

基于网络药理学的茵陈五苓散作用机制分析

樊耀华¹, 欧海亚¹, 王汉裕², 吕东勇³, 连逸青¹, 侯江涛², 邝卫红^{3*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 3. 广州中医药大学研究生院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**通过网络药理学方法初步探讨茵陈五苓散的作用机制。**方法:**本研究基于中药系统药理学技术平台、蛋白数据库和 String 数据库,分别获取茵陈五苓散中化学成分,及其对应靶点、疾病并构建化合物-靶点,靶点-疾病网络,蛋白相互作用网络,通过生物学信息注释数据库(DAVID)注释数据库对靶点进行基因本体生物学过程(gene ontology biology process, GO-BP)富集分析及基因组百科全书(*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG)通路分析。**结果:**共获得 58 个候选化合物,103 个靶点,11 个中枢(hub)靶点及 262 种疾病,关键靶点涉及肿瘤坏死因子(TNF),过氧化物合成酶 2(PTGS2),ESR1 等,疾病以肿瘤、免疫和内分泌为主。GO-BP 条目 146 条,参与信号转导、转录翻译、促增殖抑制凋亡、细胞组成和氧化应激条目等 5 种生物过程。KEGG 信号通路 108 条,含靶点数目较多的信号通路主要涉及肿瘤、病毒、寄生虫等。**结论:**本研究系统地探讨了茵陈五苓散的候选成分所对应的靶点及作用机制,为今后的临床研究及进一步的开发为新药提供了思路。

[关键词] 茵陈五苓散; 网络药理学; 靶点; 生物信息; 作用机制

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0193-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181129

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1022.040.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 14:45

Analysis on Mechanism of Yinchen Wulingsan Based on Network Pharmacology

FAN Yao-hua¹, OU Hai-ya¹, WANG Han-yu², LYU Dong-yong³, LIAN Yi-qing¹,
HOU Jiang-tao², KUANG Wei-hong^{3*}

(1. *The First Clinical Medicine College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;*

2. *First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;*

3. *Graduate School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic mechanism of Yinchen Wulingsan based on network pharmacology. **Method:** Based on the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database, the Protein Databank and the String database, the chemical compositions of Yinchen Wulingsan, corresponding targets and diseases were obtained respectively. Meanwhile, compound-target network, as well as target-disease network and protein-protein interaction network, were constructed. According to biological information annotation database (DAVID) annotation databases, gene ontology biology process (GO-BP) enrichment analysis and *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) pathway analysis of the targets were performed. **Result:** Totally 58 components, 103 targets, 11 hub targets and 262 diseases were obtained. The key targets involved tumor necrosis factor (TNF), peroxidase synthetase 2 (PTGS2), and estrogen receptor (ESR1), etc. The diseases mainly involved tumor, immune and endocrine. There were 146 GO-BP entries, including signal transduction entries, transcription and translation entries, proliferation promotion and apoptosis inhibition entries, cellular component

[收稿日期] 20171214(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503532);中国博士后科学基金项目(2017M622667);广东省重点平台及科研项目青年创新人才类项目自然科学类项目(2016KQNCX018)

[第一作者] 樊耀华,在读硕士,从事中医药治疗消化系统疾病工作,Tel:020-39358480,E-mail:384855699@qq.com

[通信作者] *邝卫红,博士,教授,从事中医药治疗消化系统疾病工作,Tel:020-39358480,E-mail:992914955@qq.com

entries, and oxidative stress entries. Besides, there were 108 KEGG pathways, involving tumor, virus, parasite and so on. **Conclusion:** The targets and mechanism corresponding to compounds of Yinchen Wulingsan were studied systematically in this study, providing ideas for further clinical researches and new drug development.

[**Key words**] Yinchen Wulingsan; network pharmacology; target; bioinformation; mechanism

茵陈五苓散源于《金匱要略·黄疸病脉证并治第十五》：“黄疸病，茵陈五苓散主之”，其具有清热、利湿、退黄等功用。现代药理学发现茵陈五苓散具有促进胆汁排泄、护肝、抗炎等作用，因此笔者在临床中常运用茵陈五苓散加减治疗肝炎黄疸。在符合中医因病机的基础上，临床上茵陈五苓散亦可治疗肝炎、高血脂症、代谢综合征、前列腺炎及痛风性关节炎^[1]，但是茵陈五苓散在扩大临床适应症的背后药理机制却尚未得到很好的阐述。目前茵陈五苓散的机制的研究局限于方中单味中药的数个有效成分分别对细胞的药效作用，不能从整体观系统生物学整体水平阐释茵陈五苓散的药理机制。

网络药理学(network pharmacology)是当前中药学科的研究前沿，其融合了系统生物学和多向药理学思想，通过构建药物-靶点-疾病之间的复杂网络分析药物的作用机制，使药理研究由传统寻找单一靶点转向综合网络分析^[2]。同时，通过网络药理学分析可发现，在不同发展阶段的同一疾病，由不同的功能基因或功能蛋白调控；而部分功能蛋白可在多个疾病中起中枢(Hub)调控作用，与中医药理论的“同病异治”和“异病同治”相似^[3]。而中药复方所含化学成分较复杂和药理作用具有多靶点多层次的特点，与网络药理学具有天然的兼容性。网络药理学能够从整体性分析和阐述中药复方的作用机理，有利于推动中药复方的深入研究和扩大临床适应症的发展。

因此，本文通过网络药理学的方法，系统性分析茵陈五苓散多成分、多靶点与多疾病之间的复杂关系，从系统生物学整体水平阐释其药理机制，并诠释茵陈五苓散的可能的新适应症，为茵陈五苓散复方开发提供全新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 筛选茵陈五苓散的化学成分 本研究采用中药系统药理学技术平台(TCMSP)(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP>)检索茵陈五苓散中茵陈、白术、桂枝、泽泻、茯苓、猪苓的所有化学成分，共搜集了 878 个化合物，其中茵陈 106 个，白术 110 个，桂枝 440 个，泽泻 92 个，茯苓 68 个，猪苓 62 个。再根据所有化合物的口服生物利用度(OB)和类药性(DL)

进行评估，得到符合条件的候选化合物。

1.2 预测靶点和疾病 基于 TCMSP 数据库，将茵陈五苓散中的有效化合物逐一配对潜在靶点。同时使用蛋白质数据库(Uniprot Database, <http://www.uniprot.org/>)，筛选出物种为“人”的靶点，从而获得与候选化合物相关的靶点蛋白信息。同时在 TCMSP 数据库中筛选靶点对应的疾病。

1.3 构建化合物-靶点网络、靶点-疾病网络和 PPI 网络 通过 Cytoscape 3.5.1 软件，将茵陈五苓散的候选化合物和相关靶点蛋白，靶点蛋白和相关疾病进行构建化合物-靶点网络以及靶点-疾病网络，以探讨茵陈五苓散的药理学作用机制。并且利用 string 数据库将靶点蛋白所对应的基因构建 PPI 网络并通过 Cytoscape 软件中的 Cytohubba 插件获取度值为前 11 的 Hub 蛋白。

1.4 分析 GO-BP 富集和 KEGG 通路富集 本研究采用 David6.7 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)对靶点蛋白进行 GO-BP 富集分析和 KEGG 通路富集分析。以“ $P < 0.01$, 基因数 > 6 ”或“ $P < 0.01$, 基因数 > 8 ”作为条件进行筛选，得到茵陈五苓散靶点主要的生物功能及药理作用机制中可能性较大的通路，并且利用 Rversion 3.3.2 软件对 GO-BP 富集分析中的 GO 条目和 KEGG 通路富集分析的通路绘制条形图。

2 结果

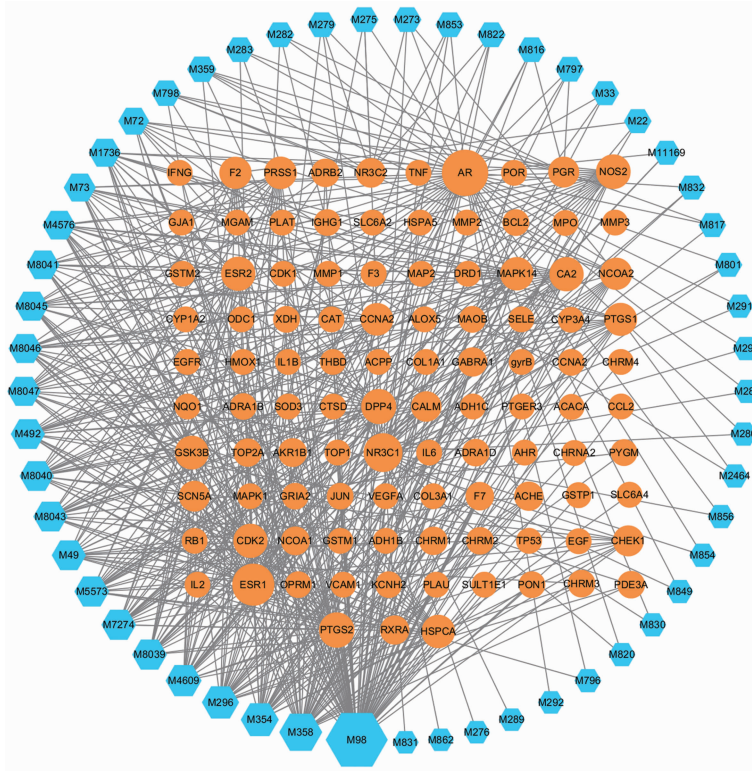
2.1 候选化合物的筛选 以“OB $\geq 30\%$ 和 DL ≥ 0.18 ”作为条件筛选 878 个化合物。经筛选后共得到茵陈化合物 13 个，白术 7 个，桂枝 7 个，泽泻 10 个，茯苓 15 个，猪苓 11 个，其中茵陈与桂枝中有相同化合物 1 个，泽泻和桂枝中含有共同化合物 1 个，茯苓和猪苓共有化合物 2 个，桂枝和猪苓中有相同化合物 1 个，共得到 58 个化合物，见表 1。

2.2 靶点获取结果和构建化合物-靶点网络 茵陈五苓散中候选化合物 58 种，有 53 种候选化合物可在 TCMSP 数据库中匹配到 103 个靶点，5 种候选化合物(M20, M21, M28, M285, M300)未能匹配到相关靶点。将化合物与靶点的关系构建成化合物-靶点网络，见图 1。网络中有 156 个节点(其中 53 个化合物节点及 103 个靶点节点)和 635 条边，网络中

表 1 茵陈五苓散中候选化合物的基本信息

Table 1 Information for candidate compounds of Yinchen Wulingsan

| 分子 ID | 化学名 | OB/% | DL | 来源 中药 | 分子 ID | 化学名 | OB/% | DL | 来源 中药 |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|----------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|----------|
| M20 | 12-senecioid-2E, 8E, 10E-atractylentriol | 62.40 | 0.22 | 白术 | M21 | 14-acetyl-12-senecioid-2E, 8E, 10E-atractylentriol | 60.31 | 0.31 | 白术 |
| M796 | (22E, 24R)-ergosta-6-en-3beta, 5alpha, 6beta-triol | 30.20 | 0.76 | 猪苓 | M72 | 8β-ethoxyatractylenolide III | 35.95 | 0.21 | 白术 |
| M28 | α-amyrin | 39.51 | 0.76 | 白术 | M98 | quercetin | 46.43 | 0.28 | 茵陈 |
| M49 | 3β-acetoxyatractylone | 54.07 | 0.22 | 白术 | M73 | ent-epicatechin | 48.96 | 0.24 | 桂枝 |
| M275 | trametenolic acid | 38.71 | 0.80 | 茯苓 | M279 | cerevisterol | 37.96 | 0.77 | 茯苓、猪苓 |
| M276 | 7,9(11)-dehydropachymic acid | 35.11 | 0.81 | 茯苓 | M282 | ergosta-7, 22E-dien-3beta-ol | 43.51 | 0.72 | 茯苓、猪苓 |
| M283 | ergosterol peroxide | 40.36 | 0.81 | 茯苓 | M289 | pachymic acid | 33.63 | 0.81 | 茯苓 |
| M290 | poricoic acid A | 30.61 | 0.76 | 茯苓 | M300 | dehydroeburicoic acid | 44.17 | 0.83 | 茯苓 |
| M291 | poricoic acid B | 30.52 | 0.75 | 茯苓 | M354 | isorhamnetin | 49.60 | 0.31 | 茵陈 |
| M292 | poricoic acid C | 38.15 | 0.75 | 茯苓 | M358 | beta-sitosterol | 36.91 | 0.75 | 茵陈、桂枝 |
| M296 | hederagenin | 36.91 | 0.75 | 茯苓 | M359 | sitosterol | 36.91 | 0.75 | 桂枝、泽泻 |
| M287 | 3beta-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid | 38.70 | 0.81 | 茯苓 | M22 | 14-acetyl-12-senecioid-2E, 8Z, 10E-atractylentriol | 63.37 | 0.3 | 白术 |
| M492 | (+) -catechin | 54.83 | 0.24 | 桂枝 | M816 | ergosta-7, 22-dien-3-one | 44.88 | 0.72 | 猪苓 |
| M797 | (22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-3-one | 44.88 | 0.72 | 猪苓 | M817 | ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol | 46.18 | 0.72 | 猪苓 |
| M798 | ergosta-7, 22-diene-3β-ol | 43.51 | 0.72 | 猪苓 | M849 | 16β-methoxyalisol B monoacetate | 32.43 | 0.77 | 泽泻 |
| M820 | polyporusterone E | 45.71 | 0.85 | 猪苓 | M831 | alisol B monoacetate | 35.58 | 0.81 | 泽泻 |
| M822 | polyporusterone G | 33.43 | 0.81 | 猪苓 | M832 | alisol, b, 23-acetate | 32.52 | 0.82 | 泽泻 |
| M830 | alisol B | 34.47 | 0.82 | 泽泻 | M1736 | taxifolin | 60.51 | 0.27 | 桂枝 |
| M853 | alisol B | 36.76 | 0.82 | 泽泻 | M4576 | taxifolin | 57.84 | 0.27 | 桂枝 |
| M854 | alisol C | 32.70 | 0.82 | 泽泻 | M4609 | areapillin | 48.96 | 0.41 | 茵陈 |
| M856 | alisol C monoacetate | 33.06 | 0.83 | 泽泻 | M8039 | isoarcapillin | 57.4 | 0.41 | 茵陈 |
| M2464 | 1-monolinolein | 37.18 | 0.30 | 泽泻 | M8045 | 4'-methylcapillarisin | 72.18 | 0.35 | 茵陈 |
| M5573 | genkwanin | 37.13 | 0.24 | 茵陈 | M7274 | skrofulein | 30.35 | 0.3 | 茵陈 |
| M8040 | eupalitin | 46.11 | 0.33 | 茵陈 | M8041 | eupalitin | 42.55 | 0.37 | 茵陈 |
| M8043 | capillarisin | 57.56 | 0.31 | 茵陈 | M8047 | artepillin A | 68.32 | 0.24 | 茵陈 |
| M8046 | demethoxycapillarisin | 52.33 | 0.25 | 茵陈 | M11169 | peroxyergosterol | 44.39 | 0.82 | 桂枝、猪苓 |
| M33 | (3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-dimethyl-17-[(2R, 5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-3-ol | 36.23 | 0.78 | 白术 | M801 | 5alpha, 8alpha-epidioxy-(22e, 24r)-ergosta-6, 22-dien-3beta-ol | 44.39 | 0.82 | 猪苓 |
| M280 | (2R)-2-[(3S, 5R, 10S, 13R, 14R, 16R, 17R)-3, 16-dihydroxy-4, 4, 10, 13, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 12, 15, 16, 17-octahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid | 31.07 | 0.82 | 茯苓 | M273 | (2R)-2-[(3S, 5R, 10S, 13R, 14R, 16R, 17R)-3, 16-dihydroxy-4, 4, 10, 13, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 12, 15, 16, 17-octahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid | 30.93 | 0.81 | 茯苓 |
| M285 | (2R)-2-[(5R, 10S, 13R, 14R, 16R, 17R)-16-hydroxy-3-keto-4, 4, 10, 13, 14-pentamethyl-1, 2, 5, 6, 12, 15, 16, 17-octahydrocyclopenta [a] phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid | 38.26 | 0.82 | 茯苓 | M862 | [(1S, 3R)-1-[(2R)-3, 3-dimethylloxiran-2-yl]-3-[(5R, 8S, 9S, 10S, 11S, 14R)-11-hydroxy-4, 4, 8, 10, 14-pentamethyl-3-oxo-1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 16-decahydrocyclopenta [a] phenanthren-17-yl]butyl] acetate | 35.58 | 0.81 | 泽泻 |



蓝色六角形代表化合物,橙色圆形为靶点,图中各节点的大小与度值呈正相关关系

图 1 茵陈五苓散化合物-靶点网络

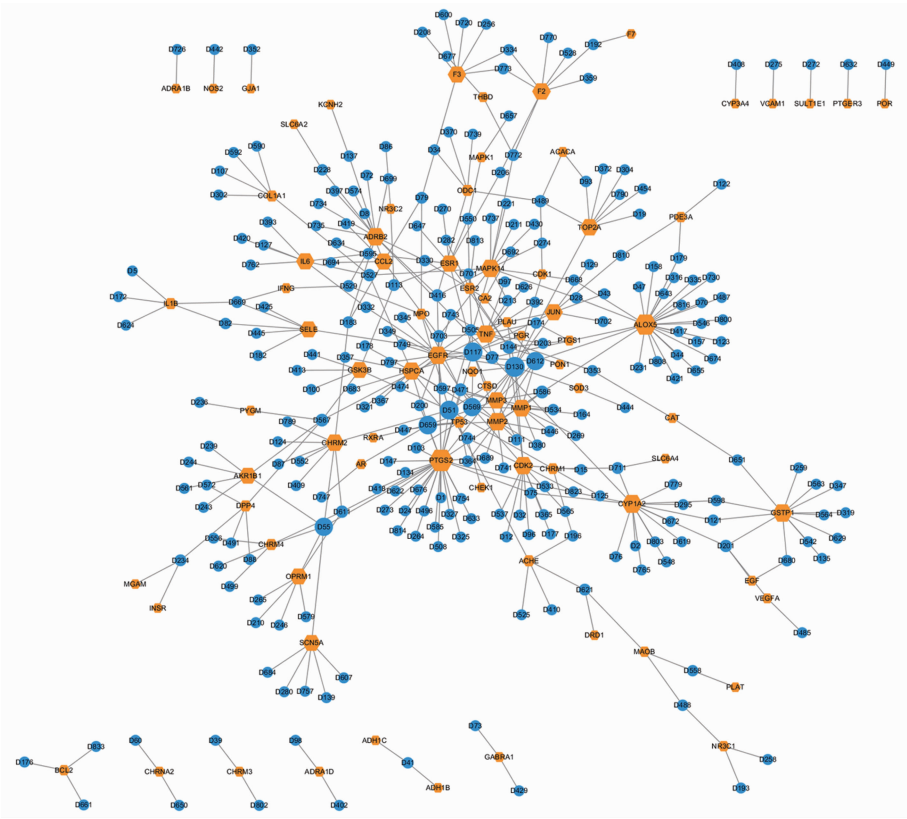
Fig.1 Compound-target network of Yinchen Wulingsan

的度值 (Degree) 表示连接该节点的边的条数。Degree 越大,表示该节点与其他节点相互作用越广泛,在网络中起到中心枢纽的作用。Degree 前 5 的化合物为槲皮素 (quercetin, M98), β -谷甾醇 (beta-sitosterol, M358), 异鼠李黄素 (isorhamnetin, M354), 常春藤皂苷 (hederagenin, M296), 茵陈黄酮 (areapillin, M4096) 对应的作用靶点分别为 78, 39, 27, 25, 22 个。其次就靶点而言, Degree 前 10 的靶点蛋白分别为雄激素受体 (androgen receptor, AR), 雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1), 糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, NR3C1), 前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2), 二肽酰基酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP4), 诱导性一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, inducible, NOS2), 碳酸酐酶 II (carbonic anhydrase II, CA2), 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cell division protein kinase 2, CDK2), 雌激素受体 β (estrogen receptor beta, ESR2), 糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3B), Degree 分别为 47, 37, 29, 21, 20, 19, 18, 18, 17。

2.3 构建靶点-疾病网络 将 103 个靶点蛋白在 TCMSF 数据库中进行匹配,其中 84 个靶点蛋白可

匹配 262 种疾病,19 个靶点蛋白未能匹配到相关疾病,由此可推测茵陈五苓散复方中还存在部分作用途径需进一步探讨。根据靶点蛋白与疾病的关系构建靶点-疾病网络 I,该网络由 346 个节点组成,包括 84 个靶点节点,262 个疾病节点和 411 条边,见图 2。其中 Degree 前 11 的靶点蛋白分别为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2), 花生四烯酸 5-脂氧合酶激活蛋白 (arachidonate 5-lipoxygenase, ALOX5), 细胞色素 P450 1A2 (cytochrome P450 1A2, CYP1A2), β_2 肾上腺素能受体 (beta₂ adrenergic receptor, ADRB2), 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cell division protein kinase 2, CDK2), 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 谷胱甘肽 S-转移酶 P₁ (glutathione S-transferase P₁, GSTP₁), 丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14), 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP), 热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP 90), 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)。

为了更直观地整理茵陈五苓散治疗疾病的机制,本研究对 262 种疾病的 Degree 进行计算,选取



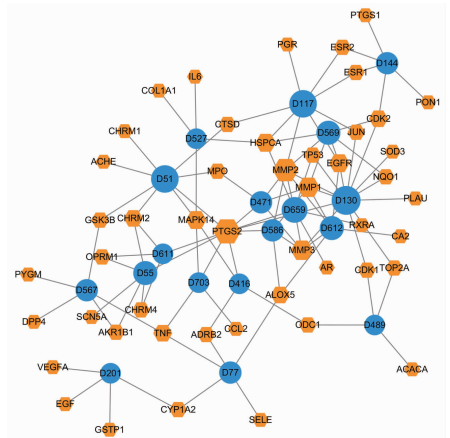
橙色六角形代表靶点,蓝色圆形为疾病,图中各节点的大小与度值呈正相关关系

图 2 茵陈五苓散靶点-疾病网络 I

Fig.2 Target-disease network I of Yinchen Wulingsan

Degree ≥ 4 疾病,与相应的靶点蛋白重新构建靶点-疾病网络 II。见图 3。该图包含 18 种不同的疾病,根据 Degree 由大到小分别为非特异性癌症(cancer, unspecified, D130),乳腺癌(breast cancer, D117),阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, D51),前列腺癌(prostate cancer, D659),胰腺癌(pancreatic cancer, D612),非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, D569),止痛剂(analgesics, D55),哮喘(asthma, D77),骨关节炎(osteoarthritis, D586),非胰岛素依赖性糖尿病(noninsulin-dependent diabetes mellitus, D567),肺癌(lung cancer, D471),非特异性心血管疾病(cardiovascular disease unspecified, D144),非特异性风湿性关节炎(rheumatoid arthritis unspecified, D703),非特异性疼痛(pain unspecified, D611),多发性骨髓瘤(multiple myeloma, D527),疟疾(malaria, D489),炎症(inflammation, D416),结直肠肿瘤(colorectal neoplasms, D201)。

2.4 构建 PPI 网络及 Hub 蛋白的提取 为了更好地探讨茵陈五苓散的作用机制,将 103 个靶点蛋白对应的基因输入 String 数据库,获取 PPI 网络,网络中含有 96 个节点,898 条相互作用关系。见图 4。

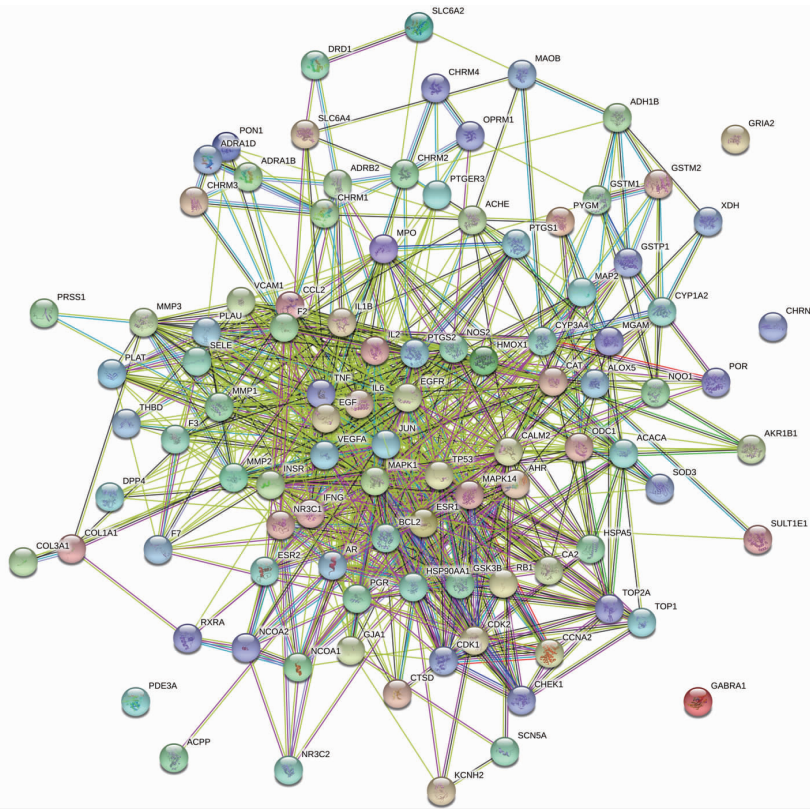


蓝色圆形代表疾病,橙色六角形为靶点,疾病编号对应具体病名如上所述,各节点的大小与度值呈正相关关系

图 3 茵陈五苓散靶点-疾病网络 II

Fig.3 Target-disease network II of Yinchen Wulingsan

利用 Cytoscape 插件中的 Degree 算法筛选出得分前 11 的蛋白作为 Hub 蛋白。这 11 个 Hub 蛋白根据得分由大至小依次为肿瘤抑制因子 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53), 转录因子激活蛋白 1 (transcription factor AP-1, JUN), 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6), TNF, 表皮生长因子受体



圆形代表靶点,核心靶点均位于中心位置

图 4 茵陈五苓散相关靶点的 PPI 网络

Fig. 4 PPI network of targets related to Yinchen Wulingsan

(epidermal growth factor receptor,EGF),血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA),丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1,MAPK1),凝血酶素(thrombin,F2),表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR),雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1),前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2,PTGS2)分别联系 57,57,52,50,50,50,46,45,43,42,41 个蛋白。Hub 蛋白是指高连通蛋白,根据中心致死率规则,高连通的蛋白比随机选择更有可能是必需的,对维持网络连通性更加重要^[4]。故 Hub 蛋白更能体现茵陈五苓散发挥生物学效应中起到关键靶点作用。

2.5 GO-BP 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果

本研究从 GO-BP 富集分析从而定位靶蛋白最主要的生物学过程。GO-BP 富集分析获得 146 个条目,具有显著意义的条目有 49 条,从中筛选基因数目 >6 个基因的条目,共得到 11 条富集条目,见图 5。图 5 中 11 条条目可大致分为 5 类,分别是信号转导、转录翻译、促增殖抑凋亡、细胞组成和氧化应激条目。KEGG 通路富集分析,共获得 108 通路,具

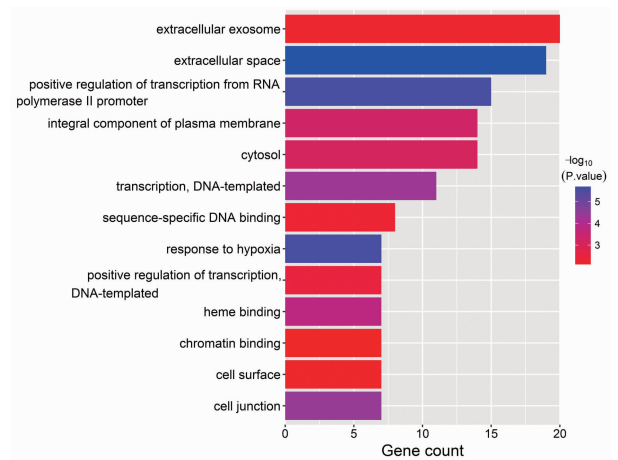


图 5 茵陈五苓散的 GO-BP 富集分析结果

Fig. 5 Analysis results of GO-BP of Yinchen Wulingsan

有显著差异的有 57 条,其中基因数目 >8 的通路共 13 条,见图 6,图 6 中总共含有 13 条通路,涉及肿瘤、病毒、寄生虫等。通路上的所含基因产物(靶点)越多,可以预测茵陈五苓散越有可能通过这些通路发挥作用,因此,和茵陈五苓散密切相关的基因数前 3 的信号通路为 pathways in cancer, neuroactive ligand-receptor interaction 和 PI3K/Akt signaling

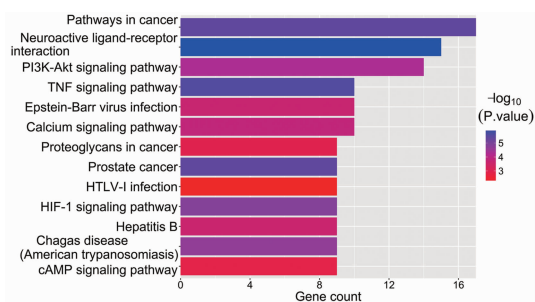


图 6 茵陈五苓散的 KEGG 富集分析结果

Fig. 6 Enrichment analysis results of KEGG of Yincheng Wulingsan

表 2 茵陈五苓散 PPI 网络中的通路 ($P < 0.01$, gene amount = Top3)

Table 2 List of pathway enrichment results to genes in PPI network ($P < 0.01$, gene amount = Top3)

| 名称 | 基因数 | 基因 | P |
|-----------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| pathways in cancer | 17 | EGFR, AR, IL-6, PTGER3, PTGS2, TP53, RB1, MMP2, CDK2, MMP1, MAPK1, GSK3B, BCL2, JUN, VEGFA, NOS2, EGF | 5.19×10^{-5} |
| neuroactive ligand-receptor interaction | 15 | OPRM1, ADRB2, DRD1, GABRA1, PTGER3, CHRM4, CHRM3, GRIA2, CHRM2, CHRM1, F2, ADRA1B, NR3C1, ADRA1D, CHRNA2 | 1.07×10^{-6} |
| PI3K/Akt signaling pathway | 14 | EGFR, MAPK1, IL-6, CHRM2, BCL2, GSK3B, CHRM1, COL3A1, VEGFA, TP53, EGF, INSR, CDK2, IL-2 | 3.86×10^{-6} |

化合物、蛋白、疾病以及生物信息注释等多个数据库,构建网络以及对靶点功能进行富集,系统综合地观察药物对疾病网络的干预与影响。

化合物-靶点网络显示化合物槲皮素,β-谷甾醇,异鼠李黄素,常春藤皂苷,茵陈黄酮能匹配到较多靶点。研究表明槲皮素,β-谷甾醇及常春藤皂苷均能促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤增生;槲皮素和β-谷甾醇具有抗氧化和免疫调节的功能;β-谷甾醇还能抗菌、抗炎、降血脂、镇痛及抑制血小板聚集;异鼠李黄素能抗氧化;常春藤皂苷能抗抑郁、抗菌、抗炎、降血糖;茵陈黄酮能抗炎镇痛^[6-11]。以上 5 种化合物的功能与茵陈五苓散的适应症相似,故笔者推测在茵陈五苓散治疗相关疾病的过程中,这 5 种化合物起主要作用;这也解释了为何茵陈五苓散能治疗多种疾病的原因。另外,茵陈五苓散中候选化合物所匹配到度值前 10 的靶点蛋白可分为 3 类,分别是肿瘤相关靶点蛋白 ESR1, ESR2, AR, PTGS2, CA2, CDK2, GSK3B, NOS2; 代谢相关靶点蛋白 DPP4; 免疫相关靶点蛋白 NR3C1, NOS2。研究发现 DPP4 基因在肥胖患者和糖尿病患者的内脏脂肪组织中过表达,其主要作用是降解胰高血糖素样肽-1 和抑胃肽,从而促进胰高血糖素分泌,使血糖升高^[12-13]。因此,茵陈五苓散治疗代谢综合征和高脂血症的机制可能与靶点 DPP4 相关。研究发现

pathway,其具体信息见表 2。其中 neuroactive ligand-receptor interaction 是信号分子及相互关系的通路。

3 讨论

现代药理学研究表明,茵陈五苓散具有护肝、利胆、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗过敏、抗炎及镇痛等作用,然而其具体作用机制仍需进一步研究^[1]。若采用“单一药物、单一靶点、单一研究思路”来研究,很难体现中药的系统性,且需耗费大量资金及时间^[5]。本次研究采用网络药理学的方法,依托

NR3C1 可诱导 CD4 淋巴细胞清除,抑制 IL-2, IL-3 及 IFN 等细胞因子产生和释放,并且诱导未成熟淋巴细胞凋亡,使机体受到抗原刺激时,免疫损伤减少^[14]。因此,茵陈五苓散治疗肝炎、前列腺炎及痛风性关节炎的机制可能与靶点 NR3C1 相关。同时结合靶点-疾病网络和 PPI 网络,可发现茵陈五苓散亦可影响靶点 ADRB2, IL-6, TNF, 从而治疗免疫相关疾病。另一方面,笔者推断茵陈五苓散亦可治疗肿瘤相关疾病,其机制可能是槲皮素,β-谷甾醇及常春藤皂苷等化合物通过影响 ESR1, CDK2, PTGS2 等相关靶点蛋白,从而使肿瘤细胞凋亡增加,增生减缓,但仍需结合靶点-疾病网络和 PPI 网络进行分析。靶点-疾病网络显示度值前 10 的靶点包括与肿瘤相关的靶点 PTGS2, CDK2, EGFR, GSTP1, MAPK14, MMP2; 同时该网络中靶点和疾病表现出复杂的相互作用模式,在一定程度上为中医“异病同治”理论提供证据,即多靶点-多疾病的复杂机制。根据化合物-靶点网络、靶点-疾病网络和 PPI 网络的结果,笔者推断茵陈五苓散的候选化合物主要影响靶点 PTGS2, AR, CDK2, ESR1, 从而治疗肿瘤相关疾病,如非特异性癌症、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、肺癌、多发性骨髓瘤、结直肠肿瘤;其中靶点 PTGS2 在化合物-靶点网络、靶点-疾病网络和 PPI 网络中度值较高,应为茵陈五苓散治疗肿瘤

相关疾病的关键,需要重点关注。研究发现,PTGS2可编码环氧化酶(COX)-2;COX-2在正常细胞中处于低表达状态,而在肝细胞癌、胃癌、胰腺癌和乳腺癌等多种肿瘤组织中高表达,表达强度与肿瘤组织类型和分化程度相关,表达水平与肿瘤浸润和转移成正相关,是肿瘤防治的重要靶点^[15-16]。

通过GO-BP富集分析可发现茵陈五苓散的候选化合物所匹配的靶点蛋白的生物功能主要包括信号转导、转录翻译、促增殖抑凋亡、细胞组成和氧化应激。异常的转录翻译可致细胞组成异常,使细胞增殖增加凋亡减少;或致细胞信号转导异常,促进肿瘤细胞迁移。KEGG富集分析结果显示茵陈五苓散治疗肿瘤的信号通路是pathways in cancer信号通路和PI3K/Akt信号通路的可能性大,其中pathways in cancer信号通路涵盖了PI3K/Akt, MAPK, mTOR和VEGF等信号通路。因此,笔者推断茵陈五苓散治疗肿瘤相关疾病的主要通路是pathways in cancer信号通路,具体机制可能是茵陈五苓散或直接影响上游信号AR和ESR1,使肿瘤细胞增殖减少凋亡增加;或经由PI3K/Akt信号通路和MAPK信号通路,从而影响PTGS2, JUN和TP53,使血管生成减少,肿瘤细胞增殖减少凋亡增加。

综上所述,本研究通过网络药理学研究方法,对茵陈五苓散中的多组分、多靶点、多种疾病之间的关系及作用机制进行了较为系统的分析。然而茵陈五苓散的网络药理学分析,只考虑通过相互作用关系的数目,未考虑存在药物-靶点-疾病之间相互作用强度差别,也未考虑药物配伍及用量及煎煮方法所带来问题,因此得出的结果须进一步通过细胞生物学实验和动物模型实验来验证。

[参考文献]

[1] 蔡小蓉,杨建云,肖炳坤,等.茵陈五苓散的药理及临床研究进展[J].中国临床药理学杂志,2017,33(9):857-860.

[2] 王君明,苗明三,屈凌波,等.网络药理学在中药研究中应用现状及建议[J].时珍国医国药,2013,24(9):2245-2246.

[3] 刘艾林,杜冠华.网络药理学:药物发现的新思想[J].药学学报,2010,45(12):1472-1477.

[4] Jeong H, Mason S P, Barabási A L, et al. Lethality and

centrality in protein networks [J]. Nature, 2001, 411 (6833):41-42.

[5] Westerhoff H V. Network-based pharmacology through systems biology [J]. Drug Discov Today Technol, 2015, doi: 10.1016/j.ddtec.2015.05.001.

[6] Cho S Y, Kim M K, Park K S, et al. Quercetin-POC conjugates: differential (MCF-7) and colorectal carcinoma (HCT116) cell lines [J]. Bioorg Med Chem, 2013,21(7):1671-1679.

[7] Massi A, Bortolini O, Ragno D, et al. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents [J]. Molecules, 2017,22(8):e1270.

[8] 王娟,刘军权,陈复兴,等.β-谷甾醇对人共刺激细胞杀伤胃癌SGC-7901细胞的影响及其机制的探讨[J].免疫学杂志,2014,30(7):578-584.

[9] WANG J, GONG H M, ZOU H H, et al. Isorhamnetin prevents H2O2-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (1):648-652.

[10] 邢颖,南敏伦,王雪,等.常春藤皂苷元的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(22):226-234.

[11] 齐善厚.茵陈黄酮的抗氧化及镇痛作用研究[J].现代食品科技,2013,29(3):501-504.

[12] Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome [J]. Diabetas, 2011, 60(7):1917-1925.

[13] 邢晓敏,张波,韩毅,等. DPP-4的基因组学研究进展与DPP-4抑制剂的临床应用[J].中国医院药学杂志,2015,35(20):1885-1888.

[14] Tacon L J, Soon P S, Gill A J, et al. The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11):4591-4599.

[15] PENG Q, YANG S, LAO X, et al. Meta-analysis of the association between COX-2 polymorphisms and risk of colorectal cancer based on case-control studies [J]. PLoS One, 2014, 9:e94790.

[16] LI W, CAO Y, XU J, et al. YAP transcriptionally regulates COX-2 expression and GCCSystm-4 (G-4), a dual YAP/COX-2 inhibitor, overcomes drug resistance in colorectal cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, doi:10.1186/s13046-017-0612-3.

[责任编辑 周冰冰]