

基于数据挖掘和网络药理学探究含黄连方剂治疗溃疡性结肠炎的配伍规律及作用机制

王佳俊¹, 陈青焱², 王 建^{1*}, 袁健梅¹

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 基于现代信息技术, 分析以黄连 *Coptidis Rhizoma* 为核心治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的用药特点及规律, 并阐明含黄连核心药物组治疗 UC 的分子机制, 为其实验验证及新型方剂的研发奠定基础。方法 运用 Apriori 关联规则分析用于治疗 UC 的含黄连方剂, 设置同时满足支持度 ≥ 0.25 , 置信度 ≥ 0.9 且提升度 ≥ 1 的药对为含黄连核心药物组, 利用 TCMSP、HERB 和 TCMID 数据库检索活性成分并收集相应靶点, 在 GeneCard 和 OMIM 数据库中以“ulcerative colitis”为关键词检索疾病靶点, 运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“中药-成分-潜在靶点”网络图, 通过 STRING11.0 构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并利用“微生信在线”网站对潜在靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路可视化, 采用分子对接软件 AUTODOCK 4 对关键靶点和成分进行对接验证。结果 数据库筛选得到 161 首目标方剂, 主要涉及 72 味药; 关联规则分析结果提示黄连与木香、甘草、白术、茯苓、当归是具有强关联性的 5 组药对, 这 6 味核心药物一共含有 144 种成分、潜在靶点 165 个, 其中有 83 个靶点分布在骨髓和淋巴组织, 关键靶点有 31 个, 包括丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、肿瘤蛋白 P53 (tumor protein P53, TP53)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、MAPK8。KEGG 分析结果显示磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、IL-17、晚期糖基化终产物及其受体 (advanced glycation end products-receptor advanced glycation end products, AGE-RAGE) 等通路与含黄连核心药物组治疗 UC 密切相关。分子对接结果显示受体蛋白与中药成分的对接活性好, 作用较稳定且与原配体的结合能相近, 其中 β -谷甾醇与原癌基因 JUN 具有最低的结合能。结论 初步分析了含黄连方剂治疗 UC 的配伍规律, 并且在分子水平揭示了含黄连核心药物组治疗 UC 的机制, 为后续含黄连方剂治疗 UC 的开发提供了理论基础。

关键词: 黄连; 溃疡性结肠炎; 数据挖掘; 关联规则; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.64 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5984-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.021

Compatibility regularity and mechanism of prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of ulcerative colitis based on data mining and network pharmacology

WANG Jia-jun¹, CHEN Qing-yao², WANG Jian¹, YUAN Jian-mei¹

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Based on modern information technology, the characteristics and rules of Huanglian (*Coptidis Rhizoma*) as the core in the treatment of ulcerative colitis (UC) were analyzed, and the molecular mechanism of drug group containing *Coptidis Rhizoma* as the core in the treatment of UC was clarified, which laid a foundation for its experimental verification and the research and development of new formulae. **Methods** Apriori association rule was used to analyze the prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* for the treatment of UC. The drug pair that satisfied support ≥ 0.25 , confidence ≥ 0.9 and lift ≥ 1 as the core drug group containing *Coptidis Rhizoma*. The TCMSP, HERB and TCMID databases were used to retrieve components and collect the corresponding targets. Disease targets were searched in GeneCard and OMIM databases using the keyword “ulcerative colitis”. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the “TCM-ingredient-potential target” network diagram, the protein-protein interaction (PPI) network was constructed

收稿日期: 2021-04-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873023)

作者简介: 王佳俊 (1995—), 男, 汉族, 江西上饶人, 硕士研究生, 研究方向为中药药性理论及应用研究。E-mail: 526632532@qq.com

*通信作者: 王 建 (1959—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药药性理论及应用研究。E-mail: jianwang08@163.com

through STRING 11.0. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were used to visualize potential targets in the “Wei Sheng Xin Online” website, and AUTODOCK 4 software was used for docking verification of key targets and components. **Results** A total of 161 target prescriptions were screened, mainly involving 72 medicines. The results of association rule analysis showed that *Coptidis Rhizoma* had strong correlation with Muxiang (*Aucklandiae Radix*), Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*), Baizhu (*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*), Fuling (*Poria*) and Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*). These six core medicines had 144 ingredients and 165 potential targets, of which 83 targets were distributed in bone marrow and lymphoid tissues. There were key 31 targets, which included serine/threonine kinase 1 (AKT1), tumor protein P53 (TP53), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), interleukin-6 (IL-6), and MAPK8. In KEGG analysis, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt), IL-17, advanced glycation end products-receptor advanced glycation end products (AGE-RAGE), etc. were closely related to UC in core drug group containing *Coptidis Rhizoma*. The results of molecular docking showed that the receptor protein had a good docking activity with traditional Chinese medicine components, the effect was relatively stable, and the binding energy was similar to that of the original ligand. Among them, β -sitosterol had the lowest binding energy with JUN. **Conclusion** The study preliminarily analyzed the compatibility of prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in the treatment of UC, revealed the mechanism of the core drug group containing *Coptidis Rhizoma* in the treatment of UC at the molecular level, and provided a theoretical basis for the subsequent development of prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in the treatment of UC.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; ulcerative colitis; data mining; association rules; network pharmacology; molecular docking

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于一种慢性特异性炎症性肠病,其病变部位常始于直肠,逆行而上,可累及全结肠与末端回肠,呈连续弥漫性分布。据报道,UC 更多见于年轻群体,30~40岁的成年人是疾病发作的高峰年龄阶段^[1-2]。UC 无性别差异,近年来,发病率和患病率在全世界范围呈上升趋势,且在发达国家的发病率高于发展中国家。其发病机制复杂,涉及遗传、环境、自身免疫和易感基因等因素,可导致腹痛、腹泻、便血等症状,且具有癌变倾向并伴随多种肠外症状,严重影响患者的生活质量,所以 WHO 将其确定为现代难治疾病之一^[3-4]。根据其临床表现,UC 在中医古籍中多被称为肠癖、泄泻、下痢等。如《素问·太阴阳明论》云:“故犯贼风虚邪者,阳受之……下为飧泄,久为肠癖。”《景岳全书·卷二十四·泄泻》载:“凡《内经》有言飧泄者,有言濡泄者,皆泄泻也;有言肠癖者,即下痢也。”对于 UC 的病因病机,中医理论认为多为外感六淫、情志失调、饮食不节等多种病因相互错杂,损伤脾胃而致病。病程中始终存在脾虚湿聚的病机变化,因此脾肾虚衰是本病的必然转归,临床上多在补脾肾的基础上分期、分型而辨证施治^[5-6]。

黄连为多年生草本植物毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎,性寒,味苦,归心、胃、肝、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,常用于湿热泻痢、呕吐等症,古今均视为治痢要药^[7]。《神农本草经》记载:“黄

连主热气,目痛,眦伤,泣出,肠癖,腹痛,下利。”《名医别录》强调其:“微寒,无毒。主治五藏冷热,久下泄痢、脓血。”现代研究表明,除主要成分小檗碱外,黄连尚含黄连碱、巴马汀、阿魏酸、绿原酸等化学成分,具有调节胃肠运动、抗溃疡、抗炎、抗病毒等作用^[8-9]。将含黄连煎剂用于治疗 UC 患者,可通过调节神经内分泌和改善机体免疫功能,修复肠黏膜,愈合溃疡,其抗 UC 的作用机制与调节肠道菌群、降低粪中性粒细胞衍生蛋白的含量、抗氧化应激等有关^[10-13]。然而目前关于黄连治疗 UC 的分子生物学研究尚不够深入且缺系统性评价方法。

中医药数据挖掘研究是将我国丰富的中医药古籍和现代信息技术相结合,挖掘药物之间的相互规律及内在联系,是中医药信息发展过程中的重要内容^[14-15]。2020年6月2日,习近平总书记主持召开专家学者座谈会并强调“要加强古典医籍精华的梳理和挖掘,建设一批科研支撑平台,改革完善中药审评审批机制,促进中药新药研发和产业发展。”本文以 IBM SPSS Modeler 18.0 关联规则挖掘方剂数据库,归纳黄连高频、强相关的药物组合;通过网络药理学探究高频对药治疗 UC 的潜在作用机制,并利用分子对接实现初步验证。从“中药-成分-疾病-靶点-组织分布-通路”角度进行分析,以期为黄连方剂加减配伍用于治疗 UC 的临床实践提供理论支撑,整体研究思路如图 1 所示。

1 材料与方法

1.1 处方数据来源

用于治疗 UC 的含黄连方剂来源于中国中医科

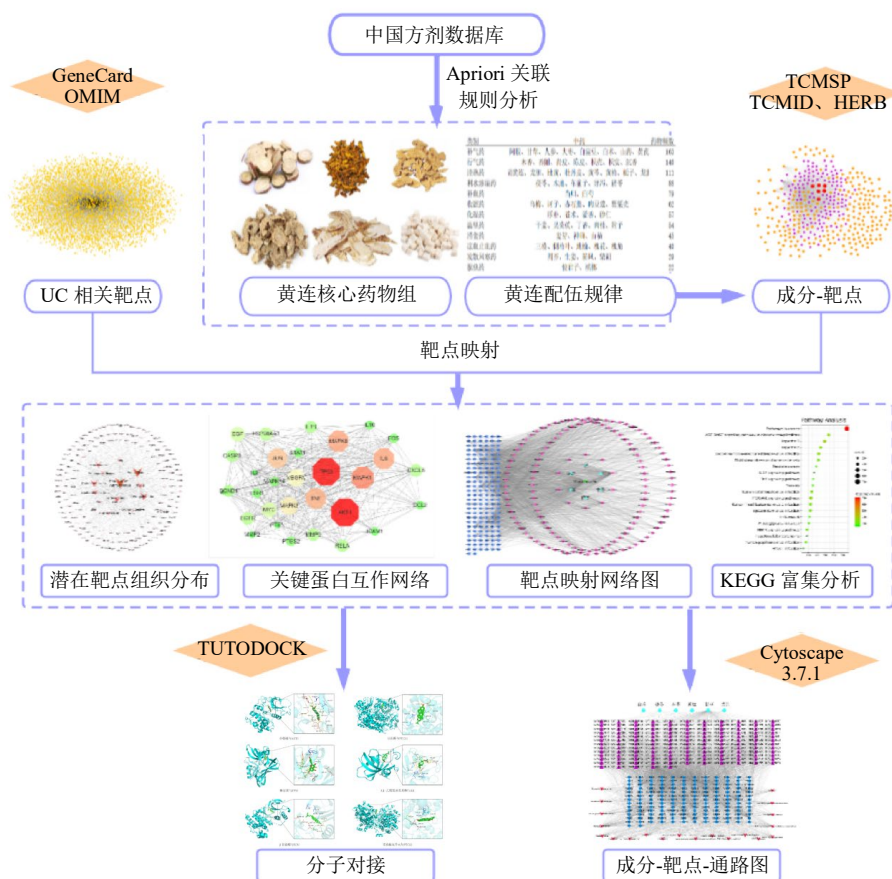


图1 含黄连核心药物组治疗 UC 的作用机制研究思路

Fig. 1 Research ideas on mechanism of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

学院中医药信息研究所的中国方剂数据库 (<http://cintmed.cintcm.com/cintmed/>), 该数据库收录从古至今的中药方剂, 时间跨度长, 方剂数据可靠。

1.2 处方筛选与数据标准化

依据中医理论对 UC 病名的认识, 检索关键词设定为主治“久泻 OR 肠癖 OR 泄泻 OR 便血”和核心药物“黄连”, 得到方剂 259 首, 并进行筛选。筛选标准如下: ①剔除外用方剂, 仅保留内服方剂; ②剔除处方药物组成无黄连而加减方中有黄连的方剂; ③剔除仅含有黄连一味药的方剂; ④剔除 1911 年以后的现代方剂。数据标准化处理: 对于不同产地、不同炮制方法、不同入药部位但功能一致的药物计为同一味药; 依据《中国药典》2020 年版、《中华本草》^[16]的药物名称进行药名标准化处理。

1.3 数据关联分析

利用 IBM SPSS Modeler 18.0 软件^[17], 基于 Apriori 算法对已筛选的含黄连方剂进行关联规则分析, 包括支持度 (support)、置信度 (confidence) 和提升度 (lift) 3 个指标, 设置同时满足支持度 ≥ 0.25 , 置信度 ≥ 0.9

且提升度 ≥ 1 的药对为黄连核心药物组^[18]。

1.4 中药成分与作用靶点的筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[19], HERB 本草组鉴 (<http://herb.ac.cn/>)、TCMID 数据库 (<http://119.341.228:8000/tcmid/>) 和近 3 年来的相关文献报道以检索相应的中药成分。TCMSP 上查找的中药成分以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件筛选其对应的靶点, 其他方式检索到的中药成分则利用 Swiss Target Prediction 和 SwissADME 网站进行相应操作。利用 UniPort (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将靶点转换为基因名。在 GeneCard (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库中, 以“Ulcerative colitis”为关键词搜索疾病靶点, 将成分靶点与疾病靶点进行映射, 获得黄连核心药物组治疗 UC 的潜在靶点。

1.5 构建与分析成分-靶点网络图

使用 Cytoscape3.7.1 软件^[20]对构建中药-成分-

潜在靶点可视化网络图。

1.6 关键靶点提取和构建蛋白互相作用 (protein-protein interaction network, PPI) 网络

将潜在靶点导入 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>)^[21], 物种设置为 homo sapiens, 以综合得分 (combined score) ≥ 0.7 为筛选条件并删除游离节点, 得到蛋白相互作用关系, 下载 tsv 格式的结果文件并导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 使用该软件中的 network analyzer 进行网络拓扑分析, 以度 (degree) ≥ 2 倍中位数的靶点为关键靶点构建 PPI 网络。

1.7 构建潜在靶点组织分布网络

根据 HPA 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 的 tissue atlas 模块构建靶点组织分布图, 归纳并揭示潜在靶点在人体组织中的分布。

1.8 通路富集分析

利用 Metascape (<https://metascape.org/>) 对黄连核心药物组潜在靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 建立中药-成分-靶点-通路 (前 20 条与 UC 相关) 对应关系, 并利用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/?p=1>) 进行可视化。

1.9 分子对接验证

采用分子对接软件 AUTODOCK 4 对 PPI 网络中每味中药对应度值最大的靶点进行分子对接验证^[22]。RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>)^[23]和 ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>)^[24]被用于获取靶蛋白和配体结构, 对接结果以结合能的形式展示, 分值越小说明结合越稳定。

2 结果

2.1 处方统计与分析

从中医药在线数据库筛选出 161 首符合要求的标准方剂, 共有 200 味中药参与组方。其中使用频数 ≥ 4 次的药物共 72 味, 合计使用次数 1351 次。关联规则结果显示含黄连方剂中高频药对 39 对, 使用频数均 ≥ 15 次, 如表 1 所示。72 味中药依据《临床中药学》(第 2 版)^[25]进行分类, 如表 2 所示。结果显示黄连治疗 UC 症状常与补气药、行气药、清热药、利水渗湿药、补血药配伍使用, 与黄连高频配伍排名前 10 味的中药多为味甘、性温之品; 归脾、肺 2 经; 疗效上多可益气健脾、行气止痛、利水渗湿, 这种用药特点与中医理论对“肠癖”的基本病机“脾虚湿盛”相符。

表 1 治疗 UC 的含黄连方剂药物之间的关联关系

Table 1 Medicines relationship between prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

排序	药物组合	功效	频率/%	排序	药物组合	功效	频率/%
1	甘草、黄连	补脾益气、清热燥湿	35.4	21	白术、人参	益气健脾、补益脏气	13.0
2	茯苓、黄连	利水渗湿、清热燥湿	27.3	22	诃子、黄连	敛肺止咳、清热燥湿	12.4
3	黄连、木香	清热燥湿、行气止痛	26.7	23	茯苓、人参	利水渗湿、补益脏气	12.4
4	当归、黄连	补血活血、清热燥湿	25.5	24	黄连、泽泻	清热燥湿、利水渗湿	12.4
5	白术、黄连	益气健脾、清热燥湿	25.5	25	黄连、神曲	清热燥湿、消食化积	11.8
6	陈皮、黄连	行气调中、清热燥湿	23.6	26	白芍、茯苓	养血敛阴、利水渗湿	11.8
7	白芍、黄连	养血敛阴、清热燥湿	23.6	27	陈皮、茯苓	理气健脾、利水渗湿	11.8
8	黄连、黄芩	清热燥湿	21.1	28	黄柏、黄连	清热燥湿	11.2
9	黄连、人参	清热燥湿、补益脏气	19.9	29	当归、地黄	补血调经、清热凉血	11.2
10	干姜、黄连	温中散寒、清热燥湿	18.0	30	当归、甘草	补血调经、补脾益气	11.2
11	黄连、枳壳	清热燥湿、理气宽中	18.0	31	黄连、肉豆蔻	清热燥湿、温中行气	11.2
12	厚朴、黄连	燥湿消痰、清热燥湿	16.1	32	茯苓、泽泻	利水渗湿	11.2
13	白术、茯苓	益气健脾、利水渗湿	16.1	33	陈皮、木香	理气健脾、行气止痛	9.9
14	地黄、黄连	清热凉血、清热燥湿	14.3	34	甘草、厚朴	补脾益气、燥湿化痰	9.9
15	白术、陈皮	益气健脾、理气健脾	14.3	35	甘草、黄芩	补脾益气、清热燥湿	9.9
16	白术、甘草	益气健脾、补脾益气	14.3	36	白芍、白术	养血敛阴、益气健脾	9.9
17	陈皮、甘草	理气健脾、补脾益气	13.7	37	黄连、乌梅	清热燥湿、涩肠止泻	9.3
18	甘草、人参	补脾益气、补益脏气	13.7	38	当归、黄芩	补血调经、清热燥湿	9.3
19	白芍、甘草	养血敛阴、补脾益气	13.7	39	半夏、黄连	燥湿消痰、清热燥湿	9.3
20	茯苓、甘草	利水渗湿、补脾益气	13.0				

表 2 治疗 UC 的含黄连方剂药物类别分析

Table 2 Analysis of medicine types of prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

类别	中药	药物频数
清热药	黄连、胡黄连、龙胆、地黄、牡丹皮、黄芩、黄柏、栀子、龙胆	272
补气药	阿胶、甘草、人参、大枣、白扁豆、白术、山药、黄芪	163
行气药	木香、香附、青皮、陈皮、枳壳、枳实、沉香	140
利水渗湿药	茯苓、木通、车前子、泽泻、猪苓	88
补血药	当归、白芍	79
收涩药	乌梅、诃子、赤石脂、肉豆蔻、罂粟壳	62
化湿药	厚朴、苍术、藿香、砂仁	57
温里药	干姜、吴茱萸、丁香、肉桂、附子	54
消食药	麦芽、神曲、山楂	45
凉血止血药	三棱、侧柏叶、地榆、槐花、槐角	40
发散风寒药	荆芥、生姜、防风、柴胡	29
驱虫药	使君子、槟榔	22
开窍药	麝香、蟾酥、冰片	18
泻下药	牵牛子、大黄	17
发散风热药	升麻、葛根	15
温化寒痰药	半夏	15
活血化瘀药	莪术、川芎	14
安神药	龙骨、朱砂	11
补阴药	麦冬	6
化瘀止血药	蒲黄	4

2.2 高频核心药物组

在关联规则分析中,筛选符合“1.3”项下条件的中药组成核心药物组,结果与上述高频药物吻合,如表 3 所示。《得配本草》云:“白术佐川连去湿火”,《药品经义》记载:“木香,香能通气,和合五脏,为调诸气要药……同黄芩、黄连治痢疾”。当归配伍茯苓功能补益气血、健脾止泻,适用于脾胃久虚、泄泻不止。《历代本草药性汇解》提出甘草“性缓,善解诸急”又“补脾胃不足,能大泻心火需用之”的观点。故以紧密相关的 6 味中药(黄连、木香、茯苓、甘草、当归、白术)作为黄连核心药物组。

2.3 成分-靶点网络构建

根据“1.4”项下设定的条件筛选得到 144 个核心药物组的中药成分,其中黄连、甘草、茯苓、木

表 3 治疗 UC 的含黄连方剂核心药对

Table 3 Core drug pair of prescriptions containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

序号	关联规则	支持度	置信度
1	甘草-黄连	0.35	1
2	茯苓-黄连	0.27	1
3	木香-黄连	0.26	1
4	当归-黄连	0.25	1
5	白术-黄连	0.25	1

香、白术、当归分别有 13、98、15、8、7、12 个成分。成分靶点与疾病靶点映射得到 165 个潜在靶点。使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建疾病-中药-成分-潜在靶点网络图,网络共有 1 个绿色节点(疾病),6 个青绿色节点(中药),144 个紫色节点(成分),165 个蓝色节点(潜在靶点),共有 2202 条边(图 2)。

2.4 关键靶点筛选和 PPI 网络构建

将自 STRING11.0 网站上下下载的 tsv 格式文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,并利用 network analyzer^[26]插件进行网络拓扑学分析,网络的平均度值为 17,网络中心性 0.518,靶点度值中位数 14,以度≥2 倍中位数的靶点构建 PPI 网络,关键靶点如表 4 所示。网络(图 3)中共有 31 个关键靶点及 343 条连线,颜色越红,节点越大,靶点度值越大,即这些靶点可能与 UC 具有强相关性。

2.5 潜在靶点组织分布网络构建

在 HPA 网站的 tissue atlas 模块查询潜在靶点在人体组织中的分布,使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建潜在靶点-组织分布网络图,网络共有 174 个节点和 547 条边,如图 4 所示,圆形节点表示潜在靶点,箭头节点表示组织器官,箭头越大,颜色越深,表明该组织分布的靶点越多,显示潜在靶点在骨髓和淋巴组织(83 个)、女性组织(74 个)、肝胆(52

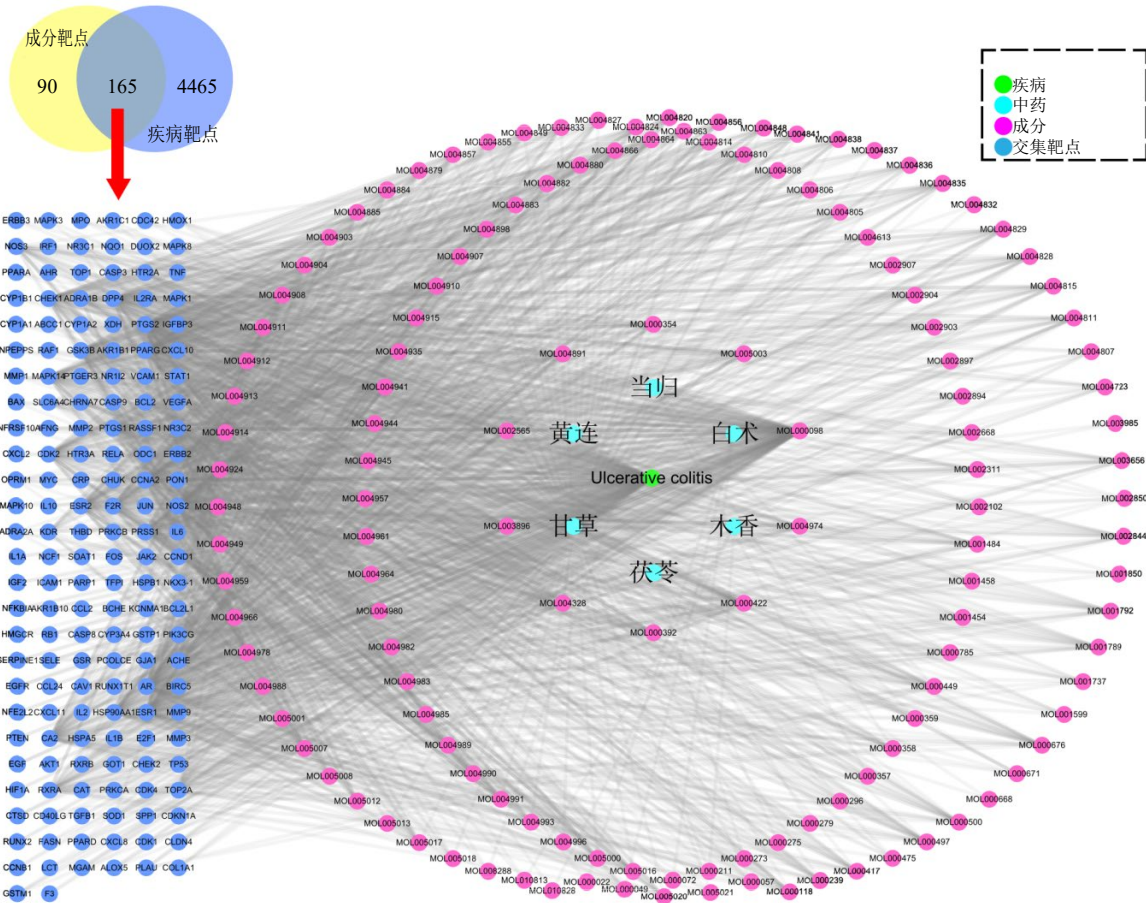


图 2 含黄连核心药物组的成分靶点与 UC 靶点的网络分析

Fig. 2 Network analysis of component targets and UC targets of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma*

表 4 含黄连核心药物组治疗 UC 的关键靶点信息

Table 4 Key target information of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

序号	靶点名称	基因名称	度
1	丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1)	AKT1	73
2	肿瘤蛋白 P53 (tumor protein P53)	TP53	72
3	丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1)	MAPK1	61
4	白细胞介素-6 (interleukin-6)	IL-6	58
5	丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8)	MAPK8	58
6	肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)	TNF	57
7	JUN 原癌基因 [transcription factor activator protein-1 (AP-1)]	JUN	55
8	丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3)	MAPK3	51
9	血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	VEGFA	50
10	MYC 原癌基因 (MYC proto-oncogene)	MYC	46
11	表皮生长因子 (epidermal growth factor)	EGF	45
12	90 000 热休克蛋白 α 1 (90 000 heat shock protein α 1)	HSP90AA1	43
13	C-X-C 基序趋化因子配体 8 (C-X-C motif chemokine ligand 8)	CXCL8	42
14	基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9)	MMP9	42
15	表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)	EGFR	42
16	半胱天冬酶 3 (Caspase 3)	CASP3	41
17	RELA 原癌基因 (RELA proto-oncogene)	RELA	41
18	白细胞介素-1 β (interleukin-1 β)	IL1B 或 IL-1 β	41
19	细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)	CCND1	40

续表 4

序号	靶点名称	基因名称	度
20	前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	PTGS2	37
21	丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14)	MAPK14	36
22	Fos 原癌基因 (Fos proto-oncogene)	FOS	36
23	雌激素受体 1 (estrogen receptor 1)	ESR1	36
24	C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2)	CCL2	35
25	信号转导和转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1)	STAT1	35
26	白细胞介素-10 (interleukin-10)	IL-10	35
27	细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1)	ICAM1	34
28	基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2)	MMP2	31
29	雄激素受体 (androgen receptor)	AR	30
30	磷酸酶和同源肌腱蛋白 (phosphatase and tensin homolog)	PTEN	30
31	白细胞介素-2 (interleukin-2)	IL-2	28

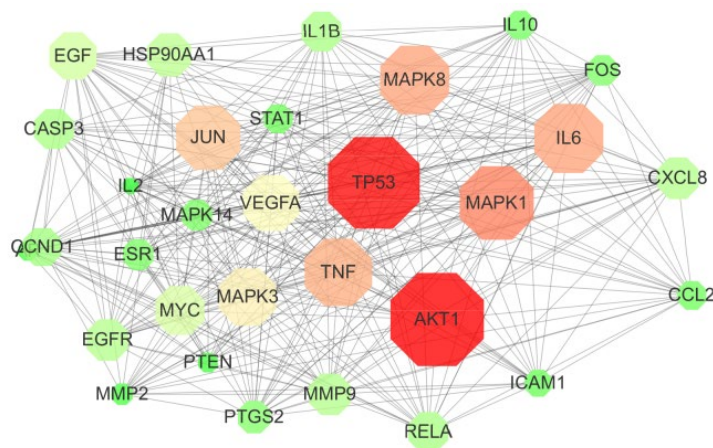


图 3 含黄连核心药物组治疗 UC 关键靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of key target protein of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

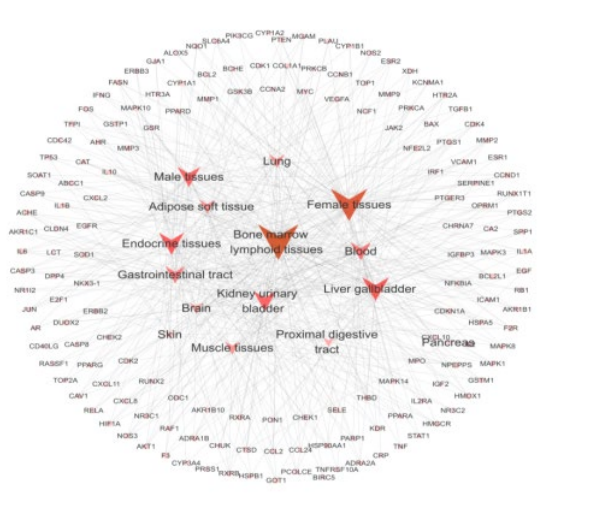


图 4 含黄连核心药物组潜在靶点-组织分布

Fig. 4 Potential target-tissue distribution of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

个)、内分泌组织 (48 个)、肾脏与膀胱 (43 个) 高表达。

2.6 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 网站对含黄连核心药物组治疗 UC 的 158 个潜在靶点进行 KEGG 富集分析, 设置 $P < 0.01$, 重叠值 ≥ 3 , 富集值 ≥ 1.5 为筛选调节, 按 count 值从大到小排序, 前 20 条通路的具体信息如图 5 所示。其中近一半的通路炎症相关, 提示含黄连核心药物组治疗 UC 的分子机制可能与炎症反应最为相关。

2.7 网络可视化分析

应用 Cytoscape 3.7.1 软件对 158 个潜在靶点、147 个中药成分和前 20 条通路进行可视化操作, 构建网络图, 如图 6 所示, 由上而下的靶点分别表示中药、成分、靶点、前 20 条通路。由图 6 表明含黄

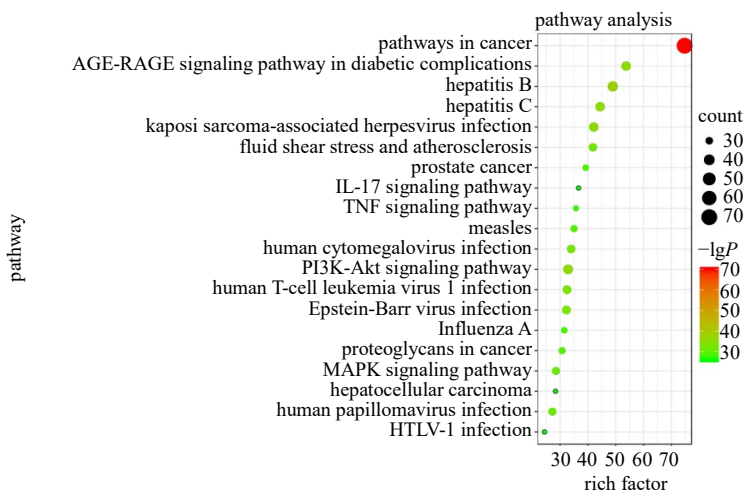


图 5 含黄连核心药物组治疗 UC 潜在靶点的前 20 条 KEGG 通路

Fig. 5 Top 20 KEGG pathways of potential targets of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

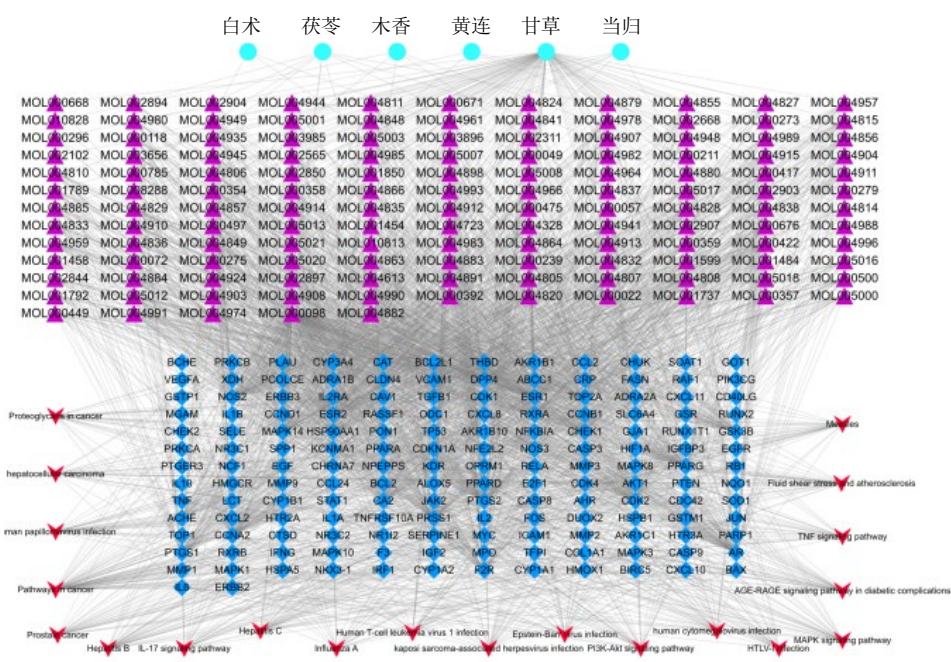


图 6 含黄连核心药物组治疗 UC 的中药-成分-靶点-通路网络

Fig. 6 TCM-component-target-pathway network of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

连核心药物组通过多组分、多靶点、多通路发挥对 UC 的治疗作用。

2.8 分子对接验证

在核心药物组众多成分对应的靶点中，筛选出度值较大的靶点为受体，与每味药相应成分进行分子对接验证，分别找到 6 对对接组合：小檗碱与 AKT1、豆甾醇与 PTGS2、槲皮素与 TP53、 3β -乙酞氧基苍术酮与 AR、 β -谷甾醇与原癌基因 JUN、常春藤皂苷元与 PTGS2。以对接后配体分子与原配体分子的均方根偏差 (root-mean-square deviation,

RMSD) 的大小作为判断软件参数设置的合理性以及程序对于该蛋白受体配体复合物的适用性，一般认为该值小于 0.2 时表明对接参数设置合理。以受体蛋白原配体的结合能为参照，进行靶点对接。对接结果如表 5 所示，结果表明受体蛋白与中药成分的对接活性好，且与原配体的结合能相近，其中当归中的 β -谷甾醇与 JUN 具有最低的结合能，分子结合模式如图 7 所示。

3 讨论

UC 是常见的消化系统疑难病，影响着全人类

表5 含黄连核心药物组潜在治疗靶点与对应中药成分对接结果

Table 5 Molecular docking results of potential targets and corresponding ingredients of core drug group containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

中药-成分	受体蛋白	RMSD	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	
			原配体	中药成分
黄连-小檗碱	AKT1	0.059	-38.86	-39.54
木香-豆甾醇	PTGS2	0.063	-22.59	-20.29
甘草-槲皮素	TP53	0.030	-24.22	-30.08
白术-3β-乙酰氧基苍术酮	AR	0.036	-21.33	-28.11
当归-β-谷甾醇	JUN	0.062	-54.05	-46.73
茯苓-常春藤皂苷元	PTGS2	0.065	-28.41	-30.58

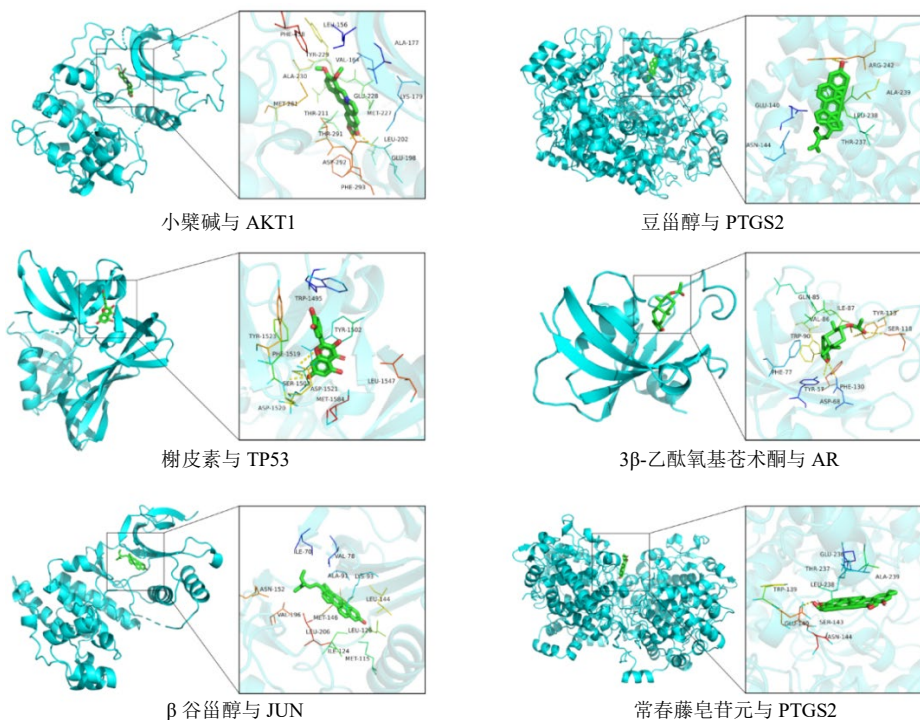


图7 含黄连核心药物组潜在治疗靶点与对应中药成分对接模式

Fig. 7 Docking model of potential targets and corresponding ingredients of core drug groups containing *Coptidis Rhizoma* in treatment of UC

的健康。中医认为 UC 的基本病机为本虚标实证，本虚责之于脾，标实多以湿热互结为主^[27]。《医宗金鉴》言：“泻皆成于湿，湿皆本于脾胃。”《景岳全书》曰：“凡里急后重者……而其病本，则不在广肠，而在脾肾”又“泄泻之本，无不由脾胃”。并在治疗总则上主张采用扶正祛邪的方法，扶正强调补脾益气，而祛邪重在清热燥湿^[28]。

本研究利用中医药在线数据库收集用于治疗 UC 的含黄连方剂，共收集到方剂 161 首，涉及 200 味中药，39 对主要药对。与黄连配伍治疗 UC 的

物多为清热药、补气药、行气药、利水渗湿药及补血药，配伍后综合发挥利湿、健脾、行气、止痛功效；黄连配伍清热药重在清热燥湿解毒，以除 UC 湿热内蕴之象，加之利水渗湿药，以减轻水湿雍滞肠道而导致的腹痛、腹泻样症状；补气药、行气药与补血药同用，气血共治，在于针对 UC 脾虚湿热而导致气血失调，湿热搏结气血而为便血之症。在中药配伍规律方面，黄连与木香、甘草、白术、当归、茯苓之间具有强关联性而形成重要的配伍药对。黄连苦寒，擅长清脾胃大肠湿热，白术功能补

气健脾而又燥湿,两药配伍,清热燥湿、补气健脾,补泻并行;木香温通性燥,善通行肠胃气滞而缓解腹胀、腹痛;当归辛温行散,补血活血止痛,二药配黄连,寒热并用,起“行血则便脓自愈,调气则后重自除”之效,而且可以兼顾湿热壅滞肠道,耗伤阴血之虑;茯苓甘淡而利水渗湿,健脾助其运化水湿,标本兼顾;甘草为缓急止痛之品,可调和诸药。含这6味核心药物治疗UC的方剂有香归白术散、当归芍药汤、加味香连散等。这些核心药物多具味甘、苦,性温、平,主归脾胃2经的性能特点,其针对UC患者脾虚、湿盛的基本病机和腹痛、便血、里急后重等临床症状,而发挥补脾、补气血而扶正,燥湿、止痛、止痢而祛邪治标,共同改善脾胃虚弱、水湿内停、泻痢后重的UC病证,可为其后开发用于治疗UC的新型黄连组方提供参考。

含黄连核心药物组潜在靶点组织分布结果显示,83个潜在靶点在骨髓与淋巴组织中高表达。近年来研究表明,骨髓间充质干细胞定向移植在受损结肠部位可通过增加肠上皮细胞的增殖、促进肠道黏膜微环境的重建,从而使肠道恢复正常功能,且骨髓为主要造血器官,骨髓细胞的增殖可增强机体造血能力,在一定程度上改善UC便血带来的缺血样症状。淋巴系统紊乱,即自体免疫功能失调,是UC发病的重要机制之一。淋巴细胞在肠道系统与机体免疫系统调节中发挥着重要的媒介作用,当肠腔内细菌由于肠屏障被破坏而进入血液系统,向免疫系统传递伤害信号,诱导淋巴细胞释放大量炎症因子而引起自身免疫反应过度,导致肠道炎症的发生。同时,靶点多组织分布的特点,体现了机体的整体性,表明核心药物组有治疗UC合并其他病症的潜能。

黄连具有广谱抗病原微生物和抗炎的药理作用。研究报道显示,黄连所含主要活性成分小檗碱能抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、IL-6、IL-8等炎症因子的产生和分泌,在抗黏膜炎症方面效果确切^[29]。药对是依据中医配伍理论形成的2味相对固定的药物配对,研究相对固定的中药配伍,可为后续方剂的开发利用提供有效的理论支撑^[30]。本研究将5组具有较强关联的药对设定为含黄连核心药物组,利用网络药理学等研究手段,微观探索其治疗UC的潜在分子机制。KEGG通路富集分析显示其涉及磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase-protein

kinase B, PI3K-Akt)、IL-17、晚期糖基化终产物及其受体(advanced glycation end products-receptor advanced glycation end products, AGE-RAGE)、TNF- α 等UC相关通路。IL-17是主要由活化的辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)产生的炎症因子,可促进T细胞的激活和刺激细胞黏附分子1(cellular adhesion molecule 1, ICAM-1),引发炎症级联反应^[31]。研究显示,AGE-RAGE信号通路可通过激活PI3K-Akt信号通路介导结肠上皮细胞迁移、增殖和凋亡^[32];在激活PI3K-Akt通路后,磷酸化的Akt可以通过增强人核因子 κ B抑制蛋白(I κ B)的磷酸化和减少I κ B的合成来激活核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)^[33]。NF- κ B的活化促进了促炎细胞因子TNF- α 和IL-1 β 等的表达和分泌,导致细胞因子含量失衡^[34];而TNF- α 介导的紧密连接蛋白缺陷会破坏肠屏障完整性,导致一系列的炎症反应和黏膜损伤发生^[35-36];提示UC的发生与机体免疫反应异常引起的细胞因子表达失衡和肠屏障被破坏有关。

网络药理学从系统性和整体性的方向对中药的物质基础和作用机制展开研究,为中药药效成分的探索提供了新思路^[37-38]。本研究构建的“中药成分-靶点”网络涉及6味中药,137个中药成分以及158个潜在靶点。分子对接验证结果显示黄连和甘草共有的成分槲皮素与靶蛋白的结合能较低,稳定性较好。有实验证实,槲皮素可通过减轻肠道微血管内皮细胞中黏附分子的表达,减少肠道炎症细胞浸润而控制肠道炎症^[39]。甘草所含的山柰酚通过核因子NF-E2相关因子(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)途径介导诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的产生,降低HepG2-C8细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RON)的含量,进而达到抗UC作用^[40]。

PPI网络图表明含黄连核心药物组治疗UC与AKT1、TP53、MAPK1、IL-6和MAPK8蛋白的关系较大。IL-6是一种主要由淋巴细胞产生的多功能细胞因子,在肿瘤细胞的增殖和凋亡及细胞免疫中起着重要的作用。研究表明,阻断该信号通路可改善小鼠实验性结肠炎^[41]。TP53是目前与人类肿瘤相关性最高的基因,其突变常见于炎症性肠病相关的结肠癌中,研究发现,槲皮素可通过下调ROS、COX-2和PI3K而减少P53突变为TP53的比例,

从而发挥抑癌及免疫调节作用^[42]。MAPK1 和 MAPK8 属于 MAPK 家族蛋白,在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用,多用于自身免疫性相关疾病中^[43]。AKT1 是一种自噬相关基因,参与包括细胞凋亡和葡萄糖代谢在内的细胞过程,实验研究表明,AKT1 蛋白的泛素化可通过增强自噬作用而降低 UC 小鼠炎症因子的表达^[44]。综上所述,作用靶点可能通过降低炎症因子表达,调节机体免疫功能维持肠道微环境的稳态从而治疗 UC,这也间接证明了网络药理学研究的可行性,是预测活性成分靶点的有力工具。

由于中药方剂成分的多样性,机体吸收、分布、代谢等复杂性,使得深度挖掘中药药效物质基础和临床价值成为中药现代化的必由之路^[45]。网络药理学从多学科的技术内容和多层次的网络整合,探索药物与疾病之间的潜在关系,其全面、系统的研究思想与中医整体观念不谋而合^[46]。故本研究基于对中医药在线数据库的系统筛查,归纳并总结黄连在治疗 UC 方面的用药配伍规律及常用药对,借助网络药理学研究策略,整合多种数据库资料并利用分子对接软件进行验证,初步阐明含黄连核心药物组多组分、多靶点的抗 UC 特点,揭示其与炎症-免疫-肠屏障之间的内在联系。但鉴于方剂配伍理论的复杂性及网络药理学仍处于发展的早期阶段,还存在着数据库信息收录偏倚,如药物成分的分离鉴定尚未区分药用部位和非药用部位,这可能会导致药效成分对靶标的作用与临床实际用药不符而无法准确预测药物与疾病之间的量效关系等问题;此外,在 PPI 网络的蛋白互作关系中,仅考虑度值量的大小而忽略边的属性,同样会对分析结果造成影响;加之不少中药均含槲皮素,黄连核心药物组是否通过槲皮素作用靶点改善 UC,其与小檗碱作用机制是否相同,且相关药效成分、潜在靶点及通路等问题均有待进一步通过实验加以验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
 [2] 干丹, 韩昌鹏. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(26): 2958-2961.
 [3] Kakuta Y, Ichikawa R, Fuyuno Y, *et al.* An integrated genomic and transcriptomic analysis reveals candidates

of susceptibility genes for Crohn's disease in Japanese populations [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10236.

- [4] 沈洪, 唐志鹏, 唐旭东, 等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南(基层医生版) [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4155-4160.
 [5] 潘晨璟, 王文荣. 溃疡性结肠炎的中医认识 [J]. 中国民间疗法, 2021, 29(3): 6-8.
 [6] 甄建华, 黄光瑞. 溃疡性结肠炎中医病名、病因、病机的古今比较和回顾 [J]. 环球中医药, 2019, 12(8): 1286-1289.
 [7] 黄玲. 黄连化学成分及有效成分药理活性的研究进展 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(17): 136-137.
 [8] 杨念云, 张启春, 朱华旭, 等. 黄连生物碱类资源性化学成分研究进展与利用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5080-5087.
 [9] 吉文岳, 冯心池, 邱峰, 等. 黄连多糖药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 638-643.
 [10] 马国琴, 刘东玲. 黄连药理研究进展 [J]. 甘肃农业, 2019(10): 97-99.
 [11] 靳瑾, 周知然. 黄连解毒汤对溃疡性结肠炎患者肠道菌群的影响 [J]. 中医学报, 2020, 35(7): 1520-1523.
 [12] 陈润英. 黄连煎剂保留灌肠治疗溃疡性结肠炎的药学研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(18): 625-626.
 [13] 张春阳. 黄连煎剂对溃疡性结肠炎患者粪中性粒细胞衍生蛋白影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 184-186.
 [14] 石云, 王超, 王磊, 等. 基于数据挖掘的中药治疗慢性牙周病用药规律研究 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(18): 186-188.
 [15] 张博. 基于关联规则的数据挖掘技术在中药方剂配伍中的应用研究 [J]. 甘肃联合大学学报: 自然科学版, 2011, 25(1): 82-86.
 [16] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
 [17] 白明, 刘保松, 彭孟凡, 等. 基于数据挖掘和网络药理学的 2 型糖尿病用药规律及机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 182-188.
 [18] 陈青垚, 王梁凤, 李慧婷, 等. 含丁香方剂的数据挖掘及其治疗腹泻的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5): 158-170.
 [19] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
 [20] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
 [21] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J].

- Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [22] Noureddine O, Gatfaoui S, Brandan S A, *et al.* Experimental and DFT studies on the molecular structure, spectroscopic properties, and molecular docking of 4-phenylpiperazine-1-ium dihydrogen phosphate [J]. *J Mol Struct*, 2020, 1207: 127762.
- [23] Burley S K, Berman H M, Charni B, *et al.* RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(D1): D464-D474.
- [24] Sterling T, Irwin J J. ZINC 15: Ligand discovery for everyone [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55(11): 2324-2337.
- [25] 张廷模. 临床中药学 [M]. 第2版. 北京: 中国中医药出版社, 2004.
- [26] Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn S E, *et al.* Computing topological parameters of biological networks [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(2): 282-284.
- [27] 任玉乐, 贾先红. 溃疡性结肠炎的中医临证思考 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(12): 918-919.
- [28] 孙平良, 钟元帅, 李裕波, 等. 溃疡性结肠炎中医病因病机研究进展 [J]. 中医研究, 2016, 29(4): 71-74.
- [29] Yan F, Wang L H, Shi Y, *et al.* Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(5): G504-G514.
- [30] 唐于平, 尚尔鑫, 陈艳琰, 等. 药对配伍效应与功效物质现代研究方法策略 [J]. 药学学报, 2019, 54(9): 1564-1573.
- [31] Geremia A, Arancibia-Cárcamo C V. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1296.
- [32] 唐康, 程勇. AGE/RAGE 参与结直肠癌细胞上皮-间质转化及肿瘤干性的调控 [J]. 肿瘤, 2017, 37(6): 576-586.
- [33] Gustin J A, Ozes O N, Akca H, *et al.* Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 1615-1620.
- [34] Huang X L, Xu J, Zhang X H, *et al.* PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(8): 727-734.
- [35] Zahraoui A, Louvard D, Galli T. Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(5): F31-F36.
- [36] Cao M, Wang P, Sun C, *et al.* Amelioration of IFN- γ and TNF- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e61944.
- [37] 袁彩英, 刘本涛, 黄嘉咏, 等. 网络药理学在中药药效物质筛选和作用机制中的应用 [J]. 广州化工, 2019, 47(20): 20-22.
- [38] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2232-2237.
- [39] Bian Y F, Liu P, Zhong J, *et al.* Quercetin attenuates adhesion molecule expression in intestinal microvascular endothelial cells by modulating multiple pathways [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(12): 3297-3304.
- [40] Alam W, Khan H, Shah M A, *et al.* Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: Current therapeutic standing [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4073.
- [41] Chen X Q, Lv X Y, Liu S J. Baitouweng decoction alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating intestinal microbiota and the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113357.
- [42] Alpert L, Yassan L, Poon R, *et al.* Targeted mutational analysis of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers [J]. *Hum Pathol*, 2019, 89: 44-50.
- [43] Choi S H, Gonen A, Diehl C J, *et al.* SYK regulates macrophage MHC-II expression via activation of autophagy in response to oxidized LDL [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 785-795.
- [44] Larabi A, Barnich N, Nguyen H T T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38-51.
- [45] 任建勋, 郭浩, 李磊, 等. 以功效为基础的中药复方毒性研究思路与方法探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 203-207.
- [46] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.

[责任编辑 潘明佳]