

· 数据挖掘 ·

# 基于网络药理学探讨五苓散治疗类风湿关节炎的作用机制

钱凯<sup>1</sup>, 杜彦仪<sup>1</sup>, 韩隆胤<sup>1</sup>, 魏赓权<sup>1</sup>, 黄文广<sup>1</sup>, 曾丽盈<sup>1</sup>, 许舒迪<sup>1</sup>, 刘敏莹<sup>2</sup>, 林昌松<sup>2\*</sup>  
(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:** 采用网络药理学的方法,对五苓散(WLS)治疗类风湿关节炎(RA)的作用机制进行研究探讨。**方法:** 通过在中药系统药理学数据库(TCMSP)平台对五苓散进行活性成分筛选、在 DragBank 数据库进行靶点预测,应用 Cytoscape 3.2.1 软件构建成分-靶点网络;在 TTD, DrugBank 及 DisGenet 数据库中进行检索,获取疾病靶点;构建韦恩图,得到五苓散治疗 RA 的作用靶点;并进行基因本体(GO)功能注释和东京基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;构建五苓散中药-成分-靶点-信号通路网络,使用 Network Analyzer 进行网络特征分析。**结果:** 研究显示共挖掘到五苓散中 52 种成分及 297 个潜在靶点,RA 疾病 1 845 个相关靶点,得到五苓散-疾病共同靶点 49 个,共同作用靶点主要富集于 322 个生物过程和 31 条信号通路上。**结论:** 五苓散可能是通过调节前列腺素内环氧化物合成酶 2(PTGS2),转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),转录因子 p65(RELA),孕激素受体(PGR)等靶点,调控癌症相关通路,肿瘤坏死因子(TNF)信号通路,白细胞介素 17(IL-17)信号通路,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路,Th17 细胞分化等通路,从而抑制炎症反应、调节免疫功能及调控细胞凋亡来治疗类风湿关节炎。

**[关键词]** 五苓散; 网络药理学; 类风湿关节炎; 靶点; 信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0138-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191802

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190603.1420.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-06-04 11:47

## Mechanism of Wulingsan in Treatment of Rheumatoid Arthritis Based on Network Pharmacology

QIAN Kai<sup>1</sup>, DU Yan-yi<sup>1</sup>, HAN Long-yin<sup>1</sup>, WEI Zhen-quan<sup>1</sup>, HUANG Wen-guang<sup>1</sup>, ZENG Li-ying<sup>1</sup>,  
XU Shu-di<sup>1</sup>, LIU Min-ying<sup>2</sup>, LIN Chang-song<sup>2\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;  
2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Wulingsan (WLS) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) by network pharmacology. **Method:** The active components of WLS were screened on traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP) platform, and the targets were predicted in DragBank database. The "component-target" network was constructed by Cytoscape 3.2.1 software. Disease targets were searched in TTD, DrugBank and DisGenet databases. The Venn diagram was built to extract the target of WLS in the treatment of RA, and the gene oesthetics (GO) function annotation and Kyoto Encyclopedin of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway enrichment analysis were performed by cluego plugin. The TCM-component-target-pathway network of WLS was constructed, and the network feature analysis was made by Network Analyzer. **Result:** Totally 52 components and 297 potential targets in WLS and 1 845 targets relating to RA were excavated, and 49 common targets of WLS-RA were obtained. The common targets were mainly enriched in 322 biological processes and 31

**[收稿日期]** 20190315(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573930,81774262)

**[第一作者]** 钱凯,在读博士,从事中医临床基础及风湿病研究,E-mail:13724051203@163.com

**[通信作者]** \*林昌松,硕士,主任医师,博士生导师,从事风湿病中医药研究,E-mail:13802772276@163.com

signaling pathways. **Conclusion:** WLS may regulate targets, such as prostaglandin epoxide synthase 2 (PTGS2), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), cysteine aspartate protein-3 (Caspase-3), transcription factor p65 (RELA), progesterone receptor (PGR), and adjust cancer-related pathways, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways, interleukin-17 (IL-17) signaling pathways, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways, Th17 cell differentiation, so as to inhibit the inflammatory response, regulate immune function and adjust apoptosis to treat rheumatoid arthritis.

[**Key words**] Wulingsan; network pharmacology; rheumatoid arthritis; target; signaling pathway

类风湿关节炎(RA)是一种常见的以对称性、慢性进行性的多关节炎为主要病变表现的自身免疫性疾病,属于中医“痹证”范畴,历代医家称之为“历节”“尪痹”“着痹”“顽痹”等。在《黄帝内经·素问·痹论》中将其病因归结为:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”现代研究表明,RA的发病机制是由于环境因素或遗传因素影响导致自身免疫耐受的缺乏,引起关节腔滑膜炎性反应,致使成纤维样滑膜迁移侵袭,并且关节腔内血管翳生成,最终能导致软骨与骨组织的破坏<sup>[1]</sup>。西医学对RA的治疗主要是从控制炎症反应,调节免疫功能入手,应用糖皮质激素、改善病情抗风湿药(DMARDs)及生物制剂进行治疗<sup>[2]</sup>,而这些治疗手段存在生物制剂价格昂贵,糖皮质激素和DMARDs毒副作用大等缺点。中医药治疗RA具有辨证论治因人制宜的特点,以及疗效确切毒副作用小的优势。但目前还存在中药复方作用机制不明确的问题,而这限制了其临床应用的推广。

网络药理学是整合了系统生物学、药物化学、药理学和生物化学的一门新兴学科<sup>[3-4]</sup>。其借助已研究出的大量生物学信息,构建药物分子、作用靶点、疾病的生物网络,分析三者之间可能的关联,从而在蛋白、分子、基因层面给出了药物对疾病作用机制的线索,为多靶点药物的开发和机制研究提供了依据<sup>[5-6]</sup>。中医药有效成分过于复杂、作用机制不够明确,使用传统药理实验方法来研究其药理作用及机制困难较大、耗费较高,故该学科在降低有效药物研发失败率和降低药物研发的成本上能起到至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。网络药理学方法为中医药从基于经验的医学转化为循证医学系统提供了一种新的研究范式,这可能为中医药研究提供新的药物研发策略,有利于推动中药复方的深入研究和扩大临床适应症的发展<sup>[9-10]</sup>。正是基于该方法已在清络饮<sup>[11]</sup>和六味地黄丸<sup>[12]</sup>中发现了生物活性化合物而且初步阐明了中药复方的作用机制。由于网络药理学是依托于已研究出的数据,故存在一定的局限性,其研究的结果尚需要经过实验验证。但是随着算法技术及基

础研究的发展及相关研究应用的推广,通过网络药理学和其他相关学科可以为深入研究中医药的具体作用机制以及中医药现代化提供更加完备的解决方案。

五苓散出自张仲景的《伤寒杂病论》,有利水渗湿,温阳化气的功效,主治膀胱气化不利之蓄水证,方中重用泽泻为君,以其甘淡,直达肾与膀胱,利水渗湿;茯苓、猪苓增强其利水渗湿之力;茯苓、白术健脾以运化水湿;桂枝温阳化气以助利水,解表散邪以祛表邪。在RA中证属湿邪内侵,痹阻气血,而风、寒、热均不明显者则适用于在此方基础上进行加减<sup>[13]</sup>。《金匱要略》中指出“太阳病,关节疼痛而烦,脉沉而细者,此名湿痹。湿痹之候,小便不利,大便反快,但当利其小便。”故RA中证属湿痹者可在五苓散的基础上加减运用进行治疗<sup>[14]</sup>,但其治疗RA的具体机制尚少有报道。五苓散作为散剂不需要煎煮能取得较汤剂更好的临床疗效<sup>[15]</sup>,其具体有效成分和作用机制可能是5味药配伍组合的叠加,这符合网络药理学研究思路,故本研究选用网络药理学研究方法进行探索。

本研究基于网络药理学对五苓散治疗RA的主要活性成分、作用靶点、作用通路等方面进行探讨,旨在为研究五苓散治疗RA的具体作用机制提供研究思路,从而为其临床上更广泛的应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 五苓散药物活性成分及其作用靶点的筛选**  
通过中药系统药理学数据库(TCMSP)<sup>[16]</sup>(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索出五苓散中桂枝、茯苓、猪苓、白术、泽泻5种中药的化学成分。对化学成分进行筛选,筛选标准:化合物类药性(DL)筛选阈值为DL $\geq$ 0.18。然后通过DrugBank<sup>[17]</sup>(<https://www.drugbank.ca/>)数据库对已筛选出的化合物进行靶点预测,在数据库中不能预测到作用靶点的成分则剔除。通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和Uniprot<sup>[18]</sup>(<https://www.uniprot.org/>)数据库中将已筛选出的靶蛋白名转换为swiss-

port ID 和靶点简称,进行标准化。

**1.2 五苓散成分-靶点网络构建** 为便于作图,将筛选出的成分以中药拉丁名单词首字母和 3 个数字为组合进行编码。把筛选出的成分和预测得到的靶点输入 Cytoscape 3.2.1 软件<sup>[19]</sup>中,构建成成分-靶点网络;然后使用 Network Analyzer 功能进行网络特征分析,其中自由度(Degree)越高则表明该节点越重要。

**1.3 RA 疾病靶点的获取** 以“rheumatoid arthritis”作为关键词,在 TTD<sup>[20]</sup> (<https://db.idrblab.org/ttd/>), DrugBank 以及 DisGenet<sup>[21]</sup> (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/search>) 数据库中进行检索,获取 RA 相关的疾病靶点。将检索出的靶点在 NCBI 和 Uniprot<sup>[18]</sup> 数据库中得到 Wwiss-Port ID 和靶点简称,从而进行标准化。然后根据标准化后的 Swiss-Port ID,删除检索结果中重复的靶点,建立疾病靶点数据集,备用。

**1.4 关键靶点筛选及构建蛋白作用网络** 应用 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 在线软件作图工具平台 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 将五苓散化学成分靶点和 RA 相关的疾病靶点进行映射构建韦恩图。存在交集的共同靶点可能是五苓散中类药活性成分治疗 RA 的关键靶点。将共同靶蛋白在 STRING 数据库<sup>[22]</sup> 在线平台 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型,蛋白种属设置为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值设为中等“medium confidence”( > 0.4),其他参数保持默认设置,获得 PPI 网络。

**1.5 关键靶点基因功能注释和通路富集分析** 应用 Cytoscape 3.2.1 软件中的 ClueGo 插件<sup>[23]</sup> 对筛选出的共同靶基因进行基因本体(GO)功能注释和东京基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,对所预测的化学成分靶点进行富集分析,保留  $P \leq 0.01$  的结果,然后进行可视化处理,分析五苓散治疗 RA 可能的生物过程和信号通路。最后应用 Cytoscape 软件中 Merge 功能构建五苓散成分-靶点-信号通路网络,使用 Network Analyzer 功能进行网络特征分析。从而将成分、靶点及通路的重要性更加数据化,得出更加明确的结果,进一步说明靶蛋白和信号通路在五苓散治疗 RA 中的作用。

## 2 结果

**2.1 五苓散成分-靶点网络的构建** 本研究在 TCMSF 数据库中应用筛选标准,共筛选出五苓散中

5 味中药 100 种类药成分。在 Drugbank 中对这些成分进行靶点预测,所有成分共得出 297 个可能的相关靶点,去重后有 132 个,其中有 48 个化合物在数据库中未找到相关靶点,故未参与网络构建及分析。最终在五苓散中得到 52 种类中药活性成分,茯苓中有 11 种,猪苓中有 11 种,泽泻中有 14 种,白术中有 7 种,桂枝中有 9 种。Degree 值表示预测出该成分与作用靶点的关联个数,具体见表 1。将 DL 成分及作用靶点导入 Cytoscape 3.2.1 软件进行可视化分析。该网络共包括 184 个节点和 297 个相互关系,见图 1。“Degree”值排名前 3 的化合物分别是  $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol) (Degree 值为 38),大黄素(emodin) (Degree 值为 36),木犀草素(hederagenin) (Degree 值为 21)。这体现了中药方剂多成分、多靶点的作用机制。

### 2.2 RA 疾病靶点的筛选及共同靶点 PPI 网络构建

通过 TTD, Drugbank, DisGeNET 数据库进行检索,删除检索结果中重复的靶点,获得 RA 相关的疾病靶点 1 845 个。将这 1 845 个疾病靶点与 132 个五苓散类药成分的作用靶点输入在线软件作图工具平台绘制韦恩图,两者取交集后获得疾病-类药活性成分共同靶点 49 个,此即五苓散治疗 RA 中有重要意义的靶点,见图 2。在 STRING 数据平台输入 56 个共同靶点,分析后得到 PPI 作用网络,共获得 30 个相互作用节点和 402 条相互作用关系,见图 3。

### 2.3 关键靶点 GO 生物功能注释

应用 Cytoscape 3.2.1 软件中的 ClueGo 插件对五苓散成分-疾病的 49 个共同作用靶蛋白进行 GO 生物功能注释,根据保留  $P \leq 0.01$  的结果,进行可视化分析,得到 GO 分析网络图及饼状图,见图 4,5。如图所示共同作用靶点主要富集在细胞对生物刺激的反应(cellular response to biotic stimulus),外源性凋亡信号通路的调控(regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway),细菌来源分子的反应(response to molecule of bacterial origin),类固醇激素介导的信号通路(steroid hormone mediated signaling pathway),凋亡信号通路负调控机制(negative regulation of apoptotic signaling pathway)等 322 个生物过程。这表明五苓散可通过调控细胞对生物刺激物的反应及细胞凋亡等方面发挥对 RA 的治疗作用。

**2.4 KEGG 通路富集分析** 应用 Cytoscape 3.2.1 软件 ClueGo 插件对五苓散类药活性成分-疾病的 49 个共同作用靶蛋白进行 KEGG 通路富集分析,根据

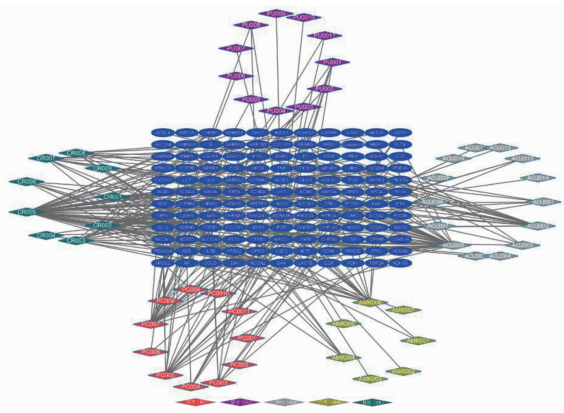
表 1 五苓散成分信息

Table 1 Information of ingredients of Wulingsan

| 编码     | 化合物名称   | DL   | Degree | 中药 |
|--------|---|------|--------|----|
| PC001  | pachyman  | 0.68 | 1      | 茯苓 |
| PC002  | beta-glucan   | 0.70 | 1      | 茯苓 |
| PC003  | $\beta$ -amyirin acetate  | 0.74 | 7      | 茯苓 |
| PC004  | ergosterol  | 0.72 | 5      | 茯苓 |
| PC005  | alexandrin  | 0.63 | 15     | 茯苓 |
| PC006  | (2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid                      | 0.81 | 2      | 茯苓 |
| PC007  | hederagenin   | 0.72 | 21     | 茯苓 |
| PC008  | cerevisterol  | 0.77 | 1      | 茯苓 |
| PC009  | trametenolic acid   | 0.80 | 1      | 茯苓 |
| PC0010 | ergosterol peroxide   | 0.81 | 1      | 茯苓 |
| PC0011 | ergosta-7,22E-dien-3beta-ol   | 0.72 | 1      | 茯苓 |
| PU001  | ergosterol  | 0.72 | 5      | 猪苓 |
| PU002  | polyporusterone G   | 0.82 | 1      | 猪苓 |
| PU003  | 27625-48-5  | 0.73 | 3      | 猪苓 |
| PU004  | polyporusterone D   | 0.82 | 1      | 猪苓 |
| PU005  | polyporusterone G   | 0.81 | 1      | 猪苓 |
| PU006  | cerevisterol  | 0.77 | 1      | 猪苓 |
| PU007  | ergosta-7,22E-dien-3beta-ol   | 0.72 | 1      | 猪苓 |
| PU008  | ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -ol  | 0.72 | 3      | 猪苓 |
| PU009  | ergosta-7,22-dien-3-one   | 0.72 | 1      | 猪苓 |
| PU0010 | (22e,24r)-ergosta-7,22-dien-3-one   | 0.72 | 1      | 猪苓 |
| PU0011 | ergosta-5,7,22-trien-3-ol   | 0.72 | 2      | 猪苓 |
| AOJ001 | stachyose   | 0.63 | 5      | 泽泻 |
| AOJ002 | sucrose   | 0.23 | 18     | 泽泻 |
| AOJ003 | raffinose   | 0.66 | 4      | 泽泻 |
| AOJ004 | alisol F  | 0.67 | 1      | 泽泻 |
| AOJ005 | alisol A  | 0.81 | 1      | 泽泻 |
| AOJ006 | emodin  | 0.24 | 36     | 泽泻 |
| AOJ007 | 16 $\beta$ -hydroxylisol B monoacetate  | 0.79 | 1      | 泽泻 |
| AOJ008 | 16 $\beta$ -methoxylisol B monoacetate  | 0.77 | 1      | 泽泻 |
| AOJ009 | alisol C monoacetate  | 0.83 | 1      | 泽泻 |
| AOJ010 | alisol B monoacetate  | 0.82 | 1      | 泽泻 |
| AOJ011 | [(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate | 0.81 | 1      | 泽泻 |
| AOJ012 | alisol B  | 0.82 | 1      | 泽泻 |
| AOJ013 | sitosterol  | 0.87 | 3      | 泽泻 |
| AOJ014 | 1-monolinolein  | 0.30 | 1      | 泽泻 |
| AMK001 | stigmast-22E-en-3beta-ol  | 0.75 | 2      | 白术 |
| AMK002 | atractylodes macrocephala   | 0.81 | 1      | 白术 |

续表 1

| 编码     | 化合物名称  | DL   | Degree | 中药 |
|--------|--|------|--------|----|
| AMK003 | biatractylolide  | 0.81 | 1      | 白术 |
| AMK004 | 8β-ethoxy atractylenolide III  | 0.21 | 5      | 白术 |
| AMK005 | (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol | 0.78 | 1      | 白术 |
| AMK006 | 3β-acetoxyatractylone  | 0.22 | 16     | 白术 |
| AMK007 | 14-acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol   | 0.30 | 1      | 白术 |
| CR001  | tetracosane  | 0.24 | 11     | 桂枝 |
| CR002  | sitogluside  | 0.62 | 17     | 桂枝 |
| CR003  | ST069309   | 0.38 | 19     | 桂枝 |
| CR004  | sitosterol   | 0.75 | 3      | 桂枝 |
| CR005  | beta-sitosterol  | 0.75 | 38     | 桂枝 |
| CR006  | ent-epicatechin  | 0.24 | 6      | 桂枝 |
| CR007  | (+)-catechin   | 0.24 | 11     | 桂枝 |
| CR008  | taxifolin  | 0.27 | 10     | 桂枝 |
| CR009  | (-)-taxifolin  | 0.27 | 4      | 桂枝 |



菱形. 成分; 椭圆形. 靶点

图 1 五苓散类药活性成分靶点网络

Fig.1 Wulingsan active ingredient target network



图 3 共同靶点 PPI 网络

Fig.3 Common Target PPI Network

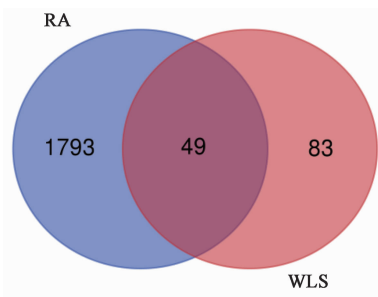


图 2 RA 靶点与五苓散成分靶点韦恩

Fig.2 Venn's diagram of RA disease target and Wulingsan component target

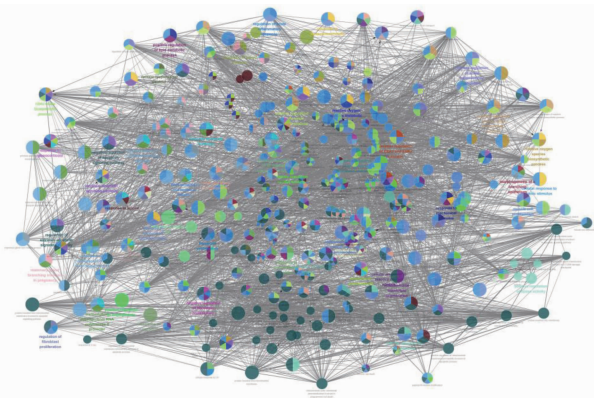
保留  $P \leq 0.01$  的结果, 然后在 imageGP (<http://www.ehbio.com/ImageGP1>) 在线平台上进行可视化

分析, 结果见图 6。共同靶点主要富集于癌症相关信号通路, IL-17 信号通路, TNF 信号通路, 凋亡通路, 低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路和表皮生长因子受体(ERBB)信号通路等 31 条信号通路上。

**2.5 构建成分-靶点-通路网络** 应用 Cytoscape 3.2.1 软件中 merge 功能将已分析出的数据, 构建出的五苓散中药-成分-共同靶点-信号通路网络拓扑图(图 7), 共有 97 个节点, 832 个相互关系。使用 network analyzer 功能进行网络特征分析, 以 Degree 值为评判标准可得出较为重要的成分、靶点及通路, 见表 2。

### 3 讨论

五苓散具有利水渗湿, 温阳化气的功效, 能够



不同颜色代表不同的生物过程,节点的大小代表调控的强弱,节点间的连线代表相互作用

图 4 共同靶点 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of shared target

有效治疗寒湿痹证型类风湿关节炎。现代基础研究表明,泽泻、茯苓和猪苓均具有免疫调节、抗炎及抗肿瘤作用<sup>[24-28]</sup>,白术具有利尿、抗肿瘤和抗炎的作用<sup>[29-30]</sup>,桂枝具有解热、镇痛、抗炎和抗肿瘤等作用<sup>[31]</sup>。尽管目前对五苓散各个主要成分的药理学作用研究已较为深入,但其治疗类风湿关节炎的具体作用机制却少有报道。

本研究发现在中药-成分-靶点-信号通路网络中大黄素(emodin), $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol),紫杉叶素(taxifolin),香豆素 343(ST069309),棉子糖(raffinose),胡萝卜苷(sitogluside)等自由度最高。其中大黄素(emodin)通过抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),Jun 氨基末端激酶(JNK),p38 丝裂原活化

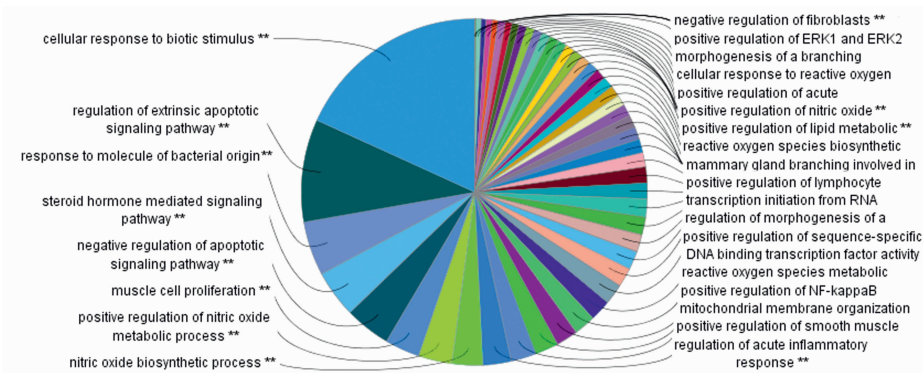
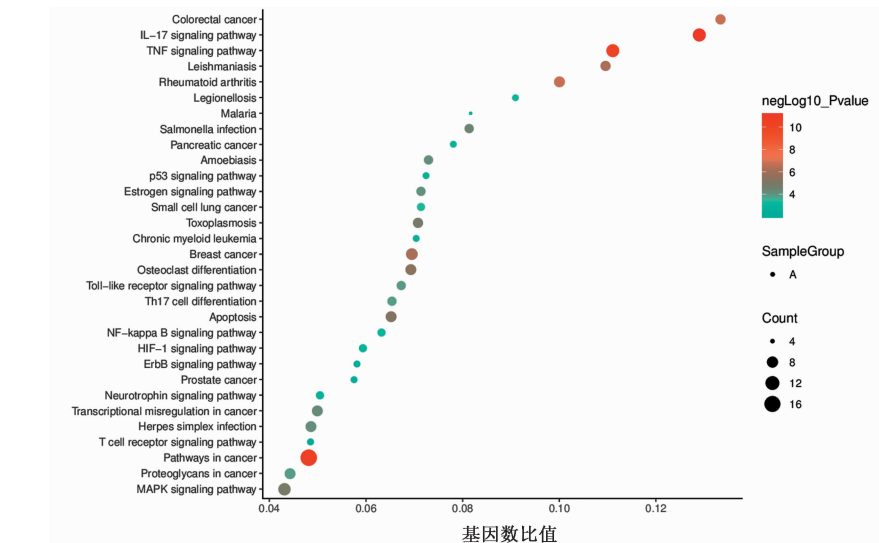


图 5 共同靶点 GO 分析饼状

Fig. 5 Shared target GO analysis pie chart



颜色与大小取决于关联基因 Count 值和 P 值,颜色向量由蓝绿色到红色表明 P 值越小;X 轴表示关联基因数与信号通路上总基因数的比值,Y 轴表示通路名称

图 6 KEGG 通路富集气泡

Fig. 6 KEGG path enrichment bubble diagram

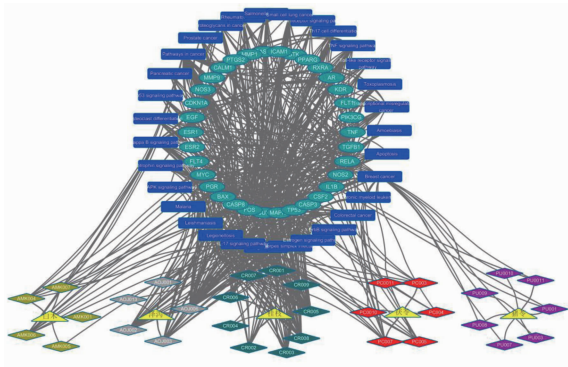
蛋白酶酶(p38 MAPK)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)等通路的活性,来抑制 TNF- $\alpha$ , IL-6,

IL-1 $\beta$ ,中性粒细胞趋化因子-1(CINC-1),巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2),细胞间黏附分子-1(ICAM-1)

表 2 网络拓扑图分析表

Table 2 Network topology diagram analysis table

| 类别 | 名称              | Degree | 类别 | 名称                               | Degree |
|----|-----------------|--------|----|----------------------------------|--------|
| 成分 | emodin          | 132    | 靶点 | Caspase-3                        | 23     |
| 成分 | beta-sitosterol | 60     | 靶点 | RELA                             | 22     |
| 成分 | taxifolin       | 36     | 靶点 | PGR                              | 19     |
| 成分 | ST069309        | 23     | 通路 | pathways in cancer               | 102    |
| 成分 | raffinose       | 20     | 通路 | TNF signaling pathway            | 58     |
| 成分 | sitogluside     | 13     | 通路 | breast cancer                    | 56     |
| 靶点 | PTGS2           | 96     | 通路 | IL-17 signaling pathway          | 44     |
| 靶点 | RXRA            | 28     | 通路 | NF- $\kappa$ B signaling pathway | 28     |
| 靶点 | TGF $\beta_1$   | 26     | 通路 | Th17 cell differentiation        | 22     |



三角形. 中药; 菱形. 成分; 椭圆形. 靶点; 正方形. 通路

图 7 中药-成分-靶点-通路网络

Fig. 7 TCM-components-target-pathway network

和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达以及上调白细胞膜分化抗原 14 (mCD14) 和一氧化氮 (NO) 的表达水平, 发挥抗炎作用<sup>[32]</sup>。并且大黄素有免疫调节作用, 其通过抑制淋巴细胞增殖分化和细胞因子的产生, 从而起到抑制免疫反应和诱导免疫耐受的作用<sup>[33-34]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇 (beta-sitosterol) 能抑制肿瘤细胞的增殖及抑制血管新生<sup>[35]</sup>。紫杉叶素 (taxifolin) 可以通过拮抗 NF- $\kappa$ B 信号通路促进的成骨细胞的分化<sup>[36]</sup>, 调节 NF- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 信号通路来抑制破骨细胞生成<sup>[37]</sup>, 从而减少骨组织损害。胡萝卜苷 (sitogluside) 能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[38]</sup>。而香豆素 343 (ST069309), 棉子糖 (raffinose) 还尚有相关报道。故五苓散治疗类风湿关节炎的过程中较为重要的成分可能是大黄素 (emodin),  $\beta$ -谷甾醇 (beta-sitosterol), 紫杉叶素 (taxifolin), 胡萝卜苷 (sitogluside) 等。

在中药-成分-靶点-信号通路网络中自由度最高

的前 6 位靶点为前列素内环氧化物合成酶 2 (PTGS2), 类视黄醇 X 受体  $\alpha$  (RXRA), 转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), 半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)-3, 转录因子 p65 (RELA), 孕激素受体 (PGR) 等靶点来达到治疗目的。PTGS2 也称为环氧合酶-2 (COX-2), 抑制 COX 活性能减少局部组织前列腺素 (PG) 的合成, 而 PG 是一类活性很强的炎症介质, 目前非甾体抗炎药主要的共同作用机制就是抑制 COX 的活性<sup>[39]</sup>。而 TGF- $\beta_1$  则能促进 RA 成纤维样滑膜细胞的侵袭, 抑制 TGF- $\beta_1$  活性则能减少成纤维细胞侵袭软骨组织的损害<sup>[40]</sup>。半胱天冬酶是程序性细胞死亡 (细胞凋亡) 的关键介质, 其中, Caspase-3 是一种经常被激活的死亡蛋白酶<sup>[40]</sup>。NF- $\kappa$ B 是由转录因子 p65 (RELA) 与转录因子 p50 构成的二聚体蛋白, 而 NF- $\kappa$ B 信号通路在 RA 炎成纤维样滑膜细胞稳定激活与抗凋亡中起到重要作用, 并且其参与免疫系统的调节<sup>[41]</sup>。另外性激素在免疫反应及局部炎症反应中起到重要作用, 并且 PGR 能促进成纤维样滑膜细胞对软骨的降解和侵袭<sup>[41-42]</sup>。类视黄醇 X 受体  $\alpha$  (RXRA) 却少见相关报道。故五苓散可能主要是通过调节 PTGS2, TGF- $\beta_1$ , Caspase-3, 转录因子 p65 (RELA), PGR 等靶点来达到治疗目的。

从富集分析结果可知, 在该治疗过程中主要涉及通路可能是癌症相关通路, TNF 信号通路, 乳腺癌通路, IL-17 信号通路, NF- $\kappa$ B 信号通路, Th17 细胞分化等。其中 TNF 信号通路, IL-17 信号通路均是在类风湿关节炎炎症反应中起到重要作用的通路<sup>[43]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路是参与免疫和炎症反应的细胞中普遍存在的快速反应转录因子相关信号通路, 并通过表达细胞因子、趋化因子、细胞黏附分子、

生长因子和免疫受体发挥其作用<sup>[44]</sup>。辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞是针对细胞外细菌和真菌的免疫应答的重要介质,而 Th17 细胞及其效应分子例如白细胞介素-17A(IL-17A),IL-17F,干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )等参与 RA 的病理学改变<sup>[45]</sup>。Th17 细胞分化机制在类风湿关节炎的免疫反应中起到重要作用。研究者发现 RA 成纤维样细胞出现类似癌细胞样侵袭性表型,并且在 RA 患者滑膜细胞中发现 c-Fos, Ras, Raf, Sis, Myb 和 Myc 等癌基因的表达水平均升高,成纤维样滑膜细胞中抑癌基因 p53 也发生了突变,而这些证据均表明 RA 成纤维细胞样滑膜细胞的侵袭性可能与癌症相关通路有一定关联<sup>[46-47]</sup>。另外也有可能是因为目前针对癌症相关通路的研究数据更为丰富,在现有数据库中分析会产生一定偏倚,故得出的结果中乳腺癌通路也参与治疗过程。此外研究发现五苓散治疗 RA 主要涉及细胞对生物刺激的反应、外源性凋亡信号通路的调控、细菌来源分子的反应、类固醇激素介导的信号通路、凋亡信号通路负调控机制等生物过程。据报道,RA 滑膜细胞并无增殖加快现象,而是滑膜细胞凋亡明显减少,导致成纤维样滑膜细胞的累积,增加其侵袭造成的损害<sup>[47]</sup>。故凋亡信号通路的调控在治疗 RA 能起到重要作用。由此可推测,五苓散可能是通过抑制炎症反应、调节免疫功能及调控细胞凋亡通路机制来治疗类风湿关节炎。

综上所述,本研究利用网络药理学方法与技术,挖掘到五苓散中 52 种类药性成分及 297 个潜在靶点,RA 疾病相关靶点 1 845 个,其中五苓散-疾病共同靶点 49 个,通过对这些靶点进行 GO 生物过程及 KEGG 信号通路的富集分析,初步预测出五苓散可能是通过调节 PTGS2, TGF- $\beta_1$ , Caspase-3, RELA, PGR 等靶点,调控癌症相关通路, TNF 信号通路, IL-17 信号通路, NF- $\kappa$ B 信号通路, Th17 细胞分化等通路,从而抑制炎症反应、调节免疫功能及调控细胞凋亡来治疗类风湿关节炎。由于各种平台数据库数据及相应分析算法和软件功能的限制,得出的结果可作为实验研究的线索,其具体的作用机制还有待实验研究的证实。

[参考文献]

[1] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055):2023-2038.  
[2] Aletaha D, Smolen J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review[J]. JAMA, 2018, 320(13):1360-1372.

[3] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.  
[4] 王欢欢,吴宏伟,李欣,等.基于网络药理学分析厚朴抗抑郁的物质基础及其作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(10):162-169.  
[5] 陈文娜,朱爱松,丛培玮,等.基于网络药理学的二陈汤治疗冠心病分子机制研究[J].中草药,2019,50(2):441-448.  
[6] 李波,雷珊珊,李贺,等.基于网络药理学的济脉通片降压机制研究[J].中国现代应用药学,2019,36(1): 49-57.  
[7] HAO D C, XIAO P G. Network pharmacology: a Rosetta Stone for traditional Chinese medicine[J]. Drug Dev Res, 2014, 75(5):299-312.  
[8] 陈凯,刘馨,管怡晴,等.基于网络药理学构建新型中药复方降压抗纤方抗高血压心肌纤维化的作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):115-122.  
[9] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2):110-120.  
[10] 樊耀华,欧海亚,王汉裕,等.基于网络药理学的茵陈五苓散作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11):193-200.  
[11] ZHANG B, WANG X, LI S. An integrative platform of tcm network pharmacology and its application on a herbal formula, Qing-Luo-Yin [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10. 1155/2013/456747.  
[12] CHENG X R, QI C H, WANG T X, et al. Characteristics of the traditional Liu-Wei-Di-Huang prescription reassessed in modern pharmacology [J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(2):103-121.  
[13] 周全,刘征堂.金实教授从湿论治类风湿性关节炎经验介绍[J].新中医,2005,37(1):21-22.  
[14] 王念莲,徐黎明.五苓散治疗类风湿关节炎 30 例[J].现代中西医结合杂志,2009,18(4):416.  
[15] 孙彩霞.基于化学成分及药理作用探讨五苓方的宜散不宜汤机制[D].北京:中国中医科学院,2016.  
[16] LI Y, HAN C, WANG J, et al. Investigation into the mechanism of *Eucommia ulmoides* Oliv. based on a systems pharmacology approach[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):452-460.  
[17] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1074-D1082.  
[18] CHEN C, HUANG H, WU C H. Protein bioinformatics databases and resources[J]. Methods Mol Biol, 2010, 694:3-24.  
[19] Paul S, Andrew M, Ozier Owen B N S, et al. Cytoscape:

- a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003,13(11):2498-2504.
- [20] LI Y H, YU C Y, LI X X, et al. Therapeutic target database update 2018; enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018,46(D1):D1121-D1127.
- [21] Pinero J, Bravo A, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 ( D1 ): D833-D839.
- [22] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017,45(D1):D362-D368.
- [23] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks [J]. *Bioinformatics*, 2009,25(8):1091-1093.
- [24] 田婷,陈华,冯亚龙,等. 泽泻药理与毒理作用的研究进展[J]. *中药材*,2014,37(11):2103-2108.
- [25] 尹春萍,吴继洲. 泽泻及其活性成分免疫调节作用研究进展[J]. *中草药*,2001,32(12):1132-1133.
- [26] 游昕,熊大国,郭志斌,等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展[J]. *安徽农业科学*,2015,43(2):106-109.
- [27] 邓媛媛,邵贝贝,王光忠,等. 茯苓调节免疫功能有效物质的比较研究[J]. *中国医药指南*,2012,10(12):94-95.
- [28] 徐硕,邝咏梅,姜文清,等. 猪苓的化学成分及生物活性研究进展[J]. *中南药学*,2016,14(7):746-751.
- [29] LI C Q, HE L C, DONG H Y, et al. Screening for the anti-inflammatory activity of fractions and compounds from *Atractylodes macrocephala* koidz [J]. *J Ethnopharmacol*,2007,114(2):212-217.
- [30] 岳美颖,潘媛,敖慧. 白术化学、药理与临床研究进展[J]. *亚太传统医药*,2016,12(5):66-68.
- [31] 许源,宿树兰,王团结,等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展[J]. *中药材*,2013,36(4):674-678.
- [32] DONG X, FU J, YIN X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2016,30(8):1207-1218.
- [33] QU K, SHEN N Y, XU X S, et al. Emodin induces human T cell apoptosis *in vitro* by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34 ( 9 ): 1217-1228.
- [34] ZHANG W, LI H, BU H, et al. Emodin inhibits the differentiation and maturation of dendritic cells and increases the production of regulatory T cells [J]. *Int J Mol Med*,2012,29(2):159-164.
- [35] Bin S M, Ameen S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2015,67(8):1214-1220.
- [36] WANG Y J, ZHANG H Q, HAN H L, et al. Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF-kappaB pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017,490(1):36-43.
- [37] CAI C, LIU C, ZHAO L, et al. Effects of Taxifolin on Osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018,9:1286.
- [38] ZENG J, LIU X, LI X, et al. Daucosterol inhibits the proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Molecules*, 2017,22(6):862-872.
- [39] Smith W L, DeWitt D L, Garavito R M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000,69:145-182.
- [40] Stanford S M, Aleman M G, Bartok B, et al. TGFbeta responsive tyrosine phosphatase promotes rheumatoid synovial fibroblast invasiveness [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016,75(1):295-302.
- [41] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009,27:693-733.
- [42] Khalkhali-Ellis Z, Seftor E A, Nieva D R, et al. Estrogen and progesterone regulation of human fibroblast-like synoviocyte function *in vitro*: implications in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*,2000,27(7):1622-1631.
- [43] Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis [J]. *Semin Immunopathol*,2017,39(4):365-383.
- [44] Lee J, Burckart G. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998,38(11):981-993.
- [45] van Hamburg J P, Tas S W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2018,87:69-81.
- [46] SUN Y, CHEUNG H S. p53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis [J]. *Semin Arthritis Rheum*,2002,31(5):299-310.
- [47] Huber L C, Distler O, Tarner I, et al. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford, England)*, 2006, 45 ( 6 ): 669-675.

[责任编辑 周冰冰]