

基于网络药理学和体外实验探究石杉碱甲对急性肺损伤中肺泡上皮细胞的作用及保护机制

石俊^{1,2}, 唐佳佳^{1,2}, 张春阳²,
陈韦², 齐曼², 陈旭昕^{2*}, 韩志海^{1,2*}

¹华南理工大学医学院, 广州 510006; ²解放军总医院第六医学中心呼吸与危重症医学科, 北京 100048

摘要: 基于网络药理学和体外实验, 探讨石杉碱甲 (huperzine A, Hup A) 对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 中肺泡上皮细胞的作用及机制。首先从公共数据库查找 Hup A、ALI 的相关靶点, 获取二者交集即为 Hup A 保护 ALI 的潜在靶点并进行富集分析; 通过构建蛋白互作网络及“成分-靶点-通路”网络进而筛选 Hup A 保护 ALI 的核心靶点并进行分子对接验证; 进一步采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激小鼠肺泡上皮细胞 (MLE-12) 构建细胞模型加以 Hup A 预处理, 分别检测细胞活性、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平、超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD) 水平、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平验证 Hup A 的保护作用, 最后蛋白免疫印迹实验验证关键靶点的蛋白水平变化。网络药理学分析结果显示 Hup A 共有 144 个潜在治疗靶点, Hup A 参与调节蛋白激酶活性、氧化应激、炎症反应等生物学过程和磷脂酰肌醇-3-激酶-丝苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase-serine-threonine kinase, PI3K-Akt) 通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路等信号通路; 分子对接结果显示 Hup A 与 Akt1、Akt2 和 Mapk1 (又称细胞外蛋白调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, Erk)) 均具有较好的结合活性; 细胞实验显示 Hup A 可以改善 LPS 诱导的细胞活性下降 ($P < 0.05$), 降低 IL-6、MDA、p-Erk1/2/Erk1/2 水平 ($P < 0.05$), 提高 SOD 与 p-Akt1/Akt1 水平 ($P < 0.05$)。综上, Hup A 可能通过调控 Akt1 和 Mapk1 保护肺泡上皮细胞进而缓解 LPS 诱导的 ALI。

关键词: 石杉碱甲; 急性肺损伤; Akt1; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)9-1600-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.9.1616

Effect and protective mechanism of huperzine A on alveolar epithelial cells in acute lung injury based on network pharmacology and *in vitro* experimentation

SHI Jun^{1,2}, TANG Jia-jia^{1,2}, ZHANG Chun-yang²,
CHEN Wei², QI Man², CHEN Xu-xin^{2*}, HAN Zhi-hai^{1,2*}

¹School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Based on network pharmacology and experimental validation, this study investigated the protective effect and mechanism of huperzine A (Hup A) on alveolar epithelial cells in acute lung injury (ALI). Firstly, the potential targets for Hup A to protect against ALI were identified by searching the public database for related targets of Hup A and ALI, and obtaining their intersection. Subsequently, the core target of Hup A protection against ALI was screened through construction of protein interaction network and "component-target-pathway" network, followed by verification through molecular docking. Furthermore, a cell model was established by stimulating mouse alveolar epithelial cells (MLE-12) with lipopolysaccharide (LPS) and pre-treating them with Hup A. The protective effect of Hup A was verified by detecting changes in cell viability, interleu-

收稿日期: 2023-12-13

接受日期: 2024-06-28

基金项目: 北京市自然科学基金资助面上项目 (7232169); 军队后勤科研重点项目 (BHJ16J011)

* 通信作者 E-mail: hanzhihai@301hospital.com.cn, huxiuc@outlook.com

kin-6 (IL-6) level, super oxide dismutase (SOD) level and malondialdehyde (MDA) level. Finally, Western blot test was conducted to verify alterations in protein levels of key targets. Network pharmacological analysis revealed 144 potential therapeutic targets for Hup A, implicating its involvement in the regulation of biological processes such as protein kinase activity, oxidative stress, inflammatory response, and signaling pathways including phosphatidylinositol 3-kinase-serine-threonine kinase (PI3K-Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). Molecular docking results demonstrated favorable binding activity of Hup A with Akt1, Akt2 and Mapk1 (also known as extracellular regulated protein kinases, Erk). Cell experiments indicated that Hup A effectively ameliorated LPS-induced decline in cell viability ($P < 0.05$), reduced levels of IL-6, MDA and p-Erk1/2/Erk1/2 ($P < 0.05$), while increasing SOD and p-Akt1/Akt1 levels ($P < 0.05$). In conclusion, Hup A may exert a protective effect in LPS induced ALI through the regulation of Akt1 and Mapk1 targets within alveolar epithelial cells.

Key words: huperzine A; acute lung injury; Akt1; network pharmacology; molecular docking

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是主要病理表现为肺泡上皮细胞损伤、肺血管通透性增高的呼吸系统急危重症,主要的病理生理机制是炎症失调和氧化应激^[1],其进展阶段急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是新冠高死亡率的重要原因。靶向肺上皮细胞减轻炎症和氧化应激性损伤治疗 ALI 是目前研究的主要方向,但目前 ALI 患者尚缺乏特异性的药物治疗,识别适用于 ALI 治疗的天然产物及其作用机制对未来的临床治疗及药物开发具有重要意义。

蛇足石杉属多年生蕨类植物,作为传统中草药可应用于跌打损伤、内伤出血、淤血肿痛、烧伤烫伤、毒虫叮咬和肌肉痉挛等^[4],其主要活性成分石杉碱甲(huperzine A, Hup A)是一类生物碱小分子化合物^[5]。现代药理学研究发现,Hup A 具有抗炎、抗氧化、提高细胞活性抑制细胞凋亡等特性,基于以上生物活性,进一步探究 Hup A 适用于保护 ALI 的潜在分子机制。

网络药理学是整合系统生物学、基因组学以及蛋白质组学等进行联合分析的一种方法,可通过拓扑学计算、网络分层聚类等计算分析药物治疗疾病的潜在靶点,并与体内、体外实验相结合发现新的药物靶点和分子机制^[7]。近年来,越来越多的研究通过网络药理学识别了治疗肺损伤的潜在药物,包括有七龙天胶囊^[8]、木犀草素^[9]可通过抑制巨噬细胞炎症减轻 ALI,达原饮可降低肺组织病理损伤减轻 ALI 等。此外,Wang 等通过网络药理学与分子对接的联合应用进一步揭示了西贝母碱可通过调控磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-serine-threonine kinase, PI3K-Akt)通路减轻颗粒物诱导的肺损伤。因此,网络药理学以及分子对接的应用对于治疗 ALI 的潜在药物识别具

有重要意义。

本研究基于在线数据库识别的 ALI 特征基因及相关差异表达基因,进一步联合网络药理学分析 Hup A 保护 ALI 的潜在靶点及相关信号通路,在此基础上通过分子对接和体外细胞实验进行验证用以阐明 Hup A 靶向肺泡上皮细胞防治 ALI 的作用机制,为 Hup A 保护 ALI 及相关药物开发提供可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Hup A (批号:19940,纯度:99.00%, MedChemExpress 公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) (批号:0000153963,纯度:97.00%, Sigma 公司);DMEM/F12 培养基、胎牛血清(批号:6124022、2350404RP, Gibco 公司);青霉素/链霉素溶液、细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK8) (批号:GA2312026、CR2207041,武汉赛维尔生物科技有限公司);酶联免疫吸附剂检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒-白介素 6(interleukin 6, IL-6) (批号:GY06N24B7021,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒(批号:111521220520、080521220525、111622230522,上海碧云天生物技术有限公司);蛋白 Marker(批号:91315953, Thermo 公司);胰蛋白酶、一抗 β -actin、山羊抗兔二抗、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、RIPA 裂解液、Super ECL Plus 超敏发光液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(10%)、一抗磷酸化 Akt1(phosphorylated Akt1, p-Akt1)、Akt1(批号分别为:724S25033156、623S390327、824S12013106、323S10016011、323S53156439、320S05116201、324S1

0016812、323S20096836, 723S35001731、723S35021273, 北京华兴博创基因技术有限公司); 一抗细胞外蛋白调节激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, Erk1/2)、磷酸化 Erk1/2 (phosphorylated Erk1/2, p-Erk1/2) (批号: 100861-1、1001375-7, 艾博抗(上海)贸易有限公司)。

1.2 仪器

多功能酶标仪(型号: iMark, 美国 Bio-Rad 公司); 化学发光成像分析仪(型号: ImageQuant LAS 4000, 美国 GE Healthcare 公司)。

1.3 实验细胞

小鼠肺泡上皮细胞(MLE-12)购自上海安为科技有限公司。

1.4 网络药理学研究

1.4.1 ALI 疾病相关靶点识别

数据集 GSE1871 和 GSE2411 为小鼠肺损伤转录组测序数据集, 下载自 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。GSE1871 数据集纳入 3 个对照组和 3 个 LPS 诱导的肺损伤组; GSE2411 数据集纳入 6 个对照组和 6 个 LPS 诱导的肺损伤组。分别对以上数据集使用“limma”R 包进行差分析, 获取的差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)作为 ALI 相关基因, DEGs 的筛选条件为: 调整后 $P(P. adj) < 0.05$, ≥ 1 为条件, 结果在火山图中展示。此外, 以“acute lung injury”“ALI”“acute respiratory distress syndrome”“ARDS”为关键词, 分别通过 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 搜索疾病相关靶点, 其中 GeneCards 数据库筛选相关性评分大于 10 的靶点^[12], 并与 OMIM 数据库结果、TTD 数据库结果、DEGs 合并去除重复值识别出最终的疾病相关靶点。

1.4.2 Hup A 治疗 ALI 的潜在靶点预测

分别借助 PharmMapper (<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>) 和 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 平台预测 Hup A 潜在作用靶点^[13], 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索获取 Hup A 的二维结构以及 Canonical SMILES, 分别将二维结构导入 PharmMapper 数据库 (Z 值 > 0)、Canonical SMILES 导入 SwissTargetPrediction 数据库 (Probably 值 > 0), 并对获取的结果利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行注释, 去除重复值后合并二者结果并进一步与“1.4.1”中获取的疾病相关靶点对比后通过韦恩图绘制获取交集即为 Hup A 治疗 ALI 的潜在作用靶点^[14]。

tps://www.uniprot.org/) 进行注释, 去除重复值后合并二者结果并进一步与“1.4.1”中获取的疾病相关靶点对比后通过韦恩图绘制获取交集即为 Hup A 治疗 ALI 的潜在作用靶点^[14]。

1.4.3 富集分析

对获取的 DEGs 进行基因名转换后使用“clusterProfiler”R 包将获取的 DEGs 进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析, 并将其结果以气泡图形式展示, 气泡大小对应富集的基因数目, 气泡颜色由红至蓝代表 $P. adj$ 值逐渐减小, 分析 Hup A 调控的潜在生物过程及相关通路^[15]。

1.4.4 Hup A 与 ALI 共有靶点蛋白互作网络构建及关键靶点识别

将获取的共有 DEGs 导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置默认参数进而构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络, 并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化处理, 进一步通过 MCODE 算法获取核心的基因群。

1.4.5 构建“Hup A-ALI 靶点-通路”网络

获取“1.4.3”中的 ALI 治疗相关通路和“1.4.4”中识别的核心基因群, 运用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“Hup A-ALI 靶点-通路”网络, 同时使用 Network Analyzer 分析网络拓扑参数识别关键调控靶点及通路。

1.4.6 分子对接实验

通过 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查找并下载关键调控靶点的晶体结构的 pdb 格式文件, 使用 Pymol 软件和 AutoDockTools 软件与 Hup A 的分子结构进行分子对接实验及结果可视化, 最终通过结合能识别 Hup A 与关键靶点的结合程度。

1.5 体外细胞实验验证

1.5.1 MLE-12 细胞培养

MLE-12 细胞使用含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 并置于 37 °C、5% 二氧化碳、95% 相对饱和湿度条件下恒温培养, 细胞铺于 T25 培养瓶中长至 80% ~ 90% 汇合度时进行传代。

1.5.2 CCK8 法检测 Hup A 对于 LPS 刺激的 MLE-12 细胞活性的影响

将处于对数生长期的 MLE-12 细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后分别以梯度 Hup A (0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 干预 MLE-12

细胞 24 h 后弃上清,每孔加入完全培养基 100 μL 和 CCK8 检测试剂 10 μL ,混匀后将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 1 h 后使用酶标仪在 450 nm 下测量吸光度。此外,采用 LPS (0.5、5、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 MLE-12 细胞筛选 LPS 抑制 MLE-12 细胞活性的剂量,并基于此结果构建模型组 (model, Mod) 加以不同时间节点 (2、4、8 h) 的 Hup A 预处理检测 Hup A 对于 LPS 刺激的 MLE-12 细胞活性的影响。其中对照组 (control, Con) 细胞为未进行 Hup A/LPS 处理的正常培养的正常培养的细胞。

1.5.3 ELISA 法检测细胞培养上清 IL-6 水平

将处于对数生长期的细胞消化离心后加入培养基调整细胞量为 5×10^5 个接种于 6 孔板中待细胞贴壁,之后按不同分组进行干预处理。Con: 仅加入培养基; Mod: 加入 LPS (500 ng/mL)^[16]; Hup A: 仅加入 Hup A (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$); Hup A + LPS: 加入 LPS (500 ng/mL) 前加入 Hup A (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 预处理 2 h^[17]。24 h 后收取细胞样品及细胞培养上清,对照试剂盒说明书检测细胞培养上清中的 IL-6 水平。

1.5.4 细胞 MDA 与 SOD 水平检测

收集“1.5.3”中各组细胞样品,对照试剂盒说明书检测细胞 MDA 与 SOD 水平。

1.5.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白的表达变化

收集“1.5.3”中各分组的细胞使用 RIPA 裂解

液提取细胞总蛋白,通过定量的方式测定各组细胞蛋白浓度,调整蛋白浓度后将等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。采用湿电转移的方法将蛋白转移至 PVDF 膜后使用 5% 脱脂奶粉/BSA 封闭液室温封闭 1 h 后,孵育一抗 (p-Akt1, Akt1, p-Erk1/2, Erk1/2; 1:1 000; β -actin; 1:10 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜之后洗膜三次,每次 10 分钟,室温孵育二抗 (1:10 000) 1 h 后洗膜三次,超敏发光液孵育后使用 ImageQuant LAS 4 000 进行显影采图,并使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.5.6 统计学处理

使用 SPSS 24.0 对数据进行统计分析,绘图采用 GraphPad Prism 8 软件。实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间两两比较采用 t 检验,多组数据之间的比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著性差异法检验,方差不齐时采用 Tamhane's T2 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 ALI 相关靶点的获取

以 $P_{\text{adj}} < 0.05$, $|\log \text{FC}| \geq 1$ 为条件,分别从 GEO 数据集 GSE1871 和 GSE2411 筛选出 DEGs 共 1 557 个和 246 个 (见图 1); 检索 OMIM、TTD、GeneCards 数据库获取 ALI 相关靶点 3 035 个,合并二者结果并去除重复值得到疾病相关靶点共 4 310 个。

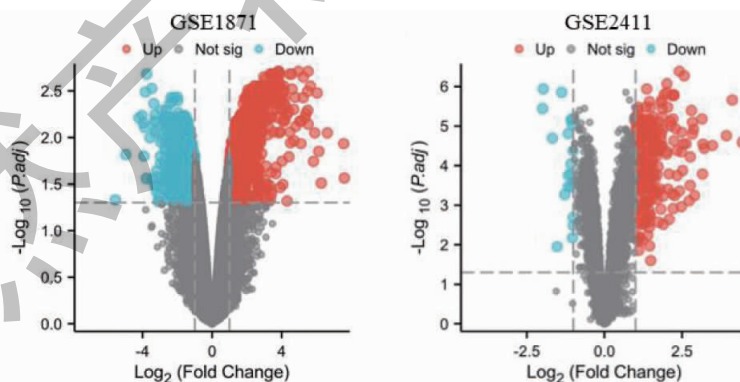


图 1 GEO 数据集分析

Fig. 1 Analysis of GEO dataset

注:灰色圆点为非差异表达基因;蓝色圆点为下调的差异表达基因 ($P_{\text{adj}} < 0.05$, $\log \text{FC} < -1$);红色圆点为上调的差异表达基因 ($P_{\text{adj}} < 0.05$, $\log \text{FC} > 1$)。Note: The gray dots are not DEGs, the blue dots are down-regulated DEGs ($P_{\text{adj}} < 0.05$, $\log \text{FC} < -1$), and the red dots are up-regulated DEGs ($P_{\text{adj}} < 0.05$, $\log \text{FC} > 1$).

2.1.2 Hup A 的潜在治疗靶点预测

分别通过 SwissTargetPrediction 数据库和 PharmMapper 数据库预测 Hup A 相关靶点获得 100

个和 172 个,合并去除重复值后最终获得 Hup A 相关靶点 262 个。进一步将疾病相关靶点和 Hup A 相关靶点获取交集后共得到 Hup A 的潜在治疗靶

点 144 个(见图 2)。

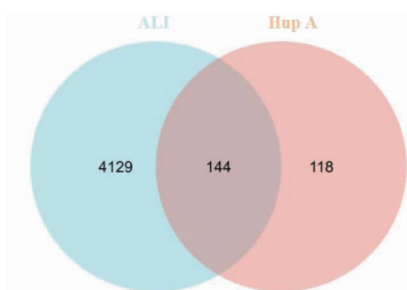


图 2 疾病-药物靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of disease-drug targets

2.1.3 治疗靶点的 GO/KEGG 富集分析

对获取的 Hup A 潜在治疗靶点进行 GO/KEGG 富集分析,GO 功能富集结果显示有调节蛋白激酶

活性、调控细胞外刺激、应对氧化应激、上皮细胞增殖、损伤修复、调节炎症反应、应对内毒素反应以及调节 ERK 级联反应等生物过程的参与;KEGG 通路富集结果显示有 PI3K-Akt 通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、FoxO 通路、凋亡、环腺苷一磷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)通路、NOD 样受体通路、5'-磷酸腺苷活化蛋白激酶(Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)通路、环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G(cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G, cGMP-PKG)通路以及核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)通路等信号通路参与(见图 3)。

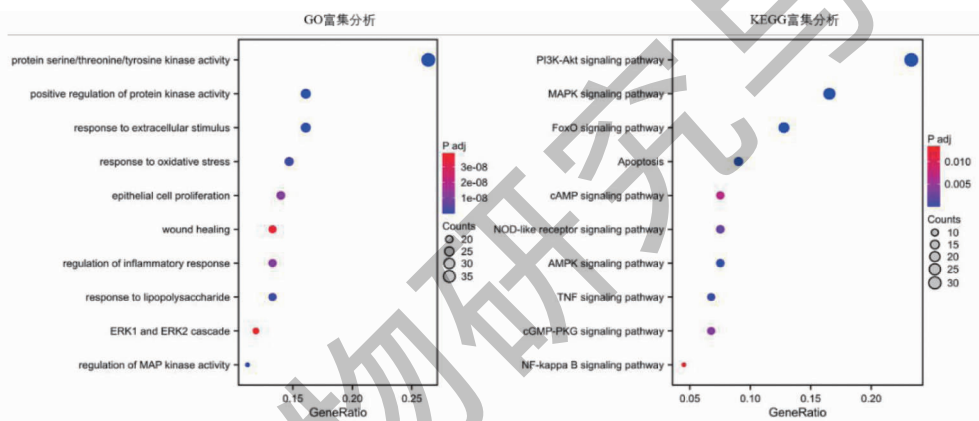


图 3 GO/KEGG 富集分析

Fig. 3 GO/KEGG enrichment analysis

2.1.4 PPI 网络构建及关键靶点识别

基于识别的 144 个 Hup A 的潜在治疗靶点构建 PPI 网络,其中共包括 139 个节点以及 1 254 条连

接,其中分值最高的为 Akt1;进一步通过 MCODE 算法识别出 7 个模块,其中得分最高的模块包含有 33 个靶点(见图 4)。

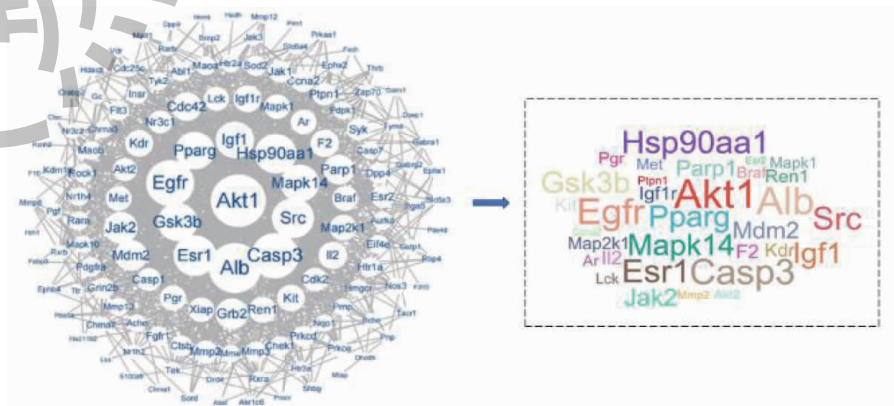


图 4 PPI 网络构建

Fig. 4 Construction of PPI network

注:不同节点间连线代表基因之间存在交互关系。Note: The connections between nodes indicate gene interactions.

2.1.5 “成分-靶点-通路”网络构建

利用“2.1.3”中识别的通路及“2.1.4”中识别的33个关键靶点共同构建“成分-靶点-通路”网络,

共包含45个节点和137条连接,其中分值最高的靶点为Akt1、Mapk1和Akt2,分值最高的通路为PI3K-Akt通路(见图5)。

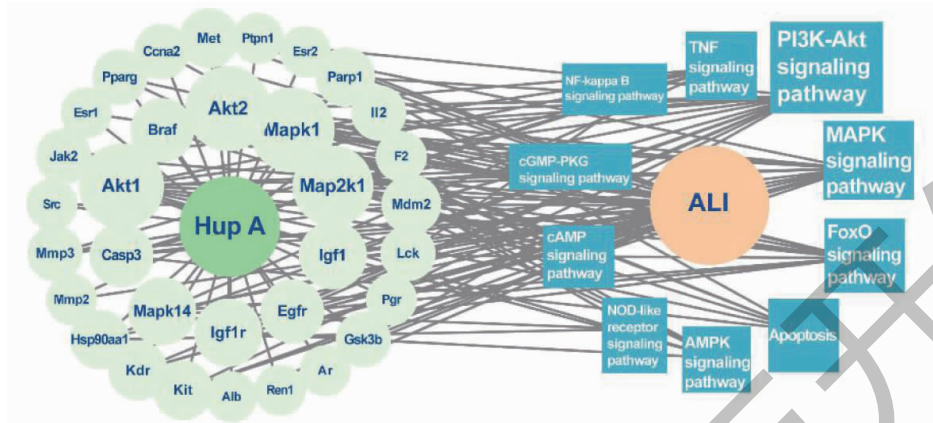


图5 “成分-靶点-通路”网络

Fig. 5 Compound-target-pathway network

注:不同节点间连线代表节点之间存在关联。Note: The connections between nodes indicate gene interactions.

2.1.6 分子对接

既往研究通常认为结合能小于-5.0 kcal/mol表示蛋白与小分子化合物之间具有较好的结合效果^[18],通过模拟蛋白靶点Akt1、Akt2以及Mapk1与

小分子药物Hup A之间的位点对接,结果显示Akt1、Akt2以及Mapk1与小分子药物Hup A之间的结合活化能分别为-6.99、-7.26、-6.79 kcal/mol,均具有较好的结合效果(见图6)。

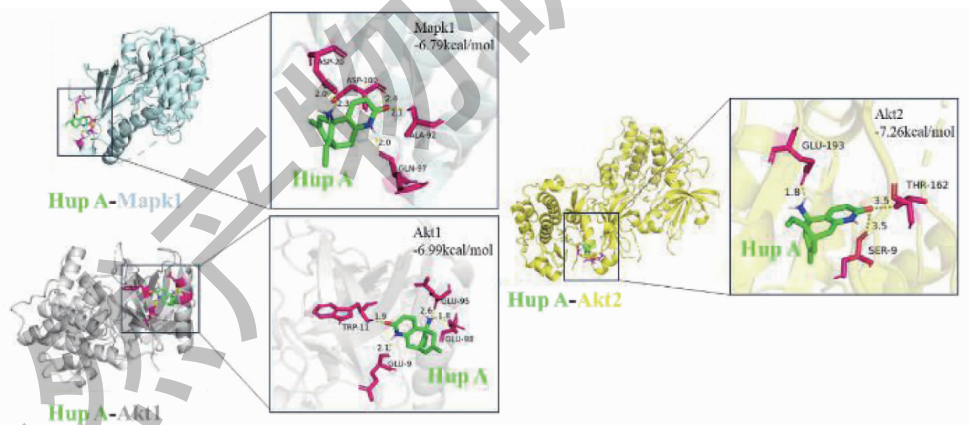


图6 分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking pattern

2.2 体外细胞实验验证

2.2.1 Hup A 干预 MLE-12 细胞的安全剂量

设置0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 共4个梯度的Hup A干预MLE-12细胞24 h, Con为未经处理的正常培养细胞。与Con相比,Hup A在0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对于细胞无活性干扰作用,在100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对于细胞活性有显著的抑制作用($P < 0.05$),其中Hup A干预浓度在1 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞

活性最高,将应用于后续实验(见图7)。

2.2.2 Hup A 对 LPS 刺激的 MLE-12 的细胞活性的影响

为检测Hup A对于MLE-12细胞活性的影响,使用不同浓度梯度的LPS干预MLE-12探索LPS的细胞毒性剂量,Con为未经处理的正常培养细胞。与Con相比,LPS干预浓度在50 $\mu\text{g/mL}$ 时可以显著诱导细胞活性下降($P < 0.05$)(见图8A);当使用

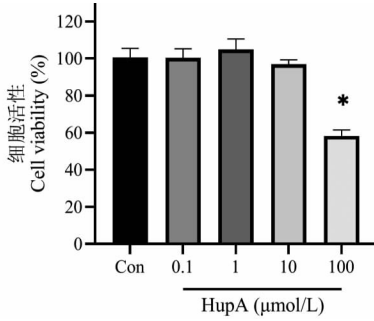


图7 Hup A 对于 MLE-12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 The impact of Hup A on the viability of MLE-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Con 相比, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$ 。

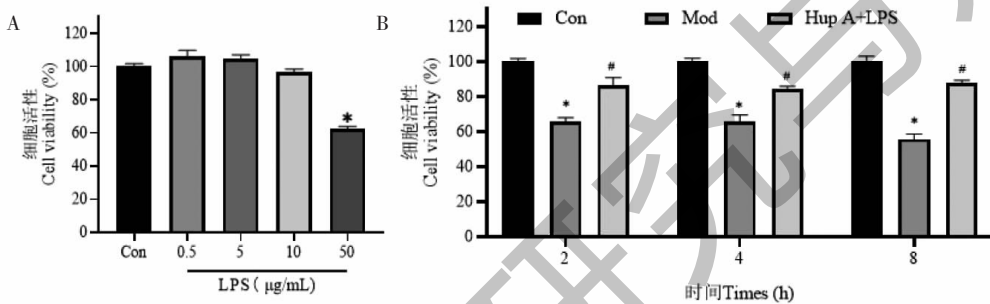


图8 Hup A 对 MLE-12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Hup A on the cell viability of MLE-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Con 相比, * $P < 0.05$;与 Mod 相比, # $P < 0.05$,下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$; Compared with Mod, # $P < 0.05$, the same below.

平($P < 0.05$)(见图9)。

2.2.4 Hup A 对 MLE-12 细胞 Akt1、p-Akt1、Erk1/2 和 p-Erk1/2 蛋白表达水平的影响

检测 MLE-12 细胞在不同干预条件下 Akt1、p-Akt1、Erk1/2、p-Erk1/2 的蛋白表达水平变化,验证

LPS (50 μg/mL) 干预 MLE-12 时构建 Mod 时, Hup A (1 μmol/L) 预处理(2、4、8 h) Mod 可以显著提高细胞活性(见图8B)。

2.2.3 Hup A 减轻 LPS 诱导的 MLE-12 细胞炎症与氧化应激

为进一步检测 Hup A 对于 ALI 发生过程中炎症与氧化应激的影响,本研究分别检测了 IL-6、MDA 以及 SOD 的表达水平变化,并基于前期实验选择 Hup A (1 μmol/L) 预处理 2 h 作为 Hup A + LPS 组的干预条件。与 Con 组相比, Mod 组 IL-6 和 MDA 水平显著升高($P < 0.05$), SOD 水平显著下降($P < 0.05$);与 Mod 组相比, Hup A 预处理显著降低了 IL-6 和 MDA 水平($P < 0.05$),显著提高了 SOD 水

网络药理学分析结果。与 Con 相比, Mod 中的 MLE-12 细胞 p-Erk1/2/Erk1/2 显著增高($P < 0.05$), p-Akt1/Akt1 显著下降($P < 0.05$);与 Mod 相比, Hup A + LPS 组中的 p-Erk1/2/Erk1/2 显著下降($P < 0.05$), p-Akt1/Akt1 显著升高($P < 0.05$)(见图10)。

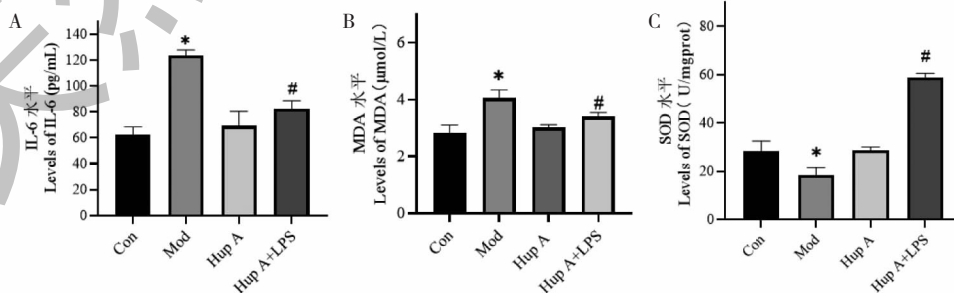


图9 不同分组细胞 IL-6、MDA 和 SOD 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Expression level of IL-6, MDA and SOD in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

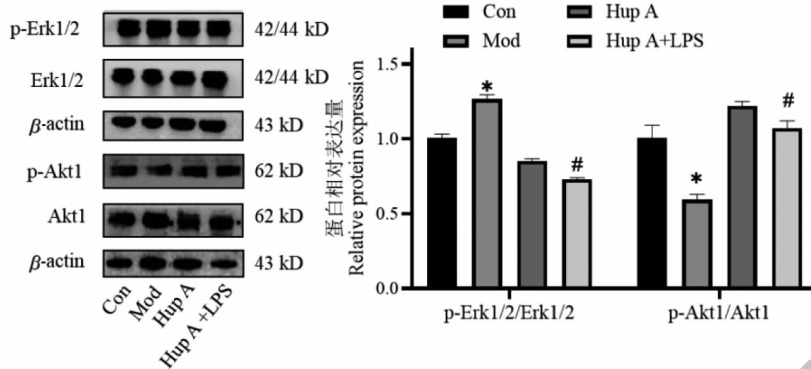


图 10 细胞 Akt1、p-Akt1、Erk1/2 和 p-Erk1/2 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Expression level of Akt1, p-Akt1, Erk1/2 and p-Erk1/2 protein in cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

Hup A 是提取自蛇足石杉的生物碱类小分子化合物,具有抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡等生物活性,早期的研究发现 Hup A 在神经退行性疾病中具有广泛的应用前景,如阿尔兹海默病等。近期有研究表明 Hup A 对脓毒症小鼠具有脏器保护作用^[19-21],但其保护肺损伤效应中涉及的靶细胞及重要靶点目前尚未明确,需进一步探索。

当前,越来越多的研究通过网络药理学的分析识别了适用于 ALI 治疗的潜在药物及相应的分子机制,包括有莲心碱可通过抑制 NF- κ B 通路减轻肺损伤,乙酰紫堇灵可以有效抑制肺损伤发生时的炎症反应,木犀草素可通过靶向 Akt1 减轻肺损伤^[9]等。本研究旨在联合网络药理学与体外实验探索 Hup A 保护 ALI 的潜在机制。首先通过公共测序数据库搜寻 DEGs、经典的疾病数据库获取 ALI 相关靶点,之后通过 Hup A 的结构及活性位点预测潜在的治疗靶点,获取二者交集共识别出 144 个 Hup A 保护 ALI 的相关靶点,为后续进一步探索 Hup A 保护 ALI 的机制提供了基础。

依据网络药理学分析识别的 144 个 Hup A 保护 ALI 的潜在靶点,GO 富集分析揭示了 Hup A 保护 ALI 的主要机制可能与调控蛋白激酶的活性、抗炎抗氧化、调节上皮细胞增殖以及修复损伤等生物学功能相关,提示 Hup A 可能会通过调控上皮细胞改善 ALI。KEGG 通路富集分析发现 PI3K-Akt 通路和 MPAK 通路是 Hup A 保护 ALI 所参与的重要通路,同时还有凋亡通路、cGMP 通路以及 NF- κ B 通路等肺损伤相关通路的富集,为后续进一步探索 Hup A 调控上皮细胞的具体分子机制提供了方向。MAPK 通路作为经典的信号通路主要通过 Erk 分子

调控细胞的生长分化,研究表明抑制 MAPK/NF- κ B 通路进而抑制 Erk 磷酸化可以有效减轻 LPS 诱导的肺损伤。PI3K/Akt 通路是调控人体病理生理的重要途径,通过活化下游的多个靶点发挥参与细胞增殖、代谢与存活。然而,目前关于调控 PI3K/Akt 通路治疗肺损伤的具体作用机制尚存争议^[29],在不同的研究模型中发现 PI3K/Akt 通路的抑制或是活化均可以诱导炎症的发生进而加重肺损伤。为进一步筛选 Hup A 保护 ALI 的关键靶点,本研究通过 144 个靶点所构建的 PPI 网络搜索到 33 个 Hup A 保护 ALI 的核心靶点,联合 KEGG 富集分析识别的 10 条富集通路成功构建“成分-靶点-通路”网络,最终识别出 Akt1、Mapk1 和 Akt2 为参与通路调控的主要靶点。通过分子对接分析 Hup A 与预测分数最高的三个靶点 Akt1、Mapk1 以及 Akt2 之间的结合能,结果显示 Hup A 与三个靶点均具有较好的结合能力,为后续实验探索 Hup A 保护 ALI 的具体机制探索提供了理论依据。

最后,本研究采用 LPS 刺激 MLE-12 细胞于体外模拟 ALI,验证网络药理学分析。首先采用 CCK8 实验结果初步发现 Hup A 对 MLE-12 细胞的保护性干预浓度范围在 10 μ mol/L 以内,并且对于高浓度 LPS 诱导的 MLE-12 细胞活性下降具有显著的抑制作用,确证 Hup A 具有细胞保护作用。此外,干预浓度在 1 μ mol/L 时 Hup A 对 LPS 处理的 MLE-12 细胞具有降低炎症因子 IL-6 释放、降低 MDA 水平以及提高 SOD 水平的效应,表明 Hup A 对于炎症和氧化应激的抑制作用,初步验证了 GO 富集分析结果。此外,通过 Western blot 实验发现 Hup A 可以促进 Akt1 的磷酸化并抑制 Erk1/2 的磷酸化,初步论证了 Hup A 保护 LPS 诱导的 ALI 可能与调控肺

泡上皮细胞中的 Akt1 与 Mapk1 靶点相关联。

本研究联合多种在线数据库共同筛选出 ALI 相关靶点,运用网络药理学探索 Hup A 保护 ALI 的潜在靶点,进一步通过分子对接分析以及体外实验验证 Hup A 通过调控肺泡上皮细胞保护 ALI 的可能相关靶点,综合论证了 Hup A 可以减轻 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症反应和氧化应激,其具体分子机制与可能调控关键靶点 Akt1 和 Mapk1 相关联,为 ALI 的基础研究以及药物开发提供了参考依据。然而,本研究在实验探索方面缺少相关的动物实验论证,后续的课题中将进一步构建 ALI 小鼠模型,并针对 PI3K-Akt 信号通路以及 MAPK 信号通路进行深入的机制探索验证。

参考文献

- 1 Wang Y,Zhao Z,Xiao Z. The Emerging roles of ferroptosis in pathophysiology and treatment of acute lung injury[J]. J Inflamm Res,2023,16:4073-4085.
- 2 De Flora S,Balansky R,La Maestra S. Rationale for the use of N-acetylcysteine in both prevention and adjuvant therapy of COVID-19[J]. FASEB J,2020,34:13185-13193.
- 3 Woodby B,Arnold MM,Valacchi G. SARS-CoV-2 infection, COVID-19 pathogenesis, and exposure to air pollution: what is the connection? [J]. Ann N Y Acad Sci,2020,1486:15-38.
- 4 Luo YC,Zhao NW,Zhao JH,et al. Studies on the species and distribution of medicinal ferns of Huperziaceae and Lycopodiaceae in Guizhou province[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学),2008,36:12729-12752.
- 5 Li ZS,An ZJ,Wang J,et al. Active compounds and their biosynthesis of *Huperzia serrata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2022,53:3505-3517.
- 6 Zhang Y,Huang W,Tian Q,et al. Network pharmacology and biochemical experiments reveal the antiapoptotic mechanism of huperzine A for treating diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol,2023. DOI:10.1136/bjo-2023-323639.
- 7 Zhao L,Zhang H,Li N,et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. J. Ethnopharmacol,2023,309:116306.
- 8 Xie Y,Su XR,Zhou T,et al. Mechanism of Qilongtian Capsules in treatment of acute lung injury based on network pharmacology prediction and experimental validation [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:4187-4200.
- 9 Zhang D,Li Y,Jiang W,et al. A network pharmacology-based treatment analysis of luteolin for regulating pyroptosis in acute lung injury[J]. Shock,2023,60:306-314.
- 10 Guo L,Yang Y,Yuan J,et al. Da-Yuan-Yin decoction polyphenol fraction attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Pharm Biol,2023,61:228-240.
- 11 Wang Y,Shen Z,Zhao S,et al. Sipeimine ameliorates PM_{2.5}-induced lung injury by inhibiting ferroptosis via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway: A network pharmacology approach [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2022,239:113615.
- 12 Wang L,Lu CB. Molecular mechanism of sophoridine in the treatment of prostate cancer based on cell experiment *in vitro* and network pharmacology[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:528-539.
- 13 Xue H,Jiang J,Zhang Y,et al. Mechanism of albiflorin in improvement of Alzheimer's disease based on network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:4738-4746.
- 14 Wen X,Hu JH,Cheng M,et al. Mechanism of *Solanum nigrum* in treatment of breast cancer based on network pharmacology,molecular docking and *in vitro* experimental verification[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:1782-1793.
- 15 Yu G,Wang L-G,Han Y,et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS,2012,16:284-287.
- 16 Xiao K,He W,Guan W,et al. Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- κ B and Hedgehog pathways in LPS-induced acute lung injury [J]. Cell Death Dis,2020,11:863.
- 17 Wang R,Yan H,Tang XC. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine [J]. Acta Pharmacol Sin,2006,27:1-26.
- 18 Zhang YP,Xu X,Lyu YT,et al. Mechanism of lemon essential oil in mitigation of anxiety based on network pharmacology and experimental validation [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:336-347.
- 19 Liu HY. Preliminary study on anti-inflammatory mechanism of huperzine A [D]. Fuzhou:Fujian Normal University(福建师范大学),2017.
- 20 Huang M. Study on the therapeutic effect and mechanism of huperzine A on sepsis [D]. Fuzhou:Fujian Normal University(福建师范大学),2020.
- 21 Su JQ. The protective function and mechanism studies of huperzine A on sepsis in mice [D]. Fuzhou:Fujian Normal University(福建师范大学),2017.
- 22 Chen H,Liu F,Dai D,et al. Liensinine reduces acute lung injury brought on by lipopolysaccharide by inhibiting the ac-

- tivation of the NF- κ B signaling pathway through modification of the Src/TRAF6/TAK1 axis [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32:1475-1488.
- 23 Li Q, Xiang Y, Zhang Z, et al. An integrated RNA-Seq and network pharmacology approach for exploring the preventive effect of *Corydalis bungeana* Turcz. extract and acetylcorynoline on LPS-induced acute lung injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318:117048.
- 24 Chen X, Tang J, Shuai W, et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Inflamm Res*, 2020, 69: 883-895.
- 25 Hou Y, Li J, Ding Y, et al. Luteolin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by activating alveolar epithelial sodium channels via cGMP/PI3K pathway [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114654.
- 26 Xie W, Deng L, Lin M, et al. Sirtuin1 Mediates the protective effects of echinacoside against sepsis-induced acute lung injury via regulating the NOX4-Nrf2 axis [J]. *Antioxidants-Basel*, 2023, 12:1925.
- 27 Zhang J, Zhang M, Zhang W-H, et al. Total terpenoids of *Inula japonica* activated the Nrf2 receptor to alleviate the inflammation and oxidative stress in LPS-induced acute lung injury [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107:154377.
- 28 Hong H, Lou S, Zheng F, et al. Hydnocarpin D attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MAPK/NF- κ B and Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101:154143.
- 29 Wang YL, Haung DM, Wang F, et al. Roles of active ingredients in Chinese medicinals in treatment of acute lung injury by regulating PI3K/Akt Signaling pathway: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2022, 28:223-236.
- 30 Meyer NJ, Huang Y, Singleton PA, et al. GADD45a is a novel candidate gene in inflammatory lung injury via influences on Akt signaling [J]. *FASEB J*, 2009, 23:1325-1337.
- 31 Jiang Y, Xia M, Xu J, et al. Dexmedetomidine alleviates pulmonary edema through the epithelial sodium channel (ENaC) via the PI3K/Akt/Nedd4-2 pathway in LPS-induced acute lung injury [J]. *Immunol Res*, 2021, 69:162-175.