肉苁蓉治疗炎症性肠病的作用机制预测及验证Δ

谯　明[1,2*]，朱　毅[1,2]，胡君萍[3]，杨建华[1,2#]（1.新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐　830011；2.新疆药物临床研究重点实验室，乌鲁木齐　830011；3.新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830017）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）21-2582-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.02

摘　要　目的　探究肉苁蓉治疗炎症性肠病（IBD）的作用机制。**方法**　借助中药系统药理学数据库与分析平台结合文献报道筛选肉苁蓉活性成分；采用Swiss Target Prediction平台获取活性成分靶点；采用GeneCards和OMIM数据库收集疾病靶点；构建蛋白质-蛋白质相互作用网络和“药物-成分-疾病-靶点”网络，筛选核心成分和核心靶点，然后进行基因本体（GO）、京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路分析，并对核心靶点和核心成分进行分子对接验证。建立IBD小鼠模型，分为模型组、阳性对照组（地塞米松，0.4 mg/kg）、肉苁蓉提取物组（100、200、400 mg/kg），另设空白对照组，每组8只。各组小鼠给予相应药物，每天1次，连续7 d。计算各组小鼠疾病活动指数（DAI）及结肠长度，观察小鼠结肠组织病理形态，检测小鼠结肠组织中炎症因子[白细胞介素6（IL-6）、IL-10、IL-1β、髓过氧化物酶（MPO）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]水平和核心靶点蛋白表达情况。**结果**　共得到肉苁蓉活性成分39个，肉苁蓉活性成分治疗IBD的潜在靶点232个；肉苁蓉治疗IBD的核心成分分别为槲皮素、苏齐内酯、β-谷甾醇、肉苁蓉苷H，核心靶点分别为TNF（肿瘤坏死因子）、AKT1（蛋白激酶B1）、STAT3（信号转导和转录激活因子3）、EGFR（表皮生长因子受体）、SRC（非受体酪氨酸激酶）。GO和KEGG通路分析结果显示，肉苁蓉治疗IBD的生物过程主要与蛋白质磷酸化、凋亡负调控等有关，主要涉及磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/AKT、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。分子对接结果显示，肉苁蓉核心成分与核心靶点的结合能均小于－4.7 kJ/mol。动物实验结果显示，经肉苁蓉提取物干预后，小鼠体重、结肠长度显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；DAI显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；结肠黏膜充血、水肿明显减轻，结肠组织病理学评分显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；结肠组织中IL-6、IL-1β、MPO、TNF-α水平和PI3K、磷酸化PI3K（p-PI3K）、EGFR、TNF-α、STAT3、磷酸化STAT3（p-STAT3）、AKT1、磷酸化AKT1（p-AKT1）、SRC蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），IL-10水平均显著升高（$P<0.01$）。**结论**　肉苁蓉具有治疗IBD的作用，其具体作用机制可能与调节SRC/EGFR/PI3K/AKT信号通路有关。

关键词　肉苁蓉；炎症性肠病；网络药理学；分子对接；实验验证

Mechanism prediction and verification of *Cistanche deserticola* in the treatment of inflammatory bowel disease

QIAO Ming[1,2], ZHU Yi[1,2], HU Junping[3], YANG Jianhua[1,2]（1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research, Urumqi 830011, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the mechanism of *Cistanche deserticola* in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **METHODS** The active components of *C. deserticola* were screened based on TCMSP and literature reports. The targets of active ingredients were obtained via Swiss Target Prediction platform. Then the disease targets were obtained by searching GeneCards and OMIM databases. PPI network and “drug-compound-disease-target” network were constructed. The core components and core targets were screened. GO and KEGG enrichment analyses were performed, and molecular docking verification was conducted for core targets and core components. The IBD mice model was established and divided into model group, positive control group (dexamethasone, 0.4 mg/kg) and *C. deserticola* extract group (100, 200, 400 mg/kg); blank control group was set, with 8 mice in each group. Each group was given relevant medicine, once a day, for 7 consecutive days. Disease activity index (DAI) score and colon length were calculated, and the pathological morphology of the colon of mice was observed. The levels of inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), IL-

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No. 82160772）

＊**第一作者** 副主任药师，博士。研究方向：新疆特色药用植物开发与应用。E-mail：1532527694@qq.com

＃**通信作者** 教授，主任药师，博士。研究方向：天然产物研究与开发。E-mail：yjh_yfy@163.com

1β, IL-10, myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor-α (TNF-α)] in colon tissue, and protein expressions of core targets were detected. **RESULTS** A total of 39 active ingredients and 232 potential targets of *C. deserticola* in the treatment of IBD were obtained. The treatment of IBD with *C. deserticola* might be related to core components such as quercetin, suchilactone, β-sitosterol and cistanoside H, and core targets such as TNF, AKT1, STAT3, EGFR and SRC. GO and KEGG pathway analysis predicted that the biological processes of *C. deserticola* in the treatment of IBD were mainly related to protein phosphorylation, and negative regulation of apoptosis, mainly involving PI3K/AKT and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance signaling pathways. The results of molecular docking showed that the binding energy between the core components and core target of *C. deserticola* was less than −4.7 kJ/mol. Animal experiment results showed that after intervention with *C. deserticola* extract, the body weight and colon length of mice significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while DAI decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The congestion and edema of colon mucosa were significantly reduced, and the pathological score of colon tissue was significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the levels of IL-6, IL-1β, MPO and TNF-α, as well as the protein expressions of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), EGFR, TNF-α, STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3), AKT1, phosphorylated AKT1 (p-AKT1) and SRC in colon tissue were reduced significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the level of IL-10 was significantly increased in model group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** *C. deserticola* may alleviate IBD by regulating the SRC/EGFR/PI3K/AKT signaling pathway.

KEYWORDS *Cistanche deserticola*; inflammatory bowel disease; network pharmacology; molecular docking; experimental verification

炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）是一类胃肠道慢性、非特异性、炎症性疾病的统称，包含克罗恩病和溃疡性结肠炎2个亚型[1]。IBD是我国消化系统常见疑难疾病之一，也是消化系统疾病基础研究和临床诊疗的重点、热点和难点。近20年，我国IBD发病率逐年上升，预计到2025年可达15万人，居亚洲之首[2]。目前普遍认为，遗传易感性、环境因素、机体免疫功能障碍、肠道菌群改变及肠黏膜屏障功能受损是IBD发生发展的主要原因[3]。IBD的临床治疗以药物治疗为主，主要包括氨基水杨酸类、抗生素、皮质激素类和免疫抑制剂等[4]，但上述药物容易导致多种不良反应，且患者长期使用会产生耐受性，停药后易复发[5]。

中药作为我国传统的优势资源，在治疗慢性疾病方面具有疗效明确、复发率低、不良反应少等优势。有“沙漠人参”之称的肉苁蓉来源于列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C. Ma或管花肉苁蓉 *C. tubulosa*（Schenk）Wight的干燥带鳞叶的肉质茎，是新疆特色优势药用资源，主要含有苯乙醇苷类、萜类等活性成分，具有补肾壮阳、润肠通便的作用，被广泛用于肠道疾病的治疗[6-7]。苯乙醇苷类成分是2020年版《中国药典》（一部）规定的用于肉苁蓉鉴别和含量测定的指标性成分（主要为松果菊苷和毛蕊花糖苷）[8]。研究显示，松果菊苷可通过促进肠上皮细胞增殖而抑制细胞凋亡改善小鼠结肠炎[9]；毛蕊花糖苷作为自由基清除剂可减缓大鼠结肠炎进展[10]；肉苁蓉总苷可通过抑制炎症因子表达防治IBD[11]。但是肉苁蓉中具体是哪些化学成分通过哪些靶点和信号通路对IBD起到治疗作用尚未有研究报道。为此，本研究拟通过网络药理学方法结合分子对接技术，对肉苁蓉治疗IBD的潜在作用机制进行预测，并对预测结果进行药效学验证，从而系统地阐明肉苁蓉治疗IBD的分子机制，以期为其后续开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

本研究所用动物为雄性SPF级C57BL/6小鼠，共48只，购自新疆医科大学动物实验中心，体重18～20 g，实验动物生产许可证号为SCXK（新）2023-0004，实验动物使用许可证号为SYXK（新）2023-0001。小鼠饲养在温度为（22±2）℃，相对湿度为50%～70%，循环照明12 h的环境中。本研究严格遵守动物福利和新疆医科大学实验动物伦理委员会伦理要求（审批号为20210301-177）。

1.2 主要药品与试剂

肉苁蓉提取物（*Cistanche* extract，CE；纯度≥85%，其中松果菊苷≥40%，毛蕊花糖苷≥16%；批号20230103）购自新疆和田帝辰医药生物科技有限公司；葡聚糖硫酸钠（DSS，相对分子量36 000～50 000，批号C16013701）购自上海麦克林生化科技有限公司；粪便隐血定性检测试剂盒（批号ml1095013）购自上海酶联生物科技有限公司；地塞米松对照品（纯度≥98%，批号54231207002）购自北京索莱宝科技有限公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介

素6（interleukin-6，IL-6）、IL-10、IL-1β、髓过氧化物酶（myeloperoxidase，MPO）酶联免疫吸附测定试剂盒（批号分别为88-7324、88-7064、88-7105、88-7013、EMMPO）均购自美国Invitrogen公司；兔源TNF-α、蛋白激酶B1（protein kinase B1，AKT1）、磷酸化AKT1（p-AKT1）、信号转导和转录激活因子3（signal transduction and activator of transcription 3，STAT3）、磷酸化STAT3（p-STAT3）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、非受体酪氨酸激酶（SRC）、磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）、磷酸化PI3K（p-PI3K）和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别GB11188、GB11689、GB150002、GB11176、GB150001、GB115662、GB112343、GB112544、GB11525、GB23303）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

本研究所用主要仪器有Multiskan Go型全波长酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），RM2016型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司），Gel.Doc.XR型凝胶电泳成像分析系统、Mini Trans-Blot型蛋白印迹仪（美国Bio-Rad公司）。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 活性成分及靶点预测

通过TCMSP平台（http://lsp.nwu.edu.cn/）筛选肉苁蓉活性成分（以口服利用度≥30%、类药性≥0.18为筛选条件）[12]，并补充已有文献报道的具有抗IBD作用的肉苁蓉活性成分。采用Swiss Target Prediction平台检索肉苁蓉活性成分靶点（probability参数＞0），去除重复项后得到肉苁蓉活性成分靶点。以“inflammatory bowel disease”为检索词，分别从GeneCards数据库（http://www.genecards.org/）和OMIM数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim）收集疾病靶点，删除重复项后得到潜在靶点。

2.1.2 韦恩图绘制及“药物-成分-靶点-疾病”交互网络构建

借助Venny 2.1在线分析工具将肉苁蓉活性成分靶点与潜在靶点取交集，得到肉苁蓉治疗IBD的潜在靶点。采用Cytoscape 3.9.1软件构建“药物-成分-疾病-靶点”多层次网络图并进行拓扑学分析。选取度值（即degree值）排前4位的成分作为肉苁蓉治疗IBD的核心成分。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络绘制

将肉苁蓉治疗IBD的潜在靶点导入STRING数据库（http://string-db.org/），将物种限定为“Homo sapiens”，交互分数限定为＞0.4，绘制蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，并计算各靶点的degree值，以degree值排名前5位的靶点作为核心靶点。

2.1.4 潜在靶点的功能和通路富集分析

将肉苁蓉治疗IBD的潜在靶点导入DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov）进行基因本体（gene ontology，GO）、京都基因和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路分析，并利用微生信在线平台（https://www.bioinformatics.com.cn/）进行可视化展示。以富集到的相应通路的靶点数和$-\lg P$值衡量富集程度；GO分析中选取排前10位的条目绘制柱状图，KEGG分析中选取排前20位的通路绘制气泡图。

2.1.5 分子对接

采用AutoDock Vina软件对筛选出的核心靶点（TNF、AKT1、STAT3、EGFR和SRC）与核心成分（槲皮素、苏齐内酯、β-谷甾醇、肉苁蓉苷H）进行分子对接验证。结合自由能越低，表明该核心成分与受体蛋白结合的亲和力越高[13]。

2.2 动物实验验证

2.2.1 造模、分组及给药

雄性C57BL/6小鼠（6～7周）48只，适应性饲养1周后按体重分为空白对照组、模型组、阳性对照组（地塞米松，0.4 mg/kg，剂量根据临床等效剂量换算）和CE低、中、高剂量组（100、200、400 mg/kg，剂量参考文献[14]设置），每组8只。空白对照组小鼠每天正常进食饮水，模型组和给药组小鼠每天自由饮用3%DSS溶液以造模，自由进食。造模同时，CE各剂量组小鼠灌胃相应剂量的CE（临用时以蒸馏水溶解），阳性对照组小鼠腹腔注射地塞米松，空白对照组与模型组小鼠每天以0.01 mL/g灌胃灭菌水，每天1次，连续7 d。实验期间，模型组、阳性对照组和CE低剂量组各死亡小鼠1只。末次给药后，禁食12 h，麻醉后摘眼球取血及结肠组织备用。

2.2.2 疾病活动指数计算及结肠长度检测

实验期间，每天记录小鼠体重和粪便情况，参照评分标准[15]评价各组小鼠的体重下降、粪便性状和便血情况，并计算疾病活动指数（disease activity index，DAI），DAI＝（体重减轻分数+粪便性状分数+大便潜血或结肠出血分数）/3。实验结束后，取小鼠结肠测量长度并拍照。

2.2.3 结肠组织病理学形态观察

取部分小鼠结肠组织以4%多聚甲醛固定，经石蜡包埋、切片后，进行苏木素-伊红（HE）染色。采用显微镜观察小鼠结肠组织病理学形态，并根据隐窝细胞丢失和炎症细胞浸润程度进行病理学评分[16]。

2.2.4　结肠组织中炎症因子水平检测

取部分小鼠结肠组织于冰上匀浆，匀浆液于4 ℃下以3 500 r/min离心15 min，收集上清液，按试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪检测血清中IL-10、IL-6、IL-1β、TNF-α、MPO水平。

2.2.5　结肠组织中核心靶点蛋白表达检测

每组取3只小鼠的结肠组织适量，采用Western blot法验证基于网络药理学筛选出的核心靶点的蛋白表达情况，采用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以β-actin为内参，计算各蛋白的表达水平。

2.3　统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　网络药理学预测结果

3.1.1　活性成分的筛选及疾病靶点预测

通过TCMSP平台筛选得到6个活性成分，通过查询文献补充33个活性成分，最终得到39个活性成分，详见表1。通过Swiss Target Prediction平台筛选得到肉苁蓉活性成分靶点433个，通过GeneCards和OMIM数据库检索得到IBD靶点2 858个。活性成分靶点与疾病靶点取交集得到232个肉苁蓉活性成分治疗IBD的潜在靶点。

3.1.2　“药物-成分-靶点-疾病”网络筛选核心成分

“药物-成分-靶点-疾病”网络（图1）共包含273个节点和854条边，核心成分分别为槲皮素（degree值=60）、苏齐内酯（degree值=56）、β-谷甾醇（degree值=52）、肉苁蓉苷H（degree值=45）。

3.1.3　PPI网络筛选核心靶点

PPI网络（图2）共包含231个节点和7 394条边，核心靶点分别为TNF（degree值=308）、AKT1（degree值=290）、STAT3（degree值=252）、EGFR（degree值=230）、SRC（degree值=230）。

表1　肉苁蓉中39个活性成分的基本信息

活性成分（中文名称）	TCMSP编号	口服利用度/%	类药性
β-sitosterol（β-谷甾醇）	MOL000358	36.91	0.75
arachidonate（花生四烯酸）	MOL005320	45.57	0.20
suchilactone（苏齐内酯）	MOL005384	57.52	0.56
yangambin（鹅掌楸树脂酚B二甲醚）	MOL007563	57.53	0.81
quercetin（槲皮素）	MOL000098	46.43	0.28
marckine	MOL008871	37.05	0.69
acteoside（毛蕊花糖苷）	MOL003333	2.94	0.62
echinacoside（松果菊苷）	MOL003734	3.14	0.38
crenatoside（黄药苷）	MOL007830	2.74	0.68
poliumoside（金石蚕苷）	NA	NA	NA
cistanoside A（肉苁蓉苷A）	MOL008856	3.62	0.36
cistanoside B（肉苁蓉苷B）	MOL008872	4.27	0.35
cistanoside C（肉苁蓉苷C）	NA	NA	NA
cistanoside H（肉苁蓉苷H）	MOL008862	5.19	0.69
tubuloside A（管花苷A）	NA	NA	NA
tubuloside B（管花苷B）	NA	NA	NA
isoacteoside（异毛蕊花糖苷）	MOL007795	1.52	0.66
2-acetylacteoside（乙酰毛蕊花糖苷）	NA	NA	NA
L-arabinose（阿拉伯糖）	MOL010200	54.12	0.03
galactose（半乳糖）	MOL010203	10.22	0.55
dulcitol（半乳糖醇）	NA	NA	NA
D-galacturonic acid（半乳糖醛酸）	MOL012957	60.80	0.06
mannitol（甘露醇）	MOL000003	17.73	0.03
fructose（果糖）	MOL000053	1.68	0.03
xylose（木糖）	MOL000731	58.74	0.03
glucose（葡萄糖）	MOL000734	24.44	0.03
rhamnose（鼠李糖）	MOL004690	40.73	0.03
sucrose（蔗糖）	MOL000842	7.17	0.23
mannose（甘露糖醇）	MOL000051	1.76	0.03
cistanin（肉苁蓉素）	MOL008855	71.78	0.06
cistachlorin（肉苁蓉氯素）	NA	NA	NA
kankanoside A（甘蓝苷A）	NA	NA	NA
kankanoside B（甘蓝苷B）	NA	NA	NA
8-epiloganic acid（8-表马钱子酸）	MOL003203	98.51	0.09
gluroside（格鲁苷）	NA	NA	NA
liriodendrin（鹅掌楸脂素）	MOL007927	5.19	0.29
citrusin A（柠檬素A）	MOL013438	25.04	0.73
palmitic acid（棕榈酸）	MOL000069	19.30	0.10
niacin（烟酸）	MOL000421	47.65	0.02

NA：未查询到信息。

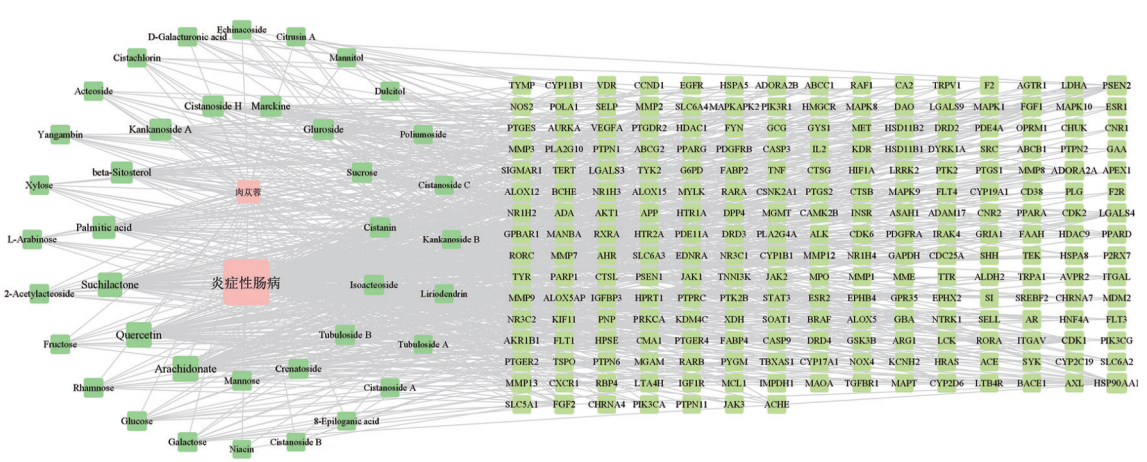


图1　“药物-成分-靶点-疾病”交互网络

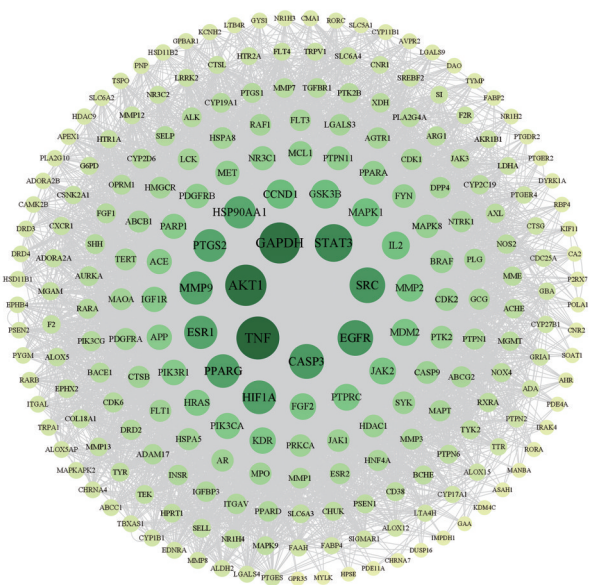


图2　PPI网络图

3.1.4　GO和KEGG富集分析

从图3和图4可知，肉苁蓉治疗IBD的生物过程主要与蛋白质磷酸化、凋亡负调控、对外源性刺激的反应等有关，主要涉及PI3K/AKT、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。

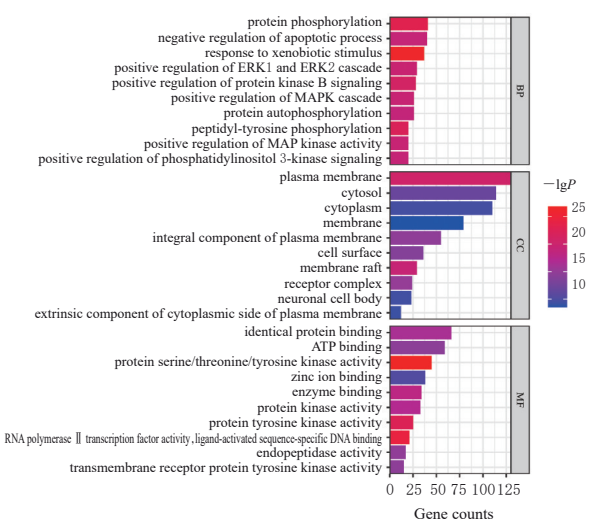


图3　肉苁蓉治疗IBD潜在靶点的GO富集分析

3.1.5　分子对接验证

分子对接验证结果（表2）显示，核心靶点与核心成分的结合能均小于−4.7 kJ/mol，表明配体分子均能和受体蛋白较好地结合，其中AKT1与β-谷甾醇的结合性最好。

3.2　动物实验结果

3.2.1　CE对小鼠体重的影响

与空白对照组比较，模型组小鼠体重显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和CE各剂量组小鼠体重均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表3。

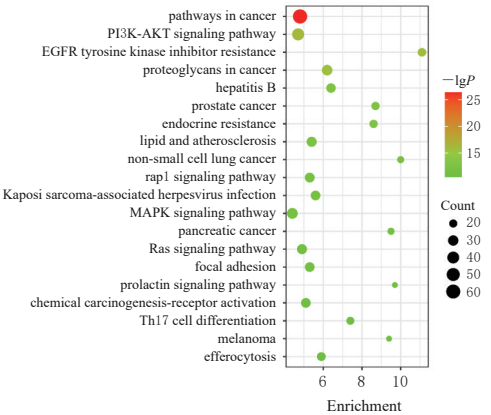


图4　肉苁蓉治疗IBD潜在靶点的KEGG通路分析

表2　核心成分与核心靶蛋白的对接结果（kJ/mol）

化合物	TNF	AKT1	STAT3	EGFR	SRC
槲皮素	−6.2	−10.0	−7.9	−7.6	−8.6
苏齐内酯	−5.2	−10.0	−8.0	−7.7	−8.0
β-谷甾醇	−6.4	−11.3	−8.0	−9.2	−8.3
肉苁蓉苷H	−4.8	−6.8	−5.2	−4.8	−5.5

表3　各组小鼠体重、DAI、结肠长度、病理评分检测结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	体重/g	结肠长度/cm	DAI/分	病理评分/分
空白对照组	8	20.84±0.61	7.48±0.18	0	0.13±0.22
模型组	7	14.24±0.92[a]	5.77±0.35[a]	3.30±0.50[a]	2.85±0.61[a]
阳性对照组	7	17.59±0.75[b]	7.47±0.70[b]	1.99±0.45[b]	0.93±0.36[b]
CE低剂量组	7	16.23±0.99[c]	7.27±0.42[b]	2.66±0.48[c]	2.22±0.60[c]
CE中剂量组	8	17.07±0.67[c]	7.37±0.34[b]	2.06±0.31[b]	1.51±0.29[b]
CE高剂量组	8	17.37±0.41[c]	7.43±0.62[b]	1.85±0.43[b]	1.13±0.77[b]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

3.2.2　CE对小鼠DAI、结肠长度的影响

与空白对照组比较，模型组小鼠DAI显著升高，结肠长度显著缩短（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和CE各剂量组大鼠DAI均显著降低，结肠长度均显著增长（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表3和图5。

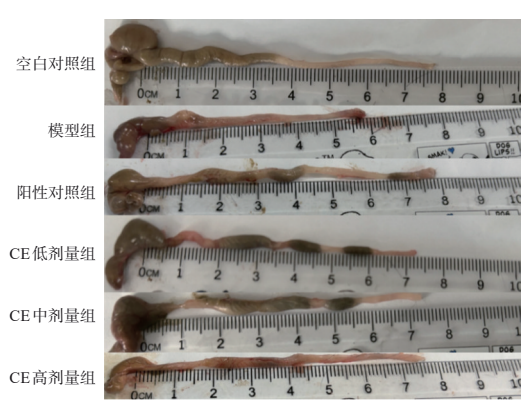
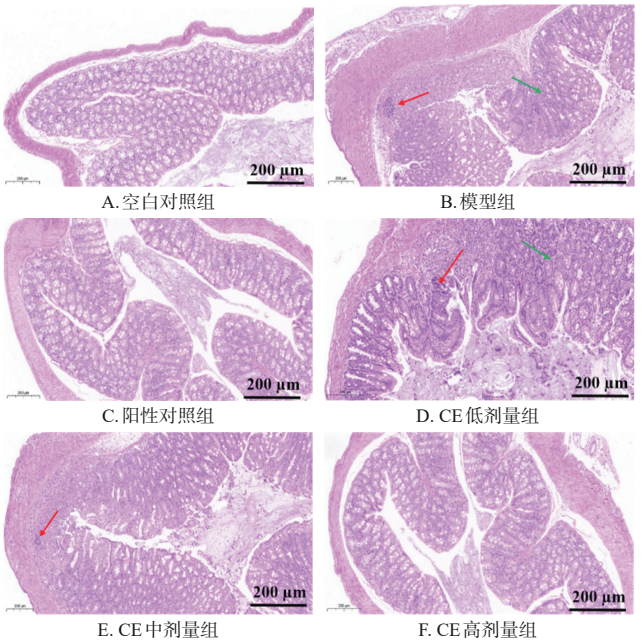


图5　各组小鼠结肠观察图

3.2.3　CE对小鼠结肠组织病理学形态的影响

空白对照组小鼠结肠黏膜完整、结构清晰，未发现炎症细胞浸润及溃疡；模型组小鼠结肠黏膜不完整，大

部分腺体被破坏，部分杯状细胞消失，隐窝结构被破坏；与模型组比较，阳性对照组和CE各剂量组小鼠结肠组织损伤情况有所好转，结肠组织炎症细胞浸润和腺体破坏情况明显减少，炎症程度明显减轻，结肠组织病理学评分显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图6、表3。



注：红色箭头表示炎症浸润；绿色箭头表示黏膜上皮细胞变性坏死。

图6　各组小鼠结肠组织病理学形态显微图（HE染色）

3.2.4　CE对小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响

与空白对照组相比，模型组小鼠结肠组织中IL-6、IL-1β、MPO、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），IL-10水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组相比，阳性对照组和CE各剂量组小鼠结肠组织中IL-6、IL-1β、MPO、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），IL-10水平显著升高（$P<0.01$）。结果见表4。

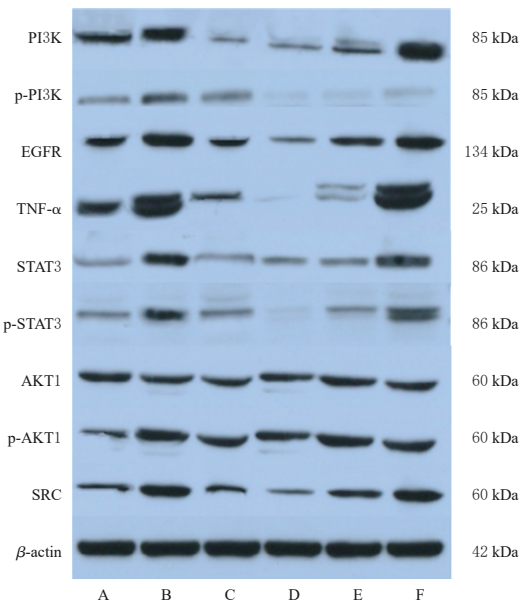
3.2.5　小鼠结肠组织中核心靶点蛋白表达水平

与空白对照组相比，模型组小鼠结肠组织中PI3K、p-PI3K、EGFR、TNF-α、STAT3、p-STAT3、AKT1、p-AKT1、SRC蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组相比，阳性对照组和CE各剂量组小鼠结肠组织中上述蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图7、表5。

表4　小鼠结肠组织中炎症因子水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	IL-10/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	MPO/(U/L)
空白对照组	8	47.04±7.09	17.35±0.64	291.27±72.53	387.71±116.76	23.06±7.26
模型组	7	3.68±0.32[a]	145.08±23.86[a]	358.94±95.11[b]	655.27±135.15[a]	97.06±28.07[a]
阳性对照组	7	44.74±8.34[c]	23.23±4.64[c]	300.52±84.71[d]	448.21±123.28[c]	38.60±16.78[c]
CE低剂量组	7	12.87±3.26[c]	81.12±18.95[c]	331.24±95.80[d]	510.81±110.63[c]	51.61±11.62[c]
CE中剂量组	8	21.80±4.12[c]	50.75±22.16[c]	323.62±79.21[d]	508.68±146.97[c]	45.53±15.21[c]
CE高剂量组	8	31.10±7.40[c]	27.55±41.22[c]	294.13±86.05[d]	461.42±140.30[c]	44.26±13.58[c]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$。



A：空白对照组；B：模型组；C：阳性对照组；D：CE高剂量组；E：CE中剂量组；F：CE低剂量组。

图7　各组小鼠结肠组织中核心蛋白表达的电泳图

4　讨论

本研究中，分子对接实验结果表明，核心成分槲皮素、苏齐内酯、β-谷甾醇、肉苁蓉苷H与核心靶点TNF、AKT1、STAT3、EGFR、SRC显示出较强的结合能力，体现了肉苁蓉多成分-多靶点协同发挥作用的特点。研究表明，槲皮素可以显著抑制炎症因子和炎症介质的分泌与释放，具有良好的抗炎作用[17]。苏齐内酯能够有效促进免疫细胞分泌γ-干扰素，并具有提高免疫细胞活力、降低肿瘤细胞活力的作用，且苏齐内酯与槲皮素在促进免疫细胞分泌γ-干扰素方面还具有协同作用[18]。β-谷甾醇可通过下调IL-6、IL-1β、TNF-α等炎症因子水平来缓解结肠炎进展[19]。肉苁蓉苷H可通过甘油磷脂代谢和花

表5　各组小鼠结肠组织中核心靶点蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	PI3K/β-actin	p-PI3K/β-actin	EGFR/β-actin	TNF-α/β-actin	STAT3/β-actin	p-STAT3/β-actin	AKT1/β-actin	p-AKT1/β-actin	SRC/β-actin
空白对照组	0.41±0.18	0.27±0.04	0.31±0.06	0.65±0.10	0.97±0.08	0.76±0.11	0.87±0.17	0.59±0.06	0.89±0.12
模型组	0.95±0.15[a]	0.69±0.11[a]	0.92±021[b]	1.28±0.14[b]	1.86±0.39[b]	1.34±0.20[b]	1.32±0.36[b]	0.94±0.30[a]	1.69±0.57[b]
阳性对照组	0.42±0.09[c]	0.33±0.07[d]	0.54±0.08[d]	0.68±0.26[c]	1.18±0.16[c]	0.81±0.19[c]	1.06±0.10[d]	0.63±0.18[d]	0.93±0.24[c]
CE低剂量组	0.62±0.13[d]	0.30±0.05[d]	0.67±0.43[d]	0.88±0.29[c]	1.56±0.38[d]	1.04±0.37[d]	1.05±0.69[d]	0.78±0.22[d]	1.31±0.06[d]
CE中剂量组	0.54±0.30[d]	0.22±0.03[d]	0.68±0.15[d]	0.80±0.16[d]	1.27±0.26[c]	0.88±0.23[c]	1.00±0.47[d]	0.76±0.10[d]	1.28±0.27[d]
CE高剂量组	0.31±0.08[c]	0.21±0.08[d]	0.58±0.13[d]	0.79±0.19[c]	1.21±0.19[c]	0.68±0.25[c]	0.94±0.18[d]	0.61±0.13[d]	1.20±0.18[d]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与空白对照组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$。

生四烯酸代谢等信号通路来调节氧化应激和炎症反应[20]。由此可知，槲皮素、苏齐内酯、β-谷甾醇、肉苁蓉苷H可能是肉苁蓉治疗IBD的物质基础。

KEGG通路分析显示，肉苁蓉主要通过调节PI3K/AKT、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性等信号通路对IBD发挥治疗作用。研究指出，PI3K/AKT信号通路的激活可促使炎症因子释放从而引发炎症损伤[21]。SRC是PI3K/AKT信号通路的上游信号分子，DSS进入细胞内能迅速激活SRC/PI3K/AKT信号通路，促进巨噬细胞、中性粒细胞等先天性免疫细胞募集至炎症受损组织，从而加速炎症因子的释放，加剧机体炎症反应[22]。EGFR可通过与上游相关蛋白结合发生磷酸化，激活PI3K/AKT信号通路，进而与Wnt信号通路协同介导炎症反应[23]。AKT1可激活核因子κB，从而促进促炎因子的合成与释放，加速炎症反应[24]。STAT3是JAK/STAT信号通路的核心靶蛋白，当STAT3被迅速激活后，可加速IL-6、IL-1β等炎症因子的释放，从而导致炎症浸润加剧[25]。TNF-α是免疫反应中最先释放的细胞因子，可通过不同的机制介导肠道炎症，还可直接诱导肠上皮细胞凋亡[26]。由此可知，TNF-α、AKT1、STAT3、EGFR、SRC可能是肉苁蓉治疗IBD的核心靶点。进一步通过动物实验发现，CE可降低上述蛋白的表达水平，证明了网络药理学预测靶点的准确性。

综上所述，本研究通过网络药理学和动物实验系统地证实了肉苁蓉治疗IBD的作用，其具体作用机制可能与调节SRC/EGFR/PI3K/AKT信号通路有关。

参考文献

[1] 包云丽，汪哲，唐海茹，等. 1990—2019年中国炎症性肠病疾病负担及变化趋势分析[J]. 中国全科医学，2023，26(36)：4581-4586.
BAO Y L，WANG Z，TANG H R，et al. Disease burden and variation tendency of inflammatory bowel disease in China from 1990 to 2019[J]. Chin Gen Pract，2023，26(36)：4581-4586.

[2] DOLINGER M T，KAYAL M. Intestinal ultrasound as a non-invasive tool to monitor inflammatory bowel disease activity and guide clinical decision making[J]. World J Gastroenterol，2023，29(15)：2272-2282.

[3] 刘艺，刘源，孙志其，等. 中药及有效成分靶向M1/M2巨噬细胞极化平衡治疗炎症性肠病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30(2)：276-286.
LIU Y，LIU Y，SUN Z Q，et al. Treatment of inflammatory bowel disease by targeting M1/M2 macrophage polarization balance with traditional Chinese medicine and active components：a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2024，30(2)：276-286.

[4] 方洒，吴开春，时永全，等. 维得利珠单抗一线及后线治疗炎症性肠病的疗效比较[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2024，33(1)：55-58.
FANG S，WU K C，SHI Y Q，et al. Comparison of the efficacy of vedolizumab on inflammatory bowel disease in the first and not line treatments[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol，2024，33(1)：55-58.

[5] 江学良. 中国中西医结合炎症性肠病质量控制指标共识[J]. 中华消化病与影像杂志，2021，11(4)：149-151.
JIANG X L. Consensus on quality control indicators of integrated Chinese and Western medicine for inflammatory bowel disease in China[J]. Chin J Dig Med Imageology Electron Ed，2021，11(4)：149-151.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：140-142.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China：Vol Ⅰ[M]. 2020 edition. Beijing：China Medical Science Press，2020：140-142.

[7] ZHOU S Q，FENG D，ZHOU Y X，et al. Analysis of the active ingredients and health applications of *Cistanche*[J]. Front Nutr，2023，10：1101182.

[8] 周亚西，周士琦，冯朵，等. 肉苁蓉生物活性成分及其免疫功效研究进展[J]. 食品科技，2022，47(6)：133-139.
ZHOU Y X，ZHOU S Q，FENG D，et al. Progress in understanding the bioactive components and immune efficacy of *Cistanche*[J]. Food Sci Technol，2022，47(6)：133-139.

[9] JIA Y M，GUAN Q N，JIANG Y，et al. Amelioration of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by echinacoside-enriched extract of *Cistanche tubulosa*[J]. Phytother Res，2014，28(1)：110-119.

[10] MAZZON E，ESPOSITO E，DI PAOLA R，et al. Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2009，380(1)：79-94.

[11] 闫文杰，冯朵，张绍时，等. 基于网络药理学与动物实验探究肉苁蓉总苷对炎症性肠病的作用机制[J]. 中国食品学报，2023，23(10)：1-11.
YAN W J，FENG D，ZHANG S S，et al. The mechanism of total glycosides of *Cistanche deserticola* Y.Ma on inflammatory bowel disease based on network pharmacology and animal experiments[J]. J Chin Inst Food Sci Technol，2023，23(10)：1-11.

[12] HUANG P，HUANG T，LI D S，et al. Molecular mechanism of Xixin-ganjiang herb pair treating chronic obstructive pulmonary disease-integrated network pharmacology

and molecular docking[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2021,2021:5532009.

[13] HUANG S J, MU F, LI F, et al. Potential mechanism study of herbal pair Schizonepetae Herba and Saposhnikoviae Radix against coronavirus pneumonia via network pharmacology and molecular docking[J]. Nat Prod Res Dev,2020,32(6):1087-1098.

[14] ZHU L, GU P Q, SHEN H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats[J]. Int Immunopharmacol,2019,68:242-251.

[15] SONG J Z, CHEN Y Y, LV Z Y, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Alhagi* honey and its protective effect against inflammatory bowel disease by modulating gut microbiota dysbiosis[J]. Int J Biol Macromol,2024,259(Pt 1):128937.

[16] XU D, WU Q Y, LIU W Y, et al. Therapeutic efficacy and underlying mechanisms of *Gastrodia elata* polysaccharides on dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease in mice: modulation of the gut microbiota and improvement of metabolic disorders[J]. Int J Biol Macromol,2023,248:125919.

[17] 蒯欢欢,于骏娣,李灿涛,等. 基于网络药理学探讨土茯苓防治炎症性肠病的作用机制[J]. 现代药物与临床,2023,38(6):1352-1359.
KUAI H H, YU J D, LI C T, et al. Mechanism of *Smilax glabra* in treatment of inflammatory bowel disease based on network pharmacology[J]. Drugs Clin, 2023, 38(6): 1352-1359.

[18] WU J J, DENG Y, ZHANG X, et al. Suchilactone inhibits the growth of acute myeloid leukemia by inactivating SHP2[J]. Pharm Biol,2022,60(1):144-153.

[19] 霍敏峰,岳娟,董秋梅,等. 半夏泻心汤及其拆方改善炎症性肠病肠道免疫的潜在靶点及作用机制的网络药理学分析[J]. 包头医学院学报,2023,39(2):62-72.
HUO M F, YUE J, DONG Q M, et al. Potential targets and mechanism of Banxia xiexin decoction and its disassembled prescriptions on improving intestinal immunity in patients with inflammatory bowel disease[J]. J Baotou Med Coll,2023,39(2):62-72.

[20] 饶志红,杨文明,李祥,等. 肉苁蓉改善认知功能的化学成分及其作用机制研究[J]. 中国民族民间医药,2022,31(15):56-60.
RAO Z H, YANG W M, LI X, et al. Study on the drug components and action mechanism of *Cistanche* for improving cognitive function[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy,2022,31(15):56-60.

[21] WANG J, ZHAO X Y, WANG Q Z, et al. FAM76B regulates PI3K/Akt/NF-κB-mediated M1 macrophage polarization by influencing the stability of PIK3CD mRNA[J]. Cell Mol Life Sci,2024,81(1):107.

[22] YE S H, ZUO B W, XU L N, et al. Inhibition of SHP2 by the small molecule drug SHP099 prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Inflammation,2023,46(3):975-986.

[23] 徐琼,张恒,王辉. 基于EGFR介导的信号通路探讨中药活性成分抗肿瘤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(6):246-253.
XU Q, ZHANG H, WANG H. Anti-tumor activity of Chinese medicine based on EGFR signaling pathway: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(6): 246-253.

[24] 邵荣瑢,杨子,张文静,等. 茯苓酸缓解小鼠克罗恩病:基于抑制PI3K/AKT信号通路拮抗肠上皮细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报,2023,43(6):935-942.
SHAO R R, YANG Z, ZHANG W J, et al. Pachymic acid protects against Crohn's disease-like intestinal barrier injury and colitis in mice by suppressing intestinal epithelial cell apoptosis via inhibiting PI3K/AKT signaling[J]. J South Med Univ,2023,43(6):935-942.

[25] DELGADO-RAMIREZ Y, BALTAZAR-PEREZ I, MARTINEZ Y, et al. STAT1 is required for decreasing accumulation of granulocytic cells via IL-17 during initial steps of colitis-associated cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14):7695.

[26] 黄淑芸,许萍,洪宗元,等. 安石榴苷改善小鼠细菌性肠炎及调节肠道菌群的实验研究[J]. 中草药,2022,53(10):3044-3052.
HUANG S Y, XU P, HONG Z Y, et al. Experimental study on improvement of bacterial enteritis and regulation of intestinal flora in mice by punicalagin[J]. Chin Tradit Herb Drugs,2022,53(10):3044-3052.

(收稿日期:2024-05-11 修回日期:2024-09-14)
(编辑:唐晓莲)