

文章编号 1006-8147(2020)06-0526-04

论著

# 基于网络药理学的熟地黄环烯醚萜类成分治疗类风湿性关节炎作用机制的初步探究

张冬丽, 于欢, 李敏, 唐生安

(天津医科大学天然药物学系, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

**摘要** 目的:对熟地黄环烯醚萜类成分治疗类风湿性关节炎(RA)的多成分、多靶点、多途径的作用机制进行初步探究。方法:通过文献查找和 TCMSp 数据库筛选出候选成分,利用 PubChem 数据库、TTD 数据库和 DrugBank 数据库筛选出各成分所作用的并与 RA 相关的靶点,再将靶点信息导入 David 数据库,得到重要靶点和通路信息。最后使用 Cytoscape3.7.0 软件对筛选后的成分、靶点和通路建立网络图。结果:由网络图的分析报告得知肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6 和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制蛋白- $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )是熟地黄环烯醚萜类成分作用的关键靶点;NF- $\kappa$ B 信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡是其产生抗 RA 活性的主要通路;说明熟地黄环烯醚萜类成分的“多成分-多靶点-多通路”的作用机制。结论:熟地黄环烯醚萜类成分主要是通过细胞因子和细胞调节发挥抗 RA 活性。

**关键词** 熟地黄;网络药理学;类风湿性关节炎;靶点

中图分类号 R917+R593.22

文献标志码 A

## A preliminary exploration on the mechanism of iridoids from *Rehmanniae Radix Praeparata* in the treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology

ZHANG Dong-li, YU Huan, LI Min, TANG Sheng-an

(Department of Natural Medicines, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the mechanism of multi-component, multi-target and multi-pathway of iridoids from *Rehmanniae Radix Praeparata* in the treatment of rheumatoid arthritis(RA). **Methods:** Candidate ingredients were screened by literature search and TCMSp database. The RA-related targets prediction and filtering for each candidate ingredient were conducted by PubChem database, TTD database and DrugBank database. Then target information was imported into David database to obtain important target and pathway information. Finally, the network of the candidate ingredients, targets and pathways was constructed by Cytoscape 3.7.0 software. **Results:** Analysis report of network diagram showed that TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, and I $\kappa$ B $\alpha$  were the important targets for the effect of iridoids from *Rehmanniae Radix Praeparata*. NF- $\kappa$ B signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, TNF signaling pathway and apoptosis are the main pathways in the treatment of RA. The mechanism of "multi-component-multi-target-multi-pathway" of iridoids from *Rehmanniae Radix Praeparata* was illuminated. **Conclusion:** The iridoids component of *Rehmanniae Radix Praeparata* mainly exerts its anti-RA activity through cytokines and cellular regulatory pathways, which lays a foundation for the subsequent experiment to verify its mechanism of action.

**Key words** *Rehmanniae Radix Praeparata*; network pharmacology; rheumatoid arthritis; target

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因尚未完全阐明的系统性炎症性自身免疫病,其主要特点是关节滑膜炎的产生、血管翳的形成和软骨破坏。滑膜炎持久反复发作,导致关节内软骨及骨的破坏,严重影响患者的生活质量和身体健康<sup>[1]</sup>。现代医学药物治疗 RA 主要有非甾体抗炎药,如美洛昔康、塞来昔布;生物制剂,如依那西普、英夫利昔单抗和糖皮质激素等,这些药物虽能缓解 RA 病情,但具有一定的毒副作用。中药具有多成分、多靶

点、多途径的治疗特点,一定程度上可以弥补西药带来的不良反应,为进一步寻找抗 RA 药物提供新方向。

熟地黄(*Rehmanniae Radix Praeparata*)为玄参科、地黄属植物。生地黄甘苦而寒,具有清热凉血、养阴生津的作用;而熟地黄甘温味厚,具有滋阴补血、益精填髓的功效<sup>[2]</sup>。根据 RA 的证候特点不同,熟地黄多用于治疗肾虚寒凝型、气血亏虚型、寒湿痹阻型 RA<sup>[3]</sup>。研究表明,六味地黄汤可以通过调节机体的免疫功能状态、恢复免疫平衡实现治疗自身免疫性疾病<sup>[4]</sup>。但由于自身免疫性疾病发病机制较复杂,熟地黄中有效成分和作用机制并不明确。因此,本文利用网络药理学对熟地黄环烯醚萜类成分进

基金项目 天津市教委科研计划项目(2019ZD031)

作者简介 张冬丽(1997-),女,硕士在读,研究方向:中药药效物质;  
通信作者:唐生安, E-mail: tangshengan@tmu.edu.cn.

行筛选,预测其作用的与 RA 有关的靶点及相关通路,构建“成分-靶点-通路”网络图,直观地展示熟地黄环烯醚萜类成分主要作用的靶点和通路,预测其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 候选成分的虚拟筛选** 首先通过查找文献得知熟地黄环烯醚萜类成分有促进骨细胞的增殖、分化和免疫调节的作用<sup>[5]</sup>,提示熟地黄环烯醚萜类成分具有抗 RA 活性。利用中药系统药理数据库(TCMSP)检索熟地黄成分,可以找到 26 个环烯醚萜成分,从中筛选出类药性(DL) $\geq 0.18$  且具有较多作用靶点的 5 个成分,分别为:梓醇(1)、益母草苷(2)、桃叶珊瑚苷(3)、(2S,3R,4R,5S,6R)-2-[(1S,4aS,5R,7aR)-4a,5-dihydroxy-7-methylol-5,7a-dihydro-1H-cyclopent[9(c)pyran-1-yl]oxy]-6-methylol-tetrahydropyran-3,4,5-triol (4)、京尼平苷(5),结构见图 1。

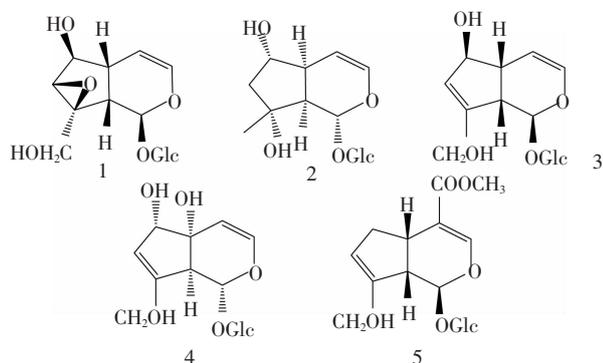


图 1 熟地黄环烯醚萜类成分结构

Fig 1 The structure of iridoids from *Rehmanniae Radix Praeparata*

**1.2 候选成分靶点预测** 通过 PubChem 数据库查找候选成分相关的分子信息及生物学测试<sup>[6]</sup>和 TCMSP 数据库进而确定各成分潜在的作用靶点。采用 UniProt KB 搜索功能得到这些靶蛋白的 UniProt ID,基因名称及其正确名称。

**1.3 靶点的筛选** 在治疗靶标数据库(TTD)中输入关键词“rheumatoid arthritis”,可以得到有关 RA 的靶点信息;在 DrugBank 数据库中搜索美国食品药品监督管理局(FDA)批准的抗 RA 药物的靶点,将两个数据库得到的与 RA 相关的靶点信息进行整合。预测的候选成分的靶点与 RA 相关靶点进行比对分析,得到靶点中有明显抗 RA 作用的靶蛋白,并统计频次。

**1.4 相关通路获取及分析** 将比对之后的靶蛋白的 UniProt ID 导入生物学信息资源数据库 David (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>),得到靶点的相关通路信息后进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释

分析。参数设置如下:Identifier:UNIPROT\_ACCESSION;List Type:Gene List;Species:Homo sapiens(Human)。在分析报告的“Functional Annotation Chart”中通过  $P$  值( $P < 0.05$  为差异有统计学意义)进行筛选。**1.5 “成分-靶点-通路”网络构建** 以选取的 5 个成分、比对分析过的靶点和通路建立相互关系,导入 Cytoscape3.7.0 软件,分析熟地黄环烯醚萜“成分-靶点-通路”的网络图。

## 2 结果

**2.1 熟地黄环烯醚萜类成分的潜在靶点信息** 将 PubChem 数据库中获得的靶点信息与 TTD 数据库和 DrugBank 数据库中获得的与 RA 相关的靶点信息进行比对,得到 13 个重复靶点,即可能为熟地黄环烯醚萜类成分治疗 RA 的潜在作用靶点,见表 1。

表 1 熟地黄环烯醚萜成分的潜在靶点信息

Tab 1 Information of potential targets from iridoid constituents of *Rehmanniae Radix Praeparata*

UniProt ID	靶蛋白	靶基因	网络节点度
P01375	肿瘤坏死因子	TNF	14
P01584	白细胞介素-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	14
P05231	白细胞介素-6	IL-6	13
P25963	NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$	I $\kappa$ B $\alpha$	13
Q9NR96	Toll 样受体 9	TLR9	8
P35354	前列腺素 G/H 合成酶 2	PTGS2	7
P10415	Bcl-2 细胞凋亡调节器	Bcl-2	7
O60674	酪氨酸激酶 JAK2	JAK2	6
P04637	细胞肿瘤抗原 p53	TP53	5
P00918	碳酸酐酶 2	CA2	-
P23219	前列腺素 G/H 合成酶 1	PTGS1	-
P04150	糖皮质激素受体	NR3C1	-
P22303	乙酰胆碱酯酶	ACHE	-

对比筛选出的各靶点的网络节点度(Degree),肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )较高,为网络中的枢纽节点,提示它们可能是熟地黄环烯醚萜类成分抗 RA 的关键作用靶点。在表 1 的基础上,对 5 个成分作用的靶点数进行归纳,见表 2。

表 2 熟地黄环烯醚萜成分的潜在靶基因和靶点数

Tab 2 Potential target genes and target number from the iridoid constituents of *Rehmanniae Radix Praeparata*

编号	化学成分	靶点数
1	梓醇	3
2	益母草苷	3
3	桃叶珊瑚苷	7
4	(2S,3R,4R,5S,6R)-2-[(1S,4aS,5R,7aR)-4a,5-dihydroxy-7-methylol-5,7a-dihydro-1H-cyclopent[9(c)pyran-1-yl]oxy]-6-methylol-tetrahydropyran-3,4,5-triol	3
5	京尼平苷	5

5 种化合物的母核都是环烯醚萜结构。由表 2 可知,桃叶珊瑚苷和京尼平苷的靶点数较多,与其他成分比较,提示桃叶珊瑚苷和京尼平苷具有相对较好抗 RA 活性。可见熟地黄环烯醚萜的不同化学成分不仅可以作用于相同的靶点,也可作用于不同的靶点,体现了其多成分、多靶点的抗 RA 机制。

2.2 熟地黄环烯醚萜成分潜在靶点的生物学过程和通路注释分析 从 13 个靶点中筛选出 9 个靶点 (JAK2、I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF、Bcl-2、TP53、TLR9、PTGS2) 进行生物学过程分析和通路注释分析,得到 15 条通路信息及靶点的生物学过程,主要富集在炎症反应、脂多糖调节的信号通路、凋亡过程、IL-6 产生的正向调控、NF- $\kappa$ B 转录因子活性的正向调控、NF- $\kappa$ B 导入细胞核的正向调控、NO 生物合成的正向调控等生物学过程。其中有 5 条通路与 RA 直接相关<sup>[7-9]</sup>,包括 NF- $\kappa$ B 信号通路、TLR 信号通路、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路和细胞凋亡,见表 3。

表 3 RA 相关信号通路所包含的靶基因

Tab 3 Target genes involved in RA related signaling pathways

通路名称	靶基因	靶点数
NF- $\kappa$ B 信号通路	Bcl-2、I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PTGS2、TNF	5
Toll 样受体信号通路	IL-1 $\beta$ 、IL-6、TLR9、I $\kappa$ B $\alpha$ 、TNF	5
肿瘤坏死因子信号通路	I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、PTGS2、TNF	5
NOD 样受体信号通路	I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF	4
细胞凋亡	Bcl-2、I $\kappa$ B $\alpha$ 、TNF、TP53	4

根据表 3 可知,5 条通路与免疫调节和细胞凋亡相关,属于细胞因子和细胞调节通路<sup>[10]</sup>,提示熟地黄环烯醚萜成分主要通过这两类通路产生抗 RA 活性。

靶点参与的主要通路注释分析如图 2 所示。

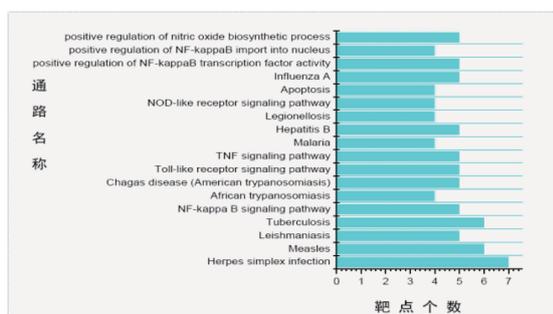


图 2 KEGG 通路富集分析结果

Fig 2 The result of KEGG pathway enrichment analysis

2.3 熟地黄环烯醚萜“成分-靶点-通路”网络构建 图中共 29 个节点,包括 5 个成分、9 个靶点、15 条通路。从图 3 中可以看出,除了 2.2 中提到的 6 条与 RA 直接相关的通路外,还涉及其他通路,比

如甲型流感、肺结核、利什曼病、麻疹、单纯疱疹感染、乙型肝炎、非洲锥虫病等,这些通路与免疫系统、细胞生存与凋亡有关,从不同角度揭示了熟地黄环烯醚萜成分具有抗 RA 活性的特点<sup>[11]</sup>。

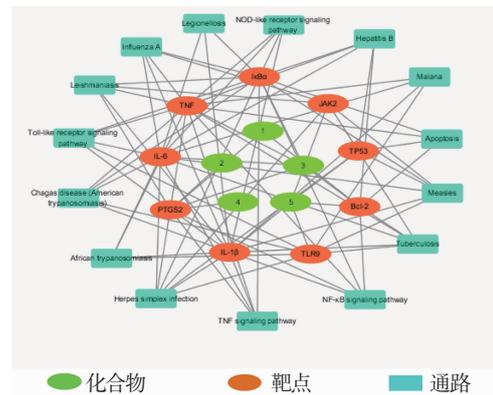


图 3 熟地黄环烯醚萜“成分-靶点-通路”网络图

Fig 3 “Components-targets-pathways” network of the iridoid constituents of *Rehmanniae Radix Praeparata*

### 3 讨论

中医药历经千百年的临床实践,积累了丰富的经验。中药及其方剂具有多成分、多途径和多靶点协同作用等特点,在防治复杂疾病方面具有其自身的特色和优势。网络药理学是一种系统的方法,它是以“疾病-基因-靶点-药物”网络模型的形式发展起来的,从多维的角度解释和评价药物的分子机制。它可以在靶点-通路识别以及说明药物靶点相互作用等方面发挥作用,并利用药物-靶点相互作用网络阐明药物的作用机制<sup>[12]</sup>。因此,在对传统药物进行作用机制的研究中,可以利用网络药理的方法,对其进行初步探索。

既往研究表明,许多细胞因子是 RA 产生炎症反应和关节损伤的重要介质,与 RA 密切相关的细胞因子有 IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6,而 TNF- $\alpha$  在炎症反应中是关键性的细胞因子,若抑制其产生,则 IL-1、IL-6 的产生也会相对减少<sup>[13]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种重要的转录因子,可以促进其他炎症因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的产生<sup>[14]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  作为 NF- $\kappa$ B 抑制剂,可以抑制 NF- $\kappa$ B 活性,使其在 RA 滑膜组织中的含量下降。

Bi 等<sup>[15]</sup>发现梓醇在星形胶质细胞的炎症反应中可以抑制 PTGS2 的产生,使 NF- $\kappa$ B 失活可能是其抗炎机制的主要决定因素。Park<sup>[16]</sup>研究发现,桃叶珊瑚苷能够抑制细胞外信号调节激酶(ERK)活性、I $\kappa$ B $\alpha$  降解和随后的 NF- $\kappa$ B 活化。Wang 等<sup>[17]</sup>发现桃叶珊瑚苷在大鼠关节软骨细胞中可以抑制 PTGS2 的产生,并且抑制 IL-1 $\beta$  诱导炎症反应及软骨基质降解,其作用是通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路活性实现

的。Pan 等<sup>[8]</sup>发现京尼平苷可以促进经 IL-1 $\beta$  刺激的大鼠软骨细胞中胶原蛋白 II 的表达,增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。

本文以熟地黄环烯醚萜类的 5 个成分为研究对象,进行靶点预测,采用网络构建以及通路注释分析的网络药理学方法对熟地黄潜在的抗 RA 作用机制进行研究,发现桃叶珊瑚苷和京尼平苷作用的与 RA 相关的靶点较多,为熟地黄环烯醚萜类化合物发挥抗 RA 活性的关键成分;TNF、IL-1 $\beta$ 、IL-6、I $\kappa$ B $\alpha$  是关键靶点;由 GO 分析和 KEGG 通路注释分析结果可知,熟地黄环烯醚萜成分作用的靶点主要通过炎症反应、凋亡过程、IL-6 产生的正向调控、NF- $\kappa$ B 转录因子活性的正向调控等生物学过程,在 NF- $\kappa$ B 信号通路、TLR 信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡中发挥抗 RA 活性。本研究阐明熟地黄环烯醚萜类化合物抗 RA 的“多成分-多靶点-多通路”作用机制特点,为深入研究熟地黄抗 RA 的作用机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 郑红艳,吴学军,刘全海. 类风湿性关节炎分子靶向治疗新药的研究进展[J]. 世界临床药物, 2013, 34(5): 306
- [2] 秦燕,朱建光. 地黄功效考证[J]. 中医学报, 2018, 33(1): 114
- [3] 邓振中,唐健强,罗世东. 中医药治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(9): 53
- [4] 方鉴,张永祥,茹祥斌. 六味地黄汤对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(1): 3
- [5] 张乃丹. 基于分子对接策略的熟地黄防治糖尿病性骨质疏松症有效成分及其作用机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016
- [6] 贾冬梅,何小鹏,姜淼,等. 基于网络药理学预测独活治疗类风湿性关节炎的分子机制[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10): 1838
- [7] 晋小荣,朱苗苗,高永翔,等. TOLL 样受体介导信号通路类风湿性关节炎关系的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(10): 193
- [8] 吕邵娃,王秋实,赵爽,等. 中药调控类风湿性关节炎核因子  $\kappa$ B 信号通路的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(11): 1580
- [9] 曹永贺,刘健. 中医药调控类风湿性关节炎细胞凋亡的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(8): 49
- [10] 王娴娴. 基于网络药理学的刺山柑果实提取物抗类风湿性关节炎的作用机制初步研究[D]. 上海医药工业研究院, 2017
- [11] 唐策,文检,杨娟,等. 藏药翼首草抗类风湿性关节炎活性成分靶点的网络药理学研究[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2666
- [12] 张彦璋,李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883
- [13] 于彭城,刘梦,徐寒梅,等. 类风湿性关节炎相关细胞因子及药物研究进展[J]. 药物生物技术, 2019, 26(2): 159
- [14] 姜申易,鲁静. NF- $\kappa$ B 在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1): 119
- [15] Bi J, Jiang B, Zorn A, et al. Catalpol inhibits LPS plus IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in astrocytes primary cultures[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(2): 543
- [16] Park K S. Aucubin, a naturally occurring iridoid glycoside inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammatory responses through suppression of NF- $\kappa$ B activation in 3T3-L1 adipocytes[J]. Cytokine, 2013, 62(3): 407
- [17] Wang S N, Xie G P, Qin C H, et al. Aucubin prevents interleukin-1 beta induced inflammation and cartilage matrix degradation via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat articular chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2): 408
- [18] Pan T L, Shi X C, Huan C, et al. Geniposide suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis in rat chondrocytes via the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Inflammation, 2018, 41(2): 390

(2020-05-09 收稿)

·读者·作者·编者·

## 《天津医科大学学报》关于“ppm、ppb、ppt”英文缩写的使用换算说明

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,但“ppm、ppb、ppt”既不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。1  $\mu$ g/mL 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL,则 1  $\mu$ g/mL 相当于 1 ppm;如果溶液密度不是 1 g/mL,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如  $\text{cm}^3/\text{m}^3$ 、 $\text{mL}/\text{m}^3$ ),换算关系是:1 ppm=1  $\text{cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$ , 1 ppb= $10^{-9}$ , 1 ppt= $10^{-12}$ ;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $\text{g}/\text{m}^3$ ),换算关系是:C=22.4 X/M,式中:X 为污染物以  $\text{mg}/\text{m}^3$  表示的浓度值,C 为污染物以 ppm 表示的浓度值,M 为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为:1 ppm=1 mg/kg=1 000  $\mu$ g/kg, 1 ppb=1  $\mu$ g/kg= $10^{-3}$  mg/kg, 1 ppt=1 ng/kg= $10^{-6}$  mg/kg。

本刊编辑部