

基于网络药理学及分子对接方法探析厚朴三物汤治疗便秘的机制研究

康蕾, 梁磊, 洪关婷, 王一琼, 莘莉琼, 杨勇军*

川北医学院附属医院 中西医结合肛肠科, 四川 南充 637000

摘要: **目的** 运用网络药理学和分子对接的方法探析厚朴三物汤治疗便秘的有效成分、作用靶点、信号通路及分子机制。**方法** 运用 TCMSP 数据库平台筛选厚朴三物汤中的有效成分、作用靶点; 通过 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb、DrugBank 数据库搜集便秘相关靶点; 利用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“药物成分-潜在作用靶点”网络图; 再导入 String 数据库构建靶点蛋白质相互作用 (PPI) 网络图。使用 R 语言对关键靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。使用 Autodock 软件进行分子对接, 进一步验证化合物与靶点能在稳定结合。**结果** 获得厚朴三物汤治疗便秘的相关活性成分有芦荟大黄素、木犀草素、柚皮素等。经过 CytoNCA 进行拓扑分析, 进一步筛选其核心靶点有白细胞介素 (IL) 1B、血管内皮生长因子 (VEGFA)、丝裂原激活蛋白激酶 3 (MAPK3)、细胞周期蛋白 D1 (CCND1)、肿瘤蛋白 P53 (TP53) 等。GO 富集分析共得生物学过程 (BP) 2 008 条、细胞组成 (CC) 67 条、分子功能 (MF) 123 条, KEGG 通路有 153 条。分子对接结果表明, 厚朴三物汤有效成分与其作用靶点稳定结合。**结论** 厚朴三物汤是通过多条通路、多种成分、多个靶点治疗便秘。

关键词: 厚朴三物汤; 便秘; 网络药理学; 分子对接; 芦荟大黄素; 木犀草素; 柚皮素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)02-0335-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.009

Mechanism of Houpo Sanwu Decoction in treatment of constipation based on network pharmacology and molecular docking method

KANG Lei, LIANG Lei, HONG Guanting, WANG Yiqiong, XIN Liqiong, YANG Yongjun

Department of Proctology of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical University, Nanchong 637000, China

Abstract: Objective To explore the effective components, targets, signaling pathways and molecular mechanisms of Houpo Sanwu Decoction in treatment of constipation by using network pharmacology and molecular docking methods. **Methods** TCMSP database platform was used to screen the effective components and target of Houpo Sanwu Decoction. Targets related to constipation were collected through GeneCards, OMIM, TTD, PharmGkb, and DrugBank databases. The network diagram of “drug ingredients - potential targets” was constructed using Cytoscape 3.8.2 software. The target protein interaction (PPI) network diagram was constructed by importing String database. The gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed for key targets using R language. Autodock software was used for molecular docking to further verify the stable binding between the compound and the target. **Results** The related activities of Houpo Sanwu Decoction on constipation were obtained, including aloe emodin, luteolin, and naringin. Topological analysis was performed by CytoNCA to further screen the core targets of interleukin (IL)-1B, vascular endothelial growth factor (VEGFA), mitogen activated protein kinase 3 (MAPK3), cyclin D1 (CCND1), tumor protein P53 (TP53), etc. GO enrichment analysis showed 2 008 biological processes (BP), 67 cell components (CC), 123 molecular functions (MF), and 153 KEGG pathways. The results of molecular docking showed that the active components of Houpo Sanwu Decoction combined stably with its target. **Conclusion** Houpo Sanwu Decoction is used to treat constipation through multiple pathways, multiple components and multiple targets.

Key words: Houpo Sanwu Decoction; constipation; network pharmacology; molecular docking; aloe emodin; luteolin; naringin

收稿日期: 2023-10-04

作者简介: 康蕾, 硕士, 从事中西医结合肛肠病研究。E-mail: 1835050405@qq.com

*通信作者: 杨勇军, 硕士生导师, 主任医师, 从事中西医结合肛肠病研究。E-mail: 653244473@qq.com

便秘是常见的胃肠道疾病，主要临床表现为大便干燥、排便时间延长、排便次数减少^[1]，在中医属“便秘”范畴。当今社会，随着社会人口老龄化、生活习惯改变、生活压力增大等各类因素，便秘发生率呈逐年上升的趋势。研究表明，便秘对多种疾病的发生也有直接影响，如帕金森病、多种肛周疾病、乳腺疾病、冠心病等。西医对便秘的治疗主要以各类泻剂为主，但疗效欠佳，所以结合现代分子生物学及生物信息学探索更多中药治疗便秘的有效途径是必要的。

《金匱要略》中首次记载厚朴三物汤，述其由大黄、枳实、厚朴 3 味药组成，厚朴为君，主气，大黄为臣主泻，枳实为佐药主滞。该方立于“通”重在“行气”，具有行气导滞通便之功^[2]。其方中重用厚朴，极大加强了该方行气的功效。尤善治疗实热内积，气滞不行，气滞重于实积之便秘。根据现有研究表明，其方中含有芦荟大黄素、厚朴酚等成分，具有明显的肌松弛、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗菌作用^[3]，可增强胃肠蠕动、改善便秘。

网络药理学是通过各数据库、运用网络技术构建“药物成分-靶点-信号通路-疾病”相互作用关系的方法，在对分析各类药物作用发生机制的过程中有着重要意义。分子对接是一种用于药物研究的方法，能够识别具有治疗意义的新化合物，并在分子水平上预测配体-靶点相互作用关系^[4]。本研究采用网络药理学和分子对接技术，筛选及分析厚朴三物汤治疗便秘的有效成分及作用靶点，为临床基础研究以及中药新药的研发提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 厚朴三物汤有效化合物成分及相关靶点筛选

利用中药系统药理学数据库 (TCMSP)，以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件，检索并获得厚朴三物汤中大黄、枳实、厚朴 3 味中药的有效化合物及对应的靶点，筛选后在 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 中将化合物作用的蛋白质靶点转化成规范的基因标识符。

1.2 便秘相关靶点筛选

以“constipation”为检索词，在 OMIM、GeneCards、PharmGKB、TTD、DrugBank 数据库中查找有关便秘的相关靶点，在各数据库获取的数据再通过 R 语言的“Venn”软件包，去重后取交集并

绘制韦恩图。

1.3 厚朴三物汤成分与靶点的网络构建与分析

将筛选的厚朴三物汤的有效成分及疾病关键靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件，构建厚朴三物汤有效成分与靶点的可视化图，运用插 CytoNCAA 分析视图的特征，设置节点值和自由度参数，以方便准确的观察复方中主要有效成分。将 1.2 项下获得的便秘靶点导入 String 数据库，选择物种为“人”模式，蛋白属设为“homo sapiens”，highest confidence = 0.95，其他参数不变，获取蛋白质相互作用 (PPI) 网络图。利用 CytoNCA 进行拓扑分析，筛选其核心靶点。

1.4 关键靶点的基因本体 (GO) 及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

利用生物信息软件包“org.Hs.eg.db”“enrichplot”“clusterProfiler”等数据包对厚朴三物汤有效成分和关键靶点进行 GO 功富集分析和 KEGG 通路分析，以 $P < 0.05$ 为阈值。以对 GO 生物学过程中的生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 富集最高的前 10 条绘制成条形图。将 KEGG 通路富集程度最高的前 20 条绘制成高级气泡图。

1.5 分子对接验证

在 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中查找关键靶点的 2D 结构，再通过 ChemOffice 软件进行转化成 3D 结构。在 Uniprot 数据库中检索疾病关键靶点基因，找到对应蛋白 ID，在 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 中下载关键靶点蛋白受体的 3D 结构，再利用 Pymol、AutoDockTools 软件进行对其进行去除水分子、原有配体和受体及分子的处理，进行加氢的处理后确定活性口袋。再运行 Vina 对分子与靶点的最低结合能进行分析验证，最后利用 Pymol 软件转化成可视化图。

2 结果

2.1 厚朴三物汤有效活性成分及对应靶点

通过 TCMSP 数据库，以 OB $\geq 30\%$ ，DL ≥ 0.18 为筛选条件，获得厚朴三物汤有效活性成分，符合筛选条件的有效成分共 39 个，其中大黄 16 个，厚朴 2 个，枳实 21 个，见表 1。活性成分对应靶点 139 个。

2.2 厚朴三物汤治疗便秘的潜在靶点

从 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DrugBank 5 个数据库中，获取便秘的靶点分别为

表 1 厚朴三物汤有效成分
Table 1 Effective components of Houpu Sanwu Decoction

MOL 编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL002235	eupatin	50.8	0.41	大黄
MOL002251	mutatochrome	48.64	0.61	大黄
MOL002259	physciondiglucoside	41.65	0.63	大黄
MOL002260	procyanidin B-5,3'-O-gallate	31.99	0.32	大黄
MOL002268	rhein	47.07	0.28	大黄
MOL002276	sennoside E_qt	50.69	0.61	大黄
MOL002280	orachrysone-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74	大黄
MOL002281	toralactone	46.46	0.24	大黄
MOL002288	emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside	44.81	0.80	大黄
MOL002293	sennoside D_qt	61.06	0.61	大黄
MOL002297	daucosterol_qt	35.89	0.70	大黄
MOL002303	palmidin A	32.45	0.65	大黄
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	大黄
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24	大黄
MOL000554	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	大黄
MOL000096	(-)-catechin	49.68	0.24	大黄
MOL005970	eucalyptol	60.62	0.32	厚朴
MOL005980	neohesperidin	57.44	0.27	厚朴
MOL013276	poncirin	36.55	0.74	枳实
MOL013277	isosinensetin	51.15	0.44	枳实
MOL013279	5,7,4'-trimethylapigenin	39.83	0.30	枳实
MOL013428	isosakuranetin-7-rutinoside	41.24	0.72	枳实
MOL013430	prangenin	43.60	0.29	枳实
MOL013433	prangenin hydrate	72.63	0.29	枳实
MOL013435	poncimarín	63.62	0.35	枳实
MOL013436	isoponcimarín	63.28	0.31	枳实
MOL013437	6-methoxy aurapten	31.24	0.30	枳实
MOL013440	citrusin B	40.80	0.71	枳实
MOL001798	neohesperidin_qt	71.17	0.27	枳实
MOL001803	sinensetin	50.56	0.45	枳实
MOL001941	ammidin	34.55	0.22	枳实
MOL013352	obacunone	43.29	0.77	枳实
MOL002914	eriodictiol (flavanone)	41.35	0.24	枳实
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	枳实
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	47.74	0.27	枳实
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	枳实
MOL005849	didymin	38.55	0.24	枳实
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	枳实
MOL007879	tetramethoxyluteolin	43.68	0.37	枳实

5 298、361、357、11、84 个，去掉重复化合物后后取并集，还剩余 1 585 个，见图 1。将厚朴三物汤主要有效成分的作用靶点与疾病的靶点数据取交集，最终获得厚朴三物汤作用于便秘的潜在靶点对应 57 个，有效成分 26 个，以韦恩图的形式展现交集靶点，见图 2。

2.3 成分 - 靶点网络分析

在 Cytoscape 数据库中，将 26 个与便秘相关的有效成分、57 条相关基因导入构建活性成分 - 靶点

网络图，见图 3。可见同一个疾病靶点可与不同的活性成分相对应，不同的靶点也可对应相同的活性成分，厚朴三物治疗便秘具有多个靶点、多种成分特点。

2.4 PPI 网络的构建分析与核心靶点筛选

将厚朴三物汤主要有效成分作用靶点与便秘疾病靶点取交集所获得的 57 个靶点导入数 String 数据库，选择最低互助评分为 0.9，去除游离点，得到 55 个节点和 1 334 条边，见图 4。将 String 数据库

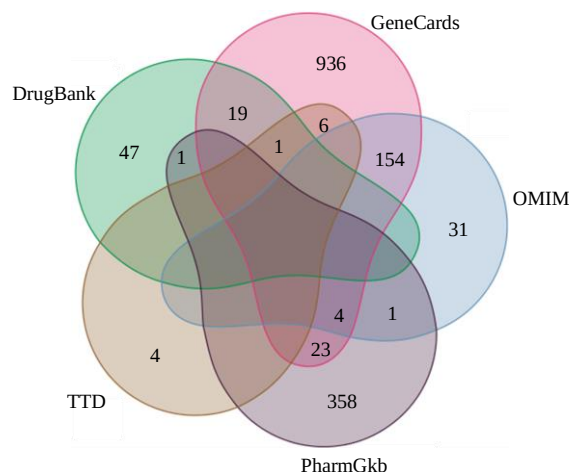


图 1 便秘相关靶点

Fig. 1 Targets associated with constipation

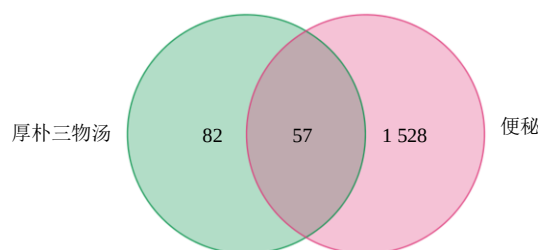


图 2 厚朴三物汤治疗便秘作用靶点

Fig. 2 Target of Houpu Sanwu Decoction in treatment of constipation

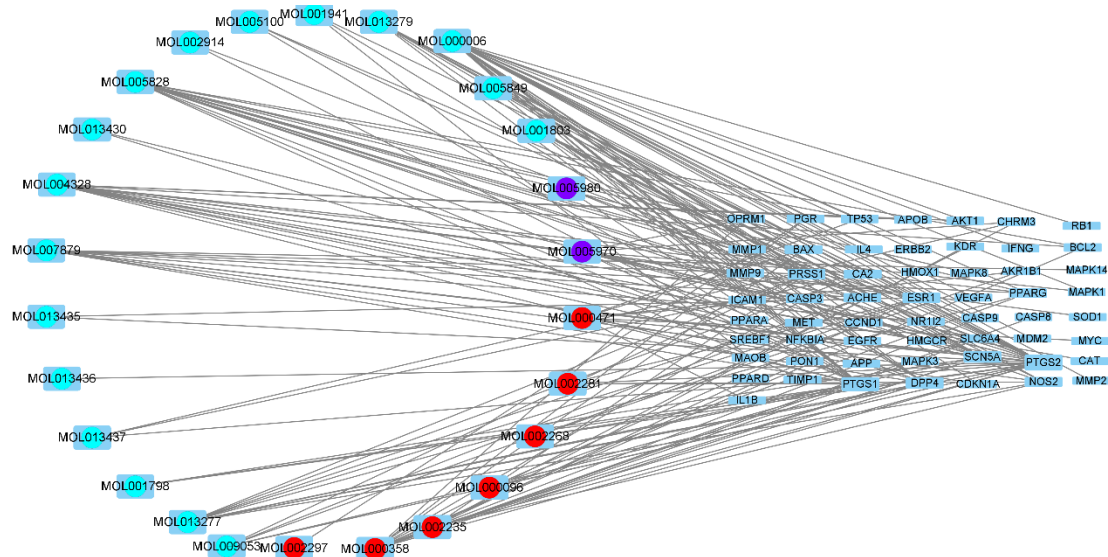


图 3 活性成分 - 靶点图

Fig. 3 Active ingredients - target plot

素蛋白连接酶结合等 123 条。分别取富集最显著的前 10 条经行可视化分析, 见图 6。对 KEGG 通路进行筛选, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 得到 153 条信

中得到的 PPI 网络文件导入 Cytoscape 软件, 利用 CytoNCA 进行筛选及可视化处理, 如图 5 所示, 其连接点数目较高的靶点基因有白细胞介素 (IL) - 1B、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 3、细胞周期素 D1 (CCND1)、肿瘤蛋白 P53 (TP53)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶体增殖物激活受体 G (PPARG)、表皮生长因子受体 (EGFR)、胞间黏附分子-1 (ICAM1)、MAPK14、原癌基因 (MYC)、血红素加氧酶 1 (HMOX1)、雌激素受体 1 (ESR1)、前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、MAPK8、蛋白激酶 B1 (Akt1)、MAPK1、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2), 这些靶点是厚朴三物汤治疗便秘的关键靶点。

2.5 关键靶点的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

将 20 个关键靶点导入利用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 以 $P < 0.05$ 为阈值筛选, 得出 BP 包含对营养素水平的反应、对金属离子的反应、对氧气水平的反应、对紫外线的反应、对药物的反应等 2 008 条, CC 包含隔膜筏、膜微区、膜区、囊泡腔、核封装等 67 个, MF 主要涉及磷酸酶结合、蛋白磷酸酶结合蛋白、核受体活动、配体激活的转录因子活性、DNA 结合转录因子、泛

号通路, 厚朴三物汤治疗便秘涉及的主要有内分泌抗药性、人巨细胞病毒感染、膀胱癌、直肠癌、卡波西肉瘤、疱疹病毒感染、IL-17、丙型肝炎、小细

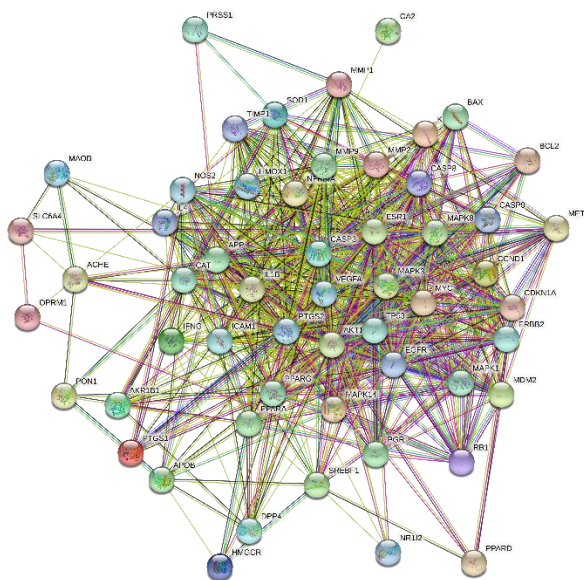


图 4 厚朴三物汤蛋白 PPI 网络图

Fig. 4 Protein PPI network of Houpo Sanwu Decoction

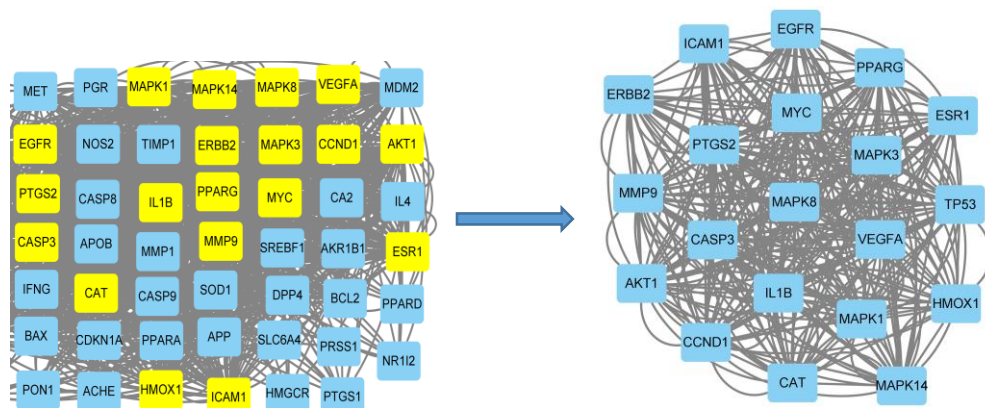


图 5 核心靶点基因网络图

Fig. 5 Core target gene network

病位在大肠，且涉及肺、脾、肾等脏腑^[5]。据历代医家总结及现代临床实践表明，厚朴三物汤主要对气滞型便秘疗效显著，但治疗机制至多为尚未清楚。故本研究通过各中药数据库，对药物的有效成分、疾病的靶点经行查找分析，以发现成分于靶点相互关系，为厚朴三物汤治疗便秘使用提供理论依据。

本研究通过网络筛选，得到厚朴三物汤的有 57 个活性成分，其中关键成分为芦荟大黄素、木犀草素、柚皮素。研究发现，芦荟大黄素可能是通过增加肠间的神经丛 P 物质 (SP)、血管活性肠肽 (VIP) 的含量，以进一步增强肠道动力来缓解便秘^[6]；Zheng 等^[7]报道，芦荟大黄素也可以通过上调便秘小鼠肠组织中水通道蛋白 3 (AQP3) 表达来改善胃肠蠕动而促进排便。木犀草素属天然黄酮类化合

物，经研究其可以通过 L 型钙离子通道来调节肠道平滑肌运动，也能够通过降低平滑肌细胞的 Akt 磷酸化水平，抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 通路激活，起到抑制平滑肌增殖的作用以达到治疗便秘的作用^[8]。柚皮素可调节血清中胃肠代谢相关成分的产生。研究显示柚皮素缓便秘症状的机制可能与上调 lop 诱导便秘小鼠的 Cajal 间质细胞和 AQP3 的表达增加相关^[9]。因此芦荟大黄素、木犀草素、柚皮素极大可能为治疗便秘的关键有效成分，为临床新药的研发提供了理论基础。

2.6 分子对接

将自由度较高的活性成分芦荟大黄素、木犀草素、柚皮素与 2.4 项下筛选的核心基因 IL-1B、VEGFA、MAPK3 进行分子对接，并利用 pymol 软件进行可视化分析，见图 8、表 2。结果显示，芦荟大黄素与各核心靶点基因有较好的结合活性，提示芦荟大黄素与上述靶点相互作用较大可能为厚朴三物汤治疗便秘的重要机制，值得做进一步的实验验证。

3 讨论

厚朴三物汤为治疗便秘的有效方，具有通便泻热，消滞除满功效。中医认为便秘不仅与自身体质有关，还与环境、饮食等外在因素有关。气血亏虚、脾肾阳虚、阴血亏虚等为便秘的常见病机，其

物，经研究其可以通过 L 型钙离子通道来调节肠道平滑肌运动，也能够通过降低平滑肌细胞的 Akt 磷酸化水平，抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 通路激活，起到抑制平滑肌增殖的作用以达到治疗便秘的作用^[8]。柚皮素可调节血清中胃肠代谢相关成分的产生。研究显示柚皮素缓便秘症状的机制可能与上调 lop 诱导便秘小鼠的 Cajal 间质细胞和 AQP3 的表达增加相关^[9]。因此芦荟大黄素、木犀草素、柚皮素极大可能为治疗便秘的关键有效成分，为临床新药的研发提供了理论基础。

PPI 网络显示，厚朴三物汤中有效化合物成分可能是通过 IL-1B、VEGFA、MAPK3 等关键靶点起作用，IL-1B 可以显著增加肠上皮细胞中抗菌肽的表达，降低肠道炎症致病菌的存活率，减轻炎症

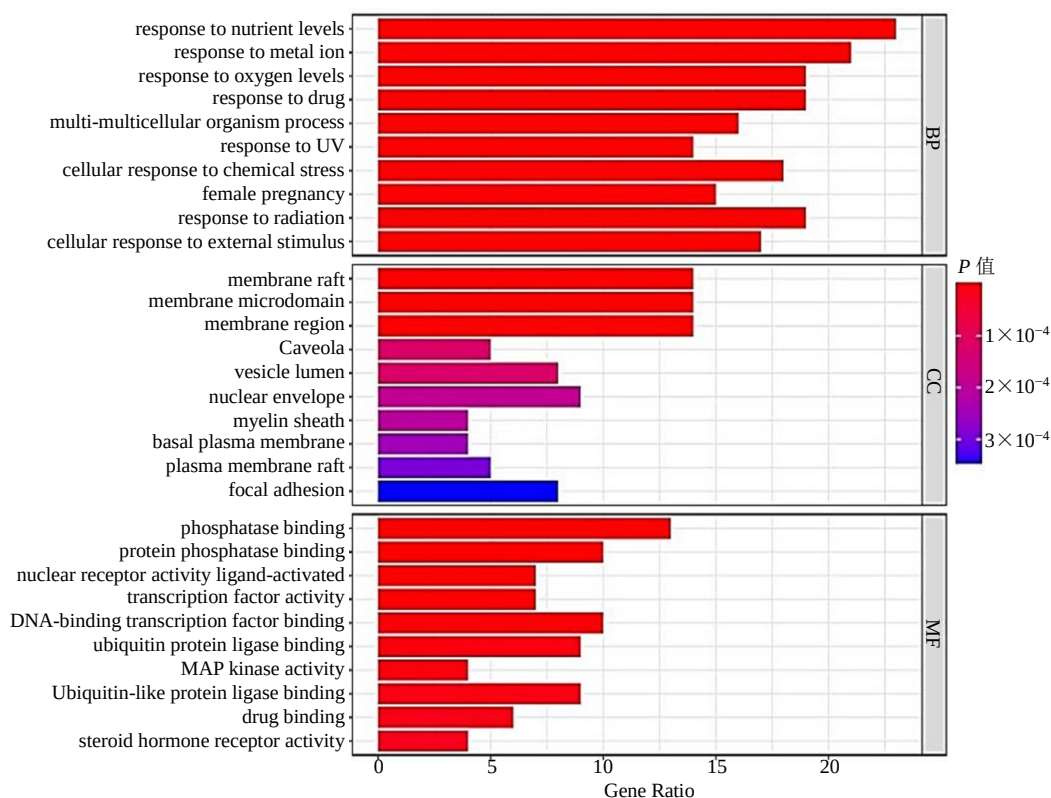


图 6 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis

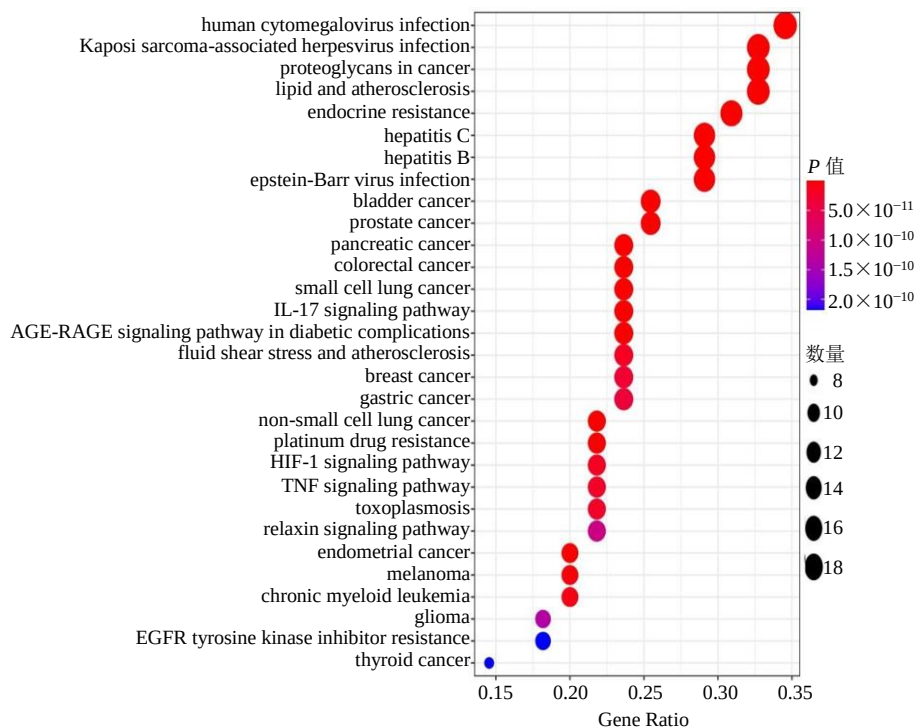


图 7 KEGG 富集分析图

Fig. 7 KEGG enrichment analysis

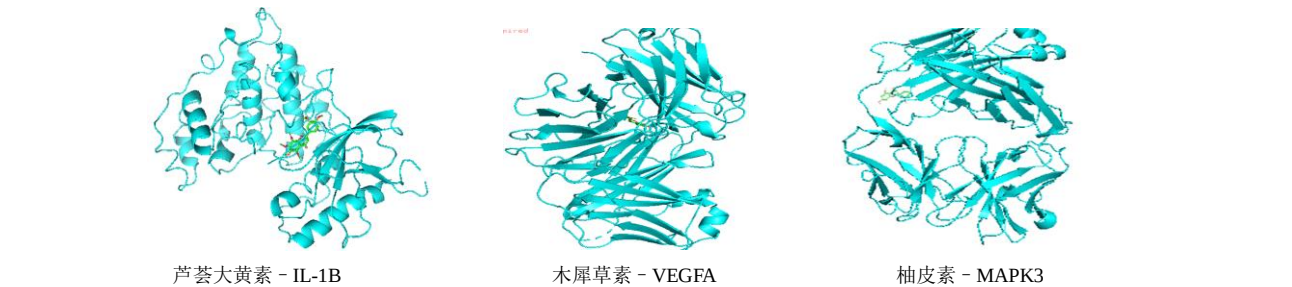


图 8 分子对接模式图
Fig. 8 Molecular docking model diagram

表 2 厚朴三物汤治疗便秘核心有效成分与靶点结合能
Table 2 Houpu Sanwu Decoction for treating constipation
core active ingredient and target binding energy

靶点	结合能/(kJ mol ⁻¹)		
	芦荭大黄酒	木犀草素	柚皮素
IL-1B	-9.4	-7.5	-6.6
VEGFA	-8.5	-7.2	-4.4
MAPK3	-8.2	-9.3	-7.3

对肠道环境的干扰^[10]。MAPK3 是 MAPK 家族成员。在便秘模型大鼠结肠组织中,通过阻断 MAPK 信号通路,可以下调 APQ3、APQ4 的表达,有效减少肠道对水分重新吸收,减少便秘的发生^[11]。

VEGFA 可促进新生血管形成,厚朴三物汤中的有效成分可能通过调节 VEGFA 水平,以改善肠神经营养支持,促进肠道蠕动,以进一步缓解便秘。通过 KEGG 富集分析可知,以上关键靶点作用于便秘有多条通路途径,主要包括内分泌抗药性、人巨细胞病毒感染、膀胱癌、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、IL-17、丙型肝炎、小细胞肺癌等信号通路。进一步说明厚朴三物汤治疗便秘很可能是通过免疫抑制、抗炎作用、抗病毒、抗肿瘤等多种方式发挥作用。通过分子对接将厚朴三物汤有效成分与关键靶点进行对接,结果显示二者能稳定结合,进一步说明厚朴三物汤有效成分能在体内稳定的发挥治疗作用。本研究表明,厚朴三物汤治疗便秘具有多成分、多靶点、多通路的特点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Krogh K, Ostergaard K, Sabroe S, *et al*. Clinical aspects of bowel symptoms in Parkinson's disease [J]. *Acta Neurol Scand*, 2008, 117(1): 60-64.

[2] 黄浩然, 赵杉. 厚朴三物汤治疗腹部术后粘连性肠梗阻的临床观察 [J]. *中国处方药*, 2021, 19(11): 83-84.

[3] 吕雪斌, 罗安东, 胡家敏, 等. 厚朴药材研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(16): 9614-9615.

[4] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.

[5] 郭慧君, 王知佳. 中医辨证分型治疗老年功能性便秘 80 例 [J]. *河北中医*, 2009, 31(5): 685-686.

[6] 李小玲, 林中, 袁园, 等. 胃肠动力的神经调节 [J]. *神经解剖学杂志*, 2012, 28(2): 213-216.

[7] Zheng Y F, Liu C F, Lai W F, *et al*. The laxative effect of emodin is attributable to increased aquaporin 3 expression in the colon of mice and HT-29 cells [J]. *Fitoterapia*, 2014, 96: 25-32.

[8] 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.

[9] 李若然, 杜长军, 武焱旻. 木犀草素对气道平滑肌细胞 PI3K/AKT 通路的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(35): 3896-3898.

[10] Ding K, Tan Y Y, Ding Y, *et al*. β -Sitosterol improves experimental colitis in mice with a target against pathogenic bacteria [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5687-5694.

[11] 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.

[责任编辑 高源]