

基于分子对接和系统药理学小青龙汤治疗哮喘的作用机制

徐文华¹, 郑景辉^{2*}, 杨文娜¹, 董音汝¹, 赵阳¹, 赵新望¹

¹广西中医药大学研究生学院, 南宁 530011; ²广西中医药大学附属瑞康医院心内科, 南宁 530000

摘要:为从分子层面阐述小青龙汤治疗哮喘的作用机制, 探索小青龙汤的潜在靶标, 本研究检索中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)并根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)、药物相似性(drug-likeness, DL)筛选出小青龙汤的活性成分, 利用PharmMapper数据库筛选小青龙汤潜在作用靶点, 挖掘CTD、Genecards数据库以筛选与哮喘相关的作用靶点, 利用Cytoscape 3.6.1软件构建小青龙汤的蛋白互作网络图、化合物靶点图, 并通过计算拓扑学参数找到小青龙汤中关键的作用靶点和化合物。对小青龙汤对哮喘的作用靶点进行GO分析和KEGG分析。利用iGEMDOCK软件进行分子对接, 预测作用靶点和主要化合物的结合度。通过筛选得到小青龙汤活性成分、潜在作用靶点; GO分析得到43个生物学过程, 11个细胞组成和9个分子功能; KEGG分析包括PI3K-Akt信号通路、HIF-1信号通路、Wnt信号通路等。初步验证和预测了小青龙汤对治疗哮喘的作用机制, 并为进一步深入揭示其作用机制提供参考。

关键词:小青龙汤; 哮喘; 网络药理学; 生物信息学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-0964-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.007

Molecular docking and network pharmacology of Xiaoqinglong decoction on asthma

XU Wen-hua¹, ZHENG Jing-hui^{2*}, YANG Wen-na¹, DONG Yin-ru¹, ZHAO Yang¹, ZHAO Xin-wang¹

¹Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China;

²Department of Cardiology, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

Abstract: To elucidate the mechanism of Xiaoqinglong decoction in the treatment of asthma from the molecular level and explore the potential target of Xiaoqinglong decoction. This study searched the Chinese medicine system pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and screened the active ingredients of Xiaoqinglong decoction according to oral bioavailability (OB) and drug-likeness (DL). PharmMapper database was screened as well. The potential target of Xiaoqinglong decoction, mining CTD, Genecards database to screen the target related to asthma, using Cytoscape 3.6.1 software to construct the protein interaction network map of Xiaoqinglong decoction, compound target map and find small by calculating topological parameters. Key targets and compounds in Xiaoqinglong decoction. GO analysis and KEGG analysis were performed on the target of Xiaoqinglong decoction on asthma. The iGEMDOCK software was used to predict the binding of the target to the main compound by molecular docking. The active components and potential targets of Xiaoqinglong decoction were obtained by screening; 43 biological processes, 11 cell components and 9 molecular functions were obtained by GO analysis; KEGG analysis included PI3K-Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, Wnt signal Pathway and other pathways. The mechanism of Xiaoqinglong decoction on the treatment of asthma was preliminarily verified and predicted. Additionally, a reference for further studies was provided.

Key words: Xiaoqinglong decoction; asthma; network pharmacology; bioinformatics; molecular docking

收稿日期: 2018-11-30 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(81660776); 国家自然科学基金(2016GXNSFAA380296); 广西中医药大学研究生教育创新计划(YCSW2018171); 2018年广西壮族自治区财政资助博士学位授予单位立项建设项目(桂学位[2018]5号)

哮喘是由多种细胞参与的气道慢性炎症性疾病。目前, 全球至少有3亿哮喘患者^[1]。中医认为哮喘是一种发作性的痰鸣气喘疾患^[2]。小青龙汤出自张仲景《伤寒论》, 方中麻黄、桂枝、细辛解表; 温

散痰饮;半夏降逆化痰;甘草和中诸药相互配合,温肺化饮,化痰平喘,肺气复舒,宣降有权,诸症悉平^[3]。临床应用小青龙汤治疗哮喘的疗效也比较显著,但是由于中药多成份、多靶点等原因,目前小青龙汤治疗哮喘的药效物质基础及分子生物学机制尚未完全被阐明。系统药理学具有“多成分、多途径、多靶点”协同作用的特点,从系统药理学角度对中药复方进行分析,其机理可能正是由于通过配伍药物之间相互协作、药物及其配体之间相互作用这一复杂关系网中的节点相互制约,从而使中药复方能有效打击疾病相关节点,保护整体网络平衡^[4]。分子对接是一个预测蛋白质与配体的结合模式和结合自由能的强有力的计算工具,可以预测给定的蛋白质和配体(蛋白质、DNA/RNA、小分子)的结合模式及结合自由能,进而对其功能及作用机制进行研究^[5]。本研究利用系统药理学和分子对接的方法,对小青龙汤的主要作用成分及作用靶点进行遴选,挖掘哮喘已知的相关靶点,根据网络拓扑分析及生物信息学分析小青龙汤治疗哮喘的潜在作用机制,为小青龙汤治疗哮喘的进一步探索提供参考。

1 材料与方法

1.1 小青龙汤的化学成分收集

本研究构建小青龙汤化学成分数据库采用的是 TC MSP 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/>),借助 TC-MSP 数据库检索小青龙汤全方的所有化学成分,以建议药物筛选标准:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ^[6]。高口服生物利用度常常是决定生物活性分子作为治疗剂的类药性的关键指标。类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[7]。筛选并得到小青龙汤中的活性成分。

1.2 小青龙汤化学成分靶点预测

将小青龙汤中 8 味药物中相应的化学成分分子结构以 Mol2 的格式上传 PharmMapper 数据库^[8-10](http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/submit_file.php),筛选剔除重复靶点。并将小青龙汤化合物潜在靶点信息录入 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中检索筛选物种为人源的靶点作为小青龙汤作用于哮喘的有效作用靶点。

1.3 小青龙汤化学成分靶点 PPI 网络的构建

为了说明靶点蛋白在系统上的作用,将 1.2 所得的小青龙汤潜在靶点信息上传 STRING 10.5 在线软件(<http://string-db.org>),获得蛋白互作网络图。将从 STRING 数据库导出的结果导入 Cytoscape

3.6.1(<http://www.Cytoscape.org/>)软件进行可视化分析,并进行拓扑学网络分析。进一步设置以 Degree 值大小体现颜色与节点大小,以边的颜色粗细反映 Combined score 大小,最终获得蛋白质相互作用网络。

1.4 小青龙汤化合物-靶点网络构建

每个节点(node)是基因、蛋白质或分子,而节点与节点之间的连接(edge)则代表着这些生物分子之间的相互作用^[11]。选取小青龙汤每个有效化合物成分前 10 个靶点,将化合物及靶点信息导入 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化分析处理,计算其拓扑学参数并构建化合物-靶点网络。

1.5 哮喘相关靶点数据构建

本研究基于 TTD 及 Genecards 数据库综合筛选哮喘相关靶点,TTD 数据库是一个提供关于耐药性突变的对目标和药物基因表达和目标组合的数据库^[12],经两大数据库挖掘共同筛选哮喘相关基因。利用 Venn 分析工具,将两者与小青龙汤潜在靶点进行比对分析。

1.6 生物信息学 GO 分析及信号通路富集分析

利用 David 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)上传小青龙汤对哮喘作用靶点的 Gene Symbol 格式,进行 GO 的生物学过程(Biological Process, BP)、细胞组成(Cellular Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)功能富集分析;同时利用 David 数据库利用 KEGG 信号通路分析,综合预测小青龙汤与哮喘关键靶点的生物学特性及调控通路。并且利用计算公式:

$$\text{Rich Factor} = \frac{\text{目标基因集中属于该通路的基因数量}}{\text{背景基因集中该通路所有基因的数量}}$$

计算出富集因子,并绘制气泡图。

1.7 网络靶点特性拓扑学分析

运用 Cytoscape 3.6.1 软件中工具 Network Analyzer 计算网络的拓扑参数。本研究基于以下参数:平均最短路径(average shortest path length, ASPL)、介数中心性(betweenness centrality, BC)、中心接近度(closeness centrality, CC)、聚类系数(clustering coefficient, CC)、连通度(degree)评估节点在全网络中的重要程度。

1.8 主要活性成分-靶点分子对接

iGEMDOCK 是通过基于对接位姿(蛋白质-配体相互作用)和化合物性质(即原子组成)使用 k-均值和分层聚类方法提供后分析工具。iGEMDOCK 一

般用于活性筛选和快速对接。其结果以能量的高低去判断与化合物结合程度,一般化合物分子与受体结合的构象稳定时能量越低,发生的作用可能性越大。在 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 中搜索小青龙汤作用于哮喘的靶点名称并保存为 pdb 格式。配体以 1.7 中通过计算拓扑学参数得到的 degree 排名前五类的化合物以 MOL2 格式上传。

2 结果

2.1 有效成分筛选

共搜集了 1 534 个化合物,其中麻黄 363 个、桂

枝 220 个、白芍 85 个、半夏 116 个、北五味子 130 个、细辛 192 个、干姜 148 个、甘草 280 个。根据 OB 和 DL 值筛选后最后得到麻黄 23 个、桂枝 7 个、白芍 13 个、半夏 13 个、北五味子 8 个、细辛 8 个、干姜 5 个、甘草 92 个化合物。化合物包括:甘草醇(glycyrol)、芍药苷酮(paeoniflorgenone)、异鼠李素(isorhamnetin)、 β -谷甾醇(β -sitosterol)、紫杉醇(lipopyranocoumarin)等,各个活性成分的 OB 和 DL 值见表 1。

表 1 小青龙汤化学成分表

Table 1 Xiaoqinglongtang chemical composition table

化合物代码 Compound code	相关化合物 Related compound	口服利用度 OB	药物相似性 DL	药物 Drug
MOL002311	Glycyrol	90.78	0.67	A
MOL001918	Paeoniflorgenone	87.59	0.37	B
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-Arylcoumarin	83.71	0.27	A
MOL004904	Licopyranocoumarin	80.36	0.65	A
MOL004891	Shinpterocarpin	80.3	0.73	A
MOL005017	Phaseol	78.77	0.58	A
MOL001460	Cryptopin	78.74	0.72	E
MOL004841	Licochalcone B	76.76	0.19	A
MOL004810	Glyasperin F	75.84	0.54	A
MOL001484	Inermine	75.18	0.54	A
MOL000500	Vestitol	74.66	0.21	A
MOL005007	Glyasperins M	72.67	0.59	A
MOL005190	Eriodietyl	71.79	0.24	C
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	71.12	0.18	A
MOL004959	1-Methoxyphaseollidin	69.98	0.64	A
MOL000392	Formononetin	69.67	0.21	A
MOL001925	Paeoniflorin_qt	68.18	0.4	B
MOL001928	Albiflorin_qt	66.64	0.33	B
MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl) chromone	66.37	0.41	A
MOL004903	Liquiritin	65.69	0.74	A
MOL012140	4,9-dimethoxy-1-vinyl-MYMB-carboline	65.3	0.19	E
MOL004808	Glyasperin B	65.22	0.44	A
MOL001910	11 α ,12 α -epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	64.77	0.38	B
MOL004829	Glepidotin B	64.46	0.34	A
MOL004855	Licoricone	63.58	0.47	A
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.9	0.53	A
MOL002514	Sexangularetin	62.86	0.3	F
MOL002501	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl]-(1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31	F

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物代码 Compound code	相关化合物 Related compound	口服利用度 OB	药物相似性 DL	药物 Drug
MOL002501	[(1 <i>S</i>)-3-[(<i>E</i>)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-[(<i>E</i>)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31	E
MOL004835	Glypallichalcone	61.6	0.19	A
MOL004907	Glyzaglabrin	61.07	0.35	A
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	D
MOL005000	Gancaonin G	60.44	0.39	A
MOL004824	(2 <i>S</i>)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2- <i>g</i>]chromen-7-one	60.25	0.63	A
MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-couMarin	59.62	0.43	A
MOL004328	Naringenin	59.29	0.21	A
MOL004328	Naringenin	59.29	0.21	C
MOL005003	Licoagrocarpin	58.81	0.58	A
MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	A
MOL010788	Leucopelargonidin	57.97	0.24	C
MOL004576	Taxifolin	57.84	0.27	C
MOL004576	Taxifolin	57.84	0.27	D
MOL005012	Licoagroisoflavone	57.28	0.49	A
MOL001558	Sesamin	56.55	0.83	E
MOL000211	Mairin	55.38	0.78	A
MOL000211	Mairin	55.38	0.78	B
MOL005018	Xambioona	54.85	0.87	A
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	C
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	D

注:根据 OB 值降序排列,列出前 50 个化学成分。A:甘草;B:白芍;C:麻黄;D:桂枝;E:细辛;F:干姜。

Note: Only the top 50 components are listed according to OB sort. A: licorice; B: white peony; C: ephedra; D: cassia twig; E: asarum; F: dried ginger.

2.2 小青龙汤化学成分潜在靶点预测及相互作用

PharmMapper 数据库计算的潜在靶点是根据匹配度 (fit score) 由高到低进行排序。选取每个化学成分的前十个蛋白,共 1 690 个,进行下一步研究。将相同的靶点进行筛选剔除,结合 Uniprot 数据库确认及转换,最终共得到 167 个靶点,其中包括 ETS1、GPI、DRAP1、XRN2、RAC1、UNC45A、CDCA8、SLC5A4、NR1D2、MDM2、MARS 等。Network analysis 发现,根据拓扑学参数计算网络中的网络度 (degree) 越大,说明小青龙汤通过该靶点治疗疾病的可能性越大,具体拓扑学参数见表 2。其中介数中心性 (betweenness centrality, BC) 表达详见图 1。靶点相互作用关系图详见图 2 其节点大小、颜色由拓扑学参数中网络度决定。

2.3 哮喘相关靶点数据构建及比对分析

在 TTD、Genecards 数据库中查询,发现经实验

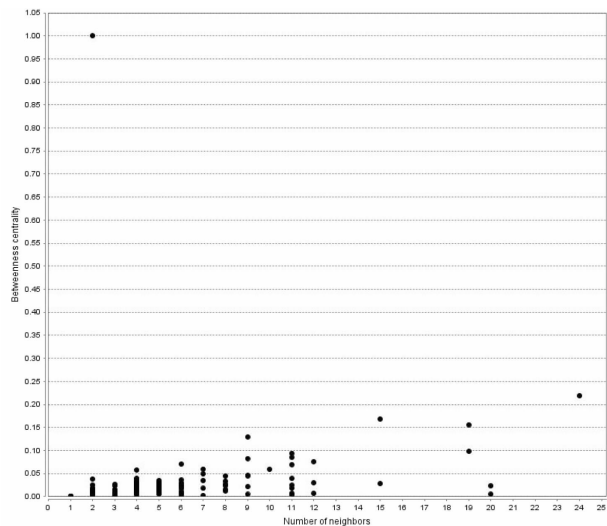


图 1 小青龙汤化合物-靶点拓扑学介数中心性

Fig. 1 Xiaoqinglong decoction compound-target map topology

表 2 小青龙汤化学成分-作用靶点的拓扑学参数

Table 2 Topological parameters of chemical constituents of Xiaoqinglong decoction

种类 Category	靶点 ID/Name	介数中心性 BC	网络度 Degree	种类 Category	靶点 ID/Name	介数中心性 BC	网络度 Degree
Compound	M0359	0.024	20	Target	UNC45A	0.03	12
Compound	M0358	0.005	20	Target	CDC48	0.076	12
Compound	M0422	0.007	12	Target	SLC5A4	0.018	11
Compound	M2501	0.083	9	Target	NR1D2	0.039	11
Compound	M1755	0.129	9	Target	MDM2	0.004	11
Compound	M0492	0.005	9	Target	MARS	0.024	11
Compound	M4993	0.034	8	Target	HDLBP	0.094	11
Compound	M4857	0.027	8	Target	FLNB	0.007	11
Compound	M2670	0.013	8	Target	EIF4E	0.07	11
Compound	M0449	0.024	8	Target	BRD7	0.085	11
Compound	M4957	0.06	7	Target	AHCY	0.059	10
Compound	M9849	0.03	6	Target	PPA1	0.022	9
Compound	M4974	0.006	6	Target	ENSG00000218672	0.045	9
Compound	M4924	0.023	6	Target	GYB5A	0.046	9
Compound	M4576	0.01	6	Target	PTPRJ	0.016	8
Compound	M4328	0.005	6	Target	GNPNAT1	0.045	8
Compound	M2565	0.009	6	Target	TAF9	0.035	7
Compound	M1924	0.026	6	Target	QARS	0.018	7
Compound	M1484	0.022	6	Target	CPSF1	0.049	7
Compound	M10788	0.07	6	Target	ACBD7	0.002	7
Compound	M0098	0.011	6	Target	SRP19	0.017	6
Target	ETS1	0.219	24	Target	RANBP2	0.025	6
Target	GPI	0.098	19	Target	F11	0.021	6
Target	DRAP1	0.156	19	Target	EEF1A1	0.001	6
Target	XRN2	0.168	15	Target	DDX58	0.023	6
Target	RAC1	0.028	15	Target	ANP32D	0.036	6

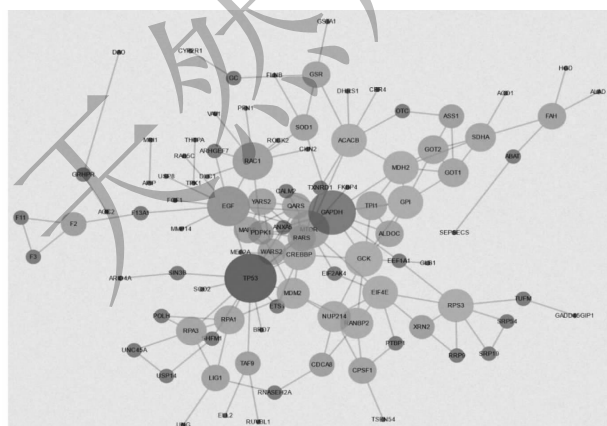


图 2 小青龙汤的蛋白互作网络图

Fig. 2 Protein interaction network diagram of Xiaoqinglong decoction.

及临床试验的药物治疗性靶点有 100 个,与小青龙汤潜在靶点有 3 个重合;经 Genecards 数据库初步筛选出 3 949 个候选基因,根据“Relevance score”度取相关度最高的前 300 个结果,其中与小青龙汤靶点有 11 个重合。经合并数据库法查询共筛选出 381 个哮喘高度相关性靶点,与小青龙汤有 13 个重叠靶点,其韦恩图表达详见图 3。

2.4 小青龙汤主要活性成分对哮喘作用靶点的生物信息学分析

利用 David 数据库进行 GO 分析的结果富集出 43 个生物学过程其中包括蛋白质磷酸化的正向调节(positive regulation of protein phosphorylation)、基因表达的正向调节(positive regulation of gene expression)、T 细胞共刺激(T cell costimulation)等。

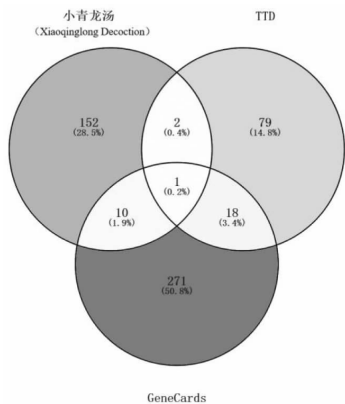


图3 小青龙汤作用靶点与哮喘靶点的韦恩图
Fig.3 Venn diagram of Xiaoqinglong decoction using target and asthma target

蛋白质磷酸化是细胞生长和发育,信号转导和代谢等细胞内过程的重要构成因素。11个细胞组成其中包括细胞外泌体(extracellular exosome)、线粒体基质(mitochondrial matrix)、局灶性粘连(focal adhesion)等和9个分子功能其中包括蛋白激酶结合(protein kinase binding)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)、ATP结合(ATP binding)等。具体分类见图4。KEGG分析得到29条信号通路;其中包括PI3K-Akt信号通路、HIF-1信号通路、FXO信号通路、Wnt信号通路、mTOR信号通路等,KEGG分析结果见表3。

2.5 分子对接结果

iGEMDOCK分子对接 iGEMDOCK分子对接结果将小青龙汤作用于哮喘的13个潜在靶点与小青龙汤中的经拓扑学参数计算主要的五类化合物 beta-sitosterol、sitosterol、kaempferol、24-Ethylcholest-4-en-3-one [(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl]、(1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2, 2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate 进行分子对接,配体与受体结合的构象稳定时能量越低发生的作用可能性越大,其结合

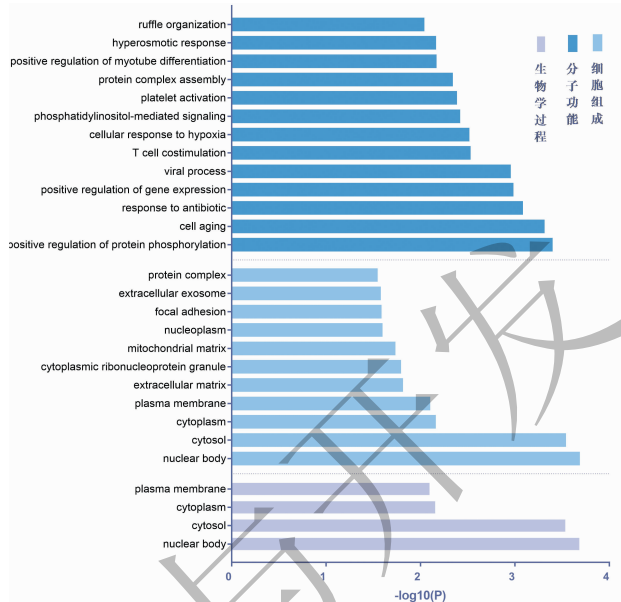


图4 小青龙汤对哮喘作用靶点的GO分析的结果
Fig.4 Results of GO analysis of Xiaoqinglong decoction on asthma target.

力具体参数见图5;具体分子对接结果,见表4。其中结合性最强的是GSR与[(1S)-3-[(E)-but-2-

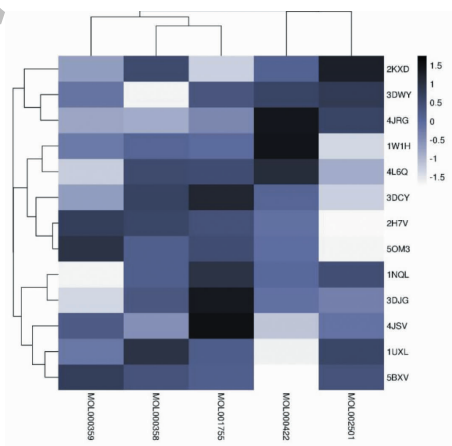


图5 小青龙汤主要化学成分和具体靶点对接结果
Fig.5 Main chemical constituents and specific target docking results of Xiaoqinglong decoction

表3 小青龙汤对哮喘作用靶点的KEGG分析的结果

Table 3 Results of KEGG analysis of Xiaoqinglong decoction on asthma target

信号通路 Signal pathway	基因名称 Gene name	-LgP
前列腺癌 Prostate cancer	PDPK1, CREBBP, TP53, MDM2, MTOR, EGF	6.66
PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	PDPK1, EIF4E, RAC1, TP53, MDM2, MTOR, EGF	4.97
癌症中的蛋白多糖 Proteoglycans in cancer	PDPK1, ROCK2, RAC1, TP53, MDM2, MTOR	4.89
癌症的途径 Pathways in cancer	ROCK2, CREBBP, RAC1, TP53, MDM2, MTOR, EGF	4.65

续表 3 (Continued Tab. 3)

信号通路 Signal pathway	基因名称 Gene name	-LgP
甲状腺激素信号通路 Thyroid hormone signaling pathway	PDPK1, CREBBP, TP53, MDM2, MTOR	4.5
胶质瘤 Glioma	TP53, MDM2, MTOR, EGF	3.78
HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	EIF4E, CREBBP, MTOR, EGF	3.26
癌症中的胆碱代谢 Choline metabolism in cancer	PDPK1, RAC1, MTOR, EGF	3.22
鞘脂信号通路 Sphingolipid signaling pathway	PDPK1, ROCK2, RAC1, TP53	3
FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	PDPK1, CREBBP, MDM2, EGF	2.86
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	ROCK2, CREBBP, RAC1, TP53	2.82
膀胱癌 Bladder cancer	TP53, MDM2, EGF	2.66
肌萎缩侧索硬化 ALS Amyotrophic lateral sclerosis ALS	RAC1, TP53, SOD1	2.49
子宫内膜癌 Endometrial cancer	PDPK1, TP53, EGF	2.46
非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	PDPK1, TP53, EGF	2.39
mtor 信号通路 mTOR signaling pathway	PDPK1, EIF4E, MTOR	2.36
病毒致癌 Viral carcinogenesis	CREBBP, RAC1, TP53, MDM2	2.33
粘着斑 Focal adhesion	PDPK1, ROCK2, RAC1, EGF	2.33
肌动蛋白细胞骨架的调控 Regulation of actin cytoskeleton	ROCK2, F2, RAC1, EGF	2.3
胰腺癌 Pancreatic cancer	RAC1, TP53, EGF	2.27
黑色素瘤 Melanoma	TP53, MDM2, EGF	2.19
癌症中的 MicroRNAs MicroRNAs in cancer	CREBBP, TP53, MDM2, MTOR	1.94
神经营养素信号通路 Neurotrophin signaling pathway	PDPK1, RAC1, TP53	1.75
细胞周期 Cell cycle	CREBBP, TP53, MDM2	1.73
丙型肝炎 Hepatitis C	PDPK1, TP53, EGF	1.67
胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	PDPK1, EIF4E, MTOR	1.64
爱泼斯坦巴尔病毒感染 Epstein-Barr virus infection	CREBBP, TP53, MDM2	1.38
亨廷顿氏病 Huntington's disease	CREBBP, TP53, SOD1	1.37
cAMP 信号通路 cAMP signaling pathway	ROCK2, CREBBP, RAC1	1.35

表 4 小青龙汤主要活性成分-作用靶点分子对接结果

Table 4 The main active ingredient of Xiaoqinglong decoction-the molecular docking result of the target

靶点名称 Target name	PDB ID	化合物 Compound	分子对接得分 Molecular docking
TP53	3DCY	β -sitosterol	-74.2198
TP53	3DCY	Sitosterol	-80.1545
TP53	3DCY	Kaempferol	-76.7652
TP53	3DCY	24-Ethylcholest-4-en-8-one	-72.1194
TP53	3DCY	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-6-carboxylate	-82.7792
SOD1	1UXL	β -sitosterol	-91.9766
SOD1	1UXL	Sitosterol	-95.9453
SOD1	1UXL	Kaempferol	-100.847
SOD1	1UXL	24-Ethylcholest-4-en-4-one	-94.5284

续表 4 (Continued Tab. 4)

靶点名称 Target name	PDB ID	化合物 Compound	分子对接得分 Molecular docking
SOD1	1UXL	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-2-carboxylate	-93.1844
ROCK2	4L6Q	β -sitosterol	-82.2422
ROCK2	4L6Q	Sitosterol	-88.8998
ROCK2	4L6Q	Kaempferol	-80.1915
ROCK2	4L6Q	24-Ethylcholest-4-en-13-one	-82.3017
ROCK2	4L6Q	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-11-carboxylate	-87.5071
RAC1	2H7V	β -sitosterol	-95.1734
RAC1	2H7V	Sitosterol	-94.6386
RAC1	2H7V	Kaempferol	-98.1151
RAC1	2H7V	24-Ethylcholest-4-en-6-one	-95.9319
RAC1	2H7V	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-4-carboxylate	-104.737
PDPK1	1W1H	β -sitosterol	-68.4275
PDPK1	1W1H	Sitosterol	-69.1211
PDPK1	1W1H	Kaempferol	-65.2296
PDPK1	1W1H	24-Ethylcholest-4-en-5-one	-68.6266
PDPK1	1W1H	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-3-carboxylate	-71.7119
MTOR	4JSV	β -sitosterol	-89.4241
MTOR	4JSV	Sitosterol	-86.6296
MTOR	4JSV	Kaempferol	-91.8557
MTOR	4JSV	24-Ethylcholest-4-en-12-one	-81.8009
MTOR	4JSV	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-10-carboxylate	-88.0765
MMP14	5OM3	β -sitosterol	-66.3335
MMP14	5OM3	Sitosterol	-60.0399
MMP14	5OM3	Kaempferol	-68.2973
MMP14	5OM3	24-Ethylcholest-4-en-14-one	-63.7437
MMP14	5OM3	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-12-carboxylate	-81.2716
MDM2	4JRG	β -sitosterol	-91.6804
MDM2	4JRG	Sitosterol	-91.2105
MDM2	4JRG	Kaempferol	-75.2285
MDM2	4JRG	24-Ethylcholest-4-en-11-one	-88.2961
MDM2	4JRG	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-9-carboxylate	-80.641
GSR	3DJG	β -sitosterol	-120.577
GSR	3DJG	Sitosterol	-112.06
GSR	3DJG	Kaempferol	-123.186
GSR	3DJG	24-Ethylcholest-4-en-9-one	-114.148
GSR	3DJG	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-7-carboxylate	-124.458
F2	2KXD	β -sitosterol	-89.2748
F2	2KXD	Sitosterol	-99.0496
F2	2KXD	Kaempferol	-92.6111

续表4(Continued Tab. 4)

靶点名称 Target name	PDB ID	化合物 Compound	分子对接得分 Molecular docking
F2	2KXD	24-Ethylcholest-4-en-7-one	-103.611
F2	2KXD	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-5-carboxylate	-83.7111
EIF4E	5BXV	β -sitosterol	-102.627
EIF4E	5BXV	Sitosterol	-101.004
EIF4E	5BXV	Kaempferol	-112.228
EIF4E	5BXV	24-Ethylcholest-4-en-15-one	-103.53
EIF4E	5BXV	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-13-carboxylate	-102.656
EGF	1NQL	β -sitosterol	-85.4722
EGF	1NQL	Sitosterol	-97.5038
EGF	1NQL	Kaempferol	-86.5662
EGF	1NQL	24-Ethylcholest-4-en-3-one	-80.6163
EGF	1NQL	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	-83.7145
CREBBP	3DWY	β -sitosterol	-96.6545
CREBBP	3DWY	Sitosterol	-89.6597
CREBBP	3DWY	Kaempferol	-86.0653
CREBBP	3DWY	24-Ethylcholest-4-en-10-one	-87.3514
CREBBP	3DWY	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-8-carboxylate	-85.2097

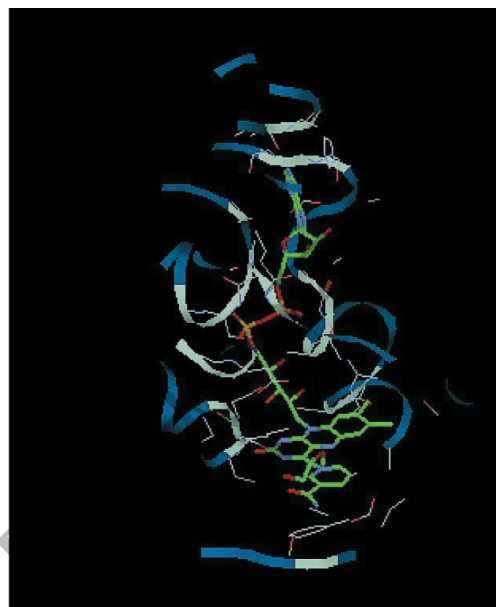


图6 GSR与[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-7-carboxylate分子对接结果

Fig. 1 GSR and [(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] [(1R,3R)-3-[(E)-3-Methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-7-carboxylate docking results.

enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-7-carboxylate,其具体对接结果见图6。

3 讨论

哮喘是世界上最常见的慢性疾病之一,是复杂的、多基因遗传倾向的疾病。哮喘的发病机制与炎症机制、神经调节等机制相关。目前主流治疗方式仍以糖皮质激素、支气管舒张剂等西药治疗,它可作用于大多数炎症细胞和结构细胞。但是由于长期使用糖皮质激素可产生严重的副作用,虽然糖皮质激素有较好的疗效,但并不能从根本上解决疾病的发病和进展,因此积极寻找新的治疗药物和手段十分重要^[13]。中医学对“咳嗽”“哮喘”有悠久而丰富的治疗经验,能显著降低哮喘患者的发病次数提高患者生活质量,同时中医综合疗法的不良反应发生率,具有极高的临床安全性^[14]。小青龙汤方中麻黄含甘露糖、氨基葡萄糖、氨基甘露糖等具有重要的免疫抑制作用^[15],可凭借细辛的挥发油成分解除气管痉挛,进而有效治疗痰浊阻肺证、外寒内饮,并且针对痰湿水气凝于肾肺的症状也可明显改善,半夏具有抑制腺体分泌、镇咳的作用。但是中药方剂具有“多因、多效、多靶点”各个成分协同起效的作

用,所以其具体分子机制难以被阐明。本研究基于分子对接模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用、生物信息学分析结合系统药理学的角度对小青龙汤治疗哮喘的具体分子机制进行预测进而对小青龙汤治疗哮喘做出科学诠释。

在化合物筛选中,部分关键化合物分子具有高度的中心性。例如:异甘草素(isoliquiritigenin)、黄芩苷(Baicalin)、芍药苷(paeoniflorin)等,覃月穆^[16]等在实验中发现,异甘草素通过抑制 NF- κ B 信号通路的活化,抑制 NF- κ B p65 入核使其不能发挥转录活性,最终影响其下游凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2,从而控制细胞凋亡。在小鼠哮喘动物实验研究中表明^[17],在小鼠哮喘模型中槲皮素能够调节 Th1/Th2 细胞平衡,可以抑制 Gata-3 表达增加 T-bet 表达,改变 Th1/Th2 极化,从而达到降低气道变应性炎症和气道高反应性的目的。在大鼠放射性肺损伤实验模型中,黄芩苷干预后明显降低了放射性肺损伤大鼠血清中 TGF- β 1、IL6 和 TNF- α 的含量,证明中药黄芩苷对促炎性因子具有一定的抑制作用,对放射性肺损伤具有一定的保护作用可以在一定程度上减轻肺损伤^[18]。芍药苷可能是通过抑制氧化应激、激活 PI3K/AKT 和 I κ B α /NF- κ B 信号通路抑制 MRL/1pr 狼疮鼠的肺部炎症^[19]。在化合物靶点网络中 ETS1、GPI、DRAP1、XRN2、RAC1、UNC45A、CDCA8 等靶点在网络拓扑学计算中占重要作用,这些靶点与血管生成参与伤口愈合来源、细胞运动、免疫反应来源、炎症反应等过程有关,并且存在着多重协同效应。

对小青龙汤的靶点网络分析后发现了多个与多种炎症反应、糖酵解、免疫调节紧密相关的关键靶点,如:SOD、GPI、RAC1 等。因此我们对小青龙汤作用于哮喘的 13 个作用靶点进行了 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。在 GO 分析中发现小青龙汤可以对蛋白磷酸化的调节、血小板活化、细胞运动、肺发育等生物过程起调控作用。SOD1、MTOR、TP53 等多个靶点在被富集出的重要生物学过程中协同起效。在 KEGG 分析的过程中 PI3K/Akt 信号转导通路、HIF-1 信号转导通路、Wnt 信号转导通路、mTOR 信号转导通路、cAMP 信号转导通路、MAPK 信号转导通路等多条信号转导通路通过实验研究与哮喘的关系密切。其中在哮喘小鼠实验中,通过阻断 PI3K/Akt 信号转导通路,发现减少嗜酸粒细胞和中性粒细胞等炎性细胞在肺组织浸润,可以抑制杯状细胞增生引起的黏液高分泌,减少气道高反应,并阻

止气道结构改变^[20]。黄革等^[22],在实验中发现 Epac 作为一个新发现的 cAMP 下游信号分子,Epac 抑制剂对气道黏膜杯状细胞增生、上皮胶原沉积和气管平滑肌增生等重塑过程均具有明显促进作用,提示 Epac 对径可能对慢性哮喘气道重塑过程有一定保护作用。

临床应用小青龙汤治疗哮喘大大改善了患者的生活质量,减轻糖皮质激素使用引起的毒副作用,提高了疾病控制率。本研究基于系统药理学方法,初步探究了小青龙汤治疗哮喘的复杂机制过程,为后续从小青龙汤汤中提取有效药物成分治疗哮喘提供了科学理论基础,也对论证中药复方的科学性提供了参考。但是随着对中药复方认识的不断深入我们逐渐认识到由于中药成分复杂等多种原因,基于系统药理学和生物信息学对小青龙汤的认识仍存在很多不足,例如:小青龙汤可能通过药物中的小分子多肽、外泌体 miRNA 调节肠道菌群等对哮喘间接起到调控作用。因此对小青龙汤对哮喘的间接作用的研究以及基础实验的验证或将成为下一步研究的重要内容。

参考文献

- Hong J, Bao Y, Chen A, et al. Chinese guidelines for childhood asthma 2016: Major updates, recommendations and key regional data [J]. *J Asthma*, 2017, 1: 1-9.
- Chang X, Zhang T, Meng QY, et al. Research progress of Xiaoqinglong decoction in treatment of bronchial asthma [J]. *J Hubei Univ TCM (湖北中医药大学学报)*, 2018, 4: 121-125.
- Gao X, Qu JL, Qiu C, et al. Research progress of Xiaoqinglong decoction in treatment of bronchial asthma [J]. *Acta Chin Med Pharm (中医药学报)*, 2006, 6: 20-22.
- Zhang Y, Li H, Li KN, et al. Advances in research on compound Chinese medicine network pharmacology [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2018, 7: 1584-1588.
- Xu XJ, Wang CX. Applications of molecular docking: Beyond the drug discovery [J]. *J Beijing Univ Technol (北京工业大学学报)*, 2017, 12: 1872-1880.
- Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel Chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 6964-6982.
- Tao W, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145 (1): 1-10.
- Liu X, Jiang H, Ouyang S, et al. PharmMapper server: A web

- server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38:609.
- 9 Wang X, Shen Y, Wang S, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45:356-360.
 - 10 Liu XK, Wu JR, Zhang D, et al. Mechanism of Shengmaisan based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23:219-226.
 - 11 Huo MQ, Zhang YL, Deng SC, et al. Mechanism of tetramethylpyrazine in treatment of coronary heart disease based on the coexpression-protein interaction network [J]. *J Beijing Univ TCM* (北京中医药大学学报), 2016, 39:989-997.
 - 12 Li YH, Yu CY, Li E, et al. Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46:1121-1127.
 - 13 Luo DD, Qiu ZW. Effect of Xiaoqinglong decoction on airway inflammation and cytokine in a mouse asthmatic model [J]. *Adv Modern Biomed* (现代生物医学进展), 2010, 10:655-657.
 - 14 Zheng YJ, Zuang XC, Wen JZ. Therapeutic effect of Mahuang Fuzi Xixin decoction on children with lung and kidney yang deficiency and cough variant asthma [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med* (四川中医), 2018, 36(10):69-71.
 - 15 Liang J, Sun lm, Song Y, et al. Identification of polysaccharides from several kinds of legal base source of ephedra based on the characteristics of compositional saccharides [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:1477-1483.
 - 16 Qin YM, Jiang ZY, Ma YX, et al. Effects of isoliquiritigenin on proliferation, apoptosis and NF-KB signaling pathway in human lung cancer H460 cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:847-855.
 - 17 Wang PY, Fang H. Quercetin improves *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infection in rats [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2017, 39:1777-1782.
 - 18 He ZJ, Sheng HF, Liu HY. The protective effect of baicalin on radiation lung injury in rats [J]. *Pract J cancer* (实用癌症杂志), 2018, 33:1567-1570.
 - 19 Xie CH, Li ZJ, Chen JL, et al. The study of protective effect of paeoniflorin on lung injury in MRL/lpr mice [J]. *J Sichuan Univ: Med Sci* (四川大学学报:医学版), 2018, 49:394-398.
 - 20 Liu WW, Zheng R, Tan MQ. Research progress of PI3K/Akt signaling pathway in the reconstruction of asthma airway [J]. *Med Recapitulate* (医学综述), 2018, 24:2961-2965.
 - 21 Huang G, Zhong JN, He D, et al. Role of exchange protein directly activated by cAMP (Epac) in airway remodeling of asthma mice [J]. *J Sichuan Univ: Med Sci* (武汉大学学报:医学版), 2016, 37(1):20-24.
-
- (上接第 1029 页)
- 11 Xu GH, Kim JA, Kim SY, et al. Terpenoids and coumarins isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(6):839-842.
 - 12 Yang MH, Wang JS, Luo JG, et al. Four new triterpenoids from *Chisocheton paniculatus* and their anti-inflammatory activities [J]. *Can J Chem*, 2012, 90:199-204.
 - 13 Mitsui K, Saito H, Yamamura R, et al. Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from *Cedrela sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55:1442-1447.
 - 14 Mitsui K, Maejima M, Saito H, et al. Triterpenoids from *Cedrela sinensis* [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61:10569-10582.
 - 15 Chen HD, Yang SP, Wu Y, et al. Terpenoids from *Toona ciliata* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72:685-689.
 - 16 Biavatti MW, Vieira PC, Fernandes JB, et al. Triterpenoid constituents of *Raulinoa echinata* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65:562-565.
 - 17 Siddiqui BS, Afshan F, Gulzar T, et al. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51:415-417.
 - 18 Breen GJW, Ritchie E, Sidwell WTL, et al. The chemical constituents of Australian *Flindersia* species [J]. *Aust J Chem*, 1966, 19:455-481.
 - 19 Jolad SD, Hoffmann JJ, Cole JR, et al. Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 2. A new triterpenoid, hispidone, and bourjotinolone A [J]. *J Org Chem*, 1980, 45:3132-3135.
 - 20 Connolly JD, Labbe C, Rycroft DS. Tetranortriterpenoids and related substances. Part 20. New tetranortriterpenoids from the seeds of *Chukrasia tabularis* (Meliaceae); simple esters of phragmalin and 12 α -acetoxyphragmalin [J]. *J Chem Soc, Perkin Trans*, 1978, 1:285-288.