

基于网络药理学和动物验证探究佛手对胃黏膜损伤的保护作用

伍沛君, 聶沁馨, 贺亚丽, 肖志健, 梁怡, 陈康, 夏荃, 汪金玉*
(广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006)

摘要: **目的** 通过网络药理学方法、分子对接技术和体内动物实验验证, 探究佛手炮制前后对胃黏膜保护作用的机制及药效差异。**方法** 将课题组前期分析得到的佛手蒸制前后差异成分通过 SwissADME 平台进行类药性和口服生物利用度筛选, 并对筛选后的潜在活性成分进行靶点预测; 通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库查找与胃溃疡疾病相关的靶点, 并利用 jvenn 网站将成分靶点和疾病靶点取交集。利用 Cytoscape 软件对交集靶点进行蛋白质互作 (PPI) 网络的构建及拓扑分析, 筛选出关键靶点; 借助 Metascape 数据分析平台对潜在靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并采用 Autodock 等软件对关键成分和关键靶点进行分子对接验证。选择乙醇致胃溃疡大鼠模型对关键靶点进行验证。**结果** 从佛手蒸制前后的 43 种差异成分中筛选得到 24 种潜在活性成分, 涉及 Akt1、CASP3、PI3K、MMP9 等 20 个核心靶点, 靶点蛋白富集的通路主要为 TNF 信号通路。分子对接结果显示, 核心成分和核心靶点均有较好的结合能力。动物实验结果表明, 佛手可改善乙醇致胃黏膜损伤大鼠胃组织损伤情况, 制佛手的保护作用优于生佛手; 并能升高 NO、EGF、MUC5AC 水平和降低 TNF- α 、IL-1 β 水平, 下调 PI3K、p-Akt、cleaved-caspase3 蛋白表达。**结论** 佛手可能主要通过升高胃黏膜防御因子水平, 减少炎症因子分泌, 进而抑制胃黏膜上皮细胞凋亡, 其中制佛手在增强胃黏膜防御能力、抗炎和抑制细胞凋亡等方面优于生佛手。

关键词: 制佛手; 生佛手; 炮制; 胃黏膜损伤; 网络药理学

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3141-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.050

佛手为芸香科植物佛手 *Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 用于治疗肝胃气滞, 胃脘痞满, 食少呕吐等疾病^[1]。关于佛手功效的描述最早记载于宋代《本草图经》^[2], “舒肝理气, 和中止痛, 化痰止咳”。中医内科常用佛手作为重点臣药治疗胃脘痛。消化性溃疡、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎等病均属于中医“胃脘痛”的范畴, 这些疾病的病因和证候虽各有特点, 但都伴有胃黏膜损伤。课题组前期已通过细胞实验和动物实验明确了生、制佛手对胃黏膜损伤均有保护作用^[3], 且结果表明制佛手的保护作用更佳; 并采用液质联用技术和气质联用技术建立了佛手蒸制前后的化学成分库。但目前关于佛手炮制前后药效变化的研究尚不够深入, 有必要进一步分析佛手保护胃黏膜的作用机制和炮制后产生的药效差异。

网络药理学可针对中药多成分、多靶点的特点, 建立药物-靶点-疾病之间的相互作用网络, 对网络进行综合分析进而揭示药物对疾病治疗的潜在药效成分、作用靶点和作用机制, 为筛选药物的活性成分和作用机制提供重要参考。

因此, 本研究将基于佛手蒸制前后的差异成分, 运用网络药理学方法分析佛手治疗胃溃疡疾病的关键靶点及通

路, 并建立乙醇致胃黏膜损伤大鼠模型, 观察生佛手和制佛手对相关细胞因子、蛋白表达的影响, 并比较佛手炮制前后对胃黏膜保护作用的药效差异, 进一步验证网络药理学结果, 以期阐释佛手蒸制增效炮制机理奠定研究基础。

1 材料

1.1 药物 生佛手饮片 (产地广东, 批号 201201) 购自广州至信药业股份有限公司, 经广州中医药大学中药学院陈康教授鉴定为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实经加工切制的饮片, 现样品保存于广州中医药大学中药学院炮制实验室。制佛手饮片为实验室自制, 按 1984 年版《广东省中药炮制规范》^[4] 进行制备。

1.2 试剂 一氧化氮 (NO) 试剂盒、大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β) 试剂盒 (批号 022421210608、053121210719) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 粘蛋白 5AC (MUC5AC) 酶联免疫试剂盒、表皮生长因子 (EGF) 酶联免疫试剂盒 (批号 202107、202107) 均购自江苏酶免实业有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒 (批号 A38220115) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 磷脂

收稿日期: 2023-08-05

基金项目: 广东省自然科学基金 (2024A1515012620); 广东省重点领域研发计划 (2020B1111120002); 广东省中药炮制技术传承基地建设项目 (粤中医办函 [2022] 52 号)

作者简介: 伍沛君 (1997—), 女, 硕士, 从事中药炮制机理和饮片质量控制研究。Tel: 13431070605, E-mail: 1007912360@qq.com

* 通信作者: 汪金玉 (1983—), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事中药炮制机理和饮片质量控制研究。Tel: (020) 39358175, E-mail: wangjinyu@gzucm.edu.cn

酰肌醇-3 激酶 (PI3K)、活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-caspase3) 兔单克隆抗体 (批号 AF5112、AF7022) 购自美国 Affinity 公司; 蛋白激酶 B (Akt) 兔单克隆抗体 (批号 75692S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 兔单克隆抗体 (批号 T40067S) 购自艾比玛特生物医药 (上海) 有限公司; ECL 高敏发光液购自美国 Millipore 公司。

1.3 动物 42 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 160~180 g, 购自广州中医药大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2018-0034], 饲养于广州中医药大学 (大学城) 实验动物中心 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (粤) 2018-0085], 本研究经广州中医药大学实验动物中心动物伦理委员会审批通过 (伦理审批号 20210915002)。

1.4 仪器 BT 125D 型分析天平 (德国赛多利斯公司); TC-15 型套式恒温器 (海宁市新华医疗器械厂); STP120 型组织脱水机、Histostar 组织包埋机、340E 型石蜡切片机、Gemini AS 型自动染色机、Thermo MultiskanGO 型全波长酶标仪 (美国赛默飞世尔公司); LUKYM-1 型冷冻研磨仪 (广州露卡测序仪器有限公司); 13R 型高速冷冻离心机 (广州千思仪器设备有限公司); DYCZ-25D 型双垂直电泳仪、DYCZ-40S 型转印电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 化学发光仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 佛手潜在活性成分筛选及靶点预测 将课题组前期已分析得到的佛手蒸制前后差异成分在 PubChem 化合物数据库查询, 得到各自的 Canonical SMILES 号, 将其 Canonical SMILES 号输入 SwissADME 平台, 按同时满足 2 个条件, (1) 胃肠吸收 (GI absorption) 为 “High”; (2) 5 种类药性预测 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 结果中有 2 个及 2 个以上为 “Yes”, 最终筛选出佛手的潜在活性成分。

将筛选出的佛手潜在活性成分对应的 Canonical SMILES 号依次输入 SwissTargetPrediction 数据库, 设置种属为 “Homo sapiens”, 完成潜在活性成分作用靶点的反向预测, 并经 Uniprot 数据库校正为标准基因名称。

2.1.2 胃溃疡疾病相关靶点的收集 由于胃溃疡疾病的病理表现主要为胃黏膜损伤, 因此选择 “gastric ulcer” 为关键词, 通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库查找与胃溃疡疾病相关的靶点, GeneCards 数据库搜索结果只保留 Relevance score ≥ 10 的靶点。最后汇总 3 个数据库得到的疾病靶点并去除重复。

2.1.3 PPI 网络构建及可视化 将 “2.1.1” 项下获得的佛手潜在活性成分对应靶点与 “2.1.2” 项获得的胃溃疡相关靶点于 jvenn 网站取交集, 找到共同的蛋白靶点, 即佛手发挥胃黏膜保护作用的潜在靶点, 并以韦恩图的方式呈现。将所得潜在靶点导入 String 数据库构建 PPI 网络。将

靶点的信息导入 Cytoscape 3.9.0 软件绘制 “成分靶点-疾病靶点” PPI 网络, 使其可视化, 并通过 “Analyze Network” 功能对 PPI 网络结构进行拓扑分析, 得到评价网络中节点重要性的指标, 包括连接度 (Degree)、紧密度中心性 (closeness centrality, CC)、介度中心性 (betweenness centrality, BC), 筛选上述 3 个指标均大于平均值的靶点作为佛手发挥胃黏膜保护作用的核心靶点。

2.1.4 GO 及 KEGG 富集分析 在 Metascape 数据分析平台对核心靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。应用微生信在线工具绘制气泡图和柱状图使结果可视化。

2.1.5 构建佛手保护胃黏膜的 “成分-靶点-通路” 网络 为进一步体现成分、靶点、通路之间的重要关系, 将 “2.1.4” 项下得到的核心通路进行对应靶点的映射, 找出各通路涉及到的潜在靶点, 再将这些潜在靶点进行对应成分的映射, 找出各潜在靶点对应的潜在活性成分, 将这些通路、靶点、成分相关信息导入到 Cytoscape 3.9.0, 构建 “成分-靶点-通路” 交互网络。

2.1.6 核心成分与核心靶点的分子对接 将 “2.1.5” 项下 KEGG 核心通路所映射得到的核心靶点和靶点映射得到的核心成分进行分子对接。在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中查找和筛选对应蛋白靶点的 3D 结构, 并利用 Autodock Tools 软件对受体蛋白进行去水分子、加氢等修饰。在 PubChem 数据库中下载成分的 3D 结构文件。通过 OpenBabel 3.0 软件将 3D 结构 sdf 格式文件转换为 pdb 格式文件。运用 Autodock Tools 软件对小分子配体原子类型、电荷、氢键进行处理。利用 Autodock Tools 软件进行分子对接, 得到结合能 (binding energy)。最后运用 PyMol 软件将结合能排名前三的结果可视化, 建立对接相互作用模式图。

2.2 动物实验验证

2.2.1 生佛手与制佛手 95% 乙醇提取物制备 称取生佛手 300 g, 第 1 次加入 20 倍量 95% 乙醇浸泡 1 h 后加热回流 1.5 h, 过滤, 第 2 次加入 15 倍量 95% 乙醇加热回流 1 h, 过滤, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至无醇味。制佛手 95% 乙醇提取物的制备方法同生佛手。

2.2.2 造模、分组与给药 动物适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为空白组, 模型组, 奥美拉唑组 (20 mg/kg), 生佛手低、高剂量组 (1.2、4.8 g/kg) 和制佛手低、高剂量组 (1.2、4.8 g/kg), 每组 6 只。空白组和模型组灌胃给予蒸馏水 10 mL/kg, 其余各组按上述剂量灌胃给予相应药物。造模前连续给药 7 d, 第 7 天给药后禁食不禁水 24 h。第 8 天末次给药 1 h 后, 除空白组外, 其余各组给予无水乙醇 10 mL/kg, 1 h 后腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 取出全胃, 沿胃大弯剪开, 用预冷的生理盐水洗去胃内残留物, 用滤纸吸干水分, 展开胃, 观察胃组织的损伤情况。

2.2.3 胃黏膜损伤指数测定 各组大鼠胃组织拍照并评分后, 将胃体纵向剪为 5 份, 1 份放置于 4% 多聚甲醛固定液中固定, 用于石蜡切片的制备; 剩余 4 份分装后保存

于-80℃冰箱,用于ELISA试剂盒检测和Western blot检测。用游标卡尺测量损伤的长度和宽度,并按Guth法^[5]计算损伤指数,点状出血计1分;条索状出血长度<1 mm计2分,1~2 mm计3分,2~4 mm计4分,>4 mm计5分;宽度>2 mm时分值加倍。每个损伤的分值之和为该大鼠的损伤指数。

2.2.4 HE染色和AB-PAS染色 将固定后的胃组织取出,切成合适的大小,放入包埋盒中进行乙醇脱水,石蜡包埋,切片后分别进行HE染色和AB-PAS染色,封片后于光学显微镜下观察胃组织病理变化和胃黏膜糖蛋白分布。

2.2.5 ELISA法检测大鼠胃组织NO、EGF、MUC5AC、TNF-α、IL-1β水平 取出于-80℃冰箱保存的大鼠胃组织,加入9倍量PBS缓冲液并冷冻研磨、4℃、12 000 r/min离心10 min,收集上清液,按照试剂盒说明书检测NO、EGF、MUC5AC、TNF-α、IL-1β水平。

2.2.6 Western blot法检测胃组织PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达 取出于-80℃冰箱保存的大鼠胃组织,提取大鼠胃组织总蛋白并测定蛋白浓度,将蛋白提取液和蛋白上样缓冲液以4:1比例混匀,100℃金属浴加热变性10 min,样本于-80℃保存。制备SDS-PAGE凝胶,各孔蛋白加样量为30 μg,电泳分离蛋白后进行转膜,PVDF膜加PI3K(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、β-actin(1:5 000)抗体在4℃孵育过夜,次日TBST清洗后,加

HRP-山羊抗兔抗体(1:3 000)室温孵育1 h,再次清洗后,使用凝胶成像系统对蛋白印迹进行显影,保存图片,最后采用Image J图像处理软件分析目的条带的光密度值。

2.2.7 免疫组化法检测胃组织cleaved-caspase3蛋白表达 各组胃组织石蜡切片常规脱蜡水化,柠檬酸盐缓冲液抗原修复,滴加适量山羊血清孵育15 min进行封闭,滴加cleaved-caspase3抗体(1:200)后放置在湿盒内于4℃孵育过夜,次日PBS清洗后滴加适量的生物素标记山羊抗兔IgG,室温孵育30 min,PBS冲洗后DAB显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片。采集400倍显微镜下视野,用Image J图像处理软件统计各组阳性信号。

2.2.8 统计学分析 通过SPSS 24.0软件进行处理,符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,组间两两比较采用图基(Tukey)检验;方差不齐时,组间两两比较则采用Dunnett's T3检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 佛手保护胃黏膜的网络药理学研究

3.1.1 佛手潜在活性成分的收集和筛选 课题组前期已分析得到佛手蒸制前后43种差异性成分,通过SwissADME平台筛选出满足“2.1.1”项下2个条件的24种潜在活性成分,上述化合物的对应ID、中文名称、英文名称、PubChem ID等信息见表1。

表1 潜在活性成分具体信息

ID	中文名称	英文名称	PubChem ID
GC-1	β-芳樟醇	linalool	6549
GC-2	反式-2-薄荷烯醇	trans-2-menthenol	98086484
GC-3	β-松油醇	β-terpineol	8748
GC-4	L-4-松油醇	L-4-terpineneol	11230
GC-5	α-松油醇	α-terpineol	17100
GC-6	L-香芹醇	cis-carveol	330573
GC-7	橙花醇	cis-geraniol	643820
GC-8	β-环柠檬醛	β-citral	643779
GC-9	香叶醇	geraniol	637566
GC-10	α-柠檬醛	α-citral	638011
GC-11	香芹酚	carvacrol	10364
GC-12	十一(烷)醛	undecanal	8186
GC-13	乙酸香茅酯	cephreine	9017
GC-14	匙叶桉油烯醇	isopathulenol	14038848
GC-15	邻苯二甲酸二丁脂	DBP(dibutyl phthalate)	3026
LC-1	欧巴酮	obacunone	119041
LC-2	橙皮素	hesperetin	72281
LC-3	香叶木素	diosmetin	5281612
LC-4	葛荭亭	7-hydroxy-6-methoxy coumarin	5280460
LC-5	5-异戊烯氧基-7-甲氧基香豆素	5-isopentenyl-7-methoxycoumarin	132281526
LC-6	5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	5-methoxy-8-hydroxypsoralen	71357574
LC-7	9-甲氧基十七烷酸	9-methoxy-heptadecanoic acid	15389270
LC-8	5-羟基补骨脂素(佛手酚)	bergaptol	5280371
LC-9	氧化前胡素	oxypeucedanin	160544

3.1.2 佛手潜在活性成分的靶点预测 基于SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetpred->

[iction.ch/](http://www.swisstargetpred-))对佛手潜在活性成分进行反向靶点预测,共得到的靶点957个,汇总去重后得靶点522个,并经Uniprot数

数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 校正为标准基因名称。

3.1.3 胃溃疡疾病靶点筛选 GeneCards 共收集得到 5 017 个靶点, Relevance score ≥ 10 的有 287 个; OMIM 数据库收集得到 81 个靶点; TTD 数据库收集得到 8 个靶点。汇总整理 GeneCards、OMIM、TTD 数据库结果并去重, 共得到胃溃疡疾病靶点 362 个。

3.1.4 PPI 网络的构建与关键靶点的筛选 将佛手潜在活

性成分作用靶点与胃溃疡疾病靶点于 jvenn 网站取交集, 找到共同靶点 54 个, 结果见图 1A。将所得的 54 个共有靶点于 String 平台和 Cytoscape 3.9.0 软件进行 PPI 网络的绘制。为从 PPI 网络中提取更重要的靶点, 按照“2.4”项下条件筛选获得关键靶点 20 个, 并运用 Cytoscape 3.9.0 软件可视化, 结果见图 1B。

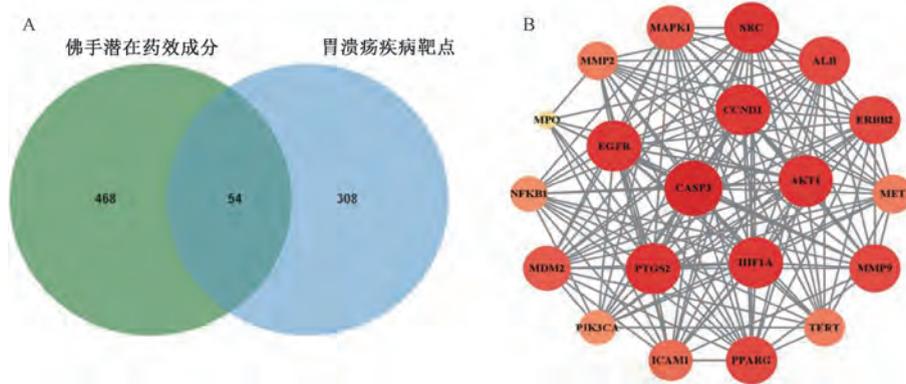


图 1 潜在活性成分靶点-胃溃疡疾病靶点 Venn 图 (A) 及 PPI 网络 (B)

3.1.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 20 个关键靶点通过 Metascape 数据平台进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。以 $P < 0.01$ 作为筛选标准, 富集结果中 GO 显示共有 38 个富集结果, 其中生物过程 (BP) 20 个, 细胞组分 (CC)

9 个, 分子功能 (MF) 9 个, 将结果绘制成柱状图展示, 见图 2。KEGG 共筛选出 10 条核心通路, 并绘制气泡图展示, 见图 3。

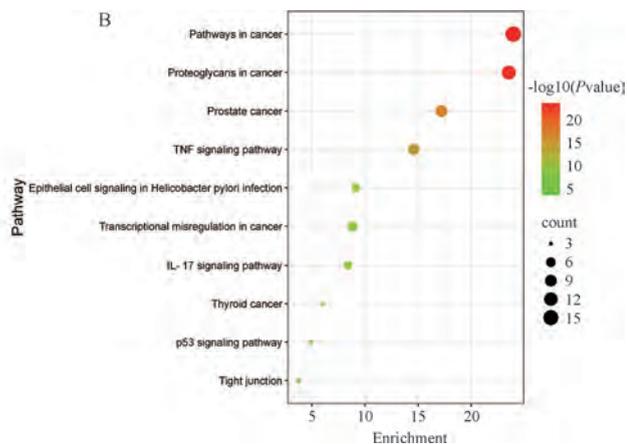
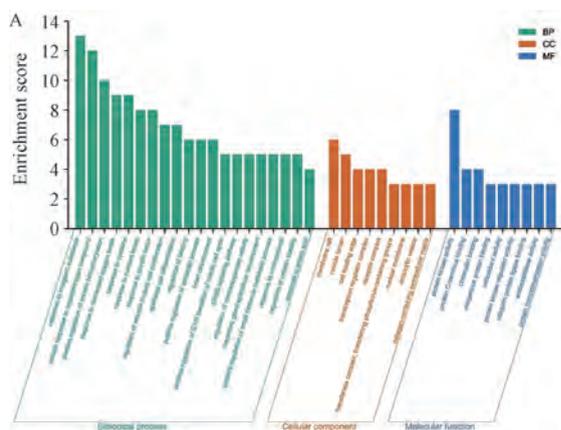


图 2 关键靶点 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

由图 2A 可知, GO 富集结果中 BP 主要涉及蛋白磷酸化的正调控 (positive regulation of protein phosphorylation)、对氧水平降低的反应 (response to decreased oxygen levels)、对细胞因子的反应 (response to cytokine) 等; CC 主要涉及膜筏 (membrane raft)、囊泡腔 (vesicle lumen)、细胞前沿 (cell leading edge) 等; MF 主要涉及蛋白激酶活性 (protein kinase activity)、外源性蛋白结合 (exogenous protein binding)、抗氧化活性 (antioxidant activity) 等。

由图 2B 可得, 关键靶点主要集中在癌症中的蛋白聚糖信号通路 (proteoglycans in cancer)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、白细胞介素 17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、p53 信号通路 (p53 signaling

pathway) 等 10 条核心通路。

3.1.6 “成分-靶点-通路”网络构建 将 KEGG 筛选得到的 10 条核心通路进行对应靶点的映射, 找出各通路涉及到的核心靶点 19 个 (即 Akt1、CASP3、MMP9、SRC、PTGS2、EGFR、NFKB1、PPARG、PI3KCA、TERT、MAPK1、MMP2、HIF1A、MDM2、ERBB2、CCND1、MET、ICAM1、MPO), 再将这些靶点进行对应成分的映射, 找出各靶点相关的核心成分, 由图 3 可知, 核心成分主要集中在非挥发性成分, 其中节点大小表示相应的 Degree 值, 节点越大表示 Degree 值越大, 彼此之间的相关性越大。

3.1.7 分子对接技术预测佛手核心成分和核心靶点的结合能力 根据“成分-靶点-通路”网络分析得到核心成分有

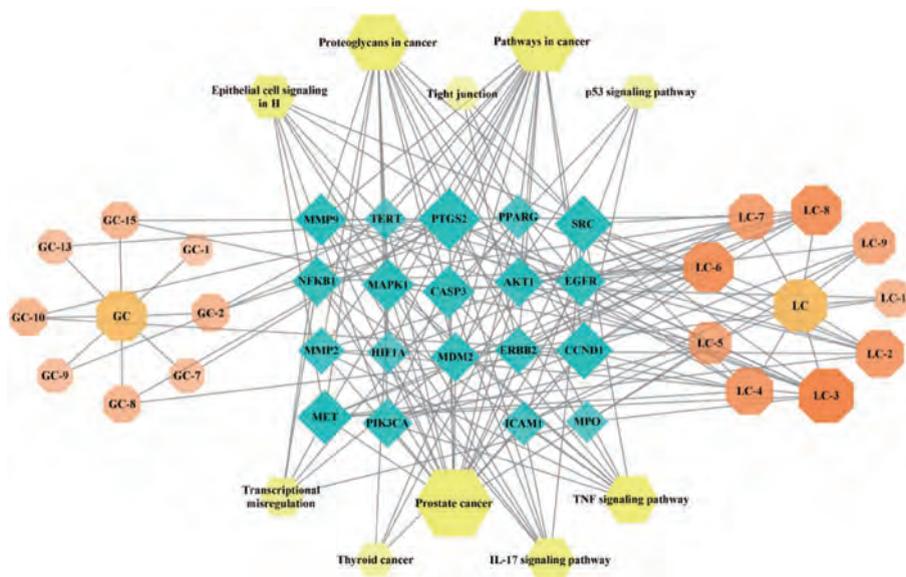


图3 “成分-靶点-通路”网络图

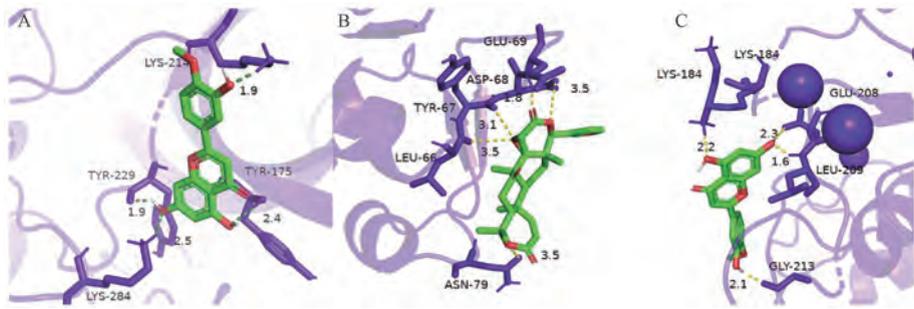
橙皮素、香叶木素、菝葜亭、佛手酚等，与核心靶点 Akt1、CASP3、MMP9、SRC、PTGS2 等进行结合能力预测。一般认为，结合能小于-5.0 kcal/mol 表明配体小分子与受体蛋白之间有良好的结合活性；结合能小于-7.0 kcal/mol 表明配体小分子与受体蛋白具有强烈的结合活性。由表 2 可知，除 LC-3 与 MPO、LC-5 与 ICAM1、LC-5 与 MPO、LC-7 与

HIF1A、LC-9 与 ICAM1、GC-15 与 CASP3 这 6 个对接结果的结合能大于-5 kcal/mol，表明对接结果较差，剩下 44 个结果中有 31 个结果结合能均小于-5 kcal/mol，说明两者间具有良好的结合活性；另外有 13 个结果结合能均小于-7 kcal/mol，说明两者间具有强烈的结合活性。运用 PyMol 软件，对结合能排名前三的结果建立相互作用模式图，见图 4。

表 2 核心成分和核心靶点之间的分子对接结果

活性成分	靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	活性成分	靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
LC-1	MAPK1	4FUY	-7.78	LC-6	EGFR	5D41	-6.74
LC-1	MDM2	2AXI	-6.48	LC-6	NFKB1	1SVC	-6.78
LC-2	TERT	5MEO	-6.15	LC-6	Akt1	4GV1	-6.19
LC-2	MMP9	6ESM	-6.41	LC-7	MDM2	2AXI	-6.65
LC-2	PPARG	1ZGY	-7.19	LC-7	MMP9	6ESM	-7.15
LC-2	MDM2	2AXI	-7.92	LC-7	HIF1A	1H2M	-4.81
LC-3	MPO	1D2V	-4.94	LC-7	PIK3CA	4TV3	-6.66
LC-3	PTGS2	5F19	-6.24	LC-8	NFKB1	1SVC	-5.58
LC-3	TERT	5MEO	-6.37	LC-8	EGFR	5D41	-6.66
LC-3	EGFR	5D41	-7.36	LC-8	ERBB2	7PCD	-6.94
LC-3	SRC	2SRC	-7.58	LC-8	CCND1	2W96	-5.61
LC-3	Akt1	4GV1	-7.89	LC-8	SRC	2SRC	-6.39
LC-3	MMP9	6ESM	-9.09	LC-8	Akt1	4GV1	-6.42
LC-4	EGFR	5D41	-5.88	LC-9	PIK3CA	4TV3	-7.20
LC-4	CCND1	2W96	-5.36	LC-9	ICAM1	1IAM	-4.34
LC-4	PTGS2	5F19	-5.17	LC-9	CASP3	1NME	-7.47
LC-4	SRC	2SRC	-6.61	LC-9	MPO	1D2V	-5.21
LC-4	ERBB2	7PCD	-6.40	GC-2	PPARG	1ZGY	-5.22
LC-5	ICAM1	1IAM	-4.09	GC-2	TERT	5MEO	-5.74
LC-5	MPO	1D2V	-4.62	GC-8	CCND1	2W96	-5.89
LC-5	PIK3CA	4TV3	-6.41	GC-8	PTGS2	5F19	-5.61
LC-5	MAPK1	4FUY	-6.02	GC-10	CCND1	2W96	-5.64
LC-6	ERBB2	7PCD	-7.83	GC-10	PTGS2	5F19	-5.01
LC-6	CCND1	2W96	-6.32	GC-15	PTGS2	5F19	-5.68
LC-6	SRC	2SRC	-6.09	GC-15	CASP3	1NME	-4.40

注：LC-1 为欧巴酮，LC-2 为橙皮素，LC-3 为香叶木素，LC-4 为菝葜亭，LC-5 为 5-异戊烯氧基-7-甲氧基香豆素，LC-6 为 5-甲氧基-8-羟基补骨脂素，LC-7 为 9-甲氧基十七烷酸，LC-8 为 5-羟基补骨脂素（佛手酚），LC-9 为氧化前胡素。GC-2 为反式-2-薄荷烯醇，GC-8 为 β-环柠檬醛，GC-10 为 α-柠檬醛，GC-15 为邻苯二甲酸二丁酯。



注: A 为 LC-3 与 Akt1 对接, B 为 LC-2 与 MDM2 对接, C 为 LC-3 与 MMP9 对接。

图 4 成分与靶点相互作用模式图

3.2 生、制佛手对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用

3.2.1 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃黏膜损伤情况与损伤指数的影响 乙醇致胃黏膜损伤模型大鼠胃黏膜损伤以片状、条索状和点状出血为主,损伤可深入肌层,胃黏膜表面呈暗红色且有水肿;与模型组比较,生佛手低剂量组

胃黏膜损伤有所减轻,但仍可见少量条索状出血,其余各给药组胃黏膜损伤均减轻,基本为线状、点状出血,见图 5。与模型组比较,各给药组胃黏膜损伤指数均降低 ($P < 0.01$);与生佛手组比较,制佛手同剂量组胃黏膜损伤指数降低 ($P < 0.05$),见图 6。

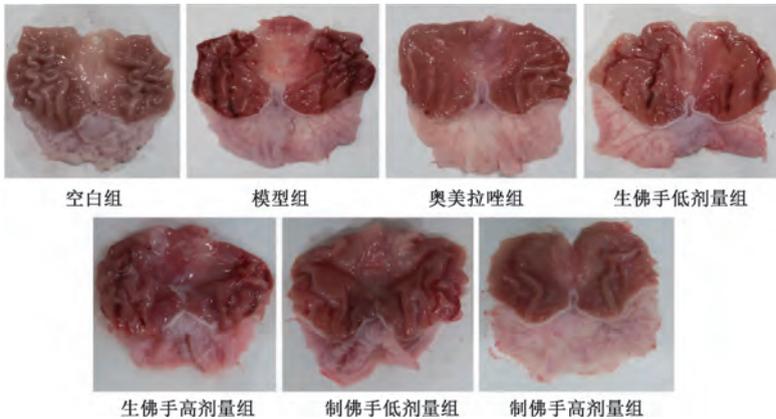
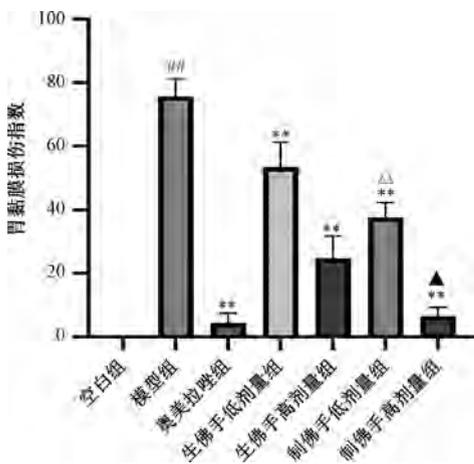


图 5 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织形态的影响



注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与生佛手低剂量组比较,^ $P < 0.05$;与生佛手高剂量组比较,^ $P < 0.05$ 。

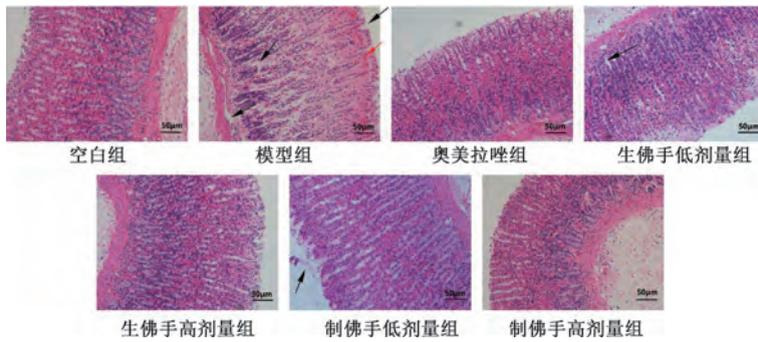
图 6 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠损伤指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.2 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织病理学的影响

如图 7 所示,空白组大鼠黏膜层胃腺丰富,腺体排列紧密,细胞形态正常,未见明显损伤;与空白组比较,模型组大鼠黏膜上皮层损伤严重,有细胞脱落现象,组织间隙有充血;与模型组比较,生、制佛手能减轻大鼠胃组织充血、水肿等病理特征。

3.2.3 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织黏膜糖蛋白表达的影响 如图 8 所示,与空白组比较,模型组大鼠胃组织 PAS 染色强度减弱,说明胃黏膜糖蛋白大量减少;与模型组比较,各给药组大鼠胃黏膜染色强度均有所增加,且制佛手组 PAS 染色强度高于生佛手组,说明生佛手和制佛手均可促进胃黏膜糖蛋白的再生和恢复,制佛手的促进作用优于生佛手。

3.2.4 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 NO、EGF、MUC5AC 的水平的影响 如图 9 所示,与空白组比较,模型组大鼠胃组织 NO、EGF、MUC5AC 水平均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,奥美拉唑组和制佛手高剂量组大鼠胃组织 NO、EGF 水平均升高 ($P < 0.01$),生佛手高剂量组大鼠胃组织 EGF 水平升高 ($P < 0.01$),生、制佛手各剂量组大鼠胃组织 MUC5AC 水平均升高 ($P < 0.01$)。



注：红色箭头指示组织间隙充血，黑色箭头指示细胞组织脱落。

图7 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织病理学的影响 (×200)

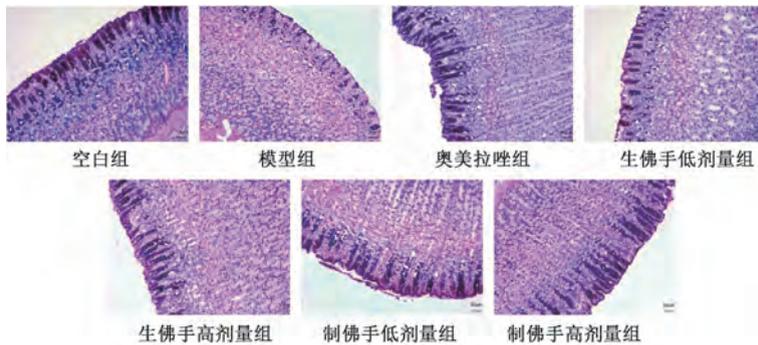
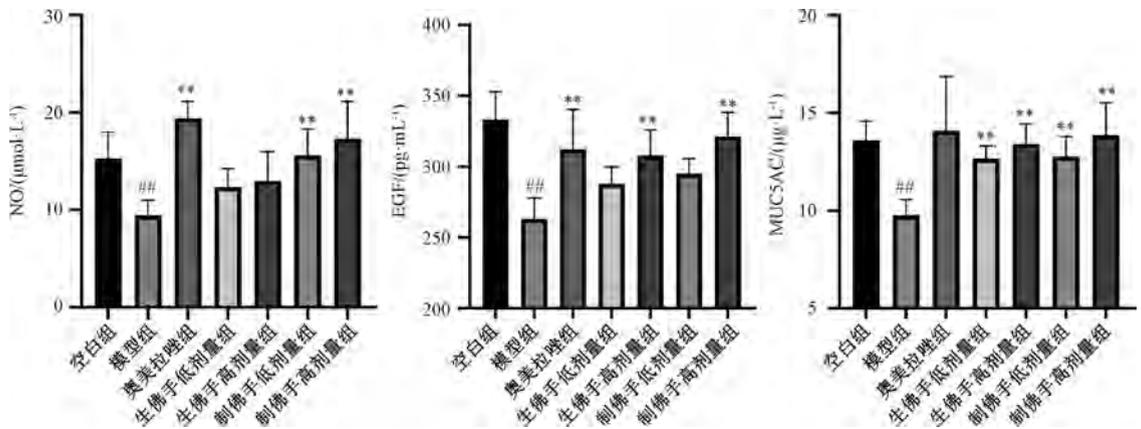


图8 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织黏膜糖蛋白表达的影响



注：与空白组比较，[#] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图9 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 NO、EGF 和 MUC5AC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.5 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 如图 10 所示，与空白组比较，模型组大鼠胃组织 TNF- α 、IL-1 β 水平均升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，奥美拉唑组和制佛手各剂量组大鼠胃组织 TNF- α 、IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)，生佛手高剂量组大鼠胃组织 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$)。

3.2.6 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响 如图 11 所示，与空白组比较，模型组大鼠胃组织 PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠胃组织 PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$)。

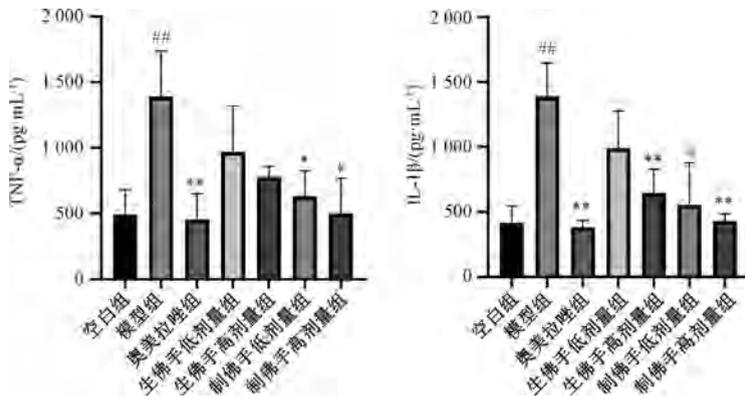
3.2.7 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 cleaved-

caspase3 表达的影响 如图 12 所示，与空白组比较，模型组大鼠胃组织中有大量棕黄色颗粒沉积，阳性染色面积增加，cleaved-caspase3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠胃组织棕黄色阳性染色面积减少，cleaved-caspase3 蛋白表达升高降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

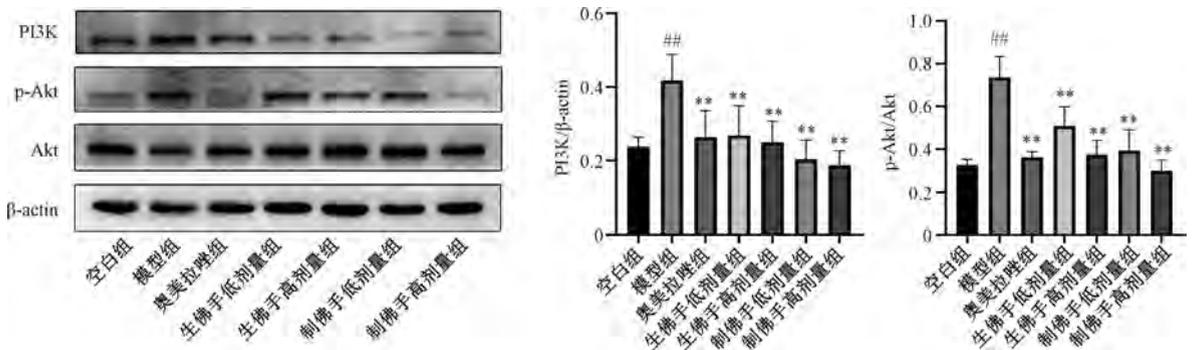
佛手在中医治疗胃肠道疾病有较高的应用频率，如消化性溃疡、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎等，这些疾病的发生发展都伴随着胃黏膜损伤。本研究基于前期实验，采用网络药理学预测结合体内动物实验探究佛手保护胃黏膜的作用机制及炮制后产生的药效差异。

从课题组前期建立的佛手成分库中筛选出 24 种潜在活



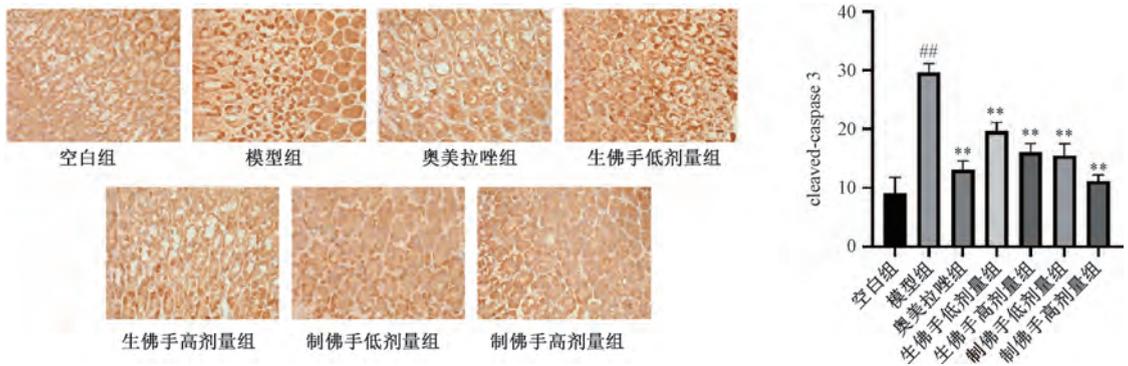
注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 10 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 11 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 12 生、制佛手对胃黏膜损伤大鼠胃组织 cleaved-caspase3 蛋白表达的影响 ($\times 400$, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

性成分，其中橙皮素可通过影响 PI3K/Akt-Nrf2 通路上调抗氧化水平；可以抑制 NF- κ B 激活，减少炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌^[6]；激活 Sirt1/Nrf2 通路，调节氧化应激、炎症反应和细胞凋亡^[7]。香叶木素能降低 ROS 和 MDA 水平，减轻氧化应激，还能降低 cleaved-caspase3 的表达，有效阻断细胞凋亡^[8]。佛手酚能抑制脂多糖诱导的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、COX-2 的基因表达，还能有效阻断 MAPK 和 NF- κ B 的活化^[9]。更有研究表明茛菪亭和橙皮素联用时，小剂量对抗炎有协同作用^[10]。因此认为这些核心成分在胃黏膜损伤的修复过程中能够参与炎症反应、调节氧化应激、调节细胞增殖和凋亡。

黏液-碳酸氢盐屏障是胃黏膜防御机制之一，胃黏液能保护胃黏膜上皮细胞免受机械性损伤以及有害因子的侵蚀^[11]。由一氧化氮合酶 (NOS) 合成的 NO 为内源性血管舒张因子，通过扩张黏膜血管调节胃黏膜血流量，并调节胃酸和黏液的分泌，在胃黏膜保护中发挥重要作用^[12]。EGF 在胃溃疡愈合过程中可促进上皮细胞的增殖、迁移，最终促进溃疡面的愈合^[13]。黏蛋白是胃黏液的主要成分，当胃黏膜受到乙醇侵袭时，会引起黏液层的改变，其中 MUC5AC 的分泌变化最为显著^[14]。TNF- α 是组织炎症损伤的攻击因子之一，可在炎症发展中调节 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等因子，其中 IL-1 β 能促进白细胞粘附分子表达，诱导炎

性细胞在病变部位分泌聚集^[15]，释放炎症介质。TNF- α 和 IL-1 β 与炎症程度呈正相关，因此两者的表达可用于判断胃黏膜炎症的严重程度和药物疗效。

通过蛋白质印迹和免疫组化实验验证网络药理学筛选出的蛋白靶点，其中 PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成的二聚体，其激活产物可进一步激活 Akt。Akt 可参与炎症反应，Akt 活化能够促进 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B 泛素化降解，促进炎症因子分泌，进一步加重炎症反应。通过抑制 Akt 磷酸化，可达到抗炎作用，从而保护胃黏膜^[16-18]。caspase 家族蛋白是一类在细胞凋亡执行过程中起着重要作用的蛋白酶，其中 caspase3 主要参与细胞凋亡执行，caspase3 被激活后经切割为 cleaved-caspase3，可促进细胞凋亡^[19-20]。本研究结果表明，生、制佛手均可通过降低 PI3K、p-Akt 和 cleaved-caspase3 蛋白表达发挥胃黏膜保护作用。

综上所述，生、制佛手对乙醇致胃黏膜损伤均有保护作用，并能降低胃黏膜损伤指数，改善胃黏膜组织病理损伤情况，促进胃黏液分泌。佛手保护胃黏膜的作用机制可能是升高胃黏膜防御因子水平，减少炎症因子分泌，下调 PI3K、p-Akt、cleaved-caspase3 蛋白表达，其中制佛手在增强胃黏膜防御能力、抗炎、抗氧化应激和抑制细胞凋亡等方面优于生佛手。本研究初步阐明了佛手保护胃黏膜的作用机制，为后续研究佛手蒸制增效的炮制机理提供了实验基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：178.

[2] 苏 頌. 本草图经 [M]. 北京：学苑出版社，2017：408；628.

[3] Zhu Y J, Zhang Q X, Gao M, et al. Comparisons of chemical profiles and gastroprotective effects of *Citri Sarcodactylis Fructus* pre- and poststeam processing [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 8491375.

[4] 广东省卫生厅. 广东省中药炮制规范 [S]. 广州：广东省卫生厅，1984：126.

[5] Guth P H, Auras D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1979, 76(1): 88-93.

[6] Li J D, Wang T Q, Liu P P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/Akt-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3898-3918.

[7] Liu P P, Li J H, Liu M M, et al. Hesperetin modulates the

Sirt1/Nrf2 signaling pathway in counteracting myocardial ischemia through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111552.

[8] 余 伟, 黄长山, 丁月超, 等. 香叶木素预处理通过抗炎和抗氧化发挥对小鼠肝缺血/再灌注的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(7): 1017-1022.

[9] Shen C Y, Wang T X, Jiang J G, et al. Bergaptol from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. *Amara* Engl inhibits LPS-induced inflammatory responses and ox-LDL-induced lipid deposition [J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 4915-4926.

[10] 蔡聪艺, 石刚刚, 陈一村, 等. 东莨菪亭与橙皮素联用对小鼠抗炎作用的定量分析 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2009, 22(4): 203-205.

[11] 张 艳, 曹瑞岗, 张 锐, 等. 中医药保护胃黏膜的作用及机制研究现状 [J]. *世界科学技术 (中医药现代化)*, 2018, 20(5): 804-809.

[12] 白 敏, 段永强, 杨晓轶, 等. 黄芪建中汤对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(4): 397-400.

[13] 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.

[14] Nam S Y, Kim N, Lee C S, et al. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone [J]. *Dig Dis Sci*, 2005, 50(11): 2110-2120.

[15] Lv H, Lin Y, Liu P, et al. Protective effects and potential underlying mechanisms of sodium copper chlorophyllin against ethanol-induced gastric ulcer in mice [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51(9): 925-933.

[16] Shen J, Cheng J, Zhu S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis [J]. *Int Immunopharmacol*. 2019, 73: 193-200.

[17] 嵇莹莹, 龚国清. PI3K/Akt/mTOR 通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展 [J]. *药学研究*, 2018, 37(4): 226-229.

[18] 成慧娟, 吕小平. PI3K-Akt 信号转导通路炎症性肠病关系的研究进展 [J]. *广东医学*, 2014, 35(2): 297-299.

[19] 李学永, 康维娜, 温进平, 等. 白芍总苷对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜的保护作用及机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(12): 1638-1644; 1740.

[20] 董 兰, 丁瑞雪, 唐文静, 等. 秋水仙碱通过调控 Bel-2/cleaved-caspase3 细胞凋亡途径改善异丙肾上腺素所致小鼠心肌损伤 [J]. *遵义医科大学学报*, 2022, 45(4): 427-432.