

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2022.06.010

基于网络药理学和体外细胞实验探讨芍药甘草汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制

何毅豪¹, 王冰², 杨骏³, 张彤¹

1. 上海中医药大学中药学院(上海 201203); 2. 中国科学院上海药物研究所药物制剂研究中心(上海 201203); 3. 上海市黄浦区香山中医医院(上海 200020)

【摘要】目的:利用网络药理学、差异基因分析、分子对接技术和体外细胞实验,探究芍药甘草汤(SYGCD)治疗溃疡性结肠炎(UC)的初步作用机制。方法:通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)和文献检索,获取 SYGCD 中白芍和甘草的活性成分和作用靶点。从基因表达综合(GEO)数据库中筛选获得 GSE47908 芯片数据,绘制差异基因热图和火山图。运用 Cytoscape 软件构建 SYGCD 治疗 UC 分子基因网络图,借助 Bisogenet 和 CytoNCA 绘制核心靶点拓扑网络,使用 R 3.6.3 软件对差异基因进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析。采用分子对接解析活性成分与关键靶点的相互作用。采用 RAW264.7 巨噬细胞,通过 MTT 实验和 RT-qPCR 实验初步验证 SYGCD 的抗炎作用的相关靶点。结果:①获得 SYGCD 治疗 UC 的 102 个活性成分,主要为槲皮素、山柰酚、异鼠李素等,拓扑网络筛选出关键候选基因为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)等。富集分析显示,与 UC 治疗相关的信号通路主要为白介素(IL)-17 信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路等。②分子对接结果显示,SYGCD 中核心成分与关键靶点均能通过氢键结合。③MTT 实验结果显示,SYGCD 对 RAW264.7 细胞几乎没有毒性;RT-qPCR 结果显示,SYGCD 能降低 RAW264.7 细胞炎症模型中细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-6* mRNA 表达水平。结论:SYGCD 治疗 UC 具有多成分、多靶点、多途径等特征,作用机制可能是 SYGCD 中的槲皮素、山柰酚、芒柄花素、异鼠李素等活性成分作用于 PPAR γ 、NOS2、IL-1 β 等靶点,调控 IL-17、TNF、NF- κ B 等信号通路发挥治疗 UC 的作用;且 SYGCD 可通过调节促炎性细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-6* 发挥抗炎效果。

【关键词】 芍药甘草汤;溃疡性结肠炎;网络药理学;GEO 芯片;分子对接;体外细胞实验

Exploration on mechanism of Shaoyao Ganciao Decoction in treating ulcerative colitis based on network pharmacology and *in vitro* cell experiments

HE Yihao¹, WANG Bing², YANG Jun³, ZHANG Tong¹

1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Center for Pharmaceutics Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Xiangshan TCM, Huangpu District, Shanghai 200020, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Shaoyao Ganciao Decoction (SYGCD) in the treatment of ulcerative colitis (UC) based on network pharmacology, differential gene analysis, molecular docking technology and *in vitro* cell experiments. **Methods:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and literature retrieval were used to obtain the active ingredients and targets of SYGCD. GSE47908 microarray data were obtained from GEO database, and differential gene heatmaps and volcano plots were drawn. The molecular gene network map of SYGCD against UC was constructed by Cytoscape software, and the core target topology network was drawn by Bisogenet and CytoNCA. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of differential genes were performed by R 3.6.3 software. Molecular docking was used to analyze the interaction between active ingredients

[基金项目] 国家科技重大专项(2019ZX09201004-002);上海市领军人才项目(2019100);上海市中医药事业发展三年行动计划项目[(2021-2023)-0502]

[作者简介] 何毅豪,男,在读硕士生,主要从事中药制药技术及体内过程研究

[通信作者] 王冰,副研究员,硕士生导师;E-mail:bwang@simm.ac.cn。张彤,教授,博士生导师;E-mail:zhangtdmj@hotmail.com

收稿日期:2021-09-18;修回日期:2022-06-08

and key targets. RAW264.7 macrophages were used to preliminarily verify the anti-inflammatory effect of SYGCD by MTT assay and RT-qPCR assay *in vitro*. **Results:** ① 102 active ingredients of SYGCD for UC treatment were obtained, mainly including quercetin, kaempferol, isorhamnetin, etc. The key candidate genes such as peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and inducible nitric oxide synthase (NOS2) were selected by topological network. Enrichment analysis showed that UC treatment was mainly related to interleukin (IL)-17 signaling pathway and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, etc. ② Molecular docking results showed that the core components of SYGCD could bind to the key targets stably by hydrogen bonding. ③ MTT assay results showed that SYGCD was almost not toxic to RAW264.7 cells. RT-qPCR results showed that SYGCD could reduce the mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 cytokines in RAW264.7 cell inflammation model. **Conclusion:** SYGCD has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway in treating UC, the mechanism of which may be that the active components of SYGCD, such as quercetin, kaempferol, formononetin, and isorhamnetin, act on the targets of PPAR γ , NOS2, and IL-1 β to regulate the signaling pathway of IL-17, TNF, and NF- κ B to play a role in treating UC. SYGCD can exert anti-inflammatory effects by regulating pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6.

KEYWORDS Shaoyao Gancao Decoction; ulcerative colitis; network pharmacology; GEO chip; molecular docking; *in vitro* cell experiments

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性非特异性炎症性疾病, 多发于青壮年, 临床表现为腹痛、腹泻、脓血便等, 其病理表现为连续性、弥漫性的结肠黏膜炎症^[1-2], 治疗难度较大, 而中医药在 UC 治疗上积累了丰富的临床经验。芍药甘草汤 (Shaoyao Gancao Decoction, SYGCD) 源自张仲景的《伤寒论》, 由白芍、炙甘草组成。方中白芍酸苦微寒、养血敛阴, 炙甘草甘平、补脾益气^[3], 二药合用, 兼具滋补阴血、缓急止痛之功, 在临床上对于消化道溃疡、炎症性疾病等具有良好的治疗效果^[4]。由于白芍、炙甘草的化学成分复杂及其临床应用广

泛^[5-7], 目前对于该方治疗 UC 的药效物质基础及作用机制尚未明确。因此, 本文旨在利用网络药理学方法探究 SYGCD 的生物活性成分和靶点, 结合 GEO (Gene Expression Omnibus) 芯片寻找 SYGCD 治疗 UC 的共同靶点并加以验证, 了解该方的活性成分对于疾病靶点的潜在作用机制, 挖掘疾病相关基因, 为探究 SYGCD 治疗 UC 的实验及临床提供前期基础, 该分析将为寻找中药 SYGCD 治疗 UC 的物质基础、作用靶点、治疗及评估预后指标等提供研究思路。研究思路见图 1。

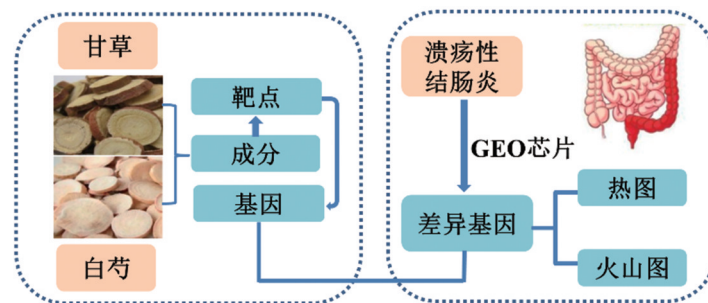


图 1 SYGCD 治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究思路

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 购自商城北纳创联生物科技有限公司。

1.1.2 药物与试剂 SYGCD 为实验室自制, 制备方法: 称取炙甘草、白芍各 62.4 g, 加入 600 ml 水浸泡 30 min, 置于中药煎煮紫砂锅中, 先武火再文火煎煮, 纱布滤过, 旋转蒸发浓缩制成生药浓度为 4.24 g/ml

的汤剂, 置于 4 °C 冰箱中保存待用。

胎牛血清 (货号: 900-108), 美国 Gemini 公司; DMEM 高糖培养基 (货号: MA0212)、青霉素-链霉素溶液 (货号: PWL062), 大连美仑生物技术有限公司; 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS, 货号: L2630)、噻唑蓝 (MTT, 货号: M2003), 美国 Sigma 公司; 0.25% 胰蛋白酶 (货号: C0203), 上海碧云天生物技术有限公司; RNA 提取试剂 (货号: 10606ES60)、逆转录试剂盒 (货号: 11123ES60), 上海翊圣生物科技

有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、三氯甲烷、无水乙醇,上海国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器 Synergy H1 型酶标仪,美国 BioTek 公司;371 型 CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo Fisher 公司;CFX384 Touch 型荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 活性成分筛选及靶点预测 中药系统药理数据库(TCMSP, <https://tcmsp.com/tcmssp.php/>)可捕获药物、靶标和疾病之间的关系^[8]。通过 TCMSP 数据库和文献挖掘的方式获取白芍、甘草的化学成分及靶点。设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug-likeness, DL)≥0.18 作为筛选标准^[9-10]。收集到的所有化学成分继续借助 TCMSP 平台获取活性化合物可能对应的药物蛋白靶点。

1.3 GEO 芯片下载及热图、火山图绘制 从 GEO 数据库^[11](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中,搜索“ulcerative colitis”关键词,限制物种为“homo sapiens”,并对纳入的数据集(series)和样本(samples)进行筛选,最终选取 GSE47908 芯片,下载其原始数据文件和注释文件,同时将探针矩阵转化为基因矩阵。运用 R 3.6.3 软件,设定“ $|\log_2FC| > 1$ and $P \text{ value} < 0.05$ ”为显著差异基因的筛选条件,引用“limma”包对芯片数据进行差异分析,得到疾病差异基因并保存在 Excel 表中。利用“pheatmap”与“plot”程序包,分别绘制差异表达基因的热图与火山图。

1.4 SYGCD 治疗 UC 分子基因网络的构建 将 SYGCD 化学成分的靶点基因与 UC 差异基因取交集,导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,绘制 SYGCD-UC 的分子基因网络,获取关键的化学成分和疾病基因。

1.5 SYGCD 治疗 UC 拓扑网络的构建 将 SYGCD 化学成分的靶点基因与 UC 的差异基因取交集后,导入到 Cytoscape 3.7.2 中,用 Network Analyzer 工具分析网络,获得网络基本参数,以便筛选关键靶点基因。提取出交集基因蛋白-蛋白互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)中所有节点 Degree (度)值中位数,使用 CytoNCA 插件筛选出 Degree>2 倍中位数的所有节点,获得 Highubs 网络。在筛选网络中的 Degree 中位数以及各个属性值,如 Betweenness、Closeness、Eigenvector 等,根据属性值中位数进行筛选,构建拓扑网络,寻找关键性的核心基因。

1.6 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 借助 R 3.6.3 软件,载入 enrichplot、clusterProfiler、DOSE 等程序包,根据 SYGCD 治疗 UC 基因,以“pvalueCutoff

<0.05”、“qvalueCutoff<0.05”为条件筛选功能富集条目,p.adjust 越靠近 0 表示基因富集越显著。选取排名前 20 的基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路,绘制柱状图。

1.7 SYGCD 治疗 UC 通路及基因网络图的绘制 将“1.6”项下的 KEGG 通路导入 Cytoscape 3.7.2 中,绘制网络图。基因与通路之间有连线说明基因属于该通路,Degree 值大小代表邻接节点数目,通路与基因相连越多,Degree 值越大。

1.8 SYGCD 化学成分-关键靶点分子对接 从有机小分子生物活性数据库(PubChem,<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载“1.3”项结果中 Degree 值靠前的化学成分的 SDF 格式文件。利用 Chem3D 软件将 2D 结构转化为 3D 结构,同时进行优化,保存为 mol2 格式。选出“1.4”项分子基因网络图中连接化学成分最多的、且在“1.5”项拓补网络中属于核心靶点的靶点。通过蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB, <https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点 3D 结构的 PDB 格式文件,将蛋白三维结构导入 PyMOL 2.4.0 软件(<https://pymol.org/2/>)中去除水分子和小分子配体。蛋白 3D 结构上传到 AutoDock Tools 1.5.6 软件(<http://autodock.scripps.edu/resources/tools/>)中进行加氢,再上传成分的 3D 结构,均保存为 pdbqt 格式文件。用 AutoDock Vina 1.1.2 软件(<http://vina.scripps.edu/>)进行分子对接。

1.9 体外细胞实验验证

1.9.1 细胞培养 RAW264.7 细胞采用含 1% 青霉素-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱中培养。待细胞密度达 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.9.2 MTT 实验 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,胰酶消化,细胞计数,以 5×10^3 个/孔(100 μ l)接种于 96 孔板中。待细胞贴壁 24 h 后,分别加入 0.01、0.10、1.00、5.00、10.00、20.00 mg/ml SYGCD 含药培养基。孵育 24 h 后,每孔加入 20 μ l MTT 溶液,并继续孵育 4 h。孵育结束后弃去上清,并保留蓝紫色结晶。每孔加入 200 μ l DMSO 使蓝紫色结晶完全溶解,在 490 nm 下检测每孔的吸光度,并计算细胞存活率。

1.9.3 RT-qPCR 检测相关 mRNA 表达 将对数生长期的 RAW264.7 细胞消化,细胞计数,以每孔 5×10^4 个细胞的数量接种于 12 孔板中。待细胞贴壁

24 h 后分为对照组、LPS 组、SYGCD 组(5、10 mg/ml)。SYGCD 组加入相应浓度的 SYGCD 后孵育 2 h, 然后 LPS 组与 SYGCD 组均加入 1 μg/ml LPS 诱导细胞炎症, 继续培养 24 h 后收集细胞。TRIzol 法提取细胞总 RNA, 采用逆转录试剂盒合成 cDNA, 并进行荧光实时定量 PCR 反应。借助 PubMed Primer Blast 设计引物, 所有引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 序列见表 1。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

1.10 统计学方法 数据采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 *t* 检验和 one-way ANOVA 进行差异分析。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SYGCD 成分与靶点 通过 TCMSP 数据库获取

表 2 SYGCD 中生物利用度排名前 30 的成分

ID	名称	ID	名称
MOL002311	甘草酚(glycyrol)	MOL001928	芍药内酯苷(albiflorin_qt)
MOL001918	芍药苷元(paeoniflorgenone)	MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	MOL004903	甘草苷(liquiritin)
MOL004904	甘草吡喃香豆素(licopyranocoumarin)	MOL004808	粗毛甘草 B(glyasperin B)
MOL004891	shinpterocarpin	MOL001910	11α,12α-epoxy-3β-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12β-olide
MOL005017	phaseol	MOL004829	鳞叶甘草素 B (glepidotin B)
MOL004841	甘草查尔酮 B (licochalcone B)	MOL004855	甘草利酮(licoricone)
MOL004810	粗毛甘草素 F (glyasperin F)	MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone
MOL001484	inermine	MOL004835	刺果甘草查耳酮(glypallichalcone)
MOL000500	维斯体素(vestitol)	MOL004907	glyzaglabrin
MOL005007	粗毛甘草素 M (glyasperins M)	MOL005000	甘草宁 G (gancaonin G)
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one
MOL004959	1-甲氧基菜豆素(1-methoxyphaseollidin)	MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin
MOL000392	芒柄花黄素(formononetin)	MOL004328	柚皮素(naringenin)
MOL001925	芍药苷(paeoniflorin_qt)	MOL005003	licoagrocarpin

2.2 GEO 芯片热图与火山图的绘制 从 GEO 数据库中下载 GSE47908 基因表达数据集和样本信息, GSE47908 数据集包含 45 例 UC 样本及 15 例对照样本。借助 R 语言分析筛选出 457 个有明显影响与改变的基因, 其中上调基因为 290 个、下调基因为 167 个。图 2 热图中, 颜色不同代表基因表达程度不同, 颜色越红, 基因表达越高; 颜色越绿, 基因

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列
GAPDH	上游: 5'-ATGGGTGTGAACCACGAGA-3'
	下游: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'
白介素(IL)-6	上游: 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTAC-3'
	下游: 5'-TCTCATTTCACGATTTCCAG-3'
IL-1β	上游: 5'-CTTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3'
	下游: 5'-TGCAGTTGCTAATGGGAACGT-3'
肿瘤坏死因子(TNF)-α	上游: 5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCCC-3'
	下游: 5'-GTCCTTGAGATCCATGCCGTTG-3'

SYGCD 的化学成分和药物靶点, 与 UC 相关的成分共 102 个, 其中白芍成分 13 个、甘草成分 92 个、共有成分 3 个。102 个成分按生物利用度进行排名, 前 30 的成分见表 2。而在这 102 个化合物中 92 个具有有效靶点, 从 92 个成分中, 剔除重复项后发现了 244 个潜在靶点。

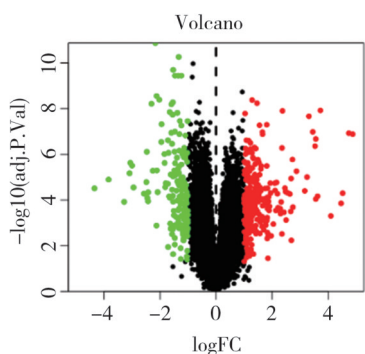
表达越低; 黑色代表中间表达基因。图 3 火山图中, 每个点即为一个基因, 左侧绿色点代表下调基因且 logFC < -1, 黑色点指对照组与实验组中无差异的基因, 右侧红色点代表上调基因且 logFC > 1。结果表明, UC 样本与对照样本间基因表达水平有明显差异。

2.3 SYGCD 治疗 UC 的分子基因网络 将 SYGCD



蓝色(C)代表对照组;粉色(T)代表实验组

图2 差异表达基因热图



绿色点代表下调基因且 logFC<-1;黑色点代表对照组与实验组中无差异的基因;红色点代表上调基因且 logFC>1

图3 GEO 芯片数据 UC 差异基因的火山图

筛选所得成分靶点基因与 UC 的差异基因取交集后,获得 17 个共同基因,导入 Cytoscape 中绘制分子基因网络图。网络图共包括 102 个节点、230 条边,绝大部分化学成分与多个疾病基因相关。见图 4。

根据 Degree 值筛选出排名前 10 的化学成分,其中槲皮素(MOL000098)和山柰酚(MOL000422)所对应的疾病基因最多,因此二者被认为是 SYGCD 治疗 UC 的重要分子。通过调整网络图的透明度,发现在 UC 的基因中诱导型一氧化氮合酶(NOS2)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)对应的药物分子最多。见表 3。

2.4 SYGCD 治疗 UC 的拓扑网络图 交集基因导入 Cytoscape 后获得 PPI 网络图,其中共包含 670 个节点、8 648 条边,见图 5A。计算得到所有节点

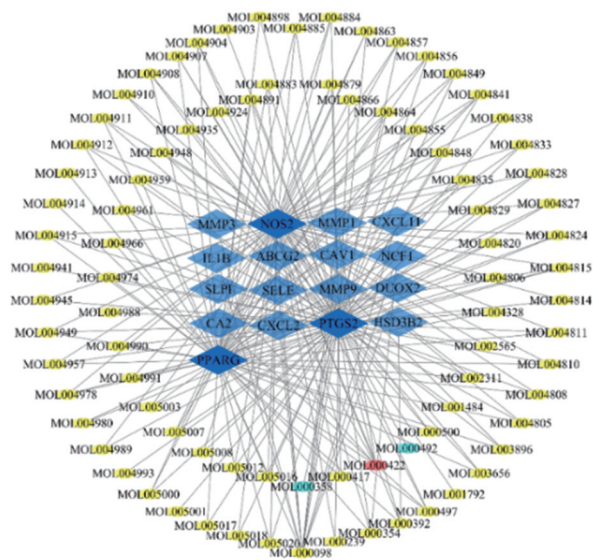


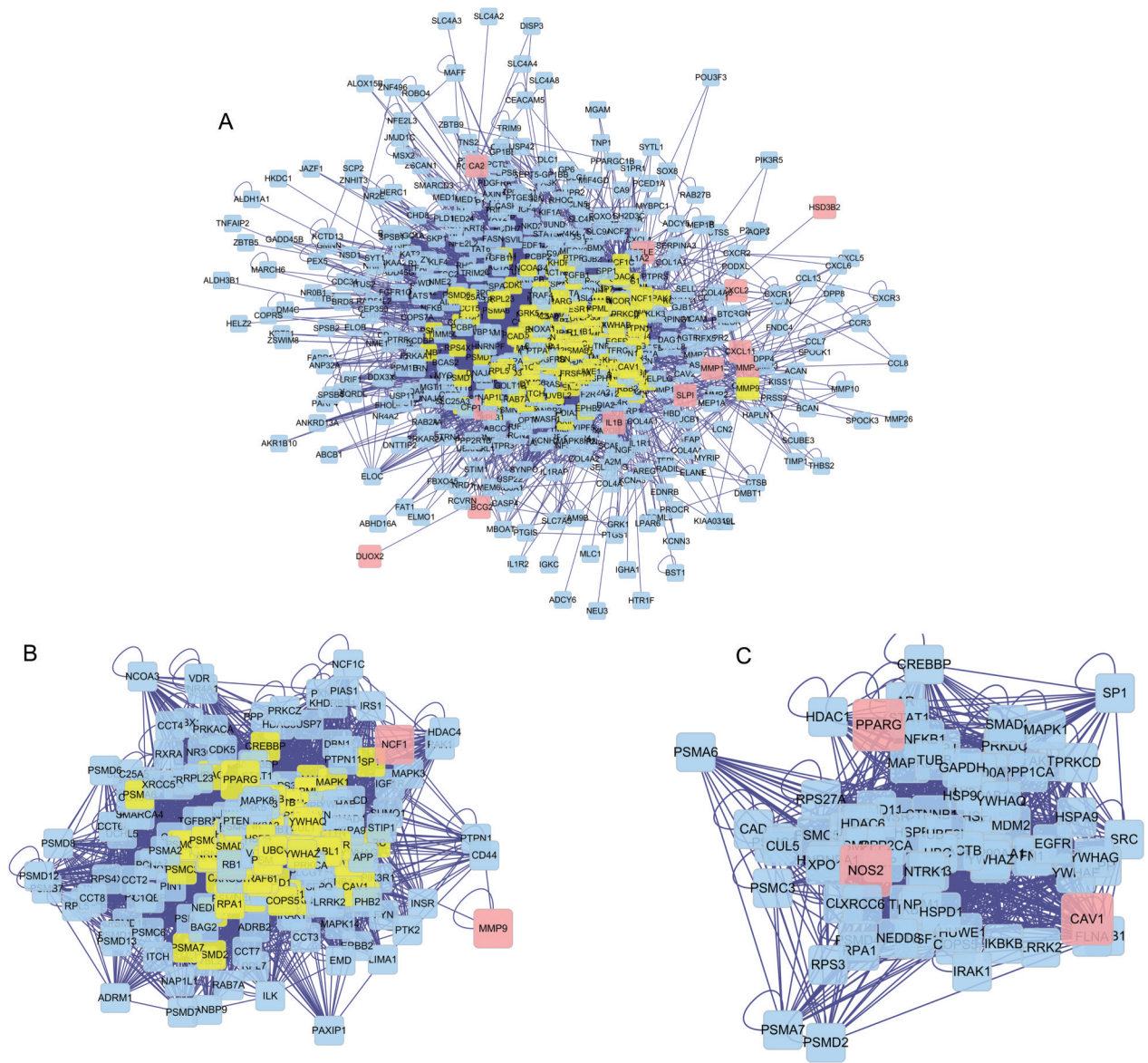
图4 SYGCD 治疗 UC 的分子基因网络图

Degree 值的中位数为 16,将该网络中 Degree 值>32 的节点及关系网络提取出来。新网络中有 205 个节点、4 196 条边,见图 5B。经 CytoNCA 插件分析得各个属性值中位数如下:Median DC=47、Median BC=84.13、Median CC=0.542 6、Median EC=0.059 9、Median LAC=15.36、Median NC=17.15;以此标准提取基因,经网络分析,包含 67 个节点、959 条边,平均 Degree 值为 86.01,拓扑网络中得到了、小窝蛋白 1(CAV1)、NOS2 共 3 个候选基因,见图 5C。

2.5 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 对 SYGCD 治疗 UC 的 17 个关键靶点基因进行富集分析,共得到 454 个 GO 条目和 17 条 KEGG 通路。GO 富集

表3 分子基因网络图中Degree值排名前10的成分

来源	ID	名称	生物利用度	DL	Degree 值
甘草	MOL000098	槲皮素(querعتin)	46.43	0.28	13
白芍、甘草	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	6
甘草	MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31	4
甘草	MOL000392	刺芒柄花素(formononetin)	69.67	0.21	4
甘草	MOL004835	刺果甘草查耳酮(glypallchalcone)	61.60	0.19	4
甘草	MOL004841	甘草查尔酮 B(licochalcone B)	76.76	0.19	4
甘草	MOL000497	甘草查尔酮 A(licochalcone A)	40.79	0.29	4
甘草	MOL003656	黄羽扇豆魏特酮(lupiwighteone)	51.64	0.37	3
甘草	MOL003896	7-甲氧基-2-甲基异黄酮(7-methoxy-2-methyl isoflavone)	42.56	0.20	3
甘草	MOL000417	毛蕊异黄酮(calycosin)	47.75	0.24	3

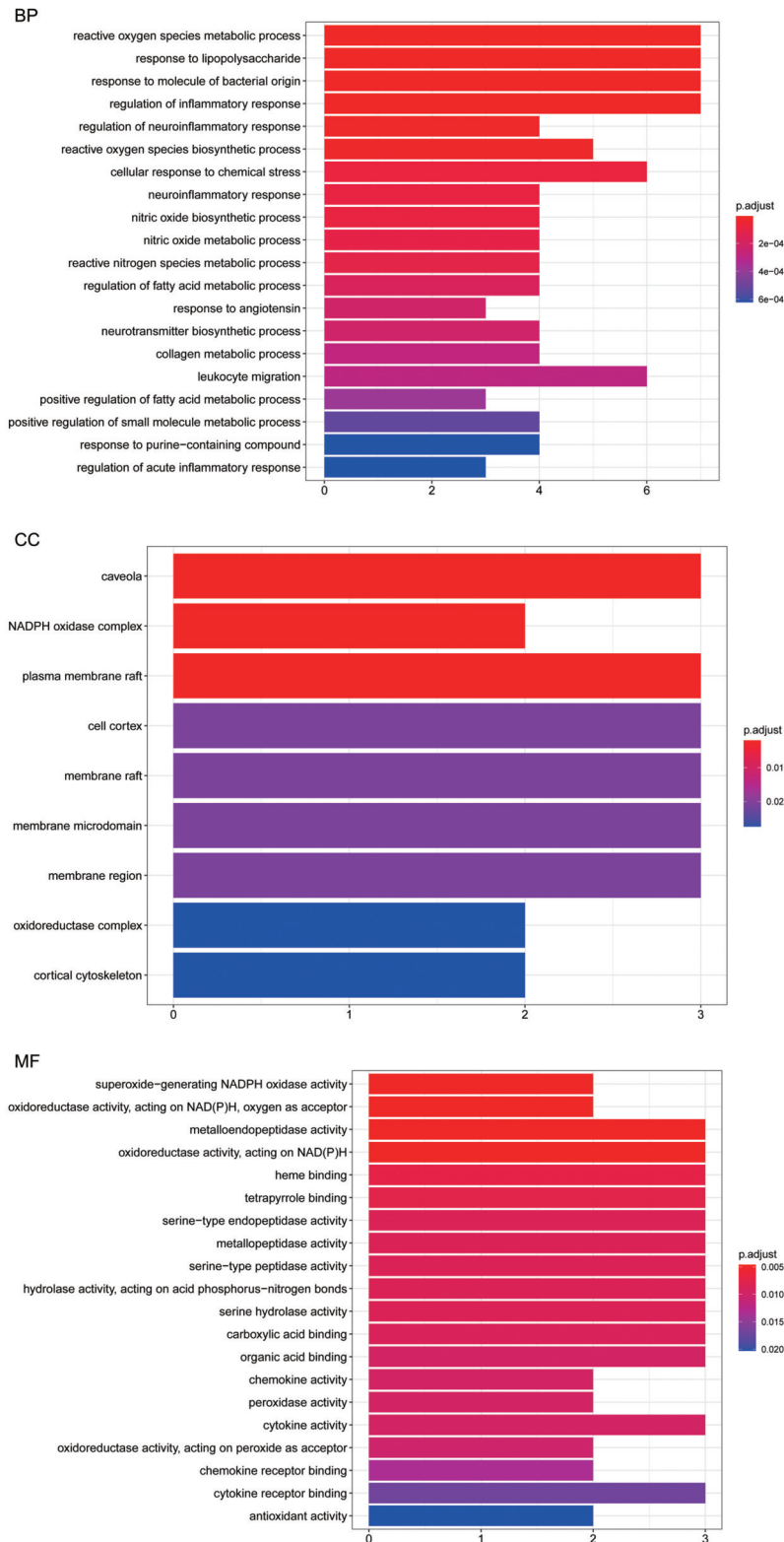


A 为 PPI 网络图;B 为第一次筛选结果;C 为第二次筛选结果

图5 SYGCD 治疗 UC 的拓扑网络图

分析显示,靶点显著富集的生物过程包括活性氧代谢过程、LPS 反应、炎症反应的调节、神经炎症反应的调节等过程;定位于小窝、NADPH 化酶复合物、

质膜筏等细胞组分;与产生超氧化物的 NADPH 氧化酶活性、金属内肽酶活性、血红素结合等分子功能关系紧密。见图 6。



BP 为生物学过程(biological process);CC 为细胞组分(cellular component);MF 为分子功能(molecular function)

图 6 SYGCD 治疗 UC 的 GO 富集分析

KEGG 通路分析显示,与 SYGCD 治疗 UC 有关的主要通路为 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、利什曼病、类风湿关节炎及 NF-κB 通路等。见图 7。

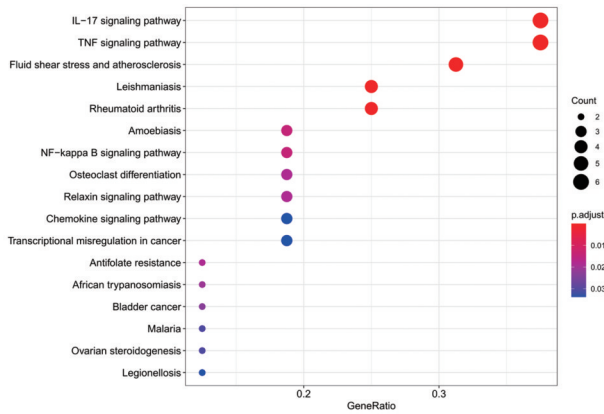
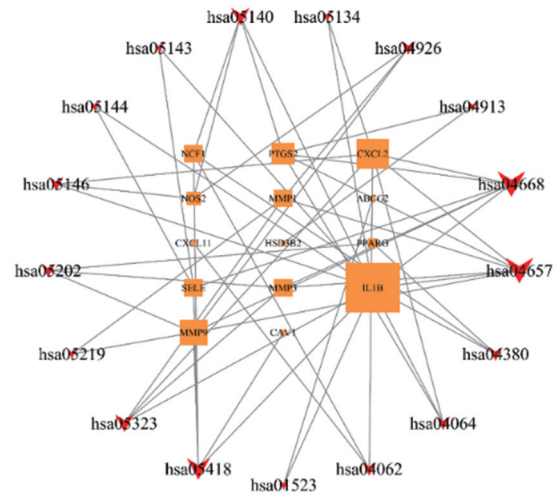


图 7 SYGCD 治疗 UC 的 KEGG 通路分析

2.6 SYGCD 治疗 UC 的通路与基因网络 由图 8 可以看出, TNF 信号通路 (hsa04668) 和 IL-17 信号通路 (hsa04657) 通路上富集的基因最多, IL-1β、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、趋化因子 CXC 配体 2 (CXCL2) 是参与数目最多的基因。

2.7 分子对接 通常结合能 <math>< -7.0 \text{ kcal/mol}</math> 表示配体与受体有强烈的结合活性^[12]。分子对接结果显示, 槲皮素、山柰酚、异鼠李素等化学成分与 PPAR γ 、NOS2



红色节点为富集分析的通路; 橙色方框为参与通路富集的基因

图 8 SYGCD 治疗 UC 的通路与基因网络

等靶点对接结果的结合能均 <math>< -7.0 \text{ kcal/mol}</math>, 说明蛋白与分子之间能稳定的结合。见表 2。

槲皮素与 PPAR γ 在 CME-285、ARG-288、SER-289 处形成氢键, 与 NOS2 在 TYR-489 处形成氢键。山柰酚与 PPAR γ 在 GLU-295、ARG-288 处形成氢键, 与 NOS2 在 TYR-489、TRP-372 处形成氢键。异鼠李素与 PPAR γ 在 ARG-443、TYR-320、LYS-319、TYR-473 处形成氢键, 与 NOS2 在 TYR-489、TRP-372 处形成氢键。见图 9。

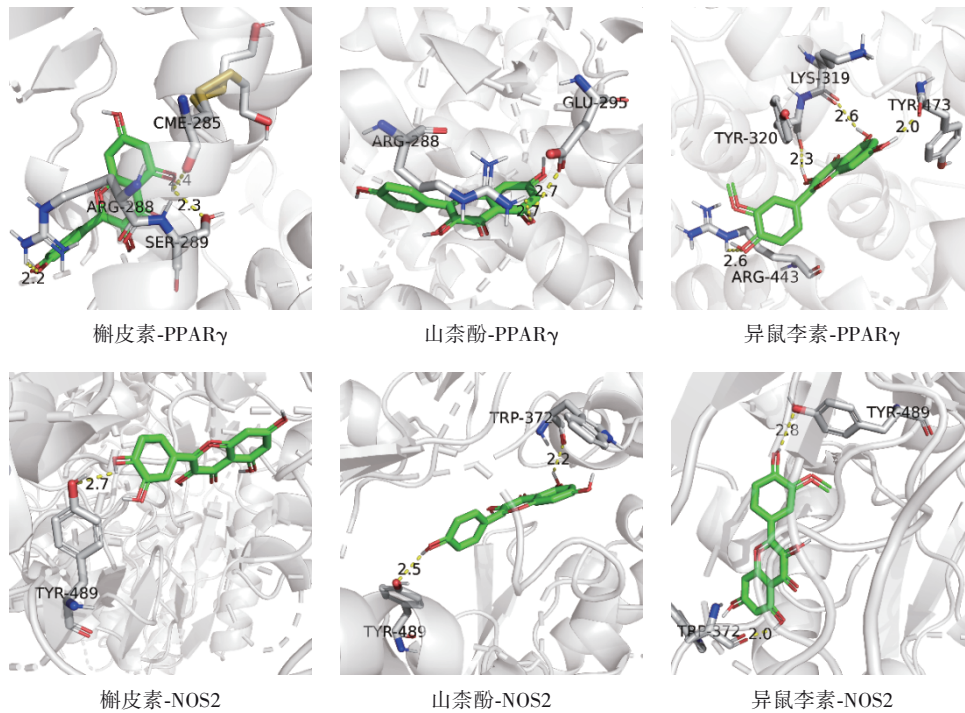


图 9 SYGCD 活性成分-关键靶点分子对接图

表2 活性成分-核心靶点分子对接

成分	靶点名称	PDB ID	结合能(kcal/mol)
槲皮素	PPAR γ	2q59	-8.8
槲皮素	NOS2	3e7g	-9.7
山柰酚	PPAR γ	2q59	-8.4
山柰酚	NOS2	3e7g	-9.8
异鼠李素	PPAR γ	2q59	-8.4
异鼠李素	NOS2	3e7g	-9.7

2.8 SYGCD 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

MTT 实验结果显示,在 20.00 mg/ml 及以下剂量范围内,SYGCD 对 RAW264.7 细胞几乎没有毒性,细胞的存活率始终保持在 80% 以上。见图 10。

2.9 SYGCD 对 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响

结果显示,LPS 组细胞中促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平均显著高于对照组 ($P<0.01, P<0.001$)。5、10 mg/ml SYGCD 干预细胞

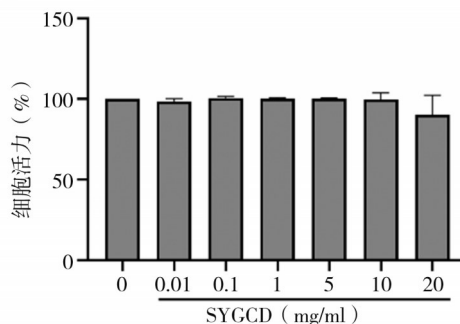
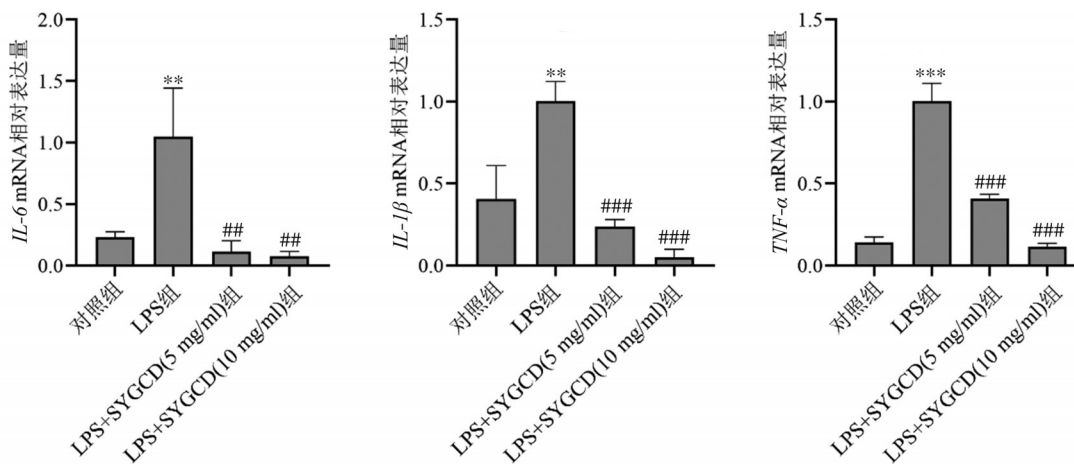


图 10 SYGCD 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

后能显著降低细胞中促炎细胞因子 mRNA 表达水平 ($P<0.01, P<0.001$),并且高浓度组的作用效果优于低浓度组。结果表明,SYGCD 能降低巨噬细胞中促炎因子的表达水平,具有良好的抗炎效果。见图 11。



与对照组比较, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ### $P<0.01$, #### $P<0.001$

图 11 各组细胞中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的比较

3 讨论

中医认为 UC 的主要发病机制是湿热内蕴, SYGCD 有清热利湿、调气活血的功效,临床应用时常单用或将其作为基本方治疗 UC。本研究根据吸收、分布和清除的性质,筛选得到该方具有潜在生物活性的 92 个化合物,并对 244 个潜在靶点进行功能富集分析,揭示这些靶点与炎症和免疫相关的生物学过程密切相关。进一步构建了分子基因网络、拓扑网络、通路与基因网络,分析结果提示 SYGCD 通过多成分、多途径协同,以免疫调节和抗炎作用共同实现对 UC 的治疗作用。

研究表明, SYGCD 中含有芍药苷 (MOL001924)、甘草苷 (MOL004903)、芒柄花素

(MOL000392)等化学成分^[13-15],这些成分均包含于本研究从 TCMSPP 数据库筛选的 102 个成分中。据文献报道,芍药苷可上调 IL-10 的表达,下调 IL-2、IL-6 的表达,促进抗炎和抑炎因子的平衡,调节肠道异常免疫反应,以此修复溃疡^[16]。此外,甘草和炙甘草水煎液的化学成分大致相同^[17-18],含量稍有变化,炙甘草有解毒、补中益气等作用。

从基因网络图分析,交集基因中 PPAR γ 与多个药效分子对应,可能是治疗 UC 的关键靶标。在轻度至中度 UC 患者中,给予 PPAR γ 激动剂如噻唑烷二酮类和 5-氨基水杨酸可诱导并维持临床缓解^[19-21]。早期研究发现,UC 患者肠黏膜中 NF- κ B 水平升高^[22],并伴有 PPAR γ 表达受损^[23],提示激活 PPAR γ 是治疗 UC 的一个重要策略。另外,研究结

果发现 SYGCD 治疗 UC 的 3 个关键药效成分为黄酮类化合物槲皮素、山柰酚、芒柄花素,均对应多个疾病基因。分子对接结果也表明以上成分与 PPAR γ 、NOS2 等靶点稳定结合,提示以上化合物可作为后续研究的主要药效成分。

研究表明,芍药苷能抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平并修复肠屏障功能损伤,通过抑制结肠巨噬细胞中 NOD 样受体热蛋白 3(NLRP3) 的表达来改善 UC 病理症状^[24-25]。孙波等^[26]发现甘草酸通过 NLRP3 炎性体信号通路减轻结肠的炎症反应。甘草酸二铵^[27-28]可调节肠黏膜炎症因子 IFN- γ 、IL-6 以及 IL-10 的表达来抑制炎症反应。但通过经典的网络药理学构建分子基因网络筛选的活性成分多是槲皮素、异鼠李素和山柰酚等活性成分,而质控性成分芍药苷、甘草酸和甘草苷等在网络图中 Degree 值相对较低,反映出中药成分靶点数据库未及时更新,筛选成分的标准还有待优化。也有研究表明,槲皮素通过抗氧化作用对 IBD 大鼠具有剂量依赖性的保护作用^[29],还能通过诱导紧密连接蛋白 claudin-4 的表达来增强 Caco-2 细胞的上皮屏障修复作用^[30]。此外,槲皮素还具有抗炎和免疫调节作用,通过阻断 NF- κ B/STAT1 信号通路的激活、抑制 p38MAPK/JNK/1 通路的激活、调节 TLR4/NF- κ B 通路,下调 NOS2、环氧合酶-2(COX-2)、IL-1 β 等其他炎性介质的蛋白表达发挥对 UC 的治疗作用^[31-32]。山柰酚可以显著恢复小鼠结肠炎模型中紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-1 的表达,恢复肠黏膜屏障的完整性^[33]。研究发现,异鼠李素下调 COX-2、前列腺素 E₂(PGE₂)、TNF- α 等参与炎症反应的关键蛋白,对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎的腹泻、黏液样便、粪便潜血等临床症状有改善作用,同时可作为孕烷 X 受体(PXR)激动剂抑制 NF- κ B 信号通路降低化学诱导的结肠炎反应^[34-35]。文献调研也发现,运用网络药理学在不同处方或药物中筛选出的核心成分相似度较高,如严海艺等^[36]采用网络药理学对柴胡-白芍药对治疗代谢相关脂肪性肝病进行研究,最终筛选出的活性成分包括槲皮素、山柰酚和异鼠李素等;刘丹等^[37]对银杏叶提取物治疗痛风潜在作用机制筛选的关键成分也包括山柰酚和槲皮素等,因此这一预测方法的准确性还有待探讨。

通过拓扑网络以及 GO 功能富集分析,发现 PTGS2、NOS2、CAV1 等可能是 UC 治疗的关键性靶点,其中,PTGS2 主要来自花生四烯酸,是一种前列腺

素类生物合成途径中的双重环氧合酶和过氧化物酶,与炎症和疼痛有关^[38]。NOS2 往往受到细胞因子(如 IL-1、干扰素等)诱导而被激活^[39],参与炎症反应,可增强促炎细胞因子 IL-6 和 IL-8 的合成。KEGG 分析表明,SYGCD 治疗 UC 主要通过 IL-17、TNF 及 NF- κ B 等信号通路。研究表明,IL-17 具有促炎作用,能够激活 NF- κ B 并诱导其依赖的细胞因子的释放^[40];但也有研究表明,在炎症性肠病中 IL-17 对肠道屏障完整性的保护作用要强于其对肠组织的破坏作用^[41-42]。另外,如流体剪切应力与动脉粥样硬化、利什曼病、类风湿关节炎和阿米巴病有关联,以上提示 SYGCD 可能对这些疾病也具有潜在的治疗作用。

通过体外实验,本研究进一步验证了 SYGCD 可以减少 RAW264.7 巨噬细胞中促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达,提示 SYGCD 可能通过减少促炎因子的表达发挥治疗 UC 的潜在作用。

综上,本研究通过网络药理学联合 GEO 芯片分析了 SYGCD 治疗 UC 的作用机制,发现 SYGCD 通过细胞凋亡、物质代谢、炎症和免疫调节等多种途径发挥治疗 UC 的作用。体外细胞实验结果显示,SYGCD 能显著改善 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应,减少炎症因子的释放,其作用机制可能与 NF- κ B 通路有关,以此发挥抗炎的作用。

参考文献:

- [1] COSNES J, CORINNE G R, SEKSIK P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1785-1794.
- [2] MORSY M A, GUPTA S, NAIR A B, et al. Protective effect of spirulina platensis extract against dextran-sulfate-sodium-induced ulcerative colitis in rats[J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2309.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版):一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020: 108.
- [4] 曲缘章,马生军,朱广伟,等. 芍药甘草汤的历史沿革与现代研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 216-225.
- [5] 唐雅男,杨燕云,张振秋. 芍药甘草汤对配伍前后次生物质含量变化的研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(10): 2143-2146, 2237.
- [6] 吴玲芳,王晓晴,陈香茗,等. 白芍化学成分及药理作用研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(3): 175-187.
- [7] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(3): 99-102.
- [8] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [9] AHMED S S S J, RAMAKRISHNAN V, KHAN A U. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. *Plos One*, 2012,

- 7(7): e40654.
- [10] URSU O, RAYAN A, GLODBLUM A, et al. Understanding drug-likeness[J]. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci, 2011, 1(5): 760-781.
- [11] EDGAR R, DOMRACHEV M, LASH A E. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 207-210.
- [12] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. Plos One, 2013, 8(12): e83922.
- [13] 赵晨曦, 吴红杰, 王莹, 等. 基于 HPLC 指纹图谱同时测定经典名方芍药甘草汤中多组分的含量[J]. 黑龙江中医药, 2020, 49(2): 39-40.
- [14] 柴瑞平, 路娟, 俞月, 等. 经典名方芍药甘草汤 UPLC 指纹图谱的建立[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(4): 473-478.
- [15] 谭洪根, 刘应泉, 冯维秀, 等. 芍药甘草汤配伍的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 550-551, 576.
- [16] 汪斌, 朱向东, 段永强, 等. 芍药苷对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理形态及血清抗炎和促炎因子平衡的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(1): 1-4.
- [17] 孙佳明, 张辉. 固相萃取-高效液相色谱-电喷雾串联质谱法分析甘草和蜜炙甘草水煎液的化学成分[C]//中医药中青年科技创新与成果展示论坛论文集. 重庆: 中华中医药学会, 2009: 41-45.
- [18] 鲁翠香, 周萍. 高效液相色谱法分析甘草炮制前后化学成分[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(7): 55-56.
- [19] FEAGAN B G, MACDONALD J K, et al. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis [J]. Cochrane Data Syst Rev, 2012, 10: CD000544.
- [20] LEWIS J D, LICHTENSTEIN G R, DEREN J J, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial[J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 688-695.
- [21] PEDERSEN G, BRYNSKOV J. Topical rosiglitazone treatment improves ulcerative colitis by restoring peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity[J]. Am J of Gastroenterol, 2010, 150(7): 1595-1603.
- [22] TAK P P, FIRESTEIN G S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
- [23] DUBUQUOY L, JANSSON E A, DEEB S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 2003, 124(5): 1265-1276.
- [24] 刘琦, 罗霞, 罗爽, 等. 芍药苷通过抑制 NLRP3 炎症小体治疗溃疡性结肠炎小鼠的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 409-414.
- [25] 王欣, 朱敏, 董思晶, 等. 芍药苷对结肠炎小鼠肠道菌群及胆汁酸代谢的调节作用[J]. 药学学报, 2021, 56(7): 1811-1819.
- [26] 孙波, 李小芹, 周方. 甘草酸对幼鼠实验性结肠炎的治疗作用及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2471-2476.
- [27] 丁润会. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及炎症因子的影响[J]. 中国医药导刊, 2012, 14(1): 100-101, 103.
- [28] 郭海荣, 霍丽娟. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠抗炎作用机制的研究[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(9): 794-797.
- [29] DODDA D, CHHAJED R, MISHRA J, et al. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of quercetin[J]. Indian J Pharmacol, 2014, 46(3): 286-291.
- [30] AMASHEH M, SCHLICHTER S, AMASHEH S, et al. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells[J]. J Nutr, 2008, 138(6): 1067-1073.
- [31] ENDALE M, PARK S C, KIM S, et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells[J]. Immunobiology, 2013, 218(12): 1452-1467.
- [32] HAN M, SONG Y, ZHANG X. Quercetin suppresses the migration and invasion in human colon cancer caco-2 cells through regulating toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway[J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(46): S237-S244.
- [33] QU Y, LI X, XU F, et al. Kaempferol Alleviates Murine Experimental Colitis by Restoring Gut Microbiota and Inhibiting the LPS-TLR4-NF- κ B Axis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 679897.
- [34] SAUD S M, YOUNG M R, ILEVA L, et al. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and β -catenin[J]. Cancer Res, 2013, 73(17): 5473-5484.
- [35] DOU W, ZHANG J, LI H, et al. Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(9): 923-933.
- [36] 严海艺, 郭瑞. “柴胡-白芍”药对治疗代谢相关脂肪性肝病的网络药理学分析及分子对接验证[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(5): 1-6, 221-222.
- [37] 刘丹, 朱靖博, 王永华, 等. 基于网络药理学的银杏叶提取物治疗痛风潜在作用机制初探[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2693-2700.
- [38] HATA A N, BREYER R M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation [J]. Pharmacol Ther, 2004, 103(12): 147-166.
- [39] 张千兵. 一氧化氮合酶通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控鼻咽癌干细胞[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [40] AMATYA N, GARG A V, GAFFEN S L. IL-17 signaling: the yin and the yang[J]. Trends Immunol, 2017, 38(5): 310-322.
- [41] MAXWELL J R, ZHANG Y, BROWN W A, et al. Differential roles for interleukin-23 and interleukin-17 in intestinal immunoregulation[J]. Immunity, 2015, 43(4): 739-750.
- [42] LEE J S, TATO C M, BARBARA J C, et al. Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability[J]. Immunity, 2015, 43(4): 727-738.

(编辑: 杨轶舜)