

·数字中医药·

本文引用: 罗雯鹏, 王真权, 周佳敏, 肖俐敏, 王 适, 陆文洪, 王军文. 基于网络药理学和实验验证探究生血通便颗粒治疗慢传输型便秘的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 408-418.

基于网络药理学和实验验证探究生血通便颗粒治疗慢传输型便秘的作用机制

罗雯鹏^{1,2}, 王真权¹, 周佳敏², 肖俐敏², 王 适¹, 陆文洪¹, 王军文^{1,2*}

1.湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2.湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 采用网络药理学预测生血通便颗粒治疗慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)的潜在作用机制, 并进行动物实验验证。**方法** 利用 TCMSP 数据库和 BATMAN-TCM 数据库筛选生血通便颗粒的活性成分及作用靶点, 通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库筛选 STC 疾病相关靶点, 构建“活性成分-疾病靶点”网络, 使用 R 语言对交集基因进行 GO 及 KEGG 富集分析。大鼠采用盐酸洛哌丁胺混悬液[3 mg/(kg·d)]灌胃建立 STC 模型。将大鼠分为正常组(等体积蒸馏水)、模型组(等体积蒸馏水)、莫沙比利组[1.35 mg/(kg·d)]、生血通便颗粒低剂量组[1.44 g/(kg·d)]、生血通便颗粒高剂量组[2.88 g/(kg·d)], 每组 8 只, 每日灌胃 1 次, 连续治疗 14 d。记录治疗后肠道推进率; HE 染色观察结肠组织病理学改变; 免疫组织化学法检测结肠组织酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, c-Kit)表达; TUNEL 染色检测结肠组织 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)凋亡情况; Western blot 检测结肠组织葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、活化型胱天蛋白酶-3(cleaved cysteine aspartic acid specific protease-3, cleaved Caspase-3)蛋白表达水平。**结果** 筛选出生血通便颗粒活性成分 74 个, 对应的作用靶点为 492 个, CASP3(Caspase-3)、Bcl-2、Bax 凋亡基因是 STC 的核心靶点之一, 其相关的作用通路为内质网应激信号通路。动物实验结果表明, 与正常组比较, 模型组大鼠肠道推进率降低($P<0.01$); 结肠黏膜萎缩、变薄, 黏膜上皮层有缺失, 固有层腺体缺损破坏明显, 可见炎性改变; 结肠组织中 c-Kit 表达降低($P<0.01$); 凋亡细胞绿色荧光增加, c-Kit 红色荧光减少, ICC 凋亡指数升高($P<0.01$); 结肠组织 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组相比, 莫沙比利组及生血通便颗粒低、高剂量组大鼠肠道推进率提高($P<0.01$); 结肠黏膜结构较完整, 炎性情况有所恢复, 腺体排列较整齐; 结肠组织中 c-Kit 表达升高($P<0.01$); 凋亡细胞绿色荧光减少, c-Kit 红色荧光增加, ICC 凋亡指数降低($P<0.01$); 结肠组织 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与莫沙比利组相比, 生血通便颗粒高剂量组肠道推进率提高($P<0.05$), c-Kit 表达升高($P<0.05$), ICC 凋亡指数降低($P<0.05$); 生血通便颗粒低、高剂量组结肠组织中 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.01$), 生血通便颗粒高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。**结论** 生血通便颗粒可通过抑制内质网应激 GRP78/CHOP 信号通路, 调控 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 凋亡蛋白表达, 从而抑制 ICC 凋亡以达到治疗 STC 的作用。

[关键词] 生血通便颗粒; 慢传输型便秘; Cajal 间质细胞; 内质网应激; 细胞凋亡; 网络药理学

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.009

[收稿日期] 2023-08-14

[基金项目] 湖南省自然科学基金青年基金项目(2023JJ40496); 湖南省中医药管理局中医防治肛肠疾病临床研究中心(湘中医药函[2022]93号); 湖南省中医药管理局一般项目(2021063); 湖南中医药大学校级科研项目(2020XJJ059); 湖南省中医药管理局中医防治肛肠疾病重点实验室建设项目(湘中医药函[2020]51号)。

[通信作者] *王军文, 男, 博士, 教授, 主任医师, E-mail: wangjunwen_1963@126.com。

Mechanism of Shengxue Tongbian Granules in treating slow transit constipation based on network pharmacology and experimental validation

LUO Wenpeng^{1,2}, WANG Zhenquan¹, ZHOU Jiamin², XIAO Limin², WANG Shi¹,
LU Wenhong¹, WANG Junwen^{1,2*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] Objective To predict the potential mechanism of action of Shengxue Tongbian Granules (SXTBG) in treating slow transit constipation (STC) by network pharmacology and to verify it by animal experiments. **Methods** TCMSP and BATMAN-TCM databases were used to screen out the active ingredients and targets of SXTBG, and GeneCards and OMIM databases were used to screen out STC disease-related targets, then an "active ingredient-disease target" network was established. GO and KEGG enrichment analyses were performed on intersection genes through R language. A STC rat model was established by gavage with loperamide hydrochloride suspension [3 mg/(kg·d)]. Rats were randomized into normal group (equal volume of distilled water), model group (equal volume of distilled water), mosapride group [1.35 mg/(kg·d)], low-dose SXTBG group [1.44 g/(kg·d)], and high-dose SXTBG group [2.88 g/(kg·d)], with eight rats in each group. All the groups were treated by gavage once a day for 14 consecutive days. Intestinal propulsion rate of the rats after treatment was recorded. In the rat colon tissue, HE staining was used to observe its pathological changes, immunohistochemical staining to check the expression level of tyrosine kinase receptor (c-Kit), TUNEL staining to examine the apoptosis of interstitial cells of Cajal (ICC), and Western blot to test expressions of glucose regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and cleaved cysteine aspartic acid specific protease-3 (cleaved Caspase-3). **Results** A total of 74 active ingredients of SXTBG were screened out, with 492 corresponding targets. *CASP3* (*Caspase-3*), *Bcl-2*, and *Bax* apoptosis genes were one of the core targets of STC, and their related pathways of action were endoplasmic reticulum stress signaling pathways. Animal experiment results showed that compared with normal group, the intestinal propulsion rate of model group decreased ($P<0.01$); the colonic mucosa atrophied and became thinner, with loss of mucosal epithelial layer, severe damage to the glandular tissue in the lamina propria, and visible inflammatory changes; the expression of c-Kit in the colon tissue decreased ($P<0.01$); the green fluorescence of apoptotic cells increased, the red fluorescence of c-Kit decreased, and the ICC apoptosis index increased ($P<0.01$); the protein expression levels of GRP78, CHOP, Bax, and cleaved Caspase-3 in the colon tissue increased ($P<0.01$), while that of Bcl-2 decreased ($P<0.01$). Compared with model group, the intestinal propulsion rates of mosapride group and low- and high-dose SXTBG groups increased ($P<0.01$); the colonic mucosal structure was relatively intact, and the inflammation was alleviated, and the glandular arrangement was relatively neat; the expression of c-Kit in the colon tissue increased ($P<0.01$); the green fluorescence of apoptotic cells decreased, the red fluorescence of c-Kit increased, and the ICC apoptosis index decreased ($P<0.01$); the protein expression levels of GRP78, CHOP, Bax, and cleaved Caspase-3 in the colon tissue decreased ($P<0.01$), while that of Bcl-2 increased ($P<0.01$). Compared with mosapride group, high-dose SXTBG group showed an increase in the intestinal propulsion rate ($P<0.05$) and c-Kit expression ($P<0.05$), and a decrease in the ICC apoptosis index ($P<0.05$); the protein expression levels of GRP78, CHOP, Bax, and cleaved Caspase-3 in the colon tissue of low- and high-dose SXTBG groups decreased ($P<0.01$), while that of Bcl-2 increased in high-dose SXTBG group ($P<0.01$). **Conclusion** SXTBG can inhibit ICC apoptosis and exert therapeutic effects on STC by inhibiting the endoplasmic reticulum stress GRP78/CHOP signaling pathway and regulating the expressions of Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 apoptotic proteins.

[Keywords] Shengxue Tongbian Granules; slow transit constipation; interstitial cells of Cajal; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; network pharmacology

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是一种临床常见的功能性胃肠疾病,以肠道动力障碍、传输功能减弱为特征,临床上主要表现为排便次

数减少、周期延长、粪质干硬等^[1]。最新流行病学调查显示,STC的患病人数在慢性便秘人群中占15%~42%^[2]。长期便秘给患者带来极大的心理负担及经济

压力,甚至可引起相关心脑血管疾病、结直肠癌等。目前,西医治疗 STC 不断完善和规范,但疗效尚不理想,而中医药因远期疗效满意和不良反应少,已成为近年来治疗 STC 药物研究的热点领域。

中医学认为,便秘病位在大肠,与心、肝、脾、肺、肾关系密切,其病机多为虚实夹杂,与气血津液、寒热虚实相关。生血通便颗粒是湖南中医药大学第二附属医院的院内自制剂,方药组成包括白芍、生地黄、大黄、瓜蒌皮、瓜蒌子、当归、枳壳、何首乌、决明子、桃仁、白术,全方补中有通、通中有补、攻补兼施,具有滋阴养血、益气润肠之功,多年来用于临床,疗效满意^[3-5]。

中药复方具有多成分、多靶点、多途径的特点,但其药效物质以及疗效机制尚不明确,还需要进一步探索。网络药理学具有整体性和系统性,与中医学的整体观和辨证论治等理论相契合^[6-8]。本研究旨在利用网络药理学方法预测生血通便颗粒治疗 STC 的相关靶点及机制,并通过动物实验验证关键靶点和相关蛋白,为本课题组后期基础研究和临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学预测

1.1.1 数据库及软件 TCMSP 数据库(<http://tcm-spw.com/index.php>);BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>);UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>);GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>);OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>);STRING 数据库(<http://string-db.org/>);Bioconductor 平台(<http://www.bioconductor.org/>);R 软件;Perl 软件;Cytoscape 软件。

1.1.2 生血通便颗粒的活性成分及对应的靶点筛选

利用 TCMSP 数据库和 BATMAN-TCM 数据库收集生血通便颗粒的活性成分及对应的作用靶点。在 TCMSP 数据库中设置筛选条件口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug-likeness, DL)≥0.18,收集白芍、瓜蒌、大黄、当归、枳壳、决明子、桃仁和白术的活性成分;在 BATMAN-TCM 数据库中设置 Score≥20 且 P<0.05 为筛选条件,收集生地黄和何首乌的活性成分。通过 TCMSP 数据库和 BATMAN-TCM 数据库检索中药成分对应的靶点

(即生血通便颗粒的药物靶点)。运用 Perl 软件结合 UniProt 数据库对药物靶点进行规范化。

1.1.3 疾病相关靶点及交集靶点获取 以“slow transit constipation”为关键词分别在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库中检索疾病相关靶点,剔除重复靶点后整理成 STC 靶点数据集。

1.1.4 “活性成分-疾病靶点”网络构建及可视化分析 利用 R 语言对药物靶点与疾病靶点进行映射,即两者取交集。运用 Perl 语言映射出交集靶点对应的中药活性成分,建立生血通便颗粒中药活性成分干预 STC 的相关靶点数据库。借助 Cytoscape 软件的最大集团中心性(maximal clique centrality, MCC)算法提取前 30 个节点,构建“活性成分-疾病靶点”可视化调控网络图。

1.1.5 PPI 网络筛选核心基因 将上述得到的交集靶点上传至 STRING 数据库,构建 PPI 网络。根据 MCC 算法对 PPI 网络进行分析,筛选出疾病核心基因。

1.1.6 富集分析 运用 R 语言对得到的交集基因进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。在 GO 富集分析中,对靶点生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3 个方面进行作用机制注释,并根据 P 值选取每个部分排名前 10 位的条目进行进一步分析。在 KEGG 富集分析中,对靶点所参与的信号通路进行注释,并根据 P 值选取排名前 30 位的条目进行深入研究。

1.2 动物实验验证

1.2.1 实验动物 44 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量(200±20) g,由湖南中医药大学动物实验中心代购并饲养,许可证号 SYXK(湘)2019-0009。所有大鼠在清洁、安静、通风良好的环境中饲养,温度为 24~26℃,相对湿度为 40%~60%,均自由进食、饮水。本动物实验研究获得湖南中医药大学实验动物伦理委员会审核通过(批准号:LL2022110820)。

1.2.2 药物 生血通便颗粒由白芍、生地黄、大黄、瓜蒌皮、瓜蒌子、当归、枳壳、何首乌、决明子、桃仁、白术组成,配制单位:湖南中医药大学第二附属医院(湖南省中医院),湘药制备字:Z20210440000,批号:20210920,规格:8 g/包。枸橼酸莫沙必利分散片(成都康弘药业集团股份有限公司,国药准字:H20031110,批号:20220113,规格:5 mg/片);盐酸

洛哌丁胺胶囊(易蒙停)(西安杨森制药有限公司,国药准字:H10910085,批号:20220302,规格:2 mg/片)。

1.2.3 主要试剂与仪器 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司,批号:11684817910);HE 染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号:BA4041);酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, c-Kit)(美国 Santa 公司,批号:SC-365504);葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)、C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、活化型胱天蛋白酶-3(cleaved cysteine aspartic acid specific protease-3, cleaved Caspase-3)、 β -actin、辣根过氧化物酶标记二抗(美国 Santa 公司,批号:SC7455、SC7532、SC7382、SC7480、SC7272、SC47778、SC2748);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0009、C1002)。

脱水机、石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12S、JB-P7);病理切片机(德国 Leica 仪器有限公司,型号:RM 2016);正置荧光显微镜、成像系统(日本尼康公司,型号:Nikon Eclipse Ti-SR、Nikon DS-U3);酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:muLISKANMK3];电泳仪、电转仪、电泳槽(北京六一生物技术有限公司,型号:DYY-6C、DYCZ-40、DYCZ-24DN);脱色摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-1);冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司,型号:neofuge 15R)。

1.2.4 动物造模 按照随机数字表法将 44 只大鼠分为正常组 10 只、造模组 34 只。除正常组外,其余大鼠采用洛哌丁胺灌胃制备 STC 大鼠模型⁹:每日予盐酸洛哌丁胺混悬液灌胃,剂量为 3 mg/(kg·d),使用无菌生理盐水配制药物浓度为 0.3 mg/mL 的盐酸洛哌丁胺混悬液,给药体积为 10 mL/kg;正常组灌胃等量蒸馏水,均连续灌胃 12 d。随后正常组与造模组每组随机取 2 只大鼠用于模型验证,造模组粪便干结、量少粒细,肠道推进率明显下降,表示模型建立成功¹⁰。

1.2.5 分组与给药 模型判定成功后,正常组剩余 8 只、造模组剩余 32 只大鼠,再将造模组随机分为模型组、莫沙比利组和生血通便颗粒低、高剂量组,每组 8 只大鼠。生血通便颗粒人临床日用量为 16 g 生药颗粒,根据临床推荐成人每日剂量以及人与动

物按体表面积折算的等效剂量(人与大鼠的换算比为 0.018)¹¹,计算得出大鼠生血通便颗粒低、高剂量分别为 1.44、2.88 g/kg(相当于临床成人等效剂量的 1、2 倍)。将生血通便颗粒用蒸馏水完全溶解以灌胃,莫沙比利组给予枸橼酸莫沙必利分散片,同样用蒸馏水溶解成混悬液灌胃,给药剂量为 1.35 mg/kg。正常组与模型组予等体积蒸馏水灌胃。给药体积均为 10 mL/kg,每日 1 次,连续 14 d。

1.2.6 样本采集与处理 第 14 日灌胃结束后,所有大鼠禁食不禁水 24 h,腹腔注射麻醉,脱颈处死大鼠,取出幽门至直肠末端肠管,计算肠道推进率;测量后剪取结肠组织,挤出肠腔内的残留物,PBS 缓冲液冲洗。一部分用 4%多聚甲醛固定,以备切片制备;另一部分置于-80 °C 保存,用于 Western blot 检测。

1.2.7 指标检测 (1)肠道推进率。末次给药结束后,各组大鼠禁食过夜以排空肠道内容物,每只大鼠按照体质量 10 mL/kg 经口灌入 10%活性炭悬液。40 min 后用 3%戊巴比妥钠,按 30 mg/kg 进行腹腔注射麻醉,并脱颈处死大鼠。立即剖取幽门至直肠末端肠管,在无张力状况下测量幽门至直肠末端总长度和幽门至炭末前沿的距离,肠道推进率=活性炭悬液前沿至幽门的距离/肠道总长度 $\times 100\%$ ¹²。(2)HE 染色观察结肠组织病理学改变。将 4%多聚甲醛固定后的结肠组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,HE 染色法制备病理切片,显微镜下观察。(3)免疫组织化学法检测结肠 c-Kit 表达水平。取大鼠结肠组织切片,捞片,60 °C 烤片 2 h。高压热抗原修复,滴加 5% BSA 封闭液,室温封闭 20 min, PBS 洗 3 次,2 min/次;滴加 c-Kit 一抗(1:200),4 °C 过夜,PBS 洗 3 次,2 min/次;滴加二抗,37 °C 孵育 60 min,PBS 洗 3 次,2 min/次;DAB 显色,苏木精复染,透明后封胶观察。每张切片随机选取 3 个高倍视野(400 倍),使用 Image J 软件进行 c-Kit 平均光密度(average optical density, AOD)测定。(4)TUNEL 染色检测结肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)凋亡情况。取包埋好的组织切片、脱蜡、水化,蛋白酶 k 孵育 10~20 min,PBS 洗 3 次,5 min/次。滴入 TUNEL 液(45 μ L 酶溶液和 45 μ L 标记液),37 °C 避光孵育 1.2 h,PBS 洗 3 次,5 min/次,加入兔抗大鼠 c-Kit 多克隆抗体,4 °C 过夜,PBS 洗 3 次,5 min/次,加入荧光二抗 CY3 标记山羊抗兔 TgG 抗体,同时加

入 DAPI 染色液复染细胞核,室温孵育 60 min, PBS 洗 3 次, 5 min/次, 荧光显微镜下观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 进行细胞凋亡指数测定。凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数×100%。(5) Western blot 检测大鼠结肠 GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平。取出结肠组织, 研磨粉碎, 加入裂解液后匀浆、离心取上清液, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 加缓冲液使蛋白变性, 制备 SDS-PAGE 凝胶。通过电泳法分离总蛋白(电压: 80 V)。转膜, 摇床上常温使用封闭液封闭 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。孵育一抗: GRP78(1:1 000)、CHOP(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:1 000)、 β -actin(1:10 000), 4 ℃冰箱过夜, 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入二抗(1:10 000), 室温摇床孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。显色, 采集数据, 使用 Image J 软件分析数据, 以 β -actin 为内参, 以目的蛋白灰度值/内参灰度值, 得出目的蛋白的相对表达量。

1.2.8 统计学方法 以 Excel 软件建立数据库, 使用 SPSS 28.0、GraphPad Prism 9 软件对原始数据进行分析及作图。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 组间计量资料先检验正态性和方差齐性, 符合正态分布且方差

齐者采用单因素方差分析(组间两两比较采用 LSD 检验), 符合正态分布但方差不齐者采用校正方差分析, 不服从正态分布者用 *Kruskal-Wallis H* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物活性成分及潜在靶点

经过筛选, 在 TCMSp 数据库中获得 56 个活性成分; 在 BATMAN-TCM 数据库中获得 20 个活性成分。剔除 2 个重复后, 获得活性成分共计 74 个, 共对应 492 个作用靶点。

2.2 疾病靶点的筛选

通过 GeneCards 数据库检索得到 STC 相关靶点 4 317 个, 通过 OMIM 数据库检索得到 STC 相关靶点 200 个, 删除重复项后得到 4 405 个疾病相关靶点。

2.3 “活性成分-疾病靶点”网络构建及可视化分析

利用 R 语言将 492 个药物作用靶点与疾病相关的 4 405 个靶点取交集, 得到 294 个共同靶点。利用 Perl 语言映射出 294 个共同靶点的有效成分, 借助 Cytoscape 软件 MCC 算法提取前 30 个节点构建生血通便颗粒“中药活性成分-STC 相关靶点”可视化调控网络图(图 1)。由于活性成分名称较长而不

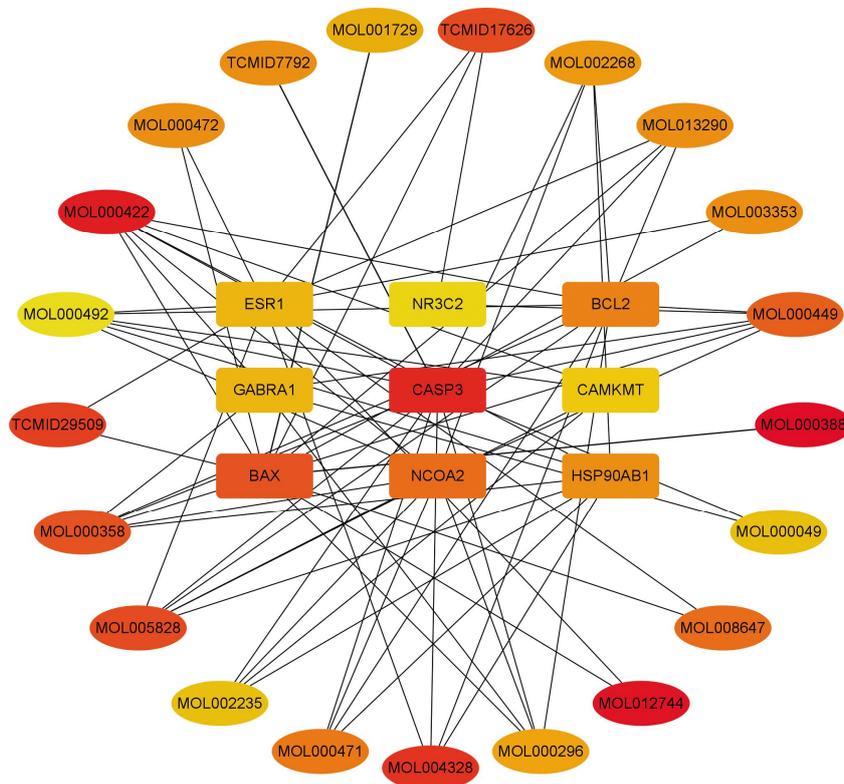


图 1 生血通便颗粒中药“活性成分-STC 相关靶点”可视化调控网络图

注: 颜色越红, 表示 MCC 值越高; MOL 表示该成分收录于 TCMSp 数据库, TCMIID 表示该成分收录于 BATMAN-TCM 数据库。

利于绘图,故本研究在绘图时以ID代替成分名称。由图1可知,MOL000388(γ -氨基丁酸)、MOL000422(山柰酚)、MOL012744(白藜芦醇)等在生血通便颗粒治疗STC中发挥关键作用。

2.4 PPI网络分析筛选核心基因

将294个交集靶点上传至STRING数据库,物种选择人类(Homo sapiens),其余参数保持默认设置,构建PPI网络。将PPI网络文件导入Cytoscape软件,根据MCC算法提取前30个基因(图2)。由图2可知,CASP3(Caspase-3)、Bcl-2、Bax是STC的核心靶点。同时,Caspase-3、Bcl-2、Bax也是细胞凋亡的关键蛋白,说明生血通便颗粒可能通过调控细胞凋亡对STC发挥治疗作用。

2.5 富集分析结果

运用R语言对药物作用靶点与疾病相关靶点的294个交集基因进行富集分析,设置 $P < 0.05$,得到GO富集条目3297条,其中BP条目2877条、CC条目171条、MF条目249条。KEGG通路富集条目193条。



图2 PPI筛选的核心基因(前30位)

注:颜色越红,表示MCC值越高,基因靶点越核心。

2.5.1 GO富集分析 BP注释主要与对外源性刺激的反应、对营养水平的反应、对细胞外刺激的反应等有关;CC注释提示相关作用机制主要发生在膜筏、膜微区、突触膜等;MF主要包括神经递质受体活性、核受体活性、配体活化转录因子活性等。详见图3。

2.5.2 KEGG通路富集分析 在193条KEGG通路中,涉及内质网中的蛋白质加工、化学致癌-受体激活、神经活性配体-受体相互作用等方面(图4)。根据PPI网络分析筛选Caspase-3、Bcl-2和Bax凋亡相关蛋白为STC的核心靶点。结合富集分析,进一步运用R语言提取出内质网的蛋白质加工信号通路机制图(图5),可知内质网应激BiP(又称GRP78)/CHOP信号通路所诱导的细胞凋亡在STC中发挥重要作用。

2.6 生血通便颗粒对STC大鼠肠道推进率的影响

与正常组相比,模型组大鼠肠道推进率明显降低($P < 0.01$);与模型组相比,莫沙必利组及生血通便颗粒低、高剂量组大鼠肠道推进率显著提高($P < 0.01$);与莫沙必利组相比,生血通便颗粒高剂量组肠道推进率提高($P < 0.05$)。详见表1。

2.7 生血通便颗粒对STC大鼠结肠组织病理的影响

正常组大鼠结肠组织结构清晰,腺体排列规整,黏膜层未观察到明显炎性改变;模型组大鼠结肠黏膜萎缩、黏膜层变薄,黏膜上皮层有缺失,固有层腺体缺损破坏且数目明显减少,黏膜可见炎性改变;与模型组比较,莫沙必利组和生血通便颗粒低、高剂量组大鼠结肠黏膜结构较完整,炎性情况有所恢

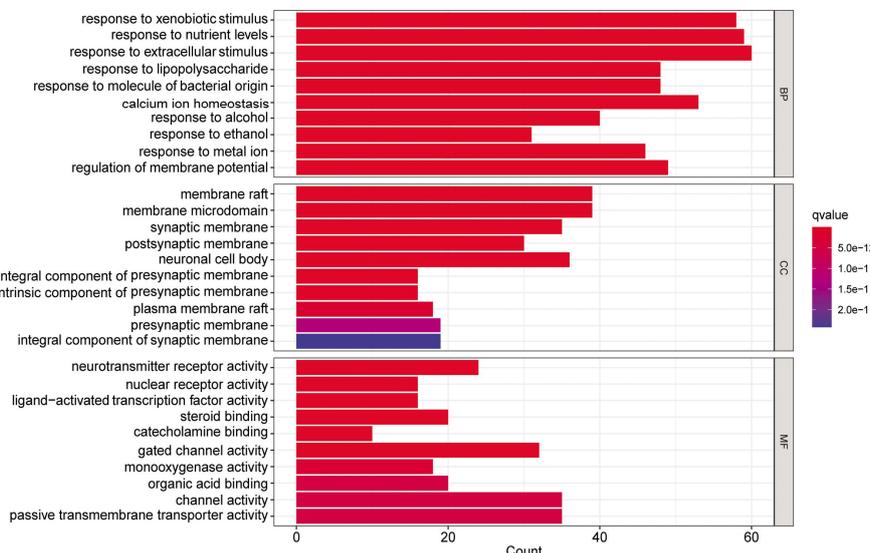


图3 GO富集分析结果图

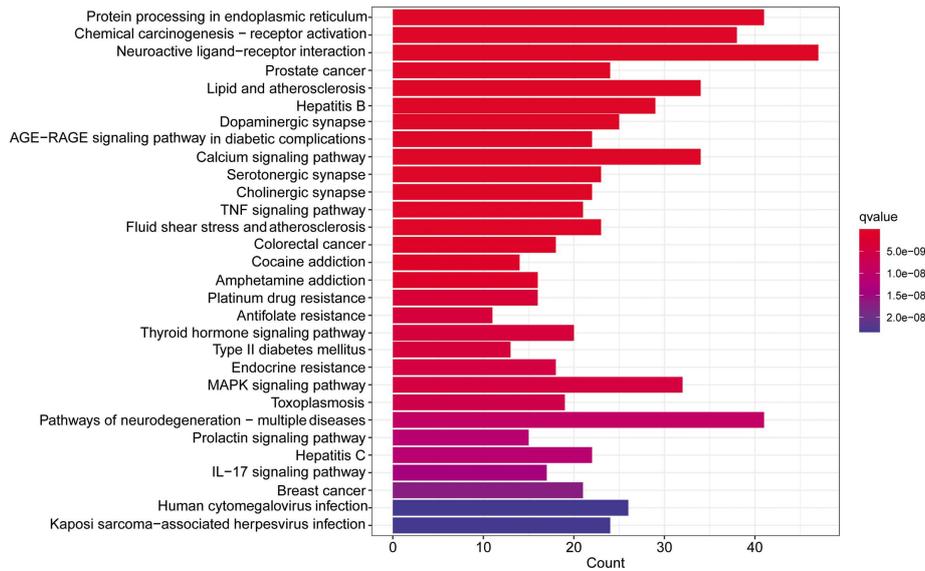


图 4 KEGG 富集分析结果图

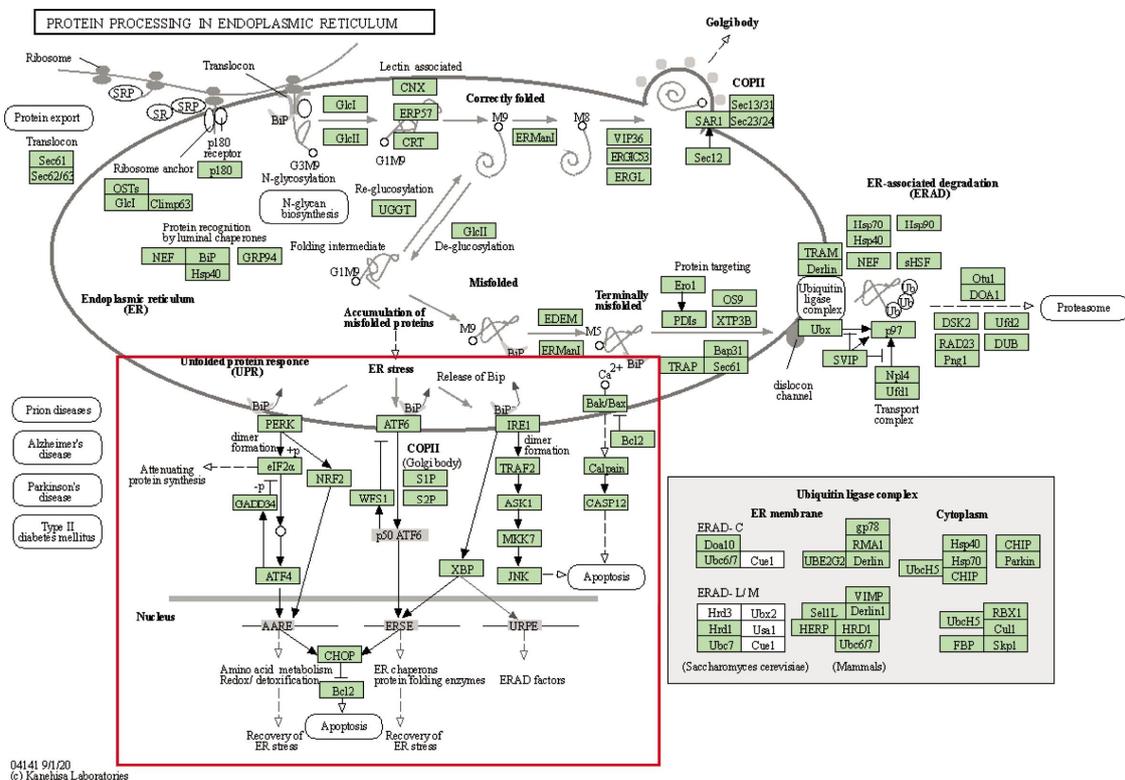


图 5 内质网中的蛋白质加工信号通路

表 1 各组大鼠肠道推进率比较 ($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	肠道推进率
正常组	65.32±1.72
模型组	43.11±2.13**
莫沙必利组	60.08±2.16 [#]
生血通便颗粒低剂量组	61.76±1.07 [#]
生血通便颗粒高剂量组	62.13±2.01 ^{#△}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与莫沙必利组比较,[△] $P<0.05$ 。

复,腺体排列较整齐。随着生血通便颗粒剂量增加,结肠的病理特征逐渐减弱。详见图 6。

2.8 生血通便颗粒对 STC 大鼠结肠 c-Kit 表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠结肠组织 c-Kit 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,莫沙必利组和生血通便颗粒低、高剂量组大鼠结肠组织 c-Kit 表达显著升高($P<0.01$);与莫沙必利组相比,生血通便颗粒高剂量组 c-Kit 表达升高($P<0.05$)。详见图 7、表 2。

2.9 生血通便颗粒对 STC 大鼠结肠组织 ICC 细胞凋亡的影响

正常组可见少许绿色荧光,提示仅有少量 ICC 凋亡;与正常组相比,模型组大鼠结肠组织凋亡细胞

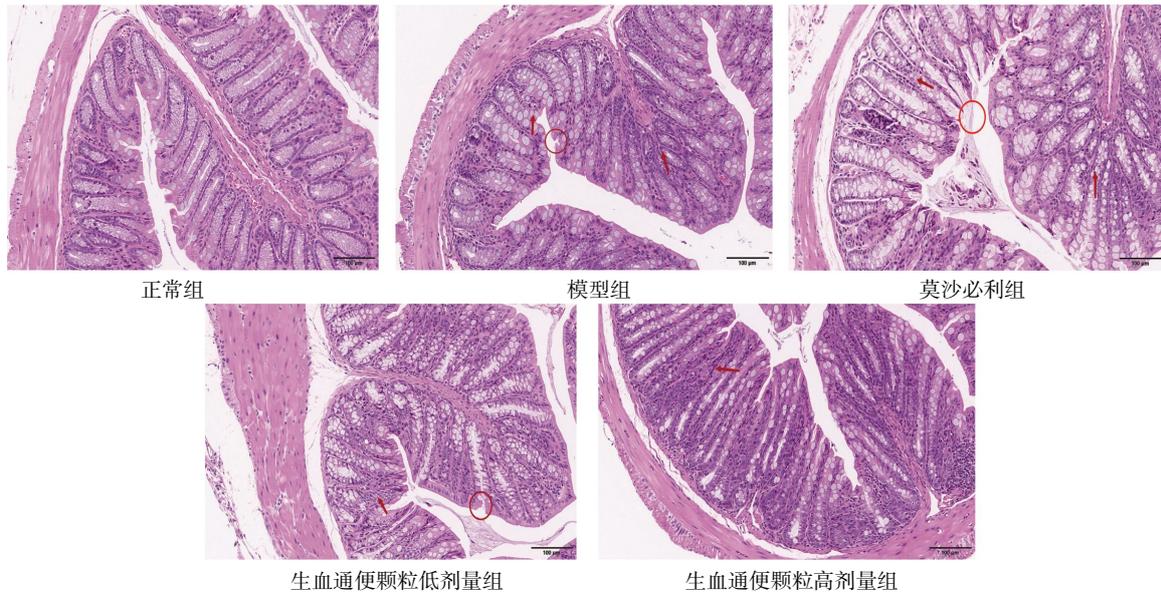


图6 各组大鼠结肠组织 HE 染色图(×200)

注:红色圆圈代表腺体破坏,少量炎性分泌;红色箭头代表结肠黏膜萎缩。

表2 各组大鼠结肠组织 c-Kit 平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	AOD
正常组	0.198±0.003
模型组	0.121±0.007**
莫沙必利组	0.159±0.008 [#]
生血通便颗粒低剂量组	0.165±0.005 [#]
生血通便颗粒高剂量组	0.168±0.007 ^{#Δ}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与莫沙必利组比较,^Δ $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠 ICC 凋亡指数比较($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	凋亡指数
正常组	6.504±1.008
模型组	13.122±2.007**
莫沙必利组	9.057±1.007 [#]
生血通便颗粒低剂量组	8.996±1.021 [#]
生血通便颗粒高剂量组	8.010±1.006 ^{#Δ}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与莫沙必利组比较,^Δ $P<0.05$ 。

绿色荧光增加、c-Kit 红色荧光减少,且 ICC 凋亡指数明显升高($P<0.01$);与模型组相比,莫沙必利组和生血通便颗粒低、高剂量组大鼠结肠组织凋亡细胞绿色荧光减少、c-Kit 红色荧光增加,ICC 凋亡指数明显降低($P<0.01$);与莫沙必利组相比,生血通便颗粒高剂量组凋亡指数降低($P<0.05$)。详见表3、图8。

2.10 生血通便颗粒对 STC 大鼠结肠组织 GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组结肠组织中 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组相比,莫沙必利组及生血通便颗粒低、高剂量组

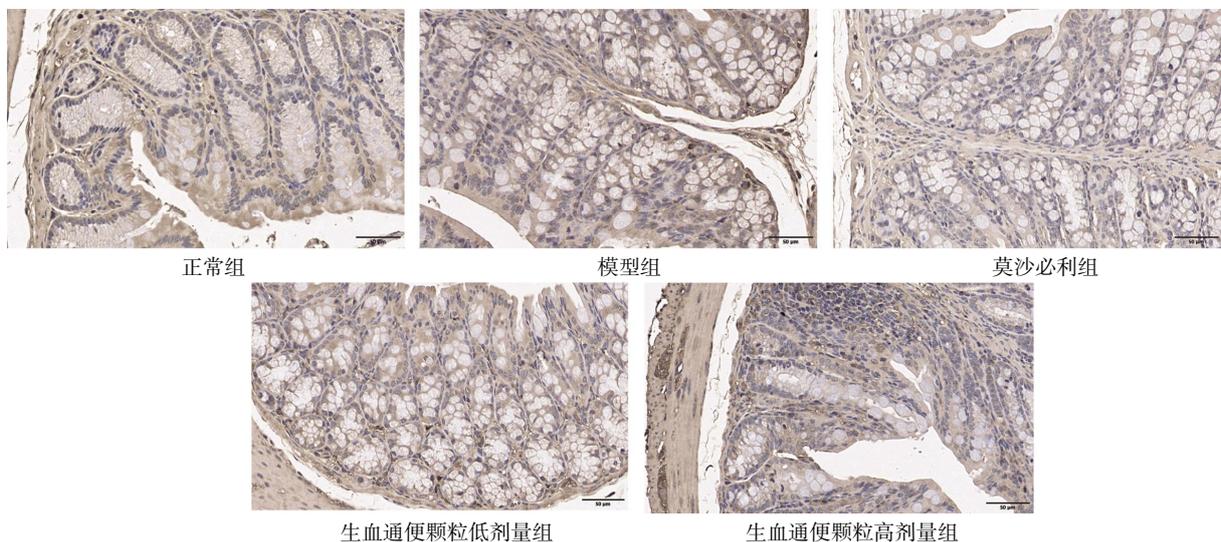


图7 各组大鼠结肠组织 c-Kit 免疫组织化学染色图(×400)

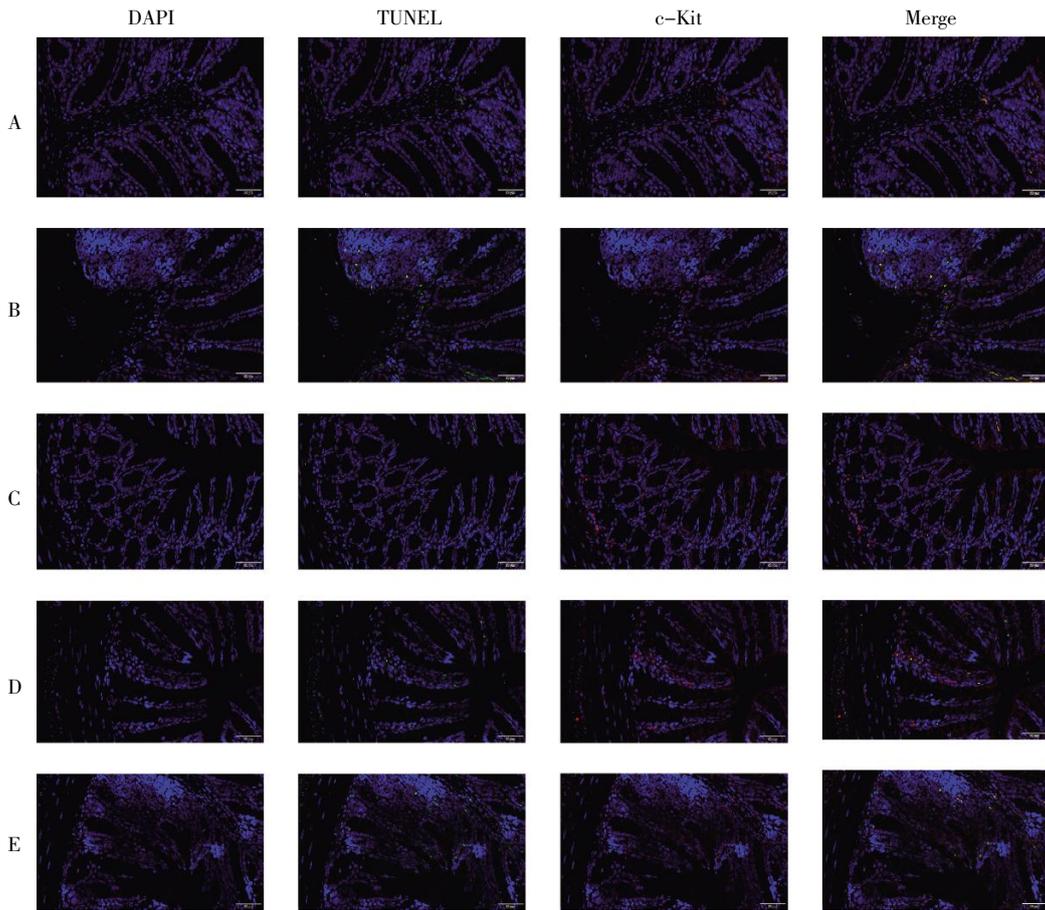


图 8 各组大鼠结肠组织 ICC 凋亡表达情况(TUNEL,×400)

注:A.正常组;B.模型组;C.莫沙必利组;D.生血通便颗粒低剂量组;E.生血通便颗粒高剂量组。DAPI 染色为蓝色荧光;TUNEL 中 ICC 凋亡细胞为绿色荧光;c-Kit 标记 ICC,c-Kit 表达为红色荧光;Merge 染色为 ICC 凋亡细胞与 c-Kit 表达的叠加。

结肠组织中 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与莫沙必利组相比,生血通便颗粒低、高剂量组结肠组织中 GRP78、CHOP、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), 生血通便颗粒高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与生血通便颗粒低剂量组相比,生血通便颗粒高剂量组结肠组织中 GRP78、CHOP、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 9、表 4。

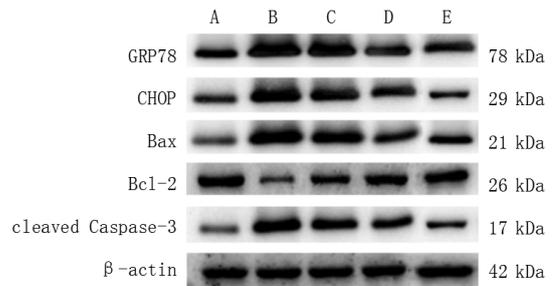


图 9 各组大鼠结肠组织 GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白条带图

注:A.正常组;B.模型组;C.莫沙必利组;D.生血通便颗粒低剂量组;E.生血通便颗粒高剂量组。

表 4 各组大鼠结肠平滑肌组织 GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	GRP78	CHOP	Bax	Bcl-2	cleaved Caspase-3
正常组	0.24±0.01	0.33±0.02	0.12±0.01	0.72±0.09	0.45±0.04
模型组	0.55±0.07**	0.71±0.05**	0.37±0.03**	0.21±0.03**	1.32±0.07**
莫沙必利组	0.47±0.05 ^{##}	0.53±0.02 ^{##}	0.29±0.02 ^{##}	0.58±0.06 ^{##}	0.82±0.06 ^{##}
生血通便颗粒低剂量组	0.35±0.03 ^{###△△}	0.44±0.01 ^{###△△}	0.14±0.01 ^{###△△}	0.63±0.04 ^{##}	0.68±0.09 ^{##△△}
生血通便颗粒高剂量组	0.29±0.06 ^{###△△▲}	0.32±0.03 ^{###△△▲▲}	0.13±0.04 ^{###△△}	0.68±0.07 ^{###△△}	0.51±0.11 ^{###△△▲▲}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与莫沙必利组比较,^{△△} $P<0.01$;与生血通便颗粒低剂量组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

3 讨论

STC是一种肠道动力障碍性疾病。ICC是一种肠道运动的起搏细胞,广泛分布于机体整个消化道的平滑肌细胞间,目前被广泛用于STC治疗药物及手段的研究^[13]。c-Kit是ICC的特异性蛋白,常被用在鉴定肠道ICC的研究中。近年来大量研究证实,细胞内外环境变化可导致肠道ICC启动程序性死亡,ICC凋亡是STC发生的主要机制之一^[14-16]。中药复方在治疗STC中具有独特优势,可修复ICC超微结构,干预ICC凋亡,对于肠道传输功能具有显著改善效果^[17-18]。经本次动物实验观察,生血通便颗粒可明显提高肠道推进率、显著增加结肠c-Kit阳性表达、抑制ICC凋亡,但生血通便颗粒高、低剂量组之间作用差异不明显,浓度梯度的依赖性不强。

本研究中,通过网络药理学方法在TCMSP数据库与BATMAN-TCM数据库分别筛选出生血通便颗粒56个活性成分和20个活性成分,去重后得到共74个活性成分、492个作用靶点。再利用R语言将药物作用靶点与疾病相关靶点取交集,得到294个共同靶点。通过PPI网络分析,发现Caspase-3、Bcl-2、BAX等基因是STC的核心靶点。Bcl-2家族通过促凋亡和抑凋亡分子相互作用来控制细胞的凋亡和存活,是细胞凋亡研究中最深入广泛的一类分子^[19]。Bax和Bcl-2均属Bcl-2家族中的成员,Bax参与促进细胞凋亡,而Bcl-2起到抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2家族通过促进线粒体外膜通透性控制凋亡途径,使促凋亡因子释放到细胞质中,进而激活Caspase蛋白酶级联反应^[20]。Caspase蛋白酶位于细胞凋亡传导通路的核心位置,直接或间接引起细胞凋亡结构特征的出现^[21]。Caspase-3的活化被认为是细胞凋亡的关键环节,是凋亡蛋白酶级联反应中不可或缺的一环^[22]。本研究实验验证发现,模型组大鼠结肠组织Bax、cleaved Caspase-3的蛋白表达水平均较正常组升高,Bcl-2较正常组降低,生血通便颗粒可降低Bax、cleaved Caspase-3表达,增加Bcl-2表达,其中生血通便颗粒高、低剂量组比较,仅cleaved Caspase-3蛋白表达有差异。以上结果说明生血通便颗粒可能通过调控凋亡蛋白基因而发挥作用,且高剂量组对部分凋亡基因的调控作用相对较强。

KEGG通路富集分析结果提示,内质网的蛋白质加工信号通路涵盖于生血通便颗粒治疗STC的靶向通路中。为进一步分析相关机制,运用R语言提取了内质网的蛋白质加工信号通路机制图,发现关键靶点中的GRP78、CHOP等均在内质网应激信号通路上富集。内质网应激所诱导的细胞凋亡是近年来才发现并了解的一种新凋亡途径^[23]。有研究发现,内质网应激诱导的ICC凋亡与胃肠动力障碍密切相关^[24]。GRP78是内质网应激的标志物,其表达上调标志着内质网应激的启动,在调节内质网未折叠蛋白反应信号网络中起关键作用^[25]。CHOP是内质网应激诱导细胞产生凋亡的下游关键信号分子^[26]。据报道,内质网应激状态下,CHOP表达显著升高,阻断细胞增殖,通过调节其下游基因Caspase等诱导内质网相关的细胞凋亡,也可通过抑制抗凋亡基因Bcl-2和上调促凋亡基因Bax表达水平介导细胞凋亡^[27]。本研究结果表明,生血通便颗粒显著抑制了STC大鼠模型结肠组织中内质网应激信号通路相关蛋白GRP78、CHOP的表达,且生血通便颗粒高剂量组抑制作用更明显,提示生血通便颗粒可能通过抑制内质网应激GRP78/CHOP通路在细胞凋亡上对ICC产生抑制作用。

综上所述,网络药理学与体内实验研究表明,生血通便颗粒可以抑制ICC凋亡,其机制可能与抑制内质网应激GRP78/CHOP信号通路,调控Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3凋亡蛋白表达有关。然而,本研究仍存在不足之处,实验只验证了网络药理学部分通路以及对应的核心靶点,且中药剂量组梯度分组较少,今后课题组将更加深入地开展动物和细胞实验,进一步挖掘作用机制,为生血通便颗粒的临床应用提供更加坚实的理论依据。

参考文献

- [1] 钱梦焱,戴高中. 中药治疗慢传输型便秘临床及实验研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(3): 518-520.
- [2] BHARUCHA A E, LACY B E. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation[J]. Gastroenterology, 2020, 158(5): 1232-1249.
- [3] 潘 燎,王真权,罗雯鹏. “增水行舟”法治疗慢传输型便秘津血亏虚证临床研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(5): 115-118.
- [4] 张德生,李益亮,刘水春,等. 生血通便颗粒联合多库酯钠片治

- 疗腰椎内固定术后便秘临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(4): 107-111.
- [5] 徐娟, 徐霜俐, 王朝红, 等. 生血通便颗粒治疗血虚肠燥型脓毒症胃肠功能损伤的临床研究[J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(5): 6-10.
- [6] ZHANG H X, ZHANG Y Y, LI Y F, et al. Bioinformatics and network pharmacology identify the therapeutic role and potential mechanism of melatonin in AD and Rosacea[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 756550.
- [7] ZHOU W A, YANG K, ZENG J Y, et al. FordNet: Recommending traditional Chinese medicine formula via deep neural network integrating phenotype and molecule[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 173: 105752.
- [8] 李鹏, 张浩然, 张元媛, 等. 基于整体化学和生物效应谱推演的中药靶点研究新模式及应用[J]. 中草药, 2023, 54(6): 1986-1997.
- [9] 许明敏, 张微, 王路, 等. 功能性便秘动物模型评价的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(1): 315-318.
- [10] 汤文娟, 夏旭婷, 刘富林. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠黏膜 AQP3、AQP9 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(6): 999-1005.
- [11] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 155-157.
- [12] 吴旻娜, 王浩, 李悠然, 等. 枳术方对慢传输型便秘大鼠结肠 5-HT₄R 及下游 CaM-MLCK 信号通路的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 891-896.
- [13] 张远哲, 黎豫川, 赵罗娜. 附子-肉桂对慢传输型便秘大鼠 5-HT 信号通路及 c-Kit 表达的影响[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2023, 25(3): 1111-1121.
- [14] VIEIRA-FREZ F C, SEHABER-SIERAKOWSKI C C, PERLES J V C M, et al. Anti- and pro-oxidant effects of quercetin stabilized by microencapsulation on interstitial cells of Cajal, nitrenergic neurons and M2-like macrophages in the jejunum of diabetic rats[J]. *Neurotoxicology*, 2020, 77: 193-204.
- [15] 陈思敏, 陈泰宇, 张智彬, 等. 基于 MAPK 信号探讨增液汤调节慢传输型便秘大鼠 Cajal 间质细胞增殖与凋亡的作用机制研究[J]. 中药材, 2023, 46(9): 2324-2329.
- [16] WANG T H, ANGELI T R, ISHIDA S, et al. The influence of interstitial cells of Cajal loss and aging on slow wave conduction velocity in the human stomach[J]. *Physiological Reports*, 2021, 8(24): e14659.
- [17] 陈萌, 于永铎, 张斯瑶, 等. 化癥通便汤对慢传输型便秘大鼠结肠 Cajal 间质细胞及相关蛋白表达调节作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(5): 1056-1059.
- [18] 林仁敬, 郭夏君, 王梨力, 等. 白术七物颗粒调控 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 Cajal 间质细胞凋亡治疗慢传输型便秘机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(8): 5-9, 221.
- [19] 胡善明, 王亚楠, 许正茂, 等. Bcl-2 家族分子在细胞凋亡中的作用研究进展[J]. 动物医学进展, 2021, 42(10): 85-89.
- [20] KALKAVAN H, GREEN D R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2018, 25(1): 46-55.
- [21] 刘大锐, 李报春, 李怀东. 细胞凋亡核心基因 Caspase 家族的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2020, 22(11): 800-805.
- [22] 郭双, 邢栋, 吕勃. 细胞凋亡及细胞程序性坏死和细胞焦亡的研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2021, 35(3): 321-324.
- [23] WANG X H, DING D Y, WU L, et al. PHB blocks endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by MPTP/MPP⁺ in PD models[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2021, 113: 101922.
- [24] 王远, 凌江红, 张丽敏, 等. 枳实含药血清对大鼠胃 Cajal 间质细胞内质网应激损伤的影响及机制[J]. 山东医药, 2018, 58(41): 34-37.
- [25] WANG W H, LIU T H, LIU Y Y, et al. Astaxanthin attenuates alcoholic cardiomyopathy via inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated cardiac apoptosis[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2021, 412: 115378.
- [26] ZHAO G C, ZHANG X L, WANG H, et al. Beta carotene protects H9c2 cardiomyocytes from advanced glycation end product-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2020, 8(10): 647.
- [27] 王增四, 高文, 陈丹, 等. 黄芪甲苷抑制内质网应激及 CHOP 信号通道改善衣霉素诱导的系膜细胞凋亡[J]. 医药导报, 2022, 41(2): 150-154.

(本文编辑 周旦)