

六味地黄汤中药成分-靶标-疾病网络分析及效应机制预测

李晓燕¹, 董姝¹, 魏滨¹, 陈启龙¹, 蔡菲菲¹, 王文海^{2*}, 苏式兵^{1*}

(1. 上海中医药大学 中医复杂系统研究中心, 上海 201203; 2. 上海市第七人民医院, 上海 200137)

[摘要] **目的:**运用网络药理学技术预测六味地黄汤的化学成分、药物靶标以及可能治疗的疾病,探讨其配伍及对多种疾病“异病同治”的分子机制。**方法:**采用 TCMSP 数据库的口服生物利用度(OB)和类药性指数(DL),筛选六味地黄汤的活性成分和相关疾病,从 Drugbank 数据库获得药物靶标,用 Cytoscape 软件构建中药成分-靶标-疾病网络,并进行网络拓扑分析及靶标功能和信号通路分析。**结果:**在六味地黄汤 507 种化合物中符合 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 有 42 种,其相关靶标有 221 个,并富集出九大类 56 种疾病,以肿瘤、心血管系统疾病以及呼吸系统疾病的网络相关度最大。六味地黄汤、三补和三泻的配伍都能调节细胞凋亡、代谢、增殖、以及血管平滑肌收缩;六味地黄汤还有调控蛋白的合成修饰和分泌作用;三补能够调控离子跨膜转运、血压以及前列腺素、视黄酸的代谢等;三泻则侧重于对细胞的信号传导以及细胞的生物合成作用的影响。**结论:**本研究筛选出六味地黄汤活性成分 42 种,预测靶标 221 个及疾病 56 个,其三补三泻的配伍使药物作用产生了 $1 + 1 > 2$ 的效应机制。六味地黄汤对多种疾病“异病同治”具有多靶标、多功能以及多通路的调节机制。

[关键词] 六味地黄汤; 网络药理学; 中药成分-靶标-疾病网络; 分子机制; 配伍

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0189-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050189

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1506.032.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:06

Chinese Herbal Medicine Compound-Target-Disease Network Analysis and Effective Mechanisms Prediction of Liuwei Dihuangtang

LI Xiao-yan¹, DONG Shu¹, WEI Bin¹, CHEN Qi-long¹, CAI Fei-fei¹, WANG Wen-hai^{2*}, SU Shi-bing^{1*}

(1. *Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Complexity System, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China*

2. *Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China*)

[Abstract] **Objective:** To predict the active compounds, therapy targets of Liuwei Dihuangtang (LWDHT) as well as possible diseases, and explore the molecular mechanism of its compatibility and its efficacy on diseases under the guidance of ‘treating different diseases with the same method’. **Method:** Oral bioavailability (OB) and drug-likeness (DL) based on TCMSP database were used to screen the active compounds of LWDHT and its related diseases. Therapy targets were obtained from the Drugbank database, and then the Chinese herbal medicine (CHM) compound-targets-disease network was constructed by using cytoscape software. The network topology analysis, target function and signaling pathway analysis were also performed. **Result:** The 42 of 507 compounds in LWDHT were screened out ($OB \geq 30\%$, drug-likeness index ≥ 0.18). The 221 related targets

[收稿日期] 20160308(005)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81330084);上海市教委 E-研究院中医内科建设计划资助项目(E03008);上海市中医临床重点学科建设项目(ZYXK202010);浦东新区卫生系统重点学科群建设项目(PWZxq2014-12)

[第一作者] 李晓燕, 硕士, 从事中医药系统生物学研究, E-mail: lixiaoyanemail@126.com

[通讯作者] * 苏式兵, 博士, 研究员, 从事中医药系统生物学和中药网络药理学研究, Tel:021-51323013, E-mail: shibingsu07@163.com;

* 王文海, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医肿瘤学研究, Tel:021-58671063, E-mail: wang180sg@163.com

were found and 9 categories of diseases involving 56 diseases were enriched, among which tumor, cardiovascular and respiratory diseases were most closely correlated with the formula. The compatibility of LWDHT, ‘Sanbu’ with reinforcing effect and ‘Sanxie’ with reducing effect can regulate cellular apoptosis, metabolism, proliferation, and vascular smooth muscle contraction. Besides, LWDHT also can regulate protein synthesis modification and secretion. The ‘Sanbu’ with reinforcing effect can regulate transmembrane transport activity of ion, blood pressure, the metabolic process of prostaglandin and retinoic acid. The ‘Sanxie’ with reducing effect can regulate cell signaling and biosynthetic process. **Conclusion:** In this study, 42 compounds were screened out as the potential effective compounds of LWDHT, and 221 targets and 56 diseases were predicted to be associated with the formula. The compatibility of ‘Sanbu’ and ‘Sanxie’ made $1 + 1 > 2$ synergistic effect mechanism. LWDHT owned multiple targets and multiple pathways to treat various diseases under the guidance of ‘treating different diseases with the same method’.

[**Key words**] Liuwei Dihuangtang; network pharmacology; Chinese herbal medicine compound-target-disease network; molecular mechanism; compatibility

六味地黄丸(汤)出自宋代名医钱乙《小儿药证直诀》,是治疗肝肾阴虚证的经典方,由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 6 味药组成^[1]。经过历代医家数百年的运用验证,六味地黄汤(LWDHT)临床疗效确切。方中以熟地黄、山茱萸和山药为三补;泽泻、牡丹皮和茯苓为三泻,配伍组方严谨合理,为通补开阖之剂,被誉为“补阴方药之祖”。近年,六味地黄汤的研究主要侧重于对其加减拆方^[2]、血清药物化学^[3]以及药效组分指纹图谱^[4]等。由于中药复方是一个复杂体系,存在着成分复杂、靶点和机制不清等问题,研究六味地黄汤治疗疾病的机制,要从多成分、多靶点协同作用的角度进行研究,而生物信息学和网络药理学分析技术^[5]的发展,为研究六味地黄汤的多成分、多靶点的效应机制提供了工具。

网络药理学是建立在疾病-基因-药物的多层次网络基础上,用于从整体上预测药物靶点、提高药物发现效率的新兴学科。网络药理学技术以其善于处理海量非线性复杂数据的特点在研究病-证-方对应关系中有其独特优势,可以揭示疾病、证候、方药之间的内在联系及网络调控机制^[6],从而更深入的把握辨证论治的精髓。LI 等^[7]运用网络药理学方法构建大柴胡汤和小柴胡汤“中药成分-靶标-疾病”网络,以验证中药加减理论的内在机制。结果表明,基础方对疾病治疗产生主要效应,而加味药则作用于相同靶点产生协同作用或作用于其他靶点产生补充效应,这与中医加减理论相合。笔者也采用网络网络药理学方法,探讨了黄芪汤抑制肝纤维化的疗效机制^[8]。本研究旨在运用生物信息和网络药理学分析技术,构建“中药成分-靶标-疾病”网络,预测

分析六味地黄汤的活性成分、作用靶标、效应机制以及可能治疗的疾病,以期对阐明六味地黄汤“异病同治”的分子调节机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 网站数据库和分析软件 笔者从西北农林科技大学中医系统药理学数据库(TCMSP 数据库TM, <http://tcmsp.nw.com>)和 TCM Database@Taiwan. 数据库(<http://tcm.cmu.edu.tw>)中查得六味地黄汤中的中药化学成分、其成分的作用靶标以及靶标对应的疾病。Drugbank(<http://www.drugbank.ca>)用于查找化合物作用的靶标。六味地黄汤化合物的活性成分主要以口服生物利用度(OB)和类药性指数(DL)来筛选。然后运用 Cytoscape 3.2(<http://cytoscapeweb.org>)软件来构建六味地黄汤“中药成分-靶标”以及“中药成分-靶标-疾病”网络,并使用 Network Analyzer 插件来分析其网络拓扑参数。运用 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov>)对网络预测出的靶点所涉及的基因功能(GO)和相关通路(Pathway)进行富集分析。

1.2 口服生物利用度预测 口服生物利用度是指药物经口服给药后药物被机体吸收进入全身血液循环的相对量和速率,它是药物特性(即吸收、分布、代谢、排泄,ADME)中最重要的药代动力学参数之一。口服生物利用度通常是决定生物活性分子(即有药效作用的分子)类药性的关键指标。西北农林科技大学王永华教授实验室建立了一个计算机模型 OBioavail 1.1^[9],在该模型中,采用多元线性回归方法(MLR),偏最小二乘法(PLS)以及支持向量机方法(SVM)来进行模型构建,计算化合物的 OB。在该项研究中,笔者把 $OB \geq 30\%$ 作为筛选指标。

1.3 类药性评估 类药性指数是指化合物与 Drugbank 数据库里所有已知药物之间的相似性。在靶标预测之前,笔者利用类药性指数将那些从化学角度就不适合做药物的化合物剔除,剩下类药化合物。在本研究中,药物的 DL 是通过 Tanimoto 系数计算得到的,其中 *A* 代表新化合物,*B* 代表数据库 Drugbank (<http://www.drugbank.ca/>) 中基于 Dragon 软件利用支持向量机方法计算得到描述符的所有 6 511 个化合物分子的平均类药性指数^[10]。DL ≥ 0.18 (整个相似度的平均值) 则认为该化合物与 Drugbank 数据库里药物具有一定的相似性,根据这一方法,笔者就可以得到所有具有类药性的化合物,进行下一步更深入的研究。

1.4 药物靶标识别 药物分子通过与特定的蛋白或核酸靶标相结合,调节其生物活性,从而发挥其治疗作用。因此要研究中药方剂的作用机制,必须先识别中药有效活性成分所影响的分子。结合笔者选取的靶标数据库,进行人工筛选、随机森林、支持向量机等方法,整合并建立药物-靶标实验数据库。

1.5 网络的构建及分析 中药成分-靶标-疾病网络的构建可以协助识别每个化合物潜在药物靶点,从宏观上理解药物治疗疾病的机制,并发现中药复

方新作用。本实验研究中网络构建使用 Cytoscape 3.2 软件。Cytoscape 是一个网络可视化和分析的开放性免费软件,它根据基本的数据结合成可视化网络,进行网络参数分析和生物功能注释。笔者使用插件 Network Analyzer 分析了网络节点的 2 个重要拓扑参数:度 (Degree) 和中间性 (Betweenness)。根据 Network Analyzer 插件说明书,度即与该点联系的边的个数,中间性的计算用公式,其中 *n* 是网络中的 1 个节点,*s* 和 *t* 则是与非 *n* 的其他 2 点,是从 *s* 到 *t* 最短路径的数量,是 *n* 所在的 *s* 到 *t* 的最短路径的数量。

2 结果

2.1 六味地黄汤化学成分筛选 笔者从 TCMSP 数据库收集了六味地黄汤六味中药的 507 种已知化合物,包括熟地黄含 75 种,山茱萸 226 种,山药 71 种,泽泻 46 种,牡丹皮 55 种,茯苓 34 种。在这 507 种化合物中符合 OB ≥ 30%, DL ≥ 0.18 的化合物共 67 种,其中在 TCMSP 数据库中没有靶标的化合物有 15 种,最后筛选出的可能的活性成分有 42 种 (表 1)。其中,熟地黄 2 种包括豆甾醇 (stigmasterol, 山茱萸及山药中也含有此化合物) 和谷甾醇 (sitosterol, 山茱萸、牡丹皮、泽泻中也含此化合物),牡丹皮 6 种,茯苓 6 种,山药 12 种,山茱萸 14 种,泽泻 7 种。

表 1 六味地黄汤的 42 种化学成分、口服生物利用度 (OB) 和类药性指数 (DL)

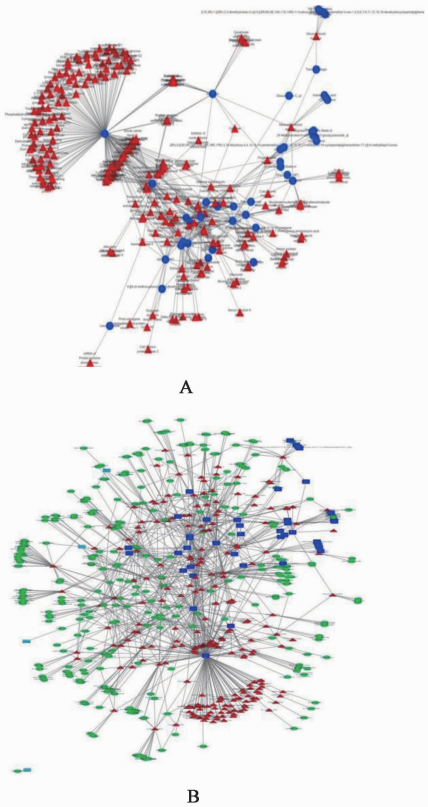
Table 1 42 compounds of Liuwei Dihuangtang (LWDHT), its oral bioavailability (OB) and drug-likeness (DL)

| 来源 | 成分 [OB/% , DL] |
|-----|--|
| 熟地黄 | 豆甾醇 [43.83, 0.76], 谷甾醇 [36.91, 0.75] |
| 山药 | 花旗松素 [60.51, 0.27], 麦角甾醇葡萄糖苷 [37.58, 0.71], AIDS180907 [45.33, 0.77], 菜油甾醇 [37.58, 0.71], CLR [37.87, 0.68], 薯蓣皂苷元 C [36.38, 0.87], 薯蓣皂苷元 [80.88, 0.81], 山萘酮 C [59.05, 0.39], 异岩藻甾醇 [43.78, 0.76], 海风藤酮 [54.72, 0.38], 萆薢宁 [30.71, 0.18], 豆甾醇 [43.83, 0.76] |
| 山茱萸 | 2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene [33.4, 0.24], β-谷甾醇 [36.91, 0.75], 腺齿紫金牛甾 [39.66, 0.33], 邻苯二甲酸二异辛酯 [43.59, 0.39], 亚麻酸乙酯 [46.1, 0.2], 油酸乙酯 [32.4, 0.19], 羟基芫花素 [36.47, 0.27], 日本樟牙菜素 [32.12, 0.78], 亚油酸乙酯 [42, 0.19], β-谷固醇 [36.91, 0.75], 远华蟾蜍精 [69.99, 0.79], 四氢鸭脚木碱 [32.42, 0.81], 豆甾醇 [43.83, 0.76], 谷甾醇 [36.91, 0.75] |
| 泽泻 | 谷甾醇 [36.91, 0.75], 23-乙酰泽泻醇 B [35.58, 0.81], 甲基泽泻醇 B 醋酸酯 [32.43, 0.77], 单亚油酸甘油酯 [37.18, 0.3], 泽泻醇 B [36.76, 0.82], 泽泻醇 B 醋酸酯 [35.58, 0.81], 泽泻醇 C 醋酸酯 [33.06, 0.83] |
| 牡丹皮 | 儿茶酸 [54.83, 0.24], 5-{[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene}barbiuric acid [43.44, 0.3], 山萘酚 [41.88, 0.24], 丁香香酚 [55.38, 0.78], 槲皮素 [46.43, 0.28], 谷甾醇 [36.91, 0.75] |
| 茯苓 | (2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid [30.93, 0.81], 啤酒甾醇 [37.96, 0.77], 麦角固醇二亚乙基三胺 [43.51, 0.72], 氧化麦角甾醇 [40.36, 0.81], 麦角甾醇过氧化物 [36.91, 0.75], 氢化松萘酸 [38.71, 0.8] |

2.2 药物-靶标网络构建分析 在 Drugbank 数据库中查找筛选出的 42 种化合物的靶标,共得到 221 个靶标。将得到的化合物-靶标数据导入 cytoscape 软件构建化合物靶标网络图 (图 1A)。网络图更直观反应了这些化合物与靶标相互作用。分析网络

拓扑结构发现,网络共有 263 个节点和 512 个边,其中 42 个节点为化合物,221 个节点为药物靶点,图中 42 个化合物的节点平均度为 12.19 (512/42),大于化合物平均节点度的化合物有 11 个,221 个靶点的节点平均度为 2.32,大于靶点节点平均度的靶点

有 50 个。其中靶点最多的化合物是槲皮素 (quercetin), 有 154 个靶点。221 个靶点蛋白中神经受体共活化因子 2 受更多的化合物调控, 20 个化合物作用于此蛋白。表 2 列举了部分靶点和化合物的网络拓扑参数。



A. “中药成分-靶标”网络, 蓝色圆点代表药物化合物, 红色三角代表靶点(蛋白); B. “中药成分-靶标-疾病”网络, 蓝色正方形代表药物成分, 红色三角代表靶标, 绿色圆圈代表疾病

图 1 六味地黄汤“中药成分-靶标”和“中药成分-靶标-疾病”网络
Fig. 1 Chinese herbal medicine (CHM) compounds-targets network and CHM compounds-targets-disease network of LWDHT

2.3 基于药物作用靶标的疾病预测 为了阐明六味地黄汤多成分治疗系统的药物靶标及在不同的疾病施加多效性的影响, 探讨中药成分、靶标以及疾病之间的相互关系, 笔者首先运用在 TCMSPP 数据库中查找出中药成分-靶标网络, 筛选出的靶标相关疾病。然后, 使用 Cytoscape 软件, 在六味地黄汤药物-靶标网络基础上, 构建了一个中药成分-靶标-疾病网络(图 1B), 并用 Cytoscape 软件分析计算出该网络的网络拓扑参数(表 2)。

进一步, 为了揭示六味地黄汤治疗肝肾阴虚证适应的疾病, 笔者对筛选出来的靶标进行富集分析, 疾病富集分析结果如表 2 所示。六味地黄汤药物-靶标-病证网络富集分析预测出 117 种疾病, 其中显著相关的疾病(大于节点平均度)有 56 种, 共九大

表 2 筛选靶标富集的疾病

Table 2 Diseases enriched by targets screened out from LWDHT

| 疾病 | 中心性 | 度 | 参考文献 |
|---------|-----------------------|-----|---------|
| 肿瘤 | 0.090 809 | 165 | [11] |
| 神经精神疾病 | 0.114 886 | 80 | [12] |
| 心血管疾病 | 0.055 232 | 68 | [13-14] |
| 肌肉骨骼疾病 | 0.013 708 | 22 | [15] |
| 呼吸系统疾病 | 0.0116 72 | 21 | [16] |
| 营养与代谢疾病 | 0.005 244 | 20 | [17-19] |
| 疼痛 | 0.004 473 | 20 | [20] |
| 免疫系统疾病 | 0.005 565 | 13 | [21] |
| 药物依赖 | 6.85×10^{-4} | 7 | - |
| 泌尿系统疾病 | 0 | 2 | [22-24] |

类, 包括肿瘤、神经系统疾病、心血管系统疾病、肌肉骨骼疾病、呼吸系统疾病、泌尿系统疾病、营养与代谢疾病、疼痛、免疫系统疾病。其中, 肿瘤包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、淋巴瘤以及肝癌等; 神经系统疾病包括阿尔兹海默症、癫痫、抑郁症、精神分裂症、认知障碍等; 心血管系统疾病包括动脉栓塞、高血压、冠心病、心肌梗死、心律失常等; 肌肉骨骼疾病包括骨关节炎、类风湿性关节炎等; 呼吸系统疾病包括慢阻肺、肺炎、哮喘、肺纤维化等; 营养与代谢疾病包括糖尿病、肥胖等; 免疫系统疾病包括变应性疾病、自体免疫疾病等。以肿瘤、心血管系统疾病以及呼吸系统疾病等的网络相关度最大。同时预测结果也表明六味地黄汤对酒精及药物成瘾的戒断有较高的影响。笔者的预测提示六味地黄汤至少能够治疗 56 种具有肝肾阴虚证的疾病。另外泌尿系统疾病在预测中显著性很低, 但临床研究表明六味地黄汤对泌尿系统疾病包括肾小球肾炎、前列腺炎、肾衰等的肝肾阴虚证^[10]有显著疗效。

目前, 在上述预测的九大类疾病中, 六味地黄汤对肝癌^[11]、帕金森氏综合征^[12]、血栓^[13]、高血压^[14]、骨质疏松症^[15]、哮喘^[16]、肥胖^[17]、糖尿病^[18-19]、跟骨骨刺疼痛^[20]以及自身免疫性脑脊髓炎^[21]; 肾小球肾炎^[22]、前列腺炎^[23]、肾衰^[24]等已有研究报道(表 2)。而且, 笔者的预测还提示六味地黄汤可以用于药物依赖和戒毒辅助治疗。

2.4 基于药物作用靶标的六味地黄汤效应机制预测 六味地黄汤配伍组方具有“三补”、“三泻”的配伍特点, 方中熟地黄用量是山萸肉、山药两药之和, 且三补用量明显重于三泻, 故本方以补为主, 肝脾肾并补, 补肾阴为着, 用三泻, 意不在利水渗湿, 而

是泄肾浊, 渗脾湿, 泻相火, 应肾藏精主水, 动静之机。为了分析六味地黄汤配伍的分子机制, 对六味地黄汤的三补成分及三泻成分进行筛选分析, 并查找其对应靶标, 对预测出的靶标进行富集分析, 并

与六味地黄汤进行对比(表 3)。结果显示, 六味地黄汤富集出 1 017 个 GO, 三补成分 124 个 GO, 三泻成分 412 个 GO。六味地黄汤靶标相关通路有 55 个, 三补成分有 8 个, 三泻成分有 18 个。

表 3 六味地黄汤及三补三泻配伍的化学成分、分子靶标及其效应的预测

Table 3 Prediction of compounds, molecular targets and effect of LWDHT

| 方剂和配伍 | 中药 | 化学成分(总数/可利用数/大于节点平均数) | 靶标(总数/大于平均数) | GO(富集数) | 信号通路(富集数) |
|--------|----------------------|-----------------------|--------------|---------|-----------|
| 六味地黄 | 熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 | 475/42/11 | 221/50 | 1 017 | 55 |
| 君臣(三补) | 熟地黄、山茱萸、山药 | 373/37/19 | 93/29 | 124 | 8 |
| 佐使(三泻) | 泽泻、牡丹皮、茯苓 | 135/17/13 | 186/62 | 412 | 18 |

进一步, 笔者对六味地黄汤、三补和三泻的成分预测出的 GO 和 Pathway 进行比较, 发现它们有共同的 GO 和 Pathway。GO 注释分析结果显示, 六味地黄汤、三补和三泻都能促进细胞正细胞凋亡、应激反应、细胞代谢过程、细胞增殖、转录、血管平滑肌收缩, 并且抑制离子转运; 六味地黄汤还有抑制细胞程序性死亡和应激反应, 调控蛋白的合成修饰和分泌作用; 三补能够调控离子跨膜转运、血压以及前列腺素、视黄酸的代谢等; 三泻则侧重于对细胞的信号传导以及细胞的生物合成作用的影响。Pathway 分析结果显示, 三者都富集在钙离子信号通路、神经配受体作用、小细胞肺癌、肿瘤通路; 六味地黄汤主要与细胞增殖分化及炎症相关信号通路相关; 三补能够作用于癌症通路、血管平滑肌收缩通路等; 三泻则侧重于咖啡因代谢、甾类激素生物合成相关通路。六味地黄汤可以通过对多功能多通路发挥作用, 这可能是其治疗复杂疾病的主要原因。

3 讨论

由于中药成分复杂, 能作用于多靶点, 干预多条通路, 从整体上对复杂疾病进行辨证论治, 这可能就是中医异病同治的分子机制^[4]。基于网络药理学构建的组分结构中药成分-靶点-疾病网络模型, 可以对多成分的作用靶点和调节途径进行整体的预测^[25-26], 从而对中医异病同治分子机制进行阐述。

在这项研究中笔者采用了网络预测和生物信息数据库信息富集分析结合的方法研究六味地黄汤活性成分效应机制及配伍规律。笔者通过口服生物利用度筛选及类药性评估筛选出的可能的活性成分有 42 种, 通过 Drugbank 等数据库查找出靶标 221 个, 富集疾病 56 个。其中槲皮素作用靶标最多, 与转录因子、前列腺素受体及凝血因子作用, 与凝血过程、转录过程等相关^[27]。而核受体共激活剂 2、前列腺素合成

酶 2(COX-2) 等靶标受最多化合物调节, COX-2 参与炎症反应, 促进肿瘤生长和转移, 可以作为预防和治疗肿瘤的靶标^[28]。

现代研究表明, 六味地黄汤对神经系统、内分泌系统、免疫系统、血液系统及肿瘤均体现出一定的药理学作用^[11-14, 18-19, 21]。笔者在对靶标富集分析后发现这些靶标与肿瘤、心血管系统疾病以及呼吸系统疾病等相关性最大。在肿瘤疾病中, 乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌等节点度最高, 尽管肠癌相关靶标较少, 但是近年来一些临床实验及动物研究表明, 利用补肾法抑制肿瘤特别是肠癌及治疗肿瘤术后及化疗后肝肾阴虚型患者有显著疗效^[29]。而且, 近年来多利用补肾法抑制肿瘤、治疗肿瘤术后及化疗后肝肾阴虚型患者有显著疗效^[30], 这些都与网络预测结果相符。

中医认为肾精滋养髓海, 肾精亏虚则脑髓失养神智失常, 肺肾金水相生, 一为气之主, 一为气之根, 故六味地黄汤既可以用于肝肾不足的神经精神疾病, 亦可用于治疗呼吸系统特别是哮喘后期肝肾亏虚证, 网络预测结果亦验证了这一观点。此外, 对靶标相关功能注释显示六味地黄汤有抑制细胞程序性死亡和应激反应, 调控蛋白的合成修饰和分泌等, 这些效应可能与治疗糖尿病以及神经退行性疾病如阿兹海默症等有关。通过文献^[10-23]研究, 笔者发现虽然历代医家对六味地黄汤方证的认识不尽一致, 但究其主要学术观点, 六味地黄汤所适用的主要病证仍然是肾阴亏虚, 结合临床研究或动物实验研究证明六味地黄汤是临床治疗或辅助治疗多种疾病肝肾阴虚证“异病同治”的有效手段。

六味地黄汤的治疗复杂疾病的作用主要通过参与多种炎症反应过程及对多种靶点作用。六味地黄汤配伍有补泻通用的特点, 笔者利用网络药理学

技术进行六味地黄汤配伍规律的研究,发现六味地黄汤三补成分和三泻成分并不是六味地黄汤有效活性成分的简单拆分,二者通过复杂的相互作用有机结合,促进细胞凋亡、细胞代谢过程、细胞增殖、转录、抑制离子转运等过程。三补成分侧重于调控离子跨膜转运、血压以及前列腺素、视黄酸的代谢等;三泻成分对细胞的信号传导以及细胞的生物合成作用有较为显著的影响。三补三泻配伍又使六味地黄汤有抑制细胞程序性死亡和应激反应,调控蛋白的合成修饰和分泌。研究提示按照中医药理论的中药配伍组方应用所产生的药效不仅仅是其中药各自药效简单的相加,还会使其产生 $1 + 1 > 2$ 等的复杂协同生物效应。网络药理学的思路方法有助于笔者研究中药复方多成分、多靶点和多效应的复杂作用及其机制。

本研究虽然通过网络预测筛选出六味地黄汤的部分活性成分及药物靶标,然而由于数据库信息并不完善,且化合物筛选仅仅考虑到中药的组成成分,并未考虑到方剂中中药的组成用量、中药成分的含量、中药煎煮过程中化合物之间的相互作用以及中药在体内的复杂代谢过程等,故研究预测的结果具有一定的局限性。例如,六味地黄丸常用于治疗肾脏疾病^[31],本研究预测的相关度就比较低;消化系统疾病没有显示出预测结果等。而且,为了证实网络预测结果,还需要通过临床试验及体内外实验来进一步验证。

4 结论

在本项研究中,笔者对六味地黄汤成分、靶标进行整合、建立六味地黄汤分子数据库,构建六味地黄汤药物-靶标-疾病网络,筛选出六味地黄汤活性成分 42 个、靶标 221 个及疾病 56 个,并对六味地黄汤配伍机制进行分析,发现六味地黄汤三补三泻的配伍使药物作用产生了 $1 + 1 > 2$ 的效应。网络药理学技术为笔者从系统角度研究中药复方的复杂成分及其靶标有机作用的角度,研究中药作用机制及可能干预的疾病提供了一种有效手段,为笔者研究复杂疾病及中医证候的分子机制提供了新的研究思路和方法。随着系统生物学技术和数据库的发展,网络药理学在处理生物医药大数据方面的优势也将越来越显著。

【参考文献】

[1] 李经纬. 中医大词典[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2004:372.
[2] 李果,罗云,肖小河,等. 六味地黄汤及其拆方的配伍

规律实验研究[J]. 中药材, 2007,30(2):205-208.

[3] 卞慧敏,张旭,龚婕宁,等. 六味地黄汤药物血清抗血管内皮细胞凋亡的作用[J]. 中药药理临床,2002,18(5):9-11.
[4] CHENG X W, SU X Q, BAI H, et al. Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput sequencing: the story for Liuwei Dihuang Wan[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5147. doi: 10. 1038/srep05147.
[5] ZHANG G B, LI Q Y, SU S B, et al. Network pharmacology: a new approach for Chinese herbal medicine research[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 621423.
[6] 王勇,李春,王伟,等. 基于生物网络与病证结合的中药复方药理学研究对策[J]. 中国中西医结合杂志, 2012,32(4):552-555.
[7] LI B, TAO W, ZHENG C, et al. Systems pharmacology-based approach for dissecting the addition and subtraction theory of traditional Chinese medicine: an example using Xiao-Chaihu-decoction and Da-Chaihu-Decoction [J]. Comput Biol Med, 2014, 53(6): 19-29.
[8] ZHANG G B, SONG Y N, CHEN Q L, et al. Mechanisms of Huangqi decoction againsts rat liver fibrosis: a gene expression profiling analysis[J]. Chin J Med, 2015, 18(10):39-43.
[9] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
[10] Walters J R. New advances in the molecular and cellular biology of the small intestine [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2002, 18(2):161-167.
[11] 任怡. 六味地黄汤对小鼠原发性肝癌模型的作用机制研究[J]. 湖南中医杂志, 2013,29(2):124-126.
[12] Tsenga Y T, Lo Y C. The Chinese herbal formula Liuwei dihuang protects dopaminergic neurons against Parkinson's toxin through enhancing antioxidant defense and preventing apoptotic death [J]. Phytomedicine, 2014,21(5):724-733.
[13] 龚婕宁,俞晶华. 六味地黄汤抗血栓作用机制研究[J]. 中药药理与临床,2006,22(34):10-12.
[14] 胡战云. 六味地黄汤加味结合尼群地平治疗阴虚阳亢高血压临床研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(10):110-111.
[15] XIA B J, TONG P J. The effects of Liuwei Dihuang on canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteoporosis [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1):

- 133-141.
- [16] 王俊, 郑云, 夏大静, 等. 六味地黄汤联合耐受性树突状细胞疫苗对哮喘小鼠的协同治疗作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 1976-1978.
- [17] Perry B, WANG Y, HUANG L W. Traditional Chinese herbal formula, suppresses chronic inflammation and oxidative stress in obese rats[J]. J Int Med Res, 2014, 12(5): 447-454.
- [18] WU Y C, HU J H, LIU I M, et al. Increase of insulin sensitivity in diabetic rats received Die-Huang-Wan, a herbal mixture used in Chinese traditional medicine[J]. Acta Pharm Sin, 2002, 23(12): 1181-1187.
- [19] 陈婷婷. 六味地黄汤对II型糖尿病患者的临床疗效及血液指标影响观察[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 123-124.
- [20] 马向明. 小针刀合六味地黄汤治疗跟骨骨刺疼痛35例[J]. 安徽中医学院学报, 1995, 14(2): 18-19.
- [21] LIU Y, ZHAO H, WANG L, et al. The regulatory effect of Liuwei Dihuang pills on cytokines in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Am J Chin Med, 2012, 40(2): 295-308.
- [22] 史为伍, 于学静, 陈丽霞, 等. 六味地黄汤加减治疗慢性肾小球肾炎的临床观察[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(8): 1352-1354.
- [23] 李旭. 六味地黄汤治疗IIIa型前列腺炎随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 29(5): 28-30.
- [24] 陈丽, 张熙, 周忠志. 六味地黄汤对慢性肾衰大鼠肾小管上皮细胞EMT的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 47-51.
- [25] LIU A L, DU G H. Network pharmacology: new guidelines for drug discovery [J]. Acta Pharm Sin, 2010, 31(45): 1472-1477.
- [26] LIU X, OUYANG S, YU B, et al. Pharm mapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucl Acids Res, 2010, 38(17): 609-614.
- [27] 刘文, 刘慧明, 覃燕梅, 等. 槲皮素-7-硫酸酯钠盐对血栓形成的影响[J]. 中国药理通讯, 2010, 27(2): 47-48.
- [28] 高视春. 环氧酶-2与肿瘤关系的研究进展[J]. 川北医学院报, 2010, 25(1): 88-91.
- [29] 陈文婷, 任建琳. 健脾补肾复方联合化疗治疗大肠癌患者疗效指标的系统评价[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(7): 1162-1166.
- [30] 饶斌, 谢斌. 滋阴方六味地黄丸抗肿瘤研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2014, 26(1): 84-87.
- [31] 李罗德, 叶俊玲, 晏子友. 六味地黄丸(汤)治疗肾脏病临床研究概况[J]. 江西中医药, 2012, 43(2): 69-71.

[责任编辑 邹晓翠]