

基于网络药理学及分子对接技术探讨刺五加改善特发性间质性肺炎作用机制及提取工艺研究

孙云峰¹, 赵妍²

1. 辽宁中医药大学教学实验中心, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学中医学院, 辽宁 沈阳 110847

[摘要] **目的:** 运用网络药理学及分子对接技术探讨刺五加改善特发性间质性肺炎的作用机制, 优选刺五加的提取工艺。**方法:** 采用HERB本草组鉴数据库筛选刺五加活性成分及其对应的潜在靶点; 在GeneCards、DisGeNET数据库中筛选特发性间质性肺炎相关基因; 利用Venny2.1获取活性成分靶点与肺炎靶点的交集; 使用Cytoscape 3.10.1软件对数据进行可视化处理, 得到刺五加活性成分-靶点-特发性间质性肺炎网络图; 通过String数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 运用DAVID数据库对潜在靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 使用AutoDock Tools 1.5.7软件完成分子对接并评估蛋白结合的稳定性, 得到3D结合模型; 并参考《中华人民共和国药典》确定指标成分。运用正交实验设计, 以乙醇倍量、乙醇浓度、提取时间、提取次数为影响因素, 以指标综合评分和出膏率为评价指标, 确定刺五加最佳提取工艺。**结果:** 筛选出427个潜在作用靶点, 与2 023个特发性间质性肺炎相关靶点取交集, 得到185个共同作用靶点。GO功能富集分析显示刺五加改善特发性间质性肺炎调控的生物过程主要集中在蛋白激酶B信号传导的正调控、MAP激酶活性的正调控、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性调控上。KEGG信号通路富集分析提示刺五加参与调控PI3K-Akt信号通路、Ras信号通路、MAPK信号通路、HIF-1信号通路、Rap1信号通路等多条通路。通过蛋白互作分析得到5个核心基因, 分别为AKT1、GAPDH、SRC、EGFR、STAT3, 分子对接进一步验证了刺五加主要有效活性成分(刺五加苷B, 刺五加苷E, 异嗪皮啶, 芝麻素)与以上5个核心基因的结合稳定性。确定指标成分为刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶, 最佳提取工艺为加8倍量60%乙醇提取2次, 每次180 min。**结论:** 刺五加活性成分可能主要通过作用于AKT1、GAPDH、SRC、EGFR、STAT3基因调控机体细胞周期蛋白和激酶的表达水平, 或抑制炎症因子的产生和释放, 从而发挥改善间质性肺炎作用。通过网络药理学及分子对接技术, 确定工艺评价指标, 优选的刺五加提取工艺合理、稳定、重复性良好, 为后续深入研究提供参考。

[关键词] 特发性间质性肺炎; 刺五加; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; 提取工艺

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2025) 15-0228-11

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2025.15.039

Exploration on Mechanism of Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis in Improving Idiopathic Interstitial Pneumonia and Its Extraction Process Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

SUN Yunfeng¹, ZHAO Yan²

1. Teaching Experiment Center of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Liaoning 110847, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Liaoning 110847, China

Abstract: **Objective:** To explore the mechanism of Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis in

[收稿日期] 2024-10-21

[修回日期] 2025-05-25

[基金项目] 辽宁省教育厅高校科研基金 (LJKMZ20221323)

[作者简介] 孙云峰 (1983-), 男, 实验师, E-mail: 149772599@qq.com。

[通信作者] 赵妍 (1984-), 女, 副教授, E-mail: 453137261@qq.com。

improving idiopathic interstitial pneumonia by network pharmacology and molecular docking technology, and to optimize the extraction process of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*. **Methods:** Active components of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* and their corresponding potential targets were screened using the HERB database. Genes related to idiopathic interstitial pneumonia were screened from the GeneCards and DisGeNET databases. Venny2.1 was used to obtain the intersection of active component targets and idiopathic interstitial pneumonia targets. Cytoscape 3.10.1 software was used for data visualization to obtain the active component–target–idiopathic interstitial pneumonia network diagram of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*. The String database was used to construct a protein–protein interaction (PPI) network, and the DAVID database was used for Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of potential targets. AutoDock Tools 1.5.7 software was used for molecular docking and to evaluate the stability of protein binding, resulting in 3D binding models. Reference was made to the *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* to determine the indicator components. An orthogonal experimental design was used, with ethanol multiple, ethanol concentration, time of extraction, and extraction times as influencing factors, and comprehensive score and extract yield as evaluation indicators, to determine the optimal extraction process of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*. **Results:** A total of 427 potential targets were screened, and 185 common targets were obtained by intersecting with 2 023 idiopathic interstitial pneumonia–related targets. GO function enrichment analysis showed that the biological processes regulated by *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* in improving idiopathic interstitial pneumonia mainly focused on the positive regulation of protein kinase B signaling, positive regulation of MAP kinase activity, protein serine/threonine/tyrosine kinase activity, and regulation of protein tyrosine kinase activity. KEGG pathway enrichment analysis indicated that *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* is involved in regulating multiple pathways, including the PI3K–Akt signaling pathway, Ras signaling pathway, MAPK signaling pathway, HIF–1 signaling pathway, and Rap1 signaling pathway. Protein interaction analysis identified five core genes: AKT1, GAPDH, SRC, EGFR, and STAT3. Molecular docking further verified the binding stability of the main active components of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* (eleutheroside B, eleutheroside E, isofraxidin, and sesamin) with these five core genes. The indicator components were determined to be eleutheroside B, sesamin, and isofraxidin. The optimal extraction process was determined to be extraction with eight times the amount of 60% ethanol, twice, each time for 180 minutes. **Conclusion:** The active components of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* can mainly improve idiopathic interstitial pneumonia by acting on the AKT1, GAPDH, SRC, EGFR, and STAT3 genes to regulate the expression levels of cell cycle proteins and kinases or inhibit the production and release of inflammatory factors. The extraction process optimized through network pharmacology and molecular docking technology is reasonable, stable, and reproducible, providing a reference for subsequent in–depth research.

Keywords: Idiopathic interstitial pneumonia; *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*; Network pharmacology; Molecular docking; Mechanism; Extraction process

特发性间质性肺炎(IIP)是一组弥漫性实质性肺疾病, 目前没有明确的病因。其病理变化主要为弥漫性的肺泡间质炎症与肺纤维组织增生, 临床表现主要产生呼吸困难、通气功能障碍及肺顺应性降低

等, 严重的甚至会癌变^[1–3]。当前中医治疗 IIP 多以扶正祛邪为主, 补者多以补气、温阳、养阴, 攻者多以清热解毒、活血通络、化痰散结^[4–5]。刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanaxsenticosus* (Rupr. Et

Maxim.)Harms的干燥根和根茎或茎，具有益气健脾、补肾安神的功效^[6]。现代药理研究表明在抗疲劳、抗炎、抗应激和增强免疫力方面有显著作用^[7-10]。已有研究表明刺五加及其提取物在减轻肺炎，抑制肺纤维化，延缓病变，改善患者生活质量上，有较好疗效^[11-12]。

网络药理学从整体上探讨了药物与疾病之间的关联性，充分体现中药“多成分、多靶点”的优势和特色，符合中医整体观、辨证论治的基础理念^[13-14]。本文借助网络药理学及分子对接技术对刺五加提取物治疗IIP的潜在活性成分与靶点蛋白进行筛选及验证。通过结合能力大小与文献相结合的方法，对获得的指标进行筛选，得到适合工艺考察的指标性成分，并用成分度值对指标进行赋权。同时设计正交试验优选刺五加提取物的提取工艺，力求采取科学简洁有效的手段，来探讨刺五加提取物的提取工艺，并初步探讨了刺五加改善IIP的作用机制。

1 仪器与材料

日本岛津公司LC-20AT高效液相色谱仪(含二元泵系统，在线真空脱气机，自动进样器，柱温箱，DAD检测器)；日本岛津色谱工作站(日本岛津)；SF-130B 高速粉碎机(上海市冠联制药仪器有限公司)；RE-2000A 型旋转蒸发器(郑州市亚荣仪器有限公司)；美国MILLI-Q SIMS50000 超纯净水器；TD-25 电子分析天平(美国丹佛仪器有限公司，十万分之一)。刺五加药材购于河北安国，经实验室鉴定为合格品。刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啉对照品(中国食品药品检定研究院，批号分别为111574-202001，110836-202003，110837-202004)；甲醇、乙腈为色谱纯，水为娃哈哈纯净水，其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 刺五加网络药理学研究

2.1.1 刺五加活性成分筛选及靶点获取 通过HERB本草组鉴数据库(<http://herb.ac.cn/>)检索刺五加活性成分信息，删除掉无分子量与无PubChem ID号的成分，并通过文献检索对数据库中未预测到的成分进行补充。再通过SwissTarget Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>)数据库对活性成分靶点进行预测。以probability>0为标准进行基因筛选，得到刺五加活性成分的潜在靶点。

2.1.2 IIP 疾病靶点的获取及韦恩图构建 通过GeneCards (<https://www.Genecards.org>)、DisGeNET

(<https://www.disgenet.org/search>)数据库中输入关键词“Idiopathic Interstitial Pneumonias”检索相关基因，并将结果进行整理，合并、去重后得到IIP靶点基因。将成分靶点与疾病靶点取交集，构建韦恩图，见图1。

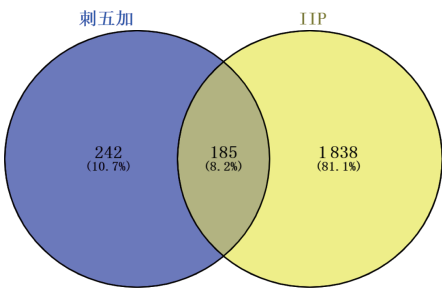


图1 刺五加成分基因与IIP 基因韦恩图

2.1.3 “药物-成分-靶点”网络构建及分析 将刺五加活性成分进行ID编号，以CWJ1-CWJ24表示，将获得的刺五加药材，刺五加活性成分以及刺五加与IIP交集靶点等数据导入Cytoscape 3.10.1软件，构建刺五加-活性成分-IIP潜在靶点网络图。网络图共有210个节点，其中成分节点有24个，靶标节点185个，还有1个药物节点为刺五加，边共有391条，见图2。并在软件中根据Degree将刺五加中所有成分进行排名，见表1。

表1 刺五加关键化合物信息

代号	Degree	活性成分	Pubchem id
CWJ2	48	Quercetin	5280343
CWJ19	44	4-[(1R)-6,7-dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-1-yl)methyl]-2-[4-[(6,7-dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-1-yl)methyl]phenoxy]phenol	45358120
CWJ3	27	Stearic Acid	5281
CWJ20	26	Ciwujiatone	5315944
CWJ17	25	Calycanthoside	5318566
CWJ5	24	Beta-Sitosterol	222284
CWJ11	24	Clonasterol	457801
CWJ12	24	(24E)-24-N-Propylidenecholesterol	5281328
CWJ13	22	(2R)-2-phenyl-2-[(4S,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-[(3R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyacetonitrile	134694146
CWJ9	20	Eleutheroside B	5316860
CWJ14	19	Isofraxidin	5318565
CWJ1	12	Sucrose	5988
CWJ10	12	Sitogluside	5742590

续表1 刺五加关键化合物信息

代号	Degree	活性成分	Pubchem id
CWJ8	11	Ethyl gallate	13250
CWJ6	9	Tristearin	11146
CWJ15	7	(+)-Eudesmin	73117
CWJ16	6	Clausarin	5315945
CWJ21	6	Ciwujianoside D1	163951
CWJ22	6	Suffruticoside A	9986231
CWJ7	5	Sesamin	72307
CWJ4	4	3,4-Methylenedioxyphenol	68289

续表1 刺五加关键化合物信息

代号	Degree	活性成分	Pubchem id
CWJ18	4	7-(8-Formyl-1,7-dihydroxy-5-isopropyl-6-methoxy-3-methyl-2-naphthyl)-2,8-dihydroxy-4-isopropyl-3-methoxy-6-methyl-naphthalene-1-carbaldehyde	375713
CWJ23	3	2-[4-[(3aR,6aS)-6-[3,5-dimethoxy-4-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[3,4-c]furan-3-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	138107782
CWJ24	3	Eleutheroside E	71312557

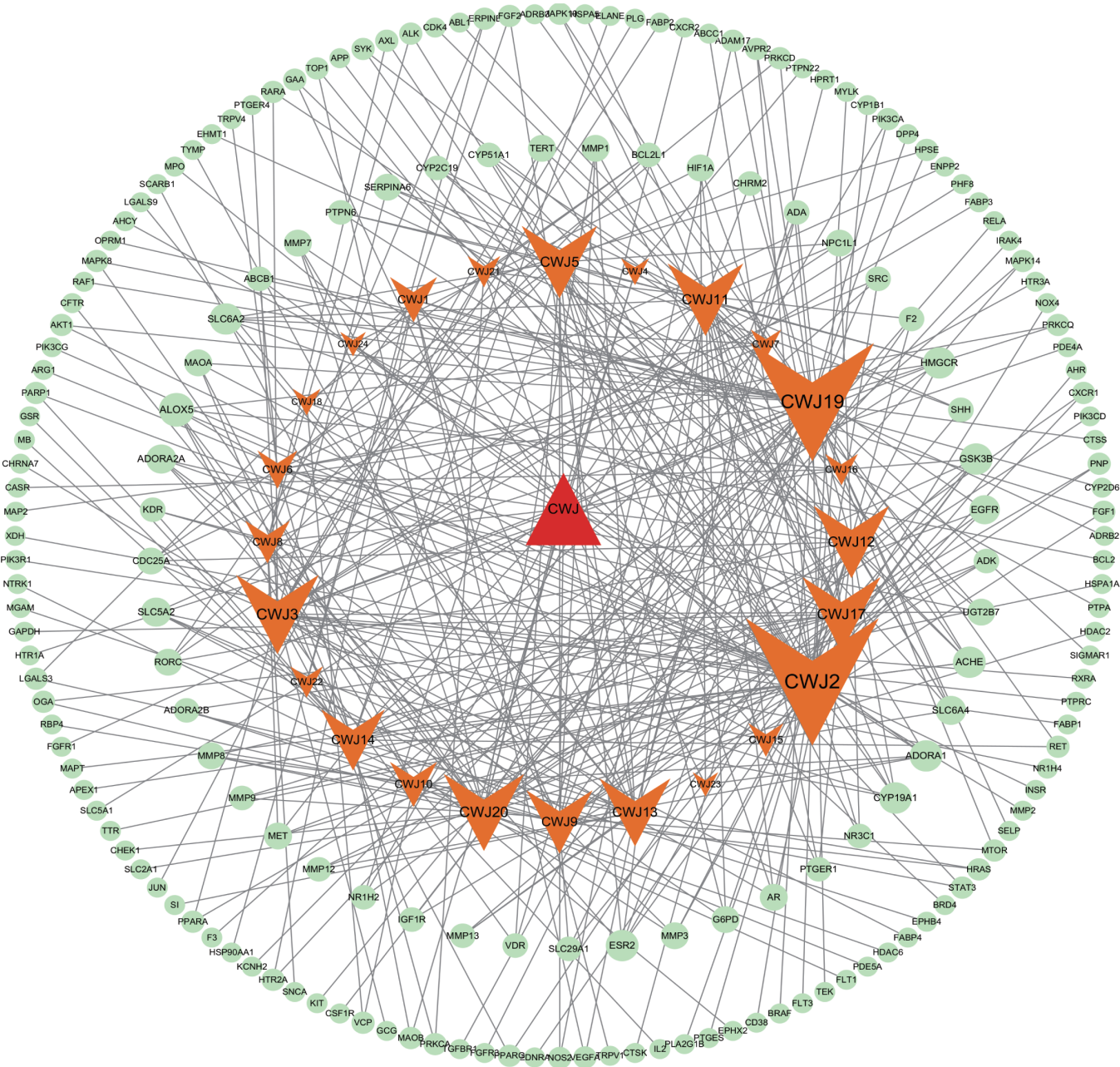


图2 刺五加“药物-成分-靶点”的可视化网络

2.1.4 关键靶点PPI网络构建 将刺五加治疗IIP的185个交集靶点基因导入String数据库(<https://string.db.org/>), 限定范围为“Homo sapiens”, medium confidence为0.4, 隐藏没有连接的节点, 得到蛋白互作(PPI)数据, 并将数据导入Cytoscape 3.10.1构建PPI网络图, 得到185个节点, 2 595个边, 在图片中靶点的颜色越深代表靶点与疾病的相关性越强, 见图3。筛选 Degree 高于平均值的靶点, 其中 AKT1、GAPDH、SRC、EGFR、STAT3 为排名前5的靶点, 可能是刺五加对抗IIP的候选核心靶点, 在治疗IIP中

发挥重要作用。

2.1.5 GO富集分析及信号通路分析 将185个交集靶点基因导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), 物种限定为“Homo sapiens”, 进行GO富集分析及KEGG信号通路分析。并利用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)对GO分析结果和KEGG结果进行可视化处理。通过GO功能富集分析共获得989种条目, 其中包括生物过程条目(BP)729种, 分子功能(MF)171种, 细胞组成(CC)89种。GO分析结果显示刺五加中有效成分主要通过蛋白激

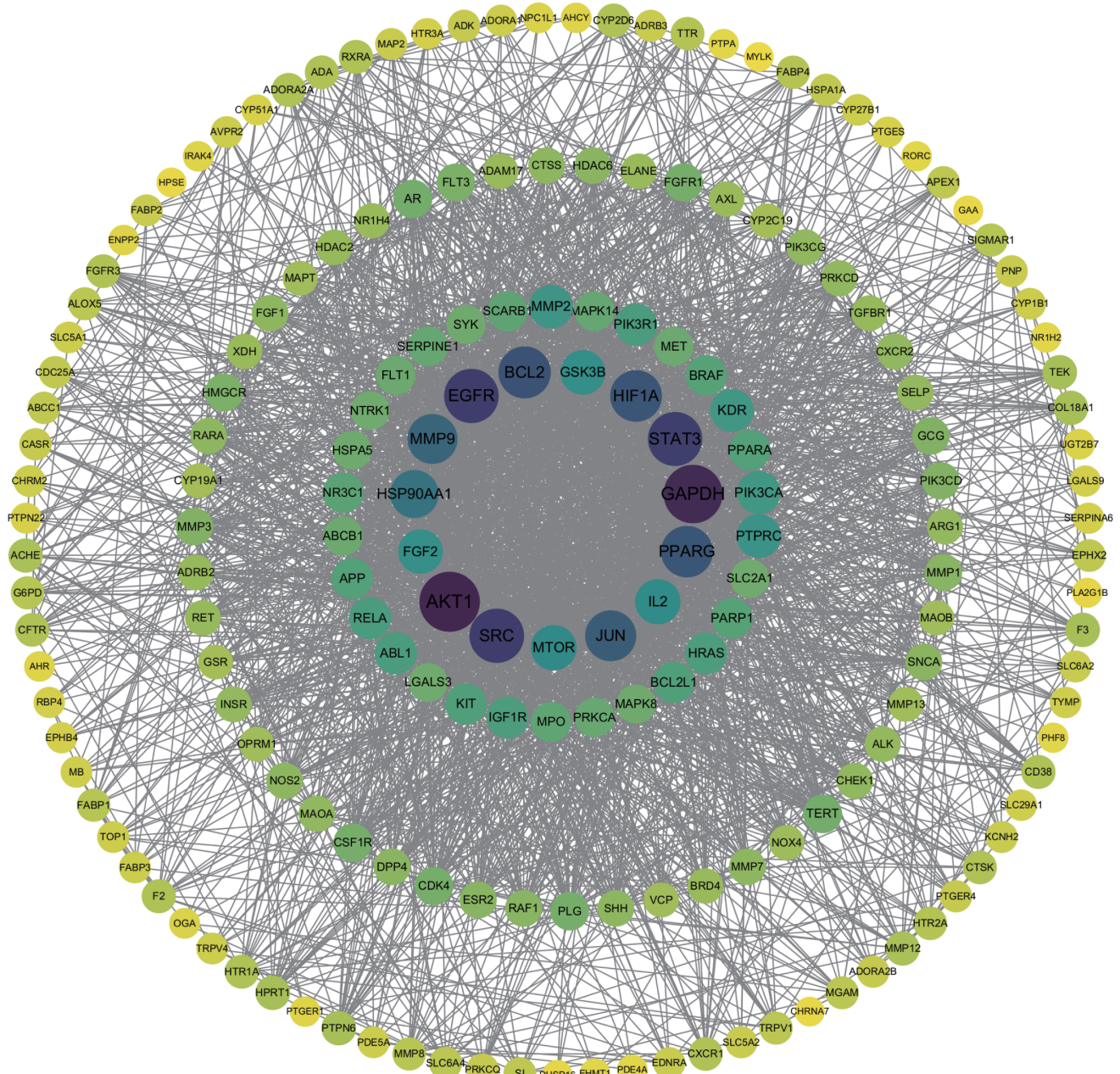


图3 刺五加治疗IIP的PPI网络

酶B信号传导的正调控(positive regulation of protein kinase B signaling)、MAP激酶活性的正调控(positive regulation of MAP kinase activity)、受体复合体(receptor complex)、质膜的组成部分(integral component of plasma membrane)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)等生物过程发挥抗IIP作用,见图4。通过KEGG通路富集筛选得到153条信号通路,主要涉及KEGG富集分析结果按照*P*排序,选取前20条目绘制气泡图,KEGG的结果显示刺五加中有效成分可能通过PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、Ras信号通路(Ras signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)、Rap1信号通路(Rap1 signaling pathway)等通路发挥治疗IIP作用,见图5。

2.1.6 分子对接分析及工艺指标成分筛选 通过

2.1.3项中选出的度值最高的前3个关键活性成槲皮素(CWJ2),CWJ19,硬脂酸(CWJ3)。并结合相关文献进一步进行筛选,度值虽然相对低但是有研究意义的4种刺五加活性成分,刺五加苷B(CWJ9),刺五加苷E(CWJ24),异嗪皮啶(CWJ14),芝麻素(CWJ7),共7种成分。通过2.1.4项中PPI网络筛选出的度值最高的前5个刺五加治疗IIP的潜在核心靶点AKT1(PDB ID: 7MYX)、GAPDH(PDB ID: 4WNC)、SRC(PDB ID: 2H8H)、EGFR(PDB ID: 8A27)、STAT3(PDB ID: 5AX3),采用AutoDock Tools 1.5.7软件将选出的活性成分与核心靶点蛋白进行分子对接。结合能的大小直接反映配体分子与受体蛋白直接的结合活性,一般认为,结合能为负值就代表成分与靶点蛋白可以结合,结合能<-5.0 kJ/mol,表明这种成分与核心靶点蛋白结合性较好,结合能<-7.0 kJ/mol,表明此种物质与核心靶点蛋白有很强结合活性^[15]。对接结果热图见图6,代表性对接结果见

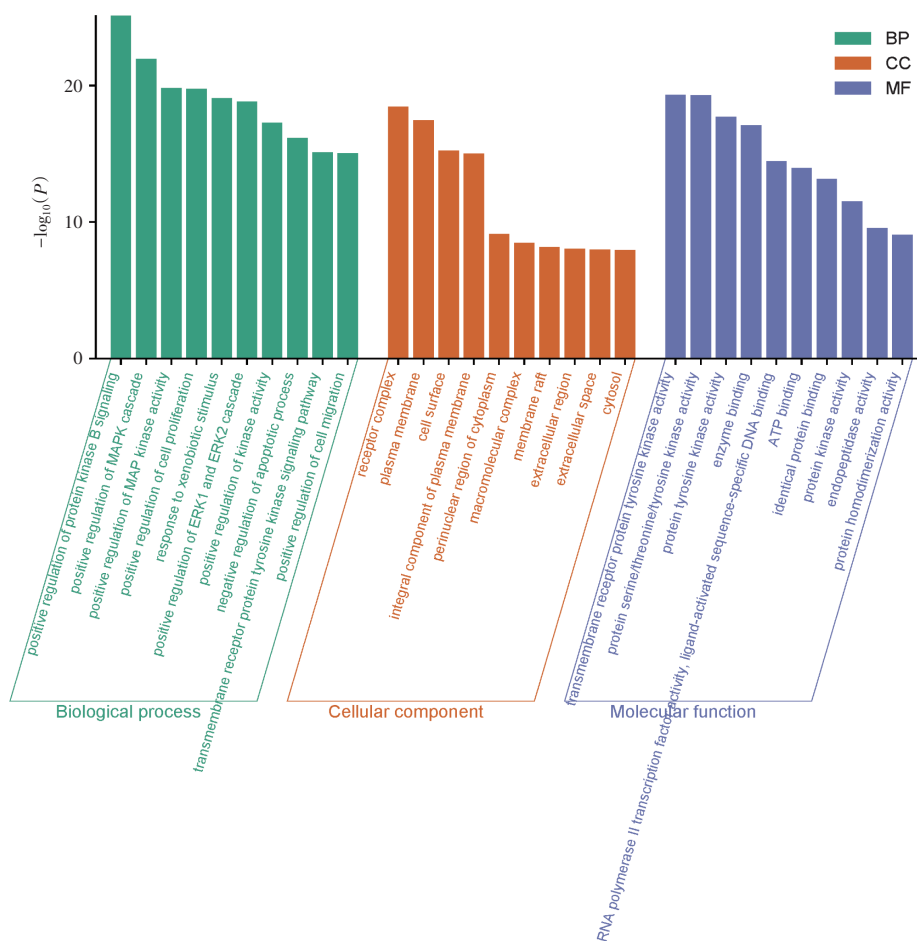


图4 刺五加活性成分治疗IIP的GO富集分析

图7,可以发现CWJ14, CWJ7对接结果最优,且均小于 -9.0 kJ/mol。结合分子对接的结果,筛选掉对接结果不好的CWJ24, CWJ3以及在刺五加中含量较少的槲皮素(CWJ2), CWJ19,并参考《中国药典》2020年版一部对刺五加含量测定成分的规定,最终确定CWJ9、CWJ14 CWJ7为刺五加提取物提取工艺的关键成分。

2.2 指标成分含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 DiamonsilTM RP C₁₈色谱柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm)。刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶检测波长分别为265 nm、285 nm、344 nm,流速1.0 mL/min,柱温40℃,进样量20 μL,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 8%~22%A; 20~35 min, 22%~45%A; 35~50 min, 45%~77%)。

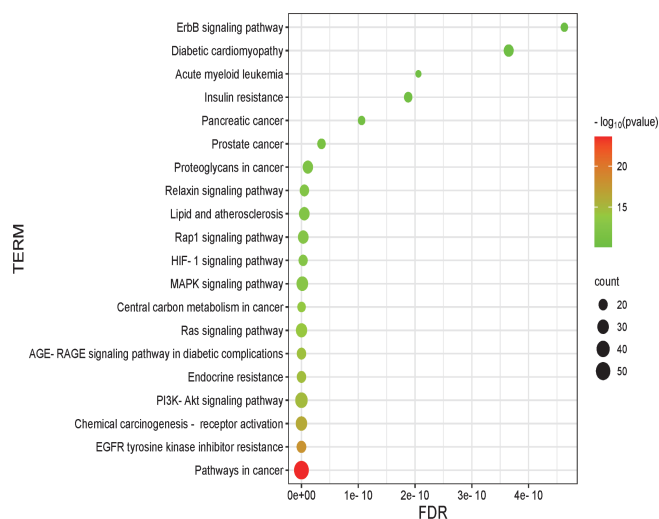


图5 KEGG通路富集分析气泡图

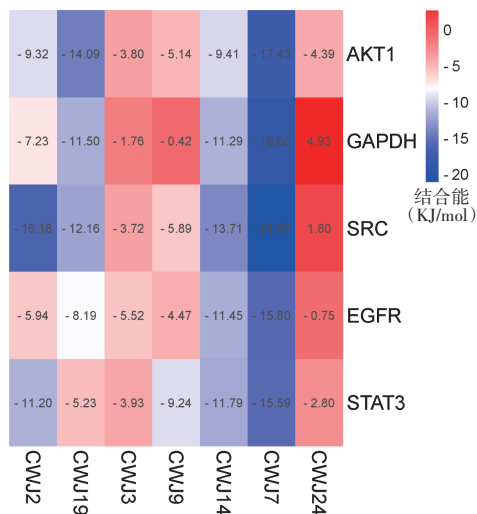
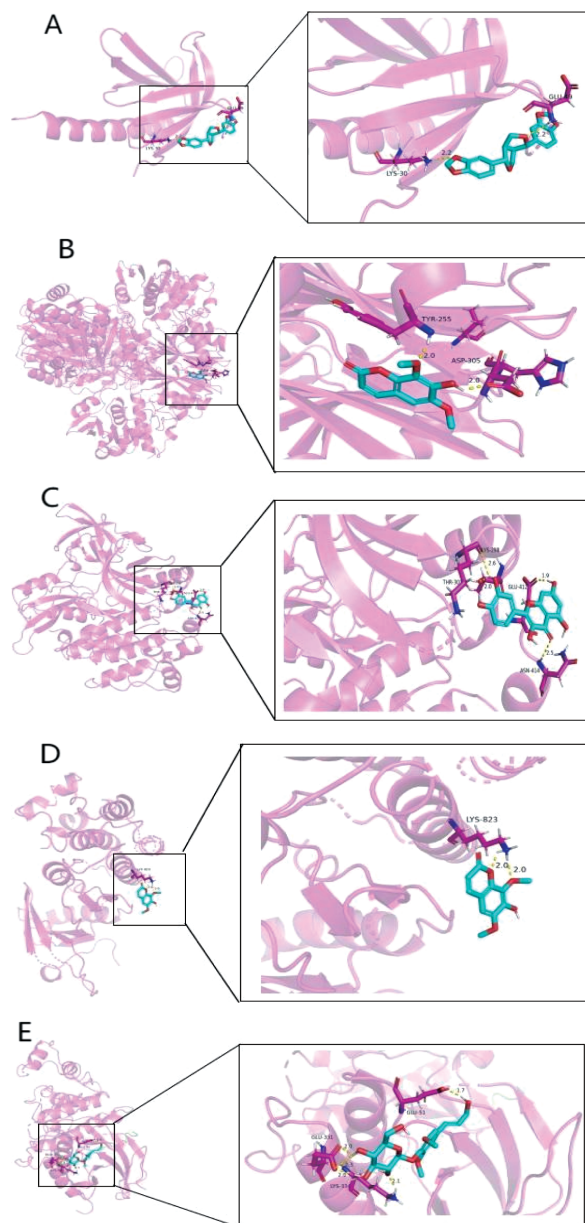


图6 分子对接结果热图

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶对照品适量,精密称定,分别置于量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成储备液。再精密量取适量各储备液,置10 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成浓度含刺五加苷B 1.012 mg/mL、芝麻素 0.096 mg/mL、异嗪皮啶 0.053 mg/mL的混合对照品溶液。



注: A. 芝麻素(CWJ7)-AKT1结合位点; B. 异嗪皮啶(CWJ14)-GAPDH结合位点; C. 槲皮素(CWJ2)-SRC结合位点; D. 异嗪皮啶(CWJ14)-EGFR结合位点; E. 刺五加苷B(CWJ9)-STAT3结合位点。

图7 分子对接分析结果

2.2.3 供试品溶液的制备 取刺五加粉末 30 g(过40目筛), 回流提取, 减压回收乙醇, 水浴蒸干, 得刺五加干膏。取干膏适量, 精密称定, 用50%甲醇溶解, 定容于25 mL容量瓶中, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 采用倍比稀释法稀释混合对照品溶液, 制成不同系列浓度的溶液。按2.2.1项下色谱条件分别进样, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标、对照品浓度为横坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线方程。

各组分的回归方程分别为: $y_{\text{刺五加苷B}} = 2.37 \times 10^6 x + 5.45 \times 10^4$ ($R=0.999\ 7$), $y_{\text{芝麻素}} = 1.23 \times 10^6 x + 4.13 \times 10^3$ ($R=0.999\ 8$), $y_{\text{异嗪皮啶}} = 2.58 \times 10^6 x - 3.41 \times 10^2$ ($R=0.999\ 8$), 线性范围分别为 0.005 06 mg/mL~0.101 2 mg/mL, 0.000 48 mg/mL~0.009 55 mg/mL, 0.000 265 mg/mL~0.005 3 mg/mL。

2.2.5 精密度的试验 精密吸取上述混合对照品溶液, 重复进样6次, 结果刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶的平均峰面积相对标准1.2%, 0.9%和1.3%, 表明仪器精密良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批刺五加药材6份, 按“供试品溶液制备”项下方法操作, 在上述色谱条件下测定, 计算含量及RSD值。结果刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶峰面积的RSD分别为0.98%、1.86%、2.34%, 表明方法的重复性较好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下放置, 分别于0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h测定。结果刺五加苷B、芝麻素、异嗪皮啶峰面积的相对标准偏差RSD分别为0.78%、2.21%、1.27%。结果表明, 供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的刺五加粉末6份(每份约1 g), 分别加入刺五加苷B 0.213 5 mg, 芝麻素0.017 13 mg, 异嗪皮啶0.020 12 mg, 按“供试品溶液制备项”下方法制备供试品溶液, 测定, 计算平均回收率分别为99.3%, 98.4%, 98.6%。RSD分别为0.97%, 1.51%, 1.32%。

2.3 干膏得率的测定 将蒸发皿于105℃干燥3 h后, 迅速移至干燥器中冷却精密称定其质量, 用移液管精密移取提取液10 mL置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 并105℃干燥3 h后到恒重, 移至干燥器内, 冷却至室温, 迅速精密称定质量, 平行

3次, 计算出膏率。

2.4 刺五加提取物的工艺优化

2.4.1 正交试验设计 由于影响中药成分提取效率的因素很多, 包括溶剂浓度, 提取时间, 溶剂用量, 回流次数等, 因此本实验在前期单因素预实验的基础上, 选择了L9(3⁴)正交试验, 称取刺五加饮片9份, 每份30 g, 按照试验设计进行回流提取, 按照2.2.1项下色谱条件进样分析, 考察各因素水平对出膏率, 刺五加苷B, 芝麻素, 异嗪皮啶的影响。因素水平见表2。

表2 正交设计表

水平	A(乙醇浓度)	B(回流时间)	C(加醇量)	D(回流次数)
1	60%	60 min	6 倍	1
2	75%	120 min	8 倍	2
3	90%	180 min	10 倍	3

2.4.2 多指标综合评分优选工艺 采用多指标综合评分的方法对正交试验的数据进行综合评价, 选择刺五加苷B和芝麻素和异嗪皮啶的综合评分与刺五加的出膏率作为考察指标, 根据2.1.3项目“药物-成分-靶点”网络构建下CWJ9和CWJ7和CWJ14的度值大小进行权重设置, CWJ9的度值为20, CWJ7的度值为5, CWJ14的度值为19, 所以将刺五加苷B的系数设定为0.46, 芝麻素的权重系数设0.11, 异嗪皮啶的权重设为0.43。为在统一标准下进行综合加权评分, 以各指标的最大值为参照将数据进行归一化, 根据确定的权重, 对3个单项分数加权求和得出如下公式: $Y_n = 0.46 \times (a_n/6.7313) \times 100 + 0.11 \times (b_n/0.6237) \times 100 + 0.43 \times (c_n/0.898) \times 100$ ($n=1-9$)。并根据公式分别对9次实验的各个指标结果进行综合评定得分。试验安排及结果见表3, 方差分析见表4。

综合评分的直观分析表明各因素对提取工艺的影响顺序为: A>B>D>C。方差分析表明A因素具有显著影响, 其他因素则无显著影响, 确定最佳提取工艺为A₁B₃C₂D₂。出膏率的直观分析表明各因素对提取工艺的影响顺序为: D>A>B>C。方差分析表明A、D因素具有显著影响, 其他因素则无显著影响, 确定最佳提取工艺为A₁B₃C₂D₃。

综合2种分析, 本着节约资源, 提取量最大化, 降低杂质的考虑, 虽然在出膏率中D因素对出膏率影响很大, 且有显著性, 但是考虑含量综合评分结果,

D因素无显著性，对含量影响不大，故最终确定，提取工艺为 A₁B₃C₂D₂，最佳提取工艺为加 8 倍量 60 % 乙醇提取 2 次，每次 180 min。

2.4.3 提取工艺验证

为了验证试验结果的准确

性及可靠性，进行 3 次重复试验，称取药材，以优选的提取工艺进行提取，分别测定刺五加苷 B 和芝麻素，及异嗪皮啶含量及出膏率，表明该水提工艺稳定可行，重复性良好，见表 5。

表3 正交试验设计与结果

No.		A	B	C	D	紫丁香苷(mg/g)	芝麻素(mg/g)	异嗪皮啶(mg/g)	综合评分(分)	出膏率(%)
1		1	1	1	1	6.257 9	0.356 8	0.621 2	78.80	7.03
2		1	2	2	2	6.723 6	0.623 7	0.817 9	96.11	7.89
3		1	3	3	3	5.872 8	0.531 7	0.863 8	90.87	8.22
4		2	1	2	3	5.139 2	0.379 5	0.856 9	82.85	7.24
5		2	2	3	1	5.848 7	0.366 7	0.898 0	89.44	6.43
6		2	3	1	2	6.160 6	0.426 3	0.888 9	92.18	7.26
7		3	1	3	2	5.985 7	0.508 4	0.371 1	67.64	6.82
8		3	2	1	3	6.085 8	0.354 2	0.375 6	65.82	7.36
9		3	3	2	1	6.731 3	0.450 5	0.383 0	72.28	6.60
综合评分	K ₁	88.593	76.430	78.933	80.173					
	K ₂	88.157	83.790	83.747	85.310					
	K ₃	68.580	85.110	82.650	79.847					
	R	20.013	8.680	4.814	5.463					
出膏率	K ₁	7.713	7.030	7.217	6.687					
	K ₂	6.977	7.227	7.243	7.323					
	K ₃	6.927	7.360	7.157	7.607					
	R	0.786	0.330	0.086	0.920					

表4 方差分析结果

指标成分	方差来源	离差平方和 SS	自由度 f	均方 MS	F 比值	显著性 P 值
综合评分	A	783.970	2	391.985	20.531	P<0.05
	B	131.254	2	65.627	3.437	
	C(误差)	38.184	2	19.092	1.000	
	D	56.340	2	28.170	1.475	
出膏率	A	1.164	2	0.582	97.000	P<0.05
	B	0.165	2	0.083	13.750	
	C(误差)	0.012	2	0.006	1.000	
	D	1.332	2	0.666	111.000	

注：F_{0.05}(2,2)=19.0。

表5 验证工艺结果

No.	刺五加苷 B(mg/g)	芝麻素(mg/g)	异嗪皮啶(mg/g)	出膏率(%)
1	6.817 3	0.532 3	0.868 0	7.77
2	6.661 4	0.536 6	0.820 2	7.81
3	6.618 8	0.532 5	0.856 1	7.83
平均值	6.699 2	0.533 8	0.848 1	7.80
RSD(%)	1.56	0.45	2.93	0.40

3 讨论

刺五加具有益气健脾、补肾安神的功效，在临床上常用于治疗脾肺气虚、体虚乏力、肺肾两虚、久咳虚喘^[16]。有研究表明，刺五加提取物及其制剂在改善 IIP 的症状，特别是缓解肺纤维化均能起到不同程度的作用^[17-18]。但具体的作用机制研究较少，本研究基于网络药理学和分子对接技术筛选刺五加的活性成分及潜在作用靶点，探讨其改善 IIP 的作用机制。通过网络药理学分析预测，AKT1、GAPDH、SRC、EGFR、STAT3 可能是其作用的核心靶点，PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)可能是其关键通路。

研究发现，所筛选的核心靶点 AKT1 通过介导线粒体增加巨噬细胞凋亡抗性，产生促炎细胞因子，如白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)

等,可以加重肺纤维化的进程^[19],因此可以通过调控PI3K-Akt信号通路,抑制肺炎症反应及氧化应激,从而减轻肺纤维化的进程^[20]。GAPDH在组织的代谢中发挥着重要的酶促作用,细胞需要GAPDH的催化能力,去维持糖酵解^[21]。在病理情况下,如呼吸或循环功能障碍,会导致糖酵解加速。SRC家族激酶可被促纤维化的细胞因子激活,参与肺纤维化的整个过程。有研究发现,当使用SRC抑制剂时,可以阻断小鼠肺组织中肌成纤维细胞的分化,降低肺纤维化的产生^[22]。EGFR在肺纤维化中也发挥很重要的作用,EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitor)可减少TGF- α 诱导的肺胶原沉积和细胞外基质堆积^[23]。同时抑制EGFR信号转导会使成纤维细胞增殖受到抑制,从而减缓肺纤维化进程^[24]。STAT3作为一种信号传导及转录激活蛋白在肺纤维化的治疗中发挥着直接或间接的作用,STAT3信号的增强激活是特发性肺纤维化的关键发病机制^[25]。

在中药提取工艺研究中,通常是通过文献及药典去筛选指标性成分,通常选择含量高的或者药典上规定的含量测定的成分,但是这些成分能否真正的关联临床疗效并未明确探讨。网络药理学作为实验前期工作,可以对刺五加治疗IIP的活性成分进行初步分析预测。但单独依靠网络药理学及分子对接的方法对成分进行筛选也存在局限性,因为在网络药理学研究中,关注更多的是原药材中存在多少针对疾病的有效成分,并没有明确成分在中药中的含量高低,有的成分虽然很有临床意义但是因为含量过低,也不能被选为中药的指标性成分,所以应将两者结合,综合分析。

本研究将网络药理预测的活性成分与预测的靶点蛋白进行分子对接。通过对接结果最终发现CWJ14和CWJ7与筛选出来的5个靶点蛋白对接效果最好,结合能均小于-9 kJ/mol,在文献研究中发现CWJ14为香豆素类化合物,具有很好的抗炎作用^[26-27],CWJ7可以缓解肺成纤维细胞增殖,并减少肌成纤维细胞的活化,也可以减轻哮喘小鼠模型的变应性气道炎症^[28-29],CWJ9通过介导PI3K/Akt/mTOR通路诱导肺癌细胞凋亡和自噬^[30]。CWJ2能够对抗肺间质纤维化的形成,对肺纤维化的发生发展有抑制作用^[31-32]。因此所筛选的成分与IIP关联度很高,证明刺五加在减缓IIP病程发展上有很好的效果。此

外,我们发现CWJ2在网络药理学分析中程度值最高,分子对接结果均小于-5 kJ/mol,很有研究价值,但考虑到其在药材中含量较低,不适合于工艺分析。因此结合《中国药典》2020年版一部中刺五加项下的含量测定成分,综合考虑,最终确定CWJ9、CWJ7、CWJ14为刺五加提取物提取工艺的筛选指标。并根据网络药理学分析获得的各成分的度值大小确定了各成分的权重指标,进一步与临床疗效进行关联,把计算的综合评分作为提取工艺的评价指标。本研究将中药工艺研究与其特定的临床药效相结合,使工艺研究更有针对性,为了进一步的刺五加制剂的开发打下基础^[33]。

[参考文献]

- [1] LYNCH D A, TRAVIS W D, MÜLLER N L, et al. Idiopathic interstitial pneumonias: CT features[J]. Radiology, 2005, 236(1): 10.
- [2] 何权瀛. 弥漫性肺间质纤维化临床诊断思路[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(1): 1-4.
- [3] 符艳, 金朝晖, 王伟, 等. 急性加重期特发性间质性肺炎患者血清CD59、Gremlin-1表达及与近期预后的相关性[J]. 疑难病杂志, 2023, 22(12): 1262-1267.
- [4] 卢绪香, 贾新华, 张伟. “气运失常”贯穿特发性间质性肺炎病程的临床研究[J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(2): 69-71.
- [5] 汪官玉, 杨璐超, 王真. 特发性间质性肺炎的中医治疗研究进展[J]. 新中医, 2018, 50(5): 215-218.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 215-216.
- [7] WANG Y H, MENG Y H, ZHAI C M, et al. The chemical characterization of Eleutherococcus senticosus and ci-wu Jia tea using UHPLC-UV-QTOF/MS[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 475.
- [8] LI X T, ZHOU J C, ZHOU Y, et al. Pharmacological effects of Eleutherococcus senticosus on the neurological disorders[J]. Phytother Res, 2022, 36(9): 3490-3504.
- [9] LI T, FERNS K, YAN Z Q, et al. Acanthopanax senticosus: Photochemistry and anticancer potential[J]. Am J Chin Med, 2016, 44(8): 1543-1558.
- [10] 梁子涵, 王旖瑶, 赖逸翔, 等. 刺五加提取物及其活性成分免疫调节作用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(15): 4895-4904.
- [11] 杨俊玲, 辛秀琴, 张捷, 等. 刺五加对肺间质纤维化治疗作用的探讨[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(5): 341-342.
- [12] 唐德才, 王全权, 陈海林, 等. 中药治疗肺纤维化的研究近况[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 424-426.
- [13] ZHAO W B, WANG B Y, LI S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence[J].

- intelligence[J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 558-560.
- [14] 龚棋棋, 刘雪菲, 蒋红. 网络药理学在药物有效成分和疾病靶点筛选中的应用研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 33(3): 237-240.
- [15] 黄琦, 李静, 马文峰, 等. 基于网络药理学和分子对接方法探讨健脾利湿养肝方治疗慢加急性肝衰竭的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(3): 557-564.
- [16] 胡强, 宋本艳, 潘嘉, 等. 刺五加注射液治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期肺肾气虚证临床疗效的观察[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(3): 511-515.
- [17] 李蓉. 刺五加注射液治疗特发性肺纤维化26例[J]. *吉林中医药*, 2003, 23(10): 14-15.
- [18] 张捷, 安继红, 张伟, 等. 刺五加对肺纤维化BALF中IL-6抑制作用的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1995, 11(5): 300-302.
- [19] LARSON C J L, DESHANE J S, RYAN A J, et al. Macrophage Akt1 kinase-mediated mitophagy modulates apoptosis resistance and pulmonary fibrosis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 582-596.
- [20] 周雯, 骆亚莉, 周世琴, 等. 基于网络药理学和动物实验探究益气养阴活血方治疗肺纤维化的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(3): 973-978.
- [21] SEIDLER N W. GAPDH and intermediary metabolism[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013; 985: 37-59.
- [22] LU Y Y, ZHAO X K, YU L, et al. Interaction of Src and Alpha-V Integrin Regulates Fibroblast Migration and Modulates Lung Fibrosis in A Preclinical Model of Lung Fibrosis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 46357.
- [23] HARDIE W D, DAVIDSON C, IKEGAMI M, et al. EGF receptor tyrosine kinase inhibitors diminish transforming growth factor- α -induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(6): L1217-L1225.
- [24] ISHII Y, FUJIMOTO S, FUKUDA T. Gefitinib prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(5): 550-556.
- [25] PECHKOVSKY D V, PRELE C M, WONG J, et al. STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 398-412.
- [26] NIU X, XING W, LI W, et al. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited TNF- α exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited/cetace MAPK pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(2): 164-171.
- [27] LEI J, YING Z H, YU C H, et al. Isofraxidin ameliorated influenza viral inflammation in rodents via inhibiting platelet aggregation[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 84(5): 236-240.
- [28] LIN C H, SHEN M L, KAO S T, et al. The effect of sesamin on airway fibrosis in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(1): 141-150.
- [29] LI L, PIAO H, ZHENG M, et al. Sesamin attenuates allergic airway inflammation through the suppression of nuclear factor- κ B activation[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 4175-4181.
- [30] 曹雪婷, 吴博雅, 陈静. 刺五加苷B介导PI3K/Akt/mTOR通路诱导肺癌细胞凋亡和自噬[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(24): 6693-6701.
- [31] 门翔, 党强, 周小果, 等. 槲皮素对基于TGF- β 1/P38 MAPK/NF- κ B信号通路抗博来霉素致小鼠肺纤维化的作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(2): 43-47.
- [32] 王婧雯, 郑大炜, 周小果, 等. 槲皮素调节T淋巴细胞效应对肺纤维化大鼠气道反应的作用及机制[J]. *解剖学杂志*, 2022, 45(4): 320-324, 363.
- [33] 黄冕, 宋育萌, 王习悦, 等. 基于网络药理学结合响应面法优选酸枣仁-南五味子药对醇提工艺[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(4): 966-977.

(责任编辑: 吴凌, 郭雨驰)