

基于网络药理学和代谢组学的蟾宝痔疮栓抗痔疮的机制研究^Δ

郭春风^{1*}, 蒋鑫², 程汝阳², 刘树民², 谢春祥³, 卢芳^{2#}(1. 黑龙江中医药大学附属第二医院哈南分院中医内科, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江蟾宝生物科技发展有限公司, 黑龙江鹤岗 154100)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)13-1622-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.13.12



摘要 **目的** 通过网络药理学和代谢组学探讨蟾宝痔疮栓(CBZCS)对痔疮大鼠的改善作用机制。**方法** 利用浸巴豆油致肛肛门肿胀建立大鼠痔疮模型。将SD大鼠分为空白组(NC组, 0.32 g/kg 凡士林), 模型组(Model组, 0.32 g/kg 凡士林), CBZCS低、中、高剂量组(分别记为CBZCS-L、CBZCS-M、CBZCS-H组, 给药剂量分别为0.16、0.32、0.64 g/kg), 马应龙麝香痔疮栓组(Positive组, 0.32 g/kg), 每组9只; 分别于造模后6、12、24、48、72 h进行肛门给药。末次给药后, 观察大鼠肛门组织病理变化, 检测大鼠血清中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。通过代谢组学的方法进行差异代谢物分析和通路富集分析, 运用网络药理学获得CBZCS治疗痔疮的靶点蛋白, 联合差异代谢物和靶点蛋白进行交互和富集分析以筛选核心代谢通路, 并对核心蛋白进行实验验证。**结果** 与NC组比较, Model组大鼠肛门组织出现明显病变, 血清中IL-6、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$); 与Model组比较, 给药组大鼠肛门组织病理损伤均有不同程度缓解, CBZCS-H组、CBZCS-M组、Positive组大鼠血清中IL-6水平和CBZCS-H组大鼠血清中TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$)。代谢组学结果显示, 从大鼠的肛门组织中共筛选出34个差异代谢物, 经CBZCS给药后共有22个出现回调。回调的差异代谢物主要富集于花生四烯酸代谢、组氨酸代谢和甘油磷脂代谢通路。通过网络药理学的方法确定了138个CBZCS抗痔疮的交集基因。差异代谢物和靶点蛋白主要富集于花生四烯酸代谢通路, 该通路的调控可能与环氧合酶2(COX-2)、Myc原癌基因蛋白(c-MYC)、细胞色素P450 1B1(CYP1B1)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6的蛋白表达有关。实验验证结果显示, Model组大鼠肛门组织中关键蛋白(COX-2、c-MYC、CYP1B1、IL-1 β 、IL-6)的表达水平均较NC组显著升高($P < 0.05$), CBZCS-H组和Positive组大鼠肛门组织中上述蛋白水平均较Model组显著降低($P < 0.05$)。**结论** CBZCS抗痔疮机制可能是抑制COX-2、c-MYC、CYP1B1蛋白的表达, 进而抑制花生四烯酸代谢, 减少炎症因子IL-6、IL-1 β 的释放。

关键词 蟾宝痔疮栓; 痔疮; 花生四烯酸代谢; 环氧合酶2; Myc原癌基因蛋白; 细胞色素P450 1B1; 炎症反应; 代谢组学; 网络药理学

Study on mechanism of Chanbao zhichuang suppository in treating hemorrhoids based on network pharmacology and metabolomics

GUO Chunfeng¹, JIANG Xin², CHENG Ruyang², LIU Shumin², XIE Chunxiang³, LU Fang²(1. Dept. of TCM Internal Medicine, Hanan Branch of Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Heilongjiang Chanbao Biotechnology Development Co., Ltd., Heilongjiang Hegang 154100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of improvement effect of Chanbao zhichuang suppository (CBZCS) on hemorrhoids in rats through network pharmacology and metabolomics. **METHODS** A hemorrhoid model was established by subcutaneous injection of rhododendron oil to induce anal swelling. SD rats were divided into blank group (NC group, 0.32 g/kg vaseline), model group (Model group, 0.32 g/kg vaseline), CBZCS low-, medium-, and high-dose groups (CBZCS-L, CBZCS-M, CBZCS-H groups, with dosages of 0.16, 0.32, and 0.64 g/kg respectively), and Mayinglong musk hemorrhoids suppository group (Positive group, 0.32 g/kg), with 9 rats in each group. Anal administration was performed at 6, 12, 24, 48, and 72 hours after modeling. After the last administration, the pathological changes of the anal tissues in rats were observed, and the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rats were detected. Differential metabolite analysis and enrichment analysis were conducted by metabolomics methods, and the target proteins of CBZCS in treating hemorrhoids were

^Δ 基金项目 黑龙江省中医药管理局第二批省级名中医专家传承工作室建设项目

* 第一作者 副主任医师, 博士。研究方向: 中医药在内科疾病中的应用。E-mail: 15004601905@163.com

通信作者 研究员, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药药性理论及药效物质基础。E-mail: lufang_1004@163.com

obtained by network pharmacology. The core metabolic pathways were screened by interaction and enrichment analysis of differential metabolites and proteins, and the core proteins were experimentally verified. **RESULTS** Compared with the NC group, the anal tissues of the Model group showed obvious lesions, and the levels of IL-6 and TNF- α in the

serum were significantly increased ($P<0.05$); compared with the Model group, the pathological damage of the anal tissues in the treatment groups was alleviated to varying degrees, and serum levels of IL-6 in CBZCS-H group, CBZCS-M group, and Positive group as well as serum levels of TNF- α in CBZCS-H group were significantly reduced ($P<0.05$). The metabolomics results showed that 34 differential metabolites were screened from the anal tissues of rats, and 22 of them showed a return after CBZCS administration. The differential metabolites mainly enriched in arachidonic acid metabolism, histidine metabolism, and glycerophospholipid metabolism. Through the network pharmacology, 138 intersection genes of CBZCS against hemorrhoids were determined. The analysis results showed that differential metabolites and target proteins were mainly enriched in the arachidonic acid metabolism pathway, and the regulation of this pathway might be related to cyclooxygenase-2 (COX-2), *Myc* proto-oncogene protein (c-MYC), cytochrome P450 1B1 (CYP1B1), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 protein expression. The experimental verification results showed that the expression levels of key proteins (COX-2, c-MYC, CYP1B1, IL-6, IL-1 β) in the anal tissues of the Model group were significantly higher than those in the NC group ($P<0.05$), and the levels of the above proteins in the anal tissues of CBZCS-H group and Positive group were significantly lower than those in the Model group ($P<0.05$).

CONCLUSIONS The mechanism of CBZCS in treating hemorrhoids may be to inhibit the expression of COX-2, c-MYC and CYP1B1 proteins, thereby inhibiting arachidonic acid metabolism and reducing the release of inflammatory factors IL-6 and IL-1 β .

KEYWORDS Chanbao zhichuang suppository; hemorrhoids; arachidonic acid metabolism; cyclooxygenase-2; *Myc* proto-oncogene protein; cytochrome P450 1B1; inflammatory reaction; metabolomics; network pharmacology

痔疮是一种全球范围内常见的慢性疾病,位于肛管中的黏膜下血管组织的软垫,起始于齿状线的近侧,常伴随肛门疼痛、灼热、瘙痒、排便困难、出血感染等症状^[1]。肛垫血管丛在长期静脉高压作用下出现内皮细胞紧密连接蛋白表达下调^[2],导致血管通透性增加和血浆外渗,形成痔核膨大特征。炎症反应也在此过程中扮演重要角色,尤其是在痔疮发展到脱垂或血栓形成阶段时^[3]。目前痔疮有诸多治疗方式,其中保守治疗更受患者青睐^[4]。但保守治疗多依赖于化学药来控制症状,难以实现疾病的根治,并且伴随诸多不良反应和肝肾毒性^[5]。

中药具有多靶点、多组分、活性成分稳定、价格低廉以及在学习和缓解疾病症状的同时还能增效减毒的作用。蟾宝痔疮栓(CBZCS)是治疗痔疮的临床经验方,由蟾酥、蟾蜍皮、冰片、紫草、三七、五倍子、白及和枯矾组成。本课题组前期研究发现,该方具有显著的抗炎、消肿、镇痛和止血等药理活性,但其确切的作用靶点及多药效成分的协同作用机制尚未明晰。代谢组学是一种研究机体内源性小分子代谢物构型及动态变化的科学方法,可以揭示中药复杂成分在生物体内的生物学转化过程^[6]。网络药理学是基于系统生物学,通过多靶点网络分析揭示药物与机体相互作用机制的学科,与中医的治疗理念相契合。因此,本研究采用巴豆油建立痔疮大鼠模型,运用代谢组学和网络药理学相结合的方法来探讨CBZCS治疗痔疮的作用机制,旨在为CBZCS的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

本研究所用的主要仪器有:KDC-160HR型高速冷冻离心机(广州科大创新股份有限公司)、m200 pro型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、eclipseCi-L型

正置白光拍照显微镜(日本 Nikon 公司)、XEVO G2-XS Q-TOF 型液质联用仪(美国 Waters 公司)、Chemi Scope 5300型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)、SVT-2型转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:CBZCS(黑龙江省蟾宝生物科技发展有限公司,批号 220401,规格为每粒 1.5 g),马应龙麝香痔疮栓(马应龙药业集团股份有限公司,批号 2201011,规格为每粒 1.5 g),二甲苯、巴豆油(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),角叉菜胶(上海麦克林生化科技股份有限公司),苏木精-伊红(HE)染色剂(北京索莱宝科技有限公司),白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 20230616-30219B、20230616-31063B),IL-1 β 一抗、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗大鼠二抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 GB11113、GB15003、GB23302、GB23303),细胞色素 P450 1B1 (cytochrome P450 1B1, CYP1B1)一抗(美国 Affinity Biosciences 公司,货号 DF6399),环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)、*Myc* 原癌基因蛋白(*Myc* proto-oncogene protein, c-MYC)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为 66351-1-Ig、67447-1-Ig),IL-6 一抗(沈阳万类生物科技有限公司,货号 WL02841)。

1.3 动物

本研究所用动物为 60 只 SPF 级 SD 雌性大鼠,10 周龄,体重(240 \pm 20) g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司[动物合格证号为 210726231102402046,生产许可证号为 SCXK(辽)2020-0001]。饲养环境温度为(25 \pm

1) °C、湿度为(50±5)%, 12 h明/12 h暗周期交替。本研究经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准通过, 批准编号:2023072001。

2 方法与结果

2.1 药效学实验

2.1.1 痔疮模型的制备

将60只SD大鼠先适应性喂养1周, 然后选取其中50只用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。用浸吸巴豆油混合液(蒸馏水、吡啶、乙醚和6%巴豆油按1:4:5:10的体积比混合)0.16 mL的棉球插入麻醉后的大鼠的肛门内, 将大鼠头朝上提起直立, 30 s后拔出棉球; 处理6 h后, 若大鼠出现直肠黏膜组织肿胀明显、黏膜下浆膜周围显著肿胀、正常黏膜皱襞消失、黏膜上皮细胞活性降低、黏膜下血管扩张, 代表造模成功^[7]。剩余10只大鼠不作处理。

2.1.2 分组与给药

符合造模成功标准的大鼠共有45只, 将其随机分为模型组(Model组), CBZCS低、中、高剂量组(分别记为CBZCS-L、CBZCS-M、CBZCS-H组)和马应龙麝香痔疮栓组(Positive组), 每组9只; 同时, 在未造模的10只大鼠中挑选9只作为空白组(NC组)。

CBZCS-L、CBZCS-M、CBZCS-H组大鼠的给药剂量分别为0.16、0.32、0.64 g/kg, 分别为临床给药剂量的0.5、1、2倍等效剂量; Positive组大鼠的给药剂量为0.32 g/kg, 为临床等效剂量; NC组和Model组大鼠按0.32 g/kg的剂量给予凡士林。将各药物分别加热融化后, 制成小块纳入大鼠肛门中, 用胶布固定; NC组和Model组则用棉签将凡士林涂抹至大鼠肛门中, 并用胶布固定。各组大鼠分别于造模后6、12、24、48、72 h给药^[8]。

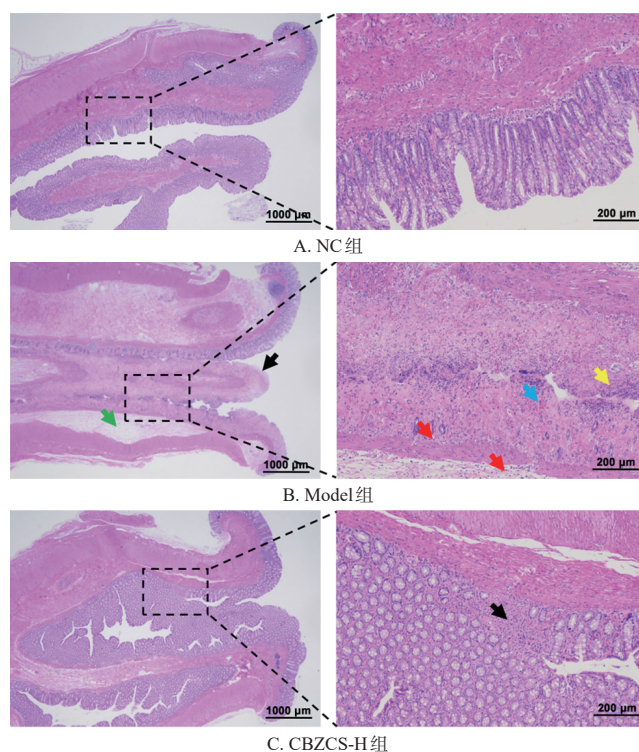
2.1.3 样本收集与处理

末次给药6 h后, 使用2%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 采用腹主动脉采血, 室温自然凝血1 h, 然后在4 °C下以3 500 r/min离心15 min分离血清, 并置于-80 °C冰箱中冻存。其中CBZCS-H组大鼠采血过程出现失误, 血液样本为8份, 其余组各为9份。以棉签插入肛门为指引, 沿大鼠肛周0.5 cm环形分离肛门, 深至直肠上1.0~1.5 cm, 剪断肠管部分。将肛门组织置于4%多聚甲醛中固定, 每组3份, 用于组织病理学观察; 其余肛门组织置于-80 °C冰箱中冻存, 用于代谢组学分析。

2.1.4 肛门组织病理学观察

采用HE染色法检测。取4%多聚甲醛固定的肛门组织, 常规制备石蜡切片(厚3~5 μm), 并行常规HE染色后, 采用显微镜观察肛门组织的病理学变化。结果(图1仅展示NC组、Model组和CBZCS-H组大鼠肛门组织的病理图, 全部图片可扫描文章首页二维码进入“增强出版”页面查看附图1)显示, 与NC组相比, Model组大鼠肛门组织黏膜层可见较多上皮细胞脱落, 结缔组织排列疏松, 固有层可见大量肠腺坏死溶解, 伴有较多出血, 黏膜层与黏膜下层可见弥散的淋巴细胞、中性粒

胞浸润和中度水肿。与Model组相比, CBZCS-H组大鼠肛门组织恢复良好, 只可见少量上皮细胞脱落; CBZCS-M组大鼠肛门组织有少量上皮细胞、肠腺细胞脱落; CBZCS-L组大鼠肛门组织黏膜层有少量上皮细胞脱落, 固有层可见较多肠腺坏死溶解, 黏膜层与黏膜下层存在少量淋巴细胞浸润; Positive组大鼠肛门组织特征与CBZCS-M组相似。



黑色箭头: 上皮细胞脱落; 黄色箭头: 固有层肠腺坏死溶解; 红色箭头: 淋巴细胞/中性粒细胞浸润; 蓝色箭头: 轻度出血; 绿色箭头: 黏膜下层水肿, 结缔组织排列疏松。

图1 NC组、Model组和CBZCS-H组大鼠肛门组织病理图(HE染色)

2.1.5 大鼠血清中IL-6和TNF-α水平检测

采用ELISA法检测。解冻-80 °C冻存的血清(每组选取8份血清样本), 按相应试剂盒说明书操作, 检测血清中IL-6和TNF-α水平。结果(表1)显示, 与NC组比较, Model组大鼠血清中TNF-α、IL-6水平均显著升高($P<0.05$); 与Model组比较, CBZCS-H组、CBZCS-M组、Positive组大鼠血清中IL-6水平和CBZCS-H组大鼠血清中TNF-α水平均显著降低($P<0.05$)。

表1 各组大鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$, pg/mL)

组别	TNF-α	IL-6
NC组	55.4±7.1	12.7±2.9
Model组	72.7±13.3 ^a	22.4±8.4 ^a
CBZCS-H组	60.0±10.0 ^b	13.6±4.0 ^b
CBZCS-M组	66.6±14.7	15.0±3.6 ^b
CBZCS-L组	67.2±17.4	19.5±5.3
Positive组	64.4±18.3	16.8±4.5 ^b

a: 与NC组比较, $P<0.05$; b: 与Model组比较, $P<0.05$ 。

2.2 肛门组织代谢组学分析

2.2.1 组织样本的制备

药效学研究结果显示,CBZCS-H组大鼠药效最好,故本研究选取该组大鼠的组织样本进行代谢组学分析。取“2.1.3”项下冻存的NC组、Model组、CBZCS-H组和Positive组大鼠的肛门组织(每组随机选取6只大鼠的样本组织),常规解冻后,取20 mg组织,加入1 mL甲醇-水溶液(1:1, V/V),在冰水浴中研磨3 min,超声15 min后于4 °C下以12 000 r/min离心15 min,过0.22 μm 微孔滤膜,取200 μL 滤液至样品瓶中,待测。取待测样品液各10 μL 混匀,作为质量控制(quality control, QC)样本,进行超高效液相色谱结合四极杆串联飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF-MS)分析。

2.2.2 色谱、质谱分析条件

色谱分析条件:采用ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm),以含0.1%甲酸的水溶液为流动相A、含0.1%甲酸的乙腈为流动相B进行梯度洗脱(0~2 min, 95%A; 2~6 min, 95%A \rightarrow 70%A; 6~7 min, 70%A; 7~10 min, 70%A \rightarrow 40%A; 10~11.5 min, 40%A; 11.5~13 min, 40%A \rightarrow 20%A; 13~13.5 min, 20%A; 13.5~16 min, 20%A \rightarrow 10%A; 16~17 min, 10%A; 17~17.5 min, 10%A \rightarrow 100%B; 17.5~20 min, 100%B; 20~20.5 min, 100%B \rightarrow 95%A; 20.5~23 min, 95%A);流速为0.4 mL/min;柱温为40 °C;进样量为3 μL 。

质谱分析条件:采用电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下检测,离子源温度为120 °C;脱溶剂气温度为500 °C,脱溶剂气流量为1 000.0 L/h;锥孔气流量为50 L/h;毛细管电压为2 000.0 V(+)/1 500.0 V(-),样品锥孔电压为60.0 V(+)/70.0 V(-);碰撞能电压为15~45 V;数据采集范围为100~1 500 m/z 。

2.2.3 代谢组学轮廓分析

将UPLC/Q-TOF-MS所处理的原始数据进行峰对齐、峰匹配、降噪、归一化预处理。基于精确的 m/z 、二级片段和同位素分布对化合物进行定性与定量分析。联合Progenesis QI软件和EZinfo 2.0软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA),观察样品间的整体分布情况。

PCA结果(图2)显示,QC样本呈现出良好的聚集情况,表明本实验涉及的仪器和实验方法稳定性高、数据质量可靠;NC组和Model组样本呈现明显分离,而药物组与Model组样本距离较远,这说明各组大鼠的代谢物存在明显差异。OPLS-DA结果(图3)和置换检验($n=200$)结果(图4)显示,正、负离子模式下NC组与Model组、Model组与CBZCS-H组样本分离明显。这提示模型拟合效果良好,组间存在一定差异,且没有出现过度拟合现象(由于版面有限,负离子模式下的图片略)。

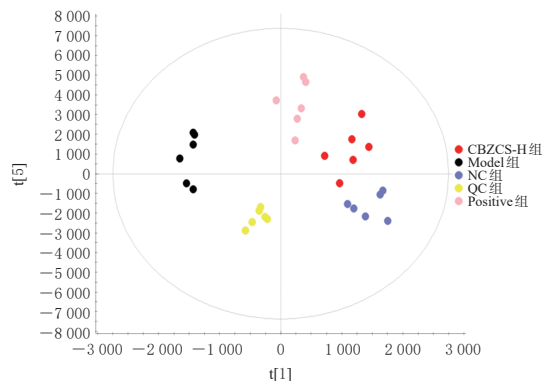


图2 各组大鼠组织样本的PCA图(正离子模式)

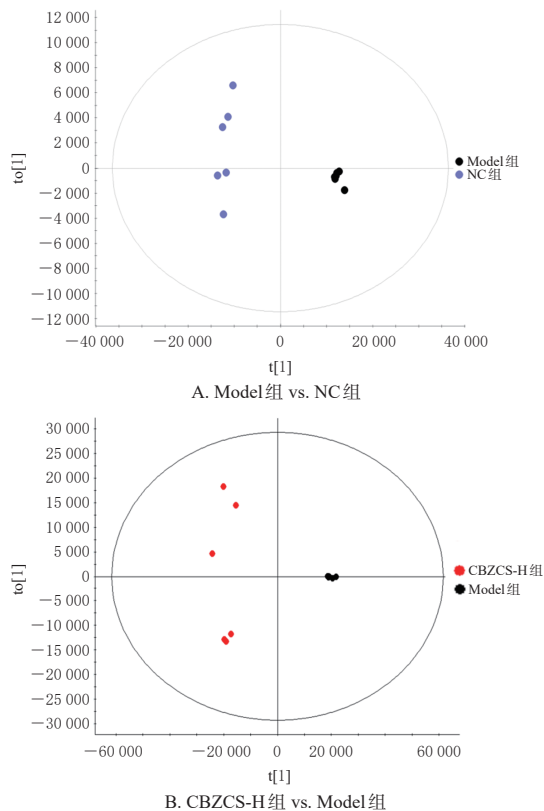


图3 各组大鼠组织样本的OPLS-DA图(正离子模式)

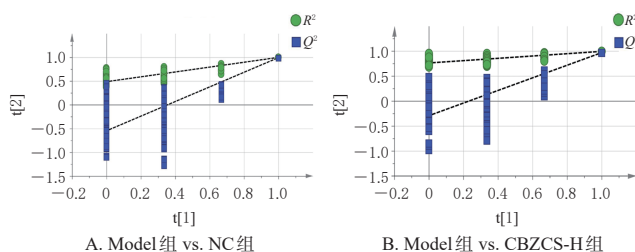


图4 各组大鼠组织样本的置换检验图(正离子模式)

2.2.4 差异代谢物的筛选和分析

通过Progenesis QI软件对NC组、Model组、CBZCS-H组和Positive组大鼠组织样本中代谢产物的变化进行预测,寻找符合变量重要性投影(variable importantin projection, VIP) >1 、组间差异倍数(fold change, FC) >1.2 或 <0.8 及 $P<0.05$ 的差异代谢物。运用微生物网站(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)对差异代谢物的丰

度值进行层次聚类分析,获得大鼠肛门组织差异代谢物丰度值热图,然后使用MetaboAnalyst 6.0网站(<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>)对给药后回调的差异代谢物进行京都基因及基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,选择 $P < 0.05$ 且Impact值 > 0 的代谢通路作为关键代谢通路。

结果显示,在Model组和NC组大鼠肛门组织样本中共发现34个差异代谢物,其中CBZCS-H组大鼠给药后回调的差异代谢物有22个。聚类热图(图5)显示,NC组大鼠肛门组织样本中差异代谢物水平与Model组差异明显,CBZCS-H组和Positive组大鼠肛门组织样本中差异代谢物水平均出现明显的回调,且接近NC组。富集分析结果(图6)显示,大鼠肛门组织样本中的差异代谢物涉及的关键代谢通路为花生四烯酸代谢、组氨酸代谢、甘油磷脂代谢通路。

2.3 基于网络药理学预测CBZCS治疗痔疮的潜在作用靶点

2.3.1 CBZCS主要活性成分及作用靶点的收集

在中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP)中分别以“sanqi”“zicao”“wubeizi”“baiji”为关键词进行检索,将类药性(drug-like, DL)设置为 ≥ 0.18 ,获取方中各中药对应的成分。鉴于蟾酥、蟾蜍皮、五倍子、冰片、枯矾在TCMSP中未被收录或者收录过少,改为运用中国知网和PubMed数据库完成上述中药成分的筛选。在PubChem中对中药成分进行身份标识,并在SwissADME数据库中分析中药成分的物理和化学性质,根据Lipinski

五规则(类药五原则)^[9]进一步筛选中药活性成分并寻找其对应的潜在作用靶点。运用UniProt数据库对靶点的基因名称和蛋白质ID进行标准化处理并剔除。以“hemorrhoids”为检索词,在GeneCards、DrugBank、NCBI、DisGeNET和TTD数据库中筛选疾病靶点,并与活性成分对应的靶点蛋白取交集。

结果显示,总共获得70个活性成分(部分成分在不同组方药材中共有)。其中,蟾酥中活性成分有15个,对应的潜在作用靶点有688个;蟾蜍皮中活性成分有17个,对应的潜在作用靶点有736个;白及中活性成分有17个,对应的潜在作用靶点有50个;冰片中活性成分有5个,对应的潜在作用靶点有108个;枯矾中活性成分有1个,对应的潜在作用靶点有143个;五倍子中活性成分有6个,对应的潜在作用靶点有560个;三七中活性成分有6个,对应的潜在作用靶点有150个;紫草中活性成分有18个,对应的潜在作用靶点有25个。经UniProt数据库处理后,共得到70个活性成分的1294个潜在作用靶点、716个疾病的基因和138个交集基因。

2.3.2 基因和差异代谢物交互分析挖掘CBZCS治疗痔疮的作用机制

笔者在MetaboAnalyst 6.0网站中将22个回调的差异代谢物与交集基因进行联合交互分析和通路富集,并通过Cytoscape软件构建“代谢物-代谢通路-基因”交互网络,以节点的中心度 > 2 倍中位数、介数中心性和紧密中心性 $>$ 中位数为条件,筛选核心代谢通路、代谢物和靶点蛋白。结果显示,34个差异代谢物和138个交集基因共作用于12条代谢通路,其中 $P < 0.05$ 的代谢通路为精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、组氨酸代谢、药物代

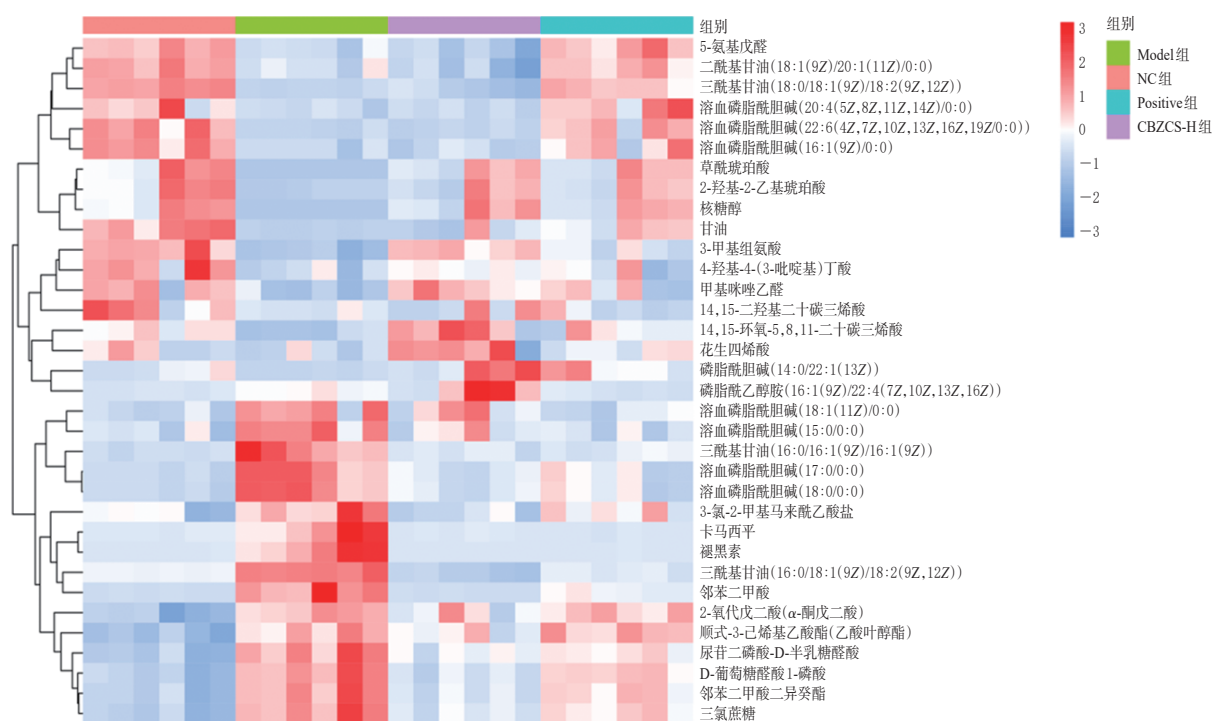


图5 各组大鼠肛门组织样本中差异代谢物的聚类热图

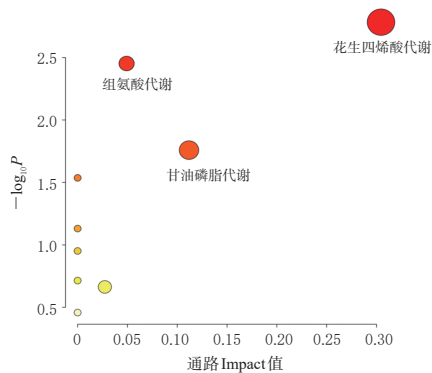


图6 各组大鼠肛门组织样本中差异代谢物的通路富集图

谢-CYP、亚油酸代谢、视黄醇代谢、色氨酸代谢、D-谷氨酰胺与D-谷氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、CYP对外源性物质的代谢通路。经网络节点筛选,可得核心代谢通路为花生四烯酸代谢、药物代谢-CYP、CYP对外源性物质的代谢通路,其中花生四烯酸代谢相关节点在“差异代谢物-代谢通路-基因”交互网络中占比最大,该代谢通路相关的核心靶点蛋白共有15个。

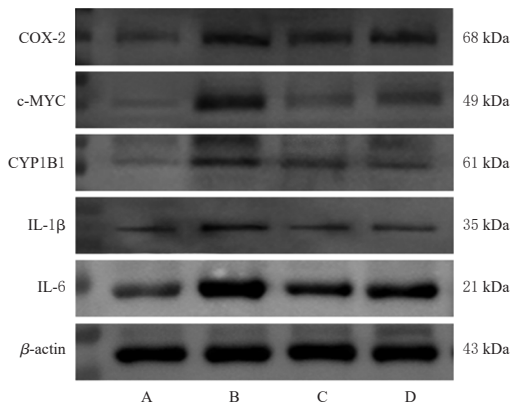
2.4 核心靶点的实验验证

从花生四烯酸代谢相关的15个核心靶点蛋白中挑选5个蛋白(CYP1B1、IL-6、IL-1 β 、c-MYC、COX-2),运用Western blot法进行实验验证。分别取NC组、Model组、CBZCS-H组和Positive组大鼠肛门组织各100 mg(每组分别取3只大鼠组织样本),提取组织中总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,取高温变性的蛋白在80 V电压下进行快速电泳分离,然后以湿法转至PVDF膜上(转膜条件为恒流300 mA、时间30 min),用5%脱脂奶粉常温封闭1.5 h;加入 β -actin(稀释比例1:3 000)、IL-1 β (稀释比例1:1 000)、CYP1B1(稀释比例1:500)、c-MYC(稀释比例1:5 000)、IL-6(稀释比例1:1 000)、COX-2(稀释比例1:1 000)一抗,4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗膜,加入二抗(稀释比例1:5 000),室温孵育1 h;洗膜,使用ECL化学发光液孵育1~2 min,置化学发光成像系统曝光显色,并用Image J软件分析条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值与内参(β -actin)蛋白条带灰度值比值表述目的蛋白的表达水平。

结果(图7、表2)显示,与NC组比较,Model组大鼠肛门组织中COX-2、c-MYC、CYP1B1、IL-1 β 、IL-6蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与Model组比较,CBZCS-H组和Positive组大鼠肛门组织中上述蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

痔疮是临床上常见的肛肠疾病之一。CBZCS作为一种中药复方制剂,在痔疮治疗中具有独特的优势。该方剂以蟾酥、蟾蜍皮为君药,能清热解毒、消肿止痛;臣以冰片、紫草助君药清热解毒、止痛,兼化腐生肌;三七



A: NC组; B: Model组; C: CBZCS-H组; D: Positive组。

图7 各组大鼠肛门组织中COX-2、c-MYC、CYP1B1、IL-1 β 和IL-6蛋白表达的电泳图

表2 各组大鼠肛门组织相关蛋白的相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	COX-2/ β -actin	c-MYC/ β -actin	CYP1B1/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-6/ β -actin
NC组	0.379 8 \pm 0.073 1	0.225 6 \pm 0.013 3	0.373 2 \pm 0.034 3	0.525 1 \pm 0.036 0	0.432 8 \pm 0.069 1
Model组	1.177 8 \pm 0.143 4 ^a	0.997 8 \pm 0.052 5 ^a	1.118 0 \pm 0.128 4 ^a	1.004 7 \pm 0.067 7 ^a	0.949 7 \pm 0.169 9 ^a
CBZCS-H组	0.860 2 \pm 0.091 8 ^b	0.300 0 \pm 0.022 7 ^b	0.903 6 \pm 0.054 6 ^b	0.570 9 \pm 0.107 3 ^b	0.566 9 \pm 0.054 3 ^b
Positive组	0.856 4 \pm 0.115 4 ^b	0.525 9 \pm 0.076 7 ^b	0.878 2 \pm 0.079 8 ^b	0.496 3 \pm 0.086 4 ^b	0.603 9 \pm 0.110 3 ^b

a: 与NC组比较, $P<0.05$; b: 与Model组比较, $P<0.05$ 。

散瘀、止血、定痛,五倍子、枯矾涩肠止泻、止血,白及收敛止血、生肌,共为佐药,使本方兼具止泻、止血、收敛生肌之效,体现了中医“标本兼治”的治疗理念。HE组织病理染色结果显示,经各剂量CBZCS干预后,痔疮模型大鼠的各症状均有不同程度缓解,其中以CBZCS-H组效果最佳。在以往的研究中证实了细胞浸润是痔疮最显著的病理特征之一,而由巴豆油所建痔疮模型大鼠血清IL-6和TNF- α 的含量会明显增多^[10]。IL-6和TNF- α 是炎症反应进程中的重要因子,IL-6参与了急性炎症反应和免疫应答的调节,能刺激B细胞前体产生抗体,诱导细胞发生炎症;TNF- α 过度产生或异常释放时,可能会诱导炎症细胞浸润,加重组织损伤和炎症过程^[11]。本研究结果显示,模型大鼠血清中TNF- α 、IL-6水平升高;经药物干预后,CBZCS-H组大鼠血清中TNF- α 、IL-6水平及CBZCS-M组大鼠血清中IL-6水平显著降低,提示CBZCS可以减轻痔疮大鼠机体的炎症反应。

为了深入研究CBZCS抗痔疮的机制,本研究采用代谢组学的方法对SD大鼠肛门组织样本的内源性小分子代谢产物的变化进行分析。结果显示,34种差异代谢物与痔疮的治疗相关。潜在生物标志物的富集通路分析结果显示,差异代谢物主要富集于花生四烯酸代谢通路。花生四烯酸代谢通路是炎症过程的重要组成部分^[12],其代谢主要通过COX途径进行,COX的表达能促进前列腺素(如前列腺素E₂)的合成,增强局部血流,导致痔疮区域充血和肿胀^[13]。

本研究通过代谢组学结合网络药理学建立与疾病相关的“代谢通路-差异代谢物-靶点蛋白”交互网络,经

拓扑分析得出花生四烯酸代谢通路的调控可能涉及 CYP1B1、IL-6、IL-1 β 、c-MYC、COX-2 等靶点蛋白的表达。研究表明,调控花生四烯酸代谢途径能够起到抑制炎症细胞因子和介质的作用^[14]。COX-1 和 COX-2 是 COX 中 2 种密切相关形式,二者共同催化花生四烯酸合成前列腺素,引起机体疼痛、血管舒张(肿胀和发红)和发热,并产生相应的炎症反应,同时炎症反应中相关的炎症因子会促进这一生物过程^[15]。有研究者在巴豆油制剂诱导痔疮模型大鼠的研究中发现,减少促炎细胞因子(IL-6、IL-1 β)的分泌可以缓解痔疮的炎症和组织损伤^[16]。c-MYC 是 Wnt/ β -连环蛋白信号通路中的一个关键成分,在细胞增殖、分化和凋亡等过程中发挥重要作用。有研究发现,IL-6、IL-1 β 可以激活 c-MYC 信号通路并调节其下游蛋白的表达^[17];而 c-MYC 是细胞迁移、分化和伤口愈合的潜在介质,调节 c-MYC 表达可能是改善痔疮的一个重要机制^[18]。而经过 *c-Myc* 基因活化的小鼠,其体内花生四烯酸衍生物会增加,伴随着 COX-2 蛋白表达的上调^[19]。COX 和 CYP 会刺激花生四烯酸的代谢途径进程^[20],尤其 CYP 在肛门组织病变的过程中发挥着重要的调节作用^[21]。本研究发现,与 NC 组相比,Model 组大鼠肛门组织中 COX-2、IL-6、IL-1 β 、c-MYC 和 CYP1B1 蛋白表达均显著上调,而经 CBZCS 干预后,上述蛋白表达均显著下调。

综上所述,CBZCS 抗痔疮机制可能是通过抑制 COX-2、c-MYC、CYP1B1 的蛋白表达,进而抑制花生四烯酸代谢,减少炎症因子 IL-6、IL-1 β 的释放。本课题组后续将在细胞层面对该机制的核心蛋白进行基因沉默和过表达干预,以期能发现更深层的调控机制。

参考文献

[1] 陈平,田振国,周璐,等.湖北省城区居民肛肠疾病流行病学调查[J].中国医药科学,2015,5(5):188-191.

[2] COSTANTINI T W, DEREE J, LOOMIS W, et al. Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and ZO-1 in immunostimulated Caco-2 intestinal monolayers[J]. Life Sci, 2009, 84(1/2): 18-22.

[3] GODEBERGE P, SHEIKH P, LOHSIRIWAT V, et al. Micronized purified flavonoid fraction in the treatment of hemorrhoidal disease[J]. J Comp Eff Res, 2021, 10(10): 801-813.

[4] 谢珉宁,徐璇,张磊,等.混合痔中医辨证分型与流行病学特点的相关性研究[J].江苏中医药,2016,48(11):38-40.

[5] 程飞.西药联合云南白药痔疮膏外敷治疗痔疮的疗效观察[J].临床合理用药杂志,2015,8(6):132-133.

[6] 梁中洁,杨晓勤.代谢组学在生物信息学专业中的教学探讨[J].科学咨询,2022(22):98-100.

[7] 孙科,李新,韩彦琪,等.消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠的药效及作用机制研究[J].中草药,2023,54(20):6734-6742.

[8] 窦建卫,彭湃.康痔栓对大鼠肛周肿胀及小鼠断尾出血的影响[J].中医外治杂志,2018,27(4):5-6.

[9] LIPINSKI C A. Rule of five in 2015 and beyond: target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 101: 34-41.

[10] 徐珊,窦燕,李小军,等.苦参凝胶对痔疮模型大鼠的治疗效果及机制研究[J].中医药学报,2024,52(3):34-39.

[11] LEI C Q, WU X, ZHONG X, et al. USP19 inhibits TNF- α - and IL-1 β -triggered NF- κ B activation by deubiquitinating TAK1[J]. J Immunol, 2019, 203(1): 259-268.

[12] XUE Y R, DENG Q Q, ZHANG Q L, et al. Gigantol ameliorates CCl₄-induced liver injury via preventing activation of JNK/cPLA2/12-LOX inflammatory pathway[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 22265.

[13] KAPRAL M, WAWSZCZYK J, SOŚNICKI S, et al. Modulating effect of inositol hexaphosphate on arachidonic acid-dependent pathways in colon cancer cells[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017, 131: 41-48.

[14] ZHOU Q, SUN H J, LIU S M. Effects of total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino on monosodium urate-induced M1-polarized macrophages through arachidonic acid signaling pathway: an *in vitro* study[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(1): 44-51.

[15] SIMON L S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation[J]. Am J Med, 1999, 106(5B): 37S-42S.

[16] ZHANG H, YAO X, ZHANG D, et al. Anti-hemorrhoidal activity of Lian-Zhi-San, a traditional Chinese medicine, in an experimental hemorrhoidal model in rats[J]. J Integr Med, 2021, 19(1): 42-49.

[17] LIU G Y, LI D Y, ZHANG L W, et al. Phenformin down-regulates c-myc expression to suppress the expression of pro-inflammatory cytokines in keratinocytes[J]. Cells, 2022, 11(15): 2429.

[18] KLINK C, BINNEBOSEL M, KAMMER D, et al. Hemorrhoids are related to changes of cell function in mucosa and submucosa[J]. Int J Colorectal Dis, 2009, 24(12): 1389-1394.

[19] ZELLER K I, ZHAO X D, LEE C W H, et al. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(47): 17834-17839.

[20] BOROS É, HEGEDŰS Z, KELLERMAYER Z, et al. Global alteration of colonic microRNAome landscape associated with inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2022, 13: 991346.

[21] AGUNDEZ J A G. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer[J]. Curr Drug Metab, 2004, 5(3): 211-224.

(收稿日期:2025-02-17 修回日期:2025-06-09)

(编辑:林静)