

黄芪建中汤下调 TLR-2、p-NF- κ B 表达治疗 消化性溃疡的效应及机制研究

仇婧玥^{1,2}, 陈小娟^{1,2}, 曾梅艳², 喻昶^{1,2}, 熊萌^{1,2}, 宋厚盼^{1,2*}

¹湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室; ²湖南中医药大学中医学学院, 长沙 410208

摘要:本研究结合网络药理学、生物信息学与动物实验探究黄芪建中汤(HQJZD)治疗消化性溃疡(PU)的疗效与机制。运用中药系统药理学数据库和分析平台检索出 HQJZD 主要活性成分 110 个, 预测靶点 943 个; 基于疾病数据库 TTD、OMIM、GAD、DrugBank、Pharm GKB 共检索到与 PU 发病密切相关的靶点 157 个。运用 Cytoscape 筛选出 HQJZD 治疗 PU 的特异性靶点 417 个, GO 和 KEGG 结果显示 HQJZD 可能通过调控 Toll 样受体、NF- κ B、JAK-STAT、MAPK 等信号通路介导的炎症反应发挥治疗效应。PU 脾胃虚寒证大鼠胃黏膜的 HE 染色、酶联免疫吸附试验和免疫荧光染色结果表明, HQJZD 低、高剂量组均能有效修复 PU 脾胃虚寒证大鼠的胃黏膜组织病理学损伤, 显著升高 PGE₂ 及 NO 含量($P < 0.01$), 显著降低 TLR2 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平($P < 0.05$)。综上所述, HQJZD 治疗 PU 具有多成分、多途径、多靶点的特点, 其机制可能与调节 PGE₂、NO 等炎症因子水平, 调控 NF- κ B 信号通路和 Toll 样受体信号通路有关。

关键词:黄芪建中汤; 消化性溃疡; 分子机制; Toll 样受体; NF- κ B; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)3-0477-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.3.014

Effect and mechanism of Huangqi Jianzhong Decoction on peptic ulcer by down-regulating TLR-2 and p-NF- κ B expression

QIU Jing-yue^{1,2}, CHEN Xiao-juan^{1,2}, ZENG Mei-yan², YU Chang^{1,2}, XIONG Meng^{1,2}, SONG Hou-pan^{1,2*}

¹ Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine;

² College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: In this study, we explored the mechanism of action and efficacy of Huangqi Jianzhong Decoction (HQJZD) in treating peptic ulcer (PU) using network pharmacology analysis and animal experiments. The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to retrieve 110 active components of HQJZD and predict 943 targets. A total of 157 targets closely related to PU were retrieved from the disease databases TTD, OMIM, GAD, DrugBank and Pharm GKB. By using Cytoscape, 417 specific targets for HQJZD for PU were identified. In GO and KEGG enrichment analyses, HQJZD may have a therapeutic role in regulating inflammatory reactions mediated by Toll-like receptors, NF- κ B, JAK-STAT, MAPK and other factors. Based on HE staining, enzyme-linked immunosorbent assay, and immunofluorescence staining of rats with PU spleen stomach deficiency cold syndrome, HQJZD at low and high doses could effectively repair pathological damage to gastric mucosa, significantly increase PGE₂ and NO levels ($P < 0.01$) and reduce TLR2 and p-NF- κ B expression ($P < 0.05$). As a result, HQJZD treatment of PU has the characteristics of being multi-component, multi-channel, and multi-target therapies. The mechanism of its action may involve regulating PGE₂ and NO levels, as well as the NF- κ B signaling pathway and the Toll like receptor signaling pathway.

Key words: Huangqi Jianzhong Decoction; peptic ulcer; molecular mechanism; Toll-like receptor; NF- κ B; network pharmacology

收稿日期: 2022-08-05 接受日期: 2022-12-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81703920); 湖湘青年科技创新人才项目(2021RC3101); 湖南省教育厅科学研究重点项目(21A0240); 湖南中医药大学研究生创新项目(2021CX46)

* 通信作者 Tel: 86-731-88459435; E-mail: hpsong2015@126.com

消化性溃疡(Peptic Ulcer, PU)是临床常见的上消化道疾病,多发生于胃和十二指肠,其典型临床症状表现为周期性上腹部疼痛。脾胃虚寒证是 PU 较常见与高发的一种证型,也是临床所有 PU 证型中最难治愈的一种。目前 PU 临床治疗药物根据其功能划分为抗酸药、抑酸药、根除幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的抗生素和消化道黏膜保护剂四大类^[1]。随着现代医学的不断进步,PU 的短期愈合已不成问题,但停药后高达 60%~80% 的复发率却一直困扰着患病人群,严重影响人类的生命健康和生活质量。药物的毒副作用、不断增高的抗生素耐药率、患者依从性低及复发率高等因素使得 PU 的彻底治愈仍存在较大困难。中医药治疗疾病讲求审证求因、辨证论治,近年来,大量的临床报道表明,中医药复方治疗 PU 具有显著的临床疗效^[2],受到消化内科临床医生的广泛关注。

黄芪建中汤(Huangqi Jianzhong Decoction, HQJZD)补虚建中,出自《金匮要略·血痹虚劳病》篇,可用于腹中拘急、虚劳内耗、阴阳形气不足之证。现代药理学研究结果显示, HQJZD 具有抗 PU 的作用,但有关其效应机制的报道较少,因此本方治疗消化性溃疡的分子机制有待进一步阐明。在网络药理学、生物信息学理论不断发展完善的过程中,关于中药潜在活性成分和作用靶点的研究亦日益增多。本文通过筛选、预测 HQJZD 治疗 PU 的相关靶点,对靶点进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析,以此探讨 HQJZD 治疗 PU 可能的作用机制,并结合动物实验以及分子生物学对其效应及作用机制进行验证,意在探明 HQJZD 治疗 PU 的分子机制,为本方应用于消化系统溃疡性疾病的临床治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 HQJZD 治疗 PU 机制的网络药理学和生物信息学研究

1.1.1 HQJZD 活性成分筛选

中药系统药理学数据库和分析平台^[3](Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)涵盖了 500 味中药及其所含有的 30 069 个化合物,并整合了药代动力学(Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion, ADME)、药物化学和药物-疾病-靶基因网络已报道的有关数据,展示了筛选和评价每个化合物的 ADME 参数^[4]。运用 TCMSP 检索 HQJZD 所有成分数据,以各成分 ADME 参数为依据进行筛选,通常

而言,中药化学成分中口服生物利用度值(oral bio-availability, OB) $\geq 30\%$ 的分子具有较好的口服生物利用度,药物相似性(drug-likeness, DL)值 ≥ 0.18 的分子具有较好的类药性^[5,6],故设定筛选条件为:OB $\geq 30\%$ 且 DL ≥ 0.18 ,同时结合前期研究结果及跟踪文献完善其主要活性成分。

1.1.2 HQJZD “活性成分-靶点网络”构建

将从 TCMSP 数据库中检索得到的 HQJZD 生物活性成分及其作用靶点的基因名导入 Cytoscape 软件,构建“成分-靶点网络”。采用 Network analyzer 对活性成分的重要性进行分析。

1.1.3 HQJZD 生物活性成分作用靶点蛋白质-蛋白质相互关系网络构建

BisoGenet 是用于生物分子关系的可视化和分析的一个多层应用程序,是后基因组时代一种新的基因网络构建工具。在 Bisogenet 中导入 HQJZD 生物活性成分作用靶点基因名,在线搜索并生成 HQJZD 生物活性成分作用靶点蛋白质-蛋白质^[7]相互关系(protein-protein interaction, PPI)网络。

1.1.4 PU 相关疾病靶点检索

药物靶点数据库(TTD)、人类在线孟德尔遗传数据库(OMIM)、遗传关联数据库(GAD)、药物银行数据库(DrugBank)和 Pharm GKB 数据库是当前常用的收集疾病信息、疾病靶点、治疗药物的数据库^[8]。将“peptic ulcer”作为关键词对 PU 相关靶点进行检索与筛选,删除重复靶点,得到 PU 发病过程已知靶点。

1.1.5 PU 靶点 PPI 网络构建

将所有疾病靶点基因名导入 Bisogenet,在线检索蛋白质相互作用数据库,并形成 PU 靶点 PPI 网络。选用 Network analyzer 对疾病靶点网络的重要性进行分析。

1.1.6 HQJZD 治疗 PU 的直接和间接靶点调控网络构建及关键靶点筛选

基于 Cytoscape 将所获得的 HQJZD 成分-靶点 PPI 网络和 PU 疾病-靶点 PPI 网络融合并提取交集网络,最终得到 HQJZD 治疗 PU 的直接和间接靶点调控网络。Cytohubba 的主要功能为发现复杂网络的关键目标和子网络,包含 11 种分析方法:Degree、EPC、MNC、DMNC、MCC 及六种中心性分析 Bottle-Neck、EcCentricity、Closeness、Radiality、Betweenness、Stress。本研究选择较常使用的 MCC 法筛选出 HQJZD 治疗 PU 的关键靶点。

1.1.7 HQJZD 治疗 PU 的分子机制分析

使用 Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对 HQJZD 治疗 PU 的可能作用靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析^[9], 依据 PValue、Term、Count、Hits 等参数分别作条形图和气泡图, 阐明 HQJZD 治疗 PU 可能的分子机制。

1.2 基于 TLR2 信号通路和 NF- κ B 信号通路探讨 HQJZD 治疗 PU 的作用机制

1.2.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 150 ~ 180 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SYXK(湘)2013-0005, 动物质量合格证编号: NO. 43004700050332, 动物实验伦理审查批号: LL2018040201。饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 大鼠自由摄食与饮水, 适应性喂养 3 天后正式实验。动物房温度 20 ~ 23 °C, 湿度 50% ~ 55%, 12 h/12 h 光照周期循环。

1.2.2 实验药物及试剂

HQJZD(黄芪 5 g、白芍 18 g、桂枝 9 g、甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 12 g、胶饴 30 g 组成)组方药物购于湖南中医药大学第一附属医院。将除胶饴外的其他药材混合, 以 8 倍于药物质量的纯水浸泡 30 min 后, 电煎药锅煎煮 40 min, 纱布过滤并收集滤液, 纱布孔径为 180 μ m。随后以相同体积的纯水重复煎煮 1 次, 过滤后将两次滤液合并, 迅速将胶饴溶解于混合滤液中, 使用旋转蒸发器浓缩至每毫升药液含 HQJZD 生药 1 g。

阿司匹林(BJ40822, Bayer HealthCare Manufacturing S. r. L); 埃索美拉唑肠溶胶囊(G180721, 重庆莱美药业股份有限公司); 无水乙醇(20160227, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司); 兔抗 Toll 样受体 2 一抗(AH04173651, 北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗磷酸化 NFKB1(Ser337)一抗(AD05294512, 北京博奥森生物技术有限公司); 自发荧光淬灭剂(G1221, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); 柠檬酸抗原修复液(G1202, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); EDTA 抗原修复液(G1206, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); 牛血清白蛋白(G5001, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); CY3 标记山羊抗兔 IgG(GB21303, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); FITC 山羊抗兔 IgG(GB25303, 武汉 Servicebio 生物科技有限公司); 伊红染液(150109, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 苏木精(P4163,

上东亚化学工业有限公司); 一氧化氮(NO)测定试剂盒(20180702, 南京建成生物工程研究); 前列腺素 E2(PGE₂)测试盒(20180713, 南京建成生物工程研究)。

1.2.3 分组、造模及给药

将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、埃索美拉唑组(esomeprazole, ESO 组)、HQJZD 低剂量组和高剂量组, 每组 12 只。采用苦寒泻下法^[10]和游泳力竭法^[11]建立大鼠脾胃虚寒证候模型。用 10 mL/kg 体质量的番泻叶水煎剂灌胃, 2 h 后, 将大鼠置于装满自来水的水槽中游泳, 至大鼠力竭、整体没入水中 3 s 后立即捞起。连续造模 9 天建立脾胃虚寒证候大鼠模型。随后在脾胃虚寒证候模型基础上进行溃疡模型制备, 首先进行单次无水乙醇(10 mL/kg)灌胃; 接着运用 10 mL/kg 体质量阿司匹林溶液(20 mg/mL)连续灌胃 4 天, 建立 PU 大鼠模型^[12]。正常组大鼠全程以 10 mL/kg 体质量的生理盐水灌胃, 不做其他任何处理。造模当日, 灌胃 4 h 后给予各治疗组大鼠相应药物治疗, 连续灌胃给药 5 天, 模型组则给予等量的生理盐水。根据人和动物体表面积折算系数换算, HQJZD 的给药剂量为: 高剂量组 18.54 g/kg, 低剂量组 9.27 g/kg。ESO 采用纯水配制, 给药剂量为 4.17 mg/kg。

1.2.4 大鼠胃黏膜病理形态学观察

大鼠最后一次给药后禁食禁水 24 h, 麻醉取胃后, 沿胃大弯将胃脏剪开, 用 4 °C PBS 缓冲液漂洗干净, 采用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后, 酒精脱水, 石蜡包埋, 以 5 μ m 厚度切片, 苏木精-伊红染色后在显微镜 150 倍视野下观察胃黏膜组织病理形态学改变。

1.2.5 免疫荧光检测 TLR2 和 p-NF- κ B 蛋白表达

胃组织石蜡切片在室温放置 60 min 后, 依次用二甲苯、梯度乙醇、纯水进行脱蜡复水; 置于 EDTA 抗原修复缓冲液中进行抗原修复; 滴加 5% 牛血清蛋白孵育, 随后依次加入兔抗 Toll 样受体 2 一抗(1:500)和 p-NFKB1 一抗(1:500), 4 °C 孵育过夜, 移去一抗, PBS 清洗并甩干, 滴加 CY3(1:300)或 FITC(1:400)荧光标记二抗, 避光室温孵育 50 min; 滴加 DAPI 染液避光室温孵育 10 min, PBS 漂洗, 甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。每张切片随机选取 2 个视野于 100 倍荧光显微镜下观察拍照, 运用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测定阳性表达部位的光密度值(optical density, OD), 平均光密度值(mean

optical density, MOD)即为TLR2与p-NF- κ B蛋白表达量。

1.2.6 胃黏膜PGE₂及NO含量测定

将大鼠血浆在4℃条件下1000 r/min离心10 min,分离出血清。按照PGE₂试剂盒说明书要求设置标准品孔与样品孔,绘制标准曲线,根据各样本所测的OD值与标准曲线方程计算PGE₂含量;同时按照NO试剂盒要求将血清与试剂混匀,设置空白孔、标准孔和测定孔,在酶标仪波长550 nm处检测各样本测得OD值,带入标准曲线方程计算NO含量。

1.2.7 统计学方法

计量资料的数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 25.0统计软件对数据进行分析,多组间比较时先进行方差齐性检验,方差齐者采用单因

素方差分析,进一步两两比较应用LSD-*t*检验;方差不齐则采用Dunnnett检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HQJZD化学成分检索及根据ADME参数筛选结果

通过TCMSP数据库检索到HQJZD已报道的所有1070个化学成分,其中OB \geq 30%的生物活性成分共557个,DL \geq 0.18的生物活性成分共406个,OB \geq 30%且DL \geq 0.18的生物活性成分147个;通过TCMSP数据库配对分析,得到有对应靶点的活性成分110个,表1为其中具有代表性的前20个活性成分。

表1 HQJZD主要生物活性成分

Table 1 The main bioactive ingredient of HQJZD

成分代码 Mol ID	成分名称 Ingredient name	OB(%)	DL
MOL002311	甘草醇 Glycyrol	90.78	0.67
MOL012992	十四元环肽生物碱 D Mauritine D	89.13	0.45
MOL004990	7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳基琥珀酸 7,2',4'-Trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin	83.71	0.27
MOL004904	甘草吡喃香豆素 Licopyranocoumarin	80.36	0.65
MOL004891	新紫檀素 Shinpterocarpin	80.3	0.73
MOL004841	甘草查尔酮 B Licochalcone B	76.76	0.19
MOL004810	粗毛甘草素 F Glyasperin F	75.84	0.54
MOL001484	楝胺 Inermine	75.18	0.54
MOL000378	7-O-甲基异木香茅醇 7-O-Methylisomucronulatol	74.69	0.3
MOL000500	维斯体素 Vestitol	74.66	0.21
MOL000787	蓝堇碱 Fumarine	59.26	0.83
MOL000211	丁子香酮 Mairin	55.38	0.78
MOL005001	甘草宁 H Gancaonin H	50.1	0.78
MOL012981	无刺枣因 S7 Daechuine S7	44.82	0.83
MOL004948	异甘草酚 Isoglycyrol	44.7	0.84
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
MOL004924	中卡蛋白 (-)-Medicocarpin	40.99	0.95
MOL001454	黄连素 Berberine	36.86	0.78
MOL000033	十二氢-1H-环戊烷[A]菲仑-3-醇 (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-Dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL004988	坎佐诺尔 F Kanzonol F	32.47	0.89

2.2 HQJZD“活性成分-靶点网络”构建及分析

图1结果显示,利用Cytoscape绘制HQJZD生

物活性成分及靶点的关系网络,图中节点表示HQJZD化合物分子及药物靶点,每条边则表示化合

物与靶点间的相互作用关系, 获得节点 351 个, 相互关系 1 812 个, 对其活性成分进行度值 (degree) 和介数值节点 (betweenness) 分析, 二者呈正相关。MOL000098 (槲皮素) 度值最大 (142), MOL000422 (山柰酚) 度值为 113, MOL000449 (豆甾醇) 度值为 60, MOL000378 (7-*O*-甲基异丙醇胺) 度值为 42, MOL003896 (7-甲氧基-2-甲基异黄酮) 度值为 38, 表明槲皮素、山柰酚、豆甾醇、7-*O*-甲基异丙醇胺、7-甲

氧基-2-甲基异黄酮等化合物是 HQJZD 中多个药物的生物活性成分, 并且均对应多个作用靶点, 提示这些化合物可能在 HQJZD 的药效作用中发挥关键作用。在活性成分作用的靶点中, PTGS2、HSP90AB1、VEGFA 等靶点与多个活性成分相关。上述结果表明, HQJZD 的活性成分和靶点间存在相互协同作用, 此结果符合中药方剂多成分多靶点发挥治疗作用的特点。

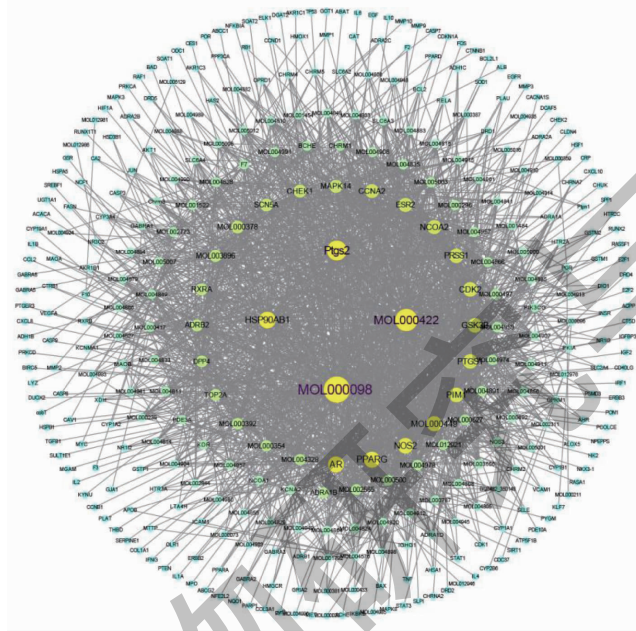


图1 HQJZD 生物活性成分-靶点网络

Fig. 1 HQJZD active ingredient-target network

2.3 HQJZD 治疗 PU 的直接和间接靶点调控网络构建

通过检索药物靶点相关数据库 TTD、OMIM、GAD、DrugBank 和 Pharm GKB 分别获得 5、115、78、0 和 1 个与 PU 发病及治疗相关的靶点, 去重后剩余 157 个与 PU 发生发展密切相关的已知靶点。采用 Bisogenet 建立 PU 靶点的 PPI 网络, 以及 HQJZD 生物活性成分的作用靶点 PPI 网络, 并利用 Cytoscape 将成分靶点 PPI 网络和疾病靶点 PPI 网络合并, 提取交集网络, 得到 HQJZD 治疗 PU 的直接或间接靶点网络, 其中节点共 350 个, 关系为 2 090 个。根据度值分析, 其中 TP53、IL-6、TNF 和 TLR 等度值较大 (见图 2)。

2.4 HQJZD 治疗 PU 的关键靶点筛选

采用 Cytohubba 插件 MCC 算法对 HQJZD 治疗 PU 的关键靶点进行筛选, 获得 10 个关键靶点, 分别为 TLR2、IL-10、IL-4、IL-1 β 、IL-6、IL-2、TP53、

CD40LG、TGFB1 和 VEGFA, 其度值在 45 ~ 127 之间, 相互关系包含 45 个, 每个靶点都与其它靶点有交互作用 (见图 3)。

2.5 HQJZD 治疗 PU 的分子机制分析

2.5.1 GO 富集分析

利用 Metascape 对 HQJZD 治疗 PU 的直接或间接靶点进行 GO 功能分析。其中生物学过程 (biological process, BP) 涉及的相关条目有 176 条, 主要包括调控炎症反应、调控 NF- κ B 转录因子活性、细胞凋亡和坏死调控、TNF 介导的信号通路调控等方面。细胞组成 (cellular component, CC) 相关条目有 176 条, 主要涉及细胞质、胞质溶胶、膜筏、细胞核和内质网等方面。分子功能 (molecular function, MF) 相关条目有 90 条, 主要与蛋白质结合、泛素蛋白连接酶结合、细胞因子活性、P53 结合、TGF- β 结合、信号传导分子活性、肿瘤坏死因子受体结合及其他受体结合等方面相关联 (见图 4)。

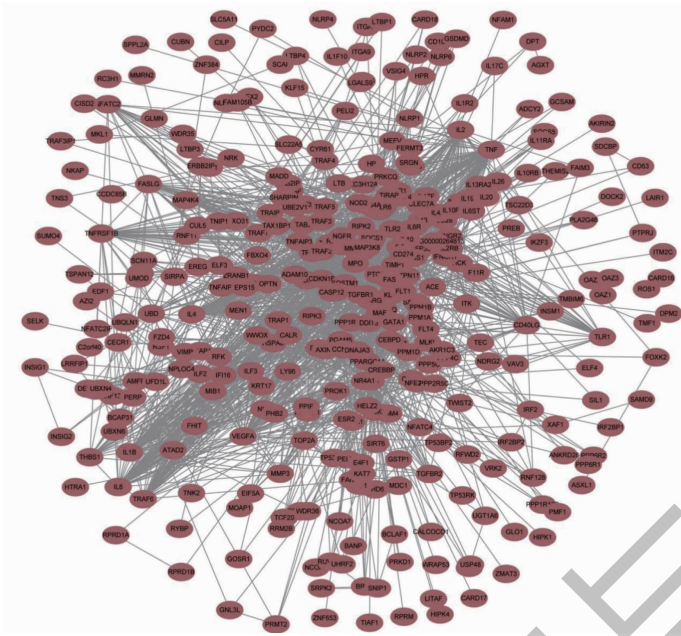


图2 HQJZD 治疗 PU 的直接和间接靶点调控网络

Fig. 2 Target regulatory network of HQJZD in the treatment of PU

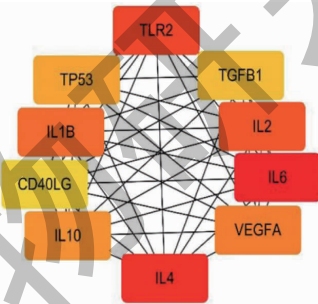


图3 HQJZD 治疗 PU 的关键靶点

Fig. 3 Key targets of HQJZD in treating PU

2.5.2 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 对 HQJZD 治疗 PU 的直接或间接靶点进行 KEGG 信号通路分析,得到 63 条信号通路,选取前 20 条信号通路做气泡图,图中以通路名称 (pathway) 为 Y 轴,以富集因子 (richfactor) 为 X 轴,目标基因富集于该信号通路的基因数量以气泡面积表示,气泡颜色代表 P 值的大小。图 5 结果表明, HQJZD 治疗 PU 的分子机制或涉及 NF- κ B 信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 介导的信号通路、JAK-STAT 信号通路、MAPK 信号通路、NOD 样受体信号通路、p53 信号通路及调控细胞因子与细胞因子结合相关的信号通路等。提示 HQJZD 的有效成分可通过作用于多条信号通路发挥治疗 PU 的效

应。

由于 PU 的主要发病机制是胃黏膜发生炎症反应,致黏膜损伤破坏并最终形成溃疡,故抗炎与促进黏膜修复是其主要治疗思路。图 6 是 Toll 样受体信号通路与 NF- κ B 信号通路相互作用的节点图,粉色标记基因是富集在该通路上的 HQJZD 治疗 PU 的关键靶点,如图所示, NF- κ B 信号通路与机体炎症反应发生发展密切相关,且 NF- κ B 信号通路是本研究中富集程度最大的信号通路 (见图 5); 而 Toll 样受体信号通路与组织黏膜修复有关,且 TLR2 是 HQJZD 治疗 PU 的关键效应靶点 (见图 3)。因此在后续动物实验中选择 NF- κ B 信号通路和 Toll 样受体信号通路进行分子水平验证。

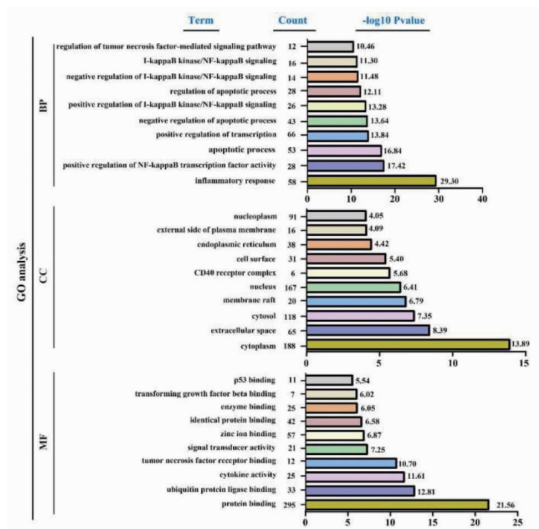


图 4 HQJZD 治疗 PU 靶点的 GO 富集分析示意图

Fig. 4 GO annotation of the differentially expressed target genes of HQJZD in treating PU

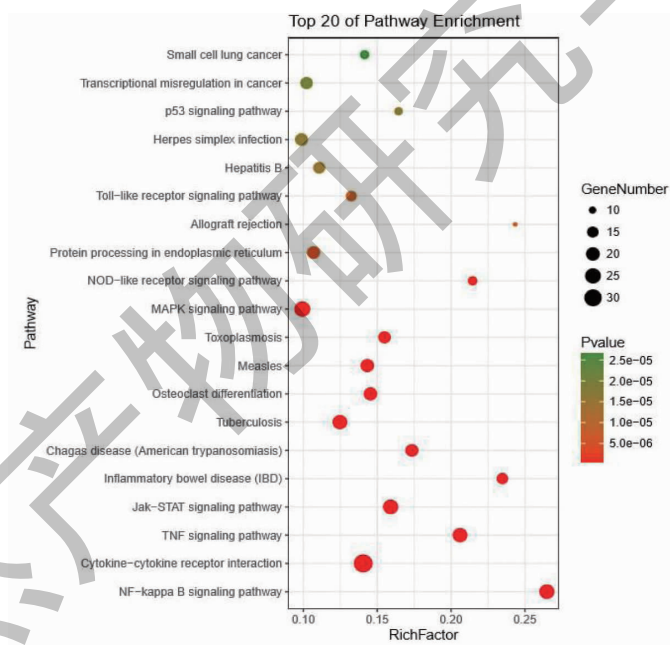


图 5 HQJZD 治疗 PU 靶点的 KEGG 通路富集分析示意图

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of the differentially expressed target genes of HQJZD in treating PU

2.6 HQJZD 对各组大鼠胃黏膜病理形态学改变的影响

HE 染色结果显示, 正常大鼠胃黏膜组织黏膜层、黏膜下层、肌层及外膜层清晰可见; 黏膜层腺体排列规整, 上皮细胞形态正常、未见炎性细胞。模型大鼠胃黏膜出现明显损伤, 黏膜上皮缺损、脱落, 黏膜层结构紊乱、腺体被大量破坏、炎性细胞浸润, 可见黏膜水肿; 给予药物治疗后, 大鼠胃黏膜形态较模

型大鼠好转明显, HQJZD 高剂量组大鼠胃黏膜形态均接近正常组, 表现为胃黏膜大部分区域结构整齐, 腺体排列较模型大鼠清晰, 未见上皮脱落, 未见黏膜水肿充血, 炎性细胞明显减少 (见图 7)。提示 HQJZD 可明显改善大鼠胃黏膜病理损伤。

2.7 HQJZD 对 PU 大鼠胃黏膜 PGE₂ 和 NO 含量的影响

PGE₂ 和 NO 与 PU 发生发展过程密切相关的血

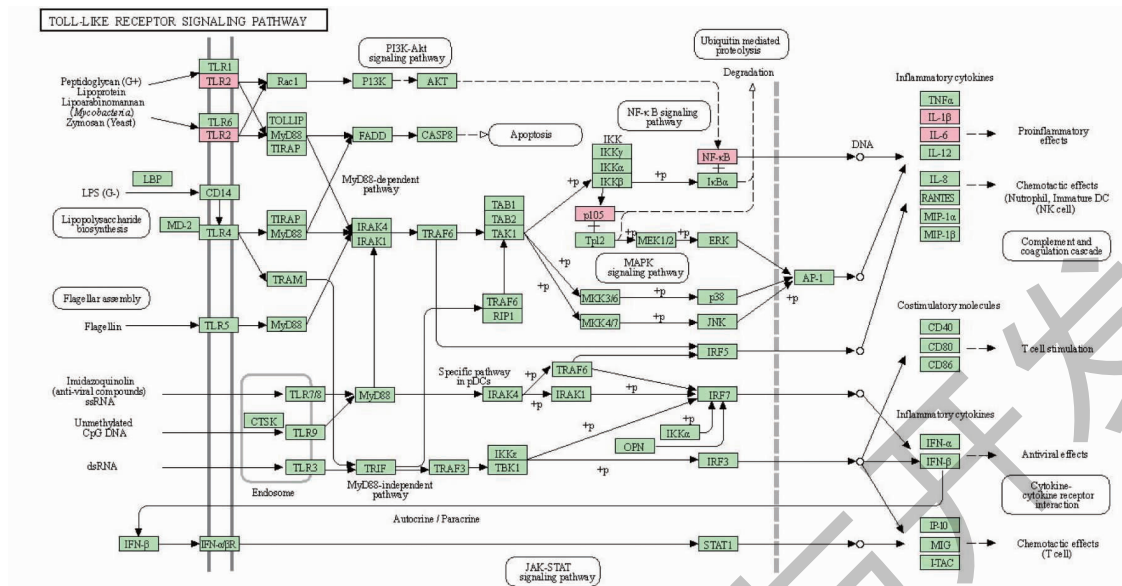


图6 Toll样受体信号通路与NF- κ B信号通路节点图

Fig. 6 Toll like receptor signal pathway and NF- κ B signal pathway map

注:粉色标记基因是富集在该通路上的HQJZD治疗PU的重要靶点。Note: Pink marker genes indicates the key target of HQJZD in the treatment of PU enriched in this pathway.

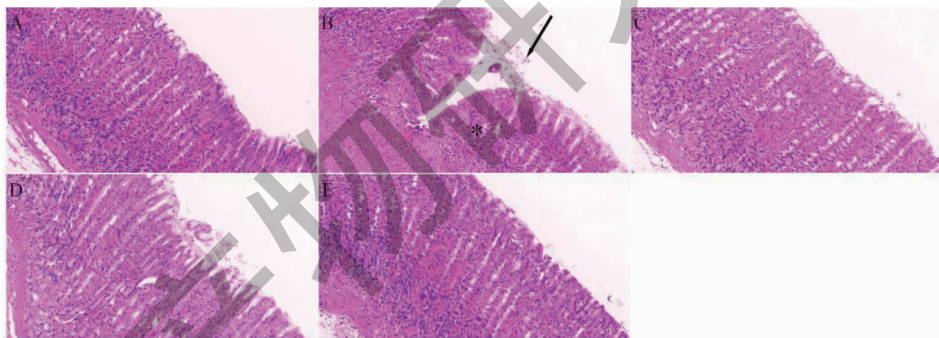


图7 大鼠胃黏膜组织HE染色形态示意图($\times 150$)

Fig. 7 HE Staining of rat gastric mucosal ($\times 150$)

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 埃索美拉唑组; D. HQJZD 低剂量组; E. HQJZD 高剂量组。箭头表示上皮细胞脱落, * 表示炎性细胞浸润。
Note: A is normal group; B is model group; C is esomeprazole group; D is HQJZD low dose group; E is HQJZD high-dose group. Arrows indicate epithelial cell abscission, * indicates inflammatory cell infiltration.

清炎症因子。表2结果表明,与正常组比较,模型大鼠胃黏膜组织中PGE₂和NO含量均明显降低($P < 0.01$);使用HQJZD治疗后,与模型组相比,大鼠胃黏膜中PGE₂和NO含量均明显升高($P < 0.01$)。提示HQJZD治疗大鼠PU脾胃虚寒证可能与调节胃黏膜PGE₂和NO含量有关。

2.8 HQJZD对PU大鼠胃黏膜TLR2和p-NF- κ B蛋白表达的影响

TLR2是调控胃肠黏膜免疫屏障功能的关键蛋白之一,对预防和治疗PU具有重要意义^[13]。NF-

κ B是参与炎症反应的核转录因子,在PU的形成与愈合中发挥重要作用。本文网络药理学预测结果显示,TLR2与NF- κ B是HQJZD治疗PU的重要靶点。图8、图9是各组大鼠胃黏膜免疫荧光染色结果,其中蓝色荧光均表示DAPI染色,红色荧光表示TLR2蛋白表达,绿色荧光表示p-NF- κ B蛋白表达。图8、图9和表3结果表明,与正常组比较,模型大鼠胃黏膜组织中TLR2与p-NF- κ B蛋白表达均明显增多($P < 0.01$);与模型组比较,低剂量和高剂量HQJZD组大鼠胃黏膜组织中TLR2和p-NF- κ B蛋白表达均

明显下调($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠胃黏膜 PGE₂ 和 NO 含量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Contents of PGE₂ and NO in gastric mucosa of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	剂量 Dose	PGE ₂ (pg/g)	NO (μ mol/g)
正常 Normal	-	65.11 \pm 6.28	55.60 \pm 5.05
模型 Model	-	33.74 \pm 5.44 ^{**}	23.64 \pm 4.94 ^{**}
埃索美拉唑 Esomeprazole	4.17 mg/kg	61.45 \pm 6.26 ^{##}	53.83 \pm 6.21 ^{##}
黄芪建中汤 HQJZD	9.27 g/kg	48.86 \pm 5.15 ^{##}	36.78 \pm 4.87 ^{##}
	18.54 g/kg	62.34 \pm 7.07 ^{##}	54.27 \pm 5.88 ^{##}

注:与正常组比较,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal,^{**} $P < 0.01$. Compared with model,^{##} $P < 0.01$.

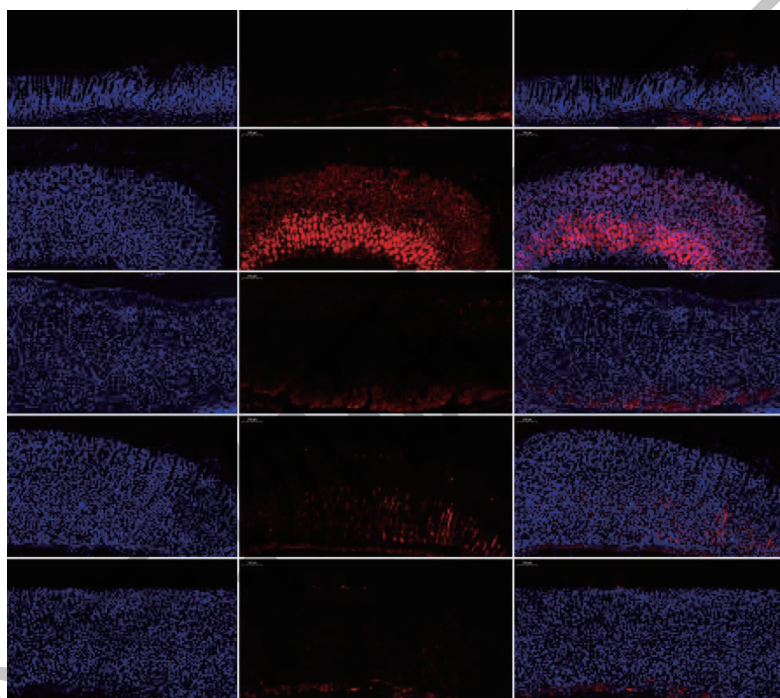


图 8 免疫荧光检测各组大鼠胃黏膜组织 TLR2 蛋白表达($\times 100$)

Fig. 8 Immunofluorescencetechnic analysis of TLR2 protein expression in the gastric mucosa of rats ($\times 100$)

注:A.正常组;B.模型组;C.埃索美拉唑组;D.HQJZD低剂量组;E.HQJZD高剂量组,下同。Note:A:Normal group,B:Model group,C:Esomeprazole group,D:HQJZD low dose group,E:HQJZD high-dose group,the same below.

3 讨论与结论

当前我国社会生活节奏加快,生活压力越来越大,PU患者的数量逐年增加^[14]。现代医学研究表明,PU发生的主要病理机制为胃黏膜发生炎症反应致黏膜损伤破坏,形成溃疡。中医药治疗PU具有愈合率高、副作用少、患者依从性好、复发率低等优势,愈来愈受到消化内科医生的关注与重视^[15]。HQJZD源自《金匮要略》,历代医家均推崇使用该方治疗脾胃虚寒型胃溃疡、十二指肠溃疡、Hp相关性

溃疡,HQJZD是临床治疗PU使用频率较高的一首方剂,具有较好的临床疗效,但涉及HQJZD治疗PU的具体作用机制和作用靶点的相关报道较少。

本研究采用网络药理学方法,分析探讨HQJZD治疗PU的关键靶点及作用分子机制。通过检索TCMSP数据库,构建HQJZD药物活性成分-靶点网络,发现有351个节点和1812条连接。HQJZD生物活性成分的作用靶点PPI网络包含16384个节点580894条连接;PU靶点PPI网络包括665个节

点和 4 825 条连接;进一步推导出 HQJZD 治疗 PU 的直接和间接靶点调控网络节点共 350 个,相互关系 2 090 个。经过 Cytoscape 进一步筛选,发掘了其

中的 10 个关键靶点及 45 条连接。这些数据提示 HQJZD 主要活性成分与其作用于 PU 相关靶点之间存在复杂的调控关系。

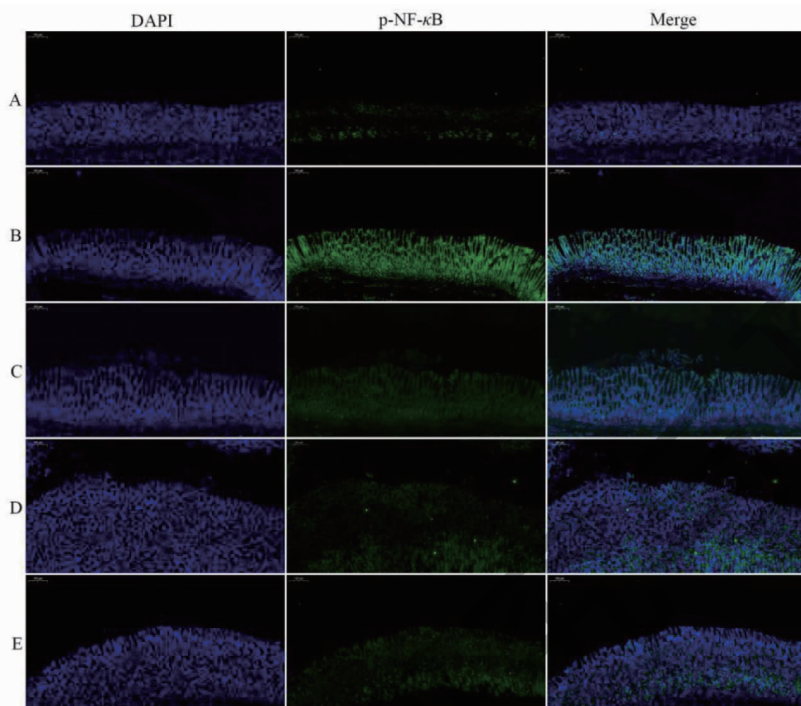


图 9 免疫荧光检测各组大鼠胃黏膜组织 p-NF- κ B 蛋白表达 ($\times 100$)

Fig. 9 Immunofluorescence analysis of p-NF- κ B protein expression in the gastric mucosa of rats ($\times 100$)

表 3 各组大鼠胃黏膜 TLR2 和 p-NF- κ B 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Relative protein expression level of TLR2 and p-NF- κ B protein in gastric mucosa of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	剂量 Dose	平均光密度值 MOD	
		TLR2	p-NF- κ B
正常 Normal	-	11.88 \pm 2.25	11.58 \pm 0.80
模型 Model	-	49.04 \pm 3.99 ^{**}	50.62 \pm 4.03 ^{**}
埃索美拉唑 Esomeprazole	4.17 mg/kg	22.21 \pm 3.15 ^{##}	19.03 \pm 0.95 ^{##}
黄芪建中汤 HQJZD	9.27 g/kg	29.29 \pm 6.99 ^{##}	24.24 \pm 1.50 ^{##}
	18.54 g/kg	22.72 \pm 2.82 ^{##}	17.29 \pm 1.79 ^{##}

注:与正常组比较,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal, ^{**} $P < 0.01$. Compared with model, ^{##} $P < 0.05$.

通过 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析发现, HQJZD 治疗 PU 可能的作用机制之一为调控与胃肠黏膜炎症反应相关的信号通路。近年来,关于 JAK-STAT 信号通路研究日益增多,它是炎症细胞和炎症介质在细胞内传递信号的共同途径,广泛参与各个组织细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等过程^[16]。有研究报道,该通路参与溃疡性结肠炎^[17]以及肿瘤^[18]等疾病的发生发展过程,但该通路是否会参与 PU 发生发展过程却不得而知。研究表明,

IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎性细胞因子是 JAK-STAT 信号通路的重要启动因子^[19,20],在它们的刺激下, JAK 和 STAT 被逐级活化,并完成从细胞质到细胞核内的信号传导,从而调控机体获得性免疫应答^[21]。本研究通过 Cytoscape 软件分析发现, HQJZD 治疗 PU 的关键靶点中包括 IL-6、IL-1 β ; GO 分析研究结果表明, HQJZD 有可能是通过调控 TNF 介导的信号通路达到治疗 PU 的目的。表明本文研究结果与已报道的相关实验结果相吻合。基于此,

课题组初步推断, HQJZD 可能通过调控 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子介导 JAK-STAT 信号通路发挥治疗 PU 的效应。

核苷酸聚合寡聚体区域蛋白(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)是细胞内的模式识别受体,在调节胃肠黏膜先天性免疫和获得性免疫方面具有重要意义。NOD 蛋白活化后,通过招募和激活受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,激活 IKK 复合体和 MAPK 途径,IKK 使 I κ B α 聚泛素降解,促进 NF- κ B 进入细胞核,加速炎症因子 TNF- α 、IL-10 等的释放,其中 TNF- α 又可诱导 NOD2 蛋白表达上调^[22]。提示 NOD 蛋白所介导的信号通路可能导致 PU 的发生发展及预后, HQJZD 可能通过调控此通路发挥治疗 PU 的效应。

NF- κ B 信号通路与机体炎症反应发生发展密切相关,它与 Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路和 MAPK 信号通路具有交互作用^[23]。Toll 样受体能够特异地识别不同病原中固有的结构即病原相关分子模式,然后经过髓样分化蛋白 88 依赖途径(myeloid differentiation factor 88, MyD88)以及 MyD88 非依赖途径进行信号转导,经过一系列的信号级联活化,最终激活 NF- κ B 信号通路,并促进 MAPKs 活化,启动并放大炎症反应,促使炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 表达增加,加速炎症细胞浸润损害胃黏膜屏障,导致胃黏膜细胞变性坏死,进而促使 PU 发生^[24,25]。研究表明,Toll 样受体所介导的 NF- κ B 信号通路广泛参与人类各组织的炎症反应^[26],其中 TLR2 与胃组织的关系最为密切。提示通过调控 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路可能是 HQJZD 发挥治疗 PU 效应的分子机制之一。

NO 是一种血管内皮舒张因子,在胃肠道中具有调节胃血流量、刺激胃中黏液分泌以维持胃肠黏膜完整性的作用^[27];还有研究指出^[28],NO 具有调节血管张力,参与炎症反应等功能,与 PU 发生发展过程密切相关。PGE₂ 在胃黏膜中大量存在,具有抑制胃酸与胃蛋白酶分泌、刺激胃黏液与碳酸氢盐产生、保护胃黏膜的作用^[29]。本研究中,PU 脾胃虚寒证大鼠经 HQJZD 治疗后,血清中 NO 与 PGE₂ 含量显著上升。提示黄芪建中汤对大鼠脾胃虚寒型 PU 的治疗作用可能与上调胃黏膜 PGE₂ 和 NO 含量有关。

本文通过网络药理学和生物信息学方法,发现 Toll 样受体信号通路和 NF- κ B 信号通路是 HQJZD

治疗 PU 的关键靶点。为验证本文结果的准确性,课题组构建了 PU 大鼠模型(脾胃虚寒证候),并予以 HQJZD 低、高剂量治疗,采集各组大鼠胃黏膜标本,进行胃黏膜病理形态学观察、TLR2 和 p-NF- κ B 蛋白表达检测。结果表明, HQJZD 可改善胃黏膜病理变化,促进胃黏膜损伤修复(见图 7),并下调 TLR2 蛋白与 p-NF- κ B 蛋白表达(见图 8、9),加速溃疡愈合。上述动物实验和分子生物学实验结果表明 HQJZD 可能通过激活 TLR2 与 NF- κ B 介导的信号通路发挥修复胃黏膜损伤、治疗 PU 的作用。

综上, HQJZD 治疗 PU 的主要机制与多条信号通路和多种炎症因子关系密切,是多因素共同作用的结果,这些信号通路、炎症因子之间既存在着紧密联系(交互作用),又相互独立。本文研究结果与中医药治疗疾病辨证论治和整体观念的特点不谋而合。本研究通过网络药理学和生信分析学方法对 HQJZD 治疗 PU 的分子机制和作用靶点进行筛选,并对筛选出的 TLR2 受体信号通路和 NF- κ B 信号通路进行动物实验和分子生物学实验验证,相关思路和方法具有一定的创新性。结果表明, HQJZD 具有良好的治疗 PU 的效应,抑制 TLR2 信号通路和 NF- κ B 信号通路、调节胃黏膜炎症因子水平可能是 HQJZD 抗溃疡作用的机制之一。本文研究结果可为 HQJZD 治疗 PU 作用机制的进一步探索提供理论依据和实验基础,为中医药抗 PU 新药的研发提供新的方向与思路。

参考文献

- Zhang S, Wang Z, Li Y, et al. Expert consensus on TCM diagnosis and treatment of peptic ulcer(2017)[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2017, 32:4089-4093.
- Xie JH, Chen YL, Wu QH, et al. Gastroprotective and anti-Helicobacter pylori potential of herbal formula HZJW: safety and efficacy assessment[J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13:119.
- Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6:13.
- Bocci G, Carosati E, Vayer P, et al. ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties[J]. Sci Rep, 2017, 7:6359.
- Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J

- Mol Sci,2012,13:6964-6982.
- 6 Ma C, Wang L, Xie XQ. GPU accelerated chemical similarity calculation for compound library comparison[J]. J Chem Inf Model,2011,51:1521-1527.
 - 7 Karten HJ, Brzozowska-Prechtel A, Lovell PV, et al. Digital atlas of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) brain: a high-resolution photo atlas [J]. J Comp Neurol,2013,521:3702-3715.
 - 8 Liang X, Xu B, Li G, et al. Molecular mechanism of Epimedium Folium in treating osteonecrosis of femoral head[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2018,24(14):188-194.
 - 9 Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. Nucleic Acids Res,2016,44:D457-462.
 - 10 Huang W, Peng Y, Wang M, et al. Regulatory effect of Sijunzi Tang and Its single herbs on intestinal flora in rats with spleen deficiency[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2019,25:8-15.
 - 11 Chung YH, Park TK, Yim SH, et al. Polysaccharide-rich extract of phragmites rhizome attenuates water immersion stress and forced swimming fatigue in rodent animal model [J]. J Med Food,2019,22:355-364.
 - 12 CHEN Zhi-feng. Research of the establishment of an ideal chronic gastric ulcer model[D]. Shantou: Shantou University (汕头大学),2012.
 - 13 Pachathundikandi SK, Blaser N, Backert S. Mechanisms of inflammasome signaling, microRNA induction and resolution of inflammation by *Helicobacter pylori*[J]. Curr Top Microbiol Immunol,2019,421:267-302.
 - 14 Deding U, Ejlskov L, Grabas MP, et al. Perceived stress as a risk factor for peptic ulcers: a register-based cohort study [J]. BMC Gastroenterol,2016,16:140.
 - 15 Zhang Y, Zhang L, Zhang Q, et al. Enhanced gastric therapeutic effects of *Brucea javanica* oil and its gastroretentive drug delivery system compared to commercial products in pharmacokinetics study [J]. Drug Des Devel Ther,2018,12:535-544.
 - 16 Trivedi S, Starz-Gaiano M. Drosophila Jak/STAT signaling: regulation and relevance in human cancer and metastasis [J]. Int J Mol Sci,2018,19:4056.
 - 17 Tran V, Shammas RM, Sauk JS, et al. Evaluating tofacitinib citrate in the treatment of moderate-to-severe active ulcerative colitis: design, development and positioning of therapy [J]. Clin Exp Gastroenterol,2019,12:179-191.
 - 18 Deng Y, Li Y. Linderolactone inhibits human lung cancer growth by modulating the expression of apoptosis-related proteins, G2/M cell cycle arrest and inhibition of JAK/STAT signalling pathway [J]. J BUON,2019,24:566-571.
 - 19 Shang AQ, Wu J, Bi F, et al. Relationship between HER2 and JAK/STAT-SOCS3 signaling pathway and clinicopathological features and prognosis of ovarian cancer [J]. Cancer Biol Ther,2017,18:314-322.
 - 20 Taher MY, Davies DM, Maher J. The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer [J]. Biochem Soc Trans,2018,46:1449-1462.
 - 21 Wu H, Zhang Y, Lu X, et al. STAT1a and STAT1b of black carp play important roles in the innate immune defense against GCRV [J]. Fish Shellfish Immunol,2019,87:386-394.
 - 22 Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation [J]. J Biol Chem,2002,277:41701-41705.
 - 23 Pashenkov MV, Murugina NE, Budikhina AS, et al. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications [J]. J Leukoc Biol,2019,105:669-680.
 - 24 B X. The Effect of amoxicillin and omeprazole combined with clarithromycin in the treatment of gastric ulcer [J]. J Math Med(数理医药学杂志),2016,29:715-716.
 - 25 Wu J, Liu B, Mao W, et al. Prostaglandin E2 regulates activation of mouse peritoneal macrophages by *Staphylococcus aureus* through toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, and NLRP3 inflammasome signaling [J]. J Innate Immun,2020,12:154-169.
 - 26 Mishra V, Banga J, Silveyra P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: therapeutic strategies and pharmacological targets [J]. Pharmacol Ther,2018,181:169-182.
 - 27 Lee JM, Lim JY, Kim Y, et al. Benexate hydrochloride beta-dex modulates nitric oxide synthesis and cytokine expression in gastric ulcers [J]. Exp Ther Med,2016,12:573-580.
 - 28 Huang S, Yin A, Liu F, et al. Antiulcer activity of *Portulaca oleracea* L. on ethanol-induced gastric ulcer rats [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:781-785.
 - 29 Zhou D, Yang Q, Tian T, et al. Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role [J]. Biomed Pharmacother,2020,126:110075.