

良附丸治疗胃溃疡的网络药理学作用机制研究[△]

魏 晴^{1*},梁珊珊¹,姜珊珊¹,魏 娜^{2#}(1.贵州中医药大学药学院,贵阳 550025;2.海南医学院药学院,海口 570100)

中图分类号 R285.5;R573.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)09-1063-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.09.07

摘 要 目的:研究良附丸治疗胃溃疡的作用机制。方法:基于网络药理学,通过检索中药系统药理学技术平台(TCMSP)、GeneCards、OMIM和DisGeNET等数据库,筛选良附丸的活性成分、靶点和胃溃疡相关靶点,并利用Venny 2.1软件筛选良附丸活性成分与胃溃疡的共同靶点;通过STRING数据库构建良附丸治疗胃溃疡的蛋白互作网络图,并利用Cytoscape 3.7.2软件对该网络进行拓扑分析;通过DAVID数据库对良附丸的活性成分与胃溃疡的共同靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并构建良附丸活性成分-胃溃疡靶点-KEGG通路网络图。在动物实验验证中,取小鼠随机分为空白组、模型组、雷尼替丁组(阳性对照,39 mg/kg)和良附丸低、中、高剂量组(0.78、1.56、3.12 g/kg),分别灌胃相应药物,每天1次,连续7天。末次给药后,除空白组外,其余各组小鼠灌胃无水乙醇(0.01 mL/g),以复制胃溃疡模型。造模成功后,取小鼠胃组织观察病变情况,并计算胃溃疡指数;检测小鼠胃组织中TP53、c-Jun、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白的表达水平。结果:共筛选出良附丸中的9个活性成分(如异鼠李素、 β -谷甾醇、山柰酚等)和166个共同靶点。良附丸可通过细胞对化学刺激的反应、蛋白质结合、细胞外空间等GO功能,以及癌症信号通路、乙型肝炎、膀胱癌、胰腺癌、TNF信号通路、前列腺癌等KEGG通路发挥治疗胃溃疡作用。动物实验结果显示,与模型组比较,良附丸能显著降低小鼠胃组织病变情况和胃溃疡指数,以及TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt和TNF- α 蛋白的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:筛选出了良附丸治疗胃溃疡的9个活性成分和166个靶点;良附丸可通过抑制MAPK、NF- κ B、TNF和PI3K/Akt等多条通路等,抑制炎症因子的表达,从而发挥改善胃溃疡的作用。
关键词 良附丸;网络药理学;胃溃疡;作用机制;小鼠

Study on Network Pharmacology Mechanism of Liangfu Pills in the Treatment of Gastric Ulcer

WEI Qing¹, LIANG Shanshan¹, JIANG Shanshan¹, WEI Na² (1. College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. College of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 570100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the mechanism of Liangfu pills in the treatment of gastric ulcer. **METHODS:** Based on network pharmacology, the active ingredients, targets and gastric ulcer related targets of Liangfu pill were screened by searching TCMSP, GeneCards, OMIM and DisGeNET databases, and the common targets of Liangfu pill and gastric ulcer were screened by Venny 2.1 software. The protein interaction network of Liangfu pill in the treatment of gastric ulcer was constructed by STRING database. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct topological analysis of the network. The function of GO and the enrichment of KEGG pathway were analyzed by DAVID database. Active component-gastric ulcer target-KEGG pathway network was constructed for Liangfu pill. In animal experiment, mice were randomly divided into blank group, model group, ranitidine group (positive control, 39 mg/kg), Liangfu pill low-, medium- and high- dose groups (0.78, 1.56, 3.12 g/kg), and were given corresponding drugs intragastrically, once a day, for consecutive 7 days. After last administration, except for blank group, the other groups were given absolute ethanol (0.01 mL/g) intragastrically to induce the gastric ulcer model. After modeling, the pathological changes of gastric tissue were observed and the gastric ulcer index was calculated; the expression of TP53, c-Jun, p38 MAPK, Akt, p-Akt and TNF- α protein in gastric tissues of mice were detected. **RESULTS:** A total of 9 active ingredients (i.g. isorhamnetin, β -gsterol, kaempferol) and 166 common targets were screened in Liangfu pills. Liangfu pill can treat gastric ulcer through GO functions such as cell response to chemical stimulation, protein binding and extracellular space, and KEGG pathways such as cancer signaling pathway, hepatitis B, bladder cancer, pancreatic cancer, TNF signaling pathway and prostate. The results of animal experiments showed that compared with model group, Liangfu pills could significantly reduce the pathological changes of gastric tissue and gastric ulcer index, as well as the protein expression of TP53, c-Jun, p38 MAPK, Akt, p-Akt and TNF- α ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** The 9 active components and 166

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660649);贵州省优秀青年科技人才项目(No.黔科合平台人才[2019]5658);贵州中医药大学博士启动基金项目(No.2019-38);贵州中医药大学科研项目(No.贵中医科院内[2019]39号)
* 讲师,博士。研究方向:中药药效物质基础及作用机理。电话:0851-88308060。E-mail:997845460@qq.com
通信作者:教授,博士。研究方向:中药药效物质基础及作用机理。E-mail:weina-0613@163.com

targets of Liangfu pill were screened out. Liangfu pill can inhibit the expression of inflammatory factors by inhibiting MAPK, NF- κ B, TNF and PI3K/Akt signaling pathway, and thus play an important role in improving gastric ulcer.

KEYWORDS Liangfu pills; Network pharmacology; Gastric ulcer; Mechanism; Mice

胃溃疡是一种常见的消化系统疾病,随着人们年龄增长和工作压力的增加,胃溃疡的发病率不断升高;胃溃疡的形成是一个复杂的多因素过程,与保护性和侵袭性因子之间的生物学平衡失调及胃黏膜损害有关^[1-2]。慢性饮酒、吸烟、压力、幽门螺杆菌感染等是导致消化性溃疡的最常见原因,若治疗不及时,患者胃部可出现出血、穿孔、梗阻,甚至癌变等并发症^[3]。

良附丸始载于清代《良方集腋》,由高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 和香附 *Cyperus rotundus* L. 两味药组成,具有疏肝理气、温胃祛寒的功效,临床常用于胃痛、消化性溃疡、胃癌、胆囊炎的治疗^[4]。现代药理学研究发现,良附丸具有抗应激性溃疡,降低胃肠蠕动、胃酸酸度和胃蛋白酶活性,以及抗炎镇痛的药理作用^[5]。

网络药理学是以系统生物学的理论为基础,应用组学、网络可视化等多种方法,建立系统网络模型,从整体上考察药物对疾病的干预与影响,揭示药物、疾病、靶点与通路之间的复杂关系,对中药作用机制以及新药研发具有重要意义^[6-8]。基于此,本课题组采用网络药理学方法,挖掘良附丸治疗胃溃疡的活性成分,预测其作用靶点及相关信号通路,探讨良附丸抗胃溃疡的作用机制,并进一步通过动物实验进行验证,以期为良附丸的进一步开发与利用提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: VictorTMX3 型多标记微孔板酶标仪(美国PekinElmer公司), TDL-4 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂), SZN45N-B4 舜宇电视显微镜(河南予华仪器有限公司), Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白转膜仪、Power Pac Basic 型电泳仪(美国BioRad公司), Odyssey 红外荧光扫描系统(美国LI-COR公司), R-200 型旋转蒸发仪(日本Buchi公司)。

1.2 主要药品与试剂

高良姜和香附均购自广州弘联医药药材有限公司(批号分别为20201105、20201112),经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定分别为姜科山姜属植物高良姜 *A. officinarum* Hance 的干燥根茎和莎草科植物莎草 *C. rotundus* L. 的干燥根茎;所用药品与试剂主要有盐酸雷尼替丁胶囊(山西云鹏制药有限公司,批号G180402,规格按雷尼替丁计为0.15 g),无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号20201011,纯度99.0%),小鼠胃泌素(GAS)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附

法(ELISA)试剂盒(武汉华联科生物工程有限公司,批号分别为20190618、20200613、20200606),兔源细胞肿瘤抗原p53(TP53)单克隆抗体、兔源c-Jun单克隆抗体、兔源p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)多克隆抗体、兔源苏氨酸激酶(Akt)多克隆抗体、兔源磷酸化Akt(p-Akt)多克隆抗体、兔源肿瘤坏死因子 α (TNF- α)单克隆抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab32049、ab40766、ab120235、ab38449、ab8805、ab109322),兔源GAPDH多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为5794s、7074),BCA蛋白定量试剂盒(福州飞净生物技术有限公司,批号PH0326),ECL超敏化学发光液(新赛美生物科技有限公司,批号P10100),哺乳动物蛋白抽提试剂(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号78502),蛋白酶抑制剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P1065、P0012A);其余试剂为实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性昆明小鼠,6~8周龄,体质量(19 ± 2) g,购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产合格证号为SCXK(湘)2019-0014。所有小鼠均饲养于12 h/12 h明暗交替的房间内,室内温度为(25.0 ± 1.0) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为(50.0 ± 10.0)%,均给予标准饲料和饮用水喂养。

2 方法与结果

2.1 良附丸活性成分的筛选及靶点预测

通过检索中药系统药理数据库(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)收集良附丸组方中药高良姜和香附的化学成分,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性指数(DL) ≥ 0.18 为筛选条件^[9],结合文献[10-12]确定高良姜和香附的活性成分,然后在TCMSP中点击“活性成分”选项,得到活性成分所对应的潜在蛋白靶点;将所有靶点合并去重后,通过Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)对蛋白名称进行标准化,即得到良附丸的潜在作用靶点。结果,共筛选出良附丸的9个活性成分,如异鼠李素、 β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素等,并获得206个潜在作用靶点。良附丸活性成分信息见表1。

2.2 良附丸活性成分与胃溃疡的共同靶点筛选

以“Gastric ulcer”为关键词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)

表1 良附丸活性成分信息

Tab 1 Active ingredients of Liangfu pills

化合物	来源	OB, %	DL
美迪紫檀素(Medicarpin)	高良姜	49.22	0.34
8-异戊烯基山柰酚(8-isopentenyl-kaempferol)	香附	38.04	0.39
延胡索乙素(Hyndarin)	香附	73.94	0.64
豆甾醇(Stigmasterol)	香附	43.83	0.76
木犀草素(Luteolin)	香附	36.16	0.25
异鼠李素(Isorhamnetin)	高良姜、香附	49.60	0.31
β -谷甾醇(β -sitosterol)	高良姜、香附	36.91	0.75
山柰酚(Kaempferol)	高良姜、香附	41.88	0.24
槲皮素(Quercetin)	高良姜、香附	46.43	0.28

www.omim.org/)、DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>)中检索收集胃溃疡相关的靶点基因,去重后即得到胃溃疡的相关靶点 3 724 个。将“2.1”项下收集的 206 个良附丸活性成分的潜在作用靶点和胃溃疡的相关靶点共同映射,通过 Venny 2.1 软件,找出两者共同的靶点,并绘制韦恩图。结果,共获得 166 个共同靶点,详见图 1。

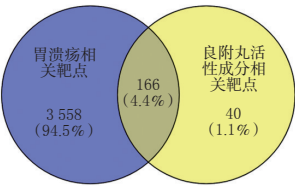


图1 良附丸活性成分与胃溃疡的共同靶点的韦恩图
Fig 1 Venn diagram of common targets of active ingredients of Liangfu pills and gastric ulcer

2.3 良附丸治疗胃溃疡的蛋白互作(PPI)网络的构建

将“2.2”项下的共同靶点上传至 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)中,构建 PPI 网络,设置置信度大于 0.7,其他参数设置不变,去掉网络中的单一节点,获得 PPI 结果。将 PPI 结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑分析,选取 Degree 大于中位数 2 倍(即 19)以上,且 Betweenness 大于中位数(即 0.013)的靶点作为良附丸治疗胃溃疡的核心靶点。结果,构建的 PPI 网络共有 164 个节点、3 250 条边,详见图 2。经拓扑分析共得到 15 个核心靶点,分别为 TP53、c-Jun、Akt1、MAPK1(丝裂原活化蛋白激酶 1)、TNF- α 、HSP90AA1(热休克蛋白 90 α 编码基因)、NF- κ B(核因子 κ B p65)、CXCL8(趋化因子配体 8)、IL-6、MAPK14、MAPK8、RB1(视网膜母细胞瘤基因 1)、ESR1(雌激素受体 α)、VEGFA(血管内皮生长因子)和 CCND1(细胞周期素 1)。

2.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将“2.2”项下的共同靶点输入 DAVIAD 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,以 $P < 0.05$ 筛选排名前 10 位的显著富集的 GO 功能和排名

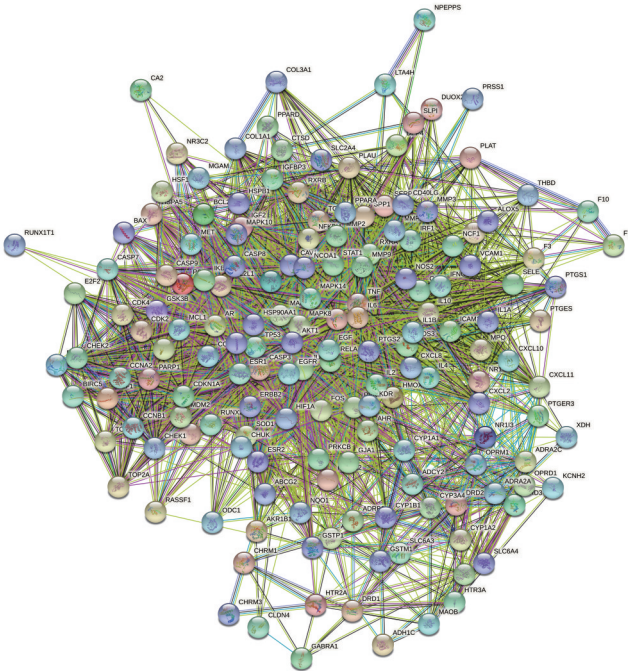


图2 良附丸治疗胃溃疡的 PPI 网络图
Fig 2 PPI network plot of Liangfu pills in the treatment of gastric ulcer

前 15 位的 KEGG 通路。采用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 Merge 功能,构建良附丸活性成分-胃溃疡靶点-KEGG 通路网络图,并筛选 Degree 值排名前 5 位的靶点。结果,良附丸治疗胃溃疡的 GO 功能主要包括 Cellular response to chemical stimulus(细胞对化学刺激的反应)、Response to chemical(对化学反应)、Positive regulation of biological process(积极调控生物过程)等生物过程,Identical protein binding(蛋白质结合)、Protein dimerization activity(蛋白质二聚活性)、Steroid hormone receptor activity(类固醇激素受体活性)等分子功能,以及 Extracellular space(细胞外空间)、Cytosol(细胞质溶胶)、Membrane Microdomain(膜微区)等细胞成分,详见图 3。共筛选出癌症、乙型肝炎、膀胱癌、胰腺癌、TNF 信号通路、前列腺癌等 KEGG 通路,详见表 2。构建的良附丸活性成分-胃溃疡靶点-KEGG 通路共有节点 185 个、边 453 条,详见图 4。Degree 值排名前 5 位的靶点分别为 TP53、c-Jun、Akt1、MAPK1、TNF- α 。

2.5 动物实验

基于上述筛选的良附丸治疗胃溃疡排名前 5 位的靶点蛋白(TP53、c-Jun、Akt1、MAPK1、TNF)进行动物实验,以探讨良附丸对胃溃疡的治疗作用并验证相关靶点。MAPK 可分为细胞外调节蛋白激酶(ERK)、p38、JNK 和 ERK5 这 4 个亚族,其中,ERK 广泛存在于各种组织,参与调控细胞的增殖、分化;JNK 家族是细胞对各种应激原诱导的信号转导的关键分子,参与细胞对辐射、

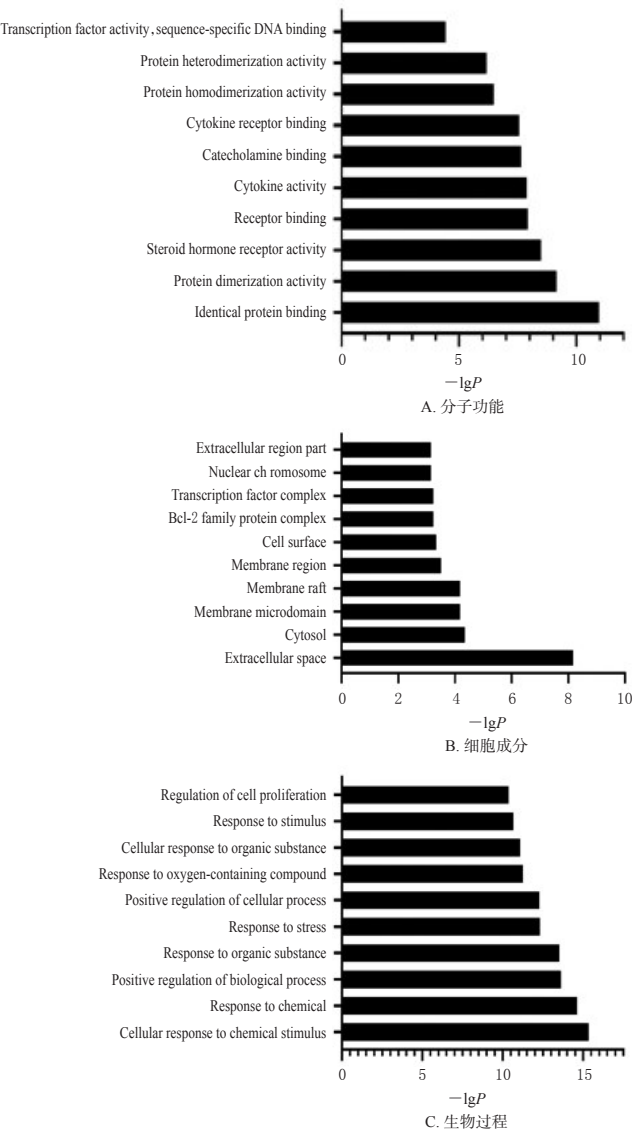
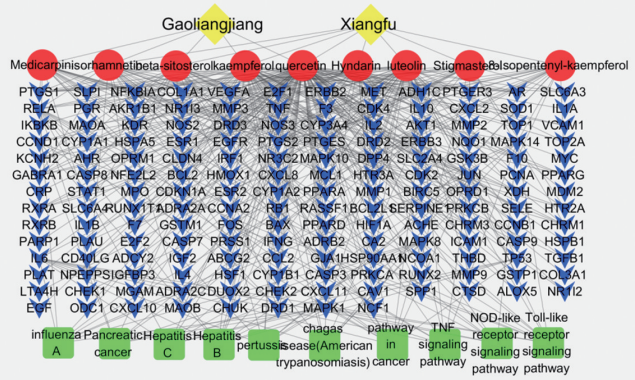


图3 良附丸治疗胃溃疡的GO功能富集图

Fig 3 Enrichment map of GO function of Liangfu pills in the treatment of gastric ulcer

表2 良附丸治疗胃溃疡的KEGG通路富集分析结果
Tab 2 Results of KEGG pathway enrichment analysis of Liangfu pills in the treatment of gastric ulcer

ID	通路名称	靶点数	P
hsa05200	癌症信号通路(Pathway in cancer)	50	1.0×10^{-30}
hsa05161	乙型肝炎(Hepatitis B)	34	5.1×10^{-26}
hsa05219	膀胱癌(Bladder cancer)	18	9.6×10^{-20}
hsa05212	胰腺癌(Pancreatic cancer)	20	4.2×10^{-18}
hsa04668	TNF信号通路(Pathway in TNF)	24	5.5×10^{-18}
hsa05215	前列腺癌(Prostate cancer)	21	1.2×10^{-16}
hsa05145	弓形虫病(Toxoplasmosis)	22	6.6×10^{-16}
hsa05142	南美锥虫病(美国锥虫病)(Chagas disease(American trypanosomiasis))	22	1.1×10^{-15}
hsa05205	癌症蛋白聚糖(Proteoglycans in cancer)	25	2.5×10^{-13}
hsa05222	小细胞肺癌(Small cell lung cancer)	18	4.9×10^{-13}
hsa05223	非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer)	15	5.8×10^{-13}
hsa05140	利什曼病(Leishmaniasis)	16	6.4×10^{-13}
hsa04620	Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)	19	7.9×10^{-13}
hsa05166	HTLV-I感染(HTLV-I infection)	27	1.9×10^{-12}
hsa05210	结肠癌(Colorectal cancer)	16	2.8×10^{-12}



注:菱形表示高良姜和香附;圆形表示良附丸治疗胃溃疡的活性成分;三角形表示良附丸治疗胃溃疡的靶点;正方形表示良附丸治疗胃溃疡的KEGG通路

Note: rhombus means *A. officinarum* and *C. rotundus*; circle means active components of Liangfu pill in the treatment of gastric ulcer; triangle means target of Liangfu pill in the treatment of gastric ulcer; square means KEGG pathway of Liangfu pill in the treatment of gastric ulcer

图4 良附丸活性成分-胃溃疡靶点-KEGG通路网络图
Fig 4 The network of Active ingredient of Liangfu pills-gastric ulcer target-KEGG pathway

渗透压、温度变化等应激反应;p38主要介导炎症、凋亡等^[13]。由于胃溃疡的产生多与炎症相关,因此选择MAPK亚蛋白p38 MAPK蛋白进行验证。

2.5.1 良附丸药液的制备 分别称取高良姜和香附药材各100 g,置于烧瓶中,加入1 600 mL水煎煮3次,每次2 h;过滤,合并3次滤液,于45 ℃水浴条件下减压旋蒸浓缩至1 g/mL(以生药量计,下同)。

2.5.2 分组、造模与给药 小鼠适应性饲养3天后,随机分成空白组、模型组、雷尼替丁组(阳性对照,39 mg/kg,根据临床等效剂量换算而得)和良附丸低、中、高剂量组(0.78、1.56、3.12 g/kg,剂量分别按临床等效剂量的1、2、4倍换算而得),每组10只。空白组、模型组大鼠灌胃生理盐水,其余各组小鼠灌胃相应药物(临用时以水溶解或稀释),灌胃体积均为10 mL/g,每天1次,连续7天。小鼠末次给药前禁食不禁水24 h,末次给药1 h后,除空白组外,其余组小鼠均一次性灌胃无水乙醇(0.01 mL/g)以复制胃溃疡模型。取3只模型组小鼠进行解剖,取其胃组织,参考文献[14—15]方法,测定小鼠胃溃疡指数。具体测定方法为:于体视显微镜下观察胃黏膜出血、溃疡的情况,测量所有溃疡面的长径并打分;长径≤1 mm者计为1分,>1~2 mm者计为2分,>2~3 mm者计为3分,>3~4 mm者计为4分,>4 mm者计为5分,合并所有溃疡面的计分即为小鼠溃疡指数。当小鼠胃溃疡指数大于20分时,表明造模成功。

2.5.3 样品采集 各组小鼠灌胃无水乙醇后,继续禁食不禁水1 h,然后摘眼球取血,血样以4 000 r/min离心15

min,取上层血清,于-20℃保存,备测。取血后,各组小鼠均脱颈椎处死,剖腹取全胃,沿胃大弯剪开,用生理盐水洗净,备用。

2.5.4 小鼠胃组织观察和胃溃疡指数的测定 取“2.5.3”项下各组小鼠的胃组织进行肉眼观察,并计算其胃溃疡指数。采用GraphPad Prime 8.0.1软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义(以下各项测定的统计学方法相同)。结果,空白组小鼠胃黏膜完整,无黏膜糜烂迹象;模型组小鼠胃组织可见出血性坏死和溃疡性血斑;与模型组比较,雷尼替丁组和良附丸各剂量组小鼠胃黏膜损伤均减轻,溃疡指数均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,低剂量组除外),详见图5、表3。

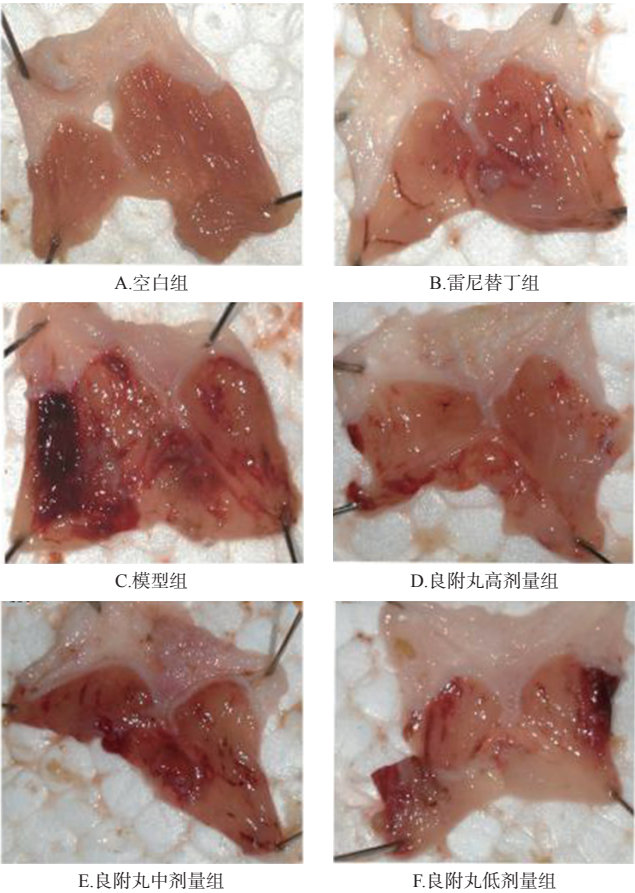


图5 各组小鼠胃组织观察结果

Fig 5 Results of observation of gastric tissue in mice of each group

2.5.5 小鼠胃组织中 TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt 和 TNF- α 蛋白表达水平的检测 采用 Western blot 法检测。取“2.5.3”项下的小鼠胃组织(良附丸组只测定高剂量组)适量,于冰上研碎至匀浆后,在4℃条件下以13 000 r/min离心10 min,取部分上清液,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白经煮沸变性后,进行十二烷基硫酸

表3 各组小鼠胃溃疡指数的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Determination results of gastric ulcer index in mice of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	溃疡指数	组别	溃疡指数
空白组		良附丸高剂量组	10.98 $\pm$ 5.29 ^{##}
模型组	23.15 $\pm$ 6.87	良附丸中剂量组	12.98 $\pm$ 6.83 [#]
雷尼替丁组	9.98 $\pm$ 2.29 ^{##}	良附丸低剂量组	15.28 $\pm$ 5.51

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

钠-聚丙烯酰胺电泳,然后转膜,以5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h;以TBST洗涤3次,分别加入TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt、TNF- α 、GAPDH一抗(稀释度均为1:1 000),4℃下孵育过夜;以TBST洗涤3次,加入二抗(稀释度为1:6 000),室温孵育2 h;以TBST洗涤3次,经ECL化学发光液显色后,于凝胶成像分析系统上成像。使用Image J 1.8.0软件分析,以目标蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带的灰度值的比值作为目标蛋白的表达水平。上述操作重复3次。结果,与空白组比较,模型组小鼠胃组织中TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt和TNF- α 蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,雷尼替丁组和良附丸高剂量组小鼠胃组织中上述5种蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图6、表4。

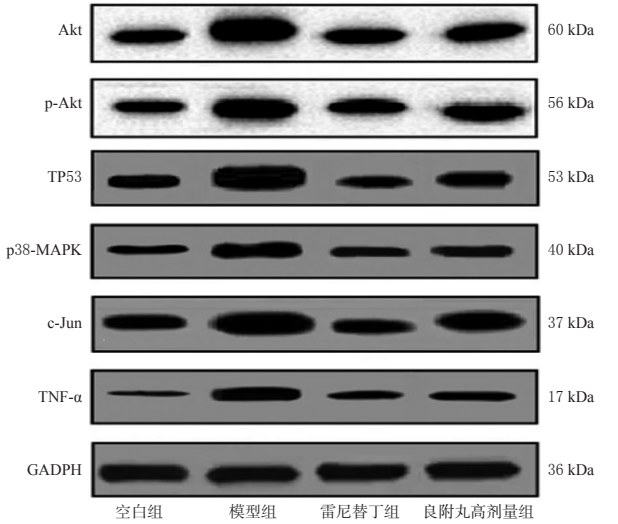


图6 各组小鼠胃组织中 TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt 和 TNF- α 蛋白表达的电泳图

Fig 6 Electrophoretogram of protein expression of TP53, c-Jun, p38 MAPK, Akt, p-Akt and TNF- α in gastric tissues of mice in each group

3 讨论

良附丸能够治疗肝郁气滞、胃有寒凝、脘腹疼痛、胸

表 4 各组小鼠胃组织中 TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt 和 TNF-α 蛋白表达水平的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Protein expression of TP53, c-Jun, p38 MAPK, Akt, p-Akt and TNF-α in gastric tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TP53	c-Jun	p38 MAPK	Akt	p-Akt	TNF-α
空白组	0.358±0.004	0.614±0.005	0.282±0.004	0.428±0.005	0.318±0.003	0.137±0.005
模型组	1.284±0.005**	1.252±0.012**	1.136±0.005**	1.223±0.008*	0.998±0.009**	0.965±0.008**
雷尼替丁组	0.343±0.005 ^{##}	0.592±0.006 ^{##}	0.374±0.004 ^{##}	0.536±0.006 ^{##}	0.369±0.004 ^{##}	0.256±0.004 ^{##}
良附丸高剂量组	0.482±0.004 ^{##}	0.868±0.005 ^{##}	0.4213±0.003 ^{##}	0.678±0.006 ^{##}	0.497±0.004 ^{##}	0.298±0.005 ^{##}

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$

Note: vs. control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

胁胀痛、痛经等疾病^[6]，其在临床上的疗效已被广泛认可，但其作用机制尚不明确^[6]。为了进一步研究良附丸治疗胃溃疡的作用机制，本文先应用网络药理学方法对良附丸中的活性成分进行筛选，并预测其治疗胃溃疡的关键靶点和信号通路；然后，基于关键靶点的筛选结果，通过动物实验进行验证，以期为后续良附丸作用机制的研究提供理论基础。

本研究结果显示，从良附丸中共筛选出 9 个活性成分，包括异鼠李素、山柰酚、槲皮素等。相关研究表明，槲皮素和山柰酚可显著改善大鼠经乙醇、盐酸、吲哚美辛、幽门结扎等因素诱导的胃溃疡，且可有效减轻其氧化应激，减少胃酸的分泌，从而起到抗胃溃疡的作用^[17-19]。这提示黄酮类化合物对胃溃疡有一定的治疗作用。

本研究通过 TCMSP、OMIM、DisGeNET 和 GeneCards 等数据库共筛选出良附丸活性成分和胃溃疡的共同基因 166 个；进一步通过 STRING 数据库和 Cytospace 软件筛选出 15 个核心靶点；然后通过 DAVIAD 网站进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，构建良附丸活性成分-胃溃疡靶点-KEGG 通路网络图；并依据 Degree 值，筛选了排名前 5 位的靶点，包括 TP53、c-Jun、Akt1、MAPK1、TNF-α。

相关研究发现，TP53 蛋白表达的升高会引起胃黏膜相关的炎症反应，从而引发溃疡；此外，TP53 还可调控细胞周期 G₁、G₂ 期并介导凋亡，从而发挥调节细胞生长和增殖的作用^[20]。MAPK 通路是细胞内信息传递的主要途径，参与了细胞外信号从细胞表面到内部的信号传导过程；当 MAPK 通路激活后，可促使 ERK 和 p38 MAPK 转移到细胞核中^[13]。一方面，活化的 ERK1/2 可促进 c-Jun 的表达，进而调节 Bcl-2 家族促凋亡成员的线粒体透化作用来上调黏膜细胞凋亡^[21]；另一方面，p38 MAPK

转移到细胞核后，主要参与机体细胞的生长、增殖分化、凋亡及炎症等重要过程，而且活化的 p38 MAPK 可以调控下游多种酶及转录因子的基因表达，促使局部组织发生急性炎症、凋亡等病理改变^[22-23]。

相关研究发现，胃溃疡模型大鼠胃黏膜中的 PI3K、Akt mRNA 和蛋白的表达水平均升高，经药物干预后，大鼠胃黏膜中的上述指标的表达水平均降低^[24]。由此说明，PI3K/Akt 信号通路可参与调控胃溃疡模型大鼠的胃黏膜病变。

研究发现，TNF-α 由巨噬细胞和淋巴细胞等产生，能够刺激线粒体，还可以激活黄嘌呤氧化酶产生超氧阴离子，进而刺激 TLR (Toll 样受体) 蛋白，激活 NF-κB 转录因子；活化的 NF-κB 能促进下游靶细胞释放更多的 TNF-α^[25]。在应激性状态下，TNF-α 能引起大量中性粒细胞聚集，从而使得胃黏膜受损，进一步导致溃疡的形成^[26]。相关研究表明，胃溃疡模型大鼠胃黏膜中 NF-κB 和 TNF-α 的蛋白的表达水平均升高；经药物干预后，大鼠胃黏膜中的上述指标的表达水平均降低^[27-28]。由此说明，NF-κB 或 TNF 信号通路可参与调控胃溃疡的发生。

本研究对小鼠灌胃良附丸药液后，再一次性灌胃乙醇，以复制胃溃疡模型小鼠。结果发现，与模型组比较，良附丸可降低小鼠胃组织中 TP53、c-Jun、p38 MAPK、Akt、p-Akt 和 TNF-α 蛋白的表达水平。这提示良附丸可能通过抑制 MAPK、NF-κB、TNF 和 PI3K/Akt 等多条通路共同改善胃溃疡，由此也验证了网络药理学预测的良附丸中活性成分对于胃溃疡靶点的作用。

综上所述，本文通过网络药理学筛选出了良附丸治疗胃溃疡的 9 个活性成分和 166 个靶点，这些靶点可通过多种信号通路共同发挥治疗作用；经动物实验验证后发现，良附丸可通过抑制 MAPK、NF-κB、TNF 和 PI3K/Akt 等多条通路，抑制炎症因子的表达，从而发挥改善胃溃疡的作用。

参考文献

[1] DARIANE T S, RENATA F R, NATALIA M M, et al. Natural deep eutectic solvent (NADES)-based blueberry extracts protect against ethanol-induced gastric ulcer in rats[J]. Food Res Int, 2020, 138(Pt A): 109718.

[2] ALAZZOUNI A S, FATHALLA A S, GABRIM S, et al. Role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells against gastric ulceration: histological, immunohistochemical and ultrastructural study[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(12): 3456-3464.

[3] 李朝芬. 奥美拉唑治疗胃溃疡的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(41): 77.

- [4] 谢利利.加味良附丸治疗胃溃疡疗效观察[J].中国中医基础医学杂志,2015,21(6):756.
- [5] 周义浪,吴晓勇,侯丽,等.新加良附方抗胃癌效应机制研究[J].贵阳中医学院学报,2012,34(3):22-24.
- [6] 许海玉,黄璐琦,卢鹏,等.基于体内 ADME 过程和网络药理学的中药现代研究思路[J].中国中药杂志,2012,37(2):142-145.
- [7] 王萍,唐仕欢,苏瑾,等.基于整合药理学的中药现代研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(7):1297-1302.
- [8] 李学军,许海玉.网络药理学与中药研究[J].药学报,2018,53(9):1385-1386.
- [9] GUO W, HUANG J H, WANG N, et al. Integrating network pharmacology and pharmacological evaluation for deciphering the action mechanism of herbal formula Zuo-jin Pill in suppressing hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1-21.
- [10] 魏晴.高良姜化学成分及细胞毒活性研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [11] 魏娜.高良姜抗胃溃疡药理作用及其药效物质基础研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [12] 潘少斌,孔娜,李静,等.香附化学成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2019,21(10):1429-1434.
- [13] LV H, ZHU C, LIANG Y J, et al. Tenuigenin ameliorates acute lung injury by inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2015, 216: 43-51.
- [14] 魏晴,梁珊珊,熊瑞,等.艳山姜提取物对急性胃溃疡模型小鼠的保护作用研究[J].中国药房,2020,31(18):2190-2195.
- [15] 魏娜,谭银丰,魏晴,等.高良姜不同提取部位对实验性胃溃疡的影响及作用机理研究[J].海南医学院学报,2015,21(2):158-160.
- [16] 马平平,毕珺辉,徐丹,等.良附丸对4种实验性胃溃疡模型大鼠的防治效果[J].中医药信息,2018,35(5):9-12.
- [17] BEBER A P, DE SOUZA P, BOEING T, et al. Constituents of leaves from *Bauhinia curvula* Benth. exert gastro-protective activity in rodents: role of quercitrin and kaempferol [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(2): 539-550.
- [18] LI Q, HU X, XUAN Y, et al. Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2018, 50(3): 246-253.
- [19] 梁雪冰,孙俊,赵国平.半夏泻心汤活性成分最佳组合筛选及其对胃溃疡大鼠 Leptin、ET-1 的影响[J].中药材,2012,35(10):1637-1640.
- [20] CESAR A C G, CALMON M F, CURY P M, et al. Genetic alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(4): 625-629.
- [21] LU T H, HSIEH S Y, YEN C C, et al. Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury[J]. Toxicol Lett, 2011, 204: 71-80.
- [22] ARAB H H, SALAMA S A, EID A H, et al. Targeting MAPKs, NF- κ B, and PI3K/AKT pathways by methyl palmitate ameliorates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22424-22438.
- [23] CHANG X Y, LUO F, JIANG W J, et al. Protective activity of salidroside against ethanol-induced gastric ulcer via the MAPK/NF- κ B pathway in vivo and in vitro[J]. Inter Immun, 2015, 28: 604-615.
- [24] 巩子汉,王艳威,段永强,等.白及多糖对GU模型大鼠胃组织 PI3K/AKT 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(6):52-57.
- [25] WANG Y, WANG S, BAO Y R, et al. Multipathway integrated adjustment mechanism of Glycyrrhiza triterpenes curing gastric ulcer in rats[J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(50): 209-215.
- [26] LIN K W, WANG Y, GONG J W, et al. Protective effects of total flavonoids from *Alpinia officinarum* rhizoma against ethanol-induced gastric ulcer in vivo and in vitro[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 854-862.
- [27] 巩子汉,王强,段永强,等.白及多糖对胃溃疡模型大鼠溃疡病灶组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 及 JNK、p38 MAPK 基因蛋白表达的影响[J].中药药理与临床,2019,35(4): 90-95.
- [28] 巩子汉,段永强,成映霞,等.白及多糖对胃溃疡模型大鼠胃组织 IL-17、IL-23、TLR-4 及 NF- κ B p65 基因和蛋白表达水平影响的研究[J].中国免疫学杂志,2020,36(7): 821-826.

(收稿日期:2021-01-15 修回日期:2021-02-26)

(编辑:唐晓莲)