

编者按:我国食品工业正处于以“营养与健康”为导向的深度转型期,迫切需要科技的支撑。食疗既是传承和弘扬我国“食药同源”传统文化的重要载体,也是进入大健康时代改善国民营养健康状况的现实选择。作为食品工业的新兴领域,食疗产业成为我国食品工业健康转型的一个重要发展方向。我国有丰富的“食药同源”资源宝库,然而,新型营养功能因子的高效制备、稳态化保持及靶向递送技术等一系列技术瓶颈亟待突破。为共享“食药同源”相关科技研究进展,助推我国新兴食疗产业健康发展,本刊开设“食药同源”特约专栏,连续刊载有关文章。

(专栏主编:中国工程院院士、本刊编委会副主任谢明勇教授。本栏目得到江西江中食疗科技有限公司的支持)

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

闫文杰¹, 冯 朵^{1,2}, 张绍时¹, 周士琦¹

¹北京联合大学生物化学工程学院 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室 北京 100023

²农业农村部食物与营养发展研究所 北京 100081)

摘要 目的:通过网络药理学及动物实验研究,探讨肉苁蓉总苷对炎症性肠病(IBD)的潜在作用机制。方法:应用 Pubchem 数据库及文献收集肉苁蓉总苷中 7 种主要活性成分的三维结构。通过 PharmMapper, UniProt, GeneCards 等数据库获取活性成分相关靶点与 IBD 相关的基因靶点信息。再将肉苁蓉活性成分靶点和 IBD 的靶点绘制韦恩图,得到交集靶点,并将交集靶点上传到 String 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)筛选分析。使用 DAVID 数据库将肉苁蓉总苷活性成分对 IBD 发挥保护作用的靶点进行基因本体(GO)功能富集、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“活性成分-靶点-通路网络”,预测肉苁蓉总苷治疗 IBD 的作用靶点与途径,并构建 IBD 小鼠模型进一步验证。结果:肉苁蓉总苷活性成分对 IBD 具有防护作用的靶点有 254 个,PPI 分析筛选出核心靶点 30 个。GO 功能富集和 KEGG 通路富集发现肉苁蓉总苷可能主要通过调控癌症通路、mTOR 通路、TGF- β 通路、JAK-STAT 通路、AMPK 通路等,进而影响细胞信号传导、增殖、分化、凋亡来发挥作用。动物实验结果表明,肉苁蓉总苷能有效缓解 IBD 小鼠体质量减轻及粪便出血,降低疾病活动指数,同时有效抑制脾脏中 mTOR、TGF- β 两个靶点蛋白的表达。通过对小鼠粪便的 16S rDNA 扩增子测序进行 PICRUSt2 基因功能注释,分析发现肉苁蓉总苷调控 IBD 疾病与小鼠体内细胞壁/细胞膜/包膜生物生成,脂代谢、糖代谢过程及相关防御信号转导机制有着密切关系,与网络药理学结果相符。结论:肉苁蓉总苷可以通过多成分、多靶点、多途径协同有效防止 IBD,这为阐明肉苁蓉治疗 IBD 的临床应用提供了新方法和新思路。其具体机制及物质基础还需更深入的试验研究加以验证。

关键词 肉苁蓉总苷;网络药理学;炎症;炎症性肠病

文章编号 1009-7848(2023)10-0001-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.001

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一种特殊的、病因尚不明确的慢性肠道炎症性疾病,包括两种亚型:克罗恩病(Crohn's Disease, CD)和溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)^[1]。截止 2017 年,全球有 680 万人被诊断患有

IBD,全球发病率和患病率逐年增加,北美、西欧 IBD 患病率较高^[2-3]。1990—2019 年中国 IBD 发病率从 1.45/10 万上升到 3.62/10 万,总体上升幅度为 149.66%;死亡率从 0.47/10 万下降至 0.33/10 万,总体下降幅度为 29.79%^[4]。随着中国人口老龄化,老年患者高发病率的小幅增加会对医疗卫生保健系统造成巨大的负担。

有研究证明,饮食调节有助于减轻 IBD 患者的腹痛或腹泻等症状,减轻其并发症;还可调节肠道微生物组成和功能,影响肠道稳态,维持肠道平

收稿日期:2023-10-12

基金项目:北京市属高校分类发展项目

第一作者:闫文杰,男,博士,教授

E-mail: meyanwenjie@126.com

常功能^[5]。肉苁蓉作为一种具有悠久历史的食药同源植物,在传统中医药中被广泛应用于肠道疾病的治疗,也被认为具有多种保健功效,因此在保健食品领域备受关注^[6-7]。2020年,肉苁蓉(荒漠)被列为食药同源物质,开展生产经营试点工作^[6-7]。肉苁蓉作为食品,在日常生活中可起到预防IBD的作用;作为药材食用,可在IBD治疗过程中起到缓解病症的作用,具有一定的经济价值和药用价值。有学者发现荒漠肉苁蓉水提取物能刺激免疫系统,调节免疫活性,预防炎症性肠病^[8]。Jia等^[9]发现从肉苁蓉中提取到的松果菊苷(Echinacoside, ECH)可改善DSS诱导的小鼠结肠炎;ECH可通过刺激肠上皮细胞增殖、上调TGF- β 来预防细胞死亡并改善黏膜组织修复作用^[10]。ECH还可通过抑制mTOR/STAT3通路表达水平,缓解LPS诱导的大鼠肠上皮细胞凋亡和炎症^[11]。此外,毛蕊花糖苷可作为机体自由基清除剂,减缓2,4-二硝基苯酸(2,4-Dinitrobenzene sulfonic acid, DNBS)诱导的大鼠结肠炎进展,减少组织损伤^[12]。

网络药理学是一门综合了生物信息学、生物化学、药理学和计算科学等多个领域的交叉学科,其利用大数据、生物信息学和计算工具,分析和模拟生物体内的复杂药物代谢、作用机制和药效预测,为新药研发和现有药物的优化提供了重要支持^[13-14]。网络药理学的核心是建立药物与生物体内分子之间的网络模型,以揭示药物与靶标蛋白、代谢途径、细胞信号通路等之间的相互关系^[15]。随着科学技术的不断进步,网络药理学将继续在医药领域发挥重要作用,为改善患者的生活质量和健康做出贡献。

有研究发现肉苁蓉总苷能够有效抑制LPS诱导的BV2细胞的炎症反应^[16],具有抑制肝癌进展^[17]、保肝护肝^[18]、改善记忆认知^[19-20]、抗衰老^[21]等作用。目前,肉苁蓉总苷对炎症性肠病的作用还鲜有研究报道。本研究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,为其治疗IBD的临床应用提供新的方法和思路。

1 材料与仪器

1.1 试剂

葡聚糖硫酸钠(DSS,相对分子量36 000~

50 000),美国MP公司;尿粪隐血测试盒,南京建成生物工程研究所;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;二甲苯,上海凌峰化学试剂有限公司;PBS缓冲液、RNA提取液、第一链反转录试剂盒、2 \times 实时定量PCR扩增的预混合溶液、RTQPCR引物,武汉赛维尔生物科技有限公司;无菌无酶水,美国HyClone公司。

1.2 主要仪器与设备

KZ-III-FP型低温研磨仪,武汉赛维尔生物科技有限公司;CT15RE型高速离心机,日本HITACHI公司;CFX荧光定量PCR仪,美国Bio-rad公司;SW-CJ-1FD型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;NanoDrop2000超微量分光光度计,德国Thermo公司;FBZ2001-up-p标准试剂型纯水仪,青岛富勒姆科技有限公司;INFINITE M NANO型多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;UV-1600型紫外分光光度计,上海美普达仪器有限公司。

2 试验方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 肉苁蓉活性成分 在已有研究^[7,22]的基础上,选择“Echinacoside”“Verbascoside”“Cistanoside A”“Tubuloside A”“Isoacteoside”“2-Acetylacteoside”“Tubuloside B”作为分析生物活性成分。通过Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)找出上述7种成分的三维化学结构数据,存为sdf格式。

2.1.2 潜在作用靶点的预测与筛选 将活性成分的三维结构文件分别导入PharmMapper数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>),靶点物种选择“human protein targets only”,其余选项保持默认,得到不同成分对应的相应目标靶点。采用UniProt数据库 (<https://www.uniprot.org/>)获取每个靶点对应的蛋白名称和基因名称信息。将7种成分对应的目标靶点合并。

在GeneCards数据库中(<https://www.genecards.org/>),以“inflammatory bowel disease”为关键词检索与炎症性肠病相关的基因,整理检索结果。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(Protein-protein, Interaction, PPI)网络构建 使用jvenn (

jevenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html) 在线绘制韦恩图, 获取肉苁蓉活性成分靶点和 IBD 的靶点交集。将得到的交集靶点上传到 String 数据库进行 PPI 筛选分析。下载 PPI 网络的 TSV 文件, 导入 Cytoscape 3.8.0, 计算蛋白互作网络中度 (degree) 值, 再依据 degree 值大小对 PPI 网络图进行美化。

2.1.4 基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能富集和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析 使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对肉苁蓉活性成分对 IBD 发挥保护作用的靶点进行 GO 分析, 再用 DAVID 数据库对肉苁蓉活性成分对 IBD 发挥保护作用的靶点进行 KEGG 通路富集分析。

2.1.5 肉苁蓉“活性成分-靶点-通路”网络构建 将肉苁蓉的活性成分, 肉苁蓉活性成分与 IBD 的交集靶点和 KEGG 富集的通路构建活性成分-靶点-通路网络。

2.2 动物模型验证

2.2.1 动物模型建立 使用 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 (5~8 周, 18~21 g), 由北京联合大学应用文理学院保健食品检测中心提供【实验动物使用许可证号: SYXK(京)2017-0038】, 饲养于 SPF 级动物房中, 温度 (23±2) °C, 相对湿度 50%~70%, 日光灯照射 12 h 交替昼夜。动物实验方案均获得北京联合大学应用文理学院保健食品检测中心动物实验室批准。将 20 只小鼠适应性喂养 3 d 后, 按体质量随机分为 4 组, 每组 5 只。①对照组 (CZ): 自由饮用无菌水, 灌胃无菌水, 连续 7 d; ②DSS 对照组 (DZ): 自由饮用每日现配 3%DSS 液, 连续 7 d; ③肉苁蓉总苷低剂量组 (LZ) (药液浓度: 0.1 g/mL):

自由饮用每日现配 3%DSS 液, 灌胃药液, 连续 7 d; ④肉苁蓉总苷高剂量组 (HZ) (药液浓度 0.4 g/mL): 自由饮用每日现配 3%DSS 液, 灌胃药液, 连续 7 d。连续造模 7 d 后断食 12 h, 颈椎脱臼处死。处死前 4 h 腹腔注射鸡红细胞, 处死后立即摘眼球收集血液, 抽取腹腔积液后打开腹腔。测量结肠长度, 取小鼠脾脏、派氏结等器官。

2.2.2 疾病活动指数 (Disease activity index, DAI) 每日固定时间灌胃前称小鼠体质量, 观察小鼠精神状态、粪便性状, 测定粪便隐血情况, 并进行相应评分, 评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分表
Table 1 Scoring criteria of DAI

评分	体质量 减少率/%	粪便状态	粪便隐血
0	无改变	正常	无色
1	1~5		浅蓝色
2	5~10	膏便	蓝绿色
3	10~15		深蓝色
4	>15	稀便	肉眼可见血

DAI 评分=(体质量评分+粪便性状评分+粪便隐血评分)/3 (1)

2.2.3 实时荧光定量 PCR 检测免疫信号通路 (qRT-PCR) 检测 收集小鼠脾脏, 剪切成 0.5 cm 大小的组织块, 浸泡在组织 RNA 稳定保存液中存放。取出组织切块, 加入 RNA 提取液并研磨粉碎, 提取其总 RNA。经反转录、PCR 扩增, 检测小鼠脾脏中 mTOR、TGF-β 两个关键免疫信号通路激活情况。qRT-PCR 所用引物序列见表 2。

表 2 引物序列表
Table 2 Primer sequence table

通路名称	上游引物	下游引物
GAPDH	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT
mTOR	CCTTCACAGATACCCAGTACCTCC	AGTAGACCTTAAACTCCGACCTCAC
TGF-β	GCTGAACCAAGGAGACGGAATA	GGCTGATCCCGTTGATTTC

2.2.4 PICRUSt2 功能注释 采用 CTAB 或 SDS 方法提取样品的小鼠粪便基因组 DNA, 之后用琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 纯度和浓度。随后取

适量 DNA 于离心管中, 用无菌水稀释至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据扩增区域选择使用带 barcode 的特异性引物、New England

Biolabs 公司的含 GC 缓冲液的高保真 PCR 混合物和高效高保真酶进行 PCR 扩增,以确保扩增效率和准确性。

PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳再次检测。对目的条带使用 Qiagen 公司提供的胶回收试剂盒进行回收。

使用 NEBNext®Ultra™IIDNA 文库准备试剂盒建库试剂盒进行文库构建,将构建好的文库进行 Qubit 和 Q-PCR 定量。待文库合格后,使用 NovaSeq6000 上机测序。

根据 16S rDNA 扩增子测序结果,基于 Greengene 数据库中的 ASV tree 和 ASV 的基因信息,推断它们共同祖先的基因功能谱。同时对 Greengene 数据库中其它未知物种的基因功能谱进行推断,构建古菌和细菌域全谱系的基因功能预测谱。最后将测序得到的菌群组成映射到数据库中,进行菌群代谢功能预测。

3 结果与分析

3.1 肉苁蓉总苷靶点与疾病靶点分析

将活性成分的三维结构文件分别导入 PharmMapper 数据库,得到不同成分对应的相应目标靶点。采用 UniProt 数据库获取每个靶点对应的蛋

白名称和基因名称信息。将 7 种成分对应的目标靶点合并,共得到 354 个靶点。在 GeneCards 数据库中,以“inflammatory bowel disease”为关键词检索相关的基因,整理检索结果,最终获得 7 851 个靶点。使用 jvenn 在线绘制韦恩图获取肉苁蓉活性成分靶点和 IBD 的靶点交集,如图 1 所示,得到肉苁蓉活性成分对 IBD 有防护作用的靶点 254 个。

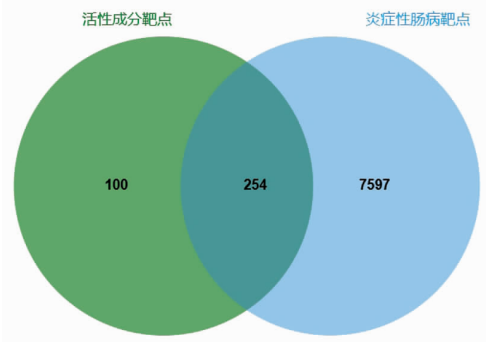


图 1 活性成分靶点与炎症性肠病 (IBD) 疾病靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of active ingredients targets and IBD targets

3.2 PPI 网络构建

将得到的交集靶点上传到 String 数据库进行 PPI 筛选。如图 2 所示,不同颜色节点分别代表肉苁蓉中的活性成分和 IBD 相关靶点,边代表活性

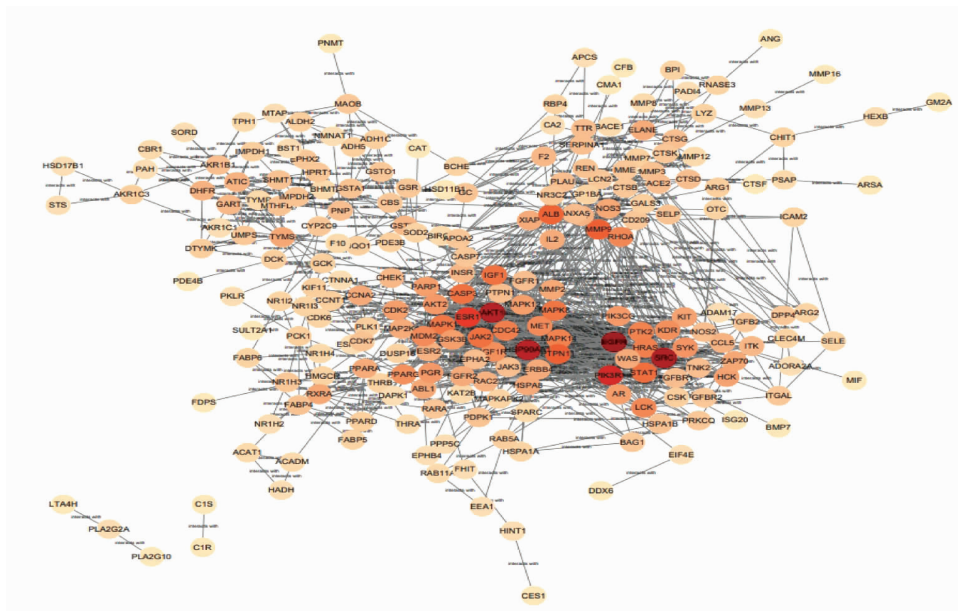


图 2 交集靶点蛋白互作 (PPI) 网络图

Fig.2 PPI-network diagram of common targets

membrane)、Extracellular exosome、Extracellular region、核浆(Nucleoplasm)、Extracellular space、薄膜(Membrane)、线粒体(Mitochondrion)。MF主要有蛋白结合(Protein binding)、相同蛋白结合(Identical protein binding)、ATP结合(ATP binding)、金属离子结合(Metal ion binding)、锌离子结合(Zinc ion binding)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性(Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、酶结合(Enzyme binding)、蛋白质同源二聚活性(Protein homodimerization activity)、蛋白激酶活性(Protein kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性(Protein tyrosine kinase activity)。

使用 DAVID 数据库对肉苁蓉活性成分对

IBD 发挥保护作用的 254 个靶点进行 KEGG 通路富集分析,共获得 161 条通路。将肉苁蓉的活性成分,肉苁蓉活性成分与 IBD 的交集靶点和 KEGG 富集的通路构建活性成分-靶点-通路网络。如图 5 所示,最左侧是肉苁蓉,左侧第 1 个圆圈为肉苁蓉活性成分,右侧圆圈为交集靶点对应筛选出的富集通路,中间矩形部分是交集靶点。由该图可以推测,肉苁蓉活性成分可能通过作用于 IL2、mTOR、ADH、CAS、SMAD、MAPK、NF- κ B 等靶点来调控癌症通路、mTOR 通路、TGF- β 通路、JAK-STAT 通路、AMPK 通路等,进而影响细胞信号传导、增殖、分化、凋亡等。

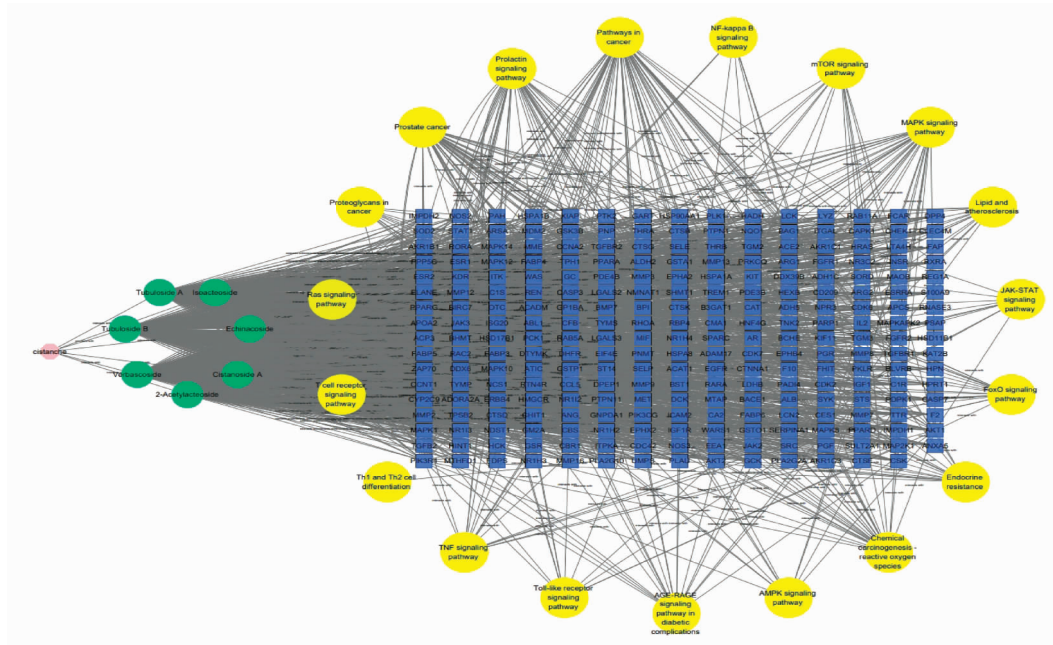


图 5 成分-靶点-通路网络

Fig.5 Component-target-pathway network

3.4 肉苁蓉总苷提高 DSS 诱导的 DAI 评分

试验结果表明,除 CZ 组外,其余 3 组均有不同程度的体质量减轻和粪便隐血情况(图 6)。其中,DSS 对照组体质量减轻率最高,粪便血情况最严重,DAI 最高,第 6 天粪便出血明显。经肉苁蓉总苷干预后,DAI 评分逐渐降低,隐血情况逐渐降低。HZ 组体质量减轻率最低,粪便隐血量最低。结果表明肉苁蓉总苷改善了炎症性肠病引起的生理反应。

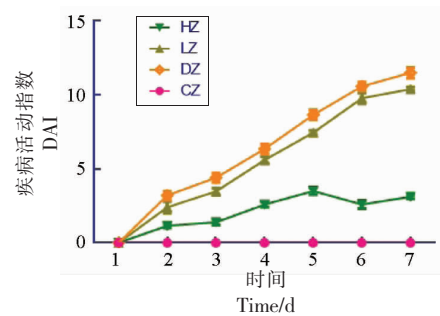


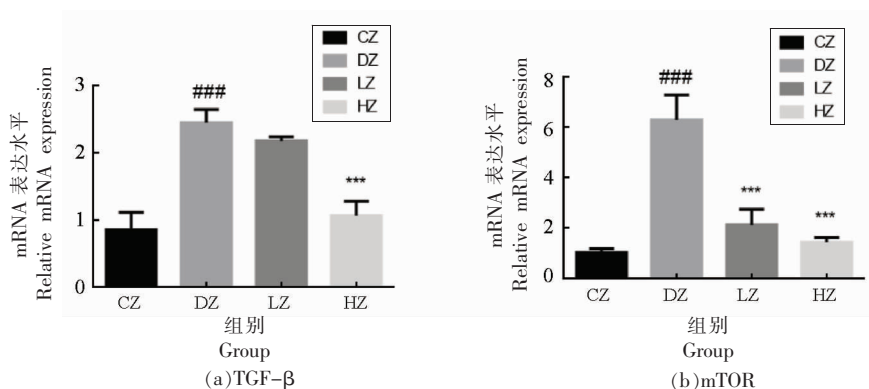
图 6 肉苁蓉总苷对小鼠 DAI 评分的影响

Fig.6 Effect of Total glycosides of *Cistanche deserticola* on the IBD score in mice

3.5 肉苁蓉总苷下调 IBD 小鼠脾脏中 mTOR 和 TGF- β 信号通路表达

mTOR 和 TGF- β 信号通路是激活炎症反应的两个重要信号通路。通过 qRT-PCR 检测小鼠脾脏组织中 mTOR 和 TGF- β 的表达,结果显示:DSS 对照组小鼠中 mTOR 和 TGF- β 的 mRNA 表达量较

正常小鼠显著增加,与 DSS 对照小鼠相比,肉苁蓉干预后小鼠中 mTOR 和 TGF- β 表达显著降低。其中,高剂量组的下降幅度最为显著,且表达水平与正常组基本一致(图 7)。结果表明,肉苁蓉总苷下调了 mTOR 和 TGF- β 信号通路的表达。



注:这些数据来自 3 次独立的实验,以“平均数 \pm 标准误(means \pm SEM)”表示。统计学:与正常组相比,#. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$;与模型组相比,*. $P < 0.05$,**. $P < 0.01$,***. $P < 0.001$ 。

图 7 肉苁蓉总苷对小鼠脾脏中和 mTOR 和 TGF- β mRNA 表达水平的影响

Fig.7 Total glycosides of *Cistanche deserticola* downregulates the mRNA of TGF- β and mTOR signaling pathways in IBD mice

3.6 PICRUSt2 功能注释分析

PICRUSt2 是一种基于生物 16S rRNA 以及 Greengene 数据库中的 ASV tree 和 ASV 的基因信息进行元基因组功能预测的生物信息工具。选用 COG 数据库进行功能预测,结果显示,肠道菌群功能主要涉及 RNA 加工;染色质结构和动力学;细胞周期控制、细胞分裂、染色体分割;防御机制;信号细胞壁/细胞膜/包膜生物发生;细胞外结构;细胞内运输、分泌和囊泡运输;能源生产和转换;碳水化合物的运输和代谢等 20 多种功能。选取丰度排名前 15 的功能及它们在每个样品中的丰度信息绘制热图(图 8),并从不同功能层面进行聚类。与 CZ 组相比,DZ 对照组小鼠的 *COG1132* (ABC-type multidrug transport system)、*COG0745* (DNA-binding response regulator)、*COG1131* (ABC-type multidrug transport system)、*COG1961* (Site-specific DNA recombinase related to the DNA invertase Pin)、*COG0438* (Lycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis)、*COG0534* (Na^+ -driven

multidrug efflux pump)、*COG0642* (Signal transduction histidine kinase)、*COG1595* (DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit)、*COG0463* (Endonuclease)、*COG4974* (Site-specific recombinase XerD)、*COG2207* (AraC-type DNA-binding domain and AraC-containing proteins)、*COG1136* (ABC-type lipoprotein export system)、*COG1309* (DNA-binding transcriptional regulator) 功能基因表达异常。这些基因主要涉及:V:防御机制;T:信号转导机制;M:细胞壁/细胞膜/包膜生物生成;I:脂质运输和代谢;K:转录;L:复制、重组和修复。这六大功能给予肉苁蓉总苷后,这些有差异的生理功能表达均向正常组接近。与 CZ 和 DZ 组小鼠对比,HZ 组小鼠的 *COG1028* (Short-chain alcohol dehydrogenase family)、*COG0451* (Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase) 基因发生高表达,这两个基因与 I:脂质运输和代谢以及 M:细胞壁/细胞膜/包膜生物生成功能有着密切联系,因此推测肉苁蓉总苷可能通过调节小鼠体内脂代谢、

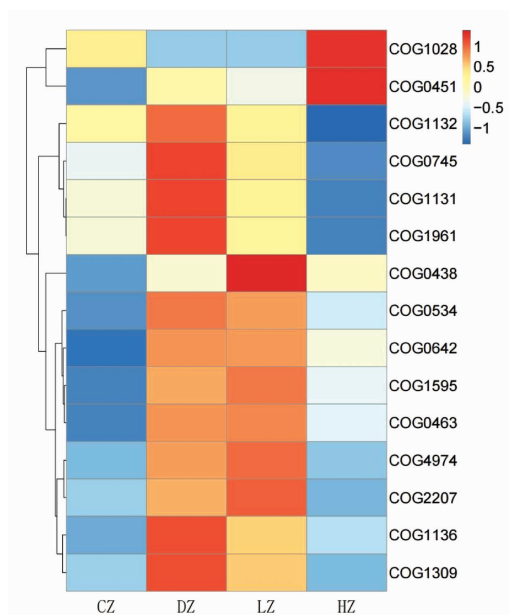


图8 PICRUSt2-功能丰度聚类热图

Fig.8 Heatmap of the PICRUSt2-functional abundance clustering

糖代谢过程及相关防御信号转导机制过程来调控IBD小鼠损伤。

4 讨论

IBD会导致肠道黏膜的慢性炎症和溃疡,现代西方医学无法完全治愈,严重影响患者的生活质量^[23-25]。中医认为,调整饮食可以平衡体内阴阳,有助于缓解肠道炎症^[26]。中医饮食疗法在炎症性肠病的辅助治疗中可以发挥积极作用。肉苁蓉可作为辅助炎症性肠病治疗的传统保健食品原料。

网络药理学分析表明,肉苁蓉总苷成分对IBD有防护作用的靶点254个。GO富集结果表明肉苁蓉总苷干预IBD可能与信号传导、蛋白质磷酸化、凋亡过程负调控、蛋白质水解、先天免疫反应、细胞增殖的正向调节、细胞分化、DNA模板的转录正调控、蛋白结合、ATP结合、金属离子结合、锌离子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、酶结合等生物过程及分子功能相关。活性成分-靶点-通路网络分析表明,肉苁蓉的活性成分可能通过作用于IL2、mTOR、ADH、CAS、SMAD、AMPK、NF- κ B等靶点来调控癌症通路、mTOR通路、TGF- β 通路、JAK-STAT通路、AMPK通路等,

进而影响细胞信号传导、增殖、分化、凋亡等。

根据网络药理学分析结果,选用DSS诱导的IBD小鼠模型模拟IBD患者相似的临床症状,对分析结果进行验证。现有研究表明TGF- β 在整个IBD疾病的形成和发生过程中居于中心,TGF- β 1的大量表达,会导致结肠的上皮损伤与异常的修复,肌成纤维细胞增生及基膜下纤维化,最终造成IBD的发生^[27]。mTOR作为一类重要蛋白质物质,是细胞生长和增殖的中心调节因子^[28-29]。mTOR参与调节许多重要的细胞过程,包括翻译、转录和自噬。其中,AMPK/mTOR信号通路可以共同介导细胞内合成代谢和分解代谢过程^[30-31]。此外,AMPK/mTOR通路也被证实是调控IBD疾病的重要通路^[32]。mTOR是AMPK重要的下游信号分子,在自噬调控中起负调控作用,TGF- β 1也可以通过调节mTOR相关信号通路表达水平抑制自噬,并可通过介导SMADS的信号通路间接地对细胞起到调控作用^[31,33]。本实验重点验证了mTOR和TGF- β 两个信号通路基因的表达。结果表明,肉苁蓉总苷能有效缓解患病小鼠体质量减轻及粪便出血,降低DAI评分,抑制脾脏中mTOR和TGF- β 信号通路表达。通过对小鼠粪便的16S rDNA扩增子测序进行PICRUSt2基因功能注释分析。结果表明,患病小鼠中COG1132、COG0745、COG1131、COG1961、COG0438、COG0534、COG0642、COG1595、COG0463、COG4974、COG2207、COG1136、COG1309功能基因表达异常升高。给予肉苁蓉总苷干预后13种基因表达恢复正常,同时COG1028、COG0451基因高表达。推测肉苁蓉总苷可能通过调节小鼠体内脂代谢、糖代谢过程及相关防御信号转导等机制过程来缓解IBD小鼠损伤。上述实验结果与网络药理学分析结果基本相同。

综上所述,肉苁蓉总苷通过多成分、多靶点、多途径协同作用治疗炎症性肠病。其作用靶点应该与IL2、mTOR、TGF- β 、JAK-STAT、NF- κ B等相关,同时实验结果表明肉苁蓉总苷可能主要是通过抑制TGF- β 、mTOR两个信号通路表达来治疗炎症性肠病。本实验为阐明肉苁蓉治疗IBD的临床应用提供了新的方法,然而,其具体机制及物质基础还需更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] LIU Z J, LIU R Z, GAO H, et al. Genetic architecture of the inflammatory bowel diseases across East Asian and European ancestries[J]. *Nature Genetics*, 2023, 55(5): 796–806.
- [2] LI D P, HAN Y X, HE Y S, et al. A global assessment of incidence trends of autoimmune diseases from 1990 to 2019 and predicted changes to 2040[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2023, 22(10): 103427.
- [3] ALATAB S, SEPANLOU S G, IKUTA K, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 5(1): 17–30.
- [4] 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]. *Chinese General Practice*, 2023, 26(36): 4581–4586.
- [5] 高苑苑, 谢华兵, 刘传, 等. 饮食疗法在炎症性肠病中的应用进展[J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(9): 994–998.
- GAO Y Y, XIE H B, LIU C, et al. Progress in the application of dietary therapy in inflammatory bowel disease[J]. *Chinese Journal of Difficult and Complicated*, 2023 22(9): 994–998.
- [6] 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 Science and Technology*, 2022, 47(6): 133–139.
- [7] ZHOU S Q, FENG D, ZHOU Y X, et al. Analysis of the active ingredients and health applications of cistanche[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1101182.
- [8] JIA Y M, GUAN Q N, GUO Y H, et al. Reduction of inflammatory hyperplasia in the intestine in colon cancer - prone mice by water - extract of *Cistanche deserticola*[J]. *Phytotherapy Research*, 2011, 26(6): 812–819.
- [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]. *Phytotherapy Research*, 2013, 28(1): 110–119.
- [10] JIA Y M, GUAN Q N, GUO Y H, et al. Echinacoside stimulates cell proliferation and prevents cell apoptosis in intestinal epithelial MODE-K cells by up-regulation of transforming growth factor- β 1 expression[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2012, 118(1): 99–108.
- [11] LI L, WAN G W, HAN B, et al. Echinacoside alleviated LPS-induced cell apoptosis and inflammation in rat intestine epithelial cells by inhibiting the mTOR/STAT3 pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 104: 622–628.
- [12] 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-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009, 380(1): 79–94.
- [13] 世界中医药医学联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. *世界中医药*, 2021, 16(4): 527–532.
- World Federation of Chinese Medicine Societies. Network pharmacology evaluation methodology guidance[J]. *World Chinese Medicine*, 2021, 16(4): 527–532.
- [14] WU J S, ZHANG F Q, LI Z Z, et al. Integration strategy of network pharmacology in traditional Chinese medicine: A narrative review[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 42(3): 479–486.
- [15] YUAN Z Z, PAN Y Y, TIAN L, et al. Progress and prospects of research ideas and methods in the network pharmacology of traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2022, 25: 218–226.
- [16] 谢乾. 肉苁蓉总苷对脂多糖诱导的小胶质细胞炎症反应的保护作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- XIE Q. Protective effects of glycodises of cistanche on lipopolysaccharide-induced inflammatory response on microglia cells[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2021.

- [17] 冯朵, 王靖, 蒋勇军, 等. 肉苁蓉总苷对 HepG2 肝癌荷瘤小鼠的影响[J/OL]. 食品科学: 1-13[2023-10-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230829.1810.008.html>.
FENG D, WANG J, JIANG Y J, et al. Effect of total glycosides of *Cistanche deserticola* on HepG2 liver cancer mice[J/OL]. Food Science: 1-13[2023-10-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230829.1810.008.html>.
- [18] 王富江, 屠鹏飞, 曾克武, 等. 荒漠肉苁蓉总苷对酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. 药学报, 2021, 56(9): 2528-2535.
WANG F J, TU P F, ZENG K W, et al. Protective effects of the total glycosides of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma in alcoholic liver injury in mice[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(9): 2528-2535.
- [19] 罗兰, 王晓雯, 时扣荣, 等. 肉苁蓉总苷对 β -淀粉样蛋白致实验性 AD 大鼠海马 CA1 区病理形态学的影响初步研究[J]. 川北医学院学报, 2020, 35(6): 947-951.
LUO L, WANG X W, SHI K R, et al. Preliminary study on the pathomorphology of the glycosides of *Cistanche herba* on the hippocampal CA1 area of experimental AD rats induced by β -amyloid[J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2020, 35(6): 947-951.
- [20] 刘心朗, 周丽丽, 杨占君, 等. 肉苁蓉总苷对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 110-115, 276-277.
LIU X L, ZHOU L L, YANG Z J, et al. Effects of glycosides of *Cistanche* on cognitive function and synaptic plasticity in SAMP8 mice[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(1): 110-115, 276-277.
- [21] 冯朵, 何悦, 蒋勇军, 等. 肉苁蓉抗衰老功能的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4429-4437.
FENG D, HE Y, JIANG Y J, et al. Research progress on anti-aging function of *cistanches* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(11): 4429-4437.
- [22] FENG D, ZHOU S Q, ZHOU Y X, et al. Effect of total glycosides of *Cistanche deserticola* on the energy metabolism of human HepG2 cells[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1117364.
- [23] 刘冲. 数据挖掘严光俊教授运用“治肠六法”治疗“慢性结肠炎”的临床经验[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
LIU C. Data mining of Professor YanGuangJun using ‘six method’ to treat intestinal’s clinical experience in the treatment of the chronic colitis[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2018.
- [24] 李军祥, 陈詒. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(2): 105-111, 120.
LI J X, CHEN J. Consensus opinion on diagnosis and treatment of ulcerative colitis with integrated traditional Chinese and western medicine (2017)[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2018, 26(2): 105-111, 120.
- [25] MOSCHEN A R. IBD in the time of corona - vigilance for immune-mediated diseases[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(9): 529-530.
- [26] 经双双, 何宗卿, 郑雪, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎的代谢组学研究进展[J]. 中医学报, 2023, 38(7): 1386-1394.
JING S S, HE Z Q, ZHENG X, et al. Research progress on metabolomics of TCM treatment of ulcerative colitis[J]. Acta Chinese Medicine, 2023, 38(7): 1386-1394.
- [27] 胥靖域, 顾三元, 王菊, 等. TGF- β 1 与溃疡性结肠炎的相关性研究[J]. 实用中西医结合临床, 2013, 13(7): 1-3.
XU J Y, GU S Y, WANG J, et al. Study on relationship between transforming growth factor- β 1 and ulcerative colitis[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2013, 13(7): 1-3.
- [28] SU S, WANG X, XI X N, et al. Phellodendrine promotes autophagy by regulating the AMPK/mTOR pathway and treats ulcerative colitis [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(12): 5707-5720.
- [29] KIM L C, COOK R S, CHEN J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment [J]. Oncogene, 2016, 36(16): 2191-2201.
- [30] LI H, PANG B, NIE B, et al. Dioscin promotes autophagy by regulating the AMPK-mTOR pathway in ulcerative colitis[J]. Immunopharmacology and Im-

- munotoxicology, 2022, 44(2): 238–246.
- [31] 孙琦. Akt、TGF- β 1、mTOR 在结直肠癌中的表达及意义[J]. 结直肠肛门外科, 2015, 21(S1): 40–41.
SUN Q. Expression and effect of Akt, TGF- β 1, mTOR in colorectal cancer[J]. Journal of Colorectal and Anal Surgery, 2015, 21(S1): 40–41.
- [32] 武荣林, 徐慧超, 蒋子文, 等. 电针“肠病方”对急性溃疡性结肠炎大鼠结肠自噬及 AMPK/mTOR 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(8): 818–824.
WU R L, XU H C, JIANG Z W, et al. Effect of electroacupuncture on colonic autophagy and AMPK/mTOR signaling pathway in rats with acute ulcerative colitis[J]. Acupuncture Research, 2023, 48(8): 818–824.
- [33] 张川锋. 补阳还五汤大鼠含药血清介导 mTOR 调控 TGF- β 诱导成纤维细胞自噬机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
ZHANG C F. The effect and mechanism of Buyanghuanwu Decoction on TGF- β induced mTOR autophagy signaling pathway[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018.

The Mechanism of Total Glycosides of *Cistanche deserticola* Y. Ma on Inflammatory Bowel Disease Based on Network Pharmacology and Animal Experiments

Yan Wenjie¹, Feng Duo^{1,2}, Zhang Shaoshi¹, Zhou Shiqi¹

(¹Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023

²Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081)

Abstract Objective: To investigate the potential mechanism of total glycosides of *Cistanche deserticola* Y. Ma on inflammatory bowel disease (IBD) through network pharmacology and animal experiments. Methods: The three dimensional structures of 7 main active components in total glycosides were collected by Pubchem database and literature. PharmMapper, UniProt, GeneCards and other databases were used to obtain the information of active ingredient related targets and IBD related gene targets. Then, the targets of *Cistanche*'s active ingredients and IBD were mapped by Wayne diagram to obtain the intersection targets, and the intersection targets were uploaded to the String database for protein-protein interaction (PPI) screening analysis. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct the 'active component-target-pathway network' for gene ontology (GO) functional enrichment and KEGG pathway enrichment analysis on the targets of the protective effect of total glycosides on IBD. To predict the target and pathway of total glycosides in the treatment of IBD, and construct mice model of IBD for further verification. Results: There were 254 protective targets of total glycosides against IBD, and 30 core targets were selected by PPI analysis. GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment showed that total glycosides may play a role by regulating cancer pathway, mTOR pathway, TGF- β pathway, JAK-STAT pathway, AMPK pathway, etc. Then it affected cell signal transduction, proliferation, differentiation, and apoptosis. The results of animal experiments showed that total glycosides could effectively relieve weight loss and fecal bleeding in IBD mice, reduce disease activity index, and effectively inhibit the expression of mTOR and TGF- β in spleen. By sequencing 16S rDNA amplicon of mouse feces and annotating *PICRUSt2* gene function, it was found that total *cistanche* glycosides regulate IBD disease and cell wall/membrane/envelope biogenesis in mice. Lipid metabolism, glucose metabolism and related defense signal transduction mechanism were closely related, which was consistent with the results of network pharmacology. Conclusion: Total glycosides could effectively treat IBD through multi-component, multi-target and multi-pathway synergism, which provided a new method and new idea for elucidating the clinical application of *Cistanche* in the treatment of IBD. However, its specific mechanism and material basis need to be verified by further experimental studies.

Keywords total glycosides of *Cistanche deserticola* Y. Ma; network pharmacology; inflammation; inflammatory bowel disease