

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.11.006

马挺, 纪鹏, 魏彦明, 等. 鹤榆止泻散防治猪溃疡性结肠炎的潜在作用机制 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(11): 67-80.

鹤榆止泻散防治猪溃疡性结肠炎的潜在作用机制

马挺, 纪鹏, 魏彦明, 李琛琛, 武凡琳,
华永丽, 张文飞, 王祈帆, 杨昊赤

甘肃农业大学 动物医学院, 兰州 730070

摘要: 采用网络药理学和分子对接技术探究自拟中药组方鹤榆止泻散防治猪溃疡性结肠炎(PUC)的作用靶点及机制。通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选鹤榆止泻散中 5 种药物活性成分及靶点, 基于 PUC 相关疾病数据库(GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD, DrugBank)综合检索疾病相关靶点, Venn 可视化两者共同关键靶点。采用 STRING 平台构建潜在靶点蛋白互作(PPI)网络, Cytoscape 3.8.0 软件对关键靶点进行网络拓扑学分析及核心基因提取, 同时建立鹤榆止泻散“活性成分-潜在作用靶点”网络, 并对所得的核心基因进行基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 预测鹤榆止泻散治疗 PUC 的分子机制, 最后通过 Autodock 软件进行结合位点和分子对接验证。通过数据分析得出鹤榆止泻散治疗 PUC 可能与槲皮素、苦参碱、山奈酚、 β -谷甾醇、柚皮素、木犀草素、甘草异黄酮等化学成分有关, 筛选出 *fos*, *jun*, *rela*, *esr1*, *mapk1* 等为核心靶点, 富集分析得到 GO 条目 2 461 条, KEGG 通路 176 条, 主要涉及炎症信号通路和 PI3K/Akt 信号通路等, 分子对接结果显示关键活性成分与对应靶点具有较好的结合活性。结果表明: 鹤榆止泻散中活性成分通过干预 *fos*, *jun*, *rela*, *esr1*, *mapk1* 等关键靶点, 调节多条信号通路, 抑制炎症反应, 发挥防治猪溃疡性结肠炎的效果。

关键词: 鹤榆止泻散; 猪溃疡性结肠炎; 网络药理学;

分子对接; 作用机制

中图分类号: S859.3

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2024)11-0067-14

Potential Mechanism of Guanyu Zhixie Powder in Control of Porcine Ulcerative Colitis

收稿日期: 2023-04-04

基金项目: 甘肃省高校产业支撑项目(2020C-14); 甘肃农业大学青年导师基金项目(GAU-QDFC-2021-04); 财政部和农业农村部 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-37); 中国科学院兰州化学物理研究所技术委托项目(GSAU-JSYF-2021-021); 甘肃农业大学伏羲英才项目(Gaufx-02Y05)。

作者简介: 马挺, 硕士研究生, 主要从事中兽医学与中兽药研究。

通信作者: 纪鹏, 副教授, 硕士研究生导师。

MA Ting, JI Peng, WEI Yanming, LI Chenchen, WU Fanlin,
HUA Yongli, ZHANG Wenfei, WANG Qifan, YANG Haochi

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: To explore the target and mechanism of Guanyu Zhixie Powder in the prevention and treatment of porcine ulcerative colitis (PUC) by network pharmacology and molecular docking technology, the active components and targets of five active ingredients in Guanyu Zhixie Powder were screened by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). Disease-related targets were comprehensively searched based on PUC-related disease databases (GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD, DrugBank), and the common key targets of the two were visualized by Venn. The STRING platform was used to construct a potential target protein interaction (PPI) network. Cytoscape 3.8.0 software was used to perform network topology analysis and core gene extraction on key targets. At the same time, the ‘active ingredient-potential target gene’ network of Guanyu Zhixie Powder was established. The obtained core genes were subjected to gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis to predict the molecular mechanism of Guanyu Zhixie Powder in the treatment of PUC. Finally, the binding sites and molecular docking were verified with Autodock software. Through data analysis, it was concluded that the treatment of PUC by Guanyu Zhixie Powder may be related to quercetin, matrine, kaempferol, β -sitosterol, naringenin, luteolin, licorice isoflavones and other chemical components. *Fos*, *jun*, *rela*, *esr1* and *mapk1* were selected as the core targets. Enrichment analysis obtained 2 461 GO entries and 176 KEGG pathways, mainly involving inflammatory signaling pathways and PI3K/Akt signaling pathways. Molecular docking results also showed that the key active ingredients had good binding activity with the corresponding targets. The active components in Guanyu Zhixie Powder can regulate multiple signaling pathways, inhibit inflammatory response and exert the effect of preventing and treating ulcerative colitis in pigs by interfering with key targets such as *fos*, *jun*, *rela*, *esr1* and *mapk1*.

Key words: Guanyu Zhixie Powder; porcine ulcerative colitis; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

猪溃疡性结肠炎(Porcine Ulcerative Colitis, PUC)作为一种病理机制尚不明确的肠炎,发病率居高不下,严重影响着养猪业的经济效益。主要病理变化为距肛门 10 cm 处肠黏膜上有多个溃疡面,中心凹陷,覆盖白苔,周边呈现充血状,临床症状主要表现为倦怠懒动,后背微弓,采食下降,出现稀便与脓血便,血便中可见肠黏膜脱落^[1]。中兽医学称溃疡性结肠炎为“休息痢”“久痢”和“肠癖”等。根据证候可分为湿热证、寒湿证、寒热证、阳虚阴虚证、气虚气泄证、血瘀等^[2]。“饲料端禁抗、治疗端减抗”背景下,寻找抗生素替代品是促进养猪业健康发展的手段之一。

以临床经验为基础,以中兽医学理论为基本准则,课题组自拟防治畜禽腹泻的中药鹤榆止泻散复方,主要功效为清热燥湿、健脾止泻。该方由老鹤草、地榆、苦豆草、小茴香和甘草组成。老鹤草主要功效为祛风湿、通经络、止泻痢,地榆主要用于治疗血热性出血、湿疹或疮疡痈肿等,苦豆草具有清热解毒、止痢等功效,小茴香主要功效为散寒止痛、理气和胃,甘草主要功效为和中、调和药性等^[3]。全方可治粪便中夹有脓血黏液的大肠湿热证型溃疡结肠炎,或粪便为白色胶冻状的脾虚湿蕴证型溃疡结肠炎。

临床实践证实鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎效果确切, 但其作用机制与功效物质基础尚不清楚. 网络药理学与分子对接是分析预测中药防治疾病作用机制与中药复方功效物质基础的两项重要技术. LI 等^[4]基于网络药理学和分子对接技术初步阐明了黄连解毒汤治疗脓毒症的潜在作用机制与功效物质基础. SIMAYI 等^[5]采用网络药理学和分子对接技术分析 SFJDC(ShufengJiedu Capsule)对抗新型冠状病毒的活性成分和机制. FENG 等^[6]通过网络药理学和分子对接方法探讨 EU-DR(Eucommia Ulmoides-Dipsaci Radix)对 OP(Osteoporosis)的潜在机制, 为治疗 OP 提供药理学依据. HU 等^[7]研究益神胶囊治疗糖尿病肾病的作用机制, 采用网络药理和分子对接技术探究其物质基础. 系统生物学与计算机网络分析技术从多角度、多方位分析药物活性成分对疾病作用靶点的调控和影响. 为探究鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎的作用机制与物质基础, 本研究采用网络药理学和分子对接技术分析鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎的潜在关键靶点与信号通路, 预测其作用机制, 分析其功效物质基础, 为兽医临床上采用鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎提供依据, 研究思路见图 1.

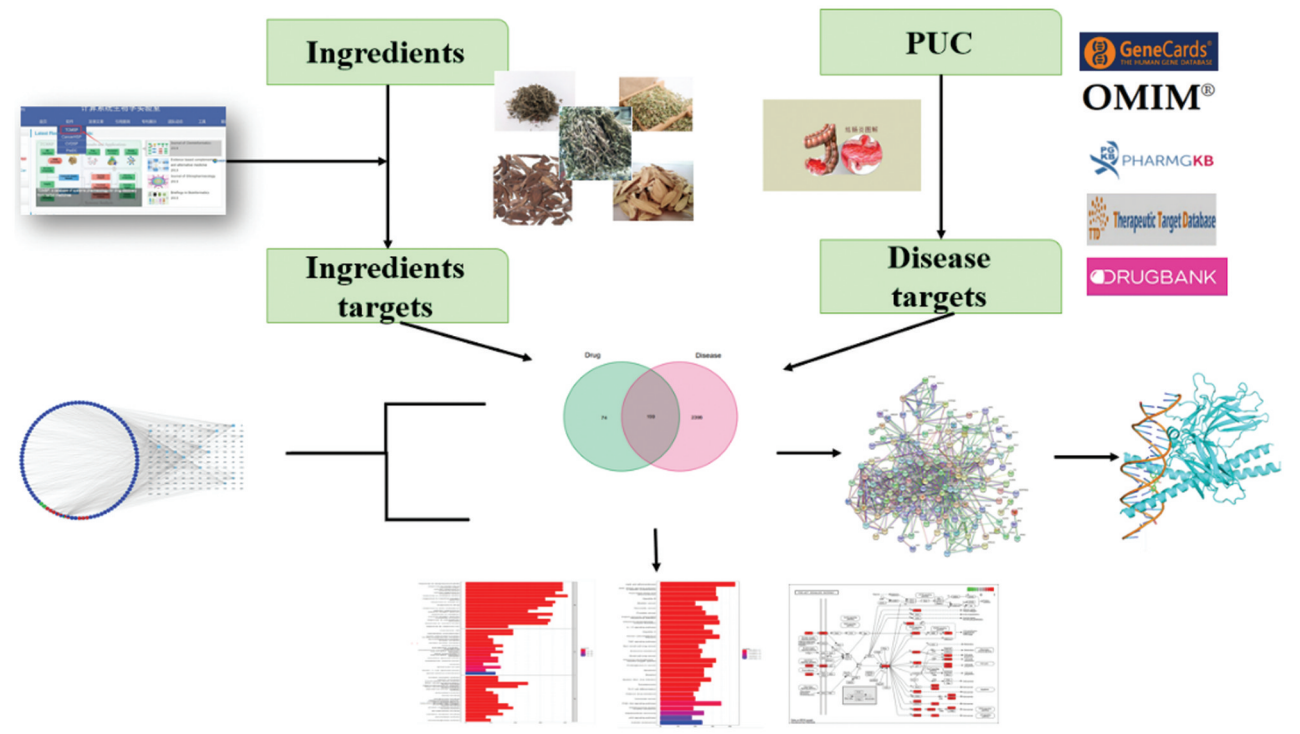


图 1 研究流程图

1 材料与方法

1.1 鹤榆止泻散活性成分与相应靶点的获取

为采集老鹤草、地榆、甘草、小茴香、苦豆草的活性成分, 通过中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>), 以口服生物利用度(Oral Bioavailability) $OB \geq 30\%$ 、类药性(Drug Likeness) $DL \geq 0.18$ 为筛选条件^[8], 并结合文献查询, 获取有效活性成分和相关作用靶点. 获得的靶点通过 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)数据库^[9]将检索出的蛋白名称标准化, 即 Official Symbol.

1.2 PUC 靶点基因的获取

PUC 相关靶点基因通过 GeneCards(<https://www.genecards.org/>), OMIM(<https://omim.org/>), PharmGkb(<https://www.pharmgkb.org/>), TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>), DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>)

www.drugbank.ca/)5 大数据库^[10],以“Porcine Ulcerative Colitis”为关键词查询,并结合文献综合选取与 PUC 相关的靶点基因。

1.3 鹤榆止泻散活性成分作用靶点与 PUC 靶点基因 Venn 图的绘制

将 1.1 项鹤榆止泻散 5 种中药活性成分作用靶点与 PUC 靶点基因导入 R 4.1.0 软件绘制 Venn 图,从而得到鹤榆止泻散治疗 PUC 的共同潜在作用靶点。

1.4 鹤榆止泻散治疗 PUC“活性成分-潜在作用靶点”网络分析与构建

将药物活性成分与对应潜在作用靶点基因导入 Cytoscape 3.8.0 软件进行可视化结果分析处理。通过网络拓扑结构分析,获得活性成分及作用靶点的连接度(Degree)。选取鹤榆止泻散活性成分连接度大于等于平均数作为关键活性化合物^[11],根据药物活性成分与潜在作用靶点基因间的相互作用关系构建“活性成分-潜在作用靶点网络图”。

1.5 蛋白相互作用网络(Protein-protein Interaction, PPI)构建与分析

将 1.3 项的潜在靶点导入 STRING 数据库(<http://stringdb.org/>),生物种类设定为“Swine”,选择 Multiple Protein 模式,置信度设置为高置信度(得分为 0.900)并导出 PPI 互作图和 tsv 文件进行分析^[12]。

将 tsv 文件导入 Cytoscape 3.8.0 中,通过 CytoNCA 功能插件进行网络拓扑属性分析,以平台 Betweenness(BC),Closeness(CC),Degree(DC),Eigenvector(EC),LAC,Network(NC)中位值参数作为重要的网络拓扑参数打分标准^[13],构建鹤榆止泻散关键活性成分作用于 PUC 的功能靶点网络,明确鹤榆止泻散干预 PUC 的核心靶点。

1.6 鹤榆止泻散在猪体内 GO 和 KEGG 通路富集分析

将 1.3 项所得的潜在作用靶点导入 R 软件,通过 R 语言插件包(Colorspace, stringi, ggplot2, DOSE, clusterProfiler, enrichplot)以 $p < 0.05$ 为筛选条件,进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,筛选 GO 中 BP(Biological Process),CC(Cellular Component),MF(Molecular Function)前 15 个生物过程,KEGG 中前 30 个通路。KEGG 通路分析后选与疾病相关信号通路做通路图,分析工具选择 R 软件包的“Pathview”。

1.7 分子对接

采用分子对接软件 VINA 对 PPI 网络中使用 Cytoscape 3.8.0 拓扑分析所得,10 个核心靶点基因中对应度值最大的靶点进行分子对接验证。PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库结合 ChemOffice 软件获得小分子配体结构,PDB(<http://www.rcsb.org/>)数据库结合 PyMOL 软件获得靶蛋白受体结构,并使用 AutoDockTools 软件将配体和受体文件转化为 PDBQT 文件格式和确定其活性口袋(即分子对接搜索范围)的地址,对接结果以结合能的形式展示,Pymol 软件进行配体与受体对接可视化,能量值的大小反映出结合形式的稳定性,越小的能量值结构越稳定。

2 结果与分析

2.1 鹤榆止泻散活性成分及相应靶点

通过设置 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$,TCMSP 数据库输入药物名称得到活性成分地榆 344 个、甘草 2 506 个、苦苣草 963 个、老鹳草 554 个、小茴香 611 个。去除符合条件但靶点数为“0”且重复的化合物,共得到 101 个药物活性成分及 233 个对应的蛋白质靶点。

2.2 PUC 靶点基因

使用 5 大数据库共获得 PUC 相关基因 2 753 个,数据库之间重复基因求并集做 Venn 图,图 2 中相交

重叠处基因数相加即为总基因数, 共 2 555 个靶点基因.

2.3 鹤榆止泻散活性成分作用靶点与 PUC 靶点基因 Venn 图

将鹤榆止泻散中 233 个作用靶点与 PUC 疾病 2 555 个基因取交集绘制 Venn 图, 最终可得 159 个潜在作用靶点(图 3).

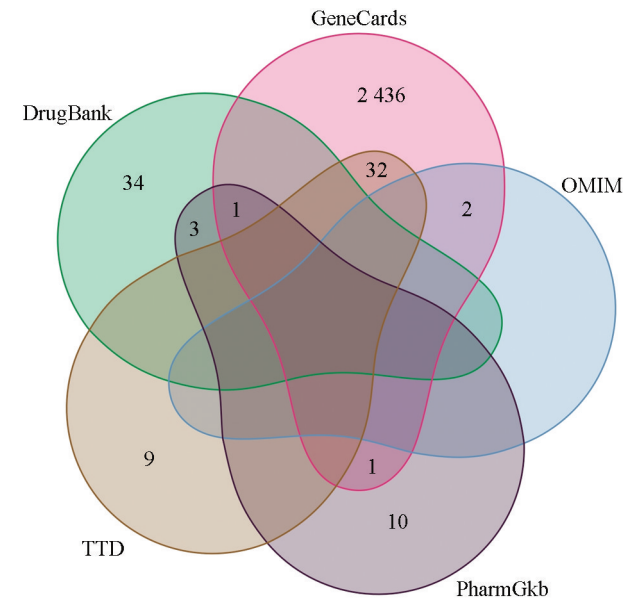


图 2 疾病相关基因 Venn 图

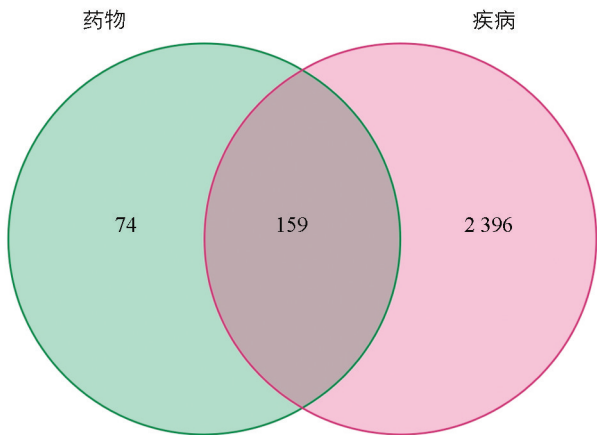


图 3 药物-疾病交集 Venn 图

2.4 “活性成分-潜在作用靶点”网络分析与构建

将 159 个交集靶点导入 Cytoscape 3. 8. 0 软件, 绘制“活性成分-潜在作用靶点”网络, 实现数据可视化. 通过图 4 网络拓扑性质及中心介数和度值, 分析得出鹤榆止泻散中 5 种药物活性成分在该网络中都起到了关键作用. 从潜在作用靶点的角度分析, 一个靶点受到越多活性成分影响, 说明鹤榆止泻散对这个靶点的调控性越高, 即鹤榆止泻散通过多成分、多靶点的相互作用来治疗 PUC. 通过网络分析和查阅 5 种药物治疗 PUC 的关键活性成分筛选出 7 种化学成分: 槲皮素、苦参碱、山奈酚、 β -谷甾醇、柚皮素、木犀草素、甘草异黄酮(表 1).

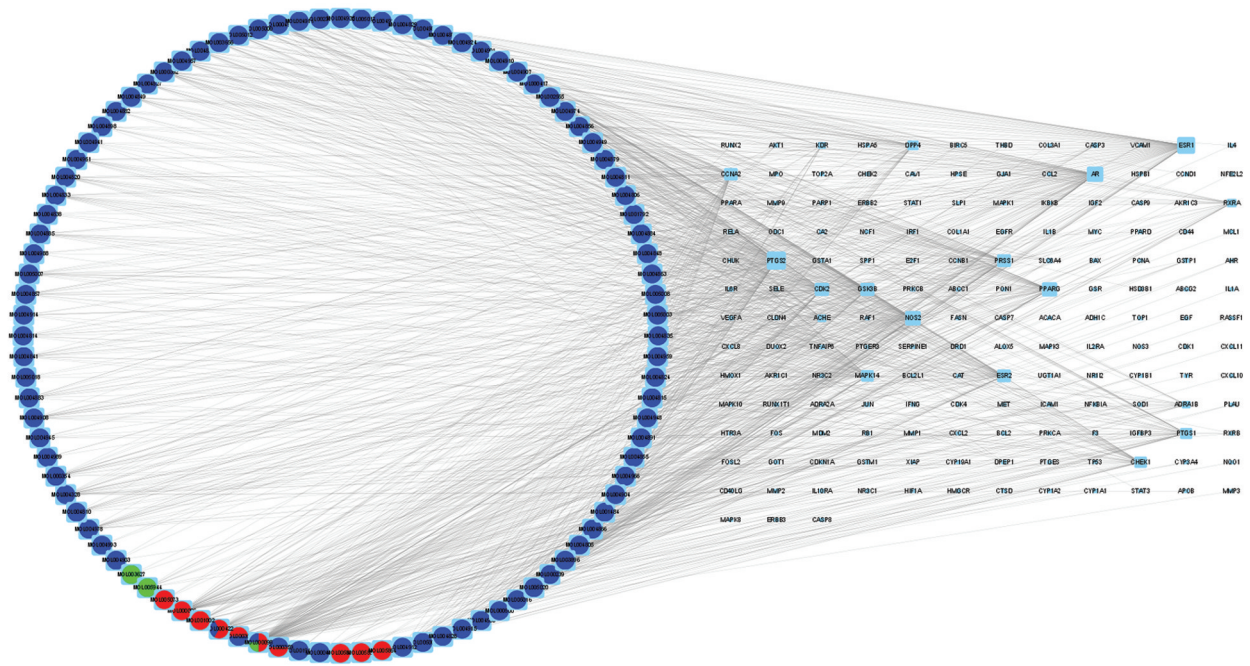
表 1 鹤榆止泻散的 7 个主要活性成分

化合物中文名	度值	所属中药	化合物中文名	度值	所属中药
槲皮素	110	地榆、甘草、苦豆草、老鹳草	柚皮素	29	甘草
苦参碱	9	苦豆草	木犀草素	48	老鹳草
山奈酚	38	地榆、甘草、老鹳草	甘草异黄酮	13	甘草
β -谷甾醇	15	地榆、小茴香			

2.5 鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎的蛋白互作网络构建与分析

将 159 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络, 观察基因间是否具有蛋白互作的关系. PPI 网络共包含 140 个节点, 1 344 条边. Cytoscape 3. 8. 0 软件进行网络拓扑学分析, 二次打分筛选过滤, 最终得到其核心基因. 对核心基因进行后续的分子对接验证(图 5), 最终得到 10 个核心基因(表 2): *esr1* (Estrogen Receptor 1), *rela* (RELA Proto-Oncogene), *akt1* (AKT Serine/Threonine Kinase 1), *mapk14* (Mitogen-Activated Protein Kinase 14), *mapk3* (Mitogen-Activated Protein Kinase 3), *stat3* (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3), *tp53* (Tumor Protein P53), *jun* (Jun Proto-Oncogene),

mapk1 (Mitogen-Activated Protein Kinase 1), *fos* (Fos Proto-Oncogene). 这些核心基因的存在说明其在 PPI 网络中具有重要意义, 可推断其在鹤榆止泻散治疗 PUC 方面能发挥作用.



正方形代表基因靶点; 淡蓝色圆形代表甘草, 绿色圆形代表苦豆草, 淡蓝色圆形代表老鹤草, 深红圆形代表地榆, 深蓝色圆形代表小茴香; 两种颜色及以上的圆形代表两种药物及以上的共同化合物.

图 4 “活性成分-潜在作用靶点”网络图

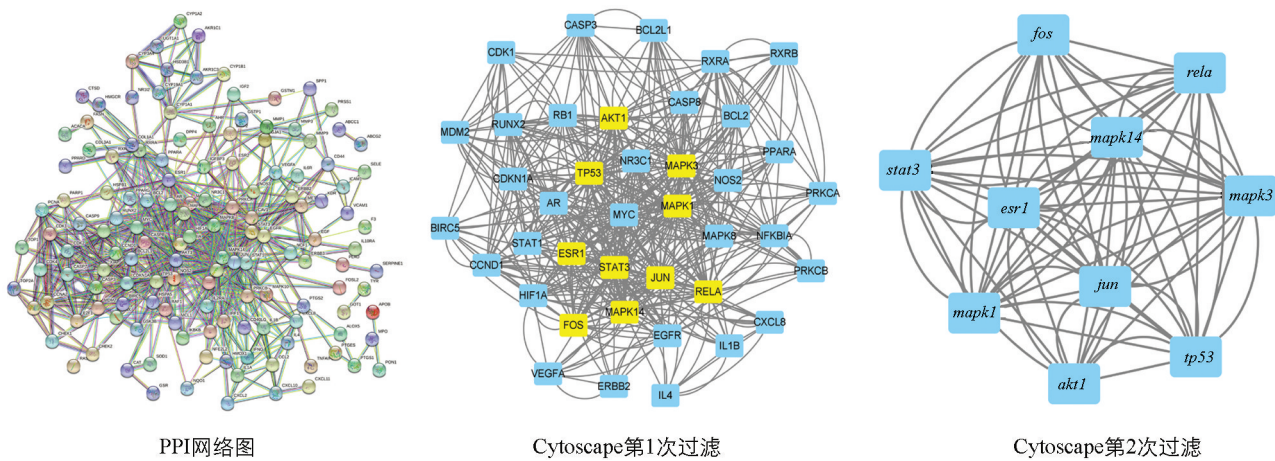


图 5 蛋白互作网络构建与分析

表 2 CytoNCA 核心基因(蛋白)

基因名	基因中文名	度值	基因名	基因中文名	度值
<i>rela</i>	转录因子	16	<i>stat3</i>	信号转导和转录激活因子 3	16
<i>esr1</i>	雌激素受体 1	18	<i>tp53</i>	细胞肿瘤抗原	14
<i>akt1</i>	蛋白激酶	12	<i>jun</i>	转录因子 AP-1	18
<i>mapk14</i>	丝裂原活化蛋白激酶 14	18	<i>mapk1</i>	丝裂原活化蛋白激酶 1	16
<i>mapk3</i>	丝裂原活化蛋白激酶 3	18	<i>fos</i>	蔗糖低聚糖	14

2.6 鹤榆止泻散在猪体内 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

采用 R 软件对 159 个潜在作用靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 富集过滤条件均为 $p < 0.05$, 筛选结果得到 2 461 个 GO 条目. 生物过程(BP)相关的条目 2 185 条, 主要涉及细菌来源分子、对氧化应激的反应、对脂多糖的调控、细胞对化学应力和氧化应激的反应、药物反应等过程; 细胞组成(CC)相关的条目 61 条, 主要涉及细胞膜上的膜筏、细胞膜区域、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶反应、囊腔等方面; 分子功能(MF)相关的条目 215 条, 主要涉及转录因子结合、酶结合、相同蛋白质结合等方面. 选择结果最优的前 45 个条目绘制气泡图, 图 6 显示 BP, CC, MF 数目前 15 条.

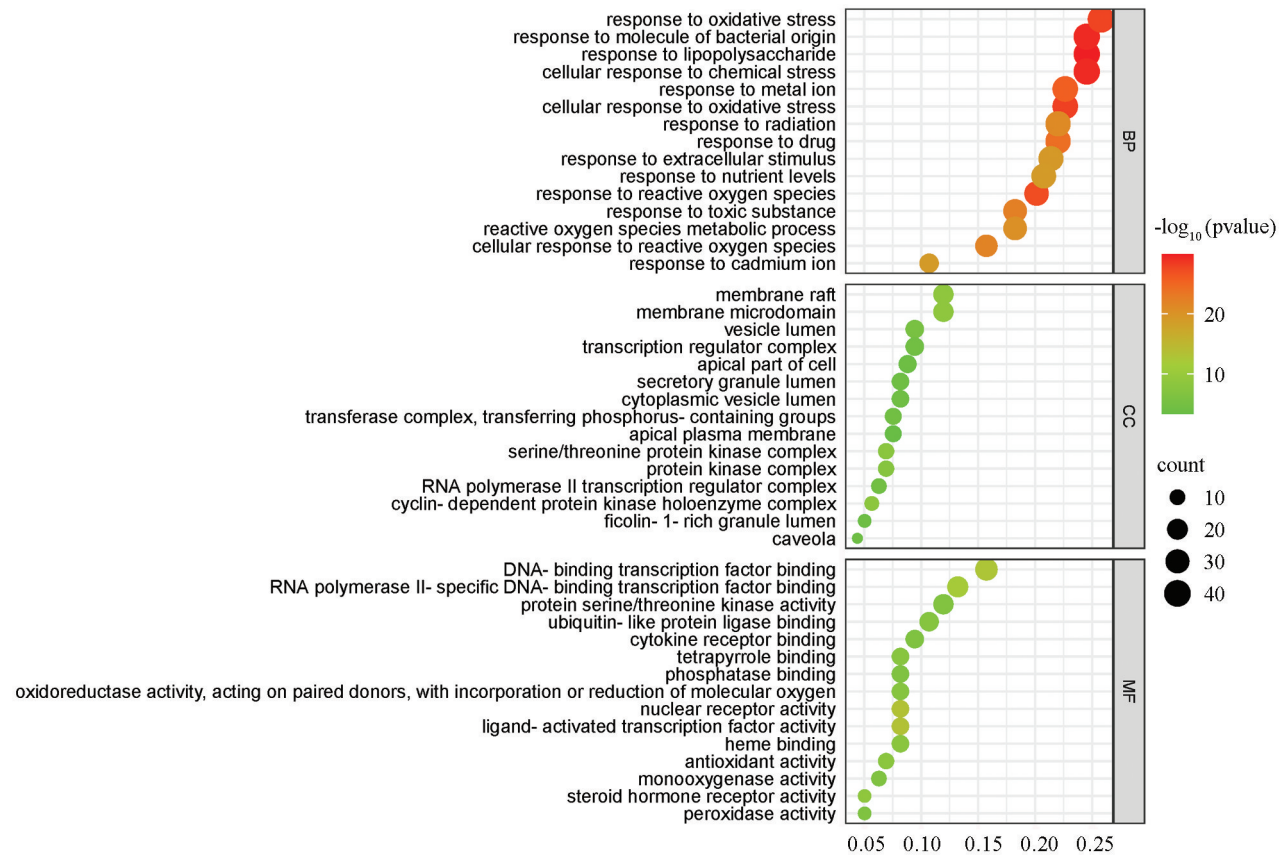


图 6 GO 富集分析气泡图

KEGG 通路 176 条, 选取前 30 条信号通路做柱状图可视化分析(图 7), 主要包括癌症信号通路、结直肠癌信号通路、TNF 信号通路、动脉粥样硬化、IL-17 信号转导通路、炎症信号通路、细胞凋亡、Th17 细胞分化、PI3K/Akt 信号通路等, 其中多数通路与炎症和癌症相关, 表明鹤榆止泻散治疗 PUC 的分子机制可能与炎症反应和癌症通路更相关, 对于 PUC 转变成结直肠癌的疾病进程或可产生一定的影响. 与溃疡性结肠炎相关的通路有 JAK/STAT 信号通路、Wnt 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路, 通过 R 语言软件插件“Pathview”进行通路图的绘制(图 8), 发现鹤榆止泻散关键活性成分通过多靶点、多成分、多通路发挥对 PUC 的治疗作用. 表 3 为与鹤榆止泻散治疗 PUC 关系密切的前 30 条通路.

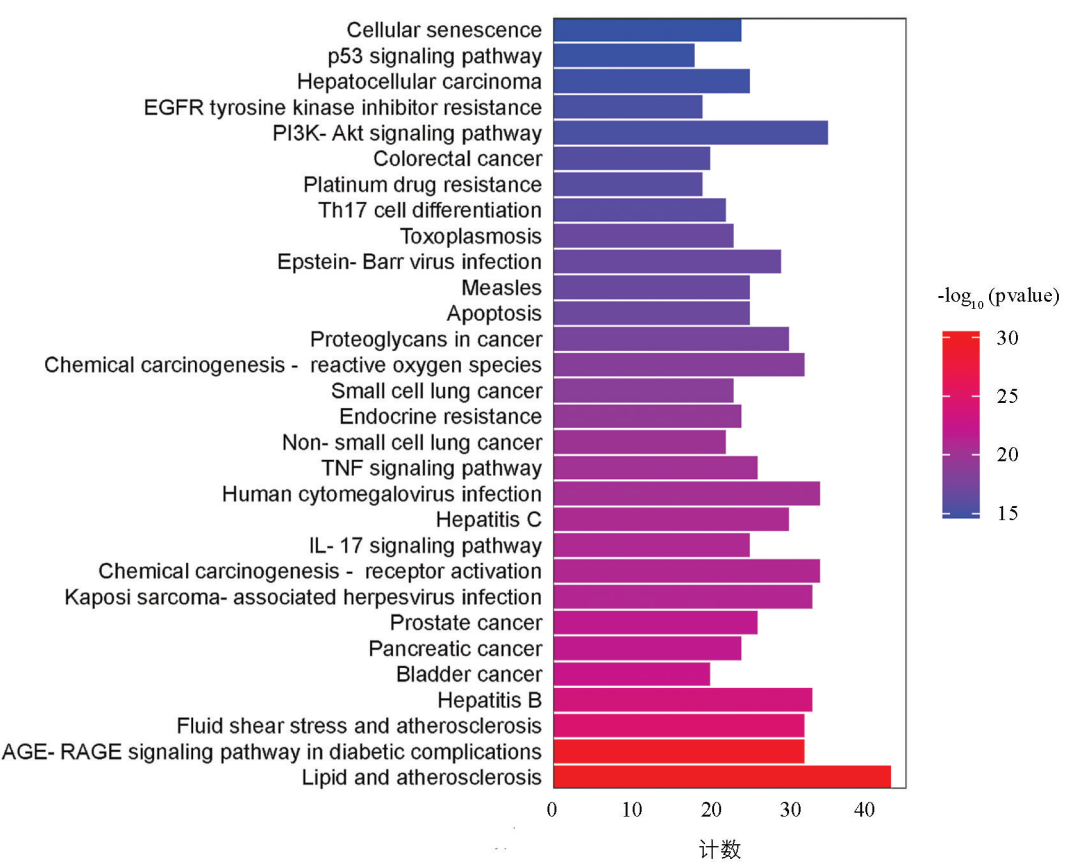


图 7 KEGG 富集分析柱状图

表 3 关键靶点前 30 条 KEGG 通路

序号	地址	描述	p 值	计数
1	hsa05417	Lipid and atherosclerosis	3. 40E-33	43
2	hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	9. 94E-32	32
3	hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	1. 17E-26	32
4	hsa05161	Hepatitis B	1. 22E-25	33
5	hsa05219	Bladder cancer	1. 62E-24	20
6	hsa05212	Pancreatic cancer	9. 74E-24	24
7	hsa05215	Prostate cancer	1. 37E-23	26
8	hsa05167	Kaposisarcoma-associated herpesvirus infection	5. 40E-23	33
9	hsa05207	Chemical carcinogenesis-receptor activation	8. 08E-23	34
10	hsa04657	IL-17 signaling pathway	1. 30E-22	25
11	hsa05160	Hepatitis C	1. 83E-22	30
12	hsa05163	Human cytomegalovirus infection	5. 99E-22	34
13	hsa04668	TNF signaling pathway	7. 86E-22	26
14	hsa05223	Non-small cell lung cancer	1. 83E-21	22
15	hsa01522	Endocrine resistance	8. 45E-21	24
16	hsa05222	Small cell lung cancer	3. 47E-20	23
17	hsa05208	Chemical carcinogenesis-reactive oxygen species	5. 80E-20	32

续表 3

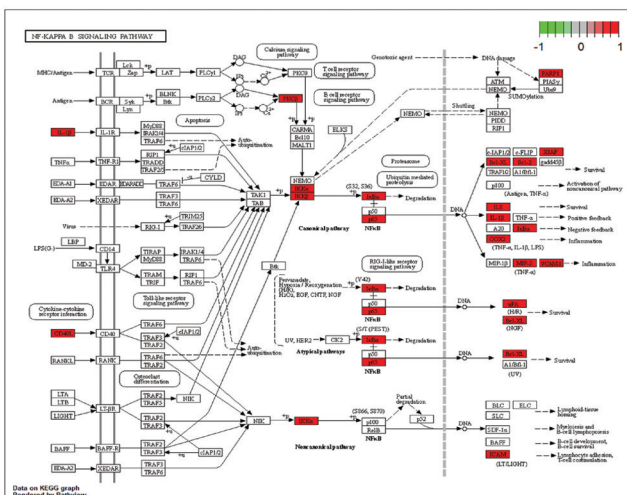
序号	地址	描述	<i>p</i> 值	计数
18	hsa05205	Proteoglycans in cancer	5.52E-19	30
19	hsa04210	Apoptosis	2.23E-18	25
20	hsa05162	Measles	3.87E-18	25
21	hsa05169	Epstein-Barr virus infection	3.94E-18	29
22	hsa05145	Toxoplasmosis	4.18E-18	23
23	hsa04659	Th17 cell differentiation	2.83E-17	22
24	hsa01524	Platinum drug resistance	3.44E-17	19
25	hsa05210	Colorectal cancer	5.42E-17	20
26	hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	1.66E-16	35
27	hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1.74E-16	19
28	hsa05225	Hepatocellular carcinoma	4.29E-16	25
29	hsa04115	p53 signaling pathway	7.02E-16	18
30	hsa04218	Cellular senescence	8.05E-16	24

2.7 分子对接分析

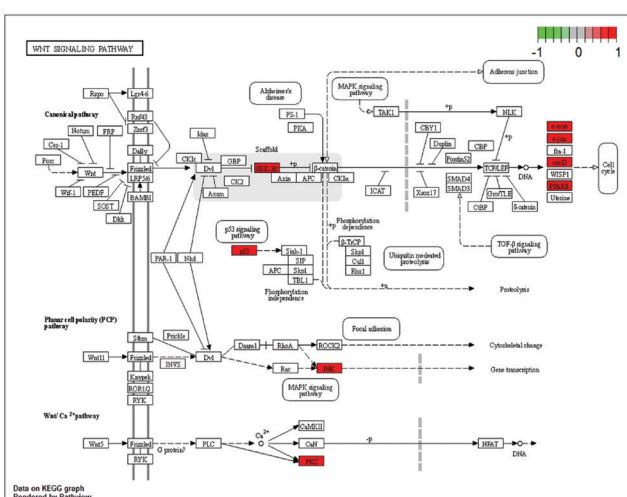
为明确鹤榆止泻散治疗 PUC 中核心基因(蛋白)与关键化合物之间的结合能活性,此次研究选取 7 个主要的活性化合物作为配体,即槲皮素、苦参碱、山奈酚、 β -谷甾醇、柚皮素、木犀草素、甘草异黄酮。以 *rela*, *esr1*, *akt1*, *tp53*, *jun*, *mapk1*, *fos* 7 个基因作为受体,进行分子对接验证,并记录其分子对接的结合能。根据文献查阅研究其成分与蛋白结合的自由能若小于 -5 kcal/mol 认为二者结合稳定,且结合能的数值越低,结合的构象越稳定。分子对接结果可以看出,活性成分与蛋白结合能均小于 -5 kcal/mol (表 4)。对接结果表明鹤榆止泻散中活性化合物与 PUC 基因受体有着很好的结合作用,其中化合物与对应靶点最佳的分子对接有:*fos* 与槲皮素,*jun* 与木犀草素,*rela* 与山奈酚,*rela* 与苦参碱,*esr1* 与甘草异黄酮,*jun* 与 β -谷甾醇,*esr1* 与柚皮素(图 9)。

表 4 PUC 靶点与其对应活性化合物的分子对接结果

对应靶点	活性化合物	结合能/ ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	对应靶点	活性化合物	结合能/ ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
<i>akt1</i>	山奈酚	-5.9	<i>tp53</i>	木犀草素	-6.4
<i>akt1</i>	木犀草素	-6.4	<i>tp53</i>	槲皮素	-6.3
<i>akt1</i>	柚皮素	-6.1	<i>jun</i>	β -谷甾醇	-7.6
<i>akt1</i>	槲皮素	-6.1	<i>jun</i>	山奈酚	-8.1
<i>rela</i>	山奈酚	-8.9	<i>jun</i>	木犀草素	-9.3
<i>rela</i>	木犀草素	-8.5	<i>jun</i>	槲皮素	-8.3
<i>rela</i>	苦参碱	-6.6	<i>mapk1</i>	木犀草素	-8.8
<i>rela</i>	柚皮素	-8.2	<i>mapk1</i>	柚皮素	-8.3
<i>rela</i>	槲皮素	-8.5	<i>mapk1</i>	槲皮素	-8.5
<i>esr1</i>	甘草异黄酮	-7.7	<i>fos</i>	槲皮素	-10.1
<i>esr1</i>	柚皮素	-8.5			



NF- κ B信号通路



Wnt信号通路



红色代表该基因显著表达.

图 8 KEGG 通路图

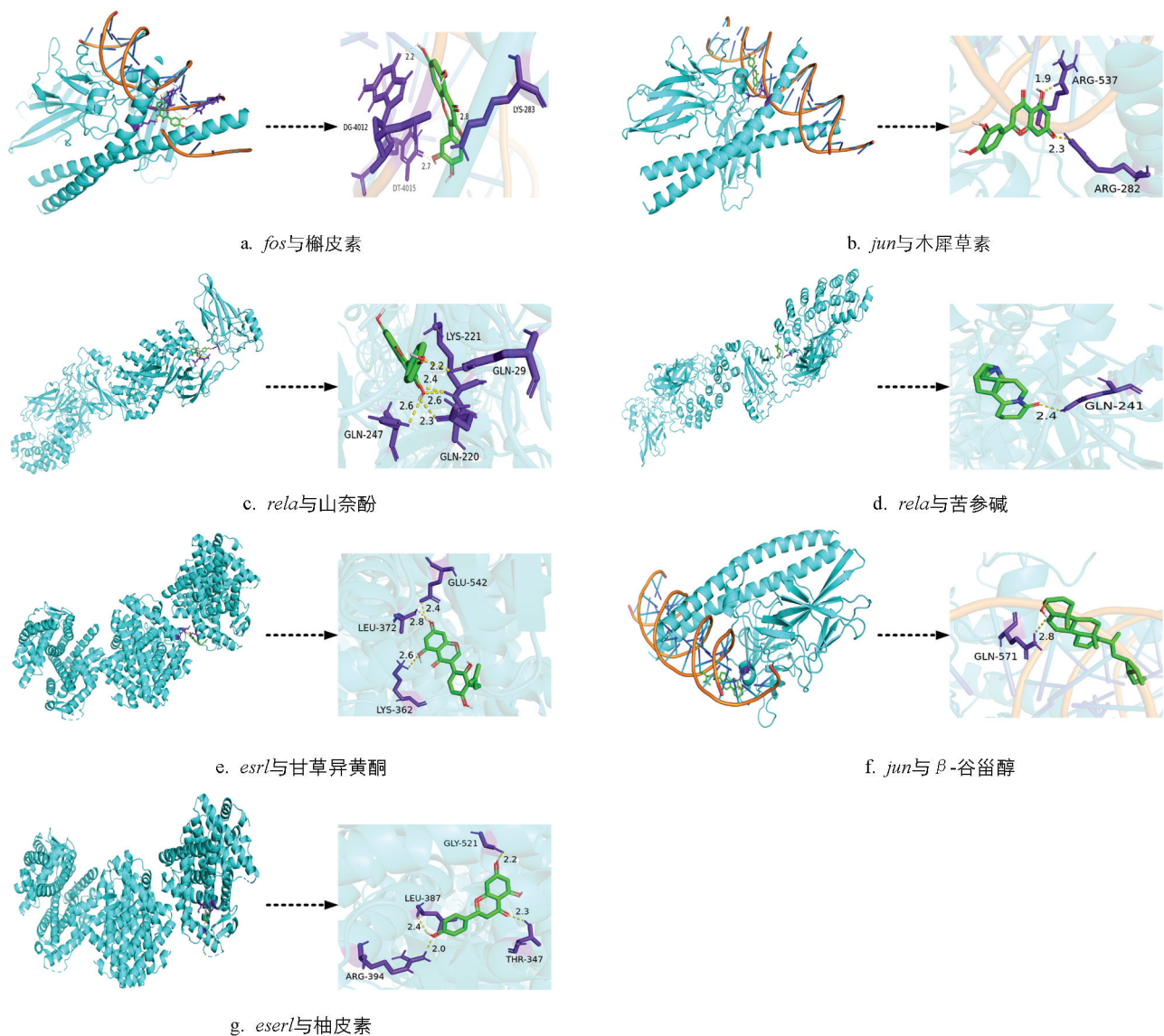


图 9 分子对接

3 讨论与结论

随着猪集约化养殖模式的快速发展, 溃疡性结肠炎发病率居高不下, 严重影响养殖效益. 鹤榆止泻散是临床上用于治疗溃疡性结肠炎的纯中药复方, 其作用机制尚不明确. 本研究采用网络药理学与分子对接的方法探究鹤榆止泻散治疗猪溃疡性结肠炎的作用机制, 发现其作用机制与炎症、细胞分化、细胞凋亡、TNF 信号通路、IL-17 信号转导通路、PI3K/Akt 信号通路等密切相关. 鹤榆止泻散治疗 PUC 的中药活性成分主要包括槲皮素、柚皮素、山奈酚、木犀草素等.

3.1 鹤榆止泻散干预猪溃疡性结肠炎的活性成分

鹤榆止泻散有效成分经网络图分析和查阅文献筛选出槲皮素(queracetin)、苦参碱(matrine)、山奈酚(kaempferol)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、柚皮素(naringenin)、木犀草素(luteolin)、甘草异黄酮(licoisoflavone)7 种活性化合物. 槲皮素是一种黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎症、抑菌等药理作用^[14]. 苦参碱是一种生物碱类化合物, 陈碧涛^[15]研究显示苦参碱可调节机体细胞免疫功能使其达到免疫平衡, 进而促进溃病性结肠炎(UC)病变恢复. 曲一帆^[16]研究表明山奈酚可改善 UC 小鼠的疾病症状,

同时可提高 UC 小鼠肠道菌群的丰富度及多样性。 β -谷甾醇是一种植物甾醇,冯思敏等^[17]研究发现, β -谷甾醇能有效改善 DSS 引起的小鼠结肠炎。谢春燕等^[18]研究发现柚皮素通过上调 miR-22 水平,抑制 NLRP3 炎症小体活化,发挥对 UC 大鼠肠屏障的保护作用。木犀草素作为一种黄酮类化合物,其多种药理活性发挥抗炎、抑菌和抗氧化等作用^[19]。严展鹏^[20]研究证实木犀草素能够通过激活 Nrf2/ARE 信号通路预防结直肠癌。甘草异黄酮为甘草中的黄酮类成分,研究发现甘草黄酮具有抗氧化、抗肿瘤、保肝、抗溃疡等功效^[21]。

3.2 鹤榆止泻散干预猪溃疡性结肠炎的核心基因

通过“活性成分-潜在作用靶点”网络图的构建,可直观反映鹤榆止泻散治疗 PUC 是通过多种药物化合物、多个目标靶点来发挥作用的。在 PPI 网络图中可以看到靶点与靶点间、单个靶点与多个靶点间相互作用,连接度值越大,表明在治疗 UC 时,药物化合物通过该靶点发挥治疗作用的可能性越大^[22]。治疗 PUC 疾病核心靶点基因主要包括 *rela*, *esr1*, *akt1*, *mapk14*, *mapk3*, *stat3*, *tp53*, *jun*, *mapk1* 与 *fos*。*rela* 是 NF- κ B 的一个亚单位,*rela* 磷酸化可能促进炎症反应,*rela* 磷酸化还可能抑制 NF- κ B 调控的炎症反应^[23]。*esr1* 可编码雌激素受体,研究发现 UC 机体肠道黏膜中炎症活动性增强,伴随 *esr1* 甲基化程度升高,该基因还参与 UC 的致癌作用^[24]。现代研究发现 *akt1* 为 UC 中的一个突变,该突变通过增强其膜联系作用来激发激酶,从而将 *akt1* 与癌症的发生直接关联起来。*mapk* 通路是多种信号通路的交汇中心,在许多细胞增殖、癌变、炎症、凋亡等相关信号通路中起到关键作用,可产生多种效应^[25]。*stat3* 响应细胞刺激而介导多种基因表达,该基因的突变和自身免疫疾病与高免疫球蛋白 E 综合征有关^[26]。赵迪克^[27]研究发现青蒿琥酯通过 *tp53* 靶点,上调 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,使下游 Caspase-3 表达增加,进而通过增进 p53 通路炎症细胞的凋亡来治疗 UC。王艳红等^[28]研究发现,复发性结肠炎大鼠结肠组织中 *c-Jun* 表达明显升高。*fos* 对肠黏膜细胞和肝具有保护作用,可增强机体免疫力^[29]。以上基因均参与了 PUC 的调控,也为鹤榆止泻散治疗 PUC 提供了科学依据。

3.3 鹤榆止泻散干预猪溃疡性结肠炎的 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

GO 功能分析发现鹤榆止泻散治疗 PUC 主要生物过程包括:对脂多糖的调控、细胞对化学应力和氧化应激的反应、酶结合等。通过这些生物过程,药物作用于相关靶点来发挥药效^[25]。KEGG 通路分析发现鹤榆止泻散通过癌症信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号转导通路、PI3K/Akt 信号通路等发挥作用。最新研究表明,PI3K 通过第二信使 PIP3 与 Akt 的 PH 结构域结合,引起 Akt 构象改变,对细胞分化、增殖、凋亡等过程进行调节^[30]。方培植等^[31]发现炎症状态下,PI3K/Akt-mTOR 信号通路过度活化,在 UC 中发挥重要作用。何秋月等^[32]研究发现具核梭杆菌通过结直肠癌细胞 HCT116 促进 TNF- α 诱导细胞损伤、死亡,阐述了 TNF 信号通路在引发 UC 过程中的重要作用。白介素-17(IL-17)作为重要的促炎细胞因子之一,在多种炎症反应及自身免疫性疾病病理过程中发挥关键作用^[33]。王丽丹等^[34]研究发现,青黛与苦参碱配伍通过调控 IL-6, TGF- β , ROR γ t 与 STAT3 水平,从而抑制 Th17 细胞分化,抑制 IL-7 释放,改善 Th17/Treg 免疫失衡,发挥治疗溃疡性结肠炎的作用。有研究发现影响 UC 相关的信号通路主要包括 JAK/STAT, PI3K/Akt, MAPKs, TGF- β /Smad, Wnt, NF- κ B 等^[35-41],这些通路与前期 KEGG 富集分析通路是一致的。

3.4 活性化合物与核心基因分子对接

分子对接结果表明鹤榆止泻散主要活性成分与筛选出的 *rela*, *esr1*, *akt1*, *tp53*, *jun*, *mapk1*, *fos* 核心靶点均有较好的结合活性,构象稳定,说明鹤榆止泻散可能通过多靶点发挥疗效,初步验证了预测结果。

综上所述,本研究首次采用网络药理学和分子对接技术证实鹤榆止泻散中多种药物的活性成分通过不

同类型的靶蛋白对多种通路进行调控, 从而治疗 PUC, 并体现出中药复方对疾病治疗的系统性与整体性的特点。鹤榆止泻散通过多成分、多靶点与多途径来干预猪溃疡性结肠炎, 为阐明鹤榆止泻散干预溃疡性结肠炎的具体机制提供了依据, 为鹤榆止泻散在后期兽医临床上的应用奠定了基础。

参考文献:

[1] 陈星, 王清静, 王蕾, 等. 仔猪溃疡性结肠炎模型的建立 [J]. 饲料工业, 2013, 34(19): 24-27.

[2] 张声生. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 891-895.

[3] 李健. 中药复方鹤榆止泻散急性毒性、药效学及其颗粒剂型质量控制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[4] LI X, WEI S Z, NIU S Q, et al. Network Pharmacology Prediction and Molecular Docking-Based Strategy to Explore the Potential Mechanism of HuanglianJiedu Decoction Against Sepsis [J]. Computers in Biology and Medicine, 2022, 144: 105389.

[5] SIMAYI J, NUERMAIMAITI M, WUMAIER A, et al. Analysis of the Active Components and Mechanism of ShufengJiedu Capsule Against COVID-19 Based on Network Pharmacology and Molecular Docking [J]. Medicine, 2022, 101(1): e28286.

[6] FENG S, WANG T, FAN L M, et al. Exploring the Potential Therapeutic Effect of Eucommia Ulmoides-Dipsaci Radix Herbal Pair on Osteoporosis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology [J]. RSC Advances, 2022, 12(4): 2181-2195.

[7] HU Y L, LIU S, LIU W Y, et al. Potential Molecular Mechanism of Yishen Capsule in the Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology and Molecular Docking [J]. Diabetes, Metabolic Syndromeand Obesity: Targets and Therapy, 2022(15): 943-962.

[8] 姚昆鹏, 刘起立, 石静, 等. 基于生物信息学及分子对接研究温阳振衰颗粒治疗慢性心力衰竭的潜在分子机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1365-1371.

[9] 袁可欣, 谭艺, 张成玲, 等. 基于网络药理学和分子对接的“当归-川芎”药对作用机制研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(10): 77-83.

[10] 王亚锋, 夏晓黎, 马艳萍, 等. 基于网络药理学和分子对接研究小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(22): 1-10.

[11] 叶坤, 雷敏, 谢欣, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨黄芪建中汤治疗腹泻型肠易激综合征的作用机制研究 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(15): 1814-1824.

[12] 刘雨, 郭煜晖, 李艳丽, 等. 基于网络药理学的淫羊藿总黄酮治疗溃疡性结肠炎作用机制研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(4): 454-463.

[13] 李玉鹏. 基于网络药理学的养血汤治疗膝骨关节炎的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.

[14] KAPLAN GG. The Global Burden of IBD: From 2015 to 2025 [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015, 12(12): 720-727.

[15] 陈碧涛. 苦参碱对溃疡性结肠炎患者 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13(5): 313-315.

[16] 曲一帆. 山奈酚缓解小鼠溃疡性结肠炎的肠道微生态机理研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.

[17] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究 [J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 80-86, 94.

[18] 谢春燕, 谢刚, 季语竹. 柚皮素通过 miR-22 抑制 NLRP3 炎症小体并减轻溃疡性结肠炎大鼠模型肠屏障损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(9): 1573-1581.

[19] 王琪, 李坤伟, 周长征. 木犀草素的药理作用及制剂研究进展 [J]. 北京联合大学学报, 2022, 36(1): 59-63.

[20] 严展鹏. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨木犀草素对结直肠癌的化学预防作用及机理研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2014.

- [21] 季宇彬, 姜薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 7-8.
- [22] 王迪, 刘路路, 史学文. 苦参-地榆治疗溃疡性结肠炎活性成分和潜在靶点的网络药理学 [J]. 世界中医药, 2021, 16(16): 2401-2407.
- [23] 李毅斌, 蔡军伟, 刘靖华. RelA/p65 的翻译后修饰及其对 NF- κ B 转录活性的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(11): 977-983.
- [24] SAITO S, KATO J, HIRAOKA S, et al. DNA Methylation of Colon Mucosa in Ulcerative Colitis Patients: Correlation with Inflammatory Status [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2011, 17(9): 1955-1965.
- [25] 余元勋, 鲍远程, 王爱玲. 中国疾病信号通路靶向治疗学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2013.
- [26] 翟艳会, 朱向东, 杨意, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 *STAT3* 基因和蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2710-2713.
- [27] 赵迪克. 基于网络药理和分子对接法探讨青蒿琥酯对溃疡性结肠炎的药效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [28] 王艳红, 丁义兰, 杨孝来, 等. 葡萄籽原花青素对复发性结肠炎大鼠结肠组织中 *c-Jun*、*c-Fos* 表达的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(9): 992-998.
- [29] 谢建新, 顾岩, 刘银坤, 等. 联合应用生长激素和谷氨酰胺对短肠大鼠小肠粘膜上皮细胞基因表达的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(5): 431-433.
- [30] 唐苗, 卢倩, 刘衡, 等. 溃疡性结肠炎相关信号通路的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1642-1647.
- [31] 方培植, 黄会云, 张涛, 等. PI3K/Akt-mTOR 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(7): 802-806.
- [32] 何秋月, 段勇, 牛敏, 等. 具核梭杆菌通过 NF- κ B 信号通路促进结直肠癌细胞 HCT116 中 TNF- α 诱导的炎症性改变 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(6): 448-454.
- [33] 瞿芳芳, 钱友存. 研究揭示 IL-17 信号通路调控新机制 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(4): 420.
- [34] 王丽丹, 吕冠华, 黄荣伟, 等. 青黛、苦参配伍对溃疡性结肠炎大鼠 Th17 细胞分化主要调控因子的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7): 1636-1640.
- [35] 王宝家, 杨宇, 唐洪屈, 等. TGF- β 1/Smads 信号蛋白在溃疡性结肠炎大鼠肺损害中的表达及意义 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3966-3969.
- [36] 钟宇, 郑学宝, 叶华, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/NF- κ B 通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1450-1456.
- [37] 毕殿勇, 贾育新, 成映霞, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎模型大鼠 IL-1 β 、IL-4 及 p38MAPK 基因蛋白表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 7-11.
- [38] 张涛, 梁建英, 黄会云, 等. Wnt/ β -catenin-TCF 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变分子机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1536-1537.
- [39] 储浩然, 王宇, 全理, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(8): 633-639.
- [40] 黄育生, 刘媛, 钟如帆, 等. 肠激安方对 IBS-D 大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 今日药学, 2017, 27(8): 505-509, 516.
- [41] 郭军雄, 汪斌, 马丽, 等. p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 709-715.