

doi: 10.13705/j.issn.1671-6825.2019.01.035

## 丹参活性成分靶点分子网络的生物信息学预测

张 牧<sup>1)</sup> 易朝辉<sup>2)</sup> 杨红梅<sup>3)</sup> 宋新强<sup>4)</sup> ,代二琴<sup>4)</sup> 李开鸣<sup>4)</sup> 刘迎福<sup>5)</sup>

1) 信阳师范学院医院 河南信阳 464000 2) 信阳职业技术学院心理咨询室 河南信阳 464000 3) 北京体育大学学术期刊社 北京 100084 4) 信阳师范学院生命科学学院 河南信阳 464000 5) 厦门大学医学院基础医学系 福建厦门 361005

关键词 丹参; 心血管疾病; 生物信息学分析; 分子网络

中图分类号 R541

**摘要** 目的: 采用整合生物信息学方法预测丹参治疗心血管疾病的潜在机制。方法: 从 PubChem 数据库中搜索丹参靶蛋白, 从 NCBI 数据库中搜索心血管疾病相关基因, 利用 IPA 比较、分析搜索结果, 预测丹参治疗心血管疾病的交互作用分子网络。结果: 丹参治疗心血管疾病的靶标蛋白主要有 FASN、PAFAH1B2、PLA2G7、PAFAH1B3 和 IL-1 $\beta$ , 这些蛋白主要涉及 LXR/RXR 活化、动脉粥样硬化、肝纤维化/肝星形细胞活化、急性反应期信号、FXR/RXR 活化等信号传导通路; 交互作用分子网络主要涉及细胞运动、免疫细胞运输、血液系统发育, 参与 DNA 的复制、重组和修复等。结论: 预测了丹参治疗心血管疾病的几个蛋白质靶点以及参与的信号途径; 整合生物信息学方法可以用于分析小分子化学成分的作用机制。

## Informatics – based prediction of molecular networks targeting active ingredients in Danshen( *Salvia miltiorrhiza* Bunge)

ZHANG Mu<sup>1)</sup> ,YI Zhaohui<sup>2)</sup> ,YANG Hongmei<sup>3)</sup> ,SONG Xinqiang<sup>4)</sup> ,DAI Erqin<sup>4)</sup> ,LI Kaiming<sup>4)</sup> ,LIU Yingfu<sup>5)</sup>

1) The Hospital Affiliated to Xinyang Normal University Xinyang Henan 464000 2) Psychological Counseling Room Xinyang Vocational and Technical College Xinyang Henan 464000 3) Academic Journals , Beijing Sport University Beijing 100084 4) Department of Biological Sciences Xinyang Normal University Xinyang Henan 464000 5) Department of Basic Medical Sciences Medical College Xiamen University , Fujian Xiamen 361005

**Keywords** *Salvia miltiorrhiza* Bunge; cardiovascular disease; bioinformatics analysis; molecular network

**Abstract** **Aim:** To identify the possible mechanisms of Danshen( *Salvia miltiorrhiza* Bunge) treating cardiovascular disease using integrative bioinformatics method. **Methods:** Possible human proteins targeted by Danshen were identified in the PubChem database , possible human gene related with cardiovascular disease were identified in the NCBI database , and then both sets were analyzed using IPA( ingenuity pathway analysis) to predict molecular networks about Danshen in cardiovascular disease treatment. **Results:** The targeted proteins of Danshen in cardiovascular disease treatment included FASN , PAFAH1B2 , PLA2G7 , PAFAH1B3 and IL1B , and they were involved primarily in LXR/RXR activation , atherosclerosis signaling transduction , hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation , acute phase response signaling , FXR/RXR activation. The main action networks were predicted to be involved in cellular movement , immune cell trafficking , hematological system development , and DNA replication , recombination , and repair. **Conclusion:** Several specific proteins and pathways of Danshen in cardiovascular disease treatment have been predicted , and integrative bioinformatics analysis has showed the power in chemical fragment mechanistic studies.

【基金项目】国家自然科学基金项目( U1804179) ; 河南省创新型科技团队项目( 2017083)

【作者简介】宋新强 通信作者 男 ,1974年5月生 博士 副教授 研究方向: 中药靶点筛选 ,E-mail: xqsong2012@126.com

心血管疾病是全球主要健康负担,也是世界上最常见的死亡原因<sup>[1-3]</sup>。丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是著名的中药,通常被用作血液流变剂来改善血液循环,消除末梢血液淤积<sup>[4-6]</sup>。许多丹参处方中除了丹参,还包含其他中药,已经被中国食药监局批准并在临床广泛使用,包括丹参胶囊、丹参丸、复方丹参滴丸、丹参酮胶囊等。目前已经从丹参中分离出超过100种生物活性化合物,这些物质通常分为水溶性成分(如丹酚酸、紫草酸B)和脂溶性成分(主要为丹参酮,如丹参酮II A、隐丹参酮、丹参酮II B)。所有这些化合物已经被应用于治疗心血管疾病<sup>[7-9]</sup>。虽然丹参在我国广泛应用,但其作用机制仍未被充分了解。本研究通过整合生物信息学方法预测丹参发挥作用的信号通路和靶点,并利用在线分析软件IPA(ingenuity pathway analysis)构建交互作用分子网络,以期明确丹参活性成分可能的作用靶点和信号通路,探索更详细的有关作用机制的信息。

## 1 材料与方法

**1.1 心血管疾病相关基因的搜索** 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因数据库中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>,截止到2017年4月28日)以“心血管疾病”为搜索条目搜索与心血管疾病相关的基因。搜索结果经过过滤,只保留与人类相关的基因。

**1.2 丹参靶标蛋白的搜索** 在小分子PubChem数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>,截止到2017年4月28日)的生化实验数据库(PubChem BioAssay)、化合物化学结构信息数据库(PubChem Compound)、机构和个人上传的化合物原始数据库(PubChem Substance)中搜索丹参活性成分的靶标蛋白。丹参活性成分包括丹酚酮II A(CID: 164676),丹酚酸B(CID: 6451084),原儿茶醛(CID: 8768),丹参素(CID: 11600642),丹参酮(CID: 160254),三七皂苷R1(CID: 441934),人参皂苷Rg1(CID: 441923),三七皂苷Rb1(CID: 122389845)和龙脑(CID: 64685)。通过过滤只保留与人类有关的蛋白质。

**1.3 丹参靶标蛋白交互作用分子网络的预测** 基于1.1和1.2搜索结果,利用IPA([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com))根据这些分子的功能,通过通路分析,建立丹参靶标蛋白交互作用分子网络。不同形状节点代表功能不同的分子,节点之间的联系至少有一个在文献、教科书或数据库中得到支持。由IPA生成分子网络,采用IPA中的“比较”模块,基于Fisher精确

概率计算,分析分子与信号通路之间的关联性。最后,通过比较两个网络确定丹参在心血管疾病中最有可能的靶点。分析流程见图1。

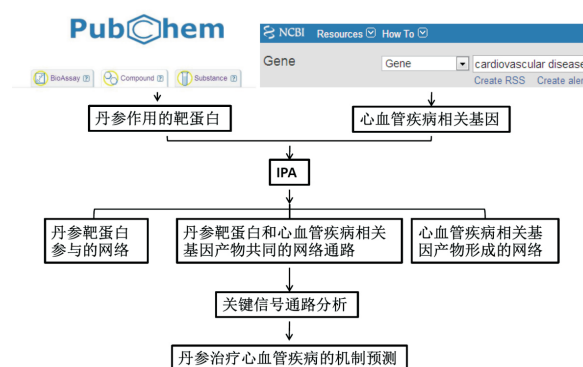


图1 生物信息学分析流程图

## 2 结果

**2.1 心血管疾病相关的基因网络及其功能** 共搜索到与心血管疾病相关的基因419条,利用IPA将这些基因编码的蛋白质组装成25组网络(图2)。这些基因主要涉及LXR/RXR活化、动脉粥样硬化信号传导、肝纤维化/肝星状细胞活化、急性反应期信号传导、FXR/RXR活化等。

**2.2 丹参靶标蛋白分子网络及其功能** 从PubChem数据库鉴定出99个丹参靶标蛋白,将它们的基因信息标识符号(GI)导入IPA生成蛋白质-蛋白质交互作用网络。结果显示,丹参靶标蛋白主要涉及JAK2信号通路、芳香烃受体信号传导通路、细胞毒性T淋巴细胞介导的靶细胞凋亡通路、JAK/STAT信号传导通路等(图2)。

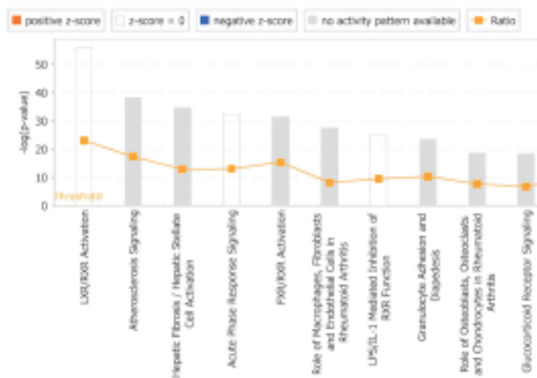
**2.3 丹参治疗心血管疾病网络的预测** 对上述两组信号通路进行交叉网络方法预测,共有33个信号通路在心血管疾病相关信号通路和丹参靶标蛋白信号通路中重叠。这些重叠通路主要涉及LXR/RXR活化、动脉粥样硬化信号传导、肝纤维化/肝星状细胞活化、急性反应期信号传导、FXR/RXR活化等(图3)。25个网络与心血管疾病相关,丹参靶点网络有9个,两组共享9个网络;这些网络主要涉及细胞运动、免疫细胞运输、血液系统发育、心血管疾病,参与DNA复制、重组、修复等,如图4。

**2.4 心血管疾病中丹参特异靶标蛋白的预测** 丹参作用的、与心血管疾病相关的靶标蛋白参与了几个关键通路。我们从IPA类别中筛选两个与心血管疾病和丹参靶标蛋白相关的通路,即LXR/RXR活化和动脉粥样硬化信号传导通路。这些通路中的几

个节点成为心血管疾病中丹参作用的直接靶点,包括 FASN、PAFAH1B2、PLA2G7、PAFAH1B3 和 IL-

1 $\beta$ (图5)。

Analysis: 2 cardiovascular disease genes - 2017-04-28 11:51 AM



Analysis: 2 FuTing danShen-target proteins - 2017-04-28 11:29 AM

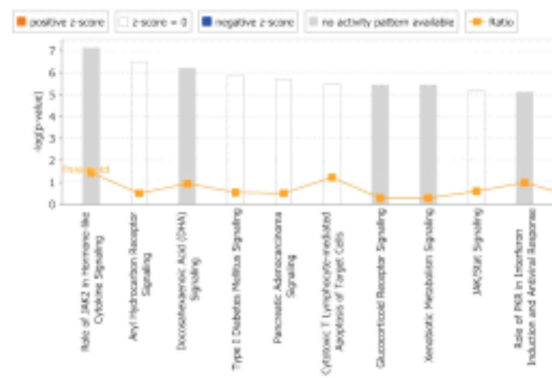
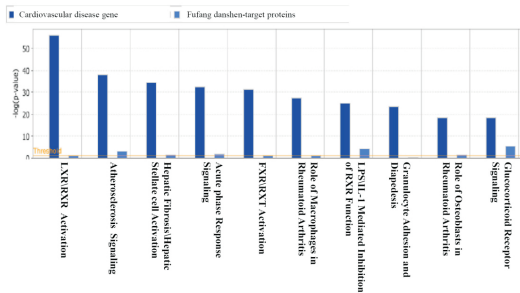


图2 心血管疾病相关基因(左)及丹参靶标蛋白(右)涉及的信号通路



左:网络主要涉及细胞运动、免疫细胞运输、血液系统发育、DNA的复制重组和修复等;右:网络主要涉及脂代谢、小分子生物化学、血液系统发育等

图3 心血管疾病和丹参靶标蛋白共同涉及的信号通路

图4 两个心血管疾病和丹参靶标蛋白共享的分子网络

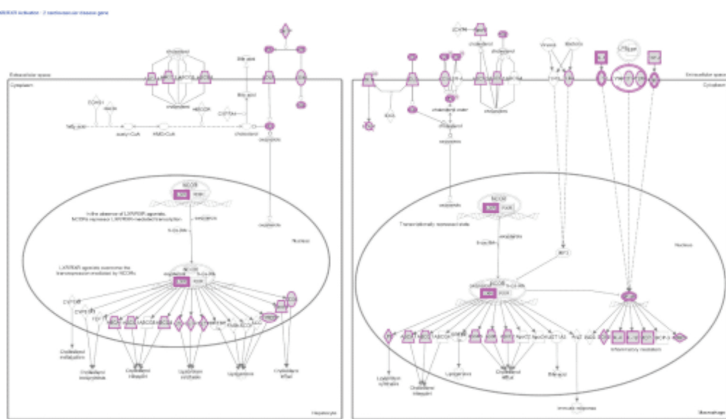
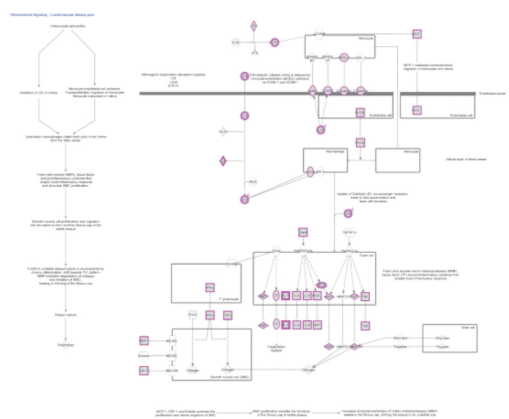


图5 LXR/RXR 活化(左)和动脉粥样硬化(右)信号传导通路的示意图(深灰代表丹参靶点)



### 3 讨论

我们利用开放的与心血管疾病基因数据库和已知或预测丹参作用的蛋白质或蛋白质片段数据库,通过整合生物信息学分析方法,确定了一些与心血管疾病有关并受丹参调控的信号传导通路和网络,

并且预测出与心血管疾病相关的几个丹参作用的特异蛋白质靶点,这为更详细的机制研究提供了参考。

我们的网络分析结果提示,丹参治疗心血管疾病的机制可能涉及细胞运动、免疫细胞运输、血液系统发育,DNA的复制、重组和修复等。研究结果与体内外若干研究的一致性提示丹参活性成分发挥心

血管保护效应可能是通过清除自由基和超氧阴离子自由基,抑制血管平滑肌细胞的炎症反应、氧化反应、血栓形成和增殖<sup>[10-15]</sup>而实现的。丹参活性成分也可能有抑制血管内皮细胞和白细胞中黏连分子的表达,减轻急性心肌缺血损伤<sup>[16-18]</sup>的作用。

IPA 分析结果显示,丹参可以通过调控 LXR/RXR 活化、动脉粥样硬化、肝纤维化/肝星形细胞活化、急性反应期信号、FXR/RXR 活化等信号传导通路,减轻心血管疾病。同时也鉴定出 FASN、PAFAH1B2、PLA2G7、PAFAH1B3 和 IL-1 $\beta$  是丹参抗心血管疾病的作用靶点。已有研究<sup>[19]</sup>显示,丹参能够抑制炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  mRNA 和蛋白的表达。目前鉴定出的其他几个靶点未曾有文献报道。

综上所述,我们认为利用整合生物信息学分析方法筛选丹参治疗心血管疾病涉及的信号通路和靶蛋白是一个很有创意的方法,这种方法适合探索生物活性分子的作用机制。

#### 参考文献

- [1] BUJA LM ,VANDER HEIDE RS. Pathobiology of ischemic heart disease: past ,present and future [J]. *Cardiovasc Pathol* 2016 25(3) : 214
- [2] CRNKO S ,DU PRE BC ,SLUIJTER JP ,et al. Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease [J]. *Nat Rev Cardiol* 2019 16(7) : 437
- [3] DYAKOVA M ,SHANTIKUMAR S ,COLQUITT JL ,et al. Systematic versus opportunistic risk assessment for the primary prevention of cardiovascular disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev* 2016(1) : CD010411
- [4] XU S ,LIU P. Tanshinone II-A: new perspectives for old remedies [J]. *Expert Opin Ther Pat* 2013 23(2) : 149
- [5] GAO S ,LIU Z ,LI H ,et al. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II A [J]. *Atherosclerosis* , 2012 220(1) : 3
- [6] CHEN Z ,XU H. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanism of tanshinone II A for atherosclerosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* ,2014. doi: 10. 1155/2014/267976
- [7] WU CF ,HONG CL ,KLAUCK SM ,et al. Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *J Ethnopharmacol* 2015 , 176: 55
- [8] WU CY ,YANG YH ,LIN YY ,et al. Anti-cancer effect of danshen and dihydroisotanshinone I on prostate cancer: targeting the crosstalk between macrophages and cancer cells via inhibition of the STAT3/CCL2 signaling pathway [J]. *Oncotarget* 2017 8(25) : 40246
- [9] SONG ZQ ,GUO LL ,LIU T ,et al. Comparative RNA-sequence transcriptome analysis of phenolic acid metabolism in *Salvia miltiorrhiza* , a traditional Chinese medicine model plant [J]. *Int J Genomics* ,2017. doi: 10. 1155/2017/9364594
- [10] FAN GW ,GAO XM ,WANG H ,et al. The anti-inflammatory activities of tanshinone II A , an active component of TCM , are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009 113(3/5) : 275
- [11] ZHANG XX ,MA ZC ,LIANG QD ,et al. Tanshinone II A exerts protective effects in a LCA-induced cholestatic liver model associated with participation of pregnane X receptor [J]. *J Ethnopharmacol* 2015 164: 357
- [12] HO JH ,HONG CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. *J Biomed Sci* 2011 18: 30
- [13] HUR KY ,SEO HJ ,KANG ES ,et al. Therapeutic effect of magnesium lithospermate B on neointimal formation after balloon-induced vascular injury [J]. *Eur J Pharmacol* , 2008 586(1/3) : 226
- [14] SHI MJ ,DONG BS ,YANG WN ,et al. Preventive and therapeutic role of tanshinone A in hepatology [J]. *Biomed Pharmacother* 2019. doi: 10. 1016/j. biopha. 2019. 108676
- [15] QIAN W ,WANG ZL ,XU TD ,et al. Anti-apoptotic effects and mechanisms of salvianolic acid A on cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury [J]. *Histol Histopathol* ,2019 , 34(3) : 223
- [16] HAN JY ,FAN JY ,HORIE Y ,et al. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther* ,2008 ,117(2) : 280
- [17] XIA HR ,SUN LR ,LOU HX ,et al. Conversion of salvianolic acid B into salvianolic acid A in tissues of *Radix Salviae miltiorrhizae* using high temperature , high pressure and high humidity [J]. *Phytomedicine* 2014 21(6) : 906
- [18] BI HC ,ZUO Z ,CHEN X ,et al. Preclinical factors affecting the pharmacokinetic behaviour of tanshinone II A , an investigational new drug isolated from *Salvia miltiorrhiza* for the treatment of ischaemic heart diseases [J]. *Xenobiotica* , 2008 38(2) : 185
- [19] MA SL ,ZHANG DW ,LOU HX ,et al. Evaluation of the anti-inflammatory activities of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* roots in THP-1 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol* 2016 188: 193

(2019-01-08 收稿 责任编辑王 曼)