

基于网络药理学和分子对接探讨杆努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制

袁桃花¹, 黄雨霄², 殷智鑫³, 石 雪², 胡 盼¹, 孙见飞¹, 刘 华¹, 徐 红¹,
吴 宁^{1*}

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学临床医学院, 贵州 贵阳 550025;
3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 基于网络药理学探究杆努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制。**方法** 利用 TCMSP、SwissTarget Prediction 等数据库预测杆努尽烟活性成分及靶点; 在 TTD、Durgbank、DisGeNT 数据库检索慢性支气管炎靶点, 利用 Cytoscape Version 3.6.1 软件构建活性成分-关键靶点网络, 采用 String Version 10.5 数据库构建靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络, 运用 AutoDock-vina 软件进行分子对接, 分析杆努尽烟活性成分与主要靶点的结合能, 运用 DAVID 6.8 软件对关键靶点进行 GO 富集及 KEGG 通路分析。30 只 SD 大鼠随机分为正常对照组, 模型组, 杆努尽烟高、低剂量组, 阳性药物组, 烟熏加脂多糖气管注射法建立慢性支气管炎大鼠模型。给药 28 d 后取大鼠肺组织进行 HE 染色, ELISA 法检测 TNF- α 水平, RT-qPCR 和 Western blot 法检测 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 获得杆努尽烟活性成分 5 种, 作用于慢性支气管炎靶点 23 个, 这些靶点调控 NF- κ B、TNF- α 等炎症因子介导的核受体转录途径、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢等生物通路, 减缓炎症反应, 治疗慢性支气管炎。与模型组比较, 杆努尽烟高、低剂量组大鼠呼吸系统症状均有改善, 肺组织炎症减轻及匀浆中 TNF- α 水平、NF- κ B mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 杆努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制可能与其抑制 TNF- α 、NF- κ B 表达, 减缓肺组织炎症反应有关。

关键词: 苗药杆努尽烟; 慢性支气管炎; TNF- α ; NF- κ B; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0980-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.056

慢性支气管炎是一种常见的慢性呼吸系统疾病, 临床多以反复的咳嗽、咳痰或伴喘息的慢性病程为特征^[1-2], 常用抗生素、气管舒张药物等西药进行治疗, 起效快且疗效明显, 但慢性支气管炎病程长且易复发, 长期服用, 副作用较大^[3]。中草药有整体调节、多途径、多环节的特点, 疗效持久, 短期内病症复发现象少, 毒副作用小, 可长期坚持服用, 使其在治疗慢性支气管炎方面显示出明显优势^[4]。杆努尽烟 (苗药名 Cherh nex jenl veeb) 是贵州凯里苗族地区治疗慢性支气管炎的特色药方, 药源丰富、应用范围广、历史长、疗效显著, 但其作用机制尚不明确, 仍处于经验用药阶段^[5-6]。网络药理学的整体性和系统性与中草药特征不谋而合, 为中药方剂潜在活性成分与作用靶点的深入研究开辟新手段^[7-8]。因此, 本研究基于网络药理学方法, 获得杆努尽烟治疗慢性支气管炎的主要活性成分、关键靶标及信号通路, 并构建慢性支气管炎大鼠模型, 对筛选出的关键通路中重要靶点进行动物实验验证, 探究苗药杆努尽烟治疗慢性支气管炎的分子机制, 为深入研究杆

努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 雄性, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司, 实验动物使用许可证号 SYXF (黔) 2018-0001。

1.2 试剂与药物 贵烟黄果树蓝佳品 (焦油量 10 mg, 烟气烟碱量 0.9 mg, 一氧化碳量 12 mg, 贵阳卷烟厂); 杆努尽烟全草采自贵州省凯里市炉山镇, 经贵阳中医药大学潘炉台教授鉴定为吊石苣苔属植物吊石苣苔 *Lysionotus pauciflorus* Maxim.。桂龙咳喘宁胶囊 (大连天山药业有限公司, 国药准字 Z20050149)。TNF- α 酶联免疫试剂盒 (批号 A38281155)、NF- κ B p65 兔抗大鼠一抗 (批号 3560144117)、qPCR 反应试剂盒 (批号 Q311-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.3 仪器 SynGeneTM 凝胶成像系统 (美国 Synoptics 公司); ABI StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司)。

收稿日期: 2020-04-19

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201810660014); 贵州省科技计划项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7080); 贵州省大学生创新创业训练计划项目 (201710660055)

作者简介: 袁桃花 (1993—), 女, 硕士生, 实验师, 从事贵州特色药材作用机制的研究。E-mail: 1841307634@qq.com

***通信作者:** 吴 宁 (1974—), 女, 硕士, 教授, 从事贵州特色药材作用机制的研究。E-mail: 1638210715@qq.com

2 方法

2.1 杆努尽烟潜在活性成分筛选 通过 TCSP (http://tcmspw.com/tcmsp.php) 及化学专业数据库 (http://www.orgchem.csdb.cn/scdb/default.htm?nCount=13303008) 发掘杆努尽烟的化学成分,文献资料进行补充,根据成分的吸收(Absorption)、分布(Distribution)、代谢(Metabolism)及排泄(Excretion),即 ADME 参数筛选有效成分^[7],筛选条件为药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 ,结合文献资料保留对慢性支气管炎有效、活性大的成分^[5],利用 PubChem 数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Nevadensia) 对筛选出的药物活性成分的 SMILES 化学式进行补充。

2.2 活性成分潜在靶点预测与筛选 采用 TCSP 数据库预测筛选杆努尽烟有效成分作用靶点,通过 SwissTargetPrediction 数据库 (http://www.swisstargetprediction.ch/) 补充空缺成分靶点,并输入 UniProt 数据库 (https://www.uniprot.org/),限定物种为人,将名称校正,获取 UniProt 号。

2.3 “杆努尽烟活性成分-靶点”网络构建 将活性成分与靶点整理后导入 Cytoscape 3.6.1 软件,构建“杆努尽烟活性成分-靶点”网络图。

2.4 慢性支气管炎靶点检索 以“Chronic bronchitis”为关键词,通过 TTD 数据库 (http://db.idrblab.net/ttd/)、Drugbank 数据库 (https://www.drugbank.ca/)、DisGeNT 数据库 (https://www.disgenet.org/) 检索慢性支气管炎靶点,取交集并去重,获得 UniProt 号。

2.5 杆努尽烟活性成分治疗慢性支气管炎作用靶点预测 利用药物靶点和慢性支气管炎靶点,通过 Venny 2.1 软件绘制 Venn 图,将图中交集靶点输入 String Version 10.5 数据库 (https://string-db.org/),限定物种为人,并隐藏出现的游离蛋白,获得杆努尽烟-慢性支气管炎蛋白互作 (PPI) 网络图,并利用 Cytoscape Version 3.6.1 软件进行可视化分析。

2.6 分子对接 利用 sybyl-x 2.0 进行配体分子的前处理,小分子加 Gasteiger-Huckel 电荷,设置最大优化步数 10 000,初始优化的能量梯度收敛条件 0.005 kcal/(mol * Å),能量优化算法为 Powell,其他值为系统默认。靶标蛋白前处理在 sybyl-x2.0 中进行:蛋白质分子全部除去晶体水、加氢并除去占据结合位点的共结晶配体分子,补上缺失氨基酸残基及末端残基,设定氨基酸质子化状态,赋予力场为 AMBER7 FF99, Kollman 电荷。利用 AutoDockTools (ADT) 生成对接所需的 pdbqt 文件,最后用 AutoDock-vina 软件计算得到几个优势结合构象,以打分最高(结合能力最强的构象)记录各配体分子与靶标间的结合能大小^[9]。

2.7 关键靶点的富集分析 用 DAVID 6.8 数据库 (http://www.david.niaid.nih.gov) 对上述关键靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路分析,其中 GO 注释包括生物学过程 (BP)、细胞组成 (CC) 和分子功能 (MF) 模块,KEGG 通路筛选以 $P < 0.05$ 作为显著性强的临界筛选,以

Count 值降序排列,列出杆努尽烟活性成分治疗慢性支气管炎的前 15 位关键通路。

2.8 分组与造模 SD 大鼠分为正常对照组,模型组,杆努尽烟高、低剂量组,阳性药物组(桂龙咳喘宁),每组 6 只。将正常对照组置于无烟环境中饲养,其余各组均采用烟熏联合脂多糖气管注射法复制慢性支气管炎大鼠模型^[10]。制备被动吸烟箱 (55 cm×45 cm×35 cm,上壁留有通气孔)。第 1 天和第 14 天以 8% 水合氯醛 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉大鼠后,气道内注射 200 mg/mL 脂多糖溶液 0.2 mL,手术当天不作烟熏,其余时间各组大鼠每次用 4 只香烟熏,每天 2 次,每次 30 min。造模 28 d 后,每组随机取 1 只大鼠,用 4% 多聚甲醛灌注处理,取左肺上叶制作 HE 切片,镜下观察大鼠肺组织病理改变,验证造模成功。

2.9 杆努尽烟水提液制备 取 2 kg 杆努尽烟,蒸馏水浸泡,于 90 °C 电热恒温水箱中连续浸提 12 h,收集并过滤浸提液;合并浸提液,浓缩至生药量为 2.5 kg/L,分装灭菌,置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.10 给药 造模结束后第 2 天开始给药,杆努尽烟高、低剂量组大鼠分别灌胃给予杆努尽烟水提液 8、2 g/kg (按生药量计),阳性药物组灌胃给予桂龙咳喘宁 1 g/kg,正常对照组及模型组灌胃给予等量生理盐水,每天 1 次,连续给药 28 d。

2.11 肺组织采集 麻醉大鼠,心脏取血,打开胸腔,取下肺组织,将左肺上叶固定于 4% 多聚甲醛中,用于制作 HE 切片;另取右肺经 RNA 保存液处理后置于 -80 °C 冰箱保存,用于后续指标的检测。

2.12 病理组织切片制作 操作流程为常规脱蜡→染色→水洗→分化→漂洗→脱水 I→复染→脱水 II→烤片→中性树胶封片→显微镜下观察支气管及肺组织病理形态学变化。

2.13 ELISA 法检测肺组织中 TNF- α 水平 取 50 mg 肺组织,置于研钵中,用眼科剪快速剪碎组织块,加入 PBS,充分研磨,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书操作,检测细胞因子 TNF- α 水平。

2.14 RT-qPCR 检测肺组织 NF- κ B mRNA 表达 Trizol 法提取大鼠肺组织匀浆总 RNA,取 1 μ g RNA 进行逆转录,按说明书合成 cDNA。内参照 GAPDH、NF- κ B 引物序列见表 1。按 qPCR 反应试剂盒说明书进行反应,反应条件为预变性 95 °C 5min;循环反应为 95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环;熔解曲线为 95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析,以 GAPDH 为内参。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
GAPDH	正向 GAAGCTGGTCATCAACGGGA
	反向 GGCGGAGATGATGACCCCTT
NF- κ B	正向 CATACGCTGACCTAGCCTG
	反向 TTTCTCAATCCGGTGGCGA

2.15 Western blot 检测 NF- κ B 蛋白表达 实验操作步骤依

次为提取蛋白→BCA 法进行蛋白浓度定量→蛋白变性→SDS-PAGE 电泳后转膜→5% 脱脂奶粉封闭→加入一抗, 4 ℃ 过夜→TBST 洗膜 3 次→加入二抗, 室温下振荡 2 h→洗涤后将 PVDF 膜置于 ECL 混合液中→应用凝胶成像系统对扫描图像的目的条带→进行灰度分析。

2.16 统计学方法 通过 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

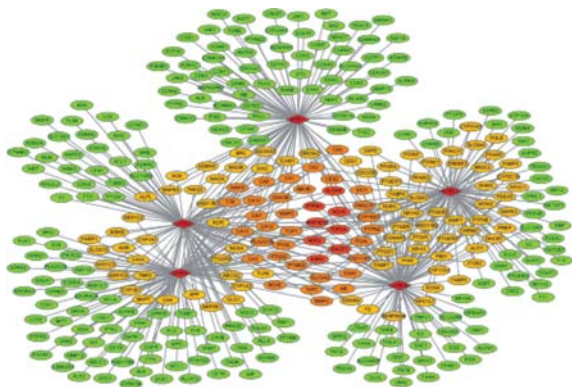
3 结果

3.1 杆努尽烟潜在活性成分筛选结果 去除重复成分后, 共得到 8 种, 同时满足 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 或结合文献报道对慢性支气管炎有效且满足其中 1 个条件的杆努尽烟活性成分共 5 种, 见表 2。

表 2 杆努尽烟潜在化学成分

成分 ID	成分名称	OB/%	DL
MOL000360	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	39.56	0.06
MOL002786	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	31.71	0.04
MOL003884	石吊兰素	14.26	0.37
MOL000511	熊果酸	16.77	0.75
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75

3.2 绘制“杆努尽烟活性成分-关键靶点”网络图 共获得 5 种活性成分靶点 514 个, 删除重复并去除假阳性项, 整合得到苗药杆努尽烟作用靶点共 340 个。“杆努尽烟活性成分-关键靶点”网络图 (图 1) 显示, 5 种关键成分共同作用的靶点有 8 个, 包括 11 号染色体的基因 ($BACE1$)、诱导型一氧化氮合酶 ($NOS2$)、蛋白酪氨酸磷酸酶—非受体 1 型 ($PTPN1$)、花生四烯 5-脂氧合酶基因 ($ALOX5$)、雌激素受体 2 ($ESR2$) 等, 其中 $ALOX5$ 、 $PTPN1$ 等能介导慢性支气管炎炎症反应, 提示这些靶点可能是杆努尽烟的作用于慢性支气管炎的靶点。



注: LPM-1~LPM-5 分别为 1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮、3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸、 β -谷甾醇、石吊兰素、熊果酸。菱形代表杆努尽烟成分, 椭圆形代表靶点; 自由度越大, 颜色越深。

图 1 “杆努尽烟活性成分-关键靶点”网络图

3.3 杆努尽烟活性成分治疗慢性支气管炎作用靶点预测 检索整合得到的慢性支气管炎靶点共 103 个, 将其与

杆努尽烟活性成分作用靶点进行基因映射, 共得潜在作用靶点 23 个, 见图 2。

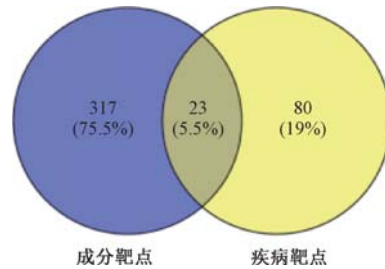


图 2 “杆努尽烟-慢性支气管炎”基因映射 Venn 图

3.4 杆努尽烟-慢性支气管炎蛋白互作 (PPI) 网络分析 杆努尽烟-慢性支气管炎蛋白互作 (PPI) 网络图中 (图 3A), 去除 2 个游离蛋白, 该图包括 23 个节点, 55 条边, 平均自由度为 4.78, 其中互作蛋白评分 ≥ 0.9 的包括 NR3C2-NR3C1、CYP1B1-ADORA1、NR3C2-PGR、CHRM2-ADORA3 等。利用 Cytoscape Version 3.6.1 软件对 PPI 网络图进行可视化, 得到杆努尽烟-慢性支气管炎蛋白互作 (PPI) 网络图 (图 3B), 该图包括 21 个节点, 平均自由度为 5.24, 得到自由度大于平均自由度的靶点共 7 个, 按自由度从高到低排序依次为 ALB、CYP1A1、CYP1B1、ADORA1、PGR、NR3C1、GSTP1、CYP1A2, 见表 3。

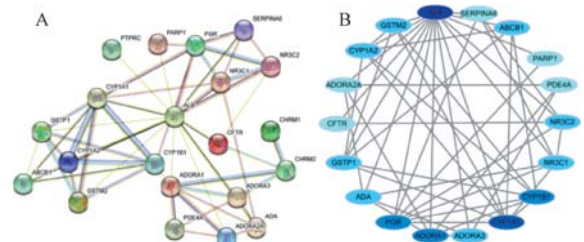


图 3 杆努尽烟-慢性支气管炎蛋白互作 (PPI) 网络图

表 3 PPI 网络关键节点及其拓扑参数

名称	自由度	中介中心度	接近中心度
ALB	16	0.54	0.80
CYP1A1	8	0.02	0.56
CYP1B1	7	0.05	0.56
ADORA1	7	0.13	0.61
PGR	7	0.04	0.54
NR3C1	6	0.01	0.53
GSTP1	6	0	0.53
CYP1A2	6	0	0.53

3.5 杆努尽烟-慢性支气管炎靶点网络图 杆努尽烟-慢性支气管炎靶点网络图 (图 4) 中包含节点 74 个, 靶标 37 个, 其中 $ALOX5$ 、多药耐药性蛋白 ($ABCB1$) 靶点的介数较大, 被预测为杆努尽烟治疗慢性支气管炎的靶点, 其次是腺苷受体 A3 ($ADORA3$)、核受体亚家族 3C 组成员 1/2 ($NR3C1/2$)、胆碱能受体毒蕈碱 2 ($CHRM2$)、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员 6 ($SERPINA6$)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 ($PARP1$)、细胞色素 P450 家族 1 亚家族 B 成员 1 ($CYP1B1$) 等发挥治疗慢性支气管炎的可能性较大。

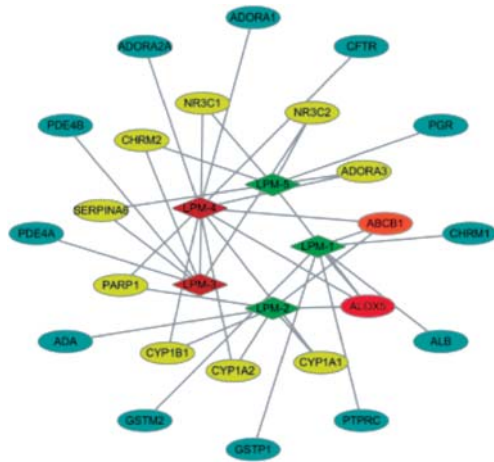
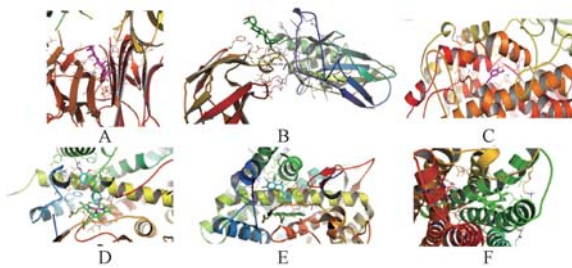


图 4 杆努尽烟-慢性支气管炎靶点网络图

3.6 分子对接分析 利用 AutoDock-vina 软件对杆努尽烟的 5 种主要活性成分与筛选出的关键靶点 (ALOX5、CYP1A1、CYP1B1、TNF- α 、NF- κ B、ADORA1) 进行分子对接, 对接模式见图 5, 对接亲合能量值见表 4。杆努尽烟的成分中熊果酸、 β 谷甾醇、石吊兰素分别与 TNF- α 和 NF- κ B 亲和能量值低, 其中熊果酸亲和力最强。3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸、1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮与 ALOX5 亲合力较强, 3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸亲和力较强。石吊兰素、3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸、1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮与 CYP1A1 和 CYP1B1 的亲合力低, 其中石吊兰素亲和力最强。 β 谷甾醇、熊果酸、石吊兰素与 ADORA1 亲合力低, β 谷甾醇亲和力最强。从以上结果可知, CYP1A1、CYP1B1、ADORA1、TNF- α 、NF- κ B 可能为杆努尽烟治疗慢性支气管炎的主要靶点。



注: A ~ E 分别为 TNF- α 与熊果酸、NF- κ B 与熊果酸、ALOX5 与 3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸、CYP1A1 与石吊兰素、CYP1B1 与石吊兰素、ADORA1 与 β 谷甾醇。

图 5 主要化合物与靶点最优结合模式图

3.7 关键靶点的富集分析 采用 DAVID 软件筛选“杆努尽烟”治疗慢性支气管炎的潜在生物效应, 根据设置阈值 $P < 0.05$ 筛选 GO 生物过程和 KEGG 通路。GO 富集分析中, 主要生物过程包括腺苷受体信号通路、嘌呤核苷酸分解过程等; 细胞成分主要涉及细胞液, 细胞连接, 细胞内膜上细胞器等; 分子功能主要涉及 G 蛋白偶联腺苷受体活性、嘌呤核苷酸分解过程。KEGG 通路富集分析结果显示, 靶点通路主要包括核受体转录途径、色氨酸代谢、细胞色素

表 4 候选 5 个化合物与 6 个关键靶点对接能量值

靶标名称	PDB ID	化合物名称	分子对接能量值
TNF- α	2AZ5	熊果酸	-9.8
TNF- α	2AZ5	β 谷甾醇	-8.3
TNF- α	2AZ5	石吊兰素	-7.4
TNF- α	2AZ5	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-5.7
TNF- α	2AZ5	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-5.6
NF- κ B	1SVC	熊果酸	-6.9
NF- κ B	1SVC	β 谷甾醇	-6.1
NF- κ B	1SVC	石吊兰素	-6.0
NF- κ B	1SVC	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-4.7
NF- κ B	1SVC	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-4.7
ALOX5	3O8Y	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-6.4
ALOX5	3O8Y	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-5.7
ALOX5	3O8Y	石吊兰素	-1.8
ALOX5	3O8Y	β 谷甾醇	1.9
ALOX5	3O8Y	熊果酸	19.9
CYP1A1	4I8V	石吊兰素	-10.6
CYP1A1	4I8V	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-8.4
CYP1A1	4I8V	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-7.5
CYP1A1	4I8V	β 谷甾醇	-7.0
CYP1A1	4I8V	熊果酸	11.1
CYP1B1	3PM0	石吊兰素	-10.7
CYP1B1	3PM0	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-7.9
CYP1B1	3PM0	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-7.7
CYP1B1	3PM0	β 谷甾醇	-5.0
CYP1B1	3PM0	熊果酸	14.9
ADORA1	5N2S	β 谷甾醇	-10.3
ADORA1	5N2S	熊果酸	-9.5
ADORA1	5N2S	石吊兰素	-8.2
ADORA1	5N2S	3-(4-羟基-3-甲氧苯基) 败脂酸	-6.0
ADORA1	5N2S	1-(4-羟基-3-甲氧苯基) 乙酮	-5.3

P450 对异生物质的代谢、花生四烯酸代谢、cAMP 信号通路等 (图 6~7), 这些通路直接或间接介导参与慢性支气管炎的发生发展过程。结果表明, 杆努尽烟主要化学成分的作用靶点涉及多样化的生物学过程, 并分布于不同的代谢通路, 体现了其多成分、多靶点、多途径的治疗特点。为此, 本研究结合富集分析结果及慢性支气管炎发病机制, 绘制杆努尽烟治疗慢性支气管炎分子作用机制的信号通路图, 主要包括 NF- κ B、TNF- α 、cAMP、IL 信号通路等, 并选取了 NF- κ B、TNF- α 通路关键靶点进行实验验证, 见图 8。

3.8 大鼠一般情况 正常对照组大鼠未见明显症状; 模型组大鼠毛发光泽度下降, 体质量减轻, 并伴有咳嗽、喘息等症状; 与模型组大鼠比较, 阳性药物组、杆努尽烟各剂量组大鼠的一般情况均有改善, 其中杆努尽烟高剂量组症状改善最为明显。

3.9 大鼠肺组织病理学改变 正常对照组大鼠肺泡壁完整均一, 细支气管上皮细胞结构完整, 排列整齐, 未见炎性细胞浸润; 模型组大鼠肺泡壁结构完整性受到破坏, 肺泡间和气管旁有大量炎性细胞浸润, 细支气管上皮细胞排列不整齐, 管腔内可见明显分泌物, 提示炎性损伤发生, 造模成功; 与模型组比较, 阳性药物组大鼠肺泡壁及细支气

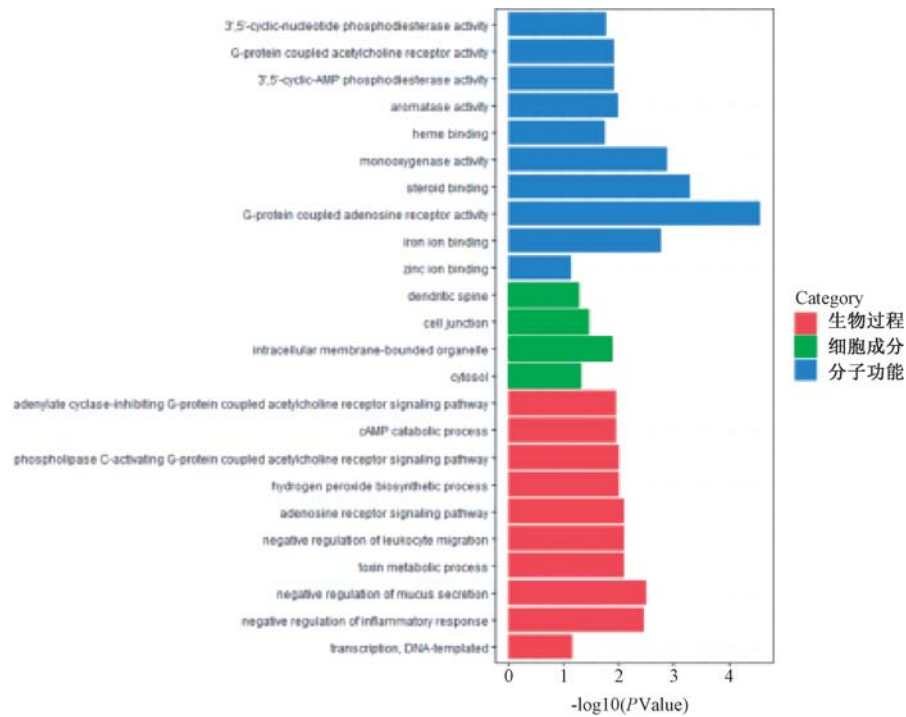


图 6 关键靶点的 GO 富集

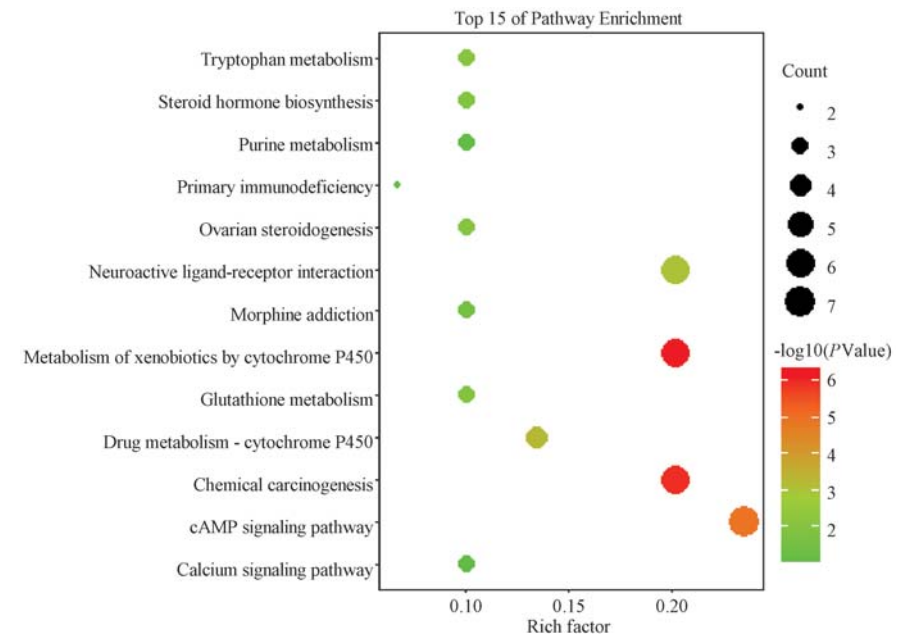


图 7 KEGG 富集排名前 15 位的信号通路

管周围炎细胞浸润程度减轻，杆努尽烟低剂量组大鼠炎性细胞浸润程度较低，细支气管上皮细胞有所改善，杆努尽烟高剂量组大鼠肺组织肺泡壁增厚情况得到改善，炎细胞浸润程度减轻，管腔内分泌物减少，细支气管上皮细胞排列整齐，见图 9。

3.10 杆努尽烟对大鼠肺组织中 TNF- α 水平的影响 与正常对照组比较，模型组大鼠肺组织中 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，阳性药物组和杆努尽烟各剂量组大鼠组织中 TNF- α 水平均降低 ($P<0.05$)，见表 5。

表 5 杆努尽烟对大鼠肺组织中 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s=6$)

组别	TNF- α /(mg·L ⁻¹)
正常对照组	44.98±4.36
模型组	72.96±10.33 [*]
阳性药物组	54.98±11.57 [#]
杆努尽烟高剂量组	52.99±1.33 [#]
杆努尽烟低剂量组	59.27±5.40 [#]

注：与正常对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ 。

3.11 杆努尽烟对大鼠肺组织中 NF- κ B 蛋白和 mRNA 表达

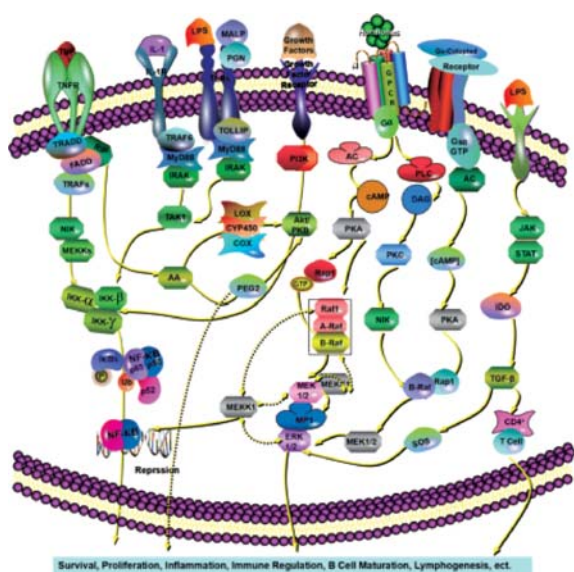
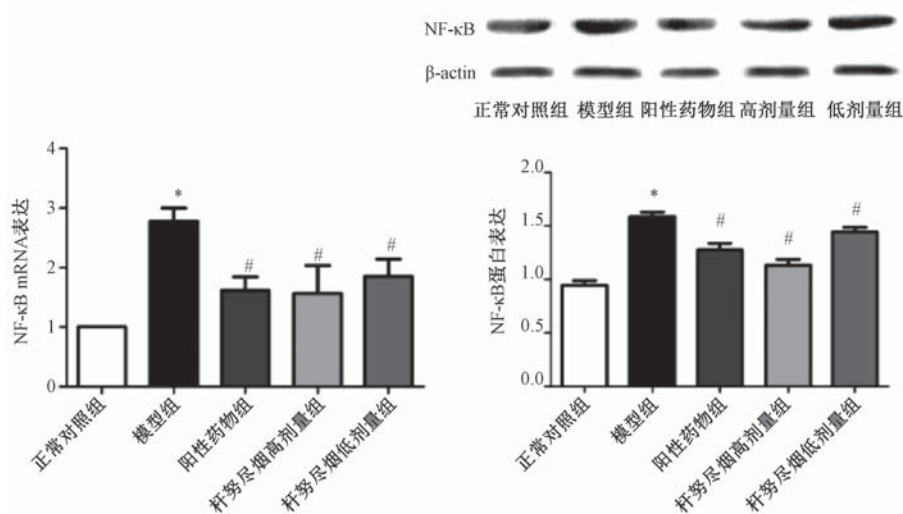


图8 杆努尽烟治疗慢性支气管炎分子作用机制图



图9 各组大鼠肺组织切片



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

图10 杆努尽烟对大鼠肺组织中 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达的的影响

为进一步探究杆努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制，进行 GO 富集与 KEGG 分析，结果主要包括核受体转录途径、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢、细胞色素 P450 对异生物质的代谢等途径。核受体超家族包括很多的转录因子，其中 NF-κB 是细胞内重要的核转录因子，能诱导肿瘤坏死因子受体 1/2/4，白介素 1 等表达，在炎症和免疫反应中发挥重要^[11-12]。色氨酸作为人体必需的氨基酸，而 5-羟色胺（5-HT）代谢途径是其重要降解途径，研究表明，5-HT 的主要

的影响 与正常对照组比较，模型组大鼠肺组织中 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达升高（ $P < 0.05$ ）；与模型组比较，阳性药物组和杆努尽烟各剂量组大鼠肺组织中 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达均降低（ $P < 0.05$ ），见图 10。

4 讨论

本研究基于网络药理学方法挖掘苗药杆努尽烟活性成分，获得杆努尽烟活性成分 5 种，分别为 3-（4-羟基-3-甲氧苯基）败脂酸、1-（4-羟基-3-甲氧苯基）乙酮、石吊兰素、熊果酸、β-谷甾醇，其中熊果酸、石吊兰素、β-谷甾醇为“杆努尽烟-慢性支气管炎靶点”网络图的核心节点，具有良好的抗炎、止咳等作用。

PPI 网络图筛选出的关键靶点包括 ALB、CYP1A1、CYP1B1 等，“杆努尽烟-慢性支气管炎靶点”网络图中 ALOX5、ABCB1 被预测为杆努尽烟治疗慢性支气管炎的靶点，其中 ALOX5、CYP1B1、CYP1A2 等靶点与炎症密切相关，而炎症反应作为慢性支气管炎发展的核心机制，提示其可能参与杆努尽烟发挥治疗慢性支气管炎的作用过程。

代谢物 5-羟基吲哚乙酸（5-HIAA）与炎症、氧化应激等多种免疫反应密切相关^[13-14]。花生四烯酸（AA）代谢途径活化会产生 ALOX5、CYP1A1 和 CYP1B15 等因子，进而激活 TNF-α、IL-1 等炎症因子，刺激花生四烯酸分泌，促使炎症反复发生^[15-16]。由此可知，TNF-α、NF-κB 参与色氨酸代谢、核受体转录途径、花生四烯酸代谢等众多生物过程，二者激活，可导致炎症反应，进而加重慢性支气管炎病情，提示杆努尽烟可通过调控 TNF-α、NF-κB 表达抑制炎症反

应, 达到治疗慢性支气管炎的目的。

基于 TNF- α 、NF- κ B 靶点初步探究杆努尽烟治疗慢性支气管炎的作用机制, 验证网络药理学结果。采用烟熏加脂多糖气管注射法成功建立慢性支气管炎大鼠模型, 给药 28 d 后, 病理切片显示杆努尽烟能减轻慢性支气管炎大鼠肺组织炎症; ELISA、RT-qPCR、Western blot 结果提示杆努尽烟能降低大鼠肺组织匀浆中 TNF- α 、NF- κ B 表达, 减缓炎症反应。

综上所述, 本研究体现了杆努尽烟治疗慢性支气管炎多成分、多靶点、多途径的作用特点, 其可能通过抑制 TNF- α 、NF- κ B 表达, 降低慢性支气管炎肺部炎症, 进而发挥治疗慢性支气管炎的作用, 为深入探究杆努尽烟治疗慢性支气管炎作用机制及其临床运用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Balte P P, Chaves P H M, Couper D J, *et al.* Association of nonobstructive chronic bronchitis with respiratory health outcomes in adults[J]. *JAMA Intern Med*, 2020, 180(5): 676-686.
- [2] Woodruff P G, Lazarus S C. Long-term sequelae of nonobstructive chronic bronchitis-is airflow obstruction important? [J]. *JAMA Intern Med*, 2020, 180(5): 686-687.
- [3] Rozanski E. Canine chronic bronchitis; an update[J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2020, 50(2): 393-404.
- [4] Wu J Y, Yan W P, Wu X H, *et al.* Protective effects of Corbrin Capsule against permanent cerebral ischemia in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109646.
- [5] 赵 丹, 胡 欣, 褚晓鹏, 等. 贵州苗药杆努尽烟对慢性支气管炎模型大鼠肺组织 MyD88 蛋白表达的影响[J]. 华北理工大学学报(医学版), 2018, 20(4): 258-264.
- [6] Zhou Z C, Chen B, Chen S M, *et al.* Applications of network pharmacology in traditional Chinese medicine research[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1646905.
- [7] 赵新望, 徐文华, 赵 阳, 等. 基于网络药理学研究川芎治疗冠心病的作用机制[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2096-2101.
- [8] 俞 婷, 刘新娟, 刘 力, 等. 基于网络药理学的荆银颗粒治疗病毒性感冒作用机制研究[J]. 中成药, 2020, 42(2): 456-461.
- [9] 朱晓芹, 刘志强, 王博龙. 基于生物分子网络和分子对接研究槲皮素抗宫颈癌的机制[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(1): 23-31; 69.
- [10] 范明华, 张 铭, 梁 晔, 等. 大鼠慢性肺部感染刺激抗中性粒细胞胞质抗体产生及其机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(8): 603-610.
- [11] Kojok K, El-Kadiry A E, Merhi Y. Role of NF- κ B in platelet function[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4185.
- [12] Choi M C, Jo J, Park J, *et al.* NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 734.
- [13] Zhang C J, Zhao B S, Zhang C, *et al.* Mechanisms of bergenin treatment on chronic bronchitis analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on metabolomics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2270-2277.
- [14] 李素素, 杨雪枝, 常 艳, 等. 色氨酸 2, 3-双加氧酶介导炎症免疫调控的作用和研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 710.
- [15] Saeed A, Khan S U, Mahesar P A, *et al.* Substituted (*E*)-2-(2-benzylidenhydrazinyl)-4-methylthiazole-5-carboxylates as dual inhibitors of 15-lipoxygenase & carbonic anhydrase II: synthesis, biochemical evaluation and docking studies [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(1): 176-181.
- [16] Tiwari M. The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2017, 12(3): 209-215.