

本文引文格式:王恒,邹纯才,鄢海燕.基于网络药理学研究决明子对氟尿嘧啶致肝损伤的保护作用机制分析[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):359-366.

【论著与临床报道】

基于网络药理学研究决明子对氟尿嘧啶致 肝损伤的保护作用机制分析

王恒,邹纯才,鄢海燕

(皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 通过网络药理学和分子对接的方式探讨决明子对氟尿嘧啶(5-Fu)致肝损伤的作用机制。方法 通过文献、TCMSP、SwissTargetPrediction、Gencards、GenCLiP、STRING、DAVID等数据库,收集决明子蒽醌类活性成分及预测靶点,筛选疾病与成分的共有靶点蛋白并进行生物学功能和通路分析,构建蛋白相互作用的PPI网络图,通过Gephi构建决明子蒽醌类成分-靶点-通路的网络图,最后利用分子对接对核心靶点进行验证。结果 从文献、TCMSP数据库筛选获得决明子蒽醌类成分35个,SwissTargetPrediction数据库检索到决明子蒽醌类成分潜在靶点349个。决明子蒽醌类成分抗5-Fu致肝损伤的预测靶点为TP53、IL1B、MAPK1、HSP90AA1、AKT1、EGFR、STAT3、PIK3CA、PPARG、MCL1等103个。通路富集92条通路,主要涉及癌症信号通路(pathways in cancer)、癌症蛋白多糖信号通路(proteoglycans in cancer)、ErbB信号通路(ErbB signaling pathway)、乙型肝炎病毒信号通路(hepatitis B)、癌症MicroRNAs信号通路(MicroRNAs in cancer)、PI3K-Akt信号传导通路(PI3K-Akt signaling pathway)等多条通路。结论 决明子蒽醌类成分通过橙黄决明素、大黄酸、决明素等27个成分作用于PIK3CG、GAPDH、AKT1、ABCG2、HSP90AA1、CDK1、PTK2等103个靶点发挥抗5-FU致肝损伤作用,揭示了决明子多成分、多靶点、多通路的的治疗特点,为深入研究决明子对抗肿瘤药致肝损伤的基础研究奠定了基础。

关键词:决明子;网络药理学;氟尿嘧啶;药物性肝损伤;分子对接

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2022)03-0359-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.010

Analysis of the protective mechanism of cassia seed against liver injury induced by 5-Fu based on network pharmacology

Wang Heng, Zou Chuncai, Yan Haiyan

(School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of cassia seed against 5-Fu (5-fluorouracil) induced liver injury by network pharmacology and molecular docking. **Methods** Through literature, TCMSP, SwissTargetPrediction, Gencards, GenCLiP, STRING, DAVID and other databases, the anthraquinone active components and predicted targets of cassia seed were collected; the common target proteins of diseases and components were screened and their biological functions and pathways were analyzed; the PPI network diagram of protein interaction was constructed; the network diagram of cassia seed anthraquinone component-target-pathway was constructed with Gephi, and the core targets were verified by molecular docking. **Results** Thirty-

基金项目:安徽省大学生创新创业计划项目(S202110368104, S202110368098);皖南医学院大学生科研资助项目(WK2021XS42)

第一作者简介:王恒(1996-),男,在读硕士研究生,研究方向:天然药物药理学,E-mail:1628902714@qq.com

通讯作者简介:鄢海燕(1968-),女,硕士,教授,研究方向:药物制剂及其质量标准研究,E-mail:yhy0801@126.com

five anthraquinone components were screened out from literature and TCMSP database, and 349 potential targets were retrieved from SwissTar Prediction database. There were 103 predicted targets of the anthraquinone component in cassia seed against 5-Fu induced liver injury, including TP53, IL1B, MAPK1, HSP90AA1, AKT1, EGFR, STAT3, PIK3CA, PPARG, MCL1 and so on. 92 Pathways were enriched, involving pathways in cancer, proteoglycans in cancer, ErbB signaling pathway, hepatitis B signaling pathway, MicroRNAs in cancer, PI3K-Akt signaling pathway and other pathways. **Conclusion** The anthraquinones of cassia seed act on 103 targets including PIK3CG, GAPDH, AKT1, ABCG2, HSP90AA1, CDK1, PTK2 and so on through 27 components such as aurantio-obtusin, rhein, obtusin and the like to exert effects of anti liver injury induced by 5-Fu, revealing the therapeutic characteristics of cassia seed with multiple components, multiple targets and multiple pathways, thus laying a foundation for further study on the basic research of cassia seed against liver injury induced by anti-tumor drug.

Key words: cassia seed; network pharmacology; fluorouracil; drug-induced liver injury; molecular docking

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指由各类处方或非处方的化学药物、生物制剂、天然药物及其代谢产物等诱发的肝损伤^[1]。DILI 易发展成肝衰竭,致死率可达 75%。据世界卫生组织 (WHO) 统计:药物引起的肝功能异常已经上升为全球肝病死亡病原的第五位^[2]。在我国,DILI 发病率仅次于病毒性肝炎、脂肪性肝病^[3]。近年来,随着抗肿瘤药物的不断研发,恶性肿瘤患者的预后有了明显的提高,生存期也大大延长,但其不良反应也为肿瘤患者的治疗带来了新的问题。肿瘤药物治疗时易引起药物性肝损伤,特别是在肝炎发病率较高的中国,寻找有效药物降低或预防药物性肝损伤值得研究。

决明子是豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *Cassia tora* L. 的成熟干燥种子,其味甘、苦、咸,性微寒,善入肝、肾、大肠经,具有清肝明目、润肠通便的功效^[4],始载于《神农本草经》,列为上品。现代研究表明,决明子具有降血压、降血脂、保肝、明目、抗氧化、抑菌等作用^[5]。决明子作为我国常用中药,同时也是药食同源物质之一,药理作用广泛,在临床疾病的预防及养生等方面具有显著的作用,但其作用机制尚不明确,本文通过网络药理学对决明子抗肿瘤药致肝损伤作用靶点进行预测分析,明确决明子对 5-FU 致肝损伤保护作用机制,为深入研究其治疗抗肿瘤药致肝损伤提供理论依据与参考。

1 材料与方法

1.1 决明子蒽醌类活性成分的筛选及靶点的整理 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、CNKI 数据库及 PubMed 等数据库收集决明子蒽醌类成分,绘制结构式并以 MDL SDfile (*.sdf) 格式保存。将绘制的结构式导入 SwissTargetPrediction 数

据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 检测匹配得到药物的预测靶点,设置 Probability ≥ 0.05 , 获得决明子蒽醌类的活性成分靶点蛋白。

1.2 收集疾病相关靶点 通过 CoolGen (<http://cisnu.edu.cn/CoolGen/Home.php>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库,以“Liver injury caused by fluorouracil”和“Liver injury”为关键词进行检索,获取疾病相关靶点。利用 Venny2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将“1.1”项下的决明子蒽醌类成分的预测靶点去重后与疾病相关靶点取交集靶点。

1.3 构建靶点的蛋白互作网络图 为了解释目的蛋白之间的相互作用,将“1.2”项下得到的交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中,选择物种为人,初步获得决明子蒽醌类成分抗 5-Fu 致肝损伤保护作用的 PPI 网络信息。导出数据库中生成的 PPI 网络信息的“TSV”文件,导入 Gephi0.9.2 软件中进行分析,获得网络中节点的度值,筛选核心靶点,度值越大表明靶点所起的作用越大。

1.4 GO 功能富集分析及 KEGG 信号通路富集分析 为了阐明决明子蒽醌类成分中目标化合物的功能及其在信号转导中的作用,利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对参与 PPI 网络的蛋白的 GO 功能和 KEGG 通路富集进行了分析,并介绍靶蛋白的细胞组成、分子功能、生物学过程和信号通路。

1.5 化学成分-靶点蛋白-通路网络的构建 通过 Gephi0.9.2 建立了“成分-疾病-靶点通路”相互作用的网络模型。将“1.1”项下的决明子蒽醌类成分及靶点、“1.3”项下的交集靶点、“1.4”项下的通路信息导入 Gephi0.9.2,构建活性成分-蛋白靶点-通路的网络图。

1.6 分子对接验证 通过 SYBYL-X 2.1.1 软件进行重要靶点和成分的分子对接,以 PPI 网络中度值前十的靶点为受体,与其对应的活性成分为配体,对氟尿嘧啶致肝损伤靶点与决明子蒽醌类成分的相互作用进行研究。在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载靶点的蛋白结构,分别将小分子与蛋白结构导入 Sybyl 软件中进行预处理,去除配体,水分子,进行加氢,以蛋白的配体小分子为口袋,与成分分子进行对接处理,得到靶点与其对应成分对接后的 Total Score 分值,Total Score 值换算结合自由能公式为 $\Delta G_0 = -2.303 RT \times \text{Total Score}$ (其中 R 为分子的理想气体常数, T 为理想气体的热力学温度),因此 Total Score 值越大,配体与受体结合越稳定^[6],再通过 PyMol 进行受体配体的相互作用模式分析。

2 结果

2.1 决明子蒽醌类成分的收集及靶点的整理 通过 TCMSP 数据库与文献检索^[6-7],共获得 35 种决明子蒽醌类成分,经筛选,共有 27 个活性成分符合条件,作为候选化合物纳入研究,见表 1。筛选得到成分相关靶点 2 711 个,设置筛选条件 $\text{Probability} \geq 0.05$,删除无效重复的靶点,最终得到决明子蒽醌类有效活性成分的靶点 349 个^[7-8]。

2.2 疾病靶点的预测 通过 Gene Cards 数据库获得肝损伤靶点 1 399 个,CoLoGeN 数据库获得 1 895 个,结合已获得的决明子蒽醌类成分的作用靶点,应用 Venny2.1.0,制作成分靶点与疾病靶点的韦恩图,共得到 103 个交集靶点,作为决明子蒽醌类成分抗 5-Fu 致肝损伤保护作用潜在的靶点,见图 1。

2.3 靶点蛋白 PPI 网络的构建与分析 将“2.2”项下得到的 103 个交集靶点导入 String 数据库中,选择物种“Homo sapiens”,得到成分与靶点的蛋白互作网络,见图 2。PPI 网络中,共 103 个节点,1 383 条边,其中节点代表目标蛋白,每条边代表蛋白-蛋白相互作用。在网络中,每个节点的度表示连接到该靶点的数量,因此,程度越大,该节点对应的目标蛋白在网络中的作用就越强,表明该目标蛋白在整个相互作用网络中起着重要的作用,将它们作为核心靶点^[9]。下载其“TSV”格式的网络信息,导入 Gephi 0.9.2 软件,利用其统计分析功能对网络节点中的度值进行计算,筛选核心靶点。如图 3 展示了 GAPDH、AKT1、STAT3、MAPK1、EGFR、TP53、HSP90AA1、SRC、CASP3 等度值较高的前二十位核心靶点,现代研究表明,这些靶点多是参与细胞增殖、分化、凋亡、分裂、新陈代谢、氧化还原、免疫调节和癌症发展等过程^[10-13]。

表 1 决明子中 27 个蒽醌类成分信息

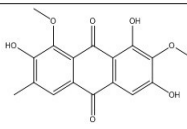
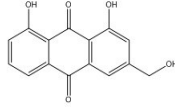
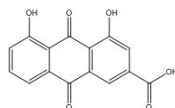
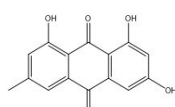
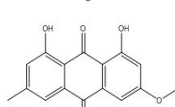
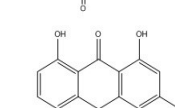
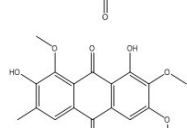
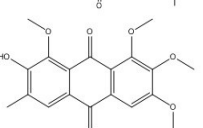
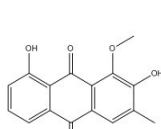
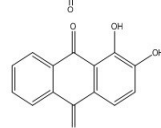
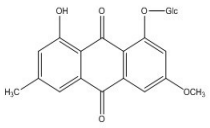
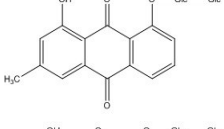
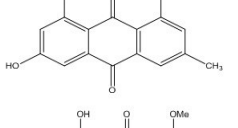
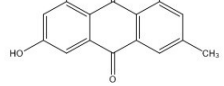
No	Name	2D - structure
1	aurantio-obtusin	
2	aloe-emodin	
3	rhein	
4	emodin	
5	physcion	
6	chrysophanol	
7	obtusin	
8	chrysoobtusin	
9	obtusifolin	
10	1,2-dihydroxyanthraquinone	
11	physcion-8-O-β-D-glucoside	
12	chrysophanol-1-O-β-D-gentiobioside	
13	Emodin-1-O-β-D-gentiobioside	
14	1-Methyl Emodin	

表 1(续) 决明子中 27 个蒽醌类成分信息

No	Name	2D - structure
15	1-desmethylobtusin	
16	1-desmethy-laurantio-obtusin	
17	1,3-dihydroxy-6-methoxy-7-methlanthraquinone	
18	1-hydroxy-3,7-diformyl anthraquinone	
19	2-hydroxyemodin-1-methylether	
20	questin	
21	chryso-obtusin-2-O-β-D-glucopyranoside	
22	4,6,7-三甲氧基芦荟大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	
23	Alatemin-1-O-β-D-glucopyranoside	
24	Alatemin	
25	7-methoxyobtusin	
26	1-desmethyllaurantio-obtusin-2-O-β-D-glucopyranoside	
27	1-desmethylichryso-obtusin	

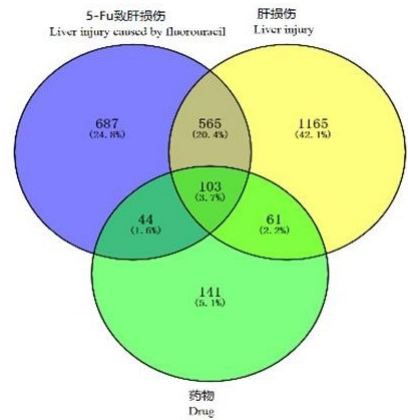


图 1 决明子蒽醌类成分靶点与疾病靶点的交集靶点

过程及信号通路富集分析。设置筛选条件 ($P < 0.05$), 由 GO 富集结果得到共有 77 条生物学功能, 其中有 37 条涉及生物学过程, 决明子蒽醌类成分主要参与蛋白质自身磷酸化, 跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路, 凋亡过程的负调控, 细胞增殖调节, 磷脂酶 C 活性正调控, 凋亡信号通路的负调控, 神经元凋亡过程的负调控, 肽基苏氨酸磷酸化, ERK1 和 ERK2 级联的正调节, 负性调节等生物学过程, 表明决明子蒽醌类成分主要参与涉及细胞凋亡、细胞增殖、炎症途径、细胞信号传导、调节和控制蛋白质活力和功能等反应。细胞成分富集了 17 条, 主要参与质膜细胞质侧的外源成分、胞质、细胞外基质、受体复合体、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物、细胞质、细胞外间隙等。分子功能共富集了 23 条, 主要参与 ATP 结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、激酶活性、金属内肽酶活性、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、血红素结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等生物功能, 见图 4。由 KEGG 富集分析得到 92 条通路 ($P < 0.05$), 得知决明子蒽醌类成分主要涉及癌症的途径、前列腺癌、PI3K-Akt 信号通路、癌症的中枢碳代谢、癌症中的蛋白多糖、HIF-1 信号通路、胰腺癌、乙型肝炎、ErbB 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、大肠癌、神经营养素信号通路等多种重要通路, 对 KEGG 前二十条重要通路进行可视化分析, 见图 5。PI3K-Akt 信号通路作为前三的核心通路, 与肝损伤密切相关, 因此将此信号通路作为决明子蒽醌类成分抗 5-Fu 致肝损伤保护作用的通路之一, 具体通路见图 6, 红色代表靶点作用的部位, 可知决明子蒽醌类成分抗肝损伤作用涉及多条通路, 且多个靶点在不同通路中发挥作用, 如 EGFR、AKT1、MAPK1 在前十的通路中涉及 7 个以上的通路, 这些通路主要关于细胞增殖、迁移、凋亡与分化、癌症的途径、炎症反应等生物功能。

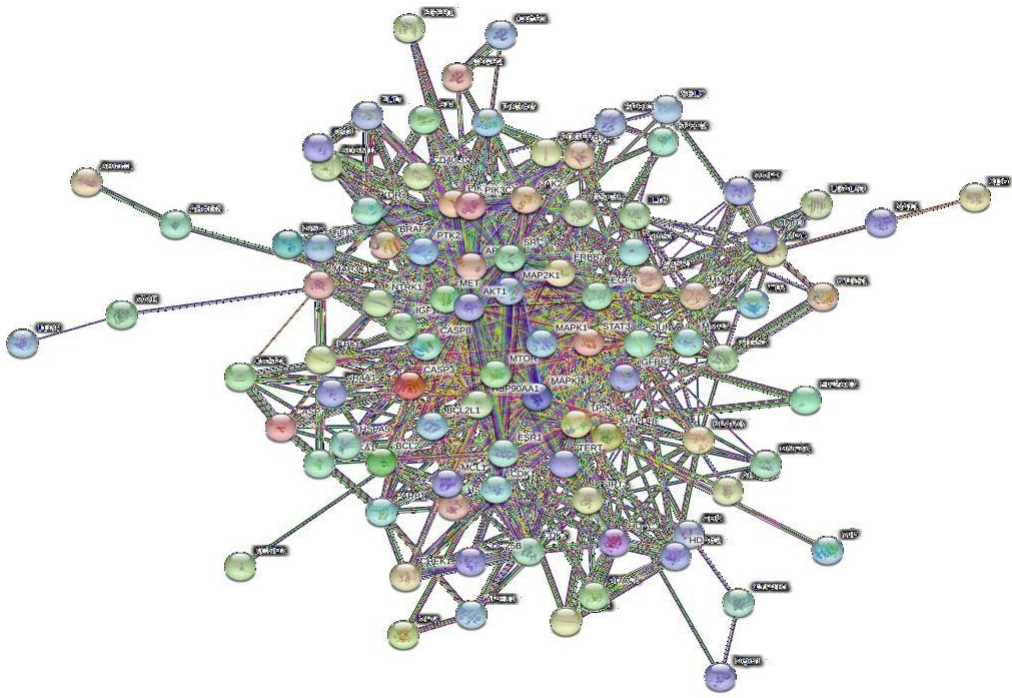


图 2 决明子蒽醌类成分与疾病靶点的 PPI 网络

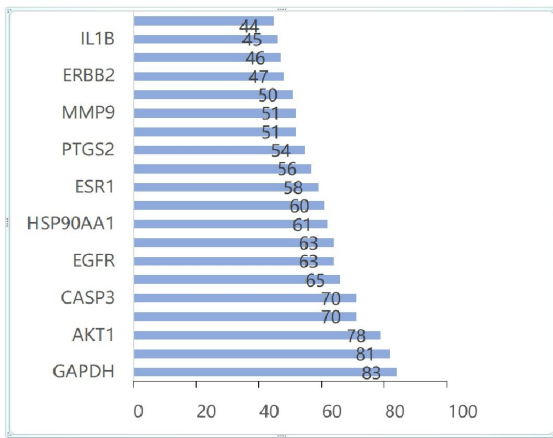


图 3 PPI 中 degree 值较高的靶点

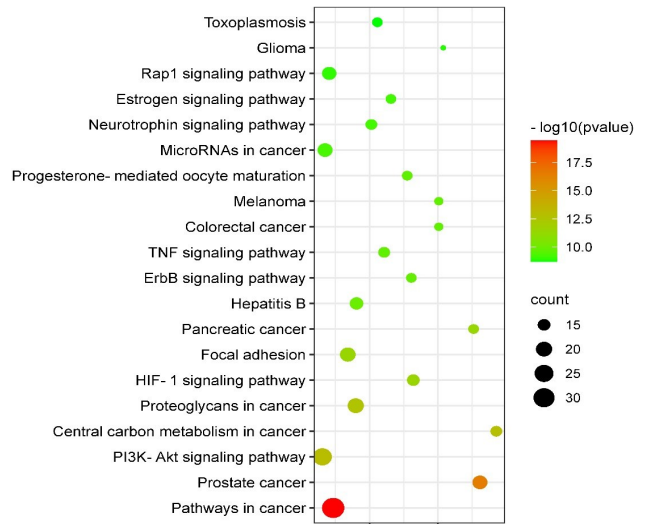


图 5 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

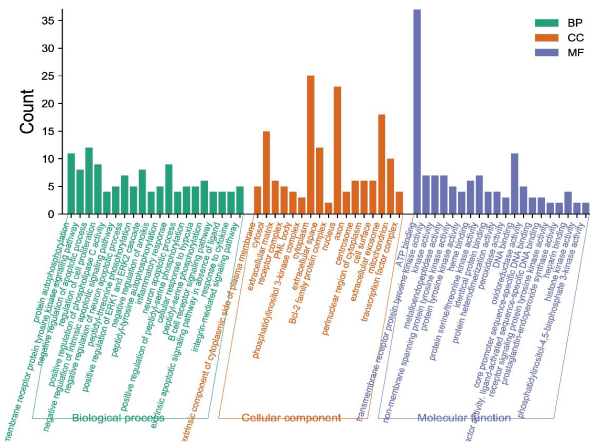


图 4 关键靶点的 GO 富集分析

2.5 化学成分-靶点蛋白-通路网络的构建 利用 Gephi 0.9.2 软件构建活性成分-靶点蛋白-通路网络(见图 7)。在网络交互中,存在 154 个节点,881 条边,点表示药物、疾病、靶点、成分和通路,边表示彼此的交互。基于网络模型图,初步探索疾病中活性成分和靶点的作用。

2.6 分子对接结果 利用 SYMBL 软件,将 PPI 网络中排名前十的核心靶点与其对应的化学成分进行分子对接,并通过 Total Score 值评价靶点与化学成分的结合能力,Total Score 值>5,表明该成分分子与相应蛋白靶点有较强的相互作用,Total Score 值>7 则表明

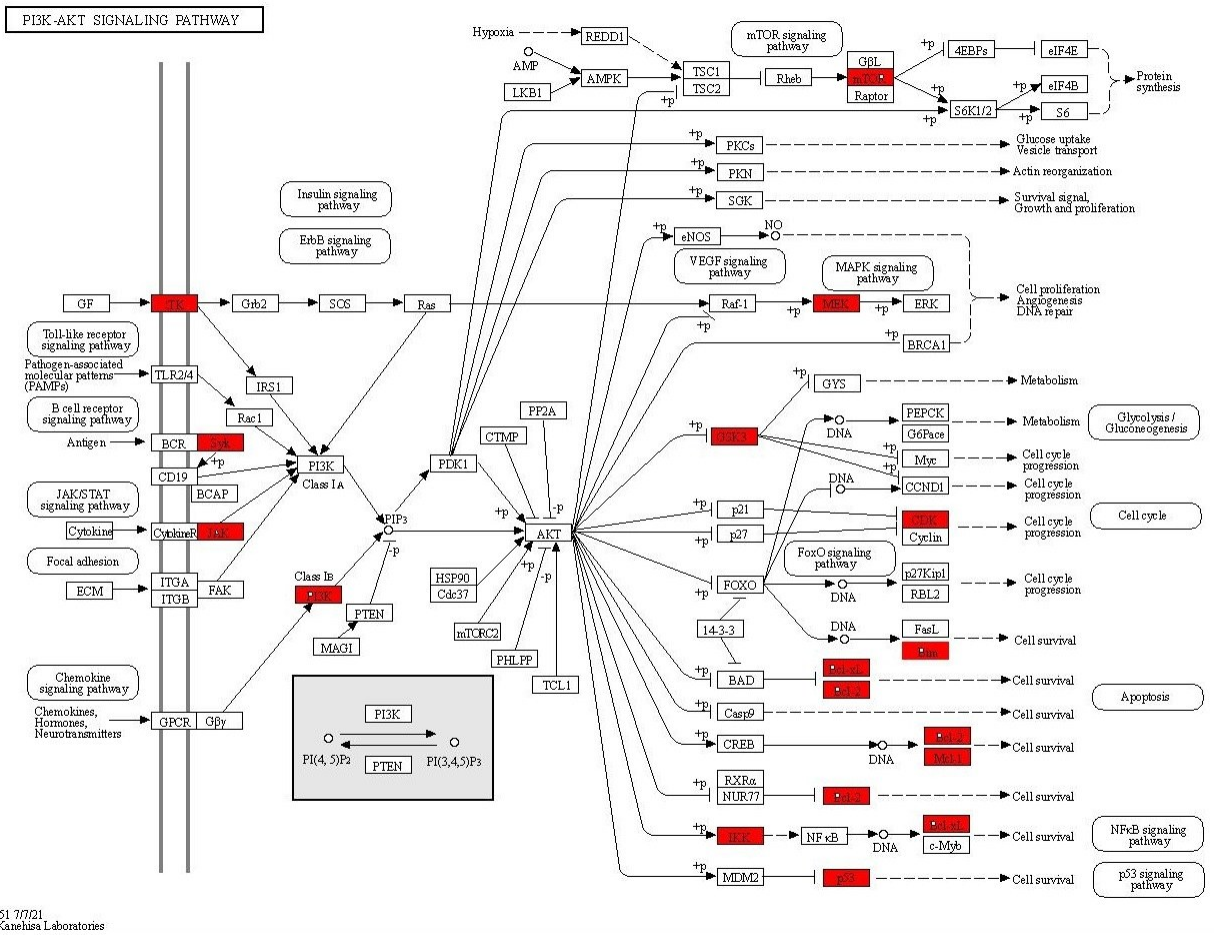


图 6 PI3K-Akt 信号通路

04151 70721
(c) Kanehisa Laboratories

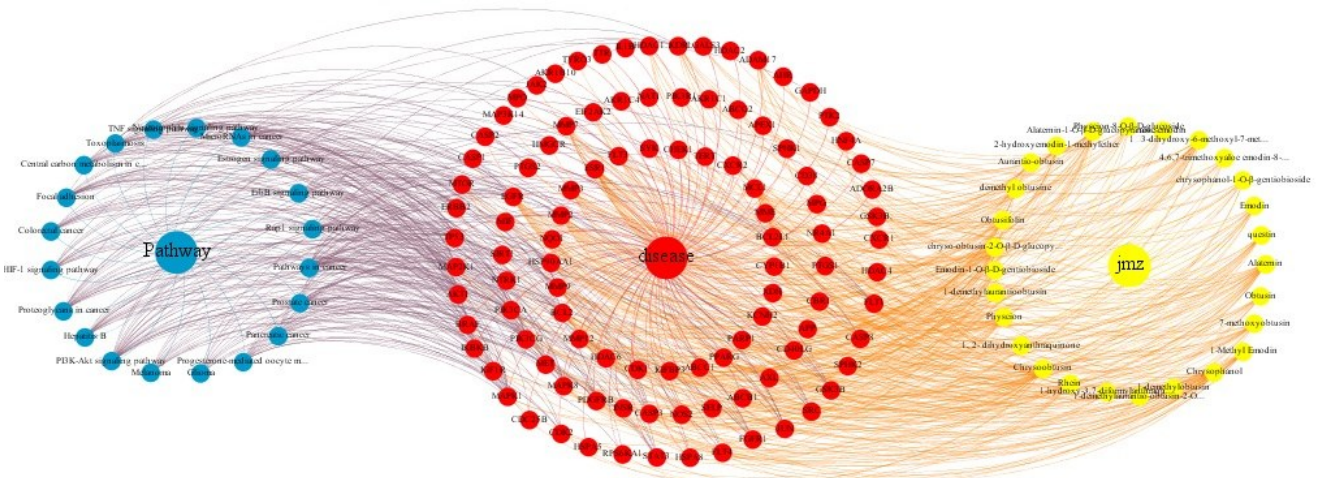


图 7 决明子蒽醌类成分(黄色)-靶点(红色)-通路(蓝色)网络

成分与靶点的相互作用强烈^[14]。对接结果显示,决明子蒽醌类成分 Alatemin-1-O-β-D-glucoovranoside 与 AKT1 有较好的结合能力,4,6,7-三甲氧基芦荟大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与 MAPK1 有较好的结合活性,1-去甲基钝叶决明素与 EGFR 有较好的结合活性,通过 PyMol 绘制其靶点与成分分子对接模式图进

行分析。Alatemin-1-O-β-D-glucoovranoside-AKT1 通过 Ser-205 氨基酸残基发挥作用(见图 8),4,6,7-三甲氧基芦荟大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷-MAPK1 的结合位点为 Lys-54、Gln-105、Ser-153、Lys-151 氨基酸残基(见图 9),1-去甲基钝叶决明素与 EGFR 结合位点为 Lys-721、Met-769 氨基酸残基(见图 10)。

参考文献:

- [1] 于乐成,茅益民,陈成伟. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 实用肝脏病杂志,2017,20(2):257-274.
- [2] BJÖRNSSON E, OLSSON R. Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database[J]. *Dig Liver Dis*,2006,38(1):33-38.
- [3] 郑艺兰,金海燕. 药物性肝损伤的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(21):162-163,168.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:152.
- [5] 杨冰,任娟,秦昆明,等. 决明子药理作用及其机制研究进展[J]. 中药材,2018,41(5):1247-1251.
- [6] 樊启猛,杨岩涛,肖美凤,等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究[J]. 中草药,2019,50(17):4200-4208.
- [7] 姬蕾. 中药决明子和钩藤的质量控制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2019.
- [8] 徐义龙. 决明子化学成分及炮制对其影响研究[D]. 北京:中国中医科学院,2014.
- [9] QE Q, CHEN L, TANG M, et al. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology[J]. *Eur J Pharmacol*,2018,833:50-62.
- [10] SABBAH D A, HAJJO R, SWEIDAN K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*,2020,20(10):815-834.
- [11] NICHOLLS C, LI H, LIU J P. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2012,39(8):674-679.
- [12] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 Isoforms Play Distinct Roles in Regulating the Development of Inflammation and Fibrosis Associated with Alcoholic Liver Disease [J]. *Cells*,2019,8(11):1337.
- [13] HILLMER E J, ZHANG H Y, LI H S, et al. STAT3 signaling in immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2016,31:1-15.
- [14] 邓桂珠,林捷欣,吴纯伟,等. 复方脑脉通治疗缺血性脑中风多靶点作用的分子对接[J]. 中成药,2016,38(8):1673-1678.
- [15] 罗先钦,徐晓玉,黄崇刚,等. 决明子总蒽醌对酒精性脂肪肝大鼠肝组织脂质过氧化与 PPAR- γ 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(12):1654-1659.
- [16] 田立元. 决明子的不同提取物及炮制品对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2008,19(8):2005-2006.
- [17] DONG X D, FU J, YIN X B, et al. Cassiae semen: A review of its phytochemistry and pharmacology (Review) [J]. *Mol Med Rep*,2017,16(3):2331-2346.
- [18] 蒲加伟,杨雄,吴余,等. 决明子总蒽醌对脂多糖诱导大鼠急性肝损伤的作用及其机制探讨[J]. 中国现代医学杂志,2020,30(20):6-11.
- [19] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 Isoforms Play Distinct Roles in Regulating the Development of Inflammation and Fibrosis Associated with Alcoholic Liver Disease [J]. *Cells*,2019,8(11):1337.
- [20] NIE Y J, HU Y D, YU K K, et al. Akt1 regulates pulmonary fibrosis via modulating IL-13 expression in macrophages[J]. *Innate Immun*,2019,25(7):451-461.
- [21] CHEN J, LIANG J, LIU S H, et al. Differential regulation of AKT1 contributes to survival and proliferation in hepatocellular carcinoma cells by mediating Notch1 expression[J]. *Oncol Lett*,2018,15(5):6857-6864.
- [22] XIAO Y Z, LIU H, YU J J, et al. MAPK1/3 regulate hepatic lipid metabolism via ATG7-dependent autophagy [J]. *Autophagy*,2016,12(3):592-593.
- [23] WANG H H, KE J, GUO Q N, et al. Long non-coding RNA CRNDE promotes the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through miR-217/MAPK1 axis [J]. *J Cell Mol Med*,2018,22(12):5862-5876.
- [24] KOMPOSCH K, SIBILIA M. EGFR Signaling in Liver Diseases [J]. *Int J Mol Sci*,2015,17(1):30.
- [25] CHOUDHURY A, BULLOCK D, LIM A, et al. Inhibition of HSP90 and Activation of HSF1 Diminish Macrophage NLRP3 Inflammasome Activity in Alcohol-Associated Liver Injury [J]. *Alcohol Clin Exp Res*,2020,44(6):1300-1311.
- [26] ZHANG Z, YAO L, YANG J H, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. *Mol Med Rep*,2018,18(4):3547-3554.
- [27] 谷雪,付文娟,孙芳初,等. PI3K/Akt 信号通路及放射性肝损伤的关系研究[J]. 解放军预防医学杂志,2018,36(12):1581-1584.
- [28] 钟景斌,刘文彬,王晖. 基于网络药理学探讨溪黄草黄酮类成分对酒精性肝病的作用机制[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(4):667-675.

收稿日期:2021-11-24;修回日期:2022-01-10