

文章编号: 1005-0957 (2023) 09-0992-07

· 综述 ·

基于生物信息学、网络拓扑策略探究针灸治疗胃溃疡的机制

王新宇, 陈紫薇, 刘江腾, 黎蔚欣, 彭慧, 张新悦, 杜琳

(北京中医药大学东直门医院, 北京 100010)

【摘要】 目的 运用文本挖掘、生物信息学、网络拓扑学等方法, 探究针灸治疗胃溃疡的分子机制。**方法** 检索文献发现针刺后产生的活性化合物, 通过 STITCH 和 Swiss Target Prediction 数据库获得其结合亲和力高的靶点。运用 Cytoscape 软件构建活性物质靶点基因-蛋白质-蛋白质互作网络, 通过 DAVID 数据库对治疗的关键靶点分别进行基因本体富集分析和京都基因组百科全书富集分析。**结果** 共鉴定了 37 个与针灸治疗胃溃疡相关的基因靶点, 筛选了 7 条通路。**结论** 针刺治疗胃溃疡与镇痛、促进平滑肌收缩、改善情绪障碍等有关, 包括的通路有神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、钙离子信号通路、5-羟色胺能突触等。

【关键词】 针灸疗法; 胃溃疡; 生物信息学; 靶点; 信号通路; 分子机制

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2023.09.0992

胃溃疡是常见的消化系统疾病, 慢性、周期性(饭后 30 min)、节律性的上腹痛是其典型的临床表现。本病易反复发作, 若未及时诊治, 可导致胃出血、胃穿孔、幽门梗阻等并发症, 甚至发生肠上皮化生, 增加患者胃上皮组织恶变几率, 严重影响患者生命健康及生活质量^[1]。据文献报道, 欧美地区消化道溃疡患病率为 6%~15%, 国内患病率为 13.83%~19.72%, 其中胃溃疡患病率占消化道溃疡的 30%左右^[2-6]。胃溃疡发病机制尚不明确, 目前被广泛认同的有攻击因子说和防御因子失衡说。攻击因子增强或防御因子的破坏, 均可导致黏膜的屏障功能损伤, 继而发生溃疡^[7]。现代医学对胃溃疡的治疗以缓解症状、促进溃疡愈合、防止并发症和预防复发为目的, 具体可通过降低胃酸、保护胃黏膜、根除 Hp 等来实现。虽然治疗效果较为显著, 但仍然存在复发率高、不良反应大等问题^[1]。

胃溃疡尚无明确的中医学病名。根据其典型症状, 可将其归类于“胃痛”“痞满”等范畴。现代研究表明, 中药、针灸等中医疗法对胃溃疡能起到很好的治疗作用。大量的基础、临床研究表明, 针刺治疗消化道溃疡疗效确切。动物研究显示胃溃疡大鼠在电针治疗 4 d 后溃疡面可基本愈合^[8]; 吕显威等^[9]认为针灸可改善胃

溃疡患者胃小凹及微血管形态, 提高溃疡愈合质量; 一项 2017 年的系统评价结果显示, 针刺和西药对消化道溃疡都能起到良好的效果, 但针刺可以显著降低消化道溃疡的复发率^[10]。针刺防治胃溃疡的疗效显著, 但其机制尚未阐明。本文基于现代研究, 试从生物信息学、网络拓扑策略^[11]等方面, 探究针刺治疗胃溃疡的主要作用机制。

1 资料与方法

1.1 文献检索

本文通过中国知网数据库、万方数据库和维普数据库中期刊数据库系统检索相关文献, 检索时限为 2001 年 8 月—2021 年 8 月。检索方式为主题词检索。检索词为“针刺”“针灸”“体针”“电针”“胃溃疡”“消化道疾病”。

1.2 纳入标准

以毫针或电针治疗胃溃疡的实验研究文献; 随机对照的人类试验或动物实验, 以及非随机的比较试验(前瞻性和回顾性); 对照干预可采取安慰剂针灸、假针灸、不治疗、另一种积极治疗或药物治疗的形式; 所选取的腧穴有具体定位及归经; 感兴趣的结果。

作者简介: 王新宇(1997—), 女, 2020 级硕士生, Email: wxy9971130@163.com

通信作者: 杜琳(1968—), 女, 主任医师, 硕士生导师, Email: dulin683@126.com

1.3 排除标准

使用其他形式刺激的研究,包括无针穴位按压、艾灸、经皮电刺激;在干预前后评估结果的单组观察性研究;仅比较不同针灸形式的研究;以痛点、敏感点为进针点的研究。

1.4 文献筛选

两名研究人员使用预先设定的纳入和排除标准,独立检索数据库,选择合适的全文版本文献。研究人员的争议通过协商解决,若未达成共识,则由第三位研究员解决争议。

1.4.1 针刺后机体产生活性成分的蛋白靶点筛选

STITCH 是一个包含 43 万种化学品的聚合数据库,链接到一个易于使用的资源,旨在促进蛋白质和化学品之间相互作用的研究。Swiss Target Prediction 是一个基于二维和三维相似性度量和已知配体结合的 web 服务器,可以准确预测生物活性分子靶标。从 STITCH 和 Swiss Target Prediction 数据库中获得与褪黑素、生长抑素(somatostatin, SS)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、P 物质(substance P, sp)、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)和神经降压素高结合亲和力(Possibility>0.1)的靶标。合并上述 2 个数据库的检索结果后去除重复值,得到活性化合物作用的靶点。

1.4.2 胃溃疡潜在治疗靶点的筛选

GeneCards 是人类基因的综合数据库,包含所有已注释和可预测的基因信息,整合了约 150 个基因数据库资源,包括基因组、转录组、蛋白质组、遗传、临床和功能信息等。本研究以“gastric ulcer”为关键词检索了 GeneCards 数据库,得到胃溃疡的相关靶点。

1.4.3 针刺抗胃溃疡相关靶点的筛选

将所得两组靶点用 Venn 工具(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>)进行分析。通过维恩图将针灸相关活性成分靶点与胃溃疡靶点之间的重叠量可视化,重叠部分即为针灸治疗胃溃疡的核心靶点。为明确针刺产生的活性成分与关键靶点之间的关系,运用 Cytoscape3.8.2 软件绘制网络图,展示活性成分-靶点的关系。

1.4.4 蛋白质相互作用网络的构建

运用 STRING11.5(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction networks, PPI)网络。将针灸治疗胃溃疡

的可能靶点上传到搜索工具(STRING11.5)中,选择人类作为物种检索相互作用的基因/蛋白质。为明确活性化合物与关键靶点之间的关系,将检索结果导入 Cytoscape3.8.2 软件,运用 Network Analyzer 插件进行网络拓扑属性分析,度值(Degree)越高,与其他节点的连线越多,说明该节点起到的作用越关键。

1.4.5 基因本体论与京都基因组百科全书的富集分析

富集分析采用基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG),继而通过 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)绘制和可视化效应器靶标,为进一步的功能研究提供依据。

2 结果

通过检索数据库,共纳入 36 篇动物试验及临床试验文献,筛选出 22 个相关的活性物质,其中褪黑素、SS、5-HT、SP、PGE₂、神经降压素出现频次最高,可能对胃溃疡有效^[12-16]。

2.1 针刺治疗胃溃疡的靶点筛查

应用 STITCH 和 Swiss Target Prediction 数据库,得出与针刺后活性成分所作用的基因 60 个;从 GeneCard 数据库中收集胃溃疡相关基因 4 980 个。将两份原始文件中的人类基因名称标准化后匹配,绘制 60 个针灸活性成分的相关靶点和 4 980 个胃溃疡相关的靶点的韦恩图,得出了交集靶点(图 1),即 37 个潜在的胃溃疡治疗靶点。“针灸-活性成分-靶点-疾病”互作网络见图 2,橘色菱形代表活性成分,粉色圆形代表 60 个潜在靶点,红色八边形代表针刺治疗,黄色六边形代表胃溃疡,产生连接越多的节点相应的图形面积越大,在治疗中发挥的作用越明显,其中褪黑素、5-HT 和 PGE₂在治疗过程中可能起到关键作用。

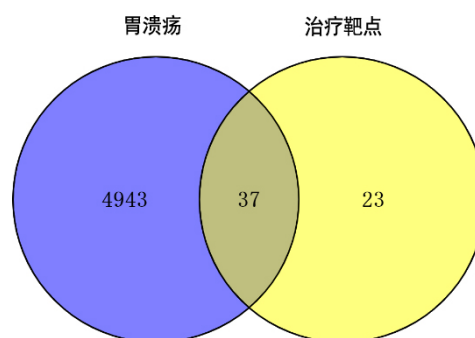


图 1 交集靶点

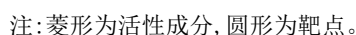


图2 活性成分-潜在靶点网络图

基于 STRING 数据库构建 PPI 网络, 经过拓扑分析后, 通过 Cytoscape 可视化, 显示 88 个节点。

2.3 GO 和 KEGG 富集分析

其中在 BP 层面(图 4), 预测靶点主要参与环核苷酸第二信使偶联的 G 蛋白偶联受体信号通路(G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger)、腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体信号通路(adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway)、平滑肌收缩(smooth muscle contraction)等生物过程具有显著意义;在 CC 层面, 神经元胞体(neuronal cell body)、突触后膜整体成分(integral component of postsynaptic membrane)其所占比例较大;在 MF 层面, 与前列腺素受

注:度值越大,圆点越大,颜色越深;分值越大,线条越粗,颜色越深。

图3 针刺治疗胃溃疡潜在靶点相互作用网络图

表 1 与针刺治疗胃溃疡相关的靶点(按“Degree”排序)

排序	Degree	靶点
1	15	POMC
2	14	SST
3	12	TAC1
4	12	SLC6A4
5	11	HTR3A
6	10	SLC6A3
7	9	HTR1A
8	8	HTR2A
9	8	NR3C1
10	6	GHRH
11	5	PPARG
12	5	ACHE
13	4	PTGER2
14	4	HTR7
15	4	TACR1
16	4	CYP1A1
17	4	ADRA2A
18	3	PTGER4
19	3	HTR4
20	3	SSTR2

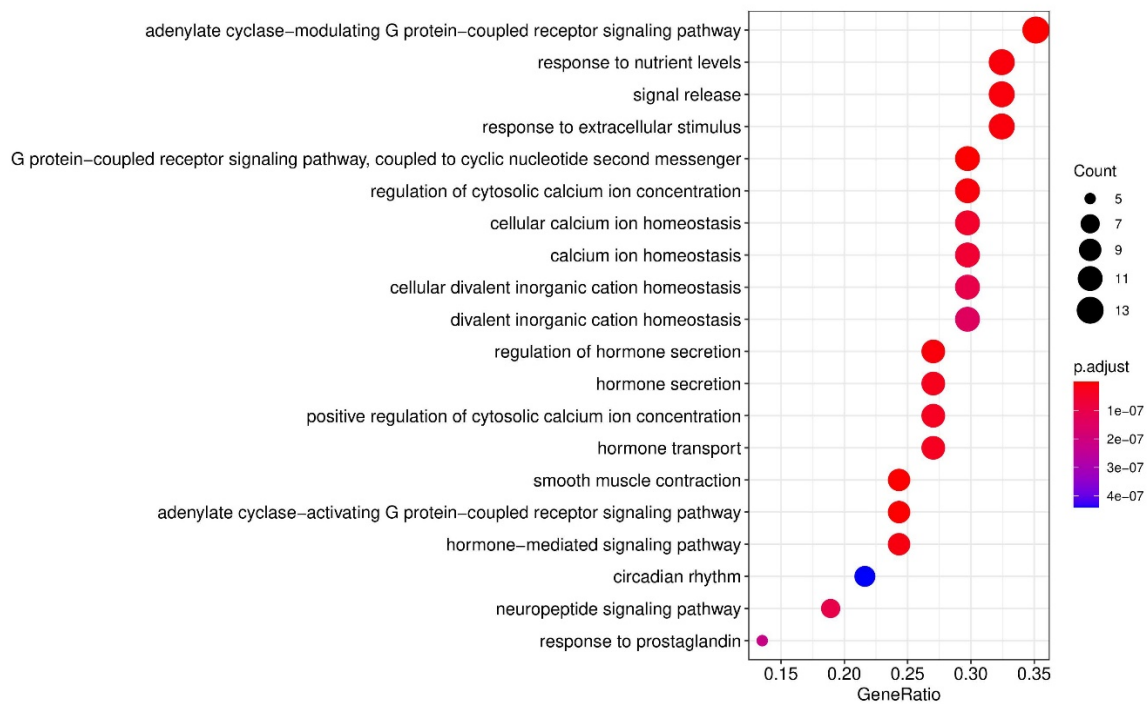


图 4 GO-BP 生物学功能分析

共富集得到 KEGG 生物学过程 7 条。图 5 列出了潜在靶点的 KEGG 富集结果。KEGG 信号通路涉及神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、钙离子信号通路 (calcium signaling pathway)、5-羟色胺能突触 (serotonergic

synapse)、生长激素合成分泌作用通路 (growth hormone synthesis, secretion and action)、色氨酸代谢 (tryptophan metabolism) 和 PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)。KEGG 通路分析结果显示, 针刺能通过多种信号通路及代谢通路发挥治疗胃溃疡的作用。图 6 总结了潜在靶点在 cAMP 通路中的作用。

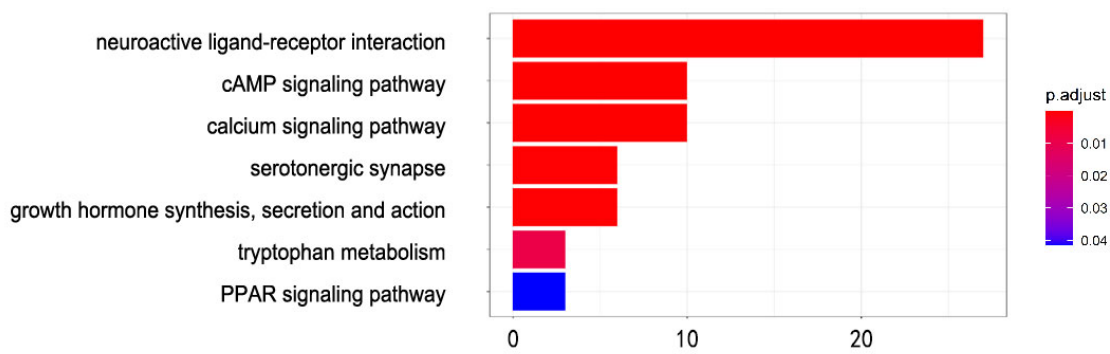
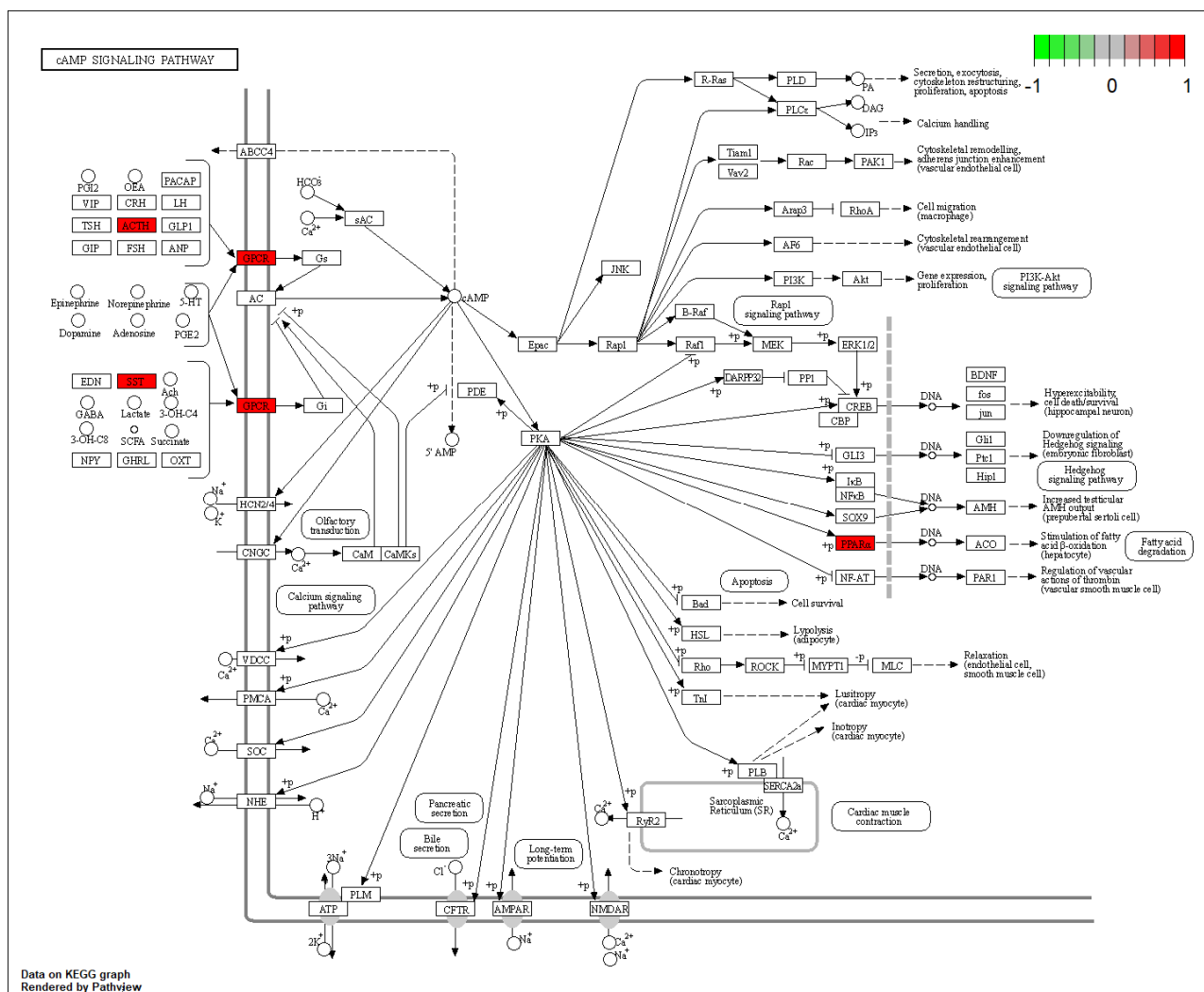


图 5 KEGG 通路富集分析



注:红色标注者为潜在治疗靶点。

图6 潜在靶点在 cAMP 通路中的作用

3 讨论

本文基于生物信息学筛选潜在活性成分及对应靶点,预测针灸治疗胃溃疡、预防复发的关键作用靶点及信号通路。

“针刺-胃溃疡”共同靶点 PPI 蛋白互作网络结果表明,针刺干预胃溃疡与 37 个靶点相关,其中 POMC、SST、TAC1、SLC6A4、HTR3A、SLC6A3、HTR1A 等蛋白交互作用相对较强。POMC 基因编码一种前蛋白,这种前蛋白经过加工可产生多种生物活性肽,如促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin hormone, ACTH)、 β -内啡肽(镇痛物质)和促黑激素等,这些活性肽在许多重要的信号通路中参与。同时 POMC 的异常表达还与抑郁症、双相情感障碍等精神心理疾病密切相关^[17]。动物实验表明,胃黏膜应激性损伤会伴随 ACTH、 β -内啡肽的升高,而药物干预可减轻粘膜损伤程度,同时使

ACTH、 β -内啡肽水平降低^[18-19]。促黑激素则被证明可通过促进 SS 表达对乙醇诱导的大鼠胃溃疡产生保护作用^[20]。以上实验均体现了 POMC 下游产物对胃溃疡的影响,但目前仍缺乏对 POMC 于胃溃疡联系的直接探究。SST 的表达产生 SS,在结合高亲和力 G 蛋白偶联的 SS 受体后,可抑制多种次级激素的释放;与胃肠道大多数的激素存在相互作用,从而抑制胃消化间期肌电复合波和胃排空、抑制回肠和胆囊收缩、抑制肠道内容物转运^[21]。若 SST 表达受到抑制,SS 分泌减少会使胃酸分泌增加、胃十二指肠黏膜的防御功能降低,从而增加了消化性溃疡的发生几率^[22]。研究发现针刺可通过提高 SS 水平来达到促进胃溃疡恢复的目的^[14]。TAC1 编码速激肽激素家族的 4 种产物,SP、神经激肽 A、神经肽 K 和神经肽 γ 。这些神经递质可与神经受体和平滑肌细胞作用,起到血管扩张剂和促分泌剂的作用。研究

发现 SP 可以通过调节 Akt/eNOS/NO 信号通路,避免炎症损伤血管内皮细胞^[23]。大量研究表明,SP 可以显著促进伤口愈合,对慢性伤口也有较好的效果^[24]。而在结构上,SP 与天然抗菌肽结构相似^[25],可能对幽门螺旋杆菌感染起到一定的防御作用,但目前尚无实验研究其对幽门螺旋杆菌抗菌活性的强弱。与此同时,脑下行的和脊髓固有的 SP 神经元释放阿片肽后,可以起到镇痛作用^[26]。由此可见,TAC1 的表达可从病因、病理机制和症状 3 个方面对胃溃疡起到治疗作用。SLC6A4、SLC6A3、HTR3A、HTR1A 均是 5-HT 相关的基因。研究发现 5-HT 信号系统在胃肠道功能性疾病中扮演了重要角色,该信号通路的异常可引发胃肠道动力及分泌功能异常和内脏高敏感性^[27]。此外,这些基因的异常表达还常见于精神、心理疾病。总的来说,这些基因联系紧密,在针刺促进胃溃疡修复的进程中相互影响,但目前的研究多着眼于单个基因某个下游产物对胃溃疡的作用机制,未针对全部下游产物逐个挖掘,且缺乏胃溃疡修复过程中多基因协作机制的研究。

GO 分析结果表明,针刺治疗胃溃疡的作用机制是多靶点、多层次的,由多种生物学过程共同参与而成,KEGG 通路分析结果将靶点富集的生物过程展示出来。首先,BP 层面涉及 G 蛋白偶联受体信号通路、平滑肌收缩,这与 Ca^{2+} 信号通路密切相关。兴奋-收缩偶联时,膜去极化诱导电压门控 Ca^{2+} 通道打开,胞内 Ca^{2+} 浓度增加,激活 RyR 开放,触发内质网局部释放 Ca^{2+} ,导致肌肉收缩^[28]。SERCA 是存在于肌浆网和内质网的膜转运蛋白,主要功能是将胞浆内的 Ca^{2+} 转运到肌浆网和内质网中,维持细胞内的 Ca^{2+} 稳态^[29]。针刺可以通过促进 GPCR 的表达,增加 PLN 磷酸化,减少 PLN 对 SERCA 的抑制,促进内质网摄取 Ca^{2+} ,胞质中 Ca^{2+} 浓度下降,促进肌肉舒张;内质网 Ca^{2+} 储存量增加,可进一步激活 RyR 开放,促进肌肉收缩。PKA 是抗抑郁药物的靶点之一,抗抑郁药物可以通过增强大脑特定部位 PKA 的活力来达到治疗目的^[30]。如图 6,GPCR 载体在 GPCR-cAMP-PKA 信号通路中也起到了作用,ATC 和 SST 均可以作用于 GPCR,从而起到上调 PKA 表达的作用,现代研究结果提示电针可以通过该通路起到抗抑郁的作用^[31]。在 GO-CC 层面涉及神经元胞体、突触后膜整体成分,其中 KEGG 结果提示,5-HT 能突触起到重要作用。针刺产生的活性物质 5-HT 可以通过激活胶质细胞上的 5-HT_{2A} 和 SERT 促进内质网释放 Ca^{2+} 、促进胞外

Ca^{2+} 内流,提高胞内 Ca^{2+} 水平,从而促进平滑肌收缩。现代研究发现,5-HT 收缩胃底平滑肌与 PKC 有关,这与 KEGG 富集结果也是一致的^[32]。此外 5-HT 还可以激活 5-HT_{4,6,7} 通路,通过 AC5 上调 cAMP 通路,起到调整抑郁状态的作用。

综上,本研究预测针灸可能通过 POMC、SST、TAC1、SLC6A4、HTR3A 等关键靶点来调节 cAMP 信号通路、钙离子信号通路、5-HT 能突触等,从而促进平滑肌收缩、保护血管内皮、防御幽门螺旋杆菌、镇痛、调节抑郁状态,从缓解症状、促进愈合、去除诱发因素等不同层面达到治疗胃溃疡的目的。大量现代研究发现,不良情绪与消化道疾病关系密切^[33]。通过本次研究可推测,针刺治疗伴发情绪障碍的胃溃疡可取得较好的疗效,而改善患者情绪也可以起到预防胃溃疡等消化道疾病复发的作用。

本研究只纳入了针刺治疗后人体产生的 6 种具有代表性的活性物质,其他活性物质仍需进一步数据挖掘和实验验证,未对针灸处方、治疗时长和频率等针灸治疗的重要参数进行分析,并缺乏对研究结果的验证。

中医学认为,人体自身是一个有机整体。针刺可以通过穴位刺激,多靶点、多层次地调控人体网络,从而起到治疗作用。笔者基于文献研究,借助生物信息学和网络拓扑学方法,研究针刺治疗胃溃疡的生物学机制,为针刺治疗胃溃疡的基础实验研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中华中医药学会脾胃病分会,张声生,王垂杰.消化性溃疡中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中华中医药杂志,2017,32(9):4089-4093.
- [2] 谢明艳.2984 例消化性溃疡的流行病学及内镜特征分析[J].中国当代医药,2021,28(7):56-59.
- [3] 冯正平,梁杏花,刘佛球.2191 例消化性溃疡的胃镜和流行病学分析[J].重庆医学,2020,49(7):1114-1117.
- [4] 成虹,胡伏莲,袁申元,等.北京地区消化性溃疡流行病学分析[J].世界华人消化杂志,2007,15(33):3518-3523.
- [5] 曾彬,胡阳黔,姜红梅,等.湖北十堰地区消化性溃疡发病因素的调查研究[J].中国医学前沿杂志(电子版),2015,7(5):71-74.
- [6] 郭庆捷,曹泽伟.天津地区消化性溃疡的流行病学分

- 析[J]. 新医学, 2010, 41(2):104-106.
- [7] 沈贵芳, 赵伟春, 张文诗. 胃黏膜损伤防御机制的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(3):257-260.
- [8] SHEN J C, LIAN L Y, ZHANG Y, *et al.* Dynamic analysis of metabolic response in gastric ulcer (GU) Rats with electroacupuncture treatment using ¹H NMR-based metabolomics[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:1291427.
- [9] 吕显威, 黄少鹏. 针灸结合胃溃灵汤治疗青壮年胃溃疡的疗效及对溃疡愈合质量的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(11):90-93.
- [10] 田瑶. 针刺治疗消化性溃疡疗效及安全性的系统评价和Meta分析[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [11] 樊晓靖, 郭威, 张玉莲, 等. 网络针灸学:一种挖掘穴位配伍规律及生物学机制的新策略[J]. 天津中医药, 2015, 32(2):80-83.
- [12] 代兴威, 吴志, 范灵通, 等. 针刺补泻足三里对急性胃溃疡治愈期大鼠血清胃动分泌影响的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(1):3-6.
- [13] 孙剑端. 电针对胃溃疡肝郁证候大鼠模型的镇痛作用机制研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2014.
- [14] 马佳佳, 闫亚南, 关翰宇, 等. 针刺对应激性胃溃疡模型大鼠血清和下丘脑中 GAS、SS 和 MT 表达的影响[J]. 环球中医药, 2018, 11(4):486-491.
- [15] 董莉莉, 刘安国, 王军燕, 等. 合募配穴对应激性胃溃疡大鼠下丘脑促性腺激素释放激素和P物质 mRNA 表达的影响[J]. 针刺研究, 2013, 38(4):291-296.
- [16] 郑关毅, 郑师碧, 韦立新. 针刺对消化性溃疡患者内源性多肽的影响[J]. 上海针灸杂志, 2002, 21(2):10-11.
- [17] 郑逗逗, 毕晓姣, 张天亮, 等. POMC 基因甲基化与精神心理疾病的研究进展[J]. 精神医学杂志, 2020, 33(5):393-396.
- [18] 李婧婷, 关翰宇, 马佳佳, 等. 艾灸对应激性胃溃疡大鼠血清及脑中促肾上腺皮质激素释放激素及促肾上腺皮质激素含量的影响[J]. 针刺研究, 2019, 44(5):347-351.
- [19] 韩焱晶, 代伟伟, 彭磊, 等. 针刺对应激性胃黏膜损伤大鼠血浆和下丘脑中 β -内啡肽含量的影响[J]. 针刺研究, 2011, 36(5):341-346.
- [20] JAHOVIC N, ERKANLI G, İŞERİ S, *et al.* Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin[J]. *Life Sci*, 2007, 80(11):1040-1045.
- [21] 王欢, 黄永坤, 刘梅. 胃肠激素与胃肠道功能及疾病的关系[J]. 医学综述, 2013, 19(15):2735-2738.
- [22] COIN I, KATRITCH V, SUN T, *et al.* Genetically encoded chemical probes in cells reveal the binding path of urocortin-I to CRF class B GPCR[J]. *Cell*, 2013, 155(6):1258-1269.
- [23] PIAO J, HONG H S, SON Y. Substance P ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell dysfunction by regulating eNOS expression in vitro[J]. *Microcirculation*, 2018, 25(3):e12443.
- [24] 李思思. 速激肽来源抗菌肽的促伤口愈合活性研究[D]. 兰州:兰州大学, 2017.
- [25] 周天雄. 两类抗菌肽的抗菌活性及作用机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2019.
- [26] 边景檀. 脊髓中 P 物质参与电针镇痛的研究[J]. 生理科学进展, 1995, 26(4):325-328.
- [27] 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20):2405-2408.
- [28] EISNER D A, CALDWELL J L, KISTAMÁS K, *et al.* Calcium and excitation-contraction coupling in the heart[J]. *Circ Res*, 2017, 121(2):181-195.
- [29] ARBABIAN A, BROULAND J P, GÉLÉBART P, *et al.* Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer[J]. *Biofactors*, 2011, 37(3):139-149.
- [30] SACKEIM H A, HASKETT R F, MULSANT B H, *et al.* Continuation pharmacotherapy in the prevention of relapse following electroconvulsive therapy: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2001, 285(10):1299-1307.
- [31] 孙健, 刘健华, 王谦, 等. 电针对抑郁症大鼠海马组织 AC-cAMP-PKA 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(24):3672-3674.
- [32] 刘丽宏, 梅其炳, 张峰, 等. 大鼠胃底平滑肌细胞 5-HT 受体的信号转导通路的研究[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(4):412-415.
- [33] 王伯军, 丁勇, 马微波, 等. 胃肠专科门诊病人情绪障碍的研究[J]. 中国医师进修杂志, 2006, 29(3):34-36.