

# 基于网络药理学探讨百令胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制

崔冬梅<sup>1</sup>, 李卓航<sup>2</sup>, 祝盼盼<sup>2</sup>, 陶雪莹<sup>2</sup>, 戚明珠<sup>2</sup>, 苏晓慧<sup>2\*</sup>

(1. 枣庄市肿瘤医院(枣庄市胸科医院), 山东 枣庄 277500;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**采用网络药理、分子对接预测百令胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)的药效物质基础和核心靶点,并通过细胞实验进一步验证以探讨其作用机制。**方法:**通过中药系统药理分析数据库(TCMSP)和Swiss Target Prediction数据库筛选百令胶囊的主要活性成分及相关靶点。从人类基因数据库(GeneCards)、DrugBank数据库、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)及药物靶标数据库(TTD)等数据库中检索获取COPD主要靶点。通过蛋白质相互作用平台(String)与Cytoscape 3.6.1软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。应用生物学信息注释数据库(DAVID)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。通过AutoDock Vina进行分子对接验证。采用3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS法)检测细胞活性,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测靶点的mRNA水平。**结果:**共获得啤酒甾醇(cerevisterol)等11个百令胶囊活性成分,相关药物靶点270个,COPD靶点蛋白1020个,二者交集74个。PPI网络图可视化分析显示,百令胶囊治疗COPD核心靶点为肿瘤蛋白P53(TP53)、连环蛋白 $\beta$ 1(CTNNB1)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-6及胰岛素(INS)。KEGG通路富集分析筛选得到20条信号通路作为百令胶囊治疗COPD的主要途径,涉及磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路、叉头框蛋白O(FoxO)信号通路、TNF信号通路、巨噬细胞缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等,分子对接验证表明4种活性成分与IL-6结合能最低且稳定。与空白组比较,百令胶囊组可显著降低脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞IL-6 mRNA表达水平( $P < 0.01$ )。**结论:**该研究初步揭示了百令胶囊治疗COPD的药理机制可能为其主要有效成分通过作用于TP53、CTNNB1、TNF、IL-6等靶点,调控PI3K/Akt信号通路、cAMP信号通路等信号通路来改善炎症反应,从而缓解COPD症状,并为后续深入研究提供了实验依据,也为疾病相关临床治疗提供了诊治方向。

**[关键词]** 百令胶囊;慢性阻塞性肺疾病;网络药理学;白细胞介素-6;分子对接

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R318.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0192-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221537

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220607.1313.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-08 9:03

## Molecular Mechanism of Bailing Capsules in Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Based on Network Pharmacology

CUI Dongmei<sup>1</sup>, LI Zhuohang<sup>2</sup>, ZHU Panpan<sup>2</sup>, TAO Xueying<sup>2</sup>, QI Mingzhu<sup>2</sup>, SU Xiaohui<sup>2\*</sup>

(1. Zaozhuang Tumor Hospital (Zaozhuang Chest Hospital), Zaozhuang 277500, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to predict the pharmacodynamic material basis and core targets of Bailing capsules in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on network

**[收稿日期]** 2022-03-05

**[基金项目]** 北京市自然科学基金面上项目(7202142,7222291);中国中医科学院中药研究所启航人才项目(ZXKT21016)

**[第一作者]** 崔冬梅,主治医师,主要从事呼吸内科临床与基础研究,E-mail:544184593@qq.com

**[通信作者]** \*苏晓慧,博士,从事中药药理研究,E-mail:sxh66159@163.com

pharmacology and molecular docking, which were further verified by cell experiments to explore the mechanism. **Method:** The main active ingredients and related targets of Bailing capsules were screened in Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and SwissTargetPrediction. The main COPD targets were searched from GeneCards, DrugBank, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and Therapeutic Target Database (TTD). The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING and Cytoscape 3.6.1. Gene Ontology (GO) function annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed by the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). Molecular docking verification was carried out using AutoDock Vina. The cell viability was detected by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay, and the mRNA level of the targets was detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** A total of 11 active ingredients of Bailing capsules such as cerevisterol, 270 related drug targets, and 1 020 COPD target proteins were obtained, with 74 intersection targets. The visualization analysis of the PPI network showed that the core targets of Bailing capsules in the treatment of COPD were tumor protein P53 (TP53), catenin beta 1 (CTNNB1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6) and insulin (INS). Further, 20 signaling pathways were screened by KEGG enrichment analysis as the main pathways for Bailing capsules to treat COPD, involving phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), forkhead box O (FoxO), TNF, and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathways. Molecular docking validation demonstrated that four active ingredients had stable binding to IL-6, with the lowest energy. Bailing capsules could reduce the mRNA level of IL-6 in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. **Conclusion:** The pharmacological mechanism of Bailing capsules in the treatment of COPD might be that its main active ingredients improved the inflammatory response by acting on TP53, CTNNB1, TNF, IL-6 and other targets and regulating PI3K/Akt, cAMP and other signaling pathways, thereby ameliorating COPD symptoms. This study provided experimental basis for subsequent in-depth research, and provided a diagnosis and treatment direction for disease-related clinical treatment.

**[Keywords]** Bailing capsules; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); network pharmacology; interleukin-6 (IL-6); molecular docking

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是以进行性气流受限、慢性呼吸道炎症为主要病理特征的呼吸系统疾病,可因有害气体或有害颗粒等因素刺激引起急性发作<sup>[1]</sup>,随着病程进展可发展为呼吸衰竭及肺心病。据报道全世界COPD在40岁以上的成年人的发病率高达19%,将成为第3位致死因素<sup>[2-3]</sup>。目前临床主要以解痉平喘、祛痰、氧疗等方式缓解症状,不能阻止疾病进展,且在早期预防以及稳定期病情控制方面并不满意。

大量研究报道联合中医药治疗COPD稳定期具有提高疗效、改善生活质量的优势<sup>[4]</sup>。百令胶囊主要成分为人工培养冬虫夏草发酵菌粉,具有补肺肾、益精气的功效<sup>[5]</sup>,在临床中单独或者联合用药,可以显著改善COPD稳定期患者疗效增加,且降低炎症反应,改善肺功能<sup>[6-7]</sup>。但因其作用机制不清,一定程度限制了其在临床的广泛应用。本研究采

用网络药理学方法分析百令胶囊的主要活性成分及其靶点蛋白,以探讨百令胶囊治疗COPD的作用机制,并为后续深入研究提供了依据和思路,也为疾病的相关临床治疗提供了方向。

## 1 材料

**1.1 细胞** RAW264.7细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞库提供,传至第5代用于本实验。

**1.2 药物与试剂** 百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号2106008);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,批号15596018);逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号K1622);胎牛血清(德国PAN Biotech公司,批号P30-3302); $\alpha$ -MEM培养基(美国通用电气公司,批号SH30265.01);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号L3755)。

**1.3 仪器** LX-100型手掌型离心机(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);ABI7500型

Real-time PCR仪(美国 Thermo Fisher 公司);3111 型二氧化碳培养箱、MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 百令胶囊主要化学成分筛选及靶点的获取

百令胶囊是以冬虫夏草为主要成分的纯中药制剂,所以在本研究中其主要成分以及靶点均以“冬虫夏草”为搜索词进行查询<sup>[5]</sup>。首先在中药系统药理分析数据库(TCMSP, <https://tcmssp.com>)中根据口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 对百令胶囊的活性成分进行筛选,后续通过文献调研补充 OB 与 DL 值不符合要求,但是已被证实与 COPD 这一疾病相关的成分<sup>[8]</sup>。

在 TCMSP 数据库中查询百令胶囊活性成分对应的靶点蛋白。对于在 TCMSP 数据库中未查询相应靶点信息的化合物,选择通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对该化合物靶点进行预测<sup>[9-10]</sup>。将预测出的靶点蛋白进行合并,删除重复靶点信息。再采用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行检索,标准化蛋白质靶点和基因信息<sup>[11]</sup>。

**2.2 COPD 疾病靶点的获取** 以“chronic obstructive pulmonary disease”或“COPD”为关键词,从 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca>)、OMIM (<https://omim.org/>)及 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)等数据库中检索与 COPD 相关的靶点蛋白<sup>[12-15]</sup>。检索完成后,合并 4 个数据库中得到的靶点蛋白信息,删除重复值。于 UniProt 数据库中检索,标准化蛋白质靶点及相应基因信息<sup>[11]</sup>。

**2.3 百令胶囊-COPD 共同靶点的获取及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图谱的构建** 将获得的百令胶囊靶点蛋白与 COPD 靶点蛋白导入 Venny 2.1.0 数据库(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),获得药物与疾病的交集靶点。再将药物的活性成分与筛选得到的交集靶点导入 Cytoscape 3.6.1 软件,获得成分-靶点网络。

通过蛋白质相互作用平台(STRING)(<https://string-db.org/>)与 Cytoscape 3.6.1 软件生成 PPI 网络图进行可视化分析<sup>[16-17]</sup>。设置节点的颜色及面积与其节点度值成正比例关系,边的颜色及粗细与其相连两个靶点蛋白之间的关系值评分成正比例关系。

### 2.4 百令胶囊治疗 COPD 的基因本体(GO)富集分

析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将百令胶囊与 COPD 的交集靶点导入生物学信息注释数据库(DAVID)(<https://david.ncifcrf.gov/>),选择类型为“official gene symbol”,并限定背景数据库为“homo sapiens”,进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析<sup>[18]</sup>。以  $P < 0.05$  为基准筛选,GO 分析的 BP、CC 及 MF 条目每个种类分别选取富集结果排名靠前的 10 项进行可视化分析,获得百令胶囊作用于 COPD 靶点 GO 富集分析条形图。KEGG 富集分析中选取排名靠前的 20 条通路进行可视化分析,得到 KEGG 富集气泡图。

**2.5 分子对接验证** 从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取白细胞介素-6(IL-6)、连环蛋白  $\beta 1$ (CTNNB1)蛋白文件并 TCMSP 数据库中获取 cerevisterol 分子结构。采用 Autodock Vina 软件,将 PPI 网络图中百令胶囊与 COPD 核心靶点进行半柔性分子对接验证<sup>[19]</sup>。再选取对接后结合能较低的复合物利用 PyMOL 2.1 软件进行可视化分析。

**2.6 MTS 法检测细胞活力** 首先用 MTS 法评估百令胶囊对 RAW264.7 细胞活力的影响:将常规培养的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,药物组加入不同浓度的百令胶囊(1、10、100、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),同时设置空白组(只加等量含 10%FBS 的 DMEM 培养基,未接种 RAW264.7 细胞)、对照组(接种 RAW264.7 细胞,未加任何药物处理),每组 5 个复孔,置于 37 °C 细胞培养箱中 24 h。使用酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光度  $A$ 。并依据公式( $A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}$ )/( $A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ ) $\times 100\%$  判断细胞活力。

**2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6 和 IL-1 mRNA 表达** 使用 LPS(100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )诱导 RAW264.7 细胞并加入百令胶囊药物(20、40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 12 h,阳性药组给予雷公藤多苷(10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),空白组使用正常培养基。收集细胞,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,进行逆转录。Real-time PCR 反应条件为 42 °C 1 h,25 °C 5 min,70 °C 5 min,4 °C,共做 40 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,并采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 mRNA 的相对表达进行分析,引物序列由 Life Technologies 公司合成,见表 1。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TNF- $\alpha$	上游 ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	96
	下游 TTTGCTACGACGTGGGCTAC	
IL-6	上游 AGGATACCACTCCCAACAGACCTG	121
	下游 CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTCA	
IL-1 $\beta$	上游 GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	115
	下游 TGGATGCTCTCATCAGGACAG	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	94
	下游 GGGGTCGTTGATGGCAACA	

### 3 结果

**3.1 百令胶囊主要化学成分及靶点的筛选** 通过上述条件筛选,从TCMSP数据库中筛选获得百令胶囊的7个活性成分,包括乙酸亚油醇酯(linoleyl acetate)、花生四烯酸(arachidonic acid)、胆固醇棕榈酸酯(cholesteryl palmitate)、胆甾(CLR)、 $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)、啤酒甾醇(cerevisterol)、过氧麦角甾醇(peroxyergosterol);通过文献调研,补充4种油酸(oleic acid)、EIC、咖啡碱(caffeine)、亚油酸(linoleic)等活性成分<sup>[20-21]</sup>,见表2。在TCMSP数据库与SwissTargetPrediction数据库中获百令胶囊相关靶点385个。合并删除重复靶点信息,并在UniProt数据库标准化蛋白名称,最终获得百令胶囊药物靶点蛋白共计270个。

表2 百令胶囊的主要化学成分

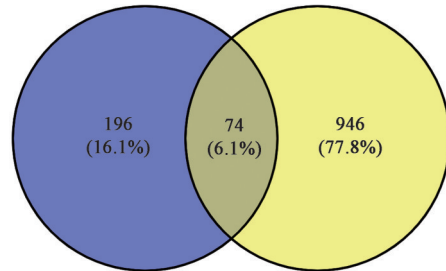
Table 2 Main chemical constituents of Bailing capsules

MOL ID	成分	OB/%	DL
MOL001645	Linoleyl acetate	42.1	0.20
MOL001439	Arachidonic acid	45.6	0.20
MOL008999	Cholesteryl Palmitate	31.1	0.45
MOL000953	CLR	37.9	0.68
MOL000358	Beta-sitosterol	36.9	0.75
MOL008998	Cerevisterol	39.5	0.77
MOL011169	Peroxyergosterol	44.4	0.82
MOL001308	Oleic acid	33.1	0.14
MOL000131	EIC	41.9	0.14
MOL003973	Caffeine	89.5	0.08
MOL000749	Linoleic	41.9	0.14

**3.2 COPD疾病相关靶点筛选** 结合GeneCards数据库、DrugBank数据库、OMIM数据库及TTD数据库中检索得到的与COPD相关靶点蛋白信息。删除重复值,并采用UniProt数据库进行蛋白名称标准

化,最终获得COPD疾病靶点蛋白1020个。

**3.3 百令胶囊治疗COPD靶点的预测** 将获得的药物靶点蛋白与疾病靶点蛋白导入VENNY 2.1.0数据库,获得百令胶囊-COPD共同靶点74个,见图1。



注:蓝色部分为百令胶囊药物靶点;黄色部分为慢性阻塞性肺疾病靶点

图1 百令胶囊-COPD共同靶点数

Fig. 1 Common targets of Bailing capsules-COPD

将筛选得到的药物活性成分与百令胶囊-COPD交集靶点导入Cytoscape 3.6.1软件,获得成分-靶点网络,图中共有85个节点,其中化合物11个,靶点74个,以及102条相互作用的边。其中度值较高的化合物是cerevisterol、arachidonic acid、beta-sitosterol、caffeine、peroxyergosterol,其分别可以与23、16、15、15个靶点相互作用,见图2,提示了百令胶囊治疗COPD具有多成分、多靶点的作用特点。

**3.4 PPI网络的构建及分析** 通过STRING数据库和Cytoscape 3.6.1软件构建百令胶囊-COPD PPI网络图,见图3。图中共得到64个节点(10个靶点蛋白未参与相互作用),226条边。其中度值排名靠前的节点分别为肿瘤蛋白P53(TP53)、连环蛋白 $\beta$ 1(CTNBN1)、TNF、IL-6及胰岛素(INS),分别为26、19、19、19、19,即分别可以与26、19、19、19、19靶点发生相互作用。推测其为百令胶囊治疗COPD的核心靶点。

**3.5 百令胶囊治疗COPD靶点GO蛋白富集分析**

通过DAVID数据库对百令胶囊治疗COPD靶点的GO分析,分别获取BP条目360个、CC条目58个MF条目85个。每个种类分别选取富集结果排名的前10项进行可视化分析,获得百令胶囊作用于COPD靶点GO富集分析条形图,见图4。对于生物过程(BP),主要涉及药物反应、雌二醇反应、信号转导、环磷酸腺苷(cAMP)分解代谢过程、单萜代谢过程等。对于细胞成分(CC),主要涉及膜筏、不对称突触、受体复合物、质膜等。对于分子功能

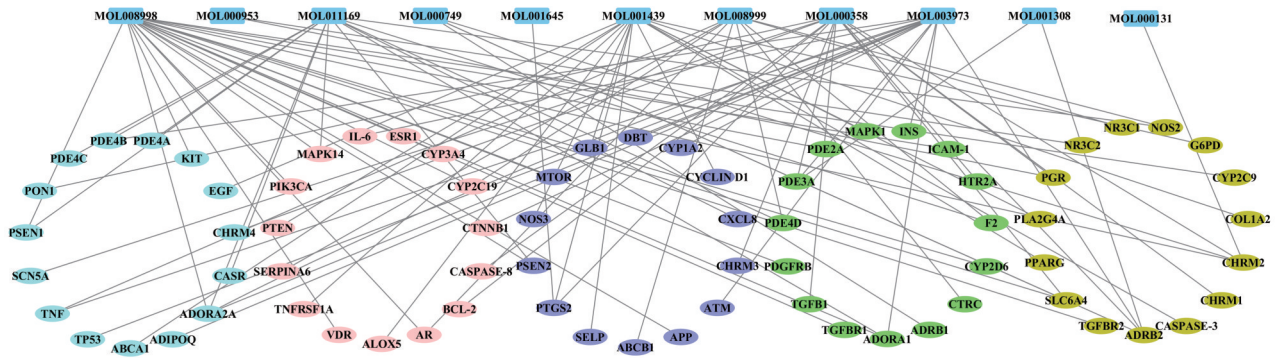


图2 药物活性成分-百令胶囊-COPD交集靶点网络  
Fig. 2 Active pharmaceutical component-Bailing capsules-COPD intersection target network

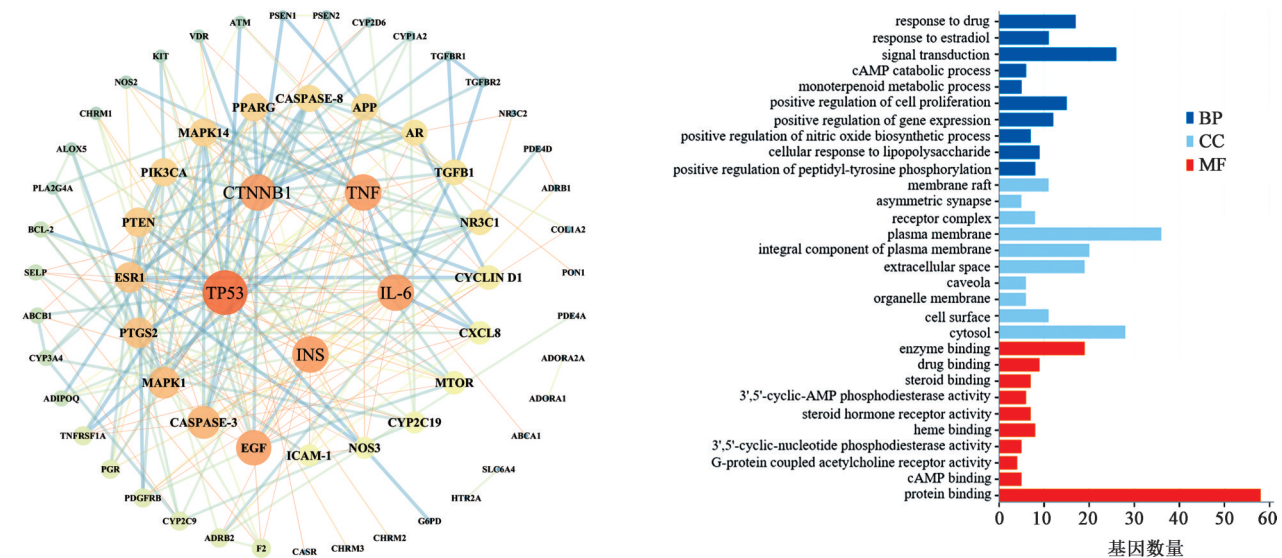


图3 百令胶囊-COPD蛋白互作网络  
Fig. 3 Bailing capsules-COPD protein-protein interaction network diagram

(MF), 主要涉及酶结合、药物结合、类固醇结合、3', 5'-环-AMP 磷酸二酯酶活性、类固醇激素受体活性等。

**3.6 百令胶囊治疗 COPD 靶点 KEGG 通路富集分析** 通过 DAVID 数据库对百令胶囊治疗 COPD 进行 KEGG 通路富集分析, 共获取相关通路 99 条, 选取富集结果排名的前 20 条通路进行可视化分析, 得到 KEGG 富集气泡图, 见图 5。富集结果显示, 百令胶囊治疗 COPD 的效应机制涉及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、cAMP 信号通路、叉头框蛋白 O (FoxO) 信号通路、TNF 信号通路、巨噬细胞缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路等。

**3.7 分子对接验证** 将 2.2 筛选出的 cerevisterol、arachidonic acid、beta-sitosterol、caffeine、Peroxyergosterol 等活性成分与 2.3 筛选出的 TP53、CTNNA1、TNF、IL-6 及 INS 等核心靶点借助

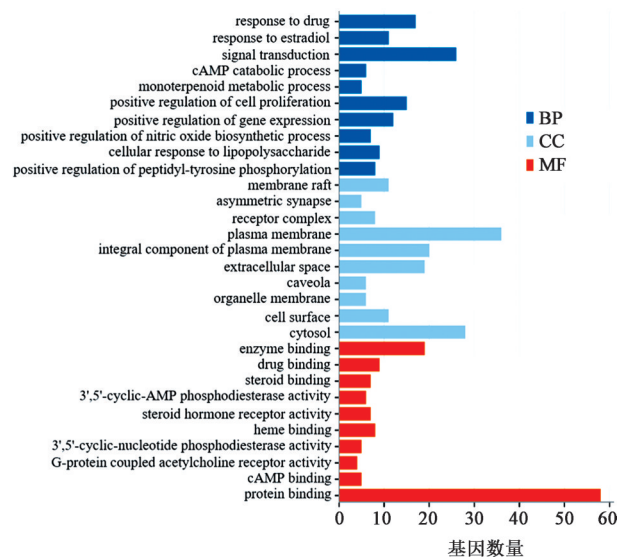


图4 百令胶囊-COPD GO 富集分析  
Fig. 4 Bailing capsules-COPD GO enrichment analysis

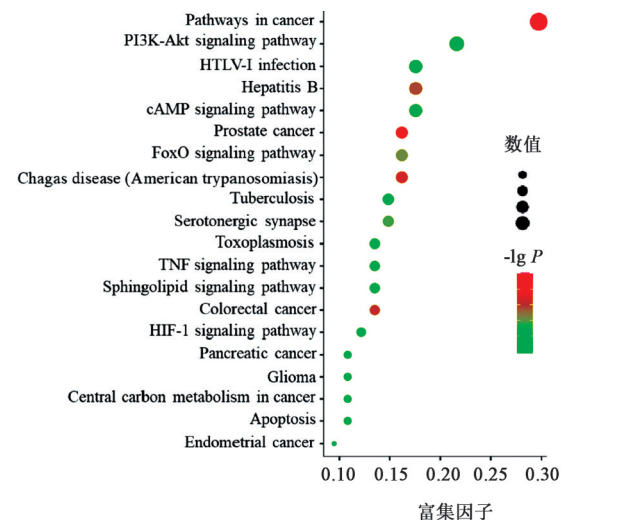


图5 百令胶囊-COPD KEGG 通路富集  
Fig. 5 Bailing capsules-COPD KEGG pathway enrichment analysis

AutodockVina 软件进行分子对接, 评价其相互作用结合能。结果见表 2。结合能大小与二者产生作用

的可能性成反比例关系。结合能 $<-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$ )时,药物活性成分与核心靶点具有较好的结合活性<sup>[19]</sup>。由表3可以看出IL-6与4种活性成分存在很好的结合作用,结合能小于 $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。选取对接后结合能较低的 cerevisterol-IL-6与 cerevisterol-CTNNB1复合物利用 PyMOL 2.1 软件进行可视化,见图6。

表3 百令胶囊分子对接的结合能

Table 3 Affinity of molecular docking of Bailing capsules

靶点	PDB ID	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$			
		arachidonic acid	beta-sitosterol	caffeine	cerevisterol
TP53	4mzi	-4.6	-6.3	-4.9	-6.5
TNF	4tsv	-4.9	-6.7	-4.2	-6.7
INS	3hyd	-4.4	-5.1	-2.9	-4.9
IL6	1il6	-5.3	-6.3	-5.2	-7.9
CTNNB1	7afw	-4.0	-6.0	-4.6	-7.4

**3.8 百令胶囊对LPS诱导的RAW 264.7细胞IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达的影响** 将不同浓度百令胶囊与RAW264.7细胞共孵育24 h,通过MTS法检测百令胶囊对细胞活力的影响。结果发现 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内百令胶囊药物对细胞活力无显著影响,见表4,提示百令胶囊对RAW264.7无细胞毒性。

RAW264.7细胞经LPS诱导后,与百令胶囊( $20, 40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )及雷公藤多苷共孵育12 h后,提取

表5 不同浓度百令胶囊对IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

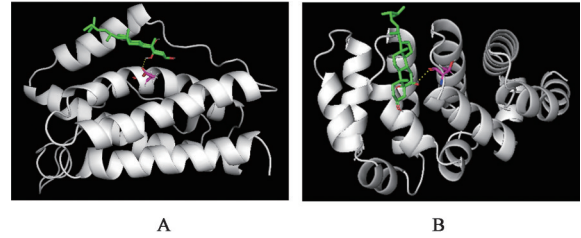
Table 5 Effect of different concentrations of Bailing capsule on IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  mRNA relative expression ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
空白组		1.00 $\pm$ 0.36	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.03
LPS组		338.29 $\pm$ 2.93 <sup>1)</sup>	20 758.59 $\pm$ 102.76 <sup>1)</sup>	4.48 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷组	10	279.97 $\pm$ 7.04 <sup>2)</sup>	12 261.89 $\pm$ 354.70 <sup>2)</sup>	2.31 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
百令胶囊组	20	213.93 $\pm$ 0.67 <sup>2)</sup>	18 702.21 $\pm$ 28.46 <sup>2)</sup>	4.44 $\pm$ 0.04
	40	187.24 $\pm$ 5.74 <sup>2)</sup>	17 003.20 $\pm$ 325.12 <sup>2)</sup>	4.74 $\pm$ 0.08

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与LPS组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$

#### 4 讨论

COPD是一种常见的进行性气道、血管和肺泡炎症病变,具有不完全可逆气流受限特征的慢性肺部炎症疾病,严重影响患者的生存质量。祖国医学中,COPD属于“肺胀”“喘证”“咳嗽”范畴,其基本病机为肺肾虚亏,痰浊、血瘀阻络。因本病反复发作,迁延不愈,具有“久病必虚”的特征,以补肾培元、润肺化痰为治则。百令胶囊是由冬虫夏草发酵制成的中草药制剂,具益肾气、滋肺阴之效,现代药理研



注:A. cerevisterol-IL-6;B. cerevisterol-CTNNB1

图6 百令胶囊-COPD分子对接验证

Fig. 6 Bailing capsules-COPD molecular docking verification

究报道具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、双向免疫调节等药理作用,对多种呼吸系统疾病尤其是COPD,以及肾脏疾病等具有良好的临床疗效<sup>[5]</sup>。

药物活性成分-靶点网络表明, cerevisterol、arachidonic acid、beta-sitosterol、caffeine、peroxyergosterol可与多个靶点相互作用,是百令胶囊治疗COPD的药效物质基础。啤酒甾醇和 $\beta$ -谷甾醇可以通过抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)并激活核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)

表4 不同浓度百令胶囊对细胞活力的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 4 Effect of different concentrations of Bailing capsule on cell viability ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00 $\pm$ 4.66
百令胶囊组	1	93.43 $\pm$ 6.84
	10	92.87 $\pm$ 7.99
	100	96.53 $\pm$ 5.50
	500	97.15 $\pm$ 4.05

究报道具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、双向免疫调节等药理作用,对多种呼吸系统疾病尤其是COPD,以及肾脏疾病等具有良好的临床疗效<sup>[5]</sup>。

药物活性成分-靶点网络表明, cerevisterol、arachidonic acid、beta-sitosterol、caffeine、peroxyergosterol可与多个靶点相互作用,是百令胶囊治疗COPD的药效物质基础。啤酒甾醇和 $\beta$ -谷甾醇可以通过抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)并激活核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)

信号通路来减轻炎症反应<sup>[22-23]</sup>。花生四烯酸对中性粒细胞 NADPH 氧化酶活性有调节作用,其水平升高会影响炎症反应的幅度和过程<sup>[24]</sup>。咖啡因代谢物 1,7-二甲基黄嘌呤可以显著抑制细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的产生<sup>[25]</sup>。以上表明百令胶囊中的有效化合物可能通过抗炎、抗氧化应激等作用改善 COPD 症状。

本研究采用 PPI 网络可视化分析百令胶囊作用于 COPD 核心靶点,并对其进行分子对接验证,评价显示药物与 TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 靶点具有较好的结合活性,预测百令胶囊治疗 COPD 的作用机制与 TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 靶点相关。通过数据分析,CTNNB1 促进 COPD 轻度患者气道上皮细胞的纤维化反应<sup>[26]</sup>,IL-6 可以抑制胞外基质分解并促进肺部肌成纤维细胞力的产生和结缔组织重塑<sup>[27]</sup>。可以认为,通过阻断 CTNNB1 及 IL-6 来调节其下游靶标可能会降低 COPD 患者气道组织重塑及结缔组织重塑程度。研究证实,IL-6 值是肺部持续炎症的特征之一,重度 COPD 患者表现出较高的 IL-6 浓度和 IL-6/IL-10<sup>[28]</sup>。TNFs 在多种炎症性疾病,包括 COPD 的发病、进展中发挥重要作用<sup>[29]</sup>,同时,TNF 启动子中多态性 rs1800629 和 rs361525 与 COPD 风险相关<sup>[30-31]</sup>。COPD 的既往诊断是肺癌的危险因素之一,结合 CTNNB1 遗传变异性与流行病学因素可以预测肺癌易感性,通过上调 TP53 蛋白表达,可以降低 COPD 进展为肺癌的风险<sup>[32]</sup>。

本研究采用 KEGG 通路富集分析筛选得到 20 条信号通路作为百令胶囊作用于 COPD 的主要途径,结果表明百令胶囊可能通过参与调控 PI3K/Akt 信号通路、cAMP 信号通路、FoxO 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等来治疗 COPD。有研究发现,控制 cAMP/PKA 和 PI3K/Akt 信号通路可以抑制炎症细胞的活化和迁移以及细胞因子的产生,有效阻止 COPD 的恶化<sup>[33]</sup>。此外,调节 cAMP 信号通路在 COPD 中还显示出具有支气管扩张作用及抗纤维化特性<sup>[34]</sup>。Nrf2 是 PI3K/Akt 信号通路下游的关键因子,其表达在 COPD 并且参与调节氧化应激反应<sup>[35]</sup>。调节 FoxO 信号通路也有助于改善 COPD 产生的线粒体氧化应激,提高抗氧化防御<sup>[36]</sup>。HIF-1 是一种由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  亚基组成的异二聚体转录因子,在 COPD 的病理条件下由缺氧诱导<sup>[37]</sup>,有实验表明 COPD 患者的肺组织 HIF-1 上调<sup>[38]</sup>。

将药物的主要有效成分与核心靶点进行分子

对接预测,从而验证百令胶囊治疗 COPD 的药效物质基础。以 cerevisterol、arachidonicacid、beta-sitosterol、caffeine、peroxyergosterol 为配体,TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 及 INS 为受体,可见药物活性成分与核心靶点具有较好的结合活性,提示了上述分子有可能作为百令胶囊的重要靶点。为进一步验证上述结果,笔者选择 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的这一经典的炎症模型,检测百令胶囊作用后可能靶点的变化情况,结果显示百令胶囊无细胞毒性剂量范围内可显著抑制 IL-1 $\beta$  及 IL-6 的表达。研究报告 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 等炎症因子已经作为治疗靶点有药物应用于免疫性疾病以及炎症性疾病的治疗<sup>[39]</sup>。本研究结果提示了 TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 及 INS 等在分子网络中具有作为百令胶囊靶点的拓扑特征,分子对接以及细胞学研究也提示其可能性。但究竟 TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 及 INS 等分子是否作为百令胶囊的靶点,还需要更多的研究去证实,比如通过表面等离子共振 (SPR) 技术测量药物分子与靶标之间相互作用强度,通过基因编辑或者分子特异抑制剂沉默/阻断靶分子后观察药物的作用变化等方法,多角度确认药物的作用靶点。

综上所述,本研究采用网络药理学对百令胶囊治疗 COPD 的机制进行进一步探讨,预测百令胶囊可能通过作用于 TP53、CTNNB1、TNF、IL-6 等靶点,调控 PI3K/Akt 信号通路、cAMP 信号通路、FoxO 信号通路、TNF 信号通路等信号通路来改善炎症反应、纤维化过程和氧化应激反应,从而治疗 COPD 患者症状。本研究为后续深入研究提供了依据,也为 COPD 临床治疗提供了诊治方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] MACNEE W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2 (4): 258-66.
- [2] FANG L, GAO P, BAO H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: A nationwide prevalence study [J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(6): 421-430.
- [3] KHAKBAN A, SIN D D, FITZGERALD J M, et al. The projected epidemic of chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations over the next 15 years. A population-based perspective [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(3): 287-291.
- [4] 吕俊,何晓凤,余小萍. 慢性阻塞性肺疾病稳定期中医药治疗研究进展 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(6): 16-19.

- [ 5 ] 许惠娟,李时悦. 百令胶囊的药理作用及其在肺部疾病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2777-2781.
- [ 6 ] 申洁,雷蓉. 百令胶囊治疗稳定期慢阻肺合并呼吸衰竭临床研究[J]. 现代中医药, 2022, 42(1): 137-142.
- [ 7 ] 张亚同,刘泽辉,胡欣. 百令胶囊治疗呼吸系统疾病有效性的系统评价[J]. 中国药房, 2017, 28(18): 2516-2519.
- [ 8 ] 赵苗青,李丰,石彬彬,等. 系统药理学(VI)——TCMSP数据库及其应用[J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 22-29.
- [ 9 ] KIM S. Getting the most out of PubChem for virtual screening[J]. Expert Opin Drug Discov, 2016, 11(9): 843-55.
- [ 10 ] GFELLER D, GROS DIDIER A, WIRTH M, et al. Swiss Target Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: W32-W38.
- [ 11 ] CONSORTIUM U. UniProt: The universal protein knowledgebase[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [ 12 ] STELZER G, DALAH I, STEIN T I, et al. In-silico human genomics with gene cards[J]. Hum Genomics, 2011, 5(6): 709-717.
- [ 13 ] WISHART D S, KNOX C, GUO A C, et al. DrugBank: A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 668-672.
- [ 14 ] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D789-D798.
- [ 15 ] CHEN X, JI Z L, CHEN Y Z. TTD: Therapeutic Target Database [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 412-415.
- [ 16 ] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [ 17 ] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-504.
- [ 18 ] DENNIS G, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. Genome Biol, 2003, 4(5): P3.
- [ 19 ] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.
- [ 20 ] BUCCI L R. Selected herbals and human exercise performance[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(2 Suppl): 624s-636s.
- [ 21 ] YANG F Q, FENG K, ZHAO J, et al. Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured cordyceps by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(5): 1172-1178.
- [ 22 ] ALAM M B, CHOWDHURY N S, SOHRAB M H, et al. Cerevissterol alleviates inflammation via suppression of MAPK/NF- $\kappa$ B/AP-1 and activation of the Nrf2/HO-1 signaling cascade [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 199.
- [ 23 ] ZHANG F, LIU Z, HE X, et al.  $\beta$ -Sitosterol-loaded solid lipid nanoparticles ameliorate complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats: Involvement of NF- $\kappa$ B and HO-1/Nrf2 pathway[J]. Drug Deliv, 2020, 27(1): 1329-1341.
- [ 24 ] HII C S, FERRANTE A. Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2007, 55(2): 99-110.
- [ 25 ] GERAETS L, HAEGENS A, WESELER A R, et al. Inhibition of acute pulmonary and systemic inflammation by 1, 7-dimethylxanthine [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 629(1/3): 132-139.
- [ 26 ] TAM A, LECLAIR P, LI L V, et al. FAM13A as potential therapeutic target in modulating TGF- $\beta$ -induced airway tissue remodeling in COPD [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 321(2): L377-L391.
- [ 27 ] HINZ B, PHAN S H, THANNICKAL V J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: Paradigms for connective tissue remodeling [J]. Am J Pathol, 2012, 180(4): 1340-1355.
- [ 28 ] OGAWA Y, DURU E A, AMEREDES B T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation [J]. Curr Mol Med, 2008, 8(5): 437-445.
- [ 29 ] AGGARWAL B B. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(9): 745-756.
- [ 30 ] ZHANG S, WANG C, XI B, et al. Association between the tumour necrosis factor- $\alpha$ -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: An update [J]. Respirology, 2011, 16(1): 107-115.
- [ 31 ] SAPEY E, WOOD A M, AHMAD A, et al. Tumor

- necrosis factor-alpha rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(2): 192-199.
- [32] WANG X, ZHANG X, JIN L, et al. Combining cttnb1 genetic variability with epidemiologic factors to predict lung cancer susceptibility [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(1): 7-12.
- [33] WANG C, ZHOU J, WANG J, et al. Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 248.
- [34] BILLINGTON C K, OJO O O, PENN R B, et al. cAMP regulation of airway smooth muscle function [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(1): 112-120.
- [35] SUN X, CHEN L, HE Z. PI3K/Akt-Nrf2 and Anti-inflammation effect of macrolides in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(4): 301-304.
- [36] 郑莉芳, 陈佩杰, 肖卫华. 骨骼肌质量控制信号通路 [J]. *生理学报*, 2019, 71(4): 671-679.
- [37] 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.
- [38] DE LA GARZA M M, CUMPIAN A M, DALIRI S, et al. COPD-type lung inflammation promotes K-ras mutant lung cancer through epithelial HIF-1 $\alpha$  mediated tumor angiogenesis and proliferation [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(68): 32972-32983.
- [39] YANG Z, SCHOOLING C M, KWOK M K. Genetic evidence on the association of interleukin (IL) -1-mediated chronic inflammation with airflow obstruction: A mendelian randomization study [J]. *Copd*, 2021, 18(4): 432-442.

[责任编辑 孙丛丛]

· 书讯 ·

## 中医腹部按摩护理对肠道微生物群的影响 ——评《护理人员中医技术使用手册》

肠道微生物群在人体内与其构建一种共生的关系,维系着宿主肠道微生态环境,让机体保持健康的稳定。从人体生命的开始,身体里就存在大量的共生微生物。肠道菌群是一个庞大而又复杂的微生态系统,与人体健康息息相关,数量是人体细胞的10倍多,由他们构成人体肠道的微生态环境。若肠道菌群失调对健康危害极大,被一些因素破坏,自然会对宿主肠道的屏障功能、动力功能及分泌功能受到威胁,从而产生一系列相关疾病,比如代谢性疾病包括肥胖、营养不良、糖尿病等,慢性肠道感染性疾病包括炎性反应性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩病等,还会诱发恶性肿瘤比如结肠癌和肝癌等。目前在高通量基因测序、肠道组织培养等技术的研发与应用背景下,有关肠道微生物群与人类健康及疾病的相关性研究,已成为生物医学界共同关注与研究的热点话题。

《护理人员中医技术使用手册》由中国中医药管理局医政司主编,中医药出版社2015年12月出版。本书结合中医护理特色和优势,以提高中医护理效果,规范中医护理行为,为患者提供更好的护理服务。全书有效彰显了中医护理的实用性与科学性,围绕刮痧技术、拔罐技术、穴位敷贴技术、中药泡洗技术、穴位注射技术、耳穴贴压技术等18种中医护理技术进行了深度阐述,结合相关知识点,掌握中医腹部按摩护理对肠道微生物群的影响。中医腹部按摩护理治疗肠道微生物群不平衡方法,主要是评估、介绍、准备和治疗等4个环节。评估,从护士与患者的首次接触直至出院的整个护理过程,对患者进行身心状况的评估,以便接受手部按摩疗法的意愿。介绍,是指第一次接受中医腹部按摩护理前对患者进行相应的宣教,操作流程以及注意事项等。准备环节,是为患者提供舒适安静的治疗环境,叮嘱患者在准备接受治疗前喝一杯约为250 mL的温水。治疗,具体方法是指患者保持屈膝仰卧时,护理人员用大拇指操作,以适当的力度对患者两侧的足三里穴位进行按摩,以患者出现酸胀、发热时效果最佳。人体气机的升降关键是脾胃气机和肝肺气机升降平衡,这将直接影响到人体肠道微生态系统的稳固状态。中医腹部按摩护理具有调畅气机、调和阴阳、激发机体自身调节作用、双向良性调节的优势,是一种安全有效且操作方便的治疗方法。在疾病状态下,人体微生物群的多样性和丰富度通常会呈现下降趋势,影响其稳定性;胃肠道菌群失衡,引起肠道菌群的改变。从相关研究中发现,对肠道菌群进行有效干预,改变其紊乱状态,可对肠道炎性反应有所缓解,可使肠道肥大细胞数量显著降低。通过中医腹部按摩穴位能够选择性调节肠道益生菌群,诸如按摩患者“关元”穴可让双歧杆菌及乳酸杆菌数量呈显著增加趋势;按摩患者“天枢”穴可让大肠杆菌、肠球菌数量呈显著增加趋势,从而对肠道菌群失调的现象进行有效调节。微生物群的改变往往是由于饮食、药物、氧气可用性或免疫反应等因素的改变而引起的,在这种情况下,菌群失调指数可作为诊断指标,但不一定是预测指标。事实上,微生物群的平衡是否会突然发生变化仍有待证实,并存在很大争议。需要注意的是,菌群失调指数不是独立的测量结局,必须结合临床结果来解释。中医腹部按摩护理有利于调节患者肠道微生物群,使其恢复稳态,优于单纯的常规护理措施,中医腹部按摩护理的整体作用,为研究调节肠道微生物组起到至关重要的作用。

《护理人员中医技术使用手册》本手册浅显易懂,容易理解,可读性较强,便于学习与临床实施参考,可供临床一线的中医护理人员、各大中医院护士工作人员、中医护理技术等相关研究学者翻阅学习,也可作为技术运用考核使用。

(作者叶学奎,刘晓静,葛军,石家庄市第四医院,石家庄 050000)