

# 基于网络药理学和细胞实验探讨六味顺激方治疗肠易激综合征的作用

李敏瑶<sup>1,2</sup>, 张耀敏<sup>1,2</sup>, 李泽豪<sup>1,2</sup>, 周福生<sup>3</sup>, 郑学宝<sup>1,2</sup>, 苏子仁<sup>1</sup>, 黄海阳<sup>4</sup>, 金真<sup>3</sup>,  
许仕杰<sup>3</sup>, 黄晓其<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学研究院, 广东 东莞 523808;  
3. 广州中医药大学, 广东 广州 510400; 4. 广州中医药大学东莞医院, 广东 东莞 523127)

**摘要:** 目的 基于网络药理学和细胞实验探讨六味顺激方治疗肠易激综合征的关键靶点基因和信号通路。方法 通过 TCMSP 数据库检索六味顺激方中药物活性成分和靶点基因, 与 DisGeNET、Pharm 和 CTD 数据库中获取的肠易激综合征疾病靶点相映射, 并基于 GEO 数据库筛选肠易激综合征与健康人差异基因, 采用 R 语言和 Cytoscape 软件对关键靶点基因进行蛋白质相互作用网络 (PPI)、基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。基于脂多糖诱导的 NCM460 细胞模型, 通过流式细胞术、免疫荧光、ELISA、Western blot、RT-qPCR 法对关键靶点基因进行验证。结果 检索得到六味顺激方活性成分 85 个, 药物靶点 274 个, 肠易激综合征相关靶点 416 个, 药物和疾病交集靶点 82 个, 其中人血管内皮生长因子 A (VEGF-A)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、蛋白激酶 (Akt1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、原癌基因 (JUN)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、细胞趋化因子 8 (CXCL8)、丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)、细胞趋化因子 2 (CCL2) 和细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 是六味顺激方治疗肠易激综合征的关键靶点, 细胞对脂多糖的应答和 TNF 信号通路可能是六味顺激方治疗肠易激综合征的效应机制。细胞实验结果显示, 六味顺激方在降低 VEGFR 表达的同时抑制 MAPK 信号通路的主要下游靶点蛋白 (ERK、JNK 和 JUN), 进而减少炎症因子、趋化因子、血管生成因子和黏附因子的释放, 缓解细胞凋亡同时抑制炎症反应恶性循环, 从而缓解肠易激综合征。结论 六味顺激方能通过多靶点、多通路发挥治疗肠易激综合征的效应, 其机制可能是通过靶向抑制 VEGFR 并抑制 MAPK 信号通路下游关键蛋白改善血管生成、炎症反应。

**关键词:** 六味顺激方; 肠易激综合征; 血管生成; VEGFR/MAPK 信号通路

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0987-12

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.052

肠易激综合征是一种功能性肠病, 临床表现为腹痛、腹胀、排便习惯改变和排便异常。虽然肠易激综合征的发病机制尚不清楚, 但胃肠道运动障碍、内脏痛觉过敏、感染和心理困扰被认为是肠易激综合征的潜在诱因<sup>[1]</sup>。其中, 肠道急性感染被认为是诱发肠易激综合征的危险因素之一, 因此肠道感染引起的黏膜炎症和免疫功能激活有待进一步研究<sup>[2-3]</sup>。目前对肠易激综合征的治疗仅限于对症治疗且治疗药物的副作用大, 而中药复方治疗该病因具有疗效好、毒副作用小的优势, 越来越受到人们的重视。

六味顺激方是周福生教授治疗肠易激综合征的临床验方, 由白芍、白术、木香、延胡索、防风、夜交藤组成, 具有疏肝健脾、安神和胃、理气止痛的功效。前期研究显示, 该方对腹泻型肠易激综合征总有效率达 92%, 并在改善患者睡眠质量、腹痛及大便性状等主要症状方面明显优于西药, 且无毒副作用<sup>[4-5]</sup>。此外, 六味顺激方可降低内脏高敏感性大鼠肠道 5-HT 和 NO 水平, 抑制背根神经节兴奋性进而降低内脏高敏感性<sup>[6-8]</sup>。因此, 本研究拟通过网络药

理学、GEO 数据挖掘与实验验证相结合的方法探讨六味顺激方活性成分、肠易激综合征疾病靶点、通路的相互作用, 为六味顺激方治疗肠易激综合征的临床应用提供理论依据。

## 1 网络药理学

1.1 基于 GEO 数据库分析基因芯片筛选肠易激综合征差异基因 基于 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 检索肠易激综合征基因表达谱, 以 “irritable bowel syndrome” 为检索式。样本应包含肠易激综合征患者样本与正常样本; 样本为人组织来源且芯片数据类型为基因表达谱。使用 R 语言对原始基因芯片进行过滤和校正后, 通过 normalize 函数对样本进行归一化处理, 采用 R 语言 limma 程序包对芯片数据进行分析, 以  $\log_{2}FC \geq 1$  和校正  $P < 0.05$  作为筛选条件, 绘制火山图。

1.2 六味顺激方活性成分与靶点预测 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>)<sup>[9]</sup>, 检索白芍、白术、木香、延胡索、防风、夜交藤的所有化学成分, 以口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ , 类药

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2019A1515010819); 广东省普通高校青年创新人才类项目 (2018KQNCX045); 广州中医药大学 “双一流” 与高水平大学学科协同创新团队培育项目 (2021XK34)

作者简介: 李敏瑶, 女, 博士生, 从事中医药防治消化道疾病的作用机制研究。E-mail: 1454770808@qq.com

\* 通信作者: 黄晓其, 男, 副研究员, 从事中医药防治消化道疾病的作用机制研究。E-mail: huangxiaoqi@gzucm.edu.cn

性 (DL)  $\geq 0.18$  为筛选条件<sup>[10]</sup>，得到白芍、白术、木香、延胡索、防风、夜交藤的活性成分。将上述获取的有效成分导入 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 网站，预测六味顺激方的潜在作用靶点。

**1.3 构建“药物-疾病”交集靶点基因数据库** 以“irritable bowel syndrome”为检索词从 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)<sup>[11]</sup>、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)<sup>[12]</sup> 和 CTD<sup>[13]</sup> 数据库中检索并收集肠易激综合征相关的疾病靶点。所有的靶点基因通过 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库<sup>[14]</sup> 进行基因注释标准化后，通过 Venny 在线绘图工具与六味顺激方有效成分的靶点取交集，建立六味顺激方-肠易激综合征交集靶点基因数据库，并尝试与“1.1”项下取得的差异基因取交集。

**1.4 构建蛋白质相互作用网络 (PPI)** 将六味顺激方治疗肠易激综合征的潜在靶点基因导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库<sup>[15]</sup>，物种选择“*homo sapiens*”，获取蛋白质相互作用信息，将上述蛋白信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制可视化 PPI 网络图，并对其进行拓扑分析，通过度中心性 (degree centrality, DC)、接近中心性 (betweenness centrality, BC) 作为筛选条件，获得的关键靶点即为 PPI 网络核心蛋白。

**1.5 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 生物富集分析** 为进一步探讨六味顺激方治疗肠易激综合征的分子作用机制，将“1.3”项下获取的靶点基因导入注释及可视化整合分析工具 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>)<sup>[16]</sup> 进行 GO 和 KEGG 通路分析，筛选  $P < 0.05$  的 GO 条目和通路。选择排名前二十位的 GO 条目及 KEGG 通路，利用 Origin 2018 软件绘制条形图和气泡图。

## 2 细胞验证实验

**2.1 药物制备** 六味顺激方中白芍、白术、木香、延胡索、首乌藤和防风均由广东兴邦药业有限公司提供 (批号 200803、200901、191001、200501、200501、200601)，以上药材经广州中医药大学中药学院陈建南教授鉴定为正品。取白芍 6 g、白术 6 g、木香 4 g、延胡索 6 g、首乌藤 12 g、防风 4 g，其中木香烘干粉碎成细粉 (能全部通过五号筛，并能通过六号筛的粉末不少于 95%) 备用，其余药材分别加 6、5、5 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次，每次 1 h，滤过，合并滤液，回收乙醇并减压浓缩至相对密度为 1.13~1.15 (60 °C) 的清膏，减压干燥，取干膏粉，加入木香细粉，混匀即可。制备方法参考一种治疗腹泻型肠易激综合征的药物组合物及其制备方法 (专利号 ZL200510100674X)。

**2.2 试剂** DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (美国康宁公司，货号 10-017-CVR、35-079-CV)；脂多糖 (LPS)、ACCUtase 细胞消化液 (美国 Sigma-Aldrich 公司，货号 L2630、A6964)；替沃扎尼试剂 (美国 TargetMol 公司，货号 T2456)；细胞计数 CCK-8 试剂盒 (美国 GlpBio 公司，

货号 GK10001)；人血管内皮生长因子 A (VEGF-A)、人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司，货号 ml060752、ml064303)；Annexin V-FITC/PI apoptosis kit 细胞凋亡试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司，货号 70-AP101-30)；HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记山羊抗小鼠、CY3 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、VEGFR2、p-Akt、Akt、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JUN、JUN、p-JNK1、JNK1 和 GAPDH 等抗体 (美国 Affinity 公司，货号 S0001、S0002、S0011、AF6281、AF0832、AF0836、BF8004、AF0155、AF3095、AF6090、AF3318、AF6318、AF7021)。

**2.3 仪器** UltiMate 3000RS 型色谱仪、Q-Exactive 高分辨质谱仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]；SW-CJ-1FD 型超净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)；DYS-810 型显微镜 (上海点应光学仪器有限公司)；HH4Y 型恒温水浴锅 (上海启前电子科技有限公司)；Neofuge 15R 型台式通用高速冷冻离心机 [力新仪器 (上海) 有限公司]；DOI-50 型恒温培养箱 [三塔科技 (上海) 有限公司]；YM100A 型高压灭菌锅 (上海三申医疗器械有限公司)；Multiskan Go1510 型全波长酶标仪、CFX96 型实时荧光定量 PCR (美国 Bio-rad 公司)；EPS300 型垂直电泳仪、4200SF 型凝胶化学成像系统 (上海天能科技有限公司)。

**2.4 细胞培养与分组处理** 人正常结肠上皮细胞 NCM460 购自美国 ATCC 细胞资源中心，置于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青霉素-链霉素) 的高糖 DMEM 培养基，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温箱中培养。NCM460 细胞用不同质量浓度 LPS (5、10、20、50、100  $\mu$ g/mL) 进行处理，选取合适的质量浓度建立 LPS 诱导的肠易激综合征细胞模型<sup>[17]</sup>。除正常组不予药物处理外，其余各组分别予六味顺激方 (50、100、200  $\mu$ g/mL) 或替沃扎尼 (10  $\mu$ mol/L, VEGFR 抑制剂) 孵育 24 h，再予以 LPS 造模 24 h。以上给药剂量根据 ELISA 和 CCK-8 实验结果进行选择。

**2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 将对数生长期 NCM460 细胞以  $1 \times 10^5$ /mL 密度接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，随即给药组予以不同剂量六味顺激方 (50、100、200  $\mu$ g/mL) 干预，48 h 后收集细胞并用预冷 PBS 洗涤，参照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明书操作，使用 Binding Buffer 重悬细胞后，分别加入 V-FITC (5  $\mu$ L) 和 PI (10  $\mu$ L) 并在黑暗中孵育 5 min，通过流式细胞术分析细胞凋亡。

**2.6 免疫荧光染色检测 VEGFR2 阳性表达** 将 NCM460 细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个的密度接种于 6 孔板中，药物干预 48 h 后，预冷 PBS 洗涤 3 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，加 BSA 室温下孵育 30 min，加 VEGFR2 一抗 (1:100) 4 °C 孵育过夜，次日加二抗 (1:200) 室温避光孵育，洗涤后加入 DAPI 避光孵育进行核染色。DAPI 标记的细胞核呈蓝色，CY3 标记的阳性表达为红色。使用 Image J 软件进行定量分析。

**2.7 ELISA 法检测细胞上清液中 VEGFA、TNF- $\alpha$  水平** 取

待测细胞上清液, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 于酶标仪 450 nm 波长处检测各孔光密度 (OD) 值, 根据 OD 值计算细胞培养上清液中 VEGFA、TNF- $\alpha$  水平。

**2.8 Western blot 法检测细胞 Akt、ERK、JUN 和 JNK 蛋白表达** 用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 每组取等量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 随后将蛋白转移至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, TBST 清洗后, 加入一抗 (p-Akt、Akt、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JUN、JUN、p-JNK、JNK 和 GAPDH, 1:1 000) 于 4 ℃ 孵育过夜, 次日加入相应的二抗, 采用 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 作为内参。

**2.9 RT-qPCR 法检测细胞 IL-6、IL-1 $\beta$ 、CXCL8、CCL2 和 ICAM-1 mRNA 表达** 用 TRIzol 试剂提取各组细胞 RNA, 按照逆转录试剂盒合成 cDNA, 随后进行 PCR 扩增反应, 条件为 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列 (5'→3')	长度/bp
IL-6	正向 GGTGTTGCCTGCTGCCCTTC 反向 GCTCTGGCTTGTCCCTCACTACTC	366
IL-1 $\beta$	正向 GCGGCATCCAGCTACGAATCTC 反向 CGGAGCGTGCAGTTCACTGATC	244
CXCL8	正向 TCTCTTGGCAGCCTTCCTGATTT 反向 CAGTTTCCCTGGGTCCAGACAG	228
CCL2	正向 CCTTCTGTGCCTGCTGCATAG 反向 GGGTTTGCTTGCTCAGGTGGTC	266
ICAM-1	正向 AGGCCACCCCAGAGGACAAAC 反向 CCCATTATGACTGCGGCTGCTA	406
GAPDH	正向 CAAGGCTGTGGCAAGGTATC 反向 GTGTCGCTGTGAAGTCAGAGGAG	228

**2.10 统计学分析** 通过 SPSS 23.0 软件进行处理, 实验数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据符合正态分布且方差齐, 组间比较采用单因素方差分析; 否则使用非参数分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 六味顺激方的有效活性成分** 检索得到六味顺激方活性成分 85 个, 其中白芍 9 个, 白术 7 个, 木香 4 个, 延胡索 49 个, 首乌藤 9 个, 防风 15 个。图 1 显示, 谷甾醇 (MOL000359) 是白芍、木香、延胡索和防风 4 味药的共同活性成分,  $\beta$ -谷甾醇 (MOL000358) 存在白芍、首乌藤和防风 3 味药中, 丁子香脑 (MOL000211) 存在白芍和木香 2 味药中, 儿茶酸 (MOL000492) 存在白芍和首乌藤 2 味药中, 豆甾醇 (MOL000449) 存在木香和延胡索 2 味药中。上述化合物均为许多中草药的常见成分<sup>[18]</sup>, 因此仍需进一步的靶点预测。85 个六味顺激方活性成分见表 2。

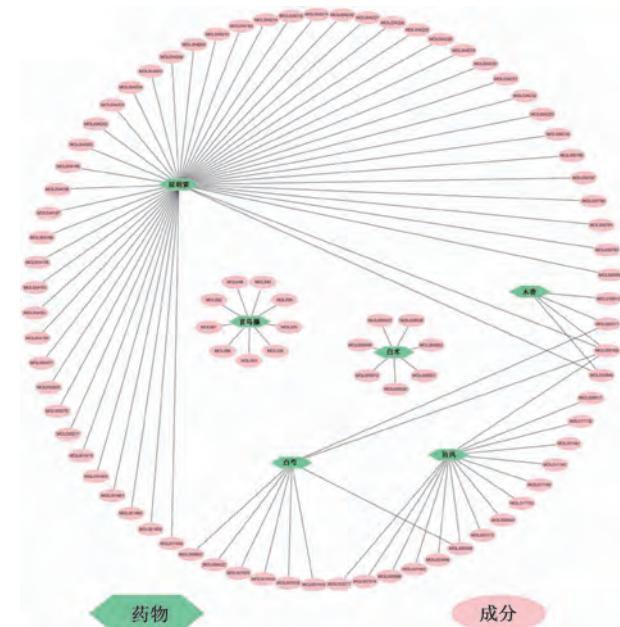


图 1 六味顺激方的药物-成分网络图

表 2 六味顺激方活性成分

编号	名称	OB/%	DL	药物
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	64.77	0.38	白芍
MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	白芍
MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	白芍
MOL001925	paeoniflorigenol_qt	68.18	0.40	白芍
MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍、木香
MOL000358	$\beta$ -sitosterol	36.91	0.75	白芍、首乌藤、防风
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	白芍、木香、延胡索、防风
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	白芍、首乌藤
MOL000020	12-senecioyl-2E,8E,10E-atractylentriol	62.40	0.22	白术
MOL000021	14-acetyl-12-senecioyl-2E,8E,10E-atractylentriol	60.31	0.31	白术
MOL000022	14-acetyl-12-senecioyl-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	0.30	白术
MOL000028	$\alpha$ -amyrin	39.51	0.76	白术
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	白术

续表2

编号	名称	OB/%	DL	药物
MOL000049	3 $\beta$ -acetoxyatractylone	54.07	0.22	白术
MOL000072	8 $\beta$ -ethoxy atracylenolide III	35.95	0.21	白术
MOL010813	benzo[ a ] carbazole	35.22	0.22	木香
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	木香、延胡索
MOL001454	berberine	36.86	0.78	延胡索
MOL001458	coptisine	30.67	0.86	延胡索
MOL001460	cryptopin	78.74	0.72	延胡索
MOL001461	dihydrochelerythrine	32.73	0.81	延胡索
MOL001463	dihydrosanguinarine	59.31	0.86	延胡索
MOL001474	sanguinarine	37.81	0.86	延胡索
MOL000217	( S ) -scoulerine	32.28	0.54	延胡索
MOL002670	cavidine	35.64	0.81	延胡索
MOL002903	( R ) -canadine	55.37	0.77	延胡索
MOL004071	hyndarin	73.94	0.64	延胡索
MOL004190	( - ) - $\alpha$ -N-methylcanadine	45.06	0.80	延胡索
MOL004191	capaurine	62.91	0.69	延胡索
MOL004193	clarkeanidine	86.65	0.54	延胡索
MOL004195	corydaline	65.84	0.68	延胡索
MOL004196	corydalmine	52.50	0.59	延胡索
MOL004197	corydine	37.16	0.55	延胡索
MOL004198	18797-79-0	46.06	0.85	延胡索
MOL004199	corynoloxine	38.12	0.60	延胡索
MOL004200	methyl-[ 2-( 3,4,6,7-tetramethoxy-1-phenanthryl ) ethyl ] amine	61.15	0.44	延胡索
MOL004202	dehydrocavidine	38.99	0.81	延胡索
MOL004203	dehydrocorybulbine	46.97	0.63	延胡索
MOL004204	dehydrocorydaline	41.98	0.68	延胡索
MOL004205	dehydrocorydalmine	43.90	0.59	延胡索
MOL004208	demethylcorydalmine	38.99	0.54	延胡索
MOL004209	13-methyldehyrocorydalmine	35.94	0.63	延胡索
MOL004210	( 1S,8'R ) -6,7-dimethoxy-2-methylspiro[ 3,4-dihydroisoquinoline-1,7'-6,8-dihydrocyclopenta[ g ][ 1,3 ] benzodioxole ] -8'-ol	43.95	0.72	延胡索
MOL004763	izoteolin	39.53	0.51	延胡索
MOL004214	isocorybulbine	40.18	0.66	延胡索
MOL004215	leonticine	45.79	0.26	延胡索
MOL004216	13-methylpalmatubrine	40.97	0.63	延胡索
MOL004220	N-methyllaurotetanine	41.62	0.56	延胡索
MOL004221	norglaucine	30.35	0.56	延胡索
MOL004224	pontovedrine	30.28	0.71	延胡索
MOL004225	pseudocoptisine	38.97	0.86	延胡索
MOL004226	24240-05-9	53.75	0.83	延胡索
MOL004228	saulatine	42.74	0.79	延胡索
MOL004230	stylopine	48.25	0.85	延胡索
MOL004231	tetrahydrocorysamine	34.17	0.86	延胡索
MOL004232	tetrahydropapaverine	57.28	0.33	延胡索
MOL004233	ST057701	31.87	0.56	延胡索
MOL004234	2,3,9,10-tetramethoxy-13-methyl-5,6-dihydroisoquinolino[ 2,1-b ] isoquinolin-8-one	76.77	0.73	延胡索
MOL000785	palmatine	64.60	0.65	延胡索
MOL000787	fumarine	59.26	0.83	延胡索
MOL000790	isocorypalmine	35.77	0.59	延胡索
MOL000791	bicuculline	69.67	0.88	延胡索
MOL000793	C09367	47.54	0.69	延胡索
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	延胡索
MOL007287	emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside	36.91	0.76	首乌藤
MOL012688	2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D- ( 2''-O-galloyl ) glucoside	34.69	0.23	首乌藤
MOL006488	emodin-8-methyl ether	60.80	0.26	首乌藤

续表2

编号	名称	OB/%	DL	药物
MOL002288	emodin-1,6-di-methyl ether	49.54	0.29	首乌藤
MOL000471	digitalis anthraquinone	31.51	0.26	首乌藤
MOL000006	luteolin	44.28	0.24	首乌藤
MOL000008	apigenin	43.75	0.21	首乌藤
MOL000011	(2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2,3-dihydropyran[5,6-h][1,4]benzodioxin-9-one	68.83	0.66	防风
MOL011732	anomalin	59.65	0.66	防风
MOL001941	ammidin	34.55	0.22	防风
MOL011747	ledebouriellol	32.05	0.51	防风
MOL011749	phelloptorin	43.39	0.28	防风
MOL011753	5-O-methylvisamminol	37.99	0.25	防风
MOL002644	phellopterin	40.19	0.28	防风
MOL000173	wogonin	30.68	0.23	防风
MOL001494	mandenol	42.00	0.19	防风
MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23	防风
MOL003588	prangenidin	36.31	0.22	防风
MOL007514	methyl icosa-11,14-dienoate	39.67	0.23	防风
MOL013077	decursin	39.27	0.38	防风

3.2 六味顺激方与肠易激综合征相关靶点交集 检索得到 85 个活性成分的 274 个靶点, 其中白芍 86 个, 白术 6 个, 木香 32 个, 延胡索 211 个, 首乌藤 91 个, 防风 82 个, 详

见图 2A。筛选得到 416 个肠易激综合征相关靶点, 韦恩图 (图 2B) 显示, 六味顺激方与肠易激综合征交集靶点共 82 个。

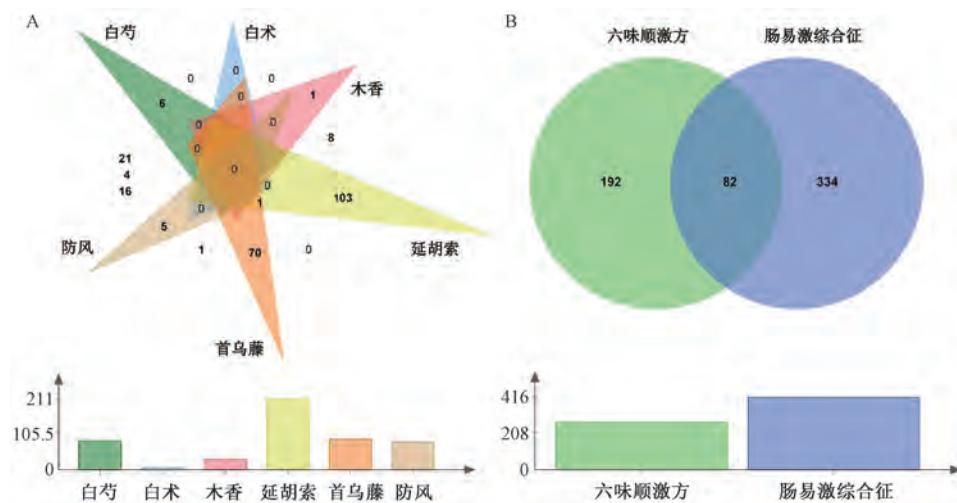


图 2 六味顺激方与肠易激综合征相关靶点交集韦恩图

3.3 基于 GEO 数据库分析肠易激综合征差异基因 通过条件检索, GSE36701 符合研究要求, 该芯片数据包含了 87 名肠易激综合征患者与 40 名健康志愿者的直肠活检中的基因谱<sup>[19]</sup>。数据归一化和校正后 (图 3A~3B), 以  $| \log_2 FC | \geq 1$  和  $P < 0.05$  为筛选条件, 结果显示上调基因 873 个和下调基因 818 个, 详见图 3C。将“3.2”项得到的药物与疾病交集靶点与肠易激综合征显著差异基因 ( $P < 0.01$ ) 取交集, 从而推测 VEGFA 为进一步研究的关键靶点, 见图 3D。

3.4 PPI 网络分析 将 82 个药物与疾病交集靶点蛋白相互作用信息导入 Cytoscape 软件, 将 Degree 值  $\geq 7$  的 50 个靶点蛋白绘制 PPI 网络 (图 4), 结果显示, 41 个靶点蛋白的 Degree 值均  $\geq$  中位数 10, 其中 Degree 值排名前十的相互作用蛋白为白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、蛋

白激酶 (Akt1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、原癌基因 (JUN)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、细胞趋化因子 8 (CXCL8)、丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)、细胞趋化因子 2 (CCL2) 和细胞间黏附分子-1 (ICAM-1), 上述靶点蛋白被认为在六味顺激方治疗肠易激综合征中具有重要意义。

3.5 GO 和 KEGG 富集分析 基于 PPI 网络分析结果, 筛选出 Degree  $\geq 2$  倍中位数的靶点蛋白, 并进行 GO 及 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示 (图 5A), 六味顺激方治疗肠易激综合征的生物学过程主要与炎症反应相关, 如细胞对脂多糖的应答 (cellular response to lipopolysaccharide)、脂多糖介导的信号通路 (lipopolysaccharide-mediated signaling pathway)、炎症反应 (inflammatory response)、细

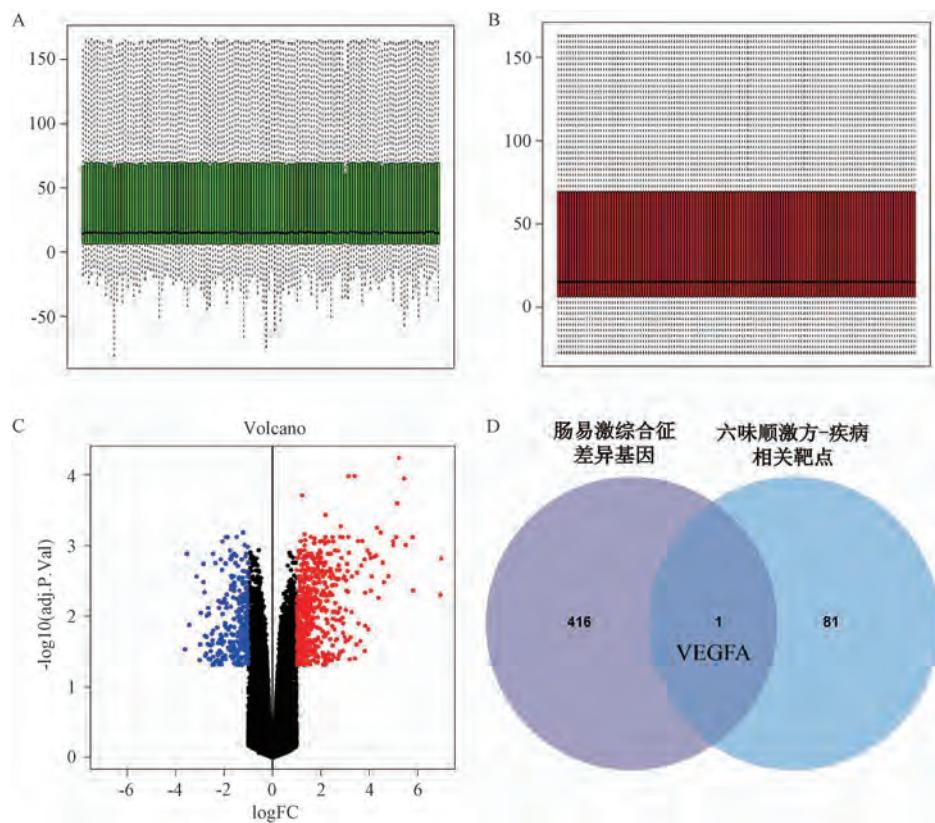
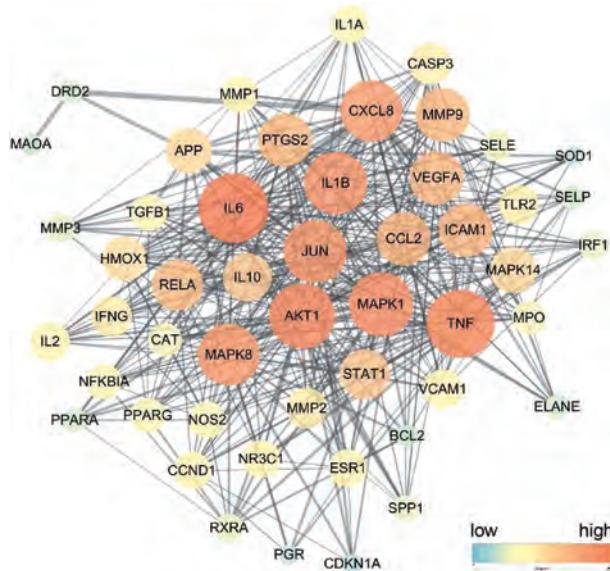


图3 肠易激综合征差异基因分析



注: 节点的大小、颜色深浅 (蓝→黄→红) 代表 Degree 值的大小及其变化; 边的粗细反映联合得分值的大小。

图4 PPI网络图

胞对白介素-1的应答 (cellular response to interleukin-1) 以及 ERK1、ERK2 级联正调节 (positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade) 等, 值得注意的是, 血管生成 (angiogenesis) 与前述筛选得到的靶点基因 VEGFA 紧密相关。KEGG 富集分析结果显示 (图 5B), 六味顺激方抗肠易激综合征的效应涉及多个信号通路, 主要涉及免疫系统、

传染病和癌症等, 其中 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、Toll 样受体介导的信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、NOD 样受体介导的信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、炎症性肠病 (inflammatory bowel disease) 和 T 细胞受体介导的信号通路 (T cell receptor signaling pathway) 已被报道与炎症反应密切相关, 且与上述提及的生物学过程存在关联, 共同发挥治疗肠易激综合征的综合作用。综上所述, 细胞对脂多糖的应答和 TNF 信号通路在六味顺激方治疗肠易激综合征方面有着重要意义。

**3.6 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞存活率和 VEGFA、TNF- $\alpha$  水平的影响** 如图 6 所示, 与正常组比较, NCM460 细胞予以 50 ng/mL LPS 处理不影响细胞存活率 ( $P>0.05$ ), 且提高 TNF- $\alpha$  和 VEGFA 水平 ( $P<0.01$ ), 因此本研究选择 50 ng/mL LPS 用于建立炎症细胞模型。与正常组比较, 50、100、200  $\mu$ g/mL 六味顺激方对细胞存活率无影响 ( $P>0.05$ )。与模型组 (50 ng/mL LPS 处理) 比较, 六味顺激方高剂量组 (200  $\mu$ g/mL) 可降低 TNF- $\alpha$  和 VEGFA 水平 ( $P<0.01$ )。

**3.7 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞凋亡的影响** 如图 7 所示, 与正常组比较, 模型组细胞凋亡率升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 六味顺激方各剂量组细胞凋亡率均降低 ( $P<0.01$ ), 表明六味顺激方可以缓解 LPS 诱导的 NCM460 细胞凋亡。

**3.8 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞 VEGFR2 表达及 VEGFA、TNF- $\alpha$  水平的影响** VEGFA 能通过刺激内皮细胞

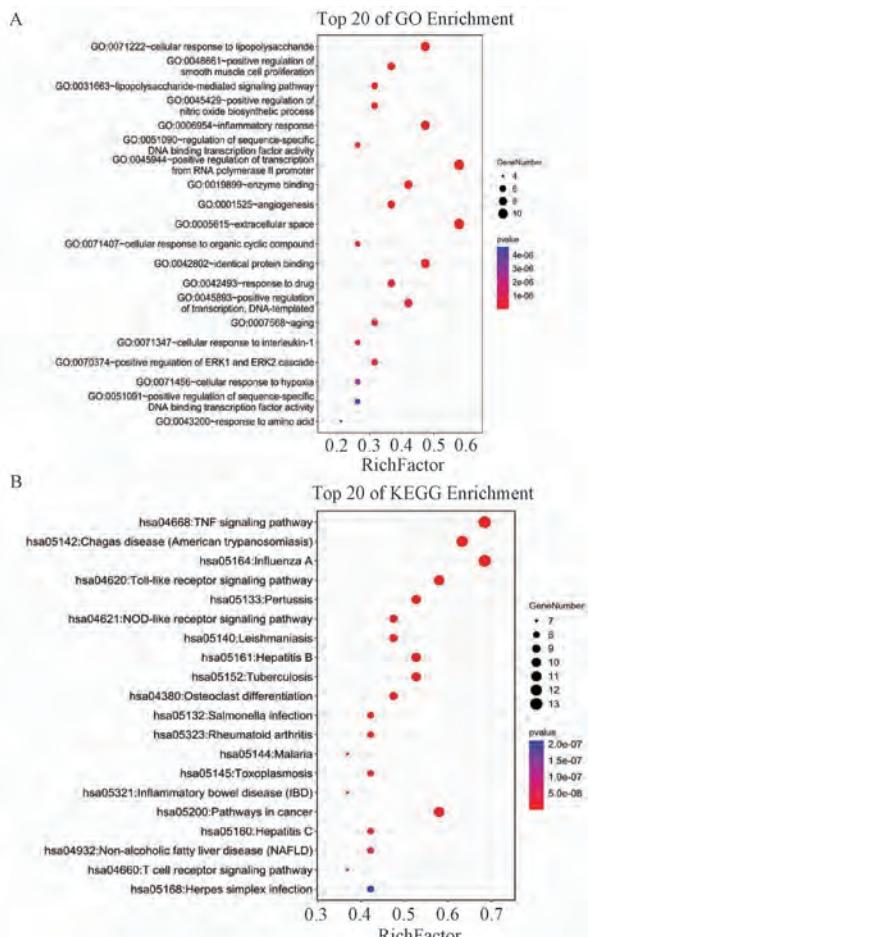
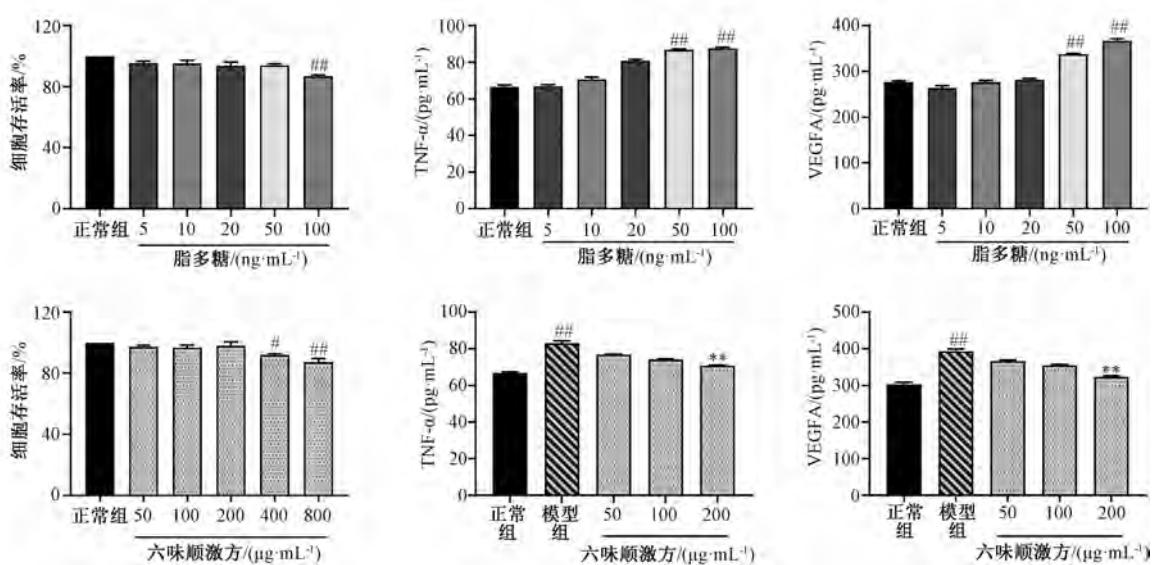


图 5 GO 及 KEGG 富集分析

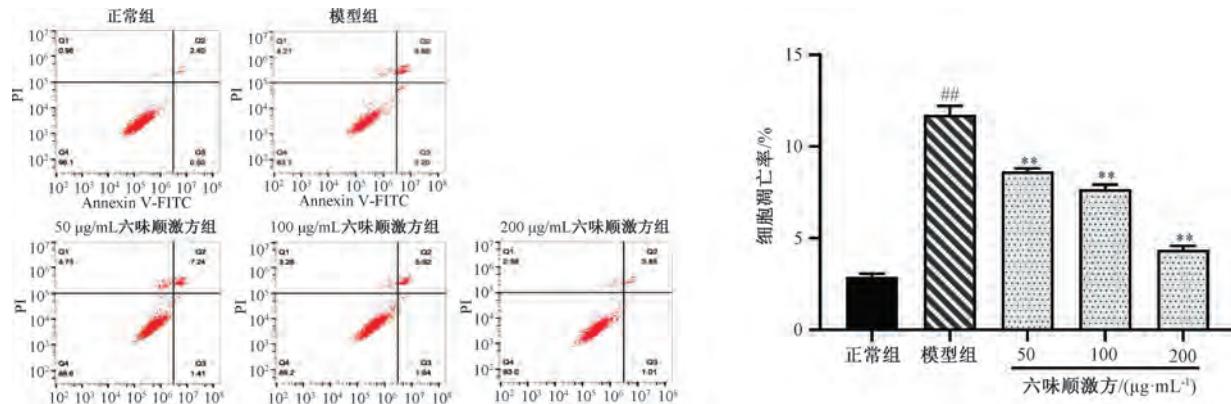


注: 与正常组比较,  $^{\#}P<0.05$ ,  $^{\#\#}P<0.01$ ; 与模型组比较,  $^{**}P<0.01$ 。

图 6 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞存活率和 VEGFA、TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

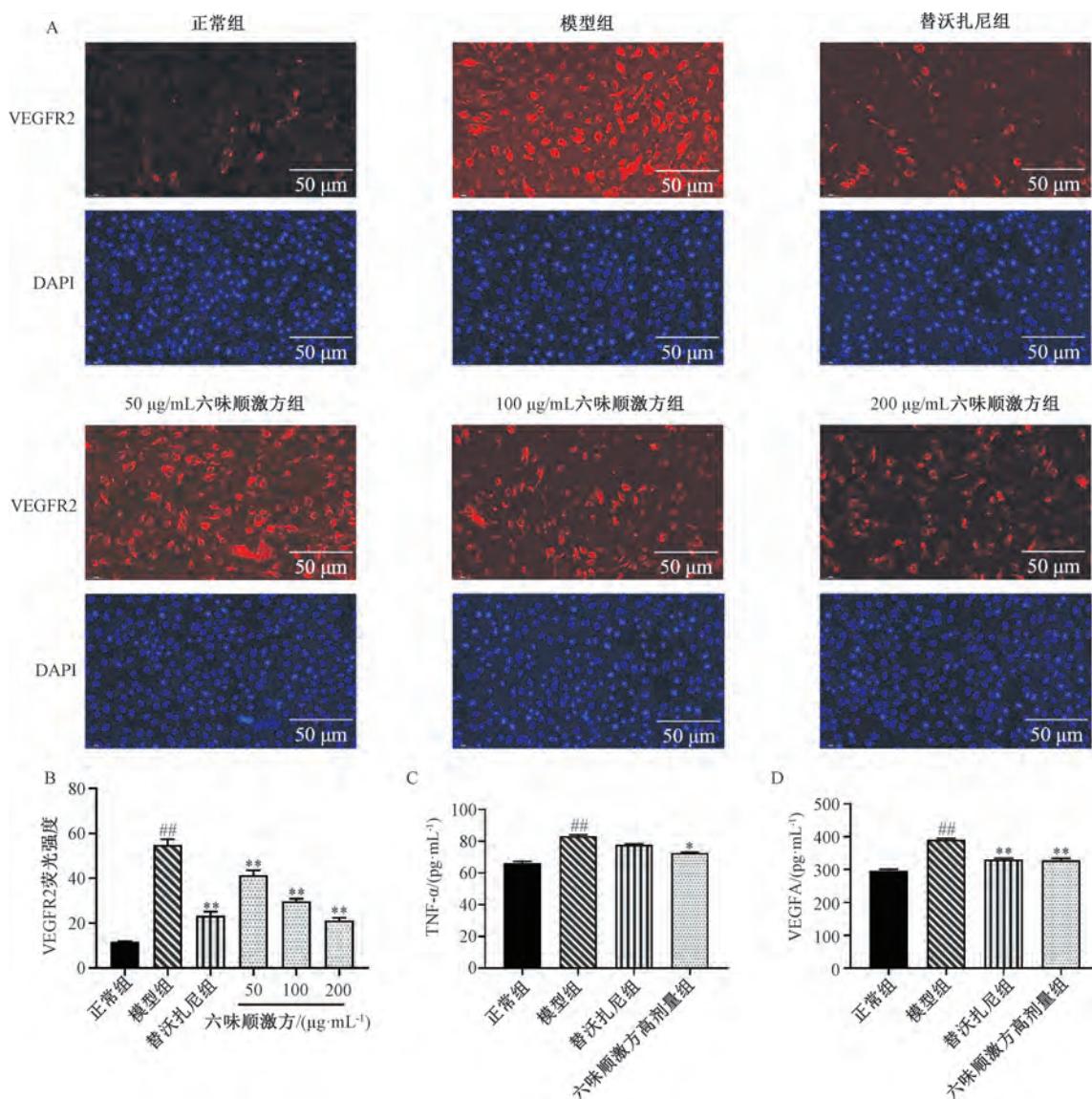
生长进而减少细胞凋亡, 同时能与不同的酪氨酸激酶受体结合, 其中以 VEGFR2 最关键<sup>[20]</sup>。如图 8 所示, 与模型组比较, VEGFR2 抑制剂替沃扎尼组和六味顺激方各剂量组

均可降低 VEGFR2 表达 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 替沃扎尼组能降低 VEGFA 水平 ( $P<0.01$ ), 六味顺激方高剂量组能降低 TNF- $\alpha$  和 VEGFA 水平 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 且作



注: 与正常组比较, ##P<0.01; 与模型组比较, \*\*P<0.01。

图7 六味顺激方对LPS诱导NCM460细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



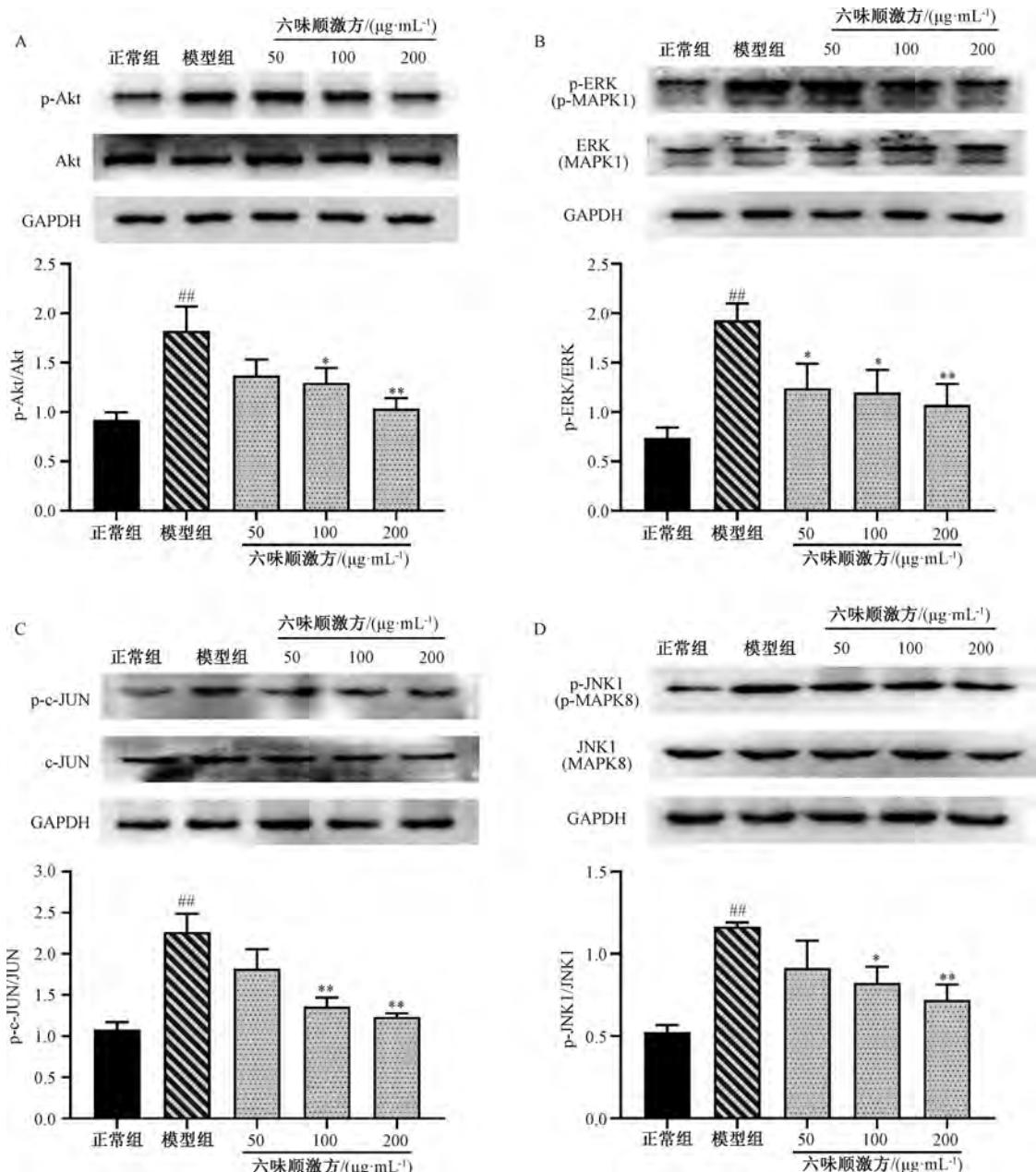
注: A为VEGFR2表达荧光图, B为VEGFR2荧光强度统计图, C~D分别为各组TNF- $\alpha$ 、VEGFA水平统计图。与正常组比较, ##P<0.01; 与模型组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01。

图8 六味顺激方对LPS诱导NCM460细胞VEGFR2表达及TNF- $\alpha$ 、VEGFA水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3 \sim 6$ )

用优于替沃扎尼。结果表明, VEGFA 在六味顺激方干预 LPS 诱导 NCM460 细胞中起重要作用。

3.9 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞 Akt、ERK、JUN 和 JNK1 蛋白表达的影响 如图 9 所示, 与正常组比较, 模型组细胞 p-Akt/Akt、p-ERK/ERK、p-JUN/JUN、p-JNK1/JNK1 蛋白表达均升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 六味顺

激方各剂量组细胞 p-Akt/Akt、p-ERK/ERK、p-JUN/JUN、p-JNK1/JNK1 蛋白表达呈剂量依赖性降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。已有文献报道, ERK、JUN 和 JNK1 属于 MAPK 信号通路的核心成员<sup>[21]</sup>, 此外 Akt 属于 MAPK 信号通路的上游蛋白<sup>[22]</sup>。因此, 六味顺激方可能通过调节 MAPK 通路以改善 LPS 诱导 NCM460 细胞。

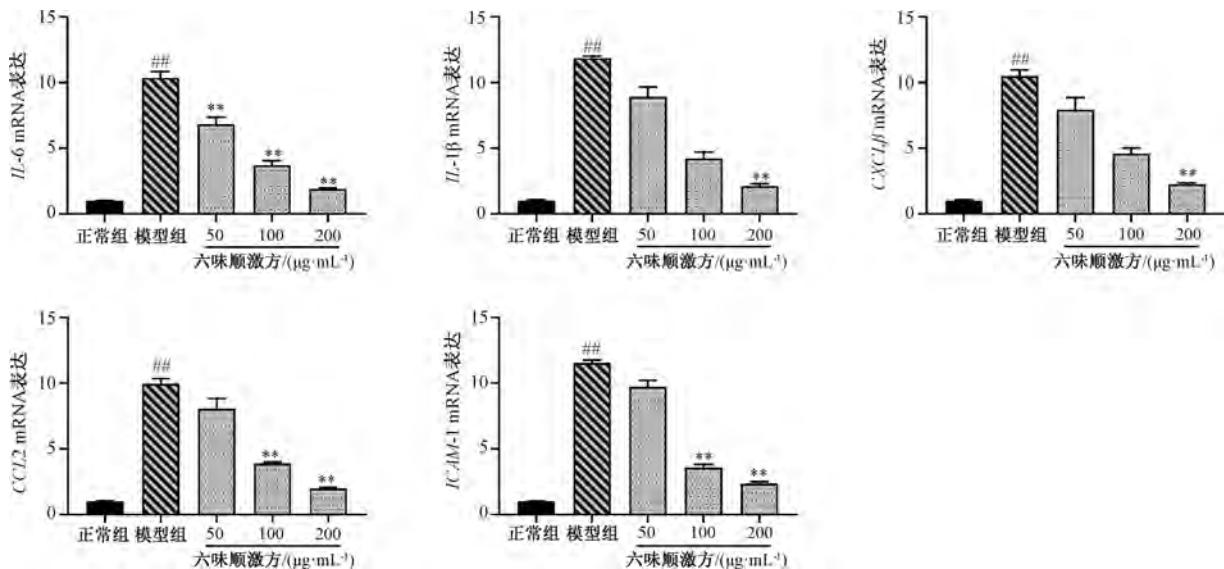


注: A~D 分别为各组 p-Akt/Akt、p-ERK/ERK、p-JUN/JUN、p-JNK1/JNK1 蛋白表达。与正常组比较, ##  $P<0.01$ ; 与模型组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图 9 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞 Akt、ERK、JUN 和 JNK1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

3.10 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞 *IL-6*、*IL-1β*、*CXCL8*、*CCL2* 和 *ICAM-1* mRNA 表达的影响 *IL-6*、*IL-1β*、*CXCL8* 和 *CCL2* 等促炎因子的 mRNA 表达可用于评估六味顺激方对 LPS 诱导的 NCM460 细胞的抗炎作用, 而 *ICAM-1*

可促进内皮细胞迁移且与血管生成和炎症反应相关<sup>[23]</sup>。如图 10 所示, 与正常组比较, 模型组 *IL-6*、*IL-1β*、*CXCL8*、*CCL2* 和 *ICAM-1* mRNA 表达均升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 六味顺激方各剂量组上述基因 mRNA 表达呈剂量依赖



注: 与正常组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 10 六味顺激方对 LPS 诱导 NCM460 细胞 *IL-6*、*IL-1β*、*CXCL8*、*CCL2* 和 *ICAM-1* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

性降低 ( $P < 0.01$ )，且高剂量抗炎效果最优。

#### 4 讨论

本研究首次基于网络药理学和实验验证探讨六味顺激方治疗肠易激综合征的潜在作用机制。根据六味顺激方的药物-成分网络分析可知, 谷甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、丁子香酚、儿茶酸和豆甾醇被发现于 2 味及 2 味以上的中药中, 且上述化合物均有报道称其具有抗炎活性<sup>[24-27]</sup>, 可推测上述化合物可能通过抗炎机制治疗肠易激综合征。

六味顺激方-肠易激综合征相关靶点与 GEO 数据库中肠易激综合征的差异基因取并集后, 所得到的关键靶点 VEGFA 主要参与血管生成, 而血管内皮功能的紊乱在炎症性肠病的发生发展中起着重要的作用<sup>[28]</sup>。临床研究表明, VEGF 和内皮抑素在肠易激综合征患者的血清和黏膜中表达均升高<sup>[29]</sup>, 同时 VEGF 亦作为炎性细胞因子以评估经饮食干预后肠易激综合征患者的改善情况<sup>[30]</sup>。另有临床研究显示, 经放松反应的身心干预后, 肠易激综合征患者焦虑评分、生活质量及症状严重程度指数均得到改善, 外周血转录组分析结果显示 TNF- $\alpha$ 、Akt、NF- $\kappa$ B、MAPK 和 VEGF 等基因被视为关键基因<sup>[3]</sup>。PPI 网络分析结果显示, *IL6*、*TNF*、*Akt1*、*MAPK1*、*JUN*、*IL-1β*、*CXCL8*、*MAPK8*、*CCL2* 和 *ICAM-1* 是排名前十的关键靶点基因。*TNF-α* 是一类具有血管活性的细胞因子, 可诱导炎症因子 *IL-6*、*CXCL8* 和 *CCL2* 等的释放, 共同促使炎性细胞浸润和新生血管的生成, 最终导致异位病灶的形成<sup>[31]</sup>。*CXCL8* 和 *CCL2* 能促进血管生成进而提高 VEGF 表达<sup>[32]</sup>, 而 VEGF/VEGFR2 同样可作用于下游 PI3K/Akt 通路<sup>[33]</sup>。此外, ERK (MAPK1)、JUN 和 JNK1 (MAPK8) 是 MAPK 通路的主要蛋白, 亦可被 VEGF 和 PI3K/Akt 通路激活<sup>[34]</sup>。*ICAM-1* 介导血管内皮细胞的迁移和粘附, 有助于血管生成<sup>[23]</sup>; 同时, *IL-1β* 诱导的 *ICAM-1* 的高表达激活了 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 通路加剧炎症反应<sup>[35]</sup>。综上所述, 上述 11 个关键靶点基

因之间同样存在相互的联系, 共同参与血管生成和炎症反应。

对靶点基因进行进一步 GO 及 KEGG 富集分析, 结果显示细胞对脂多糖的应答和 TNF 信号通路在六味顺激方在治疗肠易激综合征作用机制中起着核心作用。本研究结果显示, 经替沃扎尼处理后 VEGFR2 和 VEGFA 的表达下调, 但六味顺激方在下调 TNF- $\alpha$  水平上的作用比替沃扎尼更优。六味顺激方能够抑制 VEGFR2 受体的表达以及其下游 Akt 蛋白的磷酸化, 进而抑制 ERK、JNK 和 JUN 蛋白表达, 最终抑制炎症因子 (*IL-6*、*TNF-α*、*IL-1β*)、趋化因子 (*CXCL8*、*CCL2*)、血管生成 (*VEGFA*) 和粘附因子 (*ICAM-1*) 相关免疫因子的释放, 从而缓解细胞凋亡同时抑制炎症反应恶性循环。此外, PI3K/Akt 信号通路同样作用于 c-JUN, 共同构成六味顺激方治疗肠易激综合征的机制网络。

综上所述, 六味顺激方能通过多靶点、多通路发挥治疗肠易激综合征的效应, 所涉及的靶点和通路与血管生成、炎症反应密切相关。结合细胞验证实验结果, 推测六味顺激方可能通过靶向抑制 VEGFR 并抑制 MAPK 信号通路下游关键蛋白改善血管生成、炎症反应, 从而缓解肠易激综合征。

#### 参考文献:

- [1] Ford A C, Sperber A D, Corsetti M, et al. Functional gastrointestinal disorders 2 irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675-1688.
- [2] Du L J, Long Y Q, Kim J J, et al. Protease activated receptor-2 induces immune activation and visceral hypersensitivity in post-infectious irritable bowel syndrome mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(3): 729-739.
- [3] Kuo B, Bhasin M, Jacquot J, et al. Genomic and clinical effects associated with a relaxation response mind-body

- intervention in patients with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123861.
- [4] 于丰彦, 陶双友, 周福生. 康泰方治疗肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征临床研究[J]. 新中医, 2010, 42(4): 48-49.
- [5] 程宏辉. 疏肝健脾法对IBS内脏高敏感性的干预作用及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [6] 胡旭光. 康泰胶囊对内脏高敏感性模型大鼠的治疗作用及机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [7] Chen Y L, Huang X Q, Xu S J, et al. Relieving visceral hyperalgesia effect of Kangtai capsule and its potential mechanisms via modulating the 5-HT and NO level *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(3-4): 249-257.
- [8] 陈冠林, 韩棉梅, 梁嘉恺, 等. 康泰胶囊对肠易激综合征内脏高敏感性大鼠背根神经元兴奋性的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 37-40; 44.
- [9] Ru J L, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [10] Li M Y, Li M X, Xu N, et al. Effects of Huangqin Decoction on ulcerative colitis by targeting estrogen receptor alpha and ameliorating endothelial dysfunction based on system pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113886.
- [11] Piñero J, Ramírez-Anguita J M, Saúch-Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [12] Whirl-Carrillo M, McDonagh E M, Hebert J M, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92(4): 414-417.
- [13] Davis A P, Grondin C J, Johnson R J, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): update 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1138-D1143.
- [14] Bateman A, Martin M J, Orechard S, et al. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [15] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D447-D452.
- [16] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [17] Zeng L, Li K X, Hong W, et al. A novel EphA2 inhibitor exerts beneficial effects in PI-IBS *in vivo* and *in vitro* models via Nrf2 and NF-κB signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 272.
- [18] Du W Q, Liang X, Wang S Z, et al. The underlying mechanism of *Paeonia lactiflora* Pall. in Parkinson's disease based on a network pharmacology approach [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 581984.
- [19] Swan C, Duroudier N P, Campbell E, et al. Identifying and testing candidate polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): association with TNFSF15 and TNFα [J]. *Gut*, 2013, 62(7): 985-994.
- [20] Kaza E, Ablässer K, Poutias D, et al. Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents angiogenesis in hypertrophied myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(2): 410-418.
- [21] Woo J S, Choo G S, Yoo E S, et al. Apigenin induces apoptosis by regulating Akt and MAPK pathways in human melanoma cell A375SM [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 4877-4889.
- [22] Steinbrunn T, Stühmer T, Sayehli C, et al. Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2012, 159(4): 430-440.
- [23] Yalaza C, Canacankatan N, Gürses İ, et al. Altered VEGF, Bcl-2 and IDH1 expression in patients with adenomyosis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 302(5): 1221-1227.
- [24] Liao P C, Lai M H, Hsu K P, et al. Identification of β-sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41): 10748-10759.
- [25] Bak M J, Hong S G, Lee J W, et al. Red ginseng marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NFκB and p38 pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Molecules*, 2012, 17(12): 13769-13786.
- [26] Bai L L, Chen H, Zhou P, et al. Identification of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) inhibitor in rheumatoid arthritis using network pharmacology and molecular docking [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690118.
- [27] Bao N R, Chen F J, Dai D. The regulation of host intestinal microbiota by polyphenols in the development and prevention of chronic kidney disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 2981.
- [28] Cibor D, Domagala-Rodacka R, Rodacki T, et al. Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(3): 1067-1077.
- [29] Aksoy E, Çetinkaya H, Savaş B, et al. Vascular endothelial growth factor, endostatin levels and clinical features among patients with ulcerative colitis and irritable bowel syndrome and among healthy controls: a cross-sectional analytical study [J]. *Sao Paulo Med J*, 2018, 136(6): 543-550.
- [30] Sofi F, Whittaker A, Gori A M, et al. Effect of *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* wheat on irritable bowel syndrome: a double-blinded randomised dietary intervention trial [J]. *Br J Nutr*, 2014, 111(11): 1992-1999.
- [31] Ogami K, Yamaguchi R, Imoto S, et al. Computational gene network analysis reveals TNF-induced angiogenesis [J]. *BMC Syst Biol*, 2012, 6(Suppl 2): S12.
- [32] Pausch T M, Aue E, Wirsik N M, et al. Metastasis-associated fibroblasts promote angiogenesis in metastasized pancreatic cancer via the CXCL8 and the CCL2 axes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5420.
- [33] Liu X J, Guo A S, Tu Y Y, et al. Fruquintinib inhibits VEGF/VEGFR2 axis of choroidal endothelial cells and M1-type macrophages to protect against mouse laser-induced choroidal

- neovascularization [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 1016.
- [34] Nicolas S, Abdellatef S, Haddad M A, et al. Hypoxia and EGF stimulation regulate VEGF expression in human glioblastoma multiforme (GBM) cells by differential regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK pathways [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1397.
- [35] Xu F F, Zhu H, Li X M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and impairs bio-scaffold-mediated bone regeneration *in vivo* [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(19-20): 2768-2782.

## 基于网络药理学探究清解宣透肺卫方治疗甲型流感的作用机制

田 静<sup>1,2</sup>, 王 玉<sup>1\*</sup>, 张 玲<sup>2</sup>, 万海同<sup>2</sup>

(1. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** 目的 基于网络药理学预测清解宣透肺卫方抗甲型流感的作用机制。方法 结合前期方剂物质基础研究及TCMSP数据库, 筛选清解宣透肺卫方中的主要化合物及其靶点信息; 查询GeneCards、GenCLiP3数据库收集甲型流感相关的蛋白靶点; 采用Cytoscape 3.6.0软件构建“活性成分-靶点”网络图、PPI网络图, 并进行拓扑分析; 进行GO分析和KEGG通路富集分析; 采用AutoDock Vina对清解宣透肺卫方关键活性成分与甲型流感关键靶点进行分子对接。

**结果** 共获取122种活性成分与292个靶点; 经拓扑分析得到78个关键活性成分(包括槲皮素、山柰酚、木犀草素等)和56个关键靶点(涉及TNF、Akt、NF-κB等)与甲型流感相关; GO富集分析得到生物学过程、细胞组分和分子功能分别1388、20、40条注释信息; KEGG通路富集得到TNF、TLR信号通路等121条结果; 分子对接结果显示, 豆甾醇、虎杖苷、β-胡萝卜素等与PTGS-2具有强烈结合活性, β-胡萝卜素等与IL-10具有较好结合活性。结论 清解宣透肺卫方可能通过抗病毒, 抗病毒诱导的炎症反应, 抗氧化应激反应, 调节机体免疫, 抗细胞凋亡、减轻肺损伤等途径治疗甲型流感。其中的虎杖苷等可能为抗甲型流感病毒的主要活性物质, 关键靶点涉及ALB、PTGS-2、IL-10等。

**关键词:** 清解宣透肺卫方; 甲型流感; 网络药理学; 分子对接

**中图分类号:** R966

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2023)03-0998-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.053

甲型流感具有传染性强、传播迅速广泛的特点, 其病毒能够突破种属障碍并获得在新宿主中有效感染和传播从而导致流感大流行, 使得抗病毒药物研发的成本和难度加大<sup>[1]</sup>。根据《流行性感冒诊疗方案(2020年版)》<sup>[2]</sup>, 目前我国抗流感药物仅有奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、阿比多尔。中医治疗甲型流感, 在针对病邪的同时更注重整体, 认为其病邪在卫、气分, 总以清解、宣透肺卫气为基本治法, 且中药方剂多成分、多靶点的特点更能兼备抗病毒、抗炎、调节免疫等效用, 故在甲型流感治疗方面更具优势<sup>[3]</sup>。

清解宣透肺卫法指导下研发的清解宣透肺卫银花平感颗粒, 已获中药新药证书(国药证字Z20120004), 经过临床研究并已上市(国药准字Z20133007)。该方由麻黄、苦杏仁、葛根、金银花、虎杖、甘草组成, 具有宣肺解表、清解肺卫的功效。前期临床研究表明, 清解宣透肺卫方对

于治疗外感热病邪郁肺卫证有较好疗效, 具有显著解热、镇痛、止咳化痰等作用<sup>[4]</sup>。据此推断清解宣透肺卫方对甲型流感有治疗作用, 但其作用机制及靶点尚需进一步明确。

网络药理学融合系统生物学、系统药理学以及统计学等学科, 对于复杂疾病发病机制及治疗靶标的研究具有一定的应用价值<sup>[5]</sup>。分子对接是通过研究分子间(如配体与受体)的相互作用方式进行虚拟筛选和药物设计, 已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术。本研究基于前期实验结果, 采用网络药理学和分子对接技术, 筛选清解宣透肺卫方中的活性化合物及靶点, 预测其抗甲型流感的作用机制, 以期为该方的基础研究和临床应用提供参考。

### 1 资料与方法

1.1 活性成分筛选及靶点收集 清解宣透肺卫方HPLC分析的色谱条件为Eclipse XDB-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相0.1%磷酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱

收稿日期: 2021-06-15

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY21H270013)

作者简介: 田 静(1999—), 女, 研究方向为网络药理学。Tel: 17376598200, E-mail: tjing618@163.com

\*通信作者: 王 玉(1982—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为生物信息学和循证医学。Tel: (0571) 86613716, E-mail: wangyu@zemu.edu.cn