

基于网络药理学的射干-麻黄药对治疗 支气管哮喘的分子机制探讨

郑文江¹, 谢富洪¹, 黄慧婷^{2*}, 彭紫荆¹, 洪榆², 廖慧丽², 刘小虹²

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:** 基于网络药理学分析射干-麻黄药对治疗支气管哮喘的有效活性成分, 预测其作用靶点, 并探讨其潜在作用机制。**方法:** 用中药系统药理学数据库 (TCMSP) 平台收集射干-麻黄药对的活性成分及预测相应的作用靶点; 采用 STRING 数据库与 Cytoscape 软件构建“药物-活性成分-靶点”网络和蛋白互作网络, 通过 ClusterProfiler 和 ClueGO 对核心靶点的生物功能和代谢通路进行富集。最后把候选作用靶点映射在京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路图上进行分析。**结果:** 通过口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 两个参数筛选得到 38 个有效活性成分, 包括木犀草素 (luteolin), 豆甾醇 (stigmasterol), 香木叶素 (diosmetin), 柚皮素 (naringenin), 槲皮素 (quercetin), 鸢尾甲黄素 A (iristectorigenin A), 异鼠李素 (isorhamnetin) 等, 与疾病相关的候选作用靶点共 214 个, 该文首要分析核心靶点 55 个, 包括 RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt1), 肿瘤坏死因子 (TNF), 分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1), 血管内皮生长因子 A (VEGFA), 白细胞介素-10 (IL-10), 核转录因子- κ B 抑制因子 α (NFKBIA) 等, 并富集得到多条相关的基因本体 (GO) 功能和 KEGG 通路。**结论:** 射干-麻黄药对可能是通过调控 Th1 和 Th2, Th17 等细胞分化, Asthma, IL-17, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt, MAPK, NF- κ B, VEGF 等信号通路, 干预细胞代谢的多个过程, 抑制促炎因子的基因表达, 发挥治疗支气管哮喘的作用。

[关键词] 射干; 麻黄; 药对; 支气管哮喘; 网络药理学

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2019) 19-0182-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191803

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190610.1113.001.html>

[网络出版时间] 2019-06-10 16:15

Molecular Mechanism of Belamcandae Rhizoma and Ephedrae Herba Couplet Medicines in Treating Asthma Based on Network Pharmacology

ZHENG Wen-jiang¹, XIE Fu-qi¹, HUANG Hui-ting^{2*}, PENG Zi-jing¹, HONG Yu²,
LIAO Hui-li², LIU Xiao-hong²

(1. The First Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effective active ingredients of Belamcandae Rhizoma and Ephedrae Herba couplet medicines (BREH) in the treatment of bronchial asthma based on network pharmacology, in order to predict their potential targets and explore the mechanism. **Method:** Active ingredients and predict their targets were collected from traditional Chinese medicine system pharmacology (TCMSP) database. Drugs-components-targets network and Proteins interactions network were built by STRING database and Cytoscape software. ClusterProfiler and ClueGO was used to enrich the biological function and metabolic pathway of core targets.

[收稿日期] 20190302 (003)

[基金项目] 广东省中医药局名优中成药二次开发项目 (20174007); 刘小虹广东省名中医传承工作室建设项目 (201805)

[第一作者] 郑文江, 在读硕士, 从事中西医结合防治呼吸系统疾病研究, Tel: 020-36591365, E-mail: 20171101136@stu.gzucm.edu.cn

[通信作者] * 黄慧婷, 博士, 主治医师, 从事中西医结合诊治呼吸系统疾病的基础与临床研究, Tel: 020-36591365, E-mail: 348619123@qq.com

Finally, candidate targets were mapped onto the pictures of correlative pathways. **Result:** The 38 effectively active ingredients were screened out, including luteolin, stigmasterol, diosmetin, naringenin, quercetin, iristectorigenin A, isorhamnetin. There were 214 candidate targets relating to bronchial asthma, and 55 core ones were selected to be mainly studied, including RAC- α serine/threonine-protein kinase (Akt1), tumor necrosis factor (TNF), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), interleukin-10 (IL-10), NF- κ B inhibitor alpha (NFKBIA), and a number of relevant gene ontology (GO) functions and Kyoto Encyclopedin of Genes and Genomes (KEGG) pathways were enriched. **Conclusion:** BREH may regulate the Th1, Th2 and Th17 cell differentiations, Asthma, IL-17, phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) /Akt, MAPK, NF- κ B, VEGF signaling pathways, so as to interfere the process of cell metabolism, and inhibit gene expression of proinflammatory factor in the treatment of bronchial asthma.

[**Key words**] Belamcandae Rhizome; Ephedra Herba; couplet medicines; asthma; network pharmacology

哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1],全球至少有 3 亿哮喘患者,而中国哮喘患者约 3 000 万,哮喘急性发作时严重影响患者生活质量,并且给患者带来了沉重的经济负担。糖皮质激素是最有效的控制哮喘气道炎症的药物,慢性持续期哮喘以吸入为首选途径,但长期高剂量使用也会出现诸如骨质疏松、肾上腺皮质轴抑制等不良反应^[2],2018 年全球支气管哮喘防治倡议(GINA)提出高剂量使用短效 β_2 受体激动剂(SABA),不充分吸入糖皮质激素(ICS)治疗成为哮喘的急性加重的独立危险因素^[3],因此目前哮喘的西医常规治疗和管理方案仍有待进一步优化。

射干麻黄汤具有温肺化饮、下气祛痰之功效,是治疗支气管哮喘的经典名方,此方最早出自《伤寒杂病论》:“咳而上气,喉中水鸡声,射干麻黄汤主之。”其中,射干善消痰、散结、利咽,麻黄善宣肺、平喘;现代药理学研究证明,麻黄的活性成分具有平喘作用^[4],还具有抗过敏、免疫抑制等作用^[5],射干具有抗炎、抗过敏等作用^[6],两者合为此方君药,广东省名中医刘小虹教授临床常用射干麻黄药对精当配伍以治疗支气管哮喘,取得良好疗效。近年来的临床研究提示在西医常规治疗的基础上联合运用射干麻黄药对为主的中药汤剂在哮喘的治疗中具有一定优势^[7-8]。然而,现有关于射干麻黄药对的基础研究较少,且对其作用机制及通路的研究多局限于射干麻黄汤本身,或加味射干麻黄汤对机体的某一靶点或某一基因的影响,难以反映中药方剂多成分、多靶点、多通路的作用特性。网络药理学以系统生物学为基础、结合多向药理学,能通过构建药物、分子、靶点、通路、疾病之间的多种网络关系,从整体的角度阐释中药方剂的作用机制,与中医药治疗疾病的

整体观一致^[9]。本研究旨在运用网络药理学研究方法对射干-麻黄药对(Belamcandae Rhizoma and Ephedrae Herba couplet medicines, BREH)潜在活性成分的作用机制进行初步探索,为其深入研究及进一步开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); Universal Protein 数据库(UniProt, <https://www.uniprot.org/>); 比较毒理基因组学数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>, updated in 2018-10-15); STRING 数据库(<https://string-db.org/>, Version: 11.0); Cytoscape 软件(version 3.7.0)及其工具 NetworkAnalyzer; 插件 ClueGO; CluePedia; Bioconductor(<https://bioconductor.org/bioLite.R>)及其数据包 org. Hs. eg. db, clusterProfiler (version: 3.8.1); R 语言统计建模软件(RGUI); 京都基因与基因组百科全书(KEGG, <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>, updated in 2018-10-24)。

1.2 潜在活性成分与靶点的收集 口服生物利用度(OB)和类药性(DL)是药物活性成分在研究、开发中的两个重要参数,分别反映了药物在体内吸收、分配和与已有药物的相似性、开发成药的可能性。因此,通过 TCMSP 以 OB > 30%, DL > 0.18 为条件筛选出 BREH 的有效活性成分及其对应的靶点信息^[10]。然后把靶点输入 Uniprot 数据库中,利用 UniProtKB 的搜索功能,把靶点名称(protein name)转换为基因名(gene name)。

1.3 候选靶点的收集、筛选 在 CTD 的关键词搜索功能中选择 Disease 并输入 Asthma,选择疾病相关 Genes,与上述经 Uniprot 转换的靶点基因名进行

匹配,得到 BREH 的候选作用靶点。然后在 STRING 数据库的 Multiple proteins 搜索功能中输入候选作用靶点名称,根据得到的蛋白相互作用网络的复杂程度调整 Settings 中的“minimum required interaction score”,保证网络的可读性。最后把获得的蛋白互作关系保存为 TSV 格式。

1.4 “药物-活性成分-作用靶点”网络及蛋白互作网络的构建 把 STRING 中导出的蛋白互作关系文件中的 node1, node2 进行整合去重得到的基因靶点及其所属活性成分,和活性成分所属的药物信息导入 Cytoscape 软件中构建“药物-活性成分-作用靶点”网络。然后,把 STRING 蛋白互作关系文件中的 node1, node2, combined score 另外导入 Cytoscape 软件中得到初始蛋白相互作用网络,用其中工具 Network Analyzer 对该网络进行拓扑分析,主要根据结果中的自由度 (Degree) 值的大小筛选出核心靶点,最后仅构建核心靶点的蛋白互作网络图。

1.5 基因本体 (GO) 及 KEGG 分析 先利用 RGUI 及 org. Hs. eg. db 获取核心靶点的 entrezID,然后利用 RGUI 及 clusterProfiler 对核心靶点进行 GO 功能富集,包括分子功能 (MF),生物学过程 (BP) 及细胞组分 (CC);另外,把核心靶点导入 Cytoscape 的插件 ClueGO 中对其 GO 功能 (包括生物学过程、免疫系统过程) 及 KEGG 通路进行富集,结合 CluePedia 进行编辑,得到核心靶点与功能及通路的联系,同时对所得网络中功能和通路的节点进行人工筛选。最后利用 RGUI 及 org. Hs. eg. db 把 1.3 中获得的候选作用靶点名转换为 entrezID,利用 KEGG 数据库把候选基因靶点映射到相关通路上。

2 结果

2.1 BREH 对所含成分及其预测靶点信息 把麻黄 (Ephedra Herba), 射干 (Belamcandae Rhizoma) 输入 TCMS 数据库进行分析,共得到 419 个活性成分,4 655 个靶点信息,以 OB > 30% 和 DL > 0.18 为条件,进一步筛选得到麻黄中潜在活性成分 23 个、射干中潜在活性成分 17 个,主要为黄酮类、植物甾醇类,靶点去重后共 244 个,两者共有靶点为 100 个。把靶点逐一输入 UniProt 数据库,限定研究物种为“Homo sapiens (Human)”,只有 217 个靶点名称得以成功转换。通过与 CTD 数据库中与 Asthma 相关的基因进行比对,筛选得出其中 214 个候选靶点与该疾病有关。见表 1。

2.2 射干、麻黄治疗支气管哮喘的核心靶点的筛选

表 1 BREH 中潜在活性成分及其 OB 和 DL 值

Table 1 Potential active ingredients of BREH with OB and DL paraments

编号	潜在活性成分	OB/%	DL	靶点数目	药材归属
1	无色蹄纹天竺素 (leucopelargonidin)	57.97	0.24	5	麻黄
2	草棉黄素 (herbacetin)	36.07	0.27	14	麻黄
3	Resivit	30.84	0.27	4	麻黄
4	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24	63	麻黄
5	花翠素 (delphinidin)	40.63	0.28	8	麻黄
6	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	154	麻黄
7	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25	57	麻黄、射干
8	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75	38	麻黄
9	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	31	麻黄、射干
10	(+)-catechin	54.83	0.24	11	麻黄
11	mandenol	42.00	0.19	3	麻黄
12	鲨烯 (supraene)	33.55	0.42	0	麻黄
13	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	2	麻黄
14	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	2	麻黄
15	香叶木素 (diosmetin)	31.14	0.27	10	麻黄
16	柚皮素 (naringenin)	59.29	0.21	37	麻黄
17	花旗松素 (taxifolin)	57.84	0.27	12	麻黄
18	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	1	麻黄
19	圣草酚 (eriodictyol)	71.79	0.24	9	麻黄
20	羌花素 (genkwanin)	37.13	0.24	14	麻黄
21	柳穿鱼苷元 (pectolarigenin)	41.17	0.30	12	麻黄
22	(+)-leucocyanidin	37.61	0.27	4	麻黄
23	triflex OBP	43.74	0.24	7	麻黄
24	异牧荆素 (isovitexin)	31.29	0.72	6	射干
25	地纳亭 (dinatin)	30.97	0.27	17	射干
26	鼠李素 (rhamnazin)	47.14	0.34	23	射干
27	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31	37	射干
28	anhydrobelachinal	43.57	0.78	0	射干
29	紫金牛酮 A (ardisianone A)	44.22	0.25	1	射干
30	belachinal	31.24	0.64	0	射干
31	射干醛 (belamcandal)	30.07	0.67	0	射干
32	dihydrokaempferide	50.56	0.27	8	射干
33	epianhydrobelachinal	43.57	0.78	0	射干
34	iristectorene B	32.56	0.42	0	射干
35	鸢尾黄酮新苷元 (9CI) [iristectorigenin (9CI)]	71.55	0.34	21	射干
36	鸢尾甲黄素 A (iristectorigenin A)	63.36	0.34	22	射干
37	鸢尾异黄酮 (irolone)	46.87	0.36	13	射干
38	枞果醇酸 (mangiferolic acid)	36.16	0.84	0	射干

把上述 214 个基因输入 STRING 数据库时,经反复验证后,仅 209 个基因成功导入,限定研究物种为“Homo sapiens”,得到初始蛋白质互作关系(因客观未知原因,此时未导入的基因为 ACHE, ERBB2, *gst-1*, *GSTM1*, *PARP1*),限定“minimum required interaction score”为 0.97,进一步得到由 121 个靶点参与的蛋白质互作关系,将此数据和相关活性成分的信息导入 Cytoscape 软件中构建“药物-活性成分-靶点”网络,见图 1。把 121 个靶点及其间关联的“combined score”另外导入 Cytoscape 软件中得到初始蛋白相互作用网络,用 NetworkAnalyzer 对其进行分析,导出分析结果后用 Microsoft Office Excel 2007 对 Degree 值按降序进行排序后,筛选出序号前 55 的靶点为核心靶点,见表 2。然后返回 Cytoscape 的初始网络中,筛选出(select)该 55 个核心靶点,隐藏(hidden)剩余靶点,构建出核心靶点的蛋白互作网络,见图 2。

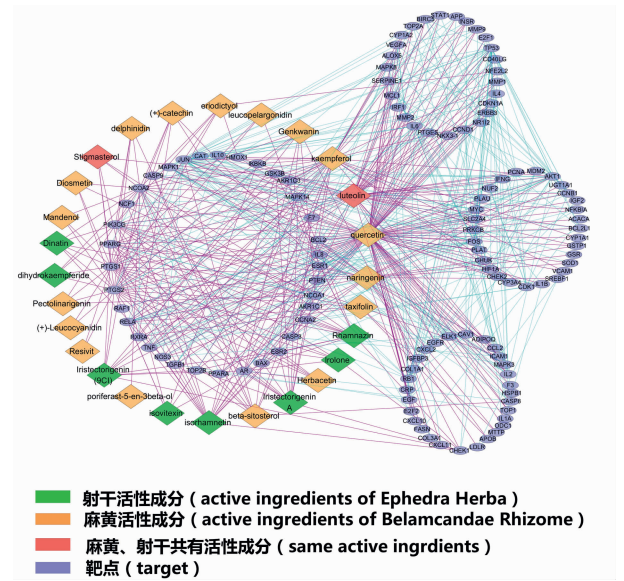


图 1 BREH“药物-活性成分-靶点”网络
Fig. 1 Drugs-components-targets network of active ingredients in BREH

表 2 BREH 潜在活性成分的核心靶点

Table 2 Information of core targets from potential active ingredients of BREH

编号	Uniprot ID	基因靶点	蛋白靶点	Degree
1	P05412	JUN	转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1)	30
2	P04637	TP53	细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53)	29
3	P31749	Akt1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)	21
4	P01100	FOS	原癌基因 c-Fos (proto-oncogene c-Fos)	19
5	P01106	MYC	Myc 原癌基因蛋白 (Myc proto-oncogene protein)	16
6	P06400	RB1	视网膜母细胞瘤相关蛋白 (retinoblastoma-associated protein)	14
7	P28482	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1)	14
8	P05231	IL-6	白细胞介素-6 (interleukin-6)	12

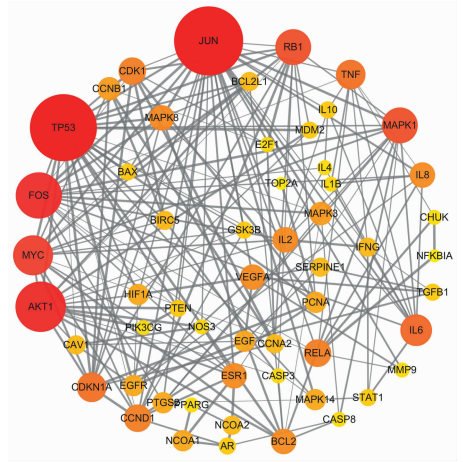


图 2 BREH 中核心靶点的蛋白互作网络
Fig. 2 Proteins interactions network of core targets in BREH

2.3 网络分析 图 1 为“射干麻黄-活性成分-作用靶点”网络,其中共有 148 个节点,625 条边,节点代表活性成分或作用靶点(橙色菱形节点代表麻黄活性成分,绿色菱形节点代表射干活性成分,红色菱形节点代表麻黄、射干的共有活性成分,紫色椭圆节点代表作用靶点),深紫色边代表活性成分和作用靶点间的相互关系(共 345 条),浅蓝色边代表作用靶点间的相互作用关系(共 280 条)。图 2 为核心靶点的蛋白相互作用网络,节点代表蛋白,边代表蛋白间的相互关系,共涉及 55 个节点,193 条边。节点的大小和颜色代表 Degree 值的大小,节点越大 Degree 值越大,颜色由黄变红对应的 Degree 值越大。边的粗细代表 Combined score 值的大小,边越粗 Combined score 值越大。

2.4 核心靶点的 GO 富集及 KEGG 通路富集分析

2.4.1 GO 富集分析 把 BREH 作用的 55 个核心靶点分别通过 clusterProfiler^[11] ($pV < 0.05$, $qV < 0.05$,核心靶点的 entrezID 见表 3,图 3~5 横坐标表示每个条目中涉及的核心靶点的数目,颜色从红

续表 2

编号	Uniprot ID	基因靶点	蛋白靶点	Degree
9	P38936	CDKN1A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1)	11
10	P01375	TNF	肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)	11
11	P06493	CDK1	细胞分裂控制蛋白 2 同系物 (cell division control protein 2 homolog)	10
12	Q04206	RELA	转录因子 p65 (transcription factor p65)	10
13	P24385	CCND1	G1/S 特异性细胞周期蛋白-D ₁ (G1/S-specific cyclin-D ₁)	10
14	P45983	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8)	9
15	P10415	Bcl-2	凋亡调节因子 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2)	9
16	P03372	ESR1	雌激素受体 (estrogen receptor)	9
17	P15692	VEGFA	血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	9
18	P60568	IL-2	白细胞介素-2 (interleukin-2)	9
19	P10145	IL-8	白细胞介素-8 (interleukin-8)	9
20	P14635	CCNB1	G ₂ /有丝分裂特异性细胞周期蛋白 B ₁ (G ₂ /mitotic-specific cyclin-B ₁)	8
21	P27361	MAPK3	丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3)	8
22	P00533	EGFR	表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)	7
23	P01133	EGF	表皮生长因子 (pro-epidermal growth factor)	7
24	Q15788	NCOA1	核受体辅激活因子 1 (nuclear receptor coactivator 1)	7
25	P12004	PCNA	增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen)	7
26	Q16665	HIF1A	缺氧诱导因子 1- α (hypoxia-inducible factor 1-alpha)	7
27	Q16539	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14)	7
28	P35354	PTGS2	前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	7
29	P05121	SERPINE1	纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor 1)	6
30	Q15596	NCOA2	核受体辅激活因子 2 (nuclear receptor coactivator 2)	6
31	P20248	CCNA2	细胞周期素 A ₂ (cyclin-A ₂)	6
32	O15392	BIRC5	含杆状病毒 IAP 重复序列的蛋白质 5 (baculoviral IAP repeat-containing protein 5)	6
33	Q07817	BCL2L1	Bcl-2 样蛋白 1 (Bcl-2-like protein 1)	6
34	P01579	IFNG	干扰素 γ (interferon gamma)	6
35	Q03135	CAV1	小窝蛋白-1 (caveolin-1)	6
36	Q00987	MDM2	E ₃ 泛素-蛋白质连接酶 Mdm2 (E ₃ ubiquitin-protein ligase Mdm2)	5
37	P10275	AR	雄激素受体 (androgen receptor)	5
38	P60484	PTEN	磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶和双特异性蛋白磷酸酶 PTEN (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN)	5
39	Q07812	BAX	细胞凋亡调节因子 BAX (apoptosis regulator BAX)	5
40	P42224	STAT1	信号转导和转录激活因子 1-alpha/beta (signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta)	5
41	P01137	TGF- β ₁	转化生长因子 β ₁ (transforming growth factor beta-1)	5
42	P49841	GSK3 β	糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta)	5
43	P22301	IL-10	白细胞介素 10 (interleukin-10)	5
44	P48736	PIK3CG	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基, γ 同种型 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit, gamma isoform)	4
45	Q01094	E2F1	转录因子 E2F1 (transcription factor E2F1)	4
46	P01584	IL-1 β	白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta)	4
47	O15111	CHUK	核因子 kappa-B 激酶亚基 α 的抑制剂 (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha)	4
48	P29474	NOS3	一氧化氮合酶, 内皮细胞 (nitric-oxide synthase, endothelial)	4
49	P37231	PPAR γ	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)	4
50	P42574	CASP3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)	4
51	P14780	MMP-9	基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9)	4
52	Q14790	CASP8	半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-8 (Caspase-8)	4
53	P05112	IL-4	白细胞介素-4 (interleukin-4)	4
54	P11388	TOP2A	DNA 拓扑异构酶 2-alpha (DNA topoisomerase 2-alpha)	3
55	P25963	NF- κ BIA	NF- κ B 抑制剂 α (NF-kappa-B inhibitor alpha)	3

表 3 BREH 潜在活性成分的候选靶点

Table 3 candidate targets from potential active ingredients of BREH

基因名称	编码	基因名称	编码	基因名称	编码	基因名称	编码
ABAT	18	CA2	760	CTRB1	1504	ICAM-1	3383
ABCC1	4363	CASP3	836	CTSD	1509	IFN γ	3458
ABCG2	9429	CASP7	840	ELK1	2002	IGF2	3481
ACACA	31	CASP8	841	ERBB2	2064	IGFBP3	3486
ACHE	43	CASP9	842	ERBB3	2065	I κ B κ B	3551
ADCY2	108	CAT	847	ESR2	2100	IL-10	3586
ADH1C	126	CAV1	857	F3	2152	IL-1A	3552
ADIPOQ	9370	CCL2	6347	F7	2155	IL-1B	3553
ADRA1A	148	CCNA2	890	FASN	2194	IL-2	3558
ADRA1B	147	CCNB1	891	FOS	2353	IL-4	3565
ADRA2A	150	CCND1	595	GABRA1	2554	IL-6	3569
ADRB1	153	CD40LG	959	GJA1	2697	INSR	3643
ADRB2	154	CDK1	983	GOT1	2805	IRF1	3659
AHR	196	CDKN1A	1026	GRIA2	2891	JUN	3725
AKR1B1	231	CES1	1066	GSK3B	2932	LDLR	3949
AKR1C1	1645	CHEK1	1111	GSR	2936	LTA4H	4048
AKR1C3	8644	CHEK2	11200	GST-1	NA	MAOA	4128
Akt1	207	CHRM1	1128	GSTM1	2944	MAOB	4129
ALOX5	240	CHRM2	1129	GSTM2	2946	MAPK1	5594
APOB	338	CHRM3	1131	GSTP1	2950	MAPK14	1432
APP	351	CHRM4	1132	HIF1A	3091	MAPK3	5595
AR	367	CHRNA2	1135	HK2	3099	MAPK8	5599
Bax	581	CHUK	1147	HMGCR	3156	MCL1	4170
Bcl-2	596	CLDN4	1364	HMOX1	3162	MDM2	4193
Bcl-2L1	598	COL1A1	1277	HSF1	3297	MET	4233
BIRC5	332	COL3A1	1281	HSPB1	3315	MGAM	8972
MMP-1	4312	RASSF1	11186	UGT1A1	54658	NKX3-1	4824
MMP-2	4313	RB1	5925	VCAM-1	7412	NOS2	4843
MMP-3	4314	RELA	5970	CXCL-10	3627	NOS3	4846
MMP-9	4318	RHO	6010	CXCL-11	6373	NQO1	1728
OPRM1	4988	RUNX1T1	862	CXCL-2	2920	PPARG	5468
PARP1	142	RUNX2	860	CXCL-8	3576	ESR1	2099
PCNA	5111	RXRA	6256	CYP1A1	1543	NR3C2	4306
PDE3A	5139	SCN5A	6331	CYP1A2	1544	ODC1	4953
PGR	5241	SELE	6401	CYP1B1	1545	OLR1	4973
PIK3CG	5294	SERPINE1	5054	CYP3A4	1576	XDH	7498
PLAT	5327	SLC2A4	6517	DGAT2	84649	ACPP	55
PLAU	5328	SLC6A2	6530	DIO1	1733	AHSA1	10598
PLB1	151056	SLC6A3	6531	DPP4	1803	CRP	1401
PPARA	5465	SLC6A4	6532	DUOX2	50506	DCAF5	8816
PPARD	5467	SOAT1	6646	E2F1	1869	HAS2	3037

续表 3

基因名称	编码	基因名称	编码	基因名称	编码	基因名称	编码
PPP3CA	5530	SOAT2	8435	E2F2	1870	KCNH2	3757
PRKCA	5578	SOD1	6647	EGF	1950	MAP2	4133
PRKCB	5579	SPP1	6696	EGFR	1956	NPEPPS	9520
PRSS1	5644	SREBF1	6720	EIF6	3692	NR1I2	8856
PSMD3	5709	STAT1	6772	VEGFA	7422	NR1I3	9970
PTEN	5728	SULT1E1	6783	MPO	4353	NUF2	83540
PTGER3	5733	TGFB1	7040	MTTP	4547	PCOLCE	5118
PTGES	9536	THBD	7056	MYC	4609	PON1	5444
PTGS1	5742	TNF	7124	NCF1	653361	POR	5447
PTGS2	5743	TOP2A	7153	NCOA1	8648	SLPI	6590
PYGM	5837	TOP2B	7155	NCOA2	10499	TOP1	7150
RAF1	5894	TP53	7157	NFE2L2	4780		
RASA1	5921	TYR	7299	NF-KBIA	4792		

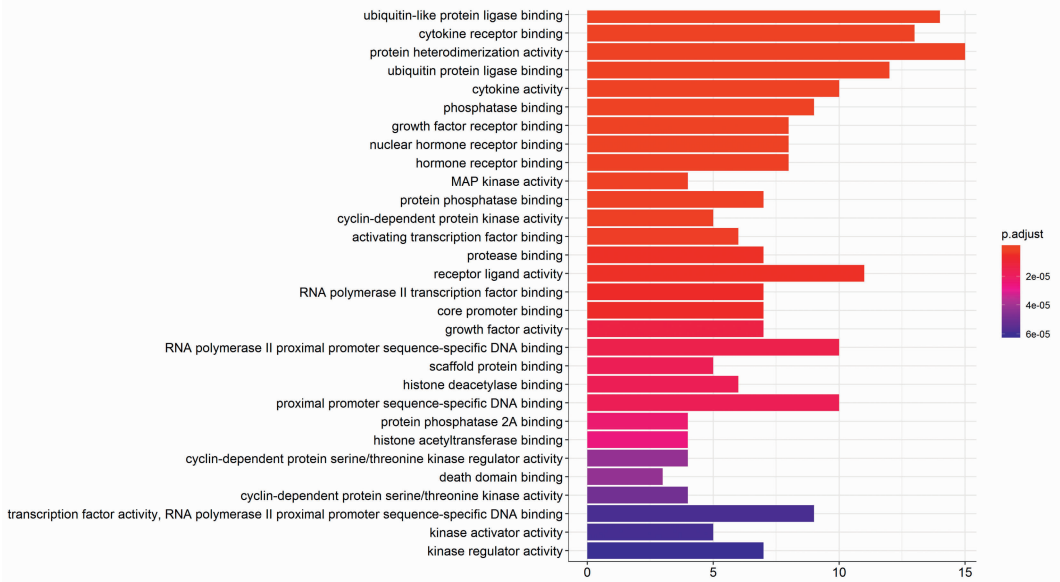


图 3 GO 富集分析的分子功能 (来自 clusterProfiler)

Fig. 3 Molecular function results of GO enrichment analysis (from clusterProfiler)

到蓝表示 pV 值从小到大,即越红表示条目的显著度越高)和 ClueGO,结合 CluePedia 进行 GO 富集分析 (use GO Term Fusion, $pV < 0.05$)。

首先,通过 clusterProfiler 进行 GO 功能富集分析,结果分别为 GO-MF(分子功能),GO-BP(生物过程),GO-CC(细胞组分)。

GO-MF 富集共有 97 个条目,图 3 为显著性前 30 的富集结果,包括泛素样蛋白连接酶结合,泛素蛋白连接酶结合,蛋白异源二聚化活性,细胞因子受体结合,细胞因子活性,磷酸酶结合,蛋白磷酸酶结合,RNA 聚合酶 II 近端启动子序列特异性 DNA 结

合,核心启动子结合,激活转录因子结合,转录因子活性,激酶调节活动,激酶激活子活性,组蛋白去乙酰化酶结合,组蛋白乙酰转移酶结合,周期素依赖蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶调节活动等关于调控细胞的增殖生长及凋亡,细胞的信号传递,基因的转录与表达,细胞因子及激素对细胞的刺激,蛋白的合成,活化与分解,能量的利用等功能。

GO-BP 富集共有 1 966 个条目,图 4 为显著性前 30 的富集结果,包括对活性氧的应答,对氧化应激的应答,对金属离子的应答,对类固醇激素的反应,对脂多糖的应答,对细菌源分子的应答,对凋亡

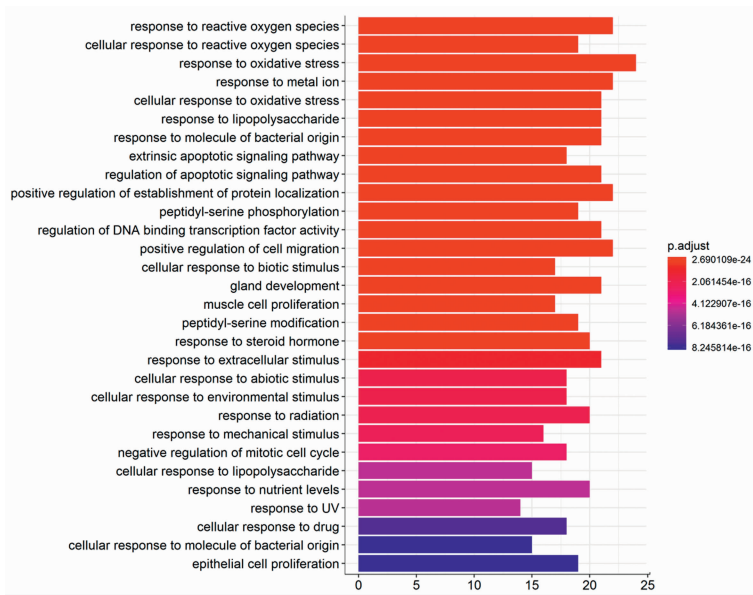


图 4 GO 富集分析的生物过程 (来自 clusterprofiler)

Fig. 4 Biological process results of GO enrichment analysis (from clusterprofiler)

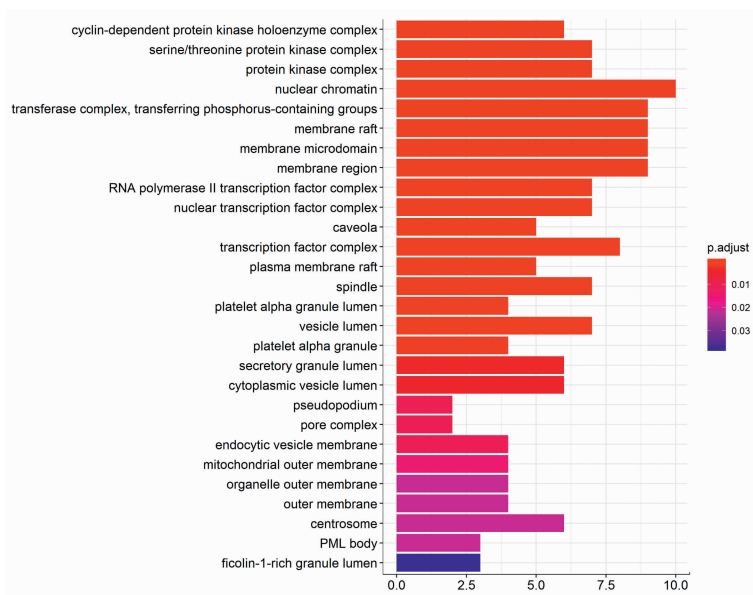


图 5 GO 富集分析的细胞组分 (来自 clusterprofiler)

Fig. 5 Cellular component of GO enrichment analysis (from clusterprofiler)

信号通路的调控, 肽链丝氨酸磷酸化与修饰, DNA 结合转录因子的调控, 有丝分裂细胞周期的负向调控, 细胞迁移的正向调控, 细胞对生物刺激和非生物刺激的应答, 腺体发育, 肌细胞增殖, 上皮细胞增殖等。

GO-CC 富集共有 28 个条目, 见图 5, 包括周期素依赖蛋白激酶全酶复合物, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物, 核染色质, 转移酶复合物, 转移含磷基团, 膜筏, 膜微区, 膜区, RNA 聚合酶 II 转录因子复合物, 核转录因子复合物, 小凹, 质膜筏, 血小板 α 颗粒腔, 囊泡腔, 核孔复合体, 线粒体外膜, 细胞器外

膜等。

其次, 用 ClueGO 分别从生物学过程、免疫系统过程进行分析 (前者共 389 个条目, 后者共 39 个条目, 剔除两者重复部分, 并在生物学过程中筛选出与哮喘明显相关的功能进行显示), 见图 6, 7 (节点的颜色与大小于此不讨论), 富集结果包括对各种免疫细胞的增殖、分化、迁移、趋化、内环境稳态及凋亡, 趋化因子、白细胞介素、肿瘤坏死因子等细胞因子的产生、分泌, 上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞的增殖与迁移、成纤维细胞的增殖, 组织重塑等的调控。

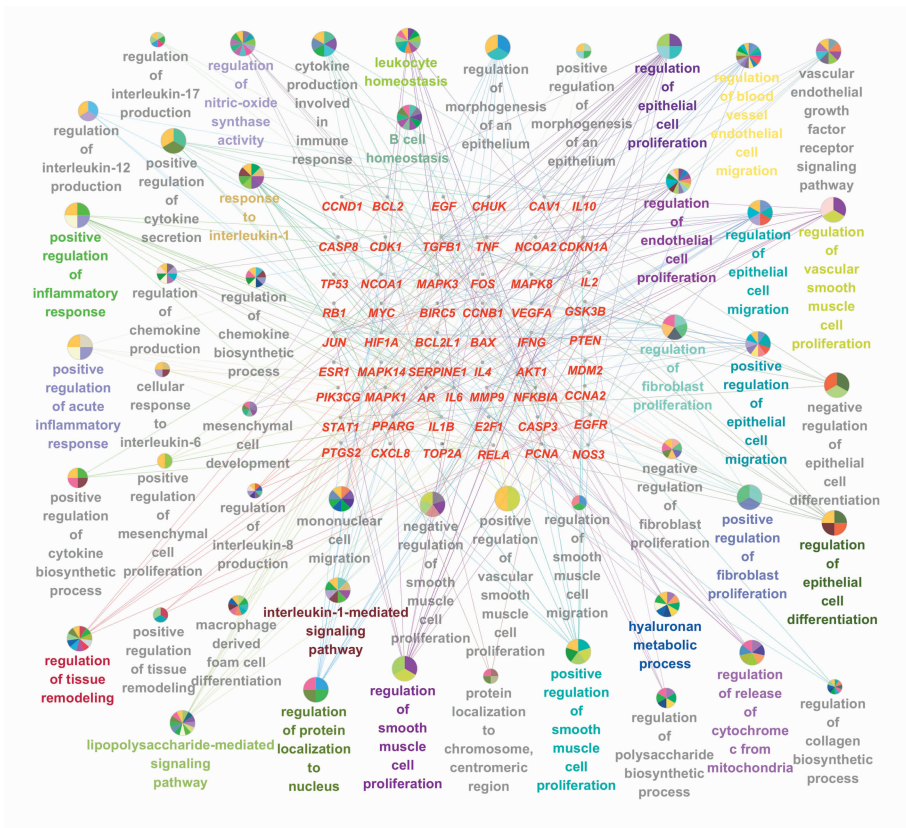


图 6 经筛选的 GO 富集分析的生物过程 (来自 ClueGO)

Fig. 6 Selected biological process of GO enrichment analysis (from ClueGO)

2.4.2 KEGG 通路富集分析 把 BREH 作用的 55 个核心靶点通过 ClueGO 结合 CluePedia 进行 KEGG 通路富集分析 ($pV < 0.05$), 共得到 123 个条目, 剔除了疾病通路后显示共 50 条通路, 见图 8 (节点的大小与颜色于此不讨论), 结果显示, 富集的代谢通路主要涉及哮喘 (Asthma), 辅助性 T 细胞 1 和 2 (Th1 和 Th2), 辅助性 T 细胞-17 (Th17) 的细胞分化, 白细胞介素 17 (IL-17), 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 通路 (PI3K/Akt), 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 核转录因子- κ B (NF- κ B), 血管内皮生长因子 (VEGF) 等信号通路。为了进一步探索 BREH 抗 Asthma 靶点在相关通路中所发挥的作用及其间相互关系, 把 2.1 项中获得的 214 个候选作用靶点名称转换成 entrezID 后 (除 *gst-1* 外皆成功转换), 通过 KEGG 数据库的“search&Color Pathway”工具把靶点映射到相关通路上 (其中 15 个非核心靶点无法被识别, 因此最终仅有 208 个靶点成功输入, 见表 3), 经反复对比筛选后纳入结果, 见图 9, 10, 其中橙色标识即为输入靶点。

3 讨论

射干麻黄汤出自东汉时期张仲景所著《伤寒杂病论》, 为治疗支气管哮喘的经典方, 本文抽取其中

作为君药的 BREH 为研究对象, 初步探究其治疗该病的作用机制。射干与麻黄的共有成分木犀草素能有效抑制哮喘小鼠气道壁厚度和平滑肌厚度的增加及通过抑制 NF- κ B, 组胺, 转录因子 GATA-3 等的表达以减轻支气管炎症^[12-13], 过敏性哮喘表现出先天性和适应性免疫功能的重要相互作用, 而 NF- κ B 被认为是先天性和适应性免疫应答的主要调节因子, 成为治疗哮喘的潜在治疗靶点^[14]。豆甾醇对卵清蛋白诱导的气道炎症损伤有显著的抑制作用^[15]。麻黄中的香木叶素能抑制 TGF- β_1 诱导的上皮-间质转化、抑制平滑肌肌动蛋白链的合成、下调 MMP-9, VEGF 的水平等, 缓解炎症和气道重塑^[16]; TGF- β 在慢性炎症性疾病如慢性阻塞性肺病和哮喘中的表达明显增加, 被认为是一种关键的肺内细胞因子, 慢性炎症性肺病中普遍存在 TGF- β 并且可能有导致免疫抑制状态, 因此患有哮喘的个体更容易出现严重和持续的病毒和细菌感染^[17]。柚皮素能平衡机体的免疫功能^[18]。槲皮素能通过平衡 Th1/Th2 水平、减轻炎症细胞的浸润、影响突触功能以抑制大鼠气管收缩等治疗哮喘^[19]。射干中鸢尾甲黄素 A 在 LPS 刺激下能下调巨噬细胞分泌 NO 及 IL-6 的水平^[20], 异鼠李素能抑制树突状细胞的成熟和迁移等, 缓解炎

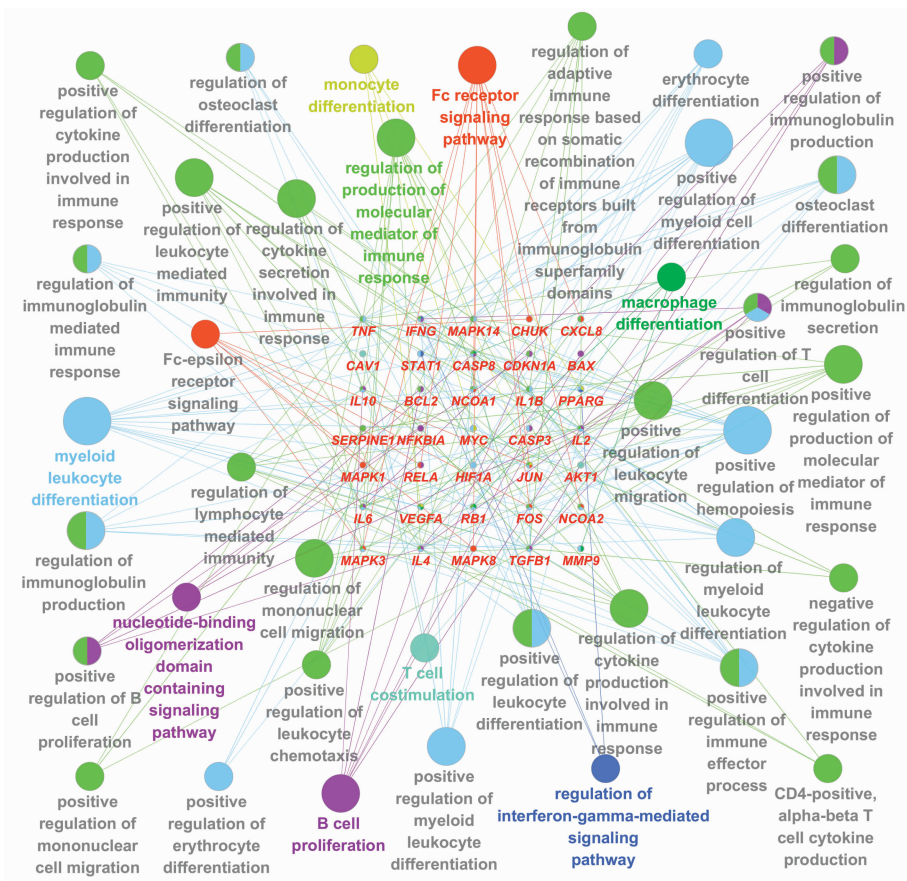


图 7 经筛选的 GO 富集分析的免疫系统过程(来自 ClueGO)
Fig. 7 Selected Immune system process of GO enrichment analysis(from ClueGO)

症^[21-22]。这些作用皆与支气管哮喘的治疗密切相关,体现了 BREH 活性成分筛选的准确性。

“射干麻黄-活性成分-作用靶点”网络体现了中药多成分、多靶点治疗支气管哮喘的特点,见图 1。蛋白相互作用网络展示了靶点间相互关联的情况,包括关联的强度以及数目,见图 2。核心靶点的 GO 功能分析结果反映了分子在机体的多个部位间各自及相互作用所发挥的显著效用。见图 3~7。

Th1/Th2 比例失衡是哮喘发作的重要机制^[23]。正常情况下, Th0 被激活后以一定的比例分化为 Th1 和 Th2,但哮喘发作时, Th2 被过度分化形成,其产生细胞因子和白细胞介素,进一步激活体液免疫和刺激肥大细胞、气道上皮细胞、嗜酸性粒细胞等分泌炎症因子,导致支气管痉挛、黏膜水肿、气流阻塞、气道炎症及高反应性等。有学者研究发现, BREH 能有效抑制炎症介质如 IL-4 的释放和聚集、增强 IFN- γ 的表达等^[24],抑制 Th0 向 Th2 分化,同时更多地向 Th1 分化,从而逆转 Th1/Th2 比例失衡,与本研究观点一致,见图 9。

Treg/Th17 细胞水平失衡在哮喘发作中起重要

作用^[25-26]。Th17 水平升高促进了炎症反应, Treg 水平下降导致机体抑制炎症反应的能力下降^[27]。有研究表明,哮喘患者体内 Treg/Th17 细胞比例明显下降,并且与 IL-10 间呈正相关、与 IL-17 间呈负相关^[28]。本研究预测, BREH 可能通过综合调控 Th17 的细胞分化及 IL-17 信号通路中的多种蛋白的表达(包括重要的细胞因子 TGF- β , IL-6, IL-8, IL-10, 趋化因子 CXCL-1, 2, 8, 基质金属蛋白酶 MMP-1, 3, 9 等),调节 Treg/Th17 平衡,减轻炎症细胞的募集和活化,缓解气道重塑的症状。见图 10。

此外, MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B, VEGF 等信号通路的激活是哮喘发生发展时的重要因素。有研究表明, MAPK 通路能促进胞浆蛋白、转录因子的磷酸化及气道平滑肌增殖等^[29-32],是参与哮喘炎症网络普遍表达的信号酶,且国外学者报道 MAPK 抑制剂在哮喘的临床开发的具有潜力,可能成为哮喘的治疗靶点^[33]。PI3K/Akt 通路能加速细胞周期、促进气道平滑肌的增殖^[34],研究提示 PI3K/Akt 可能更有效的靶向下调 CD38 的表达^[35],成为哮喘等慢性炎症性疾病的治疗靶点。NF- κ B, I κ B 参与多条

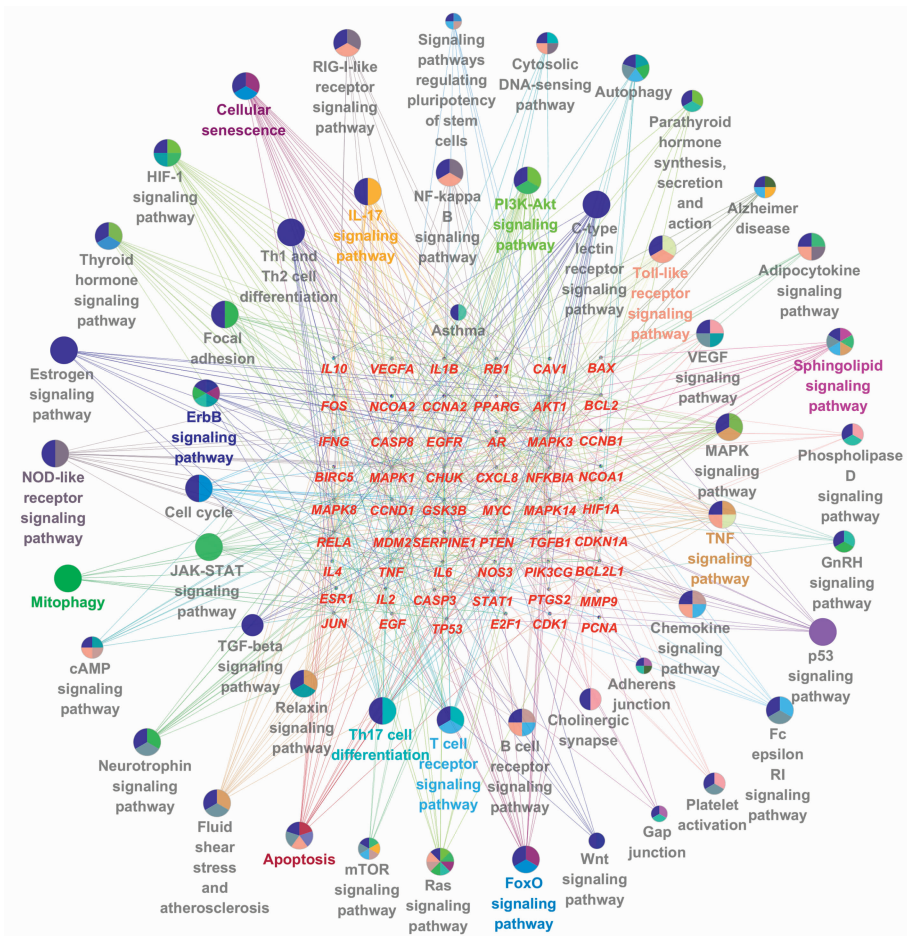


图 8 经筛选的 KEGG 富集分析的通路
Fig.8 Selected pathways in KEGG enrichment analysis

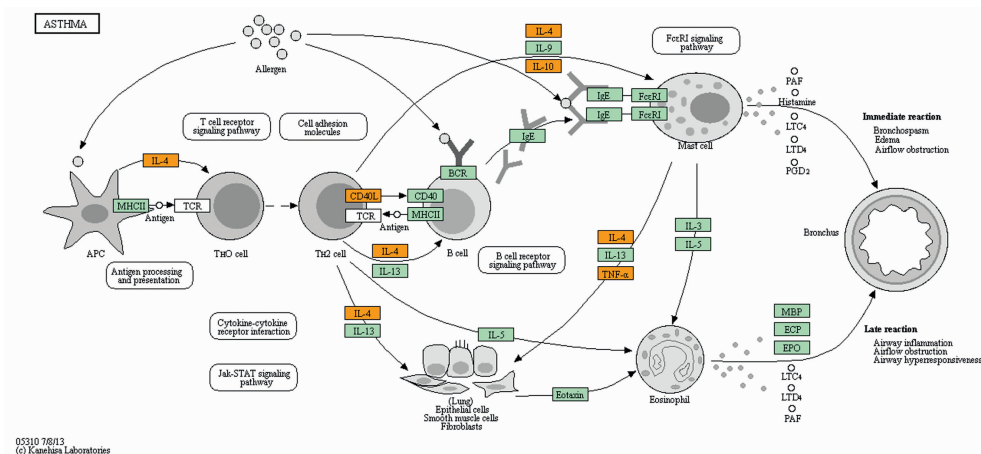


图 9 支气管哮喘信号通路 (来自 KEGG)
Fig.9 Asthma signaling pathway (from KEGG)

信号传导通路并影响多种炎性细胞因子、炎症反应相关酶类 (如 iNOS, COX2), 黏附分子等的基因转录表达 (如 ICAM-1, VCAM-1)^[36]; VEGF 是哮喘气道炎症和重塑的介质, VEGF 刺激血管内皮细胞增殖和血管通透性, 促进支气管内新血管生成^[37], 且研究表明 VEGF 和 TGF-β₁ 在过敏性气道疾病中的相

互作用, 血管内皮生长因子的抑制减弱了支气管周围纤维化^[38]。本研究预测 BREH 能通过同时调控上述通路的多个信号、受体、蛋白激酶、转录因子, 抑制支气管上黏液的分泌、胶原的沉积、细胞的异常增殖等病理变化, 改善气道重塑, 而该药对对具体因子表达水平的具体调控有待进一步研究。

- modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, doi: 10.1155/2017/2953930.
- [16] 马纳,李亚静,范吉平. 香叶木素药理作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(9): 214-217.
- [17] Thomas B J, KAN O K, Loveland K L, et al. In the shadow of fibrosis: innate immune suppression mediated by transforming growth factor-beta[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(6): 759-766.
- [18] 曾文峰,张发云,杜刚军,等. 柚皮素:新一代免疫调节剂[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(9): 915-925.
- [19] 陈果,王雄彪. 植物多酚类中药单体治疗哮喘研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(4): 59-62.
- [20] 邹桂欣,孙小玲,王光函,等. 鸢尾甲黄素 A 对脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的调节作用[J]. *中国药业*, 2017, 26(22): 1-3.
- [21] 石慧. 沙棘提取物异鼠李素抑制树突状细胞成熟和迁移的作用机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [22] 滕丹,栾新尧. 异鼠李素的药效学研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(4): 593-596.
- [23] 李学良,许朝霞,王忆勤. 支气管哮喘发病机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(9): 1960-1963.
- [24] 杨敏茹,杨万军,张伟东,等. 射干麻黄药对对支气管哮喘小鼠模型气道炎症及外周血 Th1/Th2 的影响[J]. *中国药师*, 2012, 15(3): 309-311.
- [25] YANG X, ZHANG J H, DENG W S, et al. Imbalance of gammadeltaT17/gammadeltaTreg cells in the pathogenesis of allergic asthma induced by ovalbumin [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(9): e7127.
- [26] 马婷婷,冯兴中,王学艳. 当归对阴虚哮喘 Balb/c 小鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 的影响及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 758-762.
- [27] Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells in allergic asthma[J]. *Isr Med Assoc J*, 2012, 14(3): 180.
- [28] 徐静,金晓洁,缪志海,等. 支气管哮喘小鼠细胞免疫因子及 Th₁(17) 细胞水平的变化及发病机制研究[J]. *浙江医学*, 2018, 40(3): 221-223.
- [29] 林立,李昌崇. JNK/SAPK 信号转导通路与支气管哮喘气道重塑[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 32(11): 1055-1058.
- [30] 张维溪. MAPK 信号转导途径及其在支气管哮喘中的作用[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2002, 22(5): 236-238.
- [31] 黄翠萍,张珍祥,徐永健. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号传递通路和支气管哮喘气道炎症[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2005, 25(9): 656-658.
- [32] 赵叶,杨金华,韩君萍,等. MEK/ERK 通路参与支气管哮喘发病机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(2): 329-331.
- [33] Khorasanizadeh M, Eskian M, Gelfand E W, et al. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 112-126.
- [34] 吕伟伟,郑锐,谭明旗. PI3K/Akt 信号通路在哮喘气道重塑中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(15): 2961-2965.
- [35] Jude J A, Tirumurugaan K G, KANG B N, et al. Regulation of CD38 expression in human airway smooth muscle cells: role of class I phosphatidylinositol 3 kinases[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(4): 427-435.
- [36] 于锦超,于敏,莫炜. NF- κ B 信号通路在肿瘤发生和炎症反应中的作用[J]. *药物生物技术*, 2016, 23(1): 82-85.
- [37] 邵娜,蔡琦玲,袁连方. 血管内皮生长因子(VEGF)与呼吸系统疾病相关性研究进展[J]. *继续医学教育*, 2016, 30(4): 107-109.
- [38] Lee K S, Park S J, Kim S R, et al. Inhibition of VEGF blocks TGF-beta1 production through a PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Eur Respir J*, 2008, 31(3): 523-531.

[责任编辑 周冰冰]