

基于计算机辅助药物设计及网络药理学方法探究活络丸治疗骨关节炎的分子机制

张敏^{1a,2}, 邱璐^{1b}, 林佳^{1a,2}, 后叶虎^{1b}, 张慧娟^{1a,2}, 苟丽红^{1a,2}, 陶金正^{1c}, 姚娟^{1a,2}, 刘永琦^{1b,d*}, 靳晓杰^{1a,b*} (1.甘肃中医药大学, a.药学院, b.甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, c.临床医学院, d.敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000; 2.西北中藏药协同创新中心, 兰州 730000)

摘要: **目的** 基于骨关节炎的发病机制以及临床药物需求, 运用计算机辅助药物设计以及网络药理方法探究活络丸治疗骨关节炎的潜在药效成分及分子机制。**方法** 采用 TCMS、TCMID 和化学专业数据库检索活络丸中药化合物。多靶点分子对接、结合自由能计算逐级对化合物与骨关节炎治疗靶点 COX-2、5-LOX 以及凝血因子 F2 的亲合力进行评估, 对潜在活性化合物进行层次聚类及药效团模型的构建。利用 Swiss Target Prediction 预测化合物潜在靶点, Cytoscape 构建“药味-成分-潜在靶点”网络。GeneCards、DrugBank、TTD 和 CTD 检索骨关节炎疾病靶点。DAVID 进行 GO 和 KEGG 分析, STRING 分析蛋白相互作用。**结果** 分子对接及结合自由能计算获得了具有靶向 COX-2、5-LOX、F2 潜在亲和力的成分, 经层次聚类分析后构建药效团模型, 得到针对 COX-2、5-LOX 及 F2 的药效团模型 AAH、AAA、AAR。裂叶苣荬菜内酯、芦荟大黄素、光甘草定等化合物具有的骨架结构可能对治疗骨关节炎有潜在作用。活络丸与骨关节炎共有靶点 180 个, PPI 分析得到 STAT3、SRC、CXCR4、EP300 等潜在靶点 179 个, GO 和 KEGG 分析得到 GO 条目 686 个、KEGG 通路 108 条。**结论** 本研究选择花生四烯酸代谢靶点 COX-2、5-LOX 以及凝血靶点 F2, 通过多靶点分子对接和结合自由能计算逐级筛选、聚类分析、药效团模型及网络药理学等方法, 初步揭示活络丸“多点显效, 协同增效”的分子机制, 为具有潜在较低不良反应的骨关节炎活性中药组分或组分配伍的开发提供靶点组合和研究基础。

关键词: 骨关节炎; 活络丸; COX-2; 5-LOX; F2; 多靶点分子对接; 药效团模型; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)04-0450-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.004

引用本文: 张敏, 邱璐, 林佳, 等. 基于计算机辅助药物设计及网络药理学方法探究活络丸治疗骨关节炎的分子机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 450-460.

Explore the Molecular Mechanism of Treating Osteoarthritis with Huoluo Pill Based on Computer Aided Drug Design and Network Pharmacology

ZHANG Min^{1a,2}, QIU Lu^{1b}, LIN Jia^{1a,2}, HOU Yehu^{1b}, ZHANG Huijuan^{1a,2}, GOU Lihong^{1a,2}, TAO Jinzheng^{1c}, YAO Juan^{1a,2}, LIU Yongqi^{1b,d*}, JIN Xiaojie^{1a,b*} (1. Gansu University of Chinese Medicine, a. School of Pharmacy, b. Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, c. School of Clinical Medicine, d. Dunhuang Key Laboratory of Medicine and Transformation, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China; 2. Northwest Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the potential pharmacodynamic components and molecular mechanism of Huoluo pill in the treatment of osteoarthritis by using computer aided drug design and network pharmacology based on the pathogenesis of osteoarthritis and the need for clinical drugs. **METHODS** TCMS, TCMID and Chemistry database were used to search the traditional Chinese medicine compounds of Huoluo pill. The affinity of compounds for therapeutic targets of osteoarthritis such as COX-2, 5-LOX and coagulation factor F2 was evaluated by molecular docking and binding free energy calculations. The hierarchical clustering and pharmacophore model of potential active compounds were constructed. Swiss Target Prediction was used to predict the potential targets of compounds. Cytoscape constructed a network of “drug flavor-component-potential target”. Genecards, DrugBank, TTD and CTD databases were used to search for osteoarthritis targets. DAVID performed GO and KEGG analyses, and STRING analyzed the target protein interactions. **RESULTS** The components with potential affinity for therapeutic targets of osteoarthritis such as COX-2, 5-LOX and coagulation factor F2 were obtained. The pharmacophore model

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960823); 国家自然科学基金青年科学基金项目(82004202); 甘肃省高等学校科研项目(2017A-048); 甘肃省教育厅高等学校产业支撑计划项目(2020C-15)

作者简介: 张敏, 女, 硕士生 E-mail: zmandwww@163.com *通信作者: 靳晓杰, 男, 博士, 副教授 E-mail: jinlovedream@163.com
刘永琦, 男, 博士, 教授 E-mail: liuyongqi73@163.com.

was constructed after hierarchical cluster analysis, and the pharmacophore models AAH, AAA and AAR for COX-2, 5-LOX and F2 were obtained by molecular docking and binding free energy calculation. The skeleton structure represented by santamarine, aloe emodin and glabridin might had potential effect on the treatment of osteoarthritis. There were 180 targets in Huoluo pill and osteoarthritis. Through PPI analysis, 179 potential targets such as STAT3, SRC, CXCR4 and EP300 were obtained. Six hundred and eighty six GO items and one hundred and eight KEGG pathways were obtained through GO and KEGG analyses.

CONCLUSION In this study, arachidonic acid metabolic targets COX-2, 5-LOX and coagulation target F2 are selected. Through multi-target molecular docking and binding free energy calculation step by step screening, cluster analysis, pharmacophore model and network pharmacology, the molecular mechanism of “multi-point effect and synergistic effect” of Huoluo pill is preliminarily revealed. It provides target combination and research basis for the development of active Chinese medicine components or component compatibility with osteoarthritis with low potential adverse reactions.

KEYWORDS: osteoarthritis; Huoluo pill; COX-2; 5-LOX; F2; multi-target molecular docking; pharmacophore model; network pharmacology

骨关节炎是一种常见的慢性骨关节病^[1]。非甾体抗炎药是治疗骨关节炎最主要的药物，该类药物主要通过抑制花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢的关键酶环氧合酶(cyclooxygenase, COX)，达到抗炎止痛的效果。研究表明，AA 还可通过脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)代谢，生成白三烯等致炎物质^[2]。单一引入 COX 抑制剂无法减少炎症因子的产生，反而会刺激并增加 LOX 通路中炎症因子的释放，产生不良反应^[3]。针对 COX-2 与 5-LOX 2 个靶点同时进行抑制的药物，可能对于增加疗效，减少不良反应具有重要意义^[4]。

中医上认为骨关节炎属于“痹证”“骨痹”范畴。“骨痹”的内在病因为气血不足、肝肾亏虚，而外在病因为风、寒、湿三邪，瘀血阻络为本病的关键病机^[5]。活络丸由 52 味中药组成，方中蛇、蝎、羌活等祛风除湿；赤芍、乳香、没药等活血通络；人参、白术、熟地黄等补益气血，全方扶正祛邪并投，在中医临床上常用于骨关节炎的治疗^[6]。尽管活络丸对骨关节炎治疗起到重要作用，但目前缺乏对该方起效的分子机制研究，限制了其进一步开发。

本研究考虑到活络丸活血通络的治法，选择抗凝药物重要靶点凝血因子 II(coagulation factor IIa, F2)^[7-8]来阐释活络丸活血的物质基础。本研究基于骨关节炎关键病机及活络丸治则治法，选择炎症靶点 COX-2、5-LOX 以及凝血靶点 F2 作为探究活络丸“多点显效、协同增效”分子机制的靶点组合。利用多靶点分子对接和结合自由能计算逐级筛选、层次聚类、药效团模型以及网络药理学方法^[9-11]，对活络丸治疗骨关节炎的物质基础和分子机制进行探究。同时，挖掘活络丸中可通过“多点显效”的方式协同作用于 COX-2、5-LOX 阻断 AA 代谢的中药组分或配伍并挖掘其药效结构特征，为骨关节炎治疗的中药现代化开发提供靶点组合和结构

线索。

1 材料与方法

1.1 活络丸成分结构收集

通过 TCMSP^[12]、TCMID^[13]以及化学专业数据库收集活络丸中各药味的化合物成分，并通过文献查询补充各药味成分。全方共收集到化合物 3 066 个(去除重复化合物)，见表 1。该复方中朱砂为矿石药，其起效机制不在本研究讨论范围，故未纳入。

表 1 活络丸各药味成分数量统计

Tab. 1 Quantitative statistics of each flavor component of Huoluo pill

中药	化合物数量/个	中药	化合物数量/个
麻黄	365	白术	58
甘草	280	黄连	48
白芷	223	玄参	47
细辛	193	人工麝香	44
人参	191	茯苓	35
川芎	191	天竺黄	32
羌活	185	冰片	31
没药	176	铁丝威灵仙	27
防风	173	草豆蔻	27
黄芩	143	葛根	18
沉香	128	青皮	18
乌药	128	乌梢蛇	16
乳香	127	水牛角	16
当归	126	全蝎	12
赤芍	119	血竭	12
丁香	117	何首乌	12
木香	108	天麻	8
香附	104	松香	7
肉桂	102	竹节香附	5
广藿香	95	龟甲	5
大黄	92	牛黄	5
熟地黄	76	僵蚕	3
豆蔻	71	蕲蛇	1
骨碎补	71	豹骨	1
安息香	67	地龙	1
附子	65	朱砂	0

1.2 多靶点分子对接

PDB 数据库(www.rcsb.org)下载 COX-2(PDB ID: 5IKV)^[14]、5-LOX(PDB ID: 3V99)^[15]以及 F2(PDB ID: 3PO1)^[16]晶体结构作为多靶点虚拟筛选的靶标。使用 Schrödinger 软件的 PrepWiz 模块对受体进行预处理。使用 Glide 的标准精度方法进行分子对接。将“1.1”项下收集的化合物小分子结构用 LigPrep 进行处理,运用 MMFFs 力场得到相应的低能构象。Epik28 以 pH 值为 7.0±2.0 为条件分配电离状态并进行对接计算。

1.3 结合自由能计算及层次聚类分析

受体蛋白与配体的识别和相互作用过程遵守热力学第一定律,计算受体-配体之间的结合自由能对于评价药物分子的活性有重要的意义^[17-18]。本研究采用 Prime 程序中 MM-GBSA 方法进行结合自由能估算。公式: $DG_{\text{bind}} = E_{\text{complex}}(\text{minimized}) - E_{\text{ligand}}(\text{minimized}) - E_{\text{receptor}}(\text{minimized})$ 。采用化学信息学软件包 canvas 计算化学小分子化合物分子指纹,然后通过基于相似性矩阵的层次聚类方法对化合物结构属性进行聚类。

1.4 药效团模型构建

为了进一步分析不同靶点中药潜在活性成分的药效结构本质,本研究使用 Schrödinger 软件的 Phase 版块中的 Develop Common Pharmacophore Hypotheses 构建药效团模型,进行药效特征元素的分析。

1.5 活络丸活性成分的筛选及作用靶标反向预测

中医药通常通过调节多靶点、多通路来发挥作用,为了进一步预测和分析活络丸的其他潜在靶标及作用机制,本研究根据活络丸各药味化合物成分含量、相关生物功能,通过文献挖掘与整理获取已报道的活性成分。通过 TCMSP 依据口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 筛选活络丸中关键活性成分;通过 TCMID 和化学专业数据库利用 Lipinsk 规则^[19],即筛选类药分子的 5 条基本法则,分子量 <500 ;氢键给体数目 <10 ;氢键受体数目 <10 ;脂水分配系数 <5 ;可旋转键的数目 ≤ 10 进行筛选活络丸中关键活性成分。其中,已有文献报道具有治疗骨关节炎作用的化合物不经筛选直接纳入。利用 Swiss Target Prediction 预测活性成分作用靶点,并将概率值 >0 的靶标作为活性成分的潜在相关靶标蛋白^[20]。

1.6 活络丸治疗骨关节炎靶标分析

通过 GeneCards、TTD、DrugBank 和 CTD 等

数据库,以“osteoarthritis”为检索词收集与骨关节炎疾病相关的靶点基因。其中, GeneCards 数据库纳入 Relevance score ≥ 0.1 的靶点基因。对不同数据库搜集结果进行整合并删除重复靶点后,采用 FunRich 3.1.3 软件将“1.5”项下获得的活络丸活性成分作用靶点基因与骨关节炎疾病基因进行维恩分析,获取活络丸与骨关节炎疾病靶点的共有靶点,即为活络丸治疗骨关节炎潜在作用靶点。

1.7 活络丸治疗骨关节炎关键成分分析

基于活络丸治疗骨关节炎作用靶点,采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药味-成分-靶点”网络,建立可视网络拓扑图,并导出拓扑数据。中心性是生物网络中任意节点在整个网络中所在中心的程度。度值越大则节点的中心性越高。依据拓扑网络的中心性参数分析主要核心成分和关键靶点。

1.8 活络丸治疗骨关节炎潜在作用靶点生物功能和通路富集分析

生物学信息注释数据库 DAVID^[21]为大规模的基因及蛋白富集工具,能够找出最显著富集的生物学注释。将活络丸治疗骨关节炎潜在作用靶点导入 DAVID 数据库,Select identifier 设置为 official gene symbol, List type 设置为 gene list,限定物种为 Homo sapiens,阈值 $P<0.05$,进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。利用 Omicshare 在线分析平台进行富集通路可视化处理。

1.9 活络丸治疗骨关节炎潜在关键靶点分析

利用 STRING^[22]在线数据库对靶点的蛋白间相互作用(protein protein interaction, PPI)进行分析,将靶点信息导入 STRING 数据库,物种选择“Homo sapiens”,将 PPI 综合得分 >0.9 作为筛选条件从而得到靶点的 PPI 信息,最后将得到的 PPI 信息导入 Cytoscape 软件,得到 PPI 可视化网络图。

2 结果

2.1 靶点组合的确定

研究表明, COX-2 和 5-LOX 是催化 AA 转化为前列腺素的限速步骤的关键酶,在炎症过程中发挥着关键作用^[23];凝血因子 F2 是凝血级联反应中的关键酶,是抗凝血药物开发的重要靶点^[24],同时也通过激活蛋白酶激活受体在炎症中发挥重要作用^[25]。因此,本研究选择 COX-2、5-LOX 及 F2 作为多靶点分子对接靶标,以此来探索活络丸中潜在治疗骨关节的靶向活性成分,明确该方“协同增效”的分子机制。

2.1.1 分子对接靶点晶体结构的选择 不同的蛋白晶体结构对虚拟筛选的准确性有一定的影响, 因此在进行基于分子对接的虚拟筛选前, 蛋白晶体结构的选择十分重要。由于 COX-2 和 5-LOX 为热点靶标, 而对于凝血因子 F2 的晶体结构文献报道较少, 为保证对接结果的合理性, 本研究通过检索文献得到数个 F2 晶体结构, 并在 PDB 数据库中查询相关晶体结构信息。基于晶体复合物, 首先利用重对接法分别对其各自的“对接能力”进行计算, 以计算对接后的构象与原晶体复合物中的构象的均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)来判断各晶体结构的好坏, 结果见表 2, 以 RMSD 值<2Å 为重对接较优标准, 其中 PDB: 3PO1 对接能力最优。

利用 SPSS 软件, 通过 2 个独立样本 *t* 检验的方法对 3PO1 已知的活性小分子与非活性干扰物的“分辨能力”进行考察, 结果证明 2 组样本差异极显著($P<0.01$), 见表 3。

最后, 综合“对接能力”与“分辨能力”确定晶体结构 3PO1 为虚拟筛选的晶体结构。

表 3 2 个独立样本的 *t* 检验

Tab. 3 *T* test of two independent samples

项目	Levene 检验		平均值等同性 <i>t</i> 检验						
	<i>F</i>	显著性	<i>T</i>	自由度	Sig(双尾)	平均差值	标准误差	差值的 95%下限	置信区间上限
假定等方差	2.020	0.181	-4.012	12.000	0.002	-2.429	0.605	-3.748	-1.110
不假定等方差	-	-	-4.012	9.363	0.003	-2.429	0.605	-3.791	-1.113

表 4 活络丸不同靶点潜在活性化合物的分子对接打分值

Tab. 4 Molecular docking scores of potential active compounds at different targets of Huoluo pill

靶点名称	化合物	对接打分	靶点名称	化合物	对接打分
COX-2	甘草查尔酮	-10.66	5-LOX	槐黄烷酮 G	-7.18
COX-2	芦荟大黄素	-10.26	5-LOX	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde5-(hydroxymethyl)-1-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-	-7.08
COX-2	喘诺木烯内酯	-10.23	5-LOX	4-乙基间苯二酚	-7.02
COX-2	黄芩黄酮 II	-10.09	5-LOX	苯乙酮	-7.01
COX-2	Licoagrocarpin	-10.06	5-LOX	6-甲氧基柚皮素	-7.00
COX-2	蟲漆酸 D	-10.00	F2	甘草查尔酮 D	-9.04
COX-2	黄烷酮	-9.99	F2	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychalcone	-9.01
COX-2	黏毛黄芩素 II	-9.98	F2	鸢尾酚酮	-8.98
COX-2	裂叶莛茛菪内酯	-9.95	F2	柚皮素	-8.94
COX-2	Divaricatic acid	-9.93	F2	甘草素	-8.79
5-LOX	tetrapentylthioperoxydiphosphate	-7.98	F2	2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one	-8.77
5-LOX	香草乙酮	-7.58	F2	(S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	-8.74
5-LOX	苦参酮	-7.53	F2	(S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	-8.70
5-LOX	5-羟甲基-2-呋喃甲酸	-7.24	F2	Glycyrrhiza flavonol A	-8.64
5-LOX	5-羟甲基糠醛	-7.21	F2	新橙皮苷	-8.59

注: 以分子量<500, 氢键给体数目<5, 氢键受体数目<10, 脂水分系数<5, 可旋转键的数量≤10, 选取各靶点对接打分前 10 的化合物信息进行汇总。

Note: Molecular weight<500, hydrogen bond donors<5, hydrogen bond acceptors<10, lipid-water partition coefficient<5, number of rotatable bonds≤10 is the screening condition, and the information of the three targets first 10 points is selected to summarize.

表 2 F2 晶体结构经重对接计算所得 RMSD 值

Tab. 2 RMSD value of F2 crystal structure that calculated by re-docking

PDB 编码	分辨率/nm	配体	RMSD/Å
1A2C	2.10	TYS	2.98
1DWC	3.00	MIT	4.44
1KTS	2.40	C24	5.37
2BDY	1.61	UNB	1.85
3C1K	1.84	T15	3.22
3PO1	1.65	MKY	1.19
3SI4	1.27	B04	2.21

2.1.2 多靶点分子对接筛选靶向成分 选择炎症关键靶标 COX-2、5-LOX 及活血关键靶标 F2 的晶体结构, 对活络丸中的化合物成分进行多靶点分子对接研究, 筛选活络丸中对成药性靶点具有潜在靶向能力的成分, 各靶点对接打分前十的结果, 见表 4。

2.2 结合自由能计算及聚类分析

通过结合自由能的计算, 进一步揭示各靶点与化合物之间准确的相互作用。基于多靶点分子

对接结果,选择各靶点对接打分值<-5的化合物进行结合自由能计算。结合自由能为负值,表明有利于化合物与靶点结合。各靶点结合自由能分数排名前10的结果,见表5。

综合分子对接打分值及结合自由能结果,每个靶点选择30个化合物,以化学信息学计算获得的结构指纹为分类依据进行层次聚类分析。针对靶点COX-2得到10类结构;靶点5-LOX得到4类结构;靶点F2得到4类结构。聚类结果见图2。

2.3 药效团模型构建

聚类分析得到了化学结构有差异的成分可能具有类似活性,而药效团模型可以基于不同结构的化合物,进行药效特征元素的分析,得到共同的药效特征元素^[26]。本研究分别选择靶点COX-2、

5-LOX、F2 聚类结果中每一类代表性化合物的结构作为构建药效团模型的训练集。以 Survival 分数作为评价参数得到了针对 COX-2 的药效特征AAH(图 3A);针对 5-LOX 的药效特征 AAA(图 3B);针对 F2 的药效特征 AAR(图 3C)。其中, A 为氢键受体, H 为疏水中心, R 为芳环中心。

2.4 靶向潜在活性化合物结合模式分析

为了进一步明确化合物与药物靶点之间的结合模式,选择具有共同药效特征且结构类别不同的化合物与各靶点进行结合模式分析。靶蛋白COX-2 与化合物裂叶芭莢菜内酯、furanoeudesma-1,4-diene-6-one 结合模式见图 4A、B。裂叶芭莢菜内酯与 furanoeudesma-1,4-diene-6-one 结构中的羰基氧原子均与残基 Ser530 之间形成氢键作用力,并

表 5 活络丸不同靶点潜在活性化合物的结合自由能分数
Tab. 5 Binding free energy of potential active compounds at different targets of Huoluo pill

靶点名称	化合物	结合自由能分数/ kcal·mol ⁻¹	靶点名称	化合物	结合自由能分数/ kcal·mol ⁻¹
COX-2	维生素 A 醛	-99.96	5-LOX	补骨脂乙素	-55.24
COX-2	裂叶芭莢菜内酯	-92.36	5-LOX	1,7-diphenyl-5-hydroxy-6-hepten-3-one	-53.06
COX-2	芦荟大黄素	-91.51	5-LOX	芦荟大黄素	-51.04
COX-2	黄芩黄酮	-89.68	5-LOX	没食子酰芍药苷	-50.91
COX-2	喘诺木烯内酯	-88.95	5-LOX	甘草芳香豆素	-48.38
COX-2	黄芩黄酮 I	-87.69	F2	去氢-二香素	-68.28
COX-2	黏毛黄芩素 II	-87.61	F2	新橙皮苷	-66.11
COX-2	绒毛乳菇醛	-87.43	F2	2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基查尔酮	-60.62
COX-2	5-羟基-7,8-二甲氧基黄酮	-87.38	F2	去氢粗毛甘草素 C	-60.51
COX-2	梓醇	-87.07	F2	黄甘草异黄酮 A	-59.89
5-LOX	格里西轮	-67.22	F2	氧化芍药苷	-58.25
5-LOX	芍药苷 4 乙基醚	-63.65	F2	6-prenylated-eriodictyol	-56.75
5-LOX	Ent-abyssinone II	-61.29	F2	(S)-柚皮素	56.60
5-LOX	羌活醇	-59.91	F2	sigmoidin B	-55.83
5-LOX	3-羟基光甘草酚	-55.48	F2	圣草酚	-55.23

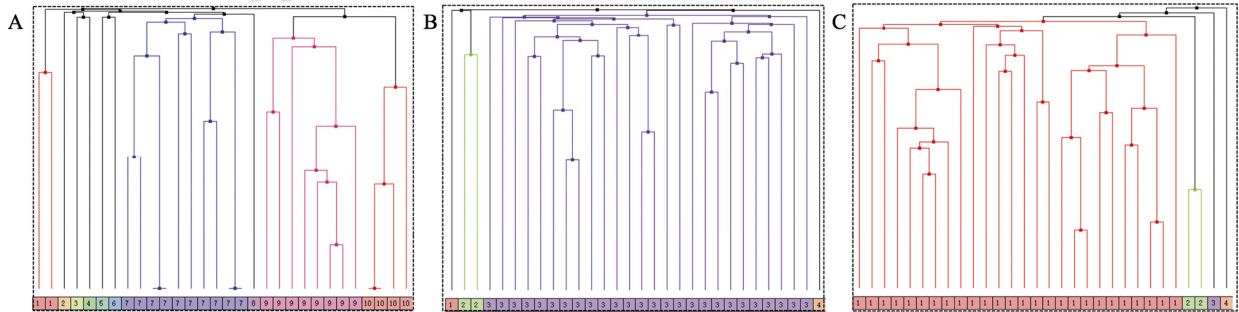


图 2 聚类分析树状图
A-COX-2 代表性化合物聚类分析树状图; B-5-LOX 代表性化合物聚类分析树状图; C-F2 代表性化合物聚类分析树状图。

Fig. 2 Cluster analysis tree chart
A-the cluster analysis tree diagram of COX-2 representative compounds; B-the cluster analysis tree diagram of 5-LOX representative compounds; C-the cluster analysis tree diagram of F2 representative compounds.

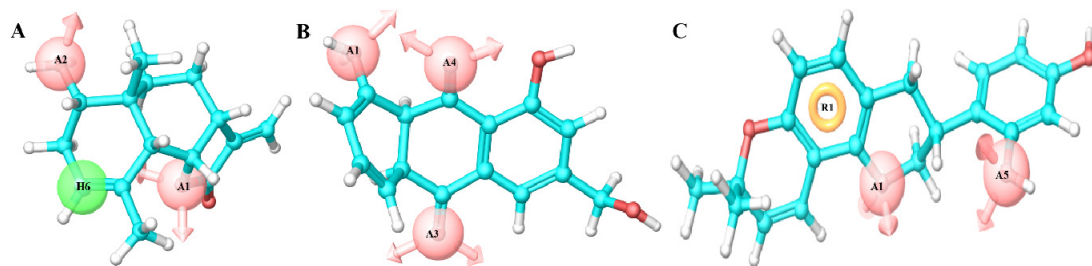


图3 药效团模型

A-COX-2 药效团模型；B-5-LOX 药效团模型；C-F2 药效团模型。

Fig. 3 Pharmacophore model

A-pharmacophore model of COX-2; B-pharmacophore model of 5-LOX; C-pharmacophore model of F2.

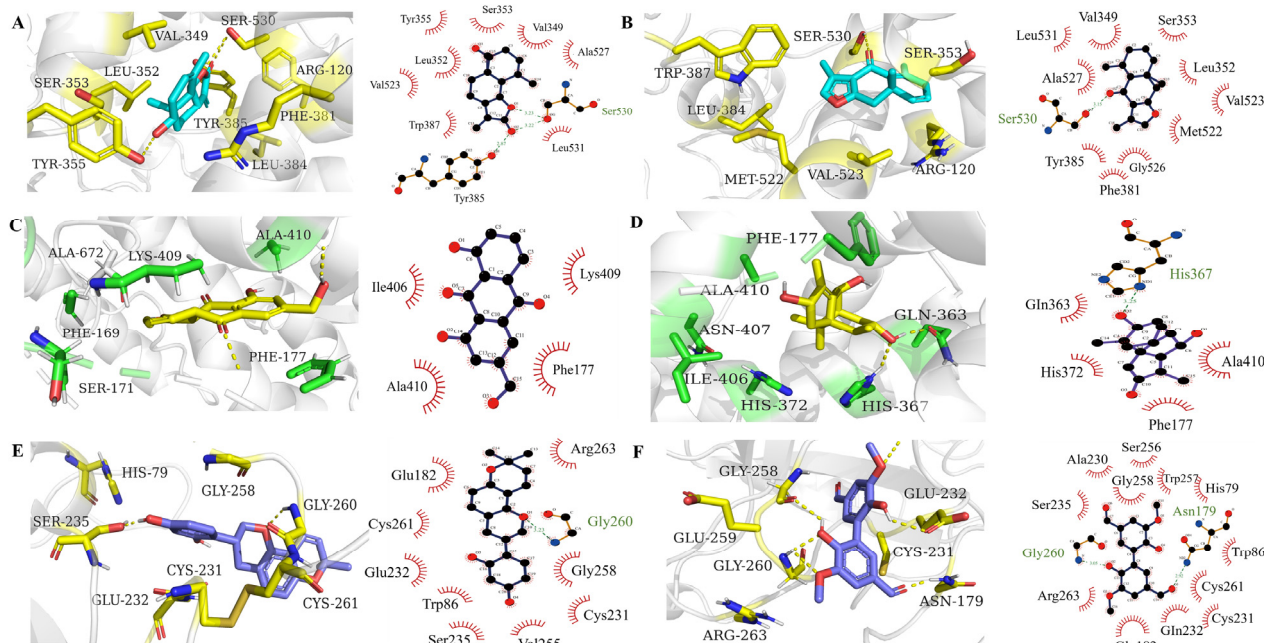


图4 代表性化合物与 COX-2、5-LOX、F2 结合模式图

A、B-分别为化合物裂叶莪荖萜内酯、furanoeudesma-1,4-diene-6-one 与 COX-2 相互作用；C、D-分别为化合物芦荟大黄素、苏葛三醇与 5-LOX 相互作用；E、F-分别为化合物光甘草定、去氢-二香兰素与 F2 相互作用。

Fig. 4 Representative compound- COX-2, 5-LOX, F2 binding pattern

A, B-interaction effect between santamarine, furanoeudesma-1,4-diene-6-one and COX-2; C, D-interaction effect between alopecurin, suetrol and 5-LOX; E, F-interaction effect between glabridin, divanillin and F2.

且二者占据着相似的空间口袋。靶蛋白 5-LOX 与化合物芦荟大黄素、苏葛三醇结合模式见图 4C、D，芦荟大黄素和苏葛三醇均与残基 Ala410、Phe177 形成疏水作用力，均位于疏水性空腔内。靶蛋白 F2 与化合物光甘草定、去氢-二香兰素结合模式见图 4E、F，光甘草定和去氢-二香兰素主要通过疏水作用力与 F2 蛋白相互作用，并且二者结构中的氧原子均与残基 Gly260 形成氢键作用力。通过药效团模型及结合模式分析表明，针对同一靶点，不同结构类型的中药成分具有共同的药效结构特征，并且有相似的结合模式和空间匹配。

2.5 活络丸治疗骨关节炎潜在作用靶点预测

本研究筛选获得了活络丸中 680 个活性成分，

基于 Swiss target prediction 预测类药性成分的作用靶点，删除重复项，共获得类药性成分作用靶点 1470 个。以“osteoarthritis”为关键词，共检索到骨关节炎疾病药物靶点734个。将活络丸中活性成分作用靶点与骨关节炎疾病进行维恩分析，获得活络丸与骨关节炎共有靶点 179 个。

2.6 活络丸治疗骨关节炎关键成分及关键靶点分析

“药味-化合物-靶点”网络共包括 731 个节点，菱形节点代表药味，长方形节点代表活络丸主要活性化合物，倒三角节点代表潜在靶点，见图 5。通过分析网络图中化合物及靶点的度值发现，排名前 10 位的化合物分别为 4-乙氧基甲基苯基-4-羟基

甲基酯、五味子酯乙、怪柳黄素、番泻苷 D、6-prenylated eriodictyol、kansonols W、glyuranolide、槲皮素、汉黄芩素以及 2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol。研究表明,槲皮素对于骨关节炎的预防和早期治疗有效^[27];汉黄芩素可通过有效抑制 IL-1 β 刺激的骨关节炎软骨细胞的凋亡通路,表现出保护软骨作用^[28]。排名前 10 的靶点分别是 ESR1、CA2、PTGS2、ALOX5、PTGS1、MMP2、NOS2、MMP9、PPARG、MMP13。其中,ESR1 基因多态性与膝骨关节炎发病有一定联系,ESR1 基因突变可能会增加膝骨关节炎患病风险^[29];PTGS2 过表达时将导致骨关节炎滑膜细胞的迁移和侵袭增加^[30];NOS2 的改变是骨关节炎发生、发展的重要介导因素^[31];PPARG 可以通过诱导软骨细胞自噬来维持细胞活力^[32]。

通过 STRING 平台分析获得靶标 PPI 网络图,见图 6。图中有节点 141 个、边 1 130 条。每条边表示各作用靶点之间的相互作用关系,颜色越深

且节点越大表示该节点对应的作用靶点越重要。对 PPI 网络进行拓扑分析能够得到该网络中的枢纽蛋白。拓扑网络中度值前 10 的靶点见表 6。其中,STAT3 在肢体骨骼发育的多个方面都是必不可少的^[33];在骨关节炎等疾病中 SRC 对软骨细胞表型的维持方面有重要作用^[34];EP300 可以增加软骨细胞的自噬^[35]。

2.7 活络丸治疗骨关节炎潜在靶点生物过程与通路富集分析

使用 DAVID 网站对活络丸与骨关节炎疾病共同靶点进行 GO 富集分析,得到了 $P<0.05$ 的 GO 条目共计 686 个,其中包含生物过程条目 538 个,细胞组成条目 66 个,分子功能条目 92 个。在生物过程层面,预测靶点主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子的转录负调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、信号转导(signal transduction)、炎症应答(inflammatory response)、凋亡过程负调控(negative regulation of apoptotic process)以及细胞增殖的正调控(positive

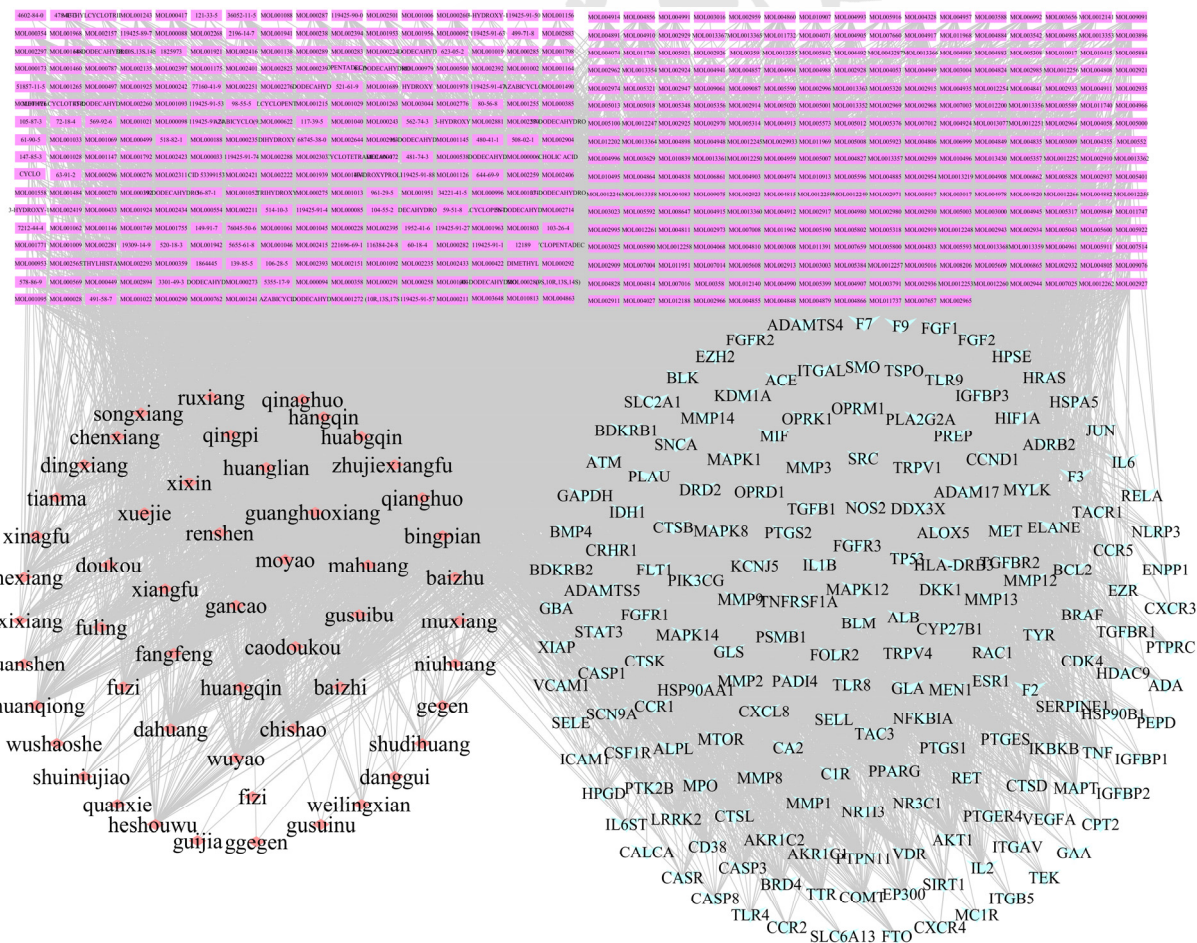


图 5 活络丸治疗骨关节炎的“药味-化合物-潜在靶点”网络

Fig. 5 Drug-compound-target network of Huoluo pill for treatment of osteoarthritis

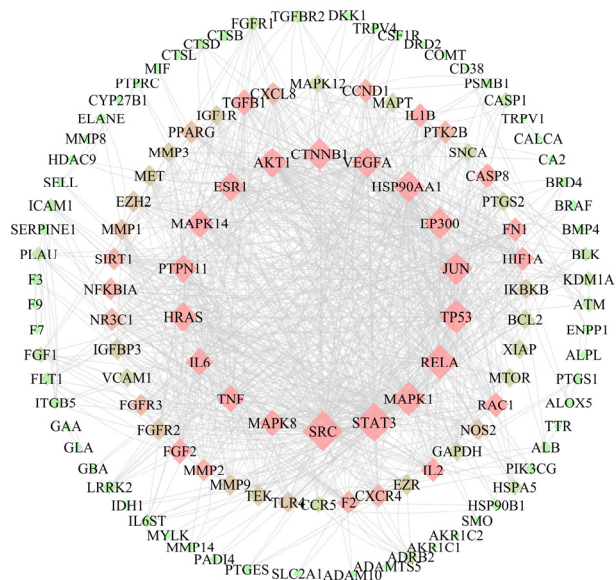


图 6 活络丸与骨关节炎疾病共同靶点 PPI 网络
Fig. 6 PPI network of key targets of Huoluo pill and osteoarthritis

regulation of cell proliferation)等;在细胞组成层面,细胞质膜(plasma membrane)、细胞质(cytoplasm)和细胞核(nucleus)所占比例较大;在分子功能层面,与蛋白结合(protein binding)关系尤为紧密。各类别前 20 的 GO 分析见图 7A~C。

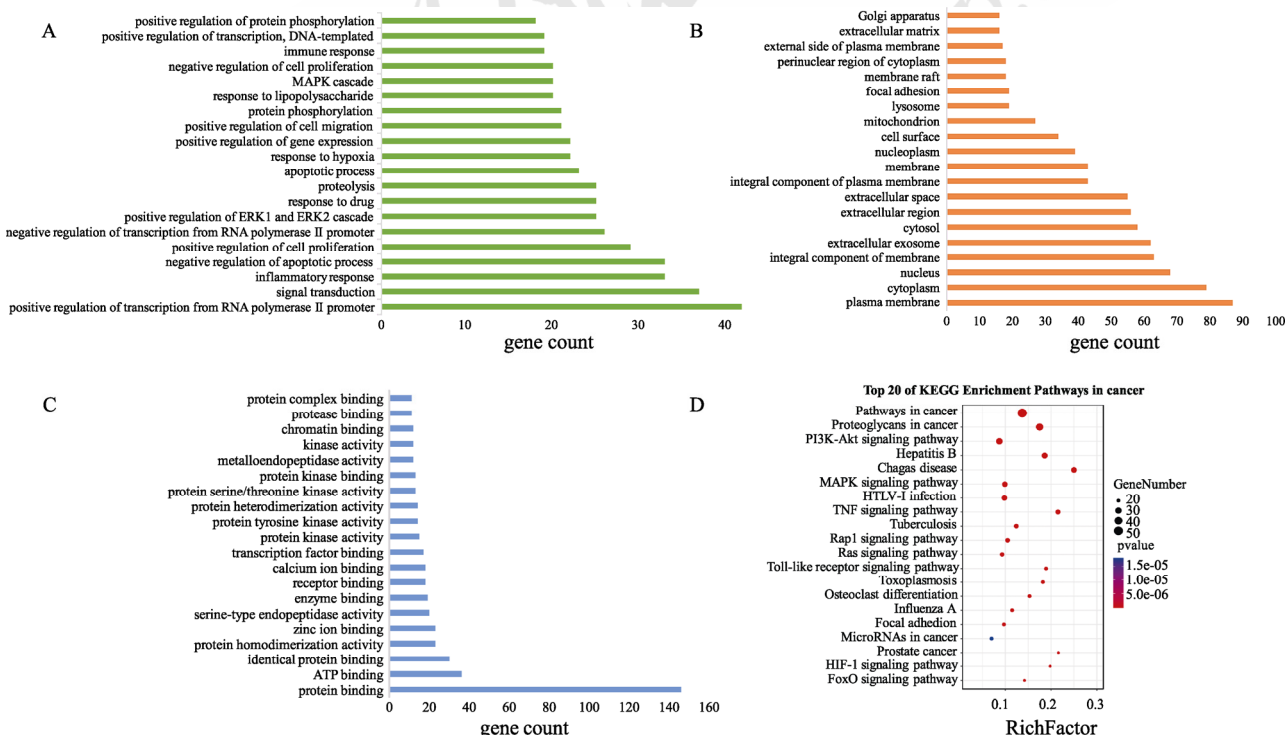


图 7 活络丸与骨关节炎疾病共同靶点的 GO、KEGG 富集分析
A-生物过程; B-细胞组成; C-分子功能; D-KEGG 通路富集分析。
Fig. 7 GO and KEGG enrichment analysis of the common targets of Huoluo pill and osteoarthritis
A-biological process; B-cell composition; C-molecular function; D-KEGG pathway enrichment analysis.

表 6 活络丸与骨关节炎疾病共同靶点 PPI 网络中度值前 10 的靶点

Tab. 6 Top 10 targets of degree in PPI network diagram of key targets of Huoluo pill and osteoarthritis

基因	蛋白名称	度值
<i>SRC</i>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	43
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	40
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	33
<i>RELA</i>	Transcription factor p65	33
<i>TP53</i>	Cellular tumor antigen p53	31
<i>JUN</i>	Transcription factor AP-1	29
<i>CTNNB1</i>	Catenin beta-1 (Beta-catenin)	28
<i>EP300</i>	EP300-interacting inhibitor of differentiation 1	28
<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein HSP 90-alpha	28
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	25

KEGG 富集分析共得到 101 条通路,采用 Omicshare 在线分析平台进行富集通路可视化处理,见图 7D,图中气泡大小代表该条通路上富集基因数目,气泡颜色差异代表了基因在该条通路富集程度的高低。结果显示活络丸治疗骨关节炎涉及数种通路,在前 20 条通路中,PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路

(TNF signaling pathway)被认为在骨关节炎的发病机制中起重要作用^[36],并且 TNF- α 诱导的 PI3K/AKT 磷酸化已被证实发生在软骨变性过程中^[37]。

3 讨论

本研究重点进行了靶点成药性分析,选择抗炎药物开发的热门靶点 COX-2、5-LOX 以及凝血因子 F2,对活络丸中的化合物成分进行多靶点分子对接、结合自由能计算研究,筛选该医方中对骨关节炎具有潜在活性的成分。依据筛选结果进行化学信息学结构聚类分析,并通过构建药效团模型,分别得到针对 3 个靶点的潜在活性成分的特征药效团模型。通过相互模式分析显示,裂叶苣荬菜内酯、furanoeudesma-1,4-diene-6-one 与 COX-2 具有相似的结合模式;芦荟大黄素与苏葛三醇主要通过疏水作用力与 5-LOX 周围氨基酸作用,光甘草定、去氢-二香兰素主要通过氢键作用力和疏水作用力与 F2 相互作用。这些分析表明针对同一靶点,结构差异较大、具有不同聚类归属的成分由于具有共同的药效结构特征及有相似的结合模式,而具有类似活性。另外,相关研究报道裂叶苣荬菜内酯为倍半萜内酯,具有一定的抗炎作用^[38];芦荟大黄素是天然蒽醌衍生物,具有抗炎活性^[39];光甘草定能够保护骨关节炎大鼠的关节软骨免受损伤^[40],推测与这些成分具有相同结构聚类归属的成分可能对抗治疗骨关节炎有潜在作用。通过多靶点分子对接、结合自由能逐级筛选并结合药效团模型初步挖掘了活络丸中靶向 COX-2、5-LOX 以及 F2 发挥治疗骨关节炎的潜在成分及药效结构特征。

考虑到中医药多靶点协同起效的作用机制,本研究从网络药理学角度出发探讨活络丸治疗骨关节炎的活性成分、潜在靶点和作用的生物过程与通路。网络药理学研究得到 180 个活络丸与骨关节炎共有靶点。通过构建的“药味-化合物-靶点”网络以及拓扑参数的分析,发现五味子酯乙、桉柳黄素、番泻苷 D、槲皮素、汉黄芩素等成分可能是活络丸治疗骨关节炎的关键成分。广泛存在于植物中的黄酮类化合物槲皮素是活络丸中豆蔻、丁香、香附、乌药、没药、黄连、广藿香、甘草、沉香及麻黄等多味中药的成分。相关研究表明,槲皮素可以通过抑制 IL-1 β 诱导的炎症和软骨降解,缓解骨关节炎的发展^[41]。同时,黄芩中的汉黄芩素也具有止痛、抗炎和保护软骨的作用^[42]。通过 GO 和 KEGG 富集分析得到 GO 条目

686 个、KEGG 通路 108 条。GO 分析结果显示,活络丸发挥药效的生物过程可能主要涉及信号转导、炎症应答、凋亡过程负调控等。大量研究已经证实,在骨关节炎发生发展过程中炎性介质、免疫因子等多种致病因素共同导致了软骨细胞凋亡、自身免疫失调等反应^[43]。KEGG 富集结果显示活络丸可能还通过介导 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路等产生调节骨关节炎发展的作用。多项研究表明,炎症在骨关节炎的发病机制中起着十分重要的作用^[44]。软骨细胞和滑膜细胞释放的细胞因子、趋化因子及基质金属蛋白酶的表达均会受到 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等的调控^[44]。通过计算机辅助药物设计及网络药理学方法结合分析,发现活络丸中具有较多抗炎、保护软骨的成分,如裂叶苣荬菜内酯、芦荟大黄素、槲皮素以及汉黄芩素等,可能通过介导 AA 代谢途径、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等起到治疗骨关节炎的作用,初步揭示了活络丸发挥治疗骨关节炎作用的多成分、多靶点、多途径的作用机制。

本研究期望从临床有效的方剂出发,选择骨关节炎的关键靶点组合,通过多靶点分子对接等多种计算方法挖掘,尝试为活络丸的治则治法提供初步科学解释,并为骨关节炎的多靶点药物研究及相关中药复方的现代化开发提供线索。

REFERENCES

- [1] BRYK M, CHWASTEK J, KOSTRZEWA M, et al. Alterations in anandamide synthesis and degradation during osteoarthritis progression in an animal model[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): E7381.
- [2] DE GAETANO G, DONATI M B, CERLETTI C. Prevention of thrombosis and vascular inflammation: Benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(5): 245-252.
- [3] SISA M, DVORAKOVA M, TEMML V, et al. Synthesis, inhibitory activity and in silico docking of dual COX/5-LOX inhibitors with quinone and resorcinol core[J]. *Eur J Med Chem*, 2020(204): 112620.
- [4] CHARLIER C, MICHAUX C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Eur J Med Chem*, 2003, 38(7/8): 645-659.
- [5] LI M Y, LIU H Y, CHEN C B, et al. Syndrome differentiation and treatment of bone Bi[J]. *Rheum Arthritis(风湿病与关节炎)*, 2020, 9(12): 53-56.
- [6] SHENG C, QI Y, ZHANG X D, et al. Observation of

- therapeutic effect of Tongren Dahuoluo pills on knee osteoarthritis[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2020, 15(12): 2325-2328.
- [7] CHEN F, HUANG G. Mechanism and inhibition kinetics of peptide P13 as thrombin inhibitor[J]. Int J Biol Macromol, 2020(150): 1046-1052.
 - [8] LI Y R, HUANG Y N, ZHAO B, et al. RGD-hirudin-based low molecular weight peptide prevents blood coagulation via subcutaneous injection[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(6): 753-762.
 - [9] JIN X J, WANG Y R, WANG Y, et al. Explore the material basis of treating pulmonary fibrosis with Yifei Jianpi prescription based on network pharmacology, molecular docking and chemical informatics[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(8): 897-906.
 - [10] MO J H, ZHU J X, OU H Y, et al. Mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang powder in treatment of hepatocellular carcinoma on network pharmacology[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2021, 40(5): 384-389.
 - [11] ZHU N Q, HOU J Y, LIU J X, et al. Study on osteoarthritis mechanisms of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(10): 1157-1165.
 - [12] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6(1): 13.
 - [13] HUANG L, XIE D, YU Y, et al. TCMID 2.0: A comprehensive resource for TCM[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(d1): D1117-D1120.
 - [14] ORLANDO B J, MALKOWSKI M G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone[J]. J Biol Chem, 2016, 291(29): 15069-15081.
 - [15] GILBERT N C, RUI Z, NEAU D B, et al. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663[J]. Faseb J, 2012, 26(8): 3222-3229.
 - [16] KARLE M, KNECHT W, XUE Y. Discovery of benzothiazole guanidines as novel inhibitors of thrombin and trypsin IV[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(14): 4839-4843.
 - [17] CHEN F, LIU H, SUN H Y, et al. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein-protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein-protein docking[J]. Phys Chem Chem Phys, 2016, 18(32): 22129-22139.
 - [18] WANG E, LIU H, WANG J, et al. Development and evaluation of MM/GBSA based on a variable dielectric GB model for predicting protein-ligand binding affinities[J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(11): 5353-5365.
 - [19] LIPINSKI C A, LOMBARDO F, DOMINY B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1/2/3): 3-26.
 - [20] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
 - [21] JIAO X, SHERMAN B T, HUANG DA W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis[J]. Bioinformatics, 2012, 28(13): 1805-1806.
 - [22] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. Nucl Acids Res, 2021, 49(D1): D605-D612.
 - [23] CUI J, JIA J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: An update[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(18): 3622-3646.
 - [24] XU T T, SHI H, WANG P B, et al. Research progress of new oral anticoagulants targeting coagulation factors[J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2020, 30(10): 636-642.
 - [25] ALITER K F, AL-HORANI R A. Thrombin inhibition by argatroban: Potential therapeutic benefits in COVID-19[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2021, 35(2): 195-203.
 - [26] KASHYAP K, KAKKAR R. Pharmacophore-enabled virtual screening, molecular docking and molecular dynamics studies for identification of potent and selective histone deacetylase 8 inhibitors[J]. Comput Biol Med, 2020(123): 103850.
 - [27] GUO H, YIN W, ZOU Z, et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development: An *in vivo* and *in vitro* study[J]. J Adv Res, 2021(28): 255-267.
 - [28] KHAN N M, AHMAD I, ANSARI M Y, et al. Wogonin, a natural flavonoid, intercalates with genomic DNA and exhibits protective effects in IL-1 β stimulated osteoarthritis chondrocytes[J]. Chem Biol Interact, 2017(274): 13-23.
 - [29] BAO L, ZHANG B, ZHAO C, et al. Association between ESR1 gene polymorphism and risk of knee osteoarthritis[J]. J Pract Orthop(实用骨科杂志), 2020, 26(10): 888-891.
 - [30] WANG C, WANG F, LIN F, et al. Naproxen attenuates osteoarthritis progression through inhibiting the expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 1[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12771-12785.
 - [31] DRANITSINA A S, DVORSHCHENKO K O, KOROTKYI O H, et al. Expression of Nos2 and acan genes in rat knee articular cartilage in osteoarthritis[J]. Cytol Genet, 2019, 53(6): 481-488.
 - [32] WANG Z J, ZHANG H B, CHEN C, et al. Effect of PPARG on AGEs-induced AKT/MTOR signaling-associated human chondrocytes autophagy[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(7): 841-848.
 - [33] TENG Y, NI G, ZHANG W, et al. TRIM59 attenuates IL-1 β -driven cartilage matrix degradation in osteoarthritis via direct suppression of NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(1): 28-34.
 - [34] BURSELL L, WOODS A, JAMES C G, et al. Src kinase inhibition promotes the chondrocyte phenotype[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(5): R105.
 - [35] SACITHARAN P K, LWIN S, GHARIOS G B, et al. Spermidine restores dysregulated autophagy and polyamine synthesis in aged and osteoarthritic chondrocytes via EP300[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(9): 1-10.
 - [36] SUN K, LUO J, GUO J, et al. The PI3K/AKT/mTOR

- signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(4): 400-409.
- [37] WANG W H, LI J Y, LI F, et al. Scutellarin suppresses cartilage destruction in osteoarthritis mouse model by inhibiting the NF-kappaB and PI3K/AKT signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2019(77): 105928.
- [38] JALAL S, AHMAD B, ZHANG T, et al. SANTAMARINE: Mechanistic studies on multiple diseases[J]. Chem Biol Drug Des, 2020, 95(4): 427-434.
- [39] DONG X, ZENG Y, LIU Y, et al. Aloe-emodin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. Phytother Res, 2020, 34(2): 270-281.
- [40] DAI J, ZHANG Y, CHEN D, et al. Glabridin inhibits osteoarthritis development by protecting chondrocytes against oxidative stress, apoptosis and promoting mTOR mediated autophagy[J]. Life Sci, 2021(268): 118992.
- [41] LI W, WANG Y, TANG Y, et al. Quercetin alleviates osteoarthritis progression in rats by suppressing inflammation and apoptosis via inhibition of IRAK1/NLRP3 signaling[J]. J Inflamm Res, 2021(14): 3393-3403.
- [42] KHAN N M, HASEEB A, ANSARI M Y, et al. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondro protective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2017(106): 288-301.
- [43] DAVID J H, SITA B Z. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [44] CHOW Y Y, CHIN K Y. The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Mediators Inflamm, 2020(2020): 8293921.

收稿日期: 2021-02-02

(本文责编: 沈倩)

中国现代应用药理学
http://www.chinjmap.com