

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.19.014

基于网络药理学分析止痒平肤液治疗靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒的分子机制

彭艳梅¹, 张静怡¹, 崔慧娟^{2*}, 李婧¹, 申文¹, 张旭¹, 孙晨耀¹

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 中日友好医院)

摘要 目的 探讨止痒平肤液治疗靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒可能的分子机制。方法 通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 及中药作用机制在线分析系统 (BATMAN-TCM), 对止痒平肤液中的成分和靶点进行筛选。在药物不良反应靶点分类系统 (ADReCS-Target) 中查找表皮生长因子抑制剂 (EGFRIs) 类靶向药的对应靶点。应用蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 数据库对蛋白之间的相互作用进行筛选, 并通过 Cytoscape 3.2.1 软件进行网络拓扑结果分析。采用 DAVID 在线工具对关键靶点进行通路富集, 预测中药作用可能的分子机制。结果 止痒平肤液各组分在 TCMSP、BATMAN-TCM 数据库筛选出成分对应验证靶点和预测靶点共 4355 个。ADReCS-Target 数据库和文献获得皮疹和皮肤瘙痒的靶点共 368 个。网络拓扑结果分析后得到 8 个关键靶点, 即表皮生长因子受体 (EGFR)、白细胞介素 6 (IL-6)、细胞色素 C (CYCS)、趋化因子配体 2 (CCL2)、磷脂酶 A2-4A (PLA2G4A)、L 型氨基酸转运载体 1 (SLC5A7)、Mu 型阿片受体基因 (OPRM1)、儿茶酚氧位甲基转移酶 (COMT), 其中 IL-6 是最核心的靶点。通过核心靶点对单味药成分的分析, 槲皮素和木犀草素可能是复方最主要的活性成分。通路富集结果显示, 细胞因子-细胞因子受体相互作用是主要的作用途径。结论 止痒平肤液主要通过调节 IL-6 相关的炎性信号通路起到治疗靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒的作用。

关键词 止痒平肤液; 靶向药; 皮疹; 皮肤瘙痒; 网络药理学; 分子机制

分子靶向治疗是目前恶性肿瘤治疗的重要手段之一, 其中表皮生长因子受体抑制剂 (epidermal growth factor receptor inhibitors, EGFRIs) 应用最为广泛, EGFRIs 的应用使肺癌、肠癌等多种恶性肿瘤的中位生存期显著延长^[1]。皮肤不良反应是 EGFRIs 类靶向药物主要的副作用, 其中痤疮样皮疹和皮肤瘙痒最常见^[2], 严重影响患者生活质量, 许多患者因此减少靶向药的用量甚至停药, 导致病情进展^[3]。本课题组多年研究发现, 靶向药相关皮肤反应以痤疮样皮疹和瘙痒为主要表现的中医证候呈规律性变化^[4]。针对初期风热证及中期湿热证, 我们创制了以清热解毒、利湿止痒为主要作用的外用中药止痒平肤液, 用于治疗靶向药相关皮疹

和皮肤瘙痒的有效率分别是 90.1%、57.9%^[5-6]。鉴于止痒平肤液成分的复杂性, 为了探索其作用的分子机制, 我们采用网络药理学和生物信息学的方法对复方活性单体及其分子机制进行了预测。网络药理学是由 Andrew L Hopkins 于 2007 年提出的, 为多靶点药物分子设计提供新思路^[7], 已成功应用于多个中药复方的机制研究中^[8]。本文通过筛选和预测止痒平肤液各药味及疾病已报道的靶点, 对药物治疗疾病的靶点进行富集分析, 探索其可能的作用机制。

1 方法

1.1 止痒平肤液成分和靶点筛选

止痒平肤液成分为黄芩 20 g、苦参 20 g、白鲜皮 30 g、马齿苋 30 g、蒲公英 30 g。从中药系统药理学数据库和分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis plat-

基金项目: 首都卫生发展科研专项(首发 2018-2-4065); 北京市科学技术委员会“首都特色应用研究”专项(Z151100004015168)

* 通讯作者: cuihj1963@sina.com, (010) 84205733

form, TCMSP)^[1] 中, 获得黄芩、苦参、白鲜皮、马齿苋 4 味药的成分, 根据成分毒物动力学 (absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME)^[1] 参数药物相似性 (druglikeness, DL) ≥ 0.18 ^[1] 进行成分筛选, 并检索相应的靶点信息。从中药作用机制在线分析系统 (bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of TCM, BATMAN-TCM) 数据库^[12] 中, 以相关性评分 ≥ 20 为标准, 获得蒲公英成分和靶点信息。

1.2 靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒靶点收集

在药物不良反应靶点分类系统 (adverse drug reaction classification system-target profile, ADRCS-Target) 中以 “acne” “pruritus” 为检索词, 查找 EGFRs 类靶向药 (厄洛替尼、吉非替尼、阿法替尼、西妥昔单抗) 对应的靶点。ADReCS-Target 提供了药物和蛋白、基因、遗传变异相互作用引起药物不良反应的复杂信息, 它包括 1710 个蛋白-药物不良反应关系, 2613 个遗传变异-药物不良反应关系, 63 298 个基因-药物不良反应关系。

1.3 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 数据收集

PPI 数据均从 STRING 数据库^[13] 中获得。在生命体中基因并不是独立发挥作用的, 往往是复杂的调控网络, 一个基因或蛋白的表达和功能往往受到多个基因影响。因此, 药物治疗疾病的靶点除表现为成分靶点的直接结合外, 更多见于直接作用靶点与间接作用靶点相结合的调控方式。而 PPI 数据的构建与挖掘为寻找靶点的直接、间接调控作用关系提供了可能。在 STRING 中, 可对两个蛋白间相互作用的置信度得分设定阈值: 低置信度 < 0.4 ; $0.4 \leq$ 中置信度 ≤ 0.7 ; 高置信度 > 0.7 。本研究设定置信度阈值 ≥ 0.4 , 对蛋白相互作用进行筛选。

1.4 网络构建及分析

根据中药组分、单味药成分、靶点之间的关系, 建立活性成分-靶点网络。应用中药治疗疾病靶点建立 PPI 网络, 从而得到止痒平肤液与靶向药皮肤不良反应靶点的直接及间接作用关系。采用 Cytoscape 3.2.1 进行网络可视化, 借助自由度 (degree)、介数 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 对 PPI 网络进行分析。如一个点的自由度、BC、CC 为该网络平均节点参数以上则定义为关键靶点。

1.5 通路富集

应用 DAVID^[14] 在线工具对止痒平肤液起治疗作用的关键靶点进行通路富集, 对中药调控的信号

通路进行预测, 所富集的 KEGG 通路以 $P < 0.05$ 为重要通路。

2 结果

2.1 止痒平肤液靶点筛选结果

检索 TCMSP 根据 $DL \geq 0.18$ 对成分信息进行筛选后, 获得黄芩 85 个化合物和 2241 个靶点, 苦参 96 个化合物和 1051 个靶点, 白鲜皮 38 个化合物和 443 个靶点, 马齿苋 22 个化合物和 459 个靶点。从 BATMAN-TCM 数据库中, 获得蒲公英 8 个化合物和 161 个靶点。共得到复方靶点 4355 个。

2.2 靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒靶点筛选结果

ADReCS-Target 数据库中查找 EGFRs 类靶向药对应的靶点 344 个, 另文献 [15] 中报道的靶点 24 个, 疾病相关的靶点共 368 个。

2.3 PPI 网络构建分析

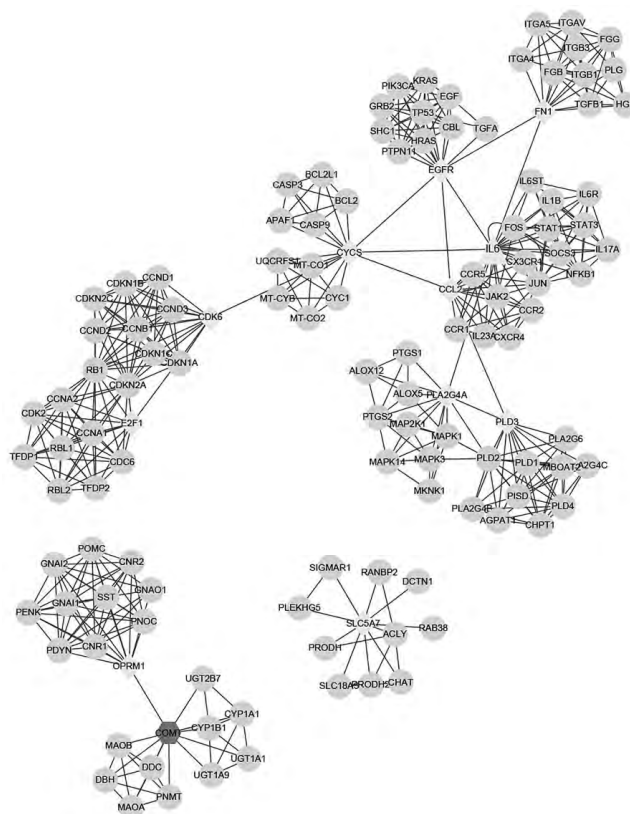


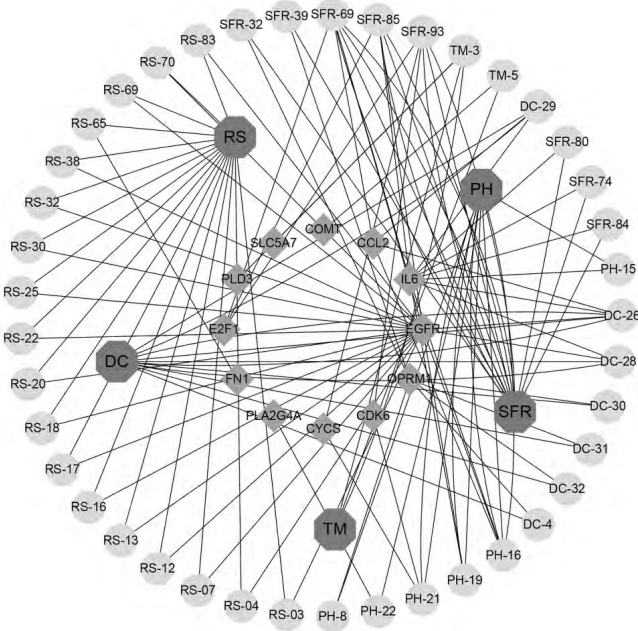
图 1 止痒平肤液治疗靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒的靶点相互作用网络图

药物和疾病共有的靶点 12 个, 应用 PPI 数据库对靶点的相互作用进行分析, 然后应用 Cytoscape 3.2.1 软件进行网络拓扑结果分析 (图 1), 基于拓扑参数进行核心网络筛选, 获得重要靶点表皮生长因子受体 (EGFR)、白细胞介素 6 (IL-6)、细胞色素 C (CYCS)、趋化因子配体 2 (CCL2)、磷脂酶 A2-IVA (PLA2G4A)、L 型氨基酸转运载体 1

(SLC5A7)、Mu 型阿片受体基因(OPRM1)、儿茶酚氧位甲基转移酶 (COMT)，其中 IL-6 是最核心的靶点。

2.4 关键成分和靶点的筛选

通过关键治疗靶点对单味药成分的分析 (图 2)，槲皮素和木犀草素可能是复方最主要的活性成分。白鲜皮、苦参、马齿苋均含有该两种化合物 (表 1)，因此，我们推测槲皮素和木犀草素可能是复方最主要活性成分。



注: RS, 黄芩; DC, 白鲜皮; TM, 蒲公英; SFR, 苦参; PH, 马齿苋; ●代表中药; ●代表活性成分; ◆代表关键靶点

图 2 中药-活性成分-关键靶点网络图

表 1 止痒平肤液药物主要治疗靶点与成分的对对应关系			
中药	序列号	靶点	活性成分
白鲜皮	DC-26	CCL2	槲皮素
白鲜皮	DC-26	EGFR	槲皮素
白鲜皮	DC-26	IL-6	槲皮素
苦参	SFR-69	CCL2	槲皮素
苦参	SFR-69	E2F1	槲皮素
苦参	SFR-69	EGFR	槲皮素
苦参	SFR-69	IL-6	槲皮素
马齿苋	PH-46	CCL2	槲皮素
马齿苋	PH-46	EGFR	槲皮素
马齿苋	PH-46	IL-6	槲皮素
苦参	SFR-85	E2F1	木犀草素
苦参	PH-49	EGFR	木犀草素
苦参	SFR-85	EGFR	木犀草素
苦参	SFR-85	IL-6	木犀草素
白鲜皮	DC-28	IL-6	木犀草素
白鲜皮	DC-28	EGFR	木犀草素
马齿苋	PH-49	IL-6	木犀草素

2.5 富集通路分析

应用 DAVID 对关键靶点进行通路富集, 得到中药治疗疾病相关的 8 条主要通路 (表 2)。

表 2 止痒平肤液治疗靶向药相关皮疹和皮肤瘙痒的 8 个重要作用靶点相关的信号通路

通路 ID	通路名称	P 值	基因
05164	甲型流感	0.001	IL-6, CCL2, CYCS
05168	单纯疱疹感染	0.001	IL-6, CCL2, CYCS
04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用	0.002	EGFR, IL-6, CCL2
05231	癌症中的胆碱代谢	0.006	EGFR, PLA2G4A, SLC5A7
05142	查加斯病	0.008	IL-6, CCL2
05161	乙型肝炎	0.012	IL-6, CYCS
05152	结核	0.018	IL-6, CYCS
00350	酪氨酸代谢	0.047	COMT

3 讨论

EGFRIs 类药物的靶点是 EGFR, 该受体在肿瘤细胞呈过表达, 也广泛存在于皮肤细胞中, 可刺激表皮细胞生长, 抑制其分化, 抑制炎症并加速创面愈合 [14]。应用 EGFRIs 治疗的患者皮肤活检结果证实了皮肤不良反应主要是表皮中的角质形成细胞被破坏, EGFRIs 类靶向药相关皮疹主要是发生于皮肤角质形成细胞的炎症反应 [17]。因此, 靶向药相关皮疹的西医规范治疗主要是抗生素和激素。预防性使用米诺环素可降低 EGFRIs 相关皮疹的严重程度, 推迟皮疹的发生时间 [18]。但米诺环素副反应严重, 引起恶心、呕吐、眩晕、腹痛, 长期应用引起皮肤色素沉着, 且会降低患者的免疫力 [19]。

中医学认为, 靶向药相关皮肤反应属于“痤疮”范畴, 以风、湿、热为病理因素, 故治疗以清热解毒、燥湿消肿、祛风止痒为主。止痒平肤液中苦参性寒, 有清热燥湿、祛风杀虫的功效, 为君药。《本草纲目》曰“苦参、黄柏之苦寒, 皆能补肾, 盖取其苦燥湿、寒除热也。热生风, 湿生虫, 故又能治风杀虫。”黄芩苦寒, 有清热燥湿、泻火解毒的功效, 尤善清上焦肺经之热, 对于“肺风粉刺”的治疗可谓循经用药, 为臣药。马齿苋酸寒, 有清热解毒、散血消肿的功效, 为佐药。白鲜皮性寒, 具有清热燥湿、祛风解毒的功效; 蒲公英苦寒, 有清热解毒、消痈散结的功效, 二者共为佐使之品。

本研究借助 DL 参数在 TCMSP 数据库中对中药的活性成分进行筛选, 认为 DL≥0.18 时分子具有较好的类药性 [20], 在 BATMAN-TCM 系统中, 认

为有效成分与目标靶点相关性评分 ≥ 20 为相关性较好, 一共筛选出 4355 个靶点。中药-活性成分-关键靶点网络图显示槲皮素和木犀草素对应的靶点和中药最多, 它们可能是该复方主要的活性成分。

国外研究显示, EGFR 被抑制后, 丝裂原活化蛋白激酶表达下调, 角质细胞生长和分化不良, 进一步导致促炎因子 TNF- α 、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 通过募集趋化因子 (CCL2、CCL5、CXCL8 等) 诱发炎症反应, 引起角质细胞的凋亡和组织损伤^[21-22]。因此, 炎症因子和细胞因子在皮疹的发生中起着重要作用。通路富集结果显示, 关键靶点参与的主要通路包括甲型流感、单纯疱疹感染、细胞因子-细胞因子受体相互作用、癌症中的胆碱代谢、查加斯病、乙型肝炎、结核、酪氨酸代谢等。结合靶向药相关皮肤不良反应发生的机制和止痒平肤液的组方特点, 细胞因子-细胞因子受体相互作用可能是中药起治疗作用主要的调控通路, 而细胞因子 IL-6 及介导的信号通路起关键作用。

IL-6 是一种具有多功能的细胞因子, 其在自身免疫性反应、免疫调节和炎症反应等过程中均发挥重要的生物学作用^[23]。目前的研究确证白细胞介素 6/信号转导与转录活化因子 3 (IL-6/STAT3) 通路存在于角质形成细胞中^[24], 与皮肤炎症反应相关^[25]。因此, 中药可能是通过调控 TNF- α 介导的 IL-6/STAT3 信号通路而起抗炎作用。通路富集分析显示, 止痒平肤液可能通过多种途径对靶向药相关皮肤不良反应起到治疗作用, 它们之间存在相互联系。结合皮肤反应发生的炎症反应机制, 在应用网络药理学的基础上预测中药起核心调控作用的通路, 这对复方的复杂性、多靶点性的精准化起到了重要作用。

参考文献

- [1] LIU YT, HAO XZ, LI JL, et al. Survival of patients with advanced lung adenocarcinoma before Gefitinib before and after approved use of Gefitinib in China: a comparative clinical study in a single center [J]. Thorac Cancer, 2015, 6 (5): 636-642.
- [2] CHEN KL, LIN CC, CHO YT, et al. Comparison of skin toxic effects associated with gefitinib, erlotinib, or afatinib treatment for non-small cell lung cancer [J]. JAMA Dermatol, 2016, 152 (3): 340-342.
- [3] SHEPHERD FA, RODRIGUES PEREIRA J, CIULEANU T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (2): 123-132.
- [4] 张心悦, 彭艳梅, 徐央波, 等. 肺腺癌患者应用表皮生长因子受体抑制剂治疗后皮肤不良反应的中医证候特点 [J]. 中医杂志, 2015, 56 (16): 1401-1405.
- [5] 王红岩, 邹超, 崔慧娟, 等. 外用清热利湿中药治疗表皮生长因子受体拮抗剂相关皮疹 120 例临床研究 [J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2013, 20 (4): 14-17.
- [6] 王红岩, 邹超, 崔慧娟, 等. 止痒平肤液治疗表皮生长因子受体拮抗剂相关皮肤不良反应的疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35 (7): 820-822.
- [7] HOPKINS AL. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25 (10): 1110-1111.
- [8] ZHANG Y, BAI M, ZHANG B, et al. Uncovering pharmacological mechanisms of Wu-tou decoction acting on rheumatoid arthritis through systems approaches: drug-target prediction, network analysis and experimental validation [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9463. doi: 10.1038/srep09463.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13. doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [10] ZHOU W, WANG Y, LU A, et al. Systems pharmacology in small molecular drug discovery [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (2): 246.
- [11] GAO L, WANG XD, NIU YY, et al. Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology [J]. Sci Rep, 2016, 6: 24944. doi: 10.1038/srep24944.
- [12] LIU Z, GUO FI, 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.
- [13] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, KUHN M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (Database issue): D561-D568. doi: 10.1093/nar/gkq973.
- [14] HUANG DA W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 44-57.
- [15] LACOUTURE ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6 (10): 803-812.
- [16] PASTORE S, MASCIA F, MARIANI V, et al. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation [J]. J Invest Dermatol, 2012, 128 (6): 1365-1374.
- [17] PASTORE S, LULLI D, GIROLOMONI G. Epidermal growth factor receptor signalling in keratinocyte biology:

- implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors [J]. Arch Toxicol, 2014, 88(6): 1189-1203.
- [8] MELOSKY B, ANDERSON H, BURKES RL, et al. Pan Canadian rash trial: a randomized phase III trial evaluating the impact of a prophylactic skin treatment regimen on epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor-induced skin toxicities in patients with metastatic lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2016, 34(8): 810-815.
- [9] 顾伟程. 皮质激素在皮肤科的应用及其不良反应 [J]. 中国医刊, 1999, 34(6): 4-6.
- [10] XU J, STEVENSON J. Drug-like index: a new approach to measure drug-like compounds and their diversity [J]. J Chem Inf Comput Sci, 2000, 40(5): 1177-1187.
- [11] PAUL T, SCHUMANN C, RÜDIGER S, et al. Cytokine regulation by epidermal growth factor receptor inhibitors and epidermal growth factor receptor inhibitor associated skin toxicity in cancer patients [J]. Eur J Cancer, 2014, 50(11): 1855-1863.
- [12] LICHTENBERGER BM, GERBER PA, HOLCMANN M, et al. Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(199): 199ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3005886.
- [13] KROY DC, HEBING L, SANDER LE, et al. Differential role of gp130-dependent STAT and Ras signalling for haematopoiesis following bone-marrow transplantation [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39728.
- [14] LU X, LUO F, LIU Y, et al. The IL-6/STAT3 pathway via miR-21 is involved in the neoplastic and metastatic properties of arsenite-transformed human keratinocytes [J]. Toxicol Lett, 2015, 237(3): 191-199.
- [15] MARU GB, GANDHI K, RAMCHANDANI A, et al. The role of inflammation in skin cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 816: 437-469. doi: 10.1007/978-3-0348-0837-8_17.

Analysis of the Molecular Mechanism of *Zhiyang Pingfu Decoction* (止痒平肤液) in the Treatment of Targeted Drugs-related Skin Rash and Pruritus: based on Network Pharmacology

PENG Yanmei¹, ZHANG Jingyi¹, CUI Huijuan², LI Qiang¹, SHEN Wen¹, ZHANG Xu¹, SUN Chenyao¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. China-Japan Friendship Hospital)

ABSTRACT Objective To study the molecular mechanism of *Zhiyang Pingfu Decoction* (止痒平肤液) in the treatment of targeted drug-associated skin rash and pruritus based on network pharmacology and bioinformatics.

Methods Through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP) and Analysis Platform and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM), the components and targets in the compound were screened. The corresponding targets for epidermal growth factor inhibitor (EGFRIs) class of targeted drugs were found in the Adverse Drug Reaction Target Classification System (ADReCS-Target). The protein-protein interaction (PPI) database was used to screen the interactions between proteins, and the network topology results were analyzed by Cytoscape 3.2.1 software. DAVID online tools were used to enrich the key target signal pathways to predict the possible molecular mechanisms of Chinese medicine. **Results** A total of 4355 targets of the components in *Zhiyang Pingfu Decoction* were screened out from TCMSP and BATMAN-TCM databases, and 368 targets of rash and pruritus were searched from ADReCS-Target database. The PPI database was used to analyze the interaction of proteins, and 8 key effective targets were obtained after the network topology analysis by Cytoscape software, including epidermal growth factor receptor (EGFR), interleukin-6 (IL-6), cytochrome C (CYCS), chemokine ligand 2 (CCL2), phospholipase A2-IVA (PLA2G4A), L-type amino acid transporter-1 (SLC5A7), Mu-type opioid receptor gene (OPRM1), catechol-O-methyltransferase (COMT), of which IL-6 was the core target. Quercetin and luteolin may be the main active ingredients of the compound through the analysis of the component of the key targets. Pathway enrichment results showed that cytokine and cytokine receptor interaction was the main pathway of action. **Conclusion** *Zhiyang Pingfu Decoction* mainly plays a role in the treatment of targeted drug-related rash and skin itching by regulating IL-6-related inflammatory signaling pathway.

Keywords *Zhiyang Pingfu Decoction*; targeted drug; rash; pruritus; network pharmacology; molecular mechanism

(收稿日期: 2018-04-09; 修回日期: 2018-06-12)

编辑: 邓 媛