

基于网络药理学探讨断藤益母汤治疗 类风湿关节炎的作用机制

王强¹, 刘敏莹², 韩隆胤¹, 郭文杰¹, 刘小宝¹, 潘东梅³, 李楠⁴, 林昌松^{2*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;

3. 南方医科大学中医药学院, 广州 510405; 4. 暨南大学中医学院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 断藤益母汤在类风湿关节炎中疗效显著,但其成分复杂,作用机制不明。使用网络药理学方法对断藤益母汤的分子机制进行研究,寻找断藤益母汤的有效成分、治疗靶标和信号通路具有一定价值。方法: 根据药代动力学参数在中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)和中医综合数据库(TCMID)筛选药物成分。在 Drugbank 数据库和 TTD 数据库挖掘药物和疾病靶标,使用可视化网络药理学 Cytoscap 工具构建药物-靶点-通路网络,探讨断藤益母汤中成分的作用机制。结果: 发现断藤益母汤的 11 个有效成分可能靶向 42 个类风湿关节炎相关靶点,如白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子(TNF),环氧酶 2(COX2),基质金属蛋白酶-1(MMP-1),基质金属蛋白酶-3(MMP-3),诱导型一氧化氮合酶(NOS₂)等。参与了包括肿瘤坏死因子(TNF)信号通路,白细胞介素-17(IL-17)通路,辅助性 T 细胞 17(Th17)分化通路,风湿关节炎通路,核转录因子- κ B(NF- κ B)通路,破骨细胞分化通路,卵巢类固醇生成通路等多条通路。结论: 断藤益母汤可能主要通过多条炎症相关信号通路对炎症细胞因子进行调控,从而对类风湿关节炎起到抗炎和免疫调控作用。

[关键词] 断藤益母汤; 类风湿关节炎; 网络药理学; 炎症反应; 细胞因子; 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)24-0150-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192404

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190905.0904.001.html>

[网络出版时间] 2019-09-05 09:34

Mechanism of Duanteng Yimutang in Treating Rheumatoid Arthritis Based on Network Pharmacology Approach

WANG Qiang¹, LIU Min-ying², HAN Long-yin¹, GUO Wen-jie¹, LIU Xiao-bao¹,
PAN Dong-mei³, LI Nan⁴, LIN Chang-song^{2*}

(1. The First Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

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

3. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Southern Medical University, Guangzhou 510405, China;

4. School of TCM, Ji'nan University, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** Duanteng Yimutang (DTYMT) has a significant effect in treating rheumatoid arthritis, but its composition is complex and its mechanism is not clear. It is worthwhile to use network pharmacology approach to find active components, therapeutic targets and signal pathways of DTYMT. **Method:** The drug composition was selected according to the pharmacokinetic parameters in the pharmacology database, the

[收稿日期] 20190414(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573930,81774262);广东省自然科学基金项目(2017A030311009,2018A0303130112);中央高校基本科研业务费专项(21618335)

[第一作者] 王强,在读博士,从事中医药防治风湿病研究,E-mail: wangqiang5250@163.com

[通信作者] *林昌松,博士生导师,从事中医药防治风湿病研究,Tel:020-36598915,E-mail: linchs999@163.com

analysis platform (TCMSP) and the TCM integrated database (TCMID) of the Traditional Chinese Medicine System. The drug and disease targets were excavated in the Drugbank database and the Therapeutic Target Database (TTD), and the drug-target-pathway network was constructed by network pharmacology tool Cytoscap, in order to explore the mechanism of the action of the components in the DTYMT. **Result:** It was found that 11 effective components of DTYMT could target 42 proteins in rheumatoid arthritis, such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), cyclooxygenase-2 (COX2), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and inducible nitric oxide synthase (NOS2). Various pathways, including tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) pathway, helper T cell 17 (Th17) differentiation pathway, rheumatic arthritis pathway, nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway, osteoclast differentiation pathway, and ovarian steroid production pathway, were involved. **Conclusion:** DTYMT may be used to regulate inflammatory cytokines mainly through multiple inflammatory-related signal pathways, so as to play anti-inflammatory and immunoregulatory roles in the treatment of rheumatoid arthritis.

[**Key words**] Duanteng Yimutang; rheumatoid arthritis; network pharmacology; inflammatory factor; cytokine; signal pathway

类风湿关节炎 (RA) 是一种常见的自身免疫性疾病,主要表现为慢性炎症性关节病。持续性滑膜炎导致软骨破坏,骨侵蚀和关节周围脱钙,随后导致关节功能受损^[1]。炎症是类风湿关节炎的一个重要特征,如白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6 (IL-6),白细胞介素-15 (IL-15),白细胞介素-17 (IL-17),白细胞介素-18 (IL-18) 等细胞因子在 RA 的各病理阶段发挥重要作用^[2]。生物制剂在 RA 炎症的控制中发挥重要作用,使患者达到了相当的临床缓解率。然而,传染病或癌症等不良事件意味着需要密切监测接受治疗的病人^[3]。此外,有研究显示仍有部分患者对生物制剂缺少反应性^[4]。因此,对类风湿关节炎患者的达标治疗仍需研发有效的药物。

断藤益母汤 (DTYMT) 由黑骨藤、南蛇藤、续断和益母草组成,针对岭南地区 RA 患者“肝肾亏虚,风湿痹阻”的病机拟定。DTYMT 对活动期 RA 患者具有改善关节功能及降低活动期炎症指标的作用,疗效与来氟米特相当,但起效时间更快,治疗 2 周后在改善关节肿胀数, C 反应蛋白 (CRP) 等指标方面显著优于对照组^[5]。在体外研究中,发现 DTYMT 可以通过调控对破骨细胞从而发挥骨保护作用,其机制可能是通过影响 Wnt 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 受体活化因子配体 (RANKL) 信号通路,即上调 Wnt3a 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 表达,下调 RANKL 和 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 表达,以及抑制破骨细胞分化和增殖而起起到减缓骨破坏作用^[6-7]。此外,笔者也发现 DTYMT 可以下调成纤维样滑膜细胞 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 及蛋白激酶 B (Akt) 蛋白

磷酸化的表达水平,从而诱导滑膜细胞凋亡^[8]。然而,由于中药复方成分复杂,单体研究面临巨大困难。因此,借助网络药理学成果,综合考虑中药有效成分的药代动力学特点,对成分进行筛选后对其作用机制进行研究。

基于网络的方法在药物发现中有望突破对药物作用的多层次信息的理解。一方面,网络药理学在细胞或表型网络的背景下考虑药物反应。另一方面,基于化学的网络是表型化学空间的一种很有前途的选择。两者都可以为合理药物设计的发展提供补充支持,并更好地了解药物多重作用的机制^[9]。这一方法对基于“诱导契合”理论的单成分-单靶点的药物研究范式提出了新的见解,利用了生物信息学方法,研究多成分-多靶点-多疾病的整合机制。中医的整体观念和辨证论治原则与新兴的网络药理学和网络生物学的核心思想有着较多共同之处,从系统角度和分子水平发现研究中药的作用机制,建立了一种新的中药网络药理学研究范式^[10-12]。

1 材料与方法

1.1 疾病靶点收集 将“Rheumatoid arthritis”作为关键词,在 Drugbank 数据库^[13] (版本 5.1.1) 和 Therapeutic Target Database (TTD) 数据库^[14] 中进行检索。Drugbank 数据库纳入了 11 901 种药物,其中 2 539 种经批准的小分子药物,1 185 种经批准的生物技术药物,129 种营养品和 5 762 种实验中药物。由于本数据库中的药物靶点是已批准临床用药或正在进行临床实验的药物靶点,因此靶点与疾病的关系已被研究并阐述,将两个数据库的检索结果合并后去除重复后作为疾病靶点数据库备用。

1.2 药物靶点收集

1.2.1 ADME 参数筛选 吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 是药代动力学重要研究内容, 高质量的候选药物不仅对治疗目标有足够的疗效, 而且在一定的治疗剂量下也表现出适当 ADME 特性^[15]。大多数中药属于口服制剂, 必须经过 ADME 过程到达靶器官和组织才能发挥作用。因此, 对 ADME 参数的重视对药物的研发和作用机制研究非常重要。本研究通过考虑 ADME 参数, 避免了无法在体内正常吸收、分布、代谢、排泄的成分的干扰。

1.2.2 中药成分数据构建 本研究通过 3 个数据库查询中药成分。TCMSP 数据库是一个独特的中草药系统药理学平台, 它能分析药物、靶标和疾病之间的关系^[16]。该数据库包括化学物质、靶点和药物靶点网络, 以及涉及口服生物利用度 (OB), 药物相似度 (DL), 生物半衰期 (HL) 等天然化合物的药代动力学特性。若本数据库未收录, 则使用 TCMID 数据库^[17], 本数据库是一个为中医和现代生命科学提供信息、弥合差距的综合性数据库, 收集了中医各方面的资料, 包括方剂、草药和草药成分、现代药理学信息。若数据库未收录, 则通过中国知网进行文献查询, 以获得中药所含成分。通过 3 个数据库获得中药成分后, 以 ADME 为标准, 在 TCMSP 数据库筛选成分, 具体而言, $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$, $HL \geq 4$ h。

1.2.3 药物靶点数据收集 通过 ADME 参数的设定, 将所有成分进行筛选后, 将候选成分在 TCMSP 数据库查询靶点全称。最后整合所有靶点全称, 输入在 Drugbank 数据库以查询靶点简称, 备用。

1.3 网络构建 Cytoscape 软件用于生物分子相互作用网络的构建^[18]。尽管其适用于任何分子组分和相互作用的系统, 但当与蛋白质, DNA 和基因相互作用的大型数据库一起使用时, 可发挥重要作用, 并将分析结果可视化处理。本研究将前期已收集的中药成分及其靶点信息导入 Cytoscape 软件, 进行网络构建并可视化处理。

1.4 网络分析方法 在研究中笔者对中药成分、药物靶点、疾病靶点的分析使用了蛋白-蛋白相互作用关系分析, 靶点信号通路分析, 以及对网络中节点的拓扑学参数进行了分析。

1.4.1 蛋白-蛋白相互作用网络分析 蛋白质通常不是作为单一的物质发挥作用, 而是作为一个动态网络中的成员发挥作用。越来越多的证据表明, 蛋白质与蛋白质的相互作用 (PPI) 在活细胞的许多生物过程中至关重要^[19]。在过去的几十年里, 基于质

谱的蛋白质组学已经成为识别蛋白质-蛋白质相互作用的一项重要技术^[20]。随着计算机技术的巨大进步, 基于计算机模拟的 PPI 方法展现出巨大的潜力。本研究中, 使用了 STRING 数据库^[21], 对靶点-靶点间的关系进行分析, 旨在发现蛋白关系网络, 揭示网络中的关键靶点。

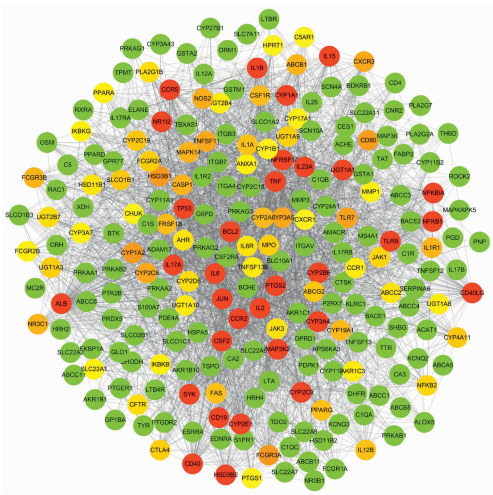
1.4.2 信号通路分析 网络药理学研究基础之一即为预测药物成分如何通过疾病靶点发挥其作用, 因此对成分靶点和疾病靶点交集的研究成为中药研究内容。Venn Diagram 可以计算若干元素列表的交集, 将生成一个文本输出, 此外还将以韦恩图的形式生成图形。本研究使用韦恩图对疾病靶点和成分靶点进行分析, 从而了解中药靶点和疾病靶点间的关系, 进一步分析中药如何通过共有的靶点发挥治疗作用。

1.4.3 网络拓扑学分析 笔者对网络中节点的评价采用网络拓扑参数^[22], 包括自由度 (Degree): 一个节点的度表示在节点相互作用网络中与该节点直接相互作用的节点数目。节点的度越大, 参与的生物功能越多, 在网络中的重要性越强; 平均最短路径长度 (average shortest path length): 网络中两节点间的最短路径长度是两节点间最短跳转数, 平均最短路径长度是网络中所有顶点间的最短路径长度的平均值。节点的平均最短路径越小说明节点在网络中越重要; 介数 (betweenness centrality): 介数反映了某个节点在通过网络进行信息传输中的重要性。网络中不相邻的节点之间的通讯主要依赖于连接两个节点的最短路径。如果一个节点被许多最短路径经过, 则表明该节点在网络中很重要。介数计算方法是网络中经过某节点的最短路径在网络中所有最短路径中的比例。因此, 介数越大, 节点在网络信息传递中发挥越重要的作用; 接近中心性 (closeness centrality): 反应在网络中某一节点与其他节点之间的接近程度。一个节点到所有其他节点的最短路径和的倒数为接近中心性。因此, 一个节点的接近中心性越大, 节点距离其他节点越近。

2 结果

2.1 类风湿关节炎靶点网络 在 TTD 及 Drugbank 数据库中, 以 “Rheumatoid arthritis” 为关键词, 共获得类风湿关节炎相关靶点 242 个。由于疾病的发生和发展并非单一蛋白出现异常, 系统、器官、蛋白、基因之间存在普遍的联系。信息和能量的交互作用需要通过细胞的特定生物过程和相互作用方式, 例如通过核苷酸、蛋白质、脂质、代谢物和其他小分子。为了

获得蛋白与蛋白之间的相互关系,使用了 STRING 数据库。STRING 数据库进行靶点间相互作用关系分析,得到蛋白-蛋白相互作用网络(图 1)。



节点代表类风湿关节炎靶点,节点颜色由绿色到红色,自由度逐渐增大;边代表靶点间关系

图 1 类风湿关节炎蛋白-蛋白相互作用网络

Fig. 1 protein-protein interaction network of rheumatoid arthritis

2.2 药物靶点网络 将 DTYMT 各中药成分汇总,共 17 有效成分,其中 3 个成分为重复成分(槲皮素,山柰酚, β -谷甾醇),故本研究得到 DTYMT 实际成分为 14 个(表 1)。对应 863 个靶点,去除重复靶点剩余 242 个,通过将成分和靶点进行映射,得到 DTYMT 成分-靶点网络(图 2)。其中若干成分作用范围广泛,有较高自由度。PFS04(槲皮素)151 个

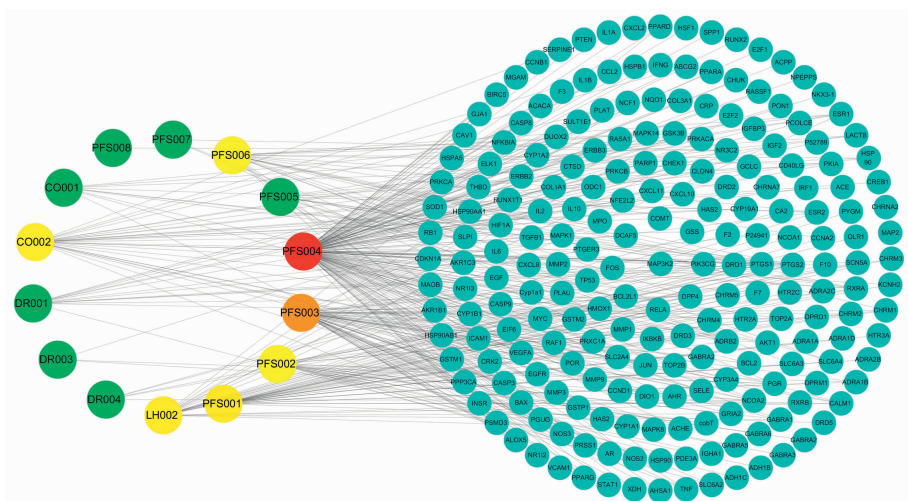
靶点;PFS03(山柰酚)61 个靶点; β -谷甾醇 36 个靶点;LH02(异鼠李素)30 个靶点;PFS01(四氢小檗碱)30 个靶点。通过对以上成分的靶点进行分析发现,大多成分的靶点主要在于炎症反应相关,可以广泛调控炎症因子、趋化因子、黏附分子、血管生长因子等,与炎症反应、血管发生有密切关系。因此,DTYMT 的作用可能主要集中在对炎症反应的抑制方面。

表 1 DTYMT 时 14 成分

Table 1 14 compounds of DTYMT

编码	中文名	英文名	OB	DL	HL
PFS01	四氢小檗碱	tetrahydroberberine	53.83	0.77	6.56
PFS02	常春藤皂苷元	hederagenin	36.91	0.75	5.35
PFS03	山柰酚	kaempferol	41.88	0.24	14.74
PFS04	槲皮素	quercetin	46.43	0.28	14.4
PFS05	甘草素	liquiritigenin	32.76	0.18	17.89
PFS06	芒柄花素	formononetin	69.67	0.21	17.04
PFS07	β -谷甾醇	β -sitosterol	33.94	0.7	13.56
PFS08	杠柳苷元	periplogenin	36.61	0.74	6.64
CO01 ¹⁾	表阿夫儿茶精	epiafzelechin	33.74	0.21	
CO02 ¹⁾	表儿茶素	epicatechin	38.93	0.24	
DR01	龙胆根素	Gentisin	64.06	13.71	0.21
DR03	谷甾醇	sitosterol	36.91	5.37	0.75
DR04	樟脑苷 III	Sylvestroside III	56.47	9.61	0.43
LH002	异鼠李素	isorhamnetin	49.60	0.31	14.34

注:¹⁾表阿夫儿茶精和表儿茶素在数据库中 HL 值缺失,但是考虑 OB 和 DL 值符合纳入标准,且 2 个单体在当前都有研究成果,因此予以纳入本次研究。



左边节点为中药成分,颜色由绿色变为红色表示自由度逐渐升高;蓝色节点为复方所有靶点;边表示成分与靶点间关系

图 2 DTYMT 的成分-靶点网络

Fig. 2 Compound-target network of DTYMT

2.3 候选成分-靶点-通路分析

2.3.1 候选靶点 通过生物信息学方法,共挖掘得

到 DTYMT 潜在的 242 个靶点。但是,尚不明确这些靶点与类风湿关节炎的关系。因此对二者的交集

进行研究,使用韦恩图表示交集靶点,共 42 个(见图 3,4,表 2)。由于 42 个蛋白既是 DTYMT 靶点,也是类风湿关节炎靶点,因此推测 DTYMT 可能通过这 42 个靶点对类风湿关节炎起到治疗作用。这些靶点中,部分靶点是炎症反应中的关键因子,如 IL-1,IL-6,TNF,COX2 (PTGS2) 等,对类风湿关节炎病理过程的炎症反应起到重要作用。目前的治疗重点也侧重于对炎症反应的控制,生物制剂已开发了 IL-1,IL-6,TNF 受体抑制剂,糖皮质激素,非甾体抗炎药对 COX2,NOS2 均有较好的抑制作用。

表 2 DTYMT 治疗 RA 的候选靶标拓扑学参数

Table 2 Topology parameters of candidate targets for DTYMT in treatment of RA

靶点	全称	自由度	平均最短路径	介数	接近中心性
IL-6	白细胞介素-6	33	1.18	0.148 8	0.851 1
TNF	肿瘤坏死因子	32	1.23	0.121 3	0.816 3
JUN	AP-1 转录因子	30	1.28	0.095 5	0.784 3
TP53	肿瘤蛋白 p53	30	1.25	0.112 2	0.800 0
PTGS2	前列腺素 G/H 合成酶 2	27	1.35	0.052 3	0.740 7
IL-1B	白细胞介素-1 β	24	1.43	0.027 4	0.701 8
BCL2	Bcl-2 凋亡调节因子	20	1.53	0.017 3	0.655 7
PPARG	过氧化物增殖物激活剂受体 γ	18	1.58	0.024 7	0.634 9
NFKBIA	NFKB 抑制剂 α	18	1.58	0.007 8	0.634 9
NOS2	诱导型一氧化氮合酶	16	1.63	0.004 9	0.615 4
CYP1A1	细胞色素 P450 家族 1 亚家族 A 成员 1	15	1.63	0.023 1	0.615 4
IL-2	白细胞介素-2	15	1.65	0.004 0	0.606 1
MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14 (p38)	15	1.65	0.002 9	0.606 1
AHR	多环芳烃受体	14	1.65	0.013 0	0.606 1
CD40LG	CD40 配体	14	1.70	0.003 5	0.588 2
IL-1A	白细胞介素-1 α	14	1.70	0.003 6	0.588 2
CYP3A4	细胞色素 P450 家族 3 亚家族 A 成员 4	13	1.68	0.017 6	0.597 0
PPARA	过氧化物增殖物激活剂受体 α	13	1.70	0.012 9	0.588 2
MPO	髓过氧化物酶	12	1.75	0.001 3	0.571 4
MMP-1	基质金属蛋白酶-1	12	1.73	0.001 8	0.579 7

此在网络中较为重要。有趣的是,发现在本网络中,介数与接近中心性较大的靶点也是自由度大、平均最短路径较小的靶点,也即排名靠前的靶点。综合这些参数,认为 IL-6, TNF, JUN, TP53, PTGS2, IL-1 β (IL-1B), BCL2 等靶点可能是 DTYMT 的潜在靶点,且这些靶点共同在 RA 病理中发挥重要作用。

2.3.3 候选成分 将 42 个成分与 14 个 DTYMT 成分进行映射后发现,有 11 个成分参与调控 42 个候选靶点(见表 3)。共有 3 个成分与 42 个靶点中的任何靶点无靶向关系,因此认为杠柳昔元 (Periplogenin), 龙胆根素 (Gentisin), 谷甾醇 (Sitosterol) 可能在类风湿关节炎中不通过上述 42 个靶点发挥治疗作用。但是,尚不明确以上 3 个成分能否通过靶向其他靶点,间接作用于候选靶点。在 11 个候选成分中,槲皮素,山柰酚, β -谷甾

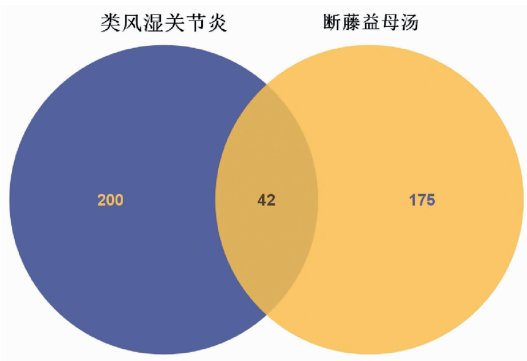


图 3 疾病与药物靶点

Fig.3 Disease and drug targets

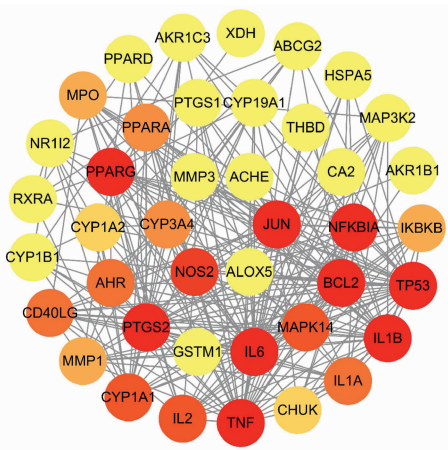


图 4 42 候选靶点 PPI 网络

Fig.4 42 candidate targets PPI network

2.3.2 候选靶点拓扑学分析 在 Cytoscape 软件中对候选靶点 PPI 网络的拓扑学参数进行分析,选取自由度排名前 20 的靶点(见表 2)。结果显示,前 20 个靶点中自由度最大靶点为 IL-6,自由度为 33。自由度越大说明靶点与更多靶标存在靶向关系,因此在网络中更为重要。平均最短路径反映靶点与其他靶点在网络中的距离,距离越近则与其他靶点关系越密切,本网络中 IL-6, TNF, c-Jun 氨基末端激酶 (JUN), 肿瘤蛋白 53 (TP53) 平均最短路径较短,因

表 3 断藤益母汤候选成分筛选

Table 3 Screening of DTYMT candidate compounds

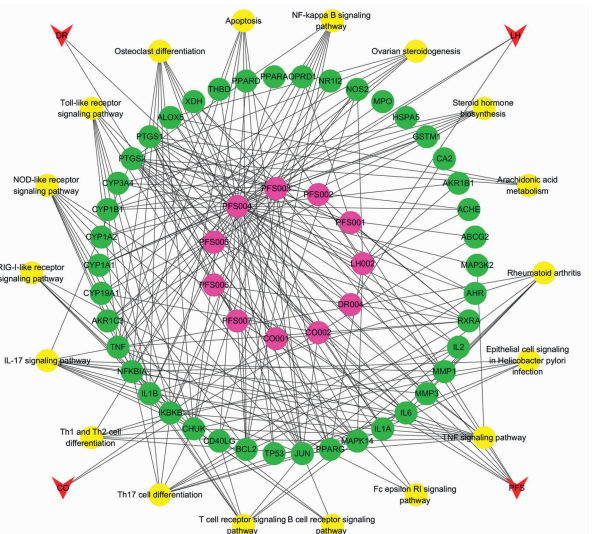
编码	中文名	英文名	靶点数
PFS01	四氢小檗碱	tetrahydroberberine	30
PFS02	常春藤皂苷元	hederagenin	23
PFS03	山柰酚	kaempferol	61
PFS04	槲皮素	quercetin	151
PFS05	甘草素	liquiritigenin	12
PFS06	芒柄花素	formononetin	22
PFS07	β -谷甾醇	β -sitosterol	36
CO01	表阿夫儿茶精	epiafzelechin	10
CO02	表儿茶素	epicatechin	26
DR04	樟脑苷Ⅲ	Sylvestroside Ⅲ	6
LH02	异鼠李素	isorhamnetin	30

醇,四氢小檗碱,异鼠李素等自由度较高,和更多的靶点有靶向关系,因此可能发挥更重要的作用。

2.3.4 通路分析 使用 Cytoscape 软件中的 Cluego 插件进行通路分析,数据库选择 KEGG。结果显示有较多候选靶点的通路,包括类风湿关节炎信号通路,IL-17 信号通路,卵巢类固醇生成通路,TNF 信号通路,Th17 细胞分化信号通路,NF- κ B 信号通路,破骨细胞分化,类固醇激素生物合成通路等。将中药、候选成分、候选靶点、信号通路进行映射,得到药物-成分-靶点-信号通路网络图(图 5)可以从图中看出,较多的靶点参与 IL-17 信号通路,TNF 信号通路,类风湿关节炎通路,NF- κ B 信号通路,说明 DTYMT 可能通过 11 个成分,作用于若干靶点,从而对众多信号通路产生调控作用。

具体而言,在类风湿关节炎信号通路中,笔者发现众多细胞类型参与 RA 病理过程,如树突状细胞,滑膜巨噬细胞、成纤维样滑膜细胞、破骨细胞、血管内皮细胞,TH17 细胞的等(图 6)。在不同类型细胞的共同作用下,发生了滑膜增生、软骨破坏、血管翳增生等病理损伤。在 42 个候选靶点中 IL-1,IL-6, MMP-1, MMP-3, TNF 等细胞因子和组织蛋白酶是 DTYMT 的靶蛋白。因此,DTYMT 可能对这些细胞因子有重要的调控作用。

TNF- α 已被证明在类风湿关节炎的病理过程中发挥重要作用,TNF 与 TNF 受体 1/2 结合后,可以激活下游 NF- κ B 信号通路及 MAPK 信号通路,进一步参与调控下游蛋白如 IL-6,IL-1 β ,MMP-1, MMP-3, COX2 (PTGS2) 等,可以发现 TNF- α 作为致病因子在



红色三角形为中药;黄色节点为信号通路;绿色节点为候选靶点;紫色节点为候选成分;边代表节点间关系

图 5 药物-成分-通路-靶点网络

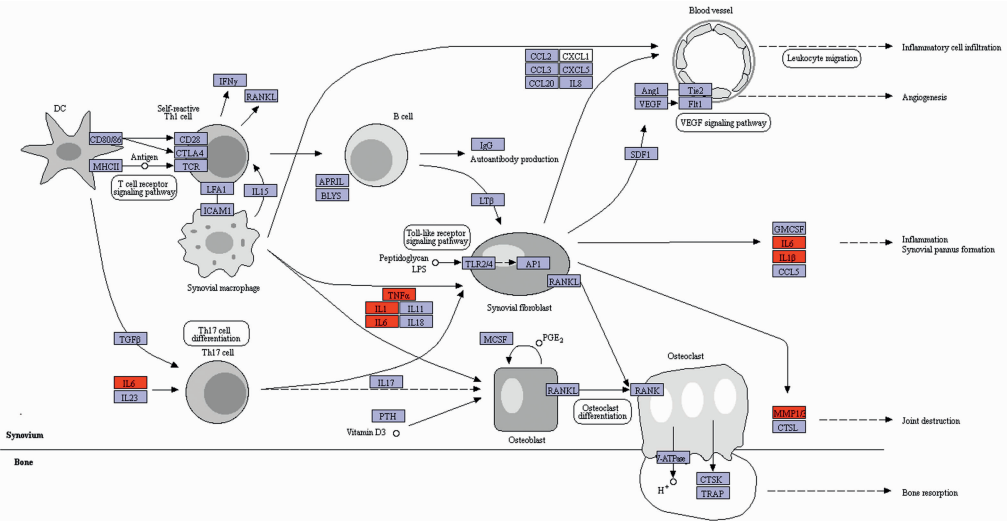
Fig. 5 Herb-compound-pathway-target network

本通路中参与正反馈调节,可以激活炎症相关的信号通路,进一步包括自身在内的炎症因子释放(见图 7)。

NF- κ B 信号通路已被证明是炎症反应中的重要通路,在 IL-1 β ,TNF- α ,TNF 超家族成员 5 (CD40L) 的刺激下,NF- κ B 信号通路可以被激活,对下游炎症因子进行负反馈调节,并通过调控 Bcl-2 蛋白,参与细胞凋亡反应(见图 8)。其他信号通路如 Th17 细胞分化信号通路,MAPK 信号通路,破骨细胞分化,类固醇激素生物合成通路,NOD 样受体信号通路,Toll 样受体信号通路等也在类风湿关节炎中发挥重要作用。IL-1,IL-6,TNF,COX-2 等炎症因子在这些通路中也发挥重要作用,由此可知,在类风湿关节炎的病理过程中,炎症反应是重要的环节,如何使用中医药缓解类风湿关节炎的炎症反应成为治疗的重要内容。

3 讨论

本研究中,笔者发现 DTYMT 中符合 ADME 参数的 11 个成分(四氢小檗碱,常春藤皂苷元,山柰酚,槲皮素,甘草素,芒柄花素, β -谷甾醇,表阿夫儿茶精,表儿茶素,樟脑苷Ⅲ,异鼠李素)可能通过作用于 IL-6, TNF, JUN, TP53, PTGS2, IL-1B, Bcl-2 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG), 核转录因子- κ B 抑制剂 α (NFKBIA), NOS2, IL-2, p38, MMP-1, MMP-3 等靶点对类风湿关节炎起到治疗作用。此外,DTYMT 可能通过以上成分和靶点作用于多条信号通路,包括 IL-17 信号通路, TNF 信号通路, 风湿



蓝色节点为信号通路蛋白;红色节点为 DTYMT 候选靶点;实线箭头表示直接关系;虚线箭头表示间接关系(图 7,8 同)

图 6 类风湿关节炎信号通路

Fig. 6 Rheumatoid arthritis signaling pathway

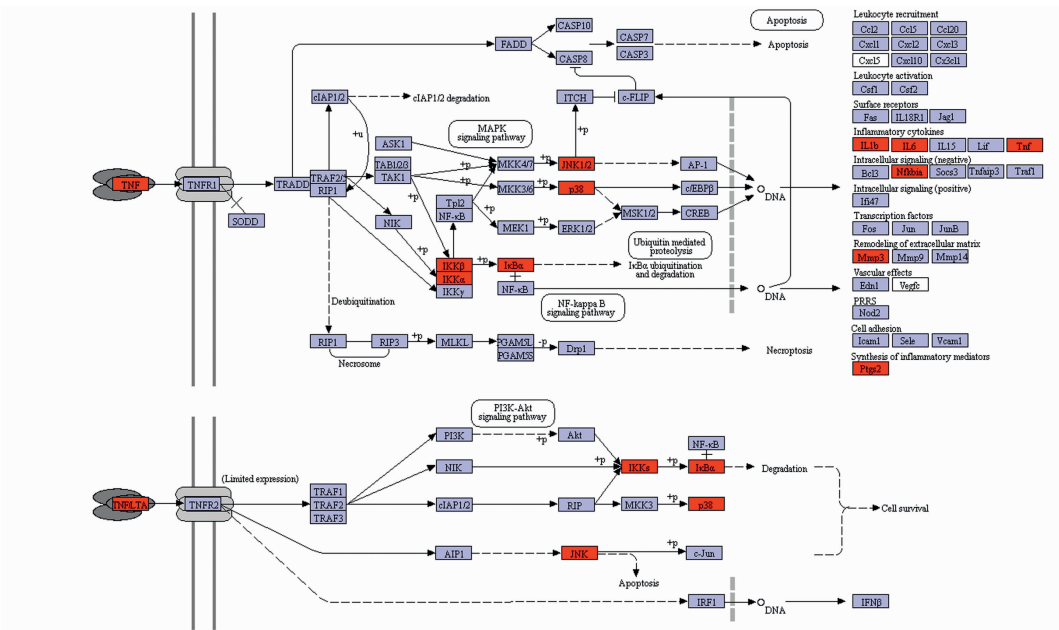


图 7 TNF 信号通路

Fig. 7 TNF signaling pathway

关节炎信号通路, NF-κB 信号通路, 破骨细胞分化, 卵巢类固醇生成通路, Th17 细胞分化信号通路等。

DTYMT 的主要作用机制可能与参与控制 RA 炎症反应相关。其中 IL-6, TNF, IL-1B, JUN, PTGS2 是临床用药的常见靶标。IL-6 不仅在机体的免疫应答中起着重要的作用, 而且在造血和中枢神经系统中起着重要的作用。在慢性炎症性自身免疫性疾病如类风湿关节炎、系统性幼年特发性关节炎、克罗恩病、系统性红斑狼疮、和血管炎等疾病中发现 IL-6 大量产生。此外, 血清 IL-6 水平与疾病活动密切相

关^[23]。托珠单抗 (tocilizumab) 能与可溶性和膜结合的 IL-6 受体特异结合, 并通过这些受体抑制 IL-6 介导的信号传递^[24]。TNF 有 2 种不同的受体, 其相对分子质量分别为 55 kDa (p55) 和 75 kDa (p75), TNF 的生物活性依赖于与细胞表面的受体的结合^[25]。依那西普 (Etanercept), 阿达木单抗 (Adalimumab), 英夫利昔单抗 (Infliximab) 都是针对 TNF 受体的生物制剂, 在类风湿关节炎的治疗中发挥重要作用。依那西普主要结合 p75 TNF 受体从而有效地将他们从循环中清除出来。阿达木单抗可以同时与 p55 和

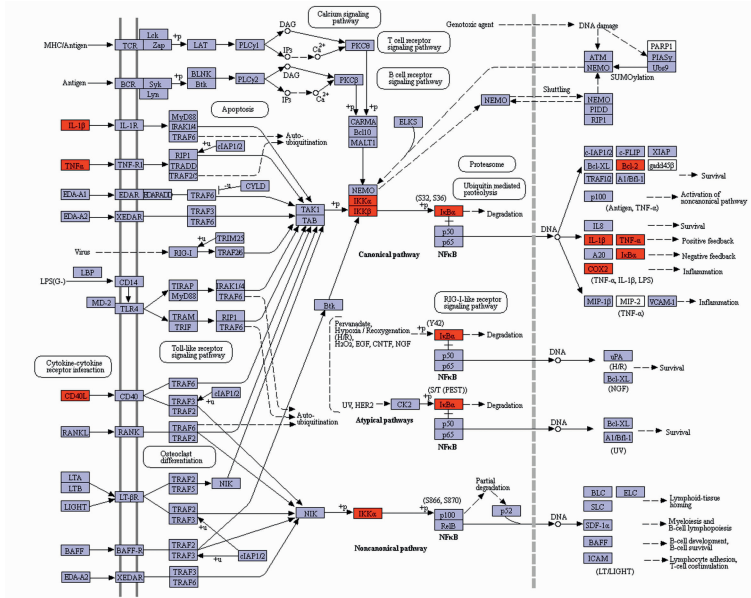


图 8 NF-κB 信号通路
Fig. 8 NF-κB signaling pathway

p75 结合^[26]。前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 也被称为 COX-2, 是前列腺素生物合成中的关键酶, 在炎症反应中发挥重要作用。与大多数抑制环氧合酶 (COX-1 和 COX-2) 的非甾体抗炎药不同, 塞来昔布 (Celecoxib) 作为非甾体类抗炎药是 COX-2 的选择性非竞争性抑制剂, 用于治疗骨关节炎、类风湿关节炎、急性疼痛、痛经和月经症状, 也用于减少家族性腺瘤性息肉病患者结肠和直肠息肉的数量^[27]。由此可见, DTYMT 可能可以调控部分在类风湿关节炎病理中扮演中药角色的细胞因子。

有趣的是, DTYMT 靶向的多条信号通路中, IL-6, TNF, IL-1B, JUN, 核转录因子-κB 激酶抑制剂 (IKκB), 核转录因子-κA 激酶抑制剂 (IKκA), MMP-1, MMP-3 等靶点在其中发挥重要作用。因此, 笔者认为 DTYMT 可以靶向多条信号通路可能是因为部分细胞因子广泛地参与炎症反应, 而 DTYMT 对炎症反应有较好的抑制作用。在当前的研究中, 发现细胞因子有促炎因子和抑炎因子, 其中 IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 可以促进炎症反应, 而 IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 可以抑制炎症反应^[2]。笔者发现 DTYMT 汤主要可以调控 IL-1, IL-6, TNF, 因此可能发挥抑制炎症反应的作用。

网络药理学研究还处于起步阶段, 但这种新的研究方法将为药物发现和设计的现代化发挥重要作用, 也为当前的药物发现领域提供了新的思路和方法。然而, 由于本研究建立在生物信息学的基础上, 前期需要进行大量的数据挖掘, 并依赖于大量的计

计算机运算法则, 其结果为预测结果。虽然可以为药物发现和设计、药物作用机制的阐述提供研究方法和思路, 仍需要后期大量的实验验证。但是, 由于网络药理学可以极大地提高研究效率, 这一方法在未来的研究中可能占据重要的地位。

4 结论

发现 DTYMT 中槲皮素, 山柰酚, β-谷甾醇, 四氢小檗碱, 异鼠李素等 11 个有效成分可能靶向 IL-6, TNF, IL-1B 等 42 个类风湿关节炎相关靶点, 参与了包括 TNF 通路, IL-17 通路, Th17 细胞分化通路, 风湿关节炎通路, NF-κB 通路, 破骨细胞分化通路, 卵巢类固醇生成通路等在内的多条通路。DTYMT 的作用机制可能主要通过参与多条信号通路, 对炎性细胞因子的调控起到对类风湿关节炎起抗炎作用。

[参考文献]

[1] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055):2023-2038.
[2] Wojdasiewicz P, Poniatowski L A, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014:561459.
[3] Talotta R, Atzeni F, Batticciotto A, et al. Biological agents in rheumatoid arthritis; a cross-link between immune tolerance and immune surveillance[J]. Curr Rheumatol Rev, 2018, 14(2):131-139.
[4] Carrera C G, Dapavo P, Malagoli P, et al. PACE study: real-life psoriasis area and severity index (PASI

- 100 response with biological agents in moderate-severe psoriasis [J]. *J Dermatolog Treat*, 2018, 29 (5): 481-486.
- [5] 林昌松, 梁江, 刘凤震, 等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6) :632-637.
- [6] 蔡叙东, 林昌松, 潘东梅, 等. 断藤益母汤对破骨细胞活性及 Wnt 信号通路的影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(10) :2332-2335.
- [7] 蔡叙东, 林昌松, 潘东梅, 等. 断藤益母汤对破骨细胞 RANKL 信号通路及 MMP-9 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12) :68-73.
- [8] 潘东梅, 王强, 蔡叙东, 等. 断藤益母汤抑制 PI3K/AKT 通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5) :2051-2055.
- [9] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, et al. Network-based approaches in pharmacology[J]. *Mol Inform*, 2017, 36 (10):114-119.
- [10] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2) :110-120.
- [11] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(18) : 3633-3638.
- [12] 王萍, 唐仕欢, 苏瑾, 等. 基于整合药理学的中药现代研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (7): 1297-1302.
- [13] 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.
- [14] CHEN X, JI Z L, CHEN Y Z. TTD: Therapeutic target database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (1): 412-415.
- [15] GUAN L, YANG H, CAI Y, et al. ADMET-score-a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness [J]. *Medchemcomm*, 2019, 10 (1):148-157.
- [16] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1) :13.
- [17] HUANG L, XIE D, YU Y, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1) :D1117-D1120.
- [18] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11) :2498-2504.
- [19] LIN J S, LAI E M. Protein-protein interactions: co-immunoprecipitation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615:211-219.
- [20] Smits A H, Vermeulen M. Characterizing protein-protein interactions using mass spectrometry: challenges and opportunities [J]. *Trends Biotechnol*, 2016, 34 (10):825-834.
- [21] 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.
- [22] 黄海滨, 杨路明, 王建新, 等. 基于网络拓扑的生物网络关键节点识别研究进展[J]. *数学的实践与认识*, 2011, 41(7) :114-125.
- [23] Alam J, Jantan I, Bukhari S. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 615-633.
- [24] Sheppard M, Laskou F, Stapleton P P, et al. Tocilizumab (Actemra)[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(9) :1972-1988.
- [25] Kristensen M, Chu C Q, Eedy D J, et al. Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor[J]. *Clin Exp Immunol*, 1993, 94(2) :354-362.
- [26] Murdaca G, Negrini S, Magnani O, et al. Update upon efficacy and safety of etanercept for the treatment of spondyloarthritis and juvenile idiopathic arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2018, 28(3) :417-431.
- [27] Fidahic M, Jelacic K A, Radic M, et al. Celecoxib for rheumatoid arthritis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 6:D12095.

[责任编辑 周冰冰]