

基于网络药理学和分子对接探讨黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制

刘文文,高云云,尹志鹏,吕刚,王玉,赵英会

(山东第一医科大学 基础医学院,山东 泰安 271000)

摘要:运用网络药理学和分子对接方法探索黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的分子机制。应用中药系统药理学数据库与分析平台对黄连温胆汤药物活性成分及药物作用靶点基因进行筛选。通过 Genecards 数据库、DisGENET 数据库查找幽门螺杆菌相关性胃炎疾病相关靶点,利用维思在线绘图工具获得疾病与药物的共同靶点基因。利用 Cytoscape 3.8.2 软件以及 STRING 数据库分别构建药物-化合物-靶点相互作用网络及蛋白质-蛋白质相互作用网络图。运用 DAVID 数据库进行基因本体功能和京都基因与基因组百科全书通路富集分析。选取度值排名前3的靶点蛋白和活性成分使用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接。共筛选得到槲皮素、川皮苷、柚皮素等 127 种黄连温胆汤药物活性成分,并获得 Akt1、JUN、TNF- α 、STAT3 等 101 个潜在靶点蛋白,涉及 P53 信号通路、NOD 样受体信号通路、TNF 信号通路等 90 条信号通路。分子对接结果显示关键靶点 STAT3、TP53、Akt1 与活性成分槲皮素、川皮苷、柚皮素的亲和力较好,其中以 Akt1 与柚皮素的结合能力最强。通过分析黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用靶点和相关信号通路,能够为临床应用和后续实验研究提供理论基础。

关键词:黄连温胆汤;幽门螺杆菌相关性胃炎;网络药理学;分子对接

中图分类号:R285 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-4026(2023)02-0023-10

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Network pharmacology and molecular docking analysis of the mechanism of Huanglian Wendan Decoction in the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastritis

LIU Wenwen, GAO Yunyun, YIN Zhipeng, LÜ Gang, WANG Yu, ZHAO Yinghui

(School of Basic Medical Science, Shandong First Medical University, Tai'an 271000, China)

Abstract: This study aimed to explore the mechanism of Huanglian Wendan Decoction in the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastritis by network pharmacology and molecular docking methods. The active ingredients and drug

收稿日期:2021-12-29

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2013HM033);泰安市科研课题(2020NS136,2016NS1074)

作者简介:刘文文(1996—),女,硕士研究生,研究方向为致癌致畸病原体感染与检测。Tel:18815380582,E-mail:17686147352@163.com

* 通信作者:赵英会(1971—),女,教授,硕士研究生导师,研究方向为致癌致畸病原体感染与检测。Tel:13605383576,E-mail:yhzha@sdfmu.edu.cn

target genes of Huanglian Wendan Decoction were screened using the traditional Chinese medicine system pharmacology database and analysis platform. The *H. pylori* associated gastritis disease-related targets were found by the GeneCards and DisGENET databases, and the common target genes of diseases and drugs were obtained via the Venny online mapping tool. Cytoscape 3.8.2 software and the STRING database were used to construct a drug-compound-target interaction network and a protein-protein interaction network diagram, respectively. Gene ontology function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway enrichment analysis were performed using the DAVID database. The target proteins and active ingredients with the top three selection scores were selected for molecular docking using Autodocktools 1.5.6 software. A total of 127 active ingredients of Huanglian Wendan Decoction were screened, such as quercetin, nobiletin, and naringenin. A total of 101 potential target proteins were obtained, such as Akt1, JUN, TNF- α , and STAT3, which involved 90 signal pathways, including the p53 signal pathway, NOD-like receptor signal pathway, and TNF signal pathway. Molecular docking results revealed that the key targets, STAT3, TP53, and Akt1, had high affinity for the active ingredients quercetin, nobiletin, and naringenin. In addition, Akt1 had the highest binding affinity for naringenin. Network pharmacology and molecular docking analysis predicted the action target and related signal pathway of Huanglian Wendan Decoction in the treatment of *H. pylori* associated gastritis, which will provide a theoretical basis for clinical application and subsequent experimental research.

Key words : Huanglian Wendan Decoction; *Helicobacter pylori* associated gastritis; network pharmacology; molecular docking

幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 是感染胃黏膜最常见的病原体^[1],流行病学研究表明,全球大约有一半人口感染幽门螺杆菌,在中国其感染率高达 50% 以上^[2-4]。幽门螺杆菌相关性胃炎是一种由幽门螺杆菌感染后所引发的胃黏膜炎症,可形成慢性炎症,预后不良,被认为是消化性溃疡和胃癌发生发展的潜在危险因素^[5]。目前,临床上通常将抗生素作为根除幽门螺杆菌感染的首选方法,主要包括标准的三联疗法和在其基础上加入铋剂的四联疗法^[6-7]。近几年,随着抗生素广泛使用,细菌的耐药性不断增加,尤其以克拉霉素为核心药物的标准三联疗法耐药情况最为严重^[6]。2017 年,WHO 将耐克拉霉素的幽门螺杆菌列为对人类健康威胁最大的 12 种细菌之一^[8]。因此,寻找能够补充替代抗生素治疗的其他方法,对于根治幽门螺杆菌感染至关重要。

已有研究表明,中药在根除幽门螺杆菌和治疗慢性胃炎方面具有较好的临床效果^[9]。黄连温胆汤具有抗炎、调理脾胃失调、清热燥湿等功效^[10],研究发现,其药物成分能够抑制胃酸的分泌,并对幽门螺杆菌具有一定清除作用,对幽门螺杆菌相关性胃炎治疗效果较为显著^[11]。但该药物对幽门螺杆菌相关性胃炎治疗的分子生物学机制还不清楚。因此,本研究采用网络药理学和分子对接的方法预测黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在靶点和相关信号通路等药理机制,为后续实验研究和在临床上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 黄连温胆汤药物活性成分及靶点的筛选

分别对黄连温胆汤中的黄连、半夏、甘草、茯苓、枳实、生姜、陈皮等 7 种药物运用中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSPP) (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 进行检索,将筛选条件设置为口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ,进一步获得药物的主要活性成分,之后运用 TCMSPP 数据库查询上述药物活性成分所对应的药物作用蛋白靶点^[12]。将获得的所有蛋白靶点去重处理,利用 Uniprot 数据库进行基因 Symbol 的转换,最终获得药物活性成分的靶点基因。

1.2 筛选疾病相关靶点和黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在靶点

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGENET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中输入关键词“*Helicobacter pylori* associated gastritis”、“Gastritis correlated to *Helicobacter pylori*”,查找幽门螺杆菌相关性胃炎疾病相关靶点,然后对疾病靶点进行合并去重处理^[13-14]。运用 Venny 2.1 在线绘图工具

(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将幽门螺杆菌相关性胃炎疾病靶点基因和黄连温胆汤药物成分靶点基因进行整合,取交集后,最终获得黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在靶点^[15]。

1.3 药物-活性成分-潜在靶点网络的构建

将药物、活性成分、潜在靶点的数据进行处理整合后导入 Cytoscape 3.8.2 作图软件,构建药物-活性成分-潜在靶点可视化网络图^[16]。利用不同形状 of 节点分别代表药物、药物活性成分、潜在靶点,边用于表示三者之间的相互作用关系,运用 Tool 工具中的 network analysis 选项对节点进行分析,最终获得各节点对应的度值(degree)。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络的构建

运用 STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>)对潜在靶点基因进行分析^[17]。将物种设为“homo sapiens”,“high confidence”设置为 0.9,获得蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)关系后将 TSV 数据导出。将上述获得的数据导入 Cytoscape 3.8.2 作图软件,通过设置 degree 值范围,完成 PPI 网络图的绘制,其中节点的大小代表度值的高低,边的粗细代表 PPI 关系的强弱程度。

1.5 GO 生物过程和 KEGG 通路富集分析

将黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在靶点基因输入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中^[18]。设定物种为“Homo sapiens”,设定阈值 $P < 0.01$,分别进行基因本体(gene ontology, GO)分析和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,得到数据后,将其导出,数据中 $-\lg P$ 值的大小代表着富集程度,值越大表示富集程度越大,最终选取富集程度排名前 10 的 GO 值和排名前 20 的 KEGG 值分别进行条形图和气泡图的绘制。

1.6 构建 BP-CC-MF-KEGG-潜在靶点网络

将药物与疾病的交集靶点、GO 分析中生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)富集度排名前 10 的数据和排名前 20 的 KEGG 信号通路数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件作图工具,绘制 BP-CC-MF-KEGG-潜在靶点网络图。

1.7 分子对接

从 PPI 网络图和药物-活性成分-靶点网络图中分别选取度值排名前 3 的靶点蛋白 STAT3、TP53、Akt1 与药物活性成分槲皮素、川皮苷、柚皮素进行分子对接验证。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载有效活性成分的结构式,利用 Chem3D 软件制作相应的 3D 结构,并输出为 mol * 2 格式^[19]。再从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载核心蛋白结构域的 pdb 格式,得到 STAT3、TP53、Akt1 的 PDB 编号分别为 6NJS、6VIP、3O96,接着利用 PyMOL 软件对蛋白质进行去水、去磷酸根等操作。利用 AutoDockTools 1.5.6 软件将药物活性成分及核心蛋白基因文件 pdb 格式转换为 pdbqt 格式并寻找活性口袋,最后运行 Vina 脚本进行分子结合能计算以及分子对接结果展示,同时运行 Discovery Studio 2019 寻找对接位点并计算柔性结合的 LibDockScore,将输出的分子对接结果导入 PyMOL 软件进行分子对接构象展示。若结合能为负值,说明配体与受体可自发结合,当 Vina 结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 以及 DS 能找到对接位点,且 LibDockScore ≥ 100 ,说明两者形成稳定对接,对配体-受体复合物进行分子对接结果 3D、2D 展示,以评价生物信息分析预测的可靠性。

2 结果

2.1 黄连温胆汤药物活性成分及靶点的筛选

运用 TCMSP 数据库检索黄连温胆汤中的黄连、半夏、甘草、茯苓、枳实、生姜、陈皮等 7 种药物活性成分,按照 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的检索条件,共筛选得到 166 种药物活性成分,将其中 21 种无对应药物靶点蛋白的化合物和 7 种多药物共有成分删除、去重整合后,最终得到 137 种药物活性化合物,多药物共有活性成分见表 1。利用 TCMSP 数据库对 137 种药物活性化合物对应的靶点蛋白进行查询,获得 2 717 个药物作用

的靶点蛋白,经过去重处理后,剩余 260 个。将 260 个药物作用的靶点蛋白利用 Uniprot 数据库进行规范化处理后,完成基因 Symbol 的转换。

表 1 药物共有活性成分
Table 1 Common pharmaceutical active ingredients

药物	MOL ID	共同活性成分	OB/%	DL
黄连-甘草	MOL000098	槲皮昔(quercetin)	46.43	0.28
半夏-生姜	MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76
半夏-生姜	MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75
陈皮-枳实	MOL005828	川皮昔(nobiletin)	61.67	0.52
陈皮-枳实	MOL005100	5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-色满-4-酮	47.74	0.27
陈皮-枳实-甘草	MOL004328	柚皮素(naringenin)	59.29	0.21
陈皮-甘草	MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75

2.2 筛选疾病相关靶点和黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在靶点

利用幽门螺杆菌相关性胃炎的英文名称为关键词在 Genecards 数据库和 DisGENET 数据库经过查找筛选,共得到 800 个疾病靶点,与上述获得的 260 个药物作用靶点进行维恩分析,最终得到 101 个交集靶点,作为黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的直接作用靶点(OSID 科学数据与内容附图 1)。

2.3 药物-活性成分-潜在靶点网络的构建

为了进一步探索黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制,将 137 种药物活性成分对应靶点去重后,与 101 个交集靶点分别进行比对筛选,删除 10 种无对应交集靶点的药物活性成分,最终将剩余的 127 种药物活性成分,7 个药物节点(黄连、半夏、甘草、茯苓、枳实、生姜、陈皮),101 个交集靶点的数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件,完成药物-活性成分-潜在靶点网络模型的构建,见 OSID 科学数据与内容附图 2,图中正方形节点代表药物活性成分、六边形节点代表药物、菱形节点代表交集靶点。利用 network analysis 选项对网络中的节点进行分析,最终得到各节点的度值。在药物活性化合物中,度值越高表示药物活性成分对应的交集靶点越多,交集靶点的度值越高,说明作用于该靶点对应药物活性成分越多。

经分析可知,平均每种药物的活性成分对应 8 个交集靶点,127 种药物活性成分中有 49 种活性成分作用的靶点数大于均值,表明这 49 种药物成分为有效活性成分;平均每个交集靶点对应 11 种药物活性成分,101 个交集靶点中有 15 个靶点对应的药物活性成分高于平均值,说明这 15 个靶点为黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的关键靶点。表 2 列举了度值最高的前 8 种(度值>15)药物活性成分,表 3 列举了度值高于均值的前 15 个交集靶点。

表 2 药物-活性成分-靶点网络中度值排名前 8 的活性成分的性质及来源
Table 2 The properties and origin of the top 8 active ingredients in the drug-active-ingredient-target network in terms of selection value

药物	活性成分	MOL ID	度值
黄连-甘草	槲皮素(quercetin)	MOL000098	133
陈皮-枳实	川皮昔(nobiletin)	MOL005828	39
陈皮-枳实-甘草	柚皮素(naringenin)	MOL004328	37
甘草	毛蕊异黄酮(calycosin)	MOL000417	31
半夏-生姜	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	MOL000358	27
半夏	黄芩素(baicalein)	MOL002714	18
甘草	槲皮素衍生物(quercetin der)	MOL004961	16
枳实	四甲氧基乌托林(tetramethoxyluteolin)	MOL007879	38

表 3 药物活性成分-靶点-疾病网络中度值高于均值的靶点基因

Table 3 Target genes with higher than average selection values in the active ingredient-target-disease network

蛋白名称	基因名称	度值
前列腺素 G/H 合酶 2	<i>PTGS2</i>	121
热休克蛋白 90α	<i>HSP90AA1</i>	86
雄激素受体	<i>AR</i>	84
诱导型一氧化氮合酶	<i>NOS2</i>	78
过氧化物酶体增殖物激活受体	<i>PPARG</i>	75
前列腺素 G/H 合酶 1	<i>PTGS1</i>	71
糖原合成酶激酶 3β	<i>GSK3B</i>	58
丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 Chk1	<i>CHEK1</i>	51
丝裂原活化蛋白激酶 14	<i>MAPK14</i>	47
凝血酶原	<i>F2</i>	43
内皮型一氧化氮合酶	<i>NOS3</i>	23
毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3	<i>CHRM3</i>	16
孕酮受体	<i>PGR</i>	13
凋亡调节因子 Bcl-2	<i>BCL2</i>	12
溶质载体家族 6	<i>SLC6A4</i>	11

2.4 PPI 网络的构建

运用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.2 作图软件进行 PPI 网络构建,见 OSID 科学数据与内容附图 3,该网络由 92 个节点和 453 条边组成,圆形节点的直径代表着度值,直径越大度值越大。边的粗细代表 PPI 关系的强弱程度,边由粗到细,作用关系由强到弱,颜色由蓝色向橙色过渡。其中度值≥20 的节点有 10 个,节点颜色用黄色表示;度值介于 10~20 之间有 27 个节点,节点颜色用红色表示;剩余 55 个节点度值 <10,节点颜色用紫色表示。度值较大的 10 个节点蛋白分别为 STAT3、TP53、Akt1、TNF、JUN、MAPK3、MAPK1、IL-6、MAPK14、MAPK8。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

将 101 个潜在靶基因利用 DAVID 数据库分别进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析,在 $P<0.01$ 条件下,共得到 349 条 GO 富集类目和 90 条信号通路,其中 BP 285 条类目、CC 25 条类目、MF 39 条类目。按照 P 值的大小和靶点数进行排序,筛选出排名前 10 的 GO 条目用于条形图的构建(OSID 科学数据与内容附图 4),筛选出排名前 20 的 KEGG 条目用于气泡图的绘制(OSID 科学数据与内容附图 5)。

结果显示黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的潜在作用靶点可以参与药物反应、脂多糖反应、酒精反应、雌二醇反应和有机环化合物的细胞反应,参与凋亡过程的负调控、缺乏配体的外源凋亡信号通路,参与基因表达的正调控、RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控等生物过程;主要定位在细胞外隙、胞质、胞外区、线粒体、蛋白质复合体、膜筏、线粒体外膜、核原生质、膜小凹、细胞外基质等;同时还可参与酶结合、同源蛋白结合、蛋白结合、转录因子结合、蛋白激酶结合、蛋白磷酸酶结合、支架蛋白结合、细胞因子活性、异源蛋白二聚体活性、同源蛋白二聚体活性等分子功能。黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎富集主要涉及 6 条癌症相关通路,7 条感染相关通路,以及其他富集度较高的 P53 信号通路、TNF 信号通路、Nod 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路等。

2.6 构建 BP-CC-MF-KEGG-潜在靶点网络

将上述得到的潜在靶点、GO 功能分析中 BP、CC、MF 排名前 10 的数据、KEGG 通路富集分析中排名前 20 的数据导入 Cytoscape 3.8.2 中,完成 BP-CC-MF-KEGG-潜在靶点网络图的绘制,见 OSID 科学数据与内容附图 6,图中红色节点代表潜在靶点、蓝色节点代表 KEGG 分析、黄色节点代表 BP 分析、绿色节点代表 CC

分析、紫色节点代表 MF 分析,可以看到黄连温胆汤作用的靶点主要分布在细胞外间隙和胞质等多细胞组分中,通过酶或蛋白等多种结合方式参与药物、脂多糖、外源刺激等反应以及凋亡过程的负调控、缺乏配体的外源凋亡信号通路等生物过程,并通过调控 P53 信号通路、TNF 信号通路等多条信号通路实现对幽门螺杆菌相关性胃炎的治疗。

2.7 分子对接

从 PPI 网络图和药物-活性成分-靶点网络图中,分别选择度值排名前 3 的靶点蛋白 STAT3、TP53、Akt1 与药物活性成分槲皮素、川皮苷、柚皮素进行结合能力预测,结合能为负值说明受体与配体具有亲和力。分子对接结果见表 4,活性成分槲皮素、川皮苷、柚皮素与靶点蛋白 STAT3、TP53、Akt1 形成的对接模型的结合能均小于-5 kJ/mol,说明亲和力较好。另外,应用 Discovery Studio 2019 软件对活性成分槲皮素、川皮苷、柚皮素及靶点蛋白 STAT3、TP53、Akt1 进行对接,计算 LibDockScore 见表 4,其中靶点蛋白 STAT3、TP53 与活性成分柚皮素,以及靶点蛋白 Akt1 与活性成分槲皮素、柚皮素形成的对接模型 LibDockScore 均大于 100,其余对接体形成的对接模型 LibDockScore<100。综合分析发现,靶点蛋白 Akt1 与柚皮素结合能力最强,能形成最稳定的对接模型。由于不同靶点蛋白与不同活性分子在不同氨基酸位点形成不同的氢键及疏水键联系,因此彼此形成不一样的对接体。最后,把 Vina 输出的化合物结果导入 Pymol 中,利用 Discovery Studio 2019 软件,与蛋白配体进行 3 维及 2 维分子对接展示,见图 1 和 OSID 科学数据与内容附图 7。

表 4 关键靶点与成分对接结果

Table 4 The docking results of key targets and components

编号	化合物名称	结合自由能/(kJ·mol ⁻¹)			DS (LibDock Score)		
		STAT3	TP53	Akt1	STAT3	TP53	Akt1
MOL000098	槲皮素	-6	-6.4	-9.2	99.71	93.06	110.1
MOL005828	川皮苷	-5.4	-5.8	-6.3	57.39	74.86	84.86
MOL004328	柚皮素	-6.1	-6.6	-8.9	102.8	105.5	111.9

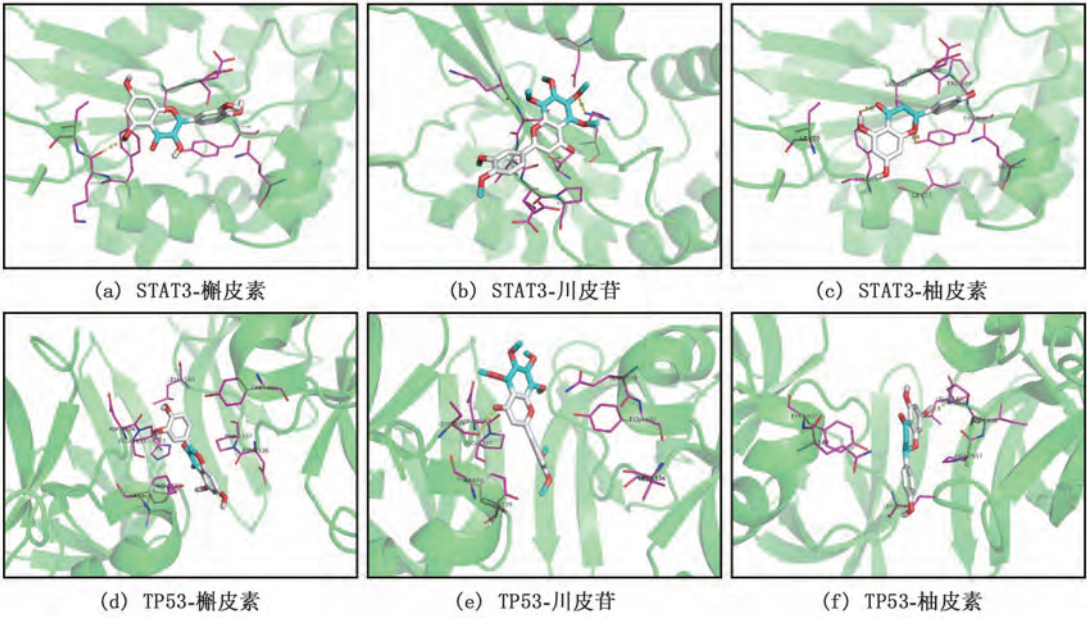


图 1 关键靶点与成分的分子对接 3D 模型

Fig.1 The molecular docking 3D model of key targets and components

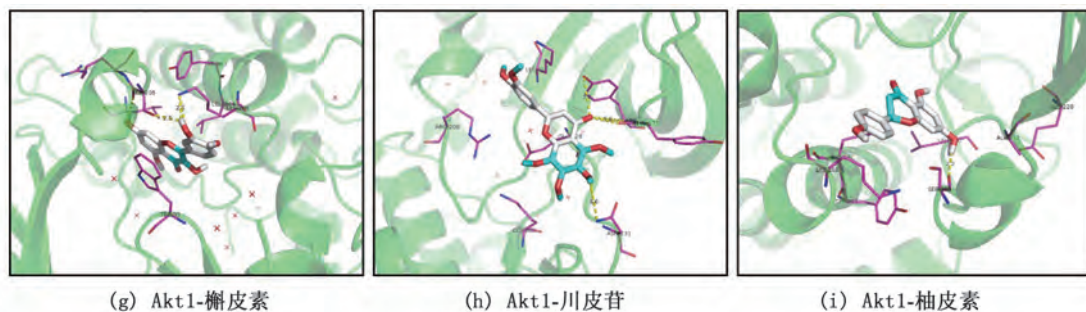


图1(续)

3 讨论

本文运用网络药理学分析黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的机制,通过构建药物-活性成分-潜在靶点网络模型,筛选出127种活性成分。其中度值大于15的8种药物活性成分,已有部分活性成分经实验证明具有抑制幽门螺杆菌增殖、治疗幽门螺杆菌相关性疾病的作用^[20]。在这8种活性成分中以槲皮素作用的靶点数最多,槲皮素是黄酮醇类黄酮亚类的主要代表,在抗氧化、抗炎、抗纤维化、抑制幽门螺杆菌增殖等方面发挥重要作用,经研究发现槲皮素能够通过抑制p38 MAPK和BAX表达,调控胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡之间的平衡,对幽门螺杆菌诱导的胃炎起到保护作用^[21-22]。黄芩素是黄芩最主要活性成分,能够抑制幽门螺杆菌在胃黏膜中的定植,减少对胃黏膜的损伤,同时可以降低核转录因子(NF- κ B)的表达水平,抑制炎症因子的产生,增强对胃黏膜的保护作用^[23]。上述两种活性成分已被证实能够通过抑制幽门螺杆菌增殖发挥对胃黏膜的保护作用,而其余几种作用靶点较多的活性成分对幽门螺杆菌的抑制作用还有待进一步研究。

利用TCMSP数据库查询137种药物活性成分对应的靶点蛋白,获得黄连温胆汤相关靶点260个,同时运用GeneCards数据库和DisGENET数据库获取800个幽门螺杆菌相关性胃炎相关靶点,将得到的药物相关靶点与疾病相关靶点取交集,最终得到101个交集靶点作为黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的关键靶点。利用STRING数据库和Cytoscape 3.8.2绘图软件对101个交集靶点进行PPI网络的构建,其中Akt1、P53、TNF- α 、IL-6、STAT3等蛋白与其他靶点联系密切,是调控整个网络的枢纽,在黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎过程中起到关键作用。

Akt又称蛋白激酶B,参与多条信号通路,其中PI3K/Akt信号通路对于维持细胞的完整性,细胞生长、生存、死亡和代谢至关重要,该通路的激活参与多种癌症的发生^[24-25]。经研究发现,幽门螺杆菌感染会增加活性氧水平,导致PI3K/Akt通路持续激活,进而促进p-Akt(Ser473)和下游蛋白p-GSK-3 β (Ser9)的激活,有助于细胞增殖和胃癌发生^[26]。通过分析,黄连温胆汤可能通过Akt1参与的信号通路发挥治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用以及降低下一步转化为胃癌的风险。

P53基因是一种重要的抑癌基因,具有修复受损DNA,并维持受损DNA基因组稳定性的功能,被称为“基因的守护者”。幽门螺杆菌感染可通过调节各种细胞应激反应,包括活性氧和活性氮的产生以及抑癌基因的异常激活,来调控宿主P53信号通路^[27]。慢性幽门螺杆菌感染可通过诱导P53突变、蛋白酶体降解、转录后修饰,来降低P53的表达水平,导致细胞过度增殖和凋亡受损,从而增加胃癌发生的风险^[28]。黄连温胆汤可影响P53的表达,进而抑制幽门螺杆菌相关性胃炎转化为胃癌的风险。

抗凋亡蛋白BCL-2和促凋亡蛋白BAX属于BCL-2基因家族成员,共同参与线粒体凋亡通路。BAX位于P53信号通路的下游,可以与BCL-2构成异源二聚体形式,同P53一起参与细胞凋亡过程^[22]。幽门螺杆菌感染可上调BAX基因,引起BCL-2与BAX蛋白表达比例降低,诱导慢性胃炎患者胃黏膜上皮细胞发生凋亡^[29]。研究证实,黄连温胆汤可以通过下调BAX,提高BCL-2蛋白表达,抑制胃黏膜细胞凋亡,对慢性胃炎的胃黏膜损伤具有一定修复作用^[30],这与本文分析一致。

幽门螺杆菌分泌的 Tipa 毒素与细胞表面受体结合后,通过激活 NF- κ B 信号通路诱导炎症因子 TNF- α 的分泌,加速胃炎的进展,并诱导细胞内信号的转变^[31]。同时 TNF- α 的异常表达与幽门螺杆菌诱导胃黏膜病变的严重程度有关,是促进浅表性胃炎向胃癌方向转变的关键因素^[32]。Chen 等^[33]发现 Tipa 可以通过激活 IL-6/STAT3 通路促进上皮细胞间充质转化,从而加速胃癌细胞的侵袭。信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 作为转录因子,能够在感染、生长因子等各种条件刺激下,介导下游信号的传递,参与炎症及相关肿瘤的发展^[34]。Piao 等^[35]研究发现,幽门螺杆菌的感染能够诱导活性氧产生,并通过刺激 IL-6 炎症因子的上调,促进 STAT3 磷酸化激活,介导下游信号转录,加速胃炎和胃癌的发生发展。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 是多种细胞信号通路的关键调控因子^[36],在众多信号通路中,MAPK 通路在细胞增殖、分化、凋亡、血管生成和肿瘤转移中发挥重要的作用^[37]。细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 MAPK 和 ERK5 信号转导途径是 4 种 MAPK 级联通路^[30]。其中 JNK/p38 MAPK 通路主要与细胞的应激和凋亡有关,而 ERK/MAPK 信号通路主要与细胞增殖和分化密切相关^[38]。幽门螺杆菌感染胃黏膜细胞后,可以触发 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 多条 MAPK 信号通路的激活,诱导 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-17 等炎症因子的分泌,造成严重的胃黏膜炎症性损伤^[39-40]。有研究发现,黄连温胆汤可通过降低炎症因子 TNF- α 和 IL-8 的分泌,减轻幽门螺杆菌诱导的胃黏膜炎症性损伤,从而改善临床症状^[41]。黄连温胆汤调控上述信号分子,在信号通路中起作用的具体机制亟待研究。

本研究将 101 个潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析,在 $P < 0.01$ 的条件下筛选出的 90 条相关通路中,癌症通路如 P53 信号通路、TNF 信号通路等在 KEGG 中富集程度较高,除此之外还包括 Toll 样受体信号通路、Nod 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路等。Toll 样受体 I 型跨膜受体,可在病原体的诱导刺激下启动免疫应答反应,而 MyD88 是信号传导的关键节点^[42]。有研究发现,当幽门螺杆菌感染细胞后,其自身的配体可与胃上皮细胞上 TLR2、TLR4 结合启动一系列级联反应,进而刺激 MyD88 和 NF- κ B 下游信号通路的激活,造成机体免疫功能紊乱,加深胃炎和胃溃疡的严重程度^[43-44]。而 NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLR) 不仅能够识别病原相关分子,还能识别损伤相关分子,NLR 受体与配体结合后被激活并参与炎症小体的形成,诱导 Caspase-1 前体蛋白募集,并自剪切成 Caspase-1 活体形式,促进炎症细胞因子的产生,从而导致炎症反应的发生^[45-46]。所以黄连温胆汤可能通过作用于以上通路发挥对幽门螺杆菌诱发的相关性胃病的治疗作用。

本文采用网络药理学和分子对接技术探究黄连温胆汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用靶点和分子机制,通过构建药物-疾病靶点网络,分析其药理作用,证实黄连温胆汤通过槲皮素、川皮苷、柚皮素等药物活性成分,经过抗炎、抗氧化、免疫调节等多种途径作用于 STAT3、TP53、Akt1 等关键靶点蛋白,发挥治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用。本研究仅是理论上的预测,能够为后续的实验验证提供理论基础,并为临床药物的推广提供科学依据。

参考文献:

- [1] PELLICANO R, RIBALDONE D G, FAGOONEE S, et al. A 2016 panorama of *Helicobacter pylori* infection: Key messages for clinicians[J]. Panminerva Medica, 2016, 58(4): 304-317.
- [2] ROSZCZENKO-JASINSKA P, WOJTYŚ M I, JAGUSZTYN-KRYNICKA E K. *Helicobacter pylori* treatment in the post-antibiotics era-searching for new drug targets[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(23): 9891-9905. DOI:10.1007/s00253-020-10945-w.
- [3] SUGANO K, HIROI S, YAMAOKA Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Asia: Remembrance of things past? [J]. Gastroenterology, 2018, 154(1): 257-258. DOI:10.1053/j.gastro.2017.08.074.
- [4] XU X L, LI W D, QIN L, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and obesity in Chinese adults: A systematic review with meta-analysis[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0221076. DOI:10.1371/journal.pone.0221076.

- [5] CHEN Q, LU H. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis and its impact on Chinese clinical practice[J]. Journal of Digestive Diseases, 2016, 17(6): 353-356. DOI:10.1111/1751-2980.12358.
- [6] MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAINC A, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the maastricht V/Florence consensus report[J]. Gut, 2017, 66(1): 6-30. DOI:10.1136/gutjnl-2016-312288.
- [7] 刘文忠. “第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告”解读[J]. 胃肠病学, 2017, 22(6): 321-324.
- [8] WHO. Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed[J]. Neurosciences, 2017, 22(2): 159-160.
- [9] 郑莉. 中医药治疗幽门螺杆菌相关性胃炎研究现状[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(4): 167-168. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2020.04.098.
- [10] 范志欣, 杨晓军, 黄敏玲, 等. 基于网络药理学探讨黄连温胆汤“心胃同治”作用机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(25): 2788-2792 DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.2020.25.012.
- [11] 张磊. 黄连温胆汤治疗脾胃湿热型幽门螺杆菌阳性浅表性胃炎的疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(10): 8-10. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2020.10.004.
- [12] RU JL, LI P, WANG J N, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13. DOI:10.1186/1758-2946-6-13.
- [13] 张彧, 吴东升, 徐寅, 等. 基于网络药理学分析半夏-黄芩-黄连治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 592-599. DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.4.007.
- [14] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 48(D1): D845-D855. DOI:10.1093/nar/gkz1021.
- [15] KIM S Y, SPEED T P. Comparing somatic mutation-callers: Beyond Venn diagrams[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 189. DOI:10.1186/1471-2105-14-189.
- [16] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-2504. DOI:10.1101/gr.1239303.
- [17] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 49(D1): D605-D612. DOI:10.1093/nar/gkaa1074.
- [18] 韩利文, 陈善军, 董榕, 等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展[J]. 山东科学, 2021, 34(6): 22-31.
- [19] KIM S. Exploring chemical information in PubChem[J]. Current Protocols, 2021, 1(8): e217. DOI:10.1002/cpz1.217.
- [20] 黄浩然, 陈蔚文, 徐晖. 中药及其有效成分抑制幽门螺杆菌的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(6): 508-511. DOI:10.19378/j.issn.1003-9783.2008.06.034.
- [21] SATO S, MUKAI Y. Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity [J]. Journal of Inflammation Research, 2020, 13: 421-431. DOI:10.2147/JIR.S228361.
- [22] ZHANG S, HUANG J, XIE X Q, et al. Quercetin from *Polygonum capitatum* protects against gastric inflammation and apoptosis associated with *Helicobacter pylori* infection by affecting the levels of p38MAPK, BCL-2 and BAX [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(5): 744. DOI:10.3390/molecules22050744.
- [23] 杨小红, 陆锦, 骆询, 等. 黄芩、黄连和大黄对幽门螺杆菌抑菌作用的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(14): 2014-2016.
- [24] HADDADI N, LIN Y G, TRAVIS G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy[J]. Molecular Cancer, 2018, 17(1): 37. DOI:10.1186/s12943-018-0803-3.
- [25] COSTA R L B, HAN H S, GRADISHAR W J. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: A review[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2018, 169(3): 397-406. DOI:10.1007/s10549-018-4697-y.
- [26] XIE C, YI J, LU J, et al. N-acetylcysteine reduces ROS-mediated oxidative DNA damage and PI3K/Akt pathway activation induced by *Helicobacter pylori* infection[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 1874985. DOI:10.1155/2018/1874985.
- [27] TOLLERI M, NEELSEN K J, STEGER M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand

- breaks and a DNA damage response in its host cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(36): 14944-14949. DOI:10.1073/pnas.1100959108.
- [28]TAO Z H, FANG J Y. The complicated dialogue between *Helicobacter pylori* and p53[J]. Gut, 2020, 69(11): 2052-2053. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-320630.
- [29]BARTCHEWSKY W, MARTINIM R, SQUASSONI A C, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the expressions of bax and bcl-2 in patients with chronic gastritis and gastric cancer[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2009, 55(1): 111-116. DOI:10.1007/s10620-008-0699-7.
- [30]赵瑞珍. 黄连温胆汤对大鼠慢性胃炎的病理及 bcl-2、bax 蛋白表达影响的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [31]李杰, 熊礼杭, 严洁. 幽门螺杆菌 Tip α 蛋白经激活 NF- κ B 对巨噬细胞分泌细胞因子诱导机制分析[J]. 智慧健康, 2020, 6(9): 7-8. DOI:10.19335/j.cnki.2096-1219.2020.9.004.
- [32]郑轶, 刘颜敏, 陈志涛, 等. 幽门螺杆菌感染的胃癌和癌前病变组织中肿瘤坏死因子- α 的表达及临床意义[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(10): 718-720. DOI:10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.013.
- [33]CHEN G D, TANG N, WANG C, et al. TNF- α -inducing protein of *Helicobacter pylori* induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer cells through activation of IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 484(2): 311-317. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.110.
- [34]杨鑫. 肥胖对幽门螺杆菌感染后胃黏膜炎症与 STAT3 表达的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [35]PIAO J Y, LEE H G, KIM S J, et al. *Helicobacter pylori* activates IL-6-STAT3 signaling in human gastric cancer cells: Potential roles for reactive oxygen species[J]. Helicobacter, 2016, 21(5): 405-416. DOI:10.1111/hel.12298.
- [36]KACAR F, METEOĞLU I, YASA H D, et al. *Helicobacter pylori*-induced changes in the gastric mucosa are associated with mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation[J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM, 2007, 15(2): 224-228. DOI:10.1097/01.pai.0000209863.35828.dd.
- [37]GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 19(3): 1997-2007. DOI:10.3892/etm.2020.8454.
- [38]KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. Physiological Reviews, 2001, 81(2): 807-869. DOI:10.1152/physrev.2001.81.2.807.
- [39]SLOMIANY B L, SLOMIANY A. *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal TGF- α ectodomain shedding and EGFR transactivation involves Rac1/p38 MAPK-dependent TACE activation[J]. Inflammopharmacology, 2016, 24(1): 23-31. DOI: 10.1007/s10787-015-0254-z.
- [40]MA X Q, YOU P T, XU Y, et al. Anti-*Helicobacter pylori*-associated gastritis effect of the ethyl acetate extract of *Alpinia officinarum* Hance through MAPK signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 260: 113100. DOI:10.1016/j.jep.2020.113100.
- [41]陶飞宝, 何钦, 叶旭星, 等. 黄连温胆汤加味治疗 Hp 相关性胃炎的疗效及对细胞因子的影响[J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(8): 1-3. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2019.08.001.
- [42]杜江, 欧希龙, 俞文秀. TLR4 及 MYD88 多态性与江苏地区幽门螺杆菌感染的相关性研究[J]. 现代消化及介入诊疗, 2018, 23(4): 433-437. DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2018.04.001.
- [43]秦凯凯. Toll 样受体 2、4、5 在幽门螺杆菌相关胃炎及胃溃疡中的表达及意义[D]. 大连: 大连医科大学, 2016.
- [44]MELİT L E, MĂRGINEAN C O, MĂRGINEAN C D, et al. The relationship between toll-like receptors and *Helicobacter pylori*-related gastropathies: Still a controversial topic[J]. Journal of Immunology Research, 2019, 2019: 8197048. DOI:10.1155/2019/8197048.
- [45]辛洪杰, 白杨. NOD 样受体在幽门螺杆菌感染和胃癌中的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(2): 256-261.
- [46]CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, KAAKOUSH N O, GOH K L, et al. The NOD-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer: A case-control study and gene expression analyses[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117870. DOI:10.1371/journal.pone.0117870.