

外来资源辣木叶与大黄的泻下药理作用及机制比较研究

岳星男^{1,2}, 王硕³, 杨滨², 冯淑怡⁴, 付饶⁵, 屈春慧⁶, 李志勇^{2,7*}

- (1. 山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 云南民族大学民族医药学院, 云南 昆明 650500; 4. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 5. 中央民族大学药学院, 北京 100081; 6. 山东中医药大学中医学学院, 山东 济南 250300; 7. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 辣木叶在印度阿育吠陀医学中具有“Virechana”(purgative, 泻下)功效,该研究以泻下中药大黄为参照,通过比较辣木叶与其在通便药效与机制方面的差异,为辣木叶在中医药中的进一步应用奠定基础。基于网络药理学和分子对接方法,寻找大黄、辣木叶发挥通便药理作用的物质基础、共有靶点和信号通路;建立低纤维饲料诱导的小鼠便秘模型,检测粪便参数、小肠推进率,使用HE染色观察结肠形态变化;RT-qPCR和免疫组化法分别检测相关基因和靶点蛋白的相对表达量。结果发现,将大黄和辣木叶靶点映射到便秘疾病的生物过程网络中,两者的靶点距离相近,表明其可能通过相似的生物过程发挥治疗便秘的作用;分子对接结果显示番泻苷元C、异槲皮苷等可作用于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)等靶点进而影响MAPK信号传导、钙信号传导等通路发挥促排便作用。动物实验表明辣木叶、大黄均可增加便秘小鼠粪便的粒数、含水率等,改善小肠运动功能及结肠黏膜层厚度和肌层厚度,上调便秘小鼠结肠AKT1、MAPK3基因表达量,降低AQP3蛋白表达量。表明辣木叶与大黄在治疗便秘的药效和作用机制方面存在一定的相似性,以大黄作为参照药,可更好地理解辣木叶“Virechana”(purgative, 泻下)功效在中医药中的特点。

[关键词] 辣木叶; 大黄; 泻下; 网络药理学; 比较

Comparative study of purgative pharmacological effects and mechanisms of *Moringa oleifera* leaves and *Rhei Radix et Rhizoma*

YUE Xing-nan^{1,2}, WANG Shuo³, YANG Bin², FENG Shu-yi⁴, FU Rao⁵, QU Chun-hui⁶, LI Zhi-yong^{2,7*}

- (1. Basic Medical College, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China; 4. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 5. School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 6. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250300, China; 7. Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China)

[Abstract] *Moringa oleifera* leaves are known for their "Virechana" (purgative) effect in Ayurvedic medicine in India. This study compared the purgative effects and mechanisms of *M. oleifera* leaves with the reference *Rhei Radix et Rhizoma* to establish a foundation for the further application of *M. oleifera* leaves in traditional Chinese medicine (TCM). Using network pharmacology and molecular docking methods, this study identified the material basis, common targets, and signaling pathways through which *Rhei Radix et*

[收稿日期] 2023-03-03

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”专项(2018YFC1706106);中央本级重大增减支项目(2060302)

[通信作者] *李志勇, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为外来新药资源的引进与开发, E-mail: lizhiyong7899@sina.com

[作者简介] 岳星男, 硕士研究生, E-mail: yuexingnan1226@163.com

Rhizoma and *M. oleifera* leaves exerted their purgative pharmacological effects. A low-fiber diet-induced constipation mouse model was established to measure fecal parameters and small intestinal propulsion rate, and histological changes in the colon were observed using HE staining. Relative expression levels of relevant genes and target proteins were assessed using RT-qPCR and immunohistochemistry, respectively. The results showed that mapping the targets of Rhei Radix et Rhizoma and *M. oleifera* leaves onto the biological process network of constipation revealed close proximity, indicating that they may exert their therapeutic effects on constipation through similar biological processes. Molecular docking results indicated that compounds such as sennoside C and isoquercitrin could target serine/threonine protein kinases (AKT1) and mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), thereby affecting MAPK and calcium signaling pathways to promote defecation. Animal experiments demonstrated that both *M. oleifera* leaves and Rhei Radix et Rhizoma increased the number of fecal pellets and water content in constipated mice, improved small intestine motility, colon mucosal thickness, and muscle layer thickness, upregulated the gene expression levels of AKT1 and MAPK3 in the colon, and downregulated the expression of AQP3 protein. These findings suggest that *M. oleifera* leaves and Rhei Radix et Rhizoma share similarities in their therapeutic efficacy and mechanisms for treating constipation. Using Rhei Radix et Rhizoma as a reference can provide a better understanding of the characteristics of the "Virechana" (purgative) effect of *M. oleifera* leaves in TCM.

[Key words] *Moringa oleifera* leaves; Rhei Radix et Rhizoma; purgative; network pharmacology; comparison

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230630.401

大量外来药材的引入和使用丰富了我国的药用资源,使中医药在不断吸收与接纳外来资源的过程中得以发展^[1]。外来新资源引进的关键问题是如何实现其“中药化”^[2],即赋予药性、定位功效和实现配伍,但受《药品注册管理办法》(国家市场监督管理总局令第27号,自2020年7月1日起施行)及现代伦理学约束,当今外来药用资源的引纳,无法直接进行中医临床实践。对外来药用资源药性、功效认知的最佳途径就是在中医药中寻找可对照的药材^[3],通过系统的比较来研判和推导外来药材可能的中药化特征。

辣木 *Moringa oleifera* 原产于印度和非洲的干旱或半干旱地区^[4],为辣木科辣木属多年生热带乔木^[5],我国于20世纪初将辣木从缅甸引种至我国云南省芒市,随后在海南、福建、贵州等地亦有引种^[6]。辣木在印度、非洲等地已有悠久的食用和药用历史,其叶、根、花和皮等多个部位皆可食用或入药。据《阿育吠陀药典》记载,辣木叶名“śigru”,性(Veerya)寒(Sheeta),味(Rasa)甘(Madhura);具有“Virechana”(purgative,泻下)^[7]、“Pachana”(digestive,消化)^[8]等功效(Karma)。已有研究证实辣木叶能有效改善小鼠便秘症状,有促进排便的作用^[9-10]。大黄是传统泻下中药的代表,首载于《神农本草经》:“大黄,味苦寒,归胃肝大肠经,其能荡涤肠胃,推陈致新,通利水谷”,其药性“劲利”“骏快”^[11-12],具泻下攻积、清热泻火等功效^[13]。其中,大黄中发挥泻下作用的主要有效成分为蒽醌衍生

物,其可通过降低抑制性肠神经递质的水平,促进肠道蠕动和传输功能,还可通过抑制肠内水分吸收和肠液分泌来发挥促进排便的作用^[14-16]。因此,选择大黄作为参照药材,将有助于更好地理解辣木叶“Virechana”(泻下)功效和其可能的中药属性。

中药具有多成分、复杂性、协调整合的作用特点,各成分之间存在着多层次、多环节、多维度的复杂作用,以系统层次和生物网络为基础的网络药理学在中药复杂体系研究中得到了广泛应用^[17-18]。网络药理学可用于阐述药物作用机制、探索药物与疾病之间的相关性,亦可从生物网络调节角度揭示不同中药、不同成分作用于机体可能产生的共性特征^[18-19]。本研究运用网络药理学、分子对接以及经典药理学方法比较辣木叶和大黄的通便作用及相关机制,为初步解析大黄、辣木叶泻下的共性特征提供基础依据。

1 资料与方法

1.1 基于网络药理学和分子对接的辣木叶、大黄比较研究

1.1.1 大黄、辣木叶成分获取及靶点预测 从TC-MSP(<http://tcmsp.com/tcmsp.php>)中收集大黄蒽醌类化学成分,检索中国知网(CNKI,<https://kns.cnki.net>)、PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)收集辣木叶化学成分。将化学成分导入PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),获取Canonical SMILES格式,利用SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行作

用靶点预测(probability>0),设置物种属性为“*Homo sapiens*”。

1.1.2 便秘疾病靶点的获取及蛋白-蛋白互作(PPI)网络的构建 在 OMIM(<https://omim.org/>)和 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)中检索获得便秘(constipation)相关靶点信息;利用 STRING 11.0 数据库(<https://string-db.org/>)构建便秘靶点蛋白的 PPI 网络,Cytoscape 3.6.0 实现可视化。

1.1.3 便秘疾病靶点的 GO 富集分析 将便秘靶点利用 Metascape(<http://metascape.org/gp/index.html/>)数据库进行 GO 富集分析,设置阈值 $P<0.01$, minimum count>3, enrichment factor>1.5。选择生物过程(biological process)条目的富集分析结果,该平台以“kappa scores”作为相似性参数,对分析结果中相似性>0.3的条目进行分层聚类分析,利用 Omic-

$$D = \left| \frac{\text{大黄 average(degree)} - \text{辣木叶 average(degree)}}{\text{辣木叶 average(degree)}} \right| + \left| \frac{\text{大黄 average(BC)} - \text{辣木叶 average(BC)}}{\text{辣木叶 average(BC)}} \right| + \left| \frac{\text{大黄 average(CC)} - \text{辣木叶 average(CC)}}{\text{辣木叶 average(CC)}} \right|$$

1.1.5 生物过程的筛选 为判别大黄和辣木叶是否可以通过相似的生物过程发挥通便作用,对生物过程条目进行筛选。筛选标准遵循以下原则:①生物过程条目中靶点数量最多者;②选择大黄、辣木叶映射到便秘 PPI 网络的交集靶点数量最多的生物过程条目;③大黄、辣木叶作用靶点距离最小的生物过程网络;筛选所得的生物过程条目即为大黄、辣木叶共同发挥药理作用所影响的条目。对所筛选的生物过程条目中的靶点进行归纳去重,即得到大黄、辣木叶治疗便秘的潜在作用靶点。

1.1.6 “药物-化学成分-靶点-通路”网络的构建与分析 将生物过程中的靶点上传至 Metascape(<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行 KEGG 富集分析。构建“大黄/辣木叶-化学成分-靶点-通路”网络,计算拓扑参数并预测大黄、辣木叶发挥通便作用的有效成分。

1.2 分子对接

将筛选所得的生物过程条目中的靶点导入 STRING 11.0 构建 PPI 网络并进行网络拓扑学分析,选择大于 3 倍“degree”中位数的靶点为网络中的核心靶点。选择上述过程中筛选出的核心靶点蛋白与大黄、辣木叶中的活性成分进行分子对接,从 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)和 RCSB PDB(<https://www.rcsb.org/>)

绘制富集结果气泡图。

1.1.4 大黄、辣木叶相似性比较 将 GO 分析获得的各生物过程所包含的靶点分别导入 STRING 进行 PPI 网络构建和拓扑参数分析;分别计算其度值(degree)、接近中心性(closeness centrality, CC)和介度中心性(betweenness centrality, BC)。将大黄、辣木叶作用靶点分别映射至各生物过程条目所构建的 PPI 网络中,求算其拓扑参数平均值,以 average(degree)、average(BC)、average(CC)表示。以下列公式计算每个生物过程网络中大黄、辣木叶靶点之间的距离(D), D 越接近于 0 则说明在生物过程靶点网络中的大黄、辣木叶靶点距离越近,即大黄、辣木叶可能通过对上述生物过程的相似作用来发挥通便活性。公式如下。

获取靶蛋白的晶体结构文件,通过 PubChem 和 Chem3D 软件获取靶点和活性成分的结构文件,AutoDock Vina 1.1.2 计算靶点蛋白与活性成分的最低结合能,结合能(affinity) $<-7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示具有较好的结合活性,且结合能越低,表明对接的效果越好^[20]。利用 PyMOL 2.3.0 软件进行可视化。

1.3 辣木叶、大黄对低纤维饲料诱导的便秘小鼠通便作用机制研究

1.3.1 动物 SPF 级 ICR 小鼠 48 只,雌性,体质量(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SYXK(京)2012-0006。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级动物室[SYXK(京)2016-0021]。实验条件保持温度在(23±2)℃,湿度 50%±10%,在 12 h/12 h 的光暗循环条件下饲养动物。实验方案取得中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验福利审查委员会批准(伦理号 ERCCACMS21-2111-28)。

1.3.2 药品 辣木叶购自云南天佑科技开发有限公司,为 *M. oleifera* 的干燥叶;大黄饮片购自河北百草康神药业有限公司(批号 2106013)。

干燥辣木叶浸泡 30 min,分别加入 10、8 倍体体积量的双蒸水,连续回流提取 2 次,每次回流 1 h,过

滤,合并2次滤液,常压浓缩;大黄饮片浸泡后直火煎煮5 min,滤去药渣后用旋转蒸发器定容。

比沙可啶(批号 B5066,百灵威科技有限公司); BeyoRT II cDNA 第一链合成试剂盒(RNase H-)(批号 D7168M,上海碧云天生物技术有限公司); BeyoFast SYBR Green qPCR Mix (2×, High ROX)(批号 D7265,上海碧云天生物技术有限公司); anti-aquaporin 3(AQP3) rabbit pAb(批号 GB11395,武汉赛维尔生物科技有限公司); ABC1 抗体(批号 sc-518001,美国 Santa Cruz 公司); 低纤维饲料配方^[21]:玉米淀粉(41.5%)、蔗糖(10.0%)、糊精(10.0%)、乳酪蛋白(24.5%)、玉米油(6.0%)、矿物质混合物(7.0%)、维生素混合物(1.0%),北京华阜康生物科技股份有限公司代加工。

1.3.3 仪器 分析天平(Adventuier™,美国 OHAUS 公司);旋转蒸发器(型号 N-3010,日本东京理化器械株式会社);高速台式冷冻离心机(型号 Eppendorf 5810 R,德国 Eppendorf 公司);高精度显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.3.4 动物模型制备 小鼠常规饲养3 d,随机选择42只小鼠用于造模,另设6只为空白组。空白组给予常规饲料饲养,造模组给予低纤维饲料饲养,连续14 d。于造模第14天后,根据小鼠6 h 粪便粒数及粪便含水率判断模型成功与否。

1.3.5 分组与给药 利用实验动物体重折算法(《药理实验方法学》第3版,徐淑云、陈修主编),依据前期研究结果^[22]选择辣木叶发挥通便作用的小鼠用药剂量为 $1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,大黄在小鼠 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于人用剂量9 g)之上具有通便效果。故选择大黄和辣木叶的剂量为 $1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作为后续实验用量。

造模成功后,将便秘小鼠随机分为模型组、阳性药组(比沙可啶, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、大黄组($1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、辣木叶组($1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组6只,空白组喂饲正常维持饲料并每天灌胃给予蒸馏水,模型组和各给药组小鼠继续喂饲低纤维饲料并灌胃给予蒸馏水及相应受试药,每日1次, $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,连续7 d。

1.3.6 粪便参数 分别在造模第14天和给药第7天观察便秘小鼠的粪便情况。检测粪便参数并进行小肠运动功能测定。在每只小鼠灌胃给予0.5 mL 曙红示踪剂后,将其单独置于笼具中,每隔30 min

收集1次粪便,记录粪便粒数及排出第1粒红便时间(即口-肛传输时间)。收集6 h的粪便总数,并称量粪便湿重,60℃干燥24 h后称量粪便干重,记录粪便粒数、粪便湿重、粪便干重并计算粪便含水率。粪便含水率=(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重×100%。

1.3.7 小肠推进率 小鼠禁食不禁水18 h后,按体质量分别灌胃给药,30 min后给予0.5 mL 曙红示踪剂,10 min后小鼠脱颈处死,剖开腹腔后分离肠系膜,取自幽门至回盲部的肠管,将其自然拉直铺平,测量肠管总长度和曙红推进长度,计算小肠推进率。小肠推进率=曙红推进长度(cm)/小肠总长度(cm)×100%。

1.3.8 HE 染色 取小鼠近端结肠约2 cm,生理盐水冲洗,置于10%多聚甲醛固定液中保存。乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片,将结肠组织横切制成4 μm的切片。脱蜡至水,苏木素、伊红染色,梯度乙醇脱水封片,进行镜检和图像采集,利用Image Pro Plus 测定结肠黏膜层及肌层厚度并进行统计学分析。

1.3.9 免疫组化法检测结肠组织 AQP3 蛋白表达 将组织切片放入3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,滴加3% BSA 以进行血清封闭。30 min后甩掉封闭液,切片与AQP3 兔来源多克隆抗体(1:200)4℃冰箱孵育过夜。PBS 缓冲液清洗,滴加山羊抗兔二抗,室温孵育2 h,然后用PBS 清洗,清洗后使用DAB 显色液进行染色,苏木素复染细胞核,脱水、中性树胶封片。镜下观察阳性细胞。出现特异性棕黄色颗粒者为阳性,选取一张切片中的3个视野统计阳性细胞数量并使用Image-Pro Plus 进行半定量分析。

1.3.10 实时荧光定量聚合酶链式反应检测 AKT1、MAPK mRNA 表达水平 精确称取小鼠结肠组织100 mg,TRIzol 法提取总 RNA,使用 NanoPhotometer[®] spectrophotometer 测定总 RNA 浓度。从 NCBI 中搜索基因全序列,使用 Primer Premier 软件设计筛选各基因特异性引物。将总 RNA 稀释后按试剂盒说明书加入 Total RNA、Oligo(dT)18 Primer、Reaction Buffer、RNase Inhibitor、dNTP Mix 和反转录酶保持总反应体系为20 μL,轻轻混匀后42℃孵育60 min,85℃加热5 s 失活,以获得模板 DNA;参照试剂盒说明书在 PCR 板中分别加入 2×PCR Taq Mix、

设计的引物、各组模板 DNA,总反应体系为 20 μ L。将板置于 PCR 仪中进行扩增,采用相对定量分析的

方法,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
GAPDH	GAAGTCGGTGTGAACGGATTTC	CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
AKT1	ATGAACGACGTAGCCATTGTG	TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
MAPK3	TCCGCCATGAGAATGTTATAGGC	GGTGGTGTGATAAGCAGATTGG

1.3.11 数据分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间差异采用 SNK 检验方法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄、辣木叶活性成分筛选及其潜在作用靶点
去重后共获得大黄蒽醌类化学成分 42 个,作用靶点 354 个;辣木叶化学成分 88 个,作用靶点 487 个。

2.2 便秘疾病靶点的获取及 PPI 网络的构建

SwissTargetPrediction 平台预测共获得便秘靶点 1 230 个;Cytoscape 3.6.0 构建便秘靶点的 PPI 网络中共获得 958 个节点,21 152 条边(便秘靶点的 PPI 网络见中国知网本文增强出版附加材料)。

2.3 便秘靶点的 GO 富集分析

利用 Metascape 数据库对 1 230 个便秘靶点进行 GO 富集分析,这些靶点共涉及 262 个生物过程,可将其划分为 20 类,包括细胞群增殖的负调节(negative regulation of cell population proliferation)、蛋白磷酸化的积极调控(positive regulation of protein phosphorylation)、行为(behavior)、调节上皮细胞增殖(regulation of epithelial cell proliferation)、运动的积极调节(positive regulation of locomotion)、细胞对有机氮化合物的反应(cellular response to organonitrogen compound)、细胞死亡的积极调节(positive regulation of cell death)、系统过程调节(regulation of system process)、离子传输调节(regulation of ion transport)等,见图 1、2。

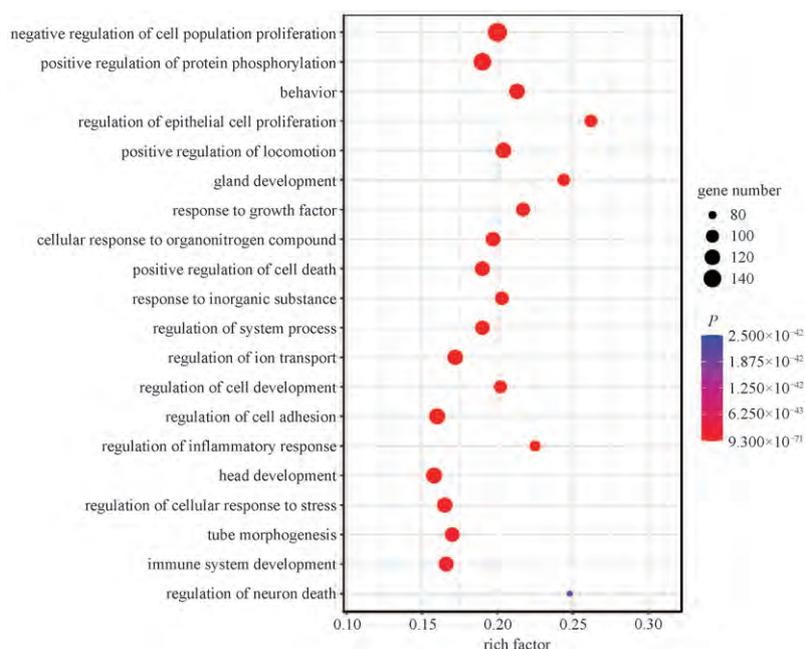
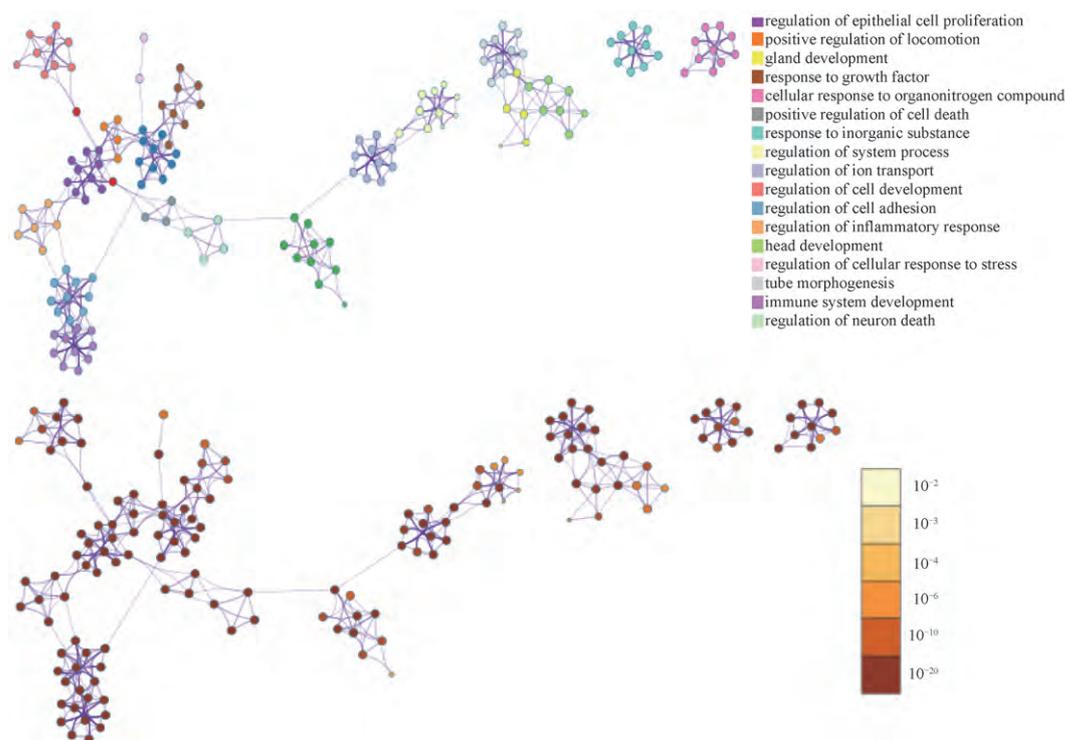


图 1 便秘靶点生物过程的 GO 富集分析

Fig. 1 GO enrichment analysis of biological process of constipation targets



上图中不同颜色的簇代表不同的聚类条目;下图中棕色的深浅代表 P 的大小,颜色越深,则 P 越小,表明该聚类条目越被显著富集。

图2 便秘靶点 GO 富集分析结果的聚类网络

Fig. 2 Clustering network of GO enrichment analysis results of constipation targets

2.4 便秘生物过程中大黄与辣木叶作用靶点的距离计算

将聚类所得生物过程条目按 P 由小到大排序,每类条目中所含靶点数目及其相应 PPI 网络中所含节点数目和边数见表 2。提取 GO(生物过程)条目聚类分析结果中每一类别所含靶点,计算辣木叶与 大黄作用靶点映射到各类生物过程 PPI 网络的靶点之间距离,结果见表 2(辣木叶、大黄靶点分别在生物过程条目靶点 PPI 网络中的映射图见中国知网本文增强出版附加材料)。结果可知,大部分的生物过程条目下大黄和辣木叶的距离值均在 0~0.5,只有 negative regulation of cell population proliferation、regulation of epithelial cell proliferation、regulation of system process、regulation of cell development 这 4 个条目的距离值大于 0.5。由此可知,大黄与辣木叶在便秘各生物过程类别中贡献度的分配较为相近,说明大黄和辣木叶可能通过影响相似的生物学过程来发挥通便作用。

2.5 生物过程的筛选及 PPI 网络的构建与分析

大黄、辣木叶作用靶点共同存在的生物过程条
5264

目是 positive regulation of protein phosphorylation(蛋白质磷酸化的正向调节)和 cellular response to organonitrogen compound(细胞对有机氮化合物的反应),包含 82 个靶点,可被认为是两者治疗便秘的潜在靶点。其中,节点的大小、颜色深浅代表 degree 的大小,见图 3。获得 degree 大于 3 倍中位数的关键靶点 13 个,包括 AKT1 (degree = 61)、TP53 (degree = 58)、MAPK3 (degree = 56)、EGFR (degree = 54)、CTNBN1 (degree = 54)、INS (degree = 54)、CASP3 (degree = 51)、SRC (degree = 51)、IGF1 (degree = 48)、IL6 (degree = 46)、IL1B (degree = 46)、MTOR (degree = 45)、TNF (degree = 45) 等,推测这些靶点可能为治疗便秘的核心靶点。

2.6 辣木叶、大黄改善便秘的“药物-化学成分-靶点-通路”网络的构建与分析

KEGG 富集分析得到了 81 条信号通路,具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的前 18 条通路见图 4,包括 MAPK 信号传导途径 (MAPK signaling pathway)、p53 信号传导途径 (p53 signaling pathway)、NOD 样受体信号传导途径 (NOD-like receptor signaling

表2 大黄、辣木叶映射到各生物过程条目所含靶点 PPI 网络中的靶点数目与其之间的距离值

Table 2 Number of targets in the PPI network of targets contained in each biological process entry mapped by *Rhei Radix et Rhizoma* and *Moringa oleifera* leaves and their distance values

No.	条目	靶点数	节点数	边数	靶点数		距离值
					大黄	辣木叶	
1	negative regulation of cell population proliferation	226	184	2 785	20	27	0.53
2	positive regulation of protein phosphorylation	220	202	4 195	42	42	0.09
3	behavior	157	153	1 992	27	36	0.43
4	regulation of epithelial cell proliferation	186	135	1 954	21	20	0.53
5	positive regulation of locomotion	123	102	1 234	25	21	0.37
6	gland development	107	107	1 215	18	18	0.35
7	response to growth factor	148	140	2 321	27	28	0.30
8	cellular response to organonitrogen compound	212	204	3 362	39	51	0.33
9	positive regulation of cell death	115	95	1 098	19	24	0.45
10	response to inorganic substance	127	126	1 256	32	34	0.29
11	regulation of system process	111	100	632	14	24	0.60
12	regulation of ion transport	138	124	932	25	30	0.46
13	regulation of cell development	107	100	817	19	14	0.59
14	regulation of cell adhesion	196	180	3 565	26	28	0.27
15	regulation of inflammatory response	166	121	1 597	18	23	0.19

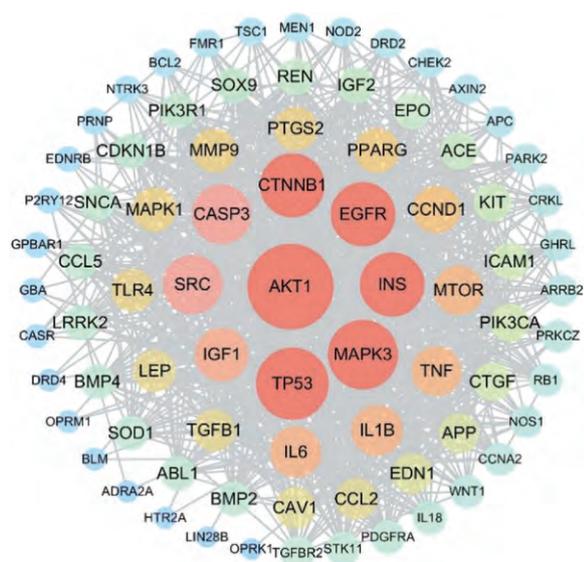


图3 生物过程条目中潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of potential targets in biological process entries

pathway)、钙信号传导途径 (calcium signaling pathway) 等。通过拓扑分析发现,“药物-化学成分-靶点-通路”网络中共包括 153 个节点,其中靶基因节点 99 个,活性成分节点 78 个(大黄 17 个,辣木叶 61 个),见图 5。大黄中的主要成分为大黄二萜酮 B (palmidin B, degree = 10)、异大黄素 (isoemodin, degree = 8)、番泻苷元 C (sennidin C, degree = 5)、大黄素甲醚 (phycion, degree = 5)、大黄酸 (rhein, degree =

3)、大黄酚 (chrysophanol, degree = 3) 等,辣木叶中的主要成分为烟曲霉素 B (niazimicin B, degree = 13)、奎宁 (quinines, degree = 12)、印度辣木素 (pterygospermin, degree = 11)、原花青素 (proanthocyanidin, degree = 11)、异槲皮苷 (isoquercitrin, degree = 10)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (quercetin-3-O-glucoside, degree = 10) 等。因此,大黄中的番泻苷元 C、大黄酸,辣木叶中的异槲皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷等成分可通过 AKT1、MAPK3 等靶点作用于 MAPK 信号传导途径、钙信号传导途径等信号通路来改变肠道平滑肌运动从而改善便秘的症状。

2.7 分子对接

选取 degree 较高的靶点 AKT1、MAPK3、EGFR、CASP3、SRC、MTOR 等与大黄、辣木叶中活性成分 palmidin B、isoemodin、citreo-rosein、quercetin-3-O-glucoside、kaempferol-3-O-glucoside、7-OH flavone 等进行分子对接,见图 6,结果显示,活性成分与靶点蛋白通过氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象。绘制活性成分与靶点对接结果,结果表明, citreo-rosein 与 AKT1 发挥相互作用,作用其残基 ASN (204)、SER (205); isoquercitrin 与 AKT1 作用于其残基 ASN (204)、LEU (213)、LYS (268),见图 7。其中 AKT1、MAPK3 的结合能显示在 palmidin B、isoemodin、citreo-rosein 等潜在活性成分具有较好的结合活

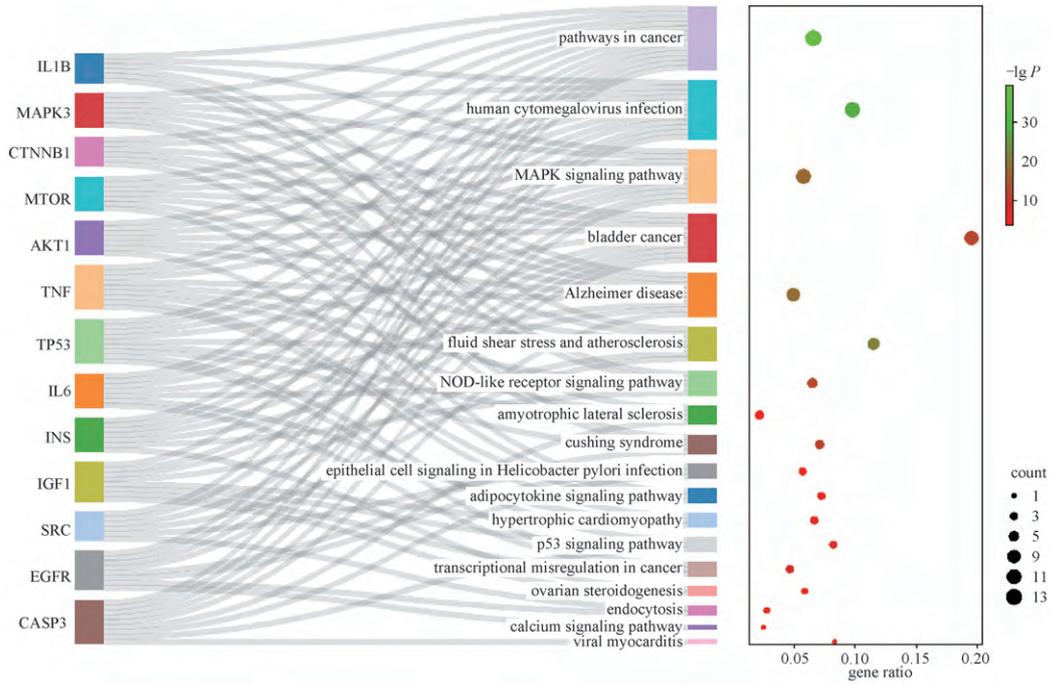
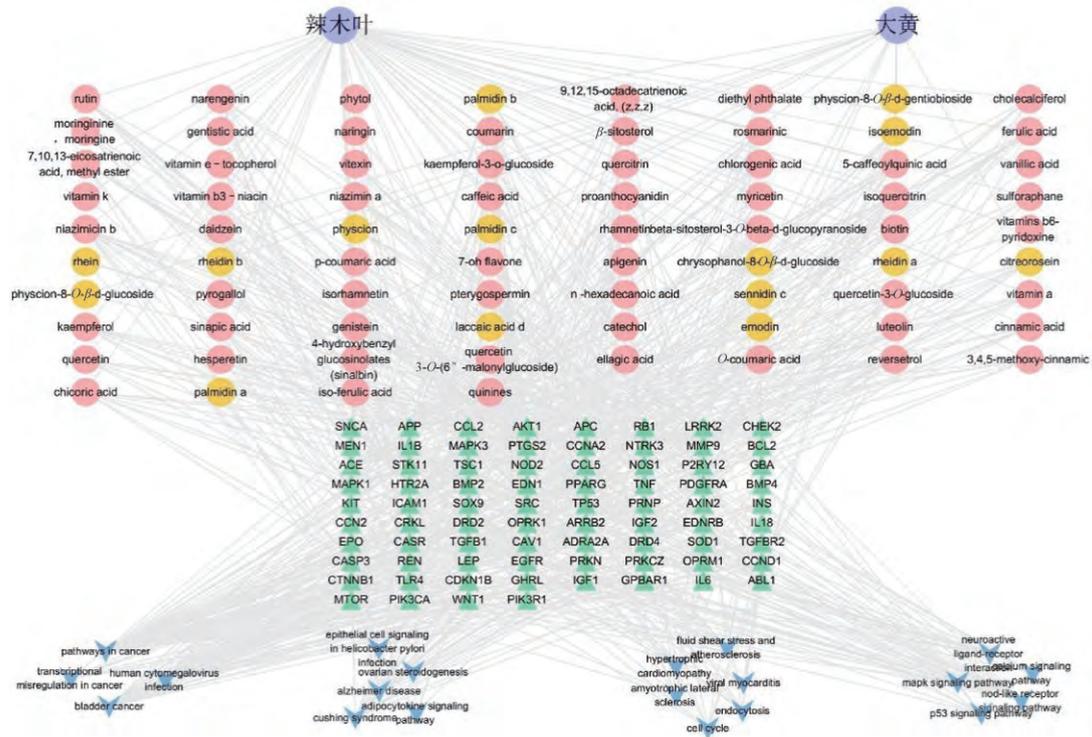


图 4 KEGG 信号通路富集分析
Fig. 4 KEGG signaling pathway enrichment analysis



紫色代表药物;粉色、黄色分别代表辣木叶、大黄的化学成分;绿色代表核心靶点;蓝色代表 KEGG 信号通路。
图 5 “大黄/辣木叶-化学成分-靶点-通路”网络
Fig. 5 Network of "Rhei Radix et Rhizoma/Moringa oleifera leaves-chemical ingredient-target-pathway"

性,推测大黄、辣木叶可能通过 palmidin B、isoemodin、citreorosein 等潜在活性成分作用于 AKT1、MAPK3 等靶点来发挥通便作用。

2.8 辣木叶、大黄对低纤维诱导的便秘小鼠的药效及机制研究

2.8.1 大黄、辣木叶对便秘小鼠粪便参数及小肠运动的影响

与空白组比较,模型组小鼠的粪便粒数、粪便湿重、粪便含水率、小肠推进率均显著降低($P <$

0.05);与模型组比较,阳性药组、大黄组小鼠的粪便含水率显著升高($P < 0.05$);阳性药组、大黄组和辣木叶组小鼠的口-肛传输时间有降低趋势,阳性药组、辣木叶组小鼠的粪便湿重有升高趋势,阳性药组、大黄组和辣木叶组小鼠的小肠推进均有升高趋势,但差异无统计学意义,见表3。以上结果表明,大黄、辣木叶可改善低纤维饲料诱导小鼠的便秘症状。

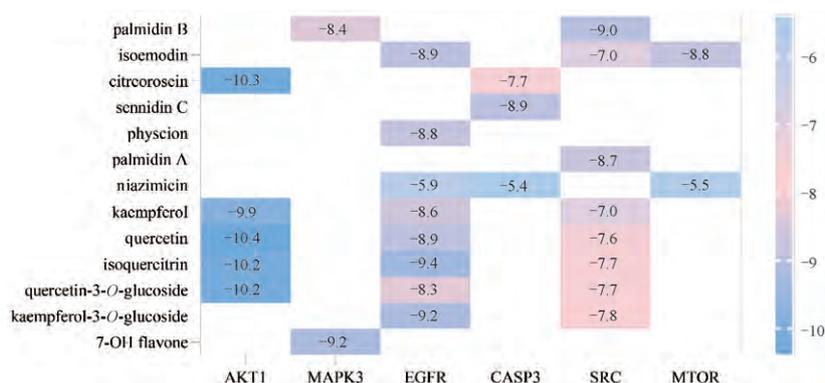


图6 靶点与相关成分分子对接的最低结合能热图

Fig. 6 Heat map of the lowest binding energy of the docking between the targets and the related component molecules

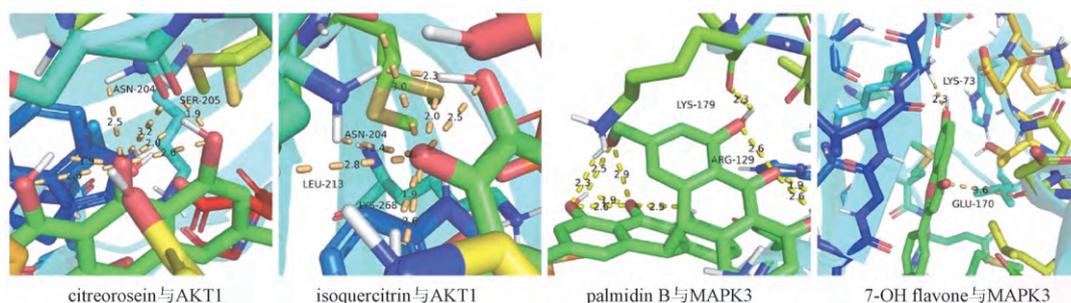


图7 分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking patterns

表3 大黄、辣木叶对便秘小鼠粪便参数和小肠推进功能的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of *Rhei Radix et Rhizoma* and *Moringa oleifera* leaves on fecal parameters and small intestinal propulsion of constipated mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

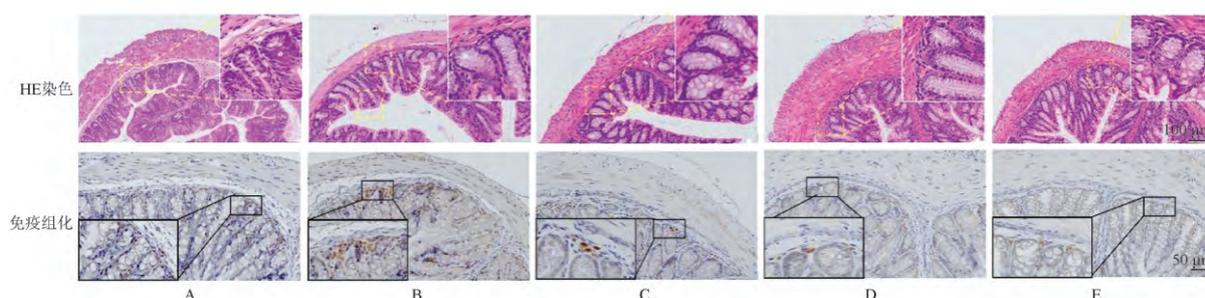
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	粪便粒数/个	口-肛传输时间/min	粪便湿重/g	粪便含水率/%	小肠推进率/%
空白	-	21.17±7.41	135.00±62.21	0.53±0.16	0.57±0.07	0.54±0.10
模型	-	12.67±6.44 ²⁾	270.00±98.59	0.17±0.09 ²⁾	0.46±0.07 ²⁾	0.41±0.05 ¹⁾
阳性药	0.001 8	14.00±5.97	205.00±120.62	0.30±0.08	0.60±0.07 ⁴⁾	0.52±0.09
大黄	1.82	7.76±5.09	186.67±139.95	0.17±0.08	0.66±0.07 ⁴⁾	0.53±0.10
辣木叶	1.82	11.67±3.67	215.00±119.12	0.25±0.08	0.52±0.05	0.52±0.12

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

2.8.2 大黄、辣木叶对便秘小鼠结肠黏膜的影响

结果显示,空白组小鼠结肠黏膜层完整,上皮细胞紧密连接,腺体排列规则,结构清晰,各层未见病理改变;与空白组比较,模型组小鼠结肠黏膜层厚度和肌层厚度显著减少($P<0.05$),黏膜层萎缩

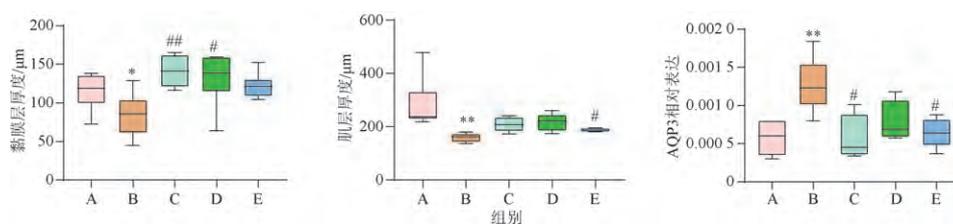
变薄,固有肌层明显萎缩;与模型组比较,大黄组、辣木叶组小鼠黏膜层厚度与结肠肌层厚度有增厚趋势,其中大黄组的黏膜层厚度显著增加($P<0.05$),辣木叶组小鼠结肠肌层厚度显著增加($P<0.05$),见图8、9。



A. 空白组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. 大黄组;E. 辣木叶组(图9同)。

图8 小鼠结肠的HE染色($\times 200$)及AQP3蛋白表达($\times 400$)

Fig. 8 HE staining ($\times 200$) and AQP3 protein expression ($\times 400$) of colon in mice



与空白组比较 $^{\#}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与模型组比较 $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$ 。

图9 小鼠结肠黏膜层厚度、结肠肌层厚度及AQP3相对表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 9 Thickness of the mucosal layer and the muscular layer of the colon, and the relative expression of AQP3 in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.8.3 大黄、辣木叶对便秘小鼠结肠组织AQP3表达的影响

结肠组织中AQP3含量的变化会影响肠道内水分的吸收^[23]。与空白组比较,模型组小鼠AQP3蛋白表达显著增强($P<0.01$);与模型组相比,阳性药组和辣木叶组小鼠AQP3的表达显著降低($P<0.05$),大黄组小鼠AQP3的表达有降低趋势,见图8、9。结果表明,大黄、辣木叶可通过下调纤维模型诱导的便秘小鼠结肠AQP3蛋白表达水平来改善便秘的症状。

2.8.4 大黄、辣木叶对便秘小鼠结肠AKT1和MAPK3 mRNA表达的影响 空白组小鼠结肠中有大量AKT1和MAPK3 mRNA表达,模型组AKT1和MAPK3 mRNA表达减少;与模型组相比,辣木叶组结肠中AKT1 mRNA表达显著增加($P<0.05$);大黄组和辣木叶组小鼠结肠的MAPK3 mRNA表达量相

似,见表4。

表4 小鼠结肠黏膜AKT1、MAPK3 mRNA表达的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of expression of AKT1 and MAPK3 mRNA in colon mucosa of mice($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	AKT1 mRNA 相对表达	MAPK3 mRNA 相对表达
空白	-	1.03 \pm 0.28	1.06 \pm 0.13
模型	-	0.73 \pm 0.14	0.84 \pm 0.13
大黄	1.82	0.56 \pm 0.33	0.89 \pm 0.44
辣木叶	1.82	1.04 \pm 0.36 ³⁾	0.84 \pm 0.43

3 讨论

本研究基于网络药理学和分子对接的方法,寻找大黄、辣木叶发挥泻下药理作用的物质基础、共有

靶点和信号通路,利用药效学实验验证2种药物的泻下作用及机制,说明大黄、辣木叶在改善及治疗便秘方面的相似性,同时预测及验证辣木叶的通便作用机制。

网络药理学结果可知,在便秘的生物过程中,大黄和辣木叶作用靶点距离相近,大黄中的大黄酸等成分和辣木叶中的黄酮类等成分为潜在活性成分,挖掘大黄和辣木叶的共有靶点 AKT1、MAPK3、EGFR 等为便秘的潜在治疗靶点,由共有靶点富集到的 MAPK 信号通路及钙离子信号传导途径等可能为改善便秘症状的信号通路,说明两者可通过相同的作用机制发挥改善便秘的作用。在动物实验中进一步发现,大黄、辣木叶可增加便秘小鼠的粪便粒数和粪便湿重,缩短口-肛传输时间,提高粪便含水率及小肠推进率来缓解小鼠便秘症状,恢复结肠黏膜层厚度和肌层厚度。对大黄、辣木叶的通便药效进行比较,大黄、辣木叶在改善粪便粒数、口-肛传输时间、粪便湿重及小肠运动等方面具有相同趋势,且两者均改善结肠黏膜层厚度和肌层厚度,以上结果验证了大黄、辣木叶发挥近似的通便药效来改善由低纤维饲料所致的便秘症状,说明两者药效具有一定的相似性。

AKT1 作为 PI3K/AKT 信号通路下游的重要蛋白信号可参与体内的氧化应激反应及平滑肌扩张,从而起到舒张肠道平滑肌、促进肠道蠕动的的作用^[24]。PI3K/AKT 是 C-kit/SCF 途径下游信号转导通路之一,钙信号通路可以通过此通路抑制细胞凋亡并促进存活,阻断其下游信号分子 PI3K 进而导致 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)异常而发生小鼠结肠功能的缺失从而导致便秘^[25]; MAPK 参与细胞增殖、分化及凋亡的调节^[26-27],其中 MAPK3 可通过 MAPK 信号通路中的 ERK/p38 MAPK 途径与胃肠道中的水通道蛋白的表达存在关联^[28-30],通过激活 MAPK/ERK1/2 信号通路下调 AQP3 在细胞中的表达改善调节结肠中水分运输的作用^[31];EGFR 可提高肠道黏膜的完整性增强肠道功能,增加肠道隐窝细胞减少炎症反应程度,从而保护肠道功能^[32],它还可以显著富集到钙离子信号传导途径,从而介导肠道平滑肌细胞的收缩过程。本实验结果中大黄、辣木叶可同时上调 AKT1 和 MAPK3 的表达量,下调 AQP3 蛋白的表达,AQP3 的降低可增加肠道对水分的重吸收和肠液的分泌从而

来改善便秘^[28,33];以上证据表明,大黄、辣木叶可以聚焦在 AKT1、MAPK 等靶点来改变肠道运动、增加肠道水分吸收,从而改善由低纤维饲料所致的小鼠便秘症状,发挥促排便作用,说明大黄、辣木叶在发挥通便机制方面也存在一定的相似性。

综上所述,大黄和辣木叶可通过潜在活性成分作用于 AKT1、MAPK3 等作用靶点影响 MAPK 信号通路、钙离子信号通路等以发挥改善便秘的作用机制,且经过药效实验和机制实验的验证与比较,2种药物在发挥“泻下”作用的效果方面具有相似性,因此,选择大黄作为辣木叶泻下作用的参照药材具有可行性。但服用这些传统泻下类药物不能发挥长期的治疗效果,在患者中发现了包括药物依赖和黑变病在内的严重不良反应^[34-35]。因此,寻找更加安全有效的替代治疗方法十分必要。相较于大黄,辣木叶具有持久更加温和的泻下作用,且两者在代谢通路方面表现出不同的代谢组学特征^[22]。因此,需要更多的实验工作探究辣木叶的功能活性,促进辣木新药资源的开发利用以实现其“本土化”。

[参考文献]

- [1] 张小波,吕冬梅,黄璐琦,等.基于“一带一路”的外来中药资源开发探讨[J].中国中药杂志,2018,43(7):1501.
- [2] 张建军,王淳,费文婷,等.外来药物“中药化”的研究思路与策略[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1425.
- [3] 李志勇,杨洪军,唐仕欢,等.外来药用资源的中药药性研究策略[J].中国中药杂志,2019,44(14):2972.
- [4] STOHS S J, HARTMAN M J. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*[J]. *Phytother Res*, 2015, 29(6): 796.
- [5] 许敏,赵三军,宋晖,等.辣木的研究进展[J].食品科学,2016,37(23):291.
- [6] 崔一凡,陈香兰,张旭,等.辣木叶成分及其活性研究进展[J].沈阳药科大学学报,2022,39(9):1142.
- [7] 李文娟,张思超.吴鞠通取象比类治疗“心”病用药特点探析[J].中医导报,2016,22(19):8.
- [8] 康砚澜.取象比类思维下的中药药性理论探析[J].中医杂志,2017,58(17):1444.
- [9] 党玥,田梦媛,王承潇,等.辣木叶提取物对便秘小鼠润肠通便的作用及机制研究[J].中草药,2021,52(14):4241.
- [10] 田梦媛.辣木叶产地加工及润肠通便效果研究[D].昆明:昆明理工大学,2019.
- [11] 孙文杰,陈亚峰,李红昌,等.大黄的“通、补”之道[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4464.
- [12] 袁代昌,袁玲,袁盼盼,等.基于本草古籍之大黄性味归经与功效研究[J].亚太传统医药,2022,18(1):196.
- [13] 祝婷婷,刘晓,汪小莉,等.大黄不同方法炮制后药理作用及化学成分变化研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(8):

- 883.
- [14] WANITSCHKE R. Influence of rhein on electrolyte and water transfer in the isolated rat colonic mucosa[J]. *Pharmacology*, 1980, 20(Suppl 1):21.
- [15] EWE K. Effect of rhein on the transport of electrolytes, water, and carbohydrates in the human jejunum and colon [J]. *Pharmacology*, 1980, 20(Suppl 1):27.
- [16] LENG-PESCHLOW E. Dual effect of orally administered sennosides on large intestine transit and fluid absorption in the rat [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1986, 38(8): 606.
- [17] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110.
- [18] ZHANG G B, LI Q Y, CHEN Q L, et al. Network pharmacology: a new approach for Chinese herbal medicine research [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:621423.
- [19] 韩利文, 陈善军, 董榕, 等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展[J]. *山东科学*, 2021, 34(6):22.
- [20] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455.
- [21] KAKINO M, TAZAWA S, MARUYAMA H, et al. Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10:68.
- [22] LI C, LI Z, WU H, et al. Therapeutic effect of *Moringa oleifera* leaves on constipation mice based on pharmacodynamics and serum metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114644.
- [23] IKARASHI N, MOCHIDUKI T, TAKASAKI A, et al. A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells [J]. *Life Sci*, 2011, 88(3/4): 194.
- [24] 孙宇, 姚秋园. 化瘀通便汤对慢传输型便秘型大鼠结肠 PI3K/AKT 信号传导通路的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(11): 48.
- [25] 夏旭婷. 枳术丸对脾虚证慢传输型便秘小鼠结肠黏膜 C-kit、SCF 表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [26] LIANG Y J, YANG W X. Kinesins in MAPK cascade: how kinesin motors are involved in the MAPK pathway? [J]. *Gene*, 2019, 684:1.
- [27] 胡文良, 孙学威, 郑艳秋. 刺五加调控 p38MAPK 信号通路对顺铂所致小鼠耳毒性的防护作用[J]. *世界中医药*, 2019, 14(11):2902.
- [28] 耿学斯, 罗春华, 肖秋平, 等. 肠润方对功能性便秘大鼠结肠黏膜 AQP3、AQP9 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(11):4699.
- [29] 杨筱. 基于 MAPK 信号通路探讨通便汤治疗慢传输型便秘的作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [30] 邱偲偲, 马师洋, 程妍. 功能性便秘和肠易激综合征便秘型患者结肠黏膜水通道蛋白 8 的表达与意义[J]. *中华消化杂志*, 2016, 36(8): 538.
- [31] MOELLER H B, FUGLSANG C H, FENTON R A. Renal aquaporins and water balance disorders[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30(2): 277.
- [32] KITCHEN P A, GOODLAD R A, FITZGERALD A J, et al. Intestinal growth in parenterally-fed rats induced by the combined effects of glucagon-like peptide 2 and epidermal growth factor [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2005, 29(4): 248.
- [33] 袁维堂, 杨会锋, 张志永. 功能性便秘患者结肠黏膜水通道蛋白 3 和水通道蛋白 9 的表达及意义[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2008, 11(1): 57.
- [34] BASSOTTI G, BLANDIZZI C. Understanding and treating refractory constipation[J]. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2014, 5(2):77.
- [35] LIM J M, KIM Y D, SONG C H, et al. Laxative effects of triple fermented barley extracts (FBe) on loperamide (LP)-induced constipation in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):143.

[责任编辑 马超一]