

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.11.015

基于网络药理学探讨小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜的作用机制

崔庆科¹, 朱浩宇², 张洁³, 冯晓纯^{2*}

1. 长春中医药大学, 吉林省长春市净月经济开发区博硕路 1035 号, 130117; 2. 长春中医药大学附属医院; 3. 山东省淄博市临淄区人民医院

[摘要] **目的** 采用网络药理学方法探讨小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜的潜在作用机制。 **方法** 依托中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 和中药分子机理生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM) 检索小儿紫癜疹消颗粒的化学成分、作用靶点, 利用 Genecard 数据库收集过敏性紫癜作用靶点, 使用 Venny 2.1 将小儿紫癜疹消颗粒作用靶点与过敏性紫癜作用靶点取交集。通过 Cytoscape 3.2.1 构建小儿紫癜疹消颗粒-活性化合物-治病靶点网络图, 使用 String 构建小儿紫癜疹消颗粒治病靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 研究小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜可能作用机制。 **结果** 小儿紫癜疹消颗粒-活性化合物-治病靶点网络图包含 9 个单味药、206 个活性化合物以及 40 个治病靶点。PPI 网络包含 39 个靶点蛋白, 关键蛋白涉及白细胞介素 6 (IL-6)、胰岛素 (INS)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等。基因本体论 (GO) 功能富集得到条目 14 个, 涉及脂多糖的反应、低氧反应、药物反应等。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析涉及 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路。 **结论** 小儿紫癜疹消颗粒是多成分、多靶点、多途径治疗过敏性紫癜, TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路为其治疗过敏性紫癜的主要通路。

[关键词] 小儿紫癜疹消颗粒; 过敏性紫癜; 网络药理学; 分子机制

过敏性紫癜 (anaphylactoid purpura 或 Henoch-Schönlein Purpura, HSP) 是一种白细胞碎裂性血管炎, 常可累及毛细血管、小动脉、小静脉等小血管^[1]。HSP 是儿童时期最常见的系统性血管炎, 其发病率有逐年上升的趋势^[2]。HSP 的主要临床表现为皮肤瘀点瘀斑、无血小板减少、关节肿痛、腹痛、胃肠道出血、便血、血尿或蛋白尿, 其中 30%~50% 患儿会出现肾损害, 而肾损害程度是决定预后的关键因素^[3]。小儿紫癜疹消颗粒由紫草、生地黄、白薇、侧柏叶、白鲜皮、黄芩、牡丹皮、茜草、鸡血藤组成, 是我们临床经验方, 临证加减可用于治疗小儿 HSP^[4-5]。我们先后进行了 40 例^[6]、120 例^[7] 临床观察, 证实了小儿紫癜疹消颗粒治疗小儿 HSP 风热伤络证疗效确切, 并且其可降低患儿血清 IgA1 浓度^[8]、白细胞介素 4 (IL-4)

和白细胞介素 6 (IL-6) 等细胞因子水平^[9], 调节 T 淋巴细胞亚群和补体 C3^[10]。另外, 动物实验^[11-12] 结果亦表明, 小儿紫癜疹消颗粒还能够改善过敏性紫癜模型兔紫癜形态, 影响血常规和 IgA、凝血常规等相关指标。本研究采用网络药理学方法深入研究小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 的可能药理作用和分子机制。

1 材料与方法

1.1 小儿紫癜疹消颗粒化学成分研究

利用中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 和中药分子机理生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 分别收集白薇、白鲜皮、侧柏叶、黄芩、鸡血藤、牡丹皮、茜草、生地黄、紫草的主要化学成分, 并使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对其化合物名称和分子结构进行核对。以口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20140311013YY, 20190201146JC)

* 通讯作者: 778005510@qq.com, (0431) 86177741

筛选条件,对化合物进行筛选。

1.2 药物、疾病靶点研究

通过 TCMS 和 BATMAN-TCM 分析平台,检索白薇、白鲜皮、侧柏叶、黄芩、鸡血藤、牡丹皮、茜草、生地黄、紫草的主要化学成分可能作用靶点并整合。其中 BATMAN-TCM 分析平台靶点获取设置条件阈值 (Prediction Score cutoff) > 20, 随后利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 校正所有靶点名称。Genecards (<https://www.genecards.org/>) 是一个以基因为中心的数据库,以“Henoch-Schönlein Purpura”为关键词进行检索并下载有关的全部基因。使用 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将小儿紫癜疹消颗粒作用靶点与 HSP 作用靶点取交集得到小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 的靶点。

1.3 网络构建

通过 Cytoscape 3.2.1 软件将上述预测和筛选结果构建小儿紫癜疹消颗粒-活性化合物-治病靶点网络图及小儿紫癜疹消颗粒治病靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。

1.4 基因本体论 (GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

本研究采用 David v 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对小儿紫癜疹消颗粒治病靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。从通路分析来阐释小儿紫癜疹消颗粒生物学角度的科学内涵。

2 结果

2.1 小儿紫癜疹消颗粒化学成分研究结果

收集小儿紫癜疹消颗粒各药物化学成分分别为白薇 24 个、白鲜皮 16 个、侧柏叶 32 个、黄芩 65 个、鸡血藤 44 个、牡丹皮 18 个、茜草 24 个、生地黄 2 个、紫草 23 个。

2.2 药物、疾病靶点预测结果

经过 Uniprot 数据库校正所有靶点名称,白薇、白鲜皮、侧柏叶、黄芩、鸡血藤、牡丹皮、茜草、生地黄、紫草潜在靶点个数分别为 47、99、145、101、132、114、31、15、73 个 (不包含重复靶点)。利用 Genecards 数据库共检索并下载 HSP 疾病有关的全部基因,共得 514 个靶点基因。将小儿紫癜疹消颗粒活性化学成分潜在靶点与 HSP 作用靶点进行整合,得到小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 靶点共 40 个治病靶点。

2.3 网络构建结果

通过 Cytoscape 3.2.1 构建小儿紫癜疹消颗粒-活性化合物-治病靶点网络图,由 255 个节点和 1290 条边组成,其中单味药 9 个,活性化合物 206 个,治病靶点 40 个 (图略)。从单味药角度,黄芩连接的化合物最多为 65 个,其次为鸡血藤和侧柏叶分别对应 44 个和 32 个。从化合物角度,排名前 10 的化合物依次为 MOL000098-quercetin、MOL000358-beta-sitosterol、MOL000008-apigenin、MOL000422-kaempferol、MOL000006-luteolin、MOL000173-wogonin、MOL000675-oleic acid、MOL000481-genistein、MOL000511-ursolic acid、MOL000359-sitosterol。从靶点角度,前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 拥有最大度 192,表明该靶点可能在小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 的重要潜在靶点。

将 40 个小儿紫癜疹消颗粒治病靶点输入 String 中,并设置条件“minimum required interaction score = 0.7”和“hide disconnected nodes in the network”,得到 39 个靶点蛋白并通过 Cytoscape 3.2.1 构建 PPI 网络图,见图 1。利用 Cytoscape 3.2.1 软件中的 Network analysis 工具分析不同网络的拓扑参数,根据中介中心度和节点度来度量节点在网络中的重要性,各药物的具体 Degree 值分别为白薇 44、白鲜皮 64、侧柏叶 110、黄芩 135、鸡血藤

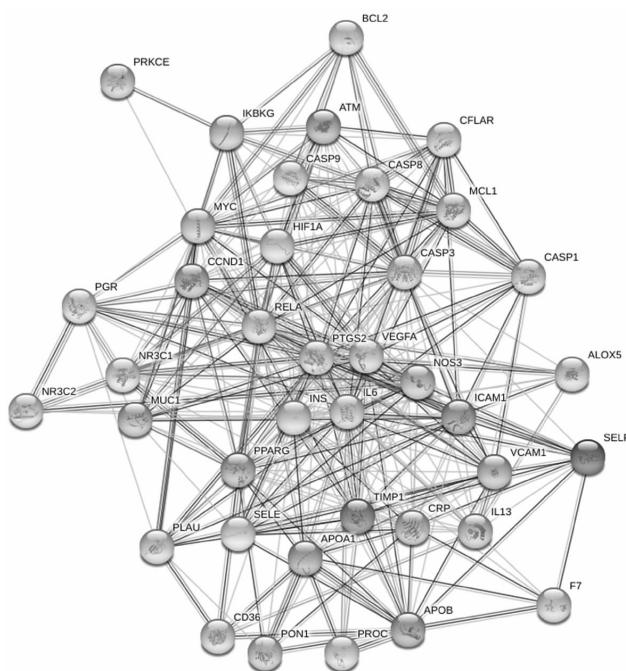


图 1 小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜靶点蛋白质-蛋白质相互作用网络节点图

123、牡丹皮 71、茜草 38、生地黄 6、紫草 54。根据节点的 Degree 值绘制出所有相关蛋白质节点的条形图, 见图 2。共有 30 个蛋白质, 平均 Degree 值为 15.23, 大于平均值的蛋白质共有 15 个。

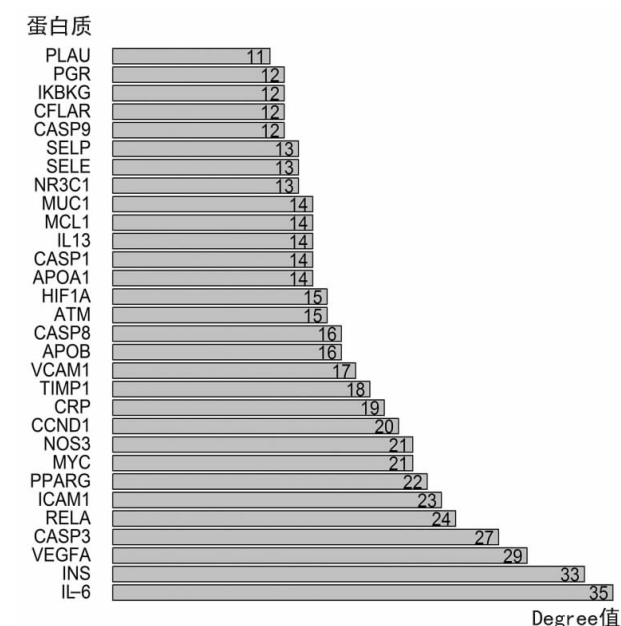


图2 小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜
相关蛋白节点条形图

2.4 GO 富集分析及 KEGG 代谢通路富集分析结果

对 PPI 网络中的 39 个靶点蛋白进行 GO 富集分析, 设定错误发现率 (FDR) < 0.01, 具体结果见图 3。小儿紫癜疹消颗粒治病靶点涉及脂多糖的反应、低氧反应、药物反应、凋亡过程的负调控、I-κB 激酶/NF-κB 信号、雌二醇的反应、乙醇的反应、细胞外间隙、膜筏、细胞外区、质膜外侧、蛋白质结合、蛋白质复合物结合、半胱氨酸型内肽酶活性, 表明小儿紫癜疹消颗粒治病靶点可能参与了 HSP 的病理和生理过程。

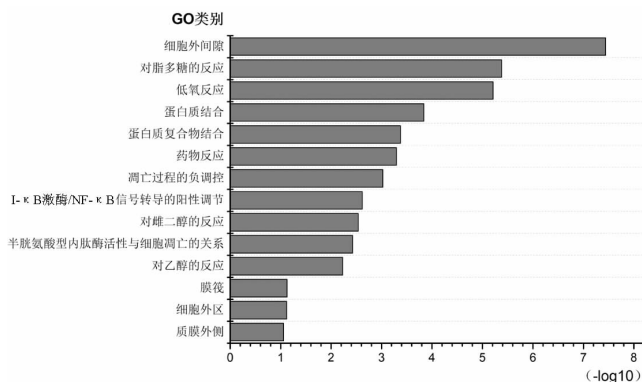


图3 GO 富集分析结果

对 PPI 网络中的 39 个靶点蛋白进行 KEGG 通路分析, 设定条件 FDR < 0.01, 并去掉无关通路, 如

癌症、细胞凋亡、乙型肝炎等, 具体结果见图 4。小儿紫癜疹消颗粒治病靶点主要参与 TNF 信号通路、NF-κB 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路 4 条通路。

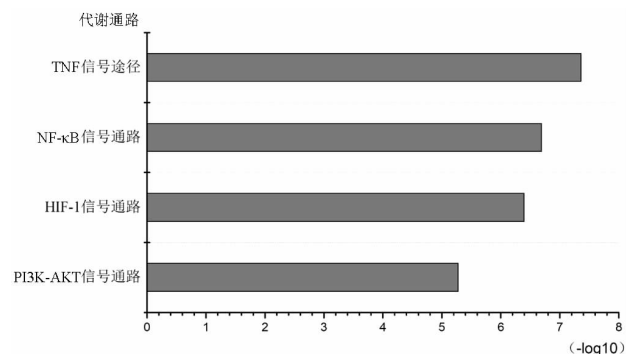


图4 KEGG 代谢通路富集分析结果

3 讨论

中医学认为, HSP 主要病机为邪热入血、迫血妄行、血不循经。毒为因、虚为本、瘀为果、病位在络, 解毒通络为其治疗大法。我们临床以三期分治、脏腑辨证、综合治疗为主^[5]。小儿紫癜疹消颗粒方中紫草气味苦寒, 善清血分伏热, 凉血活血、解毒透疹; 生地黄味甘、苦、寒, 归心、肝、肾经, 入营分、血分, 功善清热凉血。火郁发之, 此二药为君, 达解毒透疹、凉血化斑之用。白鲜皮、侧柏叶、黄芩, 三者相合, 清泄并举, 可祛风除湿, 解三焦热毒; 白薇、牡丹皮清热凉血, 益阴和营; 茜草归心、肝经, 行血凉血之要药。此六药为臣, 奏清上彻下、和营凉血、邪去正安之妙理。鸡血藤为佐使药, 养血活血, 舒经活络, 可引诸药直达脉络之病所, 亦可补肝益肾, 固本安络。在本研究中, 黄芩 Degree 值最大, 其次是鸡血藤, 表明在药物配伍中应更加注重黄芩、鸡血藤的地位。

本研究结果显示, PTGS2 可能在小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 的重要潜在靶点。PTGS2 又称环氧化酶 2 (COX-2), 是脂肪酸代谢的关键酶, 在炎症中上调^[13]。PPI 网络结果表明, IL-6、胰岛素 (INS)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (CASP3)、RELA、细胞间黏附分子 1 (ICAM1)、过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPARG)、MYC、氧化氮合酶 3 (NOS3)、CCND1、cAMP 受体蛋白质 (CRP)、金属蛋白酶 1 的组织抑制剂 (TIMP1)、血管细胞黏附因子 1 (VCAM1)、载脂蛋白 B (APOB)、CASP8 这 15 个靶点蛋白 Degree 值均大于平均值 15.23, 表

明其可能是小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 的重要靶点群。IL-6 是一种典型的促炎性细胞因子,在炎症反应及免疫应答中发挥主要的作用,与一些慢性病及自身免疫性疾病等的发病机制均有关^[14]。临床研究^[15-16]表明,HSP 患儿血清 IL-6 增高,其可能在 HSP 的发病机制中发挥了一定的作用。而 PTGS2 不在小儿紫癜疹消颗粒治疗 HSP 靶点群中,其不一致的结果可能是由于中药炮制、煎煮及靶点作用特异性等因素所造成的,有待进一步研究。

GO 功能富集结果表明,小儿紫癜疹消颗粒治病靶点主要涉及细胞外间隙、脂多糖的反应、低氧反应、药物反应、蛋白质结合、蛋白质复合物结合等,表明其治病靶点分布于不同生物过程、分子组成和分子功能中。KEGG 通路分析显示,39 个靶点主要参与 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路。众多临床研究表明,HSP 患儿血清 TNF 升高^[17-19],且使用药物干预减少 TNF 的生成和释放能有效地发挥对血管内皮损伤的修复作用^[20],这给小儿紫癜疹消颗粒通过 TNF 信号通路治疗 HSP 提供可能。

ICAM1 和 VCAM1 是内皮细胞表面覆盖的细胞黏附分子,其可介导白细胞的黏附和渗出,并在炎症反应中起关键作用,其转录主要由促炎性转录因子 NF- κ B 驱动^[21]。因此,我们推测,小儿紫癜疹消颗粒可能通过 NF- κ B 途径驱动 ICAM1、VCAM1 转录介导白细胞的黏附和渗出等发挥药理作用。磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 是一种与细胞内信号转导有关的脂类第二信使,PI3K 可激活蛋白激酶 B (AKT) 信号转导,活化的 AKT 通过对一系列底物的磷酸化作用激活或抑制糖原合酶激酶-3、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (BCL2) 蛋白、内质网激活核因子 κ B (NF- κ B)、转录调节蛋白等下游信号转导分子,进而对细胞的生存、增殖、分化和凋亡等生物学行为进行调节^[22]。有研究^[23]表明,在 PI3K 抑制剂 LY294002 的作用下,活化的 T 细胞凋亡明显增加;白细胞介素 3 (IL-3)、IL-6、白细胞介素 7 (IL-7)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 促红细胞生成素等通过 PI3K-AKT 信号转导通路抑制 T 细胞凋亡效应。本研究中,IL-6 和 BCL2 是小儿紫癜疹消颗粒的治病靶点,可通过 PI3K-AKT 发挥作用。基于此,我们推测小儿紫癜疹消颗粒可能通过作用于 PI3K-AKT 发挥对 IL-6 和 BCL2 的调控作用,进而发挥对 HSP 治疗的药理学作用。

综上所述,小儿紫癜疹消颗粒是多成分、多靶

点、多途径治疗 HSP, TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路为其治疗 HSP 的主要通路,但是仅通过潜在的信号通路研究存在一定局限性,有待进一步实验验证。

参考文献

- [1] YANG YH, TSAI IJ, CHANG JC, et al. The interaction between circulating complement proteins and cutaneous microvascular endothelial cells in the development of childhood Henoch-Schönlein Purpura [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): e0120411.
- [2] GARDNER-MEDWIN JM, DOLEZALOVA P, CUMMINS C, et al. Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins [J]. Lancet, 2002, 360 (9341): 1197-1202.
- [3] 胡亚美,江载芳,申昆玲,等. 褚福堂实用儿科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 773-775.
- [4] 冯晓纯,段晓征,张强,等. 三期分治、脏腑辨证、综合治疗小儿过敏性紫癜的探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (9): 2349-2351.
- [5] 崔庆科,张洁,钱美加,等. 冯晓纯教授应用小儿紫癜疹消颗粒治疗风毒伤络型过敏性紫癜经验 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15 (8): 77-79.
- [6] 朱浩宇,刘晓蕾,冯晓纯. 小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜 (风热伤络型) 40 例临床观察 [J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7 (8): 123-125.
- [7] 宫文,钱美加,崔庆科,等. 小儿紫癜疹消颗粒治疗过敏性紫癜 (风毒伤络型) 120 例临床观察 [J]. 光明中医, 2017, 32 (14): 1987-1989.
- [8] 朱浩宇,冯晓纯,钱美加. 小儿紫癜疹消颗粒对过敏性紫癜患儿 IgA1 影响 [J]. 中医药通报, 2018, 17 (3): 51-53.
- [9] 朱浩宇,钱美加,冯晓纯. 小儿紫癜疹消颗粒对过敏性紫癜患儿临床疗效及对白细胞介素 4、6 水平的影响 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2017, 9 (5): 375-378.
- [10] 郭珊珊. 紫癜疹消颗粒对小兒过敏性紫癜 (风热伤络证) 血清免疫分子的影响 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [11] 宫文. 小儿紫癜疹消颗粒 (免煎) 对过敏性紫癜兔模型血管炎症的作用机理研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [12] 崔庆科. 小儿紫癜疹消 (免煎) 颗粒对过敏性紫癜兔模型血清免疫分子影响的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2017.
- [13] DESAI SJ, PRICKRIL B, RASOOLY A. Mechanisms of phytonutrient modulation of cyclooxygenase-2 (cox-2) and inflammation related to cancer [J]. Nutr Cancer, 2018, 70 (3): 350-375.
- [14] 徐家新,李娟,刘淑玉,等. 硒与过敏性紫癜患儿血清白介素 2 及同型半胱氨酸的相关性研究 [J]. 齐齐哈尔

- 医学院学报, 2019, 40(10): 1201-1203.
- [15] CHANG H, ZHANG QY, LIN Y, et al. Correlation of TLR2 and TLR4 expressions in peripheral blood mononuclear cells to Th1- and Th2-type immune responses in children with henoch-schonlein purpura [J]. Int Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13532-13539.
- [16] SU Z, LV X, LIU Y, et al. Circulating midkine in children with Henoch-Schönlein purpura: Clinical implications [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39: 246-250. doi: 10.1016/j.intimp.2016.07.032.
- [17] 邢静, 李文斌, 刘振奎, 等. 儿童过敏性紫癜患者血清 IL-21、TGF- β 、TNF- α 和 IgA1 的变化及其意义 [J]. 海南医学, 2017, 28(3): 394-396.
- [18] 关霖静, 王文亮, 唐芳. 过敏性紫癜患儿血清 IL-6、IL-8 及 TNF- α 表达的意义 [J]. 河南医学研究, 2015, 24(12): 32-33.
- [19] 赵梅青, 王芳. 过敏性紫癜患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 及 VEGF 水平的研究 [J]. 中国临床研究, 2012, 25(7): 649-650.
- [20] 王旭辉, 刘永红, 李哲敏, 等. 四君子汤对过敏性紫癜患儿循环内皮祖细胞和肿瘤坏死因子 α 的影响 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(7): 100-103.
- [21] YIN Y, LI F, SHI J, et al. MiR-146a regulates inflammatory infiltration by macrophages in polymyositis/dermatomyositis by targeting TRAF6 and affecting IL-17/ICAM-1 pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(3/4): 486-498.
- [22] CANTLEY LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [23] 成慧娟, 吕小平. PI3K-AKT 信号转导通路与炎症性肠病关系的研究进展 [J]. 广东医学, 2014, 35(2): 297-299.

Exploration on the Mechanism of *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* (小儿紫癜疹消颗粒) in Treating Henoch-schonlein Purpura Based on the Network Pharmacology

CUI Qingke¹, ZHU Haoyu², ZHANG Jie³, FENG Xiaochun²

1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, 130117; 2. Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine; 3. People's Hospital of Linzi District, Zibo City, Shandong Province

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanisms of treatment of henoch-schonlein purpura (HSP) with *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* (小儿紫癜疹消颗粒) by the network pharmacology. **Methods** The chemical composition and action targets of *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* were retrieved by the Chinese Medicine System Pharmacology Analysis Platform (TCMSP) and the Chinese Medicine Molecular Mechanism Bioinformatics Analysis Tool (BATMAN-TCM), and HSP action targets were collected using Genecard database, and then the action targets of *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* were intersected with the targets of HSP by using Venny 2.1. The network map of treatment target of active compounds *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* was constructed by Cytoscape 3.2.1, and the protein-protein interaction (PPI) network of the therapeutic targets of *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* was constructed by String. The possible mechanisms of the treatment of HSP in children with *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* were studied. **Results** The network map of the active compound treatment targets of *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* contained 9 single drugs, 206 active compounds and 40 treatment targets. The PPI network contained 39 target proteins, and the key proteins involved interleukin 6 (IL-6), insulin (INS), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) etc. Enrichment of GO function resulted in 14 items, which involved lipopolysaccharide reactions, hypoxia reactions, and drug reactions. KEGG pathway analysis involved TNF signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, and PI3K-AKT signaling pathway. **Conclusion** *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* are multi-component, multi-target and multi-pathways for the treatment of HSP. TNF signaling pathway, NF- κ B signaling pathway and PI3K-AKT signaling pathway are the main pathways to treat HSP.

Keywords *Xiaoer Zidian Zhenxiao Granules* (小儿紫癜疹消颗粒); henoch-schonlein purpura; network pharmacology; molecular mechanism

(收稿日期: 2019-10-11; 修回日期: 2019-12-04)

[编辑: 邓媛]