

基于数据挖掘及网络药理学研究新安固本培元高频药 对其治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制

吴凡^{1,3,4}, 李泽庚^{2,3,4*}, 朱洁^{3,4},
王小乐^{1,3}, 高雅婷^{2,3,4}, 杨勤军^{1,3}, 吴迪^{1,3}, 丁焕章^{1,3}

¹安徽中医药大学中医学学院, 合肥 230012; ²安徽中医药大学第一附属医院; ³安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所;
⁴安徽省教育厅中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 合肥 230038

摘要:本文基于数据挖掘、网络药理学及分子对接方法, 探讨新安固本培元高频药对人参-黄芪治疗慢性阻塞性肺疾病的分子机制。采用 Apriori 算法建立关联模型挖掘出人参-黄芪为新安固本培元高频药对。使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“化合物-靶点”网络、蛋白互作网络及进行拓扑分析。采用 Metascape 数据库, 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 筛选度值较高的“有效成分-靶点”进行分子对接。结果表明人参-黄芪有效成分 33 种, 相关靶点 206 个, 慢性阻塞性肺疾病靶点 946 个, 获取目标靶点 64 个。GO 分析共包含 1 629 条生物过程、48 条细胞组分、91 条分子功能、247 条 KEGG 富集结果。分子对接结果显示山奈酚、人参皂苷 Rh₂ 及常春藤皂苷元能够与 AKT1、IL6、CX-CL8、MAPK1 及 TNF- α 结合。本研究总结出人参-黄芪为新安固本培元医家治疗慢性阻塞性肺疾病的高频药对, 初步揭示了人参-黄芪治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制。

关键词:固本培元; 人参-黄芪; 慢性阻塞性肺疾病; 网络药理学; 新安医学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)11-1959-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.11.017

Study on the high frequency drug pair of strengthening foundation and cultivating vitality in Xin'an and its action mechanism in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease based on data mining and network pharmacology

WU Fan^{1,3,4}, LI Ze-geng^{2,3,4*}, ZHU Jie^{3,4},
WANG Xiao-le^{1,3}, GAO Ya-ting^{2,3,4}, YANG Qin-jun^{1,3}, WU Di^{1,3}, DING Huan-zhang^{1,3}

¹College of Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

²The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine;

³Institute of Respiratory Disease, Anhui Academy of Chinese Medicine;

⁴Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention and

Treatment of Pulmonary Diseases, Key Laboratory of Anhui Provincial Education Department, Hefei 230038, China

Abstract: Based on data mining, network pharmacology and molecular docking, this study explored the molecular mechanism of high frequency drug pair of Astragali Radix-Ginseng Radix et Rhizoma in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. The correlation model was established by using Apriori algorithm, and the Astragali Radix-Ginseng Radix et Rhizoma was found to be the high frequency drug pair. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the compound target network protein interaction network and perform topological analysis. Metascape database was used for GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis, and the active component with higher degree value was screened for molecular docking.

收稿日期: 2021-07-29 接受日期: 2022-06-09

基金项目: 国家自然科学基金基金区域创新发展联合基金重点支持项目(U20A20398); 安徽高校自然科学研究项目(KJ2021A0572); 安徽省中医药传承创新科研项目(2020ccyb02); 安徽省自然科学基金(2108085QH369)

* 通信作者 E-mail: li6609@126.com

The results showed that there were 33 active components, 206 related targets and 946 chronic obstructive pulmonary disease targets of Astragali Radix and Ginseng Radix et Rhizoma, and 64 targets were obtained. GO analysis included 1 629 biological processes, 48 cell components, 91 molecular functions and 247 KEGG enrichment results. The molecular docking results showed that ginsenoside Rh₂, hederagenin and kaempferol could bind AKT1, IL6, CXCL8, MAPK1 and TNF- α . In this study, it was concluded that Astragali Radix-Ginseng Radix et Rhizoma was the high-frequency drug pair for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease of strengthening foundation and cultivating vitality in Xin'an, and the mechanism was preliminarily revealed.

Key words: strengthening foundation and cultivating vitality; Astragali Radix-Ginseng Radix et Rhizoma; chronic obstructive pulmonary disease; network pharmacology; Xin'an medicine

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以气流受限,气体交换异常,黏液高分泌及肺动脉高压等为特征的异质性疾病^[1]。COPD在中医上多以肺胀、咳嗽及喘证命名,发病以虚、痰、瘀为主要病机,气虚为本,多始于肺脏、传于脾脏、终及肾脏,肺脾肾三脏功能失调,津液代谢失常则成痰饮,血瘀、痰浊、水饮交错为患。补气为治疗COPD的重要治则之一。中医药治疗效果明确,具有改善咳喘症状、提高生活质量的作用。

新安固本培元派作为新安医学中最具代表性的医学流派分支,以“培补脾肾、顾护元气”为学术主张,通过固护人体后天之本而达到扶正祛邪、治病愈疾的目的。固本关键在固肺、脾、肾三脏之气,培元核心在补益气血阴阳之偏。清代休宁医家汪文绮云“脾为仓廩之官……若久咳而滋补无功,须培养脾元,补母以及其子”。歙县名医程文圃:“肺金之虚,多由肾水之涸……若阴损于下,阳孤于上……是咳虽在肺,而实在肾”。新安固本培元理论以调气血、固脾胃、补肾气为治疗特色,对于COPD的防治特色突出,疗效明确^[2]。

本文通过关联规则挖掘出新安固本培元医案中治疗COPD常用药对为人参(Ginseng Radix et Rhizoma, GRR)与黄芪(Astragali Radix, AR)配伍。人参-黄芪成分众多,治疗COPD机制尚不明确。对人参-黄芪药对开展网络药理学研究,进一步明确人参-黄芪活性成分及作用靶点,并分析其治疗COPD的作用机制,可以为人参-黄芪治疗COPD提供理论依据,对于阐释新安固本培元理论也有积极意义。

1 资料与方法

1.1 COPD相关医案收集

选取《石山医案》《孙文垣医案》《杏轩医案》《程茂先医案》《素圃医案》《程敬通医案》《吴氏医验录》及《冯塘医案》等新安医籍中涉及“肺胀”“咳嗽”“喘证”的医案,临床表现及病史符合《内科学》

COPD特征,初步检索获取医案205篇,去重后严格按照纳入标准和排除标准去除53篇医案,最后纳入分析医案152篇。

纳入标准:(1)症状符合慢性阻塞性肺疾病表现;(2)医案记录比较完整,包括主症和方药等记录;(3)医案记载,有确切疗效,能够改善相关临床症状。

排除标准:(1)只有症状及发病过程论述,或只有方药;(2)单纯针灸治疗;(3)失治误治医案(医案记录中明确指出有误的医案)。

1.2 运用Apriori关联规则算法挖掘药对

将中药名称标准化后录入Excel表格,例如将“法半夏”“清半夏”统一命名为“半夏”,将“炙甘草”“生甘草”统一命名为“甘草”,建立中药数据库。运用SPSS Modeler软件处理数据库内中药,运用Apriori关联规则算法建立数据挖掘模型,得出使用频率最高的药对^[3]。

1.3 药对中所含化学成分的收集与筛选

在中药系统药理学分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)中收集药对的主要化学成分。结合口服生物利用度(oral bioavailability, OB \geq 30%)和类药性(drug likeness, DL \geq 0.18)筛选所收集到的化学成分,建立药对的化学成分数据^[4]。将上面收集到的靶蛋白在数据库UniProt(<https://www.uniprot.org>)中进行校正,选择物种为人(Homo sapiens),校正靶点蛋白信息并转化为gene symbol,建立药物的靶基因数据库。

1.4 COPD与药对相关靶点收集

通过TTD数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),检索关键词“chronic obstructive pulmonary disease”收集COPD相关基因,其中GeneCards数据库relevance score \geq 30,三个数据库整合并去重得到COPD相关

基因,并与中药活性成分靶基因进行映射筛选共同靶点,即为药对活性成分治疗 COPD 的靶点。

1.5 “化合物-靶点”的网络构建及可视化分析

利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物活性成分-关键靶点基因网络图。网络中各节点(node)分别代表活性成分和靶点基因;网络中边(edge)用来连接活性成分与关键靶点基因;连接到网络的节点以度值(degree)为单位进行表示,某节点与其他节点连接的边数越多,则说明该节点在网络中扮演的角色越重要,度值也越大。

1.6 蛋白网络互作构建及拓扑分析

采用 STRING 数据库对人参黄芪与 COPD 的交集靶点进行蛋白质相互作用分析。物种限定为人,通过设定最小相互作用得分(interaction score) > 0.4,获得交集靶点的 PPI (protein-protein interaction) 网络数据,保存“TSV”格式文件,利用 Cytoscape 3.7.2 软件分析所获得的蛋白相互作用并建立网络图。

1.7 GO 生物学功能及 KEGG 通路富集分析

应用 metascape 数据平台 (<https://metascape.org/>) 对筛选出的共同靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,选择种族人类(Homo sapiens),设定 $P \leq 0.01$,其余保持默认,分析人参-黄芪治疗 COPD 潜在的生物过程和信号通路。利用微生物信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制 GO 分析条状图以及 KEGG 富集气泡图。

1.8 成分-靶点分子对接

登录 TCMSP 数据库下载山奈酚(kaempferol)、人参皂苷 Rh₂ (ginsenoside Rh₂) 及常春藤皂苷元(hederagenin) 三种活性成分的主要成分结构,对 3D 结构进行能量最小化后保存,利用 Autodock Tools 1.5.6 软件生成 pdbqt 格式。然后登录 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载 AKT1 (PDBID:1H10)、IL6 (PDBID:7NXZ)、CXCL8 (PDBID:6N2U)、MAPK1 (PDBID:7NR9) 及 TNF- α (PDBID:7ATB) 等 5 个靶点蛋白 3D 晶体结构,对其去水、配体,加氢,重新计算电荷;然后将活性成分文件导入,检测总电荷,分配电荷,查看柔性可旋转键。最后使用 Autodock 程序进行分子对接,计算结合能大小。Pymol 软件将结果可视化。结合能绝对值 > 4.25 代表分子与靶点初步具有结合能力,结合能绝对值 > 5.0 代表较强结合能力,结合能绝对值 > 7.0 代表很强结合能力^[5]。

2 结果

2.1 运用关联规则获取药对

纳入医案处方 152 例,涉及中药 217 味,总频次 1 962 次,中药类别包括补虚药、化痰止咳平喘药、解表药、清热药等 18 大类。基于医案处方中药,运用 SPSS Modeler 中的 Apriori 进行建模,选取支持度 ≥ 0.11 ,置信度 ≥ 0.75 ,进行关联分析,得到二项关联(见表 1),其关联关系网络图见图 1。其中,置信度最高且关联性强的药对是人参-黄芪,置信度为 90.91%,支持度为 25.00%。

表 1 治疗 COPD 处方中药物的关联规则(置信度 ≥ 0.75)

Table 1 Association rules for drugs in the treatment of COPD (confidence ≥ 0.75)

关联规则 Association rule	支持度 Support (%)	置信度 Confidence level (%)	增益 Gain
人参-黄芪 Ginseng Radix et Rhizoma-Astragali Radix	25	90.91	1.38
甘草-半夏 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Pinelliae Rhizoma	22.73	90	1.28
甘草-黄连 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Coptidis Rhizoma	15.91	85.71	1.22
茯苓-白术 Poria-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	47.73	85.71	1.45
人参-白术 Ginseng Radix et Rhizoma-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	47.73	85.71	1.3
麦冬-熟地黄 Ophiopogonis Radix-Rehmanniae Radix Praeparata	13.64	83.33	1.83
五味子-百合 Schisandrae Chinensis Fructus-Lilii Bulbus	13.64	83.33	2.16
陈皮-杏仁 Citri Reticulatae Pericarpium-Armeniaca Semen Amarum	13.64	83.33	1.83

续表 1 (Continued Tab. 1)

关联规则 Association rule	支持度 Support (%)	置信度 Confidence level (%)	增益 Gain
甘草-茯苓 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Poria	59.09	80.77	1.15
人参-茯苓 Ginseng Radix et Rhizoma-Poria	59.09	80.77	1.23
山药-人参 Dioscoreae Rhizoma-Ginseng Radix et Rhizoma	11.36	80	7.04
熟地黄-山药 Rehmanniae Radix-Dioscoreae Rhizoma	11.36	80	5.87
黄连-柴胡 Coptidis Rhizoma-Bupleuri Radix	11.36	80	5.03
人参-白芍 Ginseng Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Alba	22.73	80	1.21
陈皮-半夏 Citri Reticulatae Pericarpium-Pinelliae Rhizoma	22.73	80	1.76
人参-半夏 Ginseng Radix et Rhizoma-Pinelliae Rhizoma	22.73	80	1.21
陈皮-黄芩 Citri Reticulatae Pericarpium-Scutellariae Radix	22.73	80	1.76
甘草-黄芩 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix	22.73	80	1.14
人参-陈皮 Ginseng Radix et Rhizoma-Citri Reticulatae Pericarpium	45.45	80	1.21

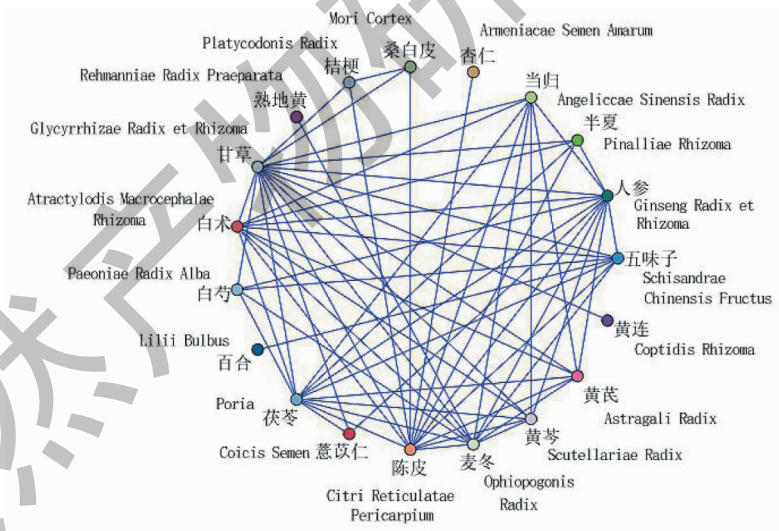


图 1 药物关联网络图

Fig. 1 Drug association network diagram

2.2 所含化学成分收集与筛选

在 TCMSp 数据库, 设置筛选条件为 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 后得到人参化学成分 22 个, 黄芪化学成分 20 个, 剔除没有靶点的化学成分, 人参化学成分 17 个, 黄芪化学成分 17 个, 山奈酚为二药共同成

分, 其中共计筛选到化学成分 33 个, 详见表 2。通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建化学成分与治疗靶点网络图(见图 2)。图 2 共有 216 个节点、587 条边, 三角形代表活性成分, 圆形为靶点基因。

表2 人参-黄芪活性成分

Table 2 Active ingredient of Ginseng Radix et Rhizoma-Astragali Radix

化合物 ID MOLID	化合物名称 Compound name	OB(%)	DL	草药 Herb
MOL005308	阿波罗胺 Aposiopolamine	66.65	0.22	GRR
MOL005321	灌木远志酮 A Frutinone A	65.9	0.34	GRR
MOL003648	山槐素 Inermin	65.83	0.54	GRR
MOL005356	吉九里香碱 Girinimbin	61.22	0.31	GRR
MOL000787	延胡索碱 Fumarine	59.26	0.83	GRR
MOL005384	苏奇内酯 Suchilactone	57.52	0.56	GRR
MOL005320	花生四烯酸 Arachidonate	45.57	0.2	GRR
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76	GRR
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯 Diop	43.59	0.39	GRR
MOL005318	石竹胺 Dianthramine	40.45	0.2	GRR
MOL005317	脱氧三尖杉脂碱 Deoxyharringtonine	39.27	0.81	GRR
MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.91	0.75	GRR
MOL005399	西托糖苷 Alexandrin	36.91	0.75	GRR
MOL005344	人参皂苷 Rh ₂ Ginsenoside Rh ₂	36.32	0.56	GRR
MOL005376	人参二醇 Panaxadiol	33.09	0.79	GRR
MOL005348	人参皂苷 Rh ₄ Ginsenoside Rh ₄	31.11	0.78	GRR
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	GRR、AR
MOL000378	7-O-甲基异丁香酚 7-O-Methylisomucronulatol	74.69	0.3	AR
MOL000392	刺芒柄花素 Formononetin	69.67	0.21	AR
MOL000433	叶酸 Folic acid	68.96	0.71	AR
MOL000211	白桦脂酸 Betulinic acid	55.38	0.78	AR
MOL000371	3,9-Di-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di-O-Methylnisosolin	53.74	0.48	AR
MOL000239	佳罗醇 Jaranol	50.83	0.29	AR
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31	AR
MOL000439	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62	AR
MOL000417	黏钙蛋白 Calycosin	47.75	0.24	AR
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	AR
MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	AR
MOL000296	常春藤皂苷元 Hederagenin	36.91	0.75	AR
MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-D-葡萄糖苷 9,10-Dimethoxypterocarpan-3-O-D-glucoside	36.74	0.92	AR
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	36.74	0.92	AR
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-Dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	AR
MOL000387	联苯双酯 Bifendate	31.1	0.67	AR

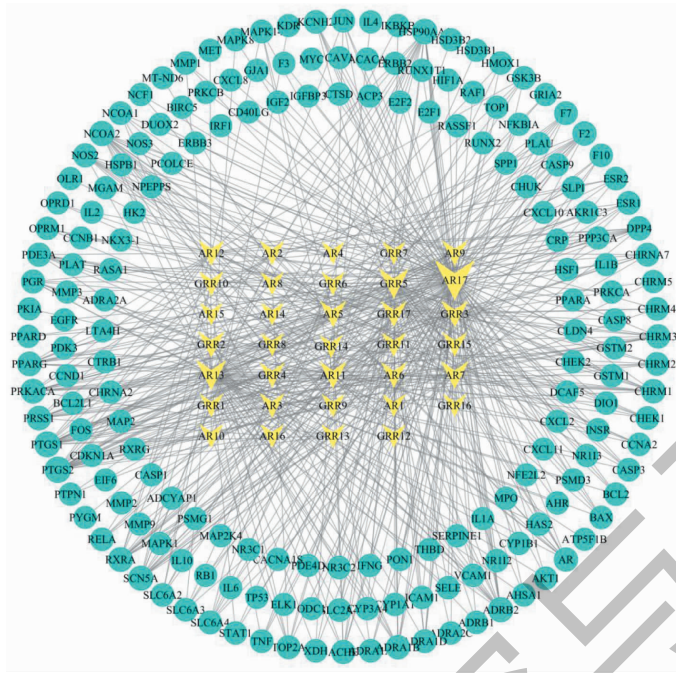


图2 人参-黄芪主要活性成分-靶点网络图

Fig. 2 Main active ingredient-target network of Ginseng Radix et Rhizoma-Astragali Radix

2.3 疾病和药物相关靶点的筛选

在 GeneCards、OMIM 及 TTD 中以“chronic obstructive pulmonary disease”为关键词,检索 COPD 相关靶基因,去重后得到靶基因 946 个,并与人参-黄芪活性成分治疗的靶基因取交集并绘制维恩图(见图 3)。图中共同靶点 64 个,说明这些基因可能在人参-黄芪治疗 COPD 过程中,发挥一定作用,为进一步阐释人参-黄芪治疗 COPD 的作用机制,将这 64 个靶点作为目标关键靶点进行分析。

2.4 关键靶点蛋白-蛋白相互作用分析

在 STRING 数据库中分析 64 个关键靶点之间

的相互作用关系并导出结果。将结果导入 Cytoscape 3.7.2 获取 PPI 网络,图中颜色越深、圆圈越大则得分越高(见图 4)。可以看出,这 64 个靶点间有相互作用,表明这些靶点相互联系,并通过多途径、多方面的协调来起到治疗 COPD。经拓扑分析,度值(degree 值)排名前 10 的靶点依次为 IL6、TNF、AKT1、TP53、MMP9、MAPK1、CXCL8、PTGS2、EIL1B、FOS,表明这些基因在人参-黄芪治疗 COPD 过程中具有重要意义。

2.5 GO 生物学功能和 KEGG 通路富集分析

用 Metascope 数据库,从生物过程、分子功能和

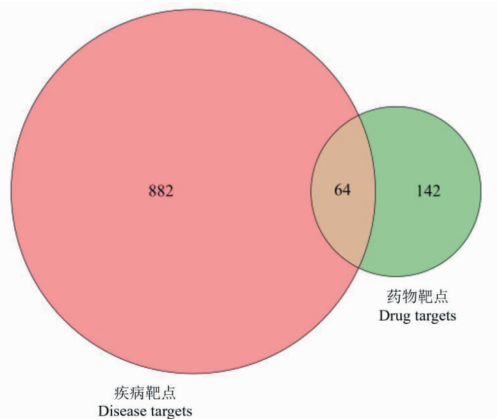


图3 疾病靶点基因与人参-黄芪靶点基因 Veen 图

Fig. 3 Veen diagram of disease target genes and Ginseng Radix-Astragali Radix target genes

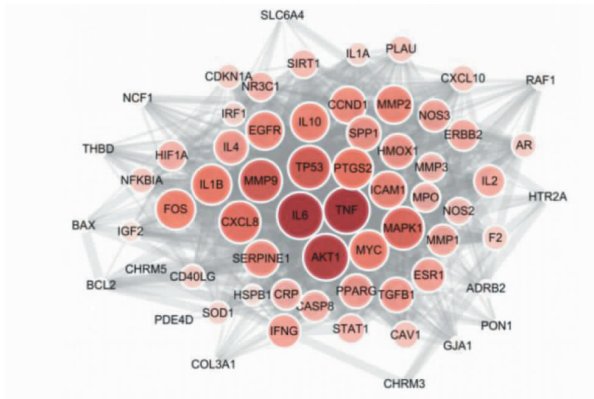


图 4 关键靶点 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of key targets

细胞组成 3 个模块对 64 个关键靶点进行 GO 功能富集分析,生物过程 (biological process, BP) 条目 1 629 条,主要涉及细胞分化、炎症反应、细胞凋亡、上皮细胞增殖及氧化应激等;分子功能 (molecular function, MF) 条目 48 条,主要涉及转录因子结合,受体调节,信号受体激活、受体配体活动及生长因子活动等;细胞组分 (cellular component, CC) 条目 91

条,主要涉及胞质核周区域、细胞外基质、线粒体外膜、细胞器外膜及膜微结构域等,具体 GO 功能分析结果可见图 5。KEGG 分析结果显示, $P \leq 0.01$ 的通路共计 133 条。结合表 3 和图 6,每条通路的 P 值从小至大进行排序,与人参-黄芪治疗 COPD 相关的通路有 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路、Th17 细胞分化及 MAPK 信号通路等。

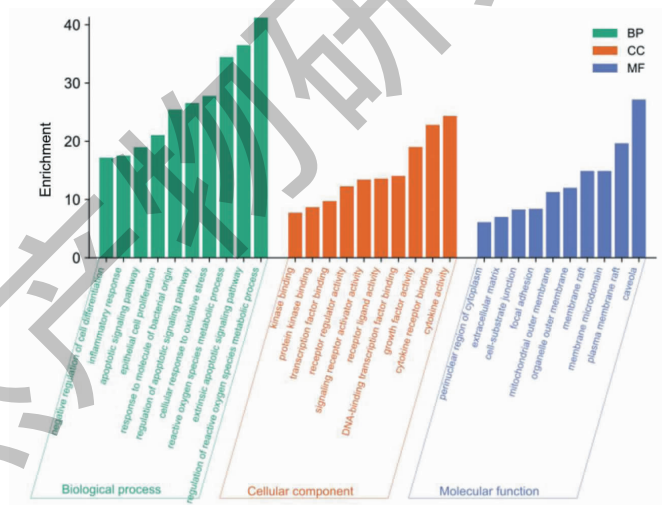


图 5 GO 富集分析柱状图

Fig. 5 GO enrichment analysis histogram

表 3 KEGG 通路富集分析 (前 14 条)

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis (Top 14)

基因 ID Gene ID	通路 Pathway	靶点 Target
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	AKT1、BAX、CCND1、BCL2、CASP8、CDKN1A、HSPB1、ICAM1、IFNG、IL6、IL10、CXCL10、MYC、NFKBIA、STAT1、TNF、TP53
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	AKT1、CCND1、BCL2、CDKN1A、EGFR、ERBB2、IGF2、IL2、IL4、IL6、MYC、NOS3、MAPK1、RAF1、SPP1、TP53

续表 3 (Continued Tab. 3)

基因 ID Gene ID	通路 Pathway	靶点 Target
hsa04657	IL-17 signaling pathway	CASP8、FOS、IFNG、IL1B、IL4、IL6、CXCL8、CXCL10、MMP1、MMP3、MMP9、NFKBIA、MAPK1、PTGS2、TNF
hsa04668	TNF signaling pathway	AKT1、CASP8、FOS、ICAM1、IL1B、IL6、CXCL10、IRF1、MMP3、MMP9、NFKBIA、MAPK1、PTGS2、TNF
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	AKT1、BCL2、CDKN1A、EGFR、ERBB2、HIF1A、HMOX1、IFNG、IL6、NOS2、NOS3、SERPINE1、MAPK1
hsa05166	HTLV-I infection	AKT1、BAX、CCND1、CDKN1A、FOS、ICAM1、IL2、IL6、MYC、NFKBIA、TGFB1、TNF、TP53
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	CD40LG、EGFR、IFNG、IL1A、IL1B、IL2、IL4、IL6、CXCL8、IL10、CXCL10、TGFB1、TNF
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	AKT1、CASP8、FOS、IL1B、IL6、CXCL8、CXCL10、NFKBIA、MAPK1、SPP1、STAT1、TNF
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	AKT1、CCND1、BCL2、CDKN1A、IFNG、IL2、IL4、IL6、IL10、MYC、RAF1、STAT1
hsa04010	MAPK signaling pathway	AKT1、EGFR、FOS、HSPB1、IL1A、IL1B、MYC、MAPK1、RAF1、TGFB1、TNF、TP53
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	AKT1、CD40LG、FOS、IFNG、IL2、IL4、IL10、NFKBIA、MAPK1、RAF1、TNF
hsa04659	Th17 cell differentiation	FOS、HIF1A、IFNG、IL1B、IL2、IL4、IL6、NFKBIA、MAPK1、STAT1、TGFB1
hsa05133	Pertussis	FOS、IL1A、IL1B、IL6、CXCL8、IL10、IRF1、NOS2、MAPK1、TNF
hsa04068	Foxo signaling pathway	AKT1、CCND1、CDKN1A、EGFR、IL6、IL10、MAPK1、RAF1、TGFB1、SIRT1

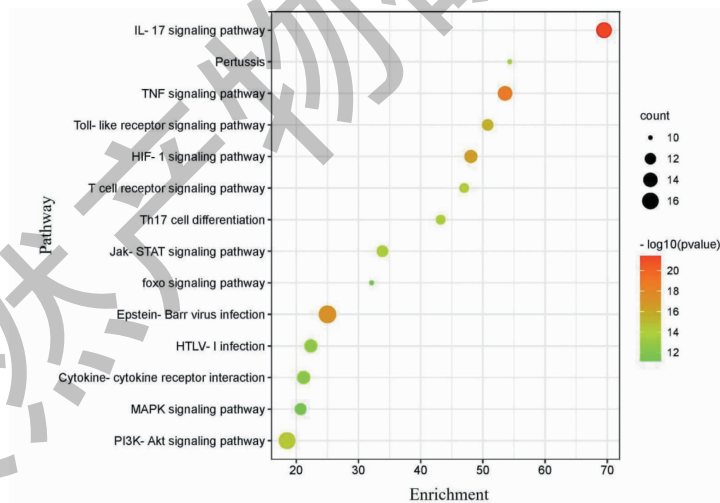


图 6 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

2.6 分子对接结果

使用 Cytoscape 3.7.2 中的插件 cytoNCA、cytoHubba 筛选出 degree 值排名前十的主要作用靶点, 选择出人参、黄芪 degree 值得出评分较高的活性成分。结合文献报道^[6], 人参皂苷 Rh₂ 及常春藤皂苷

元均有增强免疫作用, 对于慢性支气管炎具有一定的治疗作用, 人参、黄芪共同化学成分山奈酚具有抗炎、抗肿瘤、同时对肺损伤具有防治作用^[7]; 选择上述三种化合物, 根据 KEGG 分析得到得通路, 运用 PyMOL、AutoDock Vina 等软件对人参-黄芪的关键

成分及主要靶点进行分子对接,对上述三种化合物作用于 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 的结合能进行对接并打分。根据文献^[8-10]结合 TCMS 数据库查询结果,以白藜芦醇(PubChem Cid:445154)作为 AKT1 阳性对照药、槲皮苷(PubChem Cid:5280343)作为 CXCL8 阳性对照药、木犀草素(PubChem Cid:5280445)作为 IL6 阳性对照药、异槲皮苷

(PubChem Cid:5280804)作为 MAPK1 阳性对照药及苯甲酸(PubChem Cid:243)作为 TNF- α 阳性对照药。表 4 可得出,人参皂苷 Rh₂、常春藤皂苷元及山奈酚与 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 均有较强的亲和力。同时运用 PyMOL、LigPlot + 软件制作了 AKT1 与 人参皂苷 Rh₂、山奈酚,MAPK1 与 山奈酚,IL6 与 人参皂苷 Rh₂ 的 3D 对接示意图见图 7。

表 4 活性成分与靶点受体蛋白间的最低结合能

Table 4 Minimum binding energy between active ingredients and target proteins

活性成分 Active ingredient	结合能 Binding energy (kJ/mol)				
	AKT1	CXCL8	IL6	MAPK1	TNF- α
人参皂苷 Rh ₂ Ginsenoside Rh ₂	-44.8	-32.7	-35.2	-33.5	-28.5
常春藤皂苷元 Hederagenin	-44.8	-30.6	-32.2	-31.4	-25.1
山奈酚 Kaempferol	-39.8	-30.9	-31.8	-33.1	-26.4
白藜芦醇 Resveratrol	-27.7	-	-	-	-
槲皮苷 Quercetin	-	-23.4	-	-	-
木犀草素 Luteolin	-	-	-26.8	-	-
异槲皮苷 Isoquercitrin	-	-	-	-25.9	-
苯甲酸 Benzoic acid	-	-	-	-	-23.9

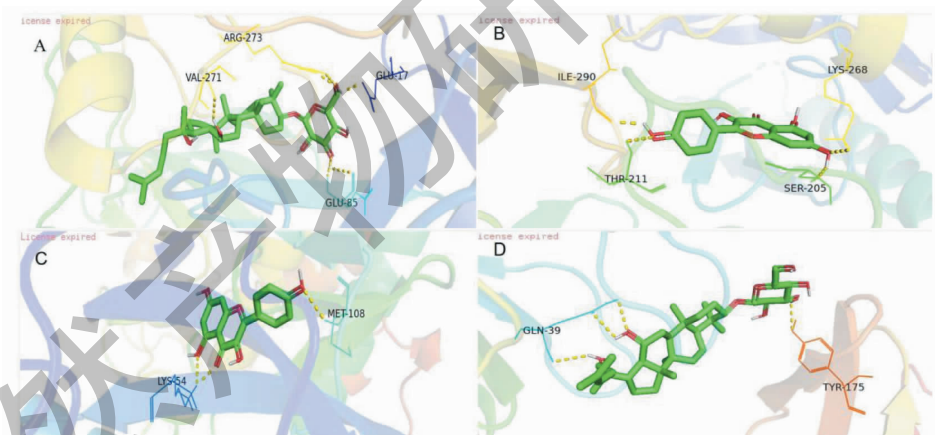


图 7 靶点受体蛋白与活性成分的对接模式和相互关系模拟

Fig. 7 Simulation of docking mode and interaction between target receptor protein and active component

注: A: AKT1-人参皂苷 Rh₂; B: AKT1-山奈酚; C: MAPK1-山奈酚; D: IL6-人参皂苷 Rh₂。Note: A: AKT1-ginsenoside Rh₂; B: AKT1-kaempferol; C: MAPK1-kaempferol; D: IL6-ginsenoside Rh₂。

3 讨论与结论

咳嗽、喘息、气短,动则加重及畏风等作为肺气虚证常见症状,最早见于 COPD 病理过程,肺气虚渐进性发展,影响及脾,发展为肺脾气虚,兼见纳呆或食少,胃脘胀满或腹胀或便溏等;病情进一步发展,可出现呼多吸少,呼吸表浅甚至气少不足以吸等肾气不足证候的症状,可见肺脾肾气虚^[11]。COPD 稳

定期治疗以补肺健脾补肾为主,兼顾行气、化痰、活血,稳定期有效防治对于减少急性发作次数、改善患者感受、延缓病理改变和病情进展有积极意义。

在固本培元理论指导下,新安医家通过补益肺、脾、肾之气,恢复脏腑气血功能,以祛痰瘀、水饮等病理产物,与 COPD 稳定期治疗高度契合。通过 Apriori 关联规则分析目标数据库里的用药规律得到人

参与黄芪同时配伍治疗 COPD 置信度最高。以汪机为代表的新安医学固本培元医家,认为“参芪不惟补阳,而亦补阴”,临床擅用人参、黄芪,重固脾胃,补益气血,平调阴阳。明代祁门医家陈嘉谟《本草蒙筌》云:“人参可定喘嗽,通畅血脉,泻阴火……肺寒受邪,短气少气,虚喘宜用”。歙县名医汪昂《本草备要》:“黄芪灸用补中,益元气,温三焦,壮脾胃……脾胃缓和,则肺气旺而肌表固实,补中即所以固表也。二药备受新安医家喜爱,合用而固本培元、健脾补肺、培土生金,符合 COPD 稳定期肺脾气虚证的基本病机。近代临床研究表明,以人参-黄芪为君药的方药对于 COPD 稳定具有良好的治疗作用, Dou 等^[12]研究发现自拟补肺益肾汤(党参、生黄芪、五味子等)可以降低慢阻肺肾气虚型患者的中医证候积分,升高 PaO₂,减少 CO₂ 潴留。

通过 Cytoscape 3.7.2 中的插件 cytoNCA 挖掘人参-黄芪中 33 个活性成分,参考 degree 排名,结合研究文献,发现山奈酚、人参皂苷 Rh₂ 及常春藤皂苷元等成分发挥着重要的作用。山奈酚具一种有二苯基丙烷结构的低分子量的黄色化合物,由 4-香豆酰辅酶 A 与三个丙二酰辅酶 A 缩合而成,能够通过抑制 NF- κ B 与髓系分化因子 88 (MYD88) 的结合活性,抑制炎症反应的发生^[13]。人参皂苷 Rh₂ 是人参中主要的生物活性皂苷之一,从结构上看, Rh₂ 可分为 S 型和 R 型两种构型,其中 20(S)-Rh₂ 单体是从中草药中分离得到的主要构型,研究显示人参皂苷 Rh₂ 通过调节 TGF- β 1/Smad 通路有效地抑制小胶质细胞活化和促炎细胞因子的产生^[14]。常春藤皂苷元是一种天然存在的三萜类化合物,在 A 环的 C-4 位带有羟甲基,高度不溶于水,能够可抑制 NF- κ B 和 p-I κ B α 的核转位,从而抑制 NF- κ B 的活化,抑制内毒素诱导的细胞 NF- κ B 水平和 NF- κ B 的核转位发挥抗炎作用^[15]。

通过对交集靶点进行 GO 功能分析,发现人参-黄芪可能在胞质核周、细胞外基质、线粒体外膜区域,调控转录因子结合、受体调节、信号受体激活、配体活动等分子功能,发挥抗氧化应激、延缓炎症及抑制细胞凋亡和上皮细胞增殖等生物过程。KEGG 通路富集分析显示,这些靶点参与了 PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、细胞因子受体相互作用信号通路、Toll 样受体信号通路、Jak-STAT 信号通路、MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路、Th17 细胞分化及 Foxo 信号通路

等。应用 Cytoscape 中的 cytoHubba 插件筛选出 degree 值排名前十的核心基因,依据文献^[16]及 KEGG 富集分析的结果,选择 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 和 Th17 细胞分化信号通路进行深入分析,得出两条通路富集的核心基因有 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 等。TLRs 是固有免疫中关键的模式识别受体,在吸烟、有害气体及微生物等因素的影响下,TLRs 成跨膜信号转导,再通过依赖于 MYD88 的 NF- κ B 通路调控炎症基因的转录、翻译和表达,产生并释放 IL-6、IL-8、COX-2、PGE2 等炎症因子,在损伤细胞同时,又作为内源性配体与中性粒细胞、NK 细胞等表面受体结合,合成并释放大量炎症介质和募集炎症细胞,导致肺部炎症反应级联被放大并持续存在,TLR2、TLR4、TLR9 都参与了 COPD 的发病过程,其中 TLR4 被认为是维持 COPD 炎症反应的主要 TLRs^[17]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 是辅助性 T 淋巴细胞中的一个特殊亚群主要分泌白细胞介素 17 (interleukin 17, IL-17) 和其他炎症细胞因子,在慢性气道炎症性疾病中与成纤维细胞、上皮细胞及平滑肌细胞表面的受体结合而发生免疫反应,诱导中性粒细胞的增殖和聚集,造成气道上皮损伤,介导纤维化^[18];与 Th17 细胞相比, Treg 细胞具有免疫调节功能,并分泌抗炎细胞因子来增强免疫耐受性和抑制炎症反应, Th17/Treg 失衡被认为是 COPD 发生的重要诱因^[19]。AKT 是进化上高度保守的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, AKT 的活化能抑制 FOXO3a 的转录活性,诱导 p53/p21 途径参与香烟诱导支气管上皮细胞的衰老^[20]。IL-6 作为细胞因子之一能够促进 Th17 (辅助性 T 细胞 17) 分化通路,并诱导促炎细胞因子如 IL-17 (白介素 17) 和 CXCL8 (趋化因子 8) 的产生,促进 COPD 发展^[21]。CXCL8 是中性粒细胞炎症介质, CXCL8 和其他由肺巨噬细胞分泌的趋化因子在外界刺激 (香烟烟雾、空气污染物) 下协调中性粒细胞 (PMN) 向肺部的运输,中性粒细胞和其他炎性细胞堆积产生的蛋白酶分泌会导致持续的广泛的组织损伤,还刺激气道上皮,使其收缩,增加其对炎症细胞的通透性,参与 COPD 的发病^[22]。TNF- α 为一种重要的炎症介质,能与香烟烟雾、LPS 等协同活化炎症细胞的 NF- κ B 系统,刺激 IL-8 等细胞因子的释放,使中性粒细胞数量增加,还能诱导基质金属蛋白酶 (MMP-9、MMP-12 等) 释放,破坏肺泡壁而加重 COPD 进展^[23]。MAPK1 (丝裂原活化蛋白激酶 1)

是细胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在进化过程中高度保守,在活化进入细胞核之前位于细胞质中,可以通过磷酸化转录因子来改变基因表达,促进炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 等的产生^[24],诱导一系列炎症和免疫反应,从而在 COPD 的发病机制中发挥作用^[25]。AKT1、IL6、CXCL8、TNF- α 、MAPK1 为富集于 Toll 样受体信号通路和 Th17 细胞分化信号通路的关键靶点,各基因之间也存在交互调控作用,可能通过炎症免疫影响 COPD 的发病和进程。

为了进一步验证网络药理学结果的可靠性,利用分子对接技术将核心成分和关键靶点进行分子对接,结果发现,核心成分山奈酚、人参皂苷 Rh₂ 及常春藤皂苷元与 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 的结合能均小于-21.4 kJ/mol,其中 AKT1 与人参皂苷 Rh₂、常春藤皂苷元的结合能为-44.8 kJ/mol,表明他们之间有强烈的结合活性。上述结果表明 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 可能是人参-黄芪发挥作用的重要靶点。

综上所述,通过数据挖掘证实新安医学固本培元派医家善用人参-黄芪药对治疗 COPD,采用网络药理学方法构建“化合物-靶点”网络,从整体上分析人参-黄芪成分、靶点、信号通路之间的相互作用关系,推测人参-黄芪通过山奈酚、人参皂苷 Rh₂ 及常春藤皂苷元等潜在药效成分协同作用于 AKT1、IL6、CXCL8、MAPK1 及 TNF- α 等多个靶点,通过 Toll 样受体信号通路和 Th17 细胞分化信号通路等发挥抗炎及调节免疫等作用治疗 COPD。初步揭示了人参-黄芪药对通过多成分、多靶点、多通路治疗 COPD 的机制,后续可对人参-黄芪药对进行实验研究,筛选该药对主要成分作用于香烟烟雾诱导的气道上皮细胞模型,检测核心靶蛋白的表达,深入探讨关键作用机制,为 COPD 治疗药物的研发提供新的方向及依据。

参考文献

- 1 Teng J, Chai XL, Wang Q, et al. Discussion on COPD intestinal dysfunction and treatment with traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(2): 196-202.
- 2 Ma X. The clinical research of preventing COPD based on root-securing origin-supplementing thought of Xin'an medicine[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine(安徽中医药大学), 2015.
- 3 Zheng JH, Chen X, Huang FJ, et al. Data mining of medication law of the medical cases of the constraint heat stage of Pi-dan; based on the book *New Discussion on Pi-dan-Understanding and Treatment of Metabolic Syndrome in Traditional Chinese Medicine*[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2021, 62: 755-763.
- 4 Cui MC, Wang HH, Chen SJ. Antitussive and expectant mechanism of *Fritillariae Thunbergii* Flos and *Eriobotryae* Flos based on network pharmacology and molecular docking[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 282-290.
- 5 Hou ZT, Su XH, Sui J, et al. Network pharmacology-based study of Bushen Zhuyun Prescription in treatment of recurrent spontaneous abortion[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 60-69.
- 6 Peng C, Peng DY. Pharmacology of Traditional Chinese Medicine(中药药理学)[M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing House, 2018: 255-262.
- 7 Pu Q, Xu WL, Li N, et al. Network pharmacology-based study on material basis and mechanism of Qikui Granules against diabetic nephropathy[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50: 5767-5777.
- 8 Zhang X, Shen T, Zhou X, et al. Network pharmacology based virtual screening of active constituents of *Prunella vulgaris* L. and the molecular mechanism against breast cancer[J]. Sci Rep, 2020, 10: 1573.
- 9 Liu Y, Zhang J, Liu X, et al. Investigation on the mechanisms of Guiqi Huoxue Capsule for treating cervical spondylosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Medicine(Baltimore), 2021, 100: e26643.
- 10 Taha KF, Khalil M, Abubakr MS, et al. Identifying cancer-related molecular targets of *Nandina domestica* Thunb. by network pharmacology-based analysis in combination with chemical profiling and molecular docking studies[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112413.
- 11 Li GD, Niu J, Wu ZS, et al. Medication and prescription rules of Chinese medicine treatment for chronic obstructive pulmonary disease at stable stage: a literature research of recent 20 years[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2019, 60: 614-618.
- 12 Kou Y. Clinical observation of Bufeiyishen Decoction on 30 cases of chronic obstructive pulmonary disease with deficiency of lung and kidney qi at stable stage[J]. Guide Chin Med(中国医药指南), 2014, 12: 180-181.
- 13 Zhang R, Ai X, Duan Y, et al. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. Biomed. Pharmacother, 2017, 89: 660-672.
- 14 Vinoth KR, Oh TW, Park YK. Anti-inflammatory effects of

- ginsenoside-Rh₂ inhibits LPS-induced activation of microglia and overproduction of inflammatory mediators via modulation of TGF- β 1/sm α d pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41: 951-957.
- 15 Lee CW, Park SM, Zhao R, et al. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW 264.7 cells and in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29: 528-537.
- 16 Dhamodharan P, Arumugam M. Multiple gene expression dataset analysis reveals toll-like receptor signaling pathway is strongly associated with chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis [J]. *COPD*, 2020, 17: 684-698.
- 17 Zhang ML, Wu YL, Zhang Y, et al. Research progress of toll-like receptors in chronic diseases [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2021, 30: 215-219.
- 18 Chen XL, Wang HY, Xu T, et al. Research progress of Th17 cells and IL-17A in chronic airway inflammatory diseases [J]. *J Med Theory Pract (医学理论与实践)*, 2021, 34: 746-748.
- 19 Gu N, Liu HB. Research progress of Th17/Treg immune imbalance in pulmonary diseases [J]. *Tianjin Pharm (天津药学)*, 2019, 31: 58-62.
- 20 Liu A, Wu J, Li A, et al. The inhibitory mechanism of *Cordyceps sinensis* on cigarette smoke extract-induced senescence in human bronchial epithelial cells [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016, 11: 1721-1731.
- 21 Lane N, Robins RA, Corne J, et al. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119: 75-86.
- 22 Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases [J]. *Theranostics*, 2017, 7: 1543-1588.
- 23 Lee SY, Cho SS, Bae CS, et al. Socheongryongtang suppresses COPD-related changes in the pulmonary system through both cytokines and chemokines in a LPS COPD model [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58: 538-544.
- 24 Zhu S, Song W, Sun Y, et al. MiR-342 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting MAPK1 expression [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47: 1448-1454.
- 25 Duan R, Niu H, Yu T, et al. Identification and bioinformatic analysis of circular RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 1391-1401.
- (上接第 1946 页)
- 17 Qin G, Wen P, Wang Y, et al. Safety assessment of xylan by a 90-day feeding study in rats [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 85: 1-6.
- 18 Liu H, Dong X, Tong J, et al. A comparative study of growth performance and antioxidant status of rabbits when fed with or without chestnut tannins under high ambient temperature [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2011, 164: 89-95.
- 19 Wang W, Hong B, Shan G. Research progress on mechanism of hepatotoxicity of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2020, 35: 378-382.
- 20 Gao S. Report of sanguid granule phormic effect and information of clinical study [J]. *J Pract Med Tech (实用医技杂志)*, 2003, 10: 76-77.