哈萨克医经典名方吾孜德克治疗肠炎的物质基础及作用机制Δ

贾丽萍[1*]，程　波[2]，史玉柱[3]，何　江[2]，王　雪[3]，杨伟俊[2#]（1.新疆农业大学食品科学与药学学院，乌鲁木齐 830004；2.新疆维吾尔自治区药物研究所新疆维吾尔药重点实验室，乌鲁木齐　830004；3.新疆维吾尔自治区药物研究所药理Ⅱ实验室，乌鲁木齐　830004）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）13-1577-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.13.07

摘　要　目的　探讨哈萨克医经典名方吾孜德克（WZDK）治疗肠炎的物质基础及潜在作用机制。**方法**　利用液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）技术分析WZDK中的化学成分。通过网络药理学和分子对接技术筛选WZDK的主要化学成分并进行靶点预测，通过体内实验验证WZDK对急性肠炎的治疗作用及作用靶点。采用葡聚糖硫酸钠诱导构建小鼠急性肠炎模型，给药期间观察小鼠一般状况并计算疾病活动指数（DAI）评分，通过苏木素-伊红染色、实时荧光定量PCR验证各组小鼠肠道病理改变及核心靶点mRNA的表达。**结果**　通过LC-MS/MS技术分析共得到316种化学成分；通过网络药理学分析，核心靶点主要包括白细胞介素1β（IL-1β）、蛋白激酶B1（AKT1）、肿瘤蛋白p53（TP53）、IL-6、肿瘤坏死因子（TNF）等；分子对接结果显示，白桦脂酸、lappadilactone、木香烃内酯、去氢木香内酯等化学成分与核心靶点结合稳定。体内实验结果显示，与模型组比较，高剂量（5.00 g/kg）WZDK能显著降低小鼠的DAI评分（$P<0.05$），改善其结肠组织炎症细胞浸润、黏膜组织损伤，显著下调其结肠组织中IL-6、TNF-α、IL-1β和TP53 mRNA的表达（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　WZDK中的白桦脂酸、lappadilactone、木香烃内酯、去氢木香内酯等多种化学成分可能通过下调结肠组织中TNF-α、IL-6、IL-1β、TP53 mRNA表达，发挥改善肠道局部炎症因子失衡、修复结肠黏膜组织损伤的作用。

关键词　吾孜德克；哈萨克医；经典名方；网络药理学；分子对接；肠炎

Material basis and mechanism of Kazakh classic prescription Wuzdekh in the treatment of enteritis

JIA Liping[1], CHENG Bo[2], SHI Yuzhu[3], HE Jiang[2], WANG Xue[3], YANG Weijun[2]（1. School of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830004, China; 2. Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 3. Laboratory Ⅱ of Pharmacology, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the material basis and potential mechanism of Kazakh classic prescription Wuzdekh (WZDK) in the treatment of enteritis. **METHODS** LC-MS/MS technology was used to analyze the chemical components in WZDK. Through network pharmacology and molecular docking technology, the main chemical components of WZDK were screened and the target was predicted; therapeutic effect and target of WZDK on acute enteritis were verified through *in vivo* experiments. The acute enteritis model of mice was induced by dextran sulfate sodium salt; the general condition of the mice was observed during administration and the disease activity index (DAI) score was calculated; pathological changes of the intestine and mRNA expression of core target were validated by HE staining and quantitative real-time PCR. **RESULTS** A total of 316 chemical components were obtained by LC-MS/MS. The core targets of network pharmacological analysis mainly included interleukin 1β (IL-1β), protein kinase B1 (AKT1), tumor protein p53 (TP53), IL-6, tumor necrosis factor (TNF) and so on. The results of molecular docking showed that chemical components such as mairin, lappadilactone, costunolide and dehydrocostus lactone were stable in binding to the core target. The results of *in vivo* experiment showed that, compared with model group, high dose (5.00 g/kg) of WZDK could significantly reduce the DAI score ($P<0.05$), improve inflammatory cell infiltration and mucosal tissue damage of colon tissue, and significantly down-regulated mRNA expressions of IL-6, TNF-α, IL-1β and TP53 in colon tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Chemical components of WZDK such as mairin, lappadilactone, costunolide and dehydrocostus lactone may play the role of improving the imbalance of local inflammatory factors in the intestine and repairing damage of colonic mucosal tissue by down-regulating mRNA expressions of TNF-α, IL-6, IL-1β and TP53 in colon tissue.

KEYWORDS　Wuzdekh; Kazakh medicine; classic prescription; network pharmacology; molecular docking; enteritis

Δ**基金项目** 新疆维吾尔自治区重大科技专项（No.2022A03003-3）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药肠病的作用机制。E-mail：1696515583@qq.com

＃**通信作者** 研究员，博士生导师，博士。研究方向：新疆地产中药民族药。E-mail：wilfred3106@163.com

肠炎通常由细菌、病毒和寄生虫等因素引起，临床表现为恶心呕吐、腹痛腹泻、稀便血便等，部分患者有发热或里急后重的感觉。肠炎按病程长短可分为急性和慢性肠炎，其发病率极高[1]，且患病人群呈年轻化趋势，给人们的健康和生活质量带来了极大影响[2]。目前，肠炎的临床治疗药物主要有柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸、糖皮质激素类等，但均会引发不良反应或存在一定的局限性[3]。近年来中药民族药因疗效好、毒副作用小[4—5]，逐渐受到研究者的关注。挖掘民族药方多成分、多靶点的特性，是发现治疗药物的有效途径。

吾孜德克（Wuzdekh，WZDK）出自哈萨克族古代医学经典《奇帕格尔巴彦》[6]（汉译名《医药志》），现载于《中国民族药医院制剂目录（第四卷）》[7]。该方由白屈菜Chelidonii Herba、木香Aucklandiae Radix、拳参Bistortae Rhizoma 3味中药材配伍组成，已在新疆阿勒泰地区应用数十年，具有清热解毒、止痢、止痛之功效，可用于急慢性胃肠炎及消化不良引起的腹泻腹痛等症状，疗效确切。但WZDK治疗肠炎的药效物质基础、信号通路、作用靶点等尚未阐明，缺乏实验研究基础。本研究通过液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）技术联合网络药理学和分子对接技术，筛选WZDK的主要化学成分并进行靶点预测，构建“化学成分-靶点-疾病”可视化网络，并通过小鼠急性肠炎模型进行靶点验证，以期为全面深入地探索WZDK治疗肠炎的物质基础和作用机制提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Vanquish型超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120型高分辨质谱仪、Heraeus Fresco17型离心机均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；BSA124S-CW型电子天平购自德国Sartorius公司；JXFSTPRP-24型研磨仪购自上海净信实业发展有限公司；YM-080S型超声仪购自深圳市方奥微电子有限公司；SpectraMax M2型多功能酶标仪购自美谷分子仪器（上海）有限公司；CFX96型实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）扩增仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

肠炎宁片（批号2109007，规格0.42 g/片）购自江西康恩贝中药有限公司；美沙拉嗪肠溶片（批号210607，规格0.25 g/片）购自葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司。木香饮片（批号8210913001，产地云南）购自河北百合健康药业有限公司，拳参饮片（批号201002，产地甘肃）购自安徽百岁堂中药饮片有限公司，白屈菜饮片购自安徽省亳州中药材专业市场，以上3种饮片经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定，分别为菊科木香*Aucklandia lappa* Decne.的干燥根茎、蓼科拳参*Polygonum bistorta* L.的干燥根茎、罂粟科白屈菜*Chelidonium majus* L.的干燥地上部分。

葡聚糖磷酸钠（dextran sulfate sodium salt，DSS）购自北京酷来搏科技有限公司；羧甲基纤维素钠购自上海山浦化工有限公司；人尿粪隐血测定试剂盒（批号C027-1-1）购自南京建成生物工程研究所；苏木素染色液、伊红染色液均购自珠海贝索生物技术有限公司；小鼠磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）、白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）、IL-1β、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、蛋白激酶B1（protein kinase B1，AKT1）、肿瘤蛋白p53（tumor protein p53，TP53）引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；TransScrip一步式gDNA去除及cDNA合成试剂盒（批号AT311-03）、PerfectStart染料法荧光定量预混试剂盒（批号AQ601-02）均购自北京全式金生物技术股份有限公司；甲醇、乙腈、甲酸为质谱纯，其余试剂为实验室常用规格。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性C57BL/6小鼠，共70只，体质量18～22 g，由新疆医科大学动物实验中心提供，实验动物生产许可证号为SCXK（新）2018-0002。将小鼠分笼后常规饲养于新疆维吾尔自治区药物研究所动物房，饲养期间正常饮食。饲养环境温度为20～26 ℃，相对湿度为40%～60%，12 h/12 h明暗交替。适应性喂养1周后开始实验。本实验经新疆维吾尔自治区药物研究所实验动物伦理委员会批准后实施，伦理号为XJIMM-20220415001。

2 方法

2.1 WZDK的制备

取白屈菜饮片560 g、木香饮片420 g，加10倍量70%乙醇提取1 h×2次，以100目筛滤过，合并滤液，60 ℃减压浓缩得相对密度为1.20～1.25的醇提浸膏，备用。将白屈菜、木香药渣和拳参最粗粉560 g混合，加10倍量水提取1 h×2次，以100目筛滤过，合并滤液，60 ℃减压浓缩得相对密度为1.20～1.25的浸膏，与醇提浸膏合并（总得率为24.81%）；60 ℃真空干燥，粉碎过100目筛，再与乳糖按质量比1∶1.5的比例混匀，用80%乙醇制作软材，16目筛制粒，50 ℃干燥，16目筛整粒，制成1 000 g的WZDK（每1 g含生药1.54 g）。

2.2 WZDK化学成分分析

采用LC-MS/MS技术分析WZDK的化学成分。

2.2.1 供试品溶液的制备

精密称取WZDK 100 mg，加入提取液甲醇-水（4∶1，*V*/*V*）500 μL，涡旋30 s，45 Hz匀浆4 min，冰水浴超声（频率40 kHz，功率480 W）1 h，－40 ℃静置1 h后，于

4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤，备用。

2.2.2　色谱条件

采用Waters UPLC BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱，以0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（含1%甲酸，B）为流动相进行梯度洗脱（0～11.0 min，85%A→25%A；11.0～12.0 min，25%A→2%A；12.0～14.0 min，2%A；14.0～14.1 min，2%A→85%A；14.1～16.0 min，85%A）；流速为0.3 mL/min；进样量为5 μL。

2.2.3　质谱条件

以Xcalibur控制软件为检测器在正、负离子模式下扫描；锥孔气流速为35 arb，辅助气流速为15 arb；离子转移管温度为350 ℃；汽化器温度为350 ℃；全质谱分辨率为60 000，二级质谱分辨率为15 000；质量扫描范围为50～2 000 Da；碰撞能量为16/32/48 eV，正、负离子喷雾电压分别为5.5、－4.0 kV；采用L-2-氯苯丙氨酸（10 μg/mL）进行实时校正。

2.3　WZDK治疗肠炎的作用靶点预测

2.3.1　WZDK、肠炎靶点的获取

根据LC-MS/MS分析结果以及TCMSP数据库（https://tcmsp-e.com/tcmsp.php）中以生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、类药性（drug likeness，DL）≥0.18为筛选标准，获取WZDK的化学成分；通过TCMSP数据库、PhamMapper数据库（http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/）收集各成分对应靶点；通过GeneCards数据库（https://www.Genecards.org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org/），以“enteritis”为关键词获取肠炎的相关靶点，并去除重复靶点。

2.3.2　蛋白质互作网络及核心靶点的构建

利用微生信在线生物信息分析数据库（https://www.bioinformatics.com.cn/）获得交集靶点，将交集靶点导入到String数据库（https://cn.string-db.org/）中构建蛋白质互作网络（protein-protein interaction networks，PPI），限定物种为“Homo Sapiens”，设置最低置信度为0.9，下载对应的TSV格式文件并将其导入到Cytoscape 3.7.2软件中，以节点度值中位数的2倍为阈值，同时以度值、紧密度、介数中心度为阈值筛选核心靶点[8]。

2.3.3　富集分析

利用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）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）信号通路富集分析，选取条件为$P<0.01$，GO功能富集分析结果取前10位，KEGG信号通路分析结果取前30位，采用微生信在线生物信息分析数据库实现富集分析结果的可视化。

2.3.4　分子对接

通过TCMSP数据库下载中心度值、亲中心度值、综合排名前12位化学成分的MOL2格式结构文件，经AutoDock Tool 1.5.6软件加氢、定义原子类型处理后将文件保存为pdbqt格式，作为小分子化合物配体；通过PDB数据库（https://www.rcsb.org/）选择下载靶点蛋白的3D结构（PDB格式），去水、加氢处理后保存为pdbqt格式，作为受体；通过AutoDock Tool 1.5.6软件对配体和受体进行分子对接并计算结合能。若结合能<0 kcal/mol，表明配体分子能和受体蛋白自发结合；若结合能<－5 kcal/mol，表明配体分子与受体蛋白结合良好。结合能越小表明化合物和受体之间的相互作用越稳定[9]。采用Pymol软件对图像进行可视化分析。

2.4　体内验证实验

2.4.1　分组、建模与给药

将实验小鼠按体质量随机分为7组，分别为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组（阳性对照1，0.30 g/kg）、肠炎宁组（阳性对照2，1.38 g/kg）和WZDK低、中、高剂量组（1.25、2.50、5.00 g/kg），每组10只。各给药组小鼠的给药剂量均参考本课题组前期预实验结果设置。除正常对照组外，其余各组小鼠自由饮用4%DSS溶液7 d（每2 d更换1次新配制的DSS溶液）以诱导建立小鼠急性肠炎模型，若小鼠出现体质量下降、稀便、便血现象则表示小鼠急性肠炎模型构建成功[10]。在建立模型的同时，各给药组小鼠按照10 mL/kg给药体积灌胃相应药液（溶剂为0.5%羧甲基纤维素钠溶液），正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液；每天灌胃1次，连续10 d。

2.4.2　小鼠一般状况观察及疾病活动指数评分计算

每日于同一时间观察并记录小鼠体质量变化、精神状态、毛发色泽、粪便性状等一般状况。采用隐血测定试剂盒检测粪便隐血情况，并根据疾病活动指数（disease activity index，DAI）标准，计算各组小鼠的DAI评分，DAI评分＝（小鼠体质量下降百分比+粪便黏稠度+粪便隐血分数）/3[11]。

2.4.3　标本采集

末次给药后，所有小鼠禁食不禁水12 h，处死后分离结肠组织。将距肛门4 cm处的结肠组织（1～2 cm）放入4%多聚甲醛溶液中固定；剩余结肠组织分装于冻存管内，－80 ℃保存备用。

2.4.4　小鼠结肠组织病理学观察

采用苏木素-伊红（HE）染色法进行观察。小鼠结肠组织经4%多聚甲醛固定后，放入包埋盒，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切成厚度为4 μm的结肠组

织切片，经二甲苯脱蜡、梯度水化后进行HE染色，中性树胶封片，晾干。显微镜下观察小鼠结肠组织形态和病理损伤情况，以炎症细胞浸润、黏膜组织损伤（变性、萎缩、坏死等）、结肠隐窝破坏等病理组织学改变为主要观察指标。

2.4.5　小鼠结肠组织中核心靶点mRNA表达的检测

采用qPCR法进行检测。每组随机取3只小鼠冻存的结肠组织50 mg，加入Trizol试剂1 mL，按说明书操作提取总RNA，测定总RNA的浓度和纯度后，根据试剂盒说明书反转录得cDNA，以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系包括：上、下游引物各0.4 μL，2×Green qPCR SuperMix 10 μL，cDNA模板2 μL，无RNA酶水7.2 μL。PCR反应条件为：94 ℃预变性30 s；94 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各指标mRNA的表达水平，结果以正常对照组为标准进行归一化处理。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1　引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
GAPDH	上游引物：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游引物：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
TNF-α	上游引物：CCAAAGGGATGAGAAGTTCC	133
	下游引物：CTCCACTTGGTGGTTTGCTA	
IL-6	上游引物：TGATGCACTTGCAGAAAACAA	270
	下游引物：GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC	
IL-1β	上游引物：CAGCAGCATCTCGACAAGAG	217
	下游引物：AAAGAAGGTGCTTGGGTCCT	
AKT1	上游引物：GTGGCAAGATGTGTATGAGAAGA	243
	下游引物：ACTGGCTGAGTAGGAGAACTG	
TP53	上游引物：GCGTTGCTCTGATGGTGAC	235
	下游引物：GCGTGATGATGGTAAGGATGG	

2.5　统计学方法

采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析。计量资料满足正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，进一步的两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　WZDK化学成分分析结果

在负离子模式下共检测到134种化学成分，其中黄酮类成分25种，生物碱类成分4种，萜类成分17种，苯丙素类成分21种，氨基酸、有机酸衍生物共11种，脂肪酸、脂肪酰类成分共14种，酚类成分14种，芳香族化合物、糖类、羟酸及其衍生物共7种，其他类成分21种。在正离子模式下共检测到182种化学成分，其中黄酮类成分19种，生物碱类成分49种，萜类成分59种，苯丙素类成分21种，酚类成分13种，脂肪酸、脂肪酰类成分4种，氨基酸、有机酸衍生物共5种，酯类、醌类、芳香族化合物共7种，其他类成分5种。

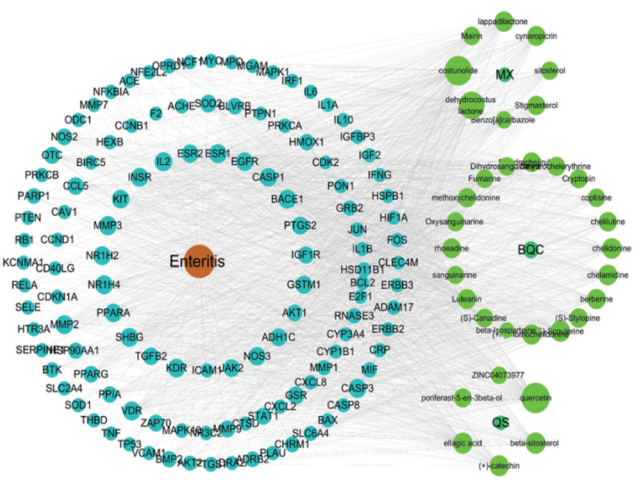
3.2　WZDK治疗肠炎的作用靶点预测结果

3.2.1　WZDK、肠炎靶点预测结果

结合LC-MS/MS分析结果及从TCMSP数据库中筛选出的符合OB≥30%、DL≥0.18标准的化学成分共有32种。此外，文献研究显示，木香烃内酯及去氢木香内酯2种化学成分对肠炎有一定改善作用[12—13]，故纳入。最终得到34种化学成分。通过TCMSP、PhamMapper数据库获取并去重后得到549个药物靶点。通过GeneCards、OMIM数据库，将所获靶点进行合并去重，共得到1 219个与肠炎密切相关的靶点。

3.2.2　PPI网络构建及核心靶点的筛选结果

将549个药物靶点和1 219个与肠炎密切相关的靶点取交集，共得到交集靶点（即治疗肠炎的潜在靶点）120个。将潜在靶点导入Cytoscape 3.7.2软件，绘制“化学成分-靶点-疾病”拓扑图，见图1。以节点度值中位数的2倍为阈值，同时以度值、紧密度、介数中心度为阈值筛选网络的核心靶点，排名前10位的核心靶点包括IL-1β、TNF、AKT1、TP53、IL-6等。结果见图2。



注：●节点代表WZDK治疗肠炎的潜在靶点；●节点代表WZDK中的化学成分；●节点代表肠炎，节点大小代表度值的大小。

图1　“化学成分-靶点-疾病”网络图

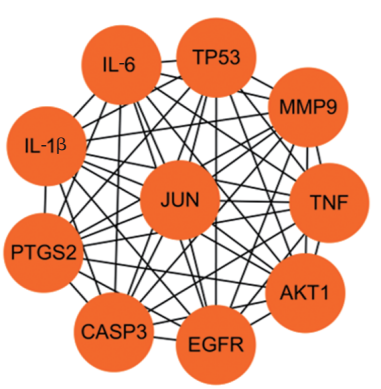
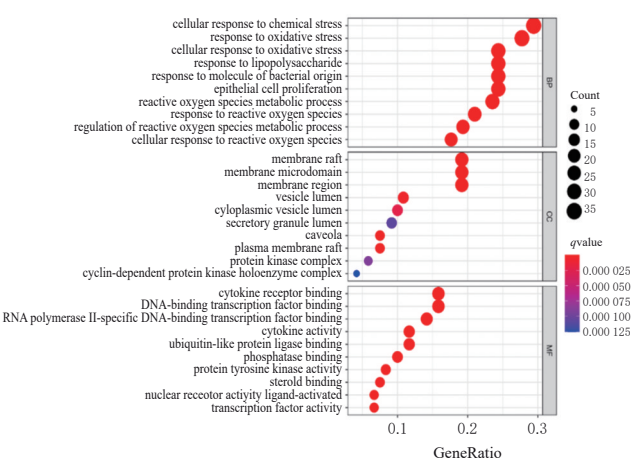


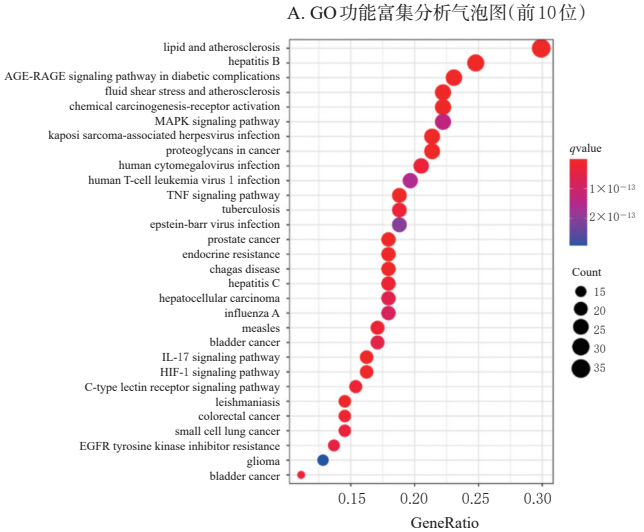
图2　核心靶点网络

3.2.3 GO功能富集和KEGG通路富集分析结果

通过GO功能富集共得到248个条目（$P<0.01$）。结果显示，生物过程（biological process，BP）主要涉及细胞对化学应激的反应（cellular response to chemical stress）、对氧化应激的反应（response to oxidative stress）等；细胞组成（cell composition，CC）主要涉及膜筏（membrane raft）、膜微域（membrane microdomain）等；分子功能（molecular function，MF）主要涉及细胞因子受体结合（cytokine receptor binding）、DNA结合转录因子结合（DNA-binding transcription factor binding）等，详见图3A。通过KEGG通路富集分析共得到153条信号通路（$P<0.01$），主要涉及促分裂原活化的蛋白激酶（MAPK）信号通路（MAPK signaling pathway）、TNF信号通路（TNF signaling pathway）、IL-17信号通路（IL-17 signaling pathway）、缺氧诱导因子1（hypoxia-inducible factor-1，HIF-1）信号通路（HIF-1 signaling pathway）等，详见图3B。该结果提示，WZDK中的化学成分可协同作用于多条信号通路，调控细胞因子受体结合、对化学应激的反应等，从而起到治疗肠炎的作用。



A. GO功能富集分析气泡图（前10位）



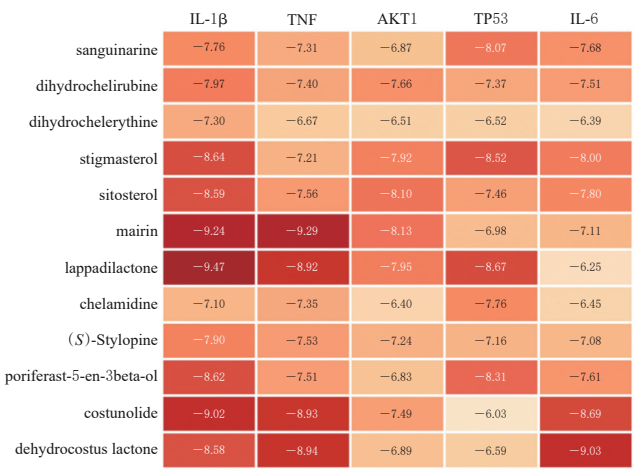
B. KEGG信号通路富集分析气泡图（前30位）

注：图中气泡大小、颜色与富集基因和显著性有关，气泡越大表示富集基因数目越多，颜色越深表示通路越显著。

图3 GO功能富集和KEGG通路富集分析气泡图

3.2.4 分子对接结果

选择综合排名前5位的关键蛋白与“化学成分-靶点-疾病”网络的中心度值、亲中心度值及等级值综合排名前12位的化学成分进行分子对接。结果显示，化学成分与核心靶点结合活性较好，其中化学成分白桦脂酸（mairin）、lappadilactone、木香烃内酯（costunolide）、去氢木香内酯（dehydrocostus lactone）等成分与核心靶点IL-1β（PDB编号lilb）、TNF（PDB编号4k8u）、AKT1（PDB编号7nh4）、TP53（PDB编号4xzs）、IL-6（PDB编号2e43）结合活性较高，可能是治疗肠炎的主要成分，详见图4。



注：对接分数越小则结合能越大，在图中颜色越深。

图4 分子对接结合能分数色阶图

3.3 体内实验验证结果

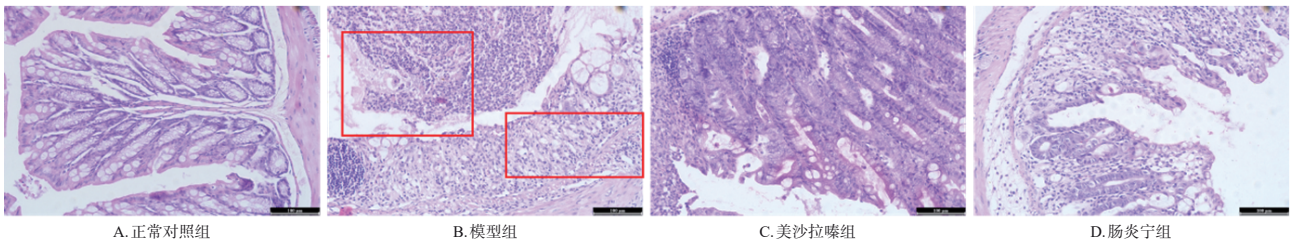
3.3.1 WZDK对小鼠一般状况及DAI评分的影响

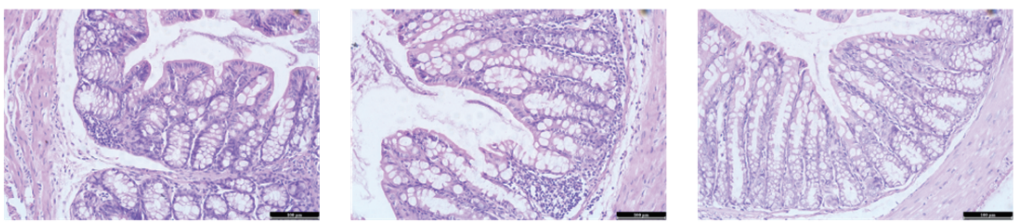
采用4%DSS诱导构建小鼠急性肠炎模型期间，正常对照组小鼠的粪便形态未见明显异常，其余各组小鼠均出现了腹泻、肉眼血便、脓便等症状，说明急性肠炎小鼠模型造模成功。

给药结束后，正常对照组、模型组、美沙拉嗪组、肠炎宁组、WZDK低剂量组、WZDK中剂量、WZDK高剂量组小鼠的DAI评分分别为0、（2.10±0.42）、（1.71±0.33）、（1.80±0.32）、（1.83±0.32）、（1.67±0.38）、（1.60±0.38）分。与正常对照组比较，模型组小鼠的DAI评分显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，WZDK中、高剂量组小鼠的稀便和血便情况明显改善，DAI评分显著降低（$P<0.05$）。

3.3.2 WZDK对小鼠结肠组织病理学的影响

正常对照组小鼠结肠组织结构基本正常，未见炎症细胞浸润、黏膜组织损伤等病理性改变。与正常对照组比较，模型组小鼠结肠可见不同程度的炎症细胞浸润、黏膜组织损伤、变性和坏死，部分可见隐窝破坏、消失，可见脱落坏死的组织，发生了严重的病理损伤。与模型组比较，各给药组小鼠结肠组织炎症细胞浸润减少，黏膜组织损伤减轻，部分可见隐窝破坏，病变程度有所减轻，尤其WZDK高剂量组改善作用明显。结果见图5。





注：红色框内结肠组织出现不规则炎症细胞浸润，结肠壁黏膜组织损伤变性。

图5　各组小鼠结肠组织病理学观察显微图（HE染色，×200）

3.3.3　WZDK对小鼠结肠组织中核心靶点mRNA表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠结肠组织中IL-6、TNF-α、IL-1β、AKT1 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，美沙拉嗪组和WZDK高剂量组小鼠结肠组织中IL-6、TNF-α、IL-1β、TP53 mRNA表达水平，肠炎宁组小鼠结肠组织中IL-6、TNF-α、IL-1β、AKT1 mRNA表达水平和WZDK低、中剂量组小鼠结肠组织中IL-1β mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2　各组小鼠结肠组织的核心靶点mRNA表达结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-6 mRNA	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA	TP53 mRNA	AKT1 mRNA
正常对照组	1.00±0.28	1.00±0.42	1.00±0.44	1.00±0.15	1.00±0.74
模型组	1.82±0.12[a]	2.53±0.67[a]	2.21±0.48[a]	1.50±0.66	4.82±0.85[a]
美沙拉嗪组	0.49±0.65[b]	0.89±0.51[b]	0.36±0.32[b]	0.32±0.10[b]	3.14±0.73
肠炎宁组	0.50±0.43[b]	0.97±0.15[b]	0.35±0.05[b]	0.78±0.27	2.40±1.06[b]
WZDK低剂量组	1.39±0.25	2.37±0.28	0.95±0.06[b]	0.92±0.23	4.68±0.68
WZDK中剂量组	1.04±0.50	1.93±0.54	0.47±0.35[b]	0.72±0.26	4.58±0.76
WZDK高剂量组	0.22±0.12[b]	1.00±0.42[b]	0.34±0.28[c]	0.37±0.16[b]	3.42±0.39

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

4　讨论

随着社会节奏的加快，不规律的饮食习惯和饮食结构的变化使我国肠炎发生率持续升高。WZDK具有悠久的人用历史，是疗效独特的中药候选药物，但关于WZDK治疗肠炎的作用机制，作者查阅文献未见报道。网络药理学以生物靶点为桥梁使药物与病症发生关联，来探索药物与疾病靶点之间的相互关系及相互作用，尤其适用于中药复方制剂的研究。

本研究结果显示，通过LC-MS/MS技术分析得到316种化学成分，结合TCMSP数据库及文献检索共筛选出34种化学成分，共得到治疗肠炎的潜在靶点120个。结合“化学成分-靶点-疾病”网络分析和分子对接结果表明，白桦脂酸、lappadilactone、木香烃内酯、去氢木香内酯等化学成分潜在作用靶点较多，且与核心靶点结合稳定。以上化合物均为木香的有效成分，具有抗炎和抗癌的作用[14]，因此笔者推测WZDK不仅可以缓解炎症反应保护肠道，而且可能具有潜在的预防结直肠癌发生的作用，进而控制肠炎的恶化。研究显示，白桦脂酸可抑制结肠癌HCT116和SW480细胞的增殖，且在20 mg/(kg·d)剂量下能够抑制结肠癌细胞皮下移植瘤的生长[15]；木香烃内酯、去氢木香内酯不仅具有抑制胃肠道平滑肌痉挛作用，还具有镇痛、止泻等作用[16]。拳参在我国一直被用于治疗腹泻、痢疾、急性胃肠炎等疾病，被称为“广谱抗菌草”，相关文献报道已从拳参中分离鉴定出158种化合物[17]。学者广泛研究的化合物有没食子酸、绿原酸等，其中没食子酸具有抗氧化、抗病原微生物的作用，相关学者验证了拳参水提物可抑制大肠埃希菌，并具有一定镇痛作用[18]。白屈菜的主要成分是生物碱，主要包括白屈菜红碱、白屈菜碱、二氢白屈菜红碱等[19]，在分子对接结果中白屈菜红碱也表现出较好的结合活性。徐香琴等[20]研究报道，白屈菜红碱对乙酸诱导的小鼠溃疡性结肠炎有治疗作用。张志宏[21]研究表明，白屈菜碱可通过抑制TNF-α诱导的核因子κB转录活性，同时抑制与细胞凋亡、增殖、炎症相关的蛋白质和mRNA表达。

KEGG通路富集分析结果显示，WZDK改善肠炎主要涉及TNF、MAPK等多条信号通路。TNF介导的通路在诱导上皮隐窝细胞凋亡中起关键作用。Goretsky等[22]研究发现，TNF在T细胞活化后诱导一氧化氮合成酶激活上皮细胞中的p53，使其稳定存在并发挥介导作用，促进上皮隐窝细胞凋亡。炎症是肠炎发展过程中至关重要的反应，核心靶点多为炎症方面的重要因子。AKT1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是磷脂酰肌醇3激酶

（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/AKT信号通路的核心蛋白，可通过PI3K/AKT信号通路调节炎症、免疫和细胞代谢，介导多种炎症细胞因子的信号转导，导致结肠黏膜受损，诱发结肠炎等肠道疾病[23]。TP53会抑制细胞分裂、诱导细胞凋亡，其突变在各种癌症中较常见。相关研究表明，TP53可作为筛选炎症性肠病与结直肠癌的生物标志物[24]。IL-6、IL-1β在免疫细胞的发育、分化以及调节免疫应答等方面发挥重要作用，过度表达会使肠上皮细胞电解质分泌失去平衡，通透性增加，中性粒细胞移行并浸润炎症部位，从而引起肠道肿胀、缩短、溃疡等病变，促进肠道的进一步恶化[25]，因此抑制炎症因子表达是治疗肠炎的重要策略。本研究体内实验验证结果表明，WZDK可改善急性肠炎模型小鼠稀便、便血现象，减轻肠壁的炎症细胞浸润现象，保护结肠组织屏障，同时可显著下调核心靶点中IL-6、TNF-α、IL-1β、TP53 mRNA的表达，这也进一步验证了网络药理学中的结果。

综上所述，WZDK中的白桦脂酸、lappadilactone、木香烃内酯、去氢木香内酯等多种化学成分可能通过下调结肠组织中TNF-α、IL-6、IL-1β、TP53 mRNA表达，发挥改善肠道局部炎症因子失衡、修复结肠黏膜组织损伤的作用。

参考文献

[1] KUMAZAKI M，USUKU S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama，Japan，between 2006 and 2012[J]. Arch Virol，2014，159（4）：761-771.

[2] KAPLAN G G. The global burden of IBD：from 2015 to 2025[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2015，12（12）：720-727.

[3] AHMAD H，KUMAR V L. Pharmacotherapy of ulcerative colitis-current status and emerging trends[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol，2018，29（6）：581-592.

[4] 肖四方，马小华，石国民，等. 抗痨颗粒治疗结核病分子机制的网络药理和实验验证[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（4）：205-211.

[5] 杜世拔，李国政，郑靓，等. 基于网络药理学的新加白虎汤治疗痛风性关节炎的作用机制及抗炎作用初步验证[J]. 药物评价研究，2022，45（2）：266-273.

[6] 乌太波依达克. 医药志[M]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生出版社，1994：346.

[7] 中央民族大学民族药医院制剂目录课题组. 中国民族药医院制剂目录：第四卷[M]. 北京：化学工业出版社，2021：114.

[8] 余秋香，李思雨，常安，等. 消食颗粒化学成分鉴定及其治疗功能性消化不良的潜在作用机制研究[J]. 中国药房，2022，33（23）：2874-2879.

[9] 龚普阳，郭瑜婕，李晓朋，等. 基于网络药理学与分子对接技术的金花清感颗粒防治新型冠状病毒肺炎的潜在药效物质研究[J]. 中草药，2020，51（7）：1685-1693.

[10] 王开，裴志花，胡桂学，等. 肠炎动物模型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2015，31（5）：704-706.

[11] CAO H Y，LIU J X，SHEN P，et al. Protective effect of naringin on DSS-induced ulcerative colitis in mice[J]. J Agric Food Chem，2018，66（50）：13133-13140.

[12] 宋洁，郭瑞芳，聂虹，等. 木香烃内酯对溃疡性结肠炎小鼠肠道免疫炎症的影响及其机制[J]. 广西医科大学学报，2021，38（12）：2300-2305.

[13] 陈媛媛. 去氢木香内酯对炎症小体的调控作用及机制研究[D]. 济南：山东中医药大学，2020.

[14] 田颖颖，李依林，田时秋，等. 去氢木香内酯激活凋亡与自噬抑制人肺癌A549细胞生长[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（2）：73-80.

[15] 黄飘. 白桦脂酸抑制Wnt通路和抗大肠癌作用的分子机制研究[D]. 上海：上海中医药大学，2020.

[16] 郑加梅，尚明越，王嘉乐，等. 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测[J]. 中草药，2022，53（13）：4198-4213.

[17] 王宏伟，刘冰晶，杜晓鹃，等. 拳参乙酸乙酯萃取部位的化学成分鉴定[J]. 中国药房，2017，28（25）：3494-3497.

[18] 崔健，赵奎君. 基于生物热动力学的拳参对大肠埃希菌抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（12）：57-61.

[19] 李纬博. 白屈菜生物活性化学成分的研究[D]. 咸阳：西北农林科技大学，2015.

[20] 徐香琴，黄松，杜先华，等. 白屈菜红碱对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（21）：171-174.

[21] 张志宏. 白屈菜碱对NF-κB活化及相应靶基因表达的影响[D]. 延吉：延边大学，2018.

[22] GORETSKY T，DIRISINA R，SINH P，et al. p53 mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD[J]. Am J Pathol，2012，181（4）：1306-1315.

[23] 胡万祥. 丝胶蛋白靶向Akt1调控PI3K/Akt/NF-κB信号通路保护STZ致损伤INS-1细胞的机制研究[D]. 承德：承德医学院，2022.

[24] DU L J，KIM J J，SHEN J H，et al. KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer：a meta-analysis[J]. Oncotarget，2017，8（13）：22175-22186.

[25] UNVER N，MCALLISTER F. IL-6 family cytokines：key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets[J]. Cytokine Growth Factor Rev，2018，41：10-17.

（收稿日期：2023-01-29　修回日期：2023-03-16）
（编辑：舒安琴）