

基于网络药理学探讨丹红注射液 成分-抗血栓靶点的相互作用*

李泮霖, 刘宏, 廖弈秋, 李沛波, 姚宏亮, 苏薇薇
(中山大学生命科学学院//广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心//
广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 采用 Surflex-Dock 分子对接方法, 探讨丹红注射液化学成分与抗血栓靶点间的相互作用, 利用 Cytoscape 软件构建丹红注射液活性成分-抗血栓靶点网络, 并通过 ClueGO 插件对靶点涉及的信号通路进行分析。丹红注射液中有 60 个成分与 106 个抗血栓作用靶点间存在 2 028 条关联。其中, 丹红注射液成分与 F2、F13A、SERPINC1、PGH2、ACE、REN、PLAU 和 PROC 等靶点密切相关, 这些靶点涉及凝血、纤溶、内皮功能、血管收缩舒张等多方面的信号通路; 与抗血栓靶点关联较多的成分为丹酚酸类。这为进一步阐明丹红注射液多成分、多靶点分子作用机制提供了依据。

关键词: 丹红注射液; 分子对接; 抗血栓; 成分; 靶点

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 04-0121-07

Interactions between Danhong Injection components and anti-thrombotic targets based on network pharmacology

LI Panlin, LIU Hong, LIAO Yiqiu, LI Peibo, YAO Hongliang, SU Weiwei

(Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation of Post-Marketed TCM//Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources//
School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The Surflex-Dock method was adopted to predict the compound-protein target association between Danhong Injection (DHI) components and anti-thrombotic activity related targets. The Cytoscape software was used to construct the DHI compound-target network, and the ClueGO plugin was used to analyze the signaling pathway of the targets. Through virtual screening, 2 028 interactions between 60 DHI components and 106 anti-thrombotic targets were obtained, and the compound-target network of DHI was established. The targets closely associated DHI components including F2, F13A, SERPINC1, PGH2, ACE, REN, PLAU and PROC, which were involved in the blood coagulation, fibrinolysis, endothelial function, vasoconstriction/dilation systems. The salvianolic acids showed more associations with anti-thrombotic targets indicating that they might be the main anti-thrombotic activity components in DHI. This study provides a basis for the further study of the multi-component and multi-target molecular mechanism of DHI.

Key words: Danhong Injection; molecular docking; anti-thrombotic; component; target

* 收稿日期: 2017-10-16

基金项目: 中山大学成果转化项目 (33000-18825004)

作者简介: 李泮霖 (1989 年生), 女; 研究方向: 中药学; E-mail: liplin3@mail.sysu.edu.cn

通信作者: 苏薇薇 (1959 年生), 女; 研究方向: 创新药物的研究开发、中药上市后质量与药效再评价;
E-mail: lssww@126.com

丹红注射液由丹参、红花两味药组成, 具有活血化瘀、通脉舒络的功效, 临床上用于瘀血闭阻所致的胸痹及中风, 冠心病、心绞痛、心肌梗塞, 瘀血型肺心病, 缺血性脑病、脑血栓。由其功能主治可以看出, 抗血栓作用是丹红注射液发挥药效的关键。现代研究表明, 在激光诱导的大鼠动脉血栓模型^[1]和大鼠急性血瘀模型^[2]中, 丹红注射液均显示出很好的抗血栓、溶栓作用; 对其相关的药理作用机制, 也进行了一些初步探讨^[3-4]。但是, 目前的研究仍仅关注单个或少数几个指标及蛋白的变化, 未能对其多成分多靶点作用机制进行解释。

网络药理学技术整合了化学、医学、生物数据, 使用计算模拟建立药理学性质预测模型, 为阐明中药复方制剂多成分、多靶点作用机制及其相应的药效物质基础提供了一种可行的方法^[5]。本研究采用 Surflex-Dock 分子对接方法, 研究丹红注射液化学成分与抗血栓靶点间的相互作用, 并建立其化学成分-靶点网络, 为阐明丹红注射液抗血栓作用的分子机制提供依据。本研究对于丰富丹红注射液的科学内涵, 指导其临床用药具有实际意义。

1 方法

1.1 化学成分

前期已采用 UFLC-PDA-Triple TOF-MS/MS 技术^[2], 确证及指证了丹红注射液中的 82 个化学成分, 并明确了各成分的药材归属。通过检索 NCBI PubChem 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) 及 Chemical Book 数据库 (<http://www.chemicalbook.com>), 获得各化学成分的分子结构, 其结构文件均储存为 mol 格式, 作为分子对接的配体。

1.2 抗血栓作用相关靶点数据库

前期已建立了抗血栓作用相关靶点数据库^[6], 该数据库由 115 个候选蛋白质靶点组成, 其 X 射线晶体结构从 RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) 中下载, 作为分子对接的受体。

1.3 分子对接

采用计算机模拟分子对接方法, 以蛋白质-配体复合物的晶体结构为中心, 参考缺省参数进行各化学成分与各候选蛋白靶点的分子模拟对接。以 Surflex-Dock 预测的分子受体和配体的最佳对接姿态的结合能作为评价参数, 将与每个分子配体 (各化学成分) 结合能大于 6 的分子受体 (各候选蛋白靶点) 作为阳性结果 (潜在靶点), 用于构建成分-靶点网络^[6]。

1.4 网络的构建与分析

利用 Cytoscape3.3.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 对计算结果进行可视化处理, 构建成成分-靶点网络。应用 Cytoscape 软件中的 ClueGO 插件, 对丹红注射液抗血栓作用相关靶点进行 KEGG 信号通路分析, 设定 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 丹红注射液成分与抗血栓作用相关靶点分子对接结果

将丹红注射液 82 个化学成分, 分别与抗血栓相关靶点数据库中的 115 个蛋白靶点进行分子对接, 结果表明: 丹红注射液中有 60 个成分与 106 个抗血栓作用靶点间存在 2 028 条关联 (表 1、表 2), 使用 Cytoscape 软件进行可视化处理, 构建了成分-靶点网络图 (图 1)。

从表 1 可以看出, 在与丹红注射液成分有关联的潜在靶点中, 与血栓形成关联密切的重要靶点排名均很靠前, 包括 F2 (凝血因子 II)、REN (肾素)、F13A (凝血因子 XIIIa)、PROC (蛋白 C-凝血因子 Va 及 VIIIa 抑制剂)、PGH2 (前列腺素 G/H 合酶 2)、ACE (血管紧张素转化酶)、PLAU (尿激酶型纤溶酶原激活物) 和 SERPINC1 (抗凝血酶) 等, 这些靶点分别涉及凝血、纤溶系统以及血管生成、收缩舒张等多个系统, 提示这些靶点是丹红注射液的主要药效靶点。

表 1 丹红注射液的潜在抗血栓作用靶点
(关联化合物数 ≥ 35)

Table 1 The potential anti-thrombotic targets of
Danhong Injection

编号	靶点	关联化合物个数
1	CDK	51
2	GSK3	45
3	PDE5A	45
4	REN	45
5	F2	43
6	HMGCR	43
7	PROC	43
8	F13A	42
9	MP2K	42
10	FOLH1	41
11	MK10	41
12	PDE4D	41
13	ACE	37
14	PDE4B	37
15	PGH2	36
16	PLAU	36
17	DPP4	35
18	SERPINC1	35

从表 2 可以看出，丹红注射液中丹酚酸类成分 是丹红注射液抗血栓作用的主要药效物质基础。与大多数血栓靶点均有较好的结合，表明丹酚酸类

表 2 丹红注射液的抗血栓活性成分
Table 2 The anti-thrombotic compounds in Danhong Injection

化合物编号 ¹⁾	化合物名称	关联靶点个数
52	丹酚酸 H, Salvianolic acid H	84
70	丹酚酸 A, Salvianolic acid A	75
50	丹酚酸 K, Salvianolic acid K	70
61	迷迭香酸, Rosmarinic acid	70
73	异丹酚酸 A, Isosalvianolic acid A	69
55	异红花苷, Isocarthamin	68
56	丹酚酸 D, Salvianolic acid D	67
53	丹酚酸 I, Salvianolic acid I	65
65	丹酚酸 E, Salvianolic acid E	63
76	丹酚酸 C, Salvianolic acid C	63
67	紫草酸乙酯, Ethyl lithospermate	60
62	紫草酸, Lithospermic acid	59
59	紫草酸甲酯, Monomethyl lithospermate	58
69	迷迭香酸甲酯, Romarinic acid methyl ester	57
66	丹酚酸 B, Salvianolic acid B	56
36	槲皮素 - 二葡萄糖苷, Quercetin-di-O-glucoside	52
46	6 - 羟基山柰酚 - 二葡萄糖苷, 6-Hydroxykaempferol-di-O-glucoside	50
51	山柰酚 - 二葡萄糖苷, Kaempferol-di-O-glucoside	49
31	6 - 羟基山柰酚 - 三葡萄糖苷, 6-Hydroxykaempferol-tri-O-glucoside	48
58	丹酚酸 G, Salvianolic acid G	47
54	异迷迭香酸苷, Salviaflaside	47
27	香豆酸 - O - 六碳糖苷, Coumaric acid-O-hexoside	46
74	异丹酚酸 C, Isosalvianolic acid C	44
77	Phenanthro [1, 2 - b] furan - 10, 11-dione, 1, 2, 6, 7, 8, 9-hexahydro-6-hydroxy-1, 6-dimethyl-	43
57	山柰酚-O-芸香糖苷, Kaempferol-O-rutinoside	41
20	色氨酸, Tryptophane	41
26	咖啡酸-O-六碳糖苷, Caffeic acid-O-hexoside	38
68	丹酚酸 L, Salvianolic acid L	37
60	Cartormin	37
25	原紫草酸, Prolithospermic acid	36
21	3, 4-二羟基苯基丙酸, 3, 4-Dihydroxybenzenepropionic acid	33
2	腺嘌呤, Adenine	32
16	丹参素, Danshensu	27
78	17-羟基隐丹参酮, 17-Hydroxycryptotanshinone	26
81	3-羟基隐丹参酮, 3-Hydroxycryptotanshinone	25
28	羟基红花黄色素 A, Hydroxysafflor yellow A	23
32	当药苷, Sweroside	23
9	龙船花苷, Ixoroside	22
23	腺苷, Adenosine	21
64	紫丁香苷, Syringin	21
30	莫诺苷, Morroniside	15
19	新绿原酸, Neochlorogenic acid	14
33	长寿花糖苷, Roseoside	14

续表 2

化合物编号 ¹⁾	化合物名称	关联靶点个数
63	9-Methyl lithospermate B	14
71	绿原酸, Chlorogenic acid	12
29	丹参二醇 A, Tanshindiol A	10
24	丹参素甲酯, Danshensu methyl ester	8
6	咖啡酸, Caffeic acid	7
12	4- (2-Carboxyethenyl) -2- (3, 4-dihydroxyphenyl) -2, 3-dihydro-7-hydroxy-3-methylester, [2 α , 3 β , 4 (E) -3-benzofurancarboxylic acid	6
13	阿魏酸, Ferulic acid	6
14	丹参二醇 B, Tanshindiol B	6
17	琥珀酸, Succinic acid	5
11	对羟基苯甲酸葡萄糖苷, p-Hydroxybenzoic acid-O-glucoside	4
44	5-羟甲基糠醛, 5-Hydroxymethyl furfural	4
22	苯丙氨酸, Phenylalanine	3
3	没食子酸, Gallic acid	2
18	原儿茶酸, Protocatechuic acid	2
38	香草酸, Vanillic acid	1
40	原儿茶醛, Protocatechualdehyde	1
41	对香豆酸, p-Coumaric acid	1

1) 化合物编号与文献 [2] 一致

同时, 通过 ClueGO 插件对丹红注射液抗血栓作用靶点涉及的 KEGG 信号通路进行分析, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 丹红注射液抗血栓作用靶点主要富集于 Complement and coagulation

cascades、cAMP signaling pathway、Calcium signaling pathway、Fluid shear stress and atherosclerosis、Renin-angiotensin system 信号通路等。

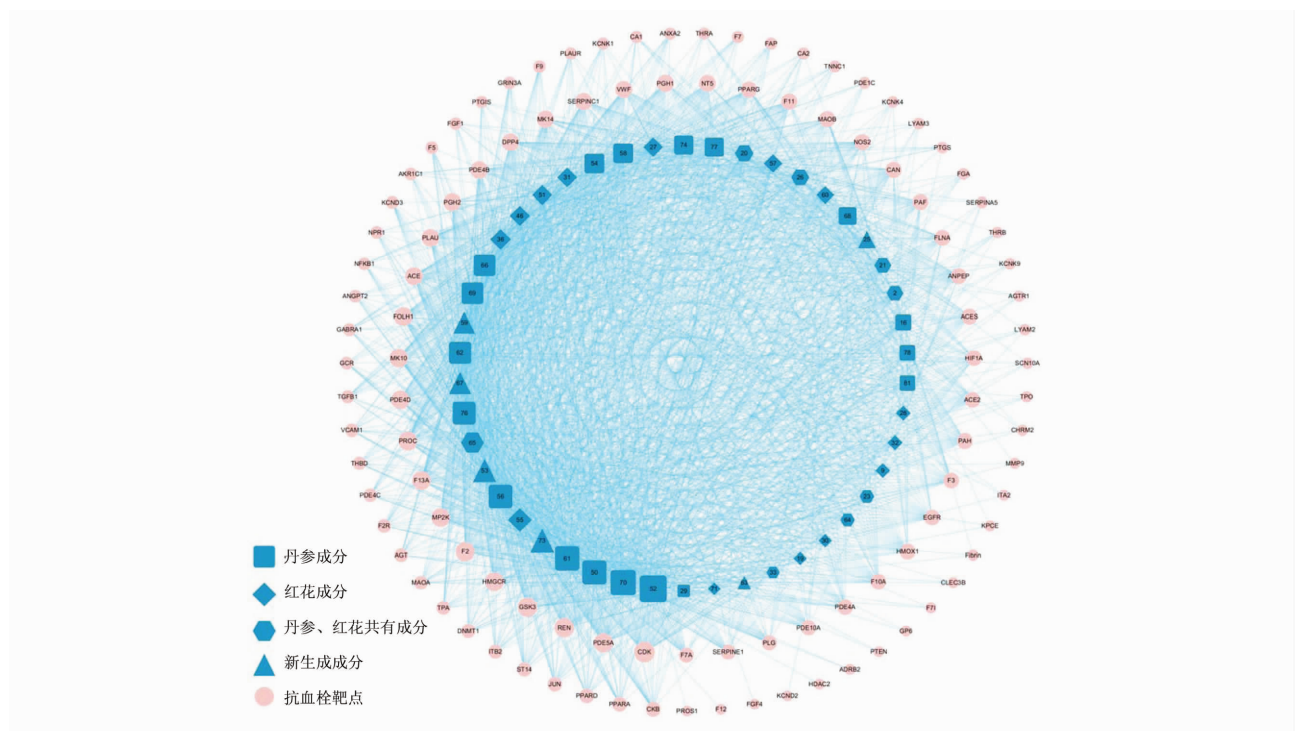


图 1 丹红注射液成分-抗血栓作用相关靶点网络图
(化合物编号对应的化合物名称见表 2)

Fig. 1 The compound-antithrombotic target network of Danhong Injection
(The compound name corresponding to the compound No. was showed in Table 2)

2.2 丹红注射液指纹图谱色谱峰的靶点分析

前期我们构建了丹红注射液生物活性指纹图谱^[2]，包括 13 个主要色谱峰，分别为 5-羟甲基糠醛 (1)、丹参素 (2)、原儿茶醛 (3)、羟基红花黄色素 A (4)、对香豆酸 (5)、丹酚酸 H (6)、

丹酚酸 I (7)、丹酚酸 D (8)、紫草酸甲酯 (9)、迷迭香酸 (10)、紫草酸 (11)、丹酚酸 B (12)、丹酚酸 A (13)。因此，对这 13 个色谱峰的相关靶点作进一步分析 (图 3)。

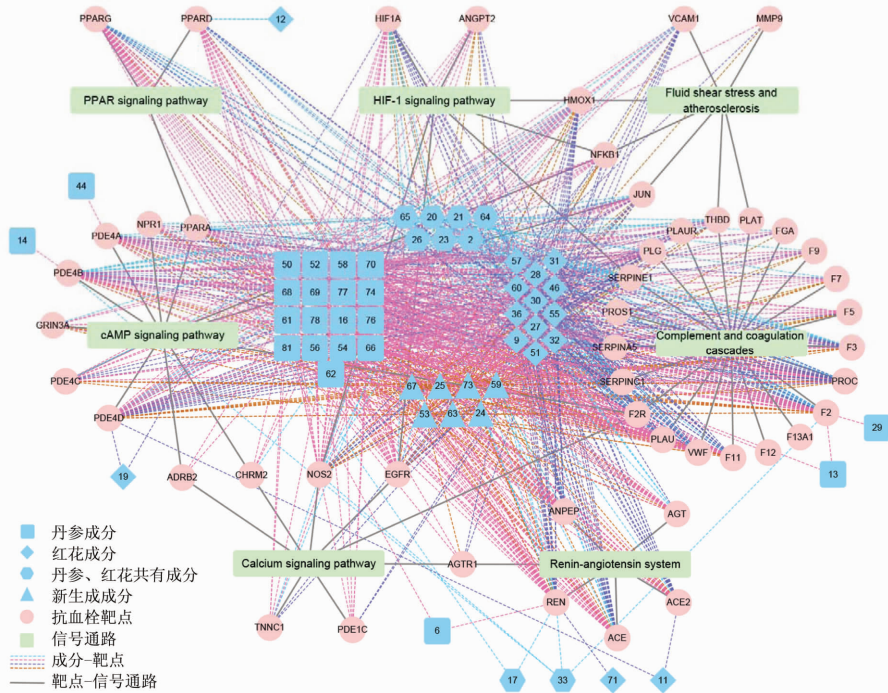


图 2 丹红注射液抗血栓作用的成分-靶点-信号通路网络 (化合物编号对应的化合物名称见表 2)

Fig. 2 The compound-antithrombotic target-signaling pathway network of Danhong Injection (The compound name corresponding to the compound No. was showed in Table 2)

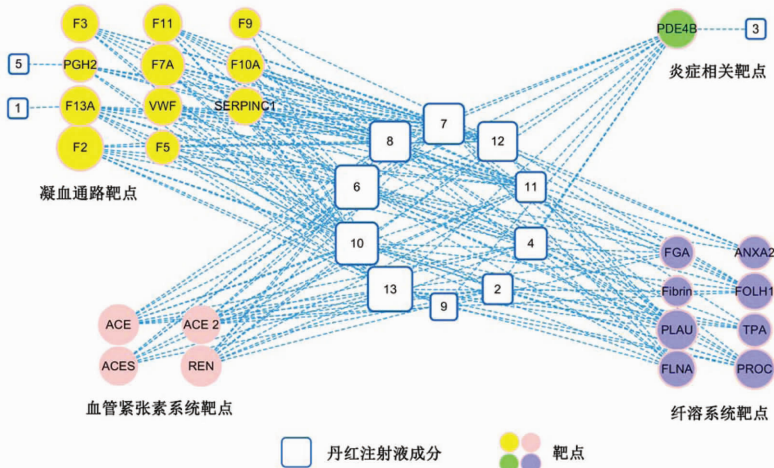


图 3 丹红注射液 13 个指纹图谱色谱峰的靶点分析

1: 5-羟甲基糠醛; 2: 丹参素; 3: 原儿茶醛; 4: 羟基红花黄色素 A; 5: 对香豆酸; 6: 丹酚酸 H; 7: 丹酚酸 I; 8: 丹酚酸 D; 9: 紫草酸甲酯; 10: 迷迭香酸; 11: 紫草酸; 12: 丹酚酸 B; 13: 丹酚酸 A

Fig. 3 The target analysis of 13 main compounds in Danhong Injection

1: 5-Hydroxymethyl furfural; 2: Danshensu; 3: Protocatechualdehyde; 4: Hydroxysafflor yellow A; 5: p-Coumaric acid; 6: Salvianolic acid H; 7: Salvianolic acid I; 8: Salvianolic acid D; 9: Monomethyl lithospermate; 10: rosmarinic acid; 11: Lithospermic acid; 12: Salvianolic acid B; 13: Salvianolic acid A

结果表明, 13 个色谱峰与凝血、纤溶系统以及血管生成、收缩舒张等多个系统的靶点具有相互关联。关联靶点较多的成分为丹酚酸 A (13)、迷迭香酸 (10)、丹酚酸 H (6)、丹酚酸 I (7)、丹酚酸 D (8)、丹酚酸 B (12); 而 5-羟甲基糠醛 (1)、原儿茶醛 (3)、对香豆酸 (5) 关联靶点个数较少, 说明其对抗血栓药效贡献较小。

3 讨论

通过本研究, 得出 106 个蛋白靶点与 60 个丹红成分间存在 2 028 个相互作用。其中, F2、F13A、SERPINC1、PGH2、ACE、REN、PLAU 和 PROC 是已知与血栓形成密切相关、且与丹红注射液化学成分有较强结合的靶点; 在抗血栓活性成分中, 丹酚酸类成分占主导地位。

F2、F13A 同为凝血因子, 通过外源性和内源性凝血途径的级联传递介导凝血酶原酶复合物的形成、凝血酶原的转变以及最终的凝血过程和血栓形成; 其中 F2 在整个过程中发挥着核心作用^[7]。SERPINC1 是血浆中最重要的抗凝物质之一, 可抑制 50% ~ 60% 的凝血酶和凝血因子 VIIa、IXa、Xa、XI、XIIa 的激活, 从而阻止血液凝固。PGH2 可以影响花生四烯酸诱导的血小板聚集和血栓形成^[8]。除了上述凝血和抗凝系统的关键靶点, 丹红注射液抗血栓作用的主要靶点还包括肾素-血管紧张素系统中的 REN 和 ACE, 与血压的稳定和调节直接相关^[9]。研究表明, ACE 作为 RAS 系统最主要的成员, 除介导血管平滑肌细胞收缩引起血压升高外, 还介导血管壁的慢性炎症反应, 进而参与动脉粥样硬化的发生与发展^[10]。此外, 丹红注射液还与纤溶系统的 PLAU 和 PROC 靶点关联密切。PLAU 作为纤溶酶原的激活剂, 通过激活 PLG (纤溶酶原) 为纤溶酶发挥溶栓作用。PROC 可同时作

用于抗凝系统及纤溶系统, 其被激活后, 在磷脂和 Ca^{2+} 存在时, 可灭活 FVa、FVIIIa; 阻碍 FXa 与血小板上的磷脂结合, 削弱 FXa 对凝血酶原的激活作用; 刺激纤溶酶原激活物释放, 增强纤溶酶活性, 促进纤维蛋白溶解^[11]。

靶点信号通路分析结果显示, 丹红注射液活性成分相关的作用靶点主要参与 Complement and coagulation cascades、cAMP signaling pathway、Calcium signaling pathway、Fluid shear stress and atherosclerosis、Renin-angiotensin system 等信号通路。这些通路涉及凝血功能、内皮功能、血管收缩舒张等多个方面, 共同维护机体血液循环系统的动态平衡, 抑制血栓形成或出血^[12]。丹红注射液同一成分或不同成分同时作用于多个通路的靶点, 也体现了中成药多成分、多靶点、综合调控的作用特点。

中药成分复杂, 单个成分在体内的浓度往往达不到其有效浓度^[13], 但在动物实验及临床中, 又可观察到较好的疗效。本研究中, 丹红注射液多个成分同时与凝血通路中的不同靶点相互作用, 可能由此引发凝血级联效应而发挥药效。整体药效到底是由于不同成分间的相互协同、加和还是拮抗, 尚有待进一步研究。

在丹红注射液指纹图谱 13 个主要色谱峰中, 丹参素 (2)、羟基红花黄色素 A (4)、对香豆酸 (5)、丹酚酸 I (7)、丹酚酸 D (8)、紫草酸甲酯 (9)、迷迭香酸 (10)、紫草酸 (11)、丹酚酸 B (12)、丹酚酸 A (13) 为核心活性成分群^[2]。本研究中, 网络药理学结果表明, 丹酚酸 A (13)、迷迭香酸 (10)、丹酚酸 H (6)、丹酚酸 I (7)、丹酚酸 D (8)、丹酚酸 B (12) 关联靶点较多。两种方法获得的丹红活血化瘀活性成分基本一致, 可以相互印证。本研究为进一步阐明丹红注射液多成分、多靶点分子作用机制提供了依据。

参考文献:

- [1] ZHAO Tiechan, CHANG Lianying, ZHANG Bo, et al. Specific combination of salvianolic acids as core active ingredients of Danhong Injection for treatment of arterial thrombosis and its derived dry gangrene[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 361.
- [2] LI Panlin, SU Weiwei, YUN Sha, et al. Toward a scientific understanding of the effectiveness, material basis and prescription compatibility of a Chinese herbal formula Dan-hong injection [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46266.
- [3] 范红晶, 李敏, 万海同, 等. 丹红注射液抗血栓药理作用的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(12): 2160-2164.
FAN Hongjing, LI Min, WAN Haitong, et al. Research progress on anti-thrombotic pharmacological action of Danhong injection [J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2015, 24(12): 2160-2164.
- [4] 常连赢, 朱彦, 高秀梅. 丹红注射液抗血栓作用研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2013, 32(4): 246-249.

- CHANG Lianying, ZHU Yan, GAO Xiumei, et al. Research progress on the anti-thrombotic effect of Danhong injection[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 24(12): 246-249.
- [5] LI Shao, ZHANG Bo. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(2): 110-20.
- [6] SHENG Shujing, WANG Jinxu, WANG Lirong, et al. Network pharmacology analyses of the antithrombotic pharmacological mechanism of Fufang Xueshuantong Capsule with experimental support using disseminated intravascular coagulation rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 154: 735-744.
- [7] TATSUMI K, OHASHI K, TAMINISHI S, et al. Effects on coagulation factor production following primary hepatomigen-induced direct hyperplasia[J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(42): 5307-5315.
- [8] 赵树铭. 前列腺素合酶-2的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1998, 19(3): 103-106.
- ZHAO Shuming. Progress in the study of prostaglandin synthase-2[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 1998, 19(3): 103-106.
- [9] PEREIRA R M, SANTOS R A S, DIAS F L C, et al. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liverfibrosis [J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(21): 2579-2586.
- [10] 王峥峥. “由瘀至虚”证慢性心衰大鼠表征与肾素-血管紧张素系统相关性研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- WANG Zhengzheng. The relation between the TCM syndrome characteristics in the symptom “From the Blood Stasis to the Deficiency Syndrome” of heart failure rats and the renin-angiotensin system[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [11] 林雪娟, 陈群, 莫传伟, 等. 心病血瘀证与纤溶系统活性的相关性[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(7): 867-869.
- LIN Xuejuan, CHEN Qun, MO Chuanwei, et al. Correlativity between blood-stasis syndrome in cardiopathy and activity of fi brinolytic system[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2009, 24(7): 867-869.
- [12] 毛江洪, 汪青山, 钮心怡, 等. 临床血液流变学的研究现状[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(5): 148-151.
- MAO Jianghong, WANG Qingshan, NIU Xinyi, et al. Research status of clinical hemorheology [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2013, 21(5): 148-151.
- [13] LI Xiuxue, DU Feifei, JIA Weiwei, et al. Simultaneous determination of eight Danshen polyphenols in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study of DanHong injection and Danshen injection [J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(7): 1470-1481.