

·中医药信息学·

基于网络药理学探究脊蛇祛湿胶囊君药金毛狗脊 治疗 RA 的作用机制

岑村红,何吉,支太发,黄聪,罗进芳

(贵州中医药大学基础医学院药理学教研室,贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 通过构建“药物-成分-靶点-疾病”的相互作用网络,探究脊蛇祛湿胶囊中的君药金毛狗脊治疗类风湿性关节炎(RA)的机制。方法 通过 CNKI 和 Pubchem 数据库查找金毛狗脊的活性成分并用 Swiss Target Prediction 数据库筛选得到的靶点,通过 GeneCards 和 omim 数据库整合筛选得到的靶点,将其取交集得到共同靶点导入 Cytoscape 进行可视化分析,并通过 String 和 Cytoscape 进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析,运用 Metescape 数据库将得到的结果进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果 通过 Swiss Target Prediction 得到金毛狗脊 167 个药物靶点, GeneCards 和 omim 数据库整合筛选 RA 3060 个靶点,取其交集共 91 个共同基因,通过 String 蛋白互作网络筛选得到 20 个关键基因;GO 分析显示金毛狗脊涉及炎症反应等生物过程;KEGG 分析显示金毛狗脊参与调节 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、雌激素信号通路等。结论 金毛狗脊的药效成分与类风湿性关节炎有相同的作用靶点,与其相关的靶点包括 ALB、MMP9、EGFR 等,金毛狗脊可以通过调节多种通路抑制类风湿性关节炎的进程。

关键词: 类风湿性关节炎;金毛狗脊;脊蛇祛湿胶囊

中图分类号:R259

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.13.001

文章编号:1006-1959(2023)13-0001-07

The Mechanism of Action of the Cibotium Barometz of Jishe Qushi Capsule in the Treatment of RA Based on Network Pharmacology

CEN Cun-hong, HE Ji, ZHI Tai-fa, HUANG Cong, LUO Jin-fang

(Pharmacology Teaching and Research Office of Medicine and Basic Sciences College, Guizhou University of
Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Cibotium barometz of Jishe Qushi capsule in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) by constructing the interaction network of “drug-component-target-disease”. **Methods** Through the CNKI and Pubchem database to find the active ingredients of Cibotium barometz, and using the Swiss Target Prediction database to screen the targets, through the GeneCards and omim database integration to screen the targets, the common targets obtained by the intersection were imported into Cytoscape for visual analysis, and the protein-protein interaction network analysis was carried out by String and Cytoscape. The results were analyzed by GO and KEGG enrichment analysis using Metescape database. **Results** A total of 167 drug targets were obtained by Swiss Target Prediction, and 3060 RA targets were screened by GeneCards and omim database integration. A total of 91 common genes were intersected, and 20 key genes were screened by String protein interaction network. GO analysis showed that the Cibotium barometz involved biological processes such as inflammatory response. KEGG analysis showed that Cibotium barometz was involved in the regulation of EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance pathway, HIF-1 signaling pathway, PI3K-AKT signaling pathway, estrogen signaling pathway and so on. **Conclusion** The active ingredients of Cibotium barometz have the same target as rheumatoid arthritis, the related targets include ALB, MMP9, EGFR, etc. Cibotium barometz can inhibit the process of rheumatoid arthritis by regulating multiple pathways.

Key words: Rheumatoid arthritis; Cibotium barometz; Jishe Qushi capsule

脊蛇祛湿胶囊(Jishe Qushi capsule)是苗药用于治疗 RA 的一种复方处方药,由经典药方金乌健骨方加工而来^[1]。方剂中的主要成分为君药金毛狗脊

(Cibotium barometz),臣药乌梢蛇,两藤(黑骨藤和鸡血藤)再佐以姜黄,白芍和三七活血备用,具有很好的祛风除湿的治疗效果^[2-3]。君药金毛狗脊最早记载于《神农本草经》,味苦,甘,性温,具有补肝肾、强筋骨、舒经络、除湿痛及利尿等功效,可用来治疗多种临床难症,是一类较为常见的中药^[4]。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一类具有较高致残率且病理表现为滑膜炎与血管翳的慢性自身免疫性疾病^[5]。西医治疗主要应用非甾体抗炎药,糖皮质激素和传统抗风湿药等^[6]。RA 在中医范畴中属“痹症”,

基金项目:贵州省基础研究(自然科学)项目(编号:黔科合基础-ZK[2022]一般 477)

作者简介:岑村红(2001.4-),女,贵州兴义人,本科,主要从事中药抗炎免疫药理研究

通讯作者:罗进芳(1989.10-),女,贵州黔西人,博士,讲师,硕士生导师,主要从事中药抗炎免疫药理研究

苗医药中将 RA 归属为“风”类疼痛病。目前占主流的学说中“主药、辅药、引药”与中医传统特点的“君臣佐使”遥相呼应。目前,关于脊蛇祛湿胶囊中的君药成分金毛狗脊治疗 RA 的作用机制尚不清楚,网络药理学以大量明确的生物信息数据为基础,利用多学科的知识及方法^[7,8],分析探索药物对疾病作用的可能机制。基于此,本研究借助网络药理学的方法可对脊蛇祛湿胶囊中的君药金毛狗脊进行中药网络学的研究,构建药物的“成分-靶点-通路-疾病”网络,初步探究金毛狗脊治疗 RA 的可能机制和作用靶点,为后续临床和实验研究提供更多科学理论依据。

1 资料与方法

1.1 金毛狗脊药效成分与靶点筛选 由于通过 TCM-SP(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、TCMID(<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 和 BATMAN (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)均未找到金毛狗脊的化学成分,因此通过中国知网检索金毛狗脊的有效成分和发挥抗风湿作用的活性成分,最终查得金毛狗脊的水溶性成分为原儿茶酸和咖啡酸,具有抗风湿的药理活性^[4,9,10]。在中药系统药理学数据库与分析平台数据库(TCMSP)中以 CAS 编号作为筛选参照,检索得到金毛狗脊的化学成分,通过 Pubchem 获得金毛狗脊化学成分的化学结构与对应的 2D 和 3D 模型。使用 Swiss Target Prediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)对靶点信息进行收集和处理,剔除重复项后整合,获取金毛狗脊化合物原儿茶酸和咖啡酸的基因靶点。

1.2 检索 RA 相关靶点 使用 GeneCards(<http://www.genecards.org/>)数据库和 omim 数据库(<http://www.omim.org/>)以“rheumatoid arthritis”为关键词进行检索,获得相关疾病作用靶点,并通过 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)将获得的靶点转换为 gene name 的形式以 excel 格式导出^[11]。

1.3 药物-疾病共同靶点筛选 在 Draw Venn Diagram 在线软件作图工具平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/venn/>)上分别录入金毛狗脊和 RA 的靶点,绘制韦恩图^[12],得到药物与疾病的共同靶点并保存。对金毛狗脊有效成分和与“药物-疾病”共同靶点运用 Cytoscape3.9.1 软件进行可视化分析和构建。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及分析 基于研究金毛狗脊治疗 RA 的靶蛋白之间的相互关系,

将药物-成分-疾病交集靶点基因通过相互作用数据平台 String(<https://string-db.org/>)进行相互作用蛋白查询并构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,物种设置为“智人”(Homo sapiens),设置最低互动评分(minimum required interaction score)为中等置信度 0.400,删减掉无相互关系的节点^[13],得到金毛狗脊治疗 RA 的蛋白质-蛋白质相互作用网络。利用 Cytoscape3.9.1 软件对 PPI 网络进行拓扑分析,其中以介数中间度(betweenness centrality, BC)为主要拓扑参数,筛选出蛋白质-蛋白质相互作用网络中的关键靶蛋白。

1.5 基因 GO 富集分析和 KEGG 通路分析 为了明确关键靶点蛋白在基因功能及信号通路中的作用,把蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)中蛋白关键靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。在 Metascape(<https://metascape.org>)数据库中输入经 String 筛选过删除重复值的蛋白基因组序列,选择物种为 Homo sapiens^[14]。分别勾选 KEGG、GOMF、GOCC、GOBP,重复 4 次分析过程,再将求得的分析结果打包下载。打开维生信(www.bioinformatics.com.cn),将药物疾病关键靶点进行 GO 分析和 KEGG 功能富集分析,并将结果以条形图和气泡图形式输出^[15]。

2 结果

2.1 金毛狗脊药效成分及靶点的筛选结果 利用 Pubchem 平台和 TCMSP 数据库结合 CNKI 的论文查询,筛选得到金毛狗脊的抗风湿性有效成分主要包括 2 个,见图 1;将活性成分对应的 SMILES 式输入 Swiss Target Prediction 数据库对靶点信息进行集合处理,去除重复值,共筛选出潜在有效成分的 167 个药物靶点。

2.2 RA 疾病靶点筛选结果 在 GeneCards 数据库和 omim 数据库共得到 3060 个 RA 疾病靶点。

2.3 药物-疾病共同靶点筛选结果 在 Draw Venn Diagram 在线软件作图工具平台上分别录入金毛狗脊 167 个药物靶点与 RA 相关的 3060 个靶点,绘制 Venn 图,得到两者的药物-疾病共同靶点为 91 个,见图 2。

2.4 “药物-成分-靶点-疾病”的网络构建及可视化分析 将金毛狗脊 2 个潜在抗风湿活性成分与 91 药物-疾病共同靶点输入 Cytoscape3.9.1 软件中,绘制并美化“药物-成分-靶点-疾病”相互作用的网络图(图 3);图中下角标代表药物和疾病的简写,六边形

代表金毛狗脊药物中的 2 个抗风湿作用的潜在化学成分。左侧为原儿茶酸(protocatechuic acid)的 46 个活性成分靶点,右侧为咖啡酸(Caffeic acid)的 30 个活性成分靶点(其中有 124 个活性成分靶点与疾病靶点无交集,予以删除),外侧大圆为 91 个疾病靶点。

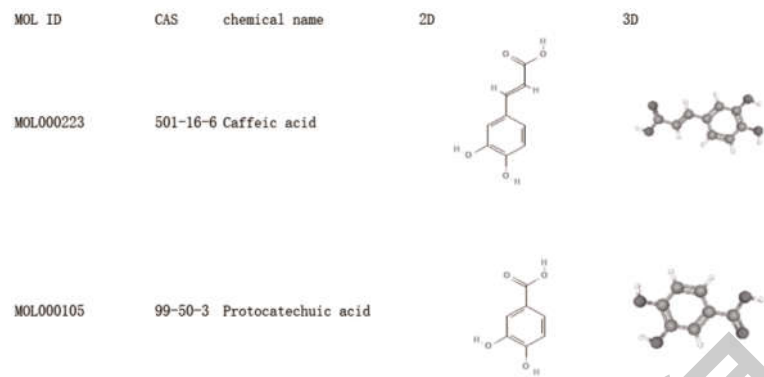


图 1 金毛狗脊的主要活性成分及 2D 结构

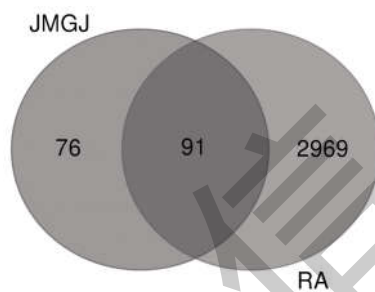


图 2 金毛狗脊有效成分靶点和 RA 相关靶点关系韦恩图

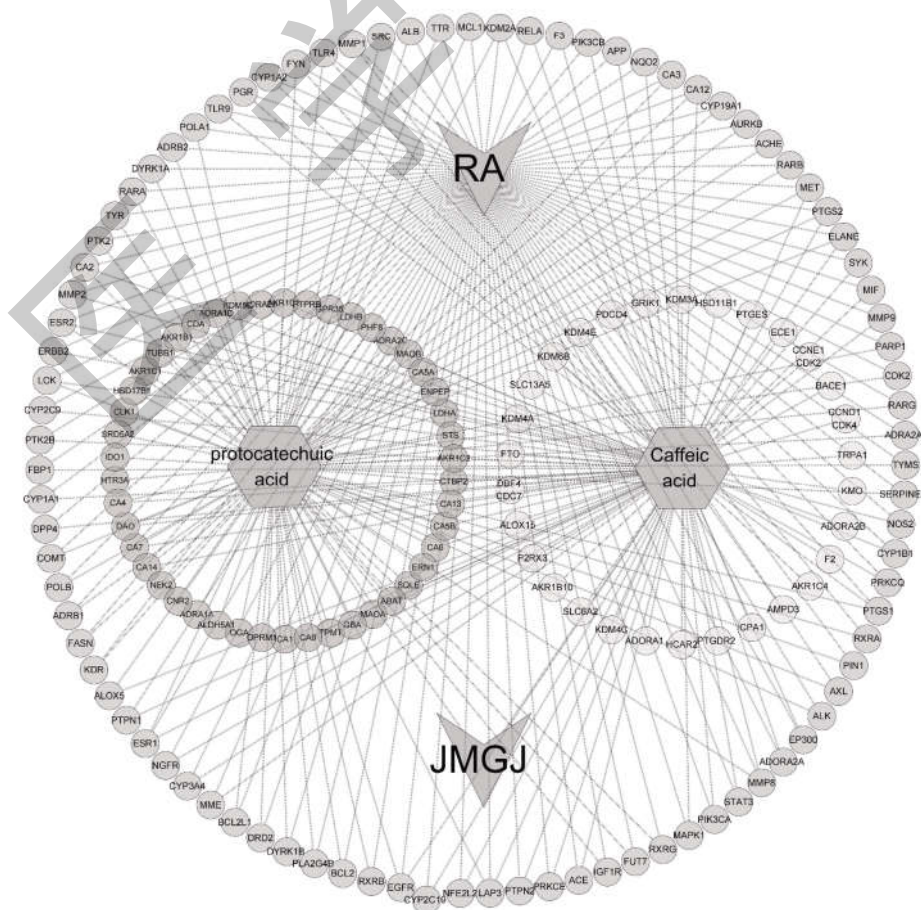


图 3 金毛狗脊治疗 RA 的“药物-成分-疾病-靶点”网络图

2.5 靶蛋白质-蛋白质相互作用网络分析 在 String 数据库中录入“药物-疾病”的 91 个共同靶点,MRIS 设置成中等置信度 0.400,分析得到蛋白相互作用网络图(图 4),共有 91 个相互作用的节点,682 条相互

作用连线,平均节点读值为 15,平均集聚系数为 0.601。通过 Cytoscape3.9.1 软件中的 CytoNCA 工具分析筛选选择 BC 值为主要拓扑参数,分析筛选得到了 20 个关键靶点基因,见图 5、表 1。

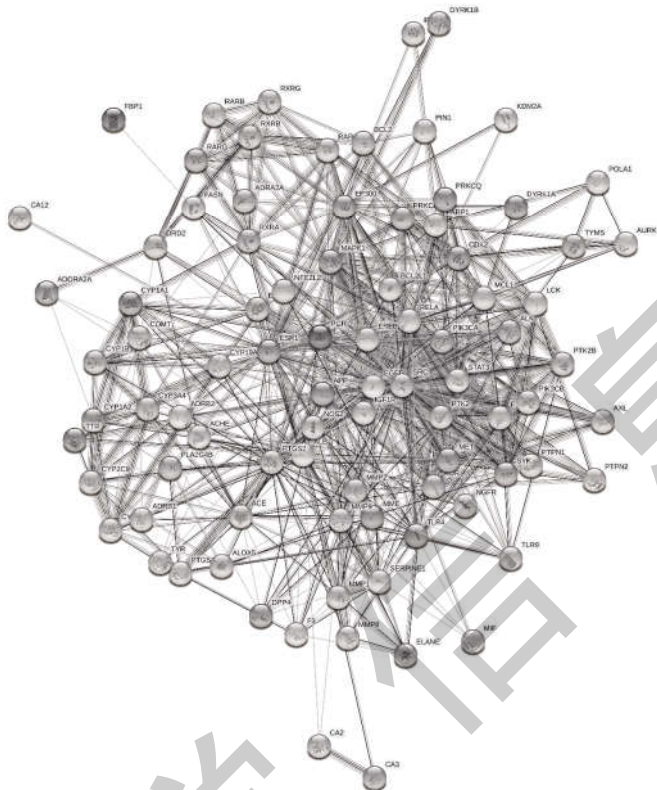
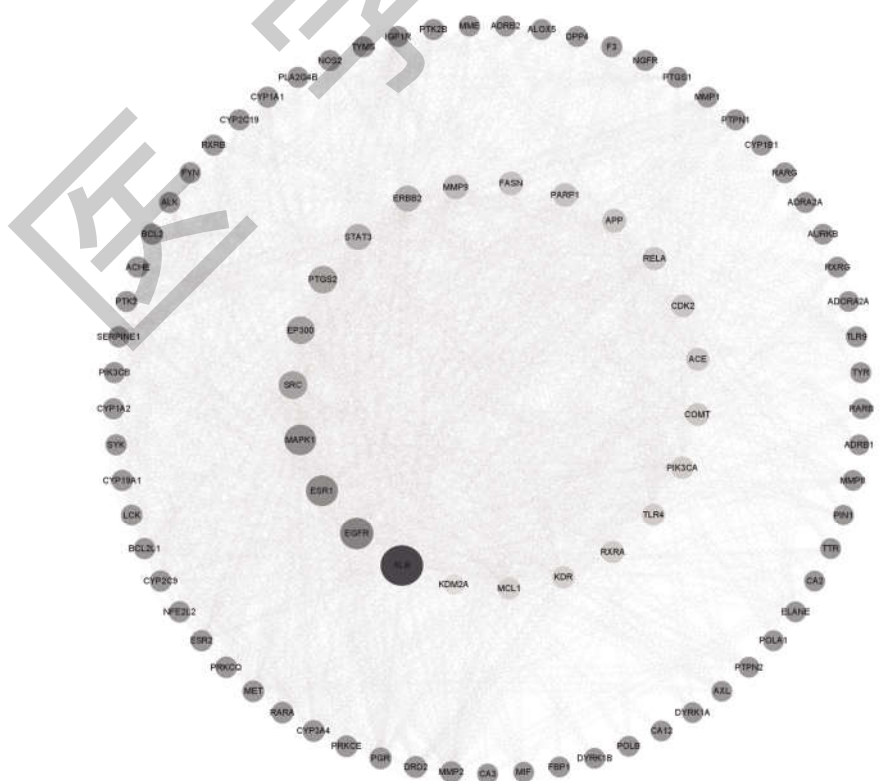


图 4 金毛狗脊治疗 RA 的靶点 PPI 网络图



注:中心圆为筛选出来的 21 个关键靶点基因,圆越大颜色越深 BC 值越高

图 5 经 BC 筛选后得到的关键靶点基因

表 1 筛选得到的 26 个关键基因

基因	BC 值	基因	BC 值
ALB	1161.839 826	FASN	183.685 518 4
EGFR	667.305 567 3	PARP1	182.131 986 8
ESR1	594.952 960 4	APP	177.825 335 6
MAPK1	586.398 809 7	RELA	159.159 336 0
SRC	416.763 114 5	CDK2	146.155 243 3
EP300	415.080 501 4	ACE	135.326 084 4
PTGS2	399.896 624 0	COMT	132.354 943 7
STAR3	315.463 040 3	PIK3CA	109.605 929 2
ERBB2	308.218 615 8	TLR4	108.603 325 3
MMP9	220.827 679 6	RXRA	104.367 697 1

2.6 GO 富集分析 将金毛狗脊治疗 RA 的 91 个靶基因输入 Metescope 数据库进行 GO 富集分析,结果显示,交集基因集合共富集至 1187 条 BP 通路,主要有对细胞激素的反应 (Response to cytohormones)、对激素刺激的反应 (Response to hormonal stimulation)、对类固醇激素的反应 (Response to steroid hormones)、细胞内受体信号通路 (Intracellular receptor signaling pathway)、细胞对有机环状化合物的反应 (Cellular response to organic ring compounds)、激素介导的信号通路 (Hormone-mediated signaling pathway)、细胞对类固醇激素刺激的反应 (Cellular response to steroid hormone stimulation)、类固醇激素介导的信号通路 (Steroid hormone-mediated signaling pathway)、蛋白质磷酸化 (Phosphoryla-

tion of protein)、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等 80 条;CC 通路表明起抗 RA 的场所主要存在于膜筏、膜微区、小窝、粘着斑痕、细胞-基质连接、质膜筏、受体复合物、早期内体、细胞基膜等;交集基因集合共富集 123 个与 MF 相关的过程中,主要涉及包括蛋白酪氨酸激酶活性 (Protein tyrosine kinase activity)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、蛋白激酶活性 (Protein kinase activity)、磷酸转移酶活性、醇基作为受体 (Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor)、激酶活性 (Kinase activity)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (Protein serine/threonine kinase activity)、蛋白质丝氨酸激酶活性 (Protein serine kinase activity)、核受体活性 (Nuclear receptor activity)、配体激活转录因子活性 (Ligand activates transcription factor activity)、核类固醇受体活性 (Nuclear steroid receptor activity) 等,分别将他们筛选前 10 个条目进行条形图可视化,见图 6。

2.7 KEGG 通路富集分析 将金毛狗脊治疗 RA 的 91 个靶基因输入 Metescope 数据库进行 KEGG 分析后共得到 156 条 KEGG 通路,结果显示共同靶点主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路等,其作用机制主要与癌症治疗、激素控制有关。选取前 20 条结果形成 KEGG 通路富集的条形图和气泡图,见图 7、图 8。

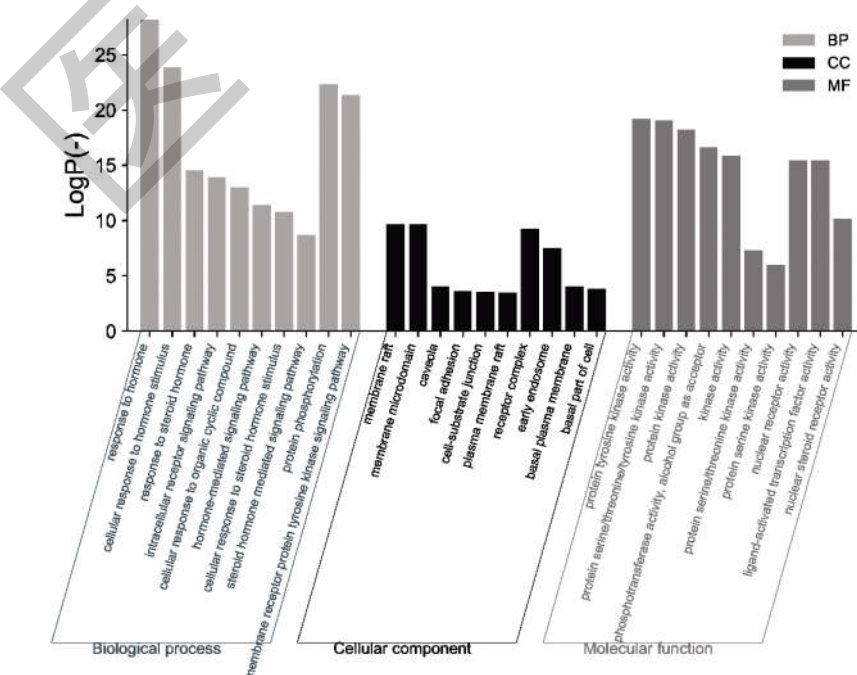


图 6 金毛狗脊治疗 RA 的基因本体论富集前 10 分析条形图

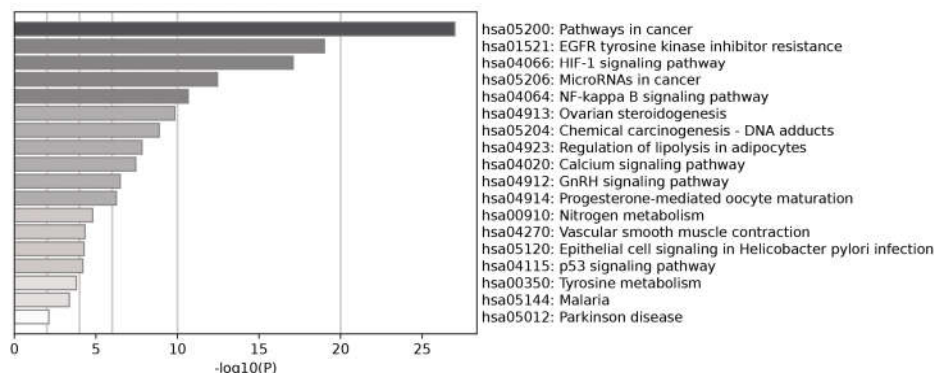


图 7 金毛狗脊治疗 RA 前 20 的 KEGG 通路富集图

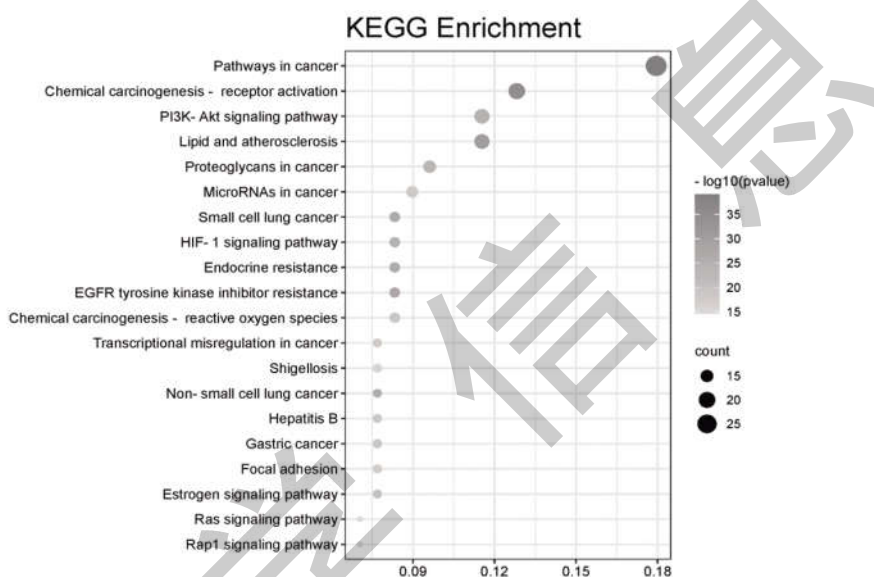


图 8 金毛狗脊治疗 RA 的前 20 的 KEGG 通路富集气泡图

3 讨论

本研究基于网络药理学的方法,筛选出金毛狗脊的 2 个主要活性成分,167 个药物靶点,3060 个疾病靶点,取其活性成分和抗 RA 疾病靶点交集 91 个,构建“靶点-成分-疾病”可视化网络。目前,药物已知的主要活性成分有原儿茶酸和咖啡酸^[16,17]。核心靶点有 ALK、SERPINE1、ALB、TYR、FYN、LCK、MMP8、ESR1、PARP1 等,其中证实以脂多糖(LPS)^[18]刺激单核巨噬细胞 RAW647.7 及炎性介质(NO)和前列腺素(PEG2)的水平可以用来评价金毛狗脊的抗炎作用水平,原儿茶酸能抑制 MMI+的表达来实现广泛抗炎作用^[19]。

从 PPI 网络成分图分析可知药物活性的主要成分基因。ALB 编码人体血液中最丰富的蛋白质,这种蛋白质在调节血浆胶体渗透压中起作用,并作为各种内源性分子(包括激素,脂肪酸和代谢物)以及

外源性药物的载体蛋白。此外,这种蛋白质表现出酯酶样活性,具有广泛的底物特异性。编码的前蛋白经过蛋白水解处理以产生成熟蛋白质,衍生自该蛋白的肽 EPI-X4 是 CXCR4 趋化因子受体的内源性抑制剂。EGFR 基因编码的蛋白质是跨膜糖蛋白,是蛋白激酶超家族的成员,这种蛋白质是表皮生长因子家族成员的受体。EGFR 是一种细胞表面蛋白,与表皮生长因子结合,从而诱导受体二聚化和酪氨酸自磷酸化,导致细胞增殖。金毛狗脊可能就是通过这 91 个共同白蛋白基因发挥抑制 RA 炎症,调节免疫平衡的作用。

从 KEGG 和 GO 富集分析图可知,得到这些靶点的生物过程包括炎症反应、T 细胞活化、对前列腺素等类固醇激素的反应、参与 PI3K-AKT 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路调

节以及细胞因子与受体之间的相互作用。有研究证明^[20],咖啡酸乙酯可能通过抑制 MAPK 信号通路(p-38 和 ERK1/2)磷酸化,从而干扰 IFN- γ /STAT1-/IFN-信号途径下调转录因子和 STAT1 的表达,从而产生抗炎活性。咖啡酸类化合物发挥抗炎作用主要通过抑制下游被激活的 MAPK/NF- κ B 信号通路,当 LPS 与巨噬细胞表面受体结合,激活了下游的 MAPK/NF- κ B 信号通路后,KC-I 化合物可以通过抑制 MAPK/NF- κ B 通路中的一些蛋白表达来减轻炎症症状,从而起到抗炎作用^[21]。本文网络药理学推测的结果与以上研究均一致,说明网络药理学的方法推测金毛狗脊作用靶点和通路是有一定科学性和可行性的。

目前对 RA 的发病机制尚不明确,而中医药的使用可以减轻或规避西医用药导致的副作用及用药单一的问题。通过对中药金毛狗脊的研究,运用现代网络药理学的方法建立“药物-成分-靶点-疾病”的网络关系,可以找到君药金毛狗脊与 RA 关键靶点的交集和可能作用通路,为含有金毛狗脊的中药处方的运用和研究提供进一步的科学参考依据。

综上所述,本研究共搜集到金毛狗脊 2 种活性成分及相关的 58 个潜在靶点,RA 疾病相关的 167 靶点,其中金毛狗脊-RA 交集靶点 91 个,发现金毛狗脊可能是通过调节 ALK、SERPINE1、ALB、TYR、FYN、LCK、MMP8、ESR1、PARP1 等靶点,调控癌症相关通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、Rap1 信号通路等,发挥抑制炎症反应、调节免疫功能及调控细胞凋亡等作用来治疗 RA。但因目前各平台数据库数据更新程度不同,相应分析方法有所区别,得出的结果仅可作为实验研究的理论参考,其作用机制还有待后续进一步的实验进行药物作用靶点和机制的验证。

参考文献:

[1]李宇,唐芳,马武开,等.脊蛇祛湿胶囊治疗膝关节炎的临床疗效及对血清中炎症因子表达的影响[J].广东医学,2019,40(2):234-237.
[2]蔡鑫,唐芳,马武开,等.苗药金乌健骨方治疗类风湿关节炎的研究进展[J].中国老年学杂志,2021,41(9):2001-2004.
[3]兰维娅,唐芳,马武开,等.苗药脊蛇祛湿胶囊联合西药治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J].贵州中医药大学学报,2021,43(5):52-57.

[4]杨慧洁,吴琦,杨世海.金毛狗脊化学成分与药理活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):230-234.
[5]李媛.BLyS 及受体 BAFF-R 水平在类风湿关节炎中的意义[D].天津:天津医科大学,2009.
[6]唐芳.苗医“通筋散血”法治膝关节炎的相关研究[D].贵阳:贵州中医药大学,2018.
[7]黄桂锋,郑晓虹,麦喆铎,等.基于网络药理学探究三七治疗冠心病的潜在作用机制[J].中国药房,2019,30(14):1959-1965.
[8]申安平,王炳森,李桓,等.类风湿关节炎中医古籍研究及网络药理分析[J].河北中医,2021,43(5):847-851.
[9]Zong J,Xiaoling Y,Wukai MA,et al.Molecular mechanism analysis of Miao medicine Jinwujiangu decoction in treating osteoarthritis based on a network pharmacology approach [J].J Tradit Chin Med,2022,42(4):576-585.
[10]徐家星.民族药用植物金毛狗的化学成分及其生源途径研究[D].昆明:云南农业大学,2012.
[11]侯玉婷,黎霞,张宏,等.复方黑骨藤抗类风湿关节炎作用及机制的研究[J].四川师范大学学报(自然科学版),2016,39(1):123-127.
[12]李俊峰,吴力超,王进,等.基于网络药理学和细胞实验探讨 Hispolon 抗结肠癌的作用机制[J].中国药理学通报,2021,37(8):1151-1158.
[13]张明,李崇慧,胡泰然,等.基于网络药理学探讨四逆加入参汤调治胃癌相关性疲乏的潜在作用机制 [J]. 中医临床研究,2022,14(1):6-12.
[14]王新亮,柴智,弓强,等.基于网络药理学探讨五子衍宗丸防控神经管畸形的分子机制[J].时珍国医国药,2022,33(7):1765-1768.
[15]刘仕伟,黄小瑾,李佳霖.基于网络药理学探讨白鲜皮治疗口腔扁平苔藓的作用机制[J].中医临床研究,2021,13(34):8-12.
[16]熊致立,周珊珊,巴元明.基于网络药理学研究五苓散治疗慢性肾衰竭的潜在机制[J].世界中医药,2021,16(19):2851-2855.
[17]许枬,石亚因,谢雪,等.金毛狗脊中的一个新酚苷[J].中草药,2013,44(4):383-386.
[18]许枬,章琪,曹跃,等.狗脊中化学成分及其对 DPPH 清除作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):162-166.
[19]An LJ,Guan S,Shi GF,et al.Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells [J].Food Chem Toxicol,2006,44(3):436-443.
[20]万春平,祁燕,郑喜,等.基于 MAPK 信号通路研究地胆草成分咖啡酸乙酯抑制 T 细胞活化的分子机制[C]//全国第十二届中西医结合风湿病学术会议.2014.
[21]侯金秋,吕博,孟凌宇,等.咖啡酸四聚体异构体基于 MAPK/NF- κ B 信号通路的体外抗炎作用机制研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2022,40(4):445-452.

收稿日期:2023-04-26;修回日期:2023-05-07

编辑/成森