

基于网络药理学的枳术丸治疗慢传输型便秘的潜在分子机制

武鹏飞¹, 庞雪², 辛学知²

1 山东中医药大学, 济南 250014; 2 山东第一医科大学第一附属医院

摘要: **目的** 基于网络药理学的方法预测枳术丸治疗慢传输型便秘 (STC) 的作用靶点和信号通路, 探讨其治疗的分子机制。 **方法** 通过 TCMSP 数据库和相关文献资料挖掘枳术丸中两味中药枳实和白术的主要化学成分及其作用靶点, 然后利用 Cytoscape3.7.2 软件构建药物分子-靶点网络; 通过搜索“Slow Transit Constipation”关键词, 从 Gene Cards、OMIM、Drugbank 数据库搜集 STC 致病相关靶点, 应用 String 平台进行蛋白质相互作用的分析和网络构建, 并对核心靶点进行网络拓扑分析; 应用 Bioconductor 生物信息软件包, 在 R 语言软件中进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析, 然后构建 STC 靶点-通路网络。 **结果** 枳术丸主要活性成分为 22 种化合物 (枳实 18 种、白术 4 种), 对应的作用靶点 126 个, 治疗 STC 的核心活性成分为木犀草素、柚皮素、川陈皮素、异橙黄酮、3 β -白术乙酰基等。共得到 STC 致病相关靶点 861 个, 其中枳术丸治疗 STC 的核心靶点有 MAPK3、MAPK1、AKT1、IL6、TP53、JUN 等。GO 富集分析得到 GO 条目 2 024 个, 其中生物过程 1 890 个, 细胞组成 51 个, 分子功能 83 个; KEGG 通路分析共得到 162 条信号通路, 涉及 IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路等。通过 STC 致病靶点-信号通路网络进一步明确, 枳术丸治疗 STC 核心靶点主要有 AKT1、MAPK3、MAPK1、RELA、TP53 等。 **结论** 枳术丸是通过多种成分、多个靶点、多条通路来发挥调治 STC 的作用, 其核心活性成分为木犀草素、柚皮素、川陈皮素、异橙黄酮、3 β -白术乙酰基等, 作用的核心靶点主要有 AKT1、MAPK3、MAPK1、RELA、TP53。

关键词: 枳术丸; 网络药理学; 慢传输型便秘; 木犀草素; 柚皮素

doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.32.007

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2020)32-0027-04



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Potential molecular mechanism of Zhizhu pills in treatment of slow-transit constipation based on network pharmacology

WU Pengfei¹, PANG Xue, XIN Xuezhi

1 Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To predict the target and signal pathway of Zhizhu pills in the treatment of slow-transit constipation (STC) using the method based on network pharmacology, and to explore the molecular mechanism of its treatment.

Methods The main chemical components and action targets of two Chinese herbal drugs in Zhizhu pills were explored through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database and the related literature. Then, Cytoscape3.7.2 software was used to construct a drug molecule-target network. By searching for the "Slow-Transit Constipation" keyword, the relevant targets of STC were mined through Gene Cards, OMIM, and Drug-Bank databases. String platform was applied to analyze protein-protein interaction and network construction, and network topology analysis was carried out for core targets. The Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were carried out in R language software by applying bioconductor biological information software package, and then STC target-pathway network was constructed. **Results** According to the screening conditions and accessing literature, 22 active ingredients (Zhishi 18, Baizhu 4), and 126 potential drug targets were obtained. The main active ingredients in Zhizhu pills to treat STC included luteolin, naringenin, nobiletin, Isosinensetin, 3 β -acetoxyatractylone, et al. A total of 861 disease-related STC targets were obtained, and the genes with high core were regarded as hub-genes (MAPK3, MAPK1, AKT1, IL6, TP53, JUN). GO enrichment analysis obtained 2 024 GO items, in-

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划(2017WS802)齐鲁医派中医学学术流派建设项目(山东辛氏肛肠中医药特色技术,鲁卫函 2020-132); 山东省名老中医药专家辛学知传承工作室(鲁卫函 2019-92)。

第一作者简介: 武鹏飞(1993-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为中西医结合肛肠病学。E-mail: 584267346@qq.com

通信作者简介: 辛学知(1964-), 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为中西医结合肛肠病学。E-mail: sinxz@sina.com

cluding 1 890 biological processes (BP) entries, 51 cell components (CC) entries, and 83 molecular functions (MF) entries. A total of 162 signaling pathways were obtained by KEGG pathway analysis, including the IL-17 signaling pathway and the PI3K-Akt signaling pathway, et al. Through the STC pathogenic target-signal pathway network, it was further clarified that the core targets of STC treatment were mainly AKT1, MAPK3, MAPK1, RELA, and TP53. **Conclusions** Zhizhu pills can treat STC through multiple components, multiple targets, and multiple pathways. The core active ingredients in Zhizhu pills are luteolin, naringenin, nobiletin, Isosinensetin, and 3 β -acetoxyatractylone, et al, and the core targets for STC treatment are MAPK3, MAPK1, AKT1, IL6, TP53, and JUN.

Key words: Zhizhu pills; network pharmacology; slow-transit constipation; luteolin; naringenin

慢传输型便秘 (STC) 是因为结肠动力障碍, 肠内容物通过结肠过慢或停滞所引发的便秘。临床中西医对于 STC 的治疗常采用促分泌剂、促动力剂、手术等手段, 但不良反应较大, 甚至加重便秘。枳术丸出自李东垣的《内外伤辨惑论》, 全方仅枳实、白术两味药, 但配伍巧妙。现代药理学研究表明, 白术中主要活性成分为内酯类, 具有促进胃肠蠕动和吸收的作用; 枳实中主要活性成分为生物碱和黄酮类, 具有改善胃和小肠排空、抗炎、抗菌、抗氧化的作用。但是, 该药在细胞与分子层面的机制尚未阐明。2020 年 3~5 月, 我们以网络药理学为依托, 结合分子靶点与疾病之间的相互作用, 探索枳术丸治疗 STC 的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 枳术丸主要化学成分及其作用靶点筛选 依托中药系统药理学 (TCMSP) 数据库^[1] (<http://tcmsp.com/tcm-sp.php>), 输入组成枳术丸的两味中药名枳实、白术, 搜索得到各自的化学成分; 以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为指标对化合物进行筛选, 得到符合条件的化合物; 再次通过查询该平台, 得到与化合物对应的蛋白质靶点。此外, 通过查阅已发表的文献, 补充因筛选指标而被舍弃的重要化合物的靶点。为得到标准化的蛋白质靶点信息, 将得到的靶点上传至 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 进行规范。

1.2 药物分子-靶点网络构建及 STC 致病相关靶点筛选 将上述枳术丸中各药物的化合物及蛋白质靶点上传 Cytoscape3.7.2 软件, 进行枳术丸化合物-靶点网络的构建。通过 Gene Cards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org>), 以“Slow transit constipation”为关键词, 挖掘 STC 的疾病潜在靶点, 通过 Drugbank 数据库^[2] (<https://www.drugbank.ca>) 搜索治疗 STC 的一线西药靶点作为补充。根据经验筛选大于“Relevance score”中位数的靶点作为 STC 的潜在靶点, 若靶点过多, 则再次筛选; 将上述结果与 OMIM 数据库搜索得到的结果整合, 删除重复值, 得到 STC 的潜在致

病靶点。

1.3 药物靶点与疾病靶点蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 为进一步明晰枳术丸药物相关靶点与 STC 疾病靶点之间的作用, 将二者靶点取交集, 在 R 语言软件上绘制韦恩图; 将二者交集靶点上传至 String11.0 平台^[3] (<https://string-db.org>), 最小相互作用阈值“highest confidence”选择 > 0.9 , 其余设置均为默认值, 得到 PPI 网络。

1.4 PPI 网络拓扑分析与核心靶点筛选 选择 Cytoscape3.7.2 软件中的 BisoGenet 插件, 点击“Tools-Network Analyzer-Network Analysis-Analyze Network”, 对 PPI 网络进行功能分析; 然后利用 CytoNCA 插件进行网络拓扑分析, 在 Centralities 中勾选除“degree”之外的全部选项, 点击“analyze”进行分析, 并将结果以 .csv 格式导出, 以便使用 Excel 打开查看。根据经验, 若靶点过多则使用关键属性值的 2 倍中位数作为核心靶点筛选条件的最小值, 第一次筛选条件设定为 degree > 50 , 第二次筛选条件设定为 degree > 166 、betweenness $> 1\ 578.81$ 。

1.5 核心靶点的 GO 富集分析与 KEGG 通路分析 利用 Bioconductor 生物信息软件包 (<http://www.bioconductor.org>), 使用 R 语言软件, 以 $P \leq 0.05$ 对核心靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析, 并选取 P 值排名前 20 的结果。

1.6 STC 致病靶点-信号通路网络构建 通过 Cytoscape3.7.2 软件构建 STC 致病靶点-信号通路网络图, 进一步明确靶点与信号通路在枳术丸治疗 STC 中的作用。

2 结果

2.1 枳术丸活性成分及其靶点 通过 TCMSP 数据库初步提取枳实化学成分 65 种、白术化学成分 55 种, 经过 ADME 筛选后获得枳实 18 种、白术 4 种 (表 1)。再将上述化学成分输入 TCMSP 数据库, 搜索与之相对应的成分作用靶点, 经筛选后获得枳实 266、白术 22 个, 合并以后删除重复值共得到成分作用靶点 126 个。

2.2 药物分子-靶点网络构建结果 从药物分子-靶点网络中共得到 149 个节点, 309 条边。其

表 1 枳术丸主要活性成分

| 药物 | MOLID | 标记 | 化合物名称 | 生物利用度(%) | 类药性 |
|----|-----------|------|---|----------|------|
| 白术 | MOL000022 | BZ1 | 14-乙酰-12-千里光酰基-2E,8Z,10E-顺式白术三醇 (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙烷-2-yl]octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二水-1H-环戊二烯 | 63.37 | 0.30 |
| 白术 | MOL000033 | BZ2 | [a]菲酚-3-ol | 36.23 | 0.78 |
| 白术 | MOL000049 | BZ3 | 3β-白术乙酰基 | 54.07 | 0.22 |
| 白术 | MOL000072 | BZ4 | 8β-白术乙氧基Ⅲ | 35.95 | 0.21 |
| 枳实 | MOL013277 | ZS1 | 异橙黄酮 | 51.15 | 0.44 |
| 枳实 | MOL013279 | ZS2 | 5,7,4'-三甲基芹黄素 | 39.83 | 0.30 |
| 枳实 | MOL013428 | ZS3 | 香风草甙 | 41.24 | 0.72 |
| 枳实 | MOL013430 | ZS4 | 栓翅芹内酯 | 43.60 | 0.29 |
| 枳实 | MOL013435 | ZS5 | 枸橼香豆精 | 63.62 | 0.35 |
| 枳实 | MOL013436 | ZS6 | 异构枸橼香豆精 | 63.28 | 0.31 |
| 枳实 | MOL013437 | ZS7 | 6-甲氧基葡萄内酯 | 31.24 | 0.30 |
| 枳实 | MOL001798 | ZS8 | 新橙皮甙 | 71.17 | 0.27 |
| 枳实 | MOL001803 | ZS9 | 甜橙黄酮 | 50.56 | 0.45 |
| 枳实 | MOL001941 | ZS10 | 欧前胡素 | 34.55 | 0.22 |
| 枳实 | MOL002914 | ZS11 | 黄烷酮 | 41.35 | 0.24 |
| 枳实 | MOL004328 | ZS12 | 柚皮素 | 59.29 | 0.21 |
| 枳实 | MOL005100 | ZS13 | 5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基)苯并二氢吡喃-4-酮 | 47.74 | 0.27 |
| 枳实 | MOL005828 | ZS14 | 川陈皮素 | 61.67 | 0.52 |
| 枳实 | MOL005849 | ZS15 | 香蜂草苷 | 38.55 | 0.24 |
| 枳实 | MOL000006 | ZS16 | 木犀草素 | 36.16 | 0.25 |
| 枳实 | MOL007879 | ZS17 | 四甲氧基木犀草素 | 43.68 | 0.37 |
| 枳实 | MOL009053 | ZS18 | 4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-羟丙基-1-enyl]-7-甲氧基-3-羟甲基-2,3-二氢苯并呋喃-2-yl]-2-甲氧基-苯酚 | 50.76 | 0.39 |

中枳术丸治疗 STC 的核心活性成分为木犀草素、柚皮素、川陈皮素等。

2.3 STC 致病相关靶点获取结果 搜索关键词得到靶点 3 278 个,经筛选、整合、删重最终得到 861 个 STC 潜在致病靶点。

2.4 枳术丸药物靶点与 STC 致病靶点 PPI 网络构建结果 将枳术丸药物靶点与 STC 致病靶点取交集,得到共同靶点 67 个;将得到交集靶点 PPI 网络,得到枳术丸治疗 STC 的核心靶点有 MAPK3、MAPK1、AKT1、IL6、TP53、JUN 等。

2.5 PPI 网络拓扑分析结果 根据“1.4”之中的筛选条件,得到一个 7 768 个节点、176 055 条边的 PPI 网络图;以 degree 值的 2 倍中位数进行一次筛选后,得到一个 2 091 个节点、86 910 条边的 PPI 网络图;再以 degree 值、betweenness 值的 2 倍中位数进行筛选后,得到一个 192 个节点、6 579 条边的 PPI 网络图。

2.6 核心靶点的 GO 富集分析与 KEGG 通路分析结果

2.6.1 GO 富集分析结果 共得出生物学过程 (BP)1 890 个、分子功能(MF)51 个、细胞组成(CC)83 个;BP 涉及细胞对氧化应激的反应、对活性氧的反应、对辐射的反应、对紫外线(UV)的反应,CC 涉及细胞周期素—依赖性蛋白激酶全酶复合物、丝氨

酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、蛋白激酶复合物、膜筏、膜微域等,MF 涉及磷酸酶结合、泛素—样蛋白连接酶结合、蛋白磷酸酶结合、泛素蛋白连接酶结合、BH 结构域绑定等。

2.6.2 KEGG 通路分析结果 共得出 162 条通路,其共同靶点在前列腺癌、内分泌抗性、乙型肝炎、卡波西肉瘤—相关疱疹病毒感染等疾病和 IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路上富集较多。

2.7 STC 致病靶点—信号通路网络构建结果 通过 STC 致病靶点—信号通路网络进一步明确,枳术丸治疗 STC 核心靶点主要有 AKT1、MAPK3、MAPK1、RELA、TP53 等。

3 讨论

中药复方治疗 STC 自古就有良好的效果,其治疗效果优于临床一线西药。刘芳等^[4]研究发现,对于 STC 热秘证患者,服用枳实导滞丸加减比服用枸橼酸莫沙比利分散片联合麻仁丸效果更优,且复发率更低。王浩^[5]通过随机对照试验表明,使用枳术丸可以改善老年 STC 患者的便秘症状和生活质量。动物实验发现,生白术可以通过提高大鼠结肠组织 c-Kit mRNA 表达,修复结肠 Cajal 间质细胞,恢复结肠平滑肌的收缩性,促进蠕动^[6];另外,枳实挥发油中的 D-柠檬烯可通过调节肠道菌群达到治疗 STC 的效果^[7]。研究还发现,枳术丸可通过提高小鼠结

肠组织中 PLC- γ 1 与 PLC- γ 2 蛋白和 mRNA 表达,有效促进其胃肠道运动,改善便秘症状^[8]。

本研究通过网络筛选结果显示,枳术丸中主要活性成分为木犀草素、柚皮素、川陈皮素、异橙黄酮、3 β -白术乙酰基等。研究表明,木犀草素可通过抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,从而减少一氧化氮(NO)产生^[9]。NO 可进入胃肠道平滑肌细胞,抑制结肠平滑肌收缩,使结肠运动变得缓慢,导致 STC 发生^[10]。肠道微生物紊乱被认为是功能性胃肠道疾病的重要病理生理学基础,而柚皮素对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等有良好的抑菌作用^[11]。川陈皮素可双向调节小肠平滑肌的收缩性,动物实验中,可显著提高小肠组织中的肌球蛋白磷酸化,上调肌球蛋白轻链激酶 mRNA 和蛋白表达^[12]。

本研究结果表明,枳术丸治疗 STC 的靶点主要集中在 AKT1、MAPK3、MAPK1、RELA、TP53。MAPK 是由多个蛋白质组成的一个复杂通路,对于细胞的增殖、分化和凋亡过程发挥着重要调节作用^[13]。MAPK 对水通道蛋白(AQPs)在细胞中的表达有着调节作用,而 AQPs 主要分布于参与水分吸收和传输的组织当中,起着促进调节水分运输的作用^[14]。马雪巍等^[15]发现,AQP3 在便秘大鼠结肠近端组织的表达较正常大鼠明显提高,并且抑制 AQP3 表达可减少结肠对于水分的吸收。AKT1、RELA、TP53 可能对肠道动力学发挥作用,但目前研究较少,机制不明确。

GO 分析发现,枳术丸调治 STC 的 BP 主要富集在细胞对氧化应激的反应、对活性氧的反应、对辐射的反应、对 UV 的反应等。KEGG 分析结果显示,枳术丸治疗 STC 的主要通路为 IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路。研究表明,PI3K/AKT 信号转导通路可以调节炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-8)的产生和释放;而 TNF- α 可诱导 NO 产生,影响微循环及胃肠道平滑肌的运动^[16]。IL-17 信号通路及相关的 IL-17 家族(IL-17A~F)参与炎症、自身免疫、感染等方面的调控。研究表明,IL-17A 可诱导 iNOS 和环氧合酶 2(COX-2)的表达^[17]。有实验发现,当结肠不完全机械性肠梗阻大鼠梗阻近端扩张的平滑肌细胞收缩能力明显下降时,其 COX-2 mRNA 和蛋白表达均明显上升;COX-2 基因缺陷小鼠结肠运动功能受影响程度较小,抑制 COX-2 表达可恢复平滑肌的收缩功能^[18]。

本研究表明,枳术丸通过多种成分、多个靶点、多条通路发挥治疗作用。但是,由于网络药理学其本身的局限性和中药成分、疾病靶点数据库信息收集不全面,以及不同药物在体内相互作用机制不明确等因素,本研究结果将进行后续临床观察进一步验证。

参考文献:

- [1] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014,6(1):1-6.
- [2] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018,46(D1):1074-1082.
- [3] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. String v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019,47(D1):607-613.
- [4] 刘芳,魏先鹏,唐学贵. 枳实导滞丸加减治疗慢传输型便秘热积便秘证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(2):92-97.
- [5] 王浩. 枳术丸加减治疗老年慢传输型便秘的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [6] 王文革,次苗苗,张俊红,等. 生白术对慢传输型便秘大鼠 c-kit mRNA 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(8):1098-1102.
- [7] 王梁凤,柳小莉,李慧婷,等. 基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(8):1909-1917.
- [8] 王伟松,夏旭婷,刘富林,等. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠肠道运动及 PLC- γ 1/PLC- γ 2 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(10):8-14.
- [9] Günter S, Irmgard M, Christoph S. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. Planta Med, 2008,74(14):1667-1677.
- [10] 张喻然,王波. 济川煎加味联合腹针对慢传输型便秘(脾肾阳虚型)疗效及对血清 SP 和 NO 水平的干预影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2018,26(3):238-242.
- [11] Zhang Y, Wang JF, Dong J, et al. Inhibition of α -toxin production by subinhibitory concentrations of naringenin controls Staphylococcus aureus pneumonia[J]. Fitoterapia, 2013,86:92-99.
- [12] 熊永建. 川陈皮素诱导肠动力平衡和缓解炎性肠病研究[D]. 大连:大连医科大学,2015.
- [13] Liang YJ, Yang WX. Kinesins in MAPK cascade: how kinesin motors are involved in the MAPK pathway[J]. Gene, 2019,684:1-9.
- [14] Moeller HB, Fuglsang CH, Fenton RA. Renal aquaporins and water balance disorders[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016,30(2):277-288.
- [15] 马雪巍,刘传佳,唐学贵. 增液汤对慢传输型便秘大鼠结肠 AQP3 和血清中 NOS 的影响[J/OL]. 中华中医药学刊:1-19 [2020-05-21]. <http://kns.cnki.net/kems/detail/21.1546.R.20191028.1554.056.html>.
- [16] 李德意,辛学知,庞雪. 慢传输型便秘神经递质改变的病机研究进展[J]. 中国肛肠病杂志,2018,38(9):66-68.
- [17] Yoichiro I, Harumichi I, Shinobu S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. Immunity, 2011,34(2):149-62.
- [18] Shi XZ, Lin YM, Powell DW. Pathophysiology of motility dysfunction in bowel obstruction: role of stretch-induced COX-2[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011,300(1):99-108.

(收稿日期:2020-06-03)