

UPLC-QTOF/MS 技术结合网络药理学探究草乌抗大肠埃希菌的作用机制

青萨¹, 包勒朝鲁¹, 佟海英², 呼和木仁¹, 吴斯琴毕力格¹, 王布和朝鲁¹, 乌日力嘎¹, 阿如娜¹, 乌兰其其格^{1*}

1. 内蒙古医科大学 蒙医药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

2. 北京中医药大学, 北京 100029

摘要: **目的** 采用 UPLC-QTOF/MS 技术与网络药理学方法探究草乌抗大肠埃希菌的作用机制。**方法** 采用 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定草乌在大鼠血清中的主要成分, 并结合网络药理学识别其作用靶点。利用 Cytoscape 和 STRING 数据库构建“成分-靶点-疾病”网络和蛋白相互作用 (PPI) 网络图, 进一步通过基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析揭示草乌抗大肠埃希菌的潜在作用机制。通过分子模拟技术评估关键入血成分与靶标蛋白的结合效力。**结果** 鉴定出草乌中的 152 个化合物和 40 个入血成分, 其中 8 个为原型成分, 32 个为代谢产物。确定大肠埃希菌的 928 个相关靶点, 并通过韦恩图识别出 90 个草乌作用的交集靶点。PPI 网络分析显示草乌入血成分主要作用于原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 1 (ESR1)、V-Jun 肉瘤病毒癌基因同源物 (JUN)、胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等关键蛋白。GO 功能富集分析表明草乌的作用机制主要与生物学过程中的激素反应、有机环化合物反应、脂质反应等相关; 在细胞定位中与膜筏、膜微域、质膜筏等有关; 分子功能则涉及肽酶类的多种活性。KEGG 通路分析揭示草乌可能通过焦点黏附、白细胞跨内皮迁移、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、Rap1 信号通路、细胞间隙连接、中性粒细胞胞外诱捕网等途径发挥作用。分子对接结果显示, 牛磺胆酸、苍术素、吴茱萸新碱等成分与 Bcl-2、EGFR、ESR1 等关键蛋白有良好的结合。**结论** 结合 UPLC-QTOF/MS 技术、网络药理学分析和分子对接模拟, 推测了蒙药草乌抗大肠埃希菌的作用机制, 为其抗菌作用的进一步研究和应用提供科学依据。

关键词: 草乌; 大肠埃希菌; 抗菌; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用; 网络药理学; 分子对接; 牛磺胆酸; 苍术素; 吴茱萸新碱

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)10-2510-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.10.008

Mechanism of *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli* by UPLC-QTOF/MS technique combined with network pharmacology

QING Sa¹, BAOLE Chaolu¹, TONG Haiying², HUHE Muren¹, WUSIQIN Bilige¹, WANGBUHE Chaolu¹, WURI Liga¹, A Runa¹, WULAN Qiqige¹

1. College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To elucidate the mechanism of action of the *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli*, employing advanced analytical and computational methods. **Methods** Utilizing UPLC-QTOF/MS, the main components in rat serum were identified. Network pharmacology approaches were used to identify the action targets. Cytoscape and STRING databases were employed to construct “component – target - disease” networks and protein-interaction maps. GO and KEGG pathway analyses were conducted to explore the potential mechanisms of action. Molecular modeling techniques were applied to assess the binding affinity of key blood entry components to target proteins. **Results** *Aconiti Kusnezoffii Radix* was found to contain 152 compounds and 40 blood-

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2021LHMS08055); 内蒙古医科大学科技创新团队 (RZ2200002685); 内蒙古医科大学蒙药“一流学科”青年教师创新能力提升项目 (myxy1xkky2020-02); 内蒙古医科大学蒙药“一流学科”研究生科研能力提升计划项目 (MYX2023-R03)

作者简介: 青萨, 男, 硕士, 研究方向为蒙药药理与毒理学研究。E-mail: 1476419823@qq.com

***通信作者:** 乌兰其其格, 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为蒙药药理与毒理学研究。E-mail: 13171003878@163.com。

entry components, including 8 prototypical components and 32 metabolites. The study identified 928 relevant targets of *Escherichia coli*, with 90 intersecting targets of *Aconiti Kusnezoffii Radix*'s action identified through the Venn diagram. PPI network analysis revealed that the blood-entry components primarily interacted with key proteins such as SRC, Bcl-2, EGFR, ESR1, JUN, and CASP3. GO functional enrichment analysis showed that the mechanism of action was mainly related to hormonal reaction, organic cyclic compound reaction and lipid reaction in biological processes. In cell localization, it is related to membrane raft, membrane microdomain, plasma membrane raft, etc. Molecular functions involve various activities of peptidases. KEGG pathway analysis suggested potential mechanisms such as focal adhesion, leukocyte transendothelial migration, natural killer cell-mediated cytotoxicity, Rap1 signaling pathway, cell gap junctions, and the extracellular trapping network of neutrophils. Molecular docking analysis showed that compounds like taurocholic acid, atractylodin, and evocarpine have a strong binding affinity to key proteins such as Bcl-2, EGFR, and ESR1. **Conclusion** Combined with UPLC-QTOF/MS technique, network pharmacological analysis and molecular docking simulation, the mechanism of action of *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli*, which provided scientific basis for further research and application of its antibacterial action.

Key words: *Aconiti Kusnezoffii Radix*; *Escherichia coli*; antibacterial; UPLC-QTOF/MS; network pharmacology; molecular docking; taurocholic acid; atractylodin; evocarpine

大肠埃希菌 *Escherichia coli* 是一种通常存在于人类和其他温血动物肠道内的革兰阴性菌, 大部分株系对宿主是无害的, 甚至在消化过程中发挥积极作用^[1]。但是, 其中的一些病原型株可引起包括肠道感染、溶血尿毒综合症、肾功能衰竭、剧烈的腹泻、发烧以及腹部疼痛等严重疾病^[2]。这些致病性大肠埃希菌通过携带特殊的病原因子而导致疾病, 此类因子使得细菌能够入侵宿主细胞、规避免疫系统的清除、制造毒素并形成保护性生物膜^[3]。这些特性不仅提升了其致病能力, 也增加了治疗的难度, 成为了一个全球性的公共健康挑战^[4]。面对挑战, 研发新型抗菌药物和实施有效的感染控制措施是至关重要的策略。草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* 为毛茛科乌头属北乌头的干燥块根, 味辛、性温、轻、有大毒^[5], 《认药白晶鉴》中记载草乌具有“杀黏, 燥协日乌素, 止痛功效”, 是蒙医临床必不可少的一味药^[6]。大肠埃希菌感染引起的疾病属于蒙医学“粘症”的范畴^[7-8]。在蒙医临床上经常使用以杀粘四药之一的草乌为君药的巴特日七味丸^[9]、嘎日迪-5^[10]、等复方治疗粘症且效果良好。本团队前期体外抑菌实验用草乌测试对 7 种细菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、炭疽杆菌)的抑制作用, 结果可知草乌对大肠埃希菌有一定的杀菌作用^[11]。因此本研究使用 UPLC-QTOF/MS 技术分析草乌的入血成分, 结合网络药理学对草乌抗大肠埃希菌的活性成分和作用靶点进行筛选, 并探讨入血成分、基因靶点以及通路之间的关系, 为深入了解草乌抗菌作用及作用机制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

主要用到的仪器设备有 ACQUITY UPLC H-Class (美国 WATERS) 超高效液相色谱仪, XEVO G2-XS QToF (美国 WATERS) 高分辨质谱仪。

1.2 试剂与药物

草乌, 批号 20140101, 购于呼和浩特市药材市场, 经内蒙古医科大学那生桑教授鉴定草乌为毛茛科植物多年生草本北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根。乙腈(质谱级, 美国赛默飞世尔科技公司), 甲醇(质谱级, 美国赛默飞世尔科技公司), 甲酸(质谱级, 美国赛默飞世尔科技公司), 超纯水。

1.3 实验动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 160~200 g。购自北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2019-0010, 饲养于内蒙古医科大学实验动物中心, 适应性饲养 1 周, 自由进食饮水, 保持 12 h 光照/黑暗, 温度为 (20±2) °C, 相对湿度控制在 (50±10) %。动物实验由内蒙古医科大学医学伦理委员会批准 (YKD202403066)。

2 方法

2.1 草乌入血成分分析

2.1.1 草乌药液制备及给药 取适量草乌粉碎, 过 100 目筛, 取粉末适量, 精密称定, 加入适量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 搅拌均匀后, 制备成草乌质量浓度为 0.15 g/mL 混悬液, 现用现配。取 24 只 SD 大鼠, 随机分为对照组和给药组, 每组 12 只, 大鼠给药前禁食 12 h, 自由饮水, 以 1.5 g/kg 剂量 ig 给

药, 对照组大鼠 ig 等量蒸馏水。

2.1.2 血清采集及血清样品制备 在给药后 15、30、45、60、90、120、240、480、720、1 440 min 后眼眶取血各约 0.5 mL, 收集至 EP 管中静置 30 min, 室温下以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 备用。精密吸取 200 μ L 含药血清 10 个时间点含药血清各吸取 50 μ L 混匀, 于 1.5 mL EP 管内, 加入 5 倍量甲醇涡旋 5 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min) 10 min, 上清液于常温下氮气吹干, 100 μ L 甲醇复溶, 涡旋 5 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min) 5 min, 取上清液供 MS 分析。

2.1.3 UPLC-QTOF/MS 条件 色谱条件: 样品采用 Waters ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱系统 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m) 色谱柱进行分离; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μ L。流动相: 0.1%甲酸 (A) - 0.1%甲酸乙腈 (B) 梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0 $\rightarrow$ 8 min, 10%~35% B; 8 $\rightarrow$ 9 min, 70% B; 9 $\rightarrow$ 20 min, 70%~100% B; 20 $\rightarrow$ 25 min, 100% B; 25 $\rightarrow$ 32 min, 100%~10% B。质谱条件: 分别采用电喷雾电离 (ESI) 正离子和负离子模式进行检测。其毛细管源电压为 2.5 kV (正离子) 或 3.0 kV (负离子), 采样锥源为 40 V, 离子源电势偏移量为 80 V, 离子源温度为 120 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度为 450 $^{\circ}$ C, 锥孔气流量为 100 L/h, 脱溶剂气体流量为 800 L/h, 毛细血管电压为 2.5 kV (正离子) 或 3.0 kV (负离子), 数据采集模式为全信息串联质谱, 质量范围为 m/z 100~1 200。

2.1.4 数据处理 用 Waters MassLynx 4.1 质谱软件记录原始数据, 经格式转换, 然后采用 Waters “UNIFI 科学信息系统” 进行离子对提取及质量校正、保留时间校正, 并提取峰面积。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 获取草乌入血成分靶点及大肠埃希菌相关靶点 通过中药系统药理学分析平台 (TCMSP) [12] 收集草乌入血成分所有的化学结构, 将筛选得到的化合物 2D Structure SDF 图导入 Swiss Target Prediction 数据库 [13] 中检索相对应的作用靶点, 收集靶点信息并进行靶点预测。利用 PubChem 平台 [14] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 SciFinder 数据库 (<https://scifinder-n.cas.org/>) 确认结构式。筛选 probability > 0 的潜在靶点, 删去重复值, 通过 UniProt 蛋白质数据库 [15] (<https://www.uniprot.org/>)

进行规范。

以 “*Escherichia coli*” 为关键词, 在 GeneCards 数据库 [16] (<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库 [17] (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM 数据库 [18] (<https://omim.org/>) 检索得到大肠埃希菌靶点, 删除重复的靶点基因, 最后通过 UniProt 蛋白质数据库进行规范。

2.2.2 草乌靶点与大肠埃希菌靶点映射 利用在线网站 Venn 2.1.0 平台 [19], 输入草乌有效化合物作用靶点与大肠埃希菌靶点, 取二者的交集, 即为草乌 - 大肠埃希菌共同作用的关键靶基因。绘制相应的 Venn 图, 导出交集结果。把 2.2.1 项下获得的草乌的入血成分所对应的靶点基因和大肠埃希菌相关的靶点基因进行匹配映射, 获得的二者共同基因作为草乌与大肠埃希菌的关键靶点, 应用 Cytoscape 3.9.1 软件 [20] 构建 “药物 - 活性成分 - 靶点基因 - 抗菌靶点” 关系网络。

2.2.3 草乌与大肠埃希菌靶点的蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 将草乌入血成分和大肠埃希菌的共同靶点输入到 STRING 数据库 [21] ([https://string-db.org/Version 10.5](https://string-db.org/Version%2010.5)), 将研究物种选择为人类 (homo sapiens) 设置置信度 (confidence) > 0.7, 并网络显示选项选择为 “hide disconnected nodes in the network”, 同时将 String 中下载的 tsv 文件导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中的 CytoNCA 插件进行分析, 根据 degree 值绘制条形图, 得到前 20 个 PPI 核心基因靶点。

2.2.4 基因本体 (GO) 功能 [22] 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) [23] 通路富集分析 应用 Metascape 平台 [24] (<https://metascape.org/>) 对获得的基因进行 GO 与 KEGG 富集分析, 并将前 20 个富集结果进行可视化。

2.2.5 靶点蛋白与草乌核心化合物分子对接 根据化合物 - 靶点复合网络得到的关键化合物和 PPI 分析中得到的关键基因进行分子对接模拟 [25]。首先, 从 PDB 数据库 [26] (<http://www.rcsb.org/>) 搜索基因蛋白质结构, 然后利用 PyMOL 软件 [26] 通过去除溶剂和有机物后对蛋白质结构预处理为分子受体。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上搜索草乌中活性化合物的 2D 晶体结构, 并使用 ChemOffice 软件通过能量最小化对分子配体进行预处理。然后通过 Autodock Tools 1.5.6 软件 [27] 添加氢原子, 并设置蛋白质受体和分子配体相关参数。

并用 PyMol 对部分结果进行可视化。

3 结果

3.1 草乌入血成分分析鉴定

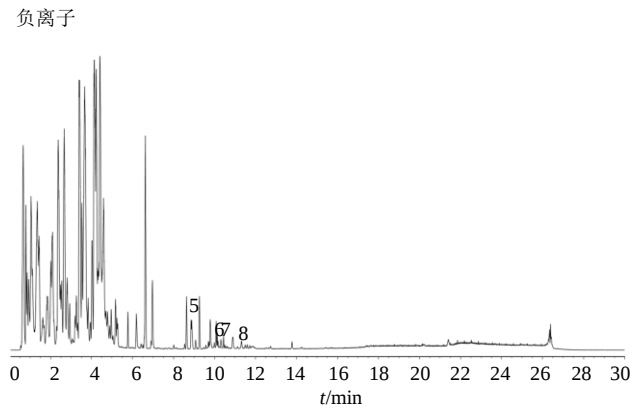
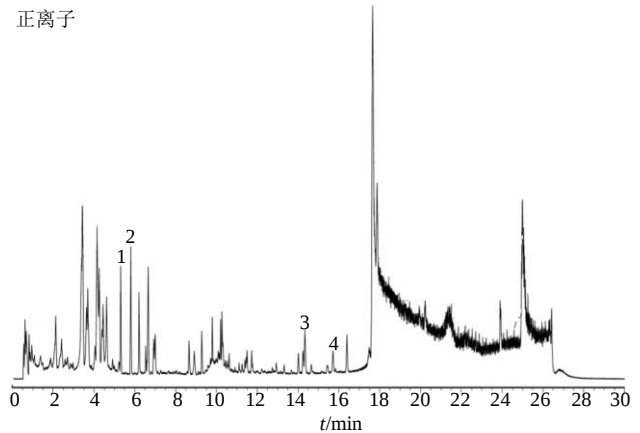
健康大鼠 ig 给药后，按照 2.1.3 项下的条件对大鼠对照血清和给药后的 10 个采血时间点的草乌含药血清进行正负离子采集，总离子流图见图 1。根据色谱峰的母离子、碎片离子、质谱裂解规律，结合文献与数据库，从提取物中鉴定主要化合物。对未知化合物采用在线数据库（ChemSpider、Web of Science、Mass Bank）进行筛查鉴定。最后，共找到 8 入血原型成分，见表 1。

3.2 草乌网络药理学研究

3.2.1 入血成分靶点的筛选 依据 UPLC-QTOF/MS 联用技术来鉴定和推测草乌在大鼠血清中的主要移行成分，中药系统药理学分析平台（TCMSP）及相关文献检索筛选得到草乌主要有效成分 152 个，二者进行对比，得到个 8 原型成分，见表 1，共得到 245 个预测靶点。

3.2.2 草乌入血成分靶点与抗大肠埃希菌靶点映射结果 在 GeneCards、OMIM、TTD 数据库以“*Escherichia coli*”进行检索，筛选获取大肠埃希菌的靶点，整合、删除重复靶点，将草乌活性成分的 245 个靶点与 928 个大肠埃希菌靶点进行匹配映射，绘制 Venn 图，获得草乌活性成分与大肠埃希菌的 90 个核心靶点，见图 2。

3.2.3 “药物 - 活性成分 - 靶点基因 - 抗菌靶点”网络分析 将 3.2.2 项下获得的草乌活性成分与大肠埃希菌的作用靶点，绘制网络图，见图 3。



1-吴茱萸新碱，2-苍术素，3-N-十六醛，4-Z-9,17-十八碳二烯醛，5-牛磺胆酸，6-癸二酸二丁酯，7-9-烯-甲基棕榈酸酯，8-冠状酸。1-evocarpine, 2-atractylodin, 3-N-hexadecanal, 4-Z-9,17-octadecadienal, 5-taurocholic acid, 6-dibutyl sebacate, 7-9-ene-methyl palmitate, 8-coronaric acid.

图 1 正/负离子模式下血清样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion current plot of serum sample in positive/negative mode

表 1 草乌入血原型成分

Table 1 Main active constituents of *Aconiti Kusnezoffii Radix* in blood

活性成分	分子式	理论值 m/z	实测值 m/z	误差	保留时间/min	发现理论碎片	来源及参考文献
冠状酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296.235 14	295.227 1	-2.7	11.18	0	数据库
吴茱萸新碱	C ₂₃ H ₃₃ NO	339.256 2	340.260 6	-8.6	5.29	1	28
Z-9,17-十八碳二烯醛	C ₁₈ H ₃₂ O	264.245 3	265.253 1	2.1	15.71	0	29
N-十六醛	C ₁₆ H ₃₂ O	240.245 3	263.237	9.5	14.24	0	30
癸二酸二丁酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	314.245 71	313.237 7	-2.3	10.52	0	31
9-烯-甲基棕榈酸酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.240 23	313.238 4	-0.1	10.52	1	数据库
牛磺胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	515.291 67	514.283 7	-1.3	8.98	0	32
苍术素	C ₁₃ H ₁₀ O	182.073 2	205.060 4	-9.6	5.57	0	33

3.2.4 PPI 网络构建与分析 将草乌与大肠埃希菌共同靶点输入到 STRING 数据库，得到草乌抗大肠埃希菌的 PPI 网络，图中节点之间的连线表示两者之间存在相互作用，连线越多则作用越密切，节点

数为 90，边数为 254，平均节点度为 5.64，平均局部聚类系数为 0.499，见图 4。同时将 STRING 中下载的 tsv 文件导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中的 CytoNCA 插件进行分析，根据 degree 值绘制条形

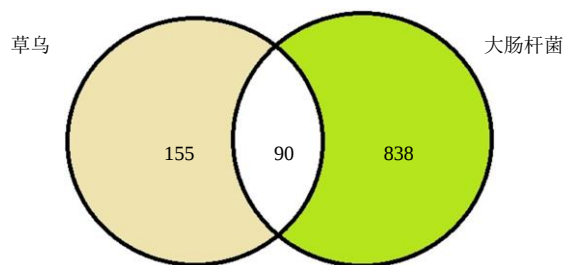


图 2 草乌与大肠埃希菌靶点交集基因 Venn 图
Fig. 2 Venn diagram of *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Escherichia coli* target intersection genes

图, 得到前 20 个 PPI 核心基因靶点, 见图 5。其中草乌与大肠埃希菌关联 degree 值最高的前 6 个节点依次为原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 1 (ESR1)、V-Jun 肉瘤病毒癌基因同源物 (JUN)、胱天蛋白酶 3 (CASP3), 表明了这些基因可能是草乌抗大肠埃希菌的潜在靶点。

3.2.5 GO、KEGG 功能富集分析 GO、KEGG 功能富集分析应用 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>) 对获得的基因进行 GO 与 KEGG 富集分析, 并将前 20 个富集结果进行可视化。绘制 GO 气泡

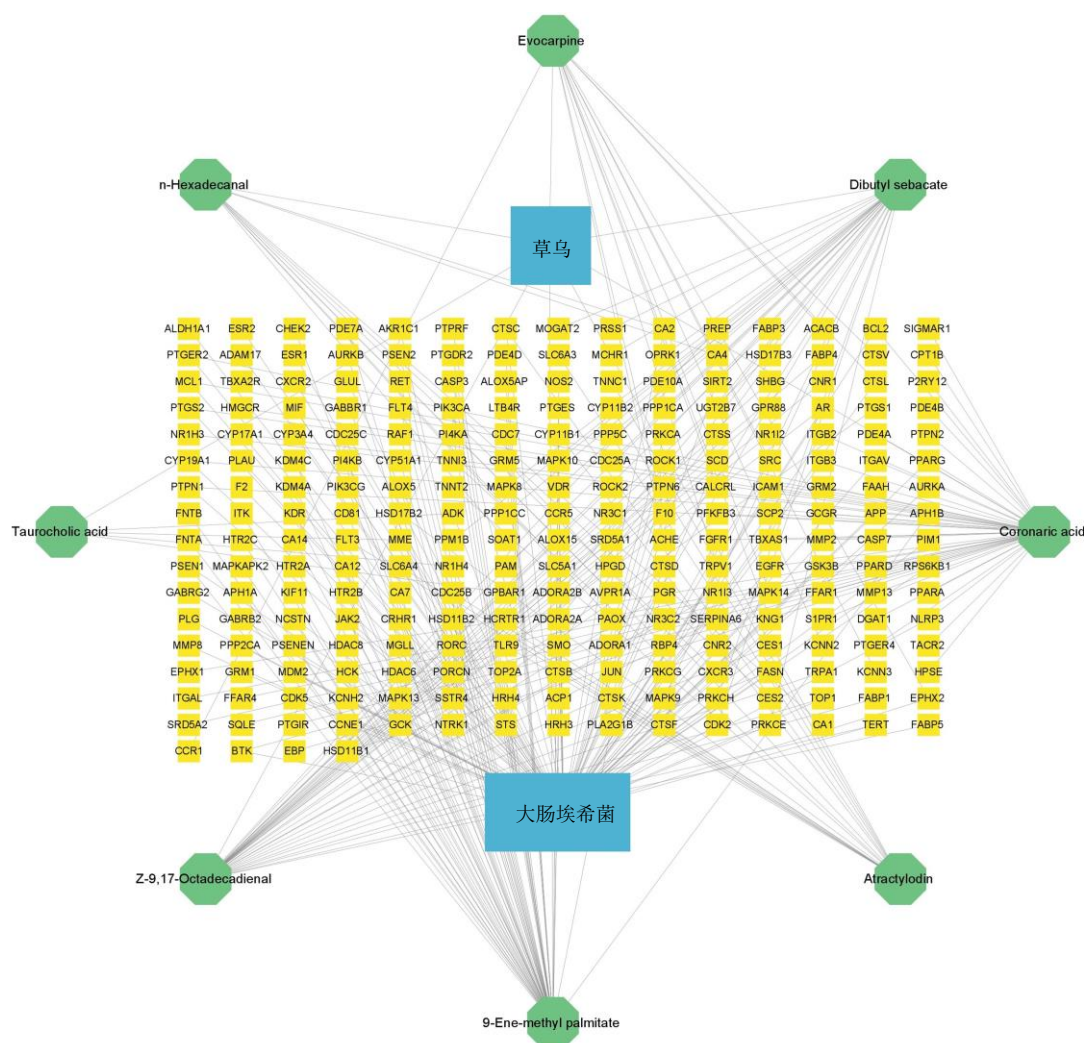


图 3 “草乌 - 活性成分 - 靶点基因 - 大肠埃希菌” 网络图
Fig. 3 “*Aconiti Kusnezoffii Radix* - active component - target gene - *Escherichia coli*” network map

图, P 值代表富集的显著性, 草乌抗大肠埃希菌作用机制 GO 功能富集分析中得到生物学过程 (BP) 中主要涉及对激素的反应 (response to hormone)、

细胞对有机环化合物的反应 (cellular response to organic cyclic compound)、细胞对脂质的反应 (cellular response to lipid)、细胞对激素刺激的反应

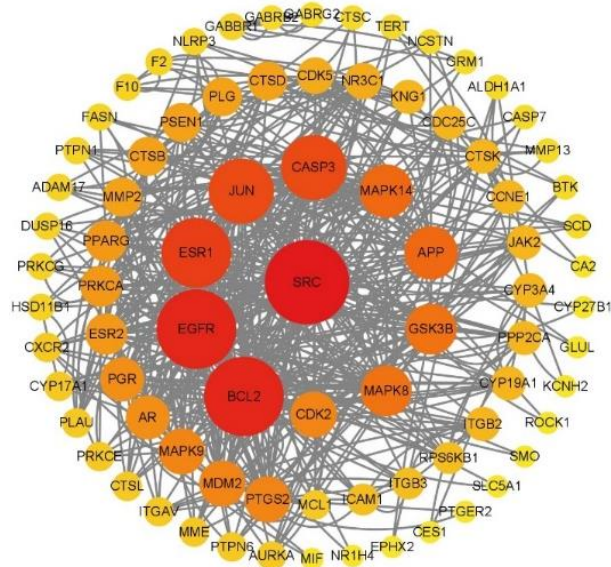


图 4 草乌抗大肠埃希菌的 PPI 网络图

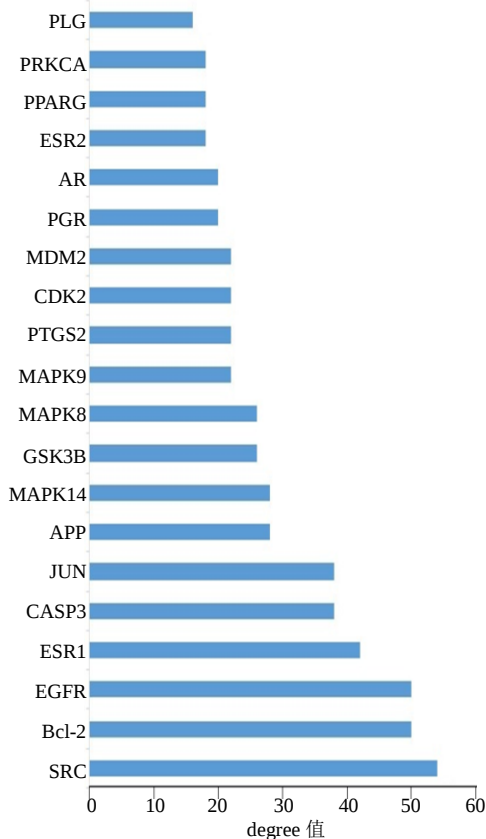
Fig. 4 PPI network diagram of *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli*

图 5 草乌抗大肠埃希菌的核心基因靶点

Fig. 5 *Aconiti Kusnezoffii Radix* core gene targets against *Escherichia coli*

(cellular response to hormone stimulus) 等, 细胞定位 (CC) 中主要涉及膜筏 (membrane raft)、微域膜

(membrane microdomain)、质膜筏 (plasma membrane raft) 等, 分子功能 (MF) 中主要涉及内肽酶活性 (endopeptidase activity)、肽酶活性 (peptidase activity)、丝氨酸型内肽酶活性 (serine-type endopeptidase activity)、丝氨酸型肽酶活性 (serine-type peptidase activity) 等, 见图 6。KEGG 通路富集筛选前 20 条信号通路 ($P < 0.05$), 结果显示草乌对抗大肠埃希菌涉及焦点黏附 (focal adhesion)、白细胞跨内皮迁移 (leukocyte transendothelial migration)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性 (natural killer cell mediated cytotoxicity)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)、细胞间隙连接 (gap junction)、中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular trap formation), 见图 7。

3.2.6 分子对接 分子对接结果显示, 将排名前 6 位的活性化合物与 SRC、Bcl-2、EGFR、ESR1、JUN、CASP3 进行分子对接, 配体与受体结合时所需的结合自由能越低, 则说明其结合构象越稳定, 见图 8、9。通常最小结合能 ≤ 0 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$), 认为目标分子与蛋白质可自发结合; 最小结合能 ≤ -5.0 kcal/mol, 说明结合活性较好; 最小结合能 ≤ -7.0 kcal/mol, 说明结合活性强烈; 且结合能越小, 则代表活性成分与靶点结合能力越强、发生作用的可能性越高^[34]。

4 讨论

大肠埃希菌是一种通常存在于动物和人类肠道内的细菌, 属于肠杆菌科、革兰阴性、无芽孢、通常呈杆状、有时也呈链状排列的细菌。大肠埃希菌的感染可引起一系列症状, 包括但不限于肠道感染、溶血尿毒综合征、尿路感染、脑膜炎、败血症、肾功能衰竭、剧烈的腹泻、发烧以及腹部疼痛等严重疾病^[35]。现代医学上治疗大肠埃希菌感染主要使用抗生素疗法, 但抗生素的滥用和不当使用加剧了耐药性问题, 减少了有效的治疗选择。耐多药菌株的出现使得某些抗生素疗法不再有效。此外, 强效抗生素的使用可能破坏正常的肠道微生物群落^[36], 从而有助于耐药菌种的发展和传播。这些药物的非选择性作用还可能导致有益菌被消除, 引发微生物失衡和继发性感染^[37]。因此, 寻找和研究新的治疗方法, 包括利用传统医学中的草本药物, 变得尤为重要。蒙医学上细菌感染的疾病归类为“粘症”的范畴。在蒙医临床上经常使用草乌为君药的复方治疗“粘症”且效果良好。本团队前期体外抑菌实验可知

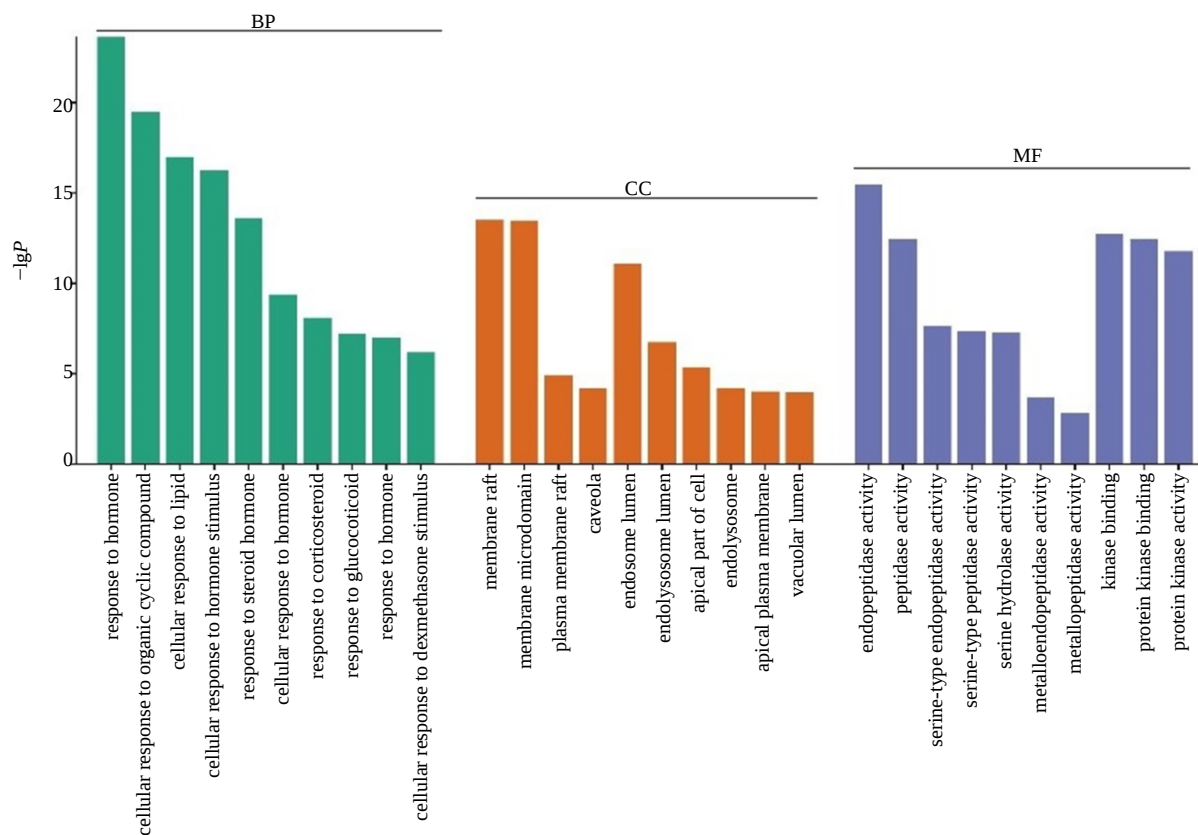


图 6 草乌抗大肠埃希菌的 GO 富集分析柱状图

Fig. 6 Histogram of GO enrichment analysis of *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli*

草乌对大肠埃希菌有一定的杀菌作用,但是草乌中具体哪些活性成分负责其抗菌作用,这些成分的作用靶点以及其背后的作用机制尚未得到充分的阐释。因此本研究通过 UPLC-QTOF/MS 技术^[38]确定哪些草乌成分能够进入血液循环,并可能参与其抗菌作用。同时,利用网络药理学方法^[39]预测草乌活性成分的潜在作用靶点,并分析其与大肠埃希菌之间的相互作用。此外,分子对接技术也被应用于模拟草乌活性成分与预测靶点之间的相互结合情况,从分子层面解释其可能的抗菌机理。为今后实验研究提供依据。

多数蒙药口服给药后,移行入血的成分才可能发挥药效,通过分析口服给药后血清中的入血成分来确定体内直接作用物质,已成为确定药效物质基础的有效途径。因此采用 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定草乌在大鼠血清中的主要成分,鉴定出 8 个成分,冠状酸、吴茱萸新碱、Z-9,17-十八碳二烯醛、癸二酸二丁酯、9-烯-甲基棕榈酸、牛磺胆酸、苍术素等。本研究的草乌药液是以低剂量制备,因此在采用 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定大鼠血清中并没有检测

到草乌的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱苯甲、酰次乌头原碱等代表性成分。

网络药理学结果显示,筛选出的草乌入血的 8 种主要活性成分有 245 个作用靶点,草乌与抗大肠埃希菌有 90 个交集靶点。PPI 网络分析显示,草乌抗大肠埃希菌的作用过程中主要涉及 SRC、Bcl-2、EGFR、ESR1、JUN、CASP3 等核心靶点,分子对接结果显示 Bcl-2、EGFR、ESR1 与草乌入血的 3 种关键成分牛磺胆酸、苍术素、吴茱萸新碱出较好的结合活性。

当大肠埃希菌侵入宿主组织时,宿主的免疫系统会通过激活炎症反应来应对感染,包括炎症介质和趋化因子的释放,吸引免疫细胞到达感染部位。中性粒细胞和巨噬细胞等免疫细胞通过吞噬、释放细菌毒素和产生抗菌酶等方式,参与感染的清除。此外,宿主的适应性免疫反应也被激活,产生特异性抗体和细胞免疫应答,以中和和清除大肠埃希菌。大肠埃希菌通过其表面的黏附因子(如菌毛、附着蛋白等)与宿主细胞表面的黏附受体结合,实现与

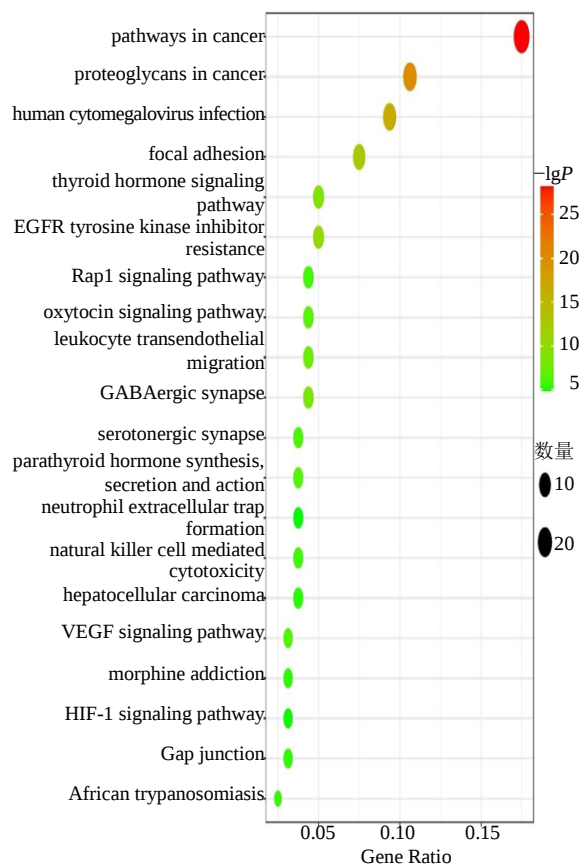


图 7 草乌抗大肠埃希菌的 KEGG 富集分析点图

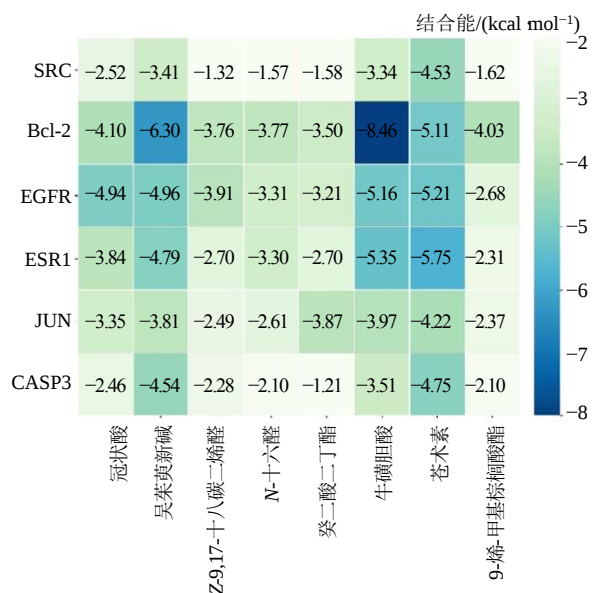
Fig. 7 Point plots of KEGG enrichment analysis of *Aconiti Kusnezoffii Radix* against *Escherichia coli*

图 8 草乌抗大肠埃希菌核心成分与关键靶点的分子对接结果热图

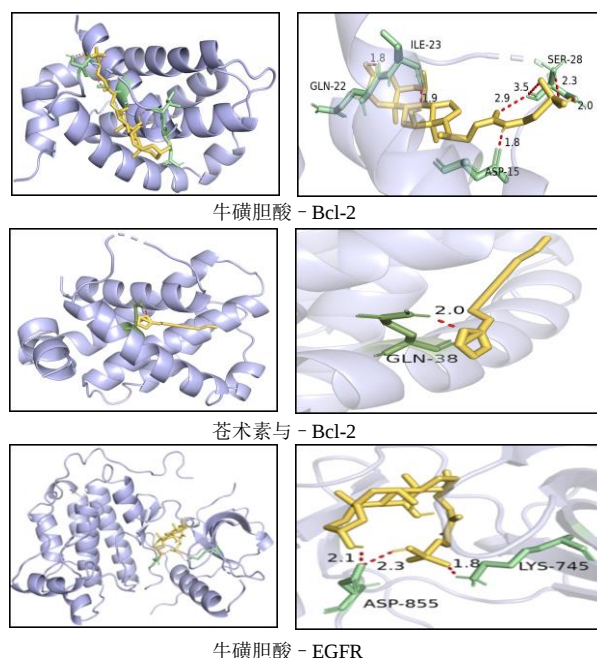
Fig. 8 Heatmap of molecular docking results of *Aconiti Kusnezoffii Radix* anti-*Escherichia coli* core components with key targets

图 9 分子对接结果

Fig. 9 Molecular docking result

宿主细胞的黏附，促使细菌在宿主组织中定植并进一步感染^[40]。黏附受体与受体配体相互作用的破坏或干扰可能阻止感染的发生和扩散。中性粒细胞是参与快速反应和清除细菌和真菌感染的关键细胞介质。许多关键的中性粒细胞功能，包括黏附依赖性脱颗粒，都受 SRC 家族激酶控制^[41]。SRC 是一种酪氨酸激酶，参与了多种细胞信号传导和调控的过程。Xia 等^[42]发现 SRC-3 在宿主防御细胞外细菌病原体（如大肠埃希菌）中起着至关重要的保护作用。

Joon 等^[43]发现肠聚集性大肠埃希菌诱导的 EGFR 激活在炎症反应中 EGFR 信号通路激活可导致细胞中的特定转录因子的激活[如核因子- κ B(NF- κ B)、转录因子 (AP-1)、信号传导转录激活因子 3 (STAT3)]，从而促进白细胞介素 (IL)-8 的分泌。细菌感染引起的炎症过程会导致消化系统内的改变。在这一过程中，产生的促炎细胞因子如 IL-1、IL-6 和 IL-8 等起到重要作用。它们能够促进免疫细胞的激活和炎症介质的产生，吸引炎症细胞到感染部位，并参与炎症反应的调控^[44]。

EGFR 是一种重要的细胞膜受体，通过激活多个信号传导途径参与细胞的增殖、存活和分化^[45]。EGFR 信号还影响焦点黏附的形成。焦点黏附是细胞与胞外基质 (ECM) 相连接的复杂结构，这些连接点通过整合蛋白 (integrins) 和其他细胞骨架蛋白

如丝/微管与细胞内骨架相连。焦点黏附的形成和解离对于细胞迁移至关重要,因为它们提供了必要的牵引力和力的传递,让细胞能够在基质上移动^[46-48]。Rap1 信号通路是一种涉及 Rap1 的生化级联反应,Rap1 是 Ras 蛋白家族中的小 GTP 酶。Rap1 在多种细胞过程中发挥作用,包括细胞黏附、细胞连接形成和细胞极性。Rap1 的激活是由黏附分子、细胞因子、生长因子如肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和干扰素 γ (IFN γ) 或与 GEFs 相关的二级信使触发的^[49]。

Bcl-2 家族蛋白通过调控线粒体膜的通透性,影响细胞凋亡的发生和执行阶段的执行^[50-51]。Bcl-2 在内质网应激过程中发挥着关键作用,调节细胞的存活和凋亡平衡。炎症性疾病中当内质网积累了未折叠蛋白质,干扰其正常功能时,会引发内质网应激。Bcl-2 与其他蛋白质(如 Bcl-2 类似 11/BIM)相互作用,促进细胞存活并抑制凋亡。然而,当内质网应激持续存在且未得到解决时,细胞会通过凋亡途径死亡^[52]。外源性和内在凋亡途径可通过 Bid 蛋白相互作用,增强信号传递^[53]。

综上所述,大肠埃希菌感染能够触发宿主的免疫反应,其中 EGFR 信号通路及 Rap1 信号通路的激活及其相应的关键靶点扮演了至关重要的角色。具体而言,EGFR 信号通路的激活能够导致细胞内特定转录因子的激活,从而促进炎症介质 IL-8 的表达和分泌。此外,焦点黏附的形成与离散对于细胞向炎症区域的迁移至关重要,这一过程依赖于整合蛋白与细胞骨架蛋白之间的相互作用,实现细胞与细胞外基质的紧密连接。同样,Rap1 信号通路在细胞的黏附、连接形成以及细胞极性的建立中发挥作用。此外,Bcl-2 蛋白家族通过调节线粒体膜的通透性,从而影响细胞凋亡的启动与执行。在炎症性疾病的背景下,持续的内质网应激可诱导细胞凋亡。蒙药草乌抗大肠埃希菌具有多靶点、多成分、多通路的特点,其可能通过牛磺胆酸、苍术素、吴茱萸新碱等主要活性成分作用于 Bcl-2、EGFR 关键靶标,影响细胞对激素、有机环化合物和脂质的反应,以及膜筏、微域膜等细胞膜特定区。它还影响内肽酶和肽酶活性,调控蛋白质处理和信号传导如焦点黏附、白细胞跨内皮迁移、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、Rap1 信号通路、细胞间隙连接、中性粒细胞胞外诱捕网等,干预细胞黏附、迁移和激活自然免疫反发挥其抗菌作用。为进一步证实草乌具有明确的抗大肠埃希菌效果,本团队将从网络药理学和

分子对接筛选出来的核心成分用于下一步的体外抑菌实验进行验证。通过此类多维度科学分析,从系统层面揭示蒙药草乌抗大肠埃希菌多靶点、多途径的分子作用机制,进而为后续研究草乌提供科学依据、提供思路与基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李梦涵,汪庆,杨光,等. 食品和临床环境中大肠埃希菌耐药现状及健康风险研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(7): 754-765.
- [2] Pakbin B, Brück W M, Rossen J W A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9922.
- [3] Riley L W. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Spectr*, 2020, 8(4): 10.1128.
- [4] Piracha Z Z, Saeed U, Ahmed R A, et al. Global emergence of Langya virus: A serious public health concern [J]. *J Glob Health*, 2023, 13: 03034.
- [5] 张贵鑫,宋凤瑞,朱禹奇,等. 蒙药草乌炮制减毒及质量标准的研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2418-2425.
- [6] 高雅,郭文勇,廖翠平,等. 草乌的研究进展及质量标志物预测 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(1): 139-147.
- [7] 乌仁图雅,刘倩楠,房月,等. 基于裂殖酵母的蒙医药抗真菌作用研究 [J]. 北方药学, 2022, 19(11): 194-196.
- [8] 琪格其图. 蒙医学中的粘证及其辨证论治法 [J]. 中国医药学报, 1990(1): 51-52.
- [9] 杨德志,胡日查,特木其乐. 蒙药巴特日-7 作用机制的研究现状与展望 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2022, 53(4): 439-447.
- [10] 昂格力玛,苓苓,吴圆圆,等. 祛粘疫蒙药嘎日迪五味丸临床应用轨迹及研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(6): 20-24.
- [11] 乌兰其其格,那生桑. 草乌炮制品的药理毒理及药效学实验研究 [J]. 内蒙古医学院学报, 2009, 31(5): 482-486.
- [12] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [13] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [14] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [15] UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023,

- 51(D1): D523-D531.
- [16] Rappaport N, Fishilevich S, Nudel R, *et al.* Rational confederation of genes and diseases: NGS interpretation via GeneCards, MalaCards, and VarElect [J]. *Biomed Eng Online*, 2017, 16(1): 72.
- [17] Zhou Y, Zhang Y T, Zhao D H, *et al.* TTD: Therapeutic target database describing target druggability information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1465-D1477.
- [18] Amberger J S, Hamosh A. Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1.2.1-1.2.12.
- [19] Jia A Q, Xu L, Wang Y. Venn diagrams in bioinformatics [J]. *Brief bioinformatics*, 2021, 22(5): bbab108.
- [20] Luna A, Shah O, Sander C S P. cyjShiny: A cytoscape.js R Shiny Widget for network visualization and analysis [J]. *PloS One*, 2023, 18(8): e0285339.
- [21] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al.* The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [22] Gaudet P, Logie C, Lovering R C, *et al.* Gene ontology representation for transcription factor functions [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2021, 1864(11-12): 194752.
- [23] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, *et al.* KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D587-D592.
- [24] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [25] Sahu D, Rathor L S, Dwivedi S D, *et al.* A review on molecular docking as an interpretative tool for molecular targets in disease management [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2024, 22(1): 40-50.
- [26] Flachsenberg F, Ehrt C, Gutermuth T, *et al.* Redocking the PDB [J]. *J Chem Inf Model*, 2024, 64(1): 219-237.
- [27] Goodsell D S, Sanner M F, Olson A J, *et al.* The AutoDock suite at 30 [J]. *Protein Sci*, 2021, 30(1): 31-43.
- [28] 孙向明, 宋辉, 胡扬, 等. 吴茱萸中两种肝毒性成分吴茱萸新碱和二氢吴茱萸新碱的药代动力学研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(6): 1905-1912.
- [29] Fishbein S R S, Bejan M, Gautam D. Antibiotic perturbations to the gut microbiome [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(12): 772-788.
- [30] 曹雨虹, 顾健, 谭睿, 等. 钻叶龙胆挥发油化学成分 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 91-93.
- [31] 王倩, 李冰冰, 黄文静, 等. 基于 2 种色谱-质谱联用技术的参芪降糖颗粒化学成分分析 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1568-1581.
- [32] 林诗铃, 林逸凡, 陈涛, 等. 基于 UPLC-MS 对牛黄解毒片中胆酸类成分定量测定及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2750-2757.
- [33] 刘思佳, 姚杰, 宋雪, 等. 苍术属药用植物的化学成分、药理作用、临床应用概况 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 151-154.
- [34] Joon A, Chandel S, Ghosh S. Enteroaggregative *Escherichia coli* induced activation of epidermal growth factor receptor contributes to IL-8 secretion by cultured human intestinal epithelial cells [J]. *Microbes Infect*, 2023, 25(7): 105166.
- [35] Riley L W. Distinguishing Pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Spectr*, 2020, 8(4): 10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020.
- [36] Sabbah D A, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10): 815-834.
- [37] Schwartz D J, Langdon A E, Dantas G. Correction to: Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 82.
- [38] 袁传裕, 胡俊杰, 李娟, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的疏肝和胃汤化学成分、HPLC 指纹图谱、化学模式识别及含量测定研究 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2183-2196.
- [39] 陈静梅, 李泽宇, 梁秋明, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和网络药理学的加味四逆散(颗粒)质量标志物分析及含量测定 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6682-6693.
- [40] Lee J B, Kim S K, Yoon J W. Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection [J]. *J Vet Sci*, 2022, 23(2): e28.
- [41] Macfarlane J G, Dorward D A, Marie-Hélène R S, *et al.* Src kinase inhibition with dasatinib impairs neutrophil function and clearance of *Escherichia coli* infection in a murine model of acute lung injury [J]. *J Inflamm*, 2020, 17(1): 34.
- [42] Xia X C, Chen Y, Xu J M, *et al.* SRC-3 deficiency protects the host from *Listeria monocytogenes* infection through increasing ROS production and decreasing lymphocyte apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107625.
- [43] Joon A, Chandel S, Ghosh S. Enteroaggregative *Escherichia coli* induced activation of epidermal growth factor receptor contributes to IL-8 secretion by cultured human intestinal epithelial cells [J]. *Microbes Infect*, 2023,

- 25(7): 105166.
- [44] Rodríguez S P, Herrera A L, Parra J E. Gene expression of pro-inflammatory (IL-8, IL-18, TNF- α , and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the duodenum of broiler chickens exposed to lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. *Vet World*, 2023, 16(3): 564-570.
- [45] Sabbah D A, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10): 815-834.
- [46] Rao T C, Ma P Y, Blanchard A, *et al.* EGFR activation attenuates the mechanical threshold for integrin tension and focal adhesion formation [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(13): jcs238840.
- [47] Kaloni D, Diepstraten S T, Strasser A, *et al.* BCL-2 protein family: Attractive targets for cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1-2): 20-38.
- [48] Mishra Y G, Manavathi B. Focal adhesion dynamics in cellular function and disease [J]. *Cell Signal*, 2021, 85(5): 110046.
- [49] Hilbi H, Kortholt A. Role of the small GTPase Rap1 in signal transduction, cell dynamics, and bacterial infection [J]. *Small GTPases*, 2019, 10(5): 336-342.
- [50] 刘瑞卿, 许宏敏, 赵岩, 等. 程序性细胞死亡与感染性疾病的研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2023, 23(11): 1213-1221.
- [51] Flores-Romero H, García-Sánchez A J. The incomplete puzzle of the Bcl-2 proteins [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1176.
- [52] Yao R Q, Ren C, Xia Z F, *et al.* Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: A potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles [J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 385-401.
- [53] Mérimón D, Bouillet P. The Bcl-2 family in autoimmune and degenerative disorders [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 570-583.

[责任编辑 高源]