

# 两种治法方药治疗骨性关节炎的计算机模拟比较研究

郑春松<sup>1</sup> 徐筱杰<sup>1,2</sup> 叶蕪芝<sup>1</sup> 李会婷<sup>3</sup> 刘献祥<sup>1</sup>

**摘要 目的** 从分子层面比较补肾法和活血法方药治疗骨性关节炎(osteoarthritis, OA)的作用。**方法** 利用化学空间、分子对接、生物网络等计算机模拟方法,分析补肾法和活血法方药化学成分的物理化学性质及其与靶点作用的网络特征。**结果** 补肾法和活血法方药的化学成分在化学空间中都分布离散,有较大的重叠区域;所建的网络模型中,补肾法和活血法方药的网络作用特征分布也存在部分的相似之处,其网络中每个化合物的平均靶点数分别为 1.86 和 2.11,平均每个靶点分别与 4.46 和 3.93 个化合物相关联,反映其多成分—多靶点作用。**结论** 计算机模拟直观地展示了补肾法和活血法方药及其在治疗 OA 上的异同点,从分子层面上揭示了两种方药配伍使用具有更广谱的靶作用和潜在的协同作用。

**关键词** 补肾法;活血法;骨性关节炎;计算机模拟;中草药

Comparative Research on Computer Simulation of Two Different Therapeutic Principles and Formulae for Osteoarthritis ZHENG Chun-song<sup>1</sup>, XU Xiao-jie<sup>1,2</sup>, YE Hong-zhi<sup>1</sup>, LI Hui-ting<sup>3</sup>, and LIU Xian-xiang<sup>1</sup> 1 Institute of Bone Diseases, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122), China; 2 Laboratory of Computer Simulation, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing (100871), China; 3 Key Laboratory of Integrative Medicine on Gerontology, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122), China

**ABSTRACT Objective** To compare the effect of reinforcing Shen method (RSM) and activating blood method (ABM) in treating osteoarthritis (OA) at the molecular level. **Methods** The physical and chemical characteristics of components from respective recipes of RSM and ABM, and network features of component-target interaction network were analyzed by computer simulation methods including chemical space, molecular docking, and biological network, etc. **Results** The chemical components of RSM and ABM were scarcely scattered with larger overlapping. Among established networks, the distribution of network features was partially similar in RSM and ABM. The average target number correlated with each component was 1.86 in RSM and 2.11 in ABM respectively. Each average target number was respectively correlated with 4.46 compounds and 3.93 compounds, reflecting multi-component and multi-target actions. **Conclusion** Computer simulation could intuitively trace out similarities and differences of two different methods and their interaction with targets, which revealed that the compatibility of RSM and ABM could have broader protein targets and potential synergism at the molecular level.

**KEYWORDS** reinforcing Shen method; activating blood method; therapeutic principles; osteoarthritis; computer simulation; Chinese herbs

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨

退变及破坏为主要病变特征的慢性疾病,是老年人关节疼痛和致残的主要原因。据世界卫生组织(WHO)统计,OA在女性患病率中占第4位,在男性患病率中占第8位,我国60岁以上者膝骨关节炎发病率高达49%<sup>[1]</sup>。因此,防治OA是目前医学所面临的一项重要课题。

中医药辨证论治在防治OA方面疗效肯定,其治则治法主要集中在补肾、活血化瘀等方面。文献报道了补肾活血方可抑制滑膜病变进展、调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路保护关节软骨等,从而起到防治OA

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No. 81202713);陈可冀中西医结合发展基金资助项目(No. CKJ2010032);福建省自然科学基金资助项目(No. 2010J01196)

作者单位:1.福建中医药大学中西医结合研究院骨病研究所(福州350122);2.北京大学化学与分子工程学院计算机模拟实验室(北京100871);3.福建中医药大学中西医结合研究院老年性疾病重点实验室(福州350122)

通讯作者:刘献祥, Tel: 0591-22861988, E-mail: liuxianxiang@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.04.0480

的作用<sup>[2,3]</sup>。但从分子层面上探讨补肾法、活血法的联系以及两种治法合用在 OA 治疗中的意义,至今鲜有研究报道。因此,本实验借助化学空间、分子对接、生物网络等计算机模拟方法,比较补肾和活血治法方药的分子特征,以及治疗 OA 中对相关靶标的作用特征,探讨不同治法防治 OA 的特点,为 OA 临床上综合治法的使用提供依据。

## 材料与方药

1 试验药物 参考文献[4],活血治法方药(桃红四物汤,出自《医宗金鉴》):熟地 12 g 当归 9 g 赤芍 12 g 川芎 6 g 桃仁 12 g 红花 9 g;补肾治法方药(右归饮,出自《景岳全书》):熟地 15 g 炒山药 9 g 山茱萸 9 g 枸杞子 6 g 甘草 6 g 杜仲(姜制)9 g 肉桂 9 g 制附子 9 g。

2 研究工具 使用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 软件进行计算,该软件的运行环境是:Discovery Studio 2.0 (DS2.0) 图形工作站和 Microsoft Windows XP Professional, SP2 操作系统。计算过程中除非特别指明,所选用的参数均为缺省值。所有计算工作皆在北京大学化学与分子工程学院计算机模拟实验室完成。

## 3 方法

3.1 中药化学成分配体的选择 所用小分子中药化学结构主要来源于《中药原植物化学成分手册》<sup>[5]</sup>和北京大学中草药有效成分三维结构与性质数据库<sup>[6]</sup>,检索桃红四物汤组方中药的化学成分,并通过文献调研对数据进行补缺,已有生物活性数据及附注化学成分的共计 206 个中药化学成分。检索右归饮组方中药的化学成分,共计 323 个中药化学成分。应用 Ligand Minimization 模块对上述化学成分配体进行处理,选用 MMFF 力场进行优化,保存为 sd 文件。

3.2 化学空间的建立 在 DS 2.0 的 QSAR 模块中,输入步骤 3.1 优化的 sd 文件,计算了 1D、2D、3D 描述符中的 188 个分子描述符,分别为分子量、碳原子数、氧原子数、氮原子数、总重原子数、环数目、可旋转键数目、氢键受体数目、氢键给体数目、手性中心数目、主惯性矩、分子接触体积、分子表面面积、总极性表面面积、总疏水表面面积和脂水分配系数等。用这些数值作为一个个点所构成的抽象的多维空间就是化学空间,利用主成分分析(principal component analysis, PCA)降维,比较两种治法方药的二维化学空间分布。

3.3 多成分—多靶点网络的建立 查阅 OA 相关文献[7-9],结合 Drugbank 数据库,找到了许多临

表 1 骨性关节炎靶标信息

蛋白序号	中文名称	英文名称
966C	基质金属酶 1	MMP-1
1ZS0	基质金属酶 8	MMP-8
1GKC	基质金属酶 9	MMP-9
1HV5	基质金属酶 11	MMP-11
3RTS	基质金属酶 12	MMP-12
3I7I	基质金属酶 13	MMP-13
2VST	过氧化物酶体增殖因子活化受体 $\gamma$	PPAR $\gamma$
3L1S	糖原合成激酶 3 $\beta$	GSK-3 $\beta$
1DB1	维生素 D 受体	VDR
2Y37	诱生型一氧化氮合酶	iNOS
2AZ5	肿瘤坏死因子 $\alpha$	TNF- $\alpha$
1UOM	雌激素受体	ER
2CNN	半胱氨酸蛋白酶 3	Caspase-3
3PXY	细胞周期依赖性蛋白激酶 2	CDK2
3TGM	血红素加氧酶 1	HO-1

床以及处于初期研究阶段的药物的有疗效的靶标蛋白。根据这些信息,在蛋白质 3D 结构数据库中下载其结构,见表 1。利用 DS 2.0 的 LigandFit 模块进行中药化学成分配体与 OA 相关蛋白对接计算研究。对接具体过程参考文献[10,11]:蛋白去溶剂、去配体、加氢处理后,以其所含的活性原配体来确定活性位点;使用蒙特卡罗(Monte Carlo)方法对中药化学成分配体进行构象采样,Dreiding 力场打分,只保留得分最高的构象。对接成功后,对分子数据库中的分子进行评分排序,以评分前 3% 的分子,视为方药中能作用于靶点的化学成分<sup>[12]</sup>。将上述化学成分或靶点用节点表示,化学成分和靶点的相互作用用边表示,采用 Cytoscape 软件<sup>[13]</sup>构建方药多成分—多靶点网络模型,并通过此软件 Plugins 面板下 Network Analysis 计算多成分—多靶点网络模型的路中心、最近距离中心、拓扑系数、路径长度分布及重要节点的度值,从上述网络特征探讨两种治法方药治疗 OA 的特点。

## 结 果

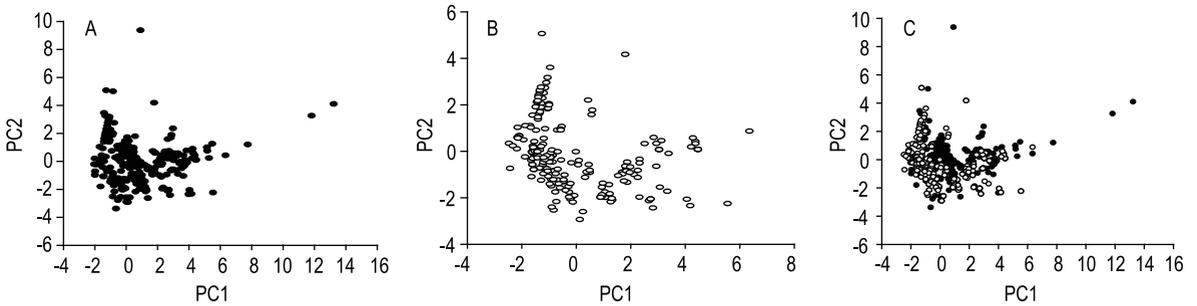
1 两种治法方药的化学空间比较(表 2,图 1) 补肾治法和活血治法方药在化学空间的前两个主成分具有相当的分散性,说明其治法方药的化学成分具有物理化学性质多样性,但补肾治法方药与活血治法方药的化学成分在化学空间上有较大的重叠,说明两种治法方药中的化学成分之间具有大部分相同的物理化学性质。选择重要的描述符(分子量、氢键给体、氢键受体、脂水分配系数)进行统计,对于补肾治法和活血治法方药分子集来说,分子量 < 500 的化合物分别占 69.65% 和 83.98%,氢键给体数目 < 5 的化合物分别占 61.61% 和 69.90%,氢键受体数目 < 10 的化合物

分别占 66.25% 和 74.76%，脂水分配系数 < 5 的化合物分别占 78.95% 和 51.70%，说明上述方药分子集中大多数化合物具有类药性。

表 2 不同治法方药化学成分的重要描述符性质

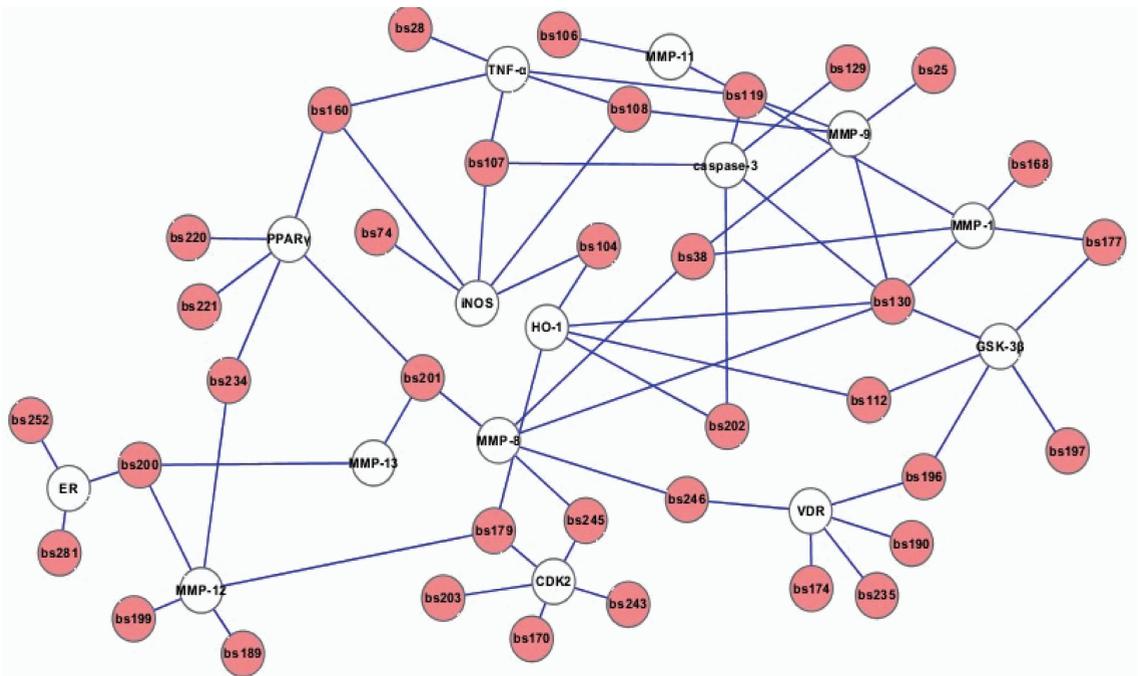
性质	补肾治法方药			活血治法方药		
	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值	平均值
碳原子数	75.00	2.00	22.79	41.00	3.00	16.670
氧原子数	48.00	0.00	8.03	26.00	0.00	5.847
氮原子数	5.00	0.00	0.19	8.00	0.00	0.167
分子量	1725.22	74.13	438.09	938.66	59.11	321.587
氢键受体数目	48.00	0.00	8.14	26.00	0.00	5.970
氢键给体数目	27.00	0.00	4.29	17.00	0.00	3.190
脂水分配系数	23.48	-9.56	1.79	13.60	-9.55	1.710
可旋转键数目	42.00	0.00	6.39	32.00	0.00	6.120

2 两种治法方药多成分—多靶点网络比较(图 2-4,表 3-4) 补肾治法和活血治法方药化学成分与靶点间存在复杂的网络关系(图 2-3),补肾治法方药多成分—多靶点网络模型中每个化合物的平均靶点数为 1.86,平均每个靶点与 4.46 个化合物相关联;而活血治法方药多成分—多靶点网络模型中每个化合物的平均靶点数为 2.11,平均每个靶点与 3.93 个化合物相关联。在 cytoscape 软件 Plugins 面板下 Network Analysis 计算得到多成分—多靶点网络作用模型的重要参数统计(表 3)及重要节点的度值(表 4)。两个网络在路中心、最近距离中心、拓扑系数、路径长度分布上既有共同的部分,又有各自独立的部分。



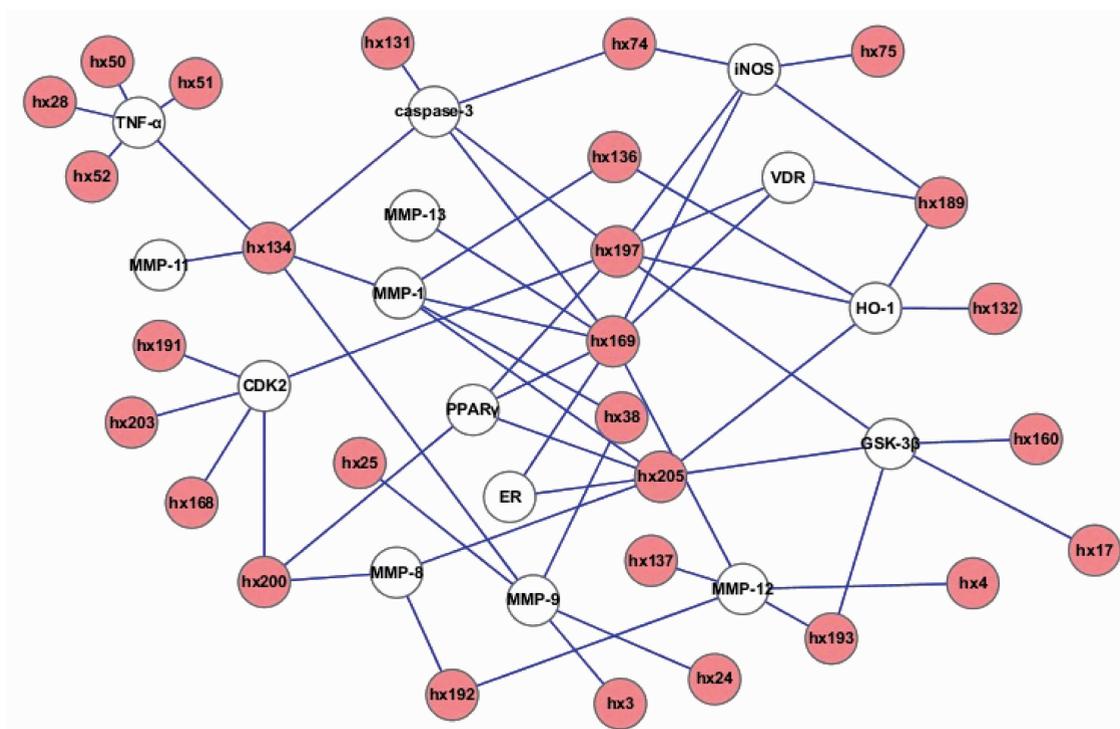
注:A 为补肾治法方药的化学空间分布;B 为活血治法方药的化学空间分布;C 为补肾治法方药和活血治法方药的化学空间分布;黑圈和白圈分别代表补肾治法方药和活血治法方药的化学空间

图 1 不同治法方药的化学空间分布



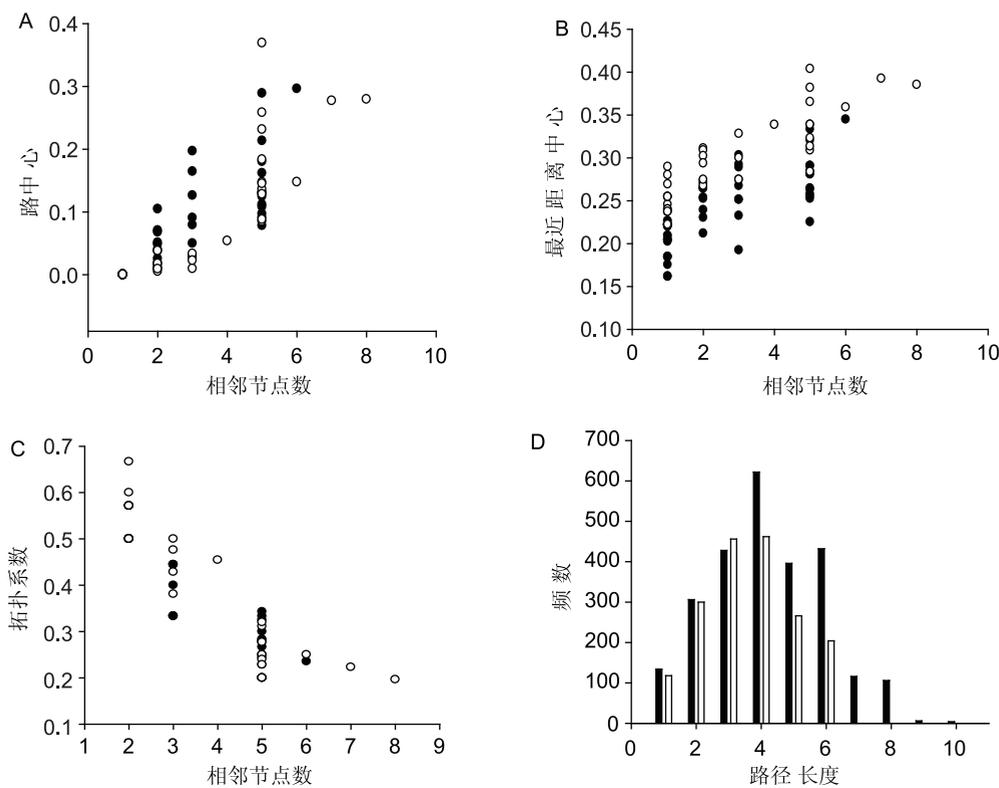
注:白色代表靶酶;粉红色代表补肾方药分子

图 2 补肾治法方药多成分—多靶点网络模型



注:白色代表靶酶;粉红色代表活血方药分子

图3 活血治法方药多成分—多靶点网络模型



注:A 为路中心的分布;B 为最近距离中心的分布;C 为拓扑系数的分布;D 为路径长度的分布;黑色填充为补肾治法网络模型参数统计;白色填充为活血治法网络模型参数统计

图4 多成分—多靶点网络模型的重要特征参数统计

表 3 多成分—多靶点网络模型的重要参数值

性质	补肾治法网络模型	活血治法网络模型
网络密度	0.053	0.065
网络集中度	0.070	0.131
网络异质性	0.630	0.725
特征路径长度	4.253	3.592
平均相邻节点数	2.627	2.744

## 讨 论

中医学认为 OA 病机为肾虚血瘀,瘀久而为骨痹。“补肾”和“活血”是临床治疗 OA 常见的重要方法<sup>[4]</sup>。但其药效物质基础及作用靶点不清楚,其之间的联系也不清楚,未被西方医学所认识。系统生物学是联系中医药与西方现代药学的桥梁,而化学成分是沟通中西医学的共同物质基础<sup>[14]</sup>。因此,研究两种治法方药化学成分的化学空间分布及其与 OA 靶点的作用网络,对于阐明不同治法的科学内涵有重要的意义。

化学空间是通过一系列特定选择的描述符描述化合物的性质形成的多维描述符空间。通过对比化合物之间的化学空间相似性,进而推测化合物的作用是否具有相似性<sup>[15]</sup>。本研究采用描述符计算和主成分分析,对补肾方药和活血方药的化学成分性质进行分析,研究两种治法方药的化学空间差异。结果显示补肾治法和活血治法方药分子集的化学空间外形类似,分布都较离散,在同个化学空间区域有重叠部分,且多数具有类药性。这提示两种治法方药对较广谱的靶标能相互作用,而且,其具有部分相同的作用;若配伍使用,有潜在的协同作用。另外,由于其类药性,使得从上述方药中进行多靶点药物筛选成为可能。

网络药理学从药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发,采用复杂网络模型表达和分析研究对象的药理学性质,特别适宜于反映及阐释中药的多成分—多靶点作用关系<sup>[16]</sup>。本研究从多靶药物虚拟筛选和生物网络相结合的角度构建了多成分—多靶点作用网络,比较补肾方药和活血方药的化学成分与

靶点的相互作用特征。研究表明:(1)补肾方药和活血方药中潜在的组合药物(combination drug)和混杂药物(promiscuous drug)百分比分别为 52.78% 和 42.28%,而活血方药中则分别为 39.29% 和 60.71%。其中,混杂药物中 bs130、bs119、hx169、hx197、hx<sup>2</sup>05、hx134 能与 5 个或 5 个以上的靶标有较好的作用。提示两种方药存在多成分、多靶点作用的特点,而且,补肾治法方药可能更多的是通过组合药物的方式起作用,但活血治法方药可能更多的是通过混杂药物的方式起作用。(2)两种治法网络模型在路中心、最近距离中心、拓扑系数、路径长度分布上有相似性和差异性,进一步证实了上述提到的广谱作用。另外,特征路径长度是复杂网络中一个重要的特征度量,可以衡量网络中节点之间传输性能与连通性<sup>[17]</sup>。补肾治法比活血治法网络模型的特征路径长度大,提示补肾治法作用可能比活血治法柔和,OA 早期时活血法作用较补肾法显著。这与文献报道相符<sup>[4]</sup>。

综上,本实验结果直观地体现补肾和活血治法方药成分的物理化学性质的特性,有效成分与相关靶标的复杂相互作用,以及中药通过多成分、多靶点发挥整体作用的特点。同时,从分子层次揭示了补肾法与活血法方药之间的异同,配伍后具有更广谱的靶作用和潜在的协同作用,为 OA 临床中药运用提供理论及实验依据。更重要的是本研究提出了不同治法方药研究的新理念、新方法,未来将结合多靶点实验,进一步完善不同治法方药的计算机模拟研究,为中药的现代研究提供示范作用。

## 参 考 文 献

- [1] 张乃峥,施金旺,张雪哲,等. 膝关节炎的流行病学调查[J]. 中华内科杂志, 2005, 34(2): 84.
- [2] 阚卫兵,姜玉祥,宋朋飞,等. 补肾活血方对家兔膝关节炎滑膜组织基因表达谱的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(1): 5-8.

表 4 多成分—多靶点网络模型中重要节点的度值

补肾治法网络模型			活血治法网络模型		
代码	化学名称	度值	代码	化学名称	度值
bs130	1,2,6-三没食子酰葡萄糖	6	hx169	叶酸	8
bs119	异诃子鞣素	5	hx197	6-羟基山奈酚-7-O-葡萄糖苷	7
bs38	异洋丁香酚苷	3	hx205	红花黄色素 A	6
bs201	异芒果苷	3	hx134	丁子芽鞣素	5
bs200	异甘草苷	3	hx200	新红花素	3
bs179	甘草宁 P-3'-甲醚	3	hx189	扁桃苷	3
bs160	大黄素甲醚双葡萄糖苷	3	hx74	地黄苷 A	2
bs108	栝木鞣质 C	3	hx193	醌式红花苷	2
bs107	栝木鞣质 B	3	hx192	红花苷	2

- [3] 梁祖建. 补肾活血方调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路保护关节软骨的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2327-2330.
- [4] 季卫锋, 童培建, 袁小凤, 等. 补肾法与活血法对 SD 大鼠膝骨性关节炎滑膜 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及软骨 MMP-13、ADAMTS-5 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(2): 1-5.
- [5] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册[M]. 北京: 化工工业出版社, 2004: 1165-1211.
- [6] Qiao X, Hou T, Zhang W, et al. A 3D structure database of components from Chinese traditional medicinal herbs [J]. J Chem Inf Comput Sci, 2002, 42(3): 481-489.
- [7] Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al. DrugBank: a knowledge base for drugs, drug actions and drug targets [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (Database issue): D901-D906.
- [8] 郑春松, 徐筱杰, 叶灵芝, 等. 青风藤治疗骨性关节炎药效物质基础多靶导向作用的计算机模拟研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 375-379.
- [9] 刘永刚, 鲍隽君, 邢自宝, 等. 骨性关节炎与细胞因子相关性研究进展[J]. 骨科, 2010, 1(2): 105-107.
- [10] Montes M, Braud E, Miteva MA, et al. Receptor-based viral ligand screening for the identification of novel CDC25 phosphatase inhibitors [J]. J Chem Inf Model, 2008, 48(1): 157-165.
- [11] 徐筱杰, 侯廷军, 乔学斌, 等. 计算机辅助药物分子设计[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 340-341.
- [12] Gu J, Zhang H, Chen L, et al. Drug-target network and poly-pharmacology studies of a traditional Chinese medicine for type II diabetes mellitus [J]. Comput Biol Chem, 2011, 35(5): 293-297.
- [13] Tang Y, Carbonetta D, Shetty S. Development of an integrated network visualisation and graph analysis tool for biological networks [J]. Int J Comput Biol Drug Des, 2012, 5(2): 152-163.
- [14] 李旭东, 黄钦, 徐筱杰. 中药方剂血府逐瘀汤中分子在靶标-配体空间的分布 [J]. 物理化学学报, 2008, 24(4): 547-550.
- [15] Dobson CM. Chemical space and biology [J]. Nature, 2004, 432(16): 824-828.
- [16] 吴磊宏, 高秀梅, 王林丽, 等. 附子多成分作用靶点预测及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2907-2910.
- [17] 李东军, 杨延阳, 付洁, 等. 复杂客户网络拓扑性质研究 [J]. 计算机工程与应用, 2011, 47(2): 213-216.

(收稿: 2012-09-03 修回: 2013-07-12)

## 第九届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会征文通知

中国中西医结合学会围手术期专业委员会定于 2014 年 5 月 16—18 日在北京市举办“第九届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会”, 以“中西医结合围手术期的安全管理”为主题, 邀请我国相关领域院士、著名专家作专题报告, 通过学术探讨和经验交流, 回顾围手术期中西医结合医学发展历程, 探讨围手术期安全管理的新理论和新发展, 推动围手术期中西医结合医学的发展, 现征文如下。

**征文内容** (1) 围手术期中西医结合医学的发展趋势与展望; (2) 围手术期快速康复与营养支持的研究进展; (3) 围手术期 VTE 的预防及合理抗凝治疗; (4) 围手术期麻醉过程的安全管理; (5) 中西医结合在临床专科围手术期的研究进展; (6) 中西医结合围手术期的其他相关内容。

**征文要求** (1) 论文内容真实可靠, 具备科学性、先进性、实用性。(2) 全文 3 000 字以内, 需附 400 字左右中文摘要。(3) 用 E-mail 传送论文电子版至 zhengxia256@126.com (请注明“中西医结合”字样)。(4) 来稿免收审稿费, 请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话, 是否同意参加大会交流。(5) 论文截稿日期: 2014 年 5 月 1 日。

**联系方式** (1) 联系人: 叶志东, 联系电话: 13910682488, E-mail: yezhidong@yahoo.com, 地址: 北京市朝阳区樱花东街 2 号(邮编 100029) 中日友好医院 A 栋 13 层心血管外科。(2) 联系人: 曹立幸, 联系电话: 020-81887233-31226, 传真: 020-81874903, E-mail: weishoushuqixiangmu@126.com, 地址: 广东省广州市越秀区大德路 111 号(邮编 510120) 广东省中医院东区 12 楼 20 房。