基于网络药理学与分子对接探讨黄芪治疗溃疡性结肠炎的作用机制Δ

郝民琦[1,2,3*]，王佳慧[1,2]，李晓玲[1,2]，李海龙[2,4]，吴玉泓[1#]（1.甘肃中医药大学基础医学院，兰州 730000；2.甘肃中医药大学敦煌医学与转化教育部重点实验室，兰州 730000；3.甘肃中医药大学中医方药挖掘与创新转化重点实验室，兰州 730000；4.甘肃中医药大学第一临床医学院，兰州 730000）

中图分类号 R285；R574.1 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2021）10-1215-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.10.10

摘 要 目的：预测黄芪对溃疡性结肠炎（UC）的可能作用靶点与机制，为临床应用黄芪治疗UC的后续研究提供参考。方法：经中药系统药理学分析平台数据库（TCMSP）和UniProt KB数据库检索黄芪的活性成分及其对应靶点基因，经Gene Cards数据库检索UC疾病相关靶点基因，借助Venny 2.1.0在线作图工具获取黄芪与UC的交集靶点基因，并应用Cytoscape 3.7.0软件构建“药物-化合物-交集靶点”相互作用网络。利用STRING数据库获取交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用关系（PPI）网络，并应用Cytoscape 3.7.0软件进行可视化分析和拓扑学分析以获取核心靶点基因。借助DAVID数据库对交集靶点基因进行基因本体（GO）功能注释及KEGG通路富集，并应用Cytoscape 3.7.0软件构建“靶点-通路”富集网络。通过AutoDock vina 1.1.2软件将度值排名前5位的活性成分与核心靶点基因编码蛋白进行分子对接，应用Discovery Studio 3.5软件绘制结合模式图。结果：黄芪中共有化合物143个，共筛选出了活性成分20个，对应的靶点基因189个；UC疾病相关靶点基因共4 356个。黄芪（涉及14种活性成分）与UC的交集靶点基因有126个。PPI网络中的核心靶点基因为*AKT*1、*MAPK*1、*RB*1、*JUN*等。GO功能注释共得到GO条目2 294个（q值＜0.05），包括生物过程条目2 093个（如对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应等）、细胞组成条目49个（如膜筏、膜微区等）、分子功能条目152个（如核受体活性、配体激活的转录等）。KEGG通路富集分析共得到条目160个（q值＜0.05），如流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K/Akt）、白细胞介素17（IL-17）信号通路等。分子对接结果显示，度值排名前5位的活性成分（槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素、异鼠李素、7-*O*-methylisomucronulatol）与核心靶点编码蛋白的结合能均小于－5.0 kcal/mol。结论：黄芪中的槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素异等活性成分可能通过作用于*MAPK*14、*JUN*、*AKT*1等靶点基因，进而对PI3K/Akt、IL-17等信号通路产生调控作用，最终发挥对UC的治疗作用。

关键词 黄芪；活性成分；溃疡性结肠炎；网络药理学；分子对接；作用机制

Study on the Mechanism of Astragali Radix in the Treatment of Ulcerative Colitis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

HAO Minqi[1,2,3], WANG Jiahui[1,2], LI Xiaoling[1,2], LI Hailong[2,4], WU Yuhong[1]（1. School of Basic Medicine, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Its Transformation of Ministry of Education, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China; 3. Key Laboratory of TCM Mining and Innovation Transformation, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China; 4. First Clinical Medicial School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000, China）

ABSTRACT OBJECTIVE: To predict the potential target and mechanism of Astragali Radix in the treatment of ulcerative colitis (UC), and to provide reference for the clinical application of Astragali Radix in the treatment of UC. METHODS: The active components and their corresponding target genes of Astragali Radix were retrieved by TCMSP and UniProt KB database. The related target genes of UC were searched by Gene Cards database. The intersection target genes of Astragali Radix and UC were obtained by Venny 2.1.0 online mapping tool, and interaction network of “drug-compound-intersection target” was constructed by using Cytoscape 3.7.0 software. PPI network of intersecting targets was obtained by using STRING database, and the visualization analysis and topological

Δ 基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81860810）；国家中医药管理局第四批全国中医基础优秀人才研修项目（No.国中医药人教发〔2017〕24号）；2018年甘肃省中医药管理局科研项目（No.GZK-2018-5）；敦煌医学与转化教育部重点实验室2018年度开放基金项目（No.DHYX18-17）；甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目（No.2019KCZD-5）

＊硕士研究生。研究方向：脾胃病及病证结合动物模型。E-mail：1277891052@qq.com

＃通信作者：教授，硕士生导师，博士。研究方向：脾胃病及病证结合动物模型。E-mail：172924249@qq.com

analysis were carried out by using Cytoscape 3.7.0 software to obtain the core target genes. By using DAVID database, the gene ontology (GO) function annotation and KEGG pathway enrichment of intersecting target genes were carried out, and the "target-pathway" enrichment network was constructed by using Cytoscape 3.7.0 software. Through AutoDock vina 1.1.2 software, the top five active components in the list of degree value were linked with the protein encoded by the core target genes; Discovery Studio 3.5 software was applied to draw out binding pattern map. RESULTS: There were 143 compounds in Astragali Radix, 20 active components were screened out, and 189 corresponding target genes were selected; there were 4 356 UC disease related target genes. There were 126 intersection target genes of Astragali Radix (involving 14 active components) and UC. The core target genes in PPI network were *AKT*1, *MAPK*1, *RB*1, *JUN*, etc. A total of 2 294 GO items (q value<0.05) were obtained from GO functional annotation, including 2 093 biological process items (e.g. response to lipopolysaccharide, response to molecule of bacterial origin), 49 cell composition items (e.g. membrane raft, membrane microdomain), and 152 molecular function items (e.g. nuclear receptor activity, ligand-activated transcription factor activity). KEGG pathway enrichment analysis yielded 160 items (q value<0.05), such as fluid shear stress and atherosclerosis signaling pathway, phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway. Molecular docking results showed that top 5 active ingredients (quercetin, kaempferol, formenonetin, isorhamnetin, 7-*O*-methylisomucronulatol) in the list of degree value had binding energies<5.0 kcal/mol with the protein encoded core targets. CONCLUSIONS: Quercetin, kaempferol, formononetin and other active components in Astragali Radix may play a role in the treatment of UC through the action of *MAPK*14, *JUN*, *AKT*1 and other target genes, and then on the signal pathways such as PI3K/Akt and IL-17.

KEYWORDS Astragali Radix; Active ingredients; Ulcerative colitis; Network pharmacology; Molecular docking; Mechanism of action

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性、非特异性肠道炎症性疾病,其临床多表现为反复发作或持续性的腹痛、腹泻、黏液脓血便或不同程度的全身症状[1]。历代中医学家认为,该病的主要病因为内外之邪影响脾胃,使脾胃运化失司,而脾胃气虚是发病的根本[2]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.的干燥根,具有补气固表、利水退肿、托毒排脓等功效[3]。现代药理研究表明,黄芪的主要成分有黄芪多糖、黄芪甲苷Ⅳ以及黄酮类、生物碱类、氨基酸类化合物等,在保护肠黏膜、抗炎、调节免疫等方面有重要作用[4-5]。相关研究发现,黄芪纳米制剂在扶植UC模型大鼠肠道正常菌群生长、调节菌群失调等方面发挥了良好的作用,且其作用优于双歧杆菌活菌胶囊[6-7]。赵先亮等[8]研究发现,在UC患者天枢、大肠俞等穴位注射黄芪注射液具有较好的疗效。由此可见,黄芪及其活性成分在治疗UC方面具有一定的开发价值。网络药理学突破了"单药物、单靶点"的传统理念,借助拓扑学分析、生物信息技术分析可以更系统、整体地探究传统中药的潜在作用靶点,充分挖掘其分子作用机制,为现代中医药研究提供了新的思路[9]。基于此,本研究拟通过网络药理学技术,探讨黄芪治疗UC多成分、多途径、多靶点的整体调节作用机制,并将筛选出的核心靶基因与黄芪的主要活性成分进行分子对接,以初步验证黄芪治疗UC的主要成分与靶点,进而为其治疗UC的相关后续研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 黄芪活性成分筛选及靶点基因收集

通过中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP, http://tcmspw.com/),以生物口服利用度(OB)≥30%、类药性指数(BL)≥0.18作为筛选条件[9],筛选黄芪的活性成分。在UniProt KB数据库(http://www.uniprot.org/)中,以"Organism:Homo sapiens(物种:智人)"为查询条件,检索上述活性成分对应靶点的UniProt ID,获取对应的基因简称,去重后即得黄芪活性成分的对应靶点基因。

1.2 "药物-化合物-交集靶点"互作网络构建

以"Ulcerative colitis"为关键词,从Gene Cards数据库(http://www.genecards.org/)中检索UC疾病相关靶点基因。将其与"1.1"项下所得活性成分对应靶点基因分别上传至Venny 2.1.0在线作图工具(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html)中,绘制韦恩图,得到黄芪与UC的交集靶点基因。将黄芪活性成分信息、交集靶点基因信息分别导入Cytoscape 3.7.0软件中,构建"药物-化合物-交集靶点"互作网络,应用该软件中"Analyze network"功能对上述网络进行拓扑学分析。网络中,节点代表药物、活性成分和交集靶点基因,节点之间以边相连接;节点度值表示与节点相连边的数量,其值越大,即与其相连的节点就越多,表明该节点在网络中越重要,在整个网络中起到枢纽的作用,可能是关键成

分或者靶点[10]。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及核心靶点筛选

将黄芪与UC交集基因导入到STRING数据库（http://string-db.org/）中，选择“Multiple proteins（多种蛋白质）”选项，种属设置为“Homo sapiens（智人）”，置信度设为“0.9”，并选择隐藏散在的节点，以获取交集靶点基因的蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络。应用Cytoscape 3.7.0软件对结果进行可视化分析（网络中，节点的大小及颜色的深浅与节点的重要性成正相关），并借助该软件的“CytoNCA”插件进行拓扑学分析，分别以介数中心性、接近中心性、度中心性、特征向量中心性、局部平均连通度、网络中心性等参数的中位值为筛选条件，应用R 4.0.2软件进行2次筛选，每次仅选取所有参数均大于中位值的靶点进项下一次打分，末次打分所剩的靶点则为核心靶点。其中，介数中心性代表经过某一节点的最短路径的数量；接近中心性计算节点与网络中其他节点的平均距离，接近中心性越大的节点其信息流动性越佳；度中心性是某一节点与其他节点的链接性，表示节点的最直接影响力；特征向量中心性表示某一节点所处的周围环境即邻居节点的数量及质量；局部平均连通度则注重节点与节点之间的相互影响，是对度中心性的补充；网络中心性作为一种新的基于边缘聚类系数的关键蛋白中心性度量，既考虑了节点的中心性，又考虑了节点与相邻节点之间的关系；这6个参数代表了整个网络中每个单独节点的拓扑重要性，其量化值越大，说明节点在该网络中越重要[11－13]。

1.4 基因本体功能注释和KEGG信号通路富集

基于DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对黄芪与UC的交集靶点基因进行基因本体（GO）功能注释和KEGG通路富集分析。限定物种为“Human（人类）”，保留q值（即校正后的P值）小于0.05的富集条目，并按照q值大小进行排序。GO分析选取排名前10位的富集结果进行展示，KEGG分析选取排名前20位的富集结果进行展示。将KEGG通路富集结果和交集靶点基因信息导入Cytoscape 3.7.0软件中，构建“靶点-通路”富集网络，实现富集分析结果的可视化。

1.5 “药物成分-核心靶点”分子对接验证

从PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中下载“1.1”项下黄芪活性成分中度值排名前5位的化合物的2D结构，保存为“SDF”格式，作为小分子配体。从PDB数据库（https://www.rcsb.org/）中下载核心靶点对应蛋白的3D结构，保存为“PDB”格式，作为蛋白受体。利用Discovery Discovery Studio 3.5软件对蛋白受体进行去除原配体、水分子及添加氢原子等预处理并寻找活性口袋；然后，采用AutoDockTools 1.5.1软件定义小分子配体，将小分子配体保存为“pdbqt”格式，并采用AutoDock vina 1.1.2软件对核心靶点蛋白受体和黄芪活性成分小分子配体进行分子对接[14]。通过两者结合能来评价其结合活性：若结合能＜0 kcal/mol，则表示配体与受体能够自发地结合；结合能＜－5.0 kcal/mol，表明结合活性良好，且结合能越小表明对接越稳定（1 kcal＝4.186 J）[15]。选取结合能≤－7.0 kcal/mol的受体-配体分子对接结果并应用Discovery Studio 3.5软件绘制核心靶点蛋白受体和黄芪活性成分小分子配体之间的结合模式图，分别以3D和2D结构进行对接模式展示。

2 结果

2.1 黄芪中活性成分的筛选结果

通过TCMSP检索发现，黄芪中共含有143个化合物，经筛选后得到20个活性成分。黄芪活性成分的基本信息见表1。

表1 黄芪活性成分的基本信息

Tab 1 General information of active ingredients of Astragali Radix

TCMSP编号	活性成分（英文名）	OB，%	DL
MOL000211	丁子香萜（Mairin）	55.38	0.78
MOL000239	华良姜（Jaranol）	50.83	0.29
MOL000296	常春藤皂苷元（Hederagenin）	36.91	0.75
MOL000033	*β*-谷甾醇（*β*-sitosterol）	36.23	0.78
MOL000354	异鼠李素（Isorhamnetin）	49.60	0.31
MOL000371	3,9-di-*O*-methylnissolin	53.74	0.48
MOL000374	5′-羟基异微凸剑叶莎醇-2′，5′-二-*O*-葡萄糖苷（5′-hydroxyisomuronulatol-2′,5′-di-*O*-glucoside）	41.72	0.69
MOL000378	7-*O*-methylisomucronulatol	74.69	0.30
MOL000379	9，10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷（9，10-dimethoxypterocarpane-3-*O*-*β*-*D*-glucoside）	36.74	0.92
MOL000380	（6a*R*，11a*R*）-3-羟基-9，10-二甲氧基紫檀烷[（6a*R*，11a*R*）-9，10-dimethoxy-6a，11a-dihydro-6*H*-benzofurano[3，2-c]chromen-3-ol]	64.26	0.42
MOL000387	联苯双酯（Bifendate）	31.10	0.67
MOL000392	芒柄花黄素（Formononetin）	69.67	0.21
MOL000398	二氢异黄酮（Isoflavanone）	109.99	0.30
MOL000417	毛蕊异黄酮（Calycosin）	47.75	0.24
MOL000422	山柰酚（Kaempferol）	41.88	0.24
MOL000433	叶酸（Folic acid）	68.96	0.71
MOL000438	异微凸剑叶莎醇[（3*R*）-3-（2-hydroxy-3，4-dimethoxyphenyl）chroman-7-ol]	67.67	0.26
MOL000439	Isomucronulatol-7,2′-di-*O*-glucosiole	49.28	0.62
MOL000442	1，7-二羟基-3，9-二甲氧基紫檀烯（1，7-dihydroxy-3，9-dimethoxypterocarpene）	39.05	0.48
MOL000098	槲皮素（Quercetin）	46.43	0.28

2.2 “药物-化合物-交集靶点”相互作用网络的分析结果

从UniProt KB数据库中共获得黄芪活性成分对应靶点基因405个，去重后得到靶点基因189个；从Gene Cards数据库中共筛选出UC疾病相关靶点基因4 356

个。两者取交集后共得到交集靶点基因126个。黄芪与UC交集靶点基因的韦恩图见图1。

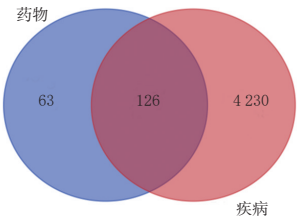


图1　黄芪与UC交集靶点基因的韦恩图

Fig 1　Venn map of the intersection target genes of Astragali Radix and UC

“药物-化合物-交集靶点”相互作用网络见图2(图中,中央圆形节点代表黄芪,外周圆形节点代表黄芪活性成分,节点上的编号为化合物对应的TCMSP编号,绿色矩形代表“药物-疾病”交集靶点,活性成分节点的大小代表与其所连接的靶点数目成正比)。由图2可见,该网络中共包括节点141个、边274条。该网络中,每个化合物平均与18.571个靶点相互作用,每个靶点平均与2.063个化合物相互作用。通过比较“药物-化合物-交集靶点”网络中各成分的度值,筛选出排名前5位的活性成分分别是槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素、异鼠李素、7-*O*-methylisomucronulatol,分别能与108、35、20、20、18个靶点蛋白发生作用;排名前5位的靶点蛋白分别是前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、PTGS1、热休克蛋白90α家族A类成员1(HSP90AA1)、蛋白质丝氨酸蛋白酶1(PRSS1)、类视黄醇X受体α(RXR-α),分别能与13、11、10、10、8个成分发生作用。

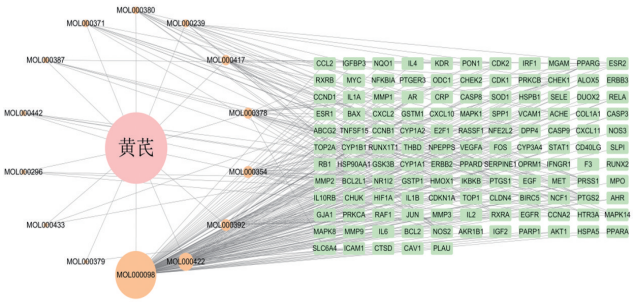


图2　黄芪治疗UC的“药物-化合物-交集靶点”互作网络

Fig 2　“Drug-compound-interaction target” network of Astragali Radix in the treatment of UC

2.3　PPI网络构建及核心靶点基因的筛选结果

拓扑学分析结果显示,PPI网络中共包含节点112个、边447条。经Cytoscape 3.7.0软件中“CytoNCA”插件两次筛选后最终得到8个核心靶点基因,即*RELA*、*MYC*、*IL2*、*MAPK14*、*JUN*、*MAPK1*、*AKT1*、*RB1*。黄芪与UC交集靶点基因的PPI网络如图3,PPI核心靶点基因的筛选流程见图4,核心靶点基因的拓扑参数详见表2。

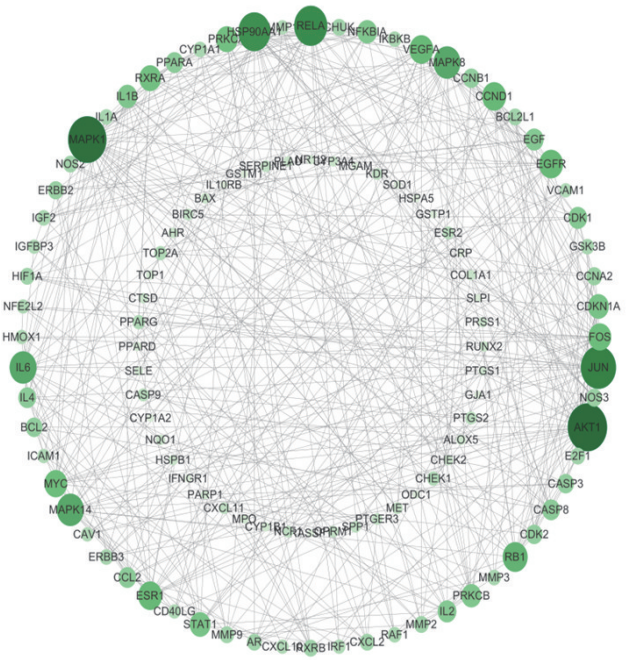


图3　黄芪与UC交集靶点基因的PPI网络

Fig 3　PPI network of interaction target genes of Astragali Radix and UC

2.4　GO功能注释和KEGG通路富集分析的结果

通过GO功能注释分析共得到条目2 294个(q值<0.05),包括生物过程2 093个、细胞组成49个、分子功能152个。分析发现,其生物过程涉及对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、细胞对化学应激的反应等;细胞组成涉及膜筏、膜微区、膜区域、转录调节复合物等;分子功能主要集中于核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合等,详见表3、表4、表5。

KEGG通路富集共获得条目160个(q值<0.05),排名靠前的通路包括糖尿病并发症中晚期糖基化终产物及其受体(AGE-RAGE)信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、前列腺癌信号通路、乙型肝炎、白细胞介素17(IL-17)信号通路等。KEGG富集分析结果(前20条)见表6,其富集网络(前20条)见图5。

2.5　黄芪主要活性成分与核心靶点蛋白的分子对接结果

“药物-化合物-交集靶点”互作网络中度值排名前5位的主要活性成分与PPI核心靶点基因*JUN*、*MAPK1*、*ATK1*、*IL2*、*MAPK14*、*RB1*(*RELA*和*MYC*基因在数据库中未找到对应蛋白晶体结构)编码蛋白分子对接的结合能分数色 阶图见图6。由图6可知,各组合对接分数均小于−5.0 kcal/mol,表明结合活性良好。以上结果说明,黄芪的主要活性成分对UC的核心靶点具有很强的关联性,而上述活性成分与核心靶点可能是黄芪治疗UC的主要作用靶点。

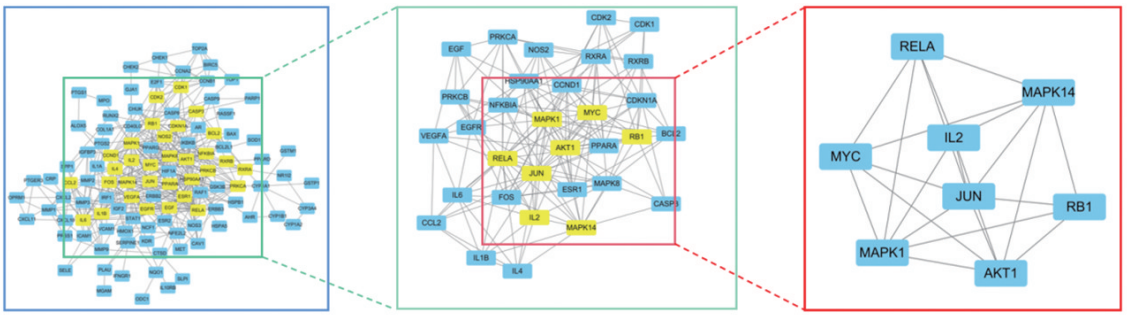


图4　黄芪与UC交集基因PPI网络中核心靶点基因的筛选流程

Fig 4　Core target gene screening of PPI network of interaction target gene of Astragali Radix and UC

表2　黄芪与UC交集基因中核心靶点基因的拓扑学参数

Tab 2　Topological parameters of the core target genes in the intersection genes of Astragali Radix and UC

核心靶点基因	介数中心性	接近中心性	度中心性	特征向量中心性	局部平均连通度	网络中心性
*MAPK*14	33.21	0.63	13	0.22	5.38	7.45
MYC	34.18	0.66	15	0.25	6.67	9.97
JUN	91.88	0.74	20	0.31	7.60	15.23
*AKT*1	81.63	0.69	17	0.25	5.53	10.02
*MAPK*1	92.49	0.74	20	0.31	7.10	14.37
IL2	20.81	0.61	11	0.19	5.27	6.65
*RB*1	22.30	0.61	11	0.17	4.73	6.56
RELA	63.52	0.69	17	0.26	6.71	12.00

表3　黄芪与UC交集靶点基因的GO功能注释分析结果（生物过程，前10位）

Tab 3　GO function annotation analysis results of intersection target genes of Astragali Radix and UC（biological process，top 10）

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	*q*值
0032496	对脂多糖的反应(Response to lipopolysaccharide)	35	5.31×10^{-29}
0002237	对细菌来源分子的反应(Response to molecule of bacterial origin)	35	1.04×10^{-28}
0062197	细胞对化学应激的反应(Cellular response to chemical stress)	34	3.10×10^{-27}
0000302	对活性氧的反应(Response to reactive oxygen species)	29	3.97×10^{-26}
0006979	氧化应激反应(Response to oxidative stress)	35	5.54×10^{-25}
0034599	细胞对氧化应激的反应(Cellular response to oxidative stress)	29	6.01×10^{-23}
0046677	对抗生素的反应(Response to antibiotic)	29	5.07×10^{-22}
0034614	细胞对活性氧的反应(Cellular response to reactive oxygen species)	23	1.76×10^{-21}
0010038	对金属离子的反应(Response to metal ion)	29	7.15×10^{-21}
0031667	对营养水平的反应(Response to nutrient levels)	31	3.25×10^{-19}

结合能≤－7.0 kcal/mol的受体-配体分子对接结果3D、2D示意图见图7（图中，黑色背景为3D结构图，主要展示对接位置及形态；白色背景为2D结构图，主要展示对接成键信息）。氢键是促使配体结合到活性位点的主要作用力[16]。由图7可知，槲皮素可与*MAPK*1基因编码蛋白（PDB编号6d5y）的活性位点MET-108、VAL-39形成氢键；槲皮素可与*RB*1基因编码蛋白（PDB编号1gux）的活性位点ARG-552形成氢键；7-*O*-methylisomucronulatol可与*RB*1基因编码蛋白（PDB编号1gux）的活性位点ARG-552、ARG-556形成氢键；芒柄花黄素可与*ATK*1

表4　黄芪与UC交集靶点基因的GO功能注释分析结果（细胞组成，前10位）

Tab 4　GO function annotation analysis results of intersection target genes of Astragali Radix and UC（cell composition，top 10）

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	*q*值
0045121	膜筏(Membrane raft)	17	2.00×10^{-9}
0098857	膜微区(Membrane microdomain)	17	2.00×10^{-9}
0098589	膜区域(Membrane region)	17	2.39×10^{-9}
0005667	转录调节复合物(Transcription regulator complex)	17	6.76×10^{-8}
1902554	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物(Serine/threonine protein kinase complex)	9	2.11×10^{-7}
0000307	细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物(Cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex)	7	2.88×10^{-7}
0090575	RNA聚合酶Ⅱ转录调节复合物(RNA polymerase Ⅱ transcription regulator complex)	11	2.88×10^{-7}
1902911	蛋白激酶复合物(Protein kinase complex)	9	8.77×10^{-7}
0031983	囊泡腔(Vesicle lumen)	13	4.23×10^{-6}
0000790	核染色质(Nuclear chromatin)	13	1.86×10^{-5}

表5　黄芪与UC交集靶点基因的GO功能注释分析结果（分子功能，前10位）

Tab 5　GO function annotation analysis results of intersection target genes of Astragali Radix and UC（molecule function，top 10）

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	*q*值
0004879	核受体活性(Nuclear receptor activity)	10	1.26×10^{-10}
0098531	配体激活的转录因子活性(Ligand-activated transcription factor activity)	10	1.26×10^{-10}
0140297	DNA结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)	19	5.53×10^{-10}
0061629	RNA聚合酶Ⅱ特异性DNA结合转录因子结合(RNA polymerase Ⅱ-specific DNA-binding transcription factor binding)	17	8.11×10^{-10}
0003707	类固醇激素受体(Steroid hormone receptor activity)	9	1.05×10^{-8}
0044389	泛素样蛋白连接酶结合(Ubiquitin-like protein ligase binding)	16	2.65×10^{-8}
0035173	组蛋白激酶活性(Histone kinase activity)	6	4.98×10^{-8}
0005126	细胞因子受体结合(Cytokine receptor binding)	15	6.23×10^{-8}
0020037	血红素结合(Heme binding)	11	9.40×10^{-8}
0005125	细胞因子活性(Cytokine activity)	13	1.53×10^{-7}

基因编码蛋白（PDB编号1unp）的活性位点GLU-40、GLN-43、GLN-47形成氢键；芒柄花黄素可与*RB*1基因编码蛋白（PDB编号1gux）的活性位点THR-738、ARG-556形成氢键，并可在HIS-699处形成π-π堆积；异鼠李素可与*MAPK*1基因编码蛋白（PDB编号6d5y）的活

表6　黄芪与UC交集靶点基因KEGG通路富集分析的结果（前20位）

Tab 6　KEGG pathway enrichment analysis of intersection target genes of Astragali Radix and UC (top 20)

KEGG编号	富集通路（英文名称）	基因数	q值
hsa04933	糖尿病并发症中晚期AGE-RAGE信号通路（AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications）	27	1.17×10^{-25}
hsa05418	流体剪切应力和动脉粥样硬化（Fluid shear stress and atherosclerosis）	29	1.86×10^{-24}
hsa05215	前列腺癌（Prostate cancer）	24	4.19×10^{-22}
hsa05161	乙型肝炎（Hepatitis B）	28	1.81×10^{-21}
hsa04657	IL-17信号通路（IL-17 signaling pathway）	23	3.03×10^{-21}
hsa04668	肿瘤坏死因子（TNF）信号通路（TNF signaling pathway）	24	8.72×10^{-21}
hsa05167	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染（Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection）	29	1.00×10^{-20}
hsa05160	丙型肝炎（Hepatitis C）	25	1.87×10^{-18}
hsa05212	胰腺癌（Pancreatic cancer）	19	6.45×10^{-18}
hsa05163	人巨细胞病毒感染（Human cytomegalovirus infection）	28	7.25×10^{-18}
hsa05222	小细胞肺癌（Small cell lung cancer）	20	1.21×10^{-17}
hsa05219	膀胱癌（Bladder cancer）	15	3.94×10^{-17}
hsa05223	非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer）	18	3.94×10^{-17}
hsa05162	麻疹（Measles）	22	2.13×10^{-16}
hsa04659	辅助性T细胞17（Th17）细胞分化（Th17 cell differentiation）	20	2.13×10^{-16}
hsa01522	内分泌抵抗（Endocrine resistance）	19	6.30×10^{-16}
hsa04151	磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K-Akt）信号通路（PI3K/Akt signaling pathway）	31	1.29×10^{-15}
hsa01521	表皮生长因子受体（EGFR）酪氨酸激酶抑制剂耐药（EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance）	17	3.88×10^{-15}
hsa05169	爱泼斯坦-巴尔病毒感染（Epstein-Barr virus infection）	24	4.65×10^{-15}
hsa05205	癌症中的蛋白多糖（Proteoglycans in cancer）	24	6.20×10^{-15}

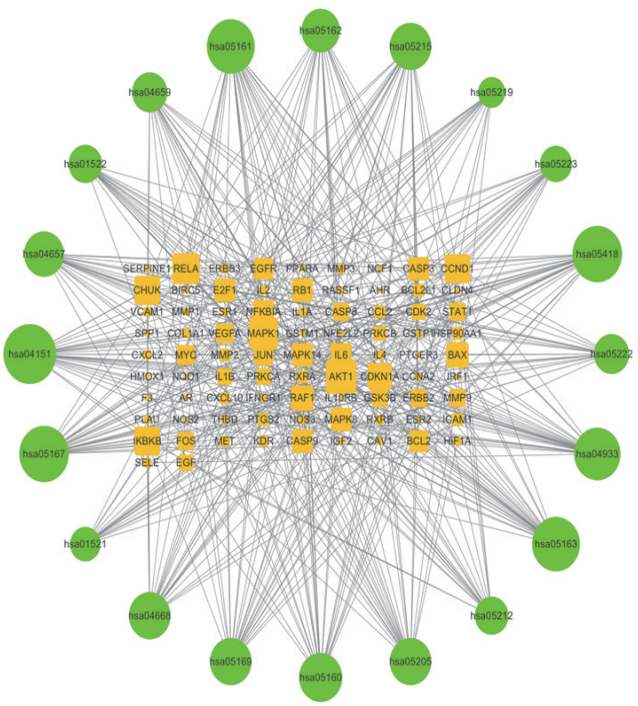


图5　黄芪与UC交集靶点基因的KEGG通路富集网络（前20位）

Fig 5　Enrichment network diagram of KEGG pathway intersection target genes of Astragali Radix and UC (top 20)

	ATK1	*JUN*	*IL2*	*MAPK1*	*MAPK14*	*RB1*
槲皮素	−6.8	−5.3	−5.5	−7.1	−6.9	−7.7
7-*O*-methylisomucronulatol	−6.1	−5.1	−5.1	−6.3	−6.4	−7.1
芒柄花黄素	−7.2	−5.4	−5.4	−6.9	−6.7	−7.1
异鼠李素	−6.6	−5.3	-5.4	−7.0	−7.0	−8.0
山柰酚	−6.7	−5.3	−5.2	−6.9	−7.1	−7.4

注：对接分数越小则结合能越大，在表中的颜色越深

Note：the smaller the docking score，the greater the binding energy and the darker the color in the table

图6　度值排名前5位的活性成分与核心靶点基因编码蛋白分子对接的结合能分数色阶图（kcal/mol）

Fig 6　Fractional color order diagram of molecular docking binding energy between top 5 active components in the list of degree value and the core target gene coding protein (kcal/mol)

性位点MET-108、GLU-33形成氢键；异鼠李素可与*MAPK*14基因编码蛋白（PDB编号5eti）的活性位点LEU-164、ASN-82、ASN-159形成氢键；异鼠李素与*RB*1基因对应蛋白（PDB编号1gux）的活性位点ARG-556、ARG-552处形成氢键；山柰酚可与*MAPK*14基因编码蛋白（PDB编号5eti）的活性位点ASN-159、ASN-82形成氢键；山柰酚可与*RB*1基因编码蛋白（PDB编号：1gux）的活性位点ARG-741、ARG-698、ARG-552、HIS-733形成氢键。

3　讨论

UC是以持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便为主要临床表现，伴腹痛、里急后重和不同程度全身症状的一种慢性非特异性肠道炎症性疾病，其病因病机尚未完全明确[17]。近年来的研究多认为，UC的发生发展是外源有害物质进入体内所致宿主反应、遗传基因调控和过度免疫反应三者之间相互作用的结果[18−19]，且与肠黏膜局部免疫反应异常的关系尤为密切[16]。目前中医临床认为，UC发病的根本原因为脾胃气虚，治疗宜以益气健脾为主[20]。基于数据挖掘和文献分析显示，在用于治疗UC的中药当中，补虚药黄芪的使用频次最高[21−25]。黄芪性微温，味甘，归脾、肺二经，具有补气固表、利水退肿、托毒排脓、生肌等功效[3,26]。相关研究表明，黄芪能够保护免疫系统及肠黏膜屏障、抑制肠道内细菌生长[27]。由此可见，黄芪可通过上述途径发挥对UC的治疗作用，但其具体分子调控机制仍不明确。

本研究结果表明，槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素异、鼠李素、7-*O*-methylisomucronulatol等活性成分的作用靶点基因较多，为黄芪的主要活性成分。相关药理研究表明，槲皮素最为核心且最为显著的功效即为调节炎症，其可通过抑制炎性细胞因子及炎症诱导酶而发挥抗炎作用[28]。山柰酚具有极强的抗炎活性，可缓解炎症反

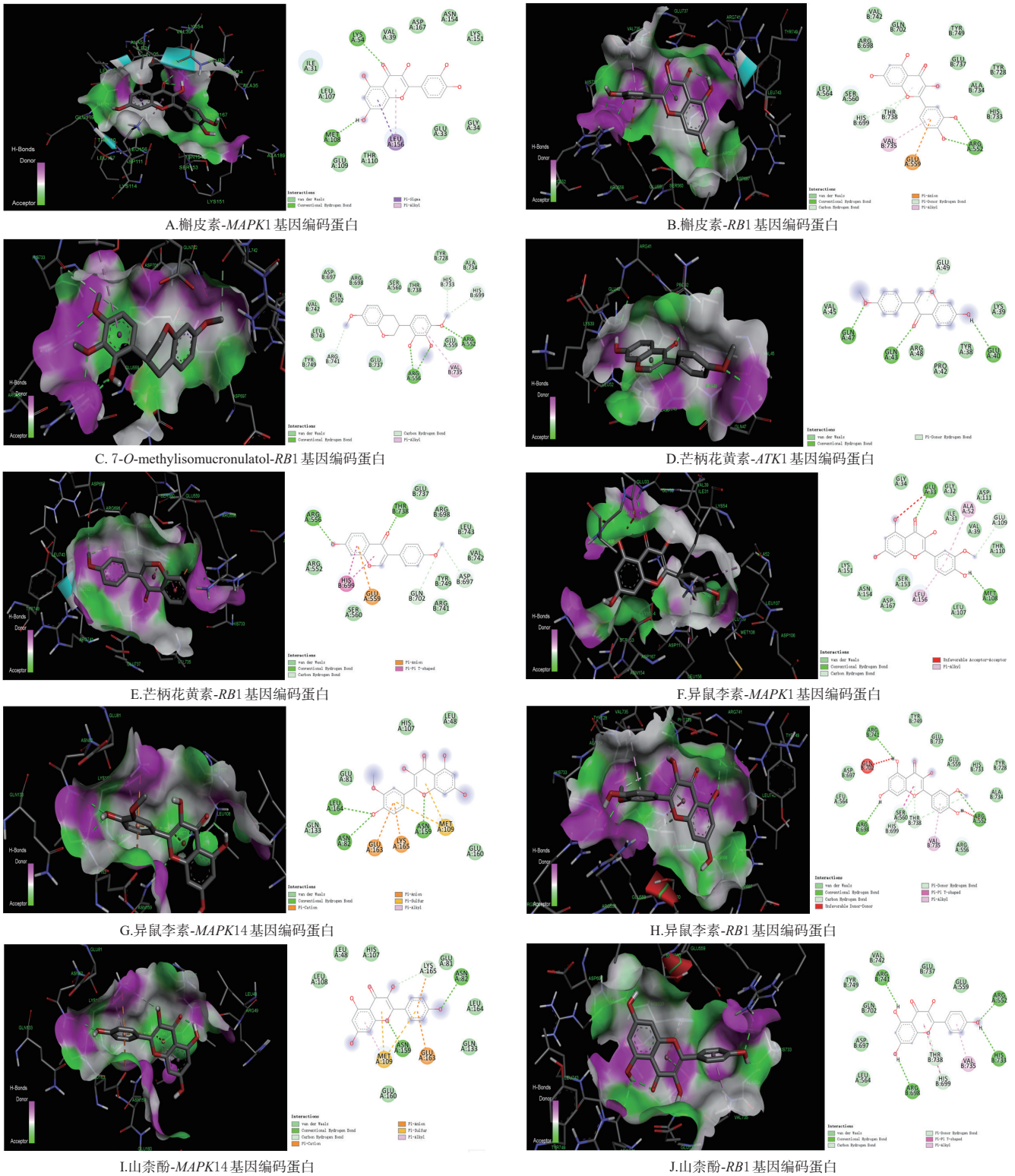


图7　活性成分与核心靶点基因编码蛋白的分子对接示意图（结合能≤－7 kcal/mol）

Fig 7　Schematic diagrams of molecular docking between active components and core target gene coding protein (binding energy≤－7 kcal/mol)

应，具有保护结肠黏膜的作用[29]。氧自由基（ORF）具有很强的氧化作用，可引起细胞损伤及死亡，而芒柄花黄素能够有效抑制并清除体外反应体系中的ORF，对机体具有保护作用，且芒柄花黄素还具有抗炎活性[30－31]。异鼠李素属于黄酮类化合物，其抗炎作用可涉及中枢神经系统、循环系统以及消化系统等，可通过抑制炎性细胞因子的表达来阻断核因子κB（NF-κB）以及p38丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）信号通路，进而发挥抗炎作用[32]。

通过对交集靶点基因进行GO功能注释分析发现，

黄芪可以通过多种生物过程、细胞组成和分子功能对UC进行调控。KEGG通路富集结果表明，AGE-RAGE信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化、前列腺癌、PI3K/Akt、IL-17、TNF等信号通路为主要的调节通路，提示不同疾病之间可能存在着相同的调节机制。研究发现，PI3K/Akt信号通路活化后可启动下游的NF-κB通路，释放促凋亡蛋白和炎性细胞因子，促进肠上皮细胞凋亡，从而维持肠道炎症，最终导致UC迁延难愈[33－34]。阻断该通路后，NF-κB活化将受到抑制，使得炎性细胞因子的表达下调，从而修复结肠黏膜的炎症损伤[35]。IL-17通过与IL-17受体结合，诱发下游信号通路转导，从而进一步诱导细胞因子和趋化因子的表达，与炎症和自身免疫疾病息息相关[36]；此外，IL-17还可通过活化MAPK等通路诱导中性粒细胞聚集以诱发炎症，如代表免疫失衡的辅助性T细胞17（Th17）细胞水平升高以及外周血中IL-17含量升高均可见于炎症性肠病中[37]。在TNF信号通路中，TNF-α可通过上调NF-κB等因子来诱导多种效应分子的表达，从而实现白细胞募集、炎症级联放大等效应，进而加重UC的炎症反应[38]。

PPI网络的拓扑学分析结果表明，*MAPK*14、*IL*2、*MAPK*1等8个靶点基因处于网络的核心位置，这8个靶点基因不仅对应多个活性成分，而且在PPI网络中具有重要作用，提示这8个基因可能是黄芪发挥治疗作用的极重要的靶点。如*MAPK*基因与细胞增殖、凋亡和炎症等多种生命活动有关，参与细胞对多种刺激的反应，其可调节细胞增殖、分化，影响细胞的存活和凋亡，与UC的发生密切相关[39－40]。IL-2是一种具有多种生物学活性的细胞因子，其对免疫调节有很大的作用，可与单核细胞体结合，增强T细胞活化和细胞杀伤作用[41]。分子对接结果表明，核心靶点与黄芪主要活性成分均拥有良好的对接活性（结合能＜－5.0 kcal/mol），进一步说明了黄芪主要活性成分可通过调控上述核心靶点对UC起到治疗作用，验证了上述网络药理学预测结果的可靠性。

综上所述，黄芪中的槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素异、鼠李素等活性成分可通过作用于*MAPK*14、*MAPK*1、*JUN*、*AKT*1等靶点基因，进而对TNF、PI3K/Akt等信号通路产生调控作用，从而发挥其对UC的治疗作用。从分析结果中还可以看出，通路及靶点之间存在着交叉作用，同一靶点可通过调控多条通路而发挥对疾病的治疗作用，而代表不同疾病的信号通路（如癌症、肝炎等信号通路）又包含相同的靶点，这与中医学“同病异治，异病同治”的思想较为符合，也从现代分子生物学角度初步印证了中药多靶点、多通路、多途径的治疗特点。

参考文献

[1] RUBIN D T, ANANTHAKRISHNAN A N, SIEGEL C A, et al. ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults[J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(3): 384-413.

[2] 汪芸，崔丁鹿.溃疡性结肠炎脾胃气虚证的研究进展[J].现代中西医结合杂志，2015，24(25)：2845-2847.

[3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版.北京：中国科技出版社，2020：315.

[4] ZHANG W, MA W, ZHANG J, et al. The immunoregulatory activities of astragalus polysaccharide liposome on macrophages and dendritic cells[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105(Pt 1): 852-861.

[5] 刘佳丽，孙平良，李忠海，等.黄芪对溃疡性结肠炎的研究进展[J].中华中医药学刊，2021，39(3)：160-163.

[6] 孙立群，梁金花，高月娟.探讨纳米级中药黄芪对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群失调的调整作用[J].中国中医急症，2012，21(8)：1263-1265.

[7] 梁金花，郑科文，孙立群.探讨中药黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群失调的调整作用[J]. 微量元素与健康研究，2013，30(2)：1-3.

[8] 赵先亮，王雪芹.黄芪注射液穴位注射治疗慢性溃疡性结肠炎80例[J].河南中医，2006，26(8)：73-74.

[9] 付海荣，庞毅，谭家华，等.山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究[J].中国药房，2019，30(24)：3392-3398.

[10] 何天目，段灿灿，李晓飞，等.基于网络药理学和分子对接探索血必净注射液治疗冠状病毒肺炎的潜在机制[J].中国现代应用药学，2020，37(4)：398-405.

[11] LI M, WANG J, CHEN X, et al. A local average connectivity-based method for identifying essential proteins from the network level[J]. Comput Biol Chem, 2011, 35(3): 143-150.

[12] LI M, ZHENG R, ZHANG H, et al. Effective identification of essential proteins based on priori knowledge, network topology and gene expressions[J]. Methods, 2014, 67(3): 325-333.

[13] 任晓龙，吕琳媛. 网络重要节点排序方法综述[J].科学通报，2014，59(13)：1175-1197.

[14] TROTT O, OLSON A J. AutoDock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.

[15] 石少瑜.彝族“黄药”艾纳香正丁醇部位化学成分分离及其抗A549、NCI-H1299细胞活性[D].北京：中央民族大学，2020.

[16] 黄友，杨莎莎，林夏，等.基于网络药理-分子对接研究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].药学学报，

2020,55(8):1812-1822.
[17] 毛慧芳,安冬,李璐,等.不同中医证型溃疡性结肠炎肠道菌群特征性变化研究进展[J].中国中医药信息杂志,2020,27(10):141-144.
[18] SHAM H P, BAZETT M, BOSILJCIC M, et al. Immune stimulation using a gut microbe-based immunotherapy reduces disease pathology and improves barrier function in ulcerative colitis[J]. Front Immunol, 2018, 27(9): 2211.
[19] LEBER A, HONTECILLAS R, TUBAU-JUNI N, et al. NLRX1 modulates immunometabolic mechanisms controlling the host-gut microbiota interactions during inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2018, 26(9): 363.
[20] 石琳妮,张高松.黄芪颗粒联合双歧杆菌四联活菌片治疗溃疡性结肠炎临床研究[J].新中医,2019,51(6):159-162.
[21] 董文海,韩梅,张俊仲.中药治疗溃疡性结肠炎的用药规律分析[J].光明中医,2018,33(18):2640-2642.
[22] 迟宇钧.基于文献分析的中医药治疗溃疡性结肠炎古今用药规律的研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2017.
[23] 裴银奇,赵党生.基于中医传承辅助系统的溃疡性结肠炎方剂用药规律分析[J].亚太传统医药,2016,12(24):92-94.
[24] 刘冬梅,王德运.中医药治疗溃疡性结肠炎活动期的数据挖掘[J].山西中医,2016,32(8):48-50.
[25] 刘启鸿,赵培琳,方文怡,等.基于文献分析中医药治疗溃疡性结肠炎用药规律[J].福建中医药,2019,50(3):10-12.
[26] 王东博,赵曼佳,代云桃,等.黄芪分析方法的优化和黄芪标准汤剂的质量评价[J].中国中药杂志,2020,45(1):119-123.
[27] 邓蓓蓓.黄芪多糖对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障损伤的保护作用[D].长春:吉林大学,2017.
[28] 杨颖,王芸芸,蒋琦辰.槲皮素药理作用的研究进展[J].特种经济动植物,2020,23(5):24-28.
[29] 徐甜,连雅君,李振汉,等.当归-白芍药对治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究[J].中华中医药学刊,2020,38(1):173-176.
[30] 杨雅静.芒柄花黄素对实验小鼠免疫功能的影响[D].唐山:华北理工大学,2019.
[31] 王茹月,叶雨.芒柄花黄素应用于抗癌药物开发的研究进展[J].肿瘤防治研究,2019,46(2):183-187.
[32] 闫姗,王晓坤,杨林燕,等.异鼠李素的抗炎作用研究进展[J].甘肃科技,2020,36(13):115-118.
[33] 蒋寅.黄芩苷对溃疡性结肠炎PI3K/Akt/NF-κB信号通路的影响及其机制研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
[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] 张超贤,郭李柯,郭晓凤.三硝基苯磺酸/乙醇灌肠液诱导大鼠溃疡性结肠炎TLR4/NF-κB和PI3K/AKT/NF-κB信号通路的表达及电针的干预作用[J].西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):263-270.
[36] 马春梅.丝/苏氨酸蛋白激酶NDR1正向调控IL-17诱导的炎症及作用机制[D].杭州:浙江大学,2016.
[37] 郭小芹. IL-17/IL-17R通路在炎症性肠病中的免疫调节机制研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2013.
[38] 马遥,姜兆伟,靳云轶,等.大鼠牙周炎正畸牙移动初期TNF信号通路的基因本体分析[J].口腔疾病防治,2019,27(11):695-702.
[39] LIAN L, ZHANG S, YU Z, et al. The dietary freeze-dried fruit powder of actinidia arguta ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting the activation of MAPKs[J]. Food Funct, 2019, 10(9):5768-5778.
[40] 张海霞.温清溃结饮对于DSS诱导的大鼠UC的治疗作用及对TLR4/MyD88/NF-KB通路的影响[D].北京:北京中医药大学,2019.
[41] 于仁芳,孔晓.外周血及结肠黏膜TNF-α、IL-6和IL-2在溃疡性结肠炎患者中的表达[J].中国急救医学,2018,38(S02):183.

(收稿日期:2020-11-25 修回日期:2021-01-28)
(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅