

基于网络药理学探讨枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的作用机制^Δ

王 苇^{1*}, 郭媛媛¹, 连雅君², 葛斐林¹, 李佳怡¹, 王添全¹, 曹俊岭^{3#} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 3. 北京中医药大学东方医院药学部, 北京 100078)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)03-0262-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.03.002

摘要 目的: 基于网络药理学方法对枳实薤白桂枝汤进行研究, 探讨其治疗肺栓塞的作用机制。方法: 根据药物成分的体内过程[吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)及排泄(excretion), ADME]属性, 通过中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)获取瓜蒌、薤白、枳实、桂枝及厚朴的主要化学成分, 并借助中医百科全书(the encyclopedia of traditional Chinese medicine, ETCM)和中医药综合数据库(traditional Chinese medicine integrated database, TCMID)进行补充, 筛选中药活性组分, 利用 Swiss Target Prediction 获取活性成分作用靶点; 通过 Genecards、人类孟德尔遗传综合数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)及 DRUGBANK 数据库获取肺栓塞主要靶点, 利用 String 平台进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析, 构建 PPI 网络。采用 Metascape 平台分析“药物-成分-靶点”及其参与的生物过程及通路, 运用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“枳实薤白桂枝汤-肺栓塞-通路”网络。结果: 枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的核心活性成分为槲皮素、木犀草素、柚皮素及咖啡酸等, 核心靶点为 CYP1B1 和 DRD2 等。枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的生物学通路主要作用于血小板活化通路、神经活性配体-受体相互作用通路等, 其功能主要为调节血红素结合、蛋白激酶活性等。结论: 本研究初步揭示了枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的可能的活性成分作用机制, 可为后续的基础研究及临床研究提供线索及依据。

关键词 枳实薤白桂枝汤; 肺栓塞; 网络药理学; 作用机制

Mechanism of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction in the Treatment of Pulmonary Embolism Based on Internet Pharmacology^Δ

WANG Wei¹, GUO Yuanyuan¹, LIAN Yajun², GE Feilin¹, LI Jiayi¹, WANG Tianquan¹, CAO Junling³ (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Dept. of Pharmacy, Dongfang Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the mechanism of Zhishi Xiebai Guizhi decoction in the treatment of pulmonary embolism based on internet pharmacology. **METHODS:** According to *in vivo* processes (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) properties of the drug components, the main chemical components of trichosanthes, citrus aurantium, citrus aurantium, guizhi and magnolia officinalis were obtained through traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). And the encyclopedia of traditional Chinese medicine (ETCM) and traditional Chinese medicines integrated database (TCMID) were used to supply and screen the active components of traditional Chinese medicine. Swiss Target Prediction was adopted to obtain the active ingredient targets. The major targets of pulmonary embolism were obtained from Genecards, online mendelian inheritance in man (OMIM) and DRUGBANK databases. Protein-protein interaction (PPI) was analyzed by using String platform, and PPI network was constructed. Metascape platform was used to analyze “drugs-components-targets” and its involved biological processes and pathways. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct the network of “Zhishi Xiebai Guizhi decoction-pulmonary embolism-pathway”. **RESULTS:** The core active ingredients of Zhishi Xiebai Guizhi decoction in the treatment of pulmonary embolism were quercetin, luteolin, naringenin and caffeic acid, and the core targets were CYP1B1 and DRD2. The biological pathways of Zhishi Xiebai Guizhi decoction in the

^Δ 基金项目: 北京中医药改革专项 (No. 201806)

* 硕士研究生。研究方向: 临床中药与药事管理。E-mail: Wangwei_i818@163.com

通信作者: 博士生导师。研究方向: 药理学及医院药学。E-mail: caojunling72@163.com

treatment of pulmonary embolism mainly acted on the platelet activation pathway and the Neuroactive ligand-receptor interaction pathway, the main functions were regulating heme binding and protein kinase activity. CONCLUSIONS: This study initially reveals the possible mechanism of active ingredients of Zhishi Xiebai Guizhi decoction in the treatment of pulmonary embolism, and provides clues and evidence for follow-up basic and clinical research.

KEYWORDS Zhishi Xiebai Guizhi decoction; Pulmonary embolism; Network pharmacology; Mechanism of action

肺栓塞 (pulmonary embolism, PE) 以血栓栓塞形成最多见,通常指肺血栓栓塞,是指来自静脉系统或右心的血栓阻塞肺动脉主干或其分支引起肺循环障碍的临床和病理生理综合征^[1]。其发病率仅次于冠心病、高血压,如今已成为威胁人类健康的第三大心血管疾病。中药可有效防治肺栓塞,在机制上具有多靶点、层次丰富、疗效稳固和安全性高等特点,尤其是在改善症状方面具有极大潜力^[2]。肺栓塞临床表现为喘息气急、胸痛和咳嗽等症状,与《金匱要略》中胸痹病和咳嗽上气病的典型表现相似,其病因病机一般为瘀血阻于肺脉,造成肺脉痹塞,从而导致肺栓塞^[3]。枳实薤白桂枝汤是治疗中医胸痹病效果良好的经方之一。因此,本研究尝试采用网络药理学方法,通过构建网络模型系统地预测枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞“多成分-多靶点-多途径”的作用特点,以期为进一步研究其治疗肺栓塞的药效物质和作用机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 枳实薤白桂枝汤相关靶点筛选

在中药系统药理学数据库和分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)^[4] (<http://tcmssp.com>) 中搜索枳实、薤白、桂枝、厚朴及瓜蒌五味中药,以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 两个药物体内过程 [吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 及排泄 (excretion), ADME] 属性值进行活性成分初步筛选,并在中医百科全书 (the encyclopedia of traditional Chinese medicine, ETCM)^[5] (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>)、中医药综合数据库 (traditional Chinese medicine integrated database, TCMID) (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>) 中对 5 味中药的活性成分进行补充,利用活性成分 PubChem CID 在 PubChem 数据库^[6] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 中查找活性成分的规范名称、SMILES 结构式并下载 2D 的 SDF 结构文件,筛选成分后,利用下载好的 SDF 结构文件,在 SwissTargetPrediction 数据库^[7] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中进行靶点预测。将预测靶点按照 Probability ≥ 0.5 进行筛选,靶点筛选结束后,为标准化蛋白质靶点信息,统一在 Uniprot 蛋白质数据库^[8] (<https://www.uniprot.org>) 中将化合物作用的蛋白质靶点进行规范。

1.2 肺栓塞相关靶点筛选

以“pulmonary embolism”“PE”及“pulmonary thrombosis”等与肺栓塞相关的疾病为关键词,挖掘 GeneCards 数据库^[9] (<https://www.genecards.org>)、人类孟德尔遗传综合数据库 (online mendelian inheritance in man, OMIM)^[10] ([omim.org\) 和 DrugBank 数据库^{\[11\]} \(<https://www.drugbank.ca/>\) 中调治肺栓塞的潜在靶点。在 Genecards 数据库中,Score 值越高代表该靶点与疾病联系密切。若靶点过多,则设定 Score 值大于中位数的目标靶点为肺栓塞的潜在靶点。合并 3 个疾病数据库靶点后,删除重复值,得到肺栓塞疾病靶点。](http://www.</p></div><div data-bbox=)

1.3 枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞疾病靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

为清晰了解枳实薤白桂枝汤药物相关靶点与肺栓塞疾病靶点间的相互作用,通过 STRING 数据库^[12] (<https://string-db.org/>) 构建药物对治疗肺栓塞潜在靶点的 PPI 网络,设置“Minimum required interaction score”为 0.7 (high confidence)。通过 Cytoscape 3.8.0 构建中药-成分-疾病靶点网络,筛选主要候选靶点。

1.4 枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞疾病功能与通路的富集分析

Metascape 平台^[13] (<http://metascape.org/gp/index.html>) 拥有全面的注释功能和基因注释的数据资料。将枳实薤白桂枝汤调治肺栓塞的靶点录入 Metascape 平台,设置 $P < 0.01$,分析其主要的生物学过程与代谢通路并进行富集分析,保存数据结果并利用生物信息在线作图网站微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对数据进行可视化。

1.5 枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞疾病靶点-通路网络图的构建

运用 CytoScape3.8.0 构建枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞疾病靶点-通路网络图,利用 CytoScape 3.8.0 内置工具分析有效成分及靶点的网络拓扑参数,并根据网络拓扑学参数判断核心靶点及发挥药效的主要活性成分。

2 结果

2.1 枳实薤白桂枝汤活性成分靶点的获取

通过 TCMSP、TCMID 和 ETCM 等 3 个数据库收集枳实薤白桂枝汤中 5 味药材相关成分,根据 ADME 标准筛选后获得潜在活性成分^[4,5,14],其中瓜蒌的活性成分有 13 种,薤白有 5 种,枳实有 22 种,桂枝有 8 种,厚朴有 15 种,薤白和枳实中有 1 种成分相同,为 Naringenin,最终得到 62 种潜在活性成分,见表 1。

2.2 枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的靶点预测

将下载的 SDF 结构文件导入 SwissTargetPrediction 数据库中,对 62 种潜在活性成分进行靶点预测,按 Probability ≥ 0.5 筛选后得瓜蒌潜在作用靶点 44 个,薤白 101 个,枳实 79 个,桂枝 26 个,厚朴 63 个,薤白与枳实中的相同成分 (Naringenin, PubChem CID 439246) 有 11 个靶点;共得到靶点 324 个,将靶

表 1 枳实薤白桂枝汤的主要成分

Tab 1 Main ingredients of Zhishi Xiebai Guizhi decoction

序号	药物	化合物	PubChem CID	数据库来源	靶点数/个
1	瓜蒌 (GL1)	5,8-Tetradecadienoic acid	5312408	ETCM	1
2	瓜蒌 (GL2)	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[(3S,10R,13R)-17-(5-Ethyl-6-methylhept-6-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	6326091	TCMID	1
3	瓜蒌 (GL3)	Bryonolate	52940232	TCMID	3
4	瓜蒌 (GL4)	Lauric acid	3893	TCMID	1
5	瓜蒌 (GL5)	Linolenic acid	5280934	TCMID	7
6	瓜蒌 (GL6)	Noscapine	275196	TCMID	3
7	瓜蒌 (GL7)	Palmitoleic acid	445638	TCMID	6
8	瓜蒌 (GL8)	2-Bromopentadecanoic acid	13615306	TCMID	1
9	瓜蒌 (GL9)	Stigmasteryl glucoside	70699355	TCMID	1
10	瓜蒌 (GL10)	gamma-Aminobutyric acid	119	TCMID	15
11	瓜蒌 (GL11)	Diosmetin	5281612	TCMSP	2
12	瓜蒌 (GL12)	alpha-Spinasterol	5281331	TCMSP	1
13	瓜蒌 (GL13)	7-O-Methyluteolin	5318214	TCMSP	2
14	薤白 (XB1)	Hesperetin	72281	TCMSP	4
15	薤白 (XB2)	beta-Sitosterol	222284	TCMSP	4
16	薤白 (XB3)	(Z)-3-(4-Hydroxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]prop-2-enamide	13939145	TCMSP	3
17	薤白 (XB4)	Quercetin	5280343	TCMSP	90
18	枳实 (ZS1)	Scopoletin	5280460	ETCM	4
19	枳实 (ZS2)	(-)-Synephrine	854067	ETCM	2
20	枳实 (ZS3)	Auraptene	1550607	ETCM	2
21	枳实 (ZS4)	7-[[(2Z)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl]oxy]-2H-1-benzopyran-2-one	1795390	ETCM	2
22	枳实 (ZS5)	5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one	3593	ETCM	4
23	枳实 (ZS6)	Sinensetin	145659	TCMID	1
24	枳实 (ZS7)	Kaempferol 5,7,4'-trimethyl ether	624831	TCMID	1
25	枳实 (ZS8)	Demethynobiletin	358832	TCMID	2
26	枳实 (ZS9)	Hesperetin (1-)	49859576	TCMID	4
27	枳实 (ZS10)	Isosinensetin	632135	TCMID	1
28	枳实 (ZS11)	N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]benzamide	3083797	TCMID	1
29	枳实 (ZS12)	(2R)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	667495	TCMID	3
30	枳实 (ZS13)	Tangeretin	68077	TCMID	1
31	枳实 (ZS14)	(2R)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	45359875	TCMSP	1
32	枳实 (ZS15)	4',5,7-Trimethoxyflavone	79730	TCMSP	1
33	枳实 (ZS16)	5,7,3'-Trihydroxy-5'-methoxyflavanone	42607889	TCMSP	4
34	枳实 (ZS17)	5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	676152	TCMSP	1
35	枳实 (ZS18)	Nobiletin	72344	TCMSP	1
36	枳实 (ZS19)	(2R)-5,7-Dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	1149877	TCMSP	2
37	枳实 (ZS20)	Luteolin	5280445	TCMSP	40
38	枳实 (ZS21)	3',4',5,7-Tetramethoxyflavone	631170	TCMSP	1
39	桂枝 (GZ1)	3,4-Dihydroxybenzoic acid	72	TCMID	8
40	桂枝 (GZ2)	Cinnamaldehyde	637511	TCMID	1
41	桂枝 (GZ3)	cis-Cinnamaldehyde	6428995	TCMID	1
42	桂枝 (GZ4)	Cinnamic acid	444539	TCMID	1
43	桂枝 (GZ5)	cis-2-Coumarate	54714352	TCMID	2
44	桂枝 (GZ6)	3,4-Dihydroxybenzoate	54675866	TCMID	8
45	桂枝 (GZ7)	Cinnamate	5957728	TCMID	1
46	桂枝 (GZ8)	(3R,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(2R,5R)-5-Ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	12303645	TCMSP	4
47	厚朴 (HP1)	Caffeic acid	689043	ETCM	14
48	厚朴 (HP2)	Syringic acid	10742	ETCM	9
49	厚朴 (HP3)	Anonaine	160597	ETCM	4
50	厚朴 (HP4)	2-[4-Hydroxy-3-[(E)-prop-1-enyl]phenyl]-4-prop-2-enylphenol	44241601	ETCM	1
51	厚朴 (HP5)	4,5,6a,7-Tetrahydro-1,11-dihydroxy-2,10-dimethoxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[de, g]quinoline-6-ium	3999	ETCM	1
52	厚朴 (HP6)	(6Ar)-1-methoxy-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de, g]quinolin-2-ol	12308663	ETCM	8
53	厚朴 (HP7)	1-[(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]-6-methoxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-ium-7-ol	4622630	ETCM	1
54	厚朴 (HP8)	Reticulin	10233	ETCM	3
55	厚朴 (HP9)	4-O-Methylhonokiol	155160	TCMID	2
56	厚朴 (HP10)	3,5-Dioxa-11-azapentacyclo[10.7.1.02,6.08,20.014,19]icosa-1(20),2(6),7,14,16,18-hexaene	3462225	TCMID	4
57	厚朴 (HP11)	Asimilobine	25774982	TCMID	8
58	厚朴 (HP12)	Honokiol	72303	TCMID	3
59	厚朴 (HP13)	Magnolol	72300	TCMID	2
60	厚朴 (HP14)	Tetrahydromagnolol	5321851	TCMID	2
61	厚朴 (HP15)	(13R,14S)-3-Hydroxy-13-methyl-12,14,15,16-tetrahydro-11H-cyclopenta[a]phenanthren-17-one	34365085	TCMSP	1
62	薤白、枳实 (A1)	Naringenin	439246	TCMSP	11

点进行合并去重后,得到活性成分相关靶点 157 个。在 OMIM (<https://omim.org>)、GeneCards(<https://www.genecards.org>)及 DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>)数据库中筛选得到疾病相关靶点 2 161 个。将潜在活性成分靶点与疾病靶点进行对比匹配,最终获得与枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞疾病相关的潜在作用靶点 57 个。

2.3 枳实薤白桂枝汤-肺栓塞靶点 PPI 网络的构建

将筛选的枳实薤白桂枝汤活性成分靶点与肺栓塞疾病靶点取交集,并通过网站 (<http://www.interactivenn.net/>)绘制韦恩图,得到枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞共同靶点 57 个,见图 1。进而将靶点提交至 STRING 11.0 平台 (<https://string-db.org>),设置高置信度,最小互动需求得分 (minimum required interaction score)为 0.700 得到枳实薤白桂枝汤靶点 PPI 网络,见图 2。

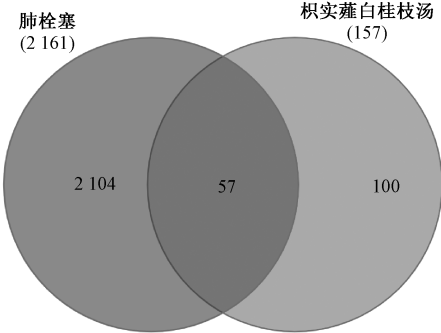


图 1 枳实薤白桂枝汤-肺栓塞靶点韦恩图
Fig 1 Venn Diagram of Zhishi Xiebai Guizhi decoction-pulmonary embolism targets

2.4 靶点功能与通路的富集分析

应用 Metascape 数据平台 (<http://metascape.org>)对枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞相关靶点进行信号通路分析,利用生物信息在线作图网站微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)

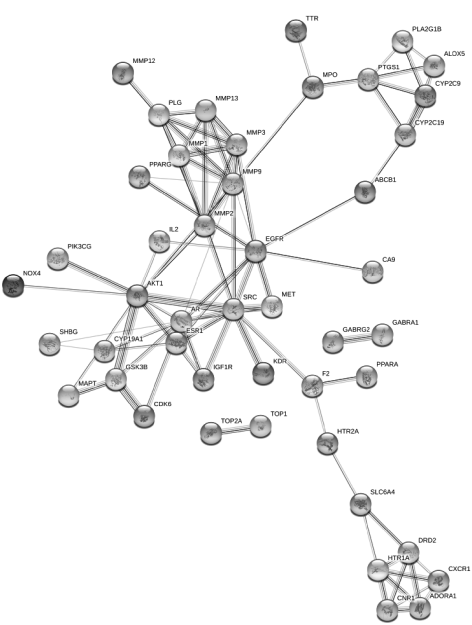


图 2 枳实薤白桂枝汤-肺栓塞靶点 PPI 网络
Fig 2 PPI network of Zhishi Xiebai Guizhi decoction-pulmonary embolism targets

对其结果进行可视化分析。由结果可见,多个靶点的功能与肺栓塞的产生密不可分。枳实薤白桂枝汤参与的通路主要有 IL-17 信号通路、PPAR 信号通路、钙信号通路及血小板活化等,见图 3;参与的生物学过程包括细胞对活性氧的应答、对肽的应答过程、对淀粉状-β-前体蛋白应答过程、对外源物刺激应答过程及氧气含量的应答,对生物化学反应的调控包括炎症反应的调控、调节细胞黏附、激酶活性的正调控、脂质代谢过程的调控及活性氧代谢过程的调控等,见图 4。靶点通路富集结果见表 2。分子功能包括磷酸酶结合、神经介质受体活动、氯离子跨膜转运蛋白活动、血红素结合及激酶结合等,见图 5。细胞组成见图 6。

表 2 枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞靶点的通路富集结果

Tab 2 Enrichment results of target pathway of Zhishi Xiebai Guizhi decoction in the treatment of pulmonary embolism				
代谢途径	LogP	计数	靶点	
hsa01521-EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-5.247 79	7	AKT1,EGFR,GSK3B,IGF1R,KDR,MET,Src	
hsa04080-Neuroactive ligand-receptor interaction	-4.402 73	10	ADORA1,ADORA2A,CNR1,DRD2,F2,GABRA1,GABRG2,HTR1A,HTR2A,PLG	
hsa05205-Proteoglycans in cancer	-5.245 53	9	AKT1,EGFR,ESR1,IGF1R,KDR,MET,MMP2,MMP9,Src	
hsa04726-Serotonergic synapse	-5.949 03	7	ALOX5,CYP2C19,CYP2C9,HTR1A,HTR2A,PTGS1,SLC6A4	
hsa05215-Prostate cancer	-5.059 21	5	AKT1,AR,EGFR,GSK3B,IGF1R	
hsa04657-IL-17 signaling pathway	-6.096 09	5	GSK3B,MMP1,MMP3,MMP9,MMP13	
hsa04913-Ovarian steroidogenesis	-2.367 85	4	ALOX5,CYP11B1,CYP19A1,IGF1R	
hsa05206-MicroRNAs in cancer	-2.330 24	7	CDK6,CYP11B1,EGFR,MET,MMP9,ABCC1,ABCB1	
hsa04611-Platelet activation	-2.312 37	5	AKT1,MYLK,PIK3CG,PTGS1,Src	
hsa03320-PPAR signaling pathway	-3.767 31	4	FABP3,MMP1,PPARA,PPARG	
hsa04540-Gap junction	-5.419 44	4	DRD2,EGFR,HTR2A,Src	
hsa04020-Calcium signaling pathway	-2.050 05	4	ADORA2A,EGFR,HTR2A,MYLK	
hsa04727-GABAergic synapse	-2.814 98	3	GABRA1,GABRG2,Src	

2.5 枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞靶点-通路网络图的构建

运用 CytoScape 3. 8. 0 构建枳实薤白桂枝汤成分-肺栓塞靶点-通路网络,见图 7;图中,圆形节点为药物的活性成分,菱形为靶点,正六边形为通路,节点的面积代表其度值,面积越大说

明该节点越重要。Cytoscape 网络分析结果表明,成分与靶标之间关系复杂,“一对多”即 1 个成分作用于多个靶标,“多对一”即多个成分作用于 1 个靶标,参与通路调节,体现枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞“多成分、多靶点、多通路”特点。

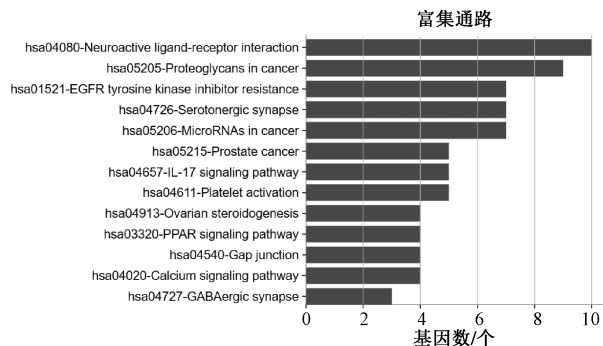


图3 枳实薤白桂枝汤主要成分潜在靶点的 KEGG 分析
Fig 3 KEGG analysis of potential targets of main components of Zhishi Xiebai Guizhi decoction

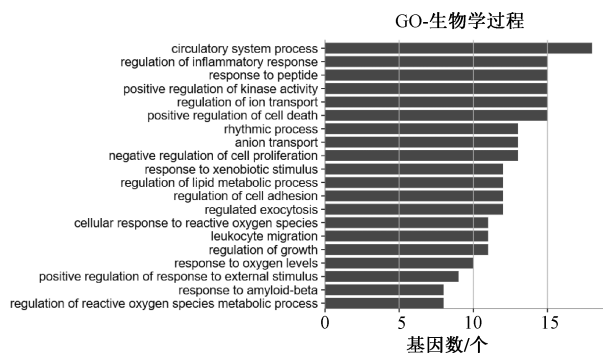


图4 枳实薤白桂枝汤主要成分潜在靶点的 GO-生物学过程分析
Fig 4 GO-biological process analysis of potential targets of main components of Zhishi Xiebai Guizhi decoction

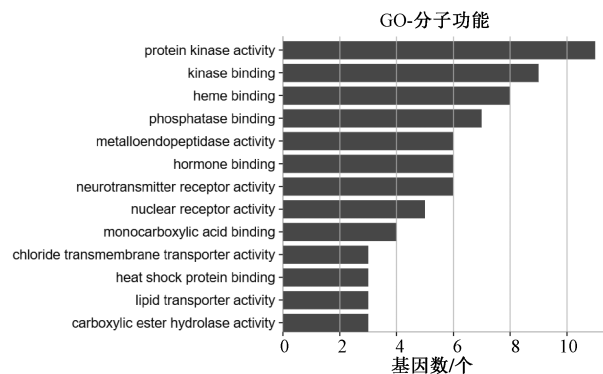


图5 枳实薤白桂枝汤主要成分潜在靶点的 GO-分子功能分析
Fig 5 GO-molecular function analysis of potential targets of main components of Zhishi Xiebai Guizhi decoction

3 讨论

目前,肺栓塞尚没有统一的中医病名和证型,相关研究结果表明,瘀血内阻证为其主要证型,属中医“胸痹”“喘证”等范畴^[3]。《金匱要略》胸痹心痛短气病脉证并治中云:“胸痹之病,喘息咳唾,胸背痛,短气,寸口脉沉而迟,关上小紧数,栝蒌薤白白酒汤主之。”该病的临床表现为胸闷、呼吸困难和胸痛,

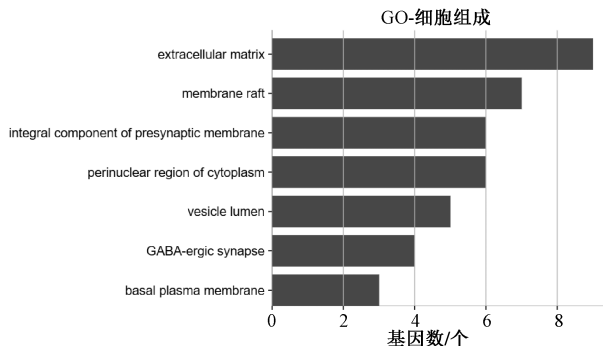


图6 枳实薤白桂枝汤主要成分潜在靶点的 GO-细胞组成分析
Fig 6 GO-cell component analysis of potential targets of main components of Zhishi Xiebai Guizhi decoction

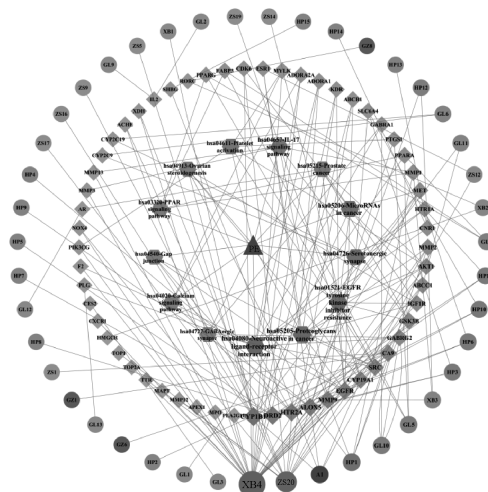


图7 枳实薤白桂枝汤-肺栓塞靶点-通路网络图
Fig 7 Zhishi Xiebai Guizhi decoction-pulmonary embolism-pulmonary embolism targets-pathway network diagram

与“胸痹”“痰饮”等表现相似;且“胸痹心中痞气,气结在胸,胸满,胁下抢逆心,枳实薤白桂枝汤主之,人参汤亦主之”^[15]。枳实薤白桂枝汤为治疗胸痹之要方,主治胸阳不振、痰浊阻滞的胸痹^[16]。近年来的研究结果发现,中医治疗肺栓塞具有疗效确切、不良反应发生率低、预后较好及患者生活质量提高等优势^[17-19]。刘艳杰等^[20]等通过临床研究观察祛痰救肺汤辅助rt-PA溶栓对急性肺栓塞的治疗效果,结果表明,该方法治疗急性肺栓塞疗效显著。刘雪莲等^[21]采用常规溶栓抗凝方案联合活血散结方治疗急性肺栓塞,治疗效果显著,明显改善了临床症状。

本研究通过网络药理学方法,初步筛选出枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的主要活性成分为槲皮素、木犀草素、柚皮素和咖啡酸等,上述成分均有不同程度的抗炎作用。急性肺栓塞期存在广泛炎症反应,其早期血浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素(IL)6含量有所升高^[22-23]。因此,枳实薤白桂枝汤的主要活性成分可能通过发挥抗炎作用治疗肺栓塞。槲皮素可抑制血小板激活因子(PAF2)诱发的血小板黏附,且呈浓度依

赖性;还能通过抑制炎症因子的形成而发挥抗炎作用^[24]。木犀草素预处理能够促进巨噬细胞表型转化,由促炎作用的 M1 型向抗炎作用的 M2 型转化,并抑制巨噬细胞的凋亡^[25]。柚皮素可能通过 PI3K/Akt 信号通路抑制血小板聚集^[26-27]。咖啡酸可以通过抑制细胞 MAPK 信号通路的传导,减少细胞炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白 1 和 TNF- α 等的释放^[28-30]。因此,枳实薤白桂枝汤可能主要通过槲皮素、木犀草素、柚皮素和咖啡酸等治疗肺栓塞。

本研究结果发现,枳实薤白桂枝汤的作用靶点主要集中在 CYP1B1 和 DRD2。细胞色素 P450(CYP)1B1 是 CYP1 家族的一个亚型,参与多环芳香烃等前致癌物的代谢活化,该基因的异常表达常与血管的形成及肺癌的发生、发展有着密切的关系^[31-33]。多巴胺受体(DRD2)调节中脑多巴胺释放,其胞吐释放与胞内钙离子浓度增加密切相关,也抑制 cAMP 介导的信号传导。近年一项研究结果表明,在急性脑卒中星形胶质细胞上激活 DRD2 可以减少神经炎症^[34]。枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的通路主要有神经活性配体-受体相互作用、血小板活化及 IL-17 信号通路等。IL-17 A 与血小板聚集相关,其可能通过诱导线粒体通透性转换孔开放而促进血小板聚集,进而促进深静脉血栓的形成^[35]。

综上所述,枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的机制可能是通过抑制血栓素、前列腺素等促凝物质的形成,从而抑制血小板聚集,降低凝血因子的活性,减少血栓栓塞的出现。此外,其发挥疗效的生物学过程中,通过研究细胞对活性氧的反应、调节活性氧代谢过程和对氧气水平的反应,认为其可能通过调节血氧饱和度,增强肺部换气功能,从而起到减少肺栓塞发生的作用。本研究通过对枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞的分子机制和生物学过程的探讨,以期临床应用枳实薤白桂枝汤治疗肺栓塞提供科学依据,同时为后续研究其药效物质基础和作用机制提供理论基础。

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组. 急性肺栓塞诊断与治疗中国专家共识(2015)[J]. 中华心血管病杂志,2016,44(3):197-211.

[2] 何敢想,尹红,王朝生. 中药防治下肢深静脉血栓形成后肺栓塞的临床观察[J]. 湖北中医杂志,2009,31(9):20-21.

[3] 王峰,王植荣,王庆海,等. 急性肺血栓栓塞症的中医证型和证素分布规律研究[J]. 中国医药指南,2019,17(1):1,3.

[4] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Chem-inform,2014,6:13.

[5] Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine[J]. Nucleic Acids Res. 2019; 47(D1): D976-D982.

[6] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D1102 - D1109.

[7] Daina A, Michielin O, Zoete V. Swiss Target Prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of

small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.

[8] UniProt Consortium. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Res,2019,47(D1): D506-D515.

[9] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.

[10] McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Online Mendelian Inheritance in Man? [EB/OL]. [2020-07-08] (2020-10-14). <https://omim.org>.

[11] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1074-D1082.

[12] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.

[13] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.

[14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.

[15] 李万辉. 急性肺栓塞的诊断与治疗进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 35(4): 40-43.

[16] 苟玉东, 徐双, 姜晓旭, 等. 枳实薤白桂枝汤的研究进展[J]. 国医论坛, 2018, 33(3): 68-70.

[17] 陆学超, 王燕青, 闫文霞. 中西医结合治疗急性肺栓塞临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1922-1924.

[18] 杜玲, 李明路, 王俊明. 中西医结合治疗下肢深静脉血栓所致肺栓塞 98 例临床观察[J]. 四川中医, 2016, 34(5): 88-89.

[19] 李平. 抗凝剂联合中医经方治疗肺栓塞的疗效探讨[J]. 当代医学, 2015, 21(8): 152-153.

[20] 刘艳洁, 刘雪莲, 白洁, 等. 祛痰救肺汤辅助 rt-PA 溶栓对急性肺栓塞的治疗效果及对凝血指标、TNF- α 及 D-D 水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 171-174.

[21] 刘雪莲, 刘艳洁, 白洁, 等. 活血散结方结合常规溶栓抗凝治疗急性肺栓塞的效果分析[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 2021-2024.

[22] 胡赞歌. 免急性肺栓塞期肢体缺血处理对溶栓后肺缺血/再灌注损伤的保护作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2016: 12-21.

[23] 王灵聪, 张微, 夏国莲, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠炎症因子的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(6): 506-508, 515.

[24] 臧宝霞, 金鸣, 吴伟, 等. 槲皮素抑制血小板活化因子受体结合作用的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2004, 23(2): 105-107.

[25] 潘德锋. 木犀草素通过 PI3K/Akt 途径调节巨噬细胞表型转化抑制凋亡的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017: 45.

[26] 黄曼婷. 柚皮素通过 P2Y12 受体信号通路抑制血小板活性和动脉血栓形成[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017: 24-53.

[27] 黄曼婷, 吴焕林, 徐丹苹. 柚皮素通过 PI3K/Akt 通路拮抗血小板聚集的体外研究[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 517-522.

[28] 刘明江. 咖啡酸抗 LPS 诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症损伤作用及其分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2014; 60-70.

[29] Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid (EA) in cardiac tissue of diabetic mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6; 33.

[30] Moon MK, Lee YJ, Kim JS, et al. Effect of Caffeic Acid on Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32 (8): 1371-1377.

[31] 刘月平, 张玲玲, 王顺平, 等. CYP1B1 基因多态性与食管鳞状细胞癌易感性及预后关系的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(33): 4122-4127.

[32] 梁戈玉, 浦跃朴, 尹立红, 等. 人工修饰双等位基因特异性引物扩增法检测 CYP1B1 多态性与肺癌易感性的关系[J]. *环境与职业医学*, 2005(1): 4-7.

[33] 高峰, 常福厚, 陈丽霞, 等. CYP1A1、CYP1B1、VEGF、CA IX 基因与肺癌关系的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2014, 34(2): 151-152, 156.

[34] Ito M, Aswendt M, Lee AG, et al. RNA-Sequencing Analysis Revealed a Distinct Motor Cortex Transcriptome in Spontaneously Recovered Mice After Stroke [J]. *Stroke*, 2018, 49(9): 2191-2199.

[35] 丁培武. IL-17A 在深静脉血栓形成中的作用及其机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018; 20-56.

(收稿日期: 2020-10-14)

(上接第 261 页)

通过表 1、图 4 的结果可知, 药对组大鼠血清炎症因子除 IL-6 含量略低以外, 其他 5 个指标含量与滋肾通关方组相比虽无统计学意义, 但均高于滋肾通关方组, 说明药对组对肾盂肾炎的炎症的治疗作用相比滋肾通关方组要低。究其原因, 可能是滋肾通关方中肉桂反佐配伍所起的作用能够促进黄柏、知母中活性成分下调 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1 及 CXCL2 等炎症因子的表达, 影响下游炎症因子的免疫应答, 进而起到抗炎以及保护肾脏等泌尿系统器官的双向调节作用。

在实验过程中也出现了设计不够合理、不够完善的问题。在检测模型是否成功的指标中, 还可以增加肾重系数、体重指数和肾功能的生化指标测定以及细菌培养(尿液、肾脏组织细菌培养)等项目, 为了结果的准确性、可靠性, 课题组将会对以上不足之处进行深入研究。

由实验结果可见, 不同组大鼠间的药效学数据的统计学差异并不太显著, 且同一组内指标含量差异大, 究其原因, 可能是由于个体差异大或者样本数量不足造成的。为了结果的准确性、可靠性, 课题组将会进一步进行滋肾通关方配伍的药效学研究。

参考文献

[1] 周栋, 孙伟, 何伟明, 等. 急性肾盂肾炎大鼠模型的建立与观察[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007(1): 30-32.

[2] 高新蕾, 陈锦英, 葛新, 等. 致肾盂肾炎大肠埃希菌毒力的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(7): 617-620, 675.

[3] 张镭, 孙凤军, 冯伟, 等. 临床尿路感染分离大肠埃希菌的耐药性及毒力分析[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(5): 420-425.

[4] 邓鼎森, 刘鹏, 赖日勇. 尿路感染大肠埃希菌的分型与相关性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(24): 5562-5563, 5569.

[5] 赵德善, 杨红. 核素肾皮质显像在急性肾盂肾炎中的作用[J]. *国外医学: 放射医学核医学分册*, 2003, 27(6): 266-269.

[6] 姚静, 杨彦坤, 杨柳, 等. 急性肾盂肾炎发病机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(6): 1071-1075.

[7] 李华伟. 滋肾通关胶囊对尿路感染的预防作用[J]. *河南中医*, 2014, 34(5): 971-972.

[8] 安金龙. 滋肾通关胶囊治疗肾虚湿热淋证临床研究及作用机制探讨[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009; 26-27.

[9] 孙伟, 周栋, 高坤. 滋肾通关胶囊治疗肾虚湿热淋证 27 例临床

疗效观察[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006(10): 602-603.

[10] 周栋. 滋肾通关胶囊治疗肾虚湿热淋证的疗效观察和作用机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2005; 13-17.

[11] 李碧怡, 彭嘉健, 邝敏华, 等. 八正散对急性肾盂肾炎模型大鼠炎症因子和局部免疫功能的影响[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(12): 2133-2136.

[12] 张志亮, 刘云, 邓智建. 热淋清颗粒辅助治疗急性肾盂肾炎膀胱湿热证[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(4): 490-493.

[13] 郑林, 陈浩, 孙慧园, 等. 头花蓼提取物在肾盂肾炎模型与正常大鼠体内的组织分布比较研究[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(8): 1008-1016.

[14] 谢林, 顾向晨, 王怡. 肾盂肾炎动物模型制作研究现状[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(1): 84-86.

[15] 姚静, 杨彦坤, 杨柳, 等. 基于细胞调控因子探讨血尿胶囊对急性肾盂肾炎模型大鼠的作用及机制[J]. *中成药*, 2017, 39(8): 1705-1709.

[16] 雷雨, 王光强, 朱德生. Mkat2 转化过的大肠埃希氏菌制备的急性肾盂肾炎小鼠模型[J]. *实验动物科学*, 2017, 34(1): 16-19.

[17] 李敏, 那宇, 韦加美, 等. 不开腹单纯膀胱内注射制备急性肾盂肾炎大鼠模型[J]. *安徽医药*, 2015, 19(5): 846-849.

[18] 何立群, 龚学忠, 郑平东, 等. 单纯膀胱内注射不结扎输尿管制备急性肾盂肾炎大鼠模型[J]. *上海实验动物科学*, 2003(3): 146-147, 156-161.

[19] 姜廷新, 刘艳. 血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎活性部位作用临床探讨[J]. *黑龙江科学*, 2018, 9(9): 24-25.

[20] 姚静. 血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎活性部位筛选及作用机制研究[D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2017; 10-21.

[21] 梁国强, 金伟民, 倪道磊, 等. 滋肾丸对肾盂肾炎大鼠 Toll 样受体及其下游信号转导通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(7): 1914-1917.

[22] 蒋春波, 倪道磊, 金伟民, 等. 滋肾通关方对慢性肾盂肾炎大鼠尿 SIgA 和 T 淋巴细胞亚群表达的影响[J]. *江苏中医药*, 2014, 46(4): 77-79.

[23] Liang G, Tang H, Ni D, et al. Zishenwan Decreases Kidney Damage in Recurrent Urinary Tract Infection through the Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Signal [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5968657.

(收稿日期: 2020-12-03)