

## 基于网络药理学的半夏-橘红药对治疗代谢综合征的作用机制探析

于嘉祥, 王安娜, 郑一, 郭鹤, 姜楠, 杨宇峰\*, 石岩\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**[摘要]** 目的:通过网络药理学研究方法,研究二陈汤中君、臣药物半夏-橘红治疗代谢综合征的作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库检索半夏、橘红2味中药的有效成分,并用毒药物动力学(ADME)参数进行筛选,运用网络药理学在线数据库(TCMID),BATMAN-TCM, SymMap, TCM-MESH数据库并结合相关文献检索结果对TCMSP所获得的有效成分进行补充。利用TCMSP靶点预测模型预测药物可能的作用靶点。检索TTD, DRUGBANK, DisGeNET, CTD, GeneCards, OMIM, PharmGkb, 京都基因与基因组百科全书(KEGG), DiGSeE数据库,获取代谢综合征的疾病靶点,从GEO数据库下载并分析芯片GSE98895,筛选正常人和代谢综合征患者的差异基因,对代谢综合征的疾病靶点数据库进行补充。用Rstudio 3.6.2取得半夏、橘红药物靶点与代谢综合征疾病靶点的交集。将上述交集靶点导入Metascape数据库中,进行模块分析和整体GO生物过程,KEGG和Reactome通路分析。用cytohubba插件从交集靶点筛选出核心靶点,将核心基因导入BioGPS, Genecards数据库分析核心靶点的组织分布和亚细胞分布,用DisGeNET数据库对核心靶点进行蛋白归属。结果:共筛选出半夏、橘红34个有效成分,120个作用靶点,经Rstudio3.6.2取交集后,共得出115个靶点。Metascape模块分析和整体分析的结果基本一致,主要涉及神经活动配体-受体相互作用,钙离子,环磷酸鸟苷-通过蛋白激酶G(cGMP-PKG),胆碱能突触,甲状腺激素,胰岛素等生物过程。cytohubba插件筛选出17个靶点,涉及VEGFA, NOS3等17个关键基因。核心靶点的组织分布和亚细胞分布主要为淋巴母细胞, CD33<sup>+</sup> Myeloid细胞,杏仁体,松果体和细胞质基质,线粒体等。其主要的蛋白归属为信号分子、激酶、核酸。结论:半夏-橘红药对治疗代谢综合征通过血液循环,神经活动配体-受体相互作用, cGMP-PKG, 白细胞介素, 钙离子相关作用等复杂的生物过程和通路,说明中药治疗疾病是通过多成分、多靶点、多生物过程、多通路等多种途径实现的(从核心基因的组织分布、亚细胞分布、蛋白归属信息也可证明),证明了中医整体观念的优越性;二陈汤及其类方适合于治疗代谢综合征,也体现了中医“异病同治”这一法则不仅仅体现在理论层面上;网络药理学需要和实验验证相结合才能更有说服力。

**[关键词]** 半夏;橘红;药对;二陈汤;网络药理学;代谢综合征;核心靶点

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0118-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202015

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200730.1846.006.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-31 11:09

### Mechanism of Pinelliae Rhizoma-Citri Exocarpium Rubrum in Treatment of Metabolic Syndrome Based on Network Pharmacology

YU Jia-xiang, WANG An-na, ZHENG Yi, GUO He, JIANG Nan, YANG Yu-feng\*, SHI Yan\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**[Abstract]** **Objective:** By the method of network pharmacology, the mechanism of Pinelliae Rhizoma

**[收稿日期]** 20200220(002)

**[基金项目]** 辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目(XLYC1807145);沈阳市科学技术计划项目(18-013-0-82);辽宁省教育厅科学研究项目(L201711);国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB532004)

**[第一作者]** 于嘉祥,在读博士,医师,从事糖尿病及代谢综合征的中医基础与临床研究, E-mail: 780412976@qq.com

**[通信作者]** \*石岩,博士,博士生导师,主任医师,从事糖尿病及代谢综合征的中医基础与临床研究, E-mail: shiyan@lntucm.edu.cn;

\*杨宇峰,博士,副教授,硕士生导师,从事基于代谢组学的2型糖尿病不同中医证型的发病机制研究, E-mail: 294660209@qq.com

and Citri Exocarpium Rubrum in the treatment of metabolic syndrome was explored. **Method:** Effective components of Pinelliae Rhizoma and Citri Exocarpium Rubrum were retrieved by TCMSP database, and then selected by ADME parameters. TCMID, BATMAN-TCM, SymMap, TCM-MESH database were used to supplement effective components of TCMSP. TCMSP target prediction model was used to predict potential targets of drugs. DRUGBANK, DisGeNET, CTD, GeneCards, OMIM, PharmGkb, KEGG, DiGSeE databases were retrieved to obtain the targets of metabolic syndrome, and the chips were downloaded and analyzed through GEO database No.GSE98895 to screen out the differential genes of normal people and patients with metabolic syndrome, and supplement the target databases of metabolic syndrome. The intersections of Pinelliae Rhizoma-Citri Exocarpium Rubrum and metabolic syndrome disease targets were obtained by Rstudio 3.6.2. The above intersection targets were imported into the Metascape database for module analysis and overall GO (Biological Process), KEGG and Reactome pathway analysis. The core targets were selected from the intersection targets by using the cytohubba plug-in, the core genes were input into the database of BioGPS, Genecards to analyze the tissue distribution and subcellular distribution, and the core targets were assigned by using the database of DisGeNET. **Result:** A total of 34 active components and 120 targets of Pinelliae Rhizoma and Citri Exocarpium Rubrum were screened out, and 115 targets were obtained after the intersection of Rstudio 3.6.2. The results of Metascape module analysis and whole analysis were mostly the same, mainly involving the biological processes, such as ligand receptor interaction, calcium ion, cGMP-PKG, cholinergic synapse, thyroid hormone, insulin. The cytohubba plug-in was used to screen out 17 targets, involving 17 key genes, such as VEGFA and NOS3. The tissue and subcellular distribution of the core targets mainly included lymphoblasts, CD33<sup>+</sup> myeloid cells, amygdala, pineal and cytoplasmic matrix, mitochondria. The main proteins were signal molecules, kinases and nucleic acids. **Conclusion:** Pinelliae Rhizoma and Citri Exocarpium Rubrum could treat metabolic syndrome through complex biological processes and pathways, such as blood circulation, ligand receptor interaction of nerve activity, cGMP-PKG, interleukin-related action, calcium ion. This indicates that traditional Chinese medicine (TCM) treated diseases through multi-component, multi-target, multi biological processes, multi-channel and other ways (which is also proved by the distribution of core genes in the tissue, subcellular and protein ascription information), indicating the superiority of the holism concept of TCM. Erchetang and its similar prescriptions are suitable for treating metabolic syndrome, which also indicates that the principle of "treating different diseases with the same therapy" of TCM is not only reflected at the theoretical level; and network pharmacology needs to be further proved in the combination with experimental verification.

**[Key words]** Pinelliae Rhizoma; Citri Exocarpium Rubrum; couple medicines; Erchentang; network pharmacology; metabolic syndrome; core target

代谢综合征(metabolic syndrome, MetS)是一组聚集发病、严重影响机体健康的临床症候群,是一组在代谢上相互关联的危险因素的组合<sup>[1]</sup>,国际上目前普遍使用2002年美国NCEP-ATP III(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel Third Report)或2005年美国糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)制定的诊断标准<sup>[2-3]</sup>,中国参考了NCEP-ATP III, IDF的诊断标准并根据中国人群血脂异常主要表现,制定了符合中国人群的MetS的诊断标准:①腹型肥胖(腰围男性 $\geq 90$  cm, 女性 $\geq 85$  cm);②高血糖[空腹血糖 $\geq 6.1$  mmol·L<sup>-1</sup>或糖负荷后2 h血糖 $\geq 7.8$  mmol·L<sup>-1</sup>和

(或)已确诊为糖尿病并治疗者];③高血压[血压 $\geq 130/85$  mmHg(1 mmHg $\approx 0.133$  kPa)及(或)已被确认为高血压并治疗者];④空腹甘油三酯(TG) $\geq 1.70$  mmol·L<sup>-1</sup>;⑤空腹高密度脂蛋白(HDL-C) $< 1.04$  mmol·L<sup>-1</sup>,以上具备3项或更多项即可诊断<sup>[1]</sup>。虽然医学界公认胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是MetS发病的核心,但是相关文献表明,IR是由多种类型的组织细胞和信号通路共同作用的结果,难以用一种机制高度概括,肌肉及脂肪组织在IR的发生中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>,故常规的西医治疗(包括新型胰岛素、降糖药、代谢手术)有局限性,甚至会产生矛盾,如SHARMA等<sup>[6]</sup>发现,第一代 $\beta$ 受体阻滞

剂在控制血压时增加了糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病风险,并且可以增加IR,隐匿低血糖症状,导致猝死的发生。因此,现在急需挖掘凝练着中医药数千年的独特理论和临床经验的经典名方,用来弥补西医治疗MetS的局限性与矛盾。

笔者在临床观察中发现:符合MetS诊断标准的患者若服用二陈汤加减,其头目眩晕、舌苔白腻等中医症状明显改善,血压、血脂异常、胰岛功能等理化指标也会缓解。查阅相关文献后发现,二陈汤及其类方功效主要为化痰燥湿、理气健脾<sup>[7]</sup>,其治疗MetS的过程始终贯穿于MetS的痰浊瘀血这一病机关键,但是机制却不甚清楚。进入21世纪以来,生命科学、生物信息工程的发展,多学科间的交叉、渗透和融合,不断增长的数据库信息资源、分析工具和技术方法,为阐明中医药的科学内涵提供了新的助力和机遇<sup>[8]</sup>,开展中药网络药理学研究,可以从系统水平构建中药活性分子-靶标-疾病之间的关系,对中药靶点的发现、活性物质确定以及复杂作用机制研究无疑具有重要意义<sup>[9]</sup>。故本研究借助网络药理学技术,首先研究二陈汤中君臣药物半夏、橘红治疗MetS的作用机制,为该方的临床精准应用及科学内涵的阐释提供证据和支持,并为后续从二陈汤药物成分-通路预测-基础研究-临床研究精准阐释二陈汤治疗MetS建立牢固的基础,同时证明古人对半夏、橘红作为二陈汤君臣药物定位的正确性。本研究的创新点是在参照了同类相关文献的检索方法来丰富完善半夏、橘红的药物靶点和MetS疾病靶点的同时,采用生信数据挖掘技术对MetS的疾病靶点进行进一步的补充,进而提升了研究结果的精准性。

## 1 研究方法

**1.1 药物有效成分的收集与筛选** 检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)(<http://tcmssp.com/tcmsspsearch.php>),查询半夏、橘红2味中药所有有效成分,并按照ADME参数进行筛选,筛选标准为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%;药物相似性(drug-likeness, DL)≥0.18;检索TCMID(<http://www.megabionet.org/tcmid>), BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsd.org/batman-tcm>), SymMap(<https://www.symmap.org/>), TCM-MESH(<http://mesh.tcm.microbioinformatics.org>)数据库并结合相关文献检索结果对TCMSP所获得的有效成分进行补充。用PubChem数据库对符合筛选标准的有效成分的分子结构进行确认。利用TCMSP靶点预测

模型预测上述药物经筛选后有效成分可能的作用靶点。

## 1.2 疾病靶点的筛选

**1.2.1 数据库检索** 分别检索(1)TTD数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>), (2)DRUGBANK数据库(<https://www.drugbank.ca/>), (3)DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/home/>), (4)CTD数据库(<http://ctdbase.org/>), (5)GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>), (6)OMIM数据库(<http://www.omim.org/>), (7)PharmGkb数据库(<https://www.pharmgkb.org/>), (8)KEGG数据库(<http://www.kegg.jp/>), (9)DiGSeE数据库(<http://210.107.182.61/geneSearch/>),下载MetS的疾病靶点并进行名称标准化。

**1.2.2 从GEO数据库筛选差异基因** 从Gene Expression Omnibus数据库,简称GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载编号GSE98895的芯片数据原始文件,该芯片数据的原始文件主要是40位受试者的血液样本的基因表达谱的基因测序,这40人中,20人已被明确诊断为MetS,为实验组,20人完全健康,为对照组。利用Robust Multiarray Average(RMA)算法背景校正和矩阵数据归一化处理其原始文件,利用Limma包二次分析芯片数据,结合P和差异倍数(fold change, FC)进行相关数值的筛选,其中显著差异基因的筛选条件为P<0.01, FC>2。

将检索数据库得到的疾病靶点和从GEO数据库下载分析后得到的差异基因去除重复值,作为MetS的疾病靶点,用Rstudio 3.6.2将分别取得半夏、橘红药物靶点与MetS疾病靶点的交集,以做后续分析。

**1.3 单味药-成分-靶点网络构建** 将半夏、橘红单味药,有效成分的MOL号,药物和疾病交集靶点的Gene Symbol导入Cytoscape 3.6.1中,去除不相关的有效成分和靶点,构建“单味药-有效成分-靶点网络”图,其中网络图中节点(node)表示分子、靶蛋白,边(edge)表示成分与靶点之间的关系;利用Network Analyzer插件分析其网络特征,以明确半夏-橘红药对中起作用的药物成分、靶点及其相互作用关系。

**1.4 交集靶点网络分析** Metascape(<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)是由包括核心成员周颖耀,周斌, LARSPACHE, MAX CHANG, CHRISTOPHER BENNER 和 SUMIT

ChANDA 以及其他贡献者于 2015 年 12 月 9 日发布的数据库, 相比 DAVID, Metascape 内容丰富, 操作简单, 数据库更新快, 图表质量高, 故本研究应用 Metascape 数据库对半夏、橘红治疗 MetS 的靶点进行分分析。将上述交集靶点导入 Metascape 中, 设置 Species 为 H.sapiens, 保留蛋白相互作用 (BioGrid 数据库) 和模块分析的结果, 保留 GO 生物过程, Reactome 和 KEGG 通路分析的结果, 根据  $-\log P$  对分析结果进行排序, 保留排名靠前的结果, 将通路分析的结果用 KEGG 数据库绘制 pathway 通路图。

将上述交集靶点的 Gene Symbol 导入 STRING 数据库 (<https://stringdb.org/>), 设置物种为 Homo Sapiens, 获取蛋白之间相互作用的关系, 将上述结果导入 Cytoscape 3.6.1 中, 用 CytoHubba 插件将交集靶点的基因依据 MCC, MNC, Degree, EPC, Closeness, Radiality, Betweenness 值进行排序, 取每项排名前 30 的靶点, 然后用 Rstudio 3.6.2 取交集, 作为半夏、橘红治疗 MetS 的核心靶点。将上述核心靶点导入 BioGPS (<http://biogps.org>), GeneCards (网址同上), DisGeNET (网址同上) 数据库中获得组织分布、亚细胞分布和蛋白分类信息。

## 2 结果

**2.1 半夏、橘红药物作用靶点的获取** 检索 TCMSMP 数据库, 将半夏、橘红 2 味中药有效成分的检索结果经过 ADME 参数  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  进行筛选, 并补充文献检索和 TCMID, BATMAN-TCM, SymMap, TCM-MESH 数据库的补充检索结果, 共得到半夏-橘红药对有 34 个有效成分, 药物靶点去除重复值后, 共得到 120 个药物作用靶点。

**2.2 疾病靶点的获取** 以“Metabolic Syndrome”为关键词检索 TTD, DRUGBANK, DisGeNET, CTD, GeneCards, OMIM, PharmGkb, KEGG, DiGSeE 上述 9 个数据库, 获得 MetS 的疾病靶点 25 489 个。通过 GEO 芯片数据库的基因芯片的二次挖掘分析发现 63 个明显影响和改变的基因, 用 Rstudio 3.6.2 做出聚类热图和火山图。在聚类热图中, 横坐标 S1~S20 代表 20 位 MetS 受试者, 横坐标 S21~S40 代表 20 位完全健康受试者, 纵坐标代表 MetS 患者和完全健康受试者的差异基因, 图中红色代表显著上调, 绿色代表显著下调; 在火山图中, 横坐标代表差异基因差异倍数进行  $\log_2$  的转化的结果, 纵坐标代表对差异基因的  $P$  进行  $-\log_{10}$  的转化后的结果, 表达上调和下调的结果同聚类热图, 见图 1。将两部分检索结果用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进

行 Gene Symbol 名称标准化并去除重复值后, 共获得 MetS 的疾病靶点 25 520 个, 用 Rstudio 3.6.2 将半夏-橘红的药物作用靶点与 MetS 的疾病靶点取交集后, 共得出交集靶点 115 个, 为半夏-橘红药对治疗 MetS 的作用靶点, 用 Venny2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 做成韦恩图, 见图 2。

**2.3 单味药-成分-共有靶点网络构建** 将半夏、橘红 2 味中药, 34 个有效成分的 MOL 号, 115 个作用靶点的 Gene Symbol 导入 Cytoscape 3.6.1 中, 去除不相关的有效成分、靶点后, 并分别进行标识, 获取半夏、橘红药对治疗 MetS 的“单味药-有效成分-靶点网络”图, 共涉及 141 个节点和 517 条边, 节点表示单味药、有效成分、靶点, 边表示单味药、有效成分和靶点彼此之间的联系, 其中, 黄色菱形节点代表半夏、橘红单味药, 蓝色三角形节点代表半夏、橘红的有效成分的 MOL 号, 粉红色椭圆形节点代表半夏、橘红药对治疗 MetS 的作用靶点。见图 3。

**2.4 交集靶点的蛋白相互作用网络构建与模块分析** 将 Metascape 数据库 (网址同上) 的蛋白相互作用网络和模块分析结果进行保存, 蛋白相互作用网络中, 共涉及 101 个节点, 372 条边, 节点的大小表示度值 (degree) 的大小, 不同模块用不同的颜色来标示。模块分析结果中, 涉及 6 个模块, 43 个节点, 208 条边, 这些模块的靶点可能在半夏-橘红药对治疗 MetS 中发挥起重要的作用。见图 4。

将上述 6 个模块用 Metascape 数据库 (网址同上) 继续进行 GO 生物过程 (biological progress), KEGG 和 Reactome 通路分析, 并根据  $-\log P$  进行排序, 保留  $-\log P$  前 3 个生物过程, Reactome 和 KEGG 通路分析结果见表 1 (不足 3 个的结果空出)。

结果显示, 模块 1 的生物过程主要与细胞蛋白定位的调控、细胞对营养水平的反应等相关, 主要涉及肿瘤相关的通路和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 白细胞介素 (IL), 激活子蛋白-1 (AP-1) 家族转录因子的激活信号通路; 模块 2 的生物过程主要与磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号途径, G 蛋白偶联相关, 主要涉及神经活动配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction), 钙离子和胺配体结合受体 (amine ligand-binding receptors), G alpha (q) 等信号通路; 模块 3 的生物过程主要与血管舒张 (vasodilation), 有机氮化合物的细胞反应相关, 主要涉及钙离子、碳水化合物代谢等信号通路; 模块 4 的生物过程主要与对类固醇激素的反应、生殖过程等相关, 主要涉及神经活动配体-受体相互作用

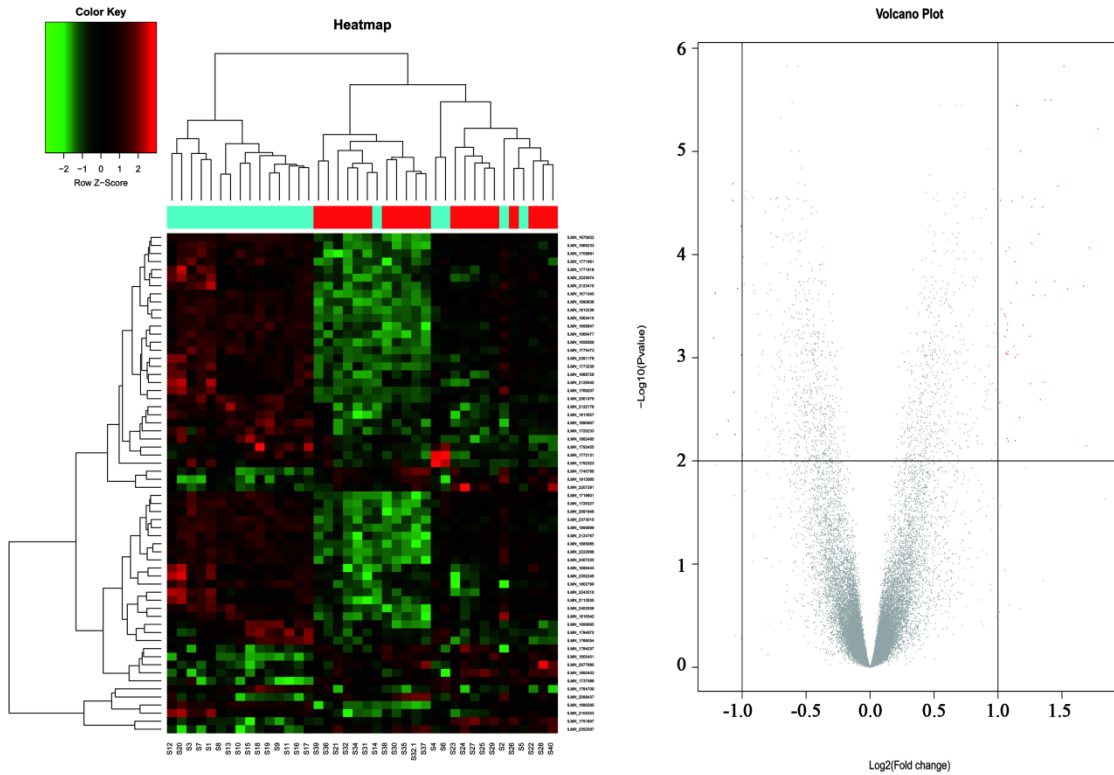


图1 经分析GSE98895芯片后获得正常人和MetS患者的差异基因

Fig. 1 Differential genes of normal people and MetS patients obtained by analyzing GSE98895 chip

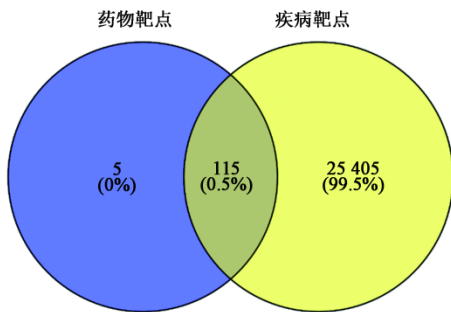


图2 半夏、橘红药物作用靶点与MetS疾病靶点相互取交集情况

Fig. 2 Intersection of action targets of Ternatum Thunb and Citri Exocarpium drugs and MetS disease targets

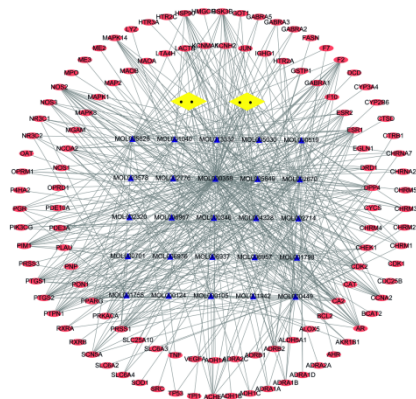


图3 半夏-橘红药对治疗MetS的单味药-成分-共有靶点网络

Fig. 3 Single drug component common target network of Ternatum Thunb and Citri Exocarpium for MetS treatment

用,催乳素和基因转录途径, RNA 聚合酶 II 转录等信号通路;模块5的生物过程主要与腺苷酸环化酶调节、抑制 G 蛋白偶联受体等反应相关,主要涉及 cGMP-PKG,胺配体结合受体等信号通路;模块6的生物过程主要与乙醇氧化相关,主要涉及第一阶段化合物的功能化 (phase I-functionalization of compounds),生物氧化信号通路。

2.5 共同作用靶点的 GO 生物过程, KEGG 和 Reactome 通路结果分析和用 KEGG 数据库绘制 pathway 通路图 将上述 115 个靶点用 Metascape 数据库 (网址同上) 进行 GO 生物过程 (biological progress) 和 Reactome, KEGG 通路分析, 根据  $-\lg P$  进行排序, 保留前 10 个 GO 生物过程, KEGG 和 Reactome 通路分析结果, 利用 Rstudio 3.6.2 和 Excel 2016 根据靶点数目,  $-\lg P$ , Gene Ratio 做出气泡图与条形图, 见图 5。结果显示, GO 生物过程主要与细胞对氮化合物和有机环状化合物的反应、血液循环、神经递质水平和膜电位调节、节律过程 (rhythmic process) 等相关; KEGG 通路分析主要涉及神经活动配体-受体相互作用, cGMP-PKG, 胆碱能突触 (cholinergic synapse), 5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse), 胰岛素, 钙离子, 甲状腺激素等信号通路; Reactome 通路分析主要涉及核受体转

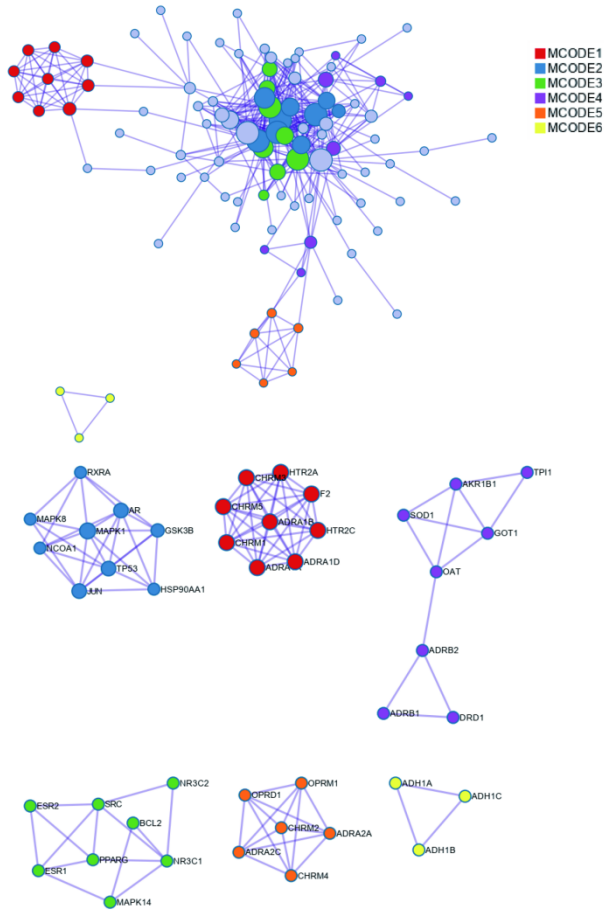


图4 半夏-橘红药对治疗MetS的共同作用靶点蛋白相互作用网络和模块分析

Fig. 4 Interaction network and module analysis of common target protein of Pinelliae Rhizoma-Citri Exocarpium Rubrum for MetS treatment

录途径,IL-4和IL-13信号,胺配体结合,毒蕈碱样乙酰胆碱(muscarinic acetylcholine receptors),ESR调节等受体和信号通路等等。上述所有过程在半夏-橘红药对治疗MetS中发挥了重要的作用。将神经活动配体-受体相互作用,钙离子,cGMP-PKG,胆碱能突触,甲状腺激素,胰岛素信号通路用KEGG数据库(网址同上)绘制 pathway 通路图,涉及到的交集靶点标红,见图6。

**2.6 核心基因的筛选** 将半夏、橘红药对治疗MetS的靶点经 cytoHubba 插件依据 MCC, MNC, degree, EPC, closeness, radiality, betweenness 值进行排序,并用 Rstudio 3.6.2 取交集后,共得到 17 个靶点,为半夏-橘红药对治疗 MetS 的核心作用靶点,见表 2。

**2.7 核心作用靶点的组织分布、亚细胞分布、蛋白归属** 将表 2 的 17 个核心作用靶点导入 Genecards 数据库(网址同上)获取各靶点亚细胞分布的信息,

保留 Confidence $\geq 5$  的分布信息,用 Cytoscape 3.6.1 绘制亚细胞-靶点网络,见图 7。图中蓝色节点代表经筛选后的关键基因,橘黄色节点代表亚细胞结构。分析结果显示,这些关键基因靶点更多分布在细胞核(nucleus, degree 12),细胞质基质(cytosol, degree 9),线粒体(mitochondrion, degree 6),细胞外液(extracellular, degree 6),细胞质膜(plasma membrane, degree 5),过氧化物酶体( Peroxisome, degree 2),内体(endosome, degree 2),细胞支架(cytoskeleton, degree 5)中,上述结果需要体外细胞实验进一步验证。

将表 2 的 17 个核心作用靶点导入 BioGPS 数据库(<http://biogps.org/#goto=welcome>),获取其组织分布信息,保留每个基因表达量前 5 位的组织。将组织分布信息导入 Cytoscape 3.6.1 中绘制组织-靶点网络图,图中节点大小代表度值大小,蓝色节点代表经筛选后的关键基因,橘黄色节点代表组织。分析结果显示,淋巴母细胞的度值等于 4, CD33<sup>+</sup> Myeloid 细胞、杏仁体、松果体、前列腺度值等于 3,在半夏-橘红药对治疗 MetS 的过程中发挥了重要的作用,也为后续进一步研究提供了方向。结果还显示, CD56<sup>+</sup> NK 细胞,前额叶脑皮层(prefrontal cortex),肺,肝,脂肪细胞等组织或细胞度值等于 2,也在半夏-橘红药对治疗 MetS 中发挥了相应的作用,上述结果需要临床病例和动物实验继续验证,以期提高网络药理学研究结果的说服力,主要采用 WB, PRM, 逆转录聚合酶链式反应(qPCR)技术验证核心作用靶点的表达量,并结合基础组学和临床组学研究方法,以代谢组学为主,主要分析半夏-橘红药对干预前后的差异性代谢产物及相关代谢通路等。见图 8。

将表 2 的 17 个核心作用靶点导入 DisGeNET 数据库(网址同上),获取蛋白归属信息,分析结果显示,经筛选后的靶点主要涉及信号分子(signaling molecule),激酶(kinase),核酸(nucleic acid),氧化还原酶(oxidoreductase),转录因子(transcription factor)等。见表 3。

### 3 讨论

陈娟<sup>[10]</sup>在山东省进行首次关于 MetS 与慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的横断面调查研究显示, MetS 患者的 CKD 发病率远高于非 MetS 患者,而其肾功能水平显著低于非 MetS 人群,这与 TOZAWA 等<sup>[11]</sup>在日本进行的横断面研究结果相同。另一项有关 MetS 和 CKD 的研究显示,由 MetS 引起

表 1 模块 1~6 的 GO 生物过程 (Biological Progress), Reactome 和 KEGG 通路分析结果 (不足 3 个的结果空出)

Table 1 Analysis results of Go Biological Progress, reaction and KEGG pathway of modules 1-6(less than 3 results are available)

模块	GO 生物过程(靶点数目/个)	KEGG 通路(靶点数目/个)	Reactome 通路(靶点数目/个)
1	regulation of cellular protein localization(6) cellular response to nutrient levels(5) rhythmic process(5)	pathways in cancer(8) colorectal cancer(5) prostate cancer(5)	MAPK targets/Nuclear events mediated by MAP kinases(4) signaling by Interleukins(8) activation of the AP-1 family of transcription factors(3)
2	G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger(8) phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway(6) G protein-coupled serotonin receptor signaling pathway(5)	neuroactive ligand-receptor interaction(9) calcium signaling pathway(8) salivary secretion(4)	amine ligand-binding receptors(8) G alpha(q) signalling events(9) class A/1(rhodopsin-like receptors)(9)
3	vasodilation(4) alditol metabolic process(3) cellular response to organonitrogen compound(5)	calcium signaling pathway(3)	Metabolism of carbohydrates(4) adrenoceptors(2) detoxification of reactive oxygen species(2)
4	response to steroid hormone(7) reproductive structure development(3) ovarian follicle development(5)	endocrine resistance(5) prolactin signaling pathway(4) fluid shear stress and atherosclerosis(3)	generic transcription pathway(21) RNA polymerase II transcription(21) gene expression (transcription)(21)
5	adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway(6) adenylate cyclase-inhibiting G protein-coupled receptor signaling pathway(5) adenylate cyclase-inhibiting G protein-coupled acetylcholine receptor signaling pathway(3)	neuroactive ligand-receptor interaction(6) cGMP-PKG signaling pathway(3)	G alpha(i) signalling events(7) amine ligand-binding receptors(6) class A/1(rhodopsin-like receptors)(4)
6	ethanol oxidation(3)	tyrosine metabolism(3)	ethanol oxidation(3) phase I-functionalization of compounds(3) biological oxidations(3)

的 IR 是导致 CKD 的最主要原因,而众所周知,无论 MetS 和 CKD,都会增加动脉硬化性心血管疾病(arteriosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 的发生率,但是 MetS 与 CKD 是否互为因果,学术界仍有争议。MetS 对患者的影响不仅局限于 CKD,而是多方面的,涉及到人体多个组织和器官,降低了患者的生活质量,增加了社会的经济负担。尽管生活干预方式可以预防或者延缓 MetS 和其相关并发症,然而这并不会起到“中流砥柱”的作用;前文也提到,西医的常规治疗费用昂贵,且有局限性,因此从中医角度研究治疗 MetS,改善患者的相关临床症状,延缓并发症,能为临床治疗提供更多的选择<sup>[12]</sup>。但是中药方剂治疗 MetS 要想得到国际上广泛的认可,需要更可靠的科学和循证医学证据证明,可以将中医、中药相关理论与分子生物学、网络药理学

相结合。分子生物学在中医药的研究已经被广泛应用,网络药理学在进行分析时因各种因素会产生部分药物有效成分、疾病靶点的缺失,但是随着数据库的不断更新,研究方法的改进,已经逐渐得到认可<sup>[13]</sup>。

本研究发现, MetS 的疾病靶点在去除了重复值后多达 25 520 个,说明了文献等的研究结果的正确性<sup>[4-5]</sup>,也说明了中医“整体观念”这一理论无与伦比的优越性和西医“器官思维”的局限性,虽然西医近些年来也逐渐提倡“整体思维”。半夏、橘红 2 味药物的作用靶点与 MetS 的疾病靶点取交集后达 115 个,这 115 个靶点为半夏、橘红药对治疗 MetS 的作用靶点。

通过参考 Metascape 对半夏-橘红药对治疗 MetS 的作用靶点进行 GO 生物过程, KEGG 和

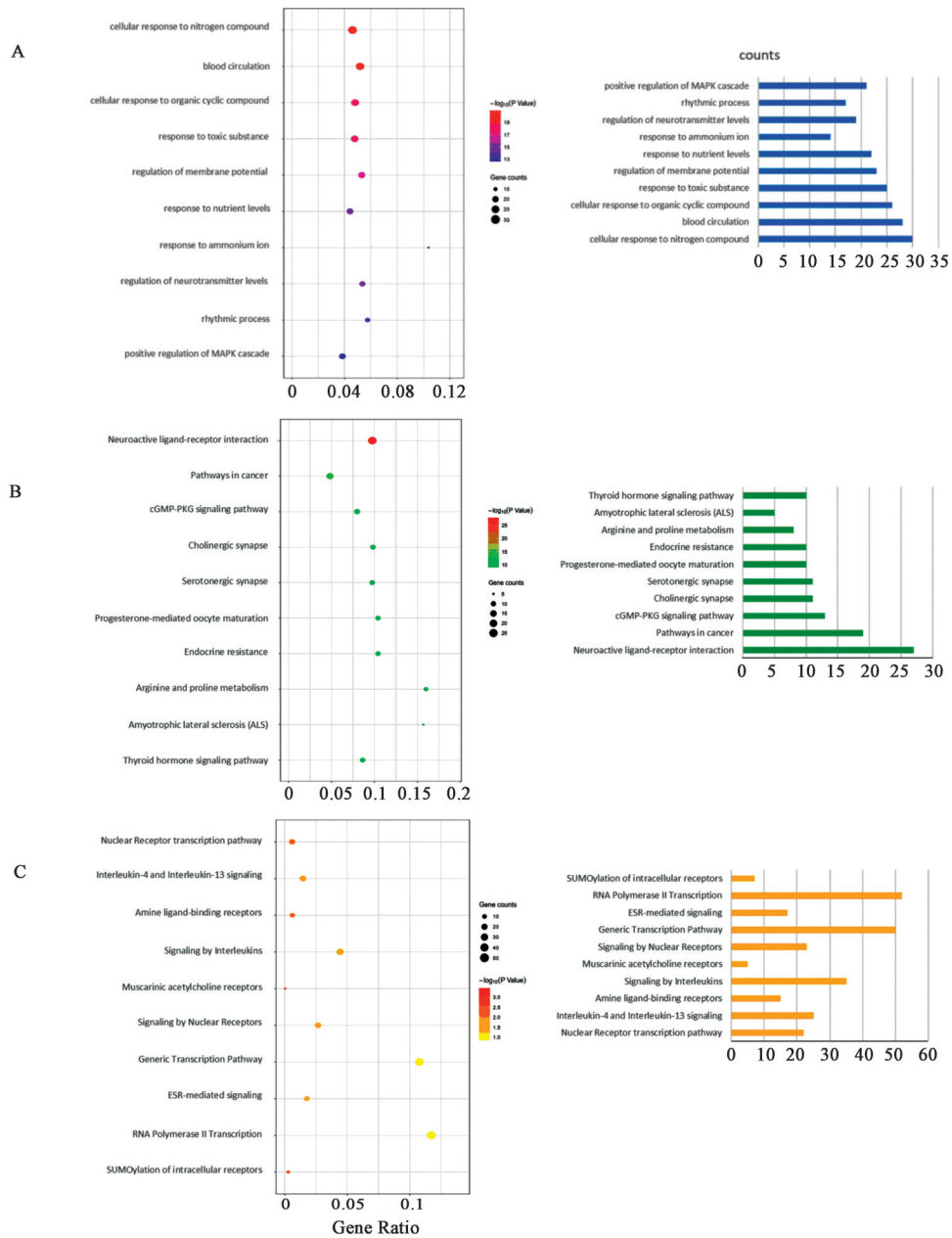


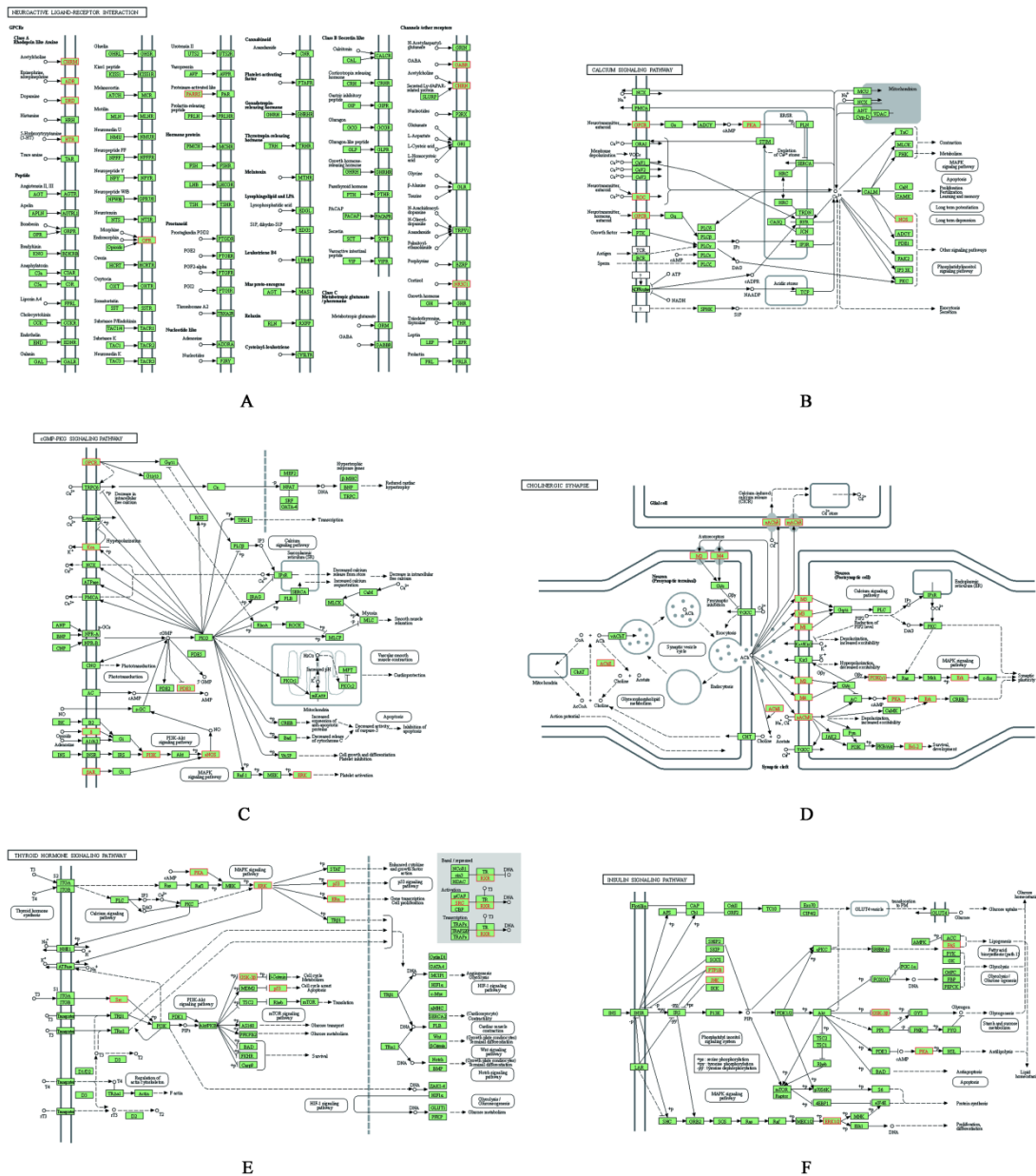
图 5 半夏、橘红治疗 MetS 交集靶点的整体 GO 生物过程(A), KEGG(B), Reactome (C) 通路分析结果

Fig. 5 Analysis results of whole Go Biological Process(A), KEGG(B), and Reactome (C) pathway of Pinelliae Rhizoma and Citri Exocarpium Rubrum treatment MetS intersection target

Reactome 通路分析结果和通路图, 笔者发现模块分析的结果和整体分析的结果基本一致, 说明了神经活动配体-受体相互作用, 钙离子, cGMP-PKG, 胆碱能突触, 甲状腺激素, 胰岛素等信号通路是半夏-橘红药对治疗 MetS 重要通路, 其中神经活动配体-受体相互作用信号通路参与了心肌保护 (cardioprotection), 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的病理生理过程<sup>[14-15]</sup>, 钙离子是细胞内普遍存在的信号调节分子, 几乎参与了生命活动的每一个部分, cGMP-PKG 在 NO 介导的血管平滑肌舒张起

着重要作用, 具有类似硝酸酯类药物的功效<sup>[16-17]</sup>, 甲状腺激素相关理化检测指标 (FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, FT<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>) 与 MetS 相关代谢指标的变化有相关性<sup>[18]</sup>。同时发现经 cytohubba 插件筛选后的 17 个核心基因或多或少的分布在上述通路中, 说明这 17 个基因为半夏、橘红药对治疗 MetS 的核心基因, 其中, VEGFA 被认为与血管生成的关系最为密切<sup>[19-20]</sup>, NOS3 被认为与 MetS 的诊断条件之一, T2DM 的生理病理过程关系密切<sup>[21]</sup>, 和 IR 也有一定的相关性<sup>[22]</sup>。

根据 17 个核心作用靶点导入 BioGPS,



A. 神经活动配体-受体相互作用; B. 钙离子; C. cGMP-PKG; D. 胆碱能突触; E. 甲状腺激素; F. 胰岛素

图6 神经活动配体-受体相互作用, 钙离子, cGMP-PKG, 胆碱能突触, 甲状腺激素, 胰岛素 pathway 通路

Fig. 6 Pathway map of ligand receptor interaction, calcium ion, cGMP PKG, cholinergic synapse, thyroid hormone and insulin

Genecards数据库后获取的组织分布信息和亚细胞分布信息也从另一个角度说明了MetS的整体发病与治疗机制的复杂性。故我们需要在现有研究的基础之上,有规划的不断研究这些机制,尤其要发挥中医药和多学科交叉结合的优势,阐释好中医这一“古老的语言”并发现新的成果,提高MetS患者的生活质量。后续实验将继续研究二陈汤治疗MetS的作用机制,首先通过网络药理学研究二陈汤中其他4味药物和二陈汤整体组方治疗MetS的作用机制(用GSEA进行富集分析);其次,进行动物实验,用(WB+PRM+qPCR)技术对相关治疗作用靶点蛋

白进行验证;最后,运用蛋白质组学、代谢组学、脂质组学技术联合当前科研热点(非编码RNA,细胞自噬,外泌体等)设计动物和临床试验继续研究二陈汤单味药、关键药对、整体组方治疗MetS的作用机制,最终从二陈汤药物成分-通路预测-基础研究-临床研究精准阐释二陈汤治疗MetS的机制,推广二陈汤在临床上的应用,并为经典名方的研究提供借鉴和思路。

#### 4 结论

本研究采用网络药理学的方法系统研究了二陈汤中君臣药物半夏、橘红药治疗MetS的机制,得



[参考文献]

- [1] 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [2] GOODMAN D W S, HULLEY S B, CLARK L T, et al. NCEP expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). final report[J]. *Circulation*, 2002, 106: 3143-3421.
- [3] ZIMMET P P, ALBERTI K G M M, RIOS S M. A new international diabetes federation (IDF) worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results[J]. *Revista Espa de Cardiologia*, 2005, 58(12): 1371-1376.
- [4] JUSTIN I. ODEGAARD, A C. The immune system as a sensor of the metabolic state[J]. *Immunity*, 2013, 38(4): 644-654.
- [5] SAMUEL V T, SHULMAN G I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(1): 12-22.
- [6] SHARMA V, M C NEILL J H. Parallel effects of beta-adrenoceptor block-ade on cardiac function and fatty acid oxidation in the diabetic heart: Confronting the maze[J]. *World J Cardio*, 2011, 3(9): 281-302.
- [7] 李威, 景龙, 邢斌, 等. 二陈汤类方用药规律探析[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(7): 445-447.
- [8] 中医药创新发展规划纲要(2006—2020年)(节选)[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(5): 471.
- [9] 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.
- [10] 陈娟. 代谢综合征与慢性肾脏病的关系及相关肾脏病理分析[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [11] TOZAWA M, ISEKI C, TOKASHIKI K, et al. Metabolic syndrome and risk of developing chronic kidney disease in Japanese adults [J]. *Hypertension Res*, 2007, 30(10): 937-943.
- [12] RAMESH P G V. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions[J]. *World J Nephrol*, 2014, 3(4): 210-219.
- [13] 范晓辉, 程翼宇, 张伯礼. 网络方剂学: 方剂现代研究的新策略[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 1-6.
- [14] WANG J Q, CHENG J, ZHANG C, et al. Cardioprotection effects of sevoflurane by regulating the pathway of neuroactive ligand-receptor interaction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery [J]. *Comput Mathemat Methods Med*, 2017, 2017: 1-7.
- [15] KONG Y, LIANG X, LIU L, et al. High throughput sequencing identifies microRNAs mediating  $\alpha$ -synuclein toxicity by targeting neuroactive-ligand receptor interaction pathway in early stage of drosophila Parkinson's disease model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137432.
- [16] PALMI M, MEINI A. Role of the nitric oxide/cyclic GMP/ $Ca^{2+}$  signaling pathway in the pyrogenic effect of interleukin-1beta [J]. *Mol Neurobiol*, 2002, 25(2): 133-147.
- [17] VANDAELE DH, MAHAPATRA S, CALORIO C, et al. Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(7): 1608-1618.
- [18] 蔡婧. 甲状腺功能与代谢综合征及甲功相关基因多态性的关联性研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [19] TISCHER E, MITCHELL R, HARTMAN T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing [J]. *Biol Chem*, 1991, 266(18): 11947-11954.
- [20] CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*, 1996, 380(6573): 435-439.
- [21] BRESSLER J, PANKOW J S, CORESH J, et al. Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79466.
- [22] CLAPAUCH R, ANDRÉ F M, MECENAS A S, et al. Endothelial function and insulin resistance in early postmenopausal women with cardiovascular risk factors: importance of ESR1 and NOS3 polymorphisms [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103444.

[责任编辑 顾雪竹]