

基于网络药理学探讨灵芝治疗哮喘的作用机制

罗成浩, 杨灵丽, 龚荣英, 吴昌燕, 梁建东*

贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年6月4日; 录用日期: 2022年7月2日; 发布日期: 2022年7月7日

摘要

目的: 本研究采用网络药理学的方法探讨灵芝治疗哮喘的可能作用机制。方法: 通过检索TCMSP数据库筛选灵芝的活性成分, 在GeneCards数据库中查找哮喘的相关靶点, 取交集基因进行蛋白互作分析, GO生物富集及KEGG富集分析。结果: 得出灵芝活性成分14个, 灵芝与哮喘的潜在相交靶标24个, 主要有NR3C2、PGR、NCOA2等; 基于DAVID数据库, GO功能分析与KEGG通路富集分析结果表明, 灵芝参与的主要信号通路有adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway、response to estradiol和G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway等。结论: 灵芝可能是通过调控Apoptosis-multiple species、Hepatitis B、Cholinergic synapse和Human immunodeficiency virus 1 infection等信号通路上的CASP9, JUN, CASP8和CASP3等基因发挥治疗哮喘的作用。

关键词

网络药理, 灵芝, 哮喘, 机制

Study on the Mechanism of Ganoderma in Treating Asthma Based on Network Pharmacology

Chenghao Luo, Lingli Yang, Rongying Gong, Changyan Wu, Jiandong Liang*

School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jun. 4th, 2022; accepted: Jul. 2nd, 2022; published: Jul. 7th, 2022

Abstract

Objective: To explore the possible mechanism of *Ganoderma* in the treatment of asthma. **Methods:**

*通讯作者。

The active components of *Ganoderma* were screened by searching the tcmsp database, and the related targets of asthma were found in the genecards database. The intersection genes were taken for protein interaction analysis, go bioaccumulation, and KEGG enrichment analysis. Results: There were 14 active ingredients in *Ganoderma* and 24 potential cross targets between *Ganoderma* and asthma, mainly NR3C2, PGR, NCOA2, etc; Based on David database, go function analysis and KEGG pathway enrichment analysis results show that the main signal pathways involved by *Ganoderma* include adenylate cycle inhibiting G-protein coupled acetylcholine receiver signaling pathway, response to estradiol, G-protein coupled acetylcholine receiver signaling pathway, etc. Conclusion: *Ganoderma lucidum* may play a role in the treatment of asthma by regulating CASP9, Jun, CASP8, and CASP3 genes on the signal pathways of apoptosis-multiple species, hepatitis B, cholinergic synapse, and human immunodeficiency virus 1 infection.

Keywords

Network Pharmacology, *Ganoderma*, Asthma, Mechanism

Copyright © 2022 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

哮喘是一种由于下呼吸道慢性炎症引起的常见疾病[1], 其特点是呼吸道症状和气流受限。其发病机制复杂, 可由各种过敏物质诱发, 其中涉及免疫细胞及促炎因子[2]。其主要治疗方法是抗炎和支气管扩张剂, 并以循序渐进的方式使用[3]。然而, 无论哮喘的严重程度如何, 尽管现已有最佳的药物治疗, 但患者还是会出现症状急性加重和因疾病失去控制的情况[4]。由于治疗困难, 容易复发, 仅仅依靠药物及环境控制措施, 并不能解决根本问题[5]。因此寻找新的药物及治疗靶点受到人们关注。

灵芝 *Ganoderma* 为担子菌纲, 多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst 或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体[6]。灵芝是中医药中历史悠久的中药材, 具有广泛的药理活性及食用价值[7]。最早记载于 2000 多年前的《神农本草经》中[8]。其味甘, 性平。归心、肺、肝、肾经。具有补气安神, 止咳平喘。用于心神不宁, 失眠心悸, 肺虚咳喘, 虚劳短气, 不思饮食[9]。现代研究表明, 从灵芝中分离出的各种化合物, 主要的活性成分有多糖、三萜、甾醇、蛋白质、腺苷等[10] [11]。其中灵芝多糖是灵芝最关键的有效成分之一, 在免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降血糖、调血脂等方面具有较好的药理作用[12]。其中报道的灵芝对哮喘的研究值得关注, Liu 等[13]发现冲灵芝提取的灵芝酸 β , 发现灵芝酸 β 可以抑制 IL-5, 增强 IFN- γ 、IL-10 和 IL-12 的产生, 并恢复哮喘患者外周血单个核细胞的 Th1/Treg-Th2 平衡培养物。石敦义等[14]研究灵芝孢子粉对哮喘动物实验中, 发现灵芝孢子粉可以有效减轻肺组织炎症病变, 和抑制肥大细胞激活释放类胰蛋白酶的作用。

2. 材料与方法

2.1. 活性成分的建立及作用靶点预测

通过 TCMSp 数据库[15] (<http://www.tcmip.cn/>)检索“灵芝”所有的成分, 以 $OB \geq 30$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件[16], 此条件下默认为该化合物为活性成分, 筛选出灵芝的活性成分及作用靶点, 建立成分靶点数据集。

2.2. 疾病靶点的筛选与建立

进入 GeneCards 数据库[17] (<https://www.genecards.org/>), 以“asthma”为关键词筛选与哮喘相关的基因靶点。将疾病靶点和药物靶点共同导入 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)中, 建立疾病-药物共用靶点图及数据集。

2.3. 关键靶点 PPI 络建网络构建

为了明确灵芝对治疗哮喘靶点之间的相互作用, 将筛选出的靶点导入 String [18] (<https://string-db.org/>)中, 设置种类为“Homo sapiens (人类)”构建靶点互作网络图(PPI), 置信度为 0.4 [19], 隐藏网络中离散点, 将结果导入 Cytoscape 3.9.0 中, 采用其“Network Analyzer”选项进行分析, 确定灵芝治疗哮喘的核心靶点。

2.4. GO 生物过程富集分析和 KEGG 信号通路

将疾病-药物共有靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中进行 GO 生物过程富集分析和 KEGG 信号通路分析, 结果以气泡图的形式进行展示。

3. 结果

3.1. 活性成分的筛选

通过检索 TCMSp 数据库, 以 $OB \geq 30$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件, 共得到灵芝化学成分 242 个, 共得到具有靶点的活性成分 14 个, 分别为: methyl (4R)-4-[(5R,10S,13R,14R,17R)-4,4,10,13,14-pentamethyl-3,7,11,15-tetraoxo-2,5,6,12,16,17-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate (MOL011129)、campesta-7,22E-dien-3beta-ol(MOL011137)、5alpha-Lanosta-7,9(11),24-triene-15alpha,26-dihydroxy-3-one (MOL011140)、ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one (MOL011159)、ergosta-7,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,6 α -triol (MOL011168)、ganoderal B (MOL011171)等, 潜在靶点 43 个, 具体见表 1。43 个靶点去重后共有 28 个潜在靶点。

Table 1. *Ganoderma* active ingredients and target number

表 1. 灵芝活性成分及靶标数

MOL ID	Chemical Component	靶点数
MOL011129	methyl (4R)-4-[(5R,10S,13R,14R,17R)-4,4,10,13,14-pentamethyl-3,7,11,15-tetraoxo-2,5,6,12,16,17-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate	1
MOL011137	campesta-7,22E-dien-3beta-ol	3
MOL011140	5alpha-Lanosta-7,9(11),24-triene-15alpha,26-dihydroxy-3-one	1
MOL011159	ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one	1
MOL011168	ergosta-7,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,6 α -triol	1
MOL011171	ganoderal B	2
MOL011256	ganolucidic acid E	1
MOL011267	Lucialdehyde B	1
MOL011270	(4R)-4-[(5R,7S,10S,13R,14R,17R)-7-hydroxy-3,11,15-triketo-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,7,12,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]valeric acid	1
MOL011287	lucidone A	2

Continued

MOL011309	methyl (4R)-4-[(5R,7S,10S,13R,14R,15S,17R)-7,15-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-3,11-dioxo-2,5,6,7,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate	1
MOL000279	Cerevisterol	1
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	1
MOL000358	beta-sitosterol	26

3.2. 疾病和药物相关靶点的筛选

在 GeneCards 数据库中以“asthma”为关键词检索,得到与哮喘相关靶基因共 7,472 个,采用 Venny2.1 对灵芝相关靶点及哮喘的靶点进行维恩图绘制,见图 1,得到灵芝与哮喘共有靶点 24 个,这些靶点包括 NR3C2、PGR、NCOA2、NCOA1、PTGS1 和 PTGS2 等。

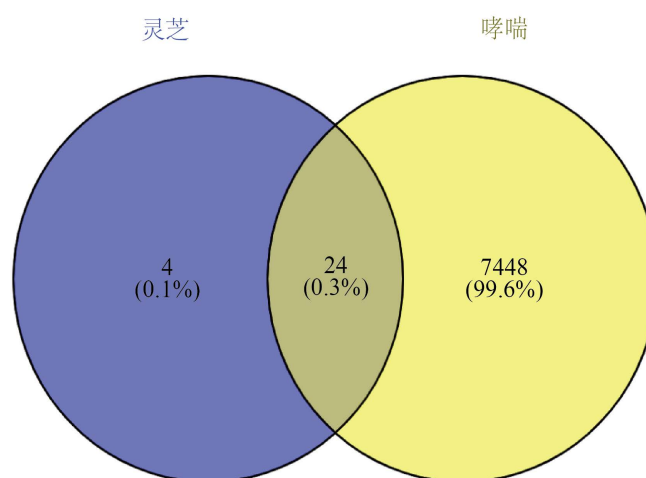


Figure 1. *Ganoderma* target of active ingredient and target of asthma
图 1. 灵芝活性成分靶点与哮喘交集靶点

3.3. 灵芝治疗哮喘的直接作用靶点拓扑参数分析

用 String 数据库构建关键靶点之间的相互作用图,将灵芝治疗哮喘的共有靶点导入 String 中,得到蛋白互作网络图(如图 2 所示),其中 number of nodes = 24、number of edges = 49、average node degree = 4.08、avg. local clustering coefficient = 0.578、expected number of edges = 10。将结果导入 Cytoscape 3.9.0 获取 PPI 网络中拓扑参数,采用 Cytoscape 3.9.0 选项中“Network Analyzer”对共有靶点的 Degree、Betweenness centrality 和 Closeness centrality 分析,结果发现 JUN (Degree = 10)、PTGS2 (Degree = 8)、CASP3 (Degree = 8)和 PGR (Degree = 7)等综合排名较前,如图 3 所示,说明这些靶点在灵芝治疗哮喘中发挥着重要作用。

3.4. GO 生物学功能富集分析

为了进一步探讨灵芝治疗哮喘的多重作用机制,将 24 个共有靶点导入 David 中进行 GO 富集分析,共得到 GO 生物学富集结果 108 条。其中前 3 位的富集过程包括 adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway、response to estradiol 和 G-protein coupled acetylcholine

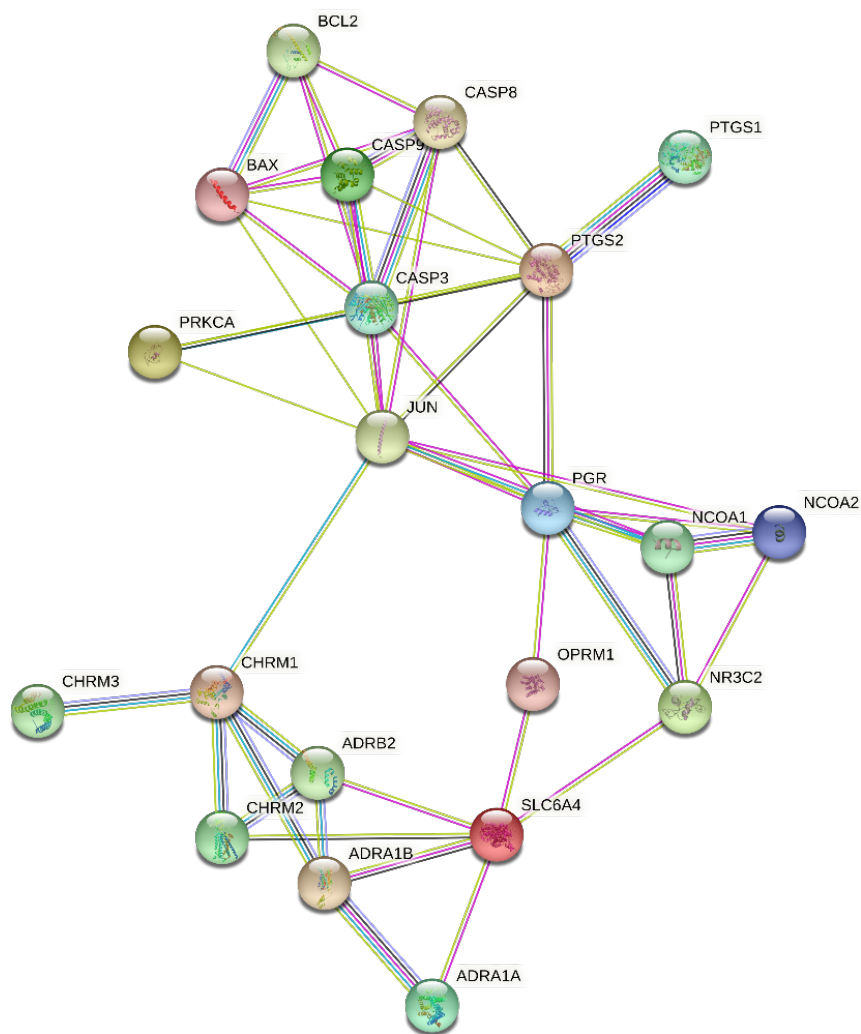


Figure 2. Protein interaction network
图 2. 蛋白互作网络图

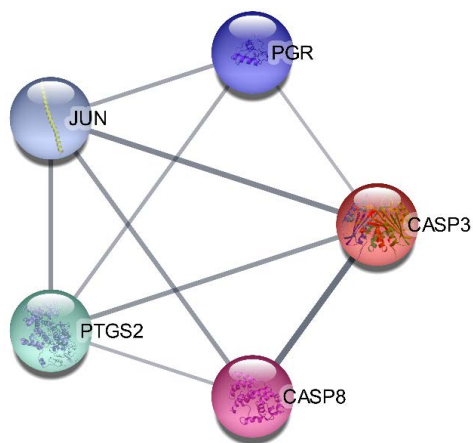


Figure 3. Protein interaction diagram of top five targets
图 3. 前五靶点蛋白互作图

receptor signaling pathway。将前 20 条富集以气泡图的形式展示，其中圆圈的大小表示相关靶点在通路富集的多少，圆圈的颜色越深代表靶点的富集程度，如图 4 所示，这表明了灵芝可能是通过调节这些生物过程而发挥治疗哮喘的作用。

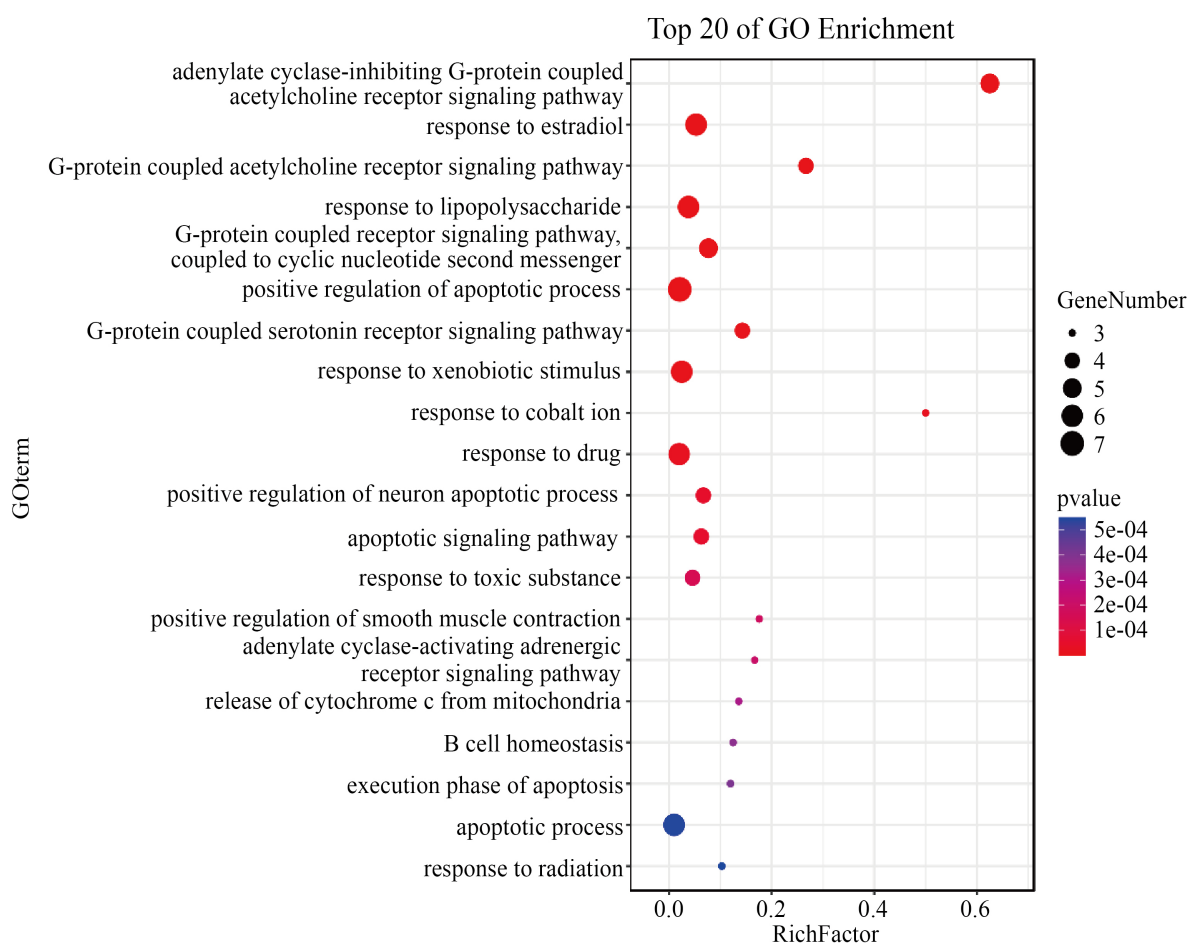


Figure 4. Bubble chart of enrichment results of GO biological function

图 4. GO 生物学功能富集结果气泡图

3.5. KEGG 通路分析

将 24 个共有靶点映射到 David 数据库中进行 KEGG 通路富集分析，将物种定义为“人类”，共得到信号通路 61 条。通过筛选灵芝 KEGG 富集结果显著性较强的前 20 条信号通路进行展示，这些通路与灵芝治疗哮喘的作用机制密切相关，如图 5 所示。其中前 5 条通路包括 Apoptosis-multiple species、Hepatitis B、Cholinergic synapse、Human immunodeficiency virus 1 infection 和 Lipid and atherosclerosis 等，这些通路大多与 CASP9, JUN, CASP8 和 CASP3 等有关。

为了更清晰的展现有效成分、核心靶点与通路之间的关系。利用 Cytoscape 3.9.0 软件将灵芝中的成分、共有靶点进行网络进行可视化分析，如图 6 所示，通过网络药理学构建出灵芝治疗哮喘的交互网络，筛选出相应的交互蛋白，其中蓝色代表灵芝和哮喘的共有靶点，绿色代表化学成分，共有 14 个，橙色代表药物，通过构建药物 - 成分 - 靶点网络图，可更直观更清晰的看出各成分对应的靶点调控。

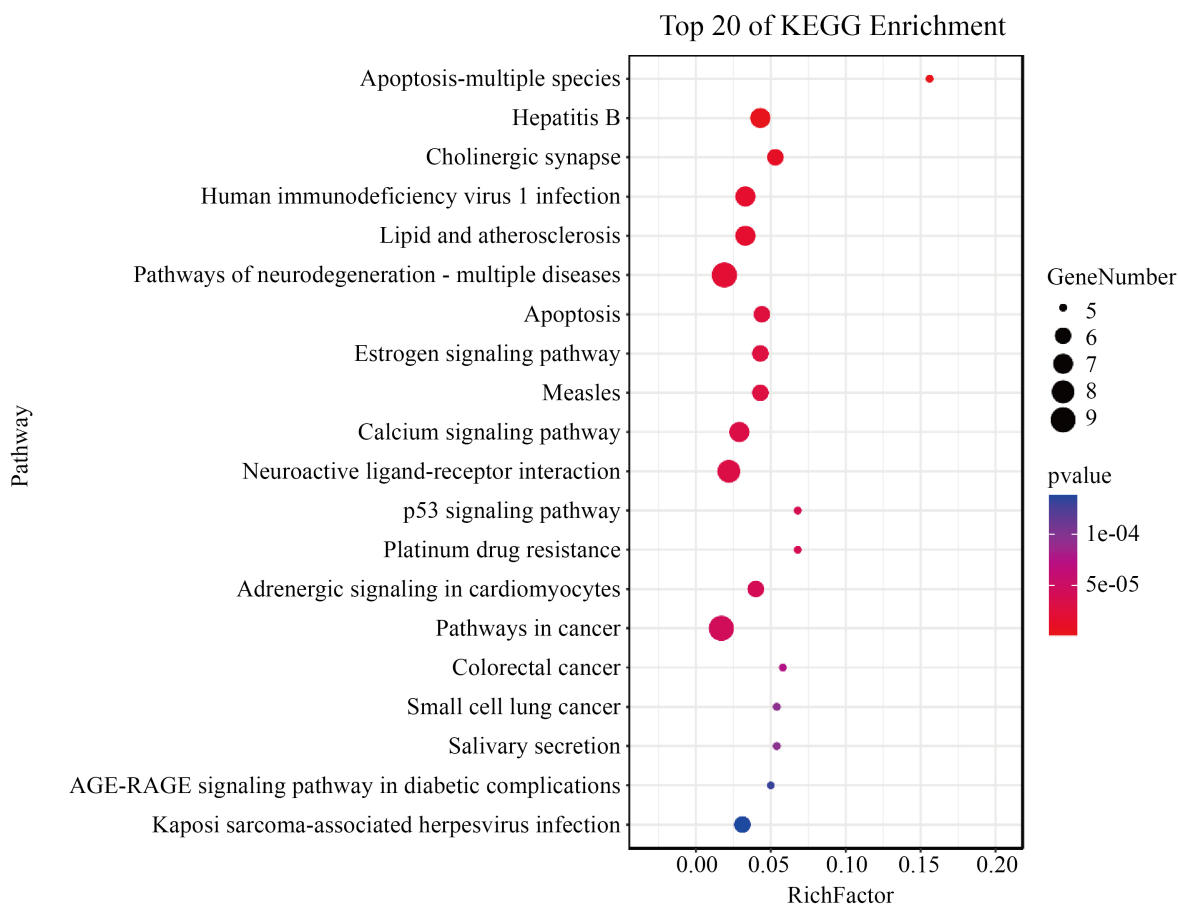
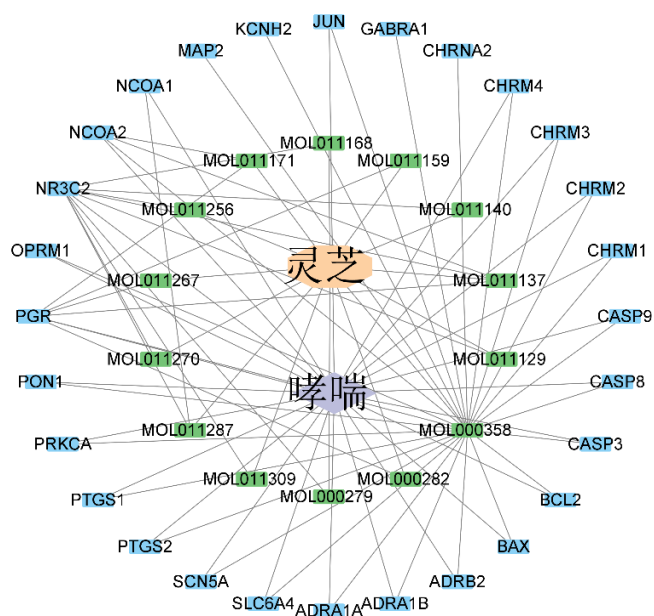


Figure 5. Bubble diagram of KEGG enrichment results
图 5. KEGG 富集结果气泡图



4. 讨论

中医药近来因其疗效及独特的魅力而受到广泛关注。同时, 中药存在的主要障碍, 包括药物成分和治疗机制的模糊。随着虚拟筛选技术的发展, 越来越多的中药化合物被研究以发现潜在的活性成分和作用机制。网络药理学建立了强大而全面的数据库, 以了解中医与疾病网络之间的关系。在本次研究中, 构建灵芝治疗哮喘的作用机制提供了理论基础和技术支撑, 同时也明确了药效物质和实现中药功效的解释[20]。

灵芝目前被作为药食两用的药材[21], 具有治疗哮喘的药理作用, 但其作用机制尚不明确。Li 等[22]人研究发现, 灵芝可以通过降低 IL-1 β 、5、6、8、17、25、33、38 的水平, 提高 IL-10 和 12 的水平来达到治疗哮喘的作用。阮正英等[23]等人发现灵芝多糖下调肺泡巨噬细胞 G1TR/GITRL 信号系统的表达、降低 BALF 中细胞总数计数、减轻肺组织炎性病理改变, 起到治疗哮喘的作用。这些研究表明, 灵芝治疗哮喘具有多成分, 多层次的特点。

排名前三的关键靶点中的 JUN (转录因子 AP-1)、PTGS2 (前列腺素 G/H 合成酶 2)、CASP3 (半胱氨酸蛋白酶 3) 参与了糖哮喘的发生发展, 大量研究表明 PTGS2 基因的遗传变异与过敏性哮喘之间存在关联, PTGS2 受促有丝分裂刺激和促炎刺激高度诱导, 参与炎症反应的调节。在哮喘患者的呼吸道上皮和粘膜下层观察到 PTGS2 的表达增加[24]。通过 Kegg 富集分析, 得到前 5 的信号通路为 Apoptosis-multiple species、Hepatitis B、Cholinergic synapse、Human immunodeficiency virus 1 infection 和 Lipid and atherosclerosis。其中 Apoptosis-multiple species (细胞凋亡) 是一个通过激活 caspases (天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶) 来消除受损或多余细胞的基因编程过程。细胞凋亡的开始是由许多相互关联的过程控制的。促凋亡和抗凋亡信号之间的平衡最终决定了细胞是否会发生凋亡、生存或增殖。TNF 家族的配体激活了抗凋亡或细胞生存信号以及凋亡信号。NGF 和白细胞介素 - 3 分别促进神经元或造血细胞的生存、增殖和分化[25]。

综上所述, 通过对灵芝治疗哮喘的网络药理学研究, 初步明确灵芝治疗哮喘活性成分、关键靶点, 生物过程及作用机制, 可为下一步的实验验证提供参考。

基金项目

贵州省高层次创新型人才项目(千层次 2014); 贵州省科技创新人才团队(黔科合平台人才[2020]5010); 贵州省发改委工程研究中心建设项目(黔发改高技(2020)896 号)。

参考文献

- [1] Mims, J.W. (2015) Asthma: Definitions and Pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology*, **5**, S2-S6.
- [2] 朴颖, 王重阳, 宋艺兰, 孟庆玲, 郑明昱, 金丽娜, 等. 朝医麻黄定喘汤对 OVA 诱导的过敏性哮喘豚鼠模型 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(5): 913-919.
- [3] Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S.E. and Reddel, H.K. (2018) Asthma. *The Lancet*, **391**, 783-800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33311-1)
- [4] Agache, I., Eguluz-Gracia, I., Cojanu, C., Laculiceanu, A., Del Giacco, S., Zemelka-Wiacek, M., et al. (2021) Advances and Highlights in Asthma in 2021. *Allergy*, **76**, 3390-3407. <https://doi.org/10.1111/all.15054>
- [5] Alwarith, J., Kahleova, H., Crosby, L., Brooks, A., Brandon, L., Levin, S.M., et al. (2020) The Role of Nutrition in Asthma Prevention and Treatment. *Nutrition Reviews*, **78**, 928-938. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa005>
- [6] 陈嘉骏, 王颖, 桑婷婷, 陈超杰, 王兴亚. 灵芝多糖在糖尿病及其并发症防治中的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(3): 937-947.
- [7] 马传贵, 张志秀, 闫梅霞, 王寿江, 简青燕. 灵芝的活性成分及其抗肿瘤研究进展[J]. 食药用菌, 2022, 30(2): 114-118.
- [8] 翁玉英. 灵芝药用价值的探讨[J]. 黑龙江中医药, 2000(3): 55-56.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 188-189.

- [10] 李钦艳, 陈逸湘, 钟莹莹. 灵芝主要活性成分及其功能的研究进展(综述) [J]. 食药菌, 2015, 23(2): 86-91.
- [11] 王浩豪. 灵芝孢子粉多糖色谱指纹图谱及其免疫活性谱效关系的研究[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [12] 周国亮, 宋翼升, 辛艳飞, 宣尧仙. 灵芝多糖抗氧化和抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5): 1002-1005.
- [13] Liu, C., Song, Y., Yang, N., Tversky, J.R., Reid-Adam, J. and Li, X.-M. (2013) Ganoderic Acid β Suppressed Th2 Responses and Induced Th1/Tregs in Cultures of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Asthmatic Patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **131**, Article No. AB1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.681>
- [14] 廖逸茹, 江南, 罗霞. 灵芝在呼吸道疾病中的运用及研究进展[J]. 四川中医, 2019, 37(3): 215-218.
- [15] Ru, J., Li, P., Wang, J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., et al. (2014) TCMSP: A Database of Systems Pharmacology for Drug Discovery from Herbal Medicines. *Journal of Cheminformatics*, **6**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- [16] 范文涛, 王倩. 基于网络药理学的石菖蒲-郁金药对治疗抑郁症作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12): 2607-2611.
- [17] Safran, M., Dalah, I., Alexander, J., Rosen, N., Iny Stein, T., Shmoish, M., et al. (2010) GeneCards Version 3: The Human Gene Integrator. *Database*, **2010**, Article ID: baq020. <https://doi.org/10.1093/database/baq020>
- [18] Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., et al. (2015) STRING v10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated over the Tree of Life. *Nucleic Acids Research*, **43**, D447-D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- [19] Tang, H. and Zhang, Y. (2018) Identification and Bioinformatics Analysis of Overlapping Differentially Expressed Genes in Depression, Papillary Thyroid Cancer and Uterine Fibroids. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **15**, 4810-4816. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6023>
- [20] Jiao, X., Jin, X., Ma, Y., Yang, Y., Li, J., Liang, L., et al. (2021) A Comprehensive Application: Molecular Docking and Network Pharmacology for the Prediction of Bioactive Constituents and Elucidation of Mechanisms of Action in Component-Based Chinese Medicine. *Computational Biology and Chemistry*, **90**, Article ID: 107402. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107402>
- [21] 谢怡琼, 王琪瑞, 孙思雅, 来梦茹, 程汝滨, 邱晓华. 灵芝的药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(10): 191-193.
- [22] Li, Y., Li, M., Wang, R., Wang, B., Athari, S.S. and Wang, J. (2022) *Ganoderma* Modulates Allergic Asthma Pathologic Features via Anti-Inflammatory Effects. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **299**, Article ID: 103843. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2022.103843>
- [23] 阮正英, 周华斐, 童夏生, 应亚萍, 金小红, 李绍波. 灵芝多糖对哮喘大鼠肺泡巨噬细胞 GITR/GITRL 信号系统表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(11): 1317-1321.
- [24] Yucesoy, B., Kashon, M.L., Johnson, V.J., Lummus, Z.L., Fluharty, K., Gautrin, D., et al. (2016) Genetic Variants in *TNFA*, *TGFBI*, *PTGS1* and *PTGS2* Genes Are Associated with Diisocyanate-Induced Asthma. *Journal of Immunotoxicology*, **13**, 119-126. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1017061>
- [25] Savitskaya, M.A. and Onishchenko, G.E. (2015) Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry*, **80**, 1393-1405. <https://doi.org/10.1134/S0006297915110012>