

· 基础研究 ·

基于网络药理学和分子对接探究三拗片治疗
急性支气管炎分子作用机制[△]滕龙飞¹, 陈佳丽¹, 周庆伟^{2*}, 王稼³

1. 河南中医药大学 第一临床医学院, 河南 郑州 450046;

2. 河南中医药大学 第一附属医院 呼吸内科, 河南 郑州 450000;

3. 河南中医药大学 基础医学院, 河南 郑州 450000

[摘要] **目的:** 通过网络药理学和分子对接方法探究三拗片治疗急性支气管炎的潜在活性成分及作用机制。**方法:** 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 筛选三拗片活性成分和靶点, 与 GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库中急性支气管炎基因集相互映射获取共同靶点; 利用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 筛选核心靶点; 依托 DAVID 平台对共同靶点进行基因本体 (GO) 生物学过程及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 以了解共同靶点集的生物学作用; 通过分子对接结果验证 PPI 网络核心靶点。**结果:** 获得三拗片活性成分 124 个; 三拗片治疗急性支气管炎靶点 103 个, 其中核心靶点 5 个; GO 生物学过程 575 条, 涉及凋亡过程、炎症反应、细胞增殖、信号转导等生物过程; KEGG 通路 117 条, 三拗片可能通过干预磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、流感、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、Toll 样受体信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路发挥治疗急性支气管炎作用; 分子对接结果显示, 三拗片中槲皮素、山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇、柚皮素、芒柄花黄素、甘草查耳酮 A 均能较好地与急性支气管炎靶蛋白结合, 可能通过作用于细胞肿瘤抗原 p53 (TP53)、Akt1、白细胞介素-6 (IL-6)、TNF、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 靶点发挥作用。**结论:** 三拗片活性化合物可能从结构上作用于支气管, 共同参与抗炎、平衡细胞因子、免疫调节、抗病毒抑菌而发挥治疗作用。

[关键词] 三拗片; 急性支气管炎; 分子对接; 网络药理学**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)08-1399-07**doi:** 10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20200717008**Molecular Mechanism of San'ao Pian in Treatment of Acute Bronchitis Based on Network Pharmacology and
Molecular Docking**TENG Long-fei¹, CHEN Jia-li¹, ZHOU Qing-wei^{2*}, WANG Jia³

1. The First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,
Zhengzhou 450000, China;

3. School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

[Abstract] **Objective:** To explore the potential active components and mechanism of San'ao Pian in the treatment of acute bronchitis by network pharmacology and molecular docking. **Methods:** The active components and targets of San'ao Pian were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and mapped with the gene sets of acute bronchitis in GeneCards, OMIM, and Drugbank to yield the common targets of the disease and the medicine. Meanwhile, protein-protein interaction (PPI) network was constructed with STRING to screen hub genes, followed by gene ontology (GO) term enrichment and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment of the common targets in Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). The hub

[△] **[基金项目]** 河南省中医药科学研究专项 (2017ZY2063, 2019ZY1011)^{*} **[通信作者]** 周庆伟, 教授, 主任医师, 研究生导师, 研究方向: 中医药防治呼吸疾病; E-mail: zhouqingwei2010@126.com

genes of PPI network were verified by molecular docking. **Results:** A total of 124 active components of San'ao Pian and 103 targets related to the treatment of acute bronchitis were retrieved, including 5 hub genes. The common targets involved 575 GO terms, such as apoptosis, inflammatory response, cell proliferation, and signal transduction, and 117 KEGG pathways, including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, influenza A, mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) signaling pathway. The results of molecular docking showed that quercetin, kaempferol, luteolin, β -sitosterol, naringenin, formononetin, and licochalcone A of San'ao Pian bound to the target proteins of acute bronchitis, such as the cellular tumor antigen p53 (TP53), protein kinase B1 (Akt1), interleukin-6 (IL-6), TNF, and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). **Conclusion:** The key compounds of San'ao Pian may act on acute bronchitis by anti-inflammation, balancing cytokines, immune regulation, anti-virus, and bacteriostasis.

[Keywords] San'ao Pian; acute bronchitis; molecular docking; network pharmacology

急性支气管炎发病率较高,部分可迁延发展为慢性支气管炎、肺气肿、慢阻肺等多种慢性肺系疾病,加重患者及社会负担。三拗片(SAP)为《太平惠民和剂局方》中三拗汤的加味方,在三拗汤基础上加入生姜,由君药麻黄、臣药苦杏仁、佐药生姜及使药甘草4味中药构成,具有宣肺解表、降气平喘之功效。生姜具有解表散寒、温肺镇咳、温中止呕的功效,因此加强了原方温肺散寒的功效,并能调和方中麻黄对胃肠道的刺激。SAP剂型为片剂,具有易于服用,方便携带、贮藏保管等特点,因此临床应用较多。中医临床研究发现,SAP对于风寒型急性支气管炎有较好的疗效^[1]。陈麒等^[2]研究表明,SAP对风寒袭肺证急性支气管炎患者的咳、痰、喘三大主症具有明显的改善作用,且无明显不良反应,其中痊愈占22.50%,显效占51.25%。SAP治疗儿童急性支气管炎疗效明显,不良反应少^[3]。中药治疗疾病具有多成分、多靶标、多通路的特点,网络药理学的出现使得方药作用于人体的机制研究更具整体性和系统性^[4]。本研究采用网络药理学方法,探讨SAP治疗急性支气管炎作用机制及其物质基础。

1 材料与方法

1.1 SAP的主要化学成分及靶点检索

利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),根据药代动力学吸收、分布、代谢、排泄(absorption、distribution、metabolism、excretion, ADME)参数筛选口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) ≥ 0.18 的SAP潜在活性成分及相应的靶点,通过UniProt数据库将靶点蛋白转换为基因名,最终得到SAP潜在活性成分的靶点基因,建立数据集。

1.2 急性支气管炎靶点基因获取

以“Acute bronchitis”为关键词,在GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)数据库中检索,获得与急性支气管炎相关的基因,重复基因仅保留1个。

1.3 SAP治疗急性支气管炎潜在作用靶点预测

通过Venny 2.1工具,将药物潜在活性成分靶点与疾病靶点相映射,最终得到药物-疾病共同靶点,即为SAP作用于急性支气管炎的预测靶点。

1.4 成分-靶点网络构建

利用Cytoscape 3.6.1软件构建成分-靶点网络,其中节点(node)代表SAP活性成分、预测靶点,边(edge)代表SAP活性成分与靶点相互作用关系。选取度(degree)和介数中心性(betweenness)大于平均值的化合物用于分子对接。

1.5 PPI网络构建及核心靶点筛选

将SAP治疗急性支气管炎的作用靶蛋白导入STRING 11.5 (<https://string-db.org/>)数据库,根据拓扑分析靶蛋白相互作用关系,并利用Cytoscape 3.6.1构建PPI网络,根据度值大小筛选排名前5的靶点作为核心靶点,用于分子对接。

1.6 基因富集分析

运用DAVID 6.8对共同靶点所涉及的基因功能和相关通路进行富集分析,并将其结果可视化。

1.7 分子对接

将1.4项下主要活性成分通过TCSP数据库下载MOL2格式文件,通过AutoDockTools 1.5.6软件

加氢后作为配体保存成pdbqt文件；通过PDB数据库下载1.5项下核心靶点PDB格式文件，利用PyMOL软件删除水和配体，通过AutoDock软件加氢后作为受体，保存成pdbqt文件，利用AutoDock Vina进行分子对接，筛选结合能最低的结构为最优结构。

2 结果

2.1 SAP活性化合物及潜在靶点筛选

筛选出SAP活性化合物共124个，共预测靶点103个；其中麻黄有效成分23个、苦杏仁有效成分19个、甘草有效成分92个、生姜有效成分5个。

2.2 急性支气管炎潜在靶点预测

检索GeneCards、OMIM、DrugBank数据库，剔除重复靶点后共获得急性支气管炎潜在靶点863个。

2.3 SAP治疗急性支气管炎潜在作用靶点

将SAP化合物靶点和急性支气管炎靶点取交集，共得到103个共同靶点，即SAP治疗急性支气管炎潜在作用靶点，见图1。

2.4 成分-靶点网络构建

利用Cytoscape 3.6.1软件构建出成分-靶点网

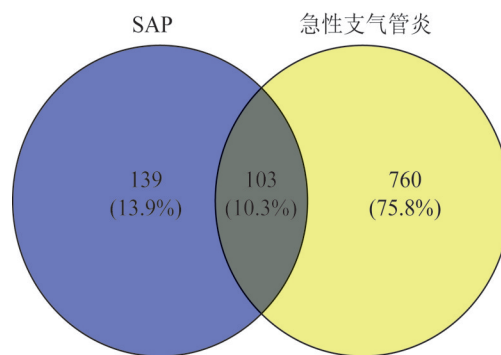
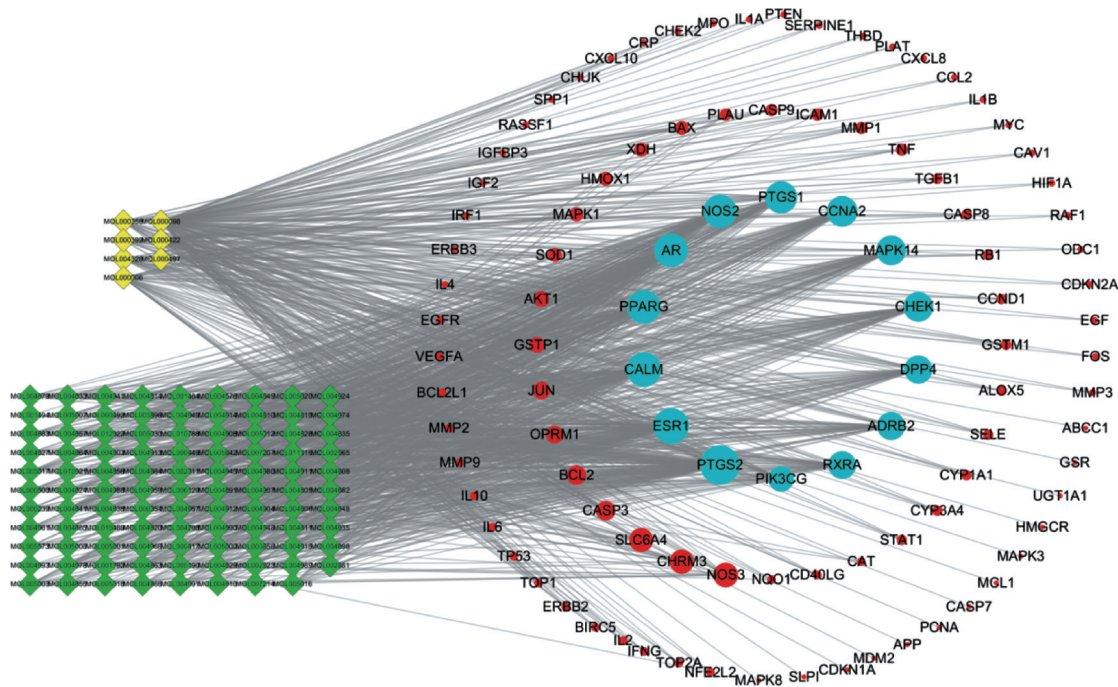


图1 SAP和急性支气管炎靶点韦恩图

络，筛选出活性化合物7个，度值从大到小依次为槲皮素(querعتin)、山柰酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、柚皮素(naringenin)、芒柄花黄素(formononetin)、甘草查耳酮A(licochalcone A)，见图2。

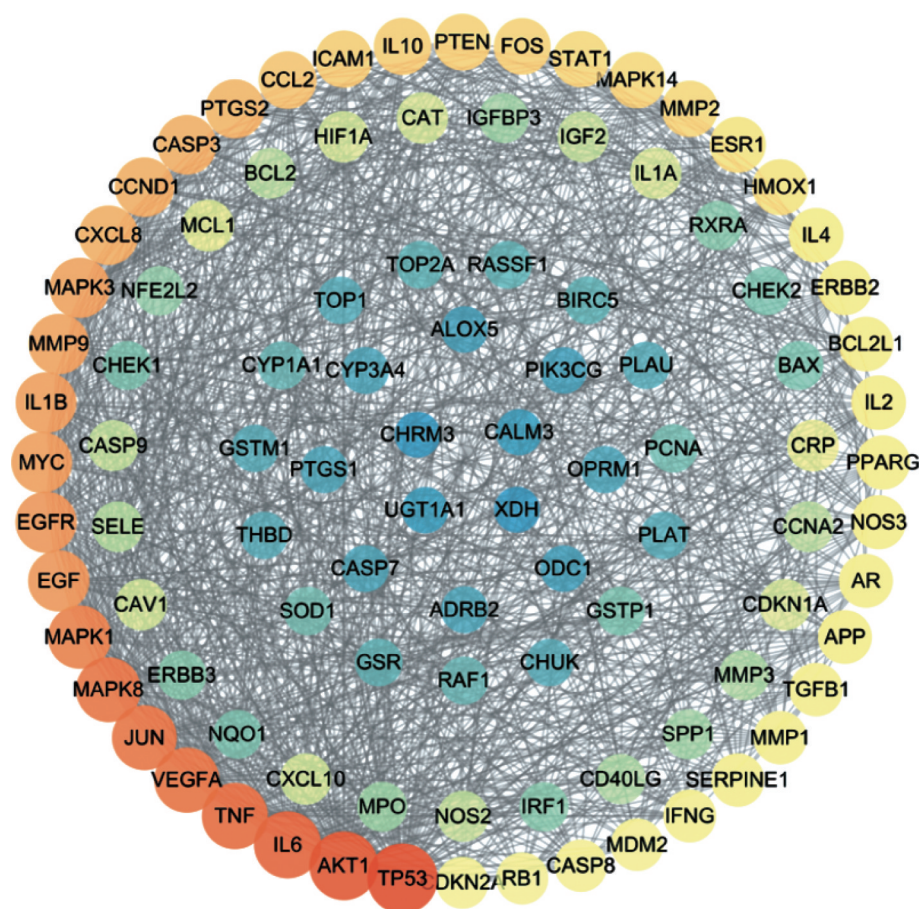
2.5 PPI网络构建

PPI网络构建结果见图3，共得到103个节点、942条边，平均节点度值为18.3，根据度值大小排名前5的核心靶点为细胞肿瘤抗原p53(TP53)、蛋白激酶B1(Akt1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子A(VEGFA)，度值分别为59、56、52、50、48。



注：黄色、绿色节点为SAP活性成分，其中黄色节点度值与介数均大于均值；蓝色、红色节点为急性支气管炎靶点，其中蓝色节点度值与介数中心性均大于均值。

图2 SAP治疗急性支气管炎的成分-靶点网络



注：蓝色、黄色、橙色节点代表靶蛋白；灰色边代表靶蛋白相互作用；度值越大则节点越大、颜色越接近橙色。

图3 SAP治疗急性支气管炎PPI网络

2.6 GO及KEGG富集分析

共富集得到 GO 生物学过程 575 条、细胞组分 54 条、分子功能 85 条。以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 选取排名前 10 的 GO 条目绘制气泡图, 见图 4, KEGG 前 10 条通路绘制气泡图, 见图 5。其中在磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、TNF 信号通路、流感、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、FoxO 信号通路、Toll 样受体信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、百日咳、p53 信号通路、核苷酸寡聚化结构域 (NOD) 样受体信号通路等方面靶点富集较为集中。

2.7 分子对接

分子对接结果显示, 槲皮素、山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇、柚皮素、芒柄花黄素、甘草查耳酮A结合能均小于 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\approx 4.182 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 均能较好地与急性支气管炎靶蛋白结合, 具体结合能信息见图6。以上7个活性化合物与Akt1结合能

的均值为 $-8.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，是5个靶蛋白中最小值，因此 Akt1 可能是 SAP 治疗急性支气管炎的核心靶点。 β -谷甾醇分子对接不能与靶蛋白残基形成氢键，故排除，与 Akt1 结合最好的为木犀草素，其次是槲皮素，分子对接模式见图7。

3 讨论

急性支气管炎是外界抗原感染所致的支气管黏膜炎症，发作以咳嗽、咯痰、喘息为特征，西医临床多从抗感染、止咳、平喘、祛痰等对症治疗为主，其治疗方法单一且不良反应多，急性期迁延不愈转为慢性支气管炎更为难治^[5]。中西医结合治疗急性支气管炎越来越得到认可，大量研究证实了SAP对于急慢性支气管炎具有较好的临床疗效及安全性，相较于单纯西医治疗，能够明显缩短病程、减少药物不良反应、提高免疫力、降低复发率^[6-10]。本方源于《太平惠民和剂局方》中三拗汤，三拗来源于制法特点^[11]：1) 麻黄不去根、节。发汗而不过汗，麻黄茎

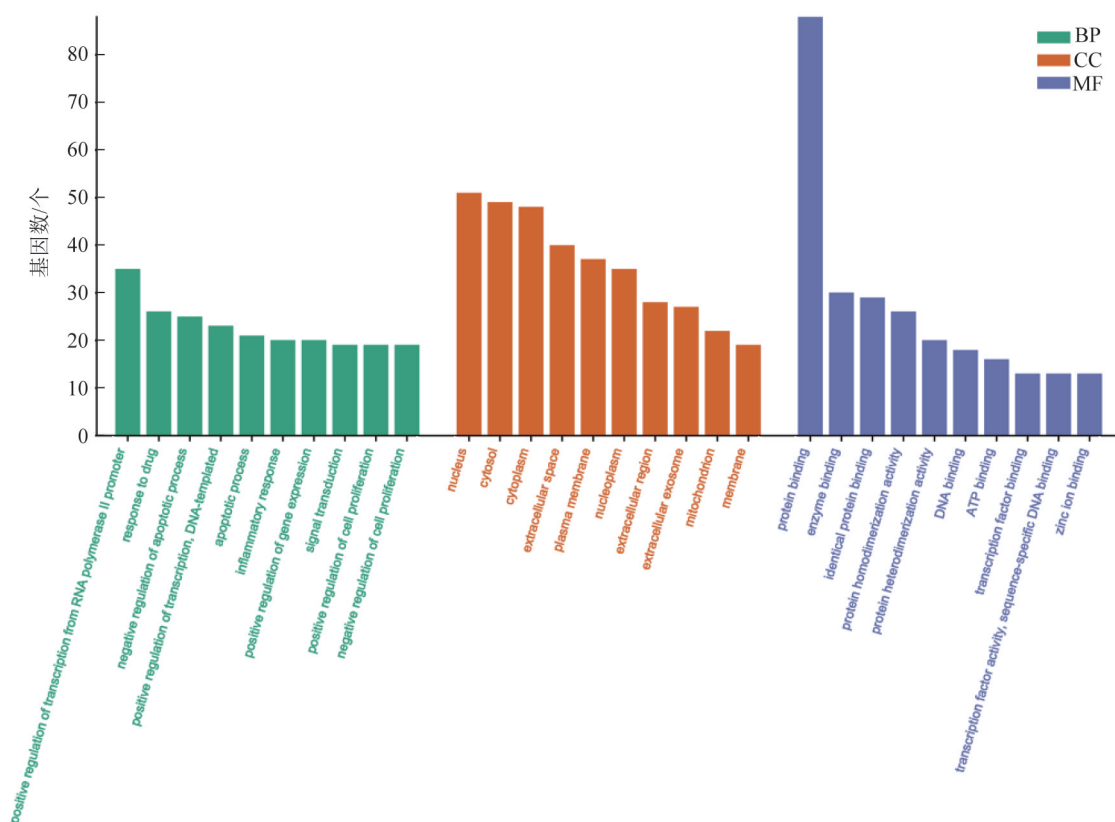


图4 SAP靶点的GO富集分析

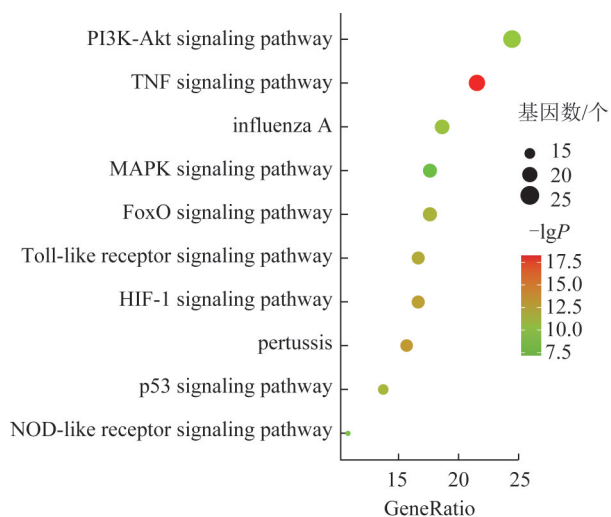


图5 SAP治疗急性支气管炎靶点的KEGG通路富集分析

在上属阳，根在地下属阴，正如肺之宣发肃降，一宣一降而复肺气。2) 杏仁不去皮、尖，留尖主发散，连皮主涩汗，也为发中有收。3) 甘草不炙，取其补中有发。本方在三拗汤基础上加入生姜1味，加强了原方温肺散寒、温胃止呕之功。

研究显示，急性毛细支气管炎的气道炎症细胞多为中性粒细胞，其对于机体防御和炎症修复至关

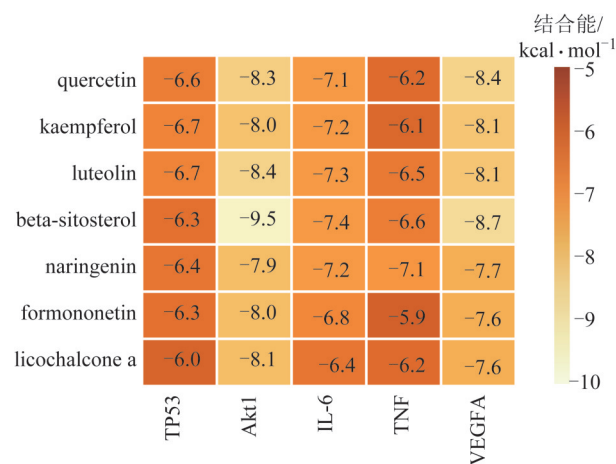
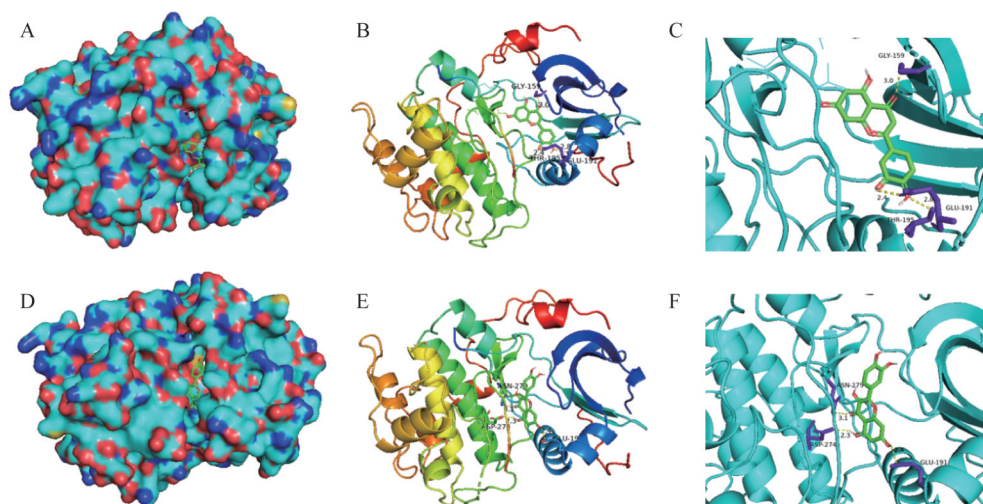


图6 SAP活性成分分子对接结合能热图

重要，而Akt1又是中性粒细胞表达的重要亚型，在细菌感染或中性粒细胞被激活时下调，Akt1的下调可减少中性粒细胞、单核细胞的炎症反应，因此SAP中的活性化合物可能通过下调Akt1起到抗炎作用^[12-14]。木犀草素和槲皮素能够显著地抑制促炎性细胞因子TNF- α 、IL-6及IL-1 β ，表明木犀草素和槲皮素具有良好的体外抗炎效果^[15]。槲皮素还是一种广谱抗菌不易耐药的植物抗生素^[16-17]。山柰酚能够通



注: A~C. Akt1与木犀草素分子对接; D~F. Akt1与槲皮素分子对接。

图7 Akt1与木犀草素、槲皮素的分子对接

过抑制肺组织促炎因子核转录因子- κ B (NF- κ B)、IL-1 β 、TNF- α 表达,对急性肺损伤具有保护作用。 β -谷甾醇具有良好的抗炎及免疫调节作用^[18]。研究显示, β -谷甾醇可防止肺组织气道炎症的发生^[19]。柚皮素能通过NF- κ B显著抑制炎症细胞及介质的释放,减轻脂多糖诱导的肺部炎症^[20]。芒柄花素可增加小鼠淋巴细胞数量及细胞因子的释放,进而调节免疫力^[21]。甘草查耳酮A可阻断细胞外调节蛋白激酶1/2 (ERK1/2)/NF- κ B来抑制炎症因子的表达,保护急性肺损伤小鼠^[22]。PM2.5触发的呼吸系统炎症可表现为VEGFA显著上调^[23],分子对接结果发现,槲皮素、木犀草素、山柰酚等可能通过调控VEGFA改善气道炎症。

通过GO生物学过程富集分析发现,SAP治疗急性支气管炎可能涉及凋亡过程、炎症反应、细胞增殖、信号转导等生物过程,在急性支气管炎的治疗过程中起到关键作用。通过KEGG通路富集分析发现,SAP主要活性成分靶点可能参与了PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路、流感、MAPK信号通路、FoxO信号通路、Toll样受体信号通路、HIF-1信号通路、百日咳、p53信号通路、NOD样受体信号通路,在急性支气管炎的治疗中发挥作用。人体免疫激活后,T细胞分化释放IL-6、TNF等促炎因子进行免疫^[24]。抑制HIF-1 α 可以降低TNF- α 和白细胞介素的表达,表明HIF-1 α 对促炎因子的分泌起关键作用。各种Toll样受体可调节病毒复制,进而影响病毒的发病^[25]。

综上所述,SAP治疗急性支气管炎的有效成分

可能是槲皮素、山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇、柚皮素、芒柄花黄素、甘草查耳酮A等,这些成分可能作用于TP53、Akt1、IL-6、TNF、VEGFA等靶点,通过PI3K-Akt、TNF、流感、MAPK、Toll样受体、HIF-1等多条信号通路,共同参与抗炎、平衡细胞因子、免疫调节、抗病毒、抑菌而起到治疗作用。本研究利用网络药理学方法初探SAP治疗急性支气管炎的机制,但缺乏动物及体外细胞实验验证预测结果,具有一定局限性,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 樊茂蓉,王冰,高金柱,等.三拗片治疗急性支气管炎(风寒袭肺证)的临床研究[J].中国临床药理学与治疗学,2014,19(1):44-48.
- [2] 陈麒,张炜,张学超.三拗片治疗急、慢性支气管炎风寒袭肺证80例分析[J].实用临床医药杂志,2012,16(1):87-88.
- [3] 余素明,李乔俊,孙婧,等.三拗片治疗儿童急性支气管炎75例临床观察[J].中医杂志,2014,55(13):1130-1131.
- [4] 代古瑞,魏文峰,霍金海,等.网络药理学在中医药领域的研究进展[J].黑龙江中医药,2018,47(6):105-107.
- [5] GUO L J, ZHAO A, CHEN R J, et al. Association between ambient air pollution and outpatient visits for acute bronchitis in a Chinese city[J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(11):833-840.
- [6] 杜宏进.三拗片治疗急性支气管炎(风寒袭肺证)的临床研究[J].人人健康,2018(14):203.
- [7] 马利国.三拗片治疗急性支气管炎的疗效及安全性分析[J].北方药学,2018,15(6):159-160.

- [8] 胡芳,赵立杰,郭军英.三拗片辅助治疗急性慢性支气管炎的临床疗效及安全性分析[J].山西医药杂志,2015,44(23):2777-2778.
- [9] 李德成,孙树业.三拗片联合桉柠蒎肠溶软胶囊治疗急性慢性支气管炎的疗效观察[J].现代药物与临床,2015,30(9):1124-1127.
- [10] 李艳莉.三拗片辅助治疗小儿急性支气管炎的临床观察[J].儿科药学杂志,2018,24(11):22-25.
- [11] 范欣生.三拗汤方证与应用探讨[J].安徽中医学院学报,2006,25(6):1-3.
- [12] 易阳,周国平,钟闻燕,等.中性粒细胞、白介素-8和弹性蛋白酶在急性毛细支气管炎发病中的作用[J].临床儿科杂志,2009,27(2):148-151.
- [13] LIU G W, BI Y J, WANG R N, et al. Kinase AKT1 negatively controls neutrophil recruitment and function in mice[J]. J Immunol, 2013, 191(5):2680-2690.
- [14] DI LORENZO A, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, CIRINO G, et al. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage [J]. PNAS, 2009, 106(34):14552-14557.
- [15] 周霄楠,韩超,宋鹏琰,等.木犀草素和槲皮素体外抗炎作用研究[J].动物医学进展,2017,38(10):56-61.
- [16] 滕楠.槲皮素抑菌作用的体内和体外研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [17] 房伟,李永年,察雪湘,等.槲皮素和黄芪甲苷对多药耐药铜绿假单胞菌抗菌活性的研究[J].河南医学高等专科学校学报,2015,27(2):119-121.
- [18] 刘威良,姬昱,黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展[J].农产品加工,2019(1):77-79.
- [19] MAHAJAN S G, MEHTA A A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a Guinea pig model of asthma[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(1):458-464.
- [20] CHEN Y, WU H, NIE Y C, et al. Mucoactive effects of naringin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and beagle dogs [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(1):279-287.
- [21] 张彦平,邓康,贾宁,等.芒柄花素对免疫抑制小鼠免疫功能影响的研究[J].中国畜牧兽医,2020,47(3):922-930.
- [22] 任倩倩,汪丽佩,赵炜,等.甘草查尔酮A抑制ERK1/2/NF- κ B途径减轻吸烟诱导的小鼠急性肺损伤[J].中国药理学通报,2016,32(5):643-651.
- [23] XU X, WANG H, LIU S, et al. TP53-dependent autophagy links the ATR-CHEK1 axis activation to proinflammatory VEGFA production in human bronchial epithelial cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) [J]. Autophagy, 2016, 12(10):1832-1848.
- [24] WEINMANN A S. Regulatory mechanisms that control T-follicular helper and T-helper 1 cell flexibility [J]. Immunol Cell Biol, 2014, 92(1):34-39.
- [25] GUO X K, ZHU Z Q, ZHANG W J, et al. Nuclear translocation of HIF-1 α induced by influenza A (H1N1) infection is critical to the production of proinflammatory cytokines[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(1):1-8.

(收稿日期:2020-07-17 编辑:田苗)