· 数据挖掘 ·

白芍-甘草药对治疗骨关节炎的疗效机制预测

程仕萍[1,2]，周平生[3]，赵宁[2]，吕诚[2]，吕爱平[2,4]，谭勇[2*]
（1. 上海中医药大学，上海 201203；
2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所，北京 100700；
3. 江西中医药大学 国际教育学院，南昌 330006；
4. 香港浸会大学 中医药学院，香港 999077）

［摘要］ **目的**：探讨白芍-甘草药对治疗骨关节炎的作用机制。**方法**：首先在《中药大辞典（第二版）》中检索白芍和甘草的所有化学成分；其次采用中药系统药理学数据库（TCMSP）中的 ADME 参数，遴选活性成分；然后在 PubChem 和 TCMSP 数据库中查找活性成分对应的人类靶蛋白，在 Gene 数据库中查找骨关节炎相关基因；把靶蛋白和基因导入分子网络分析平台，采用核心计算分析法则，分别构建药物和疾病的分子网络和生物学通路，并进行比较映射分析。**结果**：药物和疾病涉及的共同生物学通路主要包括细胞免疫、细胞因子信号，涉及的共同高连接分子主要包括白细胞介素-1（interleukin-1，IL-1），肿瘤坏死因子-α（TNF-α），核转录因子-κB1（NF-κB1）和细胞外调节蛋白激酶（ERK1/2）。**结论**：白芍-甘草药对可能通过影响 IL-1，TNF-α，NF-κB1 和 ERK1/2，以及调控细胞因子信号通路，抑制炎症，调节软骨细胞免疫，从而对骨关节炎产生协同疗效。

［关键词］ 白芍-甘草药对；骨关节炎；分子网络分析；疗效机制
［中图分类号］ R285.5　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1005-9903(2016)22-0180-06
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220180
［网络出版地址］ http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1340.040.html
［网络出版时间］ 2016-09-19 13:40

Prediction of Therapeutic Mechanism of Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Herbal Pair in Treating Osteoarthritis

CHENG Shi-ping[1,2], ZHOU Ping-sheng[3], ZHAO Ning[2], LYU Cheng[2], LYU Ai-ping[2,4], TAN Yong[2*]
(1. *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM)*, *Shanghai* 201203, *China*;
2. *Basic Clinical Research Institute of TCM*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*; 3. *Institute of International Education*, *Jiangxi University of TCM*, *Nanchang* 330006, *China*; 4. *School of Chinese Medicine*, *Hong Kong Baptist University*, *Hong Kong* 999077, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To discuss the therapeutic mechanism of Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma herbal pair (PG) in treating osteoarthritis. **Method**: Firstly, all of chemical components of peonyand licorice were retrieved in *The Dictionary of Chinese Herbal Medicine* (*second edition*). Secondly, ADME parameters in the traditional Chinese medicine database system pharmacology (TCMSP) were applied in selecting active ingredients; then, human target protein corresponding to active ingredients were searched in PubChem and TCMSP databases, and osteoarthritis-related genes were searched in Gene database; target proteins and genes were

［收稿日期］ 20151218(008)
［基金项目］ 国家自然科学基金面上项目(81573845)；国家自然科学基金青年项目(81403209)；中国中医科学院自主选题项目(Z0412)；北京市优秀博士学位论文指导教师科技项目(20118450201)
［第一作者］ 程仕萍，博士，讲师，主治医生，从事中医药生物信息学的研究工作，Tel：13576921264，E-mail：chengshiping0426@126.com
［通讯作者］ * 谭勇，博士，副研究员，从事中医药生物信息学研究及有毒中药对证控毒研究工作，Tel：13718069135，E-mail：tcmtanyong@126.com

introduced in the molecular network analysis platform, the core analysis method was used to build molecular networks and biological pathways for drugs and diseases, and compare the map analysis. **Result**: The common biological pathways involved by the drugs and diseases included cell immunity and cell factors, and the common high-connection elements they involved mainly included interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor-α (TNF-α), nuclear factor kappa B1 predominate (NF-κB1) and extracellular regulating protein kinase (ERK1/2). **Conclusion**: PG may have a curative effect on osteoarthritis by impacting IL-1, TNF-α, NF-κB1 and ERK1/2, regulating cytokine signaling pathways, inhibiting inflammation and adjusting immune regulating cartilage cells.

[**Key words**] Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma herbal pair; osteoarthritis; molecular networks analysis; therapeutic mechanism

骨关节炎(osteoarthritis, OA),是一种以关节软骨的变性、破坏、骨赘形成及关节间隙变窄为特征的退变性关节疾病。OA 发病率逐年升高,致残率高,严重影响患者生活质量和整体健康状况[1]。中医药在 OA 的治疗上经验丰富并具独到之处,可有效地改善临床症状,且副作用较少。临床中医辨证治疗 OA 的大量文献中,发现芍药和甘草为常用药对和复方配伍核心。芍药和甘草配伍出自《伤寒论》的芍药甘草汤,此方原用于阴液亏虚所致脚挛急证。目前主要应用于神经-肌肉系统、骨关节等方面的疾病[2]。在李具宝等[3]挖掘治疗膝关节炎的中医用药规律中,芍药、甘草用药频次分别居第 3 位和第 4 位。但目前芍药甘草汤治疗骨关节炎的疗效机制尚不明确,其药效成分和关键作用靶点尚未揭示。

中药治疗疾病是多靶点针对多基因的复杂过程,只有采用能够诠释这种复杂性的技术方法才能全面、准确把握中药治疗疾病的整体特征。2007 年 Hopkins 等提出了“网络药理学”的概念, 通过分析药物对疾病网络的干预, 构建“药物-靶点-疾病”的作用网络, 为药物研发提供了新的策略[4-5]。借鉴经典网络药理学的方法,特别适宜研究中药成分的作用机制,研究者可以从临床典型证候患者的组学信息中构建证候对应的生物网络,即“病-证相关网络”;进而从单味药及传统方剂中可发现有效成分组,进而针对多靶标设计、发现中药新药[6],如 Zhao 等[7]运用网络药理学方法研究桂枝芍药知母汤,网络分析表明其活性成分治疗糖尿病周围神经病变的多个靶点和生物学通路,苑婕等[8]采用网络药理学方法成功预测银杏叶治疗心脑血管类疾病的有效成分及潜在靶点。

因此,本研究运用网络药理学方法对芍药-甘草药对治疗骨关节炎的分子机制进行预测,揭示芍药-甘草药对作用于骨关节炎的作用靶点和生物学信号通路,为后续的分子生物学验证找到切入点,为药物开发和临床拓展应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物靶蛋白和疾病基因的查找 在《中药大辞典(第二版)》[5]中检索芍药甘草汤(SYGC)方剂组成白芍、甘草的化学成分, 然后在 PubChem (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), TCMSP 数据库中查找相关的分子信息及相应的生物学测试,根据各个成分的 ADME 性质确定它们的成药性和类药性,遴选出甘草的活性成分,参数设置:2≤脂水分布系数(AlogP)≤6,氢键供体数(Hdon)≥1,氢键受体数(Hacc)≥1,可旋转键数(RBNM)<10,拓扑分子极性表面积(TPSA)<60,口服生物利用度(OB)≥30,血脑屏障系数(BBB)≥0.3,半衰期(HL)≥8 h。最后,采用 TCMSP 打靶技术确定该活性成分对应的人类靶蛋白。以“Osteoarthritis”为关键词,在 Gene(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)数据库中查找 OA 的相关人源性基因。

1.2 分子网络的构建与比较 将中药靶蛋白和骨关节炎相关基因(种子分子)分别导入分子网络分析平台(ingenuity pathway analysis, IPA)。根据课题组既往的操作步骤和计算方法[7],首先,聚焦于“种子分子”和与其有密切相互作用的分子,加入 IPA 数据库中的非焦点分子构建网络,对结果网络进行打分(Score = −log[Fisher's Exact test result])排序,并得到网络分子相关的“初始通路”。其次,检验种子分子与已知功能和通路之间的关联是否来自于随机匹配,采用 Right-Tailed Fisher's Exact Test 算法,生成两个评价参数 *P*-value 和 *Z*-score。*P*-value 反映种子分子与已知功能和通路的相关度;*Z*-score 反映种子分子作用于另一个分子的方向效应或数据集中分子变化倍数对生物学过程产生的效应。然后,采用分子网络和通路活性 Overlay 工具,比较种子分子表达模式与显著分子网络和经典通路可能的信号调控模式间的异同,采用分子活性预测 MAP 工具,显

示通路被预测为激活/抑制时预期的信号传递模式及上游调节子可能的调控或激活关系,以此说明数据集中种子分子表达的变化原因。最后,通过 transcription regulator 模拟测算法对参数进行外显整合排序,获得具有显著意义的关键分子和途径。

1.3 生物学通路比较分析 利用通路分析模块功能,得到药物靶蛋白及 OA 相关基因参与的经典通路,并对比 SYGC 及 OA 的生物学通路,分析芍药-甘草药对的作用规律,通过作用位点的比较,预测芍药-甘草药对治疗 OA 的作用机制。

2 结果

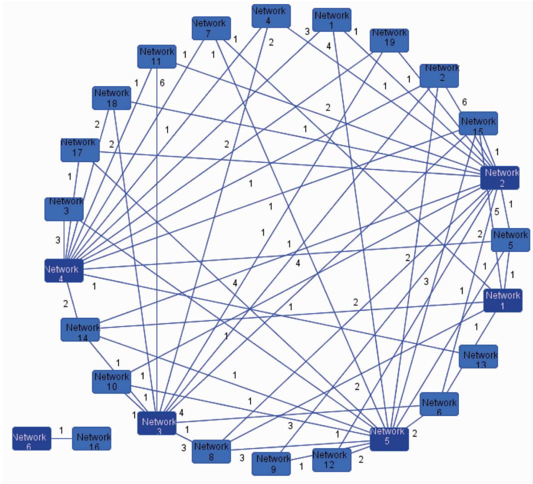
2.1 基因及靶蛋白查找结果(检索时间截止 2015 年 7 月 14 日) 以"osteoarthritis"为关键词检索 Gene 数据库,得到人类骨关节炎相关基因 389 个。通过文献检索确认白芍、甘草主要有效成分。在 PubChem, TCMSP 数据库检索有效成分的生物活性信息,确认对应靶蛋白。各有效成分靶蛋白的总和即为该药物对应的靶蛋白,其中白芍靶蛋白 8 个,甘草靶蛋白 27 个。2 味中药靶蛋白的总和即为该处方对应的靶蛋白。

2.2 分子网络分析结果 将检索到的 OA 相关基因及 SYGC 靶蛋白在线上传 IPA 进行分析,根据 Core Analysis 中的 Network 分析功能,OA 相关基因共形成 25 个生物功能各异的分子网络,芍药甘草汤靶蛋白形成 6 个生物功能不同的网络。对比分析发现评分靠前的 5 条 SYGC 分子网络均与 OA 的分子网络存在交联关系(图 1),提示芍药-甘草药对可能通过对某些关键分子的调节,影响机体的多个复杂生物网络,进而实现对 OA 的治疗作用。

为进一步明确作用机制,分别将评分高的前两个生物网络进行可视化展示分析(图 2):各网络中心区分子为高连接分子,其中芍药-甘草药对网络与 OA 网络间共同交联的连接分子有白细胞介素-1(IL-1),核转录因子-κB_1(NF-κB_1),核因子-κBp65(RELA),IκB 激酶(IκK),细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2),芳香化酶基因 19(CYP19),信号传导蛋白和转录激活物 3(STAT3)等。

2.3 生物学通路分析结果

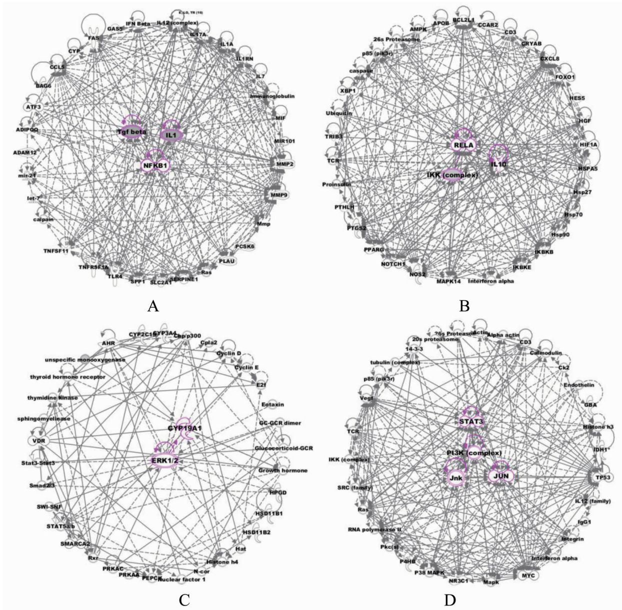
2.3.1 芍药甘草汤与 OA 的通路比较 根据 IPA 软件的 Comparative Analysis 模块分析得出,芍药-甘草药对靶蛋白在与 OA 相关基因的共同作用的通路超过 30 条,对其通路进行分类,其中与软骨细胞调亡、炎症关联度高的通路为细胞免疫通路、细胞因子信号通路(图 3,4)。而在两大类通路中同时存在且



图中每个方框代表一个网络,蓝色代表 OA 分子网络,深蓝色方框代表芍药甘草汤分子网络,方框间直线上数字表示两两网络间有共同分子交联数

图 1 OA 及 SYGC 分子网络交联

Fig. 1 Molecular network crosslinking figure of OA and SYGC



A. OA 分子网络 1; B. OA 分子网络 2; C. SYGC 分子网络 1; D. SYGC分子网络 2

图 2 OA 与 SYGC 的分子网络

Fig. 2 Molecular network of OA and SYGC

相关性最高的是 IL-6 信号通路(P-value: 1.88×10^{-8})。为进一步阐明机制,在展开 IL-6 信号通路中发现,紫色高亮的 IL-1, IκK, NF-κB_1, ERK1/2, 肿瘤坏死因子-α(TNF-α), P38MAPK 等为两者相关通路的作用位点(图 5)。对比两者相关度高的分子网络,不难发现在网络和通路中共同分子有 IL-1, NF-κB_1, TNF-α, ERK1/2, 因此预测这些分子即为芍药-甘草药对治疗骨关节炎的关键分子。

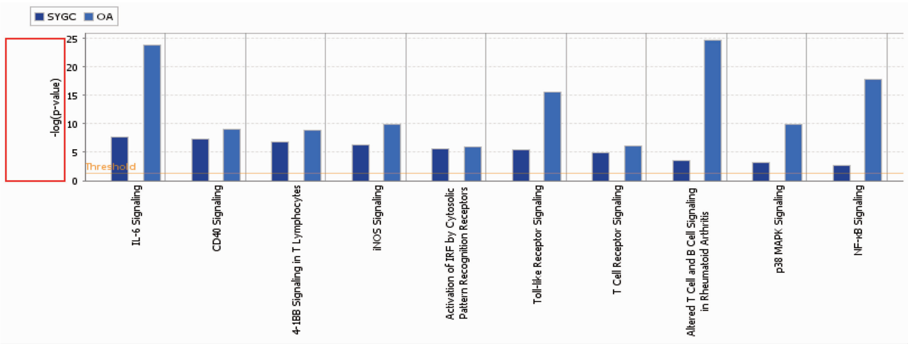


图 3　SYGC 与 OA 共同参与的细胞免疫通路

Fig. 3　Comparison of SYGC target proteins and OA genes in cellular immune pathways

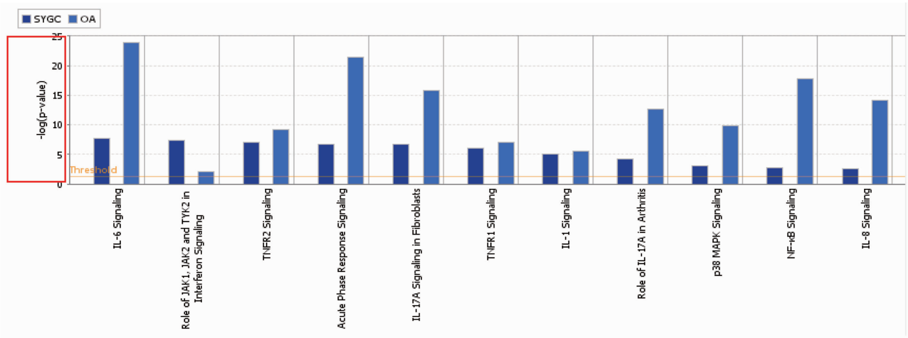


图 4　SYGC 与 OA 共同参与的细胞因子信号通路

Fig. 4　Comparison of SYGC target proteins and OA genes in cytokine signaling pathways

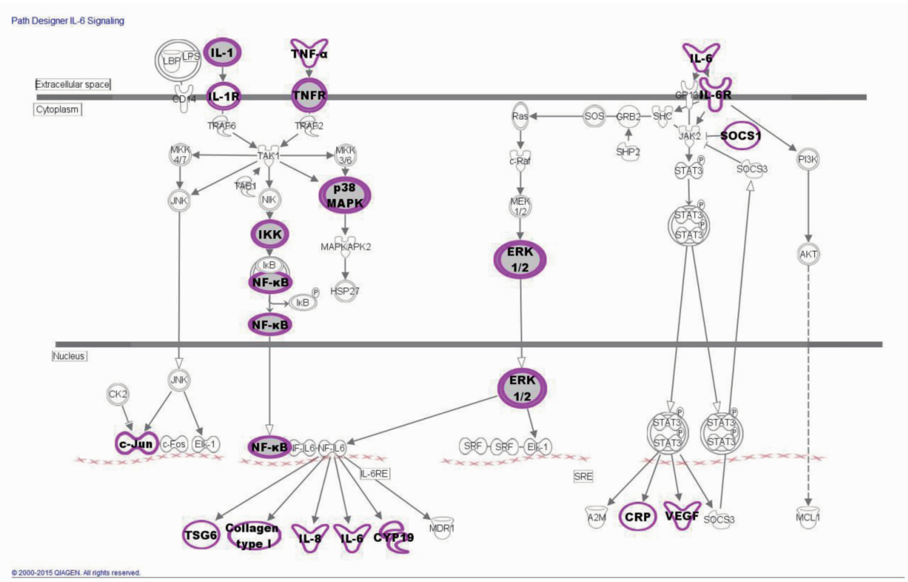


图 5　IL-6 信号通路

Fig. 5　IL-6 signaling pathways

3　讨论

骨关节炎是日常生活中最常见的一种关节炎。髋关节和膝关节 OA 往往导致患者严重的生理残疾，同时影响患者的生活质量。目前，对于 OA 选择何种药物治疗仍然具有争议，因为目前治疗 OA 的多数药物具有较大的毒性，疗效不佳。中医药治疗 OA 取得较好的疗效，且安全性好，受到了较大的关注，如芍药和甘草常常作为配伍核心药对，但同时因其疗效机制也有较大的争议。随着系统生物学技术的发展，网络药理学技术为中药复方药理机制系统、全面研究提供了新思路、新模式和新方法。中医药学的整体观与辨证论治理念体现了多成分、多靶点

及系统调控的思想，与网络药理学的研究思路有许多相似之处[9]。因此笔者用网络药理学方法研究，并发现芍药-甘草药对可能主要是通过影响 IL-1，TNF-α，NF-κB_1，ERK1/2 等分子，主要通过 JAK/STAT 途径，Ras/Erk 途径，PI3K 介导的信号转导通路对关节炎发挥疗效。

骨关节炎是一种退行性关节病变，表现为进行性关节软骨破坏及骨赘形成，并伴有不同程度的滑膜炎症。软骨关节主要由软骨细胞核细胞外基质组成，调节 OA 软骨细胞功能的细胞因子主要是 IL-1，IL-6，IL-17，TNF-α 等，这些致炎性细胞因子引起软骨细胞功能失调，最终导致进行性软骨基质破坏和关节功能的丧失[10-12]。IL-1 可促进滑膜细胞的软骨细胞合成并释放前列腺素 E_2（PGE_2）和胶原酶产生强大的促炎症作用，引起滑膜炎症和骨的吸收，而且形成的 PGE_2 反过来又进一步加强 IL-1 对软骨的分解作用。TNF-α 可激活多形核细胞，刺激滑膜细胞的 PGE_2 产生，增加骨、软骨的破坏，能诱导其他细胞因子。体外实验证实 TNF-α 与 IL-1 有着协同作用，能介导对关节组织的破坏。TNF-α 有可能诱导滑膜细胞、软骨细胞分泌 IL-1，从而在 OA 的发病中与 IL-1 起着协同作用[13]。TNF-α 也可刺激成纤维细胞和软骨细胞合成 PGE_2 和多种胶原酶，对软骨基质有很强的降解作用[14]。IL-6 可激活 B 细胞和 T 细胞，通过其自分泌形式作用于软骨细胞，促进软骨细胞的增殖。IL-6 作用于牛关节软骨细胞时，能通过激活 ERK 和 JNK 途径而引起基质金属蛋白酶-1（MMP-1），MMP-3，MMP-13 的增高[15]。芍药甘草汤，既能抑制外周神经末梢作用而减轻疼痛，又能抑制继发的炎性反应所致疼痛[16]。郑冬明等[17]发现芍药甘草汤有效组分可明显降低大鼠 IL-1β，IL-6，TNF-α，通过降低炎性细胞因子水平来抑制慢性压迫性损伤大鼠的机械痛敏和热痛敏作用，其镇痛机制可能和芍药甘草汤有效组分降低免疫细胞因子 IL-1β，IL-6，TNF-α 水平有关。宋军等[18]由芍药甘草汤合并提取获得的芍甘多苷能明显降低四氯化碳亚急性肝损伤大鼠肝脏 IL-1β 和 TNF-α 含量，通过降低细胞因子含量起到肝脏保护作用。因此，笔者认为芍药-甘草药对可能通过调控 IL-1β，IL-6，TNF-α 来治疗骨关节炎。

NF-κB 是炎症过程中比较重要的分子，参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子都受 NF-κB 的调控[19]。在对大鼠前软骨细胞和关节软骨细胞的研究中，发现 NF-κB_1 和 ERK1/2 共同参与了抑制 COL2A1 基因突变并促进 TNF-α 基因的表达[20]。早期就有学者发现体外培养的人软骨细胞中 MMP-3，MMP-13 的 mRNA 表达抑制程度与 ERK 抑制剂 U0126 成剂量依赖关系[21]。芍药甘草汤的抗炎作用机制涉及到抑制炎症过程中的细胞因子、炎症介质甚至一氧化氮（NO）的产生，因而发挥了较好的抗炎作用[22]。体外实验显示白芍可以促进成骨细胞存活、增强成骨细胞的磷酸酶（AKP）活性，还具有抑制破骨细胞存活的作用[23]。甘草提取物则对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌具有较明显的抑菌作用，并显著促进小鼠 T，B 淋巴细胞增殖[24]。朱蕾等[25]的研究结果表明，白芍总苷对胶原性关节炎大鼠具有治疗作用，白芍总苷体内、外给药均能抑制大鼠增高的 T，B 淋巴细胞增殖反应，还能显著降低刀豆蛋白 A 诱导的胶原性关节炎大鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 的能力以及脂多糖诱导的腹腔巨噬细胞产生 IL-1 的能力。由此笔者认为芍药-甘草药对可能通过调控 NF-κB_1，ERK1/2 参与细胞因子的调节，抑制炎症，调节软骨细胞免疫从而对骨关节炎产生疗效。

综上所述，采用网络药理学方法探索芍药-甘草药对治疗 OA 的分子机制，能够找到与疗效相关的生物信号通路及关键分子。本研究为下一步芍药-甘草药对治疗 OA 的分子生物学验证奠定了基础，为中药复方的筛选和优化提供了思路。

［参考文献］

[1] Zhang W, Nuki G, Moskowitz R W, et al. OARSI recommendations forthe management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(4): 476-499.

[2] 郑继生，钱景莉. 芍药甘草汤及其临床运用[J]. 河南中医，2012，8(32)：966-968.

[3] 李具宝，张磊，屈尚可，等. 膝关节骨性关节炎近十年文献中药用药规律探讨[J]. 北京中药，2013，32(11)：842-844.

[4] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm indrug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.

[5] Liu A L, Du G H. Network pharmacology: new guidelines fordrug discovery [J]. Acta Pharm Sin, 2010, 45(12): 1472-1477.

[6] 何小娟，李健，陈杲，等. 基于病证结合的中药网络药理学研究与新药研发策略[J]. 中国中医基础医学杂志，2011，17(11)：1271-1273.

[7] Zhao N, Li J, Li L, et al. Molecular network-based analysis of Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction, a TCM herbal formula, for treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2015, 1(8):1-8.
[8] 苑婕,李晓杰,陈超,等. 基于网络药理学方法预测银杏叶治疗心脑血管类疾病的有效成分及其潜在靶点[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):208-212.
[9] Zhao S W,Li S. Network-based relating pharmacological andgenomic spaces for drug target identification[J]. PLoS One,2010,5(7):e11764.
[10] Ertenli I,Kiraz S,Calguneri M. SynoviaI fluid cytokine levels in Behcers disease[J]. Clin Exp Rheumatol, 2001,19(5):37-41.
[11] Ahramson S B,Attur M,Amin A R,et al. Nitric oxide and in-flammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2001, 3(6): 535-541.
[12] Im H J,Pacione C,Chubinskaya S,et al. Inhibitory effects of in su-Lin-like growthfactor-1 and osteogenic protein-1 on fibronect-infragment and interleukin-1 stimulated matrix metal Oproteinase-13 expression in human chondrocytes[J]. Biol Chem,2003,278(28): 25386-25394.
[13] 何耀华,翁习生,邱贵兴. 白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α 在膝关节原发性骨关节病发病中的作用[J]. 中华骨科杂志,1999,19(5):281-284.
[14] Felson D T, Nevitt M C. The effect of estrogen on osteoarthritis[J]. Curr Opin Rheumatol,1998,10(3): 269-272.
[15] Prasadam I,Friis T,Shi W,et al. Osteoarthritic cartilage chondrocytes alter subchondral bone osteoblast differentiation via MAPK signaling pathway involving ERK1/2[J]. Bone,2010,46(1):226-235.
[16] 凤良元,鄢顺琴,吴愫清,等. 芍药甘草汤镇痛作用及机理的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):23-25.
[17] 郑冬明,张娟,王锐,等. 芍药甘草汤有效组分对慢性坐骨神经结扎大鼠 IL-1β,IL-6,TNF-α 的影响[J]. 中华中医药学刊,2013,31(4):801-803.
[18] 宋军,赵军宁,王晓东,等. 芍甘多苷对 Cl_4 亚急性肝损伤大鼠肝脏白细胞介素和 TNF-α 含量影响的实验研究[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(1):23-24.
[19] Oeckinghaus A, Hayden M S, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways[J]. Nat Immunol, 2011,12(8):695-708.
[20] Pulai J I,Chen H,Im H J,et al. NF-kappa B mediatesthe stimulation of cytokine andchemokine expression by humanarticular chondrocytes in response to fibronectin fragments[J]. J Immunol,2005,174(9):5781-5788.
[21] Favata M F, Horiuchi K Y, Manos E J, et al. Identificationofanovel inhibitor of itogen-activated protein kinasekinase [J]. Bio Chem, 1998, 273 (29): 18623-18632.
[22] 朱爱江,方步武,吴成中,等. 芍药甘草汤的抗炎作用研究[J]. 天津医药,2009,37(2):120-123.
[23] 贾敏,张寒. 白芍总苷对体外培养的成骨细胞和破骨细胞的影响[J]. 西北药学杂志,2010,25(5): 357-359.
[24] 朱雪峰,谢鲲鹏,霍洪楠,等. 甘草提取物的抑菌作用及其对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(3):254-257.
[25] 朱蕾,魏伟. 白芍总苷对大鼠胶原性关节炎及其免疫功能的影响[J]. 中国药学杂志,2007,10(42): 1547-1551.

[责任编辑 周冰冰]