基于网络药理学和分子对接探讨利肺片治疗慢性气管炎的作用机制

许哲雨[1],周　洁[2],余惠凡[3]*

[1]湖北文理学院附属谷城医院肾病科;[2]湖北文理学院附属谷城医院药剂科,襄阳 441700;
[3]湖北医药学院药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室,十堰 442000

摘　要:利用网络药理学和分子对接技术探讨利肺片治疗慢性气管炎的潜在作用机制。运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)及 DisGent 数据库查找利肺片有效成分及慢性气管炎基因靶点,应用 STRING、MetaScape 平台构建蛋白质互作(PPI)网络及利肺片治疗慢性气管炎活性成分-共同靶点-信号通路网络,共获得利肺片 128 个活性成分,活性成分相关靶点 531 个,疾病相关靶点 174 个,交集靶点 33 个,其中核心治疗靶点 10 个。对交集靶点进行分析,其中 GO 富集分析共得生物过程 2 548 条,分子功能 191 个,细胞组成 97 个。综上所述,利肺片可能是通过调节 TNF、TP53、CXCL8、IL1B、IL6、IL4、IL1、CD4 等靶点,参与细胞质内调控因子的合成与转运从而控制细胞增殖凋亡来改善慢性气管炎病情。

关键词:利肺片;网络药理学;慢性气管炎;分子对接

中图分类号:R285　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2024)Suppl-0114-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.015

Mechanism of Lifei tablets in treating chronic bronchitis based on network pharmacology and molecular docking

XU Zhe-yu[1],ZHOU Jie[2],YU Hui-fan[3]*

[1]*Department of Nephrology, Gucheng Hospital, Hubei University of Arts and Science*; [2]*Department of Pharmacy, Gucheng Hospital, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441700, China*; [3]*Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, School of Pharmaceutical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China*

Abstract:This study aims to explore the potential mechanism of Lifei tablets in the treatment of chronic bronchitis through network pharmacology and molecular docking methods. CMSP,OMIM and DisGent databases were used to find the active components and gene targets for chronic bronchitis. STRING and MetaScape platforms were used to construct the protein interaction (PPI) network and the active ingredient-common target-signal pathway network of Lifei Tablet for the treatment of chronic bronchitis. A total of 128 active ingredients,531 active ingredient related targets,174 disease related targets,and 33 intersection targets were obtained. There were ten core therapeutic targets. The intersection targets were analyzed,among which 2 548 biological processes,191 molecular functions and 97 cell compositions were obtained by GO enrichment analysis. In summary,Lifei tablets may regulate targets such as TNF,TP53,CXCL8,IL1B,IL6,IL4,IL1 and CD4,and participate in the synthesis and transport of cytoplasmic regulatory factors,thereby controlling cell proliferation and apoptosis to improve the condition of chronic bronchitis.

Key words:Lifei tablet;network pharmacology;chronic bronchitis;molecular docking

慢性气管炎是指气管、支气管黏膜及其周围组织急性或慢性的非特异性炎症。急性支气管炎起病急,常发病于气温突然降低或寒冷季节,主要表现为咳嗽多痰,治疗后几周内可痊愈;若久治未愈或治愈后反复发作,则可能发展为慢性支气管炎。慢性支气管炎的咳嗽症状长期、反复并逐渐加重,部分加重者则可能演化合并成其他疾病[1],最常见合并慢性阻塞性肺疾病。患者感染治病因子后,气道长期受

收稿日期:2024-04-16　　接受日期:2024-07-26
基金项目:十堰市引导性科研项目(19Y13);湖北医药学院人才启动金项目(2018QDJZR29)
*通信作者 Tel:86-015072901437;E-mail:20180523@hbmu.edu.cn

天然产物研究与开发

损,炎症细胞和炎症因子聚集导致白细胞介素-8(interleukin-8,IL-8)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor,TNF-α)等分泌异常,最终造成肺部和腺体的不可逆性损伤[2],从而造成慢性长期的病症,研究发现,慢性气管炎的具体机制与巨噬细胞的增生,黏膜上皮细胞的变性坏死有关,其中伴有纤毛细胞的溶解和凋亡。尽管如此,其发病机制并未完全明确[3,4]。

网络药理学是基于数据库、基因本体和转录组学进行的数据挖掘分析研究,通过系统化地查找药物成分、靶点、疾病靶点,构建三者之间的多层线性关系。创新性数据化的查找核心靶点与基因通路,尤其适用于"多成分-多靶点-多通路"的中药学研究[5]。分子对接技术通过核心靶点和中药成分间的残基对接,构建分子间的结合性能,并分析分子间的对接能量。本研究通过网络药理学和分子对接技术探讨利肺片治疗慢性气管炎的药物作用靶点,为利肺片后续动物、细胞实验研究提供基础理论。

1 材料与方法

1.1 利肺片活性成分的筛选及有效靶点的预测

检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,http//lsp. nwu. edu. cn/tcmsp. php)[6],获取利肺片中白及、百部、白合、冬虫夏草、甘草、蛤蚧、枇杷叶、五味子的有效成分。筛选标准分别设置为口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%及类药性(drug likeness,DL)≥0.18,其中牡蛎的主要成分由 Herb 数据库收集,并将收集到的成分名称导入 PubChem 数据库(https://pubchem. ncbi. nlm. nih. gov)[7]获得成分 SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System)及化学结构式,将所得到的结构式导入到结构相似度预测靶点数据库 SwissTargetPrediction(http://www. swisstargetprediction. ch)预测靶点。

1.2 疾病相关靶点的收集及共同靶点的筛选

以"chronic tracheitis""bronchitis""chronic bronchitis"为关键词,在 GeneCards 数据库(https://www. genecards. org/)[8],在线人类孟德尔遗传数据库(Online Frontal Analysis Mendelian Inheritance in Man, OMIM)(https://www. omim. org/)[9,10], DisGent(https://www. disgenet. org)[10]等疾病数据库进行搜索,获取慢性气管炎相关靶点,汇总去重取交集,输入到 UniProt 数据库进行靶点名称标准化处理。将利肺片与慢性气管炎相关靶点在在线韦恩图绘制平台 Venny 2.1(https:/bioinfogp. cnb. csic. es/tools/venny/)绘制韦恩图,得到交集靶点即有可能是利肺片治疗慢性气管炎的关键靶点。

1.3 药物-疾病-成分-靶点制作

将筛选后的活性成分名称重新编号,导入 Cytoscape 3.8 软件绘制药物-疾病-成分-靶点网络。然后使用软件内置的 network analyzer 工具进行分析。根据自由度值(degree)研究其中重要有效成分。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein protein interaction,PPI)网络构建

将交集的共同靶点录入 STRING[11]数据库(http://stringdb. org/cgi/input. pl)构建 PPI 网络,选择分类人类 Homo sapiens,置信度≥0.4。导出为 tsv 文件使用 Cytoscape 软件进行可视化处理。

1.5 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

使用 MetaScape 数据平台(https://metascape.org/)[12]对筛选出的共同靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,选择种族人类 homo sapiens,设定 $P \leq 0.05$,其余保持默认,分析利肺片治疗慢性气管炎潜在的生物过程信号通路。应用微生信在线平台(http://www. bioinformatics. com. cn/)绘制 GO 分析条状图及 KEGG 富集气泡图。

1.6 分子对接

将拓扑学参数排名靠前的大分子和小分子进行分子对接。蛋白质晶体结构由 alphafold 数据(https://alphafold. ebi. ac. uk/)[13]。对接小分子库由 TCMSP 数据库(https://old. tcmsp-e. com/tcmsp. php)通过搜索中药获取并建立。用 AutodockTools1,2 对蛋白质晶体结构进行去水、加氢操作,并进行受体结构准备工作。使用 Open Babel 及 Autodock 程序对小分子库进行拆分等准备工作。对接使用 Autodock 程序进行,最终将结果导入 pymol 进行对接结果的可视化。

2 结果

2.1 活性成分及有效靶点的筛选

根据设定的条件筛选去重后共得活性成分 128 个,其中包括白及 6 个、百部 22 个、百合 7 个、冬虫夏草 4 个、甘草 62 个、蛤蚧 5 个、牡蛎 2 个、枇杷叶 10 个、五味子 10 个,合计 128 个活性成分,见表 1。利用获得的 128 个活性成分去筛选靶点,合并去重后共得 531 个活性成分靶点。

天然产物研究与开发

表 1 部分中药的成分

Table 1 Ingredient in part of the traditional Chinese medicine

中药 Traditional Chinese medicine	MOL ID	潜在有效成分 Potential active ingredient	OB(%)	DL
白及	MOL005770	白及二氢菲并吡喃酚 A Bletlol A	54.43	0.55
白及	MOL005755	1-(4-羟苄基)-4-甲氧基-9,10-二氢菲-2,7-二醇 1-(4-Hydroxybenzyl)-4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,7-diol	54.18	0.55
白及	MOL005773	白及菲螺醇 Blespirol	43.74	0.86
白及	MOL005756	2,3,4,7-四甲氧基菲 2,3,4,7-Tetramethoxyphenanthrene	39.09	0.29
百部	MOL009380	双去氢百部新碱 Bisdehydrostemoninine	38.51	0.73
百部	MOL009381	双去氢百部新碱 A Bisdehydrostemoninine A	62.64	0.68
百部	MOL009382	双去氢百部新碱 B Bisdehydrostemoninine B	46.05	0.64
百部	MOL009386	3,3′-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)-2H-1-苯并吡喃 3,3′-bis-(3,4-Dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran	52.11	0.54
百合	MOL002039	异海松酸 Isopimaric acid	36.2	0.28
百合	MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
百合	MOL000358	β-谷甾醇 β-Sitosterol	36.91	0.75
冬虫夏草	MOL003152	龙胆素 Gentisin	64.06	0.21
冬虫夏草	MOL003155	野栓翅芹素 Pranferin	52.14	0.28
冬虫夏草	MOL003169	四乙酰龙胆苦苷 Gentiopicroside tetraacetate	32.44	0.75
甘草	MOL001439	花生四烯酸 Arachidonic acid	45.57	0.2
甘草	MOL001645	乙酸亚油酸酯 Linoleyl acetate	42.1	0.2
甘草	MOL000358	β-谷甾醇 β-Sitosterol	36.91	0.75
甘草	MOL011169	过氧麦角甾醇 Peroxyergosterol	44.39	0.82
枇杷叶	MOL001002	熊果酸 Ursolic acid	43.06	0.43
枇杷叶	MOL000422	山柰酚 Kaempferol	41.88	0.24
枇杷叶	MOL000358	β-谷甾醇 β-Sitosterol	36.91	0.75

2.2 疾病靶点获取和韦恩图制作

疾病靶点的获取以“chronic tracheitis”“bronchitis”“chronic bronchitis”为关键词检索,在 DisGent 数据库获得 98 个靶点,GeneCards 数据库获 31 个,OMIM 数据库获取 57 个,合并去重共计 174 个,与 531 个活性成分靶点取交集后,最终得到交集靶点 33 个,见图 1。

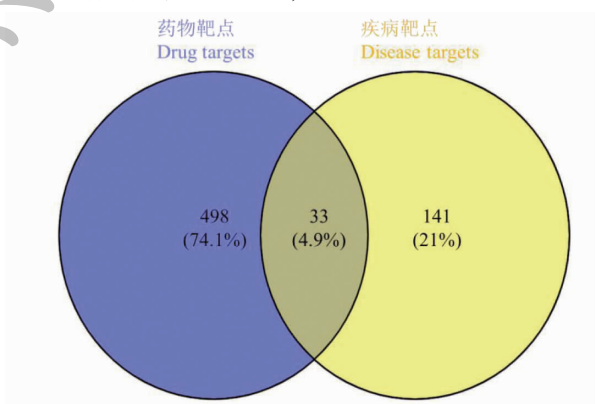

图 1 疾病靶点与活性成分靶点交集的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the intersection of disease targets and active ingredient targets

天然产物研究与开发

2.3　疾病-成分-靶点-网络的构建

将上述所得的活性成分和有效靶点数据导入 Cytoscape 3.8 进行网络构建,获得疾病-成分-靶点网络,共包含个 666 节点,1 963 条边(见图 2)。绿色倒三角代表利肺片所含中药,菱形代表利肺片中药活性成分治疗气管炎的靶点,其中六边形节点代表利肺片中药活性成分,黑线代表边,是节点间的连接数量。对疾病-成分-靶点网络进行分析,各成分 degree 值信息见表 2。其中自由度前十的活性成分分别为槲皮素、表没食子儿茶素、碳酸钙、肉碱、鸟嘌呤、白及菲螺醇、磷酸钙、7-甲氧基-3-甲基-2,5-二羟基-9,10-二氢菲、谷胱甘肽、7-甲氧基-2-甲基异黄酮。推测其可能是利肺片的重要成分。

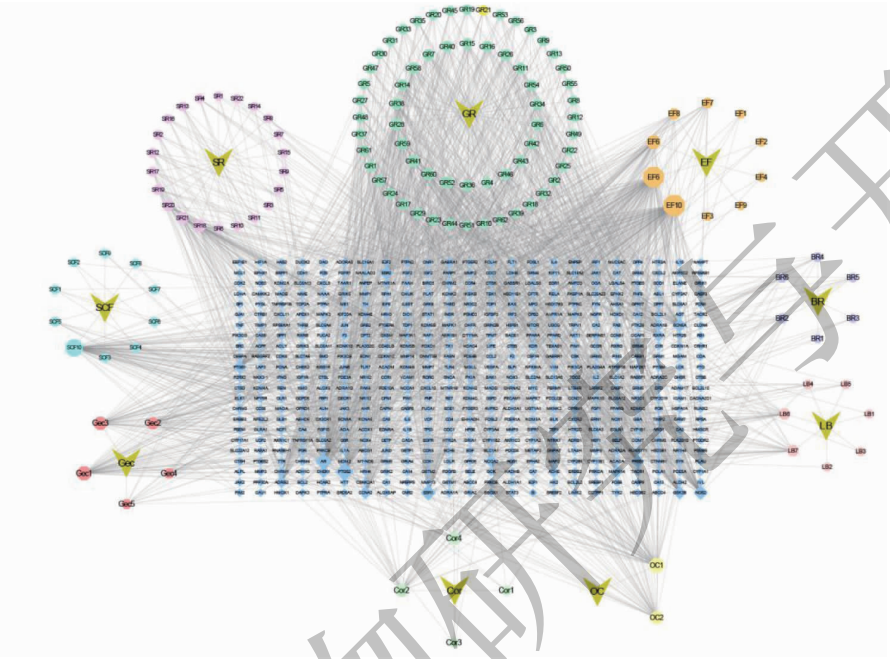

图 2　疾病-活性成分-靶点网络图

Fig. 2　Disease-active ingredient-target network diagram

注:BR:白及;SR:百部;LB:百合;Cor:冬虫夏草;GR:甘草;Gec:蛤蚧;OC:牡蛎;EF:枇杷叶;SCF:五味子。Note:BR:Bletillae Rthizoma;SR:Stemonae Radix;LB:Lilii Bulbus;Cor:Cordyceps;GR:Glycyrrhizae Radix et Rhizoma;Gec:Gecko;OC:Ostreae Concha;EF:Eriobotryae Folium;SCF:Schisandrae Chinensis Fructus.

表 2　核心成分拓扑学参数

Table 2　Core component topology parameter

核心活性成分 Core active ingredient	度中心性 Degree centrality	接近中心性 Closeness centrality	介度中心性 Betweenness centrality
槲皮素 Quercetin	128	0.403 264 813	0.228 561 116
表没食子儿茶素 Epigallocatechin	122	0.394 208 038	0.235 570 013
碳酸钙 Calcium carbonate	99	0.399 880 096	0.131 822 543
肉碱 Carnitine	88	0.366 483 516	0.18 868 525
鸟嘌呤 Guanine	80	0.364 082 969	0.091 502 013
白及菲螺醇 Blespirol	72	0.325 048 733	0.025 478 827
磷酸钙 Calcium phosphate	62	0.33 019 802	0.020 060 885
7-甲氧基-3-甲基-2,5-二羟基-9,10-二氢菲 7-Methoxy-3-methyl-2,5-dihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene	62	0.360 540 541	0.137 287 202
谷胱甘肽 Glutathion	62	0.2 821 489	0.009 356 713
7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-Methoxy-2-methyl isoflavone	55	0.332 502 493	0.124 168 367

天然产物研究与开发

2.4 共同靶点 PPI 网络构建

将 33 个共有靶点导入 STRING 平台构建 PPI 网络图，所得网络进行可视化处理。计算靶点相应属性信息，并以“degree、中介中心度（betweenness centrality，BC）、接近中心度（closeness centrality，CC）、邻域连通性（neighborhood connectivity，NC）”分别大于其相应中位数为筛选条件，进一步筛选核心靶点，最终得到利肺片治疗慢性气管炎的核心靶点共 8 个，分别为 TNF、TP53、CXCL8、IL1B、IL6、IL4、IL1、CD4 共 33 个节，297 条边。每个点表示 1 个靶点蛋白，点的面积和颜色代表点的 degree 值，面积越大，颜色越深，degree 值越大，靶点越重要（见图 3）。

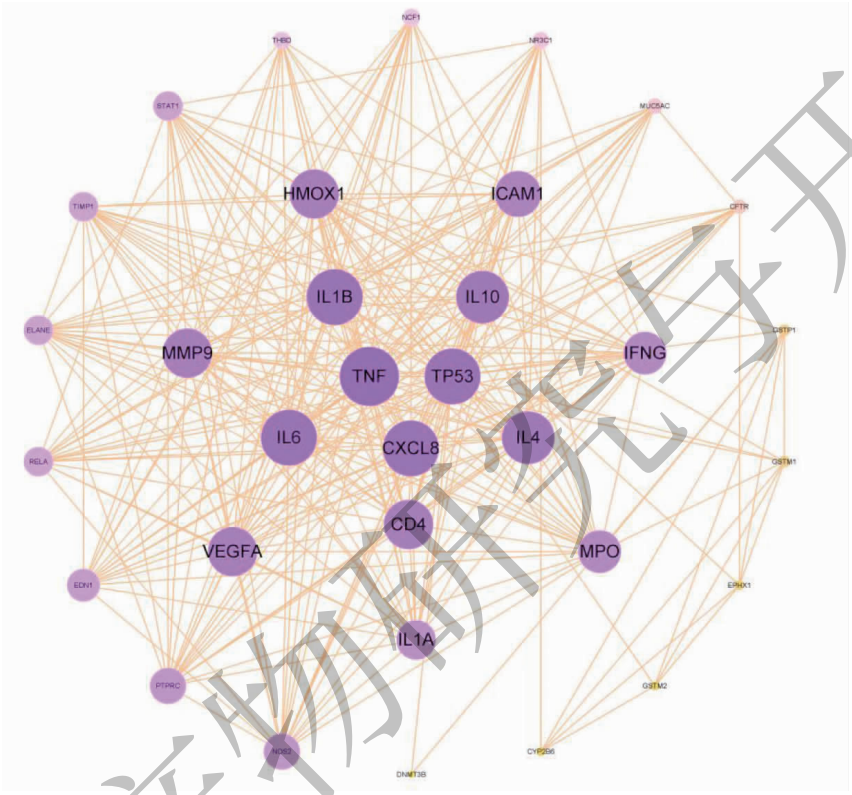

图 3 潜在作用靶点的 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network map of potential action targets

2.5 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Metascape 平台分析，GO 分析结果显示：生物过程（biological processes，BP）2 548 条，通过 $\log_{10}P$ 值和基因数的百分数比重对数据进行排名，排名靠前的是对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、细胞间粘附的正调节、细胞粘附的正调节、对活性氧的反应、白细胞-细胞粘附的正调节等。分子功能（molecular function，MF）191 条，主要包括核受体活性、受体配体活性、配体激活的转录因子活性、血红素结合、DNA 结合转录因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合等；细胞成分（cellular components，CC）共 97 条，主要由膜筏、突触后膜、细胞质核周区域、受体复合体、转录因子复合体等构成。提示利肺片可能通过调控细胞核转录因子、参与脂多糖等反应干预治疗疾病（见图 4）。

KEGG Pathway 分析共得到 169 条富集结果（见图 5），主要涉及到的通路有 IL-17 信号通路、Lipid and atherosclerosis 信号通路、T cell receptor 信号通路、Th17 cell differentiation 信号通路、TNF 信号通路等，提示利肺片可能通过上述通路机制干预疾病。

2.6 分子对接

分子对接结合热能 < -1.0 kcal/mol 表示具有结合活性，< -5.0 kcal/mol 表示结合活性较好。因此，由 AutodockTools1.5.6 软件分子对接结果可知：拓扑学参数靠前的中药化合物小分子槲皮素、表没食子儿茶素、碳酸钙、肉碱、鸟嘌呤、白及菲螺醇与 PPI 核心蛋白拓扑学参数前五的大分子受体 TNF、TP53、CXCL8、IL1B、IL6、IL4、IL1、CD4 均具有良好

天然产物研究与开发

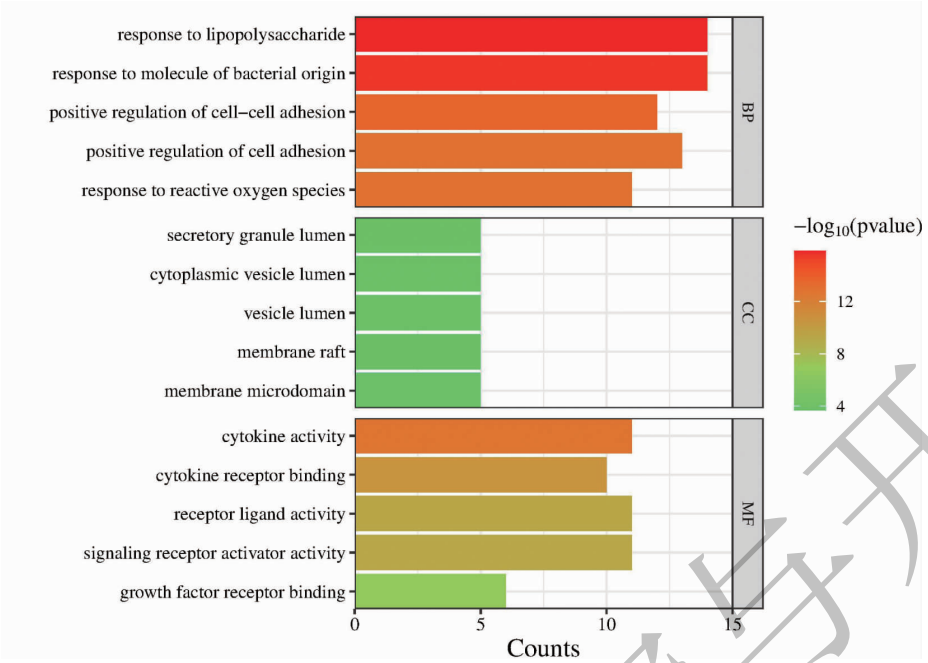

图 4　利肺片治疗慢性气管炎关键靶点的 GO 富集分析图

Fig. 4　GO enrichment analysis of key targets of Lifei tablets for treatment of chronic bronchitis

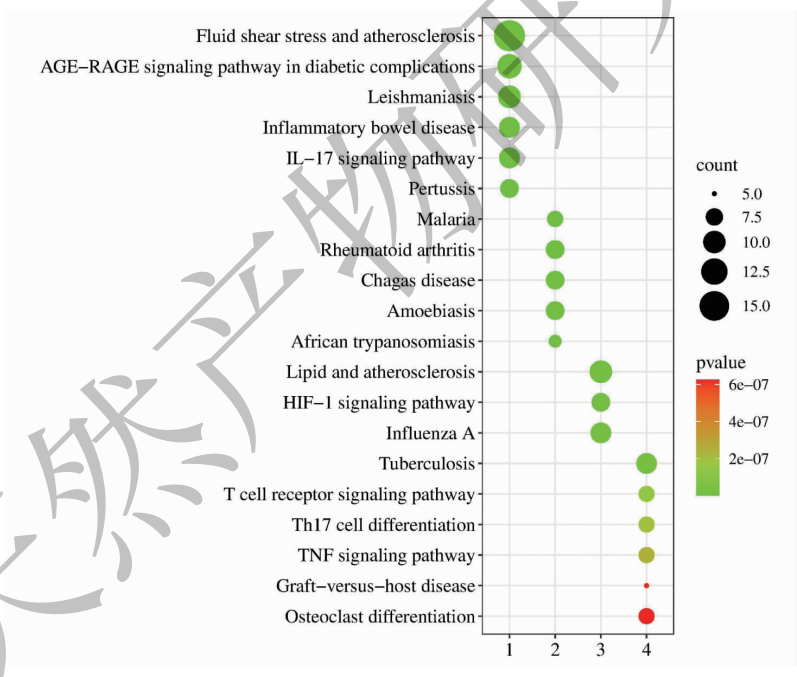

图 5　利肺片治疗慢性气管炎关键靶点的 KEGG 富集分析图

Fig. 5　Enrichment analysis of KEGG pathway in key targets of Lifei tablets for treatment of chronic bronchitis

的结合活性(见图 6)。其中槲皮素与 TNF、表没食子儿茶素与 TP53 的结合热能较低,结合活性较好(见图 7)。

3　讨论与结论

现如今,西药治疗慢性气管炎的副作用越来越明显,越来越多的研究发现,中药治疗慢性气管炎疗效良好,且具有多途径、多靶点、多通路的优势。本研究发现槲皮素、没食子酸、碳酸钙、肉碱、鸟嘌呤等是利肺片的主要活性成分。现代药理学研究发现,槲皮素作为常见的天然黄酮,存在于很多药物之中,

天然产物研究与开发

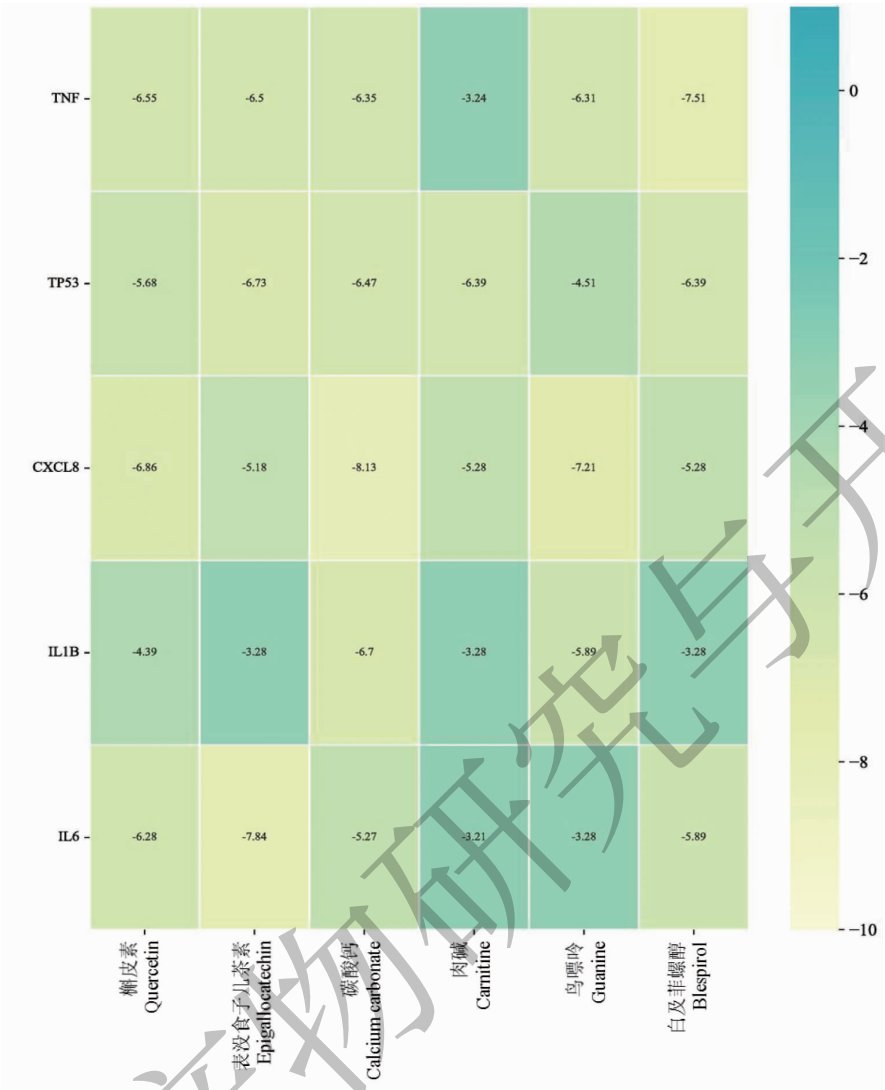

图 6 分子对接结果热图

Fig. 6 Molecular docking results heat map

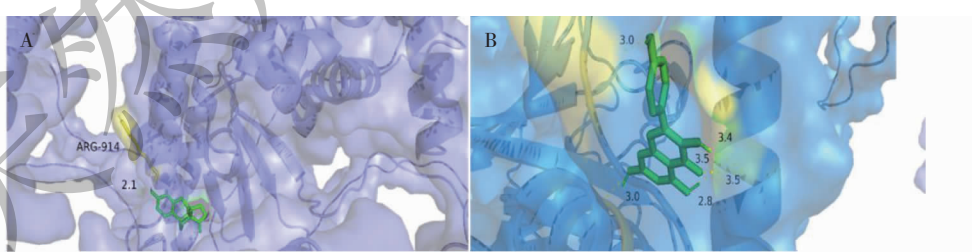

图 7 分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking pattern

注:A:槲皮素与 TNF;B:表没食子儿茶素与 TP53。Note:A:Quercetin and TNF;B:Epigallcatechin and TP53.

有研究表明其对脂多糖造成的大鼠 COPD 模型有明显的改善作用,机制主要是通过降低 TGF-β1、TNF-α 和 α-SMA 的活性抑制大鼠肺泡细胞的凋亡,减少细胞炎症因子释放从而降低大鼠肺组织炎症和纤维化损伤[14]。槲皮素具有祛痰、止咳、平喘作用[15]。没食子酸盐与表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallo-

天然产物研究与开发

catechin galla,EGCG)类似,有研究表明 EGCG 能改善 COPD 大鼠的肺损伤,其作用机制可能是降低肺组织促炎因子含量、抑制丙二醛和 Smad3 的磷酸化[16]。

通过 PPI 分析发现,TNF、TP53、CXCL8、IL1B、IL6、IL4 是本次研究的核心靶点。TP53 作为肿瘤抑制因子,可调控细胞凋亡、细胞周期阻滞,肺泡Ⅱ型上皮细胞感染结核分歧杆菌的研究中,TP53 协同 P300 抑制 NF-κB、TLR-4 蛋白的磷酸化,同时可通过调控炎症因子的表达抑制炎症反应,这可能与气道平滑肌细胞的重塑有关。

通路富集分析结果表明,IL-17 信号通路、Lipid and atherosclerosis 信号通路、T cell receptor 信号通路、Th17 cell differentiation 信号通路、TNF 信号通路等,参与调控细胞增殖、分化、发挥缓解气道平滑肌细胞痉挛的作用。经研究,慢性气管炎的发病可能与细胞的程序性死亡密切相关,细胞凋亡是细胞程序性死亡,气道上皮细胞过度凋亡,可破坏气道上皮完整性,进而破坏气道局部微环境稳态[17]。IL-17 信号通路是参与细胞生长、增殖、分化调节的重要信号转导通路,在炎症、肿瘤、代谢等相关疾病中起到至关重要的作用[18]。有实验证明,激活 IL-17 信号通路可诱导炎性因子的产生,从而促进呼吸道上皮细胞的炎症反应[19]。TNF 信号通路可激活炎症相关信号通路,产生更多的炎性介质,从而增加炎症因子对气道的浸润造成气道高反应[20]。研究发现,炎症信号通路和细胞免疫密切相关,其中和 T 淋巴细胞关联性最强,在慢性气管炎的病理过程中,是重要的炎症指标。

综上所述,本研究通过多种中药靶点和疾病靶点数据库实验,分子对接验证及相关文献数据搜集,阐明了利肺片干预调控治疗慢性气管炎的分子作用机制,既体现了中药治疗慢性病多途径,多靶点,多通路的治疗方式,也验证了中医学的整体医学观,也为后期的临床及研究提供了理论支持。网络药理学的研究同样具有大数据的弊端,在后续实验中,依靠现代技术分析结果和动物细胞实验期待进一步明确利肺片的作用疗效和具体机制。

参考文献

1 Li JS,Yu XQ,Xie Y. Chinese Diagnosis and treatment guideline for Chinese medicine on acute trachea-bronchitis[J]. Chin J Evid-Based Med(中国循证医学杂志),2021,21:1365-1372.

2 Cao LH,Zhao YY,Miao JX,et al. Effect of fresh Phragmitis Rhizoma on airway inflammation in chronic bronchitis based on TGF-β signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2021,46:5887-5894.

3 Wang TQ,Cao JL,Hu JT,et al. Mechanism of Qingke Pingchuan granule in treatment of acute and chronic bronchitis complicated with chronic obstructive pulmonary disease: an exploration based on network pharmacology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2021,27:160-168.

4 Ni QH,Li CH,Yang GJ,et al. Study on the key components and synergistic mechanism of *Ephedra-Cassia* herb in the treatment of bronchitis based on network pharmacology[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2021,43:246-254.

5 Zan Q,Hu R,Luo XQ. Preventive and therapeutic effects and mechanism of Xiaoer Feike Granules on chronic bronchitis induced by lipopolysaccharide in rats[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2019,46:2112-2118.

6 Zhao MQ,Li F,Shi BB,et al. Systematic Pharmacology(Ⅵ)-TCMSP database and application progress[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息),2019,37:22-29.

7 Luo JC. A brief introduction to UniProt[J]. Chin J Bioinf(生物信息学),2019,17:131-144.

8 Hao H,Tian GX,Geng H,et al. Introduction to the application of GeneCards,a comprehensive analysis database of human genes[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med(中国循证心血管医学杂志),2021,13:902-906.

9 Huo J,Zhang JB. Application and evaluation of OMIM database retrieval in mixed teaching of medical genetics[J]. Chin Higher Med Edu(中国高等医学教育),2021,12:68-69.

10 Dong PL,Li H,Han H. Application and thanking of Chinese medicine network pharmacology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26:204-211.

11 Niu M,Zhang SQ,Zhang B,et al. Interpretation of network pharmacology evaluation method guidance[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药),2021,52:4119-4129.

12 Zhang YT,Wu ZF,Huang Y,et al. Predictive analysis of mechanism and quality marker of fresh bamboo sap on "cough,asthma,sputum" based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2021,52:7538-7549.

13 Zeng Q,He Y,Qiang DC,et al. Prevalence and epidemio-logical pattern of gallstones in urban residents in China[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2012,24:1459-1460.

(下转第 72 页)

天然产物研究与开发