

• 实验研究 •

基于网络药理学、分子对接和分子动力学模拟技术探讨 双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制

陈 帅¹, 龙玉淮¹, 李媛媛¹, 陈福长¹, 钱海珊², 王 亭^{1,3}, 何红平^{1,3*}, 李宝晶^{1,3*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第一附属医院, 云南 昆明 650021;
3. 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 研究双姜胃痛丸中活性成分治疗胃炎的作用方式与分子机制。方法 通过中药系统药理学数据库(TCMSP)、本草组鉴(HERB)、公共化学数据库(PubChem)、药物吸收分布代谢排序毒性预测平台(ADMET lab 2.0)和小分子靶点预测平台(Swiss Target Prediction)获取双姜胃痛丸的有效活性成分与靶点。利用人类基因数据库(GeneCards)和人类在线孟德尔遗传数据库(OMIM)获取胃炎靶点。使用韦恩图与 Cytoscape 3.9.1 获取交集靶点、中药-成分-靶点-疾病网络并根据 Degree 值获取核心成分。STRING 蛋白质互作平台用于获取蛋白质互作网络(PPI), 并根据 Degree 值得到核心靶点。对核心靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因百科全书(KEGG)富集分析, 获取核心信号通路。最后运用分子对接和分子动力学模拟对核心信号通路中的靶点与核心成分进行结合验证。结果 网络药理学分析结果显示双姜胃痛丸中的 22 个核心成分可能通过调节 16 个核心靶点发挥治疗胃炎的作用, 表皮生长因子受体(EGFR)信号通路是其治疗胃炎的核心通路。分子对接结果证实了核心成分与 EGFR 信号通路中的关键靶点 EGFR、糖原合酶激酶 3β(GSK3B)、Janus 激酶 1(JAK1)和酪氨酸蛋白激酶-SRC(SRC)之间形成了强烈的结合。其中 Desglucoanagalloside B(DBR12)、Methyl lucidenate F(KCZ14)、Cyqualon(JH14)与 EGFR 的结合能分别为 -10、-9.3 和 -9.1 kcal/mol, 结合程度优于 EGFR 共晶配体。分子动力学模拟结果验证了 EGFR 与核心成分 DBR12、KCZ14 和 JH14 之间形成了稳定而强烈的结合, 分子力学/广义玻恩表面积(MM/GBSA)方法计算平均结合自由能分别为 -39.28、-23.19 和 -42.03 kcal/mol。结论 双姜胃痛丸在胃炎的治疗中具有多成分多靶点多信号通路协同作用的特点, EGFR、GSK3B、JAK1 和 SRC 可能为其中的关键靶点, EGFR 信号通路为核心信号通路, 为进一步研究双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制提供科学依据。

关键词: 双姜胃痛丸; 胃炎; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟

中图分类号: R256.3; R285; R29 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2024)05-0057-15

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.05.010

Exploring the Molecular Mechanism of Shuangjiang Weitong Pill in the Treatment of Gastritis Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations

CHEN Shuai¹, LONG Yuhuai¹, LI Yuanyuan¹, CHEN Fuchang¹, QIAN Haishan²,
WANG Ting^{1,3}, HE Hongping^{1,3}, LI Baojing^{1,3}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China;
2. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
3. College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization,
Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(82260832, 81860760); 云南省科技计划项目(202101AZ070001-159); 云南省南药可持续利用研究重点实验室基金项目(202105AG070012); 云南省科技人才与平台计划(202305AC160039)

作者简介: 陈 帅(1999-), 男, 在读硕士研究生, E-mail: 965737961@qq.com

* 通信作者: 李宝晶(1988-), 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药效物质基础及作用机制, Email: libaojingcpu@163.com;
何红平(1972-), 男, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 药物化学研究, E-mail: 95431111@qq.com

ABSTRACT: Objective To explore the molecular mechanism of the active compounds in Shuangjiang Weitong Pill in the treatment of gastritis. Methods Traditional Chinese Medicine Systemic Pharmacology Analysis Platform (TCMSP), High-Throughput Experimental and Reference Database for Traditional Chinese Medicines (HERB), Public Chemical Database (PubChem), online prediction platform for drug-induced pharmacogenicity and toxicity indicators (ADMET lab2.0), online prediction platform for compound-related targets (Swiss Target Prediction) were used for obtaining active compounds and targets. Gastritis targets were extracted by using the human gene database (GeneCards) and the human online mendelian genetic database (OMIM). The intersection target and compound-target-disease network were obtained through Venn diagram and Cytoscape3.9.1. The core compounds were determined according to the Degree value. Protein interaction network (PPI) was from STRING. The core targets were determined according to the Degree value. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genes (KEGG) enrichment analysis were performed on the core targets and the core signaling pathway was obtained. Finally, molecular docking and molecular dynamics simulations were used to verify the binding of core targets and components. Results The results of network pharmacological analysis showed that the 22 core components in Shuangjiang Weitong Pill may play a role in the treatment of gastritis by regulating 16 core targets. The epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway was the core pathway of Shuangjiang Weitong Pill in the treatment of gastritis. The molecular docking results confirmed the strong binding between the core components and the key targets in the EGFR signaling pathway, EGFR, GSK3B, JAK1 and SRC. The binding energies of Desglucoanagallolose B (DBR12), Methyl lucidene F (KCZ14) and Cyqualon (JH14) to EGFR were -10, -9.3 and -9.1 kcal/mol, respectively, and the binding degree was better than that of EGFR eutectic ligands. Molecular dynamics simulations verified EGFR formed stable and strong binding to DBR12, KCZ14 and JH14 and the average binding free energies calculated by the molecular mechanics/generalized Born surface area (MM/GBSA) method were -39.28, -23.19 and -42.03 kcal/mol, respectively. Conclusion Shuangjiang Weitong Pill had the characteristics of multi-component, multi-target and multi-signaling pathway synergy in the treatment of gastritis. EGFR, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3B), janus kinase 1(JAK1) and tyrosine protein kinase-SRC(SRC) may be the key targets, and the EGFR signaling pathway was the core signaling pathway. This can provide a scientific basis for further research on the mechanism of action of Shuangjiang Weitong Pill in the treatment of gastritis.

KEY WORDS: Shuangjiang Weitong Pill; gastritis; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulation

胃炎，是一种由多种病因引起的胃黏膜炎症，可突发急性胃炎，或随时间推移缓慢发展为慢性胃炎^[1]。流行病学调查显示，国内以长期的慢性胃炎患者居多，基于内镜诊断的慢性胃炎患病率接近 90%，且随着工作生活压力增大和不良的饮食习惯等，慢性胃炎的患病人数日益增加^[2]。胃炎的发病与幽门螺旋杆菌感染、酗酒和长期服用非甾体抗炎药有关^[1]。如未及时治疗，长期的胃炎使罹患胃溃疡和胃癌的概率增加^[3-4]。目前，西医治疗慢性胃炎的方式主要有抗幽门螺旋杆菌、保护胃黏膜和局部抗炎等，治疗效果快，但复发率高^[2]。

胃炎，傣医称之为“接崩”，“接崩”的发生与三塔失调密切相关，如饮食不当，土塔（脾胃）损伤；或寒凝中盘，水食不能温化，停积中盘胃中；或水塔不足，水不制火，胃火偏盛；或风气不足，水谷运化失利。即胃炎与风、土、水塔失调有关，需以热则解、寒则温、虚则补、积则消为原则针对性治疗^[5]。双姜胃痛丸，是源自傣药经方“雅叫帕中补”研制而成中成药，临床用于治疗胃胀痛、反酸和慢性浅表性胃炎等。组方包括姜黄

（君）、紫色姜（君）、地不容、石菖蒲和苦菜子。其中姜黄和紫色姜，性温、味微辣，入风土二塔，对消化不良、胃溃疡和胃胀气等具有良好的治疗效果；石菖蒲，入风土水三塔，治疗脘腹胀痛，食欲低下等；地不容和苦菜子入土塔，可解疮毒治腹痛，和胃消食。双姜胃痛丸，入风土水三塔，与胃炎的病因风、土、水塔失调对应^[6]。研究表明，双姜胃痛丸对热刺激和甲醛诱导的小鼠右后足疼痛有显著缓解作用^[7]。同时，可显著改善葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)，具体机制与双姜胃痛丸激活过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPARG)并调节辅助性 T 细胞 17 和调节性 T 细胞(Th17/Treg)的增殖分化有关^[8]。

傣医在临床应用中，将双姜胃痛丸中五味药加适量米汤、蜂蜜共煎煮，用于治疗脘腹胀满疼痛、便秘、气阻不通等症状。患者连服两周，饮食恢复正常，腹部症状消失^[6]。双姜胃痛丸组方在傣医临床应用中对胃炎有很好的治疗效果，但具体作用机制尚不清楚。近年来，网络药理学因其使用网络分析的方式在梳理中药成分靶点疾病之间的关系方面非常便利，其已被广

泛用于探索天然药物与疾病的相互联系,这种方法使中医从基于经验的治疗转变为基于具体科学证据的治疗^[9]。因此本研究结合网络药理学、分子对接^[10]和分子动力学模拟^[11]等方法探讨了双姜胃痛丸在治疗胃炎中涉及的活性成分、核心靶点与信号通路,为今后的临床研究提供科学参考。

1 资料与方法

1.1 数据库与软件 PubChem 有机小分子生物活性数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) ; HERB 中药高通量实验和参考数据库 (herb.ac.cn) ; TCMSP 中药系统药理学分析平台 (<https://old.tcmsp-e.com/index.php>) ; ADMET lab 2.0 药物成药性与毒性指标在线预测平台 (<https://admetmesh.scbdd.com>) ; Swiss Target Prediction 化合物相关靶点在线预测平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) ; GeneCards 人类基因数据库 (<https://www.genecards.org>) ; OMIM 人类孟德尔遗传数据库 (<https://www.omim.org>) ; STRING 蛋白质互作平台 (<https://cn.string-db.org>) ; UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 和 PDB 蛋白质数据库 (<https://www1.rcsb.org>) ; 函数绘图软件 Origin Pro 2023 (学术版) ; 网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.9.1; 统计分析与绘图语言软件 R 4.2.2; 分子三维结构显示软件 PyMOL 2.3.0; 开放化学工具箱 Open Babel 3.1.1; 自动对接工具 Auto Dock Tools 1.5.6 和 Auto Dock Vina 1.2.0; 分子动力学模拟程序包 Gromacs 2022.4。

1.2 双姜胃痛丸活性成分的获取与相关靶点的筛选

TCMSP、PubChem、HERB 数据库用于收集双姜胃痛丸五味中药的化学成分。联合使用 TCMSP 和 ADMET lab2.0 平台筛选出口服利用度 (OB) 大于 30%、类药性(DL)大于 0.18、符合利平斯基类药五规则的潜在活性成分,然后使用 Swiss Target Prediction 数据库获取活性成分相关靶点^[12-13]。

1.3 胃炎靶点获取、PPI 蛋白质互作网络与“中药成分靶点疾病”网络构建 GeneCards 与 OMIM 数据库用于获取胃炎相关靶点。Origin 软件用于获取中药活性成分与疾病的共同靶点。将共同靶点导入 STRING 数据库, 设置 Organisms 为 Homo Sapiens, minimum required interaction score 为 0.400 并获取 PPI 蛋白互作网络文件。Cytoscape 软件用于绘制 PPI 网络与“中

药成分靶点疾病”网络。取 PPI 网络中 degree 值排名前 50 的靶点与“中药成分靶点疾病”网络中 degree 值排名前 50 的靶点的交集靶点作为双姜胃痛丸治疗胃炎核心靶点;“中药成分靶点疾病”网络中每味中药中 degree 值大于 35 的成分作为双姜胃痛丸治疗胃炎核心成分^[14]。

1.4 GO 与 KEGG 富集分析 R 软件和微生信在线绘图平台用于对核心靶点的 GO 与 KEGG 富集分析, 获取 GO 功能注释与 KEGG 信号通路, 以 $-\text{Log}_{(10)}\text{P}$ 值为标准绘制 GO 和 KEGG 气泡图, $-\text{Log}_{(10)}\text{P}$ 值小于 0.05 被认为有统计学意义^[15-16]。最后使用 R 软件绘制相关性最高的信号通路图^[17]。

1.5 分子对接 将核心靶点与核心成分进行分子对接。PDB 数据库用于获取核心靶点的蛋白 3D 结构, 并使用 PyMOL 软件删除蛋白中结晶水、配体和杂质分子。PubChem 数据库用于获取核心成分的小分子 3D 结构, 并使用 Open Babel 软件中的 MMFF94 力场优化分子结构。Auto Dock Tools 软件用于补全蛋白和小分子缺失的氢, 并判定小分子内可扭转的化学键。分子对接结合位置建立在蛋白中已报到的小分子抑制剂所在位置。Auto Dock Vina 用于分子对接计算, 对接方式为半柔性对接, 算法为拉马克遗传算法, 对接精度参数 exhaustiveness=25^[18-19]。同时取蛋白中共晶配体进行分子对接方法学验证并计算均方根偏差(RMSD)值, RMSD 值小于 2 被认为方法学验证通过^[20]。最后使用 Origin、PyMOL 软件分析分子对接结果。结合能代表小分子与蛋白的结合亲和力, 结合能小于 0 kcal/mol 代表小分子与蛋白可以自发的结合, 小于 -7.2 kcal/mol 代表结合程度强烈, 结合能绝对值越高, 复合物的稳定性越好^[21]。同时, 以蛋白中共晶配体与蛋白的结合能作为对照组, 筛选与蛋白结合能优于共晶配体的核心成分进行进一步模拟验证。

1.6 分子动力学模拟 分子对接采用的半柔性对接目前无法考虑蛋白质结构的柔性, 为了进一步证明配体与蛋白质之间结合的程度与稳定性, 本文对分子对接结果进行了 100 ns 的分子动力学模拟。

使用 Gromacs 2022.4 程序包对分子对接得到的蛋白质配体复合物进行 100 ns 的分子动力学模拟。用于处理蛋白和配体的力场分别为 Amber14sb 和 Gaff2。对体系添加 single point charge(SPC)水模型并

建立周期性边界为 1.2 nm 的水盒子。粒子网格(PME)方法被用于计算长程静电相互作用,使用蒙特卡罗离子放置法引入适当数量钠离子和氯离子以中和整个系统的电荷^[22]。

在正式模拟之前,通过执行以下三步进行系统能量最小化和平衡:(1)使用 50 000 步的最速下降算法实现每个系统的能量最小化(Stop minimization when the maximum force<1 000 kJ/mol)。(2)保持恒定的粒子数、体积和温度(310 K),对每个系统进行步长为 2 fs 的 50 000 步预平衡。(3)保持恒定的粒子数、压力(一个大气压)和温度(310 K),对整个体系进行步长为 2 fs 的 50 000 步预平衡。在系统能量最小化和平衡后,在没有任何约束的情况下以步长为 2 fs 的时间进行 100 ns 的分子动力学模拟,同时每 10 ps 对结构坐标进行一次保存^[23]。最终我们分析了复合物的分子动力学模拟轨迹中的均方根偏差(RMSD)、均方根波动(RMSF)、回转半径(Rg)、溶剂可及表面积(SASA)以及复合物中蛋白质与化合物之间氢键数目、相对自由能能量分布、0、25、50、75、100 ns 5 个时刻的整体结构对比,此外我们利用了 MM/GBSA 方法计算了蛋白质与配体之间的结合自由能^[24]。

2 结果

2.1 双姜胃痛丸活性成分与相关靶点 从 PubChem、HERB、TCMSP 数据库中共获得双姜胃痛丸中,姜黄(JH)322 个,紫色姜(ZSJ)80 个,石菖蒲(SCP)175 个,地不容(DBR)20 个,苦菜子(KCZ)74 个,共 610 个化学成分,经 TCMSP 和 AMDET lab2.0 平台筛选共得到 173 个活性成分。将活性成分的 Smiles ID 输入 Swiss Target Prediction 平台,共收集到活性成分相关靶点 957 个。

2.2 疾病靶点与交集靶点的获取 从 GeneCards 和 OMIM 数据库获取胃炎相关靶点共 1 551 个,使用 Origin 软件对中药活性成分相关靶点与疾病相关靶点做交集,共获得 226 个交集靶点。如图 1。

2.3 PPI 蛋白互作网络与“中药成分靶点疾病”网络构建 使用 String 蛋白互作分析平台和 Cytoscape 软件构建 PPI 蛋白互作网络和“中药-成分-靶点-疾病”网络,如下图 2 和 3。最终得到核心成分 22 个,具体信息和结构如图 4 与表 1。核心靶点 16 个,分别为非受体酪氨酸激酶(ABL1)、丝/苏氨酸特异性蛋白激

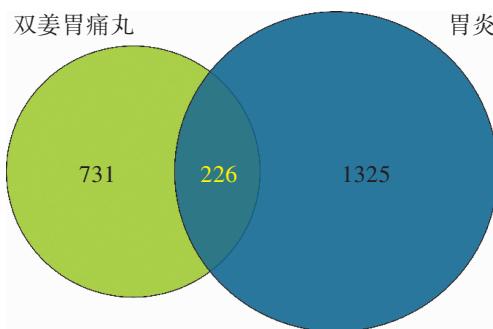


图 1 中药疾病交集靶点

酶(BRAF)、EGFR、GSK3B、JAK1、丝裂原活化蛋白激酶激酶 1(MAP2K1)、丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)、丝裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)、E3 泛素连接酶 MDM2、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(MTOR)、DNA 修复酶 PARP1、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α(PIK3CA)、前列腺素内过氧化物合酶(PTGS2)、SRC、信号传导及转录激活蛋白 3(STAT3)。

2.4 GO 与 KEGG 富集分析 GO 分析共富集到与交集靶点相关的 1 849 个 Biological process(BP)、93 个 Cellular component(CC) 和 140 个 Molecular function(MF),按照 $-\log_{10}P$ 值的顺序从 BP、CC、MF 中选择前十个条目绘制 GO 柱状分类图,如图 5。发现 BP 与肽基丝氨酸磷酸化、肽基丝氨酸修饰等有关;CC 与核包膜、细胞前沿等有关;MF 与蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性等有关。KEGG 分析共富集到与交集靶点相关的 139 个信号通路,按照 $-\log_{10}P$ 值的顺序取前 20 个信号通路绘制 KEGG 柱状分类图,如下图 6。结果显示,相关性最显著的信号通路是内分泌抵抗,属于人类疾病范围的信号通路。第二显著的是 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路,如图 7。本研究以 EGFR 通路做为双姜胃痛丸治疗胃炎最核心的信号通路做进一步研究。

2.5 分子对接结果 分子对接用于核心成分和核心靶点之间的结合验证。16 个核心靶点结合位点信息如表 2。使用 Origin 软件绘制分子对接结合能热图,如图 8。在核心靶点中仅 MDM2 和 STAT3 两个靶点与 22 个核心成分之间的整体结合趋势较差,半数以上的核心成分与 MDM2 和 STAT3 结合能都大于-7.2 kcal/mol。其余 14 个靶点与 80% 的核心成分的结合能低于-7.2 kcal/mol,整体结合趋势均很好。其中少部

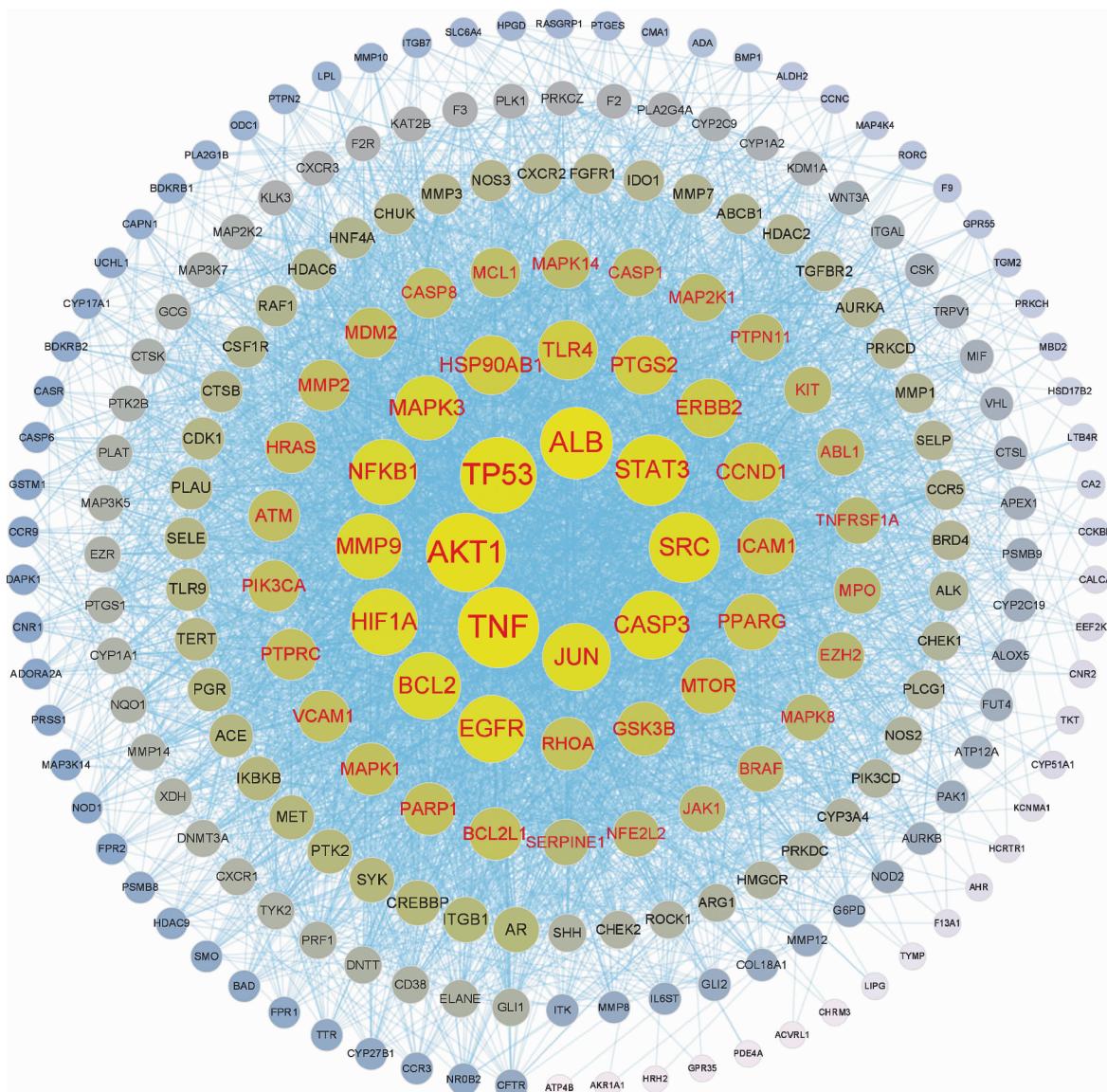


图 2 PPI 蛋白互作网络

分核心成分与核心靶点的结合能优于共晶配体,如 DBR12 (-10 kcal/mol)、KCZ14 (-9.3 kcal/mol)、JH14 (-9.1 kcal/mol) 与 EGFR, DBR5 (-9.3 kcal/mol) 与 GSK3B, 以及多个核心成分与 JAK1 和 SRC 的结合能均优于共晶配体, 具体数据如图 8 所示。同时 EGFR、GSK3B、JAK1、SRC 是 EGFR 信号通路中四个枢纽靶点, 与 KEGG 富集分析结果相呼应, 故双姜胃痛丸治疗胃炎的核心信号通路是 EGFR 通路。其中, EGFR 靶点是 EGFR 信号通路激活的源头, EGF 通过与 EGFR 表面活性空腔结合激活整个信号通路, 进而引发下游多条炎症通路的激活与炎症因子的释放。因此本文针对 EGFR 靶点进行进一步研究。

使用 PyMOL 软件将 DBR12、KCZ14、JH14 与

EGFR 的分子对接结果进行可视化分析，并与共晶配体对比，如图 9。在 4 组可视化分析结果中，共晶配体主要与 EGFR 蛋白中的氨基酸残基 ASN-842、THR-854 和 ASP-855 形成了 3 条氢键相互作用；DBR12 与 SER720、THR-790、MET-793、ASP-855、LYS-875 形成 7 条氢键作用；KCZ14 与 LYS-745 和 THR-854 形成两条氢键作用；JH14 与 LEU-718 和 ASP-855 形成两条氢键相互作用。可见 DBR12 与 EGFR 形成的氢键数量最多，且结合能为 -10 kcal/mol ，说明 DBR12 与 EGFR 的结合程度最强，很有可能发挥更好的 EGFR 抑制作用。KCZ14 和 JH14 均与 EGFR 形成两条氢键，且结合能与共晶配体相近，很有可能发挥与共晶配体相近的 EGFR 抑制作用。

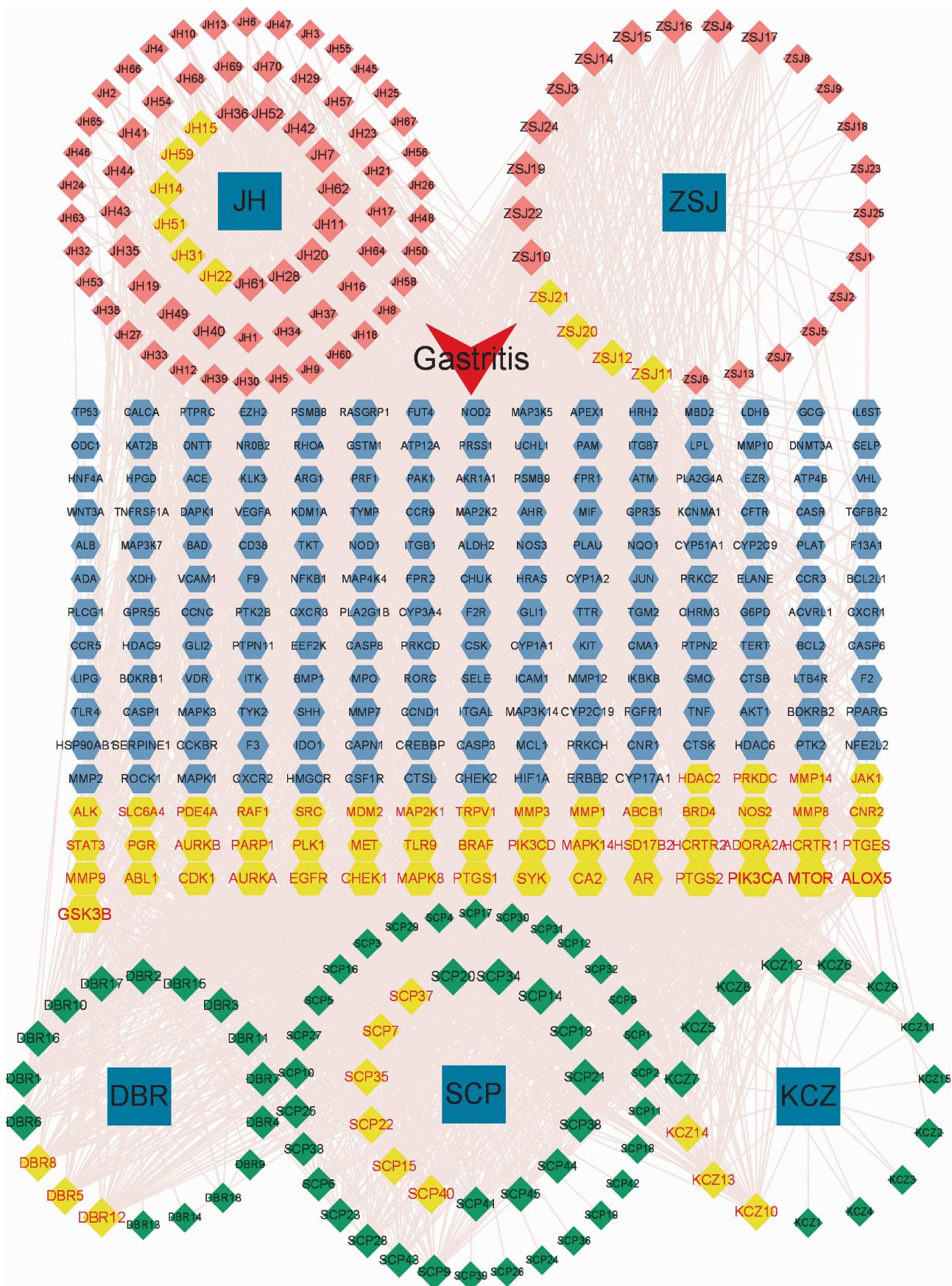


图 3 中药成分靶点疾病网络

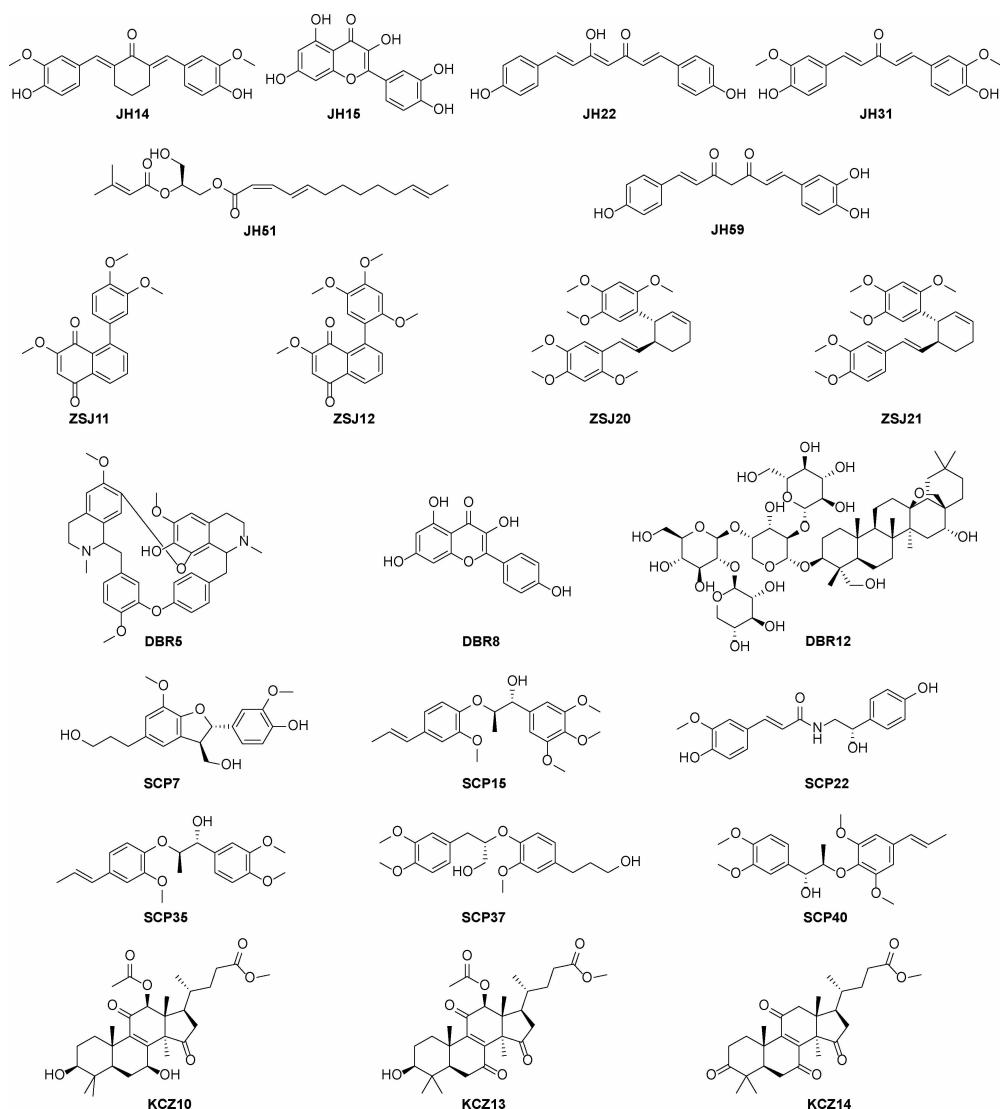


图4 核心成分分子结构

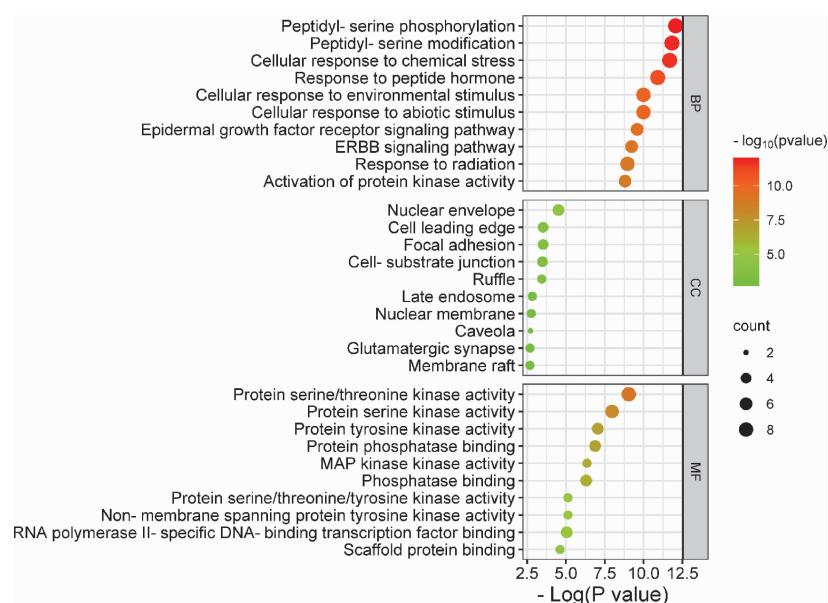


图5 GO富集分析

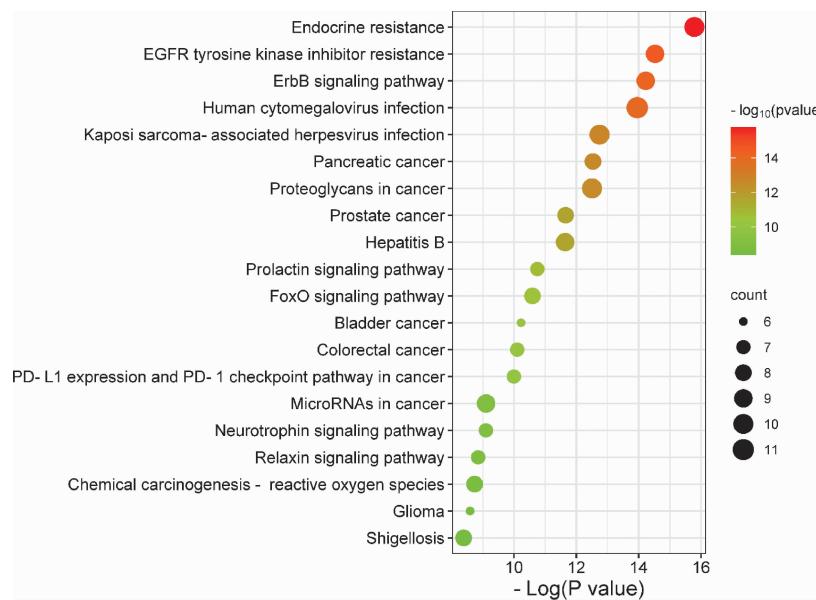


图 6 KEGG 富集分析

表 1 核心成分信息

编号	核心成分名称	PubChem CID	Degree
JH14	Cyqualon	1550234	37
JH15	Quercetin	5280343	36
JH22	1,4,6-Heptatrien-3-one	5324473	40
JH31	(1E,4E)-1,5-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one	6474893	37
JH51	[(2S)-3-Hydroxy-2-(3-methylbut-2-enoyloxy) propyl] (2Z,4E,11E)-trideca-2,4,11-trienoate	14131980	37
JH59	O-Demethyldemethoxycurcumin	25055438	36
ZSJ11	8-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-2-methoxynaphtho-1,4-quinone	23259462	44
ZSJ12	2-Methoxy-8-(2,4,5-trimethoxyphenyl)naphthalene-1,4-dione	23259463	38
ZSJ20	(3S,4R)-trans-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-4-[(E)-2,4,5-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene	129716287	37
ZSJ21	(3S,4R)-trans-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-4-[(E)-3,4-dimethoxystyryl]cyclohexene	129864213	36
DBR5	(-)-Cycleapeltine	4083684	39
DBR8	Kaempferol	5280863	36
DBR12	Desglucoanagalloside B	21681168	45
SCP7	Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol	384679	36
SCP15	Surinamensin	5281868	40
SCP22	(S)-trans-N-Feruloyloctopamine	10042201	38
SCP35	(E)-(7R,8R)-Virolin	51536521	38
SCP37	Ligraminol D	56599266	36
SCP40	(-)-(7R,8R)-Virolin	57393621	43
KCZ10	Methyl lucidenate P	11203394	39
KCZ13	Methyl lucidenate E2	21633084	39
KCZ14	Methyl lucidenate F	21633085	37

表2 核心靶点结合位点信息

Protein	PDB ID	Center (X, Y, Z)	Size (X×Y×Z)
ABL1	8H7H	-10.7, 18.0, -17.5	31×25×26
BRAF	6XFP	-3.5, 18.0, 10.9	22×25×18
EGFR	6JXT	-6.1, 54.5, 1.0	30×23×25
GSK3B	6Y9R	-13.7, -14.3, -5.4	22×22×20
JAK1	5WO4	10.1, 53.5, 6.5	21×27×6.5
MAP2K1	7PQV	-5.5, 69.7, 33.1	24×25×18
MAPK8	4L7F	-1.5, 53.7, 5.2	23×19×26
MAPK14	6ZWP	-0.1, 6.9, -17.4	23×27×29
MDM2	7NA3	-8.0, 10.3, 0.0	20×23×21
MMP9	4WZV	6.5, 13.1, 14.6	40×50×40
MTOR	8PPZ	-10.5, 2.5, 35.7	20×24×23
PARP1	6NRJ	24.8, -9.6, 7.5	20×23×23
PIK3CA	4JPS	-11.0, -4.0, 16.0	33×20×27
PTGS2	5F1A	30.8, 37.3, 242.3	24×30×24
SRC	4MXO	8.0, 38.4, -4.7	29×23×22
STAT3	6NJS	27.6, 51.1, 8.1	31×32×37

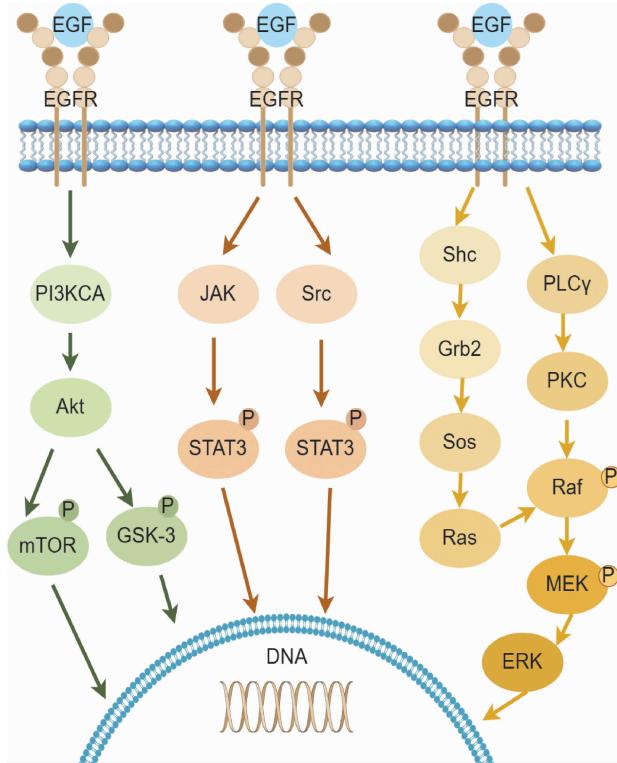


图7 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance 信号通路
(图片来源于 Figdraw2.0 软件)

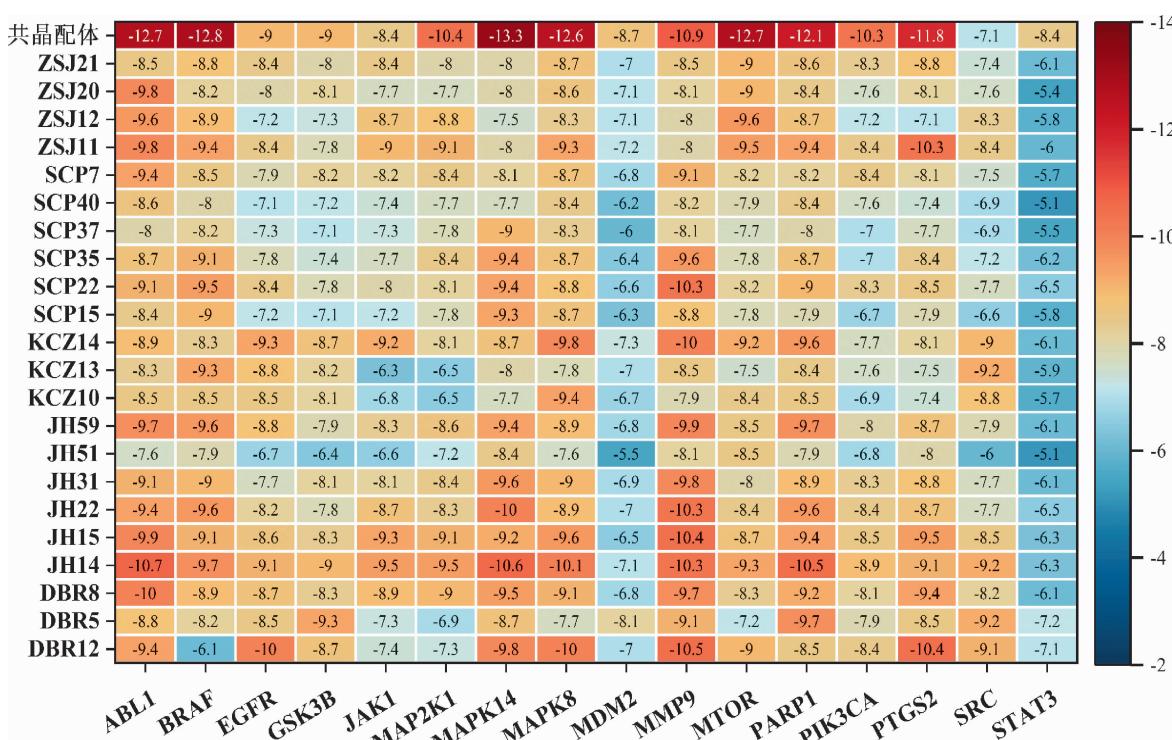


图8 分子对接结合能热图

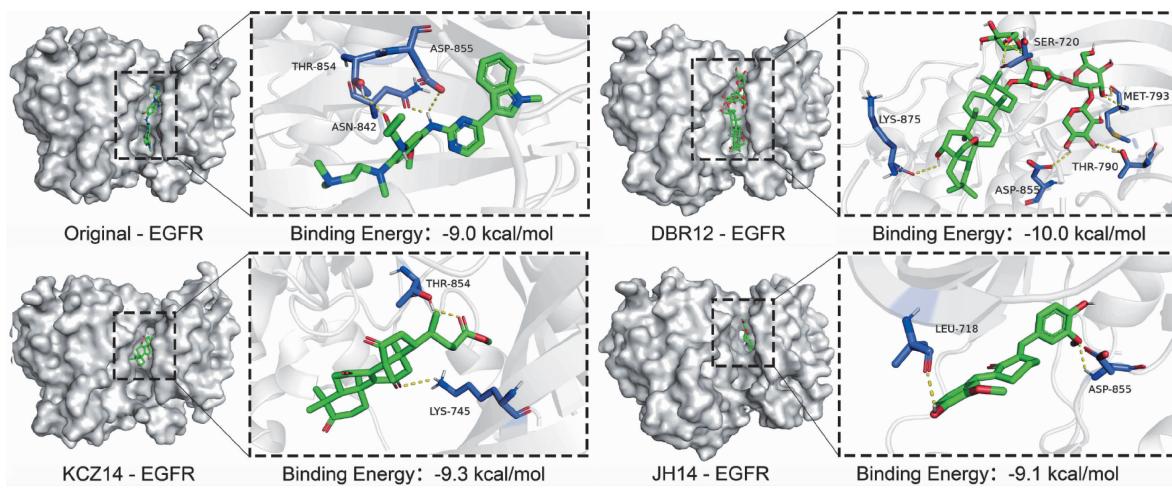
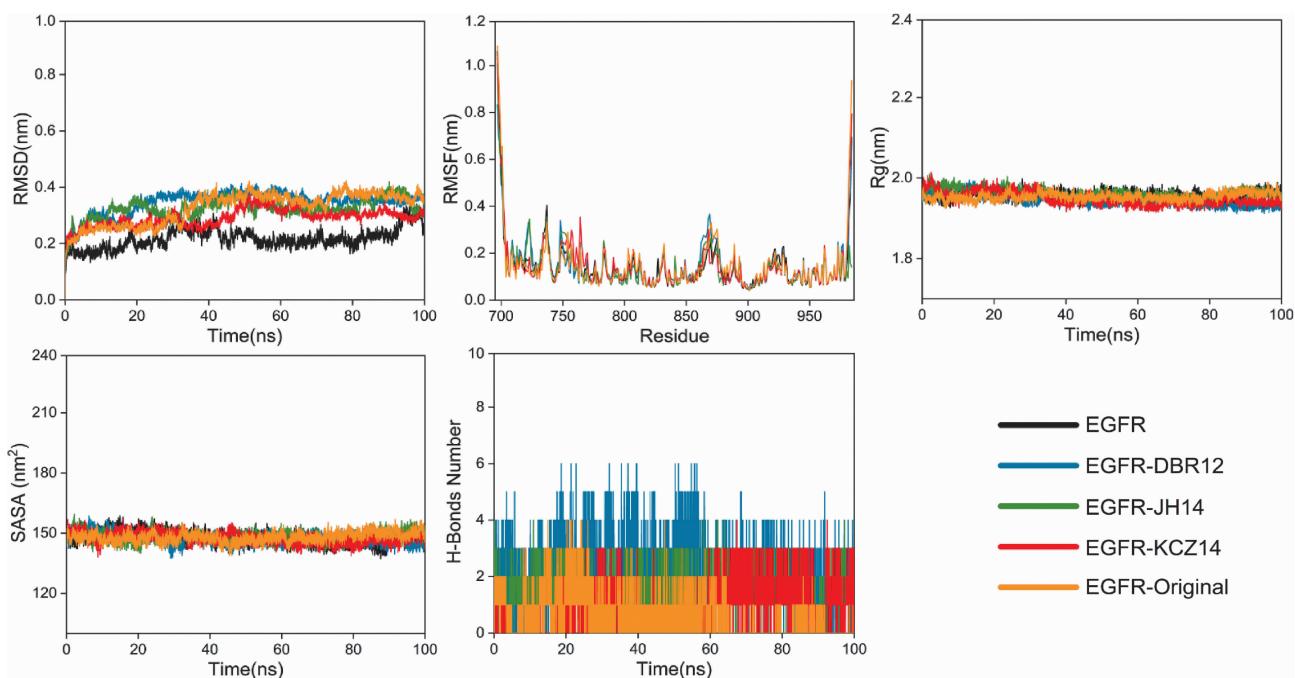


图 9 EGFR 与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 的结合情况可视化

2.6 分子动力学模拟结果 由于分子对接采用的半柔性对接目前无法考虑蛋白质结构的柔性,为了进一步证明配体与蛋白质之间结合的程度与稳定性,本文对 EGFR 与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 的对接结果进行了 100 ns 的分子动力学模拟。

图中 RMSD 曲线是判断蛋白质配体复合物稳定性的指标,RMSD 曲线越平稳代表复合物越稳定。RMSF 曲线代表氨基酸残基在动力学模拟过程中波动的程度,较低的 RMSF 值代表氨基酸残基波动小,结构稳定。 R_g 曲线用于表征结构的紧密程度与稳定性,小的回转半径说明在动力学模拟中,体系保持紧密和稳定。SASA 曲线代表溶剂可接触的蛋白质表面

积大小,表征了蛋白质折叠程度与稳定性。氢键数量变化曲线代表蛋白质配体在模拟过程中形成的氢键数量波动,氢键数量越多代表结合越稳定。使用 Gromacs 脚本 g_sham.py 和 xpm2txt.py 计算复合物的吉布斯自由能,并根据 RMSD 值、 R_g 值与吉布斯自由能,绘制自由能分布图。自由能分布图用于描述复合物结构动力学模拟全过程中能量最小的构象。若蛋白与配体相互作用很弱或不稳定,自由能分布图中会出现多个最小能量团簇;强而稳定的相互作用可以在能量分布中形成近乎单一的能量团簇。RMSD、RMSF、 R_g 、SASA、氢键数量变化曲线图如图 10 所示,自由能分布图如图 11。

图 10 RMSD、RMSF、 R_g 、SASA、氢键数量变化曲线

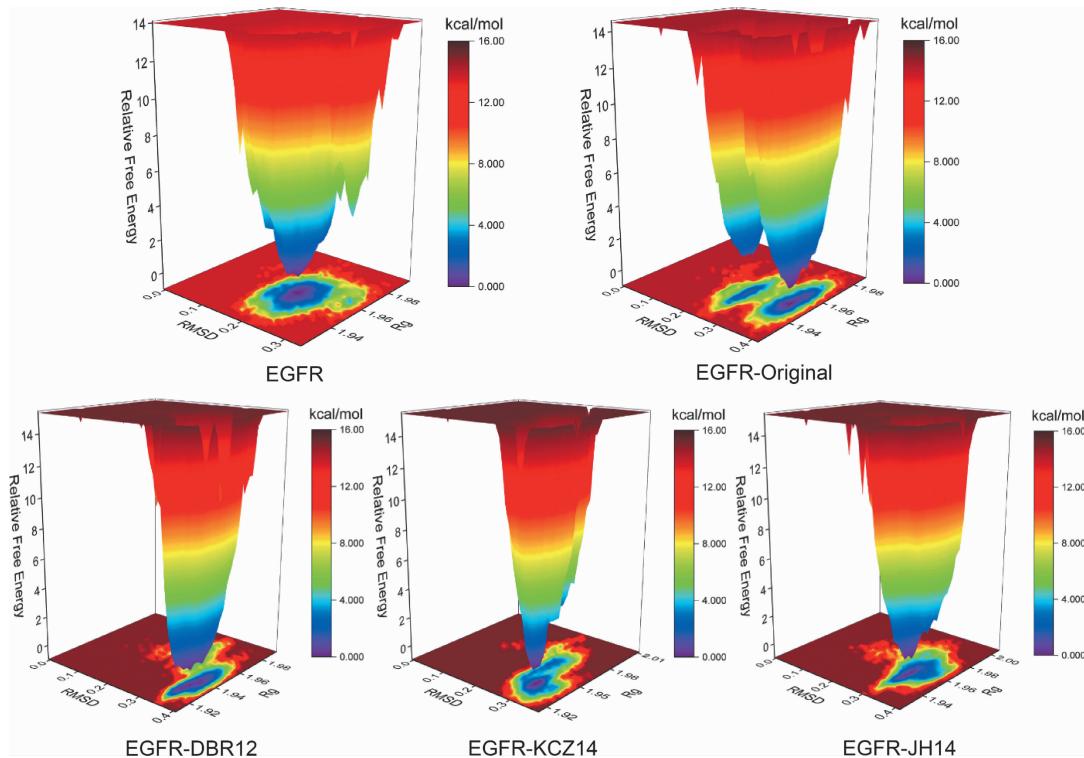
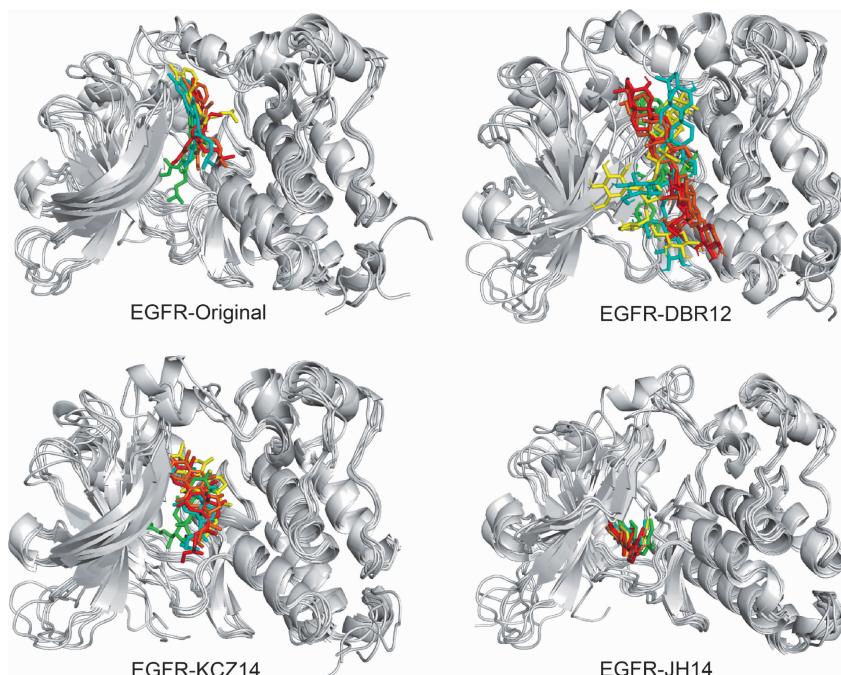


图 11 自由能分布图

可见 RMSD、RMSF、Rg、SASA 曲线均显示 DBR12、KCZ14、JH14 与 EGFR 的结合稳定性与共晶配体相近, 氢键数量变化曲线和自由能分布图显示 DBR12 与 EGFR 的结合稳定性优于共晶配体, KCZ14、JH14 与共晶配体相近。

分别提取 EGFR 与其晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 四组复合物分子动力学模拟轨迹中的 0 ns、25 ns、50 ns、75 ns 和 100 ns 5 个时刻的结合情况并叠合对比, 如图 12。可见分子动力学模拟前后, 配体小分子与 EGFR 结合位置无较大变化, 说明复合物结合稳定性高。



注:图中灰色为 EGFR 蛋白, 绿色、黄色、蓝色、橙色、红色小分子分别为 0、25、50、75 和 100 ns 五个时刻的配体分子

图 12 分子动力学模拟 0、25、50、75 和 100 ns 5 个时刻的结合情况对比

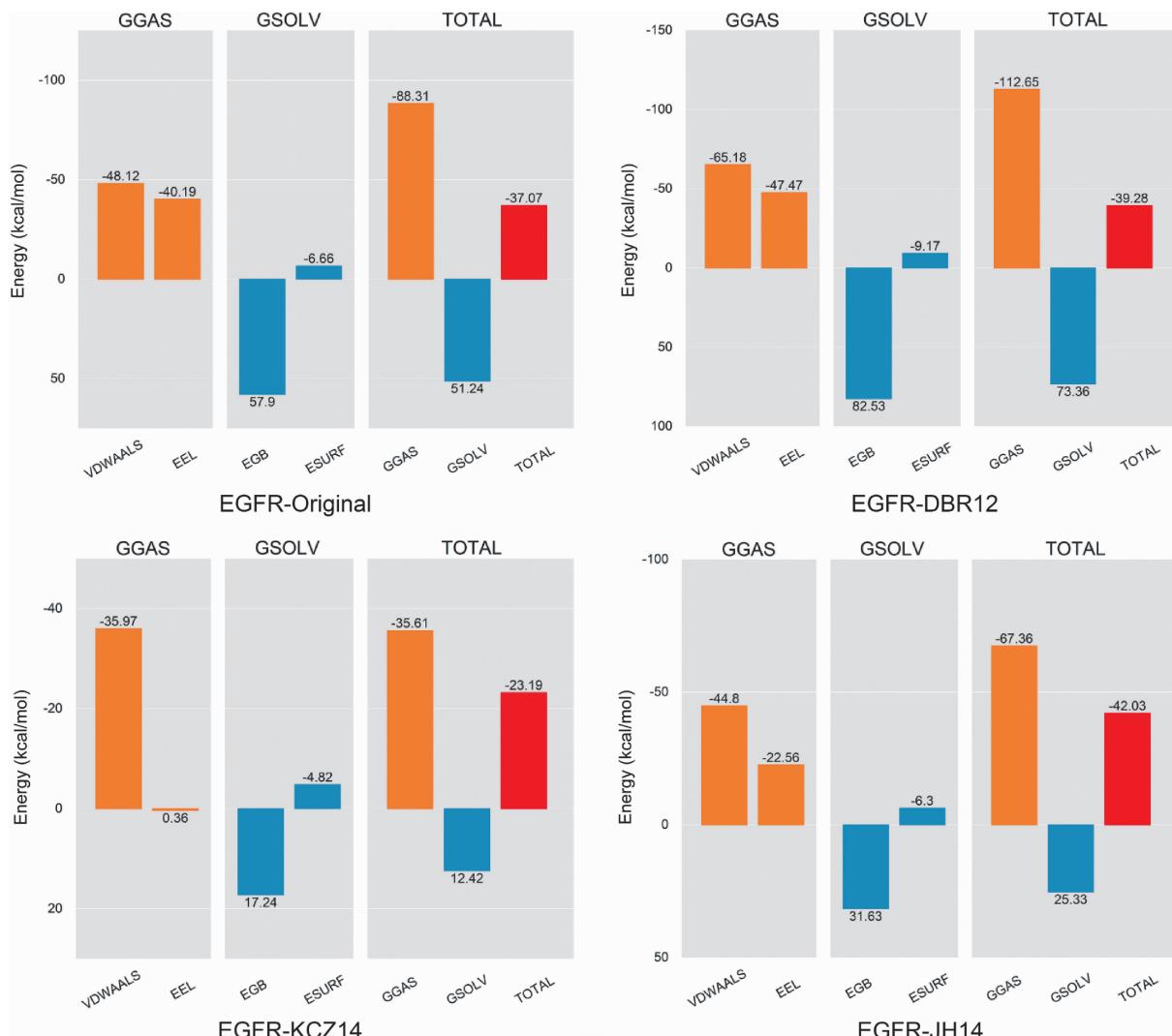
平均结合自由能代表复合物在一段时间内的平均结合程度。在复合物体系稳定后，我们使用 MM/GBSA 的方法计算了 40~100 ns 时间内 4 组复合物的平均结合自由能，如图 13。EGFR 与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 的平均结合自由能分别为 -37.07、-39.28、-23.19、-42.03 kcal/mol，可见 4 组复合物的结合程度均很强烈。其中只有 KCZ14 的结合能差于共晶配体，DBR12 和 JH14 与 EGFR 的结合能均优于共晶配体。

使用 MM/GBSA 的方法计算了体系稳定后 EGFR 中参与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 结合的氨基酸残基的能量贡献，如图 14。可见均有多个氨基酸残基参与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 的结合，且有

共同参与结合的氨基酸残基如 LEU-718、PHE-723、VAL-726、ARG-841 和 LEU-844 等，说明这 5 个氨基酸很有可能是 EGFR 的抑制位点。以上结果也与分子对接可视化结果相对应，模拟前后结合位点几乎无变化，说明复合物结合稳定性高。

3 讨论

胃炎是一种具有高复发率的常见疾病。据报道，2003 年到 2012 年间，慢性胃炎的患病率从 77.91% 上升到 87.84%^[25]。而长期胃炎患病会增加胃溃疡和胃癌的易感性。因此，及时有效的治疗胃炎对人们的健康意义重大。文献报道，双姜胃痛丸可治疗脘腹胀痛、嗳气吞酸以及慢性浅表性胃炎等^[7]。此外，双姜胃痛丸以其“通塞勒，塞拢，补塔铃。兵接崩接短，短嘎习



注：VDWAALS、EEL、EGB、ESURF、GGAS、GSOLV、TOTAL 分别代表范德华力、静电能、极性溶剂化能、非极性溶剂化能、分子力学项、溶剂化能项和平均结合自由能

图 13 EGFR 与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 的平均结合自由能

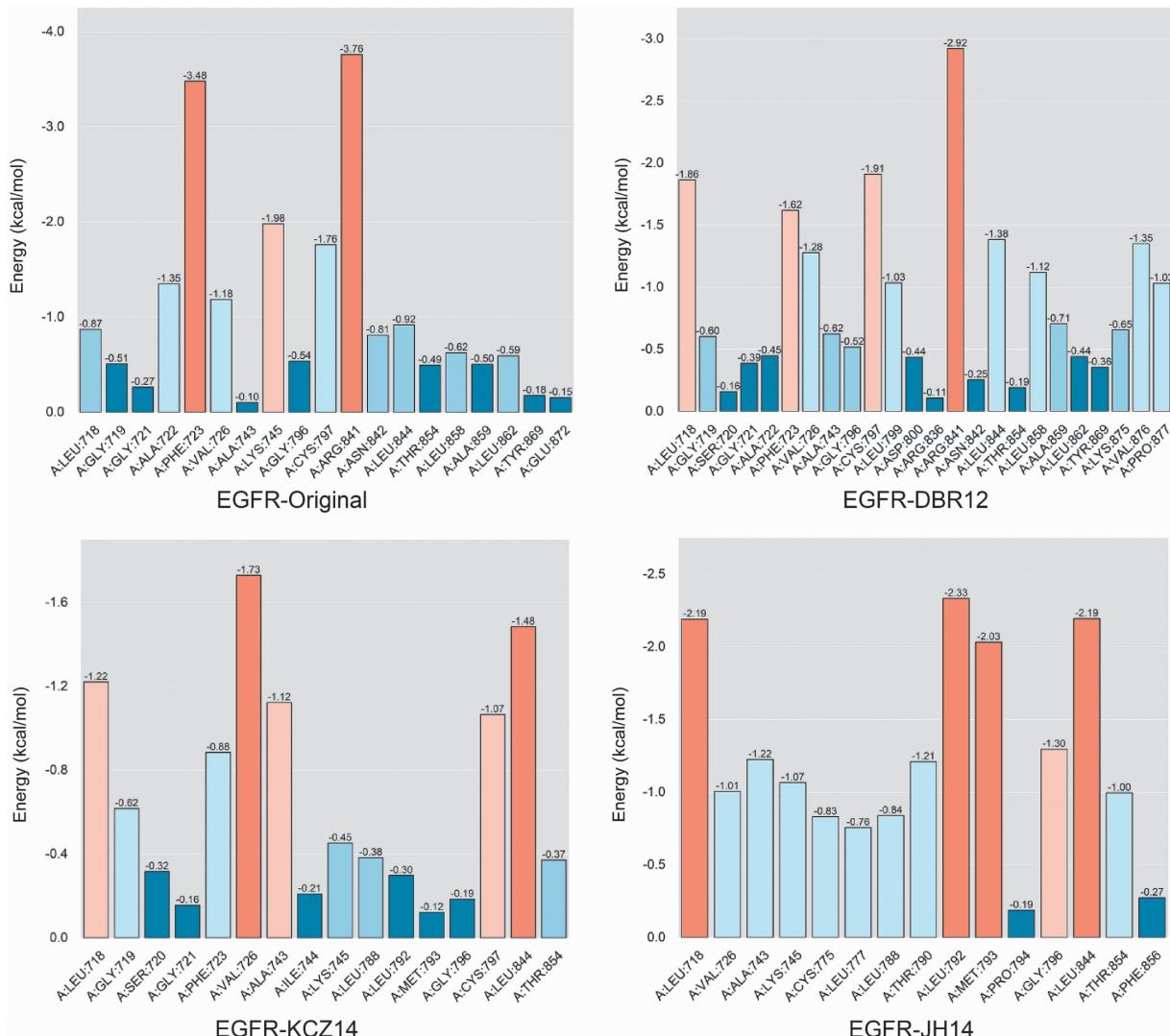


图 14 EGFR 蛋白参与共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 结合的氨基酸残基能量贡献

不利恶来”的功效著称,对胃炎的治疗具有很好的效果^[6]。但双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制尚不清楚,因此本文使用网络药理学、分子对接和分子动力学模拟的方法探索了双姜胃痛丸治疗胃炎的潜在作用机制^[26]。网络分析结果显示,22个核心成分和16个核心靶点与双姜胃痛丸治疗胃炎密切相关。GO 和 KEGG 富集分析结果显示,双姜胃痛丸治疗胃炎与 peptidyl-serine phosphorylation、peptidyl-serine modification 等生物过程,nuclear envelope、cell leading edge 等细胞组成、protein serine/threonine kinase activity、protein serine kinase activity 等分子功能和EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance 信号通路密切相关。分子对接结果显示,16个核心靶点中,ABL1、BRAF、EGFR、GSK3B、JAK1、MAP2K1、MAPK14、MAPK8、

MMP9、MTOR、PARP1、PIK3CA、PTGS2、SRC与核心成分均具有很好的结合趋势,且多个核心成分与 EGFR、GSK3B、JAK1、SRC 的结合优于靶点自带的共晶配体,这说明这些核心成分与 EGFR、GSK3B、JAK1、SRC 结合很有可能发挥优于共晶配体的抑制效果。EGFR、GSK3B、JAK1、SRC 是 EGFR 信号通路中的核心靶点,结果与 KEGG 富集分析结果相对应,故 EGFR 信号通路是双姜胃痛丸治疗胃炎的关键信号通路。由于 EGFR 靶点是 EGFR 信号通路激活的源头,因此本文对与 EGFR 结合优于共晶配体(结合能-9 kcal/mol)的中药成分 DBR12(结合能-10 kcal/mol)、KCZ14(结合能-9.3 kcal/mol)、JH14(结合能-9.1 kcal/mol)进行可视化分析与分子动力学模拟。可视化分析结果显示共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14

与 EGFR 之间形成的氢键数量分别为 3、7、2、2 个, 可见 DBR12 与 EGFR 之间形成的相互作用力数量是共晶配体的两倍, 而 KCZ14 和 JH14 与共晶配体相近。说明 DBR12 很有可能发挥优于共晶配体的 EGFR 抑制作用, KCZ14 和 JH14 发挥与共晶配体相近的 EGFR 抑制作用。分子动力学模拟结果表明, 共晶配体、DBR12、KCZ14、JH14 均与 EGFR 形成了稳定而强烈的结合, 其中 DBR12 和 JH14 表现出优于共晶配体的 EGFR 结合稳定性, KCZ14 表现出与共晶配体相似的 EGFR 结合稳定性。因此 DBR12、KCZ14、JH14 对 EGFR 的抑制作用很有可能是双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制之一。其他核心成分与核心靶点之间的相互作用也有可能是双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制之一, 但具体还有待进一步验证。

文献报道, EGFR 是膜受体蛋白, EGFR 的激活可将细胞增殖信号和抗凋亡信号通过 PI3K–AKT–MTOR、Ras–Raf–MEK–ERK1/2 等多个途径传递至细胞核, 控制细胞的生长与分裂^[27]。目前已知的 EGFR 激活配体有 6 种^[28], 分别是表皮生长因子(BTC)、肝素结合 EGF 样生长因子(HBEGF)和表皮调节素(EPR)。临床研究表明, EGF 和 EGFR 的过表达会导致胃黏膜细胞过度增殖, 甚至变异。抑制胃黏膜细胞中的 EGF 和 EGFR 表达能促进胃黏膜修复。经免疫组化染色法检测发现, 维酶素治疗后的胃炎患者的胃黏膜细胞 EGFR 水平和血清 EGF 水平照比治疗前显著降低^[29]。此外慢性胃炎的发病还伴随着 JAK1、STAT3^[30]、SRC^[31]等蛋白表达水平显著升高。因此, 慢性胃炎的发病很有可能与 EGFR 信号通路高度相关。据文献报道, DBR12(5–20 μg/mL)可以剂量依赖性方式抑制 DU-145 细胞和 PC-3 细胞的增殖^[32], 同时 DU-145 细胞和 PC-3 细胞增殖与 EGF 表达的上调和 EGFR 通路的激活有关^[33], 因此 DBR12 可能具有通过影响 EGFR 信号通路的激活调控细胞增殖与凋亡的功能。综上所述, EGFR 信号通路很有可能是双姜胃痛丸治疗胃炎核心信号通路, 与本研究的结果一致, 进一步证明网络药理学、分子对接与分子模拟技术对药物的开发具有一定指导作用, 并为双姜胃痛丸治疗胃炎提供科学参考。

本研究通过网络药理学、分子对接和分子动力学模拟揭示了双姜胃痛丸治疗胃炎的一种作用机制。然

而后期仍需进行生物实验以确保研究结果的可靠性。我们的研究为进一步探索双姜胃痛丸在胃炎的治疗中的作用机制并为后续实验验证提供了新的基础。

4 结论

本研究使用网络药理学、分子对接和分子动力学模拟等综合分析方法, 系统阐释了双姜胃痛丸治疗胃炎的分子机制。双姜胃痛丸中多个成分通过影响多靶点和多通路在治疗胃炎中发挥重要作用。结果表明, 双姜胃痛丸中的 DBR12、KCZ14、JH14 可能通过与 EGFR 靶点结合调节 EGFR 信号通路的激活与传导, 扰炎症介质的释放并治疗胃炎。综合文献报道、本研究分析结果与胃炎临床治疗经验, 深究双姜胃痛丸治疗胃炎的作用机制, 对于治疗胃炎药物的开发与改进具有重要意义。

参考文献:

- [1] SIPPONEN P, MAAROOS H I. Chronic gastritis[J]. Scand J Gastroenterol, 2015, 50(6):657–667.
- [2] 房静远, 杜奕奇, 刘文忠, 等. 中国慢性胃炎诊治指南(2022 年, 上海)[J]. 胃肠病学, 2023, 28(3):149–180.
- [3] SHAH S C, PIAZUELO M B, KUIPERS E J, et al. AGA clinical practice update on the diagnosis and management of atrophic gastritis: expert review[J]. Gastroenterology, 2021, 161(4):1325–1332.e7.
- [4] KINOSHITA H, HAYAKAWA Y, KOIKE K. Metaplasia in the stomach –precursor of gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10):2063.
- [5] 刀会仙, 玉波罕. 傣医辨治接崩(慢性胃炎)经验浅析[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(7):48–50.
- [6] 林艳芳, 依专, 金锦. 傣医传统经方雅叫帕中补临床应用[J]. 中国民族医药杂志, 1999(1):30–31.
- [7] 李宝晶, 王亭. 傣药双姜胃痛丸对小鼠的镇痛作用研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(12):13–17.
- [8] 郭雪艳. 双姜胃痛丸对葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎的改善作用及其机制研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2021.
- [9] CHANDRAN U, MEHENDALE N, PATIL S, et al. Network pharmacology[M]. Innov Approaches Drug Discovery, 2017, 127–164.
- [10] MENG X Y, ZHANG H X, MEZEI M, et al. Molecular docking:a powerful approach for structure –based drug discovery[J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2011, 7(2):

- 146–157.
- [11] FILIPE H A L, LOURA L M S. Molecular dynamics simulations: advances and applications[J]. *Molecules*, 2022, 27(7):2105.
- [12] XIONG G, WU Z, YI J, et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1):W5–W14.
- [13] TIETCHEU G B R, AYISSI O V B, GUEMMOGNE T R J, et al. In silico and in vitro screening of licensed antimalarial drugs for repurposing as inhibitors of hepatitis E virus[J]. *In Silico Pharmacol*, 2021, 9(1):35.
- [14] QI X, CHEN Y, LIU S, et al. Sanguinarine inhibits melanoma invasion and migration by targeting the FAK/PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1):696–709.
- [15] HASSAN H, SHANAK S. GOTrapp: a tool to navigate through branches of gene ontology hierarchy[J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1):20.
- [16] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27–30.
- [17] KANEHISA M, GOTO S, SATO Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:D109–D114.
- [18] FORLI S, HURY R, PIQUE M E, et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(5):905–919.
- [19] MORRIS G M, HURY R, LINDSTROM W, et al. Auto dock4 and autodock tools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16):2785–2791.
- [20] CUI Q, ZHANG Y L, MA Y H, et al. A network pharmacology approach to investigate the mechanism of Shuxuning injection in the treatment of ischemic stroke[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257:112891.
- [21] ZHANG D, WANG Z, LI J, et al. Exploring the possible molecular targeting mechanism of saussurea involucrata in the treatment of COVID-19 based on bioinformatics and network pharmacology[J]. *Comput Biol Med*, 2022, 146:105549.
- [22] XIE D, FU W, YUAN T, et al. 6'-O-caffeoarylbutin from quezui tea: a highly effective and safe tyrosinase inhibitor[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2):972.
- [23] LV S, DAI W, ZHENG Y, et al. Anxiolytic effect of Yangshendingzhi granules: integrated network pharmacology and hippocampal metabolomics[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:966218.
- [24] MAJUMDER R, MANDAL M. Screening of plant-based natural compounds as a potential COVID-19 main protease inhibitor: an in silico docking and molecular dynamics simulation approach[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40(2):696–711.
- [25] DU Y Q, BAI Y, XIE P, et al. Chronic gastritis in China: a national multi-center survey [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:21.
- [26] 张莹莹, 张科, 宋峯, 等. “川芎-当归”药对主要活性成分的网络药理学研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(1):19–24.
- [27] WEE P, WANG Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(5):52.
- [28] HARRIS R C, CHUNG E, COFFE R J. EGF receptor ligands[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284(1):2–13.
- [29] 徐芳, 朱雅碧, 王立明, 等. 摩罗丹辅助常规西药治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察及对EGF、EGFR水平的影响[J]. 新中医, 2023, 55(6):54–58.
- [30] 段利颖, 朱明阳, 于泳, 等. 黄芩苷对慢性萎缩性胃炎小鼠JAK1、STAT3表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(1):200–206.
- [31] LEE D, KIM J W, LEE C Y, et al. Guettarda crispiflora vahl methanol extract ameliorates acute lung injury and gastritis by suppressing Src phosphorylation[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(24):3560.
- [32] KOZURKIEWICZ P, PODOLAK I, SKRZECZYNSKA-MONCZNIK J, et al. Triterpene saponosides from lysimachia ciliata differentially attenuate invasive potential of prostate cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 206(1):6–17.
- [33] RABIAU N, KOSSAI M, BRAUD M, et al. Genistein and daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by polymerase chain reaction arrays in human prostate cancer cell lines[J]. *Cancer Epidemiol*, 2010, 34(2):200–206.

(收稿日期:2024-04-13)