

·中医药信息学·

基于网络药理学与 GEO 基因芯片探讨四君子汤与痛泻要方 “同病异治”腹泻型肠易激综合征的作用机制

于官正^{1,2}, 李 鸿^{1,2}, 涂 星²

(1.湖北民族大学医学部,湖北 恩施 445000;

2.湖北民族大学武陵山中药材检验检测中心,湖北 恩施 445000)

摘要:目的 基于网络药理学与 GEO 基因芯片挖掘,并预测四君子汤与痛泻要方同病异治抗腹泻型肠易激综合征(IBS-D)的共性作用靶点及相关信号通路,研究其作用机制。方法 GEO 数据库筛选 IBS-D 患者差异表达基因作为疾病靶点;中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为条件筛选,获取四君子汤与痛泻要方活性成分及对应靶点;将 IBS-D 疾病靶点与四君子汤和痛泻要方靶点做 Venn 图取交集,获得交集基因,构建中药复方调控网络;将交集基因录入 STRING 数据库绘制 PPI 网络,筛选核心基因;运行 R 语言对交集基因进行富集分析。结果 GEO 数据库载有 IBS-D 差异表达基因 2642 个;TCMSP 数据库载有四君子汤有效成分与靶点为 136、229 个,痛泻要方有效成分与靶点为 43、129 个;四君子汤和痛泻要方与 IBS-D 交集基因共 36 个,包含 23 个共性基因。GO 与 KEGG 富集分析结果显示,脂质与动脉粥样硬化信号通路、AGE-RAGE 信号通路、脂多糖反应、营养水平反应等为两复方治疗 IBS-D 潜在共性靶点。结论 脂质与动脉粥样硬化信号通路、AGE-RAGE 信号通路、脂多糖反应、营养水平反应可能为四君子汤与痛泻要方发挥“同病异治”抗 IBS-D 作用的共性靶点。

关键词:网络药理学;GEO 基因芯片;四君子汤;痛泻要方;腹泻型肠易激综合征;同病异治

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.06.003

文章编号:1006-1959(2023)06-0014-07

Explore the Mechanism of Sijunzi Decoction and Tongxieyaofang for "Same Disease with Different Treatments" of Diarrhea Predominant-irritable Bowel Syndrome Based on Network Pharmacology and GEO Gene Chip

YU Guan-zheng^{1,2}, LI Hong^{1,2}, TU Xing²

(1. Medical Department of Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China;

2. Chinese Medicinal Materials Products Quality Supervision and Inspection Center in Wuling Mountainous Area, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: Objective To predict the common targets, related signal pathways and mechanism of Sijunzi decoction and Tongxieyaofang in treating diarrhea predominant-irritable bowel syndrome (IBS-D) with concept of "same disease with different treatments" based on the network pharmacology method and GEO gene chip. **Methods** GEO database was used to screen the differentially expressed genes of IBS-D patients as disease targets. The active ingredients and corresponding targets of Sijunzi decoction and Tongxieyaofang were selected by the TCMSP database under the conditions of $OB \geq 30\%$ and $DL \geq 0.18$. The intersection of the IBS-D disease targets with the targets of Sijunzi decoction and Tongxieyaofang main prescription was made by Venn diagram, and the intersection genes were obtained to construct the regulatory network of traditional Chinese medicine compound. The intersection genes were imported into STRING database to draw PPI network, and the core genes were screened. R language was used for enrichment analysis of intersection genes. **Results** There were 2642 IBS-D differentially expressed genes in GEO database. The TCMSP database contained 136 active ingredients and 229 and targets of Sijunzi decoction, and 43 active ingredients and 129 and targets of Tongxieyaofang. There were 36 intersections between Sijunzi decoction, Tongxieyaofang and IBS-D, including 23 common genes. GO and KEGG enrichment analysis showed that lipid and atherosclerosis signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, lipopolysaccharide response, and nutrient level response were potential common targets for IBS-D treatment. **Conclusion** Lipid and atherosclerosis signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, lipopolysaccharide response, and nutrient level response may be the common targets for Sijunzi decoction and Tongxieyaofang to exert the anti-IBS-D effects of the same disease and different treatment.

Key words: Network pharmacology; GEO gene chip; Sijunzi decoction; Tongxieyaofang; Diarrhea diarrhea predominant-irritable bowel syndrome; Same disease with different treatments

基金项目:1.湖北省教育厅科学技术研究项目(编号:B2022097);2.湖北民族大学 2022 年揭榜挂帅资助项目(编号:JB22003);3.湖北省科技厅科学技术研究项目(编号:2022BCE043);4.恩施州科技项目技术支撑类重点项目(编号:D20220065)

作者简介:于官正(1996.12-),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事民族医药的挖掘、整理、保护、开发与利用研究

通讯作者:涂星(1987.9-),男,湖北黄冈人,博士,副教授,主要从事民族医药的挖掘、整理、保护、开发与利用研究

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea predominant-irritable bowel syndrome, IBS-D) 是一种以腹痛、腹泻为主要临床特征的肠道功能紊乱性疾病, 发病机制尚未明确, 可能与肠上皮屏障通透性升高、内脏高敏感性、脑-肠轴功能失调等相关^[1]。临床治疗 IBS-D 常使用解痉、止泻等药品, 疗效单一且价格昂贵^[2]。中医认为 IBS-D 属于“腹泻”“下利”等范畴, 基本病机为脾失健运、肝郁脾虚等, 常采用益气健脾、疏肝健脾等方法进行治疗^[3]。四君子汤与痛泻要方为治疗 IBS-D 的经典方, 四君子汤以人参为君药, 偏于益气健脾, 痛泻要方以白术为君药, 偏于燥湿止泻, 体现了“同病异治”的中医特色, 但其治疗 IBS-D 的共性机制尚不明确^[4]。网络药理学从整体上分析中药复方多成分、多靶点、多通路的调节机制, 与中医整体观念与辨证论治思想相契合, 为中医药“同病异治”的观点的阐述提供有效途径^[5-6]。本研究通过网络药理学预测四君子汤与痛泻要方治疗 IBS-D 潜在共性靶点与通路, 拟探究两复方“同病异治”IBS-D 的潜在共性机制, 以期为临床治疗 IBS-D 用药提供理论支撑。

1 资料与方法

1.1 软件及数据库 Cytoscape (3.7.2); Java (1.8.0); Perl 语言 (Active Perl 5.30); R 语言 (x64 4.2.1); Bioconductor 平台 (<https://www.bioconductor.org, version3.15>); 中药系统药理分析平台 (traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) (<http://tcmsp.com/index.php, version2.3>); Gene Expression Omnibus 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GEO 数据库); STRING 数据库 (<http://string-db.org/>, version 11.5)。各数据库的检索均于 2022 年 12 月 12 日完成。

1.2 筛选疾病差异基因 于 GEO 数据库中 input diarrhea-predominant irritable bowel syndrome normal, 物种选择 “Homo sapiens” 进行搜索, IBS-D 基因载于 GSE6701 芯片, 该芯片数据由 77 个健康受试者和 53 个 IBS-D 患者基因表达量构成^[7]。下载该芯片的平台文件与探针文件。借助 Perl 语言将探针名称转化为基因名称并进行分组。以健康组和 IBS-D 组基因差异倍数的绝对值 ($|\log FC|$) ≥ 1 且 $P < 0.05$ 为标准, 运用 R 语言分析基因数据的差异性, 筛选疾病差异基因并绘制火山图。

1.3 预测复方活性成分及靶点 于 TCMSP 数据库中以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) \geq

0.30、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为条件进行检索^[8-9], 获取四君子汤与痛泻要方的活性成分及对应靶点。运用 Perl 语言进行药物靶点 ID 转化, 将靶点名转为对应的基因名。

1.4 构建中药复方调控网络 将 1.3 获得的两复方作用靶点基因与 IBS-D 差异基因绘制 Venn 图, 取交集; 运用 Perl 语言呈现出交集基因对应的活性成分; 运用 Cytoscape 软件绘制中药复方调控网络并进行拓扑分析^[10]。

1.5 PPI 网络分析 将 1.4 得到的交集基因录入 STRING 数据库, 选择 “Multiple proteins”, 物种选择 “Homo sapiens”, 将游离蛋白点隐藏后更新构建 PPI 网络, 通过 R 语言运行脚本及 PPI 网络 TSV 文件, 按照基因富集数目由多至少为条件筛选排名前 30 的基因为核心基因并绘制图片。

1.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 通过 R 语言中 RSQLite 插件与 org.Hs.eg.db (version 3.15) 数据包对基因进行编码, 再运用 colorspace、stringi 插件和 DOSE、clusterProfiler、pathview 数据包 (version 3.15), 以 $P < 0.05$ 为条件进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。GO 富集分析根据 P 值由小到大筛选每个板块排名前 10 的条目, 不足 10 条则分析全部, P 值越小, 结果越显著; KEGG 富集分析同 GO 分析条件, 分析排名前 20 的通路。

2 结果

2.1 筛选疾病差异基因 运行 R 语言以 $|\log FC| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准, 对 GSE6701 芯片所载数据进行筛选, 得到健康组与 IBS-D 组差异基因 2642 个, 上调基因与下调基因分别为 1033、1609 个, 见图 1。

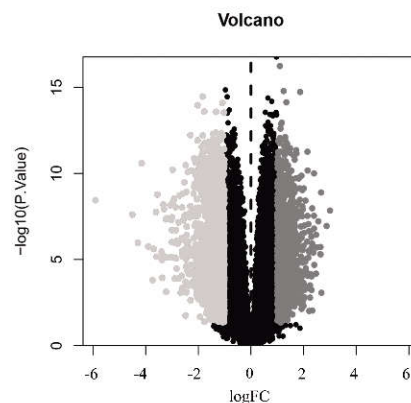
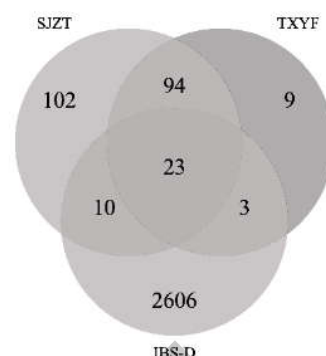


图 1 差异表达基因火山图

2.2 预测复方活性成分及靶点 于 TCMS 数据库中,以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件对四君子汤与痛泻要方所有成分进行筛选,得到四君子汤活性成分 136 个,对应靶点 229 个;痛泻要方活性成分 43 个,对应靶点 129 个。

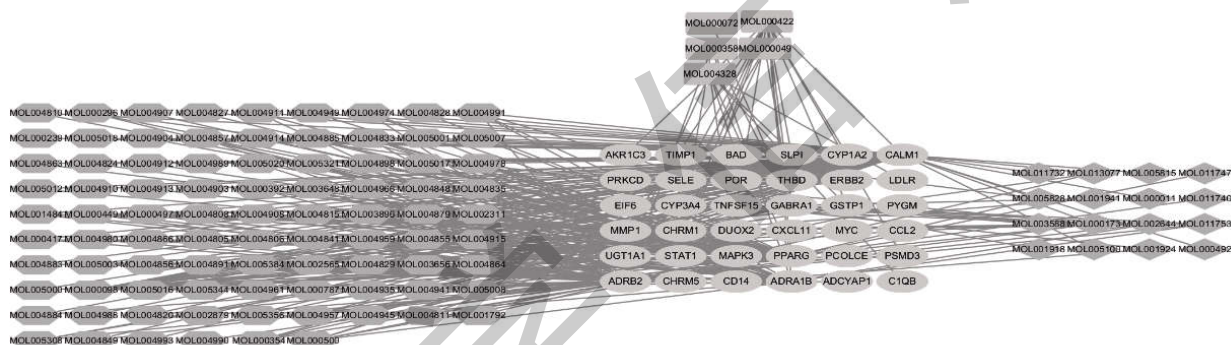
2.3 构建中药复方调控网络 运行 Perl 语言进行药物靶点 ID 转化,将剔重后的四君子汤与痛泻要方活性成分作用靶点基因与 IBS-D 差异基因绘制 Venn 图,取交集。四君子汤、痛泻要方与 IBS-D 交集基因分别为 33、26 个,两复方作用靶点基因与 IBS-D 差异基因的交集基因共 36 个;包含 23 个共性基因,10 个四君子汤优势交集基因;3 个痛泻要方优势交集基因,见图 2。运用 Perl 语言呈现出交集基因的活性成分,运用 Cytoscape 软件绘制中药复方调控网络图,得到 310 条边(表示复方活性成分与疾病靶点基

因之间的相互作用),144 个结点(表示四君子汤与痛泻要方活性成分和疾病靶点基因),见图 3。



注: SJZT 为四君子汤, TXYF 为痛泻要方

图 2 四君子汤、痛泻要方作用靶点基因与 IBS-D 差异基因 Venn 图



注: 椭圆代表 IBS-D 差异基因, 多边形代表四君子汤活性成分靶点基因, 菱形代表痛泻要方活性成分靶点基因, 矩形代表两方剂共同靶点基因

图 3 四君子汤与痛泻要方调控网络

2.4 PPI 网络分析 将 2.3 所得的 36 个交集基因录入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络。通过 R 语言根据基因富集数目筛选排名前 30 的基因为核心基因, 绘制图片, 见图 4。

2.5 GO 通路富集分析 运行 R 语言设置 $P < 0.05$ 对痛泻要方与 IBS-D 交集基因进行 GO 富集分析, 获得功能条目 273 条, 包含 BP 243 条, CC 8 条, MF 22 条, 涉及脂多糖反应、活性氧反应、营养水平反应、质膜穴样内陷、G 蛋白偶联受体活性、羧酸结合、单羧酸结合等生物功能; 同法分析四君子汤与 IBS-D 交集靶点, 获得功能条目 385 条, 其中 BP 345 条, CC 1 条, MF 39 条, 涉及调节激素水平、脂多糖反应、营养水平反应、质膜穴样内陷、G 蛋白偶联受体活性、羧酸结合、单羧酸结合等生物功能, 见图 5。

其中, 脂多糖反应、营养水平反应、质膜穴样内陷、G 蛋白偶联受体活性、羧酸结合、单羧酸结合等为两复方治疗 IBS-D 潜在共性生物学事件。

2.6 KEGG 通路富集分析 运行 R 语言以 $P < 0.05$ 为条件对四君子汤与 IBS-D 交集基因进行 KEGG 富集分析, 共得到功能条目 64 条, 涉及脂质与动脉粥样硬化、膀胱癌、化学致癌作用-受体激活、AGE-RAGE 等信号通路; 同法分析痛泻要方与 IBS-D 交集靶点, 共得到 KEGG 功能条目 54 条, 涉及化学致癌作用-受体激活、脂质与动脉粥样硬化、类固醇激素生物合成、AGE-RAGE 等通路, 见图 6。涉及化学致癌作用-受体激活、脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE 等信号通路为两复方治疗 IBS-D 潜在共性调控信号通路。

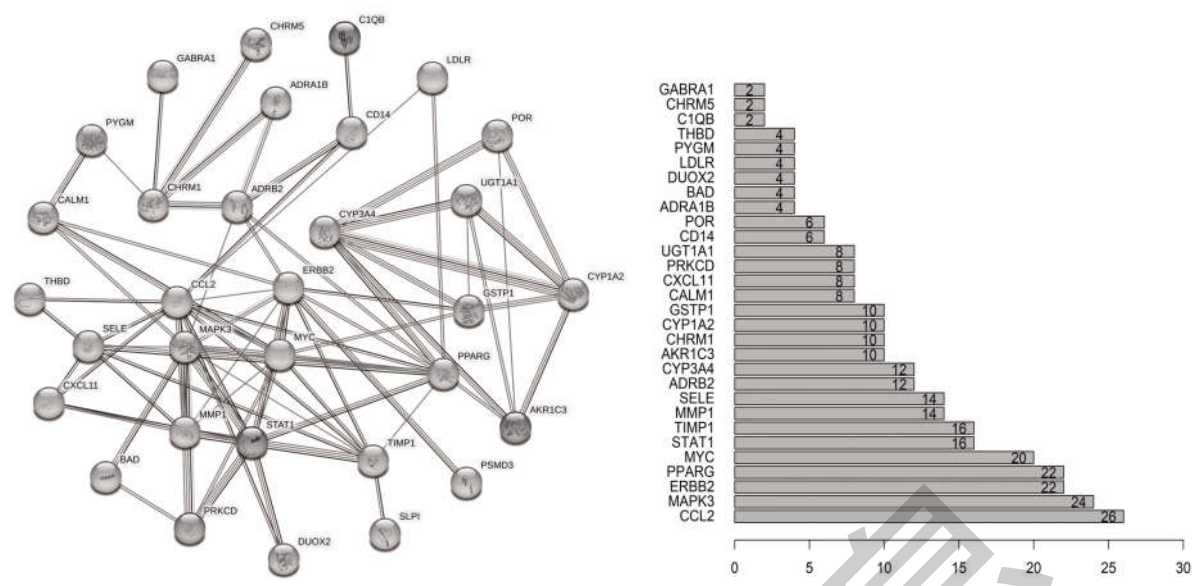
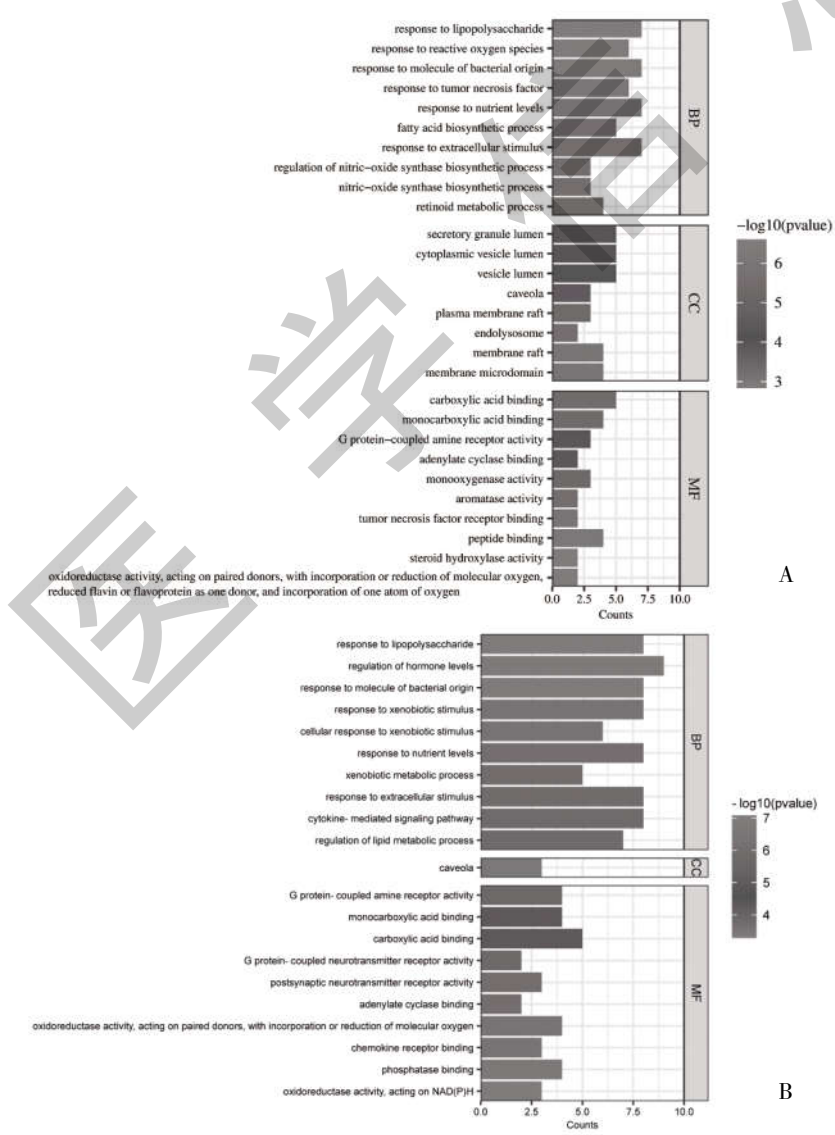
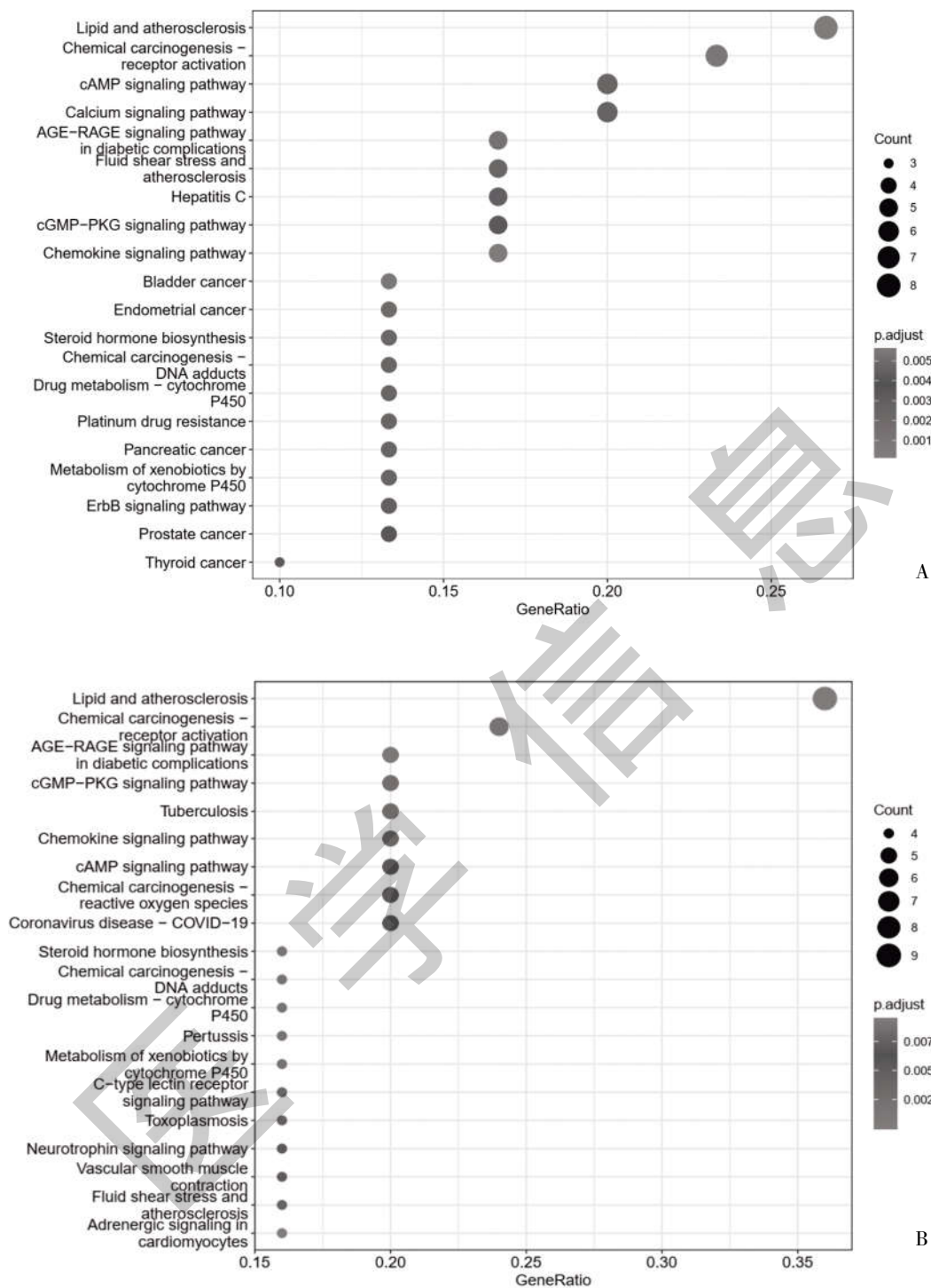


图 4 PPI 蛋白交互网络与 PPI 网络核心基因



注:A:痛泻要方;B:四君子汤

图 5 痛泻要方及四君子汤 GO 富集功能分析条形图



注: A: 四君子汤; B: 痛泻要方

图 6 四君子汤与痛泻要方 KEGG 富集分析气泡图

3 讨论

近年来, 随着生活环境的改变及心理压力增加, IBS-D 在我国发病率呈上升趋势, 给患者及社会医疗行业带来沉重压力^[11]。中医辨证论治 IBS-D

独具优势, 认为肝郁脾虚证、脾虚湿盛证等为 IBS-D 的主要证型, 其中以肝郁脾虚证最为多见。四君子汤与痛泻要方是治疗 IBS-D 的经典方, 四君子汤始载于宋代《太平惠民和剂局方》, 由人参、白术、茯

苓、炙甘草组成,具有补中益气、健脾和胃之功,善治脾虚湿盛证^[12]。痛泻要方始载于《景岳全书》,由炒白术、炒白芍、陈皮、防风组成,具有疏肝健脾、止痛止泻之功,善治肝郁脾虚证^[13]。虽有大量文献对四君子汤及痛泻要方单独治疗 IBS-D 的机制进行研究,但对二者“同病异治”发挥作用的共性机制鲜有报道。

本研究在网络药理学基础上筛选出四君子汤与痛泻要方活性成分及对应靶点,其中可作用于 IBS-D 的靶点分别有 33、26 个,共 36 个,包括 23 个共性靶点,这与中药复方干预疾病具有多成分、多靶点的特性相吻合^[14]。同时,本研究发现四君子汤可通过脂质与动脉粥样硬化、膀胱癌、AGE-RAGE 等信号通路来调节激素水平、脂多糖反应、质膜穴样内陷、单羧酸结合等生物功能发挥治疗 IBS-D 的作用;痛泻要方可通过化学致癌作用-受体激活、类固醇激素生物合成、AGE-RAGE 等通路调节脂多糖反应、活性氧反应、营养水平反应、G 蛋白偶联受体活性、单羧酸结合等生物功能发挥抗 IBS-D 的作用,这与中药复方多通路治病的特征一致^[15]。近年来有研究发现^[16,17],IBS-D 的发病与脑肠互动失衡紊乱、免疫功能失常、内脏敏感性升高、肠道菌群失衡及肠道黏膜屏障损伤等因素密切相关,表明可从调节免疫功能、保护黏膜屏障、改变肠道运动等方面来改善 IBS-D,为其临床治疗提供了新思路。有文献报道^[18,19],四君子汤可以通过改善肠道运动功能、保护肠道黏膜屏障、调节肠道菌群、干预细胞增殖及凋亡等发挥抗 IBS-D 的作用,与本研究挖掘出的四君子汤抗 IBS-D 主要生物学功能和通路相符。痛泻要方治疗 IBS-D 涉及肠道病理生理多个方面。本研究结果显示,其治疗 IBS-D 所涉及的通路中,肠道感觉功能及炎症反应发挥了主要作用,还可以适当调节精神心理。痛泻要方的有效成分可通过多通路及功能来降低内脏敏感性、改善肠道运动等。同时,IBS-D 患者多表现为焦虑、抑郁,中医称之为肝气郁结,肝郁脾虚。研究发现^[20],IBS-D 肝郁脾虚者多存在脑肠互动紊乱,痛泻要方可调畅情志、条达肝气,调节脑肠肽来恢复脑肠互动、胃肠功能,降低内脏敏感性,保护肠黏膜屏障,发挥治疗 IBS-D 的作用,与本研究预测出的痛泻要方治疗 IBS-D 所涉及的主要生物学功能和通路相符。

综上所述,本研究基于网络药理学与 GEO 数据库挖掘发现调控化学致癌作用-受体激活、脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE 等信号通路及脂多糖反应、营养水平反应、质膜穴样内陷、G 蛋白偶联受体活性、羧酸结合、单羧酸结合等生物功能可能为四君子汤与痛泻要方治疗 IBS-D 潜在共性生物学事件。本研究尚有不足之处,未开展相关动物实验进行验证,后期需开展更多实验验证。

参考文献:

- [1]Simrén M,Törnblom H,Palsson OS,et al.Management of the multiple symptoms of irritable bowel syndrome [J].Lancet Gastroenterol Hepatol,2017,2(2):112-122.
- [2]李旗,田福玲,郭振宇,等.浮针疗法对轻中度腹泻型肠易激综合征患者内脏敏感性、胃肠动力、肠道菌群及肠黏膜屏障功能的影响研究 [J].中国全科医学,2021,24 (9):1111-1115,1130.
- [3]李中玉,陈婷,王阳,等.经方辨治腹泻型肠易激综合征的理论与方法研究[J].中国中西医结合杂志,2022,42(1):107-111.
- [4]卓冰帆,张彦卿,宁晓燕.痛泻要方合四君子汤加减对腹泻型肠易激综合征患者脑肠肽的影响 [J].南京中医药大学学报,2019,35(1):25-28.
- [5]李鸿,于官正,胡雪黎,等.基于网络药理学与实验验证探讨四君子汤与痛泻要方“同病异治”溃疡性结肠炎的作用机制 [J].中国实验方剂学杂志,2023,29(3):52-60.
- [6]Zhang W,Chen Y,Jiang H,et al.Integrated strategy for accurately screening biomarkers based on metabolomics coupled with network pharmacology[J].Talanta,2020,211:120710.
- [7]Barrett T,Wilhite SE,Ledoux P,et al.NCBI GEO: archive for functional genomics data sets --update [J].Nucleic Acids Res,2013,41(Database issue):D991-D995.
- [8]Ru J,Li P,Wang J,et al.TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines.[J].J Cheminform,2014,6:13.
- [9]Xu X,Zhang W,Huang C,et al.A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J].Int J Mol Sci,2012,13(6):6964-6982.
- [10]马慧莱,侯宇芯,王爱成,等.基于网络药理学比较黄芪桂枝五物汤和四神煎治疗类风湿关节炎的作用机制[J].中医杂志,2022,63(20):1965-1974.
- [11]王翔芮,傅文斌,孙弋洪,等.痛泄要方缓解肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征患者内脏高敏的临床疗效[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(9):97-102.

(下转第24页)

(上接第19页)

- [12]姜新根,王美蓉,胡莲花.四君子汤在慢性胃炎患者中的应用效果及不良反应发生率分析[J].山西医药杂志,2022,51(1):81-84.
- [13]郭军雄,马丽,葛生虎,等.痛泻要方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠肠道高敏性的治疗作用[J].中国现代应用药学,2022,39(10):1283-1288.
- [14]Zhu N,Hou J,Yang N.Network pharmacology integrated with experimental validation revealed the anti-inflammatory effects of *Andrographis paniculata*[J].Sci Rep,2021,11(1):9752.
- [15]石娅,刘文,刘兴德,等.基于 PI3K/Akt 信号通路探究当归补血汤干预大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的作用机制 [J].中草药,2022,53(16):5052-5065.
- [16]李榕娇,郭维龙,孙慧冰,等.肠易激综合征患者肠道菌群分布和炎症因子及血清 NPY、SP、5-HT 水平的变化[J].中国微生物生态学杂志,2020,32(9):1060-1064.

- [17]Altomare A,Di Rosa C,Imperia E,et al.Diarrhea Predominant-Irritable Bowel Syndrome (IBS-D): Effects of Different Nutritional Patterns on Intestinal Dysbiosis and Symptoms [J].Nutrients,2021,13(5):1506.
- [18]牛媛媛,汪龙德,毛兰芳,等.基于网络药理学与分子对接技术探讨四君子汤治疗 IBS-D 的分子靶点与作用机制研究[J].中医药信息,2021,38(9):9-15.
- [19]连秋华,朱惠萍,梁国强,等.健脾合剂对脾虚腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群的干预研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(3):770-780.
- [20]胡莹,郑依玲,梅全喜,等.痛泻要方破壁饮片对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响[J].中药材,2020,43(7):1726-1731.

收稿日期:2023-02-05;修回日期:2023-02-18

编辑/杜帆