

基于网络药理学探讨祛痰合剂祛痰镇咳的作用机制[△]

郭思瑞^{*}, 徐 硕, 徐文峰^{#1}, 金鹏飞^{#2} (北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室(北京医院), 北京 100730)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)04-0396-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.04.003



摘 要 目的: 基于网络药理学方法, 探讨祛痰合剂的祛痰镇咳作用机制。方法: 从中药系统药理学数据库与分析平台、Symmap数据库和 BATMAN 数据库获取祛痰合剂的成分, 以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、化合物类药性 ≥ 0.18 为标准筛选出药物中的有效成分, 利用 PubChem 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库筛选活性成分并预测其作用靶点, 通过 Cytoscape 构建疾病-药物-成分-靶点网络; 利用 STRING 数据库对靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用分析, 并通过 R 语言计算核心靶点, 最后采用 DAVID 数据库对药物作用疾病相关靶点进行基因本体功能富集分析和京都基因与基因组百科全书通路富集分析。结果: 通过筛选得到 22 个主要活性成分-药物-疾病相关靶点 298 个, 提示祛痰合剂可能是通过药物应答、磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号通路及细胞增殖正向调节作用等生物过程, 酶结合、蛋白激酶活性及药物结合等分子功能发挥祛痰镇咳的作用, 其机制可能与神经活性配体-受体相互作用、环腺苷酸信号途径和钙信号通路等多个通路的调控作用密切相关。结论: 祛痰合剂可以通过多成分、多靶点、多通路的方式发挥其祛痰镇咳的作用机制, 本研究为进一步探索祛痰合剂祛痰镇咳的机制奠定了研究基础。

关键词 祛痰合剂; 祛痰镇咳; 网络药理学; 作用机制

Mechanism of Expectorant Mixture in the Treatment of Productive Cough Based on Network Pharmacology[△]

GUO Sirui, XU Shuo, XU Wenfeng, JIN Pengfei (Dept. of Pharmacy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drugs Risk and Individual Application (Beijing Hospital), Beijing 100730, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the mechanism of expectorant mixture in the treatment of productive cough based on network pharmacology. **METHODS:** Components of expectorant mixture were obtained from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, Symmap database and BATMAN database. The effective components of expectorant mixture were screened by oral bioavailability $\geq 30\%$ and drug-likeness ≥ 0.18 . Pubchem database and SwissTargetPrediction database were used to screen the active components and predict the targets, the disease-drug-component-target network was constructed by Cytoscape. Protein-protein interaction network of the targets were constructed by STRING and the key targets were calculated by R language. Finally, gene ontology functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis of related targets were performed by using the DAVID database. **RESULTS:** Totally 22 potential active components and 298 drug-disease related targets were screened out, which indicated that expectorant mixture might play a role in the treatment of productive cough by regulating some biological processes including response to drug, phospholipase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway and positive regulation of cell proliferation, and some molecular functions such as enzyme binding, protein kinase activity and drug binding. The mechanism might be closely related to the regulation of neuroactive ligand-receptor interaction, cyclic adenosine monophosphate signaling pathway and calcium signaling pathway. **CONCLUSIONS:** Expectorant mixture can exert the mechanisms of treating productive cough through multi-components, multi-targets and multi-pathways, which lays the research foundation for further

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81803715); 中央高水平医院临床科研业务费资助项目 (No. BJ-2021-211)

* 主管药师。研究方向: 医院药学和药物分析。E-mail: siruiguo@126.com

通信作者 1: 副主任药师。研究方向: 医院药学与药物分析。E-mail: xuwenfenghill@126.com

通信作者 2: 主任药师。研究方向: 医院药学与药物分析。E-mail: j790101@163.com

exploring the mechanism.

KEYWORDS Expectorant mixture; Productive cough; Network pharmacology; Mechanism

祛痰合剂由远志、桔梗和八角茴香 3 味药材组成,是我院经典的制剂品种(批准文号:京药制字 Z20063367),主要用于宣肺祛痰,外感、内伤所致痰稠色白,咳嗽痰多,咳痰不爽等症状,疗效确切,且临床应用广泛,医院年生产量较大。祛痰合剂已在我院临床使用二十余年,尚未见严重不良反应上报。然而,目前针对祛痰合剂用于祛痰镇咳的使用多为临床经验用药,尚未进行相关的机制研究,严重限制了其临床推广与安全使用。因此,如何阐释祛痰合剂祛痰镇咳的药效物质基础和作用机制,提供临床使用的科学证据,是目前亟待解决的问题,同时也可作为其他医院制剂的起效机制及临床应用研究提供依据。

以代谢组学、蛋白组学等系统生物学研究为基础的网络药理学,已被广泛应用于中药复方多成分制剂的机制研究^[1-2]。以药物-成分-靶点-疾病构建多重网络关系,进行系统的机制研究,符合中药的整体性及多成分、多靶点的起效特点。因此,本研究基于网络药理学研究方法,以祛痰合剂为研究对象,通过数据库检索潜在的活性成分和作用靶点,将预测靶点与祛痰镇咳相关靶点进行对比,构建祛痰合剂成分-靶点-疾病调控网络,并通过基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析对可能存在的协同作用机制进行探索,为祛痰合剂的临床合理用药提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 祛痰合剂有效成分与作用靶点的获取

通过查询中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcm-sp-e.com/>)、Symmap 数据库(<http://www.symmap.org/>)和 BATMAN 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)获得远志、桔梗和八角茴香的有效成分,以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 为标准筛选出药物中的有效成分^[2]。通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)获取化合物的 SMILES 结构,并预测活性成分作用靶点。

1.2 疾病靶点的获取

在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库和人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)中分别检索“productive cough”,并将 3 个数据库所得疾病相关靶点合并、去重,获得与“productive cough”相关疾病靶点。运用 R 语言对药物靶点和疾病靶点进行重合分析,筛选出药效物质基础相关的疾病靶点。

1.3 疾病-药物-成分-靶点网络及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

以疾病、药物、活性成分和相关靶点为节点,在 Cytoscape

软件中构建疾病-药物-成分-靶点网络。利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)对靶点进行 PPI 分析,并通过 R 语言计算核心靶点。

1.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对药物作用于疾病的相关靶点进行包括生物过程、分子功能和细胞组成在内的 GO 富集分析,并绘制相应的柱形图。通过 KEGG 数据库将筛选出的有效成分相关联的关键靶点对应到通路上,通过富集分析得到药物发挥祛痰镇咳作用的重要途径。综合上述方法,可得到祛痰合剂用于镇咳祛痰的相关生物学过程和代谢通路信息。

2 结果

2.1 祛痰合剂中活性成分的筛选

从 TCMSP、Symmap 和 BATMAN 数据库中筛选得到远志、桔梗和八角茴香中的活性成分,6 种活性成分来自远志(1,6-Dihydroxy-3,7-Dimethoxyxanthone、Onjixanthone I、Perlolyrine、Norhoyoscyamine、Pachymic Acid 及 α -Spinasterol),13 种活性成分来自桔梗(α -Spinasterol、Cis-Dihydroquercetin、Naringenin、2-O-Methyl-3-O-B-D-Glucopyranosyl Platycogenate A、Spinasterol、Dihydroverticillatine、Spinoside A、Robinin、Cornudentanone、Dimethyl 2-O-Methyl-3-O-A-D-Glucopyranosyl Platycogenate A、A-Spinasterol、Acacetin 及 Luteolin),5 种活性成分来自八角茴香(Luteolin、Mairin、(+)-Catechin、Quercetin 及 Kaempferol),其中包括 2 种共有成分,对应 497 个作用靶点。

2.2 疾病靶点及药物-疾病交集靶点的获取

在 GeneCards、OMIM 和 TTD 多个数据库中查询整理后,共获得 4 588 个疾病相关靶点。将 497 个药物靶点和 4 588 个疾病靶点进行收集、整理,共获得药物-疾病相关靶点 298 个。

2.3 疾病-药物-成分-靶点网络构建

采用 Cytoscape 软件构建疾病-药物-成分-靶点网络,其中,紫色三角形节点表示祛痰合剂中经 OB、DL 筛选得到的潜在活性成分,绿色矩形节点代表潜在活性成分群对应的靶点,图中共有 322 个节点,1 183 条边,见图 1。

2.4 PPI 网络分析

将 298 个药物-疾病相关靶点导入 STRING 数据库,输出交互分数>0.900 的结果,获得 PPI 网络图,见图 2;采用 R 语言对图中节点进行节点度排序,绘制排序居前 30 位的关键靶点柱状图,获得 PPI 网络图中的关键节点,见图 3。其中,Src 蛋白激酶、热休克蛋白(HSP)90 α 、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)及 MAPK1 等为调控疾病的关键靶点。

2.5 祛痰合剂关键靶点的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

2.5.1 GO 功能富集分析:将筛选得到的祛痰合剂用于祛痰镇咳的 298 个关键靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 富集分

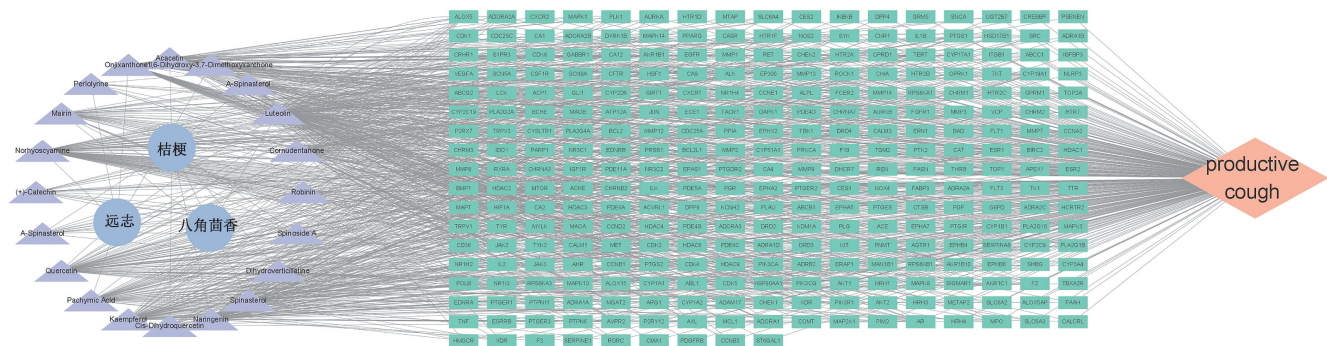


图1 疾病-药物-成分-靶点网络图

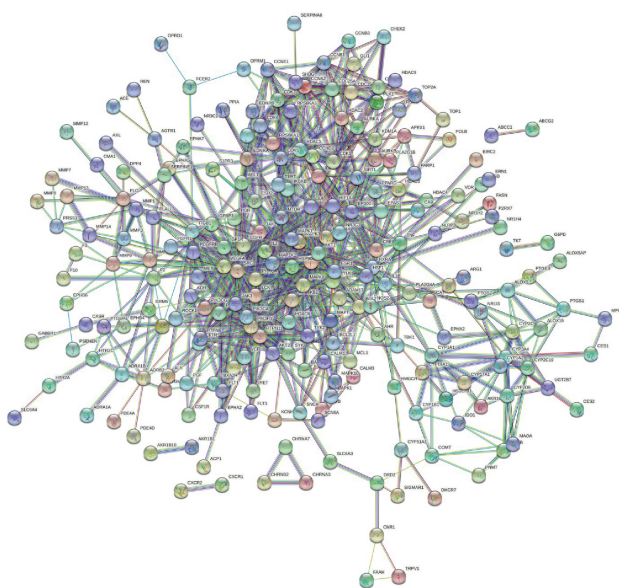


图2 PPI网络图

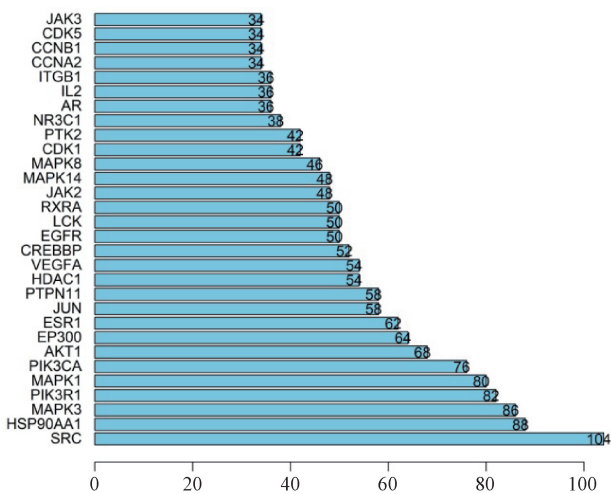


图3 PPI网络节点度

析,并从生物过程、细胞组成和分子功能3个角度对富集分析结果进行分类,按照显著性P值进行排序,排序居前15位的分析结果见图4。GO富集分析结果显示,祛痰合剂用于祛痰镇咳的关键靶点涉及的生物过程主要包括药物应答、磷脂酶C

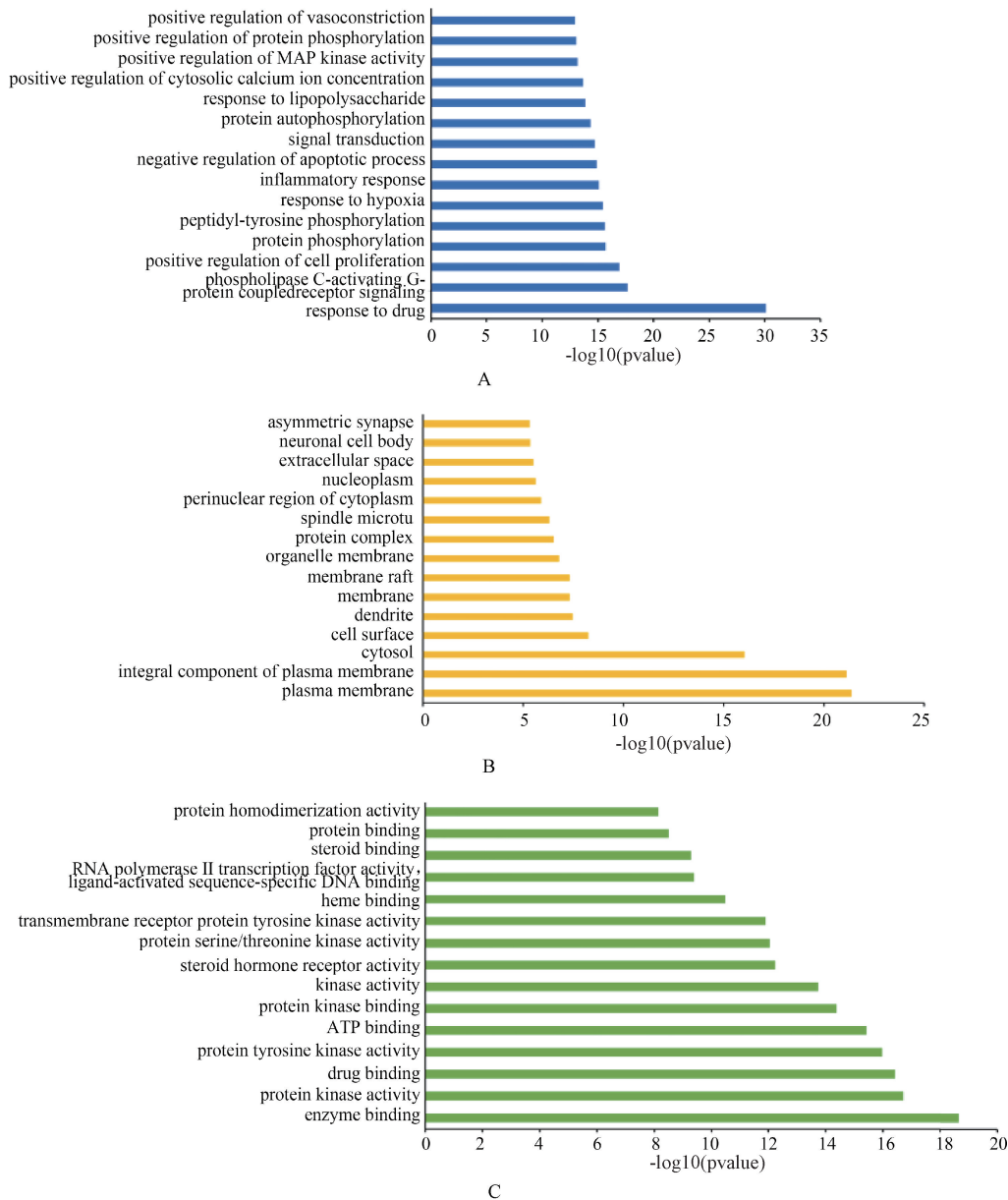
激活G蛋白偶联受体信号通路及细胞增殖正向调节作用等;涉及的细胞组成主要有质膜及其组成成分、细胞溶质等;涉及的分子功能主要有酶结合、蛋白激酶活性及药物结合等。

2.5.2 KEGG通路富集分析:将筛选得到的祛痰合剂用于祛痰镇咳的298个关键靶点进行KEGG通路富集分析,结果显示,祛痰合剂的祛痰镇咳作用主要与神经活性配体-受体相互作用、环腺苷酸信号途径和钙信号通路等密切相关,见图5。

3 讨论

痰液量异常增多、黏稠咳不出等症状是慢性气道疾病、呼吸道感染等呼吸系统疾病常见的临床表现,常伴有肺部炎症水平异常升高,严重者甚至危及生命^[3-4]。因此,在病因治疗的基础上,联合应用祛痰药对减轻不适、缩短治疗周期十分有利。祛痰合剂作为我院经典医院制剂,在临床上用于祛痰镇咳的效果十分显著,但其物质基础及作用机制尚不明确。本研究利用网络药理学方法,分析、挖掘祛痰合剂用于祛痰镇咳的活性成分、潜在靶点及作用机制。

本研究筛选出祛痰合剂中茯苓酸(pachymic acid)、柚皮素(naringenin)、丁子香萜(mairin)、儿茶素(catechin)、山柰酚(kaempferol)和刺槐素(robinin)等多种成分与祛痰镇咳作用密切相关。有研究发现,茯苓酸能抑制脂多糖诱导的巨噬细胞活化和炎症反应,改善脂多糖诱导的小鼠肺损伤,其潜在的机制是其能够抑制p38 MAPK和蛋白激酶B(Akt)介导的核因子κB(NF-κB)信号通路激活^[5]。柚皮素可能通过NF-κB信号通路抑制炎症反应和细胞凋亡,改善链球菌诱导的肺泡上皮细胞损伤^[6]。儿茶素作为酚类活性物质,已有多项研究证实其抗炎生物活性^[7];药理学研究结果表明,儿茶素可以减少嗜酸性粒细胞浸润、肥大细胞聚集,还可以降低过敏性小鼠血清中卵清蛋白特异性免疫球蛋白(Ig)E和IgG1水平,通过改善Th1/Th2细胞因子平衡、抑制NF-κB途径发挥抗炎作用^[8]。刺槐素是黄酮类化合物,对肺部损伤、关节炎和哮喘等炎症性疾病均有治疗效果,可以调节一氧化氮合酶、血红素加氧酶1、环氧合酶2和超氧化物歧化酶的表达,降低白细胞介素(IL)6、IL-1β和IL-8等炎症因子水平,减轻气道高反应,减少肺组织细胞增生^[9]。因此,祛痰合剂发挥祛痰镇咳作用,可能与上述多种活性成分参与抑制炎症因子水平,调节NF-κB等多条炎症相关信号通路有关。



A. 生物过程;B. 细胞组成;C. 分子功能。

图4 GO功能富集分析图

通过 PPI 网络分析筛选出祛痰合剂发挥药效的关键靶点,发现 SRC、HSP90AA1、MAPK3、MAPK1 和 PIK3R1 等靶点与药效密切相关。SRC 蛋白是 SRC 家族激酶成员之一,参与调控 MAPK、信号转导及转录活化因子和磷脂酰肌醇特异性磷酸酶 C 等多条信号通路,在细胞的发育、增殖和凋亡等过程中发挥了重要作用^[10-11]。HSP90 α 由基因 *HSP90AA1* 表达,是调节细胞凋亡的关键因子,当机体微环境处于损伤、炎症、氧化等应激状态,细胞内的 HSP90 α 可变异分泌至细胞外^[12-13]。MAPK3 是由 *MAPKs* 基因编码的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 MAPK 家族的重要成员,参与细胞生长、增殖、迁移、分化、稳态调节及凋亡等多种生理过程,过度激活 MAPK3 可能诱发肿瘤的发展^[14]。MAPK1 又称为细胞外信号调节激酶 (ERK) 2,是 ERK 信号通路的关键节点,MAPK1 的表达可影响肿瘤等多种疾病

的发展,磷酸化激活的 MAPK1 由胞质传递至核内,影响机体内炎症和免疫因子水平,是调控痰液黏度及分泌的关键通路^[15]。研究发现,抑制 MAPK1 的表达能够降低痰液分泌,显著降低肺组织炎症因子水平^[16]。MAPK3 与 MAPK1 可以共同组成 MAPK1/3,是 Ras-MAPK 信号通路的重要成员,参与机体炎症及免疫通路的调控^[17-18]。PI3K 是磷脂激酶家族,按照结构分为 I、II 和 III 类。I 类 PI3K 位于酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体和 GTP 酶类 (如 RAS、RAC 和 CDC42) 的信号下游,能够调节代谢、增殖和迁移在内的一系列细胞活动。*PIK3R1* 属于 I 类 PI3K 的调节亚基,编码 p85 α 、p55 α 和 p50 α 等 3 种蛋白,是 PI3K 抑制剂相关药物开发的关键靶点。当 *PIK3R1* 基因异常表达时,可以影响 PI3K/Akt 信号通路,参与慢性阻塞性肺疾病的气道高炎症反应^[19]。

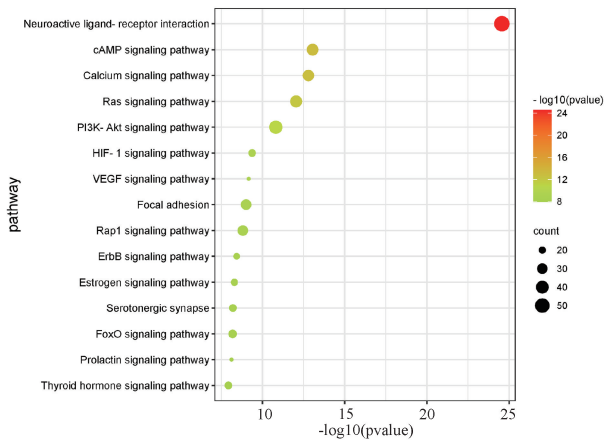


图5 KEGG 通路富集分析

为了进一步探索祛痰合剂祛痰镇咳的作用机制,本研究进行了 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,两者具有密切的关联性。GO 分析结果中,主要涉及药物应答、G 蛋白偶联受体信号通路和细胞增殖的正向调节等生物过程,酶结合和蛋白激酶活性等分子功能;KEGG 分析结果发现,祛痰合剂与神经活性配体-受体相互作用、环腺苷酸信号途径、钙信号通路和 Ras 信号通路等密切相关,提示祛痰合剂可能通过上述信号通路发挥祛痰镇咳的作用。已有研究证实,在多种祛痰镇咳药物的机制研究中神经活性配体-受体相互作用均发挥了重要作用^[20-21]。痰液黏度及分泌的异常,容易引起咳嗽、气道高炎症等生理反应,导致气道阻塞、气流受限等,会加重肺炎、哮喘和慢性阻塞性肺疾病等呼吸系统疾病患者的病情^[22]。祛痰合剂可以通过环磷酸腺苷影响下游的 Ca^{2+} 通路、蛋白激酶 A、Ras 及 MAPK 的磷酸化等,发挥支气管调节、抑制气道炎症及痰液分泌等功能^[23-25]。 Ca^{2+} 通路、Ras 信号通路及 PI3K/Akt 信号通路等均参与了 IL-6、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子的调控过程,祛痰合剂可以通过调控这些上述通路,抑制气道炎症反应。

综上所述,祛痰合剂中的 22 种活性成分通过调控不同的靶点和通路,协同发挥抗炎和改善痰液异常分泌的作用,体现了中药制剂的整体性优势。本研究在《网络药理学评价方法指南》^[26]的指导下,初步探讨了祛痰合剂用于祛痰镇咳的“多成分-多靶点-多通路”的作用机制,可为祛痰合剂的临床使用提供基础,也可为其他医院制剂的开发和研究提供参考依据。不足的是,本研究仅利用网络药理学进行了基于大数据的预测,后续还需在细胞和动物水平进行更为深入的机制验证与完善。

参考文献

[1] 毛金花, 耿楠, 路遥, 等. 当归芍药散“异病同治”慢性盆腔炎和多囊卵巢综合征的网络药理学及分子对接研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2023, 23(3): 257-263, 267.

[2] 白雅滢, 刘殊羽, 倪梦蔚, 等. 基于网络药理学的潜降汤治疗高血压作用机制研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(2): 134-139.

[3] YANG J, YANG J C. Clearing heat and resolving phlegm for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease with the

syndrome of phlegm-heat obstruction of the lung [J]. J Int Med Res, 2020, 48(8): 300060520945502.

[4] ZHONG R X, XIA T Y, WANG Y, et al. Physalin B ameliorates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice by inhibiting NF- κ B and NLRP3 via the activation of the PI3K/Akt pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114777.

[5] 陈云, 王婷婷, 郝明明, 等. 茯苓酸对 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用及机制[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(1): 83-89.

[6] 陈运庭, 王睿雯, 麦明志, 等. 柚皮素对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡及 MAPK/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 药物生物技术, 2023, 30(1): 19-24.

[7] LEE H A, SONG Y R, PARK M H, et al. Catechin ameliorates *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation via the regulation of TLR2/4 and inflammasome signaling[J]. J Periodontol, 2020, 91(5): 661-670.

[8] 李化静, 郝润海, 戴皓, 等. 儿茶素抑制卵清蛋白诱导的过敏性鼻炎小鼠模型炎症反应的机制研究[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2021, 35(4): 1-7.

[9] 王兆霞, 周玲, 叶勒丹·马汉, 等. 刺槐素的药理研究进展[J]. 广西医学, 2023, 45(2): 220-224.

[10] ORTIZ M A, MIKHAILOVA T, LI X, et al. Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cell Commun Signal, 2021, 19(1): 67.

[11] KAO T I, CHEN P J, WANG Y H, et al. Bletinin ameliorates neutrophilic inflammation and lung injury by inhibiting Src family kinase phosphorylation and activity[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(20): 4069-4084.

[12] BHATTACHARYYA N, GUPTA S, SHARMA S, et al. CDK1 and HSP90AA1 appear as the novel regulatory genes in non-small cell lung cancer: a bioinformatics approach[J]. J Pers Med, 2022, 12(3): 393.

[13] ZHONG W S, CHEN W M, LIU Y Y, et al. Extracellular HSP90 α promotes cellular senescence by modulating TGF- β signaling in pulmonary fibrosis[J]. FASEB J, 2022, 36(8): e22475.

[14] WANG H F, PANG W H, XU X S, et al. Cryptotanshinone attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis in myocardium by upregulating MAPK3[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(3): 370-377.

[15] HIROTA Y, YAMASHITA S I, KURIHARA Y, et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways[J]. Autophagy, 2015, 11(2): 332-343.

[16] 齐莎莎, 张国伟, 张旭亚, 等. 薯蓣皂苷通过 p38MAPK/NF- κ B 通路对支气管哮喘幼鼠气道炎症及气道重塑的作用机制研究[J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(7): 1015-1019.

[17] LIU L, XIAO C L, SUN Q Y. MiRNA-375 inhibits retinoblastoma progression through targeting ERBB2 and inhibiting MAPK1/MAPK3 signalling pathway[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2022, 41(1): 1-10.

(下转第 407 页)