

·数字中医药·

本文引用:陈 茉,文颖娟,杨俊超,吴 倩,彭高强,仝武宁.基于网络药理学探究葛根治疗重症肌无力的潜在作用机制及实验验证[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1717-1725.

基于网络药理学探究葛根治疗重症肌无力的 潜在作用机制及实验验证

陈 茉,文颖娟*,杨俊超,吴 倩,彭高强,仝武宁
(陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的** 运用网络药理学探讨中药葛根治疗重症肌无力(myasthenia gravis, MG)的潜在作用机制,通过动物实验进行初步验证。**方法** 运用 TCMS 筛选葛根主要活性成分与相关靶点信息;结合 UniProt 人类基因数据库,对活性成分进行蛋白质转化;筛选 GeneCards 数据库、Drugbank 数据库、Therapeutic Target Database 数据库中有关 MG 疾病靶点信息;通过 STRING 数据库、Metascape 数据库对中药-疾病交集作用靶点进行蛋白互作网络分析;运用 R 语言对作用靶点进行基因本体 GO 与 KEGG 富集分析;采用动物实验对 IL-4、TGF- β 1、Bcl-2、Caspase-9 等作用靶点进行验证。**结果** 共筛选出中药-疾病相关基因 27 个,涉及 4 种中药活性成分。蛋白互作网络分析得知 IL-4、TGF- β 1、Bcl-2、JUN、MAPK 14 等可能是葛根治疗 MG 的重要靶点。KEGG 分析结果表明,葛根治疗 MG 主要与 APOPTOSIS、AGE-RAGE、P13K-Akt、Hepatitis B 等多条信号通路有关。动物实验结果证实,葛根及其复方配伍通过减弱 Bcl-2、升高 Caspase-9 表达,干预骨骼肌细胞凋亡,此外,EAMG 大鼠血清中 TGF- β 1 表达上调,AchR-ab、IL-4 表达显著下降,验证了网络药理学的结果。**结论** 中药葛根治疗 MG 的主要生物学机制可能与多种因子及信号通路密切相关,葛根及其复方配伍能够通过影响 IL-4、TGF- β 1、Bcl-2、Caspase-9 表达干预 MG 的治疗。

[关键词] 葛根;重症肌无力;网络药理学;信号通路;细胞凋亡;大鼠

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.012

Potential Mechanism and Preliminary Verification of Gegen (Puerariae Lobatae Radix) and its Compound Compatibility in the Treatment of Myasthenia Gravis about Based on Network Pharmacology

CHEN Mo, WEN Yingjuan*, YANG Junchao, WU Qian, PENG Gaoqiang, TONG Wuning
(Shaanxi University Of Chinese Medicine, Xiayang, Shaanxi 712046, China)

[Abstract] **Objective** To explore the potential mechanism of Chinese medicine Gegen (Puerariae Lobatae Radix) in the treatment of myasthenia gravis (MG) by using network pharmacology, and to conduct preliminary verification through animal experiments. **Methods** TCMS was used to screen the main active ingredients and related target information of Gegen (Puerariae Lobatae Radix); combined with the UniProt human gene database, the active ingredients were transformed into proteins; the GeneCards database, the Drugbank database, and the Therapeutic Target Database (TTD) were searched and screened for related MG disease targets information; protein-protein interaction (PPI) network of the traditional Chinese medicine-disease interaction target was analyzed by the STRING database and Metascape database; the R language was used to analyze the target point of gene ontology GO and KEGG enrichment; the animal experiments were used to verify IL-4, TGF- β 1, Bcl-2, Caspase-9 and other targets. **Results** A total of 27 Chinese medicine-disease-related genes were screened, involving 4 active ingredients of Chinese medicine.

[收稿日期]2021-06-04

[基金项目]国家重点研发计划课题(2017YFC1703506);国家自然科学基金项目(81202642);第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目[国中医药人教发[2017]24号];陕西省科学技术厅项目(2017SF-323)。

[作者简介]陈 茉,女,在读硕士研究生,研究方向:脾胃病的方药研究与中药复方配伍规律研究。

[通信作者]*文颖娟,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:wenyuyao2003@163.com。

PPI network topology analysis revealed that IL-4, TGF- β 1, Bcl-2, JUN, MAPK 14, etc. may be important targets for Gegen (Puerariae Lobatae Radix) in the treatment of MG. KEGG analysis results showed that the treatment of MG by Gegen (Puerariae Lobatae Radix) is mainly related to multiple signaling pathways such as APOPTOSIS, AGE-RAGE, P13K-Akt, and Hepatitis B. Animal experiment results confirmed that Gegen (Puerariae Lobatae Radix) and its compound compatibility can interfere skeletal muscle cell apoptosis by attenuating Bcl-2 and increasing Caspase-9 expression. In addition, the expression of TGF- β 1 in the serum of EAMG rats was up-regulated, and the expression of acetylcholine receptor antibody and IL-4 significantly declined, verified the reliability of network pharmacology. **Conclusion** The main biological mechanism of the traditional Chinese medicine Gegen (Puerariae Lobatae Radix) in treating MG may be closely related to a variety of factors and signal pathways. Gegen (Puerariae Lobatae Radix) and its compound compatibility can interfere the treatment of MG by affecting the expression of IL-4, TGF- β , Bcl-2 and Caspase-9.

[**Keywords**] Gegen (Puerariae Lobatae Radix); myasthenia gravis; network pharmacology; signal pathway; apoptosis; rat

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种由自身抗体介导的获得性神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)传递障碍的免疫性疾病,主要受乙酰胆碱受体抗体(acetylcholine receptor antibody, AchR-ab)、肌肉特定受体酪氨酸激酶抗体(muscle skeletal receptor tyrosine kinase antibody, MuSK-ab)、低密度脂蛋白受体相关蛋白4(lowdensitylipoproteinreceptor-relatedprotein, LRP4)、兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)等影响,以眼睑下垂、四肢乏力、肌肉消瘦、吞咽困难等为主要临床表现^[1]。全球患病率约为(150~250)/百万,我国MG发病率约为0.68/10万,临床多以糖皮质激素、胆碱酯酶抑制剂、血浆置换术、胸腺切除术等方式治疗,然不良反应较多、治疗乏效^[2-3]。因此,近年来选用中医药治疗MG受到广泛关注。

中医学认为,MG属“痿证”范畴^[4],以脾气虚弱,兼有浊邪堆积为基本病机,治疗以“治痿独取阳明”为基本大法。葛根为豆科植物野葛的干燥根,甘、辛、凉,归脾、胃经,具有解肌升阳、通经活络之功。药理研究^[5]证实,葛根具有保护神经、预防骨质疏松、促进细胞增殖、提高免疫力等作用。因此,本研究拟借助网络药理学平台,对葛根治疗MG的活性成分及作用靶点进行探析,挖掘葛根治疗MG的潜在作用机制,并利用实验动物模型进行验证。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

运用中药系统药理分析平台^[6](traditional Chinese medicine systems pharmacology database and

analysis platform TCMSP, <https://tcmsp.com/tcmsp.php>);UniProt 数据库^[7](<https://www.uniprot.org>);Gene Cards 数据库^[8](<https://www.genecards.org>);Drugbank 数据库^[9](<https://go.drugbank.com>);Therapeutic Target Database 数据库^[10](<http://db.idrblab.net/ttd/>);STRING 数据库^[11](<http://string-db.org/>);Metascape 数据库^[12](<https://metascape.org/gp/index.html>);R 语言(x64.4.0.0);Cytoscape 软件(Version3.7.2)。

1.2 葛根活性成分的筛选

运用 TCMSP 数据库,输入关键词“葛根”,设置口服生物利用度(Oral bioavailability, OB)>20%和类药性(drug-likeness, DL)>0.18,筛选出中药葛根的有效成分靶点信息。通过 Uniprot 数据库将候选药物靶点信息转化为基因名称。

1.3 疾病靶点的预测

以“Myasthenia Gravis”为关键词,通过GeneCards、Drugbank、TTD 数据库检索并搜集与MG相关的基因信息。对符合MG疾病的相关基因信息与葛根靶点信息进行筛选与匹配,获取基因活性靶点。

1.4 蛋白相互作用(protein protein interaction, PPI)网络构建分析

在 STRING 数据库中录入葛根与MG蛋白作用靶点,得到PPI网络分析关系信息并绘制VENN图,运用Cytoscape 3.7.2对网络信息关系进行分析。

1.5 GO功能与KEEG通路富集分析

在Metascape中,导入葛根与MG共同基因,选择“sapiens”“custom analysis”,进行“enrichment”富集分析,运用R语言进行图形绘制。

1.6 动物实验验证

1.6.1 实验动物 SPF级8周龄的Lewis大鼠,雌性,体质量160~180 g。由成都达硕实验动物有限公司提供。饲养场所:陕西中医药大学实验室,饲养环境:SPF级。动物许可证号:SCXK(川)2020-030。动物伦理编号:SUCM-DL20210621001。

1.6.2 主要药品、试剂及仪器 人工合成鼠源性AchR- α 亚基97-116肽段序列多肽蛋白(金斯瑞生物科技股份有限公司,货号:C8385FE270-1);完全弗氏剂(complete Freund's adjuvant, CFA,美国sigma公司,货号:F5881);不完全弗氏试剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA,美国sigma公司,货号:F5506);磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS,赛默飞世尔科技公司,货号:ZLI-9062);ECL超敏发光试剂盒(货号:WB0164)、电泳液(货号:WB0132)、转膜液(货号:WB0154)、一抗稀释液(货号:WB0158)、二抗稀释液(货号:WB0159)、封闭液(货号:WB0161)均购自上海威奥生物科技有限公司;GAPDH(货号:WB0197)、Bcl-2兔抗大鼠多克隆抗体(货号:bs-0032R)、Caspase-9兔抗大鼠多克隆抗体(货号:bs-0049R)均购自武汉博士德生物工程有限公司;165-8001型垂直电泳槽、170-3930型Trans-Blot转印槽均购自Bio-Rad伯乐公司;Multiskan FC 550型酶标仪(赛默飞世尔科技公司);JY88-II型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);SH01D型高速台式离心机(上海知信实验仪器技术有限公司)。

1.6.3 实验药物 葛根方:葛根20 g;葛芪方:葛根20 g,黄芪15 g;葛参方:葛根20 g,丹参15 g;葛根和四妙散和方(简称葛妙方):葛根20 g,苍术15 g,黄柏15 g,牛膝15 g,薏苡仁15 g;葛根复方:葛根20 g,黄芪15 g,丹参15 g,苍术15 g,黄柏15 g,牛膝15 g,薏苡仁15 g。上述中药均按常规煎法并分别浓缩成相应的浓缩药液50 mL,大鼠用量为临床用量的6.25倍。阳性对照药:强的松(山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,5 mg, H20033023),实验时用0.2%的羧甲基纤维素钠将其配成0.54 mg/mL混悬液备用。

1.6.4 分组、造模、治疗与取材 将80只大鼠适应性饲养1周后,随机分为8组。复制建立实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myas-

thenia gravis, EAMG)模型^[13]。即:首次免疫将R97~116肽段、CFA、PBS三者按1:1.5:1.5比例充分混匀成乳剂,取乳剂200 μ L(其中包含R97~116肽段:100 μ g)于造模大鼠足垫、腹部、背部行多点皮下注射。对照组注射等量PBS;首次造模后30 d,将R97~116、IFA、PBS三者按1:3:3比例充分混匀进行强化接种,15 d后再次强化。对照组注射等量PBS。经肌电图确认造模成功后,对各组分别进行连续4周的灌胃治疗。各组给药剂量分别为:葛根组2.08 g/(kg·d),葛芪组3.65 g/(kg·d),葛参组3.65 g/(kg·d),葛妙组8.33 g/(kg·d),葛根复方组11.46 g/(kg·d),强的松组5.4 g/(kg·d),大鼠灌胃给药体积为10 mL/kg。最后一次灌胃24 h后,处死大鼠取血清并迅速分离其胫骨前肌,以便进行相关实验指标检测。

1.6.5 统计方法 本研究数据采用SPSS 25.0软件进行处理,符合正态分布的数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,方差齐则多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,均以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根活性成分

在TCMSP中以OB>20%、DL>0.18为筛选条件并结合文献检索共整理出7个葛根活性成分。靶点信息进行逐一对应,共得到葛根活性成分靶点信息184个。利用Uniprot标准化基因信息,并剔除无人样本Uniprot ID的基因。见表1。

表1 葛根活性成分信息表

MOLID	主要化学成分	OB/%	DL
MOL000392	formononetin(芒柄花黄素)	69.67	0.21
MOL002959	3'-methoxydaidzein(3'-甲氧基黄豆苷元)	48.57	0.24
MOL003629	daidzein-4,7-diglucoside(大豆苷元)	47.27	0.67
MOL000358	beta-sitosterol(β -谷甾醇)	36.91	0.75
MOL012297	puerarin(葛根素)	24.03	0.69
MOL004631	7,8,4'-trihydroxyisoflavone(7,8,4'-三羟基异黄酮)	20.67	0.22
MOL000357	sitoglucoside(西托糖苷)	20.63	0.62

2.2 MG疾病作用靶点

运用GeneCards数据库、Drugbank数据库、TTD数据库共检索到涉及MG的相关靶点信息845个。

2.3 药物活性成分-疾病靶点图建构

葛根活性成分对应靶点与MG相关作用靶点取

交集,通过 VENN 图显示(见图 1),共获取活性成分-疾病靶点基因 27 个,对应葛根 4 个活性成分。见图 2、表 2。

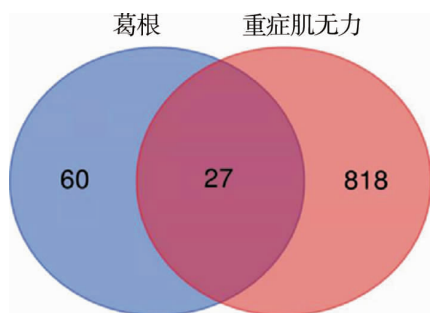


图 1 葛根-MG 靶点 VENN 图

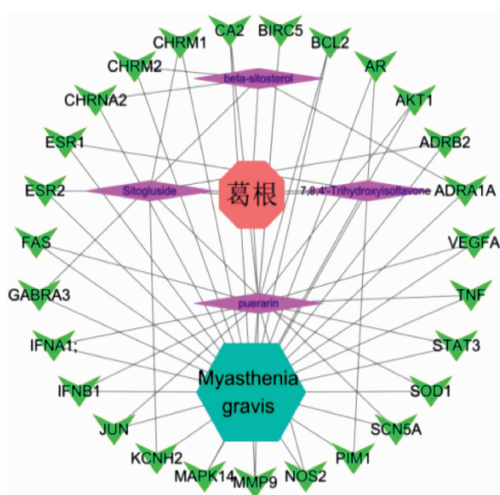


图 2 葛根与 MG 蛋白靶点图

表 2 葛根治疗 MG 主要活性成分表

序号	活性成分名称	结构式
1	sitogluside (西托糖苷)	$C_{35}H_{60}O_6$
2	beta-sitosterol (β-谷甾醇)	$C_{29}H_{50}O$
3	7,8,4'-trihydroxyisoflavone (7,8,4'-三羟基异黄酮)	$C_{15}H_{10}O_5$
4	puerarin (葛根素)	$C_{21}H_{30}O_5$

2.4 PPI 网络构建与筛选

将通过 STRING 数据库将获取的 27 个靶点基因信息进行 PPI 网络分析,数据以 tsv 格式导入 CYTOSCAPE3.7.2 进行图像绘制。见图 3。

2.5 GO 生物功能富集分析

GO 注释涉及分子功能 (GOBP)、生物过程 (GOCC)、细胞组成 (GOMF) 三部分。对 27 个药物活性成分-疾病靶点基因进行分析,得到 GO 功能富集网络柱状图(见图 4)。在 GOBP 中排名靠前的主要包括:膜电位调节、跨膜传输的调节、化学突触传递、DNA 结合转录因子活性的调控等;GOCC 以突触、复杂离子通道、膜阀为主;GOMF 强调蛋白质同源二聚化活动、蛋白磷酸酶结合、细胞因子受体结合、泛素蛋白连接酶、乙酰胆碱受体活动等多个方面。

2.6 葛根治疗 MG 作用靶点 KEGG 通路富集分析

KEGG 结果显示:27 个靶点显著富集在癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、糖尿病并发症

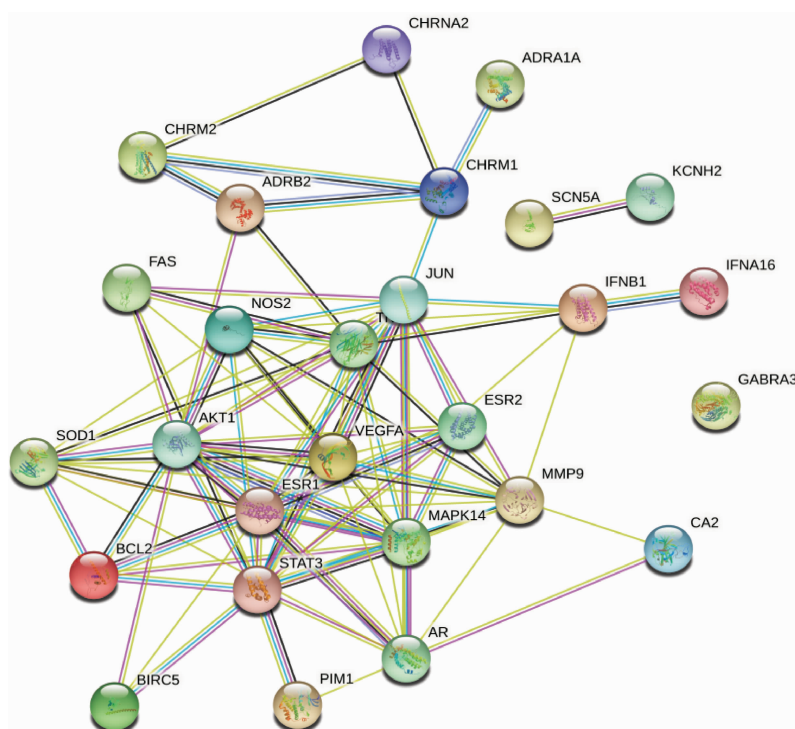


图 3 PPI 核心靶点网络图

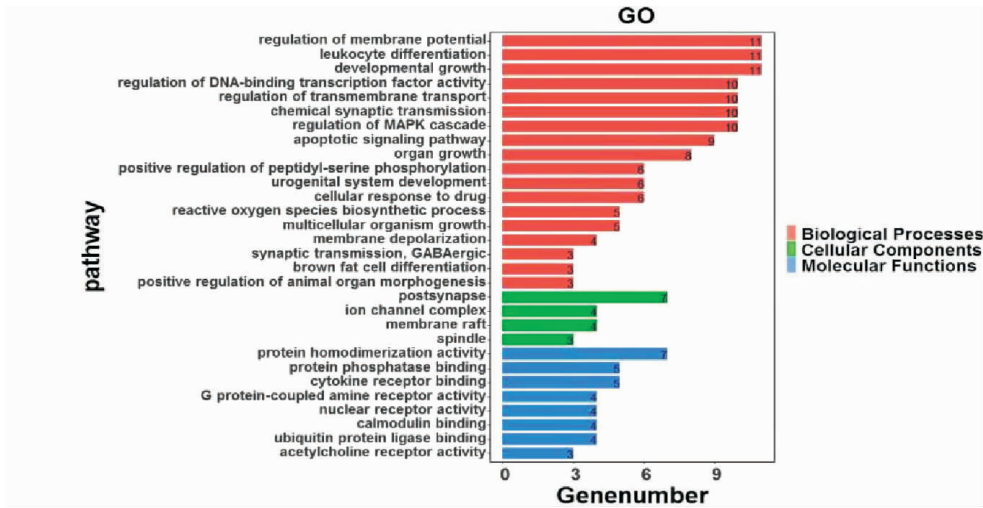


图4 GO生物功能富集分析图

AGR受体信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导(adrenergic signaling in cardiomyocytes)、凋亡通路(apoptosis)、PI3K-Akt通路(PI3K-Akt signaling pathway)、神经活性配体-受体相互作用通路(neuroactive ligand-receptor interaction)、癌症(pathways in cancer)、乙型肝炎(hepatitis B)等多条信号通路。见图5。

2.7 动物实验验证

2.7.1 葛根及其复方配伍对EAMG大鼠体质量的影响 通过测量各组体质量发现,首次免疫前,与空白组相比,各组大鼠体质量差异均无统计学意义

($P=0.4479>0.05$)。经AchR免疫后,各实验组大鼠体质量增长缓慢,从第4周开始,各实验组体质量明显低于空白组($P<0.01$),免疫后6周,与空白组相比,各实验组差异具有统计学意义($P<0.01$)。用药干预后,各用药组体质量均呈增长趋势($P<0.01$)。其中以强的松组、葛根复方组增长最为显著。见表3。

2.7.2 葛根及其复方配伍对EAMG大鼠肌力的影响 经肌电图检测得出,与空白组相比,模型组大鼠肌力明显减弱,与模型组相比,各治疗组大鼠肌力明显恢复($P<0.05$),其中强的松组、葛根复方组振幅波动小($P<0.01$),肌力恢复程度明显。见图6。

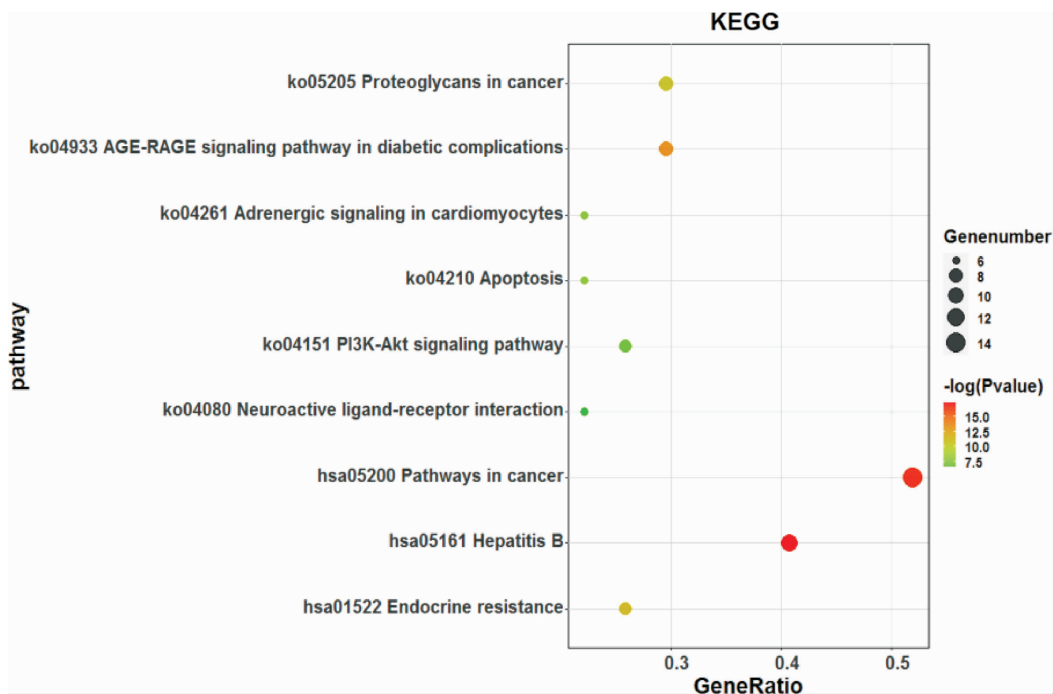


图5 KEGG富集通路图

表 3 各组大鼠体重变化情况 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别/时间	n	首次免疫前	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周
空白组	10	201.9±9.33	217.2±10.59	234.8±10.08	247.8±11.13	268.1±11.27
模型组	10	203.4±10.62	192.4±10.25 ^{△△}	185.4±8.54 ^{△△*}	177.4±6.31 ^{△△}	172.6±5.48 ^{△△}
强的松组	10	199.0±6.11	189.7±7.62 ^{△△}	182.9±5.28 ^{△△*}	201.9±8.20 ^{**}	225.2±12.78 ^{**#}
葛根组	10	204.5±12.96	192.4±11.87 ^{△△}	186.7±8.96 ^{△△*}	197.4±7.57 ^{**}	219.1±10.97 ^{**#}
葛芪组	10	196.7±11.47	187.1±10.73 ^{△△}	181.9±7.68 ^{△△*}	196.5±6.80 ^{**}	221.0±6.45 ^{**#}
葛参组	10	197.0±6.46	185.3±10.64 ^{△△}	180.5±9.90 ^{△△*}	195.1±9.94 ^{**}	219.0±12.99 ^{**#}
葛妙组	10	202.5±7.17	185.7±9.64 ^{△△}	180.3±9.41 ^{△△*}	196.5±10.84 ^{**}	222.2±10.04 ^{**#}
葛根复方组	10	200.4±7.40	189.4±7.75 ^{△△}	181.7±5.03 ^{△△*}	204.3±13.14 ^{**}	230.4±10.53 ^{**#}

注:与空白组比较,^{△△}P<0.01;与模型组比较,^{**}P<0.01;与免疫前比较,^{*}P<0.05;与治疗前比较,[#]P<0.05

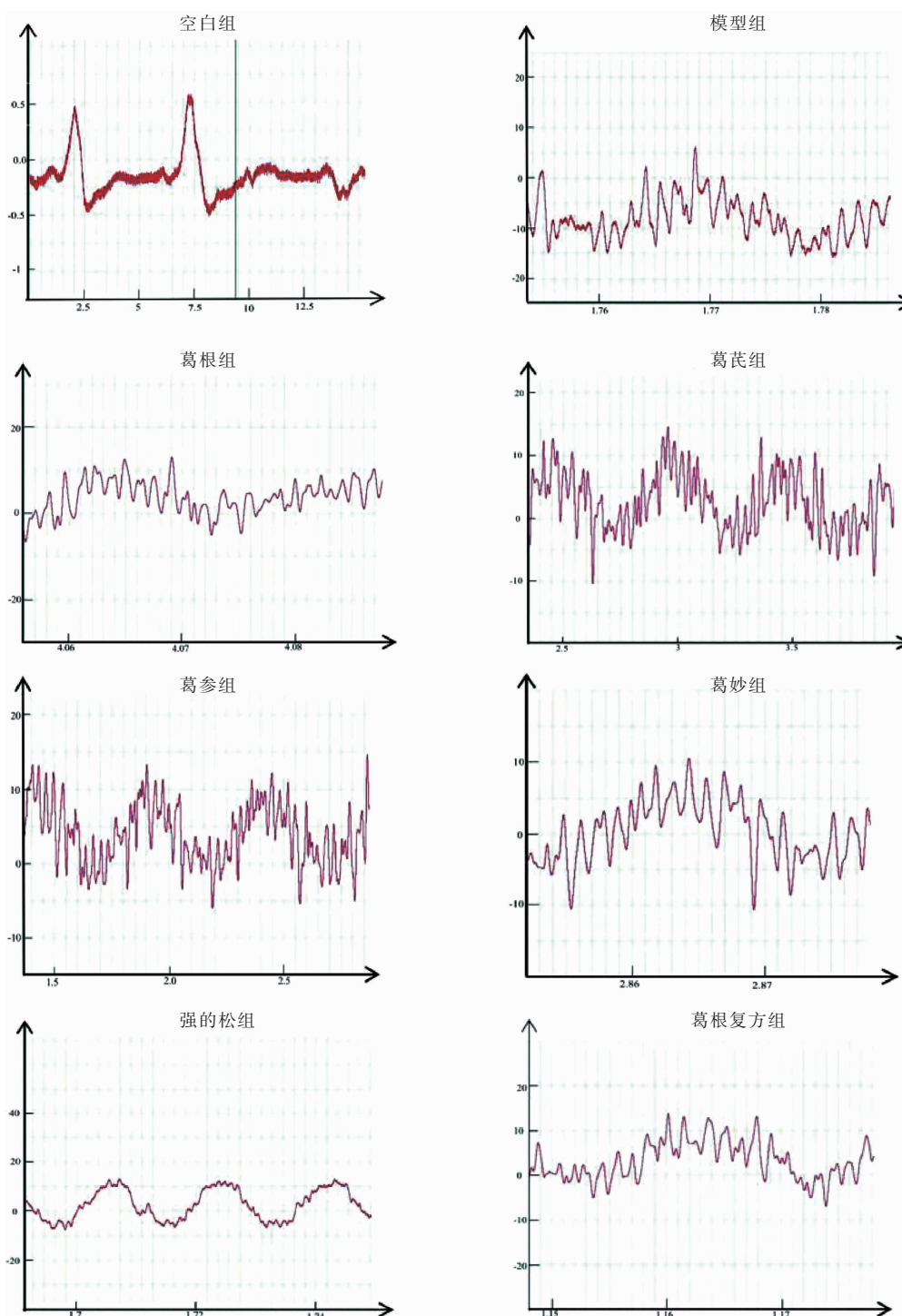


图 6 各组大鼠骨骼肌肌电变化情况 ($\mu V/s$)

2.7.3 葛根及其复方配伍对 EAMG 大鼠血清 AchR-ab 的影响($n=10$) 与空白组相比,模型组大鼠血清 AchR-ab 含量升高($P<0.01$),与模型组相比,各治疗组 AchR-ab 表达下调明显($P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 AchR-ab 含量

组别	n	AchR-ab(OD 值)
空白组	10	0.0737±0.0098
模型组	10	0.3385±0.0185 ^{△△}
强的松组	10	0.2176±0.0207 ^{△△**}
葛根组	10	0.2445±0.0138 ^{△△**●}
葛芪组	10	0.2395±0.0229 ^{△△**}
葛参组	10	0.2404±0.0143 ^{△△**●}
葛妙组	10	0.2156±0.0216 ^{△△**}
葛根复方组	10	0.2121±0.0217 ^{△△**}

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与强的松组比较,[●] $P<0.05$

2.7.4 葛根及其复方配伍对 EAMG 大鼠 IL-4 表达的影响 治疗前,与空白组相比,各组 EAMG 大鼠血清中 IL-4 表达明显升高($P<0.01$);药物治疗后,与模型组相比,各治疗组大鼠血清 IL-4 表达均出现下调($P<0.05$),其中以强的松组、葛根复方组最为显著($P<0.01$)。与空白组相比,治疗前各组 EAMG 大鼠血清中 TGF- β 1 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,各治疗组大鼠血清 TGF- β 1 表达明显升高($P<0.05$)。见表 5。

2.7.5 葛根及其复方配伍对 EAMG 大鼠细胞凋亡通路蛋白的影响 与空白组相比,模型组 Bcl-2 蛋白表达量显著增加($P<0.01$)、Caspase-9 蛋白表达量明显下降($P<0.01$);与模型组相比,各治疗组 Bcl-2 表达量下调($P<0.01$),Caspase-9 表达量升高($P<0.01$),其中以葛根复方组蛋白含量变化最为明显。见表 6 和图 7。

表 5 各组大鼠 IL-4、TGF- β 1 表达变化($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-4 治疗前	IL-4 治疗后	TGF- β 1 治疗前	TGF- β 1 治疗后
空白组	12.21±1.41	13.42±0.93	497.365±31.412	504.124±40.415
模型组	32.24±2.31 ^{△△}	30.63±1.22 ^{△△}	194.124±27.709 ^{△△}	220.151±34.010 ^{△△}
强的松组	34.41±2.01 ^{△△}	18.85±2.02 ^{**}	200.192±50.713 ^{△△}	414.153±49.017 ^{**}
葛根组	33.37±1.09 ^{△△}	22.67±3.24 ^{**}	188.437±42.234 ^{△△}	404.324±22.431 ^{**}
葛芪组	34.13±1.09 ^{△△}	24.34±2.52 ^{**}	219.326±33.342 ^{△△}	383.612±34.110 ^{**}
葛参组	33.68±1.09 ^{△△}	22.10±3.09 ^{**}	221.103±29.352 ^{△△}	394.321±31.755 ^{**}
葛妙组	35.45±1.09 ^{△△}	25.26±2.34 ^{**}	215.345±42.329 ^{△△}	400.456±35.610 ^{**}
葛根复方组	35.18±2.09 ^{△△}	15.54±3.12 ^{**●}	189.594±62.008 ^{△△}	470.134±44.911 ^{**●}

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.05$;与强的松组比较,[●] $P<0.05$;与治疗前比较,[#] $P<0.05$

3 讨论

MG 属中医“痿证”范畴,脏腑定位主要责之于脾^[14]。脾胃为气血生化之源,肉轮亦归属于脾,若脾胃气血不足,肌肉发育和运动功能发生障碍,出现眼睑下垂、肌肉消瘦、四肢无力等症状;此外,足太阴脾经连舌本,散舌下,吞咽咀嚼功能亦归属为脾,脾胃受损,则咀嚼无力。葛根,甘、辛、凉,归脾胃经。《药类法象》载:“葛根,治脾胃虚而渴,善解酒毒,通行足阳明脉经之药”,“十一五”国家级规划教材《中药学》中亦提出:“葛根具有解肌、升阳、生津之功,能够调节肌肉运动,升发脾胃阳气,以养机体。”^[15]国家级名老中医周仲瑛^[16]、裘昌林^[17]、李声岳等^[18]均以葛根为主配伍治疗 MG,疗效确切。

因此,本文以网络药理学为工具,对葛根治疗 MG 的潜在作用靶点进行预测与分析,并结合 MG 脾胃虚弱,虚、瘀、湿邪夹杂、痰浊壅滞的基本病机,选取健脾益气之黄芪、活血化瘀之丹参、祛湿化痰、通络治痿之四妙散与葛根配伍干预 EAMG 的治疗,验证网络药理学结果,以期为临床应用中医药治疗 MG 提供一定的思路与方向。

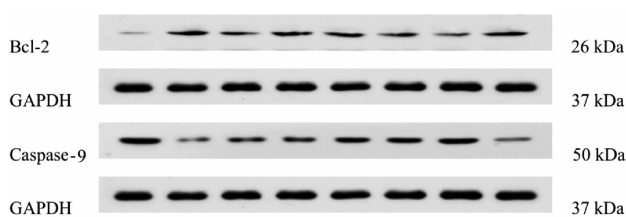
本次研究发现,葛根治疗 MG 的相关活性成分主要包括葛根素、芒柄花黄素、 β -谷甾醇、西托糖苷。葛根素作为治疗 MG 的主要成分,不仅能够增强大鼠肢体拉力、增加肌肉力量,改善肌萎缩^[19],同时,通过 PINK/PARKIN1 途径修复损伤线粒体^[20],降低 RNS 衰减度、电压依赖性阴离子通道 VDAC 的水平、抑制 AchR-ab 表达^[21]、保护神经、增强免疫力^[22]。

KEGG 通路富集和 PPI 相互作用网络图表明,SOD1、IL-4、TGF- β 1、Bcl-2、NOS2、MAPK14、ESR1、

表6 各组大鼠骨骼肌组织 Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Caspase-9/GAPDH
空白组	0.0732±0.006	0.3589±0.1363
模型组	0.4753±0.142 ^{△△}	0.1396±0.0905 ^{△△}
强的松组	0.2147±0.119 ^{**}	0.2854±0.0674 ^{**}
葛芪组	0.2431±0.194 ^{**}	0.2995±0.0942 ^{**}
葛参组	0.2293±0.131 ^{**}	0.2884±0.0474 ^{**}
葛妙组	0.2456±0.086 ^{**}	0.3028±0.0305 ^{**}
葛根复方组	0.2293±0.064 ^{**}	0.3129±0.0341 ^{**}
葛根组	0.2828±0.163 ^{**}	0.2742±0.0541 ^{**}

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$



注:从左到右依次为:空白组、模型组、葛芪组、葛参组、葛妙组、强的松组、葛根复方组、葛根组

图7 各组大鼠骨骼肌组织 Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达电泳图

JUN、IFN- β 1、TNF- α 等基因与葛根治疗 MG 密切相关,AGE-RAGE、细胞凋亡、PI3K-Akt、Hepatitis B 等可能成为葛根治疗 MG 的主要通路。相关研究发现^[23],MG 患者体内线粒体 SOD 水平下降、IL-4 表达升高。Bcl-2 家族蛋白作为细胞凋亡的主要调控因子,若胞内 Bcl-2 蛋白上调,机体自身免疫性 B 淋巴细胞逃脱阳性选择,AchR-ab 过量产生,抑制正常细胞凋亡,将诱发 MG^[24-25]。李晓峰等^[26]发现,通过上调免疫抑制性细胞因子 TGF- β 1 表达,促进 IFN- γ 、NO 水平,能够降低 MG 患者血清 AchR-ab 表达,起到积极的治疗作用,证实了本次网络药理学结果的可靠性。

动物实验研究结果证实,EAMG 大鼠存在骨骼肌细胞凋亡受抑制现象。葛根及其复方配伍通过上调 Bcl-2 蛋白表达、减弱 Caspase-9 蛋白含量,干预 IL-4、TGF- β 1 表达,降低 AchR-ab 含量,起到恢复 EAMG 大鼠骨骼肌细胞凋亡,降低炎症因子表达,提高骨骼肌肌力,治疗 MG 的作用。与此同时,本次实验研究证实,除胸腺组织细胞凋亡受抑制外^[27-28],EAMG 大鼠骨骼肌细胞凋亡同样受到明显抑制;葛

根及其复方配伍通过调节 EAMG 大鼠心肌^[29]、骨骼肌^[30]、胸腺组织^[31]相关蛋白表达,可以在一定程度上参与 MG 的治疗。

综上所述,本次研究借助网络药理学对葛根治疗 MG 的治疗靶点进行分析,预测了葛根能够通过多成分、多途径、多靶点参与 MG 的治疗。经动物实验初步证实,在 EAMG 的发病过程中存在骨骼肌细胞凋亡受抑制现象,葛根及其复方配伍通过调节 EAMG 大鼠骨骼肌 IL-4、TGF- β 1、Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达,能够在一定程度上恢复骨骼肌细胞凋亡,减弱相关炎症反应,降低 AchR-ab 表达,治疗 MG 的作用,证实网络药理学结果。那么,本课题组将在下一步实验中进一步深入探究葛根及其复方配伍对 MAPK14、JUN、VEGFA 等蛋白因子表达的影响以及调控 PI3K-Akt 等信号通路参与 EAMG 的治疗,以期为临床应用葛根治疗重症肌无力提供依据。

参考文献

- [1] 常 婷.中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020 版)[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2021,28(1):1-12.
- [2] HELDAL A T, OWE J F, GILHUS N E, et al. Seropositive myasthenia gravis: A nationwide epidemiologic study [J]. Neurology, 2009, 73(2): 150-151.
- [3] 闫 敏,张锦丽,陶小伟,等.重症肌无力治疗现状概述[J].中风与神经疾病杂志,2018,35(11):1045-1048.
- [4] 邓中光,邱仕君,邓铁涛.邓铁涛对重症肌无力的认识与辨证论治[J].中国医药学报,1993,8(2):41-43.
- [5] 孙 华,李春燕,薛金涛.葛根的化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2019,36(11):1097-1101.
- [6] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSF: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13.
- [7] CONSORTIUM T U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [8] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.1.30.33.
- [9] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [10] ZHOU Y, ZHANG Y T, LIAN X C, et al. Therapeutic tar-

- get database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): 1128–1136.
- [11] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome–wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 (D1): D607–D613.
- [12] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist–oriented resource for the analysis of systems–level datasets[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1523.
- [13] 许文华,韩莹莹,汪思应,等.鼠源乙酰胆碱受体 α 亚基97–116肽段免疫 lewis 鼠诱导实验性重症肌无力模型[J].*中国神经精神疾病杂志*,2006,32(2):179–180.
- [14] 周仲瑛.中医学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2007:434–435.
- [15] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2011:78–79.
- [16] 周仲瑛,陈四清,周 宁.健脾益肾、熄风通络法治疗重症肌无力[J].*江苏中医药*,2006,38(12):40–41.
- [17] 张燕平.李声岳治疗眼肌型重症肌无力经验[J].*中医杂志*,2006,47(2):97.
- [18] 蒋旭宏,黄小民,章正祥,等.裘昌林教授治疗重症肌无力的用药规律探究[J].*中国中医急症*,2016,25(3):428–432.
- [19] 殷 琳,陈 熙,李 娜,等.葛根素缓解1型糖尿病大鼠骨骼肌萎缩[J].*中国药理学与毒理学杂志*,2019,33(9):727.
- [20] CHEN X F, YI L, SONG S Y, et al. Puerarin attenuates palmitate–induced mitochondrial dysfunction, impaired mitophagy and inflammation in L6 myotubes[J]. *Life Sciences*, 2018, 206: 84–92.
- [21] 麦卫华,刘汉伟,韩蓉蓉,等.眼肌型及全身型重症肌无力患者外周血 T 淋巴细胞 Fas 的表达[J].*中国神经精神疾病杂志*,2011,37(12):736–739.
- [22] GE B K, ZHANG Z, ZUO Z. Radix Puerariae lobatae (Gegen) suppresses the anticoagulation effect of warfarin: A pharmacokinetic and pharmacodynamics study[J]. *Chinese Medicine*, 2016, 11: 7.
- [23] 陈 敏.白介素–4、15、18 在重症肌无力中的表达及其与端粒酶活性的相关性研究[D].南宁:广西医科大学,2007.
- [24] 袁正洲,李作孝.Bcl–2 基因家族与重症肌无力[J].*重庆医学*,2012,41(24):2528–2530.
- [25] 岳 岚,柴口,沈钢,等.胸腺生发中心及 Bcl–2 表达与获得性自身免疫性重症肌无力的关系[J].*中华医学杂志*,1999,79(3):202.
- [26] 李晓峰,李吕力,罗永坚,等.重症肌无力患者 IL–18、TGF β –1 的表达[J].*中国神经精神疾病杂志*,2010,36(7):393–396.
- [27] 张立新,任明山,熊小平,等.实验性自身免疫性重症肌无力大鼠胸腺 caspase 9 和 caspase 3 的表达[J].*安徽医科大学学报*,2010,45(1):47–49.
- [28] 武星星.MG 患者调节性 T 细胞线粒体自噬异常的分子机制[D].十堰:湖北医药学院,2021.
- [29] 文颖娟,杨俊超,王 超.葛根复方对重症肌无力实验大鼠心肌线粒体酶活性的影响[J].*现代中医药*,2015,35(1):65–67.
- [30] 李 静,文颖娟,杨俊超,等.葛根及其配伍对 EAMG 大鼠骨骼肌病理形态及骨骼肌线粒体 ATP 酶的影响[J].*四川中医*,2020,38(1): 51–54.
- [31] 杨俊超,文颖娟,王 超.葛根复方对重症肌无力大鼠 IFN– γ 和 TGF– β 1 的影响[J].*陕西中医*,2015,36(9):1266–1267.

(本文编辑 苏 维)