

基于网络药理学和分子对接研究黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的作用机制

王伟业¹, 何书宇¹, 施雨祺¹, 章译匀², 王雨婕³, 管叶^{1*}

¹杭州医学院存济口腔医学院, 浙江 杭州

²杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州

³杭州医学院临床医学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2023年2月27日; 录用日期: 2023年3月23日; 发布日期: 2023年3月31日

摘要

目的: 基于网络药理学、分子对接技术探讨黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的潜在分子机制。方法: 通过TCMSP、TTD、Genecards数据库检索并筛选得到寻常型天疱疮的活性成分靶点和疾病靶点, 交集后构建PPI网络; 对共同靶点进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析; 将黄连解毒汤里面的活性成分与寻常型天疱疮疾病的部分靶点通过Autodock进行分析对接验证。结果: 数据库搜集到78个活性成分, 825个作用靶点, KEGG分析得到105条通路, 分子对接结果显示, 黄连解毒汤活性成分和对接的核心靶点均具有较高的亲和力。结论: 黄连解毒汤可通过多种通路发挥抗炎作用, 为推进研究提供相关理论依据。

关键词

网络药理学, 分子对接, 黄连解毒汤, 寻常型天疱疮, 机制

Study on the Mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in Treating Pemphigus Vulgaris Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Weiye Wang¹, Shuyu He¹, Yuqi Shi¹, Yiyun Zhang², Yujie Wang³, Ye Guan^{1*}

¹Cunji School of Stomatology, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

²School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

³School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

Received: Feb. 27th, 2023; accepted: Mar. 23rd, 2023; published: Mar. 31st, 2023

*通讯作者。

文章引用: 王伟业, 何书宇, 施雨祺, 章译匀, 王雨婕, 管叶. 基于网络药理学和分子对接研究黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的作用机制[J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 4973-4983. DOI: 10.12677/acm.2023.133709

Abstract

Objective: To explore the potential molecular mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of pemphigus vulgaris based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods:** The active ingredient targets and disease targets of pemphigus vulgaris were retrieved and screened from TCMSP, TTD and Genecards databases, and the PPI network was constructed after the intersection; conduct gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) analysis on common targets; the active ingredients in Huanglian Jiedu Decoction and some targets of pemphigus vulgaris disease were analyzed and verified by Autodock. **Results:** 78 active ingredients and 825 action targets were collected from the database, and 105 pathways were obtained by KEGG analysis. **Molecular docking results** showed that the active ingredients of Huanglian Jiedu Decoction and the core target of docking had high affinity. **Conclusion:** Huanglian Jiedu Decoction can play an anti-inflammatory role through a variety of pathways, providing relevant theoretical basis for promoting research.

Keywords

Network Pharmacology, Molecular Docking, Huanglian Jiedu Decoction, Pemphigus Vulgaris, Mechanism

Copyright © 2023 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

天疱疮是一种发生在皮肤和口腔黏膜的自身免疫性疾病，以水疱和大疱为基本特征。天疱疮发病多见于 40~60 岁的中年人，发病无明显男女性别倾向，发病病理特征是水疱的形成以及棘层的分解，疱内可见圆形，胞质呈均匀嗜酸性，核大而深染的 Tzanck 细胞。临床上一般分型为寻常型天疱疮，落叶型天疱疮，增殖型天疱疮等[1]。天疱疮患者体内会出现抗 Dsg1 和 Dsg3 型抗体，是影响天疱疮患者临床特征的主要原因[2] [3]。

中医认为寻常型天疱疮是肺腑内脏气血虚实寒热夹杂，复感风热暑湿之邪，致使火邪，出现皮肤渗出、瘙痒、发疱等症状，可以中药复方清热除湿，解热毒炽热之症。黄连解毒汤由黄连、黄柏、黄芩、栀子四药联合，黄连清热燥湿，可去中焦之火和清泄心火，为君药；黄柏治疗下焦之火，栀子去三焦之火，导热下行，黄芩则泄上焦之火，三者联合黄连，为佐药。黄连解毒汤可治三焦火毒之症[4]，临床上用于治疗败血症，乙型脑炎，泌尿感染等疾病。

网络药理学是基于系统生物学的原理，检测中药材复方的化学成分[5]，筛选中药潜在的活性成分，预测相关作用的疾病靶点，构建方剂“化学成分 - 作用靶标 - 疾病靶标-PPI 网络”等方式，从分子层次阐述中药方剂作用原理。本项目基于网核心靶点和基因调控通路，为进一步研究黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮作用机制提供指导[6]。

2. 资料与方法

2.1. 复方黄连解毒汤活性成分的收集和药物靶点预测

在 TCMSP 中收集黄连、黄柏、黄芩、栀子的活性成分，根据 ADME 原则筛选出符合 OB 值大于 30%，

2.4. “药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”网络图的构建

在 Cytoscape 中导入 TSV 格式的交集靶点，利用“Network Analyzer”和“CytoNCA”等插件，根据 degree、Betweenness、Closeness 等值分析并可视化药物核心靶点和关键的活性成分。

2.5. 黄连解毒汤成分 - 寻常型天疱疮靶点与通路的富集分析

David 数据库可以用来进行基因的差异分析和通路的富集，输入交集靶点后得到生物学过程 BP、细胞成分 CC、分子功能 MF 的 GO 富集分析以及 KEGG 通路分析，见图 2。

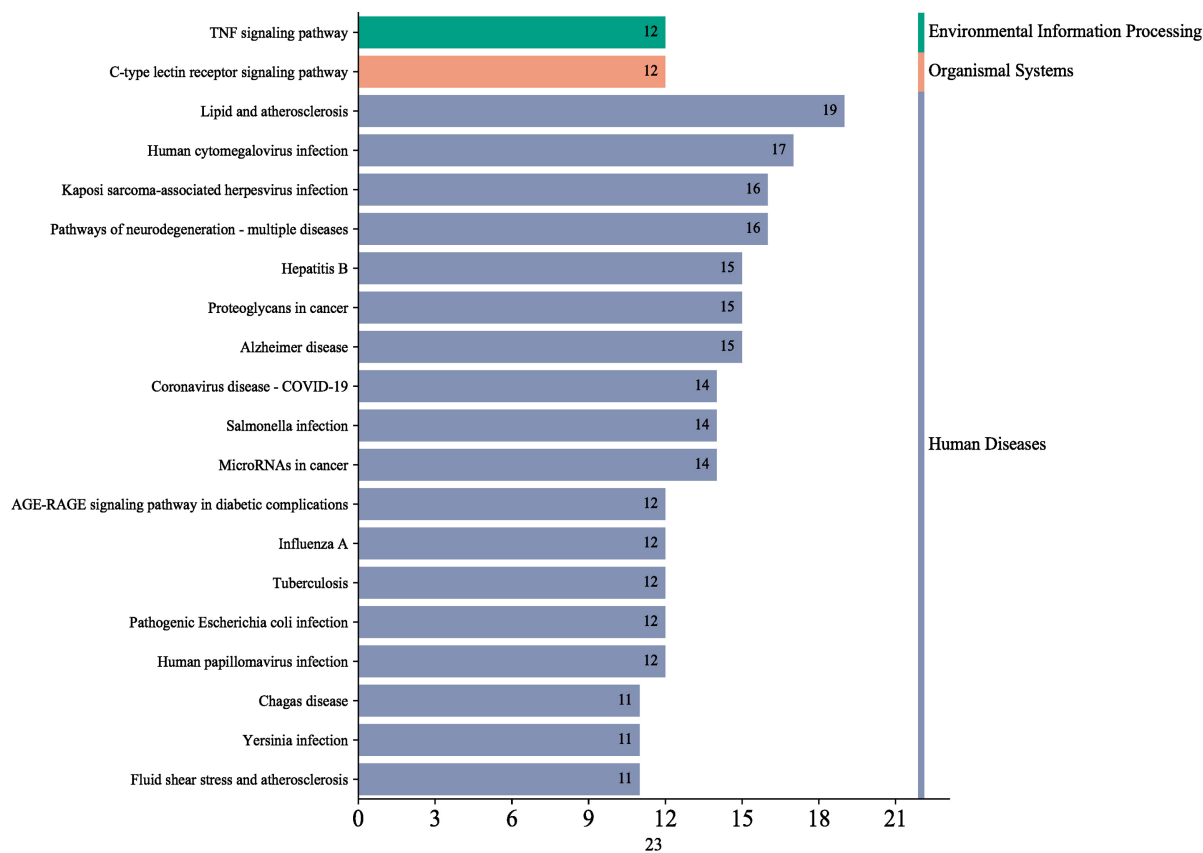


Figure 2. KEGG Pathway signal diagram

图 2. KEGG Pathway 信号图

2.6. 分子对接验证

在 Autodock 中进行受体大分子和配体小分子的对接，确定活性成分小分子和关键靶点的大分子蛋白后，从 TCMSp 中得到小分子结构，RCSB 数据库中下载 pdb 文件，通过去水、加氢后进行验证。

3. 网络药理学分析

3.1. 黄连解毒汤活性成分和靶点的选取

在 TCMSp 和 SwissTarget Prediction 数据库中通过 ADME 筛选活性成分和作用靶点。其中黄连 13 个活性成分，468 个作用靶点；黄柏 34 个活性成分，645 个作用靶点；黄芩 31 个活性成分，379 个作用靶点；栀子 15 个活性成分，473 个活性成分。四种药材合并去重后得到复方 78 个活性成分，825 个作用靶

点。表 1 为黄连解毒汤的有效活性成分。

Table 1. Effective active ingredients of Huanglian Jiedu Decoction

表 1. 黄连解毒汤有效活性成分

MOL ID	化合物	OB (%)	DL
MOL001454	berberine	36.86	0.78
MOL002897	epiberberine	43.09	0.78
MOL012245	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.63	0.27
MOL001494	Mandenol	42	0.19
MOL000622	Magnograndiolide	63.71	0.19
MOL001941	Ammidin	34.55	0.22
MOL002903	(R)-Canadine	55.37	0.77
MOL002671	Candletoxin A	31.81	0.69
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
MOL002933	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	36.56	0.27
MOL013352	Obacunone	43.29	0.77
MOL001455	(S)-Canadine	53.83	0.77

3.2. 寻常型天疱疮靶点的获取

Genecards 中获得 278 个疾病靶点，合并 Disgenet 的 115 个疾病靶点，Drugbank10 个疾病靶点，OMIM149 个疾病靶点，TTD7 个疾病靶点，Pharmgkb1 个疾病靶点，经重复值去除后得到 473 个疾病靶点。将黄连解毒汤和寻常型天疱疮疾病的靶点在 Venny 中进行交集得到 66 个共同基因靶点，并绘制韦恩图，见图 3。

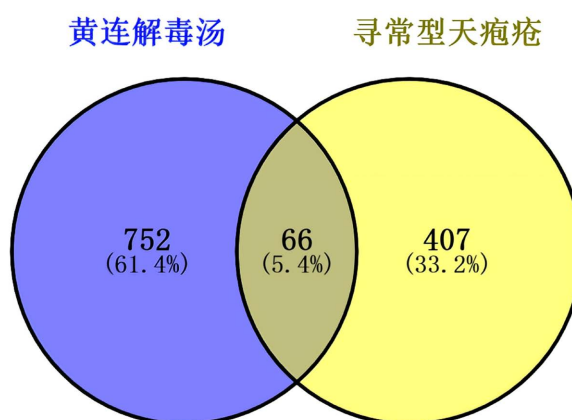


Figure 3. Venny intersection target

图 3. Venny 交集靶点

3.3. PPI 网络构建

将黄连解毒汤和寻常型天疱疮疾病的靶点在 Venny 中进行交集得到 66 个共同基因靶点，并绘制韦恩图后将交集靶点导入 STRING 平台后得到黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的 PPI 网络图，见图 4。其中 TNF、

CASP3、PTGS2、MMP9、HSP90AA1、SRC、EGFR、TLR4、CXCL8、STAT3 等靶点均 degree 值均在中位数以上，说明多种活性成分对多种靶点发挥调控作用。

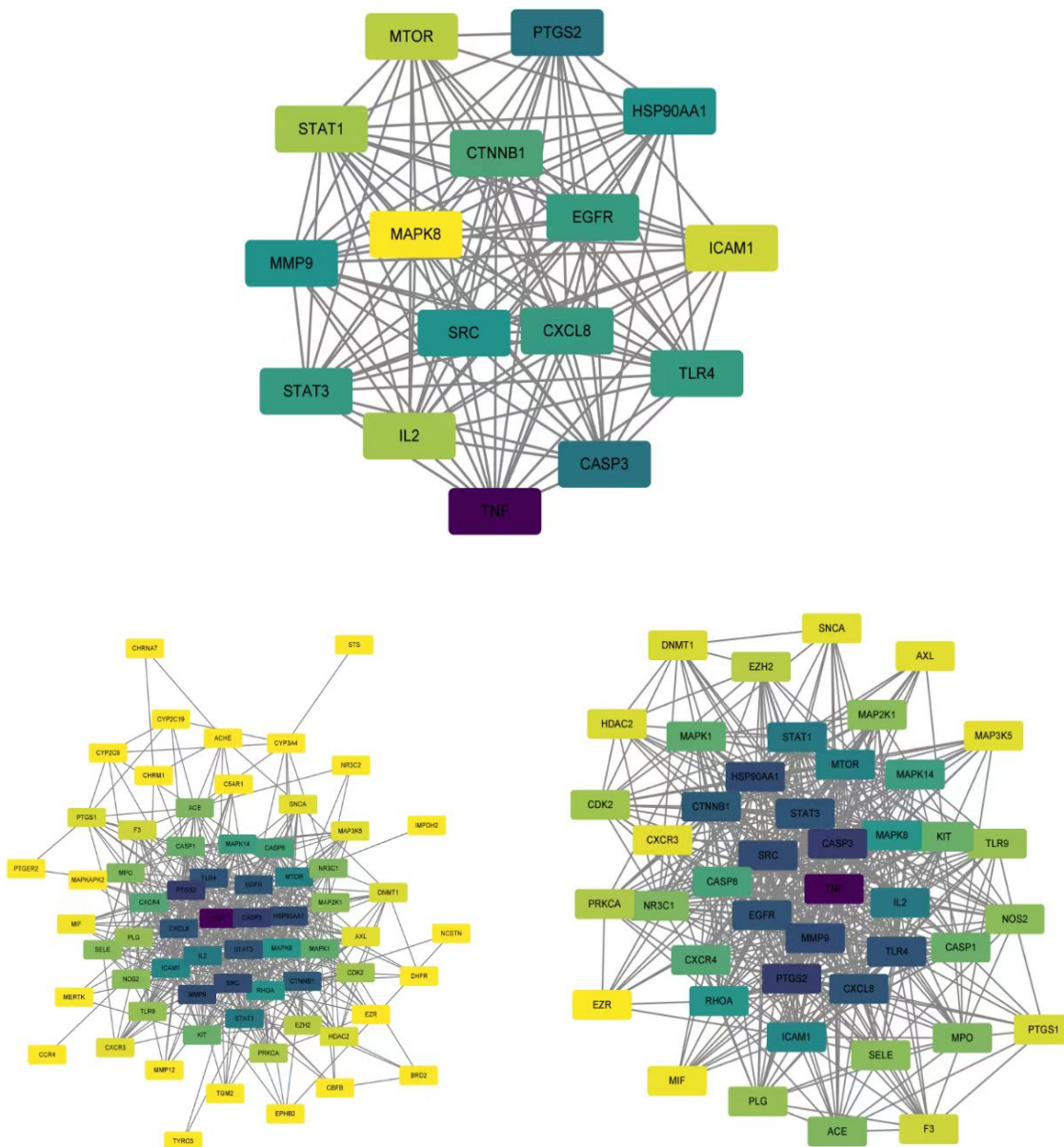


Figure 4. Construction process of Core PPI
图 4. 核心 PPI 的构建过程

3.4. 药物 - 成分 - 疾病 - 靶点网络图构建

在 Cytoscape 中利用“Network Analyzer”和“CytoNCA”等插件绘制药物 - 成分 - 疾病 - 靶点网络图来可视化活性成分与交集靶点之间的关系，并进行可视化操作，见图 5。分析黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的网络拓补学参数，degree 越大则该成分发挥越重要的作用，其中黄连素 berberine、表小檗碱 epiberberine、鸢尾黄素 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone、β-谷固醇 beta-sitosterol 等化合物能与多个靶点相结合，推测为黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的核心成分。

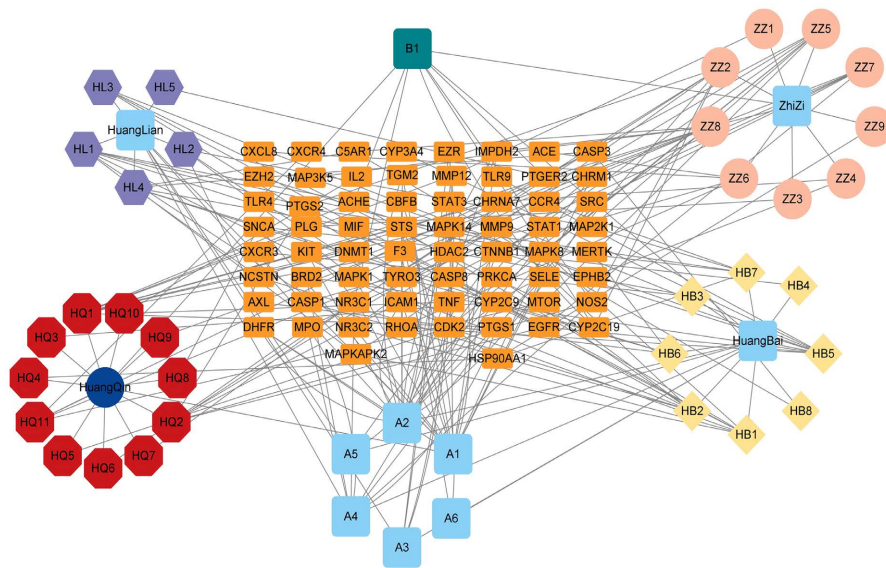


Figure 5. Network diagram of disease-target-drug-pathway
图 5. 疾病 - 靶点 - 药物 - 通路网络图

3.5. GO 和 KEGG 分析

在 David 平台对交集靶点进行富集分析，通过 P Value < 0.01 筛选得到 248 条基因基因本体论(GO) 条目，169 条 Biological Process (BP) 条目，涉及信号传导、细胞因子介导的信号通路、基因表达的正向调节等方面；33 条 Cell Component (CC) 条目，涉及到质膜、细胞质、胞核等细胞成分；46 条 Molecular Function (MF) 条目，涉及到涉及蛋白结合、炎症反应、质膜整体成分等方面；105 条京都基因与基因组百科全书(KEGG) 等条目，涉及脂质和动脉粥样硬化、人巨细胞病毒感染等方面，并对分析结果进行可视化，见图 6、图 7。

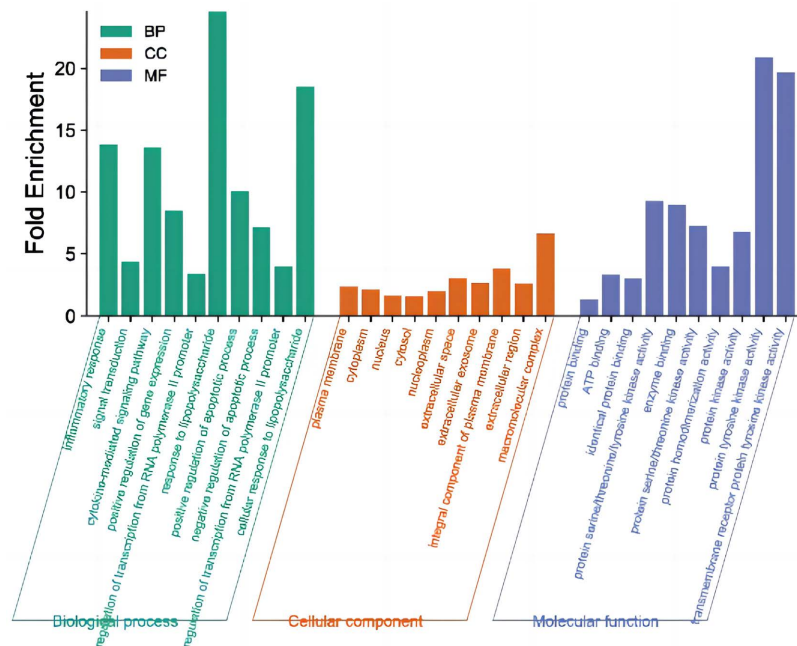


Figure 6. Top ten GO enrichment items including BP、CC and MF
图 6. GO 富集 BP、CC、MF 条目前十条

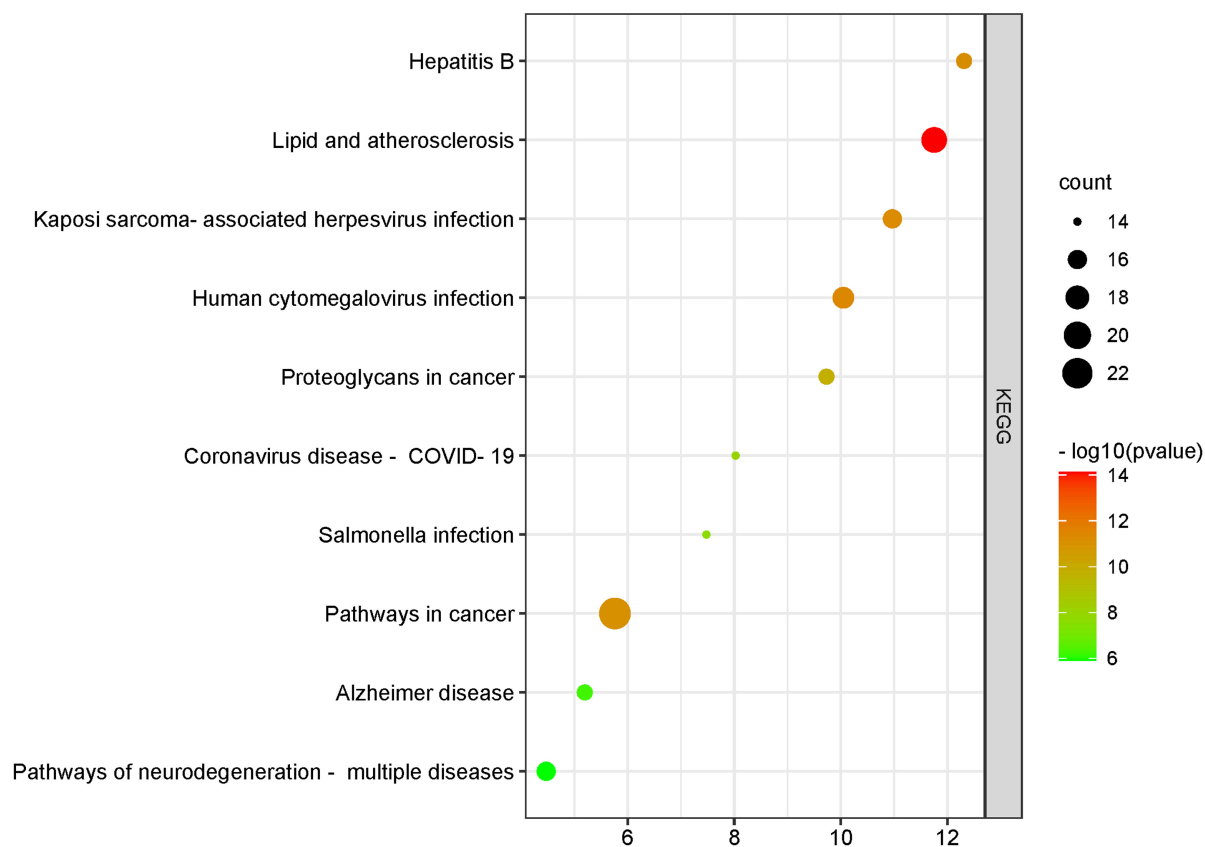


Figure 7. KEGG enrichment bubble diagram

图 7. KEGG 富集气泡图

3.6. 分子对接

选定以黄连素 Berberine、表小檗碱 Epiberberine 为分子对接的主要活性成分, TNF、CASP3、PTGS2、MMP9、HSP90AA1、SRC、EGFR 为关键靶点。在 Autodock 中进行受体、子和配体的对接, 从 TCMSP 中得到小分子结构, RCSB 数据库中下载 pdb 文件, 通过去水、加氢后进行验证。在初步分子对接得出的数据中, Degree 排名较高的 TNF、CASP3 与主要活性成分 Berberine、Epiberberine 进行配体、受体的对接, 结合能均小于-5 KJ/mol, 表面黄连解毒汤通过多靶点发挥作用。见表 2。其中, 将 TNF 和表小檗碱、HSP90AA1 与表小檗碱、SRC 和黄连素等化合物的配体受体对接图进行可视化, 见图 8~10。

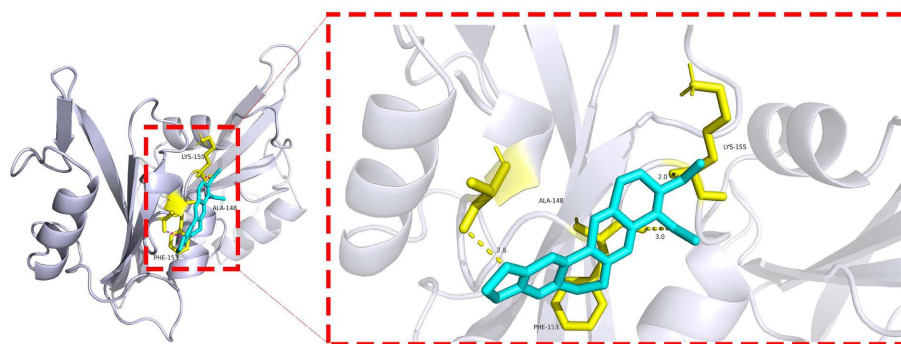


Figure 8. Molecular docking visualization of TNF and epiberberine

图 8. TNF 和表小檗碱的分子对接可视化

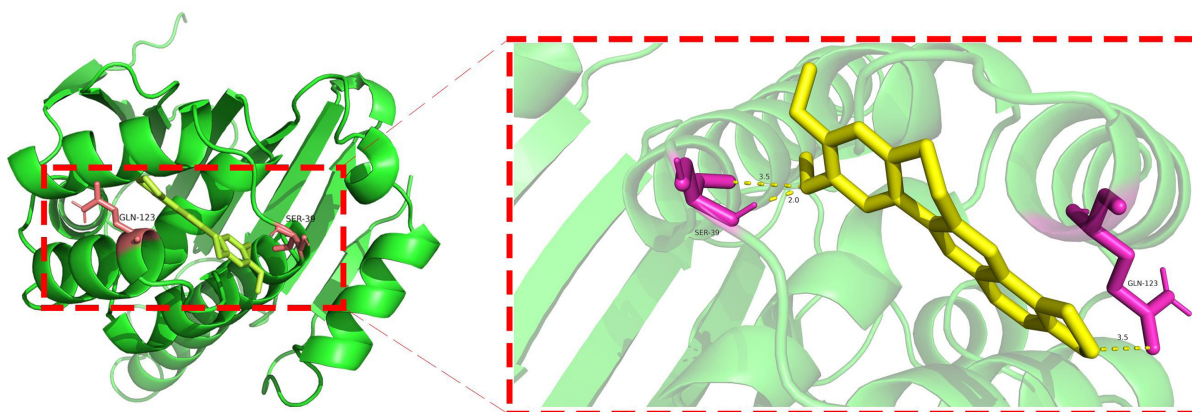


Figure 9. Molecular docking visualization of HSP90AA1 and epiberberine

图 9. HSP90AA1 与表小檗碱分子对接可视化

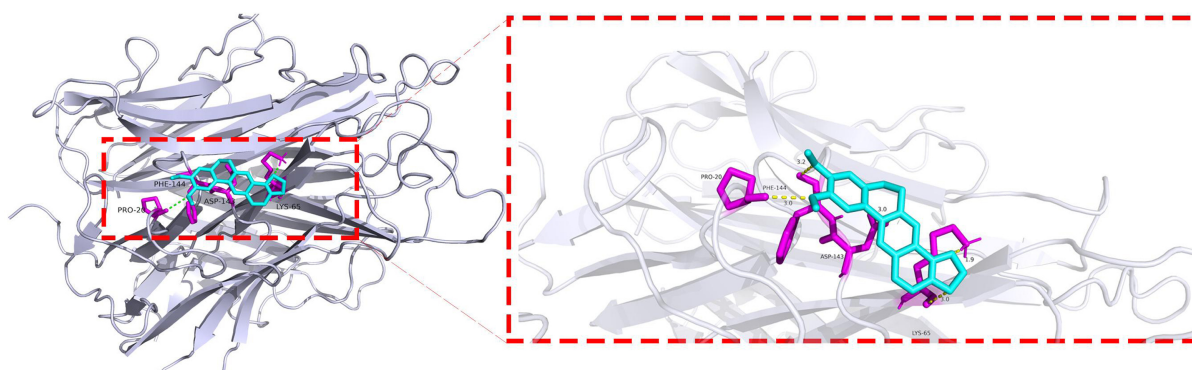


Figure 10. Molecular docking visualization of SRC and berberine

图 10. SRC 和黄连素分子对接可视化

Table 2. Core target and active ingredient docking energy

表 2. 核心靶点和活性成分对接能

关键靶点	与黄连素结合能(KJ/MOL)	与表小檗碱结合能(KJ/MOL)
TNF	-8.21	-6.6
CAPS3	-6.18	-6.23
HSP90AA1	-6.92	-6.37
MMP9	-8.99	-6.37

4. 分析

黄连解毒汤首见于《外台秘要》，是清热解毒的传统名方，主治三焦火毒之症[7]，大热烦躁，口燥咽干或热病吐血、身热下利等临床症状，具有抗炎、抗肿瘤、解湿热、抗疮疡肿毒等作用。本文利用网络药理学分析技术，对黄连解毒汤治疗天疱疮，调节巨噬细胞炎症反应、糖酵解、鞘脂代谢和谷氨酰胺代谢等方面的多成分、多靶点、多通路的相互作用规律和调控网络进行了挖掘和分析。

黄连解毒汤中发挥药效的作用成分主要为生物碱类，环烯醚萜类，黄酮类等成分，其中黄连素、表小檗碱、鸢尾黄素、 β -谷固醇等为主要的活性成分[8]。黄连素从毛茛科黄连中提取，可以清热燥湿、行气止痛、止泻止痢等作用，具有抗血小板保护血管、抗氧化、抗炎等作用[9]；鸢尾黄素取自于鸢尾属植

物中提取的黄酮类有效成分具有抗炎、抗毒、止咳等多种作用[10]。表小檗碱是黄连中的一种重要的异喹啉类生物碱,具有较强的抗氧化活性作用,能够降低血糖,与黄连素作用机理相似。 β -谷固醇是黄芩、黄柏和栀子的共同化学成分,具有降胆固醇、免疫调节、抗肿瘤、止咳祛痰、抑制肿瘤和修复组织等作用[11]。在 β 谷固醇对高脂饲料喂养小鼠的实验中通过7周的喂养小鼠模型组 TD、HDL C 和 LDL 水平显著升高,而实验组小鼠的血清 TC 水平降低($P < 0.05$),具有生物统计学意义,其中 TC 下降 16.4%水平,LDL C 下降 17.5%水平[12]。

靶点预测结果显示,黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的关键靶点中包括原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src、肿瘤坏死因子 TNF、胱天蛋白酶 3CASP3、表皮生长因子受体 EGFR、人基质金属蛋白酶 MMP9、前列腺素内过氧化物合成酶 2PTGS2 等物质。炎症反应是天疱疮疾病发病的主要病理反应,白细胞、中性粒细胞等免疫细胞在炎症反应前期会应对组织损伤和入侵微生物进行杀灭,关键靶点则是反应中的核心成分[13] [14]。PTGS2 又称为环氧化酶 COX-2,是花生四烯酸代谢过程中调节前列腺素合成的限速酶,主要会引起炎症反应。CASP3 主要参与细胞凋亡过程[15],而 PTGS2 等靶点在炎症的治疗及 RNA 病毒的复制过程中发挥作用,Src 的抑制作用通过在短时间内培养自身抗体,从而导致天疱疮中 Dsg3 抗体下游的细胞粘附丧失,其机制既依赖于皮层肌动蛋白(cortactin)又独立于皮层肌动蛋白。EGFR 通过 Src 调节 Dsg3 的粘附,而天疱疮中角质形成细胞粘附的丧失是通过直接抑制 Dsg3 结合和一些信号机制介导的,并且依赖于 Ca^{2+} 通道,能被 Ca^{2+} 离子螯合剂所阻断。但抑制该机制不干扰自身抗体诱导的直接抑制。相关数据表明,并非在所有 PV 患者中 EGFR 和 Src 都会导致皮肤起水疱。MMP-9 受 PV 血清调节,促进了其转录和表达,参与角质形成细胞凋亡,从而使表皮细胞棘层松解,导致水疱形成。其他关键靶点其功能主要富集在生物信号传导、趋化因子、细胞因子和受体相互作用上,参与病毒感染、炎症反应、机体免疫、细胞生长分化、血管重建和创伤愈合等生物学过程。

黄连解毒汤治疗寻常型天疱疮的 KEGG 通路富集结果表明,绝大部分的基因富集在癌症疾病通路,血脂和动脉粥样硬化通路,人体巨细胞病毒感染通路,卡波西肉瘤信号通路等。表明黄连解毒汤可能是通过上述信号通路在寻常型天疱疮疾病中发挥治疗作用,值得进一步研究。初步揭示了其在寻常型天疱疮方面多疾病、多靶点、多通路协同作用的复杂机制过程,以期寻找有效成分和作用机制及临床应用奠定基础。

使用 Autodock 软件进行分子对接,选择黄连素和表小檗碱作为活性成分,TNF、MMP9、CASP3、PTGS2 等作为关键靶点,其中黄连素与 TNF、MMP9、CASP3、PTGS2 等关键靶点的对接能为,表小檗碱与 TNF、MMP9、CASP3、PTGS2 等关键靶点的对接能为,黄连解毒汤核心化合物结合能均小于-5 KJ/mol,说明通过网络药理学和分子对接技术筛选出来的配体与受体结合的构象稳定时能力越低,发生作用的可能性越大,核心化合物与寻常型天疱疮可能靶点的亲和力相似,黄连解毒汤对治疗寻常型天疱疮有较好的疗效。

基金项目

浙江省大学生创新创业训练计划(Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Zhejiang Province),基金号: S202213023050; 杭州医学院 2022 年度基本科研业务费,青年科研基金,编号 KYQN202201。

参考文献

- [1] 肖敏,宋玮,沈涛,等.天疱疮源流考[J].四川中医,2021,39(4):28-30.
- [2] Schmidt, E., Kasperkiewicz, M. and Joly, P. (2019) Pemphigus. *Lanect*, **394**, 882-894.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31778-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31778-7)

- [3] Hammers, C.M. and Stanley, J.R. (2016) Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annual Review of Pathology*, **11**, 175-197. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044313>
- [4] 赵娜, 贾连群, 徐丽, 杨关林. 黄连解毒汤的文献分析研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(8): 1577-1580.
- [5] Boezio, B., Audouze, K., Ducrot, P. and Taboureau, O. (2017) Network-Based Approaches in Pharmacolog. *Molecular Informatics*, **36**, Article ID: 1700048. <https://doi.org/10.1002/minf.201700048>
- [6] 徐文华, 郑景辉, 赵阳, 等. 基于网络药理学和生物信息学的丹参酮 II_A 治疗冠心病的分子生物学机制分析[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1131-1140.
- [7] 褚庆民, 金政, 李梓源, 等. 基于网络药理学探究黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 119-122, 286-287.
- [8] 刘保光, 谢苗, 董颖, 等. 黄连解毒汤作用机制研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(9): 1861-1868.
- [9] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [10] 覃芳敏. 水栀子化学研究成分[D]: [硕士学位论文]. 广州: 暨南大学, 2014.
- [11] 余焕玲, 毕研霞, 肖荣, 等. β 谷固醇对高脂饲料喂养小鼠空间学习记忆能力的影响[J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(6): 724-727.
- [12] Zhu, C.Y., Meng, F.Q. and Liu, J. (2019) MicroRNA-524-5p Suppresses Cell Proliferation and Promotes Cell Apoptosis in Gastric Cancer by Regulating CASP3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 7968-7977.
- [13] Leuti, A., Fazio, D., Fava, M., *et al.* (2020) Bioactive Lipids, Inflammation and Chronic Diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **159**, 133-169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.028>
- [14] Heimfarth, L., da Silva Nascimento, L., Amazonas da Silva, M.J., *et al.* (2021) Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effect of Pectolarigenin, a Flavonoid from Amazonian *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Astrocytes via NF κ B and MAPK Pathways. *Food and Chemical Toxicology*, **157**, Article ID: 112538. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112538>
- [15] Sun, J.H., Sun, F., Yan, B., Li, J.Y. and Xin, D.L. (2020) Data Mining and Systematic Pharmacology to Reveal the Mechanisms of Traditional Chinese Medicine in *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia Treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **125**, Article ID: 109900. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109900>