

本文引文格式:季雨彤,汪欣蕊,李欣彤,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨丹红注射液治疗肺纤维化的作用机制[J].右江民族医学院学报,2024,46(1):32-36.

【论著与临床报道】

基于网络药理学和分子对接技术探讨丹红注射液治疗肺纤维化的作用机制

季雨彤¹,汪欣蕊¹,李欣彤¹,於蔚¹,曾文婕¹,武琦²

(1. 徐州医科大学第一临床医学院,江苏 徐州 221004;

2. 徐州医科大学生理学教研室,江苏 徐州 221004)

摘要:目的 利用网络药理学和分子对接技术,探讨丹红注射液防治肺纤维化的作用靶点。方法 通过 TCMSP 数据库检索丹参和红花的有效成分,将各有效成分带入 TCMSP 数据库和 Swiss TargetPrediction 数据库获得有效成分的作用靶点,从 GeneCards 数据库获取肺纤维化的治疗靶点,把成分靶点和疾病靶点交集后,使用 String 数据库构建蛋白互作网络(PPI)并分析。利用 R 软件进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。最后通过 AutoDock 软件对核心成分和靶点进行分子对接。结果 共获得 172 个交集靶点,GO 富集分析显示对外源性刺激的反应、炎症反应、凋亡过程的负调控等可能参与到丹红注射液治疗肺纤维化进程。KEGG 富集分析显示丹红注射液治疗肺纤维化的信号通路主要集中于 10 条,其中脂质和动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪切力与动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)这 3 条通路最为关键。分子对接结果显示,丹红注射液的关键成分木犀草素(luteolin)和丹参酮 IIA(tanshinone IIA)可与核心靶点 EGFR、SRC 匹配。结论 通过网络药理学及分子对接的方法,找到了丹红注射液治疗肺纤维化的可能潜在靶点,预测了其发挥药理作用的关键通路。

关键词:肺纤维化;丹红注射液;丹参酮 IIA;木犀草素;分子对接

中图分类号:R563 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2024)01-0032-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.01.006

Investigating the mechanism of Danhong Injection in the treatment of pulmonary fibrosis through network pharmacology and molecular docking technology

Ji Yutong¹, Wang Xinrui¹, Li Xintong¹, Yu Wei¹, Zeng Wenjie¹, Wu Qi²

(1. The First School of Clinical Medicine, Xuzhou Medical University,

Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 2. Department of Physiology,

Xuzhou medical university, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To explore the action targets of Danhong Injection in preventing and treating pulmonary fibrosis utilizing network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** Effective components of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Honghua (*Carthamus tinctorius*) were retrieved from the TCMSP database. The action targets of these components were obtained from the TCMSP database and the Swiss TargetPrediction database. Treatment targets for pulmonary fibrosis were retrieved from the GeneCards database. After obtaining the intersection of component targets and disease targets, a protein-protein interaction network (PPI) was constructed using the String database to be analyzed. The R software was used to conduct Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses. Subsequently, the AutoDock software was utilized for the molecular docking of core components and targets. **Results** A total of

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82104624);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(21KJB320003);江苏省高校大学生创新创业重点项目(202210313048Z)

第一作者:季雨彤,大学生,研究方向:肺纤维化的药物治疗,E-mail:269763277@qq.com

通讯作者:武琦,博士,讲师,硕士研究生导师,研究方向:肺纤维化的药物治疗,E-mail:wuqi@xzhmu.edu.cn

172 intersecting targets were obtained, GO enrichment analysis revealed potential involvement of the response to exogenous stimuli, inflammatory response, and negative regulation of apoptosis process in the treatment of pulmonary fibrosis with Danhong Injection. Furthermore, KEGG enrichment analysis showed that the signaling pathways involved in treating pulmonary fibrosis with Danhong Injection were mainly concentrated in 10 pathways, with lipid and atherosclerosis, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, and fluid shear stress and atherosclerosis being the most critical. The molecular docking results showed that the key components of Danhong Injection, luteolin and Tanshinone IIA, could match with the core targets EGFR and SRC. **Conclusion** Through network pharmacology and molecular docking technology, potential targets for Danhong Injection in treating pulmonary fibrosis were identified, and key pathways for its pharmacological effects were predicted.

Key words: pulmonary fibrosis; Danhong Injection; Tanshinone IIA; Luteolin; molecular docking

肺纤维化是一类进行性、不可逆的肺间质疾病。其发病机制主要包括肺泡上皮细胞损伤、成纤维细胞大量增殖并伴有胶原沉积^[1]。有研究表明,经确诊后,肺纤维化患者的 5 年生存率仅为 20%~30%。目前对于肺纤维化的治疗手段极其有限,除肺移植外,临床上缺少有效的治疗药物^[2-3]。在全球范围内,吡菲尼酮和尼达尼布为目前推荐的治疗肺纤维化的药物,二者虽然在一定程度上能够延缓特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF),但其价格昂贵,且存在胃肠道反应、肝损伤、出血等不良反应^[4]。因此寻找安全有效地治疗肺纤维化的药物非常重要。

丹红注射液是丹参、红花两味中药经过提取制成的注射剂。红花性温、味辛,具有活血化瘀、通经止痛等作用;丹参性微寒、味苦,具有通经止痛、活血祛瘀、凉血消痛、舒心清烦功效,目前已经应用于各个系统的疾病^[5]。一项 Meta 分析结果显示:在西药治疗的基础上,加用丹红注射液可改善 IPF 患者的肺功能,提高生活质量,且安全性较高^[6]。但目前对于丹红注射液在肺纤维化中的作用机制尚未明确。本研究使用生物信息学及分子对接的方法探讨丹红注射液治疗肺纤维化的作用机制,以期对肺纤维化的治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 丹参和红花的有效成分筛选 检索中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),分别查询丹参和红花的有效成分。以口服生物利用度(OB)≥30%且类药性(DL)≥0.18 作为筛选的标准,分别得到丹参和红花的有效成分,然后将每个有效成分分别输入到用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行确认。

1.2 筛选有效成分的作用靶点 分别将丹参和红花的有效成分输入到 TCMSP 数据库、Swiss TargetPrediction 数据库(<http://stitch.embl.de/>)得到药物有

效成分的作用靶点,并将靶点导入通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行转化处理。

1.3 筛选疾病靶点 以“pulmonary fibrosis”为检索词,在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)数据库中,检索与肺纤维化关系密切的靶基因。在 GeneCards 数据库中,Relevance score 代表基因与疾病间联系的密切程度,数值越大表明关系越密切。选择 Relevance score>5 的相关靶基因作为肺纤维化疾病靶点。

1.4 确定药物—有效成分—疾病靶点 将丹参和红花活性成分所对应的靶点与肺纤维化所对应的靶点取交集后,得到共有的靶点。并使用 R 软件绘制出 Venn 图。

1.5 交集靶点的蛋白—蛋白相互作用网络构建 将交集靶点导入到 String 数据库中,选定物种为人类“Homo sapiens”,对交集靶点进行蛋白质—蛋白质相互作用(PPI)的网络构建。将 PPI 结果导入 R 软件,绘制 Barplot 图,并找排名前 30 位基因。

1.6 富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析,选择种属为“homo sapiens”,计算的结果以 Count 和 P-value 值进行展示,用 R 软件绘制出气泡图。

1.7 分子对接 将核心靶点蛋白和丹红的主要有效成分进行分子对接。首先,分别在 PDB 数据(<http://www.rcsb.org/>)和 ZINC 数据库(<https://zinc.docking.org/>)中下载相关蛋白和有效成分 3D 结构,使用 AutoDock 软件进行加氢、调整电荷等处理,并进行分子对接,计算对接的结合能,并对接后文件保存成 PD-BQT 格式文件,用 Discovery Studio 软件转换为 PDB 格式文件,最后导入 Pymol 软件绘制图片。

2 结果

2.1 药物—有效成分—疾病靶点 通过检索 TCMSP 平台检索丹参和红花有效成分,然后分别将有效成分输入到 TCMSP 数据库、Swiss Target Prediction 数

数据库,在去除重复结果后共得到药物靶点 383 个。此外,本课题组从 Gene Cards 数据库中找到与肺纤维化关系密切的靶点 1 708 个。利用 R 软件绘制韦恩图,并得到交集靶点 172 个,这 172 个靶点就是丹红注射液治疗肺纤维化的潜在靶点,见图 1。

2.2 交集靶点 PPI 网络互作 将丹红注射液治疗肺纤维化的 172 个交集靶点基因导入到 String 数据库中,以构建 PPI 互作网络,并下载相关数据,将数据导入 R 软件绘制 Barplot 图,并找出 degree 值最高的前 30 个基因,其中排前五位的为 SRC、EGFR、PTGS2、MMP9、APP,见图 2。

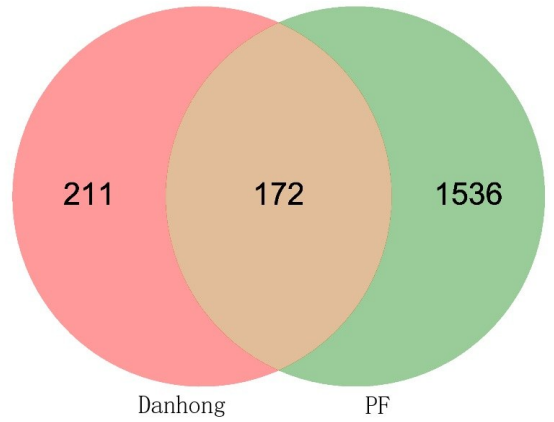
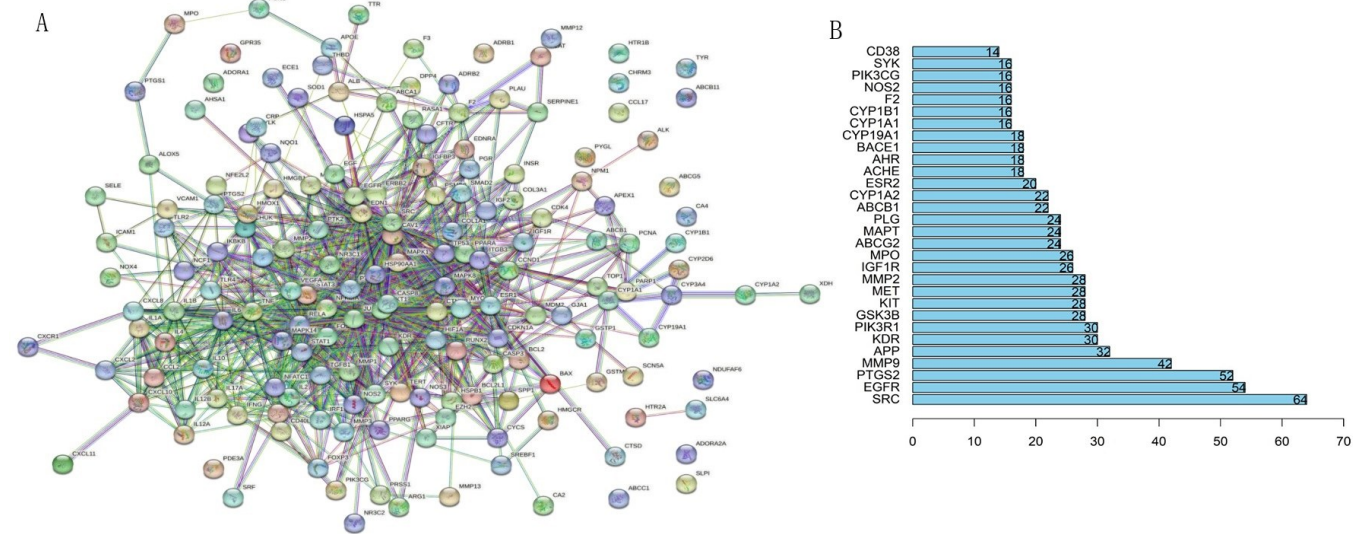


图 1 药物—有效成分—疾病靶点韦恩图



注:A. PPI 网络互作图;B. Barplot 图展示前 30 个核心靶点。

图 2 丹红注射液治疗肺纤维化交集靶点 PPI 网络互作

2.3 GO 富集分析 为预测丹红注射液治疗肺纤维化可能的作用机制,将 172 个潜在靶点进行 GO 富集分析,分别从生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 个层面进行分析。如图 3 所示,在 BP 层面,主要涉及到对外源性刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus)、炎症反应 (inflammatory response)、凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process) 等生物学进程;在 CC 方面,主要涉及到细胞表面 (cell surface)、胞外区域 (extracellular region)、大分子复合物 (macromolecular complex) 等细胞功能的变化;在 MF 方面,涉及到酶结合 (enzyme binding)、同种蛋白结合 (identical protein binding)、蛋白质结合 (protein binding) 等机制。

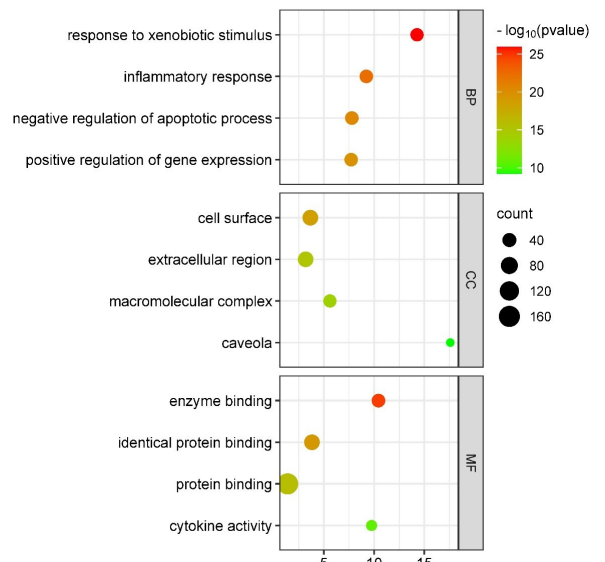


图 3 GO 富集分析结果

2.4 KEGG 富集分析 为了解丹红注射液治疗肺纤维化可能的信号通路,本课题组将 172 个潜在靶点进行 KEGG 富集通路分析,如图 4 所示,潜在靶点主要集中到 10 条信号通路上。其中在脂质和动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)富集到了 47 个靶点,糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)富集到了 36 个靶点,流体剪切力与动脉粥样硬化途径(fluid shear stress and atherosclerosis)富集到了 38 个靶点。这 3 条信号途径可能在其中发挥着关键的作用。

2.5 分子对接 为明确丹红注射液主要成分与肺纤维化关键蛋白是否能够有效地对接,本课题组利用 AutoDock 软件和 Pymol 软件对 EGFR、SRC 与木犀草素和丹参酮 IIA 进行分子对接,计算结合能。结合能越低,表明稳定性越好。图 5 结果显示,木犀草素、丹参酮 IIA 可以很好地与 EGFR、SRC 进行对接,结合能均 < -5 kcal/mol。

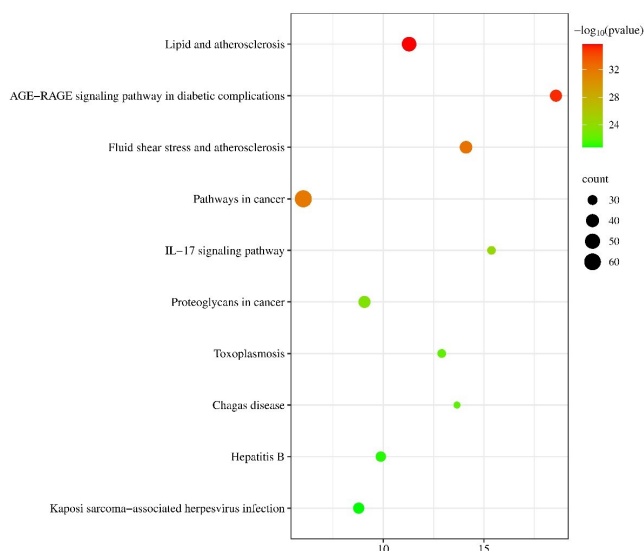
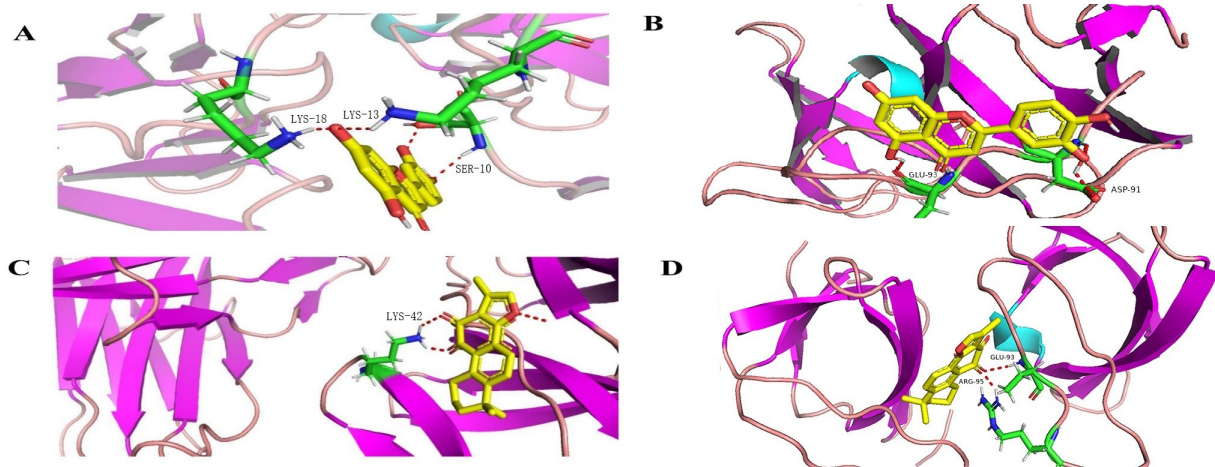


图 4 KEGG 富集分析结果



注:A. 木犀草素与 EGFR 分子对接图;B. 木犀草素与 SRC 分子对接图;
C. 丹参酮 IIA 与 EGFR 分子对接图;D. 丹参酮 IIA 与 SRC 分子对接图。

图 5 重要活性成分—关键靶点分子对接可视化

3 讨论

本研究通过检索 TCMSMP 数据库得到丹参和红花的主要有效成分,根据有效成分检索相应的药物数据库得到成分靶点,然后将肺纤维化的疾病靶点进行交集靶点 172 个,这 172 个靶点就是丹红注射液治疗肺纤维化的潜在靶点。在所得到的 172 个作用靶点中,通过 PPI 网络互作得出 SRC、EGFR、PTGS2、MMP9、APP 等几个关键的靶点可能在其中起着关键的作用。

SRC 是 SRC 家族激酶成员, SRC 激酶家族共包含 9 个成员,其中 SRC 是其中的核心成员^[7]。目前的研究发现^[8], SRC 是调节多种生化级联反应的关键点,一方面能够将胞外信号转入胞内,另一方面还可将信号在胞内进行传递,在调节细胞增殖,参与氧化应激

反应中活性氧生成,调节血管生成等方面有重要的作用。有学者研究发现,二氧化硅(SiO_2)能够诱导肺巨噬细胞活化促进矽肺中的淋巴管生成,其中 SRC/eNOS 在其中发挥着关键的调节作用^[9]。另有学者通过网络药理学预测发现,杨梅酮、川芎内酯、川芎嗪等作为川芎的核心活性成分可能主要通过 SRC 等蛋白发挥抗肺纤维化的作用,这还需要实验进行进一步的证实^[10]。

表皮生长因子受体(EGFR)广泛存在于上皮细胞细胞膜上,属于受体型酪氨酸蛋白激酶,是细胞内段具有酪氨酸激酶活性的一类跨膜受体^[11]。EGFR 被激活后可引发胞内域形成酪氨酸激酶活性,并进一步激活下游的细胞信号转导通路,参与相应的细胞功能调

节^[12]。EGFR在肺纤维化中的作用已经得到证实,目前许多研究表明EGFR与肺纤维化过程中成纤维细胞增殖活化和EMT过程有关^[13]。有研究发现^[14],EGFR磷酸化后参与了胶原蛋白合成,进而加快了肺纤维化进展。另有研究发现,EGFR激活后加快了肺泡上皮细胞发生EMT,使成纤维细胞数量大大增加。

在GO富集分析中,发现细胞对包括炎症、凋亡等外界刺激的反应、细胞表面和胞外区域结构的变化以及蛋白质结合等分子功能的变化均可能参与其中。在KEGG富集分析中,主要富集在脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、流体剪切力与动脉粥样硬化途上。

为进一步分析丹红注射液与关键靶点的结合作用,本课题组分别选择红花和丹参的两个关键的有效成分luteolin和丹参酮IIA使用分子对接的方法初步测试了这些关键靶点和EGFR、SRC的亲合力。结果显示结合能力均较好,因此表明丹红注射液关键有效成分能够与关键靶点很好的结合发挥治疗肺纤维化的作用。

参考文献:

[1] TANNI S E, FABRO A T, DE ALBUQUERQUE A, et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2021, 15(6): 791-803.

[2] WAKWAYA Y, BROWN K K. Idiopathic pulmonary fibrosis: epidemiology, diagnosis and outcomes[J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(5): 359-369.

[3] SAVIN I A, ZENKOVA M A, SEN'KOVA A V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: molecular mechanisms, relevant in vivo models, prognostic

and therapeutic approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14959.

- [4] SALISBURY M L, WIJSENBEK M S. Management of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Clin Chest Med*, 2021, 42(2): 275-285.
- [5] 王硕, 何俗非, 翟静波, 等. 丹红注射液药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(3): 128-131.
- [6] 王晶, 何海浪, 周贤梅. 丹红注射液治疗特发性肺纤维化的Meta分析[J]. *中成药*, 2019, 41(11): 2655-2662.
- [7] 张浩, 赵琦, 李晓强, 等. SRC家族激酶抑制剂PP2对大鼠膝关节炎的治疗作用[J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(3): 373-378.
- [8] 王琴, 刘力, 乐意, 等. Src激酶抑制剂研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2021, 31(4): 312-319.
- [9] 张劲松. VEGF-C通过Src/eNOS通路介导矽肺淋巴管生成分子机制研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2022.
- [10] 林郭健, 王浩然, 夏雪宜. 基于网络药理学与分子对接研究川芎改善特发性肺纤维化的分子机制[J/OL]. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2023(6): 1-15.
- [11] 鲁葆华, 李琨, 张婵, 等. 老年EGFR突变非小细胞肺癌耐药后PD-1抑制剂免疫治疗37例临床分析[J]. *临床肺科杂志*, 2023, 28(11): 1716-1722.
- [12] 杨伟源, 李理, 郑林鑫, 等. EGFR/Foxo3a/Snail1通路在博来霉素肺纤维化小鼠中的作用机制探讨[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2020, 19(4): 371-378.
- [13] 蔡琳, 李理, 方春生, 等. EGFR对博来霉素诱导小鼠肺纤维化中上皮-间质转分化的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(4): 638-641, 709.
- [14] 肖雪. 基于TGF- β 1介导的Smad3和EGFR-ERK1/2信号通路探讨黄芪注射液对特发性肺纤维化的抑制作用及机制[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.

收稿日期: 2023-10-30; 修回日期: 2023-11-16