

基于网络药理学和分子对接分析黄芪治疗溃疡性结肠炎的作用机制

黄晓燕¹, 邹孟龙², 陈雅璐¹, 宁芯², 陈柏辉², 周树珩², 王文好², 涂严平², 梁巧俐²(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

摘要: **目的** 通过网络药理学方法联合 GEO 数据库预测黄芪治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的核心活性成分及靶点, 并通过分子对接初步验证。**方法** 利用中药系统药理分析平台(TCMSP)提取黄芪的活性成分及对应靶点, 借助 Uniprot 数据库对靶点进行规范化, 通过 GEO 数据库提取溃疡性结肠炎的差异表达基因, 并利用 R 语言筛选药物与疾病的交集基因, 分别通过 DAVID 数据库、STRING 数据库对交集基因进行富集分析和蛋白互作分析; 通过 Cytoscape 软件构建黄芪“活性成分-药物靶点”网络、黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”网络及蛋白互作网络筛选出核心成分及靶点, 借助 Auto dock Vina 软件进行分子对接验证, PyMol 软件绘制对接结果图。**结果** 共获得黄芪 16 个活性成分, 对应 189 个作用靶点; GEO 数据库提取获得溃疡性结肠炎差异表达基因 1 355 个; 药物与疾病交集基因 44 个; 富集分析显示多与炎症相关; 筛选得到核心活性成分异鼠李素(Isorhamnetin)和毛蕊异黄酮(Calycosin), 核心靶点前列腺素 G/H 合成酶 2(PTGS2); 分子对接结果表明其核心活性成分与核心靶点之间均有较强的结合活性。**结论** 黄芪中的异鼠李素、毛蕊异黄酮等主要活性成分可能通过参与炎症相关信号通路及生物功能作用于 PTGS2 等疾病靶点, 从而发挥治疗溃疡性结肠炎的效用。

关键词: 网络药理学; GEO 数据库; 分子对接; 黄芪; 溃疡性结肠炎; 异鼠李素; 毛蕊异黄酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0815-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.010

Analysis of the Mechanism of Astragalus Membranaceus in the Treatment of Ulcerative Colitis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

HUANG Xiaoyan¹, ZOU Menglong², CHEN Yalu¹, NING Xin², CHEN Baihui², ZHOU Shuheng², WANG Wenyu², TU Yanping², LIANG Qiaoli² (1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023 Guangxi, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001 Guangxi, China)

Abstract: Objective To predict the core active ingredients and targets of Astragalus membranaceus in the treatment of ulcerative colitis (UC) in network pharmacology method combined with GEO database, and to verify it by molecular docking. **Methods** Active ingredients of Astragalus membranaceus and corresponding targets were extracted by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the targets were standardized with the help of Uniprot database. The differentially expressed genes of UC were extracted by GEO database, and the intersection genes of drugs and diseases were screened by the R language. Enrichment analysis and protein interaction analysis of overlapping genes were carried out by DAVID database and STRING database, respectively. The “active ingredients–drug targets” network of Astragalus membranaceus, the “active ingredients–disease targets” network of Astragalus in the treatment of UC and protein interaction network were constructed by Cytoscape software to screen core ingredients and targets. Molecular docking verification was carried out with the help of AutodockVina software, and the docking results were drawn by PyMol software. **Results** A total

收稿日期: 2020-10-26

作者简介: 黄晓燕, 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 脾胃病的中医药防治研究。Email: huangxiaoyan0705@163.com。共同第一作者: 邹孟龙, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脾胃病的中医药防治研究。Email: zoumenglong185@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460714); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238009); 广西科技重大专项(桂科 AA17202031)。

of 16 active ingredients of *Astragalus membranaceus* were obtained, corresponding to 189 targets. 1 355 of UC from GEO data and 44 genes of drug-disease intersection were obtained. Enrichment analysis was mostly related to inflammation. The core active ingredients (isorhamnetin, calycosin) and core targets ProstaglandinG/Hsynthase2 (PTGS2) were screened. The results of molecular docking showed that there was strong binding activity between the core active ingredients and the core targets. **Conclusion** The main active ingredients including isorhamnetin and calycosin in *Astragalus membranaceus* may play a role in the treatment of UC by participating in inflammation-related signaling pathways and by acting on PTGS2 target.

Keywords: Network pharmacology; GEO database; molecular docking; *Astragalus membranaceus*; ulcerative colitis; isorhamnetin; calycosin

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种主要累及直肠和结肠黏膜的炎症性疾病,其特征是黏膜炎症性溃疡^[1]。因此,促进肠道黏膜修复是治疗溃疡性结肠炎的关键。西医常规治疗短期临床效果虽明显,但基于内镜下的黏膜愈合程度仍呈局限性^[2]。在祖国医学中,溃疡性结肠炎属于“痢疾”等范畴。根据中医诊疗专家共识^[3],溃疡性结肠炎多因虚实夹杂导致,系由脾胃虚弱,运化失司,水湿内停,日久化而为热、为火,湿热内生而成痢疾。由此可知,脾虚是溃疡性结肠炎的关键病理因素。《灵枢》称“脾者主为卫”,张景岳进一步阐释“脾主运化水谷以养肌肉,五脏六腑皆赖其养,故脾之主为卫。卫者,脏腑之护卫也”。现代医学研究^[4]认为,黏膜可隔离外界致病因素,是抗感染的重要屏障之一,与祖国医学中“卫者,护卫肌表,抗御外邪”的描述不谋而合。王其庆教授^[5]在此基础上提出“脾主黏膜”的学术观点,并且在临床胃肠道黏膜疾病中收获良效。近年来,随着人们对溃疡性结肠炎发病机制的深入认识,促进肠道黏膜愈合已成为本病亟待解决的问题之一,故深入挖掘“健脾”与“黏膜愈合”的相关性对溃疡性结肠炎的防治具有重要意义。

黄芪(又称黄耆)在《本草纲目》中列为上品药,描述为“耆者,长也,黄芪色黄,为补者之长,故名黄芪。”黄芪归肺、脾经,具有健脾固表、托毒生肌等功效。现代药理研究^[6]表明黄芪药效成分包括黄芪多糖、黄芪甲苷、生物碱等。赵彩萍等^[7]研究发现黄芪甲苷能抑制白细胞介素6(IL-6)、一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶2(COX-2)等炎症因子的表达,从而促进黏膜的修复。臧凯宏等^[8-9]研究亦发现黄芪多糖和黄芪甲苷均能减少结肠组织炎症因子释放、修复黏膜屏障,从而对溃疡性结肠炎大鼠具有治疗作用。不仅如此,众多研究表明,黄芪通过上调

occludin 蛋白的表达以修复肠黏膜的机械屏障^[8]、促进杯状细胞分泌表皮生长因子以修复肠黏膜的化学屏障^[10]、下调髓源抑制细胞的表达以修复肠黏膜的免疫屏障^[11]、提高肠道优势菌群数量以修复肠黏膜的生物屏障^[12],从而发挥治疗溃疡性结肠炎的效用。然而,关于黄芪治疗溃疡性结肠炎的大部分研究却仅聚焦于黄芪多糖和黄芪甲苷^[7-9],其他成分的研究甚少,而中药发挥治疗效用是多成分、多靶点、多通路相互作用的结果。基于此,本研究拟借助网络药理学联合分子对接方法挖掘及初步验证黄芪治疗溃疡性结肠炎的核心成分和靶点,探讨其可能的作用机制,旨在为黄芪治疗溃疡性结肠炎的深入研究提供进一步参考方向。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件 TCMSP 数据库(<http://tcmspw.com/index.php>, Version 2.3); Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>, 更新至 2020 年 9 月 23 日); GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); STRING 数据库(<http://string-db.org/>, Version 11.0); DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>, Version 6.8); PDB 数据 (<https://www.rcsb.org/>)。Cytoscape 软件 (Version 3.8.0); PyMOL 软件 (Version 2.4); AutoDockTools 软件 (Version 1.5.6); ChemBio3D Ultra 软件 (Version 14.0); R 语言 (x64 4.0.0); Perl 语言 (Strawberry 5.32)。

1.2 研究方案 利用 TCMSP 数据库检索黄芪的活性成分及作用靶点,以 GEO 数据库筛选溃疡性结肠炎差异表达基因,绘制黄芪作用靶点与溃疡性结肠炎差异基因的 Venn 图,取得交集基因。通过 DAVID 数据库对交集基因进行富集分析、STRING 数据库对

交集基因进行蛋白相互作用分析 (protein-protein interaction, PPI), 同时通过 Cytoscape 软件分别构建黄芪“活性成分-药物靶点”可视化网络、黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”可视化网络,

筛选出黄芪治疗溃疡性结肠炎的核心活性成分及靶点。最后通过分子对接验证核心活性成分与靶点的结合活性。方案流程见图 1。

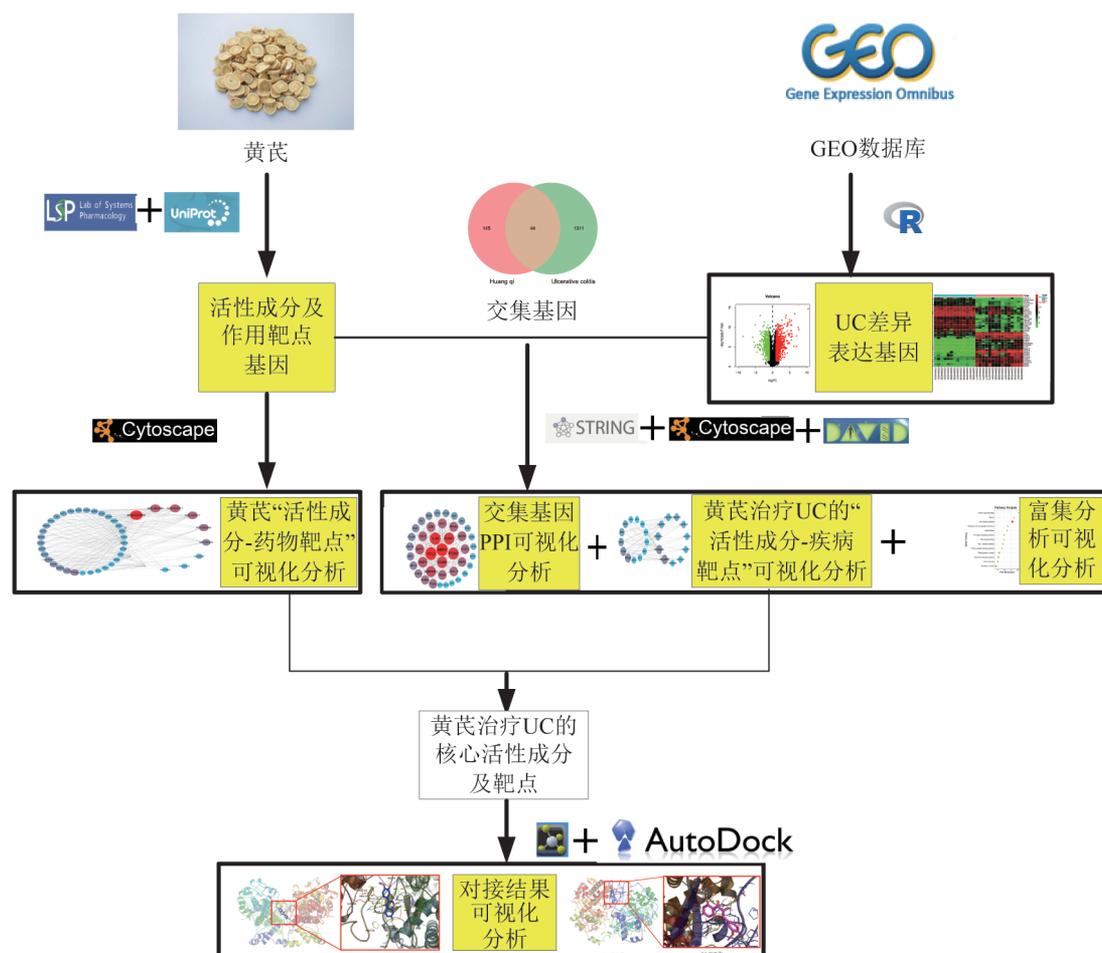


图 1 黄芪治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究方案流程图

Figure 1 Flow chart of network pharmacology research scheme of Astragalus membranaceus in the treatment of UC

1.3 黄芪活性成分和作用靶点的筛选 利用 TCMSP 数据库检索黄芪的活性成分, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 的筛选条件, 并通过查找文献补充该数据库未收录的活性成分; 同样在该数据库中检索黄芪的作用靶点。运用 Perl 语言结合 Uniprot 数据库中已认证的人类基因对作用靶点进行规范化, 将靶点名称转为基因名称。

1.4 黄芪“活性成分-药物靶点”网络的构建 将“1.3”项筛选得到的黄芪活性成分及作用靶点基因整理成 network.txt 文件, 然后导入 Cytoscape 软件, 构建黄芪“活性成分-药物靶点”可视化网络, 通过 network analyzer 拓扑功能对网络进行分析。

1.5 溃疡性结肠炎差异表达基因的筛选 以“溃疡性

结肠炎”的英文“ulcerative colitis”为关键词在 GEO 数据中检索, “Entry type”栏选择“Series”“Study type”栏选择“Expression profiling by array”“Top Organisms”栏选择“Homo sapiens”得到 87 个相关结果。经阅读后逐一剔除, 最后筛选并下载编号 GSE38713 的芯片数据。该芯片数据包含 13 例健康受试者和 15 例活动性溃疡性结肠炎患者的结肠黏膜组织基因表达量, 样本基本信息见表 1。从数据库中下载该芯片数据的压缩包及探针文件, 以健康受试者和活性溃疡性结肠炎患者表达基因差异倍数的绝对值 ($|\log_2 FC|$) ≥ 1 且 $P < 0.05$ 为标准进行数据差异性分析, 绘制火山图对差异表达基因进行可视化, 并将上调倍数最大的前 10 个基因和下调倍数最大的前 10 个基因绘制成热图。

表 1 溃疡性结肠炎样本信息

Table 1 Sample information of UC

样本来源	样本量/例	样本名称
健康受试者	13	GSM948550、GSM948551、GSM948552、GSM948553、GSM948554、GSM948555、GSM948556、GSM948557、GSM948558、GSM948559、GSM948560、GSM948561、GSM948562
活动性溃疡性结肠炎患者	15	GSM948571、GSM948573、GSM948575、GSM948577、GSM948579、GSM948581、GSM948583、GSM948585、GSM948586、GSM948587、GSM948588、GSM948589、GSM948590、GSM948591、GSM948592

1.6 黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”

网络构建及可视化分析 将黄芪作用靶点基因与溃疡性结肠炎差异表达基因取交集，并绘制 Venn(韦恩)图；运用 Perl 语言将交集基因映射出相对应的活性成分，建立黄芪“活性成分-疾病靶点”数据库；借助 Cytoscape 软件构建“活性成分-疾病靶点”可视化调控网络图，运用该软件中的 Network analyzer 拓扑功能对网络进行分析。

1.7 PPI 网络的构建及可视化分析 将“1.6”项得到的交集基因导入 STRING 数据库，物种选择人类，剔除游离靶点，构建 PPI 网络，导出该网络的 tsv 文件。将得到的 tsv 文件导入 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化，通过 network analyzer 拓扑功能对可视化网络进行分析。

1.8 富集分析 将“1.6”项得到的交集基因导入 DAVID 数据库，Identifier 选择 GENE_OFFICIAL_SYMBOL，species 选择 Homo sapiens，进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。GO 富集分析是从生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular ingredients, CC)和分子功能(molecular function, MF)3 个部分对靶点进行作用机制注释，根据 *P* 值对每个部分排名前 10 位的条目进行分析。KEGG 富集分析是对靶点所参与的信号通路进行注释，根据 *P* 值选取排名前 30 位的条目进行分析，若条目不足 30 条，则对所有条目进行分析，绘制核心信号通路图。

1.9 分子对接 将“1.4”项与“1.6”项筛选的活性成分取交集，通过 PubChem 下载交集活性成分的“SDF”格式文件，导入 ChemBio3D Ultra 软件中优化，得到活性成分(小分子)的 PDB 格式文件；将“1.4”项与“1.7”项筛选的靶点基因取交集，通过 PDB 数据库下载交集靶点的蛋白晶体结构，文件选择“PDB”格式，然后将文件导入 PyMol 软件中进行去水、加氢、调整电荷等处理，导出蛋白晶体(大分

子)的 PDB 格式文件。借助 Auto Dock Tools 软件将小分子和大分子的 PDB 格式文件转为 PDBQT 格式文件，并设置分子对接的活性口袋，然后通过 Auto dock Vina 软件完成分子对接。利用 PyMol 软件绘制最优对接结果可视化网络图。

2 结果

2.1 黄芪活性成分和作用靶点的筛选 从 TCMSP 数据库中获得黄芪活性成分 87 个，以口服生物利用度(OB)≥30%且类药性(DL)≥0.18 为筛选条件得到活性成分 20 个。将活性成分作用靶点与 Uniprot 数据库中已认证的人类基因进行映射，作用靶点为其他物种基因则删除。最终得到 16 个活性成分(见表 2)，对应 189 个作用靶点。

表 2 黄芪治疗溃疡性结肠炎的活性成分

Table 2 Active ingredients of Astragalus membranaceus in the treatment of UC

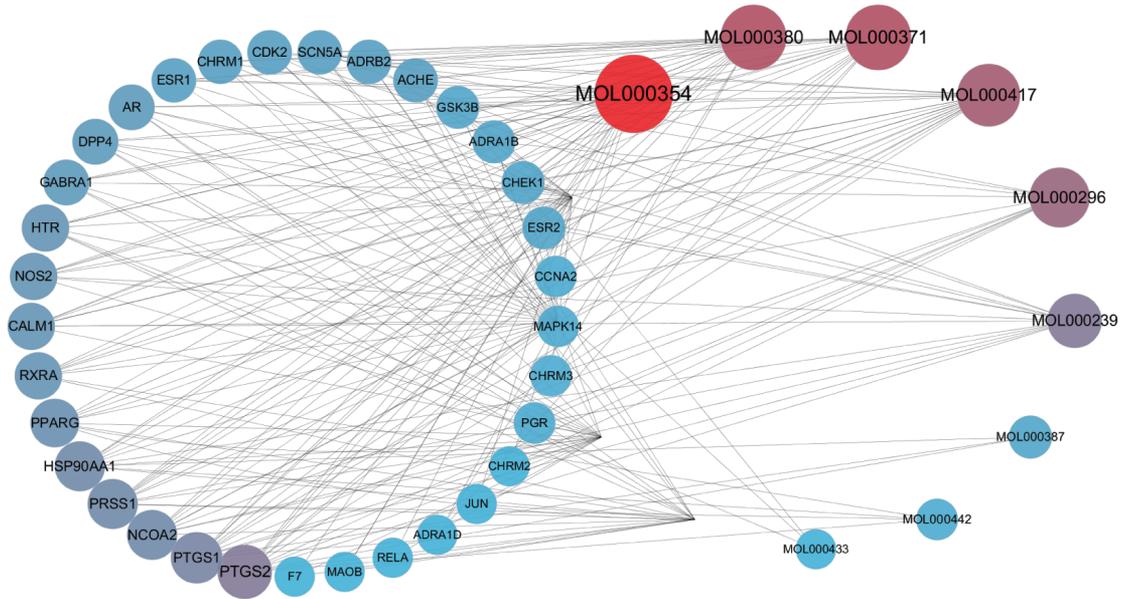
序号	成分编号	活性成分名称	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)
1	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
2	MOL000392	Formononetin	69.67	0.21
3	MOL000433	FA	68.96	0.71
4	MOL000380	(6aR, 11aR)-9, 10-dimethoxy-6a, 11a-dihydro-6H-benzofuran[3, 2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
5	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
6	MOL000371	3,9-di-O-methylnisosolin	53.74	0.48
7	MOL000239	Jaranol	50.83	0.29
8	MOL000354	Isorhamnetin	49.6	0.31
9	MOL000417	Calycosin	47.75	0.24
10	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
11	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
12	MOL000442	1, 7-Dihydroxy- 3, 9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
13	MOL000296	Hederagenin	36.91	0.75
14	MOL000379	9, 10-dimethoxypterocarpin- 3- O-β-D-glucoside	36.74	0.92
15	MOL000033	(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	36.23	0.78
16	MOL000387	Bifendate	31.10	0.67

2.2 黄芪“活性成分-药物靶点”网络的构建

借助 Perl 语言将“2.1”项中筛选得到的 16 个活性成分和 189 个作用靶点进行映射，映射结果导入 Cytoscape 软件，构建黄芪“活性成分-药物靶点”网络可视

化。得到 205 个节点(节点表示黄芪活性成分和药物靶点), 450 条边(边表示成分与靶点之间的相互作用), 平均节点值 2.2。通过拓扑分析计算度值(Degree), 并在“Select”栏设置 Degree≥平均节点值(即 Degree≥3), 提取黄芪“活性成分-药物靶点”的

核心网络, 见图 2。由图 2 可知, Degree 值排列前 5 位的活性成分分别是 MOL000354、MOL000380、MOL000371、MOL000417 和 MOL000296; 排列前 5 位的靶点分别是 PTGS2、PTGS1、NCOA2、PRSS1 和 HSP90AA1。



注: 图形和字体越大, 表示 Degree 值越高, 反之则越低。颜色越红, 表示 Degree 值越高; 颜色越蓝, 则表示 Degree 值越低
图 2 黄芪治疗溃疡性结肠炎的“活性成分-药物靶点”核心网络图

Figure 2 Core network diagram of “active ingredients–drug targets” of *Astragalus membranaceus* in the treatment of UC

2.3 溃疡性结肠炎结肠组织差异表达基因的筛选 借助 R 语言对 GSE38713 芯片数据进行整理并分析, 以 $\log_2 FC \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准进行探针的筛选, 得到健康受试者和溃疡性结肠炎患者差异表达基因 1 355 个, 其中在溃疡性结肠炎患者结肠组织中上调基因 796 个, 下调基因 559 个, 绘制火山图对数据进行可视化, 见图 3。其中横坐标表示 $\log_2 FC$, 纵坐标表示 $-\log_{10}(P \text{ 值})$, 圆点表示基因, 绿色圆点表示在溃疡性结肠炎患者结肠组织中下调的基因, 红色表示在溃疡性结肠炎患者结肠组织中上调的基因, 黑色表示无明显差异的基因; 并对上调倍数最大的前 10 个基因和下调倍数最大的前 10 个基因绘制热图, 见图 4。其中每 1 列表示 1 个样本, 下方为样本名称, 上方蓝色表示健康受试者, 粉色表示溃疡性结肠炎患者; 每 1 行表示 1 个基因在不同样本的差异, 红色表示上调基因, 绿色表示下调基因, 黑色表示无明显差异基因; 左侧连线表示差异基因的聚类模式。

溃疡性结肠炎差异表达基因取交集, 得到 44 个交集基因, 见图 5。运用 Perl 语言将交集基因映射出相对应的活性成分, 建立黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”数据库, 借助 Cytoscape 软件构建可视化调控网络图, 得到 57 个节点(节点表示黄芪活性成分和疾病靶点), 92 条边(边代表活性成分与

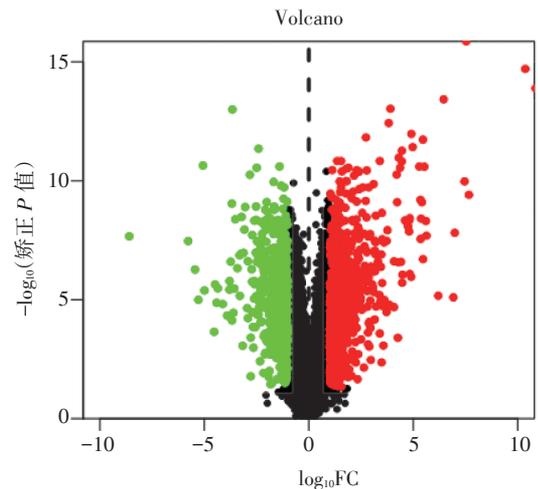


图 3 溃疡性结肠炎差异表达基因火山图
Figure 3 Differential expression gene volcano diagram of UC

2.4 黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”的网络构建及可视化分析 将黄芪作用靶点基因与

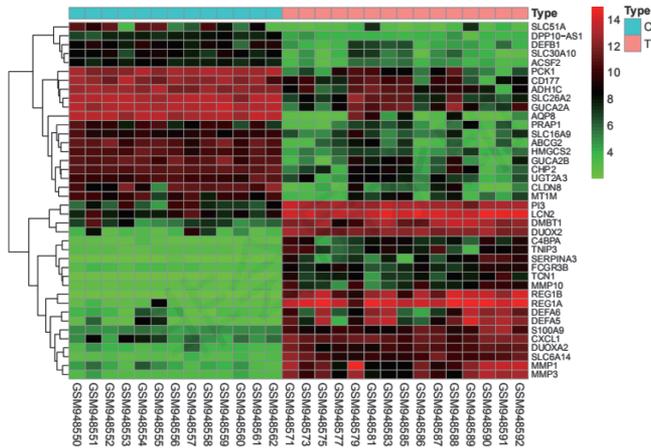


图4 溃疡性结肠炎差异表达基因差异倍数排名前10位的基因热图

Figure 4 Heat diagram of the top 10 genes with multiple differences

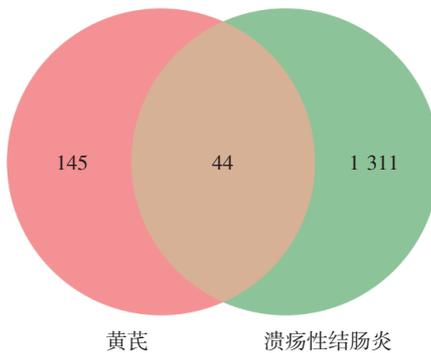


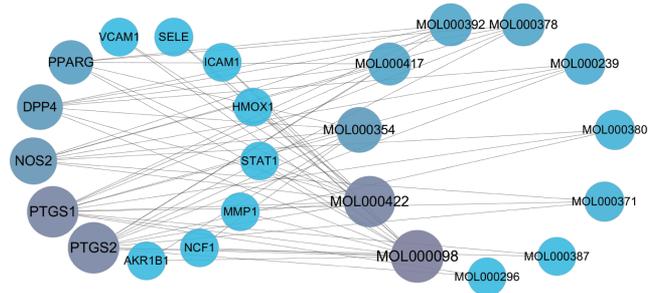
图5 黄芪治疗溃疡性结肠炎的药物靶点基因与疾病差异基因的Venn(韦恩)图

Figure 5 Venn diagram of drug targets genes and disease differentially expressed genes of Astragalus membranaceus in the treatment of UC

疾病靶点之间的相互作用), 平均节点值 1.6。通过拓扑分析计算 Degree 值, 并在“Select”栏设置 Degree ≥ 平均节点值(即 Degree ≥ 2), 提取黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”的核心网络, 见图 6。

2.5 PPI 网络的构建及可视化分析 将 44 个交集基因导入 STRING 数据库, 物种选择人类, 剔除 2 个游离靶点, 构建 PPI 网络, 导出该网络的 tsv 文件。将 tsv 文件导入 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化, 得到 42 个节点(节点表示疾病靶点), 305 条边(边表示靶点与靶点之间的相互作用), 平均节点值 6.9。通过 network analyzer 拓扑功能对可视化网络进行优化, 见图 7。

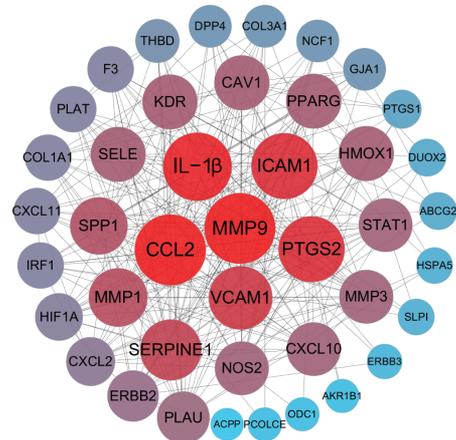
2.6 富集分析结果 将 44 个交集基因导入 DAVID 数据库进行作用机制注释, 设置 $P < 0.01$, 得到 GO 富



注: 图形和字体越大, 表示 Degree 值越高, 反之则越低; 颜色越红, 表示 Degree 值越高, 颜色越蓝, 则表示 Degree 值越低

图6 黄芪治疗溃疡性结肠炎“活性成分-疾病靶点”的核心网络图

Figure 6 The core network diagram of the “active ingredients-disease targets” of Astragalus membranaceus in the treatment of UC



注: 图形和字体越大, 表示 Degree 值越高, 反之则越低。颜色越红, 表示 Degree 值越高; 颜色越蓝, 则表示 Degree 值越低

图7 黄芪治疗溃疡性结肠炎交集靶点的 PPI 图

Figure 7 PPI diagram of intersection targets of Astragalus membranaceus in the treatment of UC

集条目 90 条, 其中生物过程条目 61 条, 细胞组成条目 12 条, 分子功能条目 17 条; KEGG 通路富集条目 13 条。

2.6.1 GO 富集分析 分析结果见图 8, 其中横坐标表示富集条目, 纵坐标表示 $-\log_{10}(P)$ 值。由图可知, 生物过程注释主要包括缺氧反应(response to hypoxia)、脂多糖反应(response to lipopolysaccharide)、白细胞迁移(leukocyte migration)、炎症反应(inflammatory response)、细胞增殖调节(regulation of cell proliferation)等; 细胞组成注释表示相关作用机制主要发生在胞外间隙(extracellular space)、胞外基质(extracellular matrix)、胞质核周区(perinuclear region of cytoplasm)、胞外区(extracellular region)、胞外体(extracellular exosome)等; 分子功能主要包括酶结合(enzyme binding)、受体结合(receptor binding)、丝氨酸型内

强^[13-14]。由表 2 可知 MOL000354、MOL000417 分别对应的活性成分是异鼠李素(Isorhamnetin)、毛蕊异黄酮(Calycosin)，故将其与 PTGS2 进行分子对接。对接结果显示，Isorhamnetin-PTGS2 结合能为 $-9.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ；Calycosin-PTGS2 结合能为 $-9.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。这表明 Isorhamnetin、Calycosin 与 PTGS2 均有较强的结合活性，初步验证了网络药理学的挖掘结果。借助 PyMol 软件将对接结果进行可视化。见图 11。

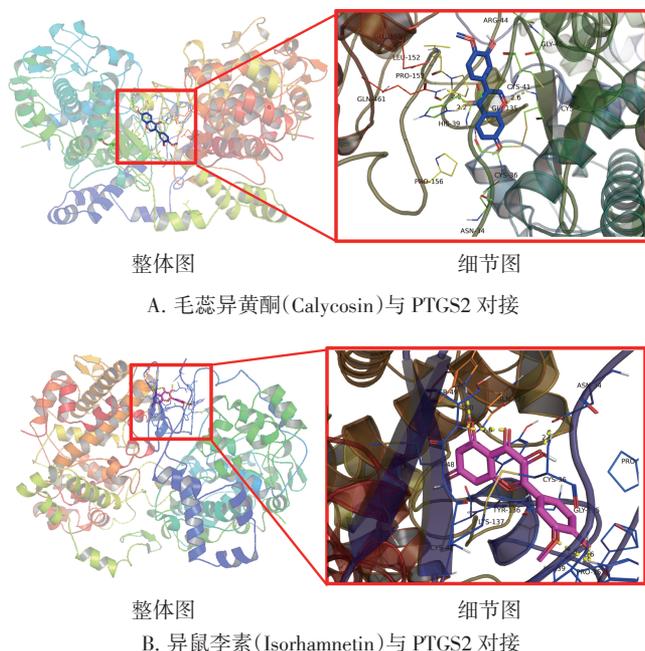


图 11 黄芪治疗溃疡性结肠炎的核心活性成分与核心靶点对接图

Figure 11 Docking diagram of core active ingredients and core targets of *Astragalus membranaceus* in the treatment of UC

3 讨论

据现代中医医家^[15-16]的临证经验及本课题组多年的临床实践均发现溃疡性结肠炎病机以“脾虚”为本，“湿热瘀毒”为标；治疗中遵循发时治标，平时治本的原则，着重强调“健脾益气，和中补虚”的重要性，尤其是对于溃疡性结肠炎慢性持续性发作患者不应只强调清热解毒，而应注重补虚健脾。黄芪作为补气健脾中药之一，其提取物被广泛研究。Kiyohara 等^[17]从黄芪中提取出 13 种成分，这些成分均可调节肠道免疫功能。胡灿等^[18]发现从黄芪中提取出不同浓度的多糖复合物对肠上皮细胞增殖亦有不同程度的促进作用。总而言之，黄芪的药物成分能够修复肠道黏膜，从而发挥治疗 UC 的效用。

本研究结果显示，黄芪中的异鼠李素(Isorhamnetin)、毛蕊异黄酮(Calycosin)等核心成分

通过作用于前列腺素 G/H 合成酶 2(PTGS2)等疾病靶点，从而发挥治疗溃疡性结肠炎的效用。Isorhamnetin 是一种黄酮类化合物，主要存在于各种植物的果实和叶片中，其具有保护心脑血管、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、保护器官、预防肥胖等作用，相关机制涉及磷脂酰肌醇激酶 3(PI3K)、蛋白激酶 B(PKB)、核转录因子 κB (NF- κB)，丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路和激酶的表达^[19]。Kim S Y 等^[20]发现 Isorhamnetin 通过破坏细胞质中抑制剂 $\kappa\text{B}-\alpha$ 的降解和磷酸化，阻止 NF- κB p65 转运入细胞核，从而抑制 NF- κB 信号通路的传导。Dou W 等^[21]研究发现 Isorhamnetin 作为人孕烷 X 受体(PXR)活化剂，可促进 PXR 上调，PXR 过表达则可抑制 NF- κB 的活性，从而减少炎症反应，进而发挥治疗溃疡性结肠炎的效用。Nod 样受体 3(NLRP3)炎症小体广泛存在于上皮细胞和免疫细胞中，其下游靶蛋白 caspase-1 可调节肠道黏膜免疫功能^[22]。研究^[23-24]表明，Isorhamnetin 可选择性调控 NLRP3 的活化，抑制促炎性细胞因子的表达及促进肠道黏膜的修复。Calycosin 是一种异黄酮植物雌激素。研究^[25]发现，Calycosin 通过 MAPK 信号通路调控血管表皮生长因子 A(VEGFA)的表达水平。实际上，在溃疡性结肠炎中，血管生成是由炎症触发的，包括内皮细胞增殖、毛细血管和小静脉重构等过程，而这些过程导致了肠黏膜微血管床的扩张，增加了血管通透性，促进了炎症细胞的进一步招募，维持了炎症的过程^[26-28]。因此，本课题组初步推测 Calycosin 可能通过调控血管生成，减缓炎症过程，从而发挥治疗溃疡性结肠炎的效用。不仅如此，Calycosin 还可以促进 Occludin 蛋白的表达，从而减缓上皮细胞紧密连接的破坏以改善黏膜机械屏障^[29]。另外，Gong A G 等^[30]借助基因敲除技术亦发现 Calycosin 是黄芪的主要活性成分，这进一步证明本研究通过网络药理学预测的黄芪活性成分的可靠性。

PTGS2(COX-2)是一种可诱导酶，介导前列腺素的合成，在炎症反应中起着重要的作用。研究^[31]发现，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORC1)通过使重组人信号转导与转录激活因子 3(STAT3)磷酸化并增强其与 COX-2 启动子结合，从而激活 COX-2 转录，导致 Thelper-17 细胞在结肠上皮募集而加剧溃疡性结肠炎进展。不仅如此，在炎症过程中，前列腺素 E2(PGE2)/前列腺素 E 受体 2(EP2)信号通路与 TNF- α 信号通路协同作用以放大 TNF- α 诱导的炎

症反应, 形成 COX-2/PGE2/EP2 信号的正反馈回路, 该回路一方面继续加剧 PG 介导的炎症反应, 另一方面通过在中性粒细胞之间形成自扩增环, 使参与炎症的活跃细胞群交替反应^[32-33]。

分子对接结果表明, Isorhamnetin、Calycosin 与 PTGS2 对接结合能均小于 $-9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 这提示筛选得到的核心活性成分与靶点之间有较强的结合活性, 同时也进一步证明网络药理学联合 GEO 数据预测药物成分与疾病靶点的可靠性。

GO 富集分析显示, 生物过程多与缺氧反应、白细胞迁移、炎症反应有关, 且多发生于细胞外区域; 分子功能主要包括酶结合、受体结合、趋化因子活性有关, 这在上述成分-靶点作用阐述中均有所体现。KEGG 信号通路富集结果表明, 黄芪治疗溃疡性结肠炎主要与 TNF 信号通路密切相关。TNF 是一类具有诱导细胞凋亡功能的细胞因子, 其生物学功能涉及细胞凋亡、诱导炎症应答等。TNF- α 是 TNF 家族最重要的细胞因子, 其与 PTGS2 协同作用放大炎症反应已在上文阐述。另外, TNF- α 与 TNF1 受体(TNFR1)结合, 诱导 NF- κ B 传导异常, 激活受体相互作用蛋白(RIP), 调控混合系列蛋白激酶结构域蛋白(MLKL)、磷酸甘油酸变位酶(PGAM)、动力蛋白相关蛋白 1(Drp1)等蛋白的活性, 进而干预 PTGS2 的表达^[34]。Aoki T 等^[35]研究发现, TNFR1 受体缺陷的小鼠炎症反应明显减少, 且 PTGS2 表达被抑制。因此, 本课题组认为干预 TNF 信号通路的传导、调控 PTGS2 蛋白的表达是黄芪治疗溃疡性结肠炎的可能机制之一。不仅如此, TNF- α 与 RIP、Caspase 蛋白结合形成复合物, 复合物聚集后迅速活化并触动下游信号通路, 从而诱导肠上皮细胞凋亡、促进溃疡性结肠炎的发生发展^[36-37]。Shen J 等^[38]研究发现黄芪可以显著降低 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白的表达。总而言之, TNF 信号通路在溃疡性结肠炎的发病过程中至关重要。

综上, 黄芪中的 Isorhamnetin、Calycosin 等主要活性成分可能通过参与 TNF 信号通路作用于 PTGS2 等疾病靶点在缺氧反应、白细胞迁移等生物进程发挥酶结合、受体结合等生物功能, 从而起到治疗溃疡性结肠炎的效用。

参考文献:

- [1] GAJENDRAN M, LOGANATHAN P, JIMENEZ G, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis[J]. Dis Mon, 2019, 65(12): 100851.
- [2] BOAL C P, COTTER J. Mucosal healing in ulcerative colitis: a comprehensive review[J]. Drugs, 2017, 77(2): 159-173.
- [3] 张声声, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [4] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease[J]. Expert Rev Gastroent, 2017, 11(9): 821-834.
- [5] 肖定洪, 王庆其. 王庆其“脾主黏膜”学术观点及其在胃肠疾病治疗中的应用[J]. 中医杂志, 2017, 58(15): 1278-1282.
- [6] ZHANG W, MA W, ZHANG J, et al. The immunoregulatory activities of astragalus polysaccharide liposome on macrophages and dendritic cells[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105(Pt1): 852-861.
- [7] 赵彩萍, 刘翠玲, 梁爽, 等. 黄芪甲苷对脂多糖诱导人胃黏膜上皮细胞GES-1的抗炎作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 918-923.
- [8] 臧凯宏, 吴建军, 段海婧, 等. 黄芪甲苷IV对溃疡性结肠炎大鼠的作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(1): 48-51.
- [9] 臧凯宏, 吴建军, 秦红岩, 等. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜屏障的影响[J]. 中药材, 2017, 40(1): 208-211.
- [10] 臧凯宏, 李应东, 朱丽娟, 等. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜的修复作用及其作用机制研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(3): 5-10.
- [11] 奚沁华, 李月芹, 戴娟, 等. 黄芪多糖治疗溃疡性结肠炎小鼠的实验研究[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(11): 975-978.
- [12] 梁金花, 郑科文, 金大伟. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群调节作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(4): 331-332.
- [13] DI MUZIO E, TOTI D, POLITICELLI F. DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina[J]. J Comput Aid Mol Des, 2017, 31(2): 213-218.
- [14] QUIROGA R, VILLARREAL M A. Vinardo: a scoring function based on AutoDock Vina improves scoring, docking, and virtual screening[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e155183.
- [15] 曹云, 郭志玲, 何莹, 等. 田德禄论治溃疡性结肠炎经验[J]. 北京中医药, 2020, 39(1): 23-26.
- [16] 陆为民, 周晓波, 徐丹华. 国医大师徐景藩教授论治溃疡性结肠炎的经验[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 124-126.
- [17] KIYOHARA H, UCHIDA T, TAKAKIWA M, et al. Different contributions of side-chains in β -d-(1 \rightarrow 3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from astragalus mongholicus Bunge[J]. Phytochemistry, 2010, 71(2/3): 280-293.
- [18] 胡灿, 李茹柳, 莫全毅, 等. 白术和黄芪不同提取部位对小肠上皮细胞增殖的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 156-160.
- [19] GONG G, GUAN Y, ZHANG Z, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110301.
- [20] KIM S, JIN C Y, KIM C, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation[J]. Int J Mol Med, 2018, 43(2): 682-692.

- [21] DOU W, ZHANG J, LI H, et al. Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(9): 923-933.
- [22] LAZARIDIS L, PISTIKI A, GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Digest Dis Sci*, 2017, 62(9): 2348-2356.
- [23] ZHEN Y, ZHANG H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 276.
- [24] AHN H, LEE G. Isorhamnetin and hyperoside derived from water dropwort inhibits inflammasome activation[J]. *Phytomedicine*, 2017, 24: 77-86.
- [25] LI S, WANG Y, FENG C, et al. Calycosin inhibits the migration and invasion of human breast cancer cells by down-regulation of Foxp3 expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 44(5): 1775-1784.
- [26] KIKUCHI R, STEVENS M, HARADA K, et al. Anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor-A in cardiovascular and renal disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2019, 88: 1-33.
- [27] MATEESCU R B, BASTIAN A E, NICHITA L, et al. Vascular endothelial growth factor-key mediator of angiogenesis and promising therapeutic targets in ulcerative colitis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58(4): 1339-1345.
- [28] SCALDAFERRI F, VETRANO S, SANS M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 585-595.
- [29] TAO Y, WANG Y, WANG X, et al. Calycosin suppresses epithelial derived initiative key factors and maintains epithelial barrier in allergic inflammation via tlr4 mediated NF- κ B pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(3): 1106-1119.
- [30] GONG A G, LI N, LAU K, et al. Calycosin orchestrates the functions of Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction composing of Astragali Radix and Angelica Sinensis Radix: an evaluation by using calycosin-knock out herbal extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 150-157.
- [31] LIN X, SUN Q, ZHOU L, et al. Colonic epithelial mTORC1 promotes ulcerative colitis through COX-2-mediated Th17 responses [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(6): 1663-1673.
- [32] AOKI T, NARUMIYA S. Prostaglandin E₂-EP2 signaling as a node of chronic inflammation in the colon tumor microenvironment[J]. *Inflammation and Regeneration*, 2017, 37(1): 4.
- [33] HIRANO T, HIRAYAMA D, WAGATSUMA K, et al. Immunological mechanisms in inflammation-associated colon carcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3062.
- [34] VAN QUICKELBERGHE E, DE SUTTER D, VAN LOO G, et al. A protein-protein interaction map of the TNF-induced NF- κ B signal transduction pathway[J]. *Sci Data*, 2018, 5: 180289.
- [35] AOKI T, FUKUDA M, NISHIMURA M, et al. Critical role of TNF- α -TNFR1 signaling in intracranial aneurysm formation[J]. *Acta Neuropathol Com*, 2014, 2(1): 34.
- [36] LEHLE A S, FARIN H F, MARQUARDT B, et al. Intestinal inflammation and dysregulated immunity in patients with inherited Caspase-8 deficiency[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(1): 275-278.
- [37] 李承宗. RIP1与TNF- α 诱导信号通路关系的研究进展[J]. *中国卫生标准管理*, 2019, 10(19): 66-69.
- [38] SHEN J, CHENG J, ZHU S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 193-200.

(编辑: 修春)