

基于网络药理学挖掘银翘马勃散治疗 喉源性咳嗽的作用机制[※]

张文强 肖 航 熊少斌 李可可 胡君霞 许越淇 严诏琦 刘良倚[▲]

摘要 目的:运用网络药理学挖掘银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的作用机制。**方法:**运用TC-MSP数据库,并将生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18作为筛选条件,从而获得银翘马勃散的主要有效成分和作用靶点,同时将获得的作用靶点导入UniProt数据库提取相应的基因名称;运用GeneCards平台获得喉源性咳嗽的相关靶点;运用Venny 2.1.0在线工具将所获得的药物和疾病靶点取交集,并通过Cytoscape 3.8.0软件,构建中药成分-靶点网络图;运用STRING数据库构建银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的蛋白PPI网络互作图;进行拓扑分析并筛选出银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的核心靶点;利用Metascape数据库对药物、疾病交集核心靶点进行GO富集分析和KEGG通路富集分析。**结果:**筛选出银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的76个有效成分,相对应的基因靶点215个;喉源性咳嗽相关靶点1399个;其中,木犀草素、槲皮素、山柰酚、β-谷甾醇、β-胡萝卜素、汉黄芩素、柱头酚等可能是银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的关键成分;涉及AKT1、TP53、TNF、ESR1、MYC、EGFR、IL6、CAV1等26个核心靶点。KEGG通路富集结果提示这些靶点参与TNF信号通路、C型凝集素受体信号通路、RIG-I样受体信号通路、Toll样受体信号通路、NOD样受体信号通路、IL-17信号通路等。**结论:**银翘马勃散中的活性成分能通过多靶点、多通路起到治疗喉源性咳嗽的作用。

关键词 银翘马勃散;喉源性咳嗽;网络药理学;通路;作用机制

喉源性咳嗽是著名耳鼻喉专家干祖望所提出的以“咽痒作咳”为主要特征的阵发性痉挛咳嗽^[1]。其临床表现为咽痒即咳、少痰或无痰,遇寒冷空气、刺激性气味时加重^[2]。近年来因为气候和环境的改变,该病发病率逐渐上升^[3]。西药治疗方案主要以抗生素和激素为主,不仅疗效不佳,且易导致抗生素的耐药,近年来的临床报告显示,中医药治疗喉源性咳嗽效果显著,且不良反应小^[4]。刘良倚教授常以银翘马勃散加减治疗各类咳嗽,并取得良好的临床疗效^[5]。黄明儒等^[6]发现银翘马勃散联合穴位贴敷治疗喉源性咳嗽能够有效缓解患者的症状,临床疗效显著。但目前关于喉源性咳嗽的病因仍不十分明确,还未形成系统和规范的认识^[7],同时,对药物治疗喉源性咳嗽的作用机制

也鲜有挖掘。

银翘马勃散出自清代吴鞠通的《温病条辨》,该方具有清热、解毒、利咽、除湿的功效。该方组成为金银花、连翘、马勃、牛蒡子、射干。方中金银花、连翘清热解毒、轻宣散邪;牛蒡子疏散风热、解毒利咽散结;射干解毒、消痰、利咽;马勃清肺利咽、止血。诸药配伍使上焦郁热得除,肺气得宣,咳嗽得治。现代药理学研究中,金银花含有萜类化合物、黄酮类化合物等有效成分,具有消炎抗菌、降血脂、抗内毒素、抗氧化等作用^[8]。连翘含有连翘苷、连翘酯苷等有效成分,具有抗病毒、抗炎镇痛、抗菌、抗氧化等作用^[9]。牛蒡子含有木脂素类、挥发油、脂肪油类、帖类等有效成分,具有抗菌、抗病毒、扩张血管、抗肿瘤、降血糖等作用^[10]。射干含有鸢尾苷、射干醇等有效成分,具有抗炎、抗病原微生物、抗溃疡等作用^[11]。马勃含有甾体化合物、萜类化合物、酰胺类化合物等有效成分,具有抗炎、止咳、止血、抗肿瘤等作用^[12]。这提示银翘马勃散治疗喉源性咳嗽有确切的依据。但是中药复方含有众多化合物成分,并作用于多种细胞靶标,故难以用常规方法分析其协同作用机制。本研究通过网络药理学

[※]基金项目 国家自然科学基金项目(No.81860826);江西省肺系疾病临床医学研究中心(No.赣科发社字[2019]44号);江西省中医疫病重点研究室(No.赣中医药科教学[2021]3号);2021年度江西中医药大学校级研究生创新专项课题(No.JZYC21S03)

[▲]通信作者 刘良倚,男,博士研究生导师,主任医师。主要从事呼吸疾病的中医临床研究。E-mail:llj6505@163.com

• 作者单位 江西中医药大学(江西 南昌 330006)

挖掘银翘马勃散的有效成分及靶点,分析药物与疾病复杂和多层次的交互网络,并进行可视化网络图的构建,进而阐明银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的潜在分子机制,为诊疗、新药开发提供新思路。

1 资料与方法

1.1 中药活性成分和潜在作用靶点的筛选和获取 以银翘马勃散中金银花、连翘、牛蒡子、射干、马勃五味中药为关键词,分别录入 TCMSP 数据库(<http://sp.nwu.edu.cn/tcm-spsearch.php>),并从中得到相关化学成分,将口服生物利用度(Oral Bioavailability, OB)≥30% 和类药性(Drug Likeness, DL)≥0.18 作为筛选条件,从而得到其活性成分,并以此挖掘其潜在作用靶点。利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>),将得到的作用靶点进行匹配,并进行基因标准化处理,以便后续和疾病基因配对。

1.2 疾病靶点的获取 以“laryngeal cough”为关键词,在数据库 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)中检索,得到有关喉源性咳嗽的靶点信息。

1.3 药物-疾病共同靶点的获取 分别将“1.1”中获得的基因标准化靶点与“1.2”中获得的喉源性咳嗽疾病的靶点,在 Venny 2.1 平台录入,取其交集,并绘制韦恩图,最终得到银翘马勃散与喉源性咳嗽的共同靶点及数量。

1.4 药物-成分-靶点网络图的构建 将“1.3”中所得到的共同靶点与“1.1”中获得的活性成分进行筛选匹配,将获得的数据与共同靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,构建药物-成分-靶点网络图。网络图中的节点(node)代表药物、成分和靶点;边(edge)代表药物、

有效成分和靶点之间的相互作用关系。利用该软件中的“Network Analyzer”功能进行数据分析并记录,以便后续分析。

1.5 共同靶点 PPI 网络构建与核心靶点的获取 将“1.3”所获得的共同靶点导入 STRING 在线分析平台(<https://www.string-db.org/>),物种类别选择“Homo sapiens”,并分析获得蛋白质-蛋白质相互作用(Protein protein Interaction, PPI)网络图。将所得数据导入 Cytoscape 3.8.0 软件,根据 Between 值大小进行排序筛选,得到药物治疗疾病的核心靶点。

1.6 GO 富集分析、KEGG 通路富集分析 将“1.5”得到的核心靶点导入 Metascape 在线分析工具(<https://metascape.org/>),并将物种类别设置为“H. sapiens (26)”,分别进行(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路、GO Molecular Functions、GO Biological Processes、GO Cellular Components 富集分析,将得到的数据按照 Score 分值进行筛选,选取符合条件的前 10 条 KEGG 通路、前 13 条生物过程(Biological Processes, BP)、前 7 条细胞组成(Cellular Component, CC)、前 10 条分子功能(Molecular Function, MF),并进行数据可视化处理。

2 结果与分析

2.1 银翘马勃散活性成分及靶点获取 通过 TCMSP 数据库,共检索出活性成分 76 个,其中金银花 23 个、连翘 23 个、牛蒡子 8 个、射干 17 个、马勃 5 个。去除重复和无靶点对应的成分后,一共得到 33 个活性成分;共获取药物有效成分潜在作用靶点 215 个。见表 1。

表 1 银翘马勃散活性成分

来源	有效成分	分子编码	OB(%)	DL	来源	有效成分	分子编码	OB(%)	DL
金银花	Mandenol	MOL001494	42.00	0.19	连翘	wogonin	MOL000173	30.68	0.23
金银花	Ethyl linolenate	MOL001495	46.10	0.20	连翘	kaempferol	MOL000422	41.88	0.24
金银花	phytofluene	MOL002707	43.18	0.50	连翘	luteolin	MOL000006	36.16	0.25
金银花	Eriodyctiol (flavanone)	MOL002914	41.35	0.24	连翘	quercetin	MOL000098	46.43	0.28
金银花	(-)-(3R,8S,9R,9aS,10aS)-9-ethenyl-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-2,3,9,9a,10,10a-hexahydro-5-oxo-5H,8H-pyrano[4,3-d]oxazolo[3,2-a]pyridine-3-carboxylic acid_qt	MOL003006	87.47	0.23	连翘	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	MOL003283	66.51	0.39
金银花	secologanic dibutylacetal_qt	MOL003014	53.65	0.29	连翘	Onjixanthone I	MOL003370	79.16	0.30
金银花	beta-carotene	MOL002773	37.18	0.58	连翘	(3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	MOL003290	52.30	0.48
金银花	ZINC03978781	MOL003036	43.83	0.76	连翘	FORSYTHINOL	MOL003322	81.25	0.57

续表

来源	有效成分	分子编码	OB(%)	DL	来源	有效成分	分子编码	OB(%)	DL
金银花	Chryseriol	MOL003044	35.85	0.27	连翘	(+)-pinoresinol monomethyl ether	MOL003295	53.08	0.57
金银花	kryptoxanthin	MOL003059	47.25	0.57	连翘	ACon1_001697	MOL003306	85.12	0.57
金银花	4,5'-Retro-.beta.,.beta.-Carotene-3,3'-dione,4',5'-didehydro-	MOL003062	31.22	0.55	连翘	3beta-Acetyl-20,25-epoxydammarane-24alpha-ol	MOL003315	33.07	0.79
金银花	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	MOL003095	51.96	0.41	连翘	(+)-pinoresinol monomethyl ether-4-D-beta-glucoside_qt	MOL003308	61.20	0.57
金银花	7-epi-Vogeloside	MOL003101	46.13	0.58	连翘	hyperforin	MOL003347	44.03	0.60
金银花	Caeruloside C	MOL003108	55.64	0.73	连翘	adhyperforin	MOL003348	44.03	0.61
金银花	Centauroside_qt	MOL003111	55.79	0.50	连翘	β-amyrin acetate	MOL003344	42.06	0.74
金银花	Ioniceracetalides B_qt	MOL003117	61.19	0.19	连翘	beta-sitosterol	MOL000358	36.91	0.75
金银花	XYLOSTOSIDINE	MOL003124	43.17	0.64	连翘	Mairin	MOL000211	55.38	0.78
金银花	dinethylsecologanoside	MOL003128	48.46	0.48	连翘	(-)-Phillygenin	MOL003330	95.04	0.57
金银花	beta-sitosterol	MOL000358	36.91	0.75	连翘	20(S)-dammar-24-ene-3β,20-diol-3-acetate	MOL003281	40.23	0.82
金银花	kaempferol	MOL000422	41.88	0.24	连翘	arctiin	MOL000522	34.45	0.84
金银花	Stigmasterol	MOL000449	43.83	0.76	连翘	Lactucasterol	MOL003365	40.99	0.85
金银花	luteolin	MOL000006	36.16	0.25	连翘	PHILLYRIN	MOL003305	36.40	0.86
金银花	quercetin	MOL000098	46.43	0.28	连翘	bicuculline	MOL000791	69.67	0.88
射干	isovitexin	MOL002322	31.29	0.72	牛蒡子	neoarctin A	MOL010868	39.99	0.27
射干	Dinatin	MOL001735	30.97	0.27	牛蒡子	arctiin	MOL000522	34.45	0.84
射干	Stigmasterol	MOL000449	43.83	0.76	牛蒡子	beta-sitosterol	MOL000358	36.91	0.75
射干	Rhamnazin	MOL000351	47.14	0.34	牛蒡子	kaempferol	MOL000422	41.88	0.24
射干	isorhamnetin	MOL000354	49.60	0.31	牛蒡子	Supraene	MOL001506	33.55	0.42
射干	anhydrobelachinal	MOL003741	43.57	0.78	牛蒡子	beta-carotene	MOL002773	37.18	0.58
射干	ardisianone A	MOL003742	44.22	0.25	牛蒡子	(3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	MOL003290	52.30	0.48
射干	belachinal	MOL003743	31.24	0.64	牛蒡子	Cynarin(e)	MOL007326	31.76	0.68
射干	belamcandal	MOL003744	30.07	0.67	马勃	ergosta-7,22-diene-3β-ol	MOL000798	43.51	0.72
射干	dihydrokaempferide	MOL003753	50.56	0.27	马勃	ergosta-7,22-dien-3-one	MOL013051	44.88	0.72
射干	epianhydrobelachinal	MOL003754	43.57	0.78	马勃	ergosta-7,22-dien-3-one(MOL000816	44.88	0.72
射干	iristectorene B	MOL003757	32.56	0.42	马勃	beta-sitosterol	MOL000358	36.91	0.75
射干	Iristectorigenin (9Cl)	MOL003758	71.55	0.34	马勃	[(2R)-2,3-dihydroxypropyl] (Z)-octadec-9-enoate	MOL002882	34.13	0.30
射干	Iristectorigenin A	MOL003759	63.36	0.34					
射干	Irolone	MOL003769	46.87	0.36					
射干	Mangiferolic acid	MOL003773	36.16	0.84					
射干	luteolin	MOL000006	36.16	0.25					

2.2 喉源性咳嗽基因靶点获取 通过 GeneCards 数据库共获得喉源性咳嗽相关基因靶点 1399 个。

2.3 药物-疾病共同靶点获取 分别将筛选后的药物和疾病基因靶点在 Venny 2.1 平台录入,取其交集,并绘制韦恩图,最终得到共同基因靶点 112 个。见图 1。

2.4 药物-成分-靶点网络图构建 将药物、活性成分、共同靶点数据导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,构建三

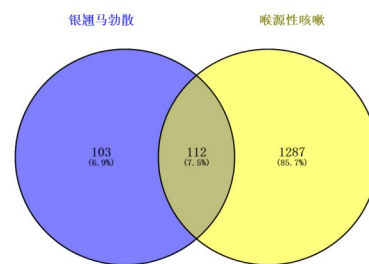


图1 药物-疾病共同靶点韦恩图

者网络图。其中黄色元素代表银翘马勃散的5种药物；棕色元素代表药物和疾病112个共同靶点；紫色元素代表银翘马勃散中22种活性成分(11种活性成分靶点和疾病靶点无交集,予以删除),单个元素大小代表相互关系程度,越大说明该成分在银翘马勃散中发挥的作用越明显。结果明显发现银翘马勃散中的木犀草素(luteolin)、槲皮素(querعتin)、山柰酚(kaempferol)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、β-胡萝卜素(beta-carotene)、汉黄芩素(wogonin)、柱头甾醇(Stigmasterol)代表值相对较大。其中,木犀草素见于金银花、连翘、射干中;槲皮素见于金银花、连翘中;山柰酚见于金银花、连翘、牛蒡子中;β-谷甾醇见于金银花、连翘、牛蒡子、马勃中;β-胡萝卜素见于金银花、牛蒡子中;汉黄芩素见于连翘中;柱头甾醇见于金银花中。结果表明这些成分具有相互协同治疗喉源性咳嗽的作用,同时也说明中药复方是通过多成分、多靶点起到治疗喉源性咳嗽的作用。见图2。

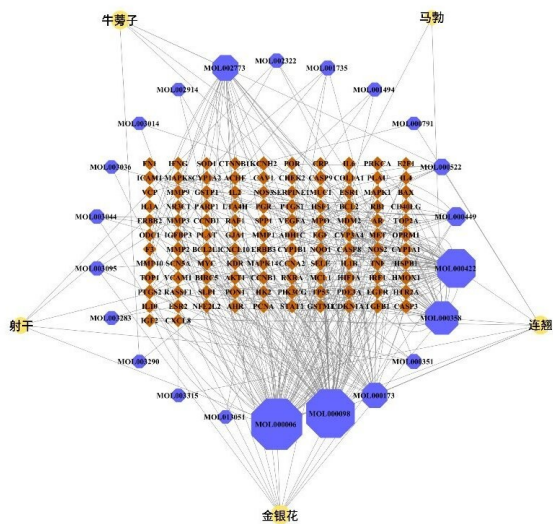


图2 药物-成分-靶点-疾病相互作用图

2.5 靶点基因PPI网络图构建 将112个共同基因录入STRING在线分析平台,将物种设置为人类(Homosapiens),并分析得到PPI网络图,图中节点数112,边数2151,平均节点度38.4,每条边代表蛋白间的相互作用关系。将得到的数据导入Cytoscape 3.8.0软件中,根据Between值进行排序筛选,得到核心靶点分别为AKT1(蛋白激酶B)、TP53(肿瘤抑制基因)、TNF(肿瘤坏死因子)、ESR1(雌激素受体α)、MYC(原癌基因)、EGFR(表皮生长因子受体)、IL6(白介素6)、CAV1(小窝蛋白-1),预测在治疗过程中发挥关键作用的是这些核心靶点。见图3、图4。

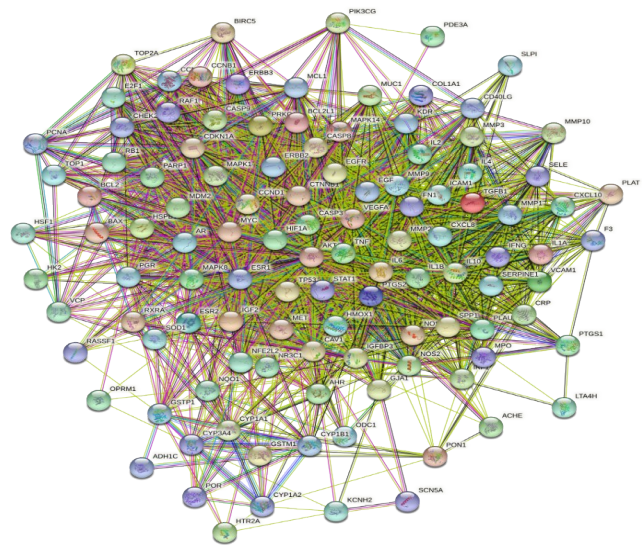


图3 银翘马勃散“成分-靶点”蛋白互作PPI图

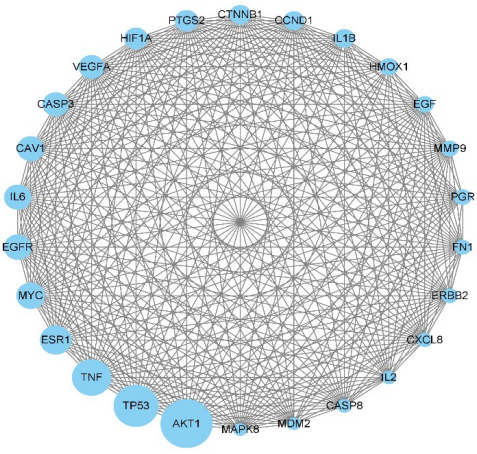


图4 “成分-疾病”核心靶点网络图

2.6 GO富集分析 将上述得到的核心靶点录入Metascape平台进行通路信号分析,并通过生物信息学平台对结果进行可视化分析。共选取与研究有关的前13条生物过程(Biological Processes, BP),如:血管内皮生长因子产生(vascular endothelial growth factor production)、RNA聚合酶II启动子转录响应缺氧的阳性调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia)、乳腺肺泡发育(mammary gland alveolus development)、阳性调节发热(positive regulation of fever generation)、调节一氧化氮合酶活性(regulation of nitric-oxide synthase activity)等;前7条细胞组成(Cellular Component, CC),如:转录抑制复合物(transcription repressor complex)、膜筏(membrane raft)、血小板α粒腔(platelet alpha granule lumen)等;前10条分子功能

(Molecular Function, MF), 如: 一氧化氮合酶调节活性 (nitric-oxide synthase regulator activity)、细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、ATP 酶结合 (ATPase binding)、生长因子受体结合 (growth factor receptor binding) 等。见表2、图5。

2.7 KEGG 通路富集分析 将上述核心靶点录入 Metascape 平台进行通路信号分析, 并通过生物信息学平台对结果进行可视化分析。筛选出符合研究的前10条关键通路: 癌症通路 (Pathways in cancer)、人巨细胞病毒感染 (Human cytomegalovirus infection)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、C 型凝集素受

体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway)、RIG-I 样受体信号通路 (IRIG-I-like receptor signaling pathway)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、甲型流感 (Influenza A)、神经变性的途径 - 多种疾病 (Pathways of neurodegeneration - multiple diseases)、NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)。其中, 与喉源性咳嗽相关的通路可能是 C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、RIG-I 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路等。见表3、图6。

表2 银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的GO分析

类型	编号	作用途径	得分	基因数目	
生物过程	GO:0010573	vascular endothelial growth factor production (血管内皮生长因子的产生)	51	4	
	GO:0061419	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia (RNA 聚合酶 II 启动子转录响应缺氧的正调控)	41	3	
	GO:0060749	mammary gland alveolus development (乳腺肺泡发育)	38	5	
	GO:0061377	mammary gland lobule development (乳腺小叶发育)	38	5	
	GO:0031622	positive regulation of fever generation (发热的积极调节)	38	3	
	GO:1903798	regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA (miRNA 调控参与基因沉默的 miRNA 的产生)	37	5	
	GO:0070141	response to UV-A (对 UV-A 的反应)	36	4	
	GO:0070920	regulation of production of small RNA involved in gene silencing by RNA (调节 RNA 参与基因沉默的小 RNA 的产生)	36	5	
	GO:0031620	regulation of fever generation (调节发热的产生)	34	3	
	GO:0031652	positive regulation of heat generation (正向调节发热)	34	3	
	GO:0060252	positive regulation of glial cell proliferation (神经胶质细胞增殖的正调控)	32	4	
	GO:0097421	liver regeneration (肝脏再生)	31	5	
	GO:0050999	regulation of nitric-oxide synthase activity (一氧化氮合酶活性的调节)	31	6	
	细胞组成	GO:0017053	transcription repressor complex (转录阻遏蛋白复合物)	19.32	5
		GO:0005901	caveola (卡沃拉)	14.81	4
GO:0045121		membrane raft (膜筏)	14.65	8	
GO:0098857		membrane microdomain (膜微结构域)	14.63	8	
GO:0044853		plasma membrane raft (质膜筏)	12.54	4	
GO:0031093		platelet alpha granule lumen (血小板 α 颗粒管腔)	12.26	3	
GO:0031091		platelet alpha granule (血小板 α 颗粒)	10.45	3	
分子功能	GO:0030235	nitric-oxide synthase regulator activity (一氧化氮合酶调节剂活性)	38.58	3	
	GO:0005126	cytokine receptor binding (细胞因子受体结合)	16.12	8	
	GO:0097718	disordered domain specific binding (无序的域特异性结合)	22.89	4	
	GO:0001221	transcription coregulator binding (转录辅助调节因子结合)	16.05	5	
	GO:0001223	transcription coactivator binding (转录共激活因子结合)	15.99	3	
	GO:0051117	ATPase binding (ATP 酶结合)	14.81	4	
	GO:0032813	Tumor necrosis factor receptor superfamily binding (肿瘤坏死因子受体超家族结合)	14.41	3	
	GO:0070851	growth factor receptor binding (生长因子受体结合)	14.14	5	
	GO:0019903	protein phosphatase binding (蛋白磷酸酶结合)	13.68	5	
	GO:0005125	cytokine activity (细胞因子活性)	12.94	6	

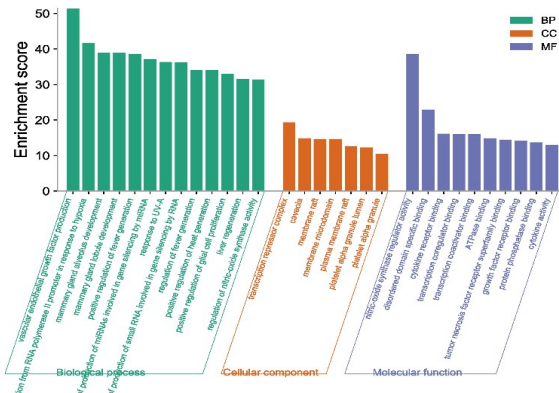


图5 GO富集分析结果网络图

表3 银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的KEGG通路

条目	信号通路	得分	基因数目
hsa05200	Pathways in cancer(癌症通路)	32.16	22
hsa05163	Human cytomegalovirus infection(人巨细胞病毒感染)	33.78	15
hsa04668	TNF signaling pathway(TNF信号通路)	28.74	9
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway(C型凝集素受体信号通路)	29.84	9
hsa04622	RIG-I-like receptor signaling pathway(RIG-I样受体信号通路)	16.07	4
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway(Toll样受体信号通路)	23.14	7
hsa05164	Influenza A(甲型流感)	17.92	7
hsa05022	Pathways of neurodegeneration - multiple diseases(神经退行性疾病的途径 - 多种疾病)	11.95	8
hsa04657	IL-17 signaling pathway(IL-17信号通路)	31.42	9
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway(NOD样受体信号通路)	14.73	6

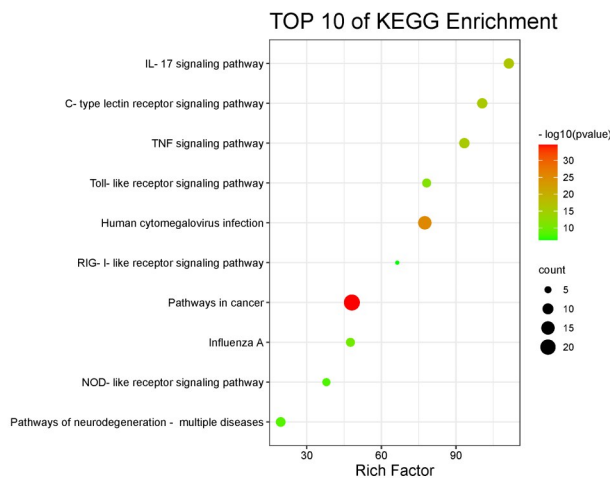


图6 KEGG通路富集分析图

3 讨论

本研究通过网络药理学共筛选到银翘马勃散中药物活性成分作用靶点215个,喉源性咳嗽相关基因靶点1399个,最终获得疾病与药物共同基因靶点112个。从药物-成分-靶点网络图分析可知,该网络图一共有节点139个,边362条,其中金银花占12条,连翘9条,射干5条,牛蒡子4条,马勃2条。金银花的degree值位居首位,表明金银花在该方治疗喉源性咳嗽中占主导地位,连翘、射干次之;牛蒡子、马勃起到辅佐作用。同时发现银翘马勃散中主要活性成分为:木犀草素、槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、 β -胡萝卜素、汉黄芩素、柱头甾醇等。木犀草素是一种黄酮类化合物,具有抗炎、抗过敏和免疫增强功能,能减轻哮喘气道炎症和超敏反应^[13]。Pio C等^[14]发现木犀草素、IL-37和IL-38都是具有不同信号通路的抗炎分子,并认为木犀草素与这些抗炎细胞因子联合用于炎症具有相关性。槲皮素是一种黄酮类化合物^[15],其在医学领域有着抗氧化、抗菌、抗癌、抗炎等作用^[16]。Jingwen等^[17]发现其可能通过调节PI3K/Akt信号通路发挥抗炎作用。山柰酚是一种黄酮醇类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗凋亡等活性,在正常情况下,能够提高脾淋巴细胞活力,促进淋巴细胞增殖,加强机体的免疫应答^[18]。陈丹等^[19]发现山柰酚能够有效减轻小鼠急性慢性炎症性疼痛,改善足底造模部位炎症情况,减轻炎症因子的聚集情况,使造模后小鼠对机械刺激和热刺激的敏感性降低。 β -谷甾醇是一种具有天然生物活性的甾体化合物,具有抵抗细菌入侵、消炎镇痛、抗氧化、抗肿瘤等作用^[20]。贾菊芳等^[21]发现, β -谷甾醇能够改善OVA诱导的过敏性哮喘大鼠气道炎症和氧化损伤,其作用机制可能与 β -谷甾醇对Th17/Treg免疫失衡及氧化应激反应调节有关。 β -胡萝卜素是常见类胡萝卜素之一,具有抗氧化、清除自由基、保护血管、抗肿瘤、增强免疫功能及保护神经系统等作用^[22]。汉黄芩素是一种天然黄酮类化合物,可通过调节PI3K-Akt、p53、核因子 κ B(NF- κ B)等多种细胞信号通路发挥抗炎、抗肿瘤、抗病毒、神经保护和抗焦虑作用^[23]。柱头甾醇可增强一氧化氮的产生,并作为潜在的抗氧化剂和增强免疫力的药物发挥治疗作用^[24]。Opoku等^[25]发现柱头甾醇对卵蛋白诱导的气道炎症损伤具有明显的抑制作用。此外,该方核心成分多为黄酮类化合物,如:槲皮素、木犀草素、汉黄芩素等。这表明该类天然化合物在治疗喉源性咳嗽中可能发挥主要作用。黄酮类化合物广泛存在于中草药中,具有

抗氧化、抗炎、抗病毒、抗血栓等常见的药理活性和多靶标协同的特点^[26]。该类化合物对改善气道重塑是否也具有明显的药理活性作用有待进一步研究。卢秋生等^[27]从中药复方中提取的天然黄酮类化合物在卷烟实验中可降低烟气对咽部的刺激。

银翘马勃散治疗喉源性咳嗽核心靶点为 AKT1、TP53、TNF、ESR1、MYC、EGFR、IL6(白介素6)、CAV1。Akt 有3种亚型,分别是 Akt1、Akt2、Akt3,由3个不同的基因进行编码,这3种亚型具有高度的同源性,在多种组织中广泛表达^[28]。AKT1 可通过阻断 PI3K/Akt 信号转导通路,以抑制杯状细胞增生引起的黏液高分泌,从而减少气道高反应,并阻止气道结构改变^[29]。TNF- α 是一种细胞因子,是气道炎症产生的重要启动因子之一^[30]。TP53、TNF α 诱导气道平滑肌产生力增强,并可介导多种炎症反应,导致气道炎性反应加重,诱发高气道反应^[31]。ESR1 是一种雌激素受体。程力等^[32]发现雌激素可能通过气道黏膜中的肥大细胞 ESR1 受体表达的变化参与女性患者哮喘发病的过程。C-MYC 是存在于正常细胞中能编码关键性调控蛋白的一类基因,在支气管上皮细胞和内皮细胞均有部分表达,阻断其表达则可控制患者气道重塑的症状^[33]。EGFR 是一种表皮生长因子受体,是气道上皮细胞功能的调控者^[34]。香烟可使气道上皮杯状细胞显著增生,研究表明,可通过 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂来防止^[35]。IL6 是一种具有多种生物学功能的前炎症因子,可出现在人气道上皮细胞损伤和炎症反应时,在免疫调节、炎症反应、细胞的增殖分化等过程中均有重要的作用^[36]。CAV1 在气道上皮细胞、内皮细胞等结构细胞中均有所表达,通过抑制 CAV1 的表达可以降低 LPS 诱导的气道黏液高分泌,这为治疗慢性气道炎症性疾病提供了一个可能有现实意义的治疗靶点^[37]。高健等^[38]发现 CAV1 与 FOXM1 可能通过互相影响,反向刺激,在气道重塑和呼吸道炎症中发挥重要作用。

GO 富集分析主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录响应缺氧的阳性调控、血管内皮生长因子产生、乳腺肺泡发育、阳性调节发热、调节一氧化氮合酶活性等生物过程;细胞组成如:转录抑制复合物、膜筏、血小板 α 粒胞等;分子功能如:一氧化氮合酶调节活性、细胞因子受体结合、ATP 酶结合、生长因子受体结合等。KEGG 通路分析发现,银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的靶点主要在 C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、RIG- I 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路上富集。C 型

凝集素受体主要在树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞表面表达,其可促进免疫细胞分泌 IL-6、TNF- α 等多种促炎细胞因子,并启动适应性免疫应答^[39]。TNF 信号通路近年来研究显示,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路异常激活与哮喘气道黏液高分泌有密切的关系,通过抑制 TNF- α /NF- κ B 信号通路可缓解气道黏液高分泌^[40]。Toll 样受体是一种固有免疫病原模式识别受体,激活其信号传导通路会加重气道炎症及气道高反应性,引起炎症因子释放^[41]。内源性和外源性配体激活 Toll 受体可以破坏“黏膜稳态”状态与“黏膜损伤”状态之间的平衡,从而导致黏膜炎症和屏障破坏^[42]。NOD 样受体信号通路在宿主抵御感染的第一道防线中起着至关重要的作用,其配备识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式,可直接激活免疫细胞^[43]。RIG- I 样受体是细胞质中的一类 RNA 解旋酶,属于固有免疫的模式识别受体,其在 I 型干扰素、促炎细胞因子产生等方面起到重要作用^[44]。IL-17 是一种促炎细胞因子,在机体的防御、组织修复、炎症性疾病的发病和癌症的过程中有着重要作用,其受体信号通路在炎症和癌症中对真菌和细菌以及病理条件下有正常保护作用^[45]。IL-17A 可作用在气道上皮细胞、气道平滑肌细胞、气道成纤维细胞上,并均有助于气道重塑的发生^[46]。

综上所述,本研究通过网络药理学挖掘银翘马勃散治疗喉源性咳嗽的潜在作用机制发现,银翘马勃散是通过多成分、多靶点、多通路参与治疗喉源性咳嗽,这为临床治疗提供了更多研究基础。

参考文献

- [1] 吕志超, 张 佑, 刘晓静. 喉源性咳嗽中医病因病机研究进展 [J]. 北京中医药, 2019, 38(8): 838-840.
- [2] 梁芳琴, 李 芳, 黄明儒. 喉源性咳嗽中医内外治法研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2019, 41(11): 64-66.
- [3] 牟元丽, 章如新, 王海娟. 喉源性咳嗽病名释义和辨证论治 [J]. 河北中医, 2009, 31(11): 1656-1657.
- [4] 刘 毅, 韦子章. 中医药治疗喉源性咳嗽进展 [J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(1): 72-74.
- [5] 徐 磊. 刘良倚教授运用银翘马勃散的临床经验总结 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [6] 黄明儒, 杨玉萍, 许忠波, 等. 杨玉萍教授运用银翘马勃散加味合穴点贴敷治疗喉咳经验 [J]. 实用中西医结合临床, 2019, 19(5): 128-130.
- [7] 张 勉, 陈 潇, 黄卓燕, 等. 喉源性咳嗽发病的影响因素研究 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(22): 2793-2795.
- [8] 钟晓凤. 金银花药用成分及现代临床药理分析 [J]. 光明中医, 2016, 31(6): 887-888.

- [9]李凡. 连翘现代药理作用研究[C]//中国药学会. 2016年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集. 北京:中国药学会, 2016: 832-839.
- [10]边巴次仁, 尼玛仓决, 赤列旺久, 等. 中草药牛蒡子化学成分及药理研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(9): 67-74.
- [11]展锐, 焦正花, 王红丽, 等. 射干的药理作用研究概况[J]. 甘肃中医, 2011, 24(1): 78-80.
- [12]郭晶, 江蔚新, 范明松. 马勃化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(3): 386-389.
- [13]SHIYUAN W, TULAKE W, WEIFENG T, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 94:107460.
- [14]CONTI P, CARAFFA A, GALLENGA C E, et al. Powerful anti-inflammatory action of luteolin; Potential increase with IL-38 [J]. Biofactors, 2021, 47(2): 165-169.
- [15]JUNHUA C, RUI X, BIAO H. Quercetin protects oral mucosal keratinocytes against lipopolysaccharide-induced inflammatory toxicity by suppressing the AKT/AMPK/mTOR pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2021, 43(5): 519-526.
- [16]AZEEM M, HANIF M, MAHMOOD K, et al. An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review [J]. Polym Bull (Berl), 2023, 80(1): 241-262.
- [17]JINGWEN Z, HONGYAN L, WEI W, et al. Assessing the anti-inflammatory effects of quercetin using network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(4): 301.
- [18]杨佳. 山奈酚对小鼠淋巴细胞活力与焦亡的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [19]陈丹. 山奈酚的抗炎镇痛作用及其机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [20]陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [21]贾菊芳, 曾梦楠, 张贝贝, 等. β -谷甾醇对OVA诱导的过敏性哮喘大鼠模型中Th17/Treg免疫失衡的调节 [J/OL]. 中国免疫学杂志, (2022-12-09) [2023-01-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20221208.1504.001.html>.
- [22]邱模昌, 蔡灵卿, 王芳, 等. β -胡萝卜素对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2014, 54(7): 24-28, 107.
- [23]YING C, XIAOWEN L, LONGFENG Z, et al. Wogonin inhibits *in vitro* herpes simplex virus type 1 and 2 infection by modulating cellular NF- κ B and MAPK pathways [J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1): 227.
- [24]NARA H, KYEOUNGCHEOL K, JUSUNG K, et al. SBT (composed of panax ginseng and aconitum carmichaeli) and stigmasterol enhances nitric oxide production and exerts curative properties as a potential anti-oxidant and immunity-enhancing agent [J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 199.
- [25]OPOKU A A, DARKO O D, NEWMAN O. Stigmasterol Modulates Allergic Airway Inflammation in Guinea Pig Model of Ovalbumin-Induced Asthma [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 2953930.
- [26]钟建青, 李波, 贾琦, 等. 天然黄酮类化合物及其衍生物的结构关系研究进展 [J]. 药学报, 2011, 46(6): 622-630.
- [27]卢秋生, 杨君, 洪林军, 等. 复方中药中天然黄酮类化合物的应用研究 [J]. 昆明医学院学报, 2009, 30(10): 33-36.
- [28]庞亚蓉, 席建宏, 王志旺, 等. 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B (PI3K/Akt)信号通路参与哮喘气道炎症反应的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(14): 1897-1901.
- [29]吕伟伟, 郑锐, 谭明旗. PI3K/Akt信号通路在哮喘气道重塑中的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(15): 2961-2965.
- [30]崔利萍, 田明, 吴丽娟, 等. 炎症因子TSLP、TNF- α 和IL-8对不同气道炎症性疾病的影响及临床意义 [J]. 中国临床研究, 2014, 27(7): 776-777, 781.
- [31]李英会, 张瑾, 杨环玮, 等. 加味取渊汤治疗痰热郁肺型上气道咳嗽综合征疗效及对患儿免疫功能和血清IL-6、TNF- α 水平的影响 [J]. 陕西中医, 2020, 41(3): 308-311.
- [32]程立, 唐友勇, 李威, 等. 支气管哮喘患者气道黏膜中肥大细胞雌激素受体表达变化的研究 [J]. 中国医师杂志, 2009, 11(3): 325-328.
- [33]徐丹, 徐新毅, 葛正行, 等. C-myc基因调控COPD大鼠气道重塑及苗药对其干预的研究 [J]. 贵州医药, 2016, 40(2): 139-142.
- [34]李文宏, 雷婷, 马嘉鑫, 等. 麻杏石甘汤对哮喘模型大鼠气道损伤及EGFR表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 1-10.
- [35]徐威, 钟秀君, 汤杰. 中药通过EGFR信号通路干预COPD气道黏液高分泌的研究进展 [C]//中华中医药学会. 第十六届国际络病学大会论文集. 河北: 中华中医药学会, 2020: 198-203.
- [36]刘艳明. 哮喘小鼠气道白细胞介素-6、信号转导和转录激活因子3的表达与活化及其作用 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.
- [37]冉丹华, 陈灵修, 黄华萍, 等. 小窝蛋白1对气道上皮细胞黏液高分泌的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1): 19-22.
- [38]高健. 支气管哮喘患儿血清小窝蛋白-1水平和叉头框蛋白M1基因表达与气道重塑的相关性 [J]. 新乡医学院学报, 2022, 39(2): 155-159.
- [39]张琴, 史伟峰. C型凝集素受体介导的抗真菌感染机制研究进展 [J]. 临床检验杂志, 2018, 36(10): 763-766.
- [40]姚楠, 韦凌霞, 王志旺, 等. 当归对阴虚哮喘小鼠气道黏液高分泌及TNF- α /NF- κ B信号通路的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(2): 97-100, 142.
- [41]史文倩, 黄光荣. Toll样受体4信号传导通路及支气管哮喘的关系 [J]. 新医学, 2020, 51(9): 647-652.
- [42]C G S, M R W, P S C, et al. No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation [J]. Mol Med, 2008, 14(9-10): 645-659.
- [43]KATARZYNA W, TOMASZ W, JUSTYNA R. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs, and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13397.
- [44]丁汝璇. RIG-I样受体信号通路及其调控研究综述 [J]. 中外医学研究, 2019, 17(14): 184-186.
- [45]XIAOXIA L, RAMI B, JUNJIE Z, et al. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease [J]. Nat Immunol, 2019, 20(12): 1594-1602.
- [46]杨胜红, 欧应勇, 欧阳瑶. IL-17A及PI3K/Akt/mTOR信号通路在气道重塑中的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2022, 38(1): 116-119.

(收稿日期: 2023-01-11)
(本文编辑: 黄明愉)