

基于网络药理学和分子对接研究灯盏细辛抗衰老的作用机制

普元柱¹, 苏 灿^{2*}, 朱屹韬¹, 肖清青¹, 张霆峰¹, 李恒瑶¹, 周荣毅¹

¹ 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; ² 云南省科学技术院, 昆明 650051

摘要: 为了研究灯盏细辛抗衰老的潜在作用机制, 本研究检索灯盏细辛口服入血成分, 通过 STITCH、SwissTarget-Prediction、TCMSP、HAGR 数据库预测入血成分抗衰老靶点, 应用 DAVID 和 STRING 平台分析抗衰老靶点生物学功能和通路, 采用 STRING 平台和 Cytoscape 软件构建抗衰老靶点蛋白互作网络、入血成分-靶点网络, 再用 Discovery Studio 软件对网络分析结果进行分子对接验证。结果检索到灯盏细辛口服入血成分 30 个, 包括黄酮类成分 13 个, 咖啡酰类成分 11 个, 其他类成分 6 个, 预测作用于 37 个衰老靶点, 涉及复制性衰老、细胞衰老等生物过程和寿命调节、肿瘤调节等通路。网络分析表明, TP53、AKT1、RBI、HRAS、HDAC1、SIRT1 是抗衰老关键靶点, 黄酮类成分槲皮素、芹菜素、木犀草素、黄芩素、山柰酚、柚皮素等是抗衰老关键活性成分。分子对接显示, 这些黄酮类成分与 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 有很好的结合活性; 此外, 9 个咖啡酰类成分与这 4 个靶点也有较好的结合活性; 入血成分与靶点的结合形式主要是氢键、 π 键。本研究初步揭示黄酮类和咖啡酰类成分是灯盏细辛抗衰老的潜在活性成分, 可能通过调控衰老和肿瘤等相关生物过程和通路而发挥抗衰老作用, 研究结果为后续实验验证提供了思路。

关键词: 灯盏细辛; 抗衰老; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1758-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.017

Study on the anti-aging mechanism of *Erigeron breviscapus* based on network pharmacology and molecular docking

PU Yuan-zhu¹, SU Can^{2*}, ZHU Yi-tao¹,

XIAO Qing-qing¹, ZHANG Ting-feng¹, LI Heng-yao¹, ZHOU Rong-yi¹

¹ School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

² Yunnan Provincial Academy of Science and Technology, Kunming 650051, China

Abstract: To investigate the potential anti-aging mechanism of *Erigeron breviscapus*, the components that can be absorbed into blood after oral administration of *E. breviscapus* were collected, and the potential targets of these absorbed components for anti-aging were predicted via STITCH, SwissTargetPredictio, TCMSP and HAGR databases, biological function analysis and pathway analysis of the predicted potential targets for anti-aging were undertaken through the DAVID and STRING platforms, protein-protein interaction network and absorbed component-target network were constructed using STRING platform and Cytoscape software, then the results of network analysis were verified by molecular docking using Discovery Studio software. A total of 30 components orally absorbed from *E. breviscapus* were retrieved, including 13 flavonoids, 11 caffeoyl quinic acids and six others, they may act on 37 aging-related targets, and these targets are involved in biological processes such as replicative senescence and cellular senescence and pathways including lifespan regulation and tumor regulation, and so on. Network analysis showed that TP53, AKT1, RBI, HRAS, HDAC1, SIRT1 are the vital anti-aging targets of *E. breviscapus*, and the flavonoids quercetin, apigenin, luteolin, baicalein, kaempferol, naringenin are important bioactive components for anti-aging. The molecular docking analysis verified that these flavonoids have good binding capacity with TP53, AKT1, HDAC1, SIRT1; in addition, nine caffeoyl quinic acids have good binding capacity with these four targets too; these absorbed components mainly binded to these four targets with hydrogen bonds and π bonds. This study preliminarily revealed that the flavonoids and caffeoyl quinic

收稿日期: 2021-04-15 接受日期: 2021-07-19

基金项目: 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项面上项目(2019FF002(-049)); 云南省教育厅科学研究基金(2018JS282); 云南中医药大学大学生创新创业训练计划建设项目(2019075)

* 通信作者 Tel: 86-871-63138976; E-mail: sucand26@126.com

acids could be the potential active components of *E. breviscapus* for anti-aging, and could play an anti-aging effect by regulating biological processes and pathways associated with aging, tumors and others, the findings in this study offer ideas for subsequent experimental studies.

Key words: *Erigeron breviscapus*; anti-aging; network pharmacology; molecular docking; mechanism

人口老龄化是当今中国和世界所面临的一道难题。人口老龄化不仅带来适龄劳动力减少、国家和家庭的养老负担增加等问题,还带来一系列健康问题。研究证实,衰老是心脑血管疾病、糖尿病、癌症、神经退行性疾病等诸多复杂疾病的危险因素^[1]。虽然衰老不可阻止,但可通过热量限制、基因操作、药物干预等方式延缓衰老^[1]。更重要的是,延缓衰老不仅延长机体寿命,而且明显改善机体健康状况。如,在大多数慢性疾病中,限制食物摄入量可有效降低症状严重程度;二甲双胍、雷帕霉素在多个模式生物中显示能延长寿命,流行病学研究表明人类适量服用二甲双胍、雷帕霉素可预防许多癌症的发生,降低神经退行性疾病的发病率^[1]。因此,延缓衰老是降低老年相关疾病发生率的有效方法之一。

中医自古强调养生保健,不治已病治未病,中药抗衰老受到越来越多的关注。灯盏细辛 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz. 是治疗心脑血管疾病等老年性疾病的常用中药,其活性成分主要是黄酮类和咖啡酰类成分。研究发现黄酮类成分灯盏花素可对抗 D-半乳糖诱导的衰老,改善小鼠记忆障碍及肝、肾异常变化,但其作用机制仍不清楚^[2,3]。而灯盏细辛中的咖啡酰类成分是否具有抗衰老作用,目前仍未见报道。网络药理学是一种基于受体理论和生物网络技术,整体阐述药物作用及其作用机制的研究方法。中药以口服为主,只有入血成分才可能是中药治病和保健的有效成分。为探析灯盏细辛抗衰老作用机制,为后续实验研究提供思路,本研究检索灯盏细辛口服入血成分,应用网络药理学方法整体预测入血成分抗衰老靶点、分析靶点生物功能及作用通路,并以分子对接方法对入血成分与关键靶点的结合作用加以验证。

1 资料与方法

1.1 数据库与软件

灯盏细辛入血成分及其结构式检索数据库: CNKI、万方、PubMed、Web of Science, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); 靶点预测/检索数据库: TCMSP(中药系统药理学数据库与分析平台, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>)、SwissTarget-

Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、STITCH (<http://stitch-beta.embl.de/>); 蛋白质数据库: UniProt (<https://www.uniprot.org/>)、PDB (<http://www.rcsb.org/>); 衰老靶点数据库: HAGR(人类衰老基因组资源库, <https://genomics.senescence.info/>); 蛋白质相互作用分析平台: STRING (<https://string-db.org/>); 生物信息分析平台: DAVID6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) 及 STRING; 网络构建、分析软件: Cytoscape 3.7.0、Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); 分子对接软件: Discovery Studio 2.5。

1.2 灯盏细辛入血成分抗衰老靶点预测

以灯盏细辛、Dengzhanxixin、*Erigeron breviscapus*、口服入血、oral administration、plasma、absorbed components、药代动力学、pharmacokinetics、代谢、metabolites、化学成分中英文名称等为关键词在 CNKI、万方、PubMed、Web of Science 等数据库中检索灯盏细辛口服入血成分。在 PubChem 数据库查找入血成分的 CAS 号、SMILES 格式文件。将各成分的 SMILES 分别导入 STITCH 和 SwissTargetPrediction 数据库预测各入血成分潜在作用靶点,以各成分的 CAS 号,在 TCMSP 数据库中查找相应成分的靶点。以上 3 个数据库得到的靶点合并去重后,即为灯盏细辛口服入血成分潜在作用靶点。从 HAGR 数据库查找和下载人类衰老相关基因,再从中筛选出在细胞模型中证实可影响细胞衰老和/或在动物模型中证实可影响寿命的基因作为衰老靶点。将灯盏细辛口服入血成分潜在作用靶点与衰老靶点输入 Venny 2.1.0 软件,交集部分即为灯盏细辛抗衰老靶点。将靶点输入 Uniprot 数据库,选定物种为“homo sapiens”,得到靶点的相应信息,如 Uniprot ID、蛋白名。

1.3 生物功能与通路富集分析

将灯盏细辛抗衰老靶点导入 DAVID 数据库, Select identifier 选“official gene symbol”, List type 选“gene list”, 物种选“homo sapiens”, 阈值 $P < 0.05$, 对灯盏细辛抗衰老靶点进行 gene ontology (GO) 分析生物过程 (biology process)。采用 STRING 平台对

灯盏细辛抗衰老靶点进行 KEGG 通路富集分析,蛋白种属选“homo sapiens”,阈值 $P < 0.05$,其余参数均默认。

1.4 靶点互作网络构建及分析

将灯盏细辛抗衰老靶点上传到 STRING 平台,蛋白种属选“homo sapiens”,交互作用评分阈值设置为大于 0.9,其余参数均默认,得到靶点蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络数据,结果保存为 TSV 格式并导入 Cytoscape 3.7.0 软件构建 PPI 网络图,应用 Cytoscape 的“Network Analyzer”计算网络拓扑参数,以靶点在网络中的度(degree)值筛选灯盏细辛抗衰老关键靶点,度值越大,表明与该靶点有相互作用的靶点数越多,在灯盏细辛抗衰老中的作用越重要,即为灯盏细辛抗衰老关键靶点。

1.5 灯盏细辛入血成分-靶点网络构建及分析

采用 Cytoscape 3.7.0 构建灯盏细辛入血成分-靶点网络。应用 Cytoscape 的“Network Analyzer”计算网络拓扑参数,以入血成分在网络中的度(degree)值筛选灯盏细辛抗衰老的关键成分,度值越大,表明该成分作用靶点数越多,在灯盏细辛抗衰老中的作用越重要,即为灯盏细辛抗衰老关键成分。

1.6 灯盏细辛入血成分与关键靶点分子对接验证

选择灯盏细辛口服入血成分作为配体, PPI 网络中 degree 值较大的前几个靶点作为受体,应用 Discovery Studio 2.5 软件的 LibDock 模块进行分子对接。在 PubChem 数据库下载入血成分 3D 结构,在 PDB

数据库下载靶点的蛋白结构,然后导入 Discovery Studio 软件,入血成分用 CHARMM 力场进行能量优化,再用“Prepare Ligands”批量处理,保存作为对接配体;蛋白先删除水分子,加氢,再用“Prepare Protein”处理,保存作为对接受体。原蛋白晶体结构有配体者,以该配体位置为中心扩大一定范围(设半径 $9 \sim 12 \text{ \AA}$)作为活性结合位点,原蛋白晶体结构无配体者,利用软件自带的“Find Sites from Receptor Cavities”寻找受体中可能的活性结合位点。选择 Libdock 对接模式, Docking Preferences 参数选择“User Specified”,在 Max Hits to Save 参数中输入值“10”,其余参数均默认,进行分子对接。对接完成后,以原配体或相应蛋白晶体的上市药物与蛋白晶体对接打分(LibDock score)为阈值,得分高于此阈值的入血成分,即认为对该靶标具有潜在活性。为验证分子对接流程可靠性,原蛋白晶体结构有配体者,将配体抽离后,再按上述方法对接回原结合口袋,然后计算对接后配体的构象与原始晶体结构中配体构象的均方根偏差(RMSD),当 RMSD 小于 2.0 时,证明对接方法可靠。

2 结果

2.1 灯盏细辛口服入血成分

通过文献检索和筛选,共检索到灯盏细辛口服入血成分 30 个,包括黄酮类成分 13 个,咖啡酰类成分 11 个,其他类成分 6 个(见表 1)。

表 1 灯盏细辛口服入血成分

Table 1 Components absorbed into blood after oral administration of *E. breviscapus*

序号 No.	CAS No.	成分 Component	参考文献 Ref.
黄酮类 Flavonoids			
1	27740-01-8	野黄芩苷 Scutellarin	4-6
2	529-53-3	野黄芩素 Scutellarein	4,5
3	480-41-1	柚皮素 Naringenin	7
4	117-39-5	槲皮素 Quercetin	7
5	22688-79-5	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷 Quercetin-3-O-glucuronide	6
6	520-36-5	芹菜素 Apigenin	4-6
7	491-67-8	黄芩素 Baicalein	8
8	491-70-3	木犀草素 Luteolin	5
9	520-18-3	山柰酚 Kaempferol	9
10	480-10-4	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 Kaempferol-3-O-glucoside	10
11	29741-09-1	灯盏甲素 Scutellarin A	5,6

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	CAS No.	成分 Component	参考文献 Ref.
12	578-74-5	芹菜素-7-O-葡萄糖苷 Apigenin-7-O-glucoside	11
13	485-72-3	芒柄花黄素 Formononetin	12
咖啡酰类 Caffeoyl quinic acids			
14	331-39-5	咖啡酸 Caffeic acid	4-6
15	537-98-4	阿魏酸 Ferulic Acid	4
16	327-97-9	绿原酸 Chlorogenic acid(3-CQA)	5,6,10
17	905-99-7	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid(4-CQA)	6
18	906-33-2	新绿原酸 Neochlorogenic acid(5-CQA)	5,6,10
19	30964-13-7	1,3-二咖啡酰奎宁酸 1,3-Dicaffeoylquinic acid(1,3-DCQA)	5
20	19870-46-3	1,5-二咖啡酰奎宁酸 1,5-Dicaffeoylquinic acid(1,5-DCQA)	13
21	14534-61-3	3,4-二咖啡酰奎宁酸 3,4-Dicaffeoylquinic acid(3,4-DCQA)	6,10
22	2450-53-5	3,5-二咖啡酰奎宁酸 3,5-Dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)	5,6
23	57378-72-0	4,5-二咖啡酰奎宁酸 4,5-Dicaffeoylquinic acid(4,5-DCQA)	5,6,10
24	224824-74-2	灯盏花苷 I Erigeside I	6
其他类 Others			
25	140-10-3	肉桂酸 Cinnamic acid	14
26	139-85-5	原儿茶醛 Protocatechualdehyde	15
27	99-50-3	原儿茶酸 Protocatechuic acid	16
28	99-96-7	对羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	17
29	92-61-5	东莨菪亭 Scopoletin	4-6
30	776-86-3	异莨菪亭 Isoscapoletin	6

2.2 灯盏细辛抗衰老潜在作用靶点

从 STITCH、SwissTargetPrediction、TCMSP 数据库,分别预测、查找到灯盏细辛口服入血成分潜在作用靶点 103、590、214 个,合并去重后得到灯盏细辛作用靶点 777 个。从 HAGR 数据库查找到人类衰

老相关基因 307 个,其中有 131 个基因在细胞模型中证实可影响细胞衰老和/或在动物模型中证实可影响寿命。将灯盏细辛 777 个预测靶点和 131 个衰老基因求交集,得到灯盏细辛抗衰老潜在作用靶点 37 个(见表 2)。

表 2 灯盏细辛抗衰老潜在靶点

Table 2 Potential anti-aging targets of *E. breviscapus*

序号 No.	Uniprot ID	基因名 Gene symbol	蛋白名 Protein name
1	P04637	TP53	细胞肿瘤抗原 p53
2	P31749	AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
3	P15692	VEGFA	血管内皮生长因子 A
4	P38936	CDKN1A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1
5	P01100	FOS	原癌基因 c-Fos
6	P37231	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ
7	Q96EB6	SIRT1	NAD 依赖性去乙酰化酶 sirtuin-1
8	P08069	IGF1R	胰岛素样生长因子 1 受体

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	Uniprot ID	基因名 Gene symbol	蛋白名 Protein name
9	Q01094	E2F1	转录因子 E2F1
10	P42771	CDKN2A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A
11	P60484	PTEN	磷酸酶及张力蛋白同系物
12	P06493	CDK1	细胞周期蛋白依赖性激酶 1
13	P06213	INSR	胰岛素受体
14	P10275	AR	雄激素受体
15	P09874	PARP1	聚 ADP-核糖聚合酶 1
16	Q07812	BAX	凋亡调节因子 BAX
17	Q16236	NFE2L2	核因子 E2-相关因子 2
18	P04040	CAT	过氧化氢酶
19	P00441	SOD1	铜锌超氧化物歧化酶
20	O96017	CHEK2	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk2
21	O43324	EEF1E1	真核翻译延长因子 1E1
22	P00749	PLAU	尿激酶型纤溶酶原激活剂
23	P06400	RB1	视网膜母细胞瘤基因 1
24	O14920	IKBKB	核因子 κ -B 激酶 β 亚基抑制剂
25	P11387	TOP1	DNA 拓扑异构酶 1
26	Q05397	PTK2	黏着斑激酶 1
27	P01106	MYC	原癌基因 Myc
28	Q05655	PRKCD	蛋白激酶 C delta 型
29	P17936	IGFBP3	胰岛素样生长因子结合蛋白 3
30	Q13547	HDAC1	组蛋白去乙酰化酶 1
31	Q16539	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14
32	P14174	MIF	巨噬细胞迁移抑制因子
33	P01112	HRAS	鼠肉瘤病毒癌基因同系物
34	P22001	KCNA3	钾电压门控通道亚家族 A 成员 3
35	O14746	TERT	端粒酶逆转录酶
36	P05121	SERPINE1	纤溶酶原激活物抑制剂 1
37	O95622	ADCY5	腺苷酸环化酶 5

37 个靶点中,22 个靶点在细胞模型中证实可影响细胞衰老。其中,8 个靶点其激活/过表达可抑制细胞衰老;14 个靶点其激活/过表达可诱导细胞衰老。14 个靶点在小鼠(*Mus musculus*)模型中证实可影响寿命,其中 6 个为促长寿靶点(pro-longevity targets),其激活/过表达可延长寿命,而抑制其活性/表达则缩短寿命;8 个为抗长寿靶点(anti-longevity targets),抑制其活性/表达可延长寿命,激活其活性/表达则缩短寿命。2 个靶点 AKT1、SIRT1 在细胞和小鼠模型中均证实可影响衰老(见图 1)。

2.3 灯盏细辛抗衰老靶点生物过程与通路富集分析

将 37 个靶点的基因名称导入 DAVID 数据库和 STRING 平台,分别进行生物过程和通路富集分析。依据 P -value < 0.05 筛选出生物过程 199 个,通路 131 条,分别选取 P -value 最小的前 20 条作图(见图 2)。如图所示,生物过程主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)、细

胞对缺氧的反应 (cellular response to hypoxia)、复制性衰老 (replicative senescence)、细胞衰老 (cell aging) 等,表明这些生物过程可能是灯盏细辛抗衰老的重要生物过程 (见图 2A); 通路结果显示,除涉及衰老相关通路细胞衰老 (cellular senescence)、寿命调节通路 (longevity regulating pathway, longevity regulating pathway-multiple species) 外,其他主要涉及的是肿瘤调节通路,如肿瘤通路 (pathways in cancer)、肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma)、前列腺癌

(prostate cancer)、肿瘤中的微 RNA (microRNAs in cancer)、乳腺癌 (breast cancer) (见图 2B),说明这些通路可能是灯盏细辛抗衰老的主要信号通路。

2.4 灯盏细辛抗衰老靶点 PPI 网络

依据 STRING 平台中的抗衰老靶点蛋白相互作用数据,采用 Cytoscape 软件构建得到灯盏细辛抗衰老靶点交互作用网络 (见图 3),该网络包括 32 个节点和 93 条边。32 个节点为灯盏细辛抗衰老靶点,其余 5 个靶点 ADCY5、KCNA3、EEF1E1、TOP1、

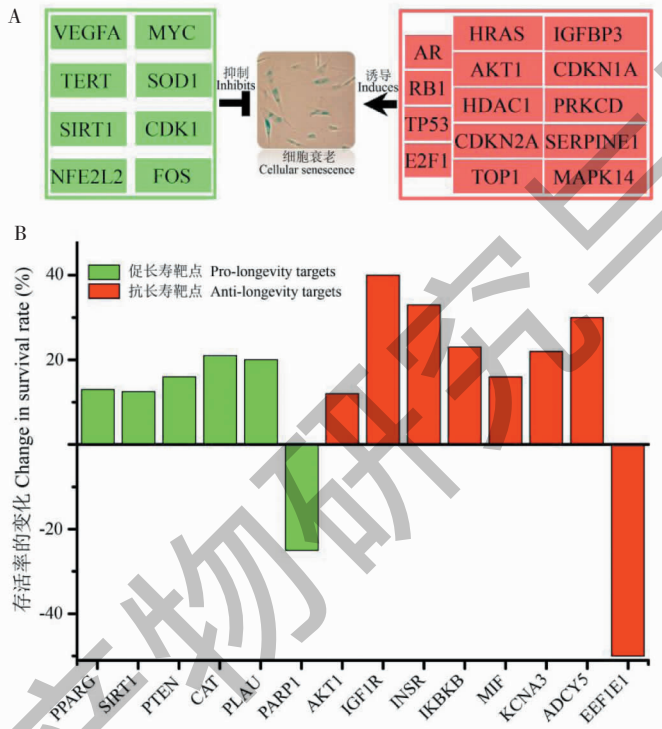
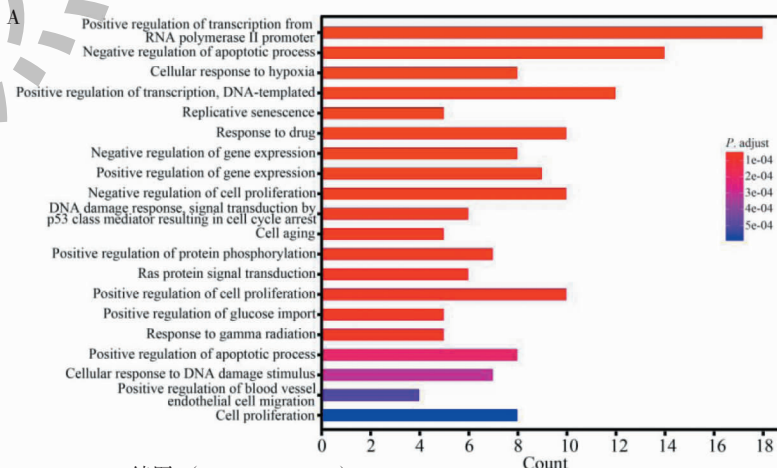


图 1 37 个靶点对细胞衰老 (A) 和小鼠寿命 (B) 的影响

Fig. 1 The effects of 37 targets on cellular senescence (A) and longevity of *Mus musculus* (B)



续图 2 (Continued Tab.2)

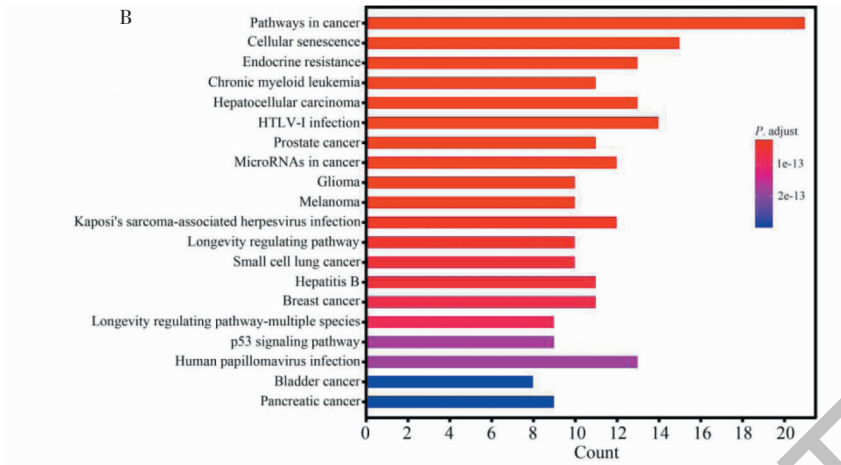


图2 灯盏细辛抗衰老靶点的生物学过程(A)和通路(B)富集分析

Fig. 2 Biology process (A) and pathway (B) analysis of targets of *E. breviscapus* anti-aging

MIF,在设定的大于0.9可信度条件下,不存在交互作用。网络分析显示,在灯盏细辛抗衰老靶点的PPI网络中,TP53、AKT1、RB1、HRAS、HDAC1、SIRT1的度值分别为22、16、12、10、10、9,是度值最

大的前6个节点,表明这6个节点是灯盏细辛抗衰老的关键靶点,可能在灯盏细辛抗衰老过程中发挥重要作用。

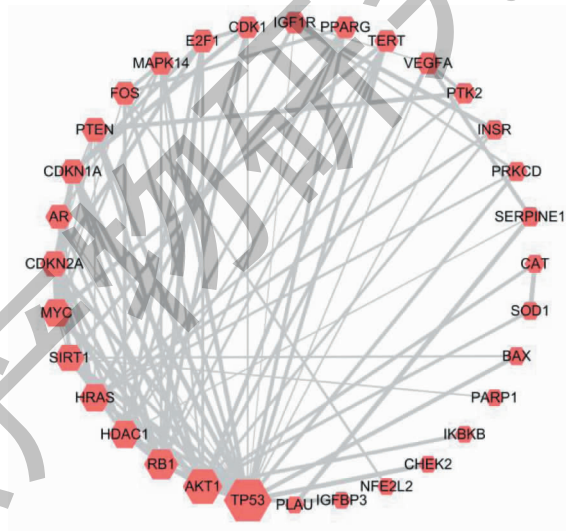


图3 灯盏细辛抗衰老靶点的蛋白相互作用网络

Fig. 3 The protein-protein interaction network of targets of *E. breviscapus* anti-aging

注:节点面积大小代表靶点度值;节点间边线粗细代表靶点之间的关系值评分(combine score),评分越高边线越粗。Note:Area of nodes represents degree value;Thickness of the edge between any two nodes represents combine score between any two targets,the higher the combine score,the thicker the edge.

2.5 灯盏细辛入血成分-靶点网络

将灯盏细辛30个入血成分及37个抗衰老靶点导入Cytoscape软件,得到灯盏细辛入血成分-抗衰老靶点网络(见图4)。该网络共包括67个节点,200条边,其中30个节点为灯盏细辛入血成分,37个节点为灯盏细辛抗衰老靶点。网络分析显示,作

用衰老靶点数在10个以上的入血成分是槲皮素、芹菜素、木犀草素、黄芩素、山柰酚、柚皮素,6个成分作用的靶点数分别为26、19、15、15、11、11;作用衰老靶点数在5-9个的入血成分是野黄芩素、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、灯盏花苷I、东莨菪亭、异莨菪亭、5-CQA、绿原酸、对羟基苯甲

酸、原儿茶醛,10个成分作用的靶点数分别为9、8、8、7、7、6、5、5、5、5;其余14个成分作用衰老靶点数小于5。6个靶点(IGF1R、INSR、PARP1、CDK1、PTK2、TERT、PRKCD)与10及10个以上灯盏细辛

入血成分有相互作用,其余31个靶点与入血成分相互作用数小于10。该网络说明灯盏细辛抗衰老是多成分、多靶点作用的结果,相互作用多的成分和靶点可能是灯盏细辛抗衰老的关键节点。

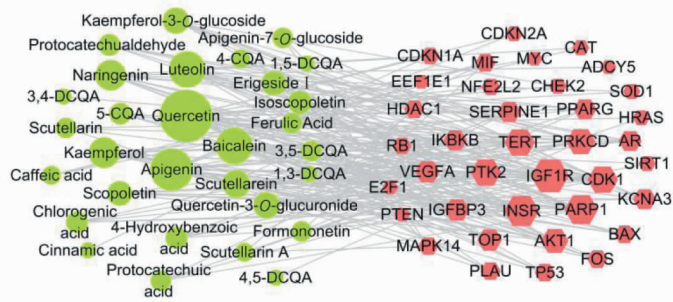


图4 灯盏细辛入血成分-靶点网络

Fig. 4 Absorbed components-targets network of *E. breviscapus* anti-aging

注:黄绿色节点代表入血成分;淡红色节点代表靶点;节点面积大小代表度值。Note: Yellow-green nodes represent the absorbed components, Light-red nodes represent targets; Area of nodes represents degree value.

2.6 灯盏细辛入血成分与关键靶点分子对接验证

采用 Discovery Studio 2.5 软件的 LibDock 模块,对30个灯盏细辛入血成分与6个关键靶点进行分子对接验证。6个靶点中,TP53(PDBID:5AB9)、AKT1(PDBID:3CQW)、HRAS(PDBID:2UZI)、SIRT1(PDBID:4ZZI)的蛋白晶体结构含有配体,将配体抽离后,再按1.6项下步骤对接回原结合口袋,计算对接后配体的构象与原始晶体结构中配体构象的RMSD值分别为1.2816(TP53)、0.6733(AKT1)、0.9361(HRAS)、0.9585(SIRT1),均小于2.0,说明本研究对接方法可靠。以成分及对应靶点对接打分构建热图(见图5)。如图所示,所有入血成分均能与6个靶点对接。原配体与TP53、AKT1、HRAS、SIRT1对接打分分别为100.95、83.33、183.404、

105.62;上市药物 Romidepsin 与 HDAC1(PDBID:6Z2J)对接打分为64.71;RB1(PDBID:4ELJ)无原配体,也没有相应上市药物,故不做后续分析。以上打分均为阈值,所有入血成分与HRAS的对接打分均低于阈值,表明30个人血成分与该靶点的结合可能较弱;17个人血成分与TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1结合打分均高于阈值,包括黄酮类成分灯盏甲素、野黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、黄芩素、柚皮素、木犀草素,咖啡酰类成分4,5-DCQA、3,4-DCQA、3,5-DCQA、1,3-DCQA、1,5-DCQA、4-CQA、5-CQA、绿原酸、灯盏花苷I;4个人血成分与TP53、AKT1、SIRT1结合打分均高于阈值,分别是槲皮素、野黄芩素、山柰酚、芹菜素。以上分子对接结果表明,黄酮类和咖

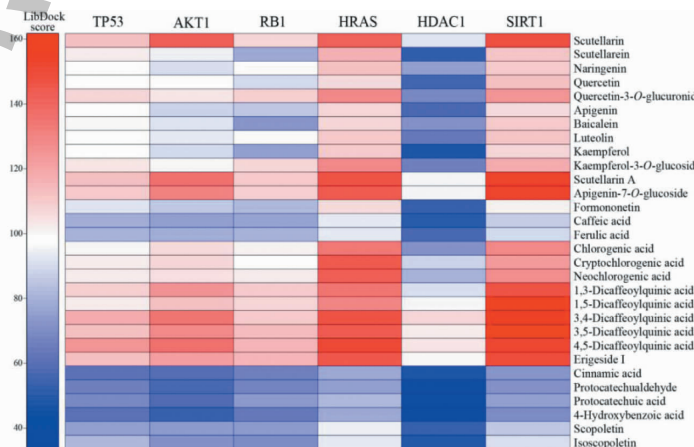


图5 灯盏细辛入血成分与关键靶点对接打分热图

Fig. 5 Heatmap for docking score of key targets with absorbed components of *E. breviscapus*

啡酰类成分是灯盏细辛抗衰老的潜在活性成分,可能通过 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 这些靶点而发挥抗衰老作用。

打分最高的 4,5-DCQA 与 TP53(见图 6A)、野黄芩苷与 AKT1(见图 6B)、3,4-DCQA 与 HDAC1(见图 6C)、3,5-DCQA 与 SIRT1(见图 6D)的结合模式进行分析,结果显示结合模式主要是氢键、烷基- π 键(Pi-Alkyl)、碳氢键。以黄酮类成分野黄芩苷与 AKT1 的结合为例,其结构中的羰基和羟基分别与氨基酸残基 GLY159、THR160、PHE161、GLY162、LEU156 形成 5 个氢键,黄酮母核 3 个环与 VAL164

(3 个)、ALA177、MET281 形成 5 个烷基- π 键, MET227 与 B 环形成 1 个硫- π 键,糖基与 LYS163、GLY162 形成 2 个碳氢键。以咖啡酰类成分 3,5-DCQA 与 SIRT1 的结合为例,其结构中的羰基和羟基与氨基酸残基 TYR280、HIS363、VAL412、ASN346、ARG446、ASP348 形成 6 个氢键,咖啡酰基苯环分别与 ALA262、ILE270 形成 2 个烷基- π 键、与 VAL445 形成 π - σ 键,另有阴离子 π 键(HIS363)、碳氢键(SER265、ILE347)形成。在结合空腔外围, PHE273、PHE413、PHE414、LYS203、ASP204 在保持口袋的疏水性方面起到了重要的作用。



图 6 灯盏细辛抗衰老靶蛋白-入血成分分子结合模式图

Fig. 6 Molecular docking pattern of target protein-absorbed components of *E. breviscapus* anti-aging

3 讨论

网络药理学常以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、半衰期(half-life, HL) ≥ 4 、类药性(drug like, DL) ≥ 0.18 为条件筛选研究成分。作者发现,灯盏细辛若以该条件筛选成分,其黄酮类主要活性成分野黄芩苷和咖啡酰类成分完全排除在外,这显然与目前认为这两类成分是灯盏细辛的主要活性成分的认识不符。中药以口服为主,口服后吸收入血的成分即有可能是中药的活性成分。因此,本研究按照血清药物化学的思路,将灯盏细辛中含有的且有文献报道口服可吸收入血的成分作为网络药理学研究的对象。

本研究检索到灯盏细辛口服入血成分 30 个,包括黄酮类成分 13 个,咖啡酰类成分 11 个,其他类成分 6 个,预测作用于 37 个衰老靶点。这 37 个靶点主要涉及衰老、肿瘤调节等生物过程和通路,这与“肿瘤和衰老密切相关,衰老是肿瘤的最大风险因素”的认识相一致。研究表明,随着年龄的增长, DNA 损伤和突变增多,导致患癌风险升高^[18]。另外,衰老引起的循环系统、内分泌系统、免疫系统改变,也可能导致癌症发生率上升^[18]。PPI 网络分析显示,TP53、AKT1、RB1、HRAS、HDAC1、SIRT1 是灯盏细辛抗衰老的潜在关键靶点。肿瘤蛋白 p53 (TP53)是一种肿瘤抑制蛋白,其调控着肿瘤发生和

衰老进程。过表达 TP53 可诱导细胞衰老,在小鼠体内异常激活 p53 降低了肿瘤发生率,但也导致小鼠过早的衰老。进一步研究发现,高表达且受到正常调控的 p53 在提高机体对肿瘤耐受性的同时,还不会导致过早衰老和寿命缩短现象的发生^[19]。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,抑制 AKT1 活性可延长寿命,如 Akt1 缺陷小鼠(Akt1^{+/-})雄性寿命延长 8%,雌性寿命延长 15%^[20]。视网膜母细胞瘤基因 1(RB1)是一个抑癌基因,在衰老调节方面, RB1 主要通过抑癌基因 p16 途径使细胞发生衰老^[21]。Harvey 鼠肉瘤病毒癌基因(HRAS)是 RAS 致癌基因家族的成员,过表达 HRAS 可诱导细胞衰老,已证明 RAS 途径与胰岛素/胰岛素样生长因子一起影响着线虫的发育和衰老^[22]。组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)在发育、转录调控和细胞周期进程等过程中起着重要的作用。过表达 HDAC1 可诱导细胞衰老,在果蝇中突变 HDAC1 的同源体 Rpd3 延长雄性果蝇寿命 33%,延长雌性果蝇寿命 52%^[23]。SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶,其激活可延缓衰老,促进长寿。在小鼠脑部特异性过表达 SIRT1 延长雌性寿命 16%、雄性寿命 9%^[24]。因此,灯盏细辛通过作用于这些靶点可起调节衰老的作用。

入血成分-靶点网络分析显示,黄酮类成分是灯盏细辛抗衰老的重要活性成分;分子对接显示,黄酮类成分与 4 个潜在关键靶点 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 结合打分高于阈值,进一步提示黄酮类成分是灯盏细辛抗衰老的潜在活性成分。不同的是,网络分析显示咖啡酰类成分在灯盏细辛抗衰老的作用中不是关键成分,但分子对接显示,除咖啡酸、阿魏酸外,11 个咖啡酰类成分与 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 结合打分均高于阈值,整体甚至高于黄酮类成分。分析原因可能是目前对咖啡酰类成分研究的不多,靶点预测数据库中收录的与该类成分结构相似的化合物较少或已验证的有关该类成分靶点的信息较少,所以预测到的靶点数较少所致。在 777 个灯盏细辛预测靶点中,13 个黄酮类成分平均每个成分预测到的靶点数是 102,而 11 个咖啡酰类成分平均每个成分预测到的靶点数仅为 26。通过文献研究,黄酮类和咖啡酰类成分均可能是灯盏细辛抗衰老的主要活性成分,可能通过 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 这些靶点而发挥抗衰老作用。实际上,这两类成分,有的经寿命实验证实确有抗衰老的作用,而

且有的成分的抗衰老机制与本研究预测结果相一致。线虫寿命实验发现,槲皮素、黄芩素、山柰酚、绿原酸、5-CQA、4-CQA、1,3-DCQA、1,5-DCQA 分别延长线虫平均寿命 18.0%、45.0%、10%、20.1%、12.1%、15.2%、12.5%、8.0%^[25]。其中,文献证实绿原酸通过抑制 AKT1 活性而延长线虫寿命^[25],这与本研究中 AKT1 是灯盏细辛抗衰老的关键靶点、绿原酸与 AKT1 有很好的结合作用的结果相一致。以上这些报道与本研究结果相互佐证,表明本研究结果具有一定的可靠性。因而,研究结果中至今没有明确的实验证实有抗衰老作用的成分,可根据预测结果设计相应实验加以验证。

综上,本研究以灯盏细辛口服吸收入血成分为研究对象,通过网络药理学方法分析了灯盏细辛抗衰老的潜在作用靶点及通路,并结合分子对接验证了这些入血成分与主要潜在作用靶点的结合能力,研究结果表明黄酮类和咖啡酰类成分是灯盏细辛抗衰老的潜在活性成分,可能通过作用于 TP53、AKT1、HDAC1、SIRT1 这些靶点,进而调控衰老和肿瘤等相关生物过程和通路而发挥抗衰老作用,研究结果为后续实验验证提供了思路。

参考文献

- 1 Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. Nature, 2019, 571(7764): 183-192.
- 2 Gong YF, Yu XM, Guan LH, et al. Effects of breviscapine on memory deficits, liver and kidney abnormal changes induced by D-galactose in mice [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2012, 28(1): 73-76.
- 3 Shi YH, Miao H, Su BF, et al. Improving effects of breviscapine on memory deficits induced by D-galactose in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2008, 19: 1445-1446.
- 4 Pu YZ. Preliminary study on phenolic components and serum pharmacology of Herba Erigerontis extract [D]. Chengdu: Chengdu university of TCM (成都中医药大学), 2011.
- 5 Tian YY, Li QQ, Zhou XP, et al. A UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of twelve constituents from *Erigeron breviscapus* extract in rat plasma: application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2017, 1046: 1-12.
- 6 Mu XM, Xu XK, Guo X, et al. Identification and characterization of chemical constituents in Dengzhan Shengmai Capsule and their metabolites in rat plasma by ultra-performance liq-

- uid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2019, 1108:54-64.
- 7 Ni BR, Cao SL, Feng LJ, et al. Simultaneous analysis of quercetin and naringenin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study after oral administration[J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54:1359-1364.
- 8 Bo YH, Wang LJ, Wu X, et al. Development and validation of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of five bioactive flavonoids in rat plasma and comparative pharmacokinetic study after oral administration of Xiaochaihu Tang and three compatibilities[J]. J Sep Sci, 2017, 40:1896-1905.
- 9 Xu WJ, Deng JG, Qian YY, et al. Simultaneous determination of kaempferol, quercetin, mangiferin, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid and chlorpheniramine maleate in rat plasma after oral administration of Mang-Guo-Zhi-Ke tablets by UHPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32(4):e4155.
- 10 Sheng N. Research on Dengzhan Shengmai medical effective substances using a liquid chromatography-mass spectrometry[D]. Peking: Peking Union Medical college(北京协和医学院), 2018.
- 11 Han X, Li XY, Yang HY, et al. Study on quality control components in water extract of *Chrysanthemum morifolium* and network pharmacology effects[J]. Chin Pharm(中国药房), 2019, 30:3258-3265.
- 12 Li YB, Song T, Jin X. UPLC-MS/MS assay for simultaneous determination of four compounds in rat plasma: application to pharmacokinetic study after oral administration of Caulis Spatholobi extract[J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30:1714-1720.
- 13 Wang Z, Wang SX, Qin BL. An LC-MS/MS method for simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and 1-O-acetylbritannilactone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(3):e3811.
- 14 Xiong ZL, Fu YH, Li JJ, et al. A UPLC-MS-MS method for quantification of harpagoside and cinnamic acid in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Yanyan Tablets[J]. Chromatographia, 2010, 72:163-169.
- 15 Zhuang YL, Chao RB. HPLC determination of danshensu and protocatechuic aldehyde in rat plasma[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1999, 34:613-616.
- 16 Li W, Zhou HJ, Chu Y, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetics of danshensu, protocatechuic aldehyde, 4-hydroxy-3-methoxyphenyl lactic acid and protocatechuic acid in human plasma by LC-MS/MS after oral administration of Compound Danshen Dripping Pills[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145:860-864.
- 17 Du Y, Wang ZB, Wang LB, et al. Simultaneous determination of seven phenolic acids in rat plasma using UHPLC-ESI-MS/MS after oral administration of *Echinacea purpurea* extract[J]. Molecules, 2017, 22(9):1494.
- 18 Magalhães JPD. How ageing processes influence cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13:357-365.
- 19 Peng L, Liu J, Xie XL, et al. The research progress of p53 regulating the balance of tumor and aging[J]. Chem Life(生命的化学), 2017, 37:515-520.
- 20 Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, et al. Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69178.
- 21 Liu SH, Wang SZ, Zhang H, et al. Research advances on *RBI* gene[J]. Hereditas(遗传), 2010, 32:1097-1104.
- 22 Nanji M, Hopper NA, Gems D. LET-60 RAS modulates effects of insulin/IGF-1 signaling on development and aging in *Caenorhabditis elegans*[J]. Aging Cell, 2005, 4(5):235-245.
- 23 Rogina B, Helfand SL, Frankel S. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction[J]. Science, 2002, 298(5599):1745.
- 24 Satoh A, Brace CS, Rensing N, et al. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH[J]. Cell Metab, 2013, 18:416-430.
- 25 Martel J, Wu CY, Peng HH, et al. Plant and fungal products that extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Microb Cell, 2020, 7(10):255-269.