

基于网络药理学探究淡豆豉对缺血性卒中的作用机制

刘林潇, 全德森, 杜京晏, 彭景熠, 蔡琨*

贵州中医药大学, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年1月17日; 录用日期: 2023年2月10日; 发布日期: 2023年2月21日

摘要

目的: 通过网络药理学探讨淡豆豉对缺血性卒中(Ischemic stroke, IS)的作用机制。方法: 通过TCMSP数据库和Uniprot对淡豆豉的有效成分和靶点进行筛选; 使用OMIM、DisGeNET、GeneCards数据库收集IS相关靶点。将IS相关靶点与淡豆豉有效成分靶点的交集作为淡豆豉防治IS的潜在作用靶点, 借助STRING数据库和Cytoscape3.9.1软件的“CytoNCA”绘制PPI图, 利用DAVID 2021数据库和微生信平台进行GO和KEGG可视化分析。结果: 筛选出淡豆豉中含有5个活性成分及34个AS潜在作用靶点, 其中蛋白互作显示ESR1、PPARG、GSK3B等是淡豆豉防治IS的关键靶点; KEGG显示淡豆豉主要通过IL-17信号通路来发挥防治AS的作用。结论: 本研究初步探讨了淡豆豉治疗IS, 可能是通过作用于ESR1、PPARG、GSK3B等关键靶点和IL-17信号通路以及其他疾病, 进而发挥治疗缺血性卒中的作用。

关键词

缺血性卒中, 网络药理学, 淡豆豉

To Investigate the Mechanism of *Sojae Semen Praeparatum* Sauce on Ischemic Stroke Based on Network Pharmacology

Linxiao Liu, Desen Quan, Jingyan Du, Jingyi Peng, Kun Cai*

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jan. 17th, 2023; accepted: Feb. 10th, 2023; published: Feb. 21st, 2023

*通讯作者。

文章引用: 刘林潇, 全德森, 杜京晏, 彭景熠, 蔡琨. 基于网络药理学探究淡豆豉对缺血性卒中的作用机制[J]. 中医学, 2023, 12(2): 401-410. DOI: 10.12677/tcm.2023.122061

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of *Sojae Semen Praeparatum* on ischemic stroke (IS) by network pharmacology. **Methods:** The active ingredients and targets of *Sojae Semen Praeparatum* were screened by TCMSP database and Uniprot, and the IS-related targets were collected by OMIM, DisGeNET and GeneCards databases. The intersection of IS-related targets and active ingredient targets of *Sojae Semen Praeparatum* was used as a potential target for the prevention and treatment of IS by *Sojae Semen Praeparatum*. PPI maps were drawn with the help of STRING database and “CytoNCA” of Cytoscape3.9.1 software, and GO and KEGG visualization analyses were performed using DAVID 2021 database and Microbiology Information platform. **Results:** *Sojae Semen Praeparatum* contained 5 active components and 34 potential targets of AS, of which ESR1, PPARG and GSK3B were the key targets of *Sojae Semen Praeparatum* to prevent and treat IS, and KEGG showed that *Sojae Semen Praeparatum* mainly played a role in preventing and treating AS through IL-17 signaling pathway. **Conclusion:** This study preliminarily investigated the therapeutic effect of *Sojae Semen Praeparatum* on IS, which may play a role in the treatment of ischemic stroke by acting on key targets such as ESR1, PPARG, GSK3B, IL-17 signaling pathway and other diseases.

Keywords

Ischemic Stroke, Network Pharmacology, *Sojae Semen Praeparatum*

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

脑卒中是全球死亡和长期残疾的主要原因之一[1]。当主要脑血管被阻断，剥夺下游组织的氧气和营养物质，并导致梗死核心的细胞几分钟内死亡时，就会发生缺血性卒中(Ischemic stroke, IS) [2]。死亡细胞释放促炎信号，激活驻留的星形胶质细胞/小胶质细胞，启动免疫细胞从外周浸润到受损组织中，导致血脑屏障破坏，加剧细胞死亡，这一过程被称为继发性炎症，可在初始损伤后持续数天至数周[3]。卒中的急性治疗针对静脉溶栓和/或血管内血栓切除术风险组织的早期再灌注，并通过管理液体量、BP 和心血管状态优化血流动力学状态[4]。抗血小板和抗凝药物是早期预防 IS 的首要选择，但出血风险仍不可避免。缺血性卒中属于祖国医学“中风”范畴，又名“缺血性中风”。卒中的发生病因病机复杂，以虚、火、风、痰、气、瘀为六大常见原因，多相兼致病，致机体阴阳失调，气血逆乱，上犯于脑。随着传统医学的发展，中医药在临床疾病的预防和治疗中发挥着显著作用，淡豆豉(*Sojae Semen Praeparatum*)，为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr.成熟的种子经过发酵加工后的产品，始载于《名医别录》，作“豉，味苦，寒，无毒” [5] [6]。研究表明，淡豆豉具有调血脂、降血糖、降血压、抗氧化、溶解血栓及类雌激素等药理作用[7]。淡豆豉预防 IS 的机制尚不清楚，故本研究利用网络药理学对淡豆豉的有效成分及作用靶点进行筛选，并对淡豆豉作用于 IS 的信号通路和生物学过程进行预测，为临床预防 IS 提供新思路。

2. 材料与方法

2.1. 淡豆豉相关成分的筛选

检索中药系统药理学 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)中淡豆豉的有效成分，得到成

分吸收、分布、代谢和排泄特性,包括口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(druglikeness, DL)等信息。利用口服生物利用度 OB ($\geq 20\%$)和类药性 DL (≥ 0.12)进行筛选[8],筛选淡豆豉有效靶点成分,通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)中提取基因名,将获取的有效成分靶点进行蛋白名称与基因 symbol 的转换[9]。

2.2. AS 疾病相关靶点的筛选

在 OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)和 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>) [10] [11]中以“Ischemic stroke”为关键词收集疾病靶点,在不影响后续整合的前提下,将从 DisGeNET 中得到的疾病靶点以基因疾病关联评分(gene-disease association score)以及 GeneCards 中得到的疾病靶点以相关性评分(relevance score)的为标准筛选,剔除相关性较小的疾病靶点,并将三个疾病数据库疾病靶点整合后去除重复值,得到 IS 疾病靶点。

2.3. 绘制 VENN 图和 PPI 图

利用 VENNY2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线绘图工具制作药物与疾病靶点 VENN 图。将交集靶点导入 STRING 在线分析平台(<https://cn.string-db.org/>),物种选择为“Homo sapiens”绘制蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)图,最低置信度(minimum confidence)设置为 0.4,隐藏网络中的离散点,并将 STRING 数据导入 Cytoscape3.9.1 软件用“CytoNCA”的插件筛选出淡豆豉防治 IS 的关键靶点。

2.4. GO 和 KEGG 代谢途径富集分析

将交集靶点导入 DAVID 2021 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)数据库分析靶基因的功能(Gene ontology, GO),包括生物过程(Biological process, BP),细胞组成(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF),以及 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)代谢途径富集分析[12],并用微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)在线作图工具绘制可视化图形,获得淡豆豉作用于 IS 的信号通路及生物过程。

3. 结果

3.1. 淡豆豉相关成分的筛选

TCMSP 数据库筛选淡豆豉已知成分,设定 $OB \geq 20\%$ 、 $DL \geq 0.12$ 为筛选阈值,得到 5 个符合条件的活性成分(表 1),药物靶点剔除重复靶点后得到 34 个药物靶点,即图 1 所示。

Table 1. Active ingredients and target number of *Sojae Semen Praeparatum*
表 1. 淡豆豉活性成分及靶点数

MOL ID	Molecule Name	Target
MOL011688	[(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-[3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyoxan-2-yl]methyl acetate	2
MOL011787	Glycitin	4
MOL000510	olmelin	25
MOL008400	glycitein	23
MOL011593	Isoflavon	19

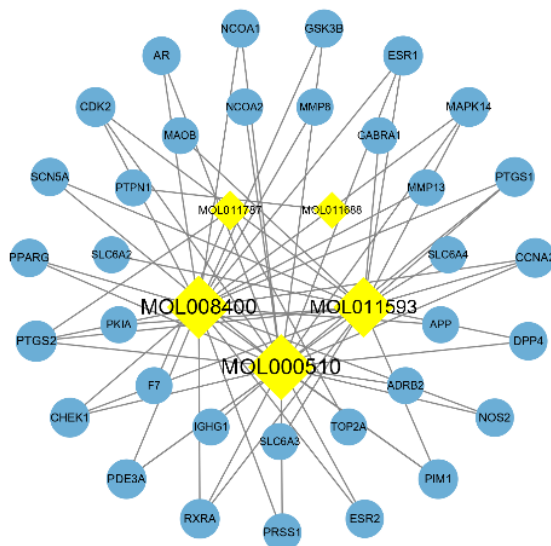


Figure 1. Network diagram of active component-target of *Sojae Semen Praeparatum*
图 1. 淡豆豨活性成分 - 靶点网络图

3.2. 淡豆豨与动脉粥样硬化交集靶点的筛选

检索 OMIM、DisGeNET 和 GeneCards 数据库获得 IS 疾病相关靶点，整合去重后获得 1344 个靶点，利用 VENN2.1 在线绘图工具获取 IS 靶点与淡豆豨药物靶点的交集，即图 2 所示的淡豆豨治疗 IS 的 22 个预测靶点。

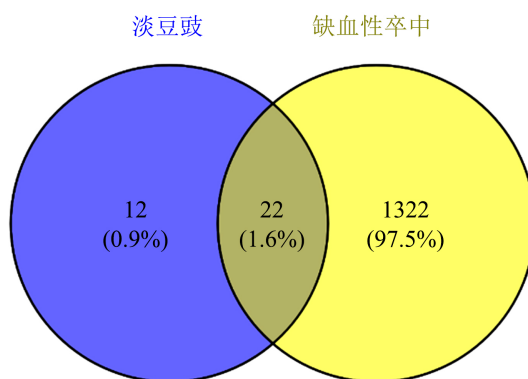


Figure 2. Drug targets of *Sojae Semen Praeparatum* and intersection targets of ischemic stroke

图 2. 淡豆豨药物靶点与缺血性卒中交集靶点

3.3. “淡豆豨-IS-交集靶点”网络构建

将获得的 22 个交集靶点导入 STRING 数据库，物种选择“Homo sapiens”，得到 PPI 图(见图 3)，设置 minimum required interaction score 为 0.4，显示查询蛋白质名称，隐藏网络中断开连接的节点。网络统计得到 number of nodes = 22、number of edges = 47、average node degree = 4.27、avg. local clustering coefficient = 0.479、expected number of edges = 12。将得到的网络数据导入 Cytoscape3.9.1 软件并用“CytoNCA”的插件建立 PPI 网络，选择介数中心度前十的靶点作为淡豆豨防治 IS 的关键靶点，包括 PPARG、PTGS2、ESR1 等。(见图 4)

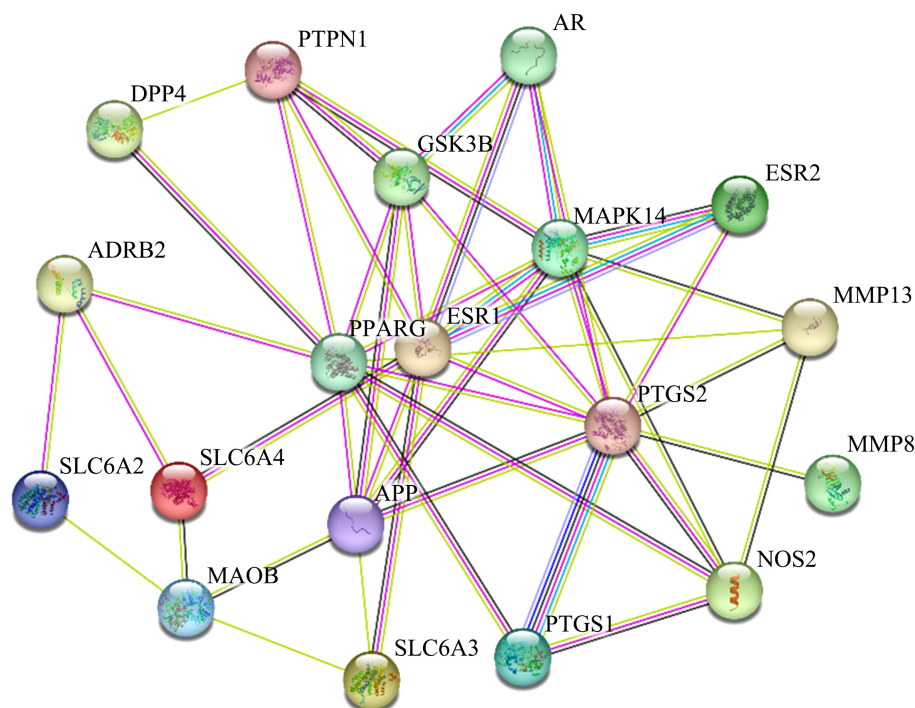


Figure 3. Protein interaction diagram for “*Sojae Semen Praeparatum*-IS-intersection target”
图 3. “淡豆豉-IS-交集靶点” 蛋白互作图

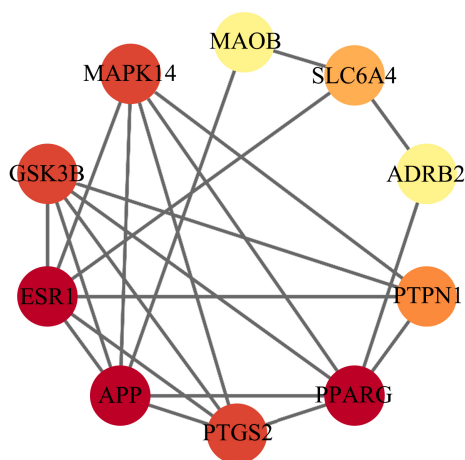


Figure 4. Top ten target protein interaction diagram
图 4. 前十靶点蛋白互作图

3.4. GO 和 KEGG 代谢途径富集分析

22 个交集靶点导入 DAVID 2021 数据库后, GO 分析得到 90 个生物过程(BP)、27 个细胞组成(CC)和 45 个分子功能(MF)结果, 选择 count 数前 10 的结果通过微生信进行富集分析(图 5~7)。其中, 关键 BP 包括药物反应、基因表达的正调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、信号传导等。CC 主要包括细胞核、细胞质、细胞外空隙和核质等。MF 包括蛋白结合、酶结合、金属离子结合、相同的蛋白结合、受体结合等。KEGG 分析得到 18 个结果, count 数前 10 的通路有癌症途径、神经退行性病变的途径 - 多种疾病、血清素能突触、催乳素信号通路、IL-17 信号通路、多巴胺能突触等(见图 8)。

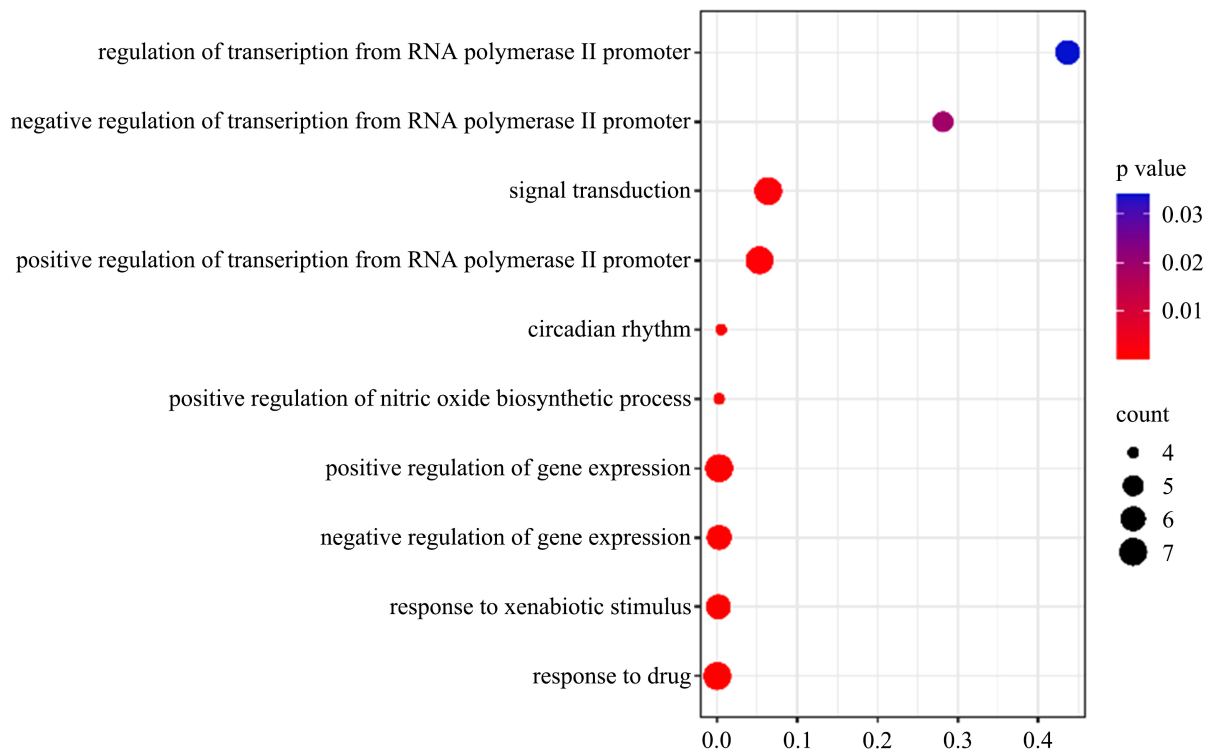


Figure 5. GO BP results plot
图 5. GO BP 结果图

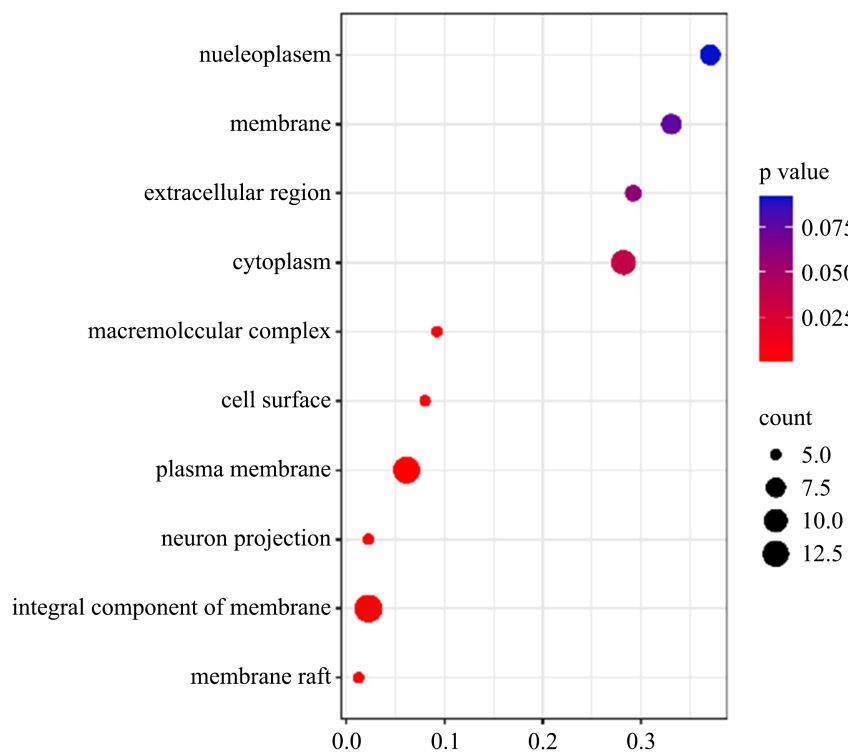


Figure 6. GO CC results plot
图 6. GO CC 结果图

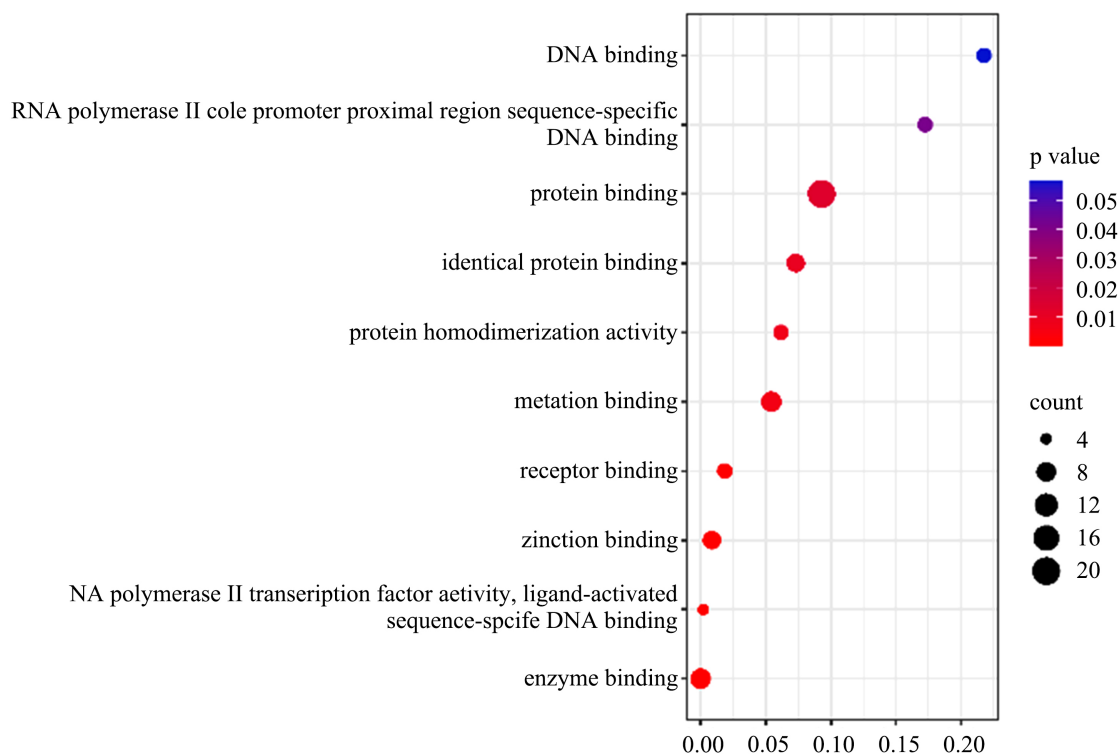


Figure 7. GO MF results plot
图 7. GO MF 结果图

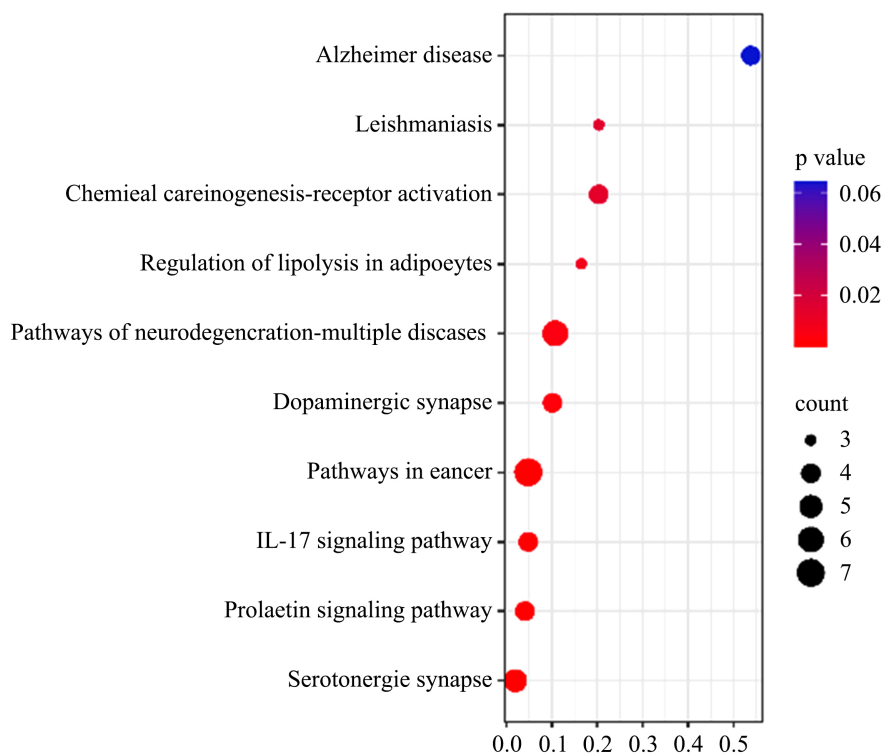


Figure 8. KEGG results plot
图 8. KEGG 结果图

4. 讨论与结论

经过筛选得到的淡豆豉有效活性成分为甘氨酸、橄榄苦苷、黄豆黄素、异黄酮。有研究表明, 黄酮类化合物可通过血脑屏障增加神经保护活性, 从而有效治疗缺血性卒中[13]。Mnafgui [14]等发现橄榄苦苷通过其抗氧化和抗血栓形成活性提供对缺血性中风的神经保护作用。因此推测淡豆豉对缺血性卒中有一定的治疗效果。

通过 PPI 网络及拓扑参数分析筛选出淡豆豉治疗 IS 的前十个关键靶点, 其中雌激素对心血管系统有保护作用, 可以保护年轻女性免受心血管疾病的侵害[15] [16]。雌激素通过下调炎症标志物(如趋化因子和细胞粘附分子)来对抗动脉粥样硬化, 从而降低心血管疾病的风险[17]。此外, 高浓度雌激素通过产生前列环素、抑制内皮素合成和阻断钙通道来促进血管舒张[18]。有研究发现, ESR1 基因的多态性与卒中风险增加相关联, 尤其是缺血性卒中[19]。PPARG 是对抗动脉粥样硬化发病机制的保护因子, 可能有保护内皮, 调节脂肪细胞分化和脂代谢, 抑制平滑肌细胞增殖和迁移, 降低炎症趋化因子和稳定斑块的功能[20]。研究表明, PPARG 基因的多态性与脑梗死相关, 是缺血性卒中的危险因素[21]。GSK3 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 包含两种不同的亚型 GSK3A 和 GSK3B, 高度富集在哺乳动物大脑中, 参与多种细胞和神经生理功能[22]。GSK3 介导的底物磷酸化和信号通路失调已经被证实和多种疾病有关, 如癌症、心血管疾病、糖尿病、炎症性疾病、神经退行性疾病和精神疾病等[23]。抑制 GSK3 作为关键治疗靶点之一受到广泛关注, GSK3B 已深度参与脑缺血性损伤引起的神经元细胞死亡[24]。

交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析显示主要生物过程有对药物的反应、基因表达的正向调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正向调节、信号转导、对异生刺激的反应、基因表达的负调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调节等; 分子功能主要为蛋白质结合、酶结合、金属离子结合、锌离子结合、相同的蛋白质结合、受体结合、蛋白质均二聚活性、RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性 DNA 结合、脱氧核糖核酸结合; 信号通路主要包括癌症的通路、神经退行性变的途径 - 多种疾病、血清素能突触、催乳素信号通路、IL-17 信号通路、多巴胺能突触、阿尔茨海默病、脂肪细胞脂肪分解的调节。IL-17 家族蛋白, 特别是 IL-17A, 广泛参与各种急性和慢性炎症反应, 脑卒中后, IL-17A 和 IL-17F 通过诱导炎症因子(如 TNF- α 、IL-6、CXCL1 等)的分泌, 招募中性粒细胞渗入中枢神经系统, 损害血脑屏障的完整性, 促进脑卒中的发展[25]。研究证明, 异黄酮可以通过抗氧化应激, 抗神经毒性物质损伤, 促进神经营养因子表达, 保护血脑屏障, 降低炎症反应[26]。缺血性卒中前痴呆是卒中后死亡的独立预测指标。与既往血管痴呆患者相比, 既往患有阿尔茨海默病和混合痴呆的患者, 卒中后的死亡率可能更高[27]。流行病学研究显示, 老年癌症患者的脑卒中发病率增加, 但年轻脑卒中患者的死亡率更高[28]。

综上所述, 本文通过网络药理学方法, 筛选出淡豆豉防治缺血性卒中的有效成分、关键靶点和信号通路, 预测淡豆豉可能通过作用于 ESR1、PPARG、GSK3B 等关键靶点和 IL-17 信号通路以及其他疾病, 进而发挥治疗缺血性卒中的作用。研究结果体现了中药多成分 - 多靶点 - 多途径的作用特点, 为阐明淡豆豉防治缺血性脑卒中提供了新的见解。

基金项目

2021 年贵州省研究生科研基金项目(黔教合 YJSKYJJ [2021] 173); 贵州中医药大学 2018 年度学术新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2017] 5735 号-15)。

参考文献

[1] GBD 2019 Stroke Collaborators (2021) Global, Regional, and National Burden of Stroke and Its Risk Factors,

- 1990-2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*, **20**, 795-820. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0)
- [2] DeMars, K.M., McCrea, A.O., Yang, C., *et al.* (2017) Abstract TP274: Activation of the Prostaglandin E2 Receptor EP4 Reduces Blood-Brain Barrier Damage in a Rat Model of Ischemic Stroke. *Stroke*, **48**, Article No. ATP274. https://doi.org/10.1161/str.48.suppl_1.tp274
- [3] Jayaraj, R.L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F.Y. and Rosenberg, G.A. (2019) Neuroinflammation: Friend and Foe for Ischemic Stroke. *Journal of Neuroinflammation*, **16**, Article No. 142. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1516-2>
- [4] Feske, S.K. (2021) Ischemic Stroke. *The American Journal of Medicine*, **134**, 1457-1464. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027>
- [5] 关水清, 周改莲, 周媛, 等. 淡豆豉的本草考证及现代研究概况[J]. 中药材, 2020, 43(9): 2296-2303.
- [6] (梁)陶弘景, 撰, 尚志钧, 辑校. 名医别录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [7] 周秋丽, 王涛, 王本祥. 现代中药基础研究与临床[M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 2012.
- [8] Ru, J., Li, P., Wang, J., *et al.* (2014) TCMSP: A Database of Systems Pharmacology for Drug Discovery from Herbal Medicines. *Journal of Cheminformatics*, **6**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- [9] The UniProt Consortium (2020) UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, **49**, D480-D489. <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D480/6006196?login=false>
- [10] Piñero, J., Saüch, J., Sanz, F. and Furlong, L.I. (2021) The DisGeNET Cytoscape App: Exploring and Visualizing Disease Genomics Data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **19**, 2960-2967. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.015>
- [11] Safran, M., Rosen, N., Twik, M., *et al.* (2021) The GeneCards Suite. In: Abugessaisa, I. and Kasukawa, T., Eds., *Practical Guide to Life Science Databases*, Springer, Singapore, 27-56. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5812-9_2
- [12] Sherman, B.T., Hao, M., Qiu, J., *et al.* (2022) DAVID: A Web Server for Functional Enrichment Analysis and Functional Annotation of Gene Lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, **50**, W216-W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- [13] Paul, A.L. (2012) A Series of Novel Neuroprotective Blood Brain Barrier Penetrating Flavonoid Drugs to Treat Acute Ischemic Stroke. *Current Pharmaceutical Design*, **18**, 3694-3703. <https://doi.org/10.2174/138161212802002652>
- [14] Mnafigui, K., Ghazouani, L., Hajji, R., *et al.* (2021) Oleuropein Protects Against Cerebral Ischemia Injury in Rats: Molecular Docking, Biochemical and Histological Findings. *Neurochemical Research*, **46**, 2131-2142. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03351-9>
- [15] Clegg, D., Hevener, A.L., Moreau, K.L., *et al.* (2017) Sex Hormones and Cardiometabolic Health: Role of Estrogen and Estrogen Receptors. *Endocrinology*, **158**, 1095-1105. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1677>
- [16] Iorga, A., Cunningham, C.M., Moazeni, S., *et al.* (2017) The Protective Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease and the Controversial Use of Estrogen Therapy. *Biology of Sex Differences*, **8**, Article No. 33. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>
- [17] Pelekanou, V., Kampa, M., Kiagiadaki, F., *et al.* (2016) Estrogen Anti-Inflammatory Activity on Human Monocytes Is Mediated through Cross-Talk between Estrogen Receptor ER α 36 and GPR30/GPER1. *Journal of Leukocyte Biology*, **99**, 333-347. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0914-430RR>
- [18] Somani, Y.B., Pawelczyk, J.A., De Souza, M.J., Kris-Etherton, P.M. and Proctor, D.N. (2019) Aging Women and Their Endothelium: Probing the Relative Role of Estrogen on Vasodilator Function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **317**, H395-H404. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00430.2018>
- [19] Fu, R., Shen, Y. and Zheng, J. (2019) Association between Common Genetic Variants in ESR1 and Stroke Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, **28**, Article ID: 104355. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104355>
- [20] Verrier, E., Wang, L., Wadham, C., *et al.* (2004) PPAR γ Agonists Ameliorate Endothelial Cell Activation via Inhibition of Diacylglycerol—Protein Kinase C Signaling Pathway. *Circulation Research*, **94**, 1515-1522. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130527.92537.06>
- [21] Hsieh, F.-I., Lo, W.-C., Lin, H.-J., *et al.* (2009) Significant Synergistic Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ C-2821T and Diabetes on the Risk of Ischemic Stroke. *Diabetes Care*, **32**, 2033-2035. <https://doi.org/10.2337/dc09-0717>
- [22] Jope, R.S., Yuskaitis, C.J. and Beurel, E. (2007) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochemical Research*, **32**, 577-595. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9128-5>
- [23] Beurel, E., Grieco, S.F. and Jope, R.S. (2015) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Regulation, Actions, and Diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, **148**, 114-131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>

- [24] Chuang, D.M., Wang, Z. and Chiu, C.-T. (2011) GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **4**, Article 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00015>
- [25] Zhang, Q., Liao, Y., Liu, Z., *et al.* (2021) Interleukin-17 and Ischaemic Stroke. *Immunology*, **162**, 179-193. <https://doi.org/10.1111/imm.13265>
- [26] 李硕, 王建. 大豆异黄酮临床应用的研究进展[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 633-640.
- [27] Zupanic, E., von Euler, M., Winblad, B., *et al.* (2021) Mortality after Ischemic Stroke in Patients with Alzheimer's Disease Dementia and Other Dementia Disorders. *Journal of Alzheimer's Disease*, **81**, 1253-1261. <https://doi.org/10.3233/JAD-201459>
- [28] Zaorsky, N.G., Zhang, Y., Tchelebi, L.T., *et al.* (2019) Stroke among Cancer Patients. *Nature Communications*, **10**, Article No. 5172. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13120-6>