

基于网络药理学和实验验证探讨缩泉丸用于小儿遗尿的作用机制

李飞飞¹, 李颖², 崔庆科², 李华^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市儿童医院, 上海 200040)

[摘要] **目的:**采用网络药理学方法全面系统筛选缩泉丸治疗小儿遗尿的作用靶点及相关信号通路,并通过动物实验进一步明确其作用机制。**方法:**利用中药系统药理学数据库TCMSP筛选缩泉丸的有效化学成分,整合多种系统生物数据库构建“活性成分-疾病-靶点”网络关系,对共有蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络基因进行功能富集分析,对核心靶点进行动物实验验证。**结果:**缩泉丸包含32个活性成分,包括波尔多定碱、去甲波尔多定、乌药醇、谷甾醇等,这些活性成分与遗尿症相关的131个潜在靶点蛋白发生相互作用,其中包含14个核心靶点基因,抗利尿激素2型受体V2R(AVPR2),神经营养酪氨酸受体激酶1(NTRK1),多巴胺D2受体(DRD2), μ 阿片受体(OPRM1),5-羟色胺受体1A(HTR1A),5-羟色胺受体1B(HTR1B),5-羟色胺转运体蛋白基因(SLC6A4), α 2A肾上腺素能受体(ADRA2A),前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2),胆碱能毒蕈碱M2受体(CHRM2),多巴胺转运体蛋白基因(SLC6A3),5-羟色胺受体6(HTR6),去甲肾上腺素转运体基因(SLC6A2)和细胞色素P450 2C19(CYP2C19)等。富集分析主要涉及G蛋白偶联受体信号通路、跨突触信号调节、神经递质转运调节、神经活性配体-受体相互作用。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹分析结果显示,缩泉丸能显著增强大鼠肾脏内AVPR2 mRNA和蛋白的表达,而减弱肾上腺组织中DRD2 mRNA和蛋白的表达。**结论:**缩泉丸中主要化学成分可能通过调节AVPR2,DRD2等关键基因,参与G蛋白偶联受体信号通路、跨突触信号调节、神经递质转运等生物过程来改善小儿遗尿。

[关键词] 缩泉丸; 小儿遗尿; 网络药理学; 抗利尿激素2型受体V2R; 多巴胺D2受体

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0213-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210612

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210311.0932.001.html>

[网络出版日期] 2021-3-11 17:21

Mechanism of Suoquanwan on Enuresis Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

LI Fei-fei¹, LI Jie², CUI Qing-ke², LI Hua^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Children's Hospital of Shanghai, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the targets and relevant signaling pathways of Suoquanwan in the treatment of enuresis using network pharmacology, and animal experiments are applied to further define its mechanism of action. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database was used to screen out active chemical components of Suoquanwan, varieties of systematic biological databases were integrated to construct the "active component-disease-target" network relationship, and the common protein protein interaction network (PPI) network genes were functionally enriched. Quantitative real time polymerase chain reaction(Real-time PCR) and Western blot were used to verify

[收稿日期] 20201202(017)

[基金项目] 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2018年—2020年)项目[ZY(2018-2020)-FWTX-4023];上海市卫健委妇幼健康中医专项建设项目(FYJKZY-EB-2)

[第一作者] 李飞飞,在读硕士,从事中医儿科疾病研究工作,E-mail:m18366331922@163.com

[通信作者] *李华,硕士,主任医师,从事中西医结合儿科临床及其基础研究工作,E-mail:lihua_chos@163.com

the effect of Suoquanwan on AVPR2 and DRD2 gene. **Result:** A total of 32 active ingredients were screened from Suoquanwan. These active ingredients were interacted with 131 potential targets relating to Enuresis, which contained 14 core target genes, namely arginine vasopressin receptor 2 (AVPR2), neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 (NTRK1), dopamine receptor D2 (DRD2), opioid receptor mu 1 (OPRM1), 5-hydroxytryptamine receptor 1A (HTR1A), 5-hydroxytryptamine receptor 1B (HTR1B), solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4), Adrenoceptor Alpha 2A (ADRA2A), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), cholinergic receptor muscarinic 2 (CHRM2), solute carrier family 6 member 3 (SLC6A3), 5-hydroxytryptamine receptor 6 (HTR6), solute carrier family 6 member 2 (SLC6A2), cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19 (CYP2C19). Gene enrichments mainly involved to G protein-coupled receptor signaling pathway, regulation of trans-synaptic signaling, regulation of neurotransmitter transport and neuroactive ligand-receptor interaction. Real-time PCR and Western blot results showed that Suoquanwan could enhance the expression of AVPR2 in rat kidney, and weaken the expression of DRD2 in rat adrenal. **Conclusion:** The main chemical constituents in Suoquanwan may alleviate enuresis by regulating AVPR2 and DRD2 and then participating in the G protein-coupled receptor signaling pathway, regulation of trans-synaptic signaling, regulation of neurotransmitter transport and other biological processes.

[Key words] Suoquanwan; enuresis; network pharmacology; namely arginine vasopressin receptor 2 (AVPR2); dopamine receptor D2 (DRD2)

小儿遗尿症是儿科常见疾病之一,据国际小儿尿控协会(ICCS)的诊断标准,遗尿是指5周岁及以上儿童夜间睡眠状态下无意识的排尿行为,平均每周尿床 ≥ 2 次,且持续3个月以上者,并且排除先天性或后天形成的神经系统疾病^[1]。儿童长期遗尿可引起严重的心理、行为问题,如不积极治疗,对健康心理状态及完整人格的形成非常不利^[2]。现代医学对本病病因病机尚不明确,认为该病是遗传、疾病、环境、神经内分泌因素等多种因素共同作用^[3]。

中医认为下元不固,膀胱虚寒是本病的主要病机,膀胱为津液之府,小便乃津液之余,小便的排泄与贮留,为膀胱气化所司,同时又赖于肾阳的温养^[4]。小儿之体,稚阴未长,稚阳未充,心肝有余,肺脾不足,肾常虚。遗尿的病因又常为胎禀不足,肾气亏虚,下元虚寒,使膀胱气化功能失调,不能制约水道而致遗尿^[5]。在治疗上强调止遗重在温补下元,固摄膀胱,兼以补脾肺气、清心火、舒肝气以治标,补肾的同时不忘清心醒神^[4]。

经典名方缩泉丸出自明代著名医学家薛己校注编著的《校注妇人良方》,由乌药、益智仁、山药3味中药组成,有温肾止遗、缩尿固涩的作用,广泛用于治疗下元虚冷、小便频数及小儿遗尿^[6]。方中益智仁为君药,乌药为臣药,山药为佐使之药,三药合用,温肾驱寒,使下焦得温而寒去,则膀胱之气复常,约束有权,尿频遗尿自可痊愈^[7]。

缩泉丸对于治疗小儿遗尿,具有广泛的临床应

用背景,但对于其分子基础和作用机制尚不清楚,缺乏系统的研究。目前,关于缩泉丸的缩尿机制研究多集中在膀胱功能障碍,分子机制主要涉及水通道蛋白(AQPs),辣椒素受体(TRPV1),毒蕈碱3型受体(M3), β_3 肾上腺素能受体(β_3 -AR)等,以广州中医药大学吴清和教授课题组研究成果为主,对缩泉丸“补肾缩尿”作用机制深入研究的靶点还相对较少,且缺乏其在肾脏和神经系统的研究。本文通过网络药理学方法首次对缩泉丸治疗遗尿的分子机制进行了全面系统的解析,网络药理学方法可通过整合多种生物数据库,构建“成分-疾病-靶点-通路”的互作网络,探究中药成分对于疾病的主要分子作用机制与信号通路,是目前探索中药方剂药理机制的综合有效的方法。另外,本文结合肾阳虚型遗尿动物模型实验验证,进一步阐述缩泉丸治疗小儿遗尿的分子机制,探究其对关键靶点的作用,为小儿遗尿临床药物的开发和临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 缩泉丸化学成分及其靶点的预测 以缩泉丸三味中药材“山药”“乌药”“益智仁”为关键词,通过中药系统药理学数据库(TCMSP)进行检索,得到其各自的主要化学成分。然后根据药物筛选中最常用的两种药代动力学特性进行筛选,口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 ,从而获得缩泉丸中具有较高活性的潜在有效化学成分。

通过有机小分子生物活性数据库 PubChem

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)检索整理缩泉丸三味中药材的有效成分的结构信息,获取各化学成分的典型结构式 Canonical SMILES,将其导入成分靶点预测数据库 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),设置物种为“Homo sapiens”,整理活性成分对应的靶标蛋白信息,后通过全球蛋白资源数据库 UniProt(<https://www.uniprot.org>)统一规范靶蛋白基因名,并去除重复数据,得到最终药物成分靶点信息^[8]。

1.2 药物有效成分靶点网络构建 人类蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)数据库 HIPPIE v2(<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~mschaefer/hippie/>),整合了来自 IntAct, MINT, BioGRID, HPRD, DIP, BIND 和 MIPS 等多个系统生物数据库^[9-15]的通过实验验证的蛋白互作网络关系。本研究利用 HIPPIE 数据库,获取到活性成分对应靶点基因的 PPI 的关系,互作阈值 ≥ 0.73 ,并将得到的数据导入 Cytoscape 3.7.0 软件构建成分靶点互作网络。

1.3 遗尿症相关靶点检索及 PPI 网络的构建 通过药物数据库 DrugBank,人类孟德尔遗传病数据库(OMIM),人类表型本体数据库(HPO),药物靶标数据库(TTD)和基因数据库 GeneCards,以“Enuresis”作为关键词进行检索,获得与遗尿发生相关的治疗靶点基因。利用 PPI 网络数据库 HIPPIE 获取疾病相关基因的 PPI 关系,后将得到的数据导入 Cytoscape 3.7.0 软件构建遗尿症靶点互作网络。

1.4 PPI 网络的构建与拓扑属性分析 利用 Cytoscape 3.7.0 软件 Merge 功能将缩泉丸成分靶点网络和遗尿靶点网络整合,获取交集网络,交集网络即为缩泉丸对于遗尿症的作用靶点网络,并通过网络拓扑分析工具 NetworkAnalyzer 对交集网络进行拓扑分析,进一步筛选所构建网络中的核心靶点。筛选标准有度值(degree),介值(betweenness)和节点紧密度(closeness)大于交集网络所有节点中位值的靶点,作为核心靶点^[16]。

1.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 为进一步了解筛选得到的交集网络在基因功能和相关信号通路上的具体作用,利用 R 语言的 ClusterProfiler(V3.10.0)软件包对缩泉丸-遗尿交集网络相关基因进行基因本体 GO 和 KEGG 通路富集分析,设定阈值 $P < 0.01$ 为具有统计学意义。

1.6 实验验证

1.6.1 实验动物 健康幼年 Sprague-Dawley(SD)

雄性大鼠 30 只,SPF 级,4 周龄,体质量(100 ± 30)g,由上海维通利华实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2017-0011。大鼠饲养在上海维通利华实验动物室,室内保持(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,采用 12 h/12 h 昼夜间断照明,大鼠可自由饮水、进食,水料充足,每周换水 3 次,换垫料 2 次。实验过程经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查,符合实验动物福利与伦理规范,伦理编号 PZSHUTCM200430003。

1.6.2 主要试剂与仪器 氢化可的松(天津金耀药业,批号 1911211),缩泉丸(湖南汉森制药,批号 1903205),异氟烷(上海雅培制药,批号 20081801),大鼠抗利尿激素(AVP)酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒(上海雅吉公司,批号 YS03706B),抗利尿激素 2 型受体 V2R(AVPR2)抗体(SAB,批号 C00536H),多巴胺受体 2(DRD2)抗体(Absin,批号 abs120396),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体(Abcam,批号 ab125247);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix, trizol, RNA 反转录试剂盒(TAKARA,批号分别为 0124401, 00345, 00356);RIPA 裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒(Eubitech,批号分别为 WB2116, WB2123)。7500 fast 型荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(ABI),SLXFA 型酶标仪(BioTek),DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物),D3024R 型离心机(DragonLab),5200Multi 型全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技)。

1.6.3 肾阳虚型遗尿模型制备及取材 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和缩泉丸组,每组 10 只。模型组和缩泉丸组给予氢化可的松 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射 21 d,正常组给予等体积生理盐水肌肉注射。从造模的第 8 天开始,缩泉丸组给予缩泉丸 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃 28 d^[17],正常组和模型组给予等量的生理盐水灌胃 28 d^[18]。分别在造模前、造模后、治疗后将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水,留取 24 h 尿标本,记录尿量。第 36 天处死大鼠,穿刺腹主动脉取血,置于离心管,分离血清(4°C , $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $r=10 \text{ cm}$, 10 min)备用。取肾和肾上腺组织,后快速冷冻于液氮中,并储存于 -80°C 冰箱中备用。

1.6.4 Real-time PCR 分析 使用 trizol 试剂盒按照说明书提取大鼠肾脏和肾上腺组织的总 RNA,使用去基因组污染的 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,而后进行 PCR 扩增,反应条件: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 72°C 延伸 45 s。以

β -肌动蛋白(β -actin)作为内参基因,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。具体引物如下,AVPR2上游5'-TGTTGCTCATGCTGCTGGCTAG-3',下游5'-TCCGAGGAGACACTGCTACTGAAG-3';DRD2上游5'-CAGTGAACAGGCGGAGAATGGATG-3',下游5'-GTGGTGGGATGGATCAGGAGAG-3'; β -actin:上游5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3',下游5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3',AVPR2,DRD2及 β -actin引物由上海生工生物技术有限公司合成。

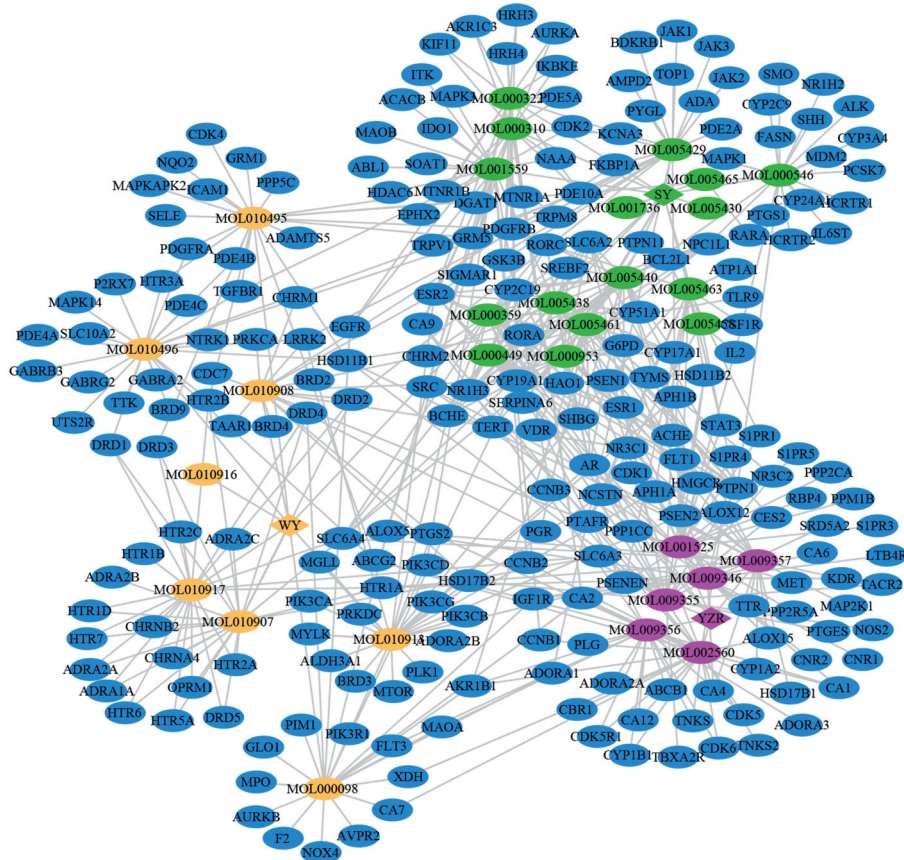
1.6.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 采用Western blot检测缩泉丸对AVPR2和DRD2蛋白表达的影响。分别将肾组织和肾上腺(100 mg)研成匀浆,并在RIPA裂解缓冲液中裂解。于12 000 \times g(4 $^{\circ}$ C)离心15 min,收集上清,用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,后-80 $^{\circ}$ C保存备用。制备SDS-

PAGE凝胶,后电泳转膜到PVDF上,封闭,孵育一抗和二抗。将ECLA液与B液等体积混合后均匀的覆盖在膜的表面,后用自动化学发光成像分析系统进行光密度定量分析。

1.6.6 统计学方法 采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缩泉丸有效化学成分及其靶点筛选 通过中药系统药理数据库,检索缩泉丸中三味中药的所有化学成分,得到32个候选化合物。其中山药7个、乌药19个、益智仁17个,后通过SwissTargetPrediction数据库检索整理出223个靶点蛋白,有效化学成分与靶蛋白的关系见图1,化学成分见表1。



橙色·乌药(WY)成分;绿色·山药(SY)成分;紫色·益智仁(YZR)成分;蓝色·靶点基因

图1 缩泉丸活性成分与靶点关系

Fig. 1 Herbs-compounds-putative targets network of Suoquanwan

2.2 遗尿治疗靶点 从OMIM, GeneCards, HPO, TTD和DrugBank数据库分别得到22,18,1,11和50个已知治疗靶点,去除重复项,最终得到79个已知治疗靶点。

2.3 缩泉丸作用靶点与遗尿症治疗靶点的交集网

络构建 为阐明缩泉丸治疗遗尿的分子机制,以HIPPIE数据库为基础,基于223个缩泉丸靶点和79个遗尿治疗靶点构建了缩泉丸-遗尿靶点网络。缩泉丸作用靶点网络由2 717个节点,6 265条边组成,遗尿症治疗靶点网络由340个节点,511条边组成,

表 1 缩泉丸活性化学成分筛选

Table 1 Active components predicted in Suoquanwan

药物	成分 ID	成分名称	口服生物利用度/%	类药性	
乌药	MOL010495	6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮	31.93	0.30	
	MOL010496	6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮	32.38	0.39	
	MOL010907	去甲波尔定	40.92	0.46	
	MOL010908	乌药醇	52.05	0.18	
	MOL010913	乌药醚内酯	77.09	0.25	
	MOL010916	nubigenol	42.55	0.19	
	MOL010917	波尔定碱	31.18	0.51	
	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	
	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	
	山药	MOL001559	萆薢宁	30.71	0.18
		MOL001736	(-)-花旗松素	60.51	0.27
		MOL000310	玉兰脂 B	61.47	0.38
		MOL000322	海风藤酮	54.72	0.38
		MOL005429	山药醇	64.01	0.37
MOL005430		山药素 C	59.05	0.39	
MOL005438		菜油甾醇	37.58	0.71	
MOL005440		异岩藻甾醇	43.78	0.76	
MOL000449		豆甾醇	43.83	0.76	
MOL005458		黄山药皂苷 C	36.38	0.87	
MOL000546		薯蓣皂素	80.88	0.81	
MOL005461		皮黄素	38.16	0.54	
MOL005463		甲基升麻甙	31.69	0.24	
MOL005465		伽升沃 B	45.33	0.77	
益智仁	MOL000953	CLR	37.87	0.68	
	MOL001525	胡萝卜苷	36.91	0.75	
	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	
	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	
	MOL009355	谷甾醇棕榈酸酯	30.91	0.40	
	MOL009356	柚木柯因	9.57	0.20	
	MOL002560	白杨素	22.61	0.18	
	MOL009346	益智醇	23.44	0.25	
	MOL009357	益智酮甲	8.2	0.25	

充分说明了靶点基因之间复杂的相互作用关系。然后,合并缩泉丸和遗尿互作网络,建立了由 131 个节点和 179 条边组成的缩泉丸-遗尿相关网络,见图 2A。基于网络拓扑分析筛选得到 14 个核心基因,

NTRK1, OPRM1, DRD2, HTR1A, HTR1B, SLC6A4, ADRA2A, PTGS2, CHRM2, SLC6A3, AVPR2, HTR6, SLC6A2, CYP2C19。这些基因与缩泉丸中 16 种有效化学成分密切相关,包括去甲波尔定,乌药醇,波尔定碱,谷甾醇,槲皮素,山药醇,菜油甾醇,异岩藻甾醇,豆甾醇,CLR,谷甾醇棕榈酸酯,杨芽黄素,益智醇, C09495, DMPEC, 益智酮甲等。其中与波尔定碱相关的核心基因数量最多,包括 ADRA2A, DRD2, HTR1A, HTR1B, HTR6, OPRM1, SLC6A3, SLC6A4。去甲波尔定次之,拥有除 HTR1B 外的 7 个基因。

2.4 富集分析 基于缩泉丸-遗尿交集网络共筛选到 131 个靶点基因进行富集分析,根据 *P* 值,排前 10 的显著富集 GO 功能和 KEGG 代谢通路如图 2B, C 所示。GO 富集分析结果显示参与的生物过程主要涉及 G 蛋白信号级联反应相关通路和跨膜运输途径等相关功能和通路,包括 G 蛋白偶联受体信号通路、腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联受体信号通路、跨突触信号调节、神经递质转运调节等。KEGG 富集分析结果显示,靶点基因主要富集在神经调节相关通路,包括神经营养蛋白信号通路和神经活性配体-受体相互作用等。

2.5 缩泉丸对大鼠尿量及 AVP 的影响 与正常组大鼠比较,模型组、缩泉丸组的尿量在造模后显著增多($P < 0.05$)。缩泉丸治疗 4 周(实验第 5 周)后,模型组大鼠比正常组尿量显著增多($P < 0.01$),缩泉丸组尿量比模型组显著减少($P < 0.01$)。缩泉丸治疗 4 周(实验 5 周)后,模型组与正常组相比,血清 AVP 含量明显降低($P < 0.01$),缩泉丸组血清 AVP 含量比模型组明显增多($P < 0.01$)。结果表明,缩泉丸治疗后能明显改善大鼠排尿量,并能显著提高 AVP 的含量。见表 2。

2.6 缩泉丸对大鼠肾脏 AVPR2, 肾上腺 DRD2 基因及蛋白表达水平的影响 定量 PCR 结果显示,与正常组相比,模型组 AVPR2 mRNA 在肾组织中的表达水平出现明显下降趋势($P < 0.01$);与模型组比较,缩泉丸治疗组 AVPR2 mRNA 在肾组织中的表达水平显著升高($P < 0.01$)。而与正常组相比,模型组 DRD2 mRNA 在肾上腺组织中的表达水平出现明显上升趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,缩泉丸治疗组 DRD2 mRNA 在肾上腺组织中的表达有显著回归正常水平的趋势,见表 3。Western blot 结果与 Real-time PCR 结果趋势一致,且达到

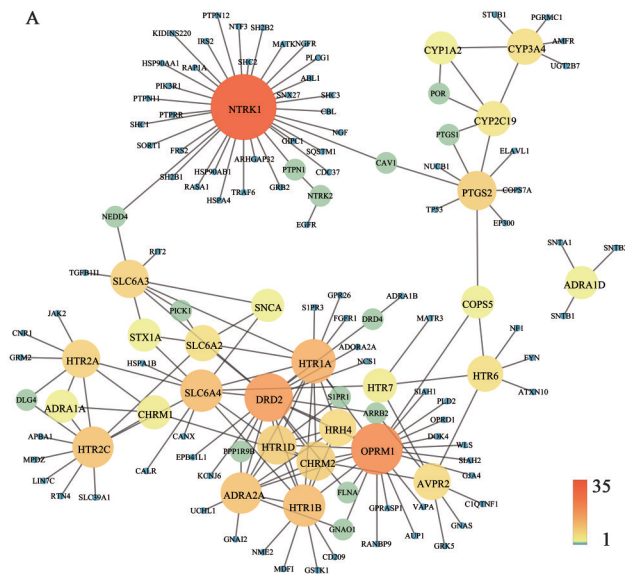


图 2 缩泉丸-遗尿交集 PPI 网络及功能富集分析

Fig. 2 Suoquanwan-enuresis related PPI network and its functional enrichment analysis

表 2 缩泉丸对大鼠尿量和血清 AVP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Suoquanwan treatment on urine output and AVP levels in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	24 h 尿量/mL			AVP(第 36 天)/ng·L ⁻¹
	造模前 (第 0 天)	造模后 (第 22 天)	治疗后 (第 36 天)	
正常	13.265±1.86	14.86±2.83	16.385±3.105	13.33±2.04
模型	12.96±1.675	33.11±4.84 ¹⁾	36.835±6.625 ¹⁾	8.27±1.88 ¹⁾
缩泉丸	13.075±2.64	31.095±4.875 ²⁾	27.37±5.065 ³⁾	12.56±1.35 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$,²⁾ $P<0.05$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$,⁴⁾ $P<0.05$;缩泉丸组剂量为 2 g·kg⁻¹。

显著水平,两个靶基因在肾/肾上腺中的蛋白水平与 mRNA 水平变化趋势一致。见表 4,图 3。

表 3 缩泉丸对遗尿大鼠肾组织 AVPR2 与肾上腺 DRD2 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Suoquanwan on mRNA expression levels of AVPR2 in kidney and DRD2 in adrenal tissues of rats with enuresis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AVPR2	DRD2
正常		6.07±0.17	2.85±0.09
模型		0.58±0.08 ¹⁾	9.94±0.34 ¹⁾
缩泉丸	2	4.84±0.11 ³⁾	5.80±0.23 ³⁾

3 讨论

遗尿症的病理生理学特征非常复杂,涉及中枢神经系统、睡眠觉醒障碍和肾脏膀胱功能障碍等^[19]。中医理论认为遗尿的基本病机为下元不固,膀胱虚寒,治疗上强调温补下元,固摄膀胱^[20]。古

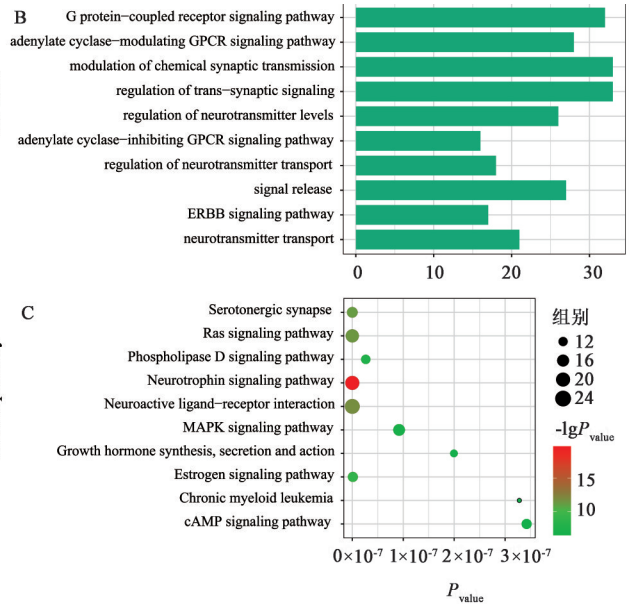


图 3 各组大鼠肾 AVPR2,肾上腺 DRD2 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of AVPR2 protein expression in kidney and DRD2 protein expression in adrenal of rats

方缩泉丸广泛应用于小儿遗尿治疗,但具体分子作用机制尚不清楚,本文运用网络药理学方法系统全面的探究缩泉丸治疗小儿遗尿的物质基础与潜在分子机制,结果表明缩泉丸通过调节肾脏和肾上腺改善遗尿症状的核心基因包含 AVPR2 和 DRD2,通过调节膀胱改善遗尿的核心基因包括 SLC6A4, HTR1A 和 CHRM2 等,可能通过调节 NTRK1, DRD2, SLC6A3, SLC6A4, HTR1B 等基因参与调控了神经系统相关通路而改善了遗尿症状,本研究通过动物实验验证了作用于肾脏和肾上腺的 AVPR2

与DRD2的作用机制,为药物开发和临床应用提供了依据。

本研究通过系统网络药理学分析,鉴定得到14个缩泉丸治疗遗尿的关键靶点基因,与缩泉丸16种有效化学成分密切相关,最主要的是波尔定碱与去甲波尔定。波尔定碱具有许多药理功效,如抗炎、解热、抗糖尿病、抗动脉粥样硬化、抗血小板、抗肿瘤,具有细胞保护作用,这与其强大的抗氧化活性有关^[21]。去甲波尔定碱是波尔定碱去N-甲基化后的成分,与波尔定碱相比活性稍弱。研究发现,波尔定碱可抑制高血压引起的慢性肾损伤大鼠的血管紧张素转化酶抑制剂ACE-1和转化生长因子TGF的增加,减轻肾脏损伤^[22]。另有报道称其可以通过调节肾小球滤过,维持肾功能正常,防止肾脏损伤^[23]。此外波尔定碱可参与肾脏中两个主要血压平衡系统,肾素-血管紧张素系统引起血管收缩和水盐潴留,而激肽释放酶-激肽系统可以诱导血管舒张和水钠排泄^[24]。缩泉丸中的波尔定和去甲波尔定可能通过改善肾脏系统平衡和肾功能,在遗尿治疗的过程中发挥了重要作用。

AVP是一种由下丘脑分泌的环状六肽激素,其2型受体V2R(AVPR2)系统参与调节机体对水分的重吸收、渗透压的平衡以及维持血压和血容量的稳定等,主要生理作用是抗利尿,2型水通道蛋白AQP2作为抗利尿激素的敏感水通道,可介导集合管进行跨膜水转运,是遗尿症最重要的调节机制之一^[25]。AVP从垂体中释放,通过血液输送到肾脏,然后与V2R受体在集合管细胞的基底侧膜上结合^[26]。激素受体复合物激活Gs蛋白,导致腺苷酸环化酶的激活和环磷酸腺苷cAMP浓度的增加,促使蛋白激酶PKA增加并激活AQP2磷酸化,AQP2插入肾脏集合管的基底侧膜而增加对水的重吸收,从而减少尿量。本研究大鼠实验中,缩泉丸明显改善了模型大鼠的遗尿症状,使AVPR2在基因和蛋白水平表达量增加,与网络药理学的分析相一致,从分子水平说明缩泉丸通过调节AVPR2的基因表达来调节尿量。缩泉丸与遗尿互作网络中靶点基因功能富集分析显示,绝大部分功能富集在信号传导中,尤其在G蛋白偶联和跨膜运输相关通路上,进一步表明缩泉丸可通过调控G蛋白偶联受体信号通路和跨膜水转运过程调节AQP2水通道,改善遗尿症状。

此外,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)是调节机体血压和体液稳态的必要环节^[27]。其中血

管紧张素Ⅱ对肾脏有多种调节作用,包括增加肾脏集合管对Na⁺和水的重吸收,以及调节电压门控钙通道从而控制血管的收缩^[28]。多巴胺在其中起到重要作用,其可调节血管紧张素Ⅱ的活性,血管紧张素Ⅱ和多巴胺的相互作用可干扰Na⁺平衡和血管舒缩张力^[29]。DRD2基因作为编码多巴胺受体的基因,在我们的核心靶点基因集中被发现,其主要在肾上腺组织表达,在肾脏调节尿量中发挥重要作用。大鼠实验证实了缩泉丸对于DRD2基因的调控作用,表明缩泉丸可能通过控制DRD2的表达来调控集合管的血管收缩和Na⁺,水的再吸收。此外,血管收缩(GO:0042310)和钙信号通路(hsa04020)等在网络药理学分析中显著富集于缩泉丸遗尿关联网络中,亦提示缩泉丸可能通过这些途径影响遗尿改善过程。

遗尿发生的另一个重要原因是膀胱功能障碍^[30]。膀胱功能由平滑肌和横纹肌协调控制,虽然膀胱的功能和基本结构看起来简单,但其依赖于复杂的中枢神经系统调节,包括胆碱能神经、肾上腺素能神经及非肾上腺素能非胆碱能神经等^[31]。本研究核心靶点基因中包含多个神经配体受体相关基因,如SLC6A4, HTR1A和CHRM2等,说明缩泉丸可通过调节神经递质改善膀胱功能,可能是其治疗遗尿的作用机制。之前有研究表明5-羟色胺转运体(5-HTT)由SLC6A4基因编码^[32],5-HTT将释放入突触间隙的5-羟色胺重吸收入突触前膜,从而调控其在突触间隙的数量及作用时间,从而影响排尿。HTR1A基因编码G蛋白偶联受体5HT1A,激活5HT1A受体会影响尿道括约肌从而增加排尿量^[33]。胆碱能毒蕈碱M2受体CHRM2参与膀胱的舒张机制,M受体主要分布于膀胱及后尿道,CHRM2可以激活磷脂酶C,并激活K⁺通道或抑制Ca²⁺通道,影响神经元的兴奋性,在功能上乙酰胆碱可以通过对受体M3亚型的作用,增加逼尿肌的收缩,以控制排尿过程^[34]。

另外值得注意的是,临床中遗尿症和注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)患儿的发病有一定的关联,注意力缺陷多动障碍儿童的遗尿发生率较正常儿童高出2.7倍,日间遗尿发生率高4.5倍^[35],尽管目前没有证据表明其发生机制间存在直接因果关系,但这一现象可能与中枢神经系统成熟障碍有关,最合理的解释包括多动症患儿脑干抑制缺失,导致无法识别膀胱信号,对膀胱充满时的意识下降^[36]。另一种解释可能

是多动症患儿的中枢肾上腺素能刺激系统受损,肾上腺素能活动减少导致括约肌过度活动,导致排泄时无法放松^[37]。另外,有病例报道显示,ADHD的治疗可能会导致遗尿症状的减轻,但其机制尚不清楚^[38]。有趣的是,一些被广泛研究和多动症有关的关键基因,亦在本研究缩泉丸-遗尿网络药理学核心靶点基因分析中被发现,包括NTRK1^[39],DRD2^[40],SLC6A3^[41],SLC6A4^[42],HTR1B^[43]等,表明这些基因可能对于小儿遗尿症和多动症同时发病的机制起到关键作用,其具体的关联机制以及缩泉丸是否会对多动症患儿有临床疗效需要进一步研究来验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PAUL F, AUSTIN S B B, WENDY B, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: update report from the standardization committee of the international children's continence society[J]. *J Urology*, 2014, 191(6):1863-1865.
- [2] ELIZABETH PRINCE, MICHELLE H. Nocturnal enuresis: an update on management [J]. *Drug Therapeut Bull*, 2020, 58(2):25-29.
- [3] TRYGGVE N. Nocturnal enuresis-theoretic background and practical guidelines [J]. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(8):1207-1214.
- [4] 范淑华,李向峰,丁樱,等. 丁樱教授运用五子衍宗丸加减治疗小儿遗尿症经验简介[J]. *新中医*, 2011, 43(12):150-151.
- [5] 张亚娟,秦曼. 从肾论治小儿遗尿经验的综述[J]. *黑龙江中医药*, 2017, 46(3):57-58.
- [6] 帅小翠,胡昌江,山珊. 益智仁盐炙品缩泉丸对肾虚模型小鼠血清Bun、Crea等组分及肾脏形态的影响[J]. *中医药导报*, 2018, 24(13):15-18.
- [7] 吴少波,龚雪,杨菲,等. 缩泉丸补肾缩尿的分子机制探讨[J]. *云南中医中药杂志*, 2016, 37(9):91-93.
- [8] 王倩,袁莉莉,张永玲,等. 石菖蒲-郁金配伍治疗癫痫的网络药理学研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(13):2701-2708.
- [9] KERRIEN S, ARANDA B, BREUZA L, et al. The IntAct molecular interaction database in 2012 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:D841-D846.
- [10] LICATA L, BRIGANTI L, PELUSO DANIELE, et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:D857-D861.
- [11] CHATR-ARYAMONTRI A, BREITKREUTZ B J,

- OUGHTRIED R, et al. The BioGRID interaction database: 2015 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43:D470-D478.
- [12] KESHAVA PRASAD T S, GOEL R, KANDASAMY K, et al. Human protein reference database-2009 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37:D767-D772.
- [13] SALWINSKI L, MILLER C S, SMITH A J, et al. The database of interacting proteins: 2004 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:D449-D451.
- [14] ISSERLIN R, EL-BADRAWI R A, BADER G D. The biomolecular interaction network database in PSI-MI 2. 5 [J]. *Database (Oxford)*, 2011, 2011:baq037.
- [15] PAGEL P, KOVAC S, OESTERHELD M, et al. The MIPS mammalian protein-protein interaction database [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(6):832-834.
- [16] GUO Q, ZHONG M, XU H, et al. A systems biology perspective on the molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of Buyang Huanwu decoction on ischemic stroke [J]. *Rejuvenation Res*, 2015, 18(4):313-325.
- [17] WANG J, LIAN D W, YANG X F, et al. Suoquanwan protects mouse from early diabetic bladder dysfunction by mediating motor protein myosin va and transporter protein SLC17A9 [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:552.
- [18] 苏文,胡爱霞,徐辉甫,等. 遗尿方对肾虚遗尿大鼠抗利尿激素的调节作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(10):825-827.
- [19] RAJIV S, SUMANTRA R. Management of nocturnal enuresis-myths and facts [J]. *World J Nephrol*, 2016, 5(4):328-338.
- [20] 李帅,周朋. 中医药治疗小儿遗尿研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(78):47-48.
- [21] LEILA, MOEZI, SIRANOUSH, et al. Acute boldine treatment induces anti-convulsant effects in mice through its antioxidant activity [J]. *Drug Res*, 2019, 69(4):227-233.
- [22] GÓMEZ GONZALO, VICTORIA V. Boldine improves kidney damage in the Goldblatt 2K1C model avoiding the increase in TGF- β [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7):1864-1883.
- [23] VELARDE, GOMEZ, GONZALO, et al. Boldine treatment ameliorates kidney damage in rats with 5/6 nephrectomy chronic renal failure [J]. *Faseb J*, 2012, 26(12):1363-1367.
- [24] MARLENE, N, ARISMENDI, et al. Boldine prevents renal alterations in diabetic rats [J]. *Experiment Diabetes Res*, 2013, 2013(2):593672-593683.
- [25] DEEN P M T, DAHL N, CAPLAN M J. The

- aquaporin-2 water channel in autosomal dominant primary nocturnal enuresis[J]. *J Urol*, 2002, 167(3): 1447-1450.
- [26] BOCKENHAUER D, BICHET D G. Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11 (10): 576-588.
- [27] TAKENAKA T, SUZUKI H, OKADA H, et al. Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: actions of angiotensin II [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(2): 558-565.
- [28] KOHAN D E, INSCHO E W, WESSON D, et al. Physiology of endothelin and the kidney [J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(2): 883-919.
- [29] PRASAD P, KUMAR P K, AMMINI A C, et al. Association of dopaminergic pathway gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes[J]. *BMC Genetics*, 2008, 9(1): 26.
- [30] RAMAKRISHNAN K. Evaluation and treatment of enuresis [J]. *Am Fam Physician*, 2008, 78 (4): 489-496.
- [31] 章振保, 张时纯. 膀胱功能的神经调节研究进展[J]. *国外医学: 泌尿系统分册*, 1998, 18(5): 229-231.
- [32] SOOKOIAN S, GEMMA C, SILVIA I GARCÍA, et al. Short allele of serotonin transporter gene promoter is a risk factor for obesity in adolescents [J]. *Obesity*, 2007, 15(2): 271-276.
- [33] CHENG C L, DE GROAT W C. Role of 5-HT1A receptors in control of lower urinary tract function in anesthetized rats [J]. *Am J Physiol-Renal*, 2010, 298 (3): F771-F778.
- [34] 陈洁君. 基于M3受体探讨缩泉丸“缩尿”的作用机理[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [35] BAEYENS, DIETER. The Impact of attention deficit hyperactivity disorders on brainstem dysfunction in nocturnal enuresis[J]. *J Urol*, 2006, 176(2): 744-748.
- [36] TAN M, APPLETON R. Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate, and epilepsy [J]. *Arch Dis Child*, 2005, 90(1): 57-59.
- [37] BORIS C, DMITRY K, WAEL ABU-ARAFEH, et al. Treatment of nocturnal enuresis in children with attention deficit hyperactivity disorder [J]. *J Urol*, 2007, 178(4): 1744-1747.
- [38] OHTOMO Y. Atomoxetine ameliorates nocturnal enuresis with subclinical attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [J]. *Pediatr Int*, 2017, 59 (2): 181-184.
- [39] SMITH T F, ANASTOPOULOS A D, GARRETT M E, et al. Angiogenic, neurotrophic, and inflammatory system SNPs moderate the association between birth weight and ADHD symptom severity [J]. *Am J Med Genet B*, 2014, 165(8): 691-704.
- [40] OMAR SERÝ, IVANA DRTÍLKOVÁ, THEINER P, et al. Polymorphism of DRD2 gene and ADHD [J]. *Neuroendocrinol Lett*, 2006, 27(1/2): 236-240.
- [41] SOLEIMANI R, SALEHI Z, SOLTANIPOUR S, et al. SLC6A3 polymorphism and response to methylphenidate in children with ADHD: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2018, 177(3): 287-300.
- [42] SONUGA-BARKE E J, KUMSTA R, SCHLOTZ W, et al. A functional variant of the serotonin transporter gene (SLC6A4) moderates impulsive choice in attention-deficit/hyperactivity disorder boys and siblings [J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 70(3): 230-236.
- [43] MÜLLER D, GREVET E H, PANZENHAGEN A C, et al. Evidence of sexual dimorphism of HTR1B gene on major adult ADHD comorbidities [J]. *J Psychiatr Res*, 2017, 95: 269-275.

[责任编辑 顾雪竹]