

基于“味性化味-网络靶点-分子对接”的藏药五味麝香丸治疗“真布”病的作用机制研究[△]

文成当智^{1*},张云森¹,仁真旺甲¹,才让南加^{1,2},贡保东知¹,切尼项毛¹,才让吉¹,刚焕晨雷^{1#},张 艺³(1.成都中医药大学民族医药学院,成都 611137;2.西藏藏医药大学研究生院,拉萨 850000;3.成都中医药大学民族医药学术传承创新研究中心,成都 611137)

中图分类号 R29;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0164-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.08

摘要 目的:探讨藏药五味麝香丸治疗“真布”病(即类风湿性关节炎)的可能机制。方法:以《四部医典》《卫生部药品标准(藏药)》《晶珠本草》为依据,搜集五味麝香丸的组方、剂量及显味,构建矢量结构模型,从六味、三化味、十七效等层面分析该方的药性,并利用 Gephi 0.9.2 复杂网络软件构建其治疗“真布”病的“组方-药性-疾病”网络。利用中药系统药理学分析平台、有机小分子生物活性数据库检索五味麝香丸的有效成分,并利用 BATMAN-TCM 网络药理学研究平台预测有效成分对应的靶标蛋白,借助 ETCM 数据库检索“真布”病的相关靶标蛋白;在筛选两者共同靶标的基础上,利用 DAVID 6.8 生物信息学资源数据库进行基因本体(GO)分析和 KEGG 通路富集分析,使用 Cytoscape 3.7.0 软件构建五味麝香丸-“真布”病-靶标-通路网络并进行网络拓扑学分析,以筛选核心靶标。以 Glide score 为评价指标,利用 Maestro Version 11.1.011 软件将上述核心靶标与五味麝香丸有效成分进行分子对接。结果与结论:五味麝香丸含诃子、铁棒锤、木香、藏菖蒲和人工麝香,以诃子剂量最高。该方六味以苦、甘为主,三化味以苦化味为主,十七效以钝、凉、重等为主,主要对治锐、热、轻等二十种特性。“组方-药性-疾病”网络中,十七效与二十种特性之间边权重值较大的为凉效-热性、钝效-锐性、重效-轻性、稀效-臭性(边权重值 ≥ 430)等。共得到五味麝香丸有效成分潜在靶标 2 306 个,“真布”病相关靶标 211 个;两者共同靶标 32 个,其对应的有效成分共 29 种。GO 分析共预测到 52 条相关结果,共同靶标主要位于胞外区、细胞核等部位,以免疫反应、炎症反应、细胞因子活性等生物学过程和分子功能为主。KEGG 富集结果显著的有 31 条($P < 0.05$),涉及肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、癌症途径等信号通路。五味麝香丸-“真布”病-靶标-通路网络中,含有效成分、靶标、通路节点 94 个、边 460 条;TNF、自杀相关因子(FAS)、白细胞介素 6(IL6)、IL10、自杀相关因子配体超家族成员 6(FASLG)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)、IL1B 等是该网络中的核心靶标,分别与奎宁酸、百里酚、去氢表雄酮、诺卡酮等有效成分以范德华力、氢键、疏水作用力、Pi-cation 键等连接,发挥治疗“真布”病的作用。

关键词 藏药;五味麝香丸;真布;类风湿性关节炎;味性化味;网络药理学;分子对接

- [7] 侯惠民,杞晓红,王浩.含有川芎嗪的组合物以及川芎嗪透皮贴剂及其制备方法:中国,1415296A[P].2003-05-07.
- [8] 王丽.磷酸川芎嗪制剂研究进展[J].科学技术创新,2018(27):46-47.
- [9] 任佳佳.马黄涂膜剂的制备及透皮吸收研究[D].济南:山东中医药大学,2016.
- [10] VITORINO C, JOÃO SOUSA, PAIS A. Overcoming the skin permeation barrier: challenges and opportunities[J]. *Curr Pharm Design*, 2015, 21(20): 1-2.
- [11] AHAD A, AQIL M, ALI A. Investigation of antihypertensive activity of carbopol valsartan transdermal gel containing 1, 8-cineole[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 144-149.
- [12] KIM JH, KO JA, KIM JT, et al. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(3): 725-732.
- [13] 张枝雪,黄茜,李玥,等.膜翅目昆虫提取物 Ento- II 涂膜剂的镇痛及活血化痰作用研究[J].中草药,2018,49(9): 2108-2113.
- [14] 谢玲,钟晓红,刘东波,等.紫珠止血涂膜剂成膜材料及附加剂的优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):27-29.
- [15] 张援,许实波,李向阳,等.不同接受液和动物皮肤对格列美脲体外经皮渗透行为的影响[J].中山大学学报(自然科学版),2004,43(5):86-90.
- [16] 肖学成,熊驰,彭秀菊,等. HPLC 测定他克莫司软膏体外透皮吸收[J].中国现代应用药理学,2014,31(7):839-843.
- [17] 崔颖,张韻慧,郭鹏.四元单纯形网格法优化磷酸川芎嗪微乳处方[J].中成药,2009,31(1):43-46.
- [18] 刘建芳,吕慧英,侯艳宁.涂膜剂的研究进展[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):325-327.
- [19] 赵培,于莹莹,王晓冬.乌头总碱贴片对不同动物皮肤经皮渗透性比较[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2007,23(6):27-29,67.
- [20] QI X, ACKERMANN C, SUN D, et al. Physicochemical characterization and percutaneous delivery of 2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine[J]. *Int J Pharm*, 2003, 253(1/2): 177-183.

△ 基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1703904);国家教育部“藏羌彝走廊民族医药传承与创新的大数据共享模式研究”(No.16XJC850001)

* 博士研究生。研究方向:藏医药基础与信息化。E-mail: wenchengdangzhi@aliyun.com

通信作者:讲师。研究方向:藏医药教学及现代化。E-mail: 417568314@qq.com

(收稿日期:2019-07-02 修回日期:2019-12-08)

(编辑:段思怡)

等层面分析五味麝香丸治疗“真布”病的作用机制,以在传统藏药药性与现代网络靶点间建立联系,提高藏药方剂研究的系统性。

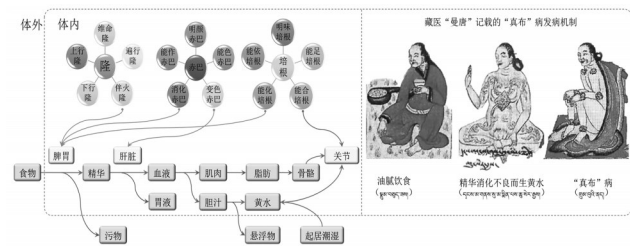


图1 基于藏医理论的“真布”病发病机制示意图

Fig 1 Illustration diagram of pathogenesis of “Grumbu” disease based on Tibetan medicine theory

1 资料与方法

1.1 药性分析

1.1.1 数据来源 以《四部医典》、《卫生部药品标准:藏药》^[4]、《晶珠本草》为依据,搜集五味麝香丸的组方、剂量、显味(即药味)。

1.1.2 矢量结构模型构建 以组方矢量(B)、剂量矢量(T)、配伍矢量(D)等3种影响方剂药性的矢量为基础,应用前期研究中构建的藏药药性分析方法,即应用方剂组方六味比值公式^[5]计算五味麝香丸中5种组方药材的六味比值(Y), $Y=X/[n+(n-1)+(n-2)+(n-3)+(n-4)+(n-5)]$,式中,“ Y ”表示药味递减间隔,“ X ”表示显味比例(本研究设显味占0.9、隐味占0.1),“ n ”表示显味记载味数且 $1 \leq n \leq 6$;应用“味性化味”矢量结构模型^[5]计算方剂整体的六味比值(R_m), $R_m = \sum_{n=1}^n (B_n T_n D_1 + B_2 T_2 D_2 + \dots + B_n T_n D_n)$,式中,“ R_m ”表示六味之某一味的比值总和,“ n ”表示方剂组方药物个数。根据六味与十七效的关系,计算十七效比值,并根据《四部医典》记载的六味、三化味、八性、二十种特性等的关系分析上述指标的相应比值。所得各比值越高,表明所对应的药性越强^[5]。

1.1.3 网络构建 取“1.1.2”项下所得五味麝香丸的六味、三化味、八性、十七效等比值,根据十七效与二十种特性的关系,计算二十种特性与三因等数据,导入Gephi 0.9.2复杂网络软件,采用“FaceAtlas 2”模块,并根据不同属性进行修正,构建五味麝香丸治疗“真布”病的“组方-药性-疾病”网络(网络中,节点代表方剂组方药材与疾病之间的潜在药性,边代表两者的内在关联);在统计模块中分析边权重值,即节点之间的关联强度。

1.2 网络靶点分析

1.2.1 五味麝香丸有效成分及靶标筛选 借助中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)、有机小分子生物活性数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)等,检索五味

麝香丸组方药材的有效成分及其结构信息,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选条件^[6],将筛选结果的“sdf”格式文件导入BATMAN-TCM网络药理学研究平台(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>),预测上述有效成分的对应靶标蛋白,并借助ETCM数据库(<http://www.nrc.ac.cn/9090/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>)检索“真布”病的相关靶标蛋白。

1.2.2 共同靶标筛选 应用Excel 2016中的“SUMIF”“VLOOKUP”等函数,筛选五味麝香丸的有效成分和“真布”病的靶标蛋白,获取二者的共同靶标。

1.2.3 网络构建与机制分析 将“1.2.2”项下所获共同靶标导入DAVID 6.8生物信息学资源数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中进行“五味麝香丸-‘真布’病-基因”的基因本体(GO)和KEGG通路富集分析;使用Cytoscape 3.7.0软件构建“五味麝香丸-‘真布’病-靶标-通路”网络,并进行可视化展示和网络拓扑学分析。网络中,节点代表化合物、靶蛋白、通路,边代表化合物-靶标-通路之间的相互关联。应用该软件中的“Network analyzer”功能,计算网络节点度值(该值反映了网络中与某节点相连边的数量),并选择网络中的核心靶标(节点度值 ≥ 11)进行分子对接^[7]。

1.3 分子对接分析

1.3.1 数据来源 将“1.2.3”项下所得核心靶标导入生物大分子空间结构(PDB)数据库(<http://www.rcsb.org>),并下载其“pdb”格式文件;应用ChemBio 3D Ultra 14软件对与核心靶标相关的五味麝香丸有效成分结构进行优化。

1.3.2 分子对接 应用Maestro Version 11.1.011软件的“Protein preparation wizard”插件对核心靶标进行对接预处理,通过“OPLS-2005力场”进行能量优化,在中性条件下加氢,优化氢键,优化均方根平均差(RMSD)至0.03 nm;以核心靶标活性空腔为对接中心,使用该软件的“Glide/receptor grid generation”模块生成格点文件;利用该软件的“LigPrep”模块建立小分子包裹,通过“OPLS-2005力场”进行能量优化,获得小分子配体;采用该软件的“Glide/ligand docking”插件将上述处理好的配体和靶标进行分子对接,为柔化配体非极性部分的电势,将比例因子设置为0.80,局部电荷阶段值设置为0.15,每个配体保留5 000个姿势,作为对接的初始阶段,选择“标准精度(SP)柔性对接”,进行对接后将能量最小化,设“拒绝最小姿势”的能量阈值为0.50 kcal/mol(1 cal=4.19 J),对接效果评价采用“Glide score”评分功能。该评分以“Chem score”为基础,且包含了一个空间冲突项,并添加了其他奖罚项[如隐极性项(根据薛定谔

设计来惩罚静电失配)、酰胺扭转项、疏水封闭项和排除体积项],可作为评价化合物与蛋白结合能力的综合性指标。将对接分子的Glide score绝对值由高到低进行排序,以阳性对照药和自身配体作为参考;若无,则参考Glide score绝对值>5^[8-9]。

2 结果

2.1 药性分析结果

2.1.1 组方和剂量 五味麝香丸中,诃子的组方剂量最高,其次为铁棒锤;药味以苦味为主,详见表1。

表1 五味麝香丸的组方、药味和剂量

Tab 1 Formulation, flavor and dosage of Wuwei shexiang pills

组方	药味	组方剂量,g	剂量占比,%
诃子	涩	20	50.6
铁棒锤	甘、苦	10	25.3
木香	苦、辛	5	12.7
藏菖蒲	辛	3	7.6
人工麝香	苦	1.5	3.8

2.1.2 药性分析 根据“味性化味”矢量结构方程,推算五味麝香丸的六味药性和三化味药性,发现该方六味以苦、甘为主,三化味以苦化味为主,十七效以钝、凉、重等为主,八性以凉为主,主要对治锐、热、轻等二十种特性,详见表2、表3、图2(表3、图2中,“*”表示赤巴之轻)。

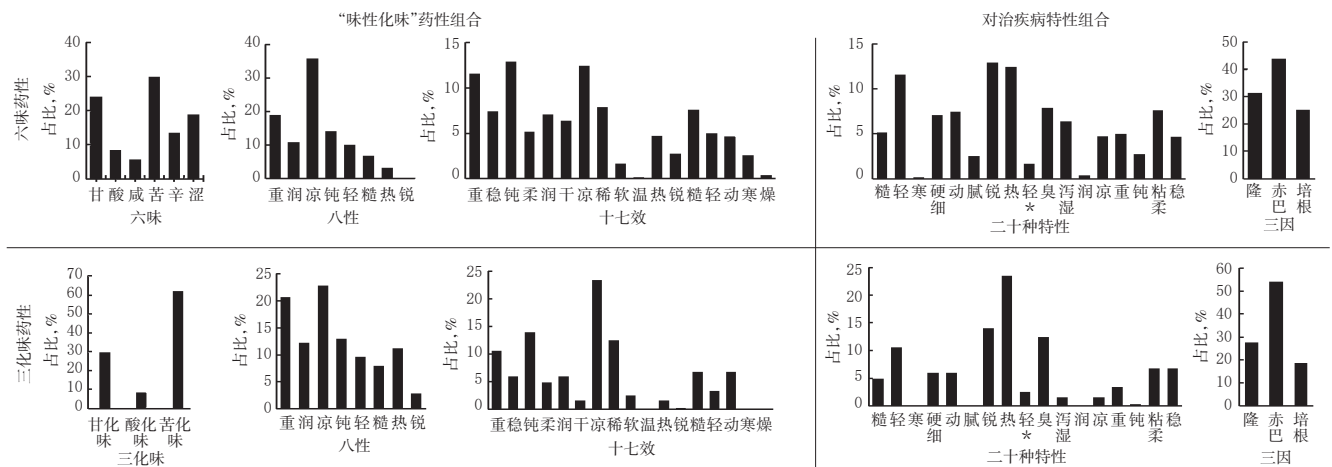


图2 基于“味性化味”的五味麝香丸药性组合和特性组合

Fig 2 Property combination and characteristic combination of Wuwei shexiang pills based on “Ro Nus Zhu rJes”

2.1.3 构建“组方-药性-疾病”网络 根据六味、十七效、二十种特性、三因等的关系,构建五味麝香丸治疗“真布”病的“组方-药性-疾病”网络,发现十七效与二十种特性之间边权重值较大的为凉效-热性-钝效-锐性-重效-轻性-稀效-臭性(边权重值≥430)等。其中,凉效和钝效、稀效等主要来自诃子的涩味、木香的苦味等,重效主要来自铁棒锤的甘味等;主要通过钝效、凉效、稀效对治锐、热、臭等赤巴的特性来调整病症,详见图3(图中,“&”为八性,“*”为十七效,“#”为二十种特性;“sx”为麝香,“hz”为诃

表2 五味麝香丸的六味、三化味的比值

Tab 2 Six tastes and three tastes after digestion of Wuwei shexiang pills

项目	药味	比值	占比,%
六味	苦	11.8	29.9
	甘	9.5	24.1
	涩	7.4	18.7
	辛	5.3	13.4
	酸	3.3	8.3
	咸	2.2	5.6
三化味	苦化味	24.5	62.0
	甘化味	11.7	29.6
	酸化味	3.3	8.4

表3 五味麝香丸的十七效对治的二十种特性的比值

Tab 3 Ratio of seventeen effects of Wuwei shexiang pills to twenty characteristics

十七效	对治的二十种特性	比值	占比,%	十七效	对治的二十种特性	比值	占比,%
钝	锐	464.1	12.9	轻	重	179.8	5.0
凉	热	446.0	12.4	热	凉	168.7	4.7
重	轻	415.7	11.6	动	稳	166.0	4.6
稀	臭	282.6	7.9	锐	钝	98.2	2.7
糙	粘柔	273.7	7.6	寒	温	91.6	2.5
稳	动	266.6	7.4	软	轻*	59.5	1.7
润	硬细	254.4	7.1	燥	润	13.2	0.4
干	泻湿	228.8	6.4	温	寒	4.9	0.1
柔	糙	185.0	5.1				

活性、花生四烯酸结合等为主;细胞部位以胞外区、细胞核、细胞外间隙等为主,其中富集基因数较多的15条生物学功能见表4。

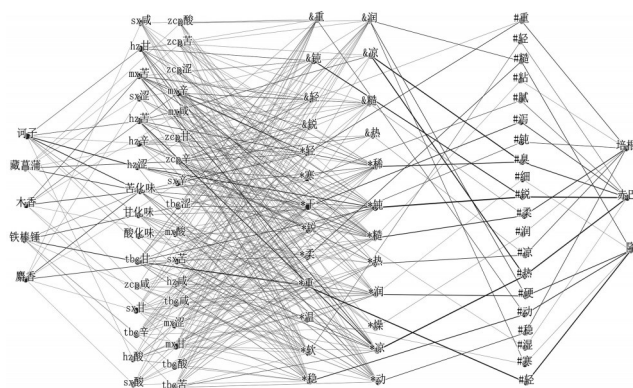


图3 五味麝香丸“组方-药性-疾病”网络

Fig 3 Network diagram of “formulation-property-disease” of Wuwei shexiang pills

表4 五味麝香丸-“真布”病-基因的GO分析结果

Tab 4 GO analysis results of Wuwei shexiang pills-“Grum bu” disease-gene

类别	基因功能	富集基因,个	P
生物学过程	免疫反应	6	9.0×10^{-5}
	炎症反应	5	9.3×10^{-4}
	RNA聚合酶II启动子转录的阳性调控	5	1.9×10^{-3}
	参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性的激活	4	7.4×10^{-5}
	核因子κB(NF-κB)活性的阳性调节	3	1.3×10^{-2}
分子功能	固有免疫应答	3	6.0×10^{-2}
	质膜外侧	3	2.4×10^{-2}
	细胞因子活性	6	8.5×10^{-6}
	花生四烯酸结合	3	3.4×10^{-5}
细胞部位	蛋白质同二聚化活性	3	1.3×10^{-2}
	肿瘤坏死因子受体结合	2	1.7×10^{-2}
	胞外区	12	1.3×10^{-4}
	细胞核	11	5.6×10^{-3}
	细胞外间隙	10	1.1×10^{-5}
	细胞表面	3	9.5×10^{-2}

2.2.2 五味麝香丸-“真布”病-基因的KEGG通路富集分析结果 两者共同靶标共筛选出KEGG富集通路33条,其中 $P < 0.05$ 的有31条。肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、癌症通路、细胞因子-细胞因子-受体相互作用等15条通路富集的基因数 ≥ 3 ,详见表5(按富集基因数量由多到少排列)。

2.2.3 五味麝香丸-“真布”病-靶标-通路网络 构建的五味麝香丸-“真布”病-靶标-通路网络详见图4(图中,“▲”表示有效成分,“◆”表示靶标蛋白,“●”表示通路;MIF为巨噬细胞移动抑制因子,FAS、FASLG为自杀相关因子及其配体超家族成员6,IL1B、IL10、IL6为白细胞介素亚型,BDKRB2为缓激肽B2受体,NOD2为核苷酸结合寡聚域样受体2,SLC22A6为人类有机阴离子转运蛋白1,PTGS2为前列腺素内过氧化物合酶2,GNAS为

表5 五味麝香丸-“真布”病-基因的KEGG通路富集分析结果

Tab 5 KEGG pathway enrichment results of Wuwei shexiang pills-“Grum bu” disease-gene

信号通路(英文名称)	P	富集基因
TNF信号通路(TNF signaling pathway)	1.7×10^{-5}	IL6,NOD2,TNF,PTGS2,FAS,TNFAIP3
癌症通路(Pathways in cancer)	5.9×10^{-3}	IL6,PTGS2,FASLG,GNAS,BDKRB2,FAS
细胞因子-细胞因子-受体相互作用(Cytokine-cytokine-receptor interaction)	3.2×10^{-4}	IL6,TNF,TNFSF11,FASLG,FAS,IL10
查加斯病(Chagas disease)	1.6×10^{-5}	IL6,TNF,FASLG,GNAS,FAS,IL10
非洲锥虫病(African trypanosomiasis)	3.1×10^{-5}	IL6,TNF,FASLG,FAS,IL10
叉头框转录因子O亚族信号通路(FoxO signaling pathway)	6.9×10^{-4}	IL6,RAG1,FASLG,RAG2,IL10
阿米巴病(Amoebiasis)	2.7×10^{-4}	IL6,TNF,GNAS,IL10,COL5A1
NF-κB信号通路(NF-kappa B signaling pathway)	2.6×10^{-3}	TNF,TNFSF11,PTGS2,TNFAIP3
炎症性肠病(Inflammatory bowel disease)	8.6×10^{-4}	IL6,NOD2,TNF,IL10
结节样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)	4.5×10^{-4}	IL6,NOD2,TNF,TNFAIP3
移植宿主病(Graft-versus-host disease)	1.5×10^{-4}	IL6,TNF,FASLG,FAS
同种异体排斥反应(Allograft rejection)	1.9×10^{-4}	TNF,FASLG,FAS,IL10
麻疹(Measles)	7.8×10^{-3}	IL6,FASLG,FAS,TNFAIP3
1型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus)	7.1×10^{-3}	TNF,FASLG,FAS
自身免疫性甲状腺疾病(Autoimmune thyroid disease)	1.1×10^{-2}	FASLG,FAS,IL10

鸟苷酸结合蛋白活性刺激肽,PIK3R1为磷脂酰肌醇3激酶调节亚基1,TNFSF11为肿瘤坏死因子配体成员11,COMT为咖啡酸-O-甲基转移酶,LRR8A为富含亮氨酸重复蛋白8A,TCF3为T细胞因子3,RAG1、RAG2为重组激活基因蛋白亚型,TNFAIP3为肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3,HPRT1为次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶1,APOE为载脂蛋白E,GDF5为生长分化因子5,TRPV1为瞬时受体电位香草酸受体1,PTPN2为非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶2,S100A8、S100A9为血清S100钙结合蛋白A8、A9,ALOX5AP为5-脂氧合酶激活蛋白,COL1A1为胶原蛋白I,PLA2G1B为磷脂酶A2 I B,COL5A1为人V型胶原 $\alpha 1$ 链,ALOX5为人花生四烯酸5-脂加氧酶)。由图4可见,该网络共含共同靶标相应有效成分、靶标、通路等节点94个、边460条。

“五味麝香丸-真布病-靶标-通路网络”靶标的节点度值详见表6。由表6可见,TNF、FAS、IL6、IL10的节点度值较高,可能是五味麝香丸治疗“真布”病的核心靶标。

2.3 分子对接结果

选择网络节点度值 ≥ 11 的7个核心靶标(TNF、FAS、IL6、IL10、FASLG、PTGS2、IL1B)与五味麝香丸的29种有效成分进行分子对接,结果见表7(表中,“-”表示无对应Glide score;有3种成分Glide score的绝对值小于自身配体或小于5,故未列出)、图5(对接结果以Glide score绝对值最高的为例)。

奎宁酸可与FASLG、IL6很好地结合,Glide score分

表6 “五味麝香丸-真布病-靶标-通路网络”靶标的节点度值

Tab 6 Target node degree values of Wuwei shexiang pills-“Grum bu” disease-target-pathway network

序号	靶标	节点度值	序号	靶标	节点度值
1	TNF	28	8	GNAS	9
2	FAS	21	9	TCF3	7
3	IL6	20	10	TNFSF11	7
4	IL10	18	11	BDKRB2	7
5	FASLG	17	12	ALOX5	6
6	PTGS2	13	13	TRPV1	6
7	IL1B	11	14	TNFAIP3	6

化合物主要通过范德华力和氢键的方式与这两个靶标结合。

百里酚与FAS、IL1B的结合亲和力较强, Glide score分别为-4.231、-6.383, 其绝对值分别大于FAS自身配体和IL1B阳性对照药米诺环素的Glide score(-4.012、-4.954)绝对值。从2D和3D构象可见, 百里酚可与FAS中的氨基酸残基Arg55形成Pi-cation键、与Gly66形成氢键; 与IL1B中的Lys65形成氢键; 此外, 由于各键定向力(如结构中羟基、氨基等强吸电子基或苯环等供电子基)的差异, 导致化合物在结合区域中的位置构型发生了一定的变化, 从而影响整个蛋白的构型。

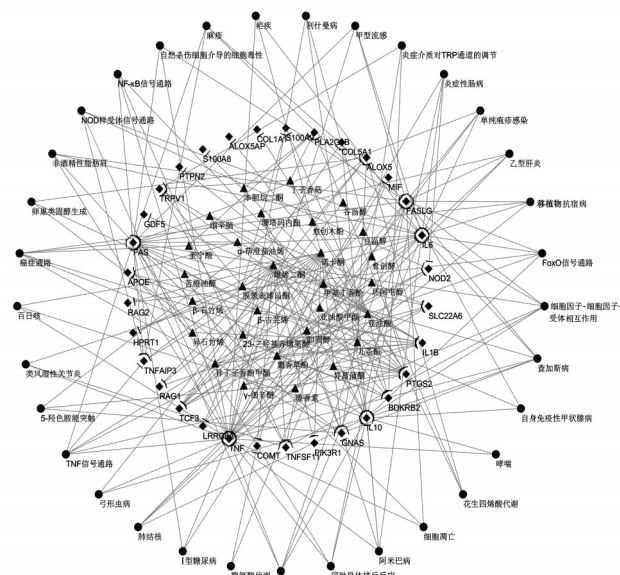


图4 五味麝香丸-“真布”病-靶标-通路网络

Fig 4 Wuwei shexiang pills-“Grum bu” disease-target-pathway network

别为-5.932、-6.703, 且该化合物与IL6结合的Glide score绝对值大于IL6阳性对照药穿心莲内酯的Glide score(-4.283)绝对值。从2D和3D构象可见, 奎宁酸可分别与FASLG、IL6的Loop区中的氨基酸残基形成6个氢键, 并完全处于两个靶标的疏水Loop区内, 表明该

表7 五味麝香丸有效成分与“真布”病核心靶标对接的Glide score

Tab 7 Glide scores of Wuwei shexiang pills effective component-core targets of “Grum bu” disease docking

有效成分(英文名称)	FASLG	IL6(穿心莲内酯;-4.283)	FAS(自身配体;-4.012)	PTGS2(自身配体;-10.182)	TNF(自身配体;-6.954)	IL10	IL1B(米诺环素;-4.954)
奎宁酸(Quinic acid)	-5.932	-6.703	-3.876	-6.056	-5.082	-	-5.271
异丁香酚甲醚(Methyl isoeugenol)	-5.010	-4.665	-2.767	-6.122	-5.239	-5.035	-4.476
5 α -雄甾烷二酮(5 α -androstane-3,17-dione)	-5.526	-4.208	-	-6.916	-5.960	-4.903	-4.492
α -蒾澄茄烯(α -cubebene)	-4.620	-3.982	-	-7.009	-5.887	-5.463	-4.761
雄烯二酮(Androstenedione)	-5.326	-4.303	-	-7.094	-5.905	-4.914	-5.059
2 α ,19 α ,23-三羟基齐墩果酸(Arjungenin)	-	-3.183	-	-3.591	-5.152	-3.498	-3.289
裂叶苣荬菜内酯(Balchanin)	-4.192	-3.790	-	-6.799	-5.820	-5.564	-4.130
β -细辛脑(β -asarone)	-4.494	-4.057	-3.156	-6.343	-5.488	-5.441	-5.316
β -石竹烯(β -caryophyllene)	-4.731	-4.056	-	-5.967	-6.117	-5.491	-4.475
β -古芸烯(β -gurjunene)	-4.619	-3.949	-2.808	-6.570	-5.723	-5.458	-4.549
邻苯二酚(Catechol)	-5.371	-5.473	-4.062	-5.815	-5.387	-4.613	-5.045
胆固醇(Cholesterol)	-4.065	-2.984	-	-6.201	-6.137	-5.092	-4.028
环阿屯醇(Cycloartenol)	-3.362	-2.969	-	-6.271	-5.599	-5.338	-3.331
去氢表雄酮(Dehydroepiandrosterone)	-5.639	-4.428	-	-7.313	-6.821	-5.841	-4.645
榄香素(Elemicin)	-3.973	-4.264	-2.737	-5.743	-5.326	-5.287	-4.783
γ -细辛醚(γ -sarone)	-4.241	-3.903	-3.337	-6.193	-5.570	-5.127	-4.590
愈创木酚(Guaiacol)	-5.208	-5.356	-3.770	-5.997	-5.443	-5.368	-5.032
愈创醇(Guaiol)	-5.647	-4.098	-	-5.418	-6.372	-5.437	-5.355
异菖蒲酮(Isoacoramone)	-4.902	-5.368	-2.850	-6.518	-5.413	-3.840	-5.639
异石竹烯(Isocaryophyllene)	-4.346	-3.818	-	-6.356	-6.138	-5.670	-4.430
白桦脂酸(Mairin)	-3.029	-1.899	-	-5.163	-5.114	-4.758	-3.143
甲基丁香酚(Methyleugenol)	-4.472	-4.187	-2.705	-5.626	-4.870	-4.990	-4.474
诺卡酮(Nootkatone)	-5.431	-3.488	-	-6.410	-5.579	-6.428	-5.302
β -谷甾醇(β -sitosterol)	-3.651	-2.179	-	-5.508	-5.837	-4.965	-4.011
豆甾醇(Stigmasterol)	-4.071	-	-	-5.798	-6.216	-6.022	-3.933
百里酚(Thymol)	-5.820	-5.206	-4.231	-6.627	-6.242	-5.675	-6.383

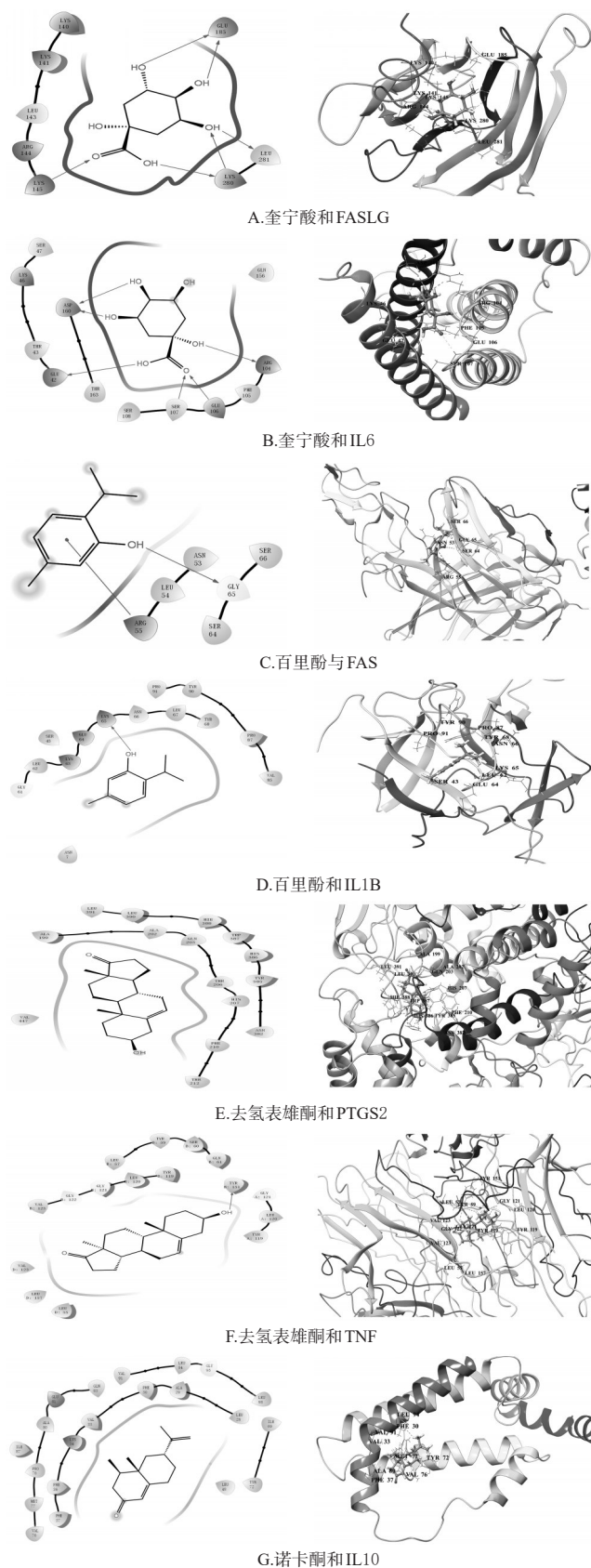


图5 五味麝香丸有效成分与“真布”病关键靶标的分子对接结果

Fig 5 Molecular docking of Wuwei shixiang pills effective component-key targets of “Grum bu” disease

去氢表雄酮与PTGS2、TNF的亲和力尚可, Glide score分别为-7.313、-6.821,但其绝对值均略小于靶标的自身配体的Glide score(-10.182、-6.954)绝对值。从2D和3D构象可见,去氢表雄酮仅与TNF中的TyrB151形成1个氢键;此外,去氢表雄酮虽未与TNF、PTGS2形成大量氢键,但化合物整体处于两个靶标的疏水Loop区内,提示氨基酸和化合物自身的疏水作用力同样可使配体与靶标稳定结合。

诺卡酮与IL10结合的Glide score为-6.428。两者的结合较为特殊,其既未生成氢键,也无共轭等相互作用力,原因可能与IL10蛋白结构较为简单有关。但从两者结合的3D构象可见,诺卡酮位于IL10的3个 α 螺旋链中,处于氨基酸最为丰富的位置,且位于适于结合的疏水空腔内,故两者的结合较为稳定。

3 讨论

藏医认为“真布”病是由于久居湿地、食用凉黏腻性食物等外因引起三胃火失衡,逐渐导致关节部位“三火”功能紊乱而引发,其病机由培根偏盛逐渐转化成赤巴偏盛^[10]。本研究以“味性化味”理论分析五味麝香丸的药性,发现该方在六味中苦、甘、涩味偏盛,累计占比超过70%;这三味均属凉性,皆具有对治赤巴的作用,且甘味也有克制隆的作用。三化味中苦化味占62.0%,根据三化味与三因的关系,提示该方经三胃火消化后凉性增强,药性峻烈,可对治极度偏盛性赤巴。十七效以钝、凉、重、稀、糙等为主,其中钝、凉、稀等可对治锐、热、臭(有“稠”之寓意)等赤巴特性引起的生疮糜烂、热性病、津血黏稠等病机,重可对治轻等隆特性引起的触觉敏感、游走性疼痛等,而糙可对治粘柔等培根特性引起的微管污垢增多、脉络堵塞等病机。因此,五味麝香丸的药性有效对治“真布”病的局部热症、黄水沉积、微管堵塞等赤巴性病机,可见藏医治疗“真布”病不仅考虑了病机的发源,还注重三因的盛衰和热寒的平衡。从“味-化味-性-效”的“味性化味”组合视角来看,该方具有“苦甘涩味-苦化味-重凉性-凉钝稀重效”药性组合,对治“热锐臭-赤巴-热”的疾病特性组合,形成药性组合与特性组合的轴承关系,从“真布”病的热寒、三因、二十种特性等层面进行多层次、多维度治疗,有效揭示了五味麝香丸治疗“真布”病的药性途径,也初步揭示了藏医治疗慢性热性疾病的隐形规律。

本研究以维持机体平衡的基因网络作为整体、以五味麝香丸有效成分与“真布”病的共同靶标为切入点,利用网络药理学方法分析发现,五味麝香丸的有效成分主要集中在胞外区、细胞核、细胞外间隙等部位,主要通过

TNF 信号通路、细胞因子-细胞因子-受体相互作用等信号通路,细胞因子活性、花生四烯酸结合等分子功能以及免疫反应、炎症反应等生物学过程来发挥治疗“真布”病的作用。网络拓扑学分析共筛选出 TNF、FAS、IL6、IL10、FASLG、PTGS2、IL1B 等 7 个核心靶标。

本研究进一步将上述 7 个核心靶标与五味麝香丸的 29 个有效成分进行分子对接,有 26 个成分可与靶标实现对接;奎宁酸、百里酚、去表雄酮、诺卡酮可与 FASLG、IL6、IL1B 等核心靶标较好地连接。其中, TNF 信号通路可促使促炎症细胞因子(IL1B)、趋化因子、生长因子和 TNF- α 本身等编码基因的表达,从而放大机体炎症反应和免疫效应^[11-12]。TNF 在炎症发生过程中具有核心作用,其主要由巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞分泌,是“真布”病治疗的靶标之一。过度分泌的 TNF- α 可刺激白细胞浸润,活化内皮细胞生成血管,并诱导细胞因子、趋化因子、黏附分子以及基质酶的生成,从而导致滑膜炎炎症反应和关节破坏^[13-14]。此外有研究发现, TNF- α 能激活 NF- κ B, 后者活化后不仅可增强 TNF- α 、IL6、黏附分子等编码基因的转录水平,还可借助其与炎症因子间的正反馈效应使炎症反应和机体损伤持续恶化;同时, NF- κ B 还与血管翳形成和软骨侵蚀密切相关^[15-16]。本研究分子对接结果显示,麝香的有效成分去氢表雄酮和百里酚分别可通过范德华力和疏水作用力与 TNF、IL1B 结合,从而影响靶标的活性。FAS 是一种存在于多种细胞系中的细胞表面受体分子, FASLG 为其配体。FAS/FASLG 系统凋亡障碍可产生大量的自身抗体,使关节组织细胞异常增殖,从而引发炎症反应,最终诱发“真布”病^[17-18]。本研究分子对接结果显示,诃子的有效成分奎宁酸可与 FASLG Loop 区中的氨基酸残基形成 6 个氢键,麝香的有效成分百里酚可与 FAS 的氨基酸残基形成 Pi-cation 键、氢键,可能是该配体活性下调的主要原因。IL6 水平变化与“真布”病免疫炎症和骨质破坏密切相关,且在造血过程中也具有重要作用^[19-20]。IL6 可诱导上皮细胞增殖形成血管翳;同时可作用于内皮细胞表面以激活黏附分子,从而诱导肝细胞合成多种急性时相蛋白,驱动 B 细胞分化并产生免疫球蛋白、类风湿因子,激活效应 T 细胞以及抑制调节性 T 细胞的反应^[21]。当生长因子和 IL6 等分泌异常时,破骨细胞和成骨细胞间的平衡被打破,从而造成骨破坏,其水平高低可间接反映“真布”病患者的病情严重程度^[22]。本研究分子对接结果显示,诃子的有效成分奎宁酸可与该靶标 Loop 区中的氨基酸残基形成 6 个氢键,这可能是 IL6 水平变化的原因之一。PTGS2 是一种诱导因子,在炎症介质、细胞因子、促癌剂、激素等因素诱导下表达,可催化产生前列

腺素等具肝毒性的炎症介质,是炎症发生的重要环节,在免疫调节、炎症反应、脂质代谢、细胞凋亡等生物过程中具有至关重要的作用^[23-24];同时,PTGS2 也是自发性关节炎的主要相关因子,与“真布”病的发生相关^[25]。本研究分子对接结果显示,麝香的有效成分去氢表雄酮与 PTGS2 的 Glide score 为 -7.313,亲合力强,且结合位点位于 Loop 区,可通过疏水作用调节靶标的活性。IL10 为抗炎细胞因子,可拮抗 NF- κ B 信号通路的活性进而发挥抑制炎症反应的作用,同时还可对部分炎症反应起到负调控作用^[26]。本研究分子对接结果显示,木香的有效成分诺卡酮可与 IL10 较好地结合,虽未见氢键、共轭等相互作用力,但该化合物可通过靶标 α 螺旋链中的疏水空腔与 IL10 稳定结合,从而达到增加 IL10 分泌、抑制炎症反应的目的。

综上所述, TNF、FAS、IL6、IL10、FASLG、PTGS2、IL1B 等可能为五味麝香丸治疗“真布”病的核心靶标,分别与奎宁酸、百里酚、去氢表雄酮、诺卡酮等有效成分以范德华力、氢键、疏水作用力、Pi-cation 键等连接,发挥治疗作用。本研究基于藏药药性理论,结合前期研究构建的“味性化味”矢量结构模型,并应用网络靶点和分子对接等分析方法,对藏医常用方剂五味麝香丸治疗“真布”病的作用机制进行了多维度、多层次分析,对藏药方剂的药性分析和临床应用具有积极意义,可为揭示藏医思维的科学价值和传承临床用药的内在规律提供理论支撑。但本研究仅借助网络药理学和分子对接等生物信息学方法对五味麝香丸治疗“真布”病的作用机制进行预测,暂未能进行细胞、动物等生物学验证,因此本课题组将继续汇总并研究藏医古籍记载的五味麝香丸不同配伍剂量的药性并进行多成分-多靶点-多通路的生物学验证,从而实现五味麝香丸的“剂量定位-临床定位”。

参考文献

- [1] 王静,赵可惠,泽翁拥忠,等.基于关联规则和熵方法的藏医药治疗“真布病”组方用药规律分析[J].中华中医药学刊,2017,35(11):2885-2888.
- [2] 宇妥·云丹贡布.四部医典:藏文版[M].拉萨:西藏人民出版社,1982:376-380.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:617-618.
- [4] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[S].北京:人民卫生出版社,1995:34-76.
- [5] 文成智,贡保东知,贡却拉姆,等.藏族药药性量化的新方法:“味性化味”矢量结构模型构建[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(19):147-154.
- [6] 刘妍,谢敏子,张璐,等.采用网络药理学研究黄芪-葶苈子药对治疗心力衰竭的作用机制[J].中国药房,2019,30

- (11):1513-1518.
- [7] 杨释岑,刘志强,刘和波,等.利用网络药理学方法研究交泰丸治疗糖尿病的作用机制[J].中国药房,2018,29(19):2656-2661.
- [8] 郑茜,王朝晖,祁增,等.24-羟基-人参二醇的抗癌作用及基于分子对接的机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(6):81-88.
- [9] 范芳芳.藏药大花红景天抗氧化应激药效物质辨识研究[D].成都:成都中医药大学,2018.
- [10] 金巴才旺.金巴四部医典注释:第1册[M].北京:民族出版社,2006:132-143.
- [11] VARFOLOMEEV E, GONCHAROV T, MAECKER H, et al. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF- κ B and MAPK activation by members of the TNF family of receptors[J]. *Sci Signal*, 2012. DOI:10.1126/sci-signal.201878.
- [12] 杨释岑,刘志强,刘和波,等.利用网络药理学方法研究交泰丸治疗糖尿病的作用机制[J].中国药房,2018,29(19):2656-2661.
- [13] ROSSOL M, SCHUBERT K, MEUSCH U, et al. Tumor necrosis factor receptor type I expression of CD4⁺ T cells in rheumatoid arthritis enables them to follow tumor necrosis factor gradients into the rheumatoid synovium[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(6):1468-1476.
- [14] CHEN G, SHAW MH, KIM YG, et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2008, 4(4):365-398.
- [15] BAI S, LIU H, CHEN KH, et al. NF- κ B-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor α -mediated apoptosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(12):3844-3855.
- [16] BENITO MJ, MURPHY E, MURPHY EP, et al. Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheuma*, 2014, 50(6):1781-1787.
- [17] 王鑫,魏平.类风湿关节炎患者B细胞上 Fas 受体表达与疾病活动度相关性研究[J].医学研究杂志,2016,45(8):138-141.
- [18] 王红霞,裘宇容,包杰,等.类风湿关节炎患者外周血 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ T 细胞与 FAS 介导的凋亡关系研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(4):311-314.
- [19] 李涛.类风湿性关节炎患者 IL-6、IL-17、OPG、RANKL 水平检测及临床意义[J].数理医药学杂志,2014,27(3):277-279.
- [20] 刘海波,王茜,苏利沙,等.类风湿性关节炎患者 C1q、SAA 和 IL-6 水平的变化及意义[J].中国卫生检验杂志,2013,23(10):2311-2313.
- [21] TANG CH, CHUANG JY, FONG YC, et al. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF- κ B pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(8):1483-1492.
- [22] NAIDU VG, DINESH BABU KR, THWIN MM, et al. RANKL targeted peptides inhibit osteoclastogenesis and attenuate adjuvant induced arthritis by inhibiting NF- κ B activation and down regulating inflammatory cytokines[J]. *Chem Biol Interactions*, 2013, 203(2):467-479.
- [23] GUO Y, ZHANG X, TAN W, et al. Platelet 12-lipoxygenase Arg261Gln polymorphism: functional characterization and association with risk of esophageal squamous cell carcinoma in combination with COX-2 polymorphisms[J]. *Pharmacogenetics Genomics*, 2007, 17(3):197-205.
- [24] 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.
- [25] YAN J, FENG J, JIAN Y, et al. Identifying a major locus that regulates spontaneous arthritis in IL-1ra-deficient mice and analysis of potential candidates[J]. *Genetics Research*, 2011, 93(2):95-103.
- [26] 曹爽,章成义.浅谈 IL-1、IL-6、IL-10 在类风湿疾病中的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(25):49-50.

(收稿日期:2019-06-20 修回日期:2019-11-25)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅