

基于网络药理学和分子对接探究罗布麻叶抗高脂血症的作用机制

许泽恭¹, 祝晨蓀¹, 周玖瑶¹, 赵钟祥¹, 李瑜², 章娟³, 周园¹, 张蕾¹ (1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006; 2. 广州中医药大学护理学院, 广东广州 510006; 3. 广州市药品检验所, 广东广州 510160)

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接方法探究罗布麻叶(*Apocynum venetum* L. leaves, AVL)抗高脂血症的活性成分和分子作用机制。**方法** 依据中药药理学技术平台(TCMSP)数据库、SuperPred webserver、STITCH、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库, 筛选罗布麻叶的潜在活性成分、预测潜在作用靶点。从 OMIM、DrugBank 和 GeneCard 数据库搜索高脂血症疾病的相关靶点信息, 由 Cytoscape 生物信息分析软件构建“分子-靶点-疾病”网络。在 String 数据库中构建蛋白互作网络并在 Cytoscape 中进行可视化。采用 Cytoscape 和 Bioconductor 数据库分别对交集靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 最终采用分子对接进行初步验证。**结果** 筛选出罗布麻叶中金丝桃苷、槲皮素和山柰酚等 28 个活性成分, 作用于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、肿瘤蛋白 P53(TP53)和丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3/ERK1)等 129 个潜在靶点, GO 分析发现罗布麻叶治疗高脂血症的潜在靶点主要参与压力应激、脂质代谢和类固醇代谢等生物过程, KEGG 通路分析主要涉及流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 和 AGE-RAGE 等信号通路。分子对接结果表明潜在活性成分和 AKT1、TP53 和 MARK3 等关键靶蛋白均能稳定结合。**结论** 本研究初步阐述了罗布麻叶抗高脂血症的作用机制, 发现其通过脂质生物合成、炎症反应调控和氧化应激等过程发挥治疗高脂血症的作用。

关键词: 高脂血症; 罗布麻叶; 网络药理学; 分子对接; 脂质生物合成; 炎症反应调控; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)08-1154-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.013

Mechanism Exploration of *Apocynum venetum* L. leaves in Treatment of Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

XU Zegong¹, ZHU Chenchen¹, ZHOU Jiuyao¹, ZHAO Zhongxiang¹, LI Yu², ZHANG Juan³, ZHOU Yuan¹, ZHANG Lei¹ (1. School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. School of Nursing, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the active compounds and integrative mechanism of *Apocynum venetum* L. leaves (AVL) in treatment of hyperlipidemia by using network pharmacology and molecular docking. **Methods** According to Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Technology Platform (TCMSP) database, SuperPred webserver, Swiss Target Prediction, STITCH and PharmMapper database, the potential active ingredients of AVL were screened and the potential targets of action were predicted. The targets of hyperlipidemia were obtained from OMIM, Drug Bank and GeneCard databases, and the compound-target-disease interaction network was built using Cytoscape3.7.2. The protein-protein interaction network was erected in the STRING database and visualized through Cytoscape. Then, Cytoscape and Bioconductor databases were respectively utilized for performing GO and KEGG pathway enrichment analysis on the intersectional targets. Finally, molecular docking was used for preliminary verification. **Results** 28 active ingredients including hyperoside, quercetin and kaempferol in AVL, as well as

收稿日期: 2020-12-02

作者简介: 许泽恭, 男, 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础及其作用机制研究。Email 583296915@qq.com。通信作者: 张蕾, 女, 教授, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及其作用机制研究。Email zhanglei261291@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803824); 广东省科技计划项目(2016A020226031); 广东省自然科学基金项目(2018A030313328)。

129 potential targets, such as serine/threonine protein kinase (AKT1), tumor P53 (TP53) and mitogen activated protein kinase 3 (MAPK3/ERK1) were screened out. GO analysis found that the potential targets of AVL in treatment of hyperlipidemia were mainly involved in biological processes including response to stress, lipid metabolism and steroid metabolism. KEGG pathway analysis mainly involved fluid shear stress and atherosclerosis, IL-17 signaling pathway and AGE-RAGE signaling pathway, etc. The molecular docking results indicated that the potential active ingredients could bind stably to key proteins such as AKT1, TP53 and MARK3. **Conclusion** This study preliminarily explained the mechanism of AVL in the treatment of hyperlipidemia. We found that AVL exerts anti-hyperlipidemia activity through regulating lipid biosynthesis, inflammatory response and oxidative stress.

Keywords: Hyperlipidemia; *Apocynum venetum* L. leaves; network pharmacology; molecular docking; lipid biosynthesis; regulation of inflammatory response; oxidative stress

罗布麻(*Apocynum venetum* L.) 为夹竹桃科植物, 别名野麻、泽漆麻、羊肚拉角等, 其叶(*Apocynum venetum* L. leaves, AVL) 是一味传统中药, 含有鞣质、黄酮类、酚酸类、脂肪酸醇脂等化学成分, 具有降压、降血脂、抗氧化和肝保护等作用^[1], 临床观察显示其可以治疗高脂血症^[2]。罗布麻叶治疗高脂血症的物质基础和机理研究进展缓慢, 故本研究首次运用网络药理学和分子对接的方法, 从罗布麻叶的降脂作用出发, 对罗布麻叶主要化学成分治疗高脂血症的作用机制进行系统分析, 以期为其治疗高脂血症提供依据。

1 材料与方法

1.1 罗布麻叶活性成分筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmssp.com/tcmssp.php>)收集的罗布麻叶的主要化学成分, 并参考以下条件: (1)罗布麻在 2020 年版《中华人民共和国药典》中规定的质量标志物; (2)通过 CNKI 和 PubMed 文献数据库搜索得到的目前已被发现具有明确药理活性、在药物中含量较高或者能够吸收入血^[3]的成分。

1.2 化合物作用靶点的收集 通过 TCMSP、CNKI 和 PubChem 数据库搜索其作用于人体的已知基因靶点; 再将化合物导入 SwissTargetPrediction、SuperPred webservice、STITCH 和 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>), 预测潜在作用靶点。其中, Swiss Target Prediction 是基于 2D 和 3D 相似性原理预测小分子蛋白质靶标的在线预测工具, 上传成分的 SMILES 格式, 3D 相似性阈值设置为 0.85, 2D 相似性阈值设置为 0.65, probability 设置为 >0.7, 选择物种为 “Homo sapiens”; SuperPred

webservice 基于相似性原理预测化合物靶标, 上传成分的 SMILES 格式, 获取活性成分的靶点; STITCH 是一个化合物-蛋白相互作用的数据库, 包含了已知的和预测的相互作用, 上传成分的 SMILES 格式, 将物种设置为 “Homo sapiens”, 选择分数大于 0.8 的靶点; PharmMapper 通过 “反向药效团匹配方法” 预测靶点, 匹配阈值选择为 300, 物种限定为人类蛋白。对上述结果汇总、去重, 导入 UniProt 数据库中, 将检索到的所有靶标校正为 official symbol, 即官方名称。

1.3 罗布麻叶治疗高脂血症疾病靶点筛选 通过 OMIM (<http://www.omim.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/targets>) 和 GeneCard (<https://www.genecards.org/>) 数据库, 以 “hyperlipidemia” 为关键词进行检索, 搜索高脂血症相关靶点。整合上述数据库得到的高脂血症靶点, 剔除重复基因和假阳性基因, 与 “1.2” 项数据进行映射, 得到罗布麻叶抗高脂血症的潜在作用靶点。

1.4 “成分-靶点-疾病” 网络的构建和分析 采用 Cytoscape version 3.7.2 软件构建 “成分-靶点-疾病” 网络。在网络中的节点(node)代表化合物或者蛋白靶点, 化合物-靶点的相互作用由边(edge)表示。对网络的拓扑属性进行分析, 计算节点连接度、节点介度和节点紧密度 3 个重要的网络拓扑参数。最后利用网络拓扑属性分析罗布麻叶治疗高脂血症的主要活性成分。

1.5 蛋白质相互作用网络构建 在 STRING 11.0 平台 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 物种限定成 “Homo sapiens”, “interaction score” 限定为 “high confidence(0.7)”, 此外的参数保持默认设置, PPI 网

络通过 Cytoscape 3.7.2 进行拓扑属性分析, 筛选 PPI 网络中的关键靶点蛋白。

1.6 GO 功能富集分析 运用 Cytoscape 软件里面的 BiNGO (Biological Networks Genen Ontologutool) 插件对上述共同靶蛋白基因进行 GO (Gene Ontology) 功能富集分析, 得到的结果采取可视化分析, 并筛选部分关键功能绘制柱状图。

1.7 KEGG 通路富集分析 运用 Bioconductor 数据库的后台数据包 ClusterProfiler 对共同基因进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析, 筛选排名靠前的生物过程和通路, 联合成分靶点信息进行可视化分析, 绘制“成分-靶点-通路”网络图。

1.8 分子对接 选择 PPI 网络中度 (degree) 值排名前 5 位的靶蛋白, 从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载其 3D 结构, 保存为 PDB 格式文件。选择度 (degree) 值大于中位数的潜在活性成分, 从 ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>) 下载其 Mol2 格式文件, 或者从 ZINC 数据库中下载其 SDF 格式文件, 再通过 Openbabel 软件转化成 Mol2 格式。利用分子对接模拟软件 autodock, 将经过脱水分子和加氢等预处理的靶蛋白存为 pdbqt 格式, 将化合物设置成可旋转键后存为 pdbqt 格式, 最终进行对接模拟计算。如果结合能 < 0 表明靶蛋白和化合物可自发结合, 结合能 $\leq -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明靶蛋白和化合物结合活性较好。

2 结果

2.1 罗布麻叶活性成分及作用靶点的筛选 如表 1 所示, 本研究共筛选出 28 个活性成分, 主要包含黄酮类和酚酸类, 编号为 M1-28。将罗布麻叶 28 种潜在活性成分 SDF 格式的 3D 结构导入到 PharmMapper、SuperPred webservice、STITCH 和 Swiss target 数据库, 选择限定为人类基因蛋白, 最终整合去除重复靶点得到罗布麻活性成分作用靶点 422 个。

2.2 罗布麻候选成分抗高脂血症的靶点预测 将 28 个候选成分在 TCMSp、PubChem、STITCH、SuperPred webservice、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库中获得的 422 个潜在作用靶点根据匹配度从高到低进行排序。以“hyperlipidemia”为关键词, 将数据库 OMIM、DrugBank 和 GeneCard 获得的人源靶点汇总后并去除重复、假阳性靶点, 最终获得与高脂血症密切相关的 1 376 个人源靶点。将罗布麻 28 个潜在活性成分作用的 422 个作用靶点映射到 1 376 个

表 1 罗布麻叶 (AVL) 潜在活性化合物的基本信息

Table 1 Basic information of potential active compounds of AVL

编号	化合物名称	分子式	成分类型	生物利用度/%	类药性
M1	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸类	63.53	0.06
M2	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	苯丙素类	19.61	0.33
M3	绿原酸	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	苯丙素类	25.58	0.33
M4	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	苯丙素类	24.50	0.33
M5	4,5-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	苯丙素类	31.76	0.68
M6	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	黄烷醇	28.93	0.24
M7	1-CQA	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	苯丙素类	/	/
M8	槲皮素 3'-O-(6-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	黄酮苷	/	/
M9	山柰酚 3-O-β-D-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	黄酮苷	/	/
M10	山柰酚 3-O-(6''-O-乙酰基)-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	黄酮苷	/	/
M11	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	黄酮醇	46.43	0.28
M12	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	黄酮醇	41.88	0.24
M13	白麻苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	黄酮苷	3.37	0.67
M14	槲皮素 3-O-[2''-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	黄酮苷	/	/
M15	杨梅素-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ C ₁₃	黄酮苷	1.43	0.79
M16	山柰酚-3-O-槐糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	黄酮苷	/	/
M17	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	黄酮苷	3.20	0.68
M18	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮苷	6.94	0.77
M19	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮苷	1.87	0.77
M20	槲皮素-3-O-(6''-O-丙二酰基)-吡喃半乳糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	黄酮苷	/	/
M21	槲皮素-3-O-(6''-O-丙二酰基)-吡喃葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	黄酮苷	/	/
M22	三叶豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	黄酮苷	19.61	0.74
M23	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	黄酮苷	14.03	0.74
M24	槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	黄酮苷	/	/
M25	槲皮素 3-O-(6''-O-乙酰基)-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	黄酮苷	/	/
M26	山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	黄酮苷	/	/
M27	山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	黄酮苷	/	/
M28	东莨菪碱	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	生物碱	49.84	0.27

高脂血症疾病靶点中, 最终获得罗布麻抗高脂血症的 129 个潜在作用靶点, 如图 1。

2.3 罗布麻叶治疗高脂血症“成分-靶点-疾病”关系网络构建 如图 2 所示, “成分-靶点-疾病”网络图

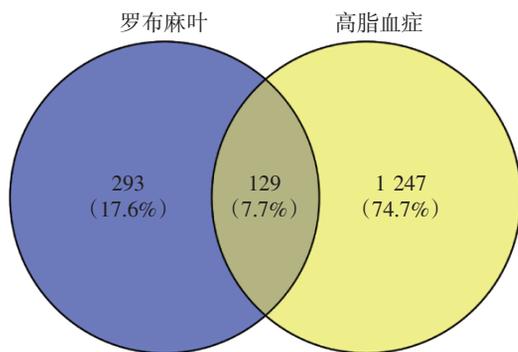
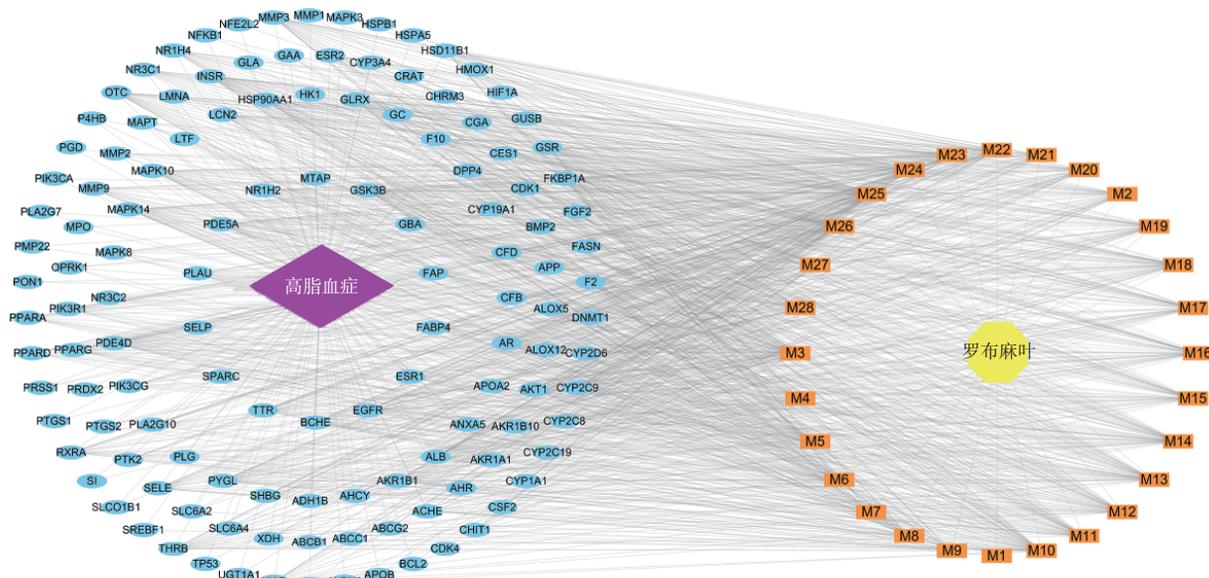


图 1 罗布麻叶(AVL)成分作用靶点和高血脂症相关靶点的交集基因韦恩图

Figure 1 Vann diagram of intersecetion gene of AVL targets and hyperlipidemia related targets

中共有节点 159 个, 连线 2 714 条, 包括 28 个罗布麻叶活性成分节点和 129 个作用靶点节点。经计算, 该网络连接度平均为 17.07, 介度平均为 0.01, 紧密度平均为 0.46。有 10 种成分连接度、介度、紧密度大于或等于其平均值, 拓扑参数见表 2。网络图中重组丝裂原活化蛋白激酶 10(MAPK10)、重组人谷胱甘肽还原酶(GSR)、重组人谷胱甘肽还原酶 3B(GSR3B)、丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT(AKT1)分别与 28、28、28、27 和 27 个化合物相联系, 说明罗布麻叶中不同活性成分可作用于相同或不同的靶点, 充分表明罗布麻叶多成分、多靶点治疗高血脂症的机制。



注: 紫红色为疾病, 蓝色为靶点基因, 黄色为药物, 棕色为活性成分

图 2 罗布麻叶(AVL)成分-靶点-高血脂症互作网络图

Figure 2 Interaction network of compounds of AVL-targets-hyperlipidemia targets

表 2 罗布麻叶(AVL)治疗高血脂症的主要活性成分拓扑参数

Table 2 Topological parameters of main active ingredients of AVL in the treatment of hyperlipidemia

编号	活性成分	连接度	介度	紧密度
M25	槲皮素 3-O-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷	79	0.10	0.55
M26	山柰酚 3-O-(6'-O-丙二酰基)-半乳糖苷	69	0.06	0.51
M3	绿原酸	62	0.04	0.49
M10	山柰酚 3-O-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷	60	0.03	0.48
M24	槲皮素 7-O-(6'-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	56	0.02	0.47
M14	槲皮素 3-O-[2'-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	55	0.01	0.47
M13	白麻苷	54	0.01	0.47
M12	山柰酚	51	0.02	0.46
M11	槲皮素	48	0.02	0.46
M18	金丝桃苷	48	0.01	0.46

2.4 罗布麻叶治疗高血脂症关键靶点的 PPI 网络构建

如图 3 所示, PPI 网络图包括 117 个节点, 994 条边。图中每一个节点代表一种蛋白质, 每条边表示蛋白质与蛋白质之间的相互作用关系, 两个节点之间线条越多则表示之间的关联度越大。利用度中心性筛选蛋白互作网络中的关键靶点, 靶点的度中心性越大, 说明其在网络中越重要。经计算, 该网络连接度平均为 8.50, 介度平均为 0.02, 紧密度平均为 0.37, 选择连接度、介度、紧密度均大于等于平均值的节点作为候选靶点, 得到罗布麻叶治疗 HLP 的关键靶点 21 个, 关键靶点的拓扑参数详见表 3。

2.5 罗布麻叶治疗高血脂症的 GO 富集分析

通过 Cytoscape 软件对 129 个共同靶点进行 GO 富集分

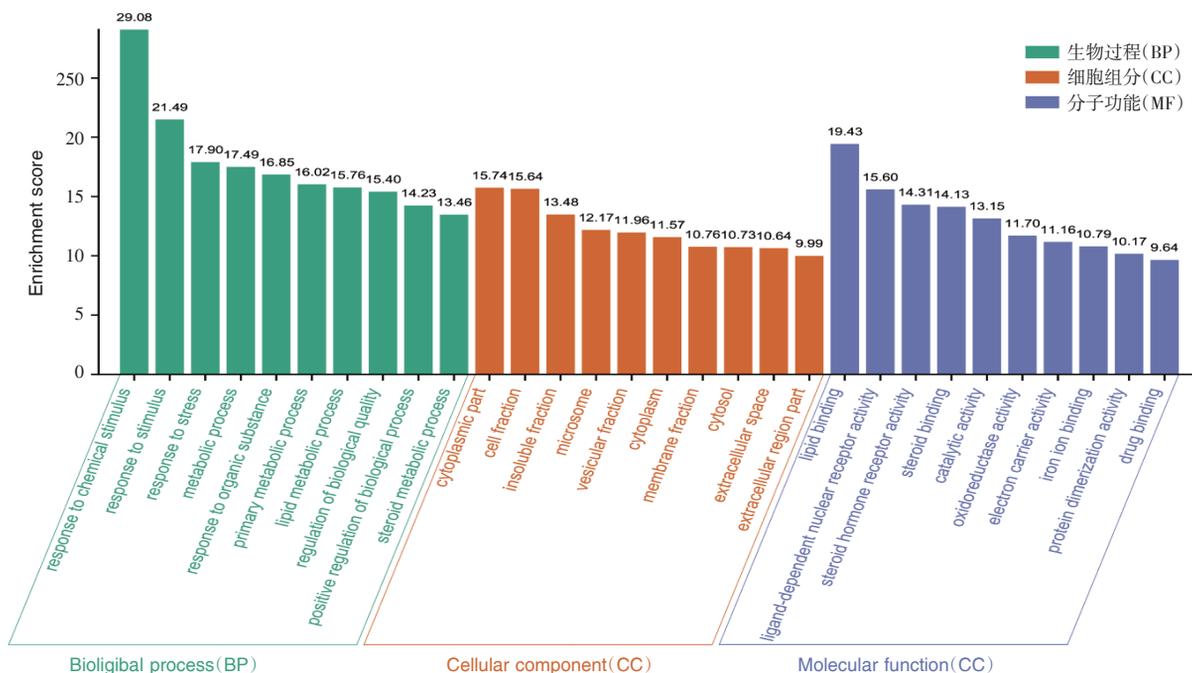


图 4 罗布麻叶(AVL)治疗高脂血症的交集靶点 GO 分析图

Figure 4 Go analysis of the intersection targets of AVL in the treatment of hyperlipidemia

2.6 罗布麻叶治疗高脂血症的 KEGG 分析

KEGG 通路注释分析结果显示,潜在靶点涉及到 132 条相关信号通路($P < 0.05$),以 P 值为筛选条件,前 20 个通路如图 5。参考有关研究^[4-10],在 KEGG 分析结果中发现有 8 条信号通路与高脂血症密切相关,具体信息如表 4 所示。为了进一步探索罗布麻叶抗高脂

血症的成分及其靶点在疾病通路网络中发挥的作用,运用 Cytoscape 3.7.2 构建罗布麻叶抗高脂血症潜在活性成分-作用靶点-通路网络,结果显示罗布麻叶所有的活性成分以及 132 个靶点中有 52 个参与了与高脂血症密切相关通路的富集,见图 6。

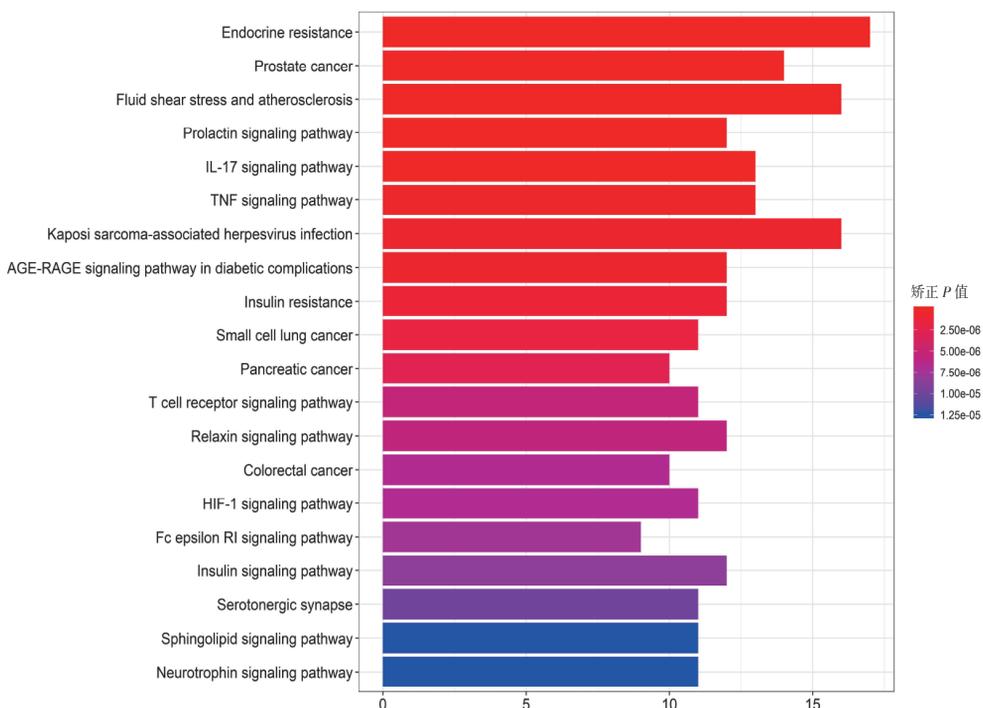


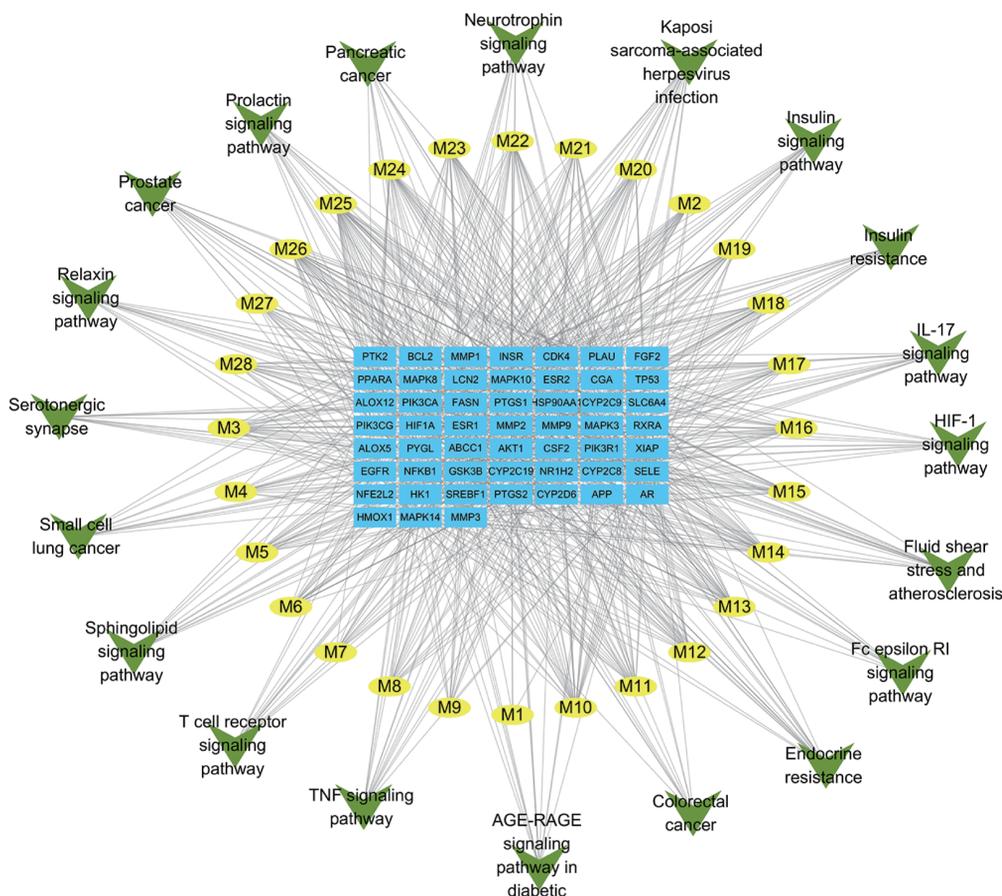
图 5 罗布麻叶(AVL)治疗高脂血症的交集靶点 KEGG 通路富集分析

Figure 5 Enrichment analysis of KEGG pathways for the intersection targets of AVL in the treatment of hyperlipidemia

表 4 罗布麻叶(AVL)治疗高脂血症的交集靶点的 KEGG 信号通路

Table 4 KEGG signaling pathways of intersection targets of AVL in the treatment of hyperlipidemia

KEGG ID	KEGG Term	P 值	Genes ID
hsa05418	流体剪切应力与动脉粥样硬化	1.15×10 ⁻¹⁰	MAPK10/HSP90AA1/MAPK8/MAPK14/MMP2/PIK3R1/PTK2/MMP9/AKT1/SELE/NFKB1/PIK3CA/TP53/NFE2L2/BCL2/HMOX1
hsa04657	IL-17 信号通路	7.12×10 ⁻¹⁰	GSK3B/MAPK10/HSP90AA1/MAPK8/MAPK14/LCN2/MMP3/MMP9/PTGS2/MMP1/MAPK3/NFKB1/CSF2
hsa04668	TNF 信号通路	6.46×10 ⁻⁹	MAPK10/MAPK8/MAPK14/MMP3/PIK3R1/MMP9/AKT1/SELE/PTGS2/MAPK3/NFKB1/PIK3CA/CSF2
hsa04933	AGE-RAGE 信号通路	1.75×10 ⁻⁸	MAPK10/MAPK8/MAPK14/MMP2/PIK3R1/AKT1/SELE/CDK4/MAPK3/NFKB1/PIK3CA/BCL2
hsa04926	松弛素信号通路	1.34×10 ⁻⁷	EGFR/MAPK10/MAPK8/MAPK14/MMP2/PIK3R1/MMP9/AKT1/MMP1/MAPK3/NFKB1/PIK3CA
hsa04066	HIF-1 信号通路	4.29×10 ⁻⁷	EGFR/HK1/INSR/PIK3R1/AKT1/HIF1A/MAPK3/NFKB1/PIK3CA/BCL2/HMOX1
hsa04664	FcεRI 信号通路	4.98×10 ⁻⁷	MAPK10/MAPK8/MAPK14/ALOX5/PIK3R1/AKT1/MAPK3/PIK3CA/CSF2
hsa04930	VEGF 信号通路	1.83×10 ⁻⁶	MAPK14/PIK3R1/PTK2/AKT1/PTGS2/HSPB1/MAPK3/PIK3CA



注：黄色节点代表成分，蓝色节点代表靶点，绿色节点代表通路

图 6 罗布麻叶(AVL)抗高脂血症的成分-靶点-通路网络

Figure 6 Components-targets-pathways network of AVL against hyperlipidemia

2.7 罗布麻叶治疗高脂血症的分子对接结果 PPI 网络分析中 degree 值排名前 5 位的靶蛋白为：AKT1 (PDB ID: 4GV1)、TP53 (PDB ID: 6SHZ)、MAPK3 (PDB ID: 4QTB)、APP (PDB ID: 1MWP) 和 ALB (PDB ID: 2VDB)，将其与 degree 值大于中位数的潜在活性成分进行分子对接，结果发现，除白麻苷与 TP53 的结合能大于 0 之外，所有活性成分与靶

蛋白的结合能均小于 0。一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低，发生的作用可能性越大，且结合能越低对接的效果越好。以辛伐他汀为阳性对照药，罗布麻叶中部分活性成分与靶蛋白的结合活性优于辛伐他汀，结果见表 5。其中与靶点 AKT1 和 TP53 较好结合的是山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷 (-6.05 kcal·mol⁻¹, -5.82 kcal·mol⁻¹)，

与靶点 MAPK3 较好结合的是金丝桃苷，与靶点 APP 较好结合的是槲皮素 3-O-[2''-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(-6.48 kcal·mol⁻¹)，与靶点 ALB 较好结合的是槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷(-6.25 kcal·mol⁻¹)，通过 pymol 软件对其绘图。从图 7 可以看出，山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷与 AKT1 在 ILE-447 和 ILE-449 位形成氢键；山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷与 TP53 在 ARG-273 和 GLN-165 位形成氢键；金丝桃苷与靶点 MAPK3 在 THR-347 和 GLU-344 位形成氢键；槲皮素 3-O-[2''-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与靶点 APP 在 CYS-105、ASN-96 和 SER-54 位形成氢键；槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷与靶点 ALB 在 GLN-32 位形成氢键。综上可知，罗布麻叶潜在活性成分和关键靶蛋白有较好结合活性。

β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与靶点 APP 在 CYS-105、ASN-96 和 SER-54 位形成氢键；槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷与靶点 ALB 在 GLN-32 位形成氢键。综上可知，罗布麻叶潜在活性成分和关键靶蛋白有较好结合活性。

3 讨论

高脂血症是指体内脂肪代谢或转运异常导致的血脂高于正常水平的疾病，是许多心血管疾病主要致病因素之一^[12-14]。临床上常采取他汀类等降血脂药物治疗高脂血症，但临床数据显示，他汀类药物具有

表 5 罗布麻叶(AVL)主要活性成分与 PPI 网络中部分关键靶点的结合能

Table 5 Binding energy of the main active components of AVL with some key target in the PPI network

编号	化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
		AKT1(PDB ID: 4GV1)	TP53(PDB ID: 6SHZ)	MAPK3(PDB ID: 4QTB)	APP(PDB ID: 1MWP)	ALB(PDB ID: 2VDB)
M25	槲皮素 3-O-(6''-O-乙酰基)-葡萄糖苷	-5.56	-2.50	-3.17	-5.36	-4.66
M26	山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷	-6.05	-5.82	-2.12	-4.38	-4.42
M3	绿原酸	-1.65	-2.25	-1.57	-2.34	-1.43
M10	山柰酚 3-O-(6''-O-乙酰基)-葡萄糖苷	-3.23	-3.09	-1.36	-3.36	-1.54
M24	槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	-4.80	-5.12	-2.12	-5.36	-6.25
M14	槲皮素 3-O-[2''-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	-5.48	-2.27	-3.29	-6.48	-4.83
M13	白麻苷	-0.97	1.12	-1.74	-0.52	-0.14
M12	山柰酚	-4.07	-3.12	-2.28	-4.37	-3.23
M11	槲皮素	-2.79	-4.07	-2.19	-4.08	-2.97
M18	金丝桃苷	-5.91	-4.14	-4.67	-5.04	-4.68
M0	辛伐他汀	-3.70	-4.92	-2.07	-4.47	-4.78

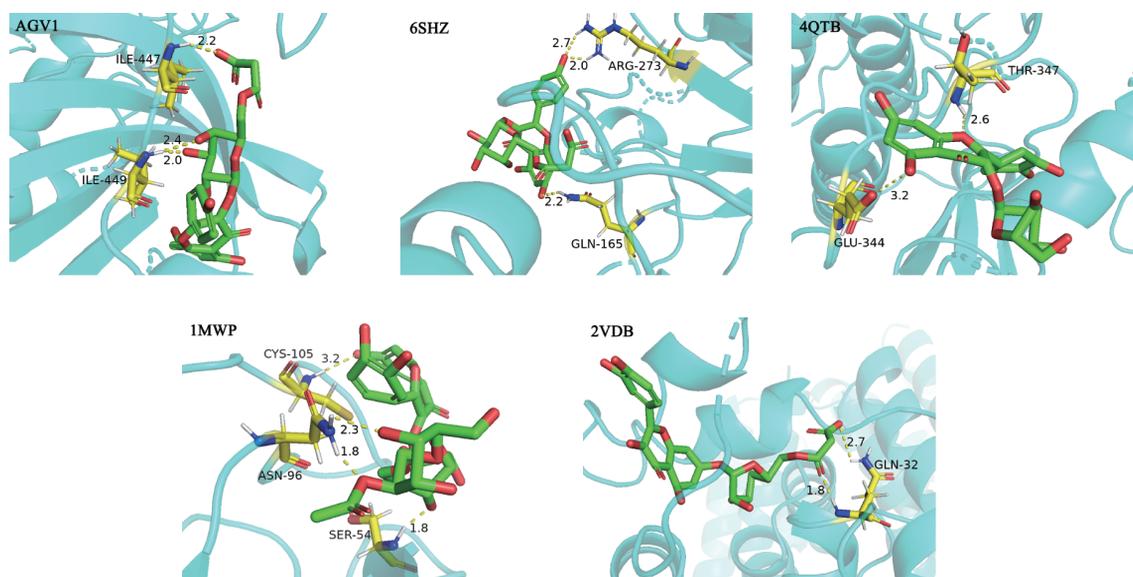


图 7 罗布麻叶(AVL)治疗高脂血症关键靶蛋白和对接后结合能最低的化合物的分子对接模式图

Figure 7 Molecular docking diagram of the key target proteins and compound with the lowest binding energy after docking of AVL in the treatment of hyperlipidemia

较强的肌毒性^[15]。因此采用毒副作用更小的药物是治疗高脂血症的重要策略之一。

有研究表明,罗布麻叶提取物能够治疗高脂血症^[16-17],具有很好的降脂作用及较低的毒副作用,可制作成罗布麻茶,对降血脂有帮助^[18]。本研究采用网络药理学的方法挖掘罗布麻叶的降脂作用,构建分子-靶点-疾病网络,可知罗布麻叶治疗高脂血症的潜在活性成分和作用靶点,此外构建 PPI 网络和靶点关联通路分析,可为罗布麻叶治疗高脂血症作用机制提供参考。

本研究结果发现罗布麻叶作用的关键靶点包括 AKT1、TP53、MAPK3、APP、ESR1 等。有研究^[19]发现与关键脂质相关联的靶点有 AKT1、TP53 和 ESR1,与本研究相一致。其中,AKT,又称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),广泛分布在组织中,AKT 在 PI3K 产生的第二信使 PI-3,4,5-P 作用下激活,参与脂质生物合成,如柠檬酸裂解酶和脂质酰合酶^[20]。MAPK3/ERK1 参与生长因子信号传导,有研究^[21]发现 ERPK1/2 在 GPR146 的促进下增加 SREBP2 活性和 VLDL 分泌速率,在增加全身性胆固醇代谢中起作用。TP53,也叫肿瘤蛋白 P53,当它发生突变而功能缺失时,甲羟戊酸途径便会失去控制,增加癌症的发病风险^[22];而阻断甲羟戊酸代谢途径,可以降低体内的胆固醇^[23],提示 TP53 可以通过调节甲羟戊酸途径,进而影响高脂血症的发展。淀粉样前蛋白(APP),是阿尔兹海默症(AD)的重要靶点。有研究表明调节体内的胆固醇会改变 APP 基因的表达水平^[24]。一些流行性病学研究也发现服用降胆固醇药物的患者有较少的 AD 患病率。ESR1 (estrogen receptor α),编码雌激素受体,可介导雌激素发挥生物学作用。Teng Zhao 等^[25]研究发现 ESR1 在高脂血症风险中具有潜在作用。罗布麻叶提取物能够明显升高心肌 AKT 和 ERK1/2 磷酸化水平,抑制缺血再灌注所致的心肌细胞损伤^[26]。5-CQA 通过 TP53 依赖性调节信号通路对 NSCLC 细胞发挥抗侵袭活性^[27]。罗布麻叶中的槲皮素成分能够通过诱导 ESR1 调控 apo A-I 基因的表达,有益于脂代谢的调节^[28]。综上所述,罗布麻叶中多种成分共同作用与关键靶点发挥抗高脂血症作用,如槲皮素和 5-CQA 等,能够影响 AKT、TP53 或 ESR1 等靶点参与体内脂质生物的合成和调节体内胆固醇的代谢,进而影响高脂血症的发展;同时本实验结果显示,除上述文献报道的成分外,罗布麻叶其他成分也参与治疗

高脂血症关键靶点的调控。

KEGG 分析结果表明罗布麻叶治疗高脂血症的关键靶点富集在流体剪切应力与动脉粥样硬化 (Fluid shear stress and atherosclerosis)、白细胞介素 (IL)-17 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等。流体剪切应力在调节内皮细胞的形态和功能中起着重要作用。当血管中剪切应力降低时,相应位置的脂质增加^[4]。然而关于罗布麻叶对流体剪切应力通路的调控尚未见报道,需深入研究。IL-17 是一种促炎性细胞因子,研究^[29]表明 PCSK9 可以通过产生 IL-17 的细胞介导高脂血症、动脉粥样硬化和免疫应答的交联。含金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷和槲皮素的巫山神茶总黄酮可以通过调节 IL-17 通路预防小鼠食道癌^[5]。AGE-RAGE 通路中晚期糖基化终末产物 (AGEs) 与糖尿病、AS 和高脂血症密切相关,有研究发现 AGE 受体 (a receptor for AGE, RAGE) 的表达是由高血脂和氧化应激诱导的^[7]。Kapil Suchal 等^[30]研究发现罗布麻叶中所含的山柰酚可通过降低 AGE-RAGE /MAPK 诱导的氧化应激和炎症反应减轻糖尿病大鼠的心肌缺血-再灌注损伤。以上报道体现了罗布麻叶可以影响本实验获得的 IL-17、AGE-RAGE 等信号通路,从而介导炎症反应、氧化应激和脂质代谢等过程。

此外,本研究利用分子对接方法进一步验证了罗布麻叶抗高脂血症的作用机制,结果发现罗布麻叶中的潜在活性成分与 AKT1 (PDB ID: 4GV1)、TP53 (PDB ID: 6SHZ)、MAPK3 (PDB ID: 4QTB)、APP (PDB ID: 1MWP) 和 ALB (PDB ID: 2VDB) 等关键靶蛋白具有较好的结合活性,其中槲皮素 3-O-(6''-O-乙酰基)-半乳糖苷、山柰酚 3-O-(6''-O-丙二酰基)-半乳糖苷、槲皮素 7-O-(6''-O-丙二酰基)-葡萄糖苷、槲皮素 3-O-[2''-O-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 6)]-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷和金丝桃苷等关键靶蛋白的结合程度整体上比阳性对照药辛伐他汀更好。

综上所述,本研究利用网络药理学探究罗布麻叶与高脂血症的复杂网络关系,发现罗布麻叶潜在活性成分金丝桃苷、槲皮素和山柰酚等,通过参与脂质生物合成、炎症反应调控和氧化应激等过程,调节 IL-17、AGE-RAGE 和 VEGF 等信号通路延缓高脂血症的发生发展,同时利用分子对接证明了罗布麻叶治疗高脂血症的合理性,为后续进一步探讨罗布麻叶治疗高脂血症的作用机制提供良好基础。

参考文献:

- [1] 侯晋军, 韩利文, 杨官娥, 等. 罗布麻叶化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1603-1605.
- [2] 刘顺美, 刘美华, 陈浩球, 等. 罗布麻治疗高脂血症疗效观察[J]. 中医杂志, 1988, 38(2): 20.
- [3] 周春玲. 罗布麻叶质量控制和相关成分药代动力学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [4] CHENG C, TEMPEL D, VAN HAPEREN R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress[J]. *Circulation*, 2006, 113(23): 2744-2753.
- [5] JIA X B, ZHANG Q, XU L, et al. Effect of *Malus asiatica* Nakai leaf flavonoids on the prevention of esophageal cancer in C57BL/6J mice by regulating the IL-17 signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 6987-6996.
- [6] 李虹仪, 习欠云, 张永亮. TNF- α 在脂肪中的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(S1): 75-77.
- [7] UEKITA H, ISHIBASHI T, SHIOMI M, et al. Integral role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in nondiabetic atherosclerosis[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2019, 65(3): 109-121.
- [8] 樊庭宇, 曲戎梅, 冯雁婷, 等. 不同浓度细胞松弛素D对人脂肪源干细胞分化能力的影响[J]. 中国临床解剖学杂志, 2018, 36(1): 45-50.
- [9] 刘淑玲, 蔡海荣, 蔡鑫桂, 等. 红花黄色素对高脂血症家兔抗动脉硬化的作用[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(8): 603-610.
- [10] 崔杏杏, 李瑶, 任梦, 张孝国, 张琨, 陈士俊, 王婧. 敲除 Fc ϵ R1 加重小鼠非酒精性脂肪肝病[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(7): 946-950.
- [11] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在物质基础研究[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.
- [12] 张沛然, 郭改会. 高脂血症的发病机制及分类[J]. 中国临床医生, 2012, 40(3): 18-20.
- [13] AL-TAMIMI H, AL-DAWOOD A, AWAISHEH S. Resveratrol mitigates hypercholesterolemia exacerbated hyperthermia in chronically heat-stressed rats[J]. *Vet World*, 2019, 12(2): 337-344.
- [14] 王宏, 江茜, 康利, 等. 基于微生物16S rDNA测序技术研究高脂血症豚鼠肠道菌群的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(10): 1011-1015.
- [15] 丁关庆. 服用他汀类降脂药应注意严重不良反应[J]. 家庭医学, 2015, 28(10): 23.
- [16] 李芝, 王超云, 张树平, 等. 罗布麻叶总黄酮对高脂高盐大鼠高血压的影响及其分子机制[J]. 中草药, 2012, 43(3): 540-545.
- [17] 张素琼, 燕虹, 李青山. 罗布麻叶有效部位降血脂及抗动脉粥样硬化的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(9): 831-832.
- [18] 韩彦彬, 杨俊峰, 赵鹏, 等. 罗布麻茶对高脂血症模型大鼠降血脂作用的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9): 2154-2156.
- [19] RAI S, BHATNAGAR S. Hyperlipidemia, disease associations, and top 10 potential drug targets: a network view[J]. *Omicron - a Journal of Integrative Biology*, 2016, 20(3): 152-168.
- [20] 刘丹丹. PI3K-Akt信号通路在葡萄糖诱导的鹅肝细胞脂质合成中的作用研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2014.
- [21] YU H, RIMBERT A, PALMER A E, et al. GPR146 deficiency protects against hypercholesterolemia and atherosclerosis[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1276-1288.e14.
- [22] MOON S H, HUANG C H, HOULIHAN S L, et al. p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 564-580.e19.
- [23] VAUGHAN C J, Gotto Jr A M. Update on statins: 2003[J]. *Circulation*, 2004, 110(7): 886.
- [24] WOOD W G, LI L, MÜLLER W E, et al. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis[J]. *J Neurochem*, 2014, 129(4): 559-572.
- [25] ZHAO T, ZHANG D, LIU Y, et al. Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women[J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(1): 50-54.
- [26] 屈小玲, 王文清, 梁向艳, 等. 罗布麻叶提取物预处理对缺血再灌注大鼠心肌损伤的作用[J]. 微循环学杂志, 2015, 25(2): 15-18, 26, 80.
- [27] IN J K, KIM J K, OH J S, et al. 5-Caffeoylquinic acid inhibits invasion of non-small cell lung cancer cells through the inactivation of p70S6K and Akt activity: involvement of p53 in differential regulation of signaling pathways[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5): 1907-1912.
- [28] HAAS M J, ONSTEAD-HAAS L M, SZAFRAN-SWIETLIK A, et al. Induction of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by the isoflavones quercetin and isoquercetin[J]. *Life Sci*, 2014, 110(1): 8-14.
- [29] KIM Y U, KEE P, DANILA D, et al. A critical role of p53 in mediating IL-17-producing T cell responses in hyperlipidemia[J]. *Immune Network*, 2019, 19(6).
- [30] SUCHAL K, MALIK S, KHAN S I, et al. Molecular pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1001.

(编辑: 修春)