

枳术宽中胶囊通过调节 JAK2/STAT3 通路与肠脑轴改善溃疡性结肠炎及抑郁样行为

杨佳莉¹, 唐靖月¹, 余学成¹, 苏文龙^{1,2}, 陈霖霖^{1,2*}, 曹国胜^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 探讨枳术宽中胶囊 (Zhizhu Kuanzhong Capsule, ZZKZ) 对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 及伴随抑郁样行为的治疗作用及其机制。方法 采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ/Orbitrap-MS) 分析 ZZKZ 中的主要成分。小鼠自由饮用 3.5% DSS 溶液建立 UC 模型, 给予药物干预 7 d, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和阿利新蓝-过碘酸-雪夫 (Alcian blue-periodic acid-Schiff, AB-PAS) 染色评估结肠组织病理损伤及黏液分泌情况; 采用旷场实验和糖水偏好实验评估抑郁样行为; 采用 16S rRNA 测序和血清非靶向代谢组学分析肠道菌群与血清代谢物变化, 结合网络药理学预测靶点和通路, 并通过分子对接、分子动力学模拟、qRT-PCR 和 Western blotting 实验进行验证。结果 与模型组比较, ZZKZ 显著减轻 UC 小鼠的结肠缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分 ($P < 0.01$), 提高旷场实验运动总距离、平均运动速度和糖水偏好指数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少结肠组织和脑组织炎症因子表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 缓解肠道组织病理损伤和海马神经元损伤 ($P < 0.01$)。16S rRNA 测序结果显示, ZZKZ 能够降低有害菌的丰度, 升高有益菌的丰度, 逆转肠道菌群失调。血清非靶向代谢组学分析结果显示, ZZKZ 能够调控代谢途径, 逆转脂质、色氨酸和胆汁酸代谢紊乱。网络药理学分析预测 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号转导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 为相关通路, ZZKZ 中熊果酸、白术内酯 I、橙皮素和异鼠李素与其靶标蛋白表现出显著的结合亲和力, 可能是其发挥疗效的主要活性成分。Western blotting 结果显示, 与模型组比较, ZZKZ 显著上调 UC 小鼠肠道紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1)、Occludin 和 Claudin-1 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化 ($P < 0.05$)。结论 ZZKZ 可能通过调节肠道菌群、代谢途径及抑制 JAK2/STAT3 通路, 缓解 UC 及伴随的抑郁样行为。

关键词: 枳术宽中胶囊; 溃疡性结肠炎; 抑郁样行为; 肠脑轴; JAK2/STAT3 通路; 白术内酯 I; 橙皮素; 熊果酸; 异鼠李素
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)17-6832-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.015

Zhizhu Kuanzhong Capsule improves ulcerative colitis and depression-like behaviors by regulating JAK2/STAT3 pathway and gut-brain axis

YANG Jiali¹, TANG Jingyue¹, YU Xuecheng¹, SU Wenlong^{1,2}, CHEN Linlin^{1,2}, CAO Guosheng^{1,2}

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of Zhizhu Kuanzhong Capsule (枳术宽中胶囊, ZZKZ) on dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) and associated depressive-like behaviors. **Methods** The main components in ZZKZ were analyzed using UPLC-LTQ/Orbitrap-MS. UC model was established by freely drinking 3.5% DSS solution in mice, and drug intervention was given for 7 d. Hematoxylin-eosin (HE) and Alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) staining were used to evaluate the pathological damage and mucus secretion of colon tissue. Depressive like behavior was evaluated using open field experiments and sugar water preference experiments. 16S rRNA sequencing and serum untargeted metabolomics were used to

收稿日期: 2026-04-08

基金项目: 湖北省自然科学基金中医药创新发展联合基金资助项目 (2025AFD569)

作者简介: 杨佳莉, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 13333901549@163.com

*通信作者: 陈霖霖, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: lin-lin.chen@hotmail.com

曹国胜, 副教授, 硕士生导师, 从事中药炮制学研究。E-mail: caoguosheng2006@163.com

analyze changes in gut microbiota and serum metabolites. Network pharmacology was used to predict targets and pathways, which were validated through molecular docking, molecular dynamics simulation, qRT-PCR and Western blotting experiments. **Results** Compared with model group, ZZKZ significantly reduced colon shortening in UC mice ($P < 0.05, 0.01$), decreased disease activity index (DAI) score ($P < 0.01$), increased total distance, average exercise speed in open field experiments and sugar preference index ($P < 0.05, 0.01$), reduced the expressions of inflammatory factors in colon and brain tissues ($P < 0.05, 0.01$), and alleviated intestinal tissue pathological damage and hippocampal neuron damage ($P < 0.01$). 16S rRNA sequencing results showed that ZZKZ could reduce the abundance of harmful bacteria, increase the abundance of beneficial bacteria, and reverse the imbalance of gut microbiota. The results of serum non-targeted metabolomics analysis showed that ZZKZ could regulate metabolic pathways, reverse lipid, tryptophan and bile acid metabolism disorders. Network pharmacology analysis predicted that Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was related pathway, ursolic acid, atractylenolide I, hesperetin and isorhamnetin in ZZKZ showed significant binding affinity with their target proteins, which may be the main active ingredients for their therapeutic effects. Western blotting results showed that compared with model group, ZZKZ significantly upregulated the expressions of zonula occludin-1 (ZO-1), Occludin and Claudin-1 in colon of UC mice ($P < 0.05, 0.01$), and inhibited the phosphorylation of JAK2 and STAT3 ($P < 0.05$). **Conclusion** ZZKZ may alleviate UC and associated depressive like behavior by regulating gut microbiota, metabolic pathways and inhibiting JAK2/STAT3 pathway.

Key words: Zhizhu Kuanzhong Capsule; ulcerative colitis; depression-like behaviors; gut-brain axis; JAK2/STAT3 pathway; atractylenolide I; hesperetin; ursolic acid; isorhamnetin

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的主要亚型之一, 临床典型症状包括腹痛、慢性腹泻、便血和体质量减轻。UC 与生活方式、饮食模式、遗传易感性和免疫失衡密切相关, 近年来全球发病率不断上升^[1]。UC 通常具有复发性的病程, 不仅严重损害患者的工作能力和生活质量, 还增加了抑郁、焦虑等精神疾病的发病率^[2]。心理症状是 IBD 的重要共病, 其对中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的肠外影响已得到广泛认可。肠道屏障结构和功能的改变会诱发神经炎症反应, 进而导致情绪和行为障碍的发生^[3]。据报道, 在 IBD 活动期, 抑郁和焦虑症的患病率持续增加, 抑郁症患者的 IBD 发病率也更高, 表明两者背后存在共同的生物学基础^[4]。IBD 所致肠道屏障损伤及全身炎症反应, 可通过循环促炎因子直接作用于 CNS 诱发神经炎症, 并改变情绪调节相关的神经递质代谢, 诱发抑郁样行为; 反之, 抑郁所致的神经免疫紊乱、肠道菌群失衡及肠-脑轴下行易化效应等机制加重 IBD 的炎症和病程。两者相互驱动, 最终导致肠道炎症与情绪障碍持续共存、互为加重。

研究表明, 肠道内的先天免疫细胞介导宿主防御反应、炎症调节和组织修复过程, 而免疫失衡是诱发 UC 的关键因素^[5]。其中 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路是细胞功能的关键通讯枢纽, 在自身免疫性

疾病背景下具有重要意义。多项研究观察到 UC 患者血清和结肠组织中促炎细胞因子的水平与肠黏膜损伤程度呈正相关, 且肠道损伤状态与 JAK2/STAT3 蛋白的异常表达密切相关^[6]。当前研究多聚焦于免疫炎症、肠道菌群失衡、黏膜屏障功能障碍、铁死亡及氧化应激等领域, 但其与 CNS 的互动机制仍不清楚。研究表明, 高脂饮食引起的肠道屏障损伤可以通过调节肠道微生物群落的平衡来修复^[7]。UC 患者的肠道菌群可下调神经肽信号通路的基因表达, 从而在接受粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) 的小鼠中诱导焦虑样和抑郁样行为^[8]。而来自健康青少年的 FMT 则可显著改善抑郁模型小鼠的抑郁样行为, 表明大脑通过复杂的肠-脑轴与肠道进行双向交流^[9]。

目前临床上常用的 UC 治疗药物为糖皮质激素和免疫调节剂, 长期应用会引起严重的不良反应。中药由于临床应用广泛、不良反应少, 在 IBD 治疗中显示出潜在优势。枳术宽中胶囊 (Zhizhu Kuanzhong Capsule, ZZKZ) 是一种源自汉代张仲景所著《金匮要略》中经典方剂枳术汤的中成药, 由白术、枳壳、柴胡、山楂 4 味中药组成, 具有健脾和胃、理气止痛等功效。研究表明柴胡和枳壳可以缓解焦虑和抑郁^[10-11]。白术可以促进其多糖被肠道细菌消化, 从而改善紊乱的肠道菌群^[12]。此外, 白术和山楂具有护胃、抗炎和促消化的作用^[13-14]。临床上, ZZKZ 广泛应用于功能性消化不良、餐后不适综合征、胃食管反流及便秘等胃肠道疾病的治疗, 并能够有效缓解

伴随的焦虑和抑郁等精神症状^[15-18]。最近研究表明,ZZKZ 对功能性消化不良患者的益处可能与其促进胃排空和对特定中枢神经系统通路的调节作用有关^[19]。然而,目前关于 ZZKZ 的研究多集中于临床疗效观察,其在缓解胃肠道组织损伤及改善伴随情绪障碍方面的具体作用机制尚未阐明,在一定程度上制约了其更广泛的临床应用与深入开发。本研究通过构建葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的 UC 小鼠模型,系统评价了 ZZKZ 对 UC 及其伴随抑郁样行为的改善作用,采用液质联用技术进行成分鉴定并结合网络药理学筛选潜在作用靶点与信号通路,利用分子对接及分子动力学模拟验证主要活性成分与核心靶点的结合特性。同时通过整合肠道菌群分析与血清非靶向代谢组学,阐明其调节肠道微生态及代谢通路的作用特点,以揭示其潜在作用机制。本研究为阐释中医药治疗 UC 及相关情绪障碍的作用机制提供了新的实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 36 只,8 周龄,体重 20~23 g,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号 SCXK(鄂)2020-0018,动物质量合格证号 42000600060657。小鼠在室温(22±2)℃、相对湿度 60%、12 h 明暗循环的受控条件下适应饲养 7 d,自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 20230222)。

1.2 药品与试剂

ZZKZ(国药准字 Z20020003,批号 231008)由郎致集团双仁制药有限公司提供;DSS(批号 160110)购自美国 MP Biomedicals 公司;柳氮磺吡啶肠溶片(sulfasalazine, SASP,批号 09220718)购自上海信谊药业有限公司; β -actin 抗体(批号 AC251110096)、Occludin 抗体(批号 00123202)、Claudin-1 抗体(批号 00143561)、紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)抗体(批号 00173684)购自武汉三鹰生物技术有限公司;JAK2 抗体(批号 R24775)、p-JAK2 抗体(批号 R381556)、STAT3 抗体(批号 200964)、p-STAT3 抗体(批号 310019)购自成都正能生物技术有限公司;人尿素粪便隐血试剂盒(批号 20221104)购自南京建成生物工程研究所;甲醇、乙腈、甲酸和乙酸铵均为色谱级,购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HRP 二抗(批号 15526003EE)购自 BioWorld 公司;苏木素-伊红

(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 20241025)、阿利新蓝-过碘酸-雪夫(Alcian blue-periodic acid-Schiff, AB-PAS)染色试剂盒(批号 20250730)购自 Biosharp 公司。

1.3 仪器

Ultimate 3000 型超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱系统(UPLC-LTQ/Orbitrap HRMS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);WD-9415C 型超声波清洗器(北京六一生物科技有限公司);ES225SM-DR 型电子天平(上海精科实业有限公司);D3024R 型低温离心机(美国 Scilogex 公司);SWE-C6 型样品快速研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 ZZKZ 的 UPLC-HRMS 分析

精确称取 ZZKZ 内容物 200 mg,溶解于 10 mL 80%甲醇中,超声提取 30 min,提取液于 9 000×g 离心 10 min,取上清液进行分析。采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~20 min, 95%~70%A;20~30 min, 70%~35%A;30~35 min, 35%A;体积流量 0.3 mL/min;柱温 35℃;进样体积 2 μ L。采用高分辨质谱在正、负离子模式进行数据采集,离子源电压为 3.5 kV,毛离子传输管温度为 320℃,辅助气加热温度为 350℃,鞘气体积流量为 35 L/min,辅助气体积流量为 15 L/min,检测模式为 Full MS-ddMS²,一级质谱扫描范围 m/z 50~1 000,分辨率为 60 000,二级质谱采用高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)模式,分辨率为 15 000, HCD 裂解能量 35 V。

2.2 网络药理学分析

通过中药系统药理数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和 SwissADME 筛选成分,在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索化合物对应的典型 SMILES,并将其导入到 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch>)中获取靶点。筛选和去重后,获得 ZZKZ 活性成分的潜在靶点。以“ulcerative colitis”和“depression”为检索词,从 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库(

idrlab.net/) 和 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 筛选疾病相关靶点, 使用 UniProt 数据库对靶点进行标准化。使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图, Venny 2.1 软件筛选 ZZKZ、UC 和抑郁的重叠靶点。基于 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并使用 CytoHubba 插件进行筛选, 将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化。使用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 进行基因本体 (gene ontology, GO) 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, GO 分析包含生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC), 选择 *P* 值最大的前 10 个 GO 条目和前 20 个 KEGG 通路, 通过微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将结果可视化条形图和气泡图。

2.3 分子对接与分子动力学模拟

从 PubChem 数据库检索活性成分的结构, 并使用 AutoDock Tools (<https://autodock.scrips.edu/>) 进行电荷最小化和可旋转键检测。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取相关靶点的结构, 并去除其结合的小分子和水分子。采用配体对接模拟来评估化合物与关键靶点之间的结合活性。根据受体的活性位点确定对接盒范围。使用 AutoDock Vina 进行受体-配体对接, 对接分数越高, 表明化合物与靶点的结合亲和力越强。使用 PyMOL 软件进行可视化。使用 GROMACS 2022.3 软件进行分子动力学模拟。

2.4 动物分组、造模与给药

将 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组及 ZZKZ 低、中、高剂量 (0.4、0.8、1.6 g/kg, 分别为临床等效剂量的 0.5、1、2 倍) 组和 SASP (250 mg/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余小鼠连续 8 d 自由饮用 3.5% DSS 溶液建立 UC 模型。造模第 2 天起, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积水, 1 次/d。给药 7 d 后, 通过颈椎脱臼法处死小鼠, 收集血液、肠道内容物、脑、脾脏和结肠组织, 于 -80 °C 保存。

2.5 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分的测定

每天固定时间记录小鼠体质量并观察粪便情

况及其是否带血。采用隐血试剂盒评估粪便隐血的存在。根据体质量减轻程度、排泄物的黏度和小鼠的粪便潜血指数测定 DAI 评分^[20]。动物处死后测量结肠长度, 称定脾脏质量并计算脾脏指数。

2.6 旷场实验

在弱光下进行旷场实验以监测小鼠的探索行为。将小鼠放置于 45 cm×45 cm×30 cm 的方形盒子中央区域, 记录其 5 min 内的运动轨迹、运动总距离和平均运动速度。每只小鼠测试后, 在箱体中喷洒 75%乙醇并擦拭干净, 以避免气味干扰。

2.7 糖水偏好实验

实验前, 小鼠禁食禁水 24 h。适应期每个笼子放置 1 瓶 1%蔗糖溶液和 1 瓶水, 12 h 后交换 2 个瓶子的位置。测试开始时, 每只小鼠单独置于 1 个笼子中, 放置 1 瓶 1%蔗糖溶液和 1 瓶水 2 h, 实验期间交换 1 次 2 个瓶子的位置。记录测试前后瓶子中蔗糖溶液和水的质量, 计算糖水偏好指数。

糖水偏好指数 = 蔗糖摄入量 / (蔗糖摄入量 + 水摄入量)

2.8 HE 染色观察结肠组织和脑组织病理变化

取结肠组织和脑组织, 于 4%多聚甲醛溶液中 4 °C 固定 24 h, PBS 充分漂洗去除残留固定液; 经常规脱水、透明、石蜡浸蜡包埋, 制备厚度为 4 μm 的石蜡切片。切片经烘烤、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 进行 HE 染色, 透明处理和封片后, 于显微镜下观察并拍照。

2.9 AB-PAS 染色观察结肠组织黏液分泌

小鼠结肠组织经固定、切片、脱蜡后, 进行 PAS 氧化、Schiff 试剂染色、苏木素染色和脱水处理, 封闭, 于显微镜下观察并拍照。

2.10 qRT-PCR 检测结肠组织和脑组织中炎症因子的表达

取小鼠结肠组织和脑组织, 按照试剂盒说明书提取组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*) 和 *IL-6* 的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

2.11 16S rRNA 测序

收集对照组、模型组和 ZZKZ 高剂量组小鼠肠道内容物, 通过 16S rRNA 基因测序检测肠道菌群。采用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB) 法从样本中提取基因组 DNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 提取质量,

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: TGCTGTCCCTGTATGCCTCT R: TTTGATGTCACGCACGATTT
TNF- α	F: TATGGCTCAGGGTCCAACCTC R: GCTCCAGTGAATTCGGAAG
IL-1 β	F: TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG R: TGCTCATGTCCTCATCCTGGAAGG
IL-6	F: ACAACCACGGCCTTCCCTAC R: TCTCATTTCCACGATTTCCCAG

随后使用 NanoDrop 1000 分光光度计测量 DNA 浓度。对小鼠结肠组织中的高度可变区 V4 区进行扩增, 引物为 515F (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 和 806R (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'), 鉴定细菌多样性。PCR 产物通过凝胶电泳验证后, 扩增产物被纯化并定量。根据所扩增的区域构建文库, 并基于 Illumina 测序平台对文库进行双端测序。对测序数据进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 聚类 and 物种分类分析。对 OTUs 进行丰度分析、 α 多样性计算以及 Venn 图和花瓣图构建。同时使用主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 直观显示各组间微生物群落的差异。此外, 选择线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 和线性判别分析效应量 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 等统计方法对各组样本间物种组成和群落结构的差异进行显著性检验。

2.12 血清非靶向代谢组学

将 100 μ L 血清样本与 300 μ L 甲醇混匀, 涡旋振荡后, 冰上孵育 5 min, 4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times g$ 离心 20 min, 收集上清液用于 LC-MS 分析。采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~1.5 min, 98% A; 1.5~3 min, 98%~15% A; 3~

10 min, 15%~0 A; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.2 mL/min; 进样体积 2 μ L。采用电喷雾离子源 (electrospray ionization source, ESI), 喷雾电压 3.5 kV, 鞘气体积流量 35 psi (1 psi=6.895 kPa), 辅助气体流量 10 L/min, 离子传输管温度 320 $^{\circ}$ C, 离子导入射频电平 60, 辅助气加热器温度 350 $^{\circ}$ C, 质谱扫描范围 m/z 100~1 500, MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。随后使用 MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) 在线平台对差异代谢物进行富集分析。结合 KEGG 数据库的检索结果和相关文献对比, 系统分析差异代谢物涉及的代谢通路及其生物学意义。

2.13 Western blotting 检测结肠组织 JAK2、p-JAK2、STAT-3、p-STAT3、ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达

取结肠组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解, 裂解液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 5 min, 收集上清液, 使用 BCA 蛋白测定试剂盒进行定量。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 1 h。加入 ECL 化学发光试剂显影, 多功能扫描仪扫描条带, 使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.14 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Prism 10.1.2 软件通过单因素方差分析和 t 检验评估组间差异的显著性。

3 结果

3.1 ZZKZ 的成分分析

对 ZZKZ 进行 UPLC-HRMS 分析, 分别于正、负离子模式下获取总离子流图 (图 1)。通过自建质谱数据库比对共鉴定出 35 种化合物 (表 2), 包括

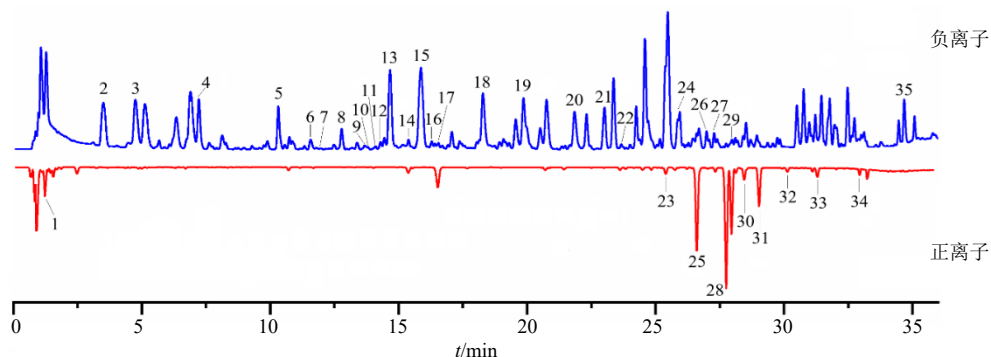


图 1 ZZKZ 的正、负离子模式总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of ZZKZ in positive and negative ion modes

表 2 ZZKZ 的化学成分鉴定

Table 2 Identification of chemical components in ZZKZ

峰号	t_R/min	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物
				理论值	测定值			
1	1.24	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	168.101 9	168.105 0	3.1	150.055 0, 144.958 0, 140.070 5	辛弗林
2*	3.52	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	313.056 0	313.056 6	1.2	295.046 2, 191.020 2, 109.030 0	水杨酸酐基- β -D-葡萄糖苷酸
3	4.64	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.087 3	353.088 6	1.6	191.056 7, 197.046 3, 179.035 6	新绿原酸
4	7.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.086 7	353.088 7	2.0	191.056 5, 206.171 5, 179.035 6	绿原酸
5	10.38	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	163.039 0	163.040 8	1.8	119.050 9, 135.046 3, 117.035 2	对香豆酸
6	11.74	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	193.049 5	193.051 4	1.9	178.027 9, 149.061 6, 134.038 1	阿魏酸
7	11.95	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	447.092 2	447.094 4	2.1	357.062 7, 339.051 8, 327.052 1	异荭草苷
8*	12.79	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{14}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	649.249 1	649.249 5	0.6	605.261 3, 443.208 4, 347.187 1	柠檬苦素葡萄糖苷
9*	13.69	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	447.092 2	447.093 4	1.2	429.078 5, 343.046 2, 300.028 0	木犀草苷
10	13.78	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.087 1	463.087 8	0.6	300.028 0, 323.078 6, 271.026 0	金丝桃苷
11	14.07	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.087 1	463.086 1	-1.0	300.028 1, 331.177 1, 287.056 6	异槲皮苷
12	14.24	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.145 0	609.146 1	1.0	301.036 0	芦丁
13	14.66	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	579.170 8	579.172 4	1.5	271.061 6, 295.061 8, 313.072 5	芸香柚皮苷
14	15.38	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	579.170 8	579.172 4	1.5	271.061 7, 277.035 1, 253.035 4	柚皮苷
15	15.88	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.181 4	609.183 7	2.2	301.072 5, 325.072 7, 286.049 2	橙皮苷
16*	16.14	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	607.165 7	607.281 5	-2.4	299.056 6, 313.055 7, 284.032 8	地奥司明
17	16.55	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.181 4	609.181 8	0.4	591.169 5, 301.071 7, 286.047 0	新橙皮苷
18*	18.30	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.150 1	593.150 9	0.8	280.134 7, 302.076 0, 262.966 1	山柰酚-3- O - β -D-芹糖苷
19*	19.92	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.187 0	593.188 8	1.3	575.181 6, 309.077 5, 285.077 4	枸橼苷
20	21.83	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	271.060 1	271.061 6	1.5	151.004 3, 169.015 0, 145.030 3	柚皮素
21	23.03	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	301.070 7	301.072 3	1.6	286.049 0, 257.082 7, 242.059 2	橙皮素
22	23.77	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	315.049 9	315.051 0	1.0	300.027 6, 287.020 3, 271.026 1	异鼠李素
23	25.53	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	373.128 1	373.128 0	-0.1	343.080 5, 357.096 7, 329.102 0	异橙黄酮
24*	25.86	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	469.185 7	469.187 6	1.9	381.207 9, 363.197 3, 229.124 1	柠檬苦素
25	26.74	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	373.128 1	373.128 3	0.1	343.081 1, 339.086 4, 357.097 0	异甜橙黄酮
26	27.02	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	779.457 6	779.458 7	1.3	617.406 3, 581.391 5, 542.353 0	柴胡皂苷 a
27*	27.28	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	449.457 6	779.456 4	-1.2	621.033 8, 521.108 7, 373.092 9	柴胡皂苷 b2
28	27.88	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	403.138 7	403.139 7	0.9	373.091 3, 369.097 8, 387.107 6	川陈皮素
29*	28.00	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	779.457 6	779.456 7	-0.9	669.317 1, 521.108 9, 315.254 2	柴胡皂苷 b1
30	28.69	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	249.148 5	249.148 4	-0.1	231.137 9, 203.143 1, 163.075 4	白术内酯 III
31	29.16	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	373.128 2	373.128 1	-0.1	343.080 8, 357.097 1, 339.086 6	橘皮素
32*	30.34	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	389.123 1	389.123 7	0.6	359.076 0, 341.065 8, 197.008 4	去甲川陈皮素
33	31.54	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	233.153 6	233.153 8	0.1	215.143 2, 187.148 2, 177.091 1	白术内酯 II
34	33.08	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	231.138 0	231.137 8	-0.1	213.127 6, 203.106 8, 185.132 6	白术内酯 I
35	34.81	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 0	455.364 5	2.5	425.339 7, 411.326 4, 437.361 7	熊果酸

*为根据数据库推测的化合物。

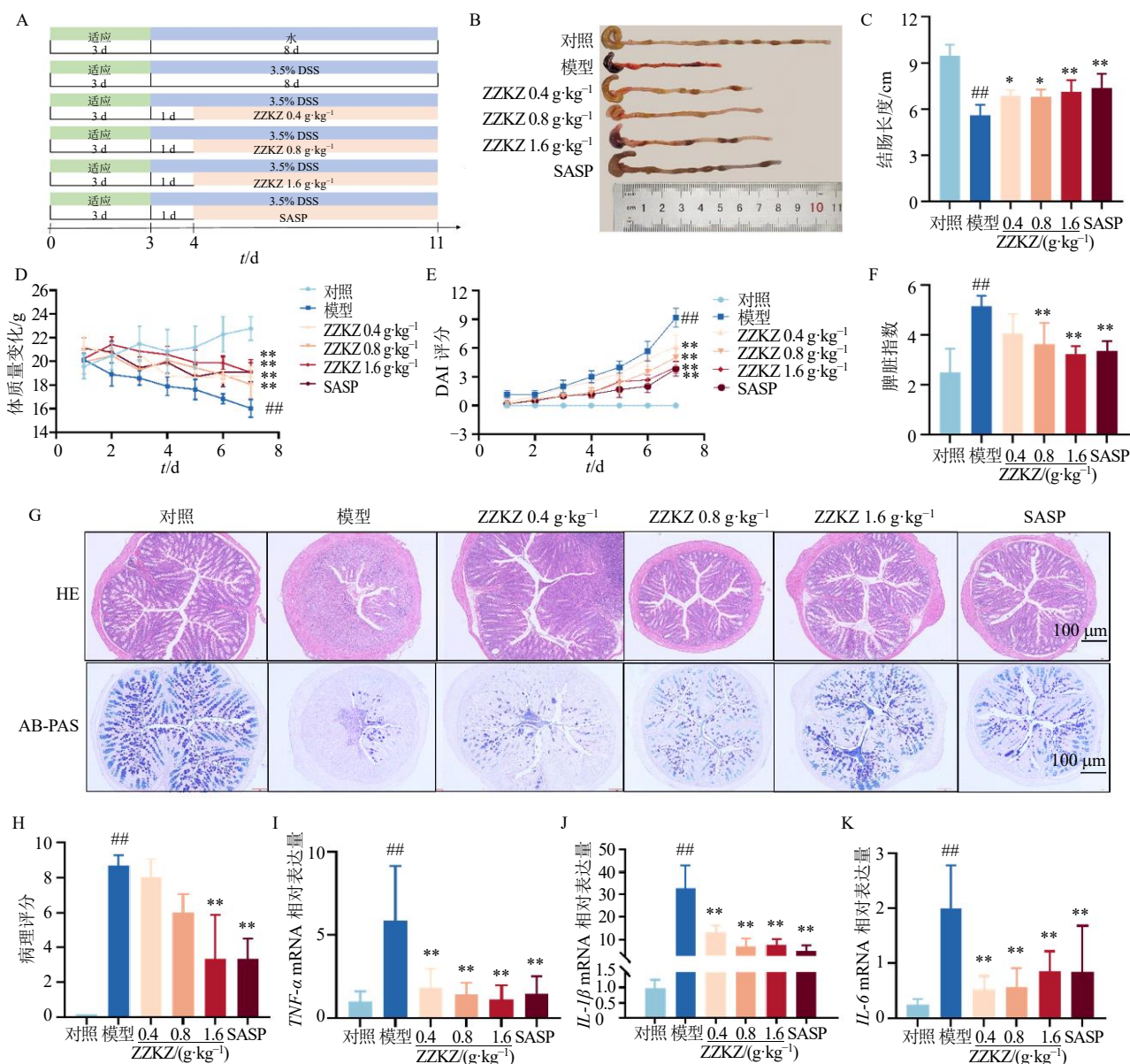
*Compounds predicted by a self-built database.

20 种黄酮(苷)类、5 种酚酸类、6 种三萜(皂苷)类、3 种倍半萜内酯和 1 种生物碱,其中 25 种成分经对照品比对确证结构。

3.2 ZZKZ 改善 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠损伤

小鼠自由饮用 3.5% DSS 溶液建立 UC 模型(图 2-A),考察 ZZKZ 对 UC 小鼠结肠损伤的改善作用。模型组小鼠表现出严重的体质量下降、腹泻和肠道出血;而 ZZKZ 治疗能够明显逆转小鼠结肠缩短和体质量下降(图 2-B~D, $P<0.05$ 、 0.01),降低 DAI 评分(图 2-E, $P<0.01$),并降低小鼠的脾脏指数(图 2-F, $P<0.01$)。HE 染色结果(图 2-G、H)显示,ZZKZ 治疗显著缓解了 UC 小鼠的结肠损伤,ZZKZ 高剂量组和 SASP 组小鼠的组织病理评分显

著降低($P<0.01$)。AB-PAS 染色常用于区分酸性黏液和中性黏液,显微镜下中酸性黏液呈蓝色,中性黏液呈紫红色,细胞核呈蓝色。AB-PAS 染色结果(图 2-G)显示,模型组小鼠结肠组织酸性黏液和中性黏液分泌明显减少;与模型组比较,ZZKZ 高剂量组和 SASP 组小鼠结肠组织酸性黏液和中性黏液分泌明显增加。炎症因子过度表达是 UC 的显著特征。如图 2-I~K 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 的基因表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠结肠组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 的基因表达水平平均显著降低($P<0.01$)。以上结果表明 ZZKZ 对 DSS 引起的肠道炎症具有保护作用。



A-实验流程图; B-小鼠结肠外观形态; C-小鼠结肠长度 ($n=6$); D-体质量变化 ($n=6$); E-DAI 评分 ($n=6$); F-脾脏指数 ($n=6$); G-结肠组织的 HE 染色和 AB-PAS 染色 ($\times 100$); H-结肠组织病理评分 ($n=3$); I~K-各组小鼠结肠组织中 *TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 的 mRNA 表达水平 ($n=6$); 与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与模型组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 图 3、8 同。

A-schematic diagram of experimental process; B-appearance and morphology of colon in mice; C-length of colon in mice ($n=6$); D-body weight change ($n=6$); E-DAI score ($n=6$); F-spleen index ($n=6$); G-HE staining and AB-PAS staining of colon tissue ($\times 100$); H-colonic histopathological score ($n=3$); I~K-mRNA expression levels of *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* in colon tissue of mice in each group ($n=6$); $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group, same as figs. 3, 8.

图 2 ZZKZ 改善 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠损伤 ($\bar{x} \pm s$)

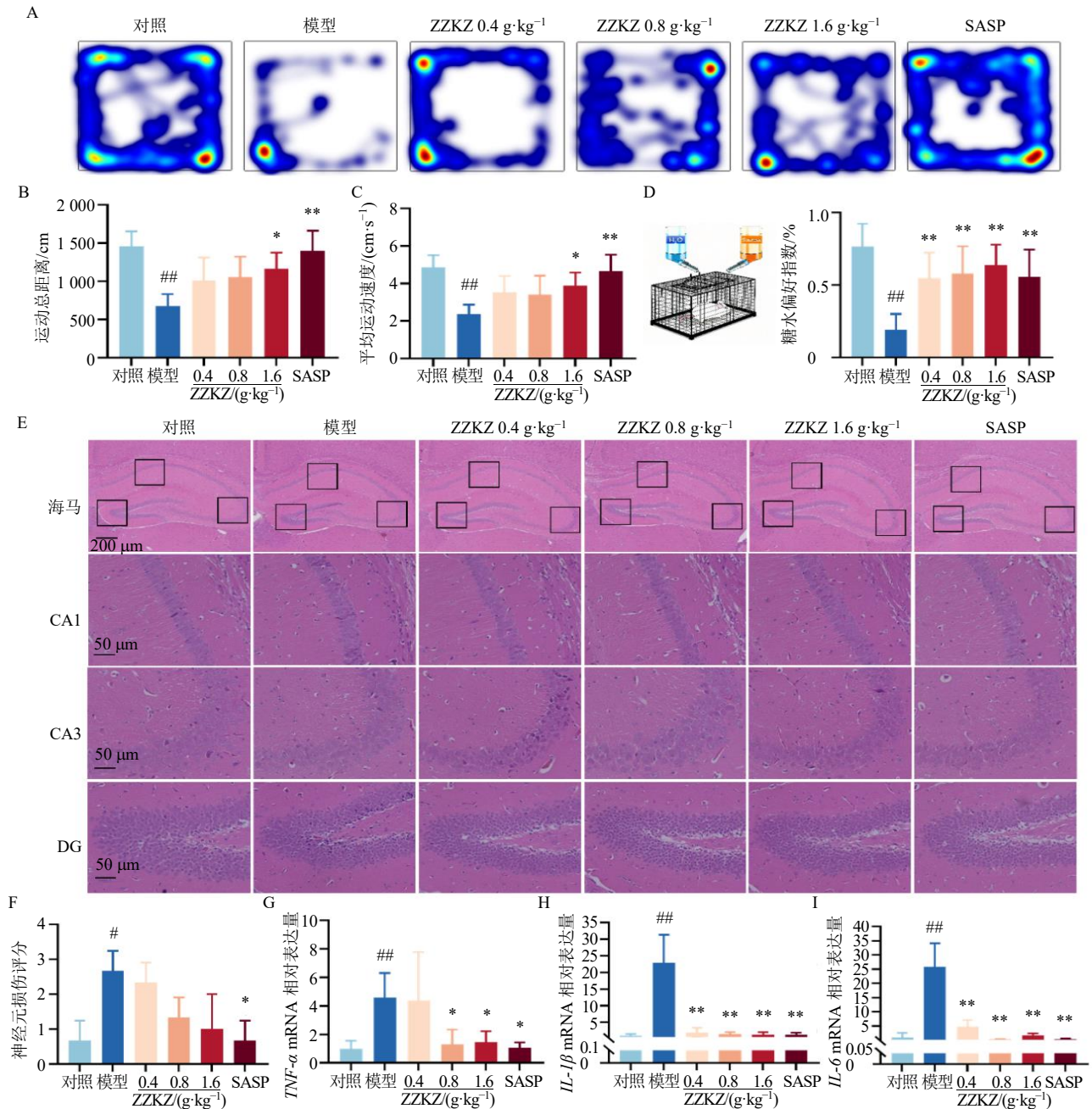
Fig. 2 ZZKZ improves DSS-induced colon injury in UC mice ($\bar{x} \pm s$)

3.3 ZZKZ 改善 DSS 诱导的 UC 小鼠抑郁样行为

对小鼠进行行为学测试以评估 UC 伴发的抑郁样行为及 ZZKZ 的干预效果。如图 3-A~C 所示, 在旷场实验中, 模型组小鼠的自发运动和探索行为均少于对照组, 表现为运动总距离和平均运动速度均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, ZZKZ 高剂量组和 SASP 组小鼠运动总距离和平均运动速度均

显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。如图 3-D 所示, 在糖水偏好实验中, 与对照组比较, 模型组小鼠的糖水偏好指数显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠的糖水偏好指数显著升高 ($P<0.01$)。行为学测试结果表明, ZZKZ 具有显著的抗抑郁作用, 可改善 UC 小鼠的快感缺乏和行为绝望。

HE 染色结果 (图 3-E、F) 显示, 对照组小鼠



A—C—旷场实验中的运动轨迹、运动总距离和平均运动速度 ($n=6$); D—糖水偏好实验示意图和糖水偏好指数 ($n=6$); E—小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区域病理切片放大图 ($\times 100$); F—海马神经元损伤评分 ($n=3$); G—I—小鼠脑组织中 *TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 的 mRNA 表达水平 ($n=3$)。A—C—motion trajectory, total distance and average velocity in open field test ($n=6$); D—schematic diagram of sucrose preference test and sucrose preference index ($n=6$); E—enlarged image of pathological sections in CA1, CA3 and DG regions of hippocampus in mice ($\times 100$); F—hippocampal neuron damage score ($n=3$); G—I—mRNA expression levels of *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* in brain tissue of mice ($n=3$).

图 3 ZZKZ 改善 DSS 诱导的 UC 小鼠抑郁样行为 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 ZZKZ improves DSS-induced depressive-like behaviors in UC mice ($\bar{x} \pm s$)

的海马神经元结构完整且排列有序，而模型组小鼠的齿状回 (dentate gyrus, DG)、CA1 和 CA3 亚区神经元染色明显加深，伴随神经元分散、核浓缩及部分核破坏与碎裂，海马神经元损伤评分显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，SASP 组受损海马神经

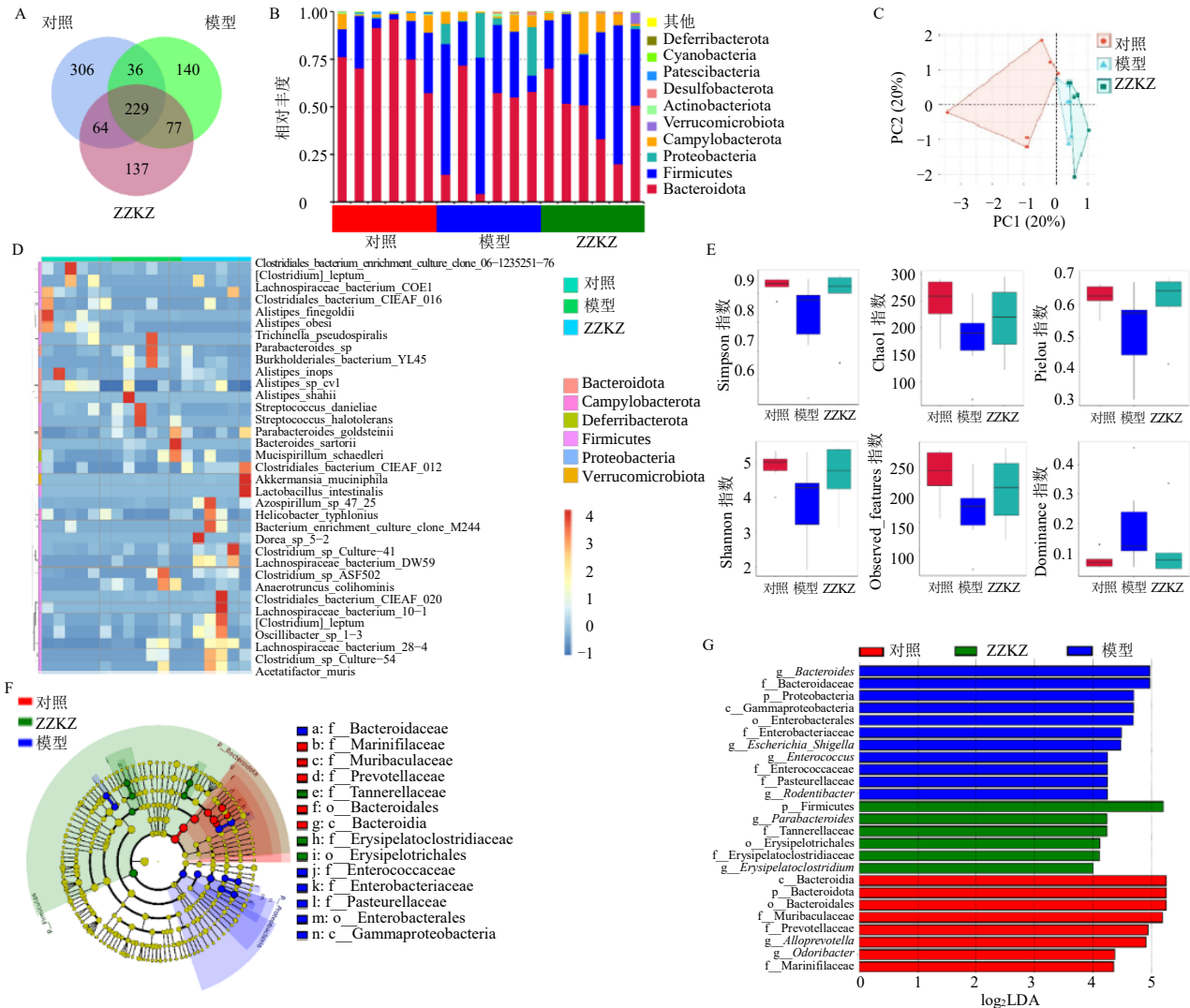
元得到修复 ($P<0.05$)，细胞水肿和空泡化减少；ZZKZ 各剂量组对海马神经元损伤均有不同程度的缓解，表明 ZZKZ 能够改善 DSS 诱导的 UC 小鼠海马组织病理损伤。如图 3-G~I 所示，与对照组比较，模型组小鼠脑组织 *TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 的基

因表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组脑组织 *IL-1 β* 和 *IL-6* 的基因表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), ZZKZ 中、高剂量组和 SASP 组脑组织 *TNF- α* 的基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.4 ZZKZ 对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群失调的影响

鉴于肠道微生物群与 UC 发病机制的关系密切, 缓解肠道菌群失调已成为 UC 潜在的新型治疗策略。通过基因测序分析, 评估 ZZKZ 对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群的影响。从对照组、模型组和 ZZKZ 高剂量组的粪便样本分析中, 共获得了 989

个 OTUs。Venn 图 (图 4-A) 显示 3 组共有 229 个核心 OTUs。其中, 对照组和 ZZKZ 高剂量组有 64 个独特 OTUs, 模型组和对照组有 36 个独特 OTUs。表明 ZZKZ 干预后的菌群结构更接近对照组, 且与正常小鼠相比, UC 导致 OTUs 数量减少。如图 4-B 所示, 在门水平上, 模型组表现出典型的菌群失调特征, 变形菌门 (Proteobacteria) 和弯曲杆菌 (Campylobacter) 的丰度显著升高, 而拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的丰度显著降低。然而, ZZKZ 干预明显逆转了上述菌群异常, 恢复了拟杆菌门的丰度。PCoA 和物种丰度聚类热图 (图 4-C、D) 证实,



A-对照组、模型组和 ZZKZ 高剂量组 OTUs 的韦恩图; B-各组门水平上的肠道菌群丰度; C-PCoA 图; D-各组物种丰度聚类热图; E- α 多样性箱线图; F-LEfSe 物种差异分析圆形分层图; G-各组肠道菌群 LDA 柱状图。

A-Venn diagram of OTUs in control group, model group and ZZKZ high-dose group; B-abundance of gut microbiota in each group at phylum level; C-PCoA diagram; D-cluster heatmap of species abundance in each group; E- α diversity boxplot; F-LEfSe species diversity analysis circular stratification diagram; G-LDA bar chart of intestinal microbiota in each group.

图 4 ZZKZ 对 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道菌群失调的影响 ($n = 6$)

Fig. 4 Effect of ZZKZ on DSS-induced intestinal dysbiosis in UC mice ($n = 6$)

ZZKZ 高剂量组菌群的整体分布与对照组更为相似。 α 多样性分析(图 4-E)显示,与对照组比较,模型组 Observed_features、Chao1、Shannon、Simpson 和 Pielou 指数降低, Dominance 指数升高;给予 ZZKZ 干预后, Observed_features、Chao1、Shannon、Simpson 和 Pielou 指数均升高, Dominance 指数降低。LEfSe 分析(图 4-F)确定了组间差异显著的菌群生物标志物,与对照组比较,模型组丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)和坦纳菌 *Tannerella* 的丰度显著升高;ZZKZ 干预后其丰度显著降低。LDA 结果(图 4-G)显示,有害菌变形菌门(*Proteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)在模型组中显著富集,而有益菌厚壁菌门(*Firmicutes*)和副杆

菌属 *Parabacteroides* 在对照组和 ZZKZ 高剂量组中显著富集。以上结果表明,ZZKZ 干预后小鼠肠道菌群的组成和多样性指数更接近正常状态,ZZKZ 逆转了 UC 病理状态导致的微生物丰富度和均匀度的下降,重建肠道微生态平衡,缓解肠道炎症。

3.5 血清代谢组学分析结果

采用 UPLC-HRMS 分析血清代谢物谱,探讨 ZZKZ 调控的代谢途径和潜在机制。由于代谢物的复杂性,单独使用无监督方法主成分分析(principal component analysis, PCA)可能无法实现有效区分。因此,采用有监督方法偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。PLS-DA 和聚类分析结果(图 5-A~D)显示,ZZKZ 高

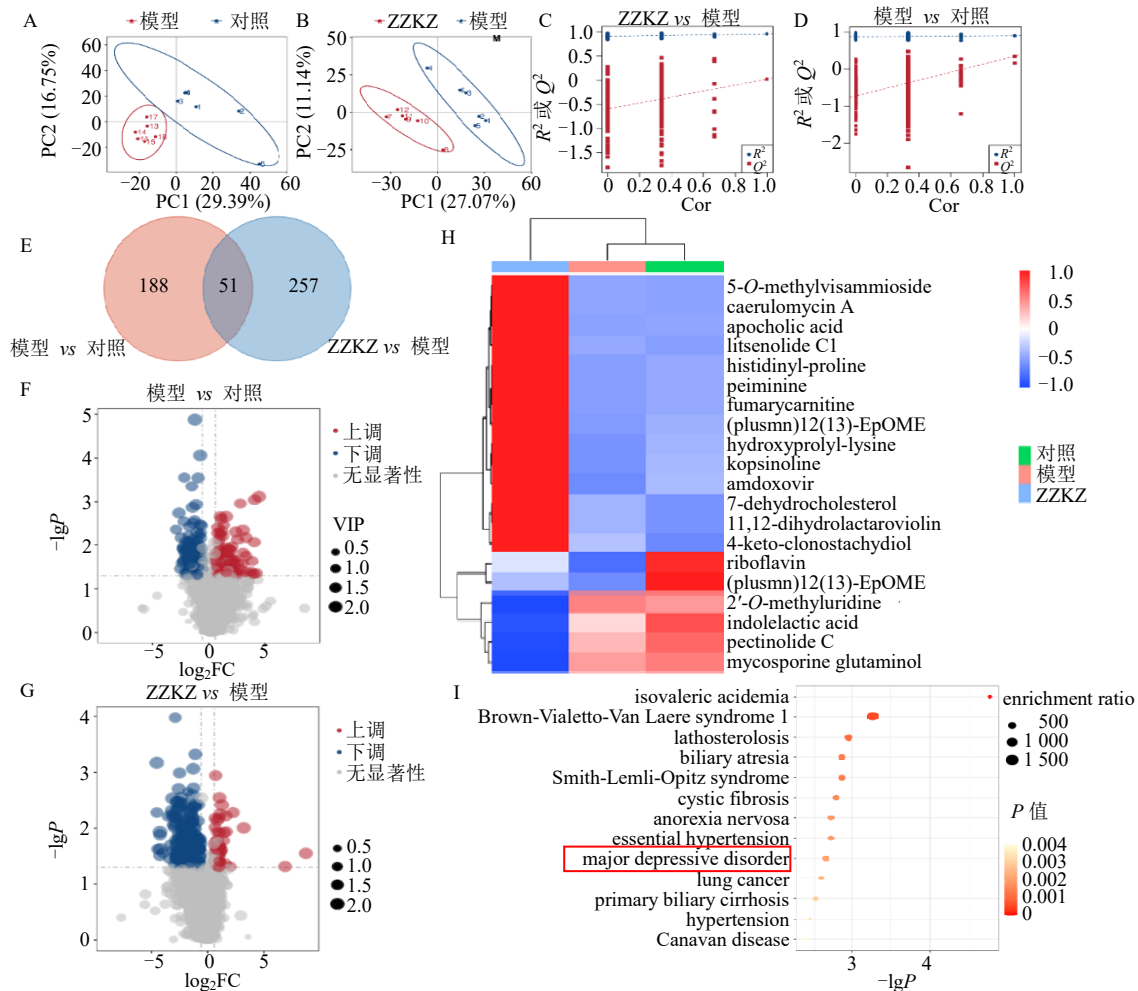


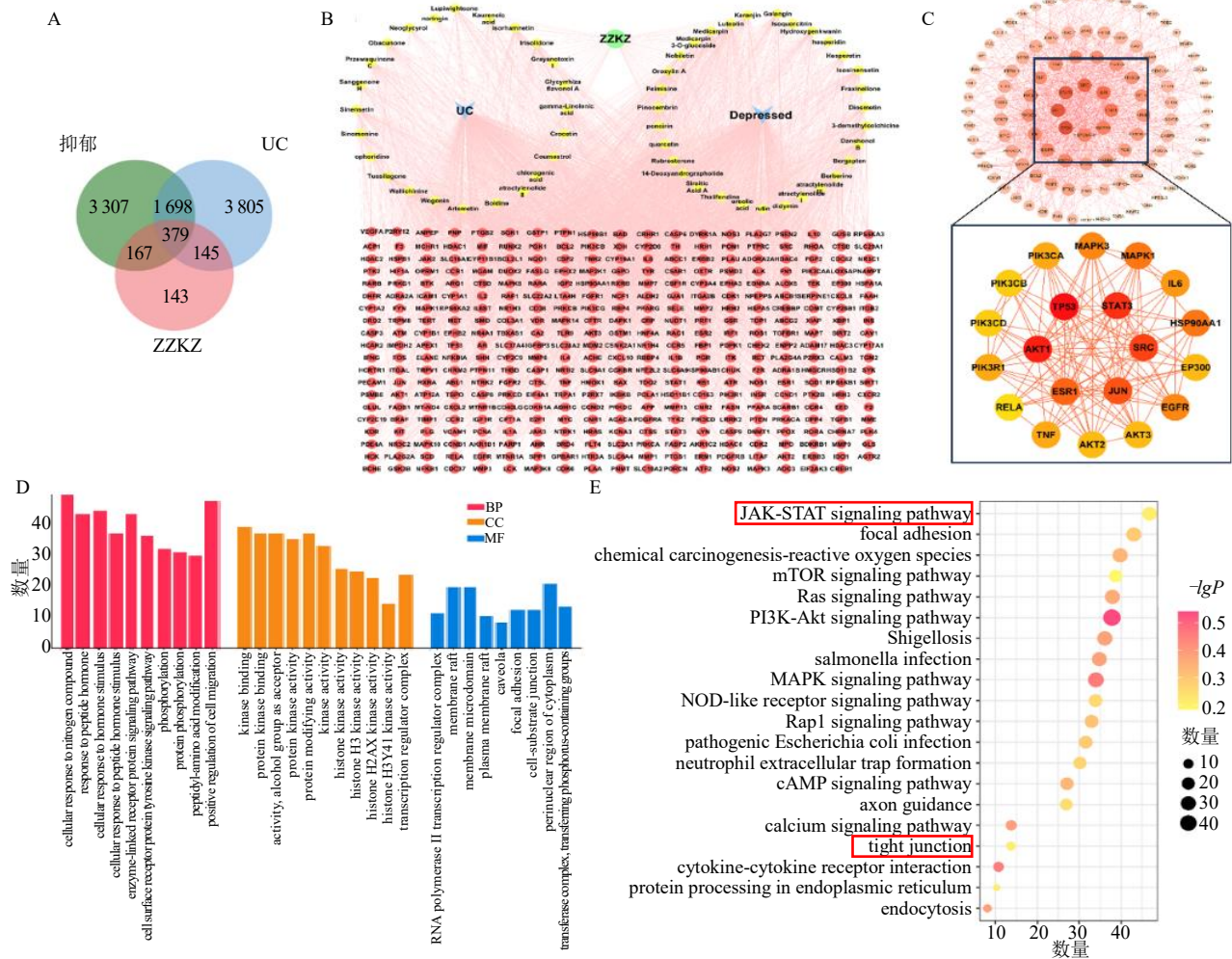
图 5 ZZKZ 对 DSS 诱导的 UC 小鼠血清代谢物的影响 ($n = 6$)
Fig. 5 Effect of ZZKZ on DSS-induced serum metabolites in UC mice ($n = 6$)
A、C、F-对照组 vs 模型组的 PLS-DA 图、置换检验及差异代谢物火山图; B、D、G-ZZKZ 高剂量组 vs 模型组的 PLS-DA、置换检验和差异代谢物火山图; E-对照组 vs 模型组与 ZZKZ 高剂量组 vs 模型组差异代谢物 Venn 图; H-各组差异代谢物热图; I-共有差异代谢物富集分析。
A, C, F-PLS-DA plot, displacement test and differential metabolite volcano plot in control group vs model group; B, D, G-PLS-DA, displacement test and differential metabolite volcano plot in ZZKZ high-dose group vs model group; E-Venn plot of differential metabolites between control group vs model group and ZZKZ high-dose group vs model group; H-differential metabolite heatmap in each group; I-enrichment analysis of common differential metabolites.

剂量组和模型组之间存在显著差异,且ZZKZ高剂量组与对照组相似,表明ZZKZ对UC具有缓解作用。置换检验结果显示,PLS-DA模型有效,没有过拟合。Venn图(图5-E)显示,3组共有496种代谢物,其中对照组 vs 模型组与ZZKZ高剂量组 vs 模型组有51种共同的差异代谢物,主要是甘油磷脂、脂肪酰基和鞘脂,表明脂质代谢紊乱是结肠炎的关键代谢特征之一。基于变量投影重要性(variable importance in projection, VIP) > 1.0和 $P < 0.05$ 的标准,结合正、负离子模式,在对照组 vs 模型组中鉴定出239种差异代谢物(图5-F),其中111种上调和128种下调;在模型组与ZZKZ高剂量组中鉴定出308种差异代谢物(图5-G),其中54种上调和254种下调,反映了UC小鼠和健康小鼠血清代谢物丰度的差异。代谢物热图(图5-H)显

示,与模型组比较,ZZKZ高剂量组2'-O-甲基尿苷、吡啶乳酸、果胶内酯C和霉菌孢菌素谷氨酰胺醇水平升高,5-O-甲基维斯明苷、原胆酸、组氨酰脯氨酸、羟脯氨酰赖氨酸、7-脱氢胆固醇等水平降低。差异代谢物的富集分析(图5-I)显示,显著富集的通路包括重度抑郁障碍相关通路、胆汁酸和不饱和脂肪酸的生物合成与代谢通路,均与UC和抑郁高度相关。

3.6 网络药理学分析结果

通过筛选共获得了55种ZZKZ的活性成分。对各中药对应的靶点进行筛选和去重后,获得了834个ZZKZ活性成分的潜在靶点。检索结果显示,UC有6027个靶点,抑郁有5551个靶点。通过整合ZZKZ活性成分的预测基因与UC和抑郁相关基因,共鉴定出379个潜在治疗靶点(图6-A)。使用



A-Venn图; B-“药物-成分-靶点-疾病”网络; C-PPI网络; D-GO功能富集分析结果(前10); E-KEGG通路富集分析结果(前20)。

A-Venn diagram; B-“drug-ingredient-target-disease” network; C-PPI network; D-GO function enrichment analysis results (top 10); E-KEGG pathway enrichment analysis results (top 20).

图6 网络药理学结果

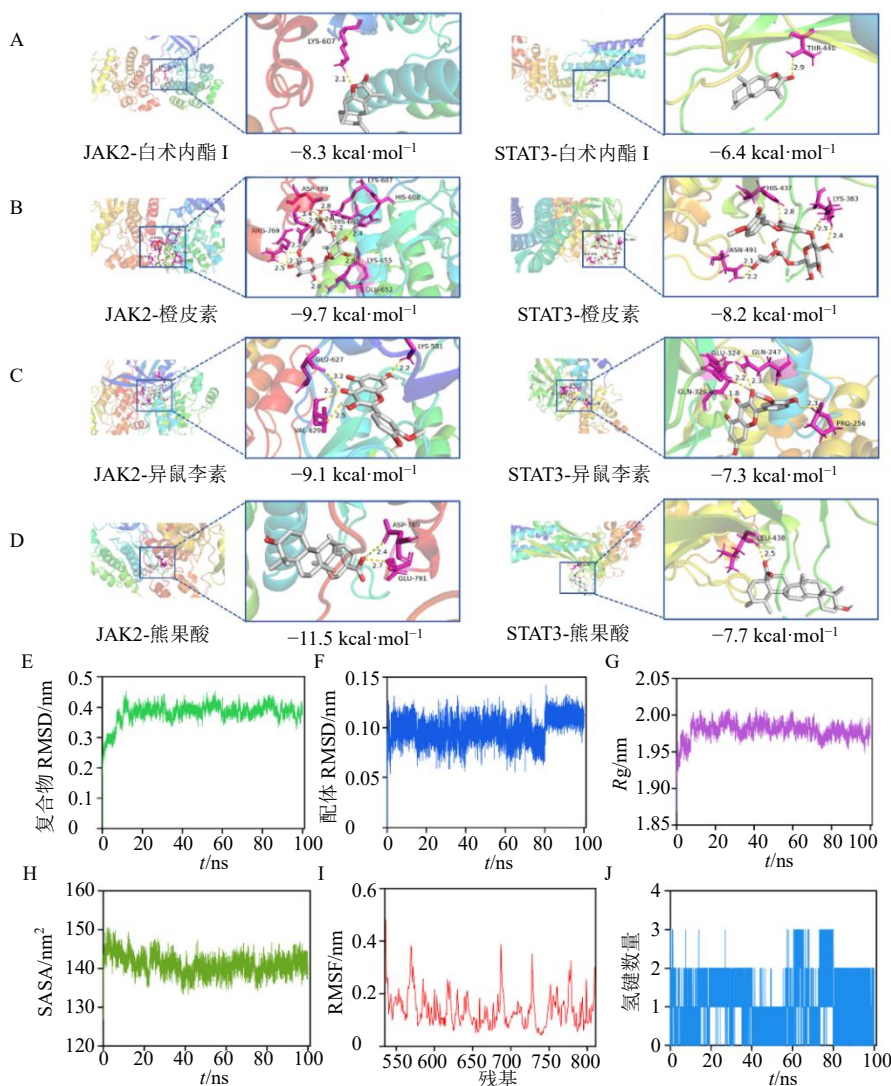
Fig. 6 Results of network pharmacology

Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络（图 6-B），该网络由 437 个节点和 2 970 条边组成。PPI 网络图包含 313 个节点和 1 692 条边，表明相交基因之间存在相互作用关系，通过度值对前 20 个基因进行排序，结果见图 6-C。GO 分析获得 1 937 个 BP 条目、77 个 CC 条目和 169 个 MF 条目，BP 条目涉及对激素刺激的细胞反应、细胞表面受体连接的蛋白质酪氨酸激酶信号通路等，CC 条目与膜筏和膜微结构域相关，MF 条目涉及受体-配体活性、蛋白激酶激活活性和组蛋白激酶活性。每个类别中 *P* 值最小的前 10 个条目见图 6-D。KEGG

富集分析共获得 201 条通路。使用气泡图可视化前 20 条 KEGG 通路（图 6-E），涉及 JAK/STAT 信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）信号通路和紧密连接等。

3.7 分子对接与分子动力学模拟结果

分子对接结果通常伴随着较大的不确定性，而分子动力学模拟可以通过计算机模拟验证对接结果，从而提供更准确的构象。将关键靶点 JAK2 和 STAT3 分别与 4 种主要活性成分（白术内酯 I、橙皮素、熊果酸和异鼠李素）进行对接，使用 PyMOL 软件进行可视化（图 7-A~D）。所有配体-靶点复合



A~D-4 种主要活性成分与 JAK2、STAT3 的分子对接图 ($1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}=4.182 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)；E-复合物的 RMSD 曲线；F-熊果酸的 RMSD 曲线；G-复合物的 Rg 曲线；H-SASA 曲线；I-蛋白质的 RMSF 曲线；J-氢键变化曲线。
A—D-molecular docking diagrams of four main active ingredients with JAK2 and STAT3 ($1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} = 4.182 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)；E-RMSD curve of complex；F-RMSD curve of ursolic acid；G-Rg curve of complex，H-SASA curve；I-RMSF curve of protein；J-hydrogen bond variation curve.

图 7 分子对接和分子动力学模拟结果

Fig. 7 Results of molecular docking and molecular dynamics simulation

物的结合自由能 ≤ -6 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 表明这些相互作用具有高稳定性。以上活性成分与靶点之间的相互作用已有报道, 如白术内酯 I 通过恢复肠道屏障功能障碍缓解 UC, 熊果酸通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 缓解 UC, 橙皮素通过阻断受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 3 (receptor interacting serine threonine kinase 3, RIPK3) /混合谱系激酶样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 的表达保护屏障^[21-23]。

选择结合能较低的熊果酸进行分子动力学模拟, 如图 7-E 所示, 复合物的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 在前 10 ns 内迅速上升后趋于稳定, 整体维持在 $0.35 \sim 0.40$ nm, 表明复合物在初期经历了一定的构象调整以达到能量平衡, 此后体系结构保持稳定。配体 RMSD 稳定在 $0.05 \sim 0.12$ nm (图 7-F), 无明显漂移或突变, 表明配体在结合位点内保持相对固定的位置, 没有发生显著的构象重排或脱离。如图 7-G 所示, 回转半径 (radius of gyration, Rg) 值在 $1.95 \sim 2.00$ nm 波动, 且无明显上升趋势, 表明蛋白在模拟过程中未发生显著的松弛或塌陷, 构象紧密稳定。溶剂可及表面积 (solvent-accessible surface area, SASA) 稳定在 $135 \sim 145$ nm² (图 7-H), 无剧烈波动, 表明体系在模拟过程中溶剂可及性恒定, 复合物的构象及表面暴露区域稳定。大部分残基均方根波动 (root mean square fluctuation,

RMSF) 在 $0.10 \sim 0.25$ nm (图 7-I), 仅少数区域 (如 N/C 端或环区) 达到 $0.3 \sim 0.4$ nm, 整体波动较小, 表明主链结构稳定, 仅柔性环区存在正常构象运动。氢键数量在 $1 \sim 3$ 个动态波动 (图 7-J), 且在整个 100 ns 过程中均有稳定存在, 表明配体与蛋白之间形成了持续的氢键网络。MM/PBSA 计算表明 JAK2-熊果酸复合物的结合自由能 (-26.51 kcal/mol) 显著为负, 表明配体与蛋白之间结合稳定、亲和力强。范德华力 (-36.94 kcal/mol) 是主要的驱动因素, 体现疏水相互作用的重要性。静电作用 (-15.67 kcal/mol) 提供了额外的结合稳定性。尽管极性溶剂化能带来一定能量惩罚 (30.86 kcal/mol), 但总体结合自由能仍表现为强烈有利。上述结果初步证实了 JAK2 与熊果酸之间的结合相对稳定, 推测其可能是 ZZKZ 发挥治疗作用的主要活性成分之一。

3.8 ZZKZ 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路改善 UC 小鼠的肠道屏障损伤

肠黏膜损伤常伴有肠道屏障破坏和炎症反应。紧密连接蛋白是维持肠道屏障完整性的重要结构, ZO-1、Occludin 和 Claudin 是其中 3 种主要蛋白, 在维持肠道屏障功能方面发挥着核心作用。JAK-STAT 信号通路是一种应激诱导的炎症通路, 其激活后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平升高。采用 Western blotting 检测紧密连接蛋白和 JAK2/STAT3 通路相关蛋白的表达, 结果如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1 和

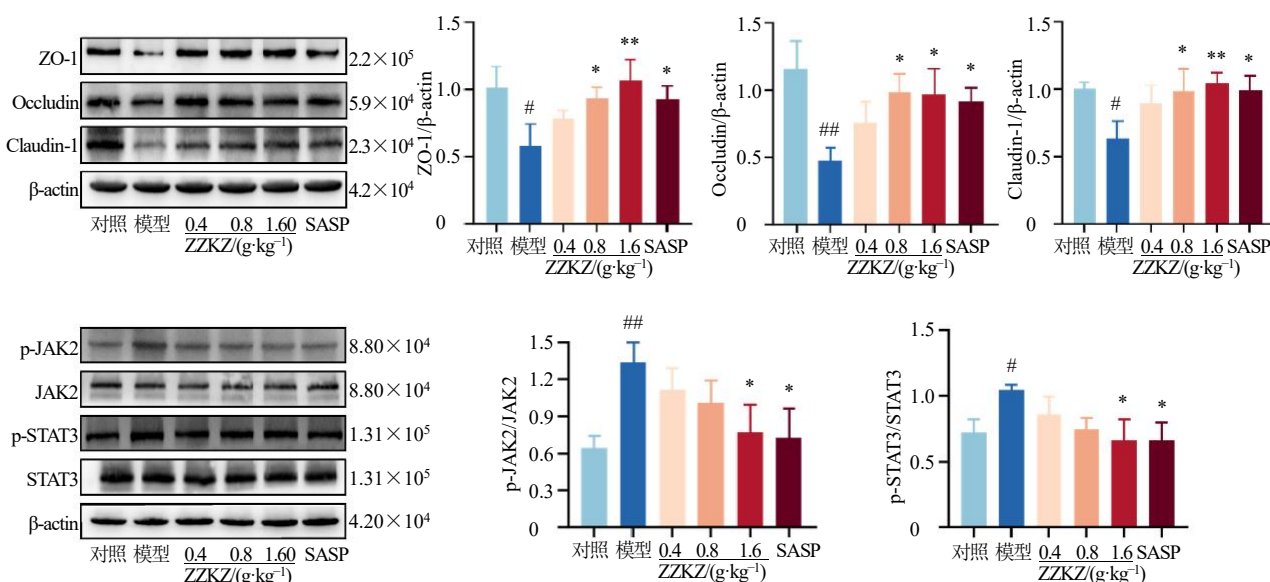


图 8 ZZKZ 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路改善 UC 小鼠的肠道屏障损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 ZZKZ improves intestinal barrier damage in UC mice by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Claudin-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，ZZKZ 中、高剂量组和 SASP 组 Occludin、ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，ZZKZ 高剂量组和 SASP 组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，表明 ZZKZ 可能通过抑制 JAK2/STAT3 通路的激活来缓解 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道屏障损伤。

4 讨论

UC 在中医体系中可归入“痢疾”“肠癖”等病证范畴，其病位在大肠，核心在脾胃，病程缠绵，患者常伴有焦虑、抑郁等情志障碍，对应中医“郁证”。UC 合并焦虑抑郁的发病机制，以及情志因素在 UC 发生发展中的作用尚不明确。但流行病学调查显示 UC 患者中抑郁、焦虑等精神障碍的患病率显著升高，而精神类药物作为 UC 的辅助治疗，在临床实践中已取得一定疗效，提示肠道和中枢之间存在双向交互作用^[20]。相对于化学药的单一靶点治疗，中药特有的多成分、多靶点和多途径的作用模式不仅能治疗 UC，还能缓解其并发症。ZZKZ 虽非治疗 UC 的传统方剂，但其“健脾和胃、理气消痞”的功效与 UC 脾虚气滞和湿热阻滞的核心病机高度契合。方中白术健脾燥湿、枳实理气消滞、柴胡升清疏肝、山楂化瘀导滞，兼顾 UC 伴发的情志不舒，体现了“消补兼施、调畅气机”的治疗思路。本研究证实，ZZKZ 可通过调节 JAK2/STAT3 通路和肠道菌群来改善 UC 病理损伤和肠黏膜屏障，同时缓解并发的抑郁症状，揭示 ZZKZ 可作为 UC 伴抑郁的辅助治疗手段。

肠道菌群失调和代谢紊乱在 UC 和精神障碍中都起着重要作用。肠道菌群失调是 UC 的一个核心特征，通常表现为微生物多样性降低和组成失衡，进而诱发肠黏膜损伤^[24-25]。本研究中，模型组变形菌门丰度升高和拟杆菌门丰度降低，与 UC 患者门水平菌群失调的特征高度一致^[26]。研究发现，补充乳酸杆菌等益生菌可以通过影响小鼠的肠道屏障功能和肠道菌群来缓解 UC，而通过 FMT 调节肠道菌群及其代谢产物可能对 UC 患者有益^[27]。本研究结果显示，ZZKZ 干预可以富集厚壁菌门和副杆菌属等有益菌。值得注意的是，厚壁菌门内的乳酸杆菌属可以降低 UC 的发病率^[28]。此外，越来越多的证据支持补充益生菌在临床人群中减少焦虑和抑

郁症状的有效性。在动物实验中，乳酸杆菌降低了应激诱导的皮质酮水平以及焦虑和抑郁相关行为^[29]。ZZKZ 降低了丹毒丝菌目等有害菌的丰度，通过双向调节修复菌群失调，为肠道黏膜屏障的保护奠定了基础，这与文献报道一致^[30]。

肠道菌群失调可以通过“菌群-代谢物-神经内分泌”轴干扰中枢神经系统并诱导抑郁样行为。本研究发现 ZZKZ 调控的关键差异代谢物主要靶向该轴的 2 个关键通路：①在色氨酸代谢衍生的吲哚通路中，由肠道细菌产生的色氨酸代谢物 3-吲哚乳酸，激活肠道上皮细胞中的芳香烃受体信号以缓解 DSS 诱导的结肠炎，3-吲哚乳酸还增加了血清 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和犬尿喹啉酸水平，改善下丘脑-垂体-肾上腺轴功能障碍，上调脑源性神经营养因子的表达，并通过催产素信号减少小鼠的抑郁样行为^[31-33]。②在胆汁酸信号通路中，肝脏合成的胆酸被肠道菌群转化为次级胆汁酸 (secondary bile acid, SBAs)，其中由 7 α -脱羟菌产生的脱氧胆酸和石胆酸水平升高是菌群代谢失调的标志，补充 SBAs 可以通过武田 G 蛋白偶联受体 5 (takeda G protein-coupled receptor 5, TGR5) 发挥抗炎作用，改善 UC 患者因菌群失调引起的 SBA 缺乏和肠道促炎状态^[34]。其中，胆汁酸代谢的改善可以减少其对肠黏膜的毒性损伤，不饱和脂肪酸代谢的平衡有助于维持肠道上皮细胞膜的完整性^[35]。胆汁酸代谢物如牛磺胆酸和脱氧胆酸也可以逆转 5-HT 代谢失衡，缓解抑郁样行为^[36]。益生菌可以通过合成 B 族维生素来调节肠道功能和代谢紊乱，是抑郁免疫代谢表型的潜在治疗方法^[37]。结合行为学测试结果，上述机制可能参与了 ZZKZ 对 UC 小鼠抑郁样行为的改善。

通过网络药理学分析从 ZZKZ 中筛选出白术内酯 I、橙皮素、熊果酸和异鼠李素 4 种活性成分，作为其抗 UC 作用的代表性化合物，这 4 种成分为相关药材的代表性成分，且被预测可作用于 JAK2/STAT3 信号通路及相关紧密连接蛋白的调控网络。本研究将 JAK2/STAT3 信号通路作为探究 ZZKZ 抗 UC 作用潜在机制的主要靶点。作为转录因子的核心通路，JAK2/STAT3 信号通路在调节炎症稳态中起着关键作用，并参与与促炎细胞因子介导的肠黏膜病理反应。JAK 激活可以促进效应记忆 T 细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 等促炎因子，促进 STAT3 核转位以调节炎症基因的表达，加重肠黏膜组织损

伤^[38]。反之,抑制 JAK2/STAT3 通路的转导可以发挥抗炎作用,并重塑 UC 小鼠受损的肠黏膜屏障^[39]。分子对接结果表明白术内酯 I、橙皮素、熊果酸和异鼠李素均可与 JAK2、STAT3 蛋白稳定结合,其中熊果酸与 JAK2 结合能最低,橙皮素与 STAT3 结合能最低。然而分子对接局限于将蛋白和配体视为刚性或半柔性结构,难以真实反映结合过程中的构象动态变化与结合稳定性,而分子动力学模拟则通过引入时间维度与原子级柔性的运动轨迹,能够更先进地评估复合物在生理环境下的动态结合模式、结合自由能及关键相互作用持续性。以与 JAK2 结合能最低的熊果酸为例,分子动力学模拟进一步验证了熊果酸在 JAK2 结合位点具有稳定动态结合特性,而其通过调控 JAK/STAT 信号通路发挥抗 UC 作用已在果蝇和小鼠等动物模型中得到验证^[21,40]。Western blotting 结果表明,ZZKZ 缓解 UC 小鼠的结肠缩短症状和结肠组织病理损伤,可能是通过抑制 p-JAK2 和 p-STAT3 的蛋白表达并上调紧密连接蛋白表达实现的。

综上,ZZKZ 通过重塑肠道菌群、调节多种代谢通路以及 JAK2/STAT3 等炎症通路等多层机制以改善肠道和中枢功能。然而本研究也存在一定的局限性,由于 ZZKZ 是复方制剂,成分复杂,药理机制多样,尚不明确哪些活性成分在体内起关键作用。DSS 诱导的 UC 作为急性疾病模型,造模和给药时间较短不利于 ZZKZ 抗抑郁效果的充分发挥。此外,UC 的发病机制涉及多种信号通路,但本研究仅关注了 JAK2/STAT3 通路,其他信号通路的调节作用仍有待深入探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] Mikocka-Walus A, Knowles S R, Keefer L, et al. Controversies revisited: A systematic review of the comorbidity of depression and anxiety with inflammatory bowel diseases [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(3): 752-762.
- [3] Zhao B T, Wu J B, Li J H, et al. Lycopene alleviates DSS-induced colitis and behavioral disorders via mediating microbes-gut-brain axis balance [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(13): 3963-3975.
- [4] Gandhi S, Jedel S, Hood M M, et al. The relationship between coping, health competence and patient participation among patients with inactive inflammatory bowel disease [J]. *J Crohn's Colitis*, 2014, 8(5): 401-408.
- [5] Huang M C, Lan M Y, Liu X, et al. Isolinderalactone regulates macrophage polarization and efferocytosis by activating the LXRA pathway against ulcerative colitis [J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 152.
- [6] Deng B Y, Wang K P, He H D, et al. Biochanin A mitigates colitis by inhibiting ferroptosis-mediated intestinal barrier dysfunction, oxidative stress, and inflammation via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156699.
- [7] Chen X Y, Zhao H Y, Lu Y J, et al. Surfactin mitigates a high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes through improving pancreatic dysfunction and inhibiting inflammatory response [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11086.
- [8] Joo M K, Lee J W, Woo J H, et al. Regulation of colonic neuropeptide Y expression by the gut microbiome in patients with ulcerative colitis and its association with anxiety-and depression-like behavior in mice [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2319844.
- [9] Zhou M F, Fan Y C, Xu L T, et al. Microbiome and tryptophan metabolomics analysis in adolescent depression: Roles of the gut microbiota in the regulation of tryptophan-derived neurotransmitters and behaviors in human and mice [J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 145.
- [10] Karimzadeh Z, Azizzadeh Forouzi M, Rahiminezhad E, et al. The effects of lavender and *Citrus aurantium* on anxiety and agitation of the conscious patients in intensive care units: A parallel randomized placebo-controlled trial [J]. *BioMed Res Int*, 2021, 2021: 5565956.
- [11] Li Q F, Lu W T, Zhang Q, et al. Proprietary medicines containing *Bupleurum chinense* DC. (Chaihu) for depression: Network Meta-analysis and network pharmacology prediction [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 773537.
- [12] Wang R J, Zhou G S, Wang M Y, et al. The metabolism of polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* Koidz and its effect on intestinal microflora [J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2014, 2014: 926381.
- [13] Tadić V M, Dobrić S, Marković G M, et al. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7700-7709.
- [14] Yang S H, Zhang J L, Yan Y Q, et al. Network pharmacology-based strategy to investigate the pharmacologic mechanisms of *Atractylodes macrocephala* Koidz. for the treatment of chronic gastritis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1629.
- [15] Xiao Y L, Li Y W, Shu J C, et al. The efficacy of oral Zhizhu Kuanzhong, a traditional Chinese medicine, in patients with postprandial distress syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 34(3): 526-531.

- [16] Zhang C X, Guo L K, Guo X F, *et al.* Clinical curative effect of electroacupuncture combined with Zhizhukuanzhong Capsules for treating gastroesophageal reflux disease [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(3): 364-371.
- [17] Wang Q Q, Cheng L, Wu B Y, *et al.* Stigma and efficacy of Zhizhu Kuanzhong Capsules versus doxepin in the treatment of refractory functional dyspepsia: A randomized controlled trial [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2023, 29(3): 360-369.
- [18] He W, Zhang Y, Wang X R, *et al.* Zhizhu Decoction promotes gastric emptying and protects the gastric mucosa [J]. *J Med Food*, 2013, 16(4): 306-311.
- [19] Moniruzzaman M, Shah A, Morrison M, *et al.* Mechanisms of action and clinical effectiveness of herbal treatments for disorders of gut-brain interaction [J]. *Dig Liver Dis*, 2025, 57(9): 1717-1729.
- [20] Liu W J, Zhong X L, Yi Y, *et al.* Prophylactic effects of betaine on depression and anxiety behaviors in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(38): 21041-21051.
- [21] Gao Z X, Yu X C, *et al.* Atractylenolide-1 alleviates ulcerative colitis via restraining RhoA/ROCK/MLC pathway-mediated intestinal barrier dysfunction [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(21): 12690-12701.
- [22] Wei T, Wu L, Ji X W, *et al.* Ursolic acid protects sodium dodecyl sulfate-induced *Drosophila* ulcerative colitis model by inhibiting the JNK signaling [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 426.
- [23] Zhang J X, Lei H B, Hu X, *et al.* Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK3/MLKL necroptosis signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992.
- [24] Guo P L, Wang W J, Xiang Q, *et al.* Engineered probiotic ameliorates ulcerative colitis by restoring gut microbiota and redox homeostasis [J]. *Cell Host Microbe*, 2024, 32(9): 1502-1518.
- [25] 张欣然, 王艺璇, 陈嘉屿. 肠道菌群-肠道屏障互作在溃疡性结肠炎中的作用及中医药干预研究进展 [J]. *中草药*, 2026, 57(16): 6632-6646.
- [26] Fang H M, Fu L, Li X J, *et al.* Long-term efficacy and safety of monotherapy with a single fresh fecal microbiota transplant for recurrent active ulcerative colitis: A prospective randomized pilot study [J]. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 18.
- [27] Bethlehem L, Estevinho M M, Grinspan A, *et al.* Microbiota therapeutics for inflammatory bowel disease: The way forward [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 9(5): 476-486.
- [28] Zhou C, Peng B, Zhang M X, *et al.* Ganjiang Huangqin Huanglian Renshen Decoction protects against ulcerative colitis by modulating inflammation, oxidative stress, and gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156172.
- [29] Bravo J A, Forsythe P, Chew M V, *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(38): 16050-16055.
- [30] Xue S G, Xue Y, Dou D B, *et al.* Kui Jie Tong ameliorates ulcerative colitis by regulating gut microbiota and NLRP3/Caspase-1 classical pyroptosis signaling pathway [J]. *Dis Markers*, 2022: 2782112.
- [31] Li M M, Han X, Sun L J, *et al.* Indole-3-acetic acid alleviates DSS-induced colitis by promoting the production of R-equol from *Bifidobacterium pseudolongum* [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2329147.
- [32] Qian X, Li Q, Zhu H Y, *et al.* Bifidobacteria with indole-3-lactic acid-producing capacity exhibit psychobiotic potential via reducing neuroinflammation [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(11): 101798.
- [33] Xue C, Li G L, Zheng Q X, *et al.* Tryptophan metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(8): 1304-1326.
- [34] Sinha S R, Haileselassie Y, Nguyen L P, *et al.* Dysbiosis-induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(4): 659-670.
- [35] Zhou R, Huang K W, Chen S M, *et al.* Zhilining Formula alleviates DSS-induced colitis through suppressing inflammation and gut barrier dysfunction via the AhR/NF- κ B p65 axis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155571.
- [36] Xie X X, Li W W, Xiong Z, *et al.* Metformin reprograms tryptophan metabolism via gut microbiome-derived bile acid metabolites to ameliorate depression-like behaviors in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2025, 123: 442-455.
- [37] Śliwiński W, Gawlik-Kotelnicka O. Circulating B vitamins metabolites in depressive disorders-connections with the microbiota-gut-brain axis [J]. *Behav Brain Res*, 2024, 472: 115145.
- [38] Zou S L, Tong Q Y, Liu B W, *et al.* Targeting STAT3 in cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 145.
- [39] Bao X D, Tang Y Y, Lv Y S, *et al.* *Tetragium hemsleyanum* polysaccharide ameliorated ulcerative colitis by remodeling intestinal mucosal barrier function via regulating the SOCS1/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 137: 112404.
- [40] Sheng Q S, Li F, Chen G P, *et al.* Ursolic acid regulates intestinal microbiota and inflammatory cell infiltration to prevent ulcerative colitis [J]. *J Immunol Res*, 2021: 6679316.

[责任编辑 李亚楠]