the expression of MCP-1, MMP-9 and VEGF in rats with diabetic retinopathy [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14: 6022–6026.
- [20] Zhang Li, Zhu QY, Wei YF, et al. Effect of quercetin on the expression of VEGF and COX-2 in prostate cancer PC3 cells [J]. *J New Chin Med (新中医)*, 2012, 44: 125–127.
- [21] Yoon HY, Lee EG, Lee H, et al. Kaempferol inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32: 971–977.