

· 思路与方法学 ·

基于网络药理学方法的雷公藤药理、毒理机制研究

许可嘉¹ 赵雨坤² 顾 颢² 张 弛² 吕爱平² 李 健¹

摘要 目的 应用网络药理学方法对雷公藤可能的药理及毒理机制进行再研究,为该药物的合理使用和深度研发提供新的研究策略。**方法** 借助多个在线数据库资源(SinoMed, Polysearch, DrugBank, David),挖掘雷公藤中已知化合物的生物学信息,筛选相似药物及与雷公藤相关性高的疾病,获取高相似度药物的编号和高相关性疾病的对应靶标,构建雷公藤化合物靶标“蛋白-蛋白”相互作用(PPI)网络及“在靶、脱靶”相关分子网络。**结果** 除已知的抗类风湿等药理作用外,雷公藤各组分具有潜在的抗肿瘤、抗氧化等活性;雷公藤化合物在靶效应主要与机体的免疫调节功能有关,脱靶效应则参与细胞增殖、凋亡、炎症反应等重要生物化学反应过程,间接提示雷公藤的脱靶效应可能对应其副反应(毒性)。**结论** 网络药理学研究方法从系统、非线性层面挖掘雷公藤既有知识之间的联系,通过分析对应靶标间相互关系及直接作用模式,揭示潜在的抗肿瘤、抗氧化等活性,为其相应的分子药理机制研究提供新的方向。

关键词 网络药理学;雷公藤;药理;毒理

Based on Network Pharmacological Approaches to Re-study the Pharmacology and Toxicity Mechanism of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. XU Ke-jia¹, ZHAO Yu-kun², GU Hao², ZHANG Chi², LU Ai-ping², and LI Jian¹ 1 School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing(100029); 2 Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing(100700)

ABSTRACT Objective Using network pharmacology methods, the pharmacological and toxicological mechanisms of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. were restudied for providing some new data and research strategy on its development and application. **Methods** The protein-protein interaction networks of drug targets, the on-target and off-target related networks were built by using some online database (SinoMed, Polysearch, DrugBank, David etc.). The biological information, pathways, and functions were obtained by network analysis. **Results** Besides anti-rheumatoid, the active pharmaceutical ingredients of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. showed anti-tumor, anti-oxidation. The on-target effect of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. was related to regulate immune function. Taking part in process of cell proliferation, apoptosis and inflammation, the off-target effect of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. has been indirectly suggesting the relationship with its side effects. **Conclusions** The network pharmacology method explores the connection between the existing knowledge of *Tripterygium Wilfordii* from the system and nonlinear levels, and analyzes the relationship between the corresponding targets and the direct-action model to reveal the potential anti-tumor and anti-oxidation activities for their corresponding molecules. The study of network pharmacological provides a new mechanism research direction.

KEYWORDS network pharmacology; *Tripterygium Wilfordii* Hook F.; pharmacology; toxicity

雷公藤(*Tripterygium Wilfordii* Hook F.)具有祛

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81273884, No. 8150141694)

作者单位: 1. 北京中医药大学基础医学院(北京 100029); 2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所(北京 100700)

通讯作者: 李 健, Tel: 010-64286762, E-mail: lijian@bucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20180412.015

风湿、通络止痛、消肿止痛、解毒杀虫等作用,已被开发为多种中成药(如雷公藤多苷片、雷公藤片、雷公藤双片片和雷公藤总萜片),因其出色的疗效引起学术界广泛重视^[1-3]。然而,雷公藤的不良作用也不容忽视。大量临床研究发现,服用雷公藤制剂一段时间,部分患者会出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻等消化道症状^[4,5];女性患者会伴有月经周期紊乱、经期延长、闭经、不孕;男性患

者有精子数量显著减少、活动力下降、畸形率增加不良反应^[6]。此外,长期或过量服用雷公藤制剂还可诱发明显的肝、肾毒性^[7]。上述不良反应在很大程度上限制了雷公藤的临床应用和深度开发,相关药理及毒理机制的研究急需深入开展。然而,雷公藤中含有多种化合物,其药物靶标及作用环节十分复杂。因此,用常规药理和毒理学研究方法很难全面揭示其药理和毒理机制^[8-10]。本研究借助多个在线数据库资源,挖掘雷公藤中已知化合物的生物学信息,构建了雷公藤化合物靶标“蛋白-蛋白”相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络及“在靶(药物治疗疾病作用靶标)、脱靶(药物不良反应作用靶标)”相关分子网络,为该药物的

合理使用和深度研发提供网络药理学资料和研究策略。

资料与方法

1 数据整理与分析

1.1 雷公藤已知化合物 DrugBank 相似药物靶点信息筛选及“蛋白-蛋白”相互作用网络构建(表 1) 综合检索 SinoMed、Polysearch 及全医药学大辞典,获取中药雷公藤已知化合物名称的列表。该列表导入 DrugBank 数据库,筛选相似药物,获取高相似度药物的编号。基于化合物结构相似、生物活性相近的原则,应用 DrugBank 数据库中高相似度药物的靶点信息,构建 PPI 网络。

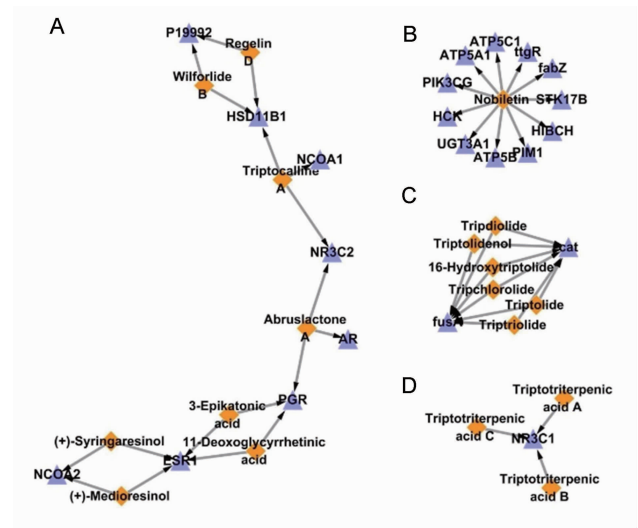
表 1 雷公藤已知化学物 DrugBank 数据库对应的相似药物筛选结果

化合物名称	DrugBank 数据库中相似药物	相似药物编号	相似度评分
雷公藤卡林 A	(11-beta)-11,21-dihydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione	DB04652	0.848
	4-[(1S,2S,5S,9R)-5-(hydroxymethyl)-8,9-dimethyl-3-oxabicyclo[3.3.1]non-7-en-2-yl]phenol	DB07087	0.695
	4-[(1S,2S,5S,9R)-5-(hydroxymethyl)-8,9-dimethyl-3-oxabicyclo[3.3.1]non-7-en-2-yl]phenol	DB07087	0.695
杜仲树脂酚			
大籽五层龙酸	6-Deoxyerythronolide B	DB04070	0.602
	Allylestrenol	DB01431	0.740
11-去氧甘草次酸	Allylestrenol	DB01431	0.740
雷公藤内酯 B	Carbenoxolone	DB02329	0.827
黑萸酮酯 D	Carbenoxolone	DB02329	0.774
替莫知母皂苷 A3	Cyclohexyl-Hexyl-Beta-D-Maltoside	DB03472	0.839
相思子内酯 A	Drospirenone	DB01395	0.795
异雷酚新内酯	Estradiol valerate/Dienogest	DB08866	0.627
雷酚酮内酯	Estradiol valerate/Dienogest	DB08866	0.625
雷酚新内酯	Estradiol valerate/Dienogest	DB08866	0.603
雷公藤酮	Formestane	DB08905	0.692
3-羟基-2,24-二酮-3-无羁萜烯-29-酸	Formestane	DB08905	0.806
16-羟基雷公藤内酯	Fusidic Acid	DB02703	0.714
雷醇内酯(雷酚内酯)	Fusidic Acid	DB02703	0.714
雷公藤氯内酯醇	Fusidic Acid	DB02703	0.639
雷公藤内酯三醇	Fusidic Acid	DB02703	0.729
雷公藤羟内酯(雷公藤甲素)	Fusidic Acid	DB02703	0.738
雷公藤内酯(雷公藤内酯醇;雷公藤甲素)	Fusidic Acid	DB02703	0.714
直楔草酸	Galactose grease	DB04680	0.635
5α-羟基雷公藤内酯	Ingenol Mebutate	DB05013	0.690
甜醇(半乳糖醇)	Mannitol	DB00742	1.000
雷公藤三萜酸 A	Medrysone	DB00253	0.696
雷公藤三萜酸 B	Medrysone	DB00253	0.696
雷公藤三萜酸 C	Medrysone	DB00253	0.707
山海棠素(雷酚内酯)	Mupirocin	DB00410	0.674
雷酚萜醇	Nabilone	DB00486	0.669
相思子原酸(3β,22α-二羟基齐墩果-12-烯-29-酸)	Natamycin	DB00826	0.736
山海棠二萜内酯 B	Oxandrolone	DB00621	0.865
川陈皮素	Quercetin	DB04216	0.780
去氢松香酸	Trazeolide	DB08647	0.667
甜醇(半乳糖醇)	D-Sorbitol	DB01638	1.000

1.2 雷公藤已知化合物“在靶/脱靶”效应网络构建(表 2) 检索 Polysearch 数据库,获取中药雷公藤已知靶标列表。该列表导入可视化软件 Cytoscape3.2.1,通过 Polysearch 数据库筛选与雷公藤相关性高的疾病,获取高相关性疾病的相关靶标,再利用软件中的 Merge 工具,将复杂网络融合在一起。通过人工降噪与美化处理,将结果可视化输出。对“在靶”及“脱靶”化合物用 David 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>) 做 GO 富集分析。

结 果

1 雷公藤已知化合物靶标 PPI 网络(图 1) 从雷公藤活性化合物靶标 PPI 网络中筛选直接相互作用的靶标(基因或蛋白质),结果显示:黑萼酮酯、雷公藤内酯、雷公藤红素、相思子内酯、雷公藤三萜酸等可与 HSD11B1、NCOA1、NR3C1、NR3C2、AR、PGR、ESR-1、NCOA2 等直接作用(图 1-A,1-D);川皮苷与 ATP 相关基因、PIK3、UGT3A1 等直接作用(图 1-B);雷公藤甲素、雷公藤内酯、雷公藤内酯二醇、雷公藤氯内酯可直接作用于过氧化氢酶基因 cat 和 RNA 绑定蛋白基因 fus(图 1-C)。



注:图 A-D 为筛选出的化合物作用的 4 个亚网络(sub-networks);◆是化学成分;▲是成分靶点

图 1 雷公藤已知化合物靶标 PPI 网络

2 雷公藤已知化合物“在靶-脱靶”分子网络及功能富集分析(图 2) 雷公藤已知化合物“在靶-脱靶”分子网络共有节点 233 个,边 315 条;与 5 种疾病有直接关联,即:类风湿关节炎、肾小球肾炎、肾炎、系统性红斑狼疮和强制性脊柱炎,属于雷公藤功能、主治范畴的疾病。图中的网络节点表明:在靶蛋白主要参与

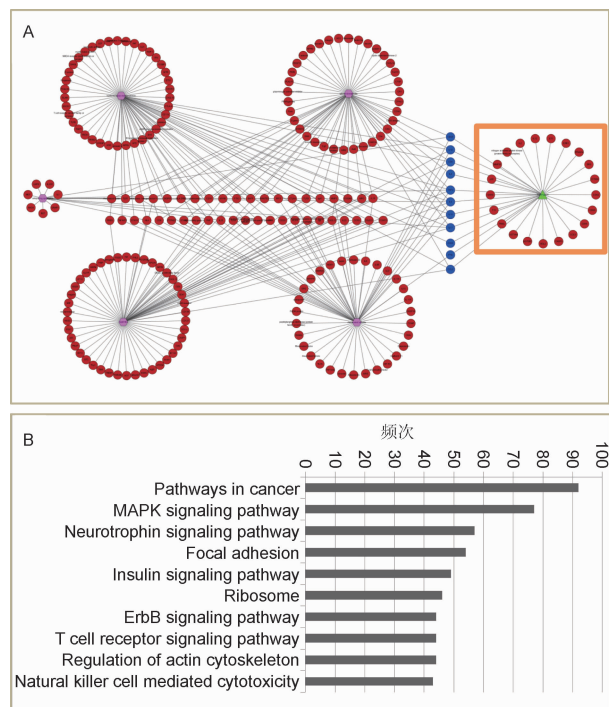
表 2 雷公藤已知靶点蛋白 Polysearch 数据库筛选结果

Z 值	相关性评分	基因名称	PubMed 命中数
10.5	474 (4,7,9,54)	TNF-α	50
9.4	424 (2,7,11,94)	IL-1β	51
6.5	300 (1,5,8,85)	IL-6	41
5.5	253 (2,4,5,28)	IFN-γ	21
5.3	246 (2,4,5,21)	IL-2	17
3.8	180 (2,2,3,15)	CCL5	3
3.5	167 (2,2,2,7)	MMP25	6
2.9	143 (1,1,1,63)	CASP3	46
2.6	126 (0,1,4,81)	IL-10	32
2.4	119 (1,2,3,4)	ET1	2
2.3	115 (1,2,2,5)	DR5	4
2.3	114 (1,1,1,34)	VEGF	16
2.1	106 (0,3,3,16)	COX ₂	16
1.8	95 (1,1,1,15)	ERK1	10
1.8	92 (1,1,1,12)	CYP450	8
1.6	85 (1,1,1,5)	CCL2	5
1.6	84 (0,1,2,49)	CD4	29
1.5	82 (1,1,1,2)	SARS	1
1.5	82 (1,1,1,2)	CD69	1
1.4	75 (0,1,4,30)	T10	8
1.4	74 (0,2,2,14)	IL-12	7
1.3	73 (0,2,2,13)	CD25	8
1.3	73 (0,1,3,33)	TRAIL	6
1.2	68 (0,2,2,8)	UGT2B7	2
1.2	68 (0,2,2,8)	UGT1A6	2
1.2	65 (0,0,1,60)	BCL2	39
1.1	64 (0,1,2,29)	IL-4	18
1.0	58 (0,1,1,28)	p38	20
1.0	58 (0,0,1,53)	IL-17	19
1.0	57 (0,1,1,27)	MAPK	20
1.0	57 (0,1,3,17)	ER-α	5
1.0	57 (0,1,1,27)	CD54	12
0.9	53 (0,1,1,23)	CYP3A	9
0.8	50 (0,1,3,10)	IL-5	3
0.8	49 (0,0,1,44)	caspase	27
0.7	47 (0,1,3,7)	hemolysin	6
0.7	47 (0,1,1,17)	CXCL12	11
0.7	46 (0,1,2,11)	ALB	7
0.7	43 (0,1,2,8)	HIF-1α	5
0.6	40 (0,1,1,10)	Caspase-8	12
0.6	40 (0,1,1,10)	CD80	4
0.5	38 (0,1,1,8)	CD40	2
0.4	34 (0,0,1,29)	nephrin	8
0.4	32 (0,1,1,2)	UGT1A9	1
0.4	32 (0,0,1,27)	podocin	7
0.4	31 (0,1,1,1)	PAI 1	1
0.4	30 (0,0,1,25)	STAT3	10
0.3	29 (0,0,1,24)	RANKL	5
0.3	26 (0,0,3,11)	Smad	3
0.3	26 (0,0,1,21)	HSPN	8
0.2	24 (0,0,1,19)	HO-1	6
0.2	23 (0,0,0,23)	p65	14
0.2	22 (0,0,0,22)	cytochrome c	18
0.1	21 (0,0,3,6)	IL-18	2
0.1	20 (0,0,1,15)	TLR4	8
0.1	20 (0,0,0,20)	CD8	14
0.1	19 (0,0,0,19)	β-Catenin	5
0.1	17 (0,0,0,17)	IL-8	8

注:Z 值即 Z 检验结果,Z 值大表示相关性高;PubMed 命中数表示化合物靶标在 PubMed 数据库中出现的频次

机体的免疫调节功能,如: VEGF、IL-1 β 、CD4、IL-4、TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-17、CD25、INF- γ 、CCL₂ 等。该结果再现了雷公藤已知的分子药理机制,即通过免疫调节作用治疗自身免疫性疾病。

脱靶蛋白包括 SARS、CYP450、ERK₁、COX₂、TRAIL、IL-2、T10、CD69、p38、BCL2、UGT1A6、UGT2B7、CD54、ER- α 、MAPK、CCL5、MMP25、CASP3、ET-1、DR5 等。上述蛋白经 GO 功能富集,排名靠前的通路依次为癌症通路、MAPK 通路、神经营养因子通路、分子黏着(激酶)通路等。



注:图 A 为在靶及脱靶分子网络拓扑结构图;图 B 为脱靶分子功能富集;粉色的节点为疾病,绿色三角形的节点为雷公藤,蓝色节点为药物作用于疾病的蛋白,红色节点为药物作用靶点蛋白和疾病相关靶点蛋白;图中竖排蓝色节点为药物雷公藤的在靶蛋白,以此为界,蓝色节点右侧的橙色方框内的圆为雷公藤的脱靶蛋白

图 2 雷公藤已知化合物在靶、脱靶分子网络及功能富集结果

讨 论

随着雷公藤制剂广泛应用于临床,其不良反应报道逐渐增多,2012 年 4 月国家药品不良反应监测中心公布的《雷公藤制剂不良反应病例报告》显示:2004 年 1 月—2011 年 9 月我国共出现雷公藤不良反应事件 839 例,其中严重病例 73 例,中毒表现主要为药物性肝炎、肝肾功能异常、肾衰竭、胃出血、骨髓抑制等^[11]。雷公藤中引起机体不良反应的主要为生物碱

类、二萜类及三萜类成分,这些同时也是雷公藤的药效物质成分^[12]。目前,传统药理学对于揭示单体化合物的药理机制有较完善和成熟的研究思路和方法。然而,这些研究方法很难从系统、全局和动态的层面描述药物与生物有机体的交互、应答过程。

本研究依托已有的开放式数据库资源(SinoMed, PubMed, DrugBank, Polysearch 等),对雷公藤已知化合物的靶标信息(相似蛋白或直接作用的基因)做了系统整理和归纳,构建了 PPI 网络及化合物“在靶/脱靶”效应网络。通过对生物信息网络的拓扑结构及相互作用关系进行深度解析,获得了雷公藤化合物“群、组”所对应的靶标间的相互关系,以及化合物与靶标间的直接作用模式。研究结果显示:除已知的抗类风湿等药理作用外,雷公藤各组分具有潜在的抗肿瘤、抗氧化等活性。本研究发现雷公藤活性化合物直接作用 CAT 和 fus, CAT 是人体内一种关键的抗氧化应激酶,可以转变活性氧上的过氧化氢为水或者氧气从而降低过氧化氢的毒性作用。fus 基因编码了不均一核糖核蛋白复合体的一个多功能蛋白组件。这种蛋白属于 RNA 结合蛋白 FET 家族,参与许多细胞过程,包括调节基因表达,维持基因组的完整性, mRNA/miRNA 加工等^[13-15]。本研究还预测到一些新的雷公藤药理及毒理相关的生物学通路,如癌症通路、MAPK 通路、神经营养因子通路、分子黏着(激酶)通路等,这些生物学通路是由雷公藤化合物脱靶效应引起的,均与细胞增殖、分化以及组织炎症反应有关。雷公藤化合物的脱靶效应如同“硬币”的两个面:或发挥药效作用,或表现为不良反应。

这些信息不仅是雷公藤已有研究结果的系统归纳和再现,而且从网络药理学的角度获得了一些新的知识,除已知的抗类风湿等药理作用外,雷公藤各组分具有潜在的抗肿瘤、抗氧化等活性,其相应的分子药理机制亟待深入研究。如今,本课题组应用代谢组学、蛋白组学、系统生物学等研究方法,研究雷公藤提取物(单体或复合物)对啮齿动物、斑马鱼等模式动物的系统毒性及可能的分子机制,期望在系统层面进一步揭示雷公藤的药理和毒理机制,为雷公藤药物研发和合理使用提供实证资料。

参 考 文 献

- [1] 贾歌,刘畅,庞晶瑶,等.雷公藤肝毒性化学成分、毒性机制及减毒方法研究进展[J].中国药房,2016,13(27):1857-1861.
- [2] 李云鹃,罗花,黄丽贞,等.雷公藤的毒性机理及减毒

- (收稿: 2017-02-21 在线: 2018-05-13)

责任编辑：赵芳芳

(以上名单按姓氏笔画为序)