

· 数据挖掘 ·

白术黄芪汤分子网络及细胞免疫作用的生物信息学分析

郭晴晴¹, 李立², 何小鹏², 吕爱平³, 马超英^{1*}

(1. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700; 3. 香港浸会大学 中医药学院, 香港 999077)

[摘要] **目的:**利用生物信息学方法分析白术黄芪汤的分子网络及与细胞免疫相关的生物通路,为白术黄芪汤免疫调节机制研究提供思路和依据。**方法:**利用在线数据库查找白术黄芪汤组方中药含有的化学成分,在 PubChem 数据库检索化学成分的靶蛋白,将靶蛋白上传至生物信息分析软件,分析上传的靶蛋白构成的分子网络及与细胞免疫相关的生物通路。**结果:**共检索到白术黄芪汤化学成分的靶蛋白 61 个,构建成 6 个分子网络,得到多条与细胞免疫相关的生物通路,前 3 个生物通路分别是 Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis, CCR5 Signaling in Macrophages 和 IL-12 Signaling and Producing in Macrophages。参与前 3 个生物通路的白术黄芪汤的靶蛋白包括 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR), 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 过氧化物酶体增殖物激活受体 gamma (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARC)。**结论:**通过生物信息学分析,得到了白术黄芪汤的复杂分子网络及与细胞免疫相关的生物通路,为其免疫调节机制研究提供了一定的思路和依据。

[关键词] 白术黄芪汤; 分子网络; 细胞免疫; 生物通路

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0206-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140206

Bioinformatic Analysis on Molecular Network and Cellular Immune Effect of Baizhu Huangqi Tang

GUO Qing-qing¹, LI Li², HE Xiao-juan², LYU Ai-ping³, MA Chao-ying^{1*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. The School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the molecular network and biological pathways related to cellular immune of Baizhu Huangqi Tang (BZHQT) by using bioinformatic method, and provide ideas and basis for the immunomodulatory mechanism study of BZHQT. **Method:** On-line databases were searched for the chemical ingredients of BZHQT prescription. Target proteins related with each ingredient were found in PubChem. Then, these target proteins were uploaded to bioinformatic analysis software. Finally, the molecular networks of the target proteins and their biological pathways related to cellular immune were analyzed. **Result:** Sixty-one target proteins of the chemical ingredients were searched from BZHQT and six molecular networks of BZHQT were obtained. Multiple biological pathways related to cellular immune were obtained, and the top 3 pathways were Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis, CCR5 Signaling in Macrophages and IL-12 Signaling and Production in Macrophages. Target proteins of BZHQT that participated in above three signaling pathways included T cell receptor (TCR), protein kinase C (PKC), and peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG). **Conclusion:** Complicated

[收稿日期] 20150922(015)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(200907001-4);国际科技合作专项(2014DFG32700);国家自然科学基金青年项目(81503388);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(Z0294)

[第一作者] 郭晴晴,从事中药复方物质基础与作用机制研究, Tel:010-64014411, E-mail: gqq5432@163.com

[通讯作者] * 马超英, 硕士, 教授, 从事中药复方物质基础与作用机制研究, Tel:028-87601838, E-mail: mey195888@126.com

molecular networks and signaling pathways related to cellular immune of BZHQT were obtained. We providing ideas and basis for study of immunomodulatory mechanism of BZHQT.

[**Key words**] Baizhu Huangqi Tang; molecular network; cellular immune; biological pathways

白术黄芪汤源自金元四大家之一刘完素的《素问病机气宜保命集》，著作中记载：“白术黄芪汤：服前药。痢虽已除，犹宜此药和之……白术一两，黄芪七钱，甘草三钱^[1]。”此方用于肠道炎性疾病缓解期的治疗渊源已久。现代药理学研究认为健脾益气中药黄芪、白术和甘草具有良好的免疫调节作用，尤其是化学有效部位黄芪皂苷和甘草黄酮的免疫调节效果明显，药理学实验证实黄芪皂苷和甘草黄酮有良好的抗消化道溃疡和胃肠道黏膜保护作用，二者在临床上已被用于治疗消化道溃疡和免疫调节剂^[2-3]。李茹柳^[4]将白术有效提取部位、黄芪总皂苷、甘草总黄酮组成白术黄芪方，通过实验研究证实该方能促进肠上皮人结肠腺癌(Caco-2)细胞增殖，增强细胞紧密连接及其胞质紧密粘连蛋白1(ZO-1)的表达。但是，白术黄芪汤发挥免疫调节的作用机制仍不清楚，有待深入研究。众所周知，中药及复方多成分、多靶点、多途径的特点使其作用机制难以阐明，随着生物信息学的快速发展，网络药理学应运而生，很多学者将其应用于中医药研究并取得一定成果^[5-7]。本研究旨在利用生物信息学的方法研究白术黄芪汤免疫调节的作用机制，有利于推进白术黄芪汤作用机制的研究。笔者通过查阅白术黄芪汤组方中药的化学成分以及这些化学成分相互作用的靶蛋白，并利用生物信息分析软件得到白术黄芪汤的分子网络及与细胞免疫相关的生物通路，最后结合相关的文献资料对生物信息学分析的结果进行解析，从分子水平解释了白术黄芪汤免疫调节的作用机制，具有一定的创新性。

1 材料与方法

1.1 中药化合物及靶蛋白的检索 利用在线中药数据库 TCM Database @ Taiwan^[8]，TCMID^[9]，HIT^[10]及《中药大辞典(第二版)》检索白术黄芪汤组方中药的化学成分。在 PubChem 数据库中查找与这些化学成分相关的靶蛋白并记录靶蛋白的 ID 号。

1.2 白术黄芪汤分子网络及与细胞免疫相关的生物通路分析 本研究使用的生物信息分析软件是基于云计算的一体化应用软件，有自己强大的数据库并会定期更新，能够分析来源于基因组，小分子 RNA(microRNA)，单核苷酸多态性(SNP)，芯片，代

谢组，蛋白组，转录组测序技术(RNA-Seq)以及各类小规模实验数据并构建相互作用模型。软件中的大规模数据分析可以将以上数据分析结果分割成分子互作，生物功能以及生物通路等模块。在分子互作模块中，软件根据分子的不同生物功能构建分子网络，并根据上传的分子与网络的关系密切程度自动计算分值，分值越大，提示上传的分子在网络中越发挥主要作用，另外，软件将分子网络以网络图的形式展示，每个节点代表 1 个分子，不同形状代表不同的分子属性，节点与节点之间的连线代表分子之间的相互作用关系，实线代表直接作用关系，虚线代表间接作用关系；在生物通路模块中，软件将与上传分子相关的生物通路以柱形图的形式展示出来，并基于映射到生物通路的分子数量按照 Fisher's Exact Test 算法计算显著性，即 P -value，来反映上传分子和生物通路之间的相关性， $-\log(P\text{-value})$ 值越大，相关性越强，在柱形图中柱子越高，另外，为了便于用户分析，生物通路模块将通路分成了细胞免疫、体液免疫、癌症、代谢等类别。本研究将查找到的中药靶蛋白 ID 号在线上传至 IPA 生物信息分析软件(Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>)，在该软件中对这些数据集进行大规模数据分析，在分子互作和生物通路模块下，展示靶蛋白的分子网络和细胞免疫相关生物学通路，随后对可视化后的结果进行生物解析。

2 结果

2.1 白术黄芪汤的化合物及靶蛋白 检索到白术、黄芪、甘草的化合物数量分别为 9, 22, 82 个，靶蛋白的数量分别为 2, 11, 67 个，将这些靶蛋白汇总，去掉重复的，共 61 个。

2.2 白术黄芪汤分子网络的构建 在分子互作模块共构建出 6 个大小不一、功能不同的分子网络，本文展示前 3 个分子网络，见表 1 和图 1，表格中加粗的分子对应图中蓝色的分子，是白术黄芪汤的靶蛋白，未加粗分子对应图中未涂色的分子，是构建网络所需的相关分子。表格中最后一列是分子网络发挥的生物功能。

2.3 与细胞免疫相关的生物通路 在生物通路模块，在类别中勾选细胞免疫选项即可得到白术黄芪汤与细胞免疫相关的生物通路，前 10 个生物通路(图

表 1 白术黄芪汤靶蛋白构成的前 3 个分子网络

Table 1 Top three molecular networks constructed by target proteins of BZHQT

No.	构成网络的分子	分值	网络的功能
1	26S proteasome, alpha tubulin, AR, CASP3, CBF, dynein, ERK, histone, HSD11B1, HSD11B2, HSP, HSP70, HSP90, HSPB1, IFN-beta, IFN-gamma, IgG, IFN-alpha, KLK7, NF- κ B (complex), NR3C1, P-TEFb, POLI, POLK, PRMT1, Pro-inflammatory Cytokine, PSMD14, RACGAP1, RNA polymerase II, RUNX1, STK33, TFIIH, TGF-beta, TRA, Ubiquitin	34	DNA Replication, Recombination, and Repair, Organismal Injury and Abnormalities, Skeletal and Muscular Disorders
2	AKR1C4, ALG5, ALPL2, ATAD5, COX6A1, DCXR, DLEU2, DNPH1, E2F1, EFCAB7, HIST1H2BJ, HSPA14, MIPEP, MLLT3, MTFR2, MYC, NDUFA8, NDUFS4, PDE5A, PREPL, RAB9A, SCO2, SENP6, SENP7, SENP8, SLC22A18AS, SLC5A7, TDP1, TMEM126A, TRIM28, TTC27, UBC, ZNF77, ZNF121, ZNF256	24	Cell Cycle, Humoral Immune Response, Skeletal and Muscular System Development and Function
3	AKR1B1, calpain, CAR ligand-CAR-Retinoic acid-RXR α , CBP/p300, cPLA2, Cyclin E, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, E2f, ERK1/2, GMNN, growth hormone, HDAC, histone H4, LDL, MRGPRX1, N-CoR, Ncoa-Nr1i2-Rxra, Ncoa-Nr1i3-Rxra, NPC1, NR0B1, NR1H, Nuclear factor 1, pi3k, PPARG, PRKCH, PXR ligand-PXR-Retinoic acid-RXR α , Rb, rxr, SREBP, STAT5A/B, SWI-SNF, unspecific monooxygenase	21	Small Molecule Biochemistry, Drug Metabolism, Energy Production

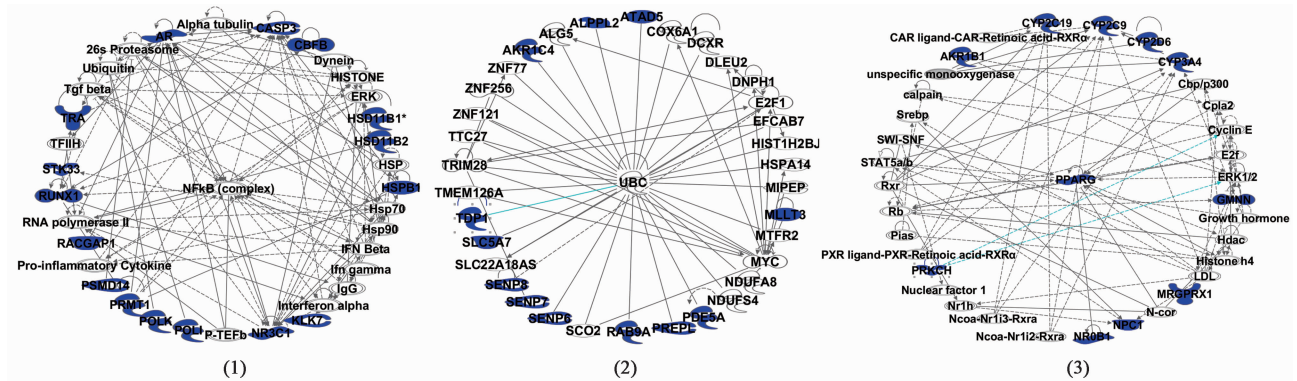


图 1 白术黄芪汤靶蛋白构成的前 3 个分子网络

Fig.1 Top three molecular networks constructed by target proteins of BZHQT

2) 分别为 Calcium-induced T lymphocyte apoptosis, CCR5 signaling in macrophages, IL-12 signaling and production in macrophages, macropinocytosis signaling, IL-3 signaling, NF- κ B activation by viruses, Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages and monocytes, phagosome formation, leukocyte extravasation signaling, fMLP signaling in neutrophils。笔者将前 3 个通路进行展示(图 3), 图中红色圆圈标记的分子是白术黄芪汤的靶蛋白, 包括 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR), 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 过氧化物酶体增殖物激活受体 gamma (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)。生物信息分析结果提示笔者白术黄芪汤可以通过靶向 TCR, PKC, PPARG, 影响信号通路 calcium-induced T lymphocyte apoptosis, CCR5 signaling in macrophages, IL-12 signaling and production in macrophages, 从而调节免疫功能。

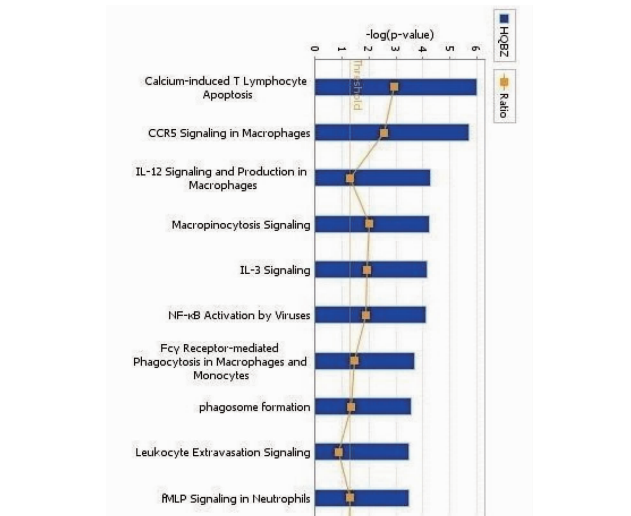
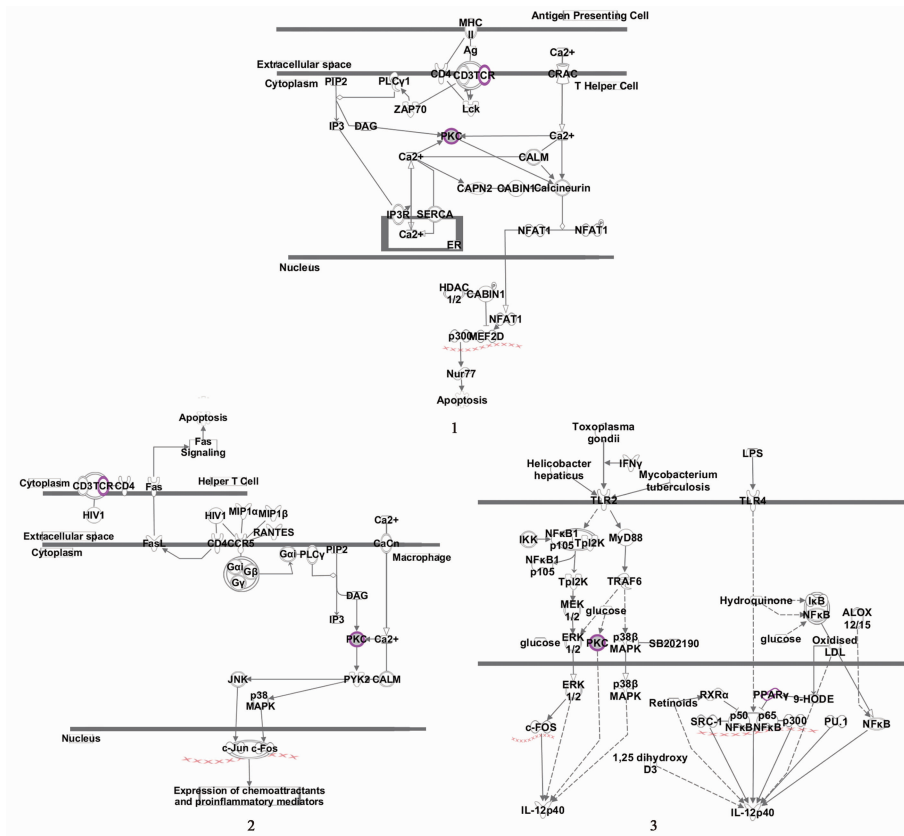


图 2 白术黄芪汤的前 10 个与细胞免疫相关的生物通路

Fig. 2 Top ten biological pathways related to cellular immune of BZHQT

3 讨论

白术黄芪汤是益气健脾的古方, 由白术、黄芪和



A. calcium-induced T lymphocyte apoptosis; B. CCR5 signaling in macrophages; C. IL-12 signaling and production in macrophages

图 3 白术黄芪汤的前 3 个与细胞免疫相关的生物通路及靶蛋白

Fig. 3 Top three biological pathways and target proteins related to cellular immune of BZHQT

甘草以 10:7:3 的比例组成,用于泻痢恢复期的治疗。现代研究通过观察白术黄芪汤对三硝基苯磺酸 (TNBS) 造模小鼠的疾病活动指数、结肠黏膜损伤指数、病理组织学评分和髓过氧化物酶 (MPO) 活性来评价其对小鼠溃疡性结肠炎的作用,结果表明有一定疗效^[11]。白术黄芪汤组方中药的化学成分及药理作用研究已在国内外开展,白术的化学成分主要为挥发油,如苍术酮、白术内酯 I, II, III 及双白术内酯等,这些化学成分具有抗肿瘤^[12-14]、抗衰老^[15]、增强机体免疫力^[16]等功效;黄芪以多糖、三萜、黄酮等成分为主,药理实验及临床报道表明,黄芪在免疫调节^[17-18]、抗肿瘤^[19]等方面具有重要作用;甘草的主要活性成分是三萜皂苷和黄酮类化合物,现代药理学^[20]研究表明,甘草具有抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节等多种活性。

本研究得到白术黄芪汤 61 个靶蛋白,6 个大小不一、功能不同的分子网络,符合中药复方多成分、多靶点、多功能的特点。生物通路模块得到多条与细胞免疫相关的生物通路,符合中药复方多途径的特点。将前 3 条与细胞免疫相关的生物通路展示,笔者可以看出白术黄芪汤是通过 TCR, PKC, PPARG

3 个靶蛋白来调控这 3 条信号通路的。众所周知, T 细胞抗原受体在细胞免疫中发挥重要作用。PKC 属于丝氨酸/苏氨酸激酶,能特异性的在丝氨酸/苏氨酸残基处磷酸化底物,是调节不同细胞功能的多个信号通路的中枢分子^[21-22]。有研究表明,在炎症肠道疾病中,活化的 aPKC 的表达量和局部炎症呈显著的负相关^[23]。PPARG 是 PPAR 家族亚型之一,该家族在炎症控制的过程起重要作用,近年来, PPARG 在炎症肠道疾病,如克罗恩病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (UC) 中的作用日益受到关注^[24-25],且已成为溃疡性结肠炎新的治疗靶标^[26]。

本研究是结合多个在线数据库检索和生物信息学分析平台研究中药复方分子网络及药理机制的成功尝试,该方法可扩展到其他中药复方的研究,利用本方法分析得到的结果对中药复方的作用机制研究具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] 李茹柳,迟莉,石忠峰,等. 白术黄芪汤及其单药提取部位组方对溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(3): 223-228.

- [2] 万春平. 黄芪皂苷类组分生物活性研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(8): 79-81.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [4] 李茹柳. 白术黄芪方对溃疡性结肠炎及紧密连接相关蛋白影响的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [5] Liang X, Li H, Li S. A novel network pharmacology approach to analyse traditional herbal formulae; the Liu-Wei-Di-Huang pill as a case study [J]. Mol Biosyst, 2014, 10(5): 1014-1022.
- [6] Zhang B, Wang X, Li S. An integrative platform of TCM network pharmacology and its application on a herbal formula, Qing-Luo-Yin [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 1155/2013/456747.
- [7] Liang F, Li L, Wang M, et al. Molecular network and chemical fragment-based characteristics of medicinal herbs with cold and hot properties from Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 770-779.
- [8] Chen C Y. TCM Database@Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in silico[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15939.
- [9] Xue R, Fang Z, Zhang M, et al. TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D1089-1095.
- [10] Ye H, Ye L, Kang H, et al. HIT: linking herbal active ingredients to targets [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D1055-1059.
- [11] 石忠峰, 陈蔚文, 李茹柳, 等. 白术黄芪汤及其有效部位组方对小鼠溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 87-90.
- [12] 赵洪敏, 朱庆均, 郑广娟, 等. 白术提取物对人肺癌 PG 细胞体外侵袭作用的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(6): 465-466.
- [13] 刘昝, 叶峰, 邱根全, 等. 白术内酯 I 对肿瘤恶病质患者细胞因子和肿瘤代谢因子的影响[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(10): 1308-1311.
- [14] 郑广娟. 白术对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑瘤作用及肿瘤凋亡相关基因 bcl-2 表达的影响[J]. 生物医学工程研究, 2003, 22(3): 48-50.
- [15] 戚晓利, 杨少峰, 赵永勋. 白术水煎剂对 D-半乳糖所致衰老小鼠 NO、NOS 和 LPO 影响[J]. 黑龙江医药科学, 2002, 25(1): 4-6.
- [16] 余上才, 章育正, 赵慧娟, 等. 枸杞子和白术免疫调节作用的实验研究[J]. 上海免疫学杂志, 1994, 14(1): 12-13.
- [17] Zhang W J, Hufnagl P, Binder B R, et al. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression [J]. Thromb Haemost, 2003, 90(5): 904-914.
- [18] Lee K Y, Jeon Y J. Macrophage activation by polysaccharide isolated from Astragalus membranaceus [J]. Int Immuno Pharmacol, 2005, 5(7/8): 1225-1233.
- [19] Guo L, Bai S P, Zhao L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival [J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 1656-1662.
- [20] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds [J]. Phytother Res, 2008, 22(6): 709-724.
- [21] Parker P J, Justilien V, Riou P, et al. Atypical protein kinase Ciota as a human oncogene and therapeutic target [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(1): 1-11.
- [22] Diaz-Meco M T, Moscat J. The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 154-167.
- [23] Wald F A, Forteza R, Diwadkar-Watkins R, et al. Aberrant expression of the polarity complex atypical PKC and non-muscle myosin IIA in active and inactive inflammatory bowel disease [J]. Virchows Arch, 2011, 459(3): 331-338.
- [24] Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98815.
- [25] Kundu P, Ling T W, Korecka A, et al. Absence of intestinal PPARGamma aggravates acute infectious colitis in mice through a lipocalin-2-dependent pathway [J]. PLoS Pathog, 2014, 10(1): e1003887.
- [26] Bertin B, Dubuquoy L, Colombel J F, et al. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention [J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(12): 1501-1507.

[责任编辑 邹晓翠]