

· 数据挖掘 ·

加味桃核承气汤防治糖尿病胃轻瘫作用机制 及网络药理学分析

周海¹, 吴晓玲², 林明欣³, 朱章志^{1*}

(1. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广州 510405;

2. 深圳市宝安区中医院, 广东 深圳 518000; 3. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:运用网络药理学技术分析加味桃核承气汤治疗糖尿病胃轻瘫的作用靶点和相关信号通路,进一步分析其防治糖尿病胃轻瘫的理论基础和作用机制。方法:运用中药系统药理学成分分析平台(bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of TCM, BATMAN-TCM)数据库获取加味桃核承气汤的化学成分及作用靶标基因,从 comparative toxicogenomics database(CTD)数据库收集糖尿病胃轻瘫的靶标基因,将两者取交集后得到加味桃核承气汤——糖尿病胃轻瘫靶基因交集,运用 STRING 构建蛋白质间相互作用网络,并将结果进行网络可视化展示,通过 Cytospace 软件 ClueGO, CluePedia 插件进行加味桃核承气汤——糖尿病胃轻瘫靶基因交集的基因本体论(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并将结果进行可视化展示。最后利用 CTD 数据库并结合文献学习,获取交集基因于糖尿病胃轻瘫的疾病治疗作用。结果:加味桃核承气汤的 621 个靶点基因中有 25 个靶点与糖尿病胃轻瘫相互关联,该方可能通过影响 MLNR, SST, PTGS1, HRH2, HTR3A, HTR4, HTR7, NOS3 基因表达,改善胃肠激素水平,影响血清素与其受体结合,活化腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),诱导环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP),蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)表达,从而激活 AC/cAMP/PKA 信号通路,并调节 Ca²⁺/K⁺通道的开放,控制离子平衡,继而促进胃平滑肌适应,收缩胃平滑肌以调节胃容量,同时改善胃酸分泌,保护胃黏膜,不排除改善血管收缩功能、血流动力学的可能。结论:网络药理学方法科学分析加味桃核承气汤通过多方面防治糖尿病胃轻瘫的作用机制,阐释其中医药多靶点、多通路防治糖尿病胃轻瘫的治疗优势,为加味桃核承气汤后续的实验研究提供研究方向和理论参考。

[关键词] 加味桃核承气汤; 糖尿病胃轻瘫; 网络药理学; 胃肠激素; 血清素

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0169-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191926

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190617.0916.002.html>

[网络出版时间] 2019-06-17 16:13

Mechanism of Modified Taohe Chengqitang in Treating Diabetic Gastroparesis Based on Network Pharmacology

ZHOU Hai¹, WU Xiao-ling², LIN Ming-xin³, ZHU Zhang-zhi^{1*}

(1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Shenzhen Bao'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China;

3. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20190401(003)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2014CB542903);国家自然科学基金面上项目(81873190);广东中医药强省建设专项中医优势病种突破项目(粤中医函[2015]19 号)

[第一作者] 周海, 博士, 从事中医药治疗内分泌疾病研究, E-mail: zhouhaitcm@outlook.com

[通信作者] *朱章志, 博士生导师, 主任医师, 从事中医药治疗内分泌疾病研究, E-mail: zhuangzi@vip.sina.com

[Abstract] Objective: To study the mechanism of modified Taohe Chengqitang in preventing and treating diabetic gastroparesis by regulating relative genes and signaling pathways based on network pharmacology. **Method:** Target genes of modified Taohe Chengqitang were obtained from Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of TCM (BATMAN-TCM) database, and target genes of diabetic gastroparesis were obtained from Comparative Toxicogenomics Database (CTD) database. The target genes of modified Taohe Chengqitang-diabetic gastroparesis intersection protein were obtained through the integration of two groups of genes. STRING was used to build the protein-protein interaction network and visualize the results. Cytospace software ClueGO, CluePedia plug-in were used for gene ontology (GO) analysis and enrichment analysis of KEGG pathway of modified Taohe Chengqitang-diabetic gastroparesis target genes intersection, and results were visualized. Finally, CTD database and literatures were used to obtain intersection genes in the treatment of diabetic gastroparesis. **Result:** Among 621 target genes in modified Taohe Chengqitang, 25 were related to diabetic gastroparesis. By regulating expressions of MLNR, SST, PTGS1, HRH2, HTR3A, HTR4, HTR7, NOS3 and other intersection genes, Taohe Chengqitang could improve the gastrointestinal hormone levels, affected the combination of serotonin and its receptors, activated adenylate cyclase (AC), and induced cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA), so as to activate AC/cAMP/PKA signaling pathway, regulate Ca^{2+}/K^{+} channel, control ion balance, promote the adaptability of gastric smooth muscle, and contract gastric smooth muscle to regulate gastric volume. At the same time, gastric acid secretion was improved to protect gastric mucosa, which may help improve vasoconstriction and hemodynamics. **Conclusion:** Based on the network pharmacology, modified Taohe Chengqitang has multiple mechanisms in the prevention and treatment of diabetic gastroparesis. This study explored relevant signaling pathways, advantages and research directions of modified Taohe Chengqitang in treatment of diabetic gastroparesis.

[Key words] modified Taohe Chengqitang; diabetic gastroparesis; network pharmacology; gastrointestinal hormone; serotonin

糖尿病胃轻瘫是糖尿病常见的慢性并发症,随着糖尿病发病率的升高,糖尿病胃轻瘫的发病率也随着上升。据统计,50%~76%病史较长的糖尿病患者存在消化道动力异常的问题,而糖尿病胃轻瘫的发病率波动在30%~50%^[1]。糖尿病胃轻瘫的发病较为隐匿,主要以胃动力低下为特点的临床证候群,临床主要表现为食欲不振、早饱、恶心、呕吐、腹胀、腹痛等消化道症状,常常被糖尿病患者及医生所忽略。但是,糖尿病胃轻瘫患者的恶心、呕吐、早饱以及胃排空延迟等症状会使得血糖控制更加困难,更易出现难以预料血糖波动,对糖尿病病情以及患者生活质量产生不利影响。研究发现,三分之二的糖尿病患者诊断胃轻瘫后,糖尿病病情越来越难以控制^[2]。因此,研究糖尿病胃轻瘫的发病机制,及早识别糖尿病胃轻瘫,寻找有效的作用靶点,多方面干预治疗,是目前医学的重要课题。

糖尿病胃轻瘫的发病机制尚不完全明确。目前研究认为,其主要与糖脂代谢紊乱^[3-4]等糖尿病基础病变所引起的胃平滑肌损伤,胃肠激素紊乱,神经病变,Cajal间质细胞(ICC)损伤,微血管损伤,免疫

相关异常以及性激素水平波动等因素相关,同时可能还与幽门螺杆菌感染、小肠细菌过度生长、精神疾患等因素相关^[5]。各种因素相互影响,互为因果,共同参与到糖尿病胃轻瘫的发病与发展当中。鉴于其复杂的发病机制,目前糖尿病胃轻瘫缺乏精准的靶向治疗,现代医学多在控制血糖的基础上,提倡患者少食多餐,选择易消化、低脂肪的食物,配合促胃肠动力药以对症治疗,严重者采用胃电起搏以及手术治疗等,但均未获得满意疗效。中医药防治糖尿病胃轻瘫具有多方面的干预作用,在改善胃动力,减轻胃肠症状等方面疗效显著,相对于现代医学治疗方案的局限性,中医学运用整体观对疾病进行辨证论治的过程,体现其独特的多靶点优势。

传统中医学并无糖尿病胃轻瘫这一概念,根据其症状多属于“痞满”“呕吐”“反胃”“积滞”之病,但糖尿病胃轻瘫病机不单以“痞满”“呕吐”“反胃”“积滞”以中土亏虚,气运不行为基本病机。糖尿病胃轻瘫是由消渴日久所致的慢性并发症。《四圣心源·消渴根源》曰:“消渴者……土湿脾陷,乙木遏抑,疏泄不遂,而强欲疏泄,则相火失其蛰藏”,即

黄师认为,消渴的发病,因中土水湿,困遏脾气,中气不升,肝失疏泄,清气无以布散,浊邪无以通泻,并指出,病消者,“胃逆而甲木不降”,淋者,“脾陷而乙木不升”,且“木之温者,水之阳根所发”,说明消渴其消者,因中气不运,少阳胆甲木不降,则上热之证,即表现为“消”,多饮、多食等现代医学糖尿病代之症状。然消渴其淋者,因土湿致脾气不升,脾气主升,己土升则癸水与乙木皆升,己土不升,则水木陷矣。乙木陷下,则水中阳气失木气之温煦,水中之火渐衰,泛滥而生寒饮。湿旺水郁,膀胱不利,则见水液流溢,即表现为小便清长、频数之“淋”证。故初起消渴是以土湿、木抑、水寒为其病机,以实证为主。木以发达为性,己土湿陷,抑遏乙木发达之气,消渴日久,木盗水气,终致木水俱虚,木虚气陷,陷则凝瘀。“初为气结在经,久则血伤入络”,胃络血瘀;木陷下则土气不升,肝脾之不升也。气不化水,则左陷于下而发为痞满、积滞等中气滞行之病,中气亏虚,不能行血,亦发为瘀血。故基于“一气周流”理论,糖尿病胃轻瘫因其病久,则其以“水亏土虚,木陷凝瘀”为其基本病机。其病位在中土。

加味桃核承气汤是广州中医药大学伤寒教研室(内分泌科)熊曼琪教授及其团队自 1980 年代,通过长期的临床运用,对中医药防治 2 型糖尿病进行观察、总结及研究所取得的成果,是基于糖尿病“气阴不足,瘀血阻络”的病机,在经方桃核承气汤基础上加味“黄芪片、玄参、生地黄、麦冬”而成,并以此方剂成分开发生产了本院院内制剂降糖三黄片(院内制剂批号粤药制字 Z20071185)。多年的临床实践发现,加味桃核承气汤在防治 2 型糖尿病及并发症方面具有良好疗效,临床能够有效缓解 2 型糖尿病患者并发胃轻瘫之食欲不振、恶心、呕吐、腹胀等症状^[6]。在中医临证运用中,本方立足糖尿病胃轻瘫“水亏土虚,木陷凝瘀”的病机,使用黄芪大补中气以补土虚,使一身之气恢复周流之常;桂枝疏发肝气,升阳解郁,桃仁苦甘平,活血破瘀;大黄苦寒,泻热下瘀,玄参,苦咸而凉,滋阴润燥,壮水制火,启肾水以滋肠燥,生地黄甘苦而寒,清热养阴,壮水生津,以增玄参滋阴润燥之力;麦冬、生地黄、玄参三药组成“增液汤”,用以填补下焦肾水之亏耗。《黄帝内经·素问·六微旨大论》曰:“君火之下,阴精承之”,北方坎水之中内寄真阳,肾水既为元阳之宅,又为木气之根,消渴日久,乙木陷下,水中阳气失木气之温煦,水中之火渐衰,肾水亏乏,气失其根,逆而上犯,则发为呕逆、胀满之证,故麦冬、生地黄、玄参三药合

用可壮水之主,稳固阳根,以降逆气。全方通补合用,以补药之体,为泻药之用,奏“益气养阴,泻热逐瘀”之功,以复人身中土之枢,四方之圆运。

前期多项研究证实,加味桃核承气汤通过改善 2 型糖尿病环境下的糖脂代谢^[6-8],修复干细胞因子(SCF)/c-kit 信号通路,调节 ICC 细胞形态功能^[6],直接影响糖尿病胃轻瘫病理进展;同时,通过影响机体胰岛素抵抗^[9]、胰岛 β 细胞凋亡^[10]、胰腺氧化应激反应^[11]、葡萄糖转运^[12]等,多方面改善糖尿病胃轻瘫发病的基础病变,从而间接发挥其对糖尿病胃轻瘫的防治作用。除此之外,亦有较多研究表明,以桃核承气汤为基础方,临证加减以辨治胃脘胀满、纳差、暖气诸证,是中医药临床改善胃动力不足的常用手段。何丽清等^[13]使用桃核承气汤合半夏泻心汤,行益气和,消瘀化痞之功,防治糖尿病胃轻瘫,能够有效提高糖尿病患者胃排空率。翟跃红等^[14]使用桃核承气汤合香连丸,治以益气健脾,泻热导滞,防治腹部术后胃瘫综合征,能够显著减轻患者恶心呕吐,恢复肠鸣音,促进排气排便,改善胃动力不足。

基于以上理论根据及临床实践,结合加味桃核承气汤前期实验基础,本研究通过网络药理学研究,进一步拓展分析加味桃核承气汤对糖尿病胃轻瘫的治疗作用靶点及其相关信号通路,有助于进一步阐释加味桃核承气汤在防治糖尿病胃轻瘫的作用机制,对后续实验研究提供研究方向,以及有益的理论参考。

1 资料与方法

1.1 加味桃核承气汤成分及作用靶标预测 加味桃核承气汤中药组成包括桃仁、桂枝、大黄、芒硝、黄芪、生地黄、麦冬、玄参、炙甘草 9 味中药。本研究使用 BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>) 平台来预测复方成分及其作用靶标。

BATMAN-TCM 平台是以“药物-靶点相似性”模型筛选靶点。该平台的“药物-靶点相似性”模型是基于 Perlman 等的 Similarity based Inference of drug-Targets 概念(SITAR),利用药物之间的结构,副作用,Anatomical, Therapeutic and Chemical(ATC)分类系统,药物诱导基因表达,化合物相互作用分数的相似性,以及靶点之间氨基酸序列,蛋白互作网络接近中心性,GO 功能富集的相似性等,利用逻辑回归集成各项相似分数,并采用“弃一法交叉验证”后构建的寻找药物靶点的模型,预测的中药靶点经实验验证,准确、可靠。本研究化学成分筛选标准参考目前网络药理学通用标准,即单味中药靶点研究以 Score

cutoff > 20, 复方多以 Score cutoff > 40 为基准^[15]。通过将加味桃核承气汤的组方药味输入完整拼音, 以 $P < 0.05$, Score cutoff > 40 为筛选条件, 寻找加味桃核承气汤的化学成分, 并预测该方的相关靶标。

1.2 糖尿病胃轻瘫疾病靶标预测 应用 CoolGeN (<http://ci.smu.edu.cn/CoolGeN/>), Gene Card (<https://www.genecards.org/>), OMIM 数据库 (<http://omim.org/>), TTD 数据库 (<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>) 以及 PharmGkb 数据库 (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>), 以“diabetic gastroparesis”为检索词获取糖尿病胃轻瘫靶标。

1.3 药物-疾病相互作用网络构建 通过 1.1 项及 1.2 项获得加味桃核承气汤相关作用靶点及糖尿病胃轻瘫靶标后, 取两者的靶点基因交集, 导入 STRING 数据库, 设定物种为人, 得出加味桃核承气汤与糖尿病胃轻瘫疾病交集基因编码的蛋白网络相互作用结构图。

1.4 基因本体论(GO)通路富集分析 GO 分析是生物学领域中广泛用于基因功能分类的系统, 主要用于描述基因产物细胞功能、分子功能和生物功能。使用 Cytospace 软件 ClueGO 插件进行 GO 富集分析, 统计学超几何分布定量 (P 值) 来评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群及蛋白生物学功能的显著性。

1.5 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 应用 Cytospace 软件 CluePedia 插件对药物-疾病交集靶标基因进行 KEGG 通路富集分析, 得到加味桃核承气汤治疗糖尿病胃轻瘫的主要作用通路, 此工具算法同 GO 分析算法。

2 结果

2.1 药物-疾病靶标预测 在 BATMAN-TCM 数据库中输入加味桃核承气汤组方的 9 味中药完整拼音, 以 9 味中药作为整体搜索对象, $P < 0.05$, Score cutoff > 40 为筛选条件, 进行搜索并发现加味桃核承气汤 9 味中药共涵盖了 83 种化学成分, 对应 TCMID 数据库编号, 获取化学成分的同时, 通过 BATMAN-TCM 数据库得到各化学成分对应的靶标基因。经导入 EXCEL 排除重复、合并统计, 共得到加味桃核承气汤 9 味中药所含化学成分涵盖靶标基因共 621 个。考虑目前糖尿病胃轻瘫疾病研究数量较少, 各数据库收集该疾病相关的靶标基因可能不完全, 故本研究采用当下具有代表性的多个基因数据库 (CoolGeN, Gene Card, OMIM, TTD 及 PharmGkb) 进行搜索采集, 尽可能全面的获取疾病基因集合。经

过搜索, 本研究共获取糖尿病胃轻瘫靶标基因 174 个。见表 1。

将加味桃核承气汤与糖尿病胃轻瘫两组靶标基因交集后显示, 共获取交集基因 25 个, 胃动素受体 (MLNR), 分泌素 (SCT), 生长抑素 (SST), 胰岛素 (INS), 白细胞介素-1 (IL-1), 5-羟色胺受体 3A (HTR3A), 5-羟色胺受体 4 (HTR4), 5-羟色胺受体 7 (HTR7), 前列腺素内过氧化物合酶 1 (PTGS1), 前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2), 一氧化氮合酶 3 (NOS3), 组胺受体 H2 (HRH2), 电压门控钾通道 eag 相关 H 家族 2 型 (KCNH2), 钾离子电压门控通道 Isk 相关家族 2 (KCNE2), ATP 结合盒亚家族 B 成员 1 (ABCB1), 多巴胺 β 羟化酶 (DBH), 多巴胺受体 D3 (DRD3), 多巴胺受体 D5 (DRD5), 天门冬氨酸-tRNA 合成酶 2 (DARS2), 肾上腺素能受体 β (ADRA1B), 阿片受体 Mu 1 (OPRM1), 血红素加氧酶 1 (HMOX1), 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PIK3) CA, C-X-C Motif 趋化因子受体 4 (CXCR4), 白蛋白 (ALB)。基于加味桃核承气汤在多年临床防治糖尿病胃轻瘫临床有效, 以及相关基础研究的进一步证实, 本研究通过药物-疾病靶标预测, 进一步量化、可视化该方对糖尿病胃轻瘫的防治作用。通过韦恩图分析发现, 加味桃核承气汤对糖尿病胃轻瘫共有 25 个交集基因, 药物-疾病基因映射率为 14.4%, 提示该方存在确切防治糖尿病胃轻瘫的作用靶点, 该方对糖尿病胃轻瘫具有一定特异性的防治作用。见图 1。

2.2 交集基因编码蛋白网络互作图构建 将药物-疾病交集基因编码蛋白导入 STRING 数据库, 限定物种为人, 获取蛋白相互作用关系, 获得药物-疾病交集作用靶蛋白互作网络图, 图中节点表示蛋白, 连线表示蛋白之间的关联, 加味桃核承气汤-糖尿病胃轻瘫交集作用蛋白共涉及 25 个节点, 73 条连线。节点的大小和颜色表示自由度 (Degree) 值的大小, 颜色由绿变红对应的 Degree 值越大, 代表该节点蛋白与其他节点作用网络越广泛。连线的粗细表示合并分值 (Combine score), 连线越粗, 分值 (score) 越大, 代表两节点蛋白之间的联系越丰富, 充分体现加味桃核承气汤防治糖尿病胃轻瘫化学成分之间的复杂作用关系, 以及多靶点的作用特点。见图 2。

加味桃核承气汤对糖尿病胃轻瘫的防治作用, 与调节前列腺素合成的 PTGS1, PTGS2 联系最为密切; 与编码血清素受体家族的 HTR3A, HTR4, HTR7 之间也具有较强的互作关系; 与编码生长抑素的 SST, 组胺受体 2 的 HRH2 具有相关性, SST 与

表 1 加味桃核承气汤中含有的 83 种化学成分

Table 1 Information for 83 compounds of modified Taohe Chengqitang

成分名称	TCMID	成分名称	TCMID
18beta-glycyrrhetic acid	23092	(E)-4-phenyl-3-buten-2-one	17087
tetradecanal	24042	astragaloside V	1940
uridine	22236	gamma-sitosterol	29509
ophiopogonone E	16130	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	23210
ophiopogonone A	16126	ophiopogonone C	16128
lupeol	13091	farnesol	7733
protocatechuic acid	23246	canavanine	3063
methyl ophiopogonone A	14627	emodin anthrone	6776
rehmaglutin C	18576	ophiopogon A	16125
campesterol	3040	procurcumenol	17861
betaine	23051	glycyrrhetic acid	23291
cinnamaldehyde	3693	anethole	1186
gamma-aminobutyric acid	23042	procyanidin B-5,3'-O-gallate	31843
astragaloside I	1936	L-asparagine	1866
3,5-dimethoxystilbene	6292	18alpha-glycyrrhetic acid	23166
na2so4. 10h2o	23634	L-asparagine	1866
emodin	6775	coumarinic acid	30820
chrysophanol	3615	guanosine	9070
3-hydroxy-25-norfriedel-3,1(10)-dien-2-one-30-oic acid	31241	5-acetyl-7-hydroxy-2-methylbenzopyran-gamma-one	26093
ophiopogonin B	16134	ophiopogon B	16132
astragaloside vii	1942	styrene	20414
2-methyl cardol	25514	(-)-nissolin	31713
choline	3589	gallicacid	8094
soyasaponin I	24621	astragaloside Iii	1938
20-hexadecanoylingenol	9488	P-methoxycinnamic acid	24377
methylchavicol	23314	epicatechin	6853
melilotocarpan A	13672	camphor	3048
(+)-catechin	3308	ophiopogonin C	24455
beta-sitosterol	23097	adenine	617
stigmasterol	20353	proanthocyanidin B ₂	17855
ophiopogonin D	16136	cordycepin	4048
soyasapogenol B	20100	orchinol	16158
sucrose	20430	ophiopogonone B	24549
nerolidol	23421	gallocatechin	23190
astragaloside Vi	1941	methyl ophiopogonone B	14628
ophiopogonin A	16133	palmidin C	16547
astragaloside li	1937	progesterone	17887
6-aldehydo-isoophiopogonone B	30349	5-carboxy-7-hydroxy-2-methyl-benzopyran-gamma-one	30740
glycyrrhizin	23172	rhapontisterone	18735
rheinoside A	18747	serotonine	25361
astramembrannin I	1945	N-trans-feruloyltyramine	7787
trans-cinnamic acid	23114		

HRH2 之间具有直接联系,并且 SST 直接参与 HTR3A,HTR7 的互作关系,同时通过胰泌素 SCT,

多巴胺受体 DRD5 间接互作于 HTR4,HRH2 直接互作于 HTR4,同时通过 DRD5 间接参与 HTR3A,

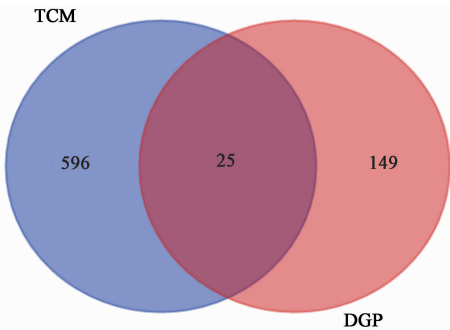


图 1 药物-疾病交集基因韦恩

Fig. 1 Modified Taohe Chengqitang and diabetic gastroparesis intersection genes Venn diagram

HTR7 的互作关系。PTGS1, MLNR, HRH2 作为互作网络的顶点、出发点, 与其他蛋白产生复杂且深远的互作关系, 提示其在加味桃核承气汤对糖尿病胃轻瘫的防治作用中, 可能参与重要的作用机制环节。见图 2。

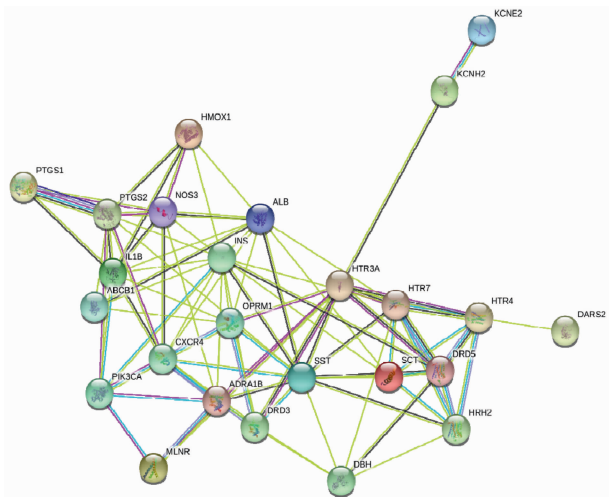


图 2 药物-疾病交集作用靶蛋白互作网络

Fig. 2 Modified Taohe Chengqitang-diabetic gastroparesis target protein interaction

2.3 药物-疾病交集基因 GO 通路富集分析 使用 Cytoscape 中 ClueGO 插件对药物-疾病交集基因进行 GO 通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为基准筛选, 共获得 43 个功能富集, 并对 GO 富集结果进行可视化展示, 以饼状图描述参与不同生物学功能及信号通路的基因占总体交集基因数量的百分比。药物-疾病交集基因 GO 分析提示, 加味桃核承气汤可能通过调节交集基因表达, 调节腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路 (35.71%); 调节血清素受体信号通路 (2.38%); 诱导胃平滑肌适应 (16.67%); 负性调控钾离子传导通道 (2.38%); 调节消化道管径 (26.19%); 正调控血管收缩 (16.67%)。见图 3。

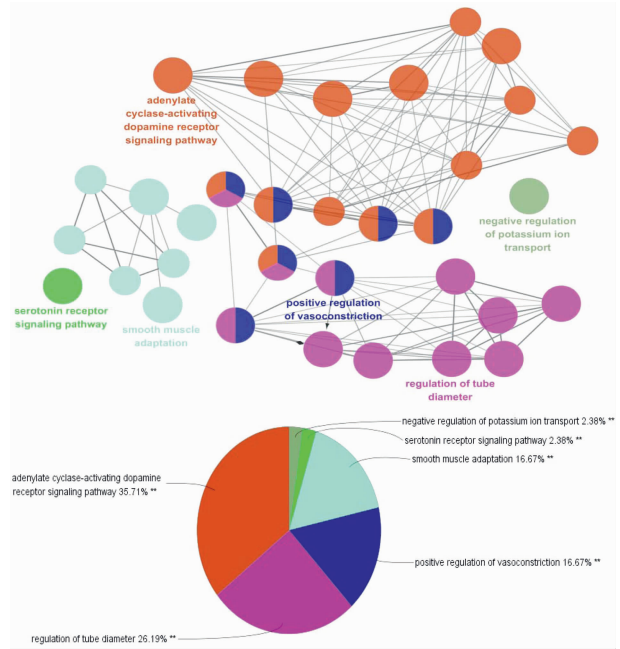


图 3 药物-疾病交集基因 GO 通路富集

Fig. 3 Modified Taohe Chengqitang-diabetic gastroparesis intersection genes GO pathway analysis

2.4 药物-疾病交集基因 KEGG 通路富集分析 使用 Cytoscape 中 CluePedia 插件对药物-疾病交集基因进行 KEGG 通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为基准筛选, 并对 KEGG 富集结果作可视化处理, 以饼状图描述参与不同生物学功能及信号通路的基因占总体交集基因数量的百分比。药物-疾病交集基因 KEGG 分析提示, 加味桃核承气汤可能通过调节交集基因表达, 影响胃酸分泌 (20.0%); 调节血清素信号通路 (20.0%); 调节脂肪细胞脂质代谢 (20.0%); 调节血管内皮生长因子信号通路 (20.0%); 调节缺氧诱导因子 1 信号通路 (20.0%)。见图 4。

3 讨论

糖尿病胃轻瘫是糖尿病常见的消化道并发症, 主要表现为胃张力、胃动力低下引起的胃排空延迟。胃张力、胃动力的正常与否有赖于激素水平、神经递质等信号对胃平滑肌功能发挥的调节作用。当胃平滑肌收缩, 胃张力大, 胃容量小; 反之, 胃平滑肌收缩抑制, 胃张力小, 胃容量大。胃的收缩功能, 体现了胃动力的强弱。当激素水平、胃平滑肌功能发生病理性改变时, 胃动力也会受到影响, 同时还可能因激素水平失调而引起胃酸分泌增多, 发生胃溃疡、胃食管反流等消化道疾病, 进一步加重糖尿病胃轻瘫患者病情。

多种激素对胃动力发挥着调节作用, 其中以胃

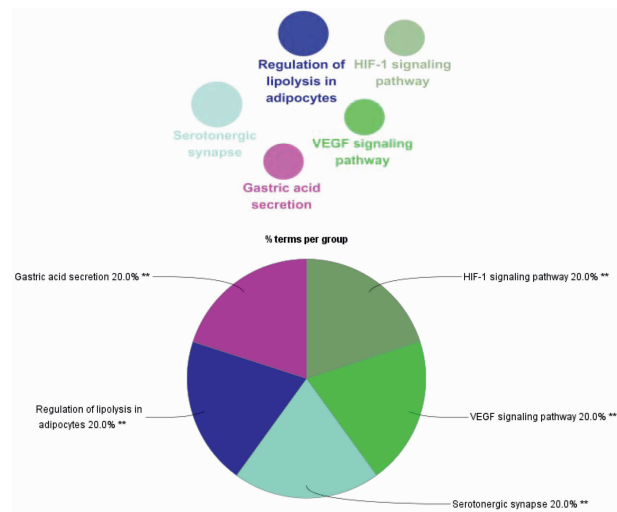


图 4 药物-疾病交集基因 KEGG 通路富集分析
Fig. 4 Modified Taohetao Chengqitang-diabetic gastroparesis intersection genes KEGG pathway analysis

动素、胃泌素、生长抑素为主的激素与糖尿病胃轻瘫关系密切,在人体与动物模型研究中观察到,糖尿病胃轻瘫状态下,胃动素、胃泌素、生长抑素水平较正常对照有明显改变^[16]。胃动素是 MLNR 基因编码的蛋白,能够引起消化间期移行复合运动 III 相的强烈收缩,加快胃排空。胃泌素可双向调节胃酸分泌,使胃酸水平保持动态平衡,同时生理水平的胃泌素可促进胃排空^[17],当胃泌素水平过高,则表现为对胃动力的抑制作用^[18]。生长抑素是 SST 基因编码的蛋白,可抑制胃张力性收缩,抑制胃酸分泌等^[19]。编码胃肠激素的基因与本研究药物-疾病交集基因显示一致,根据蛋白互作图,GO 与 KEGG 通路富集分析结果,提示加味桃核承气汤可能通过调节胃动素,生长抑素 MLNR 及 SST 基因表达,影响体内激素合成水平,参与消化道管径与平滑肌适应调节通路,改善胃平滑肌功能,调节胃容量,促进胃收缩,恢复胃动力。

加味桃核承气汤防治糖尿病胃轻瘫的前期基础研究已证实,该方能够一定程度上降低大鼠胃残留率,促进胃排空^[6],与本网络药理学研究分析结果一致。高聪等^[20]通过辨证使用桃核承气汤,对临床术后肠梗阻患者实施干预,发现能够改善腹胀,促进排气排便,缩短首次进食时间,从侧面反映了桃核承气汤的中药成分对胃动力具有一定促进作用。进一步实验研究表明,加味桃核承气汤中药单体成分对胃肠激素水平也具有一定调节作用,从物质基础方面,为该方恢复胃动力,改善糖尿病胃轻瘫的作用机制作出一定的解释。郝宗艳等^[21]使用大黄素干预

功能性消化不良大鼠,发现大黄素可显著降低大鼠胃残留率,升高胃动素水平,促进胃动力。该研究还发现,大黄素干预后,大鼠前列腺素 E₂ 水平升高,具有潜在的胃黏膜保护作用。本研究药物-疾病交集基因与蛋白互作图显示,加味桃核承气汤可能对 PTGS1,PTGS2 基因产生影响,二者参与调节前列腺素 E₂ 的合成,在细胞保护中发挥重要作用。可以认为,本网络药理学研究提示加味桃核承气汤可能通过调节 PTGS1,PTGS2 基因,影响前列腺素 E₂ 合成,发挥对胃黏膜的保护作用。

黄可儿等^[22]使用黄芪总苷干预脾虚证大鼠,发现其可上调脾虚证大鼠胃壁细胞胃泌素受体结合位点。本研究 KEGG 通路富集分析结果显示,加味桃核承气汤在治疗糖尿病胃轻瘫胃动力低下的同时,对胃酸分泌也具有一定调节作用。结合本研究药物-疾病交集基因与蛋白互作图显示,HRH2 基因编码组胺受体 H₂ 表达,组胺受体 H₂ 阻滞剂可竞争性地与壁细胞上的受体结合,从而抑制组胺或胃泌素引起的胃酸分泌。本网络药理学研究发现与前研究结果一致,提示加味桃核承气汤可能通过调节 HRH2 基因表达,影响组胺受体 H₂ 活性,组胺或胃泌素对胃壁细胞的刺激作用改变,从而发挥该方调节胃酸分泌的作用,保护胃黏膜结构。

环磷酸腺苷(cAMP)通过调节神经突触功能、糖脂代谢、平滑肌收缩等途径,介导激素、神经递质等信号对平滑肌细胞发挥调节作用。cAMP 水平的异常,破坏其发挥信号与平滑肌细胞之间的桥梁作用,表现为激素水平与细胞形态及超微结构发生病理改变^[23],产生胃动力下降,引起胃排空延迟,故糖尿病胃轻瘫的发病机制与 cAMP 本身及其调节通路有着重要关系。血清素,又名 5-羟色胺(5-HT),是调节胃动力、分泌功能的重要神经递质,可对 cAMP 表达产生调控作用。本研究药物-疾病交集基因与蛋白互作图显示,加味桃核承气汤可作用于多个 5-HT 受体家族成员,包括 HTR3A, HTR4, HTR7, 血清素信号通过神经突触的传递,参与血清素受体信号通路表达,与本研究 GO 与 KEGG 通路富集分析结果相对应。已有研究表明,5-HT 与 HTR4 受体结合,可激活腺苷酸环化酶 AC,上调 cAMP,增加 cAMP 依赖性蛋白酶 A(PKA)表达,引起平滑肌细胞膜超极化, K⁺ 通道开放,同时抑制 L-型钙离子通道^[24], Ca²⁺ 内流减少,从而引起胃平滑收缩抑制,降低胃动力。后有姜京植等^[25]通过使用 AC 激活剂 Forskolin 干预观察大鼠胃平滑肌运动情况,进一

步验证了通过激活 AC,可上调 cAMP,增加 PKA 表达,从而抑制胃平滑肌收缩;通过使用 PKA 抑制剂 H-89,胃平滑肌收缩抑制得到阻断,与前研究结果一致。本研究 GO 通路富集分析提示加味桃核承气汤可能对 K^+ 通道产生负调控作用,即平滑肌细胞膜去极化,引起 Ca^{2+} 通道开放,导致胃平滑肌收缩,增加胃张力及胃动力。本网络药理学研究提示,加味桃核承气汤可能通过改变血清素受体信号通路的传导,影响血清素与其受体家族成员的结合,继而调节腺苷酸环化酶诱导的 AC/cAMP/PKA 信号通路表达,抑制 K^+ 通道,开放 Ca^{2+} 通道,促进胃平滑肌收缩,发挥改善胃动力的作用。

吴斌^[26]通过大黄酒干预大鼠胃平滑肌细胞,发现大黄酒可通过 RhoA 途径调节 G 蛋白偶联的 Ca^{2+} 敏感性,促进胃平滑肌收缩。聂克等^[27]使用黄芪干预脾虚大鼠,发现脾虚模型大鼠胃壁细胞钙库容量增加, Ca^{2+} 浓度升高,伴随胃泌素受体数量上调,推测黄芪可能通过调节 Ca^{2+} 通道影响胃壁细胞功能,发挥其调节胃酸分泌,促进胃排空作用。以上研究与本网络药理学研究结果一致,对加味桃核承气汤改善糖尿病胃轻瘫胃动力低下的作用机制,提供了 Ca^{2+} 离子通道调节及离子平衡方面的研究基础作为可信参考。但目前国内学者基于 5-HT/AC/cAMP/PKA 信号通路及 K^+ 通道观察中医药对胃动力影响的研究较少,有效中药方剂或中药有效成分对该信号通路及钾离子通道的调节机制有待进一步探索。

本研究还发现,加味桃核承气汤可能对药物-疾病交集基因中,编码一氧化氮(NO)的 NOS3 产生影响。进一步文献研究发现,小剂量 NO 有血管扩张作用,而大剂量 NO 可使血管处于舒张麻痹。陈光晖等^[28]研究认为,桃核承气汤能够降低瘀热模型大鼠 NO 水平,减轻血管舒张麻痹,改善血管活性及血流动力学,对机体“瘀”状态产生积极影响。该研究一定程度上佐证了本研究加味桃核承气汤在临床使用中,基于糖尿病胃轻瘫患者“水亏土虚,木陷凝瘀”之病机,治以“益气养阴,泻热逐瘀”,改善机体“瘀”状态,从而取得防治糖尿病胃轻瘫之效。可以认为,本研究药物-疾病交集基因提示,加味桃核承气汤防治糖尿病胃轻瘫的作用机制中,不排除具有调节 NO 水平,改善血管收缩功能,血流动力学的可能,该可能机制符合本研究 GO,KEGG 通路富集分析结果。

综上所述得出,本次网络药理学研究分析结果

显示,加味桃核承气汤防治糖尿病胃轻瘫的作用机制,可能通过改变加味桃核承气汤-糖尿病胃轻瘫靶标基因交集的表达,改善胃肠激素水平,影响血清素与其受体结合,调节下游腺苷酸环化酶激活的 AC/cAMP/PKA 信号通路,影响 Ca^{2+}/K^+ 通道的开放,控制离子平衡,促进胃平滑肌适应,收缩胃平滑肌以调节胃容量,同时改善胃酸分泌,保护胃黏膜,除此之外,不排除改善血管收缩功能、血流动力学的可能,进而从多方面,综合发挥中药复方对糖尿病胃轻瘫胃动力低下的防治作用,并减轻糖尿病胃轻瘫并发的酸相关性疾病。

本研究结果显示与目前的中药实验研究结论基本相符。本研究结果为该方进一步的实验研究提供了参考方向和理论基础。加味桃核承气汤作用于糖尿病胃轻瘫是多靶点、多通路、多功能的复杂网络机制,本研究为中医药多靶点防治糖尿病胃轻瘫及并发酸性消化道疾病提供一定的理论基础,为进一步开展实验工作提供研究方向。由于目前糖尿病胃轻瘫处于较新的研究阶段,互联网基因数据库已收纳的资源有限,本研究获取的疾病基因集合仍有待进一步完善。鉴于网络药理学研究的局限性,本研究未能反映基因表达与信号通路改变的正负调节关系,仅通过文献研究,结合网络药理学分析的结果,尚不能完全验证加味桃核承气汤对糖尿病胃轻瘫改善作用的可能机制。考虑到中药复方中化学成分多样性,与煎煮后化学反应的复杂性,本网络药理学针对药物-疾病的基因匹配,及其相关通路表达尚不能完全反应中药复方中实际发挥生物学效应的有效成分。因此分析所得的结果仍需后续实验观察与验证,以期进一步探索中医药防治疾病多靶点、多通路的复杂网络作用机制。

[参考文献]

- [1] CHANG J, Rayner C K, Jones K L, et al. Diabetic gastroparesis and its impact on glycemia[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2010, 39(4): 745-762.
- [2] Homko C, Siraj E S, Parkman H P. The impact of gastroparesis on diabetes control: patient perceptions [J]. *J Diabetes Complicat*, 2016, 30(5): 826-829.
- [3] 罗丹华,刘诗. 糖尿病性胃轻瘫的胃动力异常机制 [J]. *胃肠病学*, 2007, 12(6): 372-374.
- [4] Ravella K, YANG H, Gangula P R. Impairment of gastric nitregeric and NRF2 system in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(6): 1504-1509.

- [5] 白颖,丛佳林,田文杨,等. 浅析糖尿病胃轻瘫的发病机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(35): 3982-3986.
- [6] 谢欣颖. 基于 ICC 降糖三黄片防治 DGP 的机制探讨及中药干预的循证研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [7] 许帅. 基于 AGEs-RAGE 加味桃核承气汤防治 T2DM 大血管病变大鼠的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [8] 吴浩祥. 代谢综合征中医证候规律及加味桃核承气汤干预机制探讨[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [9] 伍游雅. 益气养阴, 活血通腑法对代谢综合征患者外周胰岛素抵抗的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
- [10] 耿华. 降糖三黄片对大鼠胰岛细胞凋亡通路影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [11] 张萌. 降糖三黄片干预 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢 AMPK 通路的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [12] 吴伟. 降糖三黄片对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4 的转位通路研究及循证研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [13] 何丽清, 田剑锋, 储开博. 半夏泻心汤桃核承气汤合方治疗糖尿病胃轻瘫的临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2672-2673.
- [14] 翟跃红, 贾长宽. 香连丸合桃核承气汤用于腹部术后胃瘫患者的疗效观察[J]. 湘南学院学报: 医学版, 2010, 12(1): 51-52.
- [15] WANG Y, LIU Z, LI C, et al. Drug target prediction based on the herbs components; the study on the multitargets pharmacological mechanism of Qishenkeli acting on the coronary heart disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, doi: 10.1155/2012/698531.
- [16] 邹钢, 邵豪, 陆泽元, 等. 糖尿病患者血糖与胃泌素、胃动素、生长抑素相互关系的初步探讨[J]. 海南医学, 2005, 16(10): 1-2.
- [17] Elin K, Monika S, Rolf H K, et al. High gastrin cell activity and low ghrelin cell activity in high-anxiety Wistar Kyoto rats [J]. J Endocrinol, 2007, 193(2): 245-250.
- [18] 张建安, 刘力, 张瑞娜, 等. 马齿苋对糖尿病胃轻瘫模型大鼠果糖胺、胃泌素水平的影响[J]. 新中医, 2011, 43(10): 123-125.
- [19] De Herder W W, Lamberts S W. Somatostatin analog therapy in treatment of gastrointestinal disorders and tumors[J]. Endocrine, 2003, 20(3): 285-290.
- [20] 高聪, 韩勇, 林大勇, 等. 加味桃核承气汤内服和灌肠对腹部术后早期肠梗阻神经-炎症机制的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 176-181.
- [21] 郝宗艳, 李欣, 李玲. 大黄素对功能性消化不良大鼠相关指标影响的实验研究[J]. 新中医, 2017, 49(5): 1-3.
- [22] 黄可儿, 李燕舞, 王汝俊, 等. 黄芪总苷对脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体作用的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(1): 42-44.
- [23] 陆学工, 许卫兵. 半夏泻心汤治疗糖尿病胃轻瘫的疗效观察及对糖化血红蛋白胃动素的影响[J]. 四川中医, 2014, 32(12): 61-63.
- [24] Kim Y C, Choi W, Sung R, et al. Relaxation patterns of human gastric corporal smooth muscle by cyclic nucleotides producing agents [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2009, 13(6): 503-510.
- [25] 姜京植, 孙倩, 许东元, 等. Forskolin 抑制大鼠胃窦环行平滑肌自发性收缩运动[J]. 生理学报, 2013, 65(2): 224-228.
- [26] 吴斌. 大黄素影响大鼠胃平滑肌细胞钙敏感性调节机制的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2005.
- [27] 聂克, 王汝俊, 王建华. 脾虚大鼠胃壁细胞胞浆游离钙离子浓度及黄芪对其调节作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(2): 15-17.
- [28] 陈光晖, 陈子珺, 陈德兴. 桃核承气汤及其拆方组对蓄血症大鼠模型“瘀热”相关指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 282-286.

[责任编辑 张丰丰]