

基于文献的不同核心药对干预骨性关节炎的生物信息学分析

杨丽平¹, 程仕萍², 张万强¹, 朱嘉¹, 宋庆慧¹, 张平^{*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京市东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所)

摘要 目的 探索骨性关节炎 (OA) 中药配伍应用规律及其治疗 OA 的可能分子机制。方法 检索中国生物医学文献数据库中医药治疗 OA 的临床研究, 采用 Access 2003 数据库录入纳入复方的名称、组成药物的名称和药性。计算药物的关联关系并据此建立中药配伍复杂网络, 选择网络相对中心度较高的前 5 味药组成治疗 OA 的核心复方, 并将其分为不同的核心药对。查找复方中各药物主要有效成分的人类活性靶蛋白和 OA 相关基因, 并采用 IPA 分析平台对靶蛋白及 OA 的生物学通路进行整合分析。结果 共纳入复方 208 首, 复杂配伍网络相对中心度较高的前 5 味中药依次为牛膝 (0.83)、当归 (0.79)、甘草 (0.73)、杜仲 (0.71)、白芍 (0.71), 可分为当归-白芍、白芍-甘草、杜仲-牛膝 3 组药对。5 味中药主要有效成分靶蛋白分别为杜仲 32 个、牛膝 16 个、当归 30 个、白芍 36 个、甘草 16 个, OA 相关基因共 365 个。药物靶蛋白和 OA 基因所形成的分子网络中包含导入基因较多、相关度评分较高的网络数量分别为核心复方 8 个、当归-白芍 6 个、白芍-甘草 5 个、杜仲-牛膝 4 个、OA 25 个。分子网络整合分析显示, 各药对均与 OA 具有共同直接作用的分子, 其中 CA1、NF- κ B1、VDR 是当归-白芍、白芍-甘草与 OA 共有的关键靶点。OA 基因相关度最高的 10 条通路与各药对通路整合分析显示, 10 条通路中以当归-白芍影响最大, 其次是白芍-甘草, 杜仲-牛膝最小; 药对在各自通路的关键靶点的出现率以当归-白芍最高, 其次是白芍-甘草, 杜仲-牛膝最低。结论 养血柔肝、调和肝脾中药配伍原则对 OA 有更强的干预作用, 其核心药对当归-白芍、白芍-甘草、杜仲-牛膝可能通过不同分子或通路, 从细胞增殖、凋亡、机体免疫、代谢等多个方面综合发挥对 OA 的治疗作用。

关键词 骨性关节炎; 核心药对; 网络药理学; 分子网络; 生物信息学

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性关节疾病, 也是多功能蛋白、多基因相互作用紊乱造成的复杂疾病。中医药防治 OA 具有一定的优势, 在改善关节软骨及滑膜病变、降低骨内压、清除氧自由基等方面有积极作用, 但其作用机制尚不明确。中药复方多组分协同、系统调控的特点与网络药理学的研究有许多相似之处^[1]。本研究拟通过对近 10 年文献报道治疗 OA 的中药复方进行复杂网络分析, 找到核心配伍组方, 并基于网络药理学预测核心药对的作用机制, 为探索中药复方多途径、多靶点治疗 OA 提供新思路。

基金项目: 中国中医科学院望京医院院级科研课题 (WJYY2014 - YY048)

* 通讯作者: pinglele@sina.com

1 材料与方法

1.1 筛选核心复方

检索中国生物医学文献数据库 2005 年 1 月至 2015 年 1 月中医药治疗 OA 的临床研究, 纳入内服用药、资料详细、设有对照组、诊断或疗效标准是公认的通用标准的有效中药复方。采用 Access 2003 数据库录入纳入复方的名称、药名和药性, 以《中药学》^[2]为标准, 建立药物别名管理库。应用 Apriori 算法进行关联规则分析, 将药物的关联关系数据导入复杂网络软件 Cytoscape 3.1 中建立中药配伍网络。网络中各药物所产生的影响力采用相对中心度描述, 其值为与药物直接相连的药物数与理论上最大连接数的比值^[3], 选择网络相对中

心度较高的前 5 味药组成治疗 OA 的核心复方,并根据中医临床常用的对药配伍规律将其分为不同的核心药对。

1.2 检索中药靶蛋白及 OA 基因

根据《中药大辞典》^[4]选取复方中各药物的主要有效成分,在 PubChem 数据库和 Gene 数据库中检索有效成分的人类活性靶蛋白和 OA 相关基因。

1.3 生物信息学分析

将中药主要成分对应的靶蛋白、OA 基因上传至 Ingenuity Pathway Analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com/>) 分析平台,利用 Network、Canonical Pathway、Functions 及 Comparison 等功能模块进行药物与疾病的生物学通路的整合分析。

2 结果

2.1 核心复方及药对

符合纳入标准的有效复方共 208 个,复杂配伍网络相对中心度较高的前 5 味中药依次为牛膝 0.83、当归 0.79、甘草 0.73、杜仲 0.71、白芍 0.71,选择这 5 味药作为治疗 OA 的核心配伍,依据临床常用药对配伍规律将其分为 3 组药对:养血理血的当归-白芍,调和肝脾、敛阴养血的白芍-甘草,补肝肾强筋骨的杜仲-牛膝。

2.2 药物靶蛋白及 OA 相关基因

截至 2015 年 5 月 28 日,在 PubChem 数据库查到靶蛋白:杜仲 32 个,牛膝 16 个,当归 30 个,白芍 36 个,甘草 16 个;在 Gene 数据库查到 OA 相关基因 365 个。

2.3 核心复方、药对靶蛋白及 OA 基因分子网络

药物靶蛋白和 OA 基因分别形成若干生物功能各异的分子网络,选取包含导入基因较多、相关度评分较高的网络分析主要生物功能如下。核心复方:网络数量为 8,与代谢病、脑病、机体损伤、

DNA 复制重组修复、炎性病、胃肠病、能量产生、小分子生化等生物功能密切相关;当归-白芍:网络数量为 6,与代谢病、脑病、机体损伤、药物代谢、能量产生、小分子生化等生物功能密切相关;白芍-甘草:网络数量为 5,与胃肠病、炎性病、代谢病、脑病、眼病等生物功能密切相关;杜仲-牛膝:网络数量为 4,与翻译后修饰、癌症、发育障碍、细胞周期、DNA 复制重组修复、胚胎发育等生物功能密切相关;OA:网络数量为 25,与血液系统发育、细胞运动、结缔组织病、炎性病、骨骼肌肉病、细胞生长增殖、心血管病、糖代谢、小分子生化、血液系统发育、免疫细胞转运等生物功能密切相关。

2.4 核心药对与 OA 分子网络的整合分析

将每组药对的分子网络与 OA 的 25 个分子网络进行整合,发现药对与 OA 的多个分子网络具有共同分子,即存在交联关系。为进一步明确机制,通过网络分析,找到每组药对与 OA 共同直接作用的分子即关键靶点,具体如下表 1 所示。

2.5 核心药对与 OA 生物学通路的整合分析

根据 core analysis 中的 canonical pathway 分析方法,采用确切概率法($P < 0.05$)计算得出 OA

表 1 各药对与 OA 交联网络共同直接作用的分子

药对	OA 分子网络	药对分子网络	关键靶点
当归-白芍	3	1	CA1
	4	3	RELA
	6	4	NF-κB1
	13	2	VDR
白芍-甘草	3	2	CA1
	6	1	NF-κB1
	13	1	VDR
杜仲-牛膝	1	2	DNMT1
	13	1	PTPN1

注: OA, 骨性关节炎

表 2 骨性关节炎相关度最高的 10 条经典通路与各药对的相关性

经典通路	当归-白芍	白芍-甘草	杜仲-牛膝
Role of macrophages, fibroblasts and endothelial cells in rheumatoid arthritis	+	+	+ -
Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation	+	+ -	-
Role of osteoblasts, osteoclasts and chondrocytes in rheumatoid arthritis	+	+ -	+ -
Glucocorticoid receptor signaling	+	+	+ -
HMGB1 signaling	+	+ -	-
Altered T cell and B cell signaling in rheumatoid arthritis	+	+ -	-
Atherosclerosis signaling	+	+	+ -
IL-6 signaling	+	+	+ -
Acute phase response signaling	+	+	+
Dendritic cell maturation	+	+ -	-

注: +, 显著影响该途径; + -, 影响该途径但不显著; -, 不影响该途径

表 3 各药对与 OA 共同参与通路的靶蛋白

当归-白芍			白芍-甘草			杜仲-牛膝		
经典通路	靶蛋白		经典通路	靶蛋白		经典通路	靶蛋白	
Xenobiotic Metabolism Signaling	RELA, NF-κB1, ALDH1A1, NFE2L2, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, MAOA, MAOB		Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	NF-κB1, ALDH1A1, MYC, NFE2L2, TP53, HSPB1		Gai Signaling	ADORA1, DRD3, OPRD1, OPRK1	
PXR/RXR Activation	RELA, ALDH1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4		Prolactin Signaling	MYC, NR3C1, PRKCH, STAT3		cAMP-mediated signaling	ADORA1, DRD3, OPRD1, OPRK1	
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	RELA, NF-κB1, ALDH1A1, MYC, NFE2L2, TP53*, CYP1A2		IL-6 Signaling	NF-κB1, STAT3, ABCB1, HSPB1		Protein kinase A signaling	PTPN1, ACP1, PRKCH, PTPN6, PTPRF	
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	RELA, NF-κB1, STAT1, STAT3		p38 MAPK Signaling	TP53, HSPB1, MAPT, MYC		G-Protein Coupled Receptor Signaling	ADORA1, DRD3, OPRD1, OPRK1	
IL-9 Signaling	RELA, NF-κB1, STAT1, STAT3		Thrombopoietin Signaling	MYC, PRKCH, STAT3		Role of JAK2 in Hormone like cytokine Signaling	PTPN1, PTPN6	
Role of PKR in interferon induction and Antiviral Response	RELA, NF-κB1, STAT1, TP53		Xenobiotic Metabolism Signaling	NF-κB1, ALDH1A1, NFE2L2, ABCB1, PRKCH		Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	GSTO1, HSP90AA1, HSPB1	
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	RELA, NF-κB1, STAT1, STAT3, TP53		PXR/RXR Activation	ALDH1A1, ABCB1, NR3C1		Aldosterone signaling in Epithelial cells	HSP90AA1, HSPB1, PRKCH	
LPS/IL-4 Mediated Inhibition of RXR Function	ALDH1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, MAOA, MAOB		Small Cell Lung Cancer Signaling	NF-κB1, TP53, MYC		TNFR1 signaling	CASP6, MAP4K2	
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	RELA, NF-κB1, MYC, STAT1, STAT3, TP53		Acute Myeloid Leukemia Signaling	NF-κB1, MYC, STAT3		IL-3 signaling	PRKCH, PTPN6	
Small Cell Lung Cancer Signaling	RELA, NF-κB1, TP53, MYC		Prostate Cancer Signaling	NF-κB1, TP53, AR		JAK/STAT signaling	PTPN1, PTPN6	

注：灰色字体表示药对与 OA 共有的分子，即关键靶点

相关基因与多条经典通路有较高的相关度，将相关度最高的 10 条通路与各药对通路整合分析，具体见表 2。将药对通路与 OA 通路整合分析，药对在各自通路的靶蛋白具体见表 3。

3 讨论

中医理论指导下的复方配伍具有无尺度复杂网络现象，而复杂网络研究方法能够分析配伍网络结构特点，从而揭示中药的配伍规律^[6]。OA 属于中医学“痹证”“骨痹”范畴，肝肾亏虚、筋脉失养是发病根本，根据“肾主骨”“肝主筋”“脾主肌

肉”理论，确立了从肝、肾、脾论治骨痹的治则，以滋补肝肾、活血通络、温里除湿为法进行药物组合。本研究以复杂网络方法筛选的核心复方符合中医治疗 OA 的治则治法，方中当归-白芍、白芍-甘草、杜仲-牛膝 3 组经典药对以补血养肝、调和肝脾、补肝肾强筋骨的配伍功效发挥核心治疗作用。

本研究结果显示，当归-白芍、白芍-甘草与 OA 网络共同直接作用的分子即关键靶点是 CA1、维生素 D 受体 (VDR)、核因子-κB1 (NF-κB1)。CA1 是碳酸酐酶家族的一员，参与 CO₂ 的水化作用促进 CaCO₃ 的形成，而钙盐结晶是骨化过程的

重要步骤。研究显示, CA 参与生理和病理上的钙化和矿化过程^[1], 因此, 该基因的异常表达可能与 OA 的软骨下骨硬化与骨赘形成有关。VDR 信号通路除了参与维持钙磷代谢, 还对软骨内成骨有着重要的调节作用, 如 OA 的骨赘形成与 VDR 基因型有关系^[2], VDR 受体基因多态性与椎间盘退变密切相关^[3]。NF- κ B 与 RELA 均是 NF- κ B 家族的成员, 参与细胞的增殖、转化、凋亡、炎症以及免疫应答等。在软骨损伤极早期, 各种前炎症因子刺激软骨细胞激活下游分解代谢基因, 包括基质金属蛋白酶 (MMPs)、蛋白聚糖酶等, 而这些被认为是 NF- κ B 典型的靶基因^[4]。NF- κ B 和 RELA 是当归-白芍 9 条通路的关键靶点, NF- κ B 是白芍-甘草 6 条通路的关键靶点, 说明这两个靶点是补血养肝、调和肝脾作用干预 OA 的重要环节, 也是整个复方的最重要靶点。杜仲-牛膝独有的关键靶点是 DNMT1 和 PTPN1, 前者是 DNA 甲基转移酶, 功能是维持甲基化, 确保每个细胞的 DNA 甲基化模式的正常复制^[5], 衰老的细胞中 DNMT1 活性下降, 而部分基因出现高甲基化^[6]; 后者是蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPs) 家族成员, 与蛋白酪氨酸激酶 (PTKs) 共同调节蛋白质的磷酸化水平, 且 PTPs 是 JAK-STATs 信号通路的关键环节, 直接影响细胞增生、转化与凋亡^[7]。本研究中 PTPN1 是杜仲-牛膝 3 条通路的关键靶点, 说明其是补肝肾、强筋骨作用的重要靶点。

在 OA 相关生物学通路中以当归-白芍的影响最大, 其次是白芍-甘草, 杜仲-牛膝最弱。当归-白芍主要干预代谢相关通路, AHR、PXR/RXR 是配体介导的转录因子, 这些受体能够感受一系列外源物和内源物, 并调节大量的一相、二相代谢酶及转运体的生成, 进而维持着机体内环境的稳态。当归和白芍均归肝、脾经, 而肝脾的联系主要表现在经络相通、气机同调、运化水谷、通行血液及代谢水液等方面^[8], 脾化不足, 肝失疏泄造成机体物质代谢失衡, 进而引起血虚血瘀、筋脉失养, 当归-白芍可能主要通过干预 OA 相关的代谢通路发挥养血活血柔肝的治疗作用。白芍-甘草的干预通路以免疫为主, 其次是代谢通路。牛膝-杜仲主要干预 G 蛋白偶联的信号传导系统, 它是目前细胞内最重要的信号通路, 由 G 蛋白偶联受体 (GPCR)、G 蛋白和效应器组成, 参与细胞增殖、分化、物质运输及细胞骨架形成。已有研究表明, G 蛋白偶联受体 48 (GPR48) 在生殖系统中能通过调控雄性激

素受体的表达来调控泌尿生殖系统的发育^[9], GPR48 的灭活同时造成红系造血和骨发育缺陷, GPR48 信号通路通过调节细胞增殖影响骨和红细胞发育^[10]。结合本研究结果, 提示牛膝-杜仲补肝肾、强筋骨的功效可能主要通过干预 G 蛋白偶联信号传导系统实现。芳香烃受体 (AHR) 通路是 3 组药对靶蛋白均参与的主要 OA 相关通路, AHR 是细胞内重要的调节蛋白, 能调节凋亡相关基因而影响细胞凋亡^[11]。AHR 可通过不同的机制与炎症信号通路相互作用, 调节炎症进程^[12]。另外, AHR 在免疫系统中的作用日益被关注, 其可调控重要免疫细胞巨噬细胞、树突状细胞的功能和 T 细胞的分化^[13]。当归-白芍、白芍-甘草与 AHR 的相关性远高于杜仲-牛膝, 说明补血养肝、调和肝脾对炎症、凋亡和免疫等 OA 密切相关的因素有更好的干预作用。

西医学认为, OA 的多元致痛因素包含骨、神经、肌肉、滑膜、半月板等, 中医学则认为, 该病涉及筋、骨、气、血、经、络等^[14]。肝血亏虚, 筋失濡养, 则出现筋脉拘挛, 关节活动不利, 若脾失健运, 则四肢无力, 甚至肌肉萎软。从肝脾论治该病以使筋肉强健, 关节应力增强, 可延缓关节软骨的进一步损伤。本研究预测结果显示, 养血柔肝、调和肝脾的中药配伍原则对 OA 有更强的干预作用, 当归-白芍、白芍-甘草、杜仲-牛膝可能通过不同分子或通路, 从细胞增殖、凋亡、机体免疫、代谢等多个方面综合发挥对 OA 的治疗作用。

参考文献

- [1] ZHAO S, LI S. Network-based relating pharmacological and genomic spaces for drug target identification [J]. PLoS One, 2010, 5 (7) : e11764. doi: 10. 1371. /journal. pone. 0011764.
- [2] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [3] 黄源, 杨铭, 陈佳蕾, 等. 基于复杂网络的中医药治疗慢性阻塞性肺疾病的用药配伍特点 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (15) : 7-11.
- [4] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3506.
- [5] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. 药学学报, 2012, 47 (6) : 696-703.
- [6] SUPURAN CT. Carbonic anhydrases—an overview [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14 (7) : 603-614.
- [7] UITTERLINDEN AG, BURGER H, VAN DUIJN CM, et al. Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43 (7) :

1436-1464.

唐颖,雷玲. 腰椎间盘突出退变的环境与遗传因素及其交互作用[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(4): 365-381.

MAY MJ, GHOSH S. Signal transduction through NF-kappa B[J]. Immunol Today, 1998, 19(2): 80-88.

CHEN T, LI E. Establishment and maintenance of DNA methylation pattern in mammals[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 301(2): 179-201.

CASILLAS MA JR, LOPATINA N, ANDREWS LG, et al. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts[J]. Mol Cell Biol, 2003, 25(1/2): 33-43.

YU CL, JIN YJ, BURAKOFF SJ. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of TAT5: Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(1): 599-604.

李花. 中医“肝脾相关”的理论和应用研究[D]. 长沙:

湖南中医药大学, 2010.

罗剑. G 蛋白偶联受体 GPR48 在小鼠骨发育中的功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2007.

宋会平. 血液成分与骨组织的内在联系及组织工程学评价[D]. 广州: 南方医科大学, 2008.

PARK KT, MITCHELL KA, HUANG G, et al. The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 612-622.

CHIBA T, UCHI H, YASUKAWA F, et al. Role of the arylhydrocarbon receptor in lung disease[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2011, 155(Sup 1): 129-134.

殷樱, 贾功伟. 芳香烃受体在细胞免疫调节中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(11): 1002-1004.

庞坚, 曹月龙, 詹红生. 骨关节炎的“筋”“骨”之辨[J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(1): 29-30.

Bioinformatic Analysis of Different Core Herb-pairs in Intervening Osteoarthritis Based on Literature

YANG Liping¹, CHENG Shiping², ZHANG Wanqiang¹, ZHU Jia¹, SONG Qinghui¹, ZHANG Ping¹

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medicine Science)

ABSTRACT Objective To explore the rules of using compatibility herbs and the possible molecular mechanism in treating osteoarthritis (OA). **Methods** Clinical researches of Chinese medicine treating OA were searched in Chinese Biological Medical Literature Database. The names of included compound prescriptions, the names of herbs and herbs' nature were inputted in an Access 2003 database. Herbs' incidence relation was calculated, and based on the results compatibility herbs complex network was built. Top 5 herbs which got high network relative centrality were chosen to composite the core compound prescription for OA, and they were divided into different core herb-pairs. Human active target proteins and OA related genes of herbs main effective components in the compound prescriptions were searched. Confluence analysis of target proteins and biological pathway of OA were made with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) platform. **Results** Totally 208 compound prescriptions were included. Top 5 herbs which got high complex compatibility network relative centrality were Niuxi (*Radix Achyranthis Bidentatae*, 牛膝) (0.83), Danggui (*Radix Angelicae Sinensis*, 当归) (0.79), Gancao (*Radix Glycyrrhizae*, 甘草) (0.73), Duzhong (*Cortex Eucommiae*, 杜仲) (0.71) and Baishao (*Radix Paeoniae Alba*, 白芍) (0.71), which could be divided into 3 herb-pairs, Danggui-Baishao, Baishao-Gancao and Duzhong-Niuxi. There were 32 of main effective components target proteins in Duzhong, 16 in Niuxi, 30 in Danggui, 36 in Baishao, and 16 in Gancao. There were 365 genes related to OA in total. There were 8 networks with many import genes and high correlation score in core compound prescriptions, as well as 6 these kind of networks in Danggui-Baishao, 5 in Baishao-gancao, 4 in Duzhong-Niuxi and 25 in OA. Molecular network confluence analysis showed that all herb-pairs and OA had common direct effect molecules. Among them, CA1, NF-κB1 and VDR were the common key targets of Danggui-Baishao, Baishao-Gancao and OA. Confluence analysis between top 10 pathways with high OA genes association degree and all herb-pairs pathways showed that Danggui-Baishao had the greatest impact among 10 pathways, followed by Baishao-Gancao and then Duzhong-Niuxi. Danggui-Baishao got the highest occurrence rate of herb-pairs in the key target of each pathway. Baishao-Gancao got the second higher, and Duzhong-Niuxi was the lowest. **Conclusion** The herb compatibility principle of nourishing blood and softening liver, and harmonizing liver and spleen seems have strong intervention on OA. The core herb-pairs, such as Danggui-Baishao, Baishao-Gancao, and Duzhong-Niuxi, might treat OA through different molecules or pathways, from many aspects of cell multiplication, apoptosis, organism immunity, metabolism, etc.

Keywords osteoarthritis; core herb-pairs; network pharmacology; molecular network; bioinformatics

(收稿日期: 2016-01-06; 修回日期: 2016-03-02)

编辑: 崔京艳