

基于网络药理学和分子对接技术探讨金银花-连翘药对治疗川崎病的机制

马锦¹, 宋秀道², 桂环¹, 朱增燕¹, 吕海涛³ (1. 苏州大学附属儿童医院药剂科, 江苏 苏州 215025; 2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 中药临床药学实验室, 江苏 苏州 215009; 3. 苏州大学附属儿童医院心血管内科, 江苏 苏州 215025)

摘要: **目的** 基于网络药理学与分子对接技术探讨“金银花-连翘”(Jinyinhua-Lianqiao, JYH-LQ)药对治疗川崎病的主要活性成分与潜在分子机制。**方法** 利用 TCMS 数据库筛选“金银花-连翘”药对的主要活性成分及其作用靶标, 其中 TCMS 数据库中无靶点信息的化合物应用 SwissTargetPrediction 数据库进行靶标预测补充。通过 OMIM、DRUGBANK、GeneCards 以及 Disgenet 数据库查找与川崎病相关的靶标, 建立川崎病相关靶标数据集, 与“金银花-连翘”药对潜在作用靶标取交集。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图, 并利用 Cytoscape 软件的插件 Cytohubba 筛选出 PPI 网络中的核心基因。利用 DAVID 数据库对“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。使用 Autodock 软件进行分子对接验证。**结果** “金银花-连翘”药对中共筛选出 42 个主要活性成分, 282 个潜在作用靶标。共得到川崎病相关靶标 1 127 个, 其中 75 个川崎病相关靶标是“金银花-连翘”药对的潜在作用靶标, 涉及 36 个活性成分。IL-6、TNF、PTGS2 等 17 个靶标被进一步筛选为“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 PPI 网络图中的核心基因。KEGG 富集分析显示, “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标主要富集于 TNF 信号通路等, 进而构建“金银花-连翘药对-活性成分-川崎病靶标-通路”网络图。分子对接结果显示, “金银花-连翘”药对的核心活性成分槲皮素、芦丁、山柰酚、汉黄芩素以及 β -胡萝卜素可以对富集于 TNF 信号通路中的 11 个核心基因(IL-6、TNF、PTGS2、MMP9、AKT1、CASP3、CCL2、ICAM1、MAPK8、IL-1 β 以及 MAPK1)发挥调控作用。**结论** 研究表明, “金银花-连翘”药对治疗川崎病具有多成分、多途径、多靶点作用的特点, 涉及抗炎、抗血小板等多个作用, 为其治疗川崎病的物质基础和分子机制研究提供了新的线索, 也为其临床应用提供了一定的依据。

关键词: 金银花; 连翘; 网络药理学; 分子对接; 川崎病; 作用靶标; 抗炎; 抗血小板

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0069-11

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2022. 01.011

Exploration on Molecular Mechanism of Lonicerae Japonicae Flos-Forsythiae Fructus Herbal Pair in Treating Kawasaki Disease Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

MA Jin¹, SONG Xiudao², GUI Huan¹, ZHU Zengyan¹, LYU Haitao³ (1. Department of Clinical Pharmacy, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025 Jiangsu, China; 2. Clinical Pharmaceutical Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Suzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009 Jiangsu, China; 3. Cardiology Department, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025 Jiangsu, China)

Abstract: Objective This study aimed to explore main active components and possible molecular mechanism of "Lonicerae Japonicae Flos-Forsythiae Fructus" (JYH-LQ) herbal pair in the treatment of Kawasaki disease by network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The Traditional Chinese Medicine Systems

收稿日期: 2021-05-06

作者简介: 马锦, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 儿科心血管临床药学。Email: majin0912@163.com。通信作者: 吕海涛, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 儿科心血管疾病的诊治。Email: haitaosz@163.com。朱增燕, 女, 博士, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Email: zhuzengyan7676@suda.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81801559); 国家自然科学基金面上项目(81870365); 苏州市科技局项目(SKJYD2021221)。

Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP) was used to screen the main active components and potential targets of "JYH-LQ" herbal pair. Among them, the compounds without target information in TCMSP database were supplemented by SwissTargetPrediction database for target prediction. The OMIM, DRUGBANK, GeneCards, and Disgenet databases were used to find the targets related to Kawasaki disease for establishment of the Kawasaki disease-related target data set, which was intersected with the potential targets of "JYH-LQ" herbal pair in the treatment of Kawasaki disease. The STRING database and Cytoscape software were used to construct the network of the protein-protein interaction(PPI) for the intersection targets of "JYH-LQ" herbal pair-Kawasaki disease, and the plug-in Cytohubba of Cytoscape software was used to screen the hub genes in the PPI network. GO annotation and KEGG pathway enrichment analysis for the intersection targets of "JYH-LQ" herbal pair-Kawasaki disease were performed with DAVID database. The docking study was performed by using the Autodock. **Results** A total of 42 main active components and 282 potential targets were screened from "JYH-LQ" herbal pair. 1 127 Kawasaki disease-related targets were obtained. 75 potential targets of 36 active components in "JYH-LQ" herbal pair were associated with Kawasaki disease, among which 17 targets such as IL-6, TNF and PTGS2 were identified as hub genes in the PPI network of the intersection targets of "JYH-LQ" herbal pair-Kawasaki disease. KEGG pathway enrichment analysis showed that the intersection targets of "JYH-LQ" herbal pair-Kawasaki disease were mainly enriched in TNF signaling pathway, and then active components- target- pathway network for "JYH-LQ" herbal pair was constructed. The results of molecular docking suggested that the mainly active components (kaempferol, luteolin, quercetin, beta-carotene, and wogonin) in "JYH-LQ" herbal pair could regulate 11 hub genes(IL-6, TNF, PTGS2, MMP9, AKT1, CASP3, CCL2, ICAM1, MAPK8, IL-1 β and MAPK1) mostly enriched in TNF signaling pathway. **Conclusion** Based on network pharmacology and molecular docking technology, "JYH-LQ" herbal pair can be used to treat Kawasaki disease in a multi-component, multi-pathway and multi-target manner, associating with anti-inflammatory and antiplatelet effects. This research not only provides new clues for the study of the material basis and molecular mechanism of "JYH-LQ" herbal pair in the treatment of Kawasaki disease, but also provides a basis for its clinical application.

Keywords: Lonicerae Japonicae Flos; Forsythiae Fructus; network pharmacology; molecular docking technology; Kawasaki disease; action target; anti-inflammatory; antiplatelet

川崎病为一种系统性免疫性血管炎,好发于5岁以下儿童,是成年获得性心脏病的高危因素之一^[1]。川崎病最常见的血管并发症为冠状动脉损伤,严重的可发展为冠状动脉瘤、血栓形成,甚至猝死^[2]。在川崎病的治疗中,抗炎和抗血小板为主要的治疗策略。在中医学上川崎病应归属“温病”的范畴,且中医临床上多以卫气营血辨证为纲,防止川崎病血管损伤的发生^[3]。中医临床上不仅多数在西药常规治疗的基础上联合中药治疗川崎病^[4],还有个别单纯中药治疗案例的报道^[5-6]。中药治疗川崎病常用的药物以清热、活血化瘀、补阴等中药为主,治法主要是清热泻火、养阴生津、活血化瘀。“金银花-连翘”(Jinyinhua-Lianqiao, JYH-LQ)药对是治疗温病最常用的药对之一,也是临床治疗川崎病的常用药物之一^[7]。以“金银花-连翘”药对为君药的经典名方银翘

散,可用于川崎病急性期以清热疏风解表^[4,8-10]。现代药理学研究表明,金银花^[11]与连翘^[12-13]具有抗炎、抗血小板的作用。

中药是多组分、多靶点及其组分间协同作用的复杂体系,尽管在防治复杂疾病方面具有其自身的特色和优势,但因其成分复杂,系统庞大,使得中药的深入研究呈现一定困难。中药网络药理学基于“药物-靶点-疾病”相互作用网络,进而为复杂中药系统的研究提供了新的思路和视角^[14]。中药复方通过多个靶点表现出多种药理活性,因此通过网络药理学分析中药复方对复杂疾病的潜在机制具有建设性指导意义。本研究采用中药网络药理学和分子对接的研究方法,探讨“金银花-连翘”药对治疗川崎病的主要活性成分与潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 “金银花-连翘”药对主要活性成分及其作用靶标的筛选 检索 TCMSPP 中医药系统药理学数据库和分析平台(<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)以收集中药金银花和连翘的化学成分。根据两个阈值口服生物利用度(Oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(Drug-likeness, DL)≥0.18 筛选出“金银花-连翘”药对主要的活性成分并得到相应的潜在作用蛋白靶标。TCMSPP 数据库中无靶点信息的化合物,通过在 PubChem 数据库中查到的化合物的 Canonical SMILES 序列,进而在 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)进行蛋白靶标预测补充。将以上筛选出的靶标蛋白通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)查询出对应的人源靶点基因。

1.2 川崎病相关靶标的筛选以及其与“金银花-连翘”药对的潜在作用靶标的 Venn 分析 以“Kawasaki Disease”或“Mucocutaneous Lymph Node Syndrome”作为关键词,在 OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)、DRUGBANK 数据库(<http://www.drugbank.ca>)、GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org>)以及 Disgenet 数据库(<http://www.disgenet.org>)中查找与川崎病相关的靶标,将以上得到的靶标进行筛选、整合并删除重叠的靶标,建立川崎病相关靶标集。将川崎病相关靶标集与“金银花-连翘”药对的主要活性成分的作用靶标集进行 Venn 韦恩图分析(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),挖掘出“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标,进而构建“金银花-连翘药对-活性成分-靶标-川崎病”网络图。

1.3 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 PPI 网络图的构建与关键靶标的筛选 将“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标上传至 STRING 11.0 在线数据库(<http://string-db.org>),基因种属限定为“Homo sapiens”,相互作用阈值设定为“medium confidence(0.400)”,得到蛋白与蛋白之间相互作用信息,导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 PPI 网络图。通过 Cytoscape 3.7.2 软件插件 CytoHubba 对 PPI 网络进行拓扑分析,分析内容包括最大团中心性(maximal clique centrality, MCC)、最大邻居组件(maximum neighborhood component, MNC)、节点连接度(degree)和边缘渗出组件(edge percolated component, EPC)4 种拓扑分析方法,得到每种拓扑分析方法中

排名前 20 位的节点,交集的基因即为核心基因。

1.4 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 GO 功能与 KEGG 通路分析 将“1.2”项下得到的交集靶标导入 DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),基因种属限定为“Homo sapiens”,分别进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。计算富集结果的每个错误检出率(false discovery rate, FDR)值,根据从小到大的顺序对错误检出率值进行排序。采用在线绘图平台微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>)将其结果可视化。然后,构建“金银花-连翘药对-活性成分-川崎病靶标-通路”网络图。

1.5 “金银花-连翘”药对治疗川崎病的主要活性成分和潜在作用靶标的分子对接验证 选取“金银花-连翘”药对-活性成分-靶基因-川崎病网络中度(Degree)值排名靠前的活性成分和潜在作用靶标的 PPI 网络中核心基因进行分子对接。从 PubChem 和 RCSB PDB 数据库分别获取“金银花-连翘”药对化学成分分子结构和靶标蛋白分子结构的 pdp 格式,并应用 AutoDock Tools 1.5.6 软件转换为 pdbqt 格式后进行分子对接。通过 Pymol 2.2.0 软件将对对接得分较高的化合物与靶标蛋白进行分子对接可视化分析。

2 结果

2.1 “金银花-连翘”药对活性成分筛选及其潜在作用靶标预测 “金银花-连翘”药对通过 TCMSPP 数据库共筛选得到活性成分 42 个,其中属于金银花与连翘的活性成分均为 23 个,共有成分 4 个(表 1)。42 个活性成分通过 TCMSPP 平台和 SwissTargetPrediction 数据库获得对应的潜在作用靶标,删除重叠的靶标后,共获得 282 个潜在作用靶标,其中金银花 23 个活性成分共有 249 个潜在作用靶标,连翘 23 个活性成分共有 241 个潜在作用靶标(图 1)。

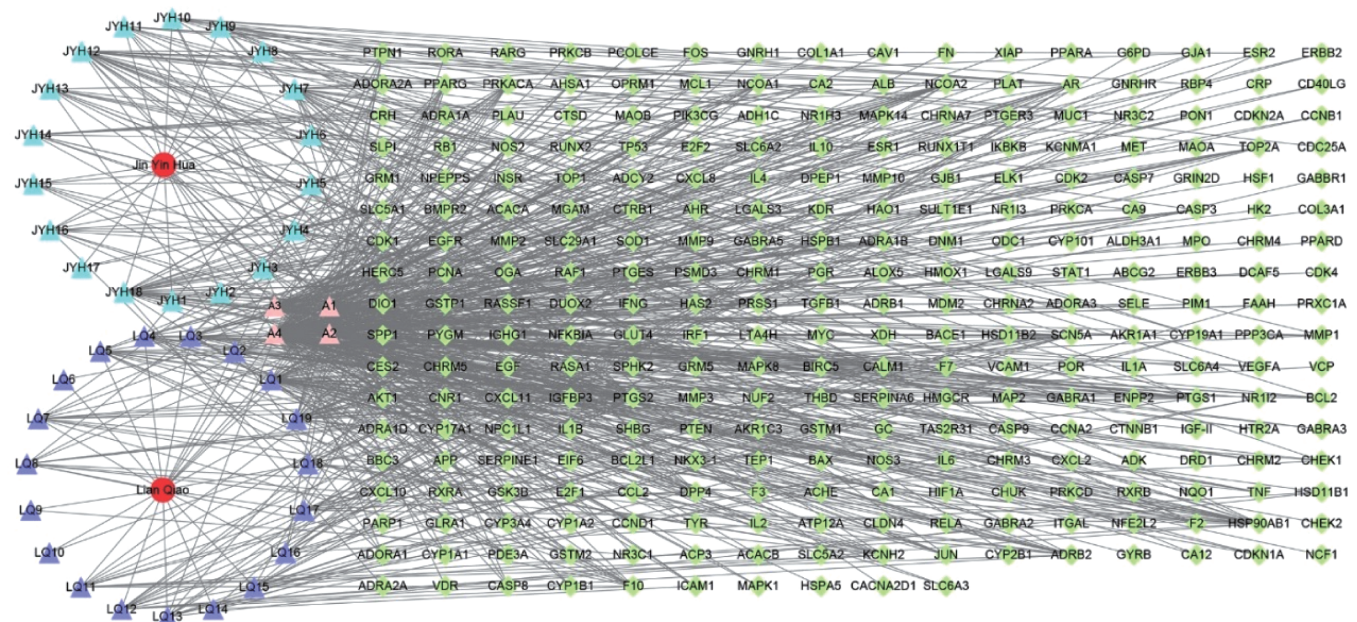
2.2 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的确定 通过 OMIM、DRUGBANK、GeneCards 以及 Disgenet 数据库共获得 1 127 个川崎病相关的人类基因。将“金银花-连翘”药对的 282 个潜在靶标的基因与 1 127 个川崎病相关的基因取交集,共筛选出 75 个基因,表明“金银花-连翘”药对中 36 个活性成分的 75 个潜在作用靶标与川崎病相关联(图 2)。

2.3 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 PPI 网络图的构建和关键靶标的筛选 通过 STRING 数据

表 1 “金银花-连翘”药对主要活性成分

Table 1 The main active components in “JYH-LQ” herbal pair

序号	命名号	主要成分	归属	序号	命名号	主要成分	归属
1	A1	beta-谷甾醇(beta-sitosterol)	金银花、连翘	20	JYH16	Ioniceracetalides B_qt	金银花
2	A2	山柰酚(kaempferol)	金银花、连翘	21	JYH17	XYLOSTOSIDINE	金银花
3	A3	芦丁(luteolin)	金银花、连翘	22	JYH18	dinethylsecologanoside	金银花
4	A4	槲皮素(quercetin)	金银花、连翘	23	JYH19	豆甾醇(stigmasterol)	金银花
5	JYH1	亚油酸乙酯(mandenol)	金银花	24	LQ1	汉黄芩素(wogonin)	连翘
6	JYH2	亚麻酸乙酯(ethyl linolenate)	金银花	25	LQ2	20(S)-dammar-24-ene-3β,20-diol-3-acetate	连翘
7	JYH3	六氢番茄红素(phytofluene)	金银花	26	LQ3	异落叶松脂素{(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol}	连翘
8	JYH4	黄烷酮[eriodictyl(flavanone)]	金银花	27	LQ4	(3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	连翘
9	JYH5	(-)-(3R,8S,9R,9aS,10aS)-9-ethenyl-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-2,3,9,9a,10,10a-hexahydro-5-oxo-5H,8H-pyrano[4,3-d]oxazolo[3,2-a]pyridine-3-carboxylic acid_qt	金银花	28	LQ5	松脂素单甲基醚[(+)-pinoselinol monomethyl ether]	连翘
10	JYH6	断马钱子酸(secologanic dibutylacetal_qt)	金银花	29	LQ6	连翘苷(PHILLYRIN)	连翘
11	JYH7	β-胡萝卜素(beta-carotene)	金银花	30	LQ7	ACon1_001697	连翘
12	JYH8	ZINC03978781	金银花	31	LQ8	(+)-pinoselinol monomethyl ether-4-D-beta-glucoside_qt	连翘
13	JYH9	金圣草黄素(chryseriol)	金银花	32	LQ9	3beta-Acetyl-20,25-epoxydammarane-24alpha-ol	连翘
14	JYH10	隐黄质(kryptoxanthin)	金银花	33	LQ10	白桦脂酸(mairin)	连翘
15	JYH11	4,5'-Retro-.beta.,.beta.-Carotene-3,3'-dione,4',5'-didehydro-	金银花	34	LQ11	连翘醇(FORSYTHINOL)	连翘
16	JYH12	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	金银花	35	LQ12	连翘脂素[(-)-phillygenin]	连翘
17	JYH13	7-表-马钱子苷半缩醛内酯(7-epi-Vogeloside)	金银花	36	LQ13	β-香树脂醇乙酸酯(β-amyrin acetate)	连翘
18	JYH14	Caerulose C	金银花	37	LQ14	贯叶金丝桃素(hyperforin)	连翘
19	JYH15	Centauroside_qt	金银花	38	LQ15	加贯叶金丝桃素(adhyperforin)	连翘
				39	LQ16	Lactucasterol	连翘
				40	LQ17	远志酮 I(onjixanthone I)	连翘
				41	LQ18	牛蒡苷(arctiin)	连翘
				42	LQ19	荷包牡丹碱(bicuculline)	连翘



注：青绿色为金银花化合物；浅蓝为连翘化合物；粉色为金银花、连翘共同含有的化合物；绿色为靶标蛋白

图 1 “金银花-连翘”药对活性成分-靶标网络

Figure 1 The active ingredient-target network for "JYH-LQ" herbal pair

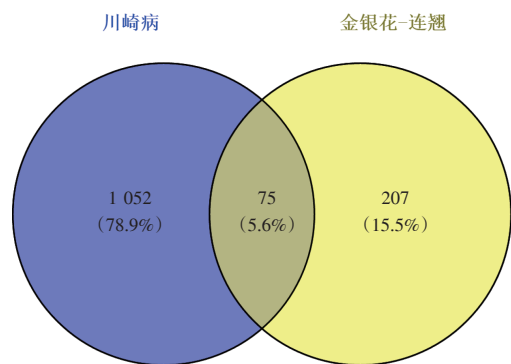


图 2 “金银花-连翘”药对活性成分潜在作用靶标与川崎病相关靶标的韦恩图

Figure 2 Venn diagram of the potential targets of active ingredients in “JYH-LQ” herbal pair and Kawasaki disease-related targets

库和 Cytoscape 软件构建“金银花-连翘”药对与川崎病的交集靶标的 PPI 网络图(图 3)。根据 Cytoscape 的 Cytohubba 插件的 MCC、MNC、DEGREE 和 EPC 四种拓扑分析方法共确定了 17 个重叠的核心基因，分别为 VEGFA、IL-6、TNF、CXCL8、PTGS2、MMP9、AKT1、IL-10、CASP3、CCL2、ALB、ICAM1、MAPK8、IL-1β、IL-4、TP53 和 MAPK1(表 2)。

2.4 “金银花-连翘”药对-活性成分-靶基因-川崎病网络图的构建 将“金银花-连翘”药对的活性成分和其作用于川崎病相关的靶标导入 Cytoscape 构建“金银花-连翘药对-活性成分-靶标-川崎病”网络图(图 4)。通过 Cytoscape 中的 NetworkAnalyzer 工具分析网络拓扑参数，主要以度值(Degree)作为判别重要

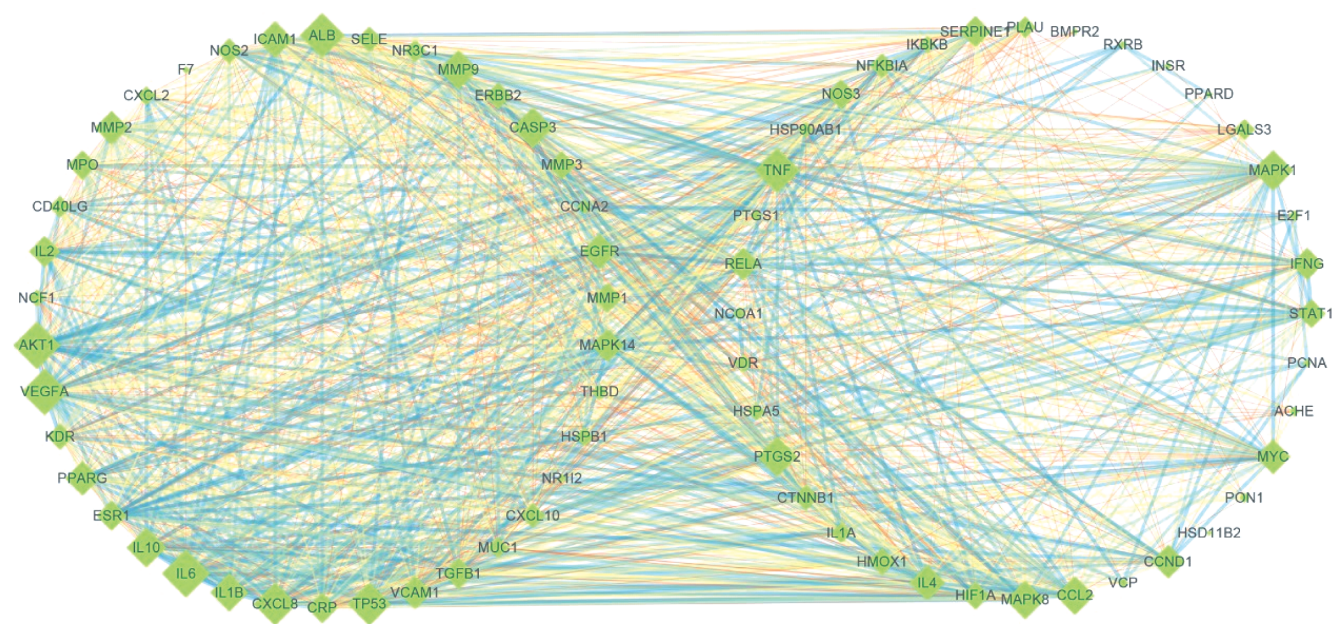


图 3 “金银花-连翘”药对与川崎病的交集靶标的 PPI 网络图

Figure 3 PPI network of intersection targets of “JYH-LQ” herbal pair-Kawasaki disease

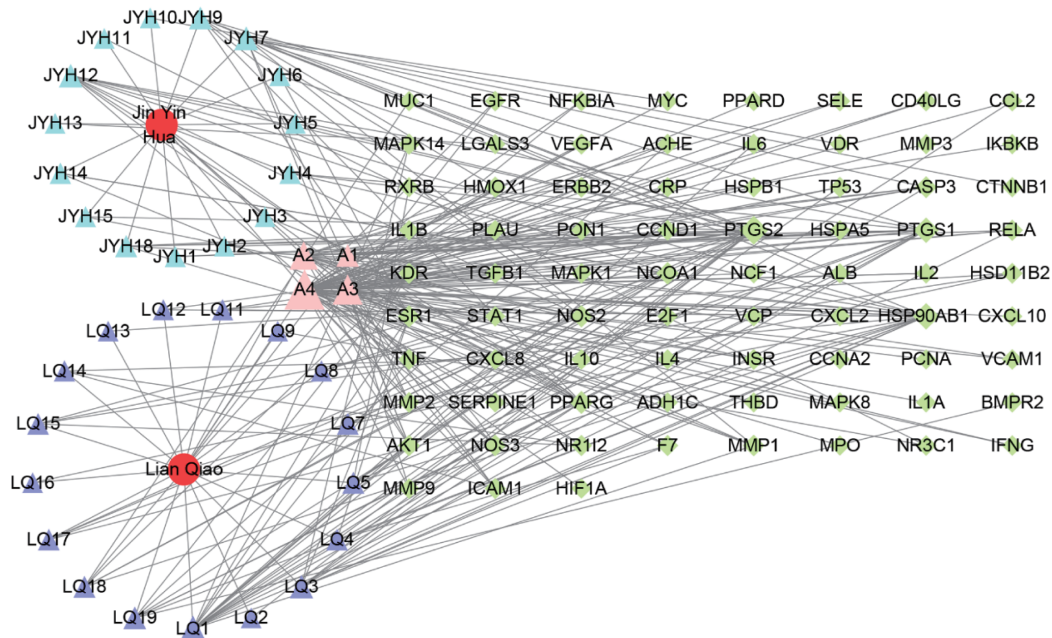
表 2 “金银花-连翘”药对与川崎病的交集靶标的 PPI 网络中关键基因排序(前 20 位)

Table 2 Hub genes for PPI network of intersection targets of “JYH-LQ” herbal pair-Kawasaki disease(top 20)

序号	Cytohubba 拓扑分析方法				序号	Cytohubba 拓扑分析方法			
	最大团中心性(MCC)	最大邻居组件(MNC)	节点连接度(Degree)	边缘渗出组件(EPC)		最大团中心性(MCC)	最大邻居组件(MNC)	节点连接度(Degree)	边缘渗出组件(EPC)
1	VEGFA	IL-6	IL-6	CXCL8	11	ALB	PTGS2	PTGS2	CASP3
2	IL-6	AKT1	AKT1	AKT1	12	ICAM1	MMP9	MMP9	MMP9
3	TNF	VEGFA	VEGFA	IL-6	13	MAPK8	CCL2	CCL2	ICAM1
4	CXCL8	TNF	TNF	VEGFA	14	IL-1β	MAPK8	MAPK8	IL-10
5	PTGS2	ALB	ALB	ALB	15	IFNG	IL-1β	IL-1β	CCL2
6	MMP9	TP53	TP53	TNF	16	IL-4	ICAM1	ICAM1	IFNG
7	AKT1	CXCL8	CXCL8	MAPK1	17	TP53	EGFR	EGFR	IL-1β
8	IL-10	MAPK1	MAPK1	TP53	18	MMP2	IL-4	IL-4	IL-4
9	CASP3	CASP3	CASP3	MAPK8	19	MAPK1	MYC	MYC	MMP2
10	CCL2	IL-10	IL-10	PTGS2	20	VCAM1	PPARG	PPARG	EGFR

成分及靶标的指标。“金银花-连翘药对-活性成分-靶标-川崎病”网络图包含 113 个节点, 278 条边; 作用于川崎病相关靶标的候选活性成分有 36 个, 槲皮素(A4, Degree=59)、芦丁(A3, Degree=30)、山柰酚(A2, Degree=25)、汉黄芩素(LQ1, Degree=

19)、 β -胡萝卜素(JYH7, Degree=11)是“金银花-连翘”药对中度值排名前 5 位的化学成分。PTGS2、HSP90AB1、PTGS1、PPARG、NCOA1、ESR1、NOS2、CASP3、NOS3 以及 MMP1 是度值排名前 10 位的靶标。



注: 青绿色为金银花化合物; 浅蓝为连翘化合物; 粉色为金银花、连翘共同含有的化合物; 绿色为靶标蛋白

图 4 “金银花-连翘药对-活性成分-靶标-川崎病”网络图

Figure 4 Network of “JYH-LQ herbal pair-active ingredients-targets-Kawasaki disease”

2.5 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 根据错误检出率结果显示, “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标在生物学过程(Biological process, BP)中排名靠前的有聚合酶 II 介导的正向转录调控、凋亡过程负调控、基因表达正调控等 16 个条目, 表明“金银花-连翘”药对可以通过调控以上生物学过程来影响川崎病; 细胞组分(Cellular component, CC)方面包括细胞外空间和细胞外区域等; 分子功能(Molecular function, MF)主要包含有酶结合、蛋白结合等方面(图 5)。KEGG 通路富集分析显示, “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标主要富集于 TNF、Pathways in cancer、Chagas disease (American trypanosomiasis) 等信号通路(图 6)。

2.6 “金银花-连翘药对-活性成分-川崎病靶标-通路”网络图的构建 KEGG 通路富集分析的结果显示, TNF signaling pathway、Pathways in cancer 以及 Chagas disease (American trypanosomiasis) 是“金银

花-连翘”药对-川崎病的交集靶标富集排名前 3 位的信号通路。进一步与“金银花-连翘”药对活性分子和潜在作用靶标一一对应, 即通路潜在靶标对应, 潜在靶标与活性成分对应。将相关数据录入 Cytoscape 软件, 构建“金银花-连翘”治疗川崎病的成分-靶标-通路网络(图 7)。该网络图包含 84 个节点, 256 条边线, “金银花-连翘”药对治疗川崎病与槲皮素、芦丁、山柰酚、汉黄芩素等 36 个活性成分有关, 与 43 个靶标有关, 包括 15 个核心基因, 如 VEGFA、IL-6、TNF、CXCL8、PTGS2、MMP9、AKT1、IL-10、CASP3、CCL2、ICAM1、MAPK8、IL-1 β 、TP53 和 MAPK1。这 15 个核心基因中除了 VEGFA、CXCL8、IL-10 以及 TP53 外均富集于 TNF 信号通路(图 8)。

2.7 分子对接技术预测“金银花-连翘”药对活性成分与 TNF 信号通路中对应潜在作用靶标的结合能力 根据“金银花-连翘药对-活性成分-靶基因-川崎病”网络中得到的 5 个核心活性成分槲皮素

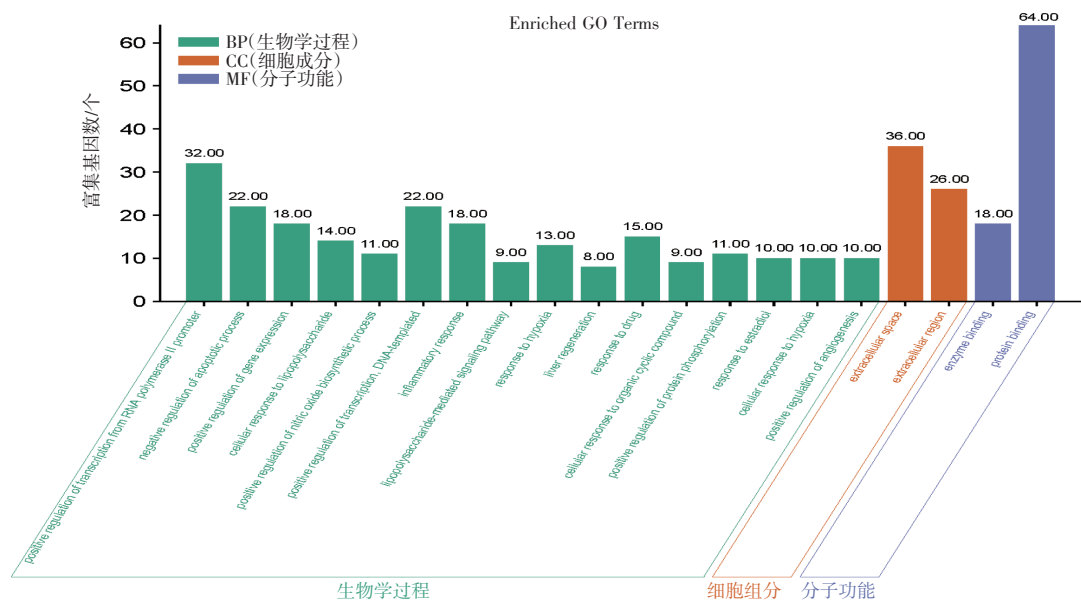


图 5 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 GO 功能富集分析柱状图
Figure 5 Histogram of GO functional enrichment analysis of intersection targets of “JYH-LQ” herbal pair-Kawasaki disease

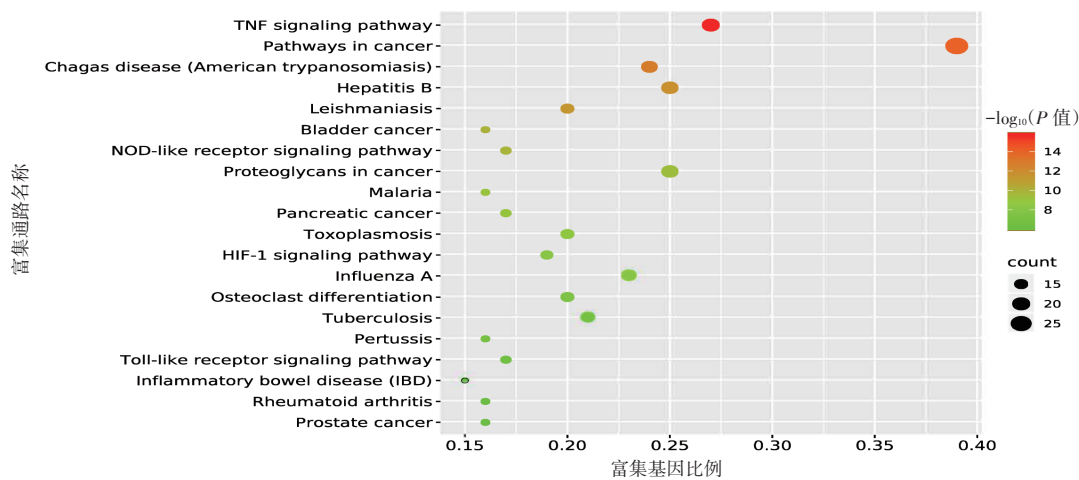
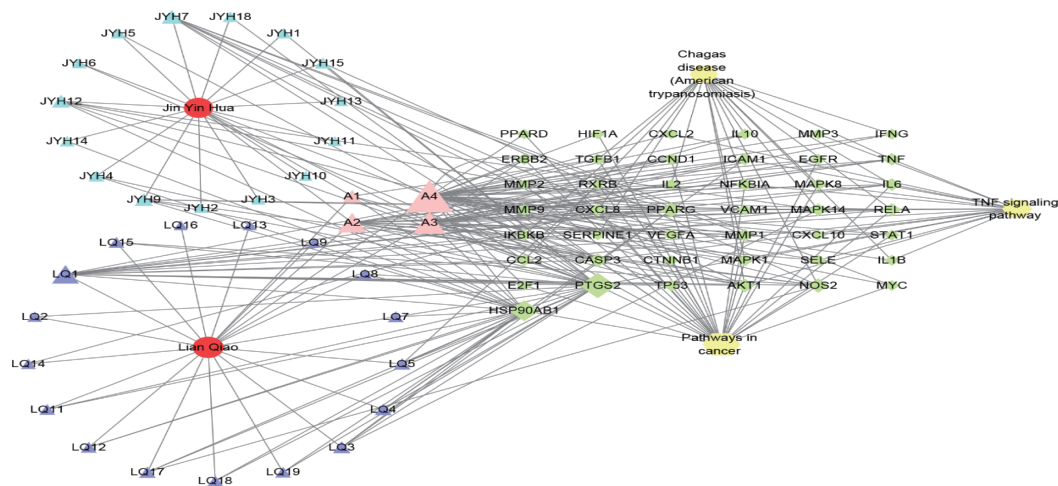


图 6 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的 KEGG 通路富集分析气泡图
Figure 6 Bubble diagram of KEGG pathways enrichment analysis of intersection targets of “JYH-LQ” herbal pair-Kawasaki disease



注：青绿色为金银花化合物；浅蓝为连翘化合物；粉色为金银花、连翘共同含有的化合物；绿色为靶标蛋白；黄色为靶标作用通路
图 7 “金银花-连翘药对-活性成分-川崎病靶标-通路”网络图

Figure 7 “Components-target-pathways” network for "JYH-LQ" herbal pair

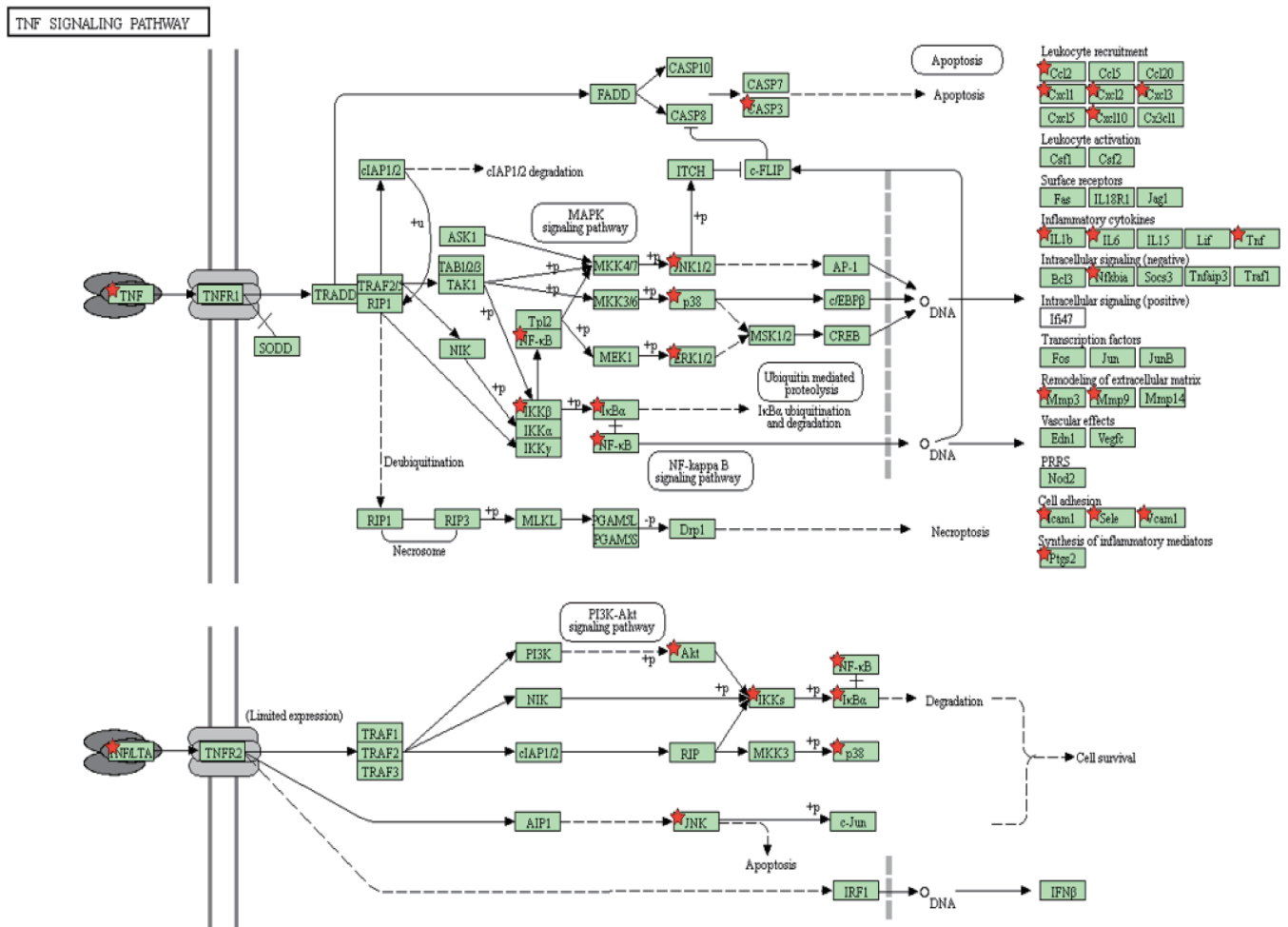


图8 “金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标在TNF信号通路中的情况

Figure 8 The intersection targets of “JYH-LQ” herbal pair-Kawasaki disease in TNF signaling pathway

(A4)、芦丁(A3)、山柰酚(A2)、汉黄芩素(LQ1)以及 β -胡萝卜素(JYH7),与17核心基因中富集于TNF信号通路中IL-6、TNF、PTGS2、MMP9、AKT1、CASP3、CCL2、ICAM1、MAPK8、IL-1 β 以及MAPK1,采用AutoDock Tools软件进行结合能力预测。表3分子对接结果显示,11个核心靶标至少与5种核心活性成分中一个的结合能小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明两者间均有着较好的结合活性。配体小分子与受体蛋白的结合能小于 $-7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,两者间有着强烈的结合活性。因此,选取IL-6与A2, TNF与LQ1, PTGS2与A3, MMP9与A3, AKT1与A2, CASP3与A3, MAPK8与A3以及IL-1 β 与A4,采用Pymol软件分别进行分子对接可视化分析(图9)。

3 讨论

临床实践发现,中西医结合治疗川崎病的临床症状改善率比单纯西医治疗高^[6,10,15-16]。中医治疗以“卫气营血辨证”为纲,针对川崎病不同时期分期施

治,但受限于川崎病的病机、致病因素尚未明确及中药复方成分复杂等,使川崎病的中药治疗研究较缓慢。网络药理学研究与中医整体观的思想具有异曲同工之处,推动中医药对川崎病治疗的研究。本研究结合网络药理学的方法,系统全面阐释川崎病急性期临床有效治疗方药银翘散中的君药“金银花-连翘”药对治疗川崎病的主要活性成分与潜在作用机制。本研究构建了“金银花-连翘药对-活性成分-靶标-川崎病”的交互网络图,并通过75个“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标的PPI网络进行拓扑分析,共筛选出17个核心基因,其中MMP9与ALB在本课题组前期研究^[17]中已被鉴定为急性期川崎病的核心基因。

目前已有研究^[1,18-19]证实,英夫利昔单抗可抑制TNF的活性从而有效调节川崎病的炎症反应,可作为丙球及激素治疗无效后的补救治疗。TNF信号转导通路中TNF、IL-6、CASP3的多态性均影响川崎病的易感性^[20]。CASP3也与川崎病患者冠状动脉病变

表 3 “金银花-连翘”药对主要活性成分与 TNF 信号通路中对应潜在作用靶标的分子对接结合能信息

Table 3 Information of binding energy between active ingredients of “JYH-LQ” herbal pair and hub genes in TNF signaling pathway

靶标名称	靶标 PDB ID 编号	成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	靶标名称	靶标 PDB ID 编号	成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	靶标名称	靶标 PDB ID 编号	成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
IL-6	1alu	A2	-8.15	AKT1	1unq	A2	-7.93	MAPK8	4g1w	A2	-7.21
		A3	-7.61			A3	-7.58			A3	-7.33
		A4	-6.27			A4	-5.73			A4	-6.8
		LQ1	-6.63			LQ1	-6.08			LQ1	-6.8
		JYH7	-5.5			JYH7	-3.97			JYH7	-4.23
TNF	2e7a	A2	-9.1	CASP3	1gfw	A2	-6.89	IL-1β	3pok	A2	-7.17
		A3	-9.7			A3	-7.23			A3	-7.62
		A4	-8.79			A4	-6.98			A4	-7.98
		LQ1	-9.93			LQ1	-6.95			LQ1	-7.76
		JYH7	-3.38			JYH7	-4.29			JYH7	-4.32
PTGS2	5f19	A2	-6.53	CCL2	1don	A2	-6.26	MAPK1	1tvo	A2	-7.0
		A3	-7.11			A3	-6.24			A3	-5.81
		A4	-6.57			A4	-6.08			A4	-6.07
		LQ1	-6.89			LQ1	-5.78			LQ1	-7.27
		JYH7	-4.05			JYH7	-2.03			JYH7	-1.74
MMP9	1l6j	A2	-8.2	ICAM1	5mza	A2	-5.54				
		A3	-9.76			A3	-5.77				
		A4	-8.68			A4	-4.44				
		LQ1	-8.74			LQ1	-4.94				
		JYH7	-4.35			JYH7	1.77				

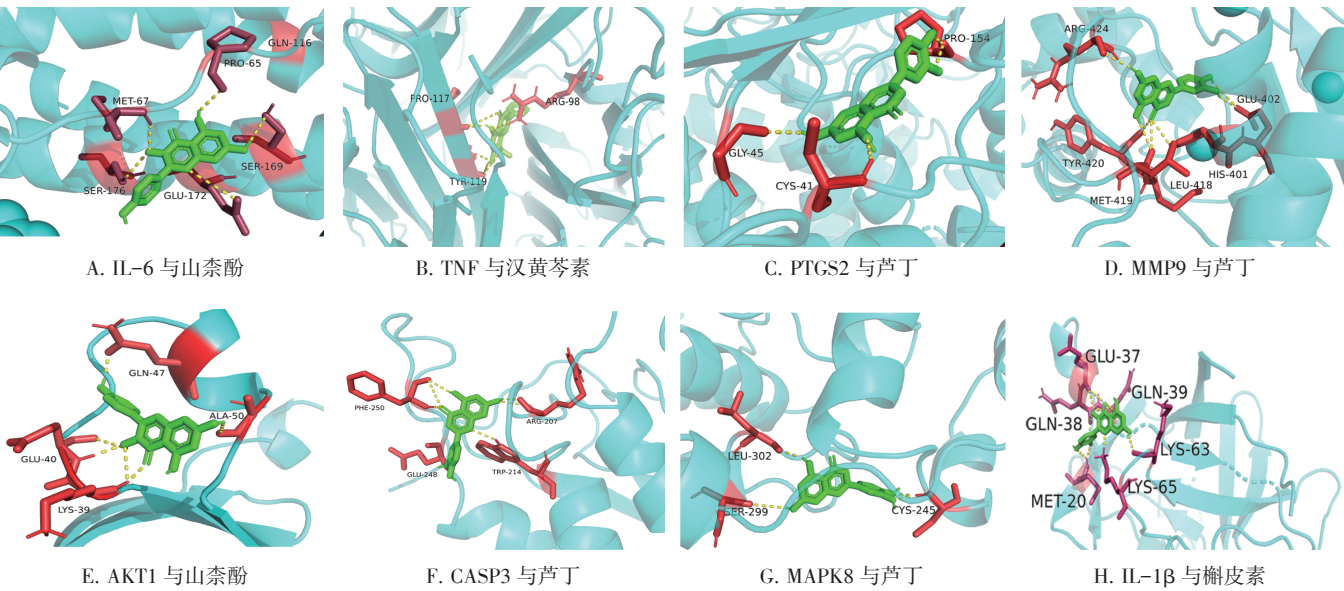


图 9 “金银花-连翘”药对主要活性成分与潜在作用靶标分子对接模式图

Figure 9 Docking mode between active ingredients of “JYH-LQ” herbal pair and hub genes

的形成有关^[21]。金银花及连翘在临床上被广泛应用于炎症的治疗，与 TNF、IL-1 等炎症相关信号转导通路有关^[11-12]。药理学研究显示“金银花-连翘”药对的部分活性成分可调控 TNF 信号传导通路：槲皮素

可抑制 TNF 诱导的视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 ICAM1 和 MMP9 的表达^[22]；槲皮素可通过阻止 ASC 寡聚抑制 NLRP3 和 AIM2 炎症体，进一步提示其可能成为川崎病血管炎和其他 IL-1 介导的炎症性疾病

的潜在候选药物^[23]；山柰酚在体外和体内都能抑制 TNF 激活的炎症通路^[24]；槲皮素、芦丁、汉黄芩素等黄酮类化合物可以减少 IL-1 β 、TNF、IL-6 等细胞因子的表达和分泌^[25]。KEGG 通路富集和 PPI 网络分析亦显示，“金银花-连翘”药对-川崎病的交集靶标主要富集在 TNF 信号转导通路，主要涉及 IL-6、TNF、MMP9、CASP3 等核心基因。分子对接技术进一步显示，“金银花-连翘”药对的核心活性成分槲皮素、芦丁、山柰酚等化合物与 TNF、IL-6、CASP3 等富集于 TNF 信号通路中的 11 个核心基因有较好的结合活性。因此，“金银花-连翘”药对可能主要通过调节 TNF 信号传导通路来改善川崎病临床症状，但仍需进一步实验验证。

川崎病患者均需要接受抗血小板治疗^[1,26]。整合素对血小板的活化、黏附和聚集都起着至关重要的作用，而 PI3K 是血小板活化的关键因子，直接参与调节整合素功能。因此，PI3K/AKT 通路在血栓形成和稳定中具有重要作用^[27]。一氧化氮(NO)对心血管系统具有保护作用，可通过降低血小板活化具有抗血栓作用^[28]。PTGS1 和 PTGS 2 分别参与血小板聚集与炎症反应^[29]。本研究筛选出的血小板活化相关基因 AKT1、NOS2/3 以及 PTGS1/2 均是“金银花-连翘”药对的潜在作用靶标，表明“金银花-连翘”的抗血小板作用可能与其对 AKT1、NOS2/3 以及 PTGS1/2 的调控有关。现代药理学研究也显示“金银花-连翘”药对的部分活性成分具有抗血小板的作用，例如动物模型证实山柰酚可抑制血栓形成和急性血栓栓塞，具有抗血小板和抗凝血作用，与其抑制凝血酶刺激血小板中 AKT、ERK1/2、P38 和 JNK1/2 的磷酸化有关^[30]；槲皮素口服摄入后的血浆浓度可达到体外抗血小板聚集的浓度，体外实验表明它可抑制血小板聚集相关信号通路，提示槲皮素具有作为血小板细胞信号转导和血栓形成的饮食抑制剂的潜力^[31]；汉黄芩素在体内外均显示出抗凝作用^[32]。本研究结果亦显示，“金银花-连翘药对-活性成分-靶基因-川崎病”网络图中的某些核心基因和活性成分与血小板有关，可为“金银花-连翘”药对用于川崎病的治疗提供科学依据。

综上所述，本研究首次运用网络药理学的方法研究“金银花-连翘”药对治疗川崎病的复杂分子网关系，发现“金银花-连翘”药对可能是通过槲皮素、芦丁、山柰酚等活性成分、调控 IL-6、TNF、PTGS2 等核心基因，进而作用于 TNF 信号通路，从

而抗炎、抗血小板等多个方面共同发挥治疗川崎病的作用。这体现了“金银花-连翘”药对治疗川崎病具有多成分、多途径、多靶点作用的特点，可为其治疗川崎病的物质基础和分子机制研究提供新的线索，也为其临床应用提供一定的依据。

参考文献：

- [1] MCCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the american heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135 (17): e927-e999.
- [2] DIETZ S M, VAN STIJN D, BURGNER D, et al. Dissecting Kawasaki disease: a state-of-the-art review[J]. *Eur J Pediatr*, 2017, 176(8): 995-1009.
- [3] 秦建. 卫气营血辨证理论的临床应用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [4] 王雪辉, 贺丰, 张邓莉. 川崎病冠脉病变中医分期论治的临床观察[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(16): 100-102.
- [5] ZHU L B, LAO L X, HUANG Y P, et al. A child with Kawasaki disease successfully treated with Chinese herbal medicine: a case report with 12-month follow up[J]. *Eur J Integr Med*, 2019, 28: 33-38.
- [6] CHEN J Y, YIN J M, DU Z D, et al. Qing re liang xue decoction alleviates hypercoagulability in Kawasaki disease[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 864597.
- [7] 江文文, 翁泽林, 许允佳, 等. 基于数据挖掘的治疗川崎病方剂组方规律分析[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(10): 1755-1757.
- [8] 张勤, 刘点, 苏敏. 中西医结合治疗川崎病的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2017, 2(17): 123-124.
- [9] 李开, 鄢素琪. 中医卫气营血辨证联合丙种球蛋白治疗儿童川崎病的临床研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(10): 2527-2531.
- [10] TANG B, LO H H, LEI C, et al. Adjuvant herbal therapy for targeting susceptibility genes to Kawasaki disease: an overview of epidemiology, pathogenesis, diagnosis and pharmacological treatment of Kawasaki disease[J]. *Phytomedicine*, 2020, 70: 153208.
- [11] LI Y, LI W, FU C, et al. Lonicerae japonicae flos and Lonicerae flos: a systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. *Phytochem Rev*, 2019, 22: 1-61.
- [12] MULUYE R A, BIAN Y, ALEMU P N. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review[J]. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4(2): 93-98.
- [13] IWAKAMI S, WU J B, EBIZUKA Y, et al. Platelet activating factor(PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1992, 40(5): 1196-1198.
- [14] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11

- (2): 110–120.
- [15] 毛娇娇. 盐酸川芎嗪治疗川崎病的临床研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.
- [16] 张庆, 李晓静, 周敏, 等. 丹参酮 II A 辅助治疗川崎病的疗效[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2011, 26(21): 1645–1647.
- [17] MA J, GUI H, TANG Y, et al. In silico identification of 10 hub genes and an miRNA-mRNA regulatory network in acute kawasaki disease[J]. Front Genet, 2021, 12: 585058.
- [18] AGARWAL S, AGRAWAL D K. Kawasaki disease: etiopathogenesis and novel treatment strategies[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2017, 13(3): 247–258.
- [19] 范雪, 徐明国. 川崎病发病机制及治疗研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(5): 6–8.
- [20] XIE X, SHI X, LIU M. The roles of genetic factors in Kawasaki disease: a systematic review and meta-analysis of genetic association studies[J]. Pediatr Cardiol, 2018, 39(2): 207–225.
- [21] ONOUCHI Y, SUZUKI Y, SUZUKI H, et al. ITPKC and CASP3 polymorphisms and risks for IVIG unresponsiveness and coronary artery lesion formation in Kawasaki disease[J]. Pharmacogenomics J, 2013, 13(1): 52–59.
- [22] CHENG S C, WU Y H, HUANG W C, et al. Anti-inflammatory property of quercetin through downregulation of ICAM-1 and MMP-9 in TNF- α -activated retinal pigment epithelial cells[J]. Cytokine, 2019, 116: 48–60.
- [23] DOMICIANO T P, WAKITA D, JONES H D, et al. Quercetin inhibits inflammasome activation by interfering with ASC oligomerization and prevents interleukin-1 mediated mouse vasculitis[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41539.
- [24] GUPTA S C, TYAGI A K, DESHMUKH-TASKAR P, et al. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 559: 91–99.
- [25] LEYVA-LÓPEZ N, GUTIERREZ-GRIJALVA E P, AMBRIZ-PEREZ D L, et al. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 921.
- [26] 中华医学会儿科学分会心血管学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 川崎病冠状动脉病变的临床处理建议(2020年修订版)[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(9): 718–724.
- [27] GUIDETTI G F, CANOBBIO I, TORTI M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis[J]. Adv Biol Regul, 2015, 59: 36–52.
- [28] GKALIAGKOUSI E, FERRO A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16: 1873–1897.
- [29] MORITA I. Distinct functions of COX-1 and COX-2[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 68–69: 165–175.
- [30] CHOI J H, PARK S E, KIM S J, et al. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation[J]. Biochimie, 2015, 115: 177–186.
- [31] HUBBARD G P, WOLFFRAM S, LOVEGROVE J A, et al. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans[J]. J Thromb Haemost, 2004, 2(12): 2138–2145.
- [32] KU S K, BAE J S. Antithrombotic activities of wogonin and wogonoside via inhibiting platelet aggregation[J]. Fitoterapia, 2014, 98: 27–35.

(编辑: 修春)