

血必净组方药效物质基础与脓毒症多靶点作用效应研究

马世堂 俞 浩 张孝林 熊友谊

摘要 目的 探讨中药血必净组方作用的药效物质基础,并对组方作用效应在分子网络层面上进行分析。**方法** 选择 16 个脓毒症相关靶点,参照生物学功能分为炎症、免疫、凝血三大类;构建该组方化学成分分子数据库,探讨其与炎症、免疫、凝血类靶点间相互作用关系。**结果** 丹参、红花与凝血、炎症类靶点间有作用效应分子较多,具有广泛的抗凝血、抗炎症效应。与脓毒症靶点有较好作用效应的前 10 个分子分别为组分色氨酸、丹参素、没食子酸、丹参酚酸 D、原儿茶酸、丹酚酸 A、丹参素 C、香草酸、迷迭香酸、苯丙氨酸。血必净组方中既存在 1 个组分与多个靶点存在较强相互作用,如丹参参与 13 个靶点有作用,同时也存在不同组分作用同一个靶点蛋白的现象,如 8 个分子与 MD-2 有作用。**结论** 该组方与各类脓毒症靶点均有一定的潜在协同效应;为寻找新型脓毒症类药物提供一定的参考和借鉴。

关键词 血必净组方;药效物质基础;脓毒症靶点

Potency Material Bases of Xuebijing Formula and Its Multi-target Effects on Sepsis MA Shi-tang, YU Hao, ZHANG Xiao-lin, and XIONG You-yi College of Food and Drug, Anhui College of Science and Technologies, Anhui (233100)

ABSTRACT Objective To explore potency material bases of Xuebijing (XBJ) formula, and to analyze its effects at the molecular network level. **Methods** Totally 16 sepsis-related targets were selected and classified into three categories such as inflammation, immune, and coagulation referring to biological roles. Then molecular database of chemical compositions in XBJ formula were constructed to explore mutual actions with inflammation, immune, and coagulation targets. **Results** Danshen root and safflower, with more effector molecules with immune and coagulation targets, have extensive anti-coagulation and anti-inflammation effects. The former 10 molecules with better mutual actions with sepsis targets were sequenced as tryptophane, danshensu, gallic acid, salvianolic acid D, protocatechuic acid, salvianolic acid A, danshensu C, vanillic acid, rosmarinic acid, phenylalanine. There existed two phenomena in XBJ formula as follows. One component had stronger actions with multi-targets, for example, danshensu had actions with 13 targets. Meanwhile, different components acted on the same target protein, for example, 8 molecules acted with MD-2. **Conclusion** XBJ formula had certain potential synergistic effects with sepsis targets, which could provide certain referential roles for finding new type anti-septic drugs.

KEYWORDS Xuebijing Formula; material basis for potency; sepsis target

脓毒症(sepsis)是一种感染后常见的炎症性并发症,其发病率及病死率高(全球每年有 1 800 万严重脓毒症患者,每天约 1.4 万人死于并发症),作用机制复杂^[1,2],目前虽在生物学等基础研究方面取得了较大的进展^[3,4]。但是,临床试验性治疗效果不佳。

血必净组方是在中医学理论指导下,结合菌、毒、炎并治原则,从古方血府逐瘀汤基础上适当加减^[5],

筛选配比而成。本组方由红花、丹参、当归、赤芍、川芎 5 味中药材调配而成,临床上与抗生素联合应用,可有效提高患者治愈率,降低病死率及改善患者预后^[6,7]。其作用机制的研究目前主要针对某几个特征指标如肿瘤坏死因子 TNF- α 、白介素 IL-1、C-反应蛋白(CRP)、血小板(PLT)、白细胞抗原(DR)^[8],这几个指标的改善尚不能准确地表征本组方防治脓毒症疾病药效物质基础。

本课题组前期研究工作证实血必净组方通过与环氧化酶(COX)-2、脂氧合酶 A5LOX 炎症靶点竞争性结合,改善炎症关键介质花生四烯酸 AA 代谢^[9]。本研究在分析在系统全面考察脓毒症病因病机基础

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81483268)

作者单位:安徽科技学院食品药品学院(安徽 233100)

通讯作者:马世堂, Tel:18725503869, E-mail:40773943@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.11.1351

上,借助于系统生物学理论和工具,有针对性的选择了脓毒症疾病相关的药物作用靶点,观察本组方与脓毒症相关的药物作用靶点间作用效应;参照靶点生物学功能对上述靶点进行功能性分类,希冀为脓毒症复杂疾病网络作用机制探析及相关的药物设计发现提供依据。

材料与方法

1 研究工具 所用筛选程序及软件为 schrodinger 公司 Maestro 药物设计平台^[10],该平台由活性组分小分子配体前处理模块 MacroModel^[11]、虚拟筛选模块 Glide^[12]、同源建模模块 Prime(蛋白三维结构的构建及已知蛋白三维结构的优化评测)、模块 SiteMap(蛋白靶点活性口袋搜寻确证)4 个子模块构成; MetaDrug 系统药理学平台^[13],脓毒症靶点结构、功能等相关信息。

2 研究方法

2.1 活性组分小分子数据库的构建(前处理)

血必净组方生物活性分子基于中科院中药与化学成分数据库^[14]和 Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases 及相关中药材活性组分数据库数据挖掘整理,检索血必净组方中红花、丹参、当归、赤芍、川芎有效组分成分,检索上述中药材化学成分信息,建立活性组分分子数据库^[15,16]。该数据库中分子数目为红花 89 个、丹参 95 个、当归 116 个、赤芍 28 个、川芎 54 个,去掉重复活性组分,本组方数据库中活性组分分子数目为 343 个。前处理部分关键参数设置如下: TNCG 轨迹、OPLS_2005 力场、MacroModel^[11] 模块、能量阈值设定为 0.5 kJ/(nm·mol)。

2.2 脓毒症靶点选择 在充分调研脓毒症疾病发病机制和信号转导通路方面的实验成果基础上,选用 GeneGo 公司 MetaDrug^[13] 模块,以内毒素 LPS 为主线,将 LPS 细胞外转入胞内、细胞核内过程中所涉及的一系列信号转导通路,以及所涉及到的炎症、免疫、凝血系统交汇效应,绘制了脓毒症靶点图。然后,查询靶点的相关研究信息,包括蛋白相关信息(结构、功能),配体相关(小分子抑制剂、生物活性、结构信息)等,最终选择了与脓毒症疾病相关的 16 个靶点(表 1)。结合脓毒症发病机制^[2-4],在充分考察上述靶点的蛋白及结构相关信息的基础上,运用系统生物学思想,依照生物学功能对上述靶点进行了功能性分类。

2.3 活性组分虚拟筛选 除 A5LOX^[9] 之外所有蛋白结构均来源于 PDB 数据库,筛选流程与参数

设置为:利用药物设计平台 Maestro^[10] 虚拟筛选模块 Glide^[11];主要步骤如下:(1)蛋白靶点前处理:每个蛋白加氢、调整键序、能量最小化至 RMSD 为 3 nm;(2)以每个蛋白自带配体为中心在 receptor grid generation 面板生成活性位点口袋,参数设置为蛋白和配体间范围设置为 1.0/0.8;(3)蛋白-小分子间对接:标准精度,对接次数 20 次,结果去掉极值取平均值,(4)结果指标选择:记录虚拟筛选评价结果对接得分、结合能、氢键指标等数据。

2.4 活性组分-靶蛋白网络分析 依据虚拟筛选结果,以每个脓毒症蛋白自带配体的对接评分为阈值,得分高于该蛋白配体阈值的组分即判定为有潜在生物作用,选取前 10 个组分与以及相对应的靶蛋白导入网络分析图形化软件 Cytoscape(3.2.1 <http://cytoscape.org/>),构建血必净分子-脓毒症蛋白网络,其中分子、脓毒症靶点蛋白用节点表示,分子与靶蛋白间的潜在生物学作用关系用边表示,并选用该软件网络特征分析插件表征网络特性。

结 果

1 靶点选择 通过对脓毒症疾病涉及到靶点网络进行综合性分析,确证了脓毒症疾病相关的药物作用靶点(表 1),并在此基础上考察血必净组方与脓毒症靶点间的作用效应。

2 血必净组方与靶点间作用效应

2.1 单味药材与脓毒症靶点间作用效应(表 2) 丹参、红花与凝血、炎症类靶点间有作用效应分子较多,具有广泛的抗凝血、抗炎症效应。

2.2 血必净组方活性组分与靶点间作用效应(表 3) 与脓毒症靶点有较好作用效应的前 10 个分子分别为组分色氨酸(1)、丹参素(2)、没食子酸(3)、丹酚酸 D(4)、原儿茶酸(5)、丹酚酸 A(6)、丹参素 C(7)、香草酸(8)、迷迭香酸(9)、苯丙氨酸(10)。

3 血必净活性组分分子与靶点间网络效应(图 1,表 4) 血必净组方中既存在 1 个组分与多个靶点存在较强相互作用,如丹参素与 13 个靶点有作用,同时也存在不同组分作用同一个靶点蛋白的现象,如 8 个分子与 MD-2 有作用。

讨 论

相关研究揭示,上述药材具有广泛的抗凝血^[17-19]、抗血小板聚集^[20-22]、抗炎^[23,24] 等作用效应,与本研究结果相一致,上述结果可为中药材中筛选脓毒症药物提供一定借鉴。研究数据阐释了血必净组

表 1 脓毒症疾病涉及的靶点

蛋白名称	蛋白序号	功能
花生四烯酸 5-脂加氧酶 (A5LOX)	自建	催化花生四烯酸中第一步白三烯生物合成,从而发挥作用,属于炎症靶点
环腺苷酸特征性 3',5'-环磷酸二酯酶 4B (PDE4B)	1RO6	水解第二信使 cAM,是许多重要的生理机能关键调节器。可能参与了中枢神经系统的治疗药物的作用,属炎症靶点
磷脂酰胆碱 2-酰水解酶 (PLA24)	1ZYX	催化 3-sn-磷酸甘油酯中酰基的钙依赖性水解。产生的毒素具有神经毒性症状和损害重要器官如肺、肝和肾,属炎症靶点
白三烯 A4 水解酶 (LTA4H)	2R59	催化最后一步的环氧化物水解酶炎症介质白三烯 B4 的合成,属炎症靶点
白介素 1 受体拮抗剂 (IL1RA)	1ILT	通过抑制白介素 1 与其受体结合来发挥抑制白介素 1 活性,不具有白介素 1 相关活性,属炎症靶点
血栓素 A2 受体 (TXA2R)	ILBN	血栓素,一种有效的小血小板聚集刺激因子受体,属凝血靶点
纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)	1DVM	通过抑制纤溶蛋白酶来抑制纤溶,是丝氨酸蛋白酶抑制剂,具有关键的作用。PAI-1 还具有调节细胞黏附作用过程有关的组织重塑功能,属凝血靶点
凝血酶原	3DA9	裂解精氨酸和赖氨酸键,将纤维蛋白原转化成纤维并激活因子 V, VII, VIII, XIII,属凝血靶点
凝血因子 IXa	1RFN	一种维生素 K 依赖性血浆蛋白,通过将因子 X 转换成活性形式钙离子、磷脂和凝血因子 V IIIa 共存方式,参与内源性凝血途径,属于凝血靶点
淋巴细胞抗原 96 (MD-2)	2E56	与 TLR4 一起拮抗细菌脂多糖的先天免疫反应,与 TLR2 共同作用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁成分响应,属于免疫靶点
腺苷受体 A2a (A2AR)	3EML	该受体的活性是通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶介导的,属于免疫靶点
内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)	1M9K	通过 cGMP 介导的信号转导通路产生一氧化氮(NO)来松弛血管平滑肌。介导血管内皮生长因子(VEGF)诱导血管内皮生长因子,促进血液凝固,属免疫靶点
诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)	3E7G	在机体内产生 NO,这是一个信使分子具有不同的功能。在巨噬细胞中,NO 介导杀死肿瘤和杀菌作用。兼具酶活性介导半胱氨酸 S-亚硝基化的细胞质靶蛋白,属于免疫靶点
巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)	2OOZ	促炎性细胞因子。参与了对细菌病原体的先天免疫反应。巨噬细胞移动抑制因子在炎症部位的表达,作为调节宿主防御巨噬细胞功能,属免疫靶点
基质金属蛋白酶-9(MMP-9)	2OW1	在细胞外基质和白细胞迁移中发挥重要作用。将 IV 型和 V 型胶原羧基端片段裂解成较大的 3/4 碳端碎片和较短的 1/4 氮端片段,属免疫靶点
基质金属蛋白酶(MMP-8)	1ZP5	降解纤维型 I、II、III 胶原,属免疫靶点

表 2 血必净组方中与脓毒症靶点间存在作用效应的分子数目

靶点	阈值	红花	丹参	赤芍	当归	川芎	合计
A5LOX	-6.117 553	6	13	8	28	14	69
PDE4B	-8.672 170	3	7	4	7	3	24
PLA24	-3.646 363	28	63	20	37	42	190
LTA4H	-9.707 463	3	2	5	11	1	22
IL1RA	-4.081 739	7	2	6	27	10	52
TXA2R	-5.550 021	3	20	7	10	9	49
PAI-1	-4.484 050	18	31	22	16	19	106
Prothrombin	-5.042 220	0	75	34	67	52	228
IXa	-7.096 682	1	12	2	3	0	18
MD-2	-5.707 128	49	79	30	52	48	258
A2AR	-7.061 453	4	29	11	9	10	63
eNOS	-6.000 381	25	17	13	64	34	153
iNOS	-4.137 221	31	26	22	70	45	194
MIF	-6.090 340	5	11	9	12	10	47
MMP-9	-7.565 032	6	10	5	9	4	34
MMP-8	-9.700 130	3	10	3	5	3	24

注:阈值以每个脓毒症蛋白配体的对接评分为界,得分高于阈值表述为两者间有作用效应

方的多靶点效应,多层面改善内毒素毒性效应,以上述活性组分为先导物(苗头物)进行脓毒症靶点的药物设计与研发。组分-靶点网络层次分析阐释了血必净组方的多靶点作用特征。

表 3 与各类靶点作用效应较好的前 10 个分子多靶点效应

靶点	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MD-2	+	+	+	+	+	+	+		+	
A5LOX	+	+	+	+	+	+		+	+	+
TXA2R	+		+		+	+				
IXa	+	+	+	+	+	+	+		+	
PLA24		+		+		+	+			
PAI-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
LTA4H	+	+	+		+		+	+		+
IL1RA	+	+	+		+			+		+
PDE4B	+		+			+				+
A2AR	+									
eNOS	+	+	+	+	+	+		+	+	+
iNOS	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Prothrombin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MIF	+	+	+	+	+		+	+	+	+
MMP-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-8	+	+	+	+			+	+	+	+

注:“+”表示分子与靶点间存在潜在生物学作用

内毒素 LPS 是脓毒症的起始致病因子,LPS 主要成分脂质 A(lipid A)首先与 LPS 受体结合,激活细胞内信号传导通路,从而诱导炎性介质因子的合成、释放,导致脓毒症疾病的发生。各类感染因素引起细菌

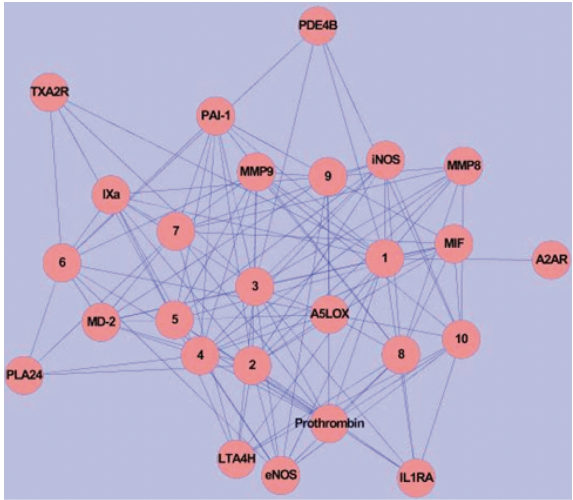


图 1 血必净组方活性组分-靶点作用网络

表 4 活性组分-靶点作用网络

网络类型	直径	半径	集中度	密度	节点数	异质化
B-T	4	2	0.267	0.354	26	0.352

细胞壁破裂释放内毒素,通过与相关受体结合将信号传入胞内,从而引起一系列的级联瀑布式反应并最终将信号转导入细胞核内,使机体代谢网络功能异常紊乱,释放一系列炎性介质因子如白介素-1、肿瘤坏死因子- α 等,上述代谢功能紊乱过程导致机体炎症反应、免疫失衡、凝血紊乱功能的瀑布式级联效应。炎症、免疫以及凝血信号转导通路间存在一定的交汇及级联放大效应。通过对疾病靶点效应图中靶点作用效应采用中药活性组分在整体层面上进行矫正倚偏修饰,可以起到纠正代谢紊乱,恢复正常功能。

结果显示,血必净组方活性分子与 16 个脓毒症靶点间均有一定的作用效应,阐释了血必净组方防治脓毒症疗效发挥的真正药效物质基础,为脓毒症临床应用提供了一定的理论支持,以及从中药成分中筛选防治脓毒症的活性先导物提供启示。

参 考 文 献

[1] Cerro G, Checkley W. Global analysis of critical care burden[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(5): 343-344.

[2] Wang HJ, Wang BZ, Zhang PJ, et al. Identification of four novel serum protein biomarkers in sepsis patients encoded by target genes of sepsis-related miRNAs[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(12): 857-867.

[3] Glaser K, Speer CP. Toll-like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2013, 9(12): 1239-1252.

[4] Leone M, Textoris J, Michel F, et al. Emerging drugs in sepsis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2010, 15(1): 41-52.

[5] 苗木,刘迪. 血府逐瘀汤加减佐治弥散性血管内凝血的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(28): 56-57.

[6] 薛垒喜,陈建荣,陶一江,等. 血必净对 ALI/ARDS 患者呼出气冷凝液中 NO 和 VEGF-A 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 766-769.

[7] 唐丽群,彭娜,潘志国,等. 血必净注射液对严重脓毒症患者凝血指标及预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(3): 132-136.

[8] 李晓会,吴孟娇,张丽娜,等. 虎杖苷对小鼠脓毒症模型 ALT、AST、TNF- α 及 COX-2 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 225-228.

[9] 马世堂,刘培勋,龙伟,等. 血必净抗炎作用药效物质基础和靶点作用效应[J]. 物理化学学报, 2009, 25(10): 2080-2086.

[10] Agrawal R, Jain P, Dikshit SN, et al. 3D QSAR and docking studies of various amido and benzyl-substituted 3-amino-4-(2-cyanopyrrolidide) pyrrolidiny analogs as DPP-IV inhibitors[J]. Protein Pept Lett, 2013, 20(9): 1066-1078.

[11] Albadry MA, Elokely KM, Wang B, et al. Computationally assisted assignment of kahalalide Y configuration using an NMR-constrained conformational search[J]. J Nat Prod, 2013, 76(2): 178-185.

[12] Tripathi SK, Muttineni R, Singh SK, et al. Extra precision docking, free energy calculation and molecular dynamics simulation studies of CDK2 inhibitors[J]. J Theor Biol, 2013, 334: 87-100.

[13] Dai W, Liu X, Zhang Z, et al. A two-level model for the analysis of syndrome of acute ischemic stroke: from diagnostic model to molecular mechanism[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 293010.

[14] 赵丽梅,谭宁华. 国内中药化学成分库建设的现状分析与思考[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3012-3016.

[15] Fu Q, Wang SB, Zhao SH, et al. Three new monoterpene glycosides from the roots of *Paeonia lactiflora* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(7): 697-702.

[16] Wang Y, Song FR, Xu QX. Characterization of aconitum alkaloids in the flowers of *Aconitum kusnezoffii* by electrospray ionization tandem mass

- spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2003, 38 (9): 962-970.
- [17] 陈小明, 曾道亮, 陈奇坚, 等. 丹参粉针剂对高血压患者凝血功能的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10 (11): 1306-1308.
- [18] 王琼, 蒋骊龙, 肖同书, 等. 丹参抑制凝血因子 Xa 和 IIa 的活性部位研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24 (5): 1153-1154.
- [19] 臧宝霞, 吴伟, 李蔚然, 等. 硅胶吸附法制备红花总黄色素抗凝血作用的实验研究 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37 (2): 106-109.
- [20] 周群, 汪晓云, 蔺承艳, 等. 红花注射液对冠心病患者血小板、凝血及纤溶功能的影响 [J]. 中国综合临床, 2002, 18 (10): 888-889.
- [21] 李丽, 李艳红, 王宁生, 等. 当归、红花与硫酸氢氯吡格雷抗血小板聚集的相互作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20 (1): 14-17.
- [22] 陈文梅, 金鸣, 吴伟, 等. 红花黄酮成分抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用 [J]. 药学报, 2001, 36 (12): 881-885.
- [23] 徐德魁. 丹参对小鼠炎症性肠病的治疗作用及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2012.
- [24] 陈亭亭, 杜玉娟, 刘晓雷, 等. 羟基红花黄色素 A 对脑缺血大鼠皮层炎症信号转导途径相关因子的抑制作用 [J]. 药学报, 2008, 43 (6): 570-575.
- (收稿: 2014-01-03 修回: 2015-07-25)

2015 年度全国中西医结合教育研讨会在长沙举行

2015 年度全国中西医结合教育研讨会暨中国中西医结合学会第六届教育工作委员会换届会议于 2015 年 8 月 25—28 日在湖南长沙召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办、中西医结合学会教育工作委员会和湖南中医药大学承办。来自全国 140 余名从事中西医结合教育事业专家出席了此次会议。

研讨会围绕中西医结合人才培养及创新教育、专业建设、课程和教材建设等 10 个专题进行了交流和探讨。中国中医药出版社社长王国辰对中西医结合规划教材建设情况和与会专家进行了交流; 国家中医药管理局医政司中西医结合与民族医药处处长赵文华向与会代表介绍了中西医结合事业的发展历程、目前的现状及今后发展的思路及国家相关政策; 中国中西医结合杂志编辑部主任李焕荣针对如何进行中西医结合论文的发表以及常见的问题进行了分析; 中国高等教育学会秘书长康凯做了“大学——国之重器”的专题讲座, 探讨了大学的社会作用以及如何培养高质量的人才。

来自全国各地的 10 名专家做了专题报告, 分享了各校在中西医结合人才培养与教学实践中的体会与经验, 给与会代表们提供了宝贵的经验。北京中医药大学司银楚教授做了“来华留学生的中医药教育现状分析及对策”的交流报告, 分享了北京中医药大学中医药留学生教育经验; 上海中医药大学郝微微教授就中西医结合临床教学资源的优化进行了交流; 河北中医学院丁旭教授结合该校经验和与会专家一起探讨了如何培养和提高中西医临床医学专业临床技能; 福建中医药大学蔡晶教授、扬州大学医学院朱虹副教授分别针对中西医结合应用型人才的培养做出思考; 南方医科大学贾钰华教授、广州中医药大学周红教授分享了各自学校中西医结合课程和教学模式的改革成效; 湖南中医药大学卢芳国教授通过中西医结合学生的实际案例对如何指导大学生创新性课题的申报和提高学生创新能力进行了汇报; 贵阳中医学院第二临床学院黄礼明教授对中西医结合高等教育的现状和发展思路进行了思考; 四川医科大学沈宏春副教授对如何在“5+3”模式下提高中西医结合临床医学专业的能力进行了思考, 并提出了相关策略。

会议总结了 2015 年度中国中西医结合学会第六届教育工作委员会的主要工作, 同时选举产生了以何清湖为主任委员的中国中西医结合学会第七届教育工作委员会, 并对下一阶段中西医结合教育工作委员会的工作进行了规划。

(刘晓丹 王国佐整理)