

基于网络药理学和生物信息学筛选小青龙汤治疗 支气管哮喘的关键基因和通路

臧凝子¹, 李品¹, 庞立健¹, 吕晓东²

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**运用网络药理学与生物信息学方法构建“疾病-基因-靶点-成分-药物”网络以探索小青龙汤治疗支气管哮喘的关键基因和信号通路。**方法:**基于高通量基因表达(GEO)数据库筛选哮喘与健康人差异基因,通过TCMSP数据库检索小青龙汤中药物活性成分,筛选疾病基因和药物成分靶点作为交集基因,采用R语言,Cytoscape 3.7.2软件中不同软件包分别对交集基因进行蛋白互作(PPI)分析,基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果:**GEO数据库中编号为Series GSE43696符合研究要求,内含108张芯片数据,通过筛选得到差异表达基因820个;小青龙汤中共含有活性成分169个,对应作用靶点246个;通过小青龙汤靶基因与疾病基因取交集共获得25个交集基因;PPI网络结果提示91个靶点可能参与小青龙汤作用机制中;GO富集分析共涉及包括氧化应激、炎症反应、细胞外基质调控、血管内皮生长因子功能调控在内的180条基因功能;KEGG富集分析共获得包括辅助性T细胞17(Th17)分化调控,白细胞介素-17(IL-17),肿瘤坏死因子(TNF),低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在内的39条信号通路。**结论:**小青龙汤在哮喘干预中体现了多成分、多靶点、多通路特征,该研究结果可为小青龙汤机制挖掘提供重要依据。

[关键词] 小青龙汤; 网络药理学; 生物信息学; 基因; 信号通路

[中图分类号] R256.12;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0171-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202313

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201022.1028.002.html>

[网络出版日期] 2020-10-22 10:58

Exploring Key Genes and Signaling Pathways in Treatment of Bronchial Asthma with Xiao Qinglongtang Based on Network Pharmacology and Bioinformatics

ZANG Ning-zi¹, LI Pin¹, PANG Li-jian¹, LYU Xiao-dong²

(1. *The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China*; 2. *Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China*)

[Abstract] **Objective:** This research aims to construct the "disease-gene-target-components-drug" network with the methods of network pharmacology and bioinformatics, and to explore the key genes and signaling pathways of Xiao Qinglongtang in the treatment of bronchial asthma. **Method:** First, we selected the differentially expressed genes between patients with asthma and healthy people with use of the gene expressing Omnibus(GEO) database, and searched the active ingredients from Xiao Qinglongtang with use of TCMSP database, and then screened disease genes and herb ingredient targets as intersecting genes to construct the protein-protein interactions (PPI) network by using R language and Cytoscape 3.7.2 software. At the same time Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out. **Result:** Series GSE43696 in GEO database were successfully filtered, which

[收稿日期] 20200226(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373579);国家自然科学基金青年科学基金项目(81403290);国家“十二五”中医药管理局中医络病重点学科建设项目(T0302);辽宁省中医临床重点学(专)科服务能力建设项目(2013-LNZYXZK-2)

[第一作者] 臧凝子,博士,从事中医药治疗肺系疾病的基础和临床研究,E-mail:1013196376@qq.com

[通信作者] *吕晓东,博士,教授,博士生导师,从事中医药治疗肺系疾病的基础和临床研究,E-mail:deanofctm@126.com

contained 108 pieces of chip data. A total of 820 differentially expressed genes were screened from the chip data. Then we filtered 169 active ingredients and 246 targets of Xiao Qinglongtang from database. Through the above steps, we obtained 25 intersecting genes, and PPI network results showed that 91 potential targets may be involved in the mechanism of Xiao Qinglongtang. A total of 180 gene functions such as response to oxidative stress, inflammatory response, extracellular matrix organization and positive regulation of vascular endothelial growth factor production were showed in GO enrichment analysis results. 39 signaling pathways were shown in the results of KEGG pathway enrichment analysis, such as T helper cell 17(Th17) cell differentiation, interleukin 17(IL-17) signaling pathway, tumor necrosis factor(TNF) signaling pathway, and hypoxia inducible factor-1(HIF-1) signaling pathway. **Conclusion:** Xiao Qinglongtang fully embodies the characteristics of multi-components, multi-targets and multi-pathways in the intervention of bronchial asthma. The results of the study could provide an important basis for mechanism research of Xiao Qinglongtang in treating asthma.

[Key words] Xiao Qinglongtang; network pharmacology; bioinformatics; gene; signaling pathways

支气管哮喘(asthma),简称哮喘,是一种常见慢性炎症性气道疾病。根据2019年全球哮喘防治倡议(GINA)指南数据,目前全球大约有3亿哮喘患者,约占总人口4.3%;疾病年龄分布涉及各个年龄组且发病率呈逐年升高趋势;因该病给社会、家庭及患者身心带来沉重的负担,故被认为是全球重大卫生问题之一。该病主要表现为反复发作的喘息、气急、胸闷、咳嗽,发作时双肺可闻及呼气相延长哮鸣音,临床上主要结合支气管激发、舒张试验或运动试验阳性或最大呼吸流量(PEF)变异率或昼夜波动率 $\geq 20\%$ 以及肺通气功能检查、影像学检查、过敏原检查等进行诊断和程度评估。吸入性激素联合支气管扩张剂治疗目前仍为哮喘治疗的主要途径和药物,然而由于目前西医治疗存在口咽部念珠菌感染、喉部刺激、心悸以及长期、高剂量吸入糖皮质激素可能带来的全身不良反应、吸入装置依从性等问题,因此探寻确切、有效的中医药治疗措施对于哮喘防治具有重要意义。

中医学一般将支气管哮喘一病归为“哮病”“喘证”“咳嗽”范畴,《黄帝内经》中虽无哮病之名,但有类似的描述,如“阴争于内,阳扰于外……使人喘鸣”。明代以后医家虞抟对哮、喘进行了明确地区分,提出“哮以声响言,喘以气息言”。“五脏六腑皆令人咳,非独肺也”,本病病位除在肺外,还与肝、肾、脾相关,涉及的病理因素主要为寒、热、风、湿、痰、燥邪^[1]。该病起病之因有外感、内伤(饮食失节、情志失调、体虚劳倦)不同,其中外感风寒、风热为主要病因。究其病机,肺为娇脏,不耐寒热,寒热客肺,伤及肺脏,肺不行水,津不得布,故聚而成痰,成为发病的潜在“夙根”,痰邪致病每每错综复杂,寒热风邪引动“伏痰”,则痰随气升,气因痰阻,相互搏

结,阻塞气道,肺管不通,肺气宣降失常,引动停积之痰故见痰鸣气喘、呼吸困难。本病总属本虚标实,在证候分型方面,有研究采用频数分析和聚类分析方法对近20年54篇临床文献进行分析结果表明,支气管哮喘最常见中医证型主要包括热哮、冷哮、肺肾两虚、肺脾两虚、肺虚、虚哮、风哮、痰湿阻肺、肺肾两虚和寒包热哮,其中冷哮证频次占比24.28%,为支气管哮喘的主要证型^[2]。小青龙汤出自张仲景《伤寒论》,为治疗冷哮的代表方剂之一,并广泛应用于成人及小儿支气管哮喘的治疗。相关Meta分析研究结果表明与单纯西医治疗相比,小青龙汤(联合西药)治疗能够明显提高治疗有效率、降低外周血嗜酸性粒细胞水平、减轻患者喘息症状、提高肺功能[一秒用力呼气容积(FEV1),FEV1/用力肺活量(FVC),PEF]水平^[3-4]。

网络药理学是以系统生物学和多向药理学为基础,选取特定节点采用生物分子网络分析方法对药物进行分子设计和靶点分析的一门学科。该方法能够从系统生物学角度构建“疾病/证候表型-基因-靶点-成分-药物”网络,具有动态性、系统性、互作性特点,这恰与中医药、整体观念、辨证施治的疾病观高度吻合^[3],采用该方法对中药复方进行研究能够更好挖掘中药复方多组分、多层次、多途径、多靶点、多水平作用特点,对于“病-证-方”规律探索、复方组方优化、靶点挖掘等中医药研究工作具有重要意义。生物信息学是采用生物学、信息学、计算机科学等学科技术,对生物信息进行采集、处理、存储、传播,分析和解释,用以探索生命过程的一门学科。伴随着人类基因组计划的启动,生物信息学得到了快速发展,人类通过构建生物信数据库的方式存储了海量高质量、规范、准确的基因表达谱实验数

据,通过对这些数据的挖掘能够有助于解读基因表达和代谢过程,探索疾病机制。高通量基因表达(GEO)隶属于美国国立生物信息技术中心(NCBI),是目前世界上存储高通量基因表达数据最全面的开源数据库^[4],其中收录了RNA表达,单核苷酸多态性(SNP),甲基化,蛋白结合及表达的数据。目前国内尚无同类数据库,国外类似的收录高通量基因表达数据的数据库还有肿瘤基因组图谱(TCGA),肿瘤芯片数据库(Oncomine),美国国立癌症研究所数据库(SEER),但三者均为针对肿瘤相关疾病的数据库,故本研究选择GEO数据库作为支气管哮喘差异基因表达的样本库。

目前,网络药理学方法已广泛应用与中医药潜在治疗靶点的预测研究中,其中疾病靶标预测是网络药理学研究中关键步骤,目前网络药理学研究大多基于CTD,TTD,PharmGKB,OMIM,Genecards,DrugBank等软件进行对疾病靶点进行预测,虽然上述“预测”方法获得的靶点信息更加海量,但相比之下,通过对GEO数据库中真实临床样本基因芯片数据的差异表达基因筛选能够更加可靠、准确、高效地反映疾病本质特征和规律。因此本研究拟创新性采用网络药理学结合生物信息学方法对小青龙汤治疗支气管哮喘的关键基因和通路进行筛选,以进一步探索经方小青龙汤治疗支气管哮喘的潜在机制,并验证生物信息学方法在网络药理学研究中的应用的可行性。

1 资料和方法

1.1 基于GEO数据库分析基因芯片筛选支气管哮喘差异基因 基于GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)计算机检索支气管哮喘基因表达谱,以"asthma"[MeSH Terms] OR asthma[All Fields] AND ("gse"[Filter] AND "Expression profiling by array"[Filter])为检索式,选择"Homo sapiens"人类样本。通过阅读摘要,以如下标准选择:①样本量40例以上(正常组、对照组均在20例以上);②正常人作为对照组;③临床样本为肺泡灌洗液、血清、肺组织。锚定目标后,下载实验结果矩阵文件(Matrix)和注释平台文件(Platforms)。采用R语言limma conductor软件包对芯片数据进行分析,采用logFC和P作为筛选条件,绘制热图和火山图。

1.2 小青龙汤有效成分筛选和靶标预测 小青龙汤由麻黄、细辛、半夏、炙甘草、五味子、桂枝、干姜、白芍8味中药构成,利用TCMSP数据库([\[tcmspw.com/tcmsp.php\]\(http://tcmspw.com/tcmsp.php\)\),对每一味中药有效成分及靶点进行筛选。筛选每味中药同时满足生物利用度\(oral bioavailability, OB\)≥30%和类药性\(drug likeness, DL\)≥0.18的化学成分取合集最终作为方剂的有效成分;检索每味中药的靶点取合集最终作为方剂可能靶点,并将系统中的靶点代码转换为gene symbol,并按照“中药-成分代码-成分名称-靶点基因 symbol”进行表格整理。](http://</p></div><div data-bbox=)

1.3 构建“药物-疾病”交集靶基因数据库并建立中药复方调控网络 将1.1项中获得的差异基因与1.2项中获得小青龙汤靶点基因取交集,采用R语言VennDiagram软件包绘制韦恩图;采用Cytoscape 3.7.2软件通过导入交集数据库“成分代码-靶点基因 symbol”数据,构建以中药名称、交集基因和药物有效成分为节点中药复方调控网络。

1.4 PPI蛋白互作网络分析 为了更加清晰地了解药物成分与靶基因的直接、间接调控关系,本研究基于6个主要的人类PPI互作信息数据库DIP, BinGARD, HPRD, intAct, MINT, BIND,采用Cytoscape 3.7.2中的BisoGenet软件包对交集基因进行PPI蛋白互作网络分析、构建基因-蛋白质-蛋白质可视化生物学网络;采用CytoNCA软件包对网络进行拓扑分析,先后通过度中心性(degree centrality, DC)>2×所有节点中位数,接近中心性(betweenness centrality, BC),紧密度中心性(closeness centrality)>所有节点中位数作为核心节点的筛选条件,获得的关键节点即为在“药物-靶基因”信息传递过程中具有更重要和更高效信息传递的关键蛋白。

1.5 关键靶基因的基因本体(GO)分析 采用GO(Gene Ontology)分析分别从功能、生物途径、细胞中定位3方面对基因进行功能注释。研究中先利用R语言org.Hs.eg.db软件包对将基因 symbol转换为ID,再利用R语言DOSE, clusterProfiler, enrichplot, colorspace, stringi, ggplot2软件包完成GO富集分析可视化,并分别输出生物学过程(BP),细胞组成(CC)和分子功能(MF)3个模块的柱状图、气泡图及富集数据结果。

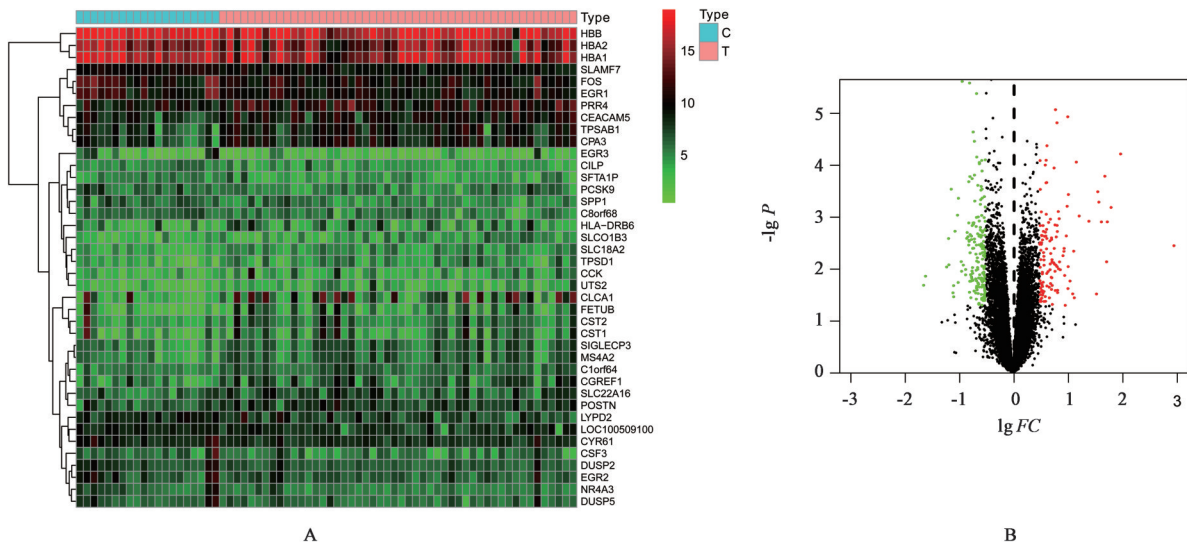
1.6 关键基因京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 采用KEGG对基因涉及的信号通路进行分析。利用R语言DOSE, clusterProfiler, enrichplot, colorspace, stringi, ggplot2, pathview软件包完成KEGG富集分析可视化,并分别输出富集后柱状图、气泡图和通路图集,

并采用 cytoscape 3.7.2 对“关键基因-KEGG 信号通路”网络进行构建。

2 结果

2.1 基于 GEO 数据库支气管哮喘差异基因分析
通过检索, 编号 Series GSE43696 符合研究要求, 其中共包含 108 张芯片数据。GEO DataSets 下载 GSE43696 基因芯片数据和 GPL6480 平台注释文件, 将该芯片数据拆分两部分分析: ① 正常组

(20 例) vs 轻中度哮喘 (50 例); ② 正常组 (20 例) vs 重度哮喘 (38 例); 分析时以 $\lg FC$ 绝对值 (火山图横坐标) < 0.5 作为筛选条件, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。通过筛选结果显示轻中度哮喘组差异表达基因共计 309 个 (上调 126 个, 下调 183 个); 重度哮喘差异表达基因共计 748 个 (上调 338 个, 下调 410 个); 去重后差异表达基因合计 820 个。差异基因热图及火山图见图 1, 2。



火山图中, $-\lg P$ 越大表明差异越显著 (图 2 同)

图 1 轻中度哮喘差异表达基因热 (A) 及火山 (B)

Fig. 1 Heat map (A) and volcano plot of differentially expressed genes between mild, moderate asthma subjects and healthy subjects (A)

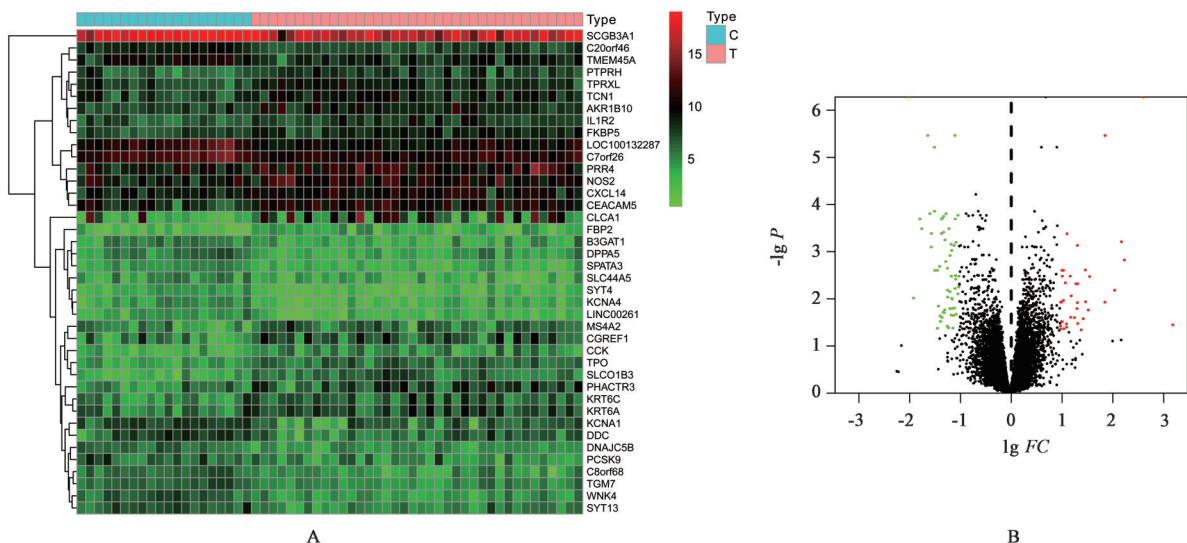


图 2 重度哮喘差异表达基因热 (A) 及火山 (B)

Fig. 2 Heat map (A) and volcano plot of differentially expressed genes between severe asthma subjects and healthy subjects (A)

2.2 小青龙汤有效成分和靶点 通过 OB, DL 筛选, 最终得到该方剂活性成分 169 个, 其中白芍 13 个、半夏 13 个、甘草 92 个、细辛 8 个、麻黄 23 个、五味子 8 个、干姜 5 个、桂枝 7 个; 方剂靶点 14 791

个, 白芍 990 个、半夏 1 302 个、甘草 2 521 个、细辛 1 668 个、麻黄 3 918 个、五味子 995 个、干姜 995 个、桂枝 2 402 个, 去除后共得到 246 个靶点。169 个该方剂活性成分见表 1。

表1 小青龙汤组方活性药物成分

Table 1 Active pharmaceutical ingredients of Xiao Qinglongtang

ID	化合物	OB%	DL	中药
MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33	白芍
MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	白芍
MOL001910	11alpha, 12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12beta-olide	64.77	0.38	白芍
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.4	白芍
MOL001919	(3S, 5R, 8R, 9R, 10S, 14S)-3, 17-dihydroxy-4, 4, 8, 10, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 7, 9-hexahydro-1H-cyclo-penta[a]phenanthrene-15, 16-dione	43.56	0.53	白芍
MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍
MOL001921	lactiflorin	49.12	0.8	白芍
MOL002776	baicalin	40.12	0.75	半夏
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	半夏
MOL005016	odoratin	49.95	0.3	甘草
MOL004898	(E)-3-[3, 4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2, 4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	甘草
MOL000354	isorhamnetin	49.6	0.31	甘草
MOL004910	glabranin	52.9	0.31	甘草
MOL004848	licochalcone G	49.25	0.32	甘草
MOL004961	quercetin der.	46.45	0.33	甘草
MOL002565	medicarpin	49.22	0.34	甘草
MOL004829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草
MOL004828	glepidotin A	44.72	0.35	甘草
MOL004907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
MOL004915	eurycarpin A	43.28	0.37	甘草
MOL003656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草
MOL005020	dehydroglyasperins C	53.82	0.37	甘草
MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2, 2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	甘草
MOL005000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
MOL004811	glyasperin C	45.56	0.4	甘草
MOL004856	gancaonin A	51.08	0.4	甘草
MOL004993	8-prenylated eriodictyol	53.79	0.4	甘草
MOL004866	2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	44.15	0.41	甘草
MOL004863	3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	甘草
MOL004883	licoisoflavone	41.61	0.42	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
MOL004913	1, 3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3, 2-c]chromenone	48.14	0.43	甘草
MOL004849	3-(2, 4-dihydroxyphenyl)-8-(1, 1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	59.62	0.43	甘草
MOL004911	glabrene	46.27	0.44	甘草
MOL004808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
MOL004857	gancaonin B	48.79	0.45	甘草
MOL004879	glycyrin	52.61	0.47	甘草
MOL004908	glabridin	53.25	0.47	甘草
MOL004855	licoricone	63.58	0.47	甘草

续表 1

ID	化合物	OB%	DL	中药
MOL005012	licoaagroisoflavone	57.28	0.49	甘草
MOL004912	glabrone	52.51	0.5	甘草
MOL004820	kazonols W	50.48	0.52	甘草
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.9	0.53	甘草
MOL004885	licoisoflavanone	52.47	0.54	甘草
MOL001484	inermine	75.18	0.54	甘草
MOL004810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
MOL004827	semilicoisoflavone B	48.78	0.55	甘草
MOL004966	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	43.71	0.57	甘草
MOL004974	3'-methoxyglabridin	46.16	0.57	甘草
MOL005003	licoagrocarpin	58.81	0.58	甘草
MOL005017	phaseol	78.77	0.58	甘草
MOL005007	glyasperins M	72.67	0.59	甘草
MOL005008	glycyrrhiza flavonol A	41.28	0.6	甘草
MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
MOL002311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
MOL005013	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	41.16	0.71	甘草
MOL004891	shinpterocarpin	80.3	0.73	甘草
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
MOL005001	gancaonin H	50.1	0.78	甘草
MOL000211	mairin	55.38	0.78	甘草
MOL004948	isoglycyrol	44.7	0.84	甘草
MOL005018	xambioona	54.85	0.87	甘草
MOL004924	(-)-medicocarpin	40.99	0.95	甘草
MOL002514	sexangularetin	62.86	0.3	干姜
MOL002501	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31	干姜
MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82	桂枝
MOL005842	pectolarigenin	41.17	0.3	麻黄
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	麻黄
MOL004624	longikaurin A	47.72	0.53	五味子
MOL008992	wuweizisu C	46.27	0.84	五味子
MOL002501	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31	细辛
MOL002962	(3S)-7-hydroxy-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)chroman-4-one	48.23	0.33	细辛
MOL001460	cryptopin	78.74	0.72	细辛
MOL001558	sesamin	56.55	0.83	细辛

注:代表药物按 OB% \geq 40 且 DL \geq 0.3 标准列出。

2.3 构建“药物-疾病”交集靶基因数据库并建立中药复方调控网络 将前操作中获得小青龙汤靶基因与疾病基因取交集共获得25个交集基因,分别为肿瘤坏死因子配体超族15(TNFSF15),白细胞介素-6(IL-6),前列腺素内过氧化物合成酶1(PTGS1),JUN,一氧化氮合成酶2(NOS2),二肽酶4(DPP4),乙酰胆碱酯酶(AChE),核受体亚家族1组I成员2(NR1I2),CYP1B1,血管内皮生长因子A(VEGFA),FOS,肾上腺素能 α 2A受体(ADRA2A),单胺氧化酶B(MAOB),胰凝乳蛋白酶原B1(CTRB1),氧化低密度脂蛋白受体1(OLR1),趋化因子配体2(CCL2),含杆状病毒IAP重复5生存蛋白(BIRC5),纤溶酶原激活因子(PLAT),COL1A1,拓扑异构酶II α (TOP2A),ATP结合家族亚家族G成员2(ABCG2),趋化因子配体2(CXCL2),分泌蛋白1(SPP1),E2F转录因子1(E2F1),NOX1,交集基因韦恩图见图3。涉及的有效成分共计90个,主要包括槲皮素(甘草、麻黄),豆甾醇(半夏、麻黄),黄芩苷(半夏),HMO(甘草),(3S)-7-hydroxy-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl) chroman-4-one(细辛),芒柄花黄素(甘草),山柰酚(白芍、甘草、麻黄、细辛),7-甲氧基-2-甲基-异黄酮(甘草),3,5,7,4'-四羟基-8-甲氧基黄酮(干姜),五味子丙素(五味子)。以Sytoscape 3.7.2软件构建“有效成分-交集基因”中药复方调控网络图,结果见图4。

2.4 小青龙汤治疗支气管哮喘的PPI蛋白互作网络及其拓扑分析结果 采用BisoGenet对25个交集基因进行PPI网络构建,结果显示1085个节点蛋白(Nodes)在“药物-靶基因”作用过程中发挥直接或间接作用,涉及的互作关系(Edges)共计18434个。DC中位数为20,故通过CytoNCA软件包以DC>40,BC>139,CC>0.58筛选,最终得到91个关键节点和1769条边,筛选策略见图5;按照节点自由度从

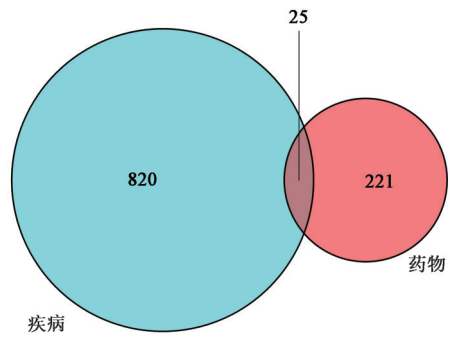


图3 “药物-疾病”交集靶基因韦恩图
Fig. 3 Venn diagram of intersection genes between drug targets and disease genes

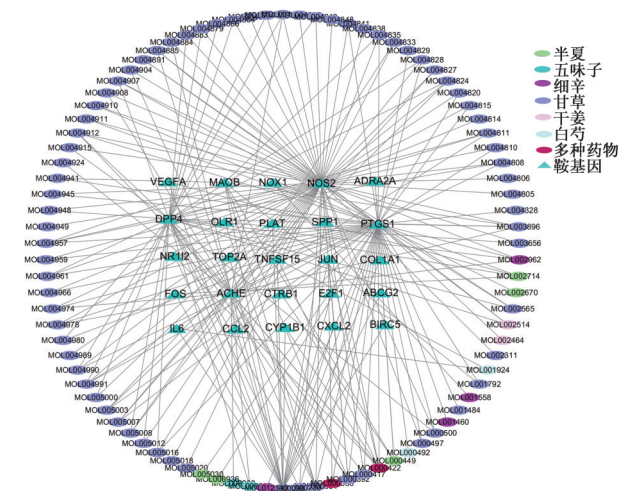


图4 小青龙汤“中药-有效成分-靶点”调控网络示意图
Fig. 4 Network diagram of “herbs-active ingredients-targets” of Xiao Qinglongtang

高到底排序前20位关键节点名称及参数见表2。
2.5 GO功能富集分析结果 对25个交集关键基因进行GO功能分析,结果以 $P<0.05$ 筛选,并以Count值降序筛选出BP,CC,MF3个模块中排名前20位GO条目,结果见图6~8。富集结果显示,①在BP中靶点共涉及158个生物过程,主要涉及脂多糖暴露反应(response to lipopolysaccharide),细菌感染

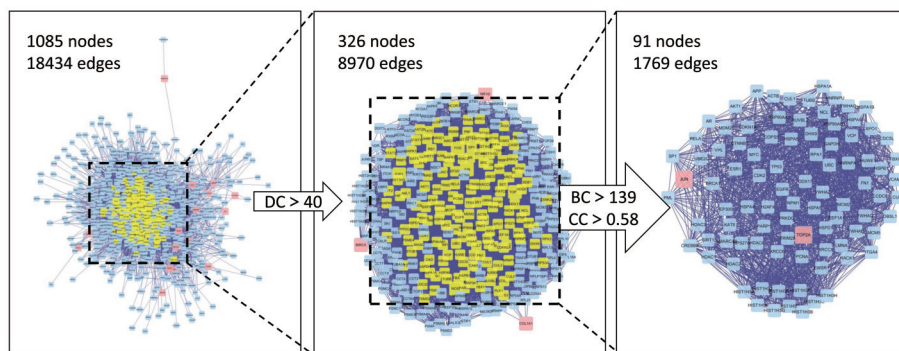


图5 小青龙汤PPI网络拓扑分析的关键节点目标筛选策略
Fig. 5 Strategy diagram of PPI network topology analysis of Xiao Qinglongtang

表 2 按节点自由度排序前 20 位 PPI 网络关键节点及其拓扑参数
Table 2 First 20 PPI network key nodes and their topological parameters were sorted according node's degree

关键节点	度中心性	接近中心性	紧密度中心性
YWHAZ	62.0	136.348 85	0.762 711 9
NPM1	58.0	137.385 3	0.737 704 93
TP53	60.0	150.061 13	0.75
MCM2	56.0	104.983 82	0.725 806 5
HSPA5	52.0	99.291 595	0.703 125
PRKDC	50.0	95.969 38	0.692 307 7
ESR1	52.0	106.485 634	0.703 125
EP300	50.0	94.018 81	0.692 307 7
EEF1A1	47.0	73.015 45	0.676 691 7
HNRNPA1	49.0	71.985 664	0.687 022 9
PARP1	49.0	92.581 51	0.687 022 9
FN1	46.0	69.404 16	0.671 641 77
HSPA8	47.0	75.346 55	0.676 691 7
CDK2	45.0	71.847 496	0.666 666 7
XRCC6	43.0	55.891 098	0.656 934 3
HSP90AA1	46.0	71.243 51	0.671 641 77
HSPD1	44.0	68.359 33	0.661 764 7
ITGA4	43.0	56.457 74	0.656 934 3
EGFR	45.0	83.184 89	0.666 666 7
H2AFX	42.0	56.619 347	0.652 173 94

反应(response to molecule of bacterial origin), 细胞外基质沉积(extracellular matrix organization), 缺氧反应(response to oxygen levels), 胞外组织结构(extracellular structure organization), 氧化应激反应(response to oxidative stress), 血管内皮生长因子调控(positive regulation of vascular endothelial growth factor production)等;②在 CC 中靶点涉及的细胞成

分共有 4 个, 主要是 RNA 聚合酶 II 转录因子复合物(RNA polymerase II transcription factor complex), 核转录因子复合物(nuclear transcription factor complex)以及转录因子复合物(transcription factor complex);③在 MF 中靶点相关分子功能涉及 18 个, 主要包括细胞因子活性(cytokine activity), 细胞因子受体结合(cytokine receptor binding), 细胞外基质结合(extracellular matrix binding), 丝氨酸蛋白水解酶活性(serine hydrolase activity), 受体调节 Smads 结合(R-SMAD binding), 血红素结合(heme binding), 氧化还原酶活性(oxidoreductase activity), 趋化因子活动(chemokine activity), 辅酶 II 结合(NADP binding)等。

2.6 KEGG 通路富集分析结果 对 25 个交集关键基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果以 $P < 0.05$ 筛选, 共有 39 条信号通路出现富集, 以 Count 值降序筛选排名前 20 位 KEGG 通路输出柱形图和气泡图, 见图 9。综合支气管哮喘相关机制研究现状, KEGG 富集结果提示小青龙汤干预支气管哮喘涉及的关键基因靶点主要与 IL-17, TNF, Relaxin, HIF-1 信号通路转导, Th17 细胞分化以及细胞因子-受体相互作用有关。采用 Cytoscape 构建“关键基因-KEGG 信号通路”网络, 见图 10 和表 3, 结果显示在 25 个关键基因中 JUN, IL-6, FOS, CCL2, CSCL2, VEGFA, NOS2 和 E2F1 为富集最多的基因, 提示这些基因与小青龙汤作用机制高度相关。

3 讨论

伤寒论原文记载“伤寒表不解, 心下有水气, 干呕发热而咳, 或渴, 或利, 或噎, 或小便利, 少腹满, 或喘者, 小青龙汤主之”, 其证机乃肺失固表, 皮毛受寒, 皮毛乃肺之合也, 表寒未解, 故寒邪可内客

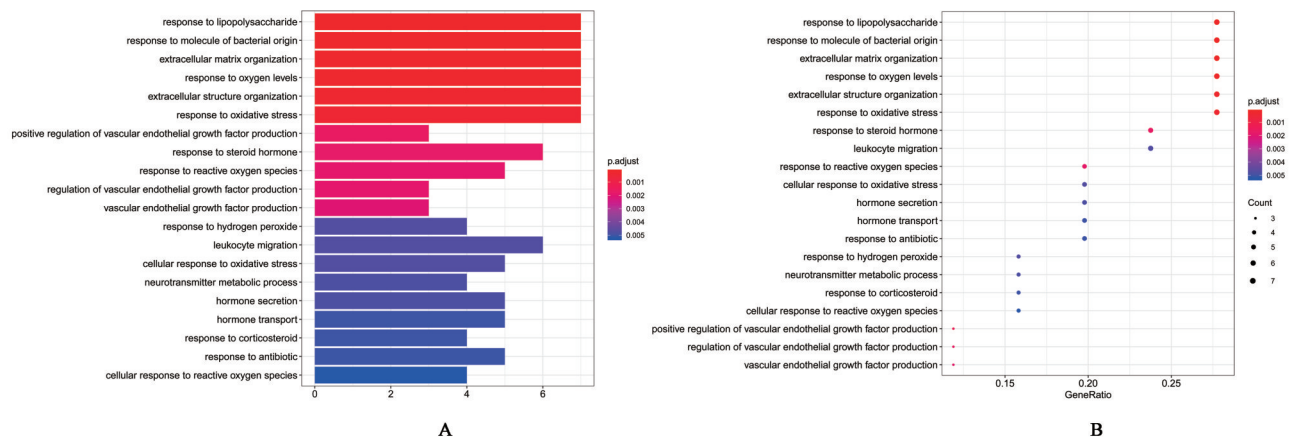


图 6 BP 模块 GO 富集柱形(A)和气泡(B)

Fig. 6 GO enrichment bar(A) and bubble diagrams(B) in module of biological process

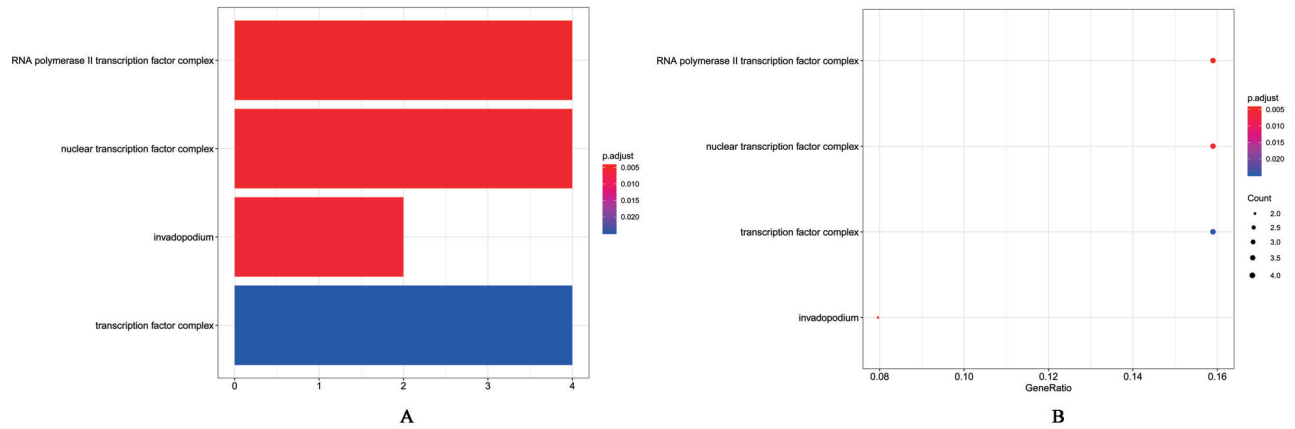


图 7 CC 模块 GO 富集柱形(A)和气泡(B)

Fig. 7 GO enrichment bar(A) and bubble diagrams(B) in module of cellular component

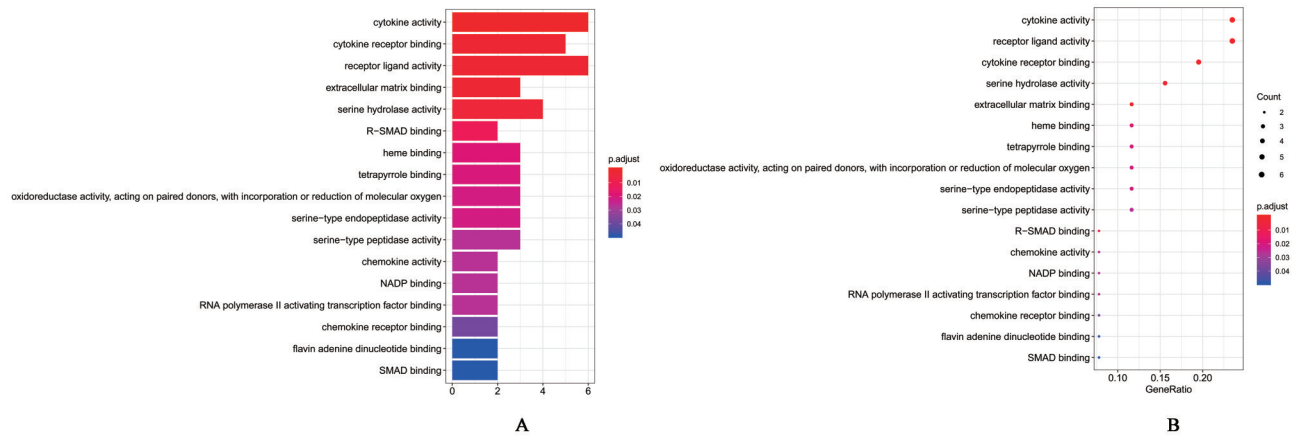


图 8 MF 模块 GO 富集柱形(A)和气泡(B)

Fig. 8 GO enrichment bar(A) and bubble diagrams(B) in module of molecular function

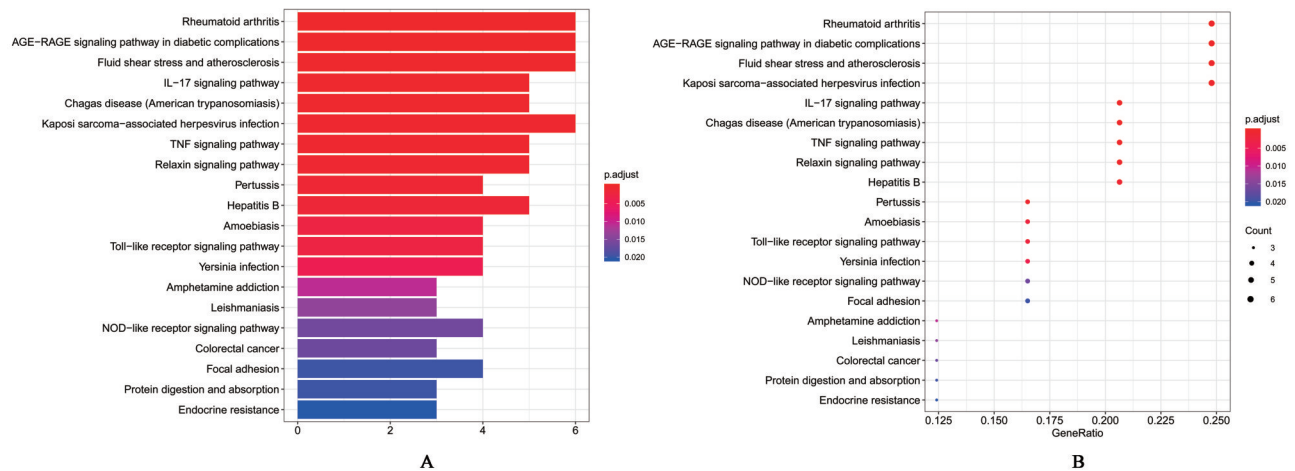


图 9 KEGG 富集柱形(A)和气泡(B)

Fig. 9 KEGG enrichment bar(A) and bubble diagrams(B)

于肺;复加寒饮入胃或内生寒饮,“寒饮入胃,从肺脉上至于肺,则肺寒”(《黄帝内经·咳论》),因而外寒与内寒相合,留恋不舍而致“外寒内饮证”。小青龙汤意在解表、化饮,全方由麻黄、白芍、细辛、干姜、炙甘草、桂枝、五味子、半夏 8 味中药构成,方中

麻、桂相须配伍,其中麻黄归手太阴肺经,能泄卫阳之闭、开腠理、散表寒;桂枝归足厥阴肝经,能引营分之邪达肌表,两者一开一引,散寒解表;再伍大辛、大热之姜、辛、夏,化在内之寒饮;而然咳喘本为肺气上逆,一味辛散恐肺气不敛,反而加重咳喘,故

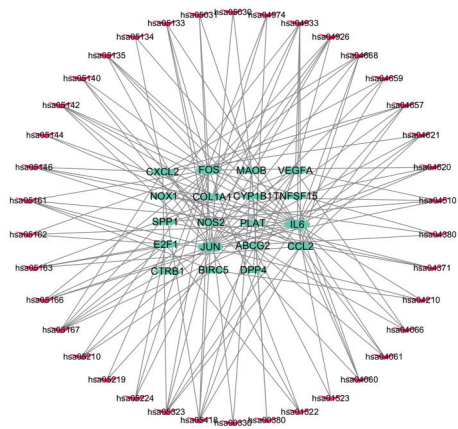


图10 关键基因-KEGG信号通路网络
Fig. 10 Network diagram of key genes-signaling pathways enriched in KEGG

配伍白芍、五味子一方肺气耗散太过,又以甘草调和诸药,全方有升有降、有散有收、开阖适宜。有大量临床试验表明小青龙汤对治疗咳嗽变异性哮喘、支气管哮喘缓解期和发作期具有显著疗效,能够明显改善患者临床症状和生存质量、提高肺功能指标、减轻气道炎症(下调FENO值)、减少复发率^[5-7]。另有实验表明其疗效可能与下调炎症细胞因子表达、减轻气道炎症、改善气道重塑、降低气道高反应性、提高免疫细胞活性等多种作用机制有关^[5-9]。

本研究结果表明经方小青龙汤共有169个药物活性成分,90个活性成分可能与抗支气管哮喘机制相关,其中槲皮素,豆甾醇,黄芩苷,HMO,(3S)-7-hydroxy-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl) chroman-4-one,芒柄花黄素,山柰酚,7-甲氧基-2-甲基-异黄酮,3,5,7,4'-四羟基-8-甲氧基黄酮,五味子丙素与疗效作用基因相关性较高。目前实验已证实在小青龙汤多种中包括单体、单味、药对等多种中药组分能够通过不同机制发挥支气管哮喘治疗作用,如槲皮素能够调控NLRP3/ASC/Caspase-1炎症小体信号通路^[5],TLR4/NF- κ B信号通路^[6]抑制炎症因子水平;黄芩苷能够抑制HMGB1/TLR4^[7],ERK信号传导通路^[8]减轻气道炎症、延缓气道重塑;单味细辛能够通过改善炎症因子MMP-9,TIMP-1失衡减轻哮喘气道重塑^[9];麻黄-甘草药对能够抑制TGF- β 表达,下调肺组织IL-4,IL-5,IL-13,IgE表达水平,抑制支气管上皮细胞间充质转化、减轻气道炎症^[10];五味子主要成分五味子素B能够抑制HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路,降低炎症水平^[11];桂枝萃取物能够纠正失衡的Th1/Th2细胞亚群,抑制组胺释放,发挥抗过敏作用^[12]。

通过对小青龙汤靶基因-疾病基因交集获得的25个交集基因进行分析,结果发现NOS2,PTGS1,DPP4,ACHE,JUN,IL-6,NR112,CYP1B1,VEGFA,FOS 10个基因与小青龙汤药物成分之间存在多个作用关系,其中NOS2为互作网中最关键基因。NO在维持气道免疫平衡过程中发挥重要作用,呼出气一氧化氮(Feno)浓度增高被认为是哮喘嗜酸性炎症的重要指标,而NOS2(iNOS)又称诱导型一氧化氮合酶,表达于人气道上皮细胞,与NOS1(nNOS)和NOS3(eNOS)基因共同发挥编码合成NO的作用^[13],在炎症过程NOS2能够受到Th2细胞因子的诱导而高度表达于T细胞、巨噬细胞和上皮细胞,是决定Feno的主要因素^[14],有最新研究表明NOS2启动子区域(CCTTT)重复多态性与哮喘急性发作存在相关性^[15],因此调控NOS2基因表达对于哮喘治疗至关重要。而相关实验也对上述网络预测给予印证,有研究表明iNOS与TNF- α ,ET可能作为寒饮蕴肺证哮喘物质基础,以小青龙汤加味治疗能够下调哮喘动物模型肺组织中iNOS mRNA和表达水平和降低肺血管通透性,调节气道功能、改善肺通气进而发挥治疗作用^[16-17],然而目前小青龙汤调控iNOS的机制尚不清楚。此外,前列腺素内过氧化物合酶-1(PTGS1)被认为是过敏原诱导气道高反应性的相关基因^[16],其突变能够提高职业性哮喘易感性^[17];二肽基肽酶IV(DPP4)参与机体免疫调节、炎症反应、细胞凋亡等多种病理过程,其抑制剂作为血糖控制药物被广泛应用,研究发现DPP4在支气管肺泡交界区域较高表达,并能够参与肺组织炎症反应、肺泡表面活性物质合成和分泌,哮喘患者DPP4血浆浓度显著增高^[18],推测其可能通过DPP4/SP-A/SP-D轴调控,T细胞免疫调节,激活Th17免疫炎症反应等多途径参与哮喘发展过程^[19]。此外,不同程度证据表明其他基因在哮喘中发挥不同程度作用,然而目前仅有小青龙汤干预IL-6,VEGF,FOS基因表达的相关报道。

对小青龙汤靶基因与疾病基因25个交集基因进行PPI映射并构建网络,结果发现YWHAZ,NPM1,TP53,MCM2,HSPA5等91个靶点可能参与小青龙汤作用机制中。为了更好的诠释靶点涉及的功能,本研究对25个关键靶点进行了GO功能富集和KEGG通路富集,结果发现小青龙汤的作用机制主要涉及氧化应激、炎症反应、细胞外基质调控、血管内皮生长因子功能调控,相关的信号通路主要有IL-17,TNF,HIF-1,Th17。针对上述可能涉及的

表 3 关键基因 KEGG 通路富集结果

Table3 KEGG enrichment results of key genes

编号	通路	关键基因
hsa05323	rheumatoid arthritis	IL-6/JUN/VEGFA/FOS/CCL2/CXCL2
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	IL-6/JUN/VEGFA/CCL2/COL1A1/NOX1
hsa05418	fluid shear stress and atherosclerosis	JUN/VEGFA/FOS/CCL2/PLAT/NOX1
hsa04657	IL-17 signaling pathway	IL-6/JUN/FOS/CCL2/CXCL2
hsa05142	chagas disease (American trypanosomiasis)	IL-6/JUN/NOS2/FOS/CCL2
hsa05167	kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	IL-6/JUN/VEGFA/FOS/CXCL2/E2F1
hsa04668	TNF signaling pathway	IL-6/JUN/FOS/CCL2/CXCL2
hsa04926	relaxin signaling pathway	JUN/NOS2/VEGFA/FOS/COL1A1
hsa05133	pertussis	IL-6/JUN/NOS2/FOS
hsa05161	hepatitis B	IL-6/JUN/FOS/BIRC5/E2F1
hsa05146	amoebiasis	IL-6/NOS2/COL1A1/CXCL2
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	IL-6/JUN/FOS/SPP1
hsa05135	yersinia infection	IL-6/JUN/FOS/CCL2
hsa05031	amphetamine addiction	JUN/FOS/MAOB
hsa05140	leishmaniasis	JUN/NOS2/FOS
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	IL-6/JUN/CCL2/CXCL2
hsa05210	colorectal cancer	JUN/FOS/BIRC5
hsa04510	focal adhesion	JUN/VEGFA/COL1A1/SPP1
hsa04974	protein digestion and absorption	DPP4/CTRB1/COL1A1
hsa01522	endocrine resistance	JUN/FOS/E2F1
hsa04061	viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	IL-6/CCL2/CXCL2
hsa05166	human T-cell leukemia virus 1 infection	IL-6/JUN/FOS/E2F1
hsa01523	antifolate resistance	IL-6/ABCG2
hsa04659	Th17 cell differentiation	IL-6/JUN/FOS
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	IL-6/NOS2/VEGFA
hsa05163	human cytomegalovirus infection	IL-6/VEGFA/CCL2/E2F1
hsa04380	osteoclast differentiation	JUN/FOS/NOX1
hsa05219	bladder cancer	VEGFA/E2F1
hsa00380	tryptophan metabolism	CYP1B1/MAOB
hsa04210	apoptosis	JUN/FOS/BIRC5
hsa04371	apelin signaling pathway	NOS2/PLAT/SPP1
hsa05162	measles	IL-6/JUN/FOS
hsa05224	breast cancer	JUN/FOS/E2F1
hsa05030	cocaine addiction	JUN/MAOB
hsa00330	arginine and proline metabolism	NOS2/MAOB
hsa05144	malaria	IL-6/CCL2
hsa04060	cytokine-cytokine receptor interaction	TNFSF15/IL-6/CCL2/CXCL2
hsa05134	legionellosis	IL-6/CXCL2

功能,有研究表明支气管哮喘急性发作期患者血清活性氧(ROS),丙二醛(MDA),8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量显著升高,总抗氧化能力(T-AOC)

降低,存在显著的氧化应激失衡^[20];哮喘患者肺组织细胞外基质沉积与哮喘的严重程度有关,哮喘气道重塑过程中气道平滑肌细胞过度生长能够改变

细胞外基质,试验发现严重哮喘患者小气道中I型胶原增加,Ⅲ型胶原减少,小气道周围区域存在纤维连接素及MMP-1, MMP-2, MMP-9含量增高,故认为小气道细胞外基质沉积可能是导致重度哮喘原因之一^[21];血管内皮生长因子是刺激血管生成的最有效信号蛋白之一,具有舒张血管、增加血管内皮通透性、促进内皮或上皮生长等作用,VEGF及其受体在肺组织中表达活跃,且缺氧对其影响极大,哮喘肺组织中VEGFmRNA及蛋白表达水平显著增高,涉及的信号通路包括mTOR/HIF-1 α ^[22], MAPKs/NF- κ B^[23]等。在上述小青龙汤干预哮喘可能涉及的信号通路中,Th17分化调控通路和IL-17信号通路尤为重要,两通路之间存在上下游连接关系,Th17作为CD4⁺效应T细胞亚群,通过分化参与多种炎症和自身免疫疾病发生发展过程^[24],该通路在哮喘发展中的作用途径比较明确,在IL-6, TGF- β 刺激下,通过诱导IL-23受体产生、促进STAT3磷酸化, ROR γ t, ROR α 转录因子激活,进而促进IL-17家族原型(IL-17A)和IL-17F分泌,支气管上皮细胞上表达的IL-17受体A和C被激活后,可通过激活下游信号转导分子ACT1,触发TRAF6依赖的靶基因转录,进一步通过NF- κ B或MAPK信号通路转导促进趋化因子CCL2,炎症细胞因子IL-6, TNF- α , COX-2,集落刺激因子GM-CSF和G-CSF以及组织重构相关分子MMP家族表达,进而参与哮喘炎症/免疫反应、气道高反应性、气道重构以及激素抵抗性^[25]形成,研究发现Th17细胞与中性粒细胞性气道炎症和且哮喘严重程度有关,尤其在中重度哮喘中发挥关键作用,可能作为哮喘治疗潜在靶点^[26]。目前小青龙汤Th17/IL-17通路相关机制研究极少,仅有研究表明小青龙汤能够下调哮喘急性发作患者外周血Th17细胞百分比^[27],根据本研究结果小青龙汤相关机制仍有待进一步挖掘。此外, TNF/MAPK, TNF/NF- κ B, IL-6/STAT3/HIF-1 α 信号通路介导的炎症细胞因子释放、细胞外基质重构、气道重构也可能作为小青龙汤的干预机制有待深入研究。

综上,网络药理学结合生物信息学技术初步构建了“疾病/证候表型-基因-靶点-药物成分-方剂”网络,为进一步挖掘经方小青龙汤治疗哮喘作用机制提供了依据。然而由于方法学限制,网络药理学在复方研究中仍借鉴单药、单成分的研究模式,且缺乏对于方剂关键维度——药量的体现,一定程度上限制了预测的准确性和可靠性,因此对于本研究预测结果仍需要通过科学的实验设计进行进一步

验证。

[参考文献]

- [1] 符丽,刘雯雯. 支气管哮喘慢性持续期患者中医证素分布及生命质量比较[J]. 山东中医杂志, 2019, 38(12):1144-1148.
- [2] 杨天一,江柏华,张碧海,等. 支气管哮喘的证候规律分析研究[J]. 黑龙江中医药, 2016, 45(6):2-3.
- [3] 黄国东,孙秀玉,陈书,等. 网络药理学在国内中药复方研究的应用概况[J]. 广西中医学院学报, 2016, 19(1):104-107.
- [4] 张阁. 基于GEO数据库的差异表达基因分析系统的构建[D]. 太原:山西医科大学, 2018.
- [5] 许成辰,徐婷贞,张敏,等. 槲皮素对支气管哮喘模型小鼠NLRP3/caspase-1炎症小体的抑制作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8):899-903.
- [6] 李鸿佳. 槲皮素通过TLR4/NF- κ B信号调节哮喘气道炎症机制研究[D]. 济南:山东大学, 2015.
- [7] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷抗哮喘作用与HMGB1/TLR4传导通路的相关性研究[J]. 世界中医药, 2019, 14(6):1402-1407.
- [8] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷对哮喘大鼠气道重塑作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(7):749-754.
- [9] 陈慧,程燕,杨莉颖,等. 细辛改善哮喘豚鼠小气道重塑的实验研究[J]. 四川中医, 2018, 36(6):66-68.
- [10] 袁为远,魏盼,包凯帆,等. 麻黄-甘草药对抑制过敏性哮喘的效应及机制初探[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1):41-45.
- [11] 王定荣,王亚亭,华山,等. 五味子乙素对哮喘小鼠肺部炎症的影响及其机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(5):735-740.
- [12] 武志强. 桂枝不同萃取部位抗过敏作用的筛选及其作用机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2015.
- [13] GAO P S, KAWADA H, KASAMATSU T, et al. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 Genes in Asthmatics[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267(3):761-763.
- [14] EMMANUELLE B, FLORENT M, MEKKI B, et al. Associations between nitric oxide synthase genes and exhaled NO-related phenotypes according to asthma status[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e36672.
- [15] HIRAI K, SHIRAI T, SUZUKI M, et al. Association between (CCTTT) n repeat polymorphism in NOS2 promoter and asthma exacerbations[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 142(2):663-665.
- [16] LI X, FLEIS R I, SHUBITOWSKI D M, et al. Fine mapping of murine asthma quantitative trait loci and

- analyses of Ptgs1 and Mrc1 as positional candidate genes[J]. *DNA Seq*, 2007, 18(3): 190-195.
- [17] YUCESoy B, KASHON M L, JOHNSON V J, et al. Genetic variants in TNF- α , TGFB1, PTGS1 and PTGS2 genes are associated with diisocyanate-induced asthma[J]. *J Immunotoxicol*, 2016, 13(1): 119-126.
- [18] LUN W M, WONG C K, KO F W, et al. Increased expression of plasma and CD4⁺ T lymphocyte costimulatory molecule CD26 in adult patients with allergic asthma [J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27 (4) : 430-437.
- [19] 孙亚冰, 马礼兵. DPP4及其抑制剂与呼吸系统疾病[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2017, 42(1): 108-112.
- [20] 马南, 嵩冰, 李萍, 等. 氧化应激失衡在支气管哮喘急性发作中的意义[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(12): 1993-1997.
- [21] DOLHNIKOFF M, DA SILVA L F , DE ARAUJO B B, et al. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma [J]. *J Allergy Clinical Immunol*, 2009, 123(5): 1090-1097.
- [22] 王莉, 张艳丽, 王秀芳, 等. mTOR/4EBP1/HIF-1 α /VEGF信号通路在哮喘小鼠肺组织中的表达及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(1): 104-110.
- [23] 杨今实, 金香, 孙天一, 等. 朝医麻黄定喘汤对哮喘小鼠 MAPKs/NF- κ B/VEGF信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10): 4448-4452.
- [24] LEE G R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730.
- [25] MCKINLEY L, ALCORN J F, PETERSON A, et al. Th17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice [J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 4089-4097.
- [26] HARTLEY R, BERAIR R, BRIGHTLING C E. Severe asthma: novel advances in the pathogenesis and therapy [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2014, 124(5): 247-254.
- [27] 朱立成, 尚云飞, 姜水菊. 小青龙颗粒对支气管哮喘患者外周血 Th17/Treg平衡影响的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(20): 2173-2174, 2176.

[责任编辑 顾雪竹]