

网络药理学探究参苓白术散防治腹泻的机制



赵泽远, 韩沂昕, 王立峰, 朱宇晨, 郑福帆, 刘颖, 王佳慧*

广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西南宁 530222

摘要: 基于网络药理学和分子对接研究参苓白术散防治腹泻的分子机制。通过 TCMSP 数据库、PubChem 数据库、Swiss TargetPrediction 检索并收集参苓白术散的活性成分及活性成分对应的相关靶点。借助 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DisGeNET 数据库, 以“Diarrhea”为关键词搜索疾病相关靶点, 并将得到的药物成分作用靶点与疾病靶点作交集得到参苓白术散作用于腹泻的预测靶点。采用 Cytoscape3.9.1 软件构建“药物—活性成分—靶点网络”图。利用 String 数据库获取蛋白互作信息, 进一步通过 CytoNCA 插件对靶点网络进行模块分析, 筛选核心作用靶点。运用微生信平台将核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 并根据富集结果。筛选得到参苓白术散 1022 个对应靶点, 腹泻相关靶点 920 个, 相交 127 个靶点。KEGG 富集分析表明核心靶点作用于 PI3K-Akt signaling pathway、Human T-cell leukemia virus 1 infection、Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection、Measles、Proteoglycans in cancer 等 10 条通路。通过网络药理学的研究, 参苓白术散调控腹泻涉及 127 个靶点以及 10 条通路, 表明参苓白术散可通过多成分、多靶点、多途径发挥防治腹泻的作用。

关键词: 参苓白术散; 腹泻; 网络药理学; 分子对接; PI3K

DOI: 10.57237/j.mrf.2023.03.001

Network Pharmacology to Investigate the Mechanism of Ginseng and Atractylodes Macrocephalae to Prevent Diarrhea

Zhao Zeyuan, Han Yixin, Wang Lifeng, Zhu Yuchen, Zheng Fufan, Liu Ying, Wang Jiahui*

Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China

Abstract: To investigate the molecular mechanism of Ginseng and Atractylodes macrocephala in the prevention and treatment of diarrhea based on network pharmacology and molecular docking. The active ingredients and the related targets of Ginseng and Atractylodes were searched and collected through TCMSP database, PubChem database and Swiss

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82204755, 81960751); 广西自然科学基金青年项目 (编号: 2023GXNSFBA026274); 广西中青年教师科研基础能力提升项目 (2022KY1667); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院科研项目 (编号: 2022MS008, 2022QJ001); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院国家级大学生创新创业项目 (202213643018); 广西中医药大学青年基金项目 (编号: 2022QN008).

*通信作者: 王佳慧, 344689018@qq.com

收稿日期: 2023-04-16; 接受日期: 2023-05-25; 在线出版日期: 2023-06-15

<http://www.pharmaceutrd.org>

TargetPrediction. With the help of GeneCards database, OMIM database and DisGeNET database, we searched for disease related targets with "Diarrhea" as the keyword, and the obtained targets of drug ingredients were intersected with the disease targets to obtain the results. The predicted targets of Ginseng and Atractylodes for diarrhea were obtained by intersection. Cytoscape 3.9.1 software was used to construct the "drug-active ingredient-target network" diagram. Protein interaction information was obtained by using String database, and the target network was further analyzed by CytoNCA plug-in to screen the core targets. The core targets were enriched by KEGG pathway analysis using the microbiology platform, and the results were based on the enrichment results. The KEGG enrichment analysis showed that the core targets acted on PI3K-Akt signaling pathway, Human T-cell leukemia virus 1 infection, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection, Measles, Proteoglycans in cancer, and 10 other pathways. Through the network pharmacology study, Ginseng and Atractylodesan regulated diarrhea involving 127 targets and 10 pathways, indicating that Ginseng and Atractylodesan can exert its effects on diarrhea prevention and treatment through multiple components, targets and pathways.

Keywords: Ginseng and Atractylodes; Diarrhea; Network Pharmacology; Molecular Docking; PI3K

1 引言

腹泻是一种临床常见的消化道疾病,该疾病的临床表现表现为排泄次数增多、排泄物形状改变、反复发作腹泻及腹部隐痛,一般与进食难以消化或者脾胃受凉有关[1-2]。腹泻的发病机制复杂,主要与胃肠道感染,胃肠动力紊乱,肠神经系统递质含量异常,肠道菌群失衡等有关。近年来,伴随着中医药的发展,中药对腹泻的防治取得显著疗效。参苓白术散首载于《太平惠民和剂局方》,是培土生金法的代表方剂,对治疗脾虚型腹泻有着很好的功效[3]。方中人参,白术,茯苓,甘草可以补脾胃,薏苡仁,白扁豆,莲子心,山药,砂仁,五味药材可以排湿止泻,这梗是手太阴肺经的引经药,在补肺气的同时,协同其他九味药便可达到治疗腹泻的作用[4]。

目前中药学的发展阻碍,主要是对中药治疗疾病的分子机制缺乏深入认知。网络药理学的兴起为挖掘中药治疗效和揭示其作用机制提供了新途径[5]。网络药理学强调对信号通路的多途径调节,提高药物的治疗效果,降低毒副作用,从而提高新药临床试验的成功率,节省药物的研发费用。本研究基于网络药理学对中药的活性成分及其潜在靶点进行预测和分析,再通过分子对接对其进行验证,探讨参苓白术散治疗腹泻机制,为后续深入研究提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 药物成分及靶点筛选

通过 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) [6]进行检索,分别

输入“人参”、“白术”、“茯苓”、“甘草”、“山药”、“桔梗”、“砂仁”、“薏苡仁”、“白扁豆”、“莲子心”,找到对应化学成分,以 OB (生物利用度,指制剂中药物被吸收进入人体循环的速度和程度) $\geq 30\%$ 和 DL (类药性,指化合物与已知药物的相似性) ≥ 0.18 为阈值,筛选出相应化合物。将获得的化合物导入 PubChem 数据库和 Swiss TargetPrediction 中获得其对应靶点。并根据已发表的文献补充未预测到其活性成分的已知靶点[7]。在筛选结束后,为使蛋白质靶点信息标准化,统一于 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将化合物作用的蛋白质靶点进行规范处理。

2.2 腹泻相关靶点筛选

以“Diarrhea”为关键词,挖掘 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DisGeNET 数据库中与腹泻相关的靶点。获得数据库后,在 Genecards 数据库中,经过三次中位数筛选,得到条件为 $\text{score} > 2.49$,筛选靶点。

2.3 交集靶点的确定

将获得的药物有效成分对应靶点与疾病靶点导入 Venny2.1.0 中,得到 venn 图和药物与疾病靶点交集。

2.4 参苓白术散“药物—活性成分—靶点网络”构建

参苓白术散“药物—活性成分—靶点网络”主要通过

软件 Cytoscape3.9.1 进行构建和分析。将参苓白术散药方组成、上述获得的靶点信息进行导入以完成网络的构建。

2.5 蛋白质相互作用网络 (PPI) 与核心靶点

为进一步确定参苓白术散治疗腹泻的潜在作用靶点之间的相互作用关系, 将“1.3”中筛选所得的交集靶点导入 String 数据库获取蛋白互作信息, 再将结果导入 Cytoscape3.9.1 软件进行可视化, 并构建 PPI 网络。随后, 运用 CytoNET 插件对靶点网络进行分析, 筛选出核心作用靶点。

2.6 GO 富集分析和 KEGG 分析

为进一步探寻核心靶点所涉及的信号通路, 运用微生信平台对核心靶点进行进一步的分析。

2.7 分子对接

首先根据 Degree 值选取药物有效成分作为对接的受体, 再利用 PPI 网络互作图筛选出核心靶点作为对接的配体。将二者导入 UniProt 数据库和 PDB 数据库得到受体的三维结构和配体的二维结构。将受体导入 PyMol 中进行去水和去残基操作, 最终导出 (PDB) 格式的文件。将配体的二维结构导入 Chem3D 中导出配体格式为 (mol2) 的三维结构。利用 AutoDock 软件构建分子对接模型, 并得出受体与配体结合所需要的能量。

3 结果

3.1 活性化合物的筛选及成分靶点预测

通过检索 TCMSP 数据库, 根据筛选条件 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$, 筛选出参苓白术散各组成药物共有 172 个有效化合物。利用 TCMSP、PubChem 数据库和 Swiss TargetPrediction 预测每个活性化合物对应的靶点, 去重整理后, 得到参苓白术散成分靶点 1022 个。

3.2 参苓白术散对腹泻作用的潜在靶点及“药物—中药—活性成分—靶点网络”构建

通过 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库收集

到腹泻相关靶点 920 个, 再将参苓白术散 1022 个成分靶点和疾病相关靶点进行分析, 共得到 127 个关键靶点。

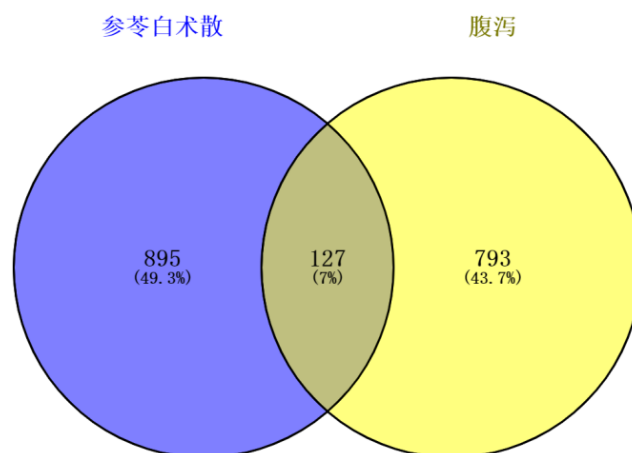


图 1 参苓白术散化学成分作用靶点与腹泻疾病相关靶点的交集靶点

通过软件 Cytoscape3.9.1 将参苓白术散组成药物、成分与靶点进行排列, 构建“药物—中药—活性成分—靶点网络”(图 2)。图中绿色为有效成分对应靶点, 红色为中药。不同靶点可对应相同的活性成分, 同一靶点也可以与不同的活性成分相对应。

3.3 PPI 网络构建与核心靶点筛选

将参苓白术散对腹泻作用的 127 个潜在靶点导入 String 数据库进行分析, 获取其相互作用关系, 设置互作强度大于 0.9, 隐藏未达标的靶点。再将结果导入 Cytoscape3.9.1 软件进行可视化, 运用 CytoNCT 插件筛选出核心靶点。如图所示, 内圈红色为核心靶点。分别为 SRC、EGFR、PIK3R1、PTPN11、PIK3CA、HSP90AA1、STAT3、LCK、CBL、SYK、RELA、ITGB1 共 12 个核心靶点。

3.4 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

运用微生信平台将获得的核心靶点导入其中, 得到 GO、KEGG 富集气泡图和富集分析结果。GO 分析结果主要富集于生物过程 (BP): peptidyl-tyrosine 磷酸化、peptidyl-tyrosine 修改、蛋白激酶 B 信号的正向调控、肌醇脂介导的信号传导、protein 自身磷酸化等生物过程。细胞组分 (CC): 膜区域、细胞膜的细胞质侧、膜微区等组分。分子功能: 蛋白络氨酸激酶活性、生长因子结合、磷酸酶结合等功能。KEGG 通路分析主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、人 T 细胞白血病病毒

[illegible]

图2 参苓白术散药物—中药—活性成分—靶点网络图

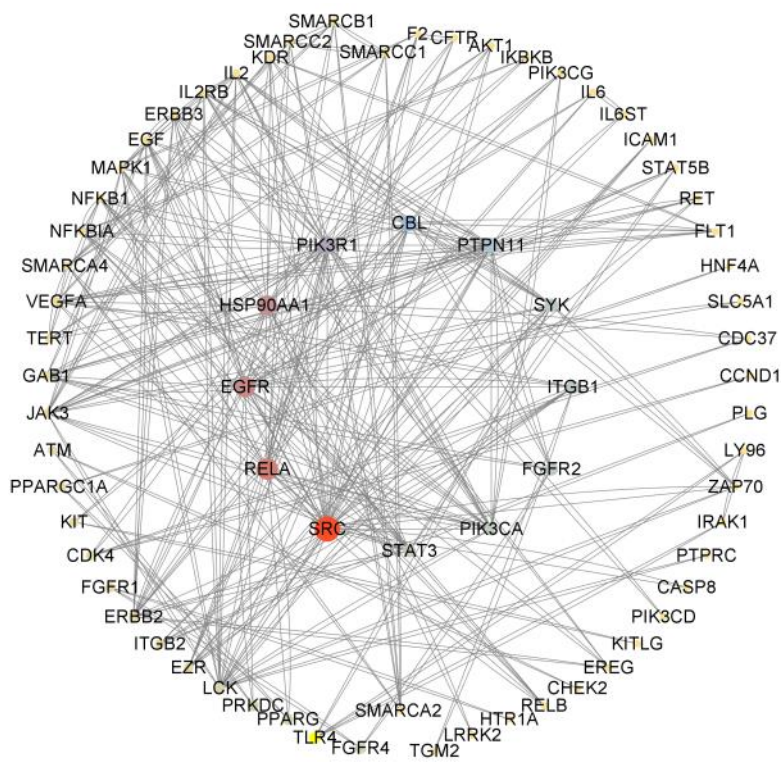


图 3 PPI 互作网络

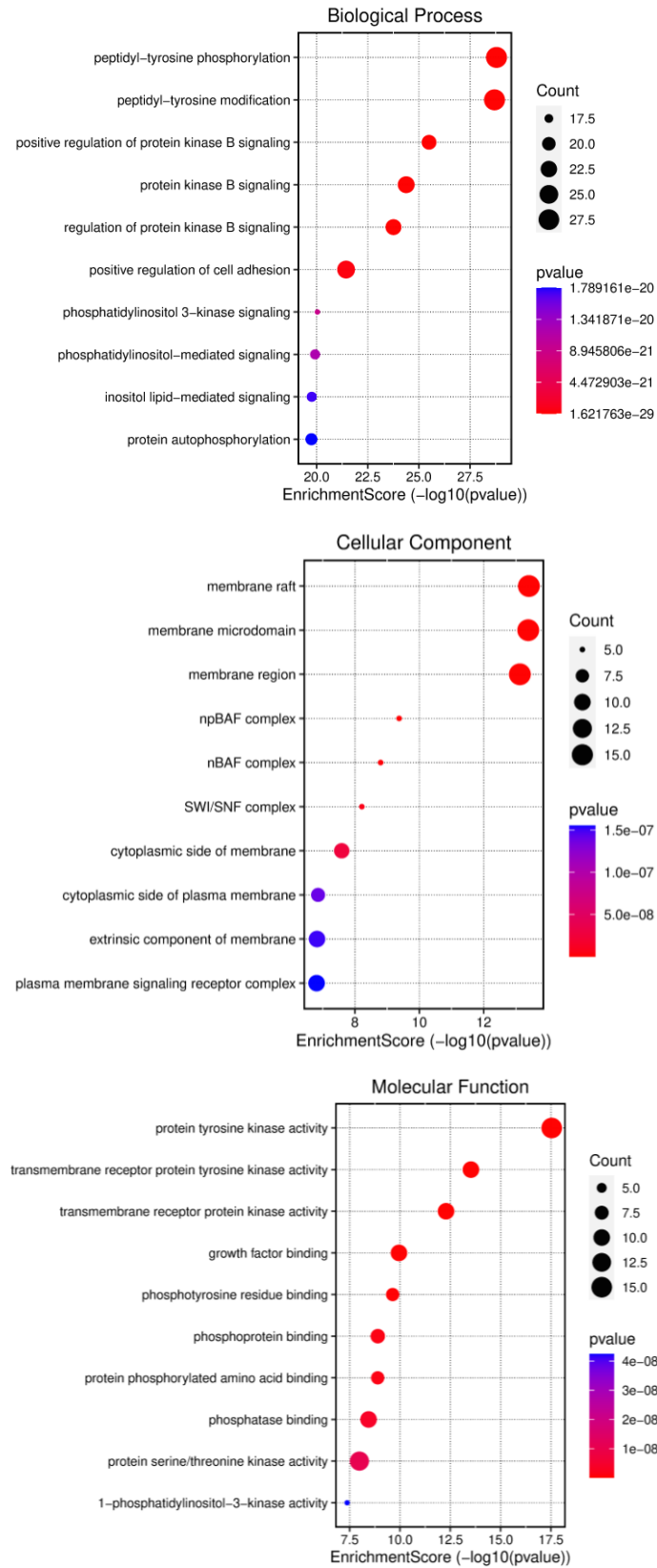


图4 关键靶点功能的富集气泡图

图注：点越大表明相关靶点数量越多；颜色越红代表富集程度越高。

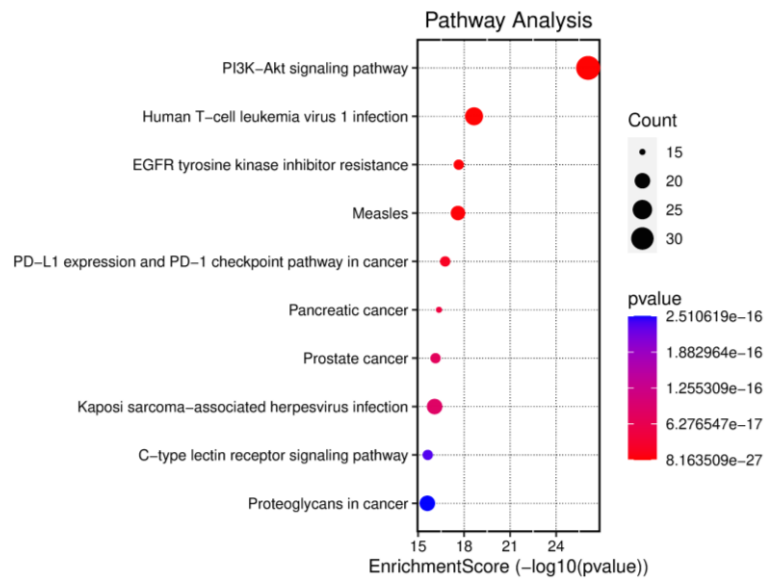


图 5 KEGG 分析

图注：图中点越大相关靶点数量越多；颜色越红代表富集程度越高。

3.5 分子对接

选取 SRC、EGFR、PTPN11、LCK 度值较高的核心靶点，以及 3 个关键成分。利用 Autodock 对配体和受体进行处理，得到配体与受体结合需要的能量，以及两者结合的位点，最后将结果导出。利用 Python Molecule Viewer 将导出结果转化为 PDB 格式。导入 PyMol 进行可视化。选取结合能较大的前 6 个对接结果进行展示，并且获得了化合物靶点结合活性能。

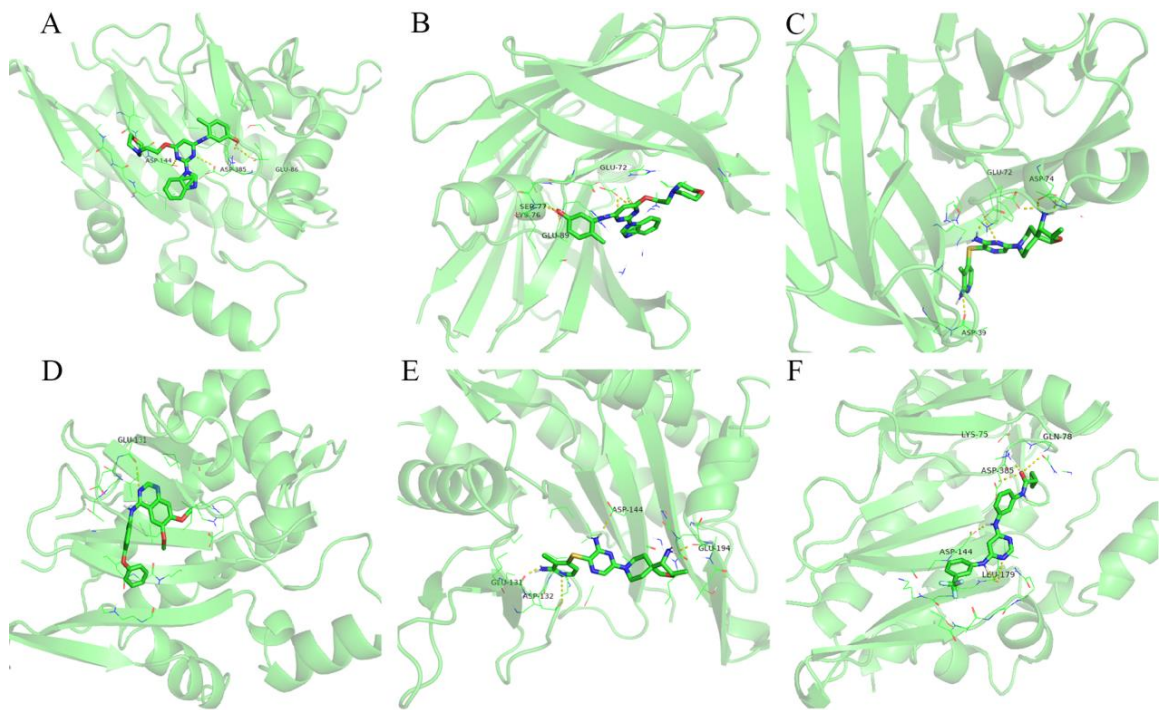


图 6 核心靶点与关键成分对接示意图

注: A: LCK-槲皮素; B: LCK-木犀草素; C: PTPN11-木犀草素; D: SRC-槲皮素; E: PTPN11-槲皮素; F: EGFR-槲皮素。

表 1 核心靶点-关键成分对接的结合能

靶点	有效成分	结合能(kcal/mol)
LCK	槲皮素 (Quercetin)	-8.85
LCK	木犀草素 (Luteolin)	-8.17
PTPN11	木犀草素 (Luteolin)	-7.92
SRC	槲皮素 (Quercetin)	-7.52
PTPN11	槲皮素 (Quercetin)	-7.29
EGFR	槲皮素 (Quercetin)	-7.12
SRC	木犀草素 (Luteolin)	-7.11
SRC	3,22-二羟基-11-氧代- δ (12) -油烷-27- α -甲氧羰基-29-甲酸	-6.86
EGFR	木犀草素 (Luteolin)	-6.84
LCK	3,22-二羟基-11-氧代- δ (12) -油烷-27- α -甲氧羰基-29-甲酸	-6.24
PTPN11	3,22-二羟基-11-氧代- δ (12) -油烷-27- α -甲氧羰基-29-甲酸	-6.02
EGFR	3,22-二羟基-11-氧代- δ (12) -油烷-27- α -甲氧羰基-29-甲酸	-5.97

4 讨论

腹泻是一种胃肠蠕动增加导致粪便次数增多, 粪质稀薄如同水, 是多病原、多因素导致的肠道疾病[8]。本研究借助网络药理学手段, 对参苓白术散防治腹泻的关键靶点进行了分析, 首先发现了参苓白术散作用靶点 1022 个, 腹泻相关靶点 920 个, 对其进行交互处理得到主要包括 SRC、EGFR、PTPN11、LCK 等 127 个靶点, 功能富集分析发现关键靶点主要调控蛋白激酶 B 信号的正向调控、肌醇脂介导的信号传导等生物过程, 主要位于 PI3K-Akt 信号通路、癌症中的蛋白聚糖等通路。进一步使用分子对接对参苓白术散防治腹泻中的核心靶点中度值靠前的 SRC、EGFR、PTPN11、LCK 靶点与有效成分中度值靠前的槲皮素[9]、木犀草素[10]、3,22-二羟基-11-氧代- δ (12) -油烷-27- α -甲氧羰基-29-甲酸进行对接测试, 发现靶点与成分有着较好的结合活力, 验证了本次网络药理学预测靶点的可靠性。槲皮素是一种天然的黄酮醇, 具有抗炎镇痛、抗氧化、抗癌和抗菌等多种生物活性。槲皮素可通过增强细胞间紧密连接, 调节肠道免疫反应, 维系肠道微生态稳定, 进而保护肠道黏膜屏障功能[11]。

木犀草素是一种具有多种药理活性的黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抑菌等活性。研究表明, 木犀草素在调节肠道免疫系统和治疗慢性炎症性肠病中起着重要作用, 可以减少小肠内容物的体积和重量, 从而发挥止泻作用[12]。PI3K-AKT 信号通路诱导细胞自噬, 介导肠上皮细胞凋亡/坏死, 参与肠黏

膜屏障变化[13]。EGFR 作为肠黏膜修复过程中的生长因子, 能有效促进淋巴管的形成来修复周围神经, 从而抑制炎症反应, 减轻腹泻[14]。

从病因学方面可将腹泻分为感染性腹泻 (病原体包括细菌、病毒、寄生虫和真菌等) 和非感染性腹泻 (如饮食性腹泻、过敏性腹泻、症状性腹泻等) 两大类[15-16]。目前治疗腹泻主要采用益生菌、口服补液、化学类药物、抗生素类药物和中药制剂干预等[17]。近年来, 随着中医药在基础研究与临床的深入探究中, 发现中药在治疗腹泻领域具有独特功效, 中草药不仅能增强机体免疫功能、提高机体的抵抗力, 而且毒副作用小、不易造成残留、资源丰富[18]。肺主行水, 主要是肺气的宣发肃降作用, 其推动和调节全身水液的输布和排泄, 脾脏对水液代谢的影响为胃和小肠消化吸收的津液、肾气吸收的水液, 以及大肠吸收的水液, 都经脾气的传输作用上输于肺, 再经肺的宣发肃降作用输布于全身。因此, 当肺气与脾气虚时, 体内湿气增多, 出现腹泻、舌苔白的现象, 参苓白术散正是补脾胃益肺气的良药, 从中医理论来看参苓白术散具有治疗腹泻扎实的理论基础。

5 结论

本研究借助网络药理学工具探究参苓白术散防治腹泻的分子机制, 发现参苓白术散的 172 个活性成分通过 127 个关键靶点发挥防治腹泻的作用, 富集分析发现其主要富集在 PI3K/AKT 信号通路上, 进一步的分子对接发现参苓白术散中活性成分槲皮素和木犀草

素等于关键靶点 LCK、PTPN11、SRC 等具有较好的靶向结合作用。综上所述,参苓白术散与腹泻关系密切,通过多成分、多途径、多靶点发挥防治作用,为后续基础研究提供了新的思路和视野。

参考文献

- [1] 陈青垚,王梁凤,李慧婷,王堯,柳小莉,徐杰,杨明,王芳,张小飞.含丁香方剂的数据挖掘及其治疗腹泻的作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):158-170.
- [2] 陈影,李硕,苏萍,张海静,张广平,叶祖光.中药抗腹泻的药效作用及机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21):203-211.
- [3] 孙墨晗,靳玉秋,赵哲,田萌媛,胡蓉,陈光顺.基于网络药理学和细胞实验探讨参苓白术散对肝纤维化中TGF- β 通路的作用机制[J].中医药信息,2023,40(1):19-29.
- [4] 刘羽茜,王艳杰,张林,赵丹玉,王建光,贾连群,张云亭.基于网络药理学和分子对接法探讨参苓白术散治疗肺癌分子机制[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(3):53-59.
- [5] 张慈浩,刘艳梅,毛婷婷,孙倩倩,李陈垚,陈孝为,董筠.基于网络药理学及分子对接探讨肠复安治疗腹泻型肠易激综合征的机制研究[J].中医临床研究,2022,14(32):1-7.
- [6] 王涛,邹文俊,张璐,李洋,郝俊杰,赵艳玲.基于网络药理学预测四逆汤抗心力衰竭的作用机制[J].中国医院用药评价与分析,2017,17(10):1304-1306.
- [7] 李安安,姜涛,詹敏,蔡宇宁,宋敏,李聪聪,林文政,张家媛,刘文刚.参苓白术散治疗膝骨关节炎作用机制的网络药理学和分子对接技术分析[J].中国组织工程研究,2022,26(2):197-204.
- [8] 李涛,谢慧春,于伟,阮瑞曼,冯晓娟,何建平.羌活提取物的抗腹泻作用[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2014,42(5):60-64.
- [9] 史志恒,曾嘉琳,黄欣如,彭雨涵,苏薇薇,王永刚.槲皮素及其衍生物抗病毒活性研究进展[J].中国现代应用药学,2022,39(18):2412-2420.
- [10] 张宝徽,鲁云,胡则林,郑国华.反相高效液相色谱法测定人字草中槲皮素和木犀草素的含量[J].湖北中医药大学学报,2013,15(1):28-30.
- [11] 梅华迪,李袁飞,马现永,余苗.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.
- [12] 田文国,陈金鹏,王春芳,刘毅,盖晓红,刘全国,田成旺,陈常青.基于网络药理学和分子对接探究肠炎宁颗粒治疗功能性腹泻和腹泻型肠易激综合征的作用机制[J].中草药,2022,53(22):7135-7147.
- [13] 夏利显,周娇俐,梅丽俊,何凌.痛泻要方通过PI3K-AKT通路诱导细胞自噬治疗腹泻型肠易激综合征的机制[J].世界中西医结合杂志,2021,16(3):468-471+504.
- [14] 李哲,李娜,崔晓燕,赵蓝青青,于永洲,赵春颖,熊辉.基于网络药理学和实验验证探讨陈皮藿香汤治疗腹泻的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(23):79-86.
- [15] 王淑玉,张运玲,牛文艳.益生菌联合蒙脱石散治疗新生儿腹泻的临床效果[J].中国城乡企业卫生,2023,38(2):137-139.
- [16] 杨瑞泉,李晓龙,王新琴.药物治疗合并推拿手法治疗小儿腹泻疗效观察[J].农垦医学,2014,36(3):245-246.
- [17] Qu Q, Yang F, Zhao C, Liu X, Yang P, Li Z, Han L, Shi X. Effects of fermented ginseng on the gut microbiota and immunity of rats with antibiotic-associated diarrhea[J]. J Ethnopharmacol. 2021,267:113594.
- [18] 唐远江,冯将,余波,张涛,卢昱希,姜玲玲.复方中药制剂对小鼠腹泻的治疗作用研究[J].湖南农业科学,2019(3):17-20.