

基于网络药理学的七首复方治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究

黄友¹, 李莎¹, 吴秋红¹, 朱芮¹, 林夏¹, 杨莎莎¹, 傅超美^{1*}, 张臻^{1,2*}¹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 611137;²四川新绿色药业科技发展有限公司 国家中医药管理局“中药配方颗粒质量与疗效评价重点实验室”, 彭州 611930

摘要:利用网络药理学和生物信息学技术分析《溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见》(2017)七首中医经典复方治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制, 以筛选治疗 UC 的潜在在共有的重要成分、靶点及通路, 同时分析每首复方独有的重要成分、靶点及通路, 并对重要证型脾肾阳虚型 UC 的重要靶点进行实验验证。通过网络药理学方法, 筛选出 7 首中医经典复方的 4 个共有重要成分、42 个共有重要靶点、30 个独有重要成分、14 个独有重要靶点; KEGG 通路分析显示, 共有重要靶点主要涉及炎症与疾病相关通路; 每首复方独有通路主要涉及 HIF-1、T 细胞受体等炎症相关通路以及阿尔茨海默病等疾病相关通路; 采用 AutoDock vina 对重要成分和重要靶点进行分子对接验证; 采用“饮食失节 + 劳倦过度 + 番泻叶灌胃 + 葡聚糖硫酸钠”建立病证结合的大鼠脾肾阳虚型 UC 模型, 灌胃给予附子理中丸混悬液 (1.2 g/kg) 21 d 后, 采用 ELISA 验证其重要靶点。结果表明, 附子理中丸能显著降低脾肾阳虚型 UC 模型大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平 ($P < 0.001$)。本研究初步提示了七首经典复方治疗 UC 的潜在共性作用机制为消除炎症、调节免疫、调节细胞凋亡及抗癌等作用; 附子理中丸可以调控 TNF、IL-6 等重要靶点, 发挥治疗脾肾阳虚型 UC 的作用, 其机制可能与调控 T 细胞受体等炎症通路相关; β -谷甾醇、豆甾醇、白桦脂酸、山柰酚等参与不同 UC 中医证型的治疗, 为治疗不同 UC 中医证型的潜在药物发现及临床精准治疗提供参考, 也为 UC 辨证分型的潜在特异性评价指标提供新思路。

关键词: 共有靶点; 共有成分; 附子理中丸; 炎症细胞因子; 特异性评价指标

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2023) 4-0662-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.014

Study on the mechanism of seven classic prescriptions for treating ulcerative colitis based on network pharmacology

HUANG You¹, LI Sha¹, WU Qiu-hong¹, ZHU Rui¹,
LIN Xia¹, YANG Sha-sha¹, FU Chao-mei^{1*}, ZHANG Zhen^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; ²Key Laboratory of Quality Control and Efficacy Evaluation of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Sichuan New Green Medicine Science and Technology Development Co., Ltd., Pengzhou 611930, China

Abstract: Network pharmacology and bioinformatics techniques were used to analyze the mechanisms of seven classic prescriptions of traditional Chinese medicine (TCM) syndrome types from *The Expert Consensus on Traditional Chinese Medicine Diagnosis and Treatment of Ulcerative Colitis* (2017) for treating ulcerative colitis (UC) to screen common and special important components, targets, and pathways in UC treatment. The important targets of UC with spleen and kidney Yang deficiency (SKYD-UC) were verified experimentally. Four common important components, 42 common important targets, 30 special important components, and 14 special important targets were screened from seven classic prescriptions for treating UC by network pharmacology. According to KEGG pathway analysis, common important targets mainly involved inflammation and disease-related pathways. The special pathways mainly involved disease-related pathways (such as Alzheimer's disease) and in-

收稿日期: 2022-09-18 接受日期: 2023-03-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81803742); 四川省科技厅四川省科技计划 (2021YJ0251); 四川省中医药管理局中医药科研专项 (2021MS109); 成都中医药大学杏林学者青年学者专项 (QNXZ2019031)

* 通信作者 Tel: 86-28-61800090; E-mail: chaomeifu@126.com, zhangzhendr@126.com

flammatory-related pathways (such as HIF-1 and T cell receptors). AutoDock Vina was employed for the molecular docking verification of important components and targets. Animal models of SKYD-UC were established by "diet deficiency + excess fatigue + senna leaf gavage + dextran sulfate sodium". Fuzi-Lizhong pill suspension (1.2 g/kg) was given for 21 days, and ELISA was carried out to verify the important targets. In animal experiments, compared with the SKYD-UC group, the Fuzi-Lizhong pill group can effectively reduce tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) levels in the SKYD-UC rats ($P < 0.001$). The common mechanism of the seven classic prescriptions for treating UC may be regulating immunity, eliminating inflammation, regulating apoptosis, anti-cancer, etc. Fuzi-Lizhong pill can regulate important targets such as TNF- α and IL-6 and participates in the treatment of SKYD-UC rats, where the mechanism may be related to the regulation of T cell receptors and other pathways. At the same time, β -sitosterol, stigmaterol, betulinic acid, kaempferol, and other important components may be involved in treating different TCM syndromes of UC. This provides a reference for the potential drug discovery and clinical precision treatment of UC with different TCM syndromes as well as for the potential specific evaluation index of UC syndrome differentiation.

Key words: common important targets; common important components; Fuzi-Lizhong pill; inflammatory cytokines; specific evaluation indexes

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是医学界公认的难治疾病, 因其反复发作, 迁延不愈的特点, 严重影响着患者的工作和生活, 目前尚无特效药物。西医将 UC 分为活动期和缓解期, 活动期分级为轻、中、重度 UC, 不同分期分级的治疗药物大致相同^[1], 常以氨基水杨酸类、糖皮质激素类和免疫抑制剂类为主。中医药防治 UC 历史悠久, 其记载最早可追溯到《黄帝内经》^[2], 将 UC 归属于“肠澼”“泄泻”“久痢”和“痢疾”等范畴, 认为本病脾虚为本, 病久及肾, 遂致脾肾两虚^[3], 当以温中健脾、温肾助阳为关键治本之法。中医治疗该病有辨证论治的独特优势, 2017 年中华中医药学会脾胃病分会发布《溃疡性结肠中医诊疗专家共识意见 (2017)》(以下称《专家共识意见 (2017)》)^[4], 将 UC 辨证分为 7 型, 即大肠湿热证、热毒炽盛证、脾虚湿蕴证、寒热错杂证、肝郁脾虚证、脾肾阳虚证、阴血亏虚证, 针对 7 个不同的 UC 中医证型, 有对应的中医经典复方, 对于 UC 的防治更具精准性。然而, 由于经典复方的药材组方复杂、成分繁多、信息整合量繁杂, 目前 7 首中医经典复方治疗 UC 的共性及差异性成分等尚未被系统、整体地研究, 辨证分型相对应的靶点通路等特异性评价指标亦未被深入挖掘。

网络药理学是人工智能和大数据时代药物系统性研究的新兴、交叉、前沿学科, 强调从生物网络的整体角度阐释疾病机制和药物作用机理^[5], 其研究理念与中医药的整体论思想不谋而合, 为中药复方的系统研究提供了新方法。本研究以中医治疗 UC 的 7 首中医经典复方作为研究对象, 通过网络药理学方法分析经典复方治疗 UC 的共性及差异作用机

制, 重点探寻经典复方的共有以及独有的重要成分、靶点、通路, 并根据本病的根本病机, 选取“温中健脾、温肾助阳”根本治法的代表性经典方—附子理中丸 (Fuzi-Lizhong Pill, FLZP), 开展脾肾阳虚型 UC 关键靶点等的实验验证, 以期治疗不同 UC 中医证型的潜在药物发现及临床精准治疗提供参考, 也为 UC 辨证分型的潜在特异性评价指标提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材与试剂

附子 (批号: 2002110)、干姜 (批号: 2101055)、炒白术 (批号: 2101026)、党参 (批号: 2011066)、甘草 (批号: 2102059)、番泻叶 (批号: 2101047) 均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司。以上药材经成都中医药大学中药鉴定专业裴瑾教授分别鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根炮制加工品、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎的炮制加工品、桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎、豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl. 的干燥小叶。羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号: 2020110401) 购自成都市科隆化学品有限公司。葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS, 批号: OU0403A) 购自西宝生物科技 (上海) 股份有限公司。粪便隐血定性检测试剂盒 (邻联甲苯胺法, 批号: 0118A21)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis fac-

tor, TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 检测试剂盒(批号:20210603LA2C)购自合肥博美生物技术有限公司。苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂包括苏木素染色液及伊红染色液(批号:G1005)购自武汉谷歌生物科技有限公司。精炼猪油、高脂高糖饲料、普通饲料均由四川达硕生物科技有限公司提供。

1.1.2 灌胃液制备

取附子、党参、炒白术、干姜、甘草五种饮片,按照《中华人民共和国药典》2020年版一部附子理中丸制法项下规定,粉碎成细粉,过筛,混匀。按比例加入适量水,制成水丸。取适量附子理中丸置于研钵中,加入适量0.5% CMC-Na溶液,研磨成糊状,转移至100 mL容量瓶中,继续加入0.5% CMC-Na溶液研磨,如此3至4次,待附子理中丸转移完全后,加0.5% CMC-Na稀释至刻度,制备成0.12 g(生药)/mL的混悬液;将番泻叶浸渍于纯净水中,每100 mL含生药100 g,浸渍过夜,滤过,滤液置4℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析

1.2.1.1 七首经典复方药材信息收集

将大肠湿热方(damp heat prescription, DHP)、热毒炽盛方(severe heat toxin prescription, SHTP)、脾虚湿蕴方(spleen deficiency and dampness prescription, SDDP)、寒热错杂方(cold-heat complicated prescription, CHCP)、肝郁脾虚方(liver stagnation and spleen deficiency prescription, LSSDP)、脾肾阳虚方(spleen and kidney Yang deficiency prescription, SKYDP)、阴血亏虚方(Yin blood deficiency prescription, YBDP)中所含的中药以2020年版《中华人民共和国药典》一部项下进行名称规范,汇总整理,得到七首经典复方的基本信息。

1.2.1.2 活性成分的筛选

本研究利用中药系统药理学分析平台(TCM-SP)检索每味中药所含化学成分,设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选参数,得到其潜在活性成分,并通过 PubChem 数据库及 Chem Bio Draw 软件获得化学成分的化学结构。

1.2.1.3 重要靶点的筛选

通过 Swiss Target Prediction 平台及 TCMSP 数据库获得活性成分的靶点蛋白,并将得到的靶点蛋白

信息使用 Uniprot 数据库进行名称规范,收集整理,得到七首复方的作用靶点。使用 GeneCards 和 OMIM 数据库检索 UC 相关疾病靶点,汇总整理,分别与七首复方的作用靶点取交集,获得各经典复方治疗 UC 的潜在靶点。

将各经典复方的潜在靶点导入 STRING 平台,限定物种为 Homo sapiens,为确保数据的可靠性,选择0.9的最高置信度,保存结果。将得到的结果导入 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。选取靶点度值大于两倍平均值的靶点为重要靶点。

1.2.1.4 重要靶点的通路分析

将重要靶点导入 DAVID 6.8 数据库, Identifier 设置为 official gene symbol, list type 设置为 gene list, 物种设置为 Homo sapiens, 进行 KEGG 通路分析, 富集分析均以错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.01 具有统计学意义,之后根据 P value < 0.01 , 且 Count $>$ 平均值,筛选出重要通路。

1.2.1.5 “活性成分-重要靶点-重要通路”网络构建与分析

将上述活性成分、重要靶点、重要通路在 Excel 表中分别建立活性成分-重要靶点、重要靶点-重要通路之间的对应关系,导入 Cytoscape 软件,构建“活性成分-重要靶点-重要通路”网络图。

1.2.2 分子对接及动物实验验证

1.2.2.1 分子对接

采用 AutoDock vina 软件对重要成分与重要靶点进行分子对接验证。从 RCSB PDB 蛋白质结构数据库中获得靶点蛋白的三维结构,采用 AutoDock Tools 对上述蛋白受体和配体进行常规处理,再用其插件 Autogrid 得到对接活性位点,进行分子对接,得到结合能(affinity)。本研究以结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 为分子与靶点结合性较好。

1.2.2.2 实验动物

本文涉及的动物实验研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 CDU2021S093)。SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 220 ~ 240 g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。将 18 只大鼠随机分为对照组(control, Con), 脾肾阳虚型 UC 组(spleen and kidney Yang deficiency with UC, SKYD-UC), 附子理中丸组(FLZP), 每组 6 只。于成都中医药大学实验动物中心动物房内适应性饲养 1 周, 室温 20 ~ 25

℃,相对湿度 65% ~ 69%,期间自由进食进水。

1.2.2.3 造模及给药

按照复合因素法“饮食失节 + 劳倦过度 + 番泻叶灌胃 + DSS”建立病证结合的大鼠脾肾阳虚型 UC 模型^[6,7]:第一阶段(前 6 d),单日喂饲甘蓝 10 g/只,双日喂高脂混合饲料 10 g/只;每日下午,38 ℃温水中游泳至疲劳(疲劳的标准为全身下沉至没颈,不能坚持游泳);第 7 ~ 21 d,在“前 6 d”施加因素基础上,每日加灌番泻叶水浸液 10 mL/kg,造脾肾阳虚型模型。大鼠出现腹泻、体重下降、毛发枯萎、精神不振、蜷缩扎堆、不喜动、反应迟钝、食量减少、游泳时间缩短、肛周污秽,提示脾肾阳虚造模成功。第二阶段(第 22 ~ 28 d),在第一阶段施加因素基础上,每日自由饮用 3% 的 DSS 溶液 7 d,每天更换一次新鲜的 DSS 溶液。大鼠出现体重减轻、脓血便、脾肾阳虚相关症状,提示脾肾阳虚型 UC 造模成功。

脾肾阳虚型 UC 模型复制后,SKYD-UC 组、附子理中丸组仍按复合因素法继续造模。对照组、SKYD-UC 组每日于造模后 5 h 灌胃等量生理盐水,附子理中丸组每日灌胃 1.2 g/kg 附子理中丸混悬液,连续灌胃给药 3 周。

1.2.2.4 一般行为及 DAI 评分

每天观察并记录大鼠精神状况,大便干湿程度,

体重变化,饮食情况,便血程度(并采用邻苯胺法检测大便潜血情况);对各组大鼠进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。计算公式为 DAI = (体质量下降率分数 + 大便性状分数 + 便血情况分数)/3。

1.2.2.5 结肠组织的病理检测

结肠组织的病理检测由四川赛因斯特生物科技有限公司完成。取各组大鼠结肠标本置于组织固定液中固定,制作蜡块、脱水、HE 染色,显微镜下进行病理学检查。

1.2.2.6 ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-6 水平

采用 ELISA 法,依据试剂盒说明书,检测血清中 TNF- α 及 IL-6 的蛋白质浓度。

1.2.3 统计学方法

应用 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七首经典复方药材信息的分析

由表 1 可知 7 首经典复方共涉及 39 味中药,之后进行药材频次统计分析,其中使用频次 ≥ 2 的有 10 味重要药材。主要为甘草、黄连、干姜、白术、党参、附子等重要药材。

表 1 《专家共识意见(2017)》不同 UC 中医证型的经典复方信息表

Table 1 Information of classic prescriptions of TCM syndrome type for treating UC in *Consultations of Experts in TCM Diagnosis and Treatment of Ulcerative Colitis (2017 Edition)*

辨证分型 Syndrome type	经典复方 Classic prescription	药材 Chinese herb
大肠湿热证	芍药汤(《素问病机气宜保命集》)	白芍、槟榔、大黄、黄芩、黄连、当归、肉桂、甘草、木香
热毒炽盛证	白头翁汤(《伤寒论》)	白头翁、黄连、黄柏、秦皮
脾虚湿蕴证	参苓白术散(《太平惠民和剂局方》)	白扁豆、白术、茯苓、甘草、桔梗、莲子心、人参、砂仁、山药、薏苡仁
寒热错杂证	乌梅丸(《伤寒论》)	乌梅、花椒、细辛、黄连、黄柏、干姜、附子、桂枝、党参、当归
肝郁脾虚证	痛泻要方(《景岳全书》引刘草窗方)合四逆散(《伤寒论》)	陈皮、白术、白芍、防风、柴胡、枳实、甘草
脾肾阳虚证	附子理中丸(《太平惠民和剂局方》)合四神丸(《证治准绳》)	肉豆蔻、补骨脂、五味子、吴茱萸、甘草、干姜、附子、党参、白术
阴血亏虚证	驻车丸(《备急千金要方》)合四物汤(《太平惠民和剂局方》)	黄连、川芎、干姜、当归、阿胶、熟地黄、白芍

2.2 七首经典复方的潜在靶点和重要靶点

2.2.1 各经典复方的潜在靶点及共有潜在靶点

利用 Swiss Target Prediction 平台及 TCMSP 等数

据库得到各经典复方潜在靶点,即大肠湿热方 342 个、热毒炽盛方 383 个、脾虚湿蕴方 300 个、寒热错杂方 369 个、肝郁脾虚方 278 个、脾肾阳虚方 449

个、阴血亏虚方 325 个。对 7 首复方的潜在靶点进行交集,得到 176 个共有潜在靶点。

2.2.2 共有重要靶点

将 176 个共有潜在靶点导入 STRING 平台和 Cytoscape 软件得到的 PPI 网络(见图 1)。PPI 网络

中共有 141 个节点(靶点蛋白)、1 216 条边(蛋白相互作用)。度值越大则说明其在网络中的作用越大,靶点蛋白平均节点度值为 5.62,大于两倍平均度值的靶蛋白有 42 个,可作为治疗 UC 的共有重要靶点。

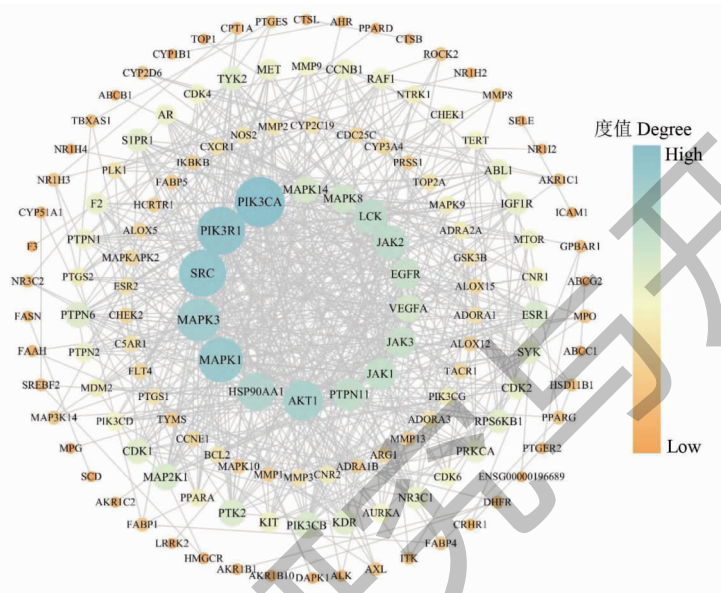


图 1 共有潜在靶点的 PPI 网络图

Fig. 1 PPI network of common potential targets

注:节点大小表示该节点度值的大小,节点越大,度值越大。Note: The node size indicates the degree value of the node, the larger the node, the higher the degree value.

2.2.3 每首复方独有重要靶点

2.2.3.1 各复方的重要靶点

利用 STRING 平台和 Cytoscape 软件得到各经典复方潜在靶点的 PPI 网络。大肠湿热方、热毒炽盛方、脾虚湿蕴方、寒热错杂方、肝郁脾虚方、脾肾阳虚方、阴血亏虚方的靶点蛋白平均节点度值分别为 19.98、17.97、66.87、68.91、17.72、77.66、19.69,大于两倍平均度值的靶蛋白分别有 39、36、33、40、23、50、36 个,可分别作为各经典复方重要靶点(见图 2A~2G),度值排名靠前的 3 个重要靶点见图 2H。七首不同经典复方治疗 UC 的重要靶点数量存在差异,这些结果说明不同 UC 中医证型之间存在差异,应当对 UC 辨证论治治疗。

值得一提的是脾肾阳虚方治疗 UC 的重要靶点数量最多(见图 2F),这可能与 UC 的中医病机(脾虚为本,病久及肾,遂致脾肾两虚等)相关,故脾肾阳虚方更应值得我们重点关注。其中脾肾阳虚方中度值排名靠前的有 TNF、IL-6 等炎症靶点, TNF 和

IL-6 是重要的促炎症细胞因子,在 UC 的免疫反应和局部炎症反应中起重要作用,能促进白细胞活化,使肠道黏膜炎症反应持续,故调控 TNF 和 IL-6 可能是脾肾阳虚方治疗 UC 的重要途径之一。

2.2.3.2 每首复方独有的重要靶点

在上述各复方的重要靶点基础上,运用 R 语言进行差异分析,获得每首复方独有的重要靶点,共有 14 个独有重要靶点。这些独有重要靶点可作为不同 UC 中医证型辨证分型及治疗的参考。

2.3 七首经典复方的重要靶点的通路富集分析

2.3.1 共有重要通路

通过 DAVID 6.8 数据库对共有重要靶点进行 KEGG 分析,根据 P value < 0.01 , Count $>$ 平均值(11.71)获得 67 条通路,按 P 值选取前 30 为重要通路,绘制气泡图。如图 3 所示,这些通路主要涉及炎症相关通路和疾病相关通路等,炎症相关通路主要包括磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)、表

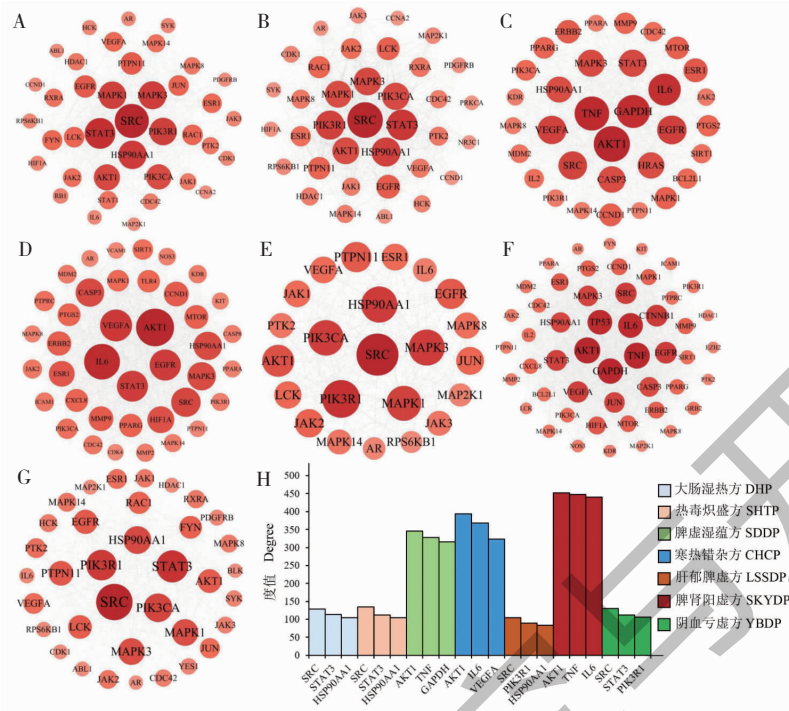


图2 各经典复方重要靶点及其度值排名靠前的3个重要靶点图

Fig. 2 The important targets of each classical prescription and its top 3 important targets in terms of degree value

注:A表示大腸濕熱方;B表示熱毒熾盛方;C表示脾虛濕蘊方;D表示寒熱錯雜方;E表示肝郁脾虛方;F表示脾腎陽虛方;G表示陰血虧虛方(表2~4同);A~G中的节点大小和颜色表示该节点度值的大小,节点越大对应的度值越大,H表示各经典复方度值排名靠前的3个重要靶点。Note:A represents DHP;B represents SHTP;C represents SDDP;D represents CHCP;E represents LSSDP;F represents SKYDP;G represents YBDP (Table 2-4 are the same). In A-G, the node sizes and colors mean the value of the node degrees. The larger the node, the larger the corresponding degree value, H represents the top 3 important targets for each classic prescription value.

皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等信号通路;疾病相关通路主

要包括肝细胞癌、胰腺癌、乙型肝炎、前列腺癌等通路。这些结果说明7首经典复方可能通过消除炎症、抗癌等作用进而治疗UC。

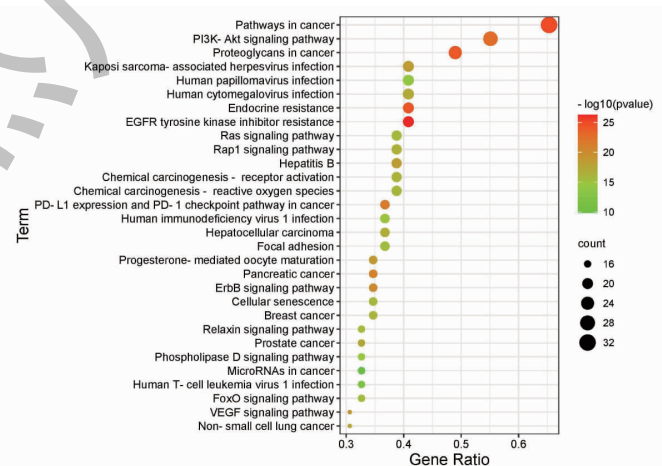


图3 共有重要靶点的KEGG通路气泡图

Fig. 3 Bubble map of KEGG pathway with common important targets

2.3.2 每首复方独有重要通路

2.3.2.1 各复方的重要通路

基于 DAVID 6.8 数据库,对 7 首经典复方的重要靶点分别进行 KEGG 通路富集分析,根据 P value < 0.01 , $\text{Count} >$ 平均值,选取 P value 前 30 作为重要通路,分别获得各复方重要通路。

2.3.2.2 每首复方独有重要通路

对各复方重要通路进行差异分析,获得共 14 条独有重要通路(见表 2)。这些通路主要涉及新型冠状病毒感染(corona virus disease 2019, COVID-19)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等疾病相关

以及 TNF、缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)、T 细胞受体(T cell receptor, TCR)等炎症相关通路。其中大肠湿热方独有重要通路有 COVID-19 肺炎相关通路,这说明大肠湿热型 UC 可能与肺相关性疾病有关,且近年来有 UC 可累及肺损害的临床报道。“肺与大肠相表里”是中医脏腑表里相合理论的重要组成部分,大肠受病可累及于肺,如《灵枢·四时气》云:“腹中常鸣,气上冲胸,喘不能久立,邪在大肠”。这些结果提示在临床治疗大肠湿热型 UC 时,应当关注患者的肺相关性疾病。

表 2 每首经典复方独有的重要通路信息表

Table 2 Table of characteristic important pathway information for each classic prescription

ID	通路名称 Pathway name	条目 Count	P 值 P Value	经典复方 Classic prescriptions
hsa04915	Estrogen signaling pathway	11	7.95E-13	E
hsa05219	Bladder cancer	12	1.92E-17	D
hsa04218	Cellular senescence	13	4.18E-12	D
hsa04630	JAK-STAT signaling pathway	13	4.62E-12	A
hsa04722	Neurotrophin signaling pathway	13	2.36E-14	G
hsa04919	Thyroid hormone signaling pathway	13	4.35E-14	B
hsa05010	Alzheimer's disease	13	1.02E-08	C
hsa05164	Influenza A	13	1.25E-11	D
hsa05171	Coronavirus disease - COVID-19	13	3.16E-10	A
hsa05231	Choline metabolism in cancer	13	3.26E-15	B
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	14	1.33E-15	D
hsa04668	TNF signaling pathway	14	1.91E-15	D
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	16	1.58E-17	F
hsa05224	Breast cancer	16	3.36E-15	F

2.4 七首经典复方治疗 UC 的重要成分

2.4.1 共有重要成分

通过 TCMSp 平台检索七首经典复方的 39 味中药成分,删除重复后,共得到 387 个潜在活性成分,其中包括大肠湿热方 153 个、热毒炽盛 43 个、脾虚

湿蕴方 180 个、寒热错杂方 91 个、肝郁脾虚 34 个、脾肾阳虚方 190 个、阴血亏虚 36 个。之后将 7 个复方的成分进行交集,获得了 7 首复方共有成分为 β -谷甾醇,6 首复方的共有成分为豆甾醇、白桦脂酸、山柰酚(见表 3)。

表 3 七首经典复方共有重要成分

Table 3 Common important components of seven classic prescription

化学名称 Chemical name	CAS	药材 Chinese herb	经典复方 Classic prescription
β -谷甾醇 β -Sitosterol	83-46-5	吴茱萸、肉豆蔻、花椒、砂仁、秦皮、黄柏、白头翁、当归、甘草、黄芩、大黄、干姜、桂枝、附子、人参、白芍、乌梅	A、B、C、D、E、F、G
豆甾醇 Stigmasterol	83-48-7	熟地黄、乌梅、山药人参、木香、当归、白头翁、黄柏、砂仁、薏苡仁、党参	A、B、C、D、F、G

续表 3 (Continued Tab. 3)

化学名称 Chemical name	CAS	药材 Chinese herb	经典复方 Classic prescription
白桦脂酸 Betulinic acid	472-15-1	白芍、白头翁、甘草、木香	A、B、C、E、F、G
山奈酚 Kaempferol	520-18-3	白芍、甘草、乌梅、细辛、人参	A、C、D、E、F、G

2.4.2 每首复方独有重要成分

2.4.2.1 各复方的重要成分

将上述 7 首复方的活性成分、重要靶点、重要通路分别导入 Cytoscape 软件,构建各复方的“活性成分-重要靶点-重要通路”网络图。大肠湿热方、热毒

炽盛方、脾虚湿蕴方、寒热错杂方、肝郁脾虚方、脾肾阳虚方、阴血亏虚方的活性成分平均节点度值分别为 3.79、8.09、2.80、6.83、4.50、4.75、6.70,选取大于两倍平均度值的成分为重要成分,共 46 个(见表 4)。

表 4 七首经典复方的重要成分

Table 4 Important components of seven classic prescriptions

序号 No.	化学名称 Chemical name	CAS	PubChem 编号 PubChem CID	经典复方 Classic prescriptions
M1	山奈酚 Kaempferol	520-18-3	5280863	A、C、D、F
M2	氧化小檗碱 Berlambine	549-21-3	11066	A、B、G
M3	槲皮素 Quercetin	117-39-5	5280343	A、C、D、F
M4	小檗碱 Berberine	633-66-9	12457	A、B、D、F、G
M5	表小檗碱 Epiberberine	6873-09-2	160876	A、G
M6	11 α ,12 α -Epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	-	-	A、E
M7	黄芩素 Baicalein	491-67-8	5281605	A
M8	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 5,7,2,5-Tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	-	44258628	A
M9	5,7,2,6-四羟基黄酮 5,7,2,6-Tetrahydroxyflavone	82475-00-1	5321865	A
M10	汉黄芩素 Wogonin	632-85-9	5281703	A
M11	白桦脂酸 Betulinic acid	472-15-1	64971	A
M12	异鼠李素 Isorhamnetin	480-19-3	5281654	A、C、F
M13	金合欢素 Acacetin	480-44-4	5280442	A、C
M14	广玉兰内酯 Magnograndiolide	92618-98-9	5319198	B
M15	掌叶大黄二萜酮 A Palmidin A	17062-55-4	5320384	B、D
M16	黄藤素 Palmatine	3486-67-7	19009	B、D
M17	黄柏酮 Obacunone	751-03-1	119041	B、D
M18	β -足叶草脂 β -Peltatin	518-29-6	11862128	B
M19	鬃毛酮 Hispidone	73891-72-2	21603613	B
M20	木犀草素 Luteolin	491-70-3	5280445	C、F
M21	2-O-甲基-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基桔梗酸 A 二甲酯 2-O-Methyl-3-O- β -D-glucopyranosyl platycogenate A	-	-	C
M22	豆甾醇 Stigmasterol	83-48-7	5280794	C、D
M23	维生素 E Vitamin E	1406-18-4	3476	C
M24	2-O-甲基-3-O- α -D-吡喃葡萄糖基桔梗二酸 A 二甲酯 Dimethyl 2-O-methyl-3-O- α -D-glucopyranosyl Platycogenate A	-	-	C
M25	谷甾醇 Sitosterol	83-46-5	12303645	C、F

续表 4 (Continued Tab. 4)

序号 No.	化学名称 Chemical name	CAS	PubChem 编号 PubChem CID	经典复方 Classic prescriptions
M26	原阿片碱 Protopine	130-86-9	4970	C、D
M27	胆固醇 Cholesterol	57-88-5	5997	C
M28	2-十八烯酸单甘油酯 2-Monoolein	3443-84-3	5319879	C
M29	β -谷甾醇 β -Sitosterol	83-46-5	222284	D、F
M30	茵芋碱 Skimmianin	83-95-4	6760	D
M31	异黄柏苷 Phellavin	32507-67-8	14392624	D
M32	珊瑚菜素 Phellopterin	2543-94-4	98608	E
M33	白花前胡乙素 Anomalin	81740-07-0	6859585	E
M34	珊瑚菜内酯 Phelloptorin	-	-	E
M35	二羟基喹啉 Divaricatol	-	9974111	E
M36	Gravacridoneshlerine	-	-	F
M37	氯菊酯 Permethrin	52645-53-1	40463	F
M38	7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-Methoxy-2-methyl isoflavone	19725-44-1	354368	F
M39	6-羟基木犀草素 6-Hydroxyluteolin	18003-33-3	5281642	F
M40	Threo-austrobailignan-5	-	-	F
M41	吴茱萸次碱 Rutaecarpine	84-26-4	65752	F
M42	吴茱萸啶酮 Evodione	482-07-5	624052	F
M43	棉花素 Gossypetin	489-35-0	5280647	F
M44	7-(β -木糖基)三杉尖宁碱 7-(β -Xylosyl) cephalomannine	-	-	F
M45	杨梅酮 Myricanone	32492-74-3	161748	G
M46	川芎茶呋内酯 Wallichilide	93236-64-7	10873344	G

2.4.4.2 每首复方独有的重要成分

对各复方的重要成分进行差异分析,获得各复方共 30 个独有重要成分,大肠湿热方中有黄芩素、汉黄芩素等成分,热毒炽盛方有广玉兰内酯、鬃毛酮等成分,脾虚湿蕴方有胆甾醇、2-十八烯酸单甘油酯等成分,寒热错杂方有茵芋碱、异黄柏苷等成分,肝郁脾虚方有珊瑚菜内酯、白花前胡乙素等成分,脾肾阳虚方有吴茱萸啶酮、氯菊酯、6-羟基木犀草素、吴茱萸次碱等成分,阴血亏虚方有杨梅酮、川芎茶呋内酯等成分。这些成分可作为不同 UC 中医证型精准治疗药物研究的参考。

2.4.4.3 抗炎重要成分

肠黏膜炎症反应的持续激活是 UC 重要的病理特征。抗炎被认为是治疗 UC 的潜在靶点。故本研究基于上述 46 个重要成分,对抗炎成分进行了挖掘。通过 GeneCards 和 OMIM 数据库,以“anti-inflammatory”为关键词进行搜索,收集与抗炎相关的蛋白信息。通过 Cytoscape 构建“重要成分-抗炎靶点”网络图,平均节点度值为 74.57,大于二倍平均度值的成分,如山柰酚、槲皮素等 28 个成分,可能是

各复方中发挥抗炎作用的重要物质基础。

2.5 分子对接及动物实验验证

2.5.1 分子对接验证

2.5.1.1 各复方的重要成分

将各经典复方度值排名靠前的 3 个重要靶点蛋白分别与七首复方的 46 个重要成分,进行分子对接验证(见图 4)。若结合能 ≤ -5.0 kJ/mol,表明其结合性好,结合能越小对接越好。图中 98.3% 的重要成分都能与重要靶点蛋白较好地结合,其中 β -谷甾醇、黄柏、鬃毛、原阿片等成分与各复方重要靶点结合性都较好。这说明 β -谷甾醇、黄柏酮、鬃毛酮及原阿片碱可以作为 UC 的候选药物。

TNF- α 在 UC 发病及病程中具有重要的作用,靶向 TNF- α 药物治疗 UC 呈现出良好前景。在本研究中和 TNF 靶点蛋白结合性较好的有广玉兰内、棉花、6-羟基木犀草素等成分,这为靶向 TNF- α 药物研究提供了参考。

2.5.1.2 共有的重要成分

将各经典复方度值排名靠前的 3 个重要靶点蛋白与 4 个共有重要成分进行分子对接验证,结果见图

5A。图中4个共有重要成分都能与重要靶点蛋白较好地结合。其中豆甾醇与磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)结合性最好(见图5B),豆甾醇与GAPDH之间的相互作用不仅有氢键,还有范德华力。豆甾醇可与亮氨酸

203 (leucine 203, Leu203) 等氨基酸残基形成氢键,与谷氨酰胺204 (glutamine 204, Gln204)、组氨酸53 (histidine 53, His53)、甲硫氨酸956 (methionine 956, Met956) 等有范德华力,这些作用力可促使复合物的形成。

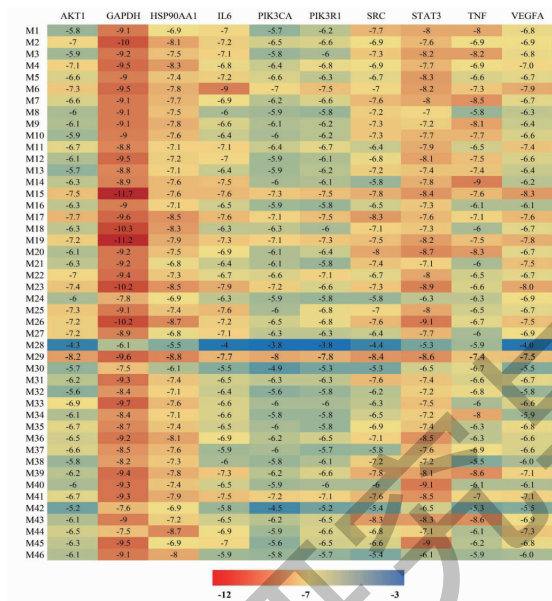


图4 各复方重要成分的分子对接结果热图

Fig. 4 Heat map of molecular docking results of important components of each classic prescription

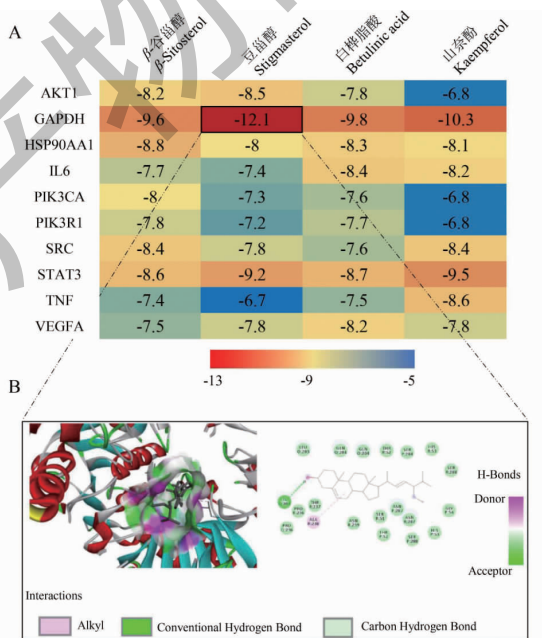


图5 共有重要成分的分子对接结果及其对接模式图

Fig. 5 Molecular docking results and docking pattern diagram of common important components

注:A表示经典复方的4个共有重要成分与重要靶点的分子对接结果;B表示豆甾醇与GAPDH蛋白的分子对接模式。Note:A represents the molecular docking results of 4 common important components and important targets of classic prescriptions;B represents the molecular docking of stigmasterol and GAPDH.

2.5.2 动物实验验证

2.5.2.1 一般行为、DAI 评分及大鼠结肠组织病理形态观察

脾肾阳虚型 UC 大鼠复制后出现:毛发枯萎、精神不振、蜷缩扎堆、喜扎堆、反应迟钝、食量减少、肉眼血便、大便稀溏,游泳时间明显缩短,肛周污秽等症状。附子理中丸干预后,大鼠便血、便秘、食欲不振等症状显著减轻且游泳时间变长。如图 6A 所示,各组大鼠体重变化显示:与对照组比较,SKYD-UC 组大鼠体重显著下降($P < 0.001$);与 SKYD-UC 组比较,附子理中丸干预后大鼠体重显著回升($P < 0.01$)。各组大鼠 DAI 评分显示(见图 6B):与对照

组比较,SKYD-UC 组大鼠 DAI 评分显著升高($P < 0.001$);与 SKYD-UC 组比较,附子理中丸干预后 DAI 评分显著下降($P < 0.01$)。

对照组结肠黏膜组织上皮细胞排列整齐,隐窝结构完整,可见大量杯状细胞排列紧密,未见上皮细胞脱落和炎性细胞浸润;与对照组相比,SKYD-UC 组结肠黏膜组织遭到破坏,黏膜层细胞坏死,结构破坏,形成糜烂,未穿过黏膜肌层。附子理中丸干预后大鼠结肠黏膜及黏膜下层水肿明显改善,隐窝结构较完整,可见较大杯状细胞排列紧密,无明显炎性细胞浸润(见图 7)。上述结果提示附子理中丸可有效治疗脾肾阳虚型 UC。

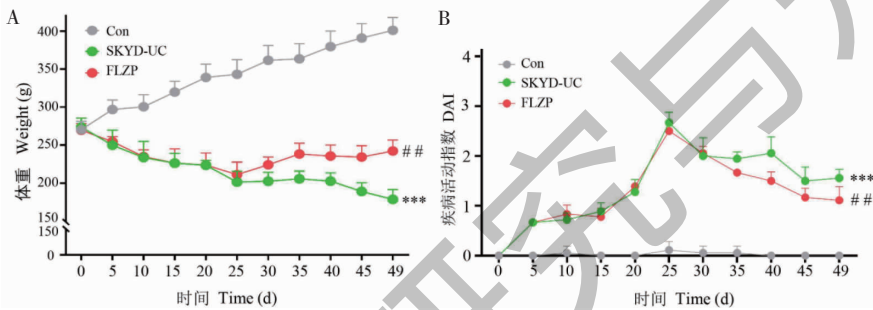


图 6 各组大鼠体重变化、DAI 评分($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Observation of body weight, DAI score in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与对照组比较,*** $P < 0.01$;与 SKYD-UC 组比较,## $P < 0.01$ 。Note:Compared with the control group,*** $P < 0.01$;Compared with the SKYD-UC group,## $P < 0.01$ 。

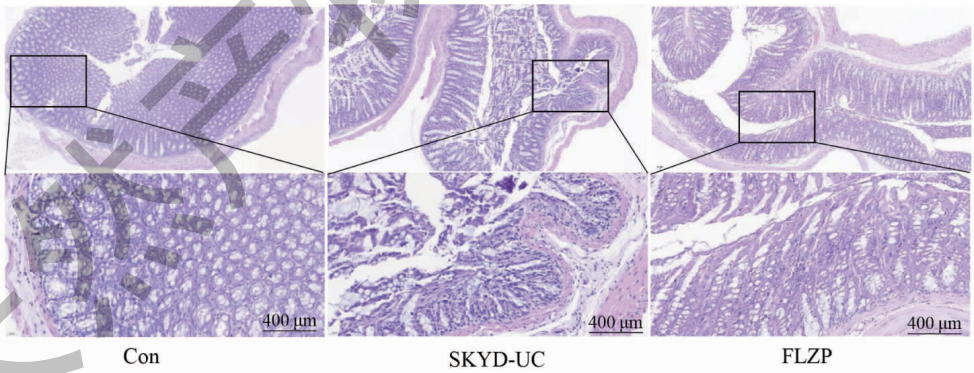


图 7 各组大鼠结肠组织病理形态观察(HE,400×)

Fig. 7 Histological morphology of the colon in each group (HE,400×)

2.5.2.2 脾肾阳虚方重要靶点的验证

采用 ELISA 对脾肾阳虚方的重要靶点 TNF- α 、IL-6 进行实验验证,结果见图 8:与对照组相比较,SKYD-UC 组血清 TNF- α 、IL-6 蛋白含量显著上升($P < 0.001$);与 SKYD-UC 组相比较,附子理中丸组血清 TNF- α 、IL-6 蛋白含量显著下降($P < 0.001$)。这

说明脾肾阳虚方附子理中丸对重要靶点蛋白 TNF- α 、IL-6 具有调控作用。

3 讨论与结论

3.1 七首经典复方的重要靶点

3.1.1 共有重要靶点

在 PPI 网络中按度值排名筛选出 42 个重要靶

点,42个靶点主要分为5类,分别为:蛋白酪氨酸磷酸酶类(PTPN1、PTPN2、PTPN6、PTPN11等)、磷脂酰肌醇3-激酶类(PIK3R1、PIK3CB、PIK3CA等)、丝裂原活化蛋白激酶类(MAPK1、MAPK3、MAPK8、

MAPK14等)、细胞周期蛋白依赖性激酶类(CDK1、CDK2、CDK4等)以及其它类重要靶点(VEGFA、HSP90AA1、LCK等),这些重要靶点可为UC靶向治疗提供参考。

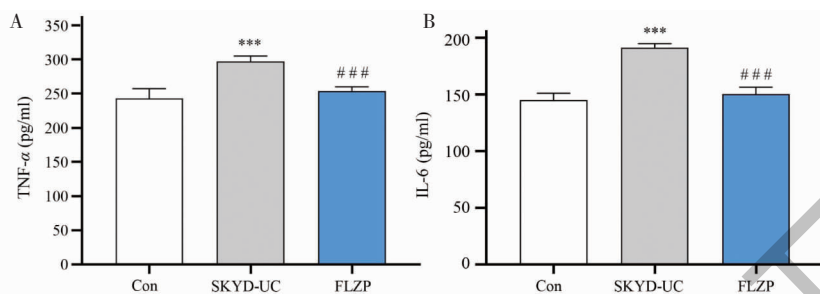


图8 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 The levels of TNF- α and IL-6 in the serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与对照组比较,*** $P < 0.001$;与 SKYD-UC 组比较,### $P < 0.001$ 。Note:Compared with the control group,*** $P < 0.001$;Compared with the SKYD-UC group,### $P < 0.001$ 。

蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs)家族在调节基本细胞信号通路方面作用非常关键,涉及细胞增殖、分化以及细胞存活。在 UC 结肠细胞水平研究上,PTPN2 已被证明是 UC 的主要靶点。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是生长因子调控信号通路的重要分子,在响应细胞外刺激的细胞内信号传导方面起着关键作用。Sun 等^[8]用逆转录聚合酶链反应法和蛋白免疫印迹法检测到 UC 大鼠结肠组织中 PIK3CA 蛋白表达量增高。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)与各种生命活动有关,参与细胞对多种刺激的反应,调节细胞增殖、分化,影响细胞的存活和凋亡。Zhu 等^[9]发现 MAPK 家族成员细胞外信号调节蛋白激酶 1(extracellular signal-regulated protein kinase 1, ERK1)及 ERK2 在 UC 模型大鼠的肠黏膜中表达升高。

细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)在细胞周期调控网络中起着重要作用。此外有部分度值极高的靶点如热休克蛋白(heat shock protein, HSP)90AA1、非受体型酪氨酸激酶家族激酶(LCK)等在当前研究中尚未得到明确的证实,值得我们关注。

3.1.2 每首复方独有的重要靶点

通过 STRING 平台和 Cytoscape 软件获得 14 个独有重要靶点,如信号转导转录激活因子 1

(STAT1, 大肠湿热方独有)作为一种重要的信号传导蛋白,可促进细胞黏附因子表达,导致淋巴细胞聚集,加重炎症反应,在 UC 大鼠结肠组织的表达显著升高^[10];Toll 样受体 4(TLR4, 寒热错杂方独有)的异常激活与 UC 的发生发展密切相关,导致一系列炎症因子的释放,产生或加重组织炎症损伤;脾肾阳虚方独有的肿瘤抑制因子 P53(tumor suppressor p53, TP53)、生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor binding protein 2, GRB2)等与肿瘤密切相关的靶点,TP53 基因是目前发现的与肿瘤相关性最高的一种抑癌基因;GRB2 是一种在细胞中广泛表达的衔接蛋白,在多种肿瘤组织中呈高表达状态。部分 UC 患者会病变为结肠癌,而中医将癌症归属于“积聚”“癥瘕”等范畴,认为本虚标实为其病机,本虚以脾肾亏虚为主,如《景岳全书》曰:“脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”,这与脾肾阳虚型 UC 的中医病机相似,因此与肿瘤密切相关的靶点 TP53、GRB2 是脾肾阳虚方治疗 UC 的独有重要靶点,这一结果在某种程度上体现了中医药的整体观念、辨证论治特色。以上的独有蛋白靶点在不同 UC 中医证型的精准治疗的研究中是值得关注的,也可作为中医证候 UC 分型的特异性评价指标。

3.2 七首经典复方的重要成分

3.2.1 共有重要成分

在 7 首经典复方成分的相互映射中,共筛选出山柰酚、 β -谷甾醇、白桦脂酸、豆甾醇等 4 个重要成

分且均与重要靶点对接的结果较好。山柰酚可以通过恢复肠道微生物和调控 TLR4 相关信号通路减轻小鼠实验性 UC^[11];β-谷甾醇可显著降低 DSS 诱导结肠炎小鼠中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的水平,对实验性 UC 具有治疗作用^[12];白桦脂酸可抑制 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的炎性肠病模型大鼠的结肠炎性损伤^[13];豆甾醇能显著抑制结肠缩短,降低结肠炎的严重程度,显著降低 IL-1β、IL-6 等炎症因子,进而改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎^[14]。这些成分可以作为治疗 UC 药物研究的重要参考。

3.2.2 每首复方独有重要成分

对比分析各经典复方的重要成分获得其独有重要成分。大肠湿热方中有黄芩素、汉黄芩素等成分,黄芩素和汉黄芩素均具有抗炎、抗氧化、抗过敏和抗肿瘤等功效。黄芩素可有效减轻 UC 大鼠炎症反应及结肠黏膜组织炎性病理损伤,其作用机制可能与有效上调结肠黏膜组织热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)表达相关^[15];脾虚湿蕴方有胆甾醇等,胆甾醇广泛分布于人体血液中,是体内激素产生的重要原料基础,其衍生物还具有抗菌、抗病毒、消炎等作用;寒热错杂方中有茵芋碱等,茵芋碱是属于花椒的一种生物碱,花椒中的生物碱均具有抗炎镇痛、抑制血小板凝集的功效;脾肾阳虚方有吴茱萸次碱等成分,吴茱萸次碱可以减轻结肠黏膜的病理损害和抑制肠道平滑肌运动,进而对实验性 UC 起到治疗作用^[16];阴血亏虚中方有杨梅酮等成分,杨梅酮是一种多羟基黄酮醇类化合物,具有抗炎症、抗氧化、抗肿瘤等药理作用。结合网络药理学结果,这些成分可作为不同证型 UC 精准治疗中潜在药物研究的重要参考。

3.3 七首经典复方的重要通路

3.3.1 共有重要通路

KEGG 通路分析表明共有重要靶点主要涉及炎症相关通路和疾病相关通路等。炎症相关通路主要包括 PI3K-Akt、肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)、VEGF 等信号通路;PI3K-Akt 信号通过参与细胞的生长、发育等过程控制癌症发生与进展,可以介导 UC 的发生发展,活化的 Akt 可激活 NF-κB,提高促炎性因子的转录水平,扩大炎症反应;RAS 主要负责机体的体液调节,是多种激素共同参与的级联反应系统。研究发现^[17]可通过影响结肠局部 RAS 的表达调节 UC 小鼠的发生发展;

VEGF 在 UC 的炎性组织中表达显著增强可以影响肠黏膜微循环,加重肠黏膜缺氧损伤^[18],提示 UC 诱导的 VEGF 信号通路被激活。这提示各经典复方共性机制可能是通过调控 PI3K-Akt、RAS、VEGF 等炎症相关通路来防治 UC。疾病相关通路主要包括肝细胞癌、胰腺癌、乙型肝炎、前列腺癌等通路,主要涉及癌症相关通路,这可能与 UC 有癌变倾向相关。

3.3.2 每首复方独有重要通路

通过对各经典复方的重要通路进行对比分析,获得各复方潜在独有重要通路:大肠湿热方有 Janus 激酶/信号转导与转录活化因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)等通路,研究表明^[19]大肠湿热方能够改善湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织的病变程度,有效减轻炎症反应,与抑制 JAK2/STAT3 信号通路,产生负反馈调节,降低其活化有关;热毒炽盛方有甲状腺激素、癌症中的胆碱代谢等通路,血浆游离甲状腺激素可间接影响胃肠的炎症反应,胆碱代谢物可以影响脂肪酸合成通路从而促进炎症反应来加速癌症发展的进程,而热毒炽盛方具有抗炎及愈合溃疡等作用^[20]。这些可能是热毒炽盛方起治疗作用的独有通路;脾虚湿蕴方有 AD 等通路,肠道菌群在 AD 发病中起重要作用,可以通过脑肠轴的神经、内分泌、免疫和代谢调节大脑的生理、行为和认知功能,而脾虚湿蕴方可调节脾虚湿困型 UC 肠道菌群失调菌群结构,从而促进损伤肠组织的恢复^[21],这提示脾虚湿蕴型 UC 可能与 AD 有着重要关联;寒热错杂方有 HIF-1 等通路,炎症部位在缺氧的环境下 HIF-1 通路被激活, HIF-1 的靶基因表达水平上调,导致血管重构、通透性改变、炎症因子释放增加等,机体则转变为慢性炎症状态;肝郁脾虚方有雌激素(estrogen)等信号通路,雌激素能够通过与其受体结合,抑制 P38/MAPK 通路,从而减少 UC 患者体内的 IL-6 以及一氧化氮(NO)水平的表达,对 UC 的疾病发展起到抑制作用^[22];脾肾阳虚方有 T 细胞受体等通路,UC 患者中表达 TCR-β 的 T 细胞克隆扩增与疾病严重程度相关,并参与介导肠道炎症^[23]。这些独有通路在对不同 UC 中医证型的精确治疗研究中值得被关注。

中医认为 UC 病多因脾为湿困,健运失常,邪滞肠道,阻滞气血运行,致腑气壅滞,血败肉腐而下痢赤白脓血,日久多累及肾阳,遂致脾肾两虚,进而发

展为脾肾阳虚型 UC。脾肾虚损已成为中医对 UC 病机认识的主流,也是 UC 缠绵难愈的关键所在。故本文在动物实验部分,选取代表性 UC 中医证型——脾肾阳虚型 UC 进行了探究。

促炎细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的分泌在 UC 的发生发展中发挥重要作用,TNF- α 能激活上皮细胞,诱导趋化因子,使中性粒细胞聚集,炎症效应放大,损伤肠黏膜组织,其血清中水平与 UC 严重程度呈正相关;IL-6 能诱导细胞因子的表达,使 TNF- α 的生物学活性增强,炎症反应加重,其血清中水平可反映 UC 的严重程度。本研究结果显示,附子理中丸能够显著抑制脾肾阳虚型 UC 大鼠血清中 TNF- α 及 IL-6 的活性,提示其有抗炎作用。此外,在本研究中对 7 首经典复方药材的使用频次进行统计分析以获得重要药材,发现脾肾阳虚方中组成附子理中丸的五味药材均为重要药材。作者前期研究表明^[24],附子理中丸治疗 UC 具有多成分、多靶点和多途径的特点。

综上所述,7 首经典复方中的 β -谷甾醇、豆甾醇、白桦脂酸、山柰酚等 4 个重要成分可能作用于 PTPN1、MAPK1、CDK1、VEGFA 等 42 个重要靶点,通过调控 PI3K-Akt、RAS、VEGF 等炎症信号通路,发挥调节免疫、消除炎症、调节细胞凋亡及抗癌等作用,这为 UC 药物研究及其靶向治疗提供参考;附子理中丸可以通过作用于 TNF- α 、IL-6 等炎症靶点,发挥治疗脾肾阳虚型 UC 的作用,其机制可能与调控 T 细胞受体等炎症通路相关。随着 UC 病情演变,不同 UC 中医证型经典复方存在靶点、通路及成分差异性。如 STAT1(大肠湿热方),TLR4(寒热错杂方),TP53、GRB2(脾肾阳虚方)等 14 个独有重要靶点;黄芩素、汉黄芩素等 30 个独有重要成分以及 JAK-STAT 等 14 条独有重要通路,这间接说明了不同 UC 中医证型存在差异,应当辨证论治精确治疗。同时这些独有重要靶点、成分、通路在不同 UC 中医证型精确治疗研究中是值得关注的,独有靶点蛋白也可作为中医证候 UC 辨证分型的潜在评价指标。

参考文献

- Li JX, Chen J. Consensus opinions on the diagnosis and treatment of ulcerative colitis by integrated traditional Chinese and western medicine(2017)[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig(中国中西医结合消化杂志),2018,26:105-111.
- Zhong HY, Chen KX, Dong LL, et al. Mechanism of com-

- bined treatment of rhein and emodin in rhubarb for ulcerative colitis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2022,47:4148-4155.
- Liu R, Wang Y, Zhu XD, et al. Effect of Sishenwan on PI3K/Akt/mTOR signal pathway in colonic tissue of Rats with ulcerative colitis model of spleen kidney Yang deficiency[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2021,27:16-23.
- Zhang SS, Shen H, Zheng K, et al. Consensus opinions of experts on traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of ulcerative colitis(2017)[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2017,32:3585-3589.
- China Association of Chinese Medicine. Top 10 academic progress of traditional Chinese medicine in 2021[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2022,28:1-12.
- Wang X, Zhu Y, Zou JJ. Effects of Kuijiening plaster point application on pro- and anti-inflammatory cytokines in serum and colonic tissue of ulcerative colitis rats with spleen-kidney yang deficiency[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2016,23:42-46.
- Wang YP, Zhu Y, Wang X. Experimental research of rat model with ulcerative colitis of spleen-kidney Yang deficiency type[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急症),2015,24:1332-1334.
- Sun CA, Wang FY, Li SX, et al. Effect of Shaoyao decoction on the expression of TLR2, PIK3CA and AKT signaling pathway in colonic tissue of rats with ulcerative colitis[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药),2019,51:83-86.
- Zhu XD, Duan YQ, Wang Y, et al. Influence of tongxie yao fang on ERK1 and ERK2 gene expressions of colonic mucosa in rats with ulcerative colitis[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2013,29:347-350.
- Yang J, Shi LJ. Effects of Stasis-resolving Yang-activating prescription on IL-23/JAK-STAT signaling pathway in UC rats[J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药),2021,34:17-21.
- Qu Y, Li X, Xu F, et al. Kaempferol alleviates murine experimental colitis by restoring gut microbiota and inhibiting the LPS-TLR4-NF- κ B Axis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 679897.
- Ding K, Tan YY, Ding Y, et al. β -Sitosterol improves experimental colitis in mice with a target against pathogenic bacteria[J]. J Cell Biochem,2019,120:5687-5694.
- Zheng WH, Bai XL, Hu JY, et al. Intervention effect of total triterpenoids on inflammatory bowel disease in rats and prediction of related targets/pathways[J]. Pharmacol Clin Chin

- Mater Med(中药药理与临床),2021,37:38-44.
- 14 Feng SM, Ning K, Shao P, et al. Study on the therapeutic effects of β -sitosterol and stigmasterol on acute colitis in mice [J]. J Chin Cereals Oils Assoc(中国粮油学报),2018,33:80-86.
 - 15 Xu WH, Zhang LZ, Li X, et al. Effects of baicalein on heat shock protein 70 expression in rats with ulcerative colitis [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2020,36:36-38.
 - 16 Liu BL, Wu WW, Jin CF, et al. Therapeutic effect of Rute-carpine on ulcerative colitis rats[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学),2004(11):1273-1277.
 - 17 Wei XZ. Vitamin D inhibits mouse colitis by targeting the local renin-angiotensin system [D]. Shenyang: China Medical University(中国医科大学),2021.
 - 18 Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Parfieniuk A, et al. Pigment epithelium-derived factor in ulcerative colitis; possible relationship with disease activity[J]. Regul Pept,2007,140:1-4.
 - 19 Wang YF, Zhao DS, Wang FY, et al. Effect of Shaoyao tang in adjusting molecular mechanism of JAK2/STAT3 and SOCS3 in syndrome ulcerative colitis rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2017,23:97-102.
 - 20 Zhang BG, Liang XX, Liu QF. Study on modern pharmacodynamics of Baitouweng Tang [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2009,31:607-608.
 - 21 Sun J, Wang J, Hu JP, et al. Effect of Shenling Baizhu San on colonic microbiota in ulcerative colitis rats with the dampness stagnancy due to spleen deficiency syndrome [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med(云南中医学院学报),2013,36:1-4.
 - 22 Lu Y, Du J, Zhao JR, et al. Effect estrogen on the expression of NF-kappa B, IL-6, and NO in patients with ulcerative colitis [J]. Int J Immunol(国际免疫学杂志),2019,42:38-44.
 - 23 Werner L, Nunberg MY, Rechavi E, et al. Altered T cell receptor beta repertoire patterns in pediatric ulcerative colitis [J]. Clin Exp Immunol,2019,196:1-11.
 - 24 Huang Y, Yang SS, Lin X, et al. The mechanism of action of Fuzi-Lizhong pill in treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology-molecular docking [J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2020,55:1812-1822.
- (上接第 647 页)
- 14 Li FC, Li HM, Yin XM, et al. Molecular identification of Tibetan *Codonopsis* plants based on ITS2 and psbA-trnH barcode [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2022,28:173-180.
 - 15 Wen M, Zhou X, Zhao C, et al. Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Miao medicine *Prionobelium qianensis* Chen [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1668-1674.
 - 16 Hou DY, Yang MM, Zhou S, et al. Identification of six medicinal materials in *Swertia* based on ITS2 sequence [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:1126-1131.
 - 17 Zhong ZM, Lai XP, Huang S, et al. ITS2 barcode identification and cluster analysis of Gingeraceae plants [J]. J Chin Med Mater(中药材),2017,40:2046-2050.
 - 18 Li D, Feng JW, Chen HP, et al. The quality evaluation of *Psidii Guajavae Folium* from different areas based on fingerprints and hemometrics [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:899-912.