

基于网络药理学探讨清咳平喘颗粒治疗急慢性支气管炎合并慢性阻塞性肺疾病的作用机制

王添全¹, 曹俊岭², 胡金涛³, 董凌燕³, 欧阳竞锋⁴, 林美娇^{3*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;
3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;
4. 中国中医科学院医学实验中心 中医药防治重大疾病北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过网络药理学的方法探讨清咳平喘颗粒治疗急慢性支气管炎合并慢性阻塞性肺疾病的潜在作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)对清咳平喘颗粒进行活性成分筛选以及作用靶点预测,运用Cytoscape 3.8构建药物成分-靶点网络;检索GeneCards,在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)以及DrugBank数据库获取疾病靶点;将靶点名输入到UniProt数据库进行标准化处理;通过韦恩图,得到清咳平喘颗粒治疗二病靶点;使用STRING平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;使用MetaScape数据平台进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析;构建清咳平喘颗粒治疗急慢性支气管炎合并慢性阻塞性肺疾病活性成分-共同靶点-信号通路网络。并通过文献确认相关靶点的准确性。结果:共获得清咳平喘颗粒165个活性成分,374个相关靶点,疾病相关靶点512个,药物疾病共同靶点130个,其中核心治疗靶点14个。对14个核心靶点进行分析,其中GO富集分析共得生物过程390条,细胞组成9个,分子功能23个;KEGG通路分析共得到22条信号通路。结论:清咳平喘颗粒可能是通过调节血管内皮生长因子受体2(KDR),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1),细胞质膜微囊蛋白1(CAV1),低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),白细胞介素-2(IL-2)等靶点,在体内主要与细胞质内的调控因子的合成与转运有关,参与传递的细胞因子主要通过控制细胞增殖凋亡等功能来改善病情。

[关键词] 清咳平喘颗粒; 网络药理学; 急慢性支气管炎; 慢性阻塞性肺疾病

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0160-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211112

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210618.1741.002.html>

[网络出版日期] 2021-06-21 11:25

Mechanism of Qingke Pingchuan Granule in Treatment of Acute and Chronic Bronchitis Complicated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: An Exploration Based on Network Pharmacology

WANG Tian-quan¹, CAO Jun-ling², HU Jin-tao³, DONG Ling-yan³, OUYANG Jing-feng⁴, LIN Mei-jiao^{3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
4. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, Medical Laboratory Center, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanism of Qingke Pingchuan granule in treating

[收稿日期] 20201109(015)

[基金项目] 国家中医药管理局全国中医药创新骨干人才培训项目(国中医药人教函2019-128号);国家自然科学基金项目(81803915)

[第一作者] 王添全,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:361127792@qq.com

[通信作者] *林美娇,硕士,主治医师,从事中医药防治小儿呼吸系统疾病研究,E-mail:linmeij1008@163.com

acute and chronic bronchitis complicated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by network pharmacology. **Method:** The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was retrieved to collect the active components of Qingke Pingchuan granule and predict the action targets, followed by the construction of component-target network using Cytoscape 3.8. GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and DrugBank were used to harvest disease targets, whose names were put into UniProt for standardization. The treatment targets of Qingke Pingchuan Granule against the two diseases were obtained based on Venn diagram, which were then imported into the STRING platform for constructing the protein-protein interaction (PPI) network. Following the gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis based on MetaScape, the active component-common target-signaling pathway network of Qingke Pingchuan granule against acute and chronic bronchitis complicated with COPD was finally constructed. The accuracy of the target was confirmed by literature. **Result:** A total of 165 active components, 374 related targets, 512 disease-related targets, and 130 common targets were obtained. Among them, the 14 core therapeutic targets were further subjected to GO enrichment analysis, which yielded 390 biological processes, nine cell components, and 23 molecular functions. The KEGG pathway analysis revealed 22 signaling pathways. **Conclusion:** Qingke Pingchuan granule alleviates the diseases possibly by regulating such targets as vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR), transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1), caveolin 1 (CAV1), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), and interleukin-2 (IL-2), affecting the synthesis and transport of regulatory factors in cytoplasm, and controlling the cell proliferation and apoptosis.

[Keywords] Qingke Pingchuan granule; network pharmacology; acute and chronic bronchitis; chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

急性慢性支气管炎(AACB)是指气管、支气管黏膜及其周围组织的急性或慢性非特异性炎症。其中急性支气管炎起病较急,常发病于寒冷季节或气温突然降低时,主要表现为咳嗽多痰,治疗后几周内可痊愈;若久治未愈或治愈后仍反复发作,则有可能发展为慢性支气管炎,伴有长期、反复、逐渐加重的咳嗽,部分加重者则可能演化成其他疾病。慢性阻塞性肺疾病(COPD)就是一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎,可进一步发展为肺心病和呼吸衰竭的常见慢性疾病^[1]。全球40岁以上人群的发病率已高达9%~10%^[2]。

支气管炎和COPD是呼吸系统最常见的两种疾病,是呼吸道及肺脏内的异常炎症反应所造成,而后者则兼具不可逆性气道阻塞。目前普遍认为是在环境和遗传因素的共同作用下,炎性细胞聚集,粘液细胞及腺体增生,转化生长因子(TGF)- β_1 ,肿瘤坏死因子(TNF)- α ,白细胞介素(IL)-8等分泌异常,弹性蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)及黏液蛋白等表达异常,呼吸道的上皮细胞及巨噬细胞受到损伤,纤毛运动减退、巨噬细胞吞噬功能降低、支气管黏液分泌增多,导致呼吸道净化能力下降、支气管黏膜充血水肿,引起慢性支气管炎以及由此引起

的组织结构破坏与气道重塑,最终导致呼吸道管腔狭窄和进行性气流受限^[3-5]。尽管如此,其发病机制并未完全明确。

西药对抗呼吸道疾病主要通过对症治疗合并抗感染治疗,起效快,但容易复发,病程反复,且多药联用副作用大、长期用药患者经济负担较重。清咳平喘颗粒出自张仲景《伤寒论》中辛凉宣泄、清咳平喘要方麻杏石甘汤,在其基础上增加6味中药辅助药效,且在多年的临床使用中取得了不错的疗效^[6-8]。全方由矮地茶、川贝母、金荞麦、苦杏仁、麻黄、枇杷叶、石膏、鱼腥草、炙甘草、紫苏子10味中药组成,方中以石膏为君药,辛甘大寒,清泻肺热;以金荞麦、鱼腥草、麻黄、苦杏仁为臣药,清热宣肺,止咳化痰;川贝母、矮地茶、枇杷叶、紫苏子为佐药,化痰止咳下气;甘草为方中使药,甘而性温,止咳祛痰,益气和中,调和诸药;全方组成紧密,相辅相成,共奏清热宣肺,止咳平喘之功。

本研究基于网络药理学探讨清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD中所涉及的有效活性成分、核心作用靶点以及相关信号通路,充分展现的中药复方多成分、多靶点的功能特点,为以后更深层次的机制研究及临床应用提供思路和依据。

1 材料与方法

1.1 清咳平喘颗粒活性成分的筛选及有效靶点的预测 检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[9]中获取清咳平喘颗粒中矮地茶、川贝母、金荞麦、苦杏仁、麻黄、枇杷叶、石膏、鱼腥草、炙甘草、紫苏子10味中药的有效成分。筛选标准分别设置为口服利用度(OB)≥30%及类药性(DL)≥0.18,其中矮地茶中成分矮茶素,麻黄中成分麻黄碱、伪麻黄碱,苦杏仁中成分苦杏仁苷未符合筛选条件,但作为主要成分亦属于有效成分,运用TCMSP数据库获取清咳平喘颗粒中有效成分的靶点信息。TCMSP数据库中未收录石膏相关关键词,检索相关文献获取石膏已知有效成分,并在HTDocking(<https://www.cbiligand.org/AD/>)中获取其靶点^[10]。将获得的靶点输入到UniProt数据库(<https://uniprot.org/>),设置类别为“human”,所得靶点名称标准化即为相关靶点。

1.2 药物-成分-靶点网络构建 将筛选后的活性成分名称进行重新编号,导入Cytoscape 3.8软件绘制清咳平喘颗粒药物-成分-靶点网络。然后使用软件内置的network analyzer工具进行网络特征分析。根据自由度值(degree)研究其中重要有效成分。

1.3 疾病相关靶点的收集及共同靶点的筛选 以“Acute and chronic bronchitis”“bronchitis”“chronic obstructive pulmonary disease”“COPD”为关键词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)(<https://www.omim.org/>), DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)等疾病数据库进行搜索,获取AACB-COPD相关靶点,汇总去重取交集,输入到UniProt数据库进行靶点名称标准化处理。将清咳平喘颗粒与AACB-COPD相关靶点在在线韦恩图绘制平台Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制韦恩图,交集靶点即有可能是清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD的关键靶点。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将交集的共同靶点录入STRING数据库(<http://string-db.org/cgi/input.pl>)构建PPI网络,选择分类人类Homo sapiens,置信度≥0.4。导出为tsv文件使用Cytoscape软件进行可视化处理。

1.5 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析 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 $P \leq 0.05$,其余保持默认,分析清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD潜在的生物过程和信号通路。利用微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制GO分析条状图及KEGG富集气泡图。

1.6 药物-成分-靶点-通路网络构建与分析 使用Cytoscape软件中内置的merge功能取交集构建药物-成分-靶点-通路网络,使用network analyzer功能进行网络特征分析。

2 结果

2.1 活性成分及有效靶点的筛选 根据设定的条件筛选去重后共得活性成分165个,其中包括矮地茶13个,川贝母10个,金荞麦15个,苦杏仁17个,麻黄24个,枇杷叶15个,石膏1个,鱼腥草5个,炙甘草88个,紫苏子14个,两味及以上中药共同所有成分19个。以拼音首字母重编号,共有成分编号为GY1~GY19。选取清咳平喘颗粒成分信息自由度前20名,见表1。利用获得的165个活性成分去筛选靶点,去重后共得374个。

2.2 药物成分-靶点-网络的构建 将上述所得的活性成分和有效靶点数据导入到Cytoscape 3.8进行网络构建,获得清咳平喘颗粒药物-成分-靶点网络,共包含个549节点,2 787条边。绿色圆形代表清咳平喘颗粒所含十味中药,菱形代表中药成分,其中黄色表示某几味中药的共有成分,蓝色方形代表成分对应靶点。对药物-成分-靶点网络进行分析,各成分degree值信息见表1。其中自由度前五的活性成分分别为槲皮素,(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐,山柰酚,木犀草素,熊果酸。推测可能是清咳平喘颗粒的重要成分。

2.3 药物疾病共有靶点的获取 以“Acute and chronic bronchitis”“bronchitis”为关键词检索,在DrugBank数据库获得4个靶点, GeneCards数据库获取974个, OMIM数据库获取244个,合并去重共计1 138个。以“chronic obstructive pulmonary disease”“COPD”等为关键词检索,在DrugBank数据库获得56个靶点, GeneCards数据库获取1 035个, OMIM数据库获取229个,合并去重共计1 247个。将1 138个AACB靶点,1 247个COPD靶点与374个清咳平喘颗粒靶点共同绘制韦恩图取交集。得到AACB-COPD靶点612个,清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD的核心作用靶点130个。

2.4 共同靶点PPI网络构建 将130个共有靶点导入STRING平台构建PPI网络图,所得网络进行可

表1 清咳平喘颗粒有效成分信息

Table 1 Information of effective components in Qingke Pingchuan granule

编码	化合物名称	degree
GY1	槲皮素 quercetin	158
PPY13	(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐(-)-epi-gallocatechin-3-gallate	141
GY2	山柰酚 kaempferol	68
GY6	木犀草素 luteolin	60
PPY15	熊果酸 ursolic acid	56
ZGC10	7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-methoxy-2-methyl isoflavone	44
GY3	β -谷甾醇 beta-sitosterol	43
ZGC11	芒柄花素 formononetin	40
GY7	异鼠李素 isorhamnetin	40
ZSZ4	花生四烯酸 arachidonic acid	39
GY18	柚皮素 naringenin	39
ZGC6	美迪紫檀素 medicarpin	35
GY8	豆甾醇 stigmasterol	34
ZGC66	甘草查尔酮甲 licochalcone a	33
ZGC68	2-[(3R)-8,8-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[6,5-f]铬-3-基]-5-甲氧基苯酚 2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	32
KXR16	千金藤啶碱 1-SPD	31
ZGC44	紫檀素 shimperocarpin	31
ZGC77	维斯体素 vestitol	31
ZGC63	1-甲氧基莱豆素 1-methoxyphaseollidin	30
ZGC80	甘草苷 licoagrocarpin	30

可视化处理。计算靶点相应属性信息,并以“degree, 中介中心度(BC),接近中心度(CC),邻里连通性(NC)”分别大于其相应中位数为筛选条件,即“degree \geq 45, BC \geq 0.002 26, CC \geq 0.601 402, NC \geq 66.464 62”进一步筛选核心靶点,最终得到清咳平喘颗粒治疗 AACB-COPD 的核心靶点共 14 个,分别为 PPARG, SERPINE1, CSF2, TGF- β_1 , 金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)-1, SPP1, IL-2, SIRT1, 血管内皮细胞生长因子受体(KDR), 低氧诱导因子(HIF)-1 α , STAT1, MAP2K1, 小窝蛋白(CAV1), AGT。共 14 个节点, 54 条边。每个点表示 1 个靶点蛋白, 点的面积和颜色代表点的 degree 值, 面积越大, 颜色越红, degree 值越大, 靶点越重要。

2.5 GO 富集分析和 KEGG 通路分析 通过 MetaScape 对清咳平喘颗粒治疗 AACB-COPD 的 14 个核心靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。

GO 功能富集分析共得到 422 个 GO 条目($P < 0.05$), 其中包含共获 390 条生物过程(BP)条目, 9 个细胞组成(CC)条目, 23 个分子功能(MF)条目。对获取的条目进行聚类时, 采用相似度量, 相似度 >0.3 的子树被认为是聚类^[10]。

选择集群中最具统计意义的术语来表示集群并作图, GO 分析见表 2。主要涉及的生物过程包括血管发育(blood vessel development), 细胞因子介导的信号通路(cytokine-mediated signaling pathway), 上皮细胞增殖(epithelial cell proliferation), 凋亡信号通路(apoptotic signaling pathway)等; 涉及的细胞组成包括细胞质核周区(perinuclear region of cytoplasm), 血小板 α 颗粒管腔(platelet alpha granule lumen), 早期内体(early endosome)等。主要的分子功能集中于生长因子活性(growth factor activity), 核激素受体结合(nuclear hormone receptor binding), 肽酶调节活性(peptidase regulator activity), 等。推测其主要与细胞质内的调控因子的合成与转运有关, 参与传递的细胞因子主要通过控制细胞增殖凋亡等功能来改善病情。

KEGG 通路分析共获 22 条信号通路($P < 0.05$), 选取可能性最高的聚落进行可视化分析, 所得 KEGG 气泡富集图共 6 条通路, 通路富集基因越多, 气泡越大, P 越小, 颜色越红。主要涉及癌症中的蛋白多糖(proteoglycans in cancer), HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway), 辅助性 T 细胞(Th)17 细胞分化(Th17 cell differentiation), 焦点粘着(focal adhesion), 细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction), 内吞作用(endocytosis)。每条通路所涉及的基因见表 3。

2.6 药物-成分-靶点-通路”网络的构建 将药物活性成分, 靶点, 疾病靶点, 通路导入 Cytoscape 软件中取交集, 获得“药物-成分-靶点-通路”网络进行网络分析, 结果见表 4, 包括 52 个节点, 105 条边。有效成分 degree 值最大的几个成分分别是槲皮素, (-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐, 山柰酚, β -谷甾醇, 木犀草素。degree 值最大的几个靶点分别是 KDR, TGF- β_1 , CAV1, HIF-1 α , IL-2, MAP2K1, STAT1 等。

3 验证

3.1 材料 40 只 SD 大鼠, 体质量 18~22 g, 4~6 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK(京)2016-0006。脂多糖(LPS, 美国 Sigma 公司, 批号 028M4094V)。清咳平喘颗粒(国药准字 Z20040047, 长春雷允上药业有限公司)。

表 2 清咳平喘颗粒治疗 AACB-COPD 的 GO 分析条目

Table 2 Go analysis items of Qingke Pingchuan granule treat AACB-COPD

GO 分析	条目	基因数/个
GO:0001568:blood vessel development	生物过程	10
GO:0019221:cytokine-mediated signaling pathway	生物过程	9
GO:0050673:epithelial cell proliferation	生物过程	8
GO:0097190:apoptotic signaling pathway	生物过程	8
GO:0048771:tissue remodeling	生物过程	7
GO:0018108:peptidyl-tyrosine phosphorylation	生物过程	7
GO:0030198:extracellular matrix organization	生物过程	7
GO:0009611:response to wounding	生物过程	7
GO:0097191:extrinsic apoptotic signaling pathway	生物过程	6
GO:0045926:negative regulation of growth	生物过程	6
GO:0071396:cellular response to lipid	生物过程	6
GO:0010742:macrophage derived foam cell differentiation	生物过程	5
GO:0032368:regulation of lipid transport	生物过程	5
GO:0001890:placenta development	生物过程	5
GO:0048568:embryonic organ development	生物过程	5
GO:0030336:negative regulation of cell migration	生物过程	4
GO:0032102:negative regulation of response to external stimulus	生物过程	4
GO:0009636:response to toxic substance	生物过程	4
GO:0007565:female pregnancy	生物过程	3
GO:0048471:perinuclear region of cytoplasm	细胞组成	4
GO:0031093:platelet alpha granule lumen	细胞组成	3
GO:0005769:early endosome	细胞组成	3
GO:0008083:growth factor activity	分子功能	5
GO:0035257:nuclear hormone receptor binding	分子功能	4
GO:0061134:peptidase regulator activity	分子功能	4
GO:0001664:G protein-coupled receptor binding	分子功能	3
GO:0050839:cell adhesion molecule binding	分子功能	3
GO:0008047:enzyme activator activity	分子功能	3

表 3 清咳平喘颗粒治疗 AACB-COPD 信号通路 KEGG 富集分析

Table 3 KEGG enrichment analysis of Qingke Pingchuan granule treat AACB-COPD signaling pathway

编号	通路	基因数/个	基因	lgP
hsa05205	proteoglycans in cancer	5	CAV1, HIF-1 α , KDR, MAP2K1, TGF- β_1	-4.45
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	4	HIF-1 α , SERPINE1, MAP2K1, TIMP-1	-4.25
hsa04659	Th17 cell differentiation	4	HIF-1 α , IL-2, STAT1, TGF- β_1	-4.25
hsa04510	focal adhesion	4	CAV1, KDR, MAP2K1, SPP1	-3.48
hsa04060	cytokine-cytokine receptor interaction	4	CSF2, IL-2, KDR, TGF- β_1	-3.18
hsa04144	endocytosis	3	CAV1, KDR, TGF- β_1	-2.05

KDR 抗体, 内皮素 (ET-1) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 K106691P, SEKH-0420), TIMP-1 抗体, MMP-9 抗

体, TGF- β_1 ELISA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 AF8163, AF5234, PT878), 白三烯 D4 (LTD4) ELISA 试剂盒 (上海研生实业有限公

表4 清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD活性成分-靶点网络分析
Table 4 Analysis of core active components target network
Qingke Pingchuan granule treat AACB-COPD

类别	名称	degree
成分	槲皮素	13
成分	(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐	7
成分	山柰酚	6
成分	β -谷甾醇	6
成分	木犀草素	4
成分	菜豆酚	3
成分	甘草苷	3
成分	甘草醇	3
成分	3'-羟基-4'-邻甲基葛兰素	2
成分	1-甲氧基菜豆素	2
成分	乙状结肠素B	2
成分	熊果酸	2
成分	甘草香豆素	2
成分	β -胡萝卜素	2
成分	甘草黄酮	2
成分	甘氨酸	2
成分	甘草素B	2
成分	甘草酮	2
成分	3-(2,4-二羟基苯基)-8-(1,1-二甲基丙-2-烯基)-7-羟基-5-甲氧基香豆素	2
成分	甘草酮G	2
成分	(4R,8R,9R)-4,8-双(3,4-二羟基苯基)-5,9-二羟基-4,8,9,10-四氢-3H-吡喃并[6,5-h]铬烯-2-酮	2
成分	格列吡多肽A	2
成分	(2S)-6-(2,4-二羟基苯基)-2-(2-羟基丙烷-2-基)-4-甲氧基-2,3-二氢糠醛[3,2-g]铬-7-酮	2
成分	葛根素B	2
成分	谷氨酰胺	2
成分	甘草素H	2
靶点	KDR	24
靶点	TGF- β_1	6
靶点	CAV1	6
靶点	HIF-1 α	5
靶点	IL-2	4
靶点	STAT1	4
靶点	MAP2K1	4
靶点	TIMP-1	2
靶点	CSF2	2
靶点	SERPINE1	2
靶点	SPP1	2

司,批号YS-H3243)。

3.2 方法 大鼠分为4组,空白组、模型组、低剂量组、高剂量组。除空白组外,其余3组麻醉后以气管插管法^[11-12]注入LPS造模,7 d 1次,持续14 d。14 d后灌胃给药,经说明书可知成人每日剂量为30 g,换算大鼠低、高剂量组给予清咳平喘颗粒低、高剂量水溶物(低剂量1.75 g·kg⁻¹·d⁻¹,高剂量5.4 g·kg⁻¹·d⁻¹),持续28 d。28 d后麻醉大鼠行腹主动脉取血,所得血液在室温下静置2 h,离心取上清,摘取肺组织脱水石蜡包埋,进行肺组织切片。

选取之前网络药理学所得靶点KDR,TGF- β_1 和TIMP-1作为验证指标,其中KDR,TGF- β_1 靶点是预测靶点中排名前二的指标。TIMP-1推测靶点之一,可以反映气道的修复过程,是气道纤维化的标志,TIMP-1还是MMP-9的抑制剂,TIMP-1和MMP-9的表达情况能够反映COPD发病过程中的变化情况^[13-14],故将TIMP-1和MMP-9作为指标。在COPD发病过程中,肺血管血流动力学可以作为诊断依据、血管活性物质及炎症介质日益受到重视,故将血管活性物质内皮素(ET)-1及炎症介质LTD4选为检测指标^[15]。

免疫组织化学检测大鼠肺组织切片KDR,TIMP-1,MMP-9的表达,ELISA检测大鼠血清TGF- β_1 ,LTD4,ET-1含量。

3.3 结果与结论 观察清咳平喘颗粒水溶物对COPD大鼠肺纤维化的影响,结果见图1,表5。免疫组化检测KDR,TIMP-1,MMP-9表达,与正常组比较,模型组KDR,TIMP-1,MMP-9的表达均明显偏高;与模型组相比,低剂量和高剂量治疗组KDR,TIMP-1,MMP-9的表达均明显降低。

表5是各组大鼠血清TGF- β_1 ,LTD4及ET-1含量的测定水平比较,与正常组比较,模型组TGF- β_1 ,LTD4及ET-1含量均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,低剂量组LTD4及ET-1含量显著降低($P<0.01$),高剂量组TGF- β_1 ,LTD4及ET-1含量显著降低($P<0.01$),与之前网络药理学的分析相符。

4 讨论

AACB-COPD作为典型的支气管炎,关于其发病机制,大部分研究显示炎症反应在其发生发展中处于核心地位,炎症反应在疾病发展的每一个环节中充当着不同的角色,炎症因子的代谢、氧化应激反应、黏液高度分泌等在支气管炎中均有所体现^[16-17]。各类炎症因子多种多样、不同通路之间交错复杂,现有的研究仍有不足。西医临床上对于炎

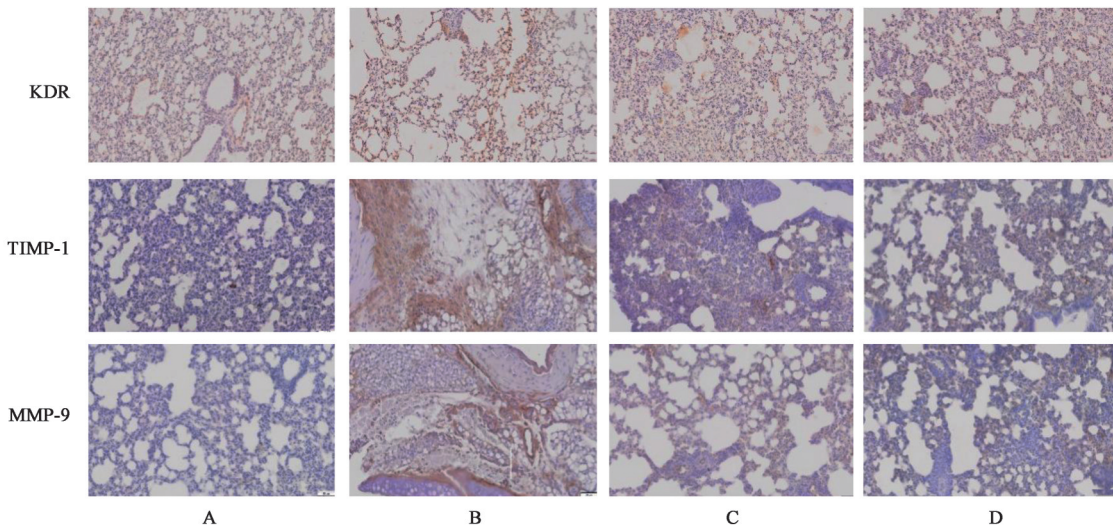


图1 清咳平喘颗粒水溶物对COPD大鼠肺组织中KDR, TIMP-1, MMP-9表达的影响(免疫组化, ×200)
Fig. 1 Effect of expression of KDR, TIMP-1 and MMP-9 by immunohistochemistry (IHC, ×200)

表5 各组大鼠血清TGF-β₁, LTD4及ET-1含量的测定水平比较(̄x±s, n=10)
Table 5 Determination levels of serum TGF-β₁, LTD4 and ET-1 in rats of each group (̄x±s, n=10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TGF-β ₁	LTD4	ET-1
正常		18.45±5.33	161.27±36.71	14.13±4.15
模型		35.53±6.17 ¹⁾	517.70±74.22 ¹⁾	18.52±3.64 ¹⁾
低剂量	1.75	27.55±2.16	213.52±32.74 ²⁾	14.51±3.44 ²⁾
高剂量	5.40	23.28±3.92 ²⁾	141.54±47.48 ²⁾	15.78±2.85 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01。

症引起的咳喘常利用支气管扩张剂或者糖皮质激素缓解病症,对于外在的刺激源常辅以一些抗菌抗感染药物。

中医认为AACB-COPD在辨证上分属“咳”“痰”“喘”三证^[18],病因主要分为“外邪”和“内因”,外邪犯肺,肺主宣发肃降,肺虚则气不畅,气机不畅,脾主运化,久之则累及脾,脾肺亏虚又致肾不纳气,脾肺肾三脏皆虚,病情反复,绵延不愈^[19]。临床治疗以止咳化痰平喘为主,调畅全身气机,使肺气下行,脾气丰满,肾气充盈,精气合一,标本兼治。

本研究通过构建清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD药物-成分-靶点-通路网络,共获活性成分26个,关键靶点11个,有效通路6条。在获得的26个活性成分之中,按degree值排序筛选出前八位作为核心活性成分,分别是槲皮素,(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐,山柰酚,β-谷甾醇,木犀草素。其中(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐是枇杷叶的有效成分,其余4个均属于多味中药的共有成分,体

现中药复方药物成分虽然复杂多样,但药物之间的互相影响也有依有据,为以后复方的研究提供思路。槲皮素作为常见的天然黄酮,存在于很多药物之中,有研究表明其对脂多糖造成的大鼠COPD模型有明显的改善作用,主要是通过降低TGF-β₁, TNF-α和α-SMA活性来抑制大鼠肺泡细胞凋亡,降低细胞炎症因子释放从而降低大鼠肺组织炎症和纤维化损伤^[20];此外槲皮素还有祛痰止咳平喘作用^[21]。山柰酚、木犀草素与槲皮素同为天然黄酮,同样拥有良好的抗炎作用。山柰酚可以通过抑制TYK2-STAT 1/3信号通路转导来降低小鼠气道上皮炎症介质相互作用影响^[22]。木犀草素可以通过抑制核转录因子-κB(NF-κB)通路和激活蛋白激酶B(Akt)/核因子E2相关因子2(Nrf2)通路,来治疗氯化汞所致小鼠肺损伤,减轻肺组织学改变和凋亡改变^[23]。β-谷甾醇是中药里常见的天然甾醇,有报道称某些主要成分为β-谷甾醇的中药如球兰在临床上治疗上呼吸道感染,急慢性支气管炎很有疗效^[24]。(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸盐与表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)类似,EGCG已被证明能改善COPD大鼠的肺损伤,其作用机制可能是降低肺组织促炎因子含量、抑制丙二醛(MDA)和Smad3的磷酸化^[25]。

通过PPI网络图可得,潜在治疗靶点有14个,其中作用较多的关键靶点有7个,分别是KDR, TGF-β₁, CAV1, HIF-1α, IL-2。KDR是血管内皮生长因子(VEGF)的受体2(VEGFR2),在COPD大鼠发病过程中往往出现气道重塑和血管新生的情况,肺组织的KDR表达水平也远远高于正常大鼠,给药后

KDR的表达则受到不同程度的抑制,证明其在COPD的发生发展中占据重要地位^[26]。TGF- β_1 是促炎因子的一种,高表达时会引发气道炎症,在COPD大鼠发病过程中,高度表达的TGF- β_1 通过介导Smads信号通路使大鼠支气管上皮细胞中的SLPI明显下调,促进COPD的发展^[27]。CAV1主要负责细胞质膜上转运微囊结构的功能,有研究表明COPD患者体内CAV1表达水平降低,可能会导致体内Th17/调节性T细胞(Treg)细胞失衡,从而破坏患者体内的炎症免疫反应^[28],机体免疫应答下降,加重病情发展。COPD在发病过程中往往伴随着低氧血症,HIF-1 α 正是机体低氧条件下的调控因子之一,低氧环境下COPD患者肺组织血管壁上的HIF-1 α 表达增加,可能是低氧条件影响了PHDs活性、从而抑制HIF-1 α 蛋白降解使得COPD继续发生发展^[29]。IL-2是人体内最常见的一种白细胞介素,研究表明COPD患者血清IL-2水平正常健康人群。COPD造成的机体损伤引起的免疫抑制,削弱了免疫细胞的活性,降低了对IL-2的分泌,IL-2的缺少又使机体免疫应答缺少了关键一环,病情反复恶化^[30]。

GO富集分析所得主要条目显示清咳平喘颗粒治疗AACB-COPD的过程中推测其主要与细胞质内的调控因子的合成与转运有关,涉及的细胞组成也多数为细胞质、管腔、内体等运输结构有关,合成释放后的细胞因子在人体内参与控制细胞增殖凋亡等功能来改善病情。KEGG路富集分析结果主要涉及癌症中的蛋白多糖,HIF-1信号通路以及Th17细胞分化。COPD与肺癌肺部疾病,死亡率高。关于蛋白多糖方面,COPD与肺癌患者血浆免疫球蛋白G(IgG)半乳糖化水平明显降低,唾液酸含量增加,N-糖链结构更加复杂,且显示出二者患者蛋白质的糖基化模式相似^[31]。COPD是一种炎症性疾病,在炎性介质的浸润过程中,细胞损伤的修复致癌性更大,COPD或许更能增加癌症的发生^[32]。HIF-1信号通路是人体在低氧条件下维持氧平衡的关键通路。HIF-1的活性是通过缺氧或其他生长因子刺激以及Ca²⁺信号转导而诱导的^[33]。另有研究显示COPD患者HIF-1信号通路被激活,相关蛋白如HIF-1 α ,VEGF和VEGFR2的高度表达与肺功能的下降密切相关,其中HIF-1 α 的表达与VEGF和VEGFR2的表达呈正相关^[34]。Th17细胞是一种免疫细胞亚群,主要效应因子是IL-17,他可以能够促进多种细胞释放炎症因子,促使气道黏液腺分泌大量黏液,形成炎性浸润,导致持续存在的慢性气道

炎症。COPD患者外周血中Th17/Treg细胞失衡,血清中IL-17表达明显增高,Th17细胞增多,Treg细胞明显减少^[35]。实验验证也证实,KDR,TGF- β_1 及TIMP-1确实为网络药理学分析所得的关键靶点,其他靶点如MMP-9,LTD4,ET-1也会调控大鼠COPD过程。

5 结论

综上所述,本研究通过网络药理学的方法,共获得清咳平喘颗粒165个活性成分,374个相关靶点,AACB-COPD相关靶点512个,药物疾病共同靶点165个,核心治疗靶点14个。通过对潜在核心靶点进行分析,推测清咳平喘颗粒可能是通过调节KDR,TGF- β_1 ,TIMP-1,CAV1,HIF-1 α ,IL-2等靶点,影响癌症中的蛋白多糖,HIF-1信号通路以及Th17细胞分化等通路来改善病情。上述数据的发现体现了清咳平喘颗粒多成分,多靶点,多通路的治疗特点,为之后的研究提供理论依据,但具体机制的探索还需后续相关实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 郝伟欣. 慢性阻塞性肺疾病[J]. 中国全科医学, 2006,14(3):172-174.
- [2] 蔡柏蔷,陈荣昌. 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治中国专家共识(2017年更新版)[J]. 国际呼吸杂志,2017,37(14):1041-1057.
- [3] BARNES P J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(13):1541-1558.
- [4] 黄纯美,刘小虹. 中药治疗慢性阻塞性肺疾病作用机制研究进展[J]. 陕西中医,2008,29(8):1098-1101.
- [5] VITENBERGA Z, PILMANE M, BABJONIŠEVA A. An insight into COPD Morphopathogenesis: Chronic Inflammation, Remodeling, and Antimicrobial Defense[J]. Medicina (Kaunas), 2019,55(8):496.
- [6] 闫璐琦,刘媛,吕霞,等. 清咳平喘颗粒治疗急性支气管炎临床观察[J]. 医学信息,2013,26(3):362.
- [7] 吴细丹,汪丙柱,桑雅清. 清咳平喘颗粒辅助治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热壅肺证疗效观察[J]. 新中医,2014,46(11):62-64.
- [8] 单建聪,吴彩芬,傅秀娥,等. 清咳平喘颗粒治疗儿童急性支气管炎疗效观察[J]. 大家健康:学术版,2016,10(6):151.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014,6(1):13.

- [10] 任婧,孟祥龙. 基于网络药理学的人参白虎汤治疗糖尿病药效机制研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(3):434-441.
- [11] 傅慧婷,平键,吴冬梅,等. 泽漆化痰方对慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌模型大鼠肺组织EGFR信号通路相关蛋白表达的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(9):802-807.
- [12] 姜友军,张培蓓,叶贤伟. 慢性阻塞性肺疾病鼠类动物模型研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(7): 1350-1357.
- [13] 高娟,王添印,韩茹,等. MMP-9、TIMP-1在肺纤维化中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(26): 104-106.
- [14] 李芳,王文林. MMP-9和TIMP-1及其在肺纤维化中的作用[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(12): 935-938.
- [15] 付义,陈冰,杨春艳,等. 七龙天对实验性肺动脉高压大鼠ET-1、LTC4的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(11):66-68.
- [16] 程越,邱志新,李为民. 慢性支气管炎发病机制研究进展[J]. 华西医学, 2017, 32(4):606-611.
- [17] 丁明静,徐桂华,高笑宇,等. 慢性阻塞性肺疾病发病机制研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(22):118,123.
- [18] 张辉,张念志,高小杰. 慢性支气管炎中医药研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(1):156-158.
- [19] 林照权,李昌炳,龚年金. 应用中医药治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期虚证研究进展[J]. 中外医学研究, 2020, 18(18):186-188.
- [20] 魏萍,陈志斌,王春娥,等. 槲皮素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(21):2570-2575.
- [21] 于夏,唐滋贵. 槲皮素的研究进展[J]. 河南职工医学院学报, 2011, 23(3):391-392.
- [22] GONG J H, SHIN D, HAN SY, et al. Blockade of airway inflammation by kaempferol via disturbing Tyk-STAT signaling in airway epithelial cells and in asthmatic mice [J]. Evid-Based Compl Alt, 2013, 2013:250725.
- [23] LIU B Y, YU H X, BAIYUN R Q, et al. Protective effects of dietary luteolin against mercuric chloride-induced lung injury in mice: Involvement of AKT/Nrf2 and NF- κ B pathways [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 113:296-302.
- [24] 魏金婷,刘文奇. 植物药活性成分 β -谷甾醇研究概况[J]. 莆田学院学报, 2007, 14(2):38-40,46.
- [25] 周进,黄文涛,代能捷,等. EGCG调控miR-133a/b-3p和TGF- β 1/Smad3抗慢性阻塞性肺疾病的作用研究[J]. 中药材, 2018, 41(2):437-441.
- [26] 王璐,陈芳,徐志波,等. 保肺定喘汤对COPD大鼠气道重塑中VEGF及受体R1、R2的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10):3647-3650.
- [27] 牛瑞超. TGF- β 1/Smads通路调控COPD发病过程中气道上皮细胞分泌SLPI的作用机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2008.
- [28] 孙妮娜. Cav-1与Th17、Treg细胞及其细胞因子在慢性阻塞性肺病中的相关性研究[D]. 青岛:青岛大学, 2017.
- [29] 潘坤,戴爱国,张泽明,等. OS-9、HIF1 α 在慢性阻塞性肺病患者中的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(19):4830-4831.
- [30] 林志强. COPD患者血清IL-2变化及其临床意义[J]. 医学信息:中旬刊, 2011, 24(5):1985.
- [31] ANDRAS K, BALAZS R, GABOR J, et al. Glycoprotein biomarkers and analysis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer with special focus on serum immunoglobulin G [J]. Clinica Chimica Acta, 2020, 506:204-213.
- [32] 任成山,白莉,钱桂生. 慢性阻塞性肺疾病合并肺癌临床特征及新理念[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版, 2015, 8(2):137-142.
- [33] SEMENZA G L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24:97-106.
- [34] FU X, ZHANG F. Role of the HIF-1 signaling pathway in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6):4553-4561.
- [35] 周金花,王伟,刘瑞娟. Treg/Th17在慢性阻塞性肺疾病合并肺癌中的相关研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(12):794-797.

[责任编辑 顾雪竹]