

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250717001

黄连平胃散对溃疡性结肠炎小鼠的治疗效果评价及其作用机制研究

黄定庸¹, 李志强², 刘思文², 湛孝东²

1. 西藏民族大学医学院(陕西 咸阳 712082); 2. 皖南医学院基础医学院(安徽 芜湖 241002)

【摘要】 **目的** 探讨黄连平胃散治疗溃疡性结肠炎(UC)小鼠的作用机制。**方法** 高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测药物主要成分,TCMSP数据库和PubChem数据库检索药物成分作用靶点, GeneCards数据库检索UC疾病靶点,筛选成分-疾病共同靶点并利用生物信息学方法分析其功能。利用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导昆明鼠构建UC模型,代谢组学方法分析黄连平胃散对代谢产物的影响,苏木精-伊红(HE)染色和阿尔辛蓝-过碘酸希夫(AB-PAS)染色观察结肠组织炎症及黏液变化,免疫组织化学法检测结肠组织中闭锁小带蛋白-1(ZO-1)表达,酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和活性氧(ROS)水平,Western blot法检测结肠组织中磷酸化蛋白53(p53)和半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3(CASP3)蛋白水平,分子对接验证主要成分与p53和CASP3结合亲和力和结合模式。**结果** 黄连平胃散成分主要由黄酮类、糖及糖苷类、苯丙素类、生物碱及萜类组成,该方剂可调节小鼠血清中单磷酸腺苷、二磷酸尿苷葡萄糖及吡啶类化合物的代谢,显著降低血清TNF- α 、IL-6、ROS水平,增加上皮紧密连接蛋白ZO-1表达和黏液分泌,减轻肠组织炎症细胞浸润,并抑制结肠组织p53和CASP3蛋白表达;分子对接显示,去氢紫堇茎碱和小檗碱均与p53和CASP3靶点具有较高的结合力。**结论** 黄连平胃散可通过抑制p53信号通路减轻肠道炎症和改善肠道功能。

【关键词】 溃疡性结肠炎;黄连平胃散;p53信号通路;网络药理学;代谢组学;中药研究

Therapeutic efficacy and underlying mechanisms of Huanglian Pingwei Powder on ulcerative colitis mice

HUANG Dingyong¹, LI Zhiqiang², LIU Siwen², ZHAN Xiaodong²

1. Medical College of Xizang Minzu University, Xianyang, Shaanxi 712082, China; 2. School of Basic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241002, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic mechanism of Huanglian Pingwei Powder in treating ulcerative colitis (UC) model. **Methods** Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect the main components of the drug. The TCMSP and PubChem databases were used to identify the targets of the drug's components. The UC model was established in mice using dextran sulfate sodium (DSS). Metabolomics analysis was conducted to assess the effects of Huanglian Pingwei Powder on metabolites. Hematoxylin and Eosin (HE) staining and Alcian Blue-Periodic Acid-Schiff (AB-PAS) staining were used to observe changes in inflammation and mucus in colon tissue. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of Zonula Occludens-1 (ZO-1), and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and reactive oxygen species (ROS). Western blot was used to assess the levels of phosphorylated protein 53 (p53) and cysteine aspartate-specific protease 3 (CASP3) proteins in colon tissue. Molecular docking was used to validate the binding affinity and interaction modes of key compounds with p53 and CASP3. **Results** Huanglian Pingwei Powder is primarily composed of flavonoids, saccharides and glycosides, phenylpropanoids, alkaloids, and terpenoids.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82502208)

[作者简介] 黄定庸,男,硕士研究生,主要从事病理学与病理生理学研究

[通信作者] 湛孝东,教授,硕士研究生导师;E-mail: xdzhan@126.com

Treatment with this formula regulated serum metabolites such as adenosine monophosphate, guanosine diphosphate-glucose, and indole compounds, significantly reducing serum TNF- α , IL-6, and ROS levels. It also increased expression of ZO-1 and mucin secretion, reduced inflammatory cell infiltration in intestinal tissue, and inhibited p53 and CASP3 protein expression in colon tissue. Both dehydrocorydaline and coptisine exhibited strong binding affinity for p53 and CASP3. **Conclusion** Huanglian Pingwei Powder alleviates intestinal inflammation and improves gut function by inhibiting the p53 signaling pathway.

Keywords: ulcerative colitis; Huanglian Pingwei Powder; p53 signaling pathway; network pharmacology; metabonomics; Chinese materia medica research

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的结肠非特异性炎症性疾病,好发于直肠及远端结肠,主要临床表现为持续反复的腹泻、腹痛及黏液脓血便,加重期与缓解期交替^[1]。近年来,UC的发病率在全球范围内不断上升,成为备受关注的公共卫生问题^[2]。现阶段,UC的药物治疗主要以氨基水杨酸类药物为主(如柳氮磺吡啶等)。然而,该类药物的治疗效果个体差异较大,不良反应明显,且有加重临床不良结局的风险^[3]。因此,寻找新的治疗药物变得尤为迫切。

中药在治疗 UC 方面不良反应较小,其多种活性成分可同时作用于抗炎、调节免疫等多个病理环节,减少单一靶点治疗的局限性。研究^[4-5]表明,葛根芩连汤加减方、白头翁汤等中药具有恢复杯状细胞功能、修复肠上皮屏障、减轻肠道炎症反应等功效,可有效改善 UC 症状。黄连平胃散出自《医宗金鉴》^[6],该方剂由苍术、厚朴、陈皮、黄连等药物组成,主治肠胃湿热导致的脐痈溃后、黄水疮等症;其药性特征与下嵩京辨治 UC 时所秉持的“清化湿热、行气调血”治法治则高度契合^[7]。然而,该方剂主要的作用机制尚未有研究报道。本研究通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导 UC 小鼠模型,验证黄连平胃散治疗 UC 的效果并探讨其可能的作用机制,旨在为该方剂治疗 UC 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级昆明小鼠,40只,雌性,体质量20~22g,购自长沙天勤生物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK(湘)2024-0021。动物使用许可证号:SYXK(皖)2023-005。饲养温度22℃,湿度70%,采用12h光照/黑暗的昼夜循环,自由摄食饮水,适应性喂养1周后进行实验。动物实验方案获皖南医学院实验动物福利与伦理委员会审查批准(伦理批号:WNMC-AWE-2025445)。

1.1.2 药物制备与试剂 黄连平胃散由麸炒苍术15g、厚朴9g、陈皮9g、甘草6g、黄连10g组成。上述药材均购于芜湖市中医医院,药物研磨成粉,加5倍体积的纯净水(约150mL)浸泡30min,加生姜6g、大枣10g,大火煮沸后转小火煮至原体积1/3(约50mL,终浓度生药1.3g/mL,为成人1d的剂量),过滤、冷却后保存备用。

DSS(批号:N1118E),大连美仑生物技术有限公司;柳氮磺吡啶肠溶片(批号:09240709),上海信谊天平药业有限公司;小鼠活性氧(ROS)酶联免疫吸附分析(ELISA)检测试剂盒(批号:ZK-5153),上海臻科生物科技有限公司;小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(批号:D721217-0096)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(批号:D721022-0096)、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3(CASP3)多克隆抗体(批号:D320074-0100)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号:D110016)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)单克隆抗体(批号:D164329)、辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(批号:D110058)、免疫组织化学试剂盒(批号:D601037-0050)、动物全蛋白提取试剂盒(批号:C510003-0050),生工生物工程(上海)股份有限公司;磷酸化蛋白53(p53)单克隆抗体(批号:AF7671)、超敏增强型化学发光(ECL)试剂盒(批号:P0018S),上海碧云天生物技术股份有限公司;阿尔辛蓝-过碘酸希夫(AB-PAS)染色试剂盒(批号:G1285),北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 多功能酶标仪(型号:Infinite M200PRO),瑞士Tecan公司;蛋白印迹系统(型号:ChemiDoc),伯乐生命医学产品(上海)有限公司;显微成像系统(型号:ECLIPSE Ci),尼康精机(上海)有限公司;全自动轮转式切片机(型号:140517),德国Leica公司;高效液相色谱仪(型号:ACQUITY UPLC I-Class),美国Waters公司;高分辨液相色谱-质谱联用仪(UPLC-MS/MS)(型号:Q-Exactive),美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 分组、造模与干预 将小鼠随机分成 4 组,即磷酸盐缓冲液(PBS)组、模型组、黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组($n=10$)。参考相关文献^[8],构建小鼠 UC 模型及判断造模成功与否。除 PBS 组外,其余各组给予 5% DSS 自由饮水,隔日更换新鲜 DSS 溶液,连续 7 d;之后黄连平胃散组给予 1.3 g/mL 的汤剂 0.2 mL 灌胃,柳氮磺吡啶组给予等体积 41 g/L 的柳氮磺吡啶灌胃,两个治疗组给药剂量依据体表面积等效原则转化而来^[9]。以散剂为例:标准成人体质量 60 kg,身高 170 cm,体表面积约 1.65 m²;标准小鼠体质量 20 g,体表面积约为 0.006 7 m²,体表面积比=0.006 7/1.65(约 0.004 06),药物浓度相同的情况下,小鼠每日剂量=人体每日剂量(50 mL)×体表面积比(0.004 06)=0.203 mL。模型组给予等体积的 PBS 灌胃,连续 7 d,PBS 组日常饮水及灌胃均用 PBS 代替。末次治疗 24 h 后,以 5% 异氟烷麻醉小鼠,眼窝取血收集血清,处死小鼠后无菌收集结肠组织,测量结肠长度,一部分新鲜组织用于总蛋白提取,余下组织置 10% 甲醛溶液中固定备用。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 药物成分分析 利用 UPLC-MS/MS 分析黄连平胃散主要成分,具体操作如下:药液均匀后取 500 μ L 置 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 含浓度为 2 mg/L 的混合内标水溶液(混合内标由 L-2-氯苯丙氨酸、琥珀酸-d4、L-缬氨酸-d8、胆酸-D4、D-虫荧光素游离酸及 L-左旋肉碱-D3 等比例混合而成),涡旋振荡 1 min,冰浴中超声提取 1 h,14 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;取 200 μ L 上清液上机分析。色谱条件:色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m),柱温 45 $^{\circ}$ C;流动相:A-水(含 0.1% 甲酸),B-乙腈。洗脱条件:0~2 min,5% B;2~4 min,30% B;4~8 min,30%~50% B;8~10 min,50%~80% B;10~15 min,80%~100% B;15.1~16 min,5% B。流速:0.35 mL/min;进样体积:5 μ L。质谱条件:离子源:HESI;样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式;数据采集模式:DDA。原始数据经 Progenesis QI v3.0 软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化。化合物的鉴定基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,使用 TCM 数据库进行定性分析。

1.3.2 共同作用靶点筛选及化合物-靶点网络构建 疾病靶点筛选:以“Ulcerative colitis”为关键词在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)筛

选 Relevance score>5 的靶点。药物靶点:以主要药物成分为关键词在 TCMSp 数据库(<https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)筛选黄连平胃散主要化学成分作用靶点;韦恩图鉴定两个靶点集的共同靶点;京都基因与基因组数据库(KEGG)分析共同靶点的信号通路;Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络,网络中结点的连接线越多表明该化合物与疾病的相关度越高。

1.3.3 小鼠一般情况及疾病活动指数(DAI)评分 实验全程观察各组小鼠活动情况及精神状态,记录体质量并计算其变化率。体质量变化率=(初始体质量-当日体质量)/初始体质量×100%。参考相关文献^[10]制定 DAI 评分标准,详见表 1。

表 1 小鼠疾病活动指数(DAI)评分标准

得分	体质量下降率/%	大便性状	大便隐血
0	无下降或增长	正常,颗粒状	无便血
1	下降 1~5	成形,但黏附于肛门	1~3 min 呈淡蓝色
2	下降 5~10	糊状,不成形	<1 min 逐渐呈蓝色
3	下降 10~15	水样便	立即呈深蓝色

1.3.4 血清代谢组学分析 样本前处理:取各组小鼠血清样本 80 μ L 至离心管中冰浴,加入 320 μ L 甲醇-乙腈(V:V=2:1,含浓度为 2 μ g/mL 的混合内标),涡旋振荡 1 min 沉淀蛋白,冰浴中超声 10 min,-40 $^{\circ}$ C 静置过夜,离心 20 min(12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C),取 150 μ L 上清液进行分析;每组 5 个样本,等比例加入质控样本(QC)。数据采集模式:DDA,原始数据经 XCMS v4.5.1 软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正;化合物的鉴定基于保留时间、精确质量数、二级碎片以及同位素分布 4 个维度,使用 The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps (v2.3)和 METLIN 数据库以及 LuMet-Animal3.0 数据库进行鉴定。代谢产物筛选标准: $P<0.05$ 、FC ≥ 2.0 或 FC $\leq 1/2.0$ 。采用主成分分析(PCA)来观察各样本间的总体分布和分析过程的稳定性,正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)区分各组间代谢轮廓的总体差异。根据 OPLS-DA 模型得到变量权重值(VIP)鉴定差异代谢产物在分组中的权重。

1.3.5 结肠组织病理分析 苏木精-伊红(HE)染色:10% 甲醛溶液固定各组小鼠远端结肠组织 24 h 后,分别经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋后切 6 μ m 厚切片进行 HE 染色,显微镜下观察各组小鼠结肠黏膜上皮损伤及炎症细胞浸润情况。

AB-PAS 染色:取各组小鼠远端结肠组织,AB-PAS 染色观察各组小鼠结肠上皮黏膜杯状细胞及黏液分泌情况,操作按试剂盒说明书步骤进行。

免疫组织化学染色:取各组小鼠远端结肠组织,ZO-1 抗体检测结肠上皮屏障的完整性。主要操作:石蜡切片脱蜡至水,3%的过氧化氢封闭 10 min,蒸馏水清洗 3 遍后将玻片置乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中,微波炉修复 5 min,PBS 清洗,5%的山羊血清封闭(37 °C,20 min),组织块上滴加 ZO-1 抗体(1:100 稀释,4 °C 过夜),后续操作按免疫组织化学试剂盒说明书步骤进行,ImageJ 软件分析阳性区域面积。

1.3.6 血清 ELISA 检测 各组小鼠麻醉后眼窝取血,室温静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 5 min,收集血清,ELISA 检测各组小鼠血清中 ROS、TNF- α 及 IL-6 水平,具体操作按试剂盒说明书步骤进行。

1.3.7 结肠组织相关蛋白 Western blot 检测 无菌取各组小鼠远端结肠组织,PBS 清洗后,按照动物全蛋白提取试剂盒说明操作,向每 1 mL 预冷的裂解缓冲液中加入 5 μ L 磷酸酶抑制剂、1 μ L 蛋白酶抑制剂和 10 μ L 苯甲基磺酰氟(PMSF)并混匀,冰上预冷待用;取远端结肠组织打碎,用 PBS 洗涤两次,离心取沉淀后加入 0.5 mL 已混匀预冷的 Lysis Buffer,4 °C 下玻璃匀浆器冰上匀浆,将匀浆液转移至预冷的离心管,冰上放置 10 min 并在此期间取出震荡 2~3 次后,以 13 200 r/min、4 °C 离心 10 min,转移上清至新的预冷离心管中;二辛可酸(BCA)法测定细胞总蛋白浓度;各孔取 5 μ L 的蛋白上样,于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离(浓缩胶 70 V 电压,100 min;分离胶 110 V 电压,100 min)。将分离后的蛋白电转移(110 V 电压 100 min)至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),加入 5% 脱脂奶粉封闭液于摇床上室温封闭 2 h;用含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗膜 3 次,每次 5 min,分别加入 p53(1:2 000)、CASP3(1:2 000)及 GAPDH(1:5 000)抗体 4 °C 反应过夜。次日先以 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;后加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),室温反应 2 h,再用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,按 ECL 试剂盒说明书步骤进行显影。采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.4 分子对接 选取化合物-靶点网络中相关度较高的化合物与 p53 信号通路的关键靶点进行分子对接,具体方法如下:从 UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) 分别搜索靶点对应的 ID 并在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载,PyMOL 软件对靶

蛋白进行去水、去配体及加氢处理,从 PubChem 数据库中下载小分子 3D 结构作为配体,将处理后的靶蛋白及配体结构转换为 pdbqt 格式,Autodock Vina 软件进行分子对接,结合能阈值设置为 ≤ -5 kcal/mol,利用 PyMOL 软件进行可视化。

1.5 统计学方法 采用 SPSS26.0 对实验数据进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布和方差齐性采用单因素方差分析,并采用 LSD 分析组间差异;数据不符合正态分布或方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连平胃散主要药物成分 黄连平胃散经阴、阳离子两种模式下色谱分析并联合质谱,共鉴定出 477 种成分,主要由黄酮类、糖及糖苷类、苯丙素类、生物碱及萜类成分组成。其中黄酮类包括川陈皮素、桔皮素及甘草苷等;糖及糖苷类包括松二糖、L-葡萄糖及麦芽三糖等;苯丙素类包括厚朴酚、3-O-阿魏酰奎宁酸及 N-阿魏酰章鱼胺等;生物碱类包括去氢紫堇碱、小檗碱和非洲防己碱等;萜类包括瓜萎镰菌醇、甘草酸及 4-O-没食子酰白芍苷等。另外,峰面积比值排名前 5 的成分分别是去氢紫堇碱、小檗碱、非洲防己碱、水苏碱、川陈皮素。

2.2 成分-疾病-靶点网络及其信号通路 在 GeneCards 数据库筛选得到 UC 相关的靶点 841 个,在 TCMSP 和 PubChem 数据库检索得到黄连平胃散相对含量排名前 10 成分的作用靶点 95 个,两者共同作用靶点 21 个;KEGG 分析显示,共同作用靶点在内分泌抵抗、p53 及缺氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路被显著富集。见表 2。

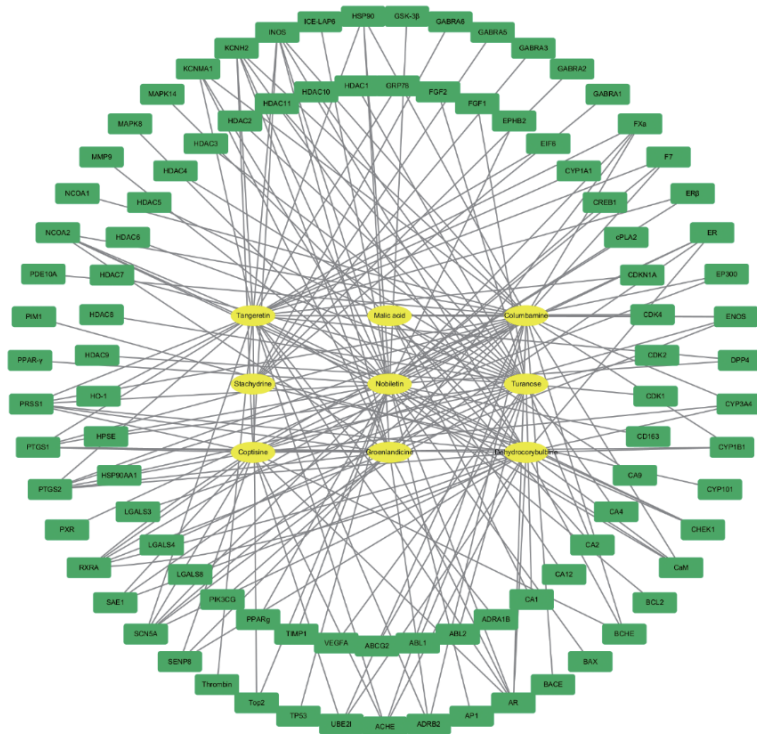
Cytoscape 软件构建并分析化合物-靶点网络显示,相关度较高的化合物依次为:去氢紫堇碱、非洲防己碱、川陈皮素、小檗碱、桔皮素等。见图 1。

2.3 黄连平胃散对血清代谢产物的调节作用 PCA 分析显示,各实验组中的 5 个重复样本均在置信区间内,组内聚集程度良好;OPLS-DA 分析显示,各实验组样本组间呈现明显分离,提示各实验组血清代谢产物产生明显变化(图 2)。具体来讲,同 PBS 组相比,模型组共筛选出差异代谢产物 824 个(上调 253 个,下调 571 个),其中二磷酸尿苷葡萄糖和白三烯等物质被显著上调,单磷酸腺苷和乙酰葡萄糖内酯等物质被显著下调,其他 VIP 值排名前 10 的代谢产物详见表 3, P 值最小排名前 20 的代谢产物如图 3A

表2 共同作用靶点的京都基因与基因组数据库(KEGG)富集分析

ID	通路信息	基因比率	矫正P值	富集在信号通路内的分子
hsa01522	内分泌抵抗	7/21	<0.01	MAPK14/BCL2/BAX/MMP9/TP53/CDKN1A/CDK4
hsa04115	p53 信号通路	6/21	<0.01	CHEK1/BCL2/BAX/TP53/CDKN1A/CDK4
hsa04066	HIF-1 信号通路	6/21	<0.01	EP300/BCL2/TIMP1/VEGFA/CDKN1A/IL6
hsa04657	IL-17 信号通路	5/21	<0.01	PTGS2/MAPK14/MMP9/TNF/IL6
hsa05210	结肠癌	4/21	<0.01	BCL2/BAX/TP53/CDKN1A

注:p53为磷酸化蛋白53,HIF-1为缺氧诱导因子-1,IL-17为白细胞介素-17,MAPK14为丝裂原活化蛋白激酶14,BCL2为B细胞淋巴瘤因子2,BAX为BCL2相关X蛋白,MMP9为基质金属蛋白酶9,TP53为肿瘤蛋白53,CDKN1A为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A,CDK4为细胞周期蛋白依赖性激酶4,CHEK1为细胞周期检查点激酶1,EP300为E1A结合蛋白p300,TIMP1为组织金属蛋白酶抑制因子1,VEGFA为血管内皮生长因子A,IL6为白细胞介素-6,PTGS2为环氧化酶2,TNF为肿瘤坏死因子。



注:绿色矩形代表作用靶点,黄色椭圆形代表药物成分,连线代表两者之间存在互作关系。

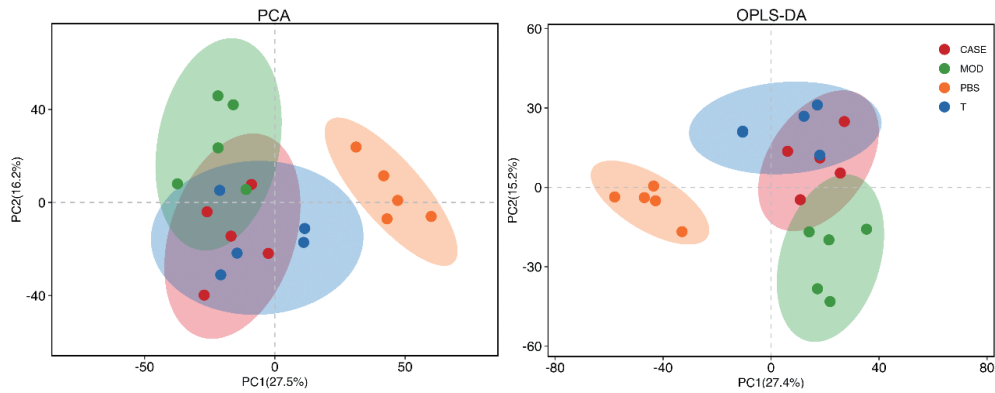
图1 “成分-疾病-靶点”网络图

所示;另外,与模型组相比,黄连平胃散组共筛选出差异代谢产物363个(上调166个,下调197个),其中5-羟基-6-甲氧基吡啶葡萄糖醛酸苷和吡啶羧酸硫酸酯等物质被显著上调,δ2-四十二碳六烯酸和白三烯E3等物质被显著下调,其他VIP值排名前10的代谢产物详见表4,P值最小排名前20的代谢产物如图3B所示。

2.4 黄连平胃散有效改善小鼠一般情况和DAI评分 实验第7天,模型组、黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组小鼠精神萎靡,活动明显减少,被毛杂乱无光泽,反应迟缓,摄食量显著减少,且DAI评分均显著高于PBS组($P<0.01$);第14天,黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组小鼠一般情况较模型组显著改善,DAI

评分均较模型组显著降低,但仍高于PBS组($P<0.01$)。见图4。

2.5 黄连平胃散可增加小鼠结肠长度 小鼠新鲜结肠组织检查发现,PBS组结肠组织外观红润,长度(10.20±0.37)cm,肠内容物呈颗粒状或条索状,质地松软,易推动(图5A);模型组结肠组织充血,水肿明显,长度(6.75±0.59)cm显著短于PBS组(图5B, $P<0.01$),肠内容物较少且质地坚硬,不易推动;黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组结肠长度无差异(图5C、D, $P>0.05$),分别为(9.25±0.53)cm和(9.38±0.51)cm,较模型组显著增长,但短于PBS组($P<0.01$,图5),两组肠内容物相当,质地较模型组软,但不易推动。



注:PCA 为主成分分析,OPLS-DA 为正交偏最小二乘法分析,PC1 为第一主成分,PC2 为第二主成分,CASE 为柳氮磺吡啶组,MOD 为模型组,PBS 为磷酸盐缓冲液组,T 为黄连平胃散组。

图 2 各组小鼠血清代谢产物 PCA 及 OPLS-DA 分析

表 3 模型组与 PBS 组比较变量权重值(VIP)排名前 10 的差异代谢产物信息

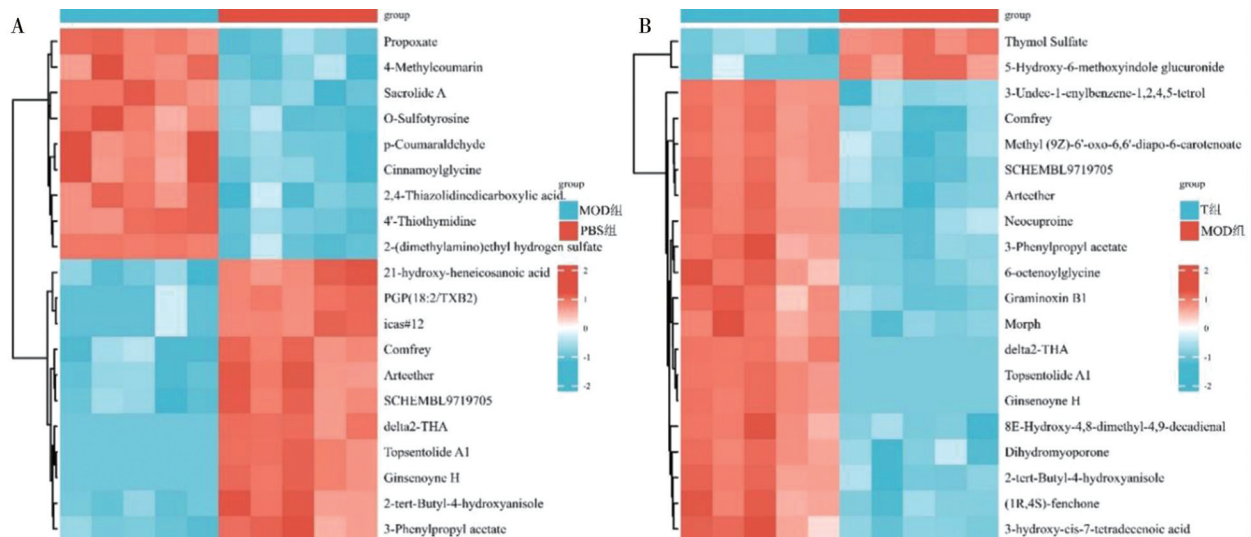
代谢产物	VIP 值	log ₂ FC	P 值
单磷酸腺苷	3.63	-12.06	<0.01
二磷酸尿苷葡萄糖	3.61	9.99	<0.001
磷脂酰甘油磷酸(18:2/TXB2)	3.38	8.66	<0.001
白三烯	3.27	8.39	<0.001
乙酰葡醛内酯	3.01	-8.24	<0.01
PS(18:2/0:0)	2.86	-7.29	<0.01
3-磷酸甘油酸	2.73	-6.58	<0.01
谷氨酰-苯丙氨酰-异亮氨酸	2.63	-6.27	<0.01
2,8-二羟基喹啉-β-D-葡萄糖醛酸苷	2.61	-6.18	<0.01
3,5-二硝基水杨酸	2.58	-5.92	<0.05

注:log₂FC=模型组均值-PBS 组均值,PBS 为磷酸盐缓冲液,PS 为磷脂酰丝氨酸。

表 4 黄连平胃散组与模型组比较变量权重值(VIP)排名前 10 的差异代谢产物信息

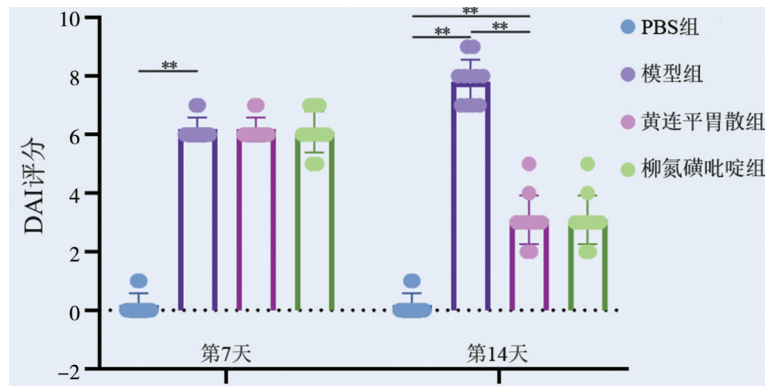
代谢产物	VIP 值	log ₂ FC	P 值
82-四十二碳六烯酸	4.31	-8.28	<0.001
5-羟基-6-甲氧基吡啶葡萄糖醛酸苷	4.07	7.82	<0.001
白三烯	3.70	-6.79	<0.001
吡啶酸硫酸酯	3.46	7.04	<0.01
乙基-葡萄糖醛酸	3.29	5.33	<0.001
磷脂酰丝氨酸(18:2/0:0)	2.98	5.44	<0.01
异亮氨酰缬氨酸	2.83	-3.75	<0.01
肉豆蔻烯酸	2.83	-3.73	<0.001
戊二酸	2.76	-3.55	<0.001
天冬酰胺酰-酪氨酰-异亮氨酸	2.69	4.75	<0.001

注:log₂FC=黄连平胃散组均值-模型组均值。



注:A 为模型组同 PBS 组比较 P 值最小排名前 20 显著差异代谢物,B 为黄连平胃散组同模型组比较 P 值最小排名前 20 显著差异代谢物,MOD 组为模型组,PBS 组为磷酸盐缓冲液组,T 组为黄连平胃散组。

图 3 各组 P 值最小排名前 20 显著差异代谢物聚类热图



注:DAI为疾病活动指数,PBS为磷酸盐缓冲液。两组之间比较,** $P < 0.01$; $n = 10, \bar{x} \pm s$ 。

图4 各组小鼠不同时间点的DAI评分比较

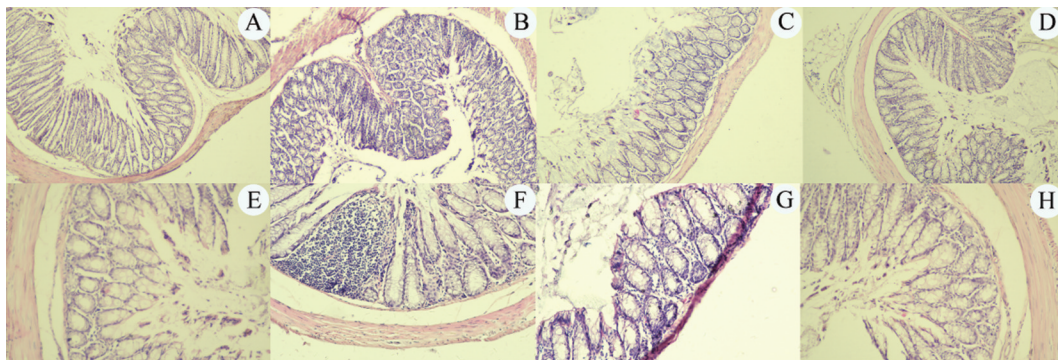


注:A为磷酸盐缓冲液(PBS)组,B为模型组,C为黄连平胃散组,D为柳氮磺吡啶组;两组之间比较,** $P < 0.01$; $n = 8, \bar{x} \pm s$ 。

图5 各组小鼠代表性结肠外观及长度比较

2.6 黄连平胃散显著改善UC小鼠结肠上皮病理形态 HE染色病理切片发现,PBS组结肠组织黏膜层表面的单层柱状上皮排列紧密、连续,大量杯状细胞散在分布,管状肠腺密集、均匀,黏膜下层无炎症细胞,肌层平滑肌纤维排列整齐,厚度均匀(图6A、E);模型组结肠组织隐窝扭曲、萎缩,杯状细胞显著减

少,黏膜下层大量淋巴细胞呈团状聚集,病变严重的可累及肌层,出现平滑肌水肿,肌纤维排列紊乱(图6B、F);与模型组比较,黄连平胃散组黏膜层结构破坏得到不同程度恢复,杯状细胞增多,淋巴细胞弥散浸润,无团状聚集(图6C、G);柳氮磺吡啶组组织结构改善明显,炎症细胞浸润显著减轻(图6D、H)。



注:A、E为磷酸盐缓冲液(PBS)组,B、F为模型组,C、G为黄连平胃散组,D、H为柳氮磺吡啶组;A~D,×100;E~H,×200。

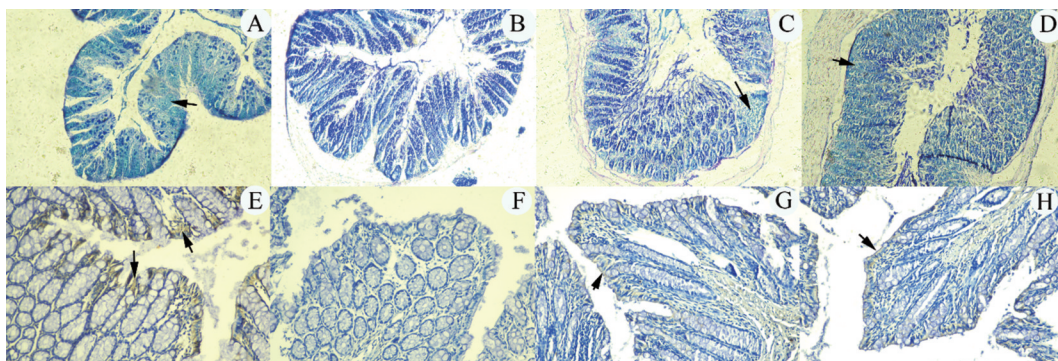
图6 各组小鼠结肠组织苏木精-伊红(HE)染色检测病理特征

AB-PAS染色发现,PBS组结肠黏膜层形成均质、连续的天蓝色黏液层(酸性黏液,图7A);模型组

结肠黏膜层天蓝色黏液显著减少,覆盖不均匀,杯状细胞胞体萎缩,胞体内蓝紫色颗粒增多(混合黏

液),提示黏液分泌减少且黏液性质发生改变(图 7B);黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组天蓝色黏液进一步增多,蓝紫色颗粒进一步减少(图 7C、D)。免疫组织化学检测 ZO-1 蛋白在肠上皮的表达情况发现, PBS 组肠上皮细胞顶侧紧密连接区域呈连续线性强阳性信号,相邻细胞间呈“网格状”连接(图 7E);模型组上皮区域阳性信号基本消失(图 7F);黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组上皮阳性区域较模型组显著增多,但阳性信号较 PBS 组弱(图 7G、H)。量化结果

显示:与 PBS 组比较,模型组 AB-PAS 染色阳性区域面积及 ZO-1 阳性区域面积显著减少($P<0.01$);与模型组比较,黄连平胃散组、柳氮磺吡啶组 AB-PAS 染色阳性区域面积显著增加($P<0.01$),并且 ZO-1 阳性区域面积也显著增加($P<0.01$);与黄连平胃散组比较,柳氮磺吡啶组 AB-PAS 染色阳性区域面积显著增加($P<0.01$),但两组 ZO-1 阳性区域面积差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。



注:A、E为磷酸盐缓冲液(PBS)组,B、F为模型组,C、G为黄连平胃散组,D、H为柳氮磺吡啶组;A~D,阿尔辛蓝-过碘酸希夫(AB-PAS)染色,×100;E~H,闭锁小带蛋白-1(ZO-1)免疫组织化学染色,×200;黑色箭头为典型的酸性黏液或ZO-1蛋白的阳性信号区。

图7 各组小鼠结肠 AB-PAS 染色及 ZO-1 免疫组织化学染色图

表5 各组小鼠结肠黏膜层阳性区域面积统计分析
($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	AB-PAS	ZO-1
PBS组	93.669±2.396	3.661±0.506
模型组	36.891±3.873**	0.034±0.018**
黄连平胃散组	61.050±3.373##	1.813±0.410##
柳氮磺吡啶组	79.257±2.571 $\Delta\Delta$	1.875±0.615

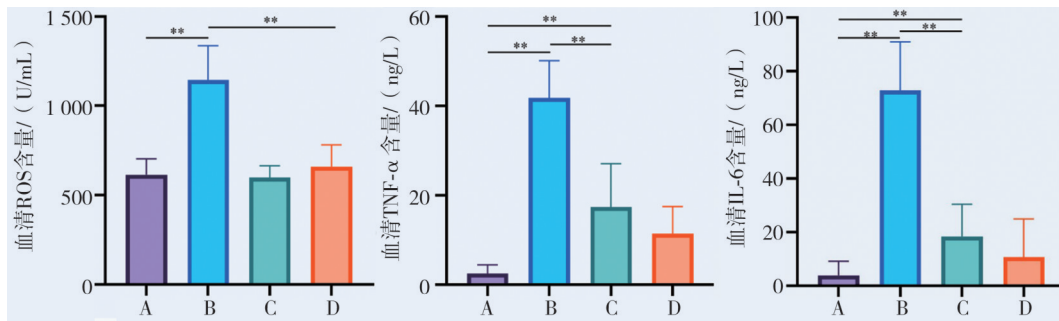
注:AB-PAS为阿尔辛蓝-过碘酸希夫,ZO-1为闭锁小带蛋白-1。与磷酸盐缓冲液(PBS)组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与黄连平胃散组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.6 黄连平胃散减轻血清炎症因子水平 ELISA 检测各组小鼠血清 ROS 及炎症因子水平,结果显示:与 PBS 组比较,模型组血清 ROS 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连平胃散组和柳氮磺吡啶组血清 ROS 水平显著降低($P<0.01$)。与 PBS 组比较,模型组血清 TNF- α 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连平胃散组血清 TNF- α 水平显著降低($P<0.01$);与黄连平胃散组比较,柳氮磺吡啶组血清 TNF- α 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与 PBS 组比较,模型组血清 IL-6 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连平胃散组血清 IL-6 水平显著降低

($P<0.01$);与黄连平胃散组比较,柳氮磺吡啶组血清 IL-6 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 8。

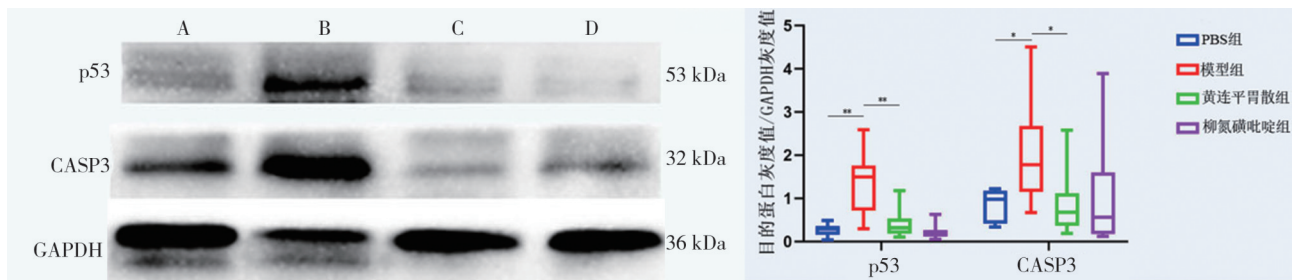
2.7 黄连平胃散可抑制 p53 信号通路 Western blot 法检测各组小鼠结肠组织 p53 和 CASP3 蛋白表达水平,结果显示:与 PBS 组比较,模型组 p53 表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连平胃散组、柳氮磺吡啶组 p53 表达水平显著降低($P<0.01$);与黄连平胃散组比较,柳氮磺吡啶组 p53 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与 PBS 组比较,模型组 CASP3 表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,黄连平胃散组 CASP3 表达水平显著降低($P<0.05$);与黄连平胃散组比较,柳氮磺吡啶组 CASP3 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 9。

2.8 分子对接结果 分子对接显示,去氢紫堇茎碱与 p53、CASP3 的结合能分别为-5.40、-5.55,其与两靶点形成的氢键连接数分别为 1 个、2 个;小檗碱与 p53、CASP3 的结合能分别为-6.63、-6.25,其与两靶点形成的氢键连接数分别为 2 个、2 个;具体的结合位点详见图 10;该结果提示去氢紫堇茎碱和小檗碱均与上述两靶点具有较高的结合亲和力。



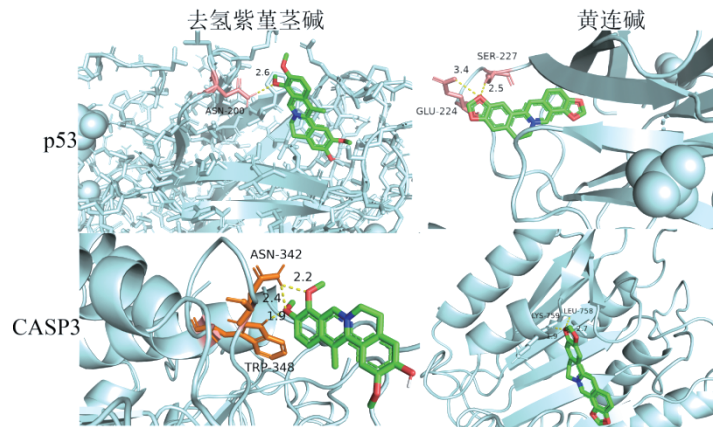
注:ROS为活性氧,TNF-α为肿瘤坏死因子-α,IL-6为白细胞介素-6。A、B、C、D分别代表磷酸盐缓冲液组、模型组、黄连平胃散组及柳氮磺吡啶组。两组之间比较,** $P < 0.01$; $n = 10, \bar{x} \pm s$ 。

图8 各组小鼠血清ROS及炎症因子水平比较



注:p53为磷酸化蛋白53,CASP3为半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A、B、C、D分别为磷酸盐缓冲液(PBS)组、模型组、黄连平胃散组及柳氮磺吡啶组。两组之间比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; $n = 7, \bar{x} \pm s$ 。

图9 各组小鼠结肠组织p53和CASP3蛋白表达水平比较



注:p53为磷酸化蛋白53,CASP3为半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3。绿色部分为小分子配体,黄色虚线表示氢键距离,ASN-200、342为天冬氨酸的200、342残基,SER-227为丝氨酸的227残基,GLU-244为谷氨酸的244残基,TRP-348为色氨酸的348残基,LEU-758为亮氨酸的758残基。

图10 去氢紫萁茎碱和黄连碱与p53信号通路重要靶点的分子对接模式图

3 讨论

UC属中医“痢疾”“肠癖”范畴,根据证型多分为湿热证、脾虚证及脾肾阳虚证等,其发病机制主要与炎症、上皮屏障缺陷及杯状细胞减少三因素密切相关,而炎症是促进病程进展的核心因素^[11-12]。黄连平胃散以黄连清热燥湿为君,配伍苍术、厚朴健脾化湿,契合湿热型UC“清热祛湿、燥湿运脾、行气和胃”的治则,课题组应用该方临床治疗湿热型UC

患者效果显著。小鼠模型是研究UC发病机制及治疗手段的常用工具,DSS是制备湿热型UC模型的常用诱导剂^[8]。目前,用于制备模型的小鼠品系、性别及DSS浓度各不相同,且不同厂商的DSS效果也存在差异。研究^[13]表明,DSS诱导雄性和雌性小鼠均可在7 d内表现出典型的UC症状。但由于雌激素的保护作用,雌鼠的DAI评分和死亡率较雄性低,更易于模型的诱导。预实验发现,5% DSS诱导雄性昆明小鼠时肠道炎症过于激烈,易发生死亡事件。本

研究造模的 30 只雌鼠第 7 天 DAI 评分均 ≥ 5 , 结肠长度较 PBS 组显著缩短, 病理切片均出现典型的结肠炎症和黏膜损伤, 提示造模成功。另外, 本研究两治疗组的给药剂量均依据体表面积等效原则^[9], 对比人体剂量转化而来, 小鼠经黄连平胃散治疗后一般情况得到有效改善, 大便成形, 体质量下降率减小, 便血显著减少, 饮食和活动增加, 精神状态得到改善, DAI 评分降低, 且可有效降低小鼠血清中 ROS 及炎症因子 TNF- α 、IL-6 的水平, 减少组织炎症细胞浸润, 增加杯状细胞数量和黏液分泌, 促进紧密连接蛋白 ZO-1 表达水平, 改善肠上皮屏障功能, 并抑制 p53 信号通路; 且整个实验过程各组小鼠未发生死亡事件, 提示造模的稳定性和该方剂治疗 UC 安全性较高。

研究^[14]表明, UC 患者肠道黏膜中 ROS 过量积累, 并促进 TNF- α 、IL-6 等炎症因子释放, 损伤上皮紧密连接蛋白, 增加肠道通透性。TNF- α 可诱导肠上皮细胞凋亡, 激活 NF- κ B 信号通路, 驱动 IL-6 等炎症因子释放, 放大炎症级联反应^[15]。IL-6 可激活 STAT3 通路, 促进 Th17 细胞分化和 T 细胞凋亡异常, 导致慢性炎症持续和反复发作, 并诱发癌变^[16]。另外, p53 信号通路在 UC 发病中扮演关键且复杂的角色, 其功能涵盖炎症调控、组织修改障碍及癌变等多个方面。p53 基因根据功能差异分为野生型 (wt-p53) 和突变型 (mt-p53); 其中, wt-p53 主要在正常组织中表达, 具有控制细胞分裂、凋亡、修复细胞 DNA 等生理功能^[17]; 然而, 约 50% 的癌症发生 p53 突变^[18]。研究^[19]表明, 在 DSS 诱导的小鼠肠道组织中, p53 和 NF- κ B 表达增加; mt-p53 可通过与 TNF- α 结合延长 NF- κ B 活化时间, 加重炎症反应^[20]; Wt-p53 可以监测 ROS 并将其维持在稳定的阈值水平^[21]。本研究发现 UC 模型的 ROS 和 TNF- α 均升高, 提示 mt-p53 比例升高, 该结果与上述报道相符。在 UC 活动期肠黏膜中, CASP3 表达显著升高, 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 形成拮抗关系, 两者失衡导致炎症细胞异常存活及肠上皮过度凋亡, 加剧黏膜屏障破坏^[22]。本研究发现 UC 模型组 p53 和 CASP3 表达均显著升高, 提示结肠上皮功能失调和结构损伤可能与 p53 突变、Wt-p53 功能的丧失及凋亡异常相关。

本研究通过代谢组学分析发现, UC 模型组血清中单磷酸腺苷、乙酰葡萄糖内酯等显著减少, 二磷酸尿苷葡萄糖和白三烯 E3 等物质增多; 经黄连平胃散治疗后, 白三烯 E3 等物质显著减少, 5-羟基-6-甲氧

基吡啶葡萄糖醛酸苷和吡啶羧酸硫酸酯等物质增多。研究^[23]表明, 单磷酸腺苷可有效降低 UC 炎症, 修复黏膜屏障, 清除 ROS, 抑制 CASP3 凋亡通路, 减少上皮细胞死亡。二磷酸尿苷葡萄糖可结合 P2Y14R 后, 抑制 cAMP/PKA 信号通路, 进而上调坏死性凋亡关键蛋白 RIPK1 的表达, 加重黏膜上皮损伤^[24]。吡啶化合物可上调黏蛋白表达, 抑制 TNF- α 等炎症因子对紧密连接蛋白的破坏, 增强肠道屏障功能^[25]。因此, 通过对代谢产物的调节来实现对肠上皮的保护和修复是黄连平胃散治疗 UC 的另一个重要机制。另外, 化合物-靶点网络分析发现, 去氢紫堇茎碱和小檗碱等成分在互作网络中的相关度较高; 分子对接显示, 上述两成分均与 p53 及 CASP3 靶点有较高的亲和力。黄连碱可通过 SNHG12/miR-603/NAMPT 轴有效抑制 p53 表达^[26], 并可通过 PI3K/Akt 通路降低活化型 CASP3 水平^[27]; 去氢紫堇茎碱可有效降低炎症因子 IL-1 β 、IL-18 和炎症介质基质金属蛋白酶 (MMP)-9 的水平^[28]。另有研究^[29]证实, 高浓度的小檗碱治疗 UC 在抗炎及上皮屏障修复方面均优于低浓度, 且高浓度的小檗碱可有效防止小鼠结肠萎缩, 降低脾脏指数, 有效促进体质量增长^[30], 上述发现提示该方剂可能存在剂量依赖效应; 但由于本研究未设置黄连平胃散的不同剂量组, 这一局限限制了对该方剂最佳治疗浓度的确定, 未来需就此深入探讨。

总之, 本研究分析了黄连平胃散的主要药物成分, 并通过动物实验验证其通过“调节代谢-抗氧化-抗炎-屏障修复”的联动机制改善 UC 症状, 其多层次的作用特性为开发新型中西医结合治疗方案提供了实验依据。

参考文献:

- [1] WANGCHUK P, YESHI K, LOUKAS A. Ulcerative colitis: clinical biomarkers, therapeutic targets, and emerging treatments [J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45(10): 892-903.
- [2] LE-BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401): 571-584.
- [3] MIKAMI Y, TSUNODA J, SUZUKI S, et al. Significance of 5-aminosalicylic acid intolerance in the clinical management of ulcerative colitis [J]. Digestion, 2023, 104(1): 58-65.
- [4] HU Y, TANG J, XIE Y, et al. Gegen Qinlian decoction ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis by regulating Th2/Th1 and Tregs/Th17 cells balance, inhibiting NLRP3 inflammasome activation and reshaping gut microbiota [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 328: 117956.
- [5] PAN S M, WANG C L, HU Z F, et al. Baitouweng decoction

- repairs the intestinal barrier in DSS-induced colitis mice via regulation of AMPK/mTOR-mediated autophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116888.
- [6] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2023: 286-287.
- [7] 杨强, 赵燕俐, 白秋生, 等. 卞嵩京辨治溃疡性结肠炎经验[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(11): 24-26.
- [8] 卢婷, 尚广彬, 阳美灵, 等. 高脂饮食及葡聚糖硫酸钠诱导的湿热蕴肠型溃疡性结肠炎小鼠模型的建立及评价[J]. 中药新药与临床药理, 2025, 36(6): 958-966.
- [9] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8): 373-382.
- [10] 许和鹏, 董伟波, 魏伟, 等. 不同浓度葡聚糖硫酸钠诱导小鼠急性溃疡性结肠炎模型的评价[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1627-1633.
- [11] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [12] LIANG J, DAI W, LIU C, et al. Gingerenone A attenuates ulcerative colitis via targeting IL-17RA to inhibit inflammation and restore intestinal barrier function [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(28): e2400206.
- [13] 张琳珮, 陆洪艳, 史雯雪, 等. 葡聚糖硫酸钠诱导不同性别溃疡性结肠炎小鼠模型的比较[J]. 药品评价, 2022, 19(3): 141-144.
- [14] ZHANG X, ZHAO X, HUA Z, et al. ROS-triggered self-disintegrating and pH-responsive astaxanthin nanoparticles for regulating the intestinal barrier and colitis [J]. *Biomaterials*, 2023, 292: 121937.
- [15] SOUZA R F, CAETANO M A F, MAGALHÃES H I R, et al. Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(18): 2733-2746.
- [16] CHEN Y Y, MA Z B, XU H Y, et al. IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role in ulcerative colitis carcinogenesis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 12009-12017.
- [17] HASSIN O, OREN M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(2): 127-144.
- [18] STEIN Y, ROTTER V, ALONI-GRINSTEIN R. Gain-of-function mutant p53: All the roads lead to tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6197.
- [19] TRAN D N, GO S M, PARK S M, et al. Loss of Nckx3 exacerbates experimental DSS-induced Colitis in mice through p53/NF- κ B Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2645.
- [20] COOKS T, PATERAS I S, TARCIC O, et al. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 634-646.
- [21] MI W, WANG C, LUO G, et al. Targeting ERK induced cell death and p53/ROS-dependent protective autophagy in colorectal cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 375.
- [22] LI T T, ZHANG J F, FEI S J, et al. Glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates ulcerative colitis in rats[J]. *Acta pharmacol Sin*, 2014, 35(2): 185-194.
- [23] CHENG H, YANG Y, HU J, et al. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) signaling is a crucial therapeutic target for ulcerative colitis[J]. *Life Sci*, 2024, 353: 122901.
- [24] LIU C, WANG H, HAN L, et al. Targeting P2Y₁₄R protects against necroptosis of intestinal epithelial cells through PKA/CREB/RIPK1 axis in ulcerative colitis [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2083.
- [25] SUGIMOTO S, NAGANUMA M, KANAI T. Indole compounds may be promising medicines for ulcerative colitis [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(9): 853-861.
- [26] MENG J, SONG X, XING X, et al. Coptisine prevents angiotensin II-induced endothelial cell injury and senescence via the lncRNA SNHG12/miR-603/NAMPT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 27(2): 68.
- [27] LIU Y, GONG S, LI K, et al. Coptisine protects against hyperuricemic nephropathy through alleviating inflammation, oxidative stress and mitochondrial apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156: 113941.
- [28] WANG Z, MEI W, WANG Q, et al. Role of dehydrocorybulbine in neuropathic pain after spinal cord injury mediated by P2X4 receptor[J]. *Mol Cells*, 2019, 42(2): 143-150.
- [29] WU W, SUN Y, NIU S, et al. Integrated microbiome and metabolomic to explore the mechanism of coptisine in alleviating ulcerative colitis[J]. *Phytother Res*, 2025, 39(2): 676-697.
- [30] WU W, SHU C, CHEN L, et al. Coptisine ameliorates colitis in mice by modulating cPLA2/TRPM8/CGRP-1 signaling pathways and strengthening intestinal barrier function [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2025, 58: e14349.

编辑:季春来

收稿日期:2025-07-17