

DOI: 10.14045/j.cnki.15-1220.2023.03.013

# 基于网络药理学和实验验证的蒙药如达-6 治疗胃溃疡作用机制研究

风 兰<sup>1</sup>, 包特日格乐<sup>1</sup>, 付明海<sup>1</sup>, 拉喜那木吉拉<sup>1</sup>, 李国瑞<sup>2</sup>, 陈永胜<sup>1,2,3</sup>

(1.内蒙古民族大学 蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028043; 2.内蒙古民族大学 生命科学与食品学院,  
内蒙古 通辽 028043; 3.中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130000)

**[摘要]**目的:通过网络药理学和动物实验,探讨蒙药如达-6治疗胃溃疡的潜在活性成分、核心靶点和作用机制。方法:利用TCMSP、SwissTargetPrediction、BATMAN-TCM、GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD和Drugbank数据库预测和筛选如达-6潜在活性成分及其治疗胃溃疡靶点。利用STRING数据库进行蛋白-蛋白(Protein-protein interaction, PPI)互作分析,使用Metascape数据库进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。通过Cytoscape3.8.0软件绘制PPI网络和“成分-靶点”网络。建立吡哆美辛诱导的胃溃疡大鼠模型,观察如达-6对胃溃疡大鼠的胃保护作用,再利用qRT-PCR方法检测关键靶点的mRNA表达水平。结果:共筛选出如达-6的58个潜在活性成分和137个治疗胃溃疡靶点。通过PPI网络分析得到STAT3、PIK3CA、SRC、RELA、TP53、MAPK1、AKT1、JUN、CTNNA1和PTPN11等10个核心靶点;通过“成分-靶点”网络分析得到槲皮素、木犀草素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、异鼠李素、华良姜素、5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)色酮、3-甲基樟脑酚以及N-(2,5-二甲氧基苯基)-4-甲氧基苯甲酰胺等10个关键成分。功能富集分析显示,如达-6可能通过癌症的途径、人巨细胞病毒感染、PI3K/Akt信号通路、癌症中的蛋白聚糖、脂质与动脉粥样硬化以及MAPK等信号通路发挥抗胃溃疡作用。实验验证结果表明,如达-6对吡哆美辛诱导的胃溃疡大鼠具有预防性保护作用,可缓解胃组织病理学改变,并增加胃组织PIK3CA、TP53、MAPK1和AKT1的mRNA表达水平( $P < 0.05$ )。结论:通过网络药理学分析和实验验证,初步揭示了蒙药如达-6通过多成分、多靶点发挥抗胃溃疡作用。

**[关键词]**蒙药;如达-6;胃溃疡;网络药理;实验验证

**[中图分类号]**R961 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1671-0185(2023)03-0257-12

## Study on the Action Mechanism of Mongolian Medicine Ruda-6 in Treating Gastric Ulcer Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

Fenglan<sup>1</sup>, BAO Terigele<sup>1</sup>, FU Ming-hai<sup>1</sup>, Laxinamujila<sup>1</sup>, LI Guo-rui<sup>2</sup>, CHEN Yong-sheng<sup>1,2,3</sup>

(1.College of Mongolian Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028043, China;

2.College of Life Science and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao

028043, China; 3.Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics,

Chinese Academy of Sciences, Changchun 130000, China)

**Abstract: Objective:** To explore the potential active components, hub targets and action mechanism of Mongolian medicine Ruda-6 (RD-6) in the treatment of gastric ulcer (GU) through network pharmacology and animal ex-

**基金项目:**应用光学国家重点实验室开放基金项目(SKLA02020001A19);内蒙古自治区高等学校青年科技人才发展项目(NJYT22048);中央引导地方科技发展项目(N2021ZY0015)

**作者简介:**风兰,内蒙古民族大学蒙医药学院博士研究生。

**通讯作者:**陈永胜,内蒙古民族大学教授,博士,博士研究生导师。

periments. **Methods:** The potential active components and therapeutic targets of Ruda-6 against gastric ulcer were predicted and screened through TCMSP, SwissTargetPrediction, BATMAN-TCM, GeneCards, OMIM, Pharma-Gkb, TTD, and Drugbank databases. Protein-protein interaction (PPI) analysis was performed through the STRING database, and GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis were performed by Metascape database. The PPI network and "component-target" network were mapped by Cytoscape3.8.0 software. Then, the gastric ulcer rat model was established by indomethacin-induction, and the gastric protective effect of Ruda-6 on gastric ulcer rats was observed. In addition, the mRNA expression level of key targets was detected by qRT-PCR. **Results:** A total of 58 potential active ingredients and 137 anti-gastric ulcer targets of Ruda-6 were screened. PPI analysis revealed 10 hub targets including STAT3, PIK3CA, SRC, RELA, TP53, MAPK1, AKT1, JUN, CTNNA1, and PTPN11. The "component-target" network analysis indicated 10 core components including quercetin, luteolin, kaempferol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, isorhamnetin, kumatakenin, 5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxy-phenyl) chromone, 3-Methyl camphor phenol, and N-(2,5-dimethoxyphenyl)-4-methoxybenzamide. Functional analysis showed that Ruda-6 may play an anti-gastric ulcer role through pathways in cancer, human cytomegalovirus infection, PI3K/Akt signaling pathway, proteoglycans in cancer, lipids and atherosclerosis, MAPK signaling pathway, etc. The experimental verification results showed that Ruda-6 had a preventive protective effect on indomethacin-induced gastric ulcer in rats, alleviated gastric histopathology injury, and increased the mRNA expression levels of PIK3CA, TP53, MAPK1 and AKT1 in gastric tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The network pharmacological analysis and experimental verification preliminarily reveal that Mongolian medicine Ruda-6 exerts anti-gastric ulcer effects through multi-components and multi-targets.

**Key words:** Mongolian medicine; Ruda-6; Gastric ulcer; Network pharmacology; Experimental verification

胃溃疡(Gastric ulcer, GU)是一种常见的消化系统疾病,同时也是胃癌风险增加的标志。其患病率在不同地区差异较大,西方人群的患病率为2.4%<sup>[1]</sup>,而中国的患病率达到了6.1%<sup>[2]</sup>。近年来,胃溃疡患病率呈现逐年上涨趋势,严重影响人们的生活质量。胃溃疡会引起严重的胃黏膜坏死性病变,包括整个黏膜表面和黏膜肌层出血和穿孔,多数患者伴有疼痛甚至是消化道出血<sup>[3]</sup>。胃溃疡的病因有很多,包括:幽门螺杆菌的感染、非甾体类抗炎药物的滥用、过量饮酒<sup>[4]</sup>以及精神紧张、焦虑等心理因素<sup>[5]</sup>。胃溃疡的发病机制复杂,主要是由胃黏膜的攻击因子(胃酸、胃蛋白酶)和防御因子(前列腺素、胃黏液、细胞再生能力)之间失衡引起。针对不同的发病机制,已经发现了很多治疗胃溃疡的药物,如奥美拉唑(质子泵抑制剂)、雷尼替丁(组胺受体拮抗剂)以及抗生素(幽门螺杆菌抑制剂)等。然而,越来越多的证据表明,这些药物存在一些安全性和副作用,包括不良反应、高复发率以及耐药性等<sup>[6-7]</sup>。因此,寻找副作用低、生物活性好的天然药物对预防和治疗胃溃疡尤为重要。

如达-6(Ruda-6, RD-6;中文名:六味木香散)是一种经典蒙药复方,由木香、栀子、石榴、闹羊花、豆蔻和荜茇等6味天然药材组成,收载于《中国药典》(2020年版)<sup>[8]</sup>。如达-6具有开郁、行气、止痛等功效,在蒙医临床上用于治疗胃“包如”病,其适应证包括厌食、消化不良、反酸、胃肠道出血和疼痛等,这些症状与现代医学中的胃溃疡症状相对应。临床研究发现,如达-6对胃溃疡有明显的缓解作用<sup>[9-10]</sup>,还对胃炎、胃痛、反流性食管炎等胃肠道疾病有显著疗效<sup>[11-14]</sup>。然而,如达-6成分复杂、靶点不明确,因此,其治疗胃溃疡的潜在药理机制仍有待探索。近年来兴起的网络药理学以大数据为手段整合分析来源于多层次多维度的数据,为药物成分和疾病之间的复杂关系提供一种研究方法<sup>[15]</sup>,在药物的作用机制研究中得到广泛应用。笔者运用网络药理学、分子生物学等技术,探索如达-6抗胃溃疡的潜在活性成分和关键靶点,以期如达-6治疗胃溃疡的机制研究提供新的思路与实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学分析

#### 1.1.1 本研究中涉及的数据库和平台信息见表1。

表 1 网络药理学分析中所使用的数据库和平台

Tab. 1 Databases and platforms used in network pharmacological analysis

名称	网址
中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)	http://tcmspw.com/tcmsp.php
SwissTargetPrediction 数据库	http://www.swisstargetprediction.ch/
BATMAN-TCM 数据库	http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/
Uniprot 数据库	http://www.uniprot.org/
GeneCards 数据库	https://www.genecards.org/
OMIM 数据库	https://omim.org/
PharmGkb 数据库	https://www.pharmgkb.org/
TTD 数据库	http://db.idrblab.net/ttd/
Drugbank 数据库	https://go.drugbank.com/
Venny v2.1.0 平台	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html
STRING 数据库	https://cn.string-db.org/
Metascape 数据库	https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1

1.1.2 如达-6的活性成分筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform,TCMSP)数据库<sup>[16]</sup>,以“木香”“梔子”“石榴皮”“闹羊花”“豆蔻”和“葶苈”为关键词搜索化学成分。以口服生物利用度(Oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(Drug-likeness, DL)≥0.18条件进行筛选,最后删除冗余成分。另外,根据《中国药典》(2020版)中相关规定,虽然木香烃内酯和去氢木香烃内酯其OB和DL值偏低,但为如达-6的主要药理成分<sup>[8]</sup>,因此也一并纳入本研究。最终整理并删除重复的成分,获得如达-6的潜在活性成分群。

1.1.3 如达-6成分靶点预测 利用TCMSP、SwissTargetPrediction<sup>[17]</sup>和BATMAN-TCM<sup>[18]</sup>数据库,物种设置Homo sapiens<sup>[19]</sup>,得出如达-6每个潜在活性成分的潜在靶点。利用Uniprot等数据库<sup>[20]</sup>,关联蛋白名称与基因名称,删除不匹配的基因。最终整理并删除重复的靶点,获得如达-6的成分靶点群。

1.1.4 胃溃疡疾病相关靶点预测 以“gastric ulcer”为关键词,利用GeneCards<sup>[21]</sup>、OMIM<sup>[22]</sup>、PharmGkb<sup>[23]</sup>、TTD<sup>[24]</sup>和Drugbank<sup>[25]</sup>数据库,搜索胃溃疡相关靶点,删除冗余靶点。

1.1.5 如达-6成分和胃溃疡共同靶点 通过Venny v2.1.0平台,获得如达-6成分与胃溃疡的交集靶点,即为如达-6抗胃溃疡的预测作用靶点。绘制韦恩图。

1.1.6 PPI分析 利用STRING<sup>[26]</sup>数据库,对1.1.5项中的交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析。设置物种为Homo sapiens,最低互作分数(minimum required interaction score)为0.9,隐藏网络中断开连接的节点,输出TSV格式文件。利用Cytoscape3.8.0<sup>[27]</sup>软件进行拓扑分析,网络中每个节点之间的连接数用度值(degree)表示。度值排名前10的靶点被视为核心靶点。

1.1.7 GO功能与KEGG通路富集分析 利用Metascape数据库<sup>[28]</sup>,对如达-6与胃溃疡的交集靶点进行Gene ontology(GO)功能注释和Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG)通路富集分析,物种设置为Homo sapiens。对得到的结果进行筛选,保留P<0.05的结果。

1.1.8 “成分-靶点”网络构建 利用Cytoscape3.8.0软件,建立如达-6潜在活性成分和治疗胃溃疡靶点之间的“成分-靶点”网络。通过该软件“CytoNCA”插件进行拓扑分析,推测其主要的活性成分。

## 1.2 实验验证

1.2.1 药物与试剂 复方如达-6由内蒙古民族大学附属医院蒙药制剂室配制。吡哆美辛(货号17378-5G)购自Sigma-Aldrich公司。伊红-苏木精(Hematoxylin-eosin, H&E)染色液(货号G1120)购自索莱宝科技有限公司。RNA提取试剂盒(货号DP431)购自天根生化科技有限公司。逆转录PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit试剂盒(货号6110A)、TB Green® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)(货号

RR420A)购自宝生物工程有限公司。

1.2.2 实验动物 雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,SPF级(批号C-NMG20210617),体重(200±20)g,由长生生物科技公司提供。动物研究方案设计和实施是在内蒙古民族大学动物伦理委员会指导下进行的(伦理编号NM-LL-202106-15-1)。动物饲养环境为12h光照/12h黑暗自然昼夜节律周期、恒温(24.0±2.0)℃及相对湿度(50±5)%。

1.2.3 动物分组与给药 大鼠在适应性饲养一周后,随机分为5组:正常组、模型组、如达-6低、中、高剂量组,每组6只。将如达-6药粉用0.5%的CMC-Na配制成27 mg·mL<sup>-1</sup>、135 mg·mL<sup>-1</sup>、270 mg·mL<sup>-1</sup>的混悬液。给药方式为灌胃。正常组和模型组给予0.5%的CMC-Na;如达-6给药剂量分别为:如达-6低剂量组0.27 g·kg<sup>-1</sup>、如达-6中剂量组1.35 g·kg<sup>-1</sup>、如达-6高剂量组2.7 g·kg<sup>-1</sup>。灌胃量为0.01 mL·g<sup>-1</sup>,每日1次,连续3周。每周根据大鼠体重变化调整灌胃量。

1.2.4 造模与取材 造模前24h,实验动物禁食不禁水。于给药的第21天,正常组大鼠灌胃0.5% CMC-Na,其余组大鼠灌胃吡啶美辛(30 mg·kg<sup>-1</sup>,悬浮于0.5% CMC-Na中),诱导胃溃疡<sup>[29]</sup>。6h后,大鼠麻醉并开腹,取出胃组织沿其大弯处剪开,清理胃内容物后迅速转移至4℃生理盐水中清洗残留物,滤纸吸干后置于冰上,观察胃损伤情况,拍照记录。将一部分胃组织切割下来,放入4%的多聚甲醛固定液中进行固定;并将未用的胃组织装入冻存管中,在液氮中迅速冷冻,置于-80℃的冰箱中储存。

1.2.5 胃组织病理学观察 对4%多聚甲醛溶液中固定的胃组织进行脱水和石蜡包埋,切成5 μm的切片,进行H&E染色,在显微镜下观察染色后的胃组织形态。

1.2.6 qRT-PCR检测 提取大鼠胃组织总RNA,以1 μg总RNA为模板进行逆转录cDNA第一链反应,再以cDNA为模板进行qRT-PCR检测。Actb用作内参。反应程序为:95℃ 3 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s共40次扩增循环。每个实验进行3个生物学重复。候选基因的特异性引物购自生工生物工程(中国上海),引物序列如表2所示。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算相对表达水平。

表2 用于qRT-PCR实验的引物序列

Tab. 2 Primer sequences used in qRT-PCR experiment

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>Pik3ca</i>	TTCCCAATGCTGTTTCAGAC	ACCCCAAGTCCATCGAA
<i>Tp53</i>	TCCGGTCAGTTGTTGGA	GCAGAGTGGAGGAAATGG
<i>Mapk1</i>	CGGCGGTTAGTTCTCTCTT	GACTTGTGCTGCGCTTC
<i>Akt1</i>	GCTGGAGAACCTCATGCTG	GTGTCCCGCAGAACGTC
<i>Actb</i>	CCTCACTGTCCACCTTCCA	GGGTGTAACCGCAGCTCA

1.2.7 数据处理 数据均以平均值±平均值的标准偏差(mean±standard error of mean,S.E.M.)表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 表示有极显著性差异。使用GraphPad Prism 8.0软件进行分析和绘图。

## 2 结果

2.1 如达-6的潜在活性成分 为了全面搜集如达-6的成分,本研究中整理了如达-6中6味药材在TC-MSP数据库中的成分信息,同时也参考了《中国药典》(2020版)<sup>[8]</sup>规定的如达-6的指标成分。根据OB≥30%且DL≥0.18条件,从TCMSP数据库中共得到如达-6潜在活性成分56个,其中包括源于木香的6个、源于栀子的15个、源于石榴皮的7个、源于闹羊花的9个、源于豆蔻的12个以及源于芫荽的15个成分。另外,《中国药典》(2020版)<sup>[8]</sup>规定的如达-6的木香烯内酯和去氢木香烯内酯也一并纳入。经过删除重复的成分后,最终筛选出如达-6的潜在活性成分58个,详细信息见表3。

2.2 如达-6抗胃溃疡靶点 预测上述58个潜在活性成分的靶点,分别从SwissTargetPrediction、BATMAN-TCM和TCMSP数据库中获得688个、557个和207个靶点,去重后共获得1 182个如达-6的成分靶点(图1A)。再以“gastric ulcer”为关键词检索疾病靶点,分别从GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD和Drugbank数据库中

获得311个、25个、19个、8个和51个靶点,去重后得到359个胃溃疡相关靶点(图1B)。然后对成分靶点和疾病靶点进行交集,确定137个重叠靶点,即为如达-6抗胃溃疡的潜在靶点(图1C)。

表3 如达-6的潜在活性成分

Tab. 3 Potential active ingredients of Ruda-6

编号	化合物中文名称	TCMSP数据库编号	分子式	OB/%	DL	来源
C1	苯并[a]咪唑	MOL010813	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N	35.22	0.22	木香
C2	菜菔苦素	MOL010828	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	67.50	0.38	木香
C3	-	MOL010839	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>	38.56	0.73	木香
C4	白桦脂酸	MOL000211	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	55.38	0.78	木香
C5	谷甾醇	MOL000359	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	36.91	0.75	木香
C6	豆甾醇	MOL000449	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	43.83	0.76	木香、栀子
C7	藏红花酸	MOL001406	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	35.30	0.26	栀子
C8	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-羟基-2,2,6a,6b,9,9,12a-七甲基-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-四十氢丙烷-4-甲酸	MOL001663	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	32.03	0.76	栀子
C9	欧前胡素	MOL001941	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	34.55	0.22	栀子
C10	苯偶氮苯偶氮-2-萘酚	MOL004561	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O	84.07	0.59	栀子
C11	槲皮素	MOL000098	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	46.43	0.28	栀子、石榴皮、闹羊花、豆蔻
C12	β-谷甾醇	MOL000358	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	36.91	0.75	栀子、石榴皮
C13	山柰酚	MOL000422	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	41.88	0.24	栀子、石榴皮、闹羊花
C14	十八碳-9,12-二烯酸乙酯	MOL001494	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	42.00	0.19	栀子
C15	角鲨烯	MOL001506	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	33.55	0.42	栀子
C16	异欧前胡素	MOL001942	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	45.46	0.23	栀子
C17	油酸乙酯	MOL002883	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	32.40	0.19	栀子
C18	5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)色酮	MOL003095	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	51.96	0.41	栀子
C19	异山柰素	MOL007245	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	60.16	0.26	栀子
C20	京尼平龙胆双糖苷	MOL009038	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	45.58	0.83	栀子
C21	鞣花酸	MOL001002	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	43.06	0.43	石榴皮
C22	(+)-儿茶素	MOL000492	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	54.83	0.24	石榴皮
C23	木犀草素	MOL000006	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	36.16	0.25	石榴皮、豆蔻
C24	鄂见新醇	MOL009274	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> ClO	55.05	0.34	石榴皮
C25	异鼠李素	MOL000354	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	49.60	0.31	闹羊花
C26	桉木毒素	MOL005136	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	55.97	0.61	闹羊花
C27	鹰爪豆碱	MOL005137	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub>	68.35	0.21	闹羊花
C28	帕西岗稔毒素	MOL005138	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	68.43	0.63	闹羊花
C29	木藜芦毒素III	MOL005141	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	47.01	0.48	闹羊花
C30	闹羊花毒素III	MOL005142	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	64.97	0.56	闹羊花
C31	山月桂萜醇	MOL005144	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	61.61	0.50	闹羊花
C32	(4E,6E)-1,7-双(3,4-二羟基苯基)庚-4,6-二烯-3-酮	MOL000224	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	33.06	0.31	豆蔻
C33	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基色氨酸-4-酮	MOL000228	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	55.23	0.20	豆蔻
C34	乔松素	MOL000230	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	57.56	0.20	豆蔻
C35	1,7-二苯基-3,5-二羟基-1-庚烯	MOL000235	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	49.01	0.18	豆蔻
C36	1,7-二苯基-5-羟基-6-庚烯-3-酮	MOL000238	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	32.65	0.18	豆蔻



心靶点(表4)。

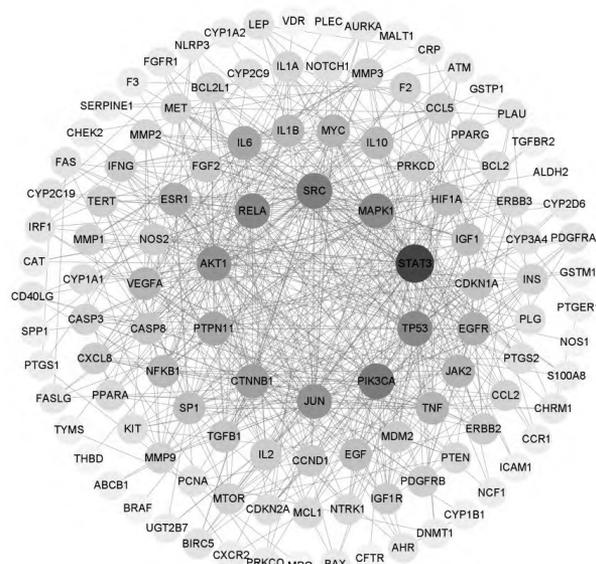


图2 如达-6和胃溃疡共同靶点的PPI分析

Fig. 2 PPI analysis of common targets of Ruda-6 and gastric ulcer

注:节点大小和颜色与其degree值成比例。节点越大、颜色越深,网络中的靶点就越重要。

表4 如达-6治疗胃溃疡潜在核心靶点

Tab. 4 Potential core targets of Ruda-6 in treatment of gastric ulcer

编号	Uniprot ID	基因名称	蛋白名称	Degree 值
1	P40763	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	51
2	P42336	<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	37
3	P12931	<i>SRC</i>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	36
4	Q04206	<i>RELA</i>	Transcription factor p65	34
5	P04637	<i>TP53</i>	Cellular tumor antigen p53	33
6	P28482	<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	33
7	P31749	<i>AKT1</i>	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	31
8	P05412	<i>JUN</i>	Transcription factor Jun	31
9	P35222	<i>CTNNB1</i>	Catenin beta-1	28
10	Q06124	<i>PTPN11</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	26

2.4 交集靶点的GO分析与KEGG富集分析 为了阐明如达-6在胃溃疡治疗中可能的作用机制,对137个交集靶点进行了GO功能注释和KEGG通路富集分析。根据GO功能注释结果,共有277个GO term显著富集( $P < 0.05$ ),包括磷酸化的正向调节、细胞迁移的正向调节、细胞运动的正向调节、运动的正向调节、蛋白质磷酸化的正向调节等(图3)。此外,对交集靶点的KEGG通路富集分析结果表明,如达-6抗胃溃疡的靶点涉及163个信号通路,包括癌症途径、人巨细胞病毒感染、PI3K/Akt信号通路、癌症中的蛋白聚糖、脂质与动脉粥样硬化以及MAPK信号通路等。这些结果说明,如达-6抗胃溃疡的作用靶点分布在不同的生物过程和信号通路中(图4)。

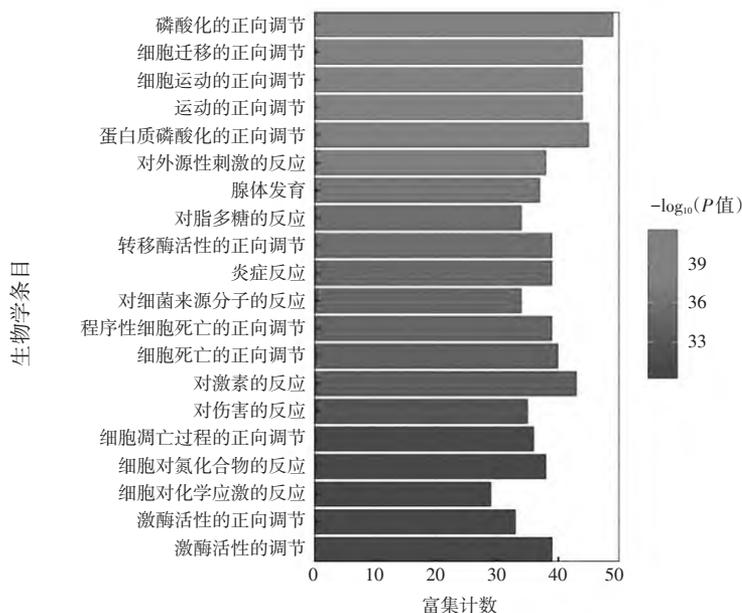


图3 如达-6抗胃溃疡靶点的GO功能注释(前20条)

Fig. 3 GO functional annotation of Ruda-6 against gastric ulcer targets (Top 20)

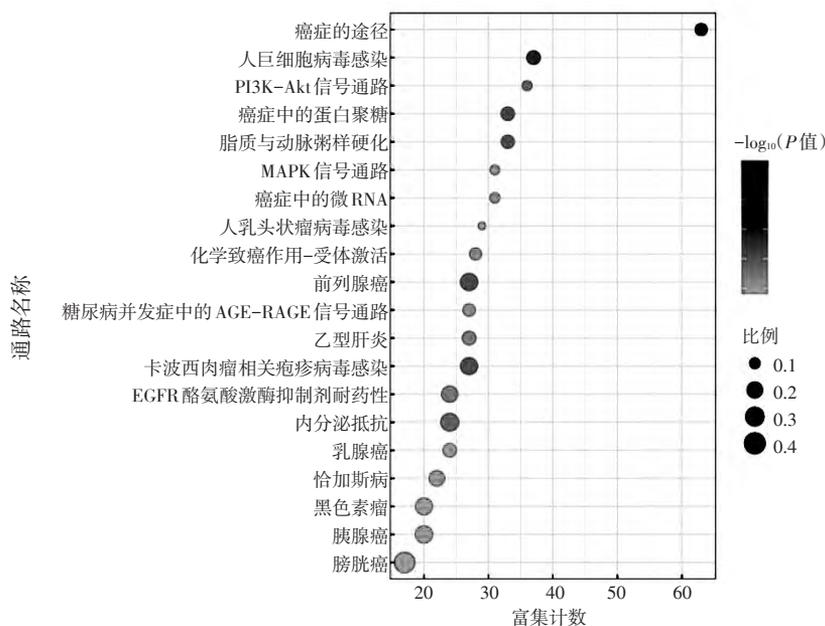


图4 如达-6抗胃溃疡靶点的KEGG信号通路(前20条)

Fig. 4 KEGG signaling pathway of Ruda-6 against gastric ulcer targets (Top 20)

2.5 “成分-靶点”网络构建 以如达-6的58个潜在活性成分和137个抗胃溃疡靶点构建“成分-靶点”网络,阐明如达-6的有效成分如何起到抗胃溃疡作用,见图5。如达-6每个成分作用于多个靶点,而每个靶点又与多个成分相互作用。其中,槲皮素、木犀草素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、异鼠李素、华良姜素、5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)色酮、3-甲基樟脑酚以及N-(2,5-二甲氧基苯基)-4-甲氧基苯甲酰胺等成分,分别调控84个、53个、45个、37个、34个、29个、29个、27个、27个和26个靶点(表5),在治疗胃溃疡过程中具有重要作用。另外,如达-6在《中国药典》规定的指标成分木香烯内酯(C57)和去氢木香烯内酯(C58)可调控9个和12个靶点。这些数据说明,如达-6通过多成分-多靶点发挥抗胃溃疡作用。

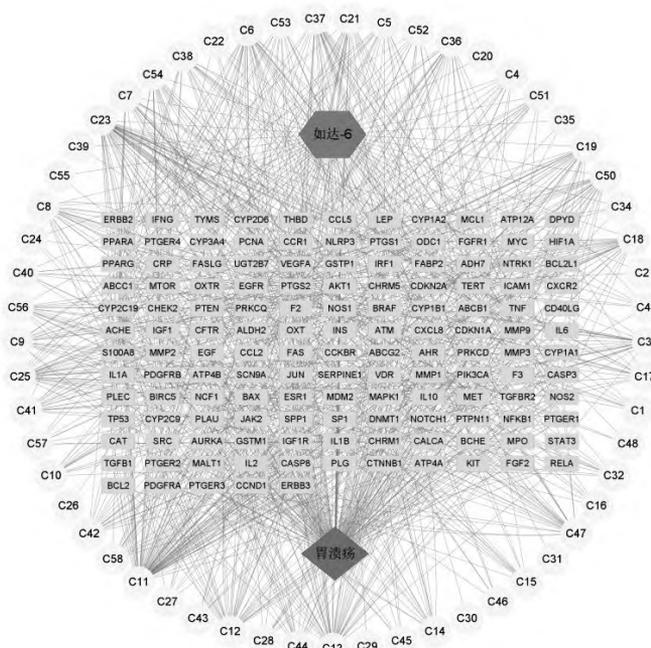


图5 如达-6抗胃溃疡“成分-靶点”网络

Fig. 5 The “component–target” network of Ruda-6 against gastric ulcer

注:六边形代表复方如达-6;圆圈代表如达-6的成分(表3);棱形代表胃溃疡;四边形代表靶点。

表5 如达-6抗胃溃疡重要的潜在活性成分

Tab. 5 Potential active ingredients of Ruda-6 against gastric ulcer

编号	化合物名称	Degree 值
C11	槲皮素	84
C23	木犀草素	53
C13	山柰酚	45
C12	β-谷甾醇	37
C6	豆甾醇	34
C25	异鼠李素	29
C37	华良姜素	29
C18	5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基-苯基)色酮	27
C19	3-甲基樟脑酚	27
C47	N-(2,5-二甲氧基苯基)-4-甲氧基苯甲酰胺	26

2.6 如达-6对吡啶美辛诱导的胃溃疡大鼠的影响 为了考察如达-6对吡啶美辛致胃溃疡大鼠的保护作用,对各组大鼠胃黏膜外观进行了观察,发现正常组大鼠胃黏膜完整,未发现出血等异常;模型组大鼠胃黏膜表面出现了出血、损伤等溃疡性病变;如达-6给药组胃黏膜损伤程度均有不同程度的减轻。观察各组大鼠胃组织H&E染色情况,发现正常组大鼠胃黏膜显示出正常的组织学表现;吡啶美辛处理引起了一系列病理学改变,包括上皮细胞的丢失、炎症渗出和浸润以及血管充血,符合胃溃疡损伤的特点;而如达-6预处理后不同程度缓解了吡啶美辛引起的病理学改变,见图6。

2.7 如达-6对关键靶点 mRNA 表达水平的影响 网络药理学预测出了如达-6抗胃溃疡的核心靶点。为了验证如达-6对这些关键靶点的影响,通过qRT-PCR方法检测了正常组、模型组以及如达-6给药组大鼠胃组织中关键靶点的mRNA表达水平的变化。与正常组相比,模型组大鼠胃组织PIK3CA、TP53、MAPK1和AKT1的mRNA表达水平显著降低;而与模型组比较,如达-6干预均使其表达量增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见图7。

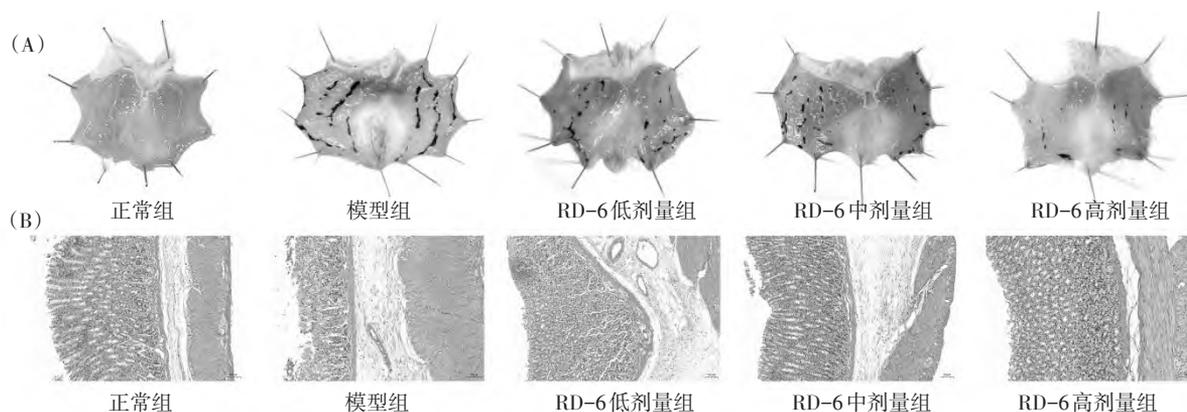


图6 各组大鼠胃黏膜损伤情况

Fig. 6 Gastric mucosal damage situation in each group of rats

注:(A)胃黏膜外观;(B)组织病理学观察(H&E×100)。RD-6代表如达-6。

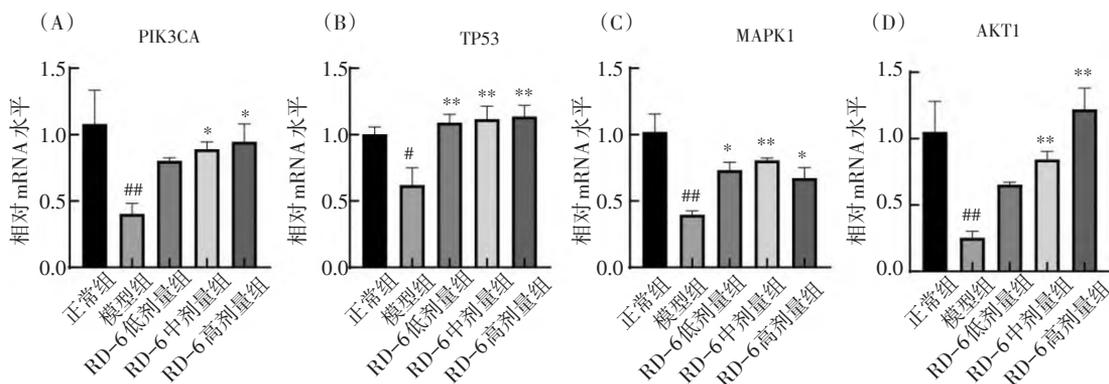


图7 如达-6对关键靶点 mRNA 表达水平的影响

Fig. 7 Effect of Ruda-6 on mRNA expression levels of key targets

注:数据为平均值±平均值的标准偏差(n=3)。与正常组相比#P<0.05,##P<0.01;

与模型组相比\*P<0.05,\*\*P<0.01。RD-6代表如达-6。

### 3 讨论

蒙药复方如达-6治疗胃肠道疾病已有悠久的历史,因其含有天然成分、不良反应相对较少且疗效显著等特点,在蒙医临床上得到了广泛应用。笔者运用网络药理学方法筛选如达-6中具有抗胃溃疡作用的潜在有效成分、预测作用靶点和信号通路、建立“成分-靶点”网络,从而系统预测如达-6治疗胃溃疡的潜在物质基础和作用机制,并通过动物实验和分子生物学技术证实如达-6的抗胃溃疡作用和潜在机制。

药物分子的体内过程直接影响其治疗效果,因此,筛选具有良好药代动力学性质的活性化合物尤为关键。本研究采用OB和DL两个典型的药代动力学参数,筛选了如达-6的潜在有效成分。另外,木香烯内酯和去氢木香烯内酯已经确定为木香的有效药理成分,也被纳入了如达-6的有效成分群。由此,从如达-6中共获得了58个潜在活性成分,包括黄酮类(如槲皮素、木犀草素、柚皮素)、萜类(如木香烯内酯、去氢木香烯内酯)以及植物甾醇(如谷甾醇、豆甾醇)等成分。这些成分的抗胃溃疡作用已在多个研究中得到证实。例如,槲皮素可抑制吲哚美辛引起的炎症反应,从而保护胃肠道<sup>[30-31]</sup>。木犀草素可减少促炎因子IL-6、IL-1 $\beta$ <sup>[32]</sup>和提高抗炎因子IL-10<sup>[33]</sup>的表达,而这些炎症因子与胃溃疡密切相关。ZHENG等<sup>[34]</sup>的研究发现了木香烯内酯和去氢木香烯内酯对乙醇引起的胃溃疡小鼠的抗溃疡活性,其机制被认为与TNF- $\alpha$ 、COX-2、MDA水平的减少与IL-10、PCNA水平的增加有关。谷甾醇和豆甾醇对胃、十二指肠黏膜也具有保护作用。ZHAO等<sup>[35]</sup>报道了豆甾醇通过抑制胃癌细胞Akt/mTOR途径,诱导细胞凋亡和保护性自噬。可见,通过网络药理学预测得到的这些有效成分具有抗胃溃疡潜力,蒙药如达-6抗胃溃疡的优势

可能体现在这些成分的协同作用上。

如达-6的潜在有效成分可能通过调节137个靶点发挥抗胃溃疡作用。根据PPI分析,STAT3、PIK3CA、SRC、RELA、TP53、MAPK1、AKT1、JUN、CTNNA1和PTPN11为如达-6发挥抗胃溃疡作用的核心靶点。通过对137个交集靶点的KEGG富集分析可知,如达-6的抗胃溃疡靶点涉及多条分子途径,其中,PI3K/Akt和MAPK信号通路可能在胃溃疡的治疗机制中发挥重要作用。大量研究已证实,这些核心靶点和关键的信号通路不仅有一定的联系,而且与胃肠道疾病密切相关。例如,复方胃通心通过上调p-PI3K、p-AKT、p-P53的蛋白表达水平,调节PI3K/Akt信号通路,从而显著改善吡啶美辛诱导的大鼠胃溃疡<sup>[36]</sup>。复方良附丸可通过减少TP53、p38 MAPK、Akt、p-Akt等蛋白水平,抑制MAPK、NF- $\kappa$ B、TNF、PI3K/Akt等信号通路,从而减轻乙醇引起的小鼠胃溃疡<sup>[37]</sup>。杜仲叶可减少盐酸-乙醇引起的大鼠胃溃疡,其预防胃溃疡机制主要与调节PI3K/Akt和NF- $\kappa$ B信号通路有关<sup>[38]</sup>。基于本文预测的核心靶点和作用机制,结合前人研究,选择PI3K/Akt信号通路中的关键靶点PIK3CA和AKT1以及MAPK信号通路中的关键靶点TP53和MAPK1进行了qRT-PCR实验验证。这些靶点mRNA表达水平的变化,表明了如达-6可能通过调控PI3K/Akt和MAPK信号通路缓解胃溃疡的发生。

综上,网络药理学分析和动物实验结果初步揭示了如达-6的多成分、多靶点的抗胃溃疡作用模式,这些发现为深入研究如达-6抗胃溃疡的作用机制提供了重要的依据。然而,由于网络药理学分析中所用数据库的准确性、完整性和可靠性等问题,本研究获得的潜在活性成分和关键靶点仍需要进一步完善。例如,如达-6中的栀子苷<sup>[39]</sup>是否应该纳入如达-6的活性成分群中还有待考证。因此,在未来的研究中需要深入挖掘如达-6的有效成分信息,并通过大量临床试验和体内外实验验证这些活性成分和作用机制。

#### 参 考 文 献

- [1] GROENEN M J, KUIPERS E J, HANSEN B E, et al. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: back to where it started[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 2009, 23(9): 604-608.
- [2] LI Z S, ZOU D W, MA X Q, et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(12): 2570-2577.
- [3] MASHAYEKHI-SARDOO H, RAZAVI B M, EKHTIARI M, et al. Gastroprotective effects of both aqueous and ethanolic extracts of Lemon verbena leaves against indomethacin-induced gastric ulcer in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(12): 1639-1646.
- [4] PANTEA M, NEGOVAN A, BANESCU C, et al. Factors associated with recurrent ulcers in patients with gastric surgery after more than 15 years: a cross-sectional single-center study[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2018, 2018: 8319481.
- [5] YEGEN B C. Lifestyle and peptic ulcer disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(18): 2034-2040.
- [6] LANAS A. We are using too many PPIs, and we need to stop: a European perspective[J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(8): 1085-1086.
- [7] SHAH R, RICHARDSON P, YU H, et al. Gastric acid suppression is associated with an increased risk of adverse outcomes in inflammatory bowel disease[J]. *Digestion*, 2017, 95(3): 188-193.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版, 2020: 741.
- [9] 康志红, 包金全. 蒙药治疗胃溃疡疗效观察[J]. *中国民族医药杂志*, 2015, 21(1): 10.
- [10] 道日教, 王玉山. 蒙医治疗胃溃疡临床疗效评价研究[J]. *中国民族医药杂志*, 2017, 23(9): 11-14.
- [11] 王念夫. 六味木香胶囊西味替丁治疗反流性食管炎[J]. *医药论坛杂志*, 2003, 24(9): 18-19.
- [12] 楚古拉, 包金亮, 白布赫. 蒙药如达-6味散治疗慢性胃炎胃痛[J]. *中国民族医药杂志*, 1998, 4(4): 38.
- [13] 格日乐吐. 蒙药如达-6治疗急性胃痛30例疗效观察[J]. *中国民族医药杂志*, 2017, 23(4): 10-11.
- [14] 白音夫, 任文栓, 党小菊. 六味木香胶囊对实验性胃溃疡的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1998, 4(6): 37-38.
- [15] ZHANG R Z, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [16] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.

- [17]GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 32–38.
- [18]LIU Z Y, GUO F F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.
- [19]WANG Z Y, CHU F H, GU N N, et al. Integrated strategy of LC-MS and network pharmacology for predicting active constituents and pharmacological mechanisms of *Ranunculus japonicus* Thunb. for treating rheumatoid arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113818.
- [20]Sangya P, Martin M J, O'Donovan C. UniProt: the universal protein knowledgebase[J]. *Nucleic Acids Res* 2017, 45 (D1): D158–D169.
- [21]STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1301–1303.
- [22]AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D789–D798.
- [23]LI G, OWEN R P, GOR W, et al. Pharm GKB: an integrated resource of pharmacogenomic data and knowledge[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2008, 14: 147.
- [24]ZHOU Y, ZHANG Y T, LIAN X C, et al. Therapeutic target database update 2022: facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): 398–1407.
- [25]WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): 1074–1082.
- [26]SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): 607–613.
- [27]SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498–2504.
- [28]ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [29]OGALY H A, ALSHERBINY M A, EL BADAWY S A, et al. Gastroprotective effects and metabolomic profiling of Chasteberry fruits against indomethacin-induced gastric injury in rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104732.
- [30]CARRASCO-POZO C, CASTILLO R L, BELTR-N C, et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- $\kappa$ B and Nrf2[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 27: 289–298.
- [31]BOONYONG C, ANGKHASIRISAP W, KENGKOO M, et al. Different protective capability of chlorogenic acid and quercetin against indomethacin-induced gastrointestinal ulceration[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(3): 427–436.
- [32]ATTIQ A, JALIL J, HUSAIN K, et al. Luteolin and apigenin derived glycosides from *Alphonsea elliptica* abrogate LPS-induced inflammatory responses in human plasma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114120.
- [33]OKEKE E B, UZONNA J E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 680.
- [34]ZHENG H, CHEN Y L, ZHANG J Z, et al. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 250: 68–77.
- [35]ZHAO H G, ZHANG X, WANG M, et al. Stigmasterol simultaneously induces apoptosis and protective autophagy by inhibiting Akt/mTOR pathway in gastric cancer cells[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 629008.
- [36]LIU W J, ZHANG X Y, MA T C, et al. Uncovering the pharmacological mechanism of Wei-Tong-Xin against gastric ulcer based on network pharmacology combined with in vivo experiment validation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115282.
- [37]魏晴, 梁珊珊, 姜珊珊, 等. 良附丸治疗胃溃疡的网络药理学作用机制研究[J]. *中国药房*, 2021, 32(9): 1063–1069.
- [38]GONG M, LI Q F, GUO H, et al. Protective effect of active components of *Eucommia ulmoides* leaves on gastric ulcers in rats: Involvement of the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Food Sci*, 2022, 87(7): 3207–3222.
- [39]包明兰, 青格乐土. 高效液相色谱法测定蒙药如达-6中栀子苷的含量[J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2009, 24(3): 325–327.

[责任编辑 赵贤芳]