

基于网络药理学和分子对接技术探讨益气开秘方治疗便秘的作用靶点及效应机制

肖长芳, 孙颢炀, 孟令昀, 李一帆, 曹永清, 陆金根, 姚一博*

上海中医药大学附属龙华医院 肛肠科, 上海 200032

摘要: **目的** 运用网络药理学和分子对接技术研究益气开秘方治疗便秘的作用靶点及效应机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台收集筛选益气开秘方中组方药材的有效活性成分及对应靶点, 利用 GeneCards、OMIM、PharmGKB、TTD 及 DrugBank 数据库获取疾病靶点; 利用 R 软件 4.1.1 筛选成分和疾病的交集靶点, 利用 STRING 数据库 (version 11.5) 和 Cytoscape 3.8.2 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络; 运用 R 软件 4.1.1 进行基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 运用 Autodock 软件对关键作用靶点和活性成分进行分子对接, 验证网络分析结果。**结果** 益气开秘方主要包含 68 个活性成分, 活性成分对应靶点 170 个; 便秘疾病靶点共 1 586 个; 益气开秘方与便秘的交集靶点基因共 68 个。PPI 分析出核心靶点为丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、MAPK3、蛋白激酶 B1 (AKT1) 等; GO 功能注释得到生物学过程条目 1 825 条 (如衰老、平滑肌细胞增殖、肽基-丝氨酸磷酸化等), 细胞组成条目 60 条 (如膜筏、膜微结构域、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等)、分子功能条目 157 条 (如磷酸酶结合、内肽酶活力、丝氨酸肽链内切酶活性等); KEGG 通路富集分析确定了 168 条益气开秘方治疗便秘作用靶点的通路 (如 PI3K/AKT 信号通路、细胞衰老、MAPK 信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节等); 分子对接提示 MAPK1、MAPK3、AKT1 与主要核心成分 (槲皮苷、木犀草素以及山柰酚) 的结合能均 < -20 kJ/mol。**结论** 益气开秘方中的槲皮苷、木犀草素以及山柰酚等活性成分可能通过与 MAPK1、MAPK3、AKT1 等靶点进而调控 MAPK 信号通路以及磷酸肌醇-3-激酶 (PI3K)/AKT 信号通路等信号通路起到治疗便秘的作用。

关键词: 益气开秘方; 便秘; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; 槲皮苷; 木犀草素; 山柰酚

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)06-1211-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.007

Target and mechanism of Yiqi Kaimi Prescription in treatment of constipation based on network pharmacology and molecular docking

XIAO Chang-fang, SUN Yang-yang, MENG Ling-yun, LI Yi-fan, CAO Yong-qing, LU Jin-gen, YAO Yi-bo

Department of Anorectal Surgery, Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: To study the target and mechanisms of Yiqi Kaimi Prescription in treatment of constipation based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The effective active components and corresponding targets of Yiqi Kaimi Prescription were collected and screened via TCMSP. The disease targets were obtained from the GeneCards, OMIM, PharmGKB, TTD and DrugBank databases. The intersection targets of components and diseases were screened by R software 4.1.1, and the protein interaction network was constructed by the STRING database (version 11.5) and Cytoscape 3.8.2. R software 4.1.1 was used for GO biological function analysis and KEGG pathway analysis. The key targets and active components were docked by Autodock software to verify the network analysis results. **Results** Yiqi Kaimi Prescription primarily contained 68 active ingredients, and the active ingredients corresponded to 170 targets. There were 1 586 targets for constipation, and 68 target genes for the intersection of Yiqi Kaimi Prescription and constipation. PPI network analysis showed that the core targets were MAPK1, MAPK3 and AKT1. GO functional analysis showed

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 国家中医药管理局关于开展全国中医学术流派传承工作室第二轮建设项目 (国中医药人教函[2019]62 号); 上海市临床重点专科项目 (shslczdk04301); 中医药流派发展高地建设—海派中医流派传承延伸计划项目[Zy(2021—2023)-0209]; 上海中医药大学杏林学者及追踪计划项目 (RC-2017-02-08); 国家自然科学基金项目 (81603625, 82174373)

作者简介: 肖长芳 (1993—), 女, 博士研究生, 研究方向为便秘的中医药治疗。E-mail: dr_xcf@163.com

***通信作者:** 姚一博, 副主任医师, 医学博士, 主要从事肛肠疾病的预防与治疗。E-mail: elevenzoe@163.com

1 825 biological processing items (such as aging, smooth muscle cell proliferation, peptide serine phosphorylation, etc.), 60 cell composition items (such as membrane raft, membrane microdomain, serine/threonine protein kinase complex, etc.), and 157 molecular functional items (such as phosphatase binding, endopeptidase activity, serine endopeptidase activity, etc.). KEGG pathway enrichment analysis identified 168 pathways (such as PI3K/AKT signaling pathway, cell senescence, MAPK signaling pathway, actin cytoskeleton regulation, etc.) for the treatment of constipation; Molecular docking showed that the binding energies of MAPK1, MAPK3 and AKT1 with the central core components (quercetin, luteolin, and kaempferol) were <-20 kJ/mol. **Conclusion** Quercetin, luteolin and kaempferol in Yiqi Kaimi Prescription may regulate cellular aging, MAPK signaling pathway and PI3K/AKT signaling pathway by interacting with MAPK1, MAPK3 and AKT1.

Key words: Yiqi Kaimi Prescription; constipation; network pharmacology; molecular docking; mechanism; quercetin; luteolin; kaempferol

益气开秘方为全国名老中医陆金根教授治疗便秘的经验用方,陆师认为便秘患者多存在“虚”症,气阴不足,且病程日久,肺、脾、肾皆虚,治疗应益气养阴清化为治^[1]。益气开秘方以生黄芪、生白术益气为君药,以枳实、杏仁等理气开秘以开上窍,通下窍,促进大肠传导能力,佐以地黄、当归等以助濡养肠道^[2]。根据多项前期临床试验提示益气开秘方具有显著的临床疗效,其有效率为 62.86%~93.50%,可以明显改善患者粪便性状、排便困难、排便频率、下坠不尽感、腹胀等情况^[3-6]。但是益气开秘方治疗便秘的相关机制尚未完全明确。

网络药理学是通过构建药物靶标相互作用网络分析的方法,在阐明多化合物复杂作用机制的过程中发挥着重要作用^[7-9]。分子对接是一种广泛用于药物发现的方法,对接能够识别具有治疗意义的新化合物,在分子水平上预测配体-靶标相互作用^[10]。本研究采用网络药理学及分子对接技术,筛选及分析益气开秘方治疗便秘的有效成分及靶点,为深入了解益气开秘的作用机制提供基础。

1 方法

1.1 益气开秘方有效成分的筛选和作用靶点的收集

益气开秘方由生黄芪、生白术、枳实、杏仁、地黄以及当归 6 味药物组成,采用中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 收集组成药物的主要化学成分及作用靶点。以口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 作为活性成分的筛选条件,整理得到益气开秘方中的活性成分及其对应的预测靶点,并利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 的注释文件将药物靶点基因进行 ID 转换。

1.2 便秘的疾病靶点收集和整理

以“constipation”为关键词,分别在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD

(<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库查找便秘的疾病靶点,利用 R 软件的“Venn”软件包对各数据库数据先去重后取交集,然后与“1.1”项中的药物靶点取交集,绘制 Venn 图。

1.3 益气开秘方成分与靶点的网络构建及分析

将益气开秘方有效成分信息及“1.2”项中所获取的疾病靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件,构建益气开秘方成分与靶点的可视化网络图,通过插件 CytoNCA 分析网络的特征,计算节点度值 (degree) 参数,直观和准确地探索复方中主要有效成分。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建

将“1.2”项中所获取的疾病靶标导入 STRING version 11.5 数据库 (<https://string-db.org/>),选择物种为“Homo sapiens”,选择 minimum required interaction score 为 highest confidence 0.900,去除游离节点,获得蛋白互作信息。将 PPI 信息导入 Cytoscape 软件构建 PPI 网络,利用 CytoNCA 插件进行拓扑分析,筛选核心靶点。

1.5 基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

运用 R 软件 4.1.1 中的“DOSE”“org.Hs.eg.db”“enrichplot”及“clusterProfiler”等数据包对益气开秘方有效作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析,探讨益气开秘方治疗便秘的生物学过程及信号通路。

1.6 分子对接

运用分子对接验证预测的关键活性成分和关键靶点之间的相互作用关系。分子对接包括大分子受体 (关键靶点) 和小分子配体 (活性成分) 准备。在 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载小分子配体的 2D 结构,用 ChemOffice 14.0.0.117 进行能量最小化处理及生成 3D 结构。在 Uniprot 数据库中检索关键靶点基因,找到对应蛋白 ID,在

PDB (<http://www.rcsb.org/>) 中下载大分子受体的 3D 结构, 利用 Pymol 2.5.2 软件进行去水分子和去除原有配体。运用 AutoDockTools1.5.7 进行受体分子加氢处理, 并确定活性口袋。运行 Vina 1.1.2 计算分子对接的结合能。最后采用 Pymol 软件进行可视化。

2 结果

2.1 益气开秘方活性成分及对应靶点

通过 TCMSP 数据库, 以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$

为筛选条件, 获得益气开秘方的活性成分, 其中黄芪 20 种, 白术 7 种, 当归 2 种, 杏仁 20 种, 枳实 21 种, 地黄 2 种, 见表 1。经过合并后得到益气开秘方 6 味中药共 68 个活性成分, 活性成分对应靶点 170 个。

2.2 便秘疾病靶点的汇总

从 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 共 5 个数据库中, 获取便秘疾病靶点分别

表 1 益气开秘方的活性成分

Table 1 Active ingredients of Yiqi Kaimi Prescription

中药	MOL ID	活性成分英文名称	活性成分中文名称
黄芪	MOL000398	isoflavanone	异黄烷酮
杏仁	MOL002311	glycyrol	甘草酚
杏仁	MOL012922	l-SPD	左旋千金藤啶碱
杏仁	MOL007207	machiline	/
杏仁	MOL005017	phaseol	/
杏仁	MOL004841	licochalcone B	甘草查耳酮乙
黄芪	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	7-O-甲基异丙醇胺
枳实	MOL013433	prangenin hydrate	白芷属脑
枳实	MOL001798	neohesperidin_qt	/
黄芪	MOL000392	formononetin	刺芒柄花素
黄芪	MOL000433	folic acid	叶酸
黄芪	MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	/
杏仁	MOL003410	ziziphin_qt	/
杏仁	MOL004903	liquiritin	甘草苷
黄芪	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	/
枳实	MOL013435	poncimarín	枸橼苦素
白术	MOL000022	14-acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol	/
枳实	MOL013436	isoponcimarín	异枸橼苦素
白术	MOL000020	12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	/
枳实	MOL005828	nobiletin	川皮苷
白术	MOL000021	14-acetyl-12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	/
枳实	MOL004328	naringenin	柚皮素
黄芪、杏仁	MOL000211	mairin	丁子香酚
杏仁	MOL000492	(+)-catechin	(+)-儿茶素
白术	MOL000049	3 β -acetoxyatractylone	3 β -乙酰氧基苍术碱
黄芪	MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	/
杏仁	MOL010921	estrone	雌激素酮
杏仁	MOL004908	glabridin	光甘草定
枳实	MOL013277	isosinensetin	异橙黄酮
黄芪	MOL000239	jaranol	熊竹素
枳实	MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	/

续表 1

中药	MOL ID	活性成分英文名称	活性成分中文名称
枳实	MOL001803	sinensetin	甜橙黄酮
黄芪	MOL000354	isorhamnetin	异鼠李亭
黄芪	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	/
黄芪	MOL000417	calycosin	毛蕊异黄酮
枳实	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	橙皮素
黄芪	MOL000098	quercetin	槲皮苷
当归、杏仁、地黄	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇
枳实	MOL007879	tetramethoxyluteolin	5,7,3',4'-四甲氧基黄酮
枳实	MOL013430	prangenin	普郎内酯
枳实	MOL013352	obacunone	黄柏酮
杏仁	MOL004355	spinasterol	菠菜甾醇
黄芪	MOL000422	kaempferol	山柰酚
黄芪	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	/
枳实	MOL002914	eriodyctiol	黄烷酮
枳实	MOL013428	isosakuranetin-7-rutinoside	/
枳实	MOL013440	citrusin B	柑属苷 B
杏仁	MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	11,14-二十碳二烯酸甲酯
枳实	MOL013279	5,7,4'-trimethylapigenin	5,7,4'-三甲氧基黄酮
白术	MOL000028	α -amyrin	α -香树脂醇
黄芪	MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	/
枳实	MOL005849	didymin	香蜂草苷
杏仁	MOL000953	CLR	/
当归	MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇
黄芪	MOL000296	hederagenin	常春藤素
杏仁、地黄	MOL000359	sitosterol	谷甾醇
黄芪	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷
枳实	MOL013276	poncirin	枳属苷
黄芪、白术	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	/
枳实	MOL000006	luteolin	木犀草素
白术	MOL000072	8 β -ethoxy atractylenolide III	8 β -乙氧基苍术内酯III
枳实	MOL001941	ammidin	欧前胡素
杏仁	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	/
杏仁	MOL010922	diisooctyl succinate	琥珀酸二异辛酯
枳实	MOL013437	6-methoxy aurapten	6-甲氧基橙皮油内酯
黄芪	MOL000387	bifendate	联苯双酯
杏仁	MOL005030	gondoic acid	巨头鲸鱼酸

为 1 117、200、410、11、100 个，去重后取并集后剩余 1 586 个，见图 1。将益气开秘方主要化学成分的作用靶点与便秘疾病靶点数据取交集，最终获得益气开秘方作用于便秘的靶点共 64 个，以韦恩图的形式展现交集靶点，见图 2。

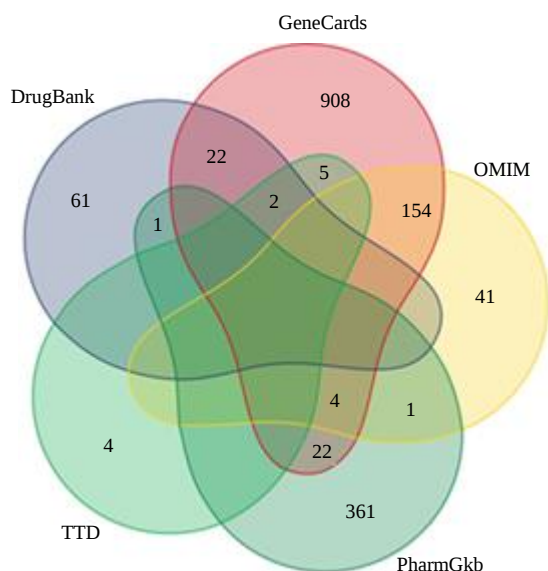


图 1 疾病靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn plot of disease targets

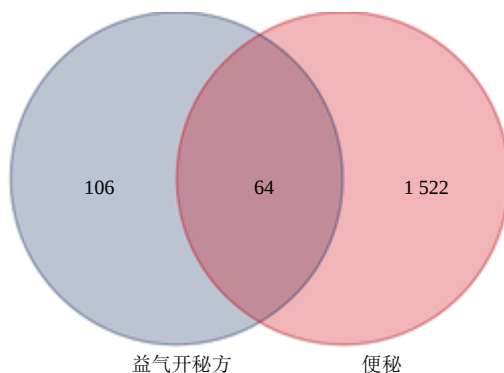
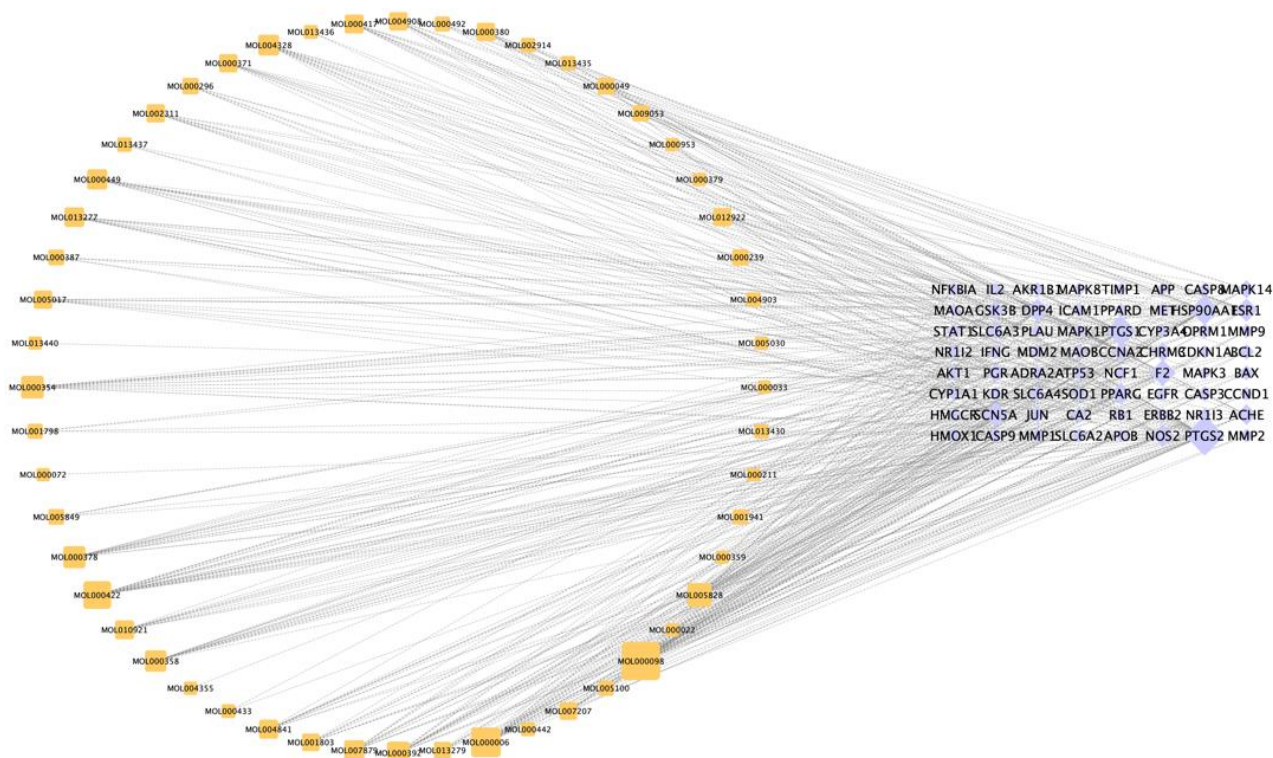


图 2 药物 - 疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Drug - disease targets Venn plot

2.3 益气开秘方成分与靶点的网络构建分析

构建益气开秘方“成分 - 靶点”调控网络模型，进行可视化分析，见图 3、4。网络包含 116 个节点（52 个活性成分及 64 个疾病潜在靶点）和 408 条边。其中正方形节点代表成分，菱形节点代表靶点蛋白，节点大小由 degree 值决定，degree 值越大，节点面积越大，在网络中的作用越重要。边代表成分与靶点蛋白之间的靶向关系。52 个活性成分中 degree 值排名前 15 的化合物见表 2。



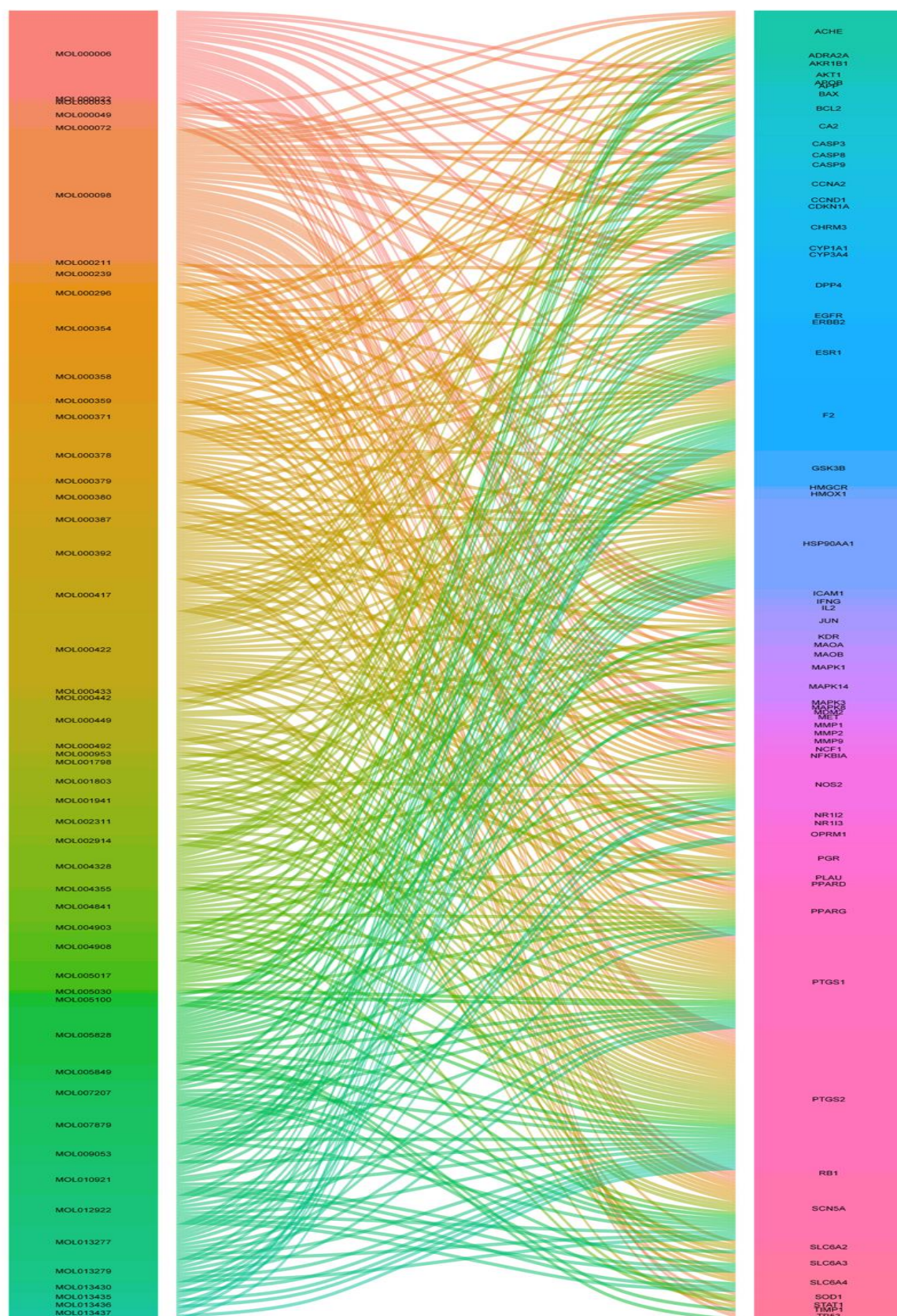


图 4 分子-靶点桑基图

Fig. 4 Sankey plot of component-target

表 2 Degree 值排名前 15 的活性成分
Table 2 Active ingredients with top 15 degree of in Yiqi Kaimi Prescription

MOL ID	活性成分英文名称	活性成分中文名称	药物	degree 值
MOL000098	quercetin	槲皮苷	黄芪	41
MOL000006	luteolin	木犀草素	枳实	27
MOL000422	kaempferol	山柰酚	黄芪	24
MOL005828	nobiletin	川皮苷	枳实	18
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李亭	黄芪	16
MOL000392	formononetin	芒柄花黄素	黄芪	16
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	7-O-甲基异丙醇胺	黄芪	15
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	当归	14
MOL004328	naringenin	柚皮素	枳实	13
MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	当归、杏仁、地黄	12
MOL007879	tetramethoxyluteolin	5,7,3',4'-四甲氧基黄酮	枳实	12
MOL013277	isosinensetin	异橙黄酮	枳实	11
MOL000417	calycosin	毛蕊异黄酮	黄芪	10
MOL010921	estrone	雌激素酮	杏仁	10
MOL004841	licochalcone B	甘草查耳酮乙	杏仁	10

2.4 PPI 网络的构建及分析

将益气开秘方主要化学成分的作用靶点与便秘疾病靶点数据取交集所获得的 64 个靶点导入

STRING 数据库，选择 minimum required interaction score 为 highest confidence 0.900，去除游离节点，得到 49 个节点和 169 条边，见图 5。

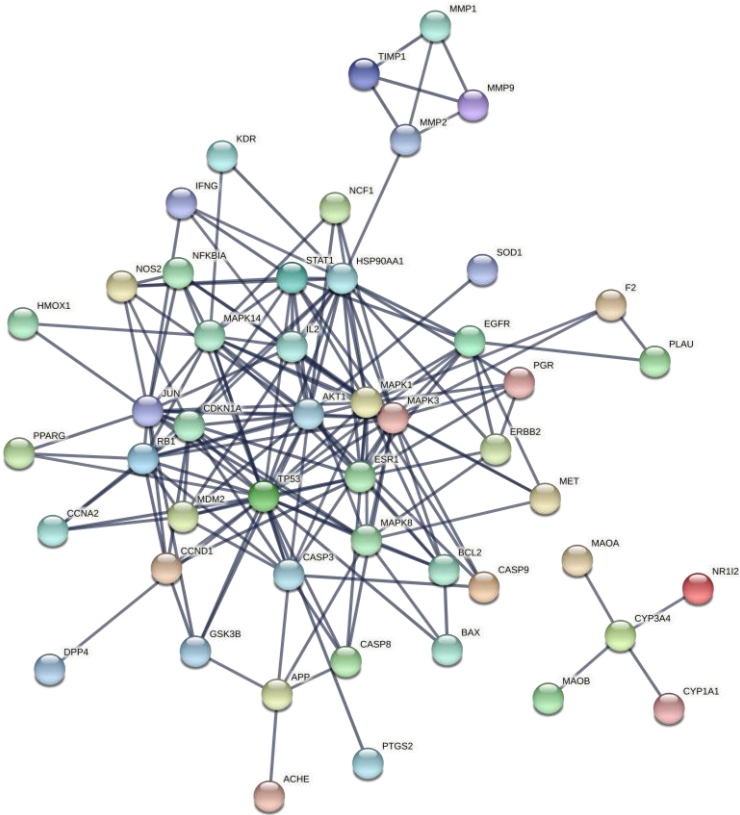


图 5 益气开秘方治疗便秘的 PPI 网络
Fig. 5 PPI of Yiqi Kaimi Prescription in treatment of constipation

将 STRING 数据库中得到的 PPI 网络文件导入 Cytoscape 软件, 利用 CytoNCA 插件计算节点的 Betweenness、Closeness、degree、Eigenvector、LAC 以及 Network 值, 利用 R 语言以大于中位值为筛选条件, 得出核心网络。第 1 次筛选后得到 17 个节点,

117 条边的网络图。第 2 次筛选后得到 5 个节点, 9 条边的核心网络图, 即丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、MAPK3、蛋白激酶 B 1 (AKT1)、转录因子 AP-1 (JUN) 及细胞肿瘤抗原 p53 (TP53), 见图 6。

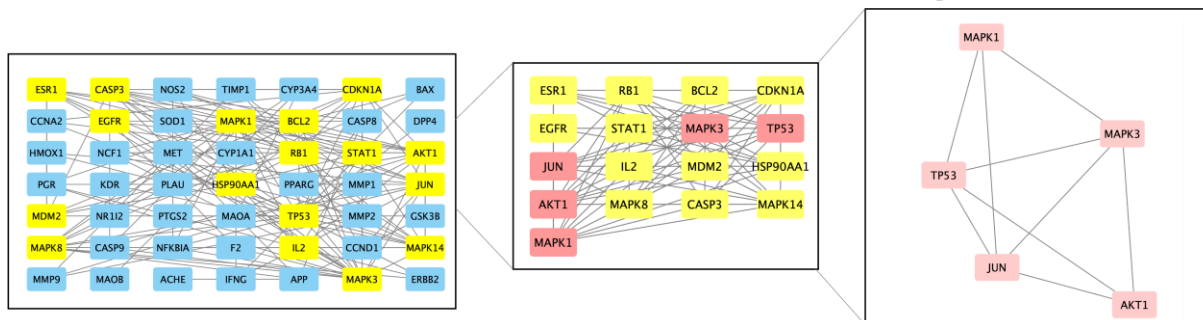


图 6 核心 PPI 网络

Fig. 6 Core PPI of Yiqi Kaimi Prescription

2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

对益气开秘方治疗便秘的潜在 64 个疾病靶点基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。根据 $P < 0.05$ 确定了生物学过程 (BP) 1 825 条、细胞组成 (CC) 60 条、分子功能 (MF) 157 条, 见图 7。GO 具体分析结果: BP 分析发现, 富集基因的 BP 过程包含衰老、细胞对氧化应激的反应、细胞对活性氧的反应、细胞对外界刺激的反应、平滑肌细胞增殖、机械刺激反应、生殖结构发育、肽基-丝氨酸磷酸化、

肽基-酪氨酸磷酸化等; CC 分析发现富集基因包含膜筏、膜微结构域、转录调控复合物、细胞器外膜、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、突触后膜的组成部分、髓鞘、黏着斑、细胞-衬底结以及内质网腔等; MF 分析发现, 富集基因包含磷酸酶结合、内肽酶活力、丝氨酸肽链内切酶活性、泛素样蛋白连接酶结合、DNA 结合转录因子结合、核受体活性、蛋白酶结合、蛋白磷酸酶结合、蛋白激酶活性以及蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等。

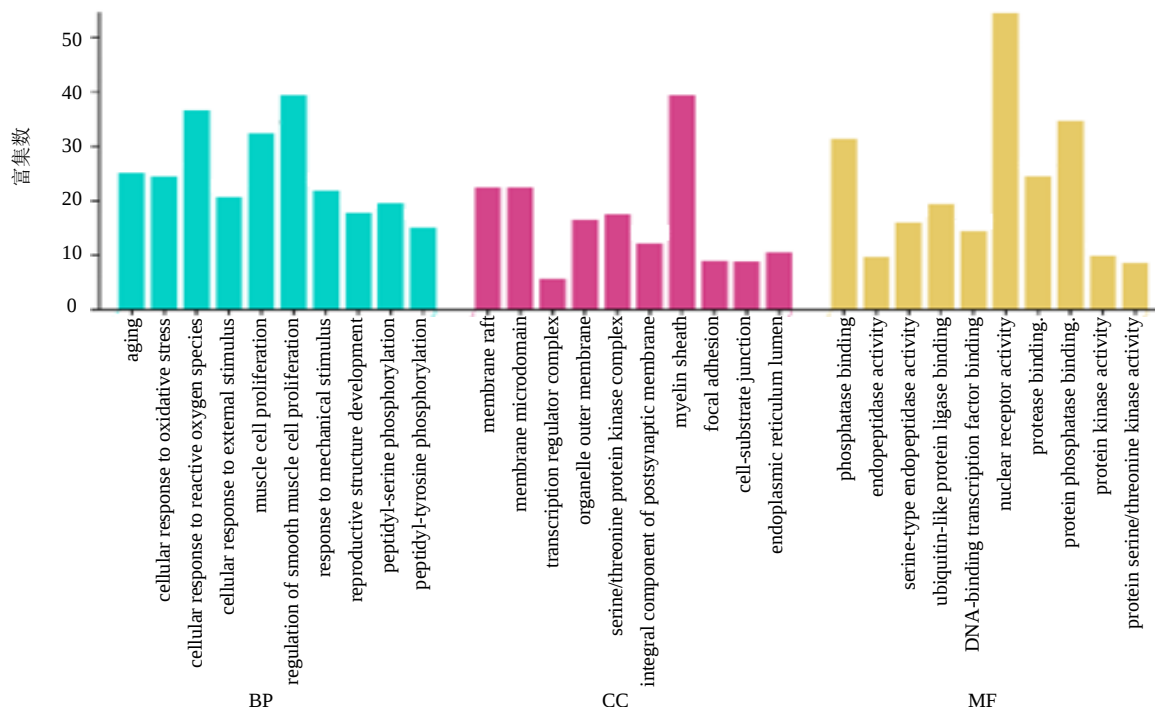


图 7 GO 功能富集分析

Fig. 7 GO functional enrichment analysis

进行 KEGG 富集分析, 根据 $P < 0.05$ 确定了 168 条益气开秘方治疗便秘作用靶点的通路, 其中发现涉及白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、松弛素信号通路、内皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂抗性、细胞凋亡、雌激素信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、T 细胞受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /AKT 信号通路、酪氨酸激酶受体 (ErbB) 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞衰老、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路、MAPK 信号通路、JAK-信号传导及转录激活蛋白 (STAT) 信号通路、Rap1 信号通路、钙信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节、酪氨酸代谢及环磷酸鸟苷 (cGMP)-环磷酸鸟苷酸依赖的蛋白激酶 (PKG) 信号通路等, 见图 8。

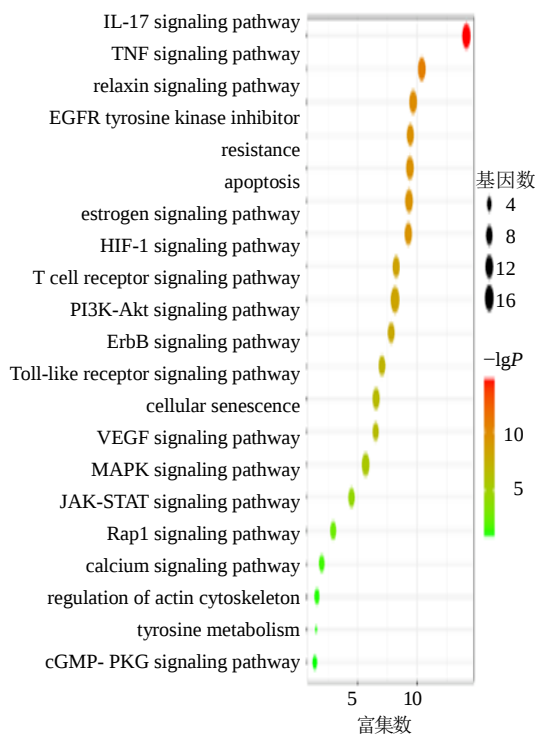


图 8 KEGG 富集分析

Fig. 8 KEGG enrichment analysis

2.6 活性成分与蛋白分子对接验证

通过 AutoDock_Vina 软件将关键蛋白 MAPK1、MAPK3、AKT1 分别与益气开秘方主要活性分子槲皮苷、木犀草素以及山柰酚进行分子对接。分子对接结果显示 MAPK1、MAPK3、AKT1 与槲皮苷、木犀草素以及山柰酚之间的最低结合能均小于 -20 kJ/mol, 见表 3。采用 Pymol 软件进行对接可视化, 见图 9。

表 3 关键蛋白 MAPK1、MAPK3、AKT1 与主要小分子的最低结合能

Table 3 Lowest binding energies of MAPK1, MAPK3 and AKT1 with major compounds

化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
	AKT1-1h10*	MAPK1-3sa0*	MAPK3-4qtb*
山柰酚	-25.498	-31.768	-38.874
木犀草素	-26.334	-32.186	-39.710
槲皮苷	-26.334	-33.440	-38.874

*为 PDB 数据库中蛋白的 IDENTIFIER

*is IDENTIFIER protein in PDB database

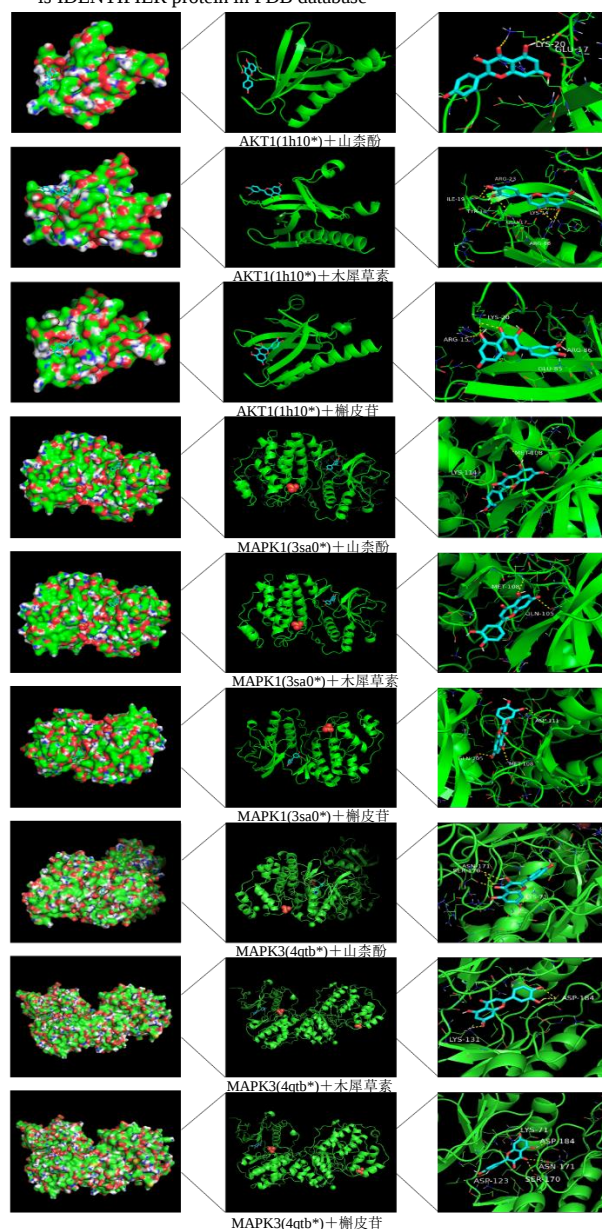


图 9 关键蛋白 MAPK1、MAPK3、AKT1 与主要小分子的对接模式图

Fig. 9 Molecular docking patterns of MAPK1, MAPK3 and AKT1 with major compounds

3 讨论

便秘是以排便困难、排便次数减少以及排便梗阻感为主要症状的临床常见疾病^[11]。全球成年人中便秘患病率约为 14%^[12]，且随着年龄的增加，在老年人群中便秘的患病率更是高达 26%~34%^[13-14]。便秘不仅严重影响患者的生活质量，还易诱发心肌梗死、缺血性中风及心脏衰竭等严重并发症^[15]。因此，便秘的治疗工作是临床亟待解决的焦点问题之一。在目前的便秘临床治疗中，主要以渗透性泻剂及促动力剂为主^[16]。然而，根据目前的报道的多项临床结果提示其临床有效率有限，如渗透性泻剂（聚乙二醇）的有效率为 51%^[17]，促动力剂（普鲁卡必利）的有效率为 37.8%^[18]。此外，长期使用常出现药物的耐药，以及药物相关的不良反应如恶心、腹胀及腹泻等常会限制临床应用^[19-21]。因此，探索安全及有效的便秘治疗药物具有重大的临床价值。

益气开秘方是全国名老中医陆金根教授经验方，组方由生黄芪 30 g、生白术 30 g、枳实 12 g、杏仁 12 g、地黄 15 g 及当归 15 g 组成。黄芪乃补气之圣药，善补一身之气；白术健脾益气，与黄芪合用可增其补气之效；枳实行气化痞消满，主治中焦痞积气滞；便秘日久津气亏耗，阴虚则肠道失养，当滋阴增液增水行舟，故用地黄、当归滋阴润燥、养血润肠；肺与大肠相表里，肺之肃降与大肠传导息息相关，上窍闭则下窍不通，故佐杏仁以降气润肠与枳实相配兼具升降降浊之功，诸药合用，共奏益气养阴、通腑消积之功效^[1, 5]。

本研究筛选益气开秘方有效活性成分 68 个，可作用于便秘的治疗靶点 64 个，这与中药复方制剂多成分、多靶点干预的特性相吻合。排名靠前有效成分分别是槲皮苷（quercetin）、木犀草素（luteolin）和山柰酚（kaempferol）3 种黄酮类化合物，提示这些化合物可能是益气开秘方干预便秘的核心药效成分。其中，槲皮苷具有多种药理活性，可有效恢复抗生素治疗后小鼠的肠道微生物群，可作为治疗肠道菌群失调的益生元^[22-23]。木犀草素可以通过 L 型钙通道电流来调控肠道平滑肌运动^[24]。同时，木犀草素能够通过降低平滑肌细胞的 AKT 磷酸化水平，抑制 PI3K/AKT 通路激活，起到抑制平滑肌增殖的作用^[25]。山柰酚可以改善肠道屏障的完整性，抑制肠道炎症，并调节高脂饮食小鼠的肠道微生物群^[26]。槲皮苷、木犀草素和山柰酚对于肠道炎症、免疫、肠道运动以及肠道菌群均有不同程度的作用。但是

基于便秘动物模型的实验研究则相对较少。

根据 PPI 网络分析结果，发现 MAPK1、MAPK3、AKT1 等为关键靶点。MAPK1 和 MAPK3 是 MAPK 家族成员，MAPK 信号通路由一组以级联方式依次激活的蛋白质 Ser/Thr 激酶，可将细胞外刺激放大并传导到细胞内^[27]。在便秘模型大鼠结肠组织中的 MAPK 表达水平明显低于对照组^[28]。通过阻断 MAPK 信号通路可以下调大鼠结肠组织中的水通道蛋白 AQP3 及 AQP4 的表达量，有效抑制肠道对水分重新吸收，减少便秘的症状^[29]。AKT1 是 AKT 的一种亚型，AKT 可由 PI3K 激活，即 PI3K/AKT 信号通路，激活 PI3K/AKT 信号通路可以促进平滑肌细胞的增殖^[30-31]。在便秘大鼠模型的结肠组织中发现 PI3K、AKT 的磷酸化水平显著上调，提示 PI3K/AKT 信号通路参与了便秘的发生^[32-33]。因此，结合 PPI 网络分析及分子对接的结果，益气开秘方可能是通过调控 MAPK1、MAPK3、AKT1 等靶点及其对应的 MAPK 信号通路、PI3K/AKT 信号通路调控肠道对水分的吸收及平滑肌功能，起到治疗便秘的作用。

GO 功能富集结果显示益气开秘方治疗便秘的 64 个潜在靶点生物学过程涉及衰老、平滑肌细胞增殖、机械刺激反应、肽基-丝氨酸磷酸化、肽基-酪氨酸磷酸化等。KEGG 通路富集结果显示益气开秘方可能通过细胞衰老、PI3K/AKT 信号通路、MAPK 信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节等通路治疗便秘。根据目前流行病学的调查，衰老与便秘之间有着重要的关系。对衰老大鼠的行为分析发现，衰老大鼠不仅表现出显著的衰老行为，而且表现出明显的便秘症状^[34]。肠道平滑肌的功能在便秘的发生与发展中起到了重要的作用，全结肠测压提示 80%便秘患者均存在肠道运输障碍，促进肠道平滑肌细胞增殖及收缩舒张是治疗便秘的重要方向^[35]。在平滑肌细胞的收缩舒张过程中，蛋白质的磷酸化修饰起到了调控的作用，如 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^[36-37]。由此预测，益气开秘方中的槲皮苷、木犀草素以及山柰酚等活性成分可能通过与 MAPK1、MAPK3、AKT1 等靶点基因进而调控细胞衰老、MAPK 信号通路以及 PI3K/AKT 信号通路等信号通路起到治疗便秘的作用。

综上所述，本研究通过网络药理学及分子对接的方法对益气开秘方治疗便秘的靶点及作用机制进

行了初步的预测,反映了益气开秘方干预便秘多成分、多靶点、多通路的特性,为后续进一步基础实验提供了方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 俞婷, 陆金根, 曹永清, 等. 陆金根辨治气阴两虚型老年功能性便秘经验 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(7): 20-22.
- [2] 何春梅, 陆金根, 曹永清, 等. 益气开秘方对慢传输型便秘疗效和生存质量的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(5): 33-36.
- [3] 彭军良, 姚向阳, 陆金根, 等. 益气开秘方治疗气阴两虚型慢传输型便秘的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(11): 50-53.
- [4] Yao Y B, Cao Y Q, Guo X T, *et al.* Biofeedback therapy combined with traditional Chinese medicine prescription improves the symptoms, surface myoelectricity, and anal canal pressure of the patients with spleen deficiency constipation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 830714.
- [5] 姚一博, 何春梅, 梁宏涛, 等. 中医“身心”综合方案治疗气阴两虚型重度混合型便秘的临床观察 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(6): 19-23, 29.
- [6] 董佳容, 李艳芳, 陆金根. 益气开秘方治疗气阴亏损型慢性便秘 105 例临床观察 [J]. 世界中医药, 2014, 9(12): 1626-1629.
- [7] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读, 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [8] Zhang B, Wang X, Li S. An integrative platform of TCM network pharmacology and its application on a herbal formula, qing-Luo-Yin [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 456747.
- [9] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [10] Pinzi L C, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4331.
- [11] Bharucha A E, Lacy B E. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(5): 1232-1249.e3.
- [12] Black C J, Ford A C. Chronic idiopathic constipation in adults: Epidemiology, pathophysiology, diagnosis and clinical management [J]. *Med J Aust*, 2018, 209(2): 86-91.
- [13] Lucak S, Lunsford T N, Harris L A. Evaluation and treatment of constipation in the geriatric population [J]. *Clin Geriatr Med*, 2021, 37(1): 85-102.
- [14] Daniali M, Nikfar S, Abdollahi M. An overview of interventions for constipation in adults [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 14(8): 721-732.
- [15] Sundbøll J, Szépligeti S K, Adelborg K, *et al.* Constipation and risk of cardiovascular diseases: A Danish population-based matched cohort study [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(9): e037080.
- [16] Vriesman M H, Koppen I J N, Camilleri M, *et al.* Management of functional constipation in children and adults [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(1): 21-39.
- [17] Dipalma J A, Cleveland M V, McGowan J, *et al.* A randomized, multicenter, placebo-controlled trial of polyethylene glycol laxative for chronic treatment of chronic constipation [J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(7): 1436-1441.
- [18] Liu B Y, Wu J N, Yan S Y, *et al.* Electroacupuncture vs prucalopride for severe chronic constipation: A multicenter, randomized, controlled, noninferiority trial [J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116(5): 1024-1035.
- [19] Pannemans J, Masuy I, Tack J. Functional constipation: Individualising assessment and treatment [J]. *Drugs*, 2020, 80(10): 947-963.
- [20] Bassotti G, Usai Satta P, Bellini M. Prucalopride for the treatment of constipation: A view from 2015 and beyond [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 13(3): 257-262.
- [21] Roerig J L, Steffen K J, Mitchell J E, *et al.* Laxative abuse: Epidemiology, diagnosis and management [J]. *Drugs*, 2010, 70(12): 1487-1503.
- [22] Batiha G E, Beshbishy A M, Ikram M, *et al.* The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin [J]. *Foods*, 2020, 9(3): E374.
- [23] Shi T L, Bian X Y, Yao Z X, *et al.* Quercetin improves gut dysbiosis in antibiotic-treated mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 8003-8013.
- [24] Yang M, Zhou Y, Wan L L, *et al.* Luteolin suppresses colonic smooth muscle motility via inhibiting L-type calcium channel currents in mice [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(1): 49-58.
- [25] 李若然, 杜长军, 武焱旻. 木犀草素对气道平滑肌细胞 PI₃ K/AKT 通路的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(35): 3896-3898.
- [26] Bian Y F, Lei J Q, Zhong J, *et al.* Kaempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 99: 108840.
- [27] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the

- MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [28] 范一宏, 张高松, 李延玲, 等. 外源性胶质细胞源性神经营养因子对慢传输型便秘大鼠胃、结肠 Akt、MAPK 表达的影响 [J]. *中华内科杂志*, 2011, 50(4): 328-332.
- [29] 万叶敏, 曾莉, 钱海华. 通便汤对 STC 大鼠模型结肠组织中 PKA/MPKA 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 135-142.
- [30] Song M, Bode A M, Dong Z, Lee MH. AKT as a therapeutic target for cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [31] 郅鹏, 黄建, 赖轶权, 等. IGF-1 诱导 PI3K-Akt 通路磷酸化对平滑肌细胞的作用 [J]. *福建医药杂志*, 2012, 34(2): 51-55.
- [32] Choi Y J, Kim J E, Lee S J, *et al*. Loperamide-induced constipation activates inflammatory signaling pathways in the transverse colon of SD rats via complement C3 and its receptors [J]. *Curr Mol Med*, 2022, 22(5): 458-469.
- [33] 李旻昊, 张国志, 袁梅, 等. 慢传输型便秘大鼠胃肠组织中 PI3K/AKT/eNOS 信号通路相关标志物的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2015, 55(19): 27-29.
- [34] Liu X J, Zhao D, Zhao S J, *et al*. Deciphering the correlations between aging and constipation by metabolomics and network pharmacology [J]. *Aging* (Albany NY), 2021, 13(3): 3798-3818.
- [35] Li Y W, Yu Y J, Fei F, *et al*. High-resolution colonic manometry and its clinical application in patients with colonic dysmotility: A review [J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7(18): 2675-2686.
- [36] Chung D, Loch Caruso R. 2, 2'-Dichlorobiphenyl decreases amplitude and synchronization of uterine contractions through MAPK1-mediated phosphorylation of GJA1 (connexin43) and inhibition of myometrial gap junctions [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 974-982.
- [37] Zhou D D, Ran J, Li C C, *et al*. Metallothionein-2 is associated with the amelioration of asthmatic pulmonary function by acupuncture through protein phosphorylation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109785.

[责任编辑 金玉洁]