

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.003>

基于系统药理学和分子对接探讨抗炎合剂治疗 脓毒症的分子调控机制

张文凯, 杨璐瑜, 陆辉志, 董辉, 付守芝

[武汉市第三医院(武汉大学同仁医院)急重症医学科, 武汉 430000]

[摘要] 目的: 基于系统药理学、分子对接以及GEO数据库差异基因表达分析的方法, 解析抗炎合剂治疗脓毒症的分子调控机制。方法: 通过TCMSP(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)和DrugBank数据库平台获得抗炎合剂的活性成分和对应靶标。基于GEO数据库分析获得脓毒症的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG), 并通过David在线分析平台对药物与疾病基因进行了GO(gene ontology)功能和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析。同时, 利用BisoGenet和CytoNCA插件对交集靶点进行网络拓扑分析, 并将获得的Hub基因与关键活性成分进行分子对接, 以证实抗炎合剂发挥治疗效用的分子机制。结果: 从抗炎合剂474个化学成分中筛选出73个活性成分, 其中45个活性成分被预测为针对54个与脓毒症相关的基因。GO功能、KEGG通路及蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络拓扑分析显示: 交集靶点主要参与酶结合、蛋白质均聚活性调控、转录因子结合、细胞凋亡调控、细胞缺氧反应、转录调控、癌症相关途径、细胞周期、TNF信号通路、HTLV-I感染、细胞凋亡和NF- κ B信号通路等, 并筛选出4个Hub基因。最后, 分子对接验证了分子靶标预测网络的可靠性。结论: 研究预测了抗炎合剂治疗脓毒症的重要功能活性成分及其作用靶点, 揭示了该中药复方的分子调控机制, 为抗炎合剂的临床应用及实验研究提供了可靠的证据。

[关键词] 抗炎合剂; 脓毒症; 系统药理学; 分子对接; Hub基因

Molecular regulation mechanism of anti-inflammatory mixtures in the treatment of sepsis based on systematic pharmacology and molecular docking

ZHANG Wenkai, YANG Luyu, LU Huizhi, DONG Hui, FU Shouzhi

[Department of Critical Medicine, Wuhan Third Hospital (Tongren Hospital of Wuhan University), Wuhan 430000, China]

Abstract **Objective:** To analyze the molecular regulatory mechanism of anti-inflammatory mixtures in the treatment of sepsis based on the methods of systematic pharmacology, molecular docking and the analysis of gene expression

收稿日期 (Date of reception): 2020-06-09

通信作者 (Corresponding author): 付守芝, Email: fszfsz188@163.com

基金项目 (Foundation item): 武汉市卫生和计划生育委员会科研项目 (WX18C19)。This work was supported by the Scientific Research Project of Wuhan Health and Family Planning Commission, China (WX18C19).

omnibus (GEO) used in differentially expressed gene (DEG). **Methods:** The active ingredients and corresponding targets of anti-inflammatory mixtures were obtained through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and DrugBank database platform. Based on the analysis of GEO database, the DEGs of sepsis were obtained, and the enrichment analysis of gene ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was performed through the David online analysis platform. At the same time, BisoGenet and CytoNCA plug-ins was conducted by a network topology analysis of intersection targets. The obtained Hub gene was molecularly docked with key active ingredients to confirm the molecular mechanism of the therapeutic effect of anti-inflammatory mixtures. **Results:** A total of 73 active ingredients were screened out of 474 chemical components of the anti-inflammatory mixtures, and 45 active ingredients of them were predicted to target 54 genes related to sepsis. The GO function, KEGG pathway, and the network topology analysis of protein-protein interaction (PPI) showed that the intersection target was mainly involved in enzyme binding, the regulation of protein homopolymerization activity, transcription factor binding, apoptosis regulation, cell hypoxia response, transcription regulation, cancer-related pathways, cell cycle, TNF signaling pathway, HTLV-I infection, apoptosis and NF- κ B signaling pathway, and 4 Hub genes were selected from them. Finally, the molecular docking verified the reliability of the molecular target prediction network. **Conclusion:** The research predicts the important functional active ingredients and their targets of anti-inflammatory mixtures in treating sepsis, reveals the molecular regulation mechanism of the Chinese herbal compound, and provides reliable evidence for the clinical application and experimental research of the anti-inflammatory mixtures.

Keywords anti-inflammatory mixtures; sepsis; systematic pharmacology; molecular docking; Hub gene

脓毒症是一种伴有多器官衰竭表现的全身炎症性疾病,是急危重症医学面临的重要临床问题。脓毒血症的发病率占有重症监护室住院患者的29.5%。因此,脓毒症的治疗费用也是所有疾病治疗中最高的^[1]。据统计,2013年美国近130万脓毒症住院患者的总费用约为236亿美元,并以每年11.5%的速度增长^[2]。尽管近年来在抗感染治疗等医疗技术方面取得了很大进步,但脓毒症的发病率仍在持续上升。此外,即使经过治疗,脓症患者也会面临长期而严重的生理、心理和认知障碍问题^[3-4]。因此,迫切需要寻找预防、诊断和治疗脓毒症的有效方法。现阶段研究表明,中医药在防治脓毒症凝血功能障碍及炎症反应方面具有一定优势。抗炎合剂由大黄、黄连、黄芩、败酱草和厚朴五味药组成,能够活血祛瘀、改善脏器微循环、有效减少炎症因子的产生^[5]。到目前为止,抗炎合剂作用于脓毒症的网络药理学研究尚无相关报道,探讨其产生疗效的分子调控机制势在必行。

系统药理学和分子对接已被广泛用于寻找中药中潜在的活性分子,并探讨其分子机制^[6-7]。此外,微阵列数据可用于识别差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)和研究潜在的通路。为了探讨抗炎合剂抗脓毒症的活性成分和这些活性物质的靶点,我们通过挖掘脓毒症

DEG,筛选出已知的理论靶点,并利用Cytoscape建立了活性成分-靶点及蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,并对其中的关键生物学功能和Hub基因进行了深入探讨。

1 资料与方法

1.1 脓毒症相关靶标的预测

为了收集脓毒症的相关靶点,本研究基于GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)挖掘了脓毒症的DEG。利用R软件包limma对独立数据集进行归一化和变换, fold change(FC)法检测脓毒症组和正常组mRNAs的差异表达,将该mRNA标记为DEG,同时利用R语言绘制DEG热图及火山图。

1.2 中药抗炎合剂活性成分的筛选和相关靶标的预测

从中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)检索关于抗炎合剂的活性成分,以“大黄Radix Rhei Et Rhizome”“黄连Coptidis Rhizoma”“厚朴Magnolia Officinalis Rehd Et Wils”“败酱草Herba Patriniae”和“黄芩

Scutellariae Radix”为关键词。功能活性成分可根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-like property, DL)进行筛选。OB值是评价药物内部转换率的重要指标,药物的OB值越高,口服给药后的利用率越高,临床应用的可能性越大。本研究中,以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为筛选功能活性成分的参数,收集抗炎合剂有效的活性成分,并通过DrugBank数据库收集活性成分对应的靶点。

1.3 “活性成分-交集靶点”网络的构建及功能富集分析

利用PERL语言分析抗炎合剂活性成分对应靶点与脓毒症DEG,并获得交集靶点。将获得的交集靶点数据导入Cytoscape3.7.1软件(<http://www.cytoscape.org/>)构建“活性成分-交集靶点”网络图并进行拓扑分析。接着,为了确定抗炎合剂治疗脓毒症相关靶点基因之间的共性,通过注释、可视化和集成发现数据库David(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因组功能注释。采用基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因和基因组学百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)途径分析研究基因功能。

1.4 PPI网络构建及网络拓扑分析

BisoGenet是一个Cytoscape插件,可用于生物分子关系可视化和分析的一个多层应用程序,主要包含PPI、蛋白质-DNA相互作用、基因和代谢通路的分析。因此,在本研究中,我们选择BisoGenet插件用于交集靶点PPI网络的构建,并使用网络拓扑分析CytoNCA插件对构建的PPI网络进行抽提,根据中心度(degree) >71 和中介中心度(betweenness centrality) $>1/200$ 构建拓扑网络,并筛选出关键基因(Hub gene),即红色矩形框中的基因。

1.5 交集靶点-KEGG关系网络图的构建

为了解释治疗脓毒症的活性成分对应的靶点在抗炎合剂中的药理作用机制,将得到抗炎合剂作用于脓毒症的主要通路及交集靶点基因连接起来,构建“交集靶点-KEGG”关系网络。利用Cytoscape3.7.1软件可视化“交集靶点-KEGG”网络,其中节点表示交集靶点,边表示交集靶点-通路的相互作用。

1.6 分子对接验证

使用iGEMDOCK验证基于Hub基因与关键有效化合物的分子对接。iGEMDOCK是一种基于结构的虚拟药物筛选方法和筛选后分析方法相结合

的对接模式,即通过对接的姿势(即蛋白质-配体之间的相互作用)和化合物的性质(即原子组成),使用K-Means算法和分层聚类来实现蛋白质与配体间的快速对接。在PDB(<https://www.rcsb.org/>)中搜索Hub基因的名称并以pdb格式保存;通过ZINC(<http://zinc.docking.org>)在线数据获得配体关键化合物的组成以MOL2格式保存。

2 结果

2.1 脓毒症候选靶标和抗炎合剂活性成分的预测

基于GEO数据库检索“sepsis normal”筛选并下载符合标准的GSE95233独立数据集,运用R语言的“limma”包对其进行差异表达分析。GSE95233数据集基于GPL570平台获得,包含22例正常样本和51例脓毒症患者样本。根据FC分析(筛选条件 $|\log FC| > 0.5$ 且 $P \text{ value} < 0.05$)共得到3598个DEGs,其中表达上调的基因有1737个,表达下调的基因有1861个(图1A);分别取前20个基因进行热图绘制(图1B)。根据ADME标准,从TCMSP数据库中筛选出81活性成分,其中大黄16种、黄芩36种、败酱草13种、厚朴2种、黄连14种,去重后共得到73个活性成分,具体信息见表1。通过DrugBank数据库获得活性成分对应靶点共1170个,去重后共224个对应靶标。

2.2 抗炎合剂治疗脓毒症的活性成分-交集靶点网络构建

基于PERL语言分析抗炎合剂活性成分对应靶点与脓毒症DEG,得到交集靶点蛋白共54个,认为这些蛋白质是抗炎合剂治疗脓毒症成分的相关靶点。抗炎合剂治疗脓毒症的活性成分-交集靶点网络用Cytoscape3.7.1进行可视化处理,如图2所示。该网络由99个节点和238条边组成。54个蓝色椭圆形节点代表54个交集靶点,三角形节点代表抗炎合剂的活性成分,红色六边形节点代表不同草药的共同成分。依据网络节点的degree和betweenness centrality大小进行了拓扑学分析,结果显示:在该网络中核心作用靶点为HSP90AA1、ADRB2、CALM1、DPP4、NCOA1、PPARG、CASP3、BCL2、CCNB1、AKT1和CDK1;关键活性成分为槲皮素(MOL000098)、木犀草素(MOL000006)、黄芩素(MOL002714)、山奈酚(MOL000422)和千层纸素(MOL002928)等。由此,可认为该活性成分-靶点网络具有多成分、多靶点,且成分与靶点相互作用等特点,形成了抗炎合剂治疗脓毒症的复杂调控网络。

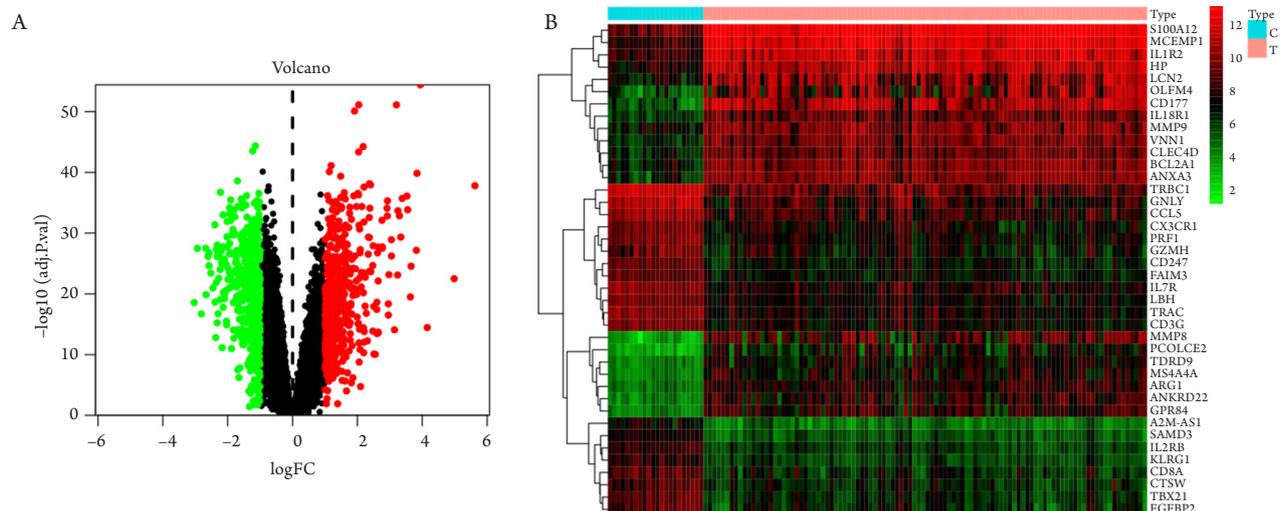


图1 GSE95233差异表达基因图谱

Figure 1 Genetic map of GSE95233 differentially expressed

(A)火山图; (B)热图。

(A) Volcanic map; (B) heat map.

表1 73个活性成分信息

Table 1 Information of 73 active ingredients

| MOL ID | 活性成分名称 | OB/% | DL | 中药来源 |
|-----------|--|-------|------|------|
| MOL002235 | EUPATIN | 50.8 | 0.41 | 大黄 |
| MOL002251 | Mutatochrome | 48.64 | 0.61 | 大黄 |
| MOL002259 | Physciondiglucoside | 41.65 | 0.63 | 大黄 |
| MOL002260 | Procyanidin B-5,3'-O-gallate | 31.99 | 0.32 | 大黄 |
| MOL002268 | rhein | 47.07 | 0.28 | 大黄 |
| MOL002276 | Sennoside E_qt | 50.69 | 0.61 | 大黄 |
| MOL002280 | Torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside | 43.02 | 0.74 | 大黄 |
| MOL002281 | Toralactone | 46.46 | 0.24 | 大黄 |
| MOL002288 | Emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside | 44.81 | 0.8 | 大黄 |
| MOL002293 | Sennoside D_qt | 61.06 | 0.61 | 大黄 |
| MOL002297 | Daucosterol_qt | 35.89 | 0.7 | 大黄 |
| MOL002303 | palmidin A | 32.45 | 0.65 | 大黄 |
| MOL000358 | beta-sitosterol | 36.91 | 0.75 | 大黄 |
| MOL000471 | aloe-emodin | 83.38 | 0.24 | 大黄 |
| MOL000554 | gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside | 30.25 | 0.67 | 大黄 |
| MOL000096 | (-)-catechin | 49.68 | 0.24 | 大黄 |
| MOL001689 | acacetin | 34.97 | 0.24 | 黄芩 |
| MOL000173 | wogonin | 30.68 | 0.23 | 黄芩 |
| MOL000228 | (2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one | 55.23 | 0.2 | 黄芩 |
| MOL002714 | baicalein | 33.52 | 0.21 | 黄芩 |
| MOL002908 | 5,8,2'-Trihydroxy-7-methoxyflavone | 37.01 | 0.27 | 黄芩 |

续表1

| MOL ID | 活性成分名称 | OB/% | DL | 中药来源 |
|-----------|--|--------|------|------|
| MOL002909 | 5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone | 33.82 | 0.45 | 黄芩 |
| MOL002910 | Carthamidin | 41.15 | 0.24 | 黄芩 |
| MOL002911 | 2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone | 69.04 | 0.22 | 黄芩 |
| MOL002913 | Dihydrobaicalin_qt | 40.04 | 0.21 | 黄芩 |
| MOL002914 | Eriodyctiol (flavanone) | 41.35 | 0.24 | 黄芩 |
| MOL002915 | Salvigenin | 49.07 | 0.33 | 黄芩 |
| MOL002917 | 5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone | 45.05 | 0.33 | 黄芩 |
| MOL002925 | 5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone | 37.01 | 0.24 | 黄芩 |
| MOL002926 | dihydrooroxylin A | 38.72 | 0.23 | 黄芩 |
| MOL002927 | Skullcapflavone II | 69.51 | 0.44 | 黄芩 |
| MOL002928 | oroxylin a | 41.37 | 0.23 | 黄芩 |
| MOL002932 | Panicolin | 76.26 | 0.29 | 黄芩 |
| MOL002933 | 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone | 36.56 | 0.27 | 黄芩 |
| MOL002934 | NEOBAICALEIN | 104.34 | 0.44 | 黄芩 |
| MOL002937 | DIHYDROOROXYLIN | 66.06 | 0.23 | 黄芩 |
| MOL000359 | sitosterol | 36.91 | 0.75 | 黄芩 |
| MOL000525 | Norwogonin | 39.4 | 0.21 | 黄芩 |
| MOL000552 | 5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone | 31.71 | 0.35 | 黄芩 |
| MOL000073 | ent-Epicatechin | 48.96 | 0.24 | 黄芩 |
| MOL000449 | Stigmasterol | 43.83 | 0.76 | 黄芩 |
| MOL001458 | coptisine | 30.67 | 0.86 | 黄芩 |
| MOL001490 | bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate | 43.59 | 0.35 | 黄芩 |
| MOL001506 | Supraene | 33.55 | 0.42 | 黄芩 |
| MOL002879 | Diop | 43.59 | 0.39 | 黄芩 |
| MOL002897 | epiberberine | 43.09 | 0.78 | 黄芩 |
| MOL008206 | Moslosooflavone | 44.09 | 0.25 | 黄芩 |
| MOL010415 | 11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester | 39.28 | 0.23 | 黄芩 |
| MOL012245 | 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone | 36.63 | 0.27 | 黄芩 |
| MOL012246 | 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone | 74.24 | 0.26 | 黄芩 |
| MOL012266 | rivularin | 37.94 | 0.37 | 黄芩 |
| MOL005970 | Eucalyptol | 60.62 | 0.32 | 厚朴 |
| MOL005980 | Neohesperidin | 57.44 | 0.27 | 厚朴 |
| MOL001454 | berberine | 36.86 | 0.78 | 黄连 |
| MOL013352 | Obacunone | 43.29 | 0.77 | 黄连 |
| MOL002894 | berberrubine | 35.74 | 0.73 | 黄连 |
| MOL002903 | (R)-Canadine | 55.37 | 0.77 | 黄连 |
| MOL002904 | Berlambine | 36.68 | 0.82 | 黄连 |

续表1

| MOL ID | 活性成分名称 | OB/% | DL | 中药来源 |
|-----------|-------------------|--------|------|------|
| MOL002907 | Corchoroside A_qt | 104.95 | 0.78 | 黄连 |
| MOL000622 | Magnograndiolide | 63.71 | 0.19 | 黄连 |
| MOL000762 | Palmidin A | 35.36 | 0.65 | 黄连 |
| MOL000785 | palmatine | 64.6 | 0.65 | 黄连 |
| MOL000098 | quercetin | 46.43 | 0.28 | 黄连 |
| MOL002668 | Worenine | 45.83 | 0.87 | 黄连 |
| MOL008647 | Moupinamide | 86.71 | 0.26 | 黄连 |
| MOL001676 | Vilmorrianine C | 33.96 | 0.22 | 败酱草 |
| MOL001677 | asperglauclide | 58.02 | 0.52 | 败酱草 |
| MOL001678 | bolusanthol B | 39.94 | 0.41 | 败酱草 |
| MOL001790 | Linarin | 39.84 | 0.71 | 败酱草 |
| MOL002322 | isovitexin | 31.29 | 0.72 | 败酱草 |
| MOL001697 | Sinoacutine | 63.39 | 0.53 | 败酱草 |
| MOL000422 | kaempferol | 41.88 | 0.24 | 败酱草 |
| MOL000006 | luteolin | 36.16 | 0.25 | 败酱草 |

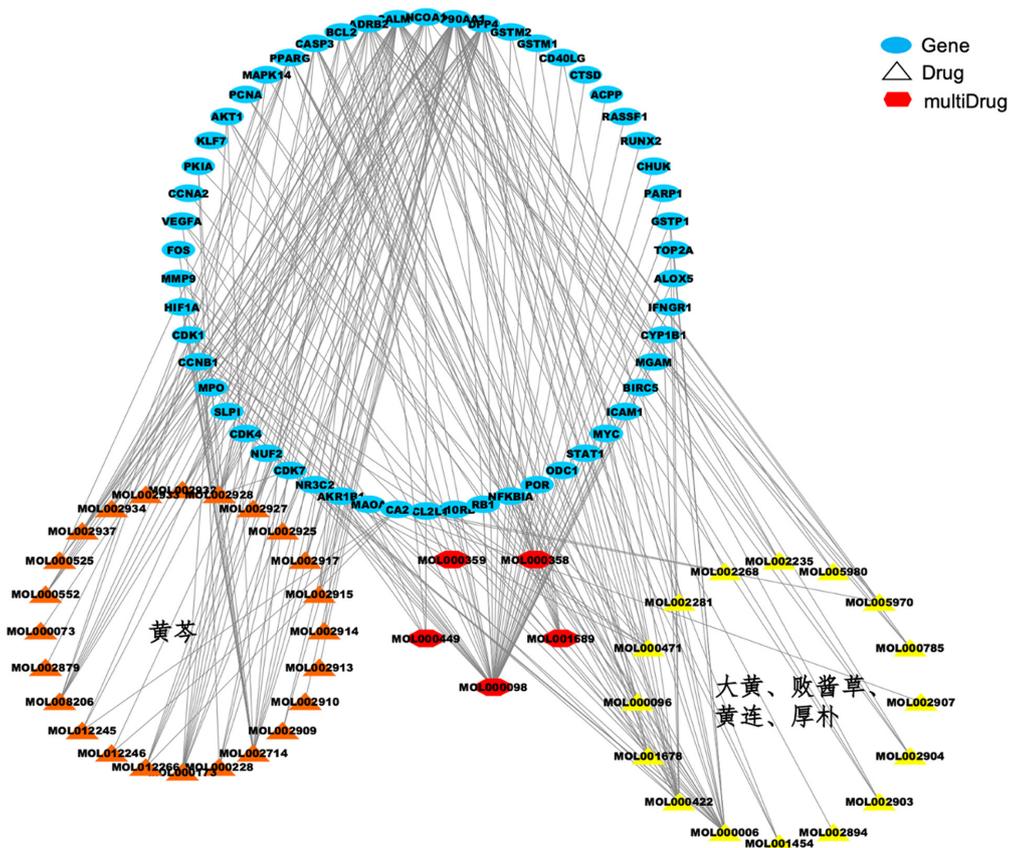


图2 活性成分-交集靶点网络图

Figure 2 Active ingredients-target network diagram

2.3 GO 功能富集分析及 KEGG 通路分析

使用David数据库对54个交集靶点进行了GO功能富集分析,结果如图3A所示。GO分析结果显示:54个靶点蛋白分子功能主要富集于酶结合、相同蛋白结合、蛋白质均聚活性和转录因子的结合上;细胞组成主要在核质、细胞核和细胞质区域富集较为集中;这些靶点主要参与对凋亡过程的负调控、RNA聚合酶II启动子对转录的正调

控、细胞对缺氧的反应、转录的正调控、细胞对胰岛素刺激的反应、细胞对有机环化化合物的响应等多种生物学过程。同时,还进行了交集靶点的KEGG通路分析,结果如图3B所示。KEGG通路网络显示:54个靶点富集的重要途径主要包括癌症相关途径、细胞周期、TNF信号通路、HTLV-I感染、T细胞受体信号通路、细胞凋亡和NF- κ B信号通路等。

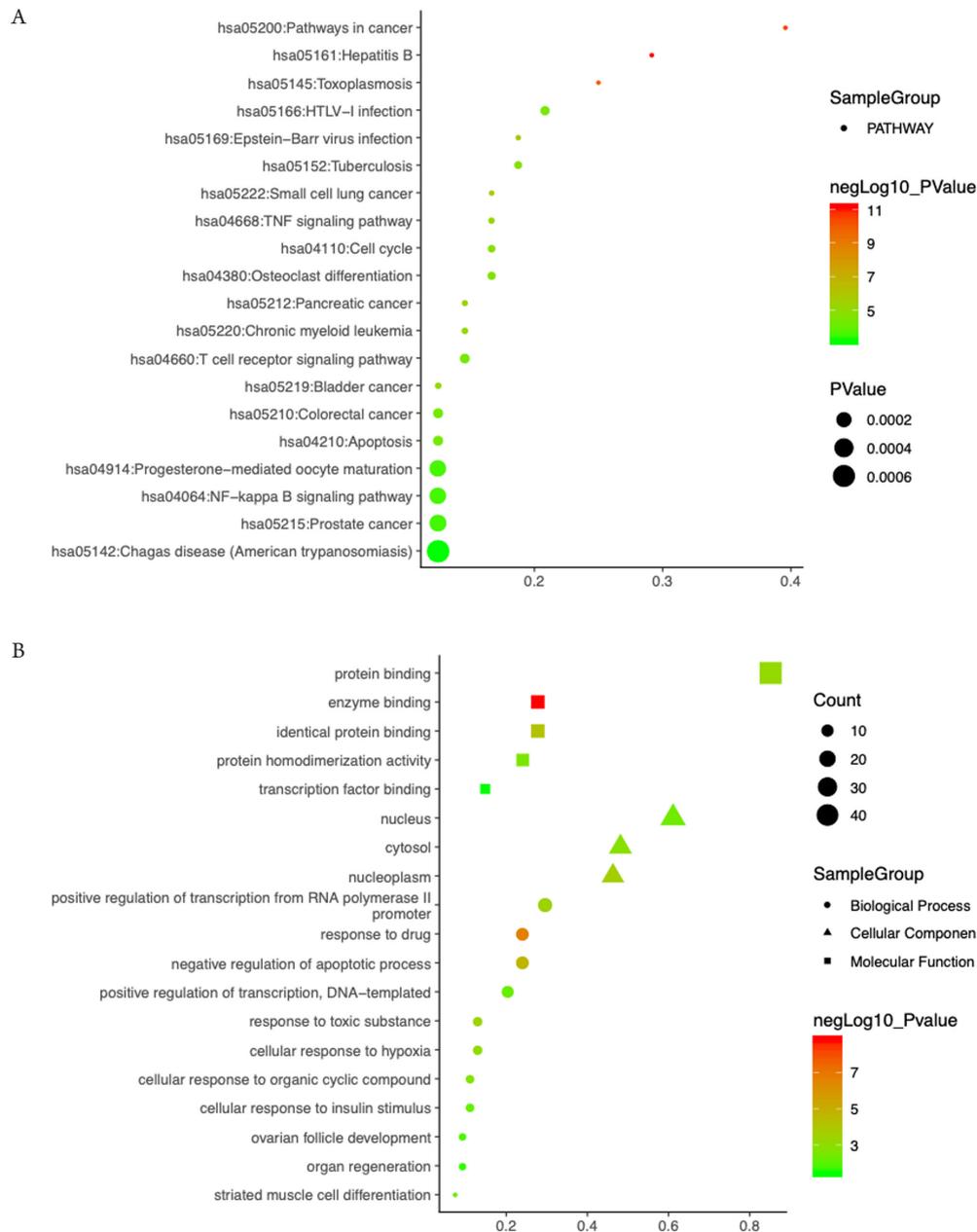


图3 基因本体论富集分析和KEGG通路分析

Figure 3 The enrichment analysis of gene ontology and KEGG pathway analysis

(A)GO功能分析; (B)KEGG通路分析。

(A) GO functional analysis; (B) KEGG pathway analysis.

2.4 PPI 网络拓扑分析

为了清晰的阐明中药抗炎合剂作用于脓毒症相关的调控机制, 我们对其54个交集靶点进行了进一步网络拓扑分析。将54个交集靶点导入Cytoscape3.7.1的BisoGenet插件, 设置Identifiers=Gene identifiers only和Data Settings=Protein Protein Interaction, 获得由3 594个节点、86 228条边组成的PPI信息网络(图4A)。接着利用CytoNCA插件进行拓扑分析, 设置degree>71, 得到拓扑网络(图4B); 进一步设置betweenness centrality>1 200, 抽提得到核心拓扑网络(图4C)。由图4C可知, 拓扑分析得到MYC、AKT1、PARP1和HSP90AA1 4个Hub基因, 认为这4个Hub基因在PPI网络中占据重要地位。

2.5 “交集靶点-KEGG”网络的构建

将交集靶点和中药抗炎合剂治疗脓毒症涉及的主要通路数据导入Cytoscape3.7.1软件构建“交集靶点-KEGG”关系网络图(图5)。该网络由52个节点(20个通路节点和32个交集节点)和168条边组成, 其中蓝色圆形代表交集靶点基因、橙色三角形代表KEGG通路, 且节点形状越大表示这些节点在中药抗炎合剂治疗脓毒症的分子调控机制中起的核心调控作用越大。由图可知, AKT1、NFKB1A、CHUK、MAPK14、MYC、RB1、BCL2L1基因和癌症相关途径(hsa05200)、HTLV-I感染(hsa05166)、TNF信号通路(hsa04668)和NF-κB信号通路(hsa04064)在该网络中起重要作用。

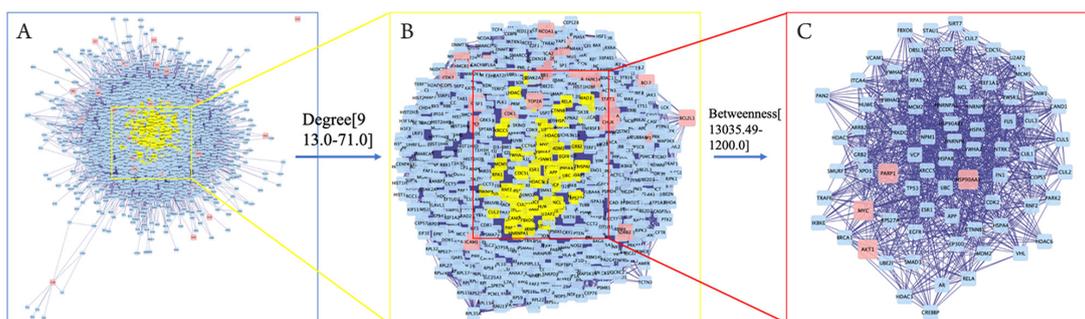


图4 PPI网络及拓扑分析网络

Figure 4 PPI network and topology analysis network

(A)PPI网络; (B)核心网络1; (C)核心网络2。

(A) Protein-protein interaction network; (B) Core network 1; (C) Core network 2.

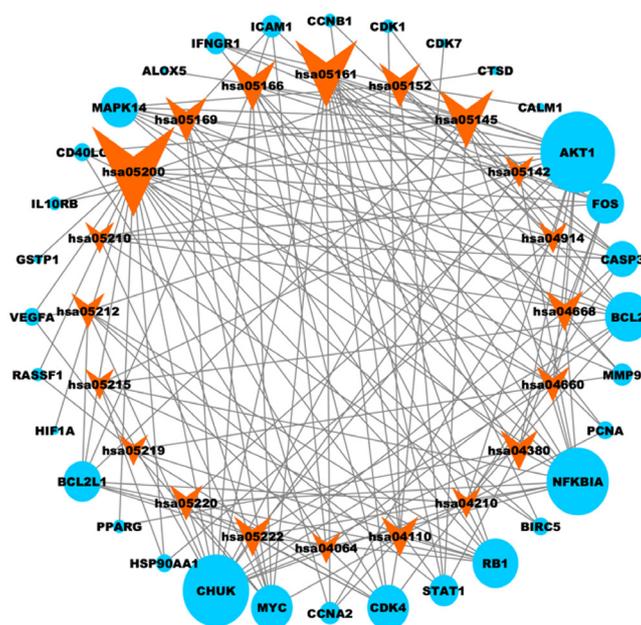


图5交集靶点-KEGG关系网络

Figure 5 Intersection targets-KEGG network

2.6 分子对接得分

为了确保本研究的准确性, 我们采用 iGEMDOCK 分子对接分析法将抗炎合剂作用于脓毒症的4个Hub基因与经拓扑分析得到的5个关键有效化合物进行分子对接。当小分子受体与配体结合构象越稳定时, 其能量越低, 产生的相互作用型越大, 根据对接得分(表2)可知, MYC与Quercetin的结合性最强, 能量得分最低, 具体对接构象如图6所示。

表2 分子对接得分

Table 2 Scores of molecular docking

| Hub gene | PDB ID | 关键活性成分 | 对接得分 |
|----------|--------|-----------|---------|
| AKT1 | 5WBL | MOL000422 | -92.65 |
| | 5WBL | MOL000006 | -90.74 |
| | 5WBL | MOL002928 | -91.37 |
| | 5WBL | MOL002714 | -99.40 |
| | 5WBL | MOL000098 | -90.90 |
| HSP90AA1 | 3O0I | MOL000422 | -87.16 |
| | 3O0I | MOL000006 | -117.84 |
| | 3O0I | MOL002928 | -110.71 |
| | 3O0I | MOL002714 | -97.81 |
| | 3O0I | MOL000098 | -86.96 |
| MYC | 1MUZ | MOL000422 | -274.44 |
| | 1MUZ | MOL000006 | -285.46 |
| | 1MUZ | MOL002928 | -296.33 |
| | 1MUZ | MOL002714 | -299.73 |
| | 1MUZ | MOL000098 | -346.70 |
| PARP1 | 6TX2 | MOL000422 | -88.37 |
| | 6TX2 | MOL000006 | -88.31 |
| | 6TX2 | MOL002928 | -83.63 |
| | 6TX2 | MOL002714 | -83.47 |
| | 6TX2 | MOL000098 | -95.35 |

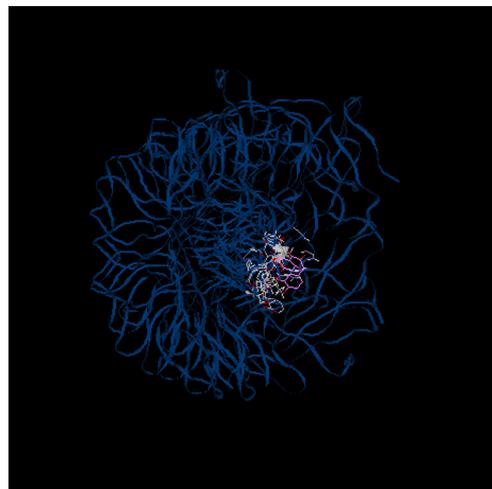


图6 MYC与MOL000098对接构象

Figure 6 MYC and MOL000098 docking conformation

3 讨论

在中医理论体系中, 将脓毒症归属于“外感热病”“虚劳”“温病”等范畴, 本病的发生主要由于正气不足, 外毒之邪气蕴结, 继而外毒转化为内毒, 内毒入里, 化热煎熬津血, 炼津为痰, 从而产生热、痰、瘀等病理产物, 这些病理产物的积累逐步诱导脓毒症的发生发展^[8]。抗炎合剂由五味中药组成, 方中大黄为君, 清热泻火、活血祛瘀; 黄连、黄芩为臣, 清热燥湿、泻火解毒; 厚朴、败酱草为佐, 行气、平喘、消痈排脓; 全方共奏苦寒并用、通腑活血之功。现代药理学研究^[9-11]表明: 大黄含有大黄酸、大黄素和鞣质, 可通过调节一氧化氮、内皮素、前列环素等对血管内皮细胞起保护作用; 黄连为毛茛科植物, 含有小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱等, 是临床常用的抗感染药物; 黄芩的有效成分黄芩素、黄芩苷能降低氧化应激和组织损伤, 抑制机体的炎症反应; 厚朴中的厚朴酚可抑制炎症反应中的中性粒细胞脱颗粒, 起抗炎镇痛的效用; 败酱草含有的活性成分败酱总黄酮可降低IL-1 β 和TNF- α 的表达, 起抗炎、抗氧化、镇静止痛的药理作用。中药中的这些成分可单独或协同作用以增强治疗效果。简而言之, 抗炎合剂的治疗效果可能归因于上述生物活性成分。

本研究通过构建复杂的多中心基因网络和对脓毒症DEG的分析, 确定抗炎合剂的主要有效成

分为槲皮素、木犀草素、黄芩素、山奈酚和千层纸素。抗炎合剂的潜在治疗靶点包括HSP90AA1、PPARG、CASP3、BCL2、CCNB1、AKT1和CDK1等,它们可以通过多种机制诱导机体的炎症反应减弱。接着,本研究对抗炎合剂治疗脓毒症的54个潜在靶点进行了GO和KEGG富集分析发现:抗炎合剂通过调控细胞凋亡过程、细胞对缺氧的反应、转录的调控及细胞对有机环化化合物的响应等多种生物学过程发挥抗脓毒症的临床作用。在机体炎症反应方面,抗炎合剂的临床作用主要涉及TNF信号通路、NF- κ B信号通路。脓毒症和感染性休克综合征的特点是多种细胞因子和趋化因子的高度调节释放。TNF是一种经过广泛研究的具有多种功能的促炎细胞因子,涉及多种细胞生物学过程,包括增殖、分化、炎症和细胞凋亡等^[12]。TNF- α 是脓毒症背景下描述的第1批可溶性蛋白因子之一。最近相关研究^[13]证实:TNF超家族的其他成员在传染病或炎症性疾病的病理生理学中发挥着与TNF相似的作用。Peng等^[14]研究显示:TNF与脓毒症的发病机制密切相关,脓症患者血清中TNF水平升高,提示TNF超家族的其他成员也可能作为脓毒症诊治的生物标志物。以往的研究表明,转录因子NF- κ B在脓毒症心肌功能障碍的发病机制中起关键作用^[15]。NF- κ B是一种重要的核转录因子,调控多种炎症基因的表达。NF- κ B与基因启动子中的特异性结合序列的相互作用可能受到多种刺激的诱导,其中包括内毒素、革兰氏阳性细菌产物(即肽聚糖和脂磷壁酸)、细胞因子(即TNF- α 和IL-1)、T细胞和B细胞有丝分裂原、氧化剂和其他物理和化学应激源等^[16-17]。当细胞受到这些刺激时,NF- κ B相关信号转导被激活,释放大炎症介质,启动氧化应激反应,使得ATP生成减少,细胞失去能量保护而凋亡、坏死,进一步促进了多器官功能的衰竭。

同时,我们利用PPI网络将抗炎合剂的潜在治疗靶点与脓毒症DEG连接起来,进行了拓扑网络构建,并通过Cytoscape软件的BisoGenet和CytoNCA插件识别了抗炎合剂抗脓毒症潜在治疗靶点的Hub基因。结果表明:Hub基因,如MYC、AKT1、PARP1和HSP90AA1作为抗炎合剂的潜在治疗靶点,与脓毒症患者的预后相关。MYC基因表达下调导致全身基因表达下调和转录抑制,这种异常是多种人类疾病的基础,或者与这些疾病的严重程度有关。相关研究^[18]发现:MYC可能是脓毒症诱导的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)潜在功能障碍

的关键调控基因,其参与剪接体途径调节分子转录水平。聚(ADP-核糖)聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerases, PARPs],又称ADP-核糖基转移酶,是真核和原核生物中的一类酶,能在受体蛋白上产生ADP-核糖修饰。PARP1是PARP酶家族中含量最丰富的一种异构体,被基因毒性刺激激活后,将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸裂解成烟酰胺,形成ADP核糖部分,这些部分可与多种受体蛋白结合,包括PARP本身^[19]。PARP的持续激活导致其底物NAD⁺的耗竭,从而导致ATP能量衰竭和细胞死亡。研究^[20]证实:在脓症患者中,PARP1可能通过介导致死性迟效介质高迁移率族蛋白1,进一步调节免疫细胞、内皮细胞和肠细胞的炎症反应。AKT1不仅是机体重要的酶,也是许多信号通路的汇聚点,调控着机体多方面的功能,如蛋白合成、细胞凋亡等。脓毒症存在两个代谢特点,分别是肌肉胰岛素抵抗和严重的肌肉萎缩^[21]。研究^[22]报道:在脓毒症期间,骨骼肌AKT1磷酸化被抑制,蛋白酶体和自噬蛋白水解途径活性增强,与肌肉萎缩密切相关。

综上所述,GO和KEGG分析初步证实抗炎合剂的作用机制包括抑制炎症反应、调节免疫系统。此外,MYC、AKT1、PARP1和HSP90AA1被鉴定为抗炎合剂治疗脓毒症的中枢基因。然而,还需进一步的实验研究来验证本次分析结果。

参考文献

1. Napolitano LM. Sepsis 2018: definitions and guideline changes[J]. Surg Infect (Larchmt), 2018, 19(2): 117-125.
2. Kumar V. Immunometabolism: another road to sepsis and its therapeutic targeting[J]. Inflammation, 2019, 42(3): 765-788.
3. Huang M, Cai S, Su J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.
4. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(7): 407-420.
5. 刘征,卜建宏,钱春美,等.抗炎合剂治疗脓毒症疗效及对血管内皮细胞的影响研究[J].山东中医杂志,2020,39(5): 472-476.
LIU Zheng, BU Jianhong, QIAN Chunmei, et al. Efficacy of Kangyan Heji on sepsis and its influence on vascular endothelial cells[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 39(5): 472-476.
6. Boezio B, Audouze K, Ducrot P, et al. Network-based approaches in pharmacology[J]. Mol Inform, 2017, 36(10): 10.1002/

- minf.201700048.
7. Yuan H, Ma Q, Cui H, et al. How can synergism of traditional medicines benefit from network pharmacology?[J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1135.
 8. 方华, 孔立, 郝浩, 等. 脓毒症的中医证候及其动态演变规律[J]. *中国中医急症*, 2017, 26(9): 1606-1608.
FANG Hua, KONG Li, HAO Hao, et al. TCM syndromes of sepsis and its dynamic evolution[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2017, 26(9): 1606-1608.
 9. 杨兴才, 楼丹飞, 韦红, 等. 抗炎合剂对脓毒症患者血管内皮细胞功能的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2018, 40(7): 587-591.
YANG Xingcai, LOU Danfei, WEI Hong, et al. Clinical study of traditional Chinese medicine anti-inflammatory mixture for the microcirculation disturbance in patients with sepsis targeting at vascular endothelium[J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 40(7): 587-591.
 10. 杨兴才, 韦红, 郑天虹, 等. 基于免疫调理的中药抗炎合剂对严重脓毒症患者治疗作用的研究[J]. *中国中医急症*, 2017, 26(8): 1451-1453.
YANG Xingcai, WEI Hong, ZHENG Tianhong, et al. Study on the therapeutic effect of traditional Chinese medicine anti-inflammatory mixture on patients with severe sepsis based on immune conditioning[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2017, 26(8): 1451-1453.
 11. 袁晓雯, 姜楠, 陈冰, 等. 单味中药治疗脓毒症的研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(5): 736-739.
YUAN Xiaowen, JIANG Nan, CHEN Bing, et al. Research progress of single traditional Chinese medicine in the treatment of sepsis[J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2017, 23(5): 736-739.
 12. Wang XB, Ellis JJ, Pennisi DJ, et al. Transcriptome analysis of ankylosing spondylitis patients before and after TNF- α inhibitor therapy reveals the pathways affected[J]. *Genes Immun*, 2017, 18(3): 184-190.
 13. Roderburg C, Benz F, Schüller F, et al. Serum levels of TNF receptor ligands are dysregulated in sepsis and predict mortality in critically ill patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153765.
 14. Peng W, Huang J, Zheng Y, et al. UCP2 silencing aggravates mitochondrial dysfunction in astrocytes under septic conditions[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4459-4466.
 15. Sun LJ, Qiao W, Xiao YJ, et al. Naringin mitigates myocardial strain and the inflammatory response in sepsis-induced myocardial dysfunction through regulation of PI3K/AKT/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105782.
 16. Prauchner CA. Oxidative stress in sepsis: pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy[J]. *Burns*, 2017, 43(3): 471-485.
 17. Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, et al. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1791-1806.
 18. Zhang J, Luo Y, Wang X, et al. Global transcriptional regulation of STAT3- and MYC-mediated sepsis-induced ARDS[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2019, 13: 1753466619879840.
 19. Walko TD 3rd, Di Caro V, Piganeli J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1-sirtuin 1 functional interplay regulates LPS-mediated high mobility group box 1 secretion[J]. *Mol Med*, 2015, 20(1): 612-624.
 20. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily[J]. *Bioessays*, 2004, 26(8): 882-893.
 21. Crossland H, Constantin-Teodosiu D, Gardiner SM, et al. A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2008, 586(22): 5589-5600.
 22. Wang X, Hu Z, Hu J, et al. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(9): 4160-4168.

本文引用: 张文凯, 杨璐瑜, 陆辉志, 董辉, 付守芝. 基于系统药理学和分子对接探讨抗炎合剂治疗脓毒症的分子调控机制[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(6): 1248-1258. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.003

Cite this article as: ZHANG Wenkai, YANG Luyu, LU Huizhi, DONG Hui, FU Shouzhi. Molecular regulation mechanism of anti-inflammatory mixtures in the treatment of sepsis based on systematic pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(6): 1248-1258. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.06.003