

# 基于网络药理学及分子对接探讨雷公藤干预结缔组织相关间质性肺病的分子机制

张希涛<sup>1</sup>,葛春蕾<sup>1</sup>,彭井华<sup>1</sup>,贾新华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>山东中医药大学,济南 250014;<sup>2</sup>山东中医药大学附属医院,济南 250011

**摘要:**为探究雷公藤干预结缔组织相关间质性肺疾病(CTD-ILD)的分子机制。运用网络药理学的方法,通过TCM-SP数据库挖掘雷公藤的主要化学成分及作用靶点,利用Genecards、OMIM、DrugBank数据库获取CTD-ILD相关靶点,利用String平台进行蛋白质相互作用分析,构建PPI网络并挖掘网络中潜在的蛋白质功能模块,然后采用Metascape进行GO及KEGG富集分析,利用Cytoscape3.8.0软件构建“雷公藤成分-CTD-ILD-信号通路”网络,最后通过AutoDock Vina进行分子对接。通过分析得到雷公藤干预CTD-ILD的靶点共80个,核心成分为山奈酚、雷公藤内酯醇、川陈皮素、 $\beta$ -谷甾醇等,核心靶点有PTGS2、JUN、MAPK8、RELA、SCN5A、TNF等。GO和KEGG富集分析显示,IL17信号通路、Toll样受体信号通路、TNF信号通路、HIF-1信号通路、FoxO信号通路、Cancer信号通路等为雷公藤干预CTD-ILD的主要通路,涉及炎症、氧化应激、细胞凋亡及癌症等多个生物过程。分子对接结果亦显示,分子亲和力小于-7 kcal/mol 占总数的62.5%,其中5次化合物的预测值超过原配体。综上,本研究初步揭示了雷公藤通过多成分、多靶点、多通路作用机制干预CTD-ILD的分子机制,并经分子对接予以验证,为临床应用雷公藤治疗CTD-ILD提供了理论依据。

**关键词:**雷公藤;CTD-ILD;网络药理学;分子对接

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)3-0479-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.016

## Study on the molecular mechanism of *Tripterygium wilfordii* in the treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Xi-tao<sup>1</sup>, GE Chun-lei<sup>1</sup>, PENG Jing-hua<sup>1</sup>, JIA Xin-hua<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

<sup>2</sup>Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

**Abstract:** To explore the molecular mechanism of *Tripterygium wilfordii* intervention in connective tissue-related interstitial lung disease (CTD-ILD). Applying the methods of network pharmacology. First, the main chemical components and targets of *T. wilfordii* were mined by TCMSP database, Using gencards, OMIM and DrugBank database to obtain the related targets of CTD-ILD, using String platform to analyze protein interaction, constructing PPI network and mining potential protein function modules in the network. Go and KEGG enrichment analysis was carried out on Metascape platform, and then a network of "*T. wilfordii* component CTD-ILD signal pathway" was constructed with the software of Cycloscape 3.8.0. Finally, molecular docking was carried out through autodockvina. Through the analysis, 80 targets of *T. wilfordii* intervention in CTD-ILD were obtained. The core components were kaempferol, triptolide, kaempferin,  $\beta$ -sitosterol and so on. The core targets were PTGS2, Jun, mapk8, rela, SCN5A, TNF and so on. The enrichment analysis of go and KEGG showed that IL17 signaling pathway, toll like receptor signaling pathway, TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, FOXO signaling pathway and cancer signaling pathway were the main pathways for *T. wilfordii* to intervene CTD-ILD, involving multiple biological processes such as in-

收稿日期:2020-06-04 接受日期:2020-10-23

基金项目:国家中医药管理局“全国中医药创新骨干人才培养项目”(国中医药人教函[2019]128号);“泰山学者”建设工程专项经费资助(ts201712096)

\*通信作者 E-mail:jiaxin\_hua\_jn@163.com

flammation, oxidative stress, apoptosis and cancer. The results of molecular docking also showed that the molecular affinity was less than  $-7$  kcal/mol, accounting for 62.5% of the total, and the predicted value of five compounds was higher than that of the original ligands. To sum up, this study preliminarily revealed the mechanism of *T. wilfordii* intervention in CTD-ILD with multi-component, multi-target and multi-channel, provided theoretical basis for clinical application of *T. wilfordii* intervention in CTD-ILD, and verified by molecular docking.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii*; CTD-ILD; network pharmacology; molecular docking

结缔组织相关间质性肺病(connective tissue disease-associated interstitial lung disease, CTD-ILD)是指患者在自身免疫性疾病基础上并发有肺部间质性病变。结缔组织病(CTD)主要病理变化为疏松结缔组织发生黏液性水肿、类纤维蛋白变性、小血管坏死和组织损伤,肺内由于含有丰富的胶原、血管等结缔组织,并具有免疫调节、代谢、内分泌等功能,常成为CTD累及的重要靶器官<sup>[1]</sup>。一项2000例结缔组织病患者随访20年的研究表明,CTD-ILD的预后比没有并发间质性肺病(ILD)的CTD患者更差,肺疾病占CTD全部死因的21.5%,其中ILD占其中的46.7%,ILD明显降低了CTD患者的生存率<sup>[2]</sup>。现阶段,对于CTD-ILD的治疗多选用激素+免疫抑制剂的治疗方案,但不良反应较多并伴有多种并发症,且临床统计的效果具有明显的差异性,总体来说并不令人满意<sup>[3]</sup>。

雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)为卫矛科雷公藤属植物,其性寒,味苦,有大毒,归属心、肝、胃、肾四经,具有祛风除湿、通络止痛等功效。现代药理学研究<sup>[4]</sup>认为,雷公藤具有有抗炎、调节免疫、镇痛、抗肿瘤、抗血管生成、保护神经、保护关节软骨等多种药理作用。临床多用于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、急慢性肾小球肾炎等自身免疫性疾病的治疗。然而,对于其在CTD-ILD中的应用并未引起广泛重视,尤其是关于其分子机制的研究多局限在单一成分、靶点、通路上,未曾系统性的评估雷公藤在CTD-ILD疾病网络中所发挥的作用。

为进一步研究雷公藤干预CTD-ILD的作用机制,笔者在课题组前期研究的基础上<sup>[5-7]</sup>,运用网络药理学及分子对接技术等现代生物信息学技术,从雷公藤的物质成分出发,着眼于整体角度分析雷公藤干预CTD-ILD的分子机制,同时为后续研究提供一定的理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 雷公藤主要活性成分及作用靶点的筛选

通过TCMSP数据库<sup>[8]</sup>(<http://tcmssp.com/tc->

[msp.php](http://tcmssp.com/tc-))获取雷公藤的化学组成成分,根据ADME属性值筛选出生物活性较高的成分,设置筛选参数为:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) > 30,类药性(drug-like, DL) > 0.18,氢键给体(hydrogen bond donors, Hdon) ≤ 5,氢键受体(hydrogen bond acceptors, Hacc) ≤ 10。筛选完成后,在TCMSP数据库进行靶标预测,并根据已发表的文献报道补充雷公藤的化学成分<sup>[9,10,11]</sup>,在Swiss Target Prediction平台(<http://www.swisstargetprediction.ch>)进行靶点预测。筛选结束后,统一在Uniprot蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org>)将化合物的靶点蛋白进行规范化处理,得到对应的靶点基因名称。

### 1.2 CTD-ILD相关靶点基因筛选

以“Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Diseases”作为检索关键词,通过OMIM数据库(<http://www.omim.org>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org>)挖掘与CTD-ILD相关的潜在靶点,进入DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca>)寻找已经获准使用的干预CTD-ILD的西药作用靶点予以补充<sup>[12]</sup>。合并3个疾病数据库靶点,删除重复值得到CTD-ILD相关靶点。

### 1.3 雷公藤成分-CTD-ILD靶点(PPI)网络构建

通过R x64 4.0.0软件将雷公藤作用靶点与CTD-ILD靶点取交集并绘制韦恩图。提取交集靶点提交至STRING数据库(<https://string-db.org>),构建蛋白互作网络(PPI)模型<sup>[13]</sup>。将物种类型设定为“Homo sapiens”,最小互相作用阈值设定为“highest confidence”( > 0.9),隐藏游离蛋白,余均为默认设置。得到PPI网络后,通过CytoScape3.8.0对PPI网络进一步分析,提取关键的蛋白质功能模块,并描述其参与的生物进程及功能。

### 1.4 GO及KEGG富集分析

通过Metascape平台(<http://metascape.org/gp/index.html>)对雷公藤干预CTD-ILD的潜在靶点进行GO及KEGG生物富集分析。保存数据结果并运用R语言进行可视化分析。

## 1.5 雷公藤活性成分-靶点-CTD-ILD 信号通路网络图的构建

运用 CytoScape3.8.0 构建“雷公藤活性成分-靶点-CTD-ILD 信号通路图”,并利用 CytoScape 3.8.0 内置工具分析雷公藤有效成分及靶点的网络拓扑参数,并根据网络拓扑学参数筛选出核心靶点及发挥药效的主要活性成分。

## 1.6 分子对接验证

对“成分-靶点-通路”网络中度值(degree)排名前4的活性成分与靶点进行分子对接,从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>)下载靶点蛋白的3D结构,并寻找与小分子相似的独特配体作为原配体(活性口袋位点)。靶点蛋白通过 PyMOL 移除水分子及原配体,导入 AutoDock Tools 1.5.6 进行加氢、

计算电荷、合并非极性氢后保存成.pdbqt格式,合并非极性氢后保存成.pdbqt格式。设置 Grid Box 大小为  $40 \times 40 \times 40$ ,最后,使用 CMD 命令字符运行 AutoDock Vina 进行分子对接<sup>[15]</sup>,用 PyMOL 对结果进行可视化处理。

## 2 结果

### 2.1 雷公藤主要活性成分靶点的获取

通过 TCMSP 平台共获取雷公藤化学成分 144 种,经 ADME 筛选后得到活性成分 42 种,剔除没有对应靶点蛋白的 13 个,剩余活性成分 29 个,包括雷公藤甲素、雷公藤内酯醇、 $\beta$ -谷甾醇等,文献补充 Tripterinin<sup>[10]</sup>。为方便后续绘图及数据处理,予以标记(见表1)。雷公藤各成分对应靶点 424 个,合并删除重复值后共得到靶点 136 个。

表1 雷公藤主要成分

Table 1 The main components of *Tripterygium wilfordii*

分子号 Mol ID	标记 Sign	活性成分 Molecule name	氢键给体 Hdon	氢键受体 Hacc	口服生物 利用度 OB (%)	类药性 DL
MOL000211	LGT1	丁香香菇 Mairin	2	3	55.38	0.78
MOL000296	LGT2	常春藤皂苷 Hederagenin	1	1	36.91	0.75
MOL000358	LGT3	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	1	1	36.91	0.75
MOL000422	LGT4	山奈酚 Kaempferol	4	6	41.88	0.24
MOL000449	LGT5	豆甾醇 Stigmasterol	1	1	43.83	0.76
MOL002058	LGT6	40957-99-1	2	7	57.2	0.62
MOL003182	LGT7	(+)-树脂醇二-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (+)-Medioresinol di-O-beta-D-glucopyrano side_qt	2	7	60.69	0.62
MOL003184	LGT8	81827-74-9	1	4	45.42	0.53
MOL003185	LGT9	(1R,4AR,10AS)-5-羟基-1-(羟甲基)-7-异丙基-8-甲氧基-1,4a-二甲基-4,9,10a-四氢-3H-菲仑-2-酮 (1R,4aR,10aS)-5-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-7-isopropyl-8-methoxy-1,4a-dimethyl-4,9,10,10a-tetrahydro-3H-phenanthren-2-one	2	4	48.84	0.38
MOL003187	LGT10	雷公藤内酯醇 Triptolide	1	6	51.29	0.68
MOL003196	LGT11	依托酚酸盐 Tryptophenolide	1	3	48.5	0.44
MOL003199	LGT12	5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆素-3)-香豆素 5,8-Dihydroxy-7-(4-hydroxy-5-methyl-coumarin-3)-coumarin	3	7	61.85	0.54
MOL003208	-	南蛇藤 $\beta$ -呋喃甲酸胺 Celafurine	2	6	72.94	0.44
MOL003209	LGT13	南蛇藤苜酰胺 Celalocinnine	2	5	83.47	0.59
MOL003217	LGT14	异蛇麻素 Isoxanthohumul	2	5	56.81	0.39
MOL003224	LGT15	雷公藤甲素 Triptiditolnide	2	6	56.4	0.67
MOL003225	LGT16	山海棠二萜内酯 A Hypodiolide A	1	3	76.13	0.49
MOL003229	LGT17	雷公藤素 B Triptinin B	2	3	34.73	0.32
MOL003231	LGT18	雷藤二萜酸 B Triptoditerpenic acid B	1	3	40.02	0.36
MOL003245	LGT19	雷藤二萜酸 Triptonoditerpenic acid	2	4	42.56	0.39
MOL003248	LGT20	雷公藤萜烯 Triptonoterpene	1	2	48.57	0.28

续表 1 (Continued Tab. 1)

分子号 Mol ID	标记 Sign	活性成分 Molecule name	氢键给体 Hdon	氢键受体 Hacc	口服生物 利用度 OB (%)	类药性 DL
MOL003266	LGT21	21-Hydroxy-30-norhopan-22-one	1	2	34.11	0.77
MOL003280	LGT22	雷公藤内酯 TRIPTONOLIDE (2R,3R,4S)-4-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)-7-甲氧基-2,3-二甲基-四氢萘-6-醇	1	4	49.51	0.49
MOL003283	LGT23	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	4	6	66.51	0.39
MOL004443	LGT24	浙贝素 Zhebeiresinol	1	6	58.72	0.19
MOL005828	LGT25	川陈皮素 Nobiletin [(2S)-2-[(2S)-2-(苯甲酰氨基)-3-苯丙基]氨基]-3-苯丙基]乙酸盐	0	8	61.67	0.52
MOL007415	LGT26	[(2S)-2-[[ (2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl] amino]-3-phenylpropyl] acetate (5S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-乙基-1,5-二甲基己基]-10,13-二甲基-2,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3,6-二酮	2	6	58.02	0.52
MOL007535	LGT27	(5S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,6-dione	0	2	33.12	0.79
MOL009386	LGT28	3,3'-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)-2H-1-苯并吡喃 3,3'-bis-(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran	2	6	52.11	0.54
-	LGT29	Tripterinin	-	-	-	-

注: MOL003208 预测靶点 Uniprot 无法校正, 故不纳入统计数据。

Note: The predicted target of MOL003208, Uniprot, could not be corrected, so the statistical data was not included.

## 2.2 CTD-ILD 相关靶点的获取

在 Genecards 数据库中, Score 值越高则代表该靶点与疾病联系越密切。根据文献<sup>[14]</sup>, 当靶点过多时设定 Score 大于中位数的目标靶点为 CTD-ILD 相关靶点, 通过 GeneCards 所得靶点的 Score 最大值为 119.41, 最小值为 0.49, 中位数为 11.38, 故设定 Score > 11.38 的基因靶点为 CTD-ILD 的相关靶点, 筛选后共得到 1 032 个。从 OMIM 数据库中, 共获取 520 个靶点。DrugBank 数据库检索中以尼达尼布的作用靶点予以补充, 共 21 个。合并 3 个数据库并剔除重复值, 最终得到 1 496 个 CTD-ILD 相关靶点。

## 2.3 PPI 网络构建

将雷公藤活性成分靶点与 CTD-ILD 疾病靶点取交集, 通过 R 语言绘制韦恩图, 得到交集靶点共 80 个 (见图 1)。将交集靶点提交至 STRING 平台, 构建 PPI 网络 (见图 2), 并通过 CytoScape3.8.0 中的 MCODE 插件进行分子复合物预测, 提取 PPI 网络中具有重要生物学意义的蛋白功能模块 (module, 见图 3)。根据 P 值, 选择 PPI 网络中 3 个评分最佳的 MCODE 对其生物功能进行描述 (见表 2)。由结果可见, 其功能主要涉及炎症因子, 癌症通路及参与

多种细胞凋亡。

## 2.4 GO 及 KEGG 分析

应用 Metascape 平台对雷公藤干预 CTD-ILD 相关靶点进行 GO, KEGG 的富集分析, 借助 R 语言对结果进行可视化处理。由结果可见多个靶点的功能与 CTD-ILD 的发生密不可分。其中, GO 富集分析共得到了 3 740 个 GO 条目 ( $P < 0.01$ ,  $FDR < 0.01$ ), 其中生物过程条目 1 559 条, 涉及炎症、免疫、代谢、细胞因子介导、生物调节等。分子功能相关条目 2 000 条, 包括抗氧化、激素调节、抗肿瘤、抗炎、分子功能调节、转录活性调节等。细胞组成相关条 39 条, 包括细胞外基质、线粒体膜、突触后膜、膜筏等。

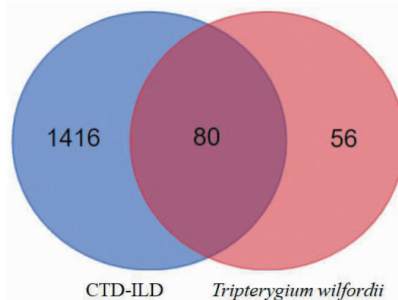


图 1 雷公藤-CTD-ILD 靶点韦恩图

Fig. 1 The venn diagram of *T. wilfordii* and CTD-ILD targets

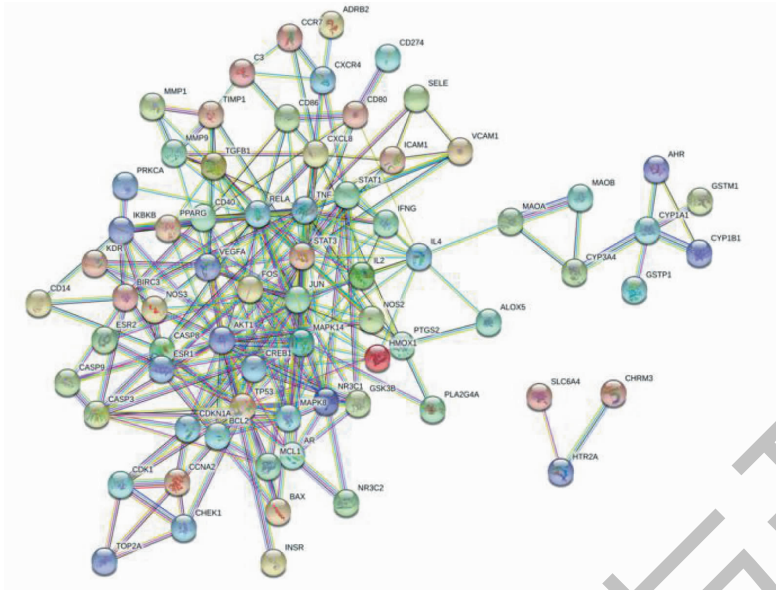


图 2 雷公藤-CTD-ILD 潜在靶点 PPI 网络

Fig. 2 Potential target gene PPI (protein interaction) network of *T. wilfordii* and CTD-ILD

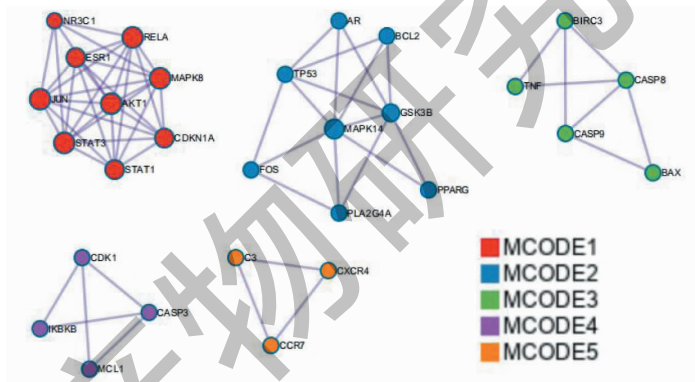


图 3 潜在靶点 PPI 网络中的 Module

Fig. 3 Modules of Potential target gene PPI network

表 2 MCODE 功能描述

Table 2 MCODE function description

功能模块 MCODE	GO 条目 GO item	功能描述 Description	Log10 (P)
MCODE_1	M115	PID REG GR PATHWAY	-15.8
	hsa05161	Hepatitis B	-14.1
	hsa04917	Prolactin signaling pathway	-13.4
MCODE_2	hsa05200	Pathways in cancer	-9.3
	hsa05210	Colorectal cancer	-8.6
MCODE_3	M115	PID REG GR PATHWAY	-8.1
	M220	PID CASPASE PATHWAY	-13.4
	hsa04210	Apoptosis	-11.2
	hsa04215	Apoptosis -multiple species	-10.8

KEGG 富集条目共 142 条 ( $P < 0.01$ ,  $FDR < 0.01$ ), 包括与炎症及免疫相关的 IL17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、Th17 细胞分化通路 (Th17 cell differentiation)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等; 与氧化应激相关的 HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、FoxO 信

号通路 (FoxO signaling pathway) 等; 癌症相关通路, 如 Cancer 信号通路 (pathways in cancer)、非小细胞肺癌信号通路 (non-small cell lung cancer)、结肠直肠癌信号通路 (colorectal cancer) 等, 以及其他蛋白酶、细胞凋亡相关信号通路。对于 GO 及 KEGG 富集结果, 根据  $P$  值, 对前 20 条相关富集结果进行可视化 (见图 4)。

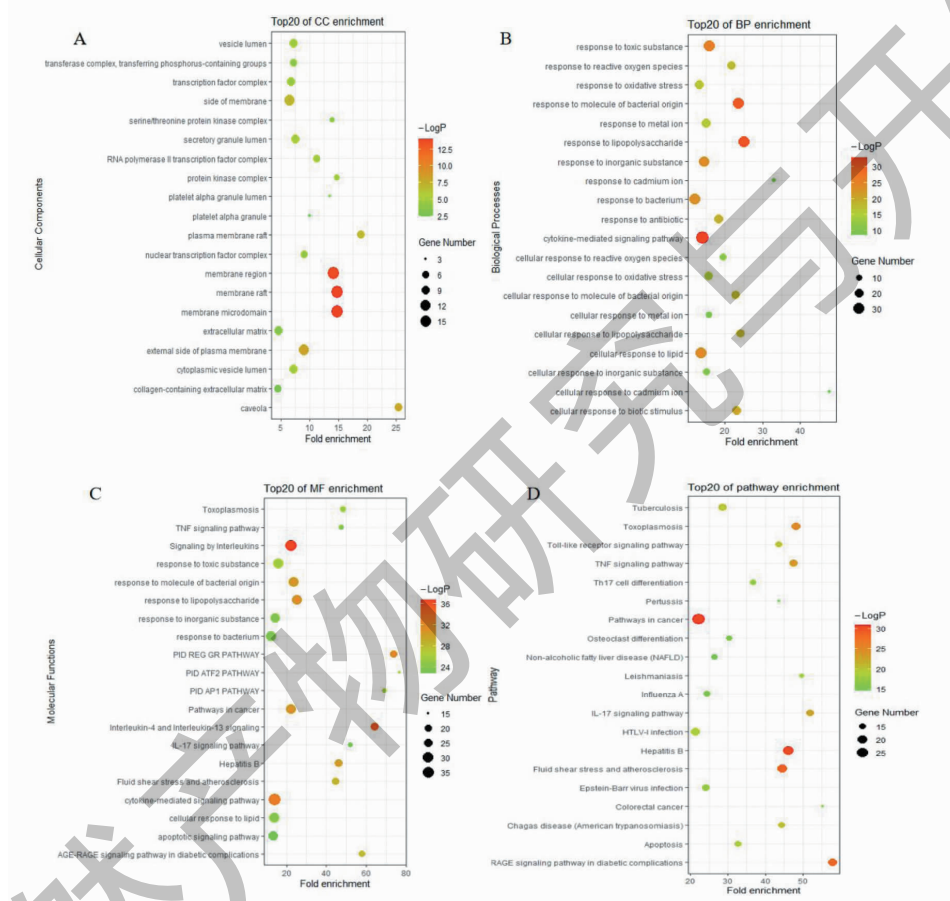


图 4 雷公藤主要成分潜在靶点的富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of potential targets of main components in *T. wilfordii*

注: A: GO-CC 分析; B: GO-BP 分析; C: GO-MF 分析; D: KEGG 分析。Note: A: GO-CC analysis; B: GO-BP analysis; C: GO-MF Analysis; D: KEGG analysis.

## 2.5 成分-靶点-信号通路网络的构建

通过 CytoScape3. 8. 0 构建“成分-靶点-信号通路”网络 (见图 5)。运用 CytoScape3. 8. 0 内置的 NetworkAnalyzer 分析通路网络的拓扑学参数, 提取核心活性成分及核心靶点。成分-靶点-信号通路网络分析结果显示, 网络中共有 130 个节点, 形成了 575 个关系对。其中, 山奈酚连接度 (dgree) 为 34, 介度 (betweenness centrality) 为 0.211 545 2, 紧密度

(closeness centrality) 为 0.47426471, 预测其是干预 CTD-ILD 中的重要成分, 其次为雷公藤内酯醇、川陈皮素、 $\beta$ -谷甾醇等 (见表 3)。PTGS2 连接度 26, 介度 0.153 926 47, 紧密度 0.507 874 02, 预测其是雷公藤干预 CTD-ILD 的重要靶点, JUN、MAPK8、RELA、SCN5A、TNF 等亦为相对重要的靶点 (见表 4)。

## 2.6 分子对接结果

对雷公藤核心成分与关键靶点进行分子对接,

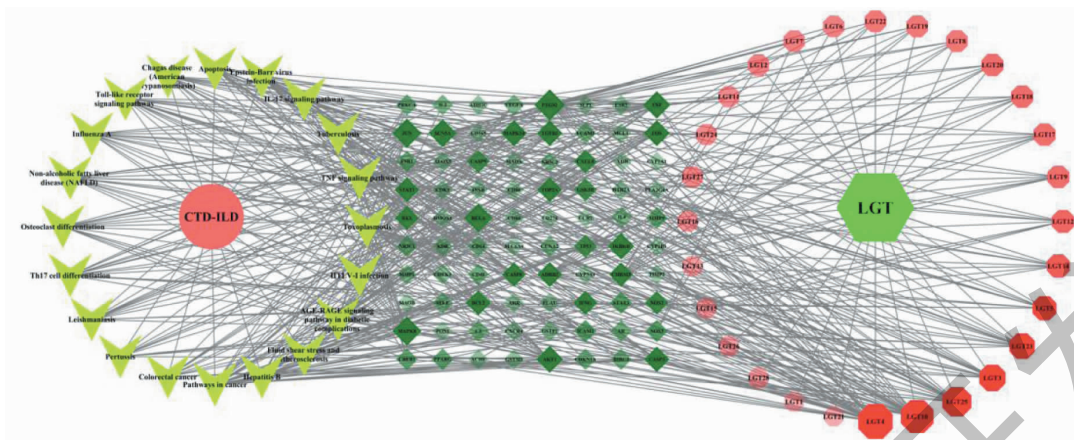


图5 雷公藤成分-CTD-ILD 靶点-信号通路网络

Fig. 5 Constituents of *T. wilfordii* and CTD-ILD target and signal pathway network

注:六边形代表药物成分;菱形代表靶点;圆形为通路。节点的面积及颜色透明度代表其度值,面积越大、颜色越深说明该节点越重要。  
 Note:Hexagon represents drug composition;Rhomboid represents target;Circle represents pathway. Area and color transparency of nodes represent degree value, larger area and deeper color indicate more important node.

表3 雷公藤核心成分

Table 3 Core ingredients of *Tripterygium wilfordii*

MOL 标识 MOL ID	化合物名称 Name	连接度 Degree	介度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	34	0.211 545 2	0.474 264 71
MOL003187	雷公藤内酯醇 Triptolide	30	0.159 260 81	0.460 714 29
MOL005828	川陈皮素 Nobiletin	22	0.104 075 18	0.435 810 81
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	16	0.077 831 15	0.418 831 17
MOL003283	(2R,3R,4S)-4-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)-7-甲氧基-2,3-二甲基-四氢萘-6-醇	14	0.0328 367 9	0.410 828 03
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	11	0.057 918 84	0.368 571 43

表4 雷公藤核心靶点

Table 4 Core target of *Tripterygium wilfordii*

靶点 Target	连接度 Degree	介度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
PTGS2	26	0.153 926 47	0.507 874 02
JUN	22	0.046 791 05	0.474 264 71
MAPK8	22	0.036 354 95	0.457 446 81
RELA	21	0.025 336 39	0.435 810 81
SCN5A	19	0.030 041 53	0.370 689 66
TNF	18	0.018 995 28	0.427 152 32
AKT1	17	0.014 109 71	0.413 461 54
IKBKB	16	0.013 441 41	0.413 461 54
MAPK14	15	0.012 674 99	0.398 148 15
FOS	15	0.010 067 1	0.393 292 68

对接结果示(见表5),分子亲和力(affinity) < -5 kcal/mol 的占 93.75%,表示有较好的结合活性,分子亲和力 < -7 kcal/mol 的占 62.5%,山奈酚与 3V3V 的亲和力最高,为-8.6 kcal/mol,显示化合物与靶点之间具有良好的对接活性<sup>[16]</sup>;而其中 5 次对接结果显示,部分化合物与靶点受体之间的亲和力

超过了原配体,分别是:山奈酚与 3QXY,山奈酚与 5T01,雷公藤内酯醇与 3QXY,川陈皮素与 5T01, $\beta$ -谷甾醇与 3QXY(见图6),这一部分化合物可能通过竞争性抑制原配体与靶点受体的结合而影响其功能,在 CTD-ILD 中发挥重要作用。

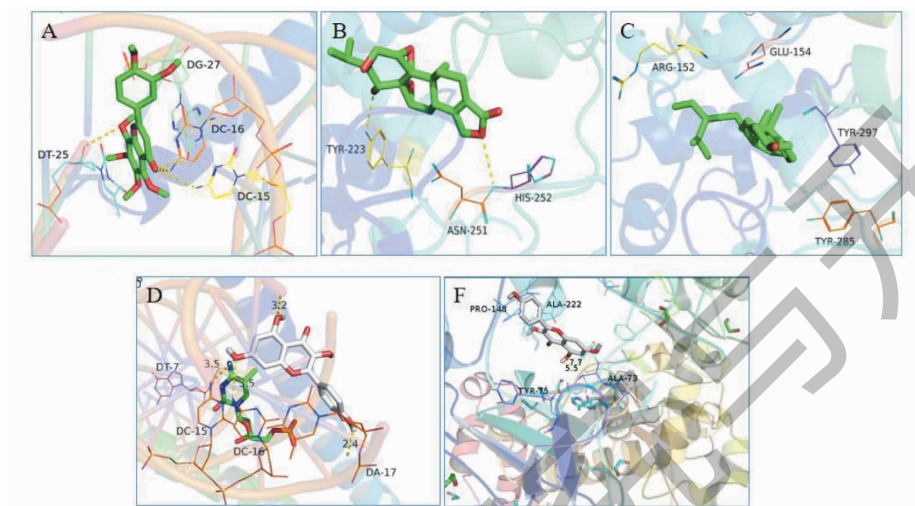


图6 分子对接模型

Fig. 6 Molecular docking model

注:A:川陈皮素—5T01;B:雷公藤内酯醇—3QXY;C: $\beta$ -谷甾醇—3QXY;D:山奈酚—5T01;E:山奈酚—3QXY)。Note:A:Nobiletin-5T01; B:Triptolide-3QXY; C: $\beta$ -Sitosterol-3QXY; D:Kaempferol-5T01; E:Kaempferol-3QXY)。

表5 分子对接结果

Table 5 Results of molecular docking

成分 Chemical composition	靶点 Target	PDB 标识 PDB ID	活性口袋位点 Active pocket site	亲和力 Affinity (kcal/mol)	
				原配体 Protoplast	小分子 Molecule
山奈酚 Kaempferol	PTGS2	5IKR	38.042, 2.131, 61.28	-9.1	-7
	JUN	5T01	40.92, 25.779, 2.383	-6.9	-7.3
	MAPK8	3V3V	30.614, 44.085, 4.212	-9	-8.6
	RELA	3QXY	63.15, 19.698, 10.383	-7.4	-8.2
雷公藤内酯醇 Triptolide	PTGS2	5IKR	24.745, 6.728, 49.935	-11.8	-7.7
	JUN	5T01	40.92, 25.779, 2.383	-6.9	-6.8
	MAPK8	3V3V	30.614, 44.085, 4.212	-9	-8.3
	RELA	3QXY	63.15, 19.698, 10.383	-7.4	-7.7
川陈皮素 Nobiletin	PTGS2	5IKR	40.466, 38.589, 86.137	-8.9	-2.2
	JUN	5T01	40.92, 25.779, 2.383	-6.9	-7.2
	MAPK8	3V3V	30.614, 44.085, 4.212	-9	-7.7
	RELA	3QXY	63.15, 19.698, 10.383	-7.4	-5.9
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	PTGS2	5IKR	24.479, 6.983, 49.467	-11.8	-7.3
	JUN	5T01	40.92, 25.779, 2.383	-6.9	-5.7
	MAPK8	3V3V	30.614, 44.085, 4.212	-9	-8.4
	RELA	3QXY	63.15, 19.698, 10.383	-7.4	-7.8



### 3 讨论

结缔组织相关间质性肺病(CTD-ILD)在古代中医文献中并未有具体的命名,结合本病的临床表现及病因病机可将其归属为“肺痹”的范畴,《内经》中最早简述了肺痹的临床表现及病因,如《素问·痹论篇》曰:“五脏皆有所合,病久而不去者,内舍于其合也,……皮痹不已,复感于邪,内舍于肺;所谓痹者,各以其时重感于风寒湿之气也;凡痹之客五脏者,肺痹者,烦满喘而呕;淫气喘息,痹聚在肺”,又曰:“其入脏者死,其流连筋骨间者疼久,其留皮肤间者易已”,论述本病病情较重,预后差;目前西医大多应用糖皮质激素及免疫抑制剂治疗,但其不良反应实多并伴有多种并发症,治疗效果不甚理想;随中医药文化蓬勃发展,中医药通过运用整体观念、辨证论治的原则在多种疾病治疗中的优势凸显,同时中药主要来源于天然的动植物、矿物及其加工品等,有效成分众多。多项研究证实,中医药在CTD-ILD的治疗中具有独特的优势。Qu等<sup>[7]</sup>从中医整体观及现代医学的角度出发,基于“伏毒学说”论治,提出了扶正益气托毒、化痰通络解毒两种治法,此外本课题组还论述了雷公藤在不同类型的结缔组织相关间质性肺病中的临床应用及作用机理<sup>[5,6]</sup>。基于上述理论研究,本篇基于网络药理学及分子对接技术进一步探讨雷公藤干预CTD-ILD的分子机制,为雷公藤用于本病治疗提供理论依据,并期待能为新药的研究提供方向。

笔者运用网络药理学研究方法筛选出雷公藤有效活性成分29个,预测作用靶点136个,其中与CTD-ILD相关的靶点80个,占总靶点的59%,说明雷公藤对于CTD-ILD的治疗具有极高的针对性,可以通过多成分、多靶点联合发挥治疗作用,在CTD-ILD的治疗中有一定的研究价值;根据PPI及“成分-靶点-通路”网络的拓扑属性分析结果,得到排名前5的关键化合物分别为山奈酚、雷公藤内酯醇、川陈皮素、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇。

山奈酚属于黄酮类化合物,广泛存在于各种植物中。现代药理学研究表明,山奈酚具有抗癌、防癌、抗炎、抗氧化、抗菌等作用。Wang等<sup>[17]</sup>研究发现,山奈酚在体外可以以非竞争性的方式抑制钙调磷酸酶(CN)的活性,后者是一种高度保守的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,其参与细胞因子介导的T细胞活化,在免疫调节过程中发挥重要的作用,同时,山奈酚还能抑制Jurkat细胞中IL-2基因的表达,发挥了

免疫抑制的作用。川陈皮素具有抗炎、抗癌、抗突变、抗血栓形成、抗胆碱酯酶等作用,Zheng等<sup>[18]</sup>研究发现,川陈皮素使细胞线粒体膜电位下降并随时间延长,Akt、p-Akt蛋白表达下调呈时间依赖性,从而得出川陈皮素可以通过线粒体途径抑制PI3K/Akt信号通路的激活,而PI3K/Akt信号通路通过刺激成纤维细胞增殖、促进纤维分泌及胶原沉积等在肺纤维化“损伤-修复”这一中心环节中发挥重要作用。雷公藤内酯醇是一种环氧二萜内酯化合物,其在抗氧化,抗类风湿,抗老年性痴呆症,抗癌等方面发挥重要作用,同时被广泛认为是雷公藤最主要的抗炎和免疫抑制成分<sup>[19]</sup>。相关药理研究认为,雷公藤内酯醇可以通过调控MAPK和VEGF等信号转导通路下调TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症因子的表达,发挥抗炎作用,Hu等<sup>[20]</sup>通过网络药理学角度阐明雷公藤内酯醇抗风湿作用机制为通过调节MAPK信号转导通路来抑制炎症细胞因子的产生和调节VEGF信号转导通路在关节抑制细胞因子的表达,来减少胶原蛋白的产生、抑制滑膜细胞增殖、减弱侵袭能力等。实验观察发现<sup>[21]</sup>,豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇均可通过显著降低非酒精性脂肪肝细胞内MDA含量、提高GSH水平,减轻脂质蓄积造成的肝细胞的过氧化损伤,增强细胞的解毒功能,其具有较强的抗氧化活性,可较好地改善细胞脂质沉积所引起的氧化应激状态。综上分析,这些关键化合物成分大多具有抗炎、抗癌、抗氧化、免疫抑制等作用,这提示雷公藤可能通过抗炎,抗氧化,免疫抑制等途径起到治疗CTD-ILD的作用。

富集分析的结果显示,IL17信号通路、TNF信号通路、Cancer信号通路等是雷公藤干预CTD-ILD的重要通路,其他还包括Th17细胞分化通路、Toll样受体信号通路、T细胞受体信号通路、FoxO信号通路、非小细胞肺癌信号通路、结直肠癌信号通路等,主要涉及炎症相关、免疫相关、氧化应激及肿瘤等。其中IL17可以促进肺成纤维细胞的增殖及向肌成纤维细胞的转化,并且能够促进I、III胶原蛋白的合成,进而加快肺纤维化的进程<sup>[22]</sup>。TNF- $\alpha$ 参与了肺纤维化的急性炎症反应,可以促进II型肺泡细胞的凋亡,从而抑制肺损伤的修复<sup>[23]</sup>,同时,TNF- $\alpha$ 可以诱导成纤维细胞大量聚集,胶原合成增加<sup>[24]</sup>。研究结果还表明,诸多癌症相关通路参与了肺纤维化的进程,如Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路不仅参与肿瘤发生发展,同时也参与肺纤维化的进展,有证据表明

Wnt1 可诱导信号蛋白-1 (WISP1) 是肺泡上皮 II 型细胞增生的关键调节因子,同时也是抗纤维化治疗重要靶点<sup>[25]</sup>,并且是治疗肺纤维化合并肺癌有希望的靶点之一。

雷公藤干预 CTD-ILD 治疗的主要靶点为 PTGS2。其中前列腺内环氧化物合成酶 (prostaglandin endoperoxide synthase, PTGS), 又称环氧合酶 (cyclooxygenase, COX), 是花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶,分为结构型 COX-1 与诱导型 COX-2。Yang 等<sup>[26]</sup>通过实验研究发现,COX-2 在博来霉素肺纤维化组织中有高度表达,主要分布于细支气管上皮细胞,其能上调 PEG2 的表达,进而导致 Th1/Th2 型细胞因子的平衡失调,刺激体内炎症介质的产生,加速肺纤维化进程。我们的研究还发现,CTD-ILD 中多个重要基因与肿瘤密切相关,如 PTGS2、JUN、TNF 等。无论是从靶点亦或是信号通路角度,肿瘤与 CTD-ILD 都具有明显的相关性,与 KEGG 富集结果相符。最后分子对接的结果也验证了本次研究结果的可靠性。

依据本次研究结果,雷公藤可以通过多靶点、多通路的联合干预 CTD-ILD 的进程,其关键化学成分为山奈酚、雷公藤内酯醇、川陈皮素、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇,关键靶点为 PTGS2、JUN、MAPK8、RELA 等。鉴于雷公藤与 CTD-ILD 的相关研究不足,缺乏更多证据支持,后续将在此基础上进行动物及细胞实验的验证,对于 CTD-ILD 的治疗仍需广大科研工作者进行更多的基础性及临床性的深入研究;同时期待本研究预测结果能为研发新药或新的治疗手段提供方向。

## 参考文献

- Li N,Zhang YP. Update of diagnosis and treatment in connective tissue disease associated interstitial lung disease[J]. Clin Focus(临床荟萃),2016,31:506-511.
- Cai HR. Practical Interstitial Lung Disease(实用间质性肺病)[M]. People's Medical Publishing House,2016:373.
- Bian DC,Xiao YL,Liu BJ,et al. A comparative study on connective tissue diseases related interstitial lung diseases and idiopathic interstitial pneumonias[J]. Chin J Respir Crit Care Med(中国呼吸与危重监护杂志),2014,13:263-267.
- Hu DJ,Peng ZY,He DC. Research progress on pharmacological action of *Tripterygium wilfordii*[J]. Herald Med(医药导报),2018,37:586-592.
- Zhang D,Jia XH. Clinical application and mechanism analysis of *Tripterygium wilfordii* in connective tissue associated pulmonary interstitial disease[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报),2018,46:115-119.
- Wang GY,Jia XH. Discussion on the differentiation treatment of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. from the etiology and pathogenesis of connective tissue-associated interstitial lung disease[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2020,35:848-850.
- Qu Y,Zhang W,Jia XH. Discussion on treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease based on hidden toxin theory[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志),2020,61:776-780.
- Ru J,Li P,Wang J,et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminformatics,2014,6:13.
- Yan PJ,Zheng CS,Ye HZ,et al. Pharmacodynamic material basis and molecular mechanism of *Tripterygium wilfordii* in treating rheumatoid arthritis based on computational simulation[J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究),2016,20:1818-1824.
- Xue J,Jia XB,Tan XB,et al. Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii* Hook. f and its toxicity[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2010,25:726-733.
- Liu L,Yan J,Shu JC,et al. Advance on alkaloids from *Tripterygium wilfordii* and their bioactivities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:2170-2181.
- Wishart DS,Feunang YD,Guo AC,et al. DrugBank 5. 0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res,2018,46(D1):D1074-D1082.
- Szklarczyk D,Gable AL,Lyon D,et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res,2019,47(D1):D607-D613.
- Trott O,Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function,efficient optimization,and multithreading[J]. J Comput Chem,2010,31:455-461.
- Jiang HH,Tang K,Zhang HW,et al. Study on mechanisms of *Schisandra sphenanthera* for treating hepatic injury based on network pharmacology[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:759-768.
- Wu C,Wei Y,Ge S,et al. Mechanism study on *Coydalis decumbens*(Thunb.)Pers. in the treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chin J

- Inf Tradit Chin Med(中医药信息),2020,37(3):104-111.
- 17 Wang H,Zhou C L,Lei H,et al. Kaempferol:a new immunosuppressant of calcineurin[J]. IUBMB Life,2008,60:549-554.
- 18 Zheng YQ,Li SZ,Li QZ,et al. Effects of nobiletin on apoptosis of human ovarian cancer cells (HO8910) [J]. J Harbin Med Univ(哈尔滨医科大学学报),2017,51:487-491.
- 19 Lu S,Wang Q,Li G,et al. The treatment of rheumatoid arthritis using Chinese medicinal plants:from pharmacology to potential molecular mechanisms [J]. J Ethnopharmacol,2015,176:177-206.
- 20 Hu WF,Wang CX. Therapeutic effect and network pharmacology of triptolide for rheumatoid arthritis in rats[J]. Chin Gen Pract(中国全科医学),2016,19(12):1408-1413.
- 21 Zhou HY,Tang W,Jiang J,et al. Effects of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol on non-alcoholic fatty liver disease *in vitro*[J]. Acta Nutr Sin(营养学报),2016,38:456-461.
- 22 Dong ZX. The role of IL-17 producing Th17 cells in bleomycin induced pulmonary fibrosis [D]. Kunming: Kunming Medical University(昆明医科大学),2012.
- 23 Kuroki M,Noguchi Y,Shimono M,et al. Repression of bleomycin-induced pneumopathy by TNF[J]. J Immunol,2003,170(1):567-574.
- 24 Epstein SG,Brook E,Israeli-Shani L,et al. Fibroblast paracrine TNF- $\alpha$  signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. Respir Res,2017,18(1):122.
- 25 Königshoff M,Kramer M,Balsara N,et al. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Clin Invest,2009,119:772-787.
- 26 Yang JL,Sun ZM,Lin QY. Signification and expression of cyclooxygenase-2 in rats with bleomycininduced pulmonary fibrosis[J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志),2009,25:745-747.

## 大肠杆菌菌落控制新模式

计算机科学先驱艾伦·图灵(Alan Turing)于1952年首次提出自然界中出现复杂、不规则图案的机制,图灵模式已经在物理和化学中被验证,越来越多的证据表明它也存在于生物系统中。

2021年2月24日 Synthetic Biology 报道,西班牙进化生物学研究所(institut de Biologia Evolutiva,CSIC-UPF)的研究者在实验室中对大肠杆菌进行微调,使菌落呈现出图灵模式。该研究提供了一种新的概念框架,在微生物群落乃至其他生物群落中创建类似图灵模式。

研究者通过设计不同的合成基因电路使大肠杆菌中遵循不同的指令,从而实现局部激活远程抑制。改造后的大肠杆菌系统由三个部分组成:一组正常分裂和扩散的规则大小的细胞;一组不能分裂或扩散的细长细胞;一种被称为内酯的分子,有助于调节大肠杆菌中的基因表达,使它们能够通过群体感应进行交流。研究者观察这个特殊群体的生长和进化情况,菌落形状由最初的圆形不断向外扩展,在边缘周围规则地长出间隔的“分支”,就像花瓣盛开的花,这与图灵的理论相符。从本质上来说,研究通过改变细胞分裂、细胞之间的粘附力和远距离通讯能力(群体感应),控制群体决策。研究人员希望将新发现应用于其他生物系统,例如群居昆虫。

研究图灵模式形成的机制,对于进一步了解生物复杂性的进化以及自我组织所起的作用至关重要。人工系统和胚胎发生过程的工程学观点可以帮助验证发育理论并确定支撑生物学模式形成的普遍特性,这对合成发育生物学领域很有价值。

吴晓燕等编译自<https://arstechnica.com/science/2021/02/scientists-create-new-class-of-turing-patterns-in-colonies-of-e-coli/>

原文链接:<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.0c00318>

原文标题:Synthetic Lateral Inhibition in Periodic Pattern Forming Microbial Colonies