

基于分子对接和表面等离子体共振技术的大承气汤治疗急性胰腺炎的作用机制研究

陈颖^{1,2}, 曹伊媛^{1,2}, 陆杰¹, 张慧倩², 岳华¹, 梁琨¹, 王新宏¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200082)

摘要:【目的】探讨大承气汤治疗急性胰腺炎的物质基础及作用机制。【方法】基于中药系统药理学技术平台(TCMSP)及文献检索筛选符合条件的大承气汤治疗急性胰腺炎的活性化合物和疾病靶点, 运用 Discovery Studio 软件进行分子对接, 应用 Cytoscape 3.6.2 软件构建成分-靶点网络关系图, 发现主要的活性成分和靶点, 通过 STRING 数据库对相关靶点进行基因本体论(GO)生物学功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析, 并采用表面等离子体共振(SPR)技术对主要活性成分和重要蛋白进行结合力验证。【结果】共筛选出大承气汤治疗急性胰腺炎的化合物有 37 个和相关靶点 32 个, 通过分子对接优选了 8 个活性成分和 6 个靶点。SPR 亲和力验证结果发现, 细胞间黏附分子 1(ICAM-1), 丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)和过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR- γ)均可以与一个或多个成分显示出较好的结合力。【结论】基于分子对接技术和网络药理学可预测大承气汤治疗急性胰腺炎的主要物质基础和潜在分子机制, 结合 SPR 技术验证了蛋白与活性成分亲和力。

关键词: 大承气汤; 急性胰腺炎; 分子对接; 表面等离子体共振

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1972-10

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.031

Study on Mechanism of *Da Chengqi* Decoction for Treatment of Acute Pancreatitis Based on Molecular Docking and Surface Plasmon Resonance Technology

CHEN Ying^{1,2}, CAO Yi-Yuan^{1,2}, LU Jie¹, ZHANG Hui-Qian²,
YUE Hua¹, LINAG Kun¹, WANG Xin-Hong¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China)

Abstract: **Objective** To explore the material basis and mechanism of *Da Chengqi* Decoction for the treatment of acute pancreatitis. **Methods** The conditions-meeting active compounds and disease targets of *Da Chengqi* Decoction for the treatment of acute pancreatitis were selected out by traditional Chinese medicine (TCM) Systems Pharmacology (TCMSP) and literature search, molecular docking were carried out by Discovery Studio software. A component-target network relationship diagram was constructed by Cytoscape 3.6.2 software to discover the main active components and targets, and then gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were performed on related targets through STRING database. Surface plasmon resonance (SPR) technology was used to verify the binding ability of the main active ingredients and important proteins. **Results** A total of 37 compounds and 32 related targets were screened out from *Da Chengqi* Decoction for the treatment of acute pancreatitis. Among them, 8 active ingredients and 6 targets were finalized by molecular docking. The results of affinity verification by SPR found that intercellular adhesion molecule

收稿日期: 2020-06-16

作者简介: 陈颖(1980-), 男, 博士, 副主任药师; E-mail: leys7382@163.com

通讯作者: 梁琨(1979-), 女, 博士, 讲师; E-mail: dolphin000000@163.com

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研项目(编号: 201740166); 上海市中医药新兴交叉学科资助计划项目(编号: 18ZYYJCXK-136); 虹口区卫生健康委员会科研课题(虹卫1903-04)

1(ICAM-1), mitogen-activated protein kinase 14(MAPK14)and peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ) showed better binding force with one or more components. **Conclusion** Based on the molecular docking technology and network pharmacology, the main material basis and potential molecular mechanism of *Da Chengqi* Decoction for the treatment of acute pancreatitis were predicted. Combining SPR technology was used to verify the affinity of protein and active ingredients.

Keywords: *Da Chengqi* Decoction; acute pancreatitis; molecular docking; surface plasmon resonance

急性胰腺炎是一种病情险恶、并发症多、病死率较高的急腹症,基本病机为腑气不通,中医治疗应始终贯彻“通里攻下”的思想^[1]。大承气汤是经典的“通里攻下”方剂,出自张仲景的《伤寒论》,由大黄、厚朴、枳实、芒硝4味中药组成。方中:大黄荡涤肠胃,泄热泻结为君;芒硝软坚润燥,泻热通便为臣;厚朴、枳实行气破结,消痞除满为佐。四药相和,综泻下、软坚、消痞、除满之用,可用于治疗“痞满燥实”为主要表现的肠梗阻、胰腺胆道疾病等多种疾病^[2]。在临床上,加用大承气汤优于单独常规西药治疗急性重症胰腺炎,具有良好的临床应用前景^[3]。本课题组前期采用胆胰管注射牛磺胆酸钠法建立急性胰腺炎大鼠模型,发现大承气汤可明显改善模型大鼠的胰腺损伤。同时,本课题组运用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术对大承气汤主要化学成分进行了快速的分析和鉴定^[4]。

分子对接(molecular docking)根据“锁-钥原理”通过化学计量学方法来模拟和预测蛋白质受体与药物小分子之间的结合力,是一种高效快速的药物筛选手段,对药效物质与作用机制研究具有重要意义^[5-6]。表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术是一种无标记型光学检测手段,通过测定共振角的变化检测生物分子间的相互作用,可为中药的活性成分分析以及对应蛋白靶点的鉴定提供有力支撑^[7]。

为进一步发现大承气汤治疗急性胰腺炎的潜在分子机制,本研究立足于中医药整体观和系统论,通过分子对接与网络药理学研究,筛选主要活性化合物和关键靶蛋白,以SPR技术验证活性成分及潜在靶标亲和力并评估其抵抗疾病的活性^[8],现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 试药 胡萝卜苷(批号: B20517)、和厚朴酚(批号: B20498)、柚皮素(批号: B21596)、大黄素-1-O-葡萄糖苷(批号: B27009)购自于上海源叶生物科技有限公司;厚朴酚(批号: AB0682-0020)、欧前胡素(批号: AB0831-0020)、柚皮苷(批号: AB1848-0020)、橙皮苷(批号: AB0714-0020)购自于成都埃法生物科技有限公司。

1.2 仪器 Biacore T200 生物分子相互作用分析系统(GE Healthcare 公司); CM-5 芯片购自于 GE Healthcare 公司。

2 方法

2.1 大承气汤活性成分筛选 通过中药系统药理学技术平台(TCMSP)(<http://sm.nwsuaf.edu.cn/lsp/tcmsp.php/>)搜集大承气汤中4味中药的化学成分。筛选类药性(DL) ≥ 0.18 、口服利用度(OB) $\geq 30\%$ 的化学成分结合已发表文献中报道过的重要活性成分,共同组成主要活性成分库。通过PubChem数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/)查找化合物的SMILES结构,导入Discovery Studio 2016(DS)软件,转化成3D结构,保存其mol2格式。

2.2 急性胰腺炎靶点预测及筛选 在DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)和TTD数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)中搜索与急性胰腺炎相关的靶点,并使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)对检索到的靶点进行命名规范化处理。PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)提供靶点的x-ray晶体结构,优先选择Resolution值小、配体不是金属离子,且有小分子与蛋白结合示意图的靶点结构,作为分子对接的受体。

2.3 化合物与疾病靶点的分子对接 将靶点蛋白

导入 DS 软件, 去除蛋白中水分子, 准备蛋白, 使其易与小分子化合物对接。最后, 选择 Libdock 模式, 对接公差设置为 0.25, 进行靶点和化合物的分子对接, 把原配体与蛋白靶点对接所得的分数作为基础值, 筛选出比之前分数高的化合物, 即说明两者之间亲和力更高, 结合较好。若对接失败, 则上调对接公差至 0.5。

2.4 成分-靶点蛋白互作网络构建 根据分子对接结果, 通过 Cytoscape 3.6.2 软件“File”“Import”“Import Network from File System”构建大承气汤化学成分和疾病靶点的互作网络图来分析成分与靶点之间的相互作用关系。

2.5 生物功能及通路的富集分析 将筛选出的疾病靶点基因名输入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)“Multiple proteins”, 物种设置为“Homo-sapiens”, 其余参数设置为保持默认, 进行基因本体(gene ontology, GO)生物学功能和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路分析, 统计富集信息。以错误发现率(false discovery rate, FDR)作为筛选条件。

2.6 SPR 技术测定活性成分与靶点蛋白的亲和力

2.6.1 蛋白芯片固定 将蛋白通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)偶联活化固定在 CM5 芯片上, 然后根据蛋白的等电点筛选蛋白质固定在 CM5 芯片的最佳 pH 值(4.0、4.5、5.0、5.5), 浓度(20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)摸索, 以确保较多的蛋白固定于蛋白芯片上, 其蛋白质的偶联包括 3 步: EDC/NHS 的活化; 蛋白质的偶联; 乙醇胺封闭蛋白质多余的结合位点。

2.6.2 化合物检测液配制 精密称定大黄素-1-O-葡萄糖苷、胡萝卜苷、厚朴酚、和厚朴酚、欧前胡素、柚皮素、柚皮苷、橙皮苷对照品适量, 分别以二甲基亚砜(DMSO)溶液溶解制成适当浓度的对照品贮备液。取各对照品储备液适量, 再分别加入 DMSO 溶液和 1.05 \times 磷酸缓冲盐(PBS)溶液, 制备成浓度为 256 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的对照品溶液, 用流动相溶液依次稀释成浓度为 128、64、32、16、8、4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的对照品溶液。

2.6.3 亲和力检测 设定结合目标蛋白的流通池为检测通道, 未结合目标蛋白的流通池为参比通

道, 流通池的流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。同时, 将待测物注入目标蛋白流通池和参比流通池, 使结合反应在 22~24 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行, 分别取上述配制梯度的对照品溶液进行检测, 流动相采用含 5.0% DMSO 的 1.05 \times PBS 溶液, 结合时间为 60 s, 流速为 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 解离时间为 180 s, 同时配制溶剂校正(solvent correction)曲线的 8 个浓度点, 范围为含 4.5%~5.5% DMSO 的 PBS 溶液, 以消除溶剂对表面折光率的影响。

2.6.4 亲和曲线拟合 进样完成后, 进行数据处理, 亲和曲线拟合用 Biacore T200 软件进行评估, 将稳态亲和力模型(1:1)用于曲线拟合。绘制靶点蛋白与单体化合物的结合曲线, 即 SPR 光谱图, 并且计算获得动力学参数如最大结合浓度(K_d)、最大响应值(R_{max})、偏移量(Offset)和卡方检验统计(Chi^2)。

3 结果

3.1 大承气汤活性成分分析 由 TCMSP 数据库检索到大黄有 92 个成分, 枳实有 65 个成分, 厚朴有 139 个成分。芒硝为硫酸盐矿物药, 化学式为 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 不计入后续研究。筛选并纳入文献报道的其他活性成分^[9], 共收集到 37 个化合物。泽兰黄醇素、大黄素甲醚二葡萄糖苷、大黄酸、决明内酯、胡萝卜苷等 12 个成分源自大黄; 桉叶醇、和厚朴新酚、厚朴酚、和厚朴酚等 4 个成分源自厚朴; 异橙黄酮、5,7,4-三甲氧基黄酮、异樱花素-7-芸香糖甙、柚皮素、橙皮素、木犀草素、橙皮苷、柚皮苷等 21 个成分源自枳实。

3.2 急性胰腺炎靶点的信息 通过搜索 DrugBank 数据库和 TTD 数据库, 共获取 430 个与急性胰腺炎相关的疾病靶点。筛选出文献报道较多, 且具有配体及 X 线晶体结构的疾病蛋白 32 个, 具体靶点信息见表 1。

3.3 分子对接分析 将上述筛选出的 37 个成分与 32 个靶点进行分子对接。结果显示: 454 条对接良好的信息, 每个成分均可以与一个或多个蛋白靶点结合良好。其中, 橙皮苷、柚皮苷、和厚朴酚、大黄素-1-O-葡萄糖苷、欧前胡素、厚朴酚、柚皮素、胡萝卜苷的亲和力较高, 其分别与 26、22、21、21、20、19、19、19 个蛋白结合较好, 对接得分见表 2。

表1 急性胰腺炎潜在的靶点信息

Table 1 Potential targets information for acute pancreatitis

ID	蛋白全称	基因名称	PDB ID
P1	serine/threonine-protein kinase TBK1	<i>TBK1</i>	4iwq
P2	apoptotic protease-activating factor 1	<i>APAF1</i>	1z6t
P3	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	<i>RAF1</i>	3omv
P4	protein kinase C iota type	<i>PRKCI</i>	3a8w
P5	serine/threonine-protein kinase PAK 6	<i>PAK6</i>	4ks7
P6	caspase-3	<i>CASP3</i>	1nme
P7	serine/threonine-protein kinase PAK 1	<i>PAK1</i>	2hy8
P8	caspase-7	<i>CASP7</i>	1shl
P9	serine/threonine-protein kinase Chk2	<i>CHEK2</i>	2xm9
P10	cytoplasmic tyrosine-protein kinase BMX	<i>BMX</i>	3sxs
P11	serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	<i>ERN1</i>	4u6r
P12	proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	<i>RET</i>	2ivs
P13	serine/threonine-protein kinase 3	<i>PLK3</i>	4b6l
P14	tyrosine-protein kinase BTK	<i>BTK</i>	5fbn
P15	serine/threonine-protein kinase pim-1	<i>PIM1</i>	5c1q
P16	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	<i>AKT1</i>	1unq
P17	mitogen-activated protein kinase 14	<i>MAPK14</i>	2fst
P18	serine/threonine-protein kinase Sgk1	<i>SGK1</i>	3hdm
P19	protein kinase C theta type	<i>PRKCQ</i>	1xjd
P20	mitogen-activated protein kinase 11	<i>MAPK11</i>	3gp0
P21	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	<i>MAP3K5</i>	2clq
P22	interleukin-2	<i>IL2</i>	1m49
P23	epidermal growth factor	<i>EGF</i>	1M17
P24	intercellular adhesion molecule 1	<i>ICAM1</i>	5mza
P25	insulin-like growth factor 1 receptor	<i>IGF1R</i>	3nw7
P26	tyrosine-protein kinase ITK/TSK	<i>ITK</i>	1sm2
P27	peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>PPARG</i>	1zgy
P28	matrix metalloproteinase-9	<i>MMP9</i>	2ovz
P29	tyrosine-protein kinase JAK2	<i>JAK2</i>	5ut3
P30	signal transducer and activator of transcription 3	<i>STAT3</i>	6njs
P31	apoptosis regulator Bcl-2	<i>BCL2</i>	4lxd
P32	induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	<i>MCL1</i>	5fc4

其中,厚朴酚和细胞间黏附分子1(ICAM-1)蛋白之间的对接相互作用如图1-A、B所示,厚朴酚母核中的羟基与ICAM-1蛋白中的氨基酸GLU87、VAL89可形成常规氢键,其键长范围为1.0-1.6Å,其苯环与VAL89具有疏水结合Pi-Alkyl作用,该化合物与ICAM-1对接能量为-8.540 87 KJ/mol。欧前胡素和ICAM-1的分子相互作用如图1-C、D所示,欧前胡素母核结构主要与ICAM-1中的氨基酸残基VAL1123、ARG88形成疏水结合Pi-Alkyl作用,同时,母核上的羰基与VAL89形成常规氢键,

其键长范围为1.0-1.6Å,增加了分子与蛋白的结合,该化合物与ICAM-1对接能量为-13.485 6 KJ/mol。

欧前胡素-丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)蛋白对接的相互作用如图2-A、B所示,苯环的中心结构与TRP197形成了 $\pi-\pi$ 相互作用力,又与氨基酸LYS249、LEU246形成疏水结合Pi-Alkyl作用,母核结构上的羰基与ASN201形成氢键,其键长范围为0.9-1.6 Å。

3.4 成分-靶点互作分析 将成分与疾病靶点通过Cytoscape 3.6.2软件构建活性成分-靶点蛋白网络

表2 8个化合物与蛋白靶点 Docking Score 值
Table 2 Docking Score values of 8 compounds and targets

基因	Ligand Score 值	Docking Score 值							
		橙皮苷	柚皮苷	和厚朴酚	大黄素-1-O-葡萄糖苷	欧前胡素	厚朴酚	柚皮素	胡萝卜苷
<i>TBK1</i>	126.64	139.33	124.66	95.41	143.94	131.45	90.69	91.11	126.79
<i>APAF1</i>	137.58	124.16	166.66	145.92	145.36	139.88	138.69	138.96	—
<i>RAF1</i>	92.43	158.02	149.43	110.11	140.84	100.21	99.22	110.71	116.85
<i>PRKCI</i>	103.18	133.70	143.77	95.09	129.34	89.53	104.76	111.66	142.04
<i>PAK6</i>	32.26	114.46	125.06	76.26	29.03	74.03	72.33	72.40	113.23
<i>CASP3</i>	87.35	93.85	117.68	105.94	114.54	105.11	92.74	88.11	96.30
<i>PAK1</i>	126.63	135.61	122.82	128.11	111.71	94.11	131.36	130.03	118.54
<i>CASP7</i>	89.01	—	—	102.34	107.40	102.97	100.56	112.78	—
<i>CHEK2</i>	132.32	135.82	119.39	135.70	139.99	102.59	133.28	136.01	141.65
<i>BMX</i>	96.24	174.72	153.33	101.41	150.22	97.83	95.89	108.76	135.04
<i>ERN1</i>	36.40	140.59	127.79	93.18	113.72	95.88	96.75	86.95	113.17
<i>RET</i>	87.10	140.73	144.23	98.00	125.90	97.13	92.06	69.18	103.67
<i>PLK3</i>	123.52	168.46	150.85	109.65	126.94	106.70	125.14	127.20	140.46
<i>BTK</i>	80.21	147.99	142.50	95.77	112.36	91.08	93.96	—	141.11
<i>PIM1</i>	91.82	144.32	144.95	94.92	117.80	102.02	88.33	84.78	120.60
<i>AKT1</i>	108.01	128.92	127.90	113.57	104.79	74.26	109.85	109.32	102.34
<i>MAPK14</i>	121.37	178.37	154.94	123.37	124.31	124.16	112.99	113.72	140.40
<i>SGK1</i>	105.82	121.19	—	95.87	132.35	111.08	91.37	98.20	85.44
<i>PRKCQ</i>	149.69	140.19	138.27	92.34	123.20	90.76	92.98	85.57	105.79
<i>MAPK11</i>	26.13	146.06	139.36	88.49	128.56	91.87	88.62	93.64	127.21
<i>MAP3K5</i>	136.16	150.66	161.81	138.77	132.92	108.48	139.75	141.59	113.65
<i>IL2</i>	144.08	150.12	139.46	102.60	120.96	150.71	99.56	95.27	132.47
<i>EGF</i>	109.91	153.71	129.67	110.58	115.13	94.84	113.87	117.74	111.36
<i>ICAM1</i>	71.50	127.52	132.17	85.87	92.30	76.52	86.04	72.22	121.92
<i>IGF1R</i>	125.97	127.87	159.47	126.27	127.53	130.38	134.08	126.14	120.15
<i>ITK</i>	151.34	147.30	172.29	157.30	119.95	155.43	153.96	159.71	152.80
<i>PPARG</i>	130.22	114.51	—	109.88	—	108.91	97.33	111.07	—
<i>MMP9</i>	201.77	218.52	185.98	140.85	149.98	129.05	140.57	140.84	170.80
<i>JAK2</i>	109.02	138.83	159.65	109.08	118.57	104.97	100.07	98.27	132.49
<i>STAT3</i>	123.33	66.16	92.53	98.23	—	81.21	80.10	78.23	90.33
<i>BCL2</i>	152.02	160.47	152.08	97.78	113.46	152.58	97.21	86.91	126.95
<i>MCL1</i>	89.99	133.98	121.72	88.54	103.83	96.45	87.24	91.31	133.10

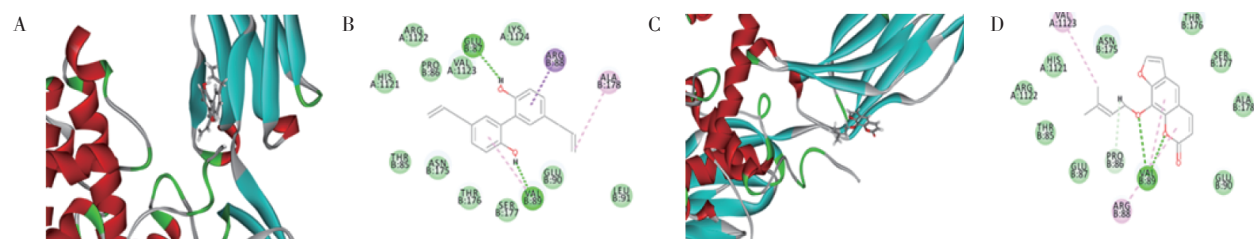


图1 ICAM-1与厚朴酚(A、B)，欧前胡素(C、D)的二维及三维分子对接模式

Figure 1 2D and 3D molecular docking patterns of ICAM-1 with magnolol(A, B), Ammidin(C, D)

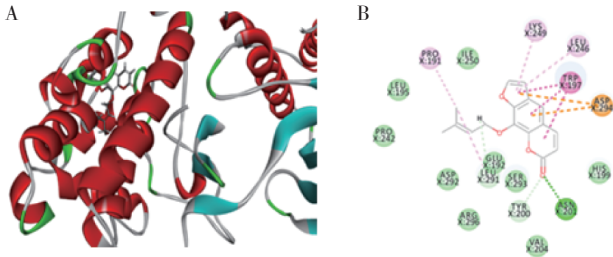


图2 MAPK14与欧前胡素的二维及三维分子对接模式(A、B)
Figure 2 2D and 3D molecular docking patterns of MAPK14 with Ammidin(A, B)

图(见图3)。红色椭圆形为大黄成分, 绿色三角形为厚朴成分, 粉色菱形为枳实成分, 该网络由66个节点(nodes)和454条边(edges)组成, 只有29个蛋白显示出与大承气汤成分对接良好。根据参数分析发现, ICAM1、MAPK11、MAPK14、ERN1、RAF1、CASP3度值分别为30、30、29、27、27、26。

3.5 生物功能和信号通路分析 将32个作用靶点

导入 SRTING 数据库中, 根据参数错误发现率 (FDR) 值, 筛选出靶点蛋白富集的前 10 条富集 GO 功能, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC), 结果如图 4 显示。这些靶点参与的生物过程有细胞内信号转导、细胞对化学刺激的反应、分子功能的正调控、蛋白质磷酸化等; 分子功能主要与蛋白激酶活性、药物结合、ATP 结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等关系密切; 细胞组成主要富集在胞浆、胞质部分、膜结合细胞器等部位。KEGG 富集结果发现, 这些靶点蛋白主要参与了癌症信号通路、AGE-RAGE 信号通路、FoxO 信号通路、细胞凋亡信号通路、JAK/STAT 信号通路等, 分别有 15、9、9、9、9 个蛋白富集在上面, 表明这些信号通路与急性胰腺炎紧密相关。FDR 排名前 20 条信号通路, 见图 5。

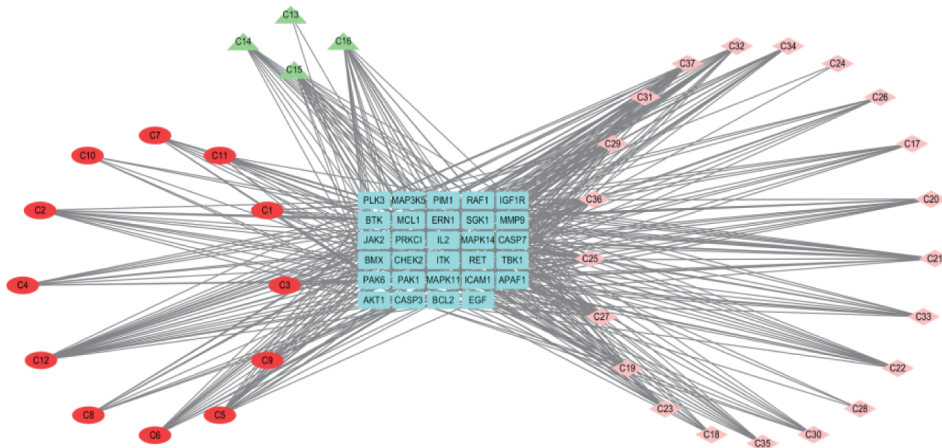


图3 大承气汤“活性成分-疾病靶点”网络图
Figure 3 “Active ingredient-disease target” network diagram of *Da Chengqi* Decoction

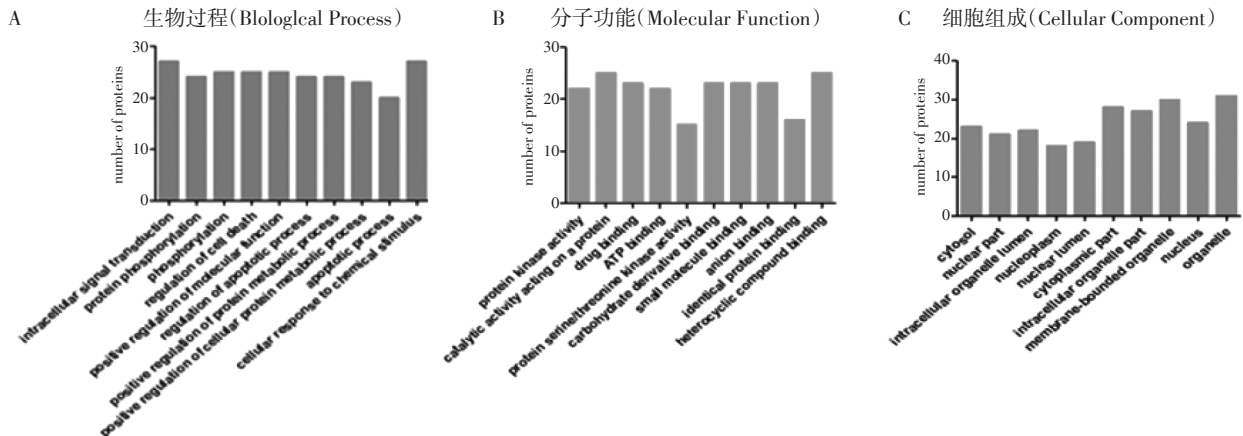


图4 大承气汤治疗急性胰腺炎的基因本体(GO)分析(A、B、C)
Figure 4 GO analysis of *Da Chengqi* Decoction for treatment of acute pancreatitis(A, B, C)

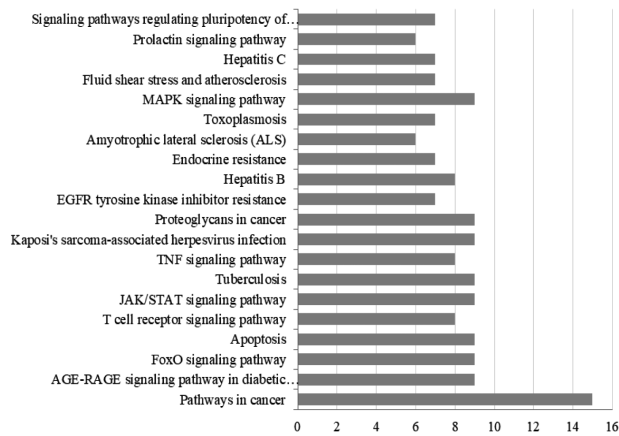


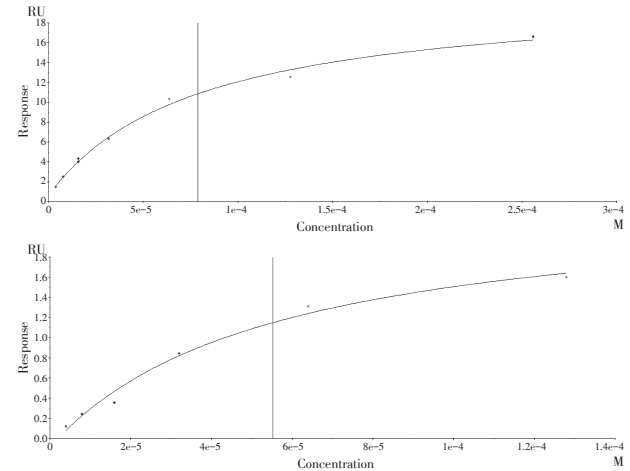
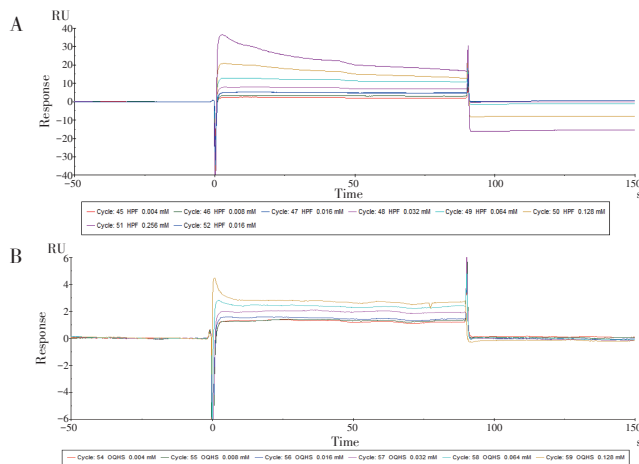
图5 大承气汤治疗急性胰腺炎的KEGG通路富集分析
Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of *Da Chengqi* Decoction for treatment of acute pancreatitis

3.6 活性成分与靶点蛋白的亲合作用分析 采用SPR生物传感器检测活性成分橙皮苷、柚皮苷、和厚朴酚、大黄素-1-O-葡萄糖苷、欧前胡素、厚朴酚、柚皮素、胡萝卜苷与关键靶点ICAM1、

MAPK14、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR- γ)之间的亲和力。其中, ICAM-1和MAPK14为“成分-靶点”图预测的关键蛋白, PPAR- γ 为文献报道的重要靶点。结果显示, 8个化合物与ICAM-1反应作出的拟合曲线中, 厚朴酚、欧前胡素与ICAM-1亲和力较好, 如图6所示。厚朴酚、欧前胡素的解离常数 K_d 值较小, 各亲和力参数如表3所示。

在对MAPK14表现出高响应和良好亲和力的化合物中, 欧前胡素可作出拟合曲线且显示出较好的亲和力, 如图7所示。 K_d 为 $19.07 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, R_{max} 为3.665, Offset为-3.754, Chi^2 为0.755。

大黄素-1-O-葡萄糖苷、和厚朴酚、厚朴酚、胡萝卜苷、欧前胡素与PPAR- γ 反应可作出拟合曲线, 如图8所示。其中, 大黄素-1-O-葡萄糖苷、和厚朴酚、厚朴酚、胡萝卜苷、欧前胡素 K_d 值较小, 说明与PPAR- γ 亲和力较好, 各亲和力参数如表4所示。



A. 厚朴酚; B. 欧前胡素

图6 ICAM-1蛋白与大承气汤主要活性成分结合SPR分析拟合图

Figure 6 SPR fit plot of ICAM-1 protein and *Da Chengqi* Decoction active components binding

表3 大承气汤主要活性成分和ICAM-1之间的亲和力动力学参数

Table 3 Affinity kinetic parameters between active compounds and ICAM-1 in *Da Chengqi* Decoction

化合物	$K_d(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	R_{max}	Offset	Chi^2
厚朴酚	78.96	20.48	0.616 5	0.225
欧前胡素	55.27	2.469	-0.086 04	0.007 29

4 讨论

本研究基于网络药理学探讨了大承气汤治疗

急性胰腺炎预测靶点可能参与的生物过程和作用通路。GO基因功能注释结果表明, 大承气汤治疗急性胰腺炎的相关靶点主要在胞浆、胞质部分、膜结合细胞器等部位发生蛋白激酶活性、药物结合、ATP结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等分子反应, 参与细胞内信号转导、细胞对化学刺激的反应、分子功能的正调控、蛋白质磷酸化等生物过程。KEGG富集结果发现, 这些靶点蛋白通过癌症信号通路、AGE-RAGE信号通路、FoxO信

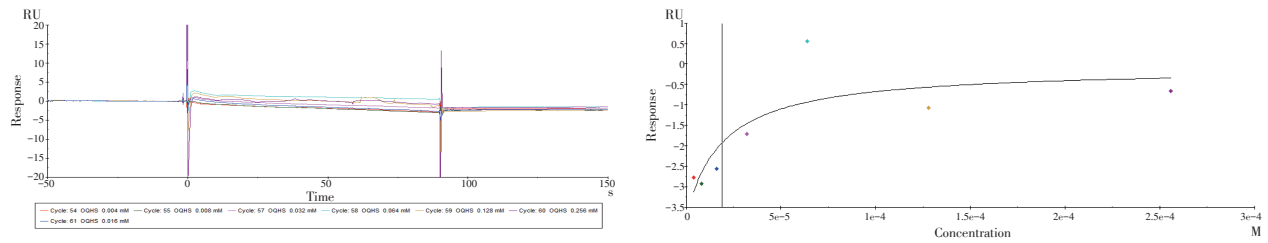
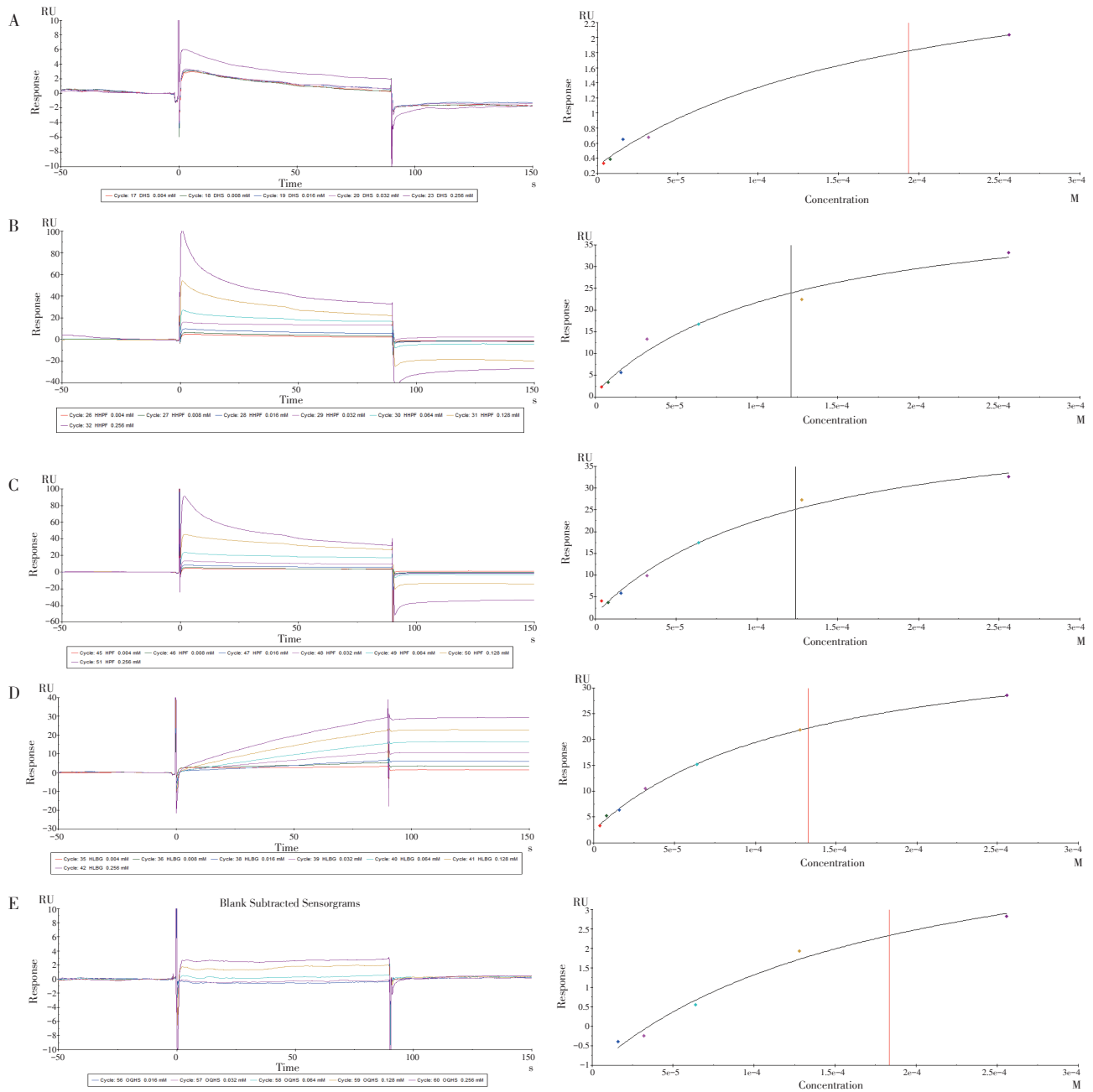


图7 MAPK14蛋白与欧前胡素结合SPR分析拟合图

Figure 7 SPR fit plot of MAPK14 protein binding with active component



A. 大黄素-1-O-葡萄糖苷; B. 和厚朴酚; C. 厚朴酚; D. 胡萝卜苷; E. 欧前胡素

图8 PPAR-γ蛋白与活性成分结合SPR分析拟合图

Figure 8 SPR fit plot of PPAR-γ protein binding with active components

表4 大承气汤主要活性成分和PPAR- γ 之间的亲和力动力学参数

Table 4 Affinity kinetic parameters between *Da Chengqi* Decoction active compounds and PPAR- γ

化合物	$K_d(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	R_{max}	Offset	Chi^2
大黄素-1-O-葡萄糖苷	193.4	3.043	0.299 9	0.009 04
和厚朴酚	121.0	45.84	1.018	3.48
厚朴酚	123.7	47.98	1.117	2.00
胡萝卜苷	132.6	39.53	2.441	0.167
欧前胡素	183.3	6.871	-1.107	0.058 0

号通路、细胞凋亡信号通路、JAK/STAT信号通路等调控急性胰腺炎。

此外,通过分子对接筛选出了大承气汤治疗急性胰腺炎的8个活性成分,这些化合物来自于不同的中药且与较多的急性胰腺炎相关靶点显示出亲和力。大黄素-1-O-葡萄糖苷、胡萝卜苷是大黄的活性成分;厚朴酚、和厚朴酚为厚朴的活性成分;橙皮苷、柚皮苷、欧前胡素、柚皮素为枳壳的活性成分。ICAM1、MAPK11、MAPK14、ERN1、RAF1、CASP3为分子对接结果中程度值较高的蛋白,进一步证实了中药“多成分-多靶点”干预疾病的整体观。

ICAM-1在肿瘤生长、侵袭和转移中起关键作用,其介导异质细胞和细胞外基质之间的粘附,并参与一系列重要的生理和病理过程,例如免疫、炎症和肿瘤转移等^[10]。在严重急性胰腺炎患者引发的免疫反应中,可见T淋巴细胞的抑制活性升高,嗜中性粒细胞的吞噬活性降低,黏附分子ICAM-1活化异常^[11]。Li等^[12]发现急性胰腺炎大鼠胰腺和肝组织中ICAM-1的表达较高,并且抗炎作用与ICAM-1表达的降低有关。MAPK是一种促分裂原活化蛋白激酶,MAPK通过细胞内信号通路传输体内的炎症反应,并在急性胰腺炎的形成机理中起重要作用^[13]。已有研究发现,重症急性胰腺炎早期MAPK14活性上调,释放了炎症细胞因子,触发炎症级联反应,加重全身炎症反应综合征,通过控制MAPK14活性可能是缓解炎症反应的有效途径^[14]。PPAR- γ 与急性胰腺炎严重程度相关,重症急性胰腺炎大鼠的胰腺及肺脏组织中PPAR- γ 表达上调,有研究发现,高脂血症通过降低PPAR- γ 表达,加重重症急性胰腺炎炎症程度^[15]。

采用SPR技术对ICAM-1、MAPK14和PPAR- γ 蛋白与大承气汤治疗急性胰腺炎的8个化合物进行亲和力检测。研究结果发现,3个蛋白均可以与1个或多个成分显示出较好的结合力。现有的报道证实了SPR的结果,厚朴酚可抑制NF- κ B信号通路降低ICAM-1的表达,发挥抗炎作用^[16]。欧前胡素在人类单核细胞系U937泡沫细胞中对ICAM-1表达具有抑制作用^[17]。故推测ICAM-1蛋白在大承气汤治疗急性胰腺炎的过程中发挥着重要作用。欧前胡素也能抑制MAPK14的磷酸化,减少胶原沉积和炎症细胞渗出^[18],这些研究侧面验证了SPR实验的有效性。PPAR- γ 为3个蛋白中与化合物结合力最好的蛋白,然而这一蛋白在分子对接结果中并未体现出优越性。这一结果可能与网络药理学和SPR技术的局限性有关。

网络药理学的数据信息主要依赖于文献数据和数据库,收录的信息可能存在偏倚。目前的网络分析技术仍然有限,虚拟计算结果呈现假阴性的可能性较高。SPR技术计算主要是在体外动态模拟化合物与蛋白芯片的相互结合,体外的虚拟计算无法全面反映出药物的体内作用状态。基于此,本课题组下一步将会从网络分析和体外研究,延伸至分子水平、细胞水平和整体动物水平等不同层面展开研究,以期阐明大承气汤在体内对靶蛋白的作用情况以及大承气汤通过调节AGE-RAGE信号通路、JAK/STAT信号通路等改善急性胰腺炎的分子生物学机制。

参考文献:

- [1] 张声生,李慧臻.急性胰腺炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中华中医药杂志,2017,32(9):4085-4088.
- [2] 刘绍永,傅延龄.大承气汤临床观察类文献方药用量分析[J].环球中医药,2016,9(5):571-574.
- [3] 王学军,曾宪涛,韩斐,等.大承气汤治疗急性重症胰腺炎效果的Meta分析[J].世界华人消化杂志,2011,19(36):3705-3713.
- [4] 陆杰,王婷婷,梁琨,等.UPLC-LTQ-Orbitrap-MS法分析大承气汤化学成分[J].中成药,2020,42(12):3275-3280.
- [5] 黄启和,周福军,徐旭,等.基于分子对接技术虚拟筛选延胡索抗心肌缺血物质基础研究[J].中草药,2019,50(10):2355-2361.
- [6] 李克宁,郑惠婷,张雨,等.基于分子对接技术虚拟筛选葛根治疗缺血性脑卒中的物质基础研究[J].中草药,2018,49(8):1847-1853.

- [7] 李秀丽, 陈艳玲, 赵军丽, 等. 表面等离子体共振生物传感器研究进展[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(11): 1399-1403.
- [8] CHEN L, LV D, WANG D, et al. A novel strategy of profiling the mechanism of herbal medicines by combining network pharmacology with plasma concentration determination and affinity constant measurement [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(11): 3347-3356.
- [9] 姜丽, 余兰彬, 张启云, 等. 基于UPLC-MS/MS大承气汤多种活性成分大鼠体内药动学研究[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2908-2915.
- [10] LIN Y T, CHEN L K, JIAN D Y, et al. Visfatin promotes monocyte adhesion by upregulating ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via activation of p38-PI3K-Akt signaling and subsequent ROS production and IKK/NF- κ B Activation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(6): 1398-1411.
- [11] KRIVORUCHKO I A, BOIKO V V, PESOTSKII O N, et al. The role of immune disorders in formation of local and systemic complications of severe acute pancreatitis [J]. *Klin Khir*, 2003, 2(2): 20-24.
- [12] LI Y Y, LI X L, YANG C X, et al. Effects of Tetrandrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(1): 155-159.
- [13] 陈旭丹, 王坤, 沈耀, 等. MAPK 信号转导在实验性重症急性胰腺炎大鼠中的作用 [J]. *临床医学工程*, 2011, 18(11): 1701-1702.
- [14] 鲍海琴, 陈本启, 赵伟, 等. 半夏泻心汤对重症急性胰腺炎大鼠肠道损伤的保护作用及肠组织 p38MAPK/NF- κ B 表达的影响 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(8): 1378-1382.
- [15] 宋慧, 刘俊, 王宏志, 等. PPAR- γ 在大鼠重症急性胰腺炎伴高脂血症中的表达及意义 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2008(5): 413-416.
- [16] CHUNLIAN W, HEYONG W, JIA X, et al. Magnolol inhibits tumor necrosis factor- α -induced ICAM-1 expression via suppressing NF- κ B and MAPK signaling pathways in human lung epithelial cells [J]. *Inflammation*, 2014, 37(6): 1957-1967.
- [17] YANG P Y, RUI Y C, LI K, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in U937 foam cells and the inhibitory effect of imperatorin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(4): 41-44.
- [18] 赵雨喆, 咸哲民, 姜京植, 等. 欧前胡素通过 p38MAPK/NF- κ B 途径改善哮喘小鼠气道炎症 [J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(9): 737-743.

【责任编辑：侯丽颖】