

基于整合药理学平台研究葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用机制

孙 婷¹, 李新民^{2*}, 孙 丹², 魏丽娜¹, 李焕敏¹

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

摘要: 目的 基于整合药理学平台探索葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用机制。方法 本研究通过中药整合药理学平台, 通过输入葛根、黄芩、黄连、甘草四味药及肺炎获取药物和疾病靶标, 然后进行蛋白质-蛋白质相互作用及网络构建, 进一步进行基因功能和通路富集分析, 进行葛根芩连汤治疗肺炎的“中药-成分-靶标-通路”多维网络分析。结果 药物作用于疾病的关键通路包括细胞生长和死亡、传染病、细胞凋亡、免疫系统、趋化因子信号通路、B细胞受体信号通路、T细胞受体信号通路、血小板活化、胃酸分泌等。药物潜在靶标为GCK、COX7C、ATP1A1、ADCY2。结论 葛根芩连汤治疗小儿肺炎的机制可能通过与能量代谢及消化系统相关物质唾液等相关, 推测其具有潜在的关系。

关键词: 整合药理学; 葛根芩连汤; 肺炎; 作用机制; 湿热证

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)01-0078-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.011

Mechanism of Gegen Qinlian Decoction in treating pediatric pneumonia based on integrated pharmacology platform

SUN Ting¹, LI Xinmin², SUN Dan², WEI Lina¹, LI Huanmin¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China

2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300381, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Gegen Qinlian Decoction in the treatment of children with pneumonia, and to find out the path and target of Gegen Qinlian Decoction in the treatment of children with pneumonia. **Methods** Through the integrated pharmacology platform of traditional Chinese medicine, the drug and disease targets were obtained by inputting puerarin, jaundice, berberine, licorice and pneumonia, and then protein-protein interaction and network construction were carried out to further carry out gene function and pathway enrichment analysis. **Results** Key pathways for drug action in disease including cell growth and death, infectious diseases, apoptosis, immune system, chemokine signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, platelet activation, gastric acid Secretion and so on. Potential drug targets are GCK, COX7C, ATP1A1, and ADCY2. **Conclusion** The mechanism of Gegen Qinlian Decoction in the treatment of children with pneumonia may be presumed to have a potential relationship through the relationship with energy metabolism and salivary system related substances

Key words: integrative pharmacology; Gegenqinlian decoction; pneumonia; Action mechanism; damp-heat syndrome

肺炎是儿科常见病,临床以气喘、发热、咳嗽、咯痰痰鸣、发热为主要特征^[1]。临床中发现,越来越多的患儿表现出发热、腹泻等湿热症状,经从湿热论治取得了较好的疗效,特别是在退热、止泻等方面突出表现了中医药的优势^[2]。《伤寒论》云:“太阳病,桂枝证,医反下之,利遂不止、脉促者,表未解也。喘而汗出者,葛根芩连汤主之。”故临床选用葛

根芩连汤治疗肺炎初期表邪未解,而泄泻则为外邪入里,下利、喘等太阳、阳明合并之证。

面对中药复杂系统,如何解析其与机体之间的相互作用关系,这是中药现代研究的关键科学问题之一。由于中药及其复方制剂具有多成分、多途径、多靶点等协同作用效果,使得其药效物质基础、作用基础不明确,中药和中药材的质量难以控制,

收稿日期: 2018-08-27

第一作者: 孙 婷, 中医儿科学。E-mail: 18686740069@163.com

*通信作者: 李新民 E-mail: 18686740069@163.com

以及缺乏科学、合理、有效的药效和安全性评价体系,很难从整体到组织、器官和分子水平进行全面、系统的研究^[3]。

整合药理学是研究多成分药物与机体相互作用及其整合规律和作用原理的一门学科,是药理学研究的新领域,有利于克服中药“化学成分群-体内过程-药效活性”之间关联性不足和存在严重的“碎片化”现象等问题^[4],本研究欲通过中药整合药理学数据和计算方法,探索葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用机制,寻找葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用通路及靶点,有助于解析其治疗小儿肺炎的有效性。

1 资料和方法

1.1 化学成分来源

整合药理学平台(<http://www.tcmip.cn/>)中,中药材数据库依据《中国药典》2015年版,收录了400余味常用中药材,包括每一味药材的中文名称、拉丁名、性味归经、基原、产地、采集期、功效等信息,同时,对性、味、归经、功效、产地等字段进行结构化,从而实现查询功能。其中化学成分信息(CAS号、中文名称、英文名称、分子式、分子量、药理作用)等来源于文献和开源性中药数据库。葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连、甘草4味药组成,在整合药理学平台信息设定界面,通过输入“葛根”“黄芩”“黄连”“甘草”获得了这4味药的CAS号、中文名称、英文名称、分子式、相对分子质量、药理作用等所有化学成分信息,建立“葛根芩连汤”化学成分库。

1.2 候选靶标来源

疾病靶标数据库整合Drugbank、OMIM、HPO、TTD、KEGG等生物学数据库资源,目前整合药理学V1.0版本,以Drugbank数据库为基础,药物信息包括DrugID、Description和Indication等字段,以英文词为检索词,从Drugbank数据库检索相关FDA认证药物,然后通过药物对应的靶标,实现疾病靶标的检索,疾病靶标信息包括有Uniprot Title、UniProt ID、Gene Symbol、Gene Name等信息。故在平台疾病靶标数据库中,以“pneumonia”作为疾病关键词进行检索,勾选检索出来的所有靶标,添加至疾病靶标,作为肺炎的候选靶标来源。

1.3 靶标预测

整合药理学平台利用OpenBabel软件提取化学成分MACCS分子指纹,通过葛根芩连汤中化学成分结构(.mol)与FDA上市药物进行化学指纹特征对比,以Tanimoto系数定义的相似度计量方法进行相似性打分,其中中药靶标预测结果中^[5],选择相似

性分数>0.8的靶标作为此次研究中的潜在药物靶标。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用信息(PPI)

葛根芩连汤的潜在靶标与肺炎疾病靶标之间的PPI可通过整合药理学平台直接获得,该平台包括HAPPI、Reactome、OPHID、In Act、HPRD、MINT、DIP、PDZBas等数据库中PPI数据。

1.5 网络构建与可视化分析

通过整合药理学平台网络分析模块中,针对葛根芩连汤作用的潜在靶标与肺炎疾病靶标之间的PPI信息计算网络特征值,以“节点连接度(degree)”的2倍中位数为卡值,选取中药靶标-疾病基因互作网络的核心节点(hubs);在此基础上,以“degree”、“节点紧密度(closeness)”和“节点介度(betweenness)”的中位数为卡值,选取同时满足3个卡值的节点为葛根芩连汤的潜在靶标-抑郁症疾病靶标相互作用网络的关键节点^[6]。

1.6 基因功能和通路富集分析

整合药理学平台数据库来源于GO数据库(<http://www.geneontology.org/>)和KEGG数据库(<https://www.kegg.jp/>),确定靶标基因、蛋白质分子功能、细胞定位及其所参与的生物学反应和通路^[7]。结合富集计算出的葛根芩连汤直接作用靶标和肺炎的核心靶标,进行基因功能分析和通路分析,并将所得结果按照P值降序排列。

2 结果

2.1 葛根芩连汤化学成分靶标预测及分析

通过整合药理学平台数据库,共收集葛根化合物成分33个,预测靶标数量144个;黄芩化合物成分54个,预测靶标数量537个;黄连化合物成分14个,预测靶标数量87个;甘草化合物成分133个,预测靶标数量360个。分析共性靶标见表1。

表1 药物共有靶标分析
Table 1 Analysis of herb common target

药物	葛根 (82)	黄芩 (146)	黄连 (67)	甘草 (115)
葛根(82)	—	77	6	28
黄芩(146)	77	—	57	75
黄连(67)	6	57	—	54
甘草(115)	28	75	54	—

2.2 葛根芩连汤候选靶标基因分析

对葛根芩连汤方剂中候选靶标进行基因分析(表2),根据degree由大到小排列,可见候选靶标

表2 中药方剂候选靶标具有的功能信息

Table 2 Functional information of traditional Chinese medicine(TCM) prescription candidate target

ID	条目	数目	P值
GO:0001518	电压门控钠离子通道	14	3.42×10^{-33}
GO:0060078	突触后膜电位调节	14	1.06×10^{-27}
GO:0005248	电压门控钠通道活性	13	2.03×10^{-26}
GO:0004129	细胞色素c氧化酶活性	13	2.46×10^{-22}
GO:0006123	线粒体传输	11	6.03×10^{-21}
GO:0035725	细胞色素c转化为氧气	15	2.16×10^{-20}
GO:0086010	钠离子跨膜转运	11	7.45×10^{-19}
GO:1902600	氢离子跨膜运输	13	1.92×10^{-17}
GO:0019228	神经元动作电位	10	9.82×10^{-17}
GO:0006814	钠离子迁移	11	1.02×10^{-13}

基因功能分析涉及电压门控钠离子通道、突触后膜电位调节、线粒体传输、氢离子跨膜运输、神经元动作电位、钠离子迁移等。

2.3 葛根芩连汤候选靶标通路富集分析

对葛根芩连汤方剂中候选靶标进行通路分析(表3),共富集50条通路,可见候选靶标通路富集结果显示,其主要参与循环系统、能量代谢、内分泌代谢疾病、PPAR信号通路、消化系统、唾液分泌、炎症介质对TRP通道的调节、胃酸分泌、血小板活化、长时程增强作用等。

表3 中药方剂候选靶标参与的通路信息

Table 3 Pathway information of traditional Chinese medicine(TCM) prescription candidate target

ID	条目	数目	P值
#	循环系统	22	6.51×10^{-15}
#	能量代谢	13	6.67×10^{-9}
#	内分泌代谢疾病	12	4.59×10^{-6}
hsa03320	PPAR信号通路	6	7.13×10^{-5}
#	消化系统	11	1.84×10^{-3}
hsa04970	唾液分泌	5	2.30×10^{-3}
hsa04750	炎症介质对TRP通道的调节	5	3.48×10^{-3}
hsa04971	胃酸分泌	4	7.39×10^{-3}
hsa04611	血小板活化	5	1.12×10^{-2}
hsa04720	长时程增强作用	3	3.18×10^{-2}

2.4 药物-疾病核心靶标分析

利用整合药理学平台对“葛根芩连汤”与“pnumonia”疾病进行药物-疾病核心靶标分析,degree前100位关键靶标网络图见图1。在degree从大到小前10位的关键靶标中,有6个已知靶标,

分别是:PRKCD、NFKB1、PIK3R1、EGFR、IKBKG、NFKB2;4个潜在靶标,分别是:GCK、COX7C、ATP1A1、ADCY2。GCK为黄芩、黄连、甘草的共有靶标,化合物主要为sucrose(黄芩)、3-carboxy-4-hydroxy-phenoxy glucoside(黄连)、isoliquiritin(甘草)、neoisoliquiritin(甘草);COX7C是甘草的靶标,化合物为glycyrrhetic acid;ATP1A1为葛根、甘草的共有靶标,涉及strumaroside(葛根)、dibutyl uralsaponin A ester(甘草)等19个化合物;ADCY2是甘草的靶标,涉及glycyrrhizic acid等7种化合物。

2.5 葛根芩连汤治疗肺炎基因功能分析

通过GO数据库对关键靶点进行基因分析,基因功能主要定位在蛋白质结合、胞质溶胶、三磷酸腺苷结合、线粒体、炎症反应、三磷酸腺苷生物合成的过程、T细胞聚集、膜等多个条目。结果见表4。

2.6 葛根芩连汤治疗肺炎通路富集分析

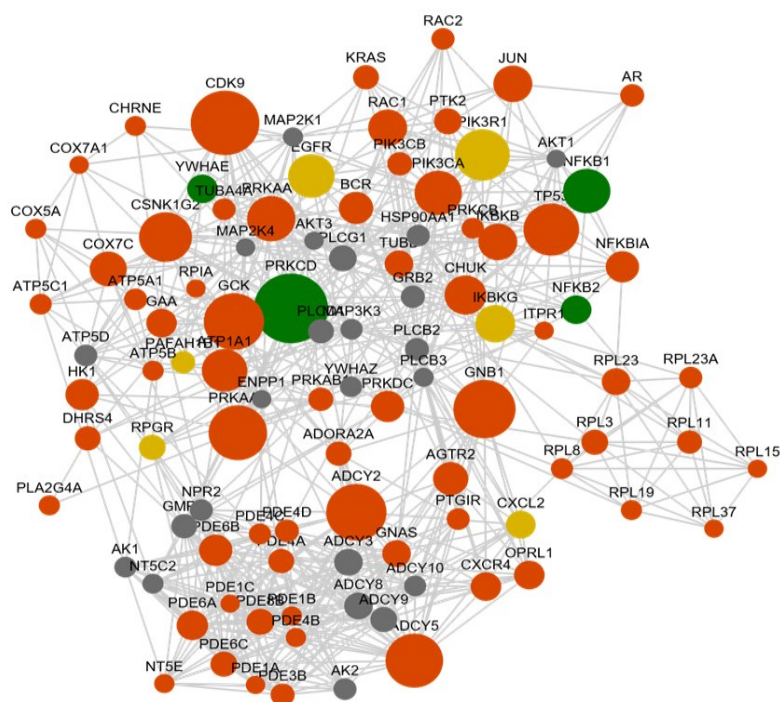
通过KEGG数据库对关键靶点进行通路富集分析,结果显示其主要参与细胞生长和死亡、传染病、B细胞受体信号通路、免疫系统、toll样受体信号通路、趋化因子信号通路、细胞凋亡、T细胞受体信号通路、血小板活化、胃酸分泌。结果见表5。

2.7 葛根芩连汤治疗肺炎的“中药-成分-靶标-通路”多维网络分析

根据P值显示前30个通路,主要富集在细胞生长和死亡、信号传导、传染病、细胞凋亡、免疫系统、趋化因子信号、B细胞受体信号等通路,这些通路的核心靶点共计34个,这些靶点与78个化学成分相关。结果见图2。

3 讨论

本研究借助整合药理学平台,研究葛根芩连汤对肺炎发挥治疗作用的物质基础及分子机制,发现



红色-潜在靶标;黄色-直接靶标;绿色-通用靶标;灰色-其他靶标
Red - Potential Target; Yellow - Direct Target; Green-General Target; Grey - Other Target

图1 葛根芩连汤-肺炎网络图

Fig. 1 Network of gegenqinliantang decoction targets for pneumonia

表4 关键靶点基因功能信息

Table 4 Enriched gene ontology terms for key target

ID	条目	数目	P值
GO:0005515	蛋白质结合	162	3.62×10^{-22}
GO:0005829	胞质溶胶	95	3.25×10^{-21}
GO:0005524	三磷酸腺苷结合	58	3.25×10^{-18}
GO:0005739	线粒体	52	1.38×10^{-17}
GO:0006954	炎症反应	24	2.72×10^{-12}
GO:0006754	三磷酸腺苷生物合成的过程	9	1.55×10^{-11}
GO:0006123	线粒体传输	8	2.00×10^{-11}
GO:0031295	T细胞聚集	12	5.69×10^{-11}
GO:0016020	膜	53	7.05×10^{-11}
GO:0030168	血小板活化	13	2.86×10^{-10}

药物作用于疾病的关键通路包括细胞生长和死亡、传染病、细胞凋亡、免疫系统、趋化因子信号通路、B细胞受体信号通路、T细胞受体信号通路、血小板活化、胃酸分泌等,药物潜在靶标为GCK、COX7C、ATP1A1、ADCY2。在GeneCards (<https://www.genecards.org/>)数据库中结果显示,GCK(葡萄糖激酶)编码己糖激酶蛋白家族的成员,其相关途径包括葡萄糖代谢和糖胺聚糖代谢;COX7C(细胞色素C氧化酶亚基7C)是蛋白质编码基因,其相关途径

包括呼吸电子传递,通过化学偶联的ATP合成和通过解偶联蛋白产生的热量;ATP1A1(ATP酶Na⁺/K⁺转运亚基α1)编码的蛋白质属于P型阳离子转运ATP酶家族,相关途径包括唾液分泌等,ADCY2基因编码腺苷酸环化酶家族的成员,腺苷酸环化酶是膜相关酶,相关途径包括唾液分泌等。这些靶标虽未有调控肺炎的直接信息,但其通过与能量代谢及消化系统相关物质唾液等的联系,可推测其具有潜在的关系。

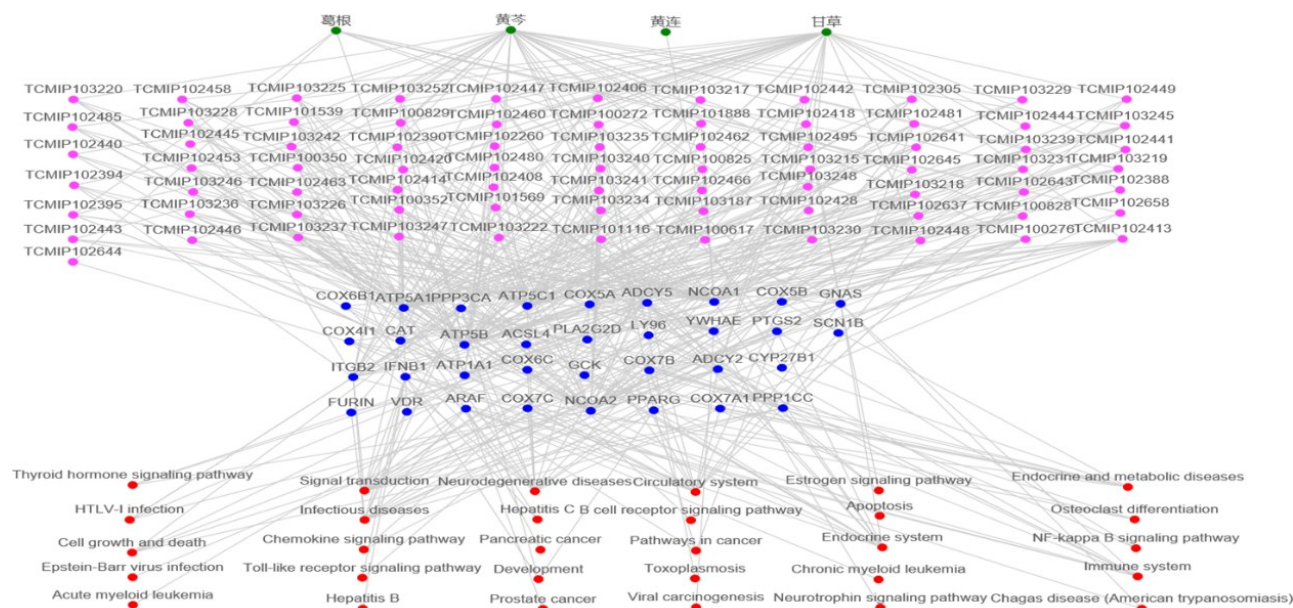


图2 中药-成分-关键靶-通路网络图

Fig. 2 “compound-target-pathway” network

表5 关键靶点通路信息

Table 5 Enriched KEGG pathways of key target

ID	条目	数目	P值
#	细胞生长和死亡	44	4.40×10^{-21}
#	传染病	80	4.47×10^{-19}
hsa04662	B细胞受体信号通路	22	5.16×10^{-18}
#	免疫系统	68	9.13×10^{-18}
hsa04620	toll样受体信号通路	22	4.02×10^{-14}
hsa04062	趋化因子信号通路	28	8.90×10^{-14}
hsa04210	细胞凋亡	18	8.16×10^{-12}
hsa04660	T细胞受体信号通路	17	1.90×10^{-9}
hsa04611	血小板活化	15	2.13×10^{-6}
hsa04971	胃酸分泌	9	1.73×10^{-4}

葛根芩连汤是《伤寒论》中的经典古方,由葛根半斤,甘草二两(炙)、黄芩三两,黄连三两组成,药味较少,一直是中医药经典方剂的研究热点。近年来国内外医学家通过实验研究证明葛根芩连汤具有解热、抗菌、抗病毒、解痉、抑制胃肠运动、抗缺氧、抗心律失常、增强机体免疫功能、抗炎等药理作用^[8-13]。这与本研究中通过整合药理学平台富集出来的免疫系统、胃酸分泌等通路不谋而合。

湿热证属温病范畴,对于其成因,可为温热之邪外侵,影响津液运行,化生水湿,湿热相搏劫发为湿热证;也可因于内伤饮食,脾胃失和,脾失健运,输布失常,进而化生水湿,致湿邪中阻,中焦被遏,郁而化热,发为湿热,或由外感与内伤相合所致^[14]。湿热证在小儿肺炎喘嗽临证辨证治疗过程中发生

率逐渐升高,而关于小儿肺炎湿热证相关研究甚少,通过整合药理学平台对葛根芩连汤治疗肺炎的关键靶标及基因功能和通路预测,为临床工作提供一定的依据。

中医药是一门利用辨证和整体的思维模式、方法来研究及认识人体正常生理活动和病理变化、发病机制和治疗策略、方法、疗效评价等极其复杂的医学科学体系。该“模式”很难应用单个或多种因素“加和”的微观分析方法与手段加以阐述^[15],其复方的作用机制仍然是个“黑匣子”。本研究借助整合药理学平台,分析葛根芩连汤治疗肺炎的关键靶标及基因功能和通路,结合临床儿科的特点,探索肺炎“中药-成分-靶标-疾病”的关系,利用现代科学技术为进一步打开中医药“黑匣子”提供一定的创新思路,但是本研究只是基于现有文献及数据进行的严谨的推测,具体确实的作用机制仍需更深入的实验研究加以验证。

参考文献

- [1] 汪受传,赵霞,韩新民,等. 小儿肺炎喘嗽中医诊疗指南[J]. 中医儿科杂志, 2008, 4(3): 1-3.
- [2] 孙丹,李新民,韩耀巍,等. 从湿热论治小儿肺炎喘嗽[J]. 中医杂志, 2017, 58(22): 1965-1967.
- [3] 邢心睿,吕狄亚,柴逸峰,等. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(2): 97-102.
- [4] 王萍,唐仕欢,苏瑾,等. 基于整合药理学的中药现代研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1297-1302.

- [5] 许海玉, 杨洪军. 整合药理学: 中药现代研究新模式 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 357-362.
- [6] Yu G, Zhang Y, Ren W, et al. Network pharmacology-based identification of key pharmacological pathways of Yin-Huang-Qing-Fei capsule acting on chronic bronchitis [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 85-94.
- [7] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3633-3638.
- [8] 杨蒙蒙, 孟静茹, 王立锋, 等. 葛根芩连汤中总生物碱体外抗轮状病毒作用实验研究 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(10): 968-971.
- [9] 郭友立. 葛根芩连汤沉淀物溶出度及盐酸小檗碱、葛根素配伍肠吸收变化的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [10] 邱爱珠, 陈宝田. 葛根芩连汤证为感染性腹泻病治的论证研究 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(6): 640-642.
- [11] 杜茜. 以体外细胞模型探究葛根芩连汤剂颗粒消化道—淋巴—胰腺作用途径 [D]. 福州大学, 2014.
- [12] 任雅君, 屈会化, 赵琰, 等. 葛根芩连汤体内作用靶点的研究 [A]. 中华中医药学会. 全国第二十二次仲景学说学术年会论文集 [C]. 内蒙古呼和浩特. 2014.
- [13] 章常华, 马广强, 邓永兵, 等. 葛根芩连汤对KK-Ay糖尿病小鼠血浆中LPS、TNF- α 、IL-6及肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1611-1616.
- [14] 韩耀巍, 李新民, 杜洪喆. 湿热证小儿肺炎喘嗽辨证施治1例 [J]. 中医药信息, 2013, 30(5): 83-84.
- [15] 黄国东, 孙秀玉, 陈书, 等. 网络药理学在国内中药复方研究的应用概况 [J]. 广西中医药大学学报, 2016, 19(1): 104-107.