

基于网络药理学探究百部止咳作用的机制及实验验证

刘畅, 梁爽, 郭雨莹, 姜焱, 蒙艳丽*, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要: **目的** 利用网络药理学探讨百部发挥止咳作用的活性成分、作用靶点及相关通路, 探究百部止咳的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 获取并筛选百部主要活性成分及其对应的作用靶点, 利用 Uniprot 蛋白质数据库将作用靶点标准化, 利用 Cytoscape 构建百部“成分-靶点”网络; 利用 GeneCards 获取并筛选疾病“咳嗽”的作用靶点, 利用 VENN 获取交集靶点, 将结果提交至 String 平台, 获取蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络; 使用 metascape 进行基因本体 (GO) 富集分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并通过微生信平台将结果进行可视化, 根据与咳嗽相关程度对通路进行筛选, 利用 Cytoscape 构建百部“成分-靶点-通路”网络。利用 RT-PCR 法检测前列腺素内过氧化物合成酶 2 (PTGS2)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) mRNA 水平上的表达变化。**结果** 获取及筛选得到百部活性成分 28 个, 作用靶点 96 个, 咳嗽靶点 1 170 个, 交集靶点 39 个; GO 功能富集分析显示其与对雌二醇、类固醇激素、脂多糖、药物的反应及血管形态发生及血管发育等相关, KEGG 通路富集分析显示其与 T 细胞受体信号通路、Nod 样受体信号通路、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路、NF- κ B 信号通路等相关。RT-PCR 结果表明百部对 PTGS2、CASP3、MAPK14 表达有明显的抑制作用。**结论** 百部可能通过抑制 PTGS2、CASP3、MAPK14 因子的表达发挥止咳作用, 为探究百部止咳的作用机制提供了理论参考。

关键词: 百部; 咳嗽; 作用机制; 网络药理学; 前列腺素内过氧化物合成酶 2; 胱天蛋白酶 3; 丝裂原活化蛋白激酶 14

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)03-0493-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.03.007

Mechanism of *Stemona Radix* in treatment of cough based on network pharmacology and experimental validation

LIU Chang, LIANG Shuang, GUO Yu-ying, JIANG Yan, MENG Yan-li, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: Objective To explore the active components, action targets and related pathways of *Stemona Radix* in treatment of cough based on network pharmacology, and to explore the mechanism of relieving cough. **Methods** The main active components and their corresponding targets of *Stemona Radix* were obtained and screened by TCMSP, and action targets were standardized using Uniprot protein database. Cytoscape was used to construct hundreds of “component-target” networks. GeneCards was used to obtain and screen the targets of “cough”, and VENN was used to obtain the intersection targets, and the results were submitted to String platform to obtain the PPI network. Metascape was used for GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis, and the results were visualized by micromessenger. Pathways were screened according to the degree of cough correlation, and Cytoscape was used to construct hundreds of “component - target - pathway” networks. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression changes of PTGS2, CASP3 and MAPK14. **Results** 28 Active ingredients, 96 targets, 1 170 cough targets and 39 intersection targets were obtained. GO functional enrichment analysis showed that it was involved in the response to estradiol, steroid, lipopolysaccharide, drugs and related to vascular morphogenesis and vascular development. KEGG pathway enrichment analysis showed that it was related to T cell receptor signaling pathway, Nod-like receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, VEGF signaling pathway,

收稿日期: 2021-11-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174060); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (LH2021H074); 黑龙江省卫生健康委科研课题 (20210202040011)

作者简介: 刘畅, 女, 研究方向为中药学。E-mail: 1368821756@qq.com

*通信作者: 蒙艳丽, 研究员, 研究方向为新药研发。E-mail: mengyanli2000@163.com

王伟明, 研究方向为中药新产品开发、中药材综合利用与加工。E-mail: wangweiming475@yahoo.com

NF- κ B signaling pathway. Real-time PCR results showed that *Stemona Radix* had significant inhibitory effect on *PTGS2*, *CASP3* and *MAPK14* mRNA expression. **Conclusion** *Stemona Radix* may relieve cough by inhibiting the expression of *PTGS2*, *CASP3* and *MAPK14* mRNA, which provides theoretical reference for exploring the specific mechanism of *Stemona Radix* in treatment of cough.

Key words: *Stemona Radix*; cough; mechanism of action; network pharmacology; *PTGS2*; *CASP3*; *MAPK14*

咳嗽是临床常见的呼吸系统疾病之一,病因病机复杂。中医认为咳嗽是因邪犯肺系、肺失宣肃、肺气上逆所致的一组病症^[1]。长期咳嗽引起焦虑、失眠、困倦、声音嘶哑等症状,严重影响患者的生活质量^[2]。临床目前多采用西医常规治疗,但存在药物不良反应明显和耐药等问题^[3]。中医则使用清肺化痰、止咳平喘类中药进行辨证论治,预后效果良好,不易出现耐药^[4]。百部是百部科百部属植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq.) Miq.、蔓生百部 *S. japonica* (Blume) Miq.或对叶百部 *S. tuberosa* Lour.的干燥块根^[5]。其性微温,味甘、苦,归肺经,具有润肺止咳、杀虫等功效,临床用于新久咳嗽、肺劳咳嗽、百日咳等症^[6]。其止咳的主要活性成分为百部生物碱,是该科植物特有的具有吡咯或吡啶并氮杂莨母核结构的生物碱^[7]。此外,百部还含有芪类、去氢苯并呋喃醇类、绿原酸类、类鱼藤酮类、醌类和香豆素类等非生物碱类成分^[8]。百部成分复杂,因此明确其在止咳中的作用机制是目前研究的主要任务。网络药理学是基于系统生物学的理论,在系统生物学与计算机技术高速发展的基础上发展起来的新学科^[9]。中药体系比较复杂,人体复杂的生物系统与中药复方复杂的化学系统之间的相互作用尤为复杂^[10]。利用网络药理学构建“药物成分-靶点-疾病”相互作用网络,系统地观察药物对疾病网络的干预与影响,揭示多组分药物对人体起治疗效应的作用机制^[11],这与中医学整体论、辨证论治的指导原则相符,体现了中药及其复方的多成分、多靶点共同作用的特点。因此本研究旨在通过网络药理学方法,明确百部止咳的主要活性成分及其潜在作用靶点以及相关通路,为百部临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药品、试剂和仪器

百部饮片购自哈尔滨同仁堂,经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定,鉴定为百部科植物百部。百部浸膏的制备:称取百部饮片 63 g,水煎 2 次,每次 90 min,滤过后合并 2 次滤液,滤液在 60 °C

浓缩至相对密度 1.30~1.35,备用。肺炎支原体(ATCC 15531)购自 American Type Culture Collection。阿奇霉素分散片(0.25 g/片)购自石药集团欧意药业有限公司,批号 274180404。枸橼酸喷托维林购自上海玉瑞生物科技(安阳)药业有限公司,批号 190305。PPLO 冻干粉购自美国 BD 公司,批号 7110677;胎牛血清购自美国 Hyclone,货号 SH30070.03;RNA 提取试剂盒购自中国 Tiangen 公司,货号 DP419;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒购自美国 Promega 公司,货号 A6020;引物购自上海生物工程有限公司;奥地利 TECAN M200 多功能酶标仪、MYSPIN-12 迷你离心机、ST-16R 型低温高速离心机 DL-CJ-1N 超净工作台、中国博日 Line Gene 9600 RT-PCR 仪、BHC-1300IIA/B3X 型生物洁净安全柜、BPN-80CH 二氧化碳培养箱。

1.2 动物

SPF 级 6 周龄 C576BL 雄鼠共 50 只,购自哈尔滨医科大学实验动物学部,体质量(20±2)g,生产许可证号 SCXK(黑)2009-001。小鼠于 25 °C、湿度 60% GLP 实验室饲养。

2 方法

2.1 百部化学成分的筛选及其潜在作用靶点的获取

打开中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>),检索条件选择“Herb name”,对百部的化学组成成分进行检索,筛选口服利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 的化学成分,然后查找每个化学成分对应的靶点,利用 Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>),筛选条件选择“Reviewed”,物种选择“Human”获得蛋白质靶点对应的标准基因名。

2.2 百部“化学成分-作用靶点”网络的构建

将 2.1 项获得的百部化学成分及各成分对应的潜在靶点文件导入 Cytoscape 软件(3.8.2),得到百部“成分-靶点”网络,并进行网络拓扑分析。

2.3 咳嗽靶点的获取及筛选

打开 GeneCards 平台(<https://www.genecards>。

org/), 以“cough”为关键词进行检索, 导出结果, 根据“Relevance score”项对靶点进行筛选。

2.4 百部与咳嗽交集靶点的获取及 PPI 网络的构建

打开 VENNY2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 将 2.1 项百部潜在作用靶点及 2.3 项咳嗽相关靶点导入取交集, 生成韦恩图。将得到的交集靶点提交至 String 平台(<https://string-db.org/>), 得到蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。获得 TSV 格式文件, 并将其导入 Cytoscape 软件(3.8.2), 依据 Degree 及 combined-score 进行网络拓扑分析。

2.5 基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

使用 metascape (<https://metascape.org/>) 对 2.4 项交集靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。选择 GO 功能中的生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC)3 个参数对基因进行富集分析。其中物种选择 H.Sapiens, 点击 Custom Analysis (自定义分析)。通过微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 得到条形图及气泡图。

2.6 百部与咳嗽“成分-靶点-通路”网络的构建

将 2.5 项得到的 KEGG 通路富集分析结果进行筛选, 得到咳嗽相关通路, 并获取上述通路靶点信息, 根据靶点反向获得与其对应的百部化学成分, 将百部化学成分、潜在作用靶点、咳嗽相关通路信息, 导入 Cytoscape 软件(3.8.2), 得到百部“成分-靶点-通路”网络。

2.7 肺炎支原体培养、小鼠分组、支原体造模及给药

在无菌条件下取灭菌后的 PPLO 7 mL、胎牛血清(56 °C 灭活 0.5 h) 2 mL、酵母浸提液 1 mL、50% 葡萄糖 200 μL 以及青霉素 25 μL (20 万 U/mL), 混匀并滤过。在无菌操作台中取 1 mL 支原体菌液加入上述培养基 9 mL, 于 5 % CO₂、37 °C 条件下培养, 当观察到颜色由红色变为黄色时, 进行小鼠滴鼻造模。

随机将 C57BL/6 小鼠分为对照组、模型组、阿奇霉素组、枸橼酸喷托维林组、百部组, 每组 10 只。模型组和各给药组小鼠连续 3 d 滴鼻(20 μL) 感染肺炎支原体, 造模成功后进行给药。通过课题组前期实验, 得到芩苈清肺浓缩丸对肺炎支原体感染小鼠最佳给药剂量, 进而确定百部给药剂量^[12-14], 根据成人用药剂量计算阿奇霉素、枸橼酸喷托维林的小鼠给药剂量; 阿奇霉素 32 mg/kg、枸橼酸喷托维林 10.4 mg/kg、百部浸膏 770 mg/kg、1 次/d, 连续

ig 给药 1 周。对照组和模型组每天 ig 相同体积纯水, 小鼠末次给药 30 min 后, 进行氨水引咳实验, 引咳后处死取肺。

2.8 RT-PCR 实验检测小鼠肺组织前列腺素内过氧化物合成酶 2(PTGS2)、胱天蛋白酶 3(CASP3)、丝裂原激活蛋白激酶 14(MAPK14) mRNA 表达

各组小鼠肺组织收集后加入 Trizol 试剂提取 RNA, 经酶标仪在波长 260 nm 和 280 nm 处检测浓度后, 将纯度在 1.8~2.0 的 RNA 用焦碳酸二乙酯水稀释至质量浓度为 100 ng/μL。PCR 反应体系: 1 μL 稀释后的小鼠肺组织 RNA, 1 μL 上下游引物, 17 μL 反应液(按 PCR 试剂盒说明书配制)。扩增条件: 95 °C 10 min, 95 °C、10 s; 60 °C、30 s; 72 °C、30 s, 40 个循环; 熔解曲线条件: 95 °C 10 s、台阶采样、台阶温度 0.5 °C。引物基因序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
PTGS2	F: CTG GTG CCT GGT CTG ATG ATG TAT G R: GGA TGC TCC TGC TTG AGT ATG TCG
CASP3	F: TCT GAC TGG AAA GCC GAA ACT CTT C R: GTC CCA CTG TCT GTC TCA ATG CC
MAPK14	F: CTG GCT CGG CAC ACT GAT GAT G R: GCC CAC GGA CCA AAT ATC CAC TG F: CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA R: AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC

分别计算各组 C_t 值的平均值, 采用相对定量法计算除模型组外其余 4 组相对于模型组的 2^{-ΔC_t} 值。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行数据分析, 通过单因素方差分析方法分析组间差异, 相关数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 百部化学成分的筛选及其潜在作用靶点的获取

通过 TCMSP 检索共获取百部化学成分 110 个, 以 OB≥30%、DL≥0.18 为条件进行筛选得到百部化学成分 28 个(表 2), 删除 4 个无潜在作用靶点成分, 潜在作用靶点 96 个。

3.2 百部“化学成分-作用靶点”网络的构建

将百部化学成分及潜在作用靶点 network 文件及 type 文件导入 cytoscape, 构建“化学成分-作用靶点”网络。圆形表示百部中化学成分, 菱形表示潜在作用靶点, 依据 Degree 进行网络拓扑学分析,

表 2 百部中的化学成分

Table 2 Chemical ingredients in *Stemona Radix*

ID	MOLID	化学成分	OB/%	DL
BB1	MOL001558	芝麻素 (sesamin)	56.55	0.83
BB2	MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	36.91	0.75
BB3	MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75
BB4	MOL000392	芒柄花黄素 (formononetin)	69.67	0.21
BB5	MOL000449	豆甾醇 (stigmaterol)	43.83	0.76
BB6	MOL005384	苏齐内酯 (suchilactone)	57.52	0.56
BB7	MOL009363	对叶百部碱 C (tuberostemonine C)	55.34	0.74
BB8	MOL009374	7-甲氧基-3-甲基-2,5-二羟基-9,10-二氢菲 (7-methoxy-3-methyl-2,5-dihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene)	59.00	0.21
BB9	MOL009377	二氢新对叶百部碱 (bisdehydroneotuberostemonine)	51.14	0.74
BB10	MOL009379	2-氧代斯替宁碱 (2-oxostenine)	72.94	0.34
BB11	MOL009380	双去氢百部新碱 (bisdehydrostemoninine)	38.51	0.73
BB12	MOL009381	双去氢百部新碱 A (bisdehydrostemoninine A)	62.64	0.68
BB13	MOL009382	双去氢百部新碱 B (bisdehydrostemoninine B)	46.05	0.64
BB14	MOL009386	3,3'-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)2H-1-苯并呋喃 [3,3'-bis-(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran]	52.11	0.54
BB15	MOL009387	百部碱 (didehydrotuberostemonine)	51.91	0.74
BB16	MOL009388	二氢百部新碱 (dihydrostemoninine)	68.01	0.72
BB17	MOL009394	曼生百部碱 (semonamine)	45.19	0.35
BB18	MOL009409	氧代百部新碱 (oxystemoninine)	42.79	0.77
BB19	MOL009411	原百部次碱 (protostemoninine)	45.99	0.75
BB20	MOL009414	直立百部生物碱 C (sessilifoliamide C)	65.87	0.20
BB21	MOL009419	直立百部生物碱 H (sessilifoliamide H)	43.68	0.68
BB22	MOL009422	直立百部类生物碱 B (sessilifoline B)	58.81	0.29
BB23	MOL009423	直立曼生百部碱 A (sessilistemonamine A)	40.28	0.73
BB24	MOL009424	直立曼生百部碱 B (sessilistemonamine B)	40.64	0.73
BB25	MOL009430	蔓生百部酰胺 (stemonamide)	67.46	0.38
BB26	MOL009431	百部碱 (stemonine)	81.75	0.72
BB27	MOL009433	百部碱 B (stemoninine B)	74.77	0.73
BB28	MOL009434	百部新酰胺碱 (stemoninoamide)	66.70	0.33

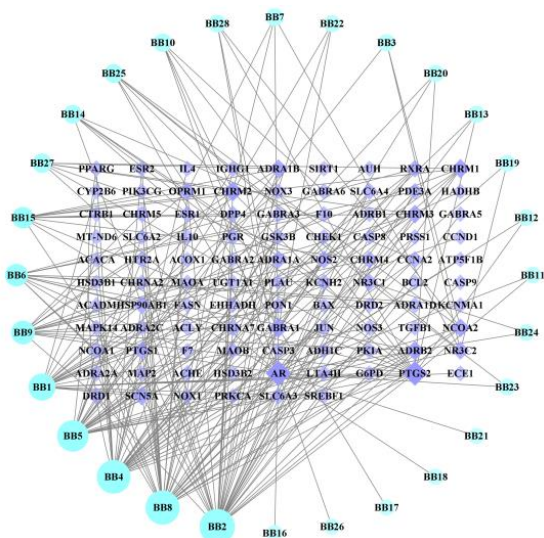


图 1 “成分-靶点”网络

Fig. 1 Ingredient-target network

其中 Dgree 越大, 颜色越深, 图形面积越大。

3.3 咳嗽相关靶点获取及筛选

打开 GeneCards 平台 (<https://www.genecards.org/>), 以 “cough” 为关键词进行检索, 共获取靶点 4 374 个, 导出结果, 根据 “Relevance score” 项筛选分值 $\geq 1.233\ 089\ 685$ 的靶点共得到 1 170 个靶点。

3.4 百部与咳嗽交集靶点获取及 PPI 网络构建

利用 Venny2.1 将 1 170 个咳嗽靶点与 96 个百部主要化学成分潜在作用靶点映射绘制韦恩图 (图 2), 即得到百部与咳嗽的交集靶点 39 个 (表 3), 将获得的交集靶点信息提交至 String 平台, 物种选择 “Homo sapiens”, 在 Settings 页面进行下述设置: 最小相互作用阈值选择 0.400, 网络显示选项选择隐藏网络中断开连接的节点。在 PPI 网络图中, 共有个 38 节点, 176 条边, 平均自由度为 9.26, 平均介数为 0.572,

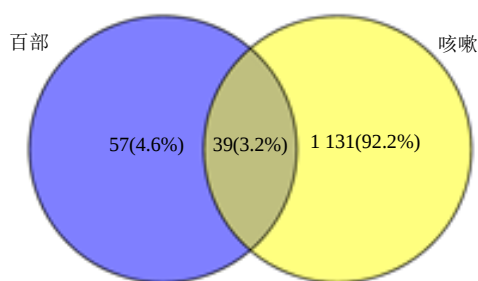


图 2 百部与咳嗽作用靶点交集韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of intersection targets between *Stemonae Radix* and cough

网络节点代表靶点蛋白, 线条代表靶点蛋白之间的联系, 线条越多表示关联程度越大 (图 3)。下载 TSV 文件并导入到 cytoscape 中, 并依据 Degree 及 combined-score 进行网络拓扑分析, 其中 Degree 越大, 图形面积越大; combined-score 分值越高线条越粗 (图 4)。

3.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

使用 metaspice 对百部与咳嗽交集靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。通过微生信得到条形图及气泡图 (图 5)。通过与疾病匹配程度进行筛选共得到 16 个通路 (表 4)。

表 3 交集靶点基本信息

Table 3 Basic information of intersection targets

缩写	靶点	Degree
PTGS2	前列腺素氧化环化酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	19
CASP3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)	19
JUN	Jun 原癌基因 (Jun proto-oncogene)	18
ESR1	雌激素受体 1 (estrogen receptor 1)	18
NOS3	一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3)	17
PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)	17
CCND1	细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)	16
MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14)	16
IL10	白细胞介素 10 (interleukin 10)	16
IL4	白细胞介素 4 (interleukin 4)	14
NR3C1	核受体家族 3 C1 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1)	14
CASP8	半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 8 (Caspase-8)	13
CASP9	半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 9 (Caspase-9)	13
TGFB1	转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1)	12
NOS2	一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2)	12
PGR	孕激素受体 (progesterone receptor)	11
ADRB2	肾上腺素受体 β 2 (adrenoceptor β 2)	8
SLC6A4	溶质载体家族 6 4 (solute carrier family 6 member 4)	8
BAX	Bcl2 相关 X 蛋白 (Bcl2 associated X)	7
CCNA2	细胞周期蛋白 A2 (Cyclin A2)	7
CYP2B6	细胞色素 P450 2B6 (cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6)	7
PTGS1	前列腺素氧化环化酶 1 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1)	7
CHRM2	M 胆碱能受体 2 (cholinergic receptor muscarinic 2)	6
BCL2	Bcl2 凋亡调节器 (Bcl2 apoptosis regulator)	6
PLAU	尿激酶型纤溶酶原激活剂 (plasminogen activator, urokinase)	6
OPRM1	阿片受体 1 (opioid receptor mu 1)	5
SLC6A2	溶质载体家族 6A2 (solute carrier family 6 member 2)	4
DPP4	二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4)	4
PIK3CG	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma)	4
CHRNA7	胆碱能受体烟碱 α 7 亚基 (cholinergic receptor nicotinic α 7 subunit)	4
DRD1	多巴胺受体 D1 (dopamine receptor D1)	4
G6PD	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase)	4
NR3C2	核受体亚家族 3 C2 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 2)	4
ADRB1	肾上腺素受体 β 1 (adrenoceptor β 1)	3
CHRNA2	胆碱能受体烟碱 α 2 亚基 (cholinergic receptor nicotinic α 2 subunit)	3
UGT1A1	UDP 葡萄糖醛酸转移酶家族 1 A1 (UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1)	3
LTA4H	白三烯水解酶 A4 (leukotriene A4 hydrolase)	2
PDE3A	磷酸二酯酶 3A (phosphodiesterase 3A)	1

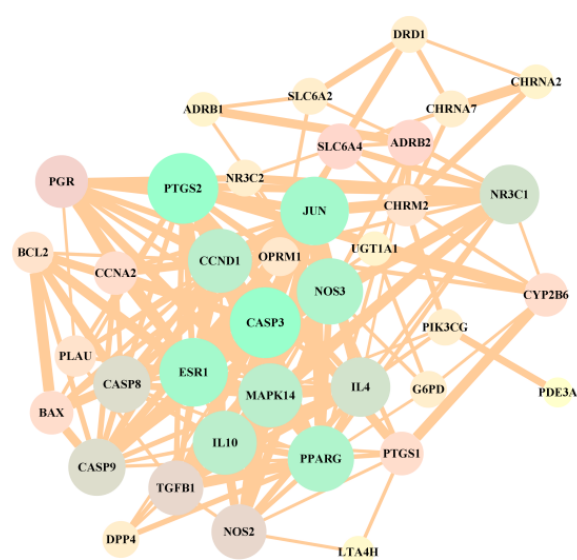


图 4 百部与咳嗽交集靶点 PPI 网络拓扑分析

Fig. 4 PPI network diagram of intersection targets between *Stemona Radix* and cough

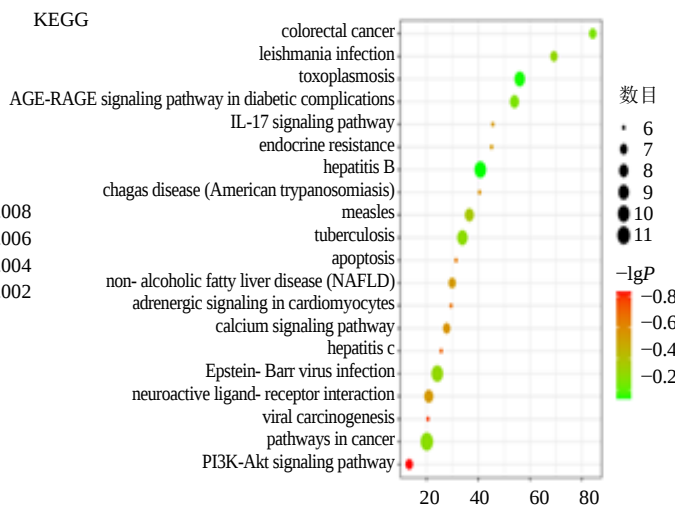
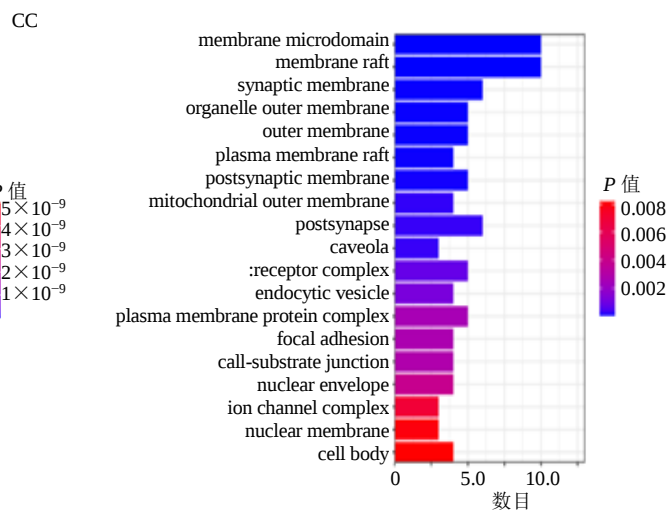


Fig. 5 Enrichment analysis of GO and KEGG passage

表 4 KEGG 功能富集分析信号通路
Table 4 Functional enrichment analysis of KEGG signaling pathways

信号通路中文名称	信号通路英文名称
肺结核	tuberculosis
AGE-RAGE 信号通路	AGE-RAGE signaling pathway
IL-17 信号通路	IL-17 signaling pathway
环磷酸腺苷信号通路	camp signaling pathway
百日咳	pertussis
肿瘤坏死因子信号通路	TNF signaling pathway
T 细胞受体信号通路	T cell receptor signaling pathway
Th17 细胞分化	Th17 cell differentiation
Nod 样受体信号通路	NOD-like receptor signaling pathway
丝裂原活化蛋白激酶信号通路	MAPK signaling pathway
血管内皮生长因子信号通路	VEGF signaling pathway
血小板激活	platelet activation
Th1 和 Th2 细胞分化	Th1 and Th2 cell differentiation
Toll 样受体信号通路	Toll-like receptor signaling pathway
甲型流感	influenza A
NF-κB 信号通路	NF-κB signaling pathway

3.6 百部与咳嗽“成分-靶点-通路”网络的构建

将 2.5 项 KEGG 通路富集分析筛选出的 16 个咳嗽相关通路, 22 个相关靶点, 并结合 2.1 项百部成分及潜在作用靶点对应关系, 得到 19 个与咳嗽相关的成分 (图 6)。其中 β-谷甾醇、芒柄花黄素、豆甾醇、7-甲氧基-3-甲基-2,5-二羟基-9,10-二氢菲、二去氢新对叶百部碱为百部在咳嗽通路中的主要作用成分, PTGS2、JUN、NOS3、MAPK14、TGFB1

为百部止咳通路中的重要靶点。

3.7 百部对小鼠肺组织 *PTGS2*、*CASP3*、*MAPK14* mRNA 表达的影响

从图 7 可见, 与对照组比, 模型组 *PTGS2*、*CASP3*、*MAPK14* mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明造模成功。与模型组比, 阿奇霉素组、枸橼酸喷托维林组、百部组 *PTGS2*、*CASP3*、*MAPK14* mRNA 表达均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

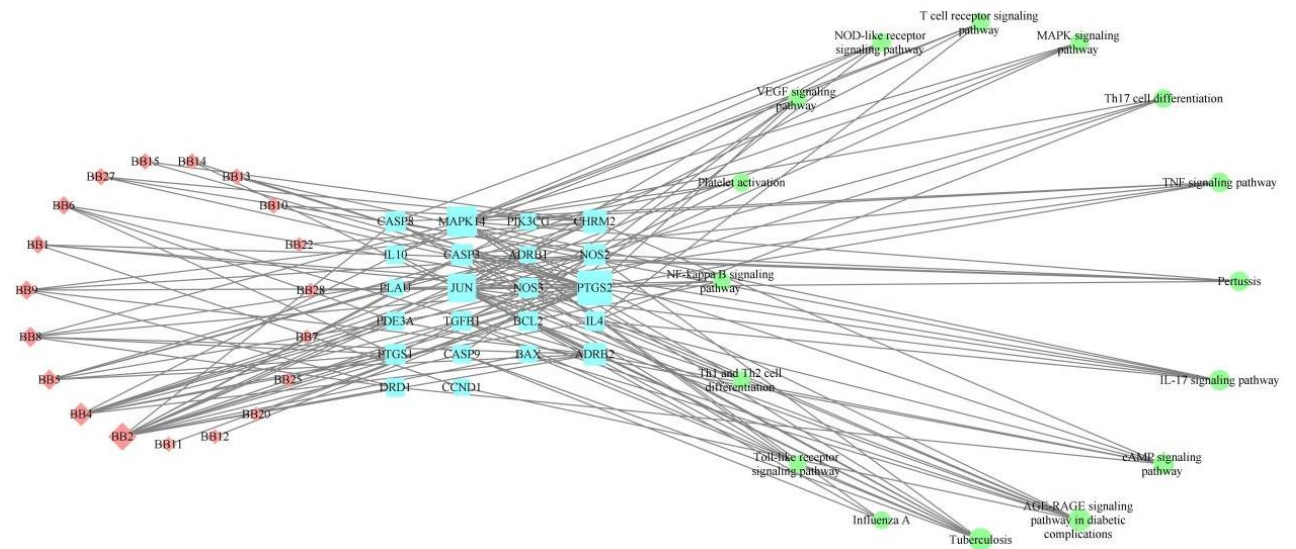


图 6 “成分-靶点-通路”网络
Fig. 6 “Ingredient-target-pathway” network

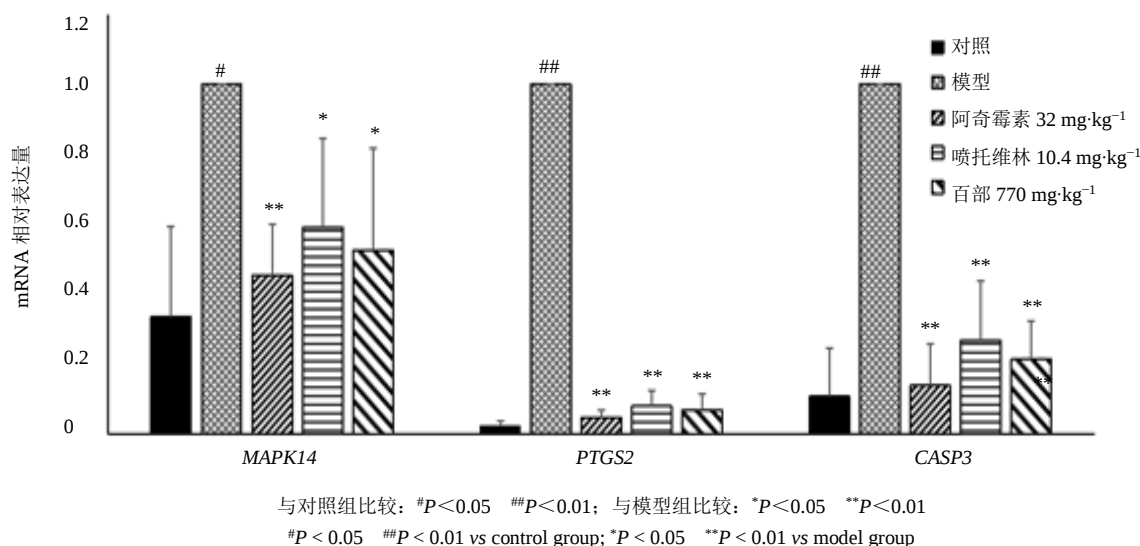


图 7 百部对小鼠肺组织 *PTGS2*、*CASP3*、*MAPK14* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 7 Effects of *Stemonae Radix* on *PTGS2*, *CASP3*, *MAPK14* mRNA expression in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

4 讨论

咳嗽的发生发展与气道的炎症反应相关, 其中 *TNF- α* 是常见的炎症反应性细胞因子, 属于气道强刺激剂, 使呼吸道黏液分泌增多、促进炎症介质释放、降低呼吸道纤毛的摆动频率, 加强气道反应性, 引发咳嗽^[15-16]。百部则能够增强呼吸功能, 杀灭致病细菌, 降低机体炎症水平, 缓解炎症引起的咳嗽^[17]。本研究结果显示, 通过 TCMSP 筛选得到百部化学成分 28 个, 对应 96 个作用靶点; 通过 GeneCards 平台筛选得到 1 170 个咳嗽相关靶点; 通过 Venny 2.1 共获得 39 个百部与咳嗽的交集靶点。通过 String 平台对 39 个交集靶点进行蛋白互作网络分析, 其中 *PTGS2*、*CASP3*、*JUN*、*ESR1*、*NOS3*、*PPARG*、*CCND1*、*MAPK14*、*IL10*、*IL4*、*NR3C1*、*CASP8*、*CASP9*、*TGFB1*、*NOS2*、*PGR* 的 Degree > 10, 是百部与咳嗽的核心靶点。

将交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 其中 GO 功能富集分析显示: 其参与对雌二醇、类固醇激素、脂多糖、药物的反应; 对细菌源性分子的响应; 细胞对有机环化合物的反应; 血液循环; 对营养水平、细胞外刺激、无机物的反应; 细胞对脂质的反应系统进程的调节; 细胞对氮化合物及有机氮化合物的反应; 血管形态发生及血管发育等生物过程。在分子功能层面上与内吞作用、离子通道等有关。在细胞组分上主要作用于细胞器外膜、线粒体外膜、突触后膜、突触膜、核膜、黏着斑、质膜蛋白复合物等。KEGG 功能富集分析共

得到 150 个通路, 结果显示其与利什曼原虫感染、弓形虫病、IL-17 信号通路、内分泌抵抗、乙型肝炎、恰加斯病(美洲锥虫病)、麻疹、结核病、非酒精性脂肪肝 (NAFLD)、心肌细胞肾上腺素能信号通路、钙信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经活性配体-受体相互作用物等信号通路相关。

通过对百部“成分-靶点-通路”网络进行分析, 得到 BAX、BCL2、*CASP3*、*CASP8*、*CASP9*、*MAPK14*、*IL10*、*NOS2*、*TGFB1*、*CCND1*、*JUN*、*NOS3*、*IL4*、*PTGS2*、*ADRB1*、*ADRB2*、*CHRM2*、*DRD1*、*PDE3A*、*PIK3CG*、*PTGS1*、*PLAU* 共 22 个百部“成分-通路”相关靶点。研究表明, *PTGS2*、*PTGS1* 在炎症的治疗中发挥重要作用^[18]; *MAPK14* 通过调控 T 细胞受体信号通路、Th1、Th2、Th17 细胞分化参与机体免疫应答^[19]; *PTGS2*、*MAPK14* 通过调控 VEGF 和 MAPK 信号通路, 参与血管形态及血管发生发育, 从而修复受损肺组织, 使肺血管再生^[20]。因此, 初步推测百部通过与 *PTGS2*、*PTGS1*、*MAPK14* 等靶点结合, 调控 *IL4*、*IL10* 等炎症因子及 MAPK、VEGF、T 细胞受体、Th1 和 Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、*TNF* 等信号通路, 进而抑制炎症反应的产生, 改善咳嗽患者的预后, 提高患者免疫力。有研究表明 β -谷甾醇具有免疫调节、抗氧化及抗肿瘤等作用^[21-22]; 豆甾醇可能通过糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、作用于 *CASP3*、*PTGS2*、*NOS2*、*NOS3* 等靶点^[23], 发挥抗炎、免疫调节、增加血氧饱和度等作用。有研究表

明,与CASP3密切相关的NF- κ B信号通路在免疫应答中起到关键性作用^[24];NF- κ B的激活是免疫防御的一部分^[25],NF- κ B被认为是控制炎症反应的核心因子^[26-27],在气道炎症中起着重要作用^[28]。Toll样受体通过激活干扰素调控因子和NF- κ B信号通路,产生促炎因子。此外,CASP3还与糖尿病并发症相关信号路径的MAPK信号通路密切相关^[29]。

综上所述,本研究利用网络药理学手段探讨百部可能是通过作用于CASP3、PTGS2、NOS2、NOS3、PTGS1、MAPK14等靶点直接或间接影响T细胞受体信号通路、NF- κ B信号通路、MAPK信号通路、VEGF信号通路、TNF信号通路等,进而抑制炎症反应、修复受损肺组织、提高患者免疫力,达到止咳的作用效果。并通过Real-Time PCR实验对CASP3、PTGS2、MAPK14 3个靶点进行验证,表明百部止咳是多组分、多靶点、多通路协同作用的结果,但百部止咳的具体作用机制需要进一步的实验进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙增涛,师艺航,李小娟.咳嗽中医诊疗专家共识意见(2021)[J].中医杂志,2021,62(16):1465-1472.
- [2] 马洪明,朱礼星,赖克方,等.不明原因慢性咳嗽的诊断探讨[J].中华结核和呼吸杂志,2003,26(11):22-25.
- [3] 臧丹阳,杨曙光,洪赞哲,等.麻杏石甘汤联合西医常规治疗慢性支气管炎急性发作的Meta分析[J].中医研究,2021,34(8):58-64.
- [4] 翁惠,邝自珍,祁昌杰.中医药分期分型治疗慢性支气管炎的研究进展[J].广西中医药,2014,37(4):10-12.
- [5] 董巍,孙晖,王伟明,等.对叶百部抗肺炎支原体活性部位的血清药物化学研究[J].中国医院药学杂志,2018,38(13):1387-1393.
- [6] 安巧,邹吉斌,姜阳明,等.对叶百部化学成分研究[J].中草药,2020,51(13):3378-3382.
- [7] But P P, Shaw P C, Lin G E, et al. Authentication and quality assessment of the antitussive herb Baibu (*Radix Stemonae*) [J]. *Adv Botan Res*, 2012, 62: 1-13.
- [8] 樊兰兰,陆丽妃,王孝勋,等.百部药理作用与临床应用研究进展[J].中国民族民间医药,2017,26(8):55-59.
- [9] 刘志华,孙晓波.网络药理学:中医药现代化的新机遇[J].药学学报,2012,47(6):696-703.
- [10] Zhang B, Wang X, Li S. An integrative platform of TCM network pharmacology and its application on a herbal formula, Qing-Luo-Yin [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 456747.
- [11] 潘家祐.基于网络药理学的药物研发新模式[J].中国新药与临床杂志,2009,28:721-726.
- [12] 杨志敏,蒙艳丽,王慧慧,等.芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体感染的影响[J].中成药,2020,42(5):1150-1155.
- [13] 蒙艳丽,徐慧星,王晓溪,等.芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠 β -catenin、 α -SMA表达影响[J].中药材,2019,42(7):1635-1639.
- [14] 蒙艳丽,王欣,王伟明.芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体作用[J].中成药,2014,36(1):36-39.
- [15] 项艳,胡珍,孙亮,等.桂枝温肺化痰汤对呼吸道感染后咳嗽及气道炎症和免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2021,39(4):184-187.
- [16] 吕晓娟,汤卫红,沈道江,等.布地奈德联合阿奇霉素序贯疗法对儿童肺炎支原体肺炎肺功能及炎症因子的影响[J].中华全科医学,2019,17(4):594-596.
- [17] 钱淑琴,陈宗良.肺力咳合剂对小儿肺炎支原体气管炎及支气管炎症状改善及预后的影响分析[J].中国药物与临床,2018,18(8):1339-1341.
- [18] Sun J H, Sun F, Yan B, et al. Data mining and systematic pharmacology to reveal the mechanisms of traditional Chinese medicine in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia treatment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109900.
- [19] Qian Z H, Zhang Z L, Wang Y Y. T cell receptor signaling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction affect the rehabilitation process after respiratory syncytial virus infection [J]. *Peer J*, 2019, 7: e7089.
- [20] Lin C K, Lin Y H, Huang T C, et al. VEGF mediates fat embolism-induced acute lung injury via VEGF receptor 2 and the MAPK cascade [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11713.
- [21] 刘威良,姬昱,黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展[J].农产品加工,2019,18(1):77-79.
- [22] 王梁凤,李慧婷,王堯,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨生脉注射液抗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J].中草药,2020,51(11):2977-2987.
- [23] Lin L G, Zhong Q X, Cheng T Y, et al. Stemoninines from the roots of *Stemona tuberosa* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 1051-1054.
- [24] 何天目,段灿灿,李晓飞,等.基于网络药理学和分子对接探索血必净注射液治疗冠状病毒肺炎的潜在机制[J].中国现代应用药学,2020,37(4):398-405.
- [25] Zou Y F, Li S H, Wu D, et al. Resveratrol promotes trophoblast invasion in pre-eclampsia by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2702-2710.

- [26] 曾新宇, 曲亚明, 利显民, 等. 慢性炎症性声带疾病核转录因子 κ B 信号通路的表达变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(4): 30-34.
- [27] Seham A. Abd-El-Aleem, Ferguson M, Appleton I, *et al.* Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers [J]. *J Pathol*, 2001, 195(5): 616-623.
- [28] 罗清, 刘萌, 廖俊城. NF- κ B 信号通路影响慢性阻塞性肺疾病进展的研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(6): 124-126.
- [29] 王雪莹, 许嘉慧, 薛艳, 等. 基于数据挖掘和网络药理学方法探究新型冠状病毒肺炎验案核心组方的中药特性及分子机制 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(7): 13-19.

[责任编辑 金玉洁]