

基于代谢组学和网络药理学探讨“黄芪-玉竹-灵芝”配伍治疗慢性支气管炎作用机制

王晨¹, 刘苏杰¹, 阮佳鑫¹, 沈子扬¹, 王晓凡¹, 于栋华^{2*}, 刘树民²

1. 黑龙江中医药大学 研究生院, 黑龙江 哈尔滨, 150040

2. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨, 150040

摘要: **目的** 运用血清代谢组学、网络药理学及分子对接技术探讨“黄芪-玉竹-灵芝”(HYL)配伍治疗慢性支气管炎(CB)的作用机制。**方法** 采用烟熏法建立SD大鼠CB模型,将模型成功大鼠随机分为模型组、阳性药(盐酸氨溴索分散片0.92 mg·kg⁻¹)组和HYL高、中、低剂量(10.71、3.57、1.19 g·kg⁻¹)组,运用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清中炎症因子白细胞介素8(IL-8),肿瘤坏死因子(TNF-α),一氧化氮(NO)、肺组织中P物质(SP)的表达水平。运用UPLC-Q/TOF-MS/MS技术对大鼠血清代谢谱进行分析,筛选差异代谢物及相关代谢通路;采用网络药理学,构建HYL治疗CB的“成分-靶点-通路-疾病”图。采用分子对接法验证活性成分与核心靶点的相互作用。将血清代谢组学与网络药理学联合分析,构建“靶点-代谢途径-代谢物”网络图。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠血清中IL-8、TNF-α及SP水平显著降低,血清中NO水平升高;通过代谢组学技术,从血清中筛选出20个差异代谢物,与模型组相比,HYL能回调这些差异代谢物水平。筛选出5条关键代谢途径(细胞色素P450、叶酸合成、鞘脂代谢、类固醇激素生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化)。网络药理学分析表明,HYL治疗CB主要作用于PIK3CA、MAPK3、MAPK1等靶点蛋白,与癌症通路、脂质与动脉粥样硬化等信号通路密切相关。整合分析显示细胞色素P450和类固醇激素生物合成代谢是HYL治疗CB的关键代谢途径。**结论** HYL可通过调节血清代谢物调控炎症相关核心靶点基因,降低炎症水平,缓解机体代谢紊乱发挥治疗CB的作用。

关键词: “黄芪-玉竹-灵芝”配伍;慢性支气管炎;代谢组学;网络药理学;分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2475-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.003

Based on metabolomics and network pharmacology mechanism of *Astragali Radix-Polygonati Odorati Rhizoma-Ganoderma* in treatment of chronic bronchitis

WANG Chen¹, LIU Sujie¹, RUAN Jiaxin¹, SHEN Ziyang¹, WANG Xiaofan¹, YU Donghua¹, LIU Shumin²

1. Graduate School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of "*Astragali Radix-Polygonati Odorati Rhizoma-Ganoderma*" (HYL) in the treatment of chronic bronchitis (CB) using serum metabolomics, network pharmacology and molecular docking techniques. **Methods** A chronic bronchitis model was established in SD rats by smoking method, and the successful rats were randomly divided into the model group, the positive drug group (Ambroxol Hydrochloride Dispersible Tablets 0.92 mg·kg⁻¹), the HYL high-, mid-, low- doses (10.71, 3.57, 1.19 g·kg⁻¹) groups, and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the inflammatory factors interleukin 8 (IL-8), tumor necrosis factor (TNF-α), and nitric oxide (NO) in the serum of the rats, substance P (SP) expression levels in lung tissues. The metabolic profiles of rat serum were analyzed by UPLC-Q/TOF-MS/MS, and the differential metabolites and related metabolic pathways were screened. The "ingredient-target-pathway-disease" diagram of HYL for CB treatment was constructed by network pharmacology. The molecular docking method was used to verify the interaction between the active ingredients and the core targets. Serum metabolomics and network pharmacology were combined to construct a "target-

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 黑龙江中医药大学优秀创新人才(领军人才)基金项目(2018RCL13)

第一作者: 王晨, 硕士研究生, 研究方向为中药药性理论及药效物质基础。E-mail: wangchen4214@163.com

*通信作者: 于栋华, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药性理论及药效物质基础。E-mail: yudonghua1015@163.com

metabolic pathway-metabolite" network diagram. **Results** HYL significantly reduced the levels of IL-8, TNF- α and SP, and increased the level of NO in the serum of rats. Twenty differential metabolites were screened out from serum by metabolomics, and HYL was able to regulate the levels of these differential metabolites compared with those in the model group. Five key metabolic pathways (cytochrome P450, folate synthesis, sphingolipid metabolism, steroid hormone biosynthesis, and pentose and glucuronide interconversion) were screened. Network pharmacological analyses showed that HYL therapeutic CB mainly acted on target proteins such as PIK3CA, MAPK3 and MAPK1, which are closely related to signaling pathways such as cancer pathways, lipids and atherosclerosis. Integrative analysis showed that cytochrome P450 and steroid hormone biosynthesis metabolism were the key metabolic pathways in HYL treatment of CB. **Conclusion** HYL can play a therapeutic role in CB treatment by regulating serum metabolites to modulate the core target genes related to inflammation, reducing inflammation level and alleviating metabolic disorders in the body.

Key words: *Astragali Radix-Polygonati Odorati Rhizoma-Ganoderma*; chronic bronchitis; metabolomics; network pharmacology; molecular docking

慢性支气管炎(CB)是一种十分常见的慢性炎症,集中发作于气管、支气管黏膜及周围组织。主要症状为咳嗽、咯痰或伴有喘息^[1],好发于老年群体,起病较缓,但病程较长,反复发作,病情可逐渐加重,严重者可逐步发展为慢性阻塞性肺疾病,甚至慢性肺源性心脏病^[2]。目前,西医治疗CB多选用抗生素,虽可一定程度缓解症状,但不良反应较多,难以祛除病因,致使部分患者病情仍反复发作^[3]。中医在呼吸系统疾病治疗方面已积累丰富经验,且具有多靶点等独特优势,逐渐应用于CB治疗^[4]。

CB属于中医学中“咳嗽”“肺胀”“痰饮”“喘证”的范畴。中医认为CB的发作多因外邪侵袭,内陷于肺,入里化热,而致肺失宣肃,阴虚肺燥,咳嗽随发;久病及肾,肾阴亏虚则纳气无权^[5]。故治疗当以益气养阴、补肺滋肾为原则^[6]。黄芪具有补气升阳、固表止汗、生津养血的作用,为补脾肺气之要药。相关研究表明,黄芪中的黄芪甲苷能够显著降低白细胞介素33(IL-33)在肺组织中的表达,对肺部炎症应答起着重要的调控作用^[7]。灵芝主治心神不宁、咳喘痰多、虚劳症等,药理研究表明灵芝可降低血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-8等炎症因子表达水平,抑制机体炎症反应,保护肺组织和支气管^[8]。玉竹有养阴润燥、生津止渴之功效,常用于肺胃阴伤,燥热咳嗽,咽干口渴,内热消渴^[9]。有研究表明玉竹提取物能明显抑制脾淋巴细胞转化和IL-2的产生,能有效提高机体免疫力,对肺部疾病的治疗有良好效果^[10]。故选用此3味药进行配伍治疗CB。

中药因其多成分、多靶点的特点,可以通过多种途径对疾病发挥作用。但如何讲明白、说清楚中药是怎样通过配伍治疗疾病显得尤为重要。所以运用现代化技术手段,从科学角度阐明“黄芪-玉竹-灵芝”(HYL)在治疗CB的作用机制,具有十分重要

的意义。血清代谢组学是通过分析血液中代谢物质的变化,以评估机体代谢状态的技术^[11],采用代谢组学可对个体代谢物的可量化差异进行分析^[12];网络药理学强调从系统层次和生物网络的整体角度出发,解析药物及治疗对象之间的分子关联规律,被广泛应用于分析中药及复方活性化合物发现、整体作用机制阐释,揭示药物对疾病的调控机制^[13]。将两者结合起来可为进一步研究疾病-药物相关机制提供思路,揭示多种代谢物与多靶点之间的复杂关系。因此,本研究拟采用血清代谢组学技术和网络药理学,探寻HYL对CB模型大鼠血清中生物标志物的变化,通过选取关键靶标关联代谢通路,揭示HYL治疗此类疾病的作用机制,为HYL配伍治疗CB提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,体质量180~220 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(黑)2018-007,饲养于黑龙江中医药大学中医药研究院动物房,适应性喂养1周后开始正式实验。饲养条件:室温(22±2)℃,相对湿度为40%~60%,通风良好,明暗光照交替12 h,实验动物给予标准饲料和自由饮水。本研究已获得黑龙江中医药大学伦理委员会批准(批准号:2023122927)。

1.2 药物与试剂

黄芪(批号221101,黑龙江祥泰中药饮片有限公司);灵芝、玉竹(批号20201201、20220301,黑龙江修生堂药业有限公司);中药饮片均为黑龙江中医药大学中医药研究院刘树民教授鉴定,鉴定药材饮片均符合《中国药典》2020年版质控标准。盐酸氨溴索分散片(批号20230509,山西仟源医药集团

股份有限公司);戊巴比妥钠(批号20190112,天津市大茂化学试剂厂);大鼠P物质(SP,批号:JM-01851R1)、白细胞介素8(IL-8,批号:JM-01582R1)、TNF- α (批号:JM-01587R1)试剂盒,均由江苏晶美生物科技有限公司提供;NO一步法试剂盒(批号:20230727,南京建成生物工程研究所);甲醇(色谱级,批号:W50164,Dikma科技公司)。

1.3 仪器

ACQUITY 超高效液相色谱与Q-TOF-MS质谱仪(美国Waters公司);KQ-700DE型超声仪(昆山市仪器有限公司);M200Pro型酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);MS105DU型电子天平(中国天马股份有限公司);KDC-160HR型离心机、BDF-86V348型-80℃冰箱(Haier公司)。

2 方法

2.1 HYL配伍方的制备

取2:1:1的黄芪、玉竹和灵芝,加入10倍水,浸泡0.5 h后加热,使药液保持微沸状态煮2 h,共提取3次,提取液趁热抽滤,加热浓缩成浸膏,得膏率为34.14%(1 g浸膏相当于2.93 g原药材质量),4℃保存备用。按70 kg成人日服生药量40 g,根据体表面积换算成大鼠的等效剂量为3.57 g·kg⁻¹,将此剂量作为中剂量,增、减3倍分别作为高剂量(10.71 g·kg⁻¹)和低剂量(1.19 g·kg⁻¹)。

2.2 大鼠CB模型建立

将60只大鼠适应性饲养1周后,按体质量随机分为对照组(10只)和造模组(50只),雌雄各半,对照组不做处理,剩余大鼠采用烟熏法复制大鼠CB模型^[14]:将SD大鼠置于特制的烟室中进行烟熏(雌雄分开),每次30 min,每天2次,连续20 d。造模过程中每天观察并记录动物的一般情况,发现大鼠相继出现打喷嚏、流鼻涕、咳嗽、眼角有血样分泌物、呼吸有啰音、毛色枯黄无光泽等明显CB症状,表明造模成功^[7]。

2.3 分组及给药

将模型成功大鼠随机分为模型组、阳性药(盐酸氨溴索分散片0.92 mg·kg⁻¹)组和HYL高、中、低剂量(10.71、3.57、1.19 g·kg⁻¹)组,对照组和模型组给予等体积蒸馏水,连续ig给药14 d,给药体积10 mL·kg⁻¹。

2.4 一般状态与体质量

观察各组大鼠喘息程度、有无嘶鸣、毛发光泽程度,在实验造模前及造模结束后分别记录大鼠的体质量。

2.5 脏器指数测定

给药第14天大鼠禁食不禁水,12 h后处死并取材。腹主动脉取血,取大鼠肺组织、脾脏组织和胸腺组织,称质量,计算各组大鼠胸腺和脾脏指数。

脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(g)

2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测

取大鼠血清,采用ELISA法,按试剂盒说明书检测IL-8、TNF- α 、NO水平。取大鼠肺组织0.5 g,冷0.9%氯化钠溶液漂洗,滤纸吸湿,称质量,加入9倍4℃0.9%氯化钠溶液,匀浆,3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,严格按试剂盒说明采用ELISA法测定SP水平。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织形态学

取左肺组织于4%多聚甲醛溶液固定24 h,脱水、石蜡包埋,切片厚度为5 μ m,进行HE染色,光镜下对各组大鼠肺组织形态学进行观察。

2.8 代谢组学检测与分析

2.8.1 样本制备 末次给药24 h后,将大鼠ip注射戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血,于4℃,3 500 r·min⁻¹离心10 min,取100 μ L上清液存于新离心管中,加入3倍量甲醇-乙腈(2:1),涡旋1 min,置冰水浴中超声10 min,放入-20℃冰箱中30 min后取出室温解冻,4℃,1 300 r·min⁻¹,离心10 min,取上清进行代谢组学分析。

2.8.2 色谱条件 BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m);柱温40℃;样品温度4℃;进样量2 μ L;流动相为0.05%甲酸乙腈溶液(A)-甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 98%~60%B; 8~10 min, 60%~2%B; 10~13 min, 2%~0B; 13~14 min, 0~98%B; 14~17 min, 98%B),体积流量0.40 mL·min⁻¹。

2.8.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);正离子模式毛细管电压1.3 kV,样品锥孔电压40 V,离子能量35 V;负离子模式毛细管电压1.5 kV,样品锥孔电压70 V,离子能量34 V;脱溶剂气温度350℃;脱溶剂气流量750 L·h⁻¹;锥孔反吹气流量20 L·h⁻¹;离子源温度110℃;质量扫描范围m/z 100~1 500。

2.9 数据处理与分析

利用QI软件,通过对大鼠血清样本数据进行无监督主成分分析(PCA)以及监督正交偏最小二乘识别分析(OPLS-DA)筛选潜在的生物标志物,同时结合碎片离子信息,再根据HMDB(<http://www.hmdb.ca/>),KEGG(<http://www.kegg.com/>),METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)以及Metabo-Analyst(<http://metabo-analyst.org/>)

www.Metaboanalyst.ca/)等数据库对这些潜在的生物标记物进行进一步筛选和鉴定, MetaboAnalyst数据库中 Impact>0.10 的途径被认为是可能的代谢物相关信号途径。

2.10 网络药理学分析

通过在TCMSP数据库中分别输入“黄芩”“灵芝”“玉竹”搜索其化学成分,以口服生物利用度(OB)≥30%和药物相似性(DL)≥0.18为条件进行筛选,查找筛选后化合物的smile号,将化合物smile号输入Swiss ADME数据库中进行筛选,选择Pharmacokinetics为“High”、Druglikeness项下有2个以上“Yes”的成分作为潜在活性成分。运用SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库预测潜在靶点。以simple chronic bronchitis为关键词,在OMIM(<https://omim.org/>)、Gene Card(<https://www.genecards.org/>)、Disgent(<https://www.disgenet.org/>)数据库检索,合并筛选结果,去除重复值收集疾病靶点。通过Venny 2.1.0(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/>)获取潜在靶点和疾病靶点的交集靶点。利用STRING数据库(<http://string-db.org/>)和Cytoscape 3.9.1软件构建交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,DAVID数据库(<http://david.ncifcrf.gov/>)对靶点进行基因本体(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,微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)制图可视化。将差异代谢物与交集靶点输入MetaboAnalyst数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)中的Joint Pathway Analysis模块,筛选相关代谢物及其代谢通路的干预靶点^[15]。使用Cytoscape3.9.1绘制“靶点-代谢途径-代谢物”网络图^[16]。

选取“成分-交集靶点-关键通路-疾病”网络图中度值排名靠前的靶点,通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库和RSCB PDB(<https://www.rcsb.org/>)数据库获取相应活性成分和关键靶点蛋白的3D结构文件。将处理后的关键靶点和活性成分结构导入AutoDock Tools 1.5.6软件进行分子对接试验,对接结果使用PyMol软件进行可视化分析。

2.11 统计方法

应用SPSS 26.0软件进行统计分析,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较符合正态分布且方差齐,使用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CB模型大鼠体质量变化

对照组大鼠精神、饮食、毛发等未有明显改变,体质量增加,模型组大鼠在实验开始后2 d,烟熏时有明显咳嗽样动作出现,4 d后活动能力减弱,9 d后出现蜷缩,动作迟缓,食欲变差,消瘦,体质量增长很缓慢。烟熏2周后,模型组大鼠精神较差,其毛发干枯,色泽变为灰白,部分大鼠大便质偏黏,不甚干燥,咳嗽样动作间断发生,体质量明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,给药14 d后,阳性药组与HYL组大鼠上述表现逐渐转好,其中阳性药组和HYL高剂量组的大鼠呼吸状况明显改善,动作灵活,HYL高剂量组体质量上升最显著($P < 0.05$)。见表1。

3.2 大鼠脏器指数变化

与对照组比较,模型组脏器指数明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,HYL组胸腺、脾脏指数均有一定改善,其中HYL高剂量组改善最明显($P < 0.05$),见表1。

表1 各组大鼠体质量、脏器指数比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Comparison of body mass and organ index of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
		给药前	给药后14 d		
对照	—	247.16±15.30	290.60±14.48	0.22±0.03	0.12±0.03
模型	—	248.82±13.52	263.43±20.43 ^{###}	0.17±0.03 ^{###}	0.09±0.02 ^{###}
阳性药	0.000 92	245.53±14.87	282.54±10.14 [*]	0.21±0.04 [*]	0.11±0.03 [*]
HYL	10.71	246.80±17.21	284.79±18.66 [*]	0.20±0.03 [*]	0.12±0.03 [*]
	3.57	253.70±17.22	269.79±13.22	0.18±0.12	0.10±0.03
	1.19	248.38±16.42	267.30±15.21	0.19±0.07	0.10±0.02

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.

3.3 大鼠血清和肺组织中炎症因子的变化

对大鼠血清中细胞因子水平进行检测发现,与对照组相比,造模后大鼠血清中IL-8、TNF- α 水平显著升高,NO水平下降,肺组织中SP水平明显升高($P<0.001$)。与模型组比较,阳性药组和HYL高剂量组大鼠血清中IL-8、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),NO水平升高($P<0.01$),肺组织中P物质水平有所回调($P<0.05$ 、 0.01),且不同性别之间无差异。见表2。

3.4 各组大鼠肺组织病理变化

对照组大鼠支气管黏膜细胞排列紧密,结构均匀,细胞饱满,支气管壁结构正常,未见炎症细胞浸润,肺泡间隔基本正常;模型组大鼠支气管黏膜有大量细胞变性、坏死、脱落等分泌物,肺泡大,肺间质有大量炎症细胞浸润,肺泡间隔严重不均;而阳性药组和HYL高、中、低剂量组给药后均明显改善

肺组织病理变化。见图1。

3.5 大鼠血清代谢组学分析

3.5.1 OPLS-DA分析 在正、负离子模式下采集大鼠血清代谢数据,将获取的全部代谢组数据导入Progenesis QI进行处理,利用EZ info进行OPLS-DA,发现模型组与对照组分离明显,说明大鼠体内血清代谢已经发生明显变化。PLS-DA显示,对照组、模型组和HYL高剂量组之间可明显区分,对模型进行200次随机置换检验, R_2 与 Q_2 从左到右低于最右原值, Q_2 与Y轴在负半轴相交,表明此模型无过度拟合现象,具有很好的可预测性和拟合度,能够准确地描述数据。见图2。

3.5.2 差异代谢物的筛选与鉴定 依据OPLS-DA模型,以VIP >1 且 $P<0.05$ 为标准进行组间差异代谢物的筛选。模型组与对照组比较,HYL高剂量组与模型组比较,筛选得到具有相反变化趋势的差异

表2 各组大鼠炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of inflammatory factor levels in rats in each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	NO/(μ mol·L ⁻¹)	SP/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	40.86 $\pm$ 3.72	43.85 $\pm$ 6.45	35.54 $\pm$ 11.75	1.42 $\pm$ 0.05
模型	—	48.43 $\pm$ 5.82 ^{###}	50.61 $\pm$ 3.11 ^{###}	16.28 $\pm$ 6.05 ^{###}	1.71 $\pm$ 0.16 ^{###}
阳性药	0.000 92	40.35 $\pm$ 3.80 ^{**}	42.86 $\pm$ 2.92 ^{***}	26.39 $\pm$ 7.32 ^{**}	1.47 $\pm$ 0.11 ^{**}
HYL	10.71	41.38 $\pm$ 7.86 [*]	46.16 $\pm$ 3.09 ^{**}	24.40 $\pm$ 6.55 ^{**}	1.48 $\pm$ 0.13 [*]
	3.57	43.98 $\pm$ 7.31	45.04 $\pm$ 7.74 [*]	22.78 $\pm$ 7.97	1.54 $\pm$ 0.14
	1.19	44.36 $\pm$ 7.57	46.59 $\pm$ 7.53	22.94 $\pm$ 8.61	1.52 $\pm$ 0.14

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$;与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ 。
^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group.

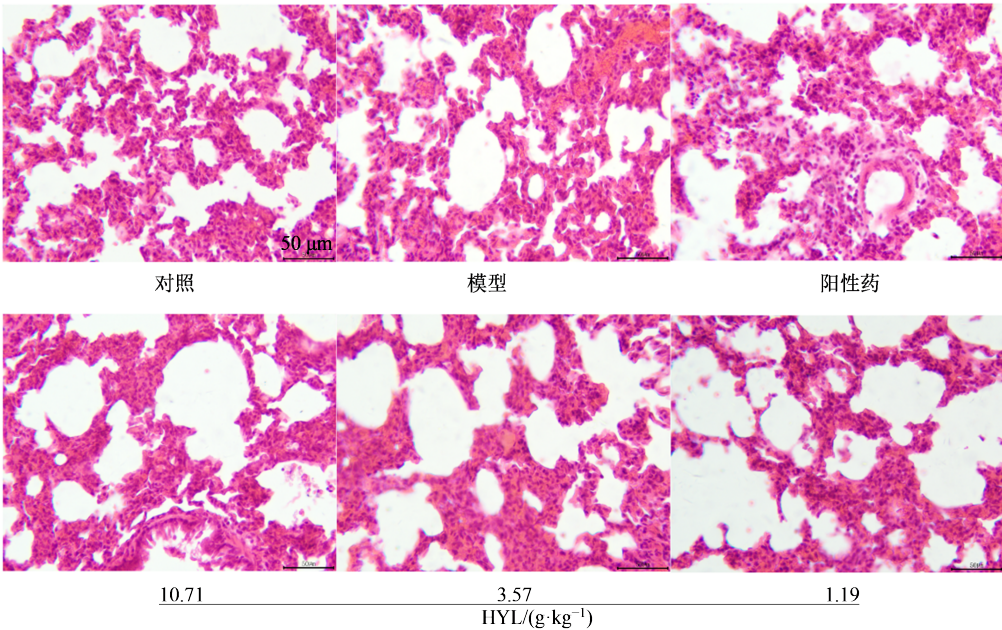
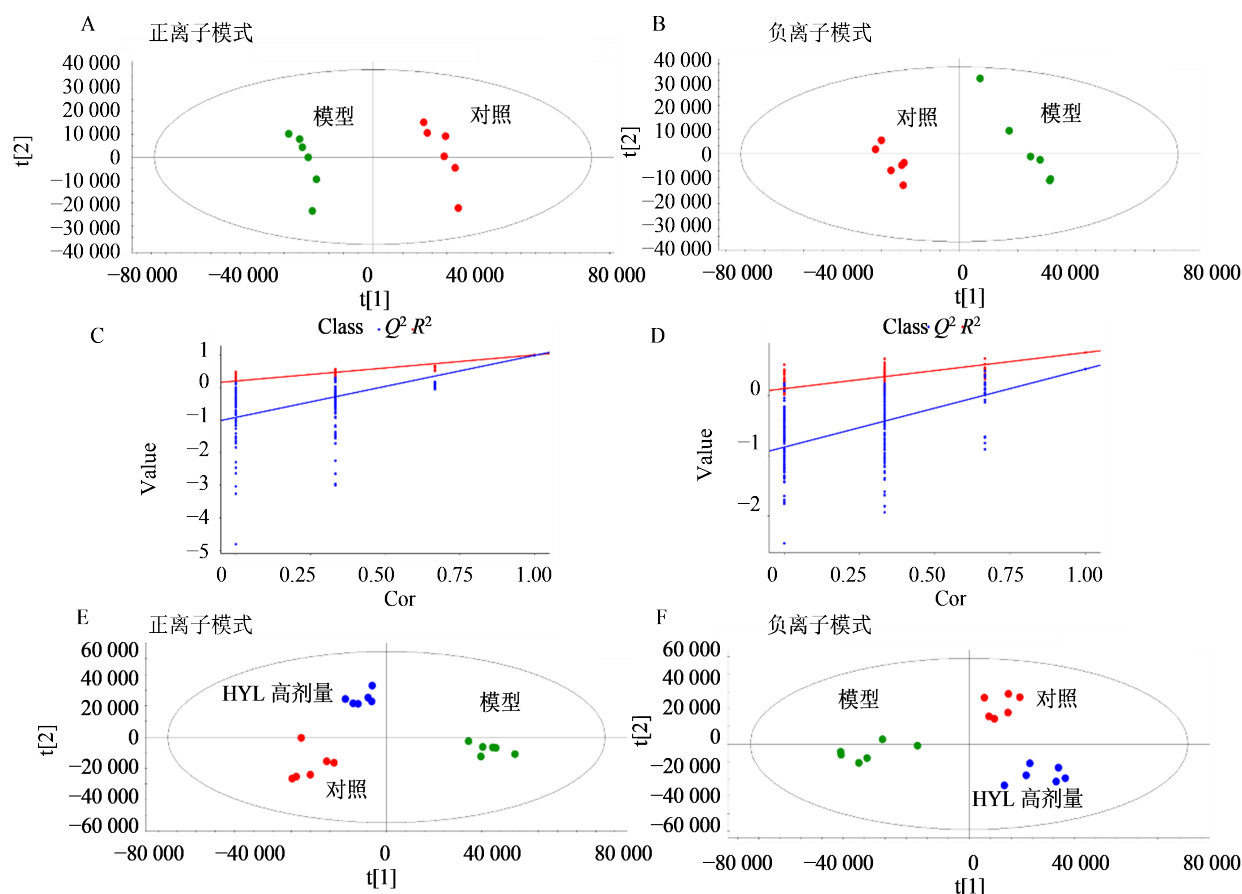


图1 各组大鼠肺组织病理变化(HE染色,×200)

Fig. 1 Histopathological changes in lungs of rats in each group (HE staining, ×200)



A、B-对照和模型组 OPLS 评分; C、D-对照和模型组置换检验; E、F-对照、模型组、HYL 高剂量组 PLS-DA 评分。
A, B-OPLS score of control and model groups; C, D-replacement test of control and model groups; E, F-PLS-DA score of control, model and HYL high dose groups.

图2 大鼠血清组间代谢产物差异的多元统计分析

Fig. 2 Multivariate statistical analysis of metabolite differences between rat serogroups

代谢物有 20 个,其中模型组上调了 8 个差异代谢物,下调了 12 个差异代谢物,给予 HYL 高剂量后可将这些差异代谢物的变化趋势逆转,见表 3。对差异代谢物进行聚类分析以展现其变化趋势,见图 3。

3.5.3 差异代谢物通路富集分析 将筛选到的差异代谢物导入 MetaboAnalyst5.0 进行代谢通路分析,Pathway>0.1 认为是潜在的关键代谢通路,包括细胞色素 P450、叶酸合成、鞘脂代谢、类固醇激素生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化。见图 4。

3.6 网络药理学分析结果

3.6.1 潜在靶点预测 将 29 个潜在活性成分的 smiles 号输入 Swiss target prediction 数据库中,得到 1 542 个去重靶点。在 OMIM、Gene Card、Disgent 数据库中得到 CB 相关的靶点,去重后得到 450 个。绘制韦恩图共得到 184 个交集靶点。见图 5。

3.6.2 PPI 网络的构建 将 184 个靶点基因导入

STRING 数据库中,构建 PPI 网络;将得到的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件中进行交集靶点的拓扑分析筛选,制得 PPI 网络可视化图,通过 Cytoscape 3.9.1 中的插件 Centiscape 2.2,根据间距中心性、接近度中心性和度中心性均大于阈值筛选出核心靶点共 34 个。见图 6。

3.6.3 GO 与 KEGG 富集分析 运用 David 分析程序对已整理的 184 个交集靶点进行 GO 富集的生物过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)3 个项目进行分析,共得到 787 条富集结果。其中 MF 143 条,主要富集在酪氨酸激酶活性、酶结合、ATP 结合等;CC 73 条,主要富集到质膜、细胞质、大分子复合物、膜筏等;BP 571 条,主要富集到蛋白质磷酸化、对脂多糖的反应、炎症反应、细胞凋亡过程的负调控等过程。见图 7。本研究针对基因富集度高的前 20 个结果进行绘图展示。KEGG 分析共富集了 175 条通路,主要涉及的通路有癌症通路、前列腺癌症、

表3 大鼠血清代谢差异物的变化
Table 3 Changes in serum metabolic differentials in rats

序号	离子模式	HMDB	差异代谢物	加合离子	分子式	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	趋势			
								a	差异倍数	b	差异倍数
1	+	HMDB0006822	甲酰胺嘧啶核苷三磷酸	[2M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₁₃ P ₃	1 083.008	3.10	↓	0.01	↑	122.29
2	+	HMDB0004836	没食子酰基神经酰胺	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₅₂ H ₉₉ NO ₁₃	928.710	3.23	↓	0.07	↑	8.70
3	+	HMDB0001022	琥珀酰-CoA	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	868.143	3.00	↓	0.52	↑	1.55
4	+	HMDB0001243	异丁酰-CoA	[M+Na] ⁺	C ₂₅ H ₄₂ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	860.139	3.30	↓	0.67	↑	1.38
5	+	HMDB0000068	肾上腺素17-羟孕酮	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ NO ₃	184.101	4.80	↓	0.70	↑	1.37
6	+	HMDB0000374	雌酮全反式庚炔二磷酸	[2M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	661.443	7.89	↑	2.38	↓	0.58
7	+	HMDB0000145	甘氨酸去氧胆酸3-葡萄糖醛酸苷6-6-巯基嘌呤核苷三磷酸	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	288.195	3.16	↓	0.78	↑	1.22
8	+	HMDB0012187	人参皂苷 Rf	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₅ H ₆₀ O ₇ P ₂	677.376	1.53	↓	0.04	↑	14.85
9	+	HMDB0002579	(Z)-2-[4-(1,2-二苯基-1-丁烯)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	643.398	3.02	↓	0.12	↑	6.26
10	+	HMDB0060411	LacCer	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ N ₄ O ₁₃ P ₃ S	506.959	3.25	↓	0.09	↑	6.43
11	+	HMDB0034745	7-[3-(4-氟苯基)-1-(1-甲基乙基)-1H-吡啶-2-基]-3,5-二羟基-6-庚烯酸	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.488	1.67	↑	1.91	↓	0.64
12	+	HMDB0014813	5'-脱氧-5-氟-N[(戊氧基)羰基]胞(嘧啶核)苷	[2M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₉ NO	743.431	1.58	↑	2.10	↓	0.59
13	+	HMDB0011593	甘氨酸	[M+Na] ⁺	C ₅₀ H ₉₅ NO ₁₃	935.724	3.42	↑	3.23	↓	0.46
14	+	HMDB0015227	四氢生物蝶呤	[M+Na] ⁺	C ₂₄ H ₂₆ FN ₄ O ₄	434.183	1.39	↑	2.87	↓	0.54
15	+	HMDB0015233	L-2,4-二氨基丁酸	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ FN ₃ O ₆	377.175	1.22	↑	1.81	↓	0.68
16	—	HMDB0004668	创伤性酸	[M+FA-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	339.228	5.65	↓	0.26	↑	2.93
17	—	HMDB0000138	甲酰胺嘧啶核苷三磷酸	[M-H] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	464.315	5.25	↑	2.68	↓	0.61
18	—	HMDB0000027	没食子酰基神经酰胺	[2M-H] ⁻	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₃	481.239	5.08	↑	1.51	↓	0.76
19	—	HMDB0006284	琥珀酰-CoA	M-H	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	117.055	8.59	↓	0.02	↑	30.92
20	—	HMDB0000933	异丁酰-CoA	M-H	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	227.122	2.88	↓	0.42	↑	1.74

a-模型组 vs 对照组; b-HYL 高剂量组 vs 模型组。

a-model group vs control group; b-HYL high dose group vs model group.

乙型肝炎、脂质与动脉粥样硬化等,选取*P*值最小的排名前20的核心通路并绘制气泡图,见图8。

3.6.4 “成分-靶点-通路-疾病”网络的构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“成分-交集靶点-关键通路-疾病”网络,见图9。根据拓扑参数分别进行通路、靶点、成分的重要性排序。结果显示,Jaranol,3,9-di-*O*-methylnisoslin,7-*O*-methylisomucronulatol,3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1-2)-[β-*D*-xylopyranosyl-(1-3)]-β-*D*-glucopyranosyl-(1-4)-galactopyranosyl-25(*S*)-spirost-5(6)-en-3β,14alrho-diol_qt、*N*-coumaroyltyramine 等成分可能通过作用于 PIK3R1、

PIK3CD、PIK3CA、MAPK3、MAPK1 等靶点,影响 Pathways in cancer、PI3K-Akt signaling pathway、Lipid and atherosclerosis、MicroRNAs in cancer、Epstein-Barr virus infection 等通路发挥对 CB 的治疗作用。

3.6.5 分子对接 采用 Discovery studio 2019 软件对筛选出的部分核心成分和核心靶点进行“Lib Dock”分子对接。共得出 25 组分子对接结合能结果(表4)。一般认为,当结合能<0 kJ·mol⁻¹时,表明化合物与靶点之间可以自行发生相互结合;当结合能<-20.9 kJ·mol⁻¹时,说明靶点与化合物之间具有

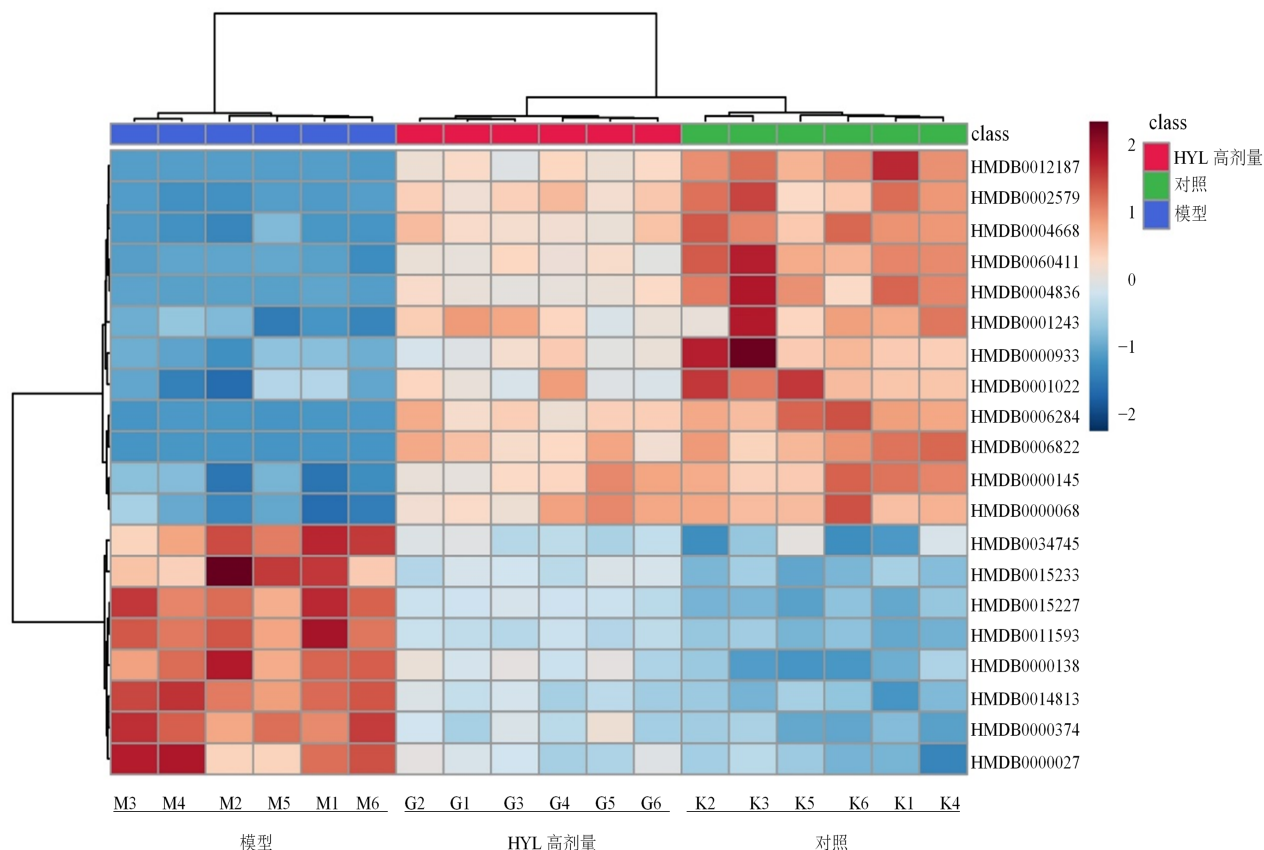


图 3 3 组血清差异代谢物聚类热图

Fig. 3 Heat map of serum differential metabolite clustering for three groups

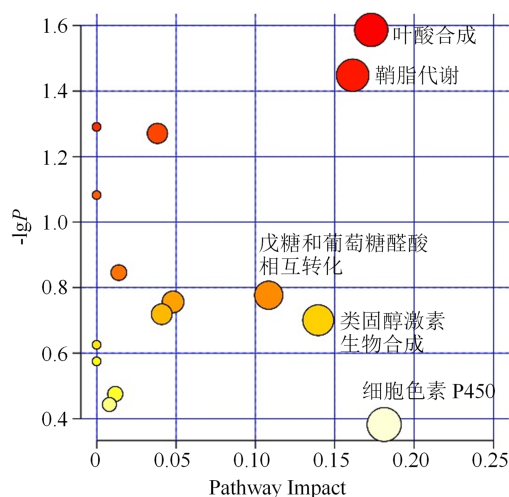


图 4 HYL 配伍治疗 CB 大鼠的相关代谢通路

Fig. 4 Metabolic pathways involved in treatment of CB rats with HYL

较强的生物结合活性^[17]。HYL 中活性成分与各核心靶点之间的结合能力较好,其中与 PIK3R1、PIK3CD、PIK3CA、MAPK3、MAPK1 对接最强的成分均为 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1-2)-[β -*D*-xylopyranosyl-(1-3)]- β -*D*-glucopyranosyl-(1-4)-galactopyranosyl-25 (*S*)-spirost-5 (6)-en-3 β ,

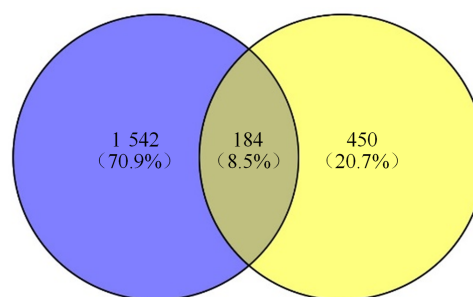


图 5 交集靶点韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of intersecting targets

14 α pho-diol_{qt}。并利用 PyMol 三维结构可视化软件将结合能相对较强的结合模式进行可视化。见图 10。

3.7 代谢组学与网络药理学联合分析结果

将 20 种差异代谢物通过 MetaboAnalyst 数据库与 184 个交集靶建立联系,筛选相关代谢物及其代谢通路的干预靶点。使用 Cytoscape3.9.1 绘制“靶点-代谢途径-代谢物”网络图,见图 11。重点展示了细胞色素 P450、类固醇激素生物合成代谢途径,与代谢组学结果一致,表明这些代谢途径可能在 HYL 配伍治疗 CB 的疗效中发挥重要作用。

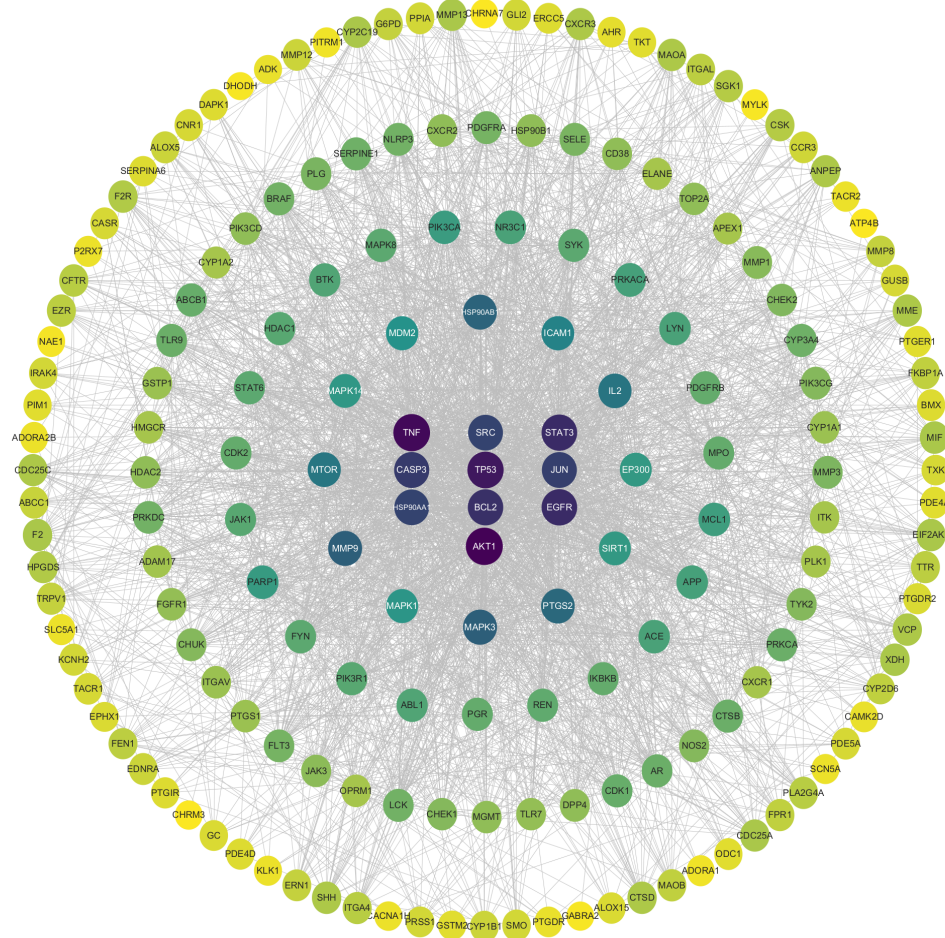


图6 PPI网络

Fig. 6 PPI network

4 讨论

CB主要是指气管、支气管黏膜及周围组织发生的慢性非特异性炎症,中医学认为,CB属于咳嗽范畴,是临床上较为常见的呼吸系统疾病。临床上将该疾病分为两大类,即单喘型和喘息型。单喘型患者临床表现为咳嗽、咯痰;喘息型患者则包括单纯型症状之外还伴有喘息,听诊时可闻及哮鸣音^[18]。代谢组学是系统生物学的组成部分,是通过系统研究新陈代谢的动态过程中代谢产物的变化规律,从而揭示机体生命活动代谢本质^[19]。网络药理学包含系统生物学、药理学、生物信息学等交叉学科,能够较全面地阐释其药效物质基础和作用机制。将网络药理学与代谢组学相结合,可从作用靶点和内源性代谢物变化两方面分析药物作用的潜在机制,从而探索药物与生物体之间的相互作用,同时也为进一步清楚地解释HYL治疗CB的分子机制提供可能。

本研究通过对基于UPLC-Q-TOF-MS/MS代谢

组学检测结果进行数据分析与筛选得知,经HYL干预治疗后,血清中有20种代谢物水平明显回调,有6条代谢通路可能是其干预代谢从而发挥药效的途径。其中,细胞色素CYP450酶代谢途径的产物环氧二十碳三烯酸可以发挥强大的抗炎作用^[20],鞘脂代谢包括神经酰胺和鞘磷脂类,其代谢紊乱与炎症的发生有关^[21-22]。戊糖和葡萄糖醛酸相互转化又称为糖醛酸途径^[23],是糖代谢的关键支路,有研究表明,免疫细胞中糖代谢升高是许多炎症性疾病(如败血症)的标志性特征^[24],强调了糖代谢在炎症反应中发挥着重要作用。

结合网络药理学预测分析HYL治疗CB的核心靶点有34个,其中PIK3R1是miR-342-3p的靶基因^[25],可调节癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[26]。PIK3CD和PIK3CA属于PI3K亚基^[27],可减弱甲酰胺配体、C5a、IL-8介导炎症细胞趋化作用,在炎症反应中起重要作用^[28]。MAPK3和MAPK1是MAPK信号通路的重要组成部分,该信号通路负责

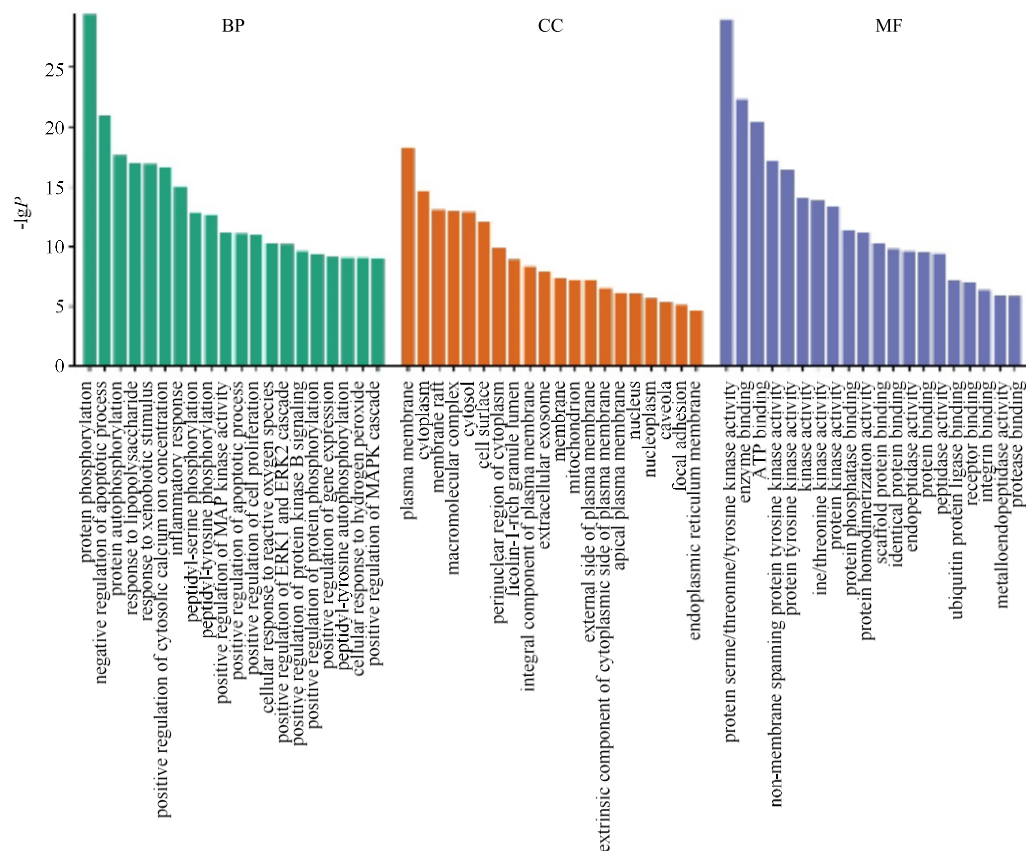


图7 GO分析
Fig. 7 GO analysis

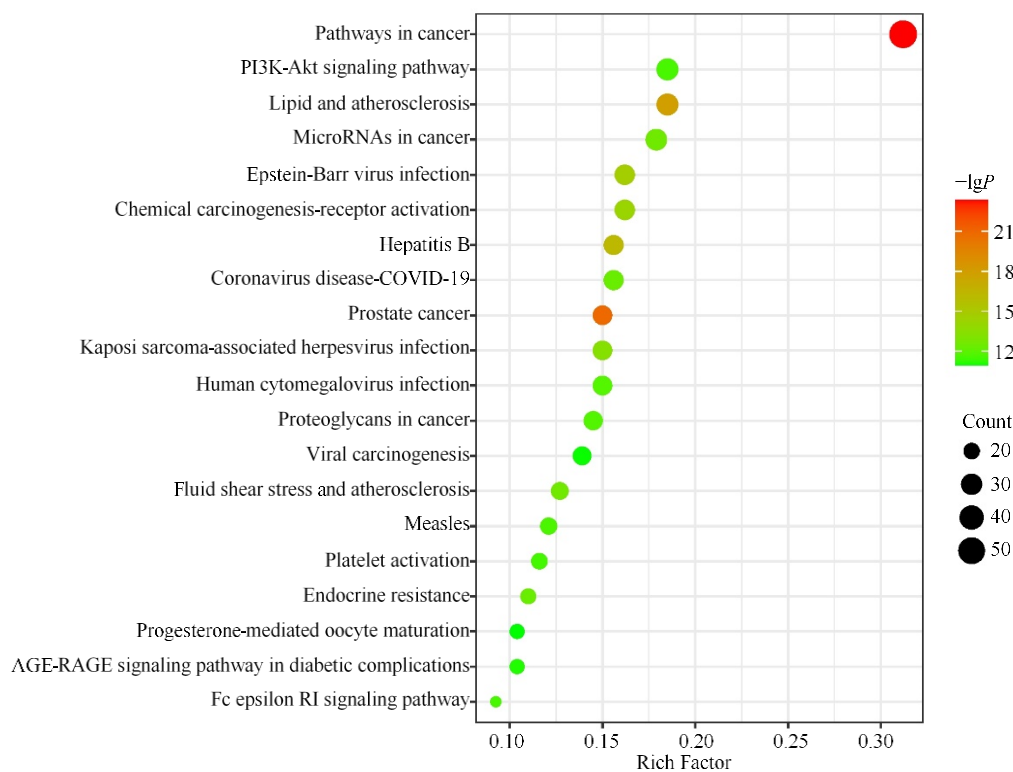


图8 KEGG通路分析
Fig. 8 KEGG pathway analysis

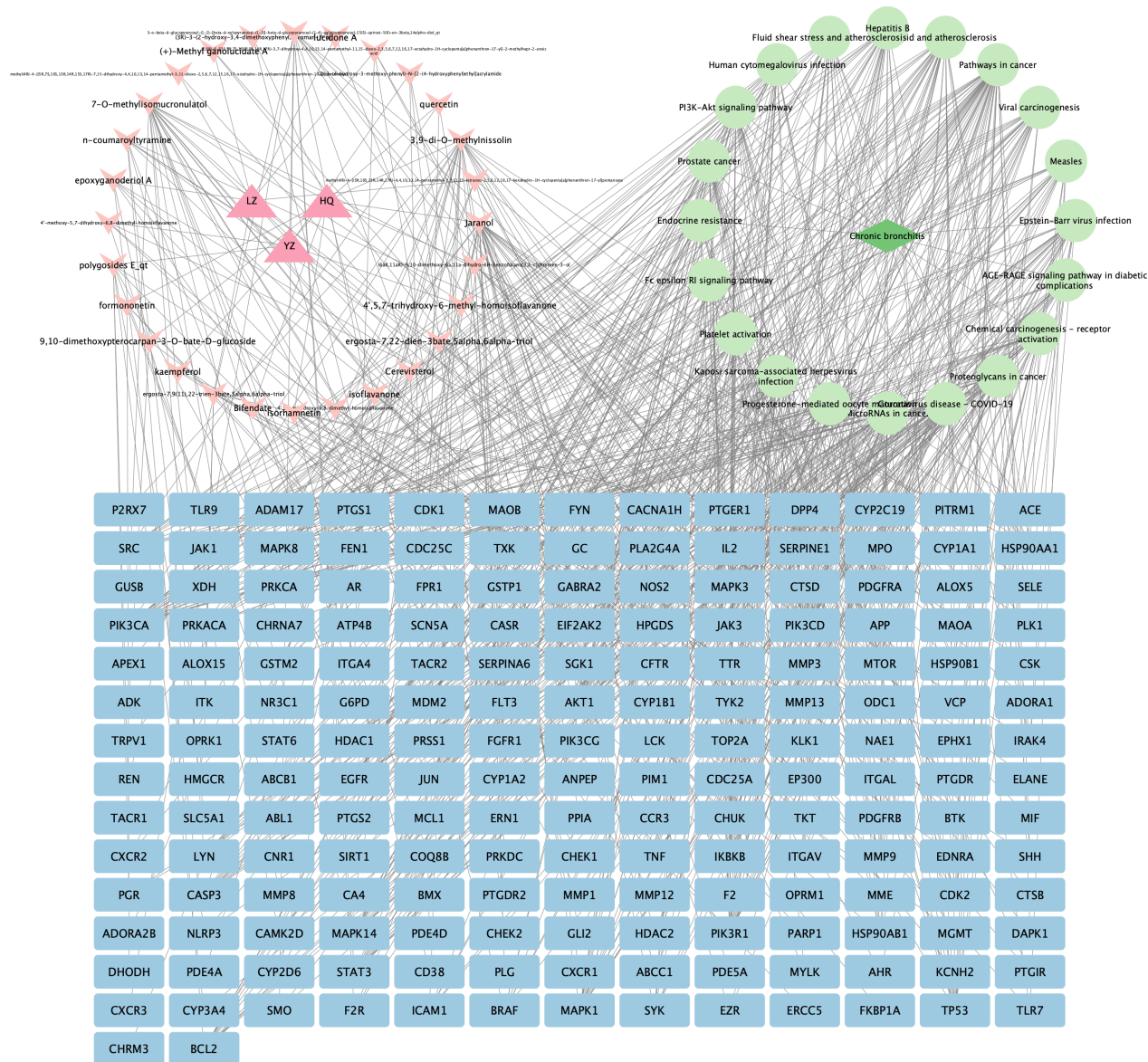


图9 “成分-靶点-通路-疾病”网络
Fig. 9 “Component-target-pathway-disease” network

表4 核心成分与核心靶点的对接结合能

Table 4 Docking binding energy of core components to core targets

成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	PIK3R1 (4A55)	PIK3CD (5ITD)	PIK3CA (5SX8)	MAPK3 (2ZOQ)	MAPK1 (4IZ5)
jaranol	-21.23	-14.80	-12.87	-18.60	-14.80
3,9-di- <i>O</i> -methylnissofin	-23.95	-16.89	-18.31	-21.99	-15.22
7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	-23.24	-12.71	-12.62	-17.22	-11.91
3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1-2)-[β- <i>D</i> -xylopyranosyl-(1-3)]-β- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1-4)-galactopyranosyl-25(<i>S</i>)-spirost-5(6)-en-3β, 14α-diols	-29.26	-21.65	-22.70	-29.64	-22.15
<i>N</i> -coumaroyltyramine	-18.64	-13.21	-15.01	-17.39	-14.25

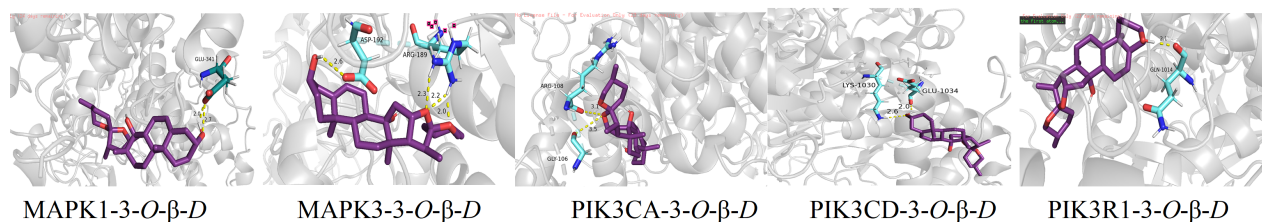
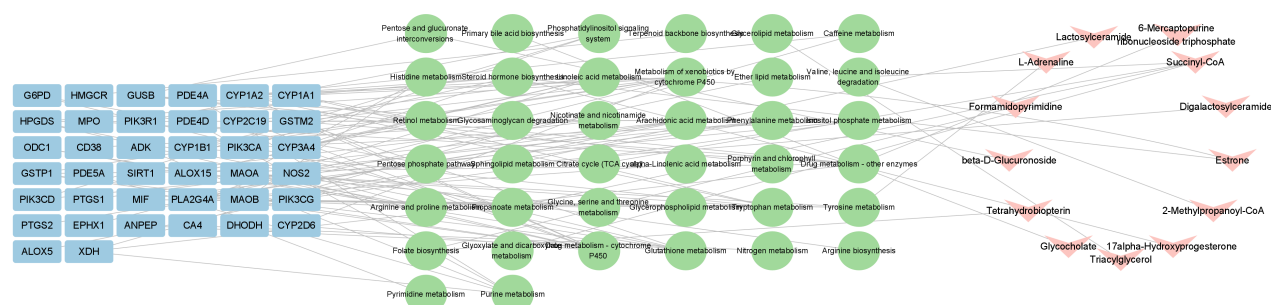


图 10 分子对接可视化图

Fig. 10 Molecular docking visualisation



蓝色方形:交集靶点;绿色圆形:代谢通路;粉色三角:代谢产物。

Blue square-target; green circle- metabolic pathway; pink triangle- metabolite.

图 11 靶点-代谢途径-代谢物网络图

Fig. 11 Network diagram of target-metabolic pathway-metabolite

将细胞因子、神经递质等细胞外刺激信号转导到细胞核内,参与调控靶细胞的炎症、细胞凋亡等病变过程^[29]。分子对接验证选取 5 个核心靶点蛋白分别与 5 个药效小分子进行分子对接,结果显示,HYL 中的活性成分与部分核心靶点都具有较强的结合能力,提示网络药理学预测结果的可靠性。

将代谢组学与网络药理学联合分析,绘制出靶点-代谢途径-代谢物网络图,重点关注细胞色素 P450、类固醇激素生物合成代谢途径。已有研究表明,通过抑制类固醇激素生物合成相关基因的表达,可发挥药物抗炎抗氧化功能^[30]。从磷脂中释放的花生四烯酸通过细胞色素 P450 通路产生的类脂类信号分子,在炎症、疼痛和免疫功能等过程中发挥作用,并且是急性和慢性炎症反应中的关键介质^[31]。

综上所述,本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术、网络药理学与分子对接等方法研究了 HYL 治疗 CB 的作用机制,筛选细胞色素 P450、叶酸合成、鞘脂代谢、类固醇激素生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化等代谢通路及其相关 20 个差异代谢物为 HYL 治疗 CB 的潜在靶标代谢物,并筛选确定了 34 个核心靶标。整合血清代谢组学-网络药理学联合分析结果表明,HYL 可以调节血清代谢物调控炎症相关核心靶基因降低炎症水平,缓解机体代谢紊

乱发挥治疗 CB 的作用。该研究体现了中药治疗多靶点、多途径的特点,可为 HYL 治疗 CB 的作用机制研究提供一定思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Segal L N, Martinez F J. Chronic obstructive pulmonary disease subpopulations and phenotyping [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(6): 1961-1971.
- [2] 梁潇, 阎保伟. 慢性支气管炎的临床治疗进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020. 41(13): 1675-1676.
Liang X, Yan B W. Progress of clinical treatment of chronic bronchitis [J]. J Qiqihar Med Coll, 2020. 41(13): 1675-1676.
- [3] 曾笑影. 穴位贴敷联合耳穴压豆治疗慢性支气管炎临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2024. 22(5): 102-104.
Zeng X Y. Clinical observation on the treatment of chronic bronchitis with acupoint application and auricular pressure bean [J]. Chin Med Mod Dis Educ China, 2024. 22 (5): 102-104.
- [4] 刘建华, 钱树坤, 丁磊, 等. 中西医结合治疗慢性支气管炎的疗效及对血清学和痰液学指标的影响 [J]. 医学综述, 2017. 23(14): 2906-2909.
Liu J H, Qian S K, Ding L. Efficacy of combined Chinese and Western medicine in the treatment of chronic

- bronchitis and its effect on serological and sputum indicators [J]. Med Rev, 2017, 23(14): 2906-2909.
- [5] 段艳菊, 等. 针刺联合润肺清燥汤治疗慢性支气管炎延期肺肾阴虚证临床研究 [J]. 新中医, 2022, 54(22): 138-143.
- Duan Y J, et al. Clinical study on the treatment of chronic bronchitis with lung and kidney *yin* deficiency by acupuncture combined with moistening lung and clearing dryness soup [J]. New Chin Med, 2022, 54(22): 138-143.
- [6] 龚大伦, 等. 润肺清燥汤治疗肺阴虚型慢性支气管炎临床研究 [J]. 四川中医, 2020, 38(7): 104-108.
- Gong Dalun, et al. Clinical study on the treatment of chronic bronchitis with lung *yin* deficiency by moistening lung and clearing dryness soup [J]. Sichuan Tradit Chin Med, 2020, 38(7): 104-108.
- [7] 陆松侠, 黄茸茸, 胡健力, 等. 基于 IL-33/ST2 信号通路研究补肺汤对慢性支气管炎大鼠肺组织炎症因子表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(23): 5826-5830.
- Lu S X, Huang R R, Hu J L, et al. Study on the effect of lung tonic soup on the expression of inflammatory factors in lung tissue of rats with chronic bronchitis based on IL-33/ST2 signalling pathway [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(23): 5826-5830.
- [8] 张凯歌, 张燕子, 孙航, 等. 灵芝水提物对慢性支气管炎大鼠的保护作用及对 TLRs 通路的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(20): 2133-2137.
- Zhang K G, Zhang Y Z, Sun H, et al. Protective effect of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on rats with chronic bronchitis and its effect on TLRs pathway [J]. J Clin Exp Med, 2022, 21(20): 2133-2137.
- [9] 陈日益. 玉竹: 养阴润燥的良品 [J]. 健康生活, 2017(10): 28-29.
- Chen R Y. Jade bamboo: A good product for nourishing *yin* and moisturising dryness [J]. Healthy Living, 2017(10): 28-29.
- [10] 关玲敏, 潘兴瑜. 玉竹提取物 A 对小鼠脾淋巴细胞转化和 IL-2 产生的影响 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(14): 176-177.
- Guan L M, Pan X Y. Effect of EA-PAOA on mice splenolymphocyte blastogenesis and IL-2 production [J]. Guide China Med, 2010, 8(14): 176-177.
- [11] Li M L, Gao W Y, Wang H J, et al. The grading quality markers identification of *Panax notoginseng* under the guidance of traditional experience using untargeted metabolomics and anti-myocardial ischemia evaluation of zebrafish [J]. Phytomedicine, 2023, 111: 154674.
- [12] 刘孟楠, 毛琳慎, 伍浩, 等. 基于血清代谢组学探究蛭龙活血通瘀胶囊对心肌缺血再灌注损伤小鼠的保护作用及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(4): 523-531.
- Liu M N, Mao L S, Wu H, et al. Investigation of the protective effect and mechanism of Hirong Xiuzhuetongyu Capsules on myocardial ischemia/reperfusion based on serum metabolomics [J]. J Beijing Univ Chin Med, 2024, 47(4): 523-531.
- [13] Pan B Y, Wang Y, Wu C N, et al. A mechanism of action study on Danggui Sini Decoction to discover its therapeutic effect on gastric cancer [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 592903.
- [14] 邓亚胜, 黄慧, 梁天薇, 等. 慢性支气管炎动物模型制备要素和模型评价的文献分析 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 199-207.
- Deng Y S, Huang H, Liang T W, et al. Analysis of literature on elements of preparation and model evaluation of animal models of chronic bronchitis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(11): 199-207.
- [15] 李加会, 等. 代谢组学结合网络药理学技术探究“瓜蒌-薤白”药对抗动脉粥样硬化的配伍机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6207-6216.
- Li J H, et al. Metabolomics combined with network pharmacology to investigate the anti-atherosclerotic mechanism of '*Psidium guajava*-*Allium sativum*' [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2022, 47(22): 6207-6216.
- [16] Li X Y, Lin S, Lin Y, et al. The analgesic mechanism of Xi Shao Formula research on neuropathic pain based on metabolomics [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2023, 10(4): 448-460.
- [17] 王家辉, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨青蛇方外用治疗湿疹的作用机制 [J]. 湖南中医杂志, 2024, 40(2): 189-195.
- Exploring the mechanism of action of Green Snake Formula for the topical treatment of eczema based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2024, 40(2): 189-195.
- [18] 黄晴. 盐酸氨溴索辅助治疗慢性支气管炎的临床观察. 广州医科大学学报, 2020, 48(6): 82-84.
- Huang Q. Clinical observation on the adjuvant treatment of chronic bronchitis with Ambroxol hydrochloride [J]. J Guangzhou Med Univ, 2020, 48(6): 82-84.
- [19] Shah N J, Sureshkumar S, Shewade D G. Metabolomics: A tool ahead for understanding molecular mechanisms of drugs and diseases [J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(3): 247-254.
- [20] Das Mahapatra A, Choubey R, Datta B. Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors in multitarget and combination therapies for inflammation and cancer [J]. Molecules, 2020, 25(23): 5488.
- [21] Jiang T, Dai L, Li P, et al. Lipid metabolism and identification of biomarkers in asthma by lipidomic

- analysis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(2): 158853.
- [22] James B N, Oyeniran C, Sturgill J L, et al. Ceramide in apoptosis and oxidative stress in allergic inflammation and asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(5): 1936-1948.
- [23] 曹旭. 抗纤维癌方干预肝癌的作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- Cao X. Study on the effect and mechanism of anti-fibre and anti-cancer formula in intervening hepatocellular carcinoma [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2022.
- [24] Li X H, Gong W, Wang H, et al. O-GlcNAc transferase suppresses inflammation and necroptosis by targeting receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 [J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 576-590.
- [25] 王红梅, 陈思瑞, 杜红. LncRNA PURPL 调节 miR-342-3p/PIK3R1 轴对肝癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. *河北医学*, 2024, 30(1): 29-35.
- Wang H M, Chen S R, Du H. Effect of LncRNA PURPL regulating miR-342-3p/PIK3R1 axis on the malignant biological behaviour of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hebei Med*, 2024, 30(1): 29-35.
- [26] Ai X J, Xiang L, Huang Z, et al. Overexpression of PIK3R1 promotes hepatocellular carcinoma progression [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 52.
- [27] 成撒诺, 徐亚丽, 戴晓波, 等. Krüppel 样转录因子 8 在肝细胞癌中经 PI3K/Akt 通路调控 VEGFA 的表达 [J]. *肿瘤*, 2014, 34(12): 1075-1081.
- Cheng S N, Xu Y L, Dai X B, et al. Krüppel-like transcription factor 8 regulates VEGFA expression in hepatocellular carcinoma through PI3K/Akt signal pathway [J]. *Tumor*, 2014, 34(12): 1075-1081.
- [28] 张蒙, 甘华田. PI3K/AKT 信号传导通路 with 肠道炎症 [J]. *华西医学*, 2006, 21(1): 192-193.
- Zhang M, Gan H T. PI3K/AKT signaling pathway and intestinal inflammation [J]. *West China Med J*, 2006, 21(1): 192-193.
- [29] 毕殿勇, 张蕾, 王利, 等. 帕金森病相关细胞信号通路及中医药干预作用的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(22): 3817-3819.
- Bi D Y, Zhang L, Wang L, et al. Progress of Parkinson's disease-related cell signalling pathways and the interventional effects of traditional Chinese medicine [J]. *J Integr Cardio Cerebrovascular Dis*, 2020, 18(22): 3817-3819.
- [30] 常小莹, 匡洪影. 中医药调控自噬治疗多囊卵巢综合征的研究进展 [J]. *中国医药*, 2024, 19(1): 151-155.
- Chang X Y, Kuang H Y. Research progress of traditional Chinese medicine regulating autophagy in the treatment of polycystic ovary syndrome [J]. *China Med*, 2024, 19(1): 151-155.
- [31] 颜耿杰, 林镛, 苏会吉, 等. 内源性脂质介质在肝衰竭中的应用及潜在价值 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(1): 211-217.
- Yan G J, Lin Y, Su H J, et al. Application and potential value of endogenous lipid mediators in liver failure [J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(1): 211-217.

[责任编辑 齐静雯]