

基于网络药理学和动物实验探讨青皮-枳壳药对治疗动力障碍型胃肠疾病的配伍关系

宁芯誉¹, 罗雯雯², 李吉旺²,
陈东良², 仇墨松², 林志岭², 柳贤福^{2*}

¹广西中医药大学研究生院; ²广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530200

摘要: 基于网络药理学及动物实验探讨青皮-枳壳药对治疗动力障碍型胃肠疾病的配伍关系。利用青皮-枳壳与胃肠疾病的交集靶点构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图并进行富集分析, 选取“靶点-成分-通路”图中中介中心性值前5的关键靶点与其相应的活性成分进行分子对接; 以小鼠的体重、胃残留率与血清胃动素浓度为指标, 观察青皮-枳壳(1:1、1:2、2:1)与其单味药治疗L-精氨酸溶液引起的小鼠胃肠动力障碍的差异。网络药理学的结果显示青皮-枳壳治疗胃肠疾病的核心靶点有CYP2C9、EGFR和HSD11B1; 核心成分有 β -谷甾醇、甜橙黄酮、柚皮素、新橙皮苷、橙皮素、马尔敏、百里酚、川陈皮素和5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基)铬-4-酮; 核心靶点与核心成分对接良好。动物实验的结果表明单行和配伍使用的青皮-枳壳均能改善小鼠胃肠运动障碍; 配伍组的疗效优于单味药组, 其中青枳1:2组优于青枳1:1组与青枳2:1组。本研究初步揭示青皮-枳壳治疗动力障碍型胃肠疾病的最佳配伍比与作用机制, 为青皮-枳壳治疗胃肠疾病的进一步研究提供参考依据。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 动物实验; 药对; 青皮-枳壳; 胃肠疾病

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)12-2133-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.12.014

Compatibility relationship of Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus drug pair in the treatment of dyskinetic gastrointestinal diseases based on network pharmacology and animal experiments

NING Xin-yu¹, LUO Wen-wen², LI Ji-wang²,
CHEN Dong-liang², CHOU Zhao-song², LIN Zhi-ling², LIU Xian-fu^{2*}

¹Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine;

²Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: This study aims to explore the compatibility relationships of Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus drug pair (CV-AF) in the treatment of dyskinetic gastrointestinal diseases (GD) based on network pharmacology and animal experiments. The intersection targets between CV-AF and GD were used for the chart construction and enrichment analysis of protein-protein interactions; and the key targets of the top 5 betweenness centrality values in the “target-component-pathway” chart were selected for molecular docking with their corresponding components; the body weight, gastric residual rates, and serum motilin concentrations of mice were used as indicators to observe the differences between CV-AF (1:1, 1:2, 2:1) and their corresponding single drug for the treatment of gastrointestinal dyskinesia in mice induced by L-arginine solution. The results of network pharmacology showed that the core targets of CV-AF for the treatment of GD were CYP2C9, EGFR, and HSD11B1; the core components were β -sitosterol, sinensetin, naringenin, neohesperidin_qt, hesperetin, marmin, thymol, nobilinetin, and 5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one; the core targets were well combined with the core components. The results of animal experiments indicated that both individual and combined use of CV-AF ameliorated gastro-

收稿日期: 2024-03-20

接受日期: 2024-10-08

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202413643015); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院校级课题 (2024MS005)

* 通信作者 E-mail: 7217151369@163.com

intestinal dyskinesia of mice; the efficacy of CV-AF groups was better than their corresponding single drug groups, with the CV-AF 1:2 group being better than the CV-AF 1:1 group and the CV-AF 2:1 group. This study reveals the optimal pairing ratio and action mechanism for the treatment of dyskinetic GD by CV-AF preliminary, which can provide a reference basis for further research on the treatment of GD by CV-AF.

Key words: network pharmacology; molecular docking; animal experiments; drug pair; Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus; gastrointestinal diseases

胃肠疾病 (gastrointestinal diseases, GD) 是一种常见的消化系统疾病, 主要包括消化性溃疡与肠胃炎等, 这类疾病的患病率较高, 发病原因较多, 得病种类较杂, 且病程较长^[1]。临床上常配伍使用青皮和枳壳防治胃肠疾病, 明代医家秦景明撰写的《症因脉治》^[2]记载枳壳青皮饮为理气剂, 能减轻三焦胀, 气满腹中, 空空然响方的症状, 宋代医家张锐撰写的《鸡峰普济方》^[3]提及枳壳汤为理气剂, 可用于治疗肠风和痔疾。

青皮 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride, CV) 是芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽培变种的干燥幼果与未成熟果实的果皮, 分为个青皮和四花青皮两种类型, 前者为 5 月到 6 月收集自落的幼果, 呈类球形, 凡是生产柑橘的地方均有, 后者为 7 月到 8 月采收的未成熟果实, 剖成四裂片至基部, 除掉囊瓣晒干, 主产于广西、广东和福建等地, 青皮性温, 味苦、辛, 具有疏肝破气, 消积化滞的功效。枳壳 (Aurantii Fructus, AF) 是芸香科植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 7 月到 8 月果皮尚绿、果实未成熟时采收, 收集后横切成两瓣, 仰面晒干或低温干燥, 主产于湖北、江西和四川等地, 枳壳性微寒, 味苦、辛、酸, 具有理气宽中、行滞消胀的作用^[4]。

青皮和枳壳均来源于芸香科柑橘属植物, 两者性能与功效相似, 共同使用能增强胃肠运动^[5]。基于网络药理学和动物实验探讨青皮-枳壳药对 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus, CV-AF) 治疗胃肠疾病的最佳配伍比与作用机制, 从而揭示该药对的配伍关系对胃肠动力的影响, 为青皮-枳壳治疗胃肠疾病的进一步研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明小鼠, 体重 18.0 ~ 22.0 g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 动物生产合格证号为 SCXK (湘) 2019-0014。该动物实验经广西中医药大学伦理委员会批准, 批准编号为 DW20230528-104。小鼠适应性饲养 7 d, 自由饮水采食, 普通饲料喂养;

饲养温度为 20 ~ 25 °C。

1.2 实验药材、药品与试剂

青皮与枳壳中药饮片均从各大连锁药店购入, 执行标准均为《中华人民共和国药典》2020 年版, 经广西中医药大学梁洁教授鉴定青皮为芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 的幼果和果皮; 枳壳为芸香科植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 的果实。

L-精氨酸 (批号: A108220, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 活性炭 (批号: C298677, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 西沙必利片 (5 mg/片, 批号: B2304122, 浙江京新药业股份有限公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 小鼠胃动素 (motilin, MTL) 酶联免疫分析试剂盒 (批号: MU30329, 武汉贝茵莱生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器

BSA2245 型电子天平 (德国赛多利斯集团); H-1011157 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); 3510E-DTH 型超声波清洗机 (美国必能信超声波有限公司); SpectraMax[®] iD3 型酶标仪 (美国美谷分子仪器有限公司)。

1.4 青皮-枳壳的活性成分与作用靶点

分别以青皮和枳壳为关键词, 利用 TCMSP 数据库进行收集, 设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 为 $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) 为 ≥ 0.18 ; 通过 BATMAN-TCM 数据库进行搜索, 设置分数截止为 ≥ 20 以及校正后的 P 值为 < 0.05 ; 筛除重复的成分和靶点得到青皮-枳壳的活性成分和作用靶点。PubChem 得到活性成分的“Canonical SMILES”字符串和“* sdf”格式, SwissTargetPrediction 数据库设置可能性为 > 0 和 PharmMapper 数据库设置标准拟合为 > 0 分别预测靶点, 筛除重复靶点得到该药对的预测靶点。Uniprot 数据库限定物种为人类, 校正靶点名称, 筛除重复靶点得到青皮-枳壳的作用靶点。

1.5 疾病靶点与交集靶点的获取

OMIM、Drug Bank 和 DisGeNET 数据库分别以“gastrointestinal diseases”为关键词收集疾病靶点,

筛除重复靶点得到疾病靶点。将青皮-枳壳的作用靶点与胃肠疾病靶点导入 Venny 在线工具平台绘制 Venny 图,得到交集靶点。

1.6 蛋白质-蛋白质相互作用网络图的构建

将交集靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图,设置置信度为 ≥ 0.40 ,将网络图里断开的节点隐藏,结果保存为“*tsv”格式并导入 Cytoscape 软件,运用“网络分析器”功能和“CytoNCA”插件对 PPI 网络进行拓扑分析,以中介中心性 (betweenness centrality, BC) 值的大小表示“节点”的重要程度。

1.7 GO 功能注释与 KEGG 通路的富集分析

通过 Metascape 数据库对交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路的富集分析,在“通路与过程富集”选项设置最小重叠为 3、*P* 值阈值为 0.01 和最小富集为 1.5,利用微生信在线平台对富集结果进行可视化。

1.8 “靶点-成分-通路”图的构建

利用 Cytoscape 软件构建青皮-枳壳活性成分、胃肠疾病和前 20 条 KEGG 通路所涉及的靶点网络图,通过“CytoNCA”插件得到靶点的 BC 值排序。

1.9 核心靶点与成分的分子对接

将“靶点-成分-通路”图中 BC 值前 5 的关键靶点和其对应的活性成分进行分子对接,利用 PDB 数据库得到靶点蛋白的 3D 结构以及 PubChem 数据库下载活性成分的“*mol2”格式。通过 Auto Dock Tools 软件对蛋白质进行去水、加氢等操作保存为“*pdb”格式,将蛋白质与小分子对接。Open Babel 软件将对接结果转存为“*pdbqt”格式,采用 PyMol 软件可视化作图。

1.10 药物的制备

L-精氨酸溶液:取 L-精氨酸加纯净水调制成溶液,第 1 d 浓度为 0.26 mol/mL,第 2~5 d 浓度为 0.325 mol/mL,现配现用。

营养性半固体糊:2.5 g 羧甲基纤维素,4 g 奶粉,2 g 糖,2 g 淀粉,1 g 活性炭,62.5 mL 纯净水,配制成 75 mL 约 75 g 的糊状物,现配现用^[6]。

单味药液:取青皮粉末 100 g,加 1 000 mL 纯净水,浸泡 30 min,煎煮 60 min,纱布过滤,80 °C 水浴浓缩,制成青皮浸膏,置 4 °C 冷藏备用。同法制备枳壳浸膏 (取枳壳粉末 100 g)。用时均按 1:1 加纯净水,超声 30 min 溶解浸膏。

药对配伍药液:取青皮粉末 50 g 和枳壳粉末 50 g 合并,加 1 000 mL 纯净水,浸泡 30 min,煎煮 60 min,纱布过滤,80 °C 水浴浓缩,制成青枳 1:1 配伍浸膏,置 4 °C 冷藏备用。同法制备青枳 1:2 配伍浸膏 (取青皮粉末 50 g 和枳壳粉末 100 g) 和青枳 2:1 配伍浸膏 (取青皮粉末 100 g 和枳壳粉末 50 g)。用时均按 1:1 加纯净水,超声 30 min 溶解浸膏^[7]。

西沙必利溶液:西沙必利片研细成粉末,加纯净水制成浓度为 1 mg/mL 的溶液,现配现用。

1.11 模型的制备、分组与给药

100 只小鼠随机选取 12 只作为空白组 (blank group, Bla),生理盐水灌胃给药 5 d,每日 1 次,模型 1 组 (model 1 group, Mod-1) 灌相同剂量的生理盐水;其余 88 只采用 L-精氨酸溶液建立小鼠胃肠动力异常模型,L-精氨酸溶液灌胃给药 5 d,每日 1 次,第 1 d 的给药剂量按体质量为 5.2 mg L-精氨酸/g,第 2~5 d 的剂量为 2.6 mg L-精氨酸/g。模型组共设置两组,模型 1 组用于检验造模是否成功,模型 2 组与各给药组进行对比,得到各给药组的疗效差异。

随机选取胃肠动力异常的小鼠分为 7 组,每组 10 只,包括模型 2 组 (model 2 group, Mod-2)、阳性药组 (positive group, Pos)、青皮组 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride group, CV)、枳壳组 (Aurantii Fructus group, AF)、青枳 1:1 组 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus 1:1 group, CA-11)、青枳 1:2 组 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus 1:2 group, CA-12) 和青枳 2:1 组 (Citri Reticulatae Pericarpium Viride-Aurantii Fructus 2:1 group, CA-21)^[8],分别给予纯净水、西沙必利溶液、青皮药液、枳壳药液、青枳 1:1 配伍药液、青枳 1:2 配伍药液和青枳 2:1 配伍药液灌胃给药 4 d,每日 1 次,模型 2 组灌相同剂量的纯净水,阳性药组的给药剂量按体质量为 2.275 mg 西沙必利粉末/kg,其余组的给药剂量均为 10 g 生药/kg^[9]。

1.12 取材与检测指标

末次造模给药后,禁食不禁水 12 h,随机选取 10 只空白组小鼠和 10 只造模的小鼠作为模型 1 组,称量小鼠体重,将两组小鼠灌胃黑色半固体糊 0.5 mL/只,30 min 后眼球取血 1 mL 备用,处死小鼠,剖开腹腔,结扎胃贲门和幽门,取胃,用生理盐水清洗,滤纸拭干后称重,沿胃大弯剪开胃体,用生理盐水洗去胃内容物后拭干称重,计算胃残留率 (胃残留率 = (胃全质量 - 胃净质量) / 半固体糊质量 × 100%)^[10],同时采用离心管收集血液,室温血清自

然凝固 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 至 -20 °C 冰箱保存, 按照胃动素试剂盒的操作步骤, 酶标仪设定 450 nm 波长测定小鼠血清中的 MTL 含量。7 组小鼠 (模型 2 组、阳性药组、青皮组、枳壳组、青枳 1:1 组、青枳 1:2 组和青枳 2:1 组) 同法取材与检测指标。

实验所得的数据均用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 小鼠的体重、胃残留率和 MTL 浓度的数据统计由 SPSS 软件处理, 用 t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 青皮-枳壳的活性成分与作用靶点

TCMSP 数据库得到 8 个活性成分和 93 个药物靶点, BATMAN-TCM 数据库得到 13 个活性成分和 146 个药物靶点 (见表 1); 筛除重复成分, 共收集到 19 个青皮-枳壳的活性成分。Swiss Target 和 PharmMapper 数据库对该 19 个活性成分进行预测靶点, 分别得到 318 和 388 个靶点。经 Uniprot 数据库校正靶点名称, 筛除重复靶点, 共收集到 706 个青皮-枳壳的作用靶点。

表 1 青皮-枳壳的活性成分与药物靶点

Table 1 The active components and drug targets of CV-AF

数据库 Database	活性成分 Active component	靶点数 Target number	
TCMSP	新橙皮苷 Neohesperidin_qt	7	
	甜橙黄酮 Sinensetin	21	
	柚皮素 Naringenin	37	
	5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基) 铬-4-酮 5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	10	
	川陈皮素 Nobiletin	35	
	马尔敏 Marmin	4	
	橙皮素 Hesperetin	9	
	β -谷甾醇 β -Sitosterol	38	
	BATMAN TCM	百里酚 Thymol	121
		正辛醇 Octanol	48
新橙皮苷 Neohesperidin_qt		3	
石蒜碱 Narcissine		4	
柠檬烯 Limonene		103	
月桂酸 Lauric acid		225	
榄香烯 Elemene		98	
3-萜烯 3-Carene		100	
辛弗林 Synephrine		38	
D-柠檬烯 D-Limonene		103	
柚皮苷 Naringin		3	
川陈皮素 Nobiletin		3	
橙皮苷 Hesperidin		13	

2.2 疾病靶点与交集靶点的获取

OMIM、DrugBank 和 DisGeNET 数据库分别收集到 545、19 和 134 个靶点, 筛除重复靶点, 得到 641 个胃肠疾病靶点。将青皮-枳壳的作用靶点与胃肠疾病靶点导入 Venny 在线工具绘制 Venny 图, 得到 45 个交集靶点 (见图 1)。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络图的构建

将交集靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图, 并通过 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行拓扑分析 (见图 2), 图中形状的大小、字体的大小和颜色的深浅与 BC 值的大小呈正相关, BC 值越大, 该节点在网络中的关联性越大, 越可能是关键靶点 (见表 2)。

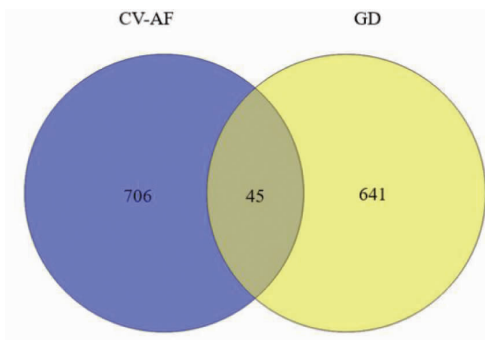


图 1 青皮-枳壳与胃肠疾病的交集靶点

Fig. 1 The intersection targets between CV-AF and GD

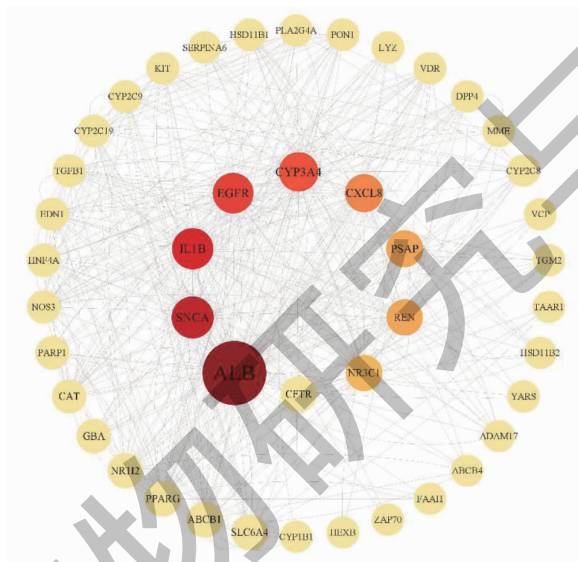


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 The PPI network chart

表 2 PPI 网络的关键靶点

Table 2 The key targets of the PPI network

序号 No.	靶点 Target	名称 Name	中介中心性 Betweenness centrality
1	ALB	白蛋白 Albumin	559.433
2	SNCA	α -突触核蛋白 α -Synuclein	173.225
3	IL1B	白细胞介素-1 β Interleukin-1 β	158.809
4	EGFR	表皮生长因子受体 Epidermal growth factor receptor	148.211
5	CYP3A4	细胞色素 P450 3A4 Cytochrome P450 3A4	127.257
6	CXCL8	白细胞介素-8 Interleukin-8	103.126
7	PSAP	鞘脂激活蛋白原 Prosaposin	84.000
8	REN	人肾素 Renin	71.171
9	NR3C1	糖皮质激素受体 Glucocorticoid receptor	70.769
10	CFTR	囊性纤维化跨膜传导调节因子 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	67.510

2.4 GO 功能注释与 KEGG 通路的富集分析

通过 Metascape 数据库对交集靶点进行富集分析,得到 GO 功能注释富集条目 658 条,其中生物过程(biological process, BP) 570 条,包括对外源性刺激的反应、类固醇代谢过程和细胞对外源性刺激的反应等;细胞组分(cellular component, CC) 29 条,包括膜筏、膜微区和裂解空泡等;分子功能(molecular function, MF) 59 条,包括芳香化酶活性、血红素结合和四吡咯结合等。利用微生信在线平台对 GO 功能

注释和 KEGG 通路的富集结果进行可视化,依据 P 值的大小对 GO 功能注释的富集条目进行排序,分别筛选出 BP、CC 以及 MF 前 10 的富集条目绘制 GO 富集分析图(见图 3)。根据 KEGG 通路的富集结果,涉及 49 条通路,利用 P 值排序绘制前 20 的 KEGG 通路气泡图, P 值越高,气泡的颜色越红,信号通路的显著性越好,潜在靶点主要集中在化学致癌-DNA 加合物通路、脂质与动脉粥样硬化通路和药物代谢-细胞色素 P450 通路等(见图 4)。

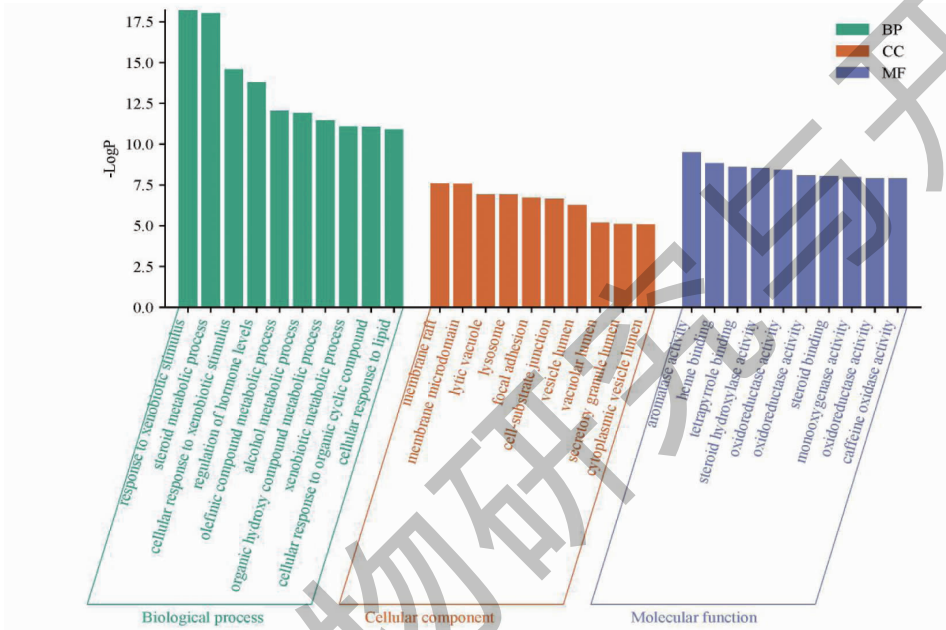


图 3 GO 富集分析图

Fig. 3 The GO enrichment analysis chart

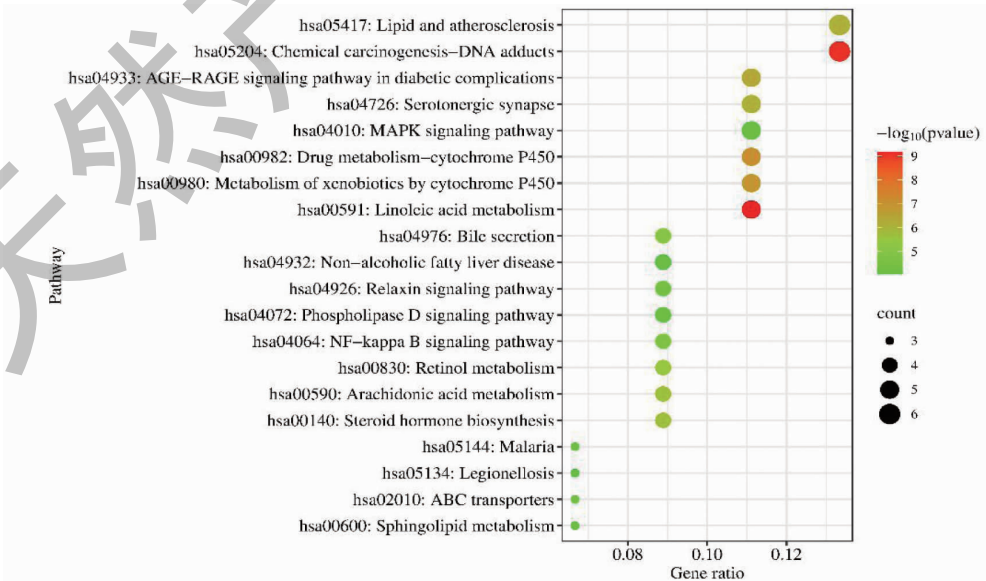


图 4 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 4 The bubble chart of the KEGG enrichment analysis

2.5 “靶点-成分-通路”图的构建

利用 Cytoscape 软件构建青皮-枳壳活性成分、胃肠疾病与前 20 条 KEGG 通路所涉及的靶点网络图(见图 5)。青色箭形、橙色六边形、蓝色正方形、

紫色圆形和黄色菱形节点分别为青皮-枳壳、胃肠疾病、青皮-枳壳的活性成分、KEGG 通路和成分、疾病与通路的共有靶点,BC 值越大,节点的形状和字体越大,越可能是关键的作用靶点。

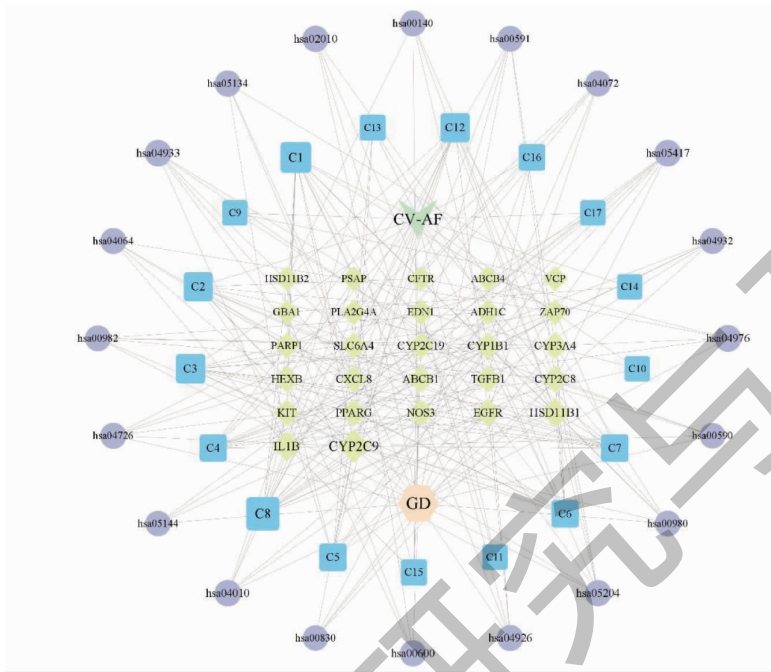


图 5 “靶点-成分-通路”图

Fig. 5 The “target-component-pathway” chart

注:C1~C17 分别为新橙皮苷、甜橙黄酮、柚皮素、5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基)铬-4-酮、川陈皮素、马尔敏、橙皮素、 β -谷甾醇、正辛醇、柠檬烯、榄香烯、月桂酸、百里酚、石蒜碱、3-萜烯、辛弗林、D-柠檬烯。Note: C1-C17 are neohesperidin_qt, sinensetin, naringenin, 5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one, nobiletin, marmin, hesperetin, β -sitosterol, octanol, limonene, elemene, lauric acid, thymol, narcissine, 3-carene, synephrine, D-limonene, respectively.

2.6 核心靶点与成分的分子对接

选取“靶点-成分-通路”图中 BC 值前 5 的关键靶点与其相对应的活性成分进行分子对接,能对接成功的核心靶点有 3 个(见表 3),结合能 < -5.0 kcal/mol 的分子对接有 18 个(见表 4),核心靶点反向筛选得到 9 个核心成分,结合能数值越低,两者的结合性越好,其中 β -谷甾醇与 CYP2C9^[11] 的相互作用最强,并将结合能低的分子对接可视化作图(见

图 6)。

2.7 小鼠的体重

利用 SPSS 软件进行组间比较,结果表明空白组的小鼠体重与造模前后的其余各组比较均无统计学意义($P > 0.05$),给药后模型 2 组的小鼠体重与阳性药组、青枳 1:2 组比较均有统计学意义($P < 0.05$),模型 2 组与其余各给药组比较均无统计学意义($P > 0.05$),并计算各组小鼠的体重(见表 5)。

表 3 核心靶点信息

Table 3 The core target information

靶点 Target	蛋白库编号 PDB ID	名称 Name
CYP2C9	1OG5	细胞色素 P450 2C9 Cytochrome P450 2C9
EGFR	5U8L	表皮生长因子受体 Epidermal growth factor receptor
HSD11B1	1XU9	11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1

表 4 分子对接结果

Table 4 The molecular docking results

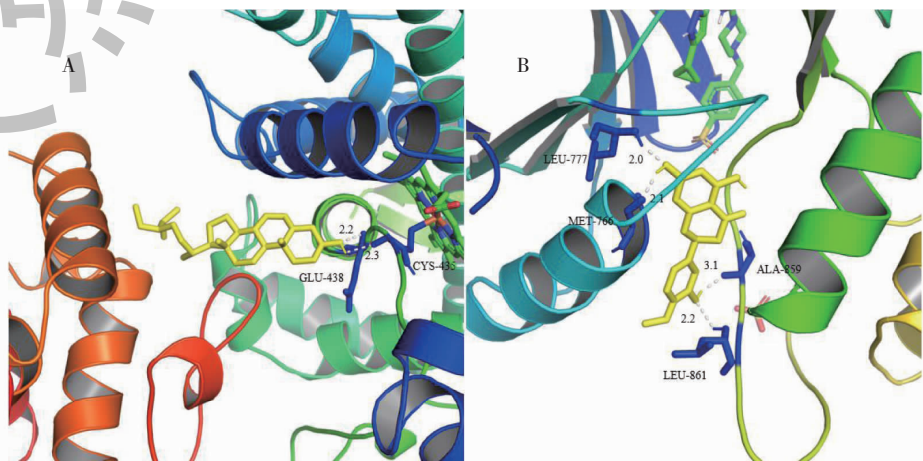
序号 No.	核心成分 Core component	结合能 Binding energy (kcal/mol)		
		CYP2C9	EGFR	HSD11B1
1	β -谷甾醇 β -Sitosterol	-8.42	-	-
2	橙皮素 Hesperetin	-	-	-6.69
		-	-7.62	-
3	柚皮素 Naringenin	-5.72	-	-
		-	-6.48	-7.02
4	甜橙黄酮 Sinensetin	-5.32	-	-
		-	-6.54	-
5	新橙皮苷 Neohesperidin _{qt}	-5.89	-	-
		-	-	-6.27
6	马尔敏 Marmin	-6.03	-	-
		-	-6.01	-
7	百里酚 Thymol	-5.00	-	-
		-5.32	-	-
8	川陈皮素 Nobiletin	-	-	-5.20
		-4.96	-	-
9	5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基) 铬-4-酮 5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	-	-	-5.03

空白组的小鼠体重变化与造模前后的其余各组相比相差不大,给药后模型 2 组的小鼠体重与阳性药组、青枳 1:2 组相比存在差异,模型 2 组与其余各给药组相比均无明显差异,说明阳性药组与青枳 1:2 组的小鼠体重增长较明显,可能是小鼠的胃肠动力得到改善造成的。

2.8 小鼠的胃残留率

根据各小鼠的胃全质量和胃净质量,计算得到

各组间的胃残留率,将各组小鼠的胃残留率导入 Graphpad Prism 软件进行可视化(见图 7)。通过 SPSS 软件进行组间比较,结果显示空白组与模型 1 组比较有统计学意义($P < 0.01$),模型 2 组与阳性药组、青枳 1:1 组、青枳 1:2 组、青枳 2:1 组比较均有统计学意义($P < 0.01$),模型 2 组与青皮组、枳壳组比较有统计学意义($P < 0.05$)。造模后模型 1 组的小鼠胃残留率高于空白组,给药后模型 2 组的小鼠



续图 6(Continued Fig.6)

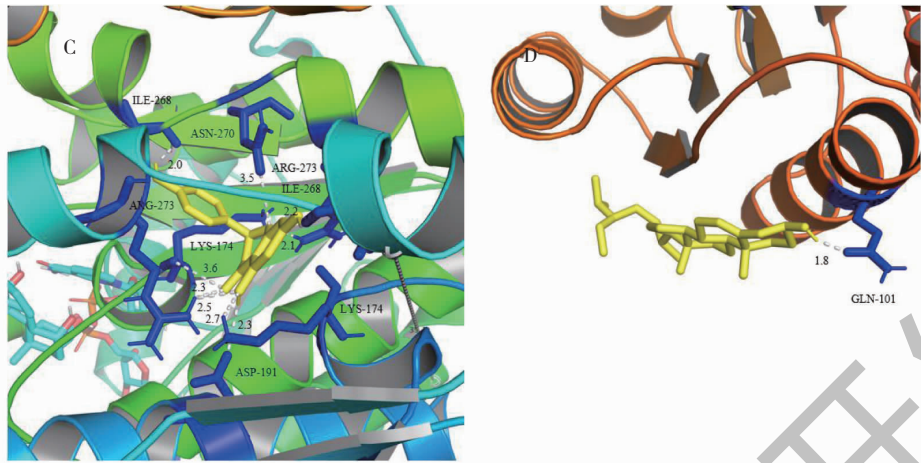


图 6 分子对接图

Fig. 6 The molecular docking chart

注:A. β -谷甾醇-CYP2C9; B. 橙皮素-EGFR; C. 柚皮素-HSD11B1; D. β -谷甾醇-HSD11B1。 Note: A. β -Sitosterol-CYP2C9; B. Hesperetin-EGFR; C. Naringenin-HSD11B1; D. β -Sitosterol-HSD11B1.

表 5 各组小鼠的体重 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 The mouse body weight of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Group	造模前 Before modeling(g)	造模后 After modeling(g)	给药后 After administration(g)
Bla	25.73 \pm 1.75	24.93 \pm 4.20	-
Mod-1	25.58 \pm 1.96	21.98 \pm 3.24	-
Mod-2	23.65 \pm 3.18	21.96 \pm 3.18	21.95 \pm 4.05
Pos	25.34 \pm 1.67	25.07 \pm 2.40	27.09 \pm 4.28 *
CV	25.65 \pm 3.81	24.15 \pm 3.48	24.48 \pm 4.02
AF	27.26 \pm 2.66	26.14 \pm 6.01	25.20 \pm 5.29
CA-11	26.82 \pm 3.08	22.55 \pm 2.54	25.58 \pm 4.79
CA-12	26.47 \pm 2.81	25.75 \pm 4.24	26.64 \pm 7.48 *
CA-21	23.92 \pm 2.40	22.72 \pm 3.11	26.20 \pm 4.91

注:与 Mod-2 比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with Mod-2, * $P < 0.05$.

胃残留率高于各给药组,其中阳性药组比其余给药组、配伍组比单味药组、青枳 1:2 组比其余配伍组以

及枳壳组比青皮组的小鼠胃残留率低,表明各给药组对小鼠的胃肠动力均有促进作用。

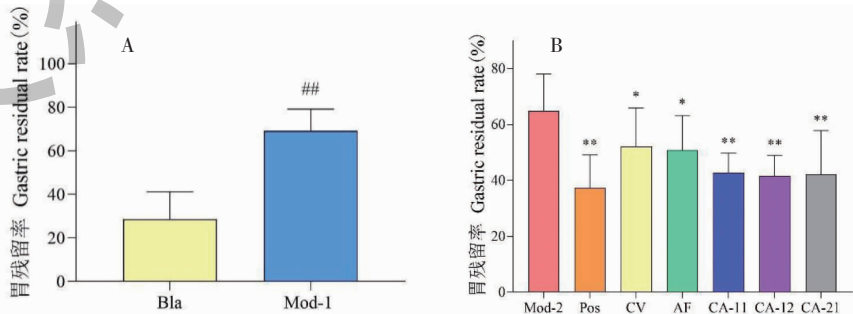


图 7 各组小鼠的胃残留率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 The gastric residual rates of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与 Bla 比较, ### $P < 0.01$; 与 Mod-2 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note: Compared with Bla, ### $P < 0.01$; Compared with Mod-2, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.9 标准曲线的绘制

将小鼠胃动素试剂盒的标准品稀释,浓度分别为0、40、80、160、320、640 pg/mL,按操作步骤处理后放入酶标仪测定,计算绝对光密度(optical densi-

ty,OD)值。Curve Expert 软件设置四次多项式拟合,以浓度为横坐标(X)和绝对OD值为纵坐标(Y)绘制标准曲线(见图8)。

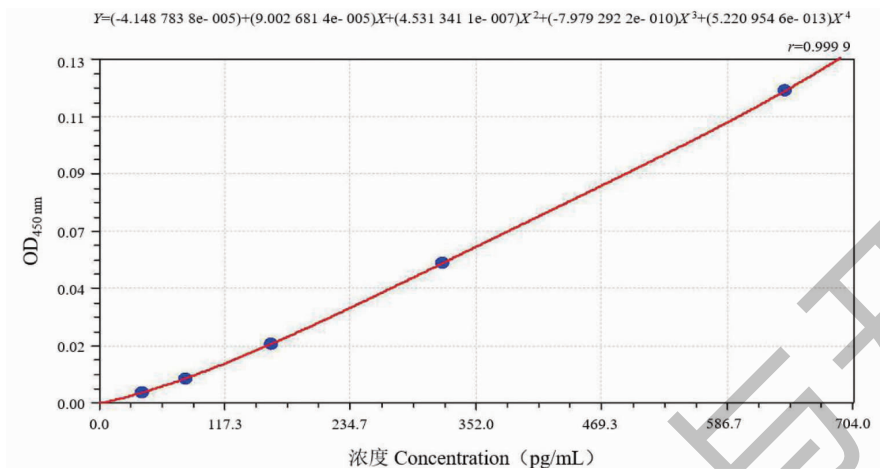


图8 胃动素浓度标准曲线

Fig. 8 The MTL concentration standard curve

2.10 小鼠血清的胃动素浓度

将样品的绝对OD值导入Curve Expert软件的“分析”选项,计算各小鼠血清中的MTL浓度,再将各组小鼠的血清MTL浓度导入Graphpad Prism软件可视化作图(见图9)。采用SPSS软件进行组间比较,发现空白组与模型1组比较有统计学意义($P < 0.01$),模型2组与各给药组比较均有统计学意义

($P < 0.01$)。造模后模型1组的小鼠血清MTL浓度低于空白组,给药后模型2组的小鼠血清MTL浓度低于各给药组,其中阳性药组比其余给药组、配伍组比单味药组、青枳1:2组比其余配伍组以及枳壳组比青皮组的小鼠血清MTL浓度高,说明各给药组均能改善小鼠的胃肠动力障碍。

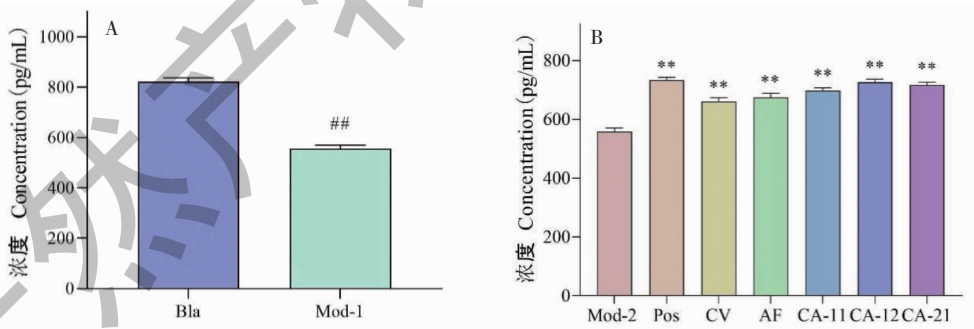


图9 各组小鼠的胃动素浓度($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 9 The MTL concentrations of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与Bla比较,## $P < 0.01$;与Mod-2比较,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with Bla,## $P < 0.01$;Compared with Mod-2,** $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

网络药理学的结果显示共收集到青皮-枳壳的活性成分19个和作用靶点706个,胃肠疾病靶点641个,交集靶点45个,GO功能注释条目658条以及KEGG通路49条;3个核心靶点与核心成分结合较稳定。经动物实验研究表明,单行和配伍组合的

青皮-枳壳均能改善由L-精氨酸溶液导致的小鼠胃肠运动障碍,其中药对配伍使用的疗效优于其单行,青枳1:2的疗效优于其余配伍比,单味枳壳的疗效优于单味青皮,得到促进胃肠动力的最佳配伍比1:2,可能与枳壳的占比有关。小鼠的体重、血清MTL浓度可能与其胃肠动力功能呈正相关,小鼠的胃残

留率可能与其胃肠动力功能和血清 MTL 浓度呈负相关。

现有“青皮散”乳液的研究^[9]发现大鼠血浆、胃和肠组织的匀浆 MTL 水平以及胃肠 MTL 细胞分布的变化与胃肠运动功能相关。枳壳^[12]中的柠檬烯能增强胃动力,柚皮苷能促进肠蠕动。枳壳^[13]水煎剂能加快小鼠的小肠推进速度,并解除肾上腺素所致的小鼠小肠推进和胃排空抑制作用。青皮^[14]对大鼠结肠头部与尾部的纵行肌和环行肌肌条的收缩波平均振幅和频率有影响。

基于药物数据库的筛选结果得到青皮与枳壳的共有成分新橙皮苷、川陈皮素、橙皮苷和柚皮素,橙皮苷能改善大鼠功能性消化不良引起的胃肠动力失常^[15],亦有报道称橙皮甙能增加小鼠的胃肠运动^[16]。橙皮素、 β -谷甾醇、辛弗林和柚皮苷等枳壳的其它活性成分能促进胃肠运动,橙皮素对胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶活性有影响^[17],可提高大鼠的肠道吸收^[18]。 β -谷甾醇能改善由幽门螺杆菌引起的感染性胃炎,减少胃黏膜的损伤^[19],通过网络药理学探究五达颗粒对胃肠动力障碍的疗效,发现其作用机制可能是 β -谷甾醇等成分能调节 JUN 等关键蛋白的信号转导、炎症和免疫反应^[20]。辛弗林能使胃平滑肌细胞松弛,增强胃运动^[21]。枳壳水煎剂和辛弗林对离体兔的小肠运动均有调控作用,枳壳与辛弗林呈量效关系,辛弗林可能是枳壳调节胃肠运动的活性成分之一^[22]。

后期建议将药对的枳壳占比提高进行动物实验,进一步研究青皮-枳壳调节胃肠动力障碍是否与青皮和枳壳的成分叠加以及枳壳的其它活性成分含量有关,并对核心靶点进行验证,为青皮-枳壳的相互作用研究建立更完整的生物效应评价体系,结合现代科学技术推动中医药传承与创新,为新时代使用中医药防治胃肠疾病的不断发展贡献力量。

参考文献

- Xiao QP, Li YM, Zuo KX, et al. Status and drug therapy of common gastrointestinal diseases[J]. China Mod Med(中国当代医药), 2020, 27: 21-25.
- Qin JM. Zhengyin Maizhi(症因脉治)[M]. Shanghai: Shanghai Health Publishing House, 1958.
- Zhang R. Jifeng Puji Fang(鸡峰普济方)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.
- Kang YG. Authentication of Chinese Medicines(中药鉴定学)[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medi-

- cine, 2016.
- Hu XQ. Investigation on mechanism of enhancing effect by traditional Chinese medicine mutual reinforcement[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27: 1896-1898.
- Song Y. Experimental study on effects of Tiaopi Chengqi Decoction on gastrointestinal function of experimental animals and its bacteriostasis *in vitro* [D]. Jinzhong: Shanxi University of Chinese Medicine(山西中医药大学), 2017.
- Duan CN, Cheng YF. Improvement of an evacuation of stomach model of ICR mice[J]. J Wannan Med Coll(皖南医学院学报), 2002, 21: 184-185.
- Ke YX, Wang ZL, Li ZY, et al. Structural characterization of polysaccharide from *Lilii Lancifolii* Bulbus and its effect on acute lung injury in mice induced by PM_{2.5} exposure [J/OL]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1-14 [2024-8-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.q.20240517.1839.008.html>.
- Jing Y, Hu TH. Study on promoting of animal gastrointestinal motility by “Qingpi San” emulsion[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2011, 39: 18521-18522.
- Chen XL, Li GJ, Li K, et al. Effects of Weifuli compound on motion of gastro-intestines in KM mice[J]. China Med Her(中国医药导报), 2006, 3: 20-24.
- Wu YJ, Cui YL, Zheng QC, et al. Theoretical studies on substrate binding mode and regioselectivity of human CYP2C9 with *S*- and *R*-warfarin[J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2014, 35: 2605-2611.
- Teng JY. Study on selection and action mechanism of chemical substance groups for promoting gastric motility by *Aurantii Fructus* [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine(辽宁中医药大学), 2011.
- Guan FL. Study of action rule and molecular mechanism of Chenpi and Zhiqiao on gastrointestinal movement [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2002.
- Xie DP, Li W, Qu SY, et al. Effect of Qingpi on contractile activity of colonic muscle strips in rats[J]. J Lanzhou Med Coll(兰州医学院学报), 1998, 24: 1-3.
- Zhang MZ, Sui HJ, Zhang LL, et al. Effects of hesperidin on functional dyspepsia gastrointestinal motility of rats and expression of ghrelin[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2014, 30: 30-34.
- Guan FL, Wang RJ, Wang JH. Effect of Chenpi and hesperidin on gastric emptying and small intestinal propulsive function in mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2002, 18: 7-9.

- 17 Sun H. Study on interaction of four dietary polyphenols with pepsin and trypsin [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology (河南科技大学), 2019.
- 18 Chen Y, Xin R, Chen LH, et al. Study on rat intestinal absorption of naringenin and hesperetin *in situ* [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2013, 30:465-469.
- 19 Chen TM, Liu YH, Wen JX, et al. Effect of β -sitosterol on inflammation in mice with *Helicobacter pylori* infectious gastritis [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2022, 38:2811-2815.
- 20 Zeng HP, Cao LX, Chen ZQ. Study on molecular mechanism of Wuda granules for gastrointestinal motility disorder based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. J New Chin Med (新中医), 2022, 54:7-14.
- 21 Guan FL. Effect of hesperidin and synephrine on isolated gastric smooth muscle cells [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2004, 20:1420-1425.
- 22 Guan FL, Wang RJ, Wang JH. Effect of Zhiqiao and synephrine on contractile activity of intestinal muscle strips *in vitro* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2002, 18:9-11.

(上接第 2101 页)

- 17 Zeng Q, Liu YB, Zhan HD, et al. Quality evaluation of black ginseng based on HPLC fingerprint and QAMS [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2021, 32:1710-1715.
- 18 Lu GP. Empirical Identification of 500 Commonly Used Chinese Herbal Medicines (500 味常用中药材的经验鉴别) [M]. Beijing: China Publishing House of Traditional Chinese Medicine, 1999:149-151.
- 19 Zhang GJ. Modern Chinese Herbal Medicine Commodities (现代中药材商品通鉴) [M]. Beijing: China Publishing House of Traditional Chinese Medicine, 2001:794-796.
- 20 Liu ZS, Zhang GJ. Identification of the Authenticity of Chinese Herbal Medicines (中药材真伪鉴别) [M]. Harbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 1985:58-60.
- 21 Zhang GJ. Commonly Used Chinese Medicine Identification (常用中医药鉴定大全) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1993:229-231.
- 22 Liu Z, Hou XL, Su Y, et al. Correlation study of the contents of gentiopicrin and loganic acid with appearance traits of *Gentiana scabra* and its quality gradation criterion [J]. China Pharm (中国药房), 2019, 30:2237-2242.