

基于斑马鱼模型水合橙皮内酯增强免疫作用及基于网络药理学机制探讨

于子翔, 吕 婧, 刘 璐, 张冠群, 张 彬, 高 燕*, 赵瀚年*

山东中医药大学, 药物研究院, 国家中医药管理局高水平重点学科-中药药剂学, 黄河流域特色中药生态保护和高质量发展协同创新中心, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 基于模式生物斑马鱼结合网络药理学, 研究枳壳的活性成分水合橙皮内酯增强免疫作用及作用机制。方法 建立2种斑马鱼免疫低下模型: 以雷帕霉素建立尾部中性粒细胞数目减少模型, 以酒石酸长春瑞滨建立静脉血管中巨噬细胞荧光强度减弱模型, 检测水合橙皮内酯(10、20、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)各给药组斑马鱼尾部中性粒细胞数目、斑马鱼尾部静脉血管中巨噬细胞荧光强度, 计算中性粒细胞增长率和巨噬细胞改善率。基于网络药理学预测水合橙皮内酯增强免疫作用的机制, 使用Pharm Mapper、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)进行水合橙皮内酯靶点筛选, 运用Gene Cards数据库和OMIM数据库检索增强免疫相关靶点, 运用Venny2.1将上述两组靶点取交集后导入String数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析, 进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 在Cytoscape3.9.1软件中构建水合橙皮内酯的增强靶点PPI网络, 并以节点度值的中位数筛选关键靶点。**结果** 与模型组相比, 水合橙皮内酯可显著增加斑马鱼尾部中性粒细胞数目($P<0.01, 0.001$)、静脉血管中巨噬细胞荧光强度($P<0.05$), 证明水合橙皮内酯具有抗雷帕霉素、酒石酸长春瑞滨引起的免疫力低下作用, 呈剂量相关性。水合橙皮内酯增强免疫的作用机制可能与AKT1、EGFR、SRC、MMP9、ESR1等关键靶点及PI3K-Akt、Rap1、AGE-RAGE等信号通路有关。**结论** 水合橙皮内酯具有增强免疫作用, 可能通过调控PI3K-Akt、Rap1、AGE-RAGE等信号通路发挥作用。

关键词: 水合橙皮内酯; 枳壳; 增强免疫; 斑马鱼模型; 网络药理学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)07-1513-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.010

Investigation of meranzin hydrate's immunoenhancing effects and mechanisms based on zebrafish model organism and network pharmacology

YU Zixiang, LÜ Jing, LIU Lu, ZHANG Guanqun, ZHANG Bin, GAO Yan, ZHAO Bonian

Collaborative Innovation Center for Ecological Protection and High Quality Development of Characteristic Traditional Chinese Medicine in the Yellow River Basin, High Level Traditional Chinese Medicine Key Disciplines of the State Administration of Traditional Chinese Medicine: Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine, Institute of Pharmaceutical Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: **Objective** To investigate the immunoenhancing effects and mechanisms of action of meranzin hydrate (MH), an active component of *Aurantii Fructus*, based on the model organism zebrafish in combination with network pharmacology. **Methods** Two types of immunocompromised zebrafish models were established: One using rapamycin to reduce the number of neutrophils in the tail, and another using vinorelbine to diminish the fluorescence intensity of macrophages in tail vein vessels. The neutrophil count in the tail and the fluorescence intensity of macrophages in tail vein vessels were measured in each treatment group of MH (10, 20, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and the growth rate of neutrophils (%) and the improvement rate of macrophages (%) were calculated. The mechanism by which MH enhances immune function was predicted using network pharmacology, with target screening for MH conducted using PharmMapper and the TCMS database. Immune-related targets were retrieved from the Gene Cards and OMIM databases. Intersection of these target sets was analyzed for protein interactions in the String Database, followed by GO and KEGG

收稿日期: 2024-02-02

基金项目: 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2023TSGC0271); 山东省自然科学基金联合基金项目(ZR2021LZY021); 山东省重点研发计划项目(2021CXGC010511-01-005)

*共同通信作者: 高 燕, 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为多组学联合中药活性成分精准筛选。E-mail: gaoyanningyes@163.com
赵瀚年, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量综合评价。E-mail: bonianzh@163.com

analyses. A PPI network of MH's immunomodulatory action was constructed in Cytoscape 3.9.1, with key targets identified based on the median degree value of nodes. **Results** Compared to the model group, MH significantly increased both the neutrophil count ($P < 0.01, 0.001$) in the tail and the fluorescence intensity ($P < 0.05$) of macrophages in tail vein vessels, demonstrating its dose-dependent protective effects against immune suppression induced by rapamycin and camptothecin. The immunoenhancing mechanism of MH may be associated with key targets such as AKT1, EGFR, SRC, MMP9, ESR1, and signaling pathways including PI3K-Akt, Rap1, and AGE-RAGE. **Conclusion** MH enhances immune function, potentially through the regulation of PI3K-Akt, Rap1, and AGE-RAGE signaling pathways.

Key words: meranzin hydrate; *Aurantii Fructus*; immunoenhancement; zebrafish model; network pharmacology

枳壳(*Aurantii Fructus*)为常用大宗理气中药,具有抗氧化^[1]、抗炎^[2]、免疫调节^[3]等功能。水合橙皮内酯是枳壳的活性成分之一,属于香豆素类化合物。目前已有研究证实,水合橙皮内酯通过降低小鼠血浆和海马体中促炎细胞因子的水平发挥抗炎作用,同时还能影响脑源性神经营养因子/酪氨酸激酶B(BDNF/TrkB)信号传导^[4]。其中,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)能通过不同的信号途径影响免疫细胞的功能,在调节免疫反应中起着关键作用^[5]。BDNF及其受体TrkB在维持神经系统的正常功能中起关键作用,该机制可能涉及到对神经免疫调节的影响^[6-7]。

基于上述研究,推测枳壳中的水合橙皮内酯能够发挥调节免疫的药效作用,但目前尚未有水合橙皮内酯调节免疫作用的相关实验研究。斑马鱼作为新兴的模式生物,其身体透明易于观察,且与人类基因同源,可通过观察药物对斑马鱼的作用进而评价药物活性^[8-9]。在课题组已有研究成果的基础上^[10],本研究旨在运用斑马鱼模式生物及网络药理学方法探讨水合橙皮内酯增强免疫作用及作用机制,以开发增强免疫创新药物。

1 材料

1.1 实验动物

AB系斑马鱼和Tg(lyz:EGFP)、Tg(mpeg1:EGFP)转基因斑马鱼,购自南京尧顺禹生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

雷帕霉素(上海源叶生物科技有限公司,批号:J221B218170);酒石酸长春瑞滨(上海源叶生物科技有限公司,批号:A19GB145811);水合橙皮内酯(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PS013089);盐酸小檗碱(上海源叶生物科技有限公司,批号:D24GB167626);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,批号:20200509);链激酶E(德国Roche Diagnostics GmbH,批号:41844523)。

1.3 仪器

斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司,Z-A-S5);恒温恒湿培养箱(山东博科科学仪器有限公司,LRHS-300A);电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司,SECURA225D-1CN];倒置荧光显微镜(Olympus,IX83);超声清洗仪(东莞康士洁超声波科技有限公司,PL-S20)。

2 方法

2.1 斑马鱼免疫低下模型的建立及水合橙皮内酯的干预作用

2.1.1 给药溶液的配制 精密称取水合橙皮内酯5 mg,加纯水超声溶解,制备成质量浓度为2.5 mg·mL⁻¹的样品母液。

2.1.2 斑马鱼胚胎的收集 将成年斑马鱼放置在28℃的水温条件下分性别饲养,确保每天进行明暗交替模拟,同时维持充分的氧气供应,并定期投喂斑马鱼食与丰年虾以保证营养。挑选适龄且健康的繁殖,将斑马鱼以1:1或1:2的性别比例放置于产卵缸内,并用隔板在光照周期前夜分隔雌雄鱼。在光照开始前移除隔板,允许斑马鱼进行自然交配及受精。自隔板取出计时2 h后,收集受精卵并在28℃恒温条件下将筛选出的优质受精卵(受精卵不区分雌雄)置于无菌培养液中继续孵化。

2.1.3 斑马鱼对水合橙皮内酯的耐受性考察 将发育至受精后48 h(48 hpf)的斑马鱼受精卵用1 mg·mL⁻¹的链激酶E脱膜处理,在显微镜下筛选发育正常的幼鱼置于12孔板中,每孔10条,每组平行2孔。设置不同质量浓度水合橙皮内酯给药组(50、100、200、500、1 000、1 500 μ g·mL⁻¹),同时设置对照组(0.5% DMSO)。将斑马鱼置于28℃恒温恒湿培养箱中孵育,每隔24 h更换新鲜药液或DMSO,记录给药48 h后斑马鱼幼鱼的死亡情况。

2.1.4 雷帕霉素致斑马鱼免疫低下(中性粒细胞减少)模型的构建及水合橙皮内酯的干预作用 选用48 hpf的Tg(lyz:EGFP)转基因斑马鱼于12孔板中,每孔10条,每组平行2孔,设置对照组、模型组、给

药组进行实验。根据课题组前期研究,模型组及给药组的雷帕霉素最终质量浓度为 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,建立斑马鱼中性粒细胞减少症模型,水合橙皮内酯组分别设10、20、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个质量浓度,对照组给予等量养鱼水。加盖置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱中孵育24 h,采用荧光显微镜对斑马鱼尾部中性粒细胞拍照并计数,采用SPSS统计软件进行One-way ANOVA分析。

增长率=(水合橙皮内酯组中性粒细胞数目-模型组中性粒细胞数目)/(对照组中性粒细胞数目-模型组中性粒细胞数目)

2.1.5 酒石酸长春瑞滨致斑马鱼免疫低下(巨噬细胞减少)模型的构建及水合橙皮内酯的干预作用 选用48 hpf的Tg(mpeg1:EGFP)斑马鱼于12孔板中,每孔10条,每组平行2孔,设置对照组、模型组、盐酸小檗胺($5.33\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、水合橙皮内酯(10、20、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组进行实验。根据实验室前期研究成果,除对照组外,其余各组均水溶给予酒石酸长春瑞滨 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,建立斑马鱼巨噬细胞减少症模型。各组加盖置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中孵育至受精后3 d(3 dpf)时,在荧光显微镜下观察斑马鱼尾部静脉血管中巨噬细胞荧光强度(S)并拍照。使用Image pro高级图像处理软件采集数据,采用SPSS 23.0统计软件进行One-way ANOVA分析。

巨噬细胞改善率=($S_{\text{水合橙皮内酯}} - S_{\text{模型}}$)/($S_{\text{对照}} - S_{\text{模型}}$)

2.2 基于网络药理学和分子对接探究水合橙皮内酯增强免疫的作用机制

2.2.1 水合橙皮内酯靶点的收集 从Pharm Mapper、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库中收集水合橙皮内酯活性靶点集,应用Uniprot (<https://sparql.uniprot.org/>)数据库,检索得到靶点名称对应的基因命名,用作后续研究。

2.2.2 增强免疫靶点的预测与筛选 在Gene Cards数据库(<http://www.genecards.org/>)和OMIM数据库(<http://www.omim.org>)中检索“immunosuppression”,并合并去重,得到与增强免疫相关的靶点基因,运用Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将水合橙皮内酯对应的靶点与增强免疫相关的靶点进行映射,得到水合橙皮内酯增强免疫作用的交集靶点。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将水合橙皮内酯增强免疫的靶点导入String数据库(<https://string-db.org/>),种属选择Homo sapiens,交互作用选择 >0.4 的靶点,并隐藏游离的节点。使用R语言对PPI网络中各靶点的邻接节点数进行计

算,并通过柱状图进行结果的可视化展示,鉴定PPI网络的关键核心基因。使用Cytoscape 3.9.1软件基于节点的度值中位数作为筛选标准,建立水合橙皮内酯增强免疫作用的PPI网络,从而筛选出关键的靶点。

2.2.4 生物学过程及通路富集分析 利用R语言软件对核心靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,探索水合橙皮内酯增强免疫作用可能的生物学功能和主要的信号通路,按照 $q<0.05$ 为标准,根据P值大小进行降序排列,筛选具有显著性差异的富集结果,分别输出富集结果的GO功能和前20条KEGG信号通路。

2.2.5 成分-靶点-通路网络构建 使用Cytoscape3.9.1软件,构建水合橙皮内酯成分-靶点-通路网络,成分、靶点和通路以节点表示,它们之间的联系以边表示。

2.3 统计学处理

数据采用SPSS 24.0软件进行统计学分析,用GraphPad Prism 7进行统计结果图形分析,两组间比较采用ANOVA检验方法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 耐受性实验结果

由图1可知,给药后48 h内,当水合橙皮内酯给药质量浓度高于 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,随着给药质量浓度的增大,幼鱼死亡率显著升高。

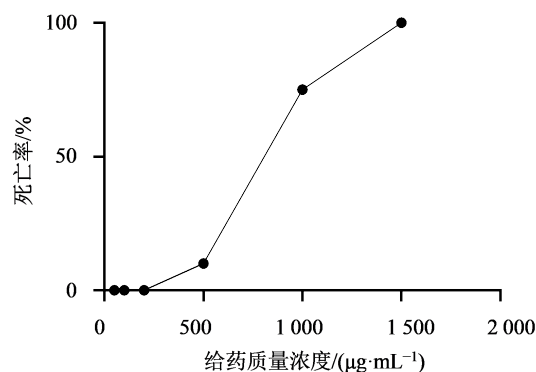


图1 水合橙皮内酯不同给药浓度对斑马鱼幼鱼生存率的影响
Fig. 1 Effect of different administration concentrations of meranzin hydrate on survival rate of zebrafish juveniles

3.2 水合橙皮内酯对斑马鱼免疫功能的影响

3.2.1 水合橙皮内酯对中性粒细胞数目的影响 由结果可知(表1、图2),与对照组相比,模型组斑马鱼尾部中性粒细胞数目显著减少($P<0.01$),说明雷帕霉素造成了斑马鱼免疫低下。与模型组相比,水

表1 各组斑马鱼中性粒细胞分析结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 1 Statistical results of neutrophil numbers in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

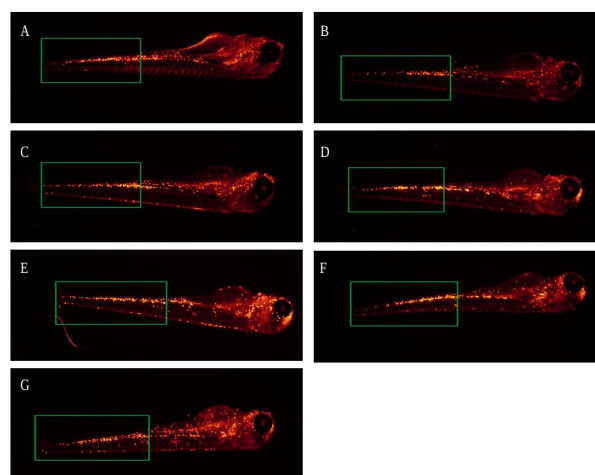
组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	中性粒细胞 数目	增长率/%
对照	—	88.5 ± 6.3	—
模型	—	$59.6 \pm 7.1^{***}$	—
水合橙皮内酯	10	$74.3 \pm 9.6^{##}$	50.6
	20	$78.1 \pm 8.0^{###}$	64.1
	50	$84.8 \pm 9.4^{###}$	87.0
	100	$72.0 \pm 9.3^{##}$	42.9
	200	64.4 ± 7.0	16.5

与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

合橙皮内酯($10, 20, 50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)可显著增加中性粒细胞数目($P < 0.01, 0.001$),说明水合橙皮内酯具有抑制雷帕霉素引起的免疫力低下作用。同时,在一定质量浓度范围内随给药质量浓度的增加,增强免疫力作用增强;当给药质量浓度 $> 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,增强免疫力作用减弱(图2)。

3.2.2 水合橙皮内酯对巨噬细胞生成的影响 通过结果(图3、表2)可以看出,水合橙皮内酯在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药质量浓度时,巨噬细胞荧光强度显



A-对照组;B-模型组;C~G-水合橙皮内酯 $10, 20, 50, 100, 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
A-control group; B-model group; C-G-meranzin hydrate 10, 20, 50, 100, and $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

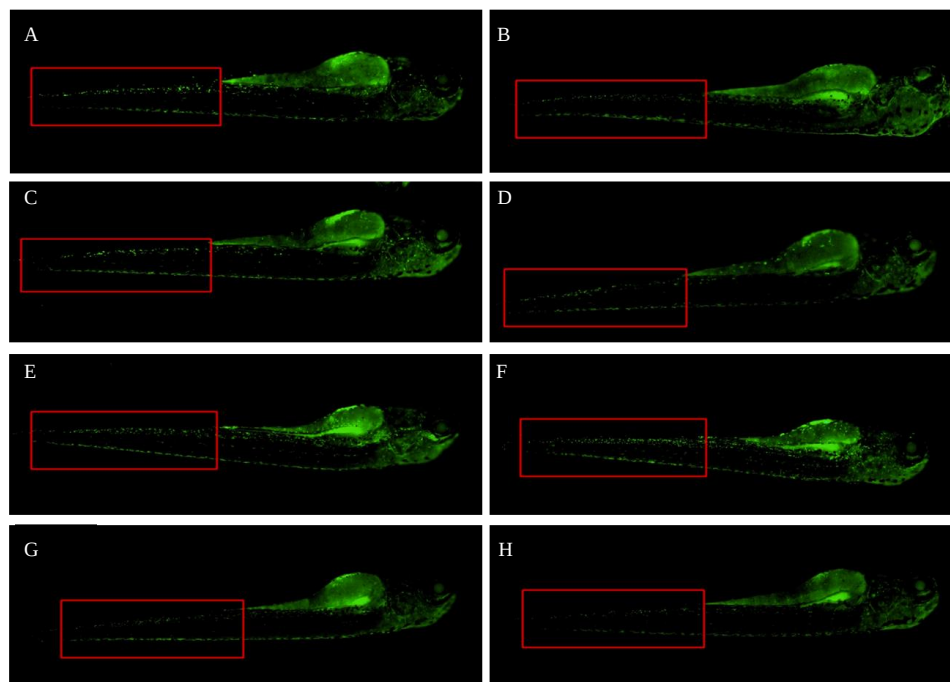
图2 各组斑马鱼尾部中性粒细胞显微图($\times 4$)

Fig. 2 Micrograph of different groups on tail neutrophils in zebrafish ($\times 4$)

著升高,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$),巨噬细胞增长率为64.34%。 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组与盐酸小檗胺组比较无显著性差异。

3.3 基于网络药理学探讨水合橙皮内酯增强免疫作用机制

3.3.1 活性靶点预测及增强免疫相关靶点获取



A-对照组;B-模型组;C-盐酸小檗胺;D~H-水合橙皮内酯 $10, 20, 50, 100, 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
A-control group; B-model group; C-berbamine hydrochloride; D-H-meranzin hydrate 10, 20, 50, 100, and $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

图3 各组斑马鱼巨噬细胞显微图($\times 4$)

Fig. 3 Micrograph of effects of different groups on zebrafish macrophages ($\times 4$)

表2 各组斑马鱼巨噬细胞分析结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 2 Statistical results of macrophage fluorescence intensity in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	巨噬细胞荧光 强度(pixel)	巨噬细胞 改善率/%
对照	—	32.76 $\pm$ 2.53	—
模型	—	26.79 $\pm$ 3.30**	—
盐酸小檗胺	5.33	31.42 $\pm$ 3.87 [#]	77.57
水合橙皮内酯	10.00	27.49 $\pm$ 2.06	11.67
	20.00	28.58 $\pm$ 3.04	29.98
	50.00	30.63 $\pm$ 1.90 [#]	64.34
	100.00	29.24 $\pm$ 3.42	40.96
	200.00	27.83 $\pm$ 2.54	17.42

与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ 。** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

水合橙皮内酯在 Pharm Mapper 和 TCMSP 数据库中识别出 216 个潜在靶点基因,在 OMIM 和 Gene Cards 数据库中预测出与增强免疫相关的靶点基因 4 567 个。对这两组靶点基因取交集后初步确认水合橙皮内酯增强免疫活性作用的 79 个潜在重要靶点基因(图4)。选取置信度 >0.4 的 PPI 数据,并通过 Cytoscape 3.9.1 构建网络,得到度值前 10 位的关

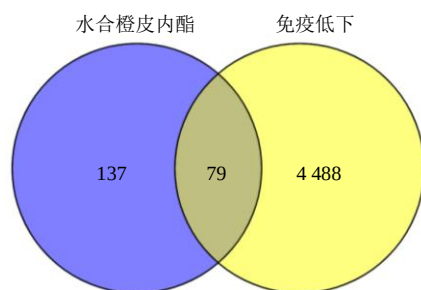


图4 水合橙皮内酯靶点与增强免疫靶点交集

Fig. 4 Targets intersection of meranzin hydrate and immunosuppression

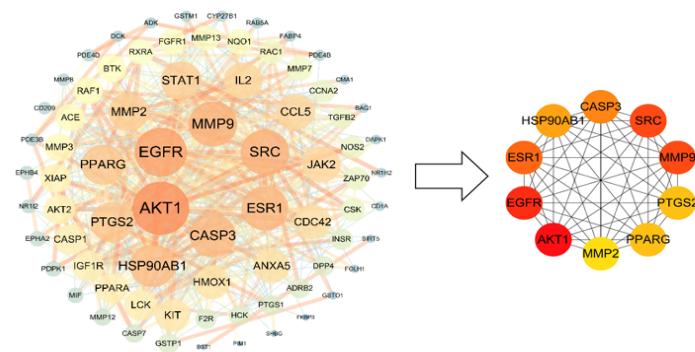


图5 交集靶点 PPI 网络关键靶点筛选

Fig. 5 Key targets screening of PPI interaction

键靶点(图5)。

3.3.2 生物过程和通路富集分析结果 如图6所示,GO-生物过程(BP)共有1 619项,主要涉及炎症反应调节和激酶活性的正向调节等;GO-细胞成分(CC)共有66项,主要涉及膜筏、膜微区等;GO-分子功能(MF)共有117项,主要涉及蛋白酪氨酸激酶活性、内肽酶活性等。KEGG分析结果按照 P 值从小到大大排列选取相关通路前20条,可视化处理结果如图7所示,结果显示水合橙皮内酯可能主要通过调控PI3K-Akt、Rap1、AGE-RAGE等信号通路发挥增强免疫作用。

3.3.3 成分-靶点-通路网络的构建 如图8所示,该网络包含67个节点和268条边,其中AKT1、EGFR、SRC、MMP9、ESR1等度值较高,可能为水合橙皮内酯发挥增强免疫作用的关键靶点。

4 讨论

中药天然产物在治疗各种疾病方面有广泛应用,其独特的化学多样性、广泛的生物活性以及对人体相对较低的毒性,为治疗疾病提供了丰富的药物资源。相比于常规治疗手段及合成药物可能引起的不良反应和耐药性问题,中药天然产物具有潜在的开发价值。免疫低下或免疫缺陷是一个涉及广泛生理病理机制的研究领域,包括先天性的免疫缺陷,如原发性免疫缺陷病(PID)^[11]、后天性免疫缺陷(AIDS等)^[12]。近年来,免疫系统疾病治疗的研究取得了一定进展,例如基因治疗^[13](应用CRISPR-Cas9校正特定基因突变)、细胞治疗^[14](造血干细胞移植和T细胞治疗)、免疫调节治疗^[14](抗逆转录病毒治疗)、免疫系统再塑造^[15]等。但是,免疫系统疾病治疗仍存在费用高昂及长期使用的安全性等问题,从传统中药中寻找价格低廉且效果相当的替代药物是医药研究的一个重要方向。

本研究运用斑马鱼模式生物开展药效学实验,

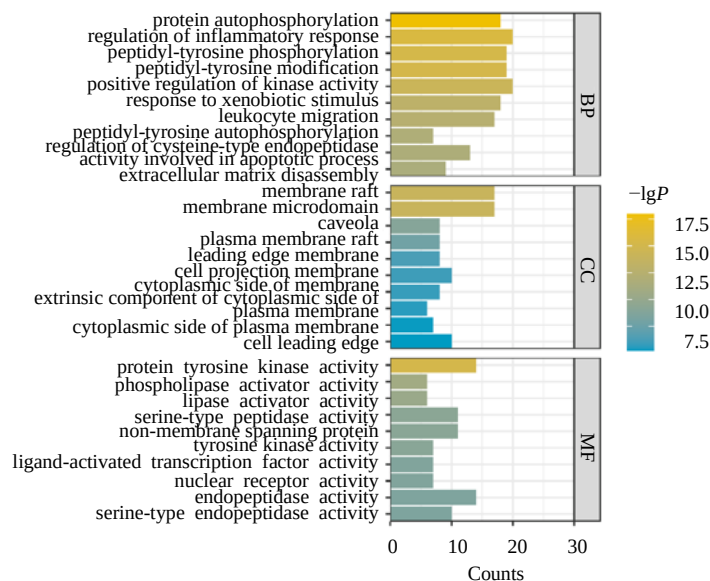


图 6 水合橙皮内酯增强免疫关键靶点的 GO 分析

Fig. 6 GO analysis of key targets of meranzin hydrate enhancing immunity

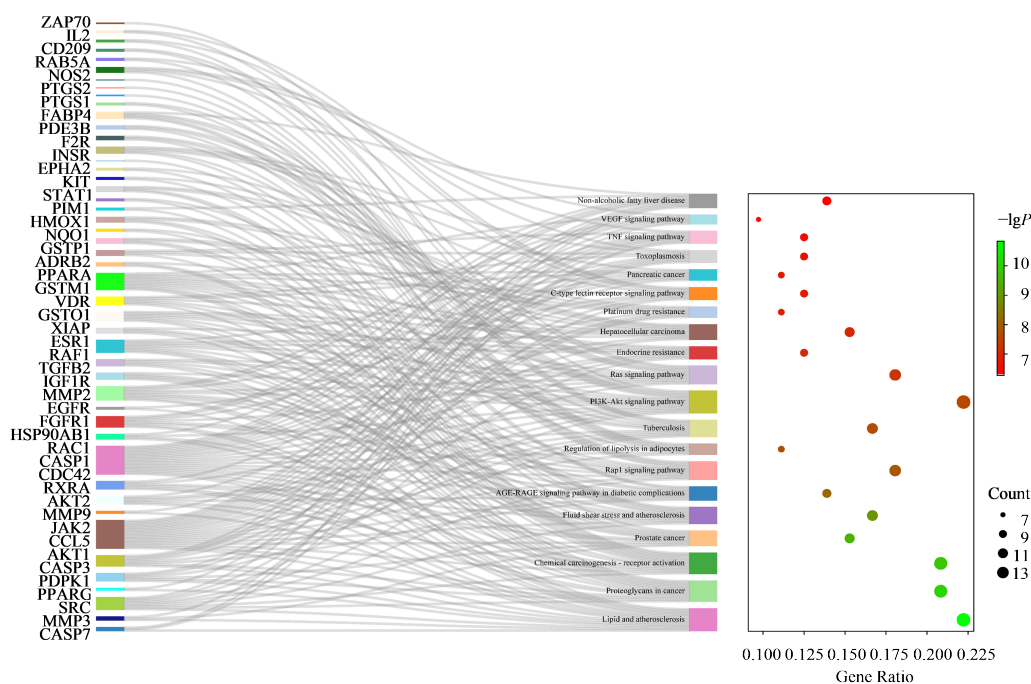


图 7 水合橙皮内酯增强免疫关键靶点的 KEGG 分析

Fig. 7 KEGG analysis of key targets of meranzin hydrate enhancing immunity

首次应用 2 种斑马鱼免疫低下模型,通过中性粒细胞数目及巨噬细胞荧光强度 2 个指标证明了水合橙皮内酯具有增强免疫的作用,为阐释含有香豆素类化合物的枳壳等中药的调节免疫作用提供了科学依据。

GO-BP 分析结果表明,水合橙皮内酯可能通过激活蛋白酪氨酸激酶及其他关键酶类调节炎症反应和免疫细胞的活性。还可能通过影响核受体介导的基因表达和改变细胞膜组分来调整免疫信号

传导。此外,水合橙皮内酯与脂质代谢相关酶的活性相关,可能关联免疫功能的调控。

KEGG 富集分析结果显示,水合橙皮内酯主要通过调控脂质代谢与动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号途径、Rap1 信号途径、肿瘤相关信号通路以及与 AGE-RAGE 相关的糖尿病并发症途径来发挥增强免疫作用。水合橙皮内酯可能通过调节动脉粥样硬化相关的流体剪应力响应来维护血管内免疫细胞的功能。Li 等^[5]研究发现水合橙皮内酯不仅降低

