

基于网络医学与等辐射分析探讨“杜仲-干姜”活性成分对神经炎症的协同抑制作用

燕子姝¹, 李东娜², 李小锦², 谭思宇², 张艳军^{3,4}, 庄朋伟^{2,3*}, 郭虹^{1*}

1. 天津中医药大学 组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 天津中医药大学 现代中医海河实验室, 天津 301617

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

4. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193

摘要: **目的** 基于网络医学与等辐射分析法探讨“杜仲-干姜”活性成分对神经炎症的协同抑制作用。**方法** 采用网络医学的方法, 通过计算杜仲-干姜的活性成分靶点模块与神经炎症基因模块之间的距离, 预测具有协同作用的 2 种活性成分组合。使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠小胶质细胞(BV-2)建立神经炎症模型, 评价药物组合对一氧化氮(nitric oxide, NO)释放的影响。以 NO 抑制率为指标, 采用等辐射分析法和统计学方法计算药物组合之间的相互作用, 从而判断 2 种成分之间协同作用。**结果** 使用网络医学的方法计算出 2 种可能具有协同关系的药物活性成分组合, 即 6-姜烯酚与杜仲醇、6-姜酚与杜仲醇。等辐射分析及统计学方法对体外实验结果进行计算发现 6-姜烯酚与杜仲醇 1:2 配伍、6-姜酚与杜仲醇 2:1 配伍在抑制小胶质细胞炎症方面均具有协同作用。**结论** “杜仲-干姜”活性成分组合(6-姜烯酚与杜仲醇、6-姜酚与杜仲醇)在抑制神经炎症方面具有协同作用, 为中药活性成分协同性研究提供了方法学参考, 为活性成分的后续深入药理机制研究提供了重要信息。

关键词: 杜仲; 干姜; 6-姜烯酚与杜仲醇配伍; 6-姜酚与杜仲醇配伍; 网络医学; 等辐射分析法; 协同作用; 神经炎症

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)15-5166-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.016

Synergistic inhibition of neuroinflammation by active ingredient of *Eucommiae Cortex* and *Zingiberis Rhizoma* based on network medicine and isobolographic analysis

YAN Zishu¹, LI Dongna², LI Xiaojin², TAN Siyu², ZHANG Yanjun^{3,4}, ZHUANG Pengwei^{2,3}, GUO Hong¹

1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To exploring the synergistic inhibitory effect of active ingredients from Duzhong (*Eucommiae Cortex*) and Ganjiang (*Zingiberis Rhizoma*) on neuroinflammation based on network medicine and isobolographic analysis. **Methods** The combination of two active ingredients with synergistic effects were predicted by calculating the distance between the active ingredient target module of *Eucommiae Cortex* and *Zingiberis Rhizoma* and the neuroinflammatory gene module through network medicine method. Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce BV-2 cells to establish a neuroinflammatory model and the effect of drug combination on the release of nitric oxide (NO) was evaluated. NO inhibition rate was used as an indicator, the interaction between

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 天津市卫生健康委员会天津市中医药重点领域科研项目(2024008)

作者简介: 燕子姝, 硕士研究生, 研究方向为中药神经药理。E-mail: swallowbookzs@126.com

*通信作者: 郭虹, 副研究员, 博士生导师, 主要从事中药脑血管及神经药理研究。Tel: 15522311879 E-mail: cacti1983@163.com

庄朋伟, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效特点发现及中药神经药理研究。Tel: 13212082363 E-mail: zhuangpengwei@163.com

drug combinations was calculated using equal radiation analysis and statistical methods to determine the synergistic effect between the two components. **Results** Two possible synergistic combinations of drug active ingredients were calculated using network medicine method, namely 6-shogaol and eucommiol, 6-gingerol and eucommiol. The results of *in vitro* experiments were calculated using isobolographic analysis and statistical methods, and it was found that the combination of 6-shogaol and eucommiol at a ratio of 1 : 2, as well as the combination of 6-gingerol and eucommiol at a ratio of 2 : 1, all had a synergistic effect on inhibiting microglial inflammation. **Conclusion** The combination of active ingredients of *Eucommiae Cortex* and *Zingiberis Rhizoma* (6-shogaol and eucommiol, 6-gingerol and eucommiol) has a synergistic effect on inhibiting neuroinflammation, providing methodological references for the study of synergistic effects of active ingredients in traditional Chinese medicine and important information for the subsequent in-depth pharmacological mechanism research of active ingredients.

Key words: *Eucommiae Cortex*; *Zingiberis Rhizoma*; combination of 6-shogaol and eucommiol; combination of 6-gingerol and eucommiol; network medicine; isobolographic analysis; synergistic effect; neuroinflammation

由于临床疾病发病机制极其复杂, 单独用药往往难以达到预期效果, 因此临床实践中常以组合用药^[1]。药物的组合疗法不仅能够提高临床疗效, 还能降低单药剂量, 减少不良反应, 具有一定优势^[2]。然而联合用药是一个系统工程, 不仅仅是单纯将药物联合使用, 还需要考虑药物作用机制、药物之间相互作用、药物不良反应等, 合理的联合用药可以提高临床疗效, 减少药物不良反应的发生^[3]。然而目前的联合用药应用中, 医生的临床经验仍占主导, 因此建立科学有效的方法寻找具有协同作用的药物组合, 对于临床用药安全及患者病情缓解具有重大意义^[4]。

本研究以课题组前期对杜仲方防治帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的研究为基础, 以杜仲方抑制神经炎症的配伍作用为例, 探索中药活性成分配伍协同作用的科学研究方法。杜仲方来源于《备急千金要方》, 由杜仲、石斛、生地黄、干姜组成, 课题组前期研究发现, 杜仲方能有效防治 PD, 且其机制与抑制小胶质细胞炎症反应有关^[5-8]。杜仲方及君药杜仲体内移行成分分析发现, 杜仲活性成分杜仲醇 (eucommiol)、1-去氧杜仲醇 (1-deoxyeucommiol), 干姜活性成分 6-姜烯酚 (6-shogaol)、6-姜酚 (6-gingerol), 石斛活性成分石斛酮碱 (nobilonine)、石斛胺 (dendramine)、dendrobiumane A 等可透过血脑屏障, 发挥脑内直接保护作用^[9]。然而各成分间是否相互影响、在抑制神经炎症方面是否具有协同作用, 仍需进一步研究。

本研究结合了网络医学与等辐射分析法探讨中药有效成分间的协同作用, 不仅从疾病关键病理环节上预测并验证了有效药物组合, 而且以药效为依据计算出药物组合的最优配比, 为有效药物组合的发现提供了方法参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠小胶质细胞 (BV-2) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

6-姜烯酚 (质量分数≥98%, 批号 J-038)、6-姜酚 (质量分数≥98%, 批号 J-019) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 杜仲醇 (质量分数≥98%, 批号 PS230330-03) 购自成都普思生物有限公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 L2880) 购自美国 Merck 公司; DMEM 高糖培养基 (批号 C11995500BT)、青霉素-链霉素 (10 000 U/mL, 批号 15140122)、含 0.25% EDTA 和酚红的胰蛋白酶 (批号 25200-072) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 胎牛血清 (批号 C04001-500) 购自 CotoyBioTech 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 C0039)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (批号 S0021S) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

HF240 型 CO₂ 恒温培养箱 (上海力康生物医疗科技控股有限公司); S.SW-CJ-2F 型净化工作台 (上海跃进医疗器械有限公司); IX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); AB204-N 型分析天平 (德国 Mettler 公司); THZ-92A 型气浴振荡器 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); Spark 多功能微孔板检测仪 (瑞士 TECAN 公司)。

2 方法

2.1 基于疾病网络与药物-靶点网络关系的药物组合筛选

2.1.1 潜在疾病靶点和药物靶点的获取 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 下载单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 数据集 GSE184950^[10],

其中包含健康人群 10 例、PD 患者 24 例。利用 R 语言 Seurat (v.4.2.0) 包进行原始数据清洗^[11], 并分析健康人群与 PD 患者小胶质细胞的差异表达基因用于后续分析。

使用 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)^[12]检索杜仲活性成分杜仲醇、1-去氧杜仲醇, 干姜活性成分 6-姜烯酚、6-姜酚, 以及石斛活性成分石斛酮碱、石斛胺、dendrobiumane A 的作用靶点。

2.1.2 药物-药物-疾病网络拓扑关系分析 基于网络的方法作为一种新的研究策略, 已被用于协同药物组合的预测发现, 该方法构建了 1 个科学可靠的人类蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 量化疾病关键模块与药物靶点的网络关系, 从而识别具有协同作用的药物组合^[13-14]。通过量化具体的疾病网络模块与 2 种药物-靶点模块对各模块在网络中的空间距离, 评价 2 种药物与疾病之间的关系。具体方法^[13]如下: 对药物靶点 (X) 和疾病靶点 (Y) 之间的最短路径长度 $d(x, y)$ 进行计算, 采用 z 值评分计算每种药物 (X) 和疾病 (Y) 之间的网络拓扑距离, 同时计算 2 种药物-靶点模块之间的 s_{AB} 值以评估 2 种药物-靶点模块之间的网络拓扑关系, 从而预测 2 种药物是否具有协同作用。当网络关系符合如图 1 所示的“互补接触”形式, 说明 2 种药物针对研究的具体疾病模块有协同作用。即对于每种药物来说, 药物-靶点模块必须与疾病模块重叠才具有治疗效果, 网络拓扑空间距离小于 0 ($z < 0$); 2 种药物-靶点模块均需与

疾病模块重叠, 但彼此之间互不重叠 ($s_{AB} \geq 0$), 才有协同治疗作用。

$$z = (d - \mu) / \sigma \quad (1)$$

$$d(X, Y) = \frac{1}{\|Y\|} \sum_{y \in Y} \min_{x \in X} d(x, y) \quad (2)$$

$$s_{AB} \equiv \langle d_{AB} \rangle - \frac{\langle d_{AA} \rangle + \langle d_{BB} \rangle}{2} \quad (3)$$

2.2 细胞培养

BV2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 完全培养基培养, 待细胞单层融合后, 胰酶消化、离心, 细胞计数后接种至 96 孔板内, 放入培养箱中培养。

2.3 CCK-8 检测细胞活力

BV2 细胞接种 24 h 后, 分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚, 或 1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜酚, 或 1、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 的杜仲醇, 另设置对照组加入不含药物的培养基, 给药处理 24 h 后, 收集上清液, 每孔加入 100 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 弃上清, 用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.4 NO 释放量检测

称取 LPS 粉末 1 mg, 加入无菌超纯水溶解配成 1 mg/mL 的 LPS 溶液, 用时稀释至 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。BV2 细胞接种 24 h 后, 设置对照组、模型组和各给药组, 除对照组加入不含药物的培养基, 其余各组加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 溶液, 各给药组再分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚, 或 1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜酚, 或 1、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 的杜仲醇, 给药处理 24 h 后, 收集上清液于新的 96 孔板中, 按照试剂盒说明书测定 NO 释放量, 并计算 NO 抑制率。

NO 抑制率 = (模型组 NO 浓度 - 给药组 NO 浓度) / (模型组 NO 浓度 - 对照组 NO 浓度)

2.5 等辐射分析法考察 6-姜烯酚、6-姜酚与杜仲醇的相互作用

等辐射分析法是一种能从定量分析上评价药物之间相互作用的方法^[15]。采用 GraphPad Prism 9 软件计算 6-姜烯酚、6-姜酚与杜仲醇对 NO 释放量的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}), 将“2.1”项下预测的具有协同关系的 2 种药物以二者 IC_{50} 的比值进行配伍, 并检测各配伍浓度下的 NO 释放量, 以计算配伍组的实测半数抑制浓度

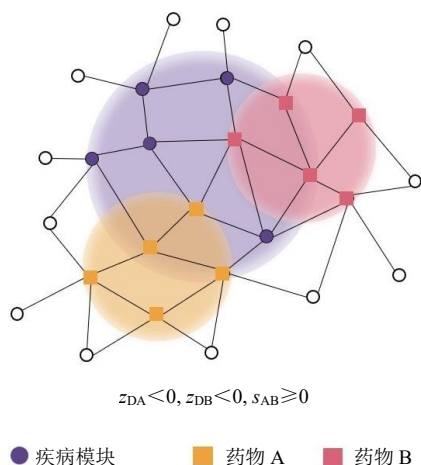


图 1 药物 A、B 靶点模块与疾病关键模块网络示意图

Fig. 1 Network diagram of drug A, B target module and disease key module

(IC_{50mix})。具体方法如下: BV2 细胞接种 24 h 后, 设置对照组、模型组、6-姜烯酚与杜仲醇配伍 (1: 2) 组、6-姜酚与杜仲醇配伍 (2: 1) 组。除对照组加入不含药物的培养基, 其余各组加入 0.1 μg/mL 的 LPS 溶液, 6-姜烯酚与杜仲醇配伍组再分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/L 的 6-姜烯酚和 1、2、3、4、5、6 μmol/L 的杜仲醇, 6-姜酚与杜仲醇配伍组再分别加入 2、4、6、8、10、12、14、16 μmol/L 的 6-姜酚和 1、2、3、4、5、6、7、8 μmol/L 的杜仲醇。给药处理 24 h 后, 按“2.4”项下方法计算 NO 抑制率。

采用等辐射分析图对 2 种药物配伍的结果进行分析^[16-17]: (1) 2 种药物单独作用时的 IC₅₀ 值分别标在 X、Y 轴上, 2 点相连后得到相加线, 即 2 种药物表现为单纯相加作用的等效曲线; (2) 将 2 种药物 IC₅₀ 值的 95% 置信区间的上限与下限分别用标注并用虚线相连, 虚线范围内即为 2 种药物相加作用的 95% 可信限; (3) 绘制两药配伍的比例线, 并计算两药配伍的理论半数抑制浓度 (IC_{50add}); (4) 将代表 IC_{50mix} 值与 IC_{50add} 值的坐标点分别标注在等辐射分析图中。若 IC_{50mix}=IC_{50add}, 且 IC_{50mix} 值落在 95% 可信限内, 则表示 2 种药物相互作用为相加; 若 IC_{50mix}<IC_{50add}, 且 IC_{50mix} 的坐标点落在 95% 可信限左侧, 则表示 2 种药物相互作用为协同; 若 IC_{50mix}>IC_{50add}, 且 IC_{50mix} 的坐标点落在 95% 可信限右侧, 则表示 2 种药物相互作用为拮抗。

$$IC_{50add}=IC_{50A}/(P_A+RP_B) \quad (4)$$

R 为 A、B 两药的效价比, $R=IC_{50A}/IC_{50B}$; IC_{50A}、IC_{50B} 分别为 A、B 单独作用的 IC₅₀ 值; P_A、P_B 分别为 A、B 在配伍中的占比

2.6 分析 6-姜烯酚、6-姜酚与杜仲醇的相互作用

相互作用指数 (γ) 亦可以用于评价 2 种药物之间的相互作用的效果^[18-19]。通过分析两药配伍后各自的实测半数抑制浓度 (IC_{50Amix}、IC_{50Bmix}) 与单独作用半数抑制浓度 (IC_{50A}、IC_{50B}) 之间的关系, 若 γ=1, 表示 2 种药物相互作用为相加; 若 γ<1, 表示 2 种药物相互作用为协同; 若 γ>1, 表示 2 种药物相互作用为拮抗。

$$\gamma=IC_{50Amix}/IC_{50A}+IC_{50Bmix}/IC_{50B} \quad (5)$$

IC_{50A}、IC_{50B} 分别为 A、B 单独作用的 IC₅₀ 值; IC_{50Amix}、IC_{50Bmix} 分别为 A、B 的配伍后各自的 IC₅₀ 值

2.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Excel 2020 和 GraphPad

Prism 9 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 基于疾病模块与药物-靶点模块网络的药物组合筛选及协同作用预测

对单细胞 RNA 测序数据集 GSE184950 中健康人群与 PD 患者的小胶质差异表达基因进行分析, 并将这部分基因映射到该研究团队所整合建立的人类 PPI 网络^[14]中, 作为本研究中的关键疾病模块。

采用 TCMSP 数据库收集药物活性成分靶点, 但由于 TCMSP 数据库收录信息的有限性, 并未查询到石斛的活性成分与靶点信息, 因此在后续研究中主要关注“杜仲-干姜”有效成分之间的协同作用。通过检索杜仲、干姜活性成分的作用靶点, 共得到干姜活性成分 6-姜烯酚 7 个靶点, 6-姜酚 26 个靶点, 杜仲活性成分杜仲醇 6 个靶点、1-去氧杜仲醇 3 个靶点, 利用 Gene 数据库对所收集的靶点进行基因名称转换, 并将 4 种活性成分的靶点映射到 PPI 网络中, 表示每种药物作用的靶点模块。

为明确药物-靶点模块与疾病模块之间的关系, 使用文献中提供的代码^[13]对网络间的拓扑距离进行计算, 得到的结果如表 1、2 所示。对 1-去氧杜仲醇-靶点模块与疾病模块进行计算, $z>0$, 表示 1-去氧杜仲醇-靶点模块与疾病模块在网络中属于分离关系, 因此认为该成分在 PD 神经炎症方面不具有治疗作用, 而对 6-姜烯酚、6-姜酚、杜仲醇靶点模

表 1 杜仲方入脑成分的药物-靶点模块和疾病模块的 z 值

Table 1 z-Values of drug-target module and disease module of components crossing blood-brain barrier in Duzhong Formula

药物	靶点	z
6-姜酚	26	-2.900 393 526
6-姜烯酚	7	-1.167 610 311
杜仲醇	6	-0.723 728 228
1-去氧杜仲醇	3	0.541 905 029

表 2 2 种药物组合的药物-靶点模块和疾病模块的 s_{AB} 值

Table 2 s_{AB}-Values of tow drug-target modules and disease module

药物 1	药物 2	s _{AB}
6-姜酚	6-姜烯酚	-0.058 333 333
6-姜酚	杜仲醇	0.180 555 556
6-姜酚	1-去氧杜仲醇	1.931 666 667
6-姜烯酚	杜仲醇	0.027 777 778
6-姜烯酚	1-去氧杜仲醇	1.964 285 714
杜仲醇	1-去氧杜仲醇	1.5

块与疾病模块进行计算, $z < 0$, 表示上述 3 种活性成分的靶点模块均与疾病模块在网络距离中重叠, 具有治疗作用。将 4 种活性成分进行两两组合后计算药物-靶点模块之间的距离, 结果如表 2 所示, 6-姜烯酚与 6-姜酚组合的药物-靶点模块在网络中相互重叠, 即 $s_{AB} < 0$, 其余药物组合的药物-靶点模块在网络中均相互分离, 即 $s_{AB} \geq 0$ 。

本研究使用 PD 中小胶质细胞活化相关的单细胞数据进行分析, 6-姜烯酚与杜仲醇、6-姜酚与杜仲醇的药物组合符合“互补接触”关系 ($z_{DA} < 0$ 、 $z_{DB} < 0$ 、 $s_{AB} \geq 0$), 因此预测这 2 种药物组合在抑制 PD 小胶质细胞炎性活化方面可能具有协同作用。

3.2 6-姜烯酚、6-姜酚、杜仲醇的体外抗炎作用

3.2.1 6-姜烯酚、6-姜酚、杜仲醇对 BV-2 细胞活力的影响 如图 2-A~C 所示, 6-姜烯酚在 $0.5 \sim 8 \mu\text{mol/L}$ 、6-姜酚在 $1 \sim 16 \mu\text{mol/L}$ 、杜仲醇在 $1 \sim 32 \mu\text{mol/L}$ 对 BV-2 细胞活力无影响。

3.2.2 6-姜烯酚、6-姜酚、杜仲醇对 LPS 诱导的 BV-2 细胞 NO 释放的抑制作用 采用 Griess 法测定了 6-姜烯酚、6-姜酚和杜仲醇对 LPS 诱导的 BV2 细胞上清液中 NO 释放量的影响, 并以 NO 浓度为指标绘制抑制曲线, 计算每种药物的 IC_{50} 。结果如图 2-D~F 所示, 6-姜烯酚、6-姜酚和杜仲醇抑制 NO 释放的 IC_{50} 分别为 2.971、13.06、7.407 $\mu\text{mol/L}$ 。

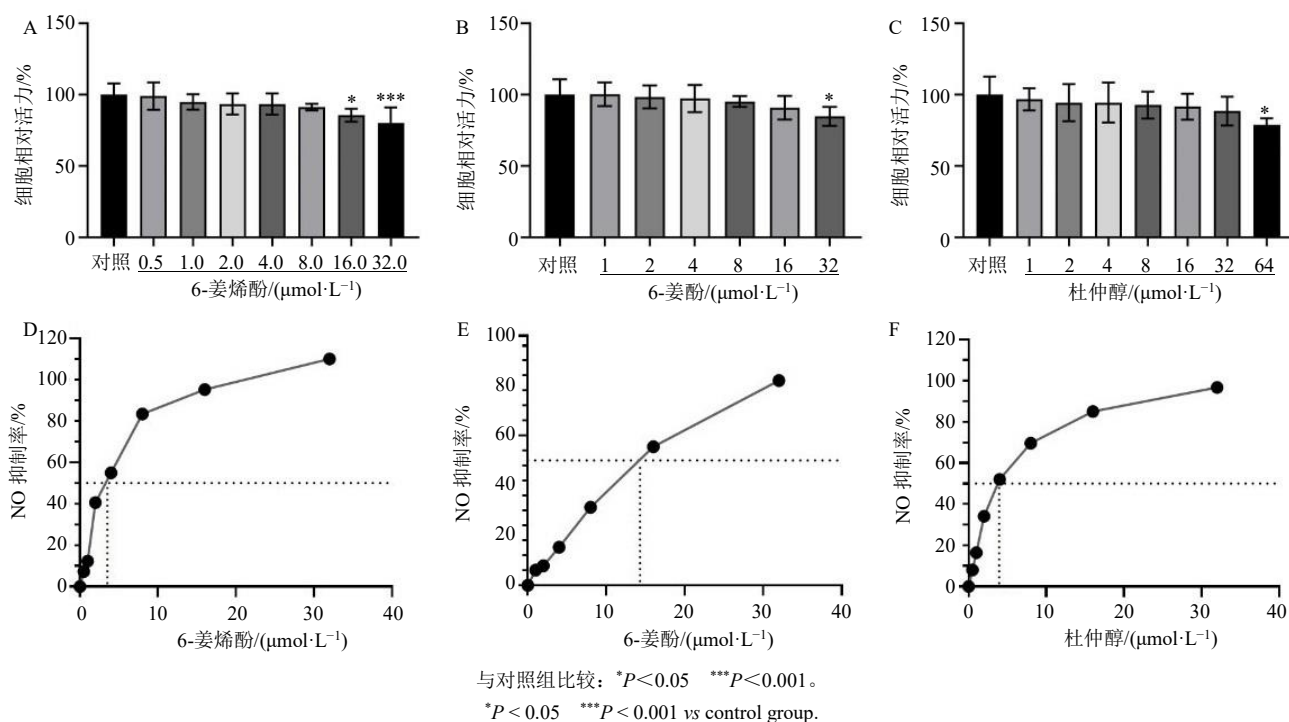


图 2 6-姜烯酚、6-姜酚和杜仲醇对 BV2 细胞活力 (A~C) 及 NO 抑制率 (D~F) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effects of 6-shogaol, 6-gingerol and eucommiol on viability (A~C) and NO inhibitory rate (D~F) in BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.3 6-姜烯酚、6-姜酚、杜仲醇配伍后的体外抗炎作用

3.3.1 两药配伍后的 NO 抑制率 等辐射分析法强调两药在产生同等药物效应的条件下进行计算, 6-姜烯酚、6-姜酚和杜仲醇抑制 NO 释放的 IC_{50} 分别为 2.971、13.060、7.407 $\mu\text{mol/L}$, 即 6-姜烯酚与杜仲醇 IC_{50} 比值为 1 : 2.49, 接近 1 : 2; 6-姜酚与杜仲醇 IC_{50} 比值为 1.838 : 1, 接近 2 : 1。为便于实验, 选择 6-姜烯酚与杜仲醇 1 : 2 配伍, 6-姜酚与杜仲醇 2 : 1 配伍。结果如表 3、4 所示, 固定配伍比

表 3 不同浓度 6-姜烯酚与杜仲醇配伍 (1 : 2) 的 NO 抑制率

Table 3 NO inhibitory rate of combination of 6-shogaol and eucommiol (1 : 2) at different concentrations

6-姜烯酚/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	杜仲醇/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	NO 抑制率/%
0.5	1.0	24.77
1.0	2.0	47.98
1.5	3.0	61.79
2.0	4.0	68.80
2.5	5.0	75.68
3.0	6.0	86.18

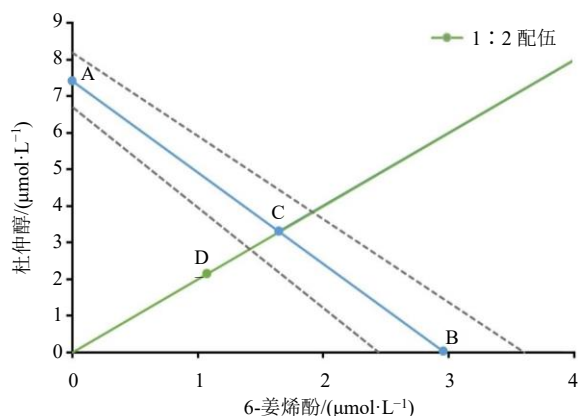
表 4 不同浓度 6-姜酚与杜仲醇配伍 (2 : 1) 的 NO 抑制率

Table 4 NO inhibitory rate of combination of 6-gingerol and eucommiol (2 : 1) at different concentrations

6-姜酚/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	杜仲醇/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NO 抑制率/%
2.0	1.0	37.08
4.0	2.0	48.59
6.0	3.0	55.15
8.0	4.0	60.97
10.0	5.0	67.01
12.0	6.0	76.48
14.0	7.0	79.71
16.0	8.0	96.46

例后,随着两药浓度的增加,2 种药物组合对 NO 释放的抑制作用也随之增加。经计算,6-姜烯酚与杜仲醇 1 : 2 配伍后,配伍组的 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 为 $3.231\ \mu\text{mol/L}$,两药各自的 $\text{IC}_{50\text{Amix}}$ 、 $\text{IC}_{50\text{Bmix}}$ 分别为 1.077 、 $2.154\ \mu\text{mol/L}$;6-姜酚与杜仲醇 2 : 1 配伍后,配伍组的 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 为 $6.225\ \mu\text{mol/L}$,两药各自的 $\text{IC}_{50\text{Amix}}$ 、 $\text{IC}_{50\text{Bmix}}$ 分别为 4.150 、 $2.075\ \mu\text{mol/L}$ 。

3.3.2 等辐射分析法评价 等辐射分析法采用相加线评价 2 种药物的相互作用,按照“2.5”项下方绘图。如图 3 所示,6-姜烯酚与杜仲醇 1 : 2 配伍



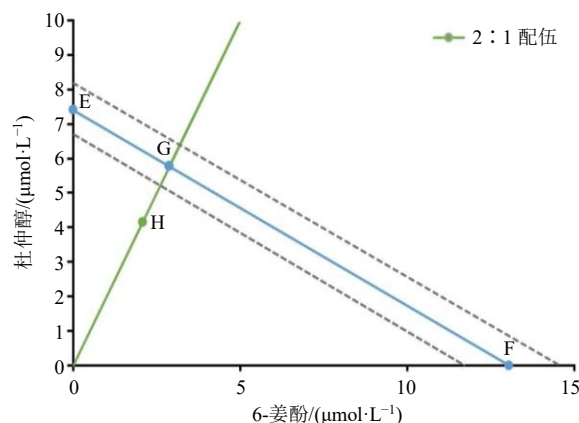
A 点表示杜仲醇单独作用的 IC_{50} 值; B 点表示 6-姜烯酚单独作用的 IC_{50} 值; 蓝色实线为两药相互作用的相加线; 虚线范围内为 95% 可信限; 绿色实线为 6-姜烯酚与杜仲醇配伍的比例线; C 点为相加线与比例线的交点,即配伍组的理论半数抑制浓度 $\text{IC}_{50\text{add}}$; D 点表示配伍组的实测半数抑制浓度 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 。

A represents IC_{50} value of single action of eucommiol; B represents IC_{50} value of single action of 6-shogaol; The blue solid line is addition line of interaction between two drugs; The dotted line is 95% confident area; The green solid line is proportion line of compatibility of 6-shogaol and eucommiol; C represents intersection of addition line and proportion line, which indicates $\text{IC}_{50\text{add}}$; D represents $\text{IC}_{50\text{mix}}$.

图 3 6-姜烯酚与杜仲醇配伍抑制 NO 释放的等辐射分析图

Fig. 3 Isobolographic analysis diagram of NO release inhibition by combination of 6-shogaol and eucommiol

的 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 落在相加线的 95% 可信限左侧,且 $\text{IC}_{50\text{mix}} < \text{IC}_{50\text{add}}$,即表示 6-姜烯酚与杜仲醇配伍后具有协同作用;如图 4 所示,6-姜酚与杜仲醇 2 : 1 配伍的 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 落在相加线的 95% 可信限左侧,且 $\text{IC}_{50\text{mix}} < \text{IC}_{50\text{add}}$,表示 6-姜酚与杜仲醇配伍后亦有协同作用。



E 点表示杜仲醇单独作用的 IC_{50} 值; F 点表示 6-姜酚单独作用的 IC_{50} 值; 蓝色实线为两药相互作用的相加线; 虚线范围内为 95% 可信限; 绿色实线为 6-姜酚与杜仲醇配伍的比例线; G 点为相加线与比例线的交点,即配伍组的理论半数抑制浓度 $\text{IC}_{50\text{add}}$; H 点表示配伍组的实测半数抑制浓度 $\text{IC}_{50\text{mix}}$ 。

E represents IC_{50} value of the single action of eucommiol; F represents IC_{50} value of single action of 6-gingerol; The blue solid line is addition line of interaction between two drugs; The dotted line is 95% confident area; The green solid line is proportion line of compatibility of 6-gingerol and eucommiol; G represents intersection of addition line and proportion line, which indicates $\text{IC}_{50\text{add}}$; H represents $\text{IC}_{50\text{mix}}$.

图 4 6-姜酚与杜仲醇配伍抑制 NO 释放的等辐射分析图

Fig. 4 Isobolographic analysis diagram of NO release inhibition by combination of 6-gingerol and eucommiol

3.3.3 统计学分析结果 按照“2.6”项下方法计算配伍组的 γ ,6-姜烯酚与杜仲醇 1 : 2 配伍的 γ 值为 0.653 ,6-姜酚与杜仲醇 2 : 1 配伍的 γ 值为 0.719 ,均小于 1,表示 2 种药物配伍在抑制 PD 小胶质细胞炎性活化方面均具有协同作用。

4 讨论

中药是中医临床用药的基本形式,与化学药相比,中药通过多成分、多靶点、多途径发挥作用,这种整合调节作用是中药的特色,在慢性、多基因复杂疾病中体现出一定的优势。若要了解中药的作用机制及其配伍规律,就需要对中药及活性成分间的相互作用进行系统的研究。本研究以杜仲方有效成分协同抑制神经炎症为例,首次将网络医学的这种方法^[13]应用于预测中药具有协同作用的有效成分组合,并以等辐射分析法和统计学方法进行验证。

干姜及其活性成分应用于神经炎症方面的研究多有报道, 6-姜烯酚、6-姜酚作为干姜中的活性成分, 具有很好的药理活性^[20-21], 许多研究发现, 6-姜烯酚与 6-姜酚具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等作用, 其中, 抗炎活性可能与其下调炎症因子的表达、抑制前列腺素合成、抑制白细胞反应、下调核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达等有关^[22-24]。近年来, 关于杜仲有效成分的提取分离及活性研究也逐步丰富, 杜仲作为一种传统中药, 具有补肝肾、强筋骨、安胎的功效, 现代药理学研究认为其能够降血压, 增强机体免疫功能, 影响垂体-肾上腺皮质系统功能, 并具有镇痛、抗炎等作用^[25]。本研究发现杜仲醇具有抑制小胶质细胞 NO 释放的作用, 且分别与 6-姜烯酚和 6-姜酚联合应用时均具有协同效应, 具有开发为抑制神经炎症药物组合的潜力, 仍需进一步研究支持目前的结果。另外, 由于疾病及中药成分的复杂性, 中药的药理作用并不是单一作用于某一环节, 而是多环节共同调控, 本研究仅以神经炎症环节为例, 寻找到了抑制小胶质细胞释放 NO 的协同成分, 未来还应以更全面的指标评价其对于神经炎症及 PD 的作用, 同时结合单细胞转录组分析及其他技术对药物作用的多种环节进行评价。

中药经过 2 000 多年的临床筛选和使用, 具有明确的治疗作用, 为有效药物组合的发现提供了重要的资源。本研究采用基于网络的方法结合等辐射分析及统计学方法不仅能够揭示中药有效成分药理作用的复杂性, 还能为中药的临床应用提供科学依据。期待未来能与更系统的研究方法相结合, 不断完善和创新, 实现中药配伍科学化, 进一步推动中医药学的发展和现代化进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dong Y Y, Chang Y Q, Wang Y X, *et al.* MFSynDCP: Multi-source feature collaborative interactive learning for drug combination synergy prediction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2024, 25(1): 140.
- [2] Meyer C T, Wooten D J, Lopez C F, *et al.* Charting the fragmented landscape of drug synergy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(4): 266-280.
- [3] He B, Lu C, Zheng G, *et al.* Combination therapeutics in complex diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2231-2240.
- [4] Jia J, Zhu F, Ma X H, *et al.* Mechanisms of drug combinations: Interaction and network perspectives [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(2): 111-128.
- [5] Li L L, Fan S S, Zhang W Q, *et al.* Duzhong Fang attenuates the POMC-derived neuroinflammation in parkinsonian mice [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3261-3276.
- [6] Fan S S, Yin Q S, Li D N, *et al.* Anti-neuroinflammatory effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. in a Parkinson's mouse model through the regulation of p38/JNK-Fos12 gene expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113016.
- [7] Guo H, Shi F, Li M J, *et al.* Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. and its bioactive constituent work via ameliorating the ubiquitin-proteasome system [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 151.
- [8] 李莉莉, 马宁宁, 范姗姗, 等. 杜仲不同提取物对帕金森病小鼠的治疗作用及谱效关系研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1400-1406.
- [9] Song L L, Yin H Q, Han R, *et al.* Metabolism of Du Zhong Formula in rats using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Mass Spectrom*, 2022, 57(1): e4795.
- [10] Wang Q, Wang M H, Choi I, *et al.* Molecular profiling of human substantia nigra identifies diverse neuron types associated with vulnerability in Parkinson's disease [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(2): eadi8287.
- [11] Tan Z Y, Chen X R, Zuo J M, *et al.* Comprehensive analysis of scRNA-Seq and bulk RNA-Seq reveals dynamic changes in the tumor immune microenvironment of bladder cancer and establishes a prognostic model [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 223.
- [12] 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.
- [13] Cheng F X, Kovács I A, Barabási A L. Network-based prediction of drug combinations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1197.
- [14] Guney E, Menche J, Vidal M, *et al.* Network-based in silico drug efficacy screening [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10331.
- [15] Gessner P K. Isobolographic analysis of interactions: An update on applications and utility [J]. *Toxicology*, 1995, 105(2/3): 161-179.
- [16] Golub V, Ramakrishnan S, Reddy D S. Isobolographic analysis of adjunct antiseizure activity of the FDA-approved cannabidiol with neurosteroids and benzodiazepines in adult refractory focal onset epilepsy [J]. *Exp Neurol*, 2023, 360: 114294.
- [17] 陈鸿潘, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用 [J]. *国外医学麻醉学与复苏分册*, 2004, 25(5): 267-269.

- [18] 潘雪梅, 胡鹏刚, 罗志军, 等. 基于 Isobologram 方法探究五倍子单宁与 Vc、SOD 的协同抗氧化作用 [J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(2): 40-48.
- [19] Chen C, Wang Y H, Zhao X P, *et al.* Combined toxicity of butachlor, atrazine and λ -cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 393-401.
- [20] 谢燕飞, 王冉, 朱金华, 等. 6-姜酚对脂多糖致 RAW264.7 细胞炎症模型的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 72-75.
- [21] Ballester P, Cerdá B, Arcusa R, *et al.* Effect of ginger on inflammatory diseases [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7223.
- [22] 侯以森, 刘雅范, 张晓雨, 等. 6-姜烯酚药理作用的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 132-135.
- [23] Bischoff-Kont I, Fürst R. Benefits of ginger and its constituent 6-shogaol in inhibiting inflammatory processes [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(6): 571.
- [24] Kou X R, Wang X Q, Ji R Y, *et al.* Occurrence, biological activity and metabolism of 6-shogaol [J]. *Food Funct*, 2018, 9(3): 1310-1327.
- [25] 穆文碧, 陈启洪, 段灿灿, 等. 杜仲的活性成分及其药动学研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2598-2604.

[责任编辑 李亚楠]