

马钱子治疗类风湿关节炎的网络药理学研究

谈利红^{1,2}, 杨宗发¹, 唐倩¹, 李艳^{1,2}, 朱照静^{1,2*}

¹重庆医药高等专科学校; ²重庆市药物制剂工程中心, 重庆 401331

摘要: 本文利用中药网络药理学技术筛选马钱子治疗类风湿关节炎的活性成分及其潜在的作用机制。利用 TCM-SP 数据库筛选马钱子活性成分和中药靶标, 然后使用 UniProt 数据库进行基因名注释, 并在 Gene Cards 数据库检索疾病的相关靶标。利用 Rversion 3.6.2 软件、Cytoscape 3.7.1 软件, 预测马钱子治疗 RA 的作用靶标与活性成分, 利用 STRING 数据库, 评估和整合蛋白之间的相互作用。最后利用 R 语言中 BiocManager 包进行 GO 分析及 KEGG 通路富集分析。通过以上流程共筛选出马钱子有效成分 13 个和中药-疾病靶标 23 个, 核心靶点涉及 PTGS2、NR3C1、ESR1、MAOA、OPRM1、SLC6A4 等。GO 功能富集分析得到 123 个 GO 条目, KEGG 通路富集得到 34 条与类风湿性关节炎发病密切相关的信号通路, 其中包括白介素 (IL)-17 信号途径、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、NF- κ B 信号途径、Toll 样受体信号途径、凋亡途径、缺氧诱导因子 (HIF)-1 信号途径、T 细胞信号途径、B 细胞信号途径、MAPK 信号途径、VEGF 信号途径、JAK-STAT 信号途径及破骨细胞分化途径等。该研究预测了马钱子治疗类风湿关节炎的物质基础及作用机制, 为马钱子的深入开发提供了理论依据。

关键词: 马钱子; 类风湿关节炎; 网络药理学; 分子机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)Suppl-0060-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.S.009

The network pharmacology study of *Strychnos nux-vomica* L. in treating rheumatoid arthritis

TAN Li-hong^{1,2}, YANG Zong-fa¹, TANG Qian¹, LI Yan^{1,2}, ZHU Zhao-jing^{1,2*}

¹Chongqing Medical and Pharmaceutical College;

²Chongqing Pharmaceutical Preparation Engineering Center, Chongqing 401331, China

Abstract: To screen the active ingredients and potential mechanism of *Strychnos nux-vomica* L. in the treatment of rheumatoid arthritis by Chinese medicine network pharmacology. The TCMSPP database was used to select the active ingredients and targets of *S. nux-vomica*, and then the Gene name annotation was performed using the UniProt database, and the disease-related targets were retrieved in the GeneCards database. The Rversion 3.6.2 software and Cytoscape 3.7.1 software was used to predict the targets and active components of *S. nux-vomica*. for RA treatment, and the interactions between proteins were evaluated using the STRING database. Finally, the BiocManager package in R language was used for GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis. A total of 13 effective components of *S. nux-vomica*. and 23 “Traditional Chinese medical” - “disease” targets were screened through the above process, and the core targets involved PTGS2, NR3C1, ESR1, MAOA, OPRM1, SLC6A4, etc. GO function enrichment analysis got 123 GO entries, and KEGG pathway enriched to obtain 34 signal pathways closely related to the onset of rheumatoid arthritis, such as interleukin (IL) - 17 signaling pathways, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, the NF- κ B signaling pathways, toll-like receptors signaling pathways, apoptosis pathway, hypoxia inducing factor (HIF)-1 signaling pathways, T cell signaling pathways, B cell signaling pathways, MAPK signaling pathways, VEGF signaling pathways, JAK-STAT signal pathway and osteoclast differentiation pathway. This study predicts the material basis and potential mechanism of *S. nux-vomica* in the treatment of rheumatoid arthritis, and provides a theoretical basis for the further development of *S. nux-vomica*.

收稿日期: 2020-05-29 接受日期: 2020-06-17

基金项目: 重庆市卫生健康委员会“十三五”市级中医药重点学科建设项目(中药药剂学)(渝中医[2018]43号); 重庆市教委应用技术研究青年项目(KJQN201802803; KJQN202002801)

* 通信作者 Tel: 86-23-61969195; E-mail: zhaojing6271@126.com

Key words: *Strychnos nux-vomica* L.; rheumatoid arthritis; network pharmacology; molecular mechanism

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因未明的慢性、以炎性滑膜炎为主的系统性疾病,其典型特征表现为滑膜持续性炎症、自身抗体产生、关节软骨和骨的破坏^[1]。RA的发病机制可能与遗传和环境等因素有关,潜在的机制涉及人体的免疫系统攻击关节,其中细胞因子和重要信号通路起到了关键作用^[2]。目前,RA的治疗方案是缓解疼痛,减轻炎症和改善人体的整体机能,常用于缓解症状的药物有止痛药,类固醇和非甾体抗炎药,也可使用抗风湿药物来减缓疾病的进展,例如羟氯喹和甲氨蝶呤等。但由于药物不良反应及耐受性等原因,RA缓解率不尽人意。因此,迫切需寻求高效、安全、价廉的药物^[3]。

类风湿关节炎属于中医“痹症、历节、疔痹”等范畴,临床上常用具有活血通络、强筋壮骨、祛风散结等功效的中药进行治疗。马钱子是活血通络的要药,具有通络止痛、散结消肿等功效^[4],主要含有马钱子碱、土的宁、伪土的宁和伪马钱子碱等生物碱,此外也含有有机酸、甾体、萜类、苷类等化学成分^[5],临床用于治疗痹症取得显著疗效^[6]。现代药理研究发现,马钱子能够抗炎、镇痛、抑制细胞免疫、抑制机体对免疫复合物的超敏反应,是治疗类风湿关节炎的理想药物^[7,8]。然而马钱子化学成分多样,治疗RA作用机制不明确,单一研究并不能反应马钱子多成分、多靶点的协同调节作用。因此,本文运用中药网络药理学的方法,挖掘了马钱子的有效成分、中药靶标、疾病靶标,构建了药物-成分-疾病-靶标调控网络,预测了马钱子治疗RA的作用靶标与主要的活性成分。最后通过功能富集分析及通路富集分析,从系统生物学角度整体阐释马钱子治疗RA的基因、蛋白以及信号通路,该研究为马钱子的深入开发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 马钱子药物成分筛选及靶标预测

在中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)中输入 maqianzi,检索马钱子的化学成分,并根据化学成分药物动力学(absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME)参

数筛选口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物类药性(drug-like, DL) ≥ 0.18 的主要活性成分,运行 Perl 软件,获得相关成分的靶点基因。

1.2 马钱子靶标基因名注释

利用 Perl 软件和 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)为筛选出的靶标添加基因名,将靶点基因的全称转换为简称。若靶标基因在 UniProt 数据库中找不到对应的简称,则剔除该基因。

1.3 RA 疾病相关靶标分析

在 Gene Cards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中输入 rheumatoid arthritis,检索疾病的相关靶标,分值越高,相关证据越多。

1.4 马钱子-RA 疾病靶标的构建

下载 library(VennDiagra)数据包,利用 Rversion 3.6.2 软件运行药物靶标基因文件和疾病基因文件,得到马钱子-RA 靶标的韦恩图(见图1)以及马钱子-RA 靶标的交集基因。

1.5 马钱子“活性成分-疾病靶标”的构建

将马钱子的活性成分和作用靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件,得到药物-成分-疾病-靶标调控网络,预测出马钱子治疗 RA 发挥主要作用的作用靶标与主要的活性成分。

1.6 靶蛋白相互作用(PPI)网络的构建与关键靶点分析

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),评估和整合蛋白之间的相互作用。将1.3获得的马钱子-RA 靶标基因导入 STRING 数据库,筛选条件物种选择“Homo Sapiens”,最小互作分数设置为 0.4,输出相关文档。将输出文档进行 R 语言分析,进行数据柱状图可视化。

1.7 GO 分析及 KEGG 通路富集分析

利用 R 语言中 Bioc Manager 包进行 GO 分析及 KEGG 通路富集分析。以 $P < 0.05$ 及 $Q < 0.05$ 认为统计学上具有差异。通过通路富集分析,最终挖掘出马钱子治疗 RA 的功能及可能的信号通路。

2 结果

2.1 马钱子有效成分的筛选和靶标预测结果

利用 TCMSP 数据库检索马钱子的有效成分,设置参数 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$,得到了 13 个有效成分(见表1)。然后再进行靶点预测,共筛选出作

用靶点 384 个,去掉重复的靶点,得到 116 个马钱子 作用靶点。

表 1 马钱子主要活性成分

Table 1 The main active ingredient of *S. nux-vomica*

化合物代码 MOLID	化合物 Compound	口服生物利用度 OB(%)	药物类药性 DL
MOL001040	(2R)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	42.36	0.21
MOL001476	(S)-Stylophine	51.15	0.85
MOL003410	Ziziphin_qt	66.95	0.62
MOL003411	Icaride A	48.74	0.43
MOL003413	Isostrychnine N-oxide(I)	35.45	0.8
MOL003414	Isostrychnine N-oxide(II)	37.33	0.8
MOL003418	Lokundjoside_qt	32.82	0.76
MOL003432	Vomicine	47.56	0.65
MOL003433	Brucine-N-oxide	49.17	0.38
MOL003436	Isobrucine	33.58	0.8
MOL003440	Brucine N-oxide	52.63	0.38
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL000492	(+)-Catechin	54.83	0.24

2.2 马钱子-RA 疾病靶标的构建结果

利用 R 语言软件,分析 RA 疾病相关基因和马钱子靶标基因,取二者交集,即得到马钱子-RA 靶标

韦恩图,从图中可以看出 RA 疾病相关基因 4 401 个,马钱子靶标基因 44 个,交集基因 23 个。

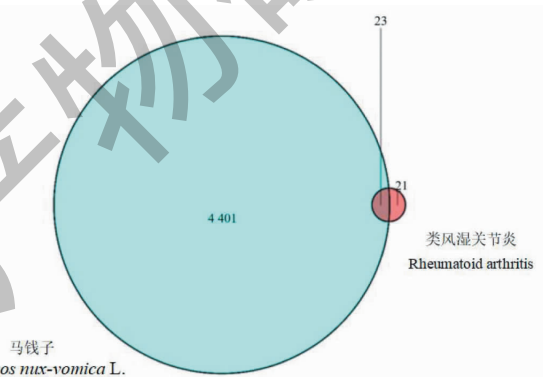


图 1 马钱子-RA 靶标韦恩图

Fig. 1 *S. nux-vomica*-RA target Venn diagram

2.3 马钱子“活性成分-疾病靶标”的构建结果

运用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制马钱子治疗 RA 活性成分-疾病靶标网络图,见图 2。图中红色代表 RA 疾病,蓝色代表马钱子药材,青绿色代表马钱子的活性成分,粉红色代表代表马钱子-RA 疾病的共同靶标。从图中也可以看出马钱子主要有 12 种有效成分,作用于 23 个疾病靶标,表明马钱子治疗 RA 存在多成分多靶点共同作用。

2.4 靶蛋白相互作用(PPI)网络的构建与关键靶点分析

靶蛋白相互作用(PPI)网络图(图 3)反映了马钱子治疗 RA 疾病相关靶标蛋白-蛋白的相互作用关系,为了便于观察,本文利用 R 语言工具进行数据柱状图可视化(图 4)。图 3 网络中包含了 22 个节点,114 条相互作用连线,邻接节点数目越多,成为核心基因的概率越大,越有可能成为马钱子治疗

RA 的关键靶点。从图 3 我们可以看出,PTGS2 节点蛋白有 12 个连线,其次是 NR3C1、ESR1、MAOA、

OPRM1 和 SLC6A4 等。以上蛋白处于核心位置,可能在马钱子治疗 RA 的过程中发挥了重要作用。

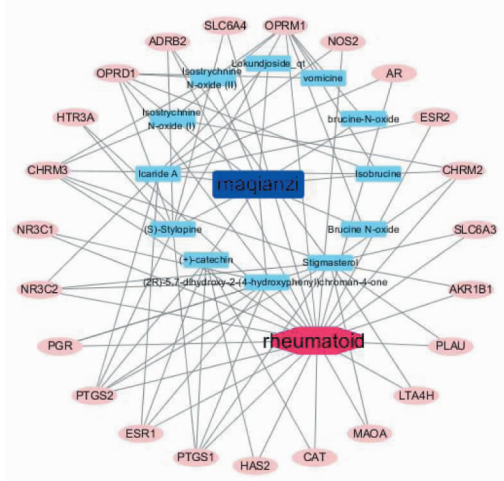


图 2 马钱子“活性成分-疾病靶标”调控网络图

Fig. 2 "Active ingredient-disease target" regulation network diagram of *Strychnos nux-vomica* L.

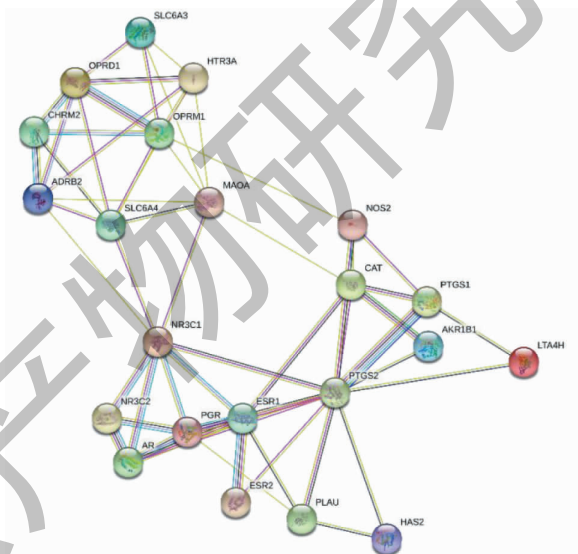


图 3 靶标蛋白相互作用网络图

Fig. 3 Network diagram of target protein interaction

2.5 GO 功能富集分析结果

利用 R 语言对马钱子治疗 RA 的靶点进行 GO 富集分析($P < 0.05$),共富集出 123 个 GO 条目,选取 P 值最小的前 20 个 GO 条目作图,如图 5 和图 6 所示。Y 轴为 GO 名称,X 轴和气泡面积大小代表目标基因集中属于 GO 的基因数量,气泡颜色代表富集显著性,颜色越红,富集的程度越高,相应的 P 值越小。马钱子治疗 RA 的核心基因的 GO 功能主要涉及细胞因子活性、细胞因子受体结合、血红素结

合、抗氧化活性、受体配体活性、激酶调节活性、激活转录因子结合、过氧化物酶活性等。

2.6 KEGG 通路富集分析结果

通过 KEGG 通路富集分析,共得到 123 条通路(附表 1),其 P 值和 Q 值均小于 0.01。这些通路中,直接含有类风湿性关节炎疾病通路,涉及 11 个基因(图 7);此外,34 条与类风湿性关节炎发病密切相关的信号通路,其中包括 IL-17 信号途径、TNF 信号通路、NF- κ B 信号途径、Toll 样受体信号途径、

凋亡途径、HIF-1 信号途径、T 细胞信号途径、B 细胞信号途径、MAPK 信号途径、VEGF 信号途径、JAK-STAT 信号途径及破骨细胞分化途径等;另外,还涉

及 47 条疾病通路,包括动脉粥样硬化、糖尿病、肝炎、癌症、疱疹病毒感染、流行性感、百日咳、麻疹、弓形体病等。

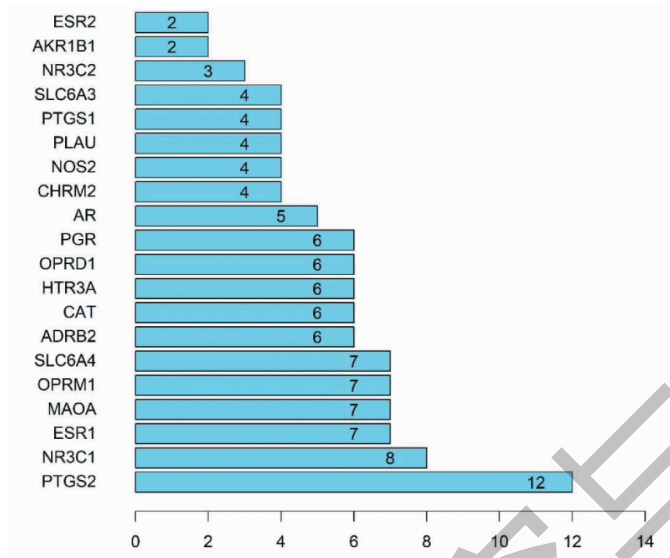


图 4 核心靶标条图

Fig. 4 Core target bar graph

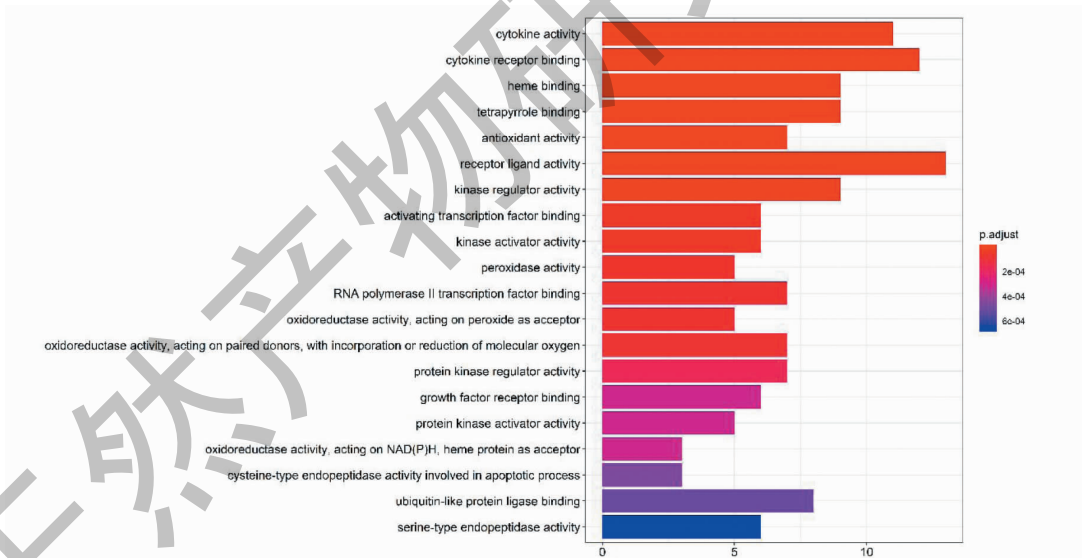


图 5 GO 功能富集分析柱状图

Fig. 5 The histogram of GO function enrichment analysis

3 讨论

RA 是一种复杂难治的自身性免疫疾病,临床上尚无治愈的药物,需要从更多的途径寻求治疗药物。目前,越来越多的学者将 RA 治疗药物的挖掘方向锁定于传统中药,但中药成分的复杂、靶点的众多以及机制的多样一直以来限制了中药的发展。近

年新兴的网络药理学或许为解决中药以上问题提供了新的契机。在本研究中,我们使用网络药理学相关分析方法对马钱子治疗类风湿性关节炎的潜在成分和靶点进行了初步的探讨。

马钱子有大毒,其发挥药效和毒性的主要成分均为马钱子生物碱,约占 1.5% ~ 5%,其中最主要

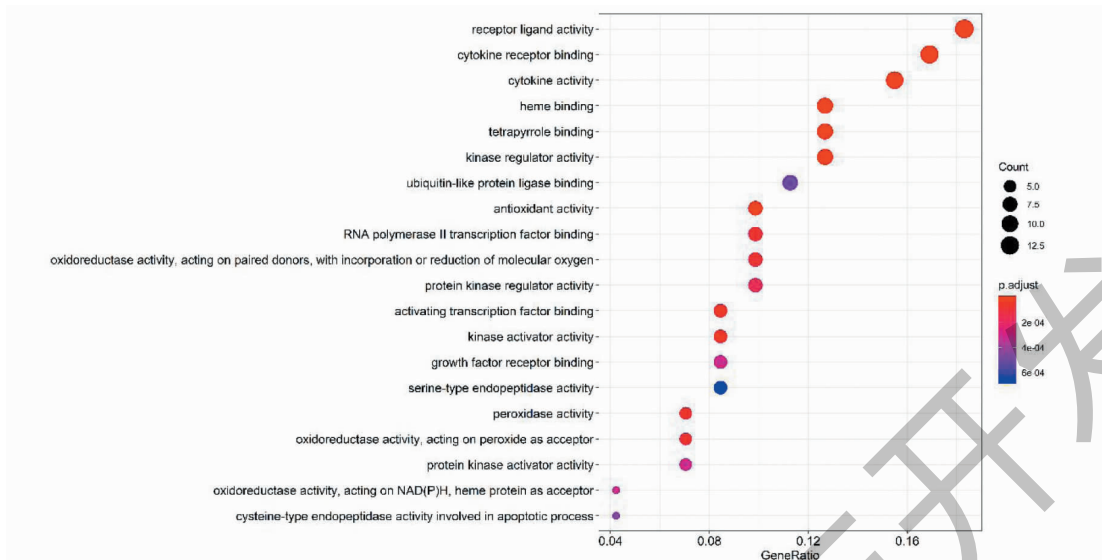


图 6 GO 功能富集分析气泡图

Fig. 6 The bubble chart of GO function enrichment analysis

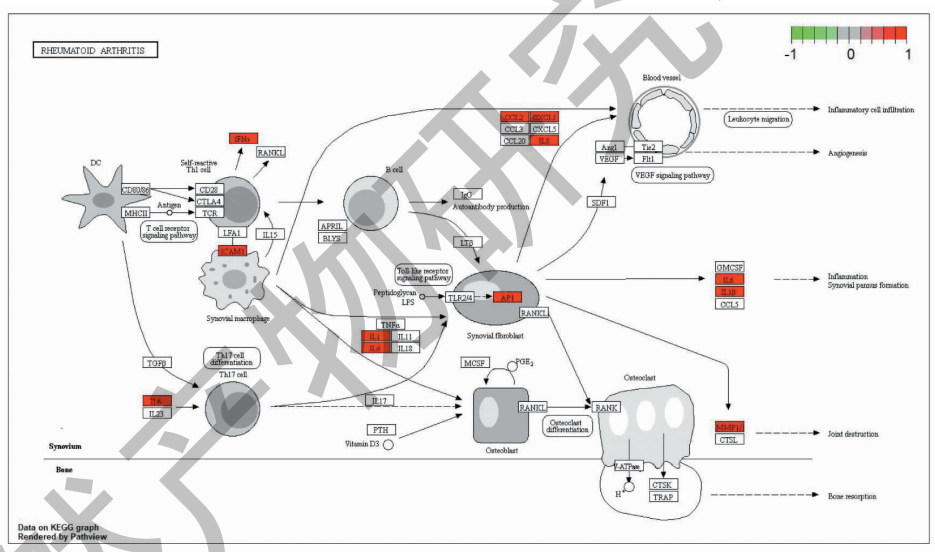


图 7 类风湿关节炎疾病通路图

Fig. 7 Rheumatoid arthritis disease pathway diagram

注:红色代表马钱子调控基因。Note: Red represents the gene regulated by *strychnos nux-vomica L.*

的生物碱为土的宁和马钱子碱,约占 70%^[9]。临床上马钱子需炮制后才可入药,而炮制的目的是通过改变土的宁和马钱子碱等毒性成分的结构,进而降低毒性,如将土的宁和马钱子碱转为相应的异构体和氮氧化物^[10]。研究表明,土的宁和马钱子碱的氮氧化物,其某些药理作用强于土的宁和马钱子碱,如马钱子碱氮氧化物在镇痛作用和抑制实验性炎症反应均强于马钱子碱^[11]。本研究得到的目标网络中包含了 12 个马钱子有效成分节点,这些节点近

一半为生物碱类化合物,包括(S)-甜菊碱((S)-stylopine)、异土的宁氮氧化物 I 和 II、土的宁次碱、马钱子碱氮氧化物、异马钱子碱。其中马钱子碱氮氧化物与 13 个基因相连,可能是马钱子抗 RA 的关键活性成分。

PPI 分析结果显示,前列腺素-过氧化物合酶 2 (PTGS2) 为最重要的中枢基因,共与 12 个基因相互作用。这一结果与蒋运斌等人分析雷公藤提取物抗 RA 的网络药理学分析结果一致^[12]。雷公藤亦为公

认的具有抗 RA 作用的中药之一。PTGS2, 又称环氧合酶, 是前列腺素生物合成中的关键酶, 主要负责产生炎性前列腺素, 促进炎症的发展^[13]。炎症反应是 RA 疾病临床症状的关键驱动因素, 而 PTGS2 过表达可导致 RA 滑膜成纤维细胞增殖, 进而促进滑膜血管翳的形成及炎症因子的释放^[14]。据报道马钱子碱氮氧化物和马钱子碱可显著抑制炎症组织中前列腺素 E2 的释放, 从而抑制滑膜血管生成, 并最终抑制角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀^[8]。因此, PTGS2 可能作为马钱子抗 RA 的潜在治疗靶点。

GO 功能分析和 KEGG 通路分析可以更明确马钱子治疗 RA 涉及的靶基因之间的相互作用。RA 关节滑膜炎炎症反应是主要的病理特征, 炎症反应需要多种细胞因子的协同作用, 如 TNF、IL-6、IL-1、IL-17 及 GM-CSF 等, 以及细胞因子与其受体结合激活相应下游炎症信号途径, 扩大炎症反应^[15]。GO 分析的结果表明 23 个基因主要集中于受体配体活性、细胞因子活性、细胞因子受体结合等。而 KEGG 通路分析结果表明马钱子的化学成分不仅可以直接作用于 RA 疾病的通路, 还可以证实了 23 个靶基因涉及到了多个与炎症反应密切相关的信号途径, 如 IL-17 信号途径、TNF 信号通路、NF- κ B 信号途径、Toll 样受体信号途径、HIF-1 信号途径、T、B 细胞信号途径、MAPK 信号途径及 JAK-STAT 信号途径等。以上途径均被报道与 RA 发病密切相关^[16-20]。研究表明, 马钱子碱可以通过抑制 MAPK 信号途径, 抑制 TNF- α 诱导的人类风湿关节炎成纤维细胞的增殖^[7]。通过本研究初步揭示了马钱子治疗 RA 的物质基础以及相关机制, 为后续实验研究及更深入的机制挖掘提供了参考依据。

参考文献

- Han LY, Wang Q, Qian K, et al. Study on molecular mechanism of Nanxu Yimu Tablet in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2020, 38(4): 149-152.
- Al-Bishri J, Attar S, Bassuni N, et al. Comorbidity profile among patients with rheumatoid arthritis and the impact on prescriptions trend [J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord, 2013, 6: 11-18.
- Singh JA, Wells GA, Christensen R, et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011(2): CD008794.
- Zhao JP, Zhao XJ, Chen XX, et al. Analysis of traditional

- Chinese medicine external use to treat rheumatoid arthritis [J]. J Med Forum(医药论坛杂志), 2017, 38(9): 5-7.
- Xie BX, Tang WZ, Wang XJ. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Strychnos nuxvomica* [J]. J Pharm Res(药学研究), 2014, 33: 603-606.
- Li CJ. 189 Cases of arthralgia treated by Maqianzi [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med(浙江中医杂志), 1986, 21(5): 196.
- Tang M. Effects of brucine on the growth of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced by TNF- α and the transformation of JNK in MAPK pathway [D]. Luzhou: Southwest Medical University(西南医科大学), 2014.
- Li Y, Wang J, Xiao Y, et al. A systems pharmacology approach to investigate the mechanisms of action of Semen Strychni and *Tripterygium wilfordii* Hook F for treatment of rheumatoid arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 175: 301-314.
- Jia XX, Li W, Li JS, et al. Progressive studies on toxicity of *Strychnos nuxvomica* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34: 2396-2399.
- Wang DD, Li W, Li JS, et al. Content change research of strychnine N-oxide and brucine N-oxide in maqianzi processing drugs circa [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2009, 27: 435-436.
- Wang DY. Preparation and evaluation of modified total alkaloid fraction from *nux vomica* [D]. Nanjing: Nanjing Univ Chin Med(南京中医药大学), 2014.
- Jiang Y, Zhong M, Long F, et al. Deciphering the active ingredients and molecular mechanisms of *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch against rheumatoid arthritis based on network pharmacology [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020: 2361865.
- Seibert K, Masferrer JL. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation [J]. Receptor, 1994, 4(1): 17-23.
- Wei Q, Lv F, Zhang H, et al. MicroRNA-101-3p inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis by targeting PTGS2 [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20191136.
- Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis [J]. Semin Immunopathol, 2017, 39: 365-383.
- Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in rheumatoid arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy [J]. Cytokine, 2015, 74(1): 101-107.