

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.05.002

❖ 基础研究 ❖

基于网络药理学和分子对接技术研究四物汤配伍黄芪提高免疫力的作用机制

杨艳, 刘丹, 邓春海, 王雨辰, 韩峰

(承德市市场监督管理综合执法局, 河北 承德 067000)

【摘要】目的: 探讨基于网络药理学和分子对接技术研究四物汤配伍黄芪提高免疫力的作用机制。**方法:** 采用 TCMSF 平台搜索 SWT-H 有效成分, 以口服生物利用度 (OB) > 30%、类药性 (DL) > 0.18 作为标准进行成分筛选。查阅文献, 对 SWT-H 所含有效成分进行补充。使用 PharmMapper 平台对有效成分作用靶点进行预测, GeneCards 平台搜索提高人体免疫力的相关靶点。Jvenn 平台分析得到重复靶点, 作为 SWT-H 提高免疫力的潜在核心靶点。将核心靶点代入 String 平台进行蛋白质交互分析 (PPI), 采用 Cytoscape 软件构建出 PPI 和中药-成分-靶点-功能网络。将已收集的核心靶点代入 Metascape 平台进行 GO 分析。并进一步通过分子对接技术对网络药理学分析进行验证。**结果:** 筛选出 SWT-H 有效成分共 93 种, PharmMapper 预测出有效成分作用靶点 211 种, 提高人体免疫力相关靶点 500 种, 交集的潜在核心靶点 29 种。核心靶点的基因富集分析得到 4 条相关通路和生物学过程及脾脏细胞 (PGB: 00011)、THY + 细胞 (PGB: 00047) 两种功能相关细胞。SWT-H 中所含的有效成分, 如焦地黄内酯 (Jioglutolide) 可有效地靶向作用于诱导型一氧化氮合酶 (NOS2), 从而调节机体免疫功能。地黄苷 A (Rehmannioside A)、6-甲氧基当归素 (Sphondin)、焦地黄呋喃 (Jiofuran) 等, 可靶向作用于巨噬细胞游走抑制因子 (MIF), 发挥调节机体内巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞的增殖、迁移等功能, 从而调控机体的免疫功能。异黄芪皂苷 IV (Isoastragaloside IV)、洋川芎内酯 A (Senkyunolide A), 可作用于丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1); 地黄苷 C (Rehmaionoside C)、地黄素 D (Rehmaglutin D) 可作用于丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14), 激活 MAPK 通路, 发挥增强免疫的功能。黄芪甲苷与 TTR 有较好的结合能力, 推测该有效成分可靶向激活转甲状腺素蛋白 (TTR), 提高人体甲状腺激素和维生素 A 向重要器官的转运能力, 从而增强人体免疫力。**结论:** SWT-H 中的 Jioglutolide、Rehmannioside A、Sphondin、Jiofuran、Isoastragaloside IV、Senkyunolide A、Rehmaionoside C、Rehmaglutin D 及黄芪甲苷可通过靶向调节 NOS2、MIF、MAPK1、MAPK 通路及 TTR 增强人体免疫力。

【关键词】 网络药理学; 四物汤; 黄芪; 免疫调节

【中图分类号】 R966 **【文献标志码】** A

The mechanism of Siwu Decoction combined with Astragalus membranaceus to improve immunity was studied based on network pharmacology and molecular docking techniques

YANG Yan, LIU Dan, DENG Chun-hai, WANG Yu-chen, HAN Feng

(Comprehensive Law Enforcement Bureau for Market Supervision and Administration of Chengde City, Chengde 067000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To analyze the potential mechanism of Siwu Decoction combined with Astragalus membranaceus to improve human immunity through network pharmacological method and molecular docking technology. **Methods:** TCMSF platform was used to search the active compounds of SWT-H, and the oral bioavailability (OB) > 30% and drug like property (DL) > 0.18 were used as the criteria for component screening. Consult the literature to supplement the active ingredients contained in SWT-H. The PharmMapper platform was used to predict the action targets of active ingredients, and the GeneCards platform was used to search for relevant targets to improve human immunity. Repeated targets were obtained through Jvenn platform analysis as potential core targets for SWT-H to improve immunity. The core target was substituted into the String platform for protein interaction analysis (PPI), and the CYTOSCAPE software was used to build the PPI and the traditional Chinese medicine ingredient target function network. Substitute the core target into the Metascape platform for GO analysis. The network pharmacological analysis was further verified by molecular docking technology. **Results:** A total of 93 effective components of SWT-H were selected, 211 targets of active components, 500 targets related to improving human immunity, and 29 potential core targets of intersection were predicted by PharmMapper. 4 related pathways and biological processes were identified by gene enrichment analysis of core targets, and two functional related cells were spleen cells (PGB: 00011) and THY +

基金项目: 河北省承德市科技研究与计划发展项目 (202006A015)

作者简介: 杨艳 (1977 -), 女, 副主任医师。E-mail: hanyangyan555888@126.com

cells (PGB:00047). The active ingredients contained in SWT-H, such as Jioglutolide, could effectively target nitric oxide synthase inducible (NOS2) to regulate the immune function of the body. Rehmannioside A, 6-methoxy-danggui (Sphondin), Jiofuran and other rehmannioside could target macrophage migration inhibitory factor (MIF) to regulate the proliferation and migration of macrophages, T cells and other immune cells in the body, thus regulating the immune function of the body. Isoastragaloside IV and Senkyunolide A could act on mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), Rehmannioside C and Rehmaglutin D could act on MAPK14 and activate MAPK pathway to enhance immunity. Astragaloside had a good binding ability with transthyretin (TTR), so it was speculated that this active ingredient could target to activate TTR, improve the transport ability of human thyroid hormone and vitamin A to important organs, and thus enhance human immunity. **Conclusion:** In SWT-H, Jioglutolide, Rehmannioside A, Sphondin, Jiofuran, Isoastragaloside IV, Senkyunolide A, Rehmannioside C, Rehmaglutin D and astragaloside IV can enhance human immunity by targeting NOS2, MIF, MAPK1, MAPK pathway and TTR.

【Key words】 Network pharmacology; Siwu Decoction; Astragalus; Immune regulation

四物汤是常用于补血的传统方剂,由当归、川芎、白芍、熟地黄四味中药组成。首载于唐代骨伤科大家蔺道人的《仙授理伤续断秘方》,具有补血活血,调经化瘀之功;主治冲任亏虚,月经不调,崩中漏下,血痕块硬,胎动不安,腹痛血下等中医学领域的病症。传统中医认为“气为血之帅,血为气之母”,气与血在中医学理论中有着密不可分的关联。因此,黄芪作为补气要药,非常适合与四物汤配伍联合使用。“卫气”“营血”等中医概念与现代医学有的“营养”“免疫”等概念有一定重合。现代药理学^[1-3]表明,当归、熟地黄、黄芪中所含的多糖成分可有效提高机体免疫力。因此,使用四物汤配伍黄芪(SWT-H)提高机体免疫力具有一定的理论基础和潜在可行性。本研究通过网络药理学和分子对接技术,寻找 SWT-H 中与免疫功能相关的有效成分,挖掘其潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 方法

1.1.1 SWT-H 的有效成分筛选 使用 TCMSP 数据库,通过对 SWT-H 中五味中药所含的有效成分进行搜索,按照 OB > 30%、DL 值 > 0.18 的标准进行筛选。排除重复成分、以及数据库中明显出现错误的成分。同时,采用文献检索的方法,在 CNKI、PubMed 等文献数据库上检索五味中药的相关报道,以补充因数据库本身不足而带来的有效成分缺失。

1.1.2 SWT-H 的有效成分作用靶点以及提高人体免疫力相关靶点预测 使用 PharmMapper 数据库,对所得成分所作用的靶点进行预测分析^[4]。将得到的靶点蛋白带入 Uniprot 数据库进行名称标准化,得到成分所作用靶点的基因名称。使用 GeneCards 数据库,对肾脏缺血再灌注损伤后纤维化对应的提高人体免疫力靶点进行搜索,确定搜索关键词为 Renal ischemia-reperfusion injury 和 Renal fibrosis。分别取各自结果的前 500 种靶点。并对检索结果进行整理、合并、去除重复项。上述成分所作用的靶点

与提高人体免疫力对应的靶点带入 Jvonn 平台进行韦恩分析,并绘出二者重复情况的图片。二者重合部分即为 SWT-H 提高人体免疫力的潜在核心靶点。

1.1.3 PPI 网络与中药-成分-靶点-功能网络构建

将上述潜在核心靶点带入 String 数据库,进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,并构建出 PPI 网络作用图。同时,根据上述分析所得中药、有效成分、作用靶点、功能靶点的关系,使用 Cytoscape 软件,构建出中药-成分-靶点-功能网络图。

1.1.4 基因富集分析 将核心靶点带入 Metascape 在线平台进行 GO 分析:包括通路和生物学过程富集分析、细胞功能类型分析,并对富集分析的结果进行可视化处理。

1.2 分子对接

采用分子对接技术,对上述网络药理学分析进行进一步验证。利用 PDB 数据库([http:// www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/))下载 PPI 网络的核心蛋白质结构,利用 PubChem([https:// pubchem.ncbi.nlm.nih.gov /](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/))数据库下载核心有效成分的 sdf 文件,将其利用 OpenBabel 软件转化为 mol2 格式,最后将得到的蛋白结构(受体)及有效成分(配体)运用 autodock 软件进行分子对接,最后使用 Discovery Studio 和 Pymol 软件将分子对接的结果可视化。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 SWT-H 有效成分筛选结果 通过 TCMSP 平台搜索、文献查阅的方法,最终得到 SWT-H 所含有效成分 93 种,其中,当归 32 种、熟地黄 17 种、川芎 8 种、白芍 12 种、黄芪 30 种,重复成分 6 种。

2.1.2 SWT-H 有效成分作用靶点以及提高人体免疫力相关靶点预测结果 使用 PharmMapper 对 SWT-H 的有效成分进行靶点预测,每种成分所作用的靶点取前 30 种,除去重复项,得到 211 种 SWT-H 有效成分所作用的靶点。GeneCards 数据库搜索与人体提高免疫力相关的靶点,搜索关键词为 Develop

immunity from disease, 共取 500 种相关靶点。Jvenn 平台进行韦恩分析并作图, 得到重复靶点 29 种。该 29 种靶点即为 SWT-H 提高人体免疫力的潜在核心靶点。见表 1 及图 1。

表 1 SWT-H 提高人体免疫力的核心靶点汇总

| 核心靶点 | 靶点全称 | 中文名称 |
|--------|---|------------------------------------|
| ADAM17 | ADAM 17 | ADAM 金属蛋白酶结构域 17 |
| ALB | Serum albumin | 血清白蛋白 |
| AR | Androgen receptor | 雄激素受体 |
| BMP2 | Bone morphogenetic protein 2 | 骨形态发生蛋白 2 |
| BRAF | B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase | B-Raf. 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 |
| CASP3 | Caspase-3 | 半胱氨酸蛋白酶 3 |
| CCL5 | C-C motif chemokine 5 | C-C 基趋化因子 5 |
| CTSD | Cathepsin D | 组织蛋白酶 D |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor | 表皮生长因子受体 |
| ESR1 | Estrogen receptor | 雌激素受体 |
| F2 | Prothrombin | 凝血酶原 |
| FGFR1 | Basic fibroblast growth factor receptor 1 | 成纤维细胞生长因子受体 1 |
| HEXB | Beta-hexosaminidase beta chain | β -己糖胺酶 β 链 |
| HRAS | GTPase HRas | 原癌基因 HRAS, GTPase |
| MAPK1 | Mitogen-activated protein kinase 1 | 丝裂原活化蛋白激酶 1 |
| MET | Hepatocyte growth factor receptor | 肝细胞生长因子受体 |
| MIF | Macrophage migration inhibitory factor | 巨噬细胞迁移抑制因子 |
| MMP3 | Stromelysin-1 | 基质溶素-1 |
| NOS2 | Nitric oxide synthase, inducible | 一氧化氮合酶, 诱导型 |
| NOS3 | Nitric oxide synthase, endothelial | 一氧化氮合酶, 内皮 |
| PIK3CG | Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform | 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ 亚型 |
| PLAU | Urokinase-type plasminogen activator | 尿激酶型纤溶酶原激活剂 |
| PPARG | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma | 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ |
| PTPN11 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 | 酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 11 型 |
| SRC | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src | 原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src |
| TGFBR1 | TGF-beta receptor type-1 | TGF- β 受体 1 型 |
| TGFBR2 | TGF-beta receptor type-2 | TGF- β 受体 2 型 |
| TTR | Transthyretin | 转甲状腺素 |
| WAS | Wiskott-Aldrich syndrome protein | Wiskott-Aldrich 综合征蛋白 |

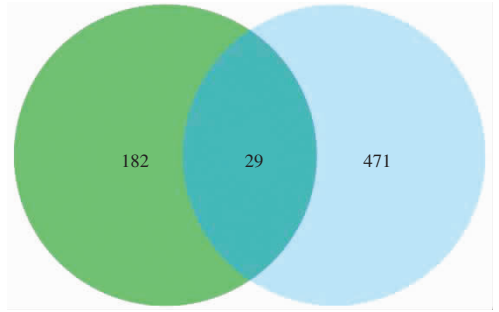


图 1 靶点重复结果

2.1.3 PPI 网络与中药-成分-靶点-功能网络构建结果 将 29 种核心靶点代入 String 平台进行 PPI 分析, 并做出 PPI 网络图。得到如下结果: 节点数为 29, 边数为 149、平均节点度为 10.3。其中节点表示蛋白靶点、节点度表示每个几点连接的边数。在 29 种核心靶点中, 节点度大于平均节点度的共有 13 种, 提示该 13 种靶点在 SWT-H 发挥增强免疫力的过程中扮演更加重要的角色。运用 Cytoscape 软件构建出 SWT-H 提高人体免疫力的中药-成分-靶点-功能网络图。根据结果显示, 洋川芎内酯 A (Senkyunolide A)、洋川芎内酯 I (Senkyunolide I)、芍药苷 (Paeoniflorin)、3,3'-Z-6,7',7,6'-双藜蓁内酯 (3,3'-Z-6,7',7,6'-diligustilide) 等成分, 可能是 SWT-H 提高人体免疫力的核心成分。见图 2 及图 3。

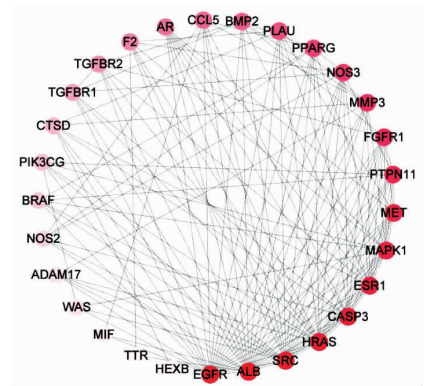


图 2 核心靶点的 PPI 网络图

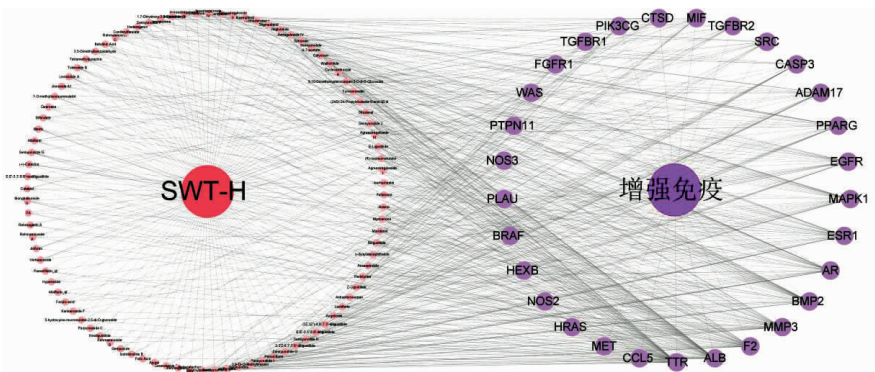


图 3 中药-成分-靶点-功能网络图

2.1.4 基因富集分析结果 (1)通路和生物学过程富集分析结果:通过 Metascope 平台对 29 种核心靶点进行 GO 通路和生物学过程分析^[5]。根据相关性降序排列,选取前 20 种条目。做出柱形图和网络图对结果进行数据可视化。其中,癌症相关通路(hsa05200;Pathways in cancer)、止血过程(R-HSA-109582;Hemostasis)、伤口愈合(GO:0042060;wound healing)、炎症、COX-2 和 EGFR 的关系(Relationship between inflammation)等条目与增强人体免疫力高

度相关。见图 4。(2)细胞功能富集分析结果 通过 Metascope 平台对 29 种核心靶点进行细胞功能富集分析,得到如下条目:肝脏 HEPG2 细胞(PGB:00002)、肝细胞(PGB:0007)、脾脏细胞(PGB:00011)、THY + 细胞(PGB:00047)、支气管上皮细胞(PGB:00081)、胎盘细胞(PGB:00045)、人脐静脉内皮 HUVEC 细胞(PGB:00031)。其中,脾脏细胞(PGB:00011)、THY⁺细胞(PGB:00047)等词条与提高人体免疫力高度相关。见图 5。

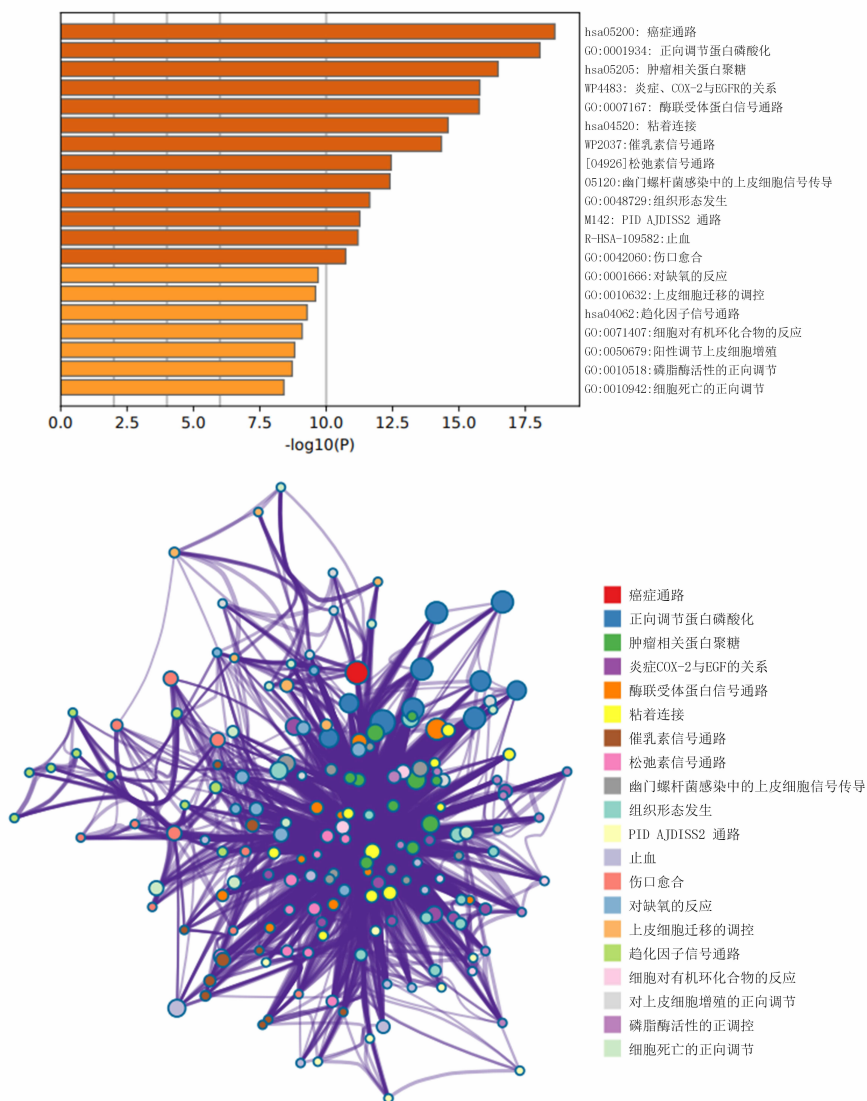


图 4 通路和生物学过程富集分析结果图

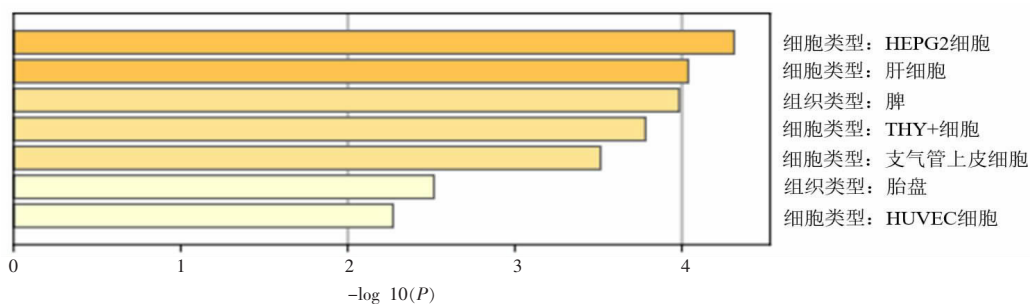


图 5 细胞功能富集分析结果

2.2 分子对接结果

根据分子对接结果,发现 SWT-H 所含有效成分洋川芎内酯 A 可与 MAPK1 的周围氨基酸残基 PHE (A:33)、THP (B:40)、TRP (B:41)、TRP (A:41)、HIS (B:90) 相互作用。SWT-H 所含有效成分黄芪甲

苷 (Astragaloside IV) 可与甲状腺素视黄质运载蛋白 (transthyretin, TTR) 的周围氨基酸残基 ALA (A:52)、VAL (A:39)、LYS (A:54)、CYS (A:166)、LEU (A:156) 相互作用,提示该两种有效成分与该两种关键靶点有着较强的结合能力。见图 6 及图 7。

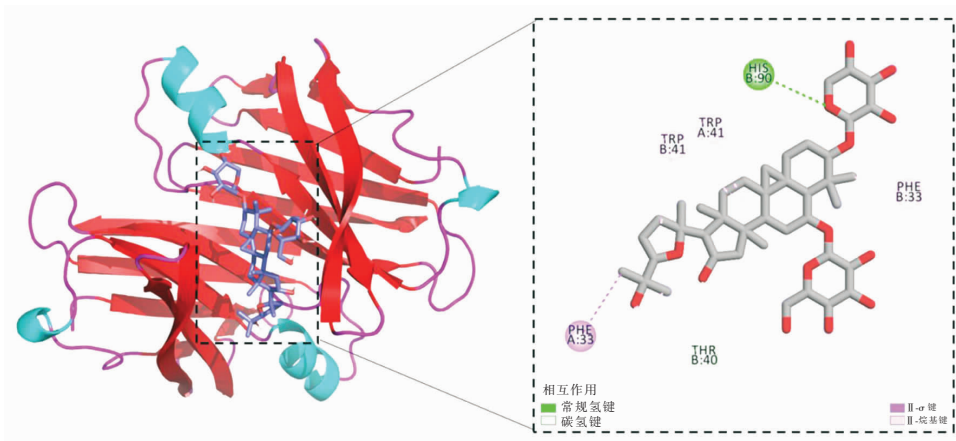


图 6 洋川芎内酯 A 与 MAPK1 作用情况

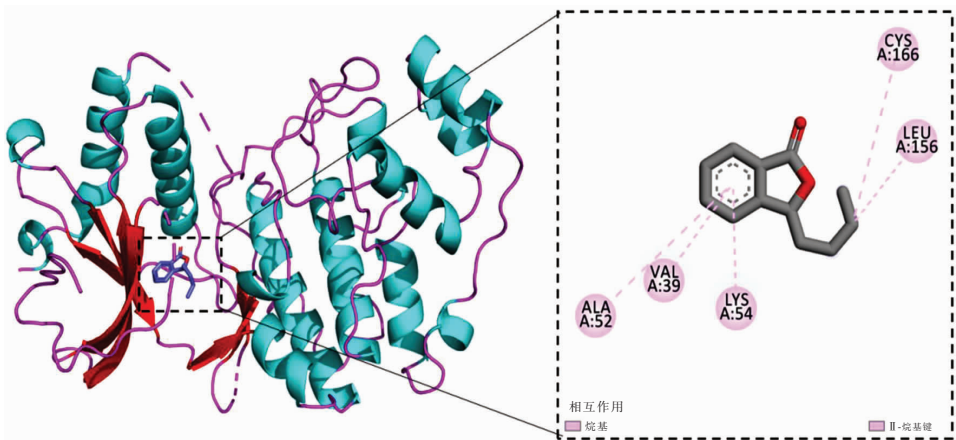


图 7 黄芪甲苷与 TTR 作用情况

3 讨论

近年来研究^[6]表明,中药在提高人体免疫力方面有良好的优势,但机制尚未完全被阐明。诱导型一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase inducible, NOS2) 是一种分布在人体全身的信使小分子,具有一定免疫调节功能。NO 在一定条件下生成活性氮 (reactive nitrogen species, RNS), RNS 会和活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 共同提供氧化还原化学反应釜,构筑成人体对抗外来病原体感染的首道防线^[7]。SWT-H 中所含的有效成分,如焦地黄内酯 (Jioglutolide) 可有效地靶向作用于 NOS2,推测其可通过影响多个器官内 NOS2 的表达,发挥调控 RNS 合成水平的作用,从而调节机体免疫功能。

巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是一种来源广泛的内分泌免疫

物质,可来源于机体免疫细胞和非免疫细胞,能够限制体内巨噬细胞的活动。通常情况下, MIF 在巨噬细胞内保持高表达,从而使巨噬细胞保持静息状态。在一定刺激下, MIF 可诱导巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α),并使 γ 干扰素 (IFN- γ) 诱导巨噬细胞产生 NO,从而增强巨噬细胞对感染的反应能力。除对巨噬细胞的控制作用外, MIF 还表现出促进 T 细胞的增殖的作用^[8]。网络药理学分析表明, SWT-H 所含多种有效成分,地黄苷 A (Rehmannioside A)、6-甲氧基当归素 (Sphondin)、焦地黄呋喃 (Jiofuran) 等,可靶向作用于 MIF,发挥调节机体内巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞的增殖、迁移等功能,从而调控机体的免疫功能。除 MIF 外,许多靶点通路参与影响 T 细胞的增殖。如丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路。MAPK 蛋白家族包括许多成员,其中 p38MAPK, 又称 MAPK14,

可促进 T 细胞增殖;特异性阻断 MAPK14 信号通路还可减少脾脏指数^[9-10]。网络药理学分析表明,SWT-H 含多种有效成分,如异黄芪皂苷 IV(Isoastragaloside IV)、洋川芎内酯 A(Senkyunolide A),可作用于 MAPK1;地黄苷 C(Rehmanioside C)、地黄素 D(Rehmaglutin D)可作用于 MAPK14,激活 MAPK 通路,发挥增强免疫的功能。分子对接结果表明,洋川芎内酯 A 与 MAPK1 有较好的结合能力,黄芪甲苷与 TTR 有较强作用力,同样也验证了网络药理学预测结果。除上述直接作用外,部分体内激素和营养物质对人体免疫力也起到关键作用,如甲状腺素、维生素 A 等。甲状腺激素参与免疫调节,在固有免疫和适应性免疫中发挥着重要作用^[11];维生素 A 可影响消化道微生物结构、修复屏障功能、改善黏膜免疫反应,从而减少肠道感染^[12]。这两种物质的水平均受到体内一种特殊转运蛋白,即甲状腺素视黄质运载蛋白(transthyretin, TTR)的调控。分子对接结果表明,SWT-H 所含有效成分黄芪甲苷与 TTR 有较好的结合能力,推测该有效成分可靶向激活 TTR,提高人体甲状腺激素和维生素 A 向重要器官的转运能力,从而增强人体免疫力。

综上,SWT-H 可通过如下几种潜在机制,提高人体免疫力:(1) Jioglutolide 调节 NOS2/NOS3 的表达水平,促进 RNS 合成,增强人体组织修复、对抗感染能力。(2)异黄 Isoastragaloside IV、Senkyunolide A 调控 MIF 在巨噬细胞内的表达,改善巨噬细胞功能,增强人体对抗病原能力。(3) Rehmanioside C、Rehmaglutin D 调控 MAPK、MIF 等相关靶点和通路,促进 T 细胞增殖。(4)黄芪甲苷靶向激活 TTR,提高体循环种甲状腺激素和维生素 A 的转运能力,从而增强人体免疫力。

参考文献

[1] 杨铁虹,贾敏,梅其炳. 当归多糖对小鼠免疫功能的调节作用

[J]. 中成药,2005,27(5):563-565.

- [2] Feng JC, Cai ZL, Zhang XP, *et al.* The effects of oral Rehmannia glutinosa polysaccharide administration on immune responses, antioxidant activity and resistance against *Aeromonas hydrophila* in the common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020,11:904.
- [3] 李树颖,秦雪梅,李科. 黄芪多糖免疫调节作用及其机制研究进展[J]. 山西医科大学学报,2019,50(5):157-161.
- [4] Liu XF, Ouyang SS, Yu B, *et al.* PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010,38(suppl_2):W609-W614.
- [5] Zhou YY, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):1-10.
- [6] Hoos MD, Vitek MP, Ridnour LA, *et al.* The impact of human and mouse differences in NOS2 gene expression on the brain's redox and immune environment[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2014,9(1):1-15.
- [7] Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, *et al.* Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011,89(6):873-891.
- [8] 梁婷,侯桂华. 巨噬细胞移动抑制因子研究进展[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册),2004,25(2):188-190.
- [9] 李覃,陈虹,白淑芳,等. 青蒿琥酯对迟发型超敏反应小鼠脾脏 T 淋巴细胞的免疫调节作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2012,16(5):843-846.
- [10] 胡燕,王小妹. MicroRNA-126 通过 IRS-1/AKT/ERK 调控 CD4⁺ T 细胞功能的分子机制研究[J]. 重庆医学,2020,49(2):178-182.
- [11] 滕方舟,魏颖,崔洁,等. 甲状腺激素对适应性免疫细胞的作用[J]. 现代生物医学进展,2022,22(5):994-1000.
- [12] Cantorna MT, Snyder L, Arora J. Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2019,54(2):184-192.

(收稿日期:2022-12-21

修回日期:2023-01-15)