

基于网络药理学和分子对接研究青果-槐花药对抗幽门螺杆菌感染的活性成分和作用机制

严家慧¹, 申雪¹, 彭昶², 张唯佳¹, 陈鹏婷¹, 江琤², 张燕玲³, 甘国兴^{4,5}, 朱卫星^{4,5}, 姚美村^{2*} [1.中山大学药学院, 广州 510006; 2.中山大学药学院(深圳), 广东 深圳 518107; 3.北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 4.清远市中医院, 广东 清远 511500; 5.广东省鲜药民族医药工程技术研究中心, 广东 清远 511500]

摘要: 目的 基于网络药理学和分子对接的方法研究青果-槐花药对抗幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染可能的活性成分和作用机制。方法 利用 TCMSP 数据库及文献检索获取青果、槐花的活性成分, TCMSP、BATMAN-TCM、SwissTargetPrediction 数据库获取成分靶标。通过 Genecards、Drugbank 和 DisGeNET 数据库收集与 Hp 感染相关的靶标, 并与成分靶标相比较, 筛选出潜在靶标。利用 STRING 数据库获取潜在靶标之间的相互关系, 筛选出核心靶标。在 DAVID 数据库中进行潜在靶标的 GO 分类富集分析和 KEGG 通路富集分析。通过 Autodock 进行核心靶标与活性成分的分子对接。最后用体外抗菌试验验证青果-槐花的抗菌活性。结果 共收集到青果-槐花药对的 20 个主要活性成分, 通过调节 154 个潜在靶标参与疾病过程, 涉及 TNF、FoxO、Toll 样受体等通路的作用。活性成分中槲皮素、染料木素、山柰酚、鞣花酸与核心靶标具有良好的结合能力, 可能通过作用于 TP53、AKT1、IL6 等靶标, 干扰 Hp 的侵入和定植。青果-槐花药对抗 Hp 活性强于单药, 其最小抑菌浓度为 1.25 mg·mL⁻¹。结论 本研究探索了青果-槐花药对抗 Hp 感染可能的活性成分、靶标和通路, 其作用机制复杂多样, 符合中医药治疗疾病的多成分、多靶点、多途径的作用特点, 为青果-槐花药对治疗 Hp 感染提供了理论依据。

关键词: 青果; 槐花; 幽门螺杆菌; 网络药理学; 分子对接; 活性验证

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)04-0429-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.001

引用本文: 严家慧, 申雪, 彭昶, 等. 基于网络药理学和分子对接研究青果-槐花药对抗幽门螺杆菌感染的活性成分和作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 429-436.

Active Components and Mechanism of Canarii Fructus-Sophorae Flos on Inhibition of *Helicobacter Pylori* Infection Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

YAN Jiahui¹, SHEN Xue¹, PENG Chang², ZHANG Weijia¹, CHEN Pengting¹, JIANG Cheng², ZHANG Yanling³, GAN Guoxing^{4,5}, ZHU Weixing^{4,5}, YAO Meicun^{2*} [1.School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences(Shenzhen), Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China; 3.School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 4.Qingyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingyuan 511500, China; 5.Engineering Technology Research Center of Fresh Medicine and National Medicine in Guangdong Province, Qingyuan 511500, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore active components and mechanism of Canarii Fructus-Sophorae Flos on inhibition of *Helicobacter pylori*(Hp) infection based on network pharmacology and molecular docking. **METHODS** The active components of Canarii Fructus-Sophorae Flos were obtained from TCMSP platform and literature search. TCMSP, BATMAN-TCM and SwissTargetPrediction databases were used to obtain the targets of components. Targets related to Hp infection were collected from Genecards, Drugbank and DisGeNET databases. The common targets of active components and disease were selected to be potential targets. STRING database was used to obtain an interaction map of potential targets, based on which the key targets were selected. The GO classified enrichment analysis and the KEGG pathway enrichment analysis were performed in DAVID database. Molecular docking between the active components and the key targets was carried out by Autodock. Finally, the antibacterial activity of Canarii Fructus-Sophorae Flos was verified by *in vitro* antibacterial test. **RESULTS** Twenty active components of Canarii Fructus-Sophorae Flos were collected, which were involved in the disease process by regulating 154 potential targets and signal pathways including TNF, FoxO, Toll-like receptor signal pathways. The

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973552)

作者简介: 严家慧, 女, 硕士生 E-mail: yanjh23@mail2.sysu.edu.cn

*通信作者: 姚美村, 男, 博士, 教授 E-mail: lssymc@mail.sysu.edu.cn

quercetin, genistein, kaempferol and ellagic acid among the active components showed good binding ability with the key targets, suggesting that they may interfere with the invasion and colonization of Hp by acting on TP53, AKT1, IL6 and other targets. The anti-Hp activity of Canarii Fructus-Sophorae Flos was better than those of single drugs, with the minimum inhibitory concentration of 1.25 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** This study preliminarily explore the active components, potential targets and pathways of Canarii Fructus-Sophorae Flos on inhibition of Hp infection. Its complex and diverse mechanism conforms to the characteristic of traditional Chinese medicine in the treatment of disease, which is multi-components, multi-targets and multi-pathways. The results provide theoretical basis for the treatment of Hp infection by Canarii Fructus-Sophorae Flos.

KEYWORDS: Canarii Fructus; Sophorae Flos; *Helicobacter pylori*; network pharmacology; molecular docking; antibacterial activity verification

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染与慢性胃炎、消化性胃溃疡、胃癌等疾病的发生密切相关,全球约有 44%的人感染 Hp,在发展中国家感染率甚至更高^[1]。目前,针对 Hp 感染的常规治疗是抗菌药物三联或四联疗法,但随着抗菌药物耐药率的不断升高,这些疗法的根除率逐步下降^[2-3],因此,开发新的抗 Hp 感染药物具有重大意义。

Hp 感染作为一种慢性病,中医药疗法有着得天独厚的优势。在中医药理论中, Hp 属于“邪气”范畴,扶正祛邪是治疗 Hp 感染的原则^[4]。与抗菌药物治疗法相比,部分中药不仅能够抑制 Hp 生长,还能从整体上调节人体机能。有研究发现青果对猪源 Hp 的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)为 3.12 mg·mL⁻¹,在 25 味清热解毒药中属于强度抑菌药^[5];槐花米提取物对尿素酶具有较强的抑制活性,使得 Hp 中和胃酸的功能变弱,暴露于酸性环境中而死亡^[6]。青果为橄榄科植物橄榄的干燥成熟果实,归肺经和胃经,具有清热解毒、利咽生津的功效,主要作用于上焦和中焦;槐花为豆科植物槐的干燥花及花蕾,归肝经和大肠经,具有凉血止血、清肝泻火的功效,主攻下焦。青果和槐花配伍,可同时作用于上中下三焦,且二者均被列入国家卫健委发布的按照传统既是食品又是中药材的物质目录,可作为食品生产经营,因此在抗 Hp 应用上具有安全便捷的优势,同时避免了抗菌药等药物使用时易产生耐药性和不良反应的不足。但目前仍未见有研究揭示青果和槐花联合抗 Hp 的活性成分和作用机制。

针对中药发挥药理作用具有多成分、多靶点、多通路的特点,网络药理学整体性、系统性的特点与其不谋而合,因此网络药理学是研究中药药效物质和作用机制的有力工具^[7-8]。本研究将基于网络药理学和抗菌活性验证的方法,探讨青果-槐花药对抗 Hp 感染可能的活性成分、靶标和通路,揭示其作用机制,为后续深入的实验研究提供参考。

1 资料和方法

1.1 青果-槐花药对活性成分搜索与筛选

利用 TCMSP 数据库(<http://tcmispw.com/tcmisp.php>)检索关键词分别为“青果”“槐花”,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%,类药性(drug likeness, DL)≥0.18 为筛选条件收集活性成分,同时通过文献检索补充重要成分。

1.2 青果-槐花药对抗 Hp 感染的靶标预测

根据收集所得的活性成分,利用 TCMSP 数据库、BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)^[9]和 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>)^[10]获取其对应的靶标。其中 BATMAN-TCM 以 Score cutoff 值≥20, $P<0.05$ 为筛选条件;SwissTargetPrediction 以 Probability 值≥0.5 为筛选条件。利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将 TCMSP 中获得的靶标名称转化为人源的 gene symbol。利用 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)和 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)检索与 Hp 感染相关的靶标,检索关键词为“*Helicobacter pylori* infection”,收集疾病靶标。筛选出活性成分靶标与疾病靶标重复的靶标,作为青果-槐花药对抗 Hp 感染的潜在靶标。利用微生信网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>),绘制活性成分靶标-疾病靶标韦恩图^[11],用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“药物-成分-潜在靶标”网络图。

1.3 潜在靶标相互作用网络的构建

以 STRING 数据库(<https://STRING-db.org/>)作为背景网络数据库,将潜在靶标导入,选择研究物种为“Homo sapiens”,获取靶标相互作用关系(中置信度 0.400)。将保存的 TSV 文件导入至 Cytoscape 3.7.1 软件,制作蛋白质相互作用网络图,并筛选出 Degree 值最大的前 5 个节点,作为核心靶标。

1.4 靶标通路分析及其可视化

将潜在靶标上传至 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 富集分析(选择生物过程、分子功能和细胞组成 3 个模块)和 KEGG 通路分析,根据 *P* 值进行升序排列,选取 GO 富集排名前 15 及 KEGG 排名前 20 的通路,使用微生信网站将结果以柱形图和富集气泡图的形式展现。

1.5 核心靶标与活性成分的分子对接

于 PDB 网站(<http://www.rcsb.org/>)下载核心靶标对应靶蛋白晶体结构,用 Chem3D Pro 14.0 对蛋白进行结构处理和优化后作为受体;以“药物-成分-潜在靶标”网络图中活性成分节点 Degree 值最大的前 4 个化合物分子作为配体。根据 DS Visualizer 软件中自动生成的活性位点位置确定蛋白对接位点相关参数。利用 AutoDock 4.2.6 软件依次将化合物与靶蛋白进行对接,提取最小结合自由能对接构象,通过 LigPlot+2.2 进行可视化。

1.6 青果-槐花药对抗菌活性验证

1.6.1 药材来源与鉴定 本实验所用药材由清远市中医院提供,经清远市中医院朱卫星主任药师鉴定为橄榄科植物橄榄 *Canarium album* (Lour.) Raeusch. 的干燥成熟果实和豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花蕾。

1.6.2 试剂与耗材 哥伦比亚琼脂(货号:CM0331)、脑心浸出液肉汤(货号:CM1135)(英国 OXIOD 公司);无菌脱纤维绵羊血(广州鸿泉生物科技有限公司,货号:HQ50071);南美胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号:10270106);克拉霉素(中国 TargetMol 公司,货号:T1434);DMSO(上海百赛生物科技有限公司,货号:D103272)。0.22 μm 滤头(天津科亿隆实验设备有限公司);2 mL 一次性无菌注射器(浙江欧健医用器材有限公司,无锡耐思生命科技股份有限公司);96 孔板、比浊管、90 mm 培养皿(无锡耐思生命科技股份有限公司);涂布棒(莱思生物技术有限公司)。

1.6.3 仪器 ZNHW 型恒温电热套(郑州予创仪器设备有限公司);CCL-170/240L 型三气培养箱(新加坡艺思高科技有限公司);-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司);Densi CHEK plus 型麦氏浊度计[梅里埃诊断产品(上海)有限公司]。

1.6.4 青果-槐花药对提取物的制备 称取 10 g 青果,加入 12 倍量二级水,电热套 250 $^{\circ}\text{C}$ 热回流 2 h。抽滤,取上清液浓缩至 1 g·mL⁻¹,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过

夜后冷冻干燥 24 h 成粉末。同法制备槐花以及青果-槐花(10:3)药对提取物。

1.6.5 菌株及其培养条件 所用到的菌株为从美国模式培养物集存库(American type culture collection)中购买的 Hp 标准菌株 ATCC 43504。细菌涂布于哥伦比亚血平板上,倒置放于三气培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、微需氧条件(5%O₂、10%CO₂、85%N₂)培养 48 h 后用于抗菌活性试验。

1.6.6 MIC 的测定 青果提取物、槐花提取物以及青果-槐花药对提取物用脑心浸出液肉汤溶解混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,过 0.22 μm 水相滤膜,按二倍稀释法配制 0.31~10 mg·mL⁻¹ 多个浓度梯度药物,克拉霉素用 DMSO 溶解配制成储备液,使用时稀释至相应的多个浓度梯度(DMSO 含量 $\leq$ 1%),将上述配制好的药液吸取 50 μL 加入 96 孔板,每个药物浓度至少设置 3 个复孔,设置阴性对照孔、生长对照孔。从培养箱取出菌株,用润湿的灭菌棉签刮取菌苔至脑心浸出液肉汤中,用含 20%胎牛血清的脑心浸出液肉汤调节菌悬液浊度为 1 McF,稀释 10 倍接种于上述含药 96 孔板中(最终在 96 孔板中的菌悬液浊度约为 1 $\times$ 10⁶ CFU·mL⁻¹),将 96 孔板置于培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 、微需氧条件、150 r·min⁻¹ 振荡培养 72 h 后取出观察结果。当生长对照呈现纽扣状或明显浑浊时结果才可用,细菌浑浊度明显降低时的最小药物浓度即为 MIC。

2 结果

2.1 青果-槐花药对活性成分收集结果

根据收集条件,除去无靶点成分及重复成分,得到青果、槐花活性成分共 20 个,其中共有成分 5 个,青果成分 12 个,槐花成分 3 个,见表 1。

2.2 青果-槐花药对抗 Hp 感染的靶标预测

通过 TCMSP、BATMAN-TCM、SwissTarget-Prediction 数据库共获取青果-槐花药对活性成分靶标 775 个。通过 Genecards 数据库、Drugbank 数据库、Disgenet 数据库共发现 667 个疾病靶标。将药物活性成分靶标与疾病靶标作对比,共获得共同靶标 154 个,即青果-槐花药对抗 Hp 感染的潜在靶标。

2.3 网络构建及分析

2.3.1 “药物-成分-潜在靶标”网络 将青果-槐花药对的潜在靶标和对应的活性成分、药物构建网络,见图 1。网络中共含有节点 177 个,边线 564

条。所有节点的大小与 Degree 值呈正相关, 节点越大, Degree 值越大, 结果显示, 所有活性成分节点中 Degree 值最大的前 4 个分别是槲皮素、染料木素、山柰酚、鞣花酸, 这些成分作用于多个潜在靶标, 是青果-槐花药对抗 Hp 感染的主要活性成分。

2.3.2 潜在靶标相互作用网络 利用 STRING 数据库得到靶标相互作用关系并导入至 Cytoscape 3.7.1 软件, 制作潜在靶标相互作用网络图, 见图

2。该图共含有圆形节点 154 个, 代表所有的潜在靶标蛋白, 节点面积越大, 颜色越深, 该节点靶标蛋白与其他靶标蛋白之间的相互作用越多; 边线 3 794 条, 代表靶标蛋白之间的相互关联。根据 Degree 值从大到小筛选前 5 个节点分别为 TP53、AKT1、IL6、TNF、VEGFA, 这 5 个靶标与青果-槐花药对抗 Hp 感染相关性最大, 可认为是核心靶标, 见表 2。

表 1 青果-槐花药对活性成分
Tab. 1 Active components in Canarii Fructus-Sophorae Flos

分子 ID	英文名称	中文名称	OB/%	DL	药材归属	CAS 号
MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28	青果、槐花	117-39-5
MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75	青果、槐花	83-46-5
MOL000415	rutin	芦丁	3.20	0.68	青果、槐花	153-18-4
MOL000069	palmitic acid	棕榈酸	19.30	0.10	青果、槐花	57-10-3
MOL000422	kaempferol	山柰酚	41.88	0.24	青果、槐花	520-18-3
MOL004328	naringenin	柚皮素	59.29	0.21	青果	480-41-1
MOL001002	ellagic acid	鞣花酸	43.06	0.43	青果	476-66-4
MOL001494	mandenol	亚油酸乙酯	42.00	0.19	青果	544-35-4
MOL001999	scoparone	滨蒿内酯	74.75	0.09	青果	120-08-1
MOL000040	scopoletin	东莨菪内酯	27.77	0.08	青果	92-61-5
MOL005072	brevifolin	短叶苏木酚	27.19	0.06	青果	90-24-4
MOL000105	protocatechuic acid	原儿茶酸	25.37	0.04	青果	99-50-3
MOL000513	gallic acid	没食子酸	31.69	0.04	青果	149-91-7
MOL004368	hyperin	金丝桃苷	6.94	0.77	青果	482-36-0
MOL000520	alpha-amyrin	α -香树脂醇	10.28	0.76	青果	638-95-9
MOL006387	chlorogenic	绿原酸	25.58	0.33	青果	327-97-9
MOL006505	(-)-epicatechin	表儿茶素	28.93	0.24	青果	490-46-0
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李素	49.60	0.31	槐花	480-19-3
MOL002693	nicotiflorin	山柰酚-3-O-芸香糖苷	3.64	0.73	槐花	17650-84-9
MOL000481	genistein	染料木素	17.93	0.21	槐花	446-72-0

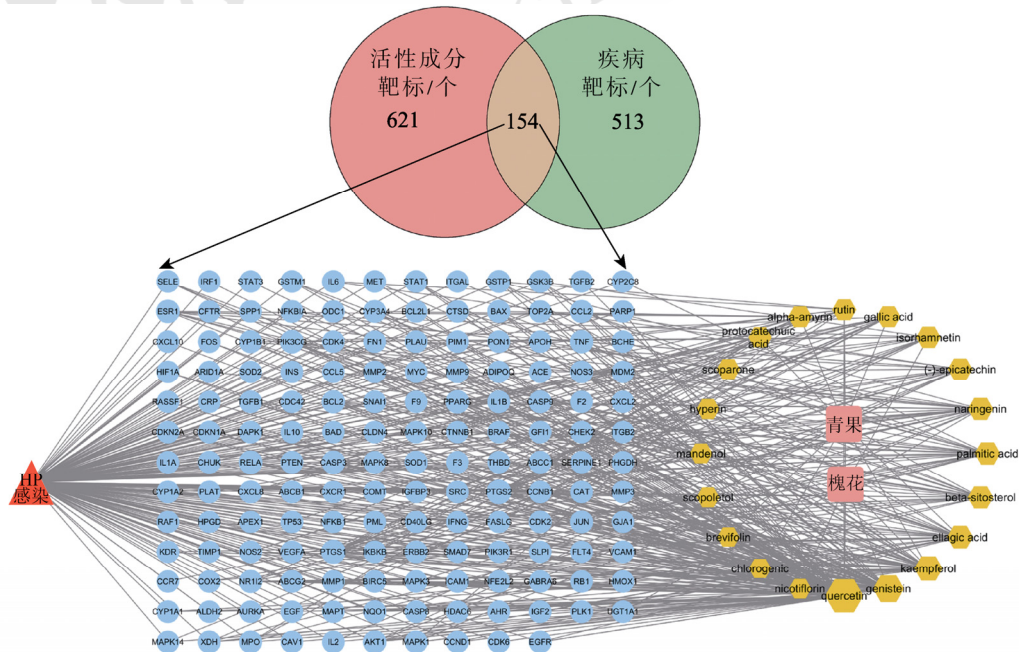


图 1 青果-槐花药对“药物-成分-潜在靶标”网络
Fig. 1 Network of “drugs-components-potential targets” of Canarii Fructus-Sophorae Flos

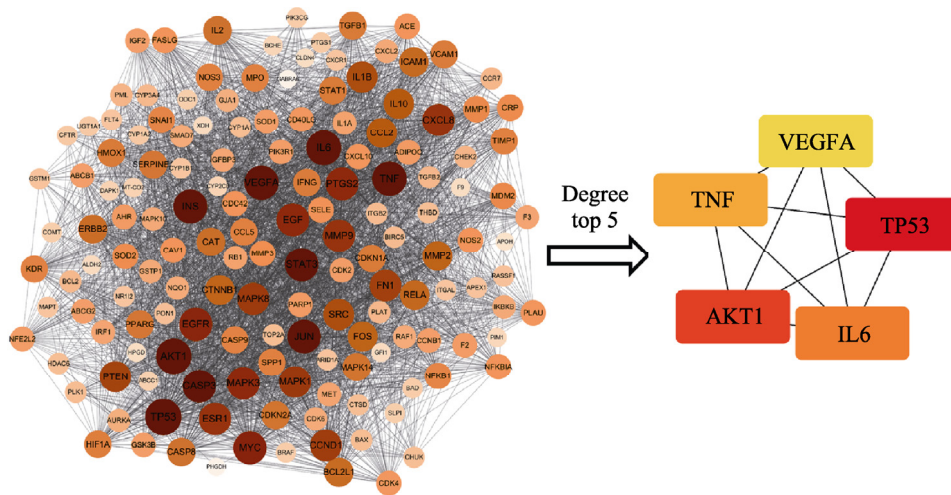


图2 青果-槐花药对潜在靶标相互作用网络
Fig. 2 Network interaction map of potential targets

表2 青果-槐花药对核心靶标
Tab. 2 Key targets of Canarii Fructus-Sophorae Flos

序号	靶标基因	UniProt KB 编号	基因全称	Degree 值
1	TP53	P04637	cellular tumor antigen p53	123
2	AKT1	P31749	AKT serine/threonine kinase 1	117
3	IL6	P05231	interleukin 6	113
4	TNF	P01375	tumor necrosis factor	110
5	VEGFA	P15692	vascular endothelial growth factor A	109

2.4 GO 和 KEGG 通路富集结果

利用 DAVID 数据库,对青果-槐花药对的潜在靶标进行 GO 分类富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析结果表明:①生物过程分析富集

影响较显著的有对药物的反应、凋亡过程的负调控、基因表达的正调控、从 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、炎症反应等;②细胞组成分析富集影响较显著的有细胞外间隙、细胞质基质、胞外区、小凹、线粒体等;③分子功能分析富集影响较显著的是酶结合、相同蛋白质结合、蛋白质异化活动、蛋白质结合(图 3A)。根据 KEGG 通路分析结果,共涉及 126 条信号通路,其中排名前 20 的通路见图 3B,青果-槐花药对治疗 Hp 感染与 TNF、FoxO、Toll 样受体、HIF-1 等多条信号通路密切相关,揭示青果-槐花药对可能通过靶向作用于这些通路介导 Hp 感染过程。

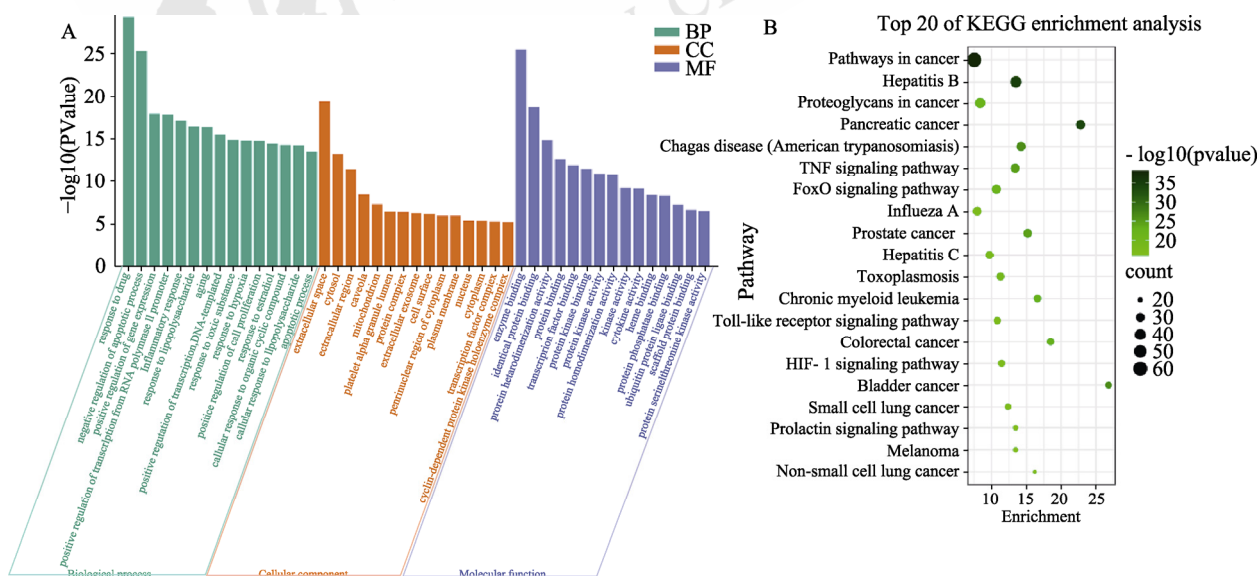


图3 青果-槐花药对潜在靶标富集分析
A-GO 分类富集分析; B-KEGG 通路分析。

Fig. 3 Enrichment analysis of potential targets of Canarii Fructus-Sophorae Flos
A-GO enrichment analysis; B-KEGG pathway analysis.

2.5 分子对接结果与分析

对筛选出的槲皮素、染料木素、山柰酚、鞣花酸这 4 个活性成分化合物与核心靶标分别进行分子对接研究。对接结果见表 3, 所有活性成分化合物与核心靶标的对接均具有结合活性。结合自由能值越低, 表明核心靶标与活性成分化合物之间结合活性越高。4 个活性成分化合物与核心靶标的总结合自由能为山柰酚<槲皮素<染料木素<鞣花酸; 5 个核心靶标与活性成分化合物的总结合自由能 TP53<AKT1<VEGFA<TNF<IL6。AKT1、TP53 靶蛋白各自与其原配体对接后的 RMSD(均方根偏差)分别为 1.02 Å, 1.83 Å, 均<2Å, 说明本研究所采用对接方式能够较好地重现原配体与蛋白的结合模式, 对接结果具有可靠性。

AKT1 基因编码的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其与原配体的结合活性高, 且 RMSD 值小, 显示对接方法准确, 以该核心靶标与配体结合模式为例分析对接结果, 见图 4。AKT1 与原配体及 4 个活性成分化合物均能形成氢键和分子间的疏

水作用。活性成分化合物中, 槲皮素与 AKT1 产生相互作用的氨基酸残基数量最多, 其与 Lys268、Ser205、Asn204 等氨基酸残基形成氢键, 与 Trp80、Gln203、Leu210 等氨基酸残基形成分子间疏水作用, 从而提高结合能力和稳定性。

表 3 核心靶标分子对接结果

Tab. 3 Molecular docking results of key targets

化合物	对接打分值/kcal·mol ⁻¹					总和
	TP53 (6si4)	IL6 (1alu)	AKT1 (6s9w)	TNF (2az5)	VEGFA (4k2n)	
原配体	-9.89	—	-12.82	—	—	—
槲皮素	-8.13	-5.41	-8.61	-6.31	-7.75	-36.21
染料木素	-8.28	-6.03	-7.92	-6.21	-6.90	-35.34
山柰酚	-8.47	-6.13	-8.26	-6.26	-7.38	-36.50
鞣花酸	-8.51	-5.33	-7.81	-5.66	-5.27	-32.58
总和	-33.39	-22.90	-32.60	-24.44	-27.30	—

2.6 抗菌活性验证结果

同时对青果、槐花单药以及青果-槐花药对提取物进行体外抗 Hp 活性测定, 其 MIC 越小说明抗菌活性越强。青果-槐花配伍后 MIC 显著降低, 小于青果或槐花单药的 MIC。结果见表 4。

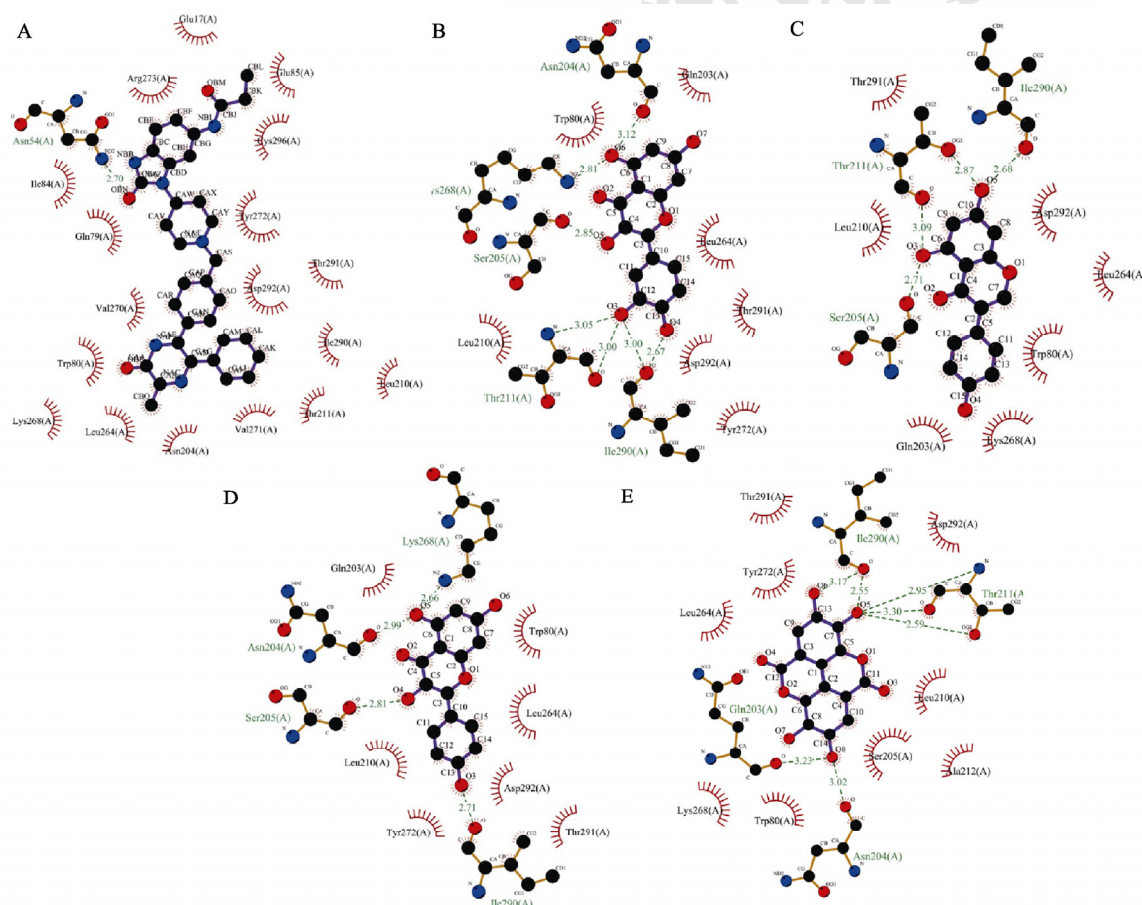


图 4 AKT1 与原配体、各活性成分化合物对接结果图

A-原配体; B-槲皮素; C-染料木素; D-山柰酚; E-鞣花酸; 绿色虚线代表氢键作用; 红色波浪线代表疏水作用。

Fig. 4 Binding modes of AKT1 with original ligand and active components

A-original ligand; B-quercetin; C-genistein; D-kaempferol; E-ellagic acid; Green dotted lines represent the hydrogen bond; red wavy lines represents hydrophobic effect.

表4 青果-槐花药对抗菌活性验证
Tab. 4 Verification of the antibacterial activity

提取物	MIC/mg·mL ⁻¹
青果	2.50
槐花	5.00
青果-槐花药对	1.25

3 讨论

本研究采用网络药理学和分子对接的方法,系统分析了青果-槐花药对抗 Hp 感染的潜在机制。青果-槐花药对抗 Hp 感染具有多成分、多靶点、多途径的作用特性,20 个活性成分作用于 PTGS2、MAPK1、NOS3 等多个炎症或肿瘤靶点,参与 TNF、FoxO、Toll 样受体等信号通路。基于分子对接模拟活性成分与靶蛋白的结合,结果显示这些活性成分具有很强的结合活性。

通过对药物成分进行分析,发现青果-槐花药对抗 Hp 感染的活性成分主要为黄酮类和酚类。其中, Degree 值前 4 的活性成分——槲皮素、染料木素、山柰酚和鞣花酸与多个潜在靶标存在相互作用。槲皮素和山柰酚为青果、槐花共有成分,通过药物的配伍可以使得共有成分含量增加,且两者都能抑制 Hp 释放细胞空泡素(Vac A),进而阻碍该毒素造成的细胞死亡,还能减少胃黏膜的 Hp 数量,减轻炎症反应和脂质过氧化^[12-14]。染料木素是一种广泛存在于豆科植物中的黄酮类化合物,具有抗 Hp 脲酶活性,能够减弱 Hp 中和胃酸的能力进而影响其在胃部的定植和黏附^[15]。鞣花酸具有抗耐药 Hp 活性,同时修复由于 Hp 感染造成的胃黏膜损伤^[16]。

根据靶标相互作用网络图,青果-槐花药对抗 Hp 感染的潜在靶标中相关性较大的是 TP53、AKT1、IL6、TNF、VEGFA。抑癌基因 TP53 在 Hp 感染组织中的表达上调,且在胃癌组织中的表达高于癌旁组织,是胃癌组织中最主要的突变基因^[17]。AKT1 编码一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过一系列下游底物的丝氨酸和/或苏氨酸磷酸化介导调节许多过程,包括代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成等, Hp 可以激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,增加 TP53 的泛素化和蛋白酶体降解,从而对 TP53 产生负调控^[18]。Hp 激活 STAT3 信号通路依赖于 IL6 的表达上调,而 IL6 表达增加是由 Hp 感染后的氧化应激介导^[19]。TNF 是参与 Hp 相关性胃炎的关键促炎因子家族, TNF 及其受体

sTNF-Rs 的表达在 Hp 阳性患者的胃黏膜中显著增加^[20]。VEGFA 是强烈促进内皮细胞分裂和血管生成的因子,与肿瘤的形成密切相关,当 Hp 感染时 VEGFA 蛋白有较高的表达率^[21]。

根据通路富集分析,青果-槐花药对抗 Hp 感染与 TNF、FoxO、Toll 样受体、HIF-1 等信号通路密切相关。TNF 与细胞凋亡密切相关, Hp 的分泌蛋白 JHP0290 可通过 TNF 依赖性或非依赖性途径触发巨噬细胞凋亡,从而帮助细菌在胃内定植^[22]; Hp 感染过程能够诱导 TNF 的产生,增加胃癌的风险^[23]。FoxO 与细胞的生存、凋亡和病变有关, FoxO1/3a 是 Hp 感染时激活 PI3K-Akt 信号通路新型底物,调控 IL-8 的产生,引起一系列炎症反应^[24]。Toll 样受体属于固有免疫病原模式识别受体,可通过不同的识别途径活化多种免疫细胞,启动非特异性或特异性免疫应答以清除病原体, TLR 1、TLR 2、TLR 4、TLR 5、TLR 6 等不同的基因多态性都与 Hp 能够导致的胃癌有关^[25]。

通过分子对接发现,槲皮素、染料木素、山柰酚、鞣花酸这 4 个活性成分化合物与核心靶标具有良好的结合能力,提示这些成分可能是青果-槐花药对的主要活性成分,针对 TP53、AKT1、IL6 等靶点蛋白,干扰 Hp 的侵入和定植。

最后通过体外抗菌活性试验,对青果-槐花药对的抗 Hp 活性进行了初步的验证,发现两者配伍后可使得 MIC 减小 2~4 倍,可能具有协同抗菌作用。

本研究探索了青果-槐花药对抗 Hp 感染的活性成分、关键靶标和信号通路,揭示了青果-槐花药对抗 Hp 感染的潜在作用机制。通过初步抗菌试验,验证了青果-槐花药对的抗菌活性,为青果-槐花药对抗 Hp 感染的科学研究和临床应用提供了可靠的理论依据和线索。

REFERENCES

- [1] ZAMANI M, EBRAHIMTABAR F, ZAMANI V, et al. Systematic review with meta-analysis: The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 47(7): 868-876.
- [2] HU Y, ZHU Y, LU N H. Novel and effective therapeutic regimens for *Helicobacter pylori* in an era of increasing antibiotic resistance[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 168.
- [3] LEJA M, GRINBERGA-DERICA I, BILGILIER C, et al. Review: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection[J]. Helicobacter, 2019, 24(S1): e12635. Doi: 10.1111/hel.12635.

- [4] HU F L, ZHANG S S. National consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* and related symptoms based on integrative traditional Chinese and Western medicine[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol(胃肠病学和肝病学杂志), 2018, 27(9): 1008-1016.
- [5] RONG Q, DAI P F, DENG L, et al. Effects of twenty-five traditional antipyretic and antidote medicine extracts against *Helicobacter pylori* from swine *in vitro*[J]. Acta Agric Zhejiangensis(浙江农业学报), 2016, 28(1): 38-43.
- [6] YUE Q Q, ZHANG H Y, YANG M H, et al. Urease inhibition evaluation of Sophora flower bud extracts[J]. J Jishou Univ: Nat Sci Ed(吉首大学学报: 自然科学版), 2017, 38(4): 59-62.
- [7] WU H M, HUANG X L, HAO J J, et al. Study on the anti-inflammatory mechanism of rose based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(13): 1563-1569.
- [8] QIAO M, ZHU Y, ZHAO Y, et al. Study on mechanism of active compounds of celery seed in the treatment of liver fibrosis based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 257-265.
- [9] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016(6): 21146. Doi: 10.1038/srep21146.
- [10] DAINA A, MICHIELIN 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.
- [11] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: An interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014(15): 293. Doi: 10.1186/1471-2105-15-293.
- [12] SHIN J E, KIM J M, BAE E A, et al. *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*[J]. Planta Med, 2005, 71(3): 197-201.
- [13] GONZÁLEZ-SEGOVIA R, QUINTANAR J L, SALINAS E, et al. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of Guinea pig[J]. J Gastroenterol, 2008, 43(6): 441-447.
- [14] YEON M J, LEE M H, KIM D H, et al. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(1): 166-173.
- [15] BAE E A, HAN M J, KIM D H. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of irisolidone isolated from the flowers and rhizomes of *Pueraria thunbergiana*[J]. Planta Med, 2001, 67(2): 161-163.
- [16] DE R, SARKAR A, GHOSH P, et al. Antimicrobial activity of ellagic acid against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(6): 1595-1603.
- [17] SHIMIZU T, MARUSAWA H, MATSUMOTO Y, et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterology, 2014, 147(2): 407-17.e3.
- [18] WEI J, NAGY T A, VILGELM A, et al. Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells[J]. Gastroenterology, 2010, 139(4): 1333-1343.
- [19] PIAO J Y, LEE H G, KIM S J, et al. *Helicobacter pylori* activates IL-6-STAT3 signaling in human gastric cancer cells: Potential roles for reactive oxygen species[J]. Helicobacter, 2016, 21(5): 405-416.
- [20] SHIBATA J, GOTO H, ARISAWA T, et al. Regulation of tumour necrosis factor (TNF) induced apoptosis by soluble TNF receptors in *Helicobacter pylori* infection[J]. Gut, 1999, 45(1): 24-31.
- [21] OU Y R, KANG M, ZHOU L, et al. Infection with L-form of *Helicobacter pylori* and expressions of MIF, MMP9 and VEGF in gastric carcinoma[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2014, 34(2): 180-187.
- [22] PATHAK S K, TAVARES R, DE KLERK N, et al. *Helicobacter pylori* protein JHP0290 binds to multiple cell types and induces macrophage apoptosis via tumor necrosis factor (TNF)-dependent and independent pathways[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e77872. Doi: 10.1371/journal.pone.0077872.
- [23] EL-OMAR E M, RABKIN C S, GAMMON M D, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms[J]. Gastroenterology, 2003, 124(5): 1193-1201.
- [24] TABASSAM F H, GRAHAM D Y, YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells[J]. Helicobacter, 2012, 17(3): 193-202.
- [25] MELIȚ L E, MĂRGINEAN C O, MĂRGINEAN C D, et al. The relationship between toll-like receptors and *Helicobacter pylori*-related gastropathies: Still a controversial topic[J]. J Immunol Res, 2019(2019): 8197048. Doi: 10.1155/2019/8197048.

收稿日期: 2020-11-18

(本文责编: 李艳芳)