

基于网络药理学探讨吉贝咳喘汤抗炎的作用机制

杜琳霖¹, 靳风云¹, 徐 锋¹, 王祥培², 吴红梅^{1*}

¹贵州中医药大学, 贵州 贵阳

²贵州民族大学, 贵州 贵阳

收稿日期: 2021年10月15日; 录用日期: 2021年11月15日; 发布日期: 2021年11月22日

摘 要

目的: 运用网络药理学的方法研究经验复方吉贝咳喘汤干预炎症的成分-靶点-通路作用机制, 旨在为其基础研究及临床应用提供依据。方法: 通过ETCM数据库、PharmMapper数据库及SwissADME平台检索筛选出吉贝咳喘汤的活性成分及作用靶点, 采用GeneCards、OMIM、DisGeNet数据库筛出炎症相关靶点, 取两者交集靶点, 将交集靶点利用STRING11.0获得蛋白互作关系, 并通过Cytoscape3.7.2构建PPI网络, 分析吉贝咳喘汤抗炎的关键靶点; 采用Metascape平台进行GO、KEGG基因富集分析, 得到潜在作用通路, 并构建靶点-通路网络。结果: 吉贝咳喘汤中筛选得到145个活性成分, 其中涉及炎症作用靶点316个, 经分析最终筛选出34个关键靶点; KEGG富集分析关键靶点主要被富集在AGE-RAGE、NF- κ B、cAMP等相关通路, 涉及炎症反应、防御调节等3609个相关生物过程。结论: 基于网络药理学探讨了吉贝咳喘汤抗炎成分-靶点-通路的作用特点, 为进一步开展吉贝咳喘汤抗炎作用机制研究提供了新的思路和方法。

关键词

网络药理学, 吉贝咳喘汤, 炎症, 作用机制

Discussion on the Anti-Inflammatory Mechanism of JibeiKechuan Decoction Based on Network Pharmacology

Linlin Du¹, Fengyun Jing¹, Feng Xu¹, Xiangpei Wang², Hongmei Wu^{1*}

¹Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

²Guizhou Minzu University, Guiyang Guizhou

*通讯作者。

文章引用: 杜琳霖, 靳风云, 徐锋, 王祥培, 吴红梅. 基于网络药理学探讨吉贝咳喘汤抗炎的作用机制[J]. 药物资讯, 2021, 10(6): 356-364. DOI: 10.12677/pi.2021.106044

Received: Oct. 15th, 2021; accepted: Nov. 15th, 2021; published: Nov. 22nd, 2021

Abstract

Objective: To use the method of network pharmacology to study the component-target-pathway mechanism of the empirical compound JibeiKechuan Decoction to interfere with inflammation, in order to provide a basis for its basic research and clinical application. **Methods:** Search and screen out the active ingredients and targets of JibeiKechuan Decoction through ETCM database, Pharm-Mapper database and SwissADME platform. Use GeneCards, OMIM, and DisGeNet databases to screen out inflammation-related targets, take the intersection of the two targets and combine them. The target uses STRING 11.0 to obtain protein interaction relationships, and constructs a PPI network through Cytoscape 3.7.2 to analyze the key targets of JibeiKechuan Decoction for anti-inflammation; uses Metascape platform to perform GO and KEGG gene enrichment analysis to obtain potential pathways and construct them Target-access network. **Results:** 145 active ingredients were screened in JibeiKechuan Decoction, including 316 targets involved in inflammation, and finally 34 key targets were screened out after analysis; the key targets of KEGG enrichment analysis were mainly enriched in AGE-RAGE, NF- κ B, cAMP and other related pathways, involving 3609 related biological processes, such as inflammatory response and defense regulation. **Conclusion:** Based on network pharmacology, the characteristics of the anti-inflammatory component-target-pathway of JibeiKechuan Decoction were discussed, which provided new ideas and methods for further research on the anti-inflammatory mechanism of JibeiKechuan Decoction.

Keywords

Network Pharmacology, JibeiKechuan Decoction, Inflammation, Mechanism of Action

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

吉贝咳喘汤由吉祥草、毛大丁草、黄芩、浙贝母、蛤壳等 11 味中药及民族药组成，方中重用苗药吉祥草作为君药，另取黄芩、浙贝、蛤壳 3 味合而为臣；再以毛大丁草、桑白等 7 味共为佐药，具有清热宣肺，化痰散结、平喘止咳之功。适用于风热犯肺、风燥伤肺及肺失清肃所致之咳嗽、胸肋满闷等病症 [1] [2] [3]。此方对慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)能迅速改善症状、体征，明显缩短病程，提高治愈率 [4]，在急性发作期，可及时控制炎症感染的发展，具有一定的抗炎效果，而炎症与许多疾病的发生、发展密切相关，但目前对于吉贝咳喘汤抗炎的药理学作用机制研究相对匮乏。为更好地了解吉贝咳喘汤的抗炎作用机制，本研究通过网络药理学的方法，在分子的水平上，从化学成分、作用靶点和信号传导通路对吉贝咳喘方的抗炎作用机制进行系统研究，以期为进一步揭示吉贝咳喘汤的药理作用机制提供理论基础。

2. 方法

2.1. 相关成分及靶点筛选

通过 ETCM 数据库 [5] (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>)并结合查阅文献对吉贝咳

喘汤中的化学成分信息进行收集, 将所获取化合物结构输入 SwissADME 平台 [6] (<http://www.swissadme.ch/>)。设置潜在核心化合物的标准为: ① 肠胃吸收为“High”, 表明成分具备良好口服生物利用度, 可被吸收; ② 设置 5 类药性预测(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)结果有 2 个及 2 个以上为“Yes”。其后通过文献核查根据筛选标准所排除的化合物, 若化合物药理作用明显且与研究主题相关, 仍予以纳入, 最终获得研究主题相关的潜在化合物。再利用基于药效团匹配法的 PharmMapper 数据库 [7] (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>) 获取潜在化合物的靶点, 选择 Normalized Fit Score (NF) ≥ 0.9 的靶点蛋白, 并根据已发表的药物相关成分文献报道, 补充未预测到的活性化合物的已知靶点。

2.2. 炎症的相关靶点获取

通过 OMIM 数据库 [8] (<http://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 [9] (<https://www.genecards.org>) 及 DisGeNet 数据库 [10] (<http://www.disgenet.org/home/>) 筛选治疗炎症的基因和蛋白靶点, 建立炎症靶点数据集。最后将筛选得到的所有靶点均经 UniProt 数据库 [11] (<https://www.uniprot.org/>) 将疾病靶点与药物成分的潜在靶点统一规范为 Gene Symbol, 其进行合并取其交集, 作为复方中活性成分防治炎症的潜在靶点。

2.3. 网络构建与分析

将上述靶点上传至 STRING11.0 数据库 [12] (<https://string-db.org>), 选择物种为“Homo sapiens”, 设置最小交互值(Minimum required interaction score), 以获得 PPI 网络关系, 利用 Cytoscape3.7.2 [13] 软件将以上网络进行可视化分析, 得到每个节点的 Degree、Betweenness centrality、Closeness centrality 3 个拓扑参数, 经分析选择以上 3 个拓扑参数值满足分别大于所有点中位数值值的靶点, 作为吉贝咳喘汤防治炎症的关键靶点。

2.4. 化学成分与疾病靶点 GO 功能富集和 KEGG 通路富集

利用 Metascape 平台 (<http://metascape.org/>) [14] 对关键靶点进行生物信息富集分析, 包括 GO 分析的生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)以及 KEGG 通路。对各个分析结果按照 P 值从小到大排序, 且以 $P \leq 0.01$ 为筛选条件, 选取符合条件的进行富集分析。

3. 结果

3.1. 主要活性成分及疾病靶点收集

通过 ETCMP、OMIM 等数据库, 以 ADME 参数($OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.15$)或药效活性(文献报道)为标准, 共筛选得到 145 个活性化合物, 获得相关靶点 564 个, 在 OMIM 数据库、GeneCards 数据库, 分别以“*Inflammation*”、“*Inflammatory*”为关键词检索炎症的相关靶点, 删除重复靶点后, 得到 1590 个疾病靶点取交集, 获得 316 个共同靶点, 并通过 R3.6.1 绘制 VENN 图(图 1)。

3.2. 蛋白互作网络图及成分潜在靶点网络图构建

将筛选到的成分靶点和疾病靶点进行合并取其交集, 做为吉贝咳喘汤活性成分抗炎的潜在靶点, 将 228 个交集靶点导入 STRING 数据库中构建蛋白相互作用网络, 分析潜在靶点, 设置参数得分为 0.4, 得到潜在靶点蛋白相互作用网络图(PPI), PPI 网络图中有 223 个节点蛋白互作, 10,206 条相互作用线(图 2), 其中 number of nodes = 315、number of edges = 1534、average node degree = 9.74、avg. local clustering coefficient = 0.409、expected number of edges = 592。将结果以 TSV 格式导出, 通过 Cytoscape3.7.2 获取

PPI 网络中拓扑参数, 在 Cytoscape3.7.2 软件中进行网络拓扑参数分析, 经筛选得到 34 个关键靶点并用软件进行可视化(图 3), 同时构建“中药 - 成分 - 潜在靶点”网络图(图 4)。

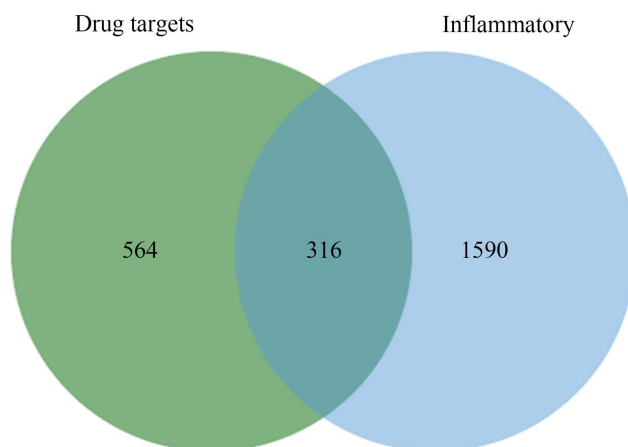


Figure 1. VENN map of drug targets and disease targets

图 1. 药物靶点和疾病靶点 VENN 图

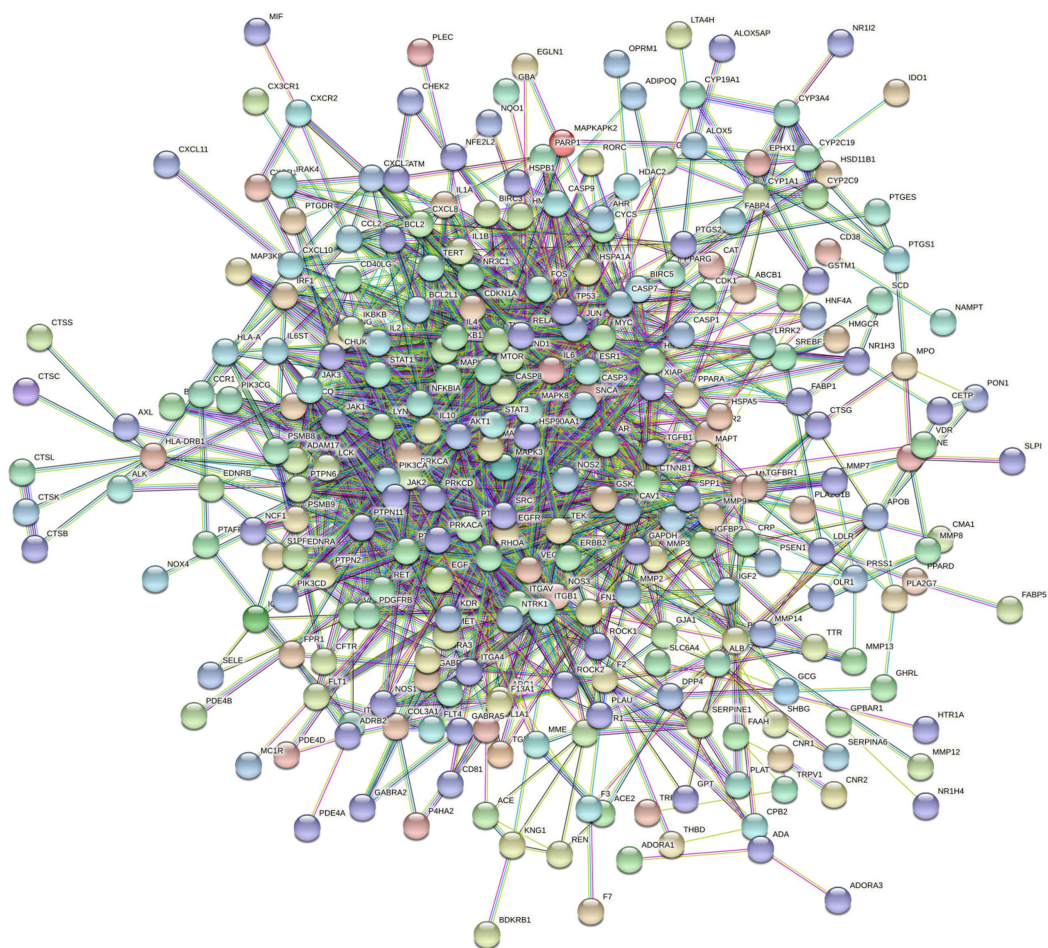


Figure 2. Potential target protein interaction network

图 2. 潜在靶点蛋白互作网络图

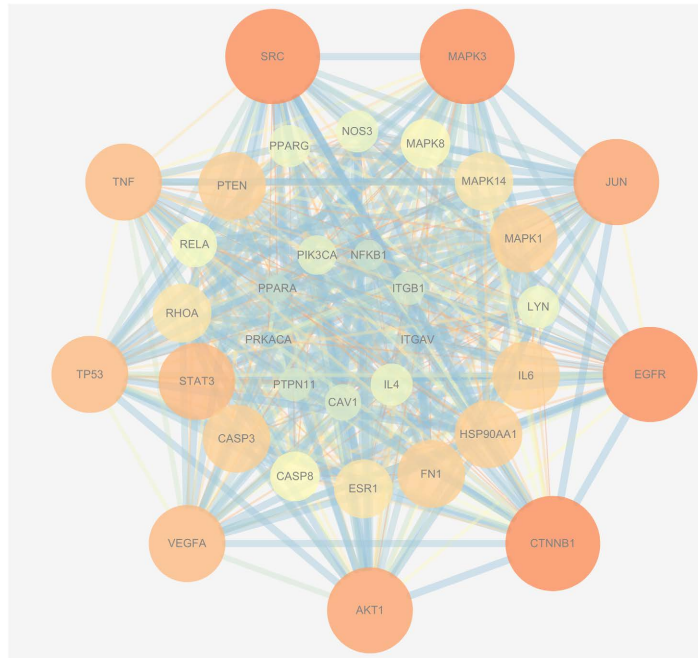


Figure 3. Visual diagram of protein interaction network of key targets
图 3. 关键靶点蛋白互作网络可视化

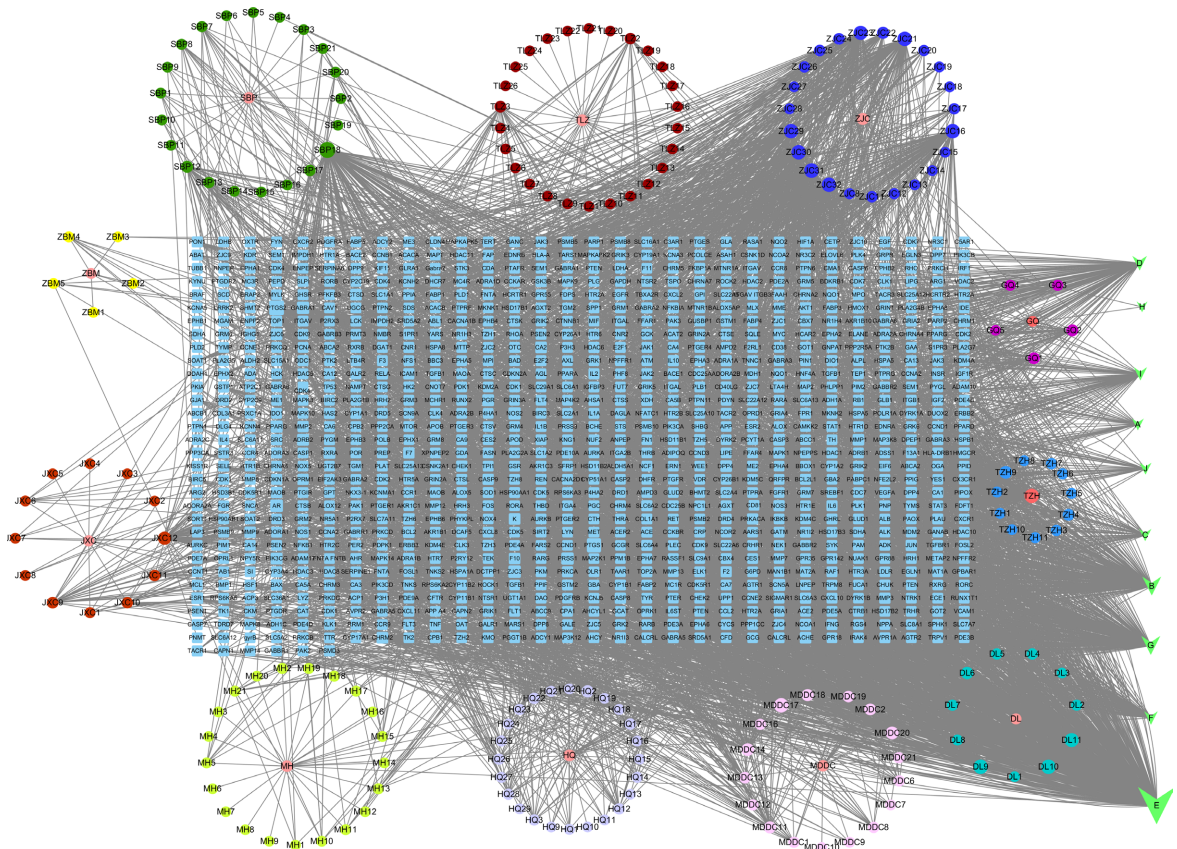


Figure 4. "Compound ingredients-target" Network
图 4. "中药 - 成分 - 潜在靶点" 网络图

3.3. 关键靶点的 GO 功能富集分析

运用 Metascape 数据库将吉贝咳喘汤抗炎的关键靶标蛋白基因上传, 设置参数 $P < 0.01$, 开展 GO 功能富集分析, 富集分析涉及其生物学过程、细胞组件及分子功能。共富集得到 3609 个条目, 生物过程包括炎症、防御反应的调节、对脂多糖、细菌及受伤的反应等, 根据显著性 P 值筛选前 30 条生物过程数据进行可视化(图 5)。

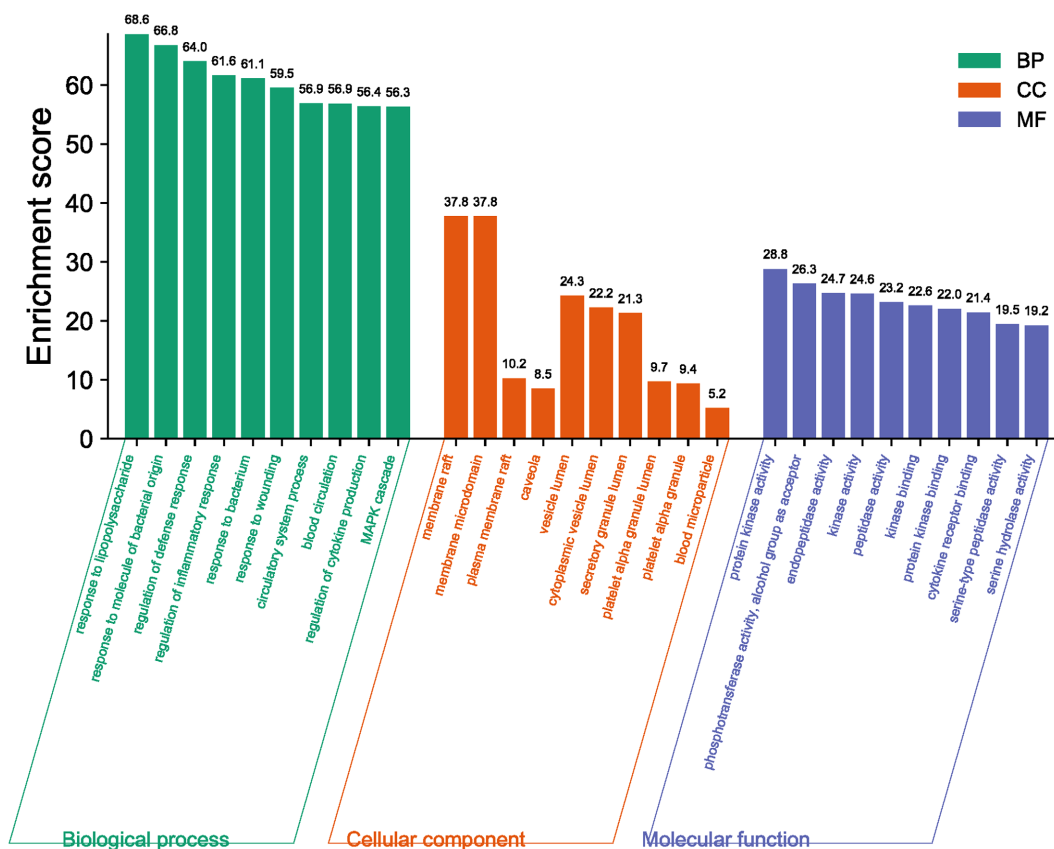


Figure 5. Visualization of GO enrichment analysis

图 5. GO 富集分析可视化图

3.4. 关键靶点的 KEGG 功能富集分析

将靶标基因在 Metascape 平台中进行 KEGG 信号通路富集分析, 总计得到 357 条涉及吉贝咳喘汤-炎症相关信号通路, 按照显著性 P 值选取前 20 条通路绘制气泡图(图 6), 靶点通路富集结果见下表(表 1)并构建靶点-通路网络图(图 7), 通过 KEGG 富集分析可推断吉贝咳喘汤干预炎症主要由 NF- κ B 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、cAMP 信号通路、细胞凋亡、癌症途径等。

Table 1. System resulting data of standard experiment

表 1. 靶点通路富集结果

| GO | Description | Count | $-\text{Log}_{10}(P)$ |
|----------|------------------------------------------------------|-------|-----------------------|
| hsa05200 | Pathways in cancer | 74 | 68.15 |
| hsa04933 | AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications | 40 | 49.83 |

Continued

| | | | |
|----------|--------------------------------------------------|----|-------|
| hsa04080 | Neuroactive ligand-receptor interaction | 46 | 39.3 |
| hsa04062 | Chemokine signaling pathway | 37 | 34.98 |
| hsa05169 | Epstein-Barr virus infection | 43 | 33.96 |
| hsa04210 | Apoptosis | 33 | 33.72 |
| ko04064 | NF-kappa B signaling pathway | 25 | 26.76 |
| hsa04024 | cAMP signaling pathway | 31 | 23.86 |
| hsa04060 | Cytokine-cytokine receptor interaction | 32 | 22.61 |
| hsa05219 | Bladder cancer | 16 | 20.48 |
| ko05323 | Rheumatoid arthritis | 20 | 19.89 |
| hsa04630 | Jak-STAT signaling pathway | 23 | 18.52 |
| hsa04611 | Platelet activation | 21 | 17.8 |
| hsa04750 | inflammatory mediator regulation of trp channels | 19 | 17.21 |
| ko05202 | Transcriptional misregulation in cancer | 22 | 15.95 |
| hsa04072 | Phospholipase D signaling pathway | 21 | 15.67 |
| hsa05014 | Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) | 12 | 12.48 |
| hsa04115 | p53 signaling pathway | 13 | 12.13 |
| hsa05010 | Alzheimer's disease | 18 | 12.02 |
| hsa04211 | Longevity regulating pathway | 15 | 11.82 |

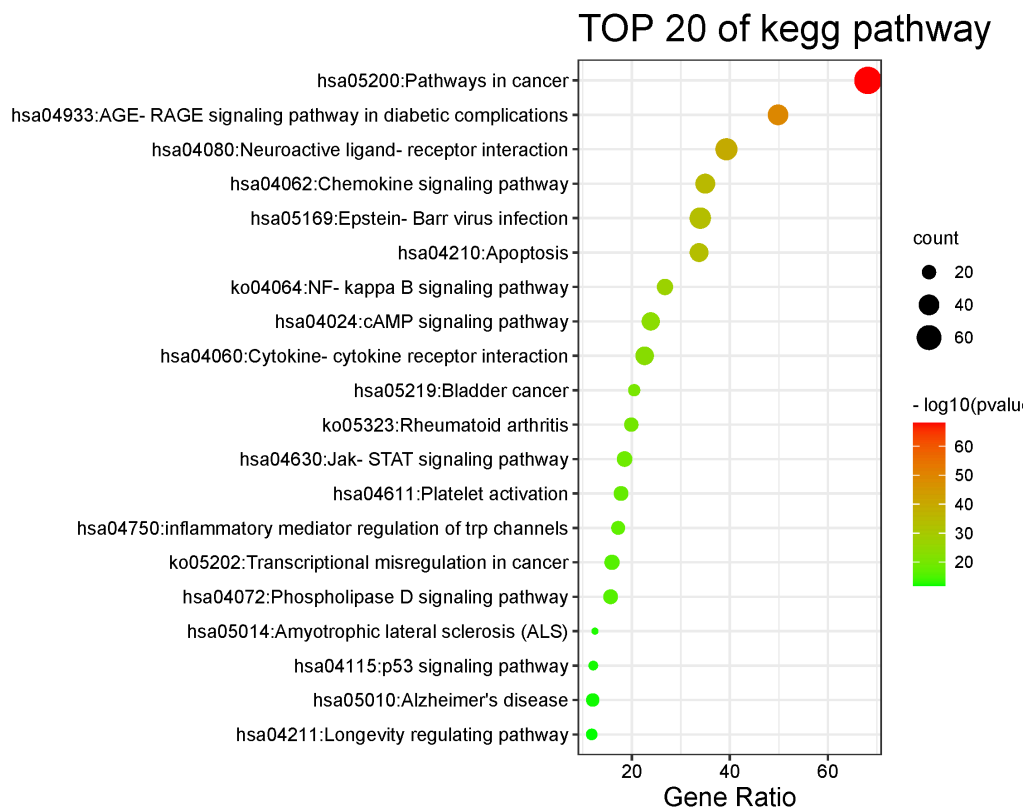


Figure 6. KEGG signal pathway analysis

图 6. KEGG 信号通路分析图

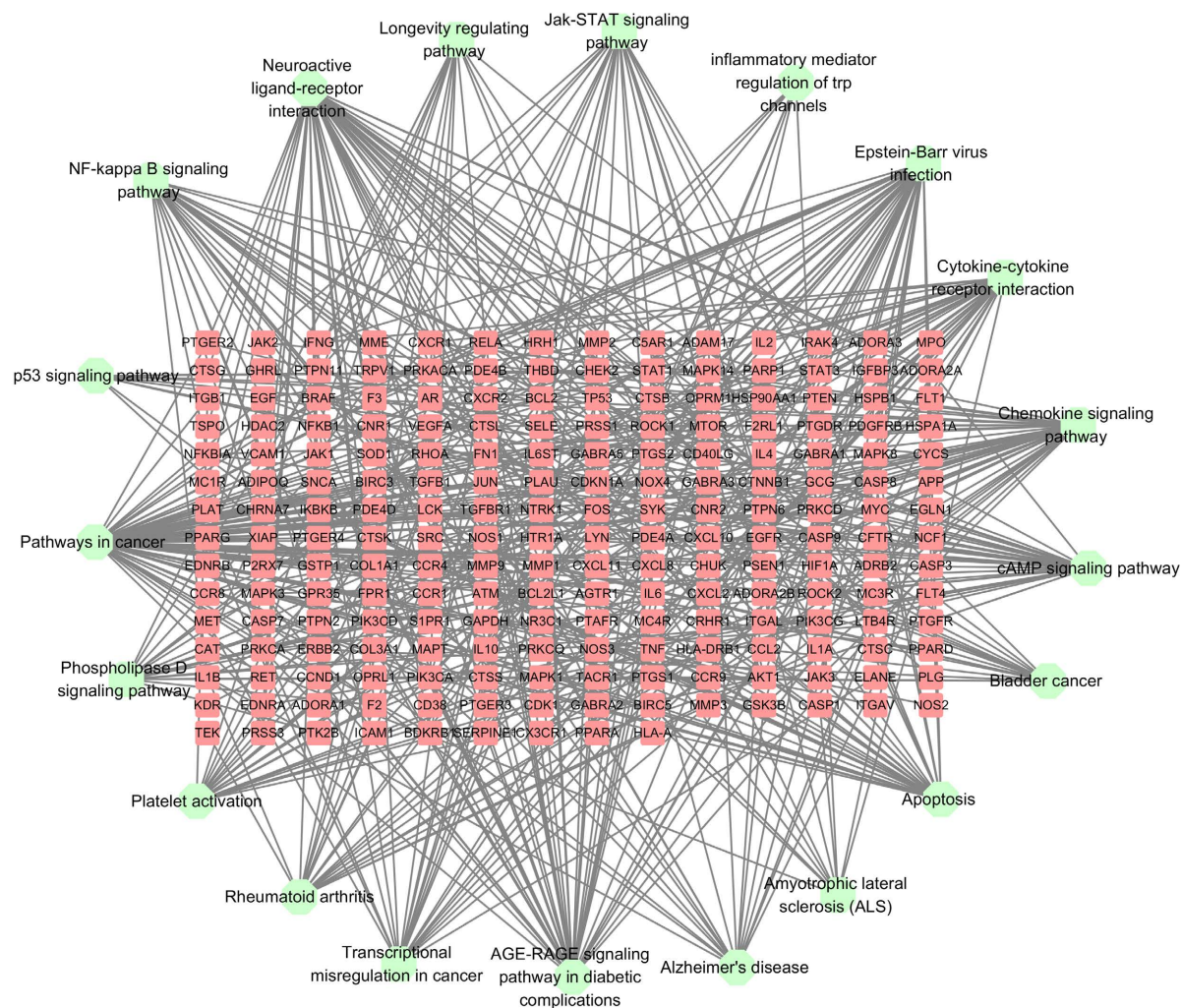


Figure 7. Target-path network diagram
图 7. “靶点 - 通路”网络图

4. 讨论

传统中医药大多通过多成分、多靶点、多途径协调作用而发挥治疗目的，但是由于中药化学成分的种类非常复杂，难以全面阐明药效物质基础和作用机制，给中医药的研究带来了难题。网络药理学通过挖掘大量数据，构建“成分 - 靶点”、“靶点 - 通路”等复杂网络图，可为中药药效物质基础和作用机制的研究提供了新的思路和方法，进一步推动了中医药的快速发展。目前研究显示，炎症反应与许多疾病(糖尿病、心脏病、高血压等疾病)的发生、发展密切相关[15] [16] [17]，因此，揭示吉贝咳喘汤抗炎的作用机制，可以进一步实现吉贝咳喘汤新药开发的价值。

本研究采用网络药理学研究方法，筛选得到了吉贝咳喘汤 145 个活性化合物，通过网络拓扑参数分析，筛选出 34 个潜在关键作用靶点，提示这些潜在靶点蛋白可能直接或间接参与抗炎作用。通过 GO 富集和 KEGG 通路注释分析结果，发现 357 条信号通路及 3609 个生物过程参与吉贝咳喘汤的抗炎作用，其中与炎症相关的主要信号通路包括癌症的途径、趋化因子、细胞凋亡、膀胱癌、类风湿关节炎、Jak-STAT、p53、AGE-RAGE、NF- κ B、cAMP 等信号通路，这些信号通路主要涉及的生物过程包括对脂多糖、细菌及来源分子的反应、细胞因子产生的调节、细胞因子介导的信号通路、MAPK 级联的正调控等。其中 RAGE

与 AGEs 之间的相互作用可引起促炎反应, 慢性低级、无菌性炎症, 随着 AGEs 的增长而增加, 可导致线粒体功能障碍或细胞衰老, AGEs 的堆积能激活 NF- κ B 信号通路并诱发氧化应激炎症反应的发生[18]。因此, 我们推测吉贝咳喘汤可能通过 AGE-RAGE、NF- κ B 信号通路的相互作用以及相关通路靶点来达到抗炎效果, 以期为吉贝咳喘汤抗炎作用机制提供了科学依据, 也为吉贝咳喘汤的深入研究及开发利用提供参考。

基金项目

贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(项目合同编号: 黔科合中专[2004] 44 号)、贵阳市科技局中药现代化专项(项目合同编号: [2007]筑科农合同字第 3-1 号)。

参考文献

- [1] 姚婉贞, 徐永健. 慢性阻塞性肺疾病[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007.
- [2] 武维屏. 中西医临床呼吸病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998.
- [3] 中华医学会呼吸病分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(8): 453-460.
- [4] 唐俊伟, 葛正行. 葛正行教授运用吉贝咳喘方治疗肺胀痰热郁肺证经验[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(13): 65-66.
- [5] Xu, H.Y., Zhang, Y.Q., Liu, Z.M., Chen, T., Lv, C.-Y., Tang, S.-H., *et al.* (2019) ETCM: An Encyclopaedia of Traditional Chinese Medicine. *Nucleic Acids Research*, **47**, D976-D982. <https://doi.org/10.1093/nar/gky987>
- [6] Antoine, D., Olivier, M. and Vincent, Z. (2017) SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- [7] Wang, X., Shen, Y.H., Wang, S.L., Li, S., Zhang, W., Liu, X., *et al.* (2017) Pharm Mapper 2017 Update: A Web Server for Potential Drug Target Identification with a Comprehensive Target Pharmacophore Database. *Nucleic Acids Research*, **45**, W356-W360. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx374>
- [8] Amberger, J.S. and Hamosh, A. (2017) Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. *Current Protocols in Bioinformatics*, **58**, 1.2.1-1.2.12. <https://doi.org/10.1002/cpbi.27>
- [9] Marilyn, S., Irina, D., Justin, A., Rosen, N., Iny Stein, T., Shmoish, M., *et al.* (2010) GeneCards Version 3: The Human Gene Integrator. *Database*, **2010**, Article No. baq020. <https://doi.org/10.1093/database/baq020>
- [10] Piñero, J., Bravo, À., Queralt-Rosinach, N., Gutiérrez-Sacristán, A., Deu-Pons, J., Centeno, E., *et al.* (2017) DisGeNET: A Comprehensive Platform Integrating Information on Human Disease-Associated Genes and Variants. *Nucleic Acids Research*, **45**, D833-D839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw943>
- [11] Mohamed, S., Mostafa, A.A., Ali, A.E., Osama, A., Ezzeldin, S., Mahgoub, S., *et al.* (2020) UniprotR: Retrieving and Visualizing Protein Sequence and Functional Information from Universal Protein Resource (UniProt Knowledgebase). *J Proteomics*, **213**, Article ID: 103613. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103613>
- [12] Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., *et al.* (2019) STRING v11: Protein-Protein Association Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Research*, **47**, D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- [13] Otasek, D., Morris, J.H., Bouças, J., Pico, A.R. and Demchak, B. (2019) Cytoscape Automation: Empowering Workflow-Based Network Analysis. *Genome Biology*, **20**, Article No. 185. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1758-4>
- [14] Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., *et al.* (2019) Metascape Provides a Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets. *Nature Communications*, **10**, No. 1.
- [15] 陈一丁. NLRP3 炎性小体与老年糖尿病患者胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 基层医学论坛, 2019, 23(5): 606-607.
- [16] 史培青. 高血压患者血压昼夜节律与炎症因子及血管内皮功能的相关性研究[J]. 湖北民族学院学报: 医学报, 2018, 35(2): 41-43, 47.
- [17] 孙爱丽, 丛海涛, 陈玲阳, 马德华, 王明仓. 炎症反应在糖尿病及心血管并发症中的机制研究进展[J]. 中国现代医生, 2018, 56(28): 159-164.
- [18] Plotkin Lilian, I., Essex Alyson, L. and Davis Hannah, M. (2019) RAGE Signaling in Skeletal Biology. *Current Osteoporosis Reports*, **17**, 16-25. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00499-w>