

• 药理 •

基于整合网络分析柿蒂治疗顽固性呃逆的 药效物质基础及作用机制

刘 方¹ 陈 宽² 段灿灿³ 晏仁义⁴ 李晓飞^{1*} 张建永²

(1. 遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000; 3. 遵义医学院基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563000; 4. 天津益倍元天然产物技术有限公司, 天津 300457)

摘要 目的: 整合多元网络分析柿蒂治疗顽固性呃逆的药效物质基础及作用机制。方法: 检索中国知网、万方、PubMed 和 TCMSp 等数据库获取柿蒂中的化合物, 采用 Targetnet 数据库对化合物进行潜在靶点预测, 将靶点导入 CTD 数据库获得对应疾病, 采用在线分析数据库 DAVID 对靶点进行基因功能及通路富集分析。最后以 Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络、靶点-疾病网络。提取度值较高的靶点和化合物及通路, 构建“核心化合物-核心靶点-信号通路”核心网络。结果: 本研究共收集柿蒂中 22 个化合物, 可作用于 77 个靶点。通过多元及核心网络分析, 柿蒂中的化合物可通过作用于 PTPN1、ALOX15、BCL2A1、MIF、ESR2、DNMT1、TLR9 等关键靶点, 进一步调节 Bile secretion pathway、Ovarian steroidogenesis pathway、Steroid hormone biosynthesis pathway 等信号通路来发挥治疗各种疾病引起的顽固性呃逆。结论: 本研究体现了柿蒂多化合物、多靶点、多途径的作用规律, 为深入开展柿蒂治疗顽固性呃逆的作用机制研究提供新的依据。

关键词 柿蒂; 顽固性呃逆; 网络药理学; 核心网络; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2019)09-2133-09

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.09.034

Study on Material Basis of Effectiveness and Mechanism of *Diospyros kaki* for Treating Intractable Hiccups by Integrative Network

LIU Fang¹, CHEN Kuan², DUAN Can-can³, YAN Ren-yi⁴, LI Xiao-fei¹, ZHANG Jian-yong²

(1. Basic Medical School, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 2. College of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 3. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine, Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 4. Tianjin Ubasic-Ingredient Natural Products Co. Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract Objective: To explore the material basis of effectiveness and mechanism of *Diospyros kaki* on the treatment of intractable hiccups based on integrated multivariate network. Methods: The main compounds in *Diospyros kaki* were obtained by searching CNKI, Wanfang, PubMed and TCMSp databases. The potential target was predicted by Targetnet database. The associated diseases of these targets were got by CTD database. The gene function and pathway enrichment analysis of targets were performed using the online analysis database DAVID. The compound-target network, target-disease network and “core compound-core target-signal pathway” network were constructed by Cytoscape software. Results: A total of 22 compounds in *Diospyros kaki* were collected, and 77 targets were acted with these compounds. After multivariate and core network analysis, the compounds in *Diospyros kaki* could by acting on PTPN1, ALOX15, BCL2A1, MIF, ESR2, DNMT1, TLR9 and other key targets, such as further regulating Bile secretion pathway, Ovarian steroidogenesis pathway, Steroid hormone biosynthesis pathway and other signaling pathways to treat various diseases cause of intractable hiccups. Conclusion: This study embodies the action of multiple compounds, multiple targets and multiple pathways, which will provide a new basis for further development of the mechanism of *Diospyros kaki* in treating intractable hiccups.

Key words *Diospyros kaki* Thunb.; Intractable hiccups; Network pharmacology; Core network; Mechanism of action

柿子为柿树科植物果实的统称。我国柿子资源丰富, 广西、陕西、山西、河南、河北、山东、北京等地

均有大量栽培。柿蒂是柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的干燥宿萼, 别名柿钱、柿丁、柿子把、柿萼, 是柿的重

收稿日期: 2018-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(81803838, 81760746); 贵州省教育厅科技拔尖人才(黔教合 KY 字[2017]078); 贵州省药国内一流学科建设(YLXKJS-YS-05)

作者简介: 刘方(1989-), 女, 在读硕士研究生, 专业方向: 中药作用机理研究; Tel: 17375715525, E-mail: 274302308@qq.com。

* 通讯作者: 李晓飞, Tel: 18275608435, E-mail: lixiaofei35@sohu.com。

要药用部位。味苦、涩,性温,入胃经、肺经,有降逆止呕的功效。现代研究发现柿蒂含黄酮类和三萜酸类等化合物,具有抑制膈肌收缩作用、抗氧化及抗肿瘤等作用。

目前临床上常用柿蒂治疗呃逆、呕吐等,尤其对顽固性呃逆有较好的疗效。西医认为呃逆为膈肌痉挛所致,常并发于胃神经官能症、胃炎,甚至肝硬化、重型肝炎、脑出血、尿毒症等严重疾病,目前临床治疗策略有限。柿蒂作为降逆止呕之要药,临床常用柿蒂单方或复方治疗上述疾病引起的顽固性呃逆^[1-3],然而柿蒂治疗顽固性呃逆的药效物质和作用机制尚未明确。

网络药理学作为多学科融合形成的新兴学科,旨在通过多种数据库检索、组学数据整合分析和计算机模拟等方法构建多层次多维网络,从而实现从系统水平研究药物与机体互作关系及规律。其以整体视角了解药物在生物系统中的复杂作用,特别适合于多化合物、多靶点、多途径的中药现代化研究,相对于传统实验药理学方法,具有更全面更系统的特点。本研究借助网络药理学挖掘柿蒂治疗顽固性呃逆的药效物质基础及作用靶点,从系统水平揭示柿蒂治疗呃逆作用的科学内涵,为柿蒂资源的深入开发及应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 软件和数据库 中国知网、万方数据库、PubMed 数据库、TCMSP 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、Chemical Book(<http://www.chemicalbook.com>)、ADMETlab 数据库(<http://admet.scbdd.com>)、Targetnet 数据库(<http://targetnet.scbdd.com>)、Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org>)、CTD 数据库(<https://ctdbase.org/tools/batchQuery.go>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)、DAVID(<https://david.ncifcrf.gov>)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路数据库(<http://www.Genome.jp/kegg/>)、Omicshare 软件、Cytoscape 3.6.1 软件。

1.2 柿蒂中化合物的收集 本研究首先通过中国知网、万方、PubMed 数据库和 TCMSP 数据库检索,收集柿蒂中分离得到的化合物,再利用 PubChem、Chemical Book 和 ADMETlab 数据库等平台对其分子结构进行确证,最后采用 ChemBioDraw13.0 软件绘制分子结构,优化结构后,统一保存为“sdf”格式文件。

1.3 柿蒂化合物潜在靶点预测 通过 Targetnet 数据库对化合物进行潜在靶点预测,遴选条件为 AUC

≥ 0.7 方法在线预测,其中 AUC 表示所采用方法的模型预测准确率,ECFP4 属于 Margan 指纹的一种,通过设定原环境 2、4、6,然后通过 Python 软件中的 PyDPI 计算各种分子描述符合指纹。经过预测得到含 Uniprot_ID、Protein、Prob(>0.7) 等信息的靶点群,删除重复项后获得柿蒂化合物作用的潜在靶点。再利用 UniProt 数据库筛选对应人源的潜在靶点。

1.4 化合物-靶点网络构建与分析 采用 Cytoscape 软件,将化合物与靶点对应关系的 Excel 数据构建“化合物-靶点”网络,进一步以 Network analysis 插件对网络特征指标度(degree)和介数(Betweenness)进行分析。

1.5 靶点-疾病网络构建与分析 将上述靶点基因导入 CTD 数据库,得到含疾病名称、疾病分类等数据,本研究首先查询基因相关疾病,基于中医认为呃逆病位在胃,即消化类器官,同时西医的各种疾病引起呃逆的病位也是消化系统。因此本研究剔除不含消化类疾病(柿蒂传统功效相关)信息的靶点,然后采用 Cytoscape 软件构建“靶点-疾病”网络,进一步以 Network analysis 插件对 degree、Betweenness 进行分析。并根据人类孟德尔遗传数据库(OMIM)的疾病分类系统对不同类别疾病进行归纳。

1.6 靶点蛋白的基因功能通路分析 为进一步分析潜在作用靶点的基因功能及其参与的主要信号通路,本研究采用在线分析数据库 DAVID 等对柿蒂作用的靶点蛋白进行基因功能分析及 KEGG 通路富集分析,设定阈值 $P\text{-value} < 0.05$,研究靶点参与的主要信号通路。并使用 Omicshare 在线分析平台对富集分析结果进行可视化,探讨柿蒂治疗各种疾病引起的顽固性呃逆相关的机制。

1.7 核心化合物-核心靶点-信号通路整合网络分析 进一步分析已经建立的“化合物-靶点”网络,取 2 倍 degree 中位数为核心节点,遴选核心化合物和核心靶点。再根据核心化合物建立核心靶点的对应关系,再根据核心靶点找到相应的信号通路,将其导入到 Cytoscape 软件构建“核心化合物-核心靶点-通路”网络。在此基础上,通过网络分析,探究柿蒂治疗各种疾病引起的顽固性呃逆的药效物质基础及作用机制。

2 结果

2.1 柿蒂中化合物的收集 本研究通过文献检索及各种数据库等共获得与柿蒂相关的化合物 22 个(表 1)。

2.2 化合物-靶点的网络分析 如图 1 所示,柿蒂治疗顽固性呃逆的“化合物-靶点”网络共有 99 个节

表 1 柿蒂中化合物信息

| 编号 | 化合物名称 | 度 | 编号 | 化合物名称 | 度 |
|-----|---------------------------------------|----|-----|--|----|
| C1 | Quercetin | 33 | C12 | Succinic acid | 37 |
| C2 | Kaempferol | 34 | C13 | Vanillic acid | 43 |
| C3 | Hyperoside | 16 | C14 | Gallic acid | 42 |
| C4 | Trifolin | 17 | C15 | β -Sitosterol | 10 |
| C5 | Betulinic acid | 8 | C16 | β -Sitosterol- <i>D</i> -glucoside | 3 |
| C6 | Pomolic acid | 6 | C17 | Friedelin | 10 |
| C7 | Ursolic acid | 7 | C18 | Syringic acid | 34 |
| C8 | 19 α 24-dihydroxy ursolic acid | 6 | C19 | Ethyl gallate | 28 |
| C9 | Barbinervic acid | 3 | C20 | QCGG | 15 |
| C10 | Oleanolic acid | 7 | C21 | 24-hydroxylolean acid | 6 |
| C11 | Stearic acid | 24 | C22 | 19 β -hydroxyursolic acid | 10 |

点,其中包含了 22 个化合物,77 个靶点。它们由 388 条边相连构成一个完整的网络,平均节点度为 3.9,其中度值排名靠前的化合物是 vanillic acid(degree = 43)、gallic acid(degree = 42)、succinic acid(degree = 37)、syringic acid(degree = 34)、kaempferol(de-

gree = 34)、quercetin(degree = 33),度值排名靠前的靶点是 PTPN1(degree = 19)、TLR9(degree = 12)、ALOX15(degree = 11)、BCL2A1(degree = 11)、DNMT1(degree = 10)、ESR2(degree = 10)、MIF(degree = 10)。

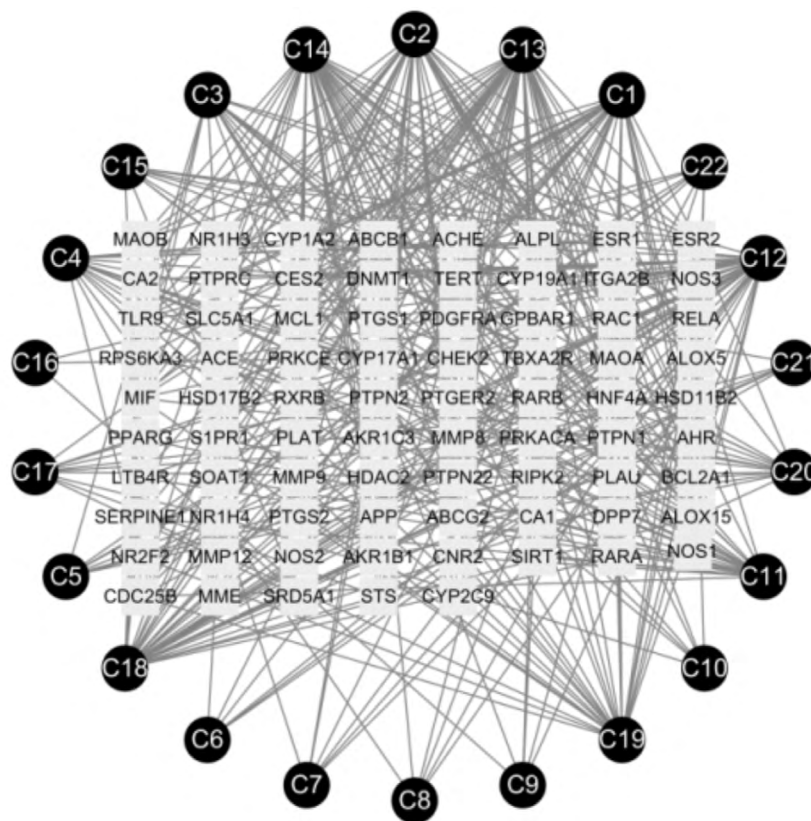


图 1 柿蒂化合物-靶点-网络图

2.3 靶点-疾病网络分析 经分析,剔除不符合消化相关的疾病,柿蒂的潜在作用靶点与 50 种疾病相关,本研究以 degree>2, betweenness>0 进一步筛选,最后得到疾病共 31 种(表 2)。根据人类孟德尔遗传数据库(OMIM)对所得疾病进行分类,得到常见消化系统疾病、伴随消化系统肿瘤、其他类消化系统

疾病三大类。如图 2 所示,将上述靶点-疾病之间的相互作用采用 cytoscape 3.6.1 构建网络图,其中 A、B、C 分别代表常见消化系统疾病(Digestive system disease)、消化系统肿瘤、其他类消化系统疾病。网络分析可知,77 个靶点作用于 50 种疾病,在网络中除部分靶点无对应的疾病外,每一个靶点至少与一

种疾病相关。其中常见消化系统疾病的作用靶点较多(degree 为 118) ,而肿瘤消化系统疾病次之(degree 为 92) 、其他类消化系统疾病最少(degree 为 9) 。表明柿蒂可能在治疗消化系统疾病引起的呃逆方面具有优势 ,符合中医将柿蒂用于治疗“病位在胃”的呃逆的传统。现代临床实践证明柿蒂单方及其复方常被用于上述疾病的治疗 ,在一定程度上证明本研究策略的可行性。

2.4 GO 生物进程分析 将柿蒂作用的 77 个靶点进行 GO 生物进程富集 ,生物进程层级关系如图 3 所示 ,选取前 10 个 GO 生物过程(如表 3 所示) ,其中骨吸收、血管平滑肌细胞增殖、镉离子响应涉及基因数目较多 ,其余 7 个 GO 生物进程 ,提示顽固性呃逆可能涉及胶原分解过程、GABAergic 突触传递调

控、GABA 能突触传递、孕酮反应、凋亡细胞清除、骨重建的调节、骨吸收调节等多种生物进程 ,而柿蒂可以通过调节以上生物进程来治疗各种疾病引起的顽固性呃逆。

2.5 KEGG 通路富集分析 采用在线分析数据库 DAVID 将网络中 77 个靶点的 KEGG 通路富集分析 ,结果如图 4 所示 ,本研究通过 Rich factor、P 值 < 0.05 富集到通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度。其中 Rich factor 指差异表达的基因中位于该通路条目的基因数目与所有注释基因中位于该通路条目的目的基因总数的比值。Rich factor 越大 ,表示富集的程度越高。研究的关键靶蛋白主要富集于 Bile secretion pathway (A) 、Ovarian steroidogenesis pathway(B) 以及 Steroid hormone biosynthesis pathway

表 2 柿蒂作用于疾病分类相关信息(degree>2、betweenness>0)

| Disease Name | Disease Categories | Degree | Betweenness |
|--|--|--------|-------------|
| Carcinoma ,Hepatocellular | Cancer Digestive system disease | 11 | 0.09102784 |
| Stomach Neoplasms | Cancer Digestive system disease | 10 | 0.06804446 |
| Colonic Neoplasms | Cancer Digestive system disease | 9 | 0.09557297 |
| Colorectal Neoplasms | Cancer Digestive system disease | 8 | 0.05630075 |
| Liver Neoplasms | Cancer Digestive system disease | 7 | 0.01848956 |
| Esophageal Neoplasms | Cancer Digestive system disease | 7 | 0.05134717 |
| Barrett Esophagus | Cancer Digestive system disease | 4 | 0.02185601 |
| Esophageal Squamous Cell Carcinoma | Cancer Digestive system disease | 3 | 0.00787574 |
| Pancreatic Neoplasms | Cancer Digestivesystem disease Endocrine system disease | 6 | 0.02579763 |
| Liver Cirrhosis ,Experimental | Digestive system disease | 29 | 0.38706966 |
| Chemical and Drug Induced Liver Injury | Digestive system disease | 12 | 0.12457115 |
| Liver Diseases | Digestive system disease | 9 | 0.06537193 |
| Non-alcoholic Fatty Liver Disease | Digestive system disease | 7 | 0.04513472 |
| Cholestasis | Digestive system disease | 6 | 0.02748916 |
| Colitis | Digestive system disease | 6 | 0.03255853 |
| Fatty Liver | Digestive system disease | 6 | 0.04204892 |
| Liver Cirrhosis | Digestive system disease | 5 | 0.03703928 |
| Colitis ,Ulcerative | Digestive system disease | 5 | 0.04211690 |
| Stomach Ulcer | Digestive system disease | 5 | 0.01586139 |
| Crohn Disease | Digestive system disease | 5 | 0.04115280 |
| Cholestasis ,Extrahepatic | Digestive system disease | 4 | 0.00550048 |
| Liver Cirrhosis ,Biliary | Digestive system disease | 4 | 0.00887849 |
| Hepatic Insufficiency | Digestive system disease | 3 | 0.00255824 |
| Inflammatory Bowel Diseases | Digestive system disease | 2 | 0.01612903 |
| Duodenal Ulcer | Digestive system disease | 2 | 0.00213421 |
| Pancreatitis | Digestive system disease | 2 | 0.00443389 |
| End Stage Liver Disease | Digestive system disease | 2 | 0.00122205 |
| Enterocolitis ,Necrotizing | Digestive system disease | 2 | 0.00096593 |
| Intestinal Perforation | Digestive system disease | 2 | 0.02839129 |
| Hepatic Encephalopathy | Digestive system disease Metabolicdisease Nervous system disease | 3 | 0.02164176 |
| Hepatomegaly | Digestive system disease Pathology(anatomical condition) | 6 | 0.03955862 |

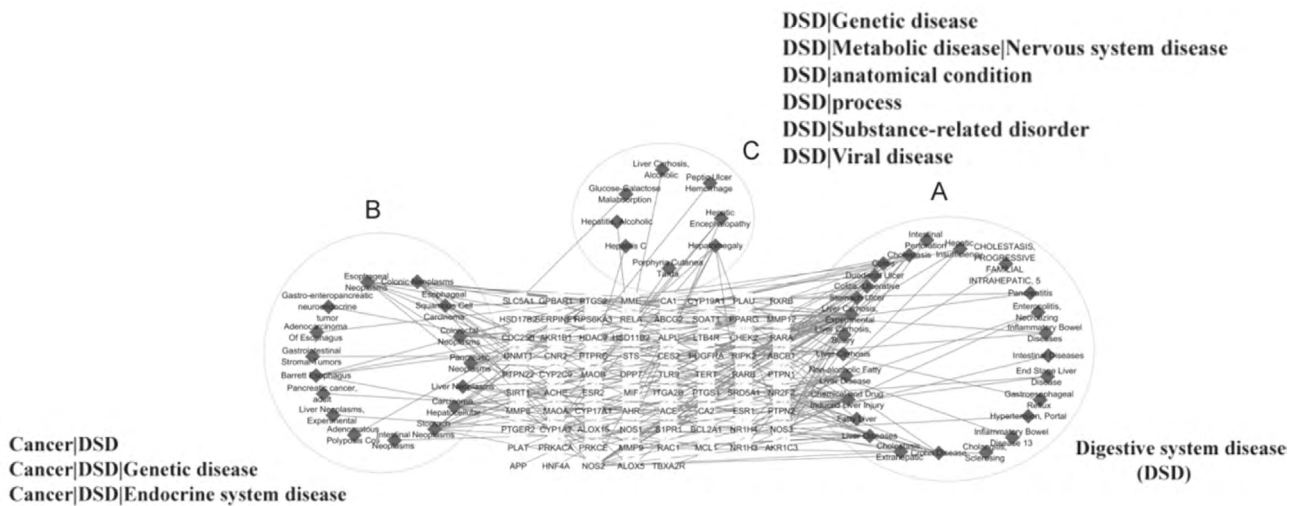


图 2 柿蒂靶点-疾病-网络图

表 3 柿蒂治疗顽固性呃逆关键靶点具有的生物进程信息

| GO 生物进程 | 基因数 | 百分比/% | P-value |
|--|-----|-------|---------|
| Collagen catabolic process | 3 | 6.12 | 0.00 |
| Regulation of synaptic transmission γ GABAergic | 3 | 7.32 | 0.00 |
| Synaptic transmission γ GABAergic | 3 | 6.12 | 0.00 |
| Response to progesterone | 3 | 6.38 | 0.00 |
| Apoptotic cell clearance | 3 | 6.52 | 0.00 |
| Regulation of bone remodeling | 3 | 4.48 | 0.00 |
| Bone resorption | 4 | 5.13 | 0.00 |
| Regulation of bone resorption | 3 | 5.88 | 0.00 |
| Vascular smooth muscle cell proliferation | 4 | 5.63 | 0.00 |
| Response to cadmium ion | 4 | 4.76 | 0.00 |

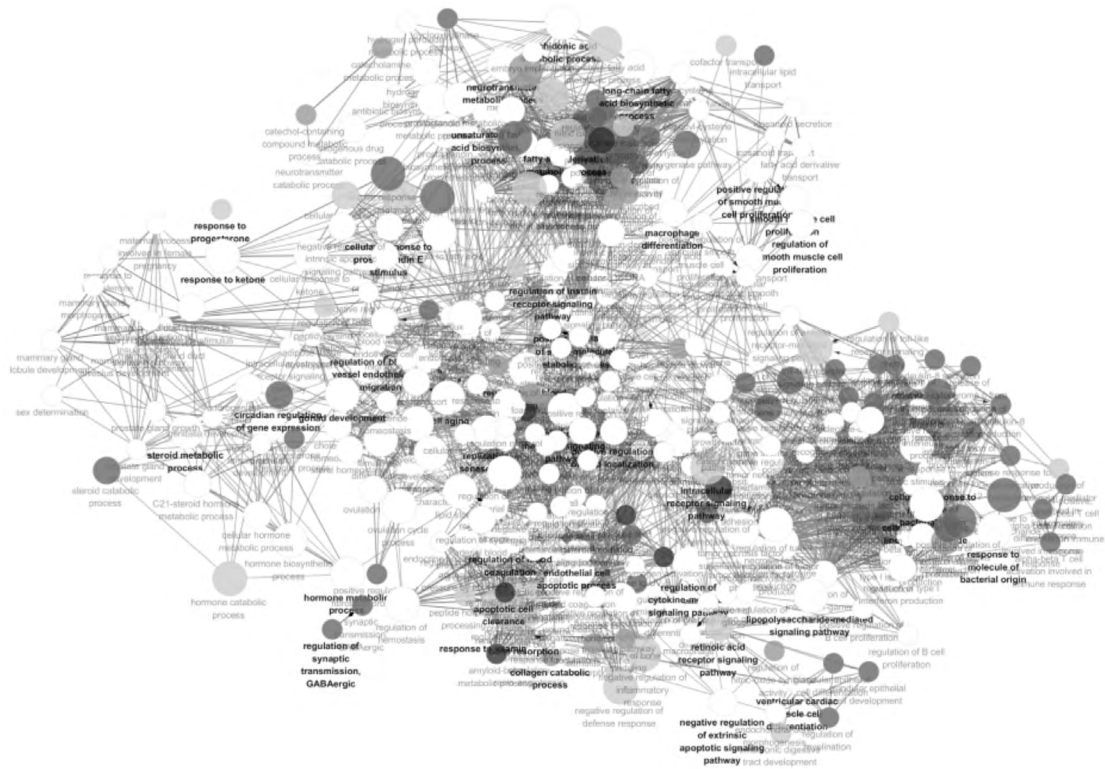


图 3 GO 生物进程层级关系



图 4 信号通路富集气泡图

(C) 这 3 条信号通路。

2.6 核心化合物-核心靶点-信号通路整合网络分析 通过筛选,最终获得核心化合物 7 个 核心靶点 8 个(表 4)。根据核心化合物-核心靶点及其关联通路的对应关系,构建“核心化合物-核心靶点-信号通路”网络。结果如图 5 所示 柿蒂中 7 个核心化合物可通过作用于 8 个核心靶点触发信号通路的调节。这些靶点主要分布在如下 4 条通路: Arachidon-

ic acid metabolism pathway、Insulin resistance pathway、Serotonergic synapse pathway、NF-kappa B signaling pathway。上述结果体现了柿蒂的多成分、多靶点、多通路整合角度来治疗各种疾病引起的顽固性呃逆的作用特点。同时这些核心化合物可作为柿蒂质量控制的候选分子。核心靶点及通路等是整体作用网络的高度浓缩,对于后续深入研究的具有重要价值。

表 4

柿蒂核心化合物-核心靶点信息

| Name | Compound or Protein | Attribute | Degree | Betweenness |
|--------|---------------------------------------|-----------|--------|-------------|
| C13 | Vanillic acid | mol | 43 | 0.14402611 |
| C14 | Gallic acid | mol | 42 | 0.150233 |
| C12 | Succinic acid | mol | 37 | 0.20764462 |
| C2 | Kaempferol | mol | 34 | 0.09329678 |
| C18 | Syringic acid | mol | 34 | 0.08875726 |
| C1 | Quercetin | mol | 33 | 0.08745633 |
| C19 | Ethyl gallate | mol | 28 | 0.05278364 |
| PTPN1 | DNA(cytosine-5) -methyltransferase 1 | target | 19 | 0.10223721 |
| TLR9 | Toll-like receptor 9 | target | 12 | 0.02900533 |
| ALOX15 | Arachidonate 15-lipoxygenase | target | 11 | 0.02217247 |
| BCL2A1 | Bcl-2-related protein A1 | target | 11 | 0.01651244 |
| DNMT1 | DNA(cytosine-5) -methyltransferase 1 | target | 10 | 0.0142581 |

续表 4

| Name | Compound or Protein | Attribute | Degree | Betweenness |
|-------|--|-----------|--------|-------------|
| ESR2 | Estrogen receptor <i>beta</i> | target | 10 | 0.0182769 |
| MIF | Macrophage migration inhibitory factor | target | 10 | 0.01116488 |
| PTGS1 | Prostaglandin G/H synthase 1 | target | 10 | 0.01116488 |

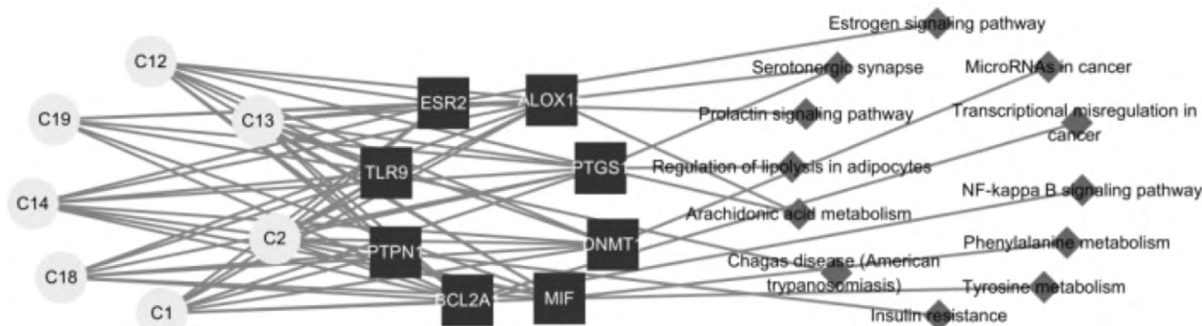


图 5 核心化合物-核心靶点-信号通路网络图

3 讨论

本研究采用网络药理学的方法分析柿蒂治疗各种疾病引起的顽固性呃逆的化合物及作用靶点,通过构建化合物-靶点网络获得柿蒂治疗顽固性呃逆的主要药效物质基础及重要靶点,进一步对靶点与疾病间的相互作用关系、靶点与信号通路的关系分析并可视化,最后提取并构建核心化合物-核心靶点-信号通路的整合网络,从而为柿蒂的药效物质基础及多靶点、多途径治疗顽固性呃逆的整合作用机制提供参考。

本研究首先通过化合物-靶点网络发现柿蒂一系列度数较高的化合物,如 vanillic acid (degree = 43)、gallic acid (degree = 42)、succinic acid (degree = 37)、syringic acid (degree = 34)、kaempferol (degree = 34)、quercetin (degree = 33) 表明这些化合物可能是柿蒂发挥药效的主要物质基础。对上述化合物文献分析发现 vanillic acid 对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎具有治疗作用,其作用机制可能为抑制结肠组织中环氧合酶-2 和血浆白细胞介素 6 的升高,减弱转录核因子- κ B p65 的激活⁽⁴⁾。有研究发现在胃溃疡大鼠模型上 gallic acid 预处理可明显降低溃疡指数,胃液量等,提高超氧化物歧化酶,谷胱甘肽还原酶等的水平,组织病理学研究也进一步证实了 gallic acid 的抗溃疡作用⁽⁵⁾。也有研究发现 gallic acid 可能是肠癌治疗的候选药物,其作用与其可抑制人结肠腺癌 COLO 205 生长和诱导细胞凋亡有关。研究发现 quercetin 对大鼠小肠缺血-再灌注损伤有保护作用,其机制主要可能与抑制中性粒细胞浸润有关⁽⁶⁾。另外 quercetin 还可抑制人胃癌细胞系 SGC-7901 的上皮间质转化,其作用机制可能是

通过对 AKT 信号通路的抑制⁽⁷⁾。研究发现在胃溃疡小鼠模型上,kaempferol 能显著降低溃疡指数,保护胃黏膜免受损伤,其机制与保护胃黏膜糖蛋白水平有关,抑制中性粒细胞聚集和 MPO 活性,调节促炎细胞因子水平等⁽⁸⁾。同时本研究发现的 syringic acid 和 succinic acid 化合物,其相关活性尚未报道,有必要通过其对应靶点进行深入研究。

本研究发现柿蒂作用的核心靶点包括 PTPN1 (degree = 19)、TLR9 (degree = 12)、ALOX15 (degree = 11)、BCL2A1 (degree = 11)、DNMT1 (degree = 10)、ESR2 (degree = 10)、MIF (degree = 10)。如临床采用 cDNA 微阵列探针研究发现胃癌组织中 PTPN1 等的拷贝数变化水平的总和与其复发预后不良显著相关 ($P < 0.05$)⁽⁹⁾。研究发现 TLR9 在溃疡性结肠炎病变肠组织中高表达,进一步研究发现 TLR9 可被细菌的 CpG DNA 激活,继而活化核因子 KBp65 激活炎症细胞并调控炎症因子的合成⁽¹⁰⁾。研究发现 ALOX15 可抑制 TNF- α , IL- β /NF- κ B 和 IL-6/STAT3 等炎症信号通路分子的表达,继而抑制胃肠道炎症反应⁽¹¹⁾。醋酸诱导的大鼠胃溃疡模型发生了 BCL2A1 mRNA 表达的改变及细胞凋亡,提示 BCL2A1 可作为治疗胃溃疡的潜在靶点⁽¹²⁾。RT-PCR 和免疫组织化学方法均发现 DNMT1 mRNA 在胃癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织,提示 DNMT1 高表达可能与胃癌的发生发展有关⁽¹³⁾。ESR2 可能在神经损伤引起多种胃肠道疾病中起重要作用,如选择性 ESR2 激动剂 LY3201 可治疗由神经元/神经胶质细胞过度损伤引起的胃肠道疾病⁽¹⁴⁾。MIF 是免疫炎症疾病中的关键促炎细胞因子,且 MIF 作为胞外细胞因子激发经膜受体的信号

传导,参与细胞生长、分化、转录调控、免疫抑制等^[15]。综上可知柿蒂可能正是通过上述的多靶点治疗不同疾病引起的顽固性呃逆。此外通过化合物-靶点网络和靶点-疾病网络关联,可知不同类型消化系统疾病关联的化合物及靶点,如胃溃疡与靶点 BCL2A1 和化合物 kaempferol 关联。为后期不同类型消化系统疾病研究中,选取合适的化合物及靶点进行分析,更有效地揭示作用机制。

为进一步探讨柿蒂治疗顽固性呃逆的作用机制,本研究采用在线分析系统 DAVID 进行 KEGG 通路富集分析,发现网络中的核心靶点主要富集于 3 个通路: Bile secretion pathway、Ovarian steroidogenesis pathway 以及 Steroid hormone biosynthesis pathway。胆汁酸是胆固醇的主要代谢产物,也是胆固醇通过胆汁分泌的一种形式,在消化吸收中起着极重要的作用。Bile secretion pathway 包括胆汁酸的合成、分泌及肠肝循环,其主要通过肝脏、胆道、门脉系统及肠道等完成,因此许多消化系统疾病可引起 Bile secretion pathway 紊乱。如胆汁酸受体 FXR 和 TGR5 在溃疡性结肠炎中的表达^[16]。反之 Bile secretion pathway 必将导致消化系统许多疾病。如胆汁酸与糖皮质激素代谢在健康与疾病中的作用^[17]。虽然目前没有发现 Bile secretion pathway 与顽固性呃逆相关的直接报道,但鉴于胆汁酸在消化系统疾病中的重要作用,提示 Bile secretion pathway 可能是治疗顽固性呃逆的重要的潜在通路。另外其他两条通路主要与卵巢类固醇生成有关,暂时还没有相关文献报道与消化系统疾病相关,可能需要更进一步研究。但是同时也说明柿蒂也可能用于治疗妇科等疾病。

最后本研究构建了柿蒂治疗各种疾病的“核心化合物-核心靶点-信号通路”网络,通过对柿蒂的核心化合物-核心靶点-信号通路的网络分析,结果表明柿蒂的核心化合物 7 个,可通过 8 个核心靶点及 12 条通路发挥作用。其中柿蒂主要通过调节 Arachidonic acid metabolism、Insulin resistance、Serotonergic synapse、NF- κ B signaling 等信号传导通路治疗顽固性呃逆。其核心靶点涉及面较广,包括 ALOX15、BCL2A1、MIF、ESR2、TLR9、DNMT1、PTPN1 和 PTGS1。其中核心靶点又以 ALOX15、BCL2A1、ESR2、TLR9、DNMT1、PTPN1、MIF 这 7 个最为重要,这些靶点主要作用于各种疾病引起的顽固性呃逆,其次还可作用于各种肿瘤引起的顽固性呃逆。

综上所述,本研究基于网络药理学研究方法,通

过化合物-靶点网络构建、靶点-疾病网络构建、KEGG 通路富集分析、构建核心化合物-核心靶点-信号通路等一系列整合网络。从系统层面揭示了柿蒂治疗顽固性呃逆的药效物质基础及作用机制,为后续开展实验研究柿蒂治疗各种疾病引起的顽固性呃逆的作用机制提供了思路与线索。

参 考 文 献

- [1] 朱雪娟. 和胃降逆柿蒂汤治疗重型脑损伤后顽固性呃逆 25 例[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(1): 121-122.
- [2] 朱碧宏. 中西医结合治疗脑血管病引起顽固性呃逆临床观察[J]. 新中医, 2017, 49(7): 37-39.
- [3] 邓放. 丁香柿蒂汤加针刺治疗胃寒型顽固性呃逆 26 例[J]. 中国药业, 2012, 21(22): 108.
- [4] Kim SJ, Kim MC, Um JY, et al. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis [J]. *Molecules*, 2010, 15(10): 7208-7217.
- [5] Sen S, Asokkumar K, Umamaheswari M, et al. Antiulcerogenic effect of gallic acid in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2013, 75(2): 149-155.
- [6] Tóth Š, Jonecová Z, Čurgali K, et al. Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 346-354.
- [7] 许振. 槲皮素对人胃癌细胞系 SGC-7901 上皮间质转化作用的初步研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- [8] QC Li, Hu XX, Xuan YH, 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.
- [9] Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, et al. Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 612-20.
- [10] Arciero J, Bard EG, Siggers R, et al. Modeling the interactions of bacteria and Toll-like receptor-mediated inflammation in necrotizing enterocolitis [J]. *J Theore Biol*, 2013, 321: 83-99.
- [11] Tian R, Zuo X, Jaoude J, et al. ALOX15 as a suppressor of inflammation and cancer: Lost in the link [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2017, 132: 77-83.
- [12] 赵健亚, 吴金彪, 陆颖, 等. 羧甲基壳聚糖对乙酸型胃溃疡大鼠胃黏膜 Bel-2 表达的影响 [J]. 现代预防医学, 2010, 37(9): 1626-1628.
- [13] Liu S, Jiang X. Relationship between methylation of MG-MT gene and protein expression of DNMT1 in gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2017, 22(7): 407-410.

- [14] D'Errico F ,Goverse G ,Dai Y *et al.* Estrogen receptor β controls proliferation of enteric glia and differentiation of neurons in the myenteric plexus after damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2018 ,115(22) : 5798-5803.
- [15] 夏金堂 李雯 汪建平 . 巨噬细胞移动抑制因子与消化系统肿瘤[J]. *中华胃肠外科杂志* ,2006 ,9(3) : 275-277.
- [16] 魏敏 程文芳 平晶 等 . 胆汁酸受体 FXR 和 TGR5 在溃疡性结肠炎中的表达 [J]. *胃肠病学* ,2017 ,22(8) : 465-468.
- [17] Verena TS ,Alex Z ,Hansjörg S *et al.* Bile acids and glucocorticoid metabolism in health and disease [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease* , 2018 ,DOI: 10. 1016/j. bbadis. 2018. 08. 001.