

基于网络药理学和分子对接探讨升陷汤治疗重症肌无力的作用机制

张艺缤¹, 王百通², 吕志国², 徐鹏², 张冬梅², 李巧莹², 张影², 卢靖², 蒋荔¹,
卢琦³, 王健^{2*}

(1. 长春中医药大学 中学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院, 长春 130021;
3. 长春中医药大学附属第三临床医院, 长春 130117)

[摘要] 目的:通过计算机网络药理学及分子对接技术,预测升陷汤治疗重症肌无力的药效基础和核心靶点并通过动物实验进一步验证已明确其作用机制。方法:通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库筛选升陷汤的活性成分和潜在靶点,利用GeneCards等数据库筛选疾病相关的靶点;将药物与疾病靶点互相映射取交集;结合STRING数据库和Cytoscape 3.8.2对交集靶点分别进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析、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;运用Cytoscape 3.8.2软件构建疾病-中药活性成分-靶点网络图;运用AutoDock和PyMOL软件对中药的关键活性成分与Hub gene进行分子对接验证,最后采用R α 97-116肽段主动免疫造模法,成功构建实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠模型后将分子对接验证得到的核心靶点进行动物实验验证。结果:共获得655个疾病靶点,118个药物活性成分,21个药物与疾病交集靶点,3个Hub gene;GO富集发现主要涉及活性氧代谢过程的调节、蛋白质转运的正调控、建立蛋白定位的正调控等生物功能;经过KEGG通路富集分析,其主要涉及Toll样受体信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、T细胞受体等信号通路等。分子对接结果显示槲皮素与Akt1结合能最低且稳定,并通过氨基酸残基LYS-30发生相互作用。蛋白免疫印迹法(Western blot)分析结果显示,升陷汤能显著抑制EAMG大鼠脾脏内磷酸化(p)-Akt蛋白的表达。结论:该研究初步揭示了升陷汤治疗MG的药理机制可能是主要化学成分通过调节关键核心蛋白Akt的表达,进而可能参与并影响PI3K/Akt等信号通路来实现的,为进一步深入研究奠定了理论基础及实验依据。

[关键词] 升陷汤;重症肌无力;网络药理学;分子对接;动物实验

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0142-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220411

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220121.1322.002.html>

[网络出版日期] 2022-1-21 15:35

Molecular Mechanism of Shengxiantang in Treating Myasthenia Gravis: Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

ZHANG Yi-bin¹, WANG Bai-tong², LYU Zhi-guo², XU Peng², ZHANG Dong-mei², LI Qiao-ying²,
ZHANG Ying², LU Jing², JIANG Li¹, LU Qi³, WANG Jian^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine,
Changchun 130117, China;

2. The Affiliated Hospital to Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China;

[收稿日期] 2021-11-04

[基金项目] 吉林省科技厅吉林省省级医药健康产业发展专项基金项目(20180311025YY);吉林省中医药管理局科技项目(2020017);吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20210978KJ);吉林省自然科学基金项目(20210101212JC);长春市科技发展计划项目(21ZY44)

[第一作者] 张艺缤,在读博士,从事中医药防治脑病和神经免疫疾病研究,E-mail:zhangyibin0926@163.com

[通信作者] *王健,博士生导师,教授,主任医师,从事中医药治疗中风病、重症肌无力等神经疾病临床循证研究,Tel:0431-86178018,
E-mail:jian-w222@163.com

3. The Third Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To predict the pharmacodynamic basis and core target of Shengxiantang in the treatment of myasthenia gravis (MG) by network pharmacology and molecular docking and to further verify the molecular mechanism through animal experiment. **Method:** The active components and potential targets of Shengxiantang were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the disease-related targets from GeneCards and other databases. Then the common targets of the decoction and the disease were screened out, followed by the construction of protein-protein interaction (PPI) network, and Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of the common targets based on STRING database and Cytoscape 3.8.2. Afterward, Cytoscape 3.8.2 was employed to construct the disease-active component-target network. AutoDock and PyMOL were used for molecular docking of key components and hub genes. Finally, we used the R α 97-116 peptide to induce experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) in rats and then verified the core target yielded in the docking with the model rats. **Result:** A total of 655 disease-related targets, 118 active components of the decoction, 21 common targets of the disease and the decoction, and 3 hub genes were screened out. The common targets were mainly involved in the GO terms of regulation of active oxygen metabolism, positive regulation of protein transport, and positive regulation of protein localization, and the KEGG pathways of toll-like receptor signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, and T cell receptor signaling pathway. The results of molecular docking showed that quercetin and Akt1 had the lowest and stable binding energy and interacted with each other through the amino acid residue LYS-30. Western blot demonstrated that Shengxiantang significantly inhibited the expression of p-Akt protein in the spleen of EAMG rats. **Conclusion:** The pharmacological mechanism of Shengxiantang in the treatment of MG may be that the main chemical components regulate the expression of the core protein Akt, and then may participate in and affect PI3K/Akt signaling pathways, laying a theoretical and experimental basis for further research.

[Keywords] Shengxiantang; myasthenia gravis; network pharmacology; molecular docking; animal experiment

重症肌无力(MG)是一种神经肌肉接头传递障碍的获得性自身免疫性疾病,病变部位在神经肌肉接头(NMJ)的突出后膜。致病性抗体包括常见的乙酰胆碱受体(AChR)抗体及不常见的肌肉特异性受体酪氨酸激酶(MuSK)抗体、低密度脂蛋白受体相关蛋白4(LRP4)抗体及兰尼碱受体(RyR)抗体等,这些抗体可阻断AChR的聚集、并破坏AChR的功能及神经肌肉接头间信号的传递。疲劳性、波动性的肌肉收缩无力为核心的临床症状,可累及眼、延髓、呼吸和四肢肌肉等全身骨骼肌,临床表现也因自身抗体类型和是否存在胸腺瘤而异^[1]。重症肌无力全球患病率为(150~250)/百万,我国重症肌无力发病率约为0.68/10万,女性略高于男性。全身骨骼肌均可受累,症状呈“晨轻暮重”,活动后加重、休息后可减轻的特点^[2]。重症肌无力的治疗目前西医仍以胆碱酯酶抑制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂、静

脉注射免疫球蛋白、血浆置换为主。中药对重症肌无力治疗有独特的优势,提高临床疗效同时减轻西药用量及副作用、改善机体免疫平衡^[3]。

升陷汤出自民国名医张锡纯的《医学衷中参西录》,用于治疗“气短不足以息,或努力呼吸,有似乎喘。或气息将停,危在顷刻”的大气下陷证,法以益气升提,以补中益气汤化裁,方有黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗^[4]。有研究表明升陷汤可以提高自身免疫力。《中医内科临床诊疗指南》中提出重症肌无力危象期属中医大气下陷证候,用升陷汤治疗^[5]。国医大师邓铁涛^[6]、王健教授^[7]等临床实践表明重症肌无力属脾胃虚损、元气虚脱证候范围,用升陷汤治疗疗效显著。虽然该方剂在临床上被各医家广泛地应用,但是对该方剂作用疾病的分子基础和作用机制尚不完全清楚,目前缺乏更加系统、深入地研究。网络药理学是近年来的新兴学科,是基于系

统生物学、多向药理学及蛋白组学,通过高通量组学数据分析和网络数据库的检索,基于“疾病-基因-靶点-药物”互作网络,通过分析整个网络以阐释药物的药理作用和疾病的发病机制,揭示多分子药物对疾病网络的干预与影响^[8-9]。不仅体现了中药复方多成分、多靶点的作用机制特点,也同中医的整体观及辨证论治的原则相符^[10]。本研究运用网络药理学联合分子对接技术,分析升陷汤的有效成分,预测升陷汤治疗重症肌无力的作用靶点及信号通路,并结合实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠动物模型的实验验证,进一步探讨升陷汤治疗重症肌无力的分子机制,并明确相关作用关键靶点,同时也为临床新药的研发提供基础理论依据。

1 资料与方法

1.1 中药成分及靶点搜集 通过中药系统药理学数据库与分析平台^[11](TCMSP, <https://tcmssp.com/tcmsspsearch.php>)检索黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗所含活性成分,根据毒物动力学(ADME)原则设定口服生物利用度(OB)≥30、类药性(DL)≥0.18两个筛选条件,初步筛选出5味中药的潜在活性成分,利用得到的活性成分在该数据库中捕获对应靶点,并在UniProt数据库^[12](<https://www.uniprot.org/>)中利用UniProtKB搜索功能(以“Homo sapiens”和“Reviewed”为筛选条件,将所获得的蛋白名转换为对应基因名,整理得到黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗有效成分的所有靶点。利用Cytoscape 3.8.2软件构建中药有效成分-靶点网络^[13]。

1.2 重症肌无力相关靶点的筛选 以“myasthenia gravis”为关键词,分别输入GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)^[14]、DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)^[15]、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)^[16]和TTD数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)^[17]、PharmGKB数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)^[18],取交集并删除重复靶点,获取疾病靶点,输入到UniProt数据库中,得到对应基因名,最后得到所有重症肌无力疾病相关靶点。

1.3 疾病-中药活性成分-交集靶点网络构建 为了确定5味中药有效成分作用于重症肌无力的对应靶标,通过Perl语言分析得到重症肌无力靶点与黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗有效成分对应靶点的交集靶点,并绘制韦恩图;再将这些中药的有效化合物和相互作用的交集靶点数据导入Cytoscape 3.8.2软件

构建“疾病-中药活性成分-交集靶点”网络并进行拓扑分析,以探索黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗活性成分的药理作用机制。

1.4 构建核心靶点网络 将上述得到的交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>)^[19],选择“multiple proteins”,属性限定“Homo sapiens”,并隐藏游离节点,其他参数保持默认值,获取交集靶点相互作用网络,同时设置medium confidence>0.4的数据来保证本分析的可靠性。下载蛋白质-蛋白质tsv格式文件,将所筛选的蛋白节点建立对应关系并整理在Excel表格里,利用Cytoscape 3.8.2软件进行可视化,用Cytohubba插件筛选核心靶点,并以度值为标准构建蛋白互作网络。

1.5 基因本体(GO)富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将交集靶点导入Hiplot数据库(<https://hiplot.com.cn/>),物种为“Homo sapiens”,设定阈值 $P<0.01$,进行GO富集分析和KEGG通路富集分析。选取前30个条目,绘制成气泡图和条形图,得到升陷汤治疗重症肌无力所参与的生物学过程(BP)、分子功能(MF)、细胞成分(CC)及主要信号通路。

1.6 关键活性成分与核心靶点的分子对接验证

基于以上研究结果,运用Network Analyzer插件进行网络拓扑结构分析,度值越大的节点在网络中的重要性越大,选取节点度值前3位且靶点数目最多的活性成分作为配体,用Cytohubba插件筛选核心关键基因作为受体,二者进行分子对接,在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载活性成分的3D结构,在PDB数据库(<http://www1.rcsb.org/>)获取靶点的蛋白3D结构,利用AutoDockTools1.5.6、AutoDock Vina及PyMOL软件进行分子结构处理和分子对接。

1.7 实验验证

1.7.1 动物 60只雌性SPF级Lewis大鼠,体质量160~180 g,周龄6~8周,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于长春中医药大学动物实验中心SPF级屏障实验室,自由食水,室内保持(21±2)°C,相对湿度50%~60%,昼夜明暗交替12 h。实验过程经长春中医药大学实验动物伦理委员会审查通过。

1.7.2 试剂与仪器 醋酸泼尼松片(上海上药信谊药厂有限公司,批号H31020675);升陷汤所需配方颗粒(生黄芪18 g、知母9 g、柴胡5 g、桔梗5 g、升麻3 g,批号20210823)由长春中医药大学附属医院药

学中心提供;大鼠来源的 AchR α 亚基 97-116 肽段(中国苏州强耀生物科技有限公司);完全福氏佐剂(CFA)、不完全福氏佐剂(IFA)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 F5881、F5506);肺结核菌 H37RA 干粉(美国 Difco Bacto 公司,批号 231141);大鼠抗乙酰胆碱脂酶受体抗体(AchR-Ab)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(酶免公司,货号 MM-70967R1);磷酸盐缓冲液(PBS,赛默飞公司,货号 003002);磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)抗体(美国 Abcam 公司,货号 ab38449);蛋白激酶 B(Akt)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 4691);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体(Proteintech 公司,货号 10494-1-AP);二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(美国 Abcam 公司,货号 ab150077);RIPA 裂解液(强)、蛋白预染 Marker、BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天公司,货号分别为 P0013B、P0068、P0010S)。

1.7.3 实验性 EAMG 大鼠模型制备及分组 从 60 只 Lewis 雌性大鼠中,随机选取 8 只作为佐剂组,剩余 52 只参考 BAGGI 等^[20]方法采用主动免疫法建立 EAMG 大鼠模型,每只大鼠注射混合乳剂 200 μ L,将 R α 97-116 肽段干粉和结核分枝杆菌 H37RA 粉加入到 PBS 中,每 200 μ L PBS 中含有 R α 97-116 干粉 50 μ g、H37RA 干粉 1 mg,在冰盒上进行超声溶解,使多肽和干粉充分融于 PBS 直至溶液浑浊。溶解后液体抽取到 1 mL 注射器里,另一支注射器抽取 CFA 200 μ L,医用软管将 2 个注射器连接,将含义肽段和菌粉的 PBS 和 CFA 混合,防止蛋白变性,整个过程在冰上进行,反复来回抽吸 2 只注射器,直到出现乳白色液体,并且乳剂不溶解、不扩散,保持球状长时间浮于水面上,则造模药配制成功。配备好的造模抗原乳剂每只鼠皮下注射于尾基部、双后肢足垫和背部两侧共 5 个点位。将 CFA 与 PBS 的混合乳剂等量注射给佐剂组;首次免疫当天记为第 0 天,于第 30 天、第 45 天各给予 1 次加强免疫,免疫乳剂的配制、注射剂量、注射位点和注射方法与首次免疫相同,只将 CFA 换为 IFA。佐剂组注射 IFA 与 PBS 混合乳剂,注射剂量、注射位点和注射方法与首次免疫相同。第 60 天评估模型,以体质量变化、Lennon 临床症状分级法^[21]及大鼠尾静脉外周血清 AChR-Ab 水平变化评估模型成功与否。并将符合 EAMG 标准 Lewis 大鼠随机分为模型组、升陷汤低剂量组、升陷汤中剂量组、升陷汤高剂量组和醋酸泼尼松片组各 8 只。

1.7.4 灌胃给药及取材 给药剂量参考《药理实验方法学》中关于人与动物体表面积折算等效比值表(大鼠比表面积/人体比表面积=6.6)进行折算,大鼠每公斤体质量生药量 27 g 左右。升陷汤中药配方颗粒高剂量组 58.5 g、升陷汤中剂量组 29.25 g、升陷汤低剂量组 14.63 g,分别加纯水溶解并定容至 100 mL,20 mL \cdot kg⁻¹;醋酸泼尼松片组 5.4 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹;佐剂组予与治疗等体积的生理盐水。每日 1 次灌胃,连续 20 d 后处理大鼠并取大鼠脾脏组织后快速冷冻于液氮中,并储存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.7.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 将取出的脾脏组织剪碎后放入 RIPA 裂解液中,在冰上裂解 30 min,12 000 r \cdot min⁻¹,4 $^{\circ}$ C 离心(离心半径 21 cm)10 min,取上清,BCA 法测蛋白浓度,将样本蛋白浓度调整相同,用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质样品,然后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,转膜结束用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,孵育 Akt、p-Akt 一抗(1:500)及二抗。使用化学发光成像系统对转移的蛋白条带进行曝光显影,光密度定量分析,采集图像。

1.7.6 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 中药有效活性成分及靶点筛选 通过上述筛选条件检索 TCMSP 数据库,同时去除未找到相关作用靶点的化合物,共获得 138 个有效活性成分,去除重复最终得到 76 个活性成分,其中黄芪 20 个、知母 15 个、柴胡 17 个、升麻 17 个、桔梗 7 个,见表 1。通过 UniProt 数据库转换得到 517 个作用靶点,去重整理后得到 118 个靶点。

2.2 重症肌无力疾病相关靶点筛选 从 GeneCards、DrugBank、OMIM、TTD 和 PharmGKB 数据库中以“myasthenia gravis”为关键词查找重症肌无力相关的所有靶点,经筛选后共获得 655 个重症肌无力相关的靶点,见增强出版附加材料。

2.3 疾病-中药活性成分-交集靶点网络构建 基于 Perl 语言分析升陷汤中药活性成分靶点与重症肌无力疾病对应靶点,得到交集靶点蛋白共 21 个,认为这些蛋白质是升陷汤治疗重症肌无力的相关靶点。通过 Cytoscape 3.8.2 构建疾病-中药活性成分-交集靶点网络,网络中共有 90 个节点和 331 条边。度值表示与该点连接的边的数量,度值越大,表示该节点与其他节点作用越广泛。绿色菱形代表疾病,蓝

表1 升陷汤中药活性成分情况

Table 1 Potential active ingredients of Shengxiantang

Mol ID	OB/%	DL	来源 中药	Mol ID	OB/%	DL	来源 中药
MOL000379	36.74	0.92	黄芪	MOL004653	46.06	0.66	柴胡
MOL000033	36.23	0.78	黄芪	MOL013187	57.13	0.64	柴胡
MOL000211	55.38	0.78	黄芪	MOL004702	30.50	0.63	柴胡
MOL000296	36.91	0.75	黄芪	MOL004598	31.97	0.59	柴胡
MOL000433	68.96	0.71	黄芪	MOL004624	47.72	0.53	柴胡
MOL000374	41.72	0.69	黄芪	MOL004609	48.96	0.41	柴胡
MOL000387	31.10	0.67	黄芪	MOL000490	30.05	0.31	柴胡
MOL000439	49.28	0.62	黄芪	MOL000354	49.60	0.31	柴胡
MOL000442	39.05	0.48	黄芪	MOL004648	31.60	0.28	柴胡
MOL000371	53.74	0.48	黄芪	MOL004628	47.82	0.28	柴胡
MOL000380	64.26	0.42	黄芪	MOL000098	46.43	0.28	柴胡
MOL000354	49.60	0.31	黄芪	MOL000422	41.88	0.24	柴胡
MOL000378	74.69	0.30	黄芪	MOL004644	79.91	0.23	柴胡
MOL000398	109.99	0.30	黄芪	MOL001645	42.10	0.20	柴胡
MOL000239	50.83	0.29	黄芪	MOL012040	31.31	0.84	升麻
MOL000098	46.43	0.28	黄芪	MOL001924	53.87	0.79	升麻
MOL000438	67.67	0.26	黄芪	MOL012081	40.10	0.76	升麻
MOL000417	47.75	0.24	黄芪	MOL000449	43.83	0.76	升麻
MOL000422	41.88	0.24	黄芪	MOL000359	36.91	0.75	升麻
MOL000392	69.67	0.21	黄芪	MOL012055	33.84	0.74	升麻
MOL004514	35.26	0.87	知母	MOL012053	83.02	0.45	升麻
MOL004540	35.50	0.87	知母	MOL011999	31.31	0.42	升麻
MOL004542	30.67	0.86	知母	MOL012023	36.79	0.40	升麻
MOL003773	36.16	0.84	知母	MOL012062	37.19	0.40	升麻
MOL000546	80.88	0.81	知母	MOL001925	68.18	0.40	升麻
MOL004489	60.06	0.79	知母	MOL011991	47.64	0.35	升麻
MOL000449	43.83	0.76	知母	MOL012052	102.67	0.34	升麻
MOL004497	51.65	0.62	知母	MOL012011	30.04	0.32	升麻
MOL004528	41.58	0.61	知母	MOL000483	118.35	0.26	升麻
MOL004492	38.72	0.58	知母	MOL012073	30.19	0.24	升麻
MOL001677	58.02	0.52	知母	MOL012078	50.01	0.23	升麻
MOL004373	45.41	0.44	知母	MOL004355	42.98	0.76	桔梗
MOL000483	118.35	0.26	知母	MOL006070	39.84	0.71	桔梗
MOL000422	41.88	0.24	知母	MOL004580	66.44	0.27	桔梗
MOL000631	112.90	0.20	知母	MOL006026	39.21	0.25	桔梗
MOL004718	42.98	0.76	柴胡	MOL005996	45.15	0.25	桔梗
MOL000449	43.83	0.76	柴胡	MOL000006	36.16	0.25	桔梗
MOL002776	40.12	0.75	柴胡	MOL001689	34.97	0.24	桔梗

色长方形代表靶基因节点,红色椭圆形代表5种中药,各活性成分在其周围呈圆形排列。进一步的拓

扑学分析(依据网络节点的度值和 Betwennes Centrality 大小)显示,该网络中的关键化学成分为薯蓣皂苷(diosgenin, MOL000546)、槲皮素(querctin, MOL000098)、木犀草素(luteolin, MOL000006)等。该疾病-活性成分-靶点网络具有成分复杂、靶点多、成分与靶点相互作用密切等特点,形成了升陷汤治疗重症肌无力的复杂网络。见增强出版附加材料。

2.4 升陷汤治疗重症肌无力 PPI 网络的构建及核心靶点的筛选 为了更好地解释升陷汤作用于重症肌无力相关的机制,笔者对其 21 个交集靶点进行了进一步评估,以分析它们之间的关系。将 21 个交集靶点导入 STRING 数据库,获得蛋白互作信息,利用 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化处理。交集靶点网络共有 21 个节点,44 条边。节点代表中药有效成分治疗重症肌无力的靶点,靶点间的相互度值越大则其颜色越深,表明该节点越重要。进一步利用 Cytohubba 和 MCODE 插件筛选核心靶点,取 7 种算法的交集基因,获得最终的核心靶点 Akt1、ESR1、TP53,说明升陷汤可能通过这些蛋白发挥重症肌无力的治疗作用。见增强出版附加材料。

2.5 GO 富集分析 将 21 个交集靶点输入 Hplot 在线数据库,设置 $P_{\text{value}} < 0.01$, $Q_{\text{value}} < 0.05$,进行 GO 富集分析得到的前 10 个条目绘制气泡图,共得到 68 个 BP、20 个 MF 和 14 个 CC。经系统分析,发现升陷汤治疗重症肌无力的生物过程中位于前列的有蛋白质运输的正调控、蛋白质定位的正调节、上皮细胞增殖、DNA 结合转录因子活性的调节、抗氧化反应、活性氧代谢过程的调节、细胞的氧化应激反应及细胞的化学应激反应等过程。其分子功能中位于前列的有细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性、信号受体激动剂的活性、生长因子受体结合磷酸酶结合和 G 蛋白偶联胺受体活性等。其细胞组成中位于前列的有膜筏、膜微结构域、突触膜、突触前膜等。见增强出版附加材料。

2.6 KEGG 信号通路富集分析 通过 Hplot 在线数据库对 21 个交集靶点进行 KEGG 信号通路富集分析,结果显示其主要富集于 76 条信号通路($P < 0.01$),前 20 条通路绘制条形图,见增强出版附加材料。与重症肌无力息息相关的信号通路主要包括 Toll 样受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 信号通路、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、T 细胞受体等信号通路等。

2.7 分子对接技术预测中药活性成分与潜在靶点的结合能力 根据“疾病-中药活性成分-交集靶点”网络分析得到前3个核心活性成分薯蓣皂苷、槲皮素、木犀草素与CytosHubba及MCOE插件筛选的前3个核心靶点Akt1、TP53和ESR1进行结合能力预测。一般认为,当小分子受体与配体结合构像越稳定时,其能量越低产生的相互作用型越大^[15],根据对接得分可知,Akt1与槲皮素的结合性最强,能量得分最低,见表2。二者通过氨基酸残基LYS-30发生H键作用,见增强出版附加材料。

表2 3个分子靶点分子对接结合能

Table 2 Molecular docking of 3 target

核心靶点	PDB ID	化合物名称	结合能/kJ·mol ⁻¹
Akt1	P31749	薯蓣皂苷	-8.80
		槲皮素	-9.31
		木犀草素	-3.19
TP53	P04637	薯蓣皂苷	-6.4
		槲皮素	-2.11
		木犀草素	-2.98
ESR1	P03372	薯蓣皂苷	-6.89
		槲皮素	-2.16
		木犀草素	-2.04

2.8 造模期间大鼠外周血清AChR-Ab水平变化

造模期间(给药前),采用ELISA检测大鼠尾静脉外周血清中AChR-Ab的含量,EAMG模型组大鼠血清中AChR-Ab含量明显高于佐剂组[佐剂组(42.931±2.966) pmol·L⁻¹, EAMG组(48.497±5.256) pmol·L⁻¹, P=0.003]。

2.9 升陷汤对大鼠脾脏Akt蛋白表达水平的影响

采用Western blot检测治疗结束后各组大鼠脾脏组织中Akt蛋白及磷酸化的表达,见表3。与佐剂组比较,EAMG模型组大鼠p-Akt蛋白表达明显升高(P<0.05),与EAMG模型组比较,升陷汤低、中、高剂量组和醋酸泼尼松组p-Akt蛋白表达均明显降低(P<0.05)。见图1。

3 讨论

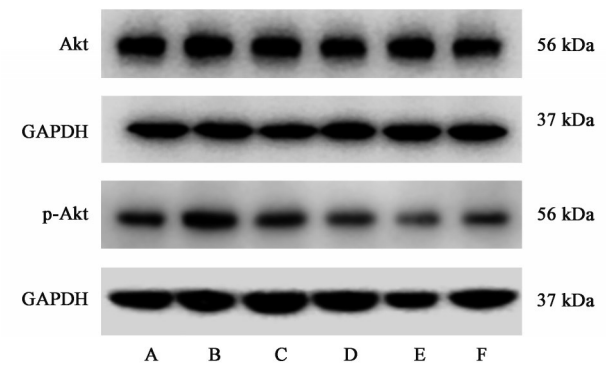
重症肌无力在现代医学中属于神经系统自身免疫性疾病,病情复杂,缠绵难愈,属于难治性疾病,国家卫生健康委员会在内联合5部门制定的《第一批罕见病目录》中纳入该病。在中医学中其属痿证,《黄帝内经·素问·痿论》中有“痿躄”“脉痿”“筋痿”“肉痿”“骨痿”的论述。根据本病的临床表现和疾病的不同阶段,可属中医不同的病证,如“睑

表3 升陷汤对大鼠脾脏p-Akt蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Protein expression of p-Akt in rats of spleen tissue($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	p-Akt/Akt
佐剂组		0.312±0.017
EAMG模型组		0.767±0.016 ¹⁾
升陷汤低剂量组	1.463 g·L ⁻¹	0.657±0.014 ¹⁾
升陷汤中剂量组	2.925 g·L ⁻¹	0.607±0.018 ¹⁾
升陷汤高剂量组	5.85 g·L ⁻¹	0.506±0.007 ¹⁾
醋酸泼尼松组	5.4 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	0.484±0.014 ¹⁾

注:与佐剂组比较¹⁾P<0.05



注:A. 佐剂组;B. EAMG模型组;C. 升陷汤低剂量组;D. 升陷汤中剂量组;E. 升陷汤高剂量组;F. 醋酸泼尼松组

图1 各组大鼠脾脏p-Akt蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression level of p-Akt analyzed by Western blot

废”“上胞下垂”“视歧”“大气下陷”等病证。近代医家张锡纯在《黄帝内经》宗气理论上,结合自己的临床实践,在《医学衷中参西录》中明确指出,大气即宗气,并首次提出“大气下陷”一词,并创制了治疗大气下陷证的代表方升陷汤。研究者在重症肌无力的临床治疗中发现,重症肌无力主要是由于脾气亏虚,虚极下陷,不输精微而导致,以升陷汤为主方随证加减则颇有良效,不仅能缓解症状,减慢疾病进展,而且无不良反应,同时也为广大肌无力患者漫长的病程中减轻经济负担^[22]。方中以黄芪为君,黄芪补气的同是又生气,此药性甘温,故用知母之清凉降润以制之,一升一降,谓之妙也,柴胡入肝经为少阳的引经药,升举少阳之气,能引大气下陷者自左上升;升麻升举力强,升阳明之气,为阳明的引经药,能引大气下陷者自右上升,与“治痿独取阳明”同法;桔梗为舟楫为使药,轻清上行,能载诸药之力上达于胸,诸药共奏益气升提,升阳举陷之功以治重症肌无力大气下陷证^[23]。

网络药理学以系统生物学理论为基础,集药理学、高通量测序、基因组学等多种技术于一体,强调

信号通路的多通道调控^[24]。本研究从网络药理学的角度寻找升陷汤治疗重症肌无力的作用机制及潜在的治疗靶点。依托TCMSP数据平台根据毒物动力学筛选出了升陷汤中5味中药(黄芪、知母、柴胡、升麻、桔梗)的76种有效成分,118个作用靶点;检索得到重症肌无力疾病靶点655个;经分析获得21个交集靶点基因,76条信号通路。同时构建了疾病-有效成分-交集靶点网络,分析了有效成分与靶点、靶点与疾病之间的相互作用关系,为升陷汤“多成分-多靶点-多通路”的治疗机制提供了参考依据。

有效成分-交集靶点网络显示,薯蓣皂苷、槲皮素、木犀草素、豆甾醇匹配的靶点较多,为升陷汤发挥治疗重症肌无力作用的核心化合物和重要物质基础。研究表明,豆甾醇、槲皮素、薯蓣皂苷、木犀草素均具抗炎,抗氧化,免疫调节和神经保护作用^[25-28]。豆甾醇通过选择性抑制Akt/mTOR信号通路促进树突状突起的生长和突触发生,抑制乙酰胆碱酯酶活性,有效改善神经退行性疾病的神经损伤^[29]。槲皮素的药理作用广泛,具有抗炎、抗病毒、抗菌、免疫调节等作用,可显著上调T辅助(Th)1中干扰素- γ (IFN- γ)和下调Th2中白细胞介素-4(IL-4)的表达,进而调节免疫功能^[26,30]。薯蓣皂苷能有效抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的基因表达改善免疫功能^[31]。木犀草素具有抗肿瘤、抗炎、脑血管保护等作用,其有关机制涉及PI3K/Akt、MAPK等信号通路的调节以及相关细胞因子和激酶的表达等^[32]。表明升陷汤中的中药可能通过抗炎、免疫调节、神经功能保护等作用治疗重症肌无力。

通过CytosHubba及MCODE插件对PPI网络中交集靶点筛选得到的核心靶点有Akt1、TP53、ESR1,预测它们可能是升陷汤治疗重症肌无力的主要靶标。研究报道Akt1可增强CD8⁺T细胞的分化,改善CD8⁺T细胞的增殖,抑制DCs的过度激活,从而达到调节免疫反应的作用^[33]。研究显示重症肌无力患者外周血清中Th1和Th17细胞及其相关细胞因子IL-1、IL-6、IL-17、IFN- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 表达数量增加^[34]。可通过抑制Akt/mTOR信号通路调节IL-6的表达去改善重症肌无力患者肌肉疲劳性无力的症状^[35]。ESR1是编码雌激素受体 α (ER)的基因,具有免疫调节的作用,ESR1可以调节VEGFA的含量水平^[36],研究表明血清AChR-Ab阳性的重症肌无力患者VEGFA水平显著升高,

这表明VEGFA可能参与了重症肌无力的发病^[37]。TP53是当前研究最广泛的肿瘤基因,TP53既可以是自噬的激活者,也可以是自噬的抑制剂,在营养耗尽或缺氧等应激条件下,TP53通过抑制mTOR信号通路促进自噬激活,从而抑制炎症反应^[38]。抑制TP53可增加IL-6的基因表达同时促进细胞的增殖分化^[39]。

根据KEGG通路富集分析结果可以看到,升陷汤主要通过调节Toll样受体(TLR)信号通路、PI3K/Akt信号通路、HIF-1信号通路、T细胞受体信号通路等信号通路来发挥治疗重症肌无力的作用。重症肌无力的发病与遗传、感染、免疫应答、药物等因素有关^[40]。TLR是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,目前已被证明参与多种自身免疫疾病,TLR介导的先天免疫反应失调在自身免疫中起关键作用,可促进B细胞异常活化,表达和分泌多种促炎症细胞因子,如TNF- α 、IL-12、IL-6等^[41]。研究显示在重症肌无力患者的PBMCs中存在TLR的异常表达,TLR9 mRNA的总表达水平与重症肌无力的临床严重程度呈显著正相关,提示TLR可能参与了重症肌无力的发病机制^[42]。已有研究表明,PI3K/Akt信号通路参与了细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运的调控,可调节T细胞的发育、稳定和功能^[43]。一项研究表明,PI3K/Akt特异性抑制剂可使重症肌无力患者PBMCs中Th1和Th17细胞显著上调,HIF-1 α 是糖酵解和PI3K/Akt/mTOR调控通路的连接点,HIF-1 α 激活GLUT1及关键糖酵解基因的表达为免疫细胞快速活化提供能量^[44]。这表明PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路可调节重症肌无力的免疫功能,但仍需要进一步的动物实验研究来阐明该通路与重症肌无力的发病关系。重症肌无力的发病机制涉及体液和细胞的双重免疫应答异常,与T淋巴细胞所释放的细胞因子的免疫调节密切相关,抗体的产生依赖CD4⁺T细胞,T细胞受体识别特异性抗原后CD4⁺T细胞分化为不同的Th细胞亚群,包括Th1、Th2、Th17, Th细胞和调节性T(Treg)细胞。实验研究表明^[45],升陷汤可升高EAMG模型大鼠血清CD4⁺T淋巴细胞含量,降低CD4⁺/CD8⁺的比例,进而抑制AChR-Ab的合成或促进其降解,起到治疗作用。研究结果涉及了T细胞受体信号通路,与网络药理学研究结果一致,一定程度上证明了网络药理学的科学性。因此,笔者预测上述信号通路是升陷汤治疗重症肌无力的关键信号通路。

为了验证升陷汤对重症肌无力治疗作用的药

效物质基础,运用分子对接技术选取预测靶点最多的活性成分薯蓣皂苷、槲皮素、木犀草素为配体,筛选出的核心靶点为受体,结果可见主要活性化合物均能与核心靶点通过氢键等作用稳定结合。其中槲皮素对接到Akt1的蛋白结构上的结合能最强,通过氨基酸残基 LYS-30 发生 H 键作用。为证实上述预测进行了动物实验,结果表明升陷汤可通过调节 Akt 蛋白含量表达,从而改善 EAMG 症状,说明升陷汤对重症肌无力治疗作用机制可能是通过调节 Akt 等靶点蛋白的变化。

综上所述,网络药理分析结果表明升陷汤主要通过薯蓣皂苷、槲皮素、木犀草素等多种活性成分作用于 Akt1、TP53、ESR1 等基因,调控多种生物学功能和多条信号通路起到治疗重症肌无力的作用,并运用分子对接和动物实验初步验证了升陷汤治疗重症肌无力作用机制是通过其药物的主要活性成分与潜在的核心靶点 Akt 发生相互作用而成,为深入研究升陷汤治疗重症肌无力的分子机制奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] ERIK N G, SOCRATES T, AMELIA E, et al. Myasthenia gravis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1):30.

[2] 中国免疫学会神经免疫分会. 中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020版)[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2021, 28(1):1-12.

[3] 况时祥,况耀黎,李艳. 中医药治疗重症肌无力的特色、优势和潜力[J]. *贵阳中医学院学报*, 2019, 41(1):32-35.

[4] 朱洁,程杨,许骏尧,等. 升陷汤对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠免疫机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3):717-720.

[5] 徐鹏,吕志国,王健,等. 重症肌无力中医循证性临床诊疗指南修订实践研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5):1979-1983.

[6] 张修铭. 邓铁涛诊治重症肌无力治未病思想及临床应用药相关规律[D]. 广州:广州中医药大学, 2019.

[7] 徐鹏,荣春书,王银萍,等. 王健教授治疗重症肌无力经验拾萃[J]. *环球中医药*, 2016, 9(3):318-319.

[8] 马堃,宫林娟,陈燕霞,等. 基于网络药理学和分子对接研究补肾促卵方治疗多囊卵巢综合征不孕的分子机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11):2650-2659.

[9] 陈健,陈启龙. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考[J]. *上海中医药大学学报*, 2021, 35(5):1-6, 13.

[10] 曲艺,但文超,刘金奎,等. 基于网络药理学的升陷汤治疗心力衰竭的作用机制研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(10):3583-3593.

[11] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6:13.

[12] CONSORTIUM U P. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:D71.

[13] SHANNON P. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498-2504.

[14] RAPPAPORT N, FISHILEVICH S, NUDEL R, et al. Rational confederation of genes and diseases: NGS interpretation via GeneCards, MalaCards and VarElect [J]. *Biomed Engineer Online*, 2017, 16(S1):72.

[15] WISHART D S, FEUNANG Y D, AN C G, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46:D1.

[16] AMBERGER J S, HAMOSH A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) : A knowledgebase of Human genes and genetic phenotypes [J]. John Wiley & Sons, Inc, 2017, doi: 10.1002/cpbi.

[17] YUNXIA W, SONG Z, FENGCHENG L, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (D1) : 1-11.

[18] HUDDART R, ALTMAN R B, KLEIN T E. PharmGKB summary: ondansetron and tropisetron pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2019, 29(4):91-97.

[19] DAMIAN S, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 49(D1):D605-D612.

[20] BAGGI F, ANNONI A, UBIALI F, et al. Breakdown of tolerance to a self-peptide of acetylcholine receptor alpha-subunit induces experimental myasthenia gravis in rats [J]. *J Immunol*, 2004, 172(4):2697-2703.

[21] LENNON V A, LINDSTROM J M, SEYBOLD M E. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs [J]. *J Experiment Med*, 1975, 141(6):1365-1375.

[22] 汪国晖,陶方泽,王安喜. 升陷汤的临床应用研究进

- 展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(17):203-210.
- [23] 林小林,唐林,陈宝贵. 从"升陷汤"浅析大气下陷[J]. 江西中医药,2021,52(4):13-16.
- [24] 张雨,李恒,李克宁,等. 复方中药网络药理学研究进展[J]. 中成药,2018,40(7):1584-1588.
- [25] HABIB M, HANNAN M A, DASH R, et al. The potential LXR β agonist stigmasterol protects against hypoxia/reoxygenation injury by modulating mitophagy in primary hippocampal neurons [J]. Phytomedicine,2020,81:153415.
- [26] YAO L, YAO J, HAN C, et al. Quercetin, inflammation and immunity[J]. Nutrients,2016,8(3):167.
- [27] JIANG Y H, LI X, NIU W, et al. β -Sitosterol regulated microRNAs in endothelial cells against an oxidized low-density lipoprotein[J]. Food Function, 2020, 11: 1881-1890.
- [28] PEI-CHUN, LIAO, MING-HOANG, et al. Identification of β -sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera* [J]. J Agricult Food Chem, 2018, 66(41): 10748-10759.
- [29] HAQUE M N, BHUIYAN M, MOON I S. Stigmasterol activates Cdc42-Arp2 and Erk1/2-Creb pathways to enrich glutamatergic synapses in cultures of brain neurons[J]. Nutrition Res, 2018, 56: 71-78.
- [30] 孙涓,余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2011(3):85-88.
- [31] CAI B, ZHANG Y, WANG Z, et al. Therapeutic potential of diosgenin and its major derivatives against neurological diseases: recent advances [J]. Oxidative Med Cellular Longevity, 2020, doi: 10.1155/2020/3153082.
- [32] HTW A, JLB H, YEL C, et al. Luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the Akt/mTOR signaling pathway-sciencedirect [J]. Phytomedicine, 2021,81:153437.
- [33] EID R A, FRIEDMAN K M, MKRTICHYAN M, et al. Akt1 and -2 inhibition diminishes terminal differentiation and enhances central memory CD8⁺ T-cell proliferation and survival [J]. Oncoimmunology, 2015,4(5):e1005448.
- [34] DANIKOWSKI K M, JAYARAMAN S, PRABHAKAR B S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis[J]. J Neuroinflammation, 2017,14(1):117-132.
- [35] MAURER M, BOUGOIN S, FEFERMAN T, et al. IL-6 and Akt are involved in muscular pathogenesis in myasthenia gravis [J]. Acta Neuropathol Commun, 2015,3(1):1-14.
- [36] FATIMA L A, CA MPELLO R S, SANTOS R, et al. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue[J]. Sci Rep,2017,7(1):16716.
- [37] UZAWA A, KAWAGUCHI N, HIMURO K, et al. Serum cytokine and chemokine profiles in patients with myasthenia gravis [J]. Clinic Experimental Immunol,2014,176(2):232-237.
- [38] SHIAO Y M, LEE C C, HSU Y H, et al. Ectopic and high CXCL13 chemokine expression in myasthenia gravis with thymic lymphoid hyperplasia [J]. J Neuroimmunol,2010,221(1/2):101-106.
- [39] SHOFFNER A, CIGLIOLA V, LEE N, et al. Tp53 Suppression promotes cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [J]. Cell Reports, 2020,32(9):108089.
- [40] GAVRILOV Y V, ALEKSEEVA T M, KREIS O A, et al. Depression in myasthenia gravis: A heterogeneous and intriguing entity [J]. J Neurol, 2020, 267 (10) : 1-10.
- [41] PAOLA C, CLAUDIA B, FULVIO B, et al. Toll-like receptors 7 and 9 in myasthenia gravis thymus: amplifiers of autoimmunity? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2018,1413(FEB):11-24.
- [42] WANG Y Z, YAN M, TIAN F F, et al. Possible involvement of toll-like receptors in the pathogenesis of myasthenia gravis[J]. Inflammation,2013,36(1):121-130.
- [43] ZHANG Z, GUO Y, CHEN M, et al. Kaempferol potentiates the sensitivity of pancreatic cancer cells to erlotinib via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway and epidermal growth factor receptor [J]. Inflammopharmacology,2021,28:1587-1601.
- [44] FENG F B, QIU H Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis [J]. Biomed Pharmacotherapy,2018,102:1209-1220. .
- [45] 许骏尧,朱洁,程杨,等. 升陷汤治疗实验性自身免疫性重症肌无力大鼠免疫机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(10):1462-1466.

[责任编辑 顾雪竹]