

• 研究论文 •

网络药理学整合巨噬细胞差异基因揭示广藿香油对炎症性肠病的治疗机制

何毅豪^{1,2}, 汪颖舒^{1,2}, 杜瑶瑶¹, 张彤^{1*}, 王冰^{2*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 药物制剂研究中心, 上海 201203)

摘要: 基于网络药理学和巨噬细胞差异表达基因探究广藿香油治疗炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的作用机制。利用气质联用技术 (GC-MS) 检测广藿香油的化学成分, 通过 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 平台收集活性成分的靶点, 检索 DrugBank、GeneCards、OMIM、PharmGkb 和 TTD 数据库筛选治疗 IBD 的靶标。合并交集靶点, 运用 Cytoscape 软件构建“成分-交集靶点”网络, 并联合 String 平台绘制 PPI 网络, 在 Metascape 平台将交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 应用 AutoDock Vina 分子对接, 对分析结果进行验证。下载巨噬细胞芯片数据, 借用 R 软件获得差异基因, DAVID 平台进行差异基因 KEGG 通路富集分析。采用实时荧光定量 PCR 对筛出的主要成分在体外细胞模型进行验证。广藿香油 14 个主要成分对应 112 个靶点, 交集得到 97 个广藿香油治疗 IBD 共同靶点。GO 富集分析得到 53 个条目。KEGG 富集分析得到 18 个条目, 涉及 cAMP 信号通路、Notch 信号通路、黏附连接以及 Th17 细胞分化等信号通路。分子对接表明, 广藿香油中筛选出的活性成分与靶点有较好的结合活性。差异表达基因富集到 Toll 样受体、Jak-STAT 和 NF- κ B 信号通路等炎症相关通路。q-PCR 实验证明, 广藿香油、广藿香醇和广藿香酮能降低 NCM460 人正常结肠上皮细胞炎症模型中细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-23) 和上调紧密连接蛋白 (occludin 和 claudin-1) 的 mRNA 水平。广藿香醇能显著降低脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 炎症因子水平。本文揭示了广藿香油的多成分、多靶点、多通路的特征, 且证实广藿香油及主要成分在体外炎症细胞模型的抗炎效果和保护肠上皮屏障完整性功能, 为进一步阐明广藿香油治疗 IBD 的机制提供理论依据。

关键词: 广藿香油; 网络药理学; 炎症性肠病; 巨噬细胞极化

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3473-11

Network pharmacology integrates the differential genes of macrophages to explain the mechanism of patchouli oil treating IBD

HE Yi-hao^{1,2}, WANG Ying-shu^{1,2}, DU Yao-yao¹, ZHANG Tong^{1*}, WANG Bing^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Center for Pharmaceutics Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: We explored the mechanism of patchouli oil in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD) based on network pharmacology and differentially expressed genes in macrophages. The chemical composition of patchouli oil was detected by GC-MS, targets for active components were collected through TCMSP and Swiss Target Prediction platform, and targets for treatment of IBD were retrieved from DrugBank, GeneCards, OMIM, PharmGkb, and TTD databases. The intersection targets were merged, Cytoscape software was used to construct the "component-to-intersection target" network, and protein-protein interaction (PPI) network was drawn with

收稿日期: 2021-02-07; 修回日期: 2021-04-21.

基金项目: 中国科学院药物创新研究院自主部署项目 (CASIMM0120184002).

*通讯作者 Tel: 86-21-20231000, E-mail: bwang@simm.ac.cn; zhangtdmj@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0218

String platform. The intersection targets were enriched for GO and KEGG enrichment analysis on Metascape platform, and the molecular docking of AutoDock Vina was used to verify the analysis results. The macrophage chip data was downloaded, and the differential genes were obtained by using R software. KEGG signaling pathway analysis of differentially expressed genes were performed by DAVID platform. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to verify the screened components in the cell model *in vitro*. The 14 main components of patchouli oil corresponded to 112 targets, and the intersection obtained 97 common targets of patchouli oil for IBD treatment. GO enrichment analysis yielded 53 items. Eighteen items were obtained by KEGG enrichment analysis, involving cAMP signaling pathway, Notch signaling pathway, adhesion connection, Th17 cell differentiation and other signaling pathways. Molecular docking showed that the selected active components of patchouli oil had good binding activity with the targets. Differentially expressed genes were enriched in inflammatory pathways such as Toll-like receptors, JAK-STAT and NF- κ B signaling pathways. q-PCR showed that patchouli oil, patchouli alcohol, pogostone can reduce the mRNA levels of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-23) and up-regulate the mRNA levels of tight junction proteins (occludin and claudin-1) in the inflammatory model of NCM460 normal colon epithelial cells. Patchouli alcohol can significantly reduce the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β inflammatory factors in RAW264.7 macrophages induced by LPS. This study revealed the multi-component, multi-target and multi-pathway of patchouli oil, and confirms the anti-inflammatory effect of patchouli oil and its main components in the inflammatory cell model *in vitro* and the protection of intestinal epithelial barrier integrity function, which provides a theoretical basis for further elucidating the mechanism of patchouli oil in the treatment of IBD.

Key words: patchouli oil; network pharmacology; inflammatory bowel disease; macrophage polarization

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种多因素诱导的慢性免疫介导性疾病, 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)^[1,2], 其发病机制复杂不清, 研究多认为由遗传易感、免疫因素、肠道菌群、环境因素、焦虑及情绪障碍等多种因素导致该病发生^[3,4]。巨噬细胞在免疫系统激活和炎症发生过程中起到关键作用^[5-7], 其有可塑性和功能多样性, 可以极化为 M1 或 M2 亚型^[8,9]。M1 型巨噬细胞与促炎及抗菌能力有关, 而 M2 型巨噬细胞则与抗炎、伤口愈合及纤维化作用相关^[10]。研究证实, 在活动期 IBD 患者和疾病动物肠黏膜中, 炎性 M1 型巨噬细胞的数量明显增加^[11,12], 因此巨噬细胞可被作为治疗 IBD 的靶细胞。

广藿香油 (patchouli oil) 为广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分经水蒸气蒸馏提取的挥发油^[13], 包含广藿香醇、广藿香酮、 β -广藿香烯和 α -愈创木烯等挥发性化学成分^[14], 具有抗炎^[15]、免疫调节^[16]、抗菌^[17]和保护肠屏障功能^[18]等药理作用。课题组前期发现, 广藿香醇不仅能够降低 UC 大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等促炎因子水平, 抑制 I κ B α 和 p65 的磷酸化水平, 通过阻断 NF- κ B (nuclear factor kappa-B) 信号通路抑制炎症反应^[19], 并且还构建了炎性巨噬细胞靶向的乳铁蛋白修饰广藿香醇脂质体, 通过主动靶向递送药物提高了抗炎药效^[20]。亦有研究表明广藿香油中其他

成分同样具有抗炎作用, 如广藿香酮具有抑制 T 细胞增殖、减少致炎性 Th 细胞组织浸润、调节细胞因子分泌体现出抗炎作用^[21-23], β -广藿香烯能够调节免疫功能、减缓葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的肠黏膜损伤^[24]。虽然诸多研究发现广藿香油及其主要成分的抗炎作用, 但是基于油中多成分组合的作用机制仍很复杂, 抗炎作用的分子机制研究甚少, 因此, 本文拟通过构建药物分子-靶点-通路-疾病网络, 富集有关信号通路及生物进程, 并结合体外实验考察广藿香油及其主要成分的抗炎作用和肠上皮修复功能, 阐述广藿香油治疗 IBD 的潜在分子生物学机制, 为下一步新药研发提供基础研究。

材料与方法

广藿香油活性成分及靶点 前期对广藿香油进行 GC-MS (gas chromatography-mass spectrometer) 分析, 得到鉴定的 14 种有效成分 (中国发明专利申请号: 202010317649.1)。在 TCMSP (traditional Chinese medicine systems pharmacology) 数据库中检索活性成分靶点, 将靶点通过 UniProt 数据库中的 UniProt KB 功能搜索相应基因。经 Swiss Target Prediction 平台预测成分的潜在靶点。将两次获得的靶点合并去重, 则为化合物靶点基因。

炎症性肠病靶点及交集靶点 以“inflammatory bowel disease”为关键词, 物种设定为“Homo sapiens”, 利用 DrugBank、GeneCards、OMIM、PharmGkb 和 TTD

数据库获取 IBD 的相关靶点。交集靶点通过借助 Venny 2.1.0 在线绘制韦恩图获得。

网络构建与分析 为深入探讨广藿香油治疗 IBD 的作用机制, 使用 Cytoscape3.7.2 构建活性成分-交集靶点网络。通过 Metascape 在线平台^[25] (<https://metascape.org/>) 输入交集靶点, 设置 $P < 0.01$, 进行 GO (gene ontology) 功能富集分析及 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析。为分析靶蛋白之间的联系, 利用 String 平台^[26] (<https://string-db.org/>) 上传交集靶点研究蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI), 将置信度 > 0.7 的数据输入 Cytoscape3.7.2 可视化, 根据 degree 值调整颜色、大小筛选核心靶点, 构建 PPI 图。

成分-靶点分子对接 选取活性成分-交集靶点网络图中度值靠前的化合物与 PPI 网络中核心靶点使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件分子对接。具体方法从 PubChem 数据库和 PDB 网站下载成分和靶点的结构, 利用 ChemOffice、AutoDockTools 1.5.6 和 PyMol 分别进行能量最小化、加氢、去除水分子和小分子配体, 文件均保存为 pdbqt 格式。随后用 Vina 进行分子对接和构象能量计算。通过 PyMol、LigPlot⁺ v.2.2 软件对以上对接结果中结合能最低的化合物与靶点, 进行可视化绘图。

巨噬细胞极化差异基因筛选 从 NCBI 的 GEO (gene expression omnibus) 数据库中搜索巨噬细胞相关芯片数据, 获取 Derlindati E 等提交的 GSE57614 基因芯片数据集。此数据为 GPL6480 平台 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (probe name version) 基因芯片, 选取其中经干扰素- γ 和脂多糖 (LPS) 诱导巨噬细胞极化至 M1 型 9 例样本, 白细胞介素-4 诱导巨噬细胞极化至 M2 型 9 例样本。利用 R x64 3.6.3 软件, 引用 limma 包分析芯片数据的差异表达基因, 过滤条件为 $P < 0.05$ 及差异倍数 $|\log_2FC| > 1$, 绘制热图, 将 M1、M2 型巨噬细胞的差异基因导出到 Excel 表格。

差异表达基因 KEGG 富集分析 DAVID (the database for annotation, visualization and integrated discovery) 是一套全面的功能性注释工具。将筛选的差异基因导入 DAVID 在线数据库进行 KEGG 通路富集分析, 按照 P 值排序, 选取前 20 条信号通路可视化。

细胞与试药 NCM460 人正常结肠上皮细胞 (广州吉妮欧生物科技有限公司)。RAW264.7 巨噬细胞 (北纳生物细胞库)。DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) (Gibco 公司); LPS (Sigma 公司); 青霉素-链霉素 (P/S)、0.25% 胰蛋白酶 (上海碧云天生物科技有限公司); RNA 提取试剂、RNA 逆转录试剂盒 (上海翊圣生物科

技术有限公司); 广藿香挥发油 (20180628, 江西恒诚天然香料油有限公司); 广藿香醇 (MUST-17073111)、广藿香酮 (MUST-19112812) (成都曼斯特生物科技有限公司)。

细胞培养及分组干预 NCM460 人正常结肠上皮细胞作为细胞模型, 在 DMEM 培养基 (含 10% FBS、1% P/S), 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 考察广藿香油、广藿香醇和广藿香酮在细胞上的作用。通过 q-PCR 检测药物对 LPS 诱导的 NCM460 人正常结肠上皮细胞释放的炎症因子及紧密连接蛋白的影响。将 NCM460 人正常结肠上皮细胞按每孔 1×10^6 个细胞种于 12 孔板中, 细胞贴壁后, 设置空白组、LPS ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激组以及广藿香油、广藿香醇、广藿香酮各给药组 ($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 孵育 24 h。Trizol 法提取细胞总 RNA, 使用逆转录试剂盒, 按照试剂盒说明书合成 cDNA, 进行荧光实时定量 PCR 检测。借助 PubMed Primer Blast 设计引物, 引物序列详见表 1。

Table 1 PCR primer sequence of each gene

Primer	Sequence
IL-1 β F	CCTGTTGTCTACACCAATGC
IL-1 β R	GGTTGCTCATCAGAATGTGG
IL-6 F	AGACAGCCACTACCTCTTCAG
IL-6 R	TTTCTGCCAGTGCCTCTTTGC
IL-10 F	TTTCCCTGACCTCCCTCTAA
IL-10 R	TCCCAAAGTGCTGGGATTAC
IL-17 α F	TTCATAGCAGGCACAAACTC
IL-17 α R	GAGGTGGATCGTTGTAGTAATC
IL-23 F	AGTGGAAGTGGCAGAGATTC
IL-23 R	CAGCAGCAACAGCAGCATTAC
TNF- α F	GGAATTCATATGAGCACTGAAAGC
TNF- α R	CGGCGCCTCGAGTCACAGGGCAATGAT
GAPDH F	GTCTCCTCTGACTCAACAGCCG
GAPDH R	ACCACCCTGTTGCTAGCCAA
4e-BP1 F	GGGGACTACAGCAGCAGC
4e-BP1 R	CGCCCCCTTATCTTCT
PI3K-L	TGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACAC
PI3K-R	ATTGGAACACGGCCTTTGACA
AKT-L	TCGGCAAGGTGATCCTGGTGAA
AKT-R	AGGCGGTCGTGGGTCTGGAAG
mTOR-L	ACAGCCCAGGCCGCATTGTC
mTOR-R	TCCAGGGACTCCGTCAGGGCG
p70S6K-L	ACTTCTGGCTCGAAAGGTGG
p70S6K-R	TTGAGTCATCTGGGCTGTCCG
Claudin-1-F	CGATGAGGTGCAGAAGATGA
Claudin-1-R	CCAGTGAAGAGCCTGACC
Occludin-F	TTTGTGGGACAAGGAACACA
Occludin-R	TCATTCACCTTTGCCATTGGAT

将对数生长期的 RAW 264.7 巨噬细胞消化, 细胞计数, 以每孔 1×10^5 细胞密度接种于 6 孔板中。设置空白组、LPS 组、广藿香醇低剂量组 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、广藿香醇中剂量组 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和广藿香醇高剂量组

(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 加入不同浓度的广藿香醇预处理 2 h, 用 LPS (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 诱导 24 h, 收集细胞进行后续检测实验。提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 根据试剂盒说明书进行 q-PCR 检测, 变性引物序列见表 2。

Table 2 PCR primer sequences

Primer	Sequence
(Mouse) GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
(Mouse) GAPDH-R	GGGGTCGTTGATGGCAACA
(Mouse) TNF- α -F	CAGGCGGTGCCTATGTCTC
(Mouse) TNF- α -R	CGATCACCCGAAGTTCAGTAG
(Mouse) IL-6-F	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC
(Mouse) IL-6-R	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
(Mouse) IL-1 β -F	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG
(Mouse) IL-1 β -R	TGGATGCTCTCATCAGGACAG

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8 软件分析数据。通过 *t* 检验及 one-way ANOVA 进行数据统计学差异分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异。

结果

1 广藿香油活性成分及对应靶点

前期对广藿香油的化学成分的分析结果见表 3。从 TCMSP 数据库和 Swiss Target Prediction 平台共获得 236 个成分靶点, 去重得到 112 个靶点。

2 IBD 靶点及交集靶点

通过 DrugBank 和 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 数据库检索 IBD 靶点, 取其并集 (图 1A) 并删除重复靶点, 获得 IBD 有关的疾病靶点 5 800 个, 将广藿香油的 112 个靶点和 IBD 的 5 800 个靶点取交集, 共获 97 个共同靶点 (图 1B)。

3 广藿香油成分-作用靶点网络图

将广藿香油活性成分与交集靶点导入到 Cytoscape3.7.2 软件中进行网络图的绘制和分析, 共有 111 个节点和 207 个边 (图 2)。节点代表活性成分和靶点, 边代表活性成分与靶点之间的相互作用关系。经 Network

Table 3 Information on the main chemical constituents of patchouli oil

No.	Compound	CAS	Content/%
1	β -Patchoulene	514-51-2	5.05
2	β -Elemene	515-13-9	1.64
3	(-)-Thujopsene	470-40-6	1.17
4	β -Caryophyllene	87-44-5	4.72
5	Seychellene	20085-93-2	19.42
6	α -Patchoulene	560-32-7	7.06
7	(-)- α -Gurjunene	489-40-7	3.53
8	α -Guaiene	3691-12-1	4.6
9	α -Bulnesene	3691-11-0	17.8
10	Boronal	3155-71-3	0.91
11	Patchouli alcohol	5986-55-0	32.02
12	Pogostone	23800-56-8	1.59
13	β -Guaiene	87745-31-1	-
14	Widdrol	6892-80-4	0.49

Analyzer 工具计算节点的 degree 值, 值越大则在网络中越重要。其中排名前 5 的化合物分别是韦得醇 (widdrol)、广藿香酮 (pogostone)、 α -布黎烯 (α -bulnesene)、广藿香醇 (patchouli alcohol)、2-甲基-4-(2,2,6-三甲基-1-环己烯基)-2-丁烯醛 (boronal)。在靶点基因中, 位居前 5 的靶标是 PPARA (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)、CNR2 (cannabinoid receptor 2)、GABRA1 (gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1)、SLC6A2 (sodium-dependent noradrenaline transporter) 和 NR1I3 (nuclear receptor subfamily 1 group I member 3), 其中 PPARA、CNR2、GABRA1 为 degree 值 ≥ 9 的关键靶点, 提示这 3 个靶点对 IBD 的治疗具有关键作用。

4 蛋白相互作用关系

在 String 数据库中上传 97 个交集靶点, 将置信度 > 0.7 的数据结果导入到 Cytoscape3.7.2 软件中进行 PPI 的网络图的可视化 (图 3)。该网络图共有 86 个节点和 201 条边, 依据 degree 值设定节点大小和颜色的深浅, 节点越大表示节点蛋白越重要, 颜色也越深。节点度值前 5 的是 AKT1 (RAC- α serine/threonine-protein kinase)、RXRA (retinoic acid receptors alpha)、

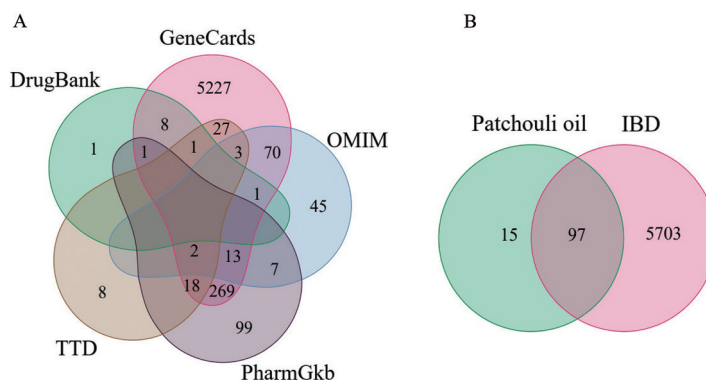


Figure 1 Disease target union map (A), the intersection target of patchouli oil and inflammatory bowel disease (IBD) Venn diagram (B)

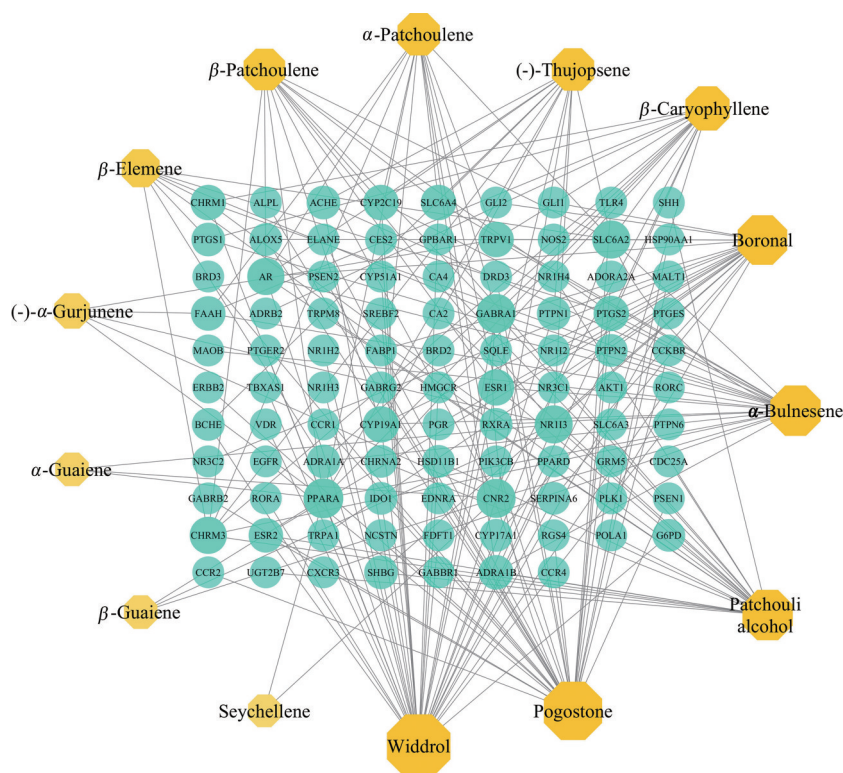


Figure 2 Patchouli oil active ingredient-intersection target network diagram

EGFR (epidermal growth factor receptor)、PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) 和 HSP90AA1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1), 对应 degree 值分别是 15、14、14、14 和 12, 这些靶点预测可作为广藿香油治疗 IBD 的核心靶点。

5 交集靶点通路注释分析

本研究对 97 个交集靶点利用 Metascape 在线数据库进行分析, 旨在揭示广藿香油治疗 IBD 的可能作用

机制。按 $P < 0.01$ 富集到 18 条通路 (图 4)。结果表明, 广藿香油治疗 IBD 主要与雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)、黏附连接 (adherens junction)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、TRP 通道的炎性介质调节 (inflammatory mediator regulation of TRP channels) 等有关。一个靶点对应多条通路, 一条通路上又存在多个靶点, 因此分析表明广藿香油治疗 IBD 可能是通过多靶点及多通路调节。另外, 发现广

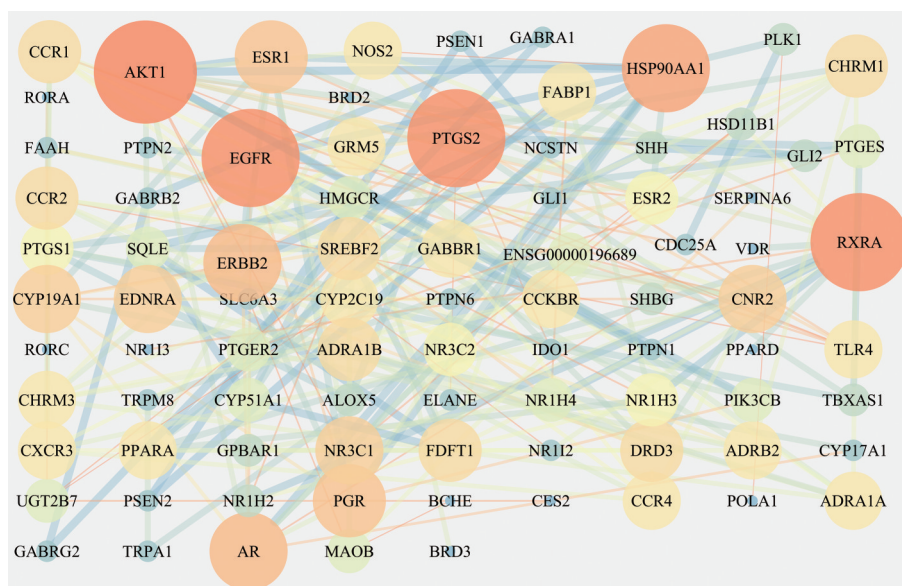


Figure 3 Protein-protein interaction (PPI) network diagram

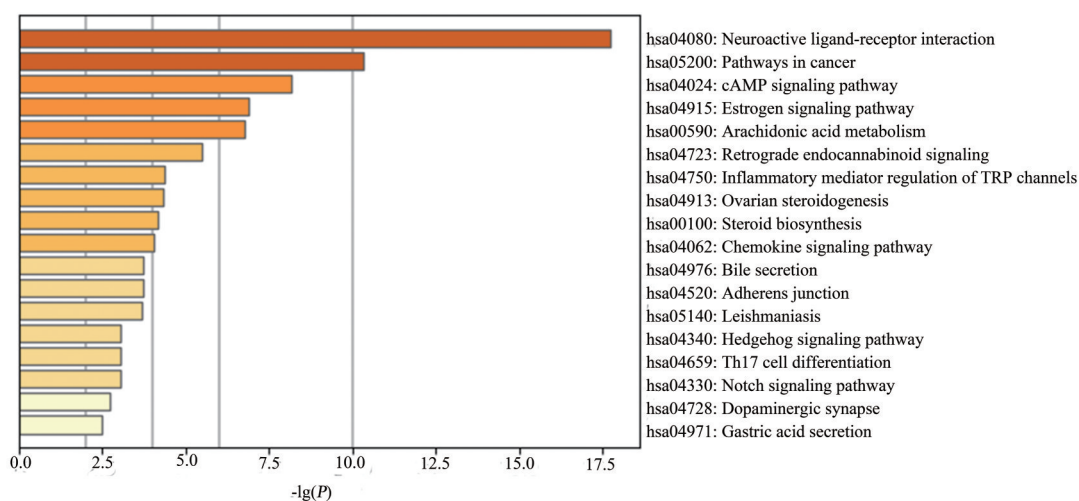


Figure 4 Enrichment analysis diagram of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway in the treatment of IBD by patchouli oil

藿香油活性成分也参与了Th17细胞分化、趋化因子、神经活性配体-受体相互作用等多条通路,提示广藿香油还可治疗其他种类疾病。

6 交集靶点的GO富集分析

使用Metascape在线数据库对广藿香油治疗IBD的97个交集靶点进行GO注释分析,GO富集分析由生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)三部分组成。生物过程主要集中于细胞对有机环状化合物的反应(cellular response to organic cyclic compound)、类固醇代谢过程(steroid metabolic process)、化学突触传递(chemical synaptic transmission)等方面(图5);细胞组成主要包括突触膜(synaptic membrane)、受体复合物(receptor complex)、RNA聚合酶II转录因子复合物(RNA polymerase II transcription factor complex)等部位(图6);分子功能主要涉及类固醇激素受体活性

(steroid hormone receptor activity)、激素结合(hormone binding)、神经递质受体活性(neurotransmitter receptor activity)等方面(图7)。

7 成分-靶点分子对接

将广藿香油中活性成分与PPI网络中核心靶点进行Vina分子对接,结果见表4。阳性对照药为5-氨基水杨酸,该药作用于炎症黏膜^[27],对引起炎症的前列腺素合成和炎症介质白三烯形成有抑制作用。广藿香醇、广藿香酮、 α -布黎烯、韦得醇等4个活性成分与PTGS2、AKT1、RXRA等5个degree值最高的关键性靶点对接,结果发现有4组对接(广藿香醇与AKT1、广藿香酮与PTGS2、韦得醇与AKT1、韦得醇与PTGS2)的结合能小于 $-7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,且结合程度均优于阳性对照药5-氨基水杨酸,其中广藿香醇与AKT1受体(PDB ID: 6HHF)结合最稳定。使用PyMol、LigPlot⁺ v.2.2绘制广藿香醇与AKT1对接模式图(图8)。由图可知,

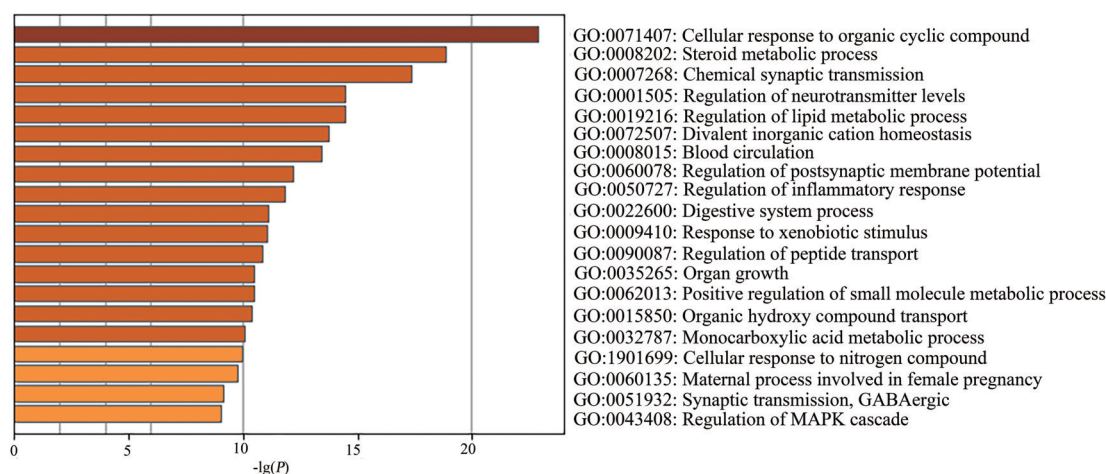


Figure 5 Bioprocess diagram of patchouli oil in the treatment of IBD

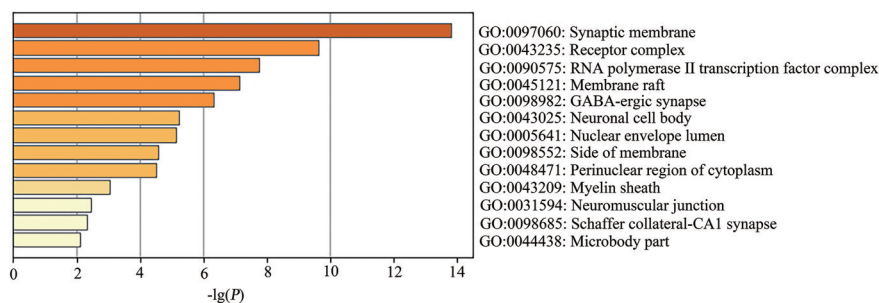


Figure 6 Cell composition diagram of patchouli oil in the treatment of IBD

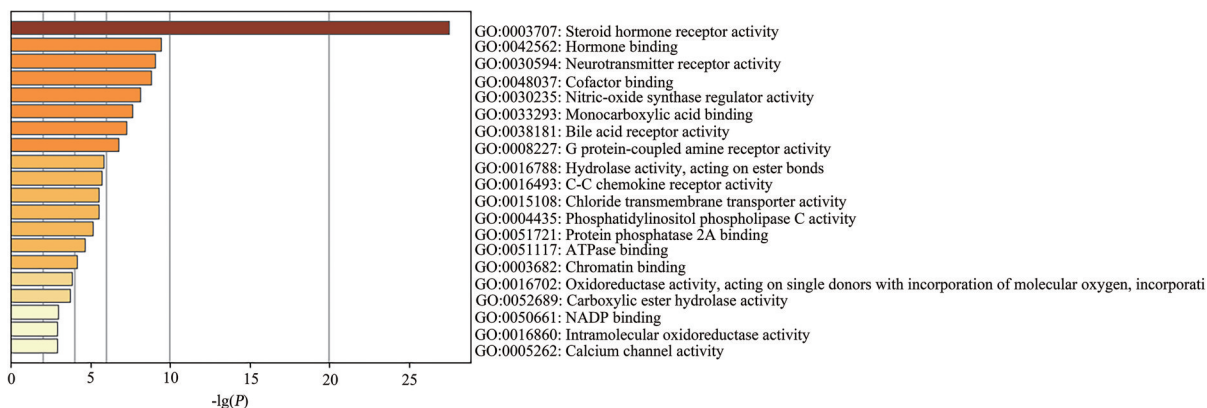


Figure 7 Molecular function diagram of patchouli oil in the treatment of IBD

Table 4 Molecular docking results of active components in patchouli oil

Compound	Binding energy/kcal·mol ⁻¹				
	AKT1	RXRA	EGFR	PTGS2	HSP90AA1
Patchouli alcohol	-7.4	-6.1	-4	-6.6	-6
Pogostone	-6.6	-6.8	-5	-7.1	-7
Widdrol	-7.3	-7	-4.4	-7.1	-6.7
α -Bulnesene	-6.8	-6.1	-4	-6.4	-5.7
5-Aminosalicylic acid	-6.1	-6.1	-4.5	-7	-6.2

AKT1与广藿香醇在氨基酸残基 Tyr272处形成氢键,与 Val217、Val270、Trp80、Asp292、Asp274、Gln79、Thr82、Asn54形成疏水作用。

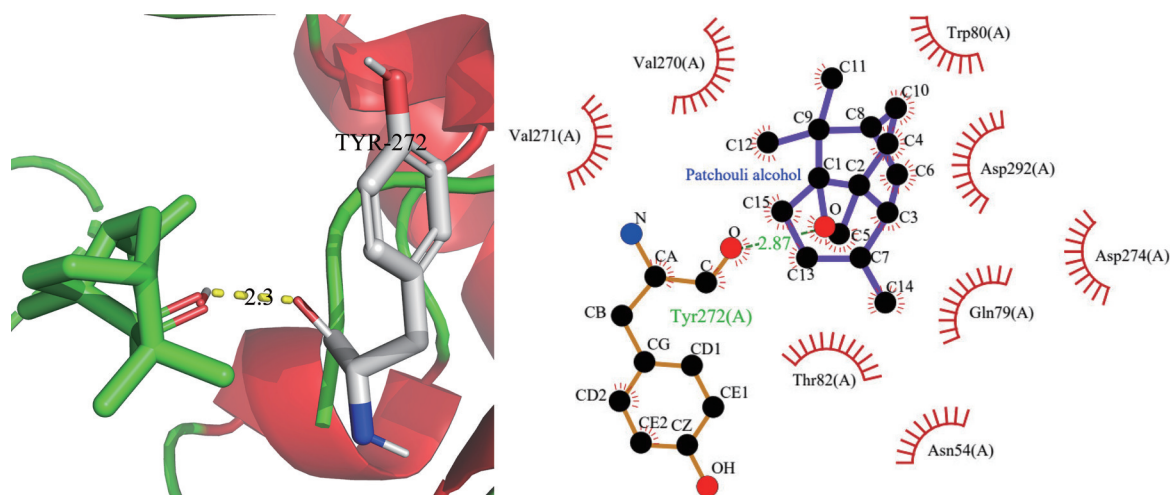


Figure 8 2D and 3D models of the interaction between fulmar alcohol and AKT1 protein

8 差异基因筛选结果

GSE57614共获得2523个差异基因。其中,1227个基因在M1型巨噬细胞中表达上调,在M2型巨噬细胞中表达下调;1296个基因在M1型巨噬细胞中表达下调,在M2型巨噬细胞中表达上调。图9的热图显示样本中基因在M1、M2型巨噬细胞中表达量有显著差异。

9 差异基因KEGG信号通路分析

差异表达基因富集得到77条信号通路,炎症反应相关通路主要涉及TNF (tumor necrosis factor)、NF- κ B、Jak-STAT (Just another kinase-signal transducer and acti-

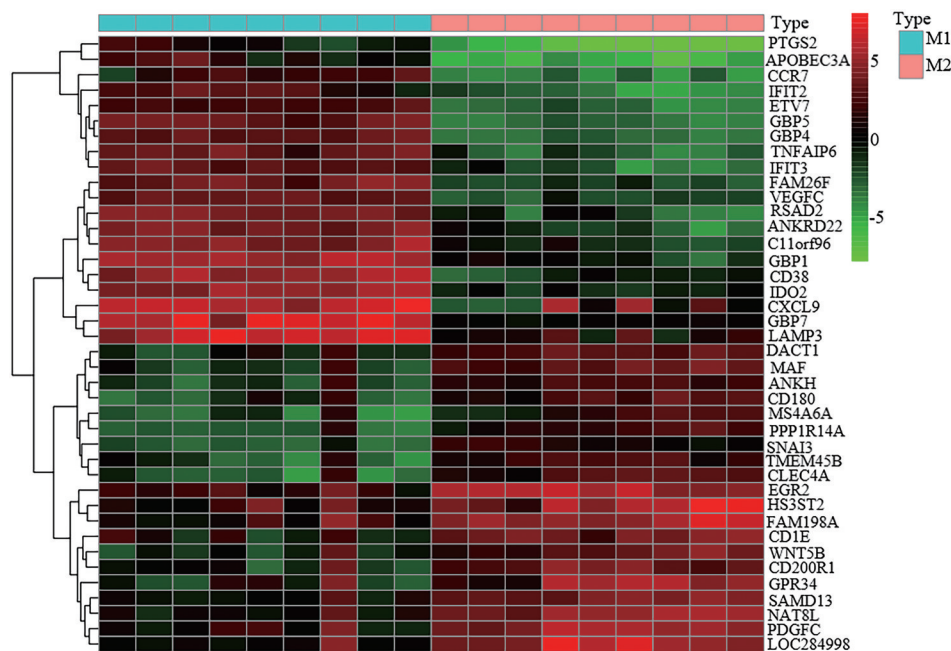


Figure 9 The heat map of the differential gene between M1 and M2 macrophages

vator of transcription) 及 Toll 样受体 (Toll-like receptors) 等信号通路, 显著富集通路结果见图 10。

10 体外验证实验结果

广藿香油、广藿香醇和广藿香酮 ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 等剂量实验结果显示, LPS 组中促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-23) 的 mRNA 水平均显著高于正常组。采用广藿香油、广藿香醇和广藿香酮处理后均能显著降低细胞因子 mRNA 水平, 但各给药组无显著性差异, 如图 11 所示。此外, LPS 组紧密连接蛋白相关 mRNA 水平均下降, 各给药组均能提高紧密连接蛋白 mRNA 水平, 但给药组间基本无统计学差异, 其中广藿香酮对紧

密连接蛋白的促进作用相对较强, 见图 12。

q-PCR 结果显示, 经 LPS 处理后的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 显著上调 ($P < 0.001$), 见图 13。经广藿香醇处理后, 巨噬细胞炎症因子水平与 LPS 组相比显著下降; 广藿香醇高剂量组抑制炎症因子能力最强。广藿香醇可以剂量依赖性地抑制炎症因子的表达。

讨论

PPI 网络显示 AKT1、RXRA、EGFR、PTGS2 和 HSP90AA1 等度值较大, 可能是广藿香油治疗 IBD 的

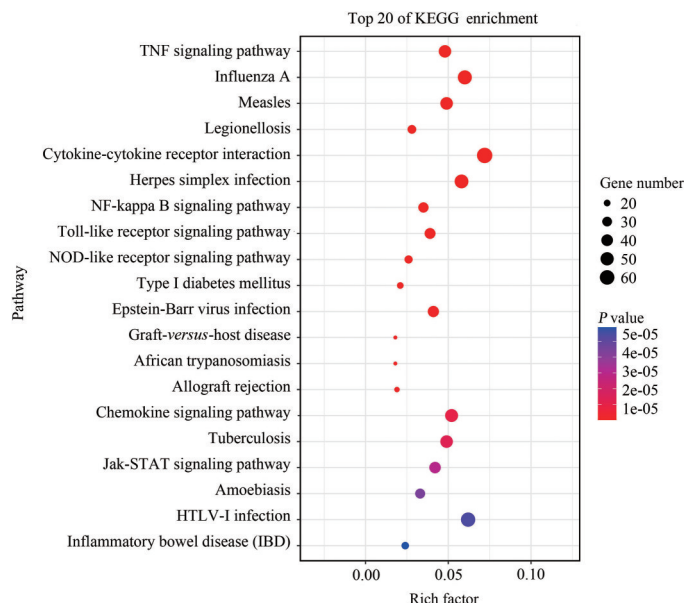


Figure 10 The top 20 signal pathways with the most significant differential gene enrichment

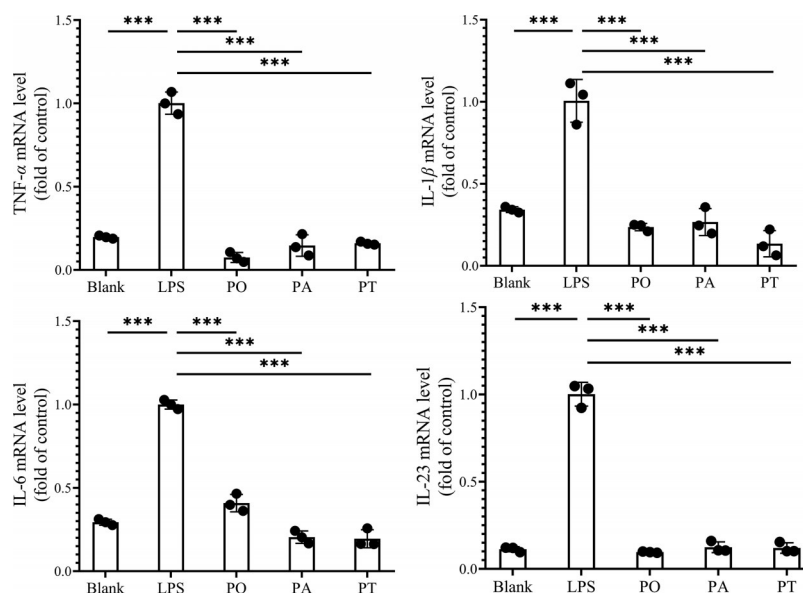


Figure 11 The mRNA levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-23) by q-PCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$. PO: Patchouli oil; PA: Patchouli alcohol; PT: Pogostone

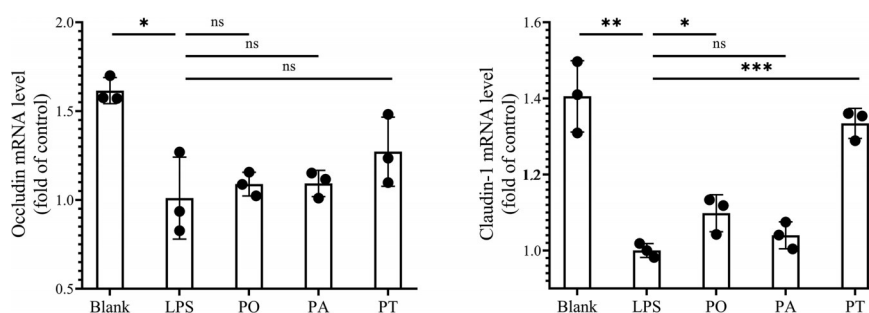


Figure 12 The mRNA levels of tight junction protein by q-PCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ns: No significance

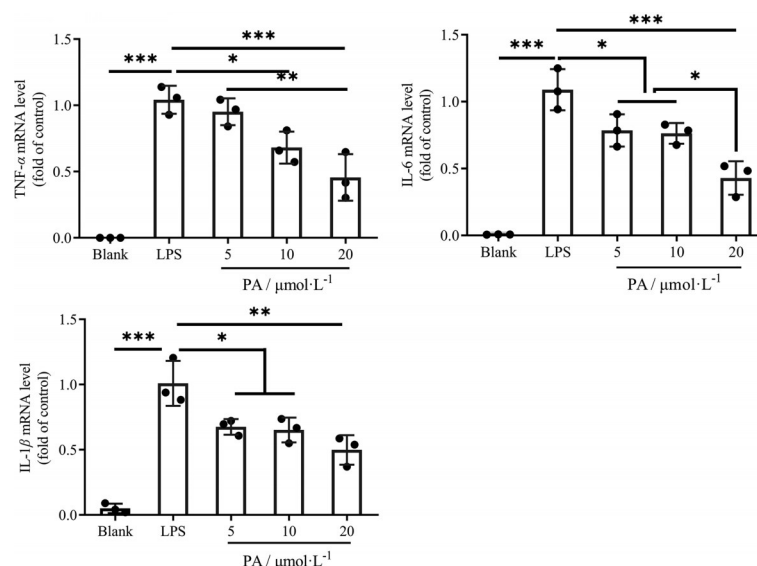


Figure 13 The mRNA levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β by q-PCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

关键性靶标。郭爱丽^[28]研究发现,在UC和LPS刺激的巨噬细胞中,类视黄醇X受体 α (RXRA)在基因及蛋白水平表达下降,提示可能与UC发病有关。核受体

RXRA的下调可抑制NF- κ B的活性,介导衰老巨噬细胞中环氧合酶2 (cyclooxygenase-2, COX-2)的表达和PGE2产生^[29]。RXRA与肠道免疫和炎症反应密切相关,维

生素 A 缺乏大鼠肠道黏膜炎症因子表达水平升高, RXRA mRNA 表达水平降低^[30]。前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2), 也称 COX-2, 是前列腺素生物合成的关键酶, 几乎不在正常肠黏膜组织表达, 而在 IBD 中表达明显增强^[31], 这种表达在损伤愈合过程中可促进上皮细胞的修复和肠上皮细胞增生。此外, 前列腺素也参与炎症过程, 增强 5-脂氧合酶的活性和促进炎性白三烯的释放^[32]。据报道, PTGS2 抑制剂塞来昔布和罗非昔布对 UC 患者和动物模型均有效^[33]。因此, RXRA 和 PTGS2 可能是广藿香油治疗 IBD 的重要靶标之一。

KEGG 通路富集分析表明, 广藿香油治疗 IBD 与神经活性配体-受体相互作用、Notch 信号通路、TRP 通道的炎性介质调节及 Th17 细胞分化等通路有关。在 IBD 患者的炎症发病机制中, 肠-脑轴是中枢神经系统和胃肠道之间的重要生理联系^[34]。IBD 患者存在交感迷走失衡、功能性肠神经缺损和下丘脑-垂体-肾上腺轴活性降低等临床症状, 迷走神经可在系统和肠道局部层面发挥多效的抗炎作用^[35]。Chen 等^[36]研究表明 TRP 通道与 IBD 的内脏高敏感性 (visceral hypersensitivity, VHS) 和免疫发病机制相关, TRP 通道的激活可导致 VHS 或肠道炎症的改善。Th17 细胞是一类能分泌 IL-17 的 CD4⁺ 细胞, 参与上皮细胞和中性粒细胞介导的对细胞外微生物的免疫应答以及自身免疫性疾病的发病机制。裴中美等^[37]发现 UC 和 CD 患者的肠黏膜组织 IL-17 表达为阳性, 且血浆中 IL-17 表达水平显著高于对照组, 提示其可能参与 IBD 的发病过程。Notch 信号通路是巨噬细胞重要的分化调节器, 活化 Notch 信号促使巨噬细胞向 M1 型极化, 抑制此通路调节巨噬细胞向 M2 型分化^[38]。巨噬细胞极化相关差异基因的 KEGG 通路富集中, NF- κ B 信号通路富集了 33 个基因。课题组前期研究发现, 广藿香醇脂质体能抑制 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 以及 NF- κ B 信号通路, 降低 IL-6 和 IL-12 等促炎细胞因子的释放, 同时该载药系统使 M1 型巨噬细胞重极化, 转化为 M2 型巨噬细胞, 缓解结肠炎症^[39]。因此, 广藿香油可能是通过激活或抑制以上通路而治疗 IBD。从分子对接结合能可知, 与抗炎阳性药 5-氨基水杨酸相比, 广藿香醇、广藿香酮、韦得醇、 α -布藜烯与 5 个关键靶点蛋白的结合程度均较为稳定, 推测以上 4 个成分有抗炎活性^[21,40], 但韦得醇、 α -布藜烯仍未见抗炎作用的文献报道。q-PCR 实验结果显示, 在广藿香油、广藿香醇和广藿香酮干预 LPS 诱导的 NCM460 人正常结肠上皮细胞炎症模型中, 相对于 LPS 组, 各药物组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-23 的 mRNA 水平降低, 证实药物对 IBD 的潜在治疗作用。

本文基于先前研究发现, 靶向巨噬细胞的广藿香醇脂质体对结肠炎有好的治疗效果, 在此借助多种生物信息学手段, 将广藿香油的活性成分进行靶点预测、通路分析, 联合 IBD 中免疫细胞-巨噬细胞极化差异表达基因, 进一步预测了中药成分群治疗复杂疾病的分子机制, 为广藿香创新药物的成分与机制关联性研究提供了前期基础。

作者贡献: 王冰和张彤负责本文设计思路及讨论; 何毅豪和汪颖舒具体参与成分靶点、疾病靶点、通路分析、分子对接以及巨噬细胞极化差异基因分析工作; 杜瑶瑶进行体外实验并处理数据; 何毅豪负责文章撰写及修改。

利益冲突: 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

References

- [1] Yao J, Gao RY, Luo MH, et al. Close homolog of L1-deficient ameliorates inflammatory bowel disease by regulating the balance of Th17/Treg [J]. *Gene*, 2020, 757: 144931.
- [2] Xia B, Deng CS, Wu KC, et al. Inflammatory Bowel Disease (炎症性肠病学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014: 1-700.
- [3] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2007, 448: 427-434.
- [4] Graff LA, Walker JR, Bernstein CN. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15: 1105-1118.
- [5] Grainger JR, Konkel J, Shaw TN, et al. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469: 527-539.
- [6] Gren ST, Grip O. Role of monocytes and intestinal macrophages in Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22: 1992-1998.
- [7] Lissner D, Schumann M, Batra A, et al. Monocyte and M1 macrophage-induced barrier defect contributes to chronic intestinal inflammation in IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21: 1297-1305.
- [8] Zhang J, Zhao Y, Hou T, et al. Macrophage-based nanotherapeutic strategies in ulcerative colitis [J]. *J Control Release*, 2020, 320: 363-380.
- [9] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [J]. *Science*, 2010, 327: 656-661.
- [10] Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30: 245-257.
- [11] Grimm MC, Pullman WE, Bennett GM, et al. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995, 10: 387-395.
- [12] Platt AM, Bain CC, Bordon Y, et al. An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 6843-6854.

- [13] Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part 1) [中华人民共和国药典 (一部)] [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020, 415.
- [14] Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, et al. Chemical composition of leaves, inflorescence, whole aerial-parts and root essential oils of patchouli {*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth} [J]. *J Essent Oil Res*, 2019, 31: 319-325.
- [15] Xian YF, Suo Juan, Huang XD, et al. A Pharmacological study on anti-inflammatory effects of refined Huodan Recipe [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2007, 13: 54-56.
- [16] Qi SS, Hu LP, Chen WN, et al. Immunological regulation effects of essential oil in leaves of *Cablin Patchouli* Herb on mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2009, 27: 774-776.
- [17] Yang X, Zhang X, Yang SP, et al. Evaluation of the antibacterial activity of patchouli oil [J]. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12: 307-316.
- [18] Xie XC, Tang F. Protective effect of volatile oil from patchouli on intestinal barrier function [J]. *China Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2009, 40: 942-944.
- [19] Wu Z, Zeng H, Zhang L, et al. Patchouli alcohol: a natural sesquiterpene against both inflammation and intestinal barrier damage of ulcerative colitis [J]. *Inflammation*, 2020, 43: 1423-1435.
- [20] Zhao Y, Yang Y, Zhang J, et al. Lactoferrin-mediated macrophage targeting delivery and patchouli alcohol-based therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1966-1976.
- [21] Su JY. Pogostone Ameliorates TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease: An Immunomodulation Study on T Cell (从T细胞角度探讨广藿香酮对炎症性肠病的免疫调节作用) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [22] Su J, Li C, Yu X, et al. Protective effect of pogostone on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis *via* inhibition of T helper cell [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 829.
- [23] Li YC, Xian YF, Su ZR, et al. Pogostone suppresses proinflammatory mediator production and protects against endotoxic shock in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 212-221.
- [24] Liu YH. β -Patchoulene, A Transformation Product of Patchouli Alcohol in Gastric Juice, Protect against Gastric Ulcer and Ulcerative Colitis (广藿香醇胃液代谢物 β -广藿香烯抗胃溃疡及溃疡性结肠炎的研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018.
- [25] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1523.
- [26] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
- [27] Bo YZ, Luo J, Miao YL. Research progress and chemophy-laxis of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease [J]. *J Intern Med (内科理论与实践)*, 2017, 12: 205-208.
- [28] Guo AL. Retinoic Acid Receptor Alpha and Retinoid X Receptor Alpha Status in Human Ulcerative and Murine Colitis (维甲酸受体 α 和类视黄醇X受体 α 在溃疡性结肠炎患者和小鼠结肠炎模型中的表达及其在炎症中的作用) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016.
- [29] Chen H, Ma F, Hu X, et al. Elevated COX2 expression and PGE2 production by downregulation of RXR α in senescent macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440: 157-162.
- [30] Dong P, Tao Y, Yang Y, et al. Expression of retinoic acid receptors in intestinal mucosa and the effect of vitamin A on mucosal immunity [J]. *Nutrition*, 2010, 26: 740-745.
- [31] Xu CM, Dong WG, Yu BP, et al. Expression of HIF-1 α and COX-2 protein in inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Med (临床内科杂志)*, 2005, 22: 82-84.
- [32] Ferrer MD, Busquets-Cortés C, Capó X, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26: 3225-3241.
- [33] Mahadevan U, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97: 910-914.
- [34] Gracie DJ, Hamlin PJ, Ford AC. The influence of the brain-gut axis in inflammatory bowel disease and possible implications for treatment [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4: 632-642.
- [35] Tamara M, Rebecca B, Qasim A, et al. The role of the autonomic nervous system in the pathogenesis and therapy of IBD [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 50: 720-737.
- [36] Chen YD, Mu JX, Zhu M, et al. Transient receptor potential channels and inflammatory bowel disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 180.
- [37] Pei ZM, Zhao ZY, Xiao JB, et al. Expression and significance of interleukin-17 in plasma and intestinal mucosa of patients with active inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology (胃肠病学)*, 2016, 21: 549-553.
- [38] Li HR, Sun Y, Chang CC, et al. Notch signaling pathway with the polarization of macrophages [J]. *J Med Postgra (医学研究生学报)*, 2015, 28: 1316-1321.
- [39] Zhao YG. Study on the Lactoferrin-modified Patchouli Alcohol Liposomes Forcolitis Treatment (乳铁蛋白修饰广藿香醇脂质体治疗结肠炎的研究) [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [40] He JJ. Experimental Study on Anti-inflammatory, Anti-allergic and Immunomodulatory Activities of Patchouli Oil and Pogostone (广藿香油和广藿香酮的抗炎抗过敏和免疫调节作用研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013.