

基于网络药理学探索桔梗治疗肺纤维化的作用机制

王璇¹, 徐泳¹, 罗子宸¹, 韩迪¹, 谢彤¹, 林丽丽¹, 徐建亚¹,
时晨^{1*}, 单进军^{1,2*}

(1. 南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏南京 210023;
2. 江苏省中药高效给药系统工程中心, 江苏南京 210023)

摘要: 基于网络药理学和动物实验研究桔梗抗肺纤维化的作用机制。通过TCMSP、Swiss Target Prediction等数据库预测桔梗的成分和作用靶点, 并与通过GeneCards、OMIM、Disgenet、Drugbank数据库筛选出的肺纤维化的疾病靶点交集整合, 获得桔梗治疗肺纤维化的潜在靶点。运用Cytoscape软件构建“药物-成分-靶点-疾病”的网络图和潜在靶点的相互作用关系, 并联合String平台绘制PPI网络, 同时进行拓扑学分析, 基于R软件使用Bioconductor生物信息软件包对交集靶点进行GO和KEGG富集分析预测作用机制。采用动物实验对网络药理学分析结果进行验证, 构建肺纤维化小鼠模型, 进行病理染色、ELISA检测、肺功能检测、qRT-PCR及Western blot。桔梗8个潜在活性成分对应289个靶点, 肺纤维化1129个疾病靶点, 得到药物-疾病共同靶点65个, GO富集分析共得到条目1575个, KEGG富集分析得到146个条目, 涉及磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B (PI3K-AKT) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路等。动物实验结果表明, 桔梗能改善肺纤维化小鼠的肺部炎症及胶原沉积。Western blot结果显示, 桔梗治疗肺纤维化小鼠后, PI3K-AKT信号通路相关蛋白p-PI3K、p-AKT表达呈剂量依赖性下调, p-AKT的下调抑制了P21的表达, 提示桔梗可能通过调控PI3K-AKT通路相关蛋白表达影响细胞衰老治疗肺纤维化小鼠。本文运用网络药理学揭示了桔梗抗肺纤维化的作用靶点和通路并进行了相关验证, 为深入探讨桔梗抗肺纤维化的作用机制提供了依据。

关键词: 桔梗; 肺纤维化; 网络药理学; PI3K-AKT; 衰老

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-2957-11

Mechanism of *Platycodon grandiflorum* in the treatment of pulmonary fibrosis based on network pharmacology

WANG Xuan¹, XU Yong¹, LUO Zi-chen¹, HAN Di¹, XIE Tong¹, LIN Li-li¹, XU Jian-ya¹,
SHI Chen^{1*}, SHAN Jin-jun^{1,2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China)

Abstract: The mechanism of *Platycodon grandiflorum* in the treatment of pulmonary fibrosis was examined by integrated pharmacology network with animal experiment validation. Compositions and targets of *Platycodon grandiflorum* were collected utilizing databases such as TCMSP and Swiss Target Prediction, whereas pulmonary fibrosis targets were obtained using GeneCards, OMIM, Disgenet, and Drugbank databases. These datasets were

收稿日期: 2021-06-24; 修回日期: 2021-08-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774156); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养资助项目 (YY-022); 江苏高校优势学科(中医学)建设工程资助项目 (PAPD).

*通讯作者 Tel: 86-25-85811329, E-mail: dfsjj@163.com; chenshi_njucm@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0932

merged in order to identify prospective *Platycodon grandiflorum* targets for the treatment of pulmonary fibrosis. The "drug-component-target-disease" network was constructed with Cytoscape software, and the interaction relationship between potential targets was produced; they were coupled with the String platform to create the PPI network while also doing topological analysis. Then, using R software and the Bioconductor biological information software package, we conduct GO and KEGG enrichment analysis to estimate the therapeutic mechanism. A mouse model of pulmonary fibrosis was constructed for pathological staining, ELISA, lung function, qRT-PCR, and Western blot to validate the results of the network pharmacology. There are 289 putative active components of *Platycodon grandiflorum*, and 1 129 disease targets for pulmonary fibrosis, for a total of 65 drug-compound-disease common targets. The GO enrichment analysis revealed 1 575 items, whereas the KEGG enrichment analysis yielded 146 entries. The phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) signaling pathway, the tumor necrosis factor (TNF) signaling system, and the interleukin-17 (IL-17) signaling pathway were enriched. In animal experiments, *Platycodon grandiflorum* was found to decrease lung inflammation and collagen deposition in mice with pulmonary fibrosis. According to Western blot results, the expression of PI3K-AKT signaling pathway-related proteins p-PI3K and p-AKT was down-regulated in a dose-dependent manner after *Platycodon grandiflorum* therapy of pulmonary fibrosis mice. When p-AKT was suppressed, P21 expression was reduced, indicating that *Platycodon grandiflorum* may control the expression of PI3K-AKT pathway-related proteins to alter cell senescence while treating mice with pulmonary fibrosis. This study uses network pharmacology to identify the targets and pathways of *Platycodon grandiflorum* against pulmonary fibrosis and conducts related animal experimental validation, providing a foundation for an in-depth discussion of the therapeutic mechanism of *Platycodon grandiflorum* against pulmonary fibrosis.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; pulmonary fibrosis; network pharmacology; PI3K-AKT; senescence

肺纤维化是一种慢性、不可逆性和致死性的肺间质病,主要表现为胸膜下与基底部的纤维化和蜂窝样改变,以及肺纤维化灶周围的胶原与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积,最终导致肺组织结构改变,肺通气和弥散功能丧失而危及生命^[1,2]。研究表明,多种呼吸道病毒(包括常见的流感以及去年突发的新冠病毒)感染均可能导致肺纤维化的发生^[3]。FDA批准的吡非尼酮和尼达尼布均为姑息药物,仅能延缓轻中度患者肺功能下降速率,降低急性加重的风险,并不会阻止或逆转已经发生的肺纤维化,其不良反应明显且价格昂贵^[4,5]。当前,可用于进行性肺纤维化的唯一有效疗法是肺移植,但也存在存活率有限、费用高、器官供体少等问题^[6]。

肺纤维化属于中医学“肺痹”、“肺痿”等病范畴,而“肺痹”、“肺痿”为肺纤维化在不同阶段的病机特征,早期以肺痹为主,晚期发展为肺痿^[7]。《内台方议》记载:“用桔梗为君,桔梗能浮而治上焦,利肺痿,为众药之舟楫也”。桔梗是一种传统药食同源的中药材^[8],现代药理研究表明,桔梗总皂苷通过降低胶原合成以及抗氧化对肺纤维化具有一定的治疗作用^[9];桔梗皂苷-D可通过减弱转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的肺成纤维细胞增殖和ECM积累在肺纤维化治疗中发挥作用^[10]。

网络药理学是基于系统生物学的理论,用生物信

息学和网络分析方法对生物系统进行分析的新兴交叉学科。运用网络药理学方法可以有效预测中药的药效成分及作用机制,体现中药具有多成分、多靶点、多途径、互协同的特点^[11]。本研究利用网络药理学与体内实验相结合的方法,构建“化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络预测桔梗治疗肺纤维化作用机制,同时利用博莱霉素构建肺纤维化小鼠模型进行相关实验验证。

材料与方法

数据库与软件 TCMSP数据库(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、OMIM数据库(<https://omim.org/>)、Disgenet数据库(<https://www.disgenet.org/>)、Drugbank数据库(<https://go.drugbank.com/>)、STRING数据库(<https://string-db.org/>)、Venny2.1在线软件作图工具平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)、Cytoscape3.7.2软件、R3.6.1软件等。

潜在活性成分的获取及靶点预测 在TCMSP数据库中检索桔梗的成分,并结合文献补充有相关药理作用的成分作为潜在活性成分。使用PubChem数据库获得上述成分的SDF结构,导入Swiss Target Prediction数据库,取预测得分大于0的靶标作为药物靶点。使

用 OMIM、Disgenet、Drugbank 数据库以“pulmonary fibrosis”为关键词进行检索, 获得疾病作用靶点。在 Venny2.1 在线软件作图工具平台上绘制韦恩图, 获得药物-疾病共同靶点。

中药-成分-靶点-疾病网络构建及分析 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图, 使用 Network Analyzer 功能对桔梗的主要活性成分进行分析。

蛋白互作 (PPI) 网络的构建及核心靶点分析 将药物-疾病共同靶点输入到 STRING 数据库中进行检索, 设置蛋白种类为“homo sapiens”, 最低相互作用阈值为 0.4, 获取靶点相互作用的网络关系数据, 将其导入 Cytoscape 软件, 绘制蛋白相互作用网络图。将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 中, 通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析, 通过 degree 排序, 选取分值大于平均分的基因作为核心靶点。

富集分析 基于 R 软件使用 Bioconductor 生物信息软件包以 $P < 0.05$ 、 $Q < 0.05$ 进行关键靶基因 GO 与 KEGG 功能富集分析, 富集分析结果均以 $P < 0.05$ 作为筛选条件。

试剂与仪器 博莱霉素 (TCI 梯希爱公司); 羟脯氨酸检测试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司); ECL 高敏发光液、蛋白预染 marker (天能生物科技有限公司); 脱脂奶粉 (日本 Wako 公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×) (Biosharp 生物科技有限公司); 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (phospho-phosphatidylinositol 3 kinase, p-PI3K) 抗体、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 抗体、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体、磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-AKT) 抗体 (Cell Signaling 公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、HE、Masson、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (南京碧云天公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 (南京福麦斯生物技术有限公司); 蛋白印迹多功能成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 (日本尼康公司); 酶标仪 (瑞士帝肯公司); 梯度 PCR 仪 (MJ mini 购自德国 Eppendorf 公司); 高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔公司); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司); Flexivent 小动物肺功能仪 (法国 EMKA 公司)。

桔梗水煎液制备 称取桔梗药材 75 g, 加入 0.9 L 水, 浸泡 30 min, 武火煮沸后文火煎煮 1 h, 将药液倒出冷却; 再加入 0.75 L 水, 武火煮沸后文火煎煮 1 h, 混合两次药液, 过滤, 减压浓缩至一定浓度的桔梗水煎液^[12]。

实验动物分组与造模 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 8 周龄, 由浙江维通利华公司提供。所有动物

实验均经南京中医药大学动物委员会批准 (许可证号: 202005A016)。适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 分别为空白组 (control)、模型组 (model)、吡非尼酮组 (Pir 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹)、桔梗低剂量组 (PR 1.35 g·kg⁻¹·d⁻¹)、桔梗中剂量组 (PR 2.7 g·kg⁻¹·d⁻¹)、桔梗高剂量组 (PR 5.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)。采用单次气管给予浓度为 5 mg·kg⁻¹ 博莱霉素造模。造模后次日, 空白组和模型组给予生理盐水灌胃。根据人与小鼠体表面积换算, 其余各组分别给予吡非尼酮 (0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹)、桔梗低、中、高剂量 (1.35、2.7、5.4 g·kg⁻¹·d⁻¹) 水煎液进行灌胃。连续给药 21 天, 末次给药 3 h 后处死小鼠, 取肺组织。所有小鼠均取右肺下叶置于 4% 多聚甲醛中固定。其余肺组织置 2 mL 冻存管中于液氮快速冷冻, 后移至 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

组织病理学 小鼠肺组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后常规脱色、石蜡包埋, 肺切片 (4 μ m) 后进行 HE 染色和 Masson 染色。根据 Szapiel 方法进行肺泡炎症评分, 参照 Ashcroft 方法进行纤维化评分。

羟脯氨酸含量测定 根据上海西唐生物科技有限公司的羟脯氨酸 ELISA 试剂盒的说明书进行, 具体实验步骤为: 每只小鼠称取肺组织约 30 mg, 根据质量加入相应比例匀浆液进行匀浆并收集上清液, 同时稀释标准品用于绘制标准曲线。将待测样品与标准品加样于包被羟脯氨酸的酶标板上, 先后加入酶标抗体工作液、底物工作液、终止液后在 450 nm 处测吸光值, 根据标准曲线计算羟脯氨酸的含量。

肺功能 最后一次给药后, 麻醉小鼠后剪开颈部皮肤, 钝性分离气管, 将肺功能仪的针管插入并用手术线固定连接部位, 固定小鼠于体描仪平台, 运行仪器检测并记录小鼠肺顺应性 [cm(H₂O)·mL⁻¹] 与肺阻力 [cm(H₂O)·mL⁻¹] 指标的变化。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 采用 qRT-PCR 方法检测肺组织中待测基因的表达, 以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 值表示基因相对表达量。引物信息见表 1, 由上海生工生物技术有限公司合成。

蛋白质免疫印迹 取肺组织冰上剪碎后加入适量 RIPA 溶液 (含蛋白酶及磷酸酯酶混合抑制剂) 进行裂解, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 向上清中按比例加入上样缓冲液后置于沸水浴中 5 min。制得的蛋白样品进行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 电泳, 按每孔 40 μ g 上样电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST (Tris buffered saline Tween20) 洗膜, 按照抗体说明书稀释一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 37 °C 孵育 1 h。ECL 显影, 凝胶成

Table 1 PCR primer sequence of each gene. AKT1: Serine/threonine kinase 1; EGFR: Epidermal growth factor receptor; MAPK3: Mitogen-activated protein kinase 3; TNF: Tumor necrosis factor; SRC: Rous sarcoma oncogene; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; JUN: Jun proto-oncogene; MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1; PTGS2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2; ERBB2: Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; IL2: Interleukin 2; ESR1: Estrogen receptor 1; MTOR: Mechanistic target of rapamycin kinase; HSP90AA1: Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1; MMP2: Matrix metalloproteinase 2; MAPK14: Mitogen-activated protein kinase 14; PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; ICAM1: Intercellular adhesion molecule 1; PLG: Plasminogen; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene	Forward primer	Reverse primer
AKT1	TGCACAAACGAGGGGAATATAT	CGTTCCTTGAGCCAATAAAGG
EGFR	TGAGTTCTCTGAGTGCAACTAG	GAATGCGTCATCTATGTTGTCC
MAPK3	CAGCTCAACCACATTCTAGGTA	TCAAGAGCTTTGGAGTCAGATT
TNF	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATT	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
SRC	ATTCCAAACCAGCAGACTCATA	CTTGAGTTTGAAGTGGTAACCG
STAT3	GCCATCATTATGAGTGCCAATT	AGGGATAAGAACGCTGAGAATT
JUN	CAAAGACCTGAAAACCTCCAAC	GACTGCTTCTCTCCATCATC
MAPK1	CTGAAAGATGAGCTCGAGAGTG	AAACGAATACACGGTGATGGTA
PTGS2	ATTCCAAACCAGCAGACTCATA	CTTGAGTTTGAAGTGGTAACCG
ERBB2	CAGGAACAACATCACCATTCCG	CTTGGAAGCGTGATTGATAGC
MMP9	CAAAGACCTGAAAACCTCCAAC	GACTGCTTCTCTCCATCATC
IL2	TGAGCAGGATGGAGAATTACAG	CAGAGGTCCAAGTTCATCTTCT
ESR1	CTACTACCTGGAGAACGAGC	GCGTCGATTGTCAGAATTAGAC
MTOR	CAGGAACAACATCACCATTCCG	CTTGGAAGCGTGATTGATAGC
HSP90AA1	ACATCAAGTTGTATGTTTCGAG	TCAGAATCCACTACCCCTCTAA
MMP2	ACTTTGAGAAGGATGGCAAGTA	CTTCTTATCCCGGTCATAGTCC
MAPK14	AGGAATTCAATGACGTGTACCT	AGGTCCCTGTGAATTATGTCAG
PIK3CA	TATGTCTACCCTCCAATGTCG	TACTTCTGCTTGTCTGTTGTTG
ICAM1	CTGAAAGATGAGCTCGAGAGTG	AAACGAATACACGGTGATGGTA
PLG	CCACAGGCACAGCATCTTCACC	TGTTGTATAGACCAAGGACCATTAC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

像系统分析目的蛋白的相对表达量,目标蛋白表达量通过 GAPDH 进行校正。

衰老染色 将冰冻的肺组织切片复温,用 PBS 洗涤 3 次,每次不少于 5 min。加入适当体积的 β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定不少于 15 min。用 PBS 浸泡洗涤组织 3 次,每次不少于 5 min。吸除 PBS,加入适量的染色工作液。37 °C 孵育过夜后普通光学显微镜下观察。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据比较采用方差分析 (one-way ANOVA),两组数据比较采用学生 *t* 检验 (student's *t* test); $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

结果

1 桔梗抗肺纤维化靶点预测

在 TCMS 数据库中设定生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 ,对桔梗的有效成分进行筛选,并结合文献补充纳入桔梗皂苷 D^[13],共得到潜在活性成分 8 个,分别为 *cis*-dihydroquercetin、2-*O*-methyl-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl platycogenate A、acacatin、spinasterol、robinin、dimethyl 2-*O*-

methyl-3-*O*- α -*D*-glucopyranosyl、luteolin、platycodin D。使用 Swiss Target Prediction 数据库筛选出 289 个药物靶点;使用 OMIM、Disgenet、Drugbank 数据库获得 1 129 个疾病作用靶点。在 Venny2.1 在线软件作图工具平台上输入 289 个药物靶点、1 129 个疾病靶点,绘制韦恩图,两者取交集后获得药物-疾病共同靶点 65 个。

2 桔梗抗肺纤维化网络图

将桔梗中 8 个潜在活性成分与 65 个药物-疾病共同靶点输入 Cytoscape 软件中,删除与靶点无交集的孤立成分,绘制出“药物-成分-靶点-疾病”相互作用的网络图 (图 1)。图中紫色代表药物,绿色代表桔梗中的 7 种活性成分 (1 个活性成分靶点与疾病靶点无交集,予删除),蓝色代表 65 个共同靶点,红色代表疾病。

3 桔梗抗肺纤维化核心靶点筛选

将上述药物-疾病共同靶点输入到 STRING 数据库中进行检索,构建蛋白相互作用的 PPI 网络。得到桔梗治疗肺纤维化潜在靶点的蛋白质相互作用 (PPI) 网络中共有 65 个节点 (靶点蛋白)、609 条边 (蛋白相互作用),见图 2。其中,节点的大小、颜色及其深浅变化代表 degree 值的大小。

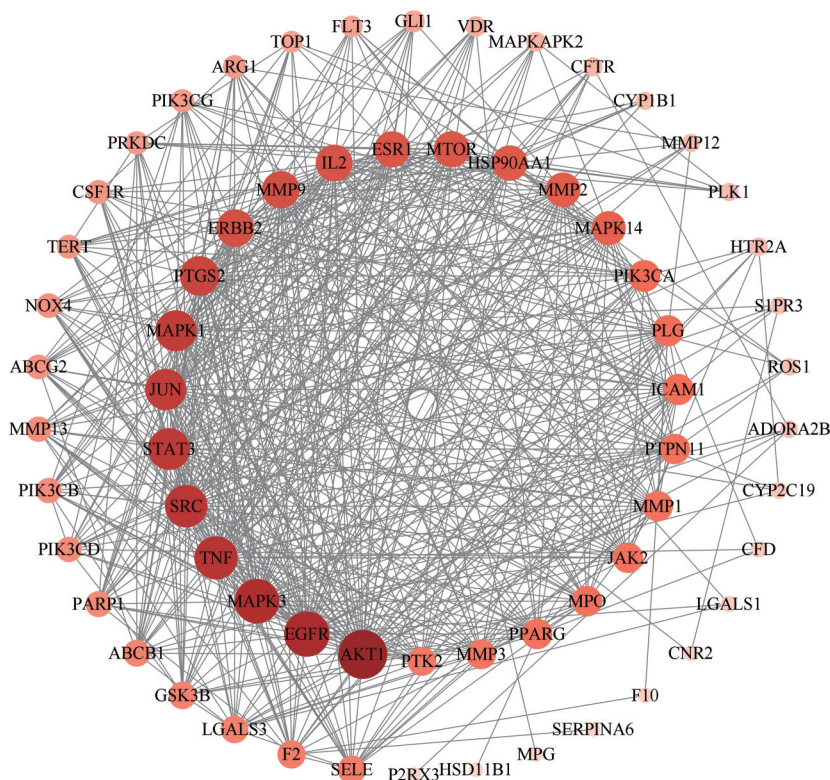


Figure 2 Protein-protein interaction network of *Platycodon grandiflorum* (PR) in the treatment of pulmonary fibrosis

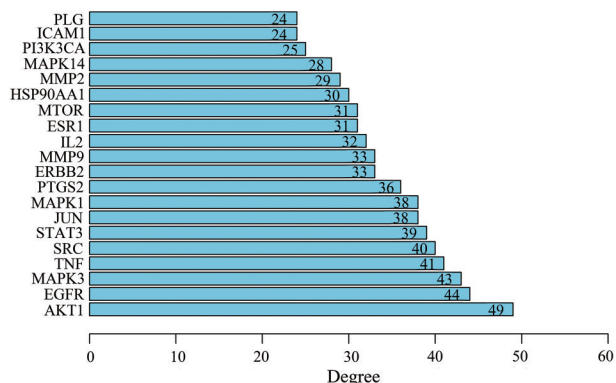


Figure 3 Ranking of core targets of PR in the treatment of pulmonary fibrosis based on PPI topology analysis

能,降低肺阻力增加肺部的顺应性,且随着剂量增加,变化逐渐明显。

6 桔梗对肺纤维化小鼠肺组织中核心靶点转录的影响

通过 qPT-PCR 检测图 3 中核心靶点的表达情况,对网络药理学结果进行初步验证。结果提示,存在差异性表达的基因有 JUN (Jun proto-oncogene)、AKT1 (serine/threonine kinase 1)、SRC (Rous sarcoma oncogene)、HSP90AA1 [heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1]、MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase)、PIK3CA (phosphatidylinositol-4, 5-

bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)、ESR1 (estrogen receptor 1) 等, MTOR、HSP90AA1、PIK3CA 等靶点均与 PI3K-AKT 信号通路有关 (图 7)。

7 桔梗对肺纤维化小鼠肺组织中关键蛋白表达的影响

网络药理学富集分析及 qRT-PCR 实验验证的结果均表明,桔梗可能通过 PI3K-AKT 信号通路发挥抗肺纤维化作用。通过 Western blot 对此通路的关键蛋白进行检测,结果表明 (图 8),模型组 p-AKT、p-PI3K 蛋白相对表达量均显著高于空白组 ($P < 0.05$),给予桔梗水煎液治疗后,其相对含量明显降低且具有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。

8 桔梗对肺纤维化小鼠肺组织衰老的影响

已有文献报道肺纤维化与细胞衰老密切相关,且 PI3K-AKT 通路可影响下游衰老相关蛋白 P21 的表达,推测桔梗治疗小鼠肺纤维化的作用可能与通过 PI3K-AKT 通路影响细胞衰老有关^[15,16]。 β -半乳糖苷酶是一种公认的可用于体内外衰老研究的生物学标志^[17],染色结果表明 (图 9A),肺纤维化模型组小鼠衰老细胞较空白组显著增加,高剂量桔梗水煎液能明显降低染色阳性率,其余组染色阳性率均有不同程度的降低,但较模型组没有显著差异。P16 是主要的细胞周期抑制蛋

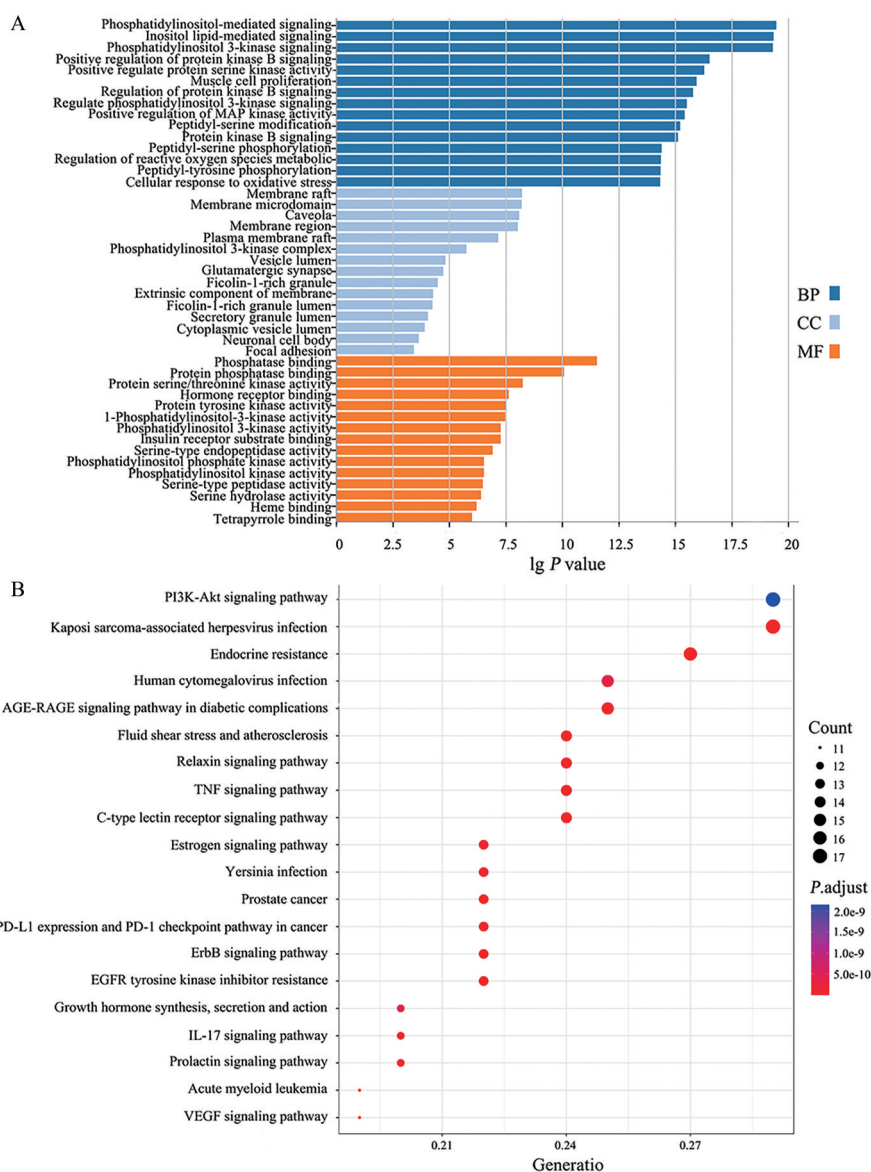


Figure 4 Gene ontology (GO) biological process, cellular component, molecular function (A) and pathway enrichment analysis (B) of PR in the treatment of pulmonary fibrosis

白, 直接参与细胞增殖的负调节, 在细胞衰老过程中起重要作用, P21 和 P16 聚集的增加均是重要且典型的衰老标志^[18]。Western blot 结果表明 (图 9B~D), 与空白组比较, 模型组 P21 和 P16 蛋白含量明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 给予桔梗水煎液治疗后, 其含量明显降低 ($P < 0.05$), 且高剂量桔梗水煎液效果最佳。

讨论

肺纤维化是一种渐进性和致命性的间质性肺疾病, 其特征是纤维母细胞灶、肺泡蜂窝状和持续性纤维化, 最终导致肺结构的破坏和暴发性呼吸衰竭^[19]。目前肺纤维化发病机制主要是肺泡上皮细胞损伤, 释放

大量炎症因子, 激活肺成纤维细胞, 诱导 ECM 大量分泌, 最终导致肺重塑和瘢痕肺^[20]。通过动物实验, 本研究发现高剂量桔梗水煎液可以减轻博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠的炎症反应和胶原沉积, 可以改善小鼠肺功能。

网络药理学结果显示, 桔梗活性成分 8 个, 对应 289 个作用靶点, 其中与肺纤维化相关的共同靶点 65 个。通过构建 PPI 网络发现, AKT1、EGFR、MAPK3、TNF 等度值较大, 可能是桔梗治疗肺纤维化的关键性靶标。AKT1 基因编码的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可以通过 PI3K 被激活, 广泛地分布在组织中, 调控细胞增殖与生长等过程^[21]; EGFR 家族活化后可促进基因转录、蛋白表达、细胞分裂与增殖等, 已有研究表明活

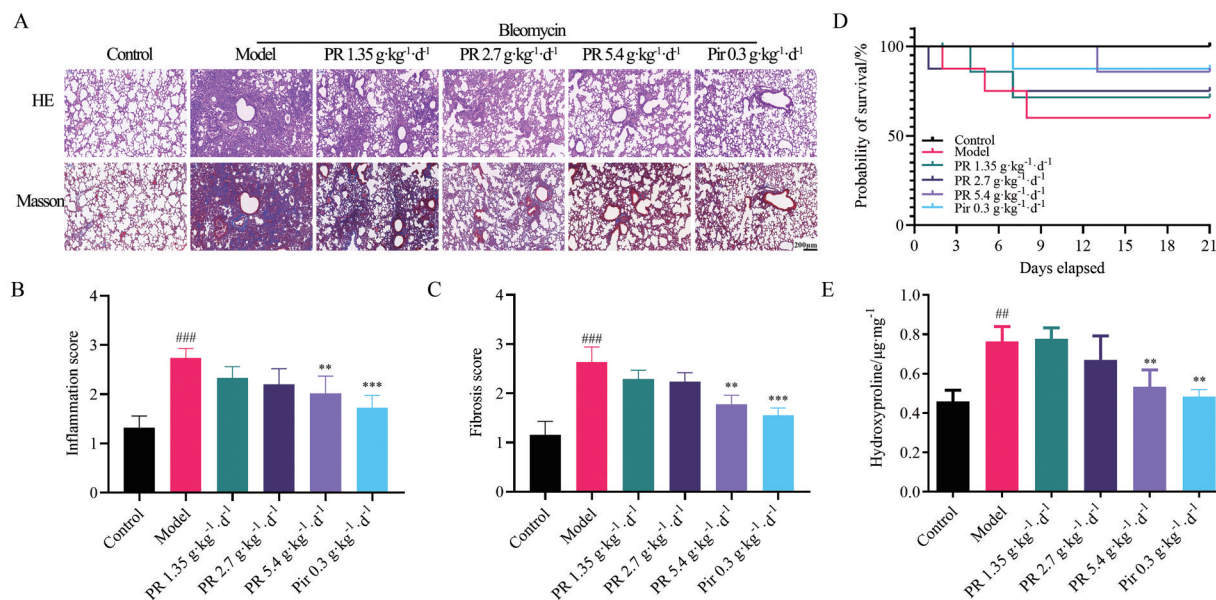


Figure 5 Effects of PR on lung changes of bleomycin-induced mice. A: Lung tissue were stained with HE (hematoxylin-eosin) and Masson (magnification 100×); B: Inflammation score; C: Fibrosis score; D: Survival curve; E: Expressions of hydroxyproline in the lung tissues were detected by ELISA method. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs blank group; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model group. Pir: Pirfenidone

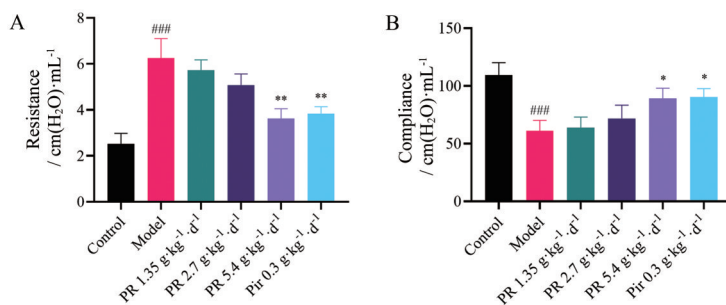


Figure 6 Effects of PR on lung function of bleomycin-induced mice with pulmonary fibrosis. A: Lung resistance; B: Lung compliance. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{###} $P < 0.001$ vs blank group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

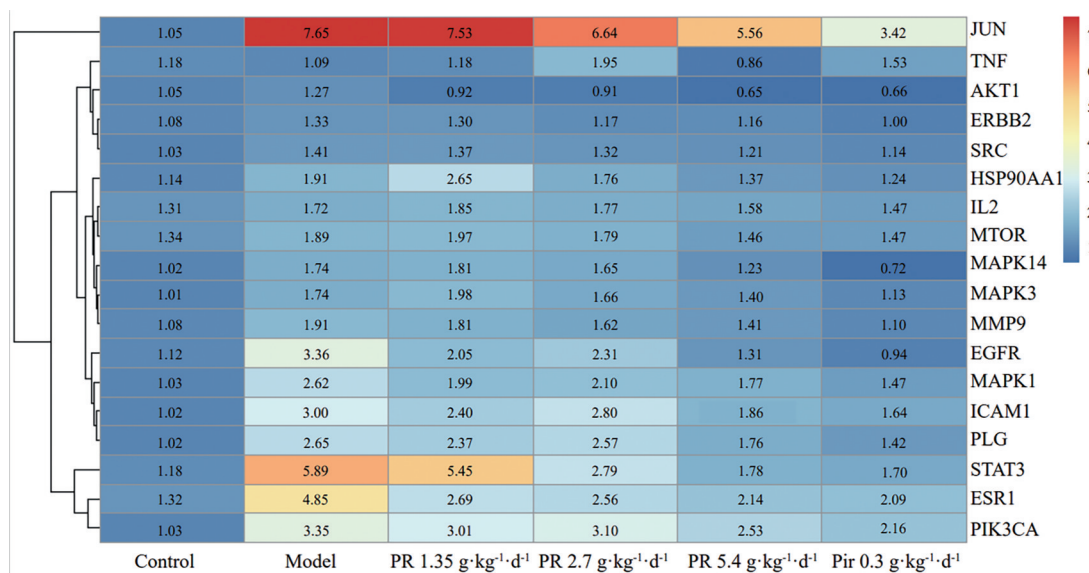


Figure 7 Effects of PR on the transcription of key target genes in lung tissue of bleomycin-induced mice with pulmonary fibrosis. $n = 3, \bar{x} \pm s$

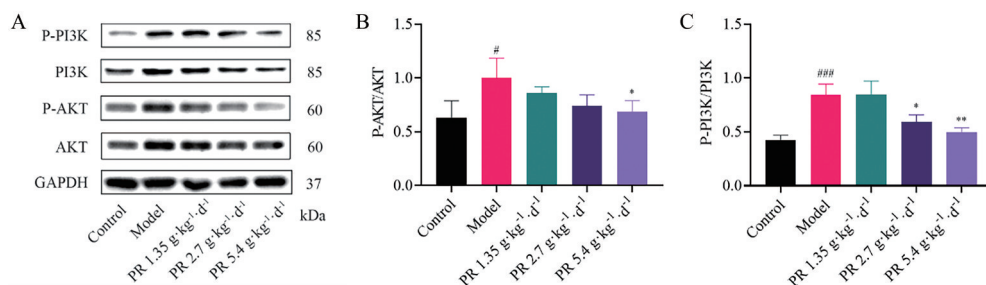


Figure 8 Effects of PR on the expression of PI3K-AKT-related marker proteins in lung tissue of bleomycin-induced mice with pulmonary fibrosis. A: The protein expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, and GAPDH were determined by Western blot analysis; B: Quantitative results of p-AKT/AKT; C: Quantitative results of p-PI3K/PI3K. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$ vs blank group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs model group

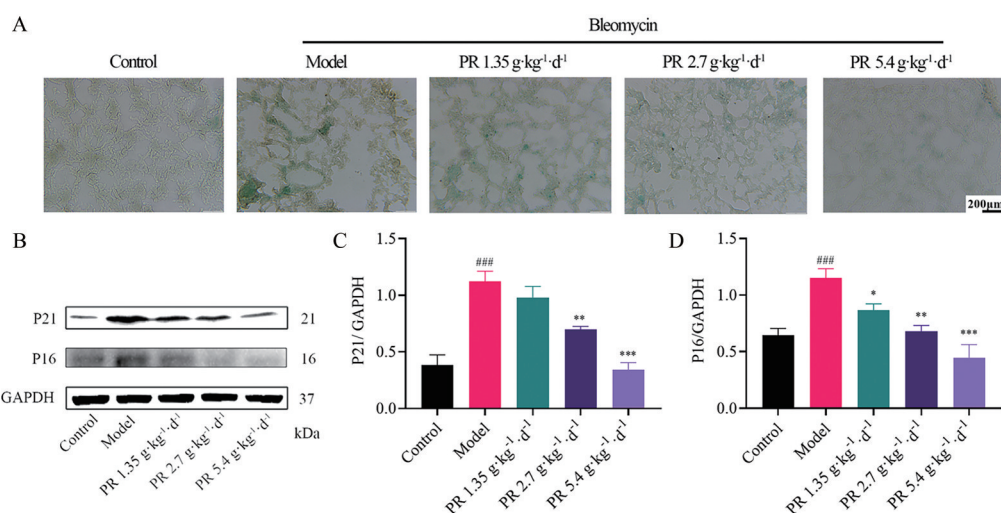


Figure 9 Effects of PR on the expression of aging-related marker proteins in lung tissue of bleomycin-induced mice with pulmonary fibrosis. A: Senescence staining (magnification 100 \times); B: The protein expressions of P21, P16, and GAPDH were determined by Western blot analysis; C: The protein expressions of P21 relative to GAPDH; D: The protein expressions of P16 relative to GAPDH. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ vs blank group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs model group

化后的EGFR可向下传递纤维化信号,在肺纤维化发生发展中起到重要作用^[22];MAPK3(ERK1)是在哺乳动物中发现的第一个丝裂原活化蛋白激酶,参与生长因子信号传导,可作为细胞增殖调节剂^[23];TNF为肿瘤坏死因子,主要活化巨噬细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和T淋巴细胞产生^[24]。KEGG通路富集分析表明,桔梗治疗肺纤维化与PI3K-AKT信号通路、TNF信号通路、EGFR信号通路等有关。TNF信号通路和EGFR信号通路均与PI3K-AKT信号通路关系密切, TNFR1的下游是核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路和MAPK信号通路, TNFR2的下游是PI3K-AKT信号通路;EGFR可通过二聚化后刺激Ras蛋白,导致磷酸化级联反应而激活PI3K-AKT信号通路^[25]。

PI3K蛋白家族参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节。研究发现,PI3K-AKT信

号通路能使受体酪氨酸激酶活化,从而使细胞质上的PI3K易位至细胞膜,激活及催化亚基,产生第2信使PI(3,4,5)P₃,与AKT氨基酸末端PH结构域相结合,通过调控下游MTOR、缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等参与肺纤维化^[26,27]。通过阻断PI3K-AKT信号通路来抑制肺纤维化,有可能成为治疗肺纤维化的新思路。已有研究表明PI3K抑制剂能够改善博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型的肺功能和病理损伤,降低肺组织羟脯氨酸含量和 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)水平^[28]。本研究结果已经证实,桔梗能够减轻肺纤维化小鼠肺组织中磷酸化的PI3K及AKT的蛋白表达。

PI3K激活AKT可以通过磷酸化或抑制其下游靶蛋白P21、B淋巴细胞瘤-2基因相关启动子(Bad)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(caspase9)、NF- κ B、Forkhead、MTOR等,从而介导胰岛素、多种生长因子

等诱发的细胞生长,经多种途径促进细胞存活,发挥抗衰老作用^[29]。不可逆的细胞周期停滞被视为衰老的标志,DNA损伤、氧化应激和端粒损伤都可能引起细胞衰老,衰老细胞不能增殖,但依然存活且能代谢,主要表现为 β -半乳糖苷酶活性增加以及细胞周期调节蛋白P53、P21和P16表达增加,亦分泌衰老相关因子^[30]。多数研究认为,肺纤维化患者的肺成纤维细胞具有衰老表型且过表达 α -SMA,呈现肌成纤维细胞特征,同时肺纤维化小鼠上皮细胞和成纤维细胞都可发生衰老,通过分泌衰老相关的分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)加重肺纤维化^[31,32]。Western blot实验结果证实了桔梗可以降低衰老标志蛋白P21和P16的表达,且高剂量效果最佳。另外, β -半乳糖苷酶染色表明,高剂量桔梗水煎液能够减少肺组织中细胞衰老。本研究结果证实了桔梗可以通过PI3K-AKT信号通路抑制细胞衰老发挥抗肺纤维化作用。然而,在肺纤维中,成纤维细胞和上皮细胞均扮演着重要角色,肺组织中同时包含其他多种类型的细胞。桔梗水煎液抗衰老发生于何种细胞目前是未知的,这也待本课题组进一步深入探讨。

综上所述,本研究基于网络药理学方法,对桔梗多成分-多靶点-多途径-多效应的抗肺纤维化机制进行了分析,在此基础上,进行了动物实验验证。结果表明,桔梗可能通过PI3K-AKT信号通路调控细胞衰老发挥抗肺纤维化作用。

作者贡献:王璇负责网络药理学分析和体外验证实验,对数据进行分析以及文章撰写;徐泳、罗子宸、韩迪参与了网络药理学分析;谢彤、林丽丽、徐建亚参与文章修改;时晨、单进军负责构思和设计实验、结果分析、基金获得、对文章进行审阅指导。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Upagupta C, Shimbori C, Alsilmi R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir Rev*, 2018, 27: 148.
- [2] Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study [J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 554-563.
- [3] Spagnolo P, Balestro E, Aliberti S, et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a call to arms? [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8: 750-752.
- [4] Vancheri C, Kreuter M, Richeldi L, et al. Nintedanib with add-on pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. Results of the INJOURNEY Trial [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197: 356-363.
- [5] Lancaster LH, de Andrade JA, Zibrak JD, et al. Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26: 170057.
- [6] Glass DS, Grossfeld D, Renna HA, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: molecular mechanisms and potential treatment approaches [J]. *Respir Investig*, 2020, 58: 320-335.
- [7] Huang YJ, Gong JN. The law on pulmonary atrophic lung disease and pulmonary fibrosis syndrome [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2016, 27: 1439-1441.
- [8] Xu WC, Luo ZC, Xie T, et al. Advance in research on platycodonis radix and preliminary analysis of its quality marker prediction [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报)*, 2021, 37: 294-302.
- [9] Wang XY, Han L, Gan YH. Mechanism of total saponins of *Platycodon grandiflorum* against pulmonary fibrosis in rats [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2015, 35: 2957-2958.
- [10] Hou HH, Su CC, Hong LL, et al. Platycodin D alleviates proliferation and extracellular matrix accumulation in TGF-beta1 induced pulmonary fibroblasts [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2021, 122: 145-151.
- [11] Li XJ, Xu HY. Network pharmacology and traditional Chinese medicine research [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1385-1386.
- [12] Deng XH, Lin MY, Tan HM. Study on the quality standard of *Platycodon grandiflorum* standard decoction based on the characteristic map of high performance liquid phase [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med (江西中医药)*, 2018, 49: 66-68.
- [13] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 289.
- [14] Yazaki M, Ito Y, Yamada M, et al. Oral ingestion of collagen hydrolysate leads to the transportation of highly concentrated Gly-Pro-Hyp and its hydrolyzed form of Pro-Hyp into the bloodstream and skin [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2315-2322.
- [15] Schafer MJ, White TA, Iijima K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14532.
- [16] Yang L, Fu WL, Zhu Y, et al. Tbeta4 suppresses lincRNA-p21-mediated hepatic apoptosis and fibrosis by inhibiting PI3K-AKT-NF-kappaB pathway [J]. *Gene*, 2020, 758: 144946.
- [17] Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase [J]. *Aging Cell*, 2006, 5: 187-195.
- [18] Leontieva OV, Blagosklonny MV. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 3063-3069.
- [19] Meyer KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11: 343-359.
- [20] Thannickal VJ, Toews GB, White ES, et al. Mechanisms of

- pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 395-417.
- [21] Duggal S, Jailkhani N, Midha MK, et al. Defining the Akt1 interactome and its role in regulating the cell cycle [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1303.
- [22] Venkataraman T, Frieman MB. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis [J]. *Antiviral Res*, 2017, 143: 142-150.
- [23] Dang T, Liou GY. Macrophage cytokines enhance cell proliferation of normal prostate epithelial cells through activation of ERK and Akt [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 7718.
- [24] Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease [J]. *Cytokine*, 2018, 101: 26-32.
- [25] Lee JH, Liu R, Li J, et al. EGFR-phosphorylated platelet isoform of phosphofructokinase 1 promotes PI3K activation [J]. *Mol Cell*, 2018, 70: 197-210.
- [26] Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170: 605-635.
- [27] Hsu HS, Liu CC, Lin JH, et al. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 14272.
- [28] Hettiarachchi SU, Li YH, Roy J, et al. Targeted inhibition of PI3 kinase/mTOR specifically in fibrotic lung fibroblasts suppresses pulmonary fibrosis in experimental models [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaay3724.
- [29] Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 62-71.
- [30] Noren HN, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence [J]. *J Vis Exp*, 2017, (123): 55533.
- [31] Waters DW, Blokland K, Pathinayake PS, et al. Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315: L162-L172.
- [32] Alvarez D, Cardenes N, Sellares J, et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313: L1164-L1173.