

# 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合网络药理学探讨半夏泻心汤入血成分及治疗脾虚型溃疡性结肠炎的作用机制

朱海燕<sup>1</sup>,杨福权<sup>2</sup>,左秦川<sup>3</sup>,  
房智彦<sup>1</sup>,黄丽莉<sup>4</sup>,淮文英<sup>1</sup>,王艳秋<sup>5\*</sup>,张天娥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学基础医学院,成都 611137;<sup>2</sup>广元市中医医院,广元 628000;<sup>3</sup>蒲江县中医医院,蒲江 611630;  
<sup>4</sup>广州中医药大学深圳医院(福田),深圳 518034;<sup>5</sup>中医药和干细胞研究中心,成都 611137

**摘要:**研究通过建立脾虚型溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)模型,采用液相芯片对大鼠血清中炎症细胞因子进行高通量检测,同时以 HE 染色对结肠组织进行炎症分级评分,验证半夏泻心汤(Banxia Xiexin Tang,BXT)对脾虚型 UC 的药理作用。随后利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)对 BXT 入血成分进行分析,并结合网络药理学,探究 BXT 治疗脾虚型 UC 的作用机制。结果显示,UC 能够增加大鼠血清中细胞因子白细胞介素-1 $\alpha$ (interleukin-1 $\alpha$ ,IL-1 $\alpha$ )、白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)、白细胞介素-18(interleukin-18,IL-18)、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ ,IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )表达水平;BXT 可降低血清炎症细胞因子含量,且 BXT 高剂量组(20 g/kg)下降最明显,无明显炎细胞浸润,表明 BXT 对脾虚型 UC 具有一定的治疗作用。大鼠血清中发现入血成分共 20 个;网络药理学筛选出 BXT 治疗 UC 相关靶点 87 个,涉及炎症反应、炎症反应调节、微生物反应等生物过程,参与了 IL-17、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 等信号通路。综上可知,BXT 治疗脾虚型 UC 可能与抑制肠道炎症、调节肠道微生物及保护肠道屏障等多个途径相关,从而达到治疗 UC 效果。

**关键词:**半夏泻心汤;脾虚型溃疡性结肠炎;UPLC-Q-Orbitrap HRMS;入血成分;网络药理学;作用机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)9-1610-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.9.017

## Blood-absorbed components of Banxia Xiexin Tang and the mechanism of its therapeutic effect on spleen deficiency type ulcerative colitis based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS and network pharmacology

ZHU Hai-yan<sup>1</sup>, YANG Fu-quan<sup>2</sup>, ZUO Qin-chuan<sup>3</sup>,  
FANG Zhi-yan<sup>1</sup>, HUANG Li-li<sup>4</sup>, HUAI Wen-ying<sup>1</sup>, WANG Yan-qiu<sup>5\*</sup>, ZHANG Tian-e<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;

<sup>2</sup>Guangyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangyuan 628000, China;

<sup>3</sup>Pujiang County (Sichuan) Hospital of Traditional Chinese Medicine, Pujiang 611630, China;

<sup>4</sup>Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Shenzhen Hospital (Futian), Shenzhen 518034, China;

<sup>5</sup>Research Center of Traditional Chinese Medicine and Stem Cell, Chengdu 611137, China

**Abstract:** This experiment first established a model of spleen deficiency type ulcerative colitis (UC), and then used high-throughput liquid chip technology to detect inflammatory cytokines in rat serum. HE staining was used to grade inflammation in colon tissue. All of the above are used to verify the pharmacological effect of Banxia Xiexin Tang (BXT) on spleen deficiency type colitis. Secondly, UPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to analyze the components of BXT in rat blood, combined with

network pharmacology, to explore the mechanism of action of BXT in treating UC of spleen deficiency type. The results showed that UC could increase the level of inflammatory factors interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukin-10 (IL-10), interleukin-18 (IL-18), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in rat serum; BXT can decrease the content of serum inflammatory factor, and the effect of BXT high dose group (20 g/kg) was the most obvious, with no obvious infiltration of inflammatory cells. It is suggested that BXT has a certain therapeutic effect on UC with spleen deficiency. A total of 20 components were found in rat serum. On this basis, network pharmacological research has screened 87 targets related to BXT in the treatment of UC, involving inflammatory response, inflammatory response regulation, microbial response and other biological processes, participating in the IL-17 signaling pathway, Lipid and atherosclerosis, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications and TNF signaling pathway. The results suggest that the treatment of spleen deficiency type UC with BXT may be related to the inhibition of intestinal inflammation, the regulation of intestinal microbes and the protection of intestinal barrier, so as to achieve the therapeutic effect of UC.

**Key words:** Banxia Xiexin Tang; spleen deficiency type ulcerative colitis; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; blood-absorbed components; network pharmacology; mechanism

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以腹泻、便血、里急后重为典型表现的慢性自身免疫性疾病;具有发作和缓解交替的特点,导致肠道持续炎症损伤,严重者可累及整个结肠,增加结直肠癌患病风险<sup>[1]</sup>。中医治疗 UC 具有改善临床症状,减少并发症和降低复发率的特点<sup>[2]</sup>。中医认为 UC 发生多由外感湿热,内伤脾胃,湿热蕴结大肠,传导失司所致,日久耗伤脾气累及肾阳,终致寒热错杂。故 UC 发病以脾胃虚损为本,湿热内蕴为标<sup>[3]</sup>。治法以调气血、清利湿热为主,以达到标本兼治的效果。半夏泻心汤即为调和肝脾、平调寒热的代表方剂。方中人参、大枣、甘草健脾益气,干姜、半夏辛开温胃止呕,黄连、黄芩苦降清利湿热,与 UC 的治法不谋而合<sup>[4]</sup>。现代研究表明<sup>[5]</sup>,半夏泻心汤 (Banxia Xiexin Tang, BXT) 具有减轻脾虚便秘小鼠模型肠道炎症反应和肠道菌群失调的作用,且可通过改善肠道菌群、保护肠道屏障、调解机体免疫和改善机体炎症达到抗 UC 的效果。但 BXT 对脾虚型 UC 的药理作用仍有待进一步探讨;且中药复方化学成分复杂,药物间相互作用和机制分析困难,进入血分的成分难以明确,目前尚未见对半夏泻心汤血中移行成分系统分析文献。因此,本研究拟通过建立脾虚型溃疡性结肠炎大鼠模型,采用液相芯片对大鼠血清中炎症因子水平进行检测,并对结肠组织 HE 染色进行炎症分级评分,验证 BXT 对脾虚型 UC 的药理作用,利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 对 BXT 体内血中移行成分进行鉴定,结合网络药理学分析 BXT 入血成分治疗脾虚型 UC 的体内作用机制,为 BXT 治疗脾虚型 UC 提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

BXT 入血成分检测实验大鼠:10 只 6 周龄 SPF 级 SD (Sprague-Dawley) 健康雄鼠,体重  $200 \pm 20$  g;脾虚型 UC 实验大鼠:58 只 3~4 周龄 SPF 级 SD 健康大鼠,雌雄兼有,体重  $200 \pm 20$  g,购于成都达硕实验有限公司,动物合格证批号:SCXK(川)2020-030。适应性喂养 7 d,常规饲养于成都中医药大学动物实验中心。该实验动物通过成都中医药大学动物伦理委员会审批 (编号:2019-04)。

### 1.2 药物与主要试剂

按《方剂学》半夏泻心汤组成:半夏 (批号:C059230401) 12 g,黄芩 (批号:220512)、干姜 (批号:221203)、人参 (批号:201101)、甘草 (批号:C851230501) 各 9 g,黄连 (批号:C806221101) 3 g,大枣 (批号:221111) 4 枚,药物购于成都中医药大学温江门诊部,且经成都中医药大学药学院陈璐副教授鉴定。

甘草次酸 (批号:WP24040812,纯度  $\geq 98\%$ )、棕榈酸 (批号:WP24022806,纯度  $\geq 98\%$ )、柠檬酸 (批号:WP24030608,纯度  $\geq 98\%$ )、油酸酰胺 (批号:WP23100804,纯度  $\geq 98\%$ )、烟酰胺 (批号:WP24011102,纯度  $\geq 98\%$ ) (四川省维克奇生物科技有限公司);柳氮磺胺吡啶片 (sulfasalazine, SASP) (批号:09150312,上海信谊天平药业有限公司);无水乙醇 (AR 级,批号:20151110,成都市科龙化工试剂厂);三硝基苯磺酸 (3-nitrobenzenesulfonic acid, TNBS) (批号:SLCG2210,美国 Sigma 公司);色谱纯乙腈、甲酸 (美国 Fisher 公司)。检测试剂盒:Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Reagent Kit, 1  $\times$  96-well Flat Bottom Plate

Cat. (批号: #171-304070M)、Bio-Plex<sup>®</sup> Calibration Kit Cat. (批号: #171203060)、Bio-Plex<sup>®</sup> Validation Kit4.0 Cat. (批号: #171203001) (美国 Bio-Rad 公司); 专门定制多细胞因子检测试剂盒, 由成都 Bio-Rad 公司定制。

### 1.3 仪器

Vanquish 超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Bio-Plex 悬液芯片系统(美国 Bio-Rad 公司); Hermle Z206A 高速台式冷冻离心机(德国 Hermle 公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.4 分析工具

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); SEA (<http://sea.bkslab.org/>); BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>); SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>); Uniprot (<https://www.uniprot.org/>); GeneCards (<https://www.genecards.org/>); CTD (<http://ctdbase.org/>); Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>); String (<https://string-db.org/>); Metascape (<http://metascape.org/>); RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>); Cytoscape 3.8.2 软件; Origin2021 软件; Open Babel 2.4.1 软件; AutoDock 软件; Pymol 软件; Compound Discoverer 3.2 软件; Xcalibur 软件; GraphPad Prism 8 软件。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 半夏泻心汤的制备

称取各药物混合, 浸泡 30 min 后进行煎煮, 煎煮 3 次, 将 3 次的药液收集混匀后进行水浴蒸发浓缩到: 2、1、0.5 g/mL, 置于 4 °C 冰箱备用。

#### 1.5.2 脾虚型 UC 大鼠造模、分组与给药

随机从 58 只 SD 大鼠中抽出 8 只作为空白对照组(control, Con), 其余 50 只大鼠给予奇数日禁食和凉水(4 °C)灌胃, 偶数日充足饮食和猪油灌胃, 且每日强迫大鼠游泳, 连续进行 20 d, 至第 21 d 麻醉, 制备三硝基苯磺酸(TNBS)/50% 乙醇灌肠液, 其中无水乙醇、纯水、5% TNBS 水溶剂原液以 6:6:5 的比例充分混合, 将制备好的 TNBS/50% 乙醇溶液灌入肠腔<sup>[6]</sup>。Con 组运用等剂量的生理盐水进行灌肠。

将 50 只模型大鼠随机分为 5 组, 分别为模型组(Model, Mod)、SASP 组(20 g/kg)、BXT 高剂量组

(20 g/kg; BXT high dose, BXT-H)、BXT 中剂量组(10 g/kg; BXT Medium dose, BXT-M)、BXT 低剂量组(5 g/kg; BXT Low dose, BXT-L), 每组 10 只, 按体质量开始灌胃给药, 连续 14 d。SASP 组按 20 g/kg、0.01 mL/g 灌服柳氮磺胺吡啶溶液, BXT-H、BXT-M、BXT-L 组分别按 20、10、5 g/kg 等体积灌服 BXT 水溶液, 其余组则灌服等体积的生理盐水。

#### 1.5.3 病变活动指数评分

观察大鼠的一般情况, 根据给药期间大鼠体重、大便性状和便血情况变化进行 UC 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评价:  $DAI = (\text{体重下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{便血分数})/3$ <sup>[7]</sup>(见表 1)。

表 1 DAI 评分

分数 Score	体重下降 Weight loss (%)	大便性状 Stool characteristic	便血程度 Degree of blood in stool
0	0	正常	隐血阴性
1	1~5	-	-
2	6~10	半稀便	隐血阳性
3	11~15	-	-
4	>15	稀便	肉眼血便

#### 1.5.4 HE 染色结肠组织病理学及炎症分级评分

各组于灌胃结束后股动脉取血处死, 观察大鼠结肠情况, 并结合 HE 染色观察大鼠结肠组织病理学改变并对结肠组织进行炎症分级评分, 评分越高表明损伤程度越明显<sup>[8]</sup>(见表 2)。

表 2 结肠炎症分级评分

病变类型 The lesion type	病变程度 The extent of the lesion	病变分级 Lesion grade
炎细胞浸润 Inflammatory cell infiltration	无	0
	轻度	1
	中度	2
炎性细胞浸润深度 Inflammatory cells infiltration depth	重度	3
	无	0
	粘膜层	1
溃疡深度 Ulcer depth	粘膜和粘膜下层	2
	结肠全层	3
	无	0
	上皮	1
	粘膜固有层	2
	粘膜肌层	3

### 1.5.5 炎症因子检测

采用液相芯片技术同时测定血清白细胞介素-1 $\alpha$  (interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的表达水平。预热 Bio-plex 系统,配置标准品和质控品,稀释样本,涡旋磁珠至 1 $\times$ ,在预湿的 96 孔板中加入 50  $\mu$ L 混合的微珠,使用 100  $\mu$ L Bio-Plex wash buffer 洗涤两次;向 96 孔板中加入 50  $\mu$ L 标准品和样品,置于摇床上(室温,300 r/min,30 min),再用 100  $\mu$ L Bio-Plex wash buffer 洗涤 3 次;每孔加入 25  $\mu$ L 抗体,置于摇床上(室温,300 r/min,30 min),用上述方式洗涤后加入 50  $\mu$ L Streptavidin-PE 荧光色素,置于摇床上(室温,300 r/min,30 min),重复洗涤步骤后用 125  $\mu$ L Bio-Plex assay buffer 重悬微珠,然后放入仪器中检测。

### 1.5.6 入血成分检测实验动物分组及给药

将 10 只 SD 大鼠随机分成空白组和半夏泻心汤组,各 5 只。半夏泻心汤组每天灌胃给予成人 6.3 倍有效剂量的半夏泻心汤(5.67 g/kg),空白组每天给予等体积的生理盐水灌胃。每天给药 2 次,间隔 12 h,连续给药 3 d。

### 1.5.7 对照品溶液制备

称取适量甘草次酸、柠檬酸、棕榈酸等对照品,甲醇溶解,定容至 20 mL 备用。测试前取各对照品混合,甲醇稀释至 50  $\mu$ g/mL 的混合标准液。

### 1.5.8 水煎液样本处理

将半夏泻心汤溶液稀释至 50 mg/mL,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜进行过滤,收集过滤液,取上清液 200  $\mu$ L 于棕色进样小瓶,待 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析。

### 1.5.9 血清样本采集和处理

在末次给药后 1 h,乙醚麻醉,腹主动脉取血,室温静置 2 h,3 500 r/min 离心 10 min,取上清分装,将同组血清混合,再取混合血清 200  $\mu$ L 于离心管中,加入甲醇 800  $\mu$ L,涡旋 5 min,4  $^{\circ}$ C 下静置 15 min,离心(4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min,10 min),取上清液,于 4  $^{\circ}$ C 静置 2 h;若静置后出现沉淀,取沉淀加入 200  $\mu$ L 甲醇,涡旋 5 min 复溶,离心(同上),取上清,两次上清合并,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜进行过滤,待 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析。

### 1.5.10 检测条件

色谱条件:色谱柱:Thermo Scientific Accucore<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>柱(3 mm $\times$ 100 mm,2.6  $\mu$ m);流动相 A:0.1% 甲酸水,流动相 B:乙腈,梯度洗脱,梯度洗脱(0~0.5 min:5% B;0.5~1.5 min:5% $\rightarrow$ 10% B;1.5~3.0 min:10% $\rightarrow$ 14% B;3.0~4.5 min:14% B;4.5~8.0 min:14% $\rightarrow$ 16.5% B;8.0~10.0 min:16.5% $\rightarrow$ 18.5% B;10.0~13.0 min:18.5% $\rightarrow$ 24% B;13.0~15.5 min:24% $\rightarrow$ 50% B;15.5~17.5 min:50% $\rightarrow$ 100% B;17.5~20 min:100% B;20~25 min:100% $\rightarrow$ 5% B)。柱温 40  $^{\circ}$ C;流速 0.5 mL/min,进样量 5  $\mu$ L。

质谱条件:采用电喷雾电离离子源,正离子、负离子分别扫描模式进行检测。正离子模式检测,喷雾电压为 3.5 kV(+)/3.0 kV(-),辅助气加热温度为 400  $^{\circ}$ C,鞘气流速 35 arb,辅助气流速 10 arb,离子传输管温度 380  $^{\circ}$ C,一级分辨率 35 000,二级分辨率 17 500,扫描范围  $m/z$  100~1 500,碰撞能量梯度依次为 20/40/60 eV。

### 1.5.11 网络药理学分析

#### 1.5.11.1 半夏泻心汤有效成分靶点的获取

将鉴定出的成分导入 SwissADME 中筛选潜在活性化学成分,筛选条件为胃肠道吸收(GI absorption)为 High,Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge 结果中有 2 个及 2 个以上为 Yes<sup>[9]</sup>。符合筛选条件的化学成分通过 SEA、BATMAN-TCM、SwissTargetPrediction 中收集原型入血成分靶点。在 Uniprot 数据库中检索筛选出物种为人且已验证的靶点,校正并去重后获得核心药组的靶点信息。

#### 1.5.11.2 溃疡性结肠炎靶点的获取

在 GeneCards 及 CTD 数据库分别获取 UC 的相关靶点。搜索关键词“ulcerative colitis”,并通过 Uniprot 予以校正,选择物种为人源(Homo sapiens),分别选取 CTD 数据库降序剔重后参考计数(reference count) $\geq$ 50 的靶点和 GeneCards 数据库降序剔重后相关分数(relevance score) $>$ 10 的靶点取并集去重,得到 UC 潜在靶点。

#### 1.5.11.3 半夏泻心汤与溃疡性结肠炎的交集靶点

将药物靶点与 UC 靶点放入 Venny 中取交集,获取药物-疾病交集靶点,并绘制韦恩图。

#### 1.5.11.4 蛋白质互作网络构建

将药物与疾病交集靶点导入 String 数据库中,选定种属为人源(Homo sapiens),选择最低相互作用

用评分 (minimum required interaction score) 为 0.400, 其余参数保持默认设置, 导出相关数据并导入 Cytoscape, 进行拓扑学分析, 并按照度值 (Degree) 标志大小作图, 构建蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。

#### 1.5.11.5 半夏泻心汤有效成分核心靶点的筛选

将交集靶点导入 Cytoscape, 使用 Centiscape 2.2 筛选核心基因, 选择度中心性 (degree centrality, DC)、中介中心性 (betweenness centrality, BC) 和接近中心性 (closeness centrality, CC) 大于平均值的靶点, 并按照 Degree 值大小进行作图, 构建核心靶点图。

#### 1.5.11.6 GO 富集分析、KEGG 通路分析及“入血成分-作用靶点-通路”网络的构建

将药物-疾病交集靶点导入 Metascape 中, 选定种属为人源 (Homo sapiens), 对靶点进行 GO 富集分析, 包括分子功能 (molecular functions)、生物学过程 (biological processes)、细胞成分 (cellular components) 和 KEGG 通路 (KEGG pathway) 富集分析, 将结果导入 Origin 软件中绘制气泡图; 将入血成分、交集靶点和 KEGG 富集前 10 条信号通路导入 Cytoscape 软件构建“入血成分-作用靶点-通路”网络图。

#### 1.5.11.7 分子对接

根据“半夏泻心汤有效成分核心靶点筛选”中选择 Degree 值前十的靶点导入 RCSB PDB 中, 得到核心靶点的晶体结构, 随后将其导入 Pymol 中去除水分子、去除配体等预处理; 将“入血成分-作用靶点-通路”中 Degree  $\geq 10$  的化合物导出 mol2 文件, 最后通过 Autodock 软件进行对接。利用 Pymol 软件和 LigPlot 进行可视化, 并进行分析。

## 1.6 统计学分析方法

采用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 8 软件对数据进行处理, 其中两组间符合正态分布的计量资料差异分析采用 *t* 检验; 多组间符合正态分布的计量资料运用方差分析, 不符合的则非参数检验, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 半夏泻心汤抗脾虚型溃疡性结肠炎验证

#### 2.1.1 DAI 评分结果

DAI 评分各组疾病指数得分均高于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), SASP 组、BXT 治疗组得分均低于 Mod 组 ( $P > 0.05$ ), 且 BXT 治疗组得分皆低于 SASP 组, 其

中 BXT-H 组 DAI 评分最低 (见表 3)。

表 3 大鼠 DAI 得分 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 DAI score of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	数量 Number	DAI
Con	-	8	0.00 $\pm$ 0.00
Mod	-	10	1.97 $\pm$ 0.45
SASP	20	10	1.75 $\pm$ 0.31
BXT-H	20	10	1.68 $\pm$ 0.25
BXT-M	10	10	1.70 $\pm$ 0.17
BXT-L	5	10	1.72 $\pm$ 0.22

#### 2.1.2 HE 染色结肠组织病理学及炎症分级评分结果

HE 染色结肠组织病理学结果 (见图 1): Mod 组大鼠结肠病变部位主要为粘膜层和粘膜下层, 病变部位可见粘膜上皮细胞脱落, 结肠组织各层均有不同程度的炎性细胞浸润; Con 组大鼠结肠组织边界清楚, 结肠粘膜完整, 未见细胞脱落和炎性细胞浸润; 与 Mod 组相比, 除 BXT-H 组外, 各治疗组大鼠结肠组织均可见炎性细胞浸润; BXT-H 组结肠组织未见明显炎性细胞浸润和结肠粘膜损伤。结合炎症分级评分 (见图 2), 与 Con 组比较, Mod 组结肠组织溃疡深度、炎细胞浸润及炎细胞浸润深度评分升高 ( $P < 0.001$ ); 与 Mod 组相比, 治疗组大鼠炎症分级评分结果皆小于 Mod 组, 其中 BXT-H 组和 BXT-M 组明显低于 Mod 组 ( $P < 0.05$ ), 由上可知, 半夏泻心汤高剂量 (20 g/kg) 可能为干预 UC 的最佳剂量。

#### 2.1.3 半夏泻心汤对各组模型大鼠血清炎症因子表达水平的影响

如图 3 所示, 与 Con 组比较, Mod 组大鼠血清中的 IL-10 表达水平升高, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), IL-1 $\alpha$ 、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  表达水平均明显上升 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ); 与 Mod 组相比, 治疗组各组血清炎症因子表达水平均有不同程度的下降, 其中各组 IL-1 $\alpha$ 、IL-10、IL-18、TNF- $\alpha$  表达水平皆低于 Mod 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 治疗组各组 IFN- $\gamma$  明显低于 Mod 组 ( $P < 0.001$ ); BXT-H 组和 SASP 组 IL-1 $\alpha$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  的表达水平低于 BXT-M、BXT-L 组, 而 IL-10 和 IFN- $\gamma$  的表达水平高于 BXT-M、BXT-L 组 ( $P > 0.05$ ), 提示 BXT 可降低脾虚型 UC 大鼠外周血相关炎症细胞因子表达水平。

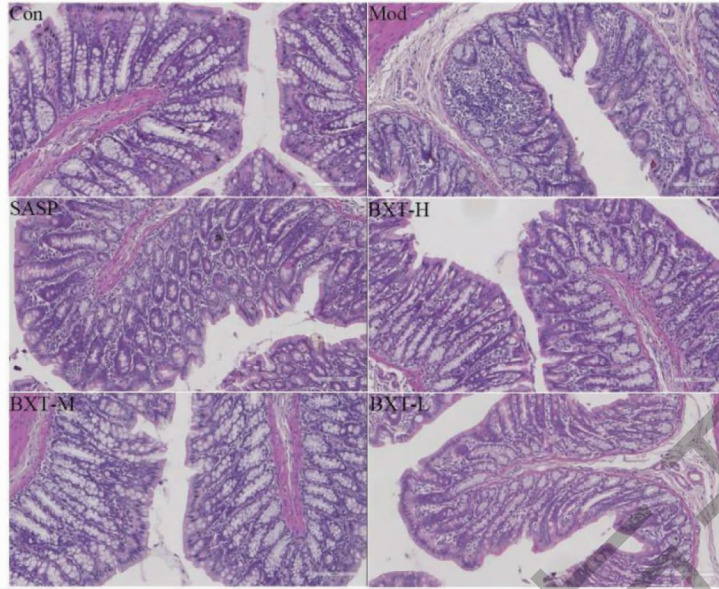


图1 各组大鼠结肠组织病理切片(HE, ×200)

Fig. 1 Pathological changes of colon tissue in different groups of rats (HE staining, ×200)

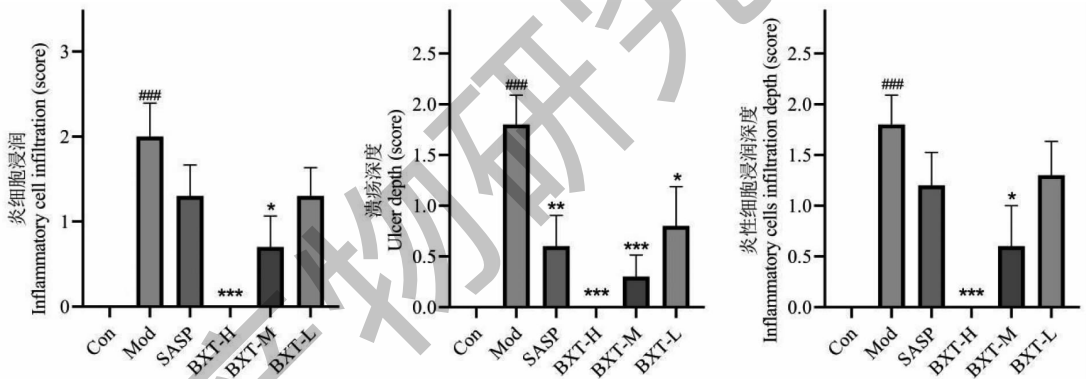
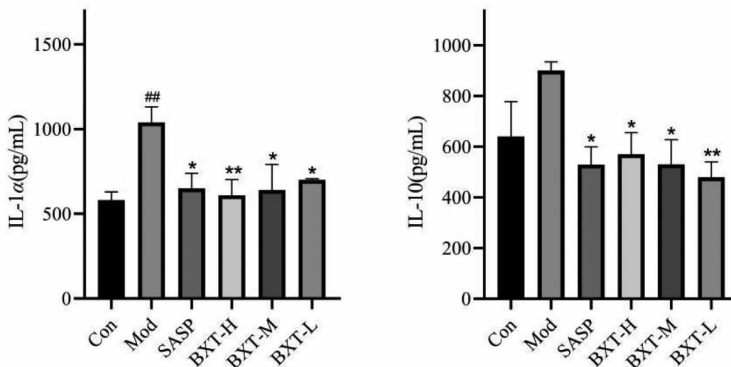


图2 大鼠结肠炎症分级得分( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

Fig. 2 Grading scores of colonic inflammation in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

注:与 Mod 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 Con 比较, ###  $P < 0.001$ , 下同。Note: Compare with Mod, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; Compare with Con, ###  $P < 0.001$ , the same below.



续图3(Continued Fig.3)

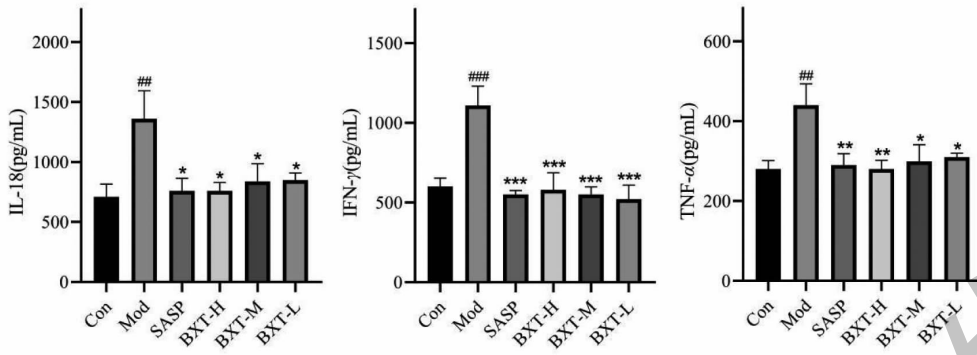


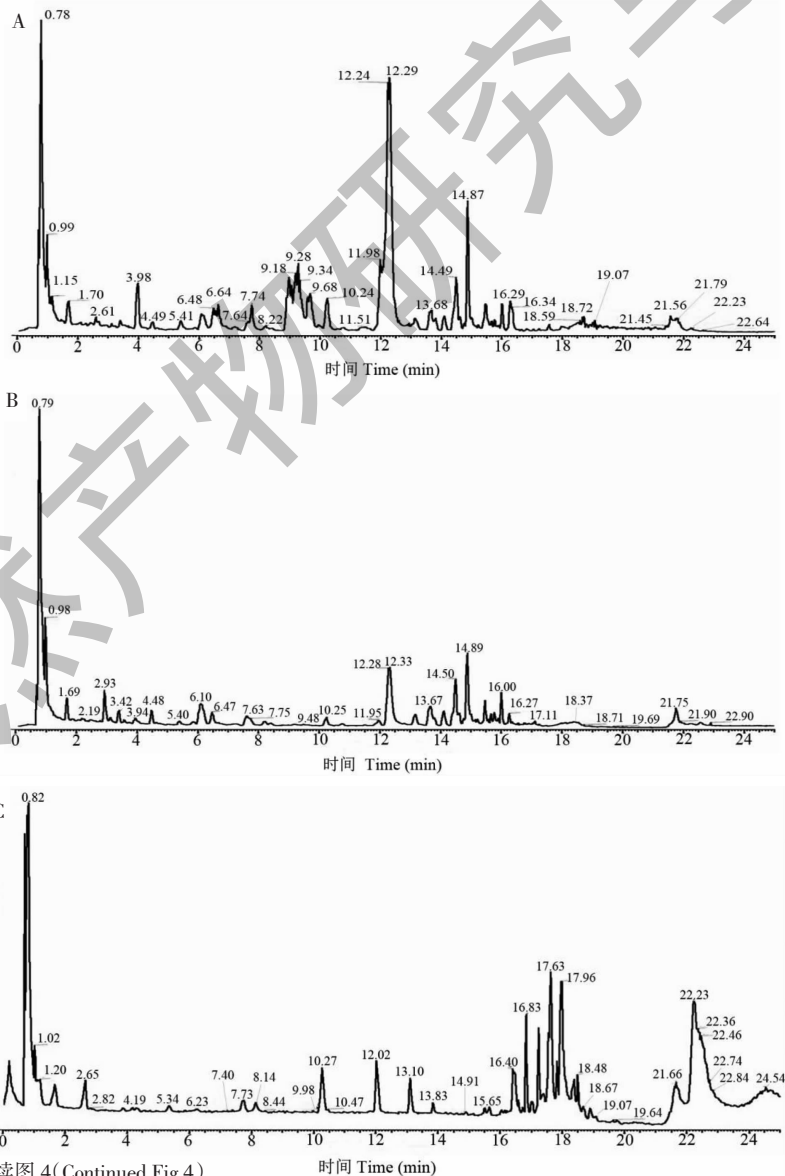
图3 各组大鼠血清炎症因子表达水平( $\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$ )

Fig. 3 Expression level of serum inflammatory factors in different groups of rats( $\bar{x} \pm s, n=8 \sim 10$ )

## 2.2 半夏泻心汤入血成分

在相同色谱、质谱条件下,通过 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 对大鼠含药血清成分进行分析。比较

BXT 水煎液、BXT 含药血清和大鼠空白血清,共鉴定出 BXT 中 20 种原型入血成分(见图 4、表 4)。



续图 4(Continued Fig.4)

时间 Time (min)



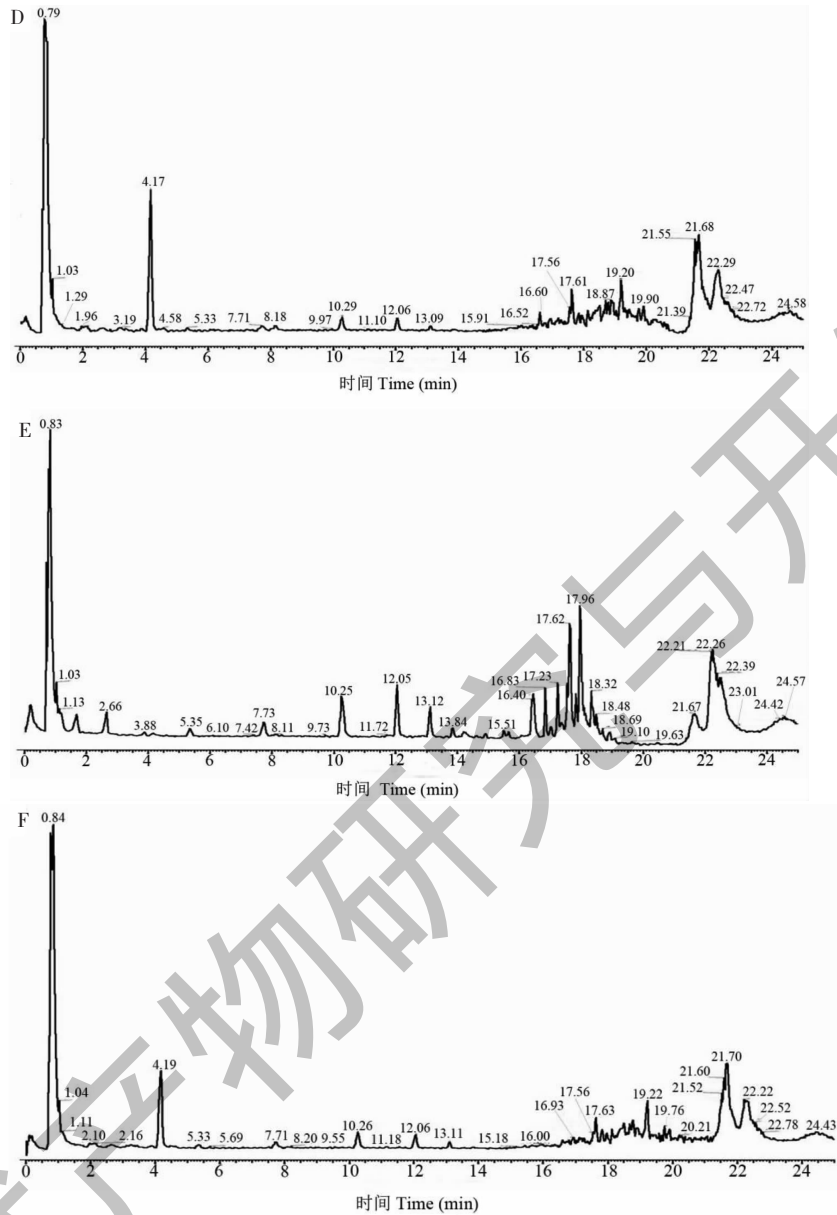


图4 正、负离子模式下各样品的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatograms for each sample in positive and negative ion mode

注:A、B为BXT;C、D为空白血清;E、F为BXT含药血清。Note:A and B are BXT;C and D are blank serum;E and F are BXT serum samples.

表4 半夏泻心汤入血成分

Table 4 Blood-absorbed components in BXT

No.	$t_R$ (min)	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	测量值 Measured value( $m/z$ )	理论值 Theoretical value( $m/z$ )	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion	化合物 Compound
1 <sup>#</sup>	16.26	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M+H]^+$	257.275 5	257.273 8	6.61	273.266 5、296.257 4	棕榈酸 Palmitic acid
2	16.83	$C_{22}H_{26}O_6$	$[M+H]^+$	387.180 2	387.180 2	-0.52	404.2070 0、409.162 3、 425.136 0、105.070 1	双(甲基苄基)山梨糖醇 Bis(methylbenzylidene)sorbitol
3	17.23	$C_{24}H_{30}O_6$	$[M+H]^+$	415.211 0	415.211 0	0.10	432.237 7、437. 193 0、119.085 6	双(4-乙基苄基)山梨糖醇 Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol



续表 4(Continued Tab. 4)

No.	$t_R$ (min)	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	测量值 Measured value( $m/z$ )	理论值 Theoretical value( $m/z$ )	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion	化合物 Compound
4	2.60	$C_{11}H_9NO_2$	$[M+H]^+$	188.070 6	188.070 5	0.53	146.059 9, 118.085 2	反式-3-吲哚丙烯酸 <i>trans</i> -3-Indoleacrylic acid
5 <sup>#</sup>	18.93	$C_{16}H_{33}NO$	$[M+H]^+$	256.263 1	256.262 9	0.78	256.265 1	棕榈酰胺 Hexadecanamide
6 <sup>#</sup>	1.14	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.019 1	191.019 0	0.52	111.007 8, 87.007 4	柠檬酸 Citric acid
7	0.76	$C_6H_{14}N_4O_2$	$[M+H]^+$	175.119 1	175.118 7	2.29	213.074 5、 197.100 5、130.097 5	DL-精氨酸 DL-Arginine
8	0.80	$C_5H_9NO_2$	$[M+H]^+$	116.071 5	116.070 7	6.90	116.071 4, 70.066 1	D-(+)-脯氨酸 D-(+)-Proline
9	18.69	$C_{22}H_{43}NO$	$[M+H]^+$	338.343 0	338.341 4	4.73	303.305 7	芥酸酰胺 Erucamide
10	0.85	$C_9H_{11}NO_3$	$[M+NH_4]^+$	201.082 2	201.082 1	0.50	165.055 5	L-酪氨酸 L-Tyrosine
11 <sup>#</sup>	17.87	$C_{18}H_{35}NO$	$[M+H]^+$	282.280 5	282.278 5	7.09	247.242 7, 176.282 9	油酸酰胺 Oleamide
12 <sup>#</sup>	0.97	$C_6H_6N_2O$	$[M+H]^+$	123.055 5	123.055 4	0.81	80.050 0	烟酰胺 Nicotinamide
13	2.65	$C_9H_7NO$	$[M+H]^+$	146.059 9	146.059 9	0.48	163.086 6, 118.066 0	吲哚-4-甲醛 4-Indolecarbaldehyde
14	0.82	$C_6H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	179.055 6	179.055 3	1.67	161.044 7, 95.013 1	D-(+)-半乳糖 D-(+)-Galactose
15	15.53	$C_{12}H_{27}NO$	$[M+H]^+$	222.217 6	222.216 3	5.85	202.181 4, 184.206 9	十二烷基二甲基氧化胺 N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide
16	0.91	$C_5H_4O_3$	$[M-H]^-$	111.007 8	111.007 8	0.36	67.017 8, 54.710 0	糠酸 2-Furoic acid
17	9.04	$C_9H_{16}O_4$	$[M-H]^-$	187.097 5	187.097 0	-2.67	187.097 1、 125.096 2, 68.797 0	壬二酸 Azelaic acid
18	1.04	$C_5H_7NO_3$	$[M-H]^-$	128.034 6	128.034 4	-1.56	112.859 4, 61.406 5	4-氧代脯氨酸 4-Oxoproline
19 <sup>#</sup>	16.00	$C_{30}H_{46}O_4$	$[M+H]^+$	471.346 1	471.346 4	-0.63	471.346 6, 93.070 3	18 $\beta$ -甘草次酸 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid
20	10.77	$C_{22}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	477.102 6	477.102 6	0.12	477.102 5、 301.070 1, 286.046 6	6-O-甲基黄芩 6-O-Methylscutellarin

注: # 经对照品比对鉴定的化合物。

Note: # Compounds identified by comparison with reference substance.

## 2.3 网络药理学分析

### 2.3.1 半夏泻心汤有效成分靶点预测结果

根据“1.5.11.1”中的筛选原则,从鉴定出的 20 种半夏泻心汤入血成分中筛选得到 16 个活性成分,通过 SEA、BATMAN-TCM、SwissTargetPrediction 数据库检索基因靶点,剔除重复项共得到 1 055 个靶点。

### 2.3.2 溃疡性结肠炎预测结果

通过疾病数据库搜索,筛选出 338 个潜在靶点与 UC 相关。

### 2.3.3 半夏泻心汤活性成分与溃疡性结肠炎潜在靶点交集

将 1 055 个 BXT 有效成分靶点与 338 个 UC 潜

在靶点取交集后得到 87 个交集靶点(见图 5)。

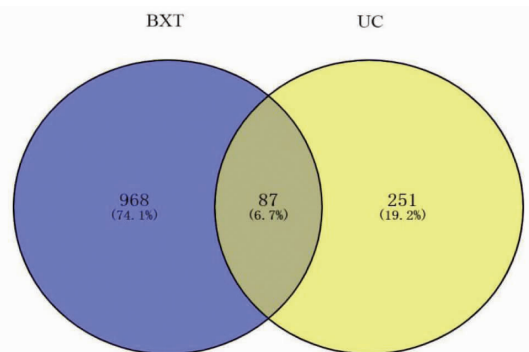


图 5 半夏泻心汤与溃疡性结肠炎交集靶点韦恩图

Fig. 5 Venn diagram for the intersection targets of BXT and UC

### 2.3.4 半夏泻心汤与溃疡性结肠炎交集靶点 PPI 网络图

将 87 个交集靶点导入 String 数据库中,将所得

数据导入 Cytoscape 中,构建 PPI 网络图,该网络包含 87 个节点及 1 072 条边,根据 Degree 值大小排列(见图 6)。

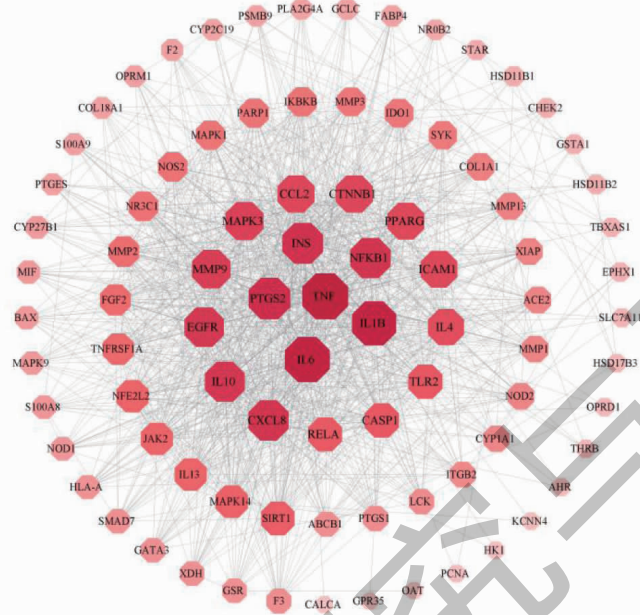


图 6 半夏泻心与溃疡性结肠炎交集靶点的 PPI 网络图

Fig. 6 PPI network diagram of the intersection targets of BXT and UC

### 2.3.5 半夏泻心汤活性成分核心靶点的筛选

将 87 个交集靶点导入 Cytoscape 中,使用 Centiscape2.2 筛选核心基因,筛选  $CC > 0.006$   $512\ 028\ 421\ 037\ 813\ 6$ ,  $BC > 72.712\ 643\ 678\ 160\ 79$  和  $DC > 24.643\ 678\ 160\ 919\ 54$  的靶点,作为核心靶点,并按照 Dgree 值的大小排列,构建核心靶点网络图,该网络包括 22 个节点及 216 条边(见图 7)。

### 2.3.6 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

将 87 个交集靶点放入 Metascape 进行分析,映射出 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,选择 Log P 值前 25 条以气泡图形式输出,分析可知 BXT 治疗 UC 可能调控了炎症反应、炎症反应调节、微生物反应、对微生物来源分子的反应以及对脂多糖的反应等生物过程,作用于膜筏、膜微区、等离子体膜筏等细胞组成,参与了细胞因子受体结合、信号受体激活剂活性、信号受体调节活性、细胞因子活性、受体配体活性等分子功能。KEGG 信号通路富集结果表明,这些靶点主要富集在 IL-17 信号通路、脂质与动脉粥样硬化信号通路、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、TNF 信号通路等通路上(见图 8)。

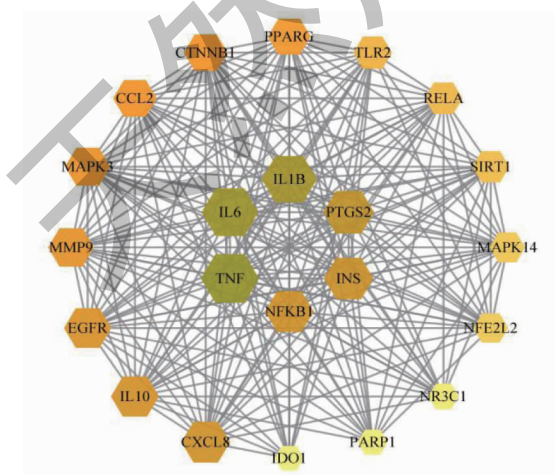


图 7 半夏泻心汤活性成分核心靶点

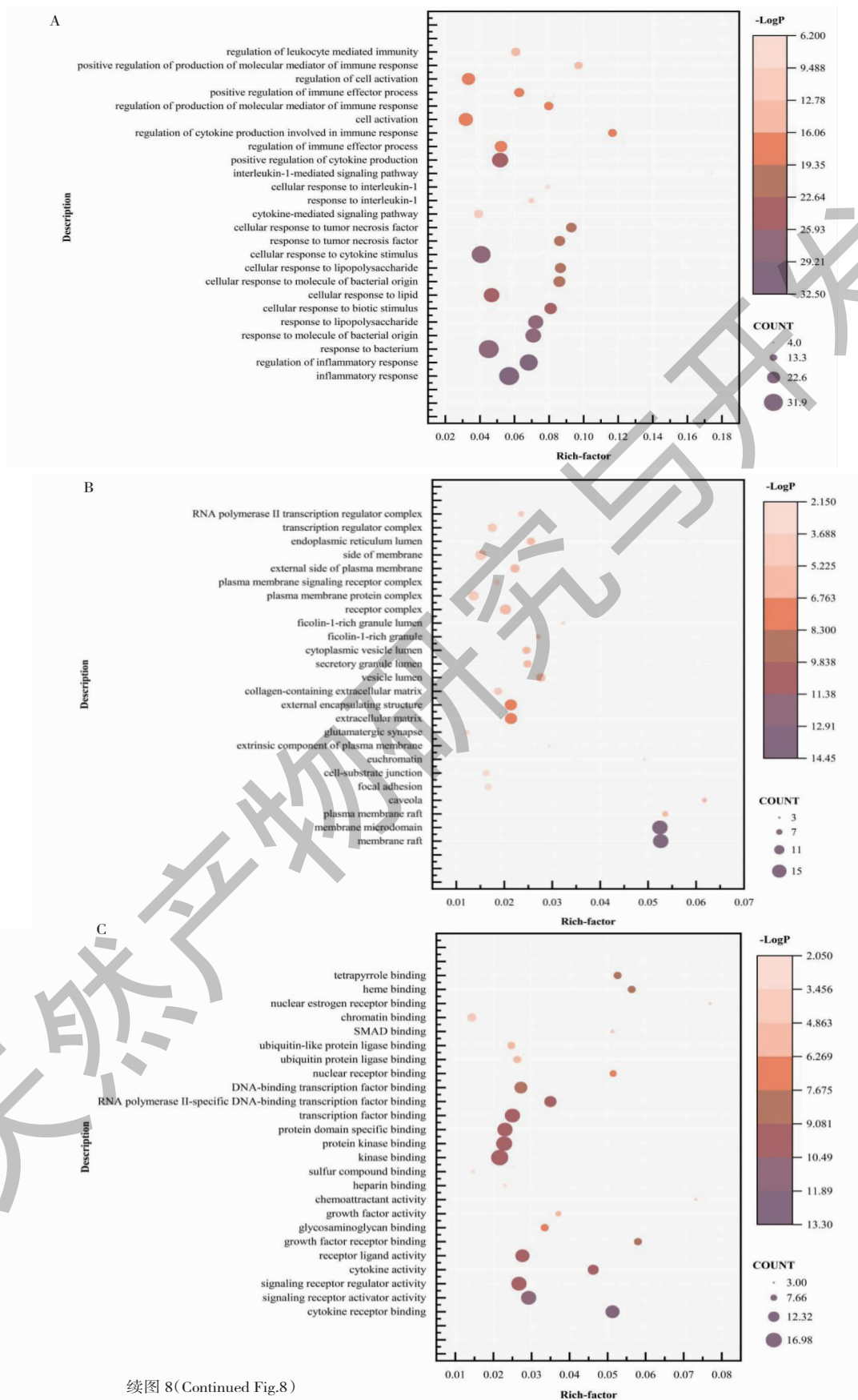
Fig. 7 Core targets of active components in BXT

### 2.3.7 “入血成分-作用靶点-通路”网络的构建

将入血成分、交集靶点和 KEGG 富集前十的信号通路导入 Cytoscape 中,构建“入血成分-作用靶点-通路”网络,该网络中包含 110 个节点及 356 条边(见图 9)。

### 2.3.8 关键成分与核心靶点分子对接结果

根据“半夏泻心汤有效成分核心靶点筛选”中



续图 8 (Continued Fig.8)

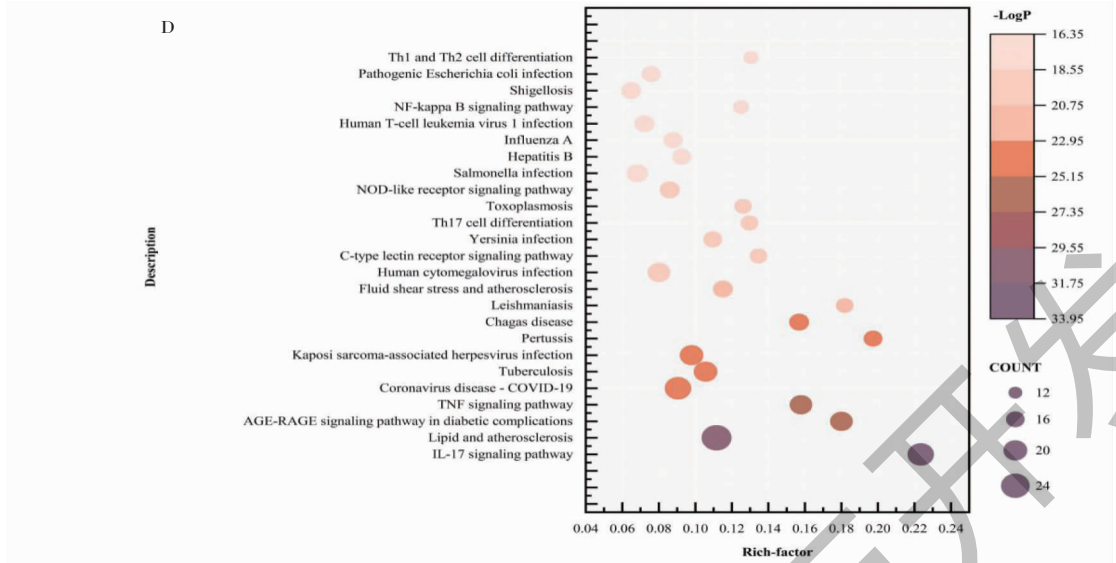


图 8 交集靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Fig. 8 GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis of intersecting targets of BXT and UC

注:A 为 GO 生物过程;B 为 GO 细胞成分;C 为 GO 分子功能;D 为 KEGG 通路。Note: A is GO biological process; B is GO cell composition; C is GO molecular function; D is KEGG pathway.

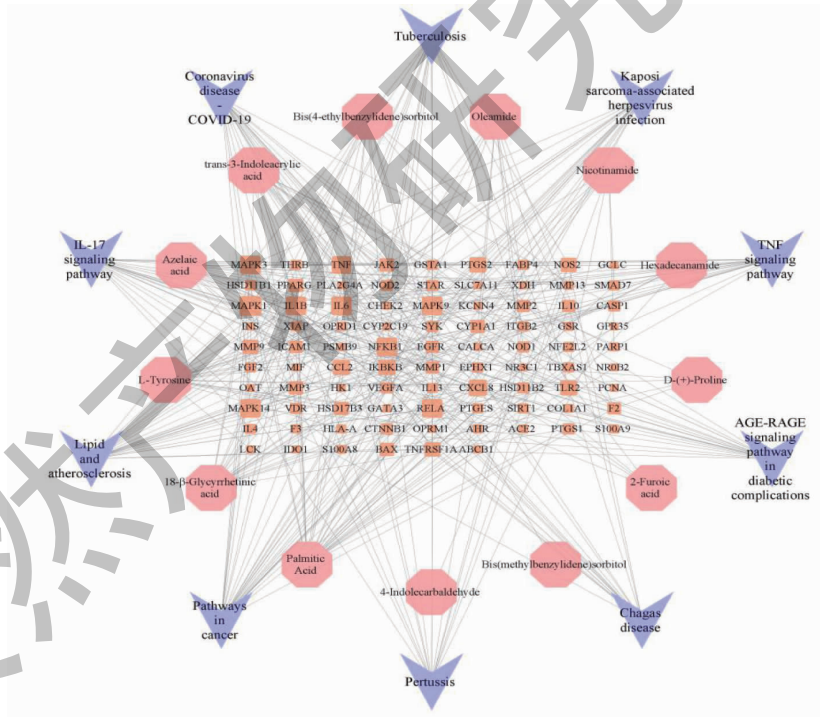


图 9 “入血成分-作用靶点-通路”网络图

Fig. 9 Network diagram of blood-absorbed components-targets-pathways of BXT and UC

选择 Degree 值前十的靶点,包括肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、胰岛素 (insulin, INS)、核因子 NF-kappa-B

p105 亚基 (nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit, NFKB1)、白细胞介素 8 (interleukin-8, CXCL8)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL10)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9); “入血



成分-作用靶点-通路”中 Degree  $\geq 10$  的成分棕榈酸、*L*-酪氨酸、 $18\beta$ -甘草次酸、壬二酸、反式-3-吡啶丙烯酸、双(4-乙基亚苯基)山梨醇、油酸酰胺、烟酰胺;进行分子对接,记录每个靶点结合能最低的化合物

(见图 10),分子对接结果显示, $18\beta$ -甘草次酸和十个核心靶点结合能都较低,说明  $18\beta$ -甘草次酸与核心靶点结合较为亲密,具有较高的亲和力,可能具有较高的药效活性(见图 11)。

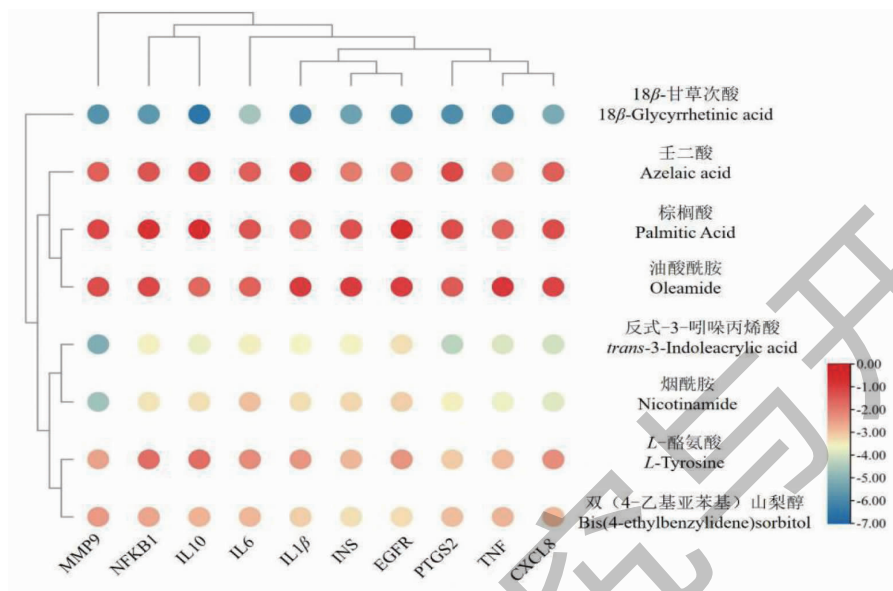
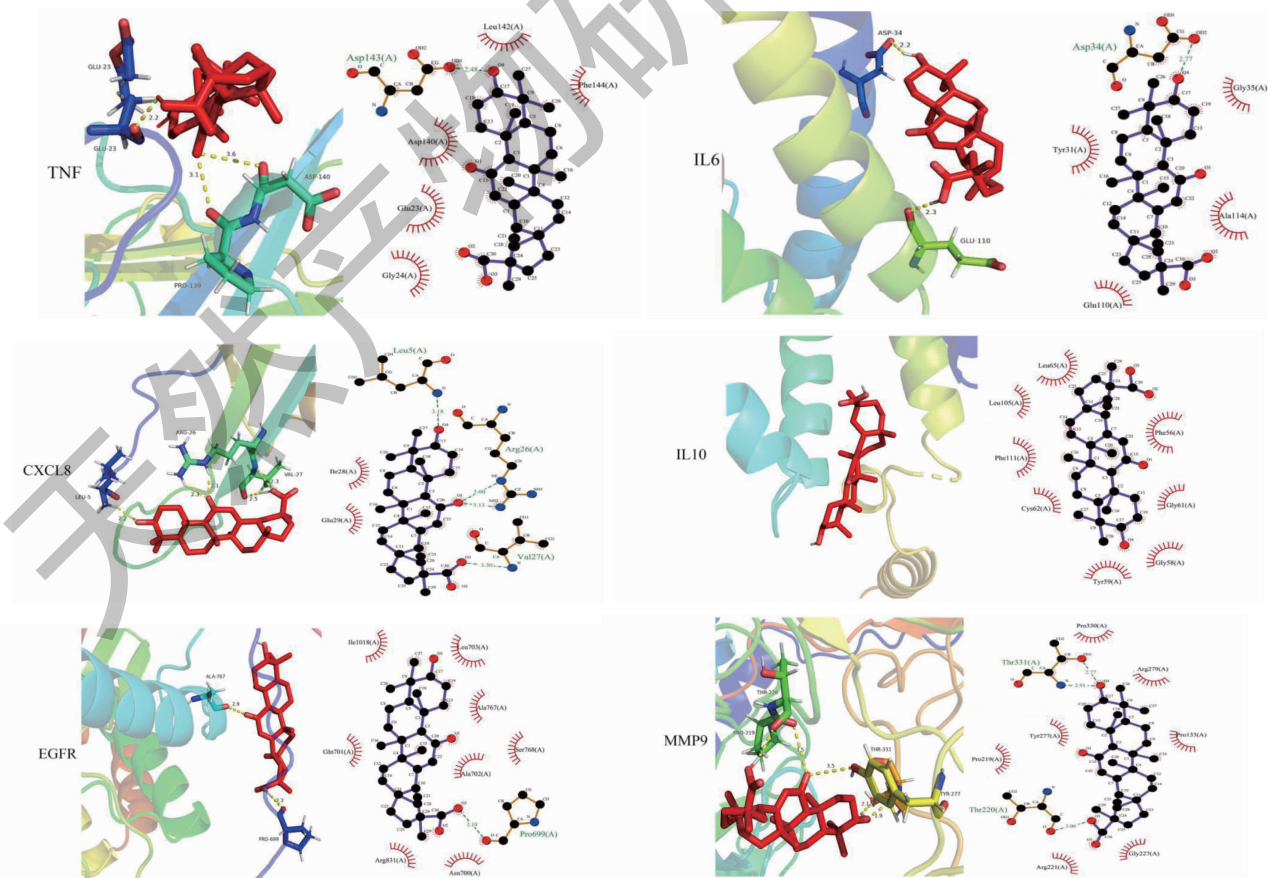
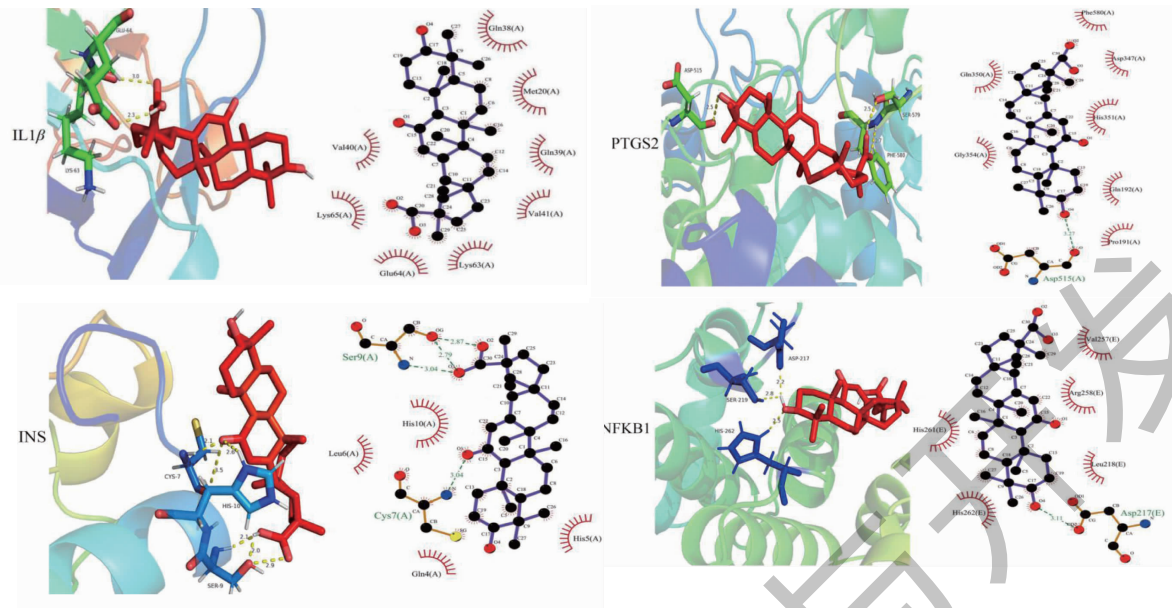


图 10 分子对接能量图

Fig. 10 Molecular docking energy diagram



续图 11 (Continued Fig.11)

图 11 18 $\beta$ -甘草次酸与主要靶点分子对接图Fig. 11 Molecular docking diagram of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and core targets

### 3 讨论与结论

临床研究发现, BXT 可有效降低 UC 患者的中医症状评分和不良反应发生率, 提高治愈率<sup>[10]</sup>。体内实验显示, 在一定浓度范围内, BXT 能明显降低脾虚型 UC 大鼠外周血中 IL-1 $\alpha$ 、IL-10、IL-18、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的表达水平和大鼠 DAI 评分, 改善肠组织中的炎细胞浸润。提示 BXT 对脾虚型 UC 具有一定治疗作用, 其中 BXT 高剂量 (20 g/kg) 可能为最佳剂量。

拓扑分析“入血成分-作用靶点-通路”网络构建可知, BXT 治疗 UC 的主要活性成分有棕榈酸 (palmitic acid, PA)、L-酪氨酸、18 $\beta$ -甘草次酸 (18 $\beta$ -glycyrrhetic acid, GA)、壬二酸、反式-3-吡啶乙酸。PA 为饱和脂肪酸类化合物, 通过诱导单核细胞活化和刺激诱导促炎反应来激活免疫系统<sup>[11]</sup>。有研究表明, PA 可通过调节细胞表面疏水性、生物膜成熟、麦角甾醇的生物合成等抑制念珠菌增殖以抑制其的肠道毒性保护肠细胞<sup>[12]</sup>。GA 为甘草酸 (glycyrrhizic acid, GL) 的关键代谢产物, 药代动力学显示, GL 被肠道微生物群代谢为 GA, 在胃肠道中被吸收<sup>[13]</sup>。本研究中的 GA 可能是由甘草中的 GL 代谢而成, GA 的药理作用主要包括抗肿瘤、抗炎、抗溃疡等, Hendricks 等<sup>[14]</sup>认为 GA 可诱导 B 细胞和 T 细胞到肠淋巴滤泡, 调节免疫反应以维持肠道炎症稳态。壬二酸被发现可通过激活异位嗅觉受体 544 调节肠道微生物和抑制肠道促炎因子的释放以改善肠道通

透性减轻肠道炎症<sup>[15]</sup>。此外, L-酪氨酸和反式-3-吡啶乙酸也具有调节肠道微生物的作用, 反式-3-吡啶乙酸可能还具有减轻肠道炎症, 调节肠道稳态, 保护肠道屏障, 预防炎性肠病的功能<sup>[16,17]</sup>。上述结果与 GO 富集分析中 BXT 可能通过炎症反应调节和微生物反应等干预溃疡性结肠炎的结果相一致。提示 BXT 可能主要通过棕榈酸、L-酪氨酸、18 $\beta$ -甘草次酸等抑制肠道炎症, 调节肠道微生物及保护肠道屏障等功能达到治疗 UC 的效果。

KEGG 富集结果显示, BXT 治疗 UC 与 IL-17 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路等有关。结合核心靶点结果显示, TNF、IL6、IL1 $\beta$  是治疗 UC 的关键靶点。由此可知, 炎症相关通路在 BXT 治疗 UC 中发挥着重要作用。有研究表明, IL17 可将信号传导介质 NF $\kappa$ B 激活因子 1 募集到 IL-17R 中, 并激活下游 NF $\kappa$ B、MAPK 等信号通路, 进一步诱导编码 TNF- $\alpha$ 、IL1、IL6、PTGS2、CXCL8、MMP9 等基因表达, 参与 IL17 介导的炎症反应、微生物调节、自身免疫疾病和肿瘤的发生<sup>[18]</sup>。结合炎症因子检测结果, 模型对照组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、INF- $\gamma$  升高可能与 IL-17 信号通路相关。此外, 另一项实验研究表明, 在没有 IL-17 信号通路传导的情况下, 结肠炎小鼠的肠上皮损伤和渗漏会加重, 提示 IL17 在肠道炎症期间也可以有效帮助保护肠道屏障; 且 IL17 还能通过抑制 Th1 极化从而减少 INF- $\gamma$  的分泌, 达到预防炎性肠

病的效果<sup>[19,20]</sup>。因此,有学者认为 IL17 在受伤肠道中的特定保护功能可以抵消其引起的肠道损伤<sup>[18]</sup>。Ivanov 等<sup>[21]</sup>还通过小鼠实验发现 IL17 与肠道微生物的共生调节途径可增加肠道黏膜免疫。故分析可得 IL-17 信号通路介导的炎症反应和肠道保护可能是半夏泻心汤治疗 UC 的关键信号通路。但由于缺乏动物体内和体外细胞对 IL-17 信号通路的阻断或过表达实验,尚不能进一步确定半夏泻心汤治疗 UC 是通过 IL-17 通路介导的。因此,课题组将基于本研究进一步对半夏泻心汤治疗脾虚型 UC 作用进行研究。

综上所述,半夏泻心汤可减轻脾虚型 UC 大鼠的炎症反应,结合 UPLC-Q-Orbitrap HRMS、网络药理学和分子对接技术预测 BXT 可能主要通过棕榈酸、L-酪氨酸、18 $\beta$ -甘草次酸等作用于 TNF、IL6、IL1 $\beta$  等多个靶点,调节 IL-17 信号通路以抑制肠道炎症,调节肠道微生物及保护肠道屏障等功能达到治疗 UC 的作用,为 BXT 干预脾虚型 UC 提供了参考依据。

#### 参考文献

- Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389:1756-1770.
- Wu YJ, Wang T, Zhu PX, et al. Research on syndrome and treatment rules of famous doctors in treating ulcerative colitis based on data mining [J]. *J Tradit Chin Med(中医杂志)*, 2023, 64:2241-2247.
- Yan CQ, Zhou JH, Si YM, et al. Professor Zhou Jianhua's experience in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药)*, 2022, 42:782-784.
- Wang CX, Ge JL, Li F, et al. Effect and mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of ulcerative colitis; a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2023, 29:270-282.
- Wang YY, Qiu ZD, Wang YC, et al. Research progress of Banxia Xiexin decoction in treating ulcerative colitis by regulating intestinal flora [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2023, 34:1446-1450.
- Zhang XF, Luo YF, Gao J, et al. Effects of Tongxie Yaofang decoction on lipid metabolism and autophagy in rats with ulcerative colitis due to liver depression and spleen deficiency [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2022, 44:739-746.
- Yuan L, Ji JH, Li MY. Effect of luteolin on Th17/Treg immune balance in mice with ulcerative colitis by regulating SIRT3/AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2023, 35:1144-1153.
- Bai SY. Experimental study on the effect of Qi Fu Li Zhong enema decoction on PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway in ulcerative colitis model rats [D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine(成都中医药大学), 2019.
- Zhao WY, Xiang Q, Wang C, et al. Mechanism of Euodiae Fructus stir-fried with water decoction of coptidis rhizoma in treatment of chronic colitis based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology and experimental verification [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47:5316-5326.
- Zhang LK, Gu WC, Wu TT, et al. The effects of Banxia Xiexin decoction on gut microbiota and 5-HT in DSS-UC mice were investigated based on brain-gut axis [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化)*, 2023, 25:2390-2401.
- Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, et al. Palmitic and oleic acid; the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus [J]. *Trends Endocrin Met*, 2018, 29:178-190.
- Prasath KG, Tharani H, Kumar MS, et al. Palmitic acid inhibits the virulence factors of *Candida tropicalis*: biofilms, cell surface hydrophobicity, ergosterol biosynthesis, and enzymatic activity [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:864.
- Ishida T, Jobu K, Kawada K, et al. Impact of gut microbiota on the pharmacokinetics of glycyrrhizic acid in Yokukansan, a kampo medicine [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45:104-113.
- Hendricks JM, Lowe DC, Hardy ME. Differential induction of isolated lymphoid follicles in the gut by 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e100878.
- Wu C, Jeong MY, Kim JY, et al. Activation of ectopic olfactory receptor 544 induces GLP-1 secretion and regulates gut inflammation [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13:1987782.
- Shatova OP, Zabolotneva AA, Shestopalov AV. Molecular ensembles of microbiotic metabolites in carcinogenesis [J]. *Biochemistry*, 2023, 88:867-879.
- Wypych TP, Pattaroni C, Perdijk O, et al. Microbial metabolism of L-tyrosine protects against allergic airway inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22:279-286.
- McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50:892-906.
- Awasthi A, Kuchroo VK. IL-17A directly inhibits TH1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10:568-70.
- Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, et al. Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability [J]. *Immunity*, 2015, 43:727-38.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria [J]. *Cell*, 2009, 139:485-98.