

黄连厚朴汤改善溃疡性结肠炎的网络药理学机制分析

王佳俊, 杨显娟, 王立映, 付尹, 王建*

(成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611100)

[摘要] 目的:基于网络药理学及动物实验,对黄连厚朴汤治疗溃疡性结肠炎(UC)的主要活性成分及其潜在的作用机制进行探讨。方法:运用中药系统药理分析平台(TCMSP)和BATMAN-TCM数据库初步获取黄连厚朴汤的活性成分,结合TCMSP、SwissADME和SwissTargetPrediction平台筛选其中的主要活性成分,并预测其靶点。借助基因表达综合数据库(GEO)检索相关芯片以获得疾病基因。取药物靶点与疾病基因交集,筛选黄连厚朴汤治疗UC的潜在治疗靶点。利用Cytoscape 3.7.2软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”相互作用网络图,同时,将潜在治疗靶点导入DAVID 6.8网站做基因本体(GO)生物学过程(BP)分析以预测相关的生物学过程。最后通过动物实验对主要生物学过程进行验证。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测黄连厚朴汤对小鼠结肠组织炎症因子的影响;使用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关凋亡蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X的蛋白质(Bax)、Bcl-2、胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)的表达;运用IVIS系统检测活性氧(ROS)在各组小鼠结肠组织的含量。结果:该研究共筛选出黄连厚朴汤19个活性成分,涉及32个UC潜在治疗靶点及158个生物学过程;动物实验结果表明,黄连厚朴汤可以通过抑制炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达、降低凋亡蛋白含量、调控ROS表达以发挥抗UC作用。结论:该研究揭示了网络药理学预测并指导实验设计的合理性,证实黄连厚朴汤可以通过参与免疫炎症、细胞凋亡、ROS等生物过程发挥效用,为黄连厚朴汤治疗UC的机制研究提供依据。

[关键词] 网络药理学; 黄连厚朴汤; 溃疡性结肠炎; 炎症; 活性氧; 细胞凋亡

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0217-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220711 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220322.0903.007.html>

[网络出版日期] 2022-03-23 8:46

Mechanism of Huanglian Houputang on Ulcerative Colitis by Network Pharmacology and Experimental Verification

WANG Jiajun, YANG Xianjuan, WANG Liying, FU Yin, WANG Jian*

(State Key Laboratory of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the active components and underlying mechanism of Huanglian Houputang (HHD) against ulcerative colitis (UC) based on network pharmacology and animal experiments. **Method:** The active components of HHD were preliminarily obtained from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) and screened out by TCMSP, SwissADME, and SwissTargetPrediction, and their targets were predicted. Relevant microarrays were searched for disease genes with the help of Gene Expression Omnibus (GEO). The common targets of HHD and disease

[收稿日期] 2021-11-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873023);成都中医药大学创新团队校项目(CXTD2018004);成都中医药大学西南特色中药资源重点实验室开放研究基金项目(2020XSGG025)

[第一作者] 王佳俊,在读硕士,从事中药药性理论与应用研究,E-mail:526632532@qq.com

[通信作者] *王建,教授,博士生导师,从事中药药性理论与应用研究,E-mail:jianwang08@163.com

genes were screened out to obtain the potential targets of HHD against UC. The drug-active component-target-disease network was constructed using Cytoscape 3.7.2. The potential therapeutic targets were imported into the DAVID 6.8 for GO-Biological process (GO-BP) analysis to predict related biological processes which were subsequently verified by the animal experiment. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the effect of HHD on inflammatory factors in colon tissues of mice. Western blot was used to detect the protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate-specific protease 3 (Caspase-3). The IVIS system was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS) in colon tissues of mice in each group. **Result:** Nineteen active components of HHD were screened out, involving 32 potential therapeutic targets against UC and 158 biological processes. The results of the animal experiment showed that HHD exerted its anti-UC effect by inhibiting the expression of inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin-1 β (IL-1 β), reducing the content of apoptotic proteins, and regulating the expression of ROS. **Conclusion:** This study revealed the rationality of predictions and guidance of network pharmacology in experimental design, and confirmed that HHD could exert its effects by participating in biological processes such as immune inflammation, apoptosis, and ROS, which is expected to provide a basis for the mechanism research of HHD in the treatment of UC.

[Keywords] network pharmacology; ulcerative colitis, inflammation; reactive oxygen species; apoptosis

溃疡性结肠炎(UC)是一种发病原因尚不十分明确的非特异性炎症性肠病,主要涉及遗传、免疫失调、环境、肠道菌群等多方面因素。本病在临床上具有病程长、反复发作、迁徙不愈等特点,严重影响患者的生活质量及生命健康^[1]。目前依据患者病情常采用5-氨基水杨酸、糖皮质激素及免疫抑制剂等进行治疗,患者长期使用易产生耐药性且多有副作用。随着对UC发病机制的深入研究及中医药现代化的长久发展,从中医药宝库中寻找高效、低毒的抗UC药物具有重要意义。

从我国传统医学的角度分析UC属“泄泻”“痢疾”“肠风”“脏毒”等范畴,中医学李任先、田河海等认为UC以湿热互结的症状为主,且在中医临床证型中以大肠湿热最为常见^[2-3]。而中医治疗湿热痢疾的基本原则是以燥湿清热为主,施以清热燥湿药,辅以理气、行血、补脾药。黄连厚朴汤出自《普济方》卷一三三引《德生堂方》,是由黄连、厚朴组成的复方,主治伤寒,发热烦渴,大便自利。通过数据挖掘分析得知黄连与厚朴均为当代国医大师治疗UC的高频用药,且频次均为排名前15的中药^[4]。有研究报道,与厚朴联用后可增强黄连对腹泻小鼠的止泻作用,同时减轻黄连苦寒败胃之性^[5]。黄连与厚朴1:1配伍能增强肠道的免疫反应,改善体内氧化应激水平与急性炎症^[6-7]。此外,吴安国^[8]指出黄连厚朴配伍能同时增强两药主要化学成分小檗碱与厚朴酚在Caco-2细胞模型中的吸收及转运。由此可知,黄连与厚朴对胃肠道的保护作用涉及多

方面因素。但目前对两药联用并且从动物和分子水平来系统阐述其抗UC的作用机制的研究较少,需要进一步研究。

以“黄连”“厚朴”为关键词检索知网、万方等数据库,可以看出大部分研究主要集中在黄连或厚朴的配伍机制、数据挖掘、临床用药等研究上,对黄连厚朴汤研究甚少。本文将研究重点放在黄连厚朴汤原方改善UC的疗效和关键环节,结合网络药理学预测潜在的生物学过程,并辅以相应的实验验证,为后续的临床与研究提供依据。

1 材料

1.1 试验药物 黄连、厚朴药材购于成都荷花池药材市场,经成都中医药大学李敏教授鉴定为毛茛科黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎,木兰科厚朴或者凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* var. *biloba* 的干燥干皮、枝皮及根皮。称取中药材黄连 45 g、厚朴 30 g,合并2次煎煮液并浓缩至 0.5 g·mL⁻¹。依据课题前期研究^[5],将黄连厚朴汤给药剂量定为 5 g·kg⁻¹,(相当于临床等效剂量的2倍),灌胃的给药剂量为 10 mL·kg⁻¹。

柳氮磺胺吡啶(SASP,上海信宜天平药业有限公司,批号09180709);葡聚糖硫酸钠(DSS,上海西宝生物科技有限公司,批号0T1001A)。SASP灌胃给药剂量为 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹(临床等效剂量)。

1.2 动物 SPF级C57BL/6J雄性健康小鼠,体质量22~24 g(动物合格证号SCXK-2019-0010,北京斯贝福生物技术公司)。饲养于成都中医药大学药理实

实验室动物房,在标准实验条件[温度(25±2)°C,湿度(60±5)%,12 h/12 h昼/夜循环]下饲养。实验场地为成都中医药大学国家中医药管理局中药药理三级科研实验室(No.TCM-09-315)。动物福利和实验程序严格按照《实验动物管理和使用指南》(中国科学技术部,2016)进行。实验动物通过成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号2013-05)

1.3 试剂 B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X的蛋白质(Bax)、Bcl-2、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)一抗(美国GeneTex公司,批号分别为GTX109683、GTX109683、GTX110543);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔多克隆抗体免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZB-2301);内参β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Affinity公司,批号T0022);蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号101920210524);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海优选生物技术有限公司,批号YX-W-C202);肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京酶免实业有限公司,批号分别为MM-0132M1、MM-0163M1、MM-0132M1),L-012探针(日本和光纯药工业株式会社,批号SKL7311),其他常规试剂均来自成都科恩实验器材有限公司。Neofuge 1600R型低温离心机(上海力申科学仪器有限公司),DG5032型酶标仪(南京华东电子集团),1658033型电泳仪(美国Bio-Rad公司),Vortex3型涡旋混匀器(德国IKA公司),JA5003型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),IVIS Spectrum型多功能成像系统(美国珀金埃尔默公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 黄连厚朴汤活性成分的收集及潜在靶点的预测 检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和BATMAN(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)数据库合并检索黄连、厚朴的化学成分信息,以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18为初筛标准,并结合两药相关文献,对未在数据库中筛选到却报道有生物活性和药理作用的成分,也纳入候选活性成分中,所有候选成分通过SwissADME数据库,将符合Lipinski五倍率法则和GI absorption为“High”的成分作为最终活性成分。借助SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)

进行活性成分的靶点预测,收集整理“Probability”>0.1的靶点数据作为黄连厚朴汤活性成分的作用靶点。

2.1.2 UC相关靶点预测 在GEO数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)中检索GSE22307基因芯片,通过GEO2R工具分析该芯片中正常健康小鼠与UC模型小鼠(自由饮用6 d 3%DSS)的差异表达基因,以表达差别较大(|log₂FC|>1, P_{adj}<0.05)的基因构建疾病靶点库用作后续分析。

2.1.3 黄连厚朴汤治疗UC潜在治疗靶点的筛选 将黄连厚朴汤的作用靶点和UC疾病靶点利用韦恩分析工具(<http://www.graphbio1.com/>)以获取活性成分治疗UC的潜在治疗靶点。

2.1.4 黄连厚朴汤治疗UC潜在治疗靶点的生物过程分析 将活性成分与UC的潜在治疗靶点导入DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中,进行基因本体生物学过程(GO-BP)富集分析,基因名称选择为“OFFICE_GENE_SYMBOL”,物种选择为“Homo sapiens”,GO数据库选择为“GOTERM_BP_DIRECT”。通过富集分析,进一步了解黄连厚朴汤改善UC的具体机制。以P<0.05为筛选标准,按照富集基因数从大到小排序,选取前15条GO-BP分析结果上传至微生信云平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/?p=1>),进行数据可视化处理,其中圆圈代表基因数,颜色代表富集显著性。

2.2 动物实验验证

2.2.1 动物实验 小鼠适应性喂养3 d后,将40只小鼠随机分为4组,空白组(10只)、UC模型组(10只)、SASP组(10只)、黄连厚朴汤组(10只)。本实验采用小鼠自由饮用3%DSS水溶液进行造模,以小鼠体质量变化联合疾病活动指数(DAI)分值判断模型成功与否^[9-10]。实验过程分为预给药3 d和给药联合造模7 d两部分,共持续10 d。实验第10天,模型小鼠精神萎靡、体质量显著减轻、DAI分值显著升高(P<0.05, P<0.01),进行小鼠活体成像检测。

2.2.2 小鼠体质量及DAI分值指标检测 在实验过程中,每天记录小鼠的体质量、粪便性状及隐血情况,并参照Koji Maruta方法^[11]评分,评分标准见表1。

2.2.3 活性氧(ROS)检测 药物联合造模7 d后,各组挑选其中3只小鼠用于活体成像检测,具体操作将小鼠用异氟烷麻醉后取出结肠部位并放在黑色卡纸上,然后将提前配置好的L-012探针溶液滴在结肠上,使用IVIS Spectrum系统检测6 min后结肠

表1 DAI评分标准

Table 1 DAI scoring standards

评分	体质量下降/%	粪便性状	粪便隐血
0	无	正常	隐血阴性
1	1~5	粪便成形,但易黏附	弱阳性
2	5~10	半成形或软便	阳性
3	10~15	粪便呈泥浆状	强阳性
4	>15	腹泻,粪便黏附于肛门	便血

光信号强度。L-012探针使用纯水配置,质量浓度为 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,注射体积为 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 炎症因子含量及脾脏指数 将各组剩余小鼠麻醉后,取出小鼠距肛门1 cm处结肠组织 2 cm^2 ,分成两部分,其中一部分用于促炎因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的检测。同时取出小鼠脾脏,以脾脏质量除以小鼠体质量计算脾脏指数。

2.2.5 凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3含量的检测 收集另一部分结肠组织以提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,经凝胶电泳、转膜、封闭、洗涤后,孵育相应一抗(1:1 000)和二抗(1:5 000),显影后经Image J软件量化灰度值,与内参 β -actin的比值用

于后续统计分析。

2.2.6 统计学分析 数据结果导入试用版GraphPad Prism 8.3软件,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄连厚朴汤活性成分及靶点和疾病靶点的预测结果 通过TCMSP数据库和BATMAN数据库及相关文献检索,共获得黄连成分48个,厚朴成分139个,其中符合TCMSP和SwissADME筛选标准(Lipinski五倍率法则)的有黄连11个,厚朴8个,见表2。将这19个活性成分以SMILES的格式导入SwissTargetPrediction数据库中,共获得384个预测靶点,去除重复后,最终得到154个药物的潜在治疗靶点。通过GEO2R分析基因芯片GSE22307中正常健康小鼠与UC模型小鼠的差异表达基因,得到1 119个疾病相关靶点。将药物的潜在治疗靶点与基因相关靶点经韦恩图分析,得到交集靶点32个,即为黄连厚朴汤改善UC的潜在治疗靶点,见增强出版附加材料。

表2 黄连厚朴汤主要活性成分

Table 2 Main active components of Huanglian Houputang (HHD)

编号	英文名称	中文名称	来源	Lipinski五倍率法则	胃肠吸收
HP1	methyl linoleate	亚油酸甲酯	厚朴	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	高
HP2	p-cymene	对伞花烃	厚朴	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	高
HP3	magnolol	厚朴酚	厚朴	Yes; 0 violation	高
HP4	honokiol	和厚朴酚	厚朴	Yes; 0 violation	高
HP5	10,13-octadecadienoic acid methyl ester	10,13-十八二烯酸甲酯	厚朴	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	高
HP6	eucalyptol	桉叶油醇	厚朴	Yes; 0 violation	高
HP7	obovato	和厚朴新酚	厚朴	Yes; 0 violation	高
HP8	1,4-cineole	1,4-桉叶素	厚朴	Yes; 0 violation	高
HL1	berberine	小檗碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL2	berberrubine	小檗红碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL3	epiberberine	表小檗碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL4	(R)-canadine	四氢小檗碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL5	berlambine	氧化小檗碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL6	corchoroside A	黄麻苷A	黄连	Yes; 1 violation: MW>500	高
HL7	magnograndiolide	广玉兰内酯	黄连	Yes; 0 violation	高
HL8	palmatine	巴马汀	黄连	Yes; 0 violation	高
HL9	quercetin	槲皮素	黄连	Yes; 0 violation	高
HL10	coptisine	黄连碱	黄连	Yes; 0 violation	高
HL11	worenine	甲基黄连碱	黄连	Yes; 0 violation	高

3.2 黄连厚朴汤活性成分治疗 UC 的生物学过程

将32个潜在治疗靶点导入DAVID数据库中以预测黄连厚朴汤治疗UC的相关生物学过程,结果显示潜在治疗靶点主要富集在炎症反应、RNA聚合酶II启动子转录的正调控、细胞死亡的正调控、对缺

氧的反应等生物过程上,对前15条生物学过程进行归纳分析,发现其中有9条属于免疫炎症反应、细胞凋亡、ROS范畴,提示黄连厚朴汤抗UC的作用机制可能与其对ROS、炎症及凋亡因子的调控有关,见表3。

表3 潜在治疗靶点的前15条GO-BP富集结果

Table 3 Top 15 GO-BP enrichment results of Potential therapeutic target

基因本体编号	生物学过程条目	归类	富集数/个	lgP
GO:0006954	inflammatory response	免疫炎症	10	-7.75
GO:0032968	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	-	9	-3.51
GO:0006955	immune response	免疫炎症	8	-5.03
GO:0010942	positive regulation of cell death	细胞凋亡	7	-7.28
GO:0001666	response to hypoxia	ROS	7	-6.2
GO:0010628	positive regulation of gene expression	-	7	-5.14
GO:0006915	apoptotic process	细胞凋亡	7	-3.29
GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	ROS	6	-7.85
GO:0030198	extracellular matrix organization	-	6	-4.56
GO:1903587	angiogenesis	-	6	-4.30
GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	ROS	6	-3.66
GO:0007155	cell adhesion	-	6	-2.85
GO:1904806	oxidation-reduction process	ROS	6	-2.37
GO:2000647	negative regulation of cell proliferation	细胞凋亡	5	-5.99
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	-	5	-5.39

3.3 黄连厚朴汤对 UC 小鼠的药效学研究

3.3.1 黄连厚朴汤对 UC 模型小鼠体质量及 DAI 分值的影响

造模联合给药后,与空白组比较,模型组小鼠体质量显著下降,DAI分值明显升高($P < 0.05$),造模成功。与UC模型组比较,黄连厚朴汤组小鼠体质量明显升高,DAI分值明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示黄连厚朴汤可逆转UC小鼠体质量下降和DAI分值上升的趋势,见表4、表5。

造模联合给药后,与空白组比较,模型组小鼠体质量显著下降,DAI分值明显升高($P < 0.05$),造模成功。与UC模型组比较,黄连厚朴汤组小鼠体质量明显升高,DAI分值明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示黄连厚朴汤可逆转UC小鼠体质量下降和DAI分值上升的趋势,见表4、表5。

表4 黄连厚朴汤对 UC 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of HHD on body weight of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
空白组		24.98±0.45	24.71±0.78	24.78±0.74	24.55±0.67	24.58±0.83	24.89±0.83
UC模型组	0.3%	24.90±0.51	25.07±0.47	24.96±0.43	24.94±0.41	24.94±0.51	25.02±0.46
SASP组	0.4	24.16±1.15	24.26±0.82	24.30±0.66	24.22±0.94	24.16±0.83	24.42±1.00
黄连厚朴汤组	5	24.91±0.75	24.50±0.88	24.60±0.77	24.29±0.29	24.60±0.61	25.10±0.87
组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
空白组		25.04±0.71	25.20±0.71	25.39±0.60	25.65±0.87	25.83±0.70	
UC模型组	0.3%	25.04±0.51	24.81±0.77	24.07±0.94	22.88±1.58	21.94±1.96 ¹⁾	
SASP组	0.4	24.45±0.98	24.31±0.89	24.23±1.02	23.39±1.42	22.60±2.09	
黄连厚朴汤组	5	24.96±0.91	24.99±0.80	24.98±0.93	24.67±1.17	24.85±0.91 ²⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

3.3.2 黄连厚朴汤对 UC 小鼠结肠组织 ROS 的影响

IVIS Spectrum系统检测结果显示,与空白组比较,模型组小鼠远端结肠光强度信号显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄连厚朴汤组小鼠结肠光强度显著下降($P < 0.01$)。提示黄连厚朴汤可以降低

UC小鼠远端结肠ROS的含量,抑制过度的氧化应激发生见图1、表6。

3.3.3 黄连厚朴汤对 UC 模型小鼠炎症因子的影响

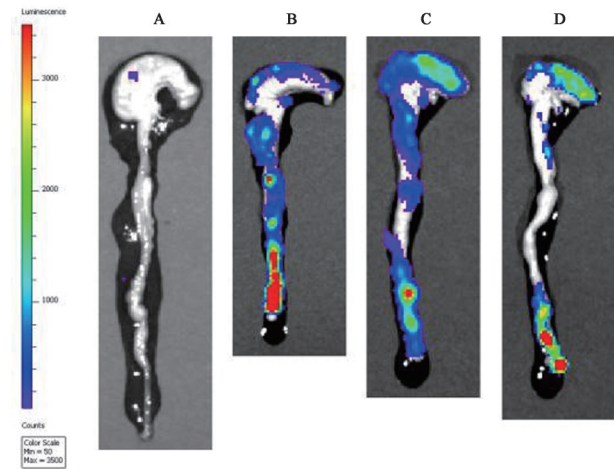
与空白组比较,UC模型组小鼠结肠组织促炎因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6明显升高($P < 0.05$);与UC模型

表5 黄连厚朴汤对UC小鼠DAI分值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 Effect of HHD on DAI score of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
空白组		0.41±0.22	0.15±0.18	0.41±0.28	0.22±0.17	0.41±0.28	0.19±0.24	0.30±0.31	0.41±0.36	0.33±0.41	0.22±0.24
UC模型组	0.3%	0.19±0.24	0.30±0.11	0.37±0.20	0.48±0.24	1.07±0.28	1.00±0.24	1.74±0.40	1.67±0.73	2.48±0.29	2.81±0.47 ¹⁾
SASP组	0.4	0.11±0.24	0.11±0.17	0.41±0.28	0.41±0.22	0.96±0.35	0.59±0.40	1.00±0.37	1.00±0.41	1.48±0.69	1.52±0.88 ²⁾
黄连厚朴汤组	5	0.30±0.26	0.00±0.00	0.37±0.48	0.48±0.18	0.89±0.33	0.89±0.37	0.78±0.33	0.78±0.41	0.78±0.47	0.63±0.31 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表6同)



注: A. 空白组; B. UC模型组; C. SASP组; D. 黄连厚朴汤组(图2、图3同)

图1 黄连厚朴汤对UC小鼠结肠组织ROS的影响

Fig. 1 Effect of HHD on ROS in colonic tissue of UC mice

表7 黄连厚朴汤对UC小鼠脾脏指数及炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7-10$)

Table 7 Effect of HHD on spleen index and inflammatory factors in UC mice ($\bar{x} \pm s, n=7-10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾指数	IL-6/ng·g ⁻¹	IL-1β/ng·g ⁻¹	TNF-α/ng·g ⁻¹
空白组		0.03±0.00	69.37±8.59	101.02±11.91	587.60±28.86
UC模型组	0.3%	0.06±0.01 ²⁾	94.64±12.06 ¹⁾	145.69±15.71 ¹⁾	695.51±35.54 ¹⁾
SASP组	0.4	0.05±0.01 ⁴⁾	80.00±12.32 ³⁾	101.17±10.15 ³⁾	624.21±35.39 ³⁾
黄连厚朴汤组	5	0.04±0.01 ⁴⁾	84.13±8.08	113.42±12.00 ³⁾	592.31±24.88 ³⁾

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8同)

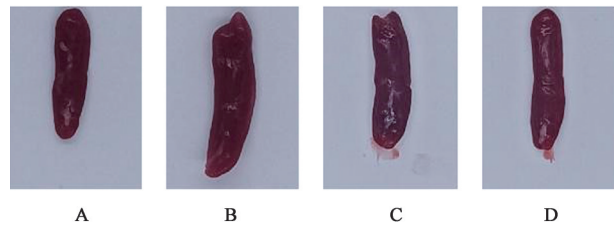


图2 黄连厚朴汤对UC小鼠脾脏形态的影响

Fig. 2 Effect of HHD on spleen morphology of UC mice

3.3.4 黄连厚朴汤对UC小鼠凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3的影响 为进一步验证网络药理学中所预测的凋亡相关过程,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)方法检测了小鼠结肠组织中促凋亡蛋白Bax、Caspase-3和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达情

表6 各组小鼠结肠组织单位面积荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Fluorescence intensity per unit area of mouse colon tissue in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	单位面积荧光强度
空白组		211.33±54.15
UC模型组	0.3%	4 234.50±283.19 ¹⁾
SASP组	0.4	2 639.67±629.05 ²⁾
黄连厚朴汤组	5	3 173.33±214.57 ²⁾

况。UC模型组小鼠结肠中Bax、Caspase-3较空白组明显上调($P<0.05, P<0.01$), Bcl-2显著下调($P<0.01$);给药后,与模型组相比,黄连厚朴汤能显著下调UC小鼠Bax、Caspase-3的含量($P<0.05$)。见图3,表8。

组比较,黄连厚朴汤组小鼠TNF-α、IL-1β的水平明显下调($P<0.05$), IL-6水平有下调趋势,但差异无统计学意义。同时,检测各组小鼠的脾脏指数,与空白组比较,UC模型组小鼠脾脏指数极显著增大,而黄连厚朴汤给药能显著逆转这种趋势($P<0.01$)。见表7,图2。

4 讨论

近几年我国的溃疡性结肠炎发病率呈倍速增长态势(年百分比变化增加14.9%),已经逐渐成为一个既常见且疑难的重大疾病^[12-13]。传统中药复方在治疗UC方面因其不良反应小、耐药性低等优势,在临床上得到广泛肯定和应用^[14-16]。黄连厚朴汤中黄连具有清热燥湿止痢功效,是治疗UC常用的中

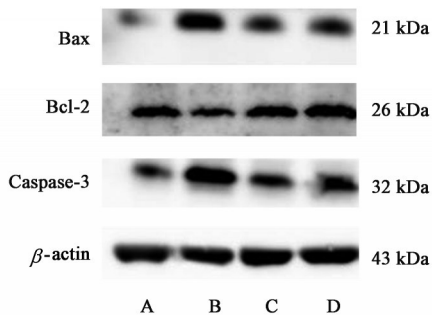


图3 黄连厚朴汤对UC小鼠结肠组织凋亡相关蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of HDD on apoptosis-related proteins in colonic tissue of UC mice

表8 各组小鼠结肠组织凋亡相关蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Expression of apoptosis-related protein in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Caspase-3 /β-actin	Bax /β-actin	Bcl-2 /β-actin
空白组		0.40±0.06	0.31±0.06	1.19±0.15
UC模型组	0.3%	0.98±0.17 ²⁾	0.75±0.11 ¹⁾	0.78±0.08 ²⁾
SASP组	0.4	0.61±0.04 ³⁾	0.49±0.08 ³⁾	1.02±0.10 ³⁾
黄连厚朴汤组	5	0.71±0.05 ⁴⁾	0.51±0.04 ³⁾	0.98±0.07

药,与厚朴配伍后,在降低黄连的寒凉之性的同时增强其燥湿功效,是临床治疗湿热中阻的基础药之一。

利用网络药理学,对黄连厚朴汤中活性化合物进行分析,构建活性成分-靶点-疾病图,得到网络中关键成分度值排名前五的有槲皮素、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚和巴马汀。这一结果与课题组前期中基于DisGeNET和OMIM构建的网络药理学研究结果大致相同。此外,查阅相关文献得知,以上5种活性成分均具有抗炎、抗溃疡的药理作用^[17-21],结果表明预测出的成分很有可能是黄连厚朴汤治疗UC的关键活性成分。

通过对关键靶点进行GO-BP分析,筛选出15个关键生物学过程,其中炎症反应、免疫反应、细胞死亡的正调控、对缺氧的反应、氧化还原过程、凋亡过程、一氧化氮生物合成过程的正调控、活性氧代谢过程、细胞增殖的负调控9条生物学过程与ROS、免疫炎症反应或凋亡过程相互关联。过度的免疫活动是UC发病的最终环节,当肠道发生过度免疫活动时,促炎因子如TNF-α、IL-6、IL-1β等大量浸润到上皮细胞,进而破坏肠屏障,最终产生免疫损伤效应,导致UC发生^[22-24]。生理情况下,肠上皮细胞的适度凋亡与肠隐窝下肠干细胞的增殖分化间维持着动态平衡,协同肠屏障形成稳固的防御体

系,当UC发生时,肠上皮细胞过度凋亡,同时抑制肠干细胞向上皮细胞的分化,从而破坏肠上皮完整性,肠腔外物质直接接触固有层淋巴细胞,加重免疫炎症反应^[25-27]。ROS是体内一类氧的单电子还原产物,包括超氧阴离子(O₂⁻·)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(·OH)以及一氧化氮等,其通过氧化DNA、蛋白质、脂质和其他细胞结构来调控细胞的凋亡,在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用^[28-29]。研究表明^[30],在肠道的慢性炎症反应和反复免疫过程中,氧化应激开始占据主导地位,高水平的ROS会导致持续性黏膜炎症并降低肠腔内氧化还原功能,导致结肠纤维化等肠外症状。预测的生物过程结果与目前已知UC相关文献的报导基本吻合,说明网络药理学的筛选具有一定的可行性。然而,GO-BP分析这一结果与李红燕等^[31]研究存在差异,猜测可能是由于两者对于成分对映靶点的筛选数据库有所不同而造成结果偏倚,提示今后在网络药理学研究过程中需要整合成分的靶点数据库,及时的更新以减少不同预测路径导致的误差。

采用动物实验验证相关生物学过程,旨在说明黄连厚朴汤干预UC形成的部分机制。结果表明经黄连厚朴汤给药后,UC模型小鼠结肠组织内促炎因子TNF-α、IL-1β和促凋亡蛋白Bax、Caspase-3显著降低,抗凋亡蛋白Bcl-2有升高趋势。ROS检测结果显示,黄连厚朴汤能清除蓄积在UC模型小鼠远端结肠部位的高浓度ROS,从而使小鼠恢复正常的氧化还原功能。以上结果提示黄连厚朴汤能通过调节ROS表达、降低细胞凋亡、抑制炎症反应等生物学过程干预UC形成。本文局限性部分在于尚未对进一步的富集通路进行实验验证分析,且在采取实验验证过程中方法较为单一,未对同一指标进行多种方式联用,提示今后网络药理学的实验验证部分应当同时注重所验证的指标及实验,为所预测结果提供更加精准的实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BOPANNA S, ANANTHAKRISHNAN A N, KEDIA S, et al. Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(4): 269-276.
- [2] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(2): 105-111, 120.

- [3] 张泽丹,王凤云,张佳琪,等. 溃疡性结肠炎湿热证动物模型的建立与评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(1): 66-74.
- [4] 许琳,王凤云,李娟娟,等. 基于数据挖掘的国医大师治疗溃疡性结肠炎用药规律研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(5): 14-19.
- [5] 郑新光,傅勇,王建,等. 黄连配厚朴对小鼠胃肠动力及止泻作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1585-1587.
- [6] 杨显娟,付尹,王建,等. 黄连-厚朴配伍对溃疡性结肠炎模型大鼠的保护作用及对凋亡因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 83-91.
- [7] 杨显娟,付尹,王佳俊,等. 黄连-厚朴配伍抑制 PI3K/Akt 信号通路改善 TNBS 诱导的大鼠溃疡性结肠炎研究[J]. 中草药, 2021, 52(15): 4587-4597.
- [8] 吴安国. 黄连厚朴配伍主要化学成分在 Caco-2 细胞模型中的吸收与转运研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [9] 石磊,李军祥,史瑞,等. 溃疡性结肠炎的动物模型研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(12): 107-112.
- [10] BILSBOROUGH J, FIORINO M F, HENKLE B W. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis[J]. Expert Opin Drug Discov, 2021, 16(5): 567-577.
- [11] MARUTA K, WATANABE C, HOZUMI H, et al. Nicotine treatment ameliorates DSS-induced colitis by suppressing MAcCAM-1 expression and leukocyte recruitment [J]. J Leukoc Biol, 2018, 104(5): 1013-1022.
- [12] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies[J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [13] SATO H, SHIBATA M, SHIMIZU T, et al. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion[J]. Neuroscience, 2013, 248: 345-358.
- [14] 张国霞,李宇飞,王晓锋,等. 李华山教授治疗溃疡性结肠炎的临证经验[J]. 中国医药导报, 2021, 18(20): 120-123.
- [15] 房子铭. 疏肝理气健脾方治疗肝郁脾虚型缓解期溃疡性结肠炎的临床观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2020.
- [16] 崔引航. 中药内服治疗脾虚湿蕴型溃疡性结肠炎的用药规律研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [17] 王锋,姜宁,罗颖,等. 和厚朴酚药理作用研究新进展[J]. 中药材, 2021(5): 1271 - 1275.
- [18] 季双双,刘子号,王梦媛,等. 盐酸小檗碱辅助治疗溃疡性结肠炎及对炎症因子影响的 meta 分析[J]. 海南医学院学报, 2022(2): 1-15.
- [19] JU S, GE Y, LI P, et al. Dietary quercetin ameliorates experimental colitis in mouse by remodeling the function of colonic macrophages via a heme oxygenase-1-dependent pathway[J]. Cell Cycle, 2018, 17(1): 53-63.
- [20] CHEN H, FU W, CHEN H, et al. Magnolol attenuates the inflammation and enhances phagocytosis through the activation of MAPK, NF- κ B signal pathways in vitro and in vivo[J]. Mol Immunol, 2019, 105: 96-106.
- [21] ZHANG X J, YUAN Z W, QU C, et al. Palmatine ameliorated murine colitis by suppressing tryptophan metabolism and regulating gut microbiota [J]. Pharmacol Res, 2018, 137: 34-46.
- [22] 杜丽萍,李菊兰,唐彬,等. 巨细胞病毒肠道感染对溃疡性结肠炎 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(23): 3547-3551.
- [23] 庄渊钊,颜景佳,谢文钦,等. 右美托咪定缓解 TNBS 诱导的结肠炎大鼠炎症介质的分泌和 NLRP3 炎症小体的活化[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(23): 2832-2837.
- [24] 刘笃佳,王媛媛,马旭. 溃疡性结肠炎的流行病学研究进展[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2017, 29(3): 214-217.
- [25] 沈雁,王章流,郑华君,等. 小檗碱对溃疡性结肠炎模型小鼠肠上皮细胞凋亡的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(12): 992-996, 封2.
- [26] 尹鑫,褚卫建,李岩岩. 溃疡性结肠炎患者血清钙卫蛋白、白细胞介素-17 及 C 反应蛋白水平的变化及其临床意义[J]. 现代实用医学, 2021, 33(8): 1009-1011.
- [27] 羊丹,徐菁,陈保银,等. 溃疡性结肠炎患者血清 MUC1、sTREM-1 水平与病情严重程度及临床结局的关系[J]. 山东医药, 2021, 61(28): 38-41.
- [28] 李宁,程功梅,田艳艳. 活性氧对坏死性小肠结肠炎病变进展的影响及相关机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(11): 1128-1132.
- [29] 陈丽霏,张世倡,肖林,等. 炎症性肠病中活性氧及抗氧化的研究进展[J]. 中国当代医药, 2020, 27(9): 24-27.
- [30] NADPH Oxidases: Methods and Protocols[M]. New York: Springer New York, 2019, 1982.
- [31] 李红燕,陈海,谢倩,等. 基于网络药理学和分子对接探究黄连、厚朴配伍调控溃疡性结肠炎作用机制[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(8): 2749-2761.

[责任编辑 顾雪竹]