

基于网络药理学和分子对接技术探讨异功散治疗小儿厌食症的作用机制

李丹¹, 刘斯琪², 陶嘉悦², 汪静², 侯金才^{1*}, 王如峰^{2*}

1. 京津冀联创药物研究(北京)有限公司, 北京 100025

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

摘要: **目的** 通过网络药理学和分子对接技术探讨异功散治疗小儿厌食症的主要成分及作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库查找异功散中口服利用度和类药性符合要求的化合物, 并通过 PubChem、UniProt 数据库获得其已知靶点。通过 GeneCards、OMIM、NCBI Gene、DisGeNET、TTD 数据库获得小儿厌食症相关靶点。将异功散和小儿厌食症靶点取交集, 并构建蛋白质相互作用(PPI)网络。通过中心度值、紧密中心度值、节点连接度值进一步筛选出关键靶点。将关键靶点蛋白进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用 PyMOL 和 AutoDock Vina 软件将关键靶点和化合物进行分子对接。**结果** 异功散中共获得 139 个符合条件的化合物, 相对应 781 个靶点, 小儿厌食症共获得靶点 2 278 个, 二者交集为 369 个靶点。通过 PPI 网络构建得到 66 个关键靶点, 关键靶点的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析得出生长因子应答、转录调节、癌症通路和蛋白磷酸化通路等生化过程和信号通路与异功散治疗小儿厌食症具有相关性。分子对接结果表明山柰酚、槲皮素、柚皮素、戈米辛 B、12-异戊烯酰基-2E,8E,10E-白术三醇与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)、白蛋白(ALB)、P53 核内磷酸化蛋白(TP53)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-6(IL-6)等靶点具有较好结合能力。**结论** 异功散通过调节丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、核因子-κB(NF-κB)、生长因子、癌症、蛋白磷酸化等相关的信号通路来实现对胃肠道消化功能和肠道菌群的调节从而治疗小儿厌食症。

关键词: 异功散; 小儿厌食症; 网络药理学; 槲皮素; 山柰酚; 柚皮素; 戈米辛 B; 12-异戊烯酰基-2E,8E,10E-白术三醇

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)12-2714-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.006

Mechanism of Yigongsan in treatment of pediatric anorexia based on network pharmacology and molecular docking

LI Dan¹, LIU Si-qi², TAO Jia-yue², WANG Jing², HOU Jin-cai¹, WANG Ru-feng²

1. Jingjinji United Innovation Pharmaceutical Research Company, Beijing 100025, China

2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the main ingredients and mechanism of Yigongsan in treatment of pediatric anorexia through network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** Compounds that met the requirements of oral availability and drug-like properties in Yigongsan were searched through TCMSP database, and their targets were obtained through PubChem, UniProt databases. Targets related to pediatric anorexia were obtained through GeneCards, OMIM, NCBI Gene, DisGeNET and TTD databases. The intersection of Yigongsan and pediatric anorexia targets was obtained and protein-protein interaction network (PPI) was constructed. Key targets were further screened by betweenness centrality, closeness centrality, and degree. Key target proteins were analyzed for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway functional enrichment. PyMOL and AutoDock Vina software were used to conduct molecular docking between key targets and compounds. **Results** A total of 139 qualified compounds were obtained from Yigongsan corresponding to 781 targets, and 2 278 targets were obtained from pediatric anorexia. The intersection of the two was 369 targets. A total of 66 key targets were obtained through the PPI network. The GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis of key targets showed that biochemical processes and signaling

收稿日期: 2022-08-28

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(206Z2502G)

作者简介: 李丹, 女, 汉族, 高级工程师, 博士, 主要从事新药研发工作。E-mail: ldyeah@yeah.net

*通信作者: 侯金才, 男, 汉族, 研究员, 博士, 主要从事新药研发工作。E-mail: jincaihou@126.com

王如峰, 男, 汉族, 教授, 博导, 主要从事中药化学成分研究工作。E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

pathways such as growth factor response, transcriptional regulation, cancer pathway and protein phosphorylation pathway were correlated with the treatment of pediatric anorexia by Yigongsan. The molecular docking results showed that kaempferol, quercetin, naringenin, gomisins B, 12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol had good binding ability to GAPDH, AKT1, ALB, TP53, TNF, IL-6 and other targets. **Conclusion** Yigongsan can regulate gastrointestinal digestive function and intestinal flora by regulating MAPK, NF- κ B, growth factor, cancer, protein phosphorylation and other related signal pathways to treat pediatric anorexia.

Key words: Yigongsan; pediatric anorexia; network pharmacology; quercetin; kaempferol; naringenin; gomisins B; 12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol

异功散又称五味异功散,出自宋代《小儿药证直诀》,为四君子汤加一味陈皮而成方,由人参、白术、茯苓、甘草、陈皮 5 味药组成。其中人参、白术、甘草健脾益气,补脾胃虚弱以固本,可除困乏、泄泻、腹胀、少食等症,配以理气除湿、醒脾助运的陈皮和茯苓,则能健脾化湿、行气化滞^[1-2]。该方主要应用于治疗小儿厌食症、慢性萎缩性胃炎、呼吸系统疾病、肠易激综合征等^[3-5]。根据《小儿药证直诀》记载异功散作用为“温中和气、治吐泻、不思乳食^[6]。凡小儿虚冷病,先与数服,以助其气。”可见其针对于小儿因脾虚气滞导致的消化不良,因此小儿厌食症是该方的主治疾病。

小儿厌食症是指 3~6 岁婴幼儿较长时间食欲减退或以食欲缺乏为主的症状,若长期难以得到改善则会影响后期生长发育^[7]。目前在中药治疗小儿厌食症方面异功散的应用频次最高^[8],但是由于中医药成分复杂,具有多靶点多通路的特点,因此异功散治疗小儿厌食症的具体机制还有待阐明。网络药理学是以系统生物学和计算机技术为基础的新兴技术,能够较为快速准确地进行数据挖掘,可视化地显示复杂方剂和蛋白靶点的作用网络,为进一步研究药理活性提供方向^[9]。基于此,本研究通过网络药理学结合分子对接技术探究异功散中治疗小儿厌食症的重要成分及其作用靶点,进一步明确治疗机制。

1 材料

TCMSP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swiss.targetprediction.ch/>)、UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.GeneCards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、NCBI Gene 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)、Metascape

数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)、BioLadder 平台 (<https://www.bioladder.cn/>)、RCSB 平台 (<https://www.rcsb.org/>)、POCASA 平台 (<https://g6altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>)。

Cytoscape 3.8.0 软件、PyMOL 软件、AutoDock Tools 软件、AutoDock Vina 1.1.2 软件、Discovery Studio 2020 软件。

2 方法

2.1 异功散化学成分及其靶点收集

在 TCMSP 数据库中,分别以人参、白术、茯苓、甘草、陈皮为关键词搜索主要成分,将参数定义为口服生物利用度 (OB) ≥ 30 ,类药性 (DL) ≥ 0.18 。在数据库中将所有符合条件的化合物的靶点进行汇总,部分在 TCMSP 中查询不到对应靶点的化合物,在 PubChem 数据库中将化合物的名称作为关键词输入,将其 Canonical SMILES 导入到 SwissTargetPrediction 数据库中,选择物种为“Homo sapiens”,按照分子相似性预测成分靶点,并将靶点名称在 UniProt 数据库进行标准化。

2.2 小儿厌食症相关靶点收集

以“pediatric anorexia”和“anorexia”为关键词在 GeneCards、OMIM、NCBI Gene、DisGeNET、TTD 数据库中检索相关靶点,将靶点在 UniProt 数据库进行名称的标准化。

2.3 “化合物-靶点-疾病”网络构建及关键靶点筛选

将 2.1 和 2.2 项下收集到的成分及疾病靶点绘制 Venn 图取交集,将交集集中的靶点和异功散 5 味药中的化合物在 Cytoscape 3.8.0 中构建“化合物-靶点-疾病”作用网络。在 STRING 平台上选择 Multiple proteins 模块,将交集靶点导入,物种选择“Homo sapiens”,即得到由数据库构建的蛋白质相互作用 (PPI) 网络,将文件导出。用 Cytoscape 3.8.0 显示 PPI 网络,将其中的靶点分别按照度 (degree) 值 < 50 、 $50 \leq \text{degree} < 100$ 、 $100 \leq \text{degree} < 200$ 和 $\text{degree} \geq 200$ 绘制同心圆。采用 Cytoscape 3.8.0 中的

Centiscape 2.2 插件分别选择中心度 (betweenness)、紧密中心度 (closeness) 和 degree 值 3 个参数, 获得了同时满足 $\text{betweenness} \geq 383.62$ 、 $\text{closeness} \geq 0.0014$ 、 $\text{degree} \geq 53.40$ 这 3 个条件的关键靶点。将关键靶点导入 STRING 平台获得相互作用情况, 用 Cytoscape 3.8.0 绘制关键靶点的 PPI 网络图。

2.4 基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将关键靶点导入 Metascape 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens”进行分析。在富集 (enrichment) 模块下设置参数为最小重叠量 (min overlap) = 3、 $P < 0.01$ 、最小富集值 (min enrichment) = 1.5。首先进行 GO 富集分析, 功能分别包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF), 分别选择排名前 20、18、20 位的通路进行绘图。KEGG 富集分析同样选择排名前 20 位通路进行绘图。将 GO 功能注释通路上传到 BioLadder 平台上, 绘制气泡图, KEGG 则采用 Metascape 导出富集结果。

2.5 分子对接

选择在“化合物-靶点-疾病”作用网络图中根据 degree 值筛选出的关键化合物, 与关键靶点中排名前 10 位的靶点进行对接。从 RCSB 平台上分

别检索人源白蛋白 (ALB)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、P53 核内磷酸化蛋白 (TP53)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、 β 1-连环蛋白 (CTNNB1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、信号传导及转录激活蛋白 (STAT3) 等 10 个靶点的晶体结构, 下载为 PDB 格式文件。在 PyMOL 软件中用各蛋白的已知配体确定对接口袋, 无特定配体的蛋白 (VEGFA) 则采用 POCASA 平台预测其活性部位。将蛋白在 AutoDock Tools 软件中进行去水、加氢、电荷分配等操作, 化合物在 TCMSP 中下载后进行 MMFF94 力场能量优化, 两者均保存为 pdbqt 格式。运用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行对接, 参数分别为对接程度值 (exhaustiveness) = 20、模式数量 (num_modes) = 20、能量范围 (energy_range) = 4。

3 结果

3.1 异功散活性成分及靶点的筛选

在 TCMSP 数据库中获得异功散中有效成分 139 个, 其中人参 22 个、白术 7 个、茯苓 15 个、甘草 92 个、陈皮 5 个, 去重后共获得 781 个靶点, 化合物信息见表 1。

表 1 化合物信息

Table 1 Information of compounds

Mol ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	人参
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	人参
MOL000787	fumarine	59.26	0.83	人参
MOL002879	diop	43.59	0.39	人参
MOL003648	inermin	65.83	0.54	人参
MOL004492	chrysanthemaxanthin	38.72	0.58	人参
MOL005308	aposiopolamine	66.65	0.22	人参
MOL005314	celabenzine	101.88	0.49	人参
MOL005317	deoxyharringtonine	39.27	0.81	人参
MOL005318	dianthramine	40.45	0.20	人参
MOL005320	arachidonate	45.57	0.20	人参
MOL005321	frutinone A	65.90	0.34	人参
MOL005344	ginsenoside rh2	36.32	0.56	人参
MOL005356	girinimbin	61.22	0.31	人参
MOL005357	gomisin B	31.99	0.83	人参
MOL005376	panaxadiol	33.09	0.79	人参
MOL005384	suchilactone	57.52	0.56	人参
MOL005399	alexandrin_qt	36.91	0.75	人参
MOL005401	ginsenoside Rg5_qt	39.56	0.79	人参
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	人参
MOL005348	ginsenoside-Rh4_qt	31.11	0.78	人参
MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	人参

续表 1

Mol ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000020	12-senecioid-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	62.40	0.22	白术
MOL000021	14-acetyl-12-senecioid-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	60.31	0.31	白术
MOL000022	14-acetyl-12-senecioid-2 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	63.37	0.30	白术
MOL000028	α -amyrin	39.51	0.76	白术
MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	白术
MOL000049	3 β -acetoxyatractylone	54.07	0.22	白术
MOL000072	8 β -ethoxy atractylenolide III	35.95	0.21	白术
MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	茯苓
MOL000280	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	茯苓
MOL000282	ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3 β -ol	43.51	0.72	茯苓
MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	茯苓
MOL000285	(2 <i>R</i>)-2-[(5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
MOL000287	3 β -hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	茯苓
MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81	茯苓
MOL000290	poricoic acid A	30.61	0.76	茯苓
MOL000291	poricoic acid B	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75	茯苓
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	茯苓
MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83	茯苓
MOL000273	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	茯苓
MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80	茯苓
MOL000279	cervisterol	37.96	0.77	茯苓
MOL001484	inermine	75.18	0.54	甘草
MOL001792	DFV	32.76	0.18	甘草
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	甘草
MOL000211	mairin	55.38	0.78	甘草
MOL000239	jaranol	50.83	0.29	甘草
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	甘草
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	甘草
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	甘草
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	甘草
MOL000497	licochalcone a	40.79	0.29	甘草
MOL000500	vestitol	74.66	0.21	甘草
MOL002311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
MOL002565	medicarpin	49.22	0.34	甘草
MOL003656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草
MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.20	甘草
MOL004805	(2 <i>S</i>)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3- <i>f</i>]chromen-4-one	31.79	0.72	甘草
MOL004806	euchrenone	30.29	0.57	甘草
MOL004808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
MOL004810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
MOL004811	glyasperin C	45.56	0.40	甘草
MOL004814	isotrifoliol	31.94	0.42	甘草
MOL004815	(<i>E</i>)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	39.62	0.35	甘草
MOL004820	kanzonols W	50.48	0.52	甘草
MOL004824	(2 <i>S</i>)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2- <i>g</i>]chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
MOL004827	semilicoisoflavone B	48.78	0.55	甘草
MOL004828	glepidotin A	44.72	0.35	甘草
MOL004829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草

续表 1

Mol ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL004833	phaseolinisoflavan	32.01	0.45	甘草
MOL004835	glypallichalcone	61.60	0.19	甘草
MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	甘草
MOL004841	licochalcone B	76.76	0.19	甘草
MOL004848	licochalcone G	49.25	0.32	甘草
MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	59.62	0.43	甘草
MOL004855	licoricone	63.58	0.47	甘草
MOL004856	gancaonin A	51.08	0.40	甘草
MOL004857	gancaonin B	48.79	0.45	甘草
MOL004860	licorice glycoside E	32.89	0.27	甘草
MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	甘草
MOL004864	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	30.49	0.41	甘草
MOL004866	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	44.15	0.41	甘草
MOL004879	glycyrin	52.61	0.47	甘草
MOL004882	licocoumarone	33.21	0.36	甘草
MOL004883	licoisoflavone	41.61	0.42	甘草
MOL004884	licoisoflavone B	38.93	0.55	甘草
MOL004885	licoisoflavanone	52.47	0.54	甘草
MOL004891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
MOL004898	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	甘草
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
MOL004907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
MOL004908	glabridin	53.25	0.47	甘草
MOL004910	glabranin	52.90	0.31	甘草
MOL004911	glabrene	46.27	0.44	甘草
MOL004912	glabrone	52.51	0.50	甘草
MOL004913	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	48.14	0.43	甘草
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.90	0.53	甘草
MOL004915	eurycarpin A	43.28	0.37	甘草
MOL004917	glycyroside	37.25	0.79	甘草
MOL004924	(-)-medicocarpin	40.99	0.95	甘草
MOL004935	sigmoidin-B	34.88	0.41	甘草
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12	0.18	甘草
MOL004945	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	36.57	0.32	甘草
MOL004948	isoglycyrol	44.70	0.84	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
MOL004957	HMO	38.37	0.21	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
MOL004961	quercetin der.	46.45	0.33	甘草
MOL004966	3'-hydroxy-4'-O-Methylglabridin	43.71	0.57	甘草
MOL004974	3'-methoxyglabridin	46.16	0.57	甘草
MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	甘草
MOL004980	inlacoumarin A	39.71	0.33	甘草
MOL004988	kanzonol F	32.47	0.89	甘草
MOL004989	6-prenylated eriodictyol	39.22	0.41	甘草
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin	83.71	0.27	甘草
MOL004991	7-acetoxy-2-methylisoflavone	38.92	0.26	甘草
MOL004993	8-prenylated eriodictyol	53.79	0.40	甘草
MOL005000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
MOL005001	gancaonin H	50.10	0.78	甘草
MOL005003	licoagrocarpin	58.81	0.58	甘草
MOL005007	glyasperins M	72.67	0.59	甘草
MOL005008	glycyrrhiza flavonol A	41.28	0.60	甘草
MOL005012	licoagroisoflavone	57.28	0.49	甘草
MOL005013	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	41.16	0.71	甘草

续表 1

Mol ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL005016	odoratin	49.95	0.30	甘草
MOL005017	phaseol	78.77	0.58	甘草
MOL005018	xambioona	54.85	0.87	甘草
MOL005020	dehydroglyasperins C	53.82	0.37	甘草
MOL004905	3,22-dihydroxy-11-oxo-delta(12)-oleanene-27-alpha-methoxycarbonyl-29-oic acid	34.32	0.55	甘草
MOL004985	icos-5-enoic acid	30.70	0.20	甘草
MOL004996	gadelaicid acid	30.70	0.20	甘草
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	甘草、陈皮
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	甘草、陈皮
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	47.74	0.27	陈皮
MOL005815	citromitin	86.90	0.51	陈皮
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	陈皮

3.2 疾病靶点的筛选

小儿厌食症在 5 个数据库中检索去重后共获得 2 278 个靶点, 将其与药物靶点取交集得 369 个靶点制作 Venn 图, 见图 1。

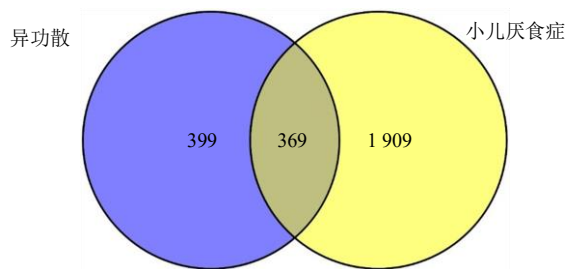


图 1 异功散与小儿厌食症靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of Yigongsan and pediatric anorexia

3.3 异功散治疗小儿厌食症的 PPI 网络

在 Cytoscape 3.8.0 中绘制“化合物-靶点-疾病”作用网络图, 见图 2。图中含有 499 个节点, 其中包括 130 个药物成分节点, 369 个靶点节点, 2 788 条边。网络图中化合物的 degree 值反映的是节点连接度, 即该化合物与靶点连接的边的条数, 也称关联度, 关联度越高, 代表该化合物在作用网络中的影响更大; closeness 和 betweenness 值也分别反映了化合物-靶点间最短路径和化合物在所有最短路径中的通信能力, 这些参数表现了节点在网络中起到的作用, 可视化地体现了中药多靶点、多通路的特点。“化合物-靶点-疾病”作用网络图中涉及的重要化合物信息如表 2 所示。

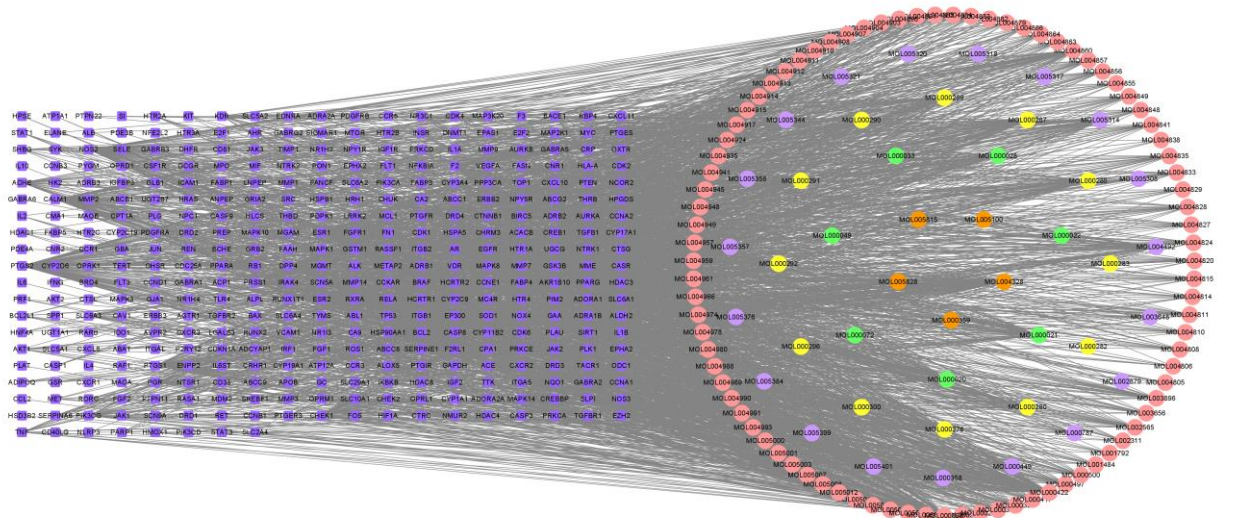


图 2 异功散 - 小儿厌食症交集靶点作用网络图

Fig. 2 Interaction network diagram of intersection of Yigongsan and pediatric anorexia

表 2 关键化合物信息

Table 2 Information of key compounds

Mol ID	名称	所属药材	betweenness	closeness	degree
MOL000422	山柰酚	人参	0.033 978 044	0.388 758 782	135
MOL000098	槲皮素	甘草	0.224 694 143	0.428 202 923	109
MOL004328	柚皮素	甘草、陈皮	0.030 121 667	0.372 475 692	92
MOL005357	戈米辛 B	人参	0.099 048 981	0.398 718 975	71
MOL000020	12-异戊烯酰基-2E,8E,10E-白术三醇	白术	0.059 606 311	0.391 201 885	62

3.4 PPI 网络构建

交集靶点的 PPI 网络图如图 3 所示, 图中根据靶点相互作用的 degree 值设置了节点的大小和颜色深浅, degree 值越高, 节点越大, 颜色越深, 其中 GAPDH、IL-6、TNF、TP53、ALB、AKT1 为关联度最高的 6 个靶点。按照 2.3 项下的条件再筛选出关键靶点, 共有 66 个, 如图 4 所示, 其中 degree 值越高, 节点面积越大, 颜色越深; 相互作用综合得分越高, 连接的边越粗, 颜色越深。根据筛选共得出 10 个重要的核心靶点, 靶点的信息如表 3 所示。

3.5 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析

GO 功能富集分析 BP、CC、MF 的通路气泡图如图 5 所示, 从图中可以看出 BP 功能排名前 3 位的信号通路为生长因子应答、激素应答、蛋白质磷酸化正向调控; CC 功能前 3 位信号通路为膜筏、转录调节复合物、细胞质核周区; MF 功能前 3 位信号通路为激酶结合、特异性 DNA 结合的 RNA 聚

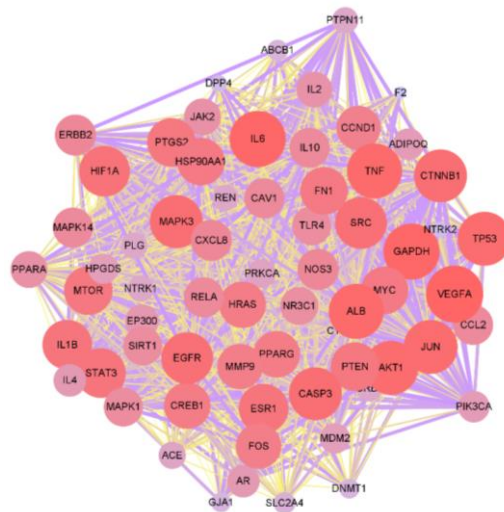


图 4 核心靶点 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of core targets

表 3 PPI 网络图节点连接度值前 10 名靶点信息

Table 3 Information of PPI network graph degree top 10 targets

靶点	betweenness	closeness	degree
ALB	0.065 490	0.714 844	223
AKT1	0.043 096	0.709 302	222
GAPDH	0.036 832	0.701 149	214
IL-6	0.032 644	0.684 112	204
TNF	0.024 400	0.680 297	203
TP53	0.023 531	0.680 297	202
VEGFA	0.023 353	0.667 883	192
CTNNB1	0.018 499	0.659 459	184
EGFR	0.017 626	0.654 741	181
STAT3	0.012 358	0.643 234	176

合酶 II 转录因子结合、蛋白结构域特异性结合。KEGG 富集分析选择排名前 20 位通路富集图如图 5 所示, 前 3 位通路分别是癌症通路、癌症蛋白聚糖、人巨细胞病毒感染。

3.6 分子对接结果

选择上文中确定的 5 个化合物和 10 个靶点蛋白进行分子对接, 对接结果见表 4。表中结合能绝

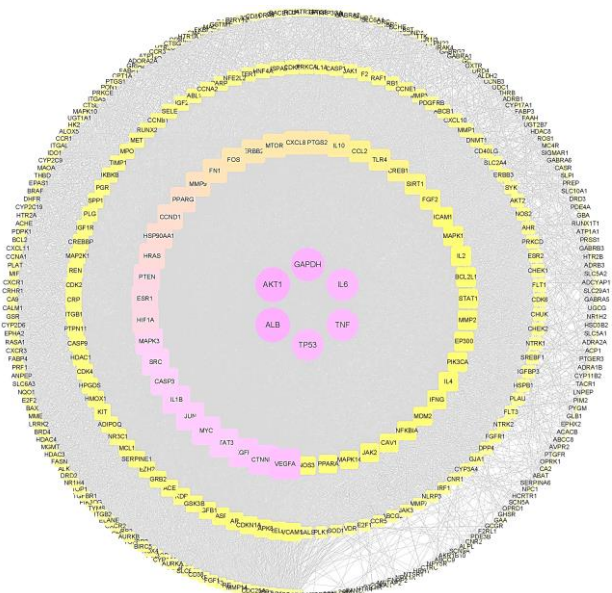


图 3 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram

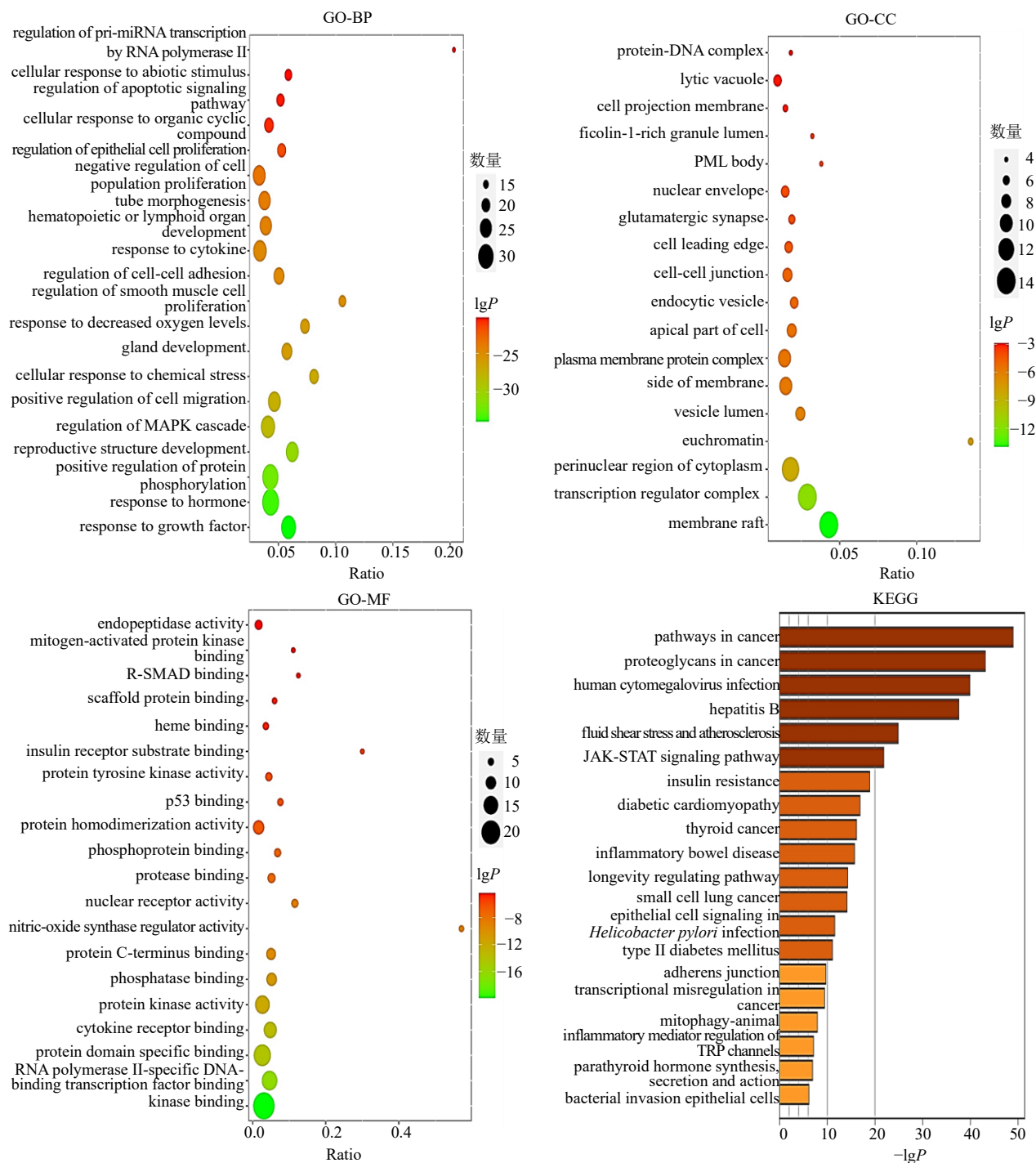


图 5 GO 功能富集注释气泡图和 KEGG 信号通路富集图

Fig. 5 Annotation bubble plot of GO feature enrichment and KEGG signaling pathway enrichment map

对值越大代表结合越稳定, 结合能小于-5 kcal/mol (1 cal=4.2 J) 表示具有结合能力, 结合能小于-7 kcal/mol 表示结合能力较强。结合能较强 (≤ -7 kcal/mol) 的分子对接模式图如图 6 所示。

4 讨论

小儿厌食症属于中医学的“内伤”, 主要病因在

于饮食不节, 饮食不节会进一步导致“过食伤脾、饥则伤胃”^[10-11]。中医学认为小儿脏腑娇弱, 脾胃发育不完全, 因而脾气虚弱, 易形成脾虚食积的症状。随着现代社会的不断发展, 生活水平有了极大的提高, 在喂养小儿的时候很容易出现营养过剩, 喂食过多的情况, 常会引起脾胃失和, 胃不受纳,

表 4 关键化合物和主要核心靶点分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energies of key compounds and major core targets

靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	山柰酚	槲皮素	柚皮素	戈米辛 B	12-异戊烯酰基-2E,8E,10E-白术三醇
ALB	-7.0	-7.2	-7.0	-5.8	-5.8
AKT1	-9.3	-9.2	-8.1	-9.2	-7.7
GAPDH	-7.4	-6.7	-7.5	-5.8	-5.9
IL-6	-5.8	-6.0	-5.7	-5.2	-4.5
TNF	-5.5	-5.4	-5.7	-5.5	-4.9
TP53	-5.3	-5.4	-5.7	-6.3	-3.9
VEGFA	-5.0	-5.3	-5.1	-5.4	-4.2
CTNNB1	-5.9	-6.2	-5.7	-5.2	-4.0
EGFR	-7.9	-8.2	-7.0	-7.2	-6.3
STAT3	-6.2	-6.2	-6.6	-6.1	-5.7

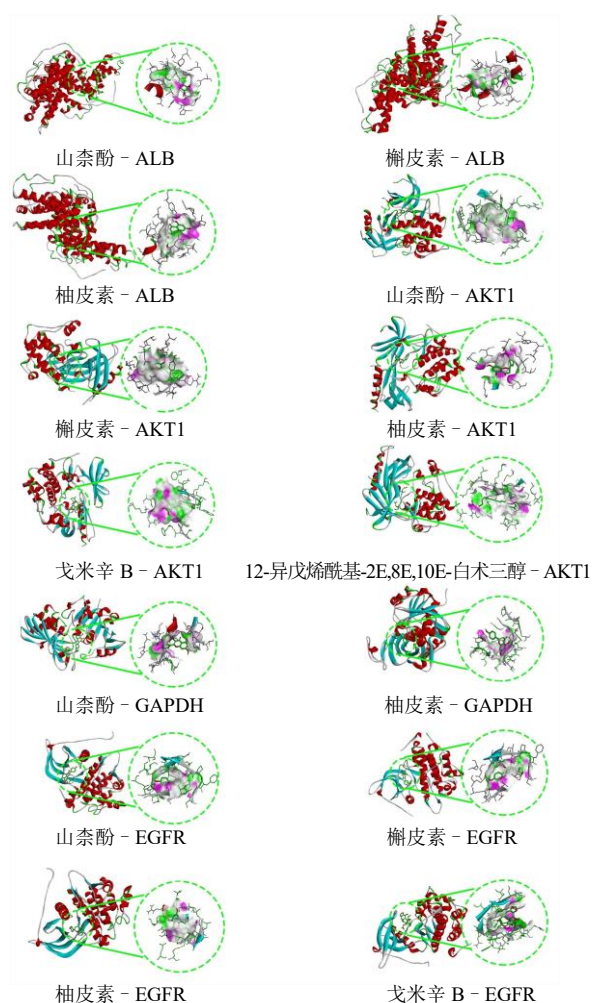


图 6 关键化合物和主要核心靶点分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking mode of key compounds and major core targets

进而造成脾失健运，出现厌食的症状^[12]。异功散中人参为君药甘温益气、健脾养胃，归脾、肺、心经；白术为臣药健脾燥湿、益气助运，归脾、胃经；佐

以茯苓健脾渗湿，使以甘草调和诸药；配以陈皮能够进一步行气健胃，有了更好的理气作用，因此异功散益气健脾、行气化滞，很适用于治疗脾虚气滞型小儿厌食症。本研究通过多数据库进行数据挖掘和整合分析，筛选出异功散治疗小儿厌食症过程中起重要作用的化合物共 139 个。

通过 PPI 网络确定了重要靶点 369 个，核心靶点以 GAPDH、AKT1、ALB、TP53、TNF、IL-6 为代表。GAPDH 是糖酵解过程中的限速酶，有研究证实当一氧化氮 (NO) 抑制 GAPDH 后会促进果糖-1,6-二磷酸氢盐的累积，从而保护受损肠道^[13]。Wu 等^[14]发现了先天性巨结肠症的发病机制与 AKT1 明显降低有关；Tiwari 等^[15]发现 AKT1 和核因子- κ B (NF- κ B) 靶点的信号转导可以降低辐射对胃肠道系统的损伤，以上研究提示该靶点与胃肠道功能有着很大关系。Cai 等^[16]研究发现牡蛎多糖在调节微生物群，缓解肠黏膜炎和营养不良的过程中，IL-6、ALB、TNF 的表达均存在不同程度的变化，说明 3 个靶点在肠黏膜炎的发生过程中发挥作用。Dalton 等^[17]认为 IL-6 可能是神经性厌食症的生物标志物；A K Nilsson 等^[18]认为 IL-6 和 TNF 的表达在神经性厌食症患者和对照组之间存在显著差异。Nakayama 等^[19]揭示了 TP53 突变加速了结直肠癌的恶性进展，说明 TP53 对肠道系统的影响。以上研究结果支持 GAPDH、AKT1、ALB、TP53、TNF、IL-6 靶点在治疗厌食症和影响消化系统功能方面的作用，是异功散治疗小儿厌食症的潜在作用靶点。

GO 注释和 KEGG 注释结果表明异功散治疗小儿厌食症的潜在核心靶点与蛋白磷酸化正向调控、生长因子应答、转录调控和癌症通路等具有密切相关性。研究证实神经性厌食症患者的体内 IGF-1、

FGF21 等生长因子发生多样的变化^[20], 可能与病征或者厌食导致营养不良的程度有关。Yamashita 等^[21]发现蛋白质酪氨酸磷酸化可以通过正向调控丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路来调节肠上皮细胞的稳态, 这与本研究 GO 注释 MF 功能中的激酶结合形成对应, 揭示了异功散很可能通过蛋白质磷酸化和激酶结合共同调节肠道功能。多项研究也表明癌症与厌食症之间存在显著关系, 如厌食症是癌症患者在治疗期间和治疗后普遍存在的症状^[22], 并且厌食很可能导致癌症预后较差^[23]。因此本研究认为异功散治疗小儿厌食症是通过生长因子、癌症、蛋白质磷酸化等相关通路实现的。

分子对接结果表明 10 个核心靶点与 5 个关键化合物之间绝大多数结合能小于 -5 kcal/mol, 表明能够较好地产生相互作用, 尤其各化合物与 ALB、AKT1、GAPDH、EGFR 之间结合能多数小于 -7 kcal/mol, 提示这些靶点很可能在异功散治疗小儿厌食症过程中起到更为重要的作用。

本研究利用网络药理学和分子对接技术发现异功散治疗小儿厌食症的关键化合物为山柰酚、槲皮素、柚皮素、戈米辛 B、12-异戊烯酰基-2E,8E,10E-白术三醇, 这些化合物通过与 GAPDH、AKT1、ALB、TP53、TNF、IL-6 等靶点结合调节 NF-κB、生长因子、癌症、蛋白磷酸化等相关的信号通路来实现对胃肠道功能的调节, 从而起到治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭丽红, 汤玉清, 廖倩, 等. 陈明岭教授运用异功散治疗皮肤病验案举隅 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(18): 97-98.
- [2] 黄建业. 《小儿药证直诀》治疗脾胃疾病方剂初探 [J]. 贵阳中医学院学报, 1986(4): 4-5.
- [3] 叶晓滨, 陈玉梅. 基于“肺脾同治”探讨异功散应用研究进展 [J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(22): 70-73.
- [4] 谭其祥. 李志安运用异功散经验 2 则 [J]. 江西中医药, 1997(4): 9.
- [5] 王瑞华. 加味异功散治疗慢性萎缩性胃炎 60 例 [J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(10): 679.
- [6] 钱乙, 阎孝忠. 小儿药证直诀 [M]. 北京: 北京人民卫生出版社, 2006: 51.
- [7] 马融. 中医儿科学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 114-118.
- [8] 汤丽珠, 李长辉. 中医药治疗小儿厌食症研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(22): 40-42.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] 赵云鸽. 基于古今文献学习探讨小儿厌食症 (脾虚食积证) 用药规律及健脾消食方的疗效观察 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [11] 中华中医药学会儿科分会, 中华中医药学会中药临床药理分会. 小儿厌食中药临床试验设计与评价技术指南 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(1): 1-5.
- [12] 谢伟. 小儿推拿联合中医护理对脾失健运型小儿厌食的效果及预后影响 [J]. 中国社区医师, 2021, 37(11): 98-99.
- [13] Sola A, Roselló-Catafau J, Gelpí E, et al. Fructose-1,6-biphosphate in rat intestinal preconditioning: Involvement of nitric oxide [J]. *Gut*, 2001, 48(2): 168-175.
- [14] Wu L H, Xiao P, Zhang Z, et al. Altered expression of AKT1 and P38A in the colons of patients with Hirschsprung's disease [J]. *Pediatr Surg Int*, 2020, 36(6): 719-725.
- [15] Tiwari V, Kamran M Z, Ranjan A, et al. Akt1/NFκB signaling pathway activation by a small molecule DMA confers radioprotection to intestinal epithelium in xenograft model [J]. *Free Radic Bio Med*, 2017, 108: 564-574.
- [16] Cai B N, Pan J Y, Chen H, et al. Oyster polysaccharides ameliorate intestinal mucositis and improve metabolism in 5-fluorouracil-treated S180 tumour-bearing mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 256: 117545.
- [17] Dalton B, Leppanen J, Campbell I, et al. A longitudinal analysis of cytokines in anorexia nervosa [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 85: 88-95.
- [18] A K Nilsson I, Millischer V, Göteson A, et al. Aberrant inflammatory profile in acute but not recovered anorexia nervosa [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 88: 718-724.
- [19] Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(4): 267-276.
- [20] Kowalska I, Karczewska-Kupczewska M, Strączkowski M. Adipocytokines, gut hormones and growth factors in anorexia nervosa [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(19-20): 1702-1711.
- [21] Yamashita H, Kotani T, Park J H, et al. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium [J]. *Plos One*, 2014, 9(3): e92904.
- [22] Zhang F, Shen A, Jin Y, et al. The management strategies of cancer-associated anorexia: A critical appraisal of systematic reviews [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 236.
- [23] Childs D S, Jatoti A. A hunger for hunger: A review of palliative therapies for cancer-associated anorexia [J]. *Ann Palliat Med*, 2019, 8(1): 50-58.

[责任编辑 高源]