

基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究

李 静^{1,2}, 高 丽¹, 高 耀¹, 秦雪梅¹, 李震宇^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘 要: **目的** 预测款冬花止咳化痰主要活性成分的作用靶点, 探讨其多成分-多靶点-多通路的作用机制。**方法** 采用网络药理学方法针对已报道的款冬花中酚酸类、苯丙素类及倍半萜类主要成分(绿原酸、3,5-二咖啡酰基奎尼酸、3,4-二咖啡酰基奎尼酸、4,5-二咖啡酰基奎尼酸、芦丁、咖啡酸、槲皮素、金丝桃苷、山柰酚、 β -谷甾醇、款冬酮、款冬素酯), 依据反向药效团匹配方法预测款冬花活性成分靶点。通过CooLGeN数据库中已批准的止咳化痰药物靶基因的比对筛选, 借助MAS 3.0生物分子功能软件进行靶点信息注释, 通过Systems Dock Web Site软件将款冬花成分与靶点进行分子对接, 采用Cytoscape软件构建款冬花成分-靶点-通路网络。**结果** 网络分析表明款冬花活性成分涉及白细胞介素-2(IL-2)、环氧合酶-2(COX-2)、人核糖核酸酶A3(RNASE3)等18个靶点及信号转导-炎症-能量代谢等相关生物过程和代谢通路。**结论** 款冬花止咳化痰作用体现了中药多成分、多靶点、多途径的作用特点, 该研究为深入阐释款冬花止咳化痰作用机制提供科学依据。

关键词: 网络药理学; 款冬花; 止咳化痰; 分子对接; 反向药效团匹配

中图分类号: R282 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)01-0179-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.025

Exploration in targets action of antitussive and expectorant bioactive components from *Farfarae Flos* based on network pharmacology

LI Jing^{1,2}, GAO Li¹, GAO Yao¹, QIN Xue-mei¹, LI Zhen-yu¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To predict the action targets of antitussive and expectorant active ingredients of *Farfarae Flos* (FF) to understand the “multi-components, multi-targets, and multi-pathways” mechanism. **Methods** Using network pharmacology, the main components in FF [chlorogenic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, rutin, caffeic acid, quercetin, kampferol, hyperoside, β -sitosterol, tussilagone, and 7 β -(3-Ethyl-cisrotonoyloxy)-1 α -(2-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-Z-notonipetranone] reported in previous studies, were used to predict the targets of main active ingredients of FF according to the PharmMapper method. The prediction was made by screening of the antitussive and expectorant targets approved by the CooLGeN database and annotating the information of targets with the aid of MAS 3.0 biological molecular function software. Based on the molecular docking, the tight binding of active ingredients with potential protein targets was explored by Systems Dock Web Site. The Cytoscape software was used to construct the FF ingredients-targets-pathways network. **Results** The network analysis indicated that the active ingredients in FF involve 18 targets, such as IL-2, COX-2, and RNASE3, as well as the signal transduction-inflammation-energy metabolism relevant biological processes and metabolic pathways. **Conclusion** The antitussive and expectorant effect of FF showed the characteristics of traditional Chinese medicine in multi-components, multi-targets, and multi-pathways. This research provides a scientific basis for elucidation of the antitussive and expectorant pharmacological mechanism of FF.

Key words: network pharmacology; *Farfarae Flos*; antitussive and expectorant; molecular docking; PharmMapper

款冬花 *Farfarae Flos* (FF) 是菊科款冬属植物 微苦, 具有润肺下气、止咳化痰的功效, 主治喘咳
款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 性温, 味辛、 痰多、劳嗽咯血、急慢性气管炎等症, 始载于《神

收稿日期: 2017-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270008); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 山西省高等学校创新人才支持计划

作者简介: 李 静, 女, 硕士, 研究方向为中药质量控制及活性成分研究。Tel: 15735175924 E-mail: jinglisxu@163.com

***通信作者** 李震宇, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制及活性成分研究。Tel: 15834101402 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

农本草经》，列为中品，谓其“主咳逆上气，善喘，喉痹，诸惊痫、寒热邪气”^[1]。橘红丸、气管炎丸、秋梨膏等复方皆含款冬花^[2]，疗效显著。目前对款冬花的研究较少，虽然其止咳化痰活性成分基本明确^[3-5]，但仍存在活性成分作用靶点不清楚等问题。因此，借助网络药理学的思路，从系统生物整体的角度探究款冬花止咳化痰作用机制具有重要意义。

网络药理学是以系统生物学和多向药理学为理论基础的药物设计新方法和新策略^[6]，通过构建药物-靶点-疾病之间的复杂网络来探讨药物的作用机制，具体包括活性分子筛选、靶点预测、分子对接以及网络分析 4 部分。网络药理学从多靶点的研究策略出发将药物-靶点网络与生物系统网络相结合，为新药研发提供新途径和新策略^[7-8]。反向药效团匹配^[9] (PharmMapper) 是 1 种基于配体特征靶点预测的方法，其中含有 7 000 多个药效团模型，并关联 1 627 个药物靶点信息，可自动寻找与查询分子构象最为匹配的药效团并进行打分，涵盖 110 种临床适应症，具有运算速度快、靶点信息全面等优点。PharmMapper 反向分子对接在中药靶点研究中得到广泛应用。这些潜在的分子靶点参与多种生理和（或）病理过程，对于具有潜在药理活性的小分子作用机制的研究有较大的指导意义。高耀等^[10]采用网络药理学和反向药效团匹配方法发现逍遥散抗抑郁活性成分涉及 25 个作用靶点以及信号转导-内分泌-能量代谢等相关生物过程和代谢通路。赵蕾等^[11]采用 TCMSP 数据库挖掘中药化学成分及靶点，并与 PharmMapper 靶点预测结果相结合的方法研究百合地黄汤干预心理亚健康的作用机制，从百合地黄汤中筛选出 11 个活性成分，共涉及 21 个靶点，且活性成分与预测的靶点有较好的相互作用，预测的 21 个靶点主要参与了 γ -氨基丁酸 (GABA) 信号转导、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路以及单胺转运等相关生物过程。刘洪等^[12]采用网络药理学方法对三拗汤治疗哮喘的的功效成分及作用机制进行分析，探讨多成分-多靶点-多通路的网络关系，通过成分-通路-靶点网络分析表明，三拗汤 11 个主要功效成分作用于 76 个靶点，涉及免疫-内分泌-信号传导-细胞过程中如 T 细胞受体、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)、Erb-B 等 46 条通路。三拗汤各味药的药效成分既有共同的作用靶点及通路，又各有侧重，为明确药物之间的配伍关系和探讨哮喘方剂的作用机制提

供了参考。因此可采用网络药理学方法解释款冬花多成分、多靶点、多途径的作用机制。

款冬花为常用止咳、平喘、祛痰的中药^[2]。已有研究证实款冬花中的咖啡酰奎尼酸类化合物具有止咳化痰活性^[3]。款冬花中其他成分如黄酮类化合物山柰酚、槲皮素、芦丁在矮地茶 *Japanese Ardisia Herb* 等其他药材中的止咳祛痰作用已得到临床证实^[4]。上述研究结果仅表明了款冬花止咳化痰的主要活性成分，但并未阐明其作用机制。因此，本研究以款冬花止咳化痰的主要活性成分为研究对象，运用网络药理学方法，通过构建成分-通路-靶点网络，全面系统地预测和发现作用靶点，为深入探讨款冬花止咳化痰的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 Sdf-mol 格式文件建立

针对课题组前期研究及已报道的与款冬花止咳化痰活性相关的 12 个化合物（绿原酸、3,5-二咖啡酰基奎尼酸、3,4-二咖啡酰基奎尼酸、4,5-二咖啡酰基奎尼酸、芦丁、咖啡酸、槲皮素、金丝桃苷、山柰酚、 β -谷甾醇、款冬酮、款冬素酯）^[5,13]在 ChemBiodraw Ultra 12.0 软件中以 structure 选项下的“convert name to structure”功能画出其各自的结构图，并以 MDL Molfile (*.mol) 格式存储^[14]。将建立的 MDL Molfile (*.mol) 格式文件导入 OpenBabel 软件，使用其 convert 功能，将 MDL Molfile 格式转换成为 sdf-MDL MOL format 格式文件。

1.2 潜在作用靶点反向预测

登陆 PharmMapper 服务器 (<http://59.78.96.61/pharmmapper/>)，上传款冬花主要活性成分 sdf-mol 格式文件，采用反向药效团匹配方法得到虚拟筛选结果^[9]。以活性小分子为探针，搜寻潜在药物靶点，进而预测化合物生物活性。由于检索到的药物靶点存在命名不规范等问题，因此，本实验使用 UniProt 数据库中 UniProtKB 搜索功能 (<http://www.uniprot.org/>)，通过输入蛋白名称并限定物种为“人”，将检索得到的所有蛋白校正为其官方名称 (Official Symbol)，经上述数据库检索和转化操作，获取与活性成分相关的蛋白信息。

1.3 靶点的筛选

将反向预测获得的靶点信息与 CoolGen (<http://ci.smu.edu.cn/CoolGen/>) 数据库中已报道的与咳嗽相关的靶点对比分析，归纳总结预测靶点中有明确止咳化痰作用的靶点。

1.4 靶点通路注释分析

通过 MAS 3.0 (<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>) 生物分子功能注释系统对获取的靶点信息进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析。款冬花对应的靶蛋白 (基因) 直接映射到通路上, 药物靶点富集的通路被认为是药物调控的通路。

1.5 活性成分-靶蛋白分子对接

根据上述款冬花化学成分的靶点预测结果, 通过 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) 找到相应蛋白的 PDB-ID。将 PDB-ID 导入 Systems Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp/>) 软件对活性成分和靶蛋白进行分子对接^[15]。

1.6 活性成分-靶点网络构建

根据上述款冬花化学成分的靶点预测结果, 采用 Cytoscape 软件的 Merge 功能构建款冬花成分-靶点-通路网络模型^[16]。网络中节点 (node) 表示活性成分、靶点以及作用通路。若某一靶点为某化合物的潜在作用靶点, 则以边 (edge) 相连。节点间的

连接原则为当活性成分作用靶点与作用通路相关靶点相同时, 则将活性成分与作用通路以边关联起来。通过构建网络研究款冬花止咳化痰多成分、多靶点、多通路的作用。

2 结果

2.1 款冬花止咳化痰活性成分的潜在靶点信息

首先依据匹配度对由 PharmMapper 得到的 300 个潜在作用靶点由高到低进行排序。将获得的靶点信息与 CoolGeN 数据库中止咳化痰 (Cough 和 Phlegm) 药物的靶标对比分析, 归纳总结得到 36 个与款冬花止咳化痰相关联的潜在作用靶点。进一步分析得 12 个活性成分与 36 个靶点的总频率为 179 次 (表 1)。结果显示, 在细胞过程中发挥重要作用的 GSTP1、MAPK14、ACHE、GSTA1、CFTR、VDR、ESP1、GSTM1、MME、DAPK1、COX-2 以及 IL-2 等是款冬花主要活性成分潜在的靶点蛋白。由表 2 可知, 款冬中不同活性成分可作用于相同的靶点, 同一个活性成分也可作用于不同的靶点, 体现其多

表 1 款冬花止咳化痰活性成分靶点信息

Table 1 Information of potential targets from active ingredients of FF

编号	PDB-ID	靶点	频率
1	P09211	谷胱甘肽硫转移酶 P1 (glutathione <i>S</i> -transferase P, GSTP1)	28
2	Q16539	丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)	15
3	P22303	乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, ACHE)	14
4	P08263	谷胱甘肽硫转移酶 α 1 (glutathione <i>S</i> -transferase α 1, GSTA1)	12
5	P13569	囊性纤维化跨膜调控子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)	11
6	P11473	维生素 D3 的核激素受体 (vitamin D3 receptor, VDR)	10
7	P03372	雌激素受体 α (estrogen receptor α , ESR1)	9
8	P00734	凝血酶 2 (prothrombin, F2)	8
9	P09488	谷胱甘肽硫转移酶 μ 1 (glutathione <i>S</i> -transferase μ 1, GSTM1)	7
10	P08473	黑色素代谢酶 (neprilysin, MME)	6
11	P53355	死亡关联蛋白激酶 1 (death-associated protein kinase 1, DAPK1)	5
12	P29476	一氧化氮合酶 1 (nitric oxide synthase, NOS1)	4
13	P45452	基质金属蛋白酶 13 (collagenase 13, MMP13)	4
14	P50135	组胺- <i>N</i> -甲基转移酶 (histamine <i>N</i> -methyltransferase, HNMT)	4
15	P11413	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, G6PD)	4
16	P49354	蛋白香叶烯基转移酶 1 α (protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha, FNTA)	4
17	P29466	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (caspase-1, CASP1)	4
18	P02768	血清白蛋白 (serum albumin, ALB)	4
19	P35355	环氧合酶-2 (prostaglandin G/H synthase 2, COX-2)	3
20	P09874	聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (poly [ADP-ribose] polymerase 1, PARP1)	2

续表 1

编号	PDB-ID	靶点	频率
21	P27338	单胺氧化酶 B (amine oxidase [flavin-containing] B, MAOB)	2
22	P17931	半乳糖凝集素 3 (galectin-3, LGALS3)	2
23	P60568	白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)	2
24	P07858	组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB)	2
25	P00813	腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA)	2
26	Q96EB6	组蛋白去乙酰化酶 1 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1, SIRT1)	1
27	P30740	丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 (leukocyte elastase inhibitor, SERPINB1)	1
28	P10153	核糖核酸酶 A2 (non-secretory ribonuclease, RNASE2)	1
29	P00797	肾素重组蛋白 (renin, REN)	1
30	P08254	基质金属蛋白酶 3 (stromelysin-1, MMP3)	1
31	P39900	基质金属蛋白酶 12 (macrophage metalloelastase, MMP12)	1
32	P28482	有丝分裂原激活蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)	1
33	P46926	葡萄糖 6-磷酸脱氢酶 1 (glucosamine-6-phosphate isomerase 1, GNPDA1)	1
34	P08246	中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, ELANE)	1
35	P42771	细胞周期依赖性激酶抑制基因 2 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2, CDKN2)	1
36	P31750	蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)	1

表 2 款冬花止咳化痰活性成分靶点数目

Table 2 Information of potential target numbers from active ingredients of FF

编号	成分	靶标数目
1	绿原酸	19
2	3,5-二咖啡酰基奎尼酸	12
3	3,4-二咖啡酰基奎尼酸	11
4	4,5-二咖啡酰基奎尼酸	14
5	芦丁	11
6	咖啡酸	18
7	槲皮素	17
8	山柰酚	24
9	金丝桃苷	21
10	β -谷甾醇	20
11	款冬酮	20
12	款冬花素	29

成分、多靶点的止咳化痰作用机制。

2.2 款冬花止咳化痰活性成分潜在靶点的通路注释

将款冬花活性成分预测出的 36 个作用靶点通过 MAS 3.0 生物分子功能注释系统对获取靶点信息进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析。GO 富集分析指在某一功能层次上统计蛋白或者基因的数目或组成的 1 个有限无环图，包括 3 个分支，即生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组分 (cellular component)。通过

GO 分析探讨款冬花预测靶点的功能分布 (表 3~5)。其中在生物过程与 proteolysis 和 metabolism 相关性最大; 在分子功能中与 protein binding 和 zinc ion binding 相关性最大; 在细胞组分中与 cytoplasm 和 nucleus 相关性最大。通过 KEGG 分析探讨款冬花止咳化痰作用预测靶点的通路分布 (表 6)。其中 36 个靶点中有 18 个参与通路富集, 共涉及 Glutathione metabolism、Drug metabolism-cytochrome P450、VEGF signaling pathway、T cell receptor signaling pathway、Bladder cancer、Non-small cell lung cancer、Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450、Chronic myeloid leukemia、Toll-like receptor signaling pathway 以及 Jak-STAT signaling pathway 等 32 条通路, 表 6 列举排名前 18 位的通路。

2.3 靶点验证

在上述通路注释分析中 32 条通路可以对应 18 个靶蛋白, 在 PDB 数据库中找出 18 个蛋白的结构 ID, 采用 Systems Dock Web Site 软件对 12 个活性成分及 18 个靶点按默认参数进行分子对接, 得出对接打分 Score 值。结合自由能越小, 配体与受体结合越稳定, 故 Score 值越大, 配体与受体结合越稳定。一般 Score 值在 4.25 以上认为是有一定的结合活性, 大于 5.0 说明分子与靶点有较好的结合活性, 大于 7.0 说明分子与靶点的结合构型具有强烈的活

表 3 生物过程中部分 GO 功能分析结果

Table 3 Part of functional analysis of GO in biological process

GO 功能注释	输入量
GO:0006508 proteolysis	8
GO:0008152 metabolism	6
GO:0055114 oxidation reduction	5
GO:0006355 regulation of transcription, DNA-dependent	4
GO:0007275 development	4
GO:0007165 signal transduction	4
GO:0006935 chemotaxis	3
GO:0006916 anti-apoptosis	3
GO:0006917 induction of apoptosis	3
GO:0006974 response to DNA damage stimulus	3
GO:0009611 response to wounding	3
GO:0005975 carbohydrate metabolism	3
GO:0042981 regulation of apoptosis	3
GO:0006468 protein amino acid phosphorylation	3
GO:0030154 cell differentiation	3

表 4 分子功能中部分 GO 功能分析结果

Table 4 Part of functional analysis of GO in molecular functions

GO 功能注释	输入量
GO:0005515 protein binding	16
GO:0008270 zinc ion binding	10
GO:0046872 metal ion binding	10
GO:0016740 transferase activity	9
GO:0008233 peptidase activity	8
GO:0005524 ATP binding	5
GO:0000166 nucleotide binding	5
GO:0004222 metalloendopeptidase	4
GO:0004674 protein serine/thre	4
GO:0016491 oxidoreductase activity	4
GO:0005509 calcium ion binding	4
GO:0003677 DNA binding	4
GO:0004364 glutathione transfer	3
GO:0020037 heme binding	3
GO:0009055 electron carrier activity	3
GO:0042802 identical protein binding	3
GO:0016787 hydrolase activity	3

性^[17], 结果如表 7 所示。从表 7 中可以看出, 在 18 个分子靶点对接中, 有强烈结合活性的靶点有 9 个, 有较好的结合活性的靶点有 8 个, 有一定的结合活性的靶点有 2 个。款冬花活性成分及其作用靶点的分子对接打分表明 12 个活性成分及 18 个靶点有着较好的相互作用, 为后续的网络分析奠定基础。

表 5 细胞组分中部分 GO 功能分析结果

Table 5 Part of functional analysis of GO in cellular components

GO 功能注释	输入量
GO:0005737 cytoplasm	24
GO:0005634 nucleus	15
GO:0005576 extracellular region	10
GO:0016020 membrane	7
GO:0005730 nucleolus	6
GO:0005615 extracellular space	6
GO:0005829 cytosol	6
GO:0005886 plasma membrane	6
GO:0005578 extracellular matrix (sensu Metazoa)	4
GO:0005654 nucleoplasm	4
GO:0005764 lysosome	3
GO:0005739 mitochondrion	3
GO:0005856 cytoskeleton	3
GO:0043231 intracellular membrane-bound organelle	3

表 6 款冬花预测靶点 KEGG 通路分析

Table 6 Enriched KEGG pathways of potential targets from main active ingredients of FF

通路	输入量
glutathione metabolism	4
drug metabolism-cytochrome P450	4
VEGF signaling pathway	4
T cell receptor signaling pathway	4
bladder cancer	3
non-small cell lung cancer	3
amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	3
glioma	3
metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3
melanoma	3
pancreatic cancer	3
chronic myeloid leukemia	3
Fc epsilon RI signaling pathway	3
small cell lung cancer	3
renin-angiotensin system	2
histidine metabolism	2
mTOR signaling pathway	2
endometrial cancer	2

2.4 款冬花活性成分-靶点-通路网络构建

采用 Cytoscape 软件的 Merge 功能构建款冬花止咳化痰活性成分-作用靶点-代谢通路网络模型, 如图 1 所示。款冬花止咳化痰主要活性成分的作用靶点分布于不同的代谢通路, 相互协调、共同调节款冬花止咳化痰的作用机制。款冬花止咳化痰的作用机制与目前炎症反应学说、细胞分子机制学说等

表 7 款冬花中 12 个活性化合物与靶点的分子对接得分值

Table 7 Docking scores of 12 active ingredients with its targets of FF

编号	化合物	靶点	PDB ID	得分	编号	化合物	靶点	PDB ID	得分
1	绿原酸	DKT1	5AUT	4.604	5	芦丁	NOS1	5G0N	7.871
		NOS1	5G0N	4.502			MK01	2OJG	7.751
		AKT1	5KCV	4.445			CDKN2	5JQ5	7.534
		CDKN2	5JQ5	4.438			AKT1	5KCV	7.286
		HNMT	2AOT	4.358			DKT1	5AUT	7.276
		MK01	2OJG	4.322			HNMT	2AOT	6.792
		G6PD	2BH9	4.293			GSTP1	2A2R	6.732
		GSTP1	2A2R	4.023			G6PD	2BH9	6.076
2	3,5-二咖啡酰基奎尼酸	CDKN2	5JQ5	7.437	6	咖啡酸	CASP1	2H4W	5.488
		NOS1	5G0N	7.427			REN	5K6S	5.271
		MK01	2OJG	7.282			MME	5L79	5.241
		AKT1	5KCV	7.122			DKT1	5AUT	4.604
		DKT1	5AUT	6.939			AKT1	5KCV	4.446
		HNMT	2AOT	6.421			CDKN2	5JQ5	4.432
		GSTP1	2A2R	6.366			NOS1	5G0N	4.423
		G6PD	2BH9	6.027			HNMT	2AOT	4.372
3	3,4-二咖啡酰基奎尼酸	CASP1	2H4W	5.310	7	槲皮素	G6PD	2BH9	4.292
		MME	5L79	5.185			MK01	2OJG	4.242
		REN	5K6S	5.123			GSTP1	2A2R	4.037
		DAPK1	5AUT	7.128			G6PD	2BH9	6.832
		NOS1	5G0N	7.395			MME	5L79	6.786
		CDKN2	5JQ5	7.397			AKT1	5KCV	6.729
		AKT1	5KCV	7.146			REN	5K6S	6.653
		MAPK1	2OJG	7.207			HNMT	2AOT	6.620
4	4,5-二咖啡酰基奎尼酸	HNMT	2AOT	6.409	8	山柰酚	DKT1	5AUT	6.475
		GSTP1	2A2R	6.400			CDKN2	5JQ5	6.346
		G6PD	2BH9	6.182			NOS1	5G0N	5.951
		CASP1	2H4W	5.330			CASP1	2H4W	5.877
		MME	5L79	5.176			GSTP1	2A2R	4.927
		REN	5K6S	5.163			G6PD	2BH9	6.873
		CDKN2	5JQ5	7.384			MME	5L79	6.768
		NOS1	5G0N	7.335			AKT1	5KCV	6.721
		MK01	2OJG	7.314			REN	5K6S	6.624
		AKT1	5KCV	7.127			DKT1	5AUT	6.496
		DKT1	5AUT	6.898			MK01	2OJG	6.173
		HNMT	2AOT	6.419			CDKN2	5JQ5	6.142
		GSTP1	2A2R	6.340			CASP1	2H4W	5.892
		G6PD	2BH9	6.066			HNMT	2AOT	5.877
		CASP1	2H4W	5.290			NOS1	5G0N	5.858
		MME	5L79	5.185			GSTP1	2A2R	4.948
		REN	5K6S	5.122	9	金丝桃苷	CDKN2	5JQ5	6.850

续表 7

编号	化合物	靶点	PDB ID	得分	编号	化合物	靶点	PDB ID	得分
9	金丝桃苷	NOS1	5G0N	6.804	11	款冬酮	CDKN2	5JQ5	7.488
		GSTP1	2A2R	6.788			MK01	2OJG	7.425
		MK01	2OJG	6.780			AKT1	5KCV	7.317
		HNMT	2AOT	6.687			DKT1	5AUT	7.235
		DKT1	5AUT	6.612			GSTP1	2A2R	6.996
		AKT1	5KCV	6.498			HNMT	2AOT	6.877
		G6PD	2BH9	6.422			G6PD	2BH9	6.595
		CASP1	2H4W	5.440			CASP1	2H4W	5.511
		MME	5L79	5.289			REN	5K6S	5.233
10	β -谷甾醇	REN	5K6S	5.215	12	款冬花素	MME	5L79	5.396
		CDKN2	5JQ5	8.347			NOS1	5G0N	8.215
		NOS1	5G0N	8.337			MK01	2OJG	7.780
		MK01	2OJG	8.323			CDKN2	5JQ5	7.767
		AKT1	5KCV	8.319			AKT1	5KCV	7.695
		DKT1	5AUT	8.298			DKT1	5AUT	7.656
		HNMT	2AOT	7.680			HNMT	2AOT	7.251
		G6PD	2BH9	7.379			GSTP1	2A2R	7.116
		CASP1	2H4W	5.403			G6PD	2BH9	6.665
11	款冬酮	MME	5L79	5.294			MME	5L79	5.649
		REN	5K6S	5.286			CASP1	2H4W	5.405
		NOS1	5G0N	7.497			REN	5K6S	5.117

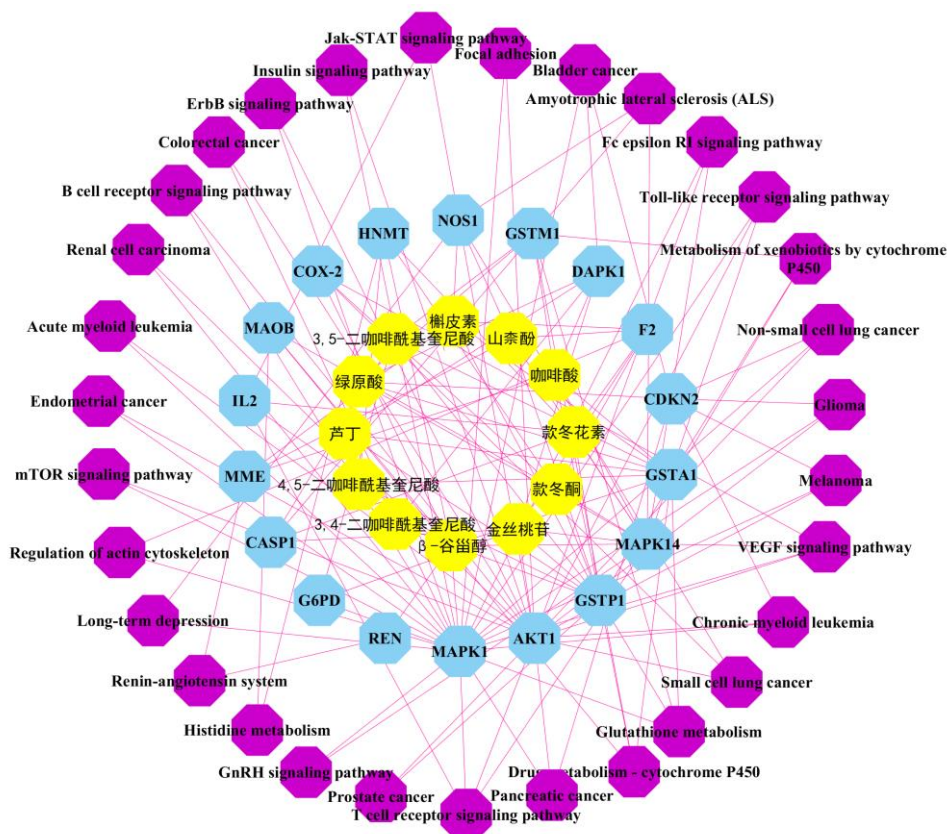


图 1 化合物-靶点-作用通路网络
Fig. 1 Compounds-targets-pathways network

多种发病学说均有相关性, 可从不同角度揭示款冬花止咳化痰的作用特点。

3 讨论

本研究采用反向药效团匹配方法虚拟筛选结合 GooLGeN 止咳化痰药物分析, 发现 36 个款冬花止咳化痰相关靶点, 并对靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 进一步确定 18 个与通路对应靶点, 采用 Systems Dock Web Site 软件对 12 个活性成分及 18 个靶点蛋白按默认参数进行分子对接, 借助网络药理学的方法对款冬花止咳化痰的作用机制进行探讨, 发现其多靶点、多通路作用特点。

PharmMapper 是以活性小分子为探针, 搜寻潜在的药物靶点, 进而预测化合物生物活性, 并建立相应的公共网络服务器^[18]。这些潜在的分子靶点参与多种生理和(或)病理过程, 对于具有潜在药理活性的小分子的作用机制研究有较大的指导意义。该方法针对中药多成分、多靶点的特点, 可减少实验资源的大量消耗, 加快研究进程, 增强实验目的性。因此, 可采用 PharmMapper 的网络药理学方法解释款冬花多成分、多靶点、多途径的作用机制。

已有研究^[14]表明咖啡酰奎尼酸的止咳机制。体外活性实验证明绿原酸可以在蛋白和 mRNA 水平上显著降低脂多糖(LPS)诱导的 COX-2 的上调, 以此抑制前列腺素 E2(PGE2)在小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 的释放。因此, 咖啡酰奎尼酸可能通过抑制炎症性细胞因子的释放来调节咳嗽的应答, 进而发挥止咳作用。文献报道^[9]吸入 IL-2 对乳腺癌有很好的治疗效果, 但会伴随剂量依赖性的咳嗽, 这可能与淋巴细胞和嗜酸性粒细胞剂量依赖性增加有关。龚志晶等^[20]发现氢气吸入治疗有助于降低气道氧化应激损伤相关炎性水平如 IL-2, 胞外超氧化物歧化酶(SOD3)等, 对全身炎症反应可能也有一定抑制效果, 同时能够改善咳嗽等呼吸系统症状。本实验中预测的靶点与已知文献报道的药理作用相吻合, 说明靶点预测的准确性, 同时揭示了款冬花多成分、多靶点、整合调节作用的特点。

款冬花中 12 个活性成分涉及 36 个作用靶点总频率为 179 次, 其中 18 个靶点可对比到代谢通路上, 并且分子对接显示 18 个靶点蛋白与 12 个活性成分有良好的结合性。通过预测靶点的频率发现, 在细胞过程中发挥重要作用的 GSTP1、IL-2、MAPK14 以及 COX-2 等是其潜在靶点基因群。款冬花中不同

活性成分可作用于相同的靶点, 同一活性成分也可作用于不同的靶点, 体现其多成分、多靶点的止咳作用机制。款冬花中作用靶点的相关研究报道较少, 可为今后深入研究款冬花止咳化痰作用潜在靶点的分子机制研究提供参考。

参考文献

- [1] 米霞, 李震宇, 秦雪梅, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的不同性状款冬花药材的化学比较 [J]. 药学学报, 2013, 48(11): 1692-1697.
- [2] 刘可越, 张铁军, 高文远, 等. 款冬花的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 22: 1837-1841.
- [3] Wu Q Z, Zhao D X, Xiang J, et al. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara* [J]. *Pharm Biol*, 2015, doi: 10.3109/13880209.2015.1075048.
- [4] 马致洁, 董红红, 李振宇, 等. 不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1305-1308.
- [5] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, et al. Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.023.
- [6] 薛潇春, 胡晋红. 网络药理学研究方法与应用进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 401-405.
- [7] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [8] 刘丹, 朱靖博, 王永华, 等. 基于网络药理学的银杏叶提取物治疗痛风潜在作用机制初探 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2693-2700.
- [9] Liu X, Ouyang S, Yu B, et al. PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharma-cophore mapping approach [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, doi: 10.1093/nar/gkq300.
- [10] 高耀, 高丽, 高晓霞, 等. 基于网络药理学的逍遥散抗抑郁活性成分作用靶点研究 [J]. 药学学报, 2015, 50(12): 1589-1595.
- [11] 赵蕾, 武嫣斐, 高耀, 等. 基于网络药理学的百合地黄汤干预心理亚健康作用机制研究 [J]. 药学学报, 2015, 52(1): 99-105.
- [12] 刘洪, 范欣生. 三拗汤主要功效成分多靶点网络构建 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3370-3376.
- [13] Shan J H, Fu J, Zhao Z H, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009,

- 9(9): 1042-1048.
- [14] Cousins K R. Computer review of Chem Draw Ultra 12.0 [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(21): 83-88.
- [15] Hsin K Y, Matsuoka Y, Asai Y, *et al.* SystemsDock: A web server for network pharmacology-based prediction and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw335.
- [16] Saito R, Smoot M E, Ono K, *et al.* A travel guide to Cytoscape plugins [J]. *Nat Methods*, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2212.
- [17] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83922.
- [18] Liu X, Ouyang S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharma-cophore mapping approach [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, doi: 10.1093/nar/gkw300.
- [19] Huland E, Heinzer H, Huland H, *et al.* Overview of interleukin-2 inhalation therapy [J]. *Cancer J Sci Am*, 2000, 6(Suppl 1): 104-112.
- [20] 龚志晶, 关继涛, 任雪珠, 等. 氢气对环卫工人雾霾暴露肺保护性作用的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(12): 916-923.