

# 基于网络药理学探索附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制

杨 艺<sup>1\*</sup>, 王冬梅<sup>2\*</sup>, 刘 毅<sup>3#</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院, 四川 成都

<sup>2</sup>成都中医药大学基础医学院, 四川 成都

<sup>3</sup>成都中医药大学临床医学院, 四川 成都

Email: #tcmly@163.com

收稿日期: 2021年7月7日; 录用日期: 2021年8月24日; 发布日期: 2021年8月31日

## 摘 要

目的: 运用网络药理学探讨附子理中汤治疗溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)的潜在作用机制。方法: 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获得附子理中汤的化学成分和作用靶点蛋白, 通过DisGeNET、OMIM数据库检索获取UC疾病的相关靶点, 利用venny2.1.0在线作图工具对药物和疾病的靶点进行映射, 使用STRING数据库构建蛋白互作(PPI)网络, 利用Metascape在线作图软件对交集靶点进行GO生物过程分析和KEGG通路富集分析, 并使用R软件及Cytoscape软件对结果进行绘图可视化。结果: 筛选得到附子理中汤中药活性化学成分104个, 与UC相关的活性化学成分98个, 与UC共同作用靶点107个; PPI网络涉及89节点, 452条边, 得到STAT3、JUN、TNF等十个核心靶点; GO功能富集分析得到2157条GO目录, 其中生物过程(BP) 1978条, 分子功能(MF) 124条, 细胞组分(CC) 55条, 包括对炎症的反应、对脂多糖的反应、对细菌原分子的反应和活性氧代谢等; KEGG富集筛选得到164条信号通路, 主要有AGE-RACE信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、白细胞介素信号17通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等信号通路, 主要与代谢、免疫炎症以及氧化应激相关。结论: 附子理中汤治疗UC主要是通过槲皮素、山萘酚、柚皮素、刺芒柄花素、甘草查尔酮a等活性成分作用于STAT3、JUN、TNF等关键靶点基因从而调节多条生物学功能与信号通路, 最终达到治疗溃疡性结肠炎的作用。

## 关键词

附子理中汤, 溃疡性结肠炎, 网络药理学

## Mechanism of Fuzilizhong Decoction on the Treatment of Ulcerative Colitis by Network Pharmacology

\*共同一作。

#通讯作者。

Yi Yang<sup>1\*</sup>, Dongmei Wang<sup>2\*</sup>, Yi Liu<sup>3#</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

<sup>2</sup>School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

<sup>3</sup>School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

Email: #tcmlly@163.com

Received: Jul. 7<sup>th</sup>, 2021; accepted: Aug. 24<sup>th</sup>, 2021; published: Aug. 31<sup>st</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** To explore the mechanism of Fuzilizhong decoction (FLD) in the treatment for ulcerative colitis (UC) by Network pharmacology. **Methods:** The known components and associated targets of FLD were obtained from TCMSD database. The disease targets for UC were obtained from the DisGeNET, OMIM databases. Effective targets were obtained after mapping the above two parts of targets by using venny 2.1.0 online mapping tool. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed from STRING database. Gene ontology (GO), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis were conducted through Metascape, the results were visualized by Cytoscape and R softwares. **Results:** Through screening, 104 main active components of FLD were obtained, only 98 active components related to the UC disease, and 107 targets were related to the UC disease. A total of 89 nodes and 452 edges were involved in the PPI network. 10 key targets were obtained, such as STAT3, JUN, TNF and so on. Metascape was used for GO enrichment analysis and the results showed that there were 1978 biological processes, 124 molecular functions and 55 cell components, including inflammatory response, response to lipopolysaccharide, response to molecule of bacterial origin and reactive oxygen species metabolic process and so on. Enrichment analysis of KEGG showed that there were 164 signal pathways such as AGE-RAGE, IL-17, TNF, HIF-1 signal pathways, which were mainly related to metabolism, immune inflammation and oxidative stress. **Conclusion:** Fuzilizhong Decoction in the treatment of ulcerative colitis mainly through quercetin, kaempferol, naringenin, formononetin, licochalcone acts on STAT3, JUN, TNF, so as to regulate multiple biological functions and signal pathways, and finally achieve the therapeutic effect.

## Keywords

Fuzilizhong Decoction, Ulcerative Colitis, Network Pharmacology

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

溃疡性结肠炎是一种与遗传、免疫、感染、环境等因素密切相关的常见慢性肠道炎症性疾病，病变多位于乙状结肠和直肠，主要有腹泻腹痛、粘液便秘、脓血、里急后重等临床表现[1]。该疾病病情复杂迁延、难以痊愈、反复发作，多发病于青壮年群体，且发生癌变的可能性较大，早已经被世界卫生组织定为现代难治疾病之一。临床上西医常规治疗 UC 短期效果明显，但无法完全治愈。溃疡性结肠炎在中医学中属“痢疾”“便血”“肠风”“泄泻”“肠癖”“滞下”等范畴，病因涉及外感六淫、劳倦过度、

饮食不节、情志内伤等，其主要病机为湿热阻滞、热毒蕴结兼脾肾阳，系由脾胃虚弱，运化失司，水湿内停，蕴结于肠道，湿热内盛，热壅血瘀，血络受损而成痢疾并贯穿于始终，是复发之根本，故健脾益气是 UC 的首要治法，由此可知，脾虚是 UC 的关键病理因素[2] [3]。由此，可以采用《三因极一一病证方论》卷二中的附子理中汤一方，附子温补先天真阳，白术健脾燥湿、干姜温胃散寒，人参补气益阴，炙甘草调和诸药。临床用于治疗 UC 疗效佳，然其具体作用机制尚不完全清楚。基于此，本研究借助网络药理学方法系统性分析附子理中汤治疗 UC 的作用机制，旨在为进一步研究提供参考方向。

### 1.1. 附子理中汤药物化学成分及相关靶点搜寻

附子理中汤含有附子、人参、白术、甘草、干姜五味中药，运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索附子理中汤的药物活性化学成分，以口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$ 、类药性(DL)  $\geq 0.18$  为标准对所有活性成分进行筛选，剔除缺少靶点预测数据的化合物，并搜集有效化学成分相关靶点。将搜寻到的附子理中汤靶点导入 UniPort，物种选定为 human，对检索得到的所有蛋白靶点校正为 UniProt ID。

### 1.2. “溃疡性结肠炎”疾病靶点搜集

以“Ulcerative Colitis”作为搜索关键词，利用 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)，对该疾病已知靶点基因进行检索与筛选，合并各数据库的疾病靶点，删除检索结果中重复的靶点，导入 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行标准化处理。

### 1.3. 韦恩图的绘制、药物疾病交集靶点及药物 - 成分 - 疾病 - 靶点网络的构建

将校正后的“溃疡性结肠炎”疾病靶点与“附子理中汤”有效成分靶点导入 venny2.1.0 在线作图工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)获得药物 - 疾病交集靶点及其韦恩图，药物名称、交集靶点、有效成分导入 Cytoscape3.6.0 软件进行映射，构建药物 - 成分 - 靶点 - 疾病网络图。

### 1.4. 蛋白互作网络构建及核心靶点的筛选

将药物 - 疾病交集靶点导入 STRING11.0 数据库(<https://string-db.org/>)选择 multiple proteins 模式，将研究物种设置为人类，最低相互作用阈值设为高等信度 0.9 (highest confidence)并选择隐藏游离节点，从而构建附子理中汤治疗溃疡性结肠炎 PPI 网络图。下载 TSV 数据文件，并将其导入 Cytoscape3.6.0 软件使用 cytoHubba 模块 Degree 算法分析筛选综合评分排名前 10 位的靶点作为附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的核心靶点，并生成核心靶点蛋白互作网络。网络中节点(node)的颜色默认按 Degree 从高到低，由红色向黄渐变。

### 1.5. 基因本体(gene ontology, GO)功能富集与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

利用 Metascape 在线数据库，将交集靶点上传至 Metascape，参数设置为 Homo species，采用“Custom Analysis”模式，分别对 GO 功能富集分析中生物过程、分子功能、细胞组成以及 KEGG 信号通路进行生物富集，并运用 R 语言对信号通路富集分析结果进行可视化处理。

## 2. 结果

### 2.1. 附子理中汤药物化学成分及相关靶点搜寻

以口服生物利用度 OB  $\geq 30\%$  且类药性 DL  $\geq 0.18$  为筛选条件，通过 TCMSP 查找附子理中汤中药(人

参、附子、干姜、白术、甘草)药物活性化学成分, 获得活性成分 108 个(含重复), 分别为附子 6 个, 人参 5 个, 白术 4 个, 甘草 88 个(见表 1)。其中干姜和人参共同活性成分 1 个: *beta*-sitosterol, 对应靶点 37 个; 甘草和人参共同活性成分 1 个: *kaempferol*, 对应靶点 60 个, 附子、干姜、甘草共同活性化学成分 1 个: *sitosterol*, 对应靶点 3 个。删除重复数据后得到 104 个活性成分, 对应 391 个作用靶点, 其中存在 164 个重复靶点。

**Table 1.** Active ingredients of Fuzilizhong Decoction

**表 1.** 附子理中汤活性成分

中药	Mol ID	Molecule name	MW (相对分子质量)	OB (%) > 30	DL > 0.18
白术	MOL00022	14-acetyl-12-senecieryl-2E,8Z, 10E-atractylentriol	356.45	63.37	0.3
白术	MOL00033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl -17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4, 7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H -cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	428.82	36.23	0.78
白术	MOL00049	3 $\beta$ -acetoxyatractylone	274.39	54.07	0.22
白术	MOL00072	8 $\beta$ -ethoxy atractylenolide III	276.41	35.95	0.21
干姜	MOL002464	1-Monolinolein	354.59	37.18	0.3
干姜	MOL002501	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4 -oxo-1-cyclopent-2-enyl](1R,3R)-3-[(E) -3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl] -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	360.49	62.52	0.31
干姜	MOL002514	Sexangularetin	316.28	62.86	0.3
干姜	MOL000358	<i>beta</i> -sitosterol	414.79	36.91	0.75
干姜	MOL000359	<i>sitosterol</i>	414.79	36.91	0.75
人参	MOL002879	Diop	390.62	43.59	0.39
人参	MOL000449	Stigmasterol	412.77	43.83	0.76
人参	MOL003648	Inermin	284.28	65.83	0.54
人参	MOL000358	<i>beta</i> -sitosterol	414.79	36.91	0.75
人参	MOL000422	<i>kaempferol</i>	286.25	41.88	0.24
附子	MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	308.56	39.99	0.2
附子	MOL002388	Delphin_qt	303.26	57.76	0.28
附子	MOL002392	Deltoin	328.39	46.69	0.37
附子	MOL002395	Deoxyandrographolide	334.5	56.3	0.31
附子	MOL002398	Karanjin	292.3	69.56	0.34
附子	MOL000359	<i>sitosterol</i>	414.79	36.91	0.75
甘草	MOL000098	<i>quercetin</i>	302.25	46.43	0.28
甘草	MOL000211	Mairin	456.78	55.38	0.78
甘草	MOL000239	Jaranol	314.31	50.83	0.29

## Continued

甘草	MOL000354	isorhamnetin	316.28	49.6	0.31
甘草	MOL000359	sitosterol	414.79	36.91	0.75
甘草	MOL000392	formononetin	268.28	69.67	0.21
甘草	MOL000417	Calycosin	284.28	47.75	0.24
甘草	MOL000422	kaempferol	286.25	41.88	0.24
甘草	MOL000497	licochalcone a	338.43	40.79	0.29
甘草	MOL000500	Vestitol	272.32	74.66	0.21
甘草	MOL001484	Inermine	284.28	75.18	0.54
甘草	MOL001792	DFV	256.27	32.76	0.18
甘草	MOL002311	Glycyrol	366.39	90.78	0.67
甘草	MOL002565	Medicarpin	270.3	49.22	0.34
甘草	MOL003656	Lupiwighteone	338.38	51.64	0.37
甘草	MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	266.31	42.56	0.2
甘草	MOL004328	naringenin	272.27	59.29	0.21
甘草	MOL004805	(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydroprano[2,3-f]chromen-4-one	390.51	31.79	0.72
甘草	MOL004806	euchrenone	406.56	30.29	0.57
甘草	MOL004808	glyasperin B	370.43	65.22	0.44
甘草	MOL004810	glyasperin F	354.38	75.84	0.54
甘草	MOL004811	Glyasperin C	356.45	45.56	0.4
甘草	MOL004814	Isotrifoliol	298.26	31.94	0.42
甘草	MOL004815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	322.38	39.62	0.35
甘草	MOL004820	kanzonols W	336.36	50.48	0.52
甘草	MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	384.41	60.25	0.63
甘草	MOL004827	Semilicoisoflavone B	352.36	48.78	0.55
甘草	MOL004828	Glepidotin A	338.38	44.72	0.35
甘草	MOL004829	Glepidotin B	340.4	64.46	0.34
甘草	MOL004833	Phaseolinisoflavan	324.4	32.01	0.45
甘草	MOL004835	Glypallchalcone	284.33	61.6	0.19
甘草	MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	308.35	58.44	0.38
甘草	MOL004841	Licochalcone B	286.3	76.76	0.19
甘草	MOL004848	licochalcone G	354.43	49.25	0.32

## Continued

甘草	MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl) -8-(1,1-dimethylprop-2-enyl) -7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	368.41	59.62	0.43
甘草	MOL004855	Licoricone	382.44	63.58	0.47
甘草	MOL004856	Gancaonin A	352.41	51.08	0.4
甘草	MOL004857	Gancaonin B	368.41	48.79	0.45
甘草	MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy -8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	693.71	32.89	0.27
甘草	MOL004864	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl) -8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	352.41	30.49	0.41
甘草	MOL004866	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy -6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	354.38	44.15	0.41
甘草	MOL004879	Glycyrrin	382.44	52.61	0.47
甘草	MOL004882	Licocoumarone	340.4	33.21	0.36
甘草	MOL004883	Licoisoflavone	354.38	41.61	0.42
甘草	MOL004884	Licoisoflavone B	352.36	38.93	0.55
甘草	MOL004885	licoisoflavanone	354.38	52.47	0.54
甘草	MOL004891	shinpterocarpin	322.38	80.3	0.73
甘草	MOL004898	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut -2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl) prop-2-en-1-one	340.4	46.27	0.31
甘草	MOL004903	liquiritin	418.43	65.69	0.74
甘草	MOL004904	licopyranocoumarin	384.41	80.36	0.65
甘草	MOL004907	Glyzaglabrin	512.75	34.32	0.55
甘草	MOL004908	Glabridin	324.4	53.25	0.47
甘草	MOL004910	Glabranin	324.4	52.9	0.31
甘草	MOL004911	Glabrene	322.38	46.27	0.44
甘草	MOL004912	Glabrone	336.36	52.51	0.5
甘草	MOL004913	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano [3,2-c]chromenone	298.26	48.14	0.43
甘草	MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano [3,2-c]chromenone	328.29	62.9	0.53
甘草	MOL004915	Eurycarpin A	338.38	43.28	0.37
甘草	MOL004924	(-)-Medicocarpin	432.46	40.99	0.95
甘草	MOL004935	Sigmoidin-B	356.4	34.88	0.41
甘草	MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	256.27	71.12	0.18
甘草	MOL004945	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) -8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	324.4	36.57	0.32
甘草	MOL004948	Isoglycyrol	366.39	44.7	0.84

## Continued

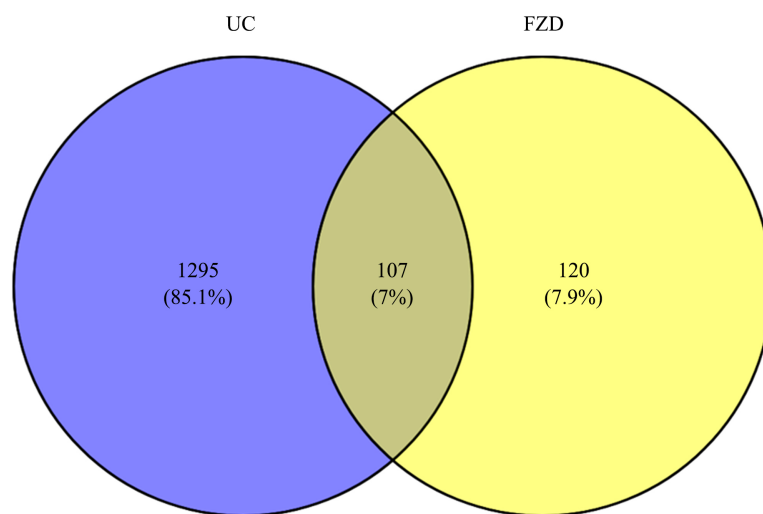
甘草	MOL004949	Isolicoflavonol	354.38	45.17	0.42
甘草	MOL004957	HMO	268.28	38.37	0.21
甘草	MOL004959	1-Methoxyphaseollidin	354.43	69.98	0.64
甘草	MOL004961	Quercetin der.	330.31	46.45	0.33
甘草	MOL004966	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin	354.43	43.71	0.57
甘草	MOL004974	3'-Methoxyglabridin	354.43	46.16	0.57
甘草	MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano [6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	338.43	36.21	0.52
甘草	MOL004980	Inflacoumarin A	322.38	39.71	0.33
甘草	MOL004985	icos-5-enoic acid	310.58	30.7	0.2
甘草	MOL004988	Kanzonol F	420.54	32.47	0.89
甘草	MOL004989	6-prenylated eriodictyol	356.4	39.22	0.41
甘草	MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy -3-arylcoumarin	300.28	83.71	0.27
甘草	MOL004991	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	294.32	38.92	0.26
甘草	MOL004993	8-prenylated eriodictyol	356.4	53.79	0.4
甘草	MOL004996	gadelaidic acid	310.58	30.7	0.2
甘草	MOL005000	Gancaonin G	352.41	60.44	0.39
甘草	MOL005001	Gancaonin H	420.49	50.1	0.78
甘草	MOL005003	Licoagrocarpin	338.43	58.81	0.58
甘草	MOL005007	Glyasperins M	368.41	72.67	0.59
甘草	MOL005008	Glycyrrhiza flavonol A	370.38	41.28	0.6
甘草	MOL005012	Licoagroisoflavone	336.36	57.28	0.49
甘草	MOL005016	Odoratin	314.31	49.95	0.3
甘草	MOL005017	Phaseol	336.36	78.77	0.58
甘草	MOL005018	Xambioona	388.49	54.85	0.87
甘草	MOL005020	dehydroglyasperins C	340.4	53.82	0.37

## 2.2. “溃疡性结肠炎”疾病靶点搜集

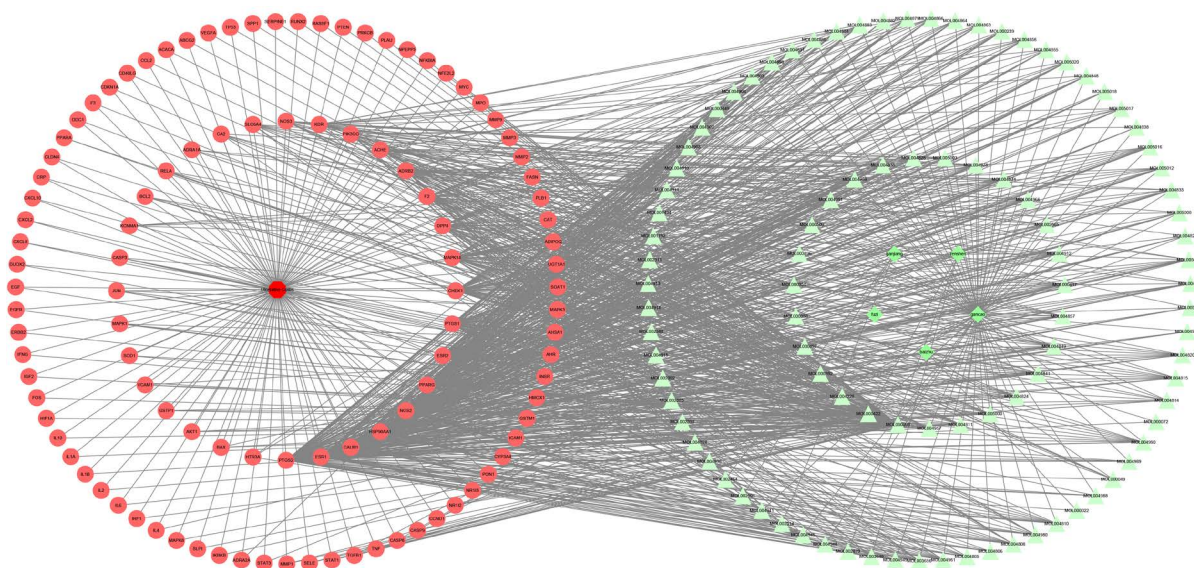
以“Ulcerative Colitis”为关键词在在线人类孟德尔遗传数据库 OMIM、DisGeNET 数据库中进行检索, 得到 UC 相关基因靶标, 两个数据库合并、去重后导入 UniProt 数据库对靶标进行标准化处理, 得到 1402 靶标基因, OMIM 数据库 181 个, DisGeNET 数据库 1331 个。

## 2.3. 韦恩图的绘制、药物疾病交集靶点及药物-成分-疾病-靶点网络的构建

将附子理中汤药物成分相关靶点、溃疡性结肠炎疾病相关靶点导入 venny2.1.0 在线作图工具, 共获得 STAT3、IL10、SELE、CXCL10、IL6、IL4 等 107 个交集靶点及韦恩图(见图 1); 将药物-疾病交集靶点与药物有效成分相互作用关系及属性文件导入 Cytoscape3.6.0 软件并进行映射, 构建药物-成分-靶点-疾病网络图(见图 2)。



**Figure 1.** Venn's diagrams of Fuzilizhong Decoction-UC targets  
**图 1.** 附子理中汤 - 溃疡性结肠炎靶点韦恩图



(注：该图 211 个节点，包括 98 个活性成分，107 个靶点，5 味中药和 1 个疾病，1174 条边，其中圆节点代表靶点，三角形节点代表化合物，菱形节点代表中药，正六边形节点代表疾病。)

**Figure 2.** Drug-component-target-disease interaction network  
**图 2.** 药物 - 成分 - 靶点 - 疾病网络

#### 2.4. 蛋白互作网络构建及核心靶点的筛选

将药物 - 疾病 107 个交集靶点导入 STRING11.0 数据库，选择 multiple proteins 模式，将研究物种设置为人类，最低相互作用阈值设为最高信度 0.9 (high confidence) 并选择隐藏游离节点，下载 TSV 数据文件，并将其导入 Cytoscape3.6.0 软件生成蛋白互作网络 PPI，共得到 89 节点，452 条边，蛋白互作网络图节点(node)大小、颜色与 Degree 成正相关(见图 3)。用 cytoHubba 插件的 Degree 算法分析筛选综合评分排名前 10 位的靶点作为附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的核心靶点，根据 STAT3、JUN、TNF 等核心靶点生成核心靶点蛋白互作网络，网络中节点(node)的颜色默认按 Degree 从高到低，由红色向黄渐变(见图 4)。



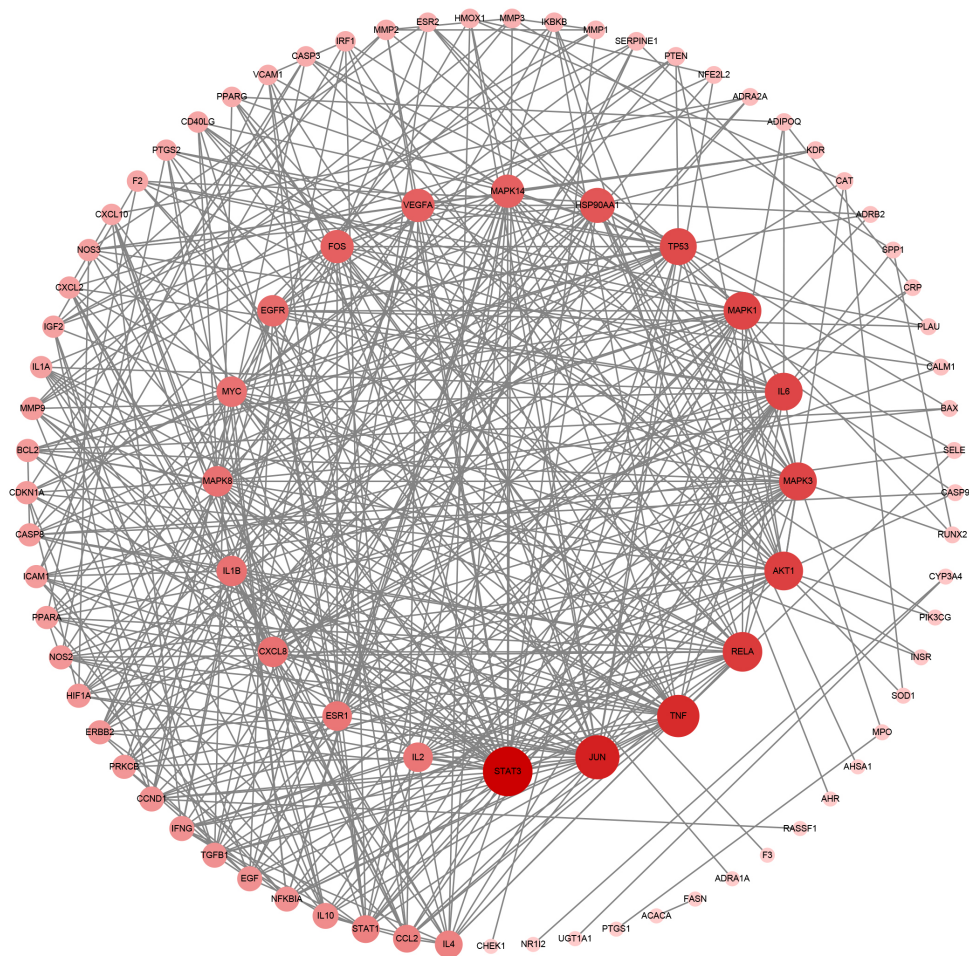


Figure 3. Protein-protein interaction network  
图 3. 蛋白互作网络图(PPI)

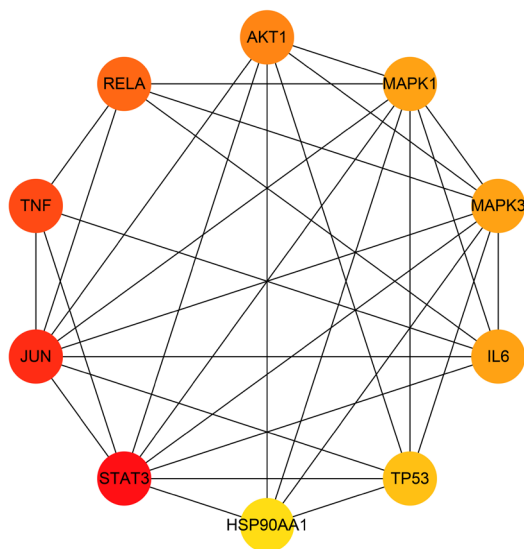


Figure 4. Interaction network diagram of core genes  
图 4. 核心靶点蛋白互作网络图

## 2.5. 基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集与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

利用 Metascape 在线数据库(<https://metascape.org/>), 将附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的交集靶点上传至 Metascape, 参数设置为 Homo species, 采用“Custom Analysis”模式进行 GO 功能分析, 共获得生物过程(biological process, BP) 1978 个, 分子功能(molecular function, MF) 124 个, 细胞组成(cellular component, CC) 55 个, 根据 $-\log_{10}(\text{pvalue})$ 大小, 运用 R 语言分别对前 20 条通路进行可视化分析(见图 5、图 6、图 7)。根据图 5、图 6、图 7 可知附子理中汤治疗溃疡型结肠炎可能参与了炎症反应、对脂多糖的反应、对细菌原分子的反应、活性氧代谢过程、细胞迁移的正调节等生物过程; 也参与了细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体调节器活动、受体配体活性、信号受体活活化器活性、蛋白质同化、DNA 结合转录因子结合、转录因子结合、RNA 特异性聚合酶 IIDNA 结合转录因子结合、蛋白质激酶结合等分子功能; 还参与了膜筏、微膜区、囊泡腔、分泌颗粒腔、细胞质囊泡腔、髓鞘等细胞部位的形成。

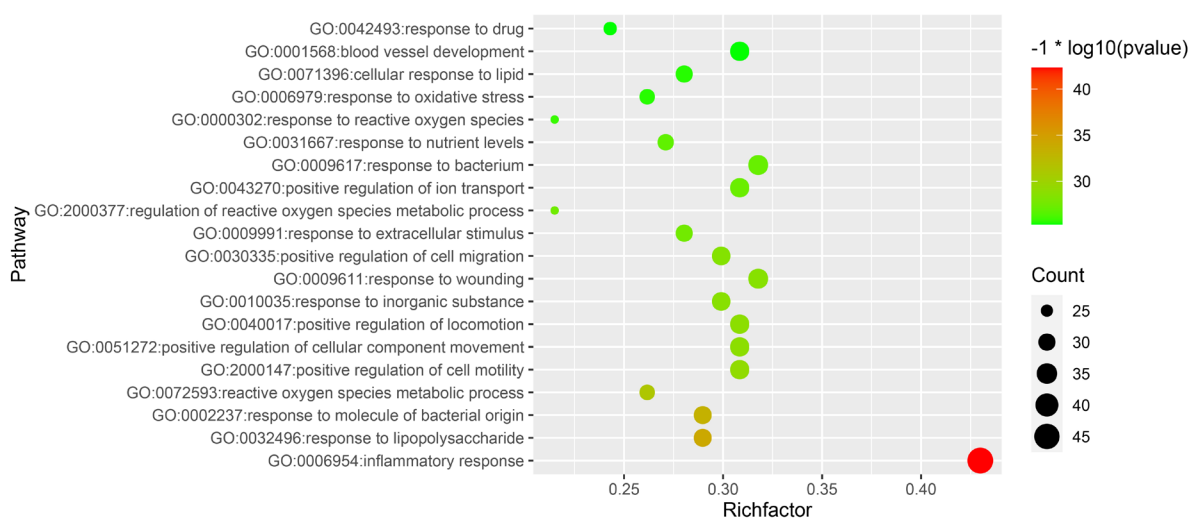


Figure 5. GO analysis of biological process (top 20)

图 5. GO 生物过程分析(top 20)

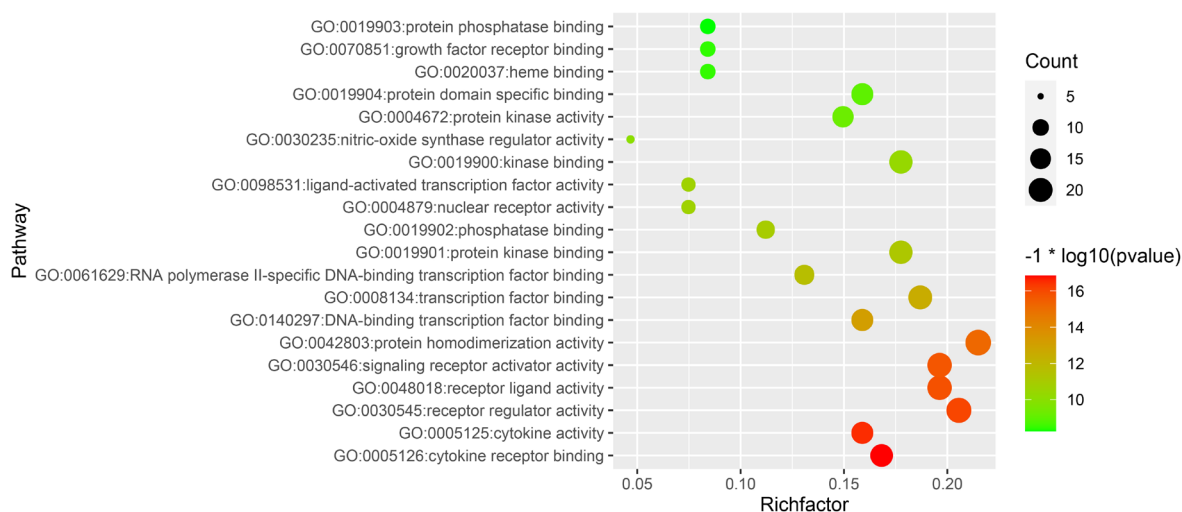
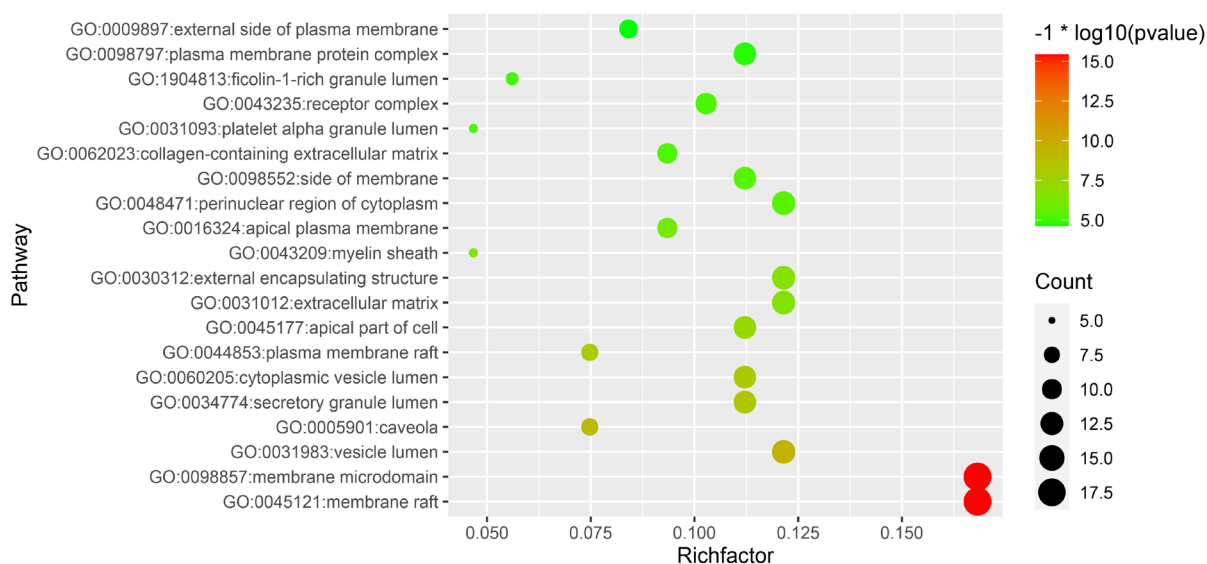


Figure 6. GO analysis of molecular function (top 20)

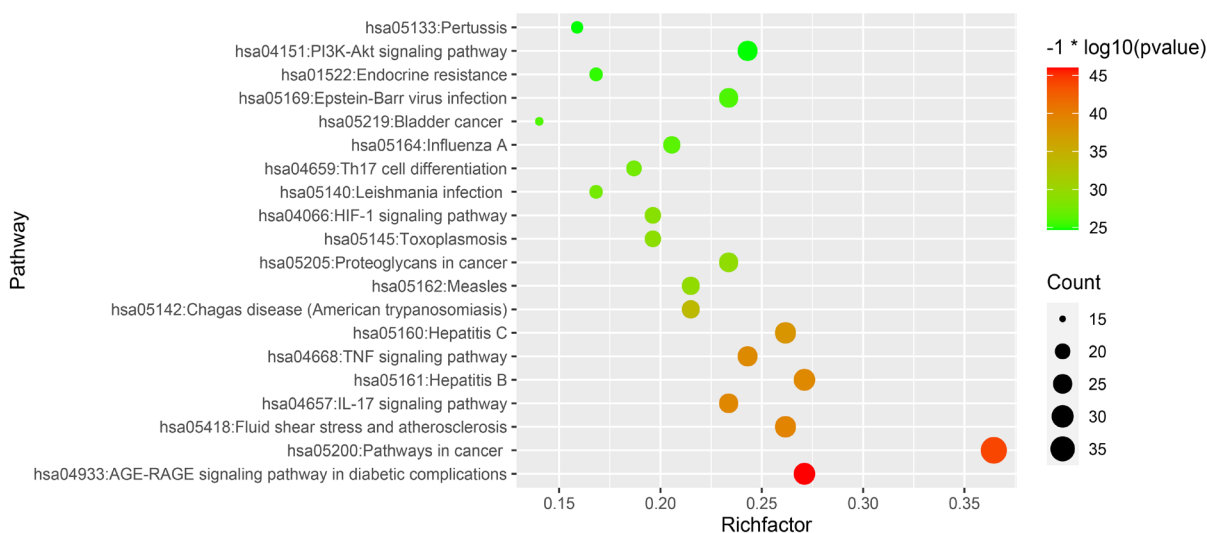
图 6. GO 分子功能分析(top 20)



**Figure 7.** GO analysis of cellular component (top 20)

**图 7.** GO 细胞组分分析(top 20)

通过 Metascape 进行 KEGG 信号通路富集分析获得 164 条信号通路, 根据  $-\log_{10}(pvalue)$  排序, 运用 R 语言对前 20 条 KEGG 通路进行可视化分析(见图 8)。靠前的通路有 AGE-RACE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、致癌通路(Pathways in cancer)、流体剪应力与动脉粥样硬化 (Fluid shear stress and atherosclerosis)、白细胞介素信号 17 通路(IL-17 signaling pathway)、乙型肝炎通路 (Hepatitis B)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、丙型肝炎通路(Hepatitis C)、查加斯病(美国锥虫病) (Chagas disease (American trypanosomiasis))、麻疹(Measles)、癌蛋白(Proteoglycans in cancer)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、Th17 细胞分化(Th17 cell differentiation)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)等。表 2 列出了排名前十的富集通路相关信息



**Figure 8.** Enrichment analysis of KEGG signaling pathway (top 20)

**图 8.** KEGG 信号通路富集分析(top 20)

**Table 2.** Information of KEGG signaling pathway (top 10)  
**表 2.** KEGG 信号通路信息(top 10)

通路	基因	基因数	P 值
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	AKT1, BAX, CCND1, BCL2, CASP3, MAPK14, F3, ICAM1, IL1A, IL1B, IL6, CXCL8, JUN, MMP2, NOS3, SERPINE1, PRKCB, MAPK1, MAPK3, MAPK8, RELA, CCL2, SELE, STAT1, STAT3, TGFB1, TNF, VCAM1, VEGFA	29	9.95E-47
Pathways in cancer	AKT1, BAX, CCND1, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, CDKN1A, EGF, EGFR, ERBB2, FOS, GSTP1, HIF1A, HSP90AA1, IKBKB, IL6, CXCL8, JUN, MMP1, MMP2, MMP9, MYC, NFKBIA, NOS2, PPARG, PRKCB, MAPK1, MAPK3, MAPK8, PTEN, PTGS2, RELA, STAT1, STAT3, TGFB1, TP53, VEGFA, RASSF1	39	8.26E-45
Fluid shear stress and atherosclerosis	AKT1, BCL2, CALM1, MAPK14, FOS, GSTM1, GSTP1, HMOX1, HSP90AA1, ICAM1, IFNG, IKBKB, IL1A, IL1B, JUN, KDR, MMP2, MMP9, NFE2L2, NOS3, MAPK8, RELA, CCL2, SELE, TNF, TP53, VCAM1, VEGFA	28	3.23E-40
IL-17 signaling pathway	CASP3, CASP8, MAPK14, FOS, CXCL2, HSP90AA1, IFNG, IKBKB, IL1B, IL4, IL6, CXCL8, CXCL10, JUN, MMP1, MMP3, MMP9, NFKBIA, MAPK1, MAPK3, MAPK8, PTGS2, RELA, CCL2, TNF	25	6.83E-40
Hepatitis B	AKT1, BAX, CCND1, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, CDKN1A, MAPK14, FASN, FOS, IKBKB, IL6, CXCL8, JUN, MMP9, MYC, NFKBIA, PRKCB, MAPK1, MAPK3, MAPK8, PTEN, RELA, STAT1, STAT3, TGFB1, TNF, TP53	29	1.04E-39
TNF signaling pathway	AKT1, CASP3, CASP8, MAPK14, FASN, FOS, CXCL2, ICAM1, IKBKB, IL1B, IL6, CXCL10, IRF1, JUN, MMP3, MMP9, NFKBIA, MAPK1, MAPK3, MAPK8, PTGS2, RELA, CCL2, SELE, TNF, VCAM1	26	1.49E-39
Hepatitis C	AKT1, BAX, CCND1, CASP3, CASP8, CASP9, CDKN1A, CLDN4, MAPK14, EGF, EGFR, FASN, IFNG, IKBKB, CXCL8, CXCL10, IRF1, MYC, NFKBIA, PPARA, MAPK1, MAPK3, MAPK8, RELA, STAT1, STAT3, TNF, TP53	28	1.79E-38
Chagasdisease (American trypanosomiasis)	AKT1, CASP8, MAPK14, FASN, FOS, IFNG, IKBKB, IL1B, IL2, IL6, CXCL8, IL10, JUN, NFKBIA, NOS2, SERPINE1, MAPK1, MAPK3, MAPK8, RELA, CCL2, TGFB1, TNF	23	1.91E-34
Measles	AKT1, BAX, CCND1, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, FASN, FOS, IFNG, IKBKB, IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, JUN, NFKBIA, MAPK8, RELA, STAT1, STAT3, TP53	23	3.07E-30
Proteoglycans in cancer	AKT1, CCND1, CASP3, CDKN1A, MAPK14, EGFR, ERBB2, ESR1, FASN, HIF1A, IGF2, IL6, KDR, MMP2, MMP9, MYC, PLAU, PRKCB, MAPK1, MAPK3, STAT3, TGFB1, TNF, TP53, VEGFA	25	3.87E-30

### 3. 讨论

本研究通过中药网络药理学技术分析, 共筛选出槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、柚皮素(naringenin)、刺芒柄花素(formononetin)、甘草查尔酮 a (licochalcone a)、异鼠李素(isorhamnetin)、 $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)、7-甲氧基-2-甲基异黄酮(7-Methoxy-2-methyl isoflavone)等 98 个与治疗 UC 密切相关的

活性化学成分, PTGS2、ESR1、CALM1、HSP90AA1、NOS2、PPARG、ESR2、PTGS1、CHEK1、MAPK14 等 107 个潜在靶点, 通过 cytoscape3.6.0 版本软件, 得到了附子理中汤 - 药物靶标 - 疾病 - 潜在靶点网络图, 利用 STRING 在线平台, 最低相互作用阈值设为最高信度 0.9 (high confidence) 并选择隐藏游离节点, 将 TSV 结果导入 cytoscape3.6.0 版本软件获得 89 节点, 通过该软件中 cytoHubba 插件中的 Degree 算法, 筛选出 STAT3、JUN、TNF、RELA、AKT1、MAPK1、MAPK3、IL6、TP53、HSP90AA1 等 10 个核心靶点, 该结果表明附子理中汤治疗 UC 具有多成分、多靶点综合作用的特点。筛选出的 10 个核心靶点在 PPI 网络中扮演着重要的角色, 预测它们可能是附子理中汤治疗 UC 的主要靶标。

筛选出的十个核心靶点主要与炎症、免疫与增殖有关, 信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 是 STAT 蛋白家族的一员, 在炎症和免疫控制方面具有关键作用, 被认为是免疫和炎症的关键蛋白, 在 Jak/STAT3 通路中发挥着重要作用[4]。IL-6 炎症因子激活 JAK2, 使其转变为 p-JAK2, 刺激 STAT3 磷酸化, 磷酸化后的 Stat 蛋白发生构象变化, 易位至细胞核, 结合靶基因抑制细胞因子信号抑制物(SOCS)的表达, 导致 STAT3 磷酸化持续进行, 进一步产生 IL-6 因子, 进而加重炎症[5] [6]。转录因子 AP-1 (JUN) 与结肠直肠癌(CRC)细胞中的特定肽酶(USP28)促进剂结合, 参与激活 KRAS 介导的结肠直肠癌(CRC)细胞特定肽酶(USP28)的转录激活, KRAS 通过以 ZNF304 依赖的方式诱导结肠直肠癌(CRC)细胞中的肿瘤抑制基因(TSG)的转录沉默, 在促进肿瘤事件方面发挥作用[7]。肿瘤坏死因子(TNF)指一组可以引起细胞死亡(凋亡)的细胞因子, 也是一种主要炎症细胞因子。TNF- $\alpha$  是 TNF/TNFR 细胞因子超级家庭的成员, 是 UC 发病的主要炎症启动因子, 它能与炎症细胞相互作用, 导致肠组织内各种炎症细胞浸润, 加重肠黏膜的炎症反应, 还能刺激单核巨噬细胞、中性粒细胞合成 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 等细胞因子进一步加重炎症反应[8]。NF- $\kappa$ B p65 蛋白(RELA)是存在于几乎所有细胞类型的全息转录因子, 参与炎症、免疫、分化、细胞生长、肿瘤形成和凋亡等生物过程, UC 发生后, 通过活化 NF- $\kappa$ B 使体内迅速产生 IL-1 $\beta$ , 引起炎症介质释放, 同时刺激 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等其他细胞因子的分泌, 进一步诱导产生更多的细胞因子, 形成级联性释放, 从而加重炎症反应, 造成组织损伤[8]。AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1) 是 3 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1, AKT2, AKT3)之一[9], 通过参与 AGE-RAGE, PI3K-Akt 和 MAPK 等多个与炎症、免疫、代谢和细胞增殖相关的信号通路对相关生物学过程进行调节。热休克蛋白 90A 家族(HSP90AA1)是一类能促进特定靶蛋白成熟、结构维持和适当调节的分子伴随蛋白, 参与细胞周期控制和信号转导; 细菌脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外壁的主要结构成分, 是引起炎症反应的有效因子, 可作为细菌感染的指标之一。脂多糖(LPS)激活单核巨噬细胞和活化的 T 淋巴细胞产生和释放 TNF 引起炎症反应, HSP90AA1 与细菌脂多糖(LPS)结合, 调解 LPS 引起的 TNF 释放导致的炎症反应[10]。IL-6 主要由巨噬细胞和中性粒细胞分泌, 是一种炎症标志物, 通过激活 STAT3 信号通路, 诱导黏膜机械屏障通透性增加, 促进慢性炎症的持续发生[11]。MAPK 家族是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, 通过三级激酶模式共同调节着细胞的生长、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。丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)和丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)是 MAPK 家族中的重要组成部分, 广泛存在于哺乳动物各种组织, 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, MAPK1/ERK2 和 MAPK3/ERK1 是 2 个在 MAPK/ERK 级联中发挥重要作用的 MAPK, MAPK/ERK 级联通过对转录、翻译、细胞骨质重新排列的调节, 调节细胞生长、粘附、生存和分化等多种生物功能[12] [13]。

附子理中汤治疗 UC 靶点富集的信号通路主要涉及 AGE-RAGE、IL-17、TNF、PI3K-Akt、Th17 细胞分化、HIF-1 以及部分癌症疾病等通路(详见图 8), 呈现出中药多成分协同、多靶点联合、多通路协调的整体性作用的机制。白细胞介素信号 17 通路(IL-17 信号通路)、AGE-RACE、PI3K-Akt 信号通路、HIF-1、

Th17 细胞分化主要与代谢、免疫炎症以及氧化应激有关, 肿瘤坏死因子信号通路(TNF 信号通路)主要涉及炎症与免疫调节。

根据附子理中汤 - 药物靶标 - 疾病 - 潜在靶点网络图, 运用“network analysis”进行拓扑分析, 按照 Degree 值, 对中药化合物成分进行排序, 槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、柚皮素(naringenin)、刺芒柄花素(formononetin)、甘草查尔酮 a (licochalcone a)、异鼠李素(isorhamnetin)等中药化合物排名前列, 预测它们可能是附子理中汤治疗 UC 的关键药物有效活性成分。UC 发病与自身免疫炎症反应及炎症细胞因子相关, 根据相关文献[9], 槲皮素具有抗氧化及清除自由基的作用、抗炎、抗病毒、降糖、降脂、免疫调节的作用。槲皮素在治疗 UC 过程中, 一方面, 槲皮素可降低细胞内活性氧自由基, 对氧化损伤的细胞具有保护作用, 另一方面可以通过抑制免疫细胞分泌促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-2), 促进分泌抗炎细胞因子(IL4、IL-10 和转化生长因子- $\beta$ 1), 还可以通过抑制与转录因子(NF- $\kappa$ B)、重组人信号转导与转录激活因子(STAT)相关的基因表达来抑制炎症细胞因子的分泌, 从而发挥抗炎作用[14] [15] [16] [17] [18]。山柰酚具有很好的抗炎作用, 通过抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6 水平及核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、STAT 信号通路的活化来抑制炎症细胞因子的分泌, 进而达到抗炎的功效[19] [20] [21]。研究表明[22], 柚皮素具有抗凋亡、抗氧化、抗线粒体、抗纤维化和抗炎的作用。刺芒柄花素通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活来抑制炎症细胞因子的分泌, 进而发挥抗炎效果[23]。甘草查尔酮 a 具有抗炎、抗氧化的作用, 主要通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路, 导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症因子的表达减少来发挥抗炎作用[24]。异鼠李素通过调节 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B、MAPK 等信号通路, 在抗炎、抗氧化、调节细胞凋亡等方面发挥着重要作用, 在治疗 UC 过程中, 异鼠李素可以通过调节 MAPK、NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 TNF- $\alpha$  导致的炎症, 进而达到治疗效果[25] [26] [27]。

#### 4. 结论

综上所述, 附子理中汤治疗溃疡性结肠炎主要是通过槲皮素、山柰酚、柚皮素、刺芒柄花素、甘草查尔酮 a、异鼠李素等活性成分作用于 STAT3、JUN、TNF、RELA、AKT1、MAPK1、MAPK3、IL6、TP53、HSP90AA1 等关键靶点基因从而调节多条生物学功能与信号通路, 最终达到治疗 UC 的作用。但是, 此次研究尚存在不足之处, 需要后期进一步实验验证。

#### 基金项目

四川省中医药管理局 2021 年度中医药科研专项课题(2021MS108); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划(ZRQN2020001); 四川省青年科技创新团队项目(19CXTD0055)。

#### 参考文献

- [1] 谢晶日, 陈善涛, 刘芝伟. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J/OL]. 海南医学报: 1-9. <http://lib.edutcm.edu.cn:7001/rwt/CNKI/https/MSYXTLUQPJUB/10.13210/j.cnki.jhmu.20210430.002>, 2021-05-07.
- [2] 潘晨璟, 王文荣. 溃疡性结肠炎的中医认识[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(3): 6-8.
- [3] 杨义维, 梁学艳, 莫怡丰, 黄坚. 潘金辉教授治疗溃疡性结肠炎经验[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(2): 97-99.
- [4] Hillmer, E.J., Zhang, H., Li, H.S. and Watowich, S.S. (2016) STAT3 Signaling in Immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **31**, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.05.001>
- [5] 王生化, 何信用, 郑思成, 孙宏伟, 陈文娜, 郭隽馥. 益糖康调控 JAK2/STAT3 信号通路抑制炎症预防糖尿病肾病的研究[J/OL]. 中华中医药学刊: 1-8. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210510.1522.004.html>, 2021-05-22
- [6] 郭芳. 蒽醌类衍生物 C10 通过 Jak/Stat3 信号通路对结肠癌细胞增殖的影响[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西大学, 2020.

- [7] Serra, R.W., Fang, M., Park, S.M., Hutchinson, L. and Green, M.R. (2014) A KRAS-Directed Transcriptional Silencing Pathway That Mediates the CpG Island Methylator Phenotype. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.02313.001>
- [8] 朱丹. 附子理中汤灌肠对溃疡性结肠炎脾肾虚型大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平的影响[D]: [硕士学位论文]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [9] Häggblad, S.S., Mortensen, A.C., Haglöf, J., Engskog, M.R., Arvidsson, T., Pettersson, C., *et al.* (2017) Different functions of AKT1 and AKT2 in Molecular Pathways, Cell Migration and Metabolism in Colon Cancer Cells. *International Journal of Oncology*, **50**, 5-14. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3771>
- [10] Triantafilou, K., Triantafilou, M. and Dedrick, R.L. (2001) A CD14-Independent LPS Receptor Cluster. *Nature Immunology*, **2**, 338-345. <https://doi.org/10.1038/86342>
- [11] 邹孟龙, 黄晓燕, 陈雅璐, 宁芯, 阮庆婷, 罗贞艺, 黎丽群. 基于网络药理学探讨四君子汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制及实验验证[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5362-5372.
- [12] Reustle, A. and Torzewski, M. (2018) Role of p38 MAPK in Atherosclerosis and Aortic Valve Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article No. 3761. <https://doi.org/10.3390/ijms19123761>
- [13] Hashimoto, R., Kakigi, R., Nakamura, K., Itoh, S., Daida, H., Okada, T., *et al.* (2017) LPS enhances Expression of CD204 through the MAPK/ERK Pathway in Murine Bone Marrow Macrophages. *Atherosclerosis*, **266**, 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.005>
- [14] 刘晟文, 刘建英. 槲皮素药理学作用的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2020, 13(1): 104-106.
- [15] Han, M., Song, Y. and Zhang, X. (2016) Quercetin Suppresses the Migration and Invasion in Human Colon Cancer Caco-2 Cells through Regulating Toll-Like Receptor 4 /Nuclear Factor-Kappa B Pathway. *Pharmacognosy Magazine*, **12**, 237-244. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.182154>
- [16] 赵晶晶, 郑福增, 周子朋, 张安琪, 郭嘉. 基于网络药理学和分子对接探讨桃红四物汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J/OL]. 世界中医药: 1-13.
- [17] Javadi, F., Ahmadzadeh, A., Eghtesadi, S., Aryaeian, N., Zabihyeganeh, M., Foroushani, A.R., *et al.* (2017) The Effect of Quercetin on Inflammatory Factors and Clinical Symptoms in Women with Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Journal of the American College of Nutrition*, **36**, 9-15. <https://doi.org/10.1080/07315724.2016.1140093>
- [18] Haleagrahara, N., Hodgson, K., Miranda-Hernandez, S., Hughes, S., Kulur, A.B. and Ketheesan, N. (2018) Flavonoid Quercetin-Methotrexate Combination Inhibits Inflammatory Mediators and Matrix Metalloproteinase Expression, Providing Protection to Joints in Collagen-Induced Arthritis. *Inflammopharmacology*, **26**, 1219-1232. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0464-2>
- [19] Lee, C.J., Moon, S.J., Jeong, J.H., Lee, S., Lee, M.-H., Yoo, S.-M., *et al.* (2018) Kaempferol Targeting on the Fibroblast Growth Factor Receptor 3-Ribosomal S6 Kinase 2 Signaling Axis Prevents the Development of Rheumatoid Arthritis. *Cell Death & Disease*, **9**, Article No. 401. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0433-0>
- [20] 洪一波, 姜宏, 王建伟, 俞鹏飞, 尤武林. 芒柄花素抑制 RANKL 诱导破骨细胞分化的实验研究[J]. 中国骨伤, 2020, 33(1): 64-70.
- [21] Liu, Z., Yao, X., Sun, B., Jiang, W., Liao, C., Dai, X., *et al.* (2021) Pretreatment with Kaempferol Attenuates Microglia-Mediate Neuroinflammation by Inhibiting MAPKs-NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and Pyroptosis after Secondary Spinal Cord Injury. *Free Radical Biology and Medicine*, **168**, 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.037>
- [22] 王兆博, 王俊志. 柚皮素治疗冠心病机制预测及药理学研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(4): 77-81.
- [23] Yi, L., Lu, Y., Yu, S., Cheng, Q. and Yi, L. (2020) Formononetin Inhibits Inflammation and Promotes Gastric Mucosal Angiogenesis in Gastric Ulcer Rats through Regulating NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 1-7. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1837873>
- [24] Liu, D., Huo, X., Gao, L., Zhang, J., Jextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **102**, 922-929. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.130>
- [25] Gang, G., Guan, Y.-Y., Zhang, Z.-L., Rahman, K., Wang, S.-J., Zhou, S., *et al.* (2020) Isorhamnetin: A Review of Pharmacological Effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **128**, Article ID: 110301. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110301>
- [26] Duan, R., Liang, X., Chai, B., Zhou, Y., Du, H., Suo, Y., *et al.* (2020) Isorhamnetin Induces Melanoma Cell Apoptosis via the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B Pathways. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 1057943. <https://doi.org/10.1155/2020/1057943>

- [27] Ren, X., Han, L., Li, Y., Zhao, H., Zhang, Z., Zhuang, Y., *et al.* (2020) Isorhamnetin Attenuates TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation, Proliferation, and Migration in Human Bronchial Epithelial Cells via MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways. *The Anatomical Record*, **304**, 901-913. <https://doi.org/10.1002/ar.24506>