

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.02.015

基于网络药理学探讨补肾强督治痿方治疗强直性脊柱炎的作用机理

邱冬妮¹, 潘峰², 谭希¹, 赖勇辉¹, 何晓红², 周颖燕², 何羿婷^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东省广州市越秀区大德路 111 号, 510120; 2. 广州中医药大学第二附属医院)

摘要 目的 通过网络药理学方法探讨补肾强督治痿方治疗强直性脊柱炎的作用机理。方法 运用中药系统药理学成分分析平台 (BAT-MAN) 数据库获取补肾强督治痿方的作用靶标基因, 于 CTD 数据库中获取强直性脊柱炎疾病相对应的靶标基因, 将两者取交集后获取疾病-药物蛋白靶基因, 运用网络可视化软件 STRING 构建蛋白质间相互作用网络, 并将结果进行网络可视化展示, 通过网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法筛选出重要的关键基因。借助 DAVID 在线工具进行疾病-药物交集靶基因的基因本体论 (GO) 分析和 KEGG 通路富集分析。最后在 CTD 数据库中获取关键基因于强直性脊柱炎的疾病治疗作用。结果 补肾强督治痿方靶标基因与强直性脊柱炎疾病靶标基因的交集基因有 705 个。GO 分析结果显示, 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶基因的生物功能主要包括基因表达的阳性调控、炎症反应、细胞增殖阳性调控等; 信号通路富集结果显示, 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶基因的网络主要涉及肿瘤坏死因子信号通路、雌激素信号通路、T 细胞受体信号通路等。获得关键基因 23 个, 都与痛症、炎症性疾病及关节炎性疾病相关。结论 补肾强督治痿方治疗强直性脊柱炎是多靶点、多通路、多选择的复杂机制过程, 其机制多与抗炎和镇痛相关。

关键词 强直性脊柱炎; 网络药理学; 关键基因; 基因本体论分析; 富集分析; 补肾强督治痿方

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是进展性的慢性炎症性疾病, 以骶髂关节及脊柱强直为特征, 致残率高^[1]。炎症、骨破坏和骨桥形成是 AS 的 3 个特征性病理改变^[2], 导致关节破坏、畸形, 功能严重受损。AS 可归属于中医学“大偻”“痹病”范畴。焦树德教授认为, 肾虚督寒是 AS 的根本病机, 肾督阳虚是内因, 寒邪入侵是外因, 内外合邪, 阳气不化, 寒邪内盛, 影响筋骨的荣养淖泽, 而致脊柱佝偻, 故以补肾强督为立方原则, 佐以祛寒化湿、通活血脉、强化筋骨, 创立了补肾强督治痿方^[3]。前期临床试验表明, 该方治疗 AS 可显著缓解关节僵硬、增加活动度, 改善骨质疏松, 有效控制炎症, 具有较好的临床疗效和安全性^[4-5]。

由于中药成分的多样性和与人体相互作用的复

杂性, 目前发掘复方的潜在分子机制仍然相当困难。近年来系统生物学的研究揭示了药物发挥作用的网络结构^[6], 生物信息学的蓬勃发展也为明确中药复方的机制提供了可能性。本研究选用近年来发展迅速的网络药理学方法, 初步挖掘中药复方补肾强督治痿方治疗 AS 的作用机理, 为进一步实验验证提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 补肾强督治痿方作用靶标预测

补肾强督治痿方由骨碎补 18 g、补骨脂 12 g、熟地黄 15 g、淫羊藿 12 g、狗脊 30 g、鹿角霜 6 g、羌活 12 g、独活 10 g、续断 18 g、杜仲 20 g、川牛膝 12 g、桂枝 15 g、知母 15 g、炮附片 12 g 等 24 味中药化裁而成。使用 BATMAN-TCM (<http://bio-net.ncpsb.org/batman-tcm>) 平台来预测复方作用靶标。BATMAN-TCM 平台通过药物相似性打分决定预测药物潜在靶标^[7], 实质是通过与已知的药物靶标的相互作用比较来计算相似性, 并对潜在的药物靶标相互作用进行排序。在 BATMAN-TCM 平台

基金项目: 国家自然科学基金 (81673898); 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项 (JDZX2015201); 广东省高水平大学中西医结合重点学科建设项目 (YN2015MJ06); 广东省中医院中医药科学技术研究专项 (YK2013BZN01)

* 通讯作者: hyt39402@126.com, 13922178769

中,将补肾强督治痿方以君、臣、佐、使的顺序,输入每味中药的完整拼音,将 Cut-off 值设置为 40 时,预测此方的相关靶标。

1.2 AS 疾病靶标预测

应用 CTD (<http://ctdbase.org/>) 数据库获取 AS 疾病靶标。

1.3 药物-靶点-疾病相互作用网络构建

获得补肾强督治痿方相关靶点及 AS 疾病靶标后,取两者的交集靶点基因,采用 STRING 在线 (<http://string-db.org/>) 构建蛋白相互作用网络 (PPI),接着使用 Cytoscape 3.5.1 (<http://www.cytoscape.org>) 软件进行蛋白网络结构可视化处理。在蛋白网络构建的过程中,使用力导向算法^[1]使节点合理分布,产生清晰的视觉效果。

1.4 基因本体论 (gene ontology, GO) 分析

GO 分析是生物学领域中广泛用于基因功能分类的系统^[2],主要用于描述基因产物的功能,包括细胞功能、分子功能和生物功能。使用 DAVID 工具 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 富集分析,统计学超几何分布定量 (P 值) 评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群^[3],以 P 值反映蛋白质生物学功能的显著性。DAVID 采用独特的 “no-cutout off” 策略从微阵列试验中选择基因,输入列表中的基因与生物学注释相关联,然后从统计的层面,从数千个相关联的注释中找出最显著富集的生物学注释。采用模糊聚类算法,基于注释共同度进行聚类分析,对被注释上的 Terms 进行聚类并给出聚类分值。分值越高,代表的基因在基因列表中越重要。

1.5 KEGG 通路富集分析

应用 DAVID 工具对药物-疾病交集蛋白靶标基因进行 KEGG 通路富集分析^[4],得到补肾强督治痿方治疗 AS 的主要作用通路,此工具算法同 GO 分析算法。富集分析采用超几何分布设计的算法,针对富集分析显著性 P 值的多重检验校正使用 Benjamini-Hochberg 校正方法。靶标分析功能基于功能条目的富集分析,考察中药的潜在靶标可能具有的生物学功能及参与的生物学通路。

1.6 关键基因筛选

关键基因是在生物学过程中发挥至关重要作用的基因,在相关通路中,其他基因的调控往往要受到该基因的影响^[5],因此关键基因往往是重要的作用靶点和研究热点。通过共表达或蛋白相互作用构建互作网络,然后根据网络拓扑结构筛选关键基因。通过 Cytoscape 3.5.1 软件构建蛋白/基因的互作网络后,较多的基因/蛋白等分子节点和节点之

间的相关连线往往会掩盖真正的关键基因,影响筛选过程。通过 MCC、DMNC、Degree、EPC、BottleNeck 等 11 种网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法,算出补肾强督治痿方的关键基因,再取交集后筛选出重要的关键基因。

1.7 关键基因于 AS 的疾病治疗预测

使用药物相似度搜索工具在 CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 获取 AS 疾病靶标搜索关键基因于 AS 的相关治疗作用。

2 结果

2.1 药物-疾病靶标预测结果

补肾强督治痿方的靶标基因为 1846 个,AS 的靶标基因为 4158 个。经交集显示,药物-疾病交集靶基因共 705 个。

2.2 药物-疾病交集靶基因 GO 分析结果

表 1 示,补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶基因的生物学功能包括基因表达的阳性调控、炎症反应、钙离子浓度的阳性调控、ERK 的级联阳性调控等。交集靶基因的细胞功能主要在于作用于细胞溶质、线粒体、细胞质及细胞外间隙等。交集靶基因的分子功能主要是相同蛋白结合、酶结合、蛋白质同源二聚体活性、受体结合等。

表 1 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶基因基本本体论分析结果

分类	GO ID	名称	P 值
生物功能	0010626	基因表达的阳性调控	7.42×10^{-30}
	0006954	炎症反应	4.38×10^{-25}
	0045944	RNA 聚合酶 II 启动子转录的阳性调节	3.18×10^{-22}
	0070374	ERK1 和 ERK2 级联阳性调控	3.18×10^{-20}
	0051092	NF-kappa B 转录因子的阳性调控	5.07×10^{-18}
细胞功能	0008284	细胞增殖阳性调控	6.81×10^{-14}
	0007204	钙离子浓度的阳性调控	1.14×10^{-12}
	0000187	MAPK 活性的激活	1.32×10^{-12}
	0005829	细胞溶质	6.05×10^{-33}
	0005739	线粒体	7.90×10^{-26}
	0005615	细胞外间隙	7.13×10^{-23}
	0005886	质膜	1.82×10^{-21}
	0009986	细胞表面	3.87×10^{-18}
	0070062	细胞外分泌体	4.55×10^{-16}
	0005759	线粒体基质	2.32×10^{-14}
分子功能	0043025	神经元胞体	4.76×10^{-13}
	0042802	相同蛋白结合	1.11×10^{-22}
	0019899	酶结合	1.27×10^{-19}
	0042803	蛋白质同源二聚化活性	1.47×10^{-19}
	0005102	受体结合	4.27×10^{-17}
	0005506	铁离子结合	5.10×10^{-16}
	0005515	蛋白质结合	1.89×10^{-14}
	0005088	鸟苷酸核苷酸交换因子活性	1.21×10^{-13}
	0046982	蛋白质异二聚化活性	1.55×10^{-13}

2.3 KEGG 通路富集分析结果

表 2 示, 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶基因的网络主要涉及肿瘤坏死因子信号通路、雌激素信号通路、T 细胞受体信号通路、破骨细胞分化通路、类风湿关节炎信号通路等。

表 2 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集靶蛋白 KEGG 通路富集分析结果

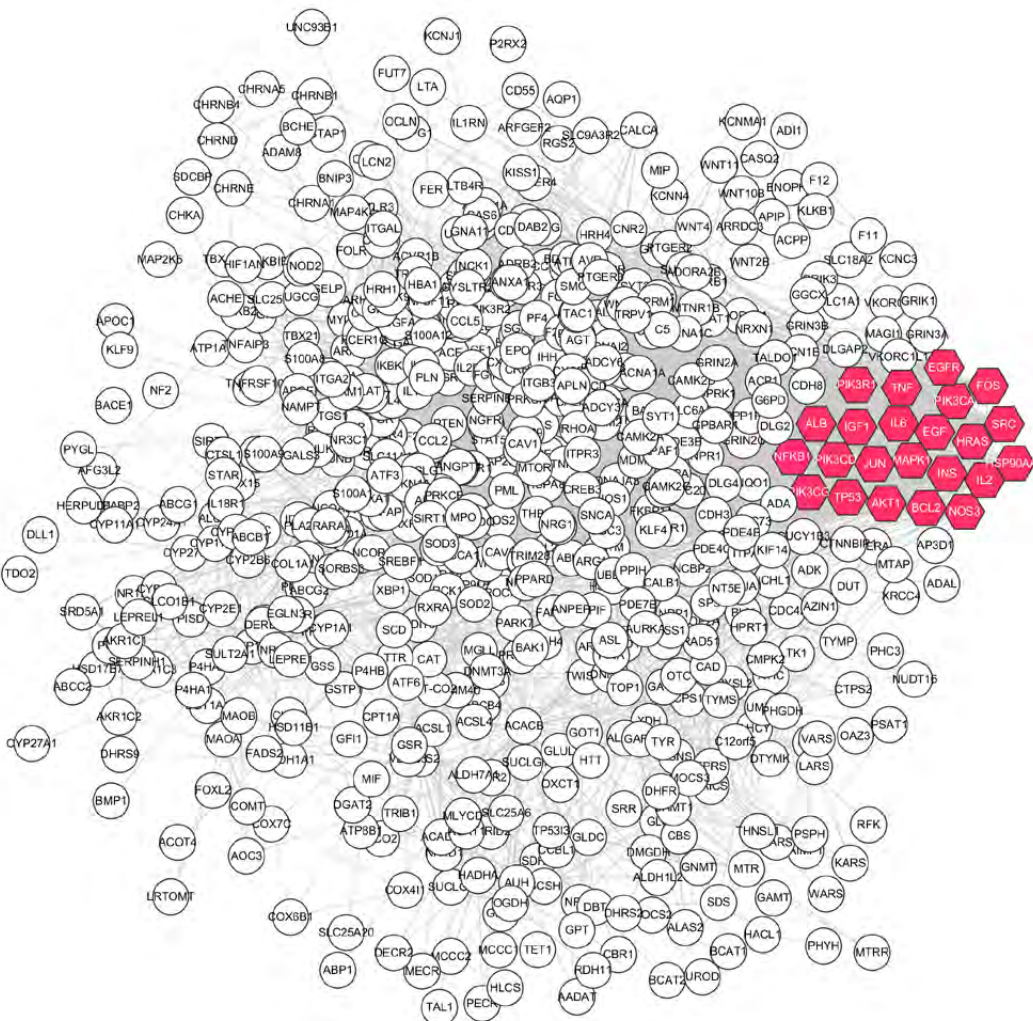
通路名称	P 值
TNF signaling pathway (肿瘤坏死因子信号通路)	1.15×10^{-17}
Estrogen signaling pathway (雌激素信号通路)	2.85×10^{-16}
T cell receptor signaling pathway(T 细胞受体信号通路)	3.17×10^{-10}
Osteoclast differentiation (破骨细胞分化通路)	4.99×10^{-7}
Rheumatoid arthritis (类风湿关节炎信号通路)	1.98×10^{-5}
Cytokine-cytokine receptor interaction (细胞因子-细胞因子受体相互作用通路)	9.94×10^{-5}
NF-kappa B signaling pathway(NF-kappa B 信号通路)	5.66×10^{-4}

2.4 关键基因筛选结果

经 Cytoscape 3. 5. 1 中 CytoHubba 的 12 种算法, 取综合分数 >0. 7, 准确地找到药物-疾病交集互作基因中的关键基因。图 1 示, 关键基因共计 23 个: ALB、PIK3R1、TNF、PIK3CA、EGFR、IGF1、IL6、EGF、FOS、HRAS、NFKB1、PIK3CD、JUN、MAPK1、INS、IL2、SRC、PIK3CG、TP53、AKT1、BCL2、NOS3、SP90AA。使用 STRING 软件进一步构建关键基因蛋白网络互作图, 见图 2。

2.5 关键基因于 AS 的疾病治疗预测结果

23 个关键基因中已被证实有镇痛效果的靶基因有 ALB、EGFR、TNF、PIK3CD、PIK3CG、PIK3R1、PIK3CA、TP53、IGF1、SP90AA、IL6、NFKB1、AKT1、NOS3, 所有的关键基因都与炎症性疾病相关。



注: 黑色六边形代表关键基因
图 1 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎交集基因网络互作图

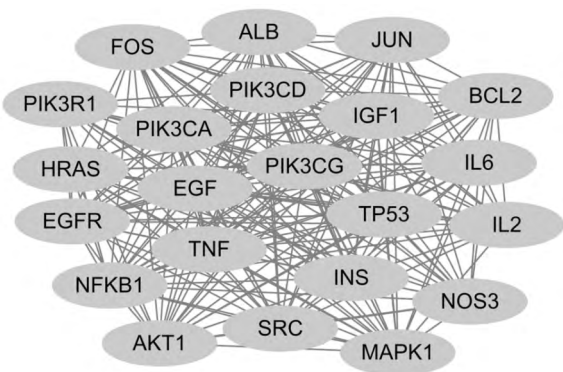


图2 补肾强督治痿方-强直性脊柱炎关键基因网络互作图

3 讨论

补肾强督治痿方以张仲景桂枝芍药知母汤合补肾强督之品化裁而成,具有补肾强督、祛寒活络、强壮筋骨之效。网络药理学是在系统生物学和多向药理学快速发展的基础上提出的药物设计新方法和新策略,内容涉及系统生物学、网络生物学分析、基因的连接性和冗余度以及基因的多效性。网络药理学超越了单靶点思想的束缚,从多靶点的研究策略出发,为我们提供了研究中药复方的一种新策略。本研究借助网络药理学手段,初步挖掘、分析补肾强督治痿方治疗 AS 的可能作用机制。

本研究结果显示,补肾强督治痿方和 AS 的交集靶基因共 705 个,进一步提炼出补肾强督治痿方治疗 AS 的生物学功能、细胞功能和分子功能。其中炎症反应、ERK 的级联阳性调控及 NF- κ B 转录因子的阳性调控、MAPK 活性的激活等生物学作用与炎症反应相关,这与主要由炎症导致相关病理改变的 AS 有正相关的生物学作用。此外,KEGG 通路富集分析结果主要涉及肿瘤坏死因子信号通路、雌激素信号通路、T 细胞受体信号通路、破骨细胞分化通路、类风湿关节炎通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路、NF- κ B 信号通路,说明补肾强督治痿方可能通过炎症、激素、破骨细胞代谢及免疫因子信号通路作用于 AS,与目前研究^[6-18]所证实的某些药物可能通过上述信号通路作用于 AS 的报道结果基本相符。在关键基因的筛选中,发现 ALB、PIK3R1、TNF、PIK3CA、EGFR、IGF1、IL6、EGF、FOS、HRAS、NFKB1、PIK3CD、JUN、MAPK1、INS、IL2、SRC、PIK3CG、TP53、AKT1、BCL2、NOS3、SP90AA 23 个靶基因是补肾强督治痿方作用于 AS 机制中的重要关键基因,这些基因也曾被报道于强

直性脊柱炎的机制研究^[9-21]。经查证,23 个关键基因都与痛症、炎症性疾病及关节炎性疾病相关。因此,补肾强督治痿方治疗 AS 作用的关键作用集中体现在抗炎及镇痛方面。综上所述,补肾强督治痿方作用于 AS 是多靶点、多通路、多选择的复杂机制过程,为进一步理解药物-靶点相互作用机制提供了重要信息,也为中医药治疗 AS 提供了机制研究方面的思路。

参考文献

- [1] LIU Z, ZHANG P, DONG J. Genetic variants of STAT4 are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and severity in a Chinese Han population [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5877-5881.
- [2] TAM LS, GU J, YU D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(7): 399-405.
- [3] 欧阳波. 补肾强督法治大痿(强直性脊柱炎) 47 例分析 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(3): 462-463.
- [4] ZHOU YY, LIN JH, HUANG RY, et al. Treatment of ankylosing spondylitis with a Bushen-Qiangdu-Zhilv decoction: a case report with a 3-year follow-up [J]. Altern Ther Health Med, 2016, 22(Suppl 1): 36-40.
- [5] 阎小萍, 陶庆文, 孔维萍, 等. 补肾强督法为主的综合疗法治疗强直性脊柱炎临床和试验系列研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(3): 10-18.
- [6] 陶庆文, 王建明, 徐愿, 等. 补肾强督法治强直性脊柱炎肾虚督寒证 309 例的多中心临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1722-1726.
- [7] 陶庆文, 徐愿, 孔维萍, 等. 基于名老中医经验传承寒热辨治强直性脊柱炎的临床研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(7): 730-733.
- [8] 周颖燕. 补肾强督法治强直性脊柱炎的疗效及抗骨化作用初探 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [9] HOPKINS AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [10] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146. doi: 10.1038/srep21146.
- [11] 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.
- [12] MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M. BiNGO: a cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks [J]. Bioinformatics,

- 2005, 21(16):3448-3449.
- [3] MARTUCCI D, MASSEROLI M, PINCIROLI F. Gene ontology application to genomic functional annotation, statistical analysis and knowledge mining [J]. Stud Health Technol Inform, 2004, 102:108-131. PMID:15853267.
- [4] DENNIS G JR, SHERMAN BT, HOSACK DA, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. Genome Biol, 2003, 4(5):P3.
- [5] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1):D353-D361.
- [6] HUBATSCH I, RAGNARSSON EG, ARTURSSON P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. Nat Protoc, 2007, 2(9):2111-2119.
- [7] FANG L, LIU J, WAN L, et al. Xinfeng capsule improves hypercoagulable state by inhibiting miR-155/NF-κB signaling pathway in patients with active ankylosing spondylitis [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2016, 32(8):1094-1098.
- [8] SIPOS W, PIETSCHMANN P, RAUNER M. Strategies for novel therapeutic approaches targeting cytokines and signaling pathways of osteoclasto- and osteoblastogenesis in the fight against immune-mediated bone and joint diseases [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(2):127-136.
- [9] MARUOTTI N, CORRADO A, CANTATORE FP. Osteoporosis in rheumatic diseases [J]. Reumatismo, 2014, 66(2):125-135.
- [10] MALEMUD CJ. Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017, 148:305-325. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.003.
- [11] CABRERA S, SANCHEZ E, REQUENA T, et al. Intronic variants in the NFKB1 gene may influence hearing forecast in patients with unilateral sensorineural hearing loss in Meniere's disease [J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112171.

Mechanism of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* (补肾强督治痿方) in Treating Ankylosing Spondylitis Based on Network Pharmacology

QIU Dongni¹, PAN Feng², TAN Xi¹, LAI Yonghui¹, HE Xiaohong², ZHOU Yingyan², HE Yiting²

(1. Second School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120; 2. Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* (补肾强督治痿方) in treating ankylosing spondylitis (AS) by network pharmacology methods. **Methods** The target genes of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* were obtained in pharmacology component analysis platform of Chinese medicine system (BAT-MAN). The Target genes corresponding to AS were obtained in the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). The target genes of the disease-drug protein were obtained after the intersection of the fore-mentioned two target genes. The interprotein interaction network was constructed by network visualization software STRING and the results were showed by network visualization. The important key genes were screened by calculation and analysis algorithm of network structure and inter node weighting connection. Gene ontology (GO) analysis of disease-drug intersection target genes and KEGG pathway enrichment analysis were made by DAVID on line tools. At last, the therapeutic effect of key genes in AS was obtained in CTD. **Results** There were 705 intersection genes of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* target genes and AS disease target genes. GO analysis results showed that the biological function of intersection target genes of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* and AS mainly included positive regulation of gene expression and inflammatory reaction, as well as positive regulation of cell proliferation. The signal pathway enrichment results showed that the network of intersection target genes of *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* and AS mainly involved Tumor necrosis factor signal pathway, estrogen signal pathway and T cell receptor signal pathway. Twenty-three key genes were obtained, which related to pain, inflammatory diseases, and arthritis. **Conclusion** *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction* treating AS is a multi target, multi path, and multi choice process with complex mechanism. The mechanism might be related to anti-inflammatory and analgesic.

Keywords ankylosing spondylitis; network pharmacology; key genes; gene ontology analysis; enrichment analysis; *Bushen Qiangdu Zhilou Decoction*

(收稿日期: 2017-07-30; 修回日期: 2017-09-28)

编辑: 邓 媛