

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.02.012

典型升浮中药和沉降中药潜在作用靶点 网络药理学及大鼠体内验证研究

张贝贝, 曾梦楠, 王亚奎, 张钦钦, 王茹, 傅阳, 冯卫生, 郑晓珂✉

河南中医药大学, 河南省郑州市金水东路156号, 450046



[摘要] **目的** 探究典型升浮中药和沉降中药的潜在作用靶点。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台检索并筛选升浮中药(麻黄、柴胡、升麻、葛根、桔梗、薄荷)和沉降中药(葶苈子、旋覆花、刀豆、川牛膝、茯苓、苦杏仁、丁香)的靶点;以病位在表(风寒表证、风水水肿)、病位在里(痰饮停聚、肺水)、病势下陷(胃缓、心衰)、病势上逆(呕吐、肝阳上亢)在GeneCards数据库检索病症靶点。取升浮中药与病位在表、病势下陷病症的共有靶点,推测其可能为升浮中药的潜在作用靶点;取沉降中药与病位在里、病势上逆病症的共有靶点,推测其可能为沉降中药的潜在作用靶点。再进行动物实验验证:将140只雄性SD大鼠分为正常对照组、麻黄组(4.2 g/kg)、柴胡组(7 g/kg)、升麻组(7 g/kg)、葛根组(10.5 g/kg)、桔梗组(7 g/kg)、薄荷组(4.2 g/kg)、葶苈子组(7 g/kg)、旋覆花组(6.3 g/kg)、刀豆组(6.3 g/kg)、川牛膝组(7 g/kg)、茯苓组(10.5 g/kg)、苦杏仁组(7 g/kg)和丁香组(2.1 g/kg),每组10只,以1ml/100g灌胃体积连续灌胃相应药物14天。根据网络药理学研究结果,采用实时荧光定量PCR法检测大鼠肺组织中胰岛素生长因子2(IGF-2)、己糖激酶2(HK-2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、毒蕈碱乙酰胆碱受体M3(CHRM3)、毒蕈碱乙酰胆碱受体M1(CHRM1)和糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)的mRNA水平;采用Western Blot法和免疫组化法检测CHRM3、CHRM1和PPAR- γ 蛋白水平。**结果** 网络药理学结果显示,升浮中药潜在作用靶点为IGF-2和HK-2,沉降中药潜在作用靶点有PPAR- γ 、CHRM3、CHRM1和GSK-3 β 。mRNA及蛋白检测结果显示,与正常对照组比较,麻黄组、柴胡组、升麻组、葛根组、桔梗组、丁香组和刀豆组CHRM3水平均显著降低,苦杏仁组CHRM3水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);葛根组和桔梗组CHRM1水平显著降低,薄荷组、葶苈子组、旋覆花组、川牛膝组、茯苓组、丁香组、苦杏仁组和刀豆组CHRM1水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);麻黄组、升麻组、葛根组和桔梗组PPAR- γ 水平显著降低,旋覆花组、川牛膝组、茯苓组、苦杏仁组PPAR- γ 水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 典型升浮中药和沉降中药潜在作用靶点主要为CHRM3、CHRM1和PPAR- γ 。

[关键词] 升浮中药;沉降中药;作用靶点;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;毒蕈碱乙酰胆碱受体

中药升降浮沉理论概括了药物对人体作用的趋向性,主要解释中药对于疾病病症、病势发展趋向的影响^[1]。“升”即上升提举,趋向于上;“降”即下达降逆,趋向于下;“浮”即向外发散,趋向于外;“沉”即向内收敛,趋向于内^[2]。升浮中药多主上行而向外,有升阳、发表、散寒、涌吐等作

用;沉降中药多主下行而向内,有潜阳、降逆、泻下、渗湿等功效。因此,在临床用药时,病位在上在表者宜升浮不宜沉降,病位在下在里者宜沉降不宜升浮,病势上逆者宜降不宜升,病势下陷者宜升不宜降^[3]。但升降浮沉药性理论仍是抽象的,概念多为医家经验所记载,缺乏具体实验数据的阐释。临床用药应遵循“顺病位、逆病势”的辨证思想^[4]。基于药物的升降浮沉性能和“顺病位、逆病势”的用药原则,推测典型升浮中药对病位在上在表以及病势下陷病症作用的靶点可能为升浮药性的

基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究专项(2019YFC1708800);河南省高层次人才特殊支持“中原千人计划”(ZY-QR201810080)

✉ 通讯作者:zhengxk.2006@163.com,(0370)60190296

潜在作用靶点, 典型沉降中药对病位在下在里以及病势上逆病症作用的靶点可能为沉降药性的潜在作用靶点。

本课题组前期研究发现, 温热性中药能促进能量代谢, 寒凉性中药能抑制能量代谢^[5]。因此, 本课题组根据前期研究结果^[6-7], 选用临床上常用典型升浮中药(麻黄、柴胡、升麻、葛根、桔梗、薄荷)及沉降中药(葶苈子、丁香、苦杏仁、旋覆花、茯苓、刀豆、川牛膝), 采用网络药理学和体内实验验证的方法探究升浮中药和沉降中药的潜在靶点。本研究通过河南中医药大学动物伦理委员会伦理审批, 伦理号: DWLL2018080003。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠雄性 140 只, 体质量 180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0011。饲养于清洁级动物房中, 12 h 光照, 恒温 24 ℃, 湿度 35%, 自由饮食、饮水。

1.2 药物

典型升浮中药包括麻黄、柴胡、升麻、葛根、薄荷、桔梗, 典型沉降中药包括丁香、苦杏仁、川牛膝、茯苓、刀豆、旋覆花、葶苈子。均取 1 kg 的药材, 麻黄、柴胡、升麻、葛根、桔梗、薄荷、川牛膝、茯苓、丁香和旋覆花提前 10 倍量水浸泡 30 min, 葶苈子、刀豆和苦杏仁提前 10 倍量水浸泡 50 min, 然后水煎煮两次, 每次 1 h, 合并滤液, 纱布过滤后, 滤液浓缩, 得到各药材的水煎液总提物, 含生药材浓度分别为 0.42、0.7、0.7、1.05、0.42、0.7、0.21、0.7、0.7、1.05、0.63、0.63、0.7、0.7 g/ml。

1.3 主要试剂与仪器

SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号: 64136301), 美国 Bio-Rad 公司; 一抗毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3 (CHRM3, 货号: A1602)、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1 (CHRM1, 货号: A12323)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ , 货号: A0270)、 β 肌动蛋白 (β -actin 抗体, 货号: AC026), ABclonal 公司; 二抗山羊抗兔(货号: 925-68071)和山羊抗鼠(货号: 925-32210), 美国 Li-Cor 公司; HiScript III RT SuperMix (货号: R323-01)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (货号: Q711-02), 南京诺维赞生物科技股份有限公司; 总 RNA 提取试剂盒(货号: R1200)、全蛋白提取试剂盒(货号:

BC3710)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: PC0020), 北京索莱宝科技有限公司。

ABI QuantStudio 5 型实时荧光定量 PCR 系统(美国赛默飞世尔公司); BioTek 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); BX53 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司); Odyssey-CLx 型双色红外荧光成像系统(美国 Li-Cor 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 典型升浮中药和沉降中药相关靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP, <https://tcmsp.w.com/tcmsp.php>), 以“麻黄”“柴胡”“升麻”“葛根”“桔梗”“薄荷”“葶苈子”“旋覆花”“川牛膝”“茯苓”“丁香”“苦杏仁”和“刀豆”为关键词检索其化学成分, 并以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 为标准进行活性成分筛选, 利用 TCMSP 检索收集活性成分所对应靶点。基于 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)和 Perl 5.30.2.1 软件将已筛选出的靶蛋白名称进行基因注释。

2.1.2 病症潜在靶点的筛选 病位: 1) 风寒表证和风水水肿病位均在表。风寒表证是指由于风寒袭表、肺气不宣而出现的病位在表病证^[8]; 风水水肿是由于风邪袭肺, 肺失宣肃, 不能通调水道, 表现为发病较快、水肿发展迅速并伴有风邪表证的病证^[9]。2) 痰饮停聚和肺水病位均在里。痰饮停聚指痰饮内伏于肺, 遇外淫、饮食、情志、劳倦等诱因而引触, 以致痰阻气道, 肺失肃降, 肺气上逆, 痰气搏击而发出痰鸣气喘声, 久而久之会出现气喘咳逆、面赤、头晕目眩等痰热内郁表现^[10]; 肺水是由于水停不化、肺气不得肃降, 肺之输布津液功能失调, 出现水液代谢异常、其形如肿等症状^[11]。

病势: 1) 胃缓和心衰病势均向下。心衰是由于胸中大气虚极下陷, 心司呼吸、贯心脉的功能受损引起的病症^[12]; 胃缓是由于脾胃虚弱, 中气下陷, 升提失司而至虚损下坠的病症^[13]。2) 呕吐和肝阳上亢病势均向上。呕吐是由胃失和降, 气逆于上所致的病证^[14]; 肝阳上亢的主要病因病机与肝肾两脏的阴阳偏盛和偏衰有关, 并以“阴虚阳亢”为中心, 表现为上实下虚之候^[15]。

基于 GeneCards 数据库(<https://www.genecards>).

org/), 以“风寒表证”“风水水肿”“痰饮停聚”“肺水”“胃缓”“心衰”“呕吐”和“肝阳上亢”为关键词进行检索疾病靶点。

2.1.3 药物-病症交集靶点筛选 通过 jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 将典型升浮中药有效靶点与“风寒表证”“风水水肿”“胃缓”和“心衰”相关的病症靶点进行映射建立 Venn 图, 筛选升浮中药潜在靶点; 将典型沉降中药有效靶点与“痰饮停聚”“肺水”“呕吐”和“肝阳上亢”相关的病症靶点进行映射建立 Venn 图, 筛选沉降中药潜在靶点。

2.2 动物实验研究

2.2.1 动物分组及给药 雄性 SD 大鼠 140 只, 适应性喂养 1 周后根据体质量由大到小依次进行分组, 第一次从第一组开始直到最后一组, 每组 1 只, 第二次从第二组开始直到最后一组, 然后再将第一组补齐 2 只, 依次进行直至将大鼠均匀分到每组。分为正常对照组、麻黄组 (4.2 g/kg)、柴胡组 (7 g/kg)、升麻组 (7 g/kg)、葛根组 (10.5 g/kg)、薄荷组 (4.2 g/kg)、桔梗组 (7 g/kg)、丁香组 (2.1 g/kg)、苦杏仁组 (7 g/kg)、川牛膝组 (7 g/kg)、茯苓组 (10.5 g/kg)、刀豆组 (6.3 g/kg)、旋覆花组 (6.3 g/kg)、葶苈子组 (7 g/kg), 每组 10 只。参照课题组前期对寒热药性研究的给药剂量, 结合麻黄具强烈的发汗作用和不可多服、令人虚的特征^[16], 除麻黄外其余药物均参考《中华人民共和国药典 (2020 年版)》^[17] 人用量折算为鼠的用量^[18] 的 42 倍量进行给药, 麻黄为 28 倍量。正常对照组大鼠灌胃 1 ml/100 g 蒸馏水。各组均每天 1 次, 持续 14 天。

2.2.2 实时荧光定量 PCR 检测大鼠肺组织药物-病症交集靶点 mRNA 表达 根据网络药理学研究结果, 14 天后提取大鼠肺组织总 RNA, 使用 HiScript

III RT SuperMix 预混液进行逆转录得到 cDNA, 最后采用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 预混液, 以实时荧光定量 PCR 对 CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、己糖激酶 2 (HK-2) 和胰岛素生长因子 2 (IGF-2) 的 mRNA 水平进行分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 以 GAPDH 为内参基因计算 mRNA 相对表达量。大鼠引物序列见表 1, 引物由武汉塞维尔生物有限公司设计合成。

2.2.3 Western Blot 检测大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达 在检测典型升浮和沉降中药对 CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 、GSK-3 β 、HK-2 和 IGF-2 mRNA 表达的影响时, 发现典型升浮和沉降中药对 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 具有较强的规律性, 因此选择这 3 个指标继续观察蛋白表达。取大鼠肺组织, 采用全蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 并使用 BCA 法进行蛋白定量。每孔蛋白上样量 60 μ g 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干法电转移至 PVDF 膜, 封闭 1.5 h 后, 加入一抗 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 抗体, 稀释比例均为 1:1000, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 回收一抗, PBST 洗 5 次, 每次 5 min, 加入二抗, 稀释比例为 1:20 000~1:30 000, 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min。Odyssey 双色红外荧光成像系统进行成像, 采用 Image Studio 5.2.5 软件进行数据分析。

2.2.4 免疫组化法检测大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达 将新鲜肺组织标本经组织固定液固定等步骤制成蜡块, 5 μ m 切片, 然后脱蜡、水化, 柠檬酸盐缓冲液回收抗原, 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 20 min, 冲洗后微波加热修复抗原, 3% BSA 封闭 30 min, 滴加一抗 (1:200 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤, 滴加生物素标记的羊抗兔二抗 (1:2000 稀释) 室温孵育 1 h, DAB 显色, 苏木精复染 3 min。将切片依次放入 75% 酒

表 1 引物合成序列

名称	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')	长度/bp
CHRM3	ACCAGGGCCATCTATTCCATT	ACGGCAGACTCTAACTGGATGG	224
CHRM1	GCTGGTTTCCTTCGTTCTCTG	ACACATGACCGTGACAGGGAG	166
PPAR- γ	CCCTTTACCACGGTTGATTTC	CTTCAATCGGATGGTTCTTCG	321
GSK-3 β	ACCTGCCCTCTTCAACTTTACC	GTGAGGAGGGATAAGGATGGTG	76
HK-2	TTGCGGACCGTGTTTGATGT	CTTGAGCGCTCTGAGATGC	171
IGF-2	CCGTGGCATCGTGGAAGAGT	CTCCAGGTGTGCAATTGAAGAAC	171
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	138

注: CHRM3, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3; CHRM1, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; HK-2, 己糖激酶 2; IGF-2, 胰岛素生长因子 2。

精 5 min, 85% 酒精 5 min, 无水乙醇 15 min, 无水乙醇 II 5 min, 二甲苯 5 min 中脱水透明, 晾干切片, 最后中性树胶封片。显微镜镜检, 图像采集分析。

2.3 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行数据分析,实验数据均符合正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者组间比较采用LSD法,方差不齐者组间比较采用Tamhane's T^2 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 典型升浮中药和沉降中药的网络药理学研究结果

图1示, 典型升浮中药共有的靶点9个, 为 NCOA1、PRSS1、AR、IGF-2、HK-2、PGR、NCOA2、

PTGS1 和 PLAU；典型沉降中药共有的靶点 10 个，为 CHRM1、PPAR- γ 、NR3C2、CHRM3、AKR1B1、GSK-3 β 、PGR、NCOA2、PTGS1 和 PLAU；排除升浮中药和沉降中药共有靶点后，升浮中药共有且特有的靶点为 NCOA1、PRSS1、AR、IGF-2、HK-2，沉降中药共有且特有的靶点为 CHRM1、PPAR- γ 、NR3C2、CHRM3、AKR1B1、GSK-3 β 。图 2 示，将病位在表的风水水肿和风寒表证以及病势下陷的胃缓和心衰疾病靶点取交集得到 413 个共有基因，将病位在里的肺水和痰饮停聚以及病势上逆的呕吐和肝阳上亢疾病靶点取交集得到 945 个共有基因。

将升浮中药与病位在表和病势下陷病症靶点的交集靶点有 IGF2 和 HK2, 即升浮中药的潜在靶点有 IGF-2 和 HK-2, 沉降中药与病位在里和病势上逆病症靶点交集基因有 PPAR- γ 、CHRM3、CHRM1

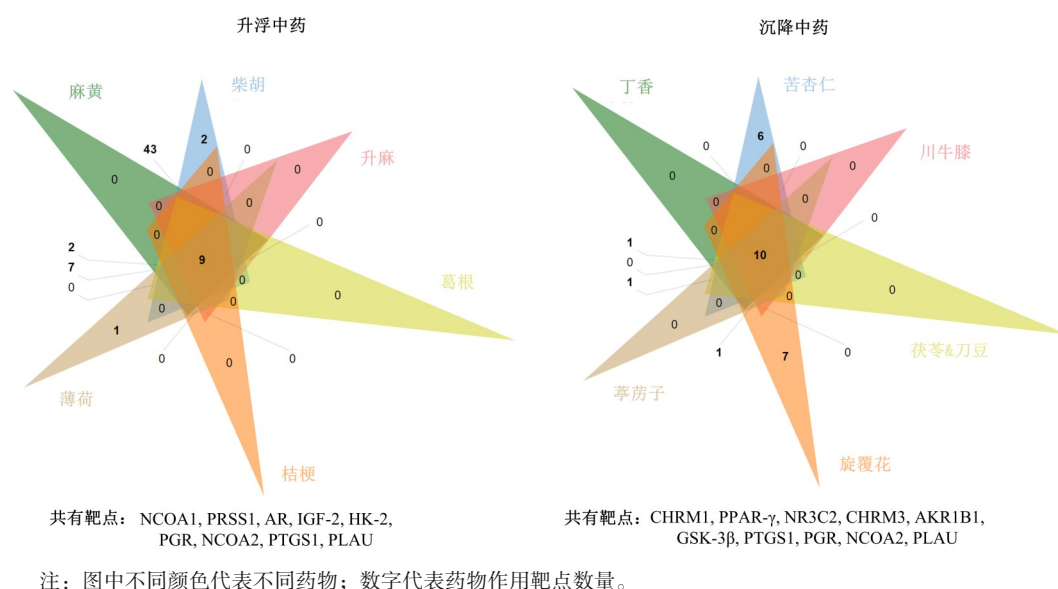


图1 网络药理学预测升浮中药和沉降中药的靶点数量

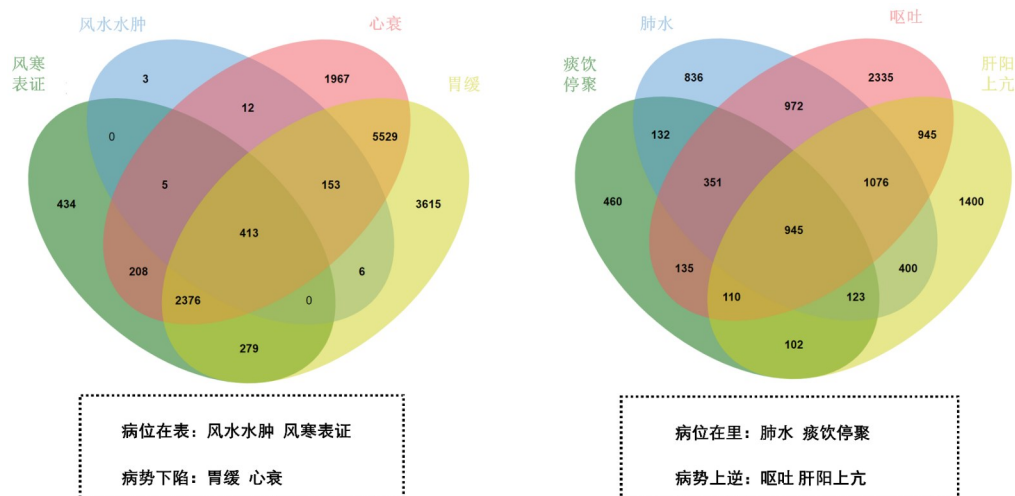


图2 网络药理学预测病位在表在里和病势下陷上逆的疾病靶点

和 GSK-3 β , 即沉降中药潜在的靶点有 PPAR- γ 、CHRM3、CHRM1 和 GSK-3 β 。

3.2 各组大鼠肺组织 CHRM3、GSK-3 β 、HK-2、PPAR- γ 、IGF-2 和 CHRM1 mRNA 表达比较

表 2、表 3 示, 与正常对照组比较, 除薄荷组外, 其余升浮中药组大鼠 CHRM3 mRNA 水平均显著降低, 沉降中药丁香组和刀豆组 CHRM3 mRNA 水平显著降低, 苦杏仁组 CHRM3 mRNA 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 麻黄组、柴胡组、桔梗组、葶苈子组、旋覆花组和苦杏仁组 GSK-3 β mRNA 水平显著升高, 升麻组、葛根组、薄荷组和茯苓组 GSK-3 β mRNA 水平显著降低 ($P<0.01$); 旋覆花组、川牛膝组、丁香组 HK-2 mRNA 水平显著升高, 柴胡组、升麻组、葛根组、桔梗组、薄荷组、茯苓组、苦杏仁组和刀豆组 HK-2 mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 升浮中药除柴胡组和薄荷组外其余各药物组 PPAR- γ mRNA 水平显著降低, 沉降中药除葶苈子组、丁香组和刀豆组外其余各药物组 PPAR- γ mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$); 葶苈子组、川牛膝组和刀豆组及升浮中药

除薄荷组外其余各药物组 IGF-2 mRNA 水平显著降低, 薄荷组、茯苓组、丁香组和苦杏仁组 IGF-2 mRNA 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 葛根组和桔梗组 CHRM1 mRNA 水平显著降低 ($P<0.01$), 薄荷组及沉降中药各药物组 CHRM1 mRNA 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.3 各组大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达 Western Blot 检测结果比较

表 4、表 5 示, 与正常对照组比较, 升浮中药各组以及沉降中药丁香组、刀豆组 CHRM3 蛋白水平显著降低, 苦杏仁组 CHRM3 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 升浮中药葛根组和桔梗组 CHRM1 蛋白水平显著降低, 沉降中药各药物组 CHRM1 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 升浮中药除柴胡组和薄荷组外其余各药物组 PPAR- γ 蛋白水平显著降低, 沉降中药除葶苈子组、丁香组和刀豆组外其余各药物组 PPAR- γ 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 蛋白电泳图见附件 (请扫描本文二维码获取)。

表 2 升浮中药对正常大鼠肺组织 CHRM3、GSK-3 β 、HK-2、PPAR- γ 、IGF-2 和 CHRM1 基因 mRNA 表达的影响 (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHRM3	GSK-3 β	HK-2	PPAR- γ	IGF-2	CHRM1
正常对照组	10	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.11
麻黄组	10	0.87 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.17 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.00 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.82 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.73 $\pm$ 0.12
柴胡组	10	0.50 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.15 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.72 $\pm$ 0.01 ^{b)}	1.03 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.10 $\pm$ 0.05
升麻组	10	0.72 $\pm$ 0.07 ^{b)}	0.82 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.63 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.73 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.65 $\pm$ 0.07 ^{b)}	0.90 $\pm$ 0.16
葛根组	10	0.50 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.65 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.70 $\pm$ 0.13 ^{b)}	0.60 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.54 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.79 $\pm$ 0.10 ^{b)}
桔梗组	10	0.83 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.12 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.80 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.86 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.58 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.56 $\pm$ 0.00 ^{b)}
薄荷组	10	1.06 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.54 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.17 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.09 ^{b)}	1.68 $\pm$ 0.40 ^{b)}

注: CHRM3, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; HK-2, 己糖激酶 2; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; IGF-2, 胰岛素生长因子 2; CHRM1, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1。

a) 与正常对照组比较, $P<0.05$; b) 与正常对照组比较, $P<0.01$ 。

表 3 沉降中药对正常大鼠肺组织 CHRM3、GSK-3 β 、HK-2、PPAR- γ 、IGF-2 和 CHRM1 基因 mRNA 表达的影响 (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHRM3	GSK-3 β	HK-2	PPAR- γ	IGF-2	CHRM1
正常对照组	10	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.04
葶苈子组	10	0.96 $\pm$ 0.05	1.16 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.90 $\pm$ 0.03	1.05 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.01 ^{b)}	1.88 $\pm$ 0.08 ^{b)}
旋覆花组	10	0.96 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.24 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.48 $\pm$ 0.05 ^{b)}	1.01 $\pm$ 0.02	1.38 $\pm$ 0.08 ^{a)}
川牛膝组	10	0.97 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.14 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.91 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.45 $\pm$ 0.27 ^{a)}
茯苓组	10	0.88 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.76 $\pm$ 0.18 ^{b)}	1.32 $\pm$ 0.08 ^{b)}	1.07 $\pm$ 0.03 ^{a)}	1.90 $\pm$ 0.22 ^{b)}
丁香组	10	0.86 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.94 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.97 $\pm$ 0.05	1.17 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.85 $\pm$ 0.04 ^{b)}
苦杏仁组	10	1.22 $\pm$ 0.13 ^{b)}	1.25 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.66 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.46 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.43 $\pm$ 0.06 ^{b)}	2.04 $\pm$ 0.40 ^{b)}
刀豆组	10	0.69 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.01 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.07 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.45 $\pm$ 0.07 ^{a)}

注: CHRM3, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; HK-2, 己糖激酶 2; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; IGF-2, 胰岛素生长因子 2; CHRM1, 毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1。

a) 与正常对照组比较, $P<0.05$; b) 与正常对照组比较, $P<0.01$ 。

表 4 升浮中药对正常大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达 Western Blot 检测结果比较
(/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHRM3	CHRM1	PPAR- γ
正常对照组	10	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.13
麻黄组	10	0.68 $\pm$ 0.13 ^{a)}	0.83 $\pm$ 0.16	0.71 $\pm$ 0.02 ^{b)}
柴胡组	10	0.48 $\pm$ 0.18 ^{b)}	0.92 $\pm$ 0.13	1.10 $\pm$ 0.16
升麻组	10	0.52 $\pm$ 0.20 ^{b)}	0.88 $\pm$ 0.22	0.68 $\pm$ 0.11 ^{b)}
葛根组	10	0.61 $\pm$ 0.14 ^{b)}	0.44 $\pm$ 0.10 ^{b)}	0.71 $\pm$ 0.16 ^{b)}
桔梗组	10	0.72 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.62 $\pm$ 0.17 ^{a)}	0.64 $\pm$ 0.11 ^{b)}
薄荷组	10	0.61 $\pm$ 0.08 ^{a)}	0.90 $\pm$ 0.23	2.09 $\pm$ 0.29 ^{b)}

注：CHRM3，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3；CHRM1，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1；PPAR- γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。
a) 与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常对照组比较， $P<0.01$ 。

表 5 沉降中药对正常大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达 Western Blot 检测结果比较
(/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHRM3	CHRM1	PPAR- γ
正常对照组	10	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.08
葶苈子组	10	0.92 $\pm$ 0.06	1.49 $\pm$ 0.08 ^{a)}	1.03 $\pm$ 0.06
旋覆花组	10	0.93 $\pm$ 0.06	1.63 $\pm$ 0.11 ^{a)}	1.23 $\pm$ 0.07 ^{b)}
川牛膝组	10	0.96 $\pm$ 0.04	1.62 $\pm$ 0.10 ^{a)}	1.28 $\pm$ 0.08 ^{b)}
茯苓组	10	0.91 $\pm$ 0.06	2.01 $\pm$ 0.72 ^{b)}	1.15 $\pm$ 0.07 ^{b)}
丁香组	10	0.78 $\pm$ 0.04 ^{b)}	2.30 $\pm$ 0.15 ^{b)}	1.01 $\pm$ 0.05
苦杏仁组	10	1.10 $\pm$ 0.05 ^{a)}	2.08 $\pm$ 0.10 ^{b)}	1.18 $\pm$ 0.04 ^{a)}
刀豆组	10	0.84 $\pm$ 0.04 ^{b)}	1.64 $\pm$ 0.23 ^{a)}	1.01 $\pm$ 0.07

注：CHRM3，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3；CHRM1，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1；PPAR- γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。
a) 与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常对照组比较， $P<0.01$ 。

3.4 各组大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达免疫组化法检测结果比较

表 6 示，与正常对照组比较，麻黄组、柴胡组、升麻组、葛根组、桔梗组、薄荷组、丁香组和刀豆组 CHRM3 蛋白表达均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；葛根组和桔梗组 CHRM1 蛋白表达显著降低，葶苈子组、旋覆花组、川牛膝组、茯苓组、丁香组和刀豆组 CHRM1 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；麻黄组、葛根组、桔梗组和刀豆组 PPAR- γ 蛋白表达均显著降低，旋覆花组、川牛膝组和茯苓组 PPAR- γ 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白免疫组化图片见附件（请扫描本文二维码获取）。

表 6 各组大鼠肺组织 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 蛋白表达免疫组化检测结果比较 (/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	CHRM3	CHRM1	PPAR- γ
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.19
麻黄组	0.42 $\pm$ 0.13 ^{a)}	1.02 $\pm$ 0.23	0.82 $\pm$ 0.10 ^{b)}
柴胡组	0.28 $\pm$ 0.10 ^{a)}	1.00 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.20
升麻组	0.48 $\pm$ 0.07 ^{a)}	1.05 $\pm$ 0.14	0.88 $\pm$ 0.10
葛根组	0.38 $\pm$ 0.08 ^{a)}	0.67 $\pm$ 0.12 ^{a)}	0.79 $\pm$ 0.14 ^{a)}
桔梗组	0.34 $\pm$ 0.08 ^{a)}	0.51 $\pm$ 0.12 ^{a)}	0.79 $\pm$ 0.08 ^{b)}
薄荷组	0.79 $\pm$ 0.14 ^{b)}	0.84 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.15
葶苈子组	0.92 $\pm$ 0.12	1.34 $\pm$ 0.24 ^{a)}	0.86 $\pm$ 0.11
旋覆花组	0.88 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.13 ^{a)}	1.30 $\pm$ 0.19 ^{a)}
川牛膝组	0.90 $\pm$ 0.07	1.24 $\pm$ 0.07 ^{b)}	1.37 $\pm$ 0.15 ^{a)}
茯苓组	0.89 $\pm$ 0.16	1.25 $\pm$ 0.13 ^{b)}	1.36 $\pm$ 0.12 ^{a)}
丁香组	0.75 $\pm$ 0.04 ^{a)}	1.46 $\pm$ 0.07 ^{a)}	0.90 $\pm$ 0.17
苦杏仁组	1.09 $\pm$ 0.20	1.15 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.20
刀豆组	0.70 $\pm$ 0.16 ^{a)}	1.24 $\pm$ 0.20 ^{b)}	0.70 $\pm$ 0.10 ^{a)}

注：CHRM3，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3；CHRM1，毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1；PPAR- γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。
a) 与正常对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常对照组比较， $P<0.05$ 。

4 讨论

升降浮沉药性理论在临床遣方用药过程中发挥着重要的作用。临床用药应遵循“顺病位、逆病势”的辨证思想，利用药势调节脏腑气机紊乱，使之恢复正常的生理功能，亦或作用于机体的不同部位以因势利导、驱邪外出，从而达到治疗疾病的目的^[4]。本研究选择升浮中药（麻黄、柴胡、升麻、葛根、桔梗、薄荷）对病位在表（风寒表证、风水水肿）及病势下陷病症（胃缓、心衰）采用网络药理学方法对升浮中药潜在作用靶点进行研究，选择沉降中药（葶苈子、旋覆花、刀豆、川牛膝、茯苓、苦杏仁、丁香）对病位在里（肺水、痰饮停聚）及病势上逆病症（呕吐、肝阳上亢）采用网络药理学方法对沉降中药潜在作用靶点进行研究。结果发现，升浮中药和病位在表、病势下陷病症共同靶点有 IGF-2 和 HK-2，且这 2 个靶点是沉降中药不具有的；沉降中药和病位在里、病势上逆病症共同靶点有 CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 和 GSK-3 β ，且这 4 个靶点是升浮中药不具有的。基于药物的升降浮沉性能和“顺病位、逆病势”治疗原则，初步推测 IGF-2 和 HK-2 可能为升浮中药潜在作用靶点，CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 和 GSK-3 β 可能为沉降中药潜在作用靶点。因此，对此 6 个靶点进行了动物实验研究，以验证网络药理学预测的靶点。
动物实验结果表明，升浮中药除薄荷外均可显

著抑制大鼠肺组织 CHRM3 mRNA 及蛋白的表达, 沉降中药除丁香、苦杏仁和刀豆外其余各药物对 CHRM3 mRNA 及蛋白表达作用不显著。升浮中药除薄荷和柴胡外其余各药物对 PPAR- γ 和 CHRM1 的表达整体呈现抑制作用, 沉降中药除丁香和刀豆外可整体促进大鼠肺组织 PPAR- γ 和 CHRM1 的表达。升浮中药和沉降中药对大鼠肺组织 GSK-3 β 、HK-2 和 IGF-2 的表达不具明显规律性。因此, 升浮中药和沉降中药对网络药理学预测靶点作用规律较为显著的是 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 。CHRM3 和 CHRM1 为毒蕈碱型乙酰胆碱受体, 乙酰胆碱受体是一种跨膜蛋白受体, 结合神经递质乙酰胆碱而起到信号传递的作用。其中 M 受体主要分布在副交感神经纤维所支配的效应器上, 乙酰胆碱作用于 M 受体时主要表现为心脏活动的抑制、促进汗腺分泌、肺血管松弛等^[19]。CHRM1 可引起气道狭窄、气道上皮细胞增生、气道炎症和肺血管松弛^[20]。气的升降出入离不开肺、脾、肾, 肺主气、司呼吸, 肺气的升降出入运动对全身气机具有重要的调节作用。肺主宣发功能可以使津液和水谷精微布散周身、外达皮毛, 也可将津液化为汗液排出体外。故而推测, CHRM1 和 CHRM3 可能与肺气的宣发功能有关。PPAR- γ 是核激素受体超家族的一部分, 在能量、葡萄糖及脂质代谢, 炎症基因表达与脂肪生成等过程中发挥着关键作用^[21]。肝主疏泄和藏血, 肝主疏泄对气机的调畅与否具有重要作用, 同时影响着津血运行和脾胃运化。因此推测, PPAR- γ 可能与肝主疏泄的生理功能相关。

综上, 本研究采用网络药理学方法筛选出 IGF-2 和 HK-2 可能是升浮中药的潜在作用靶点, CHRM3、CHRM1、PPAR- γ 和 GSK-3 β 可能为沉降中药的潜在作用靶点。升浮中药和沉降中药对正常动物的影响主要体现在 CHRM3、CHRM1 和 PPAR- γ 靶点。本研究尚存在局限性, 因为中药升降浮沉药性理论主要针对疾病而言, 所以在正常动物体内研究找到升浮中药和沉降中药的规律后, 还需采用相应的动物模型对升浮中药和沉降中药的作用规律进行验证。因此, 我们下一步将采用某一味升浮或沉降中药对应的动物模型, 对其升浮或沉降药性的潜在作用靶点进一步研究以验证升浮和沉降中药的作用规律。

参考文献

[1] 陈勇, 杨敏, 闵志强, 等. 析中药升降浮沉渊源流变

[J]. 四川中医, 2016, 34(10): 17-20.

- [2] 史伟. 中药的升降浮沉[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2018, 7(4): 151-155.
- [3] 项丽玲, 李艳, 苗明三. 升降浮沉药性现代药理研究的分析与思考[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5269-5272.
- [4] 钟赣生. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 27-28.
- [5] 克迎迎, 袁培培, 王小兰, 等. 桑白皮化学拆分组分对正常大鼠物质代谢与能量代谢的影响[J]. 世界中医药, 2015, 10(12): 1847-1853.
- [6] 刘璐, 严季澜, 李柳骥. 张元素、陈士铎对药物升降浮沉理论认识的比较[J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2017-2019.
- [7] 傅阳, 袁培培, 侯颖, 等. 基于 GnRHR 信号通路探讨升浮药麻黄与沉降药葶苈子干预哮喘作用差异[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2553-2562.
- [8] 郝万山. 伤寒论讲稿[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 32-35.
- [9] 韦绪性, 杨德全. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 300-301.
- [10] 刘燕池. 中医基础理论讲稿[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 177-179.
- [11] 韦绪性, 杨德全. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 94-96.
- [12] 余小萍, 方祝元. 中医内科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 182.
- [13] 唐旭东, 张声生, 温艳东. 常见脾胃病中医临床实践指南[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2019: 165-170.
- [14] 陈蕾蕾. 中医呕吐病症源流与古今文献研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2020: 1.
- [15] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 74-75.
- [16] 钟赣生. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 56.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 12-394.
- [18] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [19] 丛馨, 闵赛南, 吴立玲, 等. 激活毒蕈碱乙酰胆碱受体调控下颌下腺分泌的机制研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2019, 51(103): 390-396.
- [20] MAEDA Y, HIZAWA N, JINUSHI E, et al. Polymorphisms in the cholinergic receptor, muscarinic 1 (CHRM1) gene confer susceptibility to asthma in Japanese [J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(2): S200.
- [21] 陈超, 张瑞芬, 张海荣. PPAR- γ 与动脉粥样硬化及其危险因素的相关研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13(9): 1146-1147.

Network Pharmacology and In Vivo Validation of Potential Targets of Typical Ascending and Floating, Descending and Sinking Chinese Medicinals

ZHANG Beibei, ZENG Mengnan, WANG Yaxi, ZHANG Qinqin, WANG Ru, FU Yang, FENG Weisheng, ZHENG Xiaoke

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046

ABSTRACT **Objective** To explore the potential action targets of typical ascending and floating Chinese medicinals and descending and sinking medicinals. **Methods** Firstly, the targets of ascending and floating Chinese medicinals including Mahuang (*Herba Ephedrae*), Chaihu (*Radix Bupleuri*), Shengma (*Rhizoma Cimicifuga*), Gegen (*Radix Puerariae Lobatae*), Jiegeng (*Radix Platycodonis*), Bohe (*Herba Menthae*), and descending and sinking Chinese medicinals including Tinglizi (*Semen Lepidii*), Xuanfuhua (*Flos Inulae*), Daodou (*Semen Canavaliae*), Chuanniuxi (*Radix Cyathulae*), Fuling (*Poria*), Kuxinren (*Semen Armeniacae Amarum*), and Dingxiang (*Flos Caryophylli*) were searched and selected through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform. Disease targets were searched in GeneCards database with the keywords “wind-cold exterior syndrome” and “wind-water edema” (the disease is located at the exterior), “phlegm-rheum retention” and “pulmonary edema” (the disease is located at the interior), “down-bearing stomachache” and “heart failure” (sinking tendency of disease), and “vomitting” and “liver-yang hyperactivity” (upward reversal of disease tendency). The intersection genes of ascending and floating Chinese medicinals and the diseases location at the exterior and sinking tendency of disease may be the potential targets for the ascending and floating Chinese medicinals; the intersection genes of descending and sinking Chinese medicinals and the disease location at the interior and the upward reversal of disease tendency may be the potential targets for descending and sinking Chinese medicinals. Animal validation experiment: 140 male SD rats were divided into normal control group, Mahuang (4.2 g/kg) group, Chaihu (7 g/kg) group, Shengma (4.2 g/kg) group, Gegen (10.5 g/kg) group, Jiegeng (7 g/kg) group, Bohe (4.2 g/kg) group, Tinglizi (7 g/kg) group, Xuanfuhua (6.3 g/kg) group, Daodou (6.3 g/kg) group, Chuanniuxi (7 g/kg) group, Fuling (10.5 g/kg) group, Kuxingren (7 g/kg) group and Dingxiang (2.1 g/kg) group, with 10 rats in each group. Corresponding Chinese medicinals were given by gavage at the volume of 1 ml/100 g for 14 days. According to the results of network pharmacology, real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA levels of insulin-like growth factor 2 (IGF-2), hexokinase2 (HK-2), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), cholinergic receptor muscarinic 3 (CHRM3), muscarinic cholinergic receptor 1 (CHRM1) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Western Blot and immunohistochemical methods were used to detect the protein levels of CHRM3, CHRM1 and PPAR- γ . **Results** Using network pharmacology, the potential targets of ascending and floating medicinals were IGF-2 and HK-2, and those of descending and sinking medicinals were PPAR- γ , CHRM3, CHRM1 and GSK-3 β . The detection of mRNA and proteins showed that compared to normal control group, there were significantly lower CHRM3 levels in Mahuang group, Chaihu group, Shengma group, Gegen group, Jiegeng group, Dingxiang group and Daodou group, while higher CHRM3 level in Kuxingren group ($P<0.05$ or $P<0.01$); Gegen and Jiegeng groups had decreased level of CHRM1, while Bohe, Tinglizi, Xuanfuhua, Chuanniuxi, Fuling, Dingxiang, Kuxingren and Daodou groups had increased level of CHRM1 ($P<0.05$ or $P<0.01$); Mahuang, Shengma, Gegen and Jiegeng groups could significantly decrease the level of PPAR- γ , while Xuanfuhua, Chuanniuxi, Fuling and Kuxingren groups could increase the level of PPAR- γ ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The potential targets of typical ascending and floating as well as descending and sinking Chinese medicinals are mainly CHRM3, CHRM1 and PPAR- γ .

Keywords ascending and floating Chinese medicinals; descending and sinking Chinese medicinals; action target; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; muscarinic acetylcholine receptors

(收稿日期: 2022-03-05; 修回日期: 2022-11-14)

[编辑: 王利芬]