

# 治疗类风湿关节炎中药方剂作用原理的 网络药理学研究策略

李健<sup>1</sup>, 郭洪涛<sup>2</sup>, 牛旭艳<sup>2</sup>, 李立<sup>2</sup>, 刘春芳<sup>3</sup>, 林娜<sup>3\*</sup>, 吕爱平<sup>2\*</sup>

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 方剂是中医临床用药的主要形式, 是中医整体观和辨证论治思想的集中体现。长期以来, 方剂作用原理的研究既是学术界的热点也是难点。近年来, 基于组学技术及计算机模拟计算方法的网络药理学被广泛应用于中药药理、方剂配伍的科学内涵、中药药性与疗效等领域的研究中并产生了许多有价值的研究成果。本文概述了类风湿关节炎寒、热证候相关的疾病网络的构建方法, 证候关联中药组方规律的文本挖掘方法以及方证对应的生物靶点网络的构建方法。初步探讨了基于证候动物模型的组学信息构建“病-证”动物表型网络及基于寒性、热性方剂对应的化合物信息构建药物靶标网络的网络药理学思路。提出应用网络药理学的方法研究类风湿关节炎寒、热证候相关疾病网络特点及寒性、热性方剂作用原理的新策略。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 方剂; 网络药理学

**[中图分类号]** R222.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0267-04

## The Novel Paradigm of Network Pharmacology to Explore the Principle of Traditional Chinese Medicine for Treatment of Rheumatoid Arthritis

LI Jian<sup>1</sup>, GUO Hong-tao<sup>2</sup>, NIU Xu-yan<sup>2</sup>, LI Li<sup>2</sup>, LIU Chun-fang<sup>3</sup>, LIN Na<sup>3\*</sup>, LV Ai-ping<sup>2\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
3. Institute of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** Herbal formula, as the basic therapeutic form of traditional Chinese medicine (TCM) practice, is used under the guidance of syndrome (also called pattern or Zheng) differentiation based on TCM holistic view. Understanding the principle of herbal formulae is not only one of great dilemmas in current studies but also one of highlight on TCM. Based on previous *omics* methods and in silicon techniques, network pharmacology was used to explore TCM pharmacology, compounds combination, herbal property and efficacy, and so on. In present review, we outlined some proper strategies to construct TCM cold or hot syndrome related rheumatoid arthritis disease network, to set herbal formulae related biological targets network, to verify the TCM syndrome based rheumatoid arthritis disease network, and further to clarify the basis of material and the principle of herbal formulae. Hopefully, the novel paradigm and applications in the review could provide reference for the coming TCM network pharmacology.

**[Key words]** rheumatoid arthritis; formulae of Chinese medicine; network pharmacology

**[收稿日期]** 2012-06-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30825047, 90709007); 科技部重大新药创制项目(2009zx09502-019)

**[第一作者]** 李健, 博士, 副教授, 从事中药药理及毒理研究, Tel: 010-64286762, E-mail: lijiancn922@126.com

**[通讯作者]** \* 林娜, 博士, 研究员, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com;

\* 吕爱平, 博士, 研究员, Tel: 010-64014411-2343, E-mail: lap64067611@126.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜慢性炎症、关节进行性破坏为特征的多系统炎症性自身免疫性疾病。RA 发病率高, 世界范围内发病率 1% ~ 2%, 而且呈上升趋势。该病具有高致残率, 严重威胁人类健康, 属世界性、难治性重大疾病之一<sup>[1]</sup>。随着医学模式的改变, 中医药在治疗 RA 中的疗效越来越受关注, 其药理机制的研究也成为热点<sup>[2]</sup>。

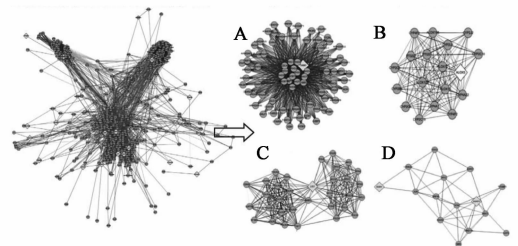
方剂是中医临床用药的主要形式, 是中医整体观和辨证论治思想的集中体现。长期以来, 中药方剂因复杂性、配伍及功能主治的多样性等特点, 给药理机制的研究带来巨大困难。如何用科学的语言诠释中药方剂作用原理, 一直是重大科学命题和研究热点。传统的中药药理学研究思路多采用化学组分分离、活性成分筛选以及“单疾病-单基因-单靶点”的“线性”模式<sup>[3]</sup>, 尽管在一定程度上能够解释中药方剂的部分药效物质基础及作用机制, 但由于中药方剂的多组分协同、多靶标作用等特点, 很难全面阐释中药方剂的物质基础及作用原理, 因而需要引进一种适合中药方剂作用特点的新的研究策略。

随着组学 (omics) 技术的发展完善, 系统生物学 (system biology) 及多向药理学 (poly-pharmacology) 的方法相互融合, 形成了新药发现、新药创制及药理、毒理机制研究的新学科, 即网络药理学 (network pharmacology)。网络药理学的概念由 Andrew L. Hopkins 于 2007 年首次系统阐述, 是一种建立在高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索基础上的新药发现、药物药效及作用机制研究的研究方法<sup>[4-5]</sup>。网络药理学的学术观点主要包括: 生命体系具有高度的自稳定功能, 其结构基础是分子相互作用的复杂生物网络<sup>[6]</sup>。疾病状态对应多基因、多功能蛋白质相互作用紊乱而形成的疾病网络<sup>[7]</sup>。干预疾病网络中的一个或几个节点对整个疾病网络几乎没有影响<sup>[8]</sup>, 而药物 (即使是单一化合物) 的生物学作用亦对应相应的复杂分子网络, 而非单一靶点<sup>[9]</sup>。上述观点与中药方剂注重多组分配伍、多靶点及系统调控的思想有许多相似点, 因而迅速被应用于中药药效、药理机制、方剂配伍的科学内涵、中药药性与疗效的相关性及中药产品的安全性评价等相关领域的研究中<sup>[10-14]</sup>。本文结合课题组前期的研究成果, 概述基于寒热证候的 RA 疾病网络构建、证候关联的治疗 RA 中药组方规律挖掘及中药方剂药物靶点网络构建的主要方法, 初步探讨基于网络药理学方法研究方剂作用原理的策

略及可行性。

## 1 基于寒热证候分类的 RA 疾病网络构建与网络分析

已有的研究发现, 相同的治疗药物 (甲氨喋呤与柳氮磺胺吡啶联用) 对寒证 RA 患者的临床疗效显著高于热证 RA 患者, 提示患者间存在个体差异 (中医理解为不同证候), 对相同的药物作用存在不同的应答模式<sup>[15]</sup>。寒、热证 RA 患者与健康人外周血 CD4 T 淋巴细胞全基因组差异分析结果表明, 寒、热证 RA 分别对应不同的基因表达轮廓<sup>[16]</sup>。全基因组学数据经标准化处理、统计分析后抽取特异性表达基因 (> 1.2 fold), 综合 BIND (<http://www.isc.org>), BioGRID (<http://thebiogrid.org>), DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu>), HPRD (<http://www.bits.vib.be>), MINT (<http://linuxmint.com>) 等数据库信息及来自文本挖掘的数据, 初步构建了 RA 寒热证候相关的蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI network)。对 PPI 网络节点及功能模块做进一步解析, 可抽取 4 个高连接簇形成的亚生物网络 (sub-networks) 并预测到多个可能的生物标志物及相应的信号通路, 如图 1。



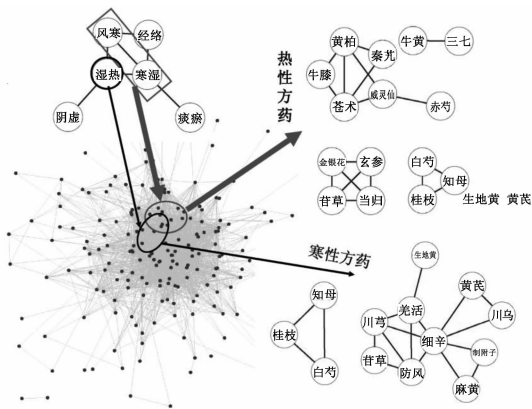
基于典型寒热证 RA 患者外周血 CD4 T 淋巴细胞全基因组数据构建生物学网络, 经网络功能模块分析, 获取种子基因及相关的 4 个高连接区亚生物网络<sup>[17]</sup>

图 1 寒热证候关联的 RA 疾病“蛋白质-蛋白质相互作用”网络

## 2 基于文本挖掘方法的 RA“方-证”关联网络构建及核心组方发现

为探明治疗 RA 有效方剂的组方及配伍规律, 笔者对 RA 相关的中医证候要素及用药规律进行定向挖掘, 构建“方-证”关联网络。方法概述如下: 在中国生物医学文献数据库 (Chinese BioMedical Literature Database, CBM, <http://sinomed.cintcm.ac.cn/index.jsp>) 中以缺省状态下检索“类风湿性关节炎 or 类风湿关节炎”, 共得到文献 14 435 篇 (检索日期: 2011 年 10 月 19 日), 依次下载所有文献并保存。将收集来的数据, 按照下载的先后顺序, 整合到一个平面文件 (后缀 txt) 里面, 以 ANSI 编码格式保

存。然后,利用专有的文本提取工具(软件著作权,软著登字第 0261882 号,登记号 2010SR073409),对下载的非结构化的 TXT 文本数据进行信息提取,保存成格式化的、便于大型关系型数据库(Microsoft SQL Server,以下简称 SQL)处理的格式,然后导入 SQL 中进行下一步的挖掘分析。假设每一篇文章的贡献度相同,一篇文章中重复出现的关键词,只需要计算一次,据此构建算法进行数据清洗工作。清洗完毕后的数据,进行可视化呈现。抽出不同频次的关键词对,用 Cytoscape 工具进行可视化处理,形成可视化的网络图,然后结合专业知识进行解析,一旦发现不合理的结果,反查原文献,如果是噪音,仍按算法进行噪音清洗,直到噪音降到满意为止。最后的结果可视化成图,结合专业知识进行解析。以 RA 为例,通过上述方法以“寒”、“热”为关键词可以定向挖掘出寒证 RA 对应的方药规律,如麻黄附子细辛汤、乌头汤及桂枝芍药知母汤;以及热证 RA 对应的方药规律,如乌头汤、麻黄附子细辛汤及桂枝芍药知母汤,如图 2。



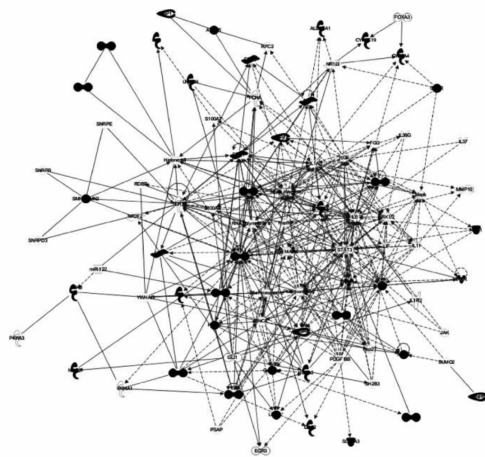
基于 RA“方-证”证对应关系,采用文本挖掘方法构建中药饮片网络,进而用定向挖掘技术抽取与寒、热证相对应的热性及寒性方剂组方规律

图 2 基于文本挖掘技术的 RA“方-证”对应的中药饮片网络及方药规律

### 3 基于 PubChem 和 IPA 分析技术的方剂生物学网络构建与靶标预测

依据 RA“方-证”关联网络的分析结果,笔者以寒热证 RA 的核心组方(桂枝、芍药、知母)为研究对象,构建了方剂生物学网络。方法概要如下:通过现有的知识库分别检索桂枝、芍药、知母中所含的活性物质(生物碱、苷类、挥发油、鞣质、糖类、氨基酸、蛋白质、酶、油脂、蜡、色素和无机成分),进而利用 PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)在线检索数据库,对每味中药的有效成分进行查找,确定

各化合物所对应的人类靶蛋白信息(蛋白名称及 GI 号)。进而合并,将方剂对应的靶蛋白数据集输入 IPA 网络分析软件(<http://apps.ingenuity.com>)构建方剂生物学网络,如图 3。基于已构建的方剂生物学网络及证候相关 RA 疾病网络,采用相关数学模型和算法,如二分图模型的预测算法(PABGVM)<sup>[18]</sup>、drug CIPHER<sup>[19]</sup>、网络节点间最短路径计算、节点中心性分析、最大节点流量路径搜索、节点重要性排序、网络比较分析、网络功能模块识别等预测方剂可能影响的靶标谱。通过靶标谱的变化,一方面能推测方剂中发挥调节作用的有效组分群,发现具有协同或拮抗作用的化合物组合;另一方面,通过靶点网络的动态变化可探查方剂的药效、药理或毒理作用的分子机制,发现方剂对应的网络靶标。



基于 PubChem 和 IPA 分析技术构建方剂生物学靶点网络,网络中实心的节点表示方剂作用的潜在靶蛋白,实线表示 2 个分子间存在直接的相互作用,虚线表示 2 个分子间存在间接的相互作用关系

图 3 “桂枝、芍药、知母”对应的生物学靶点网络

### 4 基于寒热证 RA 动物模型的寒性、热性方剂作用机制的“湿法”研究

依托已有网络生物信息数据库及计算机模拟计算技术的网络药理学方法本质是一种药物发现、药物生物学效应虚拟预测的研究体系,俗称“干法”实验。干法实验获得的预测结果还需要用真实的生物学实验(“湿法”实验)进行验证。“湿法”研究的基本思路大致可分为 3 个部分。

**4.1 寒热证 RA 模型动物内源性代谢物表型网络的构建** 以正常动物及单纯关节炎动物为参照,采用代谢组学技术,检测寒证 RA 动物及热证 RA 动物体液(血、尿)中小分子内源性代谢产物的轮廓变化,以代谢组学信息构建寒热证 RA 表型网络。进

# 中西医结合治疗黄体功能不足致不孕症

陈芳\*, 韩璐

(新疆医科大学附属中医医院妇科, 乌鲁木齐 830000)

**[摘要]** 目的: 中西医结合方法治疗黄体功能不足所致不孕症临床疗效观察。方法: 收治门诊因黄体功能不足所致不孕症患者 76 例, 随机分为对照组(30 例)和观察组(46 例), 对照组患者口服地屈孕酮进行治疗, 观察组在此基础上辨证服用中药。比较两组患者治疗后排卵期基础体温(BBT)上升天数; B 超监测两组患者卵泡发育情况; 采用酶联免疫法(ELISA)检测患者血清孕酮(P)水平; 调查患者 2 年内受孕生育情况, 判断两组患者治疗效果。结果: 观察组治疗后 BBT 上升天数大于对照组( $P < 0.05$ ); 观察组卵泡 16~20 mm 者有 37 例(80.4%), 明显高于对照组 17 例(56.7%)( $P < 0.01$ ); 治疗后观察组患者孕酮高于对照组( $P < 0.05$ )。观察组痊愈 35 例(76.1%), 痊愈患者全部妊娠 12 周成功并足月生产, 有效 10 例(21.7%), 无效 1 例(2.2%), 总有效率 97.8%; 对照组痊愈 16 例(53.3%), 痊愈者中 14 例足月生产, 1 例早产, 1 例流产。对照组有效 7 例(23.3%), 无效 7 例(23.3%), 总有效率 76.7%, 两组比较差异有明显统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论: 地屈孕酮联合中药的辨证治疗黄体功能不足所致不孕症效果好。

**[关键词]** 黄体功能不足; 不孕; 地屈孕酮; 辨证施治

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0270-03

黄体功能不足(luteal phase defect, LPD)包括黄体期缺陷和黄体期缩短, 可引起分泌期子宫内膜发育不良而影响孕卵着床, 或虽着床而极早期流产即隐匿妊娠, 其发生率在不孕人群约占 5%~10%<sup>[1]</sup>。

目前, 西医多采用黄体增补或绒毛膜促性腺激素及对因治疗, 效果不够理想; 中医认为黄体功能不全的病理变化主要与肾虚有密切关系, 排卵后肾精充足, 肾阳旺盛是维持黄体功能正常的关键<sup>[2]</sup>, 中医主要

**[收稿日期]** 20111218(009)

**[通讯作者]** \* 陈芳, 主治医师, 从事不孕症、生殖内分泌及月经病的研究, Tel: 13669687315, E-mail: chenfangzx@163.com

而通过网络比较, 获取寒热证各自对应的网络特征, 并将其差异特征映射到蛋白网络及基因网络, 预测寒热证相关的生物标志物及网络靶标。

**4.2 寒性、热性方剂对寒、热证 RA 模型动物表型网络的扰动作用** 设计不同实验组, 即: 寒性方剂-热证 RA 组; 热性方剂-寒证 RA 组; 寒性方剂-寒证 RA 组; 热性方剂-热证 RA 组; 寒性方剂-单纯 RA 组; 热性方剂-单纯 RA 组; 寒性方剂-正常对照组; 热性方剂-正常对照组。通过比较各组间代谢轮廓及网络模式的差异, 分析寒、热性方剂对相应生物标志物或网络靶标的扰动作用。

**4.3 方剂活性组分的药物靶标网络构建** 对选定方剂所包含的活性组分导入 PubChem 进行网络检索、获取活性靶蛋白信息, 再导入 IPA 软件构建方剂活性组分对应的靶标网络。将该靶标网络与寒热性药物对应的生物标志物及靶标进行比对(overlap 或 matching), 明确方剂作用的组分群或组合。通过上述自上而下和自下而上的研究, 相互补充、相互佐证, 阐明“病证”涉及的生物网络变化特点, 方剂作

用的物质基础及作用机制。

## 5 小结与展望

综上, 中药方剂对机体疾病状态的改善作用因证候不同而呈现一定差异, 不同“病证”状态对应不同的生物学网络。通过模式识别技术, 不仅可以预测方剂作用的网络靶标, 也可以通过网络分析技术解析网络拓扑关系, 阐释方剂的配伍规律, 揭示方剂对“病证”网络的干预效应、干预模式及方剂组分间的相互作用规律。

诚然, 用网络药理学方法研究方剂作用原理的思路和方法尚处于探索阶段, 有很多基础性工作有待进一步开展, 也需要更多的实证性实验结果来验证其思路和方法的科学性。但毫无疑问, 网络药理学方法引入方剂作用原理的研究与中药方剂作用的复杂性、整体性等特征有很大契合度, 可以更经济、更高效、更准确的阐释中药方剂的作用原理, 有着广阔的应用前景。

[责任编辑 古云侠]