

基于网络药理学和分子对接技术探讨凉膈散抑制急性肺损伤细胞因子风暴的机制[△]

杨丽玲^{1*}, 周湘君², 晏丽君³, 余林中³ (1. 暨南大学附属东莞医院临床药学科, 广东 东莞 523900; 2. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 3. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)07-0780-08

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.07.003

摘要 目的:利用网络药理学和分子对接技术,探讨凉膈散抑制急性肺损伤(acute lung injury,ALI)细胞因子风暴的作用机制。方法:从中药系统药理学数据库与分析平台中筛选凉膈散活性成分和作用靶点;通过人类孟德尔遗传综合数据库、Gene Cards等医学数据库获得ALI疾病靶点。利用Uniprot数据库查询靶点对应的基因,采用R软件及String数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein Interaction,PPI)网络,运用Cytoscape软件构建“中药-化合物-靶点”相互作用网络,使用R软件进行基因本体(gene ontology,GO)功能富集分析、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,预测其分子机制。将核心成分通过Autodock Vina软件与IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及糖原合成酶激酶3 β 受体进行分子对接。结果:凉膈散治疗ALI的活性成分149个、靶点237个,关键靶点涉及AKT1、IL-6及MAPK3等;GO功能富集以生物过程为主,包括氧化应激反应、脂多糖反应和细菌起源分子等。KEGG通路主要涉及PI3K-Akt、AGE-RAGE及TNF等通路;分子对接结果显示,连翘苷、豆甾醇、光甘草定、紫萼檀素及槲皮素等核心化合物的结合力与临床常用抗炎药相似,其中以连翘苷最强。结论:凉膈散可能通过连翘苷、槲皮素等多种活性成分作用于AKT1、IL-6、PI3K-Akt及AGE-RAGE等靶点与通路,从抗炎、抗菌、抗氧化和调节免疫方面发挥治疗ALI的作用。

关键词 凉膈散;急性肺损伤;网络药理学;分子对接;细胞因子风暴

Mechanism of Liangge Powder Inhibiting Cytokine Storm in Acute Lung Injury Based on Network Pharmacology and Molecular Docking[△]

YANG Liling¹, ZHOU Xiangjun², YAN Lijun³, YU Linzhong³ (1. Dept. of Clinical Pharmacy, Dongguan Hospital Affiliated to Jinan University, Guangdong Dongguan 523900, China; 2. College of Pharmacy, Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523808, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the mechanism of Liangge Powder inhibiting cytokine storm in acute lung injury (ALI) based on network pharmacology and molecular docking. **METHODS:** The active ingredients and action targets of Liangge Powder were screened from the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform; the disease targets of ALI were obtained from online mendelian inheritance in man, Gene Cards and other medical databases. Uniprot database was used to query the genes corresponding to the targets, R software and String database were adopted to construct protein-protein interaction (PPI) network, Cytoscape software was used to construct herbal-compound-target interaction network, R software was used to perform gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, so as to predict the molecular mechanisms. Autodock Vina software was adopted to conduct molecular docking on the core components of Liangge Powder with IL-1 β , IL-6, TNF- α receptors and glycogen synthase kinase 3 β . **RESULTS:** Totally 149 active ingredients and 237 targets were found in Liangge Powder in the treatment of ALI, the key targets involving AKT1, IL-6 and MAPK3, etc.; the GO functional enrichment was mainly biological processes, including oxidative stress, lipopolysaccharide response and bacteriogenic molecule, etc. The KEGG pathway mainly involved PI3K-Akt, AGE-RAGE and TNF pathways, etc.; results of molecular docking showed that the binding forces of core compounds, such as phillyrin, stigmasterol, glabridin, pterocarpin and quercetin, was similar to that of clinically used

[△] 基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(No. 2019A1515110369);广东省中医药管理局科研项目(No. 20211411)

* 副主任药师,硕士。研究方向:中药抗炎免疫药理。E-mail:yll138@126.com

anti-inflammatory drugs, among which phillyrin was the strongest. **CONCLUSIONS:** Liangge Powder may act on targets and pathways of AKT1, IL-6, PI3K-Akt and AGE-RAGE through various active ingredients such as phillyrin and quercetin, and exert therapeutic effects on ALI in terms of anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and immunoregulation.

KEYWORDS Liangge Powder ; Acute lung injury; Network pharmacology; Molecular docking; Cytokine storm

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以肺实质细胞损伤为主要特征的急性低氧血症,其严重阶段为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),严重感染及细胞因子风暴引起失控的全身性炎症反应是 ALI 发生的重要原因,急性胰腺炎、脓毒症、新型冠状病毒肺炎(COVID-19)、甲型流感(H1N1、H5N1 及 H7N9)等重症及危重病例均会出现 ALI。目前,对于 ALI 尚缺乏满意的治疗药物,糖皮质激素的应用受到广泛质疑,尽管应用了机械通气、体外膜氧合等综合治疗措施,病死率仍高达 40%,成为危重病医学的难点^[1-2]。中医学对 ALI 的认识颇有特色,中西医结合的防治措施对 ALI 的治疗作用也得到了肯定^[3-4]。尤其对于 COVID-19 疫情的防控,中医药全程介入、中西医结合治疗在控制疾病进程、提高治愈率等方面优势明显^[5]。凉膈散为中医温病治疗经典名方,由黄芩、连翘、山栀子、薄荷、大黄、芒硝、淡竹叶和甘草组成。相关的临床研究^[6]及本团队先期的实验研究^[7]结果均表明,凉膈散是治疗严重感染及炎症所致 ALI 的有效方,但该方的主要作用靶点和作用机制尚未明确,有必要进一步研究。

研究结果发现,细胞因子过度释放可诱发细胞因子风暴导致 ALI,细胞因子风暴是推动 ALI 向 ARDS 进展的主要原因^[8]。促炎因子白细胞介素(IL)1 β 、IL-6 及肿瘤坏死因子(TNF) α 是引起细胞因子风暴的关键因子,利用其特异性抑制剂、阻断剂遏制细胞因子风暴一直是抗 ALI 药物研究的热点^[9]。此外,糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)作为炎症反应的中枢激酶,是多条炎症信号通路如 NF- κ B、p38 及 JNK 信号通路相应调节位点 NF- κ B p65、CREB 及 AP-1 的共同靶分子,与 ALI 的发生发展密切相关,可作为抗 ALI 药物筛选的新靶标^[10-11]。本研究利用网络药理学技术筛选出凉膈散活性成分和作用靶点,预测其核心化合物及信号通路,再将核心化合物与 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 及 GSK-3 β 药物靶点通过 Auto Dock 进行分子对接,进一步预测凉膈散抑制 ALI 细胞因子风暴的分子机制,为凉膈散方及其单体成分多角度的开发应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 凉膈散组方药物活性成分及对应靶点的筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)中对凉膈散所有组方药物的化学成分进行筛选[条件:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq$ 30%且类药性(drug-likeness, DL) $\geq$ 0.18],得到凉膈散活性成分及相关的靶点。

1.2 ALI 靶点收集

以“acute lung injury”为关键词检索人类孟德尔遗传综合

数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)和 GeneCards 数据库,将结果汇总、分析,取交集,得到 ALI 疾病相关靶点基因。

1.3 药物-疾病靶标蛋白基因名确定、蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein Interaction, PPI)网络构建及“中药-化合物-靶点”相互作用网络构建

通过 Uniprot 数据库查询“1.1”项与“1.2”项对应的基因名,利用 R 软件进行交集分析,得到“疾病-药物”共同靶点。将共同靶点上传至 String 数据库,按最低相互作用得分(中等可信度:0.99)构建 PPI 网络。输入凉膈散活性成分、共同靶点等至 Cytoscape 软件,构建“中药-化合物-靶点”相互作用网络。

1.4 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

将“凉膈散-ALI”共同靶点用 R 软件进行 GO 功能、KEGG 通路富集分析,用 Cytoscape 软件可视化靶点-通路网络。

1.5 “成分-靶点”分子对接

通过 ChemSpider 数据库筛选出的凉膈散核心化合物结构,利用 Chem3D 软件转换为 mol2 格式。从 RCSB 数据库下载 IL-6(PDB: 1P9M)、TNF- α (PDB: 1NCF)、IL-1 β (PDB: 4DEP)和 GSK-3 β (PDB: 1H8F)的 3D 结构,在 AutoDockTools 中删配体、去水、加氢及计算格点能等,最后使用 VINA 程序进行分子对接。

2 结果

2.1 凉膈散组方药物活性化合物收集

根据设置的筛选条件,从 TCMSP 数据库中收集到候选活性化合物共 192 个;来源于大黄 16 个,连翘 23 个,黄芩 36 个,甘草 92 个,栀子 15 个,薄荷 10 个(芒硝和竹叶均未检索到化合物数据)。其中,部分化合物存在于多种单味药中,如木犀草素(luteolin)来源于连翘和薄荷, β -谷甾醇(beta-sitosterol)为黄芩、连翘、大黄和栀子共有。删除重复活性成分后,共获得候选活性化合物 173 种,其中,黄芩的新黄芩素(MOL002934)、连翘的连翘脂素(MOL003330)和甘草的甘草酚(MOL002311)的 OB 排序居前 3 位,均>90%;甘草的美迪紫檀素(MOL004924)、甘草醇 F(MOL004988)和连翘的荷包牡丹碱(MOL000791)的 DL 排序居前 3 位,均 $\geq$ 0.88;此外,有 159 个(占 90.34%)活性成分的肠上皮通透性(Caco-2) $\geq$ -0.4,提示凉膈散极易被小肠吸收利用。

2.2 “凉膈散-ALI”靶点收集及 PPI 网络构建

从 TCMSP 数据库中得到凉膈散活性成分 173 个,其对应

靶点 263 个;从 GeneCards 和 OMIM 数据库中得到 ALI 相关靶点 6 400 个,二者交集得到“凉膈散-ALI”共同靶点 237 个,见图 1。用 237 个共同靶点反向筛选凉膈散成分,剔除不作用于这 237 个靶点的成分,得到作用于 ALI 相关靶点的活性化合物 149 个。237 个“凉膈散-ALI”共同靶点通过 String 数据库构建的 PPI 网络见图 2。如图所示,靶蛋白通过基因连线相互作用形成多中心相互作用网络图,靶点蛋白节点连接数越高则在网络中越重要,为核心靶点蛋白;AKT1、IL-6、MAPK3、VEGFA、JUN、EGFR、CASP3、MAPK8、EGF 和 MAPK1 等 10 种靶蛋白连线最多,处于整个网络的核心位置,提示上述靶蛋白与其他靶蛋白相互作用非常密切,在维持网络稳定性和相互作用中起到重要作用,因此其编码基因可能是“凉膈散-ALI”的核心靶点基因。将核心靶点蛋白按其连接数进行排序,绘制成条形图,见图 3。

2.3 “中药-化合物-靶点”相互作用网络构建

“中药-化合物-靶点”相互作用网络见图 4。在组方中药方面,有 11 个化合物归属于 2 种以上药材,以来源于甘草的化合物居多。在靶点蛋白方面,10.55%的靶点蛋白与 ≥ 20 个化合物相互作用;作用 ≥ 30 个化合物的靶点蛋白共 23 个。在化合物方面,20.81%化合物的靶点蛋白 ≥ 20 个,其中 8 个化

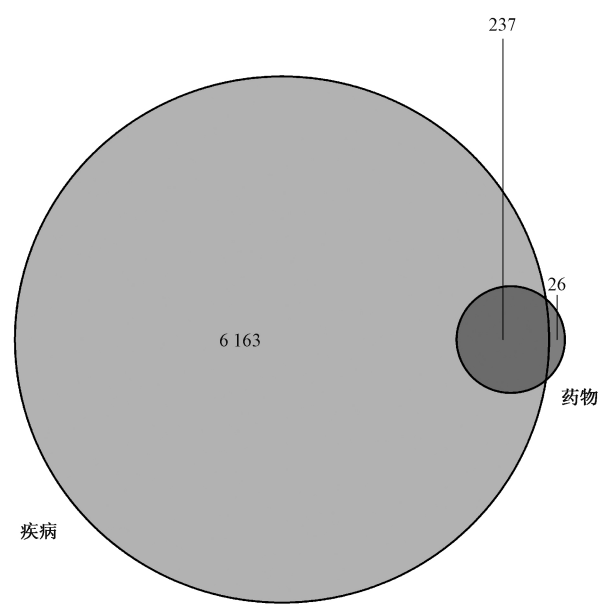
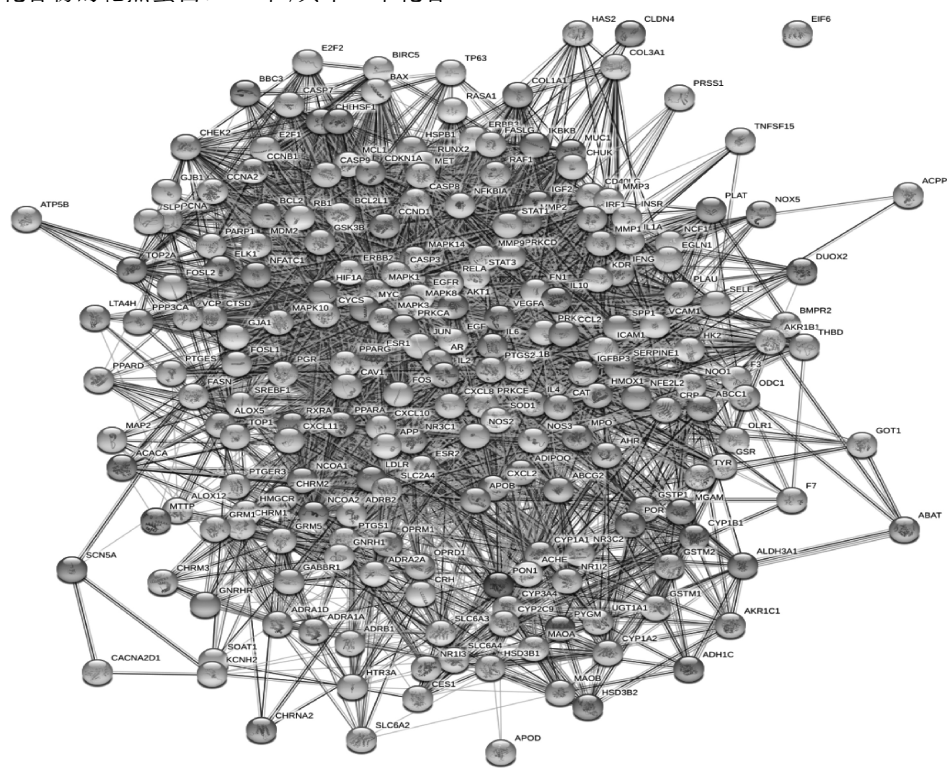


图 1 凉膈散-ALI 靶点交集韦恩图
Fig 1 Venn diagram of targets intersection of Liangge Powder-ALI



图中圆球表示靶点蛋白,连接线表示靶点蛋白间的相互作用关系
the balls in the diagram indicate target proteins, and the connecting lines indicate the interactions between target proteins

图 2 凉膈散-ALI 靶点蛋白 PPI 网络图
Fig 2 Diagram of PPI network of Liangge Powder-ALI target proteins

物的靶点蛋白 ≥ 30 个;靶点蛋白数排序居前 3 位的化合物分别为槲皮素、木犀草素和山柰酚,相关靶点蛋白数分别为 130、52 和 50 个。

2.4 GO 功能、KEGG 通路富集分析

(1)GO 条目共 2 755 个 ($P < 0.05$),其中生物过程条目 2 433 个(占 88.3%),细胞组成条目 112 个(占 4.1%),分子功

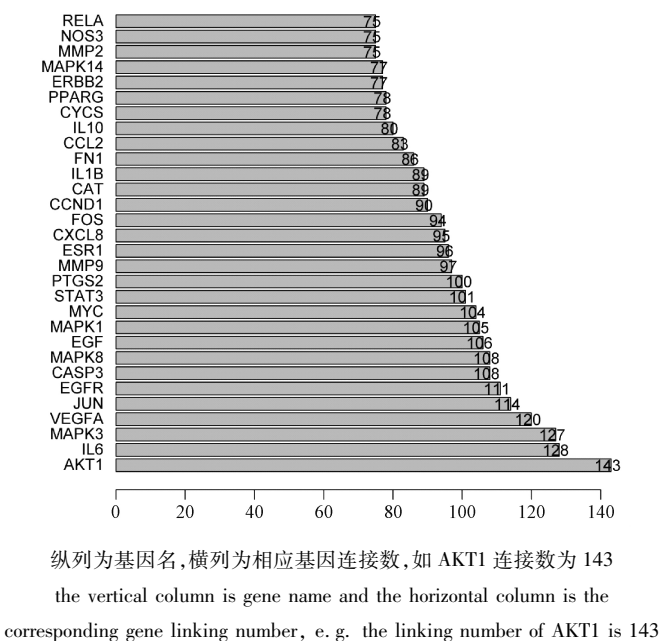
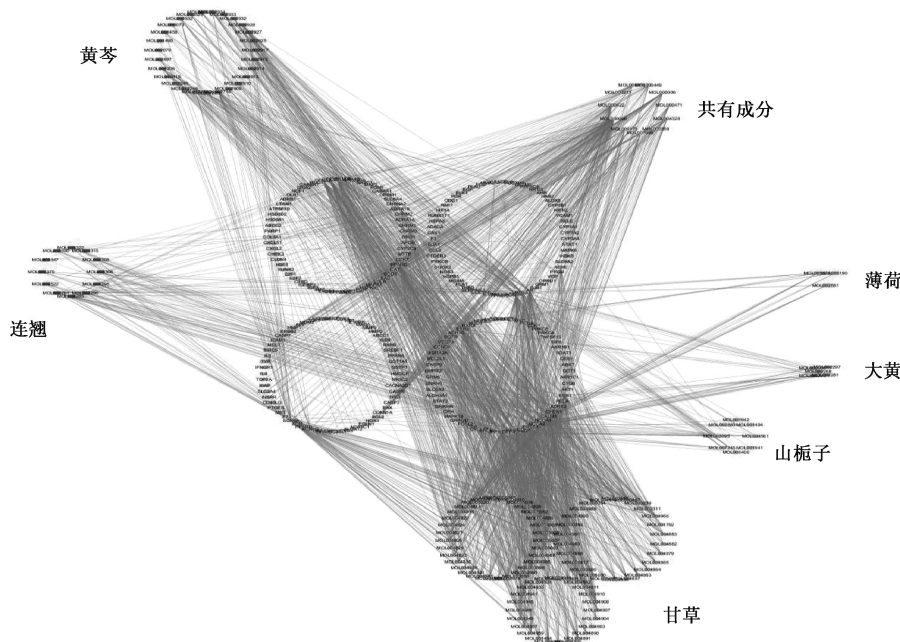


图3 凉膈散-ALI 核心靶标的条形图

Fig 3 Bar chart of Liangge Powder-ALI core targets



图中正中 4 个圆环代表凉膈散-ALI 共同靶标;其余代表凉膈散各单味中药的核心成分

the four circles in the middle of diagram represent common target of

Liangge Powder-ALI; the rest represent core components of each single flavour of Liangge Powder

图4 “中药-化合物-靶点”相互作用网络图

Fig 4 Interaction network of herbal-compound-target

-5.0 kJ/mol,说明凉膈散核心活性化合物与上述受体有较好的结合能力(见表1)。其中,与 IL-6 结合能较低的 3 个化合物为连翘苷、豆甾醇和光甘草定;与 TNF- α 结合能较低的 3 个化合物为连翘苷、豆甾醇和 β -谷甾醇;与 IL-1 β 结合能较低的 3 个化合物为连翘苷、豆甾醇和攀紫檀素;与 GSK-3 β 结合能较低的 3 个化合物为连翘苷、豆甾醇和 1-甲氧基莱青素。将目前

能条目 210 个(占 7.6%),说明 237 个靶点主要富集到生物过程,包括氧化应激反应、脂多糖反应、细菌起源分子和营养水平等,富集的靶点数分别为 58、57、57 和 57 个。靶点数排序居前 20 位的条目见图 5。(2)KEGG 通路共 182 条通路($P<0.05$),剔除疾病、广义通路后发现 237 个靶点在炎症免疫通路中富集明显,如 PI3K-Akt、TNF、IL-17 及 MAPK 等通路,其富集的靶点数均 ≥ 25 个。靶点数排序居前 20 位的通路气泡图见图 6。为了更加清晰地展示凉膈散治疗 ALI 的作用机制,将“凉膈散-ALI”共同靶点和 KEGG 主要通路输入 Cytoscape,得到可视化靶点-通路网络,见图 7。结果显示,1 个靶点对应多条通路,1 条通路涉及多个靶点,其中有 28 个靶点富集到 10 条以上信号通路,涉及靶点数 ≥ 40 个的信号通路有 4 条,表明凉膈散是通过多靶点、多通路作用于 ALI。

2.5 凉膈散核心活性化合物与 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 GSK-3 β 的分子对接结果

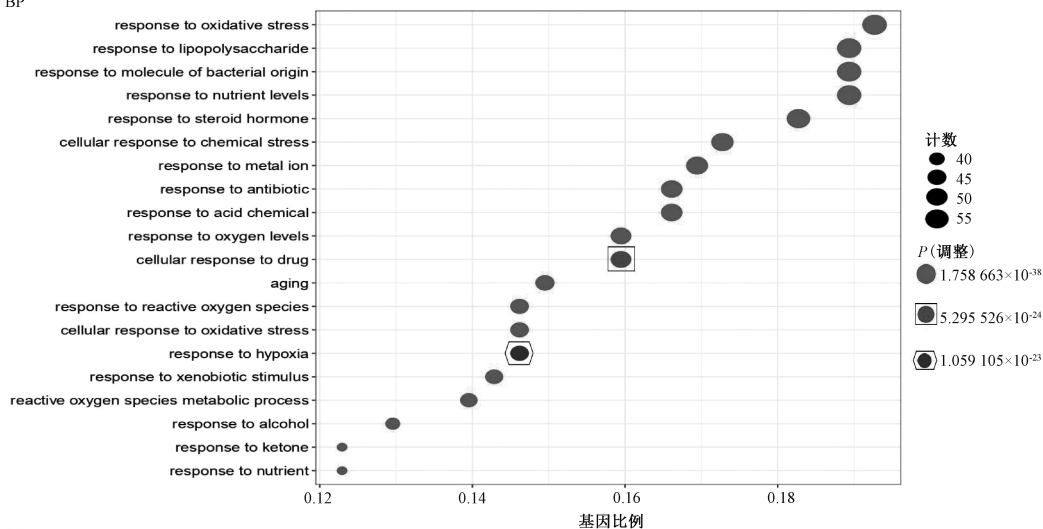
普遍认为,结合能越低,配体与受体越可能结合发挥作用,当两者结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 时结合较好。将凉膈散核心活性化合物与 IL-6(PDB:1P9M)、TNF- α (PDB:1NCF)、IL-1 β (PDB:4DEP)和 GSK-3 β (PDB:1H8F)进行对接,相应结合能均 $\leq$

临床使用的几种抗炎药与 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 GSK-3 β 受体进行分子对接,发现凉膈散核心化合物中连翘苷与上述 4 种受体的结合能均小于临床使用的几种抗炎药。连翘苷与 4 种受体对接模式见图 8。

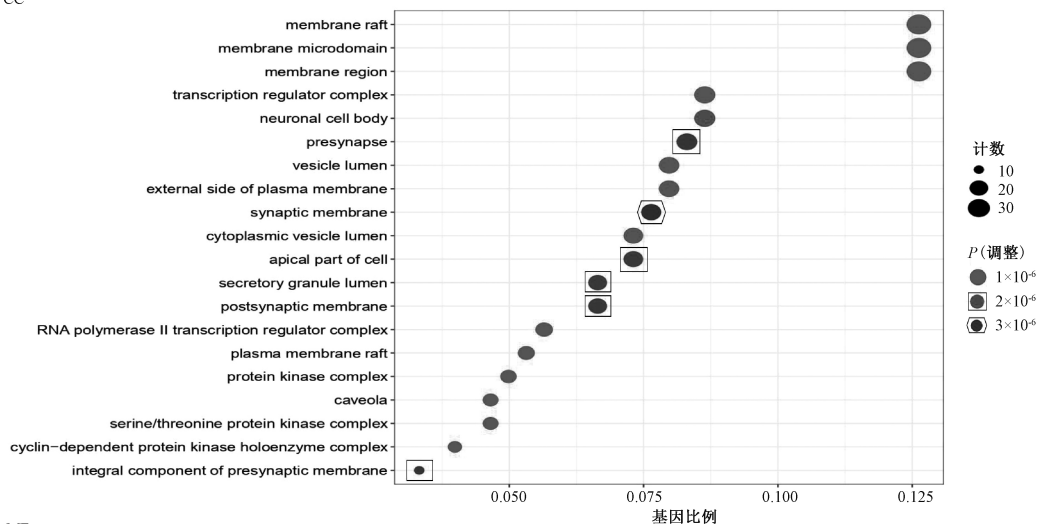
3 讨论

凉膈散出自《太平惠民和剂局方》,是清上泻下治法的

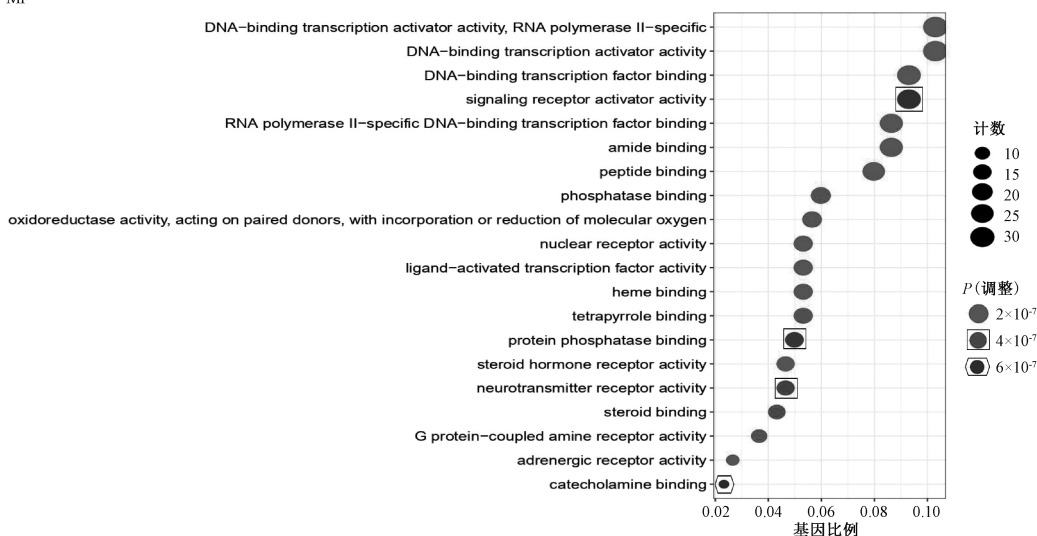
BP



CC



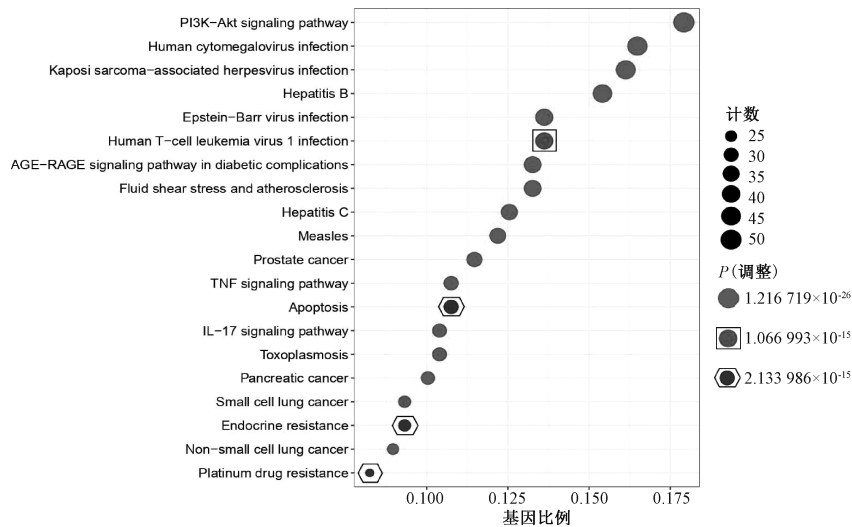
MF



气泡大小表示基因数目,横列数字表示基因比例,不同气泡代表不同 P 值,富集程度越高则 P 值越小
the size of bubble indicates the number of gene, the number in horizontal column indicates the proportion of genes, different bubbles
represent different P -values, the higher the enrichment level the smaller the P -value

图 5 凉膈散-ALI 关键靶点 GO 功能富集分析

Fig 5 GO function enrichment analysis of key targets of Liangge Powder-ALI

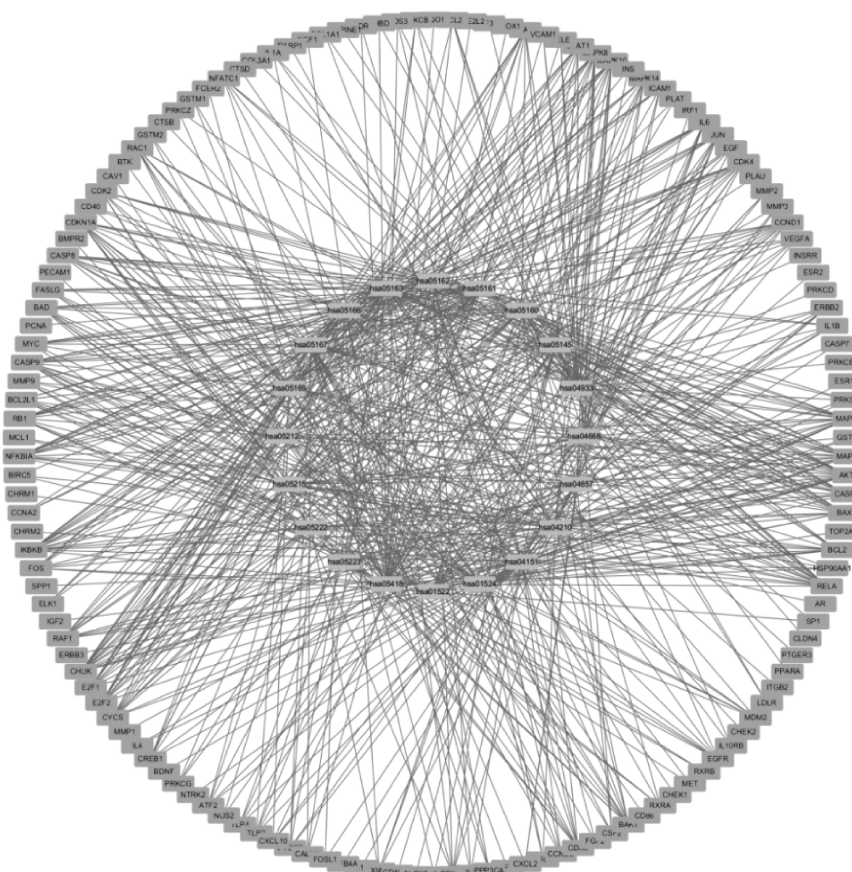


气泡大小表示基因数目,横列数字表示基因比例,不同气泡代表不同 P 值,富集程度越高则 P 值越小

the size of bubble indicates the number of gene, the number in horizontal column indicates the proportion of genes, different bubbles represent different *P*-values, the higher the enrichment level the smaller the *P*-value

图 6 凉膈散-ALI 关键靶点 KEGG 通路富集分析

Fig 6 KEGG pathway enrichment analysis of key targets of Liangge Powder-ALI



大圆环代表化合物与疾病共同靶点,小圆环代表前 20 位信号通路

Large circles represent common targets of compounds and diseases, small circles represent top 20 signaling pathways

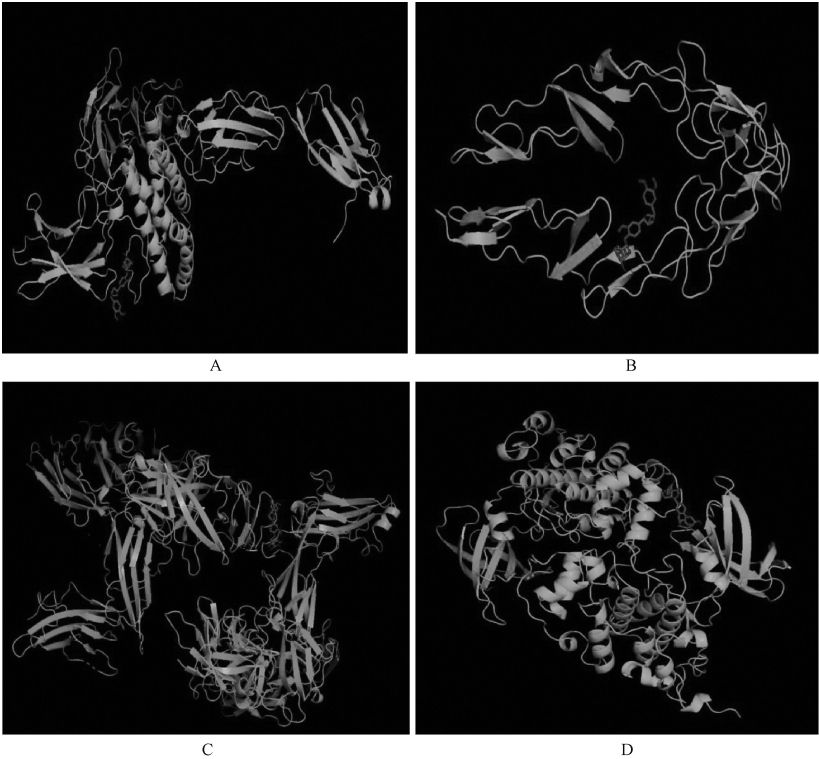
图 7 靶点-通路相互作用网络图

Fig 7 Network of interaction of target-pathway

表 1 凉膈散中核心化合物及目前临床常见抗炎药与 IL-6、TNF-α、IL-1β 和 GSK-3β 的结合能

Tab 1 Binding energy of core components in Liangge Powder and clinically used anti-inflammatory drugs with IL-6, TNF-α, IL-1β and GSK-3β

化合物	化学式	CAS	相对分子	结合能/(kJ/mol)			
				IL-6	TNF-α	IL-1β	GSK-3β
刺果甘草查耳酮(glypallichalcone)	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	146763-58-8	284.33	-6.5	-6.6	-5.5	-7.0
柚皮素(naringenin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	480-41-1	272.27	-7.2	-6.4	-6.4	-7.2
甲氧基-2-甲基异黄酮(7-methoxy-2-methyl isoflavone)	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	19725-44-1	266.29	-7.7	-7.5	-7.6	-8.8
黄芩素(baicalein)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	491-67-8	270.24	-8.4	-7.4	-9.6	-8.3
刺槐素(acacetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	480-44-4	284.26	-7.6	-7.8	-7.8	-8.9
甘草碱 a(licochalcone a)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	58749-22-7	338.40	-7.4	-7.4	-7.3	-7.7
芦荟大黄素(aloe-emodin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	481-72-1	270.20	-8.0	-7.4	-7.9	-9.2
豆甾醇(stigmasterol)	C ₂₉ H ₄₈ O	83-48-7	412.77	-9.3	-9.0	-9.9	-10.3
山奈酚(kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	520-18-3	286.25	-7.6	-7.0	-7.9	-7.6
芒柄花黄素(formononetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	485-72-3	268.28	-7.2	-7.4	-7.7	-8.0
β-谷甾醇(beta-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	83-46-5	414.79	-8.8	-8.7	-9.0	-9.1
异鼠李素(isorhamnetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	480-19-3	316.28	-8.6	-8.1	-7.7	-9.3
汉黄连素(wogonin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	632-85-9	284.26	-8.3	-7.6	-8.2	-9.2
槲皮素(quercetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	117-39-5	302.25	-8.9	-8.3	-9.3	-9.5
木犀草素(luteolin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	491-70-3	286.25	-8.4	-8.0	-8.5	-9.4
甘草胶(licogrocarpin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	N/A	338.40	-8.5	-8.1	-8.7	-8.3
攀紫檀素(shimpterocarpin)	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	157414-04-5	322.38	-8.6	-8.6	-9.9	-9.8
苜蓿素(medicarpin)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	32383-76-9	270.30	-7.6	-7.3	-8.2	-8.3
荷包牡丹碱(bicuculline)	C ₂₀ H ₁₇ NO ₆	485-49-4	367.38	-8.8	-8.1	-8.8	-9.8
氧木素 A(oroxylin A)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	480-11-5	284.28	-8.2	-7.8	-8.4	-9.0
光甘草定(glabridin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	59870-68-7	324.40	-9.0	-8.1	-9.4	-9.9
异刺芒柄花素(isoformononetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	N/A	268.28	-7.3	-7.4	-6.8	-8.1
1-甲氧基莱青素(1-methoxyphaseollidin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	N/A	354.43	-8.4	-7.8	-9.2	-10.3
连翘苷(phillyrin)	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	487-41-2	534.56	-10.2	-9.4	-10.9	-10.3
地塞米松(Dexamethasone)	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	1950-2-2	392.46	-10.1	-9.2	-9.3	-10.2
双氯芬酸(Diclofenac)	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	644-62-2	296.15	-7.3	-7.2	-8	-7.5
尼美舒利(Nimesulide)	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	77925-80-5	308.30	-7.5	-7.1	-8.1	-7.2



A. 连翘苷与 IL-6 受体对接模式;B. 连翘苷与 TNF-α 受体对接模式;C. 连翘苷与 IL-1β 受体对接模式;D. 连翘苷与 GSK-3β 受体对接模式
A. molecular docking patterns of phillyrin with IL-6;B. molecular docking patterns of phillyrin with TNF-α;C. molecular docking patterns of phillyrin with IL-1β;D. molecular docking patterns of phillyrin with GSK-3β

图 8 连翘苷分别与 IL-6、TNF-α、IL-1β 和 GSK-3β 的分子对接模式

Fig 8 Molecular docking patterns of phillyrin with IL-6, TNF-α, IL-1β and GSK-3β

代表方。连翘清热解毒,黄芩清胸膈郁热,以为君;桅子通泻三焦,大黄和芒硝攻积泄热、逐瘀通经,三药共为臣;薄荷、竹叶疏散泻火、透热于外,皆为佐;甘草和诸药,是为使;全方上疏胸膈邪热,下通中焦滞热,清泄结合,用于上中二焦火热证候。著名中西医结合急救医学专家王今达^[12]依据“肺与大肠相表里”理论,运用清上泻下、解毒排毒之法,以凉膈散治疗 ALI/ARDS,80%的重症患者痊愈。凉膈散作为集清热解毒、通腑泻下两法为一体的经典方剂,其作用机制也是多重的。过往仅针对某一靶点或途径通过实验方法逐一筛选药物作用靶点与机制的研究方式存在盲目主观、费时低效且缺乏整体观的缺点,使得中医药的综合治疗作用难以得到诠释。利用网络药理学和分子对接技术对凉膈散治疗 ALI 进行系统的预测分析,从“成分-靶点-通路”的研究理念出发,可为凉膈散及其单体成分的开发应用提供参考。

通过网络药理学技术从 TCMSP 中得到凉膈散活性化合物 173 个,相对应靶点 263 个,其中 90.34%的活性化合物极易被小肠吸收,说明凉膈散适合作为口服药物使用;90.11%的作用靶点与 ALI 有关,揭示凉膈散治疗 ALI 的合理性、有效性。在 PPI 网络、靶点-通路网络中占据中心位置的靶点 AKT1、IL-6 等在 ALI 发生发展中具有重要作用,可能是凉膈散治疗 ALI 的核心靶点。AKT1 属于 AKT 激酶家族,由 PI3K 激活,活化的 AKT 磷酸化下游靶蛋白 GSK-3 β 、IKK α 及 Tpl2 等调控 NF- κ B 信号转导,进而调节机体炎症免疫反应、细胞凋亡、肺泡凝血和纤溶等^[10-11]。IL-6 是细胞因子风暴的核心炎症因子,是急性感染和炎症损伤的早期灵敏指标。“中药-化合物-靶点”相互作用网络显示,槲皮素、山柰酚、木犀草素、柚皮素和汉黄连素存在于凉膈散的多个单味药中,其相应的连接核心靶点数排序居前 10 位,且均已被证实与抗炎、抗菌及免疫调节等密切相关,是该方的核心成分^[13-16]。GO 功能富集分析发现核心靶点主要富集生物过程,KEGG 通路富集分析发现 PI3K-Akt、TNF 和 IL-17 等多条炎症免疫信号通路富集明显,而阻断这些信号通路可明显抑制细胞因子风暴,减轻 ALI^[17-19]。从分子对接分析结果可知,核心化合物与 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 GSK-3 β 受体的结合能均远<-5.0 kJ/mol,其中,连翘中的连翘苷结合能比临床常用强抗炎药地塞米松还低,说明连翘苷与上述受体均有较好的结合活性。

综上所述,本研究应用网络药理学与分子对接技术,首次对温病治疗名方凉膈散治疗 ALI 的活性成分与分子机制进行了系统的预测,推测其潜在机制为:凉膈散活性成分一方面抑制 GSK-3 β 活性,减少 NF- κ B p65 活化,下调促炎因子表达,同时增加 CREB 和 AP-1 转录,上调抗炎因子表达,维持体内促炎与抗炎平衡,从而减轻机体炎症损伤;另一方面竞争性地与 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 受体结合,减少 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 释放,进而抑制细胞因子风暴,避免炎症级联反应对肺部的进一步损伤,改善 ALI 的临床症状。

参考文献

[1] Shaeefi S, Brenner SK, Gupta S, et al. Extracorporeal membrane oxygenation in patients with severe respiratory failure from COVID-19[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(2): 208-221.

[2] 金鹏峰,赵航. 急性肺损伤药物临床试验研究进展[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(6): 926-928, 925

[3] Guo J, Zhu J, Wang Q, et al. Comparative Efficacy of Seven Kinds of Chinese Medicine Injections in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 627751.

[4] 苏景深,刘恩顺,赵鑫民. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医药治疗研究进展[J]. 吉林中医药, 2019, 39(5): 696-700.

[5] 王琪,后亮瑛,朱鸿飞,等.《中西医结合预防与治疗 COVID-19 的动态循证指南》计划书[J/OL]. 中国中药杂志: 1-7[2021-07-13]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20210224.501>.

[6] 陆敏,叶宏伟,陈波,等. 凉膈散在重症急性胰腺炎并发急性呼吸窘迫综合征中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(14): 1521-1523.

[7] 杨华一. 凉膈散通过上调 miR-21 抑制 LPS 所致急性肺损伤[D]. 广州:南方医科大学, 2019.

[8] 尹明,曹艳,施春阳,等. 中药防治细胞因子风暴的研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1089-1095.

[9] Root-Bernstein R. Innate Receptor Activation Patterns Involving TLR and NLR Synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and Sepsis Cytokine Storms: A Review and Model Making Novel Predictions and Therapeutic Suggestions[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2108.

[10] Jope RS, Cheng Y, Lowell JA, et al. Stressed and Inflamed, Can GSK3 Be Blamed[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(3): 180-192.

[11] Liu B, Wu Y, Wang Y, et al. NF-kappaB p65 Knock-down inhibits TF, PAI-1 and promotes activated protein C production in lipopolysaccharide-stimulated alveolar epithelial cells type II[J]. Exp Lung Res, 2018, 44(4-5): 241-251.

[12] 王今达. 齐心协力共同创建独具中国特色的危重病急救医学体系[J]. 中国危重病急救医学, 1992(2): 67-70.

[13] 杨颖,王芸芸,蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(5): 24-28.

[14] Tu LY, Bai HH, Cai JY, et al. The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano[J]. Scanning, 2016, 38(6): 644-653.

[15] Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108612.

[16] 李沛波,王永刚,吴灏,等. 柚皮苷及其苷元柚皮素的呼吸系统药理作用研究概述[J]. 药学研究, 2020, 39(5): 249-255.

[17] 陈胜阳,张永强,刘俊,等. 右美托咪定激活 PI3K/Akt 通路改善 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤实验研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(11): 2123-2130.

[18] Tu Q, Zhu Y, Yuan Y, et al. Gypenosides Inhibit Inflammatory Response and Apoptosis of Endothelial and Epithelial Cells in LPS-Induced ALI: A Study Based on Bioinformatic Analysis and in vivo/vitro Experiments[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 289-303.

[19] Ragab GH, Halfaya FM, Ahmed OM, et al. Platelet-Rich Plasma Ameliorates Monosodium Iodoacetate-Induced Ankle Osteoarthritis in the Rat Model via Suppression of Inflammation and Oxidative Stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6692432.

(收稿日期: 2020-11-20)