

基于网络药理学及分子对接预测乌梅丸治疗腹泻型肠易激综合征的作用机制

朱港星¹, 曹生海^{2*}, 黎洁¹, 马忠义¹, 张成宇¹

¹青海大学, 青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室, 青海 西宁

²青海省中医院, 青海 西宁

收稿日期: 2022年7月17日; 录用日期: 2022年8月12日; 发布日期: 2022年8月19日

摘要

目的: 基于网络药理学及分子对接技术预测乌梅丸治疗IBS-D的潜在作用机制。方法: 通过TCMSP数据库筛选乌梅丸有效成分及靶点; 检索GeneCards、DisGeNET、NCBI Gene、DrugBank数据库获取IBS-D相关靶点, 得到药物-疾病共有靶点; 利用String数据库建立蛋白质互作(PPI)网络; 利用Cytoscape3.7.1软件构建“药物-有效成分-靶点”网络; 利用Metascape数据库进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析; 利用AutoDock和PyMOL软件进行分子对接和结果可视化。结果: 最终得到乌梅丸有效成分67个, 药物靶点205个; 疾病靶点2327个, 两者交集靶点148个; GO功能富集分析中生物过程(BP)得到1509条, 分子功能(CC)得到95条, 细胞成分(MF)得到167条; KEGG信号通路富集分析获得80条。结论: 乌梅丸中槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇可能是治疗疾病的核心化合物, AKT1、L-6、IL-1 β 、VEGFA、EGFR等基因靶点是疾病的最佳靶点选项, 乌梅丸治疗IBS-D可能通过参与炎症、细胞代谢及内分泌等相关反应和通路。

关键词

乌梅丸, 腹泻型肠易激综合征, 网络药理学, 分子对接

Prediction of the Mechanism of Wumei Pill in Treating Diarrhea Irritable Bowel Syndrome Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Gangxing Zhu¹, Shenghai Cao^{2*}, Jie Li¹, Zhongyi Ma¹, Chengyu Zhang¹

作者简介: 朱港星(1997-), 男, 在读硕士。研究方向: 中医消化病方向, E-mail: zgx15690176167@163.com

*通讯作者: 曹生海, (1971-), 男, 硕士研究生导师, 副主任医师。研究方向: 中医消化病方向, E-mail: 1303395548@qq.com

文章引用: 朱港星, 曹生海, 黎洁, 马忠义, 张成宇. 基于网络药理学及分子对接预测乌梅丸治疗腹泻型肠易激综合征的作用机制[J]. 临床医学进展, 2022, 12(8): 7651-7664. DOI: 10.12677/acm.2022.1281105

¹Qinghai Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research for Glucolipid Metabolic Diseases, Qinghai University, Xining Qinghai

²Qinghai Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xining Qinghai

Received: Jul. 17th, 2022; accepted: Aug. 12th, 2022; published: Aug. 19th, 2022

Abstract

Objective: To study the potential mechanism of Wumei Pill in treating IBS-D based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods:** The effective components and targets of Wumei Pill were screened by TCMSP database, to obtain relevant targets of IBS-D by retrieving the GeneCards, DisGeNET, NCBI Gene, and DrugBank databases, and obtain common targets of drugs diseases; Using String databases to establish protein interaction (PPI) networks. The network of “drugs-active ingredients-targets” was constructed by using Cytoscape3.7.1 software; Metascape database was used to analyze gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). AutoDock and PyMOL software are used for molecular docking and visualization of results. **Results:** There were 67 effective components and 205 drug targets in Wumei Pill. There are 2327 disease targets, and 148 intersection targets between them; In the functional enrichment analysis of GO, 1509 biological processes (BP), 95 molecular functions (CC) and 167 cellular components (MF) were obtained. 80 KEGG signal pathways were obtained by enrichment analysis. **Conclusion:** Quercetin, kaempferol, β -sitosterol and stigmasterol in Wumei Pill may be the core compounds for treating diseases, and gene targets such as AKT1, L-6, IL-1B, VEGFA and EGFR are the best target options for diseases. Wumei Pill may be involved in inflammation, cell metabolism and endocrine related reactions and pathways in treating IBS-D.

Keywords

Wumei Pill, Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea, Network Pharmacology, Molecular Docking

Copyright © 2022 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

肠易激综合征(Irritable bowel syndrome, IBS)是临床上最常见的一种功能性胃肠疾病(functional gastrointestinal disorders, FGID), 其中腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome with diarrhea, IBS-D)为最常见的亚型, 主要临床症状表现为反复发作的腹痛、腹胀、腹泻。该病病情反复发作, 严重影响患者的日常生活, 大大降低患者的生活质量, 还会给社会带来巨大的经济负担[1]。

根据 IBS-D 患者临床表现, 中医认为该病属于“腹痛”、“泄泻”范畴[2]。目前, 中医经方乌梅丸在临床治疗中取得确切疗效[3] [4], 但作用机制研究尚不明确。现代实验研究表明[5], 乌梅丸具有抗炎、调节免疫、促进胃肠功能恢复、调节肠道菌群等多种作用, 故乌梅丸可能通过上述多种作用治疗 IBS-D [6]。基于此, 为求进一步明确乌梅丸治疗 IBS-D 的机制, 本文通过网络药理学及分子对接技术对乌梅丸有效成分、作用靶点与 IBS-D 的关联关系及复杂作用机制做进一步研究, 为中医药的创新发展和中药新药的研究提供新的科学依据。

2. 资料与方法

2.1. 乌梅丸有效成分及作用靶点基因的获取

利用 TCMSp 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)对乌梅丸中“乌梅、黄连、花椒、附子、黄柏、干姜、桂枝、人参、当归”为检索词进行活性成分筛选;设置筛选条件为:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) \geq 30%、类药性(drug-likeness, DL) \geq 0.18;并在“Related Targets”模块获得乌梅丸的作用靶点基因,通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行标准化处理、去除重复值后,得到药物的作用靶点基因。

2.2. IBS-D 靶点基因的获取

使用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/search>)、NCBI Gene 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)以“irritable bowel syndrome with diarrhea”和“IBS-D”为检索词筛选疾病相关靶点基因。将疾病靶点基因导入 Uniprot 数据库对其进行标准化处理,去除重复值后得到疾病靶点基因。

2.3. 药物靶点及疾病靶点的交集获取

利用 Venny2.1 在线网站(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将步骤 1.1 及 1.2 中获得的药物作用靶点基因及疾病靶点基因进行取交集,并绘制韦恩图。

2.4. 构建乌梅丸治疗 IBS-D 的蛋白相互作用(PPI)网络

将步骤 1.3 中获得的交集靶点基因导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),物种设置为“Homo Sapiens”,蛋白相互作用分值为 0.4,构建 PPI 网络图,并下载该网络图 PNG 格式图片文件及 TSV 格式文本文件。

2.5. IBS-D 核心靶点基因的获取

将步骤 1.4 中 PPI 网络图的 TSV 格式文本文件导入 Cytoscape3.7.1 软件,并通过内置软件 Network Analyzer 计算网络的中心度值(betweenness centrality, BC)、紧密中心度值(closeness centrality, CC)、节点连接度值(degree)获得疾病的核心靶点基因。

2.6. 绘制“药物-活性成分-靶点”网络图及药物核心活性成分的获取

通过使用 Cytoscape3.7.1 软件绘制“药物-活性成分-靶点”网络图,并利用内置工具 Network Analyzer 分析网络图的拓扑参数,依据节点 degree 值筛选药物的核心活性成分。

2.7. GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析

将交集靶点基因上传至 Metascape 数据库(<http://metascape.org/gp/index.html>),物种设置为“Homo Sapiens”,选择“CustomAnalysis”,参数设置为最小重叠 > 3 ,值截止 < 0.01 ,最小富集 > 1.5 。分别进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析,其中 GO 功能富集分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)。并对 BP、CC、MF 中最为显著的 10 个条目上传到微生信平台(<http://bioinformatics.com.cn/>),对数据进行可视化;选取 KEGG 信号通路中最为显著的 20 条信号通路与绘制气泡图对数据进行可视化;对最显著的 20 条 KEGG 信号通路其靶点绘制通路-靶点网络图。

2.8. 分子对接验证

以核心有效成分作为配体,从 TCMSP 数据库下载其 mol2 格式文件;核心基因靶点作为受体,从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点蛋白的晶体结构(PDB 格式),其中蛋白晶体结构筛选原则如下:① 为人源蛋白;② 优先选择带有原小分子配体的晶体复合物;③ 优先选择分辨率高的结构;④ 优先选择 X-晶体衍射方法得到的结构。使用 PyMOL2.2.0 软件对核心靶点蛋白进行去除水分子和原始配体,利用 AutoDock 软件将核心靶点进行加氢后设置为受体,并保存 pdbqt 格式文件;对有效成分小分子经去除水分子、计算 Gasteiger 电荷后设置为配体,并保存为 pdbqt 格式文件;将受体、配体进行半柔性对接,保存对接结果的结合能,并对结合能最强的 5 组分子对接结果用 PyMOL 软件进行可视化。

3. 结果

3.1. 乌梅丸的有效成分及作用靶点基因的获取

通过 TCMSP 数据库检索乌梅丸的有效成分,其中乌梅 40 个、细辛 192 个、桂枝 220 个、黄连 48 个、黄柏 140 个、当归 125 个、人参 190 个、花椒 101 个、干姜 148 个、附子 65 个,初筛到 1269 个有效成分。以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为标准复筛及去除重复值选后共得到 102 个成分,删除无作用靶点的成分后最终得到有效成分为 67 个,其中共有有效成分 14 个,包括槲皮素、山奈酚、广玉兰内酯、谷甾醇、黄连素、黄连碱等。并通过“Related Targets”模块获取乌梅丸有效成分的作用靶点共 1953 个,通过 Uniprot 数据库标准化处理、去除重复值后最终获得 205 个有效成分的作用靶点。

3.2. IBS-D 靶点基因的获取

在 DisGeNET 数据库、GeneCards 数据库、DrugBank 数据库、NCBI Gene 数据库检索获取 IBS-D 的基因靶点,经标准化处理后得到疾病靶点基因共 2327 个。

3.3. 药物靶点及疾病靶点的交集获取

将步骤 2.1 及步骤 2.2 中获得的乌梅丸的作用靶点和疾病的基因靶点通过 Venny2.1 在线网站进行取交集(如图 1),获得两者交集靶点基因 148 个。

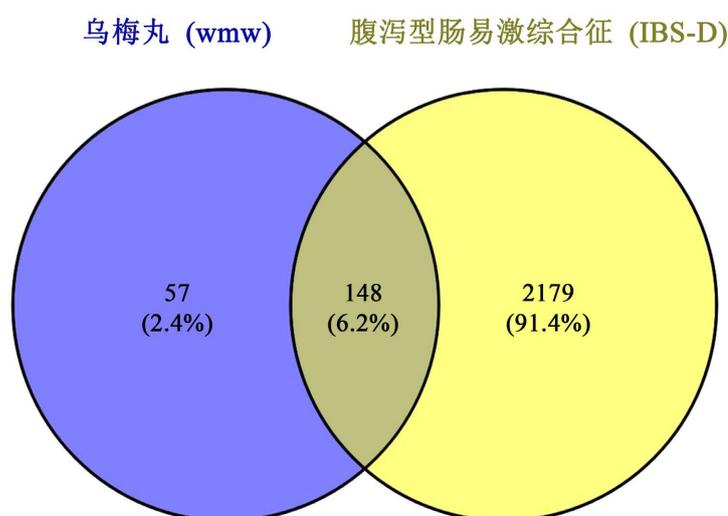


Figure 1. Intersection of drug and disease targets
图 1. 药物、疾病靶点交集图

3.4. 构建乌梅丸治疗 IBS-D 的 PPI 网络

将步骤 2.3 中获得的 148 个交集靶点基因在 String 数据库中选取“Multiple proteins”，导入交集靶点基因、物种选为“人类”后进行 PPI 蛋白互作图的绘制。设置蛋白相互作用分值为 0.400 后获得一个 148 个节点、2592 条边、平均节点连接度(degree)值为 35 的 PPI 蛋白互作图，并下载该网络图的 PNG 格式图片文件(如图 2)及 TSV 格式文本文件。

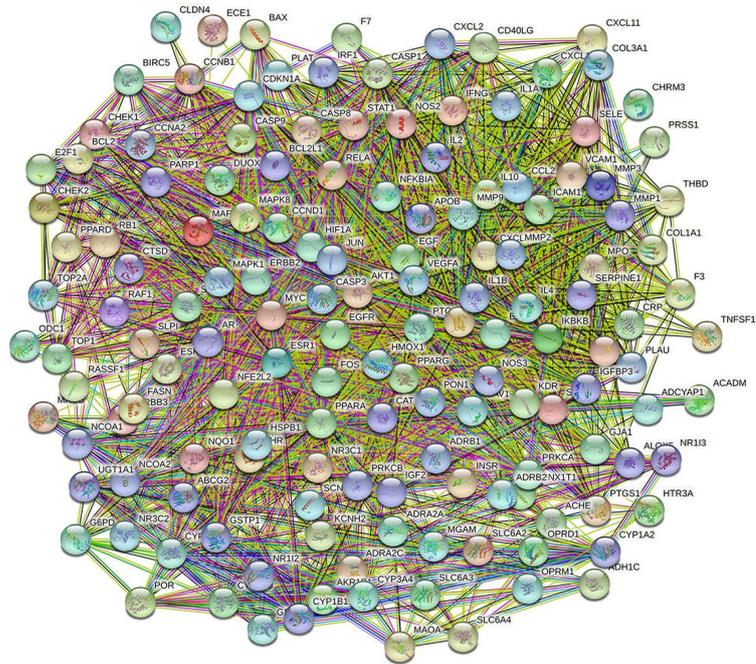


Figure 2. PPI protein mapping
图 2. PPI 蛋白互作图

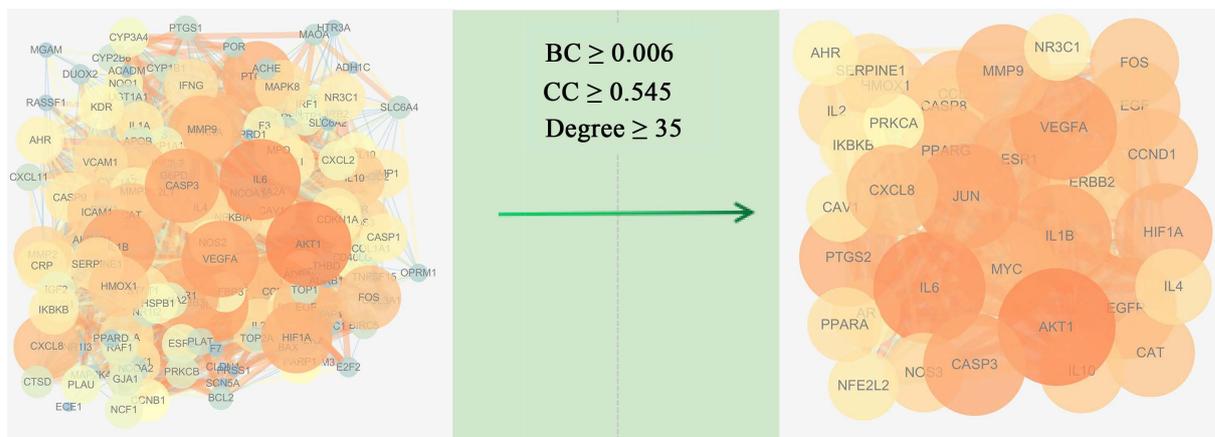


Figure 3. Screening of core targets
图 3. 核心靶点的筛选

3.5. IBS-D 核心靶点基因的获取

将步骤 2.4 中下载的 TSV 文件导入 CytoScope 3.7.1 软件，通过内置软件 Network Analyzer 对网络进

行拓扑参数分析,得到网络的 BC 为 0.006052076、CC 为 0.544729963、degree 值为 35.26530612。根据节点 degree 值设置节点大小由小到大,节点颜色由暗变亮,根据综合得分(combined score)值设置连接线由细至粗对网络图进行处理。通过设置筛选条件: $BC \geq 0.006$ 、 $CC \geq 0.545$ 、 $Degree \geq 35$ 筛选核心基因靶点,如图 3。以 degree 值由大到小筛选网络图中疾病节点,可发现 AKT1、IL6、VEGFA、JUN、IL1B、CASP3、EGFR、HIF1A、PTGS2、ESR1 等靶点度值较大,可能是乌梅丸治疗 IBS 的核心基因靶点,在整个网络中起到枢纽的作用,见表 1。

Table 1. Core target information

表 1. 核心靶点信息

gene	中文基因名称	Degree	BC	CC
AKT1	蛋白激酶 B1	105	0.0566434	0.78074866
IL-6	白细胞介素-6	98	0.0650735	0.74871795
VEGFA	血管内皮生长因子	91	0.0231012	0.71568627
JUN	转录因子 JUN	90	0.0255358	0.71568627
IL-1 β	白细胞介素-1 β	88	0.0259457	0.71219512
CASP3	胱天蛋白酶 3	87	0.0254243	0.70873786
EGFR	表皮生长因子受体	86	0.0377906	0.70873786
HIF-1 α	缺氧诱导因子-1 α	82	0.0156165	0.68544601
PTGS2	前列腺素内环氧化物合成酶 2	82	0.0175953	0.68867925
ESR1	雌激素受体 1	82	0.0344598	0.69194313

3.6. 绘制“药物-活性成分-靶点”网络图及药物核心活性成分的获取

使用 Cytoscape3.7.1 软件进行“药物-活性成分-靶点”网络图的绘制,如图 4。该网络有 265 个节点,其中 10 个药物节点、92 个药物活性成分节点、14 个共同活性成分节点、1 个疾病节点,148 个基因节点,1423 条边。通过 Network Analyzer 得到每个活性成分节点平均与 13.87 个疾病靶点基因节点所连接,每个疾病靶点节点平均与 8.73 个活性成分节点所连接,这也体现了中药多成分与疾病多靶点共同作用的整体性和联系性。依据节点 degree 值选取值排名前 10 的药物有效成分,如表 2。

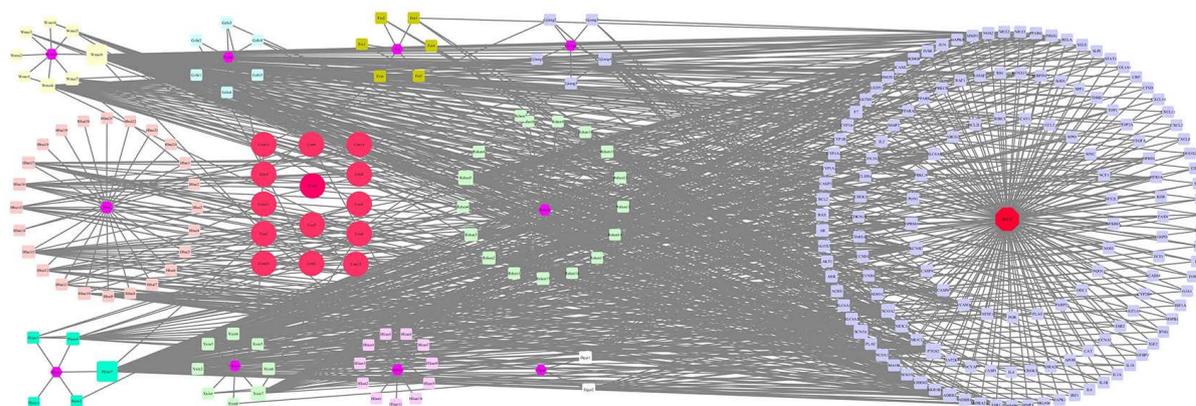


Figure 4. Network diagram of “drugs-active ingredients-targets” (Note: the left hexagonal purple nodes are 10 drugs of Wumei Pill, the colored square nodes are active ingredients of drugs, the red round nodes are common ingredients of drugs, and the right lilac rectangular nodes are common target genes of drugs and diseases)

图 4. “药物-活性成分-靶点”网络图(注:左侧六边形紫色节点为乌梅丸 10 种药物,彩色方形节点为药物有效成分,红色圆形节点为药物共有成分,右侧淡紫色矩形节点为药物、疾病共有靶点基因)

Table 2. Top 10 active ingredients of drugs with DC value
表 2. DC 值排名前 10 的药物有效成分

MOL ID	成分名称	靶点数(个)	OB (%)	DL	药物来源
MOL000098	槲皮素	138	46.43	0.28	乌梅、黄连、黄柏、花椒
MOL000422	山奈酚	53	41.88	0.24	乌梅、细辛、人参
MOL000358	β -谷甾醇	28	36.91	0.75	乌梅、桂枝、黄柏、当归、人参、花椒、干姜
MOL000449	豆甾醇	28	55.37	0.77	乌梅、黄柏、当归、人参
MOL000790	异紫堇杷明碱	27	35.77	0.59	黄柏
MOL001455	四氢小檗碱	26	53.83	0.77	黄柏
MOL002903	R-氢化小檗碱	24	55.37	0.77	黄连
MOL001558	芝麻素	22	56.55	0.83	细辛
MOL002670	卡文定碱	22	35.64	0.81	黄柏
MOL001460	隐藻酮	21	78.74	0.72	细辛

3.7. GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析

将乌梅丸治疗 IBS 的作用靶点导入 Metascape 数据库, 物种设置为人类, 选择“CustomAnalysis”分别进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能富集分析中 BP 分析获得 1583 个条目, 前 3 条为 response to inorganic substance (对无机物的反应)、response to hormone (对激素的反应) response to xenobiotic stimulus (对异生物质刺激的反应); CC 分析获得 89 个条目, 前 3 条为 membrane raft (膜筏)、transcription regulator complex (转录调节因子复合物)、vesicle lumen (囊泡腔); MF 分析获得 171 个条目, 前 3 条为: protein homodimerization activity (蛋白质同二聚化活性)、DNA-binding transcription factor binding(DNA 结合转录因子结合)、oxidoreductase activity (氧化还原酶活性)。根据 $-\log_{10}(P)$ 值选取 BP、CC、MF 中值最大的 10 个条目上传到微生信平台绘制富集分析图对数据进行可视化, 如图 5。KEGG 信号通路富集分析共获得 195 条信号通路, 前 3 条为 Pathways in cancer (癌症通路)、Lipid and atherosclerosis (脂质与动脉粥样硬化)、AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications (糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路), 根据 $-\log_{10}(P)$ 值选取 KEGG 信号通路中值最大的 20 条信号通路与其靶点基因导入 Cytoscape3.7.1 软件中, 绘制得到通路-靶点网络图, 见图 6; 同时上传到微生信平台绘制气泡图对数据进行可视化, 见图 7。

3.8. 分子对接验证

将步骤 2.6 中“药物-活性成分-靶点”网络图中核心活性成分(槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇、异紫堇杷明碱、四氢小檗碱、R-氢化小檗碱、芝麻素、卡文定碱、隐藻酮)作为配体, 通过 PDB 数据库下载步骤 2.5 所得到的 10 个核心蛋白(AKT1、IL-6、VEGFA、JUN、IL-1 β 、CASP3、EGFR、HIF-1 α 、PTGS2、ESR1)的三维结构(PDB 格式), 将处理后的蛋白质受体与有效成分配体进行对接, 并记录每一次对接的结合能, 见表 3, 并通过热图对结果进行可视化, 见图 8。一般认为, 结合能小于 -4.25 kcal/mol、 -5.0 kcal/mol 或 -7.0 kcal/mol 分别表明配体与受体之间具有一定、良好或强的结合活性。结合能越低, 受体与配体的亲和力越高, 构象越稳定[7]。输出与核心蛋白结合能最优的 5 组分子对接结果用 PyMOL 软件进行可视化, 输出三维图, 如图 9。

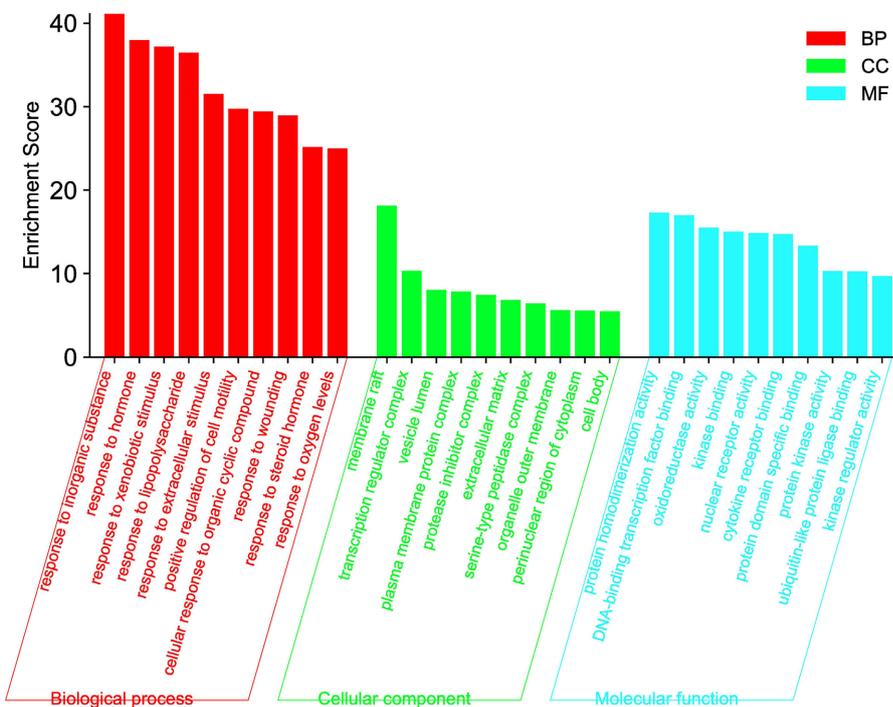


Figure 5. Enrichment diagram of BP, CC and MF pathways
 图 5. BP、CC、MF 通路富集图

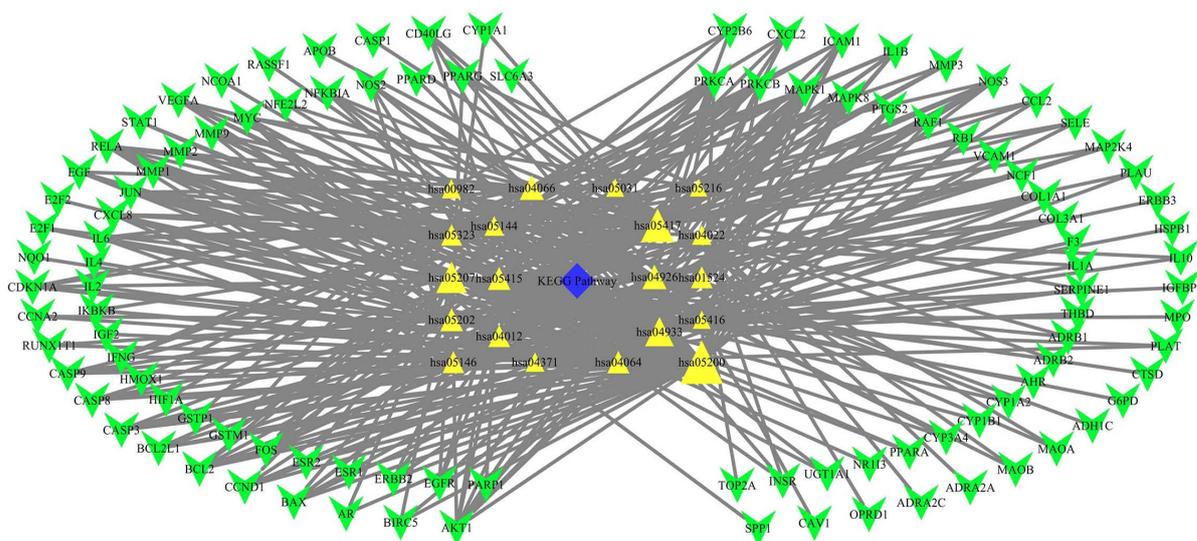


Figure 6. Pathway-target network diagram (Note: Yellow node is KEGG pathway name, and green node is gene target)
 图 6. 通路 - 靶点网络图(注: 黄色节点为 KEGG 通路名称, 绿色节点为基因靶点)

4. 讨论

中医经方乌梅丸的记载首见于《伤寒论》：“厥阴之为病，消渴，气上撞心，心中疼热，饥而不欲食，食则吐蛔，下之利不止，乌梅丸主之。”乌梅丸由乌梅、细辛、干姜、黄连、当归、炮附子、蜀椒、桂枝、人参、黄柏十味药组成。全方具有辛开苦降，寒热并用、攻补兼施的配伍特点，主要功效为祛寒温脏，养血通脉，调和阴阳。袁方[3]使用加减乌梅丸治疗 IBS-D，疗效满意；倪树文[4]等使用乌梅丸治

疗寒热错杂型 IBS-D 取得确切疗效, 并有安全、无副作用的特点。对于寒热错杂型 IBS-D, 2017 年中医共识[8]也推荐使用乌梅丸作为主方治疗。一项 Meta 分析[9]指出, 加减乌梅丸治疗 IBS-D 的临床疗效优于常规西药治疗, 且具有复发率低, 不良反应较少的特点, 尤以在改善腹痛、腹泻症状方面较明显。

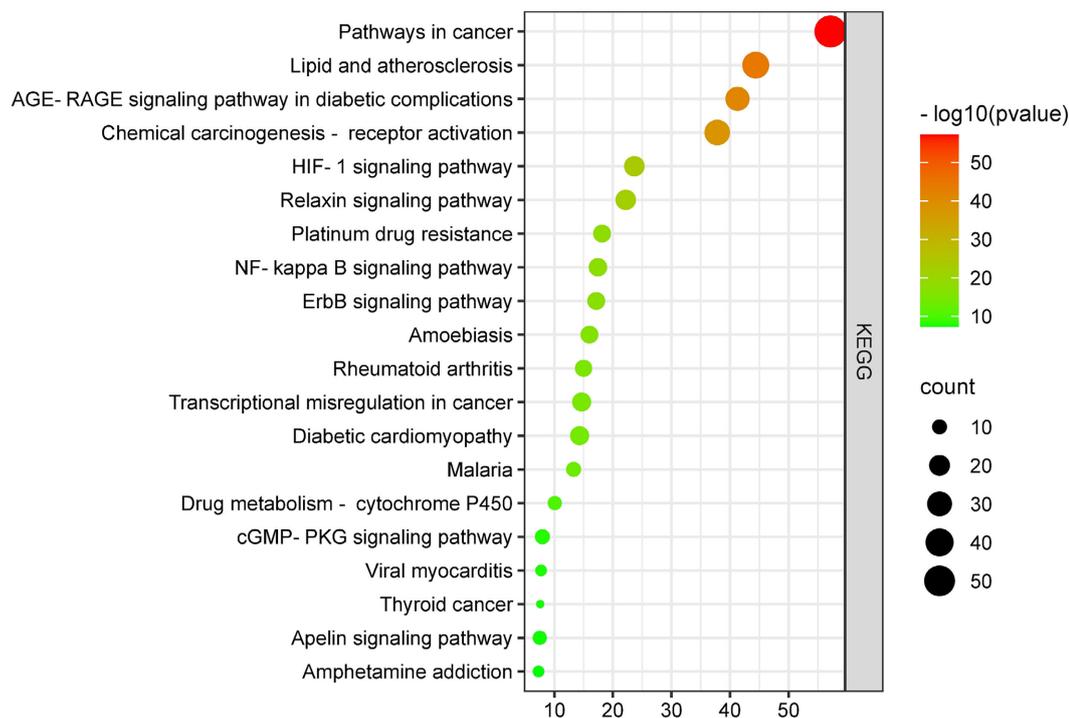


Figure 7. Enrichment diagram of Kegg pathway (Note: The circular dot size indicates the number of enrichment genes. The circular dot size larger, the number of genes increase. The color indicates the significance of enrichment. The more significant enrichment, the color to be redder.)

图 7. KEGG 通路富集图(注: 圆点大小表示富集的基因数目, 圆点越大表示富集基因越多; 颜色代表富集的显著程度, 颜色越红富集越显著。)

Table 3. Binding energy of core effective components and core targets

表 3. 核心有效成分与核心靶点结合能

MOL ID	结合能(kcal/mol)									
	AKT1 (6HHF)	IL-6 (4CNI)	VEGFA (5T89)	JUN (5FV8)	IL-1 β (3O4O)	CASP3 (2J32)	EGFR (5UG9)	HIF-1 α (4H6J)	PTGS2 (5F19)	ESR1 (2YAT)
MOL000098	-8.4	-5.8	-5.9	-5.9	-6.1	-6.4	-7.6	-7.0	-6.7	-8.1
MOL000422	-9.2	-4.8	-5.7	-5.6	-6.0	-7.3	-7.4	-7.3	-7.1	-8.3
MOL000358	-9.9	-6.6	-5.2	-5.7	-6.8	-6.0	-7.7	-6.8	-6.2	-7.9
MOL000449	-6.7	-3.7	-3.1	-5.4	-5.5	-5.5	-7.4	-6.2	-5.9	-5.9
MOL000790	-7.8	-5.5	-5.2	-5.3	-6.2	-6.4	-8.8	-7.9	-7.1	-7.2
MOL001455	-6.8	-4.9	-3.9	-5.2	-5.9	-6.1	-6.3	-7.0	-6.8	-7.8
MOL002903	-8.4	-6.2	-5.1	-5.9	-6.1	-6.8	-7.4	-6.7	-6.6	-7.6
MOL001558	-10.6	-5.7	-6.0	-6.3	-7.2	-8.4	-9.9	-7.3	-9.0	-9.5
MOL002670	-7.8	-4.3	-5.0	-5.8	-5.5	-7.5	-6.8	-7.0	-7.0	-7.8
MOL001460	-8.2	-5.8	-5.0	-5.8	-6.5	-7.8	-8.1	-6.6	-7.1	-7.1

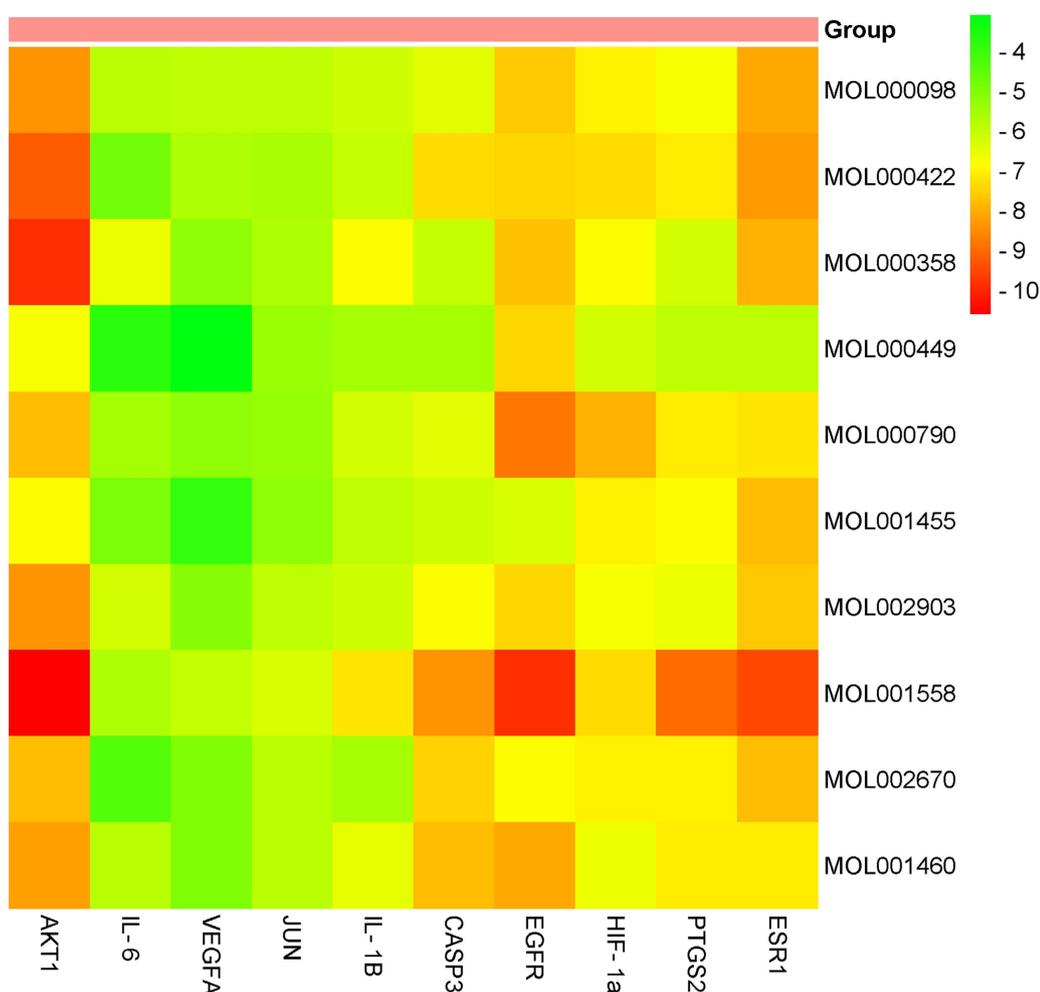


Figure 8. Thermal diagram of binding energy
图 8. 结合能热图

根据乌梅丸治疗 IBS-D 网络图, 槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇等有效成分成分有着较大的连接节点数, 这可能是乌梅丸中的核心有效成分。槲皮素、山奈酚是常见的生物类黄酮, 其中槲皮素可调控炎症信号通路, 通过抑制炎症因子、介质的表达进而起到镇痛作用[10] [11] [12]。有实验表明, 槲皮素能舒张结肠平滑肌, 抑制小鼠正常胃排空及小肠运动亢进作用, 这可能是治疗 IBS-D 的机制[13]。山奈酚可通过调节炎症相关蛋白表达、抑制转录因子激活等方式显著抑制炎症因子的产生, 从而抑制炎症的发生和发展, 还具有解痉作用[14]。 β -谷甾醇可通过抑制炎症小体 NLRP3 的激活使细胞中的肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6 (IL-6)生成显著减少, 从而起到抗炎作用[15], 还具有抗菌、抗肿瘤、降脂、抗动脉粥样硬化等多种作用[16]。豆甾醇具有抗炎作用, 研究发现[17]豆甾醇能明显抑制降低结肠组织 IL-1、IL-6 等炎症因子的 mRNA 表达; 还可抑制基质金属蛋白酶(MMPs)的表达而治疗骨关节炎; 还有镇痛、抗肿瘤、降低胆固醇、抗糖尿病等多种作用[18]。根据结合能热图, 芝麻素与疾病靶点基因 AKT1 结合能明显优于其他成分, 研究[19]发现芝麻素可抑制 TNF- α 诱导的促炎细胞因子 IL-6 和 IL-1mRNA 的表达, 具有抗炎作用, 但是其对 IBS-D 的作用机制研究较少, 还有待进一步探讨。此外芝麻素还具有抗癌、降血压、降血糖的作用[20]。

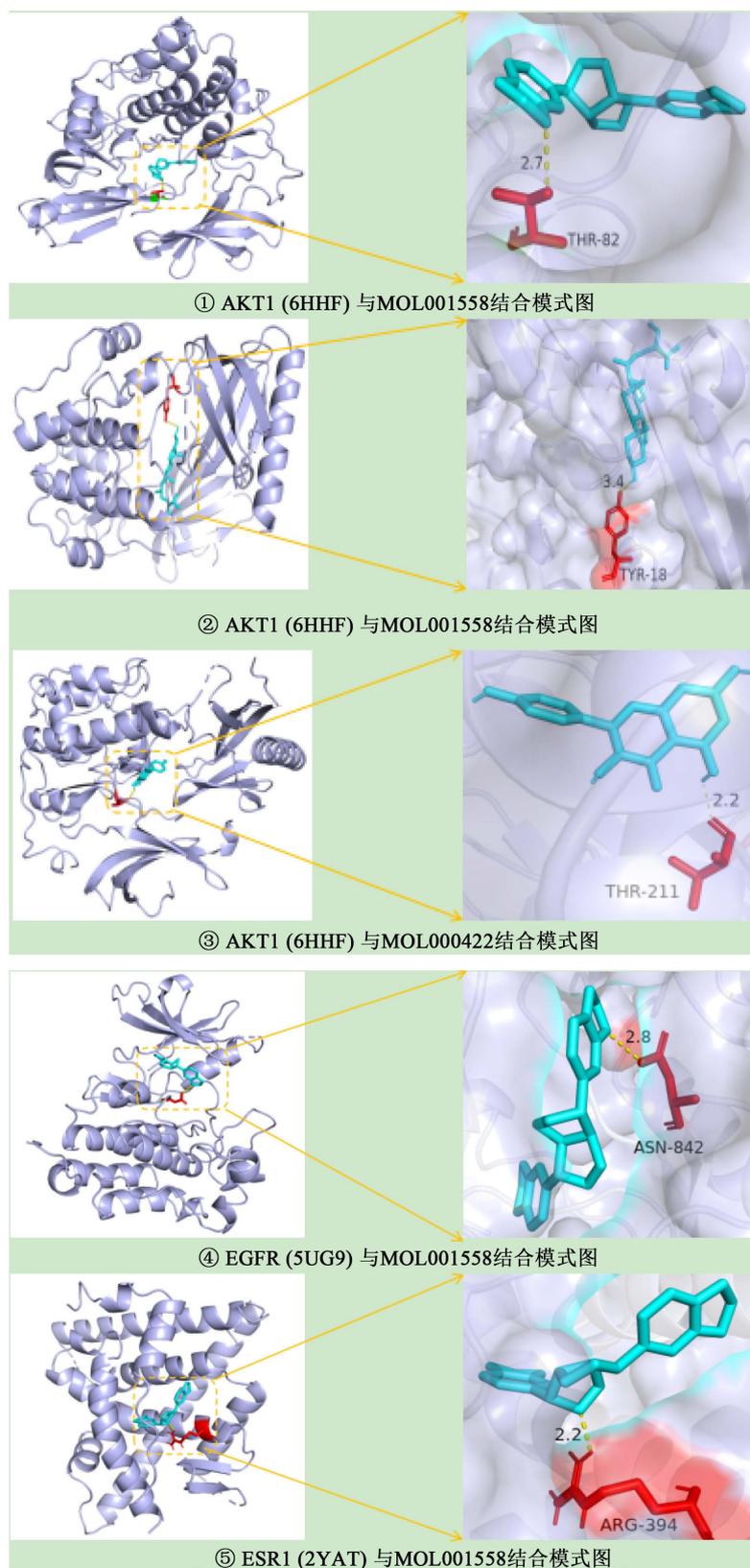


Figure 9. Docking results of 5 groups of molecules with optimal binding energy
图 9. 结合能最优的 5 组分子对接结果

通过 String 数据库构建乌梅丸治疗 IBS-D 的 PPI 网络, 根据 degree 值大小得出乌梅丸与 IBS-D 相互作用的关键靶点有 AKT-1、IL-6、VEGFA、IL-1 β 、HIF-1 α 、PTGS2、ESR-1 等, 体现出乌梅丸治疗 IBS-D 多靶点的特点。AKT1 是蛋白激酶 B (AKT) 三种亚型之一, 有研究[21]指出, IBS-D 患者血清肥大细胞数量较正常人明显增多, 并且肥大细胞数量越多, 疼痛阈值越低; 而磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路的激活可促进肥大细胞脱颗粒, 释放 5-羟色胺(5-HT)、组胺、前列腺素等生物活性物质, 破坏肠道屏障影响内脏敏感性, 或破坏局部微循环的完整性而引发炎症反应[22] [23] [24]; 亦可诱导促炎因子的分泌, 使得炎性细胞浸润, 最终导致炎症反应, 改变肠道动力及肠道敏感度, 进而引起腹痛、腹泻症状[25]。并且 AKT 参与着多种类型的肿瘤(如胰腺癌、皮肤癌、乳腺癌、结直肠癌、甲状腺癌和非小细胞肺癌)发生[26]。TNF- α 是炎症发生和肿瘤启动的重要因子, 能够参与炎症反应并促进机体分泌 IL-1、IL-6 等促炎细胞因子, 损伤粘膜组织[27] [28]; IL-1 β 、IL-6 作为多功能炎性细胞因子, 在多种生物效应中发挥重要作用。研究发现[29] IBS-D 患者 IL-1 β 、IL-6 的水平升高, IL-1 β 、IL-6 等炎症因子可促使胃肠道胆碱能神经对乙酰胆碱及其他炎性介质的敏感性增高, 这可能是引起 IBS-D 患者腹痛原因之一; IL-1 β 可通过抑制肠道钠钾酶的活性而抑制水、钠吸收, 这在一定程度上可以解释 IBS-D 腹泻症状的产生[30]。丁晓洁等[31]通过研究发现乌梅丸可降低大鼠血清 IL-6 含量, 对 IBS-D 治疗具有显著作用。IL-6 和 IL-1 β 又可通过激活 AKT1, 上调白细胞介素-17 (IL-17) 的表达而促进肠道炎症的发生[32]。研究证实[33], IBS 患者体内的 AKT1 表达确实更高此外有报道指出[34], IL-6 也是感染后肠病(PI-IBS)的独立风险因素。研究发现[35], 女性 IBS 患者体内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 比男性 IBS 患者更多, 且男女体内雌激素水平异常, 这可能是女性 IBS 患者多于男性的原因, 且雌激素能够抑制胃肠平滑肌的收缩, 也可降低结肠组织中 5-HT 水平, 抑制 IBS 的发生发展。VEGF 可激活核转录因子(NF- κ B)的表达, 导致各种促炎因子及趋化因子的产生[36]。VEGF 及其受体 VEGFR2 可提高血管通透性及促进炎性细胞浸润; VEGF 又可将白细胞及细胞粘附分子吸引到感染部位以促进炎症, 在炎症性肠病中发挥重要作用[37] [38]。多份报道指出, HIF-1 α 与炎症的关系非常密切[39] [40] [41], 炎症相关因子都能促进 HIF-1 α 的增加, 使其发挥炎症级联放大作用, 在机体的生理、病理过程中扮演着重要的角色[42]。CASP3 是重要的凋亡信号分子, 在肺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌等癌症的细胞凋亡中发挥重要作用[43] [44] [45]。c-Jun 氨基末端激酶的激活会促进炎症介质编码基因的表达而加重炎症反应[46]。

GO 分析结果表明, 乌梅丸治疗 IBS-D 在生物学过程方面最可能与对无机物、激素、异生物质刺激的反应等有关; 细胞组分方面最有可能与膜筏、转录调节因子复合物、囊泡腔等相关; 分子功能方面则最可能与蛋白质同二聚化活性、DNA 结合转录因子结合、氧化还原酶活性等相关。KEGG 通路富集分析结果显示, 乌梅丸治疗 IBS-D 主要涉及癌症通路、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等相关信号通路, 与前述乌梅丸有效成分的作用及疾病基因靶点的意义相符。

5. 结论

综上, 本文通过网络药理学和分子对接技术预测乌梅丸治疗 IBS-D 的作用机制, 发现乌梅丸中槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇等核心药效成分通过作用于 AKT1、L-6、IL-1B、VEGFA、EGFR 等核心靶点, 通过参与炎症、细胞代谢及内分泌等相关反应和通路治疗 IBS-D, 证明了乌梅丸治疗 IBS-D 具有多成分、多靶点、多通路的特点, 为乌梅丸核心药效成分及其制剂的新型药物治疗 IBS-D 提供一定的依据。

由于乌梅丸组方的复杂性, 且不同数据库资料并非实时更新, 以及分子对接技术的不成熟等影响因素, 本研究仅对乌梅丸治疗 IBS-D 的作用机制进行了预测分析, 其具体的机制还需进一步通过体内和体外实验来进行进一步验证。

参考文献

- [1] Zhang, F., Xiang, W., Li, C.Y., et al. (2016) Economic Burden of Irritable Bowel Syndrome in China. *World Journal of Gastroenterology*, **22**, 10450-10460. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i47.10450>
- [2] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 227-232.
- [3] 袁方. 乌梅丸加减治疗腹泻型肠易激综合征 46 例[J]. 光明中医, 2010, 25(8): 1384-1385.
- [4] 倪树文, 孙金蝉. 乌梅丸治疗寒热错杂腹泻型肠易激综合征的临床研究[J]. 中医药通报, 2014, 13(2): 53-55+58.
- [5] 丁晓洁, 董正平. 乌梅丸的实验研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14(12): 52-55.
- [6] 陈秒旬, 郑耿东, 陈瑞芳. 乌梅丸为基本方治疗肠易激综合征的 Meta 分析[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(5): 758-765.
- [7] Pei, C., Shao, L., Liu, J., et al. (2020) Study on the Mechanism of *Carthami flos* in Treating Retinal Vein Occlusion Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology. *Drug Design, Development and Therapy*, **32**, 1844-1851+1865.
- [8] 张声生, 魏玮, 杨俭勤. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017, 58(18): 1614-1620. <https://doi.org/10.13288/j.11-2166/r.2017.18.024>
- [9] 苏良伟, 郑欢, 黄马养, 等. 乌梅丸治疗腹泻型肠易激综合征的 Meta 分析[J]. 中国中医急症, 2019, 28(9): 1554-1558.
- [10] 李阳杰, 姜亚玲, 刘秋伟, 等. 槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(3): 175-180.
- [11] Borghi, S.M., Mizokami, S.S., Pinho-Ribeiro, F.A., et al. (2018) The Flavonoid Quercetin Inhibits Titanium Dioxide (TiO₂)-Induced Chronic Arthritis in Mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **53**, 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.010>
- [12] Ruiz-Miyazawa, K.W., Staurengo-Ferrari, L., Mizokami, S.S., et al. (2017) Quercetin Inhibits Gout Arthritis in Mice: Induction of an Opioid-Dependent Regulation of Inflammasome. *Inflammopharmacology*, **25**, 555-570. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0356-x>
- [13] 黄伟锋, 欧阳守, 林燕飞, 等. 槲皮素对胃肠运动的影响及其机制[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(18): 1815-1820.
- [14] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山奈酚生物功能研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [15] Liao, P., Lai, M.H., Hsu, K.P., et al. (2018) Identification of β -sitos-terol as *in Vitro* Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 10748-10759. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04555>
- [16] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [17] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 80-86+94.
- [18] 汪帅, 孙宇, 李春梅, 等. 豆甾醇的研究进展概述[J]. 中国药业, 2019, 28(23): 96-98.
- [19] Manatsanan, K., Thanyaluck, P., Jeerawan, K., et al. (2017) Effects of Sesamin on Primary Human Synovial Fibroblasts and SW982 Cell Line Induced by Tumor Necrosis Factor-Alpha as a Synovitis-Like Model. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **17**, Article No. 532. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2035-2>
- [20] 白金权, 黄芝锦, 魏肖宇, 等. 芝麻素药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(3): 217-219.
- [21] 杨娟, 杨琦, 张超, 等. 肠易激综合征患者内脏感觉及其与结肠黏膜肥大细胞、P 物质和血管活性肠肽的相关性研究[J]. 海军医学杂志, 2018, 39(6): 545-547+552.
- [22] Hochdörfer, T., Kuhny, M., Zorn, C.N., et al. (2011) Activation of the PI3K Pathway Increases TLR-Induced TNF- α and IL-6 but Reduces IL-1 β Production in Mast Cells. *Cellular Signalling*, **23**, 866-875. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.012>
- [23] Bos, C.-L., Richel, D.-J., Ritsema, T., et al. (2004) Prostanoids and Prostanoid Receptors in Signal Transduction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 1187-1205. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.006>
- [24] Di Gennaro, A. and Haeggström, J.Z. (2012) The Leukotrienes: Immune-Modulating Lipid Mediators of Disease. *Advances in Immunology*, **116**, 51-92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00002-8>
- [25] Shi, Z.M., Han, Y.W., Han, X.H., et al. (2016) Upstream Regulators and Downstream Effectors of NF- κ B in Alzheimer's Disease. *Journal of the Neurological Sciences*, **366**, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.022>

- [26] 张文杰. 基于 PI3K/AKT 通路探讨肠安菌泰对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠的作用机制[D]: [博士学位论文]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [27] 王新宇. 早年不良经历相关疾病共有证候——基因网络分析[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [28] Choghakhori, R., Abbasnezhad, A., Hasanvand, A., *et al.* (2017) Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome: Association with Digestive Symptoms and Quality of Life. *Cytokine*, **93**, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.005>
- [29] Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.K., *et al.* (2008) Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1beta, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, **28**, 5189-5194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>
- [30] 李亚其. IL-1 β 、IL-6、IL-10 在肠易激综合征患者中的表达及临床意义[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [31] 丁晓洁, 孙喜灵, 于晓飞, 等. 乌梅丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1296-1299+后插 5.
- [32] Fitzpatrick, L.R. (2012) Novel Pharmacological Approaches for Inflammatory Bowel Disease: Targeting Key Intracellular Pathways and the IL-23/IL-17 Axis. *International Journal of Inflammation*, **2012**, Article ID: 389404. <https://doi.org/10.1155/2012/389404>
- [33] Bennet, S., Sundin, J., Magnusson, M.K., *et al.* (2018) Altered Intestinal Antibacterial Gene Expression Response Profile in Irritable Bowel Syndrome Is Linked to Bacterial Composition and Immune Activation. *Neurogastroenterology & Motility*, **30**, Article ID: e13468. <https://doi.org/10.1111/nmo.13468>
- [34] Villani, A.C., Lemire, M., Thabane, M., *et al.* (2010) Genetic Risk Factors for Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Following a Waterborne Outbreak of Gastroenteritis. *Gastroenterology*, **138**, 1502-1513. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.049>
- [35] McKernan, D.P., Gaszner, G., Quigley, E.M., *et al.* (2011) Altered Peripheral Toll-Like Receptor Responses in the Irritable Bowel Syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **33**, 1045-1052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04624.x>
- [36] Chen, L., Deng, H., Cui, H., *et al.* (2017) Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget*, **9**, 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- [37] Waldner, M.J., Wirtz, S., Jefremow, A., *et al.* (2010) VEGF Receptor Signaling Links Inflammation and Tumorigenesis in Colitis-Associated Cancer. *Journal of Experimental Medicine*, **207**, 2855-2868. <https://doi.org/10.1084/jem.20100438>
- [38] Leick, M., Azcutia, V., Newton, G., *et al.* (2014) Leukocyte Recruitment in Inflammation: Basic Concepts and New Mechanistic Insights Based on New Models and Microscopic Imaging Technologies. *Cell and Tissue Research*, **355**, 647-656. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1809-9>
- [39] 许春梅, 董卫国, 余保平, 等. 低氧诱导因子-1 α 和炎症诱导酶在炎症性肠病中的表达及意义[J]. 临床消化病杂志, 2005, 17(3): 103-105.
- [40] Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., *et al.* (2003) HIF-1alpha Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell*, **112**, 645-657. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00154-5)
- [41] Walmsley, S.R., Print, C., Farahi, N., *et al.* (2005) Hypoxia-Induced Neutrophil Survival Is Mediated by HIF-1alpha-Dependent NF- κ B Activity. *Journal of Experimental Medicine*, **201**, 105-115. <https://doi.org/10.1084/jem.20040624>
- [42] 栾飞, 王谨涵, 李茂星, 等. 缺氧诱导因子-1 与炎症关系的研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(2): 92-97.
- [43] 黄健清, 梁红玲, 张绪超, 等. CASP3 与 Cleaved-CASP3 在肺癌中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(8): 1247-1250.
- [44] Zhu, C.-Y., Meng, F.-Q. and Liu, J. (2019) MicroRNA-524-5p Suppresses Cell Proliferation and Promotes Cell Apoptosis in Gastric Cancer by Regulating CASP3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 7968-7977.
- [45] Song, X., Zhang, Y., Dai, E., *et al.* (2021) Network Pharmacology Analysis of *Epimedium brevicornu* (Yinyanghuo) for Treatment of Ovarian Cancer. *Medicinal Plant*, **12**, 24-29.
- [46] Serra, D., Rufino, A.T., Mendes, A.F., *et al.* (2014) Resveratrol Modulates Cytokine-Induced Jak/STAT Activation More Efficiently than 5-Aminosalicylic Acid: An *in Vitro* Approach. *PLOS ONE*, **9**, Article ID: e109048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109048>