

基于网络药理学探究兰艾双香方治疗细菌感染的机制研究^{*}

宋 健¹, 孟凯强¹, 张振华¹, 张瑞凡¹, 王紫慧¹, 胥 冰¹, 王 斌¹, 沈舒文¹, 杨燕燕^{2△}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 目的 旨在通过网络药理学研究方法寻找兰艾双香方在治疗细菌感染方面存在的潜在的分子机制及相关分子通路,为进一步研究兰艾双香方提供理论依据。方法 通过中药数据分析平台(TCMSP)筛选兰艾双香方的活性成分及对应靶点,对兰艾双香方进行复方成分分析,利用 Cytoscape 软件构建兰艾双香方治疗细菌感染的“单味药-活性成分-作用靶点”网络,再通过 Gene Cards,OMIM 和 DigSee 3 个数据库整合细菌感染的相关靶点,将靶点数据导入 jvenn 平台做出韦恩图,导入 String 平台得到 PPI,导入 Metascape 中对兰艾双香方治疗细菌感染的作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,根据 KEGG 富集得到的通路绘制相关气泡图,将 KEGG 分析得到的通路导入 Cytoscape 软件构建“靶点通路”网络。结果 ①筛选得到兰艾双香方共 110 个药效成分和 1 788 个作用靶点,关键靶点包括过氧化物酶体增殖物激活受体、血管内皮生长因子 A、肿瘤坏死因子和表皮生长因子受体等;②细菌感染相关靶点 1 442 个;③蛋白互作核心网络共 97 个蛋白,分析得到 4 个蛋白模块;④获得 2 401 个 GO 生物过程,KEGG 通路富集筛选得到 324 条相关信号通路,通路类型包括癌症的路径、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子信号通路、小细胞肺癌、利什曼病、HIF-1 信号通路、军团杆菌病等,这些通路均与细菌感染的发生发展相关;⑤结果证实,兰艾双香方可能通过调节细胞代谢、增殖与凋亡、脂代谢等多种途径达到治疗细菌感染的目的,该目的是多成分、多靶点和多通路相互作用的结果。结论 兰艾双香方在癌症、糖尿病和乙型肝炎疾病进展过程中并发细菌感染的治疗可能有更好的疗效。

关键词: 网络药理学;兰艾双香方;细菌感染;并发症;癌症;糖尿病;乙型肝炎;原癌基因 c-Jun;原癌基因 c-FOS;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)04-0062-14

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.04.011

Investigating the Mechanism of Lanai Shuangxiang Decoction for the Treatment of Bacterial Infection Based on Network Pharmacology

SONG Jian¹, MENG Kaiqiang¹, ZHANG Zhenhua¹, ZHANG Ruifan¹, WANG Zihui¹,

XU Bing¹, WANG Bin¹, SHEN Shuwen¹, YANG Yanyan²

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

ABSTRACT: Objective To find out the potential molecular mechanisms and related molecular pathways of Lanai Shuangxiang decoction in the treatment of bacterial infections through the research method of network pharmacology, and to provide a theoretical basis for further research on Lanai Shuangxiang decoction. **Methods** The active ingredients and corresponding targets of Lanai Shuangxiang decoction were screened by the Traditional Chinese Medicine Data Analysis Platform (TCMSP), and the compound ingredients of Lanai Shuangxiang decoction were analyzed by Cytoscape software to construct a “single drug-active ingredient-target” network of Lanai Shuangxiang decoction for the treatment of bacterial

收稿日期: 2021-06-28

^{*} 基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(S202010716003)

第一作者简介: 宋健(1978-),男,博士,副教授、副主任医师,研究方向:中医药防治脾胃病。

△通信作者: 杨燕燕, E-mail: 694149099@qq.com

infections. The target data were imported into jvenn to make a Wayne diagram, imported into String platform to obtain PPI, imported into Metascape to perform GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis on the targets of Lanai Shuangxiang decoction for the treatment of bacterial infections, and based on the KEGG enrichment obtained, the relevant bubble maps were drawn. The KEGG pathway analysis was imported into Cytoscape software to construct the “target pathway” network. **Results** ①A total of 110 active ingredients and 1788 action targets were obtained from the screening of Lanai Shuangxiang decoction. The key targets included peroxisome proliferator-activated receptor, vascular endothelial growth factor A, tumor necrosis factor and epidermal growth factor receptor, etc.; ②1 442 targets related to bacterial infection; ③97 proteins in the core network of protein interactions, and 4 protein modules were analyzed; ④2 401 GO biological processes were obtained. KEGG pathway enrichment screening obtained 324 related signaling pathways, pathway types including pathways of cancer, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, hepatitis B, tumor necrosis factor signaling pathway, small cell lung cancer, leishmaniasis, HIF-1 signaling pathway, legionellosis, etc., which are all related to the development of bacterial infection; ⑤ The results confirmed that Lanai Shuangxiang prescription may achieve the purpose of treating bacterial infection by regulating cell metabolism, proliferation and apoptosis, lipid metabolism and other pathways, which is the result of multi-component, multi-target and multi-pathway interactions. **Conclusion** Lanai Shuangxiang decoction may have better efficacy in the treatment of bacterial infections complicated by the progression of cancer, diabetes and hepatitis B disease.

KEY WORDS: network pharmacology; Lanai Shuangxiang decoction; bacterial infections; complications, cancer; diabetes mellitus; hepatitis B; Jun; FOS; IL-6; TNF

细菌感染是常见的微生物侵体类型,细菌感染可作为诱导因素,诱导其他疾病的发生发展,也可由其他疾病诱发。关于细菌感染的治疗也是多种多样的,常规的抗生素治疗,噬菌体治疗等。由于抗生素的滥用,抗生素耐药性时常发生^[1-2],新的治疗策略就显得非常意义。

越来越多的临床数据证明传统医学理论指导下的遣方用药在治疗细菌感染方面疗效显著^[3],兰艾双香方是名老中医沈舒文教授扎实的中医理论和丰富中医临床经验的凝练,多年来一直作为治疗细菌感染临床基础方,其组成有羌活、独活、石菖蒲、藿香、苍术、丁香、薄荷、贯众、苦杏仁、佩兰、艾叶,该方临床中取得了良好的疗效。

网络药理学(network pharmacology, NP)是以整体性和系统性为特性强调多成分、多靶点、多疾病之间的相互作用,通过使用网络药理学可提高效率,降低开发成本,也适用于中医药的研究与开发。作为一项研究手段,网络药理学迅速发展,形成了一系列成熟的数据方法、平台和软件,如中药系统药理数据库与分析平台(TCMSP)可对中药成分进行筛选、获取成分-靶点-疾病关系;Gene Cards, OMIM 和 DigSee 3个数据库集成包括基因组、蛋白质组、功能信息等资源;STRING 数据库可以预测药物与蛋白质之间相互作用;Cytoscape 软件用于分子互作网络及生物途径可视化;Metascape 用于对靶点进行 GO 功能富集分

析和 KEGG 通路富集分析等。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 兰艾双香方活性成分的获取及靶点筛选 利用 TCMSP 数据库收集兰艾双香方中羌活、独活、石菖蒲、藿香、苍术、丁香、薄荷、贯众、苦杏仁、佩兰和艾叶的化学成分^[4-6],以口服生物利用度($OB \geq 30\%$)和类药性($DL \geq 0.18$)为指标进行筛选,确定其活性成分。通过 TCMSP 和 Drug Bank 数据库查询活性成分相对应的靶标蛋白,并利用 Unitprot 数据库查询靶标蛋白对应的基因名称,筛选人类的靶点蛋白,最终整理得到兰艾双香方的活性成分及其对应靶点。

1.2 细菌感染靶点筛选预测 利用 Gene Cards, OMIM 和 DigSee 3 个数据库,以“bacterial infection”为关键词,对细菌感染相关靶点进行检索及筛选,将 3 个数据库筛选结果合并,删除重复项后得到细菌感染的相关靶标信息。

1.3 网络构建与分析 利用 jvenn 平台做出韦恩图将所得药物活性成分靶点与细菌感染疾病靶点相映射,得到兰艾双香方治疗细菌感染的预测靶点。将交集得到的靶点导入 String 数据库,构建“蛋白质-蛋白质”相互作用网络,并用 Cytoscape 3.8.0 软件中的 CytoNCA 插件对所得的蛋白质相互作用网络数据进行分析,借助度中心性(DC)和介度中心性(BC)指标进行筛选,筛选完成后根据初筛结果继续筛选大于每个指标所对应的中位数的节点,得到兰艾双香方治疗

细菌感染的关键靶点^[7-8]。

1.4 GO 富集分析与 KEGG 富集分析 通过 Metascape 中对兰艾双香方治疗细菌感染的作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,分别研究兰艾双香方治疗细菌感染的主要生物功能与主要信号通路,其中 $P<0.05$ 代表富集结果显著,并通过 Metascape 制作 GO 富集分析图及 KEGG 富集分析气泡图^[9-12]。

1.5 KEGG 关系网络构建 先分别建立通路、基因相互作用关系和节点属性、基因相互作用关系,并导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,选取主要的 KEGG 信号通路,构建兰艾双香方治疗细菌感染的“KEGG-基因”的关系网络图。

1.6 主要观察指标 ①单味药-活性成分-作用关键化合物成分;②PPI 网络及网络拓扑分析后兰艾双香方关键蛋白基因;③筛选后关键基因在 KEGG 和 GO

富集的结果。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选结果 利用 TCMSP 数据库检索共收集得到兰艾双香方的化学成分,根据口服生物利用度($OB\geq 30\%$)和类药性($DL\geq 0.18$)为指标进行筛选,得到复方中共 110 个活性化学成分,羌活(15 个)、独活(9 个)、石菖蒲(4 个)、藿香(11 个)、苍术(9 个)、丁香(6 个)、薄荷(10 个)、贯众(7 个)、苦杏仁(19 个)、佩兰(11 个)和艾叶(9 个)的化学成分,活性成分的基本信息见表 1,相同活性成分对比见表 2。通过 TCMSP 数据库得到兰艾双香方中活性成分靶点 1 788 个,通过验证筛选最终确定有效靶点 245 个,利用 Cytoscape 3.8.0 软件将兰艾双香方的复方活性成分及作用靶点进行分析整理得到图 1,其中菱形代表作用靶点在中间呈长方形排列,六边形为中药的有效成分,圆形为中药,具体对应见表 3。

表 1 兰艾双香方中活性化合物基本信息

来源	编号	成分	口服利用度 (OB)%	类药性 (DL)
羌活	MOL011971	diversoside_qt	67.57	0.31
	MOL011975	notoptol	62.97	0.48
	MOL004792	nodakenin	57.12	0.69
	MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23
	MOL001951	Bergaptin	41.73	0.42
	MOL011969	Demethylfuropinnarin	41.31	0.21
	MOL011963	8-geranoxyl-5-methoxypsoralen	40.97	0.5
	MOL002644	Phellopterin	40.19	0.28
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL001941	Ammidin	34.55	0.22
	MOL011968	coumarin, glycoside	33.07	0.78
	MOL001956	Cnidilin	32.69	0.28
	MOL011962	6'-Feruloylnodakenin	32.02	0.67
	MOL002881	Diosmetin	31.14	0.27
独活	MOL004780	Angelicone	30.99	0.19
	MOL001941	Ammidin	34.55	0.22
	MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23
	MOL003608	O-Acetylcolumbianetin	60.04	0.26
	MOL004782	[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl] 3-methylbutanoate	45.19	0.34
	MOL004778	[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl] (Z)-2-methylbut-2-enoate	46.03	0.34

续表 1

来源	编号	成分	口服利用度 (OB)%	类药性 (DL)
石菖蒲	MOL004777	Angelol D	34.85	0.34
	MOL004792	nodakenin	57.12	0.69
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL003542	8-Isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
	MOL003576	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan	52.35	0.62
藿香	MOL003578	Cycloartenol	38.69	0.78
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL005573	Genkwanin	37.13	0.24
	MOL005884	patchoulan 1,12-diol	38.17	0.25
	MOL005911	5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	51.54	0.27
	MOL005921	quercetin 7-O-β-D-glucoside	49.57	0.27
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
	MOL005916	irisolidone	37.78	0.3
	MOL005918	phenanthrone	38.7	0.33
	MOL002879	Diop	43.59	0.39
苍术	MOL005890	pachypodol	75.06	0.4
	MOL005922	Acanthoside B	43.35	0.77
	MOL005923	3,23-dihydroxy-12-oleanen-28-oic acid	30.86	0.86
	MOL000173	wogonin	30.68	0.23
	MOL000085	beta-daucosterol_qt	36.91	0.75
	MOL000088	beta-sitosterol 3-O-glucoside_qt	36.91	0.75
	MOL000092	daucosterin_qt	36.91	0.76
	MOL000094	daucosterol_qt	36.91	0.76
	MOL000184	NSC63551	39.25	0.76
	MOL000188	3β-acetoxyatractylone	40.57	0.22
丁香	MOL000186	Stigmasterol 3-O-beta-D-glucopyranoside_qt	43.83	0.76
	MOL000179	2-Hydroxyisoxypyl-3-hydroxy-7-isopentene-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylic	45.2	0.2
	MOL013219	Strictosamide_qt	76.3	0.76
	MOL001749	ZINC03860434	43.59	0.35
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
	MOL011616	Fortunellin	35.65	0.74
	MOL001689	acacetin	34.97	0.24
薄荷	MOL001790	Linarin	39.84	0.71
	MOL002881	Diosmetin	31.14	0.27
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL004328	naringenin	59.29	0.21
	MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24

续表 1

来源	编号	成分	口服利用度 (OB)%	类药性 (DL)
贯众	MOL005190	eriodictyol	71.79	0.24
	MOL005573	Genkwanin	37.13	0.24
	MOL000006	luteolin	36.16	0.25
	MOL002614	Flavidin	30.1	0.26
	MOL002619	Albaspidin AA	31.16	0.36
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21
	MOL002609	Harmonyl	43.8	0.46
	MOL002605	11-Hydroxynumantenine	50.79	0.71
	MOL002610	ZINC00035529	58.39	0.22
苦杏仁	MOL010921	estrone	53.56	0.32
	MOL010922	Diisooctyl succinate	31.62	0.23
	MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.2
	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL005030	gondoic acid	30.7	0.2
	MOL000953	CLR	37.87	0.68
	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
	MOL002311	Glycyrol	90.78	0.67
	MOL003410	Ziziphin_qt	66.95	0.62
	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76
	MOL004841	Licochalcone B	76.76	0.19
	MOL004903	liquiritin	65.69	0.74
	MOL004908	Glabridin	53.25	0.47
	MOL005017	Phaseol	78.77	0.58
	MOL007207	Machiline	79.64	0.24
	MOL012922	1-SPD	87.35	0.54
佩兰	MOL000006	luteolin	36.16	0.25
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL000363	amyrin Palmitate	32.68	0.3
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL000584	7-acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxythymol	33.39	0.18
	MOL000588	9-acetoxy-8,10-epoxy-6-hydroxythymol 3-O-angelate	61.44	0.21
	MOL000592	Dammaradienyl acetate	46.52	0.82
	MOL000595	Eupatoriopicrin	76.78	0.36
	MOL000596	[(3S,4aR,6aR,6aR,6bR,8aR,12S,12aR,14aR,14bR)-4,4,6a,6b,8a,12,14b-heptamethyl-11-methylene-1,2,3,4a,5,6,6a,7,8,9,10,12,12a,13,14,14a-hexadecahydricen-3-yl] acetate	43.08	0.74
	MOL000604	Eupaformosanin	50.2	0.52
	MOL000605	taraxasteryl palmitate	33.84	0.31

续表 1				
来源	编号	成分	口服利用度 (OB)%	类药性 (DL)
艾叶	MOL002883	Ethyl oleate (NF)	32.4	0.19
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL005741	cycloartenol acetate	41.11	0.8
	MOL005720	24-methylenecycloartanone	41.11	0.79
	MOL001494	Mandenol	42	0.19
	MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL005735	dammaradienyl acetate	44.83	0.83
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28

表 2 相同活性成分对比表					
编号	活性成分	所含中药			
MOL004792	nodakenin	羌活、独活	MOL000098	quercetin	丁香、艾叶、藿香
MOL001942	isoimperatorin	羌活、独活	MOL005573	Genkwanin	薄荷、藿香
MOL000358	beta-sitosterol	羌活、独活、丁香、艾叶	MOL000449	Stigmasterol	丁香、苦杏仁、佩兰、艾叶
MOL001941	Ammidin	羌活、独活	MOL000006	luteolin	薄荷、佩兰
MOL000359	sitosterol	羌活、薄荷、苦杏仁、佩兰		(2R)-5,7-dihydroxy-	
MOL002881	Diosmetin	羌活、薄荷	MOL001040	2-(4-hydroxyphenyl)	艾叶、贯众
MOL000422	kaempferol	丁香、石菖蒲、贯众		chroman-4-one	

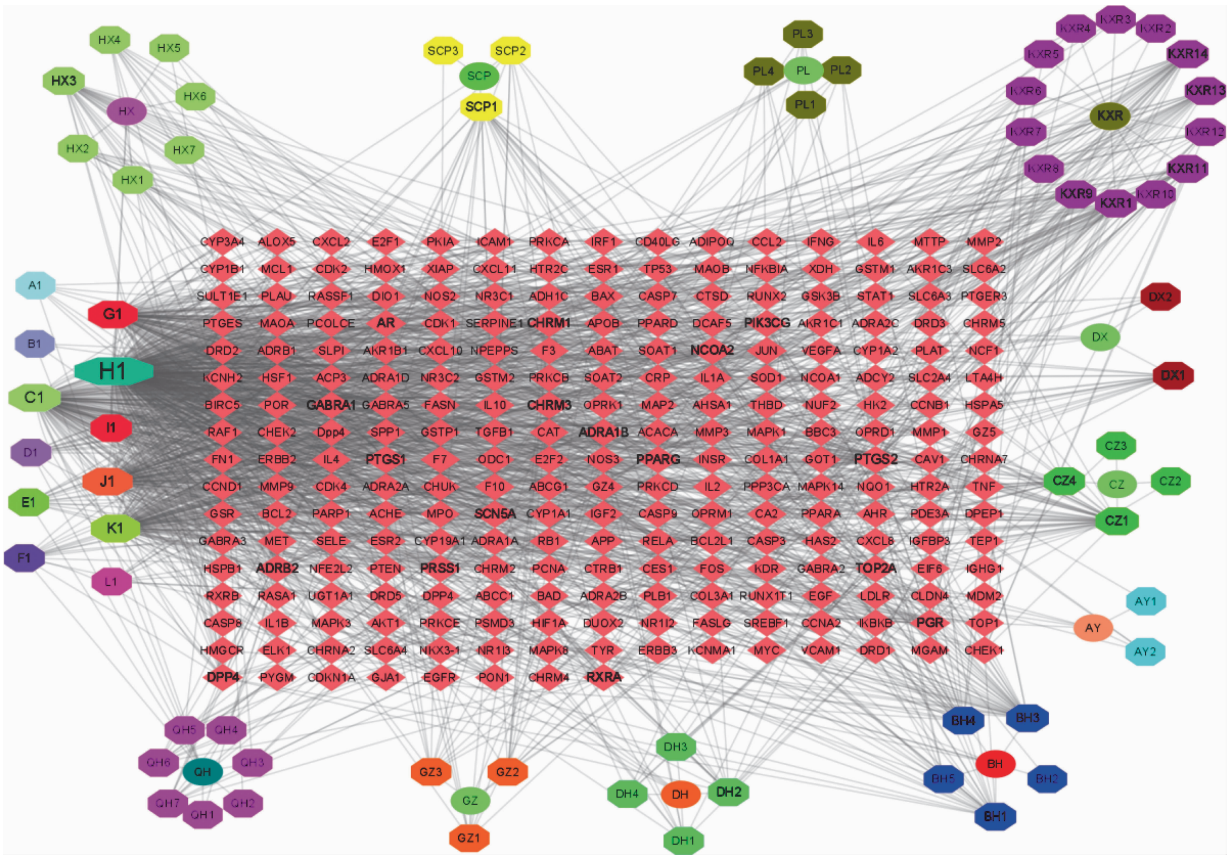


表 3 兰艾双香方网络图物质代表符号

符号	成分	符号	成分
BH	薄荷	DX2	ZINC03860434
AY	艾叶	GZ1	Flavadin
CZ	苍术	GZ2	11-Hydroxynumantenine
DX	丁香	GZ3	ZINC00035529
DH	独活	HX1	5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon
GZ	贯众	HX2	quercetin 7-O- β -D-glucoside
HX	藿香	HX3	irisolidone
KXR	苦杏仁	HX4	phenanthrone
PL	佩兰	HX5	Diop
QH	羌活	HX6	Acanthoside B
SCP	石菖蒲	HX7	3,23-dihydroxy-12-oleanen-28-oic acid
A1	nodakenin	KXR1	estrone
B1	isoimperatorin	KXR10	liquiritin
C1	beta-sitosterol	KXR11	Glabridin
D1	Ammidin	KXR12	Phaseol
E1	sitosterol	KXR13	Machiline
F1	Diosmetin	KXR14	1-SPD
G1	kaempferol	KXR2	11,14-eicosadienoic acid
H1	quercetin	KXR3	gondoic acid
I1	Genkwanin	KXR4	CLR
J1	Stigmasterol	KXR5	Mairin
K1	luteolin	KXR6	(+)-catechin
L1	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	KXR7	Glycyrol
AY1	Ethyl oleate (NF)	KXR8	Spinasterol
AY2	Mandenol	KXR9	Licochalcone B
BH1	acacetin	PL1	7-acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxythymol
BH2	Linarin	PL2	9-acetoxy-8,10-epoxy-6-hydroxythymol 3-O-angelate
BH3	naringenin	PL3	Eupatoriopicrin
BH4	aloe-emodin	PL4	Eupaformosanin
BH5	eriodictyol	QH1	diversoside_qt
CZ1	wogonin	QH2	notoptol
CZ2	beta-daucosterol_qt	QH3	Bergaptin
CZ3	NSC63551	QH4	Demethylfuropinnarin
CZ4	3 β -acetoxyatractylone	QH5	8-geranoxy-5-methoxypsoralen
DH1	Angelicone	QH6	Phellopterin
DH2	O-Acetylcolumbianetin	QH7	Cnidilin
DH3	[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl] (Z)-2-methylbut-2-enoate	SCP1	8-Isopentenyl-kaempferol
DH4	Angelol D	SCP2	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan
DX1	Strictosamide_qt	SCP3	Cycloartenol

2.2 兰艾双香方治疗细菌感染潜在作用靶点预测
将以细菌感染的英文“bacterial infection”为关键词检索 Gene Cards, OMIM 和 DigSee 3 个数据库, 整理筛选后获得细菌感染的有效靶点 1 442 个。将靶点数据导入 jvenn 平台做出韦恩图(图 2), 即兰艾双香方治疗细菌感染的潜在作用 115 个靶点。

2.3 兰艾双香方治疗细菌感染的作用靶标的蛋白质相互作用网络及核心靶点的筛选
利用蛋白质相互作用数据库 STRING 分析兰艾双香方治疗细菌感染的靶点, 物种选择为“Homo sapiens”, 得到蛋白相互作用关系 (proteinprotein interaction, PPI) 网络图图 3A, 为了更加直观的展示, 将设置自定义置信度 (“custom value confidence (0.950)”), 获得蛋白相互作用关系 (proteinprotein interaction, PPI) 网络图图 3B, 并隐藏在该网络中与其他靶标无互作关系的靶标。

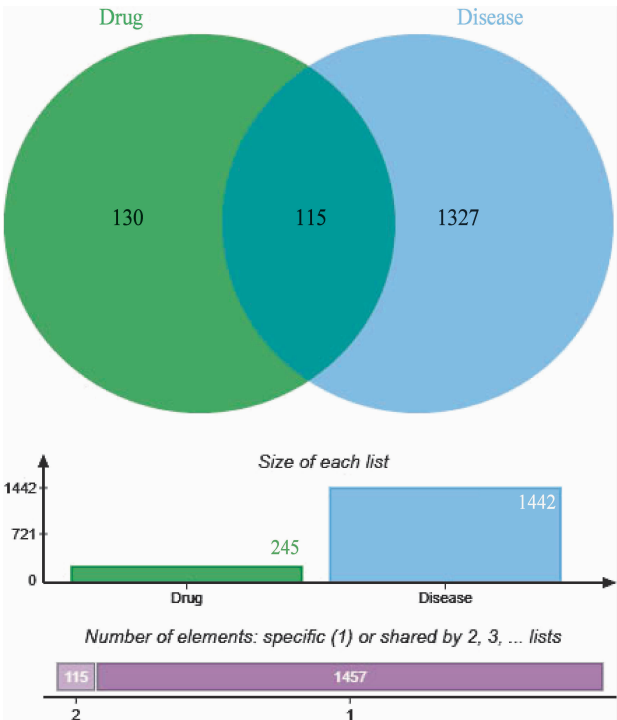
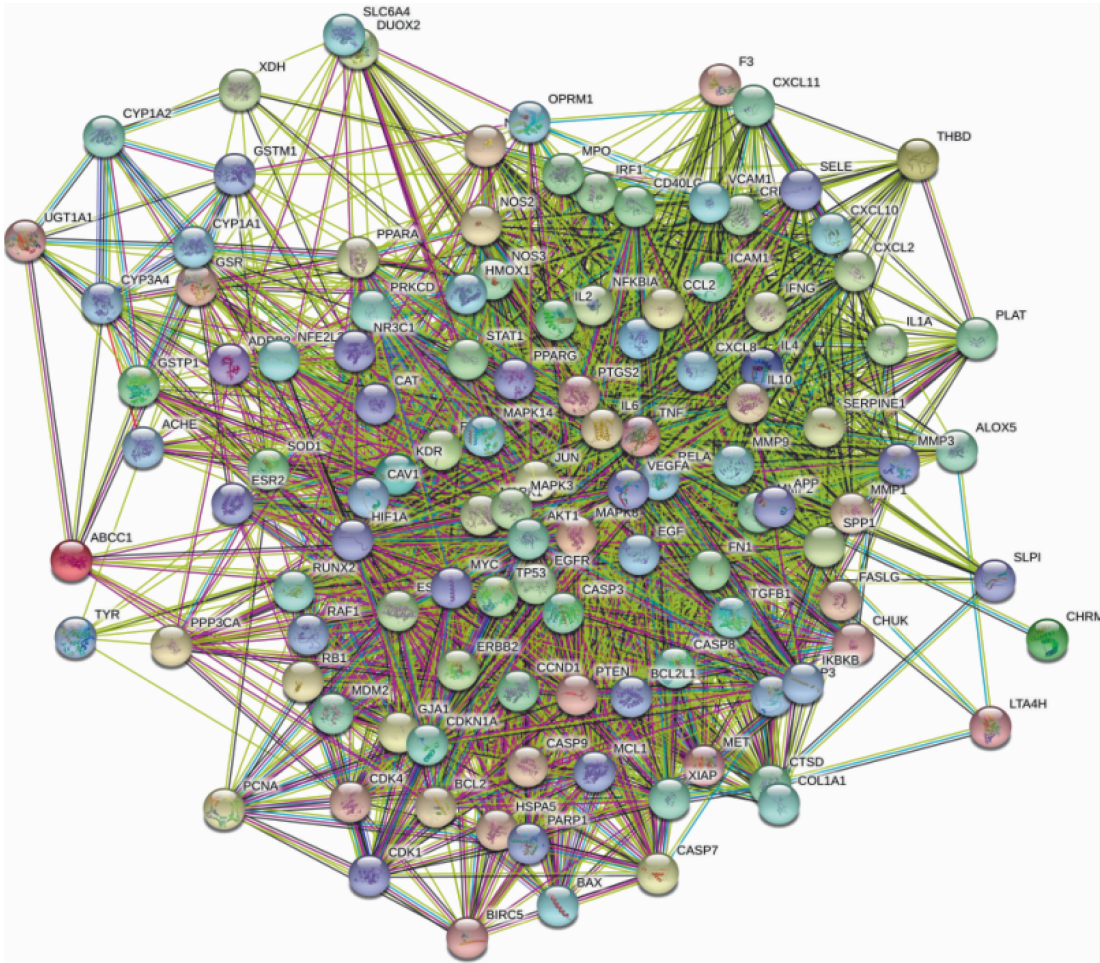


图 2 韦恩图



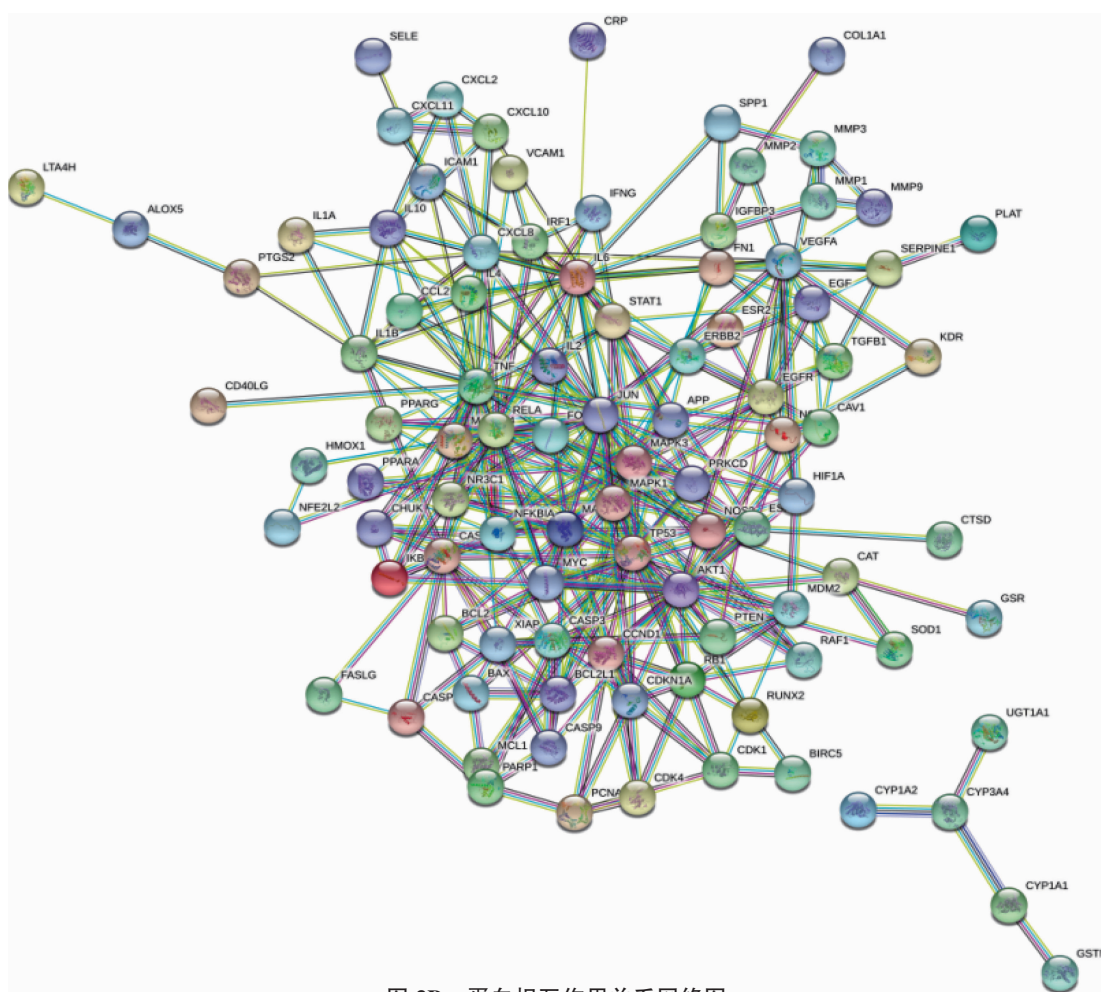


图 3B 蛋白相互作用关系网络图

2.4 PPI 网络分析结果 筛选后结果显示,该网络包含 97 个节点及 1 428 条边,其中平均节点度值为 22.31,见图 4。以节点度值为评价参数,度值越大说明其在 PPI 网络中越重要,可能在发挥生物学功能中起着重要的作用。度值排名前 10 的靶点为原癌基因 c-Jun(Jun)、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤蛋白 p53(TP53)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、细胞核因子 kp65(RELA)、白细胞介素-6(IL-6)、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(Akt1)、胱天蛋白酶 8(CASP8)、原癌基因 c-FOS(FOS),这些靶点可能是兰艾双香方治疗细菌感染的关键靶点。

2.5 蛋白模块筛选分析结果 通过 Metascape 数据库分析得知,红色区蛋白模块代表细胞周期负调控、凋亡信号通路、细胞增殖的负调控;蓝色蛋白模块代表对金属离子的反应、对无机物的反应、造血正调控;绿色蛋白模块代表脂质转运、脂质定位、脂质转运的调节;紫色蛋白模块代表长链脂肪酸生物合成过程、

长链脂肪酸代谢过程、异源代谢过程。见图 4。

2.6 GO 富集分析及 KEGG 通路分析结果 通过 Metascape 共筛选得到 GO 条目 2401 个($P<0.05$),其中生物过程(Biological processes,BP)条目 2 172 个,分子功能(molecular function,MF)条目 149 个,细胞组成(cell composition,CC)条目 80 个,分别占 90%,6%,4%,其中生物过程主要涉及对脂多糖的反应、对无机物质的反应、对有毒物质的反应、活性氧的代谢过程和对受伤的反应等;分子功能主要涉及细胞因子受体结合、蛋白质结构域特异性结合、蛋白激酶结合、蛋白质同二聚活性和磷酸酶结合等方面;细胞组成方面主要涉及膜筏、囊泡腔、细胞质核周区、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物和细胞外基质等方面。各类别前 20 的条目见图 5。KEGG 通路富集筛选得到 324 条信号通路($P<0.05$),其中排名前 20 的条目见图 6,根据 KEGG 绘制的气泡图见图 7。根据 KEGG 结果在 Cytoscape 3.8.0 中绘制了重要靶点通路见图 8。

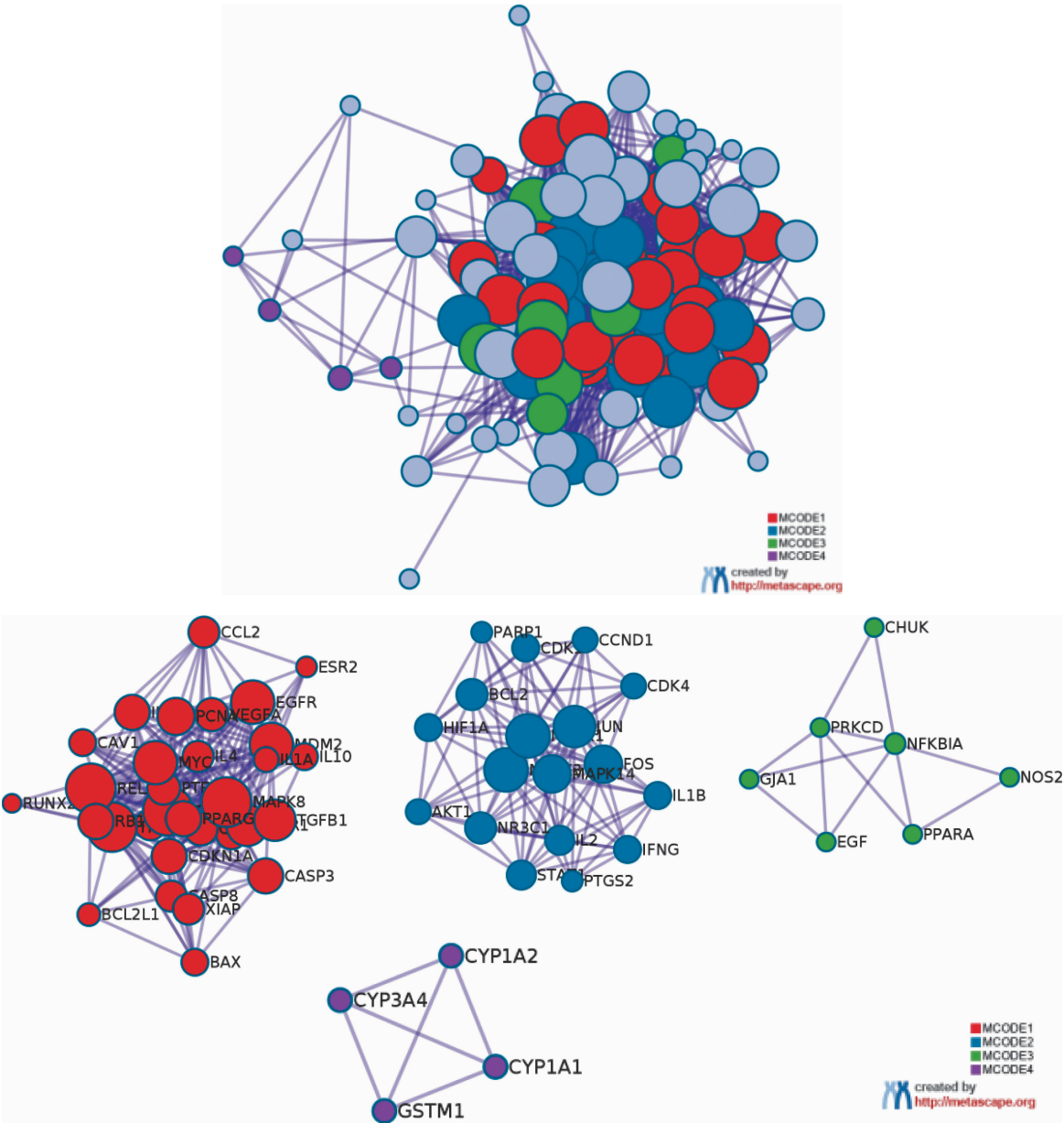


图 4 兰艾双香方治疗细菌感染靶点蛋白互作模块

3 讨论

细菌感染是致病菌侵入血液循环系统后进行生长繁殖,产生毒素和其它代谢产物,所引起的全身急性感染^[13]。细菌感染常合并其他疾病,当疾病进展过程中出现细菌感染时,疾病的进展将向危重期发展^[14-15]。抗菌抗感染的治疗对癌症、糖尿病和乙型肝炎等疾病尤为重要。扶正祛邪、调和阴阳为主的中医理论在感染性疾病的治疗中疗效显著,木其尔等^[16]总结论述了中医药对于重症脑病的治疗实验研究以及临床观察数据,得出了中医药治疗重症脑病疗效显著。邵贺等^[17]总结了白长川教授运用中医药治疗感染性休克

的经验。芮庆林等^[18]研究发现中药对重症肺炎发生细菌耐药感染有明显的干预作用,可减少耐药发生,改善预后,减少严重并发症,减少死亡率,对于减少重症肺炎耐药感染发生及治疗预后有着积极的临床意义。通过网络药理学的分析,兰艾双香方治疗细菌感染的关键基因有 Jun、TNF、TP53、MAPK1、RELA、IL-6、MAPK3、Akt1、CASP8、FOS 等。细胞因子中的 TNF、IL-6 是比较重要的指标,在细菌感染诊断中具有非常重要价值^[19]。兰艾双香方的关键基因包含 TNF 和 IL-6,进一步证实了关键基因发挥抗菌作用的可靠性。Jun 基因的作用是识别并结合 AP-1 基序5'-TGA

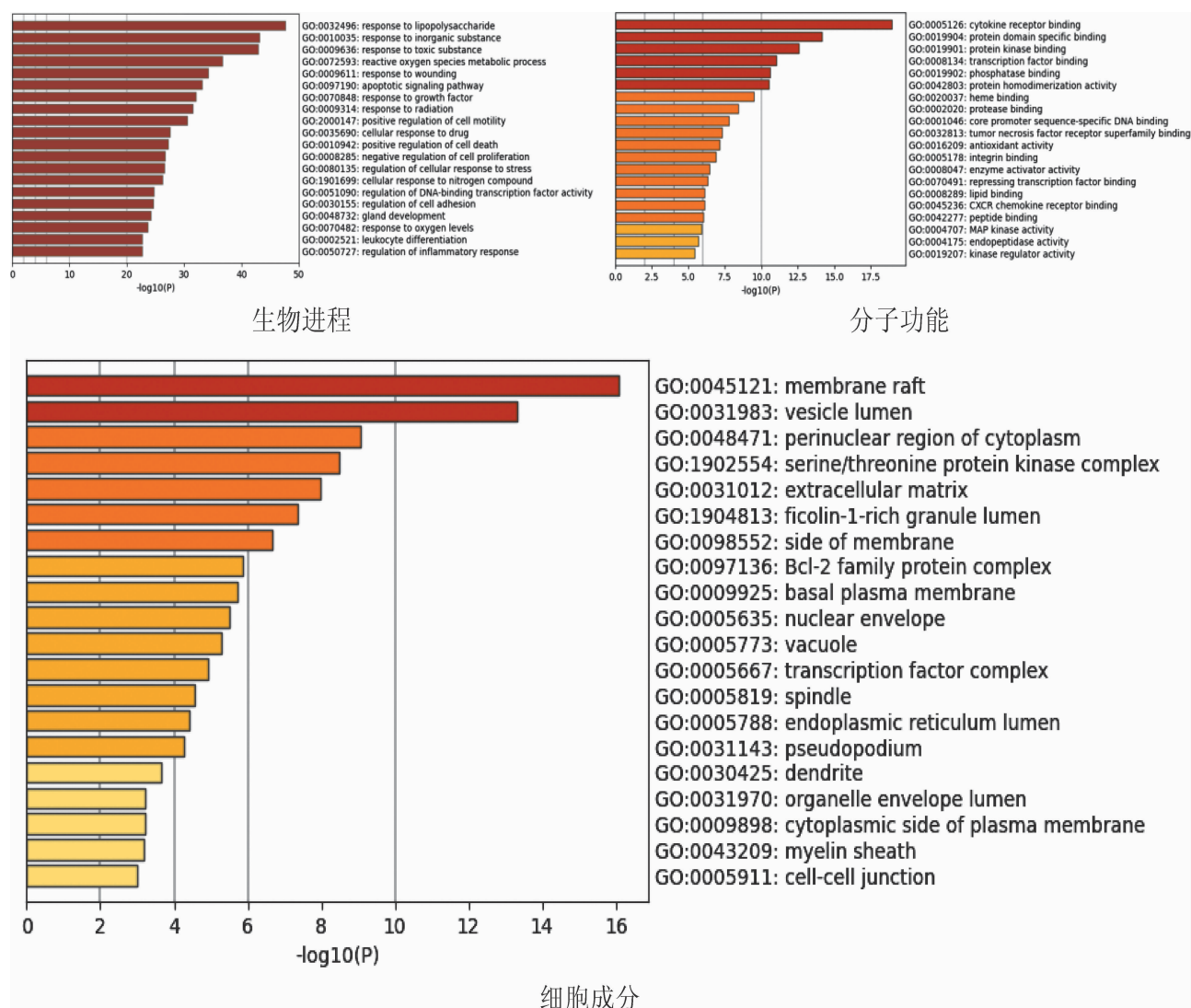


图 5 兰艾双香方活性成分治疗活性成分潜在靶点 GO 生物学过程、分子功能、细胞成分富集分析

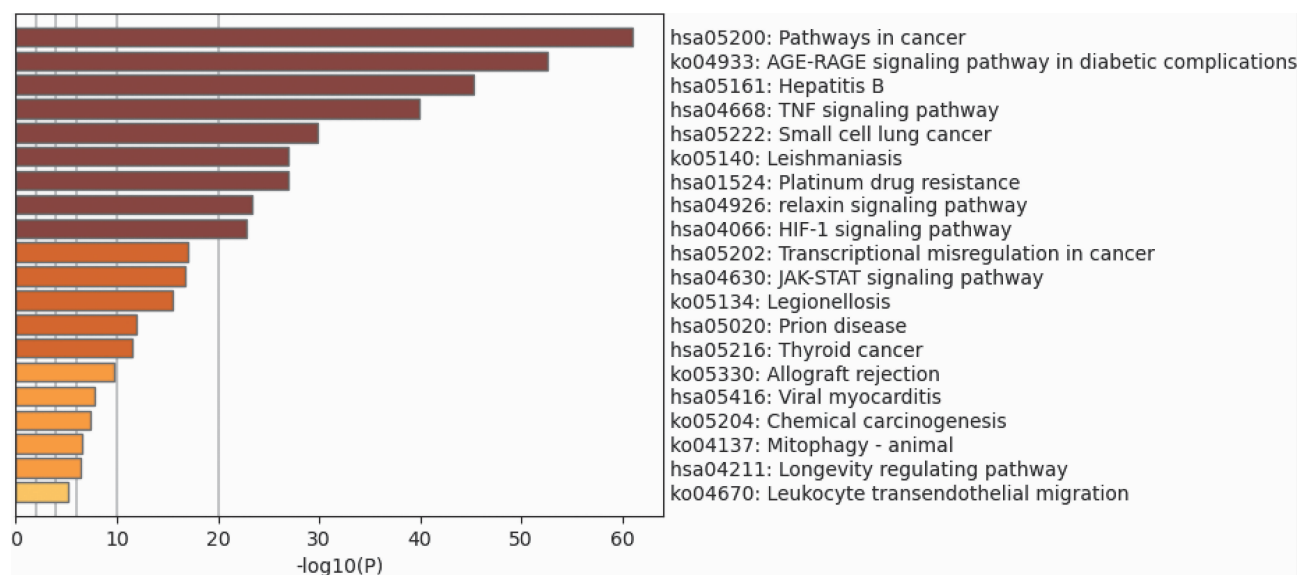


图 6 兰艾双香方活性成分治疗细菌感染潜在靶点 KEGG 通路富集分析

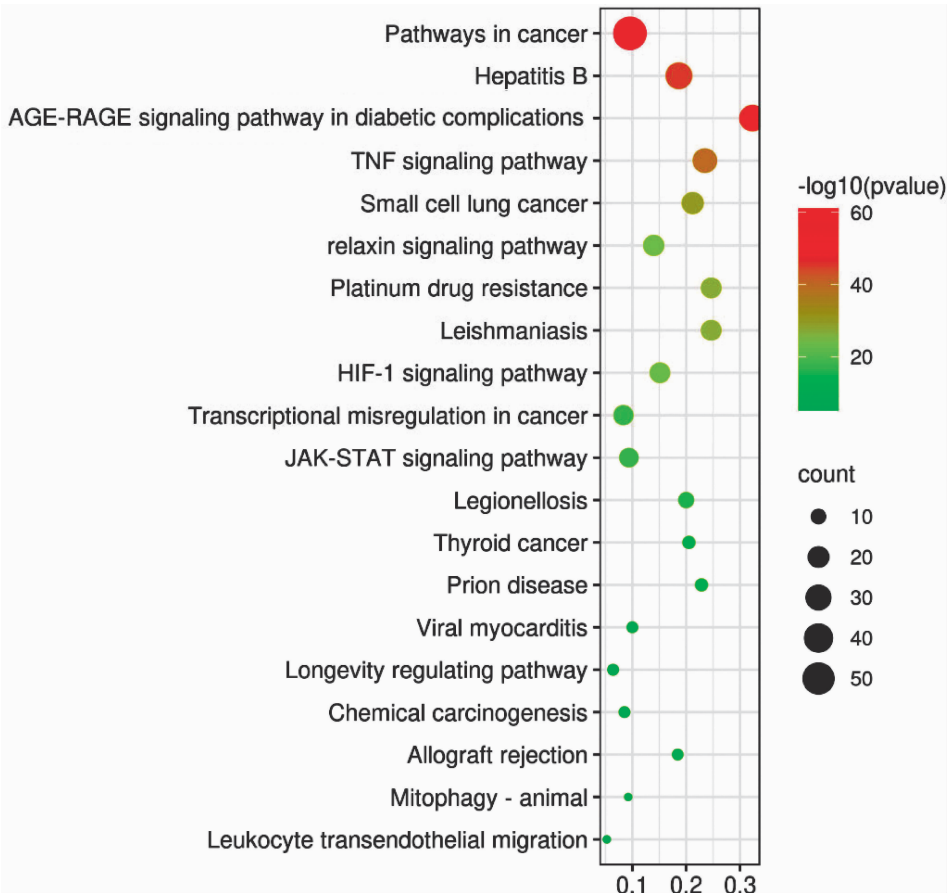


图 7 兰艾双香方活性成分治疗细菌感染潜在靶点的 KEGG 通路气泡图

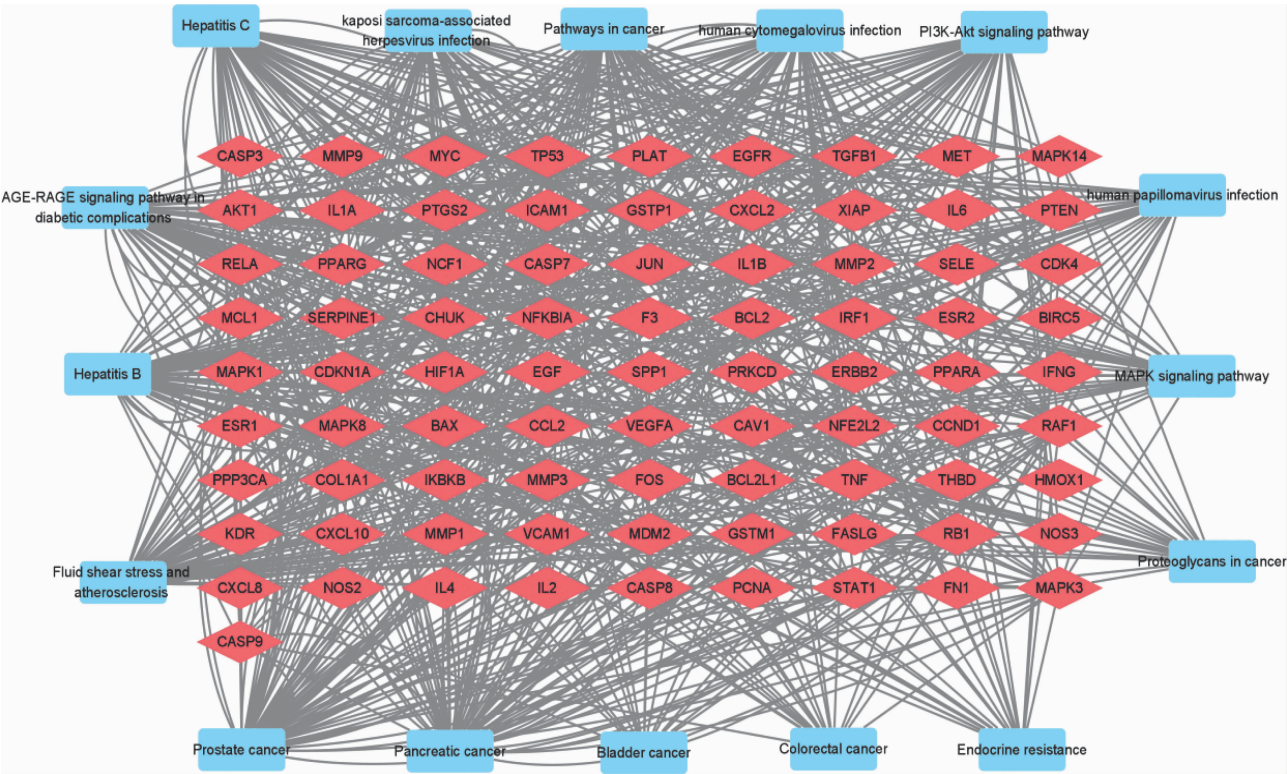


图 8 兰艾双香方靶点通路图

[CG]TCA-3' 的转录因子。当被 HIPK3 磷酸化时,促进 NR5A1 的活性,从而在 cAMP 信号通路刺激后导致类固醇生成基因表达增加。参与大肠癌(CRC)细胞中 USP28 的激活的 KRAS 介导的转录激活。与结直肠癌(CRC)细胞中的 USP28 启动子结合。TP53 是细胞内关键的感应因子,是调节应激反应的重要因素,与先天性抗病毒免疫、细胞凋亡及病毒的复制与转录都有关系^[20]。Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有抑制细胞凋亡和调节代谢作用^[20-21]。RELA 蛋白主要在细胞质发挥功能,在细菌之间高度保守,与大肠埃希菌 RelA 亲缘关系最近的是福氏志贺菌,其次是柯氏柠檬酸杆菌,其在细胞生命活动中具有重要功能,RelA 通过与核糖体和 tRNA 的相互作用介导细菌的严谨反应,因此 RelA 是一种重要的翻译因子^[22]。MAPK1 和 MAPK3 是在 MAPK/ERK 级联中起重要作用的 2 个 MAPK。它们还参与由激活的 KIT 和 KITLG/SCF 发起的信号级联。根据细胞情况,MAPK/ERK 级联通过调节转录,翻译,细胞骨架重排来介导多种生物学功能,例如细胞生长、粘附、存活和分化。MAPK/ERK 级联通过磷酸化许多转录因子,在分化细胞的减数分裂,有丝分裂和有丝分裂后功能的启动和调节中也起作用。此外,MAPK/ERK 级联还参与内体动力学的调节,包括溶酶体加工和通过核周再循环室(PNRC)的内体循环;以及有丝分裂期间高尔基体的破碎。胱天蛋白酶激活级联的大多数上游蛋白酶负责 TNFRSF6/FAS 介导的和 TNFRSF1A 诱导的细胞死亡。结合衔接子分子 FADD 会将其募集至任一受体,所得的称为死亡诱导信号复合物(DISC)的聚集体执行 CASP8 蛋白水解激活。然后将活性二聚酶从 DISC 中释放出来,并释放以激活下游的凋亡蛋白酶。N 末端前肽的蛋白水解片段(称为 CAP3,CAP5 和 CAP6)可能保留在 DISC 中。切割并激活 CASP3,CASP4,CASP6,CASP7,CASP9 和 CASP10。可能参与了 GZMB 的凋亡途径。FOS 是一种原癌基因,在正常人类细胞中可检测到极低水平的表达,与细胞的生长、增殖活化有关^[23]。

网络药理学在中医药研究过程中能够解决一些问题^[24],但也存在一定的缺陷,比如主要通过数据库进行检索,通过参数的设定来对成分进行筛选,但这些数据库可能还有待完善,而参数值的确定目前也尚

有争论。通过网络药理学相关数据库对兰艾双香方的研究我们得到以下科研成果:①筛选得到兰艾双香方共 110 个药效成分和 1 788 个作用靶点,关键靶点包括过氧化物酶体增殖物激活受体、血管内皮生长因子 A、肿瘤坏死因子和表皮生长因子受体等;②细菌感染相关靶点 1 442 个;③蛋白互作核心网络共 97 个蛋白,分析得到 4 个蛋白模块;④获得 2 401 个 GO 生物过程,KEGG 通路富集筛选得到 324 条相关信号通路,通路类型包括癌症的路径、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子信号通路、小细胞肺癌、利什曼病、HIF-1 信号通路、军团杆菌病等,这些通路均与细菌感染的发生发展相关;⑤结果证实,兰艾双香方可能通过调节细胞代谢、增殖与凋亡、脂代谢等多种途径达到治疗细菌感染的目的,是多成分、多靶点和多通路相互作用的结果。

兰艾双香方是沈舒文教授基于中医“正气存内,邪不可干”理论,针对细菌感染的“湿热”特性^[24]组建的复方,方剂由羌活、独活、石菖蒲、藿香、苍术、丁香、薄荷、贯众、苦杏仁、佩兰、艾叶 10 味中药组成,以芳香类药物为主,佐以发汗解表,使外邪透表而出。藿香^[25]味辛,性微温,归脾、胃、肺经,芳香化湿,醒脾开胃;薄荷^[26]味辛,性凉入肺、肝经,疏散风热,清利头目,利咽透疹,疏肝行气,二药共为君药,行芳香化湿,解表透邪之效。羌活味辛、苦,性温,入膀胱、肾经,解表散寒,祛风胜湿;独活味辛、苦,性微温,归肾、膀胱经,祛风除湿,通痹止痛;石菖蒲味辛,性温。归心、胃经,祛痰开窍,化湿开胃,宁神益智,3 药共为臣药,助君药化湿之功。丁香,贯众,苦杏仁,佩兰,艾叶共为佐药,辅助君臣行祛湿化浊之效。

对于名老中医沈舒文教授临床常用经验方兰艾双香方,通过网络药理学研究^[27],发现兰艾双香方对于癌症、糖尿病、乙型肝炎等疾病并发细菌感染的治疗具有良好的疗效,尤其是以癌症进展过程中的细菌感染。通过对兰艾双香方的网络药理学分析,进一步验证兰艾双香方临床疗效的科学性,为兰艾双香方的临床应用和进一步研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] WERTHEIM H F, MELLES D C, VOS M C, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections[J].

- Lancet Infect Dis, 2005, 5(12): 751-762.
- [2] 石婷, 李甜甜, 郑月娟. 金葡菌感染引发的天然免疫防御效应研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(19): 2419-2424.
- [3] 程成, 张薇, 朱波, 等. 中药抗常见耐药菌的作用及其机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(2): 229-233.
- [4] ZHANG Z Y, YI P J, YANG J J, et al. Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of Bushen Tiansui formula on Alzheimer's disease[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112371.
- [5] XU X, ZHANG W X, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [6] RU J L, LI P, WANG J A, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [7] GONG P, WANG D N, CUI D D, et al. Anti-aging function and molecular mechanism of Radix Astragali and Radix Astragali preparata via network pharmacology and PI3K/Akt signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153509.
- [8] GAO W Y, SI N, LI M L, et al. The integrated study on the chemical profiling and in vivo course to explore the bioactive constituents and potential targets of Chinese classical formula Qingxin Lianzi Yin Decoction by UH-PLC-MS and network pharmacology approaches [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 272: 113917.
- [9] 欧晨, 宋厚盼, 杨毅敬, 等. 基于网络药理学探讨枸杞子治疗视网膜色素变性的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(8): 1192-1197.
- [10] 宫成军, 马晓燕. 基于网络药理学探讨肾衰饮治疗糖尿病肾病的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(8): 1214-1220.
- [11] 赵凰宏, 詹向红, 马振, 等. 融合“通路-靶点-活性成分”探讨藿朴夏苓汤治疗新冠肺炎炎症风暴的网络药理学机制与初证[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(2): 536-551.
- [12] LIU H, WANG J A, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(3): 773-793.
- [13] 赵祥, 蒲晓允. 炎症标志物 CRP、TNF- α 、IL-6、PCT 与白细胞计数分析在肺部细菌感染中诊断价值分析[C] // 中国中西医结合学会. 第一次全国中西医结合检验医学学术会议暨中国中西医结合学会检验医学专业委员会成立大会论文汇编. 北京: 中国中西医结合学会, 2014: 5.
- [14] YADAV S, SINGH A K, AGRAHARI A K, et al. Making of water soluble curcumin to potentiate conventional antimicrobials by inducing apoptosis-like phenomena among drug-resistant bacteria[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14204.
- [15] GAUTAM S, COHEN A J, STAHL Y, et al. Severe respiratory viral infection induces procalcitonin in the absence of bacterial pneumonia[J]. Thorax, 2020, 75(11): 974-981.
- [16] 木其尔, 詹青, 陈伟. 重症脑病的中医药治疗进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(11): 4025-4032.
- [17] 郜贺, 王宝成, 李翌萌, 等. 基于“毒热”理论辨治感染性休克[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 98-101.
- [18] 袁思成, 芮庆林. 重症肺炎耐药菌感染的预防发生及预后与中药治疗相关回顾性研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 1907-1909.
- [19] 问亚锋, 金恂, 金宝生, 等. CD64 指数、血清降钙素原、IL-6 及 TNF- α 鉴别细菌感染的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1183-1184.
- [20] 段海婧, 龙晓宙, 杜丽东, 等. 清肺排毒汤对三种冠状病毒感染的 SARS、MERS 和 COVID-19 的潜在共性作用及机制探讨[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 29-35.
- [21] 陈桐莹, 高丰禾, 汪悦东, 等. 基于生物信息学探讨骨质疏松症与膝关节关节炎的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(1): 6-12.
- [22] 徐本锦, 刘玲, 宋彬裕, 等. 大肠埃希菌严谨反应蛋白 RelA 的表达载体构建及生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1427-1435.
- [23] 唐霞, 司俊卓, 卢楠, 等. 肠道病毒 D68 型感染前后转录组分析及差异表达基因的验证[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(4): 275-282.
- [24] 岳珍珍, 黄适, 玉颖, 等. 葛根芩连汤合四逆散对湿热型腹泻型肠易激综合征患者临床疗效及血清 IL-6 的影响[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(5): 21-26.
- [25] 聂坚, 解宇环, 陈柏君, 等. 芳香类中药在儿科临床运用及展望[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(2): 87-89.
- [26] 陈秋实, 张洪, 吴杰, 等. 薄荷挥发油的提取及其 β -环糊精包合物制备工艺研究[J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(1): 13-16.
- [27] 陈红阳, 杨志华, 贾壮壮, 等. 基于网络药理学探究黄芪-川芎药对治疗缺血性脑卒中的作用机制[J]. 云南中医学院学报, 2021, 44(1): 88-97.