

抗癆颗粒治疗结核病分子机制的网络药理和实验验证

肖四方, 马小华, 石国民, 喻容, 潘建华, 周婷, 向延根*

(南华大学附属长沙中心医院, 长沙 410004)

[摘要] 目的:通过网络药理学探索抗癆颗粒在抗结核分枝杆菌潜在的分子机制。方法:从中药复方数据平台中获得抗癆颗粒的活性成分,通过 SwissTargetPrediction 获取潜在的靶点,并与 GeneCards 和美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库筛选出药物治疗的疾病的靶点;采用 STRING 和 Cytoscape 3.8.0 构建“中药-疾病靶点-信号通路”网络和筛选关键靶点;然后进行基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析;运用 AutoDock Vina 对抗癆颗粒活性成分和关键蛋白进行分子对接,并通过蛋白免疫印迹法验证活性成分与关键靶蛋白的相互作用。结果:通过筛选去重得到潜在抗癆颗粒重要成分包括 β -谷甾醇、芝麻素和山柰酚等化学成分 29 个;候选作用靶点包括蛋白激酶 B1(Akt1),表皮生长因子受体(EGFR),低氧诱导因子-1A(HIF-1A),原癌基因酪氨酸蛋白激酶 C(SRC)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等关键蛋白 28 个;生物信息分析发现 GO 得到氧化代谢反应、核酸转录和代谢酶途径等 41 个重要功能条目;KEGG 富集分析结核分枝杆菌信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路等 28 条重点信号通路;分子对接的结果显示 Akt1 和芝麻素的结合力最强;体外实验验证芝麻素通过抑制 Akt1 的磷酸化来达到控制分枝杆菌的生长的作用。结论:抗癆颗粒治疗是通过多组分、多靶点和多途径共同作用间接提高杀菌和免疫反应水平,从而达到治疗结核病的功效,其中 Akt1 是其参与治疗结核的重要靶蛋白之一。

[关键词] 抗癆颗粒; 结核病; 网络药理学; 分子机制; 蛋白激酶 B; 芝麻素

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0205-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220215 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211213.0840.002.html>

[网络出版日期] 2021-12-13 17:58

Mechanism of Anti-tuberculosis Particles (Kanglao Granule) Based on Network Pharmacology and Experimental Research

XIAO Si-fang, MA Xiao-hua, SHI Guo-min, YU Rong, PAN Jian-hua, ZHOU Ting, XIANG Yan-gen*

(The Affiliated Changsha Central Hospital Affiliated to University of South China,
Changsha 410004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential anti-tuberculosis mechanism of Kanglao granule through network pharmacology. **Method:** The active components of Kanglao granule were retrieved from related databases and the potential targets of the components from SwissTargetPrediction. Targets of the tuberculosis were screened from GeneCards and National Center for Biotechnology Information (NCBI), and the anti-tuberculosis targets of the prescription were further identified. STRING and Cytoscape 3.8.0 were employed to construct the Chinese medicinal-disease target-signaling pathway network and screen core targets. Then gene ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were performed. Finally, AutoDock Vina was used for molecular docking between the active components of the prescription and key proteins and Western blotting for verifying the interaction between them. **Result:** A total of 29 important chemical components in the prescription were screened out, including β -sitosterol, sesamin, and

[收稿日期] 20210824(002)

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4639);湖南省卫生健康经济管理科研计划项目(KJZX2021021)

[第一作者] 肖四方, 硕士, 主管技师, 从事中医药防治结核研究, Tel: 0731-85667943, E-mail: xysifang@163.com

[通信作者] * 向延根, 硕士生导师, 主任技师, 从事中医药防治结核研究, Tel: 0731-85668170, E-mail: xiangyangen@126.com

kaempferol. A total of 28 key anti-tuberculosis targets were retrieved, such as protein kinase B1 (Akt1), epidermal growth factor receptor (EGFR), hypoxia inducible factor-1A (HIF-1A), proto-oncogene tyrosine-protein kinase (SRC), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Bioinformatics analysis showed the 28 targets were involved in 41 GO terms such as oxygen metabolism, nucleic acid transcription, and metabolic enzyme pathway, and 28 key KEGG pathways, including *Mycobacterium tuberculosis* signaling pathway and phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B pathway. Molecular docking results showed that Akt1 had the strongest binding affinity to sesamin. *In vitro* experiment indicated that sesamin inhibited the growth of *M. tuberculosis* by suppressing the phosphorylation of Akt1. **Conclusion:** Kanglao granule improved the sterilization level and immune response through multi-component, multi-target, and multi-pathway interactions, thereby achieving therapeutic effect on tuberculosis. Akt1 is one of the important targets involved in the treatment of tuberculosis.

[Keywords] Kanglao granule; tuberculosis; network pharmacology; molecular mechanism; protein kinase B; sesamin

结核分枝杆菌是一种对引起死亡人数最多的乙类传染性呼吸道病原体。常感染肺部引起肺结核,临床表现为咳嗽咳痰、偶有痰中带血或咯血,低热乏力、盗汗自汗等^[1]。结核病的常规治疗大多依靠化疗,不良事件发生率高,而且容易诱导耐药结核的发生^[2-3]。在中医辨证施治中,肺结核称为“肺癆”“肺癰”,早在《黄帝内经》中有记载,“外有癆虫侵袭,内因正气虚弱”。起病之初,邪气盛,主肺阴伤,最易累及脾肾,久之邪毒内盛导致气血两虚,呈阴虚、痰火、瘀热状^[4]。抗癆方就是根据这种致病特点组方,由桂林市政府根据民间经验牵头研制,曾获广西壮族自治区科研成果奖。最早官方记载在1977年版《中华人民共和国药典》(一部)^[5],由矮地茶、百部、白及、穿破石、五指毛桃和桑白皮6味药材组成^[6-7]。目前以该方为基础的市售剂型有丸、胶囊、冲剂或颗粒等,以颗粒剂型最多见,且各种剂型在市售平台描述功效基本一致。方药中以矮地茶(紫金牛科小灌木)为君药,在宋代《本草图经》中指出,“紫金牛,生福州,叶如茶,上绿下紫,红如丹株”,可化痰止咳、活血化瘀和清湿热;百部兼顾“杀虫”和润肺止咳,白及善于收敛止血、止痛生肌,二者共为臣药;桑白皮清肺热、泻肺火,助平喘止咳;五指毛桃健脾润肺,行气利湿,补益扶正共为佐药;穿破石活血通经,利于药物到达病灶,为佐使药,诸药相合,共呈祛痰止咳、活血止血和散痰生新之功^[6]。

目前关于抗癆颗粒在结核病的研究大多集中在结核转阴率、临床症状的控制或免疫功能影响等疗效观察性研究方面,均显示出良好疗效、高安全性,但作用机制尚不完全明确^[8-10]。网络药理学系

统性地将生物网络和药物网络相结合,为全面探索中医治疗疾病的作用机制提供可能,与传统医药的辨证、系统、整体研究观不谋而合^[11]。因此,本研究拟通过联合网络药理和分子对接的技术,筛选抗癆颗粒的主要活性成分并进行靶点预测,构建“中药化学活性成分-关键靶标-作用通路”可视化的网络关系,为更全面深入地探索抗癆方剂中药效物质基础和药效作用的分子机制提供理论支撑,为抗癆颗粒的临床应用和进一步的实验研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 中药化学活性筛选 在中医药百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/>)和中药网络数据库分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.w.com/tcmspsearch.php>)中检索抗癆颗粒方中“百部”“矮地茶”“桑白皮”“白及”“五指毛桃”和“穿破石”6味中药,以基本药动学参数口服吸收度(OB)≥30%,类药性(DL)≥18%为标准筛选中药方中的化学活性成分,同时以方中各成分在知网、万方和PubMed进行文献挖掘中药各成分的候选活性成分,与中药数据库TCMSP和ETCM互为补充和复核。

1.2 药物成分靶标筛选 筛选得到的抗癆颗粒各化学成分在PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中收集其标准化线性格式的SMILES号,并将其在线数据库SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行药物分子靶点预测,获取排在前15位的基因作为药物可能作用的靶点,以ETCM和TCMSP靶标进行补充和去重得到药物成分靶标。

1.3 疾病分子靶标预测 人类基因综合数据库

GeneCards(<https://www.genecards.org/>)是一个整合了多个平台的生物信息数据库,包含丰富的疾病相关分子信息。同时利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)平台(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),以关键词“tuberculosis”,并设置物种为“Homo sapiens”进行搜索,得到疾病相关基因。

1.4 关键靶标药物分子-疾病靶点网络构建 以中药抗癆颗粒活性成分, GeneCards 和 NCBI 数据库得到的疾病靶点,三者通过 FunRich 3.1.3 软件进行韦恩图映射,得到疾病靶标药物分子和疾病共同靶点,通过蛋白相互作用数据库 STRING 进行生物信息分析,用 Cytoscape 3.8.0 构建靶标药物分子-疾病靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。

1.5 基因本体(GO),分子功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将疾病靶标药物分子和疾病共同潜在靶点在生物信息数据库 DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行分析,同时利用 R 软件 4.0.2 版本进行计算,并绘制 GO 和 KEGG 富集分析柱状图和气泡图。以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

1.6 分子对接 登陆 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取靶蛋白晶体结构,使用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取核心药物成分结构并保存,为蛋白分子对接作前期准备。通过 CB-Ddock 对接,可识别蛋白结合位点并计算出对接口袋大小。通过内置 AutoDock Vina 进行分子对接,同时对其结构进行打分。完成上述步骤后,使用 LeDock 对蛋白晶体进行对接,然后使用 GraphPad Prism 8.3.0 将对接 Vina 分值绘制成热图,并用 PyMOL 2.3.0 展示对接 3D 示意图。

1.7 细胞实验验证

1.7.1 实验材料 人单核细胞 THP-1(编号 SCSP-567)购自中国科学院细胞库。芝麻素(北京索莱宝科技有限公司,批号 IS0650,纯度 $\geq 98\%$);二甲基亚砜 DMSO, RPMI1640,蛋白 Marker(美国 Thermo 公司,批号分别为 20688, 11875119, 26617);胎牛血清 FBS(杭州四季青,特级,货号 13011-8611);青霉素-链霉素溶液, SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、蛋白上样缓冲液(碧云天生物科技公司,批号分别为 C0222, P0012A, P0015);佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA,美国 Sigma 公司,货号 P8139);一抗蛋白激酶 B1(Akt1),磷酸化 Akt1 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),山羊抗兔二抗(美国 CST 公司,批号分别为 75692S, 4060S, 5174, 7074S)。

1.7.2 细胞模型构建 在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中培养 THP-1 细胞,在培养基中添加 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素,每 2~3 d 将细胞传代培养 1 次,在 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PMA 存在下,细胞以 1×10^6 个/孔的密度在六孔板中培养 24 h,以分化成黏附在培养瓶中的巨噬细胞样表型,用脓肿分枝杆菌(感染复数=10)感染分化的巨噬细胞,将细胞继续置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养,将细胞分组:①选择预测的结合最佳靶蛋白-药物活性成分(Akt1-芝麻素)中的芝麻素,并根据文献[12]按浓度梯度为 0(空白), 10, 20, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个梯度,在感染菌液 1 h 前加入,再以脓肿分枝杆菌感染巨噬细胞 1 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)轻柔地清洗细胞 2 次,加入新的完全培养基,继续培养 24 h;②以不加药和不加菌液的组为对照组。

1.7.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)验证 收集不同药物梯度下的各组蛋白样品,以蛋白样品和 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 4:1 混合,取适量样品上样电泳,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜后 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(1:2 000)4℃过夜,二抗孵育时间 1.5 h, PBS 洗膜 3 次后用增强型化学发光试剂(ECL)显影检测。

1.7.4 菌落形成实验 取各组细胞的裂解液 $8 \mu\text{L}$,用分枝杆菌液体培养基稀释 10 倍,超声分散后接种至血平板,3 d 后计数菌落情况。

1.8 统计学分析 用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行数据统计分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析组间差异,组间两两比较用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗癆颗粒化学活性成分 通过 TCMSP 和 ETCM 抗癆颗粒中 6 种主要成分,以 OB $\geq 30\%$ 以及类药性 DL $\geq 18\%$ 为标准筛选,同时与中国知网、万方和 PubMed 多数据库进行文献资料互为补充和复核,筛选得到抗癆颗粒活性成分 29 个,其重要成分信息见表 1。

2.2 抗癆颗粒治疗结核病的活性成分靶点 通过 PubChem 和 SwissTargetPrediction 收集,并与 ETCM 和 TCMSP 药物靶标进行补充和去重,筛选得到的抗癆颗粒各化学活性成分靶点基因 212 个。NCBI 得到疾病靶点基因 757 个, GeneCards 平台获得疾病靶点基因 2 378 个,二者与化学活性成分靶点取交集,最终获得药物抗癆颗粒治疗结核病的潜在靶点 28 个。

表 1 抗痨颗粒部分化学活性成分基本信息

Table 1 Basic information of main active components in anti-tuberculosis particles

ID	成分名称	成分英文名称	OB/%	DL	来源
MOL003621	水合橙皮内酯*	meranzin hydrate	43.61	0.17	五指毛桃
MOL001945	佛手柑内酯*	bergapten	42.21	0.13	五指毛桃
MOL000561	黄芪苷	astragalin	14.03	0.74	五指毛桃
MOL000365	丁香树脂酚*	syringaresinol	3.29	0.72	五指毛桃
MOL001950	补骨脂素	psoralon	33.06	0.10	五指毛桃
MOL012719	桑辛素 O	moracin O	62.33	0.44	桑白皮
MOL005043		campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	桑白皮
MOL004912	光果甘草酮	glabrone	52.51	0.50	桑白皮
MOL003860	桑辛素 F	moracin F	53.81	0.23	桑白皮
MOL003857	桑辛素 C	moracin C	82.13	0.29	桑白皮
MOL003856	桑辛素 B	moracin B	55.85	0.23	桑白皮
MOL003758	桑辛素 D	moracin D	71.55	0.34	桑白皮
MOL002514		sexangularetin	62.86	0.30	桑白皮
MOL000211	白桦脂酸	mairin	55.38	0.78	桑白皮
MOL000098	槲皮素	quercetin	46.43	0.28	桑白皮
MOL000737	桑黄素	morin	46.23	0.27	穿破石
MOL005756	2,3,4,7-四甲氧基菲	2,3,4,7-tetramethoxy phenanthrene	39.09	0.29	白及
MOL005776	1-(2,7-二羟基-4-甲氧基-1-菲)-4-甲氧基菲-2,7-二醇	1-(2,7-dihydroxy-4-methoxy-1-phenanthryl)-4-methoxyphenanthrene-2,7-diol	35.22	0.67	白及
MOL005768	4,7-二羟基-1-对羟基苜蓿-2-甲氧基-9,10-二氢菲	4,7-dihydroxy-1-p-hydroxybenzyl-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene	30.54	0.55	白及
MOL005756	2,3,4,7-四甲氧基菲	2,3,4,7-tetramethoxyphenanthrene	39.09	0.29	白及
MOL005755	1-(4-羟基苜蓿)-4-甲氧基-9,10-二氢菲-2,7-二醇	1-(4-hydroxybenzyl)-4-methoxy-9,10-dihydro-phenanthrene-2,7-diol	54.18	0.55	白及
MOL000358	β -谷甾醇	beta-sitosterol	36.91	0.75	矮地茶、百部、桑白皮
MOL009414	百部碱 C	sessilifoliamide C	65.87	0.20	矮地茶、百部
MOL001558	芝麻素	sesamin	56.55	0.83	矮地茶、百部
MOL000449	豆甾醇	stigmasterol	43.83	0.76	矮地茶、百部
MOL000392	芒柄花黄素	formononetin	69.67	0.21	矮地茶、百部
MOL000359	谷甾醇	sitosterol	36.91	0.75	矮地茶、百部
MOL000422	山柰酚	kaempferol	41.88	0.24	桑白皮、五指毛桃
MOL009441	(3S,3'R,4'R,9S,9aS)-4'-羟基-3'-甲基-3-[(2S,4S)-4-甲基-5-氧杂环戊烷-2-基]螺[1,2,3,5,6,7,8,9a-八氢吡咯[1,2-a]氮杂环戊烷-9,5'-氧杂环戊烷]-2'-酮	(3S,3'R,4'R,9S,9aS)-4'-hydroxy-3'-methyl-3-[(2S,4S)-4-methyl-5-oxoxolan-2-yl]spiro[1,2,3,5,6,7,8,9a-octahydropyrrolo[1,2-a]azepine-9,5'-oxolane]-2'-one	85.52	0.38	百部

注:*化合物是文献补充的重要活性成分,属于香豆素类化合物^[13]。

2.3 关键靶标药物分子-疾病靶点 PPI 网络构建

通过 STRING 与 Cytoscape 3.8.0 构建抗痨颗粒治疗结核病的潜在 28 个靶点的 PPI 网络,见增强出版附件材料。这些可能是抗痨颗粒有效成分中治疗结核病的蛋白互作网络中的关键靶点。根据

Cytoscape 中的复合分子检测法(MCODE)分析得到度中心度和中介中心度(BC)值,用来评估节点的重要性,见表 2。按度值(Degree)排名在前五的关键蛋白依次为蛋白激酶 B1(Akt1),原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC),人表皮生长因子受体(EGFR),基质

金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和缺氧诱导因子-1 α (HIF1A)。按 Cytoscape 软件的 Cyto Hubba 插件得到抗痨颗粒治疗结核病的关键药效成分-作用靶点图,见增强出版附件材料,一共包括 57 个节点和 115 条边,可认为是抗痨颗粒治疗结核病的关键靶点。

表 2 Top 基因度中心度(Degree Centrality)和 MCODE 分析
Table 2 Degree Centrality and MCODE analysis of top genes

名称	BC	度值	聚类评分	名称	BC	度值	聚类评分
Akt1	0.14	38	4.94	NFKB1	0.02	22	5.44
SRC	0.26	36	4.96	MMP-2	0.02	22	5.22
EGFR	0.17	36	4.94	SIRT1	0.09	22	5.44
MMP-9	0.06	30	4.94	IL-2	0.029	22	4.50
HIF1A	0.02	22	5.44	MCL1	0.01	20	5.34

注:类簇均为 Cluster 1。

2.4 GO 和 KEGG 富集通路分析 用 R 软件的 cluster Profiler 对前面得到的抗痨颗粒治疗结核病的潜在 28 个靶点进行分析,得到的 41 条 GO 分子条目主要涉及氧化代谢反应、核酸转录和代谢酶活性等方面,展示前 10 条最显著的条目,见增强出版附件材料。结合 DAVID 对抗痨颗粒治疗结核的 28 个靶点通路富集分析显示,按富集得到的通路按基因数 Count 和 P 值进行排名,排在前 20 位的通路包括结核分枝杆菌信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt 通路和 HIF-1 信号通路等,见增强出版附件材料。

2.5 分子对接 分子对接结果显示,抗痨颗粒中按 Degree 排名前 3 的药物活性成分 β -谷甾醇、芝麻素和山柰酚,与 Akt1, SRC, EGFR, MMP-9 和 HIF1A 关键靶蛋白结合的 Vina 值显示,15 对药物活性成分和靶蛋白作用的 Vina 值均 <-7 ,其中芝麻素与 Akt1 结合能最小(<-9 kcal $\cdot$ mol $^{-1}$, 1 kcal $\approx$ 4.186 kJ),表明靶蛋白和关键药物活性成分结合能力强,见表 3。Akt1 与芝麻素相互作用见增强出版附件材料,芝麻素与 Akt1 中的 ASN-265, GLY264 及 HIS297 相结合,见增强出版附件材料。

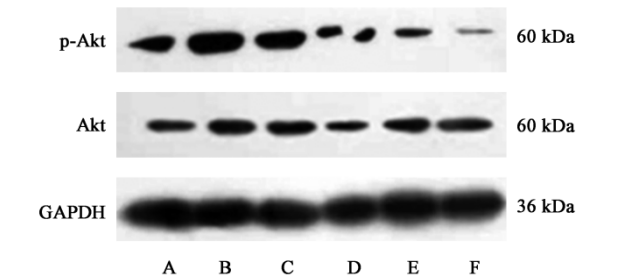
2.6 实验验证 芝麻素在 0, 10, 20, 40 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 浓度作用下呈剂量依赖地下调 p-Akt 的表达,见图 1;菌落形成实验表明,芝麻素浓度越高,胞内分枝杆菌越多,显示抗痨颗粒中的关键成分芝麻素具有增强巨噬细胞对分枝杆菌的控制作用,见表 4。

3 讨论

抗痨颗粒在辅助治疗结核病方面具有良好的疗效,可协同作用于人体内的靶点网络,活血化瘀、

表 3 重要药物有效成分和核心分子对接结果
Table 3 Docking results of active components and core molecules of important drugs

			kcal $\cdot$ mol $^{-1}$		
成分	靶点	结合能	成分	靶点	结合能
β -谷甾醇	Akt1	-7.5	山柰酚	SRC	-8.9
	EGFR	-8.0		MMP-9	-8.6
	HIF1A	-7.0		Akt1	-8.2
	SRC	-7.4		EGFR	-7.8
	MMP-9	-7.6		HIF1A	-7.8
芝麻素	Akt1	-9.3	SRC		-8.1
	EGFR	-8.5		MMP-9	-8.3
	HIF1A	-7.6			



A. 未加菌未加药; B. 加药不加菌; C~F. 芝麻素 0, 10, 20, 40 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$
图 1 药物芝麻素浓度效应下对蛋白的影响
Fig. 1 Effect of sesamin on protein Akt1

表 4 药物浓度梯度对应的 24 h 细胞内分枝杆菌负荷 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Intracellular mycobacterial load corresponding to drug concentration gradients at 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ μ mol $\cdot$ L $^{-1}$	CFU($\times 10^3$ /mL $^{-1}$)
空白		26.67 $\pm$ 2.88
芝麻素	10	48.67 $\pm$ 3.51 ¹⁾
	20	56.67 $\pm$ 0.58 ²⁾
	40	76.67 $\pm$ 3.06 ²⁾

注:与空白组比较 ¹⁾P <0.05 , ²⁾P <0.01 。

祛痰止咳和增强机体免疫功能等发挥综合治疗的作用^[3,6,14]。本研究以可视化的方式展现“活性成分-靶点-信号途径”,说明抗痨颗粒以多靶标、多通路的网络途径发挥治疗结核的作用,与中药强调的协同作用和辩证整体的思路相符^[15-16]。现重点从药物活性成分和蛋白分子靶点 2 个方面重点阐述抗痨颗粒治疗结核病的分子机制。

3.1 药物活性成分是中医药各种组分实现药效的物质基础 本研究从抗痨颗粒方中筛选得到 β -谷甾醇、芝麻素和山柰酚等重要活性成分,其中芝麻素衍生物被研究证实对结核分枝杆菌 H37Rv 表现出良好的抗结核活性^[17],山柰酚 (KAE) 及其苄基衍

生物(KAE3)是很好的结核分枝杆菌CYP121抑制剂配体^[18],符合传统中医药“杀虫”的理念。此外,芝麻素可通过Akt和ERK激活增强Nrf2介导的结肠炎氧化应激和炎症的保护性防御^[19],对于调节免疫和保护肠黏膜免受氧化应激损伤具有一定的作用。 β -谷甾醇可抑制炎症因子白细胞介素(IL)-1 β ,调节巨噬细胞免疫功能^[20]。山柰酚通过抑制血小板活化和血栓形成、槲皮素能抑制凝血酶的活性,协同实现活血化瘀的功效^[21]。表明抗癆颗粒可通过多种药效成分抑菌杀菌、调节免疫和活血化瘀等实现抗结核分枝杆菌的感染。

3.2 蛋白靶点是药物和疾病联结的重要“桥梁”

结核病和抗癆颗粒交集的靶点包括Akt1, SRC, EGFR, MMP-9和HIF1A关键靶蛋白28个。其中Akt1是PI3K/Akt/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路中重要的下游分子,属丝氨酸/酪氨酸家族成员之一,参与细胞因子激活等重要免疫通路。结核分枝杆菌分泌的致病蛋白Rv1987可诱导的M2型巨噬细胞中PI3K/Akt1/mTOR信号通路被激活,这种极化的巨噬细胞杀菌能力显著降低,导致细菌在巨噬细胞中的存活增加^[22],体内不断增殖的分枝杆菌产生的毒性代谢物,加重患者的中毒症状^[23]。PI3K/Akt1通路的激活也会使HIF-1活性降低,影响机体氧化应激和能量代谢途径,促进疲劳乏力的产生,可能是结核病患者乏力产生的部分原因^[24]。为了进一步选取抗癆颗粒方中芝麻素(与重要分子靶标Akt1结合分值最高,也是抗癆颗粒方中君药矮地茶的主要活性成分^[6])进行细胞实验,结果表明,与前面的文献研究结论一致^[22],芝麻素通过抑制Akt1的磷酸化实现对分枝杆菌的控制。这些暗示了芝麻素单体是抗癆颗粒方中的重要活性成分,Akt1是抗结核病的重要靶点之一。

HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 构成的异源二聚体,被证明对干扰素(IFN)- γ 介导的结核分枝杆菌感染的控制至关重要^[25]。山柰酚通过损害HIF-1通路相关的MAPK依赖性磷酸化,减少其核积累来抑制HIF-1的活性,从而达到增强结核治疗的作用^[26-28]。分枝杆菌感染引起的ROS和早期分泌蛋白可诱导EGFR的表达,EGFR介导下游靶标MAPK和PI3K/Akt的调控,促进NF- κ B转录合成黏液蛋白MUC5AC^[29],刺激呼吸道产生咳嗽咳痰的反应^[30]。推测抗癆颗粒方可能是通过 β -谷甾醇和山柰酚等关键成分抑制EGFR的转录^[25,31],从而达到祛痰止咳的功效。结核病感染激活自身免疫系统,

诱导MMP-9和其他靶蛋白共同趋化和活化巨噬细胞以抵抗结核分枝杆菌感染。SRC能显著降低THP-1巨噬细胞中H37Rv,促进结核分枝杆菌多耐药和泛耐药菌株的存活^[15]。这也表明抗癆颗粒通过多靶点的协同“杀菌”,祛痰止咳和改善机体免疫等综合治疗的疗效,侧面反应出抗癆颗粒治疗结核病分子机制的复杂性。

抗癆颗粒方通过 β -谷甾醇、芝麻素和山柰酚等重要活性成分,作用于Akt1, SRC, EGFR, MMP-9和HIF1A等关键蛋白靶点,调节PI3K/Akt1/mTOR, HIF-1等信号通路,参与调控结核分枝杆菌氧化代谢、核酸转录和结核分枝杆菌通路等生物学途径,抑制结核分枝杆菌的胞内复制、增强宿主免疫能力等从而达到“杀虫”“补虚”的功效。为进一步实验验证中药治疗结核病的分子机制研究提供理论基础和新的思路,也为结核病的精准治疗研究提供线索。本课题也存在一定的局限性:本研究并未用抗癆颗粒本方验证,即使芝麻素是抗癆颗粒方中最重要的生物活性成分,仍不能真正代表抗癆颗粒本方。需要进一步的实验研究来深入探索抗癆颗粒在体内外治疗结核病的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王胜圣,田洋,刘崑松,等. 基于中医文献检索的肺结核病中医证候规律分析[J]. 中华中医药杂志,2011,26(11):2491-2493.
- [2] 吴雪琼. 关于耐药结核病化疗方案合理组合的思考和探讨[J]. 中国防痨杂志,2021,43(4):305-309.
- [3] SINGH R, DWIVEDI S P, GAHARWAR U S, et al. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Appl Microbiol,2020,128(6):1547-1567.
- [4] 姜德友,高欣元. 肺癆病源流考[J]. 河南中医,2018,38(8):1141-1146.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:753.
- [6] 滑东方. 现有辅助抗结核中成药综述[J]. 临床肺科杂志,2010,15(9):1286-1288.
- [7] 赵凯鑫,卜亚芹,张婷婷,等. HPLC法测定抗癆胶囊中岩白菜素的含量[J]. 中国药品标准,2019,20(1):42-45.
- [8] 时翠林,虞忻,沈洁,等. 抗癆颗粒辅助抗结核药物对患者非结核分枝杆菌性肺病的疗效及其对T细胞亚群的影响[J]. 抗感染药学,2020,17(5):730-733.
- [9] 唐蒙轩,沈莉华. 抗癆颗粒辅助治疗难治性肺结核的

- 临床效果及安全性探析[J]. 中国现代药物应用, 2018,12(12):76-77.
- [10] 薛倩一. 抗癆颗粒联合西药治疗重症淋巴结核疗效观察[J]. 中医学报,2011,26(2):209-210.
- [11] BAPTISTA R, BHOWMICK S, SHEN J, et al. Molecular docking suggests the targets of anti-mycobacterial natural products[J]. Molecules,2021,26(2):475.
- [12] YANG S, LI X, DOU H, et al. Sesamin induces A549 cell mitophagy and mitochondrial apoptosis via a reactive oxygen species-mediated reduction in mitochondrial membrane potential [J]. Korean J Physiol Pharmacol,2020,24(3):223-232.
- [13] 赵帅,郝二伟,杜正彩,等. 瑶药五指毛桃的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2020,22(5):1506-1516.
- [14] ROJANO B, CAMINERO J A, HAYEK M. Curving tuberculosis: current trends and future needs[J]. Ann Glob Health,2019,85(1):1-7.
- [15] CHANDRA P, RAJMANI R S, VERMA G, et al. Targeting drug-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by inhibition of Src family kinases lowers disease burden and pathology [J]. mSphere,2016,1(2):e00043-e00015.
- [16] 陈俊麒,吴俊标,林华,等. 基于3种数据挖掘模型分析16618例含附子中成药的处方用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(3):183-189.
- [17] NANDHA B, NARGUND L G, NARGUND S L, et al. Design and synthesis of some novel fluorobenzimidazoles substituted with structural motifs present in physiologically active natural products for antitubercular activity[J]. Iran J Pharm Res, 2017, 16(3):929-942.
- [18] PRASASTY V D, CINDANA S, IVAN F X, et al. Structure-based discovery of novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 from Indonesian natural products [J]. Comput Biol Chem, 2020, 85: 107205.
- [19] BAI X, GOU X, CAI P, et al. Sesamin Enhances Nrf2-mediated protective defense against oxidative stress and inflammation in colitis via Akt and ERK activation [J]. Oxid Med Cell Longev,2019,2019:2432416.
- [20] TANG M, XIE X, YI P, et al. Integrating network pharmacology with molecular docking to unravel the active compounds and potential mechanism of simiao pill treating rheumatoid arthritis [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2020,2020:5786053.
- [21] 莫琼,郝二伟,覃文慧,等. 平性活血化痰中药物质基础与药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):205-216.
- [22] SHA S, SHI Y, TANG Y, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1987 protein induces M2 polarization of macrophages through activating the PI3K/Akt1/mTOR signaling pathway [J]. Immunol Cell Biol, 2021,99(6):570-585.
- [23] 黎志刚. 肺结核合并支气管结核中医证候分布规律研究[J]. 中医临床研究,2020,12(17):19-22.
- [24] 高寒,徐伟,张宇航,等. 基于网络药理学的刺五加总苷抗疲劳作用机制研究[J]. 中草药,2021,52(2):413-421.
- [25] SHARMILA R, SINDHU G. Evaluate the antigenotoxicity and anticancer role of β -sitosterol by determining oxidative DNA damage and the expression of phosphorylated mitogen-activated protein kinases', C-Fos, C-Jun, and endothelial growth factor receptor [J]. Pharmacogn Mag,2017,13(49):95-101.
- [26] BRAVERMAN J, STANLEY S A. Nitric oxide modulates macrophage responses to mycobacterium tuberculosis infection through activation of HIF-1 α and repression of NF- κ B [J]. J Immunol, 2017, 199(5): 1805-1816.
- [27] YAHAGI H, YAHAGI T, MATSUMURA M, et al. Inhibitory activity of flavonoids from Ephedrae Herba on hypoxia signaling in PANC-1 cells and the evaluation of their mechanisms[J]. J Nat Med, 2021, 75(3):612-622.
- [28] 杨凯麟,曾柳庭,葛安琪,等. 基于网络药理学探讨桃仁-红花药对活血化痰的分子机制[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2018,20(12):2208-2216.
- [29] YANG J, LI Q, ZHOU X D, et al. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- κ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells[J]. Mol Cell Biochem,2011,351(1/2):29-40.
- [30] 钟仁兴,丁子禾,杨燕妮,等. 基于网络药理学分析的橘红痰咳液主治“痰、咳、喘”的药效物质基础与作用机制研究[J]. 药学报,2020,55(9):2134-2144.
- [31] YAO S, WANG X, LI C, et al. Kaempferol inhibits cell proliferation and glycolysis in esophagus squamous cell carcinoma via targeting EGFR signaling pathway [J]. Tumour Biol,2016,37(8):10247-10256.

[责任编辑 顾雪竹]