

## 基于网络药理学的黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的潜在机制研究

宋红新<sup>1</sup>, 马旭冉<sup>1</sup>, 王敦方<sup>1</sup>, 王彦礼<sup>1</sup>, 邹迪新<sup>1</sup>, 苗金雪<sup>1,2</sup>, 王 汉<sup>3</sup>, 杨伟鹏<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040;  
3. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

**摘要:** 利用网络药理学和系统生物学方法探究黄芩汤治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 分子机制。从中药系统药理学分析平台 TCMSP 挖掘黄芩汤中 4 味中药相关的化学成分和作用靶点; 通过 OMIM 数据库、TTD 数据库以及 GeneCard 数据库筛选 UC 的预测靶点。利用 Cytoscape\_v3.7.1 软件构建化合物-靶点网络; 基于 STRING 数据库, 构建黄芩汤治疗 UC 靶点互作网络, 根据拓扑学参数筛选黄芩汤治疗 UC 的核心靶点。利用 Bioconductor 中的 R 包 clusterprofile version 3.12.0 对疾病与药物交集靶点进行 GO (gene ontology) 生物学过程富集分析和 KEGG (KEGG pathway analysis) 通路注释分析。结果发现, 黄芩汤化合物-UC 靶点网络包含 128 个化合物和相应靶点 141 个, 核心靶点涉及 AKT1、IL6、PTGS2、IL10、IL1 $\beta$  等。GO 功能富集分析得到 151 个 GO 条目, KEGG 富集筛选得到 33 条和 UC 有关通路, 主要涉及 PI3K-AKT 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路等。本文预测了黄芩汤治疗 UC 疾病的可能作用机制, 为进一步寻找其有效成分和作用机制奠定基础。

**关键词:** 网络药理学; 黄芩汤; 溃疡性结肠炎; 作用机制; 靶点

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0247-09

## Potential mechanism of Huangqin decoction for the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology

SONG Hong-xin<sup>1</sup>, MA Xu-ran<sup>1</sup>, WANG Dun-fang<sup>1</sup>, WANG Yan-li<sup>1</sup>, ZOU Di-xin<sup>1</sup>, MIAO Jin-xue<sup>1,2</sup>,  
WANG Han<sup>3</sup>, YANG Wei-peng<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**Abstract:** To study the mechanism of Huangqin decoction (HQT) in the treatment of ulcerative colitis (UC) by using network pharmacology, chemical components and targets related to the four herbs of Chinese materia medica in HQT were searched through the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) to construct the interaction network diagram of the target point of the compounds. The UC-related targets were screened through OMIM, TTD, and GeneCard databases. The compound-target network was constructed using Cytoscape\_v3.7.1 software; based on the STRING database, a target interaction network for HQT for UC was constructed, and the core target of HQT for UC was selected based on topological parameters. GO (gene ontology) biological process enrichment analysis and KEGG (KEGG pathway analysis) pathway annotation analysis were performed on the disease and drug intersection targets using the R package clusterprofile version 3.12.0 in Bioconductor. The HQT compound-UC target network contains 128 compounds and corresponding targets 141. The core targets are AKT1, IL6, PTGS2, IL10, IL1 $\beta$  and so on. GO functional enrichment analysis

收稿日期: 2019-06-06; 修回日期: 2019-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273662, 81473592).

\*通讯作者 Tel: 86-10-64093014, Fax: 86-10-64013996, E-mail: hrbywp@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0455

yielded 151 GO terms, and KEGG pathway enrichment screening resulted in 33 associations with UC, mainly involving PI3K-AKT signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and so on. The synergetic effect of HQT with multi-components and multi-pathway was confirmed by network pharmacology, and the main possible mechanism of HQT in treating UC was predicted, which lay a foundation for the identification of effective components, the mechanism of action, and clinical application.

**Key words:** network pharmacology; Huangqin decoction; ulcerative colitis; mechanism; target

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因和发病机制尚不明确的慢性肠道炎症性疾病。本病主要以大肠黏膜及黏膜下层发生慢性、非特异性炎症性病变为中心, 黏膜上皮及腺体破坏、增生或萎缩, 淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞浸润, 隐窝脓肿形成, 因而呈现黏膜充血、糜烂、溃疡及增殖性改变<sup>[1]</sup>。中医将 UC 归为“肠僻”、“大瘕泄”、“下利”、“痢疾”和“滞下”等范畴, 并认为 UC 多因感受外邪、内伤饮食、情志失调和脾胃虚弱所致, 病位在脾胃与大小肠。其发病机制为浊邪壅塞肠中, 传导失司, 气机不通, 气血壅滞, 肠络受损, 下痢赤白黏液。《济生方·痢疾论治》“胃者脾之腑, 为水谷之海, 营卫充焉。夫人饮食起居失其宜, 运动劳役失其度, 则脾胃不充, 大肠虚弱, 而风冷暑湿之邪, 得以乘间而入, 故为痢疾。”《类证治裁·痢症》谓“由胃腑湿蒸热壅, 致气血凝结, 夹糟粕积滞, 进入大小腑, 倾刮脂液, 化脓血下注。”

黄芩汤见于《伤寒论辨·太阳病脉证并治》, 该方由黄芩、白芍、大枣、炙甘草 4 味药组成。方中以黄芩为主, 苦寒坚阴而清里热; 芍药味酸微苦, 敛阴和营, 缓急止痛; 芩芍配伍, 酸苦相济, 调中存阴以止利, 是治热之要药, 炙甘草、大枣益气和缓, 调补正气。诸药合用, 共奏清热止痢, 缓急止痛之功。此方以其严谨的理法方药和确切的临床疗效, 对后世产生了深刻的影响。现代药理研究表明, 黄芩汤有非常明显的抑菌、抗炎、解痉、镇痛、解热、增强免疫和镇静等作用<sup>[2]</sup>。黄芩汤治疗 UC 在调节免疫功能、抗氧化应激, 以及通过调节肠道菌群恢复微生态的相对平衡、抑制炎症反应、保护肠黏膜屏障等作用显著。

因中药及其复方具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点, 使得中药药效物质基础不明确、作用机制不清楚, 从整体到组织器官、细胞和分子水平都很难进行全面系统地研究。近年来网络药理学在国际上兴起, 它融合系统生物学、多向药理学、计算生物学和网络分析等多学科的技术和内容, 进行多层次网络的构建, 从整体角度探索药物与疾病间的关联性, 提供了一种从系统水平寻找中药复方潜在活性成分和作用靶点的新策略, 特别适用于反映及阐释中药多成分-多靶点

的作用关系, 与中药从整体水平调控机体、发挥治疗作用的观点相吻合<sup>[3]</sup>。为此, 本研究采用网络药理学方法, 分析黄芩汤治疗 UC 的药效物质基础和可能的分子作用机制, 建立“有效成分-靶点-通路”之间的关系, 探究该方治疗 UC 的多成分、多靶点和多途径作用机制, 为后续的研究工作提供思路。

## 材料与方法

**黄芩汤活性成分和相关靶点筛选** 通过 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 寻找黄芩汤中 4 味中药化学成分, 筛选口服利用度 (OB)  $\geq 30\%$  且类药性 (DL)  $\geq 0.18$ <sup>[4]</sup> 的活性化合物, 获得黄芩汤活性化合物及其所作用的蛋白质靶点。

**UC 相关靶点的筛选** 本研究基于 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>) 以及 OMIM<sup>[5]</sup> (<http://www.omim.org>) 数据库综合遴选 UC 相关靶点。将上述疾病靶点与黄芩汤潜在靶点取交集, 共收集到 141 个基因, 作为疾病和药物的共同潜在靶点。

**黄芩汤化合物-靶点网络关系的构建** 将筛选后的黄芩汤中活性化合物与上述 141 个靶点对应关系上传至 Cytoscape\_v3.7.1 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 生成体现化合物-靶点相互作用的网络图, 进行拓扑参数<sup>[6]</sup>分析, 根据介度 (betweenness centrality, BC)、紧密度 (closeness centrality, CC) 以及连接度 (Degree) 的中位数来分析化合物-靶点网络核心节点。

**黄芩汤治疗 UC 核心靶点分析** 将上述 141 个靶点上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 构建黄芩汤治疗 UC 靶点互作网络, 将网络中节点交互作用关系参数导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络, 根据 BC、CC 和 Degree 值的中位数来分析黄芩汤治疗 UC 的靶点互作网络核心节点。

**分子对接验证** 利用分子对接模拟软件 AutoDock\_Vina, 对 Degree  $\geq 10$  的关键药效分子与筛选的 10 个核心靶点进行受体-配体对接模拟计算, 以阳性药柳氮磺胺吡啶 (SASP) 与核心靶点对接结果进行对照。完成全部的对接模拟后, 根据关键药效分子和核心靶

点最低结合能 (binding energy) 值做热图。经大量文献查阅<sup>[7]</sup>, 小分子与靶点蛋白最低结合能  $\leq -5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  表明黄芩汤的关键药效分子与靶点蛋白结合较好。

**靶点通路注释分析** 利用 Bioconductor 中的 R 包 clusterprofile version 3.12.0 对疾病与药物交集靶点进行 GO (gene ontology) 生物学过程富集分析和 KEGG (KEGG pathway analysis) 通路注释分析, 设定阈值  $P < 0.05$ <sup>[8]</sup>, 并根据生物学信息筛选与 UC 有关的通路, 构建化合物-靶点-通路网络图。

## 结果

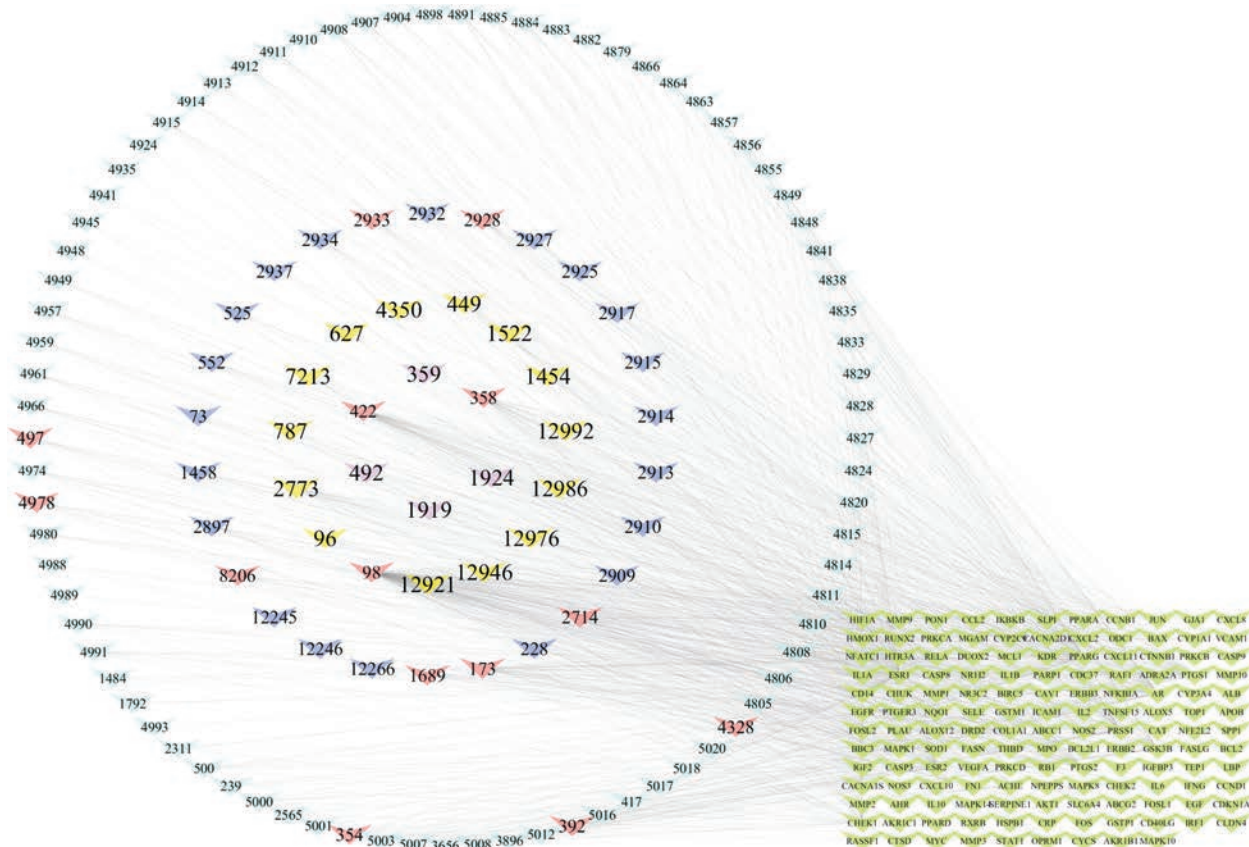
### 1 黄芩汤化合物-靶点网络的构建及核心靶点的筛选

根据 OB 与 DL 的阈值, 剔除重复化合物和缺少靶点预测的化合物, 并结合多方数据库和文献检索确认, 最终得出 128 个活性成分, 其中黄芩 26 个化学成分, 白芍 6 个化学成分, 大枣 15 个化学成分, 甘草 81 个化学成分。利用 128 个化合物与靶点的关系构建化合物-靶点网络 (图 1)。其中天蓝色节点代表甘草, 深蓝色节点代表黄芩, 黄色节点代表大枣, 紫色节点代表白芍, 绿色节点为靶点, 红色节点代表核心节点。在化合

物-靶点相互作用网络中, 共包括 269 个节点 (128 个化合物节点和 141 个靶点节点) 和 72 092 条边。每条边则表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系。经 Network Analyzer 计算该化合物-靶点网络中, Degree 值中位数 2 倍为 8, BC 和 CC 中位数分别为 0.000 890 1 和 0.709 163 34, 核心节点需满足以上参数的中位数卡值。表 1 列出了化合物-靶点网络中核心化合物的 Degree 值, 从表 1 可见, 槲皮素 (MOL000098) 的潜在靶点 155 个, 最多; 其次是山柰酚 (MOL000422), 51 个;  $\beta$ -谷甾醇 (MOL000358) 潜在靶点 36 个; 汉黄芩素 (MOL000173) 31 个; 黄芩素 (MOL002714) 22 个; 金合欢素 (MOL001689) 14 个; 异鼠李素 (MOL000354) 和甘草查尔酮 A (MOL000497) 各 11 个。这些 Degree 值较高的关键有效分子有可能在黄芩汤的药理功能中发挥着相对重要的作用。

### 2 黄芩汤治疗 UC 核心靶点分析

本研究基于 STRING 数据库分析黄芩汤治疗 UC 的靶点之间的交互作用, 将黄芩汤治疗 UC 的 141 个靶点相互作用关系导入 Cytoscape 软件进行分析, 根据  $BC \geq 0.001\ 676\ 35$ 、 $CC \geq 0.555\ 555\ 56$  以及  $\text{Degree} \geq 66$



**Figure 1** Huangqin decoction (HQT) compound-target network diagram. The sky blue nodes represent Gancao, the dark blue nodes represent Huangqin, the yellow nodes represent Dazhao, the purple nodes represent Baishao, the green nodes represent the target point, the red nodes represent key pharmacodynamic molecules, compound number is short for TCMSP-ID

**Table 1** Network characteristics of key component-target network nodes. BS: Baishao; DZ: Dazhao; GC: Gancao; HQ: Huangqin

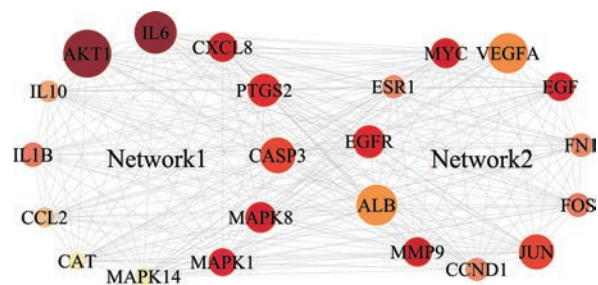
TCMSP-ID	Compound	Betweenness centrality	Degree	Source
MOL000422	Kaempferol	0.062 084 15	51	BS
MOL000358	Beta-sitosterol	0.008 639 78	36	BS
MOL000492	(+)-Catechin	0.008 152 7	8	BS
MOL000098	Quercetin	0.453 396 26	155	DZ
MOL007213	Nuciferin	0.011 412 15	8	DZ
MOL000354	Isorhamnetin	0.005 020 65	11	GC
MOL000497	Licochalcone A	0.006 692 93	11	GC
MOL004328	Naringenin	0.027 635 27	11	GC
MOL000392	Formononetin	0.001 708 54	10	GC
MOL004978	2-[(3R)-8,8-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	0.003 773 62	10	GC
MOL003896	7-Methoxy-2-methylisoflavone	0.001 708 54	9	GC
MOL004891	Shiinterocarpin	0.005 805 47	9	GC
MOL004908	Glabridin	0.002 395 44	9	GC
MOL004912	Glabrone	0.001 708 54	9	GC
MOL004974	3'-Methoxyglabridin	0.001 708 54	9	GC
MOL005003	Licoagrocarpin	0.003 463 38	9	GC
MOL000417	Calycosin	0.001 229 24	8	GC
MOL000500	Vestitol	0.001 229 24	8	GC
MOL004811	Glyasperin C	0.000 855 51	8	GC
MOL004820	Kanzonols W	0.001 229 24	8	GC
MOL004824	(2S)-6-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	0.000 855 51	8	GC
MOL004833	Phaseolinisoflavan	0.000 855 51	8	GC
MOL004856	Gancaonin A	0.000 855 51	8	GC
MOL004884	Licoisoflavone B	0.000 855 51	8	GC
MOL004885	Licoisoflavanone	0.001 502 66	8	GC
MOL004907	Glyzaglabrin	0.001 229 24	8	GC
MOL004957	3-(4-Hydroxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one	0.001 229 24	8	GC
MOL004966	3'-Hydroxy-4'-O-methylglabridin	0.001 229 24	8	GC
MOL004991	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	0.001 431 26	8	GC
MOL005007	Glyasperins M	0.001 502 66	8	GC
MOL005016	Odoratin	0.001 229 24	8	GC
MOL000173	Wogonin	0.084 177 82	31	HQ
MOL002714	Baicalein	0.054 621 48	22	HQ
MOL001689	Acacetin	0.017 291 6	14	HQ
MOL002928	Oroxylin A	0.012 981 98	10	HQ
MOL002933	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	0.004 526 95	10	HQ
MOL008206	Moslosooflavone	0.003 929 63	10	HQ
MOL002934	Neobaicalein	0.002 296 41	9	HQ
MOL000552	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	0.004 380 39	8	HQ
MOL002897	Epiberberine	0.000 829 04	8	HQ

(中位数 2 倍) 条件筛选出 23 个核心靶点, 如图 2 所示。节点的大小和颜色与 Degree 值正相关, Degree 值越大, 节点越大, 颜色越深, 表明靶点在此网络关系越重要。其中 Network 1 为黄芩汤治疗 UC 的直接作用靶点, Network 2 为黄芩汤治疗 UC 的间接靶点。表 2 列出了 23 个核心靶点的 Degree 值, 在黄芩汤治疗 UC 靶点交互作用网络中, RAC- $\alpha$  丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1, 110)、白介素 6 (IL6, 102)、半胱天冬酶 3 (CASP3, 92)、前列腺素 G/H 合酶 2 (PTGS2, 89)、转录因子 AP-1 (JUN, 92)、丝裂原激活的蛋白激酶 8

(MAPK8, 86)、白介素 8 (CXCL8, 84)、丝裂原激活的蛋白激酶 1 (MAPK1, 82)、白介素 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ , 76) 和白介素 10 (IL10, 73) 在黄芩汤治疗 UC 的直接作用靶点中处于核心位置, 可能在黄芩汤治疗 UC 中发挥重要作用。

### 3 分子对接验证结果

对 14 个关键药效分子与 10 个靶点蛋白对接的最低结合能作图, 如图 3 所示。其中横坐标为靶蛋白, 纵坐标为黄芩汤的活性成分, 颜色的深浅代表最低结合能的大小。由图可见, 所有分子与靶蛋白的最低结

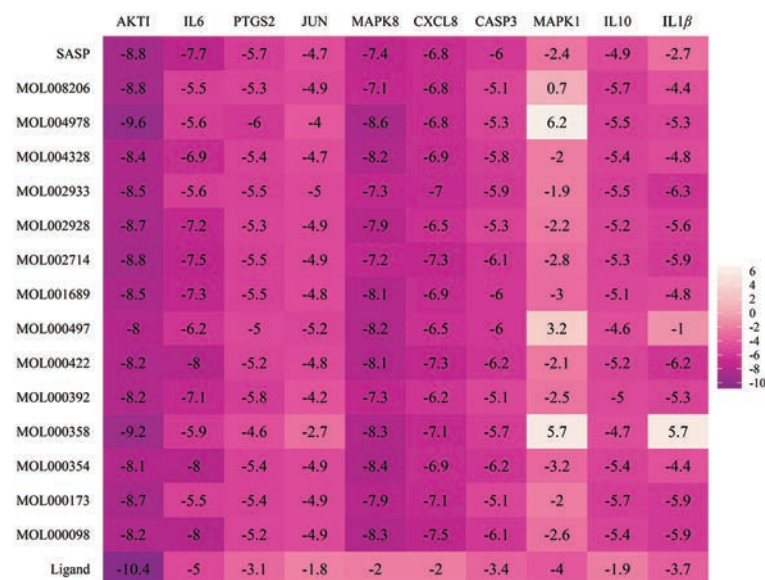


**Figure 2** Huangqin decoction (HQT) core target network diagram. The nodes of network 1 represent the direct targets of HQT for ulcerative colitis, and the nodes of network 2 represent the indirect targets of HQT for ulcerative colitis, the color shade and node size represent the position of the network relationship

合能都小于 0, 说明配体与受体可以自发结合, 最低结合能小说明分子与靶点蛋白结合越好。对接结果显示, 14 个活性化合物与蛋白靶点 AKTI、IL6、PTGS2、MAPK8、CXCL8、CASP3 最低结合能小于  $-5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 说明这些活性化合物与以上靶点蛋白结合较好。表 3

**Table 2** Information for 23 core targets of topological analysis

Target	Target-name	Degree	Target	Target-name	Degree
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	110	ALB	Serum albumin	100
IL6	Interleukin-6	102	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	99
CASP3	Caspase-3	92	JUN	Transcription factor AP-1	92
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	89	EGFR	Epidermal growth factor receptor	88
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	86	MYC	Myc proto-oncogene protein	85
CXCL8	Interleukin-8	84	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	84
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	82	EGF	Pro-epidermal growth factor	83
IL1 $\beta$	Interleukin-1 beta	76	FOS	Proto-oncogene c-Fos	76
IL10	Interleukin-10	73	CCND1	G1/S-specific cyclin-D1	75
CCL2	C-C motif chemokine 2	71	ESR1	Estrogen receptor	75
CAT	Catalase	67	FN1	Fibronectin	75
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	67			



**Figure 3** Heat map for binding energy of key targets with active ingredients of HQT. The abscissa represents the target protein, the ordinate represents the active ingredient of the HQT and the shade of the color represents the minimum binding energy

列出靶点蛋白基本信息, 包括配体和蛋白的 PDB-ID 编号及配体 ID 编号。阳性药物与靶点蛋白对接的最低结合能和黄芩汤中关键药效分子与靶点蛋白的最低结合能相差不大, 验证了靶点蛋白晶体及配体选择的合理性。

#### 4 靶点生物功能及靶点-通路分析

利用 R 包 clusterprofile 共富集出 151 个 GO 条目, 选取  $P$  值最小的前 20 个 GO 条目作图, 如图 4 所示。Y 轴代表 GO 条目, X 轴和气泡面积大小代表目标基因集中属于 GO 的基因数量, 气泡颜色代表富集显著性, 即  $P$  值的大小。其中生物学过程辅因子结合、细胞因子受体结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、受体配体活性、细胞因子活性、DNA 结合转录激活因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性和 RNA 聚合酶 II 转录因子结合富集的基因数排名靠前。

KEGG 通路富集共获得 151 条富集通路, 如图 5 所示。Y 轴代表 pathway 名称, X 轴和条形面积大小代表

**Table 3** Information on 10 proteins involved in molecular docking

Target	Uniprot-ID	PDB-ID	Ligand-ID
AKTI	P31749	6HHJ	G4H
IL6	P05231	4NI9	OMG
PTGS2	P35354	5FLA	MAN
JUN	P05412	1JUN	ACE
MAPK8	P45983	4UX9	ANP
CXCL8	P10145	1QE6	SO4
CASP3	P42574	6BF1	AZI
MAPK1	P28482	6Q7S	IPH
IL10	P22301	2ILK	SO4
IL1 $\beta$	P01584	5BVP	PCA

目标基因集中属于 pathway 的基因数量, 条形图颜色代表富集显著性, 即  $P$  值的大小。其中与 UC 有关的 33 条通路主要包括 PI3K-AKT 信号通路 (PI3K-AKT signaling pathway)、NF- $\kappa$ B 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway), 表明黄芩汤的有效成分可能通过作用于这些信号通路达到治疗疾病的目的。

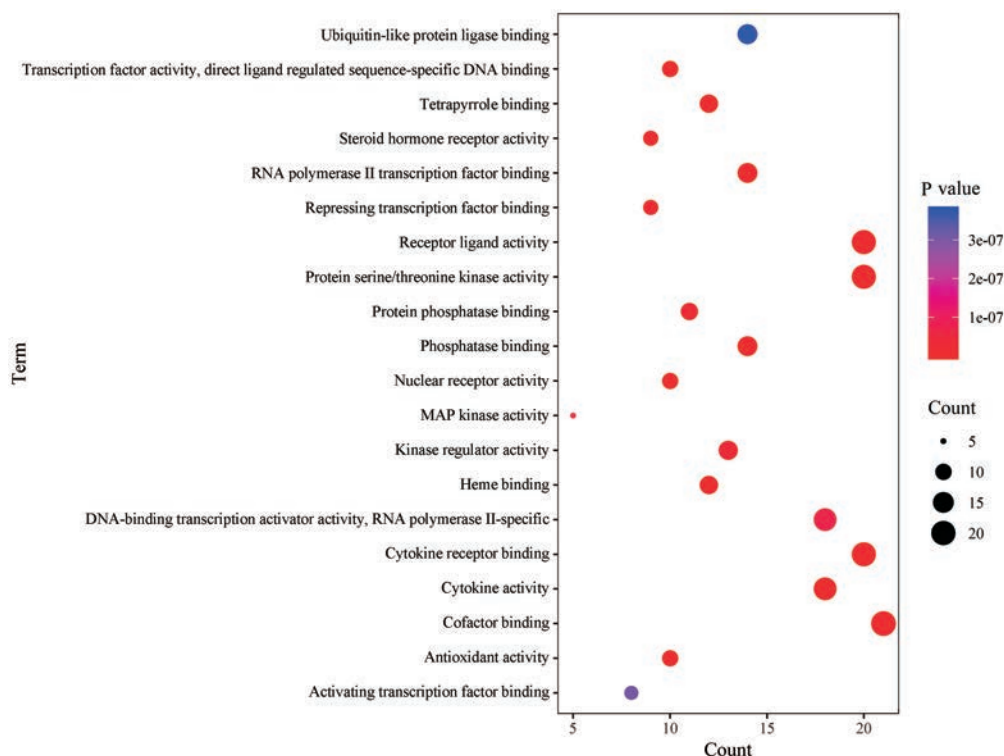
采用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路”(图 6), 其中红色节点代表根据生物信息学筛选的通路, 黄色和绿色节点分别代表核心靶点和核心活性化合物。从图中可见, 黄芩汤 41 个活性成分的作用靶点分布于不同的代谢通路, 共同调节机体水平, 体现了药物多成分、多靶点治疗 UC 的作用机制。

## 讨论

黄芩汤具有清热止痢, 缓急止痛之功效, 临床用于治疗湿热型 UC, 具有较好的临床效果。本研究基于多成分、多靶点作用的研究思路, 应用网络药理学技术, 分析黄芩汤治疗 UC 作用靶点, 阐述黄芩汤治疗 UC 潜在作用机制, 为黄芩汤临床应用提供科学依据。

基于黄芩汤活性成分-作用靶点网络分析, Degree 值排名前 10 位的关键药效分子有 9 个属于黄酮类化合物, 其中包括黄酮类化合物黄芩素 (MOL002714)、汉黄芩素 (MOL000173)、槲皮素 (MOL000098)、山柰酚 (MOL000422)、金合欢素 (MOL001689)、异鼠李素 (MOL000354)、芒柄花黄素 (MOL000392) 等、二氢黄酮类化合物柚皮素 (MOL004328) 及查尔酮类化合物甘草查尔酮 A (MOL000497)。究其原因, 主要是黄酮类在中草药及天然产物中分布广泛, 并具有抗炎、抗菌和抗氧化活性<sup>[9]</sup>。

基于 STRING 交互作用网络数据库构建黄芩汤治疗 UC 靶点交互作用网络, 筛选出 23 个核心靶点, 结合分子对接结果, 发现 AKT1、IL6、PTGS2、IL10、IL1 $\beta$ 、MAPK8、CASP3 是黄芩汤治疗 UC 关键作用靶点, 这 7 个靶点可能在黄芩汤治疗 UC 作用的发挥重要作用。分子对接结果显示 14 个关键药效成分与 AKT1、IL6、IL10、PTGS2 对接结合能都小于  $-5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 14 个活性化合物与以上靶点蛋白结合较好。免疫调节异常是

**Figure 4** GO enrichment of predicted targets of HQT decoction against ulcerative colitis

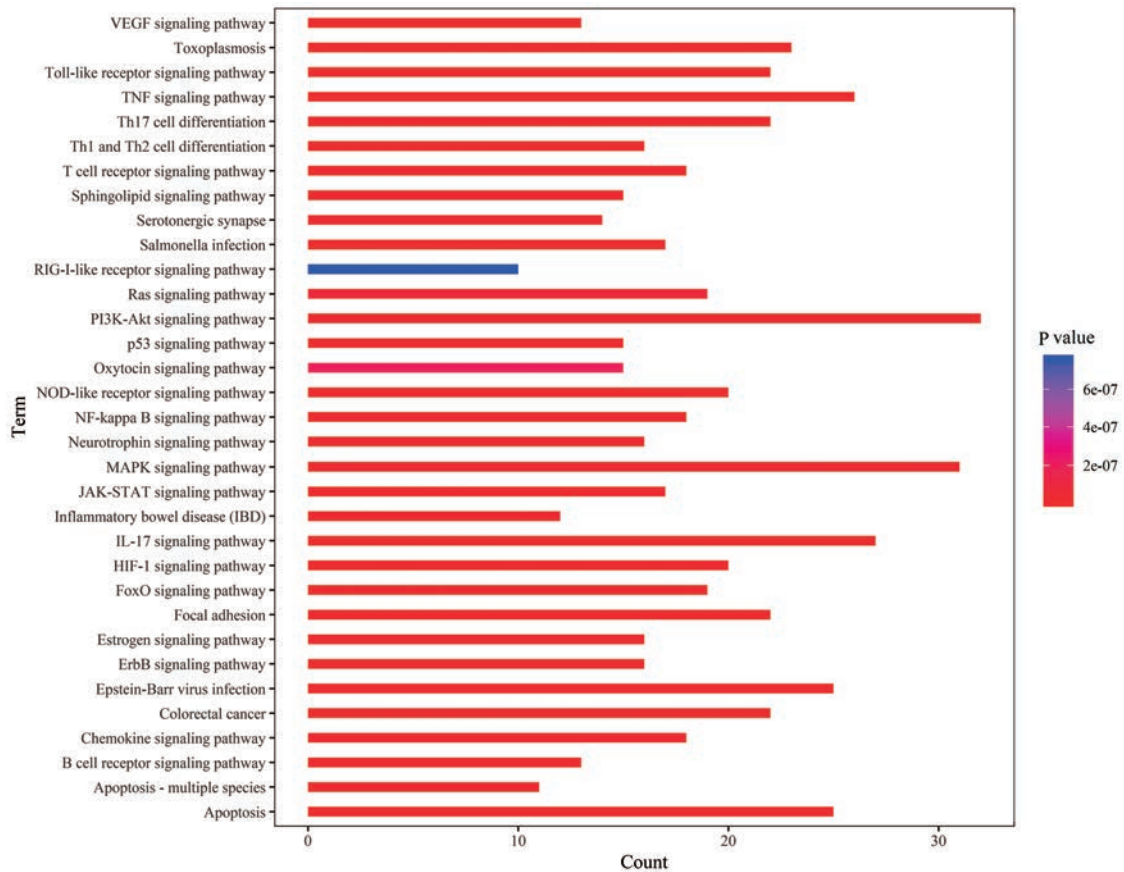


Figure 5 KEGG pathway enrichment of predicted targets of HQT decoction against ulcerative colitis

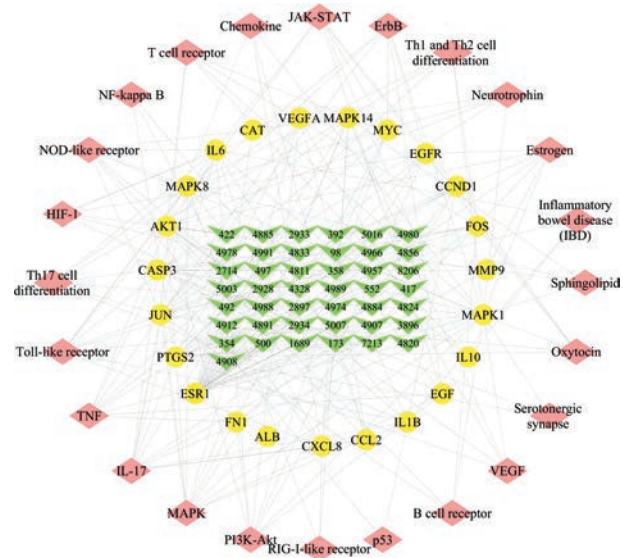


Figure 6 Ingredients-targets-pathways network of HQT. Red nodes represent pathways, yellow nodes represent core targets, and green nodes represent active compounds

相关性<sup>[10]</sup>。IL6主要由活化的巨噬细胞、淋巴细胞及上皮细胞分泌产生, IL6过度表达使体内环境紊乱, 导致肠上皮细胞的电解质分泌失调, 使其通透性增强, 进而使黏附其上的中性粒细胞游出并浸润到炎症部位<sup>[11]</sup>。IL1 $\beta$ 是IL1的一种, 在免疫与炎症启动中扮演着重要调节作用, 可增加由巨噬细胞所产生的细胞因子如: IL6、TNF $\alpha$ 、IL18等, 使得中性粒细胞浸润于肠道病变部位, 引起一系列的肠道炎症病变<sup>[12]</sup>。KEGG通路富集分析显示, IL6、IL1 $\beta$ 与UC有关炎症通路TNF、TLRS和NF- $\kappa$ B信号通路密切相关。TNF信号通路: TNF $\rightarrow$ TNFR1 $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B $\rightarrow$ IL1 $\beta$ 、IL6; TLRs信号通路: TLR1/TLR2 $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B $\rightarrow$ IL1 $\beta$ 、IL6, 得出黄芩汤可能作用于信号通路中潜在中心NF- $\kappa$ B, 从而介导下游IL1 $\beta$ 及IL6的合成。IL6、IL1 $\beta$ 在炎症反应过程中产生协同作用, 与炎症分级密切相关。IL10主要由Th2型细胞分泌, 具有多种生物学作用, 能够通过抑制激活单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和T细胞等, 调节免疫功能的一种细胞因子。IL10在黏膜免疫中发挥重要调节作用, 又能很好的稳定肠道黏膜的内环境<sup>[13]</sup>。文献报道黄芩汤有效成分黄芩素、汉黄芩素<sup>[14]</sup>、槲皮素<sup>[15]</sup>和山柰酚<sup>[16]</sup>能够抑制炎症模型细胞或实验动物IL6、IL1 $\beta$ 的表达,

UC的主要发病因素, 其中IL6、IL1 $\beta$ 、IL10在免疫细胞的发育、分化、免疫应答及某些细胞的激活过程中有重要调节作用, 并与UC的发生、发展和转归等具有密切

Chen 等<sup>[17]</sup>发现黄芩汤辅助柳氮磺胺吡啶可降低结肠炎患者 IL6 和 IL1 $\beta$ , 升高 IL10, 进一步说明筛选黄芩汤治疗 UC 核心靶点结果可靠。

PTGS 又称为环氧酶 (COX), 是催化花生四烯酸合成各种前列腺素 (PGs) 和其他二十烷类的关键酶, COX 有两种同工酶, 即组成型酶 COX1 和诱导性酶 COX2, 其中 COX2 可被多种炎性介质及细胞因子诱导, 参与组织炎症过程及细胞的分化增殖过程<sup>[18]</sup>。研究表明, 正常结肠黏膜不表达 COX2, 而炎症黏膜上皮细胞及结肠固有层单核炎性细胞大量表达 COX2, 并且在炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中 COX2 mRNA 表达水平明显高于非活动期<sup>[19]</sup>。本文分子对接结果显示, 黄芩汤中 14 个关键药效分子可与 PTGS2 结合最低能量为  $-6.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 14 个关键药效分子与 10 个蛋白靶点的对接最低结合能除  $\beta$ -谷甾醇 (MOL000358) 外都小于  $-5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 提示黄芩汤与 COX2 活性位点结合能力较强, 可推测黄芩汤作用于 PTGS2, 调节炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中 COX2 mRNA 表达, 抑制前列腺素生成, 减少炎性介质的释放。

AKT 在黄芩汤治疗 UC 的关键靶点网络关系中处于核心地位。AKT 是一种与蛋白激酶 C 相关的丝氨酸或苏氨酸激酶, 也被称为蛋白激酶 B, 是 PI3K 下游的直接作用靶点。有研究显示, PI3K 通路的异常激活在 UC 的发病机制中起到了重要作用, PI3K 是一系列胞内传导酶家族, 当所有位点被磷酸化, 细胞膜上的 AKT 被完全激活, AKT 从细胞膜释放进入细胞浆或细胞核中进行信号的传输, 执行其生物学功能<sup>[20]</sup>。因此, AKT 的磷酸化可以被作为判断 PI3K 活性的指标。KEGG 通路富集结果显示 PI3K/AKT 是基因富集最多的一条通路。近年来, PI3K/AKT 信号通路在肠道炎症和肿瘤中的作用日益受到重视, PI3K/AKT 信号传导通路与细胞因子的调控密切相关, 在肠道炎症反应中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。PI3K/AKT 信号通路可激活 NF- $\kappa$ B, 起到多向性的调节作用, 可调节免疫炎症相关的多种细胞的基因表达。在炎症反应的过程中, NF- $\kappa$ B 能起到关键的调控作用, 能提高诸如 IL1 $\beta$ 、IL6 等炎症因子的基因转录, 增加 IL1 $\beta$ 、IL6 的表达<sup>[22]</sup>, 加速炎症反应, 增加 UC 的发生。Jiang 等<sup>[23]</sup>通过体内动物实验和体外细胞实验发现黄芩苷能减轻大鼠 UC 的炎症反应, 抑制 PI3K 磷酸化, 下调 AKT 的活化, 从而抑制 TNF $\alpha$ 、IL6 等炎症因子的分泌, 发挥其抗炎效应, 提示黄芩苷可能通过抑制 AKT 的活化、抑制 NF- $\kappa$ B 的核转位发挥其抗炎的作用。黄芩苷作为黄芩汤有效成分之一, 在体内可被代谢为黄芩素、7-甲氧基黄芩素和 5-甲氧基黄芩素等<sup>[24]</sup>, 由此提示, 黄芩汤可能通过抑制

PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活而发挥抗炎作用, 减轻 UC 的炎症反应。

综上所述, 本文采用网络药理学的方法对黄芩汤治疗溃疡性结肠的分子机制进行探讨, 黄芩汤由 4 种药材配伍组成, 不同的活性成分通过调控不同的靶蛋白, 作用于不同的通路, 对 UC 起到治疗作用, 体现中药方剂整体性、系统性的特点。本研究发现, 黄芩汤可能从以下 3 个方面发挥治疗 UC 的作用: ① 作用于 PTGS2 靶点, 调节炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中 COX2 mRNA 表达。控制花生四烯酸代谢途径, 抑制前列腺素生成, 减少炎性介质的释放; ② 调节 IL6、IL1 $\beta$  和 IL10 等多种细胞因子的表达, 调节 UC 发生发展, 转归过程中的免疫异常, 稳定肠道黏膜的内环境; ③ 抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B、TNF 和 TLRs 等信号通路的活化, 进而下调 IL6、IL1 $\beta$  和 COX2 等炎性因子的表达而发挥抗炎作用。此次运用网络药理学的方法探究了黄芩汤治疗 UC 的作用机制, 同时预测的 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路, 为后续实验验证提供依据。预测所得黄芩汤成分疾病靶点与已有文献较为接近, 表明基于网络药理学与分子对接相结合的技术手段探讨其治疗 UC 的作用机制具有一定的准确性, 同时也揭示了黄芩汤多成分、多靶点的特点, 为后续的相关研究提供参考。

值得注意的是, CASP3 和 MAPK8 的 Degree 值很高, 处于黄芩汤治疗 UC 关键靶点的核心位置, 且与黄芩汤的关键药效分子结合较好, 推测黄芩汤可能还影响细胞凋亡、自噬过程, 有待进一步研究。

## References

- [1] Xi JS. Clinical Study of Huangqi Tang in the Treatment of Ulcerative Colitis (黄芩汤治疗 UC 的临床研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2006.
- [2] Zhuang SX. Study on the Antioxidative Stress of HQT on Ulcerative Colitis Through Nrf2 Pathway (黄芩汤调控 Nrf2 通路对 UC 的抗氧化应激作用机制研究) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2016.
- [3] Zhang YQ, Mao X, Guo QY, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. Chin Herb Med (中草药), 2016, 8: 107-116.
- [4] Liu M, Wu FZ, Zhang W, et al. Molecular mechanism of Sini San and Suanzaoren Tang in treatment of insomnia based on network pharmacology: a comparative study [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2019, 42: 44-50.
- [5] Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM<sup>®</sup>), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucl Acids Res, 2015,

- 43: D789-798.
- [6] Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, et al. Computing topological parameters of biological networks [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 282-284.
- [7] Liu FH, Chen SJ, Ni WJ. Study on the computer virtual screening of antithrombotic active ingredients in Chuanxiong Rhizoma [J]. *J China Pharm (中国药房)*, 2017, 28: 2182-2186.
- [8] Da WH, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 1-13.
- [9] Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2018, 13: 14-25.
- [10] Forland DT, Johnson E, Saetre L, et al. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of cytokines and calprotectin in patients ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. *Scand J Immunol*, 2011, 73: 66-75.
- [11] Unver N, Mcallister F. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 41: 10-17.
- [12] Zhao R, Zhou H, Su SB. A critical role for interleukin-1 $\beta$  in the progression of autoimmune diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17: 658-669.
- [13] Drastich P, Frolova-Brizova L, Zanvit P, et al. Spontaneous *in vitro* IL-6 production in various intestinal segments in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Folia Microbiol*, 2011, 56: 185-190.
- [14] Nakamura N, Hayasaka S, Zhang XY, et al. Effects of baicalin, baicalein, and wogonin on interleukin-6 and interleukin-8 expression, and nuclear factor-kappa B binding activities induced by interleukin-1beta in human retinal pigment epithelial cell line [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 77: 195-202.
- [15] Gupta RA, Motiwala MN, Mahajan UN, et al. Protective effect of *Sesbania grandiflora*, on acetic acid induced ulcerative colitis in mice by inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 222-232.
- [16] Basu A, Das AS, Sharma M, et al. STAT3 and NF- $\kappa$ B are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2017, 12: 54-61.
- [17] Chen YH, Cao QF, Hong QG, et al. Effect of Huangqin decoction combined with sulfasalazine on serum TNF- $\alpha$  and interleukin of colitis gravis patients [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2017, 35: 246-249.
- [18] Fiorucci S, Meli R, Bucci M, et al. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62: 1433-1438.
- [19] Shi Z, Ma XD, Wu HY, et al. Study on acupuncture regulating COX-2 and IL-1 $\beta$  in colon tissue of ulcerative colitis in rats [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med (江西中医药大学学报)*, 2004, 16: 38-40.
- [20] Owczarek D, Cibor D, Szczepanek M, et al. Biological therapy of inflammatory bowel disease [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2009, 119: 84-88.
- [21] Edstrom A, Ekstrom PAR. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 74: 726-735.
- [22] Hozumi H, Hokari R, Chie K, et al. Endoscopic finding of spontaneous hemorrhage correlates with tumornecrosis factor alpha expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28: 1049-1055.
- [23] Jiang Y. Effect of Baicalin on Ulcerative Colitis PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways and Its Underlying Mechanism (黄芩苷对溃疡性结肠炎 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及其机制研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016.
- [24] Zhang J, Cai W, Zhou Y, et al. Profiling and identification of the metabolites of baicalin and study on their tissue distribution in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap-orbitrap mass spectrometer [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 985: 91-102.