

健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的生物信息学研究

田雯¹, 刘伟², 李嘉丽¹, 杨良俊³, 潘华峰¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 3. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012)

摘要: **目的** 基于生物信息学方法分析健脾化痰解毒方对核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体活化的作用机制。**方法** 通过 GEO 数据库公开发表的基因芯片信息获取 NLRP3 炎症小体活化的相关基因, 并进行差异基因表达分析。利用中药系统药理分析平台(TCMSP)筛选健脾化痰解毒方的主要活性成分, 并结合相关文献对其进行适当补充。借助 Pubchem 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库查找主要活性成分的作用靶基因。绘制韦恩图得到活性成分靶点与差异基因的交集, 即健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的潜在作用靶点; 构建健脾化痰解毒方活性成分-靶点网络及靶蛋白相互作用(PPI)网络, 并进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。**结果** 共获得健脾化痰解毒方 9 味中药的 93 个主要活性成分, 798 个作用靶点; 得到 NLRP3 炎症小体活化相关靶点 743 个, 交集靶基因 62 个; 关键靶点包括 IL-6、VEGFA、TNF、SRC、IL-1 β 、PTGS2、BCL2L1、CCND1、FGF2、ICAM1 等; 共涉及 26 条 GO 条目与 25 条相关信号通路。**结论** 健脾化痰解毒方可能主要通过槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、豆甾醇等活性成分, 作用于 IL-6、IL-1 β 、TNF 等核心治疗靶点, 通过 PI3K-Akt、HIF-1 及 MAPK 等信号通路, 调节 NLRP3 炎症小体活化来影响细胞焦亡, 发挥防治胃癌前病变的作用。

关键词: 健脾化痰解毒方; 胃癌前病变; NLRP3 炎症小体; 细胞焦亡; 生物信息学

中图分类号: R285.5; R857.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1321-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.012

Bioinformatics Research on the Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation by Jianpi Huayu Jiedu Formula

TIAN Wen¹, LIU Wei², LI Jiali¹, YANG Liangjun³, PAN Huafeng¹ (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012 Zhejiang, China)

Abstract: **Objective** To analyze the mechanism of the main components of Jianpi Huayu Jiedu formula on the activation of NLRP3 inflammasome based on bioinformatics method. **Methods** The relevant genes of NLRP3 inflammasome activation were obtained by using Gene Expression Omnibus(GEO) database, and different expression of genes were analyzed. TCMSP was used to screen the main active ingredients of Jianpi Huayu Jiedu formula, and the main active ingredients were appropriately supplemented in combination with relevant literatures. Corresponding target genes of major active components were identified by using Pubchem database and Swiss Target Prediction database. The Venn diagram was drawn to find out the potential pharmacodynamics components and targets of Jianpi Huayu Jiedu formula in inhibiting NLRP3 inflammasome activation, then the complex-target network diagram was constructed, the protein-protein interaction(PPI) network diagram was plotted, and GO(gene ontology) enrichment

收稿日期: 2021-01-28

作者简介: 田雯, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治胃癌前病变的基础研究。Email: twilakindle@163.com。通信作者: 潘华峰, 女, 教授, 研究方向: 中医药防治慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变的研究。Email: gzphf@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(8197151818); 广东省自然科学基金项目(2019A1515010822); 广东省重点领域研发计划项目(2020B1111100011); 中国博士后科学基金会项目(面上项目, 2019M662877); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金项目(青年项目, 2019A1515110236); 国家自然科学基金青年项目(82004300)。

analysis and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) enrichment analysis were conducted. **Results** 93 main active components of 9 drugs in *Jianpi Huayu Jiedu* formula, 798 drug targets, 743 NLRP3 inflammasome activation-related targets and 62 intersection target genes were obtained. Key targets obtained through PPI network construction included IL-6, VEGFA, TNF, SRC, IL-1 β , PTGS2, BCL2L1, CCND1, FGF2, and ICAM1. Enrichment analysis results mainly involved 26 GO items and 25 signaling pathways. **Conclusion** *Jianpi Huayu Jiedu* formula may interfere with key targets such as IL-6, IL-1 β and TNF through active ingredients such as quercetin, Kaempferol, β -sitosterol and stigmastol, regulating the activation of NLRP3 inflammasome and affecting cell pyroptosis, playing a role in preventing and controlling precancerous lesions of gastric cancer.

Keywords: *Jianpi Huayu Jiedu* formula; gastric precancerous lesions; NLRP3 inflammasome; pyroptosis; bioinformatics

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体活化引起的细胞焦亡是胃癌前病变(Gastric precancerous lesions, GPL)的“炎-癌”转化过程中的关键环节^[1-2],调控 NLRP3 炎症小体活化对防治癌症具有重要意义,已成为 GPL 的治疗靶点。健脾化瘀解毒方是依据 GPL 的“虚”“瘀”“毒”致病特点,以健脾化瘀解毒为治疗原则,在四君子汤的基础上精心裁制而成,由黄芪、太子参、茯苓、白术、莪术、三七、白花蛇舌草、猴菇菌、守宫 9 味中药构成,是治疗 GPL 的有效方剂。本课题组前期研究表明,健脾化瘀解毒方能有效改善 GPL 的胃黏膜病理结构^[3],在减少胃黏膜上皮细胞凋亡^[4],抑制其侵袭迁移^[5],调节胃黏膜能量代谢^[6],调控肿瘤坏死因子(TNF) α 、白细胞介素(IL)4 等炎症因子水平^[7]等方面发挥作用,但具体作用机制尚不清楚。

随着高通量测序技术的发展,大量分子测序数据发布在公共数据库平台,为疾病相关基因及药物的分子靶向研究提供了新思路。本研究拟通过对 GEO(Gene expression omnibus)数据库基因芯片的挖掘分析,预测健脾化瘀解毒方在治疗 GPL 过程中可能存在的调节 NLRP3 炎症小体活化的作用靶点,以探讨其是否能够通过调节 NLRP3 炎症小体活化干预细胞焦亡,从而逆转 GPL,以期为深入研究健脾化瘀解毒方的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 基因表达谱芯片获取 利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)检索“NLRP3 inflammatome”相关数据,物种限定为人;根据基因芯片质量,在

结果中选择 GSE136758 测序数据。该芯片由德国耶拿大学医院内科诊所 IV Köse-Vogel N^[8]等提供,共 8 例样本,其中 2 例为空白对照组,2 例为脂多糖(LPS)联合三磷酸腺苷(ATP)处理巨噬细胞的炎症模型组。

1.2 差异基因分析 下载基因表达矩阵,并通过 Affymetrix 芯片平台(<https://www.affymetrix.com/site/mainPage.affx>)获取芯片数据文件;进行探针转换并去除重复值后,运用 R 语言软件“limma”包进行差异基因表达分析,选取 $P < 0.05$ 、 $|\log_2FC| > 2$ 的差异基因,通过“ggplot2”“pheatmap”包绘制火山图和热图。

1.3 活性成分筛选 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[9]和中国科学院化学数据库(<http://www.organchem.csdb.cn/scdb/default.asp>)检索,搜集三七、太子参、莪术、黄芪、茯苓、白术、白花蛇舌草、猴菇菌、守宫的相关化学成分。以口服利用度(Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及类药性(Druglike, DL) ≥ 0.18 ^[10]作为活性成分的筛选条件,并结合文献研究做适当补充。

1.4 活性成分-靶点网络构建 借助 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取活性成分的 Canonical SMILES 结构;通过 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)查找活性成分的靶点信息,将种属限定为人类,并与“1.2”项下获得的差异基因取交集,采用 R 软件“VennDiagram”包绘制韦恩图;采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建健脾化瘀解毒方活性成分-靶点网络。

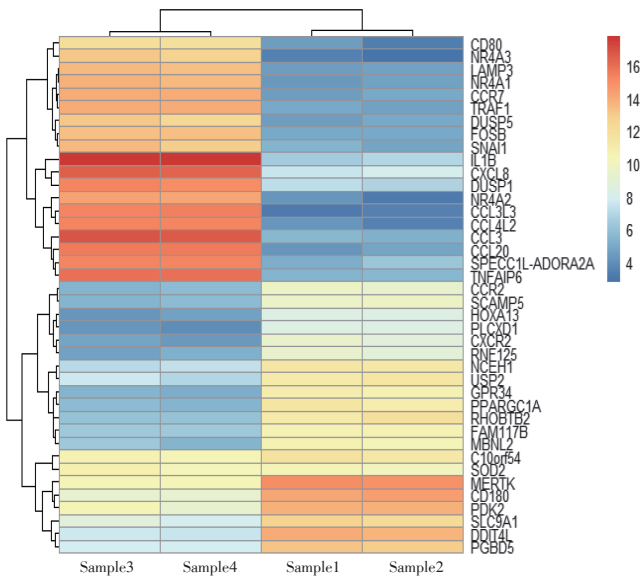
1.5 靶蛋白相互作用网络构建 将交集基因导入 String 11.0 数据库(<https://string-db.org/>),获取蛋白质相互作用(PPI)信息,将物种设定为“Homo

sapiens”，并选择 Medium confidence>0.4，排除游离的部分节点。采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建靶蛋白 PPI 网络，并利用 cytoHubba 插件进行拓扑分析，提取 MCC 值前 10 位的关键子网络。

1.6 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析 将“1.4”项下筛选的交集靶点通过 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (Gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2 结果

2.1 GEO 芯片的差异基因分析 取 GSE136758 基因芯片的空白对照组、炎症模型组样本做差异基因分析，结果得到差异基因 743 个。取上调及下调最显著的前 20 个基因绘制热图(见图 1)，并根据实际数据绘制火山图(见图 2)。结果表明，NLRP3 炎症小体活化引起的细胞焦亡作为一种炎性细胞程序性死亡方式，其发生时会引起大量趋化因子如 CXCL8、CCL3L3、CCL4L3、CCL3、CCL20、CCR7 等产生以及 IL-1 β 表达明显上升。

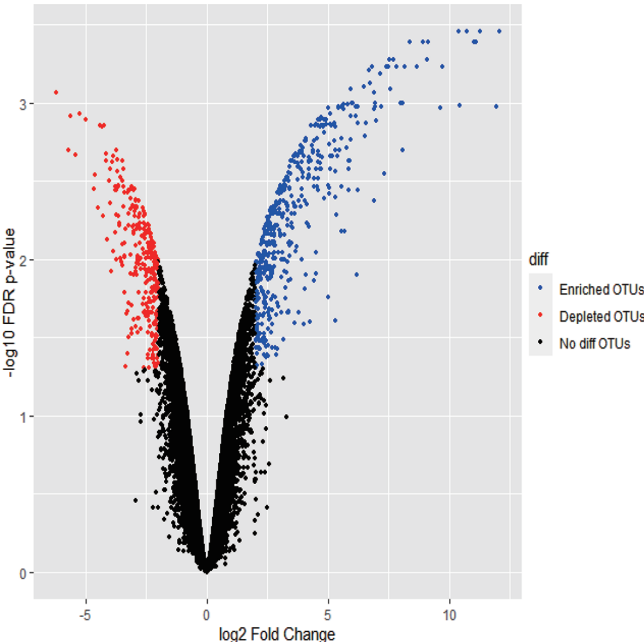


注: Sample1、Sample2 为空白对照组; Sample3、Sample4 为炎症模型组。颜色越红, 基因表达上调程度越高; 颜色越蓝, 基因表达下调程度越高

图 1 NLRP3 炎症小体活化相关差异基因热图

Figure 1 Heat map of differentially expressed genes related to NLRP3 inflammasome

2.2 健脾化痰解毒方的活性成分筛选 通过 TCMSP 平台检索得到化学成分分布如下: 黄芪含 87 个、莪术含 81 个、太子参含 25 个、白花蛇舌草含 37 个、



注: 红色为下调基因; 蓝色为上调基因; 黑色为无差异基因

图 2 NLRP3 炎症小体活化相关差异基因火山图

Figure 2 Volcano map of differentially expressed genes related to NLRP3 inflammasome

三七含 119 个、白术含 55 个、茯苓含 34 个; 通过中国科学院化学数据库获得猴菇菌含 36 个、守宫含 33 个化学成分。删除重复值后共得到 462 个化合物, 进一步通过 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 进行条件筛选后, 得到 81 个活性成分。结合文献分析结果, 增加乌索酸、齐墩果酸^[11-12]、莪术醇、吉马酮、莪术二酮^[13-14]、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪多糖、黄芪甲苷^[15]、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 等^[16], 最终共得到 93 个活性成分。表 1 为健脾化痰解毒方中相关靶点数较多的 21 个成分。

2.3 健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的活性成分-靶点网络 通过 Swiss Target Prediction 数据库对活性成分靶点进行预测, 共获得靶基因 798 个; 与 NLRP3 炎症小体活化有关基因进行映射, 获得共同靶基因(交集基因)62 个(见图 3), 其中上调基因 41 个, 下调基因 21 个。

以 62 个共同靶基因对应的蛋白作为健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的靶点, 建立中药-活性成分-靶点网络(见图 4), 该网络共有 164 个节点, 447 条边。靶点中 PPARD 对应的活性成分最多, 其过表达可导致炎症反应^[17], 并可能通过调控血管生成、上皮间质转化及侵袭、迁移影响癌细胞的转移^[18]。度值(Degree) $\geq$ 10 的主要靶点包括 PPARD、PTGER2、ADORA2A、PTGS2、PTGER4、SRC、

表 1 健脾化痰解毒方的部分活性成分

Table 1 Part of the active ingredients of *Jianpi Huayu Jiedu* formula

Mol ID	编号	名称	靶点数/个	OB/%	DL	来源
—	HGJ7	Erinapyrone A(猴头菌吡喃酮 A)	16	—	—	猴菇菌
MOL000279	F1	Cerevisterol(啤酒甾醇)	14	37.96	0.77	茯苓、猴菇菌
MOL001670	BHSSC4	2-methoxy-3-methyl-9, 10-anthraquinone(2-甲氧基-3-甲基-9, 10-蒽并醌)	14	37.83	0.21	白花蛇舌草
MOL000438	HQ18	(3 <i>R</i>)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol[(3 <i>R</i>)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧苯基)色烷-7-醇]	13	67.67	0.26	黄芪
MOL001646	BHSSC5	2,3-dimethoxy-6-methyanthraquin(2,3-二甲氧基-6-methyanthraquin)	13	34.86	0.26	白花蛇舌草
MOL000398	HQ22	Isoflavanone(异黄烷酮)	11	109.99	0.30	黄芪
MOL001689	TZS2	Acacetin(金合欢素)	10	34.97	0.24	太子参
MOL000006	TZS7	Luteolin(3',4',5,7-四羟基黄酮)	9	36.16	0.25	太子参
MOL002464	TZS1	α -Glyceril linoleate(α -甘油基亚油酸酯)	9	37.18	0.30	太子参
MOL001792	SQ5	Liquiritigenin(甘草素)	9	32.76	0.18	三七
MOL000422	HQ8	Kaempferol(山柰酚)	9	41.88	0.24	黄芪
MOL000371	HQ12	3,9,10-Trimethoxypterocarpan(3,9,10-三甲氧基紫檀碱)	9	53.74	0.48	黄芪
MOL000285	FL3	Polyporenic acid C(多孔菌酸 C)	9	38.26	0.82	茯苓
MOL000098	D1	Quercetin(槲皮素)	9	46.43	0.28	黄芪、白花蛇舌草、三七
—	SG12	Glycohyodeoxycholic acid(甘氨酸猪去氧胆酸)	8	—	—	黄芪
MOL000239	HQ6	Kumatakenin(熊竹素)	8	50.83	0.29	黄芪
MOL000380	HQ11	Astrapterocarpan(黄芪紫檀烷苷)	8	64.26	0.42	黄芪
—	HGJ2	4-chloro-3,5-dimethoxy toluene(4-氯-3,5-二甲氧基甲苯)	8	—	—	猴菇菌
MOL000275	FL9	Trametenolic acid(土莫酸)	8	38.71	0.80	茯苓
MOL000296	C1	Hederagenin(常春藤皂苷元)	8	36.91	0.75	黄芪、莪术、茯苓
MOL000044	BZ7	Atractylenolide II(白术内酯 II)	8	47.5	1.30	白术

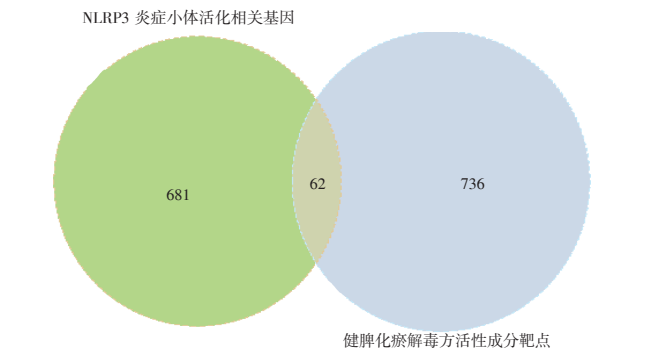


图 3 健脾化痰解毒方与 NLRP3 炎症小体活化相关基因的韦恩图

Figure 3 Vnne diagram of targets of *Jianpi Huayu Jiedu* formula and the activation of NLRP3 inflammasome

TNF、PFKFB3、PIM1、PDE4B，可能对健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化具有重要意义。

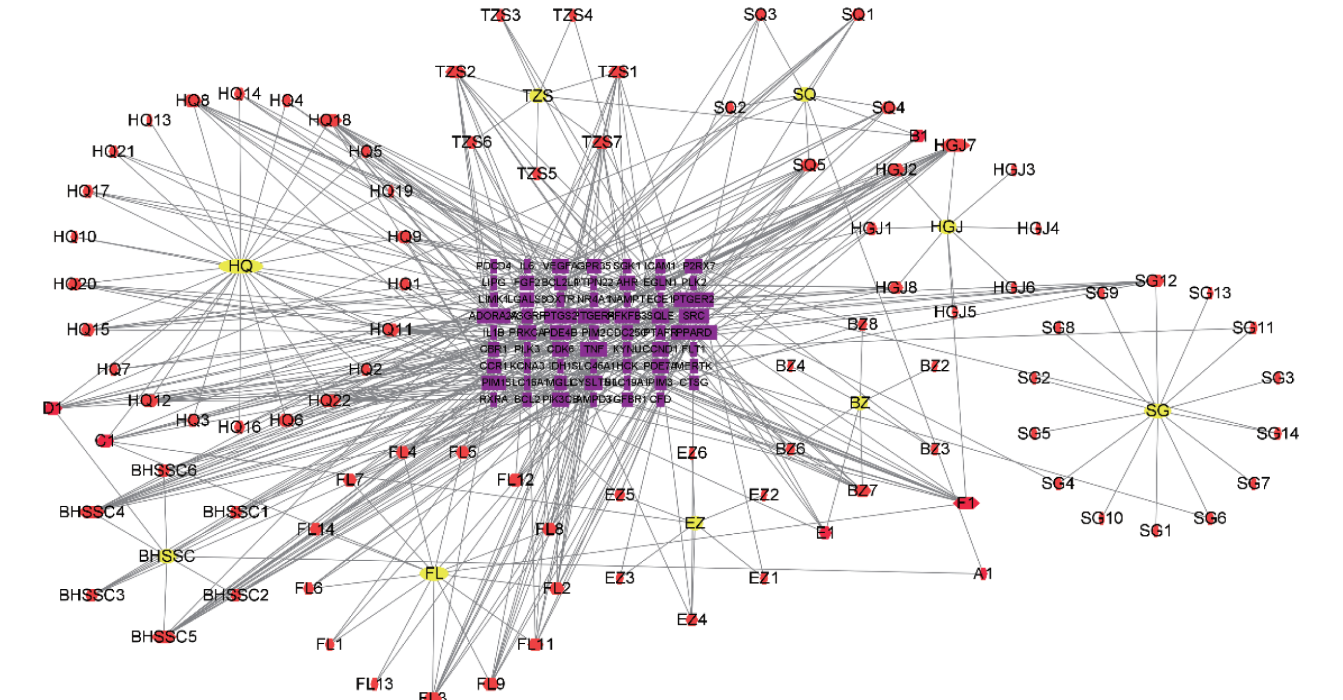
2.4 健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的靶蛋白 PPI 网络 通过 String 11.0 数据库对 62 个共同靶基因进行 PPI 网络分析，排除 4 个无关联的节点，最终得到由 58 个相互关关节点(Node)构成的 PPI 网络(见图 5)。该网络有 189 条边(Edge)，平均节点度为 6.52。采用 Cytoscape 3.8.0 软件中的 cytoHubba 插

件进行拓扑分析，提取 MCC 值前 10 位的关键子网络(见图 6)。该关键子网络包括 IL-6、VEGFA、TNF、SRC、IL-1 β 、PTGS2、BCL2L1、CCND1、FGF2、ICAM1 等靶点，可能是健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的核心靶点，具体信息见表 2。

2.5 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 通过 David 6.8 数据库对交集靶点进行 GO 功能分析，以 Corrected *P* 值 ≤ 0.01 、富集倍数 $\geq 10.0\%$ 为筛选标准，最终获得 26 条 GO 条目，其中有 13 个生物学过程(BP)、7 个细胞组分(CC)、6 个分子功能(MF)，见图 7。对交集靶点进行 KEGG 通路富集分析，以 Corrected *P* 值 ≤ 0.01 为筛选标准，并排除“HTLV-I infection”等无关的信号通路，最终共获得 25 条通路，结果见表 3。

3 讨论

健脾化痰解毒方是治疗胃癌前病变(GPL)“脾虚血瘀挟毒”证的有效方剂，方以黄芪为君，能温三焦，壮脾胃，补而不滞，温而不燥；臣以太子参益气健脾，养阴益胃；佐以白术、茯苓、猴菇菌健脾化湿，补脾益气，助消化，治疗脾胃虚弱；三七活



注：黄色为中药(首字母缩写)；红色为主要活性成分；紫色为关键靶点

图 4 健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的“中药-活性成分-靶点”网络

Figure 4 Herb-component-target network of *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

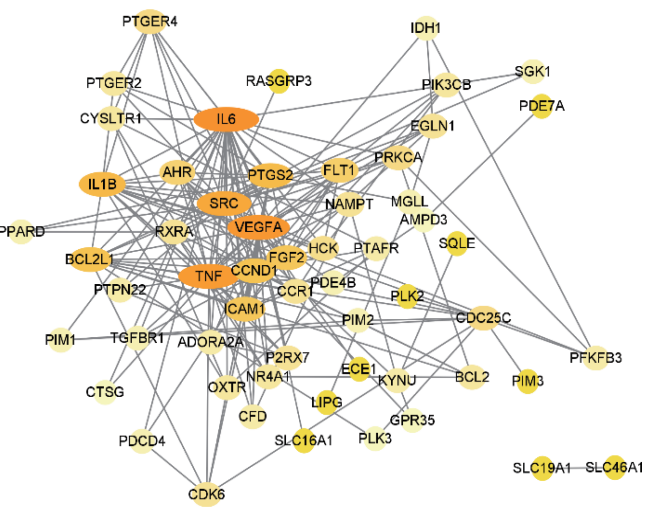


图 5 健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化的关键靶蛋白相互作用(PPI)网络

Figure 5 PPI network diagram of *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

血化瘀、消肿定痛，莪术破血逐瘀，守宫通经活络、散结消肿，三药合用能消除络脉瘀阻；诸药合用共同发挥健脾、化痰、解毒之功^[19]。本课题组前期研究^[20-21]表明，健脾化痰解毒方可能通过下调 HIF-1 α 及 mTOR 蛋白表达水平，调节 mTOR 信号通路、HIF-1 信号通路，发挥治疗 GPL 的作用，与本研究结果相一致。

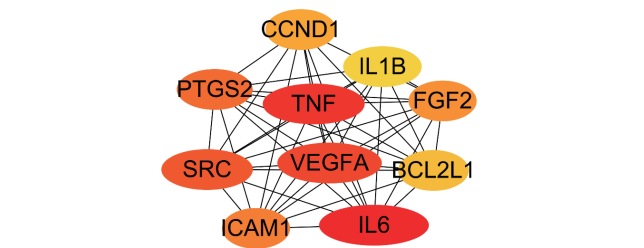


图 6 健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化的靶蛋白相互作用(PPI)关键子网络

Figure 6 Key subnetwork for PPI network of *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

表 2 健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化的核心靶点
Table 2 The core targets and target descriptions of *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

靶点	靶点描述	MCC 值
IL-6	Interleukin 6(白细胞介素 6)	132 237
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A(血管内皮生长因子 A)	132 108
TNF	Tumor necrosis factor(肿瘤坏死因子)	132 060
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src(原癌基因酪氨酸蛋白激酶)	131 995
IL-1 β	Interleukin 1 β (白细胞介素 1 β)	131 889
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2(前列腺素 G/H 合酶 2)	131 162
BCL2L1	Bcl-2-like protein 1(Bcl-2 样蛋白 1)	120 996
CCND1	G1/S-specific cyclin-D1(G1/S-周期蛋白 D1)	85 716
FGF2	Fibroblast growth factor 2(成纤维细胞生长因子 2)	80 676
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1(细胞间黏附分子 1)	46 424

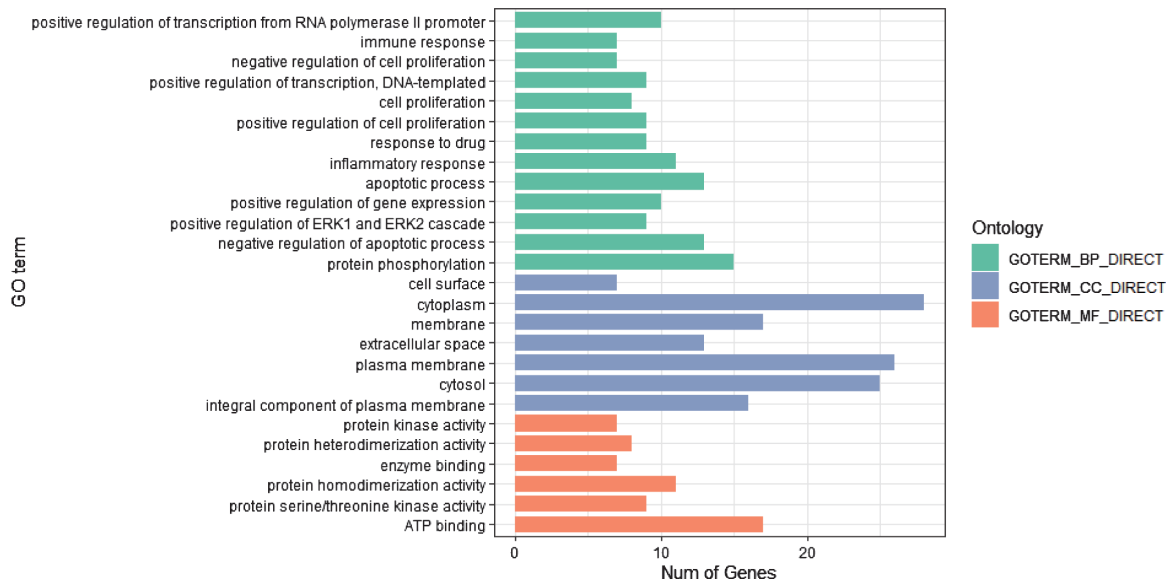


图7 健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化的 GO 功能富集分析

Figure 7 Histogram of GO functional enrichment analysis on *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

表3 健脾化痰解毒方调控 NLRP3 炎症小体活化的 KEGG 通路富集分析

Table 3 Enriched KEGG signaling pathways of *Jianpi Huayu Jiedu* formula regulating the NLRP3 inflammasome activation

通路名称	中文注释	富集基因数/个	P 值
Pathways in cancer	癌症信号通路	17	1.50E-08
PI3K-Akt signaling pathway	PI3K-Akt 信号通路	13	7.00E-06
Neuroactive ligand-receptor interaction	刺激神经组织的中的交互	9	1.00E-03
MicroRNAs in cancer	癌症相关的小分子核糖核酸	9	1.20E-03
HIF-1 signaling pathway	HIF-1 信号通路	8	6.60E-06
Proteoglycans in cancer	癌症相关的蛋白聚糖	8	7.00E-04
Rap1 signaling pathway	Rap1 信号通路	8	9.30E-04
FoxO signaling pathway	FoxO 信号通路	7	4.80E-04
Ras signaling pathway	Ras 信号通路	7	6.80E-03
MAPK signaling pathway	MAPK 信号通路	7	1.20E-02
NF-kappa B signaling pathway	NF-κB 信号通路	6	4.70E-04
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	炎性介质对 TRP 通道的调节	6	8.10E-04
TNF signaling pathway	肿瘤坏死因子信号通路	6	1.20E-03
Calcium signaling pathway	钙信号通路	6	1.10E-02
VEGF signaling pathway	VEGF 信号通路	5	1.10E-03
Jak-STAT signaling pathway	Jak-STAT 信号通路	5	2.30E-02
cAMP signaling pathway	cAMP 信号通路	5	6.20E-02
Apoptosis	细胞凋亡	4	1.10E-02
Fc gamma R-mediated phagocytosis	FcγR 介导的吞噬作用	4	2.50E-02
Toll-like receptor signaling pathway	Toll 样受体信号通路	4	4.60E-02
Natural killer cell mediated cytotoxicity	自然杀伤细胞介导的细胞毒性	4	6.40E-02
NOD-like receptor signaling pathway	NOD 样受体信号通路	3	6.70E-02
Regulation of lipolysis in adipocytes	脂肪细胞脂肪分解的调节	3	6.70E-02
mTOR signaling pathway	mTOR 信号通路	3	7.10E-02
Fc epsilon RI signaling pathway	FcεRI 信号通路	3	9.30E-02

细胞焦亡是细胞炎性死亡，其发生与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体激活有关，NLRP3 炎症小体是目前研究最多的炎症小体，在细胞焦亡中发挥着重要作用。本研究通过 GEO 芯片数据挖掘显示，NLRP3 炎症小体活化相关基因与 GPL 关系密切。一项幽门螺旋杆菌感染病例的基因表达分析研究^[22]显示，胃癌与 NLRP3 基因关系密切，在幽门螺杆菌 gc026 激发的细胞中，可见 NLRs 受体、促炎因子(IL-6、TNF)及趋化因子(CXCL2、CCL5)表达明显上调。还有研究^[23]表明，小鼠的胃黏膜组织在感染幽门螺旋杆菌之后，出现 NLRP3 炎症小体表达水平升高。因此，通过调控 NLRP3 炎症小体的活化，调节细胞局部炎性反应，从而保护胃黏膜，可能是治疗 GPL 的有效措施。

通过蛋白相互作用(PPI)网络分析提示，IL-6、VEGFA、TNF、SRC、IL-1β、PTGS2 可能是健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化的核心作用靶点。在差异基因分析的热图中，IL-1β 的表达量前后变化也最为明显。白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)均属于炎性细胞因子，NLRP3 炎症小体能够影响疾病的发生发展，主要是通过促进下游炎性细胞因子的释放，诱导机体急慢性炎性反应。机体受到感染性损害后，病原体识别受体(PPR)能激活包括核因子 κB(NF-κB)通路在内的多种信号通路，提高 IL-6、IL-1β、TNF-α 等炎性细胞因子的 mRNA 转录^[24]。IL-1β 的释放是细胞焦亡的重要环节，IL-1β 通过调节胃上皮细胞的功能来抑制胃酸分泌，引起浅表性胃炎，并

逐步发展为萎缩性胃炎及胃癌^[25]。IL-1 β 是治疗 NLRP3 炎症小体相关疾病的重要靶标, IL-1 β 受体拮抗剂(IL-1Ra)已在临床治疗中取得较好疗效^[26]。血管内皮生长因子(VEGF)A 是癌症治疗的重要靶标, 研究^[27]发现, 黄芪注射液可通过抑制 VEGF 的表达, 减少新生血管数量, 阻断胃癌发展, 并降低血清 TNF- α 的水平, 增强机体免疫功能。原癌基因酪氨酸受体激酶(SCR)是一种与膜相关的酪氨酸激酶, 参与了包括基因转录、免疫反应、细胞黏附、细胞周期进程以及凋亡、迁移和转化在内的多种生物过程^[28]。前列腺素过氧化物合酶(PTGS2)已被证明在多种肿瘤类型中表达, 是一种被阿司匹林等非甾体类抗炎药物抑制的酶^[29]。虽暂无 SCR、VEGF、PTGS2 等调节巨噬细胞焦亡的直接证据, 但其抗炎功能可能间接影响 NLRP3 炎症小体活化。

通过 GO 功能与 KEGG 通路富集分析发现, 健脾化痰解毒方主要通过调控生物调节、细胞代谢、蛋白质结合等多种生物学过程, 以及癌症信号通路、癌症 microRNA、PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路、mTOR 信号通路等调节 NLRP3 炎症小体活化, 大部分通路都与癌症及炎症反应有关。本课题组前期研究^[6]表明, 健脾化痰解毒方能够抑制 PI3K/AKT/HIF-1 α 信号通路的激活, PI3K/Akt 是细胞自噬的重要通路。细胞自噬是炎症小体激活和 IL-1 家族细胞因子释放的重要调节方式^[30]。研究^[31]表明, MAPK 信号通路在 NLRP3 炎症小体生成以及巨噬细胞焦亡中发挥重要作用, 阻断 MAPK 信号通路可以负调控 NLRP3 炎症小体的激活, 调节巨噬细胞焦亡和脂多糖(LPS)诱导的损伤。由此推测, 健脾化痰解毒方可能通过诱导巨噬细胞自噬而影响 NLRP3 炎症小体活化。

通过对“中药-活性成分-靶点”网络分析发现, 姜黄素、白术内酯 I、 β -谷甾醇、豆甾醇、山柰酚、槲皮素等活性成分可能在健脾化痰解毒方调节 NLRP3 炎症小体活化中发挥重要作用。研究^[32]表明, 莪术主要成分姜黄素能抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 蛋白表达和 TNF- α 产生。白术内酯 I 能够抑制 TNF- α 、IL-6 水平, 通过 MAPK 通路阻断 LPS 诱导的巨噬细胞的炎症反应^[33]。 β -谷甾醇、豆甾醇均属于植物甾醇, 具有抗炎的功效, 能通过参与减少 TNF- α 的释放, 减轻 LPS 诱导巨噬细胞模型的炎症反应^[34]。山柰酚^[35]、槲皮素^[36]能降低 IL-1 β 的释放, 减轻 LPS-ATP 诱导的损伤。槲皮素还可通过促进 Akt 磷

酸化并激活 PI3K, 调节 PI3K/Akt 通路, 从而影响炎症小体激活^[37-38]。

综上所述, 健脾化痰解毒方可能主要通过槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、豆甾醇等活性成分, 作用于 IL-6、IL-1 β 、TNF 等核心治疗靶点, 通过 PI3K-Akt、HIF-1 及 MAPK 等信号通路, 调节 NLRP3 炎症小体活化来影响细胞焦亡, 发挥防治胃癌前病变的作用。

参考文献:

- [1] CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, KAAKOUSH N O, MITCHELL H M. Pattern-recognition receptors and gastric cancer[J]. Front Immunol, 2014, 5: 336-345.
- [2] MENU P, VINCE J E. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(1): 1-15.
- [3] 刘伟, 潘华峰, 赵自明, 等. 健脾化痰解毒方调控 Wnt/ β -catenin/GSK3 β 通路抑制胃癌前病变大鼠 Lgr5⁺ 癌干细胞早期转移机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1952-1956.
- [4] 潘华峰, 任金玲, 赵自明, 等. 胃痞消对脾虚型慢性萎缩性胃炎癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞增殖周期分布及凋亡基因表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(5): 488-491.
- [5] 李思怡, 赵自明, 潘华峰, 等. 胃痞消体外抑制胃癌前病变细胞和胃癌 SGC7901 细胞上皮-间质转化的机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3474-3479.
- [6] 潘华峰, 袁冬生, 刘伟, 等. 健脾化痰解毒方抑制 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路阻断胃癌前病变恶性进展的机制[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2786-2790.
- [7] 李海文, 潘华峰, 赵自明, 等. 胃痞消对胃癌前病变大鼠血浆肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-4 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(2): 271-274, 384.
- [8] KÖSE-VOGEL N, STENGEL S, GARDEY E, et al. Transcriptional Suppression of the NLRP3 inflammasome and cytokine release in primary macrophages by low-dose anthracyclines[J]. Cells, 2020, 9(79): e9010079.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6(13): 1-6.
- [10] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [11] 刘志强, 王博龙. 基于网络药理学探讨白花蛇舌草主要成分的抗癌机制[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1827-1832.
- [12] 纪宝玉, 范崇庆, 裴莉昕, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 235-240.
- [13] 陈晓军, 韦洁, 苏华, 等. 莪术药理作用的研究新进展[J]. 药学研究, 2018, 37(11): 664-668.
- [14] 王莉, 徐锐, 王常伟, 等. 莪术醇的抗癌作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(3): 176-181.
- [15] 张淑娟, 张育贵, 辛二旦, 等. 黄芪和红芪比较研究进展[J]. 山

- 西医科大学学报, 2020, 51(5): 462-465.
- [16] 姚兆敏, 陈卫东, 仰忠华, 等. 白术研究进展及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4796-4807.
- [17] ZUO X, DEGUCHI Y, XU W, et al. PPAR δ and interferon gamma promote transformation of gastric progenitor cells and tumorigenesis in mice[J]. Gastroenterology, 2019, 157(1): 163-178.
- [18] ZUO X, XU W, XU M, et al. Metastasis regulation by PPAR δ expression in cancer cells[J]. JCI Insight, 2017, 2(1): e91419.
- [19] 杨良俊, 刘伟, 赵自明, 等. 胃癌灵治疗胃癌前病变机制的网络药理学预测及其促凋亡研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2244-2249.
- [20] LIU W, ZHAO Z M, LIU Y L, et al. *Weipiling* ameliorates gastric precancerous lesions in Atp4a (-/-) mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 318-326.
- [21] 樊湘珍, 赵自明, 杨良俊, 等. 健脾化痰解毒方下调氧感知通路抑制胃癌前病变小鼠胃黏膜上皮细胞超期生存研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2541-2545.
- [22] CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, KAKOUSH N O, GOH K L, et al. The NOD-like receptor signalling pathway in helicobacter pylori infection and related gastric cancer: a case-control study and gene expression analyses[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98899.
- [23] 蒋建辉, 刘胜, 罗晶晶, 等. NLRP3炎症小体及其下游分子在幽门螺杆菌感染小鼠的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(8): 785-788, 793.
- [24] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(10): e016295.
- [25] SUN X, CAI H, LI Z, et al. Association between IL-1 β polymorphisms and gastritis risk: a meta-analysis[J]. Medicine, 2017, 96(5): e6001.
- [26] DINARELLO C A, VAN DER MEER J W. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans[J]. Semin Immunol, 2013, 25(6): 469-484.
- [27] 王道军, 王晨, 伍权, 等. 黄芪注射液对胃癌大鼠血清炎症机制、p53、STAT3、VEGF表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(18): 4405-4407.
- [28] HIKITA T, KUWAHARA A, WATANABE R, et al. Src in endosomal membranes promotes exosome secretion and tumor progression[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): e3265.
- [29] KUNZMANN A T, MURRAY L J, CARDWELL C R, et al. PTGS2(Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review[J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2013, 22(9): 1490-1497.
- [30] LI D D, REN W Y, JIANG Z L, et al. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 18(5): 4399-4409.
- [31] HARRIS J, LANG T, THOMAS J P W, et al. Autophagy and inflammasomes[J]. Molecular Immunology, 2007, 86: 10-15.
- [32] JI G, CHEN R, ZHENG J. Atractylenolide I inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via mitogen-activated protein kinase pathways in RAW264.7 cells[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(6): 420-425.
- [33] YIN H, GUO Q, LI X, et al. Curcumin suppresses IL-1 β secretion and prevents inflammation through inhibition of the NLRP3 inflammasome [J]. J Immunol, 2018, 200(8): 2835-2846.
- [34] YUAN L, ZHANG F, SHEN M, et al. Phytosterols suppress phagocytosis and inhibit inflammatory mediators via ERK pathway on LPS-triggered inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and the correlation with their structure[J]. Foods, 2019, 8(11): e8110582.
- [35] HE C, YANG J, JIANG X, et al. Kaempferol alleviates LPS-ATP mediated inflammatory injury in splenic lymphocytes via regulation of the pyroptosis pathway in mice[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2019, 41(5): 538-548.
- [36] CHOE J Y, KIM S K. Quercetin and ascorbic acid suppress fructose-induced NLRP3 inflammasome activation by blocking intracellular shuttling of TXNIP in human macrophage cell lines[J]. Inflammation, 2017, 40(3): 980-994.
- [37] WU L, ZHANG Q, MO W, et al. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- β 1/Smads and PI3K/Akt pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): e9289.
- [38] XUE Y, DU M, ZHU M J. Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by escherichia coli O157: H7[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 108: 760-769.

(编辑: 邹元平)