小儿消积止咳口服液抗肠炎靶点与作用机制研究

罗倩微[1]，姚　璐[1]，杨　倬[1]，姚景春[2]，孙成宏[2]，张贵民[2*]，曾克武[1*]

1. 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室，北京　100191
2. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室，山东 临沂　276006

摘　要：目的　探索小儿消积止咳口服液改善肠道炎症作用的直接靶点，从炎症靶点生物学功能的角度，阐释小儿消积止咳口服液保护肠道并发挥消积功效的作用机制。**方法**　基于靶点“钩钓”策略从脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的小鼠肠道组织中捕获并通过高分辨质谱鉴定小儿消积止咳口服液提取物的直接作用靶点蛋白，基于京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）分析靶点蛋白相关信号通路。通过 qRT-PCR、免疫组化等方法进行靶点蛋白的功能验证。**结果**　累计从肠道组织鉴定到 1333 个结合蛋白，并通过 KEGG 分析发现靶点蛋白群主要与肠道动力学、肠道免疫、黏膜屏障等功能有关。进而利用免疫组化、qRT-PCR 等方法确证了小儿消积止咳口服液具有上述保护肠道功能的潜在作用。**结论**　小儿消积止咳口服液具有改善小鼠肠道组织炎症损伤的作用，其作用机制可能与增强肠道动力、改善肠道免疫微环境以及维持肠道黏膜完整性有关。

关键词：小儿消积止咳口服液；肠炎；靶点鉴定；肠道动力；免疫微环境

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2022)08 - 2368 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.013

Anti-enteritis targets and mechanism of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid

LUO Qian-wei[1], YAO Lu[1], YANG Zhuo[1], YAO Jing-chun[2], SUN Cheng-hong[2], ZHANG Gui-min[2], ZENG Ke-wu[1]

1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China
2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: Objective　To explore the direct targets of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid (小儿消积止咳口服液, XXZL) in improving intestinal inflammation, and explain the mechanism of XXZL on protecting the intestinal tract and exerting the effect of eliminating accumulation through the biological function of inflammatory targets. **Methods**　The target proteins from intestinal tissues of lipopolysaccharide (LPS)-induced mice were captured by “target fishing” strategy, and identified by high resolution mass spectrometry, followed by signaling pathway analysis based on Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). The functions of target proteins were verified by qRT-PCR and immunohistochemistry assays. **Results**　A total of 1333 binding proteins were identified, and these target proteins were mainly related to intestinal dynamics, intestinal immunity and mucosal barrier. Moreover, the immunohistochemistry and qRT-PCR assays confirmed the potential effects of XXZL on intestinal protection. **Conclusion**　XXZL can ameliorate LPS-induced intestinal tissue inflammation in mice, via enhancing intestinal motility, improving intestinal immune microenvironment and maintaining the integrity of intestinal mucosa.

Key words: Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid; enteritis; target identification; intestinal dynamics; immune microenvironment

肠炎是一种常发生于大肠和小肠的消化系统疾病，通常由细菌、病毒等微生物感染所致[1]，也可以由寄生虫感染、摄入化学毒物或药物引起。肠炎一般表现为食欲下降、恶心呕吐、腹部绞痛等，会导

收稿日期：2021-12-17

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81973505）；国家重点研发计划基金资助项目（2019YFC170892，2019YFC1711000）

作者简介：罗倩微（1999—），女，硕士，研究方向为药理学。Tel: 18811089606　E-mail: luoqianwei423@163.com

***通信作者：**曾克武，研究员，研究方向为天然产物与中药化学生物学。Tel: (010)82801404　E-mail: ZKW@bjmu.edu.cn

张贵民，研究员，从事药物研发工作。E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

致营养吸收障碍、消化不良、排便异常等，严重者可能会发生肠道出血、肠穿孔甚至癌变，影响到患者的正常生活[2]。小儿消积止咳口服液临床上主要用于治疗小儿积食咳嗽[3-4]，组方中含山楂、枇杷叶、枳实、连翘、桔梗等多种苦寒中药，改善积食和通便的效果良好。方中枇杷叶具有清肺止咳、降逆止呕的功效，现代研究表明其有抗炎祛痰、抗氧化、止呕等药理活性[5]。枳实、莱菔子能用于泻痢后重、大便不通等证，研究表明枳实有促进肠胃蠕动，保护胃肠屏障，抑制炎症加重的作用[6]。连翘、桔梗有良好的抗炎与抗菌活性[7-8]，因此小儿消积止咳口服液常与抗生素联用于微生物感染诱发的儿童胃肠道炎性疾病治疗[9]。但是小儿消积止咳口服液抗肠炎的作用机制尚不清楚。本研究通过建立脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的小鼠肠道炎症模型，并结合中药成分靶点“钩钓”策略，对小儿消积止咳口服液调节肠道功能及潜在靶点蛋白进行了系统研究，进而基于靶点的生物学功能探讨了小儿消积止咳口服液改善肠道功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 32 只，8 周龄，体质量 20～22 g，购自北京大学医学部实验动物中心，许可证号 SYXK（京）2016-0041。小鼠于动物房（保持 12 h 光照、12 h 黑暗循环，恒温 25 ℃）适应性饲养 7 d，自由进食饮水。动物实验经北京大学生物医学伦理会批准（批准号 LA2020475）。

1.2 药品与试剂

小儿消积止咳口服液（批号 30120086）主要由山楂、槟榔、枳实、枇杷叶、瓜蒌、莱菔子、桔梗、连翘、蝉蜕和葶苈子 10 味中药组成，由山东新时代药业有限公司提供；PBS 溶液（批号 0622010102）购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；$FeCl_3$（批号 M4RHQE6H）购自德国 CNW Technologies 公司；1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯（批号 RAR3RNH6）、4,4′-二羟基二苯甲酮（批号 RQ8RRQ9K）、无水醋酸钠（批号 DHR3RHA9）购自上海萨恩化学技术有限公司；2,3-二巯基丁二酸（批号 KYFAE90）购自北京伊诺凯科技公司；柠檬酸钠（批号 BCCC9049）购自美国 Sigma 公司；蛋白酶抑制剂（批号 O10910）、BCA 试剂盒（批号 P20608）购自北京全式金生物技术有限公司；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）抗体（批号 GR3214221-15）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）抗体（批号 GR3367614-12）、C-kit 抗体（批号 EPR22566-344）、紧密连接蛋白 1（Claudin 1）抗体（批号 GR250319-2）、闭合蛋白（Occludin）抗体（批号 GR258677-3）购自英国 Abcam 公司；热休克蛋白 60（heat shock protein 60，Hsp60）抗体（批号 3）购自美国 CST 公司；HRP 标记的山羊抗兔 lgG 二抗（批号 AB65151）购自南京巴傲得生物科技有限公司；免疫组化染色试剂盒（批号 D601037-0020）购自上海生工生物工程有限公司；RNA 提取试剂盒（批号 M0114091）、cDNA 反转录试剂盒（批号 H4104750）、qPCR Mixture（批号 H6103020）购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.3 仪器

FDU-1100 型冷冻干燥机（日本 EYALA 公司）；FastPrep-245G 型组织匀浆机（美国 MP Biomedicals 公司）；5424R 型台式冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；800TS 型多功能酶标仪（美国 BioTek 公司）；Orbitrap Velos Pro 二维纳升高效液相色谱仪串联线性离子阱质谱（nano-HPLC-LTQ-Orbitrap/MS，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；101-1BS 型烤箱（邦西仪器科技公司）；SK-R1807-E 型摇床（美国 Scilogex 公司）；Nikon Ci-S 型倒置显微镜、Nikon DS-U3 型成像系统（日本尼康公司）；Mx3005P 型 qRT-PCR 仪（安捷伦科技有限公司）。

2 方法

2.1 药物的配制

小儿消积止咳口服液冻干，得到小儿消积止咳口服液总提取物，于 4 ℃的干燥环境下保存备用。称取 1 g 小儿消积止咳口服液总提取物，加入 50 mL 纯净水溶解，配成 20 mg/mL 的母液；取 10 mL 母液，用 30 mL 纯净水稀释成 5 mg/mL 药液备用。

2.2 LPS 的配制

精密称取 2 mg 的 LPS 粉末，溶解于 10 mL 纯净水配制成 0.2 mg/mL 的 LPS 溶液，用 0.22 μm 滤膜滤过备用。

2.3 小儿消积止咳口服液提取物微球芯片的制备

将 $FeCl_3$ 溶于乙二醇，同时加入乙酸钠和柠檬酸钠，溶解后 200 ℃反应 9 h，合成空白磁性微球。通过与二巯基丁二酸于 50 ℃恒温孵育，使其表面修饰巯基后，加入 *L*-赖氨酸三异氰酸酯将已修饰巯基的磁性微球与二苯甲酮连接，即完成表面化学物的修饰。取磁性微球 5 mg 分散于 20 mL 甲醇溶液，

准确称量 5 mg 小儿消积止咳口服液提取物溶解于上述体系，将反应体系置于反应器中，通氮气 30 min，紫外照射 1 h 后，用 PBS 溶液清洗得到键合小儿消积止咳口服液提取物的磁性微球，备用[10]。

2.4　造模、分组及给药

32 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组和小儿消积止咳口服液提取物低、高剂量（50、200 mg/kg）组，每组 8 只。各给药组 ig 200 μL 相应药物，对照组 ig 200 μL 生理盐水，1 次/d，连续 5 d；除对照组外，其余各组小鼠在末次给药时 ip 200 μL LPS，建立小鼠肠炎模型，对照组 ip 200 μL 生理盐水，饲养 12 h。按表 1 对各组小鼠的状态进行评分后，小鼠麻醉处死，解剖并完整取出肠组织，用生理盐水清洗后置于冰上留用。

表 1　小鼠状态评分量表

Table 1　State rating scale of mice

体表表征	分值	表现
眼鼻	0	眼鼻正常、干净
	1	上睑下垂，无分泌物
	2	上睑下垂，有分泌物
被毛	0	光滑
	1	竖毛
	2	脱毛
粪便	0	粪便颗粒正常
	1	粪便变黑
	2	腹泻
肛门	0	正常
	1	肛门外翻
	2	排便困难
精神状态	0	活泼
	1	精神萎靡，反应迟钝
	2	双目无神、嗜睡
行为情况	0	行为敏捷
	1	活动减少，行为呆滞
	2	易蜷缩扎堆

2.5　基于微球芯片的靶点蛋白捕获

各组小鼠肠组织加入裂解液，将肠组织蛋白裂解液分为 9 份，设置空白组、结合组和竞争组，每组 3 个重复。空白组加入未键合药物成分的空白磁性微球；结合组加入键合小儿消积止咳口服液提取物的磁性微球；竞争组先将组织裂解液与 10 mg/mL 小儿消积止咳口服液提取物于 4 ℃孵育 1 h，再加入键合小儿消积止咳口服液提取液的磁性微球，4 ℃孵育 8 h，用 0.5%十二烷基硫酸钠溶液洗脱杂蛋白，进行后续实验。

2.6　靶点蛋白的高分辨质谱鉴定

利用 nano-HPLC-LTQ-Orbitrap/MS 鉴定捕获的蛋白。将各组磁性微球捕获的蛋白用胰酶消化后，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过并进样分析。色谱条件：流动相为 0.1%甲酸水溶液（A）-0.1%乙腈水溶液（B）；洗脱条件为：0～70 min，2%～40% B；70～75 min，40%～95% B。串联质谱采用线性离子肼静电场轨道肼质谱仪（LTQ-Orbitrap Velos Pro），一级质谱采用 Orbitrap 检测，分辨率 *m*/*z* 400 处为 60 000；采集质量范围为 350～2000 *m*/*z*，依次选取一级质谱中离子强度最强的 15 个离子进行 CID 二级串联质谱分析。

2.7　基于京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）的靶点蛋白生物学功能研究

基于质谱检测结果，筛选出（结合组质谱强度－空白组质谱强度）与（竞争组质谱强度－空白组质谱强度）比值大于 2 的蛋白。将筛选得到的差异蛋白输入 Cytoscape 软件，应用其中的 ClueGO 进行 KEGG 分析，种属设置为小鼠，阈值为 $P<0.05$，其余均采用默认参数。

2.8　免疫组化及苏木素-伊红（HE）染色分析

各组小鼠肠组织置于 4%多聚甲醛中固定并制成蜡块备用。按照试剂盒说明书分别制备 TNF-α、IL-6、Occludin、Claudin-1、C-kit、HSP60 的免疫组化切片和 HE 染色切片，采用 Nikon DS-U3 型成像系统扫描成像，并用 NDP.view 2 软件进行分析。

2.9　统计学分析

实验数据采用 SPSS 21.0 中的 ANOVA 进行单因素方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3　结果

3.1　小儿消积止咳口服液缓解 LPS 诱导的小鼠肠炎病理状态

如表 2 所示，LPS 诱导后的小鼠状态明显变差，存在竖毛、蜷缩、排便困难等病理特征；各给药组小鼠毛发光滑，整体更活泼，解剖发现各给药组小鼠肠组织水肿症状也有改善（图 1-A）。HE 染色结果（图 1-B）显示，LPS 诱导后的小鼠肠道结构被

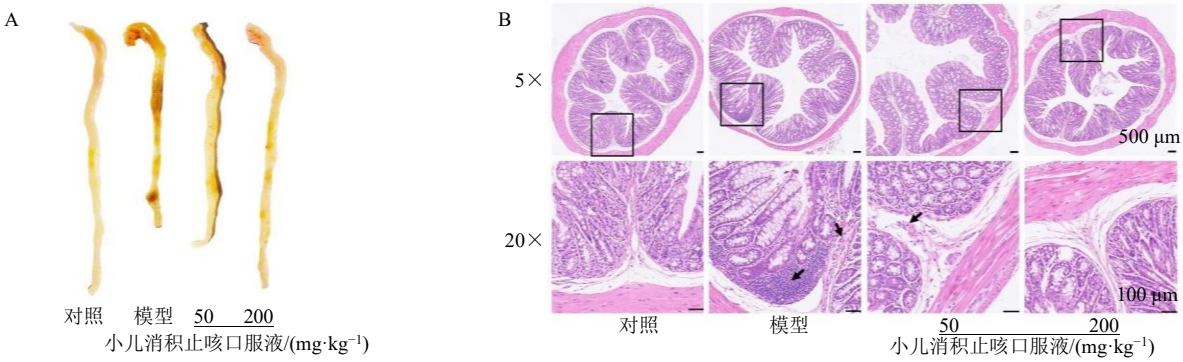
表 2　各组小鼠状态评分（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Table 2　State score of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	评分
对照	8	0.4±0.2
模型	8	6.0±0.8$^{\#\#\#}$
小儿消积止咳口服液	50	4.6±0.7
	200	3.0±0.7*

与对照组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$

$^{\#\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ *vs* model group



A-各组小鼠肠组织外观 B-各组小鼠肠组织 HE 染色

A-appearance of intestinal tissue of mice in each group B-HE staining of intestinal tissue of mice in each group

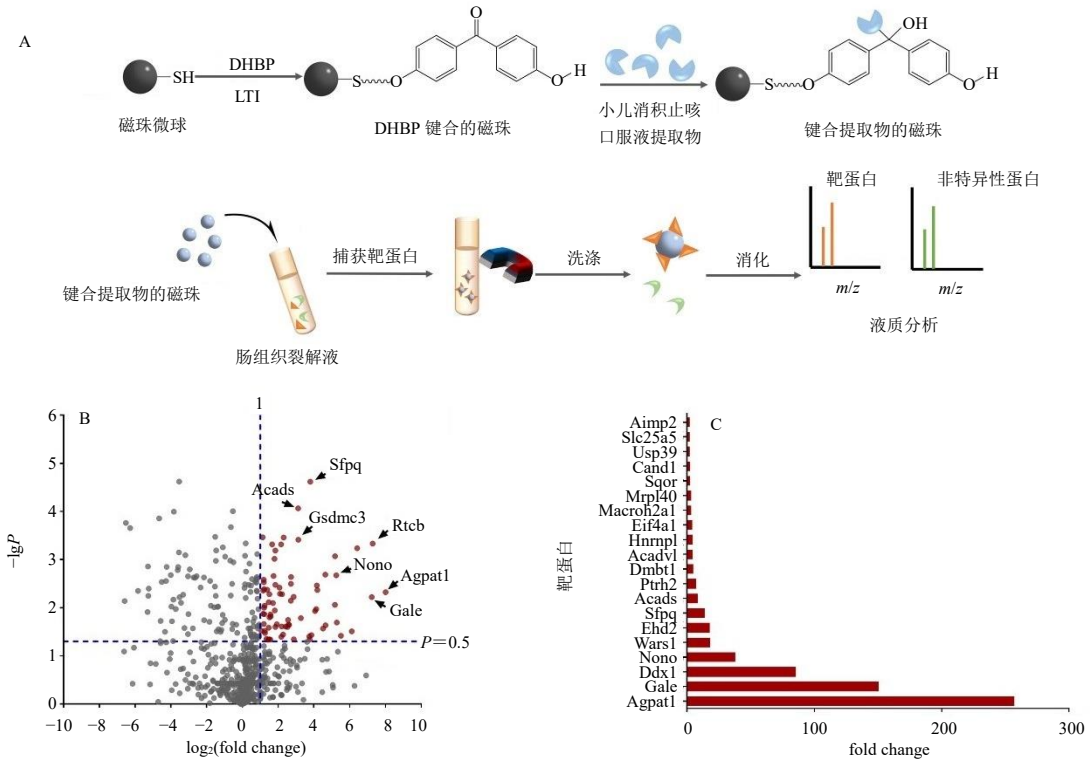
图 1 小儿消积止咳口服液缓解 LPS 诱导的小鼠肠炎病理状态

Fig. 1 Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid relieved pathological state of LPS induced enteritis in mice

破坏，肠黏膜及黏膜下层有明显的炎症细胞浸润；各给药组小鼠肠道炎症细胞浸润明显减少，尤其高剂量组的肠道完整性和炎症程度与对照组相近。

3.2 小儿消积止咳口服液提取物的肠道组织靶点鉴定

基于键合小儿消积止咳口服液的磁性微球从 LPS 诱导的小鼠肠道组织捕获靶点，通过高分辨质谱对靶点蛋白进行鉴定（图 2-A），累计发现了 1333 个潜在结合蛋白（图 2-B）。按照（结合组质谱强度－空白组质谱强度）与（竞争组质谱强度－空白组质谱强度）的比值大于 2，（结合组质谱强度－空白组质谱强度）与（竞争组质谱强度－空白组质谱强度）进行组内 t 检验，设置 $P \leqslant 0.05$ 的条件，筛选得到 20 个与小儿消积止咳口服液药理作用直接相关的靶点蛋白（图 2-C）。基于 KEGG 分析结果，对这 20 个靶点蛋白功能进行说明。



A-靶点“钩钓”流程示意图 B-靶蛋白火山图 C-特异性磁珠结合蛋白

A-flow chart of “target fishing” strategy B-target proteins volcano plot C-proteins specially binding to magnetic nano particles

图 2 小儿消积止咳口服液肠道作用靶点“钩钓”及质谱鉴定

Fig. 2 “Target fishing” and mass spectrometry identification of intestinal target proteins of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid

在所发现的潜在靶点类群中，首先重点关注了 5 个与肠道动力学有关的靶点蛋白，分别是 EH 结构域蛋白 2（EH domain-containing protein 2，Ehd2）、超长链特异性酰基辅酶 A 脱氢酶（very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase，Acadvl）、核心组蛋白 macro-H2A.1（core histone macro-H2A.1，Macroh2a1）、39S 核糖体蛋白 L40（39S ribosomal protein L40，Mrpl40）和肽基-tRNA 水解酶 2（peptidyl-tRNA hydrolase 2，Ptrh2）。研究表明，Ehd2 能够促进细胞内三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）的交换，维持肠道肌群的正常蠕动[11]。Acadvl 缺乏会导致线粒体呼吸链功能降低，活性氧水平升高，肠道供能不足。Macroh2al 缺失会使线粒体转录因子 A（mitochondrial transcription factor A，TFAM）表达显著降低[12]。Mrpl40 的缺乏则会导致线粒体钙失调，从而影响线粒体功能及 ATP 的合成[13]。Ptrh2 的突变可能导致肌肉无力。因此推测小儿消积止咳口服液提取物可能通过靶向调控多个肠道动力学相关蛋白，增强肠道细胞中的线粒体功能，进而为肠道组织细胞提供能量，发挥促进肠道蠕动的作用。

此外，还注意到 6 个与肠道炎症和免疫功能有关的靶点蛋白，分别是 ATP 依赖性 RNA 解旋酶 DDX1（ATP-dependent RNA helicase DDX1，Ddx1）、色氨酸-tRNA 合成酶 1（tryptophan-tRNA ligase，Wars1）、恶性脑肿瘤缺失蛋白 1（deleted in malignant brain tumors 1 protein，Dmbt1）、异源核糖核蛋白 L（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L，Hnrnpl）、富含脯氨酸和谷氨酰胺的剪接因子（splicing factor, proline- and glutamine-rich，Sfpq）和无 POU 域八聚体结合蛋白（non-POU domain-containing octamer-binding protein，Nono）。Ddxl 是含 TIR 结构域的接头分子 1（TIR-domain-containing molecule 1，TICAM1）复合物的组成部分，研究发现该酶活化导致细胞因子的释放和免疫细胞的活化，从而增加结肠炎的患病几率[14]。Wars1 可以显著激活髓系细胞触发受体-1，从而诱导炎症反应[15]。研究表明，Dmbt1 在炎症性肠道疾病中含量很高，表明其与肠道炎症有着密切关系[16]。Hnrnpl 可与 linc1992 特异性结合，并形成功能性的 linc1992-hnRNPL 复合物，增加 TNF-α 的转录并促进炎症发生[17]。Sfpq 可以抑制机体的氧化应激，减少炎症因子的生成。Nono 可以被募集到 IL-6 启动子区域的 PRDM1 结合位点，从而对 IL-6 的表达起到抑制作用[18]。因此，小儿消积止咳口服液可能通过调控多种与炎症和免疫相关的靶点蛋白，调控肠道炎症与免疫功能。

另外，5 个与代谢功能相关的靶点蛋白也值得关注：尿苷磷酸化酶（uridinephosphorylase，UDP）-葡萄糖-4-差向异构酶（UDP-glucose 4-epimerase，GalE）、醌氧化还原酶（quinone oxidoreductase，mitochondrial，SQOR）、Cand 蛋白 1（Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1，Cand1）、1-酰基-*sn*-甘油-3-磷酸酰基转移酶 α（1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha，Agpat1）和短链特异性酰基辅酶 A 脱氢酶（short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase，Acads）。其中，GalE 能够催化 UDP-葡萄糖向 UDP-半乳糖以及 UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖向 UDP-*N*-乙酰半乳糖胺的转化，有助于膳食中半乳糖的分解代谢。SQOR 也可以作用于肠 Cajal 间质细胞，产生传导电兴奋，进而激活肠道运动。有研究报道，CAND1 可以通过调控去泛素化机制进而抑制脂肪形成，而脂肪对于调控肠道炎症水平至关重要[19]。Agpat1 既可以促进肠道对脂质的代谢，同时也能调节血浆葡萄糖水平[20]。Acads 可以降低实验动物对油脂食物的偏好，进而降低油脂食物的摄入，减轻肠胃负担[21]。因此推测，小儿消积止咳口服液提取物可能通过靶向这些蛋白，维持了肠道细胞的正常代谢。

最后，还发现了 4 个与肠道细胞凋亡相关的靶点蛋白，分别是真核起始因子 4A-I（Eukaryotic initiation factor 4A-I，Eif4a1）、U4/U6.U5 tri-snRNP 相关蛋白 2（U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2，Usp39）、二磷酸腺苷（adenosine diphosphate，ADP）/ATP 转运酶 2（ADP/ATP translocase 2，Slc25a5）和氨酰 tRNA 合成酶复合作用多功能蛋白 2（aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2，Aimp2）。其中，Eif4a1 可以调节肠壁细胞的新陈代谢，对于肠道的自体修复具有潜在意义。而 Usp39 作为一种去泛素化酶，可以提高细胞周期检测点激酶 2（cell cycle checkpoint kinase 2，CHK2）的稳定性，进而抑制细胞凋亡。有研究表明，Slc25a5 通过磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路促进细胞的生长，并抑制细胞凋亡[22]。Aimp2 可以调节 Wnt/β-catenin 信号传导，维持肠道干细胞的稳定增殖，进而加快

肠道细胞生长[23]。由此推测小儿消积止咳口服液提取物可能通过靶向多个与肠道上皮细胞凋亡相关的靶点，抑制肠道上皮细胞凋亡。

综上可以推测，小儿消积止咳口服液提取物可能通过靶向多种不同功能的靶点蛋白群，包括促进肠道蠕动、调控肠道炎症与免疫功能、维持肠道细胞的正常代谢以及抑制肠道上皮细胞凋亡，最终发挥改善肠道病理状态的作用。

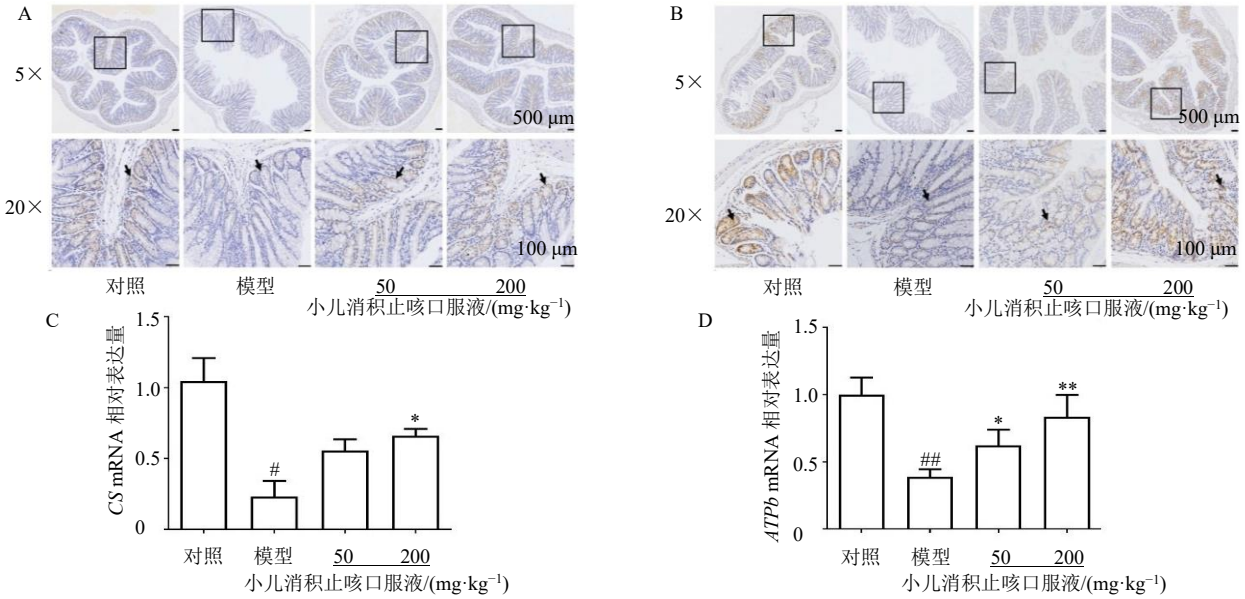
3.3 小儿消积止咳口服液促进肠道动力学标志蛋白表达

Cajal 间质细胞在维持胃肠动力中发挥重要作用，而 C-kit 是一种酪氨酸蛋白激酶受体，在 Cajal 间质细胞中广泛表达[24]。免疫组化结果显示，模型组肠组织 C-kit 表达与对照组相比明显降低；与模型组相比，各给药组肠组织 C-kit 表达有明显增加（图 3-A）。鉴于肠道动力和肠道细胞的线粒体能量代谢关系密切，而 HSP60 可作为评价细胞线粒体功能状态的标志物[25]。免疫组化结果显示，模型组与对照组相比 HSP60 表达明显减少，各给药组与模型组相比 HSP60 表达增加（图 3-B），提示小儿消积止咳口服液能够保护线粒体及其功能。此外，柠檬酸合酶（citrate synthase，CS）和 ATP 合酶 b（ATP synthase b subunit，ATPb）是线粒体合成中的 2 种关键酶，利用 qRT-PCR 检测其 mRNA 表达量发现，模型组肠组织 *CS* 和 *ATPb* mRNA 表达量明显减少（$P<0.05$、0.01），给药组后上述 2 个指标 mRNA 表达量显著回升（$P<0.05$、0.01，图 3-C、D）。表明小儿消积止咳口服液能够有效促进 Cajal 间质细胞的增殖，同时促进肠道细胞线粒体中 ATP 的合成并加强能量代谢，进而维持小肠正常运动功能。

3.4 小儿消积止咳口服液改善肠道炎症微环境及黏膜屏障

炎症因子的过度表达是肠道炎症损伤的关键病理指标。如图 4-A、B 所示，TNF-α 和 IL-6 在正常肠道组织中几乎没有表达，而在模型组中两者水平有明显升高；与模型组相比，给予小儿消积止咳口服液后的肠道组织中 TNF-α 和 IL-6 表达明显减少，说明小儿消积止咳口服液具有显著抑制肠道炎症的作用。

炎症因子的异常表达常会导致肠道黏膜的破坏和肠壁的损伤，而 Claudin-1 和 Occludin 是评价肠道细胞致密性的重要指标。如图 4-C、D 所示，对照组肠道组织中 Claudin-1 和 Occludin 均有表达，且对照组细胞完整，细胞致密性好；与对照组相比，



A～D-各组小鼠肠组织 C-kit (A) 和 HSP60 (B) 蛋白表达和 *CS* (C) 和 *ATPb* (D) mRNA 表达　与对照组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$

A—D-C-kit (A), HSP60 (B) protein expressions and *CS* (C), *ATPb* (D) mRNA expressions in intestinal tissue of mice in each group　$^{\#}P < 0.05$　$^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* model group

图 3　小儿消积止咳口服液促进小鼠肠道组织能量代谢和小肠间质细胞相关蛋白表达

Fig. 3　Promoting effects of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid on energy metabolism of intestinal tissue and related protein expressions of intestinal cells in mice

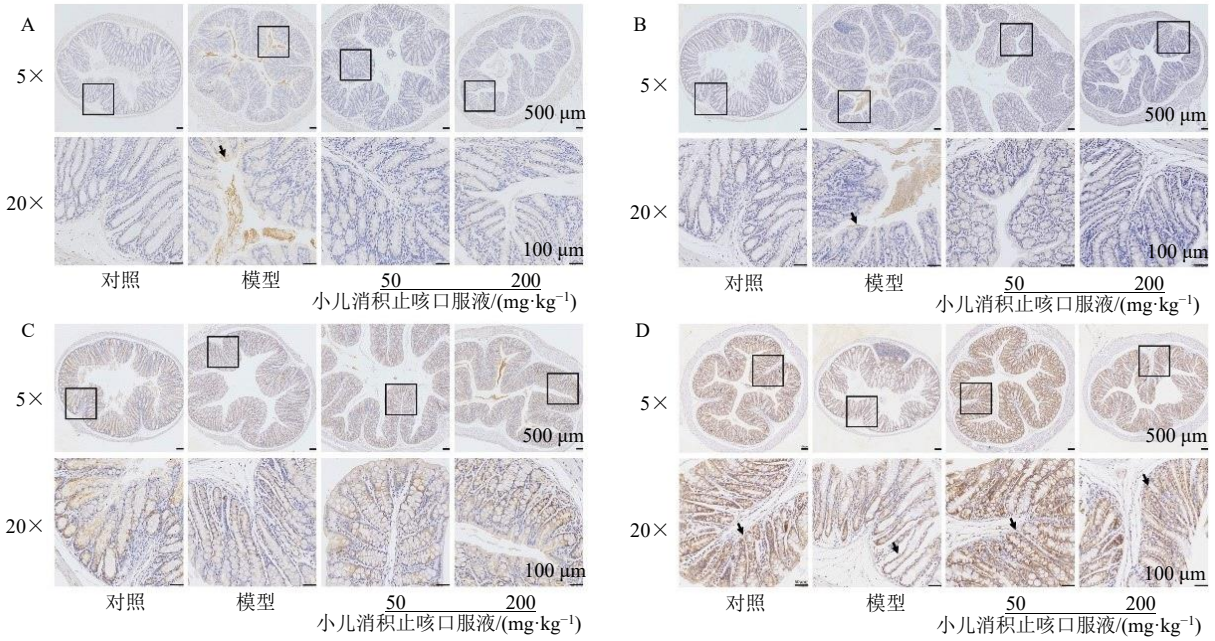


图 4　小儿消积止咳口服液增加小鼠肠道炎症组织 TNF-α (A)、IL-6 (B)、Occludin (C) 和 Claudin-1 (D) 蛋白表达

Fig. 4　Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid increased TNF-α (A), IL-6 (B), Occludin (C) and Claudin-1 (D) protein expressions in intestinal inflammatory tissues of mice

模型组 Claudin-1 和 Occludin 表达明显减少，细胞间隙增大；而给予小儿消积止咳口服液后的肠道组织损伤有所减轻，Claudin-1 和 Occludin 的表达也明显增加。推测小儿消积止咳口服液可以有效抑制肠道炎症反应，进而保护肠道内皮细胞，维持肠组织黏膜的致密性与完整性。

4　讨论

Cajal 间质细胞是一种胃肠起搏细胞，遍布整个肠道，主要参与胃肠基本电节律调控和神经递质信号传导，与胃肠运动关系密切[26]。C-kit 是其特异性标志物，几乎所有的 Cajal 间质细胞都会表达 C-kit，因此可以通过标记 C-kit 来识别小肠间质细胞[27]。本研究发现，小儿消积止咳口服液可以显著增加小鼠肠道中 C-kit 的表达，表明小儿消积止咳口服液可能通过促进 Cajal 间质细胞增殖，增强小鼠肠道动力，提高小鼠肠道的传输功能。HSP60 是在线粒体中稳定表达的一种蛋白，HSP60 缺失可能导致细胞线粒体碎片化，因此通过检测 HSP60 的表达可以判断肠组织中能量合成情况。ATP 可以为肠道活动提供充足的能量，CS 和 ATPb 参与 ATP 的生成，是影响肠道动力的重要能量代谢相关的酶，因此提高二者的表达，对于增强肠道动力具有重要意义。研究发现小儿消积止咳口服液能够提高小鼠肠组织中 HSP60 的表达以及 CS 和 ATPb 的活性，提示小儿消积止咳口服液可能通过保护线粒体完整，进而增强了小鼠肠道组织的能量代谢。此外，肠黏膜对稳定肠道内环境有重要作用，肠道上皮细胞紧密连接对维持肠黏膜屏障具有重要意义。而小儿消积止咳口服液能够通过提高 Claudin-1 和 Occludin 的表达，从而发挥维持肠组织黏膜的致密性和完整性的作用。

综上所述，小儿消积止咳口服液能够有效改善 LPS 诱导的小鼠肠炎，其作用机制可能与增强肠道动力、改善肠道免疫微环境以及维持肠道黏膜完整性有关。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 翟艳芳. 血清 PCT 联合 CRP 鉴别诊断小儿细菌性肠炎与病毒性肠炎的临床价值分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(18): 2970-2972.

[2] 马文校, 刘亿托, 罗艳贞, 等. 理中汤加味治疗慢性肠炎脾胃虚弱证临床观察 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2021, 31(15): 67-68.

[3] 葛俊德, 李晓骄阳, 刘闰平, 等. 基于“肺与大肠相表里”的小儿消积止咳口服液功效网络分析与作用机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3978-3986.

[4] 王　卉, 魏小维, 胡思源, 等. 小儿消积止咳口服液治疗痰热咳嗽兼食积证的多中心临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 376-380.

[5] 肖旭坤, 王翰华, 阮洪生. 枇杷叶化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(21): 60-66.

[6] 张晓娟, 赵良友, 李建华, 等. 中药枳实的研究概况 [J]. 中医药学报, 2021, 49(1): 94-100.

[7] 杨欣, 王乐. 桔梗提取物对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(1): 22-27.

[8] 张学人. 中药提取物连翘酯苷 A 对内毒素血症小鼠的免疫调节作用及相关机制研究 [J]. 中医药导报, 2016, 22(21): 57-60.

[9] 裴哲. 小儿消积止咳口服液联合注射用炎琥宁治疗儿童支原体肺炎的临床效果 [J]. 河南医学研究, 2018, 27(23): 4351-4352.

[10] 郭强, 姚璐, 刘忠, 等. 基于靶点“钩钓”策略的首荟通便胶囊肠道直接作用靶点鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 505-510.

[11] Hoernke M, Mohan J, Larsson E, *et al*. EHD2 restrains dynamics of caveolae by an ATP-dependent, membrane-bound, open conformation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(22): E4360-E4369.

[12] Giallongo S, di Rosa M, Caltabiano R, *et al*. Loss of macroH2A1 decreases mitochondrial metabolism and reduces the aggressiveness of uveal melanoma cells [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9745-9760.

[13] Napoli E, Tassone F, Wong S, *et al*. Mitochondrial citrate transporter-dependent metabolic signature in the 22q11.2 deletion syndrome [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(38): 23240-23253.

[14] Zhou Y R, Wu W, Xie L L, *et al*. Cellular RNA helicase DDX1 is involved in transmissible gastroenteritis virus nsp14-induced interferon-beta production [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 940.

[15] Nguyen T T T, Yoon H K, Kim Y T, *et al*. Tryptophanyl-tRNA synthetase 1 signals activate TREM-1 via TLR2 and TLR4 [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1283.

[16] Ligtenberg A J M, Veerman E C I, Nieuw Amerongen A V, *et al*. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: A single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer [J]. *Biol Chem*, 2007, 388(12): 1275-1289.

[17] Li Z H, Chao T C, Chang K Y, *et al*. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFα expression through its interaction with hnRNPL [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(3): 1002-1007.

[18] Lee K, Jang S H, Tian H, *et al*. NonO is a novel co-factor of PRDM1 and regulates inflammatory response in monocyte derived-dendritic cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1436.

[19] Dubiel D, Ordemann J, Pratschke J, *et al*. CAND1 exchange factor promotes Keap1 integration into cullin 3-RING ubiquitin ligase during adipogenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 66: 95-100.

[20] Agarwal A K, Tunison K, Dalal J S, *et al*. Metabolic, reproductive, and neurologic abnormalities in Agpat1-null mice [J]. *Endocrinology*, 2017, 158(11): 3954-3973.

[21] Kruger C, Kumar K G, Mynatt R L, *et al*. Brain transcriptional responses to high-fat diet in Acads-deficient mice reveal energy sensing pathways [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41709.

[22] Li X W, Yan X, Wang F, *et al*. Down-regulated lncRNA SLC25A5-AS1 facilitates cell growth and inhibits apoptosis via miR-19a-3p/PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in gastric cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2920-2932.

[23] Yum M K, Kang J S, Lee A E, *et al*. AIMP2 controls intestinal stem cell compartments and tumorigenesis by modulating Wnt/β-catenin signaling [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(15): 4559-4568.

[24] 邓静, 凌江红, 上官鑫超, 等. 枳实对功能性消化不良大鼠胃 Cajal 间质细胞及其 SCF/c-Kit 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2304-2309.

[25] 曹海燕, 翟玉龙, 孙夏承, 等. 基于电镜和免疫组化的线粒体数目标志物评估肝癌的初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(14): 2646-2650.

[26] Iino S, Ward S M, Sanders K M. Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine [J]. *J Physiol*, 2004, 556(Pt 2): 521-530.

[27] Vannucchi M G. Receptors in interstitial cells of Cajal: Identification and possible physiological roles [J]. *Microsc Res Tech*, 1999, 47(5): 325-335.

[责任编辑 李亚楠]