

· 论著 ·

基于网络药理学对茵连痛风颗粒抗炎镇痛作用的机制研究

徐 熠¹, 刘 静¹, 黄 瑾¹, 崔金刚² (1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科, 上海 200437; 2. 上海市中医药研究院中西医结合临床研究所, 上海 200437)

[摘要] 目的 通过网络药理学研究方法探讨茵连痛风颗粒抗炎镇痛作用的可能作用机制。方法 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 收集茵连痛风颗粒主要活性成分, 预测其作用靶点; 利用蛋白质互作网络信息建立药物与抗炎镇痛相关靶基因之间的相互作用关系, 进行 KEGG 与 GO 功能富集分析。结果 茵连痛风颗粒中与抗炎镇痛密切相关的靶点共有 37 个, 主要包括前列腺素过氧化物合酶 2 (PTGS2)、白介素-6 (IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 (TNF) 等潜在作用靶点, 这些靶点的作用机制主要与调节核转录因子 B 信号 (NF- κ B) 等通路相关。结论 该研究从多维度预测了茵连痛风颗粒多靶点抗炎镇痛的作用机制, 为进一步验证该制剂临床作用机制提供理论依据。

[关键词] 茵连痛风颗粒; 抗炎镇痛; 网络药理学

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)03-0226-06

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202007014

Anti-inflammatory and analgesic activity analysis of Yinlian Tongfeng granules based on network Pharmacology

XU Yi¹, LIU Jing¹, HUANG Jin¹, CUI Jingang² (1. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437; 2. Clinical Research Institute of Integrative Medicine, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-inflammatory and analgesic mechanism of Yinlian Tongfeng granules by network pharmacology. **Methods** Three main active components of Yinlian Tongfeng granules were collected from TCMSP database to predict its effective targets. Based on the network information of active components and targets, the anti-inflammatory and analgesic related targets were established by using protein-protein interaction information. The enrichment analysis of KEGG biological pathway and go function enrichment were carried out to construct the active component-target-signal pathway network and explain the main mechanism of anti-inflammatory and analgesic. **Results** 37 targets were closely related to anti-inflammation and analgesic effects of Yinlian Tongfeng granules, mainly on Prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factors (TNF). The mechanism of action may relate to the regulation of nuclear transcription factor B signaling pathway (NF- κ B). **Conclusion** The study predicted the anti-inflammatory and analgesic mechanism of Yinlian Tongfeng granules, and provided theoretical basis for further verification and interpretation of its mechanism.

[Key words] Yinlian Tongfeng granules; anti-inflammatory and analgesic activity; network pharmacology

痛风在中医理论中属于“痹证”、“白虎历节”范畴^[1]。中医辨证分型主要有湿热蕴结型、寒湿痹阻型、肝肾亏虚型、痰瘀痹阻型、瘀血阻滞型、脾

虚湿盛型和寒热错杂型^[2], 在治疗上主要以泄浊利湿、通络止痛为主^[3]。茵连痛风颗粒为上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院自制制剂, 是著名夏氏外科传人夏涵教授数十年的经典经验方。该制剂由茵陈、连钱草和伸筋草三味中药组成, 用于治疗间歇期痛风性关节炎^[4]。茵连痛风颗粒的成分多样, 前期研究中发现其不同部位群对痛风模型大鼠均有不同程度的抗炎镇痛作用^[5], 但其作用有效成分和疾病靶标的关系尚不明确, 抗炎镇痛作用可能与香豆素^[6]、黄酮、有机酸^[7]、三萜类、生物碱类以及蒽醌类^[8]等成分有关。因此, 笔者采用网络药理学方法对茵连痛风颗粒的抗炎镇痛作用机制进行

[基金项目] 上海市卫计委科研课题-青年项目 (20174Y0194); 岳阳中西医结合医院院级基金 (2018YJ06); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划-临床药师项目 (沪卫计人事【2019】72号); 上海中医药大学第二批临床师资“优教”项目资助 (新锐培训计划)

[作者简介] 徐 熠, 硕士, 主管药师, 研究方向: 医院药学及中药临床药学, Email: emilyxy2011@163.com

[通信作者] 黄 瑾, 博士, 主任药师, 研究方向: 医院药学及中药临床药学, Email: john70550@163.com

分析,预测茵连痛风颗粒的主要活性成分和潜在靶标部位,以期为该制剂建立临床疗效的质量评估体系提供支持。

1 材料与方法

1.1 茵连痛风颗粒活性成分及靶点的筛选

本研究利用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP)^[9](<http://tcmssp.com/tcmssp.php>) 检索获得茵连痛风颗粒中三味中药的化学成分,通过 TCMSP 筛选出化学成分对应的数据,预测成分的口服利用度 (OB) 和类药性 (DL)^[10],以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,筛选出活性成分,再将其依次输入 TCMSP,查找得到潜在的靶点蛋白,并通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)^[11] 匹配蛋白所对应的基因。

1.2 茵连痛风颗粒活性成分-预测靶点网络的构建

将茵连痛风颗粒的活性成分及潜在靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件 (<http://www.cytoscape.org/>),构建并预测茵连痛风颗粒的活性成分及靶点网络。

1.3 抗炎镇痛靶点的收集

基于 OMIM 数据库^[12] 检索抗炎、镇痛相关靶点蛋白基因,搜索关键词 "pain"、"ache"、"soreness"、"inflammation"、"inflammatory",所有靶标均通过 UniProt 数据库获取其 UniProt ID 信息。

1.4 茵连痛风颗粒蛋白互作网络的构建

将 OMIM 中获取到的蛋白质信息导入 STRNG 数据库,筛选出蛋白相互作用分值 >0.7 的高置信数据^[13],用 Cytoscape 3.7.2 构建与抗炎镇痛有关的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。

1.5 网络合并

利用 Cytoscape 3.7.2 中的 Merge 功能,将茵连痛风颗粒活性成分-预测靶点网络与抗炎镇痛的 PPI 网络合并,确定两者共有的潜在作用靶点。通过 Cytoscape 3.7.2 构建茵连痛风颗粒活性成分-潜在靶点网络,并分析茵连痛风颗粒抗炎镇痛的潜在靶点。

1.6 通路及生物过程的富集分析

采用 David v6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)^[14-16],对与抗炎镇痛相关的茵连痛风颗粒活性成分-潜在靶点网络中的蛋白进行基于基因组百科全书 (KEGG) 的生物通路富集分析,并利用 OmicShare 对通路进行可视化,采用 David v6.8 数据库,对与抗炎镇痛相关的茵连痛风颗粒活性成分-潜在靶点网络中的蛋白进行基因本体 GO 功能富集分析^[13]。

2 结果

2.1 茵连痛风颗粒活性成分筛选

在 TCMSP 数据库中搜索“茵陈”、“连钱草”、“伸筋草”三味中药的化学成分,共得到 175 个化学成分,以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,删除无对应靶点的成分,共获得 23 个潜在有效成分(表 1),其中,茵陈和连钱草共有成分为槲皮素和 β -谷甾醇^[17](图 1)。

表 1 茵连痛风颗粒 23 个有效活性成分及其 OB 及 DL 值

编号	活性成分	OB(%)	DL	来源
YC1	异鼠李素	49.60	0.31	茵陈
A1	β -谷甾醇	36.91	0.75	茵陈
YC2	茵陈黄酮	48.96	0.41	茵陈
YC3	芫花素	37.13	0.24	茵陈
YC4	蓟黄素	30.35	0.30	茵陈
YC5	异茵陈黄酮	57.40	0.41	茵陈
YC6	紫杉醇	46.11	0.33	茵陈
YC7	依帕替丁	42.55	0.37	茵陈
YC8	茵陈色原酮	57.56	0.31	茵陈
YC9	4'-甲基茵陈色原酮	72.18	0.35	茵陈
YC10	脱甲氧基姜黄素	52.33	0.25	茵陈
YC11	茵陈黄酮A	68.32	0.24	茵陈
A2	槲皮素	46.43	0.28	茵陈
LQC1	金合欢素	34.97	0.24	连钱草
LQC2	蒙花苷	39.84	0.71	连钱草
LQC3	丁子香酚	55.38	0.78	连钱草
A1	β -谷甾醇	36.91	0.75	连钱草
LQC4	山奈酚	41.88	0.24	连钱草
LQC5	木犀草素	36.16	0.25	连钱草
A2	槲皮素	46.43	0.28	连钱草
SJC1	谷甾醇	36.91	0.75	伸筋草
SJC2	福莫尼汀	69.67	0.21	伸筋草
SJC3	豆甾醇	43.83	0.76	伸筋草

2.2 茵连痛风颗粒活性成分-靶点网络的构建

将筛选出的 23 个茵连痛风颗粒潜在有效成分导入到 TCMSP,查找相应的靶点,得到 686 个潜在靶点蛋白,并利用 Uniprot 数据库匹配对应基因。将结果导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中进行网络构建,得到茵连痛风颗粒活性成分靶点网络(图 2)。该网络包含 228 个节点、686 条边,红色六边形表示茵陈特有的活性成分、紫色六边形表示连钱草特有的活性成分、绿色六边形表示伸筋草特有活性成

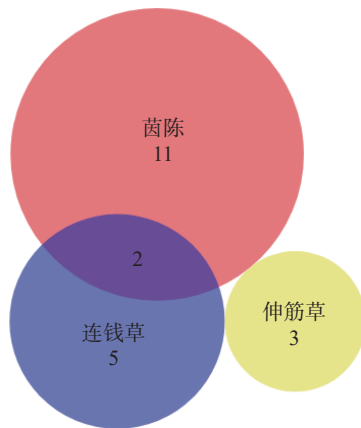


图1 茵连痛风颗粒有效活性成分韦恩图

分、黄色箭头表示两个成分共有的活性成分、粉色菱形表示单味药的作用靶点、湖绿色菱形表示两味药共同的作用靶点、蓝色菱形表示三味药共同的作用靶点。如图2所示,23个茵连痛风颗粒的活性成分均具有多靶点,不同靶点可对应相同成分,不同的成分可对应相同的靶点。

2.3 抗炎镇痛靶点信息的收集和筛选

在 OMIM 数据库检索与抗炎镇痛相关的基因,共检索到 286 个相关基因靶点。与茵陈活性成分

分共有 32 个共同靶基因,与连钱草活性成分共有 35 个共同靶基因,与伸筋草活性成分共有 7 个共同靶基因(图3)。

2.4 茵连痛风颗粒抗炎镇痛靶标蛋白-蛋白相互作用分析及网络可视化构建

将茵连痛风颗粒预测所得的基因与抗炎镇痛相关基因进行映射后得到共有靶基因,输入 STRNG 数据库进行蛋白-蛋白相互作用分析。在分析过程中,选取物种为 Homosapiens,并将蛋白-蛋白互作得分>0.7的基因输入 Cytoscape 3.7.2 进行网络可视化,共有 37 个节点,285 个连线。应用软件中的 NetworkAnalysis plugin 对网络图中节点进行统计,分析其在图中的作用,自由度越大,该节点在网络中的生物功能则越多。同时,颜色越深代表该节点自由度较大、生物功能较多(图4)。进一步对与抗炎镇痛潜在靶点网络进行分析,网络中有 17 个靶点的自由度值大于平均值 15.41,预测可能为茵连痛风颗粒活性成分发挥抗炎镇痛疗效的潜在靶点。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析

利用 David 平台进行 GO 功能富集分析,得到

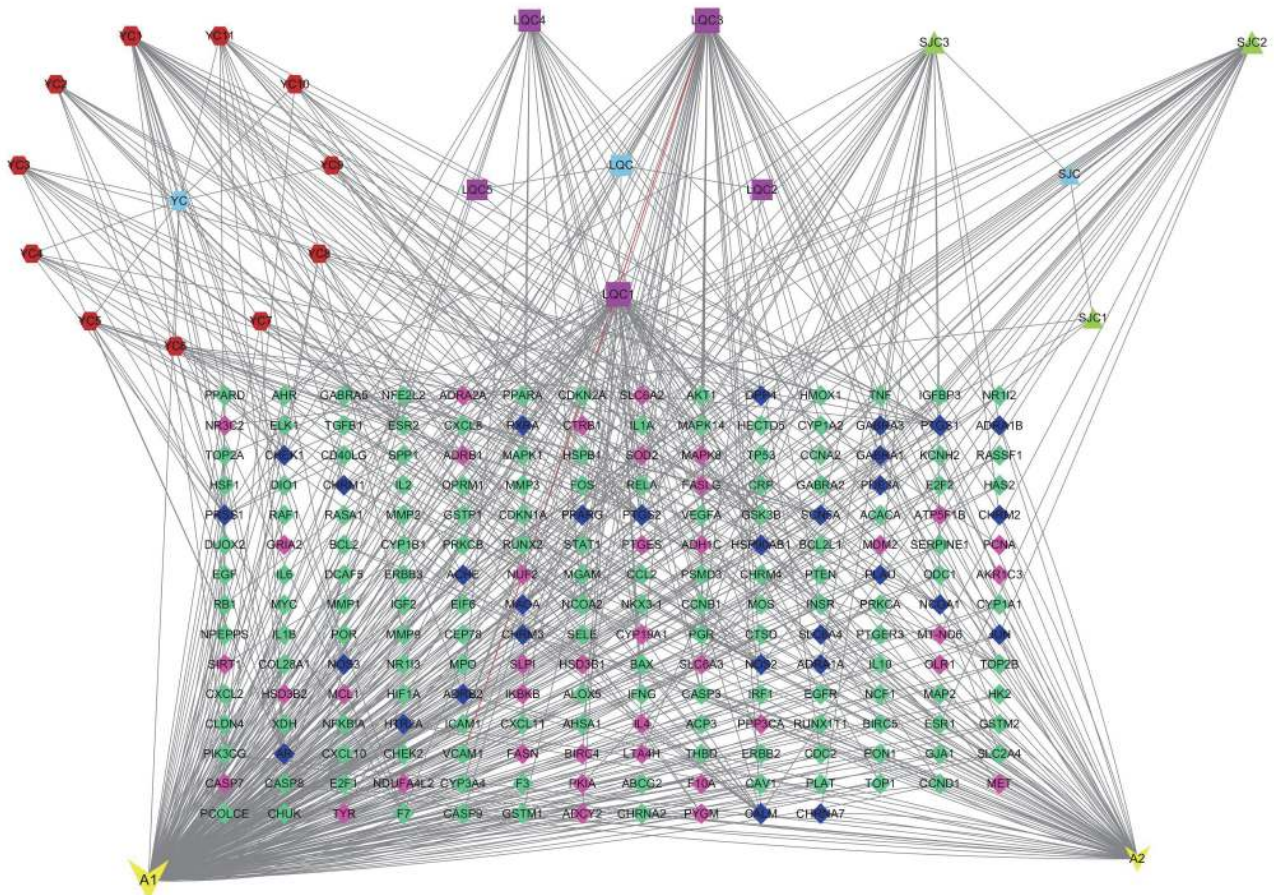


图2 茵连痛风颗粒主要活性成分-靶点网络

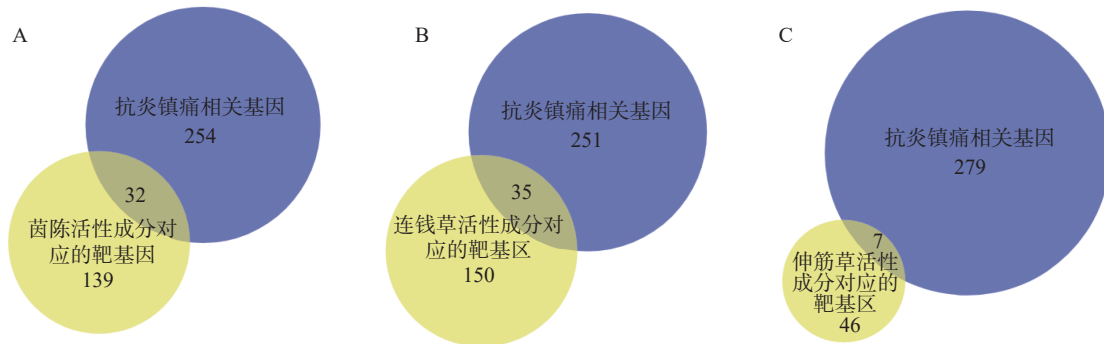


图 3 茵连痛风颗粒活性成分相关基因与抗炎镇痛相关基因

A. 茵陈活性成分对应的靶基因与抗炎镇痛相关基因共同靶基因; B. 连钱草活性成分对应的靶基因与抗炎镇痛相关基因共同靶基因; C. 伸筋草活性成分对应的靶基因与抗炎镇痛相关基因共同靶基因。

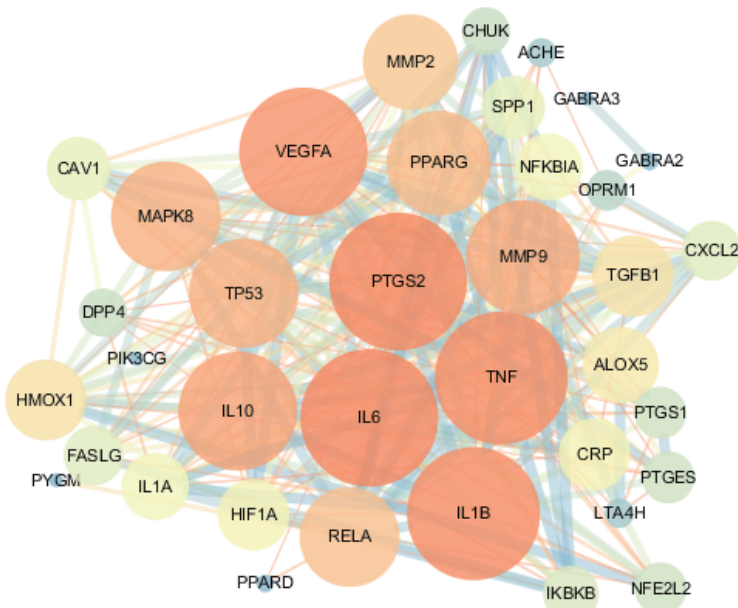


图 4 茵连痛风颗粒抗炎镇痛蛋白-蛋白相互作用图

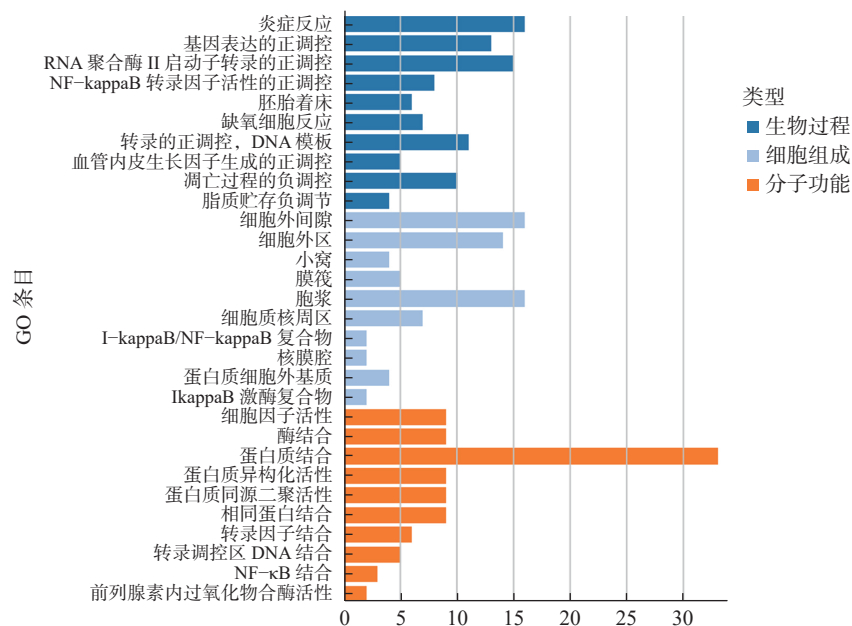


图 5 茵连痛风颗粒抗炎镇痛靶点的 GO 富集

了293个GO条目,根据 $P<0.05$ 筛选出211个GO条目,针对前10条BP分析、CC分析、MF分析绘制直方图(图5)。其中,生物过程条目170条,主要包括炎症反应、基因表达的正调控、IL-6的正调控等;细胞组成条目16个,主要包括I-kappaB/NF-kappaB复合体、细胞质核周区域、GABA-A受体复合物等;分子功能条目25条,主要包括细胞因子活性、酶结合、蛋白质异二聚活性等。

利用David平台的KEGG通路富集分析功能,得到79条信号通路,根据 $P<0.001$ 筛选出50条信号通路(图6);包括TNF信号通路、NOD受体信号通路、NAFLD、MAPK信号通路、Ras信号通路、核转录因子B信号通路等。

2.6 活性成分-靶点-通路图的构建

基于上述信息,构建活性成分-靶点-通路图,以全面阐述茵连痛风颗粒抗炎镇痛的作用机制(图7);图中有112个节点和462条边,绿色菱形代表茵连痛风颗粒活性成分,红色圆形代表潜在靶点,黄色箭头代表信号通路,边代表三者之间的相互作用,节点越大表示其抗炎镇痛的作用越大。

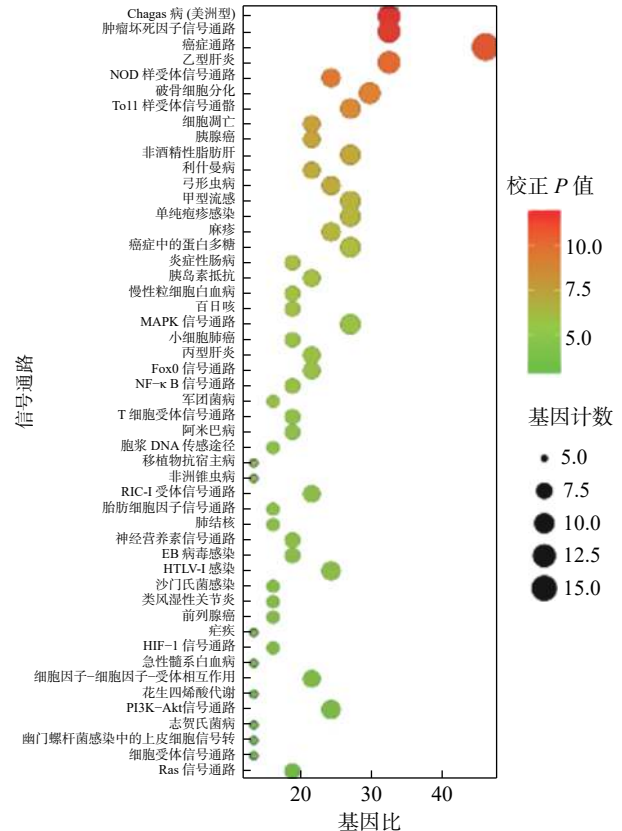


图6 茵连痛风颗粒抗炎镇痛关键靶基因KEGG通路富集

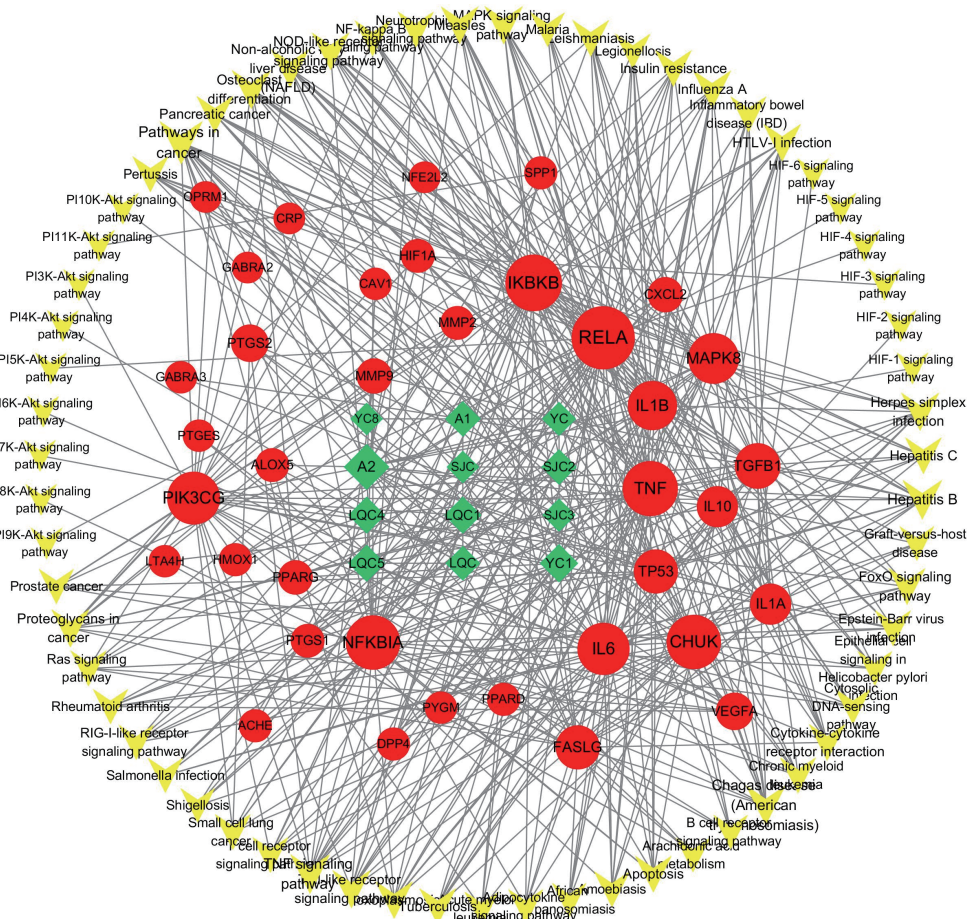


图7 茵连痛风颗粒抗炎镇痛活性成分-靶点-信号通路网络

3 讨论

茵陈连痛颗粒由茵陈、连钱草和伸筋草三味中药组成,茵陈具有清利湿热、利胆退黄的功效;连钱草具有利湿通淋,清热解毒,散瘀消肿的功效;伸筋草具有祛风除湿、舒筋活络的功效。三者合用增强了清热利湿,通络止痛的作用^[18]。

本研究通过 TCMSP、Uniprot 数据库筛选潜在的抗炎镇痛活性成分,得出槲皮素、 β -谷甾醇、茵陈色原酮、异鼠李素等 23 个黄酮类、甾体类成分。这些成分与现有文献报道中关于抗炎镇痛的活性成分相符^[19-22]。其中,共有成分槲皮素为黄酮类化合物,有研究表明槲皮素对炎症反应具有良好的抑制作用,对化学刺激疼痛模型和热刺激疼痛模型均有显著的镇痛作用^[23]。共有成分 β -谷甾醇为甾体类化合物,具有类似于氢化可的松的抗炎活性,其抗炎机制主要是通过局部免疫调节来发挥抗炎作用^[24]。

通过 OMIM 数据库、STRNG 数据库及 Cytoscape 软件构建抗炎镇痛靶标蛋白-蛋白交互网络,揭示茵陈连痛颗粒通过多靶点起到抗炎镇痛的作用。本研究共得到 PTGS2、TNF、IL-6、IL-10 等 37 个茵陈连痛颗粒抗炎镇痛的关键靶点。前列腺素内过氧化物合酶 PTGS), 又称为环氧合酶(COX), 存在两个亚型,即 COX-1 和 COX-2^[25]。PTGS2 产生炎症性前列腺素,参与炎症的发生,同时与其他预测所得出的靶点都有密切联系^[26-27]。TNF^[28]、IL-6 有镇痛和痛觉增敏的作用,IL-10 有活性较强的抗炎作用,除具抑制促炎细胞因子的产生外,还能促进其他抗炎因子的产生、下调促炎因子受体的表达^[29]。PTGS2 等靶点是抗炎镇痛的关键靶点,在炎症反应、基因表达等生物过程中起着至关重要的作用。

KEGG 富集结果表明,茵陈连痛颗粒抗炎镇痛关键靶点基因显著富集在 TNF 信号通路、MAPK 信号通路、核转录因子 B 信号通路等。茵陈中的黄酮类成分具有重要的抗炎活性,其潜在的抗炎机制可能与其对 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的抑制有关^[6]。研究表明^[30],茵陈色原酮通过 JNK 途径激活转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及其下游靶标血红素加氧酶 1(HO-1)水平,减弱 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应,也可有效抑制 MyD88 和 Toll/IL-1 接头蛋白(TIRAP)介导的信号通路,进而抑制 LPS 诱导的 NF- κ B、蛋白激酶 B(Akt)和 MAPK 激活的炎症基因活化,从而发挥抗炎作用。

综上所述,本研究基于网络药理学,对茵陈连痛颗粒抗炎镇痛的多成分、多靶点和多信号通路进

行相关性研究,初步揭示了茵陈连痛颗粒中三味中药的抗炎镇痛分子机制,为进一步开展和实验验证茵陈连痛颗粒抗炎镇痛作用机制提供理论依据。

【参考文献】

- [1] 邓丰承,邓允英. 清热祛湿方结合关节镜清术治疗膝关节炎性关节炎的疗效分析[J]. *中国处方药*, 2018, 16(2): 108-109.
- [2] 孙广瀚,刘健,龙琰,等. 中医药治疗痛风性关节炎的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(8): 64-67, 80.
- [3] 黄艳霞. 中医疗法治疗痛风性关节炎用药规律分析[J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30(2): 111-112.
- [4] 陈娜,张明,王一飞. 茵陈连痛颗粒治疗间歇期痛风性关节炎临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(7): 883-885.
- [5] 刘静,徐玲玲,徐熠. 痛风颗粒抗痛风有效部位群研究[J]. *中草药*, 2013, 44(5): 590-594.
- [6] 刘玉萍,邱小玉,刘烨,等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(9): 2235-2241.
- [7] 陈利华,李欣. 连钱草化学成分及药理作用研究[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(15): 33-35.
- [8] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等. 伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(2): 297-304.
- [9] 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(1): 1-6.
- [10] XU X, ZHANG W X, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [11] ZHANG Y Q, MAO X, GUO Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines[J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [12] RAPPAPORT N, TWIK M, PLASCHKES I, et al. MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D877-D887.
- [13] 张思旋,林茜,吴嘉瑞,等. 基于网络药理学的“苍术-黄柏”药对治疗痛风作用机制研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2019, 19(8): 927-933.
- [14] JIAO X, SHERMAN B T, HUANG D W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(13): 1805-1806.
- [15] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [16] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1-13.
- [17] HULSEN T, DE Vlieg J, ALKEMA W. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 1-6.

(下转第 254 页)

optosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway[J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31(1): 70-77.

- [5] SANDAI D, TABANA YM, OUWEINI AE, et al. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, 9(11): e37385.
- [6] HARVEY AL, EDRADA ER, QUINN RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era[J]. *Nat*

Rev Drug Discov, 2015, 14(2): 111-129.

- [7] MORALES DK, JACOBS NJ, RAJAMANI S, et al. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(6): 1379-1392.

[收稿日期] 2021-03-26 [修回日期] 2021-05-07

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 231 页)

- [18] 徐熠. 茵陈痛风颗粒的质量控制研究及初步药效学评价[D]. 上海: 上海中医药大学, 2011.
- [19] 李墨娇, 刘杰, 张玉波, 等. 伸筋草的化学成分研究[J]. *中草药*, 2015, 46(1): 33-37.
- [20] 刘杰, 李国强, 吴霞, 等. 连钱草的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(4): 695-698.
- [21] 章林平, 孙倩, 王威, 等. 茵陈有效成分的药理作用及其临床应用的研究进展[J]. *抗感染药学*, 2014, 11(1): 28-31.
- [22] WANG X, HUANG H, MA X P, et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from *Artemisia scoparia* Waldst. et kit. in vitro and in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 390-403.
- [23] 黄敬群, 宋扬, 赵鹏, 等. 槲皮素对急性痛风性关节炎的抗炎、镇痛实验研究[J]. *海峡药理学*, 2013, 25(7): 64-67.
- [24] 李荣华. 痛风康对急性痛风性关节炎的抗炎作用及对TLRs/MyD88通路的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [25] 郭璐, 夏道宗, 骆叶姣, 等. 基于网络药理学探讨土茯苓治疗痛风的作用机制[J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1413-1418.

- [26] BAS E, RECIO M C, GINER R M, et al. Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*[J]. *Planta Med*, 2006, 72(2): 136-142.
- [27] SAKATA C, KAWASAKI T, IWATSUKI Y, et al. Inhibitory effects of ASP6537, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, on thrombosis and neointima formation in rats[J]. *Thromb Res*, 2017, 157: 72-78.
- [28] 李艳华. 四妙君逸软膏对肛肠病术后疼痛模型大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-10影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [29] 崔允强. 补肾强骨方治疗膝关节骨性关节炎的疗效及对患者血清TNF- α 、IL-6和IL-10的影响[J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(4): 831-833.
- [30] KIM J, LIM J, KANG B Y, et al. Capillarisin augments anti-oxidative and anti-inflammatory responses by activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Neurochem Int*, 2017, 105: 11-20.

[收稿日期] 2020-07-02 [修回日期] 2020-09-03

[本文编辑] 李睿旻