

基于网络药理学和分子对接法探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的作用机制

王中华^{1,2}, 赵安兰^{1,2}, 张昀玥³, 赵圣轩³, 卓奥悉³, 周 畅³

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

3. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 目的 探讨柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的潜在分子机制。方法 通过 TCMSP 收集筛选柴胡疏肝散有效成分, 通过 PubChem 和 Swiss Target Prediction 得到柴胡疏肝散的潜在靶点, 利用 GeneCards、OMIM、DisGeNET 及 DrugBank 数据库得到功能性消化不良疾病靶点。采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建柴胡疏肝散“中药-成分-靶点-疾病”网络, 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.0 软件构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络; 利用 R 软件进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析; 运用 Autodock 软件进行分子对接, 验证网络分析结果。结果 共筛选出 132 个柴胡疏肝散有效成分和 448 个作用靶点。得到 2 244 个疾病靶点, 将功能性消化不良疾病靶点与柴胡疏肝散靶点取交集得到 233 个共同靶标。STAT3、AKT1、TP53、MAPK3、MAPK1 等为柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的关键靶点。GO 功能富集共得 3 371 个条目 ($P < 0.05$)。KEGG 通路分析共得到 182 条信号通路 ($P < 0.05$)。与功能性消化不良关系密切的有 EGFR、PI3K-Akt、TNF 和 IL-17 信号通路。结论 柴胡疏肝散可能在促进胃排空、促胃肠动力、改善抑郁状态, 减轻炎症等方面发挥协同作用, 改善功能性消化不良患者临床证候。

关键词: 柴胡疏肝散; 功能性消化不良; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)09-1794-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.09.004

Mechanism of Chaihu Shugan Powder in treatment of functional dyspepsia based on network pharmacology and molecular docking

WANG Zhong-hua^{1,2}, ZHAO An-lan^{1,2}, ZHANG Yun-yue³, ZHAO Sheng-xuan³, ZHUO Ao-xi³, ZHOU Chang³

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To reveal the molecular mechanism of Chaihu Shugan Powder in treatment of functional dyspepsia. **Methods** The effective compounds of Chaihu Shugan Powder were collected and screened by TCMSP, and the potential target of Chaihu Shugan Powder was obtained by PubChem and Swiss Target Prediction. Functional dyspepsia targets were obtained by GeneCards, OMIM, DisGeNET, and DrugBank databases. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct the network of "TCM - component - target - disease" of Chaihu Shugan Powder, and the STRING database and Cytoscape 3.8.0 software were used to construct the protein-protein interaction (PPI) network. R software was used for GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis. AutoDock software was used for molecular docking to verify the results of network analysis. **Results** Total of 132 effective compounds, 448 potential target of Chaihu Shugan Powder were screened out from the seven drugs. A total of 2 244 disease targets were screened out from the disease databases. 233 common targets were obtained by intersecting functional dyspepsia disease targets and Chaihu Shugan Powder targets. STAT3, AKT1, TP53, MAPK3, and MAPK1 are the hub targets of Chaihu Shugan Powder in treatment of functional dyspepsia. A total of 3 371 entries were obtained from GO functional enrichment ($P < 0.05$). A total of 182 signaling pathways were obtained by KEGG pathway analysis ($P < 0.05$). And EGFR, PI3K-Akt, TNF, and IL-17 signaling pathway were closely related to functional dyspepsia. **Conclusion** Chaihu Shugan Powder may promote gastric empties, improve gastroenteric movement and depression, reduce inflammation, and play a synergistic role in improving the clinical syndrome of functional dyspepsia patients.

Key words: Chaihu Shugan Powder; functional dyspepsia; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题 (2017126)

作者简介: 王中华 (1970—), 副主任药师, 硕士, 研究方向为中药化学、中药鉴定、临床药学。E-mail: tjtc928@qq.com

消化不良主要表现为上腹部疼痛、上腹部烧灼感、餐后饱胀和早饱感,此外还有恶心、呕吐及嗳气等表现。功能性消化不良是指具有慢性消化不良症状,但其临床表现不能用器质性、系统性或代谢性疾病等来解释^[1]。1 项多中心研究显示,以罗马 II 标准诊断的 1 115 例未经检查的消化不良患者,经胃镜检查后 43% 诊断为功能性消化不良^[2]。李晓波等^[3]对上海地区 782 例消化不良患者进行研究,结果显示 69% 的患者为功能性消化不良。对于功能性消化不良,西医常予对症治疗,常用药物包括质子泵抑制剂 (PPI) 或 H₂ 受体拮抗剂 (H₂RA) 以抑制胃酸^[4],多潘立酮、莫沙必利和伊托必利以促进胃动力^[5-6],根除幽门螺旋杆菌药物等^[7]。但上述药物长期应用不良反应多,且容易复发。功能性消化不良虽然不是器质性疾病,但它非常普遍,病程长、易反复,显著降低患者的生活质量,影响工作表现和家庭关系^[8]。因此积极寻找能够更有效和更经济的药物十分必要。

柴胡疏肝散临床应用广泛,能够较好地改善功能性消化不良患者的临床症状,安全有效^[9-12]。1 项 Meta 分析研究发现,柴胡疏肝散治疗功能性消化不良疗效显著,且不良反应少^[13]。柴胡疏肝散为《伤寒论》四逆散之变方,出自《证治准绳》引《医学统旨》方^[14],全方由陈皮、柴胡、川芎、香附、枳壳、白芍、甘草组成,其治疗功能性消化不良的相关机制仍未完全明确。

网络药理学是一种基于“疾病-基因-靶点-药物”交互的网络,从系统、综合的角度分析药物对疾病的干预和治疗作用,揭示药物对人体的复杂机制^[15]。这与中药多成分、多途径、多靶点的协同机制不谋而合。分子对接能够计算小分子与靶蛋白的结合电位,被广泛应用于计算机辅助药物发现^[16]。本研究采用网络药理学的方法筛选柴胡疏肝散有效成分及靶点,分析其治疗功能性消化不良的主要有效成分、关键靶点和信号通路。

1 方法

1.1 柴胡疏肝散有效成分的收集及靶点预测

柴胡疏肝散由陈皮、柴胡、川芎、香附、枳壳、白芍、甘草 7 味药组成,采用中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 收集柴胡疏肝散主要化学成分。生物利用度 (oral bioavailability, OB) 是口服药物的主要药动学参数,是口服药物剂量在体循环中的比例^[17]。类药

性 (drug-likeness, DL) 用于定性地评价化合物是否与现有药物有相似的物理和化学性质^[18]。

本研究以 OB $\geq$ 30% 和 DL $\geq$ 0.18 为依据筛选柴胡疏肝散的有效成分。同时通过 TCMSP 下载有效成分对应的药物靶标。对在 TCMSP 上找不到药物靶标的有效成分,利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载其 SMILES,将获得的 SMILES 导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中预测它们的药物靶标。然后将全部所得的药物靶标输入到 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中,设定蛋白种类为“Homo sapiens”,将所有得到的药物靶标校正为其官方名称 (official symbol)。

1.2 功能性消化不良疾病的相关靶标的收集和柴胡疏肝散治疗功能性消化不良作用靶点的筛选

利用 GeneCards 数据库 (<https://www.GeneCards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 和 DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 检索“functional dyspepsia”获取功能性消化不良的相关靶点,根据 Relevance score $>$ 1 和 Score gda $>$ 0.05 筛选与功能性消化不良相关的靶点。然后与柴胡疏肝散有效成分的对应的药物靶点取交集,最终获得柴胡疏肝散作用于功能性消化不良的靶点,以 Venn 图的形式展现交集靶点。

1.3 柴胡疏肝散成分与靶点的网络构建及分析

将柴胡疏肝散有效成分信息及功能性消化不良相关靶标导入 Cytoscape 3.8.0 软件,构建柴胡疏肝散成分与靶点的网络图,然后通过插件 CytoNCA 分析网络的特征,计算节点的度中心性 (degree centrality, DC),直观和准确地探索中药干预功能性消化不良的主要和次要有效成分。

1.4 PPI 网络的构建及分析

将柴胡疏肝散作用于功能性消化不良的靶点导入 STRING version:11.0 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。将蛋白互作信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建 PPI 网络并进行拓扑分析,根据 DC、中介中心性 (betweenness centrality, BC) 筛选核心作用靶点。

1.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 R 软件 version:3.3.2 的“org.Hs.eg.db”

“DOSE”“enrichplot”等数据包对将柴胡疏肝散作用于功能性消化不良的靶蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能分析, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 根据 P 值, 取排名前 10 的不同生物学过程条目绘制柱状图。同时进行基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为显著富集筛选条件, 得到柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的主要作用通路。根据 P 值, 取排名前 10 的不同生物学过程条目绘制柱状图, 根据 P 值, 选择排名前 30 的信号通路绘制柱状图。

1.6 分子对接

从 Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) 中下载拓扑分析中排名前 5 的核心蛋白, STAT3 (PDB ID: 6njs)、AKT1 (PDB ID: 3qkl)、TP53 (PDB ID: 7bwn)、MAPK3 (PDB ID: 4qtb)、MAPK1 (PDB ID: 4zzn) 的晶体结构。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载了中网络图中度值排名前 7 的化合物的结构, 通过软件 Chem3D Ultra 14.0 将化合物结构转化为三维结构, 并采用 MM2 算法进行能量最小化处理, 最小 RMS 收敛参数设置为 0.01。然后使用 PyMOL 软件, 对这 5 种靶蛋

白受体进行脱水和去除有机物等处理。通过 AutoDockTools 1.5.6 对靶蛋白受体分子进行加氢、计算电荷等处理, 并将化合物和靶蛋白受体转换为“pdbqt”文件, 并设置合适的盒子中心以及盒子格点参数。最后, 运行 Vina 1.5.6 评估分子对接。通过 Ligplot 软件将每个核心靶蛋白与化合物结合力最好的对接结果进行 2D 图展示。

2 结果

2.1 柴胡疏肝散有效成分的收集及靶点预测

通过 TCMSP 平台检索, 以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为标准筛选出有效成分 157 个, 其中陈皮 5 个、柴胡 17 个、川芎 7 个、香附 18 个、枳壳 5 个、白芍 13 个、甘草 92 个。1 味药包含多个有效成分, 同一个有效成分可以来自多味药, 表明不同中药之间具有共同化合物, 配伍使用具有协同增效的作用, 删除有效成分中的重复项和不能在 UniProt 数据库找到 official symbol 的有效成分后, 最终得到 132 个有效成分, 见表 1。通过检索 TCMSP 平台和 Swiss Target Prediction 数据库并且能在 UniProt 数据库能成功得到 official symbol 的药物靶标 2 937 个, 其中陈皮 82 个、柴胡 399 个、川芎 36 个、香附 428 个、枳壳 103 个、白芍 389 个、甘草 1 500 个。删除靶点重复项后, 得到个 448 个药物靶点。

表 1 柴胡疏肝散中部分活性成分的信息

Table 1 Basic information of part of active compounds of Chaihu Shugan powder

编号	化学成分名称	靶点数	OB/%	DL	药物来源
MOL000098	quercetin	138	46.43	0.28	柴胡、甘草、香附
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	100	64.77	0.38	白芍
MOL001928	albiflorin_qt	68	66.64	0.33	白芍
MOL001925	paeoniflorin_qt	60	68.18	0.40	白芍
MOL000422	kaempferol	55	41.88	0.24	白芍、柴胡、甘草、香附
MOL000006	luteolin	54	36.16	0.25	香附
MOL004628	octalupine	39	47.82	0.28	柴胡
MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone	37	42.56	0.20	甘草
MOL004328	naringenin	35	59.29	0.21	陈皮、甘草、枳壳
MOL001921	lactiflorin	32	49.12	0.80	白芍
MOL000392	formononetin	32	69.67	0.21	甘草
MOL005828	nobiletin	30	61.67	0.52	陈皮、枳壳
MOL000497	licochalcone a	30	40.79	0.29	甘草
MOL004071	hyndarin	29	73.94	0.64	香附
MOL000354	isorhamnetin	29	49.60	0.31	柴胡、甘草、香附

续表 1

编号	化学成分名称	靶点数	OB/%	DL	药物来源
MOL002565	medicarpin	28	49.22	0.34	甘草
MOL000358	beta-sitosterol	28	36.91	0.75	白芍、香附、枳壳
MOL000449	stigmasterol	27	43.83	0.76	柴胡、香附
MOL004978	4'-methoxyglabridin	26	36.21	0.52	甘草
MOL004891	shinpterocarpin	26	80.30	0.73	甘草
MOL000500	vestitol	26	74.66	0.21	甘草
MOL005003	licoagrocarpin	25	58.81	0.58	甘草
MOL004835	glypallichalcone	25	61.60	0.19	甘草
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	25	31.27	0.75	白芍
MOL004974	3'-methoxyglabridin	24	46.16	0.57	甘草
MOL004957	HMO	24	38.37	0.21	甘草
MOL004966	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	23	43.71	0.57	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	23	69.98	0.64	甘草
MOL004908	glabridin	23	53.25	0.47	甘草
MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	22	38.04	0.39	香附
MOL002135	myricanone	22	40.60	0.51	川芎
MOL004991	7-acetoxy-2-methylisoflavone	22	38.92	0.26	甘草
MOL005007	glyasperins M	21	72.67	0.59	甘草
MOL004644	sainfuran	21	79.91	0.23	柴胡
MOL004833	phaseolinisoflavan	20	32.01	0.45	甘草
MOL004828	glepidotin A	20	44.72	0.35	甘草
MOL004811	glyasperin C	20	45.56	0.40	甘草
MOL005016	odoratin	19	49.95	0.30	甘草
MOL004849	licoarylcoumarin	19	59.62	0.43	甘草
MOL000417	calycosin	19	47.75	0.24	甘草
MOL004912	glabrone	18	52.51	0.50	甘草
MOL004857	gancaonin B	18	48.79	0.45	甘草
MOL004820	kanzonol W	18	50.48	0.52	甘草
MOL004815	kanzonol B	18	39.62	0.35	甘草
MOL002776	baicalin	18	40.12	0.75	柴胡
MOL004911	glabrene	17	46.27	0.44	甘草
MOL004885	licoisoflavanone	17	52.47	0.54	甘草
MOL004864	gancaonin M	17	30.49	0.41	甘草
MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	17	60.25	0.63	甘草
MOL004808	glyasperin B	17	65.22	0.44	甘草
MOL003656	lupiwighteone	17	51.64	0.37	甘草

续表 1

编号	化学成分名称	靶点数	OB/%	DL	药物来源
MOL005020	dehydroglyasperins C	16	53.82	0.37	甘草
MOL004961	quercetin der.	16	46.45	0.33	甘草
MOL004915	eurycarpin A	16	43.28	0.37	甘草
MOL004856	gancaonin A	16	51.08	0.40	甘草
MOL004841	licochalcone B	16	76.76	0.19	甘草
MOL004702	saikosaponin c _{qt}	16	30.50	0.63	柴胡
MOL003044	chryseriol	16	35.85	0.27	香附
MOL005012	licoagroisoflavone	15	57.28	0.49	甘草
MOL005000	gancaonin G	15	60.44	0.39	甘草
MOL004907	glyzaglabrin	15	61.07	0.35	甘草
MOL004883	licoisoflavone	15	41.61	0.42	甘草
MOL004848	licochalcone G	15	49.25	0.32	甘草
MOL004810	glyasperin F	15	75.84	0.54	甘草
MOL001484	inermine	15	75.18	0.54	甘草
MOL005008	glycyrrhiza flavonol A	14	41.28	0.60	甘草
MOL004863	gancaonin L	14	66.37	0.41	甘草
MOL004827	semilicoisoflavone B	14	48.78	0.55	甘草
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	13	83.71	0.27	甘草
MOL004884	licoisoflavone B	13	38.93	0.55	甘草
MOL004879	glycyrin	13	52.61	0.47	甘草
MOL004866	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	13	44.15	0.41	甘草
MOL004609	areapillin	13	48.96	0.41	柴胡
MOL000239	jaranol	13	50.83	0.29	甘草
MOL004980	inflacoumarin A	12	39.71	0.33	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	12	45.17	0.42	甘草
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	12	71.12	0.18	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	12	80.36	0.65	甘草
MOL005017	phaseol	11	78.77	0.58	甘草
MOL004898	5-prenylbutein	11	46.27	0.31	甘草
MOL004855	licoricone	11	63.58	0.47	甘草
MOL004829	glepidotin B	11	64.46	0.34	甘草
MOL004814	isotrifoliol	11	31.94	0.42	甘草
MOL004945	isobavachin	10	36.57	0.32	甘草
MOL004805	shinflavanone	10	31.79	0.72	甘草
MOL001792	DFV	10	32.76	0.18	甘草
MOL000492	(+)-catechin	10	54.83	0.24	白芍
MOL005001	gancaonin H	9	50.10	0.78	甘草
MOL004913	hedysarimcoumestan B	9	48.14	0.43	甘草
MOL004648	troxerutin	9	31.60	0.28	柴胡

续表 1

编号	化学成分名称	靶点数	OB/%	DL	药物来源
MOL004598	3',4',5',3,5,6,7-heptamethoxyflavone	9	31.97	0.59	柴胡
MOL004053	isodalbergin	9	35.45	0.20	香附
MOL002311	glycyrol	9	90.78	0.67	甘草
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c] chromenone	8	62.90	0.53	甘草
MOL004806	euchrenone	8	30.29	0.57	甘草
MOL000490	petunidin	8	30.05	0.31	柴胡
MOL005815	citromitin	7	86.90	0.51	陈皮
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	7	47.74	0.27	陈皮
MOL004993	8-prenylated eriodictyol	7	53.79	0.40	甘草
MOL004989	6-prenylated eriodictyol	7	39.22	0.41	甘草
MOL004910	glabranin	7	52.90	0.31	甘草
MOL004882	licocoumarone	7	33.21	0.36	甘草
MOL002341	hesperetin	7	70.31	0.27	枳壳
MOL005018	xambioona	6	54.85	0.87	甘草
MOL004988	kanzonol F	6	32.47	0.89	甘草
MOL004948	isoglycyrol	6	44.70	0.84	甘草
MOL004058	khell	6	33.19	0.19	香附
MOL004935	sigmoidin-B	5	34.88	0.41	甘草
MOL004903	liquiritin	5	65.69	0.74	甘草
MOL004838	kanzonol U	5	58.44	0.38	甘草
MOL004077	sugeonyl acetate	5	45.08	0.20	香附
MOL013187	cubebin	4	57.13	0.64	柴胡
MOL010489	resivit	4	30.84	0.27	香附
MOL002157	wallichilide	4	42.31	0.71	川芎
MOL001924	paeoniflorin	4	53.87	0.79	白芍
MOL001645	linoleyl acetate	4	42.1	0.20	柴胡
MOL013381	marmin	3	38.23	0.31	枳壳
MOL004718	α -spinasterol	3	42.98	0.76	柴胡
MOL004653	(+)-anomalin	3	46.06	0.66	柴胡
MOL004624	longikaurin A	3	47.72	0.53	柴胡
MOL001494	mandenol	3	42.00	0.19	川芎
MOL000359	sitosterol	3	36.91	0.75	白芍、陈皮、川芎、甘草、 香附
MOL004924	(-)-medicocarpin	2	40.99	0.95	甘草
MOL004074	stigmasterol glucoside_qt	2	43.83	0.76	香附
MOL002140	perlolyrine	2	65.95	0.27	川芎
MOL001919	palbinone	2	43.56	0.53	白芍
MOL000433	FA	2	68.96	0.71	川芎
MOL004996	gadelaidic acid	1	30.70	0.20	甘草
MOL004985	icos-5-enoic acid	1	30.70	0.20	甘草
MOL004068	rosenonolactone	1	79.84	0.37	香附
MOL001918	paeoniflorgenone	1	87.59	0.37	白芍
MOL000211	mairin	1	55.38	0.78	白芍、甘草

2.2 功能性消化不良疾病的相关靶标的收集及柴胡疏肝散治疗作用靶点的筛选

通过筛选 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DisGeNET 数据库及 DrugBank 数据库的检索结果,共得到 2 244 个功能性消化不良相关靶点。与柴胡疏肝散有效化合物的药物靶点取交集,最终获得 233 个柴胡疏肝散作用于功能性消化不良的靶点,见图 1。

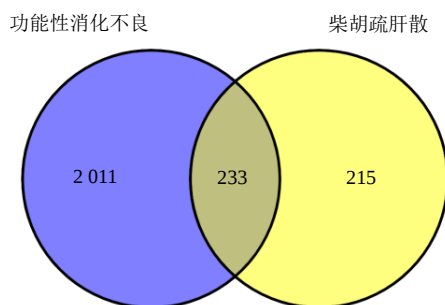


图 1 药物靶点与疾病靶点的交集靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of drug targets and disease targets

2.3 柴胡疏肝散成分与靶点的网络构建及分析

通过 Cytoscape 3.8.0 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”网络图,如图 2。网络图中可以直观展示具体节点的拓扑学特征,也可以表现生物相互作用的一般特征,该图共有 370 个节点和 1 501 条边(128 个药物活性成分,233 个交集靶点,8 个药物名称和 1 个疾病名称),表明柴胡疏肝散中有 128

个有效成分作用于功能性消化不良的靶点。其中节点面积越大代表其度值(degree)越大,节点在网络中越重要。节点之间连线表明药物有效成分与疾病靶点之间的靶向关系。

2.4 PPI 网络的构建及分析

将在 STRING 中得到数据导入 Cytoscape 软件中构建网络图,选择 minimum required interaction score 为 highest confidence 0.900 节点,并祛除游离节点,共祛除 19 个节点,得到 214 个节点和 1 291 条边。利用插件 CytoNCA 计算 214 个靶蛋白的 DC,统计 DC 中位值为 10,选取 DC20 的靶蛋白共计 38 个,创建子网络,得到 38 个节点和 601 条边。再次利用插件 CytoNCA 进行拓扑分析,计算子网络中 38 个靶蛋白的 BC,统计 BC 中位值为 31.6,筛选出 BC≥31.6 的靶蛋白共计 10 个,创建网络,结果如图 3,得到 10 个节点和 235 条边。这 10 个靶蛋白可能就是柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的关键靶蛋白。

2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

利用 R 软件 version:3.3.2 的“org.Hs.eg.db”“DOSE”“enrichplot”等数据包对柴胡疏肝散有效作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析。根据 $P<0.05$ 确定了 3 371 个 GO 条目,其中包括 BP 3 046 个条目,CC 97 个条目,MF 228 个条目,根据 $P<0.05$,分别取排名前 10 的条目绘制柱状图进行可视化分析,如图 4 所示。

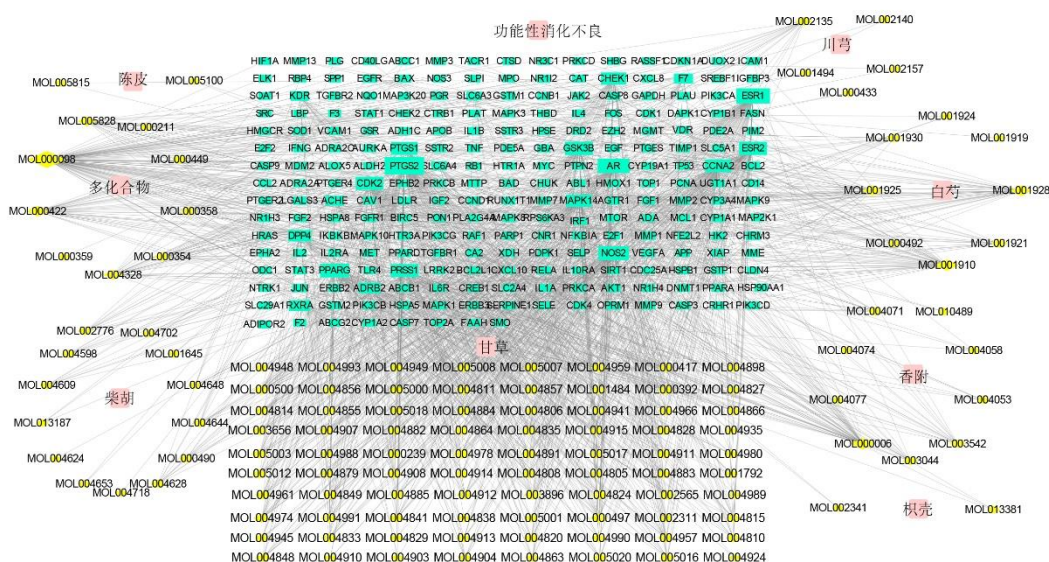


图 2 柴胡疏肝散“中药-成分-靶点-疾病”网络图

Fig. 2 Chaihu Shugan powder “drugs-compounds-potential targets-disease” network

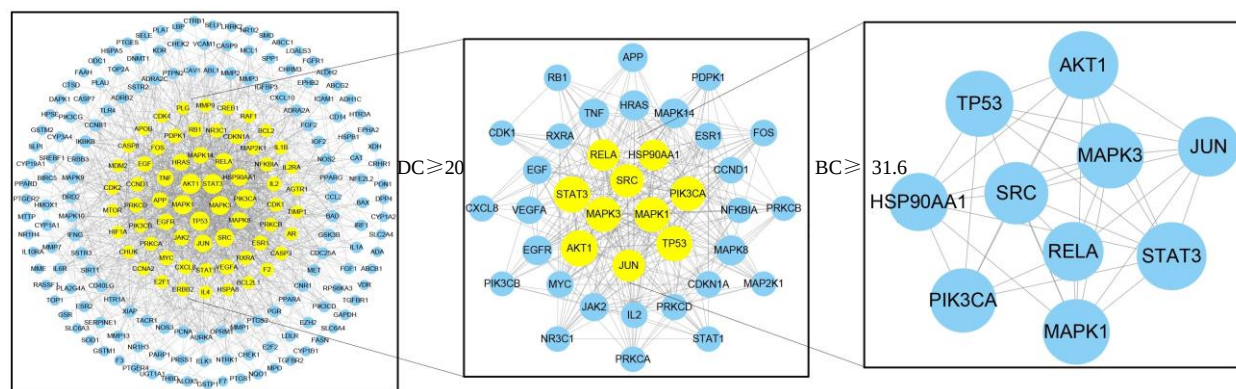


图 3 柴胡疏肝散治疗功能性消化不良靶点 PPI 网络分析

Fig. 3 Topological network of Chaihu Shugan powder for the treatment of functional dyspepsia

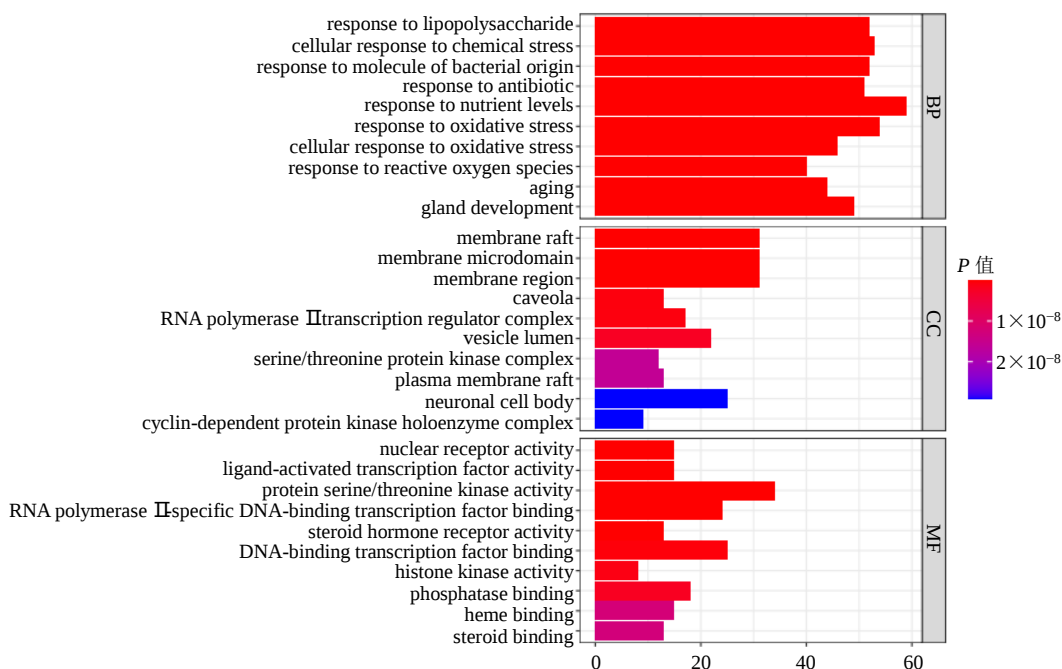


图 4 GO 功能富集分析结果柱状图

Fig. 4 GO functional enrichment analysis

进行 KEGG 富集分析, 结果显示 $P < 0.05$, 有 182 条柴胡疏肝散治疗功能性消化不良作用靶点的通路。根据 $P < 0.05$, 取排名前 30 条信号通路绘制柱状图, 如图 5 所示。

2.6 分子对接

将网络图中度值排名前 7 的化合物与中下载拓扑分析中排名前 5 的核心蛋白进行分子对接。当结合能 < 0 kJ/mol 时, 认为分子蛋白质自发结合并相互作用。且结合能越低, 分子构象越稳定^[19]。若结合能 < -20.92 kJ/mol, 表明两者具有较好的结合性, 结合力结果统计如表 2 所示。分别将 5 个靶点所对应结合能最高的化合物的分子对接结果进行 2D 图

展示, 如图 6。分子对接 2D 图直观展示靶蛋白受体与化合物的结合模式以及与周围氨基酸残基的相互作用。靶蛋白 STAT3、MAPK3 与槲皮素之间的主要作用力为氢键。靶蛋白 AKT1、TP53、MAPK1 与木犀草素之间的主要作用力为氢键和疏水作用。

3 讨论

功能性消化不良的危险因素包括心理共病、急性胃肠炎、女性、吸烟、使用非甾体抗炎药物、幽门螺杆菌感染等。其病理生理学尚不完全清楚, 但它可能与肠道和大脑之间的通信障碍有关, 导致胃肠运动障碍、内脏超敏性、胃肠道微生物群、黏膜和免疫功能的改变^[20]。

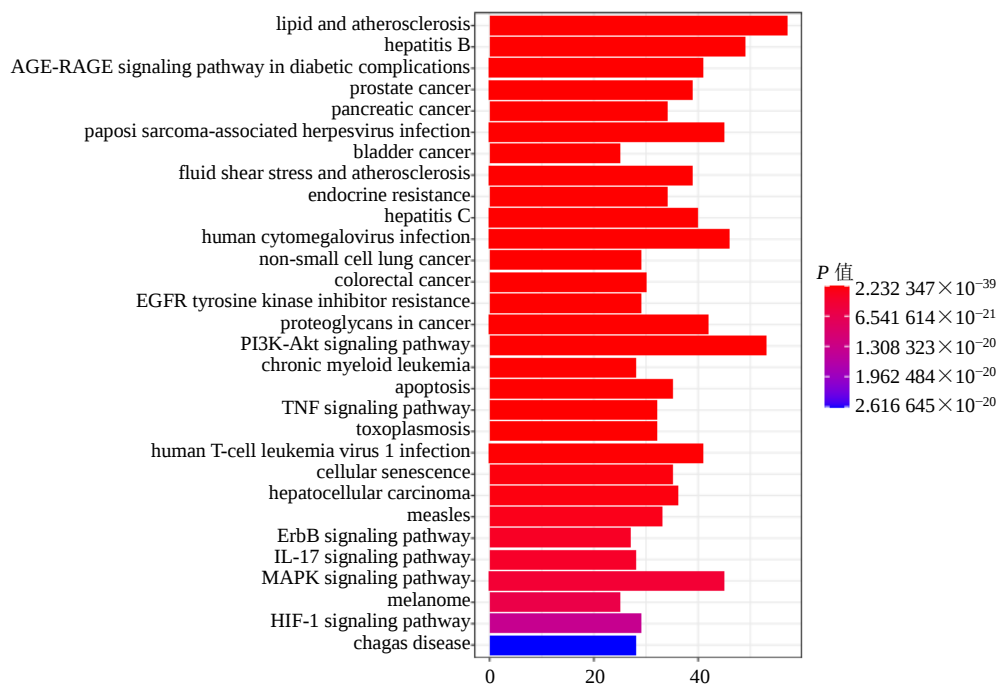


图 5 KEGG 功能富集分析结果柱状图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

表 2 关键化合物-核心靶点结合能

Table 2 inding energies of key active compounds with core targets

化合物	结合能/(kJ mol ⁻¹)				
	STAT3	AKT1	TP53	MAPK3	MAPK1
木犀草素	-33.47	-36.40	-36.40	-39.75	-33.89
槲皮素	-34.31	-35.15	-35.98	-38.91	-31.38
芍药苷	-26.78	-34.31	-33.05	-37.24	-32.22
柚皮素	-33.05	-34.31	-35.98	-39.33	-33.05
山柰酚	-33.47	-33.89	-35.98	-38.49	-32.22
芍药内酯苷	-26.78	-32.64	-32.64	-36.82	-32.64
川陈皮素	-27.61	-32.22	-31.80	-35.56	-28.87

有研究表明,柴胡疏肝散能够很好地改善功能性消化不良肝气郁结证患者临床证候,促进胃排空,降低内脏敏感性,改善胃肠激素水平,改善抑郁症状^[21-23]。柴胡疏肝散临床应用广泛,为了深入研究柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的作用机制,本研究采用网络药理学的方法筛选出柴胡疏肝散中 132 个有效成分对应 448 个靶点,其中 233 个靶点与功能性消化不良相关。

通过分析“中药-成分-靶点-疾病”网络图发现有 128 个有效成分作用于 233 个交集靶点,其中槲皮素、木犀草素、山柰酚、芍药内酯苷、芍药苷、柚皮素、川陈皮素的 degree 较高,对应的靶蛋

白较多,是柴胡疏肝散治疗功能性消化不良的主要有效成分。其中槲皮素具有最高的 degree,本方中的槲皮素来自柴胡、甘草、香附,槲皮素具有舒张胃肠平滑肌的作用^[24],研究发现槲皮素可改善肠上皮细胞通透性^[25]。幽门螺杆菌感染是功能性消化不良的危险因素之一,有研究表明,槲皮素能够通过影响 p38 丝裂原活化蛋白激酶、Bcl-2 和 Bax 的水平以使幽门螺杆菌感染相关的细胞凋亡^[26]。木犀草素来自香附,木犀草素能抑制结肠平滑肌运动和 Ca²⁺ 电流,具有一定的止泻作用^[27]。有研究报道木犀草素可以抑制幽门螺杆菌的生长^[28]。山柰酚在幽门螺杆菌感染引起的炎症反应中具有抗炎作用^[29]。

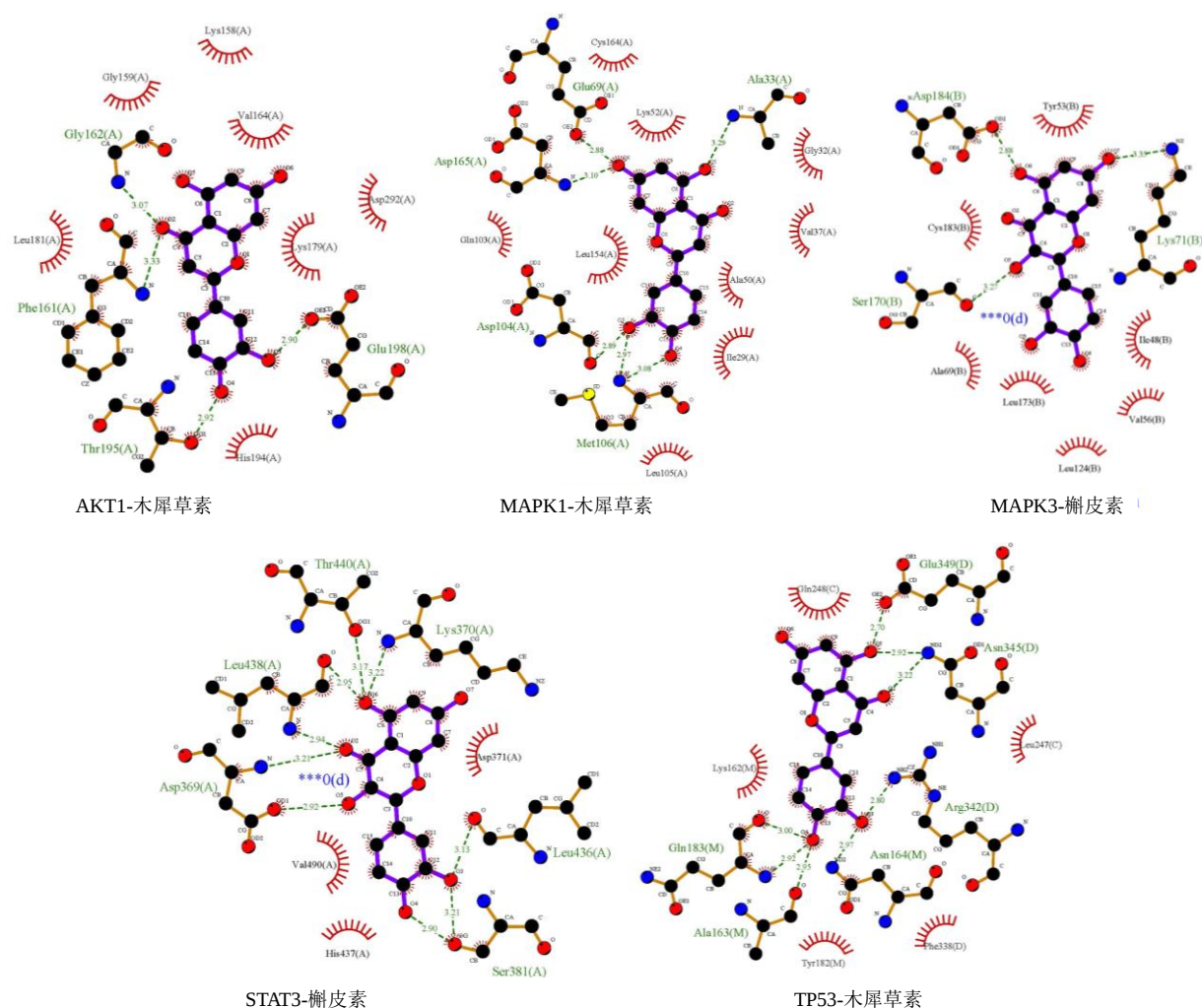


图 6 化合物-靶蛋白结合模式图

Fig. 6 Molecular docking patterns of components with five proteins

精神心理因素是导致功能性消化不良的机制之一，山柰酚可显著改善慢性应激抑郁模型老年大鼠的抑郁样行为，保护神经^[30]。芍药内酯苷及芍药苷作为白芍的主要有效成分，可能通过对脑内单胺类神经递质及环核苷酸的调节作用来抵抗肝郁状态^[31]。枳壳具有促进胃肠运动的作用^[32]。陈皮能够促进小鼠胃排空和肠推进^[33]，川陈皮素是陈皮促胃肠动力的活性物质之一^[34]。白芍对结肠平滑肌有直接兴奋作用^[35]。香附通过抑制胃排空而促进肠传输^[36]。柚皮素是功能性消化不良患者口服四逆散汤剂后吸收收入血的成分，能促进正常大鼠胃肠动力^[37]。

本研究通过分析 PPI 核心网络结果，排名前 10 位的核心靶点分别为转录激活因子 3 (STAT3)、AKT1、TP53、MAPK3、MAPK1、PIK3CA、SRC、JUN、RELA、HSP90AA1。STAT3 是 STAT 家族的

重要成员。国外有研究表明，经葡聚糖硫酸钠造模处理的小鼠，其结肠炎严重程度与活化酪氨酸激酶 (JAK) 和 STAT3 的过度激活密切相关^[38]。AKT 又称蛋白激酶 B，是 PI3K/AKT 信号通路中的关键成员^[39]。AKT 家族主要有 3 个亚型：AKT1 (PKB α)、AKT2 (PKB β) 和 AKT3 (PKB γ)，3 者之间关系紧密，与抑制细胞凋亡、细胞增殖、细胞转移及血管生成等多个过程有关^[40]。MARK 是丝裂原活化蛋白激酶，ERK1/2、p38 MAPK 是 MAPK 信号通路的重要成员，分别具有调控细胞的生长与分化，以及调节炎症与细胞凋亡等应激反应的作用^[41]。SRC 蛋白具有促进胃癌细胞增殖、肿瘤血管生成、参与癌细胞黏附和侵袭、通过生长因子受体与生长因子相互作用共同调节肿瘤生长等作用^[42]。有研究表明，针刺能通过干预 JNK 信号转导通路的主要底物 c-

Jun 的蛋白表达水平而发挥在急性应激下的早期抗抑郁效应^[43]。

GO 及 KEGG 富集分析表明生物过程主要涉及对脂多糖、细胞对化学应激的反应、对细菌源分子的反应等；细胞成分中在膜筏、膜微结构域、膜区、小窝等靶点富集显著。分子功能中与核受体的活动、配体激活的转录因子活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等相关性最大。进行 KEGG 富集分析，其中 EGFR、PI3K-AKT、TNF、IL-17 信号通路等通路富集的基因较多。EGF 与动物肠道结构和功能密切相关，其具有促进肠道发育、修复受损肠道组织、影响肠道各种酶活性、提高营养物质消化吸收、抑制肠道细菌定植等作用^[44]。PI3K 是 EGF 介导的最主要信号转导通路之一，AKT 是 PI3K 下游靶点，能够激活和调控许多下游分子目标。柴胡疏肝散可能通过调控凋亡相关蛋白表达及 PI3K/PDK1/AKT 信号通路减少由阳明腑实证引起的胃 Cajal 间质细胞凋亡，从而改善胃肠功能^[45]，证实本研究有效成分和靶点分析的结果相吻合。有学者在动物模型研究中直接提出炎症细胞因子可抑制胃排空过程^[46]。有研究发现，功能性消化不良患者血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL) -1 β 和 IL-10 水平均显著升高^[47]。另外有研究发现，IL-17F 6400A/G 基因多态性与慢性萎缩性胃炎的发生风险显著相关^[48]。

分子对接结果表明包括槲皮素、木犀草素、山柰酚、芍药内酯苷、芍药苷、柚皮素和川陈皮素与核心靶蛋白 STAT3、AKT1、TP53、MAPK3、MAPK1 均具有很强的结合活性，提示柴胡疏肝散可能是通过调节这些关键靶点发挥其药理作用的。

综上所述，本研究通过网络药理学和分子对接，初步阐明了柴胡疏肝散多成分、多靶点和多途径治疗功能性消化不良的作用特点。槲皮素、木犀草素、山柰酚、芍药内酯苷、芍药苷、柚皮素、川陈皮素调节大部分与功能性消化不良相关的靶点。柴胡疏肝散抗功能性消化不良通路网络中的关键靶基因为 STAT3、AKT1、TP53、MAPK3、MAPK1。柴胡疏肝散可能通过 EGFR、PI3K-AKT、TNF、IL-17 等信号通路促进胃排空，促胃肠动力，改善抑郁状态，减轻炎症改善患者临床证候。本研究结果可为柴胡疏肝散的进一步开发应用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组, 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组. 中国功能性专家共识意见(2015 年, 上海) [J]. 中华消化杂志, 2016, 36(4): 217-229.
- [2] Kwan A C, Bao T, Chakkaphak S, *et al.* Validation of Rome II criteria for functional gastrointestinal disorders by factor analysis of symptoms in Asian patient sample [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(7): 796-802.
- [3] 李晓波, 刘文忠, 戈之铮, 等. 上海地区消化不良症状临床特点分析 [J]. 中华消化杂志, 2005, 25(3): 142-145.
- [4] 柯美云. 中国消化不良的诊治指南(2007 大连) [J]. 胃肠病学, 2008, 13(2): 114-117.
- [5] 中国功能性消化不良专家共识意见(2015 年, 上海) [J]. 中华消化杂志, 2016, 36(4): 217-229.
- [6] 蒋琦, 丁小云, 章四杰, 等. 莫沙必利和泮托拉唑治疗功能性消化不良的对照研究 [J]. 胃肠病学, 2011, 16(9): 547-550.
- [7] Kang S J, Park B, Shin C M. *Helicobacter pylori* eradication therapy for functional dyspepsia: a meta-analysis by region and H. pylori prevalence [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): E1324.
- [8] El-Serag H B, Talley N J. Systemic review: The prevalence and clinical course of functional dyspepsia [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 19(6): 643-654.
- [9] 潘丰满. 柴胡疏肝散治疗功能性消化不良 67 例临床观察 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(22): 1-2.
- [10] 门长英. 柴胡疏肝散治疗功能性消化不良肝胃不和证的临床观察 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(11): 313-314.
- [11] 娄秀生. 柴胡疏肝散加减治疗肝胃不和型功能性消化不良的临床疗效 [J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(33): 116-117.
- [12] 贾爱南. 柴胡疏肝散加减治疗肝胃不和型功能性消化不良的临床观察 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(6): 66-67.
- [13] 苏晓玉, 陈勇毅. 柴胡疏肝散治疗功能性消化不良 Meta 分析 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(4): 384-386.
- [14] 贾波, 李冀. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 83.
- [15] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [16] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): 1-11.

- e83922.
- [17] Xu X, Zhang W X, 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.
- [18] Wang W J, Liu T L, Yang L D, *et al.* Study on the multi-targets mechanism of triphala on cardio-cerebral vascular diseases based on network pharmacology [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2019, 116: 108994.
- [19] Liu W, Fan Y H, Tian C Y, *et al.* Deciphering the molecular targets and mechanisms of HGWD in the treatment of rheumatoid arthritis via network pharmacology and molecular docking [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7151634.
- [20] Ford A C, Mahadeva S, Carbone M F, *et al.* Functional dyspepsia [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1689-1702.
- [21] 刘 汶, 范 萌, 陈言言, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良肝气郁结证患者胃动力及胃肠激素的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 30-33.
- [22] 敖海清, 徐志伟, 严 灿, 等. 柴胡疏肝散及逍遥散对慢性心理应激大鼠血清皮质酮及胃肠激素的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4): 288-291.
- [23] 周 洲, 凌江红, 徐 宽, 等. 柴胡疏肝散对功能性消化不良大鼠胃排空的促进作用及机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(37): 5-8.
- [24] 黄伟锋, 欧阳守, 林燕飞, 等. 槲皮素对胃肠运动的影响及其机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(18): 1815-1820.
- [25] 刘丽娜, 孙志广, 蔡雪婷, 等. 槲皮素改善 TNF- α 诱导的肠上皮 Caco-2 细胞功能障碍 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(6): 541-545.
- [26] Zhang S, Huang J, Xie X Q, *et al.* Quercetin from *Polygonum capitatum* protects against gastric inflammation and apoptosis associated with *Helicobacter pylori* infection by affecting the levels of p38MAPK, BCL-2 and BAX [J]. *Molecules*, 2017, 22(5): E744.
- [27] 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.
- [28] Chung J G, Hsia T C, Kuo H M, *et al.* Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(3): 191-198.
- [29] Yeon M J, Lee M H, Kim D H, *et al.* Anti-inflammatory effects of kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(1): 166-173.
- [30] 梁玉雕, 谭友果, 张 莎, 等. 山柰酚对慢性应激抑郁模型老年大鼠抑郁样行为的影响及机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(24): 4028-4030.
- [31] 赵丹萍, 张建军, 王 旭, 等. 芍药内酯苷、芍药苷对慢性束缚应激肝郁模型大鼠海马单胺类神经递质及 cAMP、cGMP 的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13(1): 146-150.
- [32] 官福兰, 王如俊, 王建华. 枳壳及辛弗林对小鼠胃排空、小肠推进功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(11): 1001-1003.
- [33] 李 伟, 郑天珍, 瞿颂义, 等. 陈皮对小鼠胃排空及肠推进的影响 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(2): 22-23.
- [34] 宋玉鹏, 陈海芳, 胡源祥, 等. 陈皮及其主要活性成分对脾虚模型大鼠血清胃泌素、血浆乙酰胆碱、P 物质、胃动素和血管活性肠肽的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3): 79-83.
- [35] 李建军, 杨小军, 轩原清史, 等. 清胰汤对豚鼠离体结肠平滑肌收缩活动的影响 [J]. 山东中医杂志, 2002, 21(3): 174-176.
- [36] 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 等. 15 味中药促胃肠动力作用的筛选研究 [J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 436-438.
- [37] Huang X, Xu J J, He J, *et al.* Pharmacokinetic study of the prokinetic ABCs liquiritigenin, naringenin and hesperitin following the oral administration of Si-Ni-San decoction to functional dyspepsia patients [J]. *Xenobiotica*, 2019, 49(6): 708-717.
- [38] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, *et al.* Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges [J]. *Gene*, 2002, 285(1/2): 1-24.
- [39] D'Oria R, Laviola L, Giorgino F, *et al.* PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia [J]. *Pregnancy Hypertens*, 2017, 10: 107-112.
- [40] 刘红兵, 张皓渝, 林兆博, 等. PTEN/PI3K/AKT 信号通路系统与胃癌研究进展 [J]. 中国现代普通外科进展, 2020, 23(3): 244-247.
- [41] 李姿慧, 王 键, 蔡荣林, 等. 参苓白术散通过 ERK/p38 MAPK 信号通路干预溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 AQP3、AQP4 的表达 [J]. 中成药, 2015, 37(9): 1883-1888.
- [42] 何晨晨, 唐 波, 董 慧, 等. Src 在胃癌腹腔转移多细胞团簇抗失巢凋亡中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(22): 2157-2162.
- [43] 郭 郁, 包伍叶, 图 娅, 等. 针刺对强迫游泳应激抑郁模型大鼠海马半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3、c-Jun 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(3): 241-246.
- [44] 刘淑杰, 徐子伟, 齐珂珂, 等. 表皮生长因子对肠道功

- 能调控的研究 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(3): 565-570.
- [45] 张延丽, 陈 暘, 杨 诚, 等. 疏肝理气法通过 PI3K/PDK1/Akt 信号通路调控胃 Cajal 间质细胞凋亡的机制研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(19): 1906-1910.
- [46] Süő G, Király A, Taché Y. Interleukin 1 beta inhibits gastric emptying in rats: mediation through prostaglandin and corticotropin-releasing factor [J]. *Gastroenterology*, 1994, 106(6): 1568-1575.
- [47] Liebrechts T, Adam B, Bredack C, *et al.* Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(6): 1089-1098.
- [48] 罗 媛, 郭 红, 边 巍, 等. IL-17 多态性与慢性萎缩性胃炎的相关性研究 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 525-528.

[责任编辑 高 源]