

基于网络药理学探讨肠通片治疗老年性便秘的作用机制

姚淮育¹,白常松²,陈雪²,王英²,付满玲³

(1.泸州市人民医院重症医学科,四川 泸州 646000;

2.西南医科大学医学影像系,四川 泸州 646000;

3.西南医科大学科技处公共实验技术中心,四川 泸州 646000)

摘要:目的 基于网络药理学研究肠通片治疗老年性便秘主要活性成分和作用机制。方法 通过 TCMSP、化学专业数据库、UniProt 数据库获得肠通片的主要活性成分和靶点,基于 OMIM、Genecards 数据库获取老年性便秘的靶点;将肠通片与老年性便秘的靶点交集,获取肠通片治疗老年性便秘的核心靶点;利用 String 数据库得到蛋白相互作用关系;使用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析;采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建 PPI 网络、“药物-活性成分-靶点”网络以及“活性成分-重要靶点-关键通路”网络,并进行网络分析。结果 共筛选了肠通片活性成分 28 个、作用靶点 1203 个、潜在靶点 87 个;经过 PPI、GO、KEGG 及相关网络分析,最终得到肠通片的主要活性成分有 quercetin、beta-sitosterol、beta-carotene、3 β -acetoxyatractylone、morin、suchilactone、Dinatin、Atractylenolide I、Yangambin、geniposide 10 个,关键靶点为 PTGS2、MAPK1、AKT1、NFKBIA、IL6 等 30 个,参与调控的 GO 生物过程有对缺氧的反应、对脂多糖的反应、凋亡过程等,参与的信号通路为 PI3K-Akt signaling pathway、TNF signaling pathway、HIF-1 signaling pathway 等 20 条。结论 运用网络药理学预测了肠通片是通过多成分、多靶点、多通路治疗老年性便秘。

关键词:肠通片;老年性便秘;网络药理学

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.16.005

文章编号:1006-1959(2023)16-0027-07

The Mechanism of Changtong Tablets in the Treatment of Senile Constipation Based on Network Pharmacology

YAO Huai-yu¹,BAI Chang-song²,CHEN Xue²,WANG Ying²,FU Man-ling³

(1.Department of Critical Care Medicine,Luzhou People's Hospital,Luzhou 646000,Sichuan,China;

2.Department of Medical Imaging,Southwest Medical University,Luzhou 646000,Sichuan,China;

3.Public Experimental Technology Center,Science and Technology Department,Southwest Medical University,Luzhou 646000,Sichuan,China)

Abstract: Objective To study the main active components and mechanism of Changtong tablets in the treatment of senile constipation based on network pharmacology.**Methods** The main active ingredients and targets of Changtong tablets were obtained from TCMSP, Chemical professional database and UniProt database, and the targets of senile constipation were obtained from OMIM and Genecards database. The target of Changtong tablets and senile constipation were intermingled to obtain the core target of Changtong tablets in the treatment of senile constipation. The protein interaction relationship was obtained using String database. DAVID database was used for GO and KEGG enrichment analysis. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct PPI network, "drug-active ingredient-target" network and "active ingredient-important target-critical pathway" network, and network analysis was performed.**Results** A total of 28 active components, 1203 targets and 87 potential targets of Changtong tablets were screened. After PPI, GO, KEGG and related network analysis, the main active ingredients ($n=10$) of Changtong tablets were quercetin, beta-sitosterol, beta-carotene, 3 β -acetoxyatractylone, morin, suchilactone, Dinatin, Atractylenolide I, Yangambin and geniposide; the key targets ($n=30$) were PTGS2, MAPK1, AKT1, NFKBIA, IL6 and others; the GO biological processes ($n=20$) involved in the regulation included response to hypoxia, response to lipopolysaccharide, apoptosis process, etc. The signaling pathways involved were PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and others.**Conclusion** Using network pharmacology, it is predicted that Changtong tablets can treat senile constipation by multi-component, multi-target and multi-pathway.

Key words: Changtong tablets; Senile constipation; Network pharmacology

基金项目:1.泸州市科技计划创新苗子项目(编号:2021-RCM-115);2.西南医科大学大学生创新创业训练计划项目(编号:2022105)

作者简介:姚淮育(1993.5-),男,四川泸州人,本科,护师,主要从事老年护理的研究

通讯作者:付满玲(1995.4-),女,四川泸州人,硕士研究生,助理实验师,主要从事中药药理研究

便秘(constipation)是常见的慢性胃肠功能性疾病之一,并随年龄增长而增加^[1]。老年人常因脏腑功能衰退、气血虚弱则无力鼓动胃肠、津液匮乏;阴阳虚衰则命门无火,肠燥便干,故便秘成为老年人常见的消化道疾病^[2]。老年性便秘是一种起病诱因极复杂的疾病,涉及饮食结构、生活习惯、社会压力等,其中功能性便秘较为常见,患者通常有大便次数减少、排便不畅、排便费力等。老年便秘发生率高,可引发多种并发症,甚至危及生命^[3]。肠通片,本项目组自主研发,已授权国家发明专利^[4],其主要成分为生白术、车前子、桑椹、生地黄、肉苁蓉,是根据老年性便秘的特点研制,避免长期食用引起老年肠道功能紊乱以及菌群失调的副作用问题,维持粪便含水量,促进肠道蠕动提高排便顺畅度。该组方健脾补肾,益精通便,长期食用可达到通便而不伤正的效果,同时可预防老年性便秘复发,标本兼治。中药组方所含的化合物数量多且相互作用复杂,阐明中药复方不同组分之间的相互作用及药理机制至关重要^[5]。网络药理学可将中药有效成分和靶点进行网络化联结与分析,预测药物治疗疾病潜在靶点及通路认识药物作用机制^[6],基于此,本研究利用网络药理学,筛选肠通片的活性成分及靶点,构建药物-活性成分-靶点、活性成分-靶点-重要通路网络,从系统层面揭示肠通片治疗老年性便秘的作用,以期为进一步的临床应用、质量标准提升以及药理作用验证研究提供科学的理论依据。

1 资料与方法

1.1 肠通片活性成分筛选 将肠通片的每一味成分(生白术、车前子、桑椹、生地黄、肉苁蓉)输入 TCMSP 数据库^[7]、化学专业数据库进行检索,按照口服药物生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 的条件,筛选出主要活性成分和靶点;与此同时,通过查找文献的方式^[8-10],筛选补充条件外的药物的主要化学成分,以及 TCMSP 数据库未收录的主要活性成分。

1.2 肠通片活性成分对应作用靶点的获取 将上述步骤获得的主要化学成分所对应的靶标蛋白输入到 UniProt 数据库进行查询,矫正并筛选基因为“human”,获得作用靶点。

1.3 肠通片治疗老年性便秘潜在靶点的预测 在 OMIM 数据库、Genecards 数据库输入“senile constipation”,获得老年性便秘的疾病靶点,将疾病靶点与肠通片靶点进行映射,获得肠通片治疗老年性便秘

的潜在作用靶点,绘制 Venn 图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)。

1.4 肠通片治疗老年性便秘的网络构建 将肠通片中的中药材、活性成分及治疗老年性便秘的潜在作用靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图,分析网络拓扑性质。

1.5 蛋白相互作用网络的构建 将 1.3 项中获得的潜在靶点导入 String 数据库,勾选 multiple proteins,物种选择 Homo sapiens,构建蛋白相互作用(PPI)关系图。

1.6 生物功能与通路富集分析 将肠通片治疗老年性便秘潜在靶点导入 DAVID 数据库,设置 $P < 0.05$,物种为 Homo sapiens,并将靶基因名称校准为官方通用名称(Official Gene Symbol),进行 GO 和 KEGG 分析,最后按照其富集的靶点数目依次进行排序,选取排名靠前的 20 个条目绘制条形图。其中 GO 富集分析选取生物过程(biological processes, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)进行绘制分析。

2 结果

2.1 肠通片的活性成分 通过 TCMSP 数据库、化学专业数据库和文献检索,筛选出主要活性成分,包括白术(Atractylodes Macrocephala Koidz)7 个、车前子(Plantaginis Semen)7 个、桑椹(Mori Fructus)4 个、生地黄(dried rehmannia root)6 个、肉苁蓉(Cistanches Herba)6 个,去除重复值共 28 个活性成份。

2.2 肠通片活性成分作用靶点 通过 TCMSP 数据库、UniProt 数据库检索活性成分的潜在作用靶点,包括白术 38 个、车前子 151 个、桑椹 165 个、生地黄 23 个、肉苁蓉 186 个。

2.3 肠通片治疗老年性便秘的潜在靶点 通过 OMIM 数据库、Genecards 数据库获得老年性便秘的作用靶点 1203 个,将老年性便秘的潜在作用靶点和肠通片的成分作用靶点导入 Venn 图在线绘制,获得肠通片治疗老年性便秘的潜在靶点 87 个,见图 1。

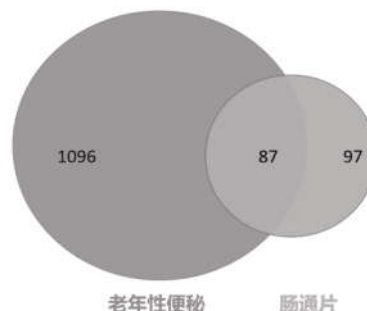
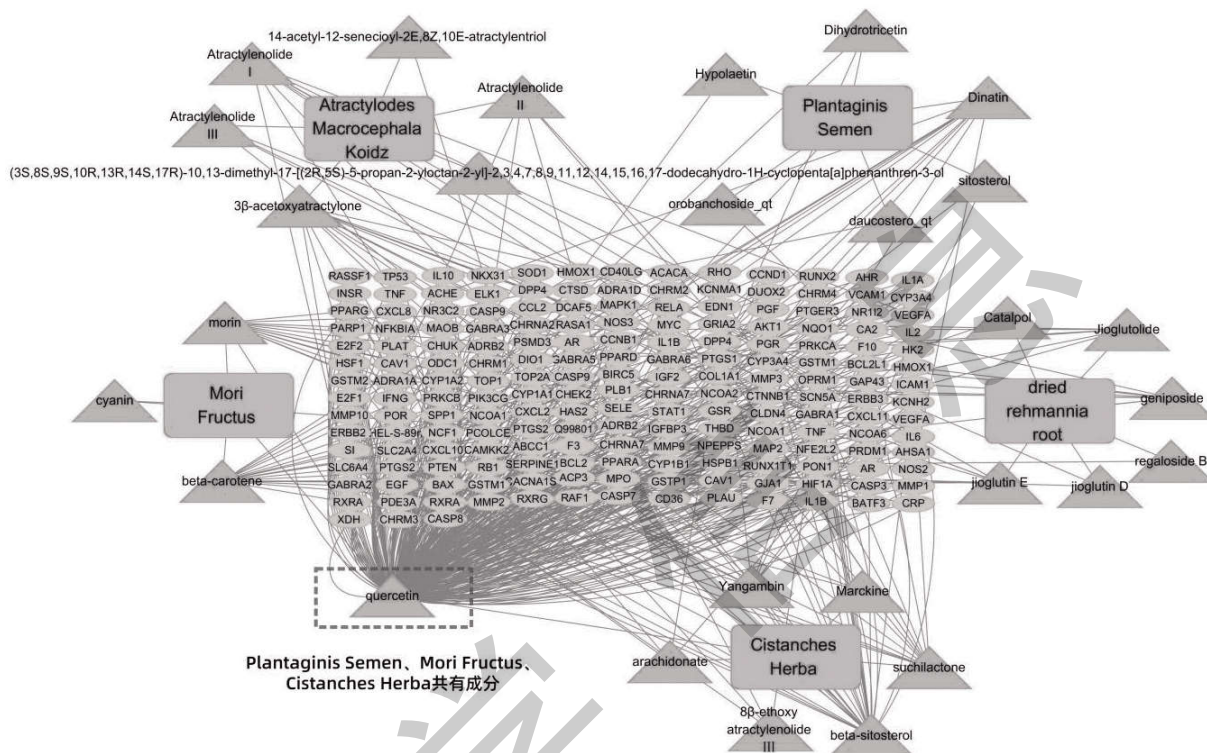


图 1 肠通片治疗老年性便秘的潜在靶点 Venn 图

2.4 肠通片治疗老年性便秘的网络构建 采用 Cytoscape3.7.1 软件构建肠通片治疗老年性便秘的网络模型,该网络共有 218 个节点(包括 5 个药物靶点、185 个靶点节点、28 个活性化合物节点)、592 条边(每条边代表活性化合物与靶点基因之间的相互作用关系),见图 2。

2.5 蛋白相互作用网络的构建 采用 Cytoscape3.7.1 软件绘制相互作用网络,共涉及 137 个节点,2237 个边;网络中节点平均度值是 32.66,大于平均度值的靶点有 56 个,分别为 AKT1、TP53、TNF、IL6、VEGFA、CASP3、CTNNB1、MYC、IL1B、STAT3 等,见图 3。



2.6 生物功能与通路富集分析 通过 DAVID 数据库, 将肠通片治疗老年性便秘的靶点进行 GO 富集分析, 结果显示共富集 582 个注释条目 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (BP) 464 个, 细胞组分 (CC) 44 个, 分子功能 (MF) 74 个, 各选取排名前 20 的条目绘制条形图, 见图 4。BP 主要涉及对缺氧的反应、对脂多糖的反应、基因表达的正向调控、凋亡过程的正向调节、

细胞增殖的正调控、老化等; CC 涉及有细胞外空间、小窝、膜筏、质膜、细胞质、线粒体等; MF 涉及了酶结合、蛋白结合、血红素结合、细胞因子活性等。KEGG 通路分析中共得到信号通路 153 条 ($P < 0.05$), 其中与老年性便秘相关的通路有 30 条, 选取排名前 20 的条目见表 1。

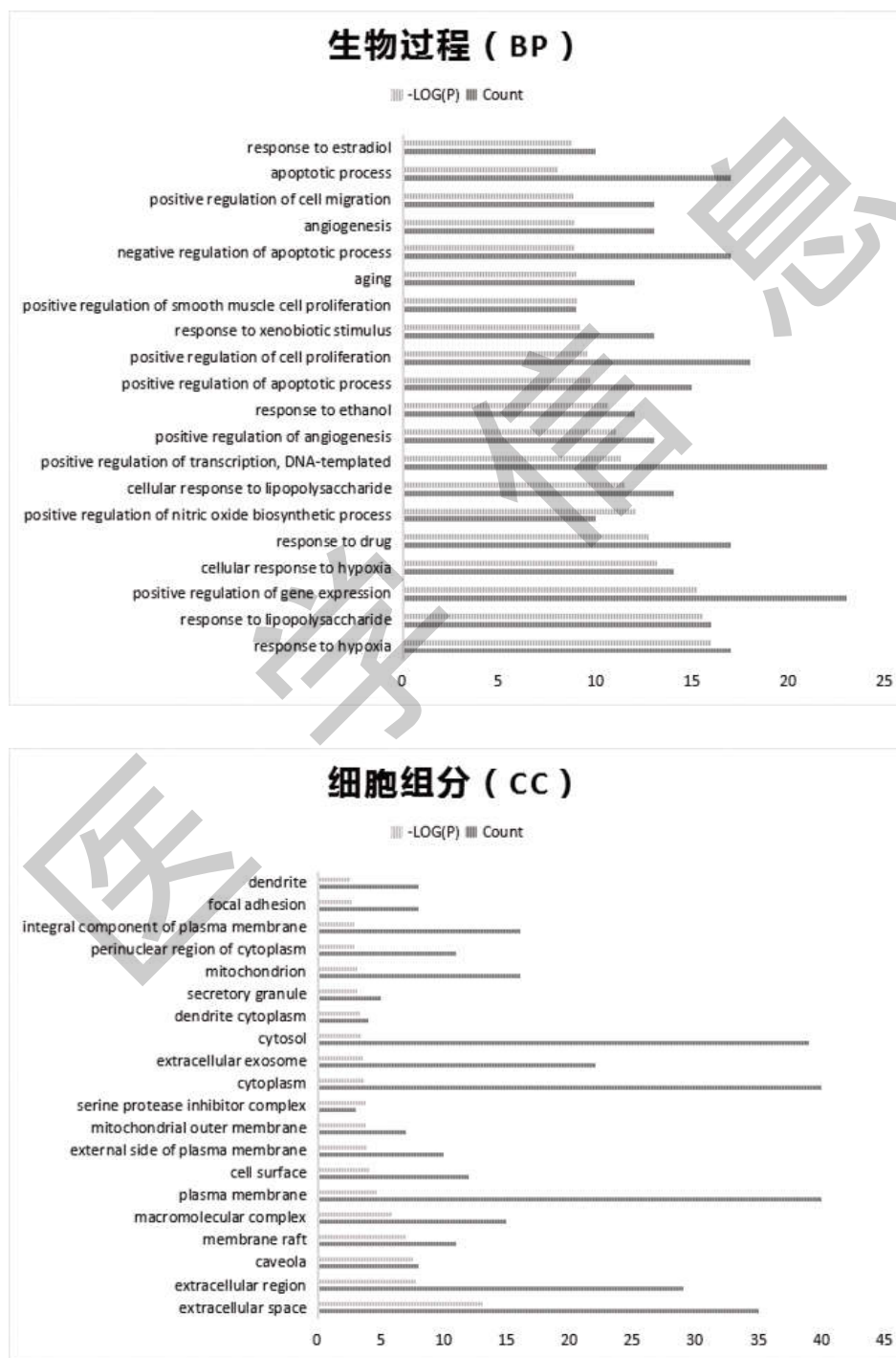


图 4 GO 富集分析生物过程、细胞组分、分子功能情况

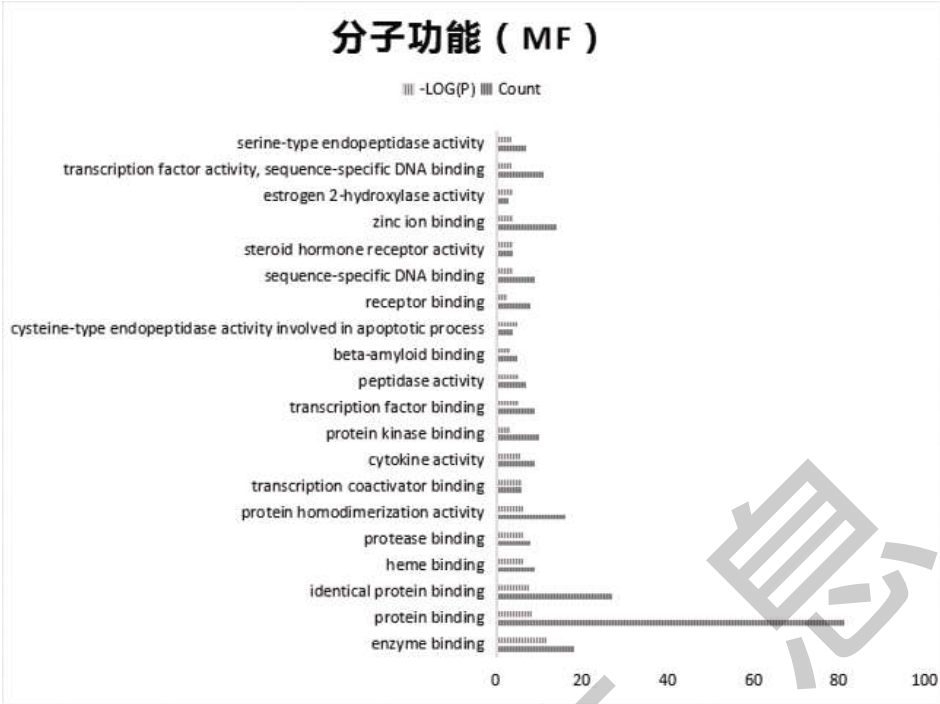


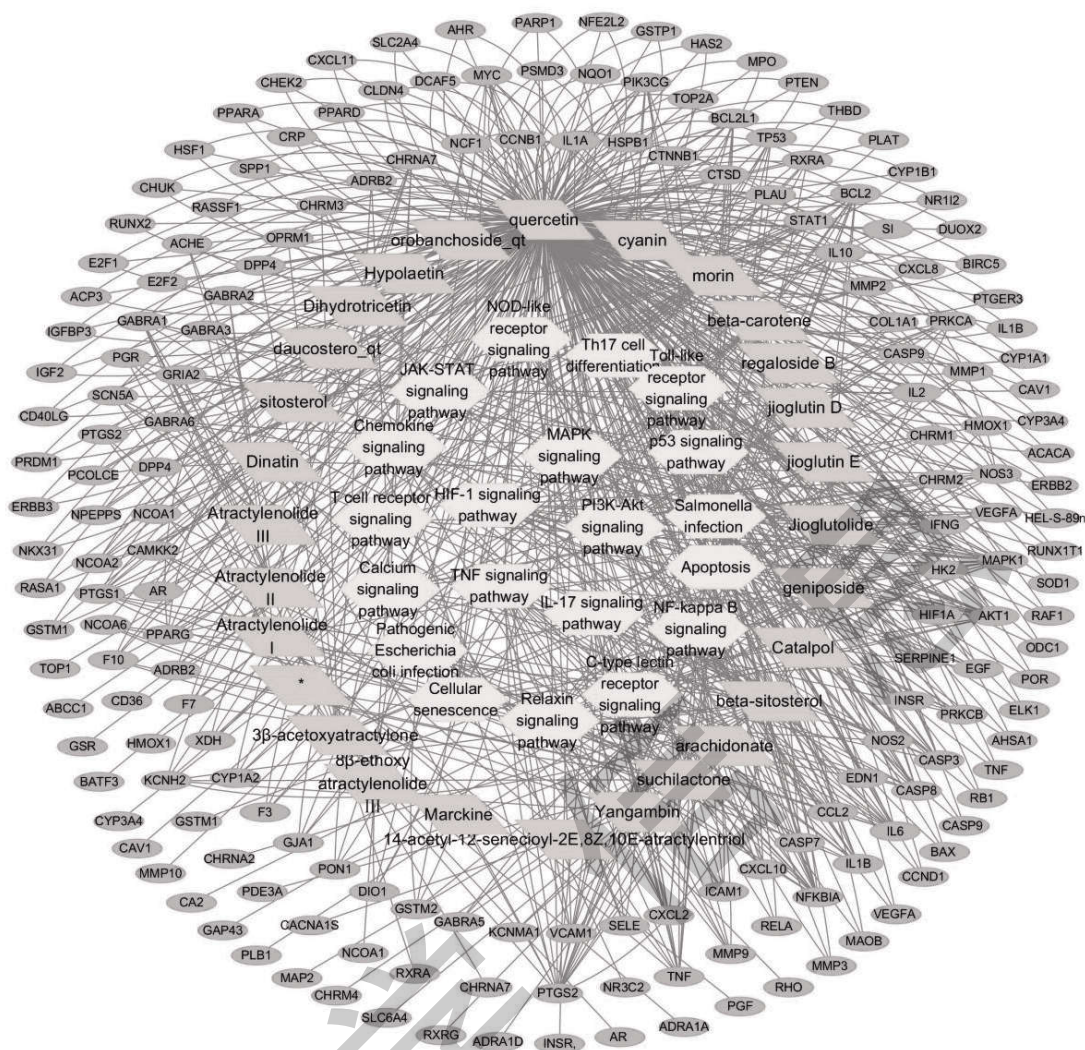
图 4 GO 富集分析生物过程、细胞组分、分子功能情况(续)

表 1 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路	Count	LOG(P)	KEGG 通路	Count	LOG(P)
TNF signaling pathway	18	-15.34	p53 signaling pathway	8	-5.12
HIF-1 signaling pathway	17	-14.18	Toll-like receptor signaling pathway	9	-5.06
IL-17 signaling pathway	14	-11.21	Th17 cell differentiation	9	-4.94
PI3K-Akt signaling pathway	19	-8.06	NOD-like receptor signaling pathway	11	-4.86
Relaxin signaling pathway	12	-7.27	JAK-STAT signaling pathway	10	-4.49
C-type lectin receptor signaling pathway	11	-7.14	Chemokine signaling pathway	10	-3.92
NF-kappa B signaling pathway	11	-7.14	T cell receptor signaling pathway	7	-3.23
Apoptosis	12	-7.03	Calcium signaling pathway	10	-3.20
Salmonella infection	13	-5.21	Pathogenic escherichia coli infection	9	-3.11
MAPK signaling pathway	14	-5.20	Cellular senescence	8	-3.03

2.7“活性成分-重要靶点-关键通路”网络模型构建及分析 将以上获得的药物的活性成分、重要靶点和关键通路导入 Cytoscape3.7.1 软件并构建“活性成分-重要靶点-关键通路”网络模型,该网络共有 233 个节点,794 条边,平均度值为 6.82,大于平均度值的活性成分有 10 个,分别为 quercetin、beta-sitosterol、beta-carotene、3β-acetoxyatractylone、morin、suchilactone、Dinatin、Atractylenolide I、Yangambin、

geniposide; 靶点有 30 个,分别为 PTGS2、MAPK1、AKT1、NFKBIA、IL6、BCL2、CASP8、TNF、NOS3、IL1B 等; 信号通路有 20 条,分别为 PI3K-Akt signaling pathway、TNF signaling pathway、HIF-1 signaling pathway、IL-17 signaling pathway、MAPK signaling pathway、Salmonella infection、Relaxin signaling pathway、Apoptosis 等,见图 5。



注:菱形表示信号通路、梯形表示活性成分、椭圆形表示靶点,*代表活性成分(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)

图 5 “活性成分-重要靶点-关键通路”网络图

3 讨论

老年性便秘多由先天禀赋不足、气血阴阳亏虚、冷热积滞等引起^[1]。老年人因身体机能下降、肠道蠕动功能减退、活动次数及频率的减低,增加了便秘的发生率,而排便不畅或用力排便可引发多种并发症。肠通片是根据便秘临床特点及肠道微生态研究的中药复方片剂,经项目组前期动物实验证明了肠通片能有效治疗小鼠便秘^[3]。中药组方在辨证论治的基础上具有满足现代药物质量可控、安全有效的特征,并且多途径、多靶点、多效应网络整合调节的组效关系是组方中药的作用机制特征,也是网络药理学的特征,这既保持了中药复方制剂的优势,又提高了中药制剂的质控水平^[12]。

本研究筛选了肠通片的活性成分,主要有白术

内酯 I (atractylenolide I)、白术内酯 II (Atractylenolide II)、槲皮素 (quercetin)、beta-sitosterol、beta-carotene 等 28 个。生白术健运脾胃,使清阳得升,同时滋养胃阴,使浊阴得降,可使全身气机升降有序,推动大肠清除积便,改善便秘时的肠道微生态环境^[13]。有研究表明^[14],白术内酯 I 可平衡结肠对水分的吸收和分泌,增加肠道传输动力,调节胃肠道功能紊乱。车前子具有润肠通便之效^[15],桑椹入肝、大肠经,具有补肝益肾、生津润肠、解养颜等功效,用于阴血不足、肠燥便秘等症。肉苁蓉可提高肠内渗透压、促进肠蠕动,尤其适合于体虚便秘和老年性便秘^[16]。槲皮素可通过调节肠道微生物的组成、黏液层的厚度、肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达、胆汁和抗菌肽的生成以及细胞因子的分泌来维护肠道

内环境稳态和机体健康^[17]。生地黄养阴生津,用于津伤便秘^[18],geniposide 可调控肠道菌群^[19]。老年性便秘的发生与肠动力减弱、肠道菌群失调、胃肠黏膜免疫调节异常、炎症因子表达等有关^[20]。本研究中的关键靶点 AKT1 参与细胞凋亡。作为 AKT 一种亚型,AKT1 是 PI3K-Akt signaling pathway/AKT signaling pathway 下游的主要靶点,可促进平滑肌收缩,并参与了大鼠便秘的发生^[21]。炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 参与免疫调节,导致炎症因子表达,NF-kappa B signaling pathway 的激活会使得 NF-kB 游离并活化进而调控 IL-6、TNF- α 等,加速便秘的进展^[22]。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,而 MAPK 信号通路以及 AKT 的磷酸化改变导致了平滑肌细胞的收缩舒张^[23],使得肠动力减弱。肠通片治疗老年性便秘机制复杂,本研究构建了药物-活性成分-靶点以及活性成分-重要靶点-关键通路”,筛选了主要活性成分和核心靶点,由此预测肠通片中的白术内酯 I、槲皮素 (quercetin)、beta-sitosterol 等活性成分可能通过 AKT1、TP53、TNF、IL6 等靶点调控 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K 信号通路等起到治疗便秘的作用。

综上所述,肠通片通过多成分、多靶点、多通路治疗老年性便秘。该研究为后续的药理研究奠定了前期基础,也为更高效探究中药治疗复杂疾病的作用机制提供了科学的思路 and 方向。

参考文献:

- [1]Zhang X,Zheng F,Zhang Z.Therapeutic effect of Cistanche deserticola on defecation in senile constipation rat model through stem cell factor/C-kit signaling pathway [J].World J Gastroenterol,2021,27(32):5392-5403.
- [2]张健谊,廖金平,郑其进,等.首届全国名中医邱健行治疗便秘经验[J].时珍国医国药,2021,32(2):513-514.
- [3]付满玲,庞艳,杨树娟,等.肠通对小鼠便秘的有效性研究[J].医学信息,2019,32(9):74-77.
- [4]付满玲,郭辉梦,张华安,等.一种用于老年性便秘的中药组合物、制剂及其制备方法:ZL201710866882[P].2021-03-16.
- [5]田会东,王静,郭丽娜,等.基于网络药理学的“苍术-玄参”药对抗 2 型糖尿病作用机制研究[J].中国现代应用药学,2020,37(2):165-169.
- [6]楼倩颖,曹程,王青青,等.开心散与生脉散抗阿尔茨海默症“同病异治”作用机制网络药理学分析与中枢神经免疫调控效用验证 [J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24 (1):98-112.
- [7]Ru J,Li P,Wang J,et al.TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J].J Chem-inform,2014,6:13.
- [8]Hoang le S,Tran MH,Lee JS,et al.Inflammatory Inhibitory Activity of Sesquiterpenoids from Atractylodes macrocephala Rhizomes[J].Chem Pharm Bull (Tokyo),2016,64(5):507-511.
- [9]陈婷,蔡志荔,程颖,等.不同炮制方法对白术化学成分影响的研究[J].广东化工,2022,49(14):148-149,160.
- [10]崔微,郑琇梅,李虹霞,等.鲜地黄的化学成分研究[J].中药材,2022,45(10):2369-2375.
- [11]中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会.功能性便秘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(1):18-26.
- [12]刘钱.基于网络药理学及临床经验方(FDQ)的 ND 片剂临床前药理学探索性研究[D].成都:成都大学,2021.
- [13]余颜,邓艳玲,赵先平,等.生白术治疗便秘探析[J].湖南中医杂志,2016,32(1):133-135.
- [14]姜亚欣.白术内酯 I 对慢传输型便秘大鼠结肠水通道蛋白 3、4 表达的调节作用和机制[D].青岛:青岛大学,2017.
- [15]李日许,黄暨生,郭秋平.圆苞车前子壳复配粉剂的通便功能研究[J].食品安全质量检测学报,2020,11(22):8593-8597.
- [16]屠鹏飞,姜勇.中药肉苁蓉的本草再考证[J].中国中药杂志,2022,47(20):5670-5679.
- [17]梅华迪,李袁飞,马现永,等.槲皮素对动物肠道黏膜屏障功能的影响及其调控机制[J].动物营养学报,2022,34(9):5475-5488.
- [18]张月月,高佳佳,王君明,等.生地黄归经的物质基础初探[J].时珍国医国药,2022,33(5):1241-1243.
- [19]罗羽莎.基于代谢组学技术的肠道菌群介导的栀子肝毒性及栀子豉汤配伍减毒机制研究[D].上海:中国人民解放军海军军医大学,2021.
- [20]白璐璐,闫曙光,梁星琛,等.从线粒体未折叠蛋白反应探讨补肾益精法治疗慢传输型便秘机制的研究思路[J].中国中西医结合杂志,2021,41(8):995-999.
- [21]肖长芳,孙颀煊,孟令昀,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨益气开脾方治疗便秘的作用靶点及效应机制[J].现代药物与临床,2022,37(6):1211-1222.
- [22]谢林林,赵玉粒,黄明桂,等.基于水通道蛋白 3 和核转录因子-kB 信号通路探讨电针神阙穴对功能性便秘胃肠动力的改善机制[J].安徽中医药大学学报,2021,40(5):64-69.
- [23]武鹏飞,庞雪,辛学知.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[J].山东医药,2020,60(32):27-30.

收稿日期:2022-11-02;修回日期:2022-11-26

编辑/杜帆