

Snake Venom-Treating Mechanisms of *Polygonum perfoliatum* L. Based on Network Pharmacology

Jincheng Du^{1,2}, Hao Xiao¹, Gangjun Du²

¹Chinese Medical School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha Hunan

²Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng Henan

Email: 10200029@vip.henu.edu.cn

Received: Jun. 19th, 2020; accepted: Jul. 6th, 2020; published: Jul. 13th, 2020

Abstract

Objective: To analyze the possible mechanisms of *Polygonum perfoliatum* L. for snake venom treatment and provide a reference for revealing its value in snake venom treatment. **Methods:** Effective components from *Polygonum perfoliatum* L. were indexed in Shanghai Institute of Organic Chemistry-Chinese Medicine Effective Components Database (SIOC-CMECD) and selected based on drug-likeness (DL) > 0.18 by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Each Simplified Molecular Input Line Entry System (SMILES) of effective components was downloaded from PubChem database, and their target proteins were predicted by Swiss Target Prediction and STITCH web servers. Compared with anti-snake venom-related gene in GeneCards database, the target proteins of *Polygonum perfoliatum* L. treating snake venom were obtained. STRING was used to construct protein-protein interaction networks, the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID) was used to annotate gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway, and Cytoscape software was used to construct compounds-targets-pathways network of *Polygonum perfoliatum* L. treating snake venom. **Results:** The predicted results showed that 12 active components exhibited good drug-like properties, 17 target proteins of *Polygonum perfoliatum* L. treating snake venom were involved in 19 KEGG pathways and 56 GO biological process, and ELANE, PTGS2, HMOX1, MMP2, LYN, CASP8, STAT1, CASP9, TP53 were core targets. **Conclusion:** *Polygonum perfoliatum* L. has the advantages of multi-components, multi-targets, and multi-pathways in snake venom treatment, and has the possibility to be developed for snake venom medicine.

Keywords

Polygonum perfoliatum L., Snake Venom, Effective Components, Therapeutic Targets, Network Pharmacology

基于网络药理学研究杠板归 (*Polygonum perfoliatum* L.) 抗蛇毒的作用机制

杜金城^{1,2}, 肖浩¹, 杜钢军²

¹湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙

²河南大学药学院药物研究所, 河南 开封

Email: 10200029@vip.henu.edu.cn

收稿日期: 2020年6月19日; 录用日期: 2020年7月6日; 发布日期: 2020年7月13日

摘要

目的: 分析杠板归抗蛇毒的可能作用机制, 为揭示其抗蛇毒价值提供参考。方法: 采用上海有机所化学专业数据库获取杠板归化学成分, 在TCMSP数据库中根据化合物类药性(DL) > 0.18标准对有效成分进行筛选。利用PubChem数据库下载有效成分SMILES格式, 通过Swiss Target Prediction和STITCH数据库得到预测靶点。于GeneCards数据库中获取蛇毒相对应的靶标基因, 与预测靶点对比获取杠板归抗蛇毒靶基因, 运用STRING构建蛋白质间相互作用网络, DAVID进行GO和KEGG富集分析, Cytoscape构建杠板归对蛇毒作用的“化合物-靶点-通路”网络图。结果: 类药性DL > 0.18筛选出杠板归12种有效活性成分, 涉及抗蛇毒靶点17个, 其中核心靶点是ELANE, PTGS2, HMOX1, MMP2, LYN, CASP8, STAT1, CASP9, TP53, 参与19KEGG通路和56个生物过程。结论: 杠板归对蛇毒有多成分-多靶点-多途径治疗优势, 有开发为蛇毒治疗药物的可能性。

关键词

杠板归, 蛇毒, 活性成分, 治疗靶点, 网络药理学

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

我国已知的毒蛇近 54 种, 其中有剧毒的有 10 余种, 每年蛇伤患者近 10 万人次, 近年来, 随着毒蛇在市场上大量售卖, 饭店及家庭与其接触机会明显增多, 一年四季均有蛇咬事件发生[1]。蛇毒的主要化学成分是酶、神经毒性多肽、神经生长因子和膜活性多肽[2]。它们通过阻断神经-肌肉接头的传递, 引起骨骼肌松弛性瘫痪和呼吸肌麻痹; 水解各种磷脂类, 增加红细胞膜的通透性, 引起血管内溶血; 使细胞膜的通透性改变, 造成细胞破坏和组织坏死。目前治疗蛇毒主要采用抗毒血清中和蛇毒素, 中药在抗蛇毒方面有悠久的历史, 主要通过提高人体的解毒功能发挥作用, 综合优势明显, 对多种蛇毒素均有效果, 尤其适用于未知种类毒蛇咬伤[3]。

杠板归(*Polygonum perfoliatum* L.)为多年生草本蓼科属植物, 又名蛇不过、河白草、老虎刺等, 广泛分布于全国各地[4]。据本草文献记载, 杠板归“味酸, 入肺和小肠经”, 功能清热解毒, 祛痰止咳, 利湿肿, 散瘀止血, 主治痈肿疔疮, 丹毒, 喉痹, 瘰疬, 黄疸, 痢疾等, 也治跌打损伤, 毒蛇咬伤[5]。明代龚廷贤所著《万病回春》最早记载杠板归用于治疗蛇咬伤[6], 现代药理学研究发现, 杠板归具有抗菌、抗病毒、抗诱变、降血压、抗肿瘤、止血等作用[7], 临床应用有治疗咳嗽、细菌性痢疾、痔疮、烧伤、带状疱疹、急性肾炎、蛰伤等[8], 但其治疗蛇咬伤仅在上世纪七十年代中期赤脚医生杂志有一篇与算盘子根等中药一起外敷熏洗治疗 68 例毒蛇咬伤的报道。杠板归的主要化学成分为黄酮类、有机酸类、萜类、蒽醌类等, 目前分离鉴定出的化学成分约 130 余种[6], 为其临床应用提供了良好的物质基础。为给杠板归治疗蛇咬伤提供科学依据和研究指向, 本文采用网络药理学中药分析了其治疗蛇咬伤可能的有效成分和作用机制, 并构建了其治疗蛇咬伤的成分-靶点-通路网络。

2. 材料与方法

2.1. 分析平台与软件

1) 中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP (<http://isp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); 2) 上海有机所化学专业数据库-中药与有效成分数据库(http://www.chemcpd.csdb.cn/scdb/main/tcm_introduce.asp); 3) PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); 4) Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); 5) STITCH (<http://stitch.embl.de/>); 6) GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); 7) 蛋白质相互作用分析平台 STRING (<https://string-db.org/>); 8) 人类基因组注释数据库 DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>); 9) Omicshare 数据库(<http://www.omicshare.com/>); 10) 网络图形拓扑分析与编辑软件 Cytoscape。

2.2. 化学成分及靶点的获取

使用上海有机所化学专业数据库——中药与有效成分数据库收集杠板归的化学成分。根据中药的药理学特性, 利用 TCMSP 数据库筛选 $DL > 0.18$ 的化学成分。利用 PubChem 数据库下载有效成分 SMILES 格式, 通过 Swiss Target Prediction 和 STITCH 数据库在线预测化学成分靶点蛋白。

2.3. 关键靶基因筛选与分析

利用 GeneCards 数据库获取抗蛇毒靶标。将预测靶点与抗蛇毒靶标进行比对分析, 得到杠板归的蛇毒治疗靶点, 利用 STRING 平台构建靶蛋白之间的相互作用网络, 将结果以 TSV 格式导出, 将其导入 Cytoscape 3.2.1 软件, 利用 Network Analyzer 功能分析网络中的重要靶点, 构建 PPI 网络图。在网络中, 治疗靶点由节点表示, 两个节点之间相互作用由边相连表示。以节点 degree 值反映靶点大小, 并根据 degree 值筛出核心靶点。

2.4. 关键靶点生物功能注释及通路分析及可视化

使用生物学信息注释数据库 DAVID 在线进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并用 FDR 错误控制法($FDR < 0.05$)对 P 值作检验校正, 最终根据 $P < 0.05$ 筛选具有显著性差异的生物功能及过程。使用 Omicshare 数据库将筛选出的生物功能及过程结果在线绘制成气泡图。

2.5. 成分-靶点-通路相互作用网络的构建

利用 Cytoscape 3.2.1 软件, 以杠板归有效活性成分, 杠板归抗蛇毒作用靶点以及作用通路为节点 (node), 用 Merge 功能构建杠板归治疗蛇咬伤的成分-靶点-通路网络图。

3. 结果

3.1. 杠板归活性成分的筛选

通过 TCMSP 数据库检索的杠板归化学成分 27 个, 通过 $DL \geq 0.18$ 进一步筛选得到杠板归的潜在活性成分 12 个, 见表 1。

Table 1. Effective components from *Polygonum perfoliatum* L.

表 1. 杠板归活性成分

| 分子 ID | 分子名称 | 类药比 |
|-----------|-----------------|------|
| MOL000098 | quercetin | 0.28 |
| MOL000422 | kaempferol | 0.24 |
| MOL012811 | betulinic acid | 0.78 |
| MOL001551 | betulinic acid | 0.78 |
| MOL000511 | ursolic acid | 0.75 |
| MOL002298 | aloemodin | 0.24 |
| MOL000476 | physcion | 0.27 |
| MOL010584 | daucosterol | 0.6 |
| MOL000358 | beta-sitosterol | 0.75 |
| MOL000701 | quercitrin | 0.74 |
| MOL000354 | isorhamnetin | 0.31 |
| MOL004368 | hyperin | 0.77 |

3.2. 靶蛋白互作网络

利用 STRING 软件构建杠板归与蛇毒靶点的 PPI 网络, 图 1 中图中红色圆形代表蛇毒相关蛋白, 其他颜色圆形代表文本挖掘得出的相关蛋白, 黄色为核心靶点。线条的粗细与蛋白间的关联度成正比, 线条越粗, 关联度越大。

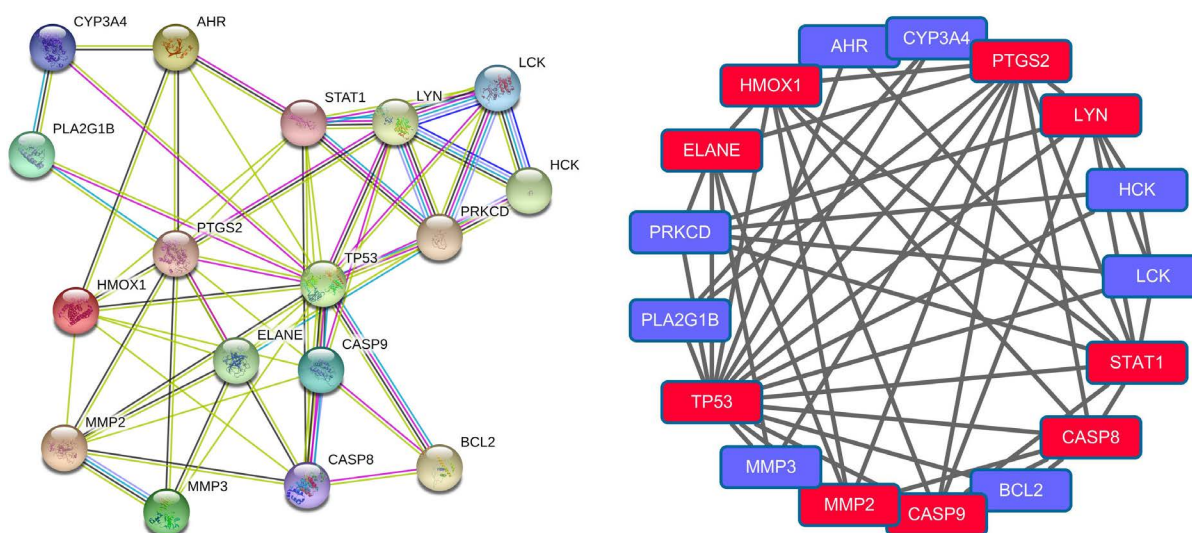


Figure 1. Protein-protein interaction network of *Polygonum perfoliatum* L. treating snake venom

图 1. 杠板归治疗蛇毒靶点蛋白相互作用网络图

3.3. GO 生物过程富集

GO 注释结果显示杠板归对蛇毒的 17 个靶标基因所富集的前 30 个生物学功能主要为“血小板活化”，“细胞凋亡”，“对有毒物质的反应”，“干扰素- γ 介导的信号通路”等，如图 2，表明杠板归可以通过参与调控多种生物学过程而发挥抗蛇毒作用。

KEGG 通路富集分析显示，杠板归对蛇毒的关键基因靶点主要富集的通路为“NF- κ B 信号通路”，“甲状腺激素信号通路”，“Fc γ R 介导的吞噬作用”等，如图 3。

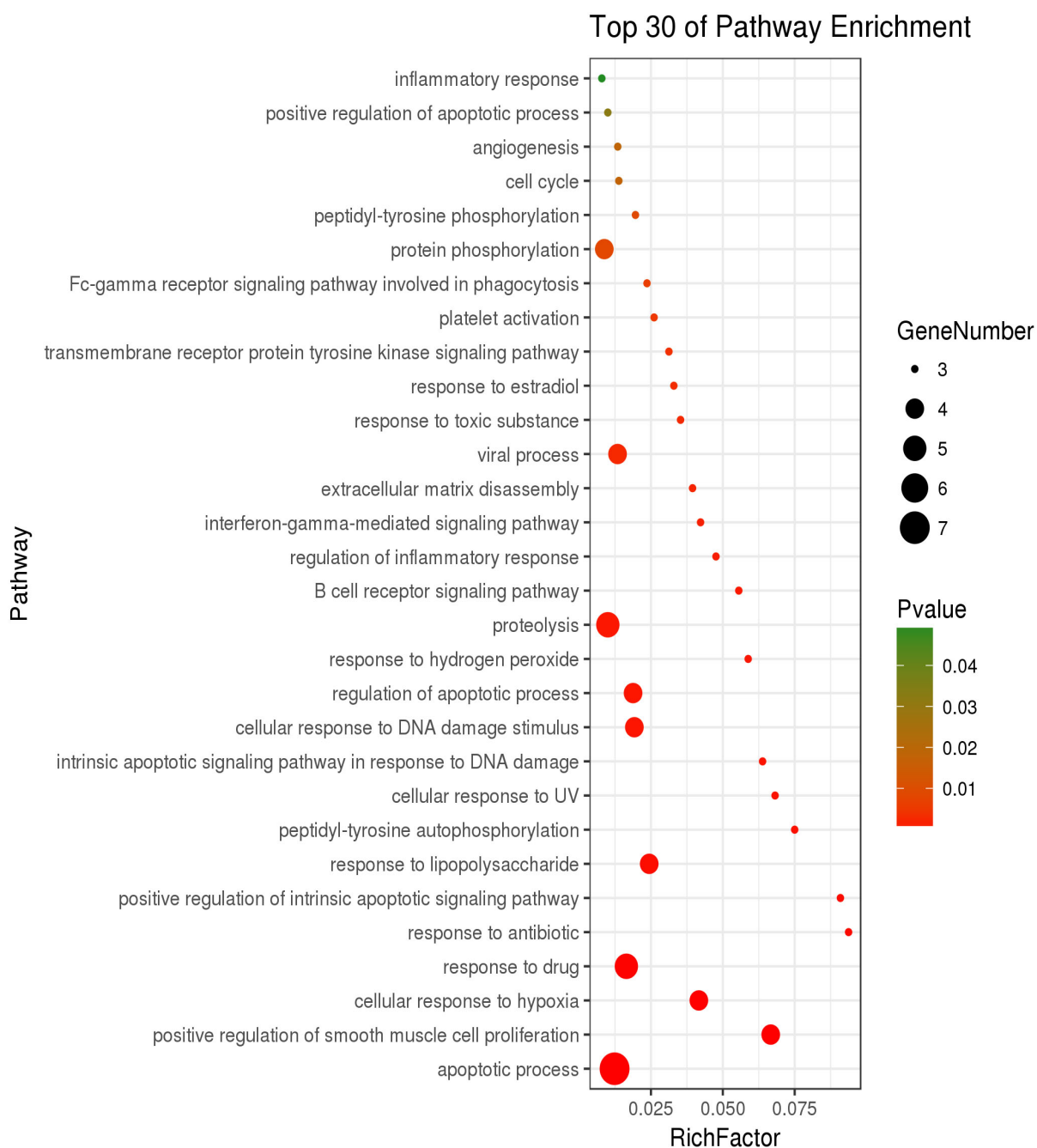


Figure 2. Biological process in GO enrichment analysis of snake venom-treating targets of *Polygonum perfoliatum* L.

图 2. 杠板归活性成分抗蛇毒关键靶点 GO 生物学过程富集分析

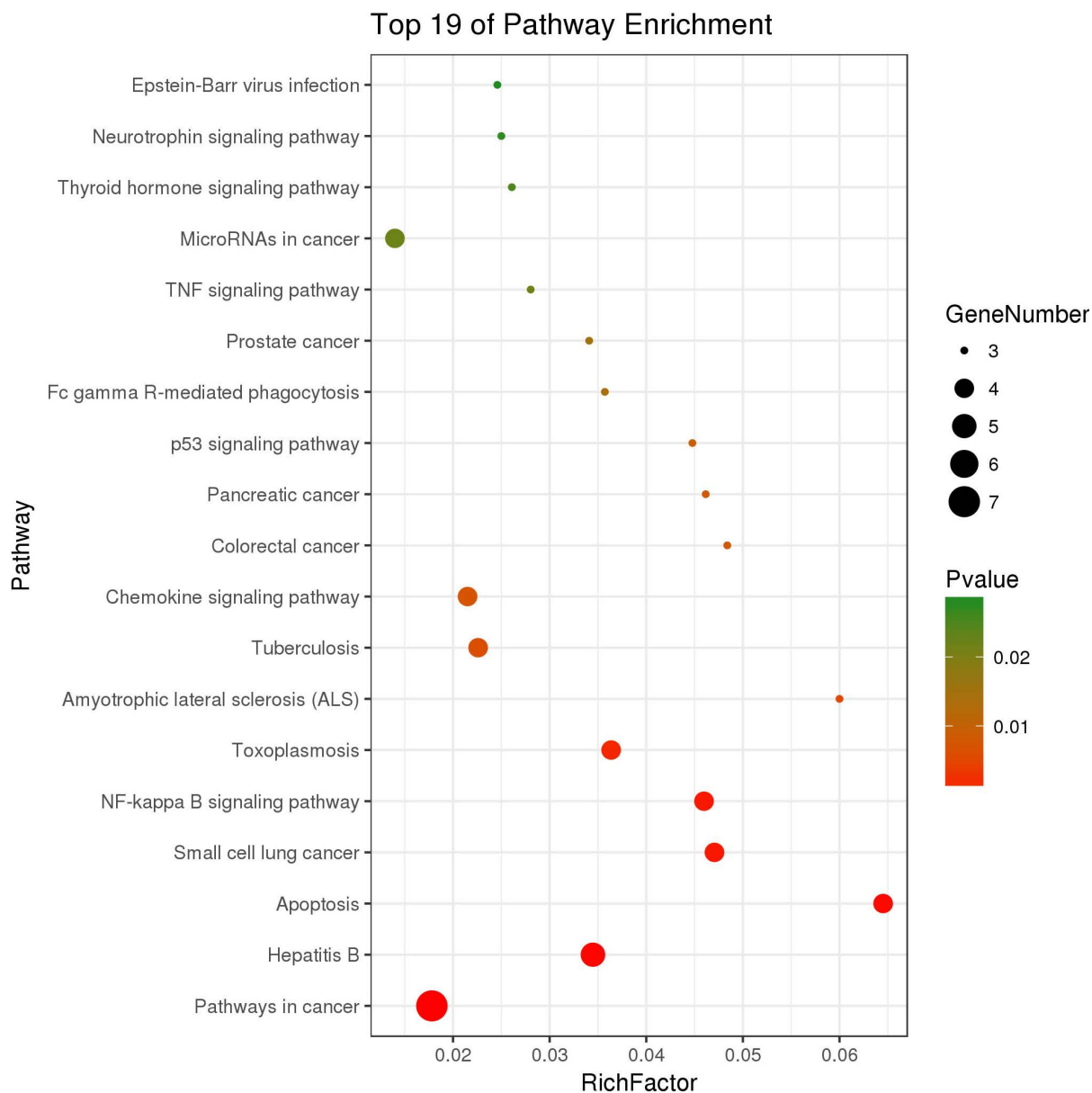


Figure 3. Signal pathway in KEGG enrichment analysis of snake venom-treating targets of *Polygonum perfoliatum* L.
图 3. 杠板归活性成分抗蛇毒关键靶点的 KEGG 信号通路富集分析

3.4. 成分 - 靶点 - 通路网络

将杠板归有效活性成分、杠板归对蛇毒作用靶点以及作用通路导入 Cytoscape 3.2.1 软件中共有节点 19 个，如图 4，直观地呈现了 12 个活性成分、13 个靶基因、19 条作用通路和蛇毒间的关联。其中紫色代表信号通路，红色代表杠板归抗蛇毒治疗靶点，蓝色代表杠板归活性成分。

4. 讨论

古人对毒蛇咬伤早有认识，中医认为，毒蛇咬伤的病因与蛇毒有关，临床上根据不同种类毒蛇咬伤后所出现不同的症状，又分为风毒型、火毒型和风火毒型 3 大类型。① 风毒型治疗宜祛风止痉、疏风解毒。② 火毒型治疗宜泻火解毒、凉血化瘀。③ 风火毒型治疗宜清热泻火、散风解毒[3]。根据中医“火

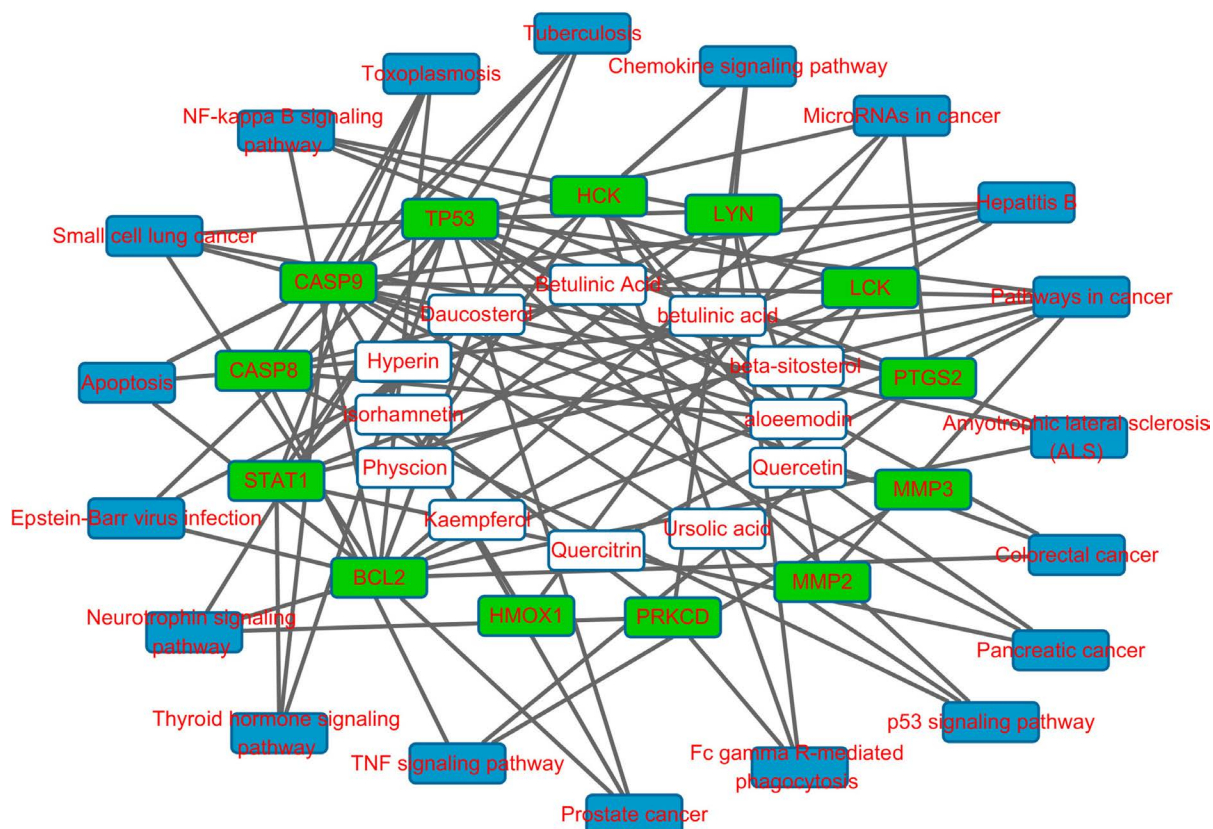


Figure 4. Compounds-targets-pathways network of *Polygonum perfoliatum* L. treating snake venom

图 4. 杠板归抗蛇毒成分 - 靶点 - 通路网络图

借风势、风助火威”的风火相连思想，杠板归有较好清热解毒功能，其可能对各种蛇毒均有治疗作用。

本研究中药物 - 成分 - 靶点网络显示杠板归主要活性成分为槲皮素、槲皮苷、山柰酚、白桦脂酸、大黄素甲醚、金丝桃苷、熊果酸、 β -谷甾醇等。其中大黄素甲醚对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、链球菌和痢疾杆菌等 26 种细菌均有抑制作用，并有一定的抗肝纤维化活性[9]。槲皮苷能改变其体内在外周循环系统的分布，起到抗心肌缺血作用[10]；金丝桃苷具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、扩血管、抗病毒、镇痛等作用[11]；熊果酸临床表现出显著而迅速降低谷丙转氨酶、血清转氨酶、消退黄疸、增进食欲、抗纤维化和恢复肝功能的作用[12]。杠板归中黄酮类成分含量最高[6]，虽然这些黄酮类成分并没有显示种特异性，但不同黄酮类化合物有偏于抗氧化、保护心脑血管、抗凝血、提高机体耐毒素能力等独特的药理活性[13] [14]。蛇毒中主要含血循毒，它通过激活凝血因子 X 和 V 而导致先促凝后失凝的凝血机制功能障碍，在蛇咬伤早期可导致机体微血管产生广泛微血栓，后期因凝血因子和血小板耗竭导致全身各器官出血倾向[15]。杠板归中不同黄酮类成分的有机组合可起到提高机体抗蛇毒损伤能力、抑制蛇毒引起的高凝和出血倾向等独特功能，这可能是杠板归能够治疗蛇咬伤的主要原因，也说明了杠板归可通过多成分、多靶点的协同作用而充分发挥增强机体抗蛇毒的能力。

GO 注释结果显示，关键靶点涉及的生物学过程主要为血小板活化、凋亡过程的正调控、凋亡过程的调节、炎症反应、肽基酪氨酸磷酸化、参与吞噬作用的 Fc γ 受体信号通路、蛋白质磷酸化、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、干扰素- γ 介导的信号通路等。KEGG 代谢通路富集分析显示杠板归对蛇毒的关键基因靶点主要参与的通路为“NF- κ B 信号通路”，“甲状腺激素信号通路”，“Fc γ R 介导的吞噬作用”，“神经营养信号通路”等，这些通路涉及免疫过程、抗炎过程、凝血及细胞损伤修复过程，与调节机

体耐毒能力密切相关,与杠板归有治疗蛇咬伤作用相符。

上述分析结果显示了杠板归对蛇毒有多成分-多靶点-多途径治疗优势,有开发为蛇毒治疗药物的可能性。

参考文献

- [1] Wong, O.F., Fung, H.T., Lam, S.K.T., *et al.* (2009) A Preliminary Survey of Hong Kong Snake Shops and the Potential Snake Bite Risks for the Healthcare System. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**, 931-936. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.022>
- [2] 应雪红, 王永安, 王汉斌. 毒蛇咬伤的诊断和治疗进展[J]. 中国医刊, 2007, 42(7): 24-28.
- [3] 黄念, 吴国程, 杨延龙, 等. 中药治疗毒蛇咬伤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(12): 54-55.
- [4] 刘玉梅, 范文昌. 杠板归药理作用与临床应用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6): 161-162.
- [5] 黄鹤飞, 张长城, 袁丁, 等. 杠板归抗炎及抑菌活性部位研究[J]. 安徽医药, 2008, 12(7): 595-596.
- [6] 孙欣, 陈华国, 周欣. 杠板归药材的化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(39): 110-113.
- [7] 张可锋, 杜正彩, 高雅, 等. 杠板归抗二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 242-245.
- [8] 徐丽丽, 徐一, 郭秋言, 等. 杠板归的研究进展[J]. 中医药导报, 2017, 23(24): 118-122.
- [9] 潘亭, 刘媛, 吕志平. 大黄素甲醚对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 广东医学, 2018, 39(12): 1772-1775.
- [10] 汤小平, 马哲龙, 施宁川, 等. 槲皮苷衍生物的合成及药理作用研究[J]. 中国药师, 2016, 19(2): 251-254.
- [11] 樊慧杰, 柴智, 周然. 金丝桃苷对神经系统保护作用的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4560-4562.
- [12] 陈维维, 张小莉. 熊果酸调控细胞因子法治疗炎症疾病的临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(1): 141-143.
- [13] 郭萌, 张晴, 闫丽萍, 等. 黄酮类化合物为主要活性成分的单味药和复方中药及其药理作用[J]. 沈阳医学院学报, 2018, 20(6): 558-564.
- [14] 王小雪, 卢杉, 郑思悦, 等. 归经中药化学成分、药理作用及临床应用的实证分析[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5193-5197.
- [15] 黄雄亮. 蛇毒清汤剂治疗蝥蛇咬伤的疗效观察[J]. 蛇志, 2018, 30(4): 577-578.