

基于网络药理学的罗汉果陈皮止咳化痰研究——活性分、作用靶点及通路预测分析

陈蔓晗¹ 林小洁² 陈沛洪² (通讯作者)

1 广东药科大学中医学院, 广东汕头, 515000;

2 汕头大学医学院第二附属医院药学部, 广东汕头, 515000;

摘要: 网络药理学探讨罗汉果和陈皮止咳化痰的作用机制。方法: 采用网络药理学与分子对接技术, 筛选两药入血活性成分, 获取咳嗽痰相关靶点, 经富集分析、PPI网络构建后, 对核心成分与关键靶点进行对接验证。结果: 入血成分16个。对接结果显示罗汉果陈皮入血成分与 AKT1, TNF, CHRNA7, PTGS2 有较好的结合活性。结论: 罗汉果陈皮可能通过抑制炎症的发生和舒张支气管平滑肌来发挥止咳化痰的作用, 该结果可为后续研究提供参考方向。

关键词: 止咳化痰; 网络药理学; 罗汉果; 陈皮

DOI: 10.69979/3029-2808.26.02.100

引言

咳嗽痰是呼吸道疾病的常见症状, 长期困扰患者, 也是医学领域的研究重点。现代医学治疗虽有激素、镇咳祛痰药等多种选择, 但激素及部分镇咳药长期使用的副作用, 严重影响患者生活质量, 促使我们探索更安全有效的替代方案。

传统中医治疗咳嗽痰理论深厚、经验丰富。中医认为, 咳嗽痰多与肺脏功能失调相关, 外邪侵袭、脏腑功能紊乱等因素, 均可导致肺失宣降、津液凝聚成痰, 进而引发病症。治疗以祛痰、润肺、固护肺功能为主, 同时调理相关脏腑及津液输布, 使痰浊得以及时化解。

陈皮、罗汉果为药食同源之品, 在改善咳嗽痰方面应用广泛。陈皮性温、味苦辛, 能理气健脾、燥湿化痰, 调理气机、运化水湿, 从根源减少痰浊生成。罗汉果性凉、味甘, 可清热润肺、滑肠通便, 滋润肺燥、稀释痰液、促进排出。二者配伍, 一温一凉相互制约, 避免寒凉伤正, 又能协同增效, 增强理气化痰之力, 有效恢复肺脏宣发肃降功能, 具有天然、低毒、疗效确切的优势, 研究与应用价值显著。

本文采用网络药理学方法, 筛选并预测罗汉果、陈皮干预咳嗽痰的潜在作用靶点, 分析其核心成分与通路机制, 为进一步阐释其药效物质基础及作用机理提供理论依据。

1 方法

1.1 查找罗汉果陈皮的有效成分靶点

在 TCMS 数据库分别查找罗汉果、陈皮两味中药的有效活性成分。入血成分筛选条件: 口服生物利用度 $0 \leq B \leq 30\%$, 药物相似性 $DL \geq 0.18$ 。得到符合条件的化合物

后, 将化合物结构以 mol2 格式导入 Pharmmap 数据库中, 进行逆向对接预测。将得到的结果以 Fit 值大于或等于 0.5 为条件筛选, 并将得到的靶蛋白在 String 数据库中转换成基因。得到罗汉果陈皮入血成分的靶点数据。

1.2 构建 PPI 网络图

在 STRING 数据库中, 输入上述交集靶点, 物种选择 “Homo sapiens”, 构建 PPI 网络, 等值置信度为 0.7, 其余参数为不变。结果导入 Cytoscape 3.10.1 软件构建 PPI 网络图。选择工具栏的 Analyze Subset of Nodes”, 计算相关参数, 根据 Degree 值和 Combined Score 的大小对数据进行可视化分析。

1.3 GO 基因注释和 KEGG 通路富集分析

登录 David 数据库, 物种选择 “Homo Sapiens”, 输入上述共同靶点, 对共同靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。将结果整理后, 通过 R 语言程序对 GO 功能分类图和 KEGG 通路气泡图进行可视化分析。

1.4 根据 KEGG 通路富集获得对接靶点并进行网络构建

通过 KEGG 通路富集获得与咳嗽痰相关的前 4 个通路及其相关靶基因 (32 个), 于 PDB 数据库中获得这些靶基因的相关蛋白晶体结构共计 24 个。

将从 TCMS 数据库下载的化学结构用通过 Autodocktool-1.5.6 软件赋予分子电子及电荷输出为 .pdbqt 格式。课题采用 Autodocking vina 1.1.2 进行分子对接研究。以原蛋白晶体的配体所处口袋位置进行模拟对接。研究将对接参数 exhaustiveness 设置为默认值 8。以小于 -5 kcal/mol 的结果与靶点蛋白用 cytoscape 进行网络具现化 (活性成分-蛋白网络 PPI) [4]。

1.5 对接热图分析及分子动力学验证

选取对接结果 affinity[kcal/MOL]在 -6.0[~]-10.0 之间, ≤ -7.0 kcal/mol 为稳定结合, ≤ -8.0 kcal/mol 为极强结合制作热图进行分析,并选取热图结果中对接参数最小的蛋白晶体及化合物进行分子动力学分

析及制作构象

2 结果

2.1 活性化学成分筛选

如表 1 所示,以 OB≥30%和 DL≥18%作为筛选条件得到 16 个活性成分

表 1 陈皮罗汉果的入血活性成分

Mol ID	分子名称	OB (%)	DL
MOL000359	谷甾醇	36.91	75.00%
MOL004328	柚皮素	59.29	21.00%
MOL005100	橙皮素	47.74	27.00%
MOL005815	二氢川陈皮素	86.9	51.00%
MOL005828	川陈皮素	61.67	52.00%
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	75.00%
MOL000422	山奈酚	41.88	24.00%
MOL001494	亚油酸乙酯	42	19.00%
MOL001506	角鲨烯	33.55	42.00%
MOL001749	邻苯二甲酸二辛酯	43.59	35.00%
MOL002140	川芎嗪	65.95	27.00%
MOL009295	酒渣碱	94.28	39.00%
MOL010070	11-氧-罗汉果苷 II A1	37.63	22.00%
MOL010072	11-氧罗汉果苷 II E	32.77	21.00%
MOL010105	(S)-2-甲基丁基-4-(4-癸氧基苄基氨基)	45.01	71.00%
MOL010131	罗汉果二醇苯甲酸酯	41.69	31.00%

2.2 GO 基因注释和 KEGG 通路富集分析

为了阐明陈皮罗汉果的止咳化痰作用机制将 214 个靶点进行 GO 基因注释和 KEGG 通路富集分析得到以下结果。GO 富集分析指在某一功能层次上统计蛋白或者基因的数目或组成的一个有限无环图,包括 3 个分支,即生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组分 (cellular component)。通过 GO 富集分析可以粗略了解差异基因富集在哪些生物学功能、途径或者细胞定位,如图生物过程与对类固醇激素的反应,细胞对化学应激的反应相关性最大;在细胞组分中与分泌颗粒腔和细胞质囊泡腔相关性最大;在分子功能中与核受体活性和配体激活转录因子活性相关性最大。

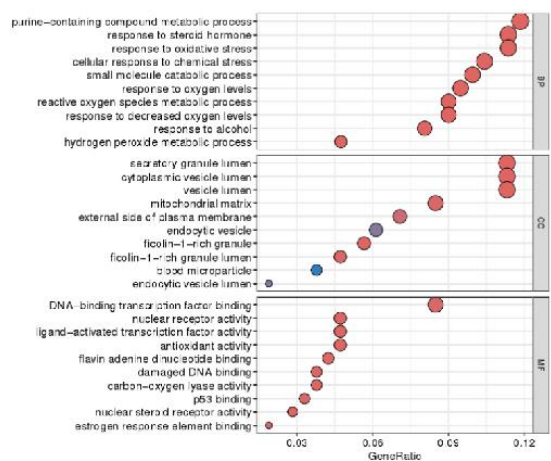


图 1 GO 富集分析

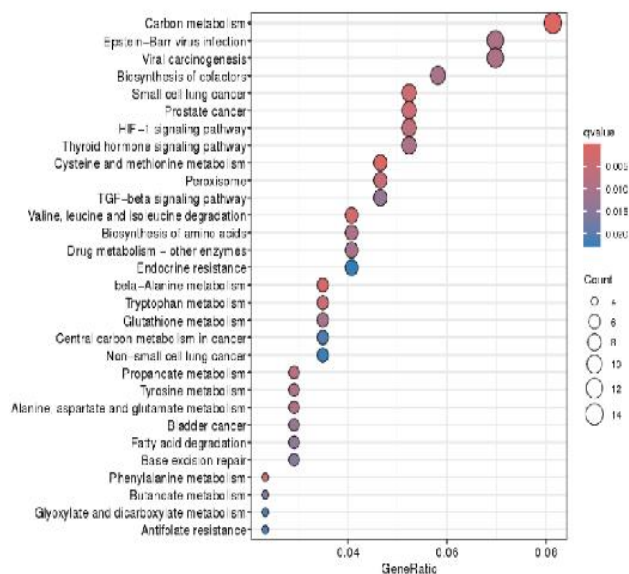


图 2 KEGG 通路富集分析

通过 KEGG 通路富集分析我们得到 214 个交集靶点中有五条通路较为集中,分别是“Carbon metabolism”、“Cysteine and methionine metabolism”、“beta-Alanine metabolism”、“Valine, leucine and isoleucine degradation”、“Small cell lung cancer”,经筛选获得这些靶基因的相关蛋白晶体结构共计 24 个。

2.3 分子对接网络图

经过 autodocking vina 对接的结果用 cytoscape 进行网络具现化得到下图。

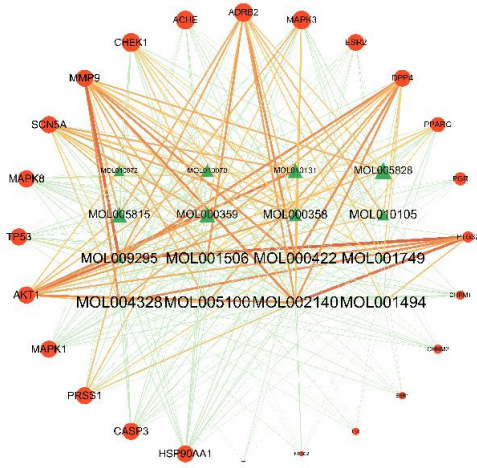


图 3 活性成分-靶点互作网络图

设置对接分数值 (score) 高于 1 的颜色向红色更深, 小于 1 的颜色向绿色更浅, 分数值 (score) 高于 1 的线条越粗。由此得到其中这些靶蛋白被罗汉果陈皮有效成分作用的强度较强。其中 PTGS2, MMP9 两个靶点受体与炎症的发生有关^[5], 而 AKT1, DPP4, ADRB2 则根据文献报道与鼻咽疾病, 高血糖, 2 型糖尿病和呼吸系统疾病相关。

为了观察 16 个活性成分中哪些成分对靶蛋白作用较强另外制作靶点-活性成分网络图, 分数值 (score) 低于 1 的不显示线条最细, 高于 1 的显红色线条越粗, 得到以下网络图, 经观察发现 MOL009295 (酒渣碱), MOL000422 (山奈酚), MOL004328 (柚皮素), MOL002140 (川芎嗪), MOL010131 (罗汉果二醇苯甲酸酯) 这五个成分的分数值较其他活性成分更强。

2.4 靶蛋白与活性成分相互作用分析

根据活性成分-靶点互作网络和对接热图的结果我们选取 AKT1 这个靶蛋白与之对接分数最高的化合物进行作图分析其活性成分与靶蛋白的作用情况。

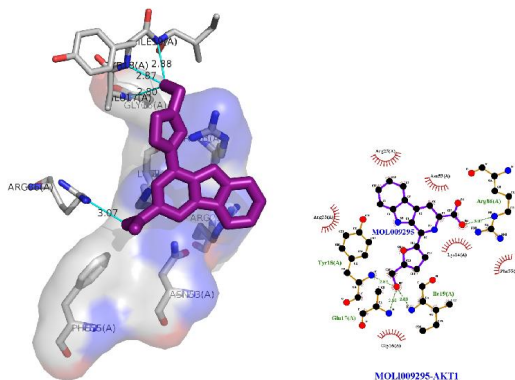


图 4 MOL009295-AKT1

2.5 MOL009295-AKT1

MOL009295 处于 AKT1 蛋白活性口袋内, 与周围氨基酸残基紧密接触。图中标注了 ARG (精氨酸) 等氨基酸, 部分原子间距离如 2.87、2.88、3.02 等表明可能存在氢键或静电相互作用, 涉及精氨酸等氨基酸的原子与小分子上的对应原子。

3 讨论和结论

呼吸系统疾病是临床较为常见的疾病, 其中呼吸系统疾病所引发的咳嗽咳痰症状是临床较为棘手的情况。陈皮和罗汉果是中医临床常用的化痰止咳药材。其两种配合使用可以缓解咳嗽咳痰症状。本研究借助网络药理学分析其二者入血成分与体内咳嗽靶点及通路的关系并通过分子对接技术进一步筛选其关键靶点及关键活性物质。为陈皮罗汉果的进一步在体研究提供方向。

本研究通过网络药理学方法初步了解到罗汉果陈皮的入血成分可影响“碳代谢”、“半胱氨酸和甲硫氨酸代谢”、“β-丙氨酸代谢”、“缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解”、“小细胞肺癌”等代谢通路, 通过分子对接技术可知入血的活性成分对这些通路中的 PTGS2, DPP4, PPARG, ADRB2, AKT1, PRSS1, MMP9, CHEK1, MAPK3, CHRNA7, TNF, ESR1 等靶蛋白有较好的对接活性。其中尤以 MMP9, AKT1, CHRNA7, TNF, ESR1 这些靶蛋白对接分数较高。

而查阅文献发现这些靶蛋白对咳嗽咳痰的治疗也起到关键作用。如其中 MMP9, PTGS2, AKT1, MAPK3 等是与炎症相关的蛋白, 在咳嗽咳痰的治疗中可以作用这些蛋白以起到减少炎症介质的产生。

ADRB2 则在咳嗽的治疗过程中则起到稳定细胞膜并舒张支气管平滑肌的作用, 临床上常用 β 受体激动剂来对该靶点进行作用。本文在研究过程中还发现陈皮罗汉果的入血成分对降血糖 (DPP4, PPARG, ADRB2) 有作用。

而研究过程中发现 MOL009295 (酒渣碱) 为关节活性成分对 AKT1, PTGS2, MMP9 和 DPP4 有较强的对接活性, 而 MOL009295 (酒渣碱) 亦有文献报道对该化合物可以抑制 TNF-α 和 IL-2 的 mRNA 表达和分泌, 并且可逆转 ConA 诱导的脾细胞 p-ERK1/2 和 p-p38 的增加。具有免疫调节功能, 可用于治疗免疫相关疾病。

根据以上结果可知罗汉果陈皮可能通过抑制炎症的发生和舒张支气管平滑肌来发挥止咳化痰的作用。

参考文献

[1] Kruse, A.C., et al., Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine r

- ceptor. Nature Publishing Group, 2013(7478).
- [2]Morris, G.M., et al., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of Computational Chemistry, 2009. 30.
- [3]Sanner, M.F., Python: A Programming Language for Software Integration and Development. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 1998.
- [4]Trott, et al., AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem., 2009. 31(2): p. NA-NA.
- [5]吕硕, 柑橘橘皮素抗炎活性. 2021, 西南大学.
- [6]Woo, et al., Lung Function Response to 12-week Treatment with Combined Inhalation of Long-acting β_2 Agonist and Glucocorticoid According to ADRB2 Polymorphism in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Lung, 2008.
- [7]Ying, K., et al., Immunomodulatory effects of flazin from *Crassostrea sikamea* on splenic lymphocytes of Sprague-Dawley rats. 中国天然药物:英文版, 2021. 19(11): p. 8.
- 作者简介: 陈蔓晗, 2008年1月, 女, 汉族, 广东省揭阳市普宁市, 广东药科大学中医学院在读大学生, 从事中医药研究。
- 基金项目: 汕府科[2022]81号-220518176491711