

基于网络药理学与分子对接探讨兰州软儿梨止咳化痰作用机制

罗慧英, 吴步梅, 马天玥, 张文利, 方彩霞, 魏永波, 陈辅斌

Based on Network Pharmacology and Molecular Docking to Discuss the Mechanism of Antitussive and Expectorant Action of Ruanerli

LUO Huiying, WU Bumei, MA Tianyue, ZHANG Wenli, FANG Caixia, WEI Yongbo, and CHEN Fubin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010103>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yigancao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070092>

基于体外药效学结合网络药理学和分子对接对人参-桑椹改善骨质疏松的机制研究

Mechanism of Ginseng-Mulberry Treating Osteoporosis Based on Pharmacodynamics *in Vitro* Combined with Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(20): 1-13 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010155>

基于网络药理学探讨桦褐孔菌降血糖功效成分及作用机制

Action Mechanism of *Inonotus obliquus* in the Treatment of Diabetes and the Material Basis of Pharmacodynamics Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(22): 18-29 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040268>

基于网络药理学探讨预知子抗抑郁的作用机制

Mechanism of Anti-depression Mechanism of Akebiae Fructus Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 8-15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110295>

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010111>

基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制

Analysis of the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Dendrobium Nobile in the Treatment of Nervous System Diseases Using Integrative Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(13): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110140>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

罗慧英, 吴步梅, 马天玥, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨兰州软儿梨止咳化痰作用机制 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 11-20. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010103

LUO Huiying, WU Bumei, MA Tianyue, et al. Based on Network Pharmacology and Molecular Docking to Discuss the Mechanism of Antitussive and Expectorant Action of Ruanerli [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 11-20. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010103

· 未来食品 ·

基于网络药理学与分子对接探讨兰州软儿梨止咳化痰作用机制

罗慧英^{1,2}, 吴步梅³, 马天玥⁴, 张文利³, 方彩霞³, 魏永波⁵, 陈辅斌⁶

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃兰州 730000;

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃兰州 730000;

3. 兰州市农业科技研究推广中心, 甘肃兰州 730000;

4. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 211198;

5. 皋兰百璐通瓜果专业合作社, 甘肃兰州 730200;

6. 什川镇农业农村综合服务中心, 甘肃兰州 730200)

摘要: 采用网络药理学方法预测软儿梨止咳化痰作用及其机制, 并采用分子对接和动物实验对预测结果予以验证。通过文献调研和 TCMSPP 等数据库筛选得到软儿梨的成分与作用靶点, 与 GeneCards 数据库中“咳嗽 (cough)”和“痰 (sputum)”相关的两组基因相映射, 得到软儿梨止咳化痰作用的靶点基因。通过 Metascape 平台对靶点基因进行 GO 和 KEGG 富集分析; 通过 STRING 数据平台构建靶点基因间 PPI 网络; 利用 Cytoscape 插件 CytoHubba 筛选软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因, 并通过 Metascape 数据平台对 Top10 基因进行 KEGG 通路富集以预测软儿梨止咳化痰作用可能涉及的信号通路。通过 Autodock Vina 对预测所得 Top10 基因蛋白和软儿梨 Top3 活性成分进行分子对接; 最后通过氨水引咳试验和酚红排泄试验对预测所得结果进行验证。经多数据库联合分析, 发现软儿梨中已见报道的化学成分有 51 个, 对应作用靶点 282 个, 其中 80 个与止咳化痰作用有关, 根据 Degree 值筛选出的 Top10 基因主要富集在与感染和免疫相关通路上。分子对接试验证明 Top10 基因与 PPI 网络中排名前 3 位的化学成分 (咖啡酸、芦丁、戊醛) 有较强的结合活性。动物实验证明软儿梨可以明显抑制小鼠氨水引发的咳嗽反应, 降低血清中 IL-6 和 IL-13 水平, 增加小鼠气管酚红的排泄量。PCR 和 WB 检测发现, 软儿梨可降低炎症相关基因 IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3 的 mRNA 水平和蛋白表达, 软儿梨的止咳化痰作用可能与降低炎症基因表达, 减少致炎因子释放有关。

关键词: 网络药理学, 分子对接, 软儿梨, 止咳化痰, 炎症因子

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0011-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010103



本文网刊:

Based on Network Pharmacology and Molecular Docking to Discuss the Mechanism of Antitussive and Expectorant Action of Ruanerli

LUO Huiying^{1,2}, WU Bumei³, MA Tianyue⁴, ZHANG Wenli³, FANG Caixia³, WEI Yongbo⁵, CHEN Fubin⁶

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

3. Lanzhou Agrotechnical Research and Popularization Center, Lanzhou 730000, China;

4. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

5. Bailutong Melon and Fruit Farmer Cooperatives, Lanzhou 730200, China;

收稿日期: 2023-01-16

基金项目: 甘肃省农业农村厅资助项目 (20221809RB)。

作者简介: 罗慧英 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药药效与物质基础研究, E-mail: louria@126.com。

6. Shichuan Agriculture and Rural Comprehensive Service Center, Lanzhou 730200, China)

Abstract: The antitussive and expectorant effects of Ruanerli and its mechanism were investigated by methods of network pharmacology. The outcomes predicted were verified by molecular docking and animal experiments. The components and targets of Ruanerli were obtained by literature investigation and TCMSP database screen. Mapping with two groups of genes related to "cough" and "sputum" from GeneCards database, the target genes of antitussive and expectorant effects of Ruanerli were obtained. GO and KEGG enrichment analysis of the target genes was performed by Metascape platform. The PPI network among the target genes was constructed through STRING data platform. Cytoscape plugin CytoHubba was used to screen the Top10 genes related to antitussive and expectorant effects of Ruanerli, and KEGG pathway enrichment was performed on the Top10 genes through Metascape data platform to predict the possible signal pathways involved in antitussive and expectorant effects of Ruanerli. Autodock Vina was used for molecular docking between the predicted Top10 gene proteins and the Top 3 active ingredients of Ruanerli. Finally, the predicted results were verified by ammonia induced cough test and phenol red excretion test. According to the analysis of multiple databases, 51 chemical components and 282 corresponding targets have been reported, eighty of them were related to the antitussive and expectorant effects of Ruanerli. The Top10 genes selected by Degree value were mainly concentrated in infection and immune-related pathways. Molecular docking test showed that the Top10 genes had strong binding activity with the Top3 chemical components (Caffeic acid, Rutin and Valeraldehyde) in PPI network. Animal experiments showed that the cough induced by ammonia was significantly inhibited when treated with Ruanerli in mice. The levels of IL-6 and IL-13 in serum were reduced and the excretion of phenol red in mice trachea was increased. PCR and WB detection showed that the mRNA levels and protein expressions of inflammatory genes IL6, IL1B, VEGFA, PTGS2 and MAPK3 were decreased, suggesting that the antitussive and expectorant effects of Ruanerli might be related to decreasing the expression of inflammatory genes and the release of inflammatory factors.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Ruanerli; antitussive and expectorant effects; inflammatory factor

软儿梨(*Pyrus ussuriensis* Maxim.)也叫冻梨、香水梨,是兰州特色水果。食用方法独特,具有后熟发酵及冻食特性。每年深秋采摘,新鲜果品口味欠佳,果肉硬而味酸,冷冻贮藏40多天后,果皮变黑,果肉发酵软化,其品质不因褐变而受到影响,果糖含量增加,此时食用梨软如泥,浆液充盈,味甜似蜜,是中国地方梨品种中的一个特色品种。2015年被农业部批准为“全国农产品地理标志”。兰州年产软儿梨3万多吨,但是由于技术原因,除直接食用和简单加工后制成果汁、果酒外,未见高附加值的下游产品,资源浪费巨大,高值化、多品类的开发利用成为现今迫切需求。

咳嗽是呼吸道系统的常见病。中医认为“肺主宣发和肃降”,肺气宣发通畅,则能主一身之气而呼吸调匀,助血液循环而贯通百脉^[1-2]。但肺为娇脏,最易受外邪侵袭,如果受到风、寒、暑、湿、燥、火六淫的侵袭,就会造成肺失宣降,肺气上逆,引起咳嗽。按病邪性质咳嗽可分为风寒咳嗽、风热咳嗽、风燥咳嗽,痰湿咳嗽等^[3-6]。秋冬时节,由于气候干燥多燥邪或风邪犯肺引发咳嗽,治疗多以清热去燥;而内伤咳嗽,多以脏器功能的失调为基础,以痰湿、痰热、肝火犯肺,肺阴亏损等为主要病症,治疗多以滋阴润肺为主^[7-9]。软儿梨性凉味甘,富含果酸、苹果酸、柠檬酸、蔗糖、葡萄糖等成分,具有清热解毒、润燥止咳,生津化痰、滋身祛疾之功效^[10-11],是药食兼备的妙品。《本草纲目》记载软儿梨有润肺、止咳、凉心消炎、降火、解疮毒、解酒等多种功效,当地人常服食之以镇咳化痰,但其具体作用机制鲜见报道。本研究

旨在采用网络药理学方法和生物信息分析技术对软儿梨止咳化痰作用进行研究,并通过分子对接和动物实验对分析结果进行验证,以期为软儿梨止咳化痰功效提供理论与试验依据。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

中药系统药理学数据库(TCMSP, <http://tcmospw.com/tcmosp.php>)、本草组鉴(<http://herb.ac.cn>)、ECTM数据库(<http://www.tcmip.cn/ETCM/>)、STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、Metascape分析平台(<https://metascape.org/>)、PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Uiprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)、PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)、Cytoscape 3.6.1、Autodock Vina 2.1、Chem3D、Pymol 3.3、Venny 2.1.0等。

1.2 材料与仪器

软儿梨冻梨 甘肃皋兰百璐通瓜果专业合作社提供,剥去表皮后自然解冻取汁1000 mL,相当于软儿梨冻梨1460.7 g,经高效液相色谱法测定,总酚含量为149.14 mg/kg、总黄酮含量为58.23 mg/kg^[12]; SPF级昆明小鼠 100只,18~20 g,雌雄各半,甘肃中医药大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(甘)2015-0002,动物伦理审查批号:20220714;麻杏止咳糖浆 太极集团四川南充制药有限公司,国药准字Z51022042;氨水、酚红 青岛海湾精细化工有限公司;IL-6 ELISA试剂盒、IL-13 ELISA试剂盒 南

京建成生物工程研究所; RT-PCR 试剂盒、逆转录试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒、RNA 提取(Trizol 法)试剂盒 上海翌圣生物科技股份有限公司; 兔抗 IL6 多克隆抗体、兔抗 IL1B 多克隆抗体、兔抗 MAPK3 多克隆抗体、兔抗 VEGFA 多克隆抗体、兔抗 PTGS2 多克隆抗体 上海酶联生物科技有限公司。

UV-5500 型紫外分光光度计、BS124S 型电子天平、B-600 型超微量分光光度计 上海元析仪器有限公司; TDL-5M 型台式大容量低温离心机 上海精密仪器仪表有限公司; 医用 KJR-602C 型超声雾化器 合肥康居人智能科技有限公司; SUNRISE 酶联免疫检测仪 瑞士 TECAN 公司; PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪 美国 Applied Biosystem 公司; 1645050 型基础电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽、小型 rans-Blot 转印槽 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 软儿梨止咳化痰作用网络药理学分析 通过调研, 收集文献已报道的软儿梨化学成分, TCMS、本草组鉴、ECTM 数据库中检索其对应的作用靶点。GeneCards 数据库中分别以关键词“咳嗽(cough)”和“痰(sputum)”检索, 得到与咳嗽和生痰相关的两组基因。将 GeneCards 数据库中所得两组基因与软儿梨的作用基因相映射, 得到软儿梨止咳化痰作用的靶点基因。Venny 2.1.0 绘制维恩图, Cytoscape 绘制软儿梨止咳化痰作用成分-靶点图。将软儿梨止咳化痰作用靶点基因提交至 Metascape 数据分析平台, 进行 GO 功能富集分析(包括 Biological process、Cellular component、Molecular function)和 KEGG 通路富集分析。将软儿梨止咳化痰作用靶点基因提交至 STRING 数据平台, 构建软儿梨止咳化痰作用靶点基因间的蛋白互作网络(PPI 网络)。利用 Cytoscape 插件 CytoHubba, 根据 Degree 值过滤出 PPI 网络中的关键基因(Top10 基因)。通过 Metascape 数据平台对 Top10 基因进行 KEGG 通路富集, 预测软儿梨止咳化痰作用可能涉及的信号通路。

1.3.2 软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因分子对接验证 Uiprot 数据库、PDB 数据库中检索下载 Top10 基因的蛋白结构, PubChem 数据库中下载 PPI 网络中排名前 3 位的化学成分 3D 结构。采用 Chem3D、Pymol 对受体和配体进行加氢、去水、均电荷等预处理, 采用 Autodock Vina 进行对接, 设置对接 20 次, 采用 Pymol 将结合能最小的对接结果可视化。

1.3.3 软儿梨止咳化痰作用动物试验验证

1.3.3.1 氨水引咳试验 SPF 级昆明种小鼠 50 只, 雌雄各半, 体重 18~20 g, 随机分为 5 组, 分别为软儿梨高、中、低剂量组(软儿梨原汁 0.2、0.15、0.1 mL/10 g), 麻杏止咳糖浆(0.1 mL/10 g)为阳性对照组, 生理盐水(0.1 mL/10 g)为空白对照组; 每天灌胃给药 1 次, 连续 10 d。于最后 1 次给药 1 h 后逐一将小鼠

放入钟罩内, 用医用超声雾化器以最大喷雾量(0.2 mL/min)向钟罩内喷入 25% 氨水气雾对小鼠进行引咳, 15 s 后将小鼠移出, 记录从开始喷雾到小鼠产生第一次咳嗽所需时间(咳嗽潜伏期)和 3 min 内咳嗽次数^[13]。小鼠典型咳嗽症状为: 腹部内缩, 同时张大口, 有咳嗽声。并按公式计算止咳率。

$$\text{止咳率(\%)} = \frac{\text{给药组咳嗽潜伏期}}{\text{空白组咳嗽潜伏期}} \times 100$$

1.3.3.2 酚红排泄试验 SPF 级昆明种小鼠 50 只, 雌雄各半, 分组及给药方法同氨水引咳试验。末次给药 30 min 后小鼠腹腔注射 5% 的酚红溶液 0.5 mL (0.5 g/kg), 30 min 后处死动物, 剥离甲状软骨下至气管分叉处的气管, 放入盛有 2 mL 生理盐水的试管中, 加入 1 mol/L 的 NaOH 0.1 mL 摇匀, 于波长 546 nm 处测吸光度, 根据标准曲线, 计算酚红含量($\mu\text{g/mL}$)^[14]。

1.3.3.3 ELISA 法检测血清炎症因子水平 氨水引咳试验中的小鼠, 记录咳嗽潜伏期和 3 min 内咳嗽次数后, 摘眼球取血, 离心取血清, 按 ELISA 试剂盒说明测定血清中 IL-6 和 IL-13 含量。

1.3.3.4 RT-PCR 检测肺组织中 IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3 的 mRNA 表达 氨水引咳试验中的小鼠, 摘眼球取血后, 处死动物, 冰上取出肺脏, 分成两份, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 分别供逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫印迹(WB)使用。取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的肺组织 50 mg, 按试剂盒说明书提取收集 RNA, 将得到的 RNA 溶于 DEPC 水中; 取溶解后的 RNA 2 μL , 微量分光光度计于 260、280 nm 处测定吸光度, 通过 A260/A280 计算 RNA 的纯度和浓度。通过逆转录试剂盒合成 cDNA, NCBI GeneBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Primer Bank(<http://harvard.edu>)搜索基因序列, 根据基因序列设计引物(引物序列见表 1), 采用实时荧光定量 PCR 扩增, 每个样品做 3 个复孔, 扩增条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环。

表 1 引物序列表
Table 1 Primer sequence

基因	引物	序列(5'→3')	长度
IL6	正向	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	170 bp
	反向	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	
VEGFA	正向	AGGGCAGAATCATCACAAGT	183 bp
	反向	AGGGTCTCGATTGGATGGCA	
PTGS2	正向	TAAGTGCATTGTACCCGGAC	285 bp
	反向	TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT	
IL1B	正向	AGCTACGAATCTCCGACCAC	289 bp
	反向	CGTTATCCCATGTGTGAAGAA	
MAPK3	正向	CTACACGCAGTTGCAGTACAT	213 bp
	反向	CAGCAGGATCTGGATCTCCC	

1.3.3.5 Western Blot 检测肺组织中 IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3 的蛋白表达 取适量

-80 ℃ 保存的肝脏组织加入裂解液, 8000 r/min, 4 ℃ 低温匀浆 10 min, 冰上裂解 20 min 后冻融 3 次, 低温离心 10 min(8000 r/min, 4 ℃), 取上清, 用 5× 上样缓冲液与蛋白样品按 1:4 的比例混合, 100 ℃ 变性 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜, 5% BSA 封闭 1 h, 一抗(1:1000 稀释)4 ℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 发光液显影, Image J 软件分析目的蛋白与内参蛋白的灰度值, 根据相应内参的灰度值计算目的蛋白的相对表达量。

1.4 数据处理

用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行处理, 计量资料用 $\bar{X}+SD$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 软儿梨止咳化痰作用网络药理学分析结果

经文献调研发现, 软儿梨中已见报道的化学成分有 51 个(表 2), 经 TCMSP、本草组鉴、ECTM 数据库检索得到对应作用靶点 282 个。GeneCards 数据库中与咳嗽相关的基因有 4425 个, 与生痰有关的基因有 1737 个, 三者映射重叠基因有 80 个(图 1a), 软儿梨止咳化痰作用成分-靶点-疾病映射图见图 1b。将 80 个交集基因提交至 Metascape 数据分析平台, 得到 KEGG 通路富集(图 1c)和 GO 功能富集(图 1d)结果, 如图可知, 这 80 个基因可能与细胞内过氧化物酶活性(Peroxidase activity)、抗氧化活性(Antioxidant activity)、氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)、对活性氧的反应(Response to reactive oxygen species)等生物过程有关, 机制可能涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、癌症信号通路等。通过 STRING 数据库, 构建软儿梨止咳化痰作用靶点基因间的蛋白互作网络(PPI 网络)(图 1e)。利用 Cytoscape 插件 CytoHubba, 根据 Degree 值过滤出 PPI 网络中的关键基因(Top10 基因)(图 1f), 分别是: *GAPDH*、*IL6*、*IL1B*、*VEGFA*、*PTGS2*、*JUN*、*CASP3*、*CXCL8*、*IL10*、*MAPK3*。Top10 基因与软儿梨中所含化学成分对应关系如图 1g 所示。对 Top10 基因进行 KEGG 通路富集分析, 前 20 条富集信号通路如图 1h 所示, 其中 12 条信号通路与细菌、病毒及寄生虫感染有关(Pertussis、Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection、Pathogenic *Escherichia coli* infection、Chagas disease、Human cytomegalovirus infection、Yersinia infection、Leishmaniasis、*Salmonella* infection、Amoebiasis、Malaria、Legionellosis、Hepatitis B), 4 条信号通路与免疫相关疾病有关(IL-17 signaling pathway、C-type lectin receptor signaling pathway、Rheumatoid arthritis、Toll-like receptor signaling pathway)(见图 1i), 提示软儿梨可能主要通过消除炎症感染、增加人体免疫力来发挥止咳化痰作用。

表 2 软儿梨化学成分表

Table 2 Chemical composition table of Ruanerli

序号	成分中文名	成分英文名	分子式	分子量(g/mol)
1	苹果酸	MLT(malic acid)	C ₄ H ₆ O ₅	134.09
2	柠檬酸	citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192.12
3	熊果苷	isohomoarbutin	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	286.28
4	儿茶酚	catechol	C ₆ H ₆ O ₂	110.11
5	绿原酸	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31
6	咖啡酸	caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.16
7	对香豆酸	(Z)-p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.16
8	阿魏酸	ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18
9	芦丁	rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5
10	2-甲基-丁醇	2-methyl-butanol	C ₅ H ₁₂ O	88.15
11	3,7-二甲基-6-辛烯	(R)-3,7-dimethyl-6-octen	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	212.33
12	反-2-己烯	trans-2-hexene	C ₆ H ₁₂	84.16
13	反-2-辛烯	trans-2-octen	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.25
14	环己醇	cyclohexanol	C ₆ H ₁₂ O	100.16
15	二氢杨梅素	dihydromyricetin	C ₉ H ₂₀ O	144.25
16	戊醇	amyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	88.15
17	辛醇	capryl alcohol	C ₈ H ₁₈ O	130.23
18	2-甲基萘	2-methylnaphthalene	C ₁₁ H ₁₀	142.2
19	邻苯二甲酸二乙酯	diethyl phthalate/dimethyl phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.24
20	反-2-辛烯醛	trans-2-octenal	C ₈ H ₁₄ O	126.2
21	庚醛	n-heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114.19
22	癸醛	1-decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156.26
23	己醛	hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100.16
24	壬醛	1-nonanaldehyde	C ₉ H ₁₈ O	142.24
25	戊醛	valeraldehyde	C ₅ H ₁₀ O	86.13
26	2-甲基丁酸	2-Methylbutyric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	102.13
27	3,4-二羟苯基-D-丙氨酸	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-d-alanine	C ₉ H ₁₁ NO ₄	197.19
28	β -苯基-L-丙氨酸	β -phenyl-L-alanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19
29	乙醛酸	glyoxylic acid	C ₂ H ₂ O ₃	74.04
30	棕榈酸	palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42
31	2-戊酮	2-pentanone	C ₅ H ₁₀ O	86.13
32	α -法呢烯	α -farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204.35
33	环十二烯	cyclododecene	C ₁₂ H ₂₂	166.3
34	十七烷甲酸	1-heptadecanecarboxylic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.5
35	苯甲酸苯酯	benzyl benzoate	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	212.24
36	醋酸丁酯	butyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.16
37	丁酸丁酯	butyl butyrate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21
38	3-苯基丁酸甲酯	3-benzyl methyl butyrate	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₃	344.4
39	丁酸乙酯	ethyl butyrate	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.16
40	核黄素	riboflavin	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.4
41	硫胺素	thiamine	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ ⁺	265.36
42	尼克酸	niacin	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11
43	维生素C	vitamin C	C ₆ H ₈ O ₆	176.12
44	蔗糖	cane sugar	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3
45	乙醇	ethanol	C ₂ H ₆ O	46.07
46	萘	naphthalene	C ₁₀ H ₈	128.169
47	丙酸	propionic acid	C ₃ H ₆ O ₂	74.08
48	乙酸	acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	60.05
49	丙酮	acetone	C ₃ H ₆ O	58.08
50	苯乙烯	styrene	C ₈ H ₈	104.15
51	甲苯	toluene	C ₇ H ₈	92.14

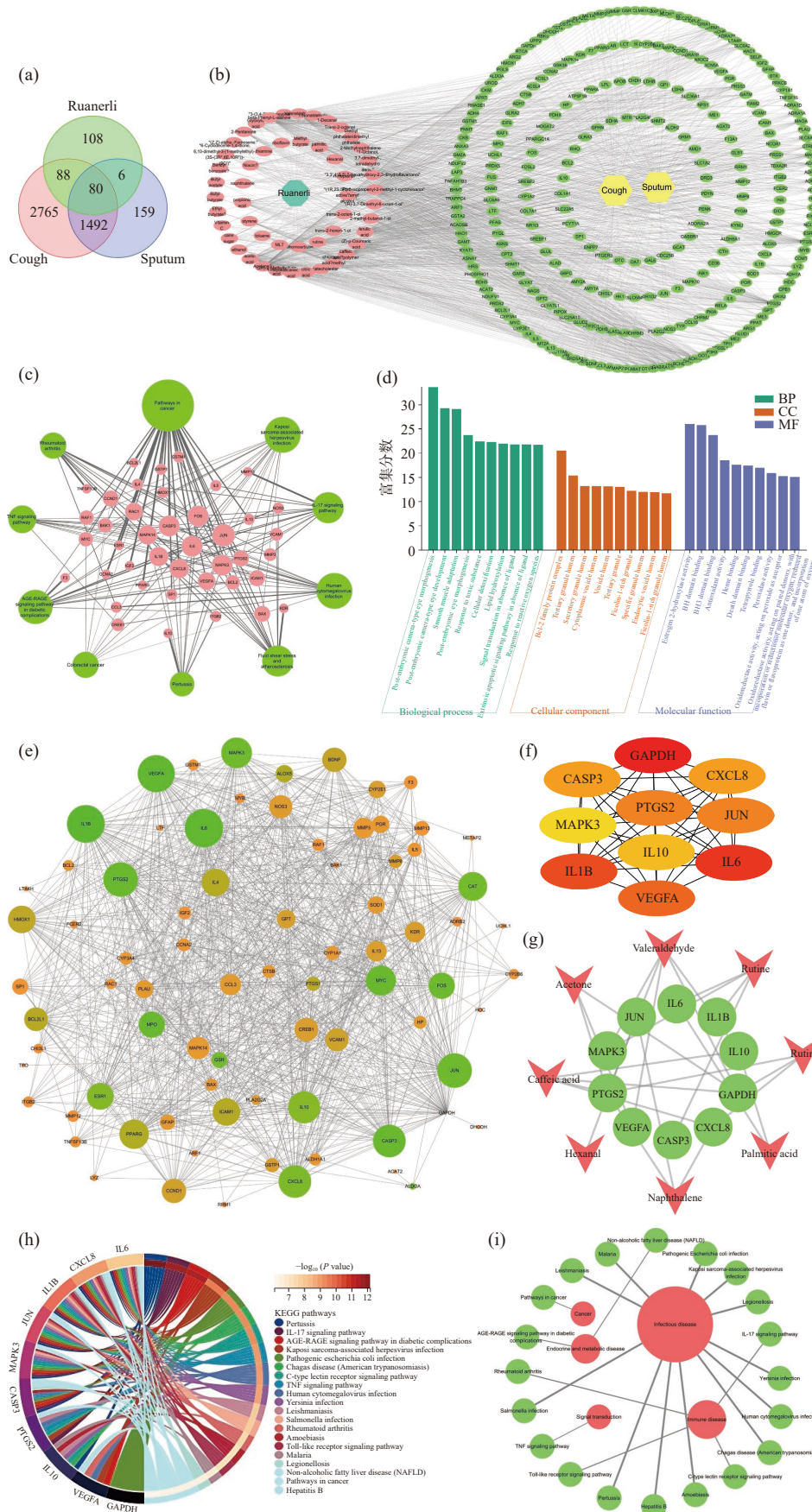


图 1 软儿梨止咳化痰作用网络药理学分析结果

Fig.1 Results of network pharmacological analysis on the antitussive and expectorant effects of Ruanerli

注: a: 软儿梨作用靶点基因-GeneCards 中止化痰基因韦恩图; b: 软儿梨-成分-靶点图; c: 软儿梨止咳化痰基因 KEGG 通路富集图; d: 软儿梨止咳化痰基因 GO 功能富集图; e: 软儿梨止咳化痰基因蛋白互作网络图; f: 软儿梨止咳化痰 Top10 基因; g: 软儿梨中所含化学成分-Top10 基因关系图; h: Top10 基因 KEGG 通路富集圈图; i: Top10 基因 KEGG 通路富集分组图。

2.2 软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因分子对接结果

分子对接结果显示,软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因与 PPI 网络中排名前 3 位的化学成分(咖啡酸、苦丁、戊醛)的结合能均小于-5 kcal/mol(见图 2),说明受体与配体能够自发结合,且具有较强的结合活性^[15],部分分子对接结果见图 3。

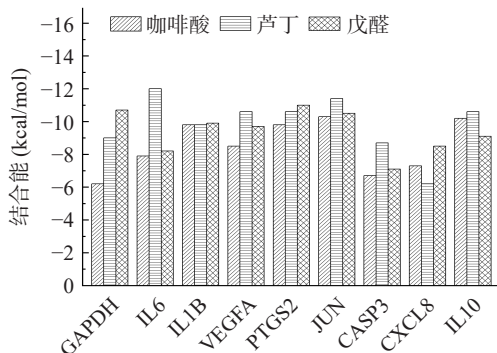


图 2 软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因蛋白与 Top3 活性成分结合能图

Fig.2 Binding energy graph of Top10 gene proteins for the antitussive and expectorant effects of Ruanerli and Top3 active components

2.3 软儿梨对氨水致小鼠咳嗽反应的影响

氨水是一种刺激性较强的化学物质,动物吸入氨水气雾后,可刺激呼吸道感受器,引起咳嗽^[13]。由表 3 可知,经氨水刺激后小鼠出现明显咳嗽反应。与空白组比较,软儿梨组小鼠咳嗽次数显著减少 ($P<0.05$),咳嗽潜伏期也有显著延长 ($P<0.05$),且作用呈剂量依赖性,提示软儿梨对氨水所致咳嗽有较好的抑制作用。

2.4 软儿梨对小鼠呼吸道酚红排泄的影响

酚红是一种对人体无害的染料,经腹腔注射进入小鼠体内后可部分由呼吸道排泄,由祛痰作用的药

物在使支气管分泌增加的同时,也使呼吸道黏膜的酚红排泄量增加,因此可由呼吸道酚红的排泄量间接推测药物的祛痰作用。在本实验中,酚红标准曲线为: $Y=0.81048X-0.05511, r^2=0.97959$ 。经与标准曲线对比发现,与空白组比较软儿梨组酚红排泄量显著增加 ($P<0.05$),其呈显著剂量依赖性 ($P<0.05$) (见表 4),提示软儿梨有促进支气管黏膜分泌(祛痰)的作用。

2.5 软儿梨对血清中炎症因子水平的影响

IL-6 是一个 26 kDa 的多肽,生物效应极为广泛,主要包括^[16-18]:调节 B 细胞的生长和分化;增强 CTL、NK 细胞的杀伤效应;刺激造血干细胞的增生分化;促进肝细胞合成急性相蛋白等。大量实验资料表明,IL-6 在维持机体生理平衡中具有十分重要的地位,体内 IL-6 的异常与多种疾病有关。IL-13 是趋化因子家族的一种细胞因子,可诱导单核细胞分化和炎症反应,在过敏、哮喘、肺纤维化和肿瘤发生中具有重要作用^[19-21]。在本实验中,经 ELISA 检测发现,经氨水刺激后,小鼠血清中 IL-6 和 IL-13 的水平明显升高,经软儿梨处理后 IL-6 和 IL-13 的水平显著降低 ($P<0.05$),且作用呈显著剂量依赖性 ($P<0.05$) (表 5),提示软儿梨可以降低血清中炎症介质的水平。

2.6 软儿梨对肺组织中 IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3 mRNA 表达及蛋白表达的影响

IL1 是趋化因子家族的一种细胞因子,IL1B 是其一种存在形式。低浓度的 IL-1 主要发挥免疫调节作用^[22-23],主要表现在: a. 与抗原协同作用,使 CD4+T 细胞活化,增加 IL-2R 表达; b. 促进 B 细胞生长和分化,可使脾细胞的溶血空斑数(PFC)增加 100 倍,说明 IL-1 也可促进抗体的形成; c. 促进单核巨噬细胞等的抗原递呈能力; d. 与 IL-2 或干扰素协同可以增强 NK 细胞活性; e. 吸引中性粒细胞,引起炎症介质

表 3 软儿梨对氨水致小鼠咳嗽反应的影响(n=10)

Table 3 Effect of Ruanerli on cough response induced by ammonia in mice (n=10)

组别	给药量(mL/10 g)	咳嗽潜伏期(s)	咳嗽次数(次/3 min)	止咳率(%)
空白对照组	生理盐水	35.1000±13.7554	15.9000±6.3675	100
软儿梨低剂量组	0.1	33.1111±8.2681	15.4444±8.8192	94.33
软儿梨中剂量组	0.15	50.9000±16.2580 [#]	11.2000±2.6998 [#]	145.01 [#]
软儿梨高剂量组	0.2	63.0000±26.7664 ^{#&}	7.6000±5.6999 ^{#&}	179.49 ^{#&}
麻杏止咳糖浆组	0.1	69.4000±19.1265 ^{#&}	6.3000±3.5917 ^{#&}	197.72 ^{#&}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与软儿梨低剂量组比较,# $P<0.05$;与软儿梨中剂量组比较,& $P<0.05$;表4-表6同。

表 4 软儿梨对小鼠呼吸道酚红排泄的影响

Table 4 Effect of Ruanerli on phenol red excretion in respiratory tract of mice

组别	动物数	给药量(mL/10 g)	酚红排泄量(μg/mL)
空白对照组	10	-	2.25±1.37
软儿梨低剂量组	10	0.1	2.44±0.89
软儿梨中剂量组	10	0.15	3.01±2.14 [#]
软儿梨高剂量组	10	0.2	3.85±2.01 ^{#&}
麻杏止咳糖浆组	10	0.1	4.18±1.56 ^{#&}

表 5 软儿梨对小鼠血清中炎症因子水平的影响(n=10)

Table 5 Effect of Ruanerli on serum levels of inflammatory factors in mice (n=10)

组别	给药量(mL/10 g)	IL-6(pg/mL)	IL-13(pg/mL)
空白对照组	-	5.61±1.34	0.81±0.11
软儿梨低剂量组	0.1	5.54±1.56	0.79±0.23
软儿梨中剂量组	0.15	3.90±1.02 [#]	0.62±0.15 [#]
软儿梨高剂量组	0.2	2.72±0.45 [#]	0.53±0.19 [#]
麻杏止咳糖浆组	0.1	2.32±0.78 ^{#&}	0.42±0.25 ^{#&}

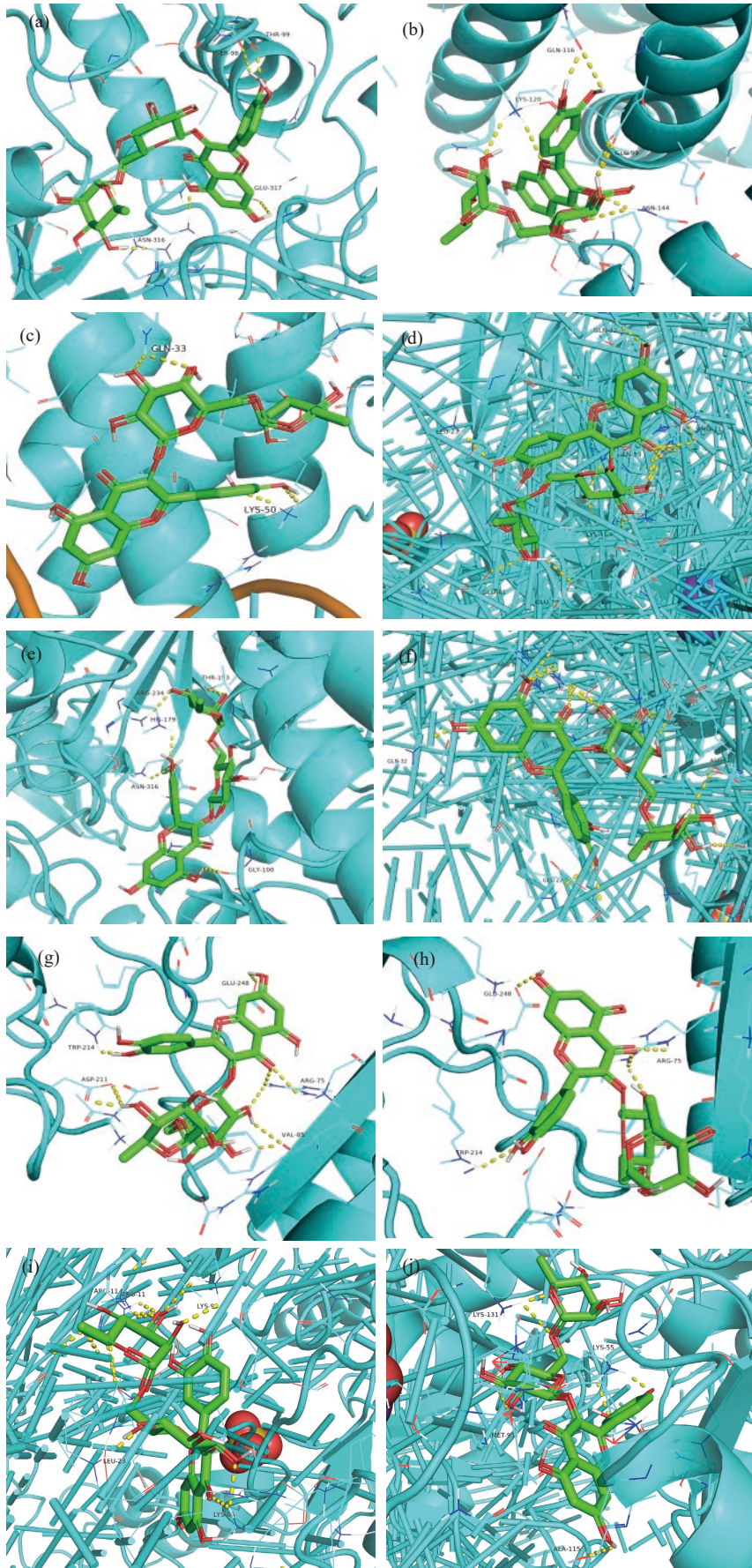


图 3 Top10 基因蛋白与芦丁分子对接图

Fig.3 Molecular docking diagram of Top10 gene proteins and rutin

注: a: GAPDH 与芦丁分子对接图; b: IL6 与芦丁分子对接图; c: IL1B 与芦丁分子对接图; d: VEGFA 与芦丁分子对接图; e: JUN 与芦丁分子对接图; f: PTGS2 与芦丁分子对接图; g: CASP3 与芦丁分子对接图; h: CXCL8 与芦丁分子对接图; i: IL10 与芦丁分子对接图; j: MAPK3 与芦丁分子对接图。

表6 软儿梨对肺组织中IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3蛋白表达的影响(n=10)

Table 6 Effect of Ruaneli on protein expression of IL6, IL1B, VEGFA, PTGS2 and MAPK3 in lung tissue (n=10)

组别	IL6	IL1B	VEGFA	PTGS2	MAPK3
空白对照组	0.855±0.0428	0.794±0.0397	0.571±0.0286	0.688±0.0344	0.613±0.0307
软儿梨低剂量组	0.762±0.0381*	0.712±0.0356*	0.532±0.0266*	0.645±0.03225*	0.589±0.02945*
软儿梨中剂量组	0.714±0.0357*#	0.665±0.03325*#	0.501±0.02505*#	0.574±0.0287*#	0.511±0.02555*#
软儿梨高剂量组	0.659±0.03295*#&	0.652±0.0326*#	0.449±0.02245*#&	0.415±0.02075*#&	0.456±0.0228*#&
麻杏止咳糖浆组	0.601±0.03005*#&	0.497±0.02485*#&	0.401±0.02005*#&	0.375±0.01875*#&	0.366±0.0183*#&

释放; f.可刺激多种不同的间质细胞释放蛋白分解酶并产生一些效应等。

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 又称血管通透因子(Vascular permeability factor, VPF)是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用, 其作用主要包括^[24-25]: a. 促进内皮细胞增生。VEGF是一种血管内皮细胞的特异性有丝分裂原, 在体外可促进血管内皮细胞的生长, 在体内可诱导血管增生。尤其是在低氧环境下, VEGF与内皮细胞膜上VEGF受体结合, 引起受体的自身磷酸化, 从而激活有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK), 实现VEGF的有丝分裂原特性, 诱导内皮细胞增生; b. 促进血管增生。在低氧环境下, VEGF通过提高血浆酶原活化因子(PA)和血浆酶原活化因子抑制因子-1(PAI-1)的mRNA表达, 来提高血浆酶原活化因子的活性, 促进细胞外蛋白水解, 进而促进新生毛细血管的形成; c. 增加血管通透性。VEGF是最强的可增加血管通透性的物质之一, 该作用主要通过细胞小囊泡器来实现的, 其特点是作用迅速、持续时间短。

前列腺素内过氧化物合成酶2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2), 又名环加氧酶2, 只存在于一些特殊的细胞内, 诱导、增强和传递疼痛及炎症信号^[26-27]。

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一组能被不同的细胞外刺激, 如细胞因子、神经递质、激素、细胞应激及细胞黏附等激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 参与调节细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理/病理过程^[28-29]。MAPK3是这个激酶家族的一员, 可作用于多个信号级联, 调节多种细胞过程, 如增殖、分化和细胞周期进程, 以响应各种细胞外信号^[30-31]。

在本实验中, 经RT-PCR和Western blot检测发现, 经氨水刺激后, 空白组小鼠肺组织中炎症相关基因(IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3)的mRNA水平和蛋白表达明显增加, 提示炎症激活。软儿梨中、高剂量组可显著降低炎症基因的mRNA水平和蛋白表达($P<0.05$), 且作用呈显著剂量依赖性($P<0.05$)(结果见表6、图4~图5), 提示软儿梨可能通过抑制炎症相关基因的表达, 进而降低血清中炎性

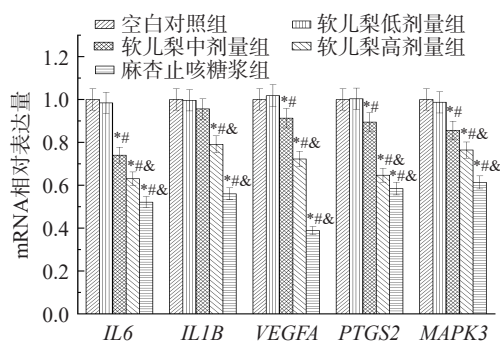


图4 软儿梨对肺组织中IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3 mRNA表达的影响(n=10)

Fig.4 Effect of Ruaneli on mRNA expression of IL6, IL1B, VEGFA, PTGS2 and MAPK3 in lung tissue (n=10)

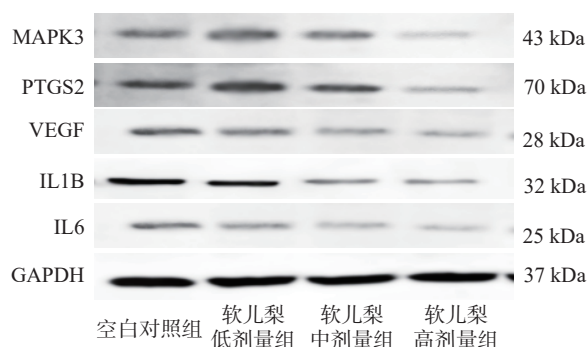


图5 软儿梨对肺组织中IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、MAPK3蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of Ruaneli on expression of IL6, IL1B, VEGFA, PTGS2 and MAPK3 proteins in lung tissue

介质含量, 发挥止咳化痰作用。

3 结论

通过文献调研发现软儿梨中已见报道的化学成分有51个, 对应作用靶点282个。与GeneCards数据库中咳嗽和生痰相关基因映射后得到80个软儿梨止咳化痰作用的相关基因。富集分析发现这80个基因可能与细胞内过氧化物酶活性、抗氧化活性、氧化还原酶活性、对活性氧的反应等生物过程有关, 机制可能涉及TNF信号通路、IL-17信号通路、癌症信号通路等。根据Dgree值, 从PPI网络中筛选出了软儿梨止咳化痰作用的Top10基因(GAPDH、IL6、IL1B、VEGFA、PTGS2、JUN、CASP3、CXCL8、IL10、MAPK3)。通过对Top10基因进行KEGG通路富集分析发现, 在前20条富集信号通路中12条与细菌、病毒及寄生虫感染有关, 4条与免疫相关疾

病有关,提示软儿梨可能主要通过消除炎症感染、增加人体免疫力来发挥止咳化痰作用。分子对接结果显示,软儿梨止咳化痰作用 Top10 基因与 PPI 网络中排名前 3 位的化学成分(咖啡酸、芦丁、戊醛)可以自由结合,且具有较小的结合能。动物试验表明,软儿梨可以明显抑制小鼠氨水引发的咳嗽反应,增加小鼠气管酚红的排泄量,降低血清中炎症介质 IL-6 和 IL-13 水平;PCR 和 WB 检测结果显示,软儿梨可显著降低炎症相关基因 *IL6*、*IL1B*、*VEGFA*、*PTGS2*、*MAPK3* 的 mRNA 水平和蛋白表达,且作用与剂量成正比,这与生信分析结果相符,提示软儿梨的止咳化痰作用可能与降低炎症基因表达,减少致炎因子释放有关。由于客观条件限制,本文未对软儿梨止咳化痰作用做进一步的研究,其中涉及的深层机制还需要更深入的探讨。

参考文献

- [1] 吕艳杭,黄文宝,陈卿倩,等.《伤寒论》咳嗽病六经辨治规律与临床应用[J]. *环球中医药*, 2021, 14(4): 722-726. [LÜ Y H, HUANG W B, CHEN Q Q, et al. Treatise on Febrile Diseases "cough disease six meridians syndrome differentiation and clinical application of law and clinical application[J]. *Global Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 14(4): 722-726.]
- [2] 朱育红,王怡.治疗咳嗽中成药的辨证使用[J]. *首都医药*, 2012, 19(6): 46-47. [ZHU Y H, WANG Y. The dialectical use of Chinese patent medicine in the treatment of cough[J]. *Capital Medicine*, 2012, 19(6): 46-47.]
- [3] 李为贵.从虚证、寒证论治慢性咳嗽[J]. *湖北中医杂志*, 2012, 34(4): 34-35. [LI W G. Treating chronic cough from deficiency syndrome and cold syndrome[J]. *Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 34(4): 34-35.]
- [4] 潘家文.基于数据挖掘的感染后咳嗽中医药规律研究[D]. 广州:广州中医药大学,2019. [PAN J W. Data mining on the treatment of postinfectious cough by traditional chinese medicine[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2019.]
- [5] 谢剑鹏,李建生,王至婉等.基于现代名老中医经验的咳嗽病因病机及证素规律研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(4): 1409-1412. [XIE J P, LI J S, WANG Z W, et al. Regularity of etiology pathogenesis and syndrome factors of cough based on the experience of modern famous doctors of traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 31(4): 1409-1412.]
- [6] 张作良,康晓文,梁永林等.浅析"五脏六腑皆令人咳,非独肺也"[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(10): 124-126. [ZHANG Z L, KANG X W, LIANG Y L, et al. Analysis on "The Viscera all cause cough, not only Lung" [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine Information*, 2019, 26(10): 124-126.]
- [7] 符琼方,胡朋,杨文秀等.钩藤饮子合小青龙汤辨证治疗咳嗽变异性哮喘(风邪犯肺证)的效果及对外周血白三烯 D4、C4 及尿白三烯 E4 水平的影响[J]. *天津中医药大学学报*, 2022, 41(3): 317-321. [FU Q F, HU P, YANG W X, et al. Efficacy of Gouteng Yinzi with Xiaoqinglong decoction in the dialectical treatment of cough variant asthma (pathogenic wind invading the lung) and its influence on levels of peripheral blood leukotriene D4 and C4 and urinary leukotriene E4[J]. *Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 41(3): 317-321.]
- [8] 薛贝,张毅杰,张山等.基于数据挖掘的中医药治疗感染后咳嗽用药规律研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(13): 1854-1858,1864. [XUE B, ZHANG Y J, ZHANG S, et al. Research on the medication rule of traditional Chinese medicine in the treatment of post-infectious cough based on data mining[J]. *Journal of Modern Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2022, 31(13): 1854-1858,1864.]
- [9] 高曰媚,黄振炎,黄慧欣.养阴清肺法治疗燥热伤肺型喉源性咳嗽临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(6): 1274-1279. [GAO X M, HUANG Z Y, HUANG H X. Clinical observation on the effect of therapy of Nourishing Yin to clear lung for the treatment of laryngeal cough with Dryness-heat impairing lung syndrome[J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 39(6): 1274-1279.]
- [10] 王程,杨来胜,杨磊.甘味品牌—兰州软儿梨[J]. *西北园艺(果树)*, 2022(4): 65-67. [WANG C, YANG L S, YANG L. Sweet brand —Lanzhou Ruanerli [J]. *Northwest Horticulture (fruit trees)*, 2022(4): 65-67.]
- [11] 黄毅君.软儿梨和热冬果[J]. *中医健康养生*, 2017(11): 69. [HUANG Y J, Ruanerli and Redongguo[J]. *Chinese Medicine Health*, 2017(11): 69.]
- [12] 张忠,马朝玲,丁若琚,等.不同解冻方式对软儿梨果实品质与抗氧化物质含量的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 236-244. [ZHANG Z, MA Z L, DING R J, et al. Effects of different thawing methods on fruit quality and antioxidant compound contents of Ruaner Pear[J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 236-244.]
- [13] 毛姝英,金蔚,付思思,等.口服脾多肽改善氨水诱导的小鼠咳嗽和体内炎症[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(6): 601-607. [MAO Z Y, JING Z, FU S S, et al. Oral lienal peptides improve ammonia-induced coughing and inflammation in mice[J]. *Chinese Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2022, 27(6): 601-607.]
- [14] 刘泱泱.艾叶油治疗慢性支气管炎的实验研究[J]. *中国现代药物应用*, 2022, 16(21): 186-190. [LIU Y Y. Experimental study on the treatment of chronic bronchitis with mugwort oil[J]. *Modern Drug Application in China*, 2022, 16(21): 186-190.]
- [15] MATSUZAKA Y, YASHIRO R. Molecular docking and intracellular translocation of extracellular vesicles for efficient drug delivery[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12971.
- [16] GROZA Y, JEMELKOVA J, KAFKOVA L R, et al. IL-6 and its role in IgA nephropathy development[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 66: 1-14.
- [17] MILLER C L, MADSEN J C. Targeting IL-6 to prevent cardiac allograft rejection[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(S4): 12-17.
- [18] FORCINA L, FRANCESCHI C, MUSARÒ A. The hormetic and hermetic role of IL-6[J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 80: 101697.
- [19] LAMIABLE O, BREWERTON M, RONCHESE F. IL-13 in dermal type-2 dendritic cell specialization: From function to therapeutic targeting[J]. *Eur J Immunol*, 2022, 52(7): 1047-1057.
- [20] DARCY Q, GHARAEI-KERMANI M, ZHILIN-ROTH A, et al. The IL-4/IL-13 signaling axis promotes prostatic fibrosis[J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0275064.
- [21] ZHANG Y, JING D, CHENG J, et al. The efficacy and safety of IL-13 inhibitors in atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 923362.
- [22] GONZÁLEZ L, RIVERA K, ANDIA M E, et al. The IL-1 Family and its role in Atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 17-42.
- [23] KHAROUF F, TSEMACH-TOREN T, BEN-CHETRIT E. IL-1 inhibition in familial mediterranean fever: Clinical outcomes

- and expectations[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(8): 1567–1574.
- [24] AHMAD A, NAWAZ M I. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2022, 123(12): 1938–1965.
- [25] CALVO P M, HERNÁNDEZ R G, DELA CRUZ R R, et al. VEGF is an essential retrograde trophic factor for motoneurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(26): e2202912119.
- [26] ROHNER E, YANG R, FOO K S, et al. Unlocking the promise of mRNA therapeutics[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(11): 1586–1600.
- [27] LIU K, ZHAO M, LI Y, et al. VEGF loaded porcine decellularized adipose tissue derived hydrogel could enhance angiogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2022, 33(5): 569–589.
- [28] LI S, HAN X, LU Z, et al. MAPK cascades and transcriptional factors: Regulation of heavy metal tolerance in plants[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4463–4476.
- [29] CHENG Y, CHEN J, SHI Y, et al. MAPK signaling pathway in oral squamous cell carcinoma: Biological function and targeted therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(19): 4625–4642.
- [30] XIE Y, DING M, YIN X, et al. MAPKK2/4/5/7-MAPK3-JAZs modulate phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Phytochemistry*, 2022, 199: 113177.
- [31] KLINK V P, ALKHAROUF N W, LAWRENCE K S, et al. The heterologous expression of conserved *Glycine max* (soybean) mitogen activated protein kinase 3 (MAPK3) paralogs suppresses *Meloidogyne incognita* parasitism in *Gossypium hirsutum* (upland cotton)[J]. *Transgenic Res*, 2022, 31(4-5): 457–487.