

# 藏药翁布对溃疡性结肠炎的作用机制研究

李新蕊<sup>1</sup>, 陈海娟<sup>1,2\*</sup>, 高禹涵<sup>1</sup>, 徐丽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>青海师范大学生命科学院 青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室;

<sup>2</sup>高原科学与可持续发展研究院, 西宁 810008

**摘要:**基于网络药理学、分子对接和实验验证,探讨藏药翁布(*Myricaria germanica*)治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的作用及机制。采用UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS技术对翁布原植物化学成分进行快速分析;基于网络药理学预测和筛选翁布治疗UC的核心成分、靶基因和主要通路,并对核心成分和靶点进行分子对接验证;通过葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导UC小鼠模型,观察翁布对UC小鼠的治疗作用。筛选出翁布治疗UC活性成分23种,作用于111个共同靶点;PPI网络分析显示AKT1、TNF、CASP3等可能是核心靶点;GO生物过程主要涉及炎症反应、免疫反应等;KEGG信号通路主要涉及MAPK信号通路、TNF信号通路等;分子对接显示核心靶点TNF、CASP3等与核心活性成分结合良好;翁布可以改善DSS诱导的UC小鼠的结肠长度和结肠黏膜损伤,降低结肠和血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量。翁布通过大黄酸、异鼠李素、鞣花酸、蟛蜞菊内酯和去甲蟛蜞菊内酯等化合物调节TNF- $\alpha$ 、PTGS2等靶点发挥治疗UC的作用。

**关键词:**翁布;溃疡性结肠炎;UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS;网络药理学;分子对接

中图分类号:S859.7

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)2-0206-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.2.003

## Study on the mechanism of Tibetan medicine *Myricaria germanica* on ulcerative colitis

LI Xin-rui<sup>1</sup>, CHEN Hai-juan<sup>1,2\*</sup>, GAO Yu-han<sup>1</sup>, XU Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Medicinal Animal and Plant Resources in Qinghai Tibet Plateau, School of Life Sciences, Qinghai Normal University; <sup>2</sup>Academy of Plateau Science and Sustainability, Xining 810008, China

**Abstract:** Based on network pharmacology, molecular dock and experimental verification, the effect and mechanism of *Myricaria germanica* in the treatment of ulcerative colitis (UC) were investigated. The UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS technique was used for the rapid analysis of the original phytochemical components of *M. germanica*; the core components, target genes and main pathways of *M. germanica* for the treatment of UC were predicted and screened based on the network pharmacology, and molecular docking validation was carried out on the core components and targets; and the therapeutic effects of *M. germanica* on UC were observed by the mouse model of UC induced by dextran sulfate sodium (DSS). Twenty-three active ingredients of *M. germanica* for the treatment of UC were screened and acted on 111 common targets; PPI network analysis showed that AKT1, TNF, CASP3, etc. might be the core targets; GO biological process mainly involved inflammatory response, immune response, etc.; KEGG signaling pathway mainly involved MAPK signaling pathway, TNF signaling pathway, etc.; molecular docking showed that TNF, CASP3 and other core targets could bind well with the core active components; *M. germanica* can improve colon length and colonic mucosal damage in DSS-induced UC mice, and reduce the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in colon and serum. *M. germanica* exerts its therapeutic effects on UC by modulating TNF- $\alpha$ , PTGS2 and other targets through compounds such as rheic acid, isorhamnetin, ellagic acid, wedelolactone and desmethylwedelolactone.

**Key words:** *Myricaria germanica*; ulcerative colitis; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; network pharmacology; molecular docking

收稿日期:2023-07-21

接受日期:2023-12-06

基金项目:青海省科技厅科技国际合作项目(2021-HZ-805);青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”(2020);青海师范大学博士科研启动经费(2021)

\* 通信作者 E-mail: chenmercury@126.com

翁布为传统藏药,其来源为柽柳科水柏枝属(*Myricaria*)多种植物的嫩叶<sup>[1]</sup>,广泛分布于西藏、青海、云南等地。现代研究表明,翁布的主要化学成分为黄酮类和多酚类化合物<sup>[1]</sup>,药用部位为嫩枝,青绿色,其性平,味涩微苦,治黄水病、内腔毒热、发散透疹,用于瘟疫、血热、中毒热证,麻疹不透及咽喉肿痛等症<sup>[2]</sup>。“久痢”的基本病机是脾虚湿热蕴结,气血不和,而“血热”是溃疡结肠炎活动期的重要致病因素<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明翁布还具有抑菌、抗炎镇痛、抗风湿、抗疲劳和抗氧化等作用<sup>[4]</sup>。

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未完全清楚的结肠慢性炎症疾病,病变局限于大肠黏膜及黏膜下层<sup>[5]</sup>,主要症状为腹痛、腹泻、黏液脓血便等<sup>[6]</sup>,且病情易复发、迁延难愈<sup>[7]</sup>。免疫抑制剂、皮质类固醇激素和氨基水杨酸钠制剂是目前治疗 UC 的主要手段,短期治疗效果明显,但存在不良反应大、不能维持等问题<sup>[8]</sup>。翁布对 UC 是否有治疗作用,尚不明确。本研究拟通过 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术、网络药理学、分子对接和动物实验验证,探究藏药翁布治疗 UC 的作用及机制,为翁布的合理开发利用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 C57BL-6 小鼠,40 只,清洁级,体重(20 ± 2)g,购于西安交通大学医学实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK(陕)-2017003),实验前适应性饲养 7 d,自由摄食、饮水,室内温度 18 ~ 24 °C,相对湿度 40% ~ 70%,每日 12 h 光照维持,昼夜循环。实验过程中动物的处置均符合实验动物伦理学规范,实验程序符合青海师范大学实验动物伦理委员会的批准(编号 20230310)。

### 1.2 实验药物和试剂

翁布采自 2022 年 7 月青海省海东市民和县古鄯镇,经青海师范大学生命科学学院尚军副教授鉴定为水柏枝(*Myricaria germanica*)嫩枝叶。美沙拉嗪胶囊(批号:H20020211,黑龙江天宏药业有限公司);葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)(批号:0216011090,美国 MP 公司,);多聚甲醛(PFA)固定液(批号:G1101-500ML,武汉塞维尔生物科技有限公司);TNF- $\alpha$ 、IL-6 试剂盒(批号:J24082、J24111,武汉吉立德生物科技有限公司);羧甲基纤维素钠(sodium carboxyl methyl cellulose, CMC-Na)(批号:S851013,上海弘顺生物科技有限

公司);其他分析纯均购自山东禹王化学试剂厂。

### 1.3 实验仪器

高通量组织破碎仪(Tissuelyser-48,上海净信实业发展有限公司);台式快速离心浓缩干燥器(ZLS-1,湖南赫西仪器装备有限公司);氮气吹扫仪(Reacti-thermo)、超高效液相色谱(UHPLC)、质谱仪(Q Exactive)(赛默飞世尔科技有限公司)。

### 1.4 动物实验

#### 1.4.1 DSS 模型制备和给药方法

取干燥的翁布嫩枝叶 2 kg,粉碎,用 10 倍量的 75% 乙醇加热冷凝回流提取 3 次,每次 120 min,合并三次提取液,浓缩减压干燥得翁布乙醇提取物浸膏。给药时,将浸膏用 0.5% CMC-Na 配成混悬液<sup>[9]</sup>。Bao 等<sup>[10]</sup>用乙醇回流提取翁布嫩枝叶,用生理盐水配成含提取物 0.14 g/mL(相当于生药量 0.864 g/kg)的溶液,探究藏药翁布提取物对 SD 大鼠 FCA 诱导性关节炎的试验研究。参照此给药剂量换算小鼠给药高、低翁布提取物混悬液:0.06、0.24 mg/L;阳性药美沙拉嗪胶囊:0.3 g/kg。

将 40 只小鼠随机分为空白对照组(negative control, NC)、DSS 模型组(DSS model, Mod)、翁布高(*M. germanica* high dose, MG-H)、低剂量组 *M. germanica* low dose, MG-L)和阳性药物美沙拉嗪(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)组。实验期间,空白组小鼠给予蒸馏水,其余各组采用自由饮用 3% DSS 溶液(每天 8 时定时更换添加新的饲喂蒸馏水及 DSS 溶液),均连续饲喂 7 d,建立 UC 小鼠模型。实验期间每天测量小鼠体重、观察粪便性状,肛门是否便血,并进行 DAI 评分。于造模第 3 d 和 7 d 各组随机各取 1 只小鼠,颈椎脱臼处死,测量小鼠结肠长度和观察充血程度,并结合体重变化和便血程度确认是否造模成功。从造模第 1 d 开始,每天定时上午 9 时对小鼠进行 1 次灌胃,连续 15 d。

#### 1.4.2 血清、结肠样本的采集和检测

最后一次给药后,禁食不禁水 24 h,进行眼眶取血,静置,以 3 000 r/min 转速离心 10 min,收集上清液,测定小鼠血清中白介素 6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  的含量,具体方法按照 ELISA 试剂盒的说明书进行检测。实验结束后,各组小鼠脱颈处死,解剖取结肠,测量并记录结肠长度;肉眼观察结肠表面有无充血、溃疡等变化;取出的肠段组织,生理盐水(预冷)清洗内容物,切取约 1 cm 变化较为明显的肠段并用滤纸吸干水分,使用组织固定液固定,再进行石蜡包

理、切片、苏木素-伊红染色,观察结肠组织的病理变化情况。免疫组织化学检验的切片 60 °C 烤箱过夜,脱蜡水化,抗原修复,血清封闭,DAB 显色脱水,透明中性树胶封片,光镜下观察结果。

#### 1.4.3 RT-qPCR 法检测 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 和 IL-6mRNA 表达

按“1.4.2”项下方法取各组取小鼠结肠黏膜组织研磨匀浆,在小鼠结肠黏膜组织样本中加入 Trizol,经氯仿、异丙醇体系提取组织总 mRNA,经逆转录合成对应的 cDNA,完成 RT-PCR 的检测。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'-3')
TNF- $\alpha$	F:TGCACTTTGGAGTGATCGGC R:GCTTGAGGGTTTGCTACAACA
IL-6	F:TGGGACTGATGCTGGTGACAAC R:GACGGCAGAGAGGAGTTGACT

## 1.5 网络药理学分析

### 1.5.1 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 获取翁布化学成分

#### 1.5.1.1 样品制备

将干燥的翁布嫩枝叶研磨粉碎,过 100 目筛,得翁布粉末样品,低温保存。样本在 4 °C 环境下解冻后,称取适量样本(0.1 ~ 200 mg),分别加入 0.1 mL 水(预冷),涡旋 1 min,加入 400  $\mu$ L 预冷甲醇乙腈溶液(1:1, V/V),涡旋 1 min,低温超声 0.5 h,2 次,-20 °C 放置 1 h 沉淀蛋白,12 000 r/min,4 °C 离心 20 min,取上清真空干燥复溶于 200  $\mu$ L 30% 乙腈,涡旋,14 000 g,4 °C 离心 0.25 h,取上清上机检测。

#### 1.5.1.2 液相色谱参数

色谱柱:Waters HSS T3(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu$ m);流动相:A 相为 0.1% 甲酸-水溶液,B 相为 0.1% 甲酸-乙腈-异丙醇;流速 0.3 mL/min;柱温 40 °C;进样量 2  $\mu$ L;洗脱梯度:0.0 ~ 2.0 min A/B(90:10, V/V),6.0 ~ 15.0 min A/B(40:60, V/V),15.1 ~ 17.0 min 水/乙腈(90:10, V/V);将样品置于 4 °C 自动进样器进行自动进样分析(随机顺序连续分析),为监测和评价系统的稳定性和实验数据的可靠性,实验时将 QC: 样品穿插入样本序列中。

#### 1.5.1.3 QE 质谱条件

采用美国 Thermo 公司 Q exactive 高分辨质谱检

测系统进行样本一级、二级谱图的采集。电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)条件如下:鞘气 40 arb;辅助气 10 arb;离子喷雾电压 3 000 V/-2 800 V;温度 350 °C;离子传输管温度 320 °C。扫描模式为 Full-scan MS<sup>2</sup> 模式;扫描方式为正离子/负离子,一级扫描范围:70 ~ 1 050 Da,二级扫描 200 ~ 2 000,一级分辨率 70 000,二级 17 500。

### 1.5.2 翁布主要活性成分靶蛋白的预测

将 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 得到的化学成分在 TCMSP (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台进行筛选,筛选口服生物利用度(oral bioavailability, OB) > 30,类药性(drug-likeness, DL) > 0.18,利用 PubChem 数据库查找活性成分的 Canonical SMILES 表达式,导入 SwissTargetPrediction 数据库和 TargetNet 数据库进行筛选,预测翁布各成分对应靶蛋白,合并 23 个活性成分在两个数据库的筛选结果。

### 1.5.3 溃疡性结肠炎相关基因靶点收集

以“ulcerative colitis”为关键词,在 GeneCards 数据库中检索 UC 的潜在靶点。通过 Excel 计算,以 Score > 1.07 进行筛选,获取最终 UC 相关基因靶点。

### 1.5.4 翁布治疗 UC 潜在靶点预测

在 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 网站输入翁布靶点和 UC 靶点,得到二者相交靶点图,相交部分即翁布治疗 UC 的潜在靶点。

### 1.5.5 翁布活性成分-UC 靶点网络图的构建

运用 Cytoscape3.9.0 构建“翁布-活性成分-UC”靶点网络图,进行有效成分及靶点的拓扑数据分析(TDA)分析,包括度值(degree)、中介中心度(betweenness centrality, BC)和接近中心度(closeness centrality, CC),并根据 TDA 分析参数判断翁布治疗 UC 核心靶点及其发挥药效的主要活性成分。

### 1.5.6 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络的构建和关键靶点的筛选

将 1.5.5 所得翁布治疗 UC 核心基因靶点导入 STRING 数据库构建蛋白互作网络,并将相互作用信息导入 Cytoscape3.9.0 软件中,进行拓扑数据分析(TDA),计算出各节点的度值、BC 和 CC,选择 TDA 分析参数均大于中位数的靶蛋白,获得关键靶点。

### 1.5.7 关键靶蛋白 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

将上述“1.5.6”所得的 14 个关键靶蛋白导入 DAVID 数据库,对其进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,获得翁布治疗 UC 的潜在通

路。通过微生物信作图平台得到 GO 富集分析的气泡图和 KEGG 通路分析图。

### 1.5.8 翁布核心成分与溃疡性结肠炎作用核心靶蛋白的分子对接验证

将“翁布-活性成分-UC”疾病靶点网络图中 TDA 分析参数排名前 5 的活性成分与 PPI 网络 TDA 分析得到的核心靶蛋白进行分子对接。UniProt 数据库和 PDB 数据库下载核心蛋白 3D 结构的 pdb 文件;从 TCMS 数据库获取翁布活性成分 2D 结构的 mol2 文件。运用 AutoDockTools 软件首先进行核心蛋白去水、加氢,选为受体,然后对活性成分小分子进行加氢处理,将其选为配基。然后准备 Autogrid

和 AutoDock 并运行,运行完毕后进行半柔性对接 (semi-flexible docking), 将对接结果运用 OpenBabel 和 PyMOL 软件进行转换和绘图处理,得到翁布主要有效成分治疗 UC 的证据支持。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学分析

#### 2.1.1 翁布治疗 UC 主要活性成分及靶点筛选

翁布供试品溶液按上述色谱和质谱条件进 UH-PLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 分析,结合正、负离子模式下总离子流图(见图 1),根据所测精确分子量,将一级质谱数据与数据库化合物的分子式对比,对化合物进行初步鉴定,从翁布中共鉴定出 171 种化合

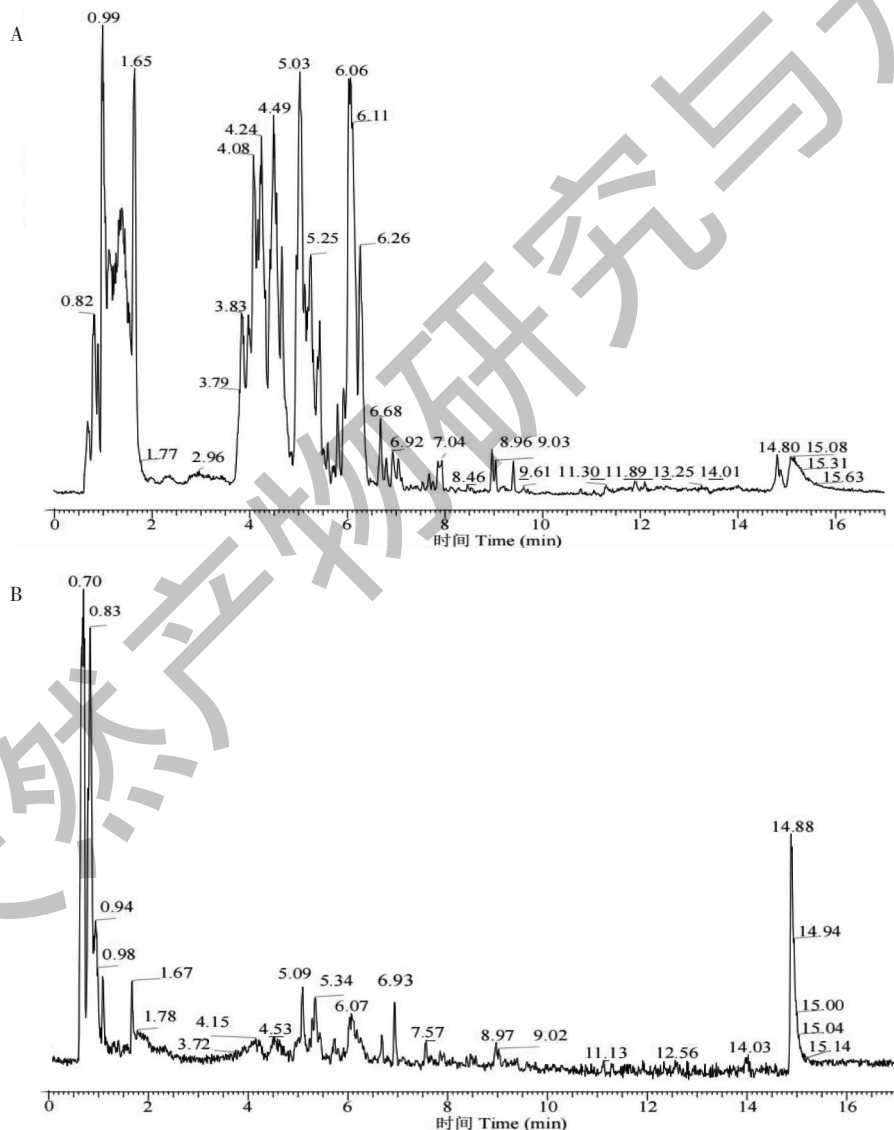


图 1 翁布药材总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of *M. germanica*

注:A 为负离子模式;B 为正离子模式。Note:A: Negative ion mode; B: Positive ion mode.

物,经 TCMSP 数据库进行筛选,获得翁布有效成分 23 个(见表 2)。通过 SwissTarget Prediction 数据库

对翁布的 23 个活性成分的作用靶点进行预测,共获得 285 个活性成分靶点。

表 2 翁布活性成分和靶点数

Table 2 Active components and target number of *M. germanica*

编号 No.	化合物 Compound	靶点数 Number of targets
1	蟛蜞菊内酯 Wedelolactone	58
2	花旗松素 Taxifolin	28
3	大黄酸 Rheic acid	47
4	乔松素 Pinocembrin	22
5	柳穿鱼黄素 Pectolarigenin	41
6	桑色素 Morin	35
7	亚麻酸乙酯 Linolenic acid ethyl ester	23
8	蒙花苷 Linarin	21
9	异牡荆黄素 Isovitexin	20
10	异鼠李素 Isorhamnetin	43
11	橙皮素 Hesperetin	29
12	高良姜素 Galangin	15
13	连翘苷 Forsythin	9
14	圣草酚 Eriodictyol	22
15	表儿茶素 Epicatechin	22
16	鞣花酸 Ellagic acid	43
17	香叶木素 Diosmetin	41
18	去甲蟛蜞菊内酯 Demethylwedelolactone	42
19	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 Cyanidin-3-O-glucoside chloride	12
20	波尔定碱 Boldine	22
21	穿心莲内酯 Andrographolide	9
22	金合欢素 Andrographolide	35
23	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 (-)-Epigallocatechin gallate	21

### 2.1.2 翁布治疗 UC 的核心靶点筛选及 PPI 网络的构建

从 GeneCards 数据库筛选出 UC 靶点 2 415 个。将以上 285 个活性成分靶点与 2 415 个疾病相关靶点取交集,获得翁布治疗 UC 的潜在作用靶点 111 个(见图 2)。将上述共有靶点构建“翁布-活性成分-UC”网络图,如图 3 所示,翁布治疗 UC 的核心成

分为蟛蜞菊内酯、去甲蟛蜞菊内酯、大黄酸、鞣花酸和异鼠李素,最主要靶点为 TNF、ABCB1、RELA 等。将筛选出的潜在靶点输入到 String 数据库,构建 PPI 蛋白相互作用网络图,如图 4 所示,TNF、EGFR 和 CASP3 等基因位于 PPI 网络图的核心位置,在 PPI 网络中发挥关键调控作用。

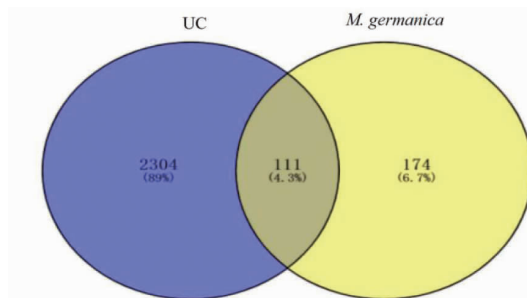


图 2 溃疡性结肠炎与翁布交集靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of UC-*M. germanica* targets

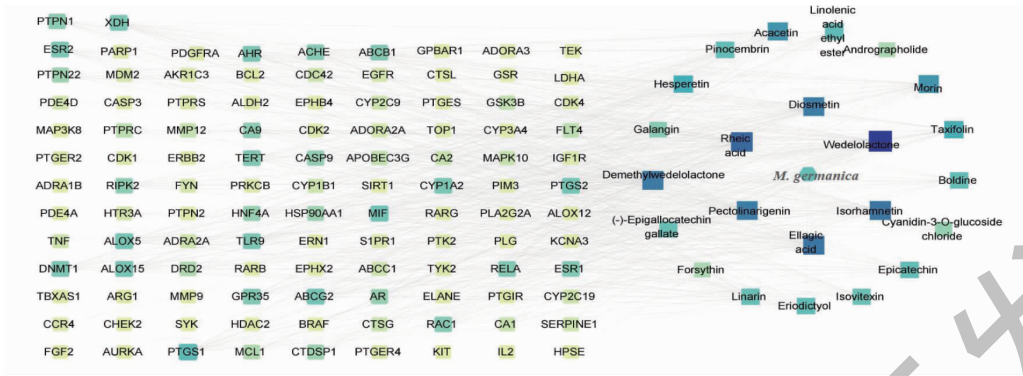


图3 翁布“活性成分-作用靶点”网络

Fig. 3 Network prediction of active compound-target of *M. germanica*

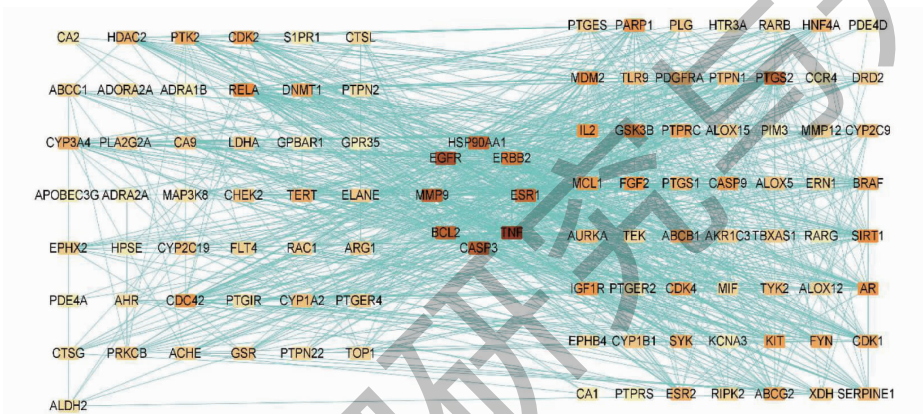


图4 蛋白-蛋白互作网络

Fig. 4 Protein-protein interaction diagram

2.1.3 翁布治疗溃疡性结肠炎潜在靶点生物功能与通路的富集分析

GO 功能富集分析包括生物过程 (biological

process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cell component, CC) 三个模块。如图 5 所示, BP 显示靶基因主要集中在 一氧化氮合酶调控过

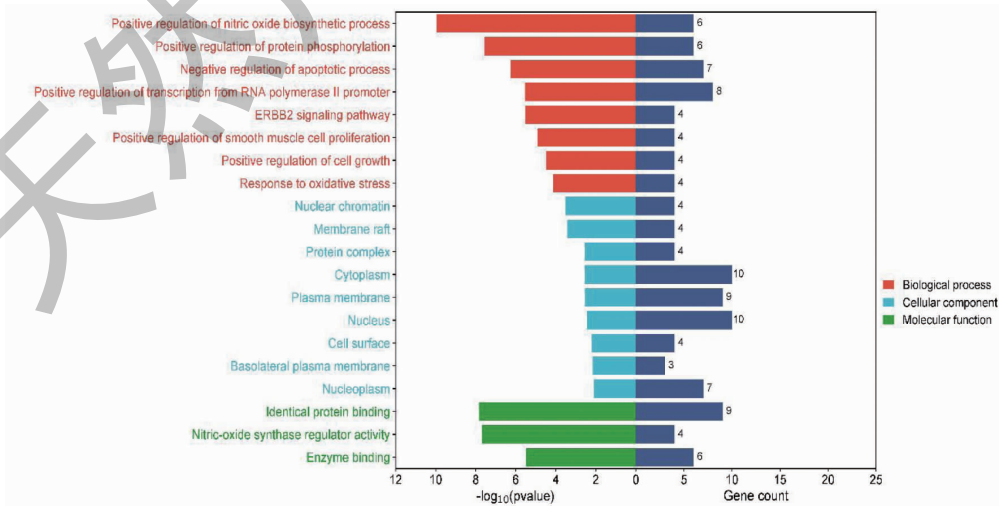


图5 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO enrichment of function analysis

程、蛋白磷酸化调控、细胞凋亡过程、平滑肌细胞增殖调控和氧化应激反应等;CC 主要与核染色质、蛋白质复合物、细胞质等有关;MF 主要与相同蛋白质结合、蛋白质复合物、细胞质等有关。KEGG 通路富

集分析显示(如图 6 所示),翁布治疗 UC 的药理作用通路包括癌症通路、TNF 信号转导、MAPK 信号转导通路和雌激素信号通路等。

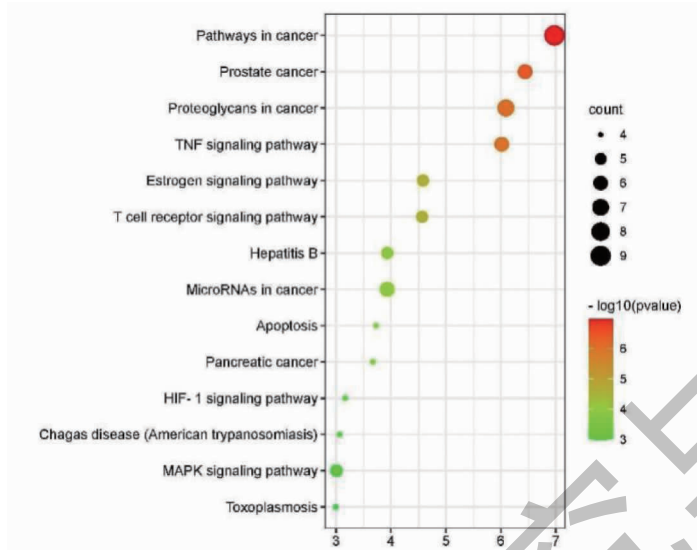


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis

#### 2.1.4 翁布核心活性成分与溃疡性结肠炎共同作用靶蛋白的分子对接验证

为进一步验证翁布治疗溃疡性结肠炎的分子机制,将翁布治疗溃疡性结肠炎的核心成分与靶点进行分子对接,初步验证两者之间的结合活性,结果见表 3。配基与蛋白受体之间的结合能越低,两者之间亲和能力越好,构想也更稳定<sup>[11,12]</sup>。对接结果显示,大黄酸、去甲蟛蜞菊内酯、蟛蜞菊内酯和鞣花酸等化合物与关键作用靶点 TNF、CASP3、EGFR、PTGS2 和 HSP90AA1 的结合能均小于-5.10 kcal/mol,说明两者之间具有较好的结合活性,且大黄酸与 TNF,大黄酸、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯与

PTGS2 之间的结合能均小于-7.23 kcal/mol,显示出强烈的结合活性,利用 PyMOL 软件进行可视化分析(见图 7),观察可视化图发现所述配基化合物均能很稳定地包裹在受体蛋白的活性口袋中。Rheic acid 通过氨基酸残基 ALA-109、GLY-224、VAL-226 与 TNF 形成 5 条氢键,通过氨基酸残基 CYS-32、TYR-116、CYS-26、HIS-24、LYS-454、GLU-451 与 PTGS2 形成 7 条氢键。去甲蟛蜞菊内酯与 PTGS2 通过氨基酸残基 ASN-28、GLN-26、ARG-29、CYS-26、LYS-454、CYS-32、HIS-24、GLU-451 形成 9 条氢键,并且所述配基化合物均能很稳定地包裹在受体蛋白的活性口袋中。

表 3 翁布核心成分与核心靶蛋白结合能

Table 3 Binding energy between core components and core target proteins of *M. germanica* (kcal/mol)

化合物 Compound	TNF	CASP3	EGFR	PTGS2	HSP90AA1
大黄酸 Rheic acid	-7.23	-5.18	-5.59	-7.42	-5.28
去甲蟛蜞菊内酯 Demethylwedelolactone	-5.69	-4.86	-5.72	-7.26	-4.89
蟛蜞菊内酯 Wedelolactone	-5.13	-4.70	-5.10	-7.77	-4.45
鞣花酸 Ellagic acid	-6.93	-4.69	-5.39	-6.97	-4.8
异鼠李素 Isorhamnetin	-4.55	-4.53	-4.65	-4.93	-5.16

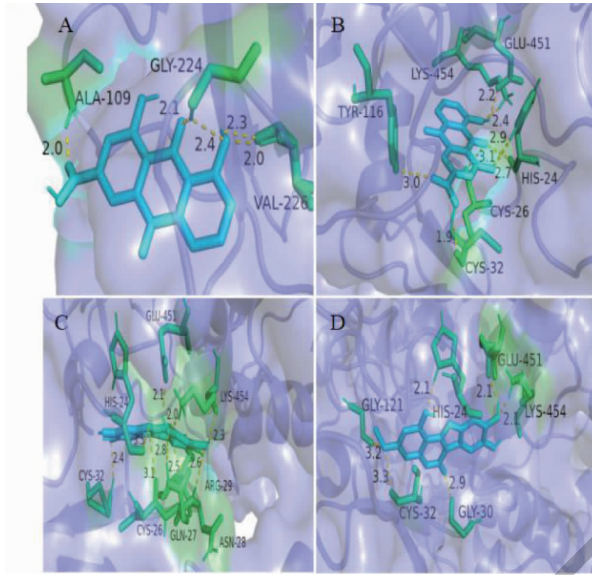


图7 分子对接示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecular docking

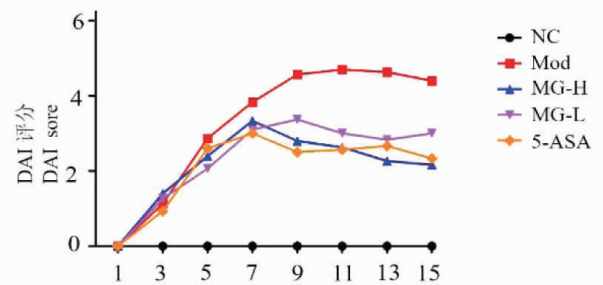
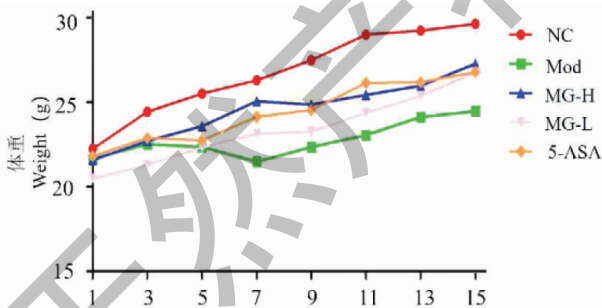
注:蓝色表示配基,绿色表示与配基对接的氨基酸残基,黄色代表氢键。A:TNF-大黄酸;B:PSTG2-大黄酸;C:PSTG2-去甲蟅蜆菊内酯;D:PSTG2-蟅蜆菊内酯。Note:Blue for ligands,green for amino acid residues docking with ligands,yellow for hydrogen bonds. A:TNF-Rheic acid;B:PSTG2-Rheic acid;C:PSTG2-Demethylwedelolacton;D:PSTG2-Wedelolacton.

## 2.2 体内实验验证

### 2.2.1 翁布提取物对 UC 小鼠一般状态的影响

空白对照组小鼠毛发、大便、饮食均正常,精神状态良好,体重自然增加;与空白对照组相比,模型组小鼠精神状态倦怠,身体蜷缩,少动,毛发无光泽,出现不同程度的便血、腹泻或肛门血染,如图8所示,

体重在造模期间逐渐减少,停止造模后缓慢增加;与模型组相比,翁布各给药组和5-ASA组在造模第1~5 d体重增加缓慢,在停止造模后,随着治疗的推进,体重逐渐回升。模型组小鼠DAI评分较空白组增加;与模型组相比,5-ASA组和翁布各剂量组小鼠DAI评分降低。

图8 翁布对 UC 小鼠体重和 DAI 评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 8 Effect of *M. germanica* on the body weight and DAI score in UC mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 2.2.2 翁布对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理损伤的影响

空白对照组小鼠腺体排列整齐,黏膜结构完整,未见炎性细胞浸润;与空白对照组相比,模型组小鼠腺体排列紊乱,间隙增大,上皮脱落,炎性细胞浸润明显。与模型组相比,各给药组小鼠黏膜结构,腺体排列和炎性细胞浸润程度等均有所改善(见图9)。

### 2.2.3 翁布对 UC 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的影响

与空白对照组相比,模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高( $P < 0.001$ );与模型组相比,翁布高、低剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低( $P < 0.01$ )(见图10)。



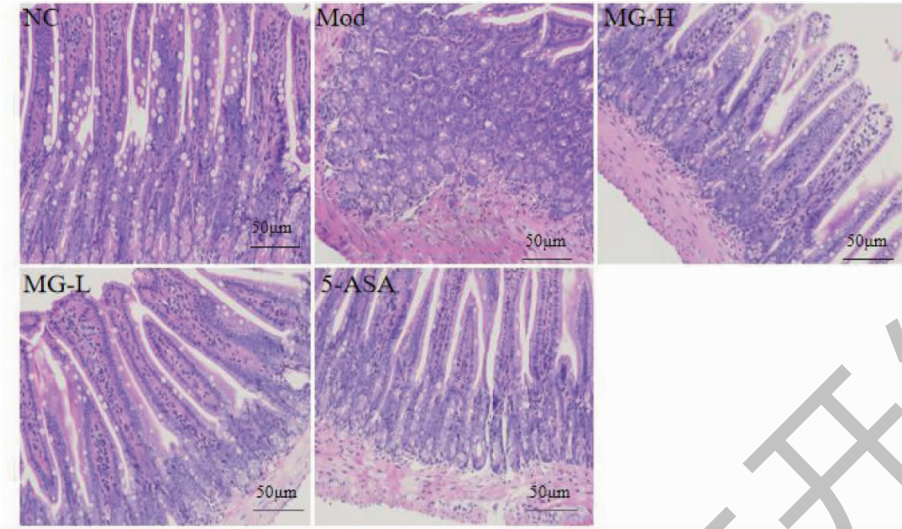


图 9 翁布对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 9 Effect of *M. germanica* on pathological changes of colonic tissues in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

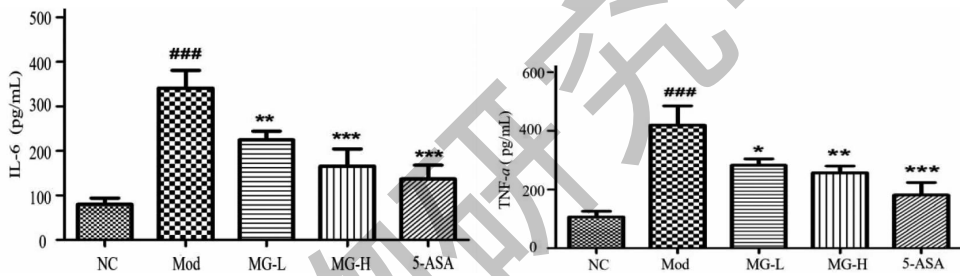


图 10 翁布对 UC 小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Effect of *M. germanica* on serum inflammatory cytokines in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

注:与空白对照组相比,###  $P < 0.001$ ;与模型组相比,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ,下同。Note:Compared with control,###  $P < 0.001$ ;Compared with model,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ,the same below.

2.2.4 翁布对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 TNF-α 和 IL-6 表达的影响

与空白对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 TNF-α 和 IL-6 阳性染色表达显著增加;与模型组相

比,翁布高、中、低剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织紧密连接相关蛋白 TNF-α 和 IL-6 阳性染色表达显著增加(见图 11)。

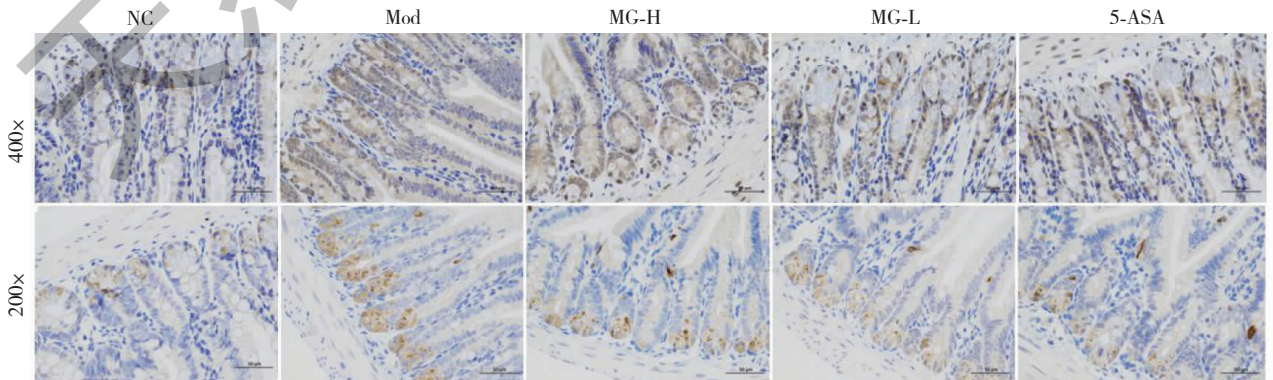
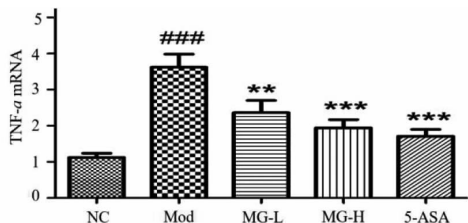


图 11 翁布对 UC 小鼠结肠组织 TNF-α 和 IL-6 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effect of the expression of TNF-α and IL-6 in colon tissues of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.2.5 翁布对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 mRNA 表达的影响

与空白对照组相比,模型组小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.001$ );与模型



组相比,翁布高、低剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 12)。

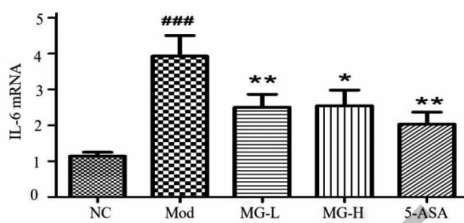


图 12 翁布对 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 12 Effect of *M. germanica* on the mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the colon tissue of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论与结论

本研究运用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析出翁布 171 个成分,通过 TCMS 平台筛选出翁布活性成分 23 个。根据“翁布-活性成分-UC”网络图可知,匹配靶点最多的前 5 个成分为蟛蜞菊内酯、去甲蟛蜞菊内酯、大黄酸、异鼠李素、鞣花酸。He 等<sup>[13]</sup>的研究表明鞣花酸具有抗氧化、抗炎等药理作用。Zheng 等<sup>[14]</sup>研究发现鞣花酸通过抑制 MAPK/I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/COX 等通路,显著减少 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NO 释放,进而产生改善 UC 的作用。大黄酸具有抗肿瘤、抑菌和抗炎等活性<sup>[15,16]</sup>,且研究表明<sup>[16]</sup>大黄酸可通过抑制 JAK2 等靶蛋白阻碍炎症信号传递,减少炎症因子的释放,缓解 UC 免疫功能异常引起的炎症反应<sup>[17]</sup>。异鼠李素 (isorhamnetin, ISO) 是一种广泛存在于多种植物的天然小分子黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒等多种生物学功能<sup>[18]</sup>。ISO 可通过抑制 MPO 的活性、阻碍促炎介质 (TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6) 的释放、下调 NF- $\kappa$ B 信号通路来发挥抗炎、治疗炎症性肠炎的作用<sup>[19]</sup>。蟛蜞菊内酯能抑制 NLRP3 炎症小体的激活和细胞焦亡,从而在体内发挥抗炎作用<sup>[20]</sup>。

通过网络药理学技术筛选得到翁布作用靶点 285 个,溃疡性结肠炎疾病靶点 2 415 个,交集后得到 111 个治疗溃疡性结肠炎的潜在靶点,通过构建“翁布-活性成分-UC”网络,揭示了翁布治疗溃疡性结肠炎的分子机制;通过蛋白互作网络预测翁布治疗溃疡性结肠炎的关键靶点,PPI 网络分析发现翁布可能通过调控 TNF、CASP3、EGFR、PTGS2 和 HSP90AA1 等靶蛋白,发挥治疗溃疡性结肠炎的作用,而这些基因直接或间接参与细胞炎症、凋亡、氧

化应激等过程。TNF- $\alpha$  是治疗溃疡性结肠炎的关键靶点,有研究表明溃疡性结肠炎患者的粪便样本和结肠黏膜活检标本中发现 TNF- $\alpha$  水平升高,抗 TNF- $\alpha$  单抗可通过阻断其生物活性以达到抗炎的目的,抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体药物在治疗溃疡性结肠炎方面具有较好疗效<sup>[21]</sup>。凋亡蛋白酶 (caspases) 参与细胞凋亡,胱天蛋白酶 3 (CASP3) 细胞凋亡过程中起重要作用<sup>[22]</sup>。溃疡性结肠炎的发生与细胞凋亡密切相关,动物研究表明,溃疡性结肠炎模型组肠黏膜中 CASP3 含量均显著升高,且经有效药物处理后,其表达水平下调,结肠细胞凋亡率明显下降<sup>[23]</sup>。前列腺素内过氧化物合成酶 (PTGS2) 蛋白参与多条炎症反应信号通路,抑制该蛋白能够减少炎症介质的产生<sup>[24]</sup>。EGFR 信号通路作为人体中的关键信号通路,介导细胞的凋亡和增殖,与结肠黏膜损伤的发生有关,因此,干预 EGFR 信号通路为治疗 UC 提供了可能。有研究显示溃疡性结肠炎肠黏膜受损会影响 EGFR 表达,进而减少对结肠黏膜的保护及修复作用,并发现 EGFR 水平与 UC 复发密切相关<sup>[25]</sup>。HSP90AA1 与炎症密切相关,可调节细胞的增殖和凋亡,抑制 HSP90AA1 能诱导自噬从而改善溃疡性结肠炎<sup>[26]</sup>。

由此推测,翁布可能通过调控上述 5 个靶蛋白抗炎、抗氧化、减少细胞凋亡,发挥治疗 UC 作用。分子对接结果也显示,翁布与以上 5 个核心基因具有良好的结合活性。

KEGG 结果显示,翁布治疗溃疡性结肠炎的主要通路有细胞免疫研究的核心通路 T 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路以及 TNF- $\alpha$  信号通路等。白介素 6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$  是炎症

反应中常见的三种炎症因子<sup>[27]</sup>。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  是急性 UC 早期的重要促炎因子。促炎因子抑制效应 T 细胞凋亡发挥持续促炎作用等,从而参与 UC 的发生发展。有研究表明<sup>[28]</sup> 可通过 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路改善肺、肠组织的病理损伤,达到肺、肠同治的作用。丝裂原活化蛋白激酶信号通路包括 ERK 以及 p38 MAPK 等信号通路,其能够参与调控炎症反应、氧化应激、细胞分化与凋亡等多种生理病理过程<sup>[29]</sup>,MAPK 信号转导与 UC 的炎症反应密切相关。

TNF- $\alpha$  是机体受到有害刺激所释放的第一个细胞因子,IL-1 $\beta$  可由 TNF- $\alpha$  诱导产生。IL-1 $\beta$  增加可以与 TNF- $\alpha$  协同作用,共同刺激 IL-6 的产生<sup>[30]</sup>。因此,本研究采用网络药理学和分子对接技术预测翁布对溃疡性结肠炎的潜在作用治疗靶点及信号通路,并通过自由饮用 DSS 复制溃疡性结肠炎小鼠模型进行药效学评价,翁布可以改善 DSS 诱导的 UC 小鼠的结肠长度和结肠黏膜损伤,降低结肠和血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量,缓解溃疡性结肠炎症反应。

综上所述,本研究通过网络药理学方法对翁布治疗 UC 的作用机制进行系统性分析,并利用分子对接技术初步验证其作用靶点,同时通过 C57BL-6 小鼠体内实验检验翁布治疗 UC 作用的药效。研究结果初步表明翁布可通过“多靶点、多通路”治疗 UC,可缓解 DSS 诱导的炎症反应,而其机制尚不清晰。后续工作将对其进行研究,以期对翁布治疗溃疡性结肠炎的作用机制提供参考。

#### 参考文献

- Tang X, Zeng Y, Song YP, et al. Chemical and pharmacological research progress of Tibetan medicine *Myricaria germanica* [J]. J Qinghai Normal Univ; Nat Sci (青海师范大学学报: 自科版), 2014, 30: 40-42.
- La XQ, Zeng Y, Xu M, et al. Flavonoids from the twigs of the Tibetan medicine *Myricaria germanica* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2011, 23: 596-599.
- Yang Y, Xu Y. Professor SHAN Zhaowei's experience in treating ulcerative colitis based on the theory of epidemicfebrile disease [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2023, 15: 144-146.
- Zeng Y, Chen ZN, Zhong L, et al. Study on the effects that caused by the tradition Tibetan herb *Myricaria germanica* (L.) Desv. on the immune function of cells and the toxicity testy [J]. J Qinghai Normal Univ; Nat Sci (青海师范大学学报: 自科版), 2005, 21: 66-68.
- Lin C, Wang F, Wang HQ, et al. Gegen Qinliantang and its combinations inhibit oxidative stress injury in ulcerative colitis rats by regulating Nrf2/NQO1 Signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 19-27.
- Sun XY. The efficacy of nicotine in the patients with active ulcerative colitis: a meta-analysis [D]. Fuzhou: Fujian Medical Univ (福建医科大学), 2014.
- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2012, 380: 1606-1619.
- Feng X, Liu YQ, Liu B, et al. Mechanism of Huangqintang in treatment of ulcerative colitis and related colon cancer: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 1-10.
- Zeng Y, Bao M, Ma JX, et al. Immunoregulatory mechanisms of the total flavonoids of Tibetan herb *Myricaria germanica* Auct. non Linn. Desv. in adjuvant arthritic rats [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2011, 27: 504-507.
- Bao M, Zeng Y, Chen ZN. Study of the extracts from the tradition Tibetan herb *Myricaria germanica* for FCA induced arthritis on SD rats [J]. J Qinghai Normal Univ; Nat Sci (青海师范大学学报: 自科版), 2012, 28: 46-48.
- Guo YL, Liu WL, Ju AX, et al. Anti-inflammatory mechanism of active components of *Trollius* based on network pharmacology [J]. Acta Chin Med Pharm (中医药学报), 2020, 4: 25-28.
- Ding J, Zheng P, Sun YY, et al. Analysis of Wumei Pills in treating chronic digestive system diseases with concept of "treating different diseases with same method" based on network pharmacology and molecular docking [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 4164-4176.
- Heng YH, Liang MT, Liu LX, et al. A review of pharmacological effects of ellagic acid [J]. Chem Engineer Equip (化学工程与装备), 2022, 3: 216-217.
- Zheng Z, Jiang LJ, Zhu Y, et al. Ameliorating effect of ellagic acid on ulcerative colitis in mice induced by DSS and its effect on COX2/p38/JNK/ERK/IKB- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B and iNOS/3-NT/CYP2E1 signal pathways [J]. Food Drug (食品与药品), 2022, 24: 295-300.
- Chen QH, Pi RB, Chen JK. Advance of the synthesis and pharmacology of rhein and its derivatives [J]. J Res Pharm (药学研究), 2016, 35: 161-167.
- Jiang L, Yang Y. Research progress of antitumor mechanism of rhein [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2021, 43: 2765-2769.
- Si YF. Pathological review of single-center renal biopsy and a

- preliminary study of serum metabolomics in diabetic and non-diabetic nephropathy [D]. Shanghai: Naval Medical University(中国人民解放军海军军医大学),2022.
- 18 Ren J, Dai QQ, Chen R, et al. Research progress on anticancer effect and mechanism of isorhamnetin [J]. Chin Med Herald(中国医药导报),2022,19:37-41.
  - 19 Yan S, Wang XK, Yang LY, et al. Research progress on the anti-inflammatory effects of isorhamnetin [J]. Gansu Sci Technol(甘肃科技),2020,36:115-118.
  - 20 Lin YQ. Study on the anti-inflammatory mechanism of wedelolactone by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学),2021.
  - 21 Wang XY. Meta analysis of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monotherapy and combined with aminosalicyclic acid in the treatment of ulcerative colitis [D]. Changchun: Jilin University(吉林大学),2023.
  - 22 Zhang JX, Liu XJ, Yang C, et al. Preliminary study on interaction mechanism among several natural products and CASP3 target [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2017,19:1824-1828.
  - 23 Tang WH, Shen H. Exploring the underlying mechanism of *Rubia cordifolia* on ulcerative colitis based on network pharmacology [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究),2021,13:5-11.
  - 24 Tan M, Xiong WN, Huang JM, et al. Identification of quality markers associated with the anti inflammatory effects of Jian-gzhenxiang, a folk medicine [J]. Acta Pharm Sin(药学报),2022,57:3396-3404.
  - 25 He T, Wang W, Li L, Qiu SL, et al. PCNA, EGFR, MUC2 expression levels and clinical significance in ulcerative colitis [J]. J Med Res(医学研究杂志),2022,51:104-107.
  - 26 Song KH, Oh SJ, Kim S, et al. HSP90A inhibition promotes anti-tumor immunity by reversing multi-modal resistance and stem-like property of immune-refractory tumors [J]. Nat Commun,2020,11:562.
  - 27 Dong NN, Chen XL, Deng BL, et al. Effective constituents of essential oil from *Gleditsiae Fructus Abnormalis* and anti-cerebral ischemia/reperfusion injury mechanism; based on GC-MS, network pharmacology, and experimental verification [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:1076-1086.
  - 28 Hu L, Bai C, Long CJ, et al. Effect of *Astragalus* glycosides on JNK/p38 MAPK signaling pathway in rats with knee osteoarthritis [J]. Global Tradit Chin Med(环球中医药),2022,15:363-369.
  - 29 Yang BC, Fu XJ, Zhu L. The study of the intervention mechanism of Yinlai decoction on lung and intestinal tissues based on TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Chin J Osteopor(中国骨质疏松杂志),2022,28:1491-1495.
  - 30 Zhang JY, Shen M. Therapeutic mechanisms of TNF- $\alpha$  inhibitors for systemic autoinflammatory diseases [J]. Chin J Allergy Clin Immunol(中华临床免疫和变态反应杂志),2023,17:68-73.
- 
- (上接第 232 页)
- 14 Xiu F, Li XT, Zhang WJ, et al. A new alkaloid from *Portulaca oleracea* L. and its antiacetylcholinesterase activity [J]. Nat Prod Res,2019,33:2583-2590.
  - 15 Li GQ, Deng ZW, Li J, et al. Chemical constituents from starfish *Asterias rollestoni* [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学:英文版),2004,13:81-86.
  - 16 Sun JF, Wu Y, Yang B, et al. Chemical constituents of marine sponge *Halichondria* sp. from south China sea [J]. Chem Nat Compd,2015,51:975-977.
  - 17 Vaca J, Salazar F, Ortiz A, et al. Indole alkaloid derivatives as building blocks of natural products from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus velezensis* and their antibacterial and antifungal activity study [J]. J Antibiot,2020,73:798-802.
  - 18 Tempone AG, Pieper P, Borborema SET, et al. Marine alkaloids as bioactive agents against protozoal neglected tropical diseases and malaria [J]. Nat Prod Rep,2021,38:2214-2235.
  - 19 Ishihara A, Kumeda R, Hayashi N, et al. Induced accumulation of tyramine, serotonin, and related amines in response to *Bipolaris sorokiniana* infection in barley [J]. Biosci Biotechnol Biochem,2017,81:1090-1098.
  - 20 Corbally RP, Mehta LK, Parrick J, et al. Experimental and calculated  $^{13}\text{C}$  chemical shifts for  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -carbolines [J]. Magn Reson Chem,2000,38:1034-1036.