

引用本文: 缪涛声, 李逸婷, 郑鸿铭, 等. 基于基因表达综合数据库和网络药理学探讨香参丸治疗溃疡性结肠炎的分
子机制[J]. 安徽医药, 2024, 28(5): 883-888. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.05.008.



◇ 药学研究 ◇

基于基因表达综合数据库和网络药理学探讨香参丸 治疗溃疡性结肠炎的分子机制

缪涛声¹, 李逸婷¹, 郑鸿铭¹, 胡芝凡¹, 莫乔兰¹, 邱泽鑫¹, 陈斌²

作者单位:¹广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510006;

²广州中医药大学第一附属医院脾胃科, 广东 广州 510405

通信作者: 陈斌, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合消化内科学, Email: chenbin0576@vip.163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074197)

摘要 目的 采用生物信息学和网络药理学分析香参丸对溃疡性结肠炎(UC)的分子机制。方法 2023年1—5月通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)收集香参丸的有效成分及其相关靶点, 利用基因表达综合(GEO)数据库筛选UC相关靶点, 将香参丸与UC的交集靶点信息上传至STRING并通过Cytoscape 3.7.2可视化蛋白质相互作用(PPI)网络。使用Metascape数据库进行KEGG与GO通路富集分析并预测香参丸作用UC的相关通路, 并绘制“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络, 利用Autodock进行分子对接。结果 结果显示共筛选得到香参丸主要成分136个、靶点243个, UC相关靶点1750个, 香参丸与UC交集靶点37个, 筛选出关键成分槲皮素、刺芒柄花素、木犀草素以及山柰酚等, 关键靶点如NOS2、PPARG、IL1B、MMP2以及ICAM1等。分子对接结果提示核心成分与核心靶点结合稳定, 平均最低结合能为-5.5986 kCal/mol。KEGG与GO通路富集分析显示香参丸参与多种分子功能和生物过程, 其涉及的主要通路有TNF信号通路、Toll样受体信号通路、HIF-1信号通路以及MAPK信号通路等。结论 香参丸可通过多靶点、多通路改善UC症状, 其主要成分槲皮素、刺芒柄花素、木犀草素以及山柰酚等可能通过TNF信号通路、Toll样受体信号通路、HIF-1信号通路以及MAPK信号通路等作用于NOS2、PPARG、IL1B、MMP2等关键靶点。

关键词 结肠炎, 溃疡性; 香参丸; 网络药理学; 基因表达综合数据库

To explore the molecular mechanism of *Xiangshenwan* against ulcerative colitis based on gene expression omnibus data base and network pharmacology

MIAO Taosheng¹, LI Yiting¹, ZHENG Hongming¹, HU Zhifan¹, MO Qiaolan¹, QIU Zexin¹, CHEN Bin²

Author Affiliation:¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

²Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China

Abstract Objective To analyze the molecular mechanism of *Xiangshenwan* in the treatment of Ulcerative colitis (UC) by network pharmacology and bioinformatics. **Methods** From January to May 2023, Main components and its targets of *Xiangshenwan* were obtained from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the related targets of UC were obtained from GEO database. The intersection target information of *Xiangshenwan* and UC was uploaded to STRING and visualized by Cytoscape 3.7.2. Metascape database were used to Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and Gene Ontology (GO) function enrichment analysis to predict the related pathways of *Xiangshenwan* on UC. The "drug-component-disease-target-access" network was plotted. Autodock was used for molecular docking prediction. **Results** The results of this study showed that a total of 136 components, 243 targets, the 1750 UC related targets, and 37 intersection targets of *Xiangshenwan* and UC were screened out. The key components of *Xiangshenwan* were quercetin, ononetin, luteolin, and kaempferol, and key targets such as NOS2, PPARG, IL1B, MMP2 and ICAM1. The results of molecular docking showed that the core components had stable binding with the core targets, and the average minimum binding energy was -5.5986 kCal/mol. The results of KEGG pathway analysis and GO functional annotation analysis showed that *Xiangshenwan* were involved in a variety of molecular functions and biological processes, and the main pathways involved TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, MAPK signaling pathway and so on. **Conclusion** *Xiangshenwan* exerts therapeutic effect on UC through multiply targets and multiply pathways. The main components of *Xiangshenwan*, such as quercetin, formononetin, luteolin and kaempferol, may act on key targets such as NOS2, PPARG, IL1B, MMP2 through TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and

MAPK signaling pathway.

Keywords Colitis, ulcerative; *Xiangshenwan*; Network pharmacology; Gene expression omnibus database

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)一种常见的慢性、非特异性结、直肠炎性疾病^[1],临床表现主要有腹痛、腹泻、黏液脓血便等,如今UC因其发病率的不断上升已成为全球公共卫生问题^[2]。UC目前的治疗药物主要有5-氨基水杨酸、生物制剂及激素等,但仍具有药物依赖性、病人经济负担较大等问题^[3],因此迫切需要为UC病人开发新型有效、副作用较低且经济实惠的治疗方法。

中医药是我国重要的医学资源宝库,具有经济负担与副作用较低、疗效较好、病人依从性较高等优势。香参丸出自《奇方类编》,由木香、苦参以及甘草组成,具有清热燥湿、行气止痛的功效,常用于治疗痢疾。最新研究表明香参丸可用于治疗UC^[4-5],但目前关于香参丸治疗UC的临床研究相对较少,且相应作用机制尚未明确,本研究自2023年1—5月通过生物信息学和网络药理学探讨香参丸治疗UC的分子机制,以期对香参丸的临床应用提供依据,并为其作用机制的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 基因表达综合(GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TC MSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),蛋白质数据库UniProt(<https://www.uniprot.org/>),STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),Metascape数据库(<https://metascape.org/>),Cytoscape 3.7.2软件,GraphPad Prism 9.0软件,R语言4.0.1软件,Autodock 4.0软件,PyMOL 2.5软件。

1.2 方法

1.2.1 GEO数据库溃疡性结肠炎差异表达基因筛选 从GEO数据库中搜索“Ulcerative colitis”,筛选并下载GSE38713芯片,其平台为GPL570,该芯片有43个样本,其中包括13例健康受试者与15例活动期溃疡性结肠炎病人。以 $\log_2|FC| \geq 1$,校正 $P < 0.05$ 为条件进行差异基因表达分析。

1.2.2 加权共表达分析 将GEO数据库获取的差异基因数据导入R语言进行加权共表达分析,构建无标度共表达网络。利用R语言WGCNA包goodSamplesGenes方法去除离群的基因和样本,使用幂函数 $a_{mn} = |C_{mn}|^\beta$ (a_{mn} :基因与基因的邻间矩阵; C_{mn} :所有基因对的皮尔逊相关性获得的相

似性矩阵; β :软阈值)构建加权邻接矩阵,并转换为拓扑重叠矩阵(TOM)及其相关的相似度(1-tom),以最小基因组数30和敏感度3为条件构建1-tom矩阵的层次聚类树。在与溃疡性结肠炎高度相关的模块中根据 $IMMI > 0.8$ 筛选获得溃疡性结肠炎的HUB基因。

1.2.3 香参丸化学成分的筛选及其靶点的预测 利用TC MSP数据库,以“木香”“苦参”以及“甘草”分别作为关键词对香参丸的主要化学成分及其相关作用靶点进行搜索。香参丸的主要化学成分的筛选条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 。将筛选得到的化学成分在TC MSP数据库查询相关靶点信息,并通过UniProt数据库将相关靶点信息转化为基因靶点信息,最终得到243个基因靶点信息。

1.2.4 预测香参丸治疗UC的作用靶点 将香参丸UniProt的基因靶点信息与UC相关的HUB基因信息取交集,筛选出可能共同作用的基因靶点信息并绘制韦恩图,最终得到37个共同作用靶点。

1.2.5 PPI网络模型的构建与分析 将香参丸与UC的共同靶点信息导入STRING数据库,蛋白种属设置为“Homo Sapiens”,得到蛋白质相互作用网络(protein protein interaction, PPI)数据,将数据导入Cytoscape 3.7.2软件进行进一步可视化处理,得到PPI网络模型。同时利用Cytoscape 3.7.2软件工具中的Network Analyzer进行拓扑分析,得到香参丸与UC交集靶点的度值。

1.2.6 KEGG与GO通路富集分析 利用Metascape对香参丸与UC的共同基因靶点做KEGG与GO通路富集分析,蛋白种属设置为“Homo Sapiens”,其中GO通路包括生物学过程(biological process, BP),细胞组分(cellular component, CC),分子功能(molecular function, MF)。将获得的数据进行进一步可视化处理得到功能富集气泡图。

1.2.7 “中药-成分-疾病-靶点-通路”网络模型的构建与分析 将香参丸的主要成分、香参丸与UC的交集靶点信息、Metascape数据库获得的KEGG富集通路信息导入Cytoscape 3.7.2,构建“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络模型。

1.2.8 分子对接 根据“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络及PPI网络模型筛选关键药物成分及靶点,利用Chem3D MM2进行能量最小化结构优化,利用PyMOL软件移除水分子、无机盐、配体等,通过

Autodock 软件对筛选出的核心药物成分及核心靶点进行半柔性分子对接预测,利用 PyMOL 对对接结果进行可视化处理,并通过 R 语言 pheatmap 包绘制结合能热图。

2 结果

2.1 溃疡性结肠炎差异表达基因筛选 从 GEO 数据库下载 GSE38713 芯片数据和 GPL570 平台数据,借助 R 语言对数据进行整理分析。最终获得溃疡性结肠炎差异表达基因共 8 020 个,其中 UC 病人结肠黏膜组织中上调基因 3 953 个,下调基因 4 067 个,根据 UC 差异表达基因筛选结果绘制火山图与热图(图 1)。图 1A 中每个点代表一个基因,其中红色代表 UC 中上调的基因,绿色代表 UC 中表达下调的基因。图 1B 中横坐标为样本信息,纵坐标为基因名,每一个色块代表基因在该样本的表达量。

2.2 溃疡性结肠炎差异表达基因加权共表达分析 利用函数 pick Soft Threshold 选择软阈值构建无标度网络(图 2),图 2 中 A 和 B 的横坐标为软阈值,纵坐标分别为相关系数和基因连接数的均值,如图 2 所示 $\beta=14$ 时相关系数为 0.85,基因连接数均值为 38.13,因此选择 $\beta=14$ 构建无标度网络。模块特征向量分析中共筛选得到 4 个加权基因模块(图 3),图 3 的 B 中横坐标代表分组情况,其中蓝色为正常结肠黏膜,红色代表 UC 病人的结肠黏膜,纵坐标代表聚类的模块,图中左上角的三角色块代表相关性,右下角三角色块代表显著性,其中青色模块和粉色模块在 UC 与正常组的结肠黏膜之间相关性高,所以选取青色模块中的 796 个基因和粉色模块中的 954 个基因共 1 750 个基因用于后续香参丸治疗 UC 的靶点分析。图 3 的 C 为青色模块基因与 UC 相关性的散点图,可见基因集中于 $y=x$ 上,位于图片中央,与 UC 高度相关。

2.3 香参丸主要化学成分的筛选与其靶点的预测 以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为筛选条件利用 TCMSP 数据库分别检索“木香”“苦参”以及“甘草”获取有效成分,共得到木香主要有效成分 6 个,苦参主要有效成分 45 个,甘草主要有效成分 92 个,经去除重复项后共得到香参丸主要有效成分 136 个。利用 TCMSP 数据库检索其主要成分相关作用靶点,经去除重复项、UniProt 数据库转化并以“Reviewed”“Human”为条件筛选后得到香参丸主要作用靶点 243 个。

2.4 香参丸与 UC 共同作用靶点的获取 将 UC 的 1 750 个靶点与香参丸的 243 个活性成分靶点信息绘制成韦恩图(图 4),其中左侧圆圈代表香参丸的活性成分靶点,右侧圆圈为 UC 的相关靶点,交集部

分为香参丸与 UC 的共同靶点共 37 个。

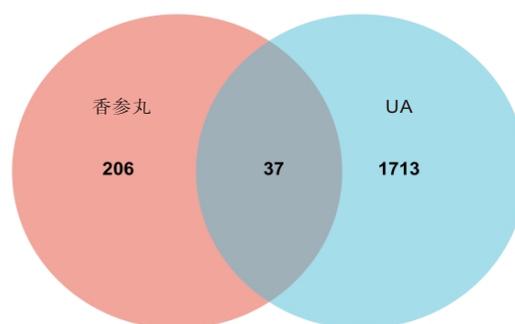


图 4 香参丸与 UC 的共同靶点韦恩图

2.5 PPI 网络构建 将香参丸与 UC 的 37 个共同靶点导入 STRING 数据库,物种选择“Homo Sapiens”,分析得到 PPI 网络数据,将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化(图 5)。该 PPI 网络节点的颜色越深、越靠近中心,大小越大代表其度值越高且同一圆圈上的靶点的度值从大到小以逆时针为顺序进行排列。每条边则是代表 PPI 网络的关系,线条越多关联度越大。

2.6 KEGG 与 GO 通路富集分析 使用 Metascape 网站对 37 个香参丸与 UC 的共同靶点进行 KEGG 与 GO 通路富集分析。KEGG 富集分析共富集至 49 条通路,其中主要的通路包括糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、松弛素信号通路(Relaxin signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)以及 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)等(图 6)。GO 通路分析包括 MF、BP、CC 分析,所有的富集分析按 P 值大小从小到大进行排序。结果显示 GO 富集分析 BP 共有 440 条、CC 共有 28 条、MF 共有 30 条,涉及的生物学过程主要有细胞运动的正调节(positive regulation of cell motility)、对损伤反应的调节(regulation of response to wounding)、血管生成调节(regulation of angiogenesis)等。分子功能能够涉及丝氨酸型内肽酶活性(serine-type endopeptidase activity)、生长因子的结合(growth factor binding)、核受体结合(nuclear receptor binding)、泛素样蛋白连接酶结合(ubiquitin-like protein ligase binding)等。细胞组分涉及细胞外基质(extracellular matrix)、细胞质的核周区域(serine-type peptidase complex)、内质网腔(endoplasmic reticulum lumen)等(图 7)。

2.7 “中药-成分-疾病-靶点-通路”网络 将香参丸所含的中药、37 个共同作用靶点、含有共同靶点的共 90 个成分、KEGG 富集通路导入 Cytoscape 3.7.2,

构建“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络(图8)。其中橙色方块形节点代表香参丸所含的中药,红色菱形节点代表各中药含有的成分,黄色菱形节点代表中药间含有的相同成分,位于网络左侧的三个黄色菱形节点为甘草和苦参的共同成分,位于网络右侧黄色菱形节点为甘草和木香的共同成分。蓝色椭圆形节点为香参丸与UC的共同作用靶点。绿色三角形节点为KEGG富集的主要通路。通过Cytoscape对网络中的中药成分及靶点进行分析得到对应度值,网络度值>4的中药成分度值排名见表1,主要靶点度值排名见图9。

表1 香参丸治疗UC的主要成分

编号	名称	度值
MOL000098	quercetin	58
MOL000392	formononetin	8
MOL000006	luteolin	7
MOL000422	kaempferol	7
MOL004835	Glypallichalcone	5
MOL004841	Licochalcone B	5
MOL000449	Stigmasterol	4
MOL000359	sitosterol	4
MOL003542	8-Isopentenyl-kaempferol	4
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	4
MOL005944	matrine	4
MOL000354	isorhamnetin	4
MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	4
MOL000417	Calycosin	4
MOL004328	naringenin	4
MOL004815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	4
MOL004828	Glepidotin A	4
MOL004957	HMO	4
MOL000497	licochalcone a	4
MOL004991	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	4
MOL000500	Vestitol	4

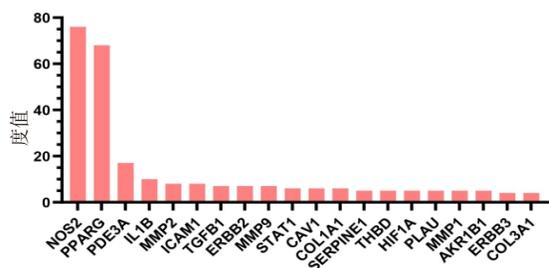


图9 “中药-成分-疾病-靶点-通路”网络靶点度值排序图

2.8 分子对接 利用PubChem及蛋白质结构数据库(protein data bank, PDB)获取小分子配体及蛋白质受体结构文件,利用Chem3D MM2进行能量最小化结构优化,利用PyMOL软件移除水分子、配体、无

机盐等,通过Cytoscape对“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络进行分析,根据度值大小排序筛选出度值排名前十的化合物和靶点并利用Autodock进行半柔性对接(具体排序可见表1及图9),后通过火山图对对接结果进行可视化处理,如图10所示,横坐标代表靶点,纵坐标为化合物,热图中的数字为对接结合能,平均结合能为-5.598 6 kCal/mol,结果显示对接良好。结合能排名前四的对接为MMP2和甘草查尔酮B(Licochalcone B,结合能为-7.00 kCal/mol)、PDE3A和豆甾醇(Stigmasterol,结合能为-6.97 kCal/mol)、MMP2和刺果甘草查耳酮(glypallichalcone,结合能为-6.92 kCal/mol)、ICAM1和甘草查尔酮B(Licochalcone B,结合能为-6.66 kCal/mol),结果显示见图11。筛选的核心靶点NOS2、PPARG、PDE3A、IL1B、MMP2、ICAM1、TGFB1、ERBB2、MMP9、STAT1分别对应的PDB数据库X衍射晶体结构ID为5XN3、8B8Y、7LRE、7Z3W、8H78、3E2M、1KLC、3BCZ、5OM6以及8D3F。

3 讨论

通过分析香参丸治疗UC的“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络,推测槲皮素(quercetin)、刺芒柄花素(formononetin)、木犀草素(luteolin)以及山柰酚(kaempferol)等成分可能是香参丸治疗UC的主要成分。槲皮素为黄酮醇类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[6],而氧化应激是UC发生的重要机制之一^[7],减轻肠道炎症以及氧化应激反应则是治疗UC的重要手段,因此槲皮素已被列为治疗UC的重要候选化合物之一^[8]。Riemschneider等^[9]通过用槲皮素治疗由葡聚糖硫酸钠诱导的UC小鼠发现槲皮素可以显著改善UC小鼠的症状以及结肠的组织病理学评分,经槲皮素治疗后小鼠的结肠黏膜上皮炎症细胞的浸润减少且肠上皮屏障可以得到一定程度的恢复。另一项研究表明槲皮素可下调LCN-2、TNF- α 抑制炎症介质的表达,从而减轻肠道炎症,发挥治疗UC的作用^[10]。刺芒柄花素是一种异黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、促进细胞凋亡的作用^[11-12]。Wu等^[13]通过研究证实刺芒柄花素可通过抑制NLRP3炎性小体通路(NLRP3、ASC、IL-1 β 等)蛋白水平,并上调紧密连接蛋白(ZO-1、claudin-1等)治疗经DSS诱导的急性结肠炎。杨倩等^[14]给予UC小鼠刺芒柄花素后,结肠的TNF- α 、IL-6以及COX-2的含量都出现明显下降,并通过基因敲除等技术推测刺芒柄花素可能通过激活Nrf2的表达来改善UC的症状。木犀草素和山柰酚与槲皮素一样也是黄酮类化合物,李越、沈磊^[15]发现木犀草素可以显著降低UC小鼠疾病活动指数评分(DAI),其机

制可能与激活 Nrf2 信号通路、抑制促炎因子 TNF- α 、IL-6 mRNA 等表达有关。Andrade 等^[16]证实山柰酚和槲皮素可下调 NF- κ B 与 Toll 样受体的表达,使促炎、趋化因子及细胞黏附分子减少,改善肠道损伤、减少肠道的氧化应激反应和炎症细胞的浸润。

结合 PPI 网络和“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络,推测 NOS2、PPARG、IL1B、MMP2 以及 ICAM1 等是香参丸治疗 UC 的靶点。有研究表明 NOS2 编码的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在 UC 病人的结肠黏膜上被显著上调^[17],研究表明 iNOS 在炎症性疾病中发挥着重要作用,其机制可能与超氧阴离子相互作用生成过氧亚硝酸盐破坏肠上皮有关^[18-19]。Bernstein 等^[20]则证实抑制 NOS2 可以减轻肠道炎症,所以 NOS2 可能是治疗 UC 的重要靶点。PPARG 为过氧化物酶体增生激活受体,可以激活结肠上皮细胞的线粒体增加耗氧量,使结肠黏膜上皮缺氧坏死并破坏肠道菌群稳态^[21-22],Stephanie 等^[23]研究表明 5-氨基水杨酸可能通过激活肠上皮中的 PPAR- γ 发挥治疗 UC 的作用,其机制可能与 PPARG 抑制 NF- κ B 活化^[24]和肠黏膜中前列腺素的产生^[25]有关。IL1B 即为 IL-1 β ,为促炎细胞因子之一,已有许多研究表明其存在与肠道炎症关系密切^[26-27]。Rawat 等^[28]证实 IL1B 可以上调 MIR200C-3p 从而增加肠黏膜的紧密连接降低肠细胞 occludin 蛋白的表达,从而增加紧密连接的通透性。

KEGG 富集分析中主要富集在 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路以及 MAPK 信号通路等。TNF 称为肿瘤坏死因子,是参与 NF- κ B 通路的重要转录调节因子,而 NF- κ B 信号通路已被证实是参与 UC 发生发展的重要通路之一^[29-30]。有研究表明 NF- κ B 信号通路可在 UC 的肠固有层中的单核细胞中被激活,参与 UC 炎症的产生^[31],目前 UC 的主要治疗药物柳氮磺胺吡啶和糖皮质激素的作用机制之一就是抑制 NF- κ B 信号通路的表达^[32]。“中药-成分-疾病-靶点-通路”网络分析得到的关键成分如槲皮素、山柰酚、刺芒柄花素等都能通过调节核因子 NF- κ B 的表达来抑制肠道炎症反应减少肠道损伤^[14,16]。关键靶点 PPARG 也被证实可以抑制 NF- κ B 活化^[24],且 NF- κ B 信号通路的激活则会通过 LPS/IFN- γ 或 IL-1 β /IFN- γ 诱导关键靶点 iNOS 的表达^[33],所以富集得到的 TNF 信号通路筛选出的关键成分、关键靶点相吻合。Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)是一种跨膜信号转运蛋白,参与人体免疫、炎症反应。有研究表明 TLR 可以与相应的配体结合,激活 TLR-NF- κ B 信号通路,介导 IFN- γ 、TNF、IL-1 β 等因子的释放^[34],目前研究认为 TLR4/

NF- κ B 信号通路是 UC 发生发展的重要信号通路之一,且如山柰酚等香参丸的关键成分也可作用于 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥对结肠的保护作用^[35],所以 Toll 样受体信号通路可能是香参丸作用于 UC 的潜在通路。缺氧诱导因子 HIF-1 在缺氧状态下可被诱导产生,活化后可形成 HIF-1 α 介导炎症、氧化应激等反应。苏淑伶等^[36]表明 HIF-1 α 、COX-2 等因子水平与 UC 病情严重程度呈正相关,可为临床诊断及临床治疗评估提供可靠依据。Tang 等^[37]则研究证实 HIF-1 α 可激活 NF- κ B 信号通路,从而介导 NLRP3 炎症小体产生,引起一系列级联炎症反应,所以 HIF-1 信号通路与 TNF 信号通路息息相关。如今,MAPK 信号通路在 IBD 中的作用已被许多研究所证实,成为研究治疗 IBD 的经典通路之一^[38-39]。在 UC 中 MAPK 信号通路可以调控下游的能调控下游的 NF- κ B 信号通路,介导 TNF- α 、IL-6、IL-1 等炎症因子的释放、嗜中性粒细胞活化和细胞凋亡,诱导细胞内 NO 的表达,提高细胞内 iNOS 活性^[40-41]。

综上所述,香参丸主要成分槲皮素、刺芒柄花素、木犀草素以及山柰酚等可能通过 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路以及 MAPK 信号通路作用于 NOS2、PPARG、IL1B、MMP2 以及 ICAM1 等靶点发挥治疗 UC 的作用。

(本文图 1~3 见插图 5-1;

图 5~8,图 10 见插图 5-2;图 11 见插图 5-3)

参考文献

- [1] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis[J]. Nature Reviews. Disease Primers, 2020, 6(1): 74.
- [2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN PB, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet (London, England), 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [3] LINARES V, ALONSO V, DOMINGO JL. Oxidative stress as a mechanism underlying sulfasalazine-induced toxicity [J]. Expert Opinion on Drug Safety, 2011, 10(2): 253-263.
- [4] 刘妙华, 潘源乐, 熊祎, 等. 香参丸对慢性溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群结构性改变的调控作用[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2061-2064.
- [5] 刘億, 刘端勇, 刘雪珂, 等. 香参丸对结肠炎大鼠结肠黏膜代谢关键酶的调控作用[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2561-2563.
- [6] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.
- [7] ZHOU M, XU W, WANG J, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- κ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury[J]. EBioMedicine, 2018, 35: 345-360.
- [8] DUAN L, CHENG S, LI L, et al. Natural Anti-inflammatory compounds as drug candidates for inflammatory bowel disease [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 684486. DOI: 10.3389/fphar.2021.684486.
- [9] RIEMSCHEIDER S, HOFFMANN M, SLANINA U, et al. In-

- dol-3-carbinol and quercetin ameliorate chronic DSS-induced colitis in C57BL/6 Mice by AhR-mediated anti-inflammatory mechanisms[J]. *Inte J Environ Res Public Health*, 2021, 18(5): 2262.
- [10] DICARLO M, TETI G, VERNA G, et al. Quercetin exposure suppresses the inflammatory pathway in intestinal organoids from winnie mice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5771.
- [11] LIMA CAVENDISH R, DE SOUZA SANTOS J, BELO NETO R, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 173: 127-133.
- [12] LI Z, DONG X, ZHANG J, et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2014, 338(1/2): 112-117.
- [13] WU D, WU K, ZHU Q, et al. Formononetin administration ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute colitis by inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018: 3048532. DOI:10.1155/2018/3048532.
- [14] 杨倩, 陈刚, 杨洋, 等. 刺芒柄花素通过诱导 Nrf2 表达缓解 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎 [J]. *中国药学(英文版)*, 2016, 25(3): 178-188.
- [15] 李越, 沈磊. 木犀草素对小鼠结肠炎的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(3): 453-456.
- [16] ANDRADE AWL, GUERRA GCB, DE SOUZA ARAÚJO DF, et al. Anti-inflammatory and chemopreventive effects of bryophyllum pinnatum (lamarck) leaf extract in experimental colitis models in rodents [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 998.
- [17] GODKIN AJ, DE BELDER AJ, VILLA L, et al. Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 1996, 26(10): 867-872.
- [18] KANWAR JR, KANWAR RK, BURROW H, et al. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16(19): 2373-2394.
- [19] SINGER II, KAWKA DW, SCOTTS S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111(4): 871-885.
- [20] BERNSTEIN H, HOLUBEC H, BERNSTEIN C, et al. Deoxycholate-induced colitis is markedly attenuated in Nos2 knockout mice in association with modulation of gene expression profiles [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2007, 52(3): 628-642.
- [21] KELLY CJ, ZHENG L, CAMPBELL EL, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function [J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 662-671.
- [22] BYNDLOSS MX, OLSAN EE, RIVERA-CHÁVEZ F, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic enterobacteriaceae expansion [J]. *Science*, 2017, 357(6351): 570-575.
- [23] CEVALLOS SA, LEE JY, VELAZQUEZ EM, et al. 5-aminosalicylic acid ameliorates colitis and checks dysbiotic escherichia coli expansion by activating PPAR- γ signaling in the intestinal epithelium [J]. *mBio*, 2021, 12(1): e03227-20. DOI:10.1128/mBio.03227-20.
- [24] EGAN LJ, MAYS DC, HUNTOON CJ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(37): 26448-26453.
- [25] SHARON P, LIGUMSKY M, RACHMILEWITZ D, et al. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine [J]. *Gastroenterology*, 1978, 75(4): 638-640.
- [26] AL-SADI RM, MA TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4641-4649.
- [27] LAO'NEILL, DINARELLO CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense [J]. *Immunology Today*, 2000, 21(5): 206-209.
- [28] RAWAT M, NIGHOT M, AL-SADI R, et al. IL1B increases intestinal tight junction permeability by up-regulation of MIR200C-3p, which degrades occludin mRNA [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(4): 1375-1389.
- [29] BOUMA G, STROBER W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(7): 521-533.
- [30] OGURA Y, INOHARA N, BENITO A, et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(7): 4812-4818.
- [31] SCHREIBER S, NIKOLAUS S, HAMPE J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease (see comments) [J]. *Gut*, 1998, 42(4): 477-484.
- [32] AUPHAN N, DIDONATO JA, ROSETTE C, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis [J]. *Science*, 1995, 270(5234): 286-286.
- [33] NOMURA Y. NF-kappaB activation and IkappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells [J]. *Life Sciences*, 2001, 68(15): 1695-1701.
- [34] WU LR, LIU L, XIONG XY, et al. Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80315-80324.
- [35] QU Y, LI X, XU F, et al. Kaempferol alleviates murine experimental colitis by restoring gut microbiota and inhibiting the LPS-TLR4-NF-kappaB axis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 679897. DOI: 10.3389/fimmu.2021.679897.
- [36] 苏淑玲, 苏龙, 郑丽丽, 等. HIF-1 α 、COX-2、CRP 及 ESR 在溃疡性结肠炎患者外周血及黏膜组织中的表达及临床意义 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(4): 415-419.
- [37] TANG X, GUO DQ, LIN CP, et al. hCLOCK induction by hypoxia promotes inflammatory responses by activating the NF-kappaB pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(3): 1401-1406.
- [38] 陈晨, 姜树民, 石宇, 等. 基于 MAPK 通路探讨消痢止痢汤对溃疡性结肠炎大鼠的抗炎机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(7): 1540-1545.
- [39] 谢超群, 邹君君, 张建伟, 等. 基于 p38MAPK/NF-kappaB 信号通路的穴位埋线对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜上皮屏障的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(9): 77-83.
- [40] 朱德伟, 余群, 周利红, 等. MAPKs 通路在炎性肠病-结肠癌中的作用及中药干预研究进展 [J]. *中成药*, 2022, 44(11): 3572-3578.
- [41] 何馥倩, 邹雨珮, 黄晓丽, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在溃疡性结肠炎中的作用 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(3): 393-396, 401.

引用本文:徐礼玲,付恒,曾思.加巴喷丁减轻骨折模型大鼠焦虑情绪及海马神经炎症的作用机制研究[J].安徽医药,2024,28(5):889-893.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.05.009.



◇ 药学研究 ◇

加巴喷丁减轻骨折模型大鼠焦虑情绪及海马神经炎症的作用机制研究

徐礼玲¹,付恒¹,曾思²

作者单位:¹自贡市精神卫生中心,四川 自贡 643020;

²四川省医学科学院,四川 成都 610000

通信作者:付恒,男,副主任医师,研究方向为影像诊断,Email:tothateighth86@21cn.com

基金项目:四川省医学(青年创新)科研课题(S20025)

摘要 **目的** 探析加巴喷丁对骨折模型大鼠焦虑情绪、海马神经炎症、人核因子 κ B(NF- κ B)/肿瘤坏死因子 α (TNF- α)信号通路的影响。**方法** 自2022年1—6月,选择健康雄性无特定病原体(SPF)SD大鼠48只,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、治疗组。假手术组正常饲养,未做任何处理,其余两组大鼠均进行骨折造模。其中治疗组给予加巴喷丁治疗,模型组给予等量生理盐水干预,连续给药12 d。采用高架十字迷宫实验评估大鼠焦虑情绪;采用酶联免疫吸附(ELISA)检测白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA),采用比色法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。采用苏木素伊红(HE)染色评估海马组织病理形态特征;采用蛋白质印迹法检测TNF- α 、NF- κ B蛋白表达量。**结果** 假手术组、治疗组、模型组总穿臂次数(TE)、进入比例(OE)、停留时间比例(OT)比较,假手术组大鼠TE[(12.31±2.59)次比(10.29±2.37)次、(7.25±2.16)次]、OE[(40.25±5.41)%比(37.02±5.13)%、(32.77±5.43)%]、OT[(23.67±4.22)%比(21.94±5.31)%、(16.47±2.35)%]均高于治疗组、模型组大鼠,治疗组大鼠TE、OE、OT均高于模型组($P<0.05$)。假手术组大鼠IL-4[(41.23±5.37)ng/L比(50.23±6.78)ng/L、(59.44±6.92)ng/L]、IL-6[(101.45±12.36)ng/L比(114.32±12.74)ng/L、(135.49±16.78)ng/L]、IL-1 β [(87.64±8.74)ng/L比(101.23±10.45)ng/L、(110.34±10.25)ng/L]均低于治疗组、模型组大鼠,治疗组大鼠IL-4、IL-6、IL-1 β 均低于模型组($P<0.05$)。假手术组大鼠GSH-Px、SOD均高于治疗组、模型组大鼠,MDA低于两组;且治疗组大鼠GSH-Px、SOD均高于模型组,MDA低于该组($P<0.05$)。假手术组大鼠NF- κ B、TNF- α 蛋白表达均低于治疗组、模型组大鼠,治疗组大鼠NF- κ B、TNF- α 蛋白表达均低于模型组($P<0.05$)。**结论** 骨折导致大鼠焦虑情绪增加,而加巴喷丁可以有效削弱骨折大鼠的焦虑情绪,可能与加巴喷丁减弱海马炎症反应有关,从而增强NF- κ B/TNF- α 信号通路对海马神经的保护作用。

关键词 加巴喷丁; 大鼠; 骨折; 焦虑; 海马神经; 炎症

Mechanism of gabapentin alleviating anxiety and hippocampal neuroinflammation induced by fracture model in rats

XU Liling¹,FU Heng¹,ZENG Si²

Author Affiliations:¹Zigong Mental Health Center, Zigong, Sichuan 643020, China;

²Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of gabapentin on anxiety, hippocampal neuroinflammation and human nuclear factor kappa B (NF- κ B)/tumor necrosis factor α (TNF- α) signaling pathway induced by fracture model in rats.**Methods** From January to June 2022, forty-eight healthy male specific pathogen-free (SPF) SD rats were selected and assigned into sham operation group, model group, and treatment group by random number table method. The rats in the sham operation group were fed normally without any treatment, while the other two groups of rats were subjected to fracture modeling. The treatment group was given gabapentin, and the model group was given the same amount of normal saline for continuous administration for 12 days. The elevated plus maze test was used to evaluate rat anxiety, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and colorimetry to detect glutathione peroxidase (GSH-Px). Hematoxylin eosin (HE) staining was used to evaluate the histopathological characteristics of hippocampus, and Western blotting was used to detect the expression levels of TNF- α and NF- κ B.**Results** In the sham operation group, total pass times (TE) [(12.31±2.59) vs. (10.29±2.37), (7.25±2.16)], entry ratio (OE) [(40.25±5.41) % vs. (37.02±5.13) %, (32.77±5.43) %], and residence time ratio (OT) [(23.67±4.22) % vs. (21.94±5.31) %, (16.47±2.35) %] were higher than those in the treatment group and model group. The TE, OE and OT of rats in the treatment group were higher than those in the model group ($P<0.05$). The IL-4 [(41.23±5.37) ng/L vs. (50.23±6.78) ng/L,