

基于网络药理学与代谢组学探讨枳实-厚朴药 对治疗慢传输型便秘的作用机制

董朋峻, 蔡彬*

(无锡市中医医院 肛肠科, 江苏 无锡 214000)

摘要:利用网络药理学与代谢组学探讨枳实-厚朴药对治疗慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)的潜在作用机制。使用中药系统药理数据库与分析平台筛选枳实与厚朴的化学成分及作用靶点,通过 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库搜集 STC 的疾病预测靶点,运用维恩图获得成分与疾病的交集靶点,采用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,运用 Cytoscape 3.8.0 软件计算并筛选关键靶点,同时绘制中药-成分-靶点网络图,利用 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO(gene ontology)功能富集分析和 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析。采用洛哌丁胺诱导法构建 STC 小鼠模型,给予枳实+厚朴灌胃给药后,对小鼠盲肠内容物进行基于气相色谱联合飞行时间质谱(GC/TOF-MS)的非靶向代谢组学检测,分析差异性代谢物。结果获得枳实-厚朴药对活性成分共 24 种,与 STC 疾病相关的交集靶点共 106 个,其中度值排名靠前的关键靶点包括 AKT1、TNF、TP53、IL6、CASP3、JUN。GO 分析发现可能涉及的生物学过程包括细胞对氮化合物的反应、细胞对脂质的反应、蛋白磷酸化的正调控、炎症反应的调节、离子传输的调节等。KEGG 分析可能涉及的通路包括癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、钙信号通路、5-羟色胺能突触信号通路等。非靶向代谢组学检测共发现 21 种差异性代谢物,包括 Akt 相关性代谢物烟酸、果糖、原儿茶酸。本研究揭示枳实-厚朴药对通过多成分、多靶点、多通路对 STC 发挥治疗作用,其活性成分柚皮素和木犀草素,关键靶点 Akt 及相关性代谢物值得特别关注,这为后续基础研究提供了思路与理论依据。

关键词:枳实;厚朴;慢传输型便秘;网络药理学;代谢组学

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1002-4026(2023)03-0018-09

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Action mechanism of the herb pair *Aurantii Fructus Immaturus*-*Magnoliae*
Officinalis Cortex in the treatment of slow transit constipation based
on network pharmacology and metabolomics

DONG Pengjun, CAI Bin*

(Department of Anorectal Surgery, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214000, China)

收稿日期:2022-10-09

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(82205110);江苏省“六大人才高峰”项目(WSN-190);无锡市“双百”中青年医疗卫生拔尖人才项目(BJ2020070);无锡市科技发展医疗卫生指导性计划(SKJJZD20)

作者简介:董朋峻(1996—),男,硕士研究生,研究方向为中西医结合临床。E-mail:aa496091689@163.com

*通信作者,蔡彬(1988—),男,博士,副主任医师,研究方向为肛肠疾病的中医临床与基础研究。E-mail:cb1988cn@126.com

Abstract : The potential action mechanism of aurantii fructus immaturus and magnoliae officinalis cortex in the treatment of slow transit constipation (STC) was investigated via network pharmacology and metabolomics. The chemical ingredients and targets of aurantii fructus immaturus and magnoliae officinalis cortex were obtained using the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform. The disease prediction targets of STC were collected through the GeneCards, OMIM, and DisGeNET databases. The intersection targets of ingredients and diseases were obtained using Venn diagrams. The STRING database was used to construct the protein-protein interaction network. The Cytoscape 3.8.0 software was used to calculate and screen the key targets, and then the network diagram of TCM-ingredient targets was plotted. The gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the intersection targets were performed using the Metascape database. A loperamide-induced STC mouse model was used in the study. After intragastric administration of aurantii fructus immaturus and magnoliae officinalis cortex, GC/TOF-MS-based untargeted metabolomics of cecal contents was performed to analyze differential metabolites. A total of 24 active ingredients and 106 intersection targets were obtained. The key targets with higher degree values included AKT1, TNF, TP53, IL6, CASP3, and JUN. GO analysis revealed that the possible processes were cellular response to nitrogen compound, cellular response to lipid, positive regulation of protein phosphorylation, regulation of inflammatory response, regulation of ion transport, etc. KEGG analysis revealed the pathways involved in cancer, the PI3K-Akt signaling pathway, the calcium signaling pathway, serotonergic synapse, etc. In addition, 21 differential metabolites were found via untargeted metabolomics, including the Akt-associated metabolites nicotinic acid, fructose, and protocatechuic acid. The results suggested that aurantii fructus immaturus and magnoliae officinalis cortex exerted therapeutic effects on STC via multi-ingredient, multi-target and multi-pathway mechanisms, thereby providing ideas and a theoretical basis for future basic research. The active ingredients naringenin and lignan, as well as the key target Akt and its related metabolites, deserves special attention.

Key words : Aurantii Fructus Immaturus; Magnoliae Officinalis Cortex; slow transit constipation; network pharmacology; metabolomics

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是由于结肠运输能力减弱,以肠道内容物传输缓慢为特征的一类顽固性便秘,约占功能性便秘的 45.5%^[1]。STC 的临床表现为长期便次减少,便意缺失,排便时间延长,粪便干结,呈羊粪状或球状,部分患者伴有腹胀、左下腹隐痛等不适症状。中医学上将便秘归为“便秘”“脾约”“后不利”等范畴。《金匱翼·便秘》指出“气内滞,而物不行也”,大肠传导失司,气机郁滞,通降失职,糟粕内停为本病基本病机,即如《丹溪心法》所云“当升者不得升,当降者不得降,当变化者不得变化也,传化失常”^[2]。

对于 STC 病机的认识,目前普遍认为应当属于中医学“虚秘”范畴,为本虚标实之证。究其本源,多为中焦脾胃虚弱,纳运失职,气机升降失常,气虚则大肠传导无力,不能推动肠内糟粕运行^[3]。归纳总结上海中医药大学附属龙华医院曹永清教授 561 首治疗便秘中药内服处方,共涉及中药 113 味,按选用频次高低排序,排名前 5 的中药依次为枳实、厚朴、党参、茯苓、川楝子^[4];河北省中医院李佃贵教授治疗便秘 90 首处方中,最为常用的前 5 位中药分别是枳实、大黄、厚朴、当归、川芎^[5];广东省中医院黄穗平教授治疗便秘 176 首处方中,使用频率最高的 5 味中药依次为枳实、炙甘草、黄芪、厚朴、火麻仁^[6]。分析当代医家治疗便秘的组方特点及用药规律,我们可以发现“枳实”与“厚朴”两味中药在临床治疗便秘组方配伍中的选用频率排名前列。

枳实与厚朴皆属苦泄辛散性温,“辛”能行,能散,引气上行,“苦”能降,能泻,苦泻下行,苦辛通降,调理脾胃气机,具有较强的行气消积作用,同为消除胀满的要药。枳实-厚朴药对出自张仲景《伤寒论》,此两药之配伍自古至今被认为具有协同增效的作用。因此,本研究以枳实-厚朴药对作为研究对象,运用网络药理学方法筛选枳实与厚朴的有效成分及作用靶点,并进行生物信息学分析,同时结合非靶向代谢组学研究,探索其治疗 STC 的潜在作用机制,为下一步研究提供数据基础与理论依据。

1 资料与方法

1.1 枳实、厚朴活性成分及作用靶点的筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TC MSP) (<https://tcmsp-e.com/tcm sp.php>) 中分别检索枳实、厚朴的化学成分,选择口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为参考标准筛选出活性成分,而后获得活性成分的靶点信息。此时得到的靶点信息为蛋白名称,利用 Unitprot 数据库 (<http://uniprot.org/>) 进行检索转化为基因名称。

1.2 STC 疾病相关靶点筛选

以“slow transit constipation”为关键词在 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中检索 STC 疾病相关靶点,将上述 3 个数据库中获得的靶点信息删除重复项后,得到本次研究的疾病预测靶点库。

1.3 药物-疾病交集靶点获取

利用 Venny 2.1 在线工具 (<https://bioinfo gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将枳实、厚朴活性成分的作用靶点同 STC 疾病预测靶点库进行交集,从而得到枳实-厚朴药对在 STC 治疗中的潜在作用靶点。

1.4 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图

将 1.3 节得到的交集靶点数据导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),选择 Mutiple proteins 分析,选择 Organisms 为 Homo Sapiens,设置 minimumrequired interaction score 为 medium confidence (0.400),得到蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 信息,以 STV 格式导入 Cytoscape 3.8.0 软件绘制 PPI 网络图。

1.5 拓扑分析及关键靶点筛选

利用 Cytoscape 软件中的 Centiscape 2.2 插件计算每个靶点的连接度 (degree),按照度值由高到低进行排列,排位越靠前代表此成分靶点越关键。同时利用 Cytoscape 软件绘制中药-成分-靶点网络图。

1.6 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 对 1.3 节得到的交集靶点数据进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组大百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析,预测枳实-厚朴药对治疗 STC 的潜在机制。

1.7 实验动物及分组

6~8 周龄,18~22 g,清洁级,雄性,C57BL/6 小鼠,共 18 只,购于常州卡文斯实验动物有限公司 (SCXK (苏)2021-0010),饲养于无锡市人民医院实验动物中心屏障级环境设施中。饲养温度为 24~26 ℃,湿度为 50%~70%,12 h/12 h 固定明暗周期。本项目通过无锡市中医医院动物伦理审查 (伦理审批号 SSB2022011001)。所有小鼠适养一周后随机分为 3 组,即正常组 (NC 组)、便秘模型组 (STC 组) 和枳实+厚朴治疗组 (ZS+HP 组),每组各 6 只。STC 组和 ZS+HP 组小鼠利用洛哌丁胺灌胃法构建便秘模型,方法为按 10 mg/kg 体重剂量给予洛哌丁胺 (西安杨森制药,批号:LGJ0448) 灌胃,1 次/d;NC 组小鼠给予 0.2 mL 生理盐水灌胃,1 次/d。ZS+HP 组小鼠按 12.0 g/kg 剂量给予枳实+厚朴水提液 ($V(\text{枳实}):V(\text{厚朴})=1:1$) 灌胃,1 次/d。NC 组和 STC 组小鼠则给予相同剂量的生理盐水灌胃。

1.8 样本采集及处理

造模后第 8 d,所有小鼠禁食 12 h 后颈椎脱臼处死,取小鼠盲肠内容物,速冻后置于-80 ℃冰箱保存。称取 5 mg 冻干粪便样品放置在离心管中,然后与 10 μL 内标混合,每份样品再加入 50 μL 预冷后的 50% 甲醇,14 000 g,4 ℃ 离心 20 min (Microfuge 20R, Beckman, USA),将上清转移到自动取样瓶 (Agilent

Technologies, USA)。将 175 μ L 预冷后的甲醇/氯仿(体积比为 3:1)加入残渣中进行二次萃取。14 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取 100 μ L 上清转移到自动取样瓶,剩余上清液汇集在一起,制成质量控制样品。使用真空浓缩器(Labconco, USA)对自动取样瓶中的所有样品进行短暂蒸发以去除氯仿,并使用冷冻干燥机(Labconco, USA)进一步冻干。干燥的样品加入 50 μ L 甲氧基胺盐酸盐吡啶溶液(20 mg/mL)在 30 $^{\circ}$ C 衍生 2 h,然后用样品制备头在 37.5 $^{\circ}$ C 下加入 50 μ L MSTFA (1% TMCS)再衍生 1 h。

1.9 基于 GC-TOF/MS 的非靶向代谢组学分析

小鼠盲肠内容物的非靶向代谢组学分析通过气相色谱联合飞行时间质谱(GC/TOF-MS)系统(Pegasus HT, Leco, USA)进行检测,测序分析委托麦特绘谱生物科技(上海)有限公司实施。通过 Rxi-5ms 毛细管气相色谱柱(30 m $\times$ 250 μ m,0.25 μ m, Restek, USA)进行分离。载气为氦气($\geq$ 99.999%),恒定流速 1.0 mL/min。注入和转移温度为 270 $^{\circ}$ C。质谱参数如下:EI 离子源模式,70 eV 电离能量,离子源温度 220 $^{\circ}$ C,采集速率 25 spectra/s,扫描范围:50~500 Da。使用 ChromaTOF v4.71(Leco, USA)软件处理和识别获得的原始数据。化合物的鉴定参考麦特绘谱(上海)构建的 JiaLib 代谢物数据库。运用主成分分析法和正交偏最小二乘判别分析法对各组代谢物谱进行分析。代谢物 VIP(variable importance in projection) $>$ 1 和 $P<$ 0.05(Student's t-test)被认为存在显著差异。

2 结果

2.1 枳实、厚朴的活性成分及作用靶点

通过 TCMSp 数据库检索得到枳实活性成分 22 种,作用靶点 124 个;厚朴活性成分 2 种,作用靶点 28 个。删除重复项后得到枳实-厚朴药对的活性成分共 24 种(OSID 科学数据与内容附表 1),主要活性成分见表 1。作用靶点共 134 个,见 OSID 科学数据与内容附表 2。

表 1 枳实、厚朴主要活性成分基本信息

Table 1 The main active ingredients in Aurantii Fructus Immaturus and Magnoliae Officinalis Cortex

药物	编码	英文名称	中文名称	OB/%	DL
枳实	MOL013433	prangenin hydrate	桉翅芹内酯水合物	72.63	0.29
	MOL001798	neohesperidin_qt	新橙皮苷_qt	71.17	0.27
	MOL013435	poncimarín	枸橼苦素	63.62	0.35
	MOL013436	isoponcimarín	异枸橼苦素	63.28	0.31
	MOL005828	nobiletin	川陈皮素	61.67	0.52
	MOL004328	naringenin	柚皮素	59.29	0.21
	MOL013277	isosinensetin	异橙黄酮	51.15	0.44
	MOL001803	sinensetin	甜橙黄酮	50.56	0.45
厚朴	MOL005970	eucalyptol	桉油精	60.62	0.32
	MOL005980	neohesperidin	新橙皮苷	57.44	0.27

2.2 STC 疾病相关靶点

以“slow transit constipation”作为关键词在 OMIM 数据库和 GeneCards 数据库中分别检索到 STC 疾病相关靶点 604 个和 3 801 个,由于在 DisGeNET 数据库中无法以“slow transit constipation”作为关键词进行检索,遂改用“constipation”作为关键词,在 DisGeNET 数据库中检索到疾病相关靶点 424 个。综合 3 个数据库结果,删除重复项后,最终得到 STC 疾病相关靶点合计 4 380 个。

2.3 药物-疾病交集靶点及 PPI 网络构建

通过 Venny 2.1 在线工具得到枳实-厚朴药对与 STC 的药物-疾病交集靶点共 106 个,见 OSID 科学数据与内容附图 1。将获得的 106 个交集靶点数据导入 STRING 数据库,得到蛋白质间的相互作用信息,借助

Cytoscape 3.8.0 软件重新布局交集靶点 PPI 网络,见 OSID 科学数据与内容附图 2,度值越大则节点图标越大,颜色越深,相互作用越强则节点连线越粗。

2.4 关键靶点分析

在 Cytoscape 3.8.0 软件中对交集靶点度值进行分析,度值排名前 10 的关键靶点包括 AKT1、TNF、TP53、IL6、CASP3、JUN、VEGFA、MAPK3、PPARG、EGFR,见 OSID 科学数据与内容附图 3。同时绘制中药-成分-靶点网络图,见 OSID 科学数据与内容附图 4。

2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 Metascape 数据库对药物与疾病交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 分析发现枳实-厚朴药对治疗 STC 的潜在生物过程可能涉及细胞对氮化合物的反应、对肽的反应、对异种刺激的反应、细胞对脂质的反应、腺体发育、蛋白磷酸化的正调控、对营养水平的反应、炎症反应的调节、离子传输的调节、对氧气水平降低的反应等,见 OSID 科学数据与内容附图 5。KEGG 分析结果显示枳实-厚朴药对可能参与的通路为癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路、铂类药物耐药性、化学致癌-受体激活、结直肠癌、非酒精性脂肪肝、钙信号通路、5-羟色胺能突触信号通路、AMPK 信号通路,见 OSID 科学数据与内容附图 6。

2.6 非靶向代谢组学分析

PCA(principal component analysis,主成分分析)和 OPLS-DA(orthogonal partial least squares-discriminant analysis,正交偏最小二乘法判别分析)分析结果显示 NC 组和 STC 组小鼠盲肠内容物中的代谢物聚类性较好,两组间代谢水平存在明显差异(图 1(a),1(c)),STC 组和 ZS+HP 组比较同样显示两组间代谢水平存在明显差异(图 1(b),1(d))。筛选 NC 组和 STC 组两组间的差异性代谢物(图 1(e)),根据 VIP>1 的标准鉴定出 79 种差异性代谢物,根据 $P<0.05$ 的标准鉴定出 43 种差异性代谢物,同时满足上述两种筛选标准的差异性代谢物共有 43 种。相同方法筛选 STC 组和 ZS+HP 组两组间的差异性代谢物共 43 种(图 1(f))。对上述两两比较得到的组间差异性代谢物进行综合分析,最终发现相较于 NC 组,SCT 组小鼠盲肠内容物中有 16 种代谢物出现明显减少,但在给予枳实+厚朴灌胃给药后上述代谢物显著增加,包括乙醇胺、N-甲基丙氨酸、烟酸、脯氨酸、尿嘧啶、氢化肉桂酸、核糖、果糖、焦谷氨酸、赤酮酸、谷氨酸、木酮糖、甘露糖、1-单硬脂精、1-单肉豆蔻精和 3-羟基苯乙酸。此外,有 5 种代谢物在 SCT 组小鼠盲肠内容物中较 NC 组显著升高,但在枳实+厚朴给药后出现明显下降,包括腐胺、纤维二糖、N-乙酰腐胺、原儿茶酸和麦芽糖(表 2)。

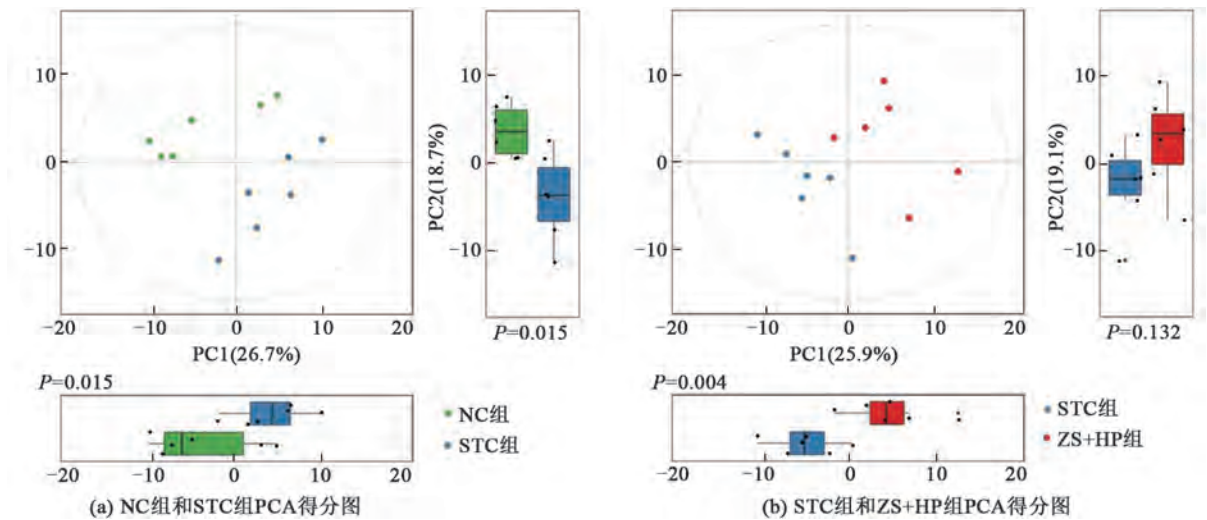


图 1 代谢物 PCA 和 OPLS-DA 分析

Fig.1 PCA and OPLS-DA analyses of metabolites

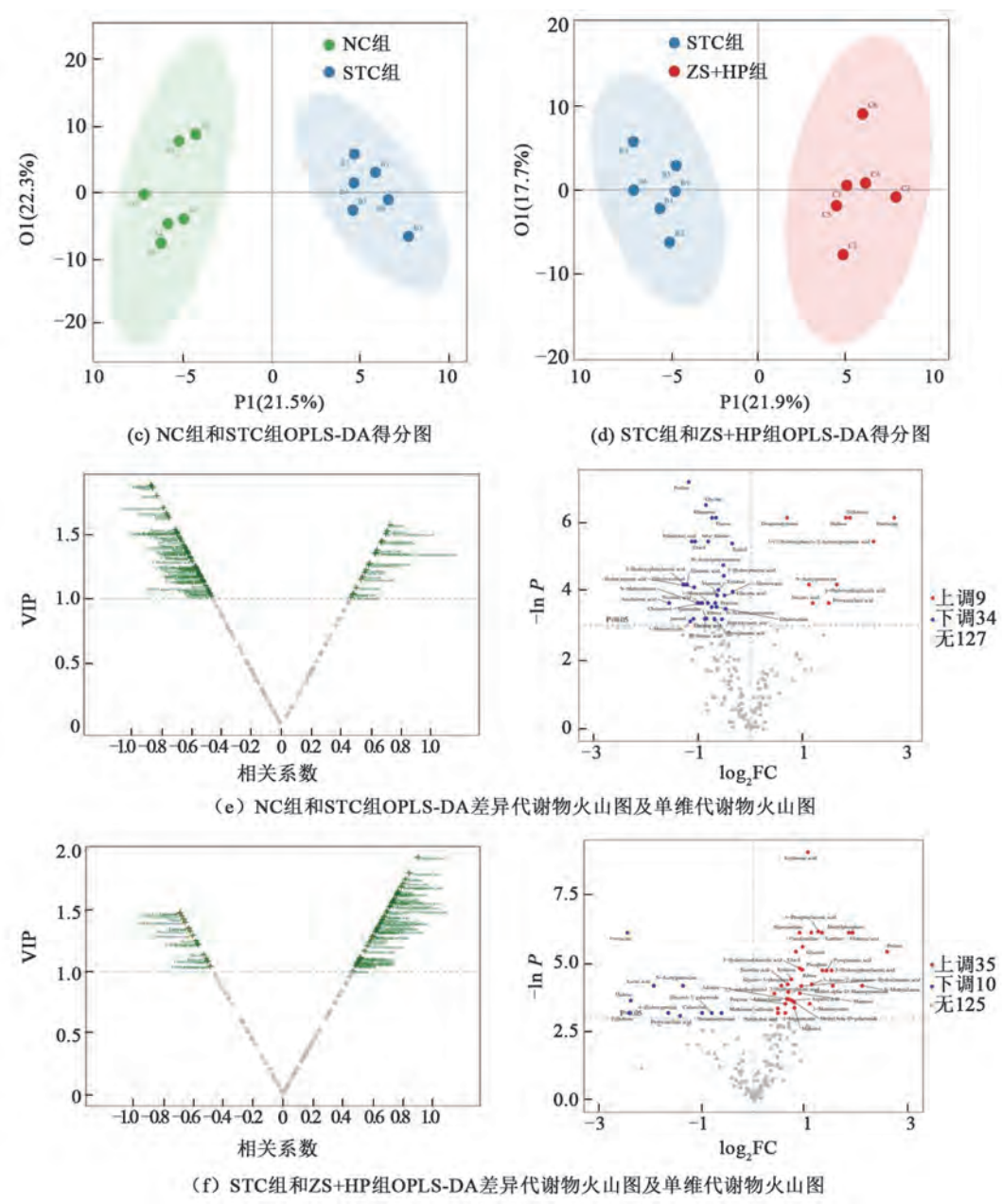


图 1(续)

表 2 差异性代谢物筛选
Table 2 Screening of differential metabolites

差异性代谢物	分类	HMDB ID	VIP 值	变化倍数	P 值	变化趋势	
						STC 组 vs. NC 组	ZS+HP 组 vs. STC 组
N-甲基丙氨酸	氨基酸	HMDB0094692	1.573 2	4.320 9	0.015 152	↓	↑
乙醇胺	胺类	HMDB0000149	1.321 9	1.567 0	0.024 673	↓	↑
烟酸	吡啶类	HMDB0001488	1.445 0	1.585 2	0.014 412	↓	↑
脯氨酸	氨基酸	HMDB0000162	1.655 7	6.058 7	0.004 329	↓	↑
尿嘧啶	核苷酸	HMDB0000300	1.642 9	1.770 9	0.004 329	↓	↑
氢化肉桂酸	苯丙酸类	HMDB0000764	1.416 3	1.899 3	0.015 333	↓	↑

表 2(续)

差异性代谢物	分类	HMDB ID	VIP 值	变化倍数	P 值	变化趋势	
						STC 组 vs. NC 组	ZS+HP 组 vs. STC 组
焦谷氨酸	氨基酸	HMDB0000267	1.804 8	2.677 3	0.008 658	↓	↑
赤酮酸	糖类	HMDB0000613	1.933 5	2.078 7	0.000 113	↓	↑
谷氨酸	氨基酸	HMDB0000148	1.720 3	3.804 4	0.002 165	↓	↑
木酮糖	糖类	HMDB0001644	1.557 8	1.661 7	0.011 984	↓	↑
核糖	糖类	HMDB0000283	1.624 5	1.932 6	0.008 412	↓	↑
腐胺	胺类	HMDB0001414	1.105 1	0.182 4	0.002 165	↑	↓
N-乙酰腐胺	胺类	HMDB0002064	1.456 0	0.386 1	0.015 152	↑	↓
原儿茶酸	苯甲酸类	HMDB0001856	1.330 2	0.371 2	0.045 747	↑	↓
果糖	糖类	HMDB0000660	1.480 4	1.538 2	0.029 288	↓	↑
甘露糖	糖类	HMDB0000169	1.449 5	1.866 1	0.019 933	↓	↑
纤维二糖	糖类	HMDB0000055	1.351 7	0.187 2	0.041 126	↑	↓
麦芽糖	糖类	HMDB0000163	1.428 1	0.190 6	0.025 974	↑	↓
1-单硬脂精	脂类	HMDB0011131	1.344 3	1.537 6	0.041 126	↓	↑
1-单肉豆蔻精	脂类	HMDB0011561	1.383 5	2.133 9	0.029 271	↓	↑
3-羟基苯乙酸	酚类	HMDB0000440	1.526 3	2.859 9	0.008 658	↓	↑

3 讨论

通过研究 PPI 网络发现,枳实-厚朴药对治疗 STC 的关键靶点有 AKT1、TNF、TP53、IL-6、CASP3、JUN 等。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K/AKT1 信号通路的重要作用节点,主要参与细胞增殖、细胞凋亡、代谢等生物学过程,研究发现 AKT1 磷酸化激活对于维持 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的功能具有重要作用^[7]。ICC 是一种广泛分布于胃肠道肌层的间质细胞,是胃肠道平滑肌慢波的发起者和传播者,被视为胃肠动力的起搏细胞^[8]。ICC 在全结肠的分布相对均匀,STC 患者各段结肠中 ICC 的数量与体积较正常人均明显减少^[9]。TNF 和 IL-6 属于炎症性细胞因子,肠道微生物介导的炎症性细胞因子分泌异常可能是导致便秘的原因之一,研究报道慢性便秘患者血清中 IL-6 和 TNF-α 的浓度均出现明显升高^[10]。TP53 和 JUN 是癌症相关基因,一项针对便秘患者罹患癌症的风险追踪随访调查发现,便秘会导致短期内患发癌症的风险升高^[11]。CASP3 是一种蛋白酶,属于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)家族,在细胞凋亡中起着不可替代的作用。研究发现 STC 相关的反应性人肠胶质细胞(reactive human enteric glial cell, rhEGC)表型会引起 CASP3 的 mRNA 转录上调,提示 CASP3 可能通过影响肠神经胶质细胞从而对胃肠动力发挥调节效应^[12]。

本研究 KEGG 分析结果显示枳实-厚朴药对治疗 STC 的潜在通路包括 PI3K-Akt 信号通路、钙信号通路、5-羟色胺能突触信号通路等。PI3K-Akt 信号通路除了涉及调控 ICC 细胞功能外,还能够通过调控下游内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达从而参与便秘疾病过程。研究发现 p-Akt 的表达降低,会导致结肠组织 eNOS 的表达升高,使得 NO 释放增加,NO 是一种抑制性神经递质,可以作用于胃肠道平滑肌,抑制其收缩,减少胃肠道蠕动^[13-14]。本研究中药-成分-靶点网络分析显示,关键靶点 Akt 对应的活性成分为柚皮素和木犀草素。木犀草素是一种天然黄酮类化合物,具有多种药理学活性,如抗炎、抗过敏、降尿酸、抗肿瘤、抗病毒等,多项研究发现木犀草素可以通过调控 PI3K-Akt 信号通路发挥治疗作用^[15-16]。柚皮素是柚皮甙的甙元,属于二氢黄酮类化合物,研究同样发现柚皮素可以通过调控 PI3K-Akt 信号通路发挥抗炎、抗肿瘤、抗血小板凝集等生物学作用^[17-19]。此外,Yin 等^[20]报道柚皮素能够通过上调 Cajal

间质细胞的标志物干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体c-kit的表达,以及调控水通道蛋白3(Aquaporin3, AQP3)的表达从而对洛哌丁胺诱导的STC小鼠发挥治疗作用。

钙信号通路与胃肠道平滑肌收缩关联紧密,平滑肌的收缩伴随有钙信号的改变,表现为收缩时细胞外液中 Ca^{2+} 内流或细胞内贮存的 Ca^{2+} 释放使得平滑肌细胞内 Ca^{2+} 的浓度升高,而在舒张时游离 Ca^{2+} 被质膜钙泵或 Na^{+} 、 Ca^{2+} 交换排出胞外使得平滑肌细胞内 Ca^{2+} 的浓度降至静息水平^[21]。李东鑫等^[22]研究发现枳实含药血清可以提高胃窦平滑肌细胞内 Ca^{2+} 的浓度,增强肌细胞的收缩。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是肠神经系统中一种重要的神经递质,5-HT可以刺激肠道平滑肌收缩,一般认为便秘患者通常伴随5-HT水平降低以及5-HT受体活性的改变^[23]。研究表明5-HT3受体表达下降会影响肠道感觉向大脑中枢的传递使得便意减少,另一方面又会使胃肠道蠕动减弱,延缓胃肠道内容物的运输^[24]。此外,结肠5-HT4受体表达降低同样会引起肠蠕动减弱,肠道分泌反射异常,导致便秘^[25]。

本研究还通过非靶向代谢组学方法检测了枳实-厚朴药对灌胃对STC小鼠肠道代谢物的影响,最终共检测出21种差异性代谢物,其中值得注意的是枳实-厚朴给药增加了STC小鼠肠道内容物中烟酸和果糖的含量,降低了原儿茶酸的含量,而这3种差异性代谢物均与Akt信号通路存在关联。烟酸是一种多功能物质,对机体神经系统、炎症反应以及脂肪代谢等具有调节作用^[26]。林福全等^[27]报道烟酸可以增强人永生表皮细胞(HaCaT)中Akt活性。果糖是与葡萄糖同分异构的单糖,李颖霞等^[28]研究发现果糖能够显著激活Akt信号通路中的关键分子Akt的磷酸化水平。Sato等^[29]同样报道果糖给药可以增强小鼠肝脏中Akt的磷酸化。原儿茶酸被证实具有抗氧化和抗炎等作用。Nam等^[30]报道原儿茶酸可以抑制脂多糖诱导的Akt信号通路的激活。Wu等^[31]同样发现原儿茶酸可以显著降低成纤维样滑膜细胞(FLSs)中Akt和mTOR的磷酸化水平。

综上所述,本研究应用网络药理学研究方法结合非靶向代谢组学检测,分析枳实-厚朴药对治疗STC的活性成分、关键靶点、相关通路之间的相互联系,探讨其潜在作用机制,结果表明枳实-厚朴药对针对STC存在多成分、多靶点、多通路的作用特点,其中引起我们特别关注的是活性成分柚皮素和木犀草素,以及关键靶点Akt及其相关性代谢物烟酸、果糖和原儿茶酸。本研究结果为临床选用枳实-厚朴药对治疗慢传输型便秘补充了理论依据,同时为后续基础实验提供了研究思路。

参考文献:

- [1] ZHAO Y F, MA X Q, WANG R, et al. Epidemiology of functional constipation and comparison with constipation-predominant irritable bowel syndrome: The systematic investigation of gastrointestinal diseases in China (SILC)[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2011, 34(8): 1020-1029. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04809.x.
- [2] 张朝斌, 魏志军, 陈浩洋, 等. 脏腑气机升降出入整体观在便秘诊治中的运用[J]. *新中医*, 2015, 47(9): 244-246. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.09.112.
- [3] 颜帅, 董宏利, 乐音子, 等. 通便汤治疗老年慢传输型便秘多中心、双盲、随机对照临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3): 1171-1174.
- [4] 赵向东, 曹永清, 徐向. 基于中医传承辅助系统的曹永清治疗便秘用药规律研究[J]. *国际中医中药杂志*, 2020, 42(6): 583-587. DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20190308-00069.
- [5] 高玲肖, 刘建平, 刘小发, 等. 基于数据挖掘技术分析李佃贵治疗便秘的用药规律[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(4): 609-612. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.200406.
- [6] 梁丹. 基于中医传承辅助平台挖掘黄穗平教授治疗慢性便秘的组方规律[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [7] HUANG Y, LI F, TONG W D, et al. Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of interstitial cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein kinase[J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2010, 221(2): 125-132. DOI: 10.

1620/tjem.221.125.

- [8] ORDÖG T, WARD S M, SANDERS K M. Interstitial cells of Cajal generate electrical slow waves in the murine stomach[J]. The Journal of Physiology, 1999, 518(1): 257-269. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.0257r.x.
- [9] LYFORD G L, HE C L, SOFFER E, et al. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Gut, 2002, 51(4): 496-501. DOI: 10.1136/gut.51.4.496.
- [10] MOKHTARE M, ALIMORADZADEH R, AGAH S, et al. The association between modulating inflammatory cytokines and constipation of geriatrics in Iran[J]. Middle East Journal of Digestive Diseases, 2017, 9(4): 228-234. DOI: 10.15171/mejdd.2017.78.
- [11] SUNDBØLL J, THYGESEN S K, VERES K, et al. Risk of cancer in patients with constipation[J]. Clinical Epidemiology, 2019, 11: 299-310. DOI: 10.2147/celep.s205957.
- [12] LIÑÁN-RICO A, TURCO F, OCHOA-CORTES F, et al. Molecular signaling and dysfunction of the human reactive enteric glial cell phenotype: Implications for GI infection, IBD, POI, neurological, motility, and GI disorders[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2016, 22(8): 1812-1834. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000854.
- [13] 谭丽, 谭至柔, 黄雪, 等. 不同类型一氧化氮合酶在慢传输型便秘大鼠结肠中的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(1): 64-66. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2011.01.021.
- [14] 路越. 化癥通便汤对慢传输型便秘大鼠 PI3K/Akt/eNOS 信号通路及血管活性肽的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(4): 429-433. DOI: 10.16294/j.cnki.1007-659x.2020.04.018.
- [15] HE H T, CHEN X. Luteolin attenuates cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion through the modulation of the PI3K/Akt pathway in rats[J]. Journal of Veterinary Research, 2021, 65(3): 341-349. DOI: 10.2478/jvetres-2021-0037.
- [16] WANG S Y, WUNIQIEMU T, TANG W F, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94: 107460. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107460.
- [17] LIM W, PARK S, BAZER F W, et al. Naringenin-induced apoptotic cell death in prostate cancer cells is mediated via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(5): 1118-1131. DOI: 10.1002/jcb.25729.
- [18] ZHAO M H, LI C, SHEN F J, et al. Naringenin ameliorates LPS-induced acute lung injury through its anti-oxidative and anti-inflammatory activity and by inhibition of the PI3K/AKT pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14(3): 2228-2234. DOI: 10.3892/etm.2017.4772.
- [19] HUANG M T, DENG M Z, NIE W Q, et al. Naringenin inhibits platelet activation and arterial thrombosis through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 722257. DOI: 10.3389/fphar.2021.722257.
- [20] YIN J Q, LIANG Y C, WANG D L, et al. Naringenin induces laxative effects by upregulating the expression levels of c-Kit and SCF, as well as those of aquaporin 3 in mice with loperamide-induced constipation[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(2): 649-658. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3301.
- [21] 吕艳锋, 张成博, 喻苗, 等. 玉烛散对血虚型慢传输型便秘小鼠结肠平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度及收缩的影响[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, 19(5): 337-342. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2016.05.001.
- [22] 李东鑫, 凌江红, 王煜姣, 等. 枳实含药血清对大鼠胃窦平滑肌细胞收缩效应及细胞内钙离子浓度、钙调蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(8): 1224-1230.
- [23] 窦迎春, 于新娟, 许倩倩, 等. 慢性便秘患者血清中 5-羟色胺、生长抑素的表达及意义[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2018, 7(1): 42-46. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2018.01.009.
- [24] 王博, 米东飞, 赵发, 等. 五羟色胺与慢传输型便秘关系研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(35): 3984-3987. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2016.35.039.

- hippocampal neurons as revealed by transcriptome analysis[J]. *Phytomedicine*, 2018, 46: 164-175. DOI:10.1016/j.phymed.2018.04.012.
- [15] ADEBIYI O E, OLOPADE J O, OLAYEMI F O. Sodium metavanadate induced cognitive decline, behavioral impairments, oxidative stress and down regulation of myelin basic protein in mice *Hippocampus*: Ameliorative roles of β -spinasterol, and stigmasterol[J]. *Brain and Behavior*, 2018, 8(7): e01014. DOI:10.1002/brb3.1014.
- [16] HAO T Y, YANG Y Q, LI N, et al. Inflammatory mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury with treatment of stepharine in rats[J]. *Phytomedicine*, 2020, 79: 153353. DOI:10.1016/j.phymed.2020.153353.
- [17] 俞月, 路娟, 吕欣锴, 等. 荷叶碱药理作用及机制研究进展[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(1): 164-170. DOI:10.13313/j.issn.1673-4890.20191031002.
- [18] ZHENG J J, ZHANG T Y, LIU H T, et al. Cytisine exerts an anti-epileptic effect via $\alpha 7$ nAChRs in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 706225. DOI:10.3389/fphar.2021.706225.
- [19] 马婧, 刘晓莉, 乔德才. 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 在突触可塑性和神经精神疾病中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(11): 1485-1488. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2018.11.002
- [20] ENGEL T, GÓMEZ-SINTES R, ALVES M, et al. Bi-directional genetic modulation of GSK-3 β exacerbates hippocampal neuropathology in experimental status epilepticus[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9: 969. DOI:10.1038/s41419-018-0963-5.

(上接第 26 页)

- [25] 丁健华, 赵荣华, 傅传刚, 等. 慢传输型便秘患者结肠中五羟色胺受体亚型的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(32): 3111-3115. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2006.32.008.
- [26] 钟港, 苏敏超, 王笑言, 等. 烟酸的功能及其在脂肪代谢中的作用机制[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(9): 5516-5525. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2022.09.007.
- [27] 林福全, 许文, 关翠萍, 等. 蛋白激酶 B 和丝裂原活化蛋白激酶在烟酸保护的 HaCaT 细胞抵抗中波紫外线损伤中的作用[J]. *中华皮肤科杂志*, 2012, 45(11): 806-810. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2012.11.016.
- [28] 李颖霞, 姜利彬, 徐海燕, 等. 果糖通过激活 Akt 信号通路促进 3T3-L1 细胞的脂肪分化[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(11): 2035-2041. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.11.017.
- [29] SATO T, WATANABE Y, NISHIMURA Y, et al. Acute fructose intake suppresses fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the AKT-FoxO1 pathway[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2019, 18: 100638. DOI: 10.1016/j.bbrep.2019.100638.
- [30] NAM Y J, LEE C S. Protocatechuic acid inhibits Toll-like receptor-4-dependent activation of NF- κ B by suppressing activation of the Akt, mTOR, JNK and p38-MAPK[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 55: 272-281. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.12.024.
- [31] WU H Q, WANG J, ZHAO Q, et al. Protocatechuic acid inhibits proliferation, migration and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2020, 48(1): 969-976. DOI: 10.1080/21691401.2020.1776307.