

小儿广朴止泻口服液治疗腹泻机制的预测及初步验证

陈 琦¹, 张亚云², 张丹丹², 夏 杨², 孙 丽³, 曹思瑶³, 卞慧敏^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215009

3. 长春雷允上药业有限公司, 吉林 长春 132000

摘 要: **目的** 通过数据库预测和分子对接技术探究小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的活性成分和作用机制, 并在大鼠小肠上皮 IEC-6 细胞上进行初步实验验证。 **方法** 通过中药系统药理学平台 (TCMSP) 数据库和文献检索获取小儿广朴止泻口服液的化学成分; 采用 GeneCards 和 DisGeNET 数据库获得腹泻相关基因, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction network, PPI) 网络获得小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的重要靶点, 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 使用 Autodock Vina 软件进行分子对接验证。采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 IEC-6 细胞损伤模型, 采用 MTT、ELISA 法检测小儿广朴止泻口服液对细胞凋亡及炎症的影响, 并通过 Western blotting 法验证其可能的作用机制。 **结果** 小儿广朴止泻口服液的主要活性成分有 63 个, 预测获得重要靶点 86 个, 核心靶点 28 个; GO 功能和 KEGG 通路富集分析显示小儿广朴止泻口服液主要调控了机体炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等生物过程, 涉及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 以及磷酸肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等信号通路。体外结果表明小儿广朴止泻口服液能显著升高 LPS 诱导的 IEC-6 细胞存活率 ($P<0.01$), 显著抑制炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和 TNF- α 的分泌 ($P<0.01$), 显著下调剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、Caspase-8、核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 蛋白表达 ($P<0.01$), 上调 β -catenin 蛋白表达 ($P<0.01$)。 **结论** 小儿广朴止泻口服液可能通过抑制炎症反应和细胞凋亡治疗腹泻。

关键词: 小儿广朴止泻口服液; 腹泻; IEC-6 细胞; 抗炎; 凋亡; 分子对接; 啤酒甾醇; 芦丁

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)08-2390-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.016

Prediction and preliminary verification of mechanism of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid in treatment of diarrhea

CHEN Qi¹, ZHANG Ya-yun², ZHANG Dan-dan², XIA Yang², SUN Li³, CAO Si-yao³, BIAN Hui-min¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Leiyunshang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Suzhou 215009, China

3. Changchun Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 132000, China

Abstract: Objective To explore the active ingredients and mechanism of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid (小儿广朴止泻口服液) in treatment of diarrhea by database prediction and molecular docking, and preliminarily verify it on rat intestinal epithelium IEC-6 cells. **Methods** TCMSP database and literature retrieval were applied to obtain chemical components of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid. Disease targets relating to diarrhea were screened out through GeneCards and DisGeNET database. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and core targets in network were predicted. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of core targets were performed. Furthermore, molecular docking method was used to verify the binding of components with core targets by Autodock Vina. The injury model of IEC-6 cells was induced by lipopolysaccharide (LPS), effects of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid on apoptosis and inflammation were detected

收稿日期: 2021-12-24

作者简介: 陈 琦 (1993—), 女, 博士, 研究方向为中药药理。Tel: 13770610886 E-mail: qichen@njucm.edu.cn

*通信作者: 卞慧敏, 博士生导师, 研究员, 主要从事心血管药理研究。E-mail: 320561@njucm.edu.cn

by MTT and ELISA, and possible mechanism was verified by Western blotting. **Results** There were 63 major active compounds in Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid, with 86 significant targets and 28 core targets. The results of GO function and KEGG pathway enrichment analysis revealed Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid mainly regulated the organism's inflammatory response, cell proliferation, apoptosis and other biological processes. The mainly involved signal pathways included tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, Toll-like receptor (TLR) signaling pathway, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway. *In vitro* experiment confirmed that Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid could significantly increase the survival rate of IEC-6 cells induced by LPS ($P < 0.01$), inhibit the release of inflammatory factors IL-6, IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$), down-regulate cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3), Caspase-8 and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) protein expressions ($P < 0.01$), and up-regulate β -catenin protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid may treat diarrhea by inhibiting inflammatory response and apoptosis.

Key words: Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid; diarrhea; IEC-6 cells; anti-inflammation; apoptosis; molecular docking; cerevisterol; rutin

小儿腹泻是一种由多病原及多因素引起的儿科消化道多发病和常见病^[1], 是全球范围内引起 5 岁内儿童死亡的第 2 大原因^[2]。目前临床多采用抗生素对症治疗急性腹泻, 对于慢性腹泻尚无特效药物, 而长期服用抗生素易引起耐药性、便秘、恶心、肠道菌群紊乱等不良反应^[3-4]。中医无“腹泻”之病名, 可将其归属于“泄泻”范畴^[5], 中医认为引起小儿腹泻的常见病因包括感受外邪、内伤乳食、脾胃虚弱或脾肾阳虚, 病位在脾胃^[6], 脾胃运化失常, 清浊相干, 并走大肠。临床主要从“健脾运脾”和“淡渗利湿”2 个方面入手治疗小儿泄泻, 并取得了较好的疗效。小儿广朴止泻口服液源于我国著名中医儿科专家倪珠英教授的临床经验方, 主要由广藿香、苍术、茯苓、泽泻、厚朴、车前草、陈皮以及六神曲 8 味中药组成。小儿广朴止泻口服液临床用于治疗小儿感染性腹泻和非感染性腹泻的疗效良好, 然而其作用机制却不明确。因此本研究借助于数据库和分子对接技术预测小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的有效成分及可能的作用靶点, 并在大鼠小肠上皮 IEC-6 细胞上进行了初步的验证, 以期为后续研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞

IEC-6 细胞购自北京协和细胞库。

1.2 药品与试剂

小儿广朴止泻口服液(批号 014211002)由长春雷允上药业有限公司提供; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 0000081277)购自美国 Sigma 公司; MTT 粉末(批号 20190105)购自上海碧云天生物技术有限公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3,

cleaved Caspase-3) 抗体(批号 00096469)购自武汉三鹰生物技术有限公司; Caspase-8 抗体(批号 40044)购自美国 GeneTex 公司; 核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 抗体(批号 GR226290-5)、 β -catenin 抗体购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体(批号 ATUMA0501)购自翼飞雪生物科技有限公司; HRP 标记的二抗(批号 ATUJA0801)购自武汉 Abbkine 生物技术有限公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 20211020)、IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 20211020)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 20211020)购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

Universal hood II 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Nanodrop 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Synergy2 多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

2 方法

2.1 活性成分和药物靶点的收集

通过中药系统药理学平台(TCMSP)和文献报道搜索小儿广朴止泻口服液(广藿香、苍术、茯苓、泽泻、厚朴、车前草、陈皮、六神曲)的活性成分, 根据药物药理学参数进行筛选, 纳入口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 ≥ 0.18 的活性成分^[7], 同时将《中国药典》2020 年版收载的指标性成分重新纳入。记录活性成分 PubChem ID、靶点名称, 通过 Sting 平台转换靶点蛋白名称为基因名称, 通过 PubChem 数据库搜索文献报道的靶点, 合并所有的药物靶点用于后续研究。

2.2 腹泻疾病靶点预测

通过人类基因数据库(GeneCards)和

DisGeNET 数据库检索腹泻疾病基因。在 Genecards 数据库中选择关联分数 >20 的基因^[8], 在 DisGeNET 数据库中选择证据指数 (evidence index, EI) = 1、疾病特异性指数 (dysphonia severity index, DSI) <0.5 、疾病多效性指数 (disease pleiotropy index, DPI) >0.5 、score ≥ 0.01 的基因, 2 个数据库得到的基因合并去重后获得腹泻相关基因。随后与药物靶点取交集, 并绘制韦恩图, 提取的交集靶点即为小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的潜在靶点。

2.3 化合物-靶点网络的构建与拓扑分析

将化合物、交集靶点导入 Cytoscape 软件生成化合物-靶点网络图, 对该网络中节点的多个拓扑参数进行分析, 计算每个节点的度中心性、中间中心度、紧密中心性以及拓扑系数。度中心性值大于度中心性值中位数 2 倍的节点称为重要节点, 其他指标大于所有节点的中位数的节点称为核心靶点^[9], 筛选出小儿广朴止泻口服液发挥治疗作用的核心化合物和核心靶点。

2.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction network, PPI) 网络的构建与分析

将小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的潜在靶点上传 String 平台^[10], 选择 high confidence 为 0.7, 构建 PPI 网络, 获得 PPI 网络信息文件, 计算每个节点的度值, 筛选度值 $>$ 平均度值的靶点作为小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的重要靶点^[11]。

2.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

将 PPI 网络得到的重要靶点导入 David 数据库^[12], 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 将 $P \leq 0.01$ 作为通路聚类标准, 筛选出显著生物功能和信号通路。

2.6 分子对接验证

使用 Autodock Vina 1.1.2 软件进行小分子与蛋白对接^[13]。

2.7 体外验证实验

2.7.1 药物配制 以小儿广朴止泻口服液作为原液 (浓度视为 100%), 使用前用培养基稀释成终浓度进行细胞干预。

2.7.2 细胞培养 IEC-6 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合度为 70% 时, 用 0.25% 胰酶消化进行传代, 取处于对数生长期、生长

状态良好的细胞进行实验。

2.7.3 MTT 检测 IEC-6 细胞活力 IEC-6 细胞经胰酶消化后以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和不同浓度小儿广朴止泻口服液 (3.24%、1.08%、0.36%、0.12%、0.04%) 组, 每组设 6 个复孔, 模型组和各给药组加入 10 nmol/L LPS, 各给药组再加入不同浓度的小儿广朴止泻口服液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。加入 MTT 溶液 (5 g/L), 孵育 4 h 后加入二甲基亚砷, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = 1 - (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

2.7.4 ELISA 检测 IEC-6 细胞上清液中炎症因子水平 IEC-6 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和小儿广朴止泻口服液 (0.04%、0.12%、0.36%) 组, 模型组和各给药组加入 10 nmol/L LPS, 各给药组再加入不同浓度的小儿广朴止泻口服液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。收集细胞上清液, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平。

2.7.5 Western blotting 检测 IEC-6 细胞 cleaved Caspase-3、Caspase-8、NF- κ B p65 和 β -catenin 蛋白表达情况 按“2.7.4”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 加入细胞裂解液裂解过夜, 次日离心取上清液检测蛋白浓度后煮沸。取 30 μ g 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白电转移到 PVDF 膜上, 加入 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日 TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 缓冲液清洗后进行曝光, 以灰度值进行定量分析。

2.8 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 小儿广朴止泻口服液的主要活性成分和潜在治疗靶点

在通过 TCMSP 检索和文献查询后, 根据口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 ≥ 0.18 , 得到小儿广朴止泻口服液主要活性成分 63 个。通过 TCMSP、PubChem 等数据库检索到 63 个活性成分的 664 个药物靶点; 同时通过 GeneCards 和 DisGeNET 数据

库检索到腹泻相关疾病基因 1025 个。将药物靶点与疾病基因进行交集, 得到 277 个小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的潜在作用靶点。

3.2 小儿广朴止泻口服液化合物-靶点网络的构建及拓扑分析

对 277 个潜在靶点构建小儿广朴止泻口服液化合物-靶点网络 (图 1-A), 结果显示共有 28 个小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的重要靶点。同时, 通过对网络中代表活性成分的节点进行拓扑学参数分析, 挖掘出小儿广朴止泻口服液中相对重要的活性成分有 15 个, 所有节点分布情况见图 1-B。

3.3 PPI 网络的构建与分析

在 String 数据库中构建上述 277 个靶点的 PPI 网络见图 2。筛选度值 > 平均度值的靶点作为重要

靶点, 获得 86 个重要靶点。结果发现排名前 20 的重要靶点类别可分为蛋白激酶、细胞因子、趋化因子、受体以及配体等, 主要与机体炎症反应、细胞生长、细胞增殖、分化、凋亡以及机体代谢等过程相关。在 PPI 网络中, 大于平均度值且排名前 5 的靶点依次为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT1)、白蛋白 (albumin, ALB)、内皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、内皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和 IL-8/CXCL8。

3.4 KEGG 信号筛选与 GO 生物过程富集结果

对 86 个重要靶点进行 GO 功能富集分析, 其中生物过程富集有 273 条, 细胞组分富集 28 条, 分子功能有 38 条。GO 分析分别取以上 3 个部分的显著

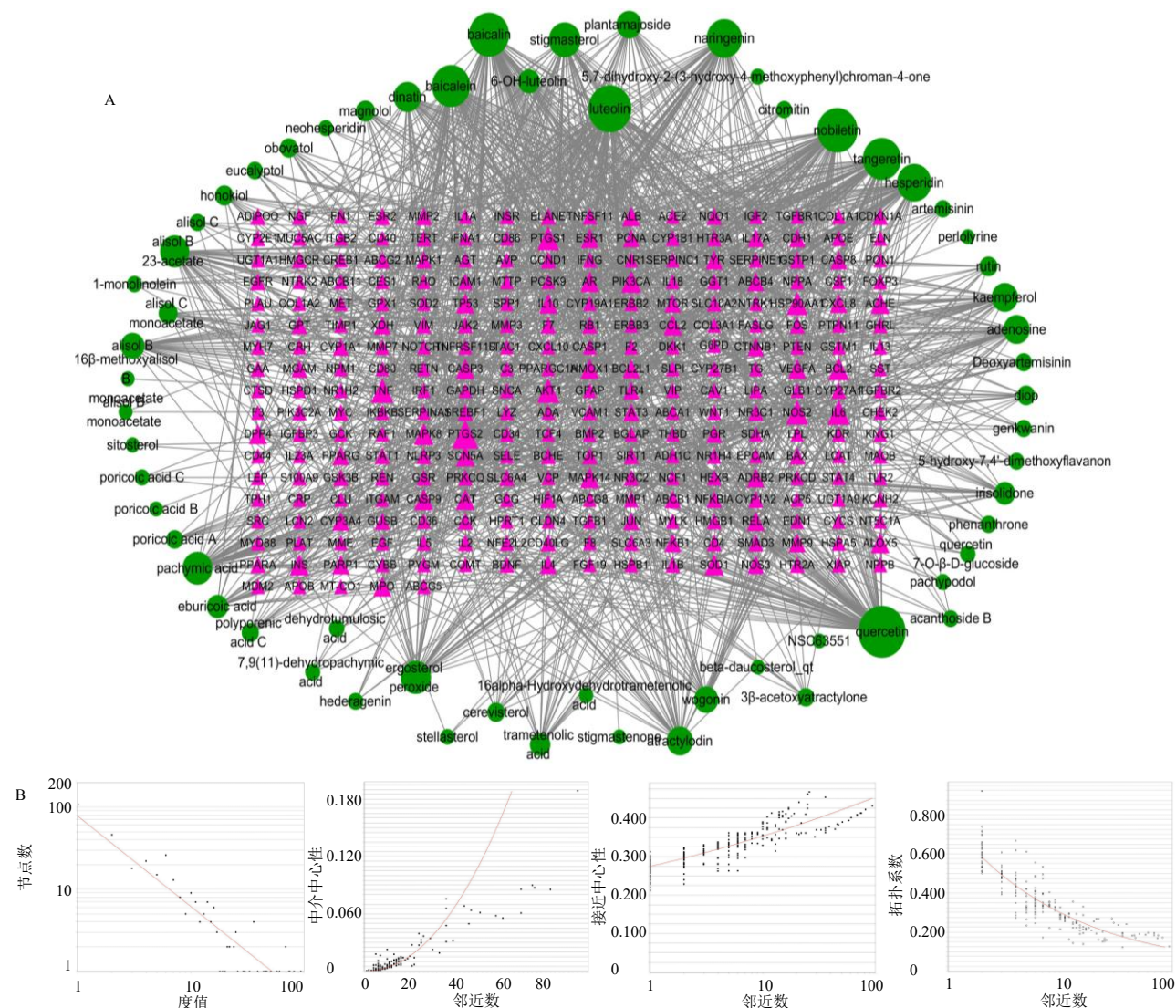


图 1 小儿广朴止泻口服液化合物-靶点网络 (A) 及网络拓扑图 (B)

Fig. 1 Compound-target network (A) and network topology (B) of Xiaoe Guangpu Zhixie Oral Liquid

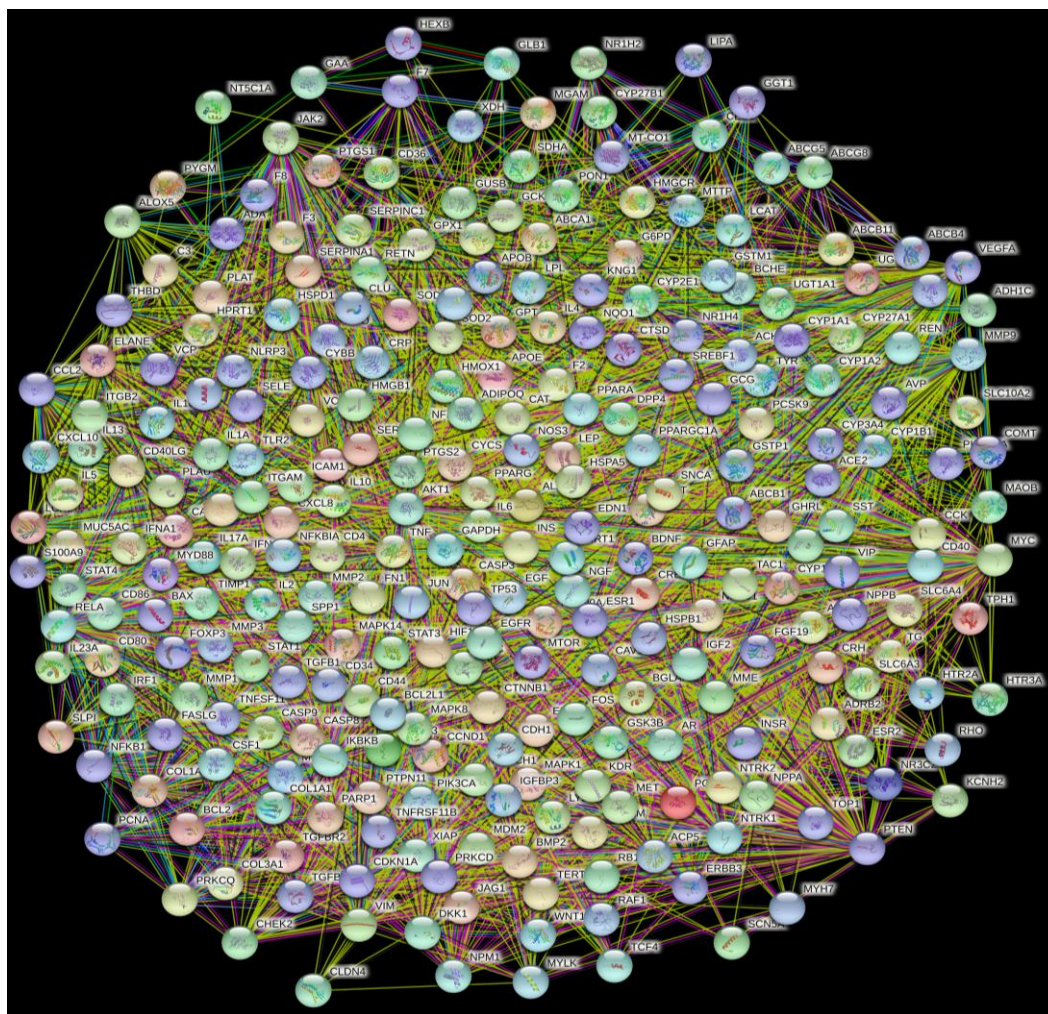


图 2 小儿广朴止泻口服液治疗腹泻潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid in treatment of diarrhea

前 20 条目录进行条形图展示, 见图 3。对 86 个重要靶点进行 KEGG 信号通路富集, 排名前 20 的信号通路见图 4。结果显示重要靶点显著富集于炎症、癌症、免疫调节、传染病等相关信号通路, 其中 TNF、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 以及磷酸肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-Akt 信号通路的富集程度高。因此, 小儿广朴止泻口服液可能通过以上通路调节机体炎症免疫反应及肠黏膜损伤修复, 从而治疗腹泻。

3.5 核心化合物-核心靶点分子对接验证

对化合物-靶点网络筛选出的 28 个核心靶点与 PPI 网络得到的前 20 个重要靶点取交集, 得到 4 个主要的核心靶点: 丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1)、CXCL8 及编

码 β -catenin 蛋白的基因 CTNNB1。对化合物-靶点网络筛选出的度值 > 10 的 8 个核心化合物 (obovitol、cerevisterol、rutin、honokiol、alisol C monoacetate、magnolol、irisolidone、alisol B) 和 4 个主要核心靶点进行分子对接验证, 经 Autodock Vina 1.1.2 软件对接后获得各化合物与靶点对接的结合能, 经换算后见表 1。随后采用 Pymol 软件对产生强烈结合的化合物和靶点的对接位点进行可视化处理, 见图 5。结果显示 8 个核心化合物与 4 个主要的核心靶点均有较好的结合活性, 其中大部分化合物与 MAPK1、CCND1 及 CXCL8 均能产生强烈的结合, 而啤酒甾醇和芦丁与该 4 个主要核心靶点均能产生强烈结合。提示 MAPK1、CCND1、CXCL8 及 CTNNB1 可能是小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的主要直接作用靶点, 而啤酒甾醇和芦丁可能是发挥作用的核心化合物。

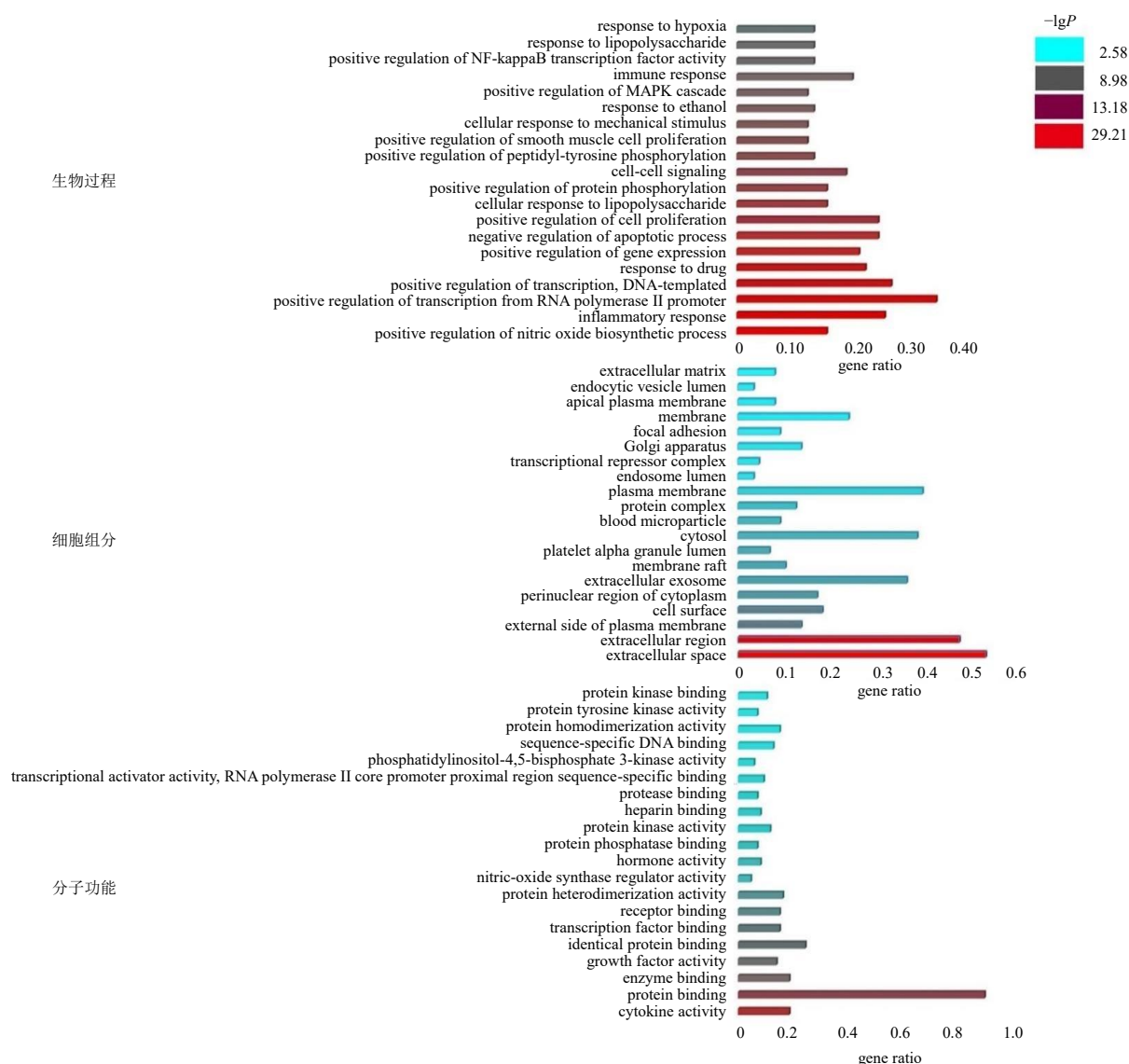


图 3 小儿广朴止泻口服液治疗腹泻靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid in treatment of diarrhea

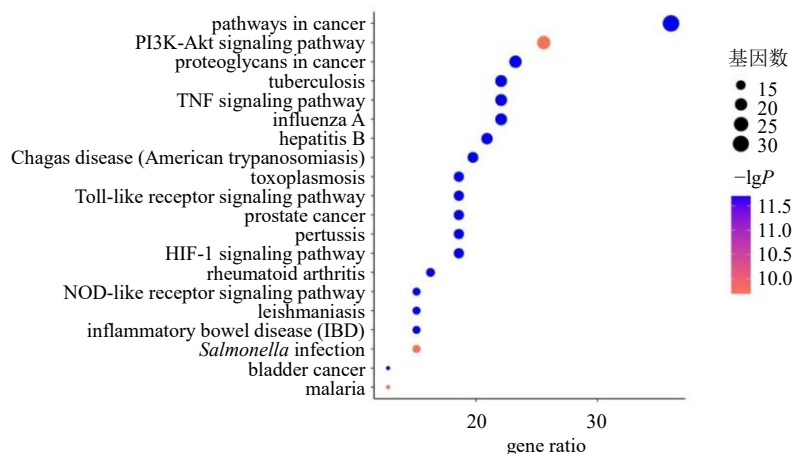


图 4 小儿广朴止泻口服液治疗腹泻靶点的 KEGG 通路富集气泡图

Fig. 4 Bubble enrichment in KEGG pathway of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid in treatment of diarrhea

表 1 小儿广朴止泻口服液中核心化合物与主要核心靶点的结合能

Table 1 Binding energy of core compounds and main core targets of Xiaoe Guangpu Zhixie Oral Liquid

来源	化合物	中文名	与靶点的结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
			MAPK1	CCND1	CXCL8	CTNNB1
厚朴	obovitol	厚朴新酚	-30.14	-28.46	-27.21	-28.05
茯苓	cerevisterol	啤酒甾醇	-36.84	-30.14	-32.23	-32.23
六神曲	rutin	芦丁	-38.51	-34.74	-33.49	-36.42
厚朴	honokiol	和厚朴酚	-32.65	-30.14	-28.46	-30.56
泽泻	alisol C monoacetate	23-乙酰泽泻醇 C	-28.88	-29.30	-32.65	-32.23
厚朴	magnolol	厚朴酚	-31.39	-28.88	-28.88	-29.30
广藿香	irisolidone	尼泊尔鸢尾异黄酮	-32.65	-29.72	-28.46	-31.81
泽泻	alisol B	泽泻醇 B	-30.56	-30.98	-28.88	-29.72

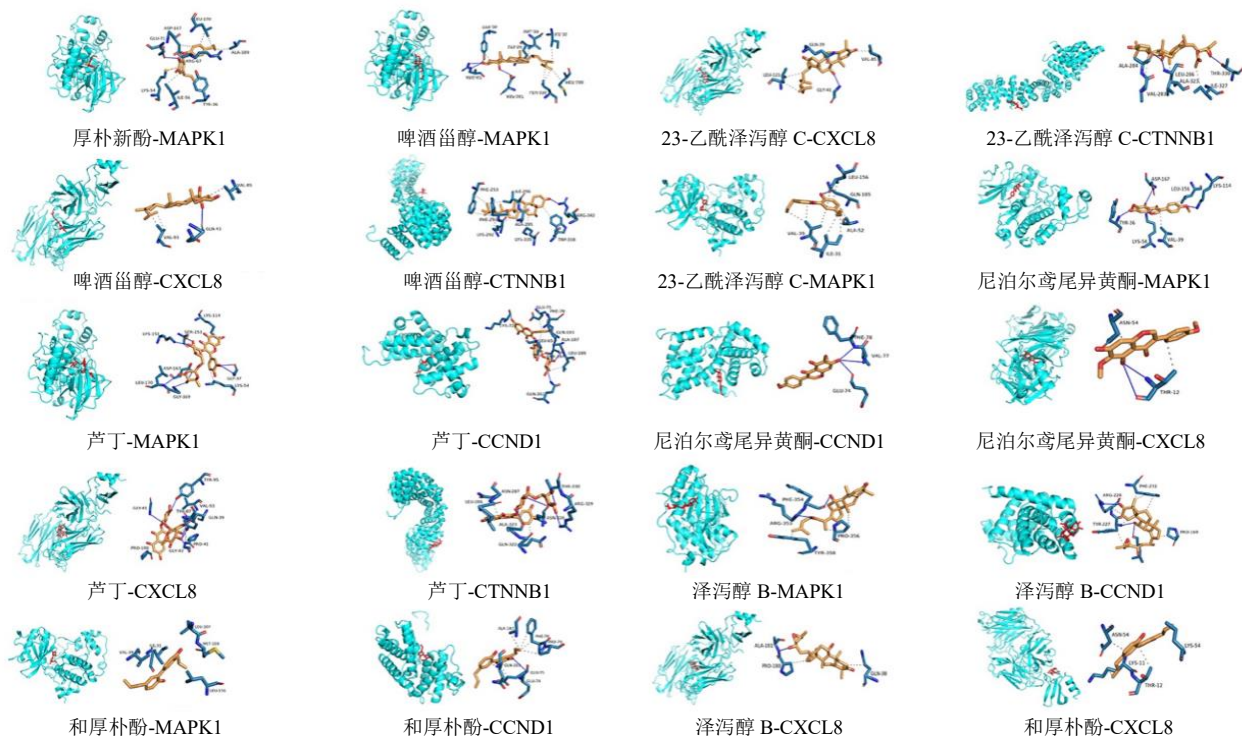


图 5 小儿广朴止泻口服液核心化合物与核心靶点的分子对接模型及位点

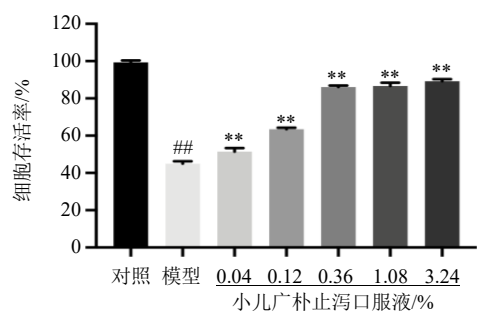
Fig. 5 Molecular docking models and sites between core compound and core targets of Xiaoe Guangpu Zhixie Oral Liquid

3.6 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞存活率的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组细胞存活率均显著升高 ($P < 0.01$),且 0.04%~0.36%小儿广朴止泻口服液呈剂量相关性。

3.7 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞上清液中炎症因子水平的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量相关性,提示小儿广朴止泻口服液能减轻 LPS 诱导的 IEC-6 细胞炎症反应。



与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$, 下同
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group, same as figures below

图 6 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of Xiaoe Guangpu Zhixie Oral Liquid on survival rate of IEC-6 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

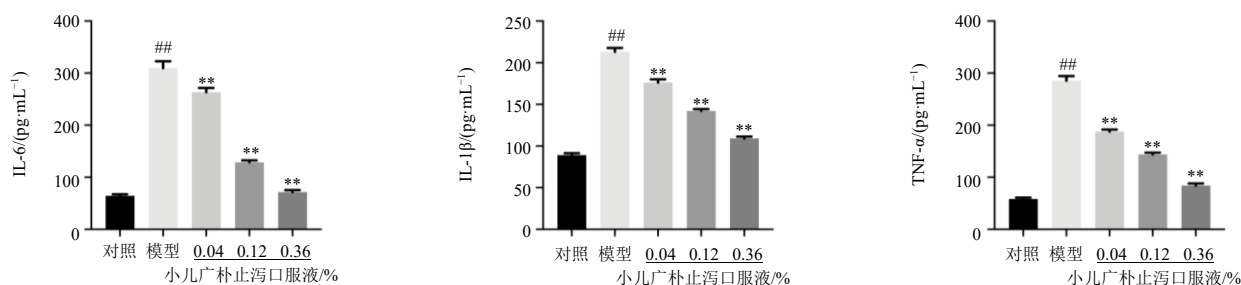


图 7 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞上清液中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid on inflammatory factors levels in supernatant of IEC-6 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞炎症及凋亡相关蛋白表达的影响

为了进一步阐明小儿广朴止泻口服液抑制 LPS 诱导的细胞损伤的机制,检测了炎症及凋亡相关蛋白的表达,如图 8 所示,与对照组比较,模型组细胞炎症信号核内蛋白 NF-κB p65 以及促凋亡蛋白

cleaved Caspase-3、Caspase-8 表达均显著升高 ($P < 0.01$), β-catenin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组细胞 cleaved Caspase-3、Caspase-8 及核内 NF-κB p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), β-catenin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

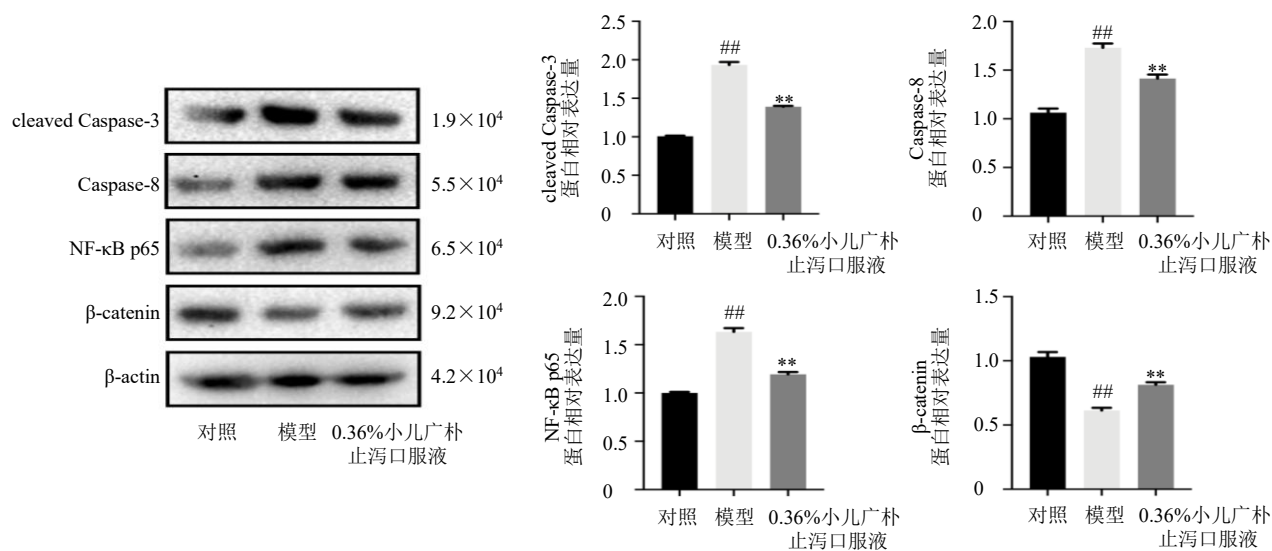


图 8 小儿广朴止泻口服液对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞炎症及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Xiaoer Guangpu Zhixie Oral Liquid on inflammation and apoptosis-related protein expressions of IEC-6 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中医将腹泻归属于“泄泻”范畴,《幼幼集成》载:“夫泄泻之本,无不由于脾胃”,认为“腹泻”的基本病机为脾虚湿盛,因此治疗则以化湿运脾为主要原则。小儿广朴止泻口服液中广藿香有芳香化浊、开胃止吐、发表解暑的功效;苍术可健脾解郁、燥湿辟秽,二者共为君药,为祛湿之要药;茯苓、厚朴、泽泻为臣药,其中茯苓、泽泻均可利水渗湿;厚朴可燥湿消痰、下气除满;车前草清热解毒,可治暑湿泻痢;六神曲可消食健胃、和中止泻,二者

共为佐药;辅以陈皮理气和胃、燥湿醒脾。全方共奏祛湿止泻、和中运脾之功效,契合腹泻的中医症候。临床用于治疗湿困脾土所致的小儿泄泻,症见泄泻、大便稀溏或水样、腹胀、腹痛、纳差、呕吐、或见发热、舌淡苔白腻以及轮状病毒性肠炎和非感染性腹泻等症。前期药理学研究亦表明小儿广朴止泻口服液能抑制和杀灭轮状病毒,具有解痉、促进胃液分泌、抗炎和增强免疫力的作用^[14],且富含钾、钠、镁、锌等人体微量元素,对腹泻引起的脱水、电解质失衡有调节作用。然而其作用机制尚不清晰,

本研究拟从药物-成分-靶点网络阐明小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的作用及机制。

现代医学研究表明腹泻发病机制涉及肠道炎症、胃肠激素分泌紊乱和肠黏膜损伤等因素。本研究预测得到小儿广朴止泻口服液调控的 84 个重要靶点主要参与了炎症免疫反应、细胞增殖、细胞凋亡等生物进程,调节了 TNF、TLR、HIF-1 以及 PI3K-Akt 等信号通路,其中主要的核心靶点为 MAPK1、CCND1、CXCL8 和 CTNND1。TNF 在炎症、细胞增殖和凋亡中具有重要作用,TNF- α 可作为细菌感染急性期的炎症指标^[15]。TLR 信号通路中的 TLRs 激活后,可通过 NF- κ B、MAPK 等信号通路来调节炎症因子的释放,在炎症调控、免疫细胞增殖等方面发挥着关键作用^[16]。MAPK1 家族是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,p38 MAPK 能使 NF- κ B 表达和活化,加剧炎症性肠病患者的肠道炎症^[17]。CTNND1 表达 β -catenin 蛋白,是调控结肠上皮干细胞增殖和分化的重要组织^[18]。结合体外细胞实验的结果,证实了小儿广朴止泻口服液具有抑制 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症反应的作用,初步探讨了小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的机制,在一定程度上验证了网络药理学筛选的结果。

综上所述,本研究借助网络药理学^[19]和分子对接技术初步预测了小儿广朴止泻口服液治疗腹泻的药效物质基础及潜在作用机制,同时通过细胞实验初步证实了网络药理学的预测,表明小儿广朴止泻口服液可通过多组分-多靶点-多通路抑制肠道炎症,调节肠黏膜上皮细胞的凋亡和增殖,拮抗肠道黏膜损伤,从而发挥治疗腹泻的作用,为后续深入探究药物机制、推广临床应用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mejía A, Atehortúa S, Flórez I D, *et al.* Cost-effectiveness analysis of zinc supplementation for treatment of acute diarrhea in children younger than 5 years in Colombia [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, 60(4): 515-520.
- [2] Keddy K H. Old and new challenges related to global burden of diarrhoea [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): 1163-1164.
- [3] Camilleri M, Sellin J H, Barrett K E. Pathophysiology, evaluation, and management of chronic watery diarrhea [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(3): 515-532.
- [4] Thiagarajah J R, Donowitz M, Verkman A S. Secretory diarrhoea: Mechanisms and emerging therapies [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(8): 446-457.
- [5] 徐沙沙, 张向峰. 复方丁香开胃贴治疗小儿腹泻病临床观察 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(12): 2289-2290.
- [6] 赖崇杰. 中医药治疗小儿腹泻的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(21): 23-24.
- [7] 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.
- [8] 冯贺龙, 王晓雪, 张福利. 基于网络药理学的四逆散保肝作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6258-6268.
- [9] 浦强, 徐巍龙, 李楠, 等. 基于网络药理学芪葵颗粒治疗糖尿病肾病的物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5767-5777.
- [10] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [11] 刘思莹, 凌爽, 李雪莹, 等. 基于网络药理学探讨丹参-葛根药对治疗糖尿病心肌损伤的分子机制 [J]. 中医药学报, 2021, 49(2): 42-47.
- [12] 朱颖, 李丹丹, 吉洁, 等. 二仙汤治疗高血压的网络药理学研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(3): 377-383.
- [13] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [14] 刘嵩, 谭大琦, 卢笑丛, 等. 广朴止泻液药效学研究 [J]. 医药导报, 2008, 27(7): 778-781.
- [15] 何旒, 胡文辉. 双歧杆菌四联活菌片治疗轮状病毒性肠炎患儿的疗效及对血清细胞因子的影响 [J]. 中国现代医生, 2014, 52(2): 36-38.
- [16] 梁磊. 八宝丹对大鼠慢性肝损伤的影响及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [17] Kristensen N N, Olsen J, Gad M, *et al.* Genome-wide expression profiling during protection from colitis by regulatory T cells [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008, 14(1): 75-87.
- [18] Barker N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 19-33.
- [19] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

[责任编辑 李亚楠]