

UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合网络药理学和分子对接探讨椭圆叶花锚抗肝炎的药效物质及作用机制

左文明¹, 李锦萍¹, 李彩明¹, 王虹雨¹, 刘力宽^{1*}, 曾 阳^{1,2*}

¹青海师范大学生命科学院 青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室, 青海 西宁 810008;

²高原科学与可持续发展研究院, 西宁 810008

摘要: 本文旨在利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 通过网络药理学和分子对接方法, 探究椭圆叶花锚抗肝炎的潜在分子作用机制。首先通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析椭圆叶花锚主要化学成分, 并利用 Swiss Target Prediction 数据库预测其作用靶点, 将结果与在 DisGeNET、GeneCards 数据库中检索肝炎相关靶点求交集获得关键核心靶点。其次通过 String 数据库构建蛋白相互作用网络, 将结果导入 Cytoscape 3.6.0 软件构建蛋白互作网络及成分-靶点-通路网络。然后通过 DAVID 数据库对靶点基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 最后利用 Autodock Vina 等软件将网络中预测到的潜在活性成分与核心靶点进行分子对接验证。结果显示 39 个关键抗肝炎作用的活性成分和 33 个潜在靶点。主要通过白细胞迁移、一氧化氮生物合成过程的正调控、血小板活化、细胞外调节蛋白激酶 ERK1 和 ERK2 级联的正调控、磷脂酰肌醇 3-激酶信号转导的调控等生物过程, 以及 TNF、PI3K、Toll-like receptor、FoxO、HIF-1、VEGF、Fc epsilon RI 等关键信号通路, 发挥抗肝炎的作用。

关键词: 椭圆叶花锚; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 抗肝炎; 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(2021)11-1946-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.018

Study on the effective substances and mechanism of *Halenia elliptica* D. Don in anti-hepatitis based on UPLC-Q-TOF-MS/MS combined network pharmacology and molecular docking

ZUO Wen-ming¹, LI Jin-ping¹, LI Cai-ming¹, WANG Hong-yu¹, LIU Li-kuan^{1*}, ZENG Yang^{1,2*}

¹The College of Biological Science, the Key Laboratory of Medicinal Animal and Plant Resources in Qinghai-Tibetan Plateau in Qinghai Province, Qinghai Normal University;

²Academy of Plateau Science and Sustainability, Xining 810008, China

Abstract: This study aims to explore the potential molecular mechanism of anti-hepatitis of *Halenia elliptica* D. Don by using UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, network pharmacology and molecular docking methods. At first, the main chemical components were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS, and the targets were predicted by Swiss Target Prediction database. The key core targets were obtained by intersection of the results and the hepatitis related targets retrieved from DisGeNET and GeneCards databases. Secondly, protein interaction network was constructed by String database, and the results were imported into Cytoscape 3.6.0 software to construct protein interaction network and component target pathway network. Then GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of target genes were carried out through David database. Finally, the potential active components predicted in the network were verified by molecular docking with the core target by using Autodock Vina and other software. The results showed 39 key active components and 33 potential targets. It plays an anti-hepatitis role mainly through the positive regulation of leukocyte migration, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, platelet activation, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling and

收稿日期: 2021-02-02 接受日期: 2021-06-04

基金项目: 国家自然科学基金(31360068); 青海省科技厅基础研究计划(2017-ZJ-742); 青海省科技创新团队(2020-2023)

* 通信作者 E-mail: 20081lk@163.com, zy-3@263.net

other biological processes, as well as TNF, PI3K, Toll-like receptor, FoxO, HIF-1, VEGF, Fc epsilon RI and other key signaling pathways.

Key words: *Halenia elliptica* D. Don; UPLC-Q-TOF-MS/MS; anti-hepatitis; network pharmacology; molecular docking

椭圆叶花锚 (*Halenia elliptica* D. Don) 为龙胆科 (Gentianaceae) 花锚属 (*Halenia*) 植物, 性味苦寒, 全草入药, 藏医药系统常用于治疗肝胆系统疾病^[1]。临床用于治疗肝炎等“协日”和“热”过剩所致疾病。椭圆叶花锚虽然在临床已得到使用, 并且椭圆叶花锚对治疗肝炎、实验性肝损伤确有疗效已被证实^[2]。但关于其抗肝炎的文献报道却不多, 作用机制更尚不清楚, 因此需要进一步研究, 明确其作用机制, 为藏药的发展及利用提供理论依据。

网络药理学是一门新兴的药理学分支学科, 以系统生物学和网络生物学基本理论为基础, 通过利用相关数据库和算法进行深度挖掘、分析和整理汇总, 从而构建药物作用于疾病的靶点及机制网络, 具有整体性、系统性的特点, 因此, 特别适合于中藏药这种组分多、作用靶点多及作用途径复杂的药物作用机制研究^[3-5]。本研究拟利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 通过网络药理学研究方法, 探究椭圆叶花锚抗肝炎的潜在作用机制, 并筛选出其活性成分及其作用靶点, 以期椭圆叶花锚抗肝炎药理作用机制的进一步研究提供新的思路和理论基础。

1 仪器与材料

Xevo G2-XS QToF 液质联用仪 (美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 (100 × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱 (美国 Waters 公司); Secura513-1CN 精密天平 (德国赛利多斯); KQ3200DE 型数控超声波清洗器 (昆山舒美超声仪器有限公司); N1200BV-W 小型浓缩系统 (日本东京理化器械株式会社); Eyela CA-1115B 冷却水循环装置 (日本东京理化器械株式会社); Eyela FDU-2110 冷冻干燥机 (日本东京理化器械株式会社); Milli-Q 超纯水仪 (美国密理博), 5810R 台式高速冷冻离心机 (德国艾本德)。

甲醇、乙腈、甲酸为质谱级 (美国 Fisher 公司); 氢氧化钠 (ACS 级) (美国 Sigma 公司); 亮氨酸脑啡肽 (StandardsKit for TOF G2-S) (美国 Waters 公司); 蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司); 超纯水 (Milli-Q 超纯水仪制备); 其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 椭圆叶花锚化学成分分析

椭圆叶花锚样品采集于青海地区, 由青海师范

大学曾阳教授鉴定为椭圆叶花锚 (*Halenia elliptica* D. Don)。取样品 20 g, 粉碎, 过 80 目筛, 得样品粉末。精密称取粉末 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶, 加入 7.5 mL 甲醇浸没, 50 °C 水浴, 超声提取 1 h, 取粗提液 100 μL 于 1.5 mL 离心管内, 加入 75% 乙腈 500 μL 稀释, 混匀静置 2 min, 冷冻离心 15 min (12 000 rpm, 10 °C)。取上清液过 0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶, 4 °C 保存, 备用。

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 1 μL, 柱温 40 °C; 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.01% 甲酸乙腈溶液 (B); 梯度洗脱条件: 0 ~ 1 min, 99% → 90% A; 1 ~ 10 min, 90% → 74% A; 10 ~ 14 min, 74% → 34% A; 14 ~ 16 min, 34% → 1% A; 16 ~ 19 min, 1% A; 19 ~ 20 min, 1% → 99% A; 20 ~ 23 min, 99% A。

质谱条件: 电喷雾离子源正/负离子模式 (ESI⁺/ESI⁻), Continuum 模式采集 MS^F 数据; 校正液为 200 pg/μL 亮氨酸脑啡肽 (leucine-enkephalin), 0.5 mM 甲酸钠 (sodium-formate)。扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 200, 扫描时间 0.2 s, 检测时间 20 min。低能量碰撞电压 (CE) 6 V, 高能量碰撞电压为 20 ~ 60 V; 正/负离子模式毛细管电压均为 2 kV, 锥孔电压为 45 V, 离子源温度为 100 °C, 辅助喷雾电离与去溶剂气体为高纯度 N₂, 去溶剂化温度 350 °C, 锥孔气体流量 50 L/h, 去溶剂化气体流量 600 L/h。

利用 UNIFI 数据处理系统、Masslynx V4.1 软件及文献比对, 完成色谱峰对应化合物的定性分析, 筛选确定椭圆叶花锚的化学成分。

2.2 椭圆叶花锚作用靶点预测

通过 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对鉴定的化合物检索查询 Canonical SMILES 号, 未检索到的化合物利用 ChemDraw 将化合物结构式保存为 SDF 格式, 将 SDF 格式文件导入 OpenBabel 获得 Canonical SMILES 号; 将获得的 Canonical SMILES 号上传 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>), 点击 Predict targets 进行预测分析, 输出化合物靶点信息^[6]。将获得的化合物靶点信息导入 Uniport 数据库 (ht-

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	m/z	化合物 Compound
J7	3.05	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.094 4	1-Caffeoyl- β -D-glucose
J8	3.07	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₅	536.171 7	Methyl 4- $\{$ [6- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy $\}$ -3,5-dimethoxybenzoate
J9	3.26	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	376.137 0	5,9- <i>epi</i> -Penstemoside
J10	3.77	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374.121 0	京尼平昔酸 Geniposidic acid
J11	3.88	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₄	506.162 4	(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,7 <i>aR</i>) 4 <i>a</i> -Hydroxy-7-methyl-5-oxo-1,4 <i>a</i> ,5,7 <i>a</i> -tetrahydrocyclopenta [c]pyran-1-yl-4- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl- β -D-glucopyranoside
J12	3.90	C ₁₆ H ₂₈ O ₉	364.172 7	(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>) 4,6-Dihydroxy-4,7-dimethyloctahydrocyclopenta [c]pyran-1-yl- β -D-glucopyranoside
J13	4.26	C ₁₆ H ₃₀ O ₈	350.193 5	10-(β -D-Glucopyranosyloxy) decanoic acid
J14	4.30	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	356.109 6	Feruloside
J15	4.36	C ₁₄ H ₂₄ O ₈	320.146 2	Octanoyl- β -D-glucuronide
J16	4.66	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358.126 4	獐芽菜苷 Sweroside
J17	4.79	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	388.209 7	(2 <i>S</i>)-2-Hydroxy-4-[(1 <i>R</i>)-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl]butyl- α -L-glycero-hexopyranoside
J18	5.29	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358.126 0	1-(Hexopyranosyloxy)-7-methyl-1,4 <i>a</i> ,5,7 <i>a</i> -tetrahydrocyclopenta [c]pyran-4-carboxylic acid
J19	5.42	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₉	772.184 6	3- <i>O</i> -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-glucopyranoside-(6''-caffeoyl)3,5,7,3',4'-pentahydroxyl-flavonoid
J20	5.47	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	388.136 6	5- β -Hydroxy-swerside
J21	5.52	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₉	730.232 2	4-[(<i>E</i>)-2- $\{$ 3-[6- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-5-hydroxyphenyl vinyl $\}$ -3-hydroxyphenyl]- β -D-glucopyranoside
J22	5.61	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 2	芦丁 Rutin
J23	5.78	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₈	742.174 2	3- <i>O</i> - β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside-(5''-caffeoyl)3,5,7,3',4'-pentahydroxyl-flavonoid
J24	5.85	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₉	772.184 9	3- <i>O</i> -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside-(6'''-caffeoyl)3,5,7,3',4'-pentahydroxyl-flavonoid
J25	6.27	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	580.143 4	Kaempferl-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside-7- <i>O</i> - α -L-arabinofuranoside
J26	6.52	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.154 2	Kaempfer-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside
J27	6.86	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.099 9	山奈酚-3- <i>O</i> -葡萄糖甙 Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside
J28	7.05	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	770.207 3	Kaempfer-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-xylopyranoside-(6'''-feruloyl)
J29	7.12	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596.175 3	新圣草次苷 Neoriocitrin
J30	7.91	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	566.165 0	Methyl(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-1- $\{$ 6- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]- <i>D</i> -erythro-hexopyranosyl]oxy $\}$ -5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-1,4 <i>a</i> ,5,7 <i>a</i> -tetrahydrocyclopenta [c]pyran-4-carboxylate
J31	7.99	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₆	626.185 5	3'-Methoxyl-neoriocitrin
J32	10.19	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	464.132 3	Homoeriodictyol-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
J33	10.69	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₆	626.183 5	2-(β -D-Erythro-hexopyranosyloxy)benzyl-2-[(2- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl)oxy]-6-hydroxybenzoate
J34	11.04	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047 9	山奈酚 Kaempferol
J35	11.73	C ₂₇ H ₄₀ O ₃	412.293 1	(2 <i>S</i>)-3-Oxocholesta-1,4-dien-26-oic acid
J36	13.22	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.062 9	1,7-Dihydroxyl-3,8-dimethoxy-xanthone
J37	13.34	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	388.292 8	Methyl-3-oxocholan-24-oate
J38	13.66	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.078 5	1-Hydroxyl-3,7,8-trimethoxy-xanthone
J39	13.77	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.073 4	2,5-Dimethoxy-xanthone
J40	13.82	C ₁₆ H ₁₄ O ₇	318.074 2	1,2-Dyhydroxyl-3,4,5-trimethoxy-xanthone

3.2 活性成分靶点预测

按照方法“2.2”,利用 Swiss Target Prediction 数

据库对 40 个化合物进行靶标预测,其中 ascorbylglucoside 化合物靶点预测结果中 probability > 0 的结果

为 0 个。将审核过的 462 个靶点与 604 个 DisGeNET 数据库检索与肝炎相关的靶点和 9 631 个 GeneCards 数据库检索相关靶点,构建韦恩图(图 2),得到 33 个椭圆叶花锚治疗肝炎的潜在作用靶点,靶点信息见表 2。

3.3 蛋白-蛋白相互作用网络构建

按照方法“2.3”,得到蛋白相互作用网络图,如图 3 所示,节点表示靶点,边表示靶点间关联,靶点大小和颜色与 degree 值成正相关。该网络共有 33 个靶点、348 条边,平均节点度 21.1。其中具有较大

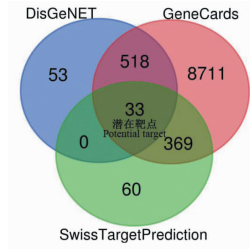


图 2 椭圆叶花锚抗肝炎靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of anti-hepatitis target of *Halenia elliptica* D. Don

表 2 椭圆叶花锚抗肝炎潜在靶点

Table 2 Potential target of anti-hepatitis in the *Halenia elliptica* D. Don

序号 No.	Uniprot ID	靶点 Target	序号 No.	Uniprot ID	靶点 Target
1	P98170	XIAP	18	P45983	MAPK8
2	P15692	VEGFA	19	Q16539	MAPK14
3	P19320	VCAM1	20	P28482	MAPK1
4	P01375	TNF	21	P17931	LGALS3
5	P40763	STAT3	22	P05412	JUN
6	P16109	SELP	23	P05231	IL6
7	Q06124	PTPN11	24	P60568	IL2
8	P35354	PTGS2	25	P05362	ICAM1
9	P37231	PPARG	26	P49841	GSK3B
10	P27986	PIK3R1	27	P00734	F2
11	P42336	PIK3CA	28	P03372	ESR1
12	P09874	PARP1	29	Q14790	CASP8
13	P04150	NR3C1	30	P42574	CASP3
14	P35228	NOS2	31	P05067	APP
15	P05164	MPO	32	P35869	AHR
16	P14780	MMP9	33	P12821	ACE
17	Q00987	MDM2			

度值(degree 值 > 25)的蛋白质有 VEGFA、TNF、IL6、MAPK1、CASP3、STAT3、PTGS2、MAPK8、JUN 等。通过网络图,能直观看出靶点之间复杂的互作关系,进一步表征了椭圆叶花锚通过多成分、多靶点协同调控治疗肝炎的作用特点。

3.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

将“2.2”筛选出的椭圆叶花锚治疗肝炎的潜在靶点输入 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。从生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)3 个水平对 33 个靶点

进行 GO 功能富集分析,按照 $P < 0.05$ 的阈值过滤,3 个水平分别得到 28、16、4 条生物功能。按照富集的显著程度取排名靠前的条目绘制可视化条形图,见图 4。KEGG 通路富集分析,按照 $P < 0.05$ 的阈值过滤,得到 53 条通路,选取排名靠前的通路绘制气泡图,见图 5。

GO 分析显示,在生物学过程方面,主要包括白细胞迁移(leukocyte migration)、一氧化氮生物合成过程的正调控(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、血小板活化(platelet activation)、细胞外调节蛋白激酶 ERK1 和 ERK2 级联的正调控

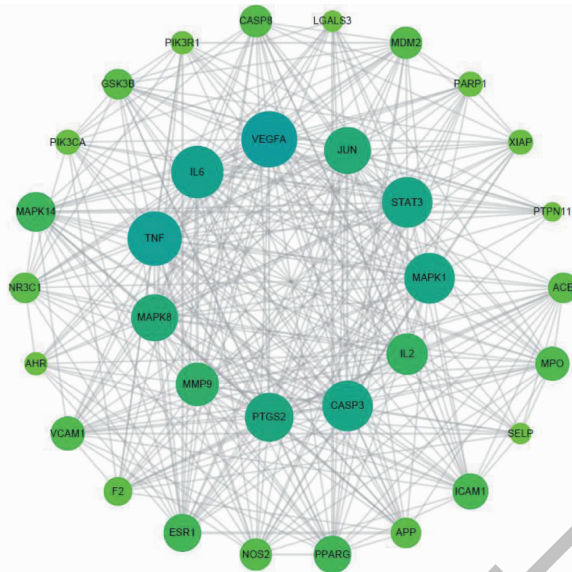


图3 靶点间相互作用网络

Fig. 3 Interaction network among targets

(positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade)、平滑肌细胞增殖的正调控(positive regulation of smooth muscle cell proliferation)、细胞对糖皮质激素的反应(response to glucocorticoid)、FcεRI 受体信号通路(Fc-epsilon receptor signaling pathway)、磷脂酰肌醇3-激酶信号转导的调控(regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling)、白细胞与细胞的粘附(leukocyte cell-cell adhesion)、蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)、肽丝氨酸磷酸化(peptidyl-serine phosphorylation)、细胞形状的调节(regulation of cell shape)、肽基苏氨酸磷酸化(peptidyl-threonine phosphorylation)、磷脂酰肌醇-3-磷酸酯的生物合成过程(phosphatidylinositol-3-phosphate biosynthetic process)等生物过程。细胞组分方面,靶点涉及膜(membrane)、质膜的外侧(external side of plasma membrane)、膜筏(membrane raft)、细胞表面(cell surface)、质膜的组成部分(integral component of plasma membrane)等组分。分子生物学功能方面涉及DNA结合(DNA binding)、转录因子结合(transcription factor binding)、转录因子活性,序列特异性DNA结合(transcription factor activity, sequence-specific DNA binding)、ATP结合(ATP binding)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)、激酶活性(kinase activity)、转录调控区DNA结合(transcription regulatory region DNA binding)、染色质结合(chromatin binding)、RNA聚

合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性 DNA 结合(RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding)、转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性结合(transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding)等分子生物功能。

KEGG 通路富集结果(图 5)显示椭圆叶花锚抗肝炎的靶点主要涉及 TNF 信号通路(14 个靶点, 42%)、乙型肝炎(11 个靶点, 33%)、Toll 样受体信号通路(9 个靶点, 27%)、甲型流感(10 个靶点, 30%)、T 细胞受体信号通路(8 个靶点, 24%)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(9 个靶点, 27%)、胰岛素抵抗(8 个靶点, 24%)、神经营养蛋白信号通路(8 个靶点, 24%)、EB 病毒感染(8 个靶点, 24%)、HTLV-I 感染(10 个靶点, 30%)、破骨细胞分化(8 个靶点, 24%)、丙型肝炎(8 个靶点, 24%)、FoxO 信号通路(8 个靶点, 24%)等信号通路。

3.5 椭圆叶花锚主要成分-靶点-通路网络构建

按照“2.5”项中方法构建椭圆叶花锚主要成分-靶点-通路网络,其中“菱形”表示化学成分,“圆形”表示抗肝炎作用靶点,“V 形”表示通路,由图 6 可知该网络由 92 个节点,包括种 39 种成分、33 个靶点、20 条通路和 307 条边,其中化学成分 J24、J34、J35、J39、J38、J17、J36、J27、J25、J40 等节点较大,表明与其相连的节点较多,可能是椭圆叶花锚治疗

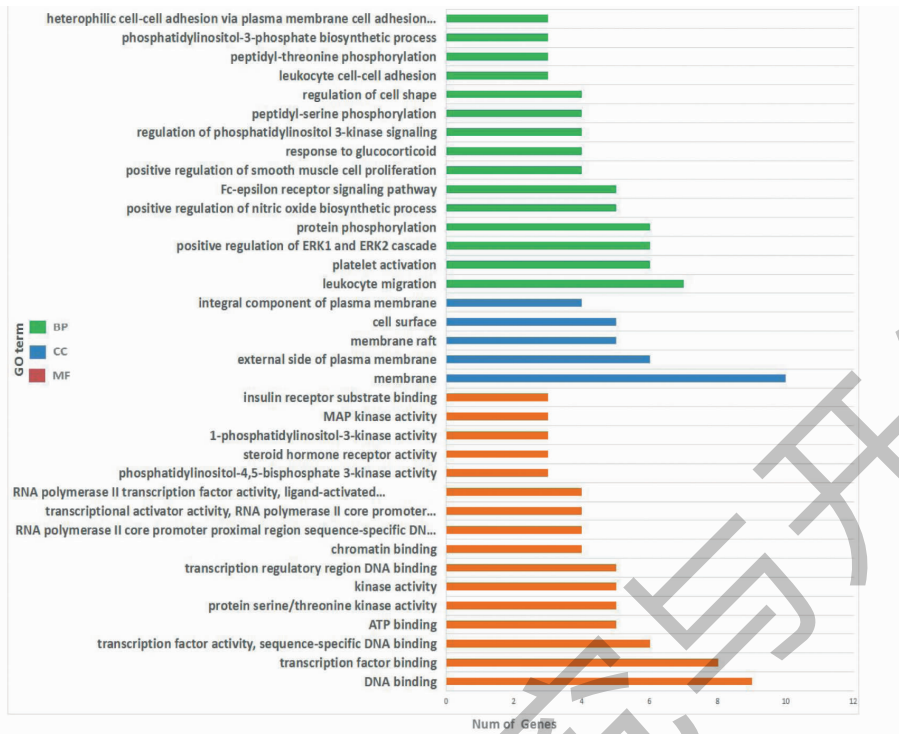


图4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

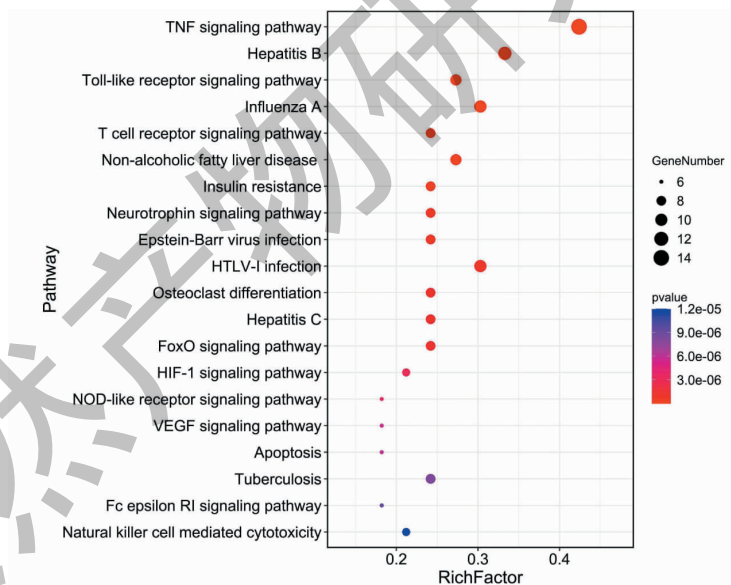


图5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

肝炎疾病的重要活性成分, 另外 PIK3CA、TNF、PIK3R1、MAPK8、LGALS3、PTGS2、MAPK1、MAPK14、APP、STAT3、IL6 等靶点节点较大, 可能是椭圆叶花锚治疗肝炎疾病的重要作用靶点, 其中 TNF、Toll-like receptor、FoxO、HIF-1、VEGF、Fc epsilon RI 等通路可能是椭圆叶花锚治疗肝炎疾病的重要通路。

3.6 主要活性成分-靶点分子对接验证

主要活性成分与关键靶点的分子对接结果结合能见表 3。一般认为, 对接能量值小于 -4.25 kcal/mol 表示两者间有一定的结合活性, 小于 -5.0 kcal/mol 表示有较好的结合活性, 小于 -7.0 kcal/mol 表示有强烈的结合活性^[7]。化合物与靶点对接结果

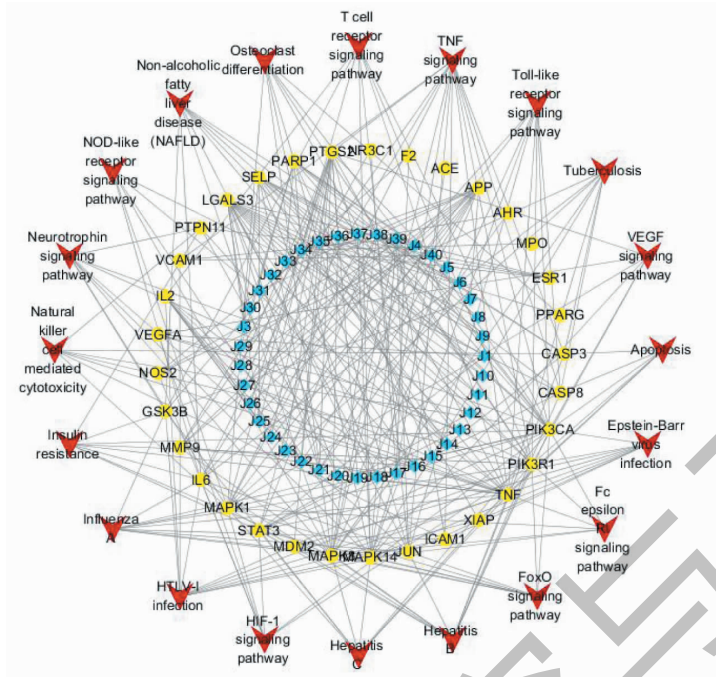


图6 成分-靶点-通路图

Fig. 6 Compound-target-pathway network

在 PyMOL 软件中进行可视化处理(见图7)。分子对接结果显示,网络药理学所预测的核心成分与关

键靶点均可自发结合,证实了网络药理学预测结果的可靠性。

表3 椭圆叶花锚抗肝炎核心成分与关键靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of core anti-hepatitis components of *Halenia elliptica* D. Don with key targets

化合物 Compound	结合能 Binding energy (kcal/mol)				
	6PYS (PIK3CA)	5UUI (TNF)	5GJI (PIK3R1)	2XR (MAPK8)	3ZSJ (LGALS3)
J24	-9.9	-8.6	-9.8	-9.0	-9.7
J34	-8.7	-6.7	-7.5	-7.1	-7.8
J35	-9.3	-6.2	-8.8	-6.0	-7.9
J38	-8.4	-6.3	-7.4	-7.9	-7.2
J39	-7.2	-5.9	-6.6	-5.2	-6.4

4 讨论

本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析了椭圆叶花锚 40 种化学成分,主要为以吡啶及其昔为主的黄酮类、裂环烯醚萜、三萜和生物碱类成分。其中 J34、J39、J35、J24、J38 等度值较大,且度值排名前十化合物中 4 个为吡啶类成分,表明吡啶类成分可能是椭圆叶花锚抗肝炎的主要活性成分,且 Zhang 等^[8]研究表明花锚及其所含的吡啶昔为抗肝炎主要成分,是通过增加蛋白质的合成和肝细胞内的糖元和核糖核酸,促进肝细胞合成来实现保肝作

用。Wang 等^[9]探究了 2 种吡啶单体对肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用及其具体机制,发现 2 种吡啶化合物均能有效抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖,其机制可能是通过诱导细胞自噬实现。Zhang 等^[10]研究了山奈酚(kaempfer1)对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤的作用,发现山奈酚通过抑制 JNK 通路来保护肝细胞启动坏死模式,启动线粒体功能,且山奈酚能上调肝细胞中的 GSH,从而达到保肝作用。Shakya 等^[11]研究发现山奈酚通过抑制过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶等抗氧化

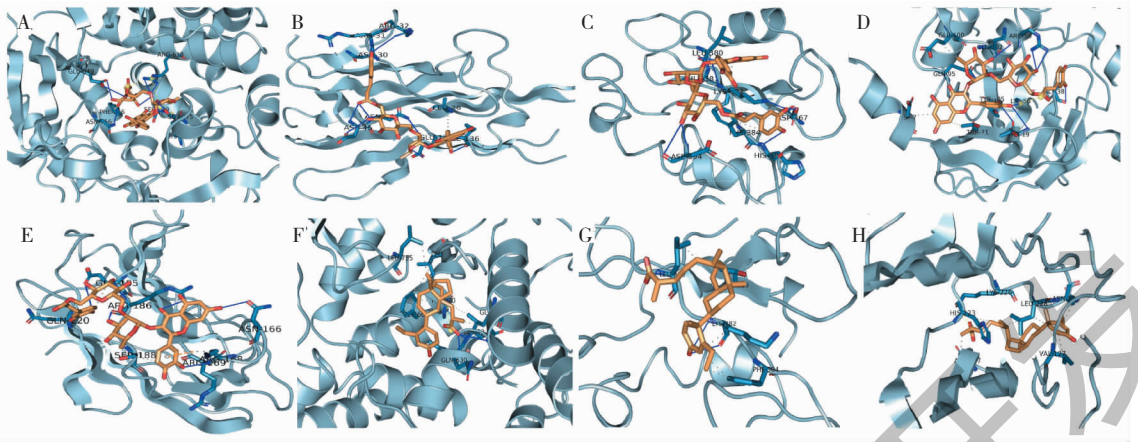


图7 关键化合物与靶点的分子对接示意图

Fig. 7 Molecular docking diagram of key compounds and core targets

注:A~H分别为:J24与PIK3CA、J24与TNF、J24与PIK3R1、J24与MAPK8、J24与LGALS3、J35与PIK3CA、J35与PIK3R1、J35与LGALS3。Note:A~H are as follows:J24 and PIK3CA、J24 and TNF、J24 and PIK3R1、J24 and MAPK8、J24 and LGALS3、J35 and PIK3CA、J35 and PIK3R1、J35 and LGALS3.

酶的表达,从而降低由酒精和多不饱和脂肪酸引起的小鼠肝组织的氧化应激反应,进而对由此引发的肝损伤起到一定的保护作用。其余几种度值较大的重要成分文献报道较少,其药效学及作用机制需进一步实验证明。

由KEGG通路富集及成分-靶点-通路网络图可知,PIK3CA、TNF、PIK3R1、MAPK8、LGALS3、MAPK1、MAPK14、STAT3、IL6、PTGS2等靶点和TNF、Toll-like receptor、FoxO、HIF-1、VEGF、Fc epsilon RI等信号通路degree值较大,与其相连的成分较多,可能是椭圆叶花锚抗肝炎的主要潜在靶点与通路。

PI3K信号通路是细胞内控制细胞的增殖、凋亡和代谢的关键性信号转导通路^[12-14],且PIK3CA和PIK3R1在肝癌、脑癌、乳腺癌、胃癌和结肠癌里突变率较高^[15,16]。Griffith等^[17]通过研究人类乳腺癌中PIK3CA和PIK3R1基因表达情况,从而创建了PIK3CA和PIK3R1影响突变的肿瘤基因型谱,为基因治疗癌症开辟了新途径。Xiao等^[18]研究发现亚低温预处理能够通过PI3K/AKT/FOXO3a通路抑制炎症细胞因子的释放和凋亡,对缺血再灌注肝损伤具有保护作用。Jiang等^[19]研究发现表没食子儿茶素没食子酸酯能显著改善胆道梗阻大鼠肝损伤及病理形态,其作用机制可能是通过调控PI3K/Akt信号通路,促进PI3K、AKT的磷酸化,抑制肝细胞的凋亡来实现的。PIK3CA和PIK3R1均属于PI3K信号通路,PI3K/Akt通路可通过激活肝星状细胞和成纤维

细胞促进肝纤维化^[20],椭圆叶花锚中吡啶类成分可能是通过介导PI3K信号通路,抑制肝细胞凋亡来实现抗肝炎的作用。

MAPKs是众多信号蛋白的一种,其激活调控一系列细胞活动。活化的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等参与细胞增殖、分化、转化及凋亡的调节,并与炎症、肿瘤等多种疾病的发生密切相关^[21]。Roman等^[22]研究发现,在RAW264.7巨噬细胞中,sPGN强度将会激活MAPK1/ERK2通路,中度激活MAPK8/JNK通路,轻度激活P38通路,其中ERK通路主要介导炎症反应,P38通路在炎症条件下的激活具有多种特性^[23]。其中MAPK8基因在肝癌、胃癌、胰腺癌等人体的多个部位的肿瘤组织中均呈现高表达,致癌机制均是MAPK8通路先被外界刺激因素激活,转至细胞核内提高转录因子的活性,进一步使癌细胞增殖和分化^[24,25]。

TNF作为一种重要的细胞因子,可诱导细胞内多种信号通路,包括增殖、凋亡、炎症、免疫等。Wang等^[26]研究发现,慢性丙型肝炎患者TNF水平较正常健康人明显偏高。Tilg等^[27]研究发现慢性乙型肝炎患者血清致炎因子TNF- α 、IL-6水平的高低能够反映肝细胞损害的程度。TNF- α 、IL-6作为重要的致炎因子,对乙肝的发生、发展起到了重要的作用,且与疾病的严重程度呈正相关,因此,目前研究认为中医药可以通过降低血清中TNF- α 、IL-6水平而起到保肝作用^[27]。

综上,本研究在椭圆叶花锚化学成分的测定分析基础上,利用网络药理学的分析方法,分析了椭圆叶花锚 40 种化学成分 33 个抗肝炎的潜在作用靶点,发现椭圆叶花锚可能通过白细胞迁移、一氧化氮生物合成过程的正调控、血小板活化、细胞外调节蛋白激酶 ERK1 和 ERK2 级联的正调控、磷脂酰肌醇 3-激酶信号转导的调控等生物过程,以及 TNF、PI3K、Toll-like receptor、FoxO、HIF-1、VEGF、Fc epsilon RI 等关键信号通路,发挥抗肝炎的作用。分子对接结果验证了预测的主要化学成分和关键靶点有较好结合活性,表明本研究的预测较为准确可靠,当然,本研究也具有一定局限性,如数据库不完善等,因此后续还需对相关靶点通路进行验证。

参考文献

- Liu SH, He TN, Zhou LH, et al. Flora of Qinghai (青海植物志) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997: 72-74.
- Gu XY, Zhu JK, Zhang L. Pharmacological effect of total flavones from *Halenia elliptica* on steatohepatitis model rats [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2015, 37: 2308-2311.
- Xie J, Gao S, Li L, et al. Research progress and application strategy of network pharmacology in the field of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 2257-2265.
- Jiang HH, Tang Kai, Zhang HH, 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.
- Zhou WX. The research progress and development prospect of network pharmacology [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29: 760-762.
- Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(W1): W32-W38.
- Hsin KY, Ghosh S, Kitano H, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83922.
- Zhang JM, Bao WL, Gao HP, et al. Discussion on the effective components of huaanchu in the treatment of hepatitis [J]. Chin J Plateau Med Biol (中国高原医学与生物学杂志), 1984, 2(1): 11-17.
- Wang YX, Liu HY, Ren JH, et al. Autophagy induced by two ketones in HepG2 cells [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 2151-2157.
- Zhang WX. Effect of kaempferol on acetaminophen induced acute liver injury and its mechanism [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University (广东药科大学), 2019.
- Shakya G, Manjini S, Hoda M, et al. Hepatoprotective role of kaempferol during alcohol- and Δ PUFA-induced oxidative stress [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2014, 25(1): 73-79.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13: 195-203.
- Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(1): 7-24.
- Liu H, Qin T, Ai X, et al. Dihydroartemisinin attenuates autoimmune thyroiditis by inhibiting the CXCR3/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8: 115028-115040.
- Broderick DK, Di C, Parrett TJ, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas [J]. Cancer Res, 2004, 64: 5048-5050.
- Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103: 1475-1479.
- Griffith OL, Spies NC, Meenakshi A, et al. The prognostic effects of somatic mutations in ER-positive breast cancer [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3476.
- Xiao Q, Ye QF, Wang W, et al. Mild hypothermia pretreatment protects against liver ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16: 7520-7526.
- Jiang WH, Zhou Y, Wang C. Epigallocatechin gallate inhibits hepatocyte apoptosis and improves liver function in rats with biliary obstruction through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Anat Res (解剖学研究), 2020, 42(4): 34-39.
- Chen J. Effects of interferon α on liver function and p-mTOR p-p70s6k protein in animal model of hepatitis B virus infection by regulating PI3K/Akt pathway [J]. Chin Med Clin (中国药物与临床), 2021, 21: 381-385.
- Chen JY, Wang J, Wang J, et al. Research progress of MAPK signaling pathway [J]. Chin Med Sci (中国医药科学), 2011, 1(8): 32-34.
- Roman D, Jin YP, Dipika G. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38, and c-Jun NH2-Terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan [J]. J Infect Dis, 1996, 174: 777-785.

- 23 Jiang Y, Gong XW. Regulation of MAPK signal transduction pathway on inflammatory response [J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 2000, 52: 267-271.
- 24 Cui YP, Ma H, Duan XF. Expression and significance of mapk8 gene in oral squamous cell carcinoma [J]. J Pract Stomatol (实用口腔医学杂志), 2019, 35(1): 105-108.
- 25 Neha T, Nathalie MS, Phil A, et al. Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8) [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57329.
- 26 Wang P, Tian DY. Relationship between serum IL-2, TNF, HCV genotypes and interferon therapy in patients with chronic hepatitis C [J]. Acta Univ Med Tongji (同济医科大学学报), 2000, 29: 168-170.
- 27 Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases [J]. Liver Int, 2006, 26: 1029-1039.

齐墩果酸通过使 SOD1 失活和刺激溶酶体蛋白水解 阻断嘌呤补救途径用于癌症治疗

代谢重编程是癌症的核心标志,也是肿瘤发生和肿瘤进展的关键。对抗癌化合物代谢扰动的研究将有助于彻底了解这些药物的潜在机制并确定新的抗癌靶点。来自上海中医药大学的陈文连及其团队研究了齐墩果酸(OA)对肺癌和乳腺癌代谢的影响。结果表明,OA能迅速改变癌症的代谢,特别是抑制嘌呤补救途径(PSP)的作用。PSP的恢复明显抑制了OA诱导的DNA复制和细胞增殖停滞,强调了该途径对OA抗癌活性的重要性。次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)和5'-核苷酸酶(5'-NT)是PSP活性必不可少的两种代谢酶,可通过溶酶体途径被OA迅速降解。OA选择性靶向超氧化物歧化酶1(SOD1)并产生活性氧(ROS)以激活AMP活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物目标雷帕霉素复合物1(mTORC1)/巨自噬途径的哺乳动物靶标,从而引发HGPRT和5'-NT的溶酶体降解。此外,该团队发现PSP在人肺癌和乳腺癌中过度激活,与患者存活率呈负相关。该研究结果阐明了通过SOD1/ROS/AMPK/mTORC1/巨自噬/溶酶体途径抑制PSP的OA抗癌新机制,明确了PSP作为癌症治疗的新靶点,并强调OA作为具有高PSP抑制活性的潜在癌症治疗剂。相关研究发表在《Molecular Therapy-Oncolytics》杂志上。

胡乃华编译自: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8505360/>

原文标题: Oleanolic acid blocks the purine salvage pathway for cancer therapy by inactivating SOD1 and stimulating lysosomal proteolysis