

基于网络药理学探讨鸡蛋花不同提取部位改善超敏反应的作用机制

何欣倩¹, 夏允彤², 肖新玉³, 周欣欣^{2*}

¹广州中医药大学 青蒿研究中心, 广州 510405; ²广州中医药大学 中药学院, 广州 510006;

³佛山市南海区人民医院, 佛山 528225

摘要:探讨鸡蛋花不同提取部位(水提取部、正丁醇部、石油醚部、乙酸乙酯部)对肥大细胞脱颗粒反应的抑制效果,运用网络药理学探讨鸡蛋花有效活性成分改善 I 型超敏反应的作用机制。使用吐温 80 构建 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型,评估鸡蛋花的抗瘙痒药效。预测鸡蛋花治疗超敏反应的靶标和通路,使用分子对接方式验证鸡蛋花有效成分与关键靶标的结合能力。结果表明鸡蛋花的乙酸乙酯部提取物对超敏反应的抗瘙痒机制有明显的效用。其中鸡蛋花苷类成分与黄酮类成分在抗瘙痒,改善超敏反应的机制可能与 D(2)多巴胺受体、P2Y 嘌呤受体 2、5-羟色胺受体 2A、P2Y-嘌呤受体 1、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1、5-羟胺受体 2C、毒物学乙酰胆碱受体 M、 α -1D 肾上腺素能受体、 α -1A 肾上腺素能受体、P2Y-嘌呤受体 1 等蛋白调节相关。

关键词:鸡蛋花;超敏反应;抗瘙痒;肥大细胞;网络药理学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0110-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.016

Study on the mechanism of different extraction sites of *Plumeria rubra* for improving hypersensitivity by network pharmacology

HE Xin-qian¹, XIA Yun-tong², XIAO Xin-yu³, ZHOU Xin-xin^{2*}

¹Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

²School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

³Nanhai District People's Hospital, Foshan 528225, China

Abstract: Studying the inhibitory effect of different solvent extraction sites of *Plumeria rubra* (water extract, n-butanol extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract) on degranulation of mast cells. And the mechanism of improving type I hypersensitivity by effective active components of *P. rubra* was predicated by network pharmacology method and molecules docking. The RBL-2H3 cells were used as the experimental materials, Tween 80 as the model reagent to induce the degranulation of RBL-2H3 cells. The anti-pruritus effects of different extracts were compared. The prediction targets and disease targets of *P. rubra* were integrated to obtain the key targets. Molecular docking was used to virtual verify the binding ability between the effective active components of *P. rubra* and core targets. The cell experiment showed that the ethyl acetate extract of *P. rubra* had obvious effect on the anti-hypersensitivity. And the anthocyanins and flavonoids of treating hypersensitivity in *P. rubra* may be related to D(2) dopamine receptor, P2Y purinoceptor 2, 5-hydroxytryptamine receptor 2A, P2Y purinoceptor 12, muscarinic acetylcholine receptor M1, 5-hydroxytryptamine receptor 2C, muscarinic acetylcholine receptor M2, alpha-1D adrenergic receptor, alpha-1A adrenergic receptor, P2Y purinoceptor 1.

Key words: *Plumeria rubra*; hypersensitivity; anti-pruritus; mast cell; network pharmacology

鸡蛋花(*Plumeria rubra*) 别名为缅栀子、蛋黄花、印度素馨、大季花,主产地在亚热带地区,是夹竹

桃科鸡蛋花的干燥花。根据文献^[1],鸡蛋花有抗疟疾,抗寄生虫,抗炎,镇痛等方面的作用。现代研究证明,苦参具有杀菌、杀寄生虫、和抗炎的作用^[2]。苦参中的活性成分包括生物碱、黄酮、木脂素、三萜皂苷、酚酸、少量苯丙醇和长链脂肪酸,苦参中的主

要活性成分是生物碱类和黄酮类化合物^[3]。蛇床子中的主要成分为香豆素类,目前从蛇床子中分离并鉴定的香豆素成分包括蛇床子素、欧前胡素、花椒毒素、佛手柑内酯等^[4,5]。临床观察发现用含有中药蛇床子的内服或外用制剂治疗过敏性皮肤病效果良好^[6],且根据文献资料中可知蛇床子素可以在免疫反应原未知的情况下,直接抑制肥大细胞脱颗粒现象,蛇床子素有望成为治疗过敏性皮肤瘙痒的一种新方法^[7],因此本次实验把蛇床子素作为阳性药物。

痒觉是由过敏原直接或间接刺激位于皮肤或者粘膜的神经纤维末梢的痒觉感受器所产生,瘙痒也常见于皮肤、粘膜或全身性疾病。它会起人类感到不适,进一步引起产生不自主的搔抓意愿。过敏性引起的瘙痒反应在各种瘙痒症中最为常见。由文献^[8]可知,过敏反应主要分为四种,包括I型、II型、III型和IV型。在临床表现上,I型超敏反应是最为广泛的,它主要表现为皮肤过敏反应等。目前临床应用的抗过敏药物主要包括以下四种:抗组胺药物、反应介质阻断剂、钙剂、免疫抑制剂^[9]。虽然西医用治疗过敏反应的方法疗效明显且迅速,但有一定的局限性,如会产生复发病,停药后不良反应较多^[10]。中药作为治疗慢性病的常用药物,具有多靶点、毒副作用少的优点,且在近年来,许多临床经验表明中医药在治疗人体慢性病上具有很大的潜力,尤其是在中药抗过敏反应研究方面。本实验是通过培养肥大细胞 RBL-2H3,利用吐温 80 造 RBL-2H3 细胞脱颗粒病理模型,在 RBL-2H3 细胞脱颗粒病理模型中加入中鸡蛋花提取物(水提取部、正丁醇部、石油醚部、乙酸乙酯部),以及传统中药苦参碱单体以及蛇床子素单体,并观察各鸡蛋花提取物对肥大细胞 RBL-2H3 细胞脱颗粒病理模型的影响,把 β -氨基己糖苷酶的释放量作为实验指标,以探讨鸡蛋花有效活性成分的作用。运用网络药理学研究方法,针对现阶段已证实的成分结构,阐明鸡蛋花有效活性成分作用于超敏反应抗瘙痒的多个靶点和途径的内在机制,探究其活性成分之间的作用关系、生物过程和代谢通路等。为药物研究做前期工作,为药物筛选提供条件。

1 材料与方法

1.1 鸡蛋花对肥大细胞脱颗粒模型的细胞实验

1.1.1 细胞

大鼠嗜碱性白血病细胞(rat basophilic leukemia

cell) RBL-2H3 细胞株:中山大学药学院赠予。

1.1.2 试验药物

鸡蛋花,2018 年采摘于老挝万象种植基地,经广州中医药大学中药学院周欣欣教授鉴定,标本保存于中药学院中药学教研室(GZUCM20181008),鸡蛋花的水提取部、正丁醇部、石油醚部和乙酸乙酯部由广州中医药大学中药学院实验人员提取;苦参碱(HPLC \geq 98%,北京万佳 BW1625)、阳性对照药物:蛇床子素(HPLC \geq 98%,北京万佳 BW2439)。

1.1.3 主要试剂与仪器

PBS 缓冲液(货号:8115400,上海立菲生物技术有限公司);MEM 培养基(500 mL/瓶)(货号:C12571500BT,LIFE);CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8 试剂盒)(型号:C0039,碧云天);0.25%胰蛋白酶(生产批号 17820,Gibco);吐温 80 100 mL(货号:T8360,索莱宝);胎牛血清 PBS(500 mL/瓶,货号:10296,Gibco);LPS(10 mg,货号:L2880-10MG,Sigma);双抗(青霉素与链霉素)(货号:aba258380,Gibco);二甲基亚砜(DMSO)(货号:20170127,杭州碧云天生物技术研究);对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(品牌:源叶生物)。

RT-2100C 型自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

1.1.4 采用 CCK-8 法检测细胞在不同吐温 80 浓度下存活率的方法

96 孔板中种入 RBL-2H3 细胞,浓度为 4×10^4 个/孔,培养箱中培养 24 h 后弃去原培养基,由于后期实验中血清会影响脱颗粒的检测,因此加入用无血清培养基配制的吐温 80 反应 1 h。加入后弃去原培养基,加入 100 μ L/孔的 CCK-8 溶液于细胞培养箱中,注意避光,孵育 1 h 后,使用酶标仪将所测 96 孔板置于 405 nm 波长下检测吸光度,按照如下公式计算细胞存活率(细胞存活率均在 85% 以上,表明吐温 80 在 1 h 内均对细胞增殖无抑制作用)。

细胞存活率 =

$$(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

式中,空白组为无细胞的对照组,正常组为仅含有细胞不作任何处理。

1.1.5 采用 CCK-8 法检测细胞在不同药物浓度下存活率的方法

96 孔板中种入 RBL-2H3 细胞,浓度为 4×10^4 个/孔,培养箱中中培养 24 h 后弃去原培养基,由于后期实验中血清会影响脱颗粒的检测,因此加入用

无血清培养基配制的药物:鸡蛋花(水提取部、正丁醇提取部、鸡蛋花乙酸乙酯部、石油醚部)、蛇床子素、苦参碱反应 1 h。加入后弃去原培养基,加入 100 μL /孔的 CCK-8 溶液,于细胞培养箱中,注意避光,孵育 1 h 后,使用酶标仪将所测 96 孔板,置于 405 nm 波长下检测吸光度,计算细胞存活率。

1.1.6 RBL-2H3 肥大细胞活化脱颗粒情况的测定方法

RBL-2H3 肥大细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 24 孔板,500 μL /孔,分为模型组、正常组、水提取部组、正丁醇部组、石油醚部组、乙酸乙酯部组、苦参组和蛇床子组共 8 个组,培养过夜,吸走上清液,用 PBS 洗 3 遍细胞,加入 100 μL 吐温 80 30 min,再加入带药培养基 100 μL 。过夜(24 h)后取上清 50 μL 至 96 孔板,加入显色液(β -氨基己糖苷)50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,加入 200 μL 终止液终止反应,于 405 nm 波长测 OD 值。

1.1.7 实验数据处理及分析方法

本实验的实验数据采用 Excel 软件进行分析,组间比较采用无重复双因素方差分析检验,检验水准 $P \leq 0.05$ ($\alpha = 0.05$) 时认为各组间差异有统计学意义, $P < 0.01$ 时认为各组间差异有显著统计学意义。

1.2 网络药理学实验与分子对接

1.2.1 鸡蛋花化学成分库的建立

通过检索获取鸡蛋花有效成分相关药理实验文献^[11-13],总结鸡蛋花已获鉴定的有效成分,搜索相关的 CAS 号,建立鸡蛋花的化学成分库。

1.2.2 鸡蛋花靶标预测与疾病靶标汇总

用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 搜索鸡蛋花的有效活性成分 SMILE 结构,在 Swiss Target Prediction^[14] (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 平台上进行二维结构相似性搜索,相似性分数设定为 0.85。

通过 Drugbank^[15] 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 和 DisGeNET^[16] 数据库 (<http://www.disgenet.org/wed/DisGeNET/menu/home>) 检索关键词“hypersensitivity”“Allergies”和“Allergic Reactions”,获取对超敏反应进行调控的相关靶标基因数据,并通过 Uniprot^[17] (<https://www.uniprot.org/>) 完善靶点的 Uniprot-ID、基因名称等信息。

1.2.3 鸡蛋花抗超敏反应的蛋白质-蛋白质相互作用信息(PPI)网络构建

将鸡蛋花的共同预测靶标与超敏反应的作用靶

点进行聚类分析,相互映射取交集,获取鸡蛋花有效活性成分改善超敏反应的关键作用靶标。

通过 String^[18] 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建鸡蛋花有效活性成分靶标和超敏反应相关的疾病靶标 PPI 网络。将鸡蛋花与超敏反应的关键作用靶点录入数据库中,选择“Homo Spaniens”获取蛋白-蛋白相关关系数据,并将数据导入 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化显示。同时,使用 MOCDE 插件,设置“degree cutoff”为 2,“node score cutoff”为 0.2,“k-score”为 2,“max. depth”为 100,分析相关靶标数据,进行聚类构建。

1.2.4 关键靶标的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID^[19] 数据库 (<https://david.nciferf.gov/summary.jsp>) 对关键作用靶标进行 GO 富集分析,研究对象选择“Homo Sapiens”,筛选条件设置为生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cell composition, CC)、分子功能 (molecular function, MF),获得相关 GO 富集分析数据。同时通过 DAVID 的 KEGG 通路分析鸡蛋花有效活性成分抗超敏反应作用通路预测,对相关数据分析,进行通路显著性排序。使用 R 3.6.1 对数据进行分析处理。

1.2.5 关键靶标的分子对接验证

在 PubChem 上搜索化合物的二维结构,对于未记载的结构使用 Chemdraw 18.0 转换成 mol₂ 格式保存。使用 Chem 3D 对所有化合物进行能量最小化,优化结构。从 AlphaFold Protein Structure 数据库中下载关键靶标的三维晶体结构,并在 Sybyl-X 2.1.1 中对蛋白进行加氢、修复侧链、加电荷、提取内嵌配体等操作。然后选择 Multi-Channel Surface 进行对接位置确定后采取柔性对接。以 Total-Score 为分子与蛋白结合能力评估。

2 结果

2.1 细胞实验结果

2.1.1 不同浓度吐温 80 对 RBL-2H3 细胞的存活情况

用不同浓度的吐温 80 处理 RBL-2H3 细胞中,1 h 后采用 CCK-8 法检测 RBL-2H3 细胞的存活情况,从而确定适宜的造模条件,选择 RBL-2H3 细胞能够有一定的存活率,也有一定的病理效应的吐温浓度。最终确定刺激 RBL-2H3 脱颗粒反应的条件:吐温 80 浓度为 0.4 mg/mL。结果见表 1 和表 2。

表1 在不同浓度下的吐温 80 作用 1 h 后 RBL-2H3 细胞的存活率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The cell viability of RBL-2H3 cell after dealing with different Tween 80 concentration in 1 h($\bar{x} \pm s, n = 3$)

吐温 80 浓度 Tween 80 concentration (mg/mL)	RBL-2H3 细胞存活率 The RBL-2H3 cell viability (%)
1	24.89
0.5	84.07
0.2	90.09
0.1	97.79
0.05	103.34
0.02	99.97
0.01	101.98
0.005	98.93
0.002	107.32

表2 在 0.2~0.4 mg/mL 浓度区间下的吐温 80 作用 1 h 后 RBL-2H3 细胞的存活率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 The cell viability of RBL-2H3 cell after dealing with 0.2-0.4 mg/mL Tween 80 concentration in 1 h($\bar{x} \pm s, n = 5$)

吐温 80 浓度 Tween 80 concentration (mg/mL)	RBL-2H3 细胞存活率 The RBL-2H3 cell viability (%)
0.4	87.45
0.3	88.64
0.2	90.72

2.1.2 各药物的不同浓度对 RBL-2H3 细胞的存活情况

分别用鸡蛋花(水提取物、正丁醇部、石油醚部、乙酸乙酯部)、苦参碱以及蛇床子素共六药物的不同浓度加入 RBL-2H3 细胞中,1 h 后采用 CCK-8 法检测 RBL-2H3 细胞的存活情况,结果见表 3。最终确定提取物的浓度为:一号提取物(鸡蛋花水提部)20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、二号提取物(鸡蛋花正丁醇部)20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、三号提取物(鸡蛋花乙酸乙酯部)20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、四号提取物(鸡蛋花石油醚部)20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、苦参碱组 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、蛇床子素组 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.3 RBL-2H3 肥大细胞活化脱颗粒情况的测定结果

对鸡蛋花不同提取部位的提取物改善吐温 80 诱导的 RBL-2H3 细胞脱颗粒的超敏反应病理模型的 β -氨基己糖苷酶^[15] 释放测定在 405 nm 波长下的

表3 在不同浓度下各提取物中作用 1 h 后 RBL-2H3 细胞的存活率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 The cell viability of RBL-2H3 cell after dealing with different extracts' different concentration in 1 h($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	不同药物浓度下的存活率 Cell viability under different drug concentration (%)				
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1 号提取物组 Extract group	92.72	94.50	95.95	93.05	98.23
2 号提取物组 Extract group 2	86.87	89.16	87.36	98.96	103.08
3 号提取物组 Extract group 3	84.61	84.81	90.11	85.98	95.00
4 号提取物组 Extract group 4	86.42	97.00	100.39	92.30	100.59
苦参碱组 Matrine	86.73	90.48	99.41	80.31	70.80
蛇床子素组 Osthol	87.48	88.32	93.44	84.38	97.63

OD 值,探讨鸡蛋花提取物治疗超敏反应的机制效用(见表 4)。试验研究结果发现,与模型组比较, $P \leq 0.05$ 有明显的药理作用,其中 3 号提取物,即鸡蛋花乙酸乙酯部的提取物在改善 RBL-2H3 细胞脱颗粒有一定的治疗效果,并且其效果与苦参碱组相比更明显。

表4 六种中药提取物对 RBL-2H3 细胞脱颗粒病理模型的 β -氨基己糖苷酶释放的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of six Chinese herbal extracts on β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cell degranulation pathological model($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	OD _{405 nm}
模型组 Model	3.24 \pm 0.22 [*]
正常组 Control	0.99 \pm 0.18
1 号提取物组 Extract group 1	3.18 \pm 0.02
2 号提取物组 Extract group 2	3.20 \pm 0.03
3 号提取物组 Extract group 3	3.18 \pm 0.02 [#]
4 号提取物组 Extract group 4	3.18 \pm 0.01
苦参碱组 Matrine	3.19 \pm 0.03 [#]
蛇床子素组 Osthol	3.16 \pm 0.02 [#]

注:与正常组相比,^{*} $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P \leq 0.05$ 。
Note:Compared with control,^{*} $P < 0.01$;Compared with model,[#] $P \leq 0.05$.

2.2 网络药理学实验结果

2.2.1 鸡蛋花的化学成分

经过文献检索,获得已鉴定的鸡蛋花化学成分共 50 个(见表 5)。

表5 鸡蛋花相关有效活性成分 ID

Table 5 ID of related active ingredients of *Plumeria rubra*

序号 No.	CAS-ID	成分 Ingredient
PR01	-	7',8'(Z)-1 α -流明原甲素 A 7',8'(Z)-1 α -Prodemethylplumericin A
PR02	-	7',8'(E)-1 α -流明原甲素 A 7',8'(E)-1 α -Prodemethylplumericin A
PR03	-	13-O-咖啡基-15-去甲基鸡蛋花苷 13-O-Caffeoy-15-demethylplumieride
PR04	-	鸡蛋花苷 P-Z-香豆素葡糖苷 Plumieride P-Z-coumarate glucoside
PR05	--	鸡蛋花苷 P-E-香豆素葡糖苷 Plumieride P-E-coumarate glucoside
PR06	159598-00-2	7- β -羟基-11-甲基-磺酰亚胺 7- β -Hydroxy-11-methyl-forsythide
PR07	22255-40-9	落干酸 Loganic acid
PR08	132586-69-7	去甲基鸡蛋花苷 15-Demethylplumieride
PR09	511-89-7	鸡蛋花苷 Plumieride
PR10	-	香豆酰鸡蛋花苷 Plumieride P-Z-coumarate
PR11	118197-36-7	咖啡酰鸡蛋花苷 13-O-Caffeoylplumierides
PR12	-	去甲基香豆酰鸡蛋花苷 15-Demethylplumieride P-Z-coumarate
PR13	-	β -二氢草胺酸 β -Dihydroplumericinic acid
PR14	-	过山藤素 Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside
PR15	153-18-4	芦丁 Rutin
PR16	-	新异芦丁 Extraneous rutin
PR17	482-35-9	异槲皮苷 Isoquercetin
PR18	31159-41-8	山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖 Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside
PR19	29741-10-4	木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Luteolin-7-O- β -D-glucopyranoside
PR20	118024-86-5	木犀草素-3'-O- β -D-葡萄糖苷 Luteolin-3'-O- β -D-glucopyranoside
PR21	117-39-5	槲皮素 Quercetin
PR22	520-18-3	山柰酚 Kaempferol
PR23	4382-17-6	槲皮素-3',3'-二甲醚 Quercetin-3',3'-dimethylether
PR24	5746-55-4	3-O-香豆酰奎宁酸 3-O-coumaroylquinic acid
PR25	117405-48-8	顺式葡萄糖香豆酸 (Z)-4-Coumaric acid-4-O- β -D-glucopyranoside
PR26	117405-48-8	反式葡萄糖香豆酸 (E)-4-Coumaric acid-4-O- β -D-glucopyranoside
PR27	331-39-5	咖啡酸 Caffeic acid
PR28	99-50-3	原儿茶酸 Protocatechuate
PR29	-	海杧果酸甲酯 Methylcerberic acid
PR30	1309362-77-3	海杧果酸 Cerberic acid B
PR31	99-96-7	对羟基苯甲酸 Phydroxy benzoic acid
PR32	14364-05-7	肉桂酸 Coumaric acid
PR33	121-91-5	间羟基苯乙酸 Isophthalic acid
PR34	121-34-6	4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid
PR35	65-85-0	海杧果酸 B 乙酯 Benzoic acid
PR36	69-72-7	邻羟基苯甲酸 Salicylic acid
PR37	57-11-4	硬脂酸 Stearic acid
PR38	112-80-1	油酸 Oleic acid

续表 5 (Continued Tab. 5)

序号 No.	CAS-ID	成分 Ingredient
PR39	638-95-9	α -香树脂醇 α -Amyrin
PR40	472-15-1	白桦脂酸 Betulinic acid
PR41	83-46-5	β -谷甾醇 β -Sitosterol
PR42	508-02-1	齐墩果酸 Oleanolic acid
PR43	1041179-92-3	叶荆芥 A1 Foliachinenosides A1
PR44	118-61-6	水杨酸酯 6-Hydrofoliachinenoside A2
PR45	1041180-01-1	叶荆芥 A2 Foliachinenosides A2
PR46	305-01-1	七叶亭 6,7-Dihydroxycoumarin
PR47	2280-44-6	葡萄糖 Glucose
PR48	554-91-6	龙胆二糖 Gentiobioside
PR49	9009-65-8	原儿茶醛 Protocatechu aldehyde
PR50	78-70-6	芳樟醇 Linalool

2.2.2 鸡蛋花有效成分靶标分析与 PPI 网络构建及核心靶标筛选

在 Swiss Target Prediction 平台获取预测靶标整理后获得鸡蛋花有效活性成分的预测靶标有 854

个。与疾病靶标取交集,获得鸡蛋花有效成分治疗超敏反应的关键作用靶点共有 74 个。并且对鸡蛋花的 PPI 进行分析得到 degree 值前 10 的核心靶标的蛋白质-蛋白质相互作用信息网络图(见图 1)。

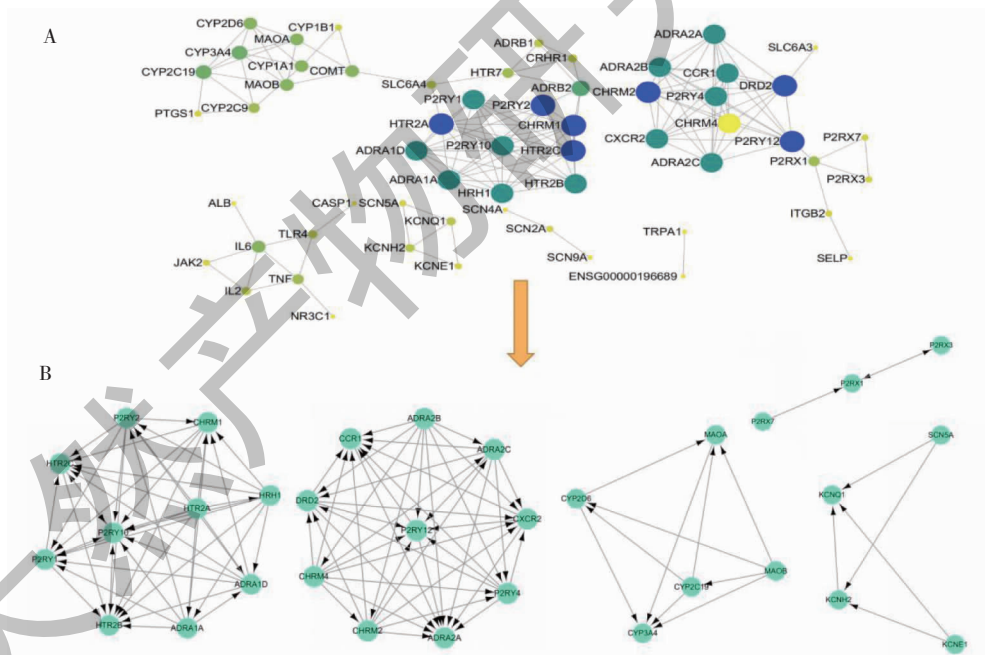


图 1 药物治疗疾病靶标的蛋白质-蛋白质相互作用信息网

Fig. 1 Information map of drug composition-disease target-protein interaction

注:A 为药物治疗疾病靶标的蛋白质-蛋白质相互作用信息网;B 为核心靶标。Note:A:Protein protein interaction information network of drug therapy targets,B:Protein protein interaction information network of core targets.

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用信息(PPI)网络构建及核心靶标筛选

因为连接度(degree)是判断靶标节点在关系中

重要性的关键拓扑特征大小值之一,其值大小与重要性呈正相关。图中的圆圈面积越大,代表靶点的 degree 值越大,其作用更重要,所以筛选出 degree 值

较大排前 10 的关键作用靶点,包括 D(2)多巴胺受体(D(2) dopamine receptor, DRD2)、P2Y 嘌呤受体 2(P2Y purinoceptor 2, P2RY2)、5-羟色胺受体 2A(5-hydroxytryptamine receptor 2A, HTR2A)、P2Y-嘌呤受体 12(P2Y purinoceptor 12, P2RY12)、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1 (Muscarinic acetylcholine receptor M1, CHRM1)、5-羟胺受体 2C(5-hydroxytryptamine receptor 2C, HTR2C)、毒理学乙酰胆碱受体 M2 (Muscarinic acetylcholine receptor M2, CHRM2)、 α -1D 肾上腺素能受体 (Alpha-1D adrenergic receptor, ADRA1D)、 α -1A 肾上腺素能受体 (Alpha-1A adrenergic receptor, ADRA1A)、P2Y-嘌呤受体 1 (P2Y purinoceptor 1, P2RY1)。将核心靶点与相关有效活性成分的分子 ID 进行可视化分析,如下表 6 和图 2。

表 6 鸡蛋花改善超敏反应的关键靶标名称及其相关网络拓扑特征参数值

Table 6 Core target names of *Plumeria rubra* for hypersensitivity treatment and topological characteristic parameter values of related networks

关键靶标 Core target	连接度 Degree	紧密度 Closeness	介度 Betweenness
DRD2	10	0.28	0.05
P2RY2	10	0.33	0.06
HTR2A	10	0.31	0.13
P2RY12	10	0.29	0.22
CHRM1	10	0.33	0.06
HTR2C	10	0.33	0.06
CHRM2	10	0.34	0.48
ADRA1D	9	0.28	0
ADRA1A	9	0.28	0
P2RY1	9	0.28	0

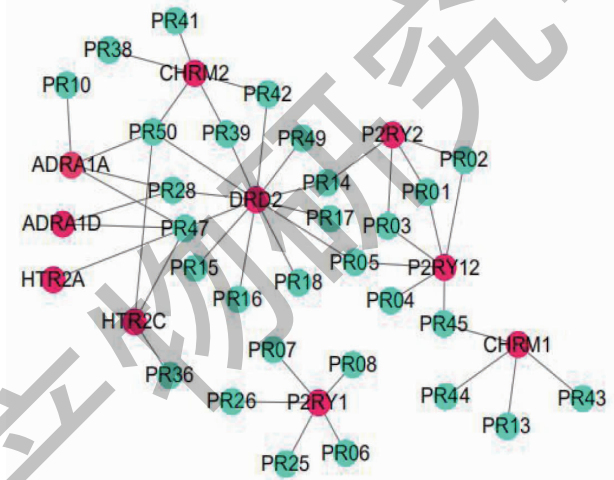


图 2 鸡蛋花治疗超敏反应的核心靶标所对应的化合物信息

Fig. 2 Compound information corresponding to the core target of *Plumeria rubra* for hypersensitivity treatment

注:红色为鸡蛋花治疗超敏反应的核心靶标;绿色为核心靶标所对应的化合物编号。Note: Red is the core targets of *Plumeria rubra* for the treatment of hypersensitivity; Green is the compound number corresponding to the core target.

2.2.4 鸡蛋花改善超敏反应关键靶标的 GO 和 KEGG 通路富集分析

2.2.4.1 鸡蛋花改善超敏反应关键靶标的 GO 富集分析

通过 DAVID 数据库对关键作用靶标进行 GO 富集分析,研究对象选择“Homo Sapiens”,筛选条件设置为生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cell composition, CC)、分子功能 (molecular function, MF),获得相关 GO 富集分析数据,用 $FDR < 0.5$ 、 $P\text{-value} < 0.05$ 进行筛选,获取具有统计学意

义的条目,选取 P 值较小排前 20 的 GO 富集分析结果 (见图 3),发现鸡蛋花的预测靶标与质膜的组成成分、磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号途径、腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路、细胞信号转导、离子运输的正调节、血红素结合、药物结合、肾上腺素结合、神经元动作电位、炎症反应、血管收缩的调节、类固醇代谢过程、动作电位过程中的膜去极化、药物反应、对有毒物质的反应、平滑肌收缩、电压门控钠通道复合体、质膜外侧、电压门控钠通道活性、杂环代谢过程等生物功能信息有关。

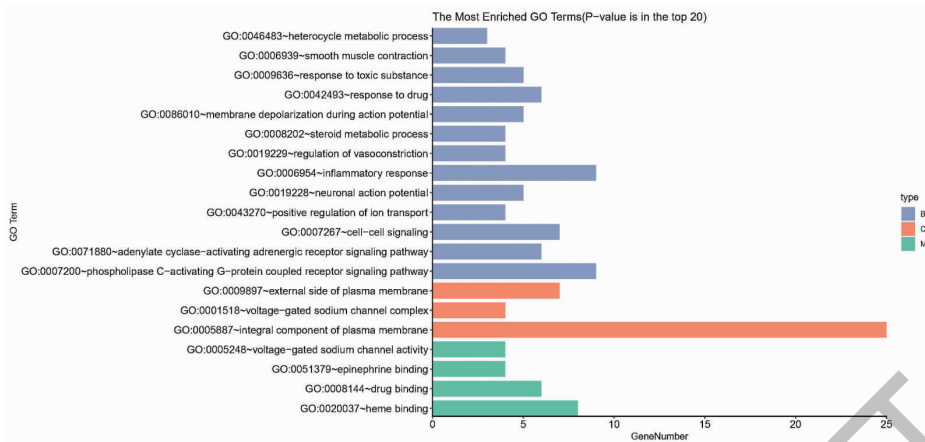


图3 药物核心靶标 GO 富集分析结果 (P-value 值在前 20)

Fig. 3 Analysis results of GO enrichment of drug core target (P-value in top 20)

2.2.4.2 鸡蛋花改善超敏反应关键靶标的 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 的 KEGG 通路分析,取 P-value 值较小排前 20 的通路进行分析,主要作用于神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、5-羟色胺能突触、炎症介质对 TRP 通道的调节、胆碱能突触、cGMP-PKG 信号路径、炎症性肠病、药物代谢-细胞色素 P450、化学致癌、疟疾、军团杆菌病、心肌细胞肾上腺素能信号转导、细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响、百日咳、色氨酸代谢、多巴胺能突触、血小板活化、唾液分泌、可卡因成瘾(见图 4)。根据 PPI 网络构建筛选的排行前 10 的关键作用靶点,从 20 条通路中筛选出与超敏反应相关的通路有 5 条,反映鸡蛋花有效活性成分在治疗超敏反应中能够在

细胞膜上进行神经活性配体与受体的结合、控制细胞活性因子的膜上转运、降低炎症介质的作用并且对超敏反应与瘙痒造成的毛孔放大与血液流动有一定的作用(见表 7)。

2.2.5 鸡蛋花改善超敏反应的多维网络关系分析

将已获取鸡蛋花及其有效成分、关键作用靶标、主要通路的数据导入 Cytoscape 3.6.1 软件,利用其 Merge 及 Union 功能,将有效成分与其潜在关键靶标相连接,使关键靶标与其所在的相关通路相连接,构建鸡蛋花改善超敏反应的相应“中药-核心成分-关键靶标-主要通路”关系(见图 5)。

鸡蛋花已鉴定的有效成分共有 50 个,都直接或间接作用于 74 个超敏反应的关键预测靶标上,富集分析得到的通路共有 36 条,在 P-Value 值较小排行

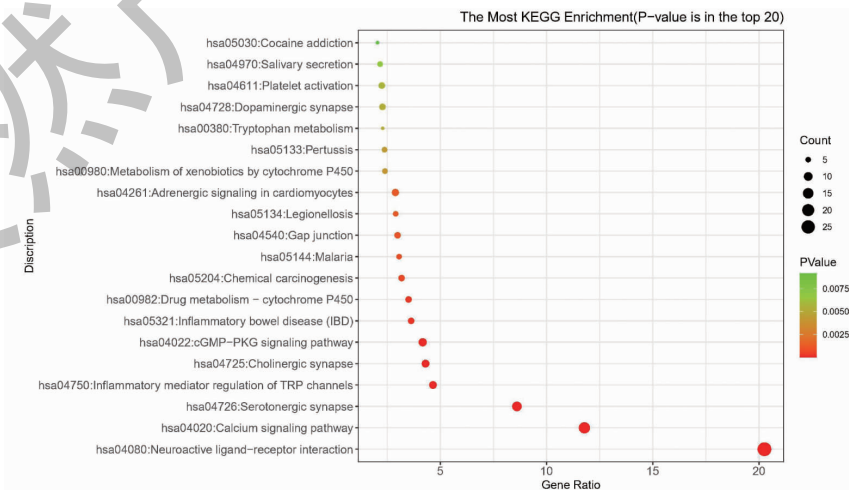


图4 药物核心靶标 KEGG 富集分析结果 (P-value 值在前 20)

Fig. 4 Analysis results of KEGG enrichment of drug core target (P-value in top 20)

表 7 作用于超敏反应的 KEGG 通路富集分析结果

Table 7 Analysis results of KEGG pathways enrichment of hypersensitivity

ID	通路 Pathway	基因 Gene	P 值 P-value
hsa04080	神经活性配体-受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	DRD2、TRPV1、NR3C1、HRH1、P2RY4、P2RY2、P2RY1、ADRA2A、ADRA2C、CHRNA7、ADRA2B、CRHR1、P2RX7、ADRB2、P2RY10、ADRB1、CHRM4、P2RX1、CHRM2、P2RX3、CHRM1、HTR7、ADRA1A、HTR2B、HTR2C、ADRA1D、HTR2A	5.50×10^{-21}
hsa04020	钙信号通路 Calcium signaling pathway	ITPR3、P2RX7、HRH1、ADRB2、ADRB1、P2RX1、CHRM2、P2RX3、CHRM1、HTR7、ADRA1A、CHRNA7、HTR2B、HTR2C、MYLK、ADRA1D、HTR2A	1.65×10^{-12}
hsa04750	炎症介质对 TRP 通道的调节 Inflammatory mediator regulation of TRP channels	HRH1、TRPV1、P2RY2、TRPA1、HTR2B、ITPR3、HTR2C、HTR2A	2.23×10^{-5}
hsa04022	cGMP-PKG 信号路径 cGMP-PKG signaling pathway	ADRB2、ADRB1、ADRA2A、ADRA1A、ADRA2C、ADRA2B、ITPR3、ADRA1D、MYLK	6.80×10^{-5}
hsa00982	药物代谢-细胞色素 P450 Drug metabolism - cytochrome P450	CYP3A4、CYP2C19、CYP2C9、MAOA、MAOB、CYP2D6	3.15×10^{-4}
hsa00980	细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	CYP3A4、CYP1B1、CYP1A1、CYP2C9、CYP2D6	4.05×10^{-3}
hsa00380	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	CYP1B1、CYP1A1、MAOA、MAOB	5.19×10^{-3}
hsa04611	血小板活化 Platelet activation	P2RY12、P2RX1、P2RY1、PTGS1、ITPR3、MYLK	5.70×10^{-3}

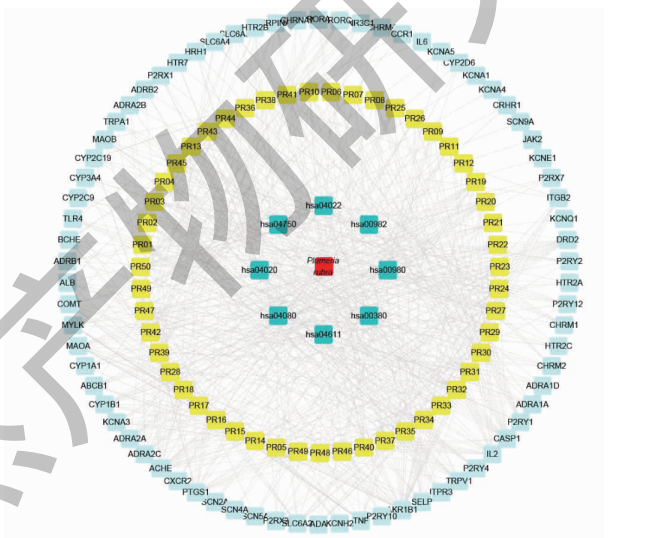


图 5 鸡蛋花的“中药-核心成分-关键靶标-主要通路”关系图

Fig. 5 "Traditional Chinese medicine- core components -key target -main pathway" map of *Plumeria rubra*

注:红色代表鸡蛋花;黄色代表有效活性成分 ID;浅蓝色代表关键靶标;蓝色代表通路。Note: Red represents *Plumeria rubra*; Yellow represents active ingredient ID; Light blue represents key target; Blue represents pathway.

前 20 的通路显著性更高,有 5 条通路与超敏反应的抗瘙痒机制密切相关,分别是神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、炎症介质对 TRP 通道的调节、cGMP-PKG 信号路径、血小板活化。

2.2.6 鸡蛋花有效化合物与关键靶标的分子对接
将已获取鸡蛋花有效成分与前 10 个关键靶标

对接后的 Total-Score 的数据进行热图分析(见图 6)。其中与 DRD2 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 24 个(48%),与 P2RY2 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 37 个(74%),与 HTR2A 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 33 个(66%),与 P2RY12 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 39 个(78%),与

CHRM1 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 36 个 (72%), 与 HTR2C 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 9 个 (18%), 与 CHRM2 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 30 个 (60%), 与 ADRA1D 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 29 个 (58%), 与 ADRA1A 蛋白结合分数大于等于 7 分的共有 29 个 (58%), 与 P2RY1 蛋白结合分数大于等 7 分的共有 36 个 (72%), 总体对接分数大于 7 分的结合率达到

50% 以上, 说明鸡蛋花相关成分能结合抗过敏的相关靶标, 从而发挥改善 I 型超敏反应的作用。并且, 能与这 10 个靶标结合分数达到 7 分以上的, 有 RP03、RP04、RP05、RP09、RP11、RP12、RP14、RP19, 其中 RP03、RP04、RP05、RP09、RP11、RP12 是以鸡蛋花苷为母体的环烯醚萜类化合物, 是鸡蛋花中的主要代表性成分, 后期能以鸡蛋花苷为母体进行修饰, 开发出治疗 I 型超敏反应的新药。

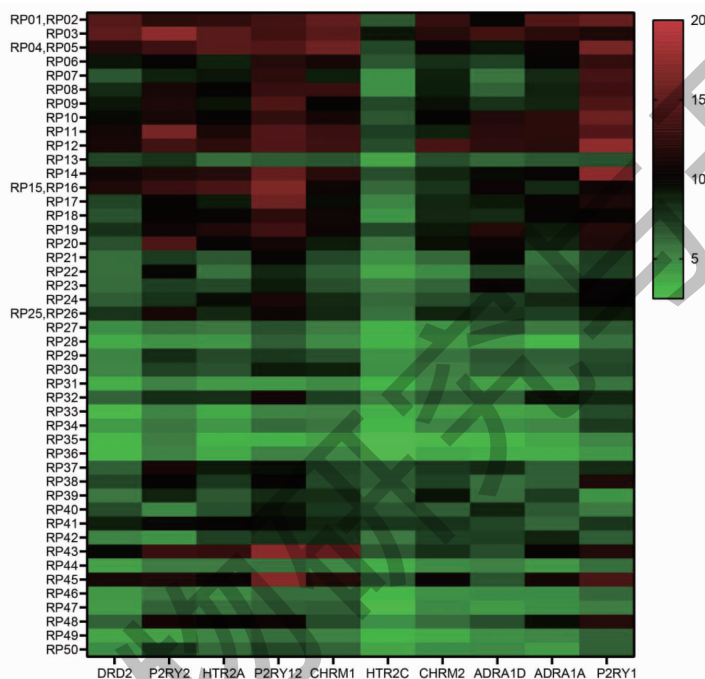


图 6 鸡蛋花有效成分与关键靶标对接分数热图

Fig. 6 The heat map of the docking score between effective components of *Plumeria rubra* and key targets

3 讨论与结论

瘙痒是常见的慢性疾病之一, 引起瘙痒症的原因多种多样, 由过敏反应引起的瘙痒症常有发生, 其中由 IgE 介导的 I 型过敏反应是最为常见的。而且这种瘙痒症具有反复发作的特点, 是人类难以解决的健康难题之一^[20]。临床上的 I 型过敏反应又称为 I 型变态反应, I 型过敏反应可以分为两个阶段: ①当特异性过敏原刚接触机体时, B 细胞会处于被诱导状态, 产生免疫球蛋白 E 抗体, 同时机体也会转变为致敏状态; ②过敏原再次与处于致敏状态的肥大细胞接触时, 这时特异性过敏原会与处于致敏状态下肥大细胞表面的免疫球蛋白 E 进行反应, 肥大细胞被触发脱颗粒反应^[21]。其中肥大细胞是过敏性疾病发生机制中的桥梁^[22], 所以在细胞验证药理实验所用的细胞是 RBL-2H3 细胞, RBL-2H3 细胞

系是大鼠嗜碱性粒细胞系的一个亚系, 具有与肥大细胞非常相似的特性。并且近年来, 由中药注射剂引起的临床过敏反应频频发生, 其中吐温 80 作为中药注射剂的常用辅料, 被认为是引起过敏反应的诱因之一^[23], 且通过张嘉^[24] 及关翠雯^[25] 的实验研究可得知, 一定浓度的吐温 80 可以直接诱导肥大细胞脱颗粒, 释放活性介质。

鸡蛋花是日常生活中常用到的中药, 主产地为东南亚地区, 在岭南地区多作为凉茶的主要成分之一^[26]。其气味芳香, 可作为化妆品原材料。鸡蛋花具有抑菌、消炎、抗疟疾等作用, 其外观形状为外面乳白色, 中心鲜黄色, 气味极芳香, 其药用价值高, 外形好看, 气味芬芳深受大众欢迎。但目前对于鸡蛋花不同提取部位在抗瘙痒方面的研究较少, 本次实验为进一步探究鸡蛋花的药效作用, 通过网络药理

学试验预测鸡蛋花有效成分在治疗超敏反应,抗瘙痒的机制与作用靶点,然后细胞实验验证性地将鸡蛋花不同的提取部位(水提取部、正丁醇提取部、乙酸乙酯提取部、石油醚提取部)作用于经吐温 80 诱导脱颗粒处理的 RBL-2H3 肥大细胞,为鸡蛋花的药效研究提供一定的确证。作为对照的蛇床子素与苦参碱是较为经典的抗瘙痒中药单体,在临床上应用广泛。

3.1 鸡蛋花治疗超敏反应,抗瘙痒的细胞分子机制

由 GO 富集分析,发现鸡蛋花治疗超敏反应的核心靶标主要通过质膜的组成成分、磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号途径、腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路、细胞信号转导、离子运输的正调节、血红素结合、药物结合、肾上腺素结合、神经元动作电位、炎症反应、血管收缩的调节、类固醇代谢过程、动作电位过程中的膜去极化、药物反应、对有毒物质的反应、平滑肌收缩、电压门控钠通道复合体、质膜外侧、电压门控钠通道活性、杂环代谢过程等前 20 条具有显著性的生物功能信息有关。在细胞层面,因为超敏反应与细胞膜上 IgE 受体及抗体的作用机制非常相关,I 型过敏反应在过敏原接触到细胞后会引发细胞的一系列膜质变化,使细胞处于更为敏感的阶段,从而使机体产生瘙痒感^[27]。而 GO 富集的结果中大多数与超敏反应的发生机制都相关,特别是细胞信号转导、离子运输正调节、神经元动作电位变化以及膜去极化等都是与细胞的通透性有关;而血红素结合、药物结合、肾上腺素结合、炎症反应、血管收缩调节等也是能够降低过敏反应的瘙痒感,使细胞的敏感度减少,从而改善瘙痒。所以鸡蛋花治疗超敏反应,抗瘙痒的细胞分子水平是有一定的预测机制。

3.2 鸡蛋花治疗超敏反应,抗瘙痒的相关靶标和作用通路

通过 KEGG 通路富集分析,针对鸡蛋花类药性评价较高的成分进行关键靶标预测,研究治疗超敏反应的主要核心靶标和关键通路。发现在关键的通路:神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、炎症介质对 TRP 通道的调节、cGMP-PKG 信号路径、药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源物质代谢的影响、色氨酸代谢、血小板活化通路等 8 条通路都是治疗超敏反应的关键通路。

潘等^[28]人认为神经活性配体受体相互作用是质膜上参与细胞内外信号转导通路的配体与受体的

所有集合,其中 IL-6 炎症介质受体就处于肥大细胞质膜上,参与神经活性配体受相互作用,体现抗炎活性。Wang 等^[29]的研究证明肥大细胞膜上的 MRG-PRX2 受体是抗过敏反应的重要受体之一,而鸡蛋花能够对细胞表面受体进行作用,阐明鸡蛋花可以通过神经活性配体-受体相互作用信号通路进行治疗。由于细胞内外钙信号的转导参与过敏反应的产生,而 TRP 通路能够调节钙离子的转运,通过 ORAI-STIM 复合物的钙内流可以产生持续的 Ca^{2+} 信号,编码 IL-2、IL-4 和 TNF 等过敏炎症细胞因子表达,所以炎症介质对 TRP 通道的调节是一个重要的调节途径^[30]。而鸡蛋花在钙信号通路和炎症介质通路上能够有一定的显著治疗作用,说明鸡蛋花较大概率上是通过细胞表面的炎症细胞因子起治疗过敏反应的作用。cGMP-PKG 信号通路能够改善 Ca^{2+} 稳态,扩张血管,改善血液循环,其与血小板在血管中的流动相关^[31],而血小板在特定地方的活化,能够直接参与过敏性炎症疾病^[32]。血小板通过 IgE 的特异性膜受体与 IgE 抗体相互作用,激活后血小板分泌具有强炎症特性的不同生物介质,其中 β -血栓球蛋白(β -TG)血小板因子 4(PF-4)被认为是体内血小板活化过程的重要标志,它们属于过敏反应的促炎细胞因子血小板家族,称为趋化因子,负责炎症部位白细胞群体的积累和激活,这些趋化因子和其他血小板衍生的生物活性介质被认为是过敏性疾病的致病因素^[33]。有研究表明色氨酸代谢在治疗过敏性鼻炎中,发现在 Th2 衍生的细胞中将 IL-4、IL-13 表达会促进炎症的发生,从而产生过敏反应,而 IFN- γ 与 IL-12 能够缓解这种促炎反应^[34]。Stoilov 等^[35]研究细胞色素 P450 在过敏反应的作用,发现细胞色素 P450 与炎症因子的释放相关,其中 IL-4、IL-13、CCL11 的增加能够使过敏反应迅速进入急性期,其中抗炎因子 IL-10 的释放水平则保持在较高水平。以上数据表明鸡蛋花治疗过敏反应,抗瘙痒的机制中,可以重点聚焦在炎症因子介导的 IL-6 信号通路、IL-4 与 IL-13 信号通路以及 IL-10 信号通路上,通过检测相关炎症因子表达量来研究鸡蛋花的治疗通路,为研究鸡蛋花治疗过敏反应的作用机制提供一定的预判,确定研究方向。

3.3 鸡蛋花不同部位提取物改善吐温 80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒

据研究^[36]得知鸡蛋花的主要化学成分主要分为挥发油、三萜类、环烯醚萜类、黄酮醇类、醛类、糖

类、脂肪族类化合物、环烯醚萜苷、黄酮醇苷类等 10 类化合物。本次实验得出鸡蛋花的乙酸乙酯提取部位具有抑制 RBL-2H3 脱颗粒的作用。由 Lin^[37] 的研究得知,鸡蛋花的黄酮类成分中含有大量的黄酮苷类化合物。而鸡蛋花乙酸乙酯部提取物改善 RBL-2H3 细胞脱颗粒的药理效用较之苦参碱的更好,与蛇床子素相比也有一定的疗效。结合网络药理学与分子对接部分研究鸡蛋花的作用靶点与通路中,可以得知鸡蛋花在治疗 I 型过敏反应,减少瘙痒感,改善机体的不良感观有较明显作用效果的有效成分主要集中在环烯醚萜苷类和黄酮类成份^[11]上,包括去甲基咖啡酰鸡蛋花苷(RP03)、香豆酰鸡蛋花苷(RP04、RP05)、鸡蛋花苷(RP09)、咖啡酰鸡蛋花苷(RP11)、去甲基香豆酰鸡蛋花苷(RP12)、过山蕨素(RP14)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷(RP19)等,并且能够在炎症反应、血小板活化、血管收缩控制的基础上降低超敏反应的不良感觉,从而达到一定的治疗效果。RBL-2H3 细胞试验进一步验证了吐温 80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型模拟肥大细胞产生超敏反应的成功,并且在改善瘙痒的细胞实验中,验证了鸡蛋花的乙酸乙酯部提取物在治疗超敏反应,减少瘙痒有一定的效果。

综上所述,通过吐温 80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒的药理作用试验,验证鸡蛋花的确能够改善细胞脱颗粒,进一步阐明鸡蛋花的乙酸乙酯部提取物在治疗超敏反应,减少瘙痒感有一定的药效,结合网络药理学与分子对接对鸡蛋花有效成分治疗超敏反应,抗瘙痒进行靶点与通路预测,发现预测的机制通路中鸡蛋花的治疗作用可能与细胞膜上的神经活性配体-受体的作用以及炎症介质的转运相关,并且可能会调节血管的收缩程度和血小板活化来减缓超敏反应的瘙痒感。并且根据分子对接的结果得出鸡蛋花中的环烯醚萜类化合物和黄酮类化合物是治疗超敏反应的主要有效成分,能够以鸡蛋花苷类和黄酮类化合物为母体,进行修饰,形成改善超敏反应的新药。本次实验阐明了鸡蛋花在治疗超敏反应,抗瘙痒有一定的治疗作用,其中可预测鸡蛋花能够通过抗炎和调节细胞膜上钙离子转运以及相关炎症细胞因子受体的机制达到治疗效果,调节超敏反应相关蛋白的化合物环烯醚萜类和黄酮类成分可能存在于本次实验的乙酸乙酯提取部位。

参考文献

1 Hong T, Yu B, Lu Y, et al. Advances in chemical composi-

- tions and biological activities of *Plumeria rubra* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2011, 23: 565-570.
- 2 Hwang GB, Lee JE, Nho CW, et al. Short-term effect of humid airflow on antimicrobial air filters using *Sophora flavescens* nanoparticles [J]. Sci Total Environ, 2012, 421-422: 273-279.
- 3 Zhang C, Ma Y, Gao HM, et al. Advance on chemical constituents in *Sophora flavescens* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 205-214.
- 4 Li YM, Jia M, Li HQ, et al. *Cnidium monnieri*: a review of traditional uses, phytochemical and ethnopharmacological properties [J]. Am J Chin Med, 2015, 43: 835-877.
- 5 Jiang T, Li HL. Survey on studies on *Cnidium monnieri* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2001, 32: 181-183.
- 6 Wang B, Qiang YH, Zhang FX. Present situation and prospect of anti-allergic effect of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Med Res (中华医学研究杂志), 2007, 7: 1118-1119.
- 7 Zhang QQ, Lei TC. Suppression of osthole on the Degranulation of RBL-2H3 Cells Induced by Phorbol [J]. Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med (中国中西医结合皮肤性病学杂志), 2018, 17: 105-108.
- 8 Han JY, Yi Y, Liang AH, et al. Review on requirements of drug allergy or pseudoallergic reactions in pre-clinical evaluation [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 50: 49-52.
- 9 Wang HL, Li ZH, Xu YT. Advances in pharmacologic studies on treatments of allergic diseases by Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 1542-1555.
- 10 Hua XD, Yi CH. Development of research on anti-allergy mechanism of Chinese traditional medicine [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2009, 21: 69-72.
- 11 Lu XJ. Study on chemical constituents and quality evaluation of flos *Plumeria rubra* cv. *acutifolia* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2016.
- 12 Deng HD, Jiang WQ, Tan L, et al. Frangipani of terpenoids in different extraction and eeparation methods of comparative study [J]. Guangdong Chem (广东化工), 2017, 44: 33-34.
- 13 Gao ZR, Huang J, Liu JY, et al. Research advances in the volatile components and pharmacological effects of *Plumeria rubra* L [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科技), 2012, 40: 10067-10070.
- 14 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47

- (W1):W357-W364.
- 15 Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5. 0; a major update to the DrugBank database for 2018[DB]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46; D1074-D1082.
 - 16 Piñero J, Bravo Á, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET; a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45; D833-D839.
 - 17 The UniProt Consortium. UniProt; a worldwide hub of protein knowledge[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47; D506-515.
 - 18 Szklarczyk D, Gable AL, 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; D607-613.
 - 19 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4; 44-57.
 - 20 Naal Rose Mary Z G, Tabb Joel, Holowka David, et al. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20; 791-796.
 - 21 Deng Z, Pu XP. Progress in research of the targets and new drugs resisting type I hypersensitivity[J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2013, 22; 417-421.
 - 22 Chen P, Fang LH. Application of RBL-2H3 cell line in allergic diseases[J]. *Chem Life* (生命的化学), 2010, 30; 586-589.
 - 23 Zhang MY, Li YK, Zhang J, et al. Experimental study on anaphylactic and anaphylactoid reactions of *Houttuynia cordata* injections[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2009, 26; 610-614.
 - 24 Zhang J, Li P, Li YK, et al. Effect on Tween 80 on the degranulation of RBL-2H3 cells[J]. *Curr Immunol* (现代免疫学), 2009, 29; 240-245.
 - 25 Jiao Y, Wang JD, Deng JP. Study of degranulation induced by injective excipients in a rat mast(RBL-2H3) cell line[J]. *J Toxicol* (毒理学杂志), 2018, 50; 49-52.
 - 26 China Academy of Chinese Medical Sciences, et al. Dictionary of Traditional Chinese Medicine(中医大辞典)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1995; 194.
 - 27 Draber P, Halova I, Polakovicova I, et al. Signal transduction and chemotaxis in mast cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778; 11-23.
 - 28 Pan LZ, Yan ZY, Zuo CY, et al. Influence of long-term usage of diazepam on neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathway[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, 42443-446.
 - 29 Wang JL, Zhang YJ, Wang J, et al. Paeoniflorin inhibits MRGPRX2-mediated pseudo-allergic reaction via calcium signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2020, 34; 401-408.
 - 30 Nam JH, Kim WK. The role of TRP channels in allergic inflammation and its clinical relevance[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 27; 1446-1468.
 - 31 Chen JJ. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca²⁺ homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the Enos/Cgmp/PKG pathway [C]//Chinese Society of Traditional Chinese Medicine; The 15th international Congress on Luobing Theory(第十五届国际络病学大会论文集), 2019; 2.
 - 32 Hu W. Study of change of apelin in plasma of ischemic stroke patient and its regulation function in cerebral blood vessel and cerebral collateral circulation via cGMP-PKG/PKA signaling pathway[D]. Heifei: Anhui Medical University (安徽医科大学), 2017.
 - 33 Kasperska-Zajac A, Rogala B. Platelet activation during allergic inflammation[J]. *Inflammation*, 2007, 30; 161-166.
 - 34 Ciprandi G, De Amici M, Tosca M, et al. Tryptophan metabolism in allergic rhinitis; The effect of pollen allergen exposure [J]. *Nat Immunol*, 2010, 71; 911-915.
 - 35 Stoilov I, Krueger W, Mankowski D, et al. The cytochromes P450(CYP) response to allergic inflammation of the lung [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 456; 30-38.
 - 36 Deng XM, Liu J, Zhao B, et al. Identification of *Jidanhua* (*Plumeria rubra*) and its different polar parts by FTIR combined with principal component analysis [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2019, 25; 55-58.
 - 37 Lin LZ. The Pharmacognostical study of *Plumeria Flos*[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University (广东药学院), 2015.