

基于网络药理学预测二妙丸“一方多效”的分子机制

刘志强, 王博龙*

(宜春学院 化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] **目的:**基于网络药理学思路与方法,研究二妙丸中有效成分、靶点、通路之间的关系,预测其可能的“一方多效”药理机制。**方法:**依托中药分子机制的生物信息学分析工具服务器(BATMAN-TCM)对二妙丸进行成分-靶点的预测和筛选,借助检索相互作用的基因/蛋白质的搜索工具平台(String)构建靶蛋白互作网络,利用BiNGO和MCODE插件对靶基因进行基因本体(GO)生物过程富集和聚类分析,通过注释、可视化和集成发现的数据库(DAVID)平台对关键靶点京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路进行富集分析。**结果:**二妙丸活性成分作用于血清白蛋白(ALB),丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1),肿瘤坏死因子(TNF),前列腺素内环氧合酶2(PTGS2),5-羟色胺受体2A(HTR2A),腺苷脱氨酶(ADA),糖皮质激素受体(NR3C1)等37个关键靶点;参与炎症反应、神经传导、金属阳离子稳态平衡、氧化还原、脂质代谢、核苷酸代谢等GO生物过程;调控TNF,TRP通道炎症调控,FcεRI信号通路,II型糖尿病,钙离子信号通路,5-羟色胺以及多种信号转导、肿瘤、细胞色素P450通路。**结论:**二妙丸除具有治疗痛风、关节炎、湿疹等炎症疾病外,还可能具有抗糖尿病周围神经病变、治疗神经系统、胃肠系统、心血管系统疾病的“一方多效”作用。

[关键词] 二妙丸;网络药理学;聚类分析;靶点;通路;蛋白互作

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0198-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181827

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180628.1747.005.html>

[网络出版时间] 2018-06-29 11:47

Predict “Multi-efficacy of One Formula” Molecular Mechanism of Ermiaowan Based on Network Pharmacology

LIU Zhi-qiang, WANG Bo-long*

(School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between effective ingredients, targets and pathway in Ermiaowan, and predict its possible “Multi-Efficacy of One Formula” Molecular Mechanism based on Network Pharmacology. **Method:** The main ingredients and targets of Ermiaowan were predicted and screened by relying on A Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine server (BATMAN-TCM). The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins platform (STRING) was used to construct target-protein interaction network, and gene ontology (GO) bioprocess enrichment and clustering analysis of target genes were finished by using BiNGO and MCODE plug-ins. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was used to analyze kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways of the key targets. **Result:** The active ingredients of Ermiaowan acted on 37 key targets such as serum albumin (ALB), mitogen-activated protein kinase1 (MAPK1), tumour necrosis factor (TNF), prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), 5-hydroxytryptamine receptor 2A (HTR2A), adenosine deaminase (ADA), glucocorticoid receptor (NR3C1). Got mainly involved in GO biological processes such as inflammation, nerve conduction, metal

[收稿日期] 20180411(013)

[基金项目] 江西省教育厅项目(GJJ12596)

[第一作者] 刘志强,在读硕士,从事临床药理学、网络药理学、循证药理学、中药学、医学检验技术等研究,E-mail:626814166@qq.com

[通信作者] *王博龙,博士,副教授,硕士生导师,主治医师,从事药物临床前研究及临床有效性、安全性评价,E-mail:wblong77@126.com

ions homeostasis, oxidation and reduction, lipid metabolism, and nucleotide metabolism; regulated signaling pathways such as TNF, TRP channel inflammatory, FcεRI, Type II diabetes mellitus, calcium signaling pathway, serotonergic and a variety of signal transduction, tumor and cytochrome P450 enzyme. **Conclusion:** Besides Gout, arthritis, eczema and some inflammatory diseases, Ermiaowan may also have “Multi-Efficacy of One Formula” effect on diabetic peripheral neuropathy, nervous system, gastrointestinal system and cardiovascular system diseases.

[**Key words**] Ermiaowan; network pharmacology; cluster analysis; targets; pathways; protein-protein interaction

二妙丸源自朱丹溪的《丹溪心法》，全方由黄柏、苍术两药等分配伍而成，其中“黄柏为君，苦以燥湿、寒以清热；苍术为臣，辛散苦燥、健脾燥湿”，二药相伍，一温一寒、清热燥湿、标本兼顾，主要用于治疗两足痿软、湿疹、带下、小便短赤等湿热气盛、湿热下注之证^[1]。黄柏的主要成分为生物碱，包括黄柏碱、小檗碱、木兰花碱、巴马汀以及蝙蝠葛任碱等，还含有黄柏苷，尼洛替星，7-脱氢豆甾醇， β -谷甾醇等黄酮、萜类、甾醇等成分，具有抗炎、抗痛风、降血糖、降血压、抗癌、抗氧化等多种药理作用^[2-3]。苍术中主要富含 β -桉叶醇、茅术醇、苍术酮等挥发油成分，还含有一些白术内酯 II，愈创木烷型倍半萜等非挥发油成分，具有促进胃肠蠕动、抗溃疡、调节心血管系统、神经系统、泌尿生殖系统的作用^[4-6]。药理研究表明二妙丸具有抗湿热证痛风类物质作用，还能抑制高尿酸血症小鼠尿酸生成，降低血清尿酸水平、促进尿酸排泄^[7-8]。临床上常用二妙丸类方治疗妇科炎症^[9]、关节炎^[10]、痛风^[11]、糖尿病^[12]、湿疹^[13]等疾病疗效确切。

“一方多效”是指一个方剂具有功效的多维性，存在“一方多用、一方数证”等特点^[14]。例如，二妙丸即可以用于治疗湿热气盛的全身骨酸、足踝痿弱；也可以用于治疗湿热下注的带下、小便短赤等证，具有“一方多效”的特点。传统的药理试验是研究“一方多效”的常规方法，但存在研究盲目、不系统、耗费高、耗时长等弊端，很难从系统的层面揭示某个方剂多成分、多靶点、多功效的药理机制。网络药理学、系统药理学等新研究理念提出，为中医药现代化研究带来了重大变革^[15-17]，运用生物信息学数据库和拓扑算法构建药物分子网络、靶标网络，研究中药方剂多成分、多靶点、多功效的药理机制，可以有效揭示“一方多效”科学内涵。例如，吴嘉瑞等^[18]运用网络药理学技术方法揭示了“金银花-连翘”药对具有治疗癌症、疼痛、心血管疾病、炎症的“一方多效”药理机制，证明网络药理学能成功揭示传统方剂的多功效作用机制。本研究基于网络药理学思路

与方法，研究二妙丸中有效成分、靶点、通路之间的关系，预测其可能的“一方多效”药理机制。

1 材料与方法

1.1 二妙丸成分及靶点筛选 运用中药分子机制生物信息学分析工具(A Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine, BATMAN-TCM)^[19] (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/index.php/Home/Index/index>) 挖掘二妙丸中的成分、及对应的潜在靶点，并用 Cytoscape 软件构建成分-潜在靶标网络。BATMAN-TCM 是北京蛋白质组研究中心刘中扬博士团队，整合多种生物信息学数据库，研发的中药分子机制生物信息学分析平台。该平台调用中药综合数据库(Traditional Chinese Medicines Integrated Database, TCMID) 中药化学成分信息，基于 Perlman 等^[20]的 Similarity-based Inference of drug-TARgets (SITAR) 理念，组建“药物-靶点相似性”模型，用于筛选化合物对应的潜在靶点。试验证明该服务器的预测功能准确、可靠^[21]。

1.2 PPI 网络构建与关键靶标筛选 蛋白互作网络 (protein protein interaction network, PPI network) 是系统网络生物学重要研究内容，蛋白与蛋白的相互作用是细胞、组织的功能的基础，起到调节机体生理、病理状态的作用^[22]。本研究利用 STRING 平台^[23] (<https://string-db.org/>) 构建靶点群蛋白互作网络 (protein protein interaction network, PPI network)，设置物种为“Homo sapiens” (智人) 进行操作，最低相互作用阈值设为中等“medium confidence = 0.4”。然后用 Cytoscape 软件的“Network Analyzer”模块分析 PPI 网络的拓扑属性参数，计算网络整体的“节点度值分布 (node degree distribution)，介数中心性 (betweenness centrality)”。节点的拓扑属性参数是计算复杂网络的中节点重要性的关键指标，度值 (degree) 和介数 (betweenness) 是判断一个网络节点重要性的两个主要拓扑参数，degree 和 betweenness 越大，节点在该网络就越重

要^[24-25]。因此,本研究选取 degree 和 betweenness 同时在平均数之上的靶标为“关键靶标”,研究关键靶标可能的药理作用。

$$\text{degree: } C_D(v) = \text{deg}(v)$$

注:Degree 反映了网络节点与其他节点的连接数目。

$$\text{betweenness: } C_B(v) = \sum_{s \neq v \neq t \in V} \frac{\sigma_{st}(v)}{\sigma_{st}}$$

注:betweenness 是网络中所有最短路径中经过该节点的路径数目与最短路径总数之比,公式中 σ_{st} 表示的是节点 s 和 t 之间的最短路径的数量,而 $\sigma_{st}(v)$ 是最短路径中经过节点 v 的数量。

1.3 关键靶标的 GO 注释与聚类分析 本研究利用 Cytoscape 软件中的“BiNGO”插件对关键靶标进行基因本体(gene ontology, GO)生物过程富集分析,建立 GO 生物过程层级关系图,分析关键靶标在体内的可能实现的生物分子过程,并用 MCODE 插件的对不同的生物功能聚类分析^[26]。MCODE 是以节点赋权重、模块预测以及可选的后期处理为步骤的,基于密度的局部搜索聚类算法,可将不同类别 GO 生物过程分为不同的“子簇”,同一“子簇”下的 GO 生物过程具有相似的功能特性,探究各“子簇”代表的主要 GO 生物过程及其药理意义。

1.4 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集 利用 DAVID v 6.8 平台对二妙丸关键靶点进行 KEGG 信号通路富集,分析靶点的 KEGG 信号通路,对信号通路分类,研究二妙丸可能作用的通路及其药理意义。

2 结果

2.1 二妙丸成分-靶标网络 在 BATMAN-TCM 平台挖掘二妙丸主要化学成分及其对应靶标,并构建活性成分-靶点网络。二妙丸主要化学成分 38 个,其中黄柏中化学成分 23 个,苍术中化学成分 15 个,见表 1。二妙丸 38 个化学成分对应 177 个潜在靶点,该图共含有 215 个节点(包括 38 个成分,177 个靶标),449 条边(表示成分与靶标的相互作用),见图 1,充分体现了二妙丸多成分、多靶点的特点。

2.2 PPI 网络与关键靶标分析 将二妙丸 177 个潜在靶点进行 PPI 网络分析,其中 169 个靶点参与了 PPI 网络(8 个靶蛋白未参与蛋白互作),其中 848 条边代表了靶蛋白之间复杂的相互作用,见图 2。PPI 网络平均 degree 为 10.04,平均 betweenness 为 1.21×10^{-2} , degree, betweenness 均超过平均值的靶

表 1 二妙丸中主要成分

Table 1 Main Ingredients in Ermiaowan

中药	化学成分	英文名	化学式	pubChem 编号
黄柏	7-脱氢豆甾醇	7-dehydrostigmasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	52931386
	木兰花碱	magnoflorine	C ₂₀ H ₂₄ INO ₄	6451920
	非洲防己碱	columbamine	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	72310
	蝙蝠葛波酚碱	menisporphine	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	150032
	黄柏碱	phellodendrine	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	9928008
	坎得毒素 A	candletoxin A	C ₃₅ H ₄₄ O ₉	442008
	巴马汀	palmatine	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	200119
	黄柏苷	phellamurin	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₁	7163183
	猴头菌酮 H	hericenone H	C ₃₆ H ₅₂ O ₆	5318024
	α-水芹烯	α-phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	7460
	异黄柏苷	phellavin	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	5320517
	γ-谷甾醇	γ-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	636741
	苯乙胺	phenethylamine	C ₈ H ₁₁ N	6365704
	蝙蝠葛任碱	menisperine	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄ ⁺	161487
	尼洛替星	niloticin	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	44559946
	去氢槐胺碱	dehydrosophoramine	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O	5316467
	四氢小檗碱	tetrahydroberberine	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	443422
	南美花椒酸胺	herculin	C ₁₆ H ₂₉ NO	5318023
	胍	guanidine	CH ₅ N ₃	451298
	β-谷甾醇	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	53399246
	菜油甾醇	campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	51051617
	白栝楼碱	candicine	C ₁₁ H ₁₈ NO ⁺	23135
	黄皮树碱	obamegine	C ₃₆ H ₃₈ N ₂ O ₆	10257912
苍术	尿苷	uridine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	45356795
	榄香醇	elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	11064030
	榄香脂素	elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	10248
	γ-桉叶烯	γ-selinene	C ₁₅ H ₂₄	10655819
	白术内酯II	atractylenolide II	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	11736433
	6,6'-二甲氧基棉酚	6,6'-dimethoxygossypol	C ₃₂ H ₃₈ O ₈	5316861
	β-桉叶醇	β-eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	5317270
	茅术醇	hinesol	C ₁₅ H ₂₆ O	11379068
	TR-皂苷 A	tr-saponin A	C ₅₃ H ₈₀ O ₂₀	11969009
	β-蛇麻烯	β-humulene	C ₁₅ H ₂₄	5879124
	化合物 1	compound 1 ¹⁾	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	11015789
	桉叶醇	eudesmol	C ₁₅ H ₂₄ O	6432493
	2-呋喃甲酸	2-furancarboxylic Acid	C ₅ H ₃ O ₃	5460151
	愈创萜醇	guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	9899341
	α-花柏烯	α-chamigrene	C ₁₆ H ₂₆	5315803

注:1). Compound 1 为 2-(8-methyl-2, 8-dihydroxy-9-oxo-2-hydroxymethylbicyclo[5.3.0]decan-7-yl) isopropanol glucoside。

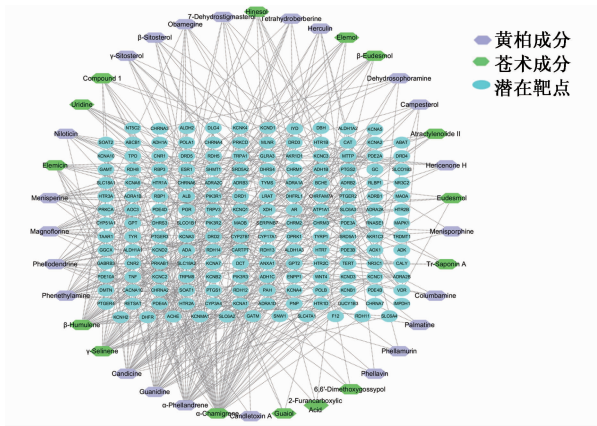


图 1 “活性成分-靶点”网络
Fig.1 Network of “Ingredients-targets”

点共有 37 个, 见图 3, 4。以上 37 个靶点是二妙丸发挥药效作用的关键靶点, 见表 2。

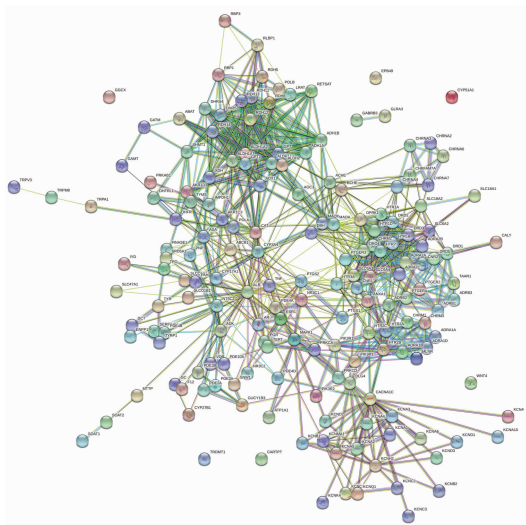


图 2 靶蛋白 PPI 网络
Fig.2 PPI network of targets

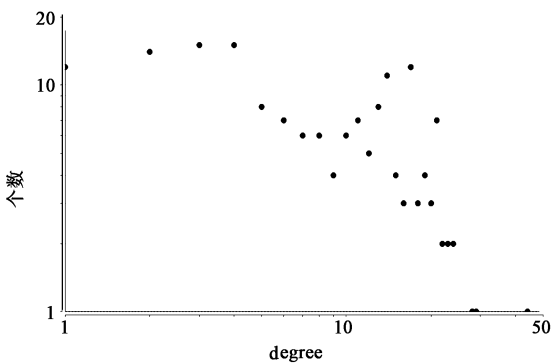


图 3 Degree 分布
Fig.3 Degree distribution

2.3 GO 生物过程富集与聚类分析 以 $P(\text{adjusted}) < 0.01$ 为标准, 将二妙丸 37 个关键靶

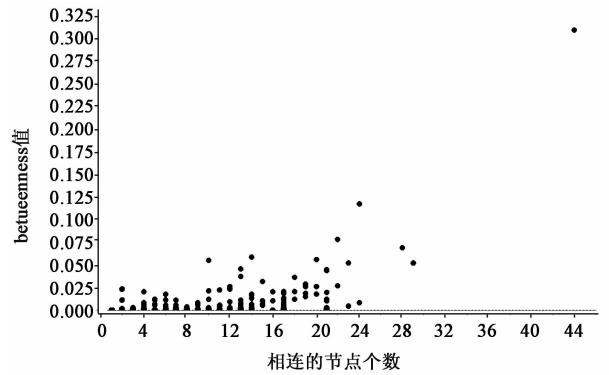


图 4 Betweenness 中心性
Fig.4 Betweenness centrality

点进行 GO 生物过程富集, 37 个关键靶点能参与 372 个 GO 生物过程, 包含 602 条层级关系连线。按照 MCODE 聚类分析算法, 可将 372 个 GO 生物过程分为 13 个“子簇”, 包括调节炎症、神经传导、金属离子平衡、氧化还原、信号转导、脂质代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢等 13 个类别。见图 5, 表 3。

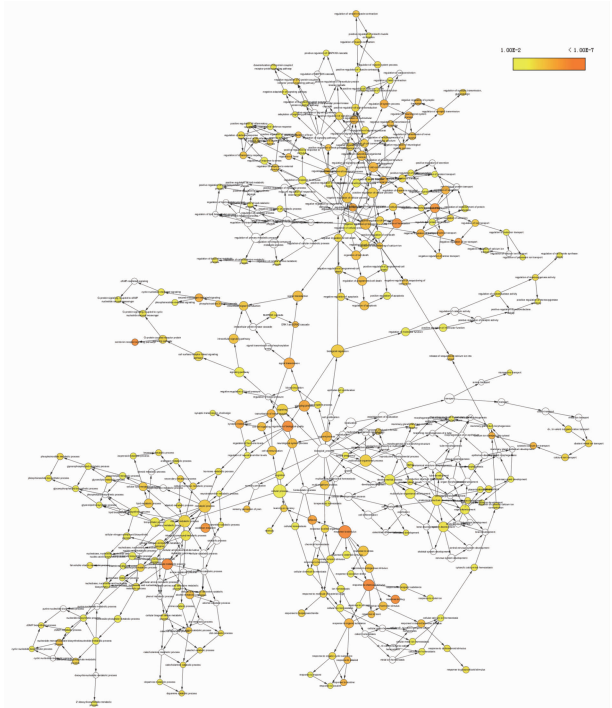


图 5 GO 生物过程层级关系
Fig.5 Hierarchy of biological processes

2.4 KEGG 信号通路富集 将 37 个核心靶标进行 KEGG 信号通路富集研究, 结果按照 $P < 0.05$ 标准, 共筛选出 6 类 23 条与疾病相关的信号通路, 包括与风湿炎症相关的肿瘤坏死因子, 瞬时感受器电位 (TRP) 通道炎症调控通路, $Fc\epsilon RI$ 信号通路; 与糖尿病相关的 II 型糖尿病、糖代谢通路; 与心血管病相关的钙离子信号通路、肾上腺素在心肌细胞信号通路、

表 2 关键靶点的拓扑参数

Table 2 Topological parameters of key targets

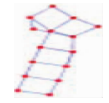

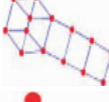

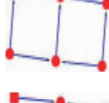
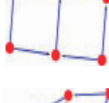
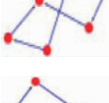
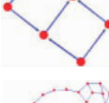
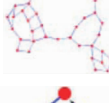
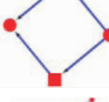


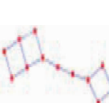
靶点名称	英文名称	靶点	betweenness	degree
血清白蛋白	serum albumin	ALB	3.10×10^{-1}	44
电压门控 L 钙通道 $\alpha 1C$	voltage-dependent L-type calcium channel $\alpha 1C$	CACNA1C	1.18×10^{-1}	24
过氧化氢酶	catalase	CAT	7.89×10^{-2}	22
单胺氧化酶 A	amine oxidase [flavin containing] A	MAOA	6.96×10^{-2}	28
DLG4 蛋白	disks large homolog 4	DLG4	5.89×10^{-2}	14
丝裂原活化蛋白激酶 1	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	5.65×10^{-2}	20
5-羟色胺受体 2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	HTR2A	5.26×10^{-2}	23
膜联蛋白 A1	annexin A1	ANXA1	5.23×10^{-2}	29
胞质嘌呤 5'-核苷酸酶	cytosolic purine 5'-nucleotidase	NT5C2	4.57×10^{-2}	13
醛氧化酶	aldehyde oxidase	AOX1	4.53×10^{-2}	21
乙醇脱氢酶 1A	alcohol dehydrogenase 1A	ADH1A	4.41×10^{-2}	21
腺苷脱氨酶	adenosine deaminase	ADA	3.76×10^{-2}	13
5-羟色胺受体 2C	5-hydroxytryptamine receptor 2C	HTR2C	3.68×10^{-2}	18
胸苷酸合成酶	thymidylate synthase	TYMS	3.23×10^{-2}	15
肿瘤坏死因子	tumor necrosis factor	TNF	2.93×10^{-2}	19
单胺氧化酶 B	amine oxidase [flavin-containing] B	MAOB	2.71×10^{-2}	22
5-羟色胺受体 7	5-hydroxytryptamine receptor 7	HTR7	2.69×10^{-2}	20
神经乙酰胆碱受体 $\alpha 4$	neuronal acetylcholine receptor subunit $\alpha 4$	CHRNA4	2.68×10^{-2}	12
细胞色素 P450 3A4	cytochrome P450 3A4	CYP3A4	2.66×10^{-2}	19
乙酰胆碱酯酶	acetylcholinesterase	ACHE	2.37×10^{-2}	12
胆碱酯酶	cholinesterase	BCHE	2.25×10^{-2}	11
大麻素受体 1	cannabinoid receptor 1	CNR1	2.12×10^{-2}	18
雌激素受体	estrogen receptor	ESR1	2.11×10^{-2}	17
5-羟色胺受体 2B	5-hydroxytryptamine receptor 2B	HTR2B	2.06×10^{-2}	16
5-羟色胺转运体	sodium-dependent serotonin transporter	SLC6A4	2.04×10^{-2}	21
前列腺素内环合酶 2	prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2	1.94×10^{-2}	17
醛脱氢酶, 线粒体	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	1.93×10^{-2}	19
乙醇脱氢酶 1B	alcohol dehydrogenase 1B	ADH1B	1.85×10^{-2}	20
雄性激素受体	androgen receptor	ADRB2	1.78×10^{-2}	14
β_2 肾上腺素能受体	beta-2 adrenergic receptor	AR	1.75×10^{-2}	14
胆碱 M ₂ 受体 (毒蕈样)	muscarinic acetylcholine receptor M ₂	CHRM2	1.55×10^{-2}	19
糖皮质激素受体	glucocorticoid receptor	NR3C1	1.37×10^{-2}	14
钠依赖型多巴胺转运体	sodium-dependent dopamine transporter	SLC6A3	1.36×10^{-2}	17
醛脱氢酶 1 家族 A3 成员	aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	ALDH1A3	1.35×10^{-2}	17
视黄醇脱氢酶 12	retinol dehydrogenase 12	RDH12	1.25×10^{-2}	18
视网膜脱氢酶 1	retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	1.24×10^{-2}	21
磷脂酰肌醇 3 激酶监管 α	phosphatidylinositol 3 kinase regulatory α	PIK3R1	1.22×10^{-2}	17

脂质代谢相关通路;与神经调节相关的 5-羟色胺(5-TH),多巴胺,胆碱能信号通路,和一些信号转导、肿

瘤、细胞色素 P450 酶、利什曼病相关通路。见表 4。二妙丸应用最广的就是治疗风湿关节炎、妇科、

表 3 各子簇的中心 GO 生物过程

Table 3 Center GO biological process in each cluster

序号	子簇图	子簇主要功能注释	子簇中心 GO 生物过程	P
1		调节炎症反应	regulation of inflammatory response	3.28×10^{-6}
2		神经传导、突触传递	transmission of nerve impulse	1.59×10^{-7}
3		钙离子、金属离子稳态平衡	calcium ion homeostasis	1.44×10^{-3}
4		氧化还原、催化活性调控	regulation of oxidoreductase activity	1.96×10^{-4}
5		细胞信号转导正调控	positive regulation of signal transduction	6.88×10^{-5}
6		脂质代谢负调控	negative regulation of lipid catabolic process	6.70×10^{-4}
7		脂质代谢正调控	positive regulation of lipid biosynthetic process	1.59×10^{-3}
8		蛋白质分泌、运输正调控	regulation of protein secretion	6.24×10^{-4}
9		核苷酸、氨基酸、脂质、磷脂、儿茶酚等物质代谢调控	small molecule biosynthetic process	8.99×10^{-4}
10		组织器官发育	organ development	3.46×10^{-4}
11		乳腺发育	mammary gland development	1.46×10^{-3}
12		生殖过程	reproductive process in a multicellular organism	9.68×10^{-3}
13		细胞死亡调控	regulation of cell death	1.03×10^{-6}

湿疹等炎症疾病, 本研究发现其能通过作用于 ERK1/2 (MAPK1), PI3K (PIK3R1), PTGS2, TNF 等 4 个关键靶点, 显著富集到 TNF 信号通路 ($P = 1.4 \times 10^{-2}$)。从而推知, 二妙丸能通过调控 TNF 信号通路的表达, 发挥抗炎镇痛, 治疗风湿关节炎、妇

科、湿疹等炎症疾病的作用。见图 6。

3 讨论

二妙丸由黄柏-苍术药对组成, 现代主要用于治疗痛风、关节炎、湿疹皮炎、妇科炎症等疾病, 具有明显的“一方多效、一方多用、一方数症”的特点^[9-13]。

表 4 KEGG 信号通路

Table 4 KEGG Signaling pathways

项目	KEGG 信号通路	靶点	P
炎症通路	TNF signaling pathway	MAPK1, PIK3R1, PTGS2, TNF	1.4×10^{-2}
	inflammatory mediator regulation of TRP channels	HTR2A, HTR2B, HTR2C, PIK3R1	1.1×10^{-2}
	FcεRI signaling pathway	MAPK1, PIK3R1, TNF	4.1×10^{-2}
糖代谢病通路	type II diabetes mellitus	CACNA1C, MAPK1, PIK3R1, TNF	1.5×10^{-3}
	glycolysis/Gluconeogenesis	ADH1A, ADH1B, ALDH1A3, ALDH2	3.9×10^{-3}
心血管病通路	calcium signaling pathway	HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR7, ADRB2, CACNA1C, CHRM2	1.7×10^{-4}
	adrenergic signaling in cardiomyocytes	ADRB2, CACNA1C, MAPK1, PIK3R1	3.2×10^{-2}
	fatty acid degradation	ADH1A, ADH1B, ALDH2	1.8×10^{-2}
	regulation of lipolysis in adipocytes	ADRB2, PIK3R1, PTGS2	2.9×10^{-2}
神经调节通路	serotonergic synapse	HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR7, CACNA1C, MAPK1, MAOA, MAOB, PTGS2, SLC6A4	1.4×10^{-9}
	dopaminergic synapse	CACNA1C, MAOA, MAOB, SLC6A3	2.3×10^{-2}
	cholinergic synapse	ACHE, CACNA1C, CHRM2, CHRNA4, MAPK1, PIK3R1	1.6×10^{-4}
信号转导通路	cAMP signaling pathway	ADRB2, CACNA1C, CHRM2, MAPK1, PIK3R1	1.4×10^{-2}
	mTOR signaling pathway	MAPK1, PIK3R1, TNF	3.1×10^{-2}
	VEGF signaling pathway	MAPK1, PIK3R1, PTGS2	3.4×10^{-2}
	oxytocin signaling pathway	CACNA1C, MAPK1, PIK3R1, PTGS2	3.9×10^{-2}
	cGMP-PKG signaling pathway	ADRB2, CACNA1C, MAPK1, PIK3R1	4.4×10^{-2}
	prolactin signaling pathway	ESR1, MAPK1, PIK3R1	4.5×10^{-2}
其他	leishmaniasis	MAPK1, PTGS2, TNF	4.5×10^{-2}
	metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	ADH1A, ADH1B, ALDH1A3, CYP3A4	5.1×10^{-3}
	drug metabolism - cytochrome P450	ADH1A, ADH1B, ALDH1A3, AOX1, CYP3A4, MAOA, MAOB	6.5×10^{-7}
	retinol metabolism	ADH1A, ADH1B, ALDH1A1, AOX1, CYP3A4, RDH12	1.2×10^{-5}
	chemical carcinogenesis	ADH1A, ADH1B, ALDH1A3, CYP3A4, PTGS2	5.3×10^{-4}

本研究在 BATMAN-TCM 服务器挖掘二妙丸 38 个主要化学成分, 177 个潜在靶点, 并通过 PPI 网络拓扑属性分析确定了二妙丸 37 个关键靶标, 发现二妙丸中黄柏碱, 四氢小檗碱, 蝙蝠葛任碱, 黄柏苷, 尼洛替星, β-桉叶醇, 茅术醇, 白术内酯 II 等主要成分能直接、间接的作用于 TNF, 前列腺素内环氧合酶 2 (COX-2), 腺苷脱氨酶, 糖皮质激素受体, 5-TH 转运体, 多巴胺转运体等与炎症, 痛风等相关的靶点, 参与炎症调控、金属阳离子调控、核苷酸代谢等 GO 生物过程, 显著富集在 TNF, TRP 通道炎症调控通路, FcεRI 等信号通路上, 能发挥多重抗炎、抗痛风、抗湿疹等作用。

2004 年, 杨澄^[27]发现二妙丸水提取物能抑制痛风性关节炎大鼠关节肿胀, 降低血清和肿胀部位组织液 K⁺, DA 和 5-TH 含量, 改善痛风性关节炎肿

胀组织病理变化。研究表明黄柏能降低血尿酸含量、下调 TNF-α, COX-2 的表达, 抑制相关炎症反应, 还能抑制小鼠的 VI 型变态反应以及发挥类似糖皮质激素样的抗炎作用; 苍术也能抑制 TNF-α, COX-2 的表达, 发挥抗炎镇痛的作用^[30]。朱晓勤^[31]发现湿热型痛风炎症的致痛因子有 K⁺, H⁺ 等离子, 前列腺素, 5-羟色胺等, 而二妙丸能显著缓解湿热型痛风造成的疼痛。虽然目前尚无二妙丸调节腺苷脱氨酶, FcεRI 靶点通路治疗疾病的实验报道, 但有研究^[32-33]表明含有黄柏的三黄洗液能调节 FcεRI 表达, 抗婴幼儿湿疹; 含有黄柏的利湿活血方能降低血清尿酸含量、降低腺苷脱氨酶活性, 对高尿酸血症由较好的治疗效果。以上报道与本研究均证明了二妙丸能显著治疗炎症、痛风性关节炎、湿疹等疾病, 具有“一方多效”的药效作用。

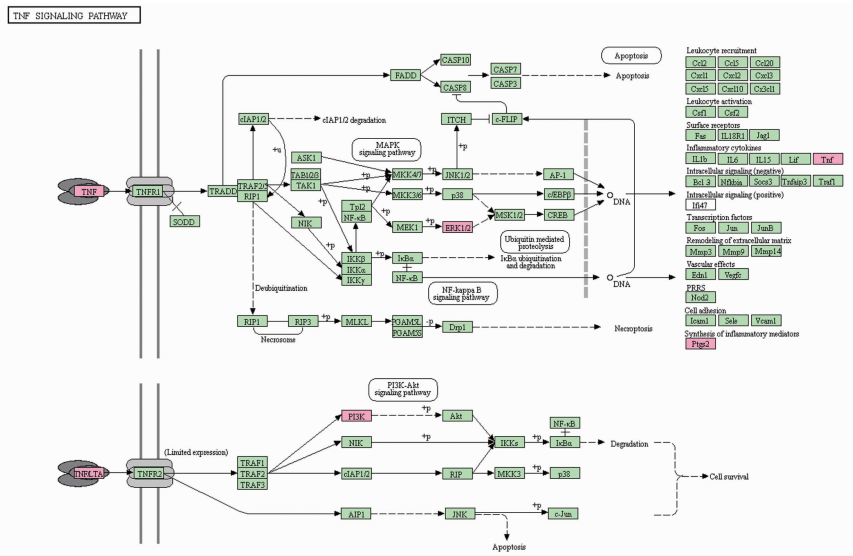


图 6 TNF 信号通路

Fig. 6 TNF signaling pathways

此外,本研究还发现二妙丸能作用于 5-TH 受体, β_2 肾上腺素受体以及一些激素受体,参与调节脂质降解 GO 生物过程,调控糖尿病、心血管病、神经、肿瘤等信号通路^[28-29]。推测二妙丸还可能具有抗糖尿病周围神经病变、治疗神经系统、胃肠系统、心血管系统疾病,以及调控细胞色素 P450 酶、抗肿瘤等作用。呼永河等^[12]发现二妙丸能提高糖尿病周围神经病变患者的运动、感觉神经传导速度,治疗糖尿病周围神经病疗效显著。在黄柏-苍术药对基础上制成的加味二妙丸、加味二妙散也以广泛用于治疗糖尿病周围神经病变,并取得了显著疗效^[34-35]。方宾^[36]发现以加味二妙丸配合治疗有机磷中毒所致迟发性神经病变,具有明显疗效。黄柏能调节心血管系统疾病,具有 β 肾上腺素样作用^[37],还具有调节家兔肠管收缩,以及中枢抑制作用^[38];苍术具有降低高血糖、高尿酸、高血压以及保护心肌的作用^[39]。均说明二妙丸具有多种药效作用,临床不仅仅局限于治疗风、关节炎、湿疹皮炎、妇科炎症等病,还能治疗其他多种疾病。

综上所述,本研究运用网络药理学技术与方法,分析了二妙丸成分-靶点-通路之间的相互作用关系,预测了二妙丸可能的药理作用机制,为进一步研究二妙丸“一方多效”的分子机制,提供了新的线索与依据。

【参考文献】

[1] 熊延熙,丁舸. 试论二妙散组方配伍意义[J]. 江西中医药,2016,47(398):15-16.

[2] 冯昕,赵文军,侯婷,等. UPLC-MS/MS 测定二妙散提取物中 14 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(21):79-85.

[3] 龚森. 黄柏的化学成分和药理作用研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2009,9(4):318-320.

[4] 于欢,刘德文,龚鹏飞,等. 苍术炮制方法及其饮片的质量控制、药效评价研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(23):194-200.

[5] 邓爱平,李颖,吴志涛,等. 苍术化学成分和药理的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(21):3904-3913.

[6] 张明发,沈雅琴. 苍术及其活性成分 β -桉叶醇的神经药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学,2017,14(1):6-11.

[7] 吕耀中,胡庆华,王星,等. 二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠尿酸失衡及其相关基因和蛋白水平的影响[J]. 中草药,2010,41(3):418-423.

[8] 李欣. 二妙丸类方抗湿热证痛风物质基础相关性研究[D]. 江苏:南京中医药大学,2009.

[9] 孙国珍,史党民. 中西药物治疗慢性妇科炎症的疗效比较[J]. 医药世界,2006,7:95-96.

[10] 雷昌,张秀丽,向韵,等. 两种不同粒径二妙丸制剂药效对比研究[J]. 亚太传统医药,2017,13(5):31-34.

[11] KONG L D, YANG C, GE F, et al. A Chinese herbs medicine Ermiao wan reduces sermeric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthineoxidase in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93:325-330.

[12] 呼永河,李静,吴深涛. 二妙丸加味治疗糖尿病肌病 42 例[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(9):46.

[13] 应振毅,王松挺. 二妙丸联合抗组胺药治疗湿疹 120 例[J]. 福建中医药,2008,39(4):40-42.

- [14] 牛明,章从恩,伍珊珊,等. 基于生物靶标网络的中药“一药多效”评价与精准用药[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2017,19(1):44-49.
- [15] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol,2007,25:1110.
- [16] 李梢. 网络靶标:中药方剂网络药理学研究的一个切入点[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2017-2020.
- [17] 李跃文,王博龙. 二至丸抗肝纤维化活性成分-靶点-通路的网络预测[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):201-205.
- [18] 吴嘉瑞,金燕萍,王凯欢,等. 基于网络药理学的“金银花-连翘”药对作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):179-183.
- [19] 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.
- [20] Perlman L, Gottlieb A, Atias N, et al. Combining drug and gene similarity measures for drug-target elucidation [J]. Comput Biol,2011,18(2):133-145.
- [21] WANG Y, LIU Z, LI C, et al. Drug target prediction based on the herbs components; the study on the multitargets pharmacological mechanism of Qishenkeli acting on the coronary heart disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, doi: 10.1155/2012/698531.
- [22] 郑世超,严小英,陈菊,等. 基于蛋白互作网络分析法风湿药川乌的抗炎机制[J]. 中国中药杂志,2017,42(9):1747-1751.
- [23] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (Database issue): D561-D568.
- [24] 薛潇春,胡晋红. 网络药理学的方法与应用进展 [J]. 药学实践杂志,2015,33(5):401-405.
- [25] Anitha P, Anbarasu A, Ramaiah S. Gene network analysis reveals the association of important functional partners involved in antibiotic resistance; a report on an important pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* [J]. Gene,2016,575:253-263.
- [26] Bader G, Hogue C. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks [J]. BMC Bioinformatics,2003,4(1):2.
- [27] 杨澄. 二妙丸水提取物抗痛风活性研究 [D]. 南京:南京大学,2004.
- [28] 胡家才,刘睿. 黄柏对尿酸性肾病大鼠肾组织肿瘤坏死因子 α 及环氧合酶-2表达的影响 [J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(5):655-657.
- [29] 吕纯鹏,张喜国,张秋风. 苦柏颗粒冷湿敷治疗面部激素依赖性皮炎疗效观察 [J]. 光明中医,2017,32(7):959-961.
- [30] 张明发,沈雅琴. 苍术抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 药物评价研究,2016,39(5):885-890.
- [31] 朱晓勤. 二妙丸类方抗湿热证痛风物质基础与生物效应的相关性研究 [D]. 江苏:南京中医药大学,2008.
- [32] 邹国明,谢斌. 复方三黄洗液治疗婴幼儿湿疹临床研究 [J]. 辽宁中医杂志,2011,38(2):297-299.
- [33] 吴丽,王林元,王小花,等. 利湿活血方对高尿酸血症大鼠尿酸及肾脏抗氧化能力的影响 [J]. 环球中医药,2017,10(6):646-650.
- [34] 谢梅华,吴虹. 加味二妙散内服配合中药外敷治疗糖尿病周围神经病变 32 例 [J]. 安徽中医临床杂志,2003,15(1):14-15.
- [35] 韩晶. 加味二妙散合麦冬定治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察 [J]. 中医药学报,2007,35(5):56-57.
- [36] 方宾. 中西医结合治疗有机磷致迟发性神经病变 [J]. 浙江中西医结合杂志,2006,16(12):775.
- [37] 杨秀伟. 黄柏的药理活性物质 β -样作用物质的分离和对心血管系统的作用 [J]. 中药通报,1984,9(2):48.
- [38] 都日娜,乌日娜. 黄柏的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志,2008,14(3):75-76.
- [39] 张明发,沈雅琴. 苍术及其有效成分对心血管和代谢系统药理作用的研究进展 [J]. 抗感染药学,2017,14(2):244-249.

[责任编辑 周冰冰]