基于网络药理学研究白仙风汤剂治疗类风湿性关节炎的药理机制

魏　欣，王士民，孙　成，周仁鹏，胡　伟*
安徽医科大学第二附属医院 药物临床试验研究中心，安徽 合肥　230061

摘　要：目的　基于网络药理学探讨白仙风汤剂治疗类风湿性关节炎的活性成分，并预测其可能机制。**方法**　白仙风汤剂中白芍、甘草、青风藤、威灵仙4味草药在TCMSP数据库中检索，经口服吸收率（OB）、类药性、半衰期条件筛选得到药物有效成分，并进行靶点预测；从OMIM、TTD、PharmGKB和GAD数据库对类风湿性关节炎靶点进行检索；使用Cytoscape 3.2.1软件构建药物成分靶点蛋白相互作用网络，对该网络进行拓扑学分析得到核心化学成分及核心靶点；对核心靶点基因进行GO通路分析和KEGG生物过程分析。**结果**　筛选得到白芍有效成分10个，甘草有效成分66个，青风藤有效成分6个，威灵仙有效成分8个，删除共有的有效成分，共有83个有效活性化合物，对这些化合物进行靶点预测，共得到260个药物靶点；对疾病相关靶点进行检索，共得到58个疾病靶点。通过对药物成分-疾病靶点网络节点的拓扑学分析得到槲皮素、β-谷甾醇、豆甾醇、甘草素等19个核心化学成分，及丝裂原活化蛋白激酶14、雌激素受体、糖皮质激素受体等9个核心靶点，对这些靶点进行通路富集发现药物治疗疾病涉及血管内皮生长因子（VEGF）信号通路、调节脂肪细胞中的脂肪分解、催乳素信号通路、雌激素信号通路、TNF信号通路等11条通路。**结论**　白仙风汤剂主要通过VEGF信号通路、调节脂肪细胞中的脂肪分解、催乳素信号通路等多条途径实现类风湿性关节炎的治疗作用，表现出多成分、多靶点、多通路的特点，与类风湿关节炎治疗机制相一致。

关键词：白仙风汤剂；网络药理学；类风湿性关节炎；槲皮素；血管内皮生长因子信号通路；脂肪分解；催乳素信号通路
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-6376（2019）05-0858-11
DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.009

Pharmacological mechanism of Chinese herbal compound Bai Xian Feng Decoction in treating rheumatoid arthritis based on network pharmacology

WEI Xin, WANG Shimin, SUN Cheng, ZHOU Renpeng, HU Wei
Center for Drug Clinical Trials, Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

Abstract: Objective Based on network pharmacology, the basis of active ingredients of rheumatoid arthritis treated by Bai Xian Feng decoction was discussed, and its possible mechanism was predicted. **Method** The four herbs in Baixianfeng Decoction, Paeonia lactiflora, Licorice, Sinomenia sinensis and Willingxian, were searched in TCMSP database. The active ingredients were screened by oral absorption rate (OB), medicinal properties and half-life conditions, and the target was predicted. The target of rheumatoid arthritis was searched from OMIM, TTD, PharmGKB and GAD databases. The target eggs of drug components were constructed by Cytose 3.2.1 software. White Interaction Network (BIN) is used to obtain core chemical components and core targets by topological analysis, GO pathway analysis and KEGG biological process analysis of core target genes. **Result** There were 10 effective ingredients of Paeoniae Radix Alba, 64 effective components of licorice, 6 effective constituents of Caulis Sinomenii and 8 effective components of Radix Clematidis. A total of 83 effective active compounds were deleted. The targets of these compounds were predicted, and 260 drug targets were obtained. At the same time, a total of 58 disease targets were obtained. By the topology analysis of the network nodes, 19 core chemical components, such as beta sterol, sterol, glycyrrhizin and naringin, are obtained, and 9 cores, such as mitogen activated protein kinase 14, estrogen receptor, glucocorticoid receptor, etc. Targeting, the pathway enrichment of these targets is found to involve 11 pathways, such as VEGF signaling pathway, estrogen signaling pathway, TNF signaling pathway, and cGMP-PKG signaling pathway. **Conclusion** Baixianfeng Decoction mainly regulates the treatment of rheumatoid arthritis through VEGF signaling pathway, regulating fat breakdown in fat cells and prolactin signaling pathway.

收稿日期：2018-09-01
基金项目：安徽省自然科学基金（1408085MH151）
第一作者：魏　欣，硕士，研究方向为中药学。Tel：15077900232　E-mail：1507790232@163.com
***通信作者：**胡　伟，博士（后），副教授/主任药师，研究方向为类风湿性关节炎。Tel：13856086475　E-mail：3139132024@qq.com

Baixianfeng Decoction for rheumatoid arthritis shows multi-component, multi-target, multi-channel characteristics, consistent with the treatment mechanism of rheumatoid arthritis.

Key words: Bai Xian Feng decoction; network pharmacology; rheumatoid arthritis; Quercetin; vascular endothelial growth factor signaling pathway; fat decomposition; prolactin signaling pathway

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种常见的慢性自身免疫性疾病，主要引起滑膜增生、炎性浸润、血管翳生成、软骨破坏，最终导致关节畸形，严重影响患者的生活质量。该病发病率、致残率高，全球的平均发病率为0.5%～1.0%[1]，且在各年龄段均有发病，女性患病率高于男性。由于该病涉及的机制多样，且容易反复发作，给患者的身心都造成极大痛苦。目前没有有效根治该病的药物，临床常用的治疗RA的药物主要有：针对病理表现，消炎止痛的非甾体抗炎药；针对机制，减少炎症因子产生的糖皮质激素类；改变病情的慢作用抗风湿药，以及针对特定细胞因子或通路的生物制剂等[2]。但是传统的治疗RA的药物只能起到改变或控制病情的作用，而且副作用多，患者往往依从性不高[3-4]，这也是RA反复发作的一个原因。

与西药相比，中药治疗RA有很多独特的优点，虽然起效不如西药迅速，但是副作用明显减少，且耐受性较好[5]。与现代医学治标相比，中医更加注重系统的调理。白仙风汤剂（BXF）是近年来已被广泛证实治疗RA有效的中药复方，其组成有白芍、炙甘草、青风藤、威灵仙4味中药。郭丽冰等[6]用小鼠动物实验证明，单独使用BXF可以有效降低佐剂RA模型小鼠的足肿胀度，证明BXF具有抗RA的作用。陈汉玉等[7]在RA患者的治疗和康复过程中使用针灸配合BXF治疗，证明该治疗方法可以有效改善患者的临床症状。罗冬冬等[8]采用BXF联合甲氨蝶呤治疗RA，从细胞因子和相关炎症蛋白表达变化的角度证明，联用BXF的效果优于单独使用甲氨蝶呤。前期研究只在动物实验或临床研究中证实BXF具有治疗RA的药理作用，然而其具体的作用机制尚不清楚。中药复方往往含有多个单味草药，草药中含有的化学成分更多，故在研究中药复方的具体机制时难度较大。然而中药的作用基础又具有多成分多靶点的特点，具体研究其中的特定成分的作用靶点和机制是对其整体性进行拆分的表现，是与中药治疗理念相背驰的。网络药理学是由Hopkins首先提出并应用于中药药理研究的方法[9]，它集合了高通量数据整合、数据库检索、数据挖掘、靶点预测、以及模拟实验室等多种研究手段，从系统的角度展现中药成分靶点间的相互联系和作用，在不拆分中药各成分的前提下对中药可能的作用机制进行分析研究[10-12]。本文在前期对BXF药效作用研究的基础上，利用网络药理学的方法对BXF的作用机制进行预测。

1 方法

1.1 BXF成分靶点的获取

通过查阅相关文献，确定BXF的复方组成有白芍、甘草、青风藤、威灵仙4味中药。使用TCMSP数据库http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php依次检索相应的草药名称，获得相应单味药物的化合物成分及各个化学成分的作用靶点。

1.2 RA疾病靶点的收集

大多数利用网络药理学方法研究疾病的案例中，对于疾病相关基因的收集都只是在一个数据库中进行的，不能保证由于数据库的更新不及时或者与其他相似数据库的差异而造成的数据完整性问题。本研究中集合了现在公认的疾病数据库，分别从OMIM数据库http://omim.org/、TTD数据库http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp、PharmGKB数据库https://geneticassociationdb.nih.gov/和GAD数据库以“rheumatoid arthritis”为检索词条，对RA相关基因进行检索和收集，合并了重复的基因后共计558个相关靶点。

1.3 RA疾病靶点与成分靶点的映射

通过比较BXF有效活性成分作用靶点与RA相关蛋白的共同部分，得到该汤剂治疗RA的靶点蛋白。使用Cytoscape 3.2.1软件构建药物成分靶点蛋白相互作用网络。对该网络进行拓扑学分析，筛选大于平均自由度的节点为核心节点，对核心的靶点进行通路分析，预测药物作用于疾病的通路和可能的机制。

1.4 通路分析

对“1.3”项结果中的核心靶点基因进行GO通路分析和KEGG生物过程分析，其中GO分析中包括生物过程（BP）、细胞组成（CC），以及分子功能（MF）3个部分，在分析结果选择$P<0.05$的项目，认为在该条件下结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 药物有效成分靶点的收集结果

通过检索得到白芍成分85个、甘草成分280个、青风藤成分16个、威灵仙成分57个。由于该复方以汤剂形式给药，给药后涉及吸收、分布、代谢、排泄（ADME）的过程，所以根据推荐的ADME参数，设定参数中口服吸收率（OB）≥30%、类药性（DL）≥0.18、半衰期（HL）≥4 h，结果得到白芍有效成分10个、甘草有效成分66个、青风藤有效成分6个、威灵仙有效成分8个。删除共有的有效成分，共得到83个有效活性化合物，具体信息见表1。

在TCMSP数据库中获得4种草药的靶点蛋白，由于芍新苷（Lactiflorin）、恩比宁（Embinin）没有直接作用的靶点，所以采用靶点预测的方法增加预测这些成分的潜在靶点，使用Pubchem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库检索需要预测的化合物，找到其SMILE号，进入Swiss Target Prediction数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）进行靶点预测，选择预测靶点中可能性≥50%的靶点蛋白作为成分作用的靶点。采用Uniprot数据库http://www.uniprot.org/对靶点蛋白进行名称的标准化，获得BXF的药物靶点基因，用文恩图http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html对4种草药活性成分作用靶点交叉情况进行分析，结果见图1。删除多余的共有靶点，共得到260个成分靶点。

表1 BXF有效成分ADME参数描述

Table 1 Description of ADME parameters of BXF active ingredients

中药	化学成分名	OB/%	DL	HL/h	中药	化学成分名	OB/%	DL	HL/h
白芍	kaempferol	41.88	0.24	14.74		Lupiwighteone	51.64	0.37	15.63
	paeoniflorin	53.87	0.79	13.88		Isolicoflavonol	45.17	0.42	15.55
	Mairin	55.38	0.78	8.87		Jaranol	50.83	0.29	15.5
	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	8.81		(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	15.24
	paeoniflorgenone	87.59	0.37	7.45		5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	30.49	0.41	14.99
	Lactiflorin	49.12	0.80	7.26		(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one	31.79	0.72	14.82
	albiflorin_qt	66.64	0.33	6.54		kaempferol	41.88	0.24	14.74
	sitosterol	36.91	0.75	5.37		glycyroside	37.25	0.79	14.62
	beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36		Xambioona	54.85	0.87	14.5
	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	4.34		Sigmoidin-B	34.88	0.41	14.49
甘草	licorice glycoside E	32.89	0.27	25.39		quercetin	46.43	0.28	14.4
	Glyzaglabrin	61.07	0.35	21.2		isorhamnetin	49.6	0.31	14.34
	Licoagroisoflavone	57.28	0.49	19.64		(-)-Medicocarpin	40.99	0.95	13.2
	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxy phenyl) chroman-4-one	71.12	0.18	18.09		Inermine	75.18	0.54	11.72
	liquiritin	65.69	0.74	17.96		Glycyrol	90.78	0.67	9.85
	Pinocembrin	64.72	0.18	17.96		Licocoumarone	33.21	0.36	9.66
	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxy phenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	36.57	0.32	17.95		Phaseol	78.77	0.58	9.64
	DFV	32.76	0.18	17.89		1-Methoxyphaseollidin	69.98	0.64	9.53

续表1

中药	化学成分名	OB/%	DL	HL/h	中药	化学成分名	OB/%	DL	HL/h
	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	38.92	0.26	17.49		Licoagrocarpin	58.81	0.58	9.45
	Calycosin	47.75	0.24	17.10		1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.9	0.53	9.32
	formononetin	69.67	0.21	17.04		Mairin	55.38	0.78	8.87
	Semilicoisoflavone B	48.78	0.55	17.02		1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	48.14	0.43	8.87
	Licochalcone B	76.76	0.19	17.02		8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	8.71
	Glypallichalcone	61.60	0.19	17.01		Medicarpin	49.22	0.34	8.46
	naringenin	59.29	0.21	16.98		Isotrifoliol	31.94	0.42	7.91
	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.2	16.89		Isoglycyrol	44.7	0.84	6.69
	Gancaonin A	51.08	0.4	16.82		shinpterocarpin	80.3	0.73	6.5
	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	44.15	0.41	16.77		Lupiwighteone	51.64	0.37	15.63
	HMO	38.37	0.21	16.56		Isolicoflavonol	45.17	0.42	15.55
	Gancaonin B	48.79	0.45	16.49		sitosterol	36.91	0.75	5.37
	Licoricone	63.58	0.47	16.37		(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63	4.31
	Odoratin	49.95	0.3	16.35	青风藤	beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
	Glabranin	52.9	0.31	16.24		16-epi-Isositsirikine	49.52	0.59	10.91
	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	39.62	0.35	16.16		Stepholidine	33.11	0.54	1.54
	glyasperin B	65.22	0.44	16.1		Sinomenine	46.09	0.53	5.44
	Glabrone	52.51	0.5	16.09		Michelenolide	47.54	0.25	3.92
	Licoisoflavone	41.61	0.42	16.09		Magnograndiolide	63.71	0.19	3.17
	Glepidotin A	44.72	0.35	16.09	威灵仙	Stigmasterol	43.83	0.76	5.57
	Glepidotin B	64.46	0.34	15.98		ClematosideA'_qt	37.51	0.76	3.6
	euchrenone	30.29	0.57	15.89		(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydropicene-4a-carboxylicacid	32.03	0.76	4.34
	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	15.81		beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
	licochalcone G	49.25	0.32	15.75		Embinin	33.91	0.73	18.19
	Licoisoflavone B	38.93	0.55	15.73		(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosa-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42	3.15
	licoisoflavanone	52.47	0.54	15.67		Heptyl phthalate	42.26	0.31	4.25
	glyasperin F	75.84	0.54	15.64		Embelin	37.72	0.18	3.82

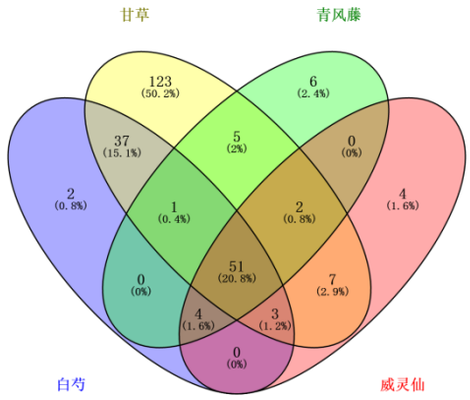

图1 BXF 4种草药活性成分交叉情况文恩图

Fig. 1 Venn diagram of cross-over of BXF's four herbal active ingredients

2.2 药物靶点与疾病靶点映射结果

筛选BXF的成分靶点蛋白与RA的疾病靶点蛋白的交集，获得58个相互作用靶点，靶点具体信息见表2。

2.3 药物成分-疾病靶点网络及药物成分-疾病靶点核心网络的构建

使用cytoscape 3.2.1软件对药物成分与疾病靶点的网络关系进行可视化构建，结果如图2所示。对该网络进行拓扑学分析，设置筛选的条件为Degree≥Average degree的节点为大节点，即网络中与其他节点相关程度高的节点进行分析。拓扑分析结果如表3所示，核心成分靶点如图3所示。BXF治疗RA的核心成分主要有白芍中的β-谷甾醇、山

表2 BXF治疗RA靶点信息

Table 2 BXF treatment of RA target information

靶点	中文全称	Uniprot ID	靶点	中文全称	Uniprot ID
PGR	孕激素受体	P06401	CD14	单核细胞分化抗原CD14	P08571
GCR	糖皮质激素受体	P04150	IL-6	白细胞介素-6	P05231
AR	雄激素受体	P10275	MMP2	72 kDa IV型胶原酶	P08253
ESR1	雌激素受体	P03372	CDN1A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1	P38936
TGFB1	转化生长因子β-1	P01137	FOS	原癌基因c-Fos	P01100
PON1	血清对氧磷酶/芳酯酶1	P27169	VEGFA	血管内皮生长因子A	P15692
5HT2A	5-羟色胺受体2A	P28223	P53	细胞肿瘤抗原p53	P04637
ADRB2	β-2肾上腺素能受体	P07550	IL-10	白细胞介素10	P22301
ACHA7	神经元乙酰胆碱受体亚基α-7	P36544	UROK	尿激酶型纤溶酶原激活剂	P00749
PGH2	前列腺素G/H合成酶2	P35354	NCF1	中性粒细胞胞浆因子1	P14598
ESR2	雌激素受体β	Q92731	ABCG2	ATP结合盒亚家族G成员2	Q9UNQ0
PK3CG	磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚基γ同种型	P48736	PARP1	聚[ADP-核糖]聚合酶1	P09874
MK14	丝裂原活化蛋白激酶14	Q16539	IL-2	白细胞介素-2	P60568
MMP1	间质胶原酶	P03956	IFN-γ	干扰素γ	P01579
STAT1	信号转导和转录激活因子1-alpha/beta	P42224	TPA	组织型纤溶酶原激活剂	P00750
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体γ	P37231	PAI1	纤溶酶原激活物抑制剂1	P05121
HMOX1	血红素加氧酶1	P09601	CD40L	CD40配体	P29965
CP1A2	细胞色素P450 1A2	P05177	ERBB3	受体酪氨酸蛋白激酶erbB-3受体	P21860
ICAM1	细胞间黏附分子1	P05362	IL-1α	白细胞介素-1α	P01583
LYAM2	E-选择素（CD62抗原样家族成员E）	P16581	CRP	C-反应蛋白	P02741
GSTP1	谷胱甘肽S-转移酶P.	P09211	IKKA	核因子kappa-B激酶亚基α的抑制剂	O15111
GSTM1	谷胱甘肽S-转移酶Mu 1	P09488	OSTP	骨桥蛋白	P10451
TF65	转录因子p65	Q04206	IKBA	NF-κB抑制剂α	P25963
IKKB	核因子kappa-B激酶亚基β的抑制剂	O14920	IL-1β	白细胞介素-1β	P01584
TNF-α	肿瘤坏死因子-α	P01375	MMP3	溶基质蛋白酶-1	P08254
NOS3	一氧化氮合酶，内皮细胞	P29474	IL-4	白细胞介素-4	P05112
NANO3	Nanos同系物3（NOS-3）	P60323	PLB1	磷脂酶B1，膜相关	Q6P1J6
LEG3	半乳糖凝集素3	P17931	CP19A	细胞色素P450 19A1	P11511
MMP9	基质金属蛋白酶-9	P14780	MRP1	多药耐药相关蛋白1	P33527

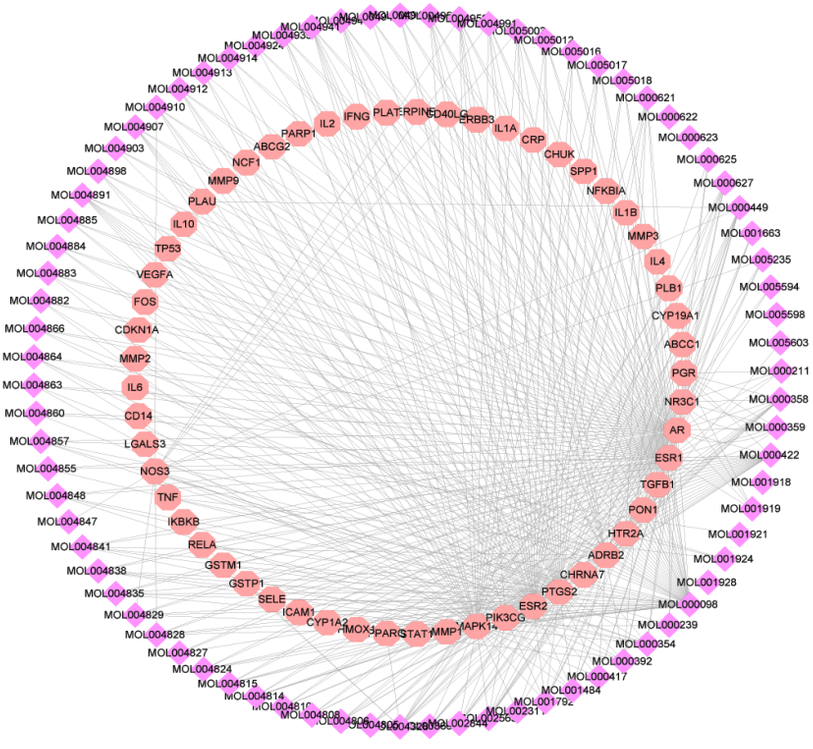

图2 BXF成分-靶点网络

Fig. 2 BXF component-target network

表3 BXF治疗RA核心成分靶点拓扑分析结果

Table 3 Topological analysis results of BXF treatment of RA core component target

节点名	中文名	最短路径长度	接近中心性	自由度	介数
MOL005003	利可卡因	2.359 375	0.423 841 06	7	0.002 306 05
MOL004991	7-乙酰氧基-2-甲基异黄酮	2.359 375	0.423 841 06	7	0.002 306 05
MOL004941	(2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-4-酮甘草苷	2.375	0.421 052 63	7	0.001 335 33
MOL002844	松属素	2.375	0.421 052 63	7	0.001 335 33
MOL001792	DFV	2.375	0.421 052 63	7	0.001 335 33
MOL001484	Inermine	2.375	0.421 052 63	7	0.001 335 33
MOL000627	千金藤啶碱	2.375	0.421 052 63	7	0.00 352 898
MOL000621	16-异二去氢羟基柯楠甲酸甲酯	2.375	0.421 052 63	7	0.00 352 898
MOL004959	1-甲氧基去甲肾上腺素	2.343 75	0.426 666 67	8	0.002 982 33
MOL004891	新藤黄素	2.359 375	0.423 841 06	8	0.005 019 86
MOL000359	谷甾醇	2.437 5	0.410 256 41	8	0.002 508 28
MOL002565	美迪紫檀素	2.3437 5	0.426 666 67	9	0.008 096 44
MOL000392	芒柄花素	2.328 125	0.429 530 2	9	0.020 437 17
MOL000354	异鼠李素	2.343 75	0.426 666 67	9	0.009 529 16
MOL000449	豆甾醇	2.312 5	0.432 432 43	10	0.017 667 37
MOL004328	柚皮苷	2.312 5	0.432 432 43	12	0.054 706 95
MOL000358	β-谷甾醇	2.281 25	0.438 356 16	13	0.028 029 15
MOL000422	山柰酚	2.140 625	0.46 715 328	20	0.082 334 46
MOL000098	槲皮素	1.718 75	0.581 818 18	47	0.432 356 95
PGR	孕激素受体	2.929 687 5	0.341 333 33	7	0.002 498 66
NR3C1	糖皮质激素受体	3.132 812 5	0.319 202	8	0.001 795 72
NOS3	一氧化氮合酶	2.429 687 5	0.411 575 56	14	0.027 120 71
PIK3CG	磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶	2.367 187 5	0.422 442 24	15	0.016 074 44
ADRB2	β-2肾上腺素能受体	2.289 062 5	0.436 860 07	23	0.038 598 24
MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶14	1.820 312 5	0.549 356 22	49	0.089 813 09
ESR2	雌激素受体β	1.7578 125	0.568 888 89	53	0.102 338 86
PTGS2	前列腺素G/H合酶2	1.6328 125	0.612 440 19	61	0.139 441 15
AR	雄激素受体	1.5234 375	0.656 410 26	69	0.194 790 34

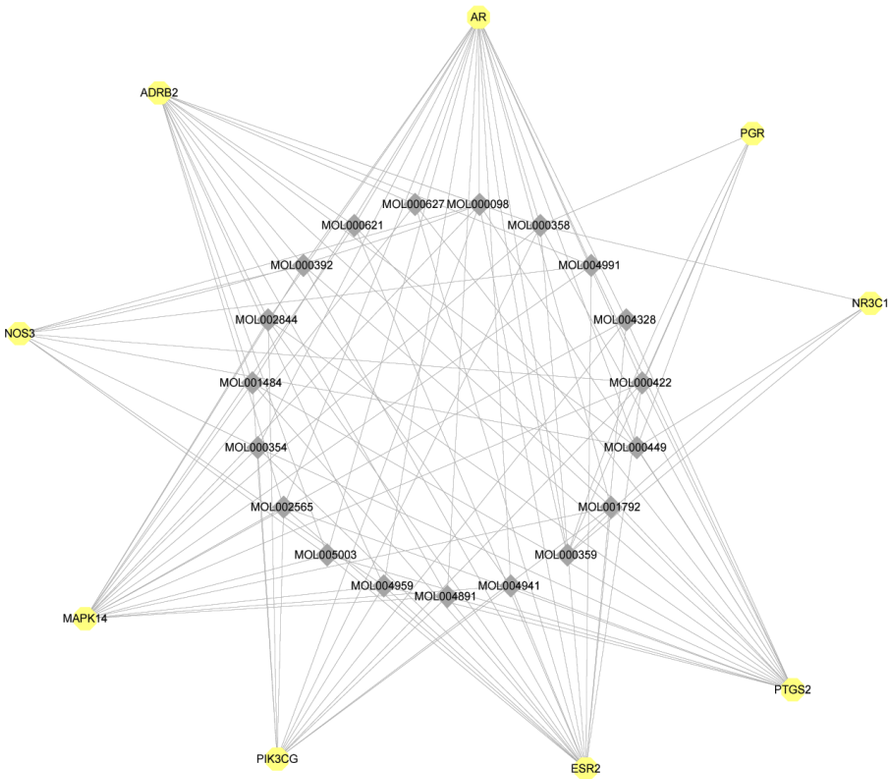

图3 BXF核心成分-RA靶点网络

Fig. 3 BXF core component - RA target network

柰酚；青风藤中的千金藤啶碱、β-谷甾醇、芒柄花素；威灵仙中的豆甾醇、β-谷甾醇；甘草中的山柰酚、7-乙酰氧基-2-甲基异黄酮、松属素、(2R)-7羟基-2-(4-羟基苯基)-苯并二氢吡喃-4-酮甘草苷、槲皮素、新藤黄素、β-谷甾醇、美迪紫檀素、芒柄花素、异鼠李素、豆甾醇、柚皮苷等19个核心化学成分。核心靶点蛋白为丝裂原活化蛋白激酶14、雌激素受体、前列腺素G/H合酶2、雄激素受体、孕激素受体、糖皮质激素受体、一氧化氮合酶、磷脂酰肌醇4，5-二磷酸-3-激酶催化亚基γ亚型、β-2肾上腺素能受体9个靶点。核心化学成分相互作用，共同影响与RA疾病相关的蛋白，从而起到治疗的作用。

2.4 药物作用靶点通路分析结果

为了研究BXF治疗RA的具体作用机制，利用DAVID数据库 https：//david.ncifcrf.gov/对核心靶点进行了GO分析和KEGG分析，结果如表4、5所示。

表4 GO分析结果及各项目关联的基因

Table 4 GO analysis results and genes associated with each project

类别	名称	计数	*P*值	基因
细胞组成	核	8	0.001 207 711	PGR, AR, ADRB2, PTGS2, MAPK14, NOS3, NR3C1, ESR2
	蛋白质复合物	3	0.013 044 756	AR，PTGS2，NR3C1
	核质	5	0.022 718 492	PGR，AR，MAPK14，NR3C1，ESR2
	小窝	2	0.028 185 475	PTGS2，NOS3
	细胞质	6	0.048 090 173	PIK3CG，AR，PTGS2，MAPK14，NOS3，NR3C1
生物过程	RNA聚合酶II启动子的转录起始	4	3.94×10^{-5}	PGR，AR，NR3C1，ESR2
	血管生成	4	1.23×10^{-4}	PIK3CG，PTGS2，MAPK14，NOS3
	细胞-细胞信号传导	4	1.81×10^{-4}	PGR，AR，ADRB2，ESR2
	RNA聚合酶II启动子转录的正调节	5	6.70×10^{-4}	PGR，AR，ADRB2，MAPK14，NR3C1
	信号转导	5	0.001 269 904	PGR，AR，MAPK14，NR3C1，ESR2
	平滑肌收缩的负调节	2	0.001 904 478	ADRB2，PTGS2

续表4

类别	名称	计数	*P*值	基因
	棕色脂肪细胞分化的正调节	2	0.002 855 526	PTGS2，MAPK14
	钙离子转运的负调节	2	0.006 177 954	PTGS2，NOS3
	转录，DNA模板化	5	0.008 704 118	PGR，AR，MAPK14，NR3C1，ESR2
	调节钠离子转运	2	0.009 963 15	ADRB2，NOS3
	细胞增殖的负调节	3	0.014 137 931	AR，PTGS2，NOS3
	棕色脂肪细胞分化	2	0.015 147 194	ADRB2，PTGS2
	脂多糖介导的信号通路	2	0.015 147 194	MAPK14，NOS3
	调节血压	2	0.030 557 097	PTGS2，NOS3
	MAPK级联的正调节	2	0.037 952 317	AR，ADRB2
	细胞或亚细胞成分的运动	2	0.040 253 178	PTGS2，MAPK14
分子	类固醇结合	4	2.03×10^{-7}	PGR，AR，NR3C1，ESR2
功能	类固醇激素受体活性	4	1.91×10^{-6}	PGR，AR，NR3C1，ESR2
	酶结合	5	9.78×10^{-6}	PGR，AR，PTGS2，MAPK14，ESR2
	序列特异性DNA结合	4	0.001 433 588	PGR，AR，NR3C1，ESR2
	转录激活因子活性，RNA聚合酶II核心启动子近端区序列特异性结合	3	0.005 155 141	PGR，AR，NR3C1
	蛋白质结合	9	0.005 371 365	PIK3CG，PGR，AR，ADRB2，PTGS2，MAPK14，NOS3，NR3C1，ESR2
	转录因子活性，序列特异性DNA结合	4	0.008 298 269	PGR，AR，NR3C1，ESR2
	RNA聚合酶II核心启动子近端区序列特异性DNA结合	3	0.011 355 132	PGR，AR，NR3C1
	锌离子结合	4	0.014 247 297	PGR，AR，NR3C1，ESR2
	RNA聚合酶II转录因子活性，配体激活的序列特异性DNA结合	2	0.016 937 288	AR，ESR2
	ATP酶结合	2	0.034 542 704	PGR，AR
	DNA结合	4	0.037 230 277	PGR，AR，NR3C1，ESR2

表5 KEGG通路分析结果及各项目关联的基因

Table 5 KEGG pathway analysis results and genes associated with each project

类别	名称	计数	*P*值	基因
通路	VEGF信号通路	4	3.55×10^{-5}	PIK3CG，PTGS2，MAPK14，NOS3
	调节脂肪细胞中的脂肪分解	3	0.001 751	PIK3CG，ADRB2，PTGS2
	催乳素信号通路	3	0.002 801	PIK3CG，MAPK14，ESR2
	孕酮介导的卵母细胞成熟	3	0.004 177	PIK3CG，PGR，MAPK14
	雌激素信号通路	3	0.005 379	PIK3CG，NOS3，ESR2
	TNF信号通路	3	0.006 145	PIK3CG，PTGS2，MAPK14
	鞘脂信号通路	3	0.007 821	PIK3CG，MAPK14，NOS3
	血小板活化	3	0.009 131	PIK3CG，MAPK14，NOS3
	心肌细胞中的肾上腺素能信号传导	3	0.011 42	PIK3CG，ADRB2，MAPK14
	催产素信号通路	3	0.013 288	PIK3CG，PTGS2，NOS3
	cGMP-PKG信号通路	3	0.014 604	PIK3CG，ADRB2，NOS3

从富集分析的结果来看，BXF活性成分可能作用于RA的核心靶点影响了多个生物过程，如影响血管生成，减少钙离子的转运，调节钠离子的转运，参与脂多糖介导的信号通路以及正向调节MAPK级联反应通路等，都与已报道的RA发病机制一致，因此该富集结果是可信的。

KEGG富集结果显示，核心靶点涉及VEGF信号通路、调节脂肪细胞中的脂肪分解、催乳素（PRL）信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、雌激素信号通路、TNF信号通路、鞘脂信号通路、血小板活化、

心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、催产素信号通路、cGMP-PKG信号通路11条通路。将结果用Omicshare高级气泡图进行可视化处理，如图4所示，Rich factor指差异表达基因中位于该pathway条目的基因数目与所有注释基因中位于该pathway条目的基因总数的比值，Rich factor越大，表示富集的程度越大。Q_{value}是做过多重假设检验经校正后的P value，Q_{value}的取值范围为0～1，且越接近于0，表示富集越显著。在图中，点的大小表示富集的基因数目多少，点越大表示富集的基因数目越多；点的颜色表示Q_{value}的大小，越接近红色表示Q_{value}越小。结果显示，VEGF的富集程度最高，富集最为显著，该通路可能是BXF治疗类风湿性关节炎的关键通路。

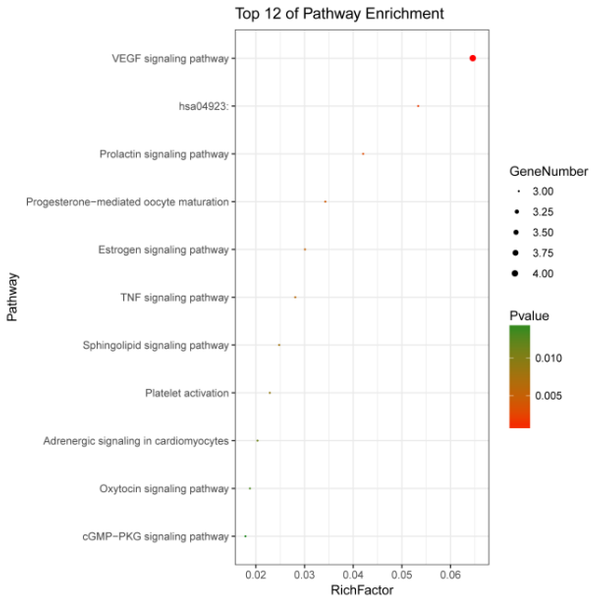

图4 KEGG分析富集结果高级气泡图

Fig. 4 KEGG analysis enrichment results advanced bubble chart

为了更清晰的展现复方成分、核心靶点与通路之前的关系，课题组使用cytoscape3.2.1软件构建了BXF活性成分-疾病靶点-通路网络，如图5所示。通过网络图可以直观展示出BXF具有通过多成分、多靶点、多途径作用于RA的特点。根据网络拓扑学分析的结果对活性成分与核心靶点的节点颜色进行渲染，根据degree值的大小，degree值越小，越接近紫色，degree值越大，越接近深蓝色。结果显示在成分中槲皮素的degree值最大，说明该成分在复方中是一个重要的成分，其余成分的degree值相差不大，可能起到协同作用；在靶点蛋白中AR、PTGS2、ESR2和MAPK14的degree值较大，是靶点中的重要蛋白，可能在药物发挥作用的过程中具有重要作用。

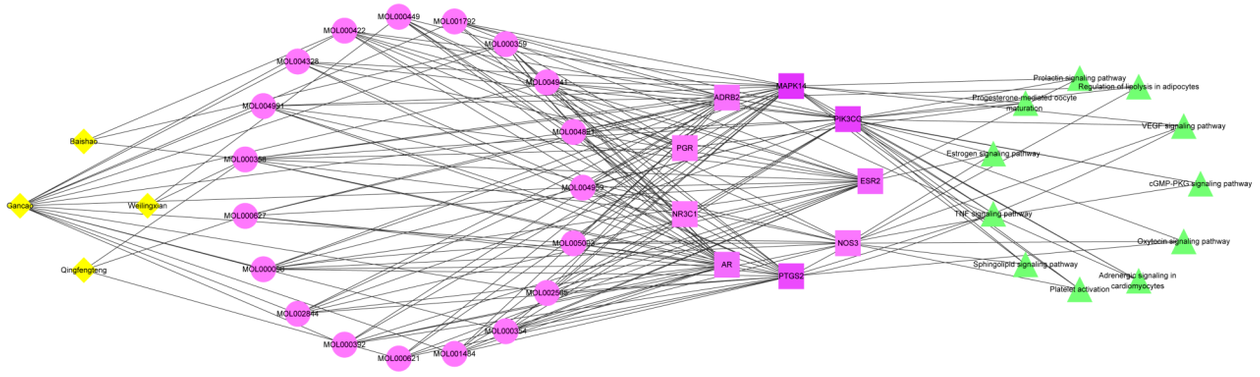

图5 BXF活性成分-疾病靶点-通路网络图

Fig. 5 BXF active ingredient - disease target - pathway network map

3 讨论

通过分析BXF活性成分与靶点，与RA疾病相关靶点进行映射构建活性成分-疾病靶点网络。发现BXF中的单个活性成分可以作用于多个靶点，多个活性成分也可以作用于同一靶点，这符合中药治疗的系统性特点。对该网络进行拓扑学分析得到网络的核心节点，即药物核心成分与治疗核心靶点。对这些靶点进行通路分析发现，BXF中的以槲皮素为代表的多个成分，通过影响磷脂酰肌醇、前列腺素G/H合酶2、雌激素受体β、以及一氧化氮合酶等作用于VEGF信号通路等多条途径，达到治疗RA的效果。已经有大量研究证明槲皮素可以促进RA成纤维样滑膜细胞的凋亡[13]，其可通过抑制NF-κB的生物活性，来减少NF-κB介导的相关细胞因子的产生，同时也能诱导TNF-α的产生，提高血液的抗氧化能力[14]。核心靶点中的磷脂酰肌醇是调节细胞自噬的重要蛋白[13]，血管内皮生长因子是血管

内皮细胞的多功能因子，在RA的发生发展过程中具有重要作用[15]。综合前期的研究成果可以部分地验证本研究预测的结果的正确性。

在本研究中，根据高级气泡图结果中气泡的颜色和大小，以及KEGG分析结果中*P*值的大小，主要研究富集程度及显著性最大的前三条通路，分别为VEGF信号通路、调节脂肪细胞中的脂肪分解、PRL信号通路。VEGF是血管生成的关键调节因子，并参与各种生物活动，如刺激内皮细胞增殖，迁移和血管形成。血管内皮生长因子受体2（VEGFR2）是血管生成的主要受体之一，VEGF与VEGFR2的结合导致多种细胞内信号分子的激活，包括磷酸肌醇3-激酶/AKT激酶、细胞外信号调节激酶（ERKs）和p38丝裂原活化蛋白激酶（p38-MAPK）。BXF可能作用于VEGF信号通路，通过减少滑膜血管生成起到消淤和净流血管的作用[16]。RA患者的临床表现有体质量下降，佐剂关节炎（AA）大鼠造模成功后出现严重的恶病质，表现为水肿、食欲不振、体质量下降、血浆去甲肾上腺素和肾上腺素增加，加快脂肪分解[17]。预测BXF可能通过影响脂肪分解过程，调节RA患者的体质量变化。PRL是乳腺发育和产奶所必需的激素，有研究证明PRL也具有免疫抑制作用[18-19]，临床通过PRL输注或用氟哌啶醇治疗增加PRL用于改善RA的炎症和关节破坏，如通过减少关节肿胀，降低TNF-α、IL-1β、IFN-γ和IL-6等促炎细胞因子的局部表达以及抑制软骨细胞凋亡、血管翳形成和骨侵蚀等途径缓解症状[20]。Maria G等[21]发现，PRL通过STAT3依赖性途径下调培养的滑膜成纤维细胞中细胞因子诱导的RANKL基因表达，降低成骨细胞中的RANKL/OPG比率来增加生长期间大鼠的骨形成。因此本课题组预测BXF可能通过调节PRL的表达影响成骨细胞与破骨细胞的比率，增加骨密度，缓解关节病变。以上机制的预测将在接下来的实验中一一进行验证。

网络药理学作为一门新兴的学科，不但是研究中药药理机制的一个有效工具，而且为新药研发及老药新用提供了清晰的模板[22]。虽然研究过程繁琐，使用到的数据库繁杂，但是其为中药复方和单方作用机制的研究指明了方向，大大提高了研究效率和成功率。在本课题研究中，课题组通过使用网络药理学的思想和方法系统预测了BXF治疗RA的作用机制，后续会从实验的角度对BXF治疗类风湿性关节炎进行深入研究。

参考文献

[1] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.

[2] 张如峰, 沈海丽. 类风湿关节炎的药物治疗现状及进展 [J]. 青海医药杂志, 2014, 44(1): 62-63, F0004.

[3] 栾仲秋, 李秋红, 王继坤, 等. 类风湿关节炎的中医药治疗概况 [J]. 中国中医药科技, 2017, 24(1): 123-124.

[4] 陈川, 陈宗良. 中西医结合治疗类风湿性关节炎的临床体会 [J]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2018, 18(56): 161.

[5] 赵建萍, 赵秀娟, 陈谢谢, 等. 中药治疗类风湿关节炎的常用药分析 [J]. 医药论坛杂志, 2017, 38(9): 5-7.

[6] 郭丽冰, 王　蕾, 林　爽, 等. 治疗类风湿性关节炎中药复方白仙风汤剂的药理作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2489-2491.

[7] 陈汉玉, 冷冬月. 温针灸配合白仙风汤剂对类风湿关节炎患者外周血miR-146a、$HMGB_1$、CXCR16水平的影响 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(12): 2097-2099, 2129.

[8] 罗东东. 白仙风汤剂配合甲氨碟呤治疗类风湿性关节炎急性期的研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2010.

[9] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.

[10] Liu C X, Liu R, Fan H R, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional chinese medicine [J]. Chin Herb Med, 2015, 7(1): 3-17.

[11] 刘艾林, 杜冠华. 网络药理学: 药物发现的新思想 [J]. 药学学报, 2010, 45(12): 1472-1477.

[12] 杨　沙, 段灿灿, 晏仁义, 等. 基于网络药理学的半枝莲抗肿瘤活性成分及整合作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3471-3482

[13] 肖 鹏. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡及其机制的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2013.

[14] 李兰林, 孙晓博, 向大雄. 天然药物中有效成分抗类风湿关节炎研究进展 [J]. 中南药学, 2011, 9(2): 130-134.

[15] 盖楠楠. 血管内皮生长因子在类风湿关节炎周围神经病变患者中的应用价值 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20(9): 32-34.

[16] He L H, Liu C F, Sun C C, et al. Wu-Tou decoction inhibits angiogenesis in experimental arthritis by targeting VEGFR2 signaling pathway [J]. Rejuvenation Res, 2018, 21(5): 442-455.

[17] Stofkova A, Krskova K, Vaculin S, et al. Enhanced activity of hormone sensitive lipase (HSL) in mesenteric but not epididymal fat correlates with higher production of epinephrine in mesenteric adipocytes in rat model of cachectic rheumatoid arthritis [J]. Autoimmunity, 2016,

49(4): 268-276.

[18] Matera L, Cesano A, Bellone G, et al. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes [J]. Brain Behav Immun, 1992, 6(4): 409-417.

[19] Dugan A L, Thellin O, Buckley D J, et al. Effects of prolactin deficiency on myelopoiesis and splenic T lymphocyte proliferation in thermally injured mice [J]. Endocrinology, 2002, 143(10): 4147-4151.

[20] Adán N, Guzmán-Morales J, Ledesma-Colunga M G, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis [J]. J Clin Invest, 2013, 123(9): 3902-3913.

[21] Ledesma-Colunga M G, Adán N, Ortiz G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 93.

[22] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110-1111.