

[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1724-1734.

[19] Yuan Z T, Shi X J, Qiu Y Y, *et al.* Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance in colon cancer by cinobufagin [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1815-1825.

[20] Dai Y H, Wang A D, Chen Y L, *et al.* A new indole alkaloid from the traditional Chinese medicine Chansu[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(6): 581-585.

[21] Wang J, Cai H, Xia Y, *et al.* Bufalin inhibits gastric cancer invasion and metastasis by down-regulating Wnt/ASCL2 expression[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(34): 23320-23333.

[22] Zhao H Y, Zhao D L, Jin H L, *et al.* Bufalin reverses intrinsic and acquired drug resistance to cisplatin through the AKT signaling pathway in gastric cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1817-1822.

[23] Qi H Y, Qu X J, Liu J, *et al.* Bufalin induces protective autophagy by Cbl-b regulating mTOR and ERK signaling pathways in gastric cancer cells[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(1): 33-43.

[24] Dou L, Zou D, Song F R, *et al.* Bufalin suppresses ovarian cancer cell proliferation *via* EGFR pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 135(4): 456-461.

[25] Gai J Q, Sheng X, Qin J M, *et al.* The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis *via* Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 338-348.

[26] Wang Y, Lonard D M, Yu Y, *et al.* Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1506-1517.

[27] Qi F H, Wang J J, Zhao L, *et al.* Cinobufacini inhibits epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma cells through c-Met/ERK signaling pathway [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3): 291-297.

[28] Zhang C, Ma K, Li W Y. Cinobufagin suppresses the characteristics of osteosarcoma cancer cells by inhibiting the IL-6-OPN-STAT3 pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 4075-4090.

[29] Su S, Dou H T, Wang Z, *et al.* Bufalin inhibits ovarian carcinoma *via* targeting mTOR/HIF- α pathway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2021, 128(2): 224-233.

中药通过调节铁死亡作用治疗溃疡性结肠炎的用药规律研究

吴 娜¹, 饶 颖¹, 周佳林¹, 李 重², 黄雪云¹, 谢昌莹¹, 贺柯庆^{1*}
(1. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省中西医结合医院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨中药通过调节铁死亡作用治疗溃疡性结肠炎的用药规律。**方法** 基于生物信息学、数据挖掘, 分别在 FerrDb、DisGeNET 数据库下载与铁死亡、溃疡性结肠炎相关基因并进行映射, 采用 STRING 数据库、Cytoscape 软件得出溃疡性结肠炎中与铁死亡发生机制相关的关键基因, Coremine Medical 分析治疗关键基因的中药并进行数据挖掘。**结果** 溃疡性结肠炎中共有 76 个基因与铁死亡发生机制相关, 关键基因为 *TP53*、*IL6*、*HIF1A*、*STAT3*、*ALB*、*EGFR*、*VEGFA*、*SRC*、*HRAS*、*TLR4*, 作用关键基因的中药有丹参、人参、黄芪、黄芩, 从本病病机、药理学方面考虑, 选择黄芩进行后续研究。对 CNKI 数据库进行挖掘, 共筛选出 363 首方剂, 包含 209 味中药, 黄芩、黄连、甘草、白芍、木香为核心中药组。**结论** 本研究分析了中药通过调节铁死亡作用治疗溃疡性结肠炎的用药规律, 可为相关临床治疗及机制探索提供参考。

关键词: 中药; 溃疡性结肠炎; 铁死亡; 用药规律; 生物信息学; 数据挖掘

中图分类号: R287 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3482-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.056

溃疡性结肠炎是一种病因尚不明确的结肠和直肠慢性非特异性炎症性疾病, 临床常表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便, 具有病程长、易复发、难治愈等特点, 现已被世界卫生组织列为现代社会最难治疗的疾病之一, 目前其发病率在我国呈持续上升趋势^[1-2]。正常的肠上皮细胞 (IECs) 死亡可维持其功能, 保持其持续更新能力, 维护组织稳态, 而其脱离稳态后会导致肠通透性增加、肠屏障功能障碍, 是导致溃疡性结肠炎发生发展的关键因素^[3]。铁死亡是近

收稿日期: 2022-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160903); 江西省自然科学基金青年基金项目 (20212BAB216060); 江西省中医药中青年骨干人才 (第四批) 培养计划项目 (赣中医药科教字 [2022] 7 号); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ211223); 江西省中医药管理局科技计划重点项目 (2022Z005); 江西省卫生健康委科技计划项目 (202310695)

作者简介: 吴 娜 (1989—), 女, 博士, 副教授, 主治中医师, 从事中医药防治炎症性肠病研究。E-mail: wuna0791@163.com

* 通信作者: 贺柯庆 (1979—), 男, 硕士, 副主任中医师, 从事中医药防治消化系统疾病研究。E-mail: 645233169@qq.com

年提出的一种新型细胞程序性死亡方式，主要依赖于细胞内铁和脂质活性氧积累所引起的细胞死亡，目前被认为是导致 IECs 死亡的重要原因^[4]。近期多项研究表明，铁死亡参与溃疡性结肠炎的发生发展。

中药治疗溃疡性结肠炎由来已久，疗效确切，副作用较少，但其具体作用机制尚不明确。近年来，生物信息学在疾病诊断、靶向新药研发等临床研究中广泛运用，本研究通过生物信息学寻找出治疗溃疡性结肠炎的中药中作用机制与铁死亡相关的中药，再采用数据挖掘技术分析其配伍规律、核心药物组合，以期对相关中医治疗及机制探索提供参考。

1 资料与方法

1.1 溃疡性结肠炎中与铁死亡相关基因检索 FerrDb (<http://www.zhounan.org/ferrdb/index.html>) 是从 PubMed 数据库中下载关于铁死亡的文章，从中提取出与铁死亡调控因子、标志物及相关疾病的数据库，于 2021 年 12 月下载铁死亡的标志物 (marker)、抑制因子 (suppressor)、驱动因子 (driver) 3 个文件，并将相关数据进行合并，删除重复项，最终获得相关基因 (数据集 1)。DisGeNET (v 7.0)^[5] (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>) 包含了 17 074 个基因、20 370 种疾病、561 119 个基因-疾病相关，从中获得与溃疡性结肠炎相关的疾病基因 (数据集 2)。将上述 2 个数据集输入 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化后映射，最终得到共有基因，即为溃疡性结肠炎中与铁死亡发生机制相关的基因。

1.2 溃疡性结肠炎中与铁死亡相关关键基因获取 将铁死亡基因输入 STRING (the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) 数据库 (v 11.5) (<http://string-db.org/>)^[6] 进行蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 分析，选取得分大于 0.4 的基因输入 Cytoscape 3.7.1 软件^[7]，应用 network analysis plugin 功能对网络中基因进行统计分析，得到其在网络中的作用——自由度 (Degree)，根据其大小进行可视化，颜色由浅黄色逐渐变成红色，红色越深，Degree 越大，该基因在网络中的生物功能越多，选取排名前十的基因，即为溃疡性结肠炎铁死亡基因中的关键基因。

1.3 调节铁死亡作用溃疡性结肠炎中药获取 Coremine Medical 是挪威与中国科学院、中国医学科学院、美国国立医学图书馆等机构联合开发的医学信息检索平台，通过输入基因名可检索出与该基因相关的疾病及潜在治疗药物。将溃疡性结肠炎铁死亡关键基因输入该数据库，以 $P<0.05$ 为标准进行筛选^[8]，得到作用于每个关键基因的中药，对其出现频次进行统计，得到排名最高的前 3 味中药。

1.4 中药数据挖掘 查阅相关文献，从“1.3”项下出现频次前三的中药中筛选合适的 1 味进行后续数据挖掘，分析以其为核心治疗溃疡性结肠炎的用药配伍规律。

1.4.1 数据来源 在中国知网 (CNKI) 数据库中以“溃疡性结肠炎”及“1.4”项下中药为关键词进行检索，时间为建库至 2021 年 12 月。

1.4.2 纳入标准 (1) 文献为已公开发表、可浏览内容的随机对照试验，单盲、双盲或非盲法不限，语种中文；(2) 给药途径为口服，试验组干预措施为单纯中药、中成药或中药/中成药联合西药治疗，对照组干预措施为西医治疗 (包括水杨酸制剂、激素、免疫抑制剂等)。

1.4.3 排除标准 (1) 使用重复中药复方的文献；(2) 给药途径包括中药灌肠；(3) 无具体中药组成的文献；(4) 仅使用单味中药治疗的文献；(5) 学术经验体会类、综述类、实验类文献。

1.4.4 数据处理 经检索后共得到 3 905 篇相关文献，按“1.4.2”“1.4.3”项下标准筛选后得到 363 个符合条件的方剂，根据 2015 年版《中国药典》^[9] 和《中药学》^[10] 将中药名称、分类进行统一，例如“川白芍”“白芍药”均统一为“白芍”，“广木香”“云木香”统一为“木香”，“橘皮”统一为“陈皮”，“炙甘草”统一为“甘草”。

1.4.5 数据分析 采用 Excel 2019 软件对方剂中单味中药出现频次、类型、性味归经等进行统计；IBM SPSS Modeler 18.0 软件分析组方中药，以出现频次 ≥ 40 次者为高频中药；Cytoscape 3.7.1 软件绘制高频中药网络图；Apriori 算法进行关联规则分析，其中满足支持度 $\geq 30\%$ 、置信度 $\geq 100\%$ 、提升度 ≥ 1 的药对为核心中药；IBM SPSS Statistics 26.0 软件对高频中药进行聚类分析。

2 结果

2.1 溃疡性结肠炎中与铁死亡发生机制相关的基因 在 FerrDb 数据库中共得到 259 个与铁死亡发生机制相关的基因 (数据集 1)，在 DisGeNET 数据库中得到 1 458 个与溃疡性结肠炎发生相关的基因 (数据集 2)，将上述 2 个数据集标准化后映射得到 76 个共有基因，即为溃疡性结肠炎铁死亡基因，见图 1。

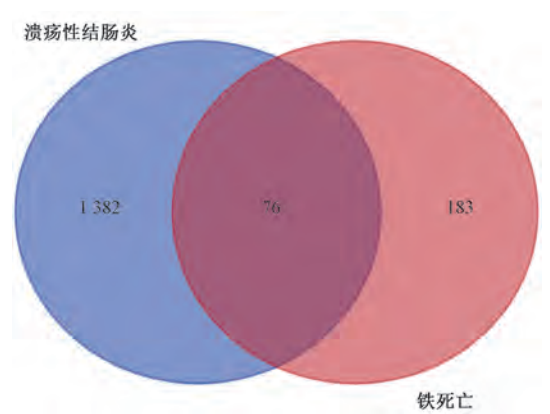


图 1 溃疡性结肠炎中与铁死亡发生机制相关的基因韦恩图

2.2 溃疡性结肠炎铁死亡关键基因分析 将 76 个溃疡性结肠炎铁死亡基因输入 STRING 数据库筛选，通过 Cytoscape 软件可视化，根据 Degree 大小进行颜色渲染，得到 10 个关键基因，分别为肿瘤蛋白 P53 (TP53)、白细胞介素-6 (IL6)、低氧诱导因子-1A (HIF1A)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、白蛋白 (ALB)、表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、肉瘤基因

(*SRC*)、V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物 (*HRAS*)、TOLL 样受体 4 (*TLR4*)，具体见表 1、图 2。

表 1 溃疡性结肠炎中与铁死亡相关的关键基因

序号	基因	自由度	序号	基因	自由度
1	<i>TP53</i>	57	6	<i>EGFR</i>	44
2	<i>IL6</i>	54	7	<i>VEGFA</i>	42
3	<i>HIF1A</i>	49	8	<i>SRC</i>	40
4	<i>STAT3</i>	48	9	<i>HRAS</i>	40
5	<i>ALB</i>	44	10	<i>TLR4</i>	40

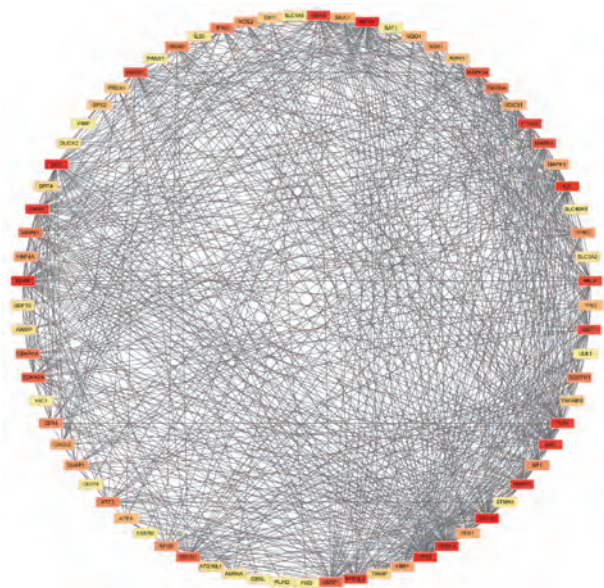


图 2 溃疡性结肠炎中与铁死亡发生机制相关的基因

2.3 调节铁死亡作用溃疡性结肠炎的中药 将“2.2”项下关键基因输入 Coremine Medical 数据库进行检索，发现出现频次最高的前 3 味中药是丹参、人参、黄芩、黄芪，其中黄芩、黄芪出现频次相同，故一起纳入，具体见表 2。现代研究发现，黄芩主要成分黄芩素可直接螯合人体内铁离子，减少铁离子沉积，抑制芬顿反应，具有显著的抗铁死亡活性，对其抑制作用优于传统抑制剂 Ferrostatin-1，并且溃疡性结肠炎病机以湿热、瘀热蕴结肠道为主，故选择该中药进行后续数据挖掘。

表 2 调节铁死亡作用溃疡性结肠炎的中药

序号	中药	出现频次/次
1	丹参	6
2	人参	5
3	黄芪	4
4	黄芩	4

2.4 含黄芩方剂统计 共得到含黄芩方剂 363 首，包含 209 味中药，①功效，包括清热类（1 128 次，29.20%）、补虚类（1 040 次，26.92%）、理气类（356 次，9.22%）、解表类（243 次，6.29%）、止血类（242 次，6.26%）、利水渗湿类（191 次，4.94%）、温理类（125 次，3.24%）、收涩类（93 次，2.41%）、化湿类（86 次，2.22%）、驱虫类（78 次，2.02%）、化痰止咳平喘类（77 次，1.99%）、

消食类（64 次，1.66%）、活血化瘀类（64 次，1.66%）、泻下类（56 次，1.45%）、祛风湿类（8 次，0.21%）、平肝息风类（5 次，0.13%）、安神类（4 次，0.10%）、开窍类（3 次，0.08%）；②四气，包括寒（1 381 次，39.46%）、温（1 193 次，34.09%）、平（621 次，17.74%）、凉（169 次，4.83%）、热（136 次，3.89%），具体见图 3A；③五味，包括苦（2 495 次，41.72%）、甘（1 447 次，24.19%）、辛（1 138 次，19.03%）、酸（878 次，14.68%）、咸（23 次，0.38%），具体见图 3B；④归经，包括脾（2 825 次，22.00%）、胃（2 020 次，15.73%）、肺（1 567 次，12.20%）、肝（1 562 次，12.16%）、大肠（1 520 次，11.84%）、心（1 143 次，8.90%）、胆（984 次，7.66%）、小肠（396 次，3.08%）、肾（395 次，3.08%）、三焦（218 次，2.19%）、膀胱（156 次，1.21%）、心包（55 次，0.43%），具体见图 3C。

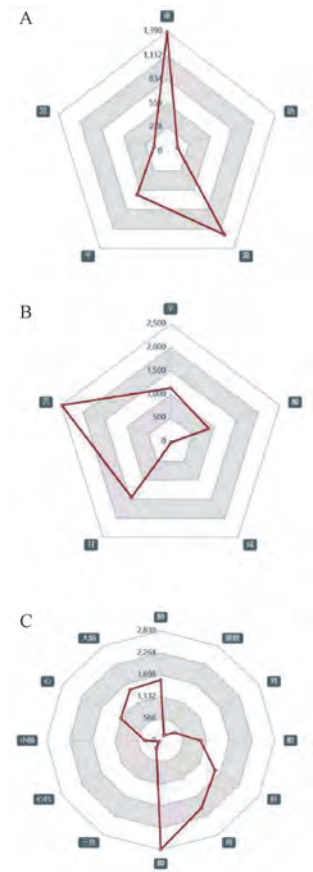


图 3 含黄芩方剂中药雷达图

2.5 核心中药组分析 采用 Apriori 算法进行关联规则分析，发现核心药对共 16 对，其中黄芩与黄连、甘草、白芍、木香出现频次最多，为核心中药组，具体见表 3。

2.6 聚类分析 采用 IBM SPSS Modeler 18.0 软件进行聚类分析，共筛选出 29 味使用频次≥40 次的中药，即为高频中药，Cytoscape 软件绘制其网络图，具体见图 4。再采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件中的“组间联接”，测量区间选择“皮尔逊相关性”，设置区间距离为 21，可将高

表 3 核心中药组

序号	组成	出现频次/次	序号	组成	出现频次/次
1	黄芩、黄连	296	9	黄芩、木香、黄连	183
2	黄芩、甘草	274	10	黄芩、白芍、黄连	178
3	黄芩、白芍	218	11	黄芩、白芍、甘草	169
4	黄芩、木香	202	12	黄芩、木香、甘草	159
5	黄芩、白术	154	13	黄芩、木香、白芍	153
6	黄芩、当归	124	14	黄芩、白术、黄连	126
7	黄芩、白头翁	112	15	黄芩、当归、黄连	114
8	黄芩、甘草、黄连	227			

频中药药物聚为 6 类，第 1 类为半夏、干姜、大枣、党参；第 2 类为黄芩；第 3 类中组 1 为陈皮、防风、白术、茯苓、黄芪，组 2 为柴胡、枳壳、甘草、地榆；第 4 类为大黄、肉桂、槟榔、当归、白芍、木香；第 5 类为薏苡仁、败酱草、黄连、葛根；第 6 类为白头翁、秦皮、黄柏、白及、赤芍，具体见图 5。

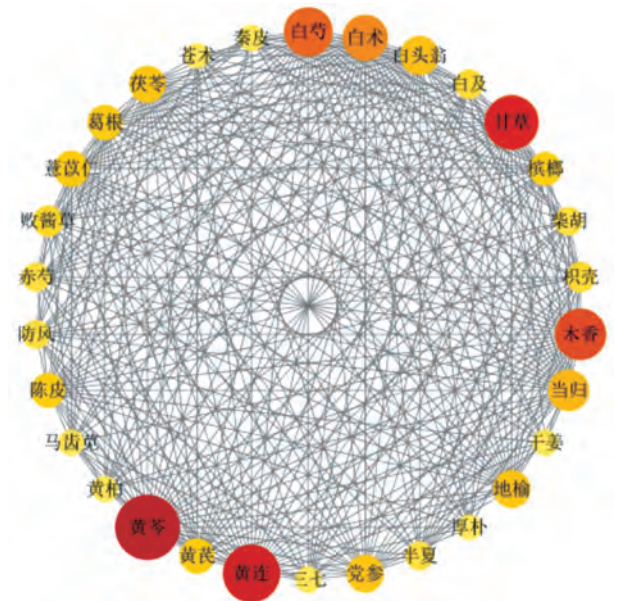


图 4 高频中药网络图

3 讨论与结论

2012 年，Dixon、Stockwell 等^[11]发现，小分子化合物爱拉斯汀可通过抑制胱氨酸/谷氨酸逆转运体减少半胱氨酸依赖的谷胱甘肽合成，从而导致一种不同于细胞凋亡、坏死、自噬、焦亡等的新型细胞死亡模式，并将其命名为“铁死亡”，目前它正参与肿瘤、神经退行性疾病、缺血再灌注损伤、溃疡性结肠炎等疾病的发生发展^[12-15]。中药治疗溃疡性结肠炎由来已久，疗效确切，现已发现多种中药成分可调控铁死亡，并且与经典相关干预剂相比具有价格低廉、来源广、疗效可靠等优势^[16]，故挖掘该类中药并研究其用药规律对相关诊疗具有重大意义。

通过生信预测发现，丹参、人参、黄芩、黄芪治疗溃疡性结肠炎的作用机制可能与铁死亡相关，近年来研究表明含上述 4 味中药的方剂对溃疡性结肠炎有治疗作用，与本研究预测结果相符。中医认为，溃疡性结肠炎发病与

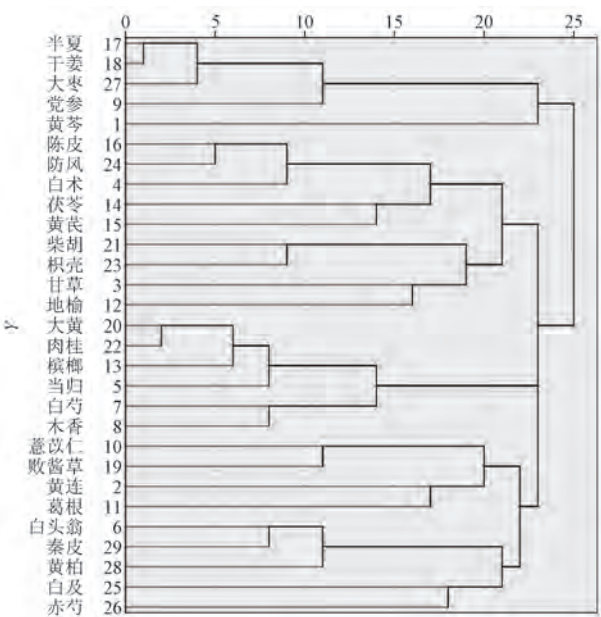


图 5 高频中药聚类分析

“湿热”“热毒”相关，其病机主要为湿热蕴结肠道^[17-18]。黄芩入心、肺、胆、大肠经，有清热祛湿、泻火解毒功效，常用于治疗湿热泻痢、诸热肠癖等病，其符合该病证的治疗要求，现代药理研究证实，其主要成分黄芩素可直接螯合人体内铁离子，减少铁离子沉积，抑制芬顿反应，具有显著的抗铁死亡活性，并且对其抑制作用优于传统抑制剂 Ferrostatin-1^[19-20]，故选用该中药进行后续研究。通过数据挖掘得到含黄芩方剂共 363 首，涉及 209 味中药，发现以清热、补虚、理气类为主，并且黄芩与黄连、甘草、白芍、木香为核心中药组。黄芩配伍清热类中药黄连时，前者善清上焦火，后者善清中焦火，两者性味相投，功效相似，相须为用，可增强清热解毒燥湿之功，有助清胃肠之湿热；配伍补虚类中药白芍、甘草时，白芍敛阴和营、缓急止痛，芍药相配，酸苦相济，调中存阴，而甘草益气和缓、调补正气，与黄芩一泻一补、相互制约，可减弱前者泻下之力，使其泻热而存阴、祛邪不伤正；与理气类中药木香配伍时，可得后者行而不滞，而后者得前者温而不燥，寒热并有，相反相成，共奏清热燥湿、行气止痛之功效。另外，黄芩、白芍、甘草也是治疗里热下痢之祖方黄芩汤的重要组方药材，而且课题组前期发现，黄芩汤作用溃疡性结肠炎的机制可能与铁死亡相关^[21]，与本研究结论相符。

综上所述，本研究以铁死亡为切入点，通过生物信息学、数据挖掘方法分析中药通过调节铁死亡作用治疗溃疡性结肠炎的用药规律，发现丹参、人参、黄芩、黄芪 4 味中药治疗作用可能与铁死亡相关，从病机、药理方面考虑选择黄芩进行考察，发现它治疗本病时常与清热、补虚、理气类中药配伍，其中黄芩、黄连、甘草、白芍、木香为核心中药组。上述结果可为溃疡性结肠炎中医治疗及其作用机制探索提供参考。

参考文献：

[1] Jeong D Y, Kim S, Son M J, *et al.* Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease; a comprehensive review [J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(5): 439-454.

[2] 李学锋, 彭 霞, 周明欢. 我国炎症性肠病流行病学研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(9): 1265-1267.

[3] Subramanian S, 耿 华, 谭小弟. 肠道疾病中肠上皮细胞的死亡[J]. 生理学报, 2020, 72(3): 308-324.

[4] Xu M Y, Tao J, Yang Y D, *et al.* Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 86.

[5] Piñero J, Queralt-Rosinach N, Bravo À, *et al.* DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes [J]. *Database (Oxford)*, 2015, 2015: bav028.

[6] Szkarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* String v10: protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 447-452.

[7] 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.

[8] Kong Q, Ma Y, Yu J, *et al.* Predicted molecular targets and pathways for germacrone, curdione, and furanodiene in the treatment of breast cancer using a bioinformatics approach[J]. *Sci Rep*, 7(1): 15543.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部

[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[10] 高学敏, 钟赣生. 中药学[M]. 北京：人民卫生出版社，2013.

[11] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

[12] Kobayashi Y, Ohfuji S, Kondo K, *et al.* Association between dietary iron and zinc intake and development of ulcerative colitis: a case-control study in Japan [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 34(10): 1703-1710.

[13] Xu M Y, Tao J, Yang Y D, *et al.* Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 86.

[14] Chen Y R, Zhang P, Chen W R, *et al.* Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 9-15.

[15] Wang S J, Liu W, Wang J, *et al.* Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4 [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118356.

[16] 欧海亚, 叶小鹏, 李 舒, 等. 基于网络药理学及数据挖掘探讨中药调节铁死亡的用药规律研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(18): 2317-2324.

[17] 王 康. 基于 STAT3/NF-kB/IL6 通路研究加味黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[D]. 南京：南京中医药大学，2020.

[18] 张声生, 沈 洪, 郑 凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见（2017）[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.

[19] 季小添, 李海珊, 李伟荣, 等. 基于黄芩苷药理研究进展探讨其对出血性脑损伤可能的保护作用及机制[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12): 1508-1515.

[20] 徐文慧, 李沧海, 姜廷良. 铁死亡通路中药干预机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(20): 4019-4026.

[21] 吴 娜, 万治平, 曾 娟, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激及铁死亡相关指标 GSH-Px4, P53, SLC7A11 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 17-24.