

· 经典方剂网络药理学研究专栏 ·

[编者按] 网络药理学是在现代药理学研究的基础之上提出的药物设计与开发的新方法和新策略,其是以系统生物学为基础,从整体水平观察“药物-靶点-疾病”复杂网络关系,进而指导新药研发及药理作用研究。网络药理学提供了一种系统层次的方法来了解疾病的发病机制,其研究策略的整体性和系统性的特点与中医药整体观与辨证论治的原则不谋而合,可用于发现先导化合物、识别靶标和预测适应症。目前,大多数中药网络药理学研究是基于在线数据库提供的数据进行分析的,药物信息及药物相关基因或蛋白数据库包括 TCMSP, PubChem, TCM Database@ Taiwan, DrugBank, TTD, ChEMBL, STITCH, UniProt 等;对生物分子网络功能进行分析的数据库包括 DAVID, KOBAS, BiNGO 等。大多数疾病尤其是复杂疾病是由多个基因共同调节的,单个基因的识别无法对疾病的各种症状和发病机制做出有效的分析,而网络药理学方法可以构建生物分子网络对机体复杂生物系统进行分析。本课题组应用网络药理学方法,对4个中药复方四君子汤、吴茱萸汤、参附汤、生脉散的作用机制做了初步的分析和预测,构建了“化合物-靶点网络”和“蛋白互作网络”,并进行了基因本体富集分析和信号通路富集分析等,希冀为进一步深入研究这些复方的作用机制提供先导信息和基础,也为网络药理学在中医药研究中的应用提供思路。

基于网络药理学的四君子汤作用机制分析

刘鑫馗, 吴嘉瑞*, 蔺梦娟, 张晓朦
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的:采用网络药理学方法探讨四君子汤的功物质基础和配伍机制。方法:依托中药系统药理学分析平台(TCMSP)检索四君子汤全方4味中药的化学成分、作用靶点、相关疾病。进而构建化合物-靶点网络,靶点-疾病网络,蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,靶点-通路网络,研究四君子汤作用机制。结果:通过筛选得出27个化合物,相应靶点93个、相关疾病215种。PPI网络包含68个靶点,关键靶点涉及FOS, ESR1, AR, PPARG等。基因本体(GO)条目121个,其中生物过程相关的条目96个,分子功能相关的条目13个,细胞组成相关的条目12个。京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路3条,涉及神经活性受体-配体相互作用信号通路、钙离子信号通路、癌症信号通路。结论:本研究结果初步验证了四君子汤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] 四君子汤; 网络药理学; 靶点; 作用机制

[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)16-0194-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160194

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.0938.022.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 9:38

Mechanism of Si Junzitang Based on Network Pharmacology

LIU Xin-kui, WU Jia-rui*, LIN Meng-juan, ZHANG Xiao-meng
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy and compatibility mechanism of Si Junzitang. **Method:** Chemical components, targets and diseases related to the four traditional Chinese medicine (TCM) herbs were searched through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform

[收稿日期] 20170115(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473547,81673829)

[第一作者] 刘鑫馗,在读硕士,从事临床中药学研究,Tel:15811155905,E-mail:lxchuige@163.com

[通讯作者] *吴嘉瑞,博士,教授,硕士生导师,从事临床中药学研究,Tel:010-84738662,E-mail:exogamy@163.com

(TCMSP). Compound-target network, target-disease network, protein-protein interaction (PPI) network, and target-pathway network were constructed to explore the mechanism of Si Junzitang. **Result:** Totally 27 components, 93 targets and 215 diseases related to the four TCM herbs were obtained through screening. The PPI network contains 68 targets, in which key targets involving FOS, ESR1, AR, PPARG and so on. There were 121 gene ontology (GO) entries, including 96 biological process entries, 13 molecular function entries and 12 cellular component entries. Besides, there were 3 KEGG pathways, involving Neuroactive ligand-receptor interaction, calcium signaling pathway and cancer pathway. **Conclusion:** The result of the study preliminarily verifies the basic pharmacological effects and related mechanisms of Si Junzitang, in order to lay a solid foundation for further studies on the mechanism of action.

[**Key words**] Si Junzitang; network pharmacology; target; mechanism

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》，由人参、白术、茯苓、炙甘草 4 味药组成，为补脾益气的代表方剂^[1]。方中人参甘温扶脾养胃，大补元气为君药；白术苦温，燥湿健脾为臣药；茯苓甘淡，健脾祛湿为佐药，白术、茯苓相伍则健脾祛湿之功显著；甘草甘温，益气和中，调和诸药，为佐使之药^[2]。四药相辅，共奏益气健脾之功，主治脾虚胃弱，言语低微，四肢无力，舌色淡，脉弱细无力，食欲锐减，满腹肠鸣，伴有寒证者^[3]。临床主要用于治疗慢性胃炎；消化性溃疡；慢性腹泻；急、慢性肝损伤；小儿厌食；腹部术后肠麻痹及习惯性便秘等诸多病症^[4]。随着现代分子生物技术的发展，四君子汤治疗多种疾病的研究已经进入细胞层面和基因转录水平的研究，但整体研究水平尚处于较浅的层面^[5]。网络药理学作为中药研究的学科前沿，融合了系统生物学和多向药理学的思想，它从整体的角度探索药物与疾病的关联性，强调从药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发，反映及阐释中药的多成分-多靶点作用关系，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不谋而合^[6-7]。本研究采用网络药理学方法，对四君子汤多成分、多靶点与多种疾病间复杂网状关系进行研究，希冀为揭示四君子汤作用机制的科学内涵提供参考。

1 材料与方法

1.1 四君子汤的化学成分 本研究依托中药系统药理学分析平台 (TCMSP) (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>) 检索四君子汤全方人参、白术、茯苓、甘草的所有化学成分，共搜集了 559 个化合物，其中人参 190 个、白术 55 个、茯苓 34 个、甘草 280 个。

1.2 口服利用度 (OB) 和类药性 (DL) 筛选 本研究中，人参、白术、茯苓、甘草中的化合物 OB 和 DL 筛选阈值分别为 $OB \geq 30\%$ ， $DL \geq 0.18$ 。通过筛选，

559 个化合物分子中有 136 个符合条件，并将其作为候选化合物。

1.3 化合物-靶点网络和靶点-疾病网络的构建 将四君子汤的化合物、靶点和相关疾病通过 Cytoscape 3.4.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建化合物-靶点网络和靶点-疾病网络，以探究四君子汤的药理学作用机制。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 为了说明靶点蛋白在系统水平上的作用，将四君子汤相关靶点基因上传至在线 STRING 10.0 软件 (<http://string-db.org>)，本研究选取的是打分值高于 0.9 的最高置信度的数据，构建由导入基因所表达产物组成的 PPI 网络，并且利用 R version 3.3.2 软件 (<https://www.r-project.org/>) 对 PPI 网络中的蛋白绘制条形图。

1.5 基因本体 (GO) 功能富集京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 为了说明中药化合物的靶点蛋白在基因功能和信号通路中的作用，本研究采用 David v 6.7 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 PPI 网络中的蛋白质进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，通过 Cytoscape3.4.0 软件对 KEGG 通路富集分析中筛选出的信号通路构建靶点-通路网络。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选 为了提供更准确的结果，本研究只挑选 TCMSP 平台中 OB 和 DL 都较高的化合物，以及已有文献报道的活性化合物进行进一步的分析，一共筛选出 27 个活性化合物。表 1 为四君子汤中含有的 27 个活性化合物基本信息。

2.2 四君子汤化合物-靶点相互作用网络 利用 27 个化合物与靶点的关系构建的化合物-靶点网络 (图 1)。在化合物-靶点相互作用网络中，总共包括 120 个节点 (27 个化合物节点和 93 个靶点节点) 和 275

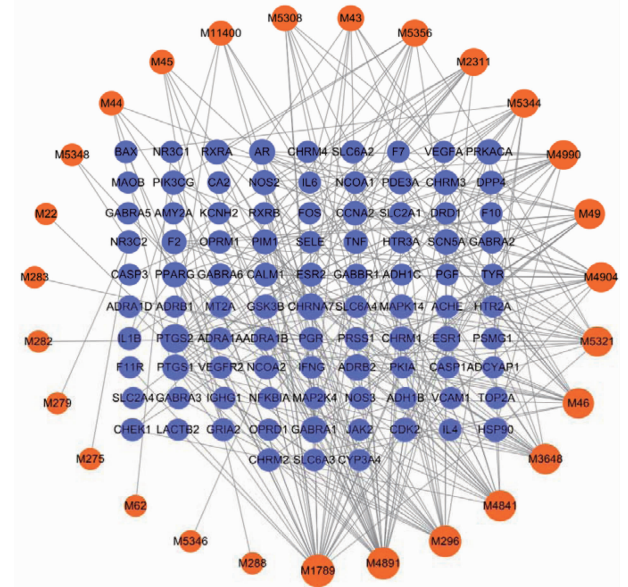
表 1 四君子汤中含有的 27 个活性化合物基本信息

Table 1 Information for 27 active compounds of Sijunzi Tang

分子 ID	名称	口服利 用度/%	类药性	来源 中药
M3648	inermin	65.83	0.54	人参
M5308	aposiopolamine	66.65	0.22	人参
M5321	frutinone A	65.90	0.34	人参
M5344	ginsenoside Rh ₂	36.32	0.56	人参
M5346	ginsenoside-Rh ₃ _qt	13.09	0.76	人参
M5348	ginsenoside-Rh ₄ _qt	31.11	0.78	人参
M5356	girinimbin	61.22	0.31	人参
M11400	ginsenoside Rf	17.74	0.24	人参
M22	14-acetyl-12-senecioid- 2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	0.30	白术
M43	atractylenolide I	37.37	0.15	白术
M44	atractylenolide II	47.50	0.15	白术
M45	atractylenolide III	68.11	0.17	白术
M46	atractylone	41.10	0.13	白术
M49	3β-acetoxyatractylone	54.07	0.22	白术
M62	biatractylolide	17.45	0.81	白术
M275	trametenolic acid	38.71	0.80	茯苓
M279	cerevisterol	37.96	0.77	茯苓
M282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72	茯苓
M283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	茯苓
M288	pachyman	0.45	0.68	茯苓
M296	hederagenin	36.91	0.75	茯苓
M1789	isoliquiritigenin	85.32	0.15	甘草
M2311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
M4841	licochalcone B	76.76	0.19	甘草
M4891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
M4904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
M4990	7,2',4'-trihydroxy-5- methoxy-3-aryl coumarin	83.71	0.27	甘草

条边,其中橙色节点表示化合物分子,蓝色节点表示药物靶点,每条边则表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系。在网络中,一个节点的度(Degree)表示网络中和节点相连的路线的条数。根据网络的拓扑学性质筛选 Degree 较大的节点进行分析,这些连接化合物或靶点较多的节点在整个网络中起到枢纽的作用,可能是关键的化合物或者靶点。表 2 列出了化合物-靶点网络中化合物和靶点的 Degree。

该网络中,每个化合物的平均靶点数目为 11 个,每个靶点平均与 3 个化合物相互作用,因此四君子汤中存在一个化合物与多个靶点之间的相互作用,同时也存在不同化合物共同作用于同一个靶点的现象,这体现了四君子汤多成分与多靶点之间共同作用的机制,同时也符合中药复方的特点。从化合物的角度,有 48% 的化合物的作用靶点 ≥ 10 个,其中靶点 ≥ 16 个的化合物有 9 个。甘草中的异甘草素(M1789)的连接度最高,能与 31 个靶点蛋白发



橙色表示化合物,蓝色表示靶点,节点的大小与节点的度呈正比例关系(图 6 同)

图 1 四君子汤化合物-靶点网络

Fig.1 Compound-target network of Sijunzi Tang

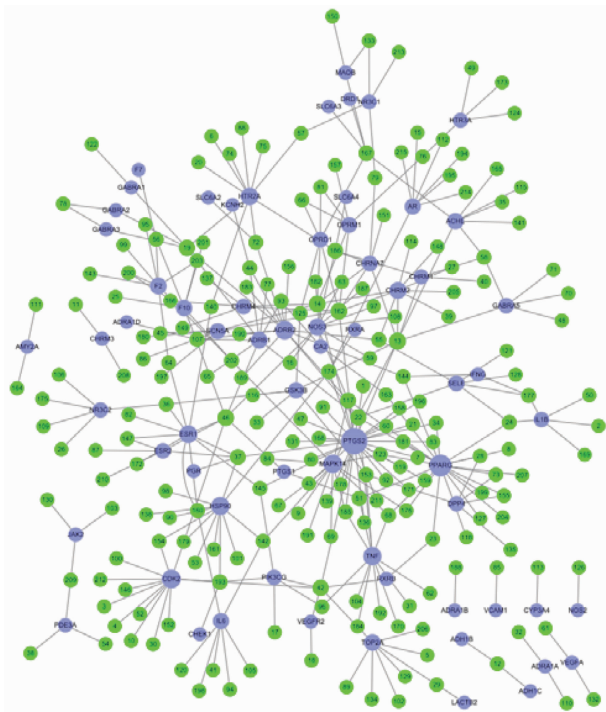
生相互作用;紧随其后的是甘草中的 shinpterocarpin (M4891),作用靶点 30 个;茯苓中的 hederagenin (M296)作用靶点 21 个;人参中的 inermin (M3648)和白术中的苍术酮(M46)都能与 18 个靶点蛋白发生相互作用。对于靶点, Degree 最高的为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2),对应了 14 个化合物。其次是神经元的乙酰胆碱受体蛋白 α-7 链 (neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain, CHRNA7) 和 β₂-肾上腺素能受体(beta-2 adrenergic receptor, ADRB2),均对应了 9 个化合物。前列腺素内过氧化物合酶 1 (prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1) 和 γ-氨基丁酸受体亚基 α-1 (gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1, GABRA1) 均对应了 8 个化合物。

2.3 四君子汤靶点-疾病相互作用网络 靶点-疾病网络由 281 个节点组成,包括 66 个靶点节点,215 个疾病节点和 341 条边,其中蓝色节点表示靶点,绿色节点表示疾病,每条边则表示靶点与疾病之间的相互作用关系(图 2)。93 个靶点中有 27 个靶点在靶点-疾病网络中没有相对应的疾病,由此可推测四君子汤复方中还存在暂时未被发现的作用途径。该网络中靶点和疾病表现出复杂的相互作用模式,这进一步体现出中药复方多靶点-多疾病的复杂作用模式。靶点-疾病网络中,PTGS2 参与调节了 32 种不同的疾病,包括阿尔茨海默病、乳腺癌、炎症、

表 2 化合物-靶点网络的关键节点及其拓扑学性质

Table 2 Topology characteristics of hub nodes from compound-target network

名称	类别	介数	度
isoliquiritigenin(M1789)	compound	0.272 722 14	31
shinpterocarpin(M4891)	compound	0.177 924 32	30
hederagenin(M296)	compound	0.215 896 51	21
licochalcone B(M4841)	compound	0.042 336 68	19
inermin(M3648)	compound	0.067 596 79	18
atractylone(M46)	compound	0.104 054 12	18
frutinone A(M5321)	compound	0.047 018 98	16
licopyranocoumarin(M4904)	compound	0.078 007 23	16
3 β -acetoxyatractylone(M49)	compound	0.063 218 61	16
7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin(M4990)	compound	0.022 634 20	15
ginsenoside Rh ₂ (M5344)	compound	0.140 672 08	12
glycyrol(M2311)	compound	0.0197 206 1	11
girinimbin(M5356)	compound	0.033 283 55	10
PTGS2	target	0.257 197 38	14
CHRNA7	target	0.069 653 28	9
ADRB2	target	0.052 497 27	9
PTGS1	target	0.034 047 25	8
GABRA1	target	0.035 414 98	8
SCN5A	target	0.019 663 72	7
PRKACA	target	0.011 502 77	7
PPARG	target	0.012 162 71	7
AR	target	0.017 204 39	7



蓝色表示靶点,绿色表示疾病,节点的大小与节点的度呈正比例关系(图 3 同)

图 2 四君子汤靶点-疾病网络

Fig.2 Target-disease network of Sijunzi Tang

痛症、前列腺癌等。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG) 参与调节了 21 种不同的疾病,包括哮喘、炎症、溃疡性结肠炎、炎症性肠病、胰腺癌、动脉粥样硬化、膀胱癌、糖尿病、肥胖症等。为了更好地研究四君子汤复方治疗疾病的机制,本研究通过对 221 种疾病的 Degree 进行计算,选取 Degree ≥ 4 疾病,与相应的靶点重新构建靶点-疾病网络图(图 3)。该网络包含 13 种不同的疾病,根据 Degree 由大到小分别为 Alzheimer's disease, Cardiovascular disease, Pain, Analgesics, Cancer, Anxiety disorder, Schizophrenia, Parkinson's disease, Inflammation, Breast cancer, Asthma, Solid tumors, Prostate cancer。由此可推测四君子汤可能在这些疾病的治疗过程中发挥一定的作用,值得进一步深入研究。本研究结果显示,一个疾病通常由多个靶点所调控。例如阿尔茨海默病能同时被 ACHE, CHRM1, CHRM2, CHRNA7 等靶点所调节,心血管疾病能同时被 ADRB1, CDK2, ESR1, ESR2 等靶点所调节。以上分析结果表明大多数复杂疾病并不是由于单一分子发生病变而引起的,而是由于机体内多个分子或者基

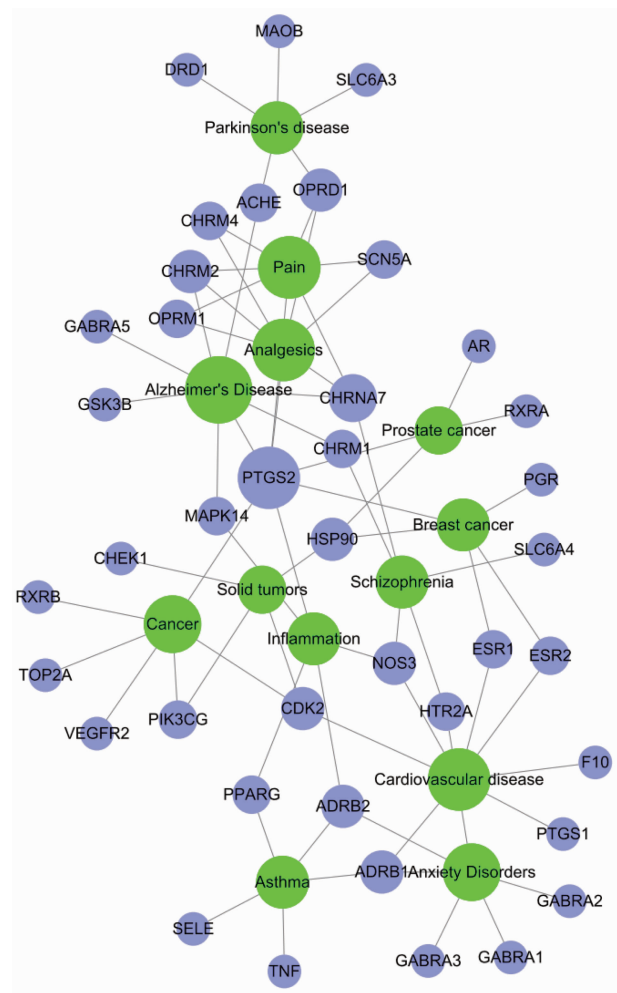


图 3 Degree ≥ 4 条件下四君子汤靶点-疾病网络
Fig. 3 Target-disease network of Sijunzi Tang under condition of Degree ≥ 4

因产物发生紊乱,导致通路失衡而引起的一系列生理反应^[12]。

2.4 四君子汤靶点 PPI 网络的构建与分析 为了更好地理解四君子汤的作用机制,基于 PPI 关系,利用 STRING 软件构建了四君子汤靶点的 PPI 网络(图 4)。PPI 网络包含 68 个蛋白质节点,178 条相互作用关系(连线)。根据节点的 Degree 绘制出了前 30 个关键蛋白质节点的条形图(图 5)。Degree ≥ 10 的节点包括 FOS, ESR1, AR, PPARG, IL1B, IL6, JAK2, MAPK14, HSP90AA1, NOS3。其中, FOS (Degree = 20) 的 Degree 远高于其他蛋白质节点,说明这个蛋白质在网络中发挥了关键作用,成为连通网络中其他节点的桥梁。

2.5 GO 富集与 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 平台的 GO 和 PATHWAY 富集分析功能,对四君子汤 PPI 网络中涉及的 68 个蛋白质的功能进行了研究。在 GO 富集分析中,确定了 121 个 GO

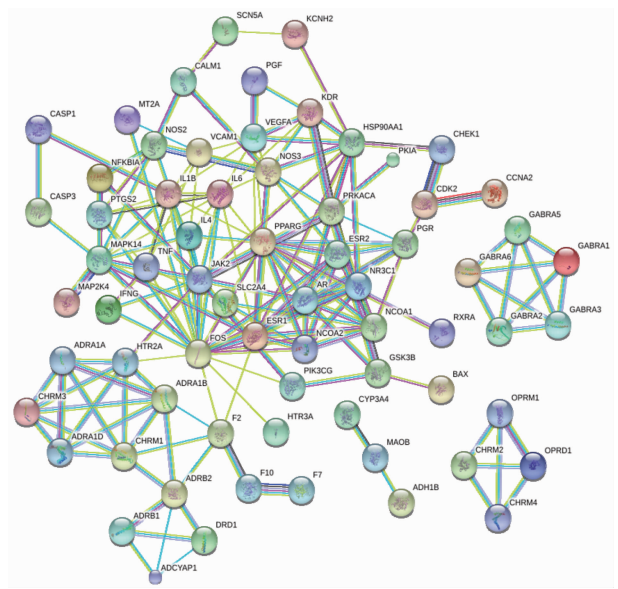


图 4 四君子汤相关靶点的 PPI 网络
Fig. 4 PPI network of Sijunzi Tang related targets

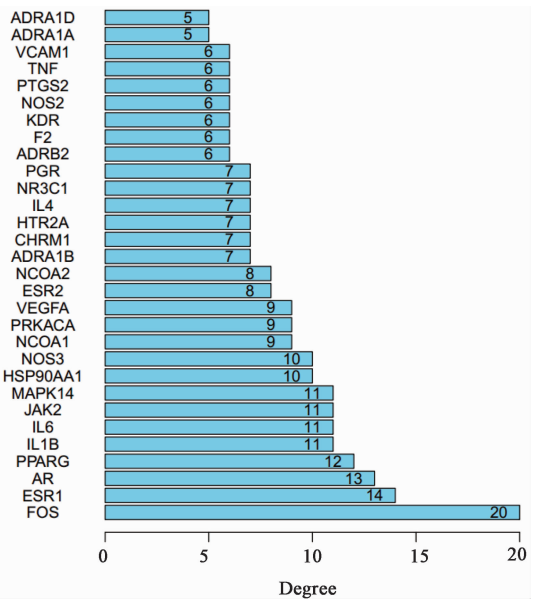


图 5 PPI 网络中的关键节点
Fig. 5 Hub nodes from PPI network

条目(错误发现率, FDR < 0.01, 表 3 根据 FDR 列出前 30 个), 其中生物过程相关的条目 96 个, 涉及细胞增殖的调控、细胞内信号级联、系统过程的调控、多细胞生物过程的调控、生物合成过程的调控、代谢过程的调控、细胞坏死及凋亡调控等方面; 分子功能相关的条目 13 个, 涉及受体活性、胺结合、药物结合、神经递质结合、类固醇结合等方面; 细胞组成相关的条目 12 个, 涉及质膜、突触、神经元投影等方面。

在通路富集分析中, 得到 36 条信号通路, 根据

表 3 四君子汤 PPI 网络中的 GO 条目 (FDR < 0.01)

Table 3 List of GO enrichment results to genes in PPI network (FDR < 0.01)

类别	编号	名称	基因数/个	FDR
生物过程	0042127	regulation of cell proliferation	29	1.69×10^{-14}
生物过程	0007242	intracellular signaling cascade	34	5.56×10^{-14}
分子功能	0008227	amine receptor activity	12	1.44×10^{-13}
生物过程	0044057	regulation of system process	18	1.64×10^{-10}
生物过程	0010033	response to organic substance	24	3.55×10^{-10}
生物过程	0051240	positive regulation of multicellular organismal process	16	1.15×10^{-9}
生物过程	0051241	negative regulation of multicellular organismal process	14	1.84×10^{-9}
生物过程	0009891	positive regulation of biosynthetic process	22	1.47×10^{-8}
生物过程	0051173	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	21	3.18×10^{-8}
生物过程	0051050	positive regulation of transport	14	9.14×10^{-8}
生物过程	0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process	21	9.67×10^{-8}
生物过程	0009719	response to endogenous stimulus	17	1.46×10^{-7}
生物过程	0030522	intracellular receptor-mediated signaling pathway	10	1.68×10^{-7}
生物过程	0019932	second-messenger-mediated signaling	14	1.76×10^{-7}
生物过程	0007166	cell surface receptor linked signal transduction	32	1.89×10^{-7}
生物过程	0008284	positive regulation of cell proliferation	17	2.02×10^{-7}
生物过程	0042981	regulation of apoptosis	22	2.25×10^{-7}
分子功能	0043176	amine binding	11	2.38×10^{-7}
生物过程	0043067	regulation of programmed cell death	22	2.70×10^{-7}
生物过程	0010941	regulation of cell death	22	2.89×10^{-7}
生物过程	0009725	response to hormone stimulus	16	3.87×10^{-7}
生物过程	0044093	positive regulation of molecular function	19	4.85×10^{-7}
分子功能	0008144	drug binding	9	5.21×10^{-7}
生物过程	0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	22	7.28×10^{-7}
细胞组成	0031226	intrinsic to plasma membrane	25	8.22×10^{-7}
分子功能	0030594	neurotransmitter receptor activity	10	1.43×10^{-6}
生物过程	0010557	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	19	2.82×10^{-6}
分子功能	0042165	neurotransmitter binding	10	2.96×10^{-6}
细胞组成	0005887	integral to plasma membrane	24	3.21×10^{-6}
生物过程	0008285	negative regulation of cell proliferation	15	3.31×10^{-6}

FDR 筛选出 3 条通路(表 4, 图 6), 分别为神经活性受体-配体相互作用信号通路、钙离子信号通路、癌症信号通路, 表明四君子汤的有效成分可以作用于这些信号通路来达到治疗疾病的目的。本研究中, 有 20 个基因富集在神经活性受体-配体相互作用信号通路上, 分别为 OPRM1, DRD1, GABRA2, GABRA1, GABRA3, GABRA6, GABRA5, NR3C1, ADRB2, ADRB1, CHRM4, CHRM3, CHRM2,

CHRM1, F2, ADRA1B, ADRA1A, ADRA1D, HTR2A, OPRD1; 有 14 个基因富集在钙信号通路上, 分别为 DRD1, ADRB2, ADRB1, CHRM3, CHRM2, CHRM1, ADRA1B, ADRA1A, PRKACA, NOS3, NOS2, ADRA1D, CALM1, HTR2A; 有 16 个基因富集在癌症信号通路上, 分别为 PI3KCG, IL-6, AR, HSP90AA1, PTGS2, PGF, RXRA, PPARG, NFKBIA, CDK2, FOS, Caspase-3, GSK3B, Bax, VEGFA, NOS2。

表 4 四君子汤 PPI 网络中的通路 (FDR < 0.01)

Table 4 List of pathway enrichment results to genes in PPI network (FDR < 0.01)

编号	名称	基因数 / 个	FDR
hsa04080	neuroactive ligand-receptor interaction	20	1.42×10^{-8}
hsa04020	calcium signaling pathway	14	4.72×10^{-5}
hsa05200	pathways in cancer	16	2.06×10^{-3}

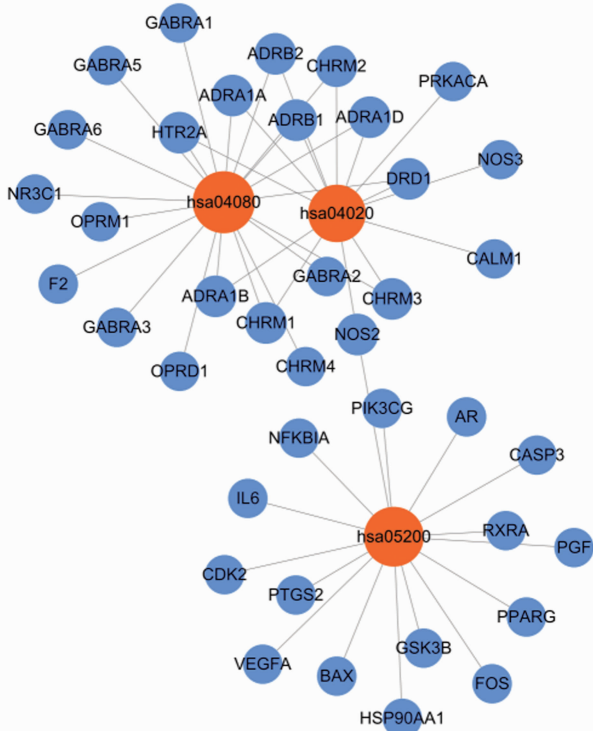


图 6 靶点-通路网络

Fig. 6 Target-pathway network

3 讨论

网络药理学适用于中药多成分、多靶点、多途径特点,为进一步阐明中药复方多方面有效性,深化对中药复方研究提供了新的思路^[8]。四君子汤是中医临床常用的补脾益气的基础方剂,素有“补气不离四君”之说,用药历史悠久。为了研究四君子汤的作用机制,本研究依托 TCMSP 中药系统药理学分析平台研究了四君子汤 4 味中药(人参、白术、茯苓、甘草)的有效成分,同时构建了化合物-靶点网络和靶点-疾病网络,分析了化合物与靶点、靶点与疾病直接的相互作用关系,为四君子汤“多组分-多靶点-多疾病”的治疗机制提供了参考。四君子汤化合物-靶点网络和靶点-疾病网络中的关键靶点包括 PTGS2, PPARG 等,而这些关键靶点参与调控的多种疾病如阿尔茨海默病、心血管疾病、哮喘、前列腺癌等,与已有的四君子汤治疗上述疾病的研究达成一致。PTGS2 又称为环氧化酶(COX-2),是生成前

列腺素的关键酶,在静息细胞及正常生理状态下的多数组织内检测不到其表达,仅在细胞接受相应的刺激因素(如生长因子,细胞因子,A 和 HSP 等)时 PTGS2 表达迅速在转录水平上被诱导上调,进而催化花生四烯酸产生多种前列腺素,导致疼痛和炎症反应。PTGS2 基因的过表达与抑制凋亡、促进增殖和某些上皮肿瘤的发生有关。包括消化系统肿瘤在内的许多良性癌前病变和恶性肿瘤中,均有 PTGS2 基因的扩增及其蛋白的高表达^[9-10]。PTGS2 是非甾类抗炎药物的一个重要靶点^[11],是四君子汤中 4 味药的共同靶点,调控 PTGS2 将有益于炎症过程的调控和脾胃疾病的治疗。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是一类由配体激活的转录因子,属于 II 型核激素受体超家族成员,迄今为止已在人体内鉴定到 PPAR α , PPAR β , PPAR γ 3 种亚型^[12-13]。PPARG 编码的 PPAR γ 分布广泛,在棕色和白色脂肪组织、结肠、脾脏、视网膜血管和免疫细胞等都有所表达^[14]。PPAR γ 生物学功能复杂,参与脂肪和糖代谢、能量平衡、控制单核细胞分化成熟、诱导巨噬细胞凋亡、抑制炎症反应、诱导肿瘤细胞分化和凋亡,抑制肿瘤血管生成、抗肝纤维化、抗动脉粥样硬化、调血脂、降血压、改善心功能参与心室重构、促进神经细胞的分化与成熟,参与神经细胞凋亡等。近年来对 PPAR γ 的研究主要集中于肿瘤细胞分化、凋亡、抑制肿瘤细胞浸润、抑制炎症反应等生理病理过程^[15]。此外,现代药理学研究表明,四君子汤具有调节胃肠道功能(包括调节胃肠运动、调节消化液分泌、调节胃肠激素分泌、保护胃肠黏膜、提高肠道黏膜免疫机能、调节肠道微生态平衡)、增强机体免疫功能、调节神经内分泌、抗菌消炎、提高能量代谢、促进细胞增殖、促进癌细胞凋亡、抗衰老等作用,这些药理作用与四君子汤在临床上治疗多种复杂疾病紧密相关^[16-17]。陈云波^[18]应用液相蛋白芯片技术筛选治疗阿尔茨海默病方药,发现四君子汤对 SAMP8 小鼠的学习记忆能力有明显的改善作用,此外能在一定程度上调节 SAMP8 小鼠的异常免疫反应,且对痴呆小鼠异常免疫状态的调节作用与改善其认知功能障碍可能有关。曹彬^[19]研究表明,四君子汤在改善慢性心衰大鼠心功能和心室重构的同时,还可以明显减轻缺血缺氧下肝脏组织的病理变化。任燕等^[20]在治疗喘证有气短乏力,纳差,便溏等脾虚之象时,常以四君子汤加减施治,疗效确实。李婷等^[21]对哮喘病古今方剂的用药配伍规律进行研究,发现四君子汤作为基本方被各家广泛应用。

赵慧朵^[22]研究表明,四君子汤能明显改善乳腺癌术后患者食少纳呆、体倦乏力、神疲懒言、食后腹胀、面色萎黄等脾气虚症状,且能提高乳腺癌术后患者的卡氏评分,改善乳腺癌患者一般体力状况,改善其生存质量。周方等^[23]研究表明,四君子汤对精神分裂症记忆损害有一定改善作用。乔治^[24]研究表明,以四君子汤作为治疗晚期前列腺癌的基本方,能显著改善激素难治性前列腺癌患者的生活质量,明显改善前列腺癌患者纳呆、乏力、排尿困难、尿痛等症状。然而,四君子汤治疗焦虑症、帕金森病等疾病的相关报道较少,值得进一步深入研究。对四君子汤的靶点进行 PPI 映射并构建网络,对网络分析后发现了多个与多种复杂疾病紧密相关的关键靶点,如 FOS, ESR1, AR, PPARC 等。FOS 蛋白作为一类核蛋白转录因子,在调控细胞生长、分裂、增殖、分化乃至程序性死亡等方面具有举足轻重的地位,它的表达影响了许多生命活动和过程,特别是其在学习记忆及射精的标记方面的重要作用,吸引了国内外学者的广泛关注^[25-26]。ESR1(雌激素受体 1)编码的 ER α (雌激素受体 α)既调控着雌激素的水平,同时也是一个配体激活的转录因子,在与 DNA 相互作用转录表达等起着关键的作用,主要分布于子宫、乳腺、胎盘、肝脏、中枢神经系统、心血管系统和骨组织等一些通常认为有雌激素效应的组织^[27-28]。与 ER α 密切相关的疾病包括乳腺癌、子宫内膜癌、心血管疾病、骨质疏松症、阿尔茨海默病等^[29]。很多研究表明 ESR1 和恶性肿瘤细胞的生殖有着密切的关系,可以被认为是关键的抑癌基因之一^[27]。苗知春^[30]和周琳^[31]研究表明,人参皂苷 Rh₂(ginsenoside Rh₂)可以调节雌激素受体蛋白质水平的表达,对肿瘤细胞的发生发展有着复杂的影响。由此推测四君子汤正是通过多种组分与这些关键靶点直接或间接相互作用达到治疗疾病的目的。为了说明四君子汤作用靶点在基因功能和信号通路中的作用,本研究对 PPI 网络中出现的基因进行了 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析发现,四君子汤治疗多种疾病的基因功能主要体现在细胞增殖的调控、细胞内信号级联、受体活性等方面。KEGG 通路涉及神经活性受体-配体相互作用信号通路、钙离子信号通路、癌症信号通路,由此推测四君子汤的有效成分可能通过作用于这些信号通路来达到治疗疾病的目的。段永强^[32]通过研究发现,四君子汤能下调脾虚证大鼠小肠组织钙离子信号通路关键分子的表达,上调胰腺、骨骼肌、肝脏

组织钙离子信号通路关键分子的表达。李靖^[33]通过研究发现,四君子汤药物血清可以抑制胃癌侧群细胞增殖、促进胃癌侧群细胞凋亡,促进促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)表达,抑制抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达。田黎等^[34]通过研究发现,四君子汤含药血清可以上调 Bax,下调 Bcl-2,促进细胞色素-C(Cyt-C)释放,激活半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)介导的细胞凋亡途径,对甲状腺癌细胞中侧群细胞生长有抑制作用。李斌等^[35]通过研究发现,四君子汤能有效减轻结肠腺癌荷瘤小鼠癌性恶病质症状,提高体重,抑制炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)可能其作用机制之一。徐玲等^[36]通过研究发现,四君子汤能显著降低血清中 IL-1, IL-6, TNF- α 水平,而增加血清类胰岛素一号增长因子(IGF-1)水平,从而改善癌性恶病质小鼠的营养状况,延缓恶病质的发展。罗春蕾等^[37]通过研究发现,四君子汤能明显下调移植性原发性肝癌小鼠血清血管内皮生长因子(VEGF)水平,促进小鼠肝癌细胞凋亡,影响肿瘤细胞周期,发挥抑瘤作用。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,对四君子汤复方的多成分、多靶点与多种疾病间复杂网状关系进行研究。研究结果初步验证了四君子汤的基本药理学作用和相关机制,并为进一步深入探讨其作用机制奠定了良好的基础。同时,本研究未考虑四君子汤中 4 味中药混合煎煮过程中可能发生的化学变化对药物成分造成的影响,也未考虑药物配伍中剂量选择、给药途径等因素,因此所得出的结果尚需进一步深入研究探讨。

[参考文献]

- [1] 田茸,巩子汉,杨晓轶,等. 四君子汤对脾气虚证大鼠脑肠 CaM/CaMK II 干预效应研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4075-4079.
- [2] 陈健. 复方四君子汤抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2012.
- [3] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用[J]. 中医研究, 2012, 25(1): 76-79.
- [4] 张海艳. 四君子汤对埃坡霉素 B 化疗的减毒作用及其化学成分研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [5] 张巍云,唐洪梅,柴玉娜,等. 四君子汤调节脾虚证神经-内分泌-免疫网络的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3219-3221.
- [6] 邱宏清,赵筱萍,李正,等. 基于网络药理学的五味子木脂素类主要药效作用研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 522-527.

- [7] 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.
- [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] 魏斌. 癍痕疙瘩发病机制初步探讨:siRNA 沉默成纤维细胞 PTGS2 基因表达的实验研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2008.
- [10] 赵玲. Ca^{2+} 介导红景天苷诱导骨髓间充质干细胞向神经元细胞定向分化的机制研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2015.
- [11] 周伟. 心血管疾病中医分型、治疗以及外源物毒性的系统药理学研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [12] 王鹏,李晋福,弓军胜,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 与肿瘤[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2016,10(20):3081-3084.
- [13] 梁荣,霍清萍. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 对动脉粥样硬化的作用及其中医药研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(17):2019-2021.
- [14] 张文旭,李文立. 过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ 的结构特征和生物学功能[J]. 动物营养学报,2012,24(9):1628-1635.
- [15] 蔡灵钰,王莉,俞春江. 过氧化物酶体增殖物受体 γ 激动剂对脑缺血再灌注损伤的保护机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2016,18(2):218-220.
- [16] 纪云飞,王瑞君,李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2016,47(5):837-843.
- [17] 吴艳梅,马贤德,韩晓伟,等. 四君子汤治疗脾虚证实验研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(10):67-70.
- [18] 陈云波. 应用液相蛋白芯片技术筛选治疗老年性痴呆方药初探[D]. 广州:广州中医药大学,2007.
- [19] 曹彬. 四君子汤对慢性心衰大鼠肝脏蛋白质组学的影响研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [20] 任燕,单迪. 四君子汤加减治疗喘证病案 2 则[J]. 中医药导报,2015,21(23):99.
- [21] 李婷,陈晓东. 哮喘病方剂用药配伍规律分析[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(3):439-440.
- [22] 赵慧朵. 四君子汤对乳腺癌术后患者细胞免疫功能的影响[D]. 南京:南京中医药大学,2008.
- [23] 周方,贾兹晓,唐永怡,等. 四君子汤治疗精神分裂症记忆损害的临床观察[J]. 首都医科大学学报,2008,29(4):428-430.
- [24] 乔治. 调理脾胃治疗晚期前列腺癌临床观察[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [25] 徐秋颖. 痛泻要方对 IBS 模型大鼠 FOS 蛋白的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2015.
- [26] 涂冬萍,马小军,莫长明,等. FOS 蛋白的研究进展及生物信息学分析[J]. 湖北农业科学,2015,54(7):1537-1542.
- [27] 李丕栋. 基于系统生物学的肝癌分子机制及护肝片治作用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [28] 苗知春,罗志勇. 雌激素受体信号转导的研究[J]. 生命的化学,2010,30(6):854-859.
- [29] 刘晓霞,翟耀耀,赵越. 雌激素受体 $ER\alpha$ 的功能调控及相关疾病的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(1):65-71.
- [30] 苗知春. 人参皂苷 Rh2 诱导 HL-60 细胞凋亡的信号转导机制[D]. 长沙:中南大学,2010.
- [31] 周琳. 人参皂苷 Rh2 诱导 HeLa 和 A549 细胞凋亡的信号转导机制[D]. 长沙:中南大学,2010.
- [32] 段永强. Ca^{2+} /CaM 信号通路在大鼠脾虚证躯体泛化效应中的响应及益气健脾中药干预研究[D]. 兰州:兰州大学,2014.
- [33] 李靖. 四君子汤对胃癌侧群细胞增殖及凋亡的影响[D]. 蚌埠:蚌埠医学院,2013.
- [34] 田黎,崔巍,孙红. 四君子汤含药血清抑制甲状腺癌侧群细胞生长的实验研究[J]. 新医学,2016,47(6):362-368.
- [35] 李斌,万丽丽,李颜,等. 四君子汤对结肠腺癌荷瘤小鼠癌性恶病质的影响[J]. 中医杂志,2014,55(18):1584-1587.
- [36] 徐玲,张学进,杨国良. 四君子汤对癌性恶病质小鼠血清细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(4):907-910.
- [37] 罗春蕾,钟慧,顾怡中,等. 四君子汤抑制移植性原发性肝癌小鼠肿瘤生长的实验研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(12):2857-2859.

[责任编辑 邹晓翠]