

基于网络药理学探讨红核妇洁洗液 抗感染的作用机制*

饶鸿宇, 李沛波, 谌攀, 史志恒, 苏薇薇

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 / 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要: 采用网络药理学方法分析红核妇洁洗液在抗感染过程中发挥功效的潜在靶点和通路, 为红核妇洁洗液的机制研究提供参考。首先运用TCMSP、SwissTargetPrediction和CTD数据库检索得到红核洗液中92个化合物的潜在靶标, 再检索DisGeNET数据库获得感染性疾病相关靶点, 将两者整合去重, 得到与抗感染相关的交集靶点合计143个。构建药材-成分-靶点网络后, 采用Cytoscape研究该网络的拓扑结构, 明确红核妇洁洗液抗感染的关键化合物和潜在作用靶标, 主要涉及PARP1、PTGS1、ESR1、IDO1、NOS2、ALOX5、EGFR、PTGS2、HDAC6和JAK1等。将交集靶点导入David数据库进行分析, 发现红核洗液主要通过脂多糖介导的通路、TNF通路、TLR通路和NF-kappa B通路等发挥抗感染的功效。此外, 红核洗液中还能抑制病原菌入侵和繁殖、调节机体免疫应答、减轻炎症反应、缓解机体氧化应激损伤, 从而发挥抗感染的作用。

关键词: 红核妇洁洗液; 抗感染; 网络药理学

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2022) 03-0021-07

Discovery of the active ingredients and the mechanism of action for the effects of Honghe Fujie Lotion on infection based on network pharmacology methods

RAO Hongyu, LI Peibo, CHEN Pan, SHI Zhiheng, SU Weiwei

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

Abstract: The study aimed to explore the mechanism of anti-infection of Honghe Fujie Lotion (HHFJL) through network pharmacology, and provide a scientific reference for its clinical application. 92 compounds in HHFJL were identified by GC-MS in preliminary studies. The action targets were collected by TCMSP, Toxicogenomics Database (CTD) and SwissTargetPrediction, while the infection related targets were queried through DisGeNET database, and the "compound-disease" intersection targets were obtained using Venn Diagram. The herb- active ingredient- intersection target network was constructed and analyzed by Cytoscape. A total of 1 056 targets were collected for HHFJL, and 143 key targets were selected, such as PARP1, PTGS1, ESR1, IDO1, NOS2, ALOX5, EGFR, PTGS2, HDAC6, JAK1, and so on. The results from DAVID indicated that lipopolysaccharide-

* 收稿日期: 2020-07-31 录用日期: 2020-10-14 网络首发日期: 2021-05-20

作者简介: 饶鸿宇(1994年生), 男; 研究方向: 中药药理学; E-mail: raohongyu1205@163.com

通信作者: 苏薇薇(1959年生), 女; 研究方向: 创新药物研发、中药上市后质量与药效再评价;

E-mail: lssww@mail.sysu.edu.cn

mediated signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and TNF signaling pathway were the key pathways, which were involved in anti-infective therapies. HHFJL may show therapeutic effects on infection probably through inhibiting pathogenic, regulating immune function, alleviating inflammation and oxidative damage based on multi-target and multi-pathway.

Key words: Honghe Fujie Lotion; infection; network pharmacology

阴道感染,常表现为分泌物异常、瘙痒和异味等,是临床最常见的妇科疾病之一,降低了女性的生活质量。目前,临床治疗仍以抗生素为主,然而抗生素的长期应用增强了细菌的耐药性,容易诱导耐药菌的出现,另外抗菌药物的大量使用还会破坏阴道菌群稳态,导致疾病反复。传统中药经过长期的临床实践遴选,具有不良反应小、耐药率低等优势,具有良好的开发前景,但由于其作用机制尚不明确,限制了其应用。

红核妇洁洗液收录于《新药转正标准中药第33册》,是用山楂核制得的外用洗剂,多项研究发现其对白色念珠菌等生殖道致病菌均有良好的杀灭功效,可用于各种原因引起的女性阴道感染,还能用于预防产后感染和会阴伤口的消毒等^[1-5]。本团队研究了红核妇洁洗液的化学成分,发现了包括2,6-二甲氧基苯酚在内的多个具有良好抑菌活性的酚类化合物,但其他抗感染机制仍有待研究^[6-8]。

中药网络药理学整合了包括医学、化学和生物学在内的多方面数据,运用计算机技术建立预测模型,可以从分子、细胞、组织等多个层面预测药物的作用机制,更好地揭示中药的整体作用,为多组分中药的机制研究提供了新的方向^[9-12]。本研究基于网络药理学方法,首次探讨了红核妇洁洗液预防和治疗感染性疾病的作用机理,为红核妇洁洗液的临床应用提供了支撑。

1 方法

1.1 化学成分的收集

基于气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,本团队对红核妇洁洗液的物质组成进行了系统的研究,共确证和指认了包括酚类和醛酮类等在内的92个化合物,其中多个酚类化合物展现出了良好的抗菌活性,揭示了红核妇洁洗液的化学成分^[6-7]。

1.2 交集靶点的确定及药材-活性成分-交集靶点网络的构建

在DisGeNET(<http://www.disgenet.org/>)中对“infection”进行搜库,得到与感染性疾病相关的靶基因名,同时将红核妇洁洗液所有化合物的结构导入TCMSP(<http://tcmsp.com/>)、SwissTarget-Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和CTD(<https://ctdbase.org/>),明确红核妇洁洗液的全部潜在靶标基因^[8]。搜集两者的交集数据,并制作维恩图,明确红核妇洁洗液发挥抗感染功效的潜在靶基因。再运用Cytoscape3.7.2对上述相关的靶点和对应化合物进行网络可视化处理,同时研究该网络的特征。

1.3 交集靶点通路分析和功能分析

为进一步挖掘靶基因的功能,将“交集数据”导入DAVID v6.7(<https://david.ncifcrf.gov/>),选定研究目标为人种(homo sapiens),分析其通路信息(KEGG,kyoto encyclopedia of genes and genomes)和生物学功能(GO, gene ontology),阐明红核妇洁洗液的作用机制^[8]。

2 结果

2.1 成分收集和靶点筛选

从DisGeNET共获得491个抗感染相关的靶点,与搜集到的1056个红核妇洁洗液潜在作用靶点整合后,得到红核妇洁洗液抗感染的相关靶点143个(图1),用于后续网络构建。

2.2 网络分析

将药材-成分-靶点构建的网络图导入Cytoscape进行拓扑分析,发现该网络共有227个节点(包括84个成分和143个交集靶点),1170条边(图2)。在这些靶点中,Degree排名靠前的靶点依次为PARP1、PTGS1、ESR1、IDO1、NOS2、ALOX5、EGFR、PTGS2、HDAC6、JAK1、PTPRC、PIK3CA、TLR9、MIF和PTPN22,为红核妇洁洗液潜在的作用靶点。Degree排名靠前的成分依次是Eugenol(丁香酚)、2-methoxy-4-(1-propenyl)-Phenol(异丁香酚)、2-methoxy-Phenol(愈创木酚)、Catechol(邻苯二酚)和3-methyl-1,2-Benzenediol(3-甲氧基邻苯

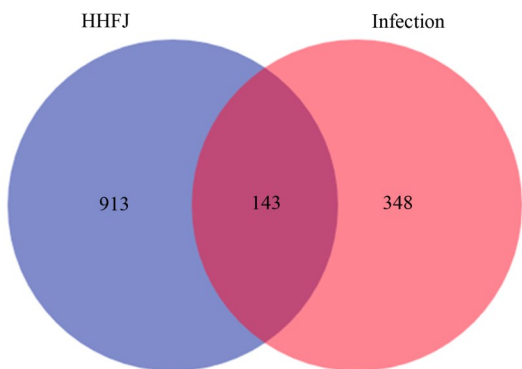


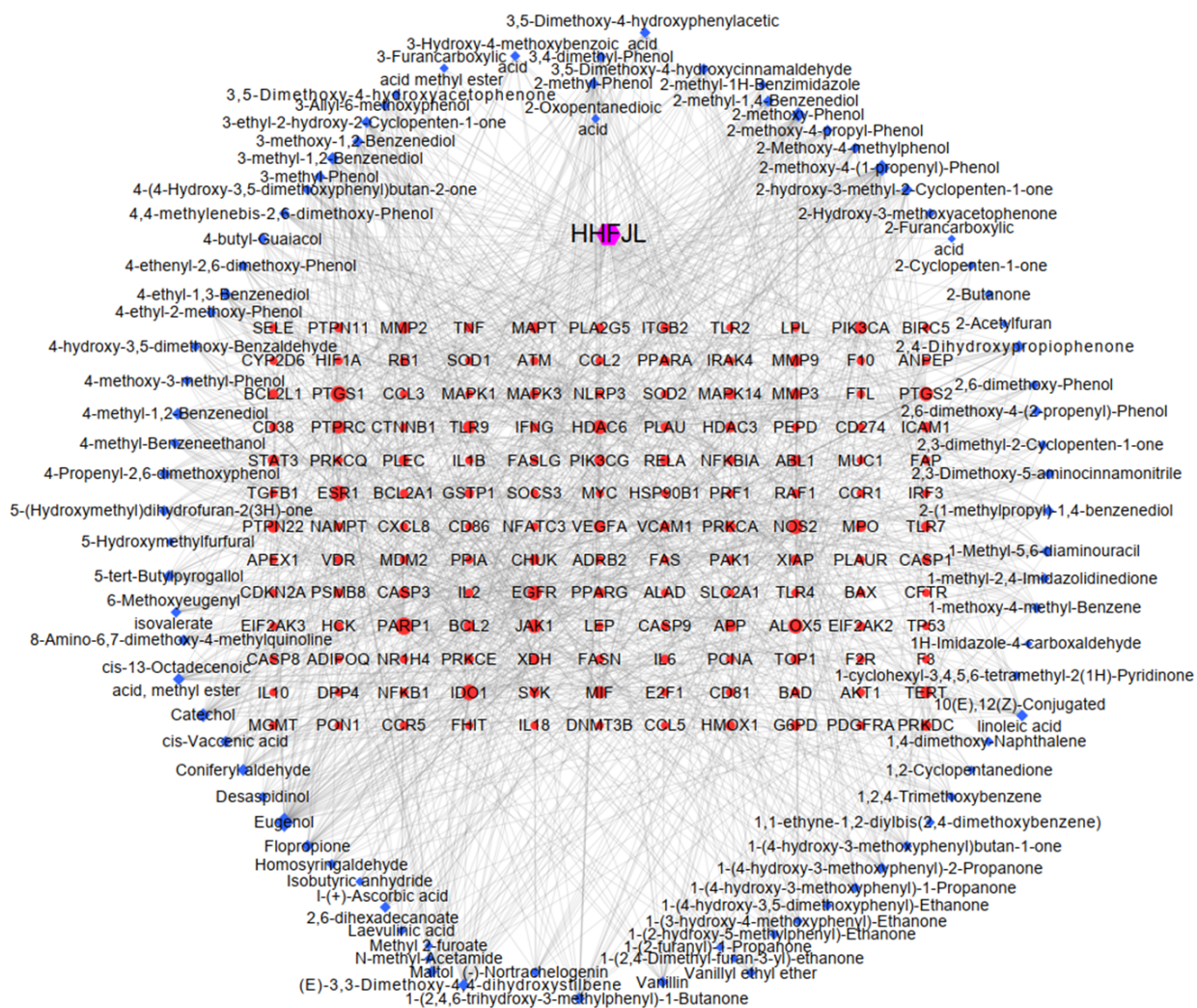
图 1 红核妇洁洗液成分潜在靶点与感染性疾病靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of HHFJL potential targets and infection disease targets

二酚), 是红核妇洁洗液发挥功效的潜在化合物。

2.3 交集靶点通路分析和功能分析

由图 3 可见, KEGG 分析 ($P < 0.05$) 共筛选出包括 TNF 信号通路、TLR 信号通路、NF-kappa B 信号通路和 NOD-like 受体信号通路等信号通路合计 107 条 (P 值越小, 富集程度越高)。GO 功能分析则关联到 715 个条目 ($P < 0.05$), 其中与脂多糖介导的信号通路、凋亡过程负调控、炎症反应、缺氧反应等生物过程相关的条目有 570 个, 与酶结合、蛋白质结合、转录因子结合等分子功能相关条目有 93 个, 与细胞质基质、细胞外空间、细胞表面等细胞组成相关条目有 52 个 (图 4)。



Purple hexagon, red circle, and blue square represents the drug, the key target, and the active constituent, respectively.

The size indicates nodes degree value.

图 2 药材-成分-交集靶点网络图

Fig. 2 The herb-component-key target network

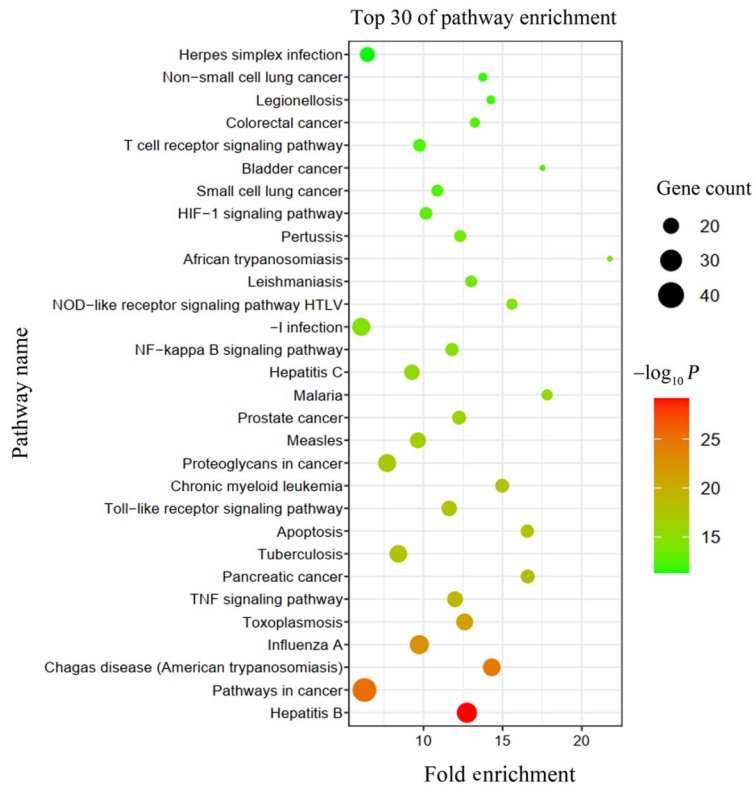


图3 红核妇洁洗液交集靶点KEGG通路富集分析结果

Fig. 3 Pathway enrichment analysis of the key targets

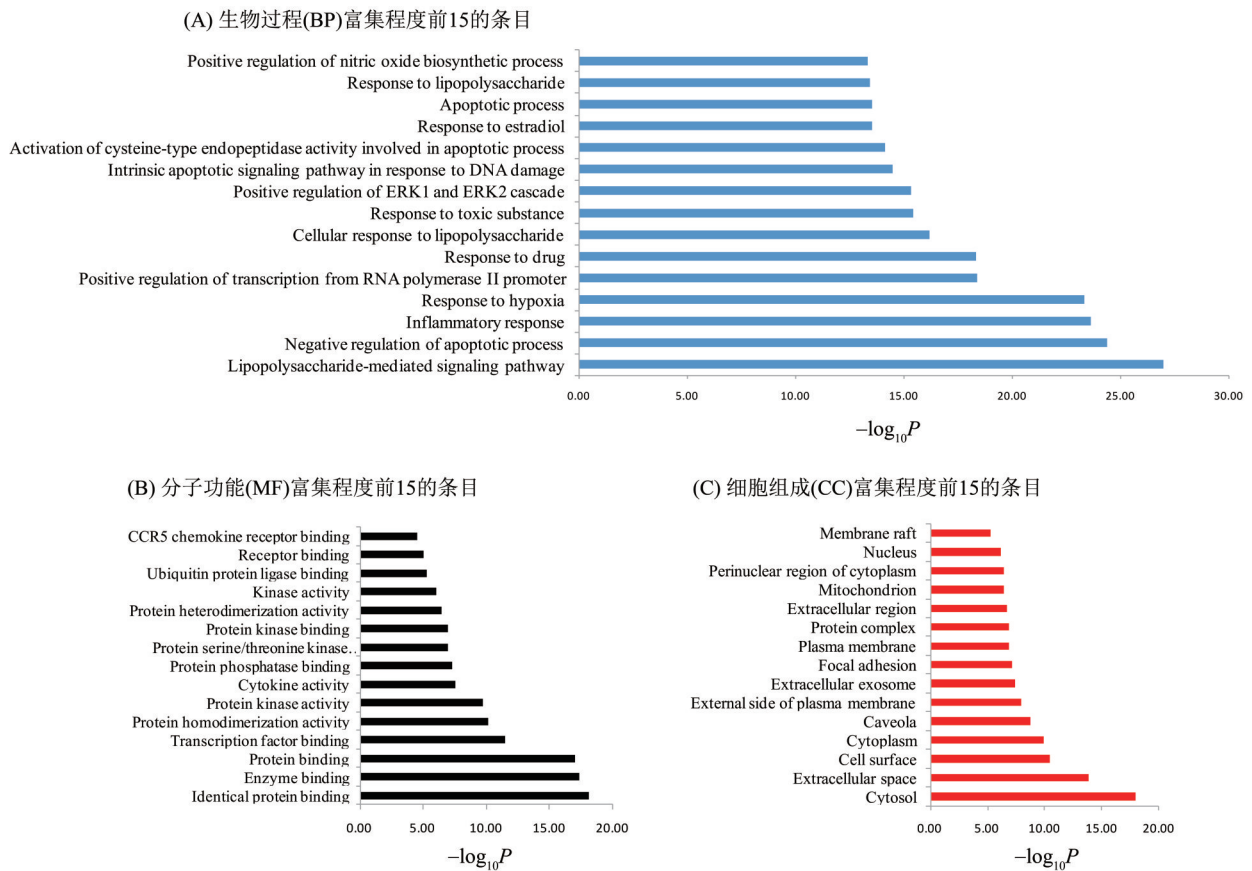


图4 红核妇洁洗液交集靶点GO富集分析结果

Fig. 4 GO enrichment analysis of the key targets

3 讨论

纵观人类疾病发展史, 感染性疾病是造成人类流行病的主要原因之一。随着青霉素的问世, 抗菌药在一线抗感染过程中一直扮演着十分重要的角色。然而抗菌药的大量使用加剧了细菌的耐药趋势, 部分菌株的耐药率已超过60%, 甚至出现了对多种抗生素都具有耐药性的“超级细菌”, 给公共医疗系统造成了巨大的负担^[13]。传统中药经过长期的临床实践遴选, 具有扎实的临床应用基础, 但其体外抑菌能力距离现代医学界定的抗感染药物标准尚存在着差距。由此可见, 传统的最小抑菌浓度评价体系在评估中药抗感染功效时存在局限性, 必须运用更加合理评判体系去分析中药的抗感染功效。

多项临床研究发现红核妇洁洗液可用于治疗需氧菌性阴道炎、霉菌性阴道炎、非特异性阴道炎和阴道瘙痒等多种妇科感染性疾病^[2-3]。体外研究数据则表明红核妇洁洗液原液能抑制红色毛癣菌、犬小孢子菌和念珠菌等多种皮肤浅表真菌的生长, 同时红核妇洁洗液中的2,6-二甲氧基苯酚和5-叔丁基邻苯三酚等物质还可以有效杀灭阴道加德纳氏菌、白色念珠菌和大肠杆菌等生殖道致病菌^[4-6]。由此可见, 红核妇洁洗液可抑制多种微生物的生长, 有利于感染性疾病的治疗和伤口的消毒等。

本研究采用网络药理学解析了红核洗液抗感染的有效成分, 发现在92个化合物中, 包括愈创木酚、2,6-二甲氧基苯酚和5-叔丁基邻苯三酚等64个化合物均与10个以上靶点相关, 其中排名最高的是丁香酚, 为55个。丁香酚可作用于细胞质膜表面, 影响细胞膜的通透性和流通性, 导致致病菌与宿主细胞的黏附减少, 降低病原菌的致病性, 还能影响细胞内容物的转运, 促进钾离子和ATP的流失; 此外, 丁香酚还能激活细胞内的活性氧, 诱导氧化应激, 促使细菌和真菌的细胞凋亡^[14-15]。Patricia等^[16]对酚类化合物的抗菌活性进行了系统研究, 发现愈创木酚对铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金葡菌等均展现出良好的抑制功效。Yang等^[17]发现2,6-二甲氧基苯酚具有良好的抗菌和抗氧化活性, 可应用于灭菌制剂的开发。杨梅等^[18]运用DPPH实验研究艾叶燃烧物的抗氧化活性, 结果发现其中的5-叔丁基邻苯三酚可以清除自由基, 具有良好的抗氧化能力。由此可见, 红核洗液中的丁香酚、愈创木酚和2,6-二甲氧基苯酚等在对抗

病原菌入侵、抑制病原菌生长和清除体内自由基等方面发挥了良好的功效, 可以减轻机体的感染症状。

在“成分-靶点”研究中, 本研究发现了红核妇洁洗液的潜在作用靶点中有43个靶基因与10个以上化合物相关, 占30.07%, 评分高低依次为PARP1、PTGS1、ESR1和IDO1等。PARP1是一种与DNA损伤和细胞凋亡密切相关的DNA修复酶, 诸多研究表明PARP1在病毒与宿主细胞结合过程中发挥着重要的作用^[19-20]。Wang等^[21]发现PARP1还可以抑制IRF1的转录, 影响Jurkat细胞对感染的免疫应答。PTGS是催化前列腺素合成的关键酶之一, 大量研究表明PTGS1(又名COX1)在机体炎症反应和免疫调节过程中扮演着十分重要的角色^[22-24]。ESR1可介导雌激素反应, 有研究发现ESR1的激活与ZIKV病毒的复制和登革热病毒诱导的细胞自噬具有一定的相关性^[25-26]。此外, Laura等^[27]发现ESR1还可以促进中性粒细胞迁移至阴道腔, 对抗白色念珠菌等致病菌的入侵, 降低阴道感染的风险。Noa等^[28]对沙眼衣原体感染进行研究, 发现IDO1可调节机体免疫反应, 且该调节作用不受干扰素分泌的影响。因此, 红核妇洁洗液可从抑制细菌、病毒感染和调节机体免疫功能等途径改善机体状态, 发挥抗感染作用。

在对红核妇洁洗液作用的靶基因分析过程中, 本研究发现包括脂多糖信号通路、NF-kappa B信号通路、炎症反应和缺氧反应等多个信号通路和生物过程可能与红核妇洁洗液的抗感染治疗密不可分。做为革兰氏阴性菌细胞壁重要的组成成分, 脂多糖可通过激活TLR4诱导免疫反应, 促进下游的NF-kB和IRF3等多条信号通路的活化, 加重机体的氧化应激和炎症反应^[29]。TNF家族是与炎症刺激紧密相连的细胞因子, 被激活的TNFR可以促进IL-1、IL-6和IL-10等细胞因子的释放, 还能激活与细胞凋亡相关的MAPK-JNK和NF-kB等多条信号通路, 激活磷脂酶A2和5-脂氧合酶等多个蛋白, 加重机体的炎症反应^[30]。有研究表明药物和细胞可通过影响LPS和TNF信号通路等, 降低TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等细胞因子的含量, 减轻炎症反应, 促进机体的恢复^[31-33]。与此同时, Yu等^[34]发现能量代谢异常可影响巨噬细胞分化, 加重机体感染症状。此外, Arnab等^[35]指出白色念珠菌等病原菌可通过调节局部免疫, 适应缺氧环境, 完成定植, 增加感染复发的风险。因此, 红

核妇洁洗液可通过减轻炎症反应和氧化应激,改善细胞缺氧等方面,促进感染患者的痊愈。

综上所述,红核妇洁洗液可通过多靶点多通路抑制病原菌的入侵和繁殖,还能调节免疫应答、

减轻炎症反应、缓解氧化应激损伤等,促进感染症状的消退和患者的痊愈。本研究剖析了红核妇洁洗液的作用靶点和信号通路,为红核妇洁洗液在治疗感染性疾病方面的应用提供了合理的解释。

参考文献:

- [1] 熊英,黄服喜. 红核妇洁洗液含量测定方法的改进[J]. 中国药品标准, 2005, 6(5):54-55.
- [2] 王鹤,韩学学,郎桂清,等. 红核妇洁洗液联合硝呋太尔制霉素阴道软胶囊治疗妊娠期霉菌性阴道炎的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2015, 15(3): 306-308.
- [3] 李秀兰,杨铭越,齐晓玲. 红核妇洁洗液预防阴式手术切口感染的临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(32):4130-4131.
- [4] 梅龙,林蓉,卢朝辉. 红核妇洁洗液体外抗菌实验研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2014, 15(2):145-147.
- [5] 靳真,姚凤,商晨旭,等. 红核妇洁洗液对白念珠菌生物膜及浅部真菌体外作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(16):1556-1560.
- [6] RAO H Y, LI P B, WU H, et al. Simultaneous determination of six compounds in destructive distillation extracts of hawthorn seed by GC-MS and evaluation of their antimicrobial activity [J]. *Molecules*, 2019, 24(23):4328.
- [7] 饶鸿宇,朱承科,彭维,等. 红核妇洁洗液化学物质基础研究[J]. 药学研究, 2020, 39(3):133-137.
- [8] 饶鸿宇,李沛波,谌攀,等. 基于网络药理学探讨红核妇洁洗液抗炎的活性成分和作用机制[J]. 药学研究, 2021, 40(1): 9-15.
- [9] 刘忠政,梁洁萍,聂怡初,等. 复方血栓通胶囊基于血液循环和凝血过程相关靶点的网络药理学研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2013, 52(2):97-100.
- [10] 李泮霖,苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [11] 李泮霖,刘宏,廖弈秋,等. 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[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2018, 57(4):121-127.
- [12] 刘梓燊,杨国旺. 基于网络药理学分析“黄芪-白术”治疗肺癌的作用机制[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2020, 59(5):134-143.
- [13] 程锦泉,刘少础. 超级细菌的警示与滥用抗生素潜在在公共卫生问题[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(12): 1521-1522.
- [14] MARCHESI A, BARBIERI R, COPPO E, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(6): 668-689.
- [15] BHATIA R, SHREAZ S, KHAN N, et al. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5):504-512.
- [16] FONTES PINHEIRO P, ALVES PARREIA MENINI L, CAMPOS BERNARDS P, et al. Semisynthetic phenol derivatives obtained from natural phenols: Antimicrobial activity and molecular properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(1):323-330.
- [17] KOCACALISKAN I, TALAN I, TERZI I. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi chinensis* [J]. *Molecules*, 2016, 21, 1150.
- [18] 杨梅,江丹,易筠,等. 艾叶燃烧物清除自由基作用的观察[J]. 中国针灸, 2009, 29(7):547-549.
- [19] WESTER L, JENNINGS M A, MAAMARY J, et al. Poly-ADP ribosyl polymerase 1 (PARP1) regulates influenza A virus polymerase [J]. *Advances in Virology*, 2019(18):1-11.
- [20] SHOU Q Y, FU H Y, HUANG X P, et al. PARP-1 controls NK cell recruitment to the site of viral infection [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(12):e121291.
- [21] WANG C, DU M, HUANG D, et al. Inhibition of PARP1 increases IRF-dependent gene transcription in Jurkat cells [J]. *Current Medical Science*, 2019, 39(3):356-362.
- [22] BLANCA LOPEZ N, SORIANO V, GARCIA MARTIN E, et al. NSAID-induced reactions: Classification, prevalence, impact, and management strategies [J]. *Journal of Asthma and Allergy*, 2019, 12: 217-233.
- [23] GIMENEZ G, BELAUNZARÁN M L, MAGALHÃES K G, et al. Involvement of TLR6 in the induction of COX-2, PGE2 and IL-10 in macrophages by lipids from virulent S2P and attenuated R1A *Babesia bovis* strains [J]. *Veterinary Parasitology*,

- 2016, 223:127-132.
- [24] HEMMAT N, BANNAZADEH BAGHI H. Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer [J]. *Pathogens and Disease*, 2019, 77(5): ftz048.
- [25] LASSO G, MAYER S V, WINKELMANN E R, et al. A structure-informed Atlas of human-virus interactions [J]. *Cell*, 2019, 178(6):1526-1541.
- [26] MANCHALA N R, DUNGDUNG R, TRIVEDI P, et al. Mycophenolic acid (MPA) modulates host cellular autophagy progression in sub genomic dengue virus-2 replicon cells [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137:103762.
- [27] SALINAS MUNOZ L, CAMPOS FERNANDEZ R, MERCADER E, et al. Estrogen receptor-alpha (ESR1) governs the lower female reproductive tract vulnerability to *Candida albicans* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:1033.
- [28] ZIKLO N, HUSTON W M, TAING K, et al. High expression of IDO1 and TGF- β 1 during recurrence and post infection clearance with Chlamydia trachomatis, are independent of host IFN- γ response [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1):218.
- [29] ROCHA D M, CALDAS A P, OLIVEIRA L L, et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 244:211-215.
- [30] CHU C Q. How much have we learnt about the TNF family of cytokines? [J]. *Cytokine*, 2018, 101: 1-3.
- [31] YADAV N, CHANDRA H. Modulation of alveolar macrophage innate response in proinflammatory-, pro-oxidant-, and infection- models by mint extract and chemical constituents: Role of MAPKs [J]. *Immunobiology*, 2018, 223(1):49-56.
- [32] LI Y H, ZHOU W H, TAO Y, et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016, 13(1):73-81.
- [33] LUAN H, ZHANG Q, WANG L, et al. OM85-BV induced the productions of IL-1 β , IL-6, and TNF- α via TLR4- and TLR2-mediated ERK1/2/NF- κ B pathway in RAW264.7 cells [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2014, 34(7): 526-536.
- [34] YU Q, WANG Y F, DONG L, et al. Regulations of glycolytic activities on macrophages functions in tumor and infectious inflammation [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10:287.
- [35] PRADHAN A, AVELAR G M, BAIN J M, et al. Hypoxia promotes immune evasion by triggering β -glucan masking on the *Candida albicans* cell surface via mitochondrial and cAMP-protein kinase a signaling [J]. *mBio*, 2018, 9(6):e01318-18.

(责任编辑 张冰)