

· 网络药理学研究专栏 ·

编者按:中药具有多成分、多途径和多靶点协同作用等特点。因其成分复杂,系统庞大,使得中药的深入研究有一定困难。如何科学地阐释中医药的内涵,理解中药与病证的生物学基础,是中医药现代化面临的关键问题之一。网络药理学基于“疾病-基因-靶点-药物”相互作用网络,系统地观察药物对疾病网络的干预与影响,从而揭示药物协同作用于人体的奥秘。其整体性、系统性特点与中医学从整体观念和中药的多成分、多途径、多靶点协同作用的原理不谋而合。网络药理学是经典药理学、生物化学、结构生物学、基因组学、病理学、应用数学、计算机技术、生物信息学等多学科交叉的产物,是建立在高通量组学数据分析、虚拟计算及网络数据库检索基础上的生物信息网络构建及网络拓扑结构分析策略和技术。网络药理学的主要研究内容包括基于网络的疾病基因预测,药物-基因-疾病的共模块分析,中药成分的靶标谱和药理活性预测,中药方剂多成分协同作用的大规模筛选,以及中药方剂的配伍规律和网络调节机制分析等。综上,网络药理学将以“整体”为特点的中医药和以“系统”为朝向的现代医药研究有机地衔接,为从系统水平阐明中药靶标、研究中药作用机制、发现中药活性成分提供了重要手段和研究思路,其不仅对中医药现代化起到重要支撑作用,而且有望对整个医学和药物研究的发展做出原创性的重要贡献。

基于网络药理学的“金银花-连翘”药对作用机制分析

吴嘉瑞, 金燕萍, 王凯欢, 刘鑫馥, 张丹, 张冰*
(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**探讨“金银花-连翘”药对的功效物质基础和配伍机制。**方法:**从中药系统药理学分析平台(TCMSP)中寻找与金银花及连翘相关的所有化学成分,并寻找与其相关的潜在靶点,采用网络药理学的方法对金银花-连翘的功效物质和配伍机制进行研究。**结果:**通过口服利用度(OB),类药性(DL)条件筛选得出16个候选活性分子,相应靶点64个,相关疾病166种。其中度值较高的候选化合物分子分别是荷包牡丹碱(37),松脂素单甲基醚(30)等;度值较高的靶点蛋白为SLC6A3, DPP4, AR, NOS2, PTGS2等;度值较高的相关疾病依次是非特异性癌症、阿尔茨海默症、乳癌、痛经、心血管病、炎症等。**结论:**本研究结果初步验证了金银花-连翘药对的基本药理作用及其机制,并为进一步深入揭示其作用机制奠定了良好基础。

[关键词] 网络药理学; 金银花; 连翘; 配伍

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0179-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050179

Mechanism of Lonicerae Japonicae Flos -Weeping Forsythia Herbal Pair Based on Network Pharmacology

WU Jia-rui, JIN Yan-ping, WANG Kai-huan, LIU Xin-kui, ZHANG Dan, ZHANG Bing*
(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy and compatibility mechanism of Lonicerae Japonicae Flos-Weeping Forsythia herbal pairs. **Method:** All of chemical components related to the two traditional Chinese medicines were researched from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), in order to explore potential targets related to candidate compounds. The network

[收稿日期] 20160829(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473547);北京市中医药科技基金项目(JJ-2010-70);北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-14)

[第一作者] 吴嘉瑞,博士,教授,硕士生导师,从事临床中医学研究,Tel:010-84738662,E-mail:exogamy@163.com

[通讯作者] *张冰,博士,教授,博士生导师,从事临床中医学研究,Tel:010-84738606,E-mail:zhangbing@263.net

pharmacological method was adopted to analyze its efficacy and compatibility mechanism. **Result:** According to the oral bioavailability (OB) and drug likeness (DL) conditions, 16 candidate active molecules, 64 corresponding target and 166 kinds of related diseases were screened out. The value of the first three candidate compounds were bicuculline (37), turpentine monomethyl ether (30), and 5-hydroxy-7-methoxy-2-3,4,5-trimethoxyphenyl chromone (30). The five target proteins with the degree value equal to 13 were SLC6A3, DPP4, AR, NOS2, PTGS2. The related diseases with high degree value were non-specific cancer, Alzheimer's disease, breast cancer, pain, cardiovascular disease, inflammation in the order from high to low. **Conclusion:** The result of the study preliminarily verifies the basic pharmacological effects of *Lonicerae Japonicae Flos*-Weeping Forsythia herbal pair and its related mechanisms, and lays a solid foundation for further studies on the mechanism of action.

[**Key words**] network pharmacology; *Lonicerae Japonicae Flos*; Weeping Forsythia; compatibility

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾或带初开的花,功能清热解毒、疏散风热,用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等^[1]。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* 的干燥果实,可清热解毒、消肿散结、疏散风热,用于痈疽、瘰疬、乳痈、丹毒、风热感冒、温病初起、温热入营、高热烦渴、神昏发斑、热淋涩痛等^[2]。“金银花-连翘”是治疗温病最常用的药对之一,根据中医配伍理论,二者配伍属于七情配伍中的相须,即二者配伍可增强清热解毒、疏风散热之功效。清代温病大家吴鞠通擅用金银花、连翘,其所著《温病条辨》载方剂 204 首,其中金银花、连翘药对出现的方剂达 26 方^[3-5]。其中,以金银花、连翘药对为君药的经典名方银翘散家喻户晓,其可辛凉透表,清热解毒,临床既可治疗温病初起风热袭卫而证见发热、微恶风寒等证者,也可治疗温病初起但热不寒,或经治疗恶寒已解而里热不甚者^[6]。现代研究表明,银翘散对上下呼吸道感染、流行性腮腺炎、病毒性心肌炎、流行性出血热、病毒性角膜炎等疾病均有疗效,并且还具解热、抗炎、镇痛、抗过敏、调节免疫功能的作用^[7]。中医特色所在为整体观念及辨证论治,并基于辨证论治立法处方,涉及“君、臣、佐、使”及各药间协同关系,如何科学地阐释中医药的内涵,理解中药方剂与病证的生物学基础,成为中医药现代化的当务之急^[8-9]。中药是多组分、多靶点及其组分间协同作用的复杂体系,在防治复杂疾病方面具有其自身的特色和优势^[10-11]。因其成分复杂,系统庞大,使得中药的深入研究呈现巨大困难,而中药网络药理学则为复杂中药系统的研究提供了新的思路和视角^[12]。网络药理学基于“药物-靶点-疾病”相互作用网络,其研究策略的整体性、系统性特点与中医学从整体观念、辨证论治的角度去诊治疾病的理论,中药及其方剂的多成分、多途径、多靶点协同作

用的原理不谋而合^[11]。本研究采用网络药理学研究方法,对“金银花-连翘”主要功效物质以及配伍机制进行研究,以期揭示“金银花-连翘”配伍的科学实质与内涵提供参考。

1 材料与方法

1.1 化学成分构建 依托中药系统药理学分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)检索与金银花、连翘相关的所有化学成分,其中与金银花有关的化学成分有 236 个,与连翘相关的化学成分有 150 个,两者相同含有的成分 21 个,故而“金银花-连翘”中含有的所有相关化学成分共 365 个。

1.2 口服利用度(OB)和类药性(DL)预测 本研究选择了 $OB \geq 50\%$, $DL \geq 0.18$ 作为化合物分子的筛选条件,通过条件筛选,365 个化合物分子中有 16 个符合条件,并将其作为候选化合物。

1.3 网络构建与分析 通过 TCMSP 平台寻找与 16 个候选化合物相关的潜在靶点,将候选化合物与其潜在的靶点蛋白生成一个体现药物靶点相互作用的网络图。并根据得出的潜在靶点在 TCMSP 平台中找出相关的疾病,进而可生成靶点疾病相互作用网络图。药物-靶点和靶点-疾病网络的构建均使用 Cytoscape 3.2.1 软件。Cytoscape 3.2.1 是一款可以图形化显示网络并可进行分析和编辑的软件。它支持多种网络描述格式,也可以用 Microsoft Excel 等文件作为输入源,或者利用软件本身的编辑器模块直接构建网络。

2 结果

2.1 OB 与 DL 预测 本研究基于样本量、数据的复杂性以及综合文献的考虑,选择 $OB \geq 50\%$, $DL \geq 0.18$ 为 ADME 筛选条件,结果表明,16 个候选化合物有良好的口服利用度和类药性。“金银花-连翘”药对中含有的 16 个候选化合物基本信息见表 1。

2.2 分子-靶点相互作用网络分析 本研究中,笔

表 1 “金银花-连翘”中通过 OB 和 DL 预测的 16 个候选化合物信息

Table 1 Sixteen candidate compounds in ‘Flos Lonicerae Japonicae-Weeping Forsythia’ through OB and DL

分子编号	化合物名称	OB/%	DL	degree
0211	mairin	55.4	0.78	4
0791	bicuculline	69.7	0.88	37
3006	(-)-(3R,8S,9R,9aS,10aS)-9-ethenyl-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-2,3,9,9a,10,10a-hexahydro-5-oxo-5H,8H-pyrano[4,3-d]oxazolo[3,2-a]pyridine-3-carboxylic acid Qt	87.5	0.23	7
3014	secologanicdibutylacetal Qt	53.6	0.29	4
3095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	52.0	0.41	30
3108	caeruloside C	55.6	0.73	
3111	centaurosides Qt	55.8	0.50	10
3117	ioniceracetals B Qt	61.2	0.19	6
3283	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	66.5	0.39	27
3290	(3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	52.3	0.48	28
3295	(+)-pinoresinol monomethyl ether	53.1	0.57	30
3306	ACon1_001697	85.1	0.57	29
3308	(+)-pinoresinol monomethyl ether-4-D-beta-glucoside Qt	61.2	0.57	28
3322	forsythinol	81.2	0.57	24
3330	(-)-phillygenin	95.0	0.57	29
3370	onjixanthone I	79.2	0.30	22

者将经过 OB 和 DL 筛选的 16 个候选化合物及其潜在的靶标相连来构建分子-靶点相互作用网络(图 1)。分子-靶点相互作用网络包含 73 个节点(15 个化合物和 58 个潜在靶标)和 315 条边,另化合物 3108(caeruloside C)因在数据处理过程中发现,其在该数据库中还未有相关的靶点,故而在构建的分子-靶点网络中,只显示相关的 15 个化合物。在网络中,粉色节点代表分子,蓝色节点代表靶点,一个节点的度(degree)表示网络中和节点相连的路线的条数。如每一个粉点的度即表示候选化合物分子所拥有的靶点数目;而每一个蓝点的度则代表着相应靶点所有相关的候选化合物分子的数目。从图 1 可以看出,分子 0791(荷包牡丹碱)有最多的潜在靶标(37 个),其次是 3295(松脂素单甲基醚),3095(5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone)有 30 个潜在靶标。这些数据表示,这些度值高的药物分子有可能在“金银花-连翘”药对的药理功能中发挥着较为重要的作用。另外,在网络中,靶点钠依赖性多巴胺转运体(SLC6A3),丝氨酸蛋白酶(DPP4),雄激素受体(AR),诱导型一氧化氮合酶(NOS2),前列腺素 G/H 合酶 2(PTGS2)有着最多的相互作用配体,为 13 个。在 58 个潜在靶标中,有 39 个靶点至少与两个化合物分子连接,有 19

个靶点蛋白只与 1 个候选化合物分子相关。而且根据表 1 中候选化合物分子的 degree 值可以发现,网络中每个候选化合物都至少与 4 个蛋白质靶点连接,如此也说明“金银花-连翘”中含有的候选化合物分子可能作用于整个生物网络系统,而不单一作用于某一个靶点蛋白,从而也进一步说明了中草药作用的整体性与复杂性。在表 1 中,16 个化合物,包含了萜类、木脂素类、有机酸类等,但以环烯醚萜类化合物(如 caeruloside C, secologanicdibutylacetal)为主。OB 值最高的为(-)-phillygenin 即连翘脂素(95%),其为木脂素类成分,在降血脂、抗氧化、抗病毒等方面有一定的药理活性^[13]。DL 最高的 bicuculline 即荷包牡丹碱(0.88),其在镇痛、镇静、催眠方面有较强的药理活性,可用于牙疼、头痛、腰痛、小手术后疼痛以及神经衰弱等,也有实验研究表明其对癌症也存在一定的药理活性^[14-15]。

2.3 靶点-疾病相互作用网络分析 药物靶点被视为药物在机体内的作用结合位点,包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子等。选择确定并且新颖的有效药物靶点在新药研发中具有重要意义,也是研究药物分子与疾病之间作用关系的关键所在。图 2 为潜在靶点与相关疾病相连构建而成的靶点-疾病相互作用网络,该网络中包含 215 个节点

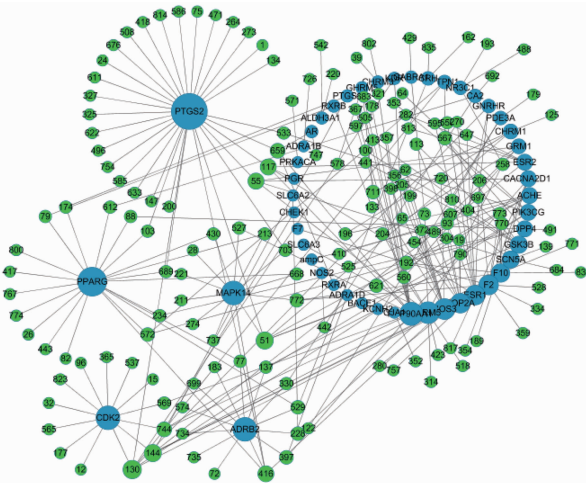


图 1 “金银花-连翘”候选化合物与靶标相互作用网络
Fig.1 Interaction network diagram for ‘Lonicerae Japonicae Flos-Weeping Forsythia’ candidate compounds and targets

(49 个靶标和 166 种相关疾病)和 247 条边。蓝色节点代表靶点,绿色节点代表疾病。在候选化合物-靶点网络中发现其所涉及的靶点数目有 58 个,而在靶标-疾病网络中只显示 49 个相应靶点蛋白,由此可知,有 9 个靶点在网络中没有相对应的疾病。从图 2 中可以看出 1 个靶蛋白可以与许多疾病相关,如过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPARG), PTGS2 (前列腺素 G/H 合酶 2) 等,也有一个靶点与一种疾病相关的,如 442 (缺血再灌注损伤)与 β -肾上腺素能受体 (ADRB1) [16]。网络中涉及的 166 种疾病主要以炎症、恶性肿瘤、神经系统以及心脑血管疾病为主。

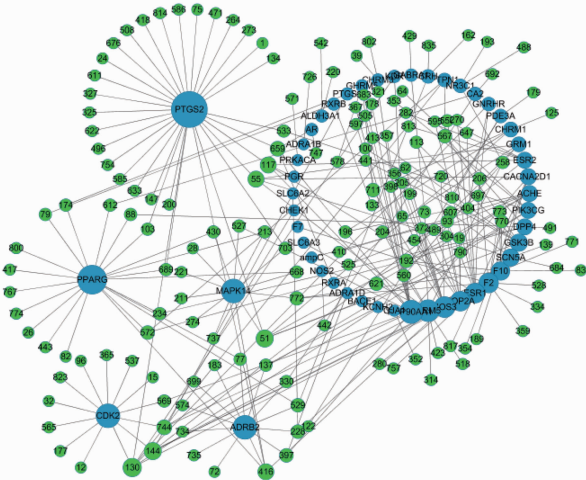


图 2 “金银花-连翘”靶标与疾病相互作用网络
Fig.2 Interaction network diagram for ‘Lonicerae Japonicae Flos-Weeping Forsythia’ targets and diseases

在网络中可发现 degree 值最大的靶点为 PTGS2,与 32 种疾病都相关,如炎症、恶性肿瘤、心

血管疾病等,这也与其现代药理实验的结论相吻合 [17-19]。又如丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14),是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,与细胞凋亡、增殖、肿瘤发生以及氧化应激性肠上皮细胞损伤等有密切关系,其 degree 为 13,涉及的疾病包括阿尔茨海默症、炎症、血栓症、胰岛素抵抗、银屑病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、细胞因子介导的疾病、内毒素血症、皮肤病、成人呼吸窘迫综合征 [20]。在此基础上,本研究通过对这 166 种疾病的 degree 值进行计算,取其平均值 (2.30),将度值大于平均值的疾病与靶点重新构建靶点-疾病网络图,即图 3。其中符合条件的疾病共有 17 种,相关靶点 36 个。

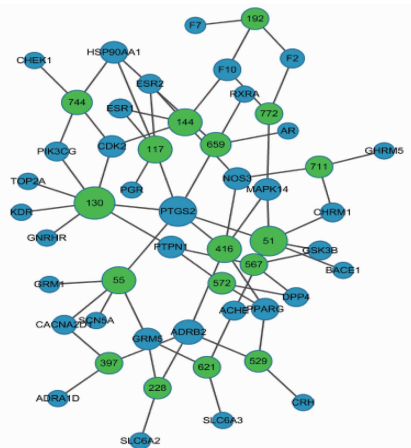


图 3 “金银花-连翘”疾病 degree ≥ 3 条件下的靶标-疾病相互作用网络
Fig.3 Interaction network diagram for ‘Lonicerae Japonicae Flos-Weeping Forsythia’ targets and diseases under the condition of degree ≥ 3

3 讨论

网络药理学是利用大数据分析来进行药物研究的新模式,主要从复杂生物网络角度,对疾病机制和药物作用机制开展系统性研究,而将传统的中医药内容与新兴的网络药理学相结合是一个值得探索的方向。建立中医药学方面的网络药理学方法为将传统中医药从基于经验的研究方法,转化成了基于证据的研究体系,可以大大提高中医药的发展速度,提升现有的研究策略 [21-23]。而“金银花-连翘”为中医临床药对,金银花甘寒,清热解毒,偏于上半身之热;而连翘苦微寒,清热解毒,散结消肿,便于透达全身之热。二者常相须为用既有清凉透泻、清热解毒的作用,又有芳香避秽的功效,在透解卫气分邪毒的同时,兼顾了温热病邪多挟秽浊之气的特点。本次研究,采用网络药理学的方法对该药对的作用机制进

行分析,以便临床更加有效地应用。

研究结果显示,金银花中含有236个化合物,连翘中有150个化合物。通过OB,DL条件筛选得出16个候选活性分子,相应靶点有64个,相关疾病有166种,取度值大于平均值的重新构建网络图,得出相关的疾病17种,涉及分子15个,相关靶点蛋白36个。由此可知中药治疗疾病的广泛性,在一定程度上也说明了中医“同病异治,异病同治”的治病理念是有其物质基础存在的。其二从所涉及疾病来看,主要是恶性肿瘤、炎症性疾病等,也说明了其与“金银花-连翘”相须可清热解毒,疏风散热,消痈散结的功效作用是相符合的。其三,在构建的分子-靶点网络和靶点-疾病网络中,度值小于平均值的靶点蛋白或者疾病是广泛存在的,如此也就说明“金银花-连翘”的临床应用还有许多有待发现和研究的內容。

诚然,网络药理学以数据研究作为基础,反映了大数据时代生物医药系统性研究的趋势,也存在一定的片面与局限性,若要得出的结论应用于临床,还需要更多的药理实验研究^[11]。如就“金银花-连翘”的配伍而言,在本研究中不曾考虑药物混合煎煮过程中可能发生的化学反应会否对药物成分造成影响,也不曾考虑药物配伍中剂量的选择以及给药途径的选择等,只在数据处理的基础上进行简单的加成,故而所得出的结果只能为后期的实验研究方向提供思路与参考。

[参考文献]

[1] 杨欣,李洪波,陈诚,等. 金银花药性与功效的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 220-222.

[2] 秦宇,张文丽,林媛媛,等. 连翘化学成分与抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 149-152.

[3] 刘泉,刘涛. 吴鞠通配伍应用金银花、连翘的经验[J]. 中医药导报, 2016, 22(3): 24-25, 30.

[4] 李莉,王冰,陶小军,等. 多指标综合评分法考察金银花连翘药对最佳提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 21-23.

[5] 王小青. 银花连翘水凝胶制剂的应用研究[D]. 西安:西北大学, 2011.

[6] 张晏豪. 银翘散加减治疗皮肤病的文献研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2009.

[7] 陈俏妍. 银翘散治疗急性病毒性咽炎的临床和基

础研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2013.

[8] 蔡甜甜,潘华峰,王奇,等. 中药复方在病证基础上的网络药理学研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4746-4748.

[9] 张博,李慧颖,李梢. 网络药理学:中医药与转化医学研究新途径[J]. 转化医学研究:电子版, 2013, 3(3): 1-11.

[10] 张文娟,王永华. 系统药理学原理、方法及在中医药中的应用[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 280-286.

[11] 张彦琼,李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.

[12] 王永华,杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系[J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 801-808.

[13] 张晓旭. 连翘脂素在肝微粒体中代谢及对大鼠肝CYP3A酶体外抑制作用的研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2015.

[14] 汪诗卉,陈剑群,董秋菊,等. 荷包牡丹碱对人胃癌SGC-7901细胞生长的作用及机制初探[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(11): 4898-4901.

[15] 肖顺汉,钱永龄,叶宗勤. L-荷包牡丹碱药理作用初步研究[J]. 四川生理科学杂志, 1988(4): 50-51.

[16] 尧林,杨双强. β -肾上腺素能受体信号转导系统与心脏缺血再灌注损伤[J]. 心血管病学进展, 2008, 29(4): 602-605.

[17] 郭琳,李珏宏,李昌平,等. STAT3、PPAR- γ 在小鼠溃疡性结肠炎的作用及姜黄素的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 14(1): 28-36.

[18] 吴晨方. PPAR- α / γ 激动剂对代谢综合征心室重构的保护机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2014.

[19] 张雪松. 红景天苷对糖尿病大鼠肾脏Nrf2、 γ -GCS、PPAR- γ 表达的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.

[20] 段永强,程卫东,杜娟,等. 益气健脾中药对脾气虚大鼠神经肽Y、血管活性肠肽和丝裂原活化蛋白激酶14基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(4): 59-62, 66.

[21] 李梢. 网络药理学在中医药研究中的应用[C]//中国药理学学会生化与分子药理学专业委员会. 中国药理学学会生化与分子药理学专业委员会网络药理学研讨会论文摘要. 北京, 2012: 17-18.

[22] SHAO L I. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. Chi J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120.

[23] 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.

[责任编辑 邹晓翠]