

基于蛋白质组学和 LINCS 数据库预测中药复方的不良反应——以黄连解毒汤为例

尚津锋, 李倩楠, 姜婷月, 焦家康, 毕磊, 王璟邑, 刘欣*

北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要:目的 基于蛋白质组学和 LINCS 数据库探讨预测中药复方不良反应的方法。方法 以黄连解毒汤为例, 对黄连解毒汤干预脑缺血大鼠模型进行蛋白质组学分析, 运用 LINCS 数据库、Python、RStudio 等筛选与黄连解毒汤成分化合物结构相似和基因表达类似的临床药物, 检索药物的不良反应, 预测黄连解毒汤可能的不良反应。结果 黄连解毒汤干预脑缺血模型蛋白质组学共筛选出 72 个上调蛋白和 91 个下调蛋白。阿司匹林、曲克芦丁等 11 个临床药物与黄连解毒汤成分的化学结构相似, 表现出皮疹、恶心、呕吐、腹泻等不良反应; 地昔帕明、山柰酚等 30 个临床药物与黄连解毒汤基因表达谱类似, 表现出恶心、头晕、头痛等不良反应。根据上述结果, 预测黄连解毒汤可能的不良反应为腹泻、恶心、头晕、头痛、呕吐等。结论 以黄连解毒汤为例, 探讨了一种预测中药复方不良反应的新方法, 为临床研究提供参考。

关键词: 蛋白质组学; LINCS 数据库; 中药复方; 黄连解毒汤; 脑缺血; 不良反应

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-4053-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.019

Prediction of adverse reactions of traditional Chinese medicine compound based on proteomics and LINCS database: A case study of Huanglian Jiedu Decoction

SHANG Jin-feng, LI Qian-nan, JIANG Ting-yue, JIAO Jia-kang, BI Lei, WANG Jing-yi, LIU Xin

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore a method to predict the adverse reactions of traditional Chinese medicine (TCM) compound based on proteomics and LINCS database. **Methods** Taking Huanglian Jiedu Decoction (黄连解毒汤) as an example, proteomics analysis was conducted on Huanglian Jiedu Decoction intervened cerebral ischemia rat model. LINCS database, Python and RStudio were used to screen clinical drugs with similar structure and gene expression to Huanglian Jiedu Decoction. Adverse reactions of drugs were retrieved and possible adverse reactions of Huanglian Jiedu Decoction were predicted. **Results** A total of 72 up-regulated proteins and 91 down-regulated proteins were screened via proteomics. The chemical structure of 11 clinical drugs, such as aspirin and trolox, were similar to that of Huanglian Jiedu Decoction, which showed rash, nausea, vomiting and diarrhea and other adverse reactions. The gene expression profiles of 30 clinical drugs, such as diltiazem and kaempferol, were similar to those of Huanglian Jiedu Decoction, which showed nausea, dizziness, headache and other adverse reactions. According to the above results, the possible adverse reactions of Huanglian Jiedu Decoction were predicted to be diarrhea, nausea, dizziness, headache, vomiting, etc. **Conclusion** This study explores a new method to predict the adverse reactions of TCM compound, and takes Huanglian Jiedu Decoction as an example to illustrate the feasibility of the method and provide reference for clinical research.

Key words: proteomics; LINCS database; traditional Chinese medicine compound; Huanglian Jiedu Decoction; cerebral ischemia; adverse reaction

黄连解毒汤出自《肘后备急方》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味苦寒药物组成,为“苦寒直折”的代表方剂,具有清热解毒的功效,主治三焦火毒之证^[1]。

现代研究显示,黄连解毒汤在体内外均具有明显的抗炎作用,能够治疗炎症感染、高血脂、糖尿病、消化性溃疡等多种疾病^[2]。近年来,在“毒损脑络”的

收稿日期: 2021-12-26

基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费项目(重点攻关项目)(2020-JYB-ZDGG-039)

作者简介: 尚津锋(2001—),男,硕士研究生,从事脑缺血作用特点及药物干预研究。E-mail: sjf01qtd@163.com

*通信作者: 刘欣,博士,副教授,硕士生导师,主要从事脑缺血作用特点及药物干预研究。Tel: (010)53912127 E-mail: xinliu1011@126.com

中医理论观点指导下,黄连解毒汤广泛应用于治疗脑血管疾病^[3]。临床上,黄芩、黄连、黄柏、栀子或多或少存在不良反应,可能与其药性苦寒有关^[4-7],然而黄连解毒汤不良反应报道较少,因此预测黄连解毒汤潜在的不良反应具有临床意义和研究价值。

目前已有研究从化学结构角度预测药物的不良反应^[8],化学结构决定药物的性质,结构不同的药物,性质不同,通常药理、毒理作用差异较大。靶标是药物和机体效应之间的桥梁,药物作用于靶标产生毒效,构建“药-靶-不良反应”网络利于发现潜在不良反应^[9]。化学结构相似、调控靶标相近的药物药效和毒理相似,从化学结构和作用靶标预测药物的不良反应具备可行性。为此,本研究设计了一种预测中药复方不良反应的方法:通过比对化学结构和基因表达,寻找与中药复方成分化学结构相似和基因表达类似的临床常用药物,检索临床常用药物的不良反应数据,以此为依据预测中药复方的不良反应。同时以黄连解毒汤治疗脑缺血为例,验证该方法的实用性:对黄连解毒汤干预脑缺血大鼠模型进行蛋白组检测,分析黄连解毒汤治疗脑缺血的基因表达谱,并利用 LINCX 等数据库检索与黄连解毒汤成分化合物结构相近和基因表达相似的药物,根据药物的不良反应,从而推测黄连解毒汤治疗脑缺血可能的不良反应。

1 资料与方法

1.1 黄连解毒汤治疗脑缺血的蛋白质组学研究

1.1.1 仪器、药物和主要试剂 RIGOLL-3000 型高效液相色谱系统(北京普源精电科技有限公司),MX-S 型涡旋振荡器(SCILOGEX 公司),CV100-DNA 型真空离心浓缩仪(北京吉艾母科技有限公司),XMTD-7000 型电热恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司),hf-48 型高通量组织研磨器(上海贺帆仪器有限公司),JY96-IIN 型超声破碎仪(上海沪析实业有限公司)等。

黄芩配方颗粒(浙江贝尼菲特药业有限公司,批号 2005056,生产日期 2020-05-25,有效期至 2023-05-24),黄连配方颗粒(浙江贝尼菲特药业有限公司,批号 1910044,生产日期 2019-10-18,有效期至 2022-10-17),黄柏配方颗粒(浙江贝尼菲特药业有限公司,批号 2005042,生产日期 2020-05-19,有效期至 2023-05-18),栀子配方颗粒(浙江贝尼菲特药业有限公司,批号 2005036,生产日期 2020-05-15,有效期至 2023-05-14),金纳多(德国威玛舒培博士

药厂,批号 6280219),蛋白定量染液(Huaxingbio 公司,批号 WC320333),牛血清白蛋白(Thermo Scientific 公司,批号 VA294012),二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, Amresco 公司,批号 2923C501-0.1KG),碘代乙酰胺(iodoacetamide, IAM, Amresco 公司,批号 0736C278),胰蛋白酶(Promega 共,批号 0000490995),碳酸氢铵(Sigma-Aldrich 公司,批号 BCBN6056V),尿素(Amresco 公司,批号 3635C203),乙腈(J. T. Baker 公司,批号 0000221770),氨水(Wako Pure Chemical Industries Ltd.,批号 CTH2187),甲酸(Sigma-Aldrich 公司,批号 BCBM11920)等。

1.1.2 动物分组、造模和取材 选用的动物为 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠[许可证号 SCXK(京)2019-0010],体质量 220~240 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物实验经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会批准(批准号 BUCM-4-2021101101-4007)。所有动物饲养于北京中医药大学动物房,于室温 22~25 °C,相对湿度 50%~60%,12 h 明暗交替环境中适应 3 d 后进入实验。

将大鼠分为假手术组,模型组,黄连解毒汤高、中、低(0.710、0.355、0.178 g/kg,根据实验动物与人体临床等效剂量换算关系确定)组和阳性药(金纳多,21.6 mg/kg)组。分组前进行标号,并随机将动物分为 6 组,每组 10 只大鼠。所有动物每 12 小时 ig 给药 1 次(每日 7:00 和 19:00 时),连续给药 5 d,假手术组和模型组大鼠 ig 同体积蒸馏水。第 6 天早上 8:00 给药后造模。

造模方式采用大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,末次给药后 1 h 大鼠用 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,分离颈动脉,夹闭颈总动脉,由颈外动脉插入线栓,头端直径(0.32±0.02) mm,至线栓 18 mm 标记进入颈内动脉与颈总动脉分叉处,术后保温。除假手术组大鼠不插线栓外,其他组大鼠均造模且操作一致。造模 12 h 后进行神经功能评分,随后麻醉,快速剥离完整的脑,进行氯化三苯基四氮唑(triphenyl-tetrazolium chloride, TTC)法染色。运用 TTC 染色法、Bederson 评分观测大鼠脑梗死体积和神经功能评分,并计算大鼠脑梗死率。采用双盲法进行神经功能评分,Bederson 评分分为 4 个等级,0 分:无神经损伤症状;1 分:悬尾实验不能完全伸展对侧前爪;2 分:前肢抵抗对侧推力能力下降;3 分:向

对侧转圈。脑梗死率越大,神经功能评分越高,大鼠损伤越严重,以脑梗死体积和神经功能评分判断造模是否成功。

根据大鼠脑梗死体积和神经功能评分结果,确定黄连解毒汤中剂量组的治疗效果最好。以黄连解毒汤的中剂量进行后续实验,将大鼠分为假手术组、模型组以及黄连解毒汤组,每组 3 只,造模、取材等步骤同上。各组大鼠处理 12 h 后麻醉,快速剥离完整的脑,于冰上剥离皮层组织,用生理盐水快速冲洗,擦干,冻存于 -80°C 冰箱等待检测。

1.1.3 蛋白质分析 先对“1.1.2”的样品进行蛋白提取,并采用 Bradford 法^[10]测定提取的蛋白浓度。参考 FASP 法^[11]酶解蛋白,每组样品取出 100 μg 蛋白溶液,加入 40 mmol/L 的 IAM, 37°C 酶解反应 12 h,使用 C_{18} 脱盐柱对样品进行脱盐。采用 RIGOL L-3000 高效液相色谱系统进行梯度洗脱,经液相分离后经过 Q Exactive HF-X 质谱仪进行鉴定。

液相色谱分析条件:流动相为 100% 质谱水-0.1% 甲酸(A 液)和 80% 乙腈-0.1% 甲酸(B 液),体积流量为 600 nL/min,洗脱程序为 0~7 min, 8%~12% B; 7~55 min, 12%~30% B; 55~65 min, 30%~40% B; 65~66 min, 40%~95% B; 66~80 min, 95% B。

质谱分析条件: Nanospray Flex (NSI) 离子源,离子喷雾电压为 2.4 kV,离子传输管温度为 275°C ,质谱全扫描范围为 m/z 350~1500;一级质谱分辨率设为 120 000 (m/z 200),最大增益控制 (automatic gain control target, AGC) 为 3×10^6 ,最大注入时间为 80 ms;二级质谱分辨率设为 15 000 (m/z 200),AGC 为 5×10^4 ,最大注入时间为 45 ms。

1.1.4 统计分析 对 Rattus norvegicus 数据库采用 Proteome Discoverer 2.4 软件进行搜库。应用 RStudio 的 limma 包对所纳入数据集的数据矩阵进行标准化并筛选差异蛋白^[12]。以 $|\log_2\text{FC}| > 0.5$ [FC 表示差异倍数 (fold change)] 且 $P < 0.05$ 为标准,筛选有统计学意义的差异蛋白,即 $\log_2\text{FC} > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 为上调蛋白, $\log_2\text{FC} < -0.5$ 、 $P < 0.05$ 为下调蛋白。对调控蛋白的基因进行分析,得到差异基因,并利用 RStudio 的 ggplot2 包^[13]等绘制差异基因火山图。黄连解毒汤组和模型组相比得到的上调、下调基因,是黄连解毒汤是否干预脑缺血模型表达差异较大的基因,以此作为黄连解毒汤治疗脑缺血的作用靶标。

1.2 筛选与黄连解毒汤成分结构相似的药物

TCMSP 数据库包含中药的成分、靶点等数据,

并提供成分的结构式、药理学参数等^[14]。利用 TCMSP 数据库检索黄芩、黄连、黄柏、栀子的组成成分,以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 和血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) ≥ -0.30 为阈值,去重筛选得到黄连解毒汤的有效成分。由于目前已发现的药物数量众多,功效各异,因此本研究仅检索脑缺血治疗化学药,判断这些药物是否与黄连解毒汤成分的化学结构相似。根据《2021 AHA/ASA 指南:卒中和短暂性脑缺血发作患者的卒中预防》^[15]和《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》^[16]检索治疗脑缺血的上市化学药。运用 PubChem 数据库^[17]获取黄连解毒汤化合物和脑缺血临床药物的 SMILES 号,构建黄连解毒汤化合物数据库和治疗脑缺血临床药物数据库。

rdKit 包能够根据化学结构分析小分子之间的结构相似性,得到化合物之间的相似性分数^[18]。利用 Python 的 rdKit 包计算黄连解毒汤化合物、临床药物化学结构之间的相似性,临床药物与全部成分化合物结构相似性分数的平均值越高,说明该药物和黄连解毒汤成分的结构越相近。此外,将分析得到的化合物相似性矩阵导入 RStudio 的 hClust 包进行聚类分析并绘制聚类树状图,聚成一类的化合物之间结构相似,性质相近,产生的药理作用也越相似。根据结构聚类树状图和相似性分数平均值排名,筛选出与黄连解毒汤成分结构相似的药物集合。

1.3 筛选与黄连解毒汤基因表达类似的药物

LINCS 数据库 (<https://commonfund.nih.gov/LINCS/programhighlights>) 中包含丰富的生物信息数据,利用多种模型系统和各种化学扰动的集合,生成大规模扰动-效应网络^[19]。基于 LINCS 数据库, CMap (Build 02) (<https://portals.broadinstitute.org/cmap/>) 包含 1309 个不同剂量药物治疗的 5 个人类细胞系的 6100 个基因表达图谱,通过将输入的差异基因与化合物的所有参考表达谱进行比较,得到连接性分数在 $-1 \sim 1$ 的化合物排序^[20-21]。如果药物治疗疾病与化合物的表达谱高度正相关,即药物治疗疾病的靶标与化合物作用靶标相似程度很高,说明药物治疗疾病的机制可能与该化合物效应相似。

将蛋白质组学分析得到的差异基因输入 CMap 数据库,获取化合物连接性分数,化合物的连接性分数越接近 1,说明该化合物的作用于人体细胞的

基因表达谱与黄连解毒汤治疗脑缺血的基因表达谱越相似。通过上述方法,筛选出与黄连解毒汤治疗脑缺血基因表达相似的药物集合。

1.4 预测药物和黄连解毒汤的不良反应

SEP-L1000 数据库 (<http://maayanlab.net/SEP-L1000/>) 通过化学结构和基因表达特征,对超过 20 000 种小分子化合物(包含美国药监局批准药物在内)的不良反应进行优先度排序,有助于理解药物作用机制^[22]。将“1.2”和“1.3”项中基于化学结构和基因表达 2 个特征相似度筛选的药物集合

输入 SEP-L1000 数据库,预测药物的不良反应,获取每个药物发生不同不良反应的可能性分数。计算每种不良反应在化学结构相似和基因表达相似 2 个药物集合可能性分数的总和,从高到低对不良反应进行排序,以此作为依据,预测黄连解毒汤治疗脑缺血潜在的不良反应。

2 结果

2.1 黄连解毒汤治疗脑缺血的蛋白质组学结果

黄连解毒汤干预脑缺血模型的各组大鼠脑梗死体积和神经功能评分结果见图 1~3。结果表明,

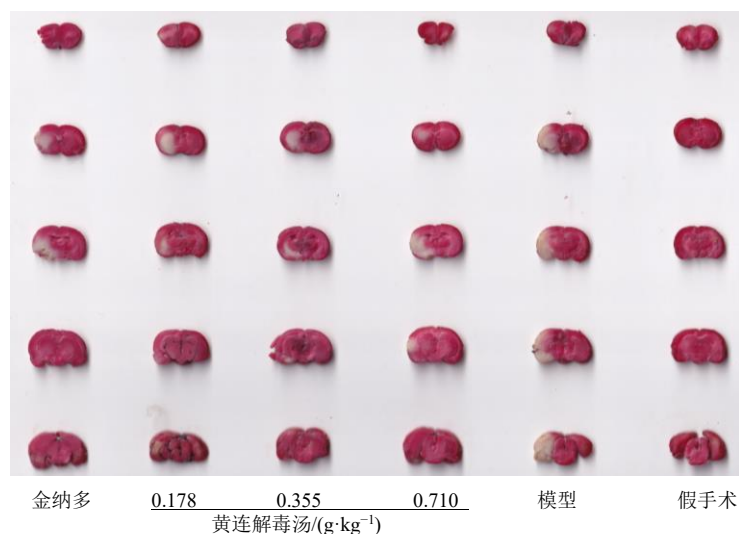
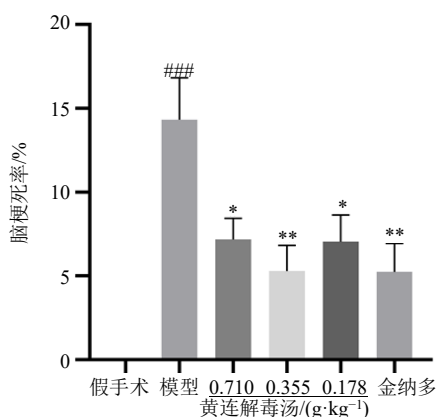


图 1 黄连解毒汤对脑缺血模型大鼠脑梗死体积的影响 (TTC)

Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on cerebral infarction volume in cerebral ischemia model rats (TTC)

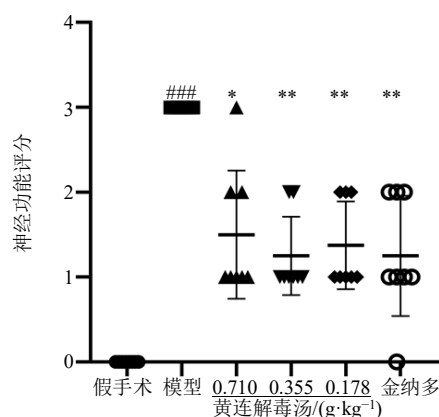


与假手术组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 黄连解毒汤对脑缺血模型大鼠脑梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on cerebral infarction rate in cerebral ischemia model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与假手术组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 3 黄连解毒汤对脑缺血模型大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on neurological score in cerebral ischemia model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

连解毒汤中剂量 (0.355 g/kg) 组的治疗效果最好。以黄连解毒汤中剂量进行蛋白质组学分析。运用蛋白质组学技术共鉴定出 4794 种蛋白, 以 $|\log_2FC| > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 为标准, 在黄连解毒汤组和模型组之间筛选出 163 个差异蛋白, 包括 72 个上调蛋白和 91 个下调蛋白。差异蛋白对应 71 个上调基因和 88 个下调基因, 利用 RStudio 绘制的火山图见图 4。黄连解毒汤组和模型组相比得到的 159 个差异基因, 是黄连解毒汤干预脑缺血模型大鼠的差异表达基因, 以此作为黄连解毒汤治疗脑缺血的作用靶标。

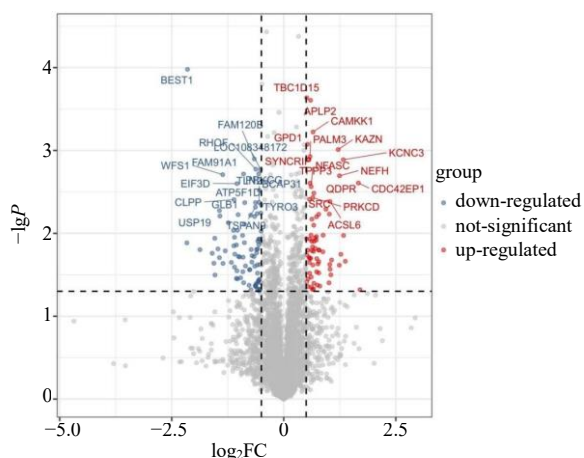


图 4 黄连解毒汤干预脑缺血模型大鼠的差异基因火山图
Fig. 4 Volcano map of differential genes of Huanglian Jiedu Decoction in cerebral ischemia model rat

2.2 基于化学结构和基因表达筛选药物

2.2.1 黄连解毒汤成分结构相似的药物筛选 利用 TCMSP 数据库检索黄芩、黄连、黄柏、栀子的成分, 共得到 370 个成分, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 和 $BBB \geq -0.30$ 为标准, 筛选得到 59 个成分。根据脑缺血诊疗指南获取脑缺血治疗常用药物 21 个, 包括盐酸托培松、曲克芦丁、氨酪酸、奥拉西坦、硫酸氢氯吡格雷、氯吡格雷、肝素、阿司匹林、艾地苯醌、胞磷胆碱钠、依达拉奉、辛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、甘露醇、呋塞米、尼莫地平、西洛他唑、奥扎格雷钠、胞苷二磷酸胆碱、华法林。利用 Python 的 rdkit 包计算黄连解毒汤成分与化学药结构之间的相似性分数, 将运算结果保存为 $N \times N$ 矩阵格式。同时运用 RStudio 的 hClust 包对 59 个黄连解毒汤成分和 21 个脑缺血治疗药物进行聚类, 共聚成 10 类, 树状图见图 5。不同的中药复方成分与不同类型的上市药物聚成一类, 提示黄连解毒汤

可能具有不同的药理作用。基于结构相似性的化合物聚类表明, 具有相似化学结构的黄连解毒汤成分聚合成类, 具有相同基团的脑缺血治疗药物基本聚成一类。肝素、甘露醇、氨酪酸与鲨烯, 华法林、阿司匹林与双苯-1,2-二甲酸酯, 曲克芦丁与茵芋碱、脱氢蒽酮 II_A, 依达拉奉与吴茱萸次碱等聚集, 表明黄连解毒汤成分与治疗脑缺血常用药物具有相似的结构或功能基团。

临床药物与黄连解毒汤成分结构相似性分数的平均值从高到低排序: 华法林 (0.248)、阿司匹林 (0.220)、曲克芦丁 (0.215)、氯吡格雷 (0.215)、硫酸氢氯吡格雷 (0.209)、尼莫地平 (0.204)、依达拉奉 (0.193)、艾地苯醌 (0.187)、盐酸托培松 (0.179)、呋塞米 (0.174)、辛伐他汀 (0.172)、胞磷胆碱钠 (0.165)、胞苷二磷酸胆碱 (0.161)、阿托伐他汀 (0.161)、西洛他唑 (0.160)、瑞舒伐他汀 (0.156)、奥拉西坦 (0.147)、奥扎格雷钠 (0.129)、氨酪酸 (0.119)、肝素 (0.105)、甘露醇 (0.053)。由此可见, 华法林、阿司匹林、曲克芦丁等药物与黄连解毒汤成分结构较相似。选择相似性分数 ≥ 0.170 的药物建立黄连解毒汤成分结构相似药物集合, 包括华法林、阿司匹林、曲克芦丁、氯吡格雷、硫酸氢氯吡格雷、尼莫地平、依达拉奉、艾地苯醌、盐酸托培松、呋塞米、辛伐他汀共 11 个临床药物。这些药物与黄连解毒汤成分化合物的结构相似, 并具备治疗脑缺血的功效, 是与黄连解毒汤成分结构相似、作用功效相近的药物。

2.2.2 黄连解毒汤基因表达类似的药物筛选 将黄连解毒汤治疗脑缺血的上调、下调基因输入 CMap 数据库, 共检索到 1309 个药物, 根据连接性分数从大到小排序, 筛选出连接性分数 > 0.400 的 30 种药物, 建立黄连解毒汤基因表达相似药物集合, 见表 1。这些药物与黄连解毒汤干预脑缺血的基因表达谱相似度较高, 作用靶点相近, 这些药物可能与黄连解毒汤药理机制相似。

2.3 黄连解毒汤不良反应预测

2.3.1 黄连解毒汤不良反应概述 从中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 5 个数据库检索黄连解毒汤的不良反应文献, 未见黄连解毒汤治疗脑缺血的不良反应报道。根据检索结果发现黄连解毒汤在临床上运用广泛, 常搭配其他中药复方或化学药治疗阿尔茨海默病^[23-25]、2 型糖尿病^[26]、动脉粥样硬化^[27]、感染性心内膜炎^[28]等疾病。在治疗过



1 个颜色代表一类, 标有*的代表脑缺血治疗常用药物, 未标有*的代表黄连解毒汤成分

One color represents one class, those marked with * represent drugs commonly used in cerebral ischemia treatment, and those not marked with * represent ingredients of Huanglian Jiedu Decoction

图 5 黄连解毒汤成分和脑缺血临床治疗药物的结构聚类图

Fig. 5 Structural cluster diagram of components of Huanglian Jiedu Decoction and clinical drugs for cerebral ischemia

表 1 基于 CMap 数据库筛选的黄连解毒汤基因表达类似药物

Table 1 Similar drugs of Huanglian Jiedu Decoction gene expression screened based on CMap database

药物英文名称	药物中文名称	连接性分数	特异度	实验次数	有效率/%
desipramine	地昔帕明	0.401	0.195	4	75
butamben	布坦本	0.401	0.159	4	75
harmaline	骆驼蓬碱	0.405	0.042	4	75
netilmicin	奈替米星	0.406	0.007	4	75
decitabine	地西他滨	0.407	—	1	100
strophanthidin	毒扁豆碱	0.408	0.314	4	75
brinzolamide	布林佐胺	0.420	0.039	4	75
esculetin	七叶皂苷	0.420	0.410	3	66
amprolium	氨丙啉	0.424	0.000	5	80
pralidoxime	解磷定	0.425	0.142	4	75
tomelukast	托鲁司特	0.437	—	1	100
kaempferol	山柰酚	0.439	0.125	4	75

续表 1

药物英文名称	药物中文名称	连接性分数	特异度	实验次数	有效率/%
dilazep	地拉卓	0.441	0.042	5	80
oxybenzone	氧化苯甲酮	0.441	0.159	4	75
clemizole	氯咪唑	0.457	0.158	5	80
prestwick-920		0.457	0.104	4	75
seneciophylline	千里光碱	0.458	0.074	4	75
arachidonic acid	花生四烯酸	0.463	0.109	3	66
tetramisole	四咪唑	0.468	0.015	4	75
betulin	白桦脂醇	0.471	0.019	3	100
cytochalasin B	细胞松弛素 B	0.475	—	1	100
tropine	托品	0.506	0.000	4	100
2-deoxy-D-glucose	2-脱氧-D-葡萄糖	0.509	—	1	100
12,13-EODE		0.537	—	1	100
corticosterone	皮质酮	0.547	0.000	4	100
oligomycin	寡霉素	0.561	—	1	100
phenanthridinone	菲啶酮	0.568	—	1	100
mecamylamine	美加明	0.572	0.008	3	100
fendiline	芬地林	0.576	0.034	3	100
MG-132		0.594	—	1	100

程中, 黄连解毒汤的不良反应发生率较低, 发生的不良反应以腹泻居多, 兼有恶心、失眠、便溏腹胀、腹痛、眩晕、药疹等症状出现, 多数研究的对照组和试验组不良反应发生率无统计学差异。上述结果表明, 黄连解毒汤在治疗疾病中偶尔出现不良反应, 出现不良反应以腹泻为主, 可能与黄芩、黄连、黄柏、栀子的药性苦寒、易伤脾胃有关。

2.3.2 基于成分结构的不良反应预测 运用 SEP-L1000 数据库检索黄连解毒汤成分结构相似药物的不良反应, 共检索到阿司匹林、氯吡格雷、依达拉奉、呋塞米、艾地苯醌、尼莫地平、辛伐他汀、华法林 8 个药物的不良反应, 按可能性分数的总和对不良反应进行排序, 从高到低前 20 种不良反应为皮疹、恶心、呕吐、腹泻、瘙痒、疼痛、头痛、头晕、荨麻疹、腹痛、过敏、贫血、虚弱、水肿、体温升高、白细胞减少、血小板减少、消化不良、感觉异常、混乱状态, 成分化学结构相似药物的不良反应可能性热图见图 6。

2.3.3 基于基因表达的不良反应预测 运用 SEP-L1000 数据库检索黄连解毒汤基因表达相似药物的不良反应, 共检索到地昔帕明、布坦本、地西他滨、毒扁豆碱、布林佐胺、解磷定、托鲁司特、山柰酚、

地拉卓、氧化苯甲酮、氯咪唑、千里光碱、四咪唑、细胞松弛素 B、托品、皮质酮、寡霉素、美加明、芬地林、MG-132 共 20 种药物的不良反应, 按可能性分数的总和对不良反应进行排序, 从高到低前 20 种不良反应为恶心、头晕、头痛、皮疹、呕吐、疼痛、瘙痒、水肿、腹泻、荨麻疹、虚弱、体温升高、过敏、腹痛、食欲减退、便秘、呼吸困难、消化不良、疲劳、失眠, 基因表达类似药物的不良反应可能性热图见图 7。

将基于成分结构和基因表达预测的可能性分数排名前 10 的不良反应取交集, 预测黄连解毒汤在治疗脑缺血中的不良反应为恶心、呕吐、腹泻、皮疹、头晕、头痛、疼痛、瘙痒、荨麻疹。

3 研究整体流程和方法总结

本研究设计的预测中药复方不良反应方法, 基于化学结构和基因表达的不良反应预测流程见图 8。需要准备中药复方治疗某一疾病的基因表达谱, 可以运用蛋白质组学、基因组学、转录组学等各种组学方法, 本研究采用蛋白质组学获取黄连解毒汤干预脑缺血模型大鼠的表达谱。结合 PubChem、LINCS、CMap 等数据库比较中药复方和临床药物在化学结构和基因表达 2 个维度的相似性, 进而获

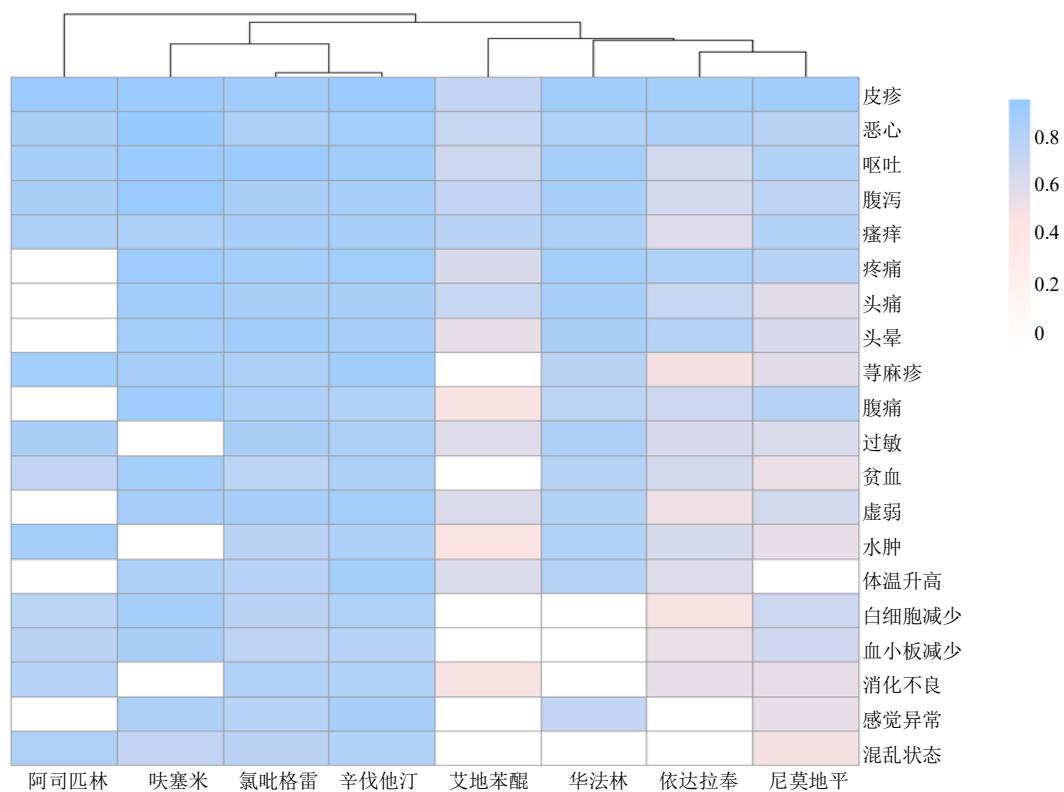


图 6 黄连解毒汤成分结构相似药物的不良反应可能热图

Fig. 6 Adverse reactions likelihood heat map of drugs with similar structure of composition in Huanglian Jiedu Decoction

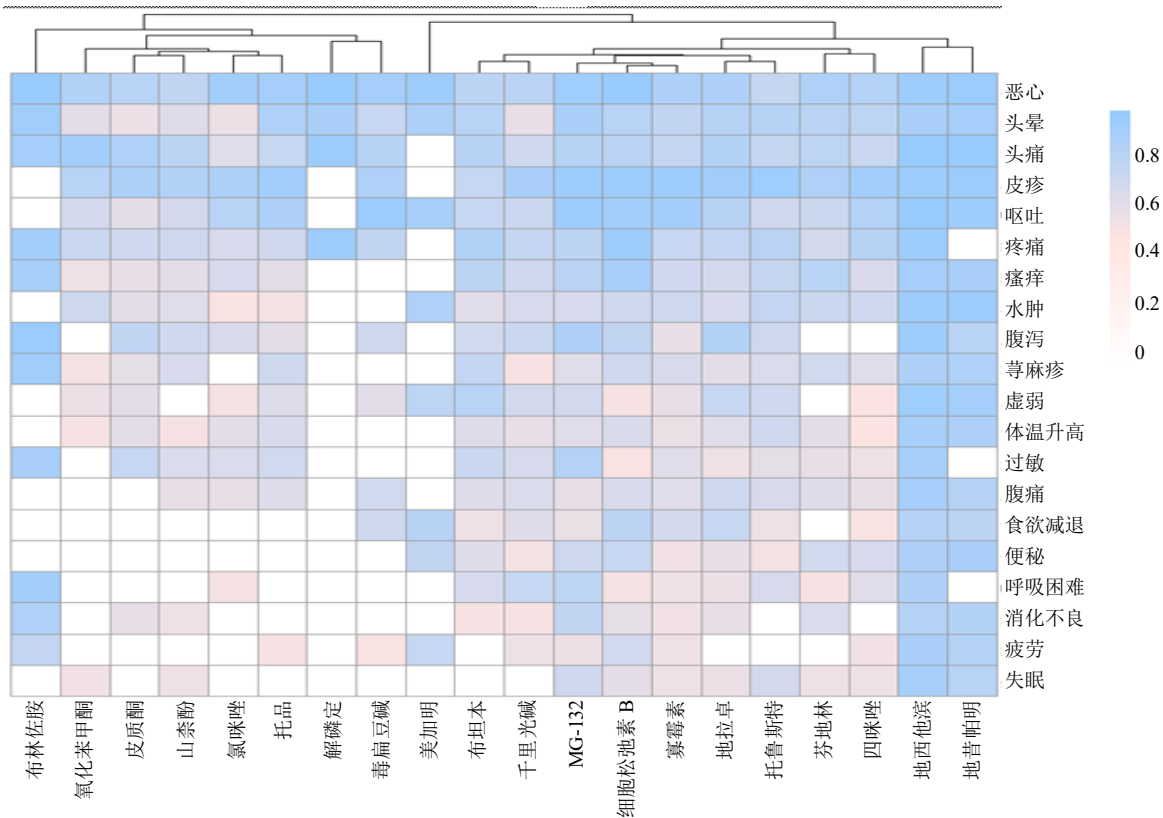


图 7 黄连解毒汤基因表达类似药物的不良反应可能性热图

Fig. 7 Adverse reaction likelihood heat map of drugs with similar expression of gene in Huanglian Jiedu Decoction

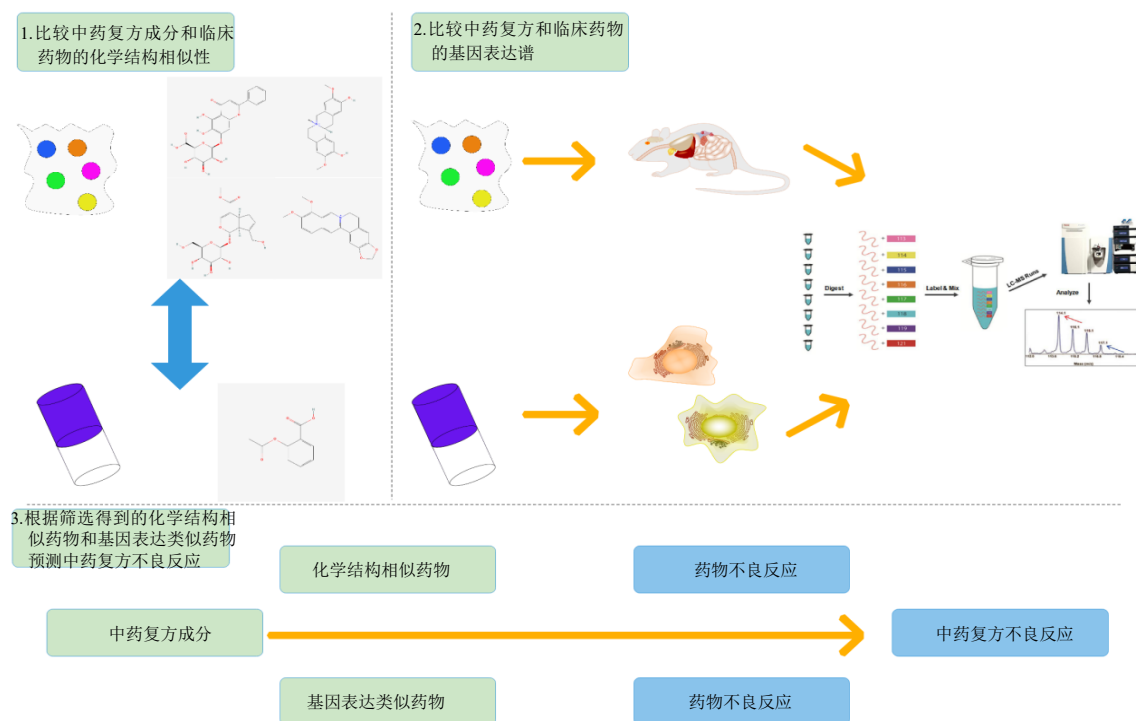


图 8 基于蛋白质组学和数据库预测中药复方不良反应的流程

Fig. 8 Process of predicting adverse reactions of traditional Chinese medicine formula based on proteomics and database

取化学结构相似和基因表达类似的药物，检索这些药物的不良反应，进而预测中药复方的不良反应。大体分为以下 3 个步骤：（1）比较中药复方所含成分和临床药物的化学结构相似性，获取化学结构相似药物；（2）比较中药复方和临床药物的基因表达谱，获取基因表达类似药物；（3）根据筛选得到的化学结构相似药物和基因表达类似药物预测中药复方的不良反应。

4 讨论

本研究设计了一种预测中药复方不良反应的方法，以蛋白质组学实验和现有 LINCS 数据库的数据为基础，化学结构相似性和基因表达类似度为标准，筛选与中药复方成分结构相似和基因表达类似的临床药物，通过检索临床药物的不良反应，预测中药复方可能存在的不良反应。本研究首次将化学成分结构和基因表达谱结合，应用于中药复方不良反应的预测中，并以黄连解毒汤为例探讨该方法的可行性。

中医认为，黄连解毒汤“苦寒直折”，方中君药黄连清泻心火兼中焦之火；臣药黄芩泻肺热与上焦之火；黄柏泻下焦之火，栀子泻三焦之火，引热下行，二者为佐药。黄连解毒汤主治三焦火毒热盛证，症见大热烦躁、口燥咽干、错语不眠；或热病出血、

痈疽疮疡^[29-30]，针对以风火痰瘀壅塞三焦、毒损脑络为特点的脑缺血病理过程，发挥通三焦、解火毒的作用，达到“解毒通络”的目的^[31]。黄连解毒汤解三焦火毒与其药性苦寒密不可分，传统已有“苦寒伤胃”一说，即苦寒药性寒凉，有伤胃之弊，不宜用于脾胃虚寒者，临床应用这类药物易出现腹痛等症状。目前相关研究表明，苦寒药在较大剂量连续用药后可致正常动物和脾胃虚寒模型动物的胃肠运动功能减退，“伤胃”之弊体现在消化系统的多个方面^[32]，印证了传统中医的观点。此外，在黄连解毒汤蛋白质组学实验过程中，发现黄连解毒汤给药组的大鼠便溏软，是腹泻症状的表现，可能与黄连、黄芩、黄柏、栀子药性苦寒有关。根据文献检索结果，临床上黄连解毒汤的不良反应较少且发生频率低，仅有腹泻、恶心、腹痛等几个不良反应的报道^[23-25,33-34]，与本研究的预测结果相符。所有这些结果表明，基于化学结构相似性聚类以及基因表达谱比较，挑选中药复方的类似临床药物为依据推测不良反应，是预测中药复方不良反应的有效方法。

脑缺血临床药物与黄连解毒汤成分结构聚类图显示，黄连解毒汤成分与目前临床应用广泛的治疗药物结构相似，它们之间具备相似官能团，尤其阿

司匹林、曲克芦丁、尼莫地平、依达拉奉、氯吡格雷、呋塞米、辛伐他汀, 不仅与成分的结构相似度高, 而且临床应用广泛, 因此依据临床药物的药效机制能够推测黄连解毒汤的药理作用和不良反应。阿司匹林有解热、镇痛、抗炎的药理作用, 对血小板的聚集有抑制作用, 其肠溶片可作为“中风”的二级预防^[35]。药理研究显示, 阿司匹林肠溶片可促使血小板环氧化酶乙酰化, 抗血小板聚集; 尼莫地平则促进脑血管扩张, 调节脑组织血流量, 降低钙水平, 避免神经元损伤; 辛伐他汀调节血液流速及血液黏稠度, 调节血脂, 联合阿司匹林增强治疗缺血性脑病的疗效^[36-38]。动物实验表明, 曲克芦丁对脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 与减轻脂质过氧化反应、增加自由基的清除能力等有关^[39], 这说明曲克芦丁通过抗氧化损伤保护脑组织。依达拉奉具有抗炎作用, 在治疗脑缺血再灌注损伤中能显著降低炎症反应, 可能与 Wnt 家族分泌蛋白/ β -连环蛋白通路 (canonical Wnt/ β -catenin pathway) 通路激活有关^[40-41]。此外, 研究显示, 呋塞米通过肾外作用显著降低了脑阻抗, 发挥抗水肿作用, 改善脑缺血损伤^[42]。黄连解毒汤的成分与上述脑缺血临床药物结构相似, 基于这种无监督的化学结构聚类方法和已有研究^[43-46], 组学大数据预测和验证的黄连解毒汤具有以下药理作用: 抑制血小板凝集 (阿司匹林)、抵抗氧化损伤 (曲克芦丁)、抑制炎症反应 (阿司匹林、尼莫地平、依达拉奉)、减少胆固醇合成 (他汀类), 其成分还可能具有利尿的作用 (呋塞米), 说明黄连解毒汤多途径、多作用保护脑组织和神经元细胞, 对抗脑缺血损伤。

基于黄连解毒汤干预脑缺血的蛋白质组学数据, 本研究筛选了 71 个上调基因和 88 个下调基因, 以基因靶标为基础可以深入挖掘黄连解毒汤治疗脑缺血的作用机制。以蛋白组学的差异表达基因, 筛选得到地昔帕明、布坦本、地西他滨、布林佐胺、解磷定、山柰酚、氯咪唑、千里光碱、四咪唑、细胞松弛素 B、托品、皮质酮等 30 个药物与黄连解毒汤基因表达类似, 目前黄连解毒汤能够治疗脑缺血, 上述药物能否在脑缺血治疗中发挥作用有待验证, 其中山柰酚已经证实具有改善脑缺血功能。药理研究显示, 山柰酚能抑制炎症, 保护血脑屏障, 改善慢性脑缺血诱导的大鼠认知功能障碍、四肢平衡能力障碍及病理损伤, 作用机制可能与抗氧化、抑制炎症通路激活有关^[47-48]。地昔帕明、普托品、皮质

酮也被证明与脑缺血的病理损伤相关^[49-52]。因此, 通过比较药物基因表达的相似度, 由已知的毒效用推测未知的毒效用具备可行性。本研究筛选的与黄连解毒汤基因表达谱类似药物, 可以研究与脑缺血损伤和治疗机制的关系, 为药物药理作用的发现提供新思路。

经过本研究设计的不良反应预测流程 (图 8), 预测黄连解毒汤不良反应为恶心、呕吐、腹泻、皮疹、头晕、头痛、疼痛、瘙痒、荨麻疹。恶心、呕吐、腹泻、药疹、疼痛、头痛等不良反应已有报道, 出现频次较低且反应不剧烈, 不良反应的发生可能与其药性苦寒伤胃相关。由此说明, 本研究设计的不良反应预测方法具有价值和可行性。但这些不良反应是基于临床药物推测的, 临床化学药的不良反应通常较多, 反应剧烈, 而黄连解毒汤临床上虽然有报道腹泻等不良反应, 但出现频率低、反应数量少、程度轻微, 黄连解毒汤与临床药物相比不良反应症状减轻、频率下降, 是否与中药的配伍减毒作用相关有待研究。中药复方在治疗疾病中有其独特优势, 不良反应发生率少, 广泛运用中医药大势所趋。

5 结论

本研究探讨了一种中药复方不良反应预测的方法, 将中药复方的成分化学结构、基因表达与临床药物结合, 建立化学结构、基因靶标与不良反应之间的联系, 筛选中药复方类似药物, 预测中药复方的不良反应, 为中药不良反应研究提供新的策略和方法。然而, 本研究受限于数据量等因素, 具有一定的局限性, 希望今后丰富数据、完善方法。总之, 基于蛋白质组学和 LINCS 数据库, 本研究探讨了一种预测中药复方不良反应的方法, 并以黄连解毒汤为例说明该方法具备可行性, 可能有助于阐明传统医学的独特机制, 为不良反应研究提供新的策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王文杰, 陈赛贞, 徐红燕, 等. 黄连解毒汤抗脑缺血研究进展及展望 [J]. 江西中医药, 2018, 49(11): 70-74.
- [2] 廖国平, 孙德贵, 尹新生, 等. 黄连解毒汤的抗炎作用研究进展 [J]. 大家健康: 学术版, 2015, 9(10): 277-278.
- [3] 张志辰, 张允岭, 曹晓岚, 等. 基于数据挖掘的急性脑梗死血压、体温联动变化与毒损脑络证候特点相关性分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(5): 309-312.
- [4] 赵锡艳, 仝小林, 赵林华, 等. 黄连复方及其制剂不良反应现代研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4):

- 546-547.
- [5] 李春楠. 中药栀子不良反应与肝肾毒性机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [6] 李春霞, 谢志虹, 徐文艳, 等. 黄柏联合益生菌治疗妊娠 37 周后细菌性阴道炎孕妇的疗效及安全性 [J]. 河北医药, 2019, 41(5): 721-723.
- [7] 康雨菲. 复方黄芩“水膜”湿敷联合健脾化湿汤治疗亚急性湿疹的疗效观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [8] Bender A, Scheiber J, Glick M, *et al.* Analysis of pharmacology data and the prediction of adverse drug reactions and off-target effects from chemical structure [J]. *Chem Med Chem*, 2007, 2(6): 861-873.
- [9] Dafniet B, Cerisier N, Audouze K, *et al.* Drug-target-ADR network and possible implications of structural variants in adverse events [J]. *Mol Inform*, 2020, 39(12): e2000116.
- [10] Weinstock M. Bradford's law [J]. *Nature*, 1971, 233(5319): 434.
- [11] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [12] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, *et al.* Limma Powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [13] Ito K, Murphy D. Application of ggplot2 to pharmacometric graphics [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2013, 2(10): e79.
- [14] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [15] 雷洋, 苟梦秋, 边原, 等. 《2021 AHA/ASA 指南: 卒中和短暂性脑缺血发作患者的卒中预防》解读 [J]. 医药导报, 2022, 41(1): 8-11.
- [16] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.
- [17] Kim S, Chen J, Cheng T J, *et al.* PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [18] Lovrić M, Molero J M, Kern R. PySpark and RDKit: Moving towards big data in cheminformatics [J]. *Mol Inform*, 2019, 38(6): e1800082.
- [19] Stathias V, Turner J, Koleti A, *et al.* LINCS Data Portal 2.0: Next generation access point for perturbation-response signatures [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D431-D439.
- [20] Yang K, Dinasarapu A R, Reis E S, *et al.* CMAP: complement map database [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(14): 1832-1833.
- [21] Hurle M R, Yang L, Xie Q, *et al.* Computational drug repositioning: From data to therapeutics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 93(4): 335-341.
- [22] Wang Z C, Clark N R, Ma'ayan A. Drug-induced adverse events prediction with the LINCS L1000 data [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(15): 2338-2345.
- [23] 高炎. 黄连解毒汤治疗阿尔茨海默病的临床观察及实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [24] 梁瑞景, 梁瑞凯. 黄连解毒汤联合复方苡蓉益智胶囊、多奈哌齐片对阿尔茨海默症患者尿 AD 相关神经丝蛋白水平的影响 [J]. 陕西中医, 2021, 42(4): 446-448.
- [25] 杨青. 黄连解毒汤联合盐酸多奈哌齐片治疗阿尔茨海默病 (心肝火旺型) 的临床疗效观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [26] 岳新, 史素琴. 黄连解毒汤加减联合耳穴埋针辅助治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的效果 [J]. 慢性病学杂志, 2021, 22(7): 993-995.
- [27] 刘亚荣, 孙婧. 黄连解毒汤对颈动脉粥样硬化作用观察及部分机制探析 [J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2688-2692.
- [28] 王星, 陈康寅, 贾忠伟, 等. 黄连解毒汤合五味消毒饮治疗急性感染性心内膜炎的临床观察 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(6): 1226-1228.
- [29] 李冀. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 112.
- [30] 刘磊, 姜鹏, 窦圣姍, 等. 黄连解毒汤的化学及药理学研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 935-938.
- [31] 宁为民, 李国顺. 试论三焦气化与中风 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(11): 1989-1992.
- [32] 李飞艳. 从苦寒药伤胃看常用苦寒药一般毒性及对胃肠运动影响的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [33] 时晶, 倪敬年, 田金洲, 等. 清热解毒法治疗阿尔茨海默病的系统评价 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(8): 667-672.
- [34] 李根龙. 辨证分型治疗老年痴呆 120 例临床观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(7): 9-10.
- [35] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2010 [J]. 中国实用乡村医生杂志, 2015(6): 2-4.
- [36] 董歌. 瑞舒伐他汀钙联合阿司匹林肠溶片、尼莫地平治疗短暂性脑缺血发作的疗效 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(19): 2894-2897.
- [37] 他汀类药物预防缺血性卒中/短暂性脑缺血发作专家组. 他汀类药物预防缺血性卒中/短暂性脑缺血发作的专家建议 [J]. 中华内科杂志, 2007, 46(1): 81-83.
- [38] 田亮, 胡成伍, 鄢圣娟. 辛伐他汀联合阿司匹林治疗脑

- 血栓形成的疗效及对神经功能缺损的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(12): 1649-1650.
- [39] 张芸榕, 何丽, 李笑晓, 等. 曲克芦丁对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 华西药理学杂志, 2018, 33(2): 169-171.
- [40] 杨士超. 依达拉奉辅助治疗对脑缺血再灌注损伤患者神经功能及 MRS 评分的影响 [J]. 哈尔滨医药, 2021, 41(5): 95-96.
- [41] 谢明, 朱俊德, 周璐, 等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(4): 418-424.
- [42] Oria de Suárez C, Eblen Zajjur A. Efectos extrarrenales de la furosemida en el tejido cerebral normal e isquémico de la Rata [J]. *RevNeurol*, 2001, 32(5): 414.
- [43] 董颖, 刘保光, 许二平. 黄连解毒汤抗炎作用与临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 245-250.
- [44] 柴倩. 黄连解毒汤对 MODS 患者凝血功能影响的临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [45] 何信用, 郑思成, 王群, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化的潜在分子机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 687-696.
- [46] 徐静华, 于庆海, 李立志. 黄连解毒汤对脑缺血小鼠的抗氧化作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 2-4.
- [47] 李伟瀚, 程笑, 杨滢霖, 等. 山奈酚通过抑制神经炎症及保护血脑屏障而改善大鼠脑缺血再灌注神经功能 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 673.
- [48] 张君, 程笑, 杨欢, 等. 山奈酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 39-44.
- [49] 朱子涛, 张雪翔, 刘健, 等. 地昔帕明对大鼠短暂脑缺血致海马 CA1 神经元自发放电的影响 [J]. 药理学学报, 1996(1): 35-38.
- [50] 蒋丽萍, 韩晓建, 陈晓媛, 等. 普托品对脑缺血的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 9-10.
- [51] 李军岩, 袁芳, 陈泽斌. 针刺预处理对脑缺血再灌注大鼠血清皮质酮含量的影响 [J]. 湖北中医学院学报, 2008, 10(2): 9-11.
- [52] 王嗣欣, 周丽宏, 滕春芳. 皮质激素在实验性缺血性脑血管病中应用进展 [J]. 国外医学 神经病学神经外科学分册, 2001, 28(3): 220-223.

[责任编辑 潘明佳]