

基于网络药理学和分子对接探讨黄芪治疗特发性肺纤维化的分子机制

赵梦雅¹,姜梦笔¹,杨欣¹,张浩宇²,刘杨¹,黄高¹,陈蕾蕾^{1*}

¹贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025;²广州中医药大学番禺区中心医院,广州 510006

摘要:本研究旨在以黄芪活性成分为切入点,基于网络药理学及分子对接研究黄芪治疗特发性肺纤维化的分子机制。首先,通过 TCMSp 筛选黄芪的活性成分;利用 Swiss Target Prediction 预测黄芪化学成分潜在靶点;使用 GeneCards 和 CTD 筛选出特发性肺纤维化的相关基因,交集获得黄芪治疗特发性肺纤维化的潜在靶点,对潜在靶点进行生物信息学分析明确关键靶点。然后,通过采用分子对接(SYBYL 2.1.1)验证关键靶点与黄芪化学成分的结合程度。最后通过 HE 染色、Masson 染色及 ELISA 实验验证网络药理学富集分析结果。最终,通过网络药理学初步筛选得到黄芪治疗特发性肺纤维化的信号通路 29 条($P < 0.05$),靶点 25 个,其中 IL-17 信号通路、EGFR 信号通路和 HIF-1 信号通路为疾病相关通路,PTGS2、VEGFA、MMP-9、STAT3 和 EGFR 为关键靶点;通过分子对接明确黄芪中 6 个化学成分与 5 个关键靶点均有较好的结合;HE 染色和 Masson 染色均提示黄芪及其活性成分叶酸对博来霉素诱导的大鼠特发性肺纤维化具有治疗作用,可降低大鼠特发性肺纤维化程度;ELISA 实验证明黄芪及其活性成分叶酸能够降低大鼠血清 IL-17、MMP-9 的表达。本研究通过网络药理学、分子对接及实验验证结果可以明确黄芪治疗特发性肺纤维化的关键靶点及主要化学成分,为开发黄芪抗特发性肺纤维化的有效成分及作用机制提供新的思路方法,为临床有效应用黄芪治疗特发性肺纤维化提供理论依据。

关键词:网络药理学;黄芪;特发性肺纤维化;分子对接

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)9-1582-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.1616

Study on the molecular mechanism of Astragali Radix in treating idiopathic pulmonary fibrosis based on network pharmacology and molecular docking

ZHAO Meng-ya¹,JIANG Meng-bi¹,YANG Xin¹,
ZHANG Hao-yu²,LIU Yang¹,HUANG Gao¹,CHEN Lei-lei^{1*}

¹School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

²Panyu Central Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: To study the molecular mechanism of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis, we used the active ingredients of Astragali Radix as an entry point, based on network pharmacology and molecular docking. Firstly, the active ingredients of Astragali Radix were screened by TCMSp. The potential targets of Astragali Radix chemical components were predicted by Swiss Target Prediction. GeneCards and CTD were used to screen out the related genes of idiopathic pulmonary fibrosis, and obtain the potential targets of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis. Bioinformatics analysis of the potential targets were conducted to clarify the key targets. Secondly, molecular docking (SYBYL 2.1.1) was used to verify the degree of binding between key targets and the chemical components of Astragali Radix. Then, HE staining, Masson staining and ELISA were used to verify the results of network pharmacological enrichment analysis. Finally, through network pharmacology preliminary screening, 29 signal pathways and 25 targets of Astragali Radix were obtained for idiopathic pulmonary fibrosis, among which the IL-17 signal pathway, EGFR signal pathway and HIF-1 signal pathway were disease-related pathways. And PTGS2, VEG-

收稿日期:2021-04-12 接受日期:2021-08-05

基金项目:贵州省科技计划(黔科合基础[2020]1Y384);中医药骨干人才培养项目(黔中医药函[2019]66号)

*通信作者 Tel:86-013765040098; E-mail:dreamk0921@163.com

FA, MMP-9, STAT3 and EGFR were the key targets. Through molecular docking, we found that the six chemical components in Astragali Radix had good combination with the five key targets. Both HE staining and Masson staining suggested that Astragali Radix and its active ingredient folic acid had therapeutic effect on bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis in rats, and could reduce the degree of idiopathic pulmonary fibrosis in rats. ELISA showed that Astragali Radix and its active ingredient folic acid could reduce the expression of IL-17 and MMP-9 in serum of rats. This study clarified the key targets and main chemical components of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis through network pharmacology, molecular docking and experimental verification, and provides new ideas and methods for the development of the effective components and mechanism of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis and provides a theoretical basis for the clinical application of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis.

Key words: network pharmacology; Astragali Radix; idiopathic pulmonary fibrosis; molecular docking

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种以逐渐加重的呼吸困难和肺功能不可逆下降为特征的慢性、进行性肺间质疾病。此病在发展过程中受炎症反应、肺损伤、免疫反应和纤维生成等要素的综合影响,导致机体出现肺泡损伤、成纤维细胞增殖以及细胞外基质 (ECM) 大量沉积等病理表现^[1]。我国目前 IPF 患病人数呈逐年增加的趋势,且预后不良^[2]。目前,西医治疗特发性肺纤维化多以糖皮质激素、细胞毒药物和免疫抑制剂为主^[3]。大量临床和试验研究表明中医药对 IPF 的多

个病理环节均有明显的改善作用,可提高患者的生存质量,降低死亡率,具有良好的应用前景^[4]。基于数据挖掘分析,中医药在治疗此类疾病过程中补益药的使用频率高达 55%^[5],其中黄芪的使用频次为 148 次^[6],位列第一,以此说明黄芪在特发性肺纤维化的治疗中发挥了重要作用。

黄芪 (Astragali Radix) 味甘,性微温,归脾、肺经,具有补脾升阳、益肺固表等功效,常用于扶正固本,《神农本草经》载其“主治痈疽…补虚”,是临床防治多脏器纤维化的主要中药之一。黄芪活性成分

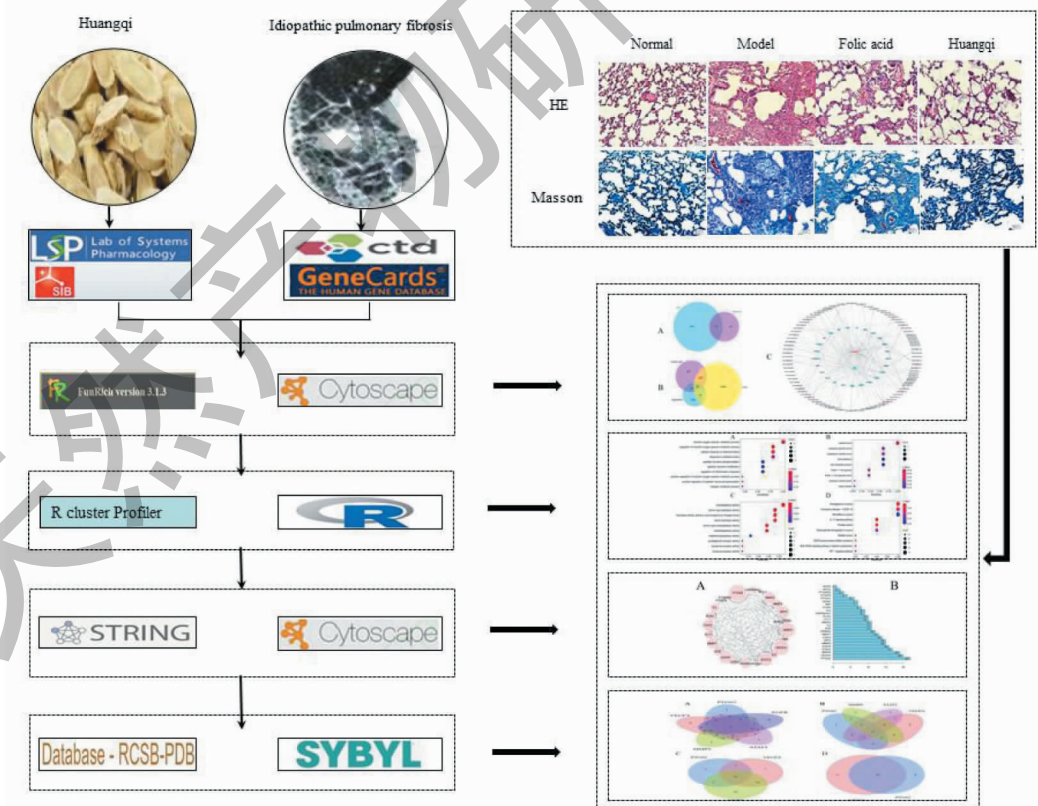


图 1 网络药理学及分子对接实验流程

Fig. 1 Network pharmacology and molecular docking experimental process

较多,主要含黄芪皂苷、黄芪多糖、黄酮类化合物及三萜类物质。目前,黄芪的化学成分及活性成分受到广泛关注,随着各方对黄芪药理作用研究的不断深入,黄芪甲苷、黄芪多糖、黄芪总皂苷^[7]及黄芪注射液^[8],已在 IPF 的治疗中取得疗效。因此本研究以黄芪化学成分为切入点,通过网络药理学及分子对接技术,探讨黄芪治疗 IPF 的关键活性成分及调节的靶点,为开发及临床用黄芪提供理论依据。具

体流程见图 1。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

本次研究过程中所使用和涉及的数据库及软件见表 1。软件运行于 Windows 操作系统平台。处理器为 Inter(R) Core(TM) i5-10400 CPU@2.90GHz, 64 位操作系统。使用的相关软件已授权或开源软件。

表 1 本研究中使用的数据库及软件

Table 1 Database and software used in this study

编号 No.	数据库及软件 Database and software	功用 Function	网址 Website
1	Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP)	筛选药物活性成分	http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tempssearch
2	Swiss Target Prediction	预测化合物潜在靶点	http://www.swisstargetprediction.ch/
3	Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	筛选疾病相关基因	http://ctdbase.org/
4	GeneCards	筛选疾病相关基因	https://www.genecards.org/
5	FunRich 3.1.3	获得“药物-疾病”的潜在靶点	http://www.funrich.org/
6	STRING	获取蛋白与蛋白相互作用的 PPI 数据	https://string-db.org/
7	RCSB Protein Data Bank (PDB)	查询靶点 PDB-ID 号	http://www.rcsb.org/pdb
8	R 语言 (3.6.1)	进行 GO 和 KEGG 富集分析	https://cran.r-project.org/bin/windows/base/
9	SYBYL 2.1.1	分子对接	美国 Tripos 公司
10	Cytoscape 3.6.1	构建“药物-成分-靶点-疾病”网络	http://www.cytoscape.org

1.2 筛选黄芪化学成分及靶点

基于中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP) 以“黄芪”为关键词进行化学成分检索。基于 Swiss Target Prediction 预测黄芪化学成分的潜在靶点。根据黄芪所有化学成分的 SMILES 进行预测,在线打开 Swiss Target Prediction,选择“old.swisstargetprediction.ch”依次上传黄芪活性成分的 SMILES 结构式,选择“Homo sapiens”,其他参数默认,点击“Submit”即可预测靶点。

1.3 特发性肺纤维化疾病靶点筛选

基于人类基因数据库 GeneCards 和比较毒物基因组学数据库 CTD 两个平台,输入关键词“idiopathic pulmonary fibrosis”,收集与特发性肺纤维化相关的疾病靶点,使用 FunRich 3.1.3 软件将两个数据库所得的疾病靶点进行映射取交集构建疾病靶点库,再与预测所得的活性成分靶点取交集,最终筛选出黄芪治疗特发性肺纤维化的潜在作用靶点。

1.4 GO 和 KEGG 通路分析

利用 R 语言中的 clusterProfiler 包进行 GO 和

KEGG 分析,对潜在作用靶点的生物学过程 (biological process, BP), 细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个方面分别进行富集分析,首先在 R 软件安装 Bioconductor 软件包“org.Hs.eg.db”并运行,将黄芪治疗特发性肺纤维化的关键靶基因转换成 entrez ID。然后在 R 软件安装 clusterProfiler 包,根据已转换的 entrez ID,设定种为人源,选择 $P(P\text{-value}) < 0.05$ 且校正的 $P(P\text{.adjust}) < 0.05$ 为阈值进行关键靶基因 GO 和 KEGG 的富集分析,并将结果以气泡图的形式输出。

1.5 蛋白相互作用 (PPI) 分析

STRING 数据库是一种检索蛋白相互作用的数据库,收集了包括实验验证得到的以及通过生物信息学方法预测得到在内的大量 PPI 数据。打开 STRING 数据库,选择“multiple proteins”,将黄芪与特发性肺纤维化的共同作用靶点导入,将 Organism 设置为“Homo”进行筛选,选择中等置信度为 0.400,获取 PPI 关系,建立 PPI 网络,应用 R 软件包,绘制条形图展示关键靶点在网络中相互作用的频次 (degree)。

1.6 黄芪活性成分和作用靶点的分子对接验证

从蛋白质晶体结构数据库 RCSB 中获取前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2, PDB-ID:3W15), 血管内皮生长因子 A (VEGFA, PDB-ID:3BDY), 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9, PDB-ID:1GKC), 信号转导与转录激活因子 3 (STAT3, PDB-ID:4E68), 表皮生长因子受体 (EGFR, PDB-ID:1M17), PDB 格式保存。后将其导入 SYBYL 2.1.1 软件中进行预处理, 包括提取配体小分子、去除水分子、加氢等。将从 PubChem 数据库下载的活性化合物 3D 结构的 sdf 文件进行能量优化, 利用 SYBYL 2.1.1 中的 Surflex-Dock 模块将对应的化合物与蛋白进行分子对接, 利用打分函数进行评价。采用药物分子设计模拟 SYBYL 2.1.1 软件的 Surflex-Dock 和模块完成分子对接研究。初始筛选采用标准模式进行对接, 修饰后的小分子与靶标蛋白进行半柔性对接, 对接过程中阈值参数 0.5, 其他参数为系统缺省值。

1.7 实验验证

1.7.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 200 ± 20 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证号为 SCXK(京)2019-0008, 于贵州中医药大学实验动物中心适应性饲养一周, 自由饮食饮水。

1.7.2 药物、试剂与仪器

1.7.2.1 药物

黄芪饮片(批号 2008002, 安国市彤康药业有限公司); 叶酸(批号 F809516-5 g, 质量分数 97%, 上海麦克林生化科技有限公司); 博来霉素(国药准字 H20055883, 规格 1.5 万单位/支, 海正辉瑞制药有限公司)。

1.7.2.2 试剂

苏木精-伊红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1120); Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1340); 大鼠白细胞介素 17(IL-17) ELISA 试剂盒(批号 MM-0088R1, 江苏酶免实业有限公司); 大鼠基质蛋白酶 9/明胶酶 B (MMP-9/Gelatinase B) ELISA 试剂盒(批号 MM-0055R1, 江苏酶免实业有限公司)

1.7.2.3 仪器

组织包埋机(EG1150 H, 德国 Leica); 石蜡切片机(KD3368, 浙江金华科迪有限公司); 光学显微镜(DP73, 日本 OLYMPUS 株式会社); 高速冷冻台式离心机(x-30R BECKMAN COULTER); 生化培养箱

(SPX-150A, 苏州威尔实验用品有限公司); 多功能酶标仪(1510-01061C Thermo Fisher)。

1.7.3 实验方法

1.7.3.1 模型制备及分组

SPF 级 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型对照组、叶酸治疗组及黄芪治疗组, 每组 10 只, 除空白对照组外其余大鼠按体质量用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉, 观察呼吸及反应, 稳定后将大鼠仰卧 30° 固定于手术台上, 酒精消毒颈部皮肤, 剪刀纵向切开颈部皮肤 1 cm 左右, 手术镊逐层钝性分离颈部组织, 直至气管暴露。模型对照组及药物处理组大鼠按体质量气管注射博来霉素(bleomycin, BLM), 浓度为 1 mg/mL(生理盐水溶解), 给药剂量为 5 mg/kg, 随即将大鼠头部抬起直至大鼠完全直立, 使博来霉素注射液均匀分布于两肺, 缝合皮肤, 放入鼠笼保温待其苏醒, 醒后正常饮水进食, 观察大鼠一般状况。

1.7.3.2 给药及标本采集

术后连续饲养 3 天, 而后开始灌胃给药。根据《中国药典》2020 版, 称取黄芪 30 g, 8 倍水量浸泡 30 min, 先武火后文火煎煮 3 次, 合并浓缩滤液。给药剂量参考徐叔云主编《药理实验方法学》, 按体表面积和人与动物临床剂量倍数进行换算, 得出大鼠的给药等效剂量黄芪 3.15 g/kg, 叶酸 0.04 mg/kg。每天灌胃 1 次, 持续 28 天, 末次给药 1 h 后将各组大鼠用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 腹主动脉采血处死, 摘取左肺组织, PBS 溶液清洗残血, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 4 °C 冰箱保存, 用于组织病理学检测。采血管放入离心机, 3 000 rpm 离心 10 min 得到血清, -80 °C 冰箱冻存。

1.7.3.3 HE 染色和 Masson 染色

将 4 °C 冰箱固定 24 h 后的肺组织取出, 进行常规石蜡包埋操作, 即自来水冲洗过夜、由低到高浓度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡和包埋, 4 °C 冰箱保存过夜, 取出包埋组织以 5 μm 厚度切片, 具体染色步骤按照试剂盒说明书内容进行操作, 染色结束后中性树脂封片, 光学显微镜下观察 HE 染色的炎症反应情况及 Masson 染色的胶原增殖情况。

1.7.3.4 酶联免疫吸附法检测大鼠血清中 IL-17、MMP-9 蛋白的表达

酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中 IL-17 及 MMP-9 蛋白表达水平。使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中各细胞因子的含量, 按照试剂盒说明

书在室温下规范操作即可。首先稀释标准品,然后进行加样、37 ℃ 温育 30 min、配制洗涤液、洗涤 5 次、加酶、再次 37 ℃ 温育 30 min 并洗涤 5 次、加显色剂显色、加终止剂终止反应,最后使用 450 nm 波长的酶标仪迅速测定各孔的吸光度(OD 值),将测定结果以标准品 OD 值为横轴,浓度为纵轴求得标准曲线的直线回归方程式,将测得的各组样品本 OD 值代入方程式,得出样品稀释后的浓度,将其乘以稀释倍数则可得到样品的实际浓度。

1.7.3.5 数据分析

使用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行显著性分析,所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学

意义。

2 结果

2.1 黄芪抗特发性肺纤维化靶标分析

中药黄芪基于 TCMSP 数据库筛选出 87 个化学成分,87 个化学成分获得 1 305 个靶基因。基于 GeneCards 获得 713 个 IPF 的相关基因,基于 CTD 筛选获得 1 981 个 IPF 的相关基因,两个数据库共交集 272 个靶点(图 2A)。272 个特发性肺纤维化的相关基因与黄芪化学成分靶基因进行交集,共筛选出 25 个黄芪抗特发性肺纤维化的靶基因(图 2B 和表 2)。基于 Cytoscape 3.6.1 建立黄芪化学成分-靶点网络模型(见图 2C)。

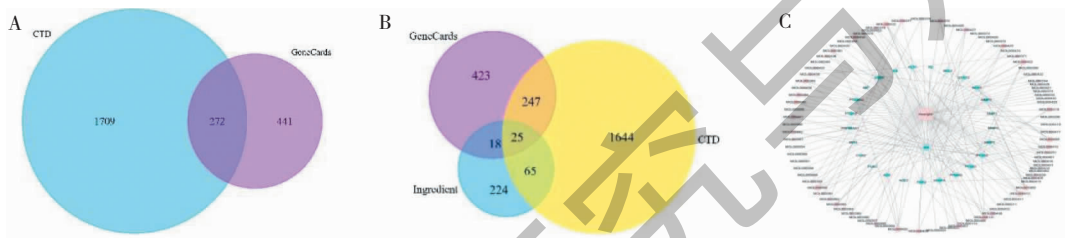


图 2 黄芪化学成分-靶点-特发性肺纤维化

Fig. 2 Chemical composition of Astragali Radix-target-idiopathic pulmonary fibrosis

表 2 黄芪治疗特发性肺纤维化的靶点

Table 2 The therapeutic target of Astragali Radix for idiopathic pulmonary fibrosis

编号 No.	基因名 Gene symbol	基因号 Gene ID	编号 No.	基因名 Gene symbol	基因号 Gene ID
1	VEGFA	7422	14	PLAU	5328
2	MMP9	4318	15	HSP90AA1	3320
3	STAT3	6774	16	F2	2147
4	MMP2	4313	17	EGFR	1956
5	MMP1	4312	18	BCL2	596
6	ACE	1636	19	FLT1	2321
7	NOX4	50507	20	MPO	4353
8	FGF2	2247	21	PPARG	5468
9	IL5	3567	22	PTGS1	5742
10	CCR2	729230	23	ACE2	59272
11	MMP3	4314	24	PTGER2	5732
12	PTGS2	5743	25	PTGFR	5737
13	MIF	4282			

2.2 GO 和 KEGG 通路富集分析

25 个差异基因的 GO 富集分析主要是使用 R 中 clusterProfiler 包完成,输出 25 个差异基因的 GO 前 10 项(见图 3A~C),其中横坐标 GeneRatio 表示输入的基因占整体基因的百分之比(%)。圆圈的大小代表基因的数量,圆圈的颜色代表校正的 P 值

(P . adjust)。结果发现 25 个靶点参与的生物过程中主要富集于活性氧化代谢,炎症反应、氧化应激等 (P -value < 0.05);基因主要定位于囊泡腔、内吞囊泡腔(P -value < 0.05);分子功能主要为内肽酶、丝氨酸型肽酶和金属肽酶活性等(P -value < 0.05),如表 3 所示。

表 3 GO 富集分析
Table 3 GO enrichment analysis

GO 注释 GO annotation	编号 No.	名称 Name	P -value	基因数 Gene number
生物过程 Biological process	1	Reactive oxygen species metabolic process	1.57E-12	10
	2	Regulation of reactive oxygen species metabolic process	2.49E-12	9
	3	Cellular response to chemical stress	4.74E-10	9
	4	Regulation of inflammatory response	2.04E-09	9
	5	Response to oxidative stress	3.92E-09	9
细胞成分 Cellular component	1	Vesicle lumen	5.19E-05	5
	2	Endocytic vesicle lumen	0.000 3	2
	3	Ficolin-1-rich granule	0.000 5	3
分子功能 Molecular function	1	Serine-type peptidase activity	4.20E-09	7
	2	Serine hydrolase activity	4.86E-09	7
	3	Endopeptidase activity	7.75E-08	8
	4	Serine-type endopeptidase activity	8.55E-08	6
	5	Metallopeptidase activity	1.66E-07	6

25 个靶点涉及 29 条信号通路 (P -value < 0.05),基于 R 输出前 10 项(图 3D),主要涉及 IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、前列腺癌(prostate cancer)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药

(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)等。

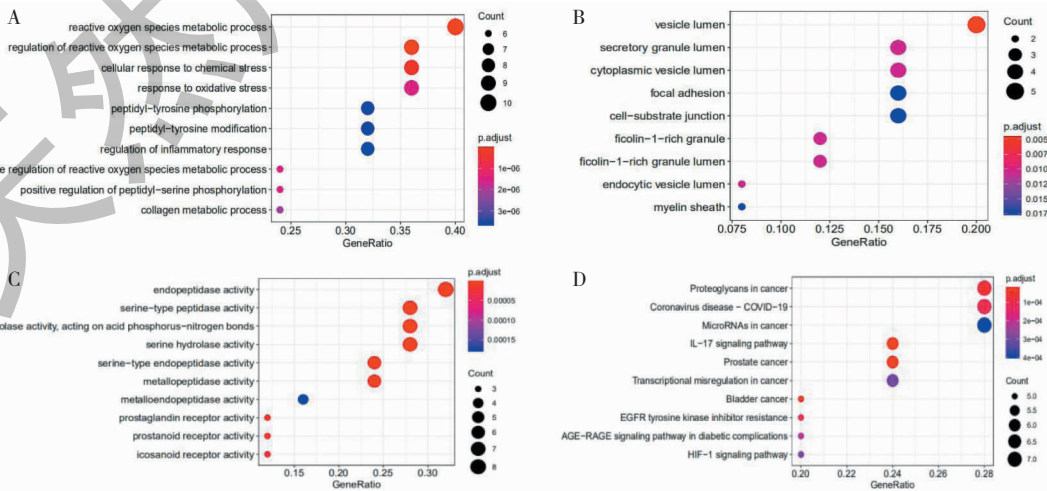


图 3 关键靶基因的 GO 与 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways of key target genes

2.3 蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建

25 个靶点使用 STRING 结合 Cytoscape 3.6.1 进行 PPI 分析(见图 4A),25 个靶点关联密切。利用 R 语言根据节点的 degree 绘制蛋白质节点的条形图,如图 4B 所示。Degree > 15 的节点包括前列

腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2),血管内皮生长因子 A (VEGFA),基质金属蛋白酶-9 (MMP-9),信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 和表皮生长因子受体 (EGFR)。我们将进一步采用分子对接进行验证分析,关键靶点的生物学效应见表 4。

表 4 关键靶标的生物学效应
Table 4 Biological effects of key targets

编号 No.	靶点名称 Target name	PDB-ID	配体 Ligand	生物学效应 Biological effect
1	前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)	3W15	NO3	与骨关节炎、慢性盆腔炎等反应相关
2	血管内皮生长因子 A (VEGFA)	3BDY	GOL	参与成纤维细胞活化和肌纤维细胞活化等反应
3	基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)	1GKC	NFH	与新生儿肺炎、肺纤维化等病理变化相关
4	信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)	4E68	DC	与 ADM 作用,抑制 TGF- β 诱导的纤维化
5	表皮生长因子受体 (EGFR)	1M17	AQ	参与 hMPV 入胞,EGFR 活化会促进病毒入胞

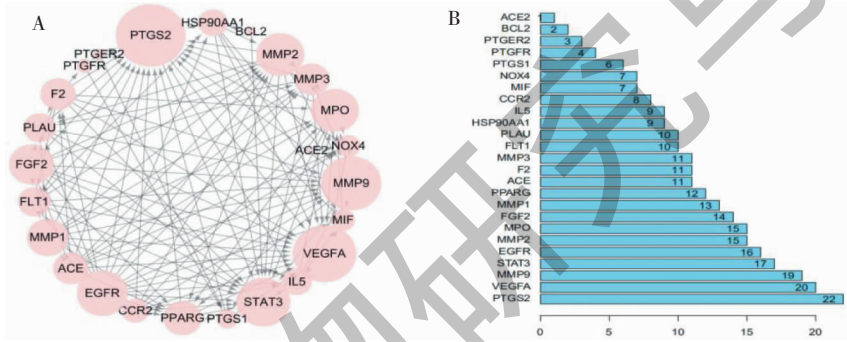


图 4 蛋白质-蛋白质相互作用

Fig. 4 Protein-protein interaction

2.4 分子对接

基于 SYBYL 2.1.1 分子对接验证黄芪 87 个化学成分与 5 个关键靶点的结合情况,对接结果以打分函数 $T_score \geq 5$ 为阈值, $T_score \geq 5$ 表示活性成分与靶标蛋白有较好的结合。 $T_score > 7$ 说明具有强烈的结合活性。分子对接结果见表 5。黄芪 6 个化学成分能同时与 5 个靶点 (PTGS2、VEGFA、MMP-9、STAT3、EGFR) 有较好的结合 ($T_score \geq 5$, 图 5A);黄芪 6 个化学成分能同时与 4 个靶点 (PTGS2、

VEGFA、MMP9、STAT3) 有较好的结合 ($T_score \geq 5$, 图 5B);黄芪 12 个化学成分能同时与 3 个靶点 (PTGS2、VEGFA、MMP-9) 有较好的结合 ($T_score \geq 5$, 图 5C);黄芪 19 个化学成分能同时与 2 个靶点 (PTGS2、VEGFA) 有较好的结合 ($T_score \geq 5$, 图 5D)。同时黄芪中的异鼠李素、黄酮、叶酸、落叶松树脂醇、5'-羟基异氟尿嘧啶-2',5'-di-O-葡萄糖、异黄酮可能是黄芪治疗特发性肺纤维化的关键成分,我们将进一步深入研究。

表 5 黄芪活性成分与靶标蛋白分子对接得分

Table 5 The docking score of Astragali Radix active component and target protein

黄芪的活性成分 The active ingredient of Astragali Radix	靶标蛋白 Target protein				
	PTGS2	VEGFA	MMP-9	STAT3	EGFR
异鼠李素 Isorhamnetin	7.98	5.98	5.76	5.07	6.68
黄酮 Flavaxin	7.61	5.14	6.65	5.91	8.40

续表 5 (Continued Tab. 5)

黄芪的活性成分 The active ingredient of Astragali Radix	靶标蛋白 Target protein				
	PTGS2	VEGFA	MMP-9	STAT3	EGFR
叶酸 Folic acid	7.35	6.37	9.09	6.17	7.44
落叶松树脂醇 Lariciresinol	6.93	5.47	8.43	5.19	7.21
5'-羟基异氟尿嘧啶-2',5'-di-O-葡萄糖 5'-Hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	5.68	7.22	6.66	5.86	6.00
异黄酮 Astraisoflavanin	5.25	5.67	6.45	5.72	7.05

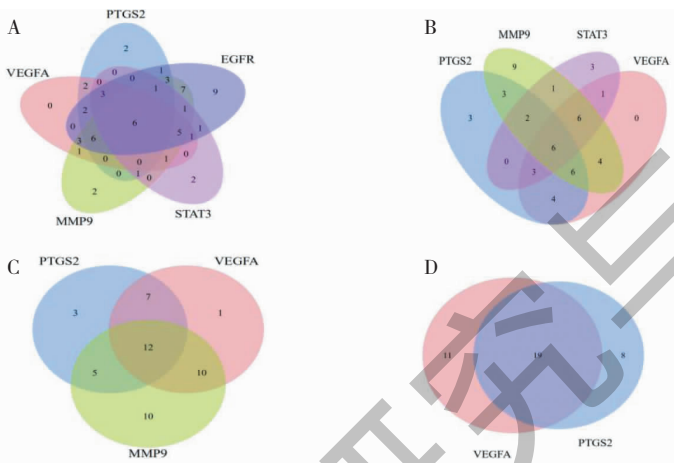


图 5 关键靶基因与黄芪活性成分对接

Fig. 5 Docking of key target genes with the active component of Astragali Radix

2.5 黄芪及叶酸对 IPF 大鼠肺组织炎症程度和胶原增殖的影响

HE 染色结果详见图 6。空白对照组大鼠肺泡结构清晰完整,肺泡间隔正常,支气管周围无充血、渗出等病理表现,也未见明显的炎症反应。与空白对照组比较,模型对照组大鼠肺泡结构塌陷粘连、大量融合致数量减少,肺泡壁明显增厚,毛细血管充血,被大量炎性细胞浸润,肺纤维结节大量出现,形成肺纤维化瘢痕,出现大片肺实变区域。同模型对照组比较,叶酸治疗后有所好转,但肺泡结构仍然杂乱,组织周围仍有较多炎性细胞浸润,组织被破坏程

度介于空白组与模型组之间;黄芪治疗后改善作用明显,虽有轻微炎症反应,但肺泡结构较清晰。

Masson 染色结果详见图 7。空白对照组大鼠肺泡结构清晰,仅有少量的胶原纤维存在。与空白对照组比较,模型对照组大鼠肺泡结构塌陷皱缩,分布杂乱,胶原纤维增殖明显,大面积染蓝。同模型对照组比较,2 个治疗组肺组织结构纹理尚为清晰,胶原染色面积有所减少,具有改善作用。

2.6 ELISA 检测各组大鼠血清中 IL-17 及 MMP-9 的表达结果

各组大鼠血清中 IL-17、MMP-9 含量详见表 6。

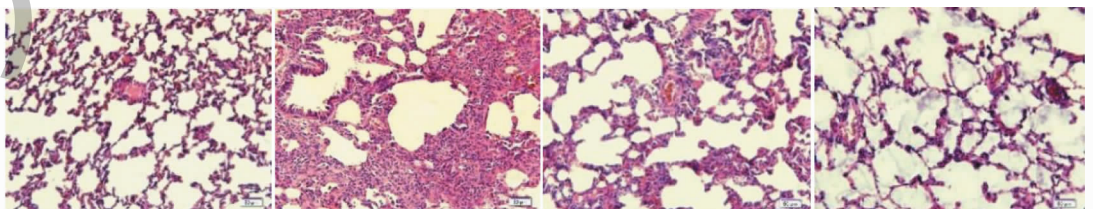


图 6 黄芪和叶酸对 IPF 大鼠肺组织内炎症程度的影响 (HE 染色, ×50)

Fig. 6 Effects of Astragali Radix and folic acid on the degree of inflammation in the lung tissue of IPF rats (HE staining, ×50)

注: A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 叶酸治疗组; D: 黄芪治疗组, 下同。 Note: A: Normal group; B: Model group; C: Folic acid treatment group;

D: Astragali Radix treatment group, the same below.

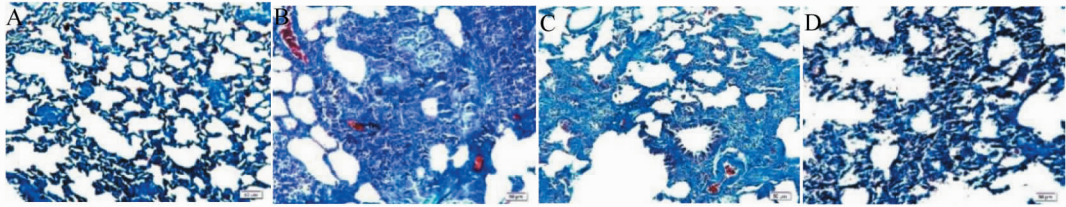


图7 黄芪和叶酸对IPF大鼠肺组织内胶原增殖程度的影响(Masson染色, $\times 50$)

Fig. 7 Effects of Astragali Radix and folic acid on collagen proliferation in lung tissue of IPF rats (Masson staining, $\times 50$)

同空白对照组相比,模型对照组大鼠血清IL-17、MMP-9含量均明显增高($P < 0.01$)。同模型对照组相比,各组大鼠血清IL-17、MMP-9含量均明显降

低($P < 0.01$)。2个药物治疗组之间相比,黄芪治疗组大鼠血清IL-17、MMP-9含量略低于叶酸治疗组。

表6 各组大鼠血清IL-17、MMP-9含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Serum IL-17 and MMP-9 contents of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	IL-17 (ng/L)	MMP-9 ($\mu\text{g/L}$)
空白对照组 Normal group	-	23.30 \pm 1.75	89.89 \pm 1.48
模型对照组 Model group	-	33.79 \pm 3.86*	115.09 \pm 3.57*
叶酸治疗组 Folic acid treatment group	0.4 $\times 10^{-4}$	27.40 \pm 2.82#	99.89 \pm 1.66*#
黄芪治疗组 Astragali Radix treatment group	3.15	24.47 \pm 2.57#	94.44 \pm 2.67#

注:与空白对照组相比, * $P < 0.01$; 与模型对照组相比, # $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, * $P < 0.01$; Compared with model control group, # $P < 0.01$.

3 讨论与结论

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明,呈慢性进行性加重且难以逆转的最常见的肺系疾病^[9],是炎症反应、肺损伤、免疫反应和纤维生成4个要素的综合结果。IPF影响全球约300万人,多发于中老年人,以逐渐加重的呼吸困难和肺功能不可逆下降为特征,预后不良。IPF生存率低,发病率高,被称为“类肿瘤疾病”,一经确诊,患者的生存率会逐年下降,3年的患病时长尚可保证50%的生存率,一旦达到5年,其生存率会下降至仅剩20%^[10],是严重危害公众健康的重大疾病。

黄芪(Astragali Radix)乃补气之长者,主入肺、脾二经,因其广泛的作用范围和明确的功效而成为中医临床治疗肺纤维化的最常用中药之一。其化学成分诸多,药理研究表明黄芪能够增强免疫功能,具有抗炎、抗菌、抗病毒与抗缺氧等作用,可降低肺中胶原含量^[11],为临床防治多脏器纤维化的主要中药之一。目前已发表的文献中多以黄芪的主要成分黄芪甲苷、黄芪总黄酮等作为主要研究对象,本研究通过生物信息学发现黄芪治疗IPF的成分-靶点网络图显示异鼠李素、叶酸等6种化合物与IPF的多个

靶点连接度较高,分子对接结果提示这些成分可能在黄芪治疗IPF的过程中发挥作用。Zheng等^[12]研究证实异鼠李素可通过抑制内质网应激和上皮-间充质转化保护博来霉素诱导的肺纤维化;Kawami等^[13]研究发现叶酸可能有效抑制mtx诱导的肺损伤;Yao等^[14]研究发现巨噬细胞的叶酸受体 β 表达在IPF中起着致病性作用,针对表达叶酸受体 β 的巨噬细胞的靶向治疗也许是治疗IPF的有效方法。

GO和KEGG信号通路分析结果显示,黄芪治疗IPF靶点涉及通路主要与炎症反应和氧化应激相关,结合分析结果及文献研究发现IL-17信号通路、EGFR信号通路及HIF-1信号通路与IPF的关联度较高。Xu等^[15]研究发现IL-17可作为肺纤维化辅助诊断指标,预测药物疗效,评估治疗效果;Pan等^[16]研究发现COPD患者的IL-17表达含量明显升高,炎症反应持续;Ma等^[17]研究发现CBPP的PEI作为先导化合物,可以通过作用于EGFR和MLC2信号通路,改善肺功能,减轻肺纤维化;Wang等^[18]通过研究证实百草枯能够通过激活HIF-1 α 信号通路来启动上皮间质转化程序,进而诱导肺纤维化的产生。

PPI网络分析结果发现PTGS2、VEGFA、MMP-

9、STAT3 及 EGFR 为关键靶点,分子对接结果说明黄芪化学成分能与其有较好的结合,目前,已有研究表明这些靶点在 IPF 中发挥重要作用。Wang 等^[19]研究发现益气温阳活血利水法能够改善肾脏损伤,减少纤维化,其机制可能为调控 PTGS2/NOX1 信号通路进而降低 ROS 水平减少细胞铁死亡;BLM 诱导大鼠的实验表明,抑制 VEGFR 可能会减少纤维化,而 VEGF 的过表达会加重肺纤维化的进程^[20-22];Luan 等^[23]研究发现黄芪甲苷可通过降低 VEGF、VEGFR2 基因表达水平来发挥抗肺纤维化的作用;MMP-9 是一种 IV 型胶原酶,可以降解分布于肺基底膜和间质的胶原 ECM 等成分,导致肺损伤并启动肺纤维化的发生,Ren 等^[24]研究发现通肺络补宗气方可调节 MMP-9/TIMP1 失衡,减少 FN、Col IV 的过度沉积,进而改善大鼠肺功能,抑制大鼠肺纤维化的发生发展;Wu 等^[25]研究发现敲除小鼠的 STAT3 基因,STAT3 活性表达增加而减少成纤维细胞的凋亡,更易被 BLM 诱导发生肺纤维化,提示 STAT3 蛋白可能促进了肺纤维化的发生。以表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)为代表的 EGF 生长因子家族及其受体 EGFR 均在肺纤维化的病程中起着重要作用,Li 等^[26]研究发现 EGFR 在博莱霉素染毒大鼠肺组织损伤的不同组别表达水平具有明显差异,IPF 组患者肺组织中的 EGFR 表达水平明显高于对照组患者,以此推测 IPF 的发生可能与 EGFR 高表达有关。

HE 染色和 Masson 染色结果显示,IPF 大鼠肺内积有大量炎症细胞,胶原增殖程度明显增加,肺组织结构发生病理性改变,胶原组织替代了正常的肺泡结构,导致肺的呼吸功能受损,经叶酸和黄芪治疗后病理情况有所改善,黄芪的治疗效果更为明显。实验大鼠血清 ELISA 结果显示,模型对照组及 2 个药物治疗组大鼠血清 IL-17、MMP-9 含量与空白对照组相比均有明显增高,其中模型对照组含量最高。2 个药物治疗组干预效果显示,黄芪组大鼠血清 IL-17、MMP-9 含量明显低于叶酸组。从趋势上来看,药物治疗组大鼠血清 IL-17、MMP-9 含量同模型对照组比均有所降低,说明其能够通过抑制 IPF 大鼠血清中 IL-17、MMP-9 的表达,进而起到抗 IPF 的作用。

综上所述,本研究应用生物信息学方法对黄芪治疗 IPF 的成分-靶点进行了分析,通过实验验证了黄芪活性成分对于 IPF 具有治疗作用,提示筛选具

有合理性,实验结果初步明确黄芪防治 IPF 的关键靶点及活性成分,黄芪的治疗效果优于其活性成分叶酸的治疗效果,侧面体现黄芪是通过多成分、多靶点、多途径协同作用治疗 IPF 的特点,但由于中药化学成分复杂,详细的作用机制需进一步探究。

参考文献

- 1 Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines[J]. *Eur Respir Rev*, 2014, 23(132):193-214.
- 2 Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17074.
- 3 Xiong F, Lin JR, Ye XW, et al. Clinical analysis of *N*-acetylcysteine combined with glucocorticoid therapy in 41 patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Guizhou Med J(贵州医药)*, 2015, 39(1):30-31.
- 4 Jin L, Li C, Wang Y. Research progress of traditional Chinese medicine in treating idiopathic pulmonary interstitial fibrosis[J]. *Chin Pharm(中国药业)*, 2017, 26(8):95-97.
- 5 Huang YJ. Data mining of traditional Chinese medicine treatment for pulmonary fibrosis and study on the intervention mechanism of Yangfei Huoxue recipe[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2017.
- 6 Ma LN, Wang R, Miao MS. Medicine rule of Chinese materia medica in treatment of pulmonary fibrosis based on data mining[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2020, 51:1406-1411.
- 7 HAN J. Effects of Astragali Radix components on transdifferentiation of lung epithelial cells in IPF mice[D]. Guiyang: Guizhou University of Traditional Chinese Medicine(贵州中医药大学), 2019.
- 8 Zhang HY, Lu XD, Pang LJ, et al. Systematic review and Meta-analysis of efficacy and safety of Chinese medicine injection in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*, 2021, 23(1):123-128.
- 9 Gu ZR, Li F, Ge B. Experimental research progress on the intervention mechanism of Astragali Radix and its medicinal composition on pulmonary fibrosis[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2018, 30(1):161-167.
- 10 Stowasser S, Hallmann C. New guideline for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lancet*, 2015, 386:1823-1824.
- 11 LI HB. Analysis of the mechanism and active components of traditional Chinese medicine Feifukang against pulmonary fibrosis[D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2019.
- 12 Zheng Q, Tong M, Bai QO, et al. Isorhamnetin protects a-

- against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1):117-126.
- 13 Kawami M, Honda N, Hara T, et al. Investigation on inhibitory effect of folic acid on methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition focusing on dihydrofolate reductase[J]. *Drug Metab Pharm*, 2019, 34:396-399.
- 14 Yao ZP, Qin HJ, He CH. Effect of macrophage FR β expression on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Chongqing Med(重庆医学)*, 2018, 47:887-891.
- 15 Xu L, Luo YH, Li X. The value of platelet growth factor and interleukin-17 in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis[J]. *J Mol Diags Ther(分子诊断与治疗杂志)*, 2019, 11(2):132-135.
- 16 Pan YD, Pan XD, Li J, et al. Detection of inflammatory factors secondary to pulmonary infection and analysis of the role of TLR7/IL-23/IL-17 signaling pathway in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chin J Nosocomiol(中华医院感染学杂志)*, 2020, 30:994-998.
- 17 Ma XY, Liu AN, Liu WJ, et al. Analyze and identify peiminine target EGFR improve lung function and alleviate pulmonary fibrosis to prevent exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by phosphoproteomics analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:737.
- 18 Wang XF, Li FX, Li JY, et al. Paraquat promotes epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells through HIF-1 α signaling pathway[J]. *Prog Mod Biomed(现代生物医学进展)*, 2018, 18:2419-2423.
- 19 Wang JY, Wang LJ, Liang BR, et al. Influence of chronic heart failure on kidney function and fibrosis and intervention of benefiting qi-warming yang-activating blood circulation-promoting urination method based on theory of "harmonization of water and fire"[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2020, 38(8):162-166.
- 20 Cao ZW, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis[J]. *Nat Med*, 2016, 22(2):154-162.
- 21 Sato S, Shinohara S, Hayashi S, et al. Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):172.
- 22 Kutluk CB, Ostapoff KT, Gerber DE, et al. BIBF 1120 (nintedanib), a triple angiokinase inhibitor, induces hypoxia but not EMT and blocks progression of preclinical models of lung and pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12:992-1001.
- 23 Luan ZH, Zhang DP, Liu BW, et al. Effects of astragaloside IV on VEGF/VEGFR2 signaling pathway in pulmonary fibrosis mice[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2019, 30:1611-1613.
- 24 Ren PZ, Miao Q, Yang B, et al. Effects of Tongfeiluo Buzongqi prescription on pulmonary function, MMP9/TIMP1 balance and expression of FN and Col IV in rats with pulmonary fibrosis[J]. *J Basic Chin Med(中国中医基础医学杂志)*, 2020, 26:181-184.
- 25 Wu SH, Wu XH, Lu C, et al. Lipoxin A inhibits proliferation of human lung fibroblasts induced by connective tissue growth factor₄[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(1):65-72.
- 26 Li L, Yang LS, Li H, et al. Expression and clinical significance of the EGFR/STAT signal pathway in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci(西安交通大学学报:医学版)*, 2013, 34:500-502.