

# 硫代葡萄糖苷治疗炎症性肠病的作用机制研究

陈 澍<sup>1</sup>, 望 宇<sup>4</sup>, 毛旭文<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011; <sup>2</sup>新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830000; <sup>3</sup>新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830000; <sup>4</sup>新疆医科大学第三临床医学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要:** 研究结球甘蓝中硫代葡萄糖苷(简称硫苷; glucosinolates, GSL)治疗炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的作用机制。利用公共数据库获得 IBD 和 GSL 的作用靶点, 将二者取交集, 构建蛋白互作网络, 利用 GO 和 KEGG 富集分析其治疗 IBD 的潜在靶点。通过分子对接验证 GSL 中的活性单体成分 3-吲哚基甲基硫苷(glucobrassicin, GBC)与核心靶点之间结合能。用葡聚糖硫酸钠建立 IBD 小鼠模型, 检测其疾病活动指数评分、肠通透性、肠组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等细胞因子水平。使用试剂盒检测人结直肠腺癌细胞增殖活性, 酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导下该细胞释放 TNF- $\alpha$  和白细胞介素 10(interleukin-1, IL-10)水平。得到 IBD 与 GSL 交集靶点 92 个; GO 功能分析表明调节炎症反应、调节激酶活性等多种生物过程参与 IBD 发展进程, 获得了拓扑异构酶 II $\alpha$  (topoisomerase II alpha, TOP2A)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、细胞色素 P450C9 (cytochrome P450C9, CYP2C19) 等 10 个 GSL 治疗 IBD 的核心靶点; KEGG 富集相关性较高的通路为 TRP 通道炎症介质调节通路等; 分子对接显示 GBC 与核心靶点有较好的结合活性。中、高剂量 GSL 组可减缓小鼠体重下降幅度并改善小鼠稀便和便血等情况, 显著降低模型组 DAI 评分 ( $P < 0.001$ ); 降低小鼠肠组织 TNF- $\alpha$  等细胞因子水平 ( $P < 0.001$ ), 升高 IL-10 水平 ( $P < 0.001$ )。在 20~300  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内, GSL 促进人结直肠腺癌细胞增殖, 抑制 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  分泌, 升高 IL-10 水平。以上结果表明, GSL 可能通过抑制 TOP2A、CDK1 蛋白表达, 减轻小鼠肠道的炎性反应, 缓解炎症性肠病症状。

**关键词:** 硫代葡萄糖苷; 炎症性肠病; 结球甘蓝; 分子对接

中图分类号: R284.1; R319

文献标识码: A

## Study on the mechanism of glucosinolate in treating inflammatory bowel disease

CHEN Shu<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>4</sup>, MAO Xu-wen<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; <sup>2</sup>College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Active Component and Drug Delivery Technology of Natural Medicines, Xinjiang, Urumqi 830000, China; <sup>4</sup>Third Clinical Medical College,

**Abstract:** The purpose of this paper is to explore the mechanism of action of glucosinolates (GSL) in common head cabbage for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). Using public databases, this study obtained the targets of IBD and GSL, took the intersection of the two, constructed the protein interactions network, and analyzed their potential targets for the treatment of IBD using GO and KEGG enrichment. The binding energy between glucobrassicin (GBC), the active monomer component of GSL, and the core target was verified by molecular docking. Mice models of IBD were established with dextran sodium sulfate, and their disease activity index scores, intestinal permeabilities, intestinal tissue tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and other cytokine levels were detected. The proliferative activity of human colorectal adenocarcinoma cells was detected using a kit, and the levels of TNF- $\alpha$  and interleukin-1 (IL-10) released from this cell induced by lipopolysaccharide (LPS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ninety-two intersection targets of IBD and GSL were obtained. GO functional analysis indicated that various biological processes, such as regulation of inflammatory response and modulation of kinase activity, were involved in the developmental process of IBD. Ten targets for the treatment of IBD by GSL, such as topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A), cell cycle protein-dependent kinase 1 (CDK1), cytochrome P450C9 (CYP2C19) were obtained; In the KEGG enrichment analysis, the pathways with higher relevance included TRP channel inflammatory mediator-regulated pathway. Molecular docking showed that GBC had better binding activity with the core targets. The medium and high dose GSL groups slowed down the weight loss and improved the condition of mice, such as loose stool and blood in stool, and significantly reduced the DAI score of the model group ( $P < 0.001$ ), lowered the levels of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , in the intestinal tissues of the mice ( $P < 0.001$ ), and elevated the levels of IL-10 ( $P < 0.001$ ). In the concentration range of 20-300  $\mu\text{mol/L}$ , GSL promoted the proliferation of human colorectal adenocarcinoma cells, inhibited LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion, and elevated IL-10 levels. The above results suggested that GSL could attenuate the inflammatory response of the mouse intestine and alleviate the symptoms of inflammatory bowel disease by inhibiting TOP2A and CDK1 protein expression.

**Key words:** glucosinolate; inflammatory bowel disease; common head cabbage; molecular docking

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 临床主要表现为肠道炎症、稀便、血便等, 是一种容易反复发作的慢性炎症性疾病, 主要分为克罗恩病 (Crohn disease) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis) [1]。其发病原因尚未明确, 与周围环境、基因遗传、自身免疫、感染等多种因素相互关联, 炎症性肠病发病时, 全身症状也十分明显, 如高热、呕吐等。IBD 的发生被认为是明确的结直肠癌高危因素, 常发生于癌前[2]。炎症性肠病临床治疗药物主要

有水杨酸类、糖皮质激素类和免疫抑制剂类等，但这些药物的适用范围较为局限，在长期使用后易产生如：诱发或加重感染、物质代谢紊乱等不良反应<sup>[3]</sup>，故寻求一种有效且不良反应少的天然药物十分迫切。

硫代葡萄糖苷（简称硫苷；glucosinolates, GSL）是结球甘蓝中含量最高的生物活性物质<sup>[4]</sup>。《本草拾遗》载：“阔叶可食，治黄毒者，煮作菹，经宿渍，色黄，和盐食之，去心下结伏气。”主治湿热黄疸、消化道溃疡疼痛、关节不利、虚损等症。根据现有文献总结，结球甘蓝 GSL 分为两种：脂肪族 GSL 约占 58.4%（3-甲基硫氧烯丙基硫苷等）和吲哚族 GSL 约占 41.6%（3-吲哚基甲基硫苷等），以 3-吲哚基甲基硫苷（glucobrassicin, GBC）为主<sup>[5]</sup>。现有研究表明，GSL 及其代谢产物具有抑菌消炎、抗肿瘤、抗氧化、调节肠道菌群等作用，GSL 通过上消化道进入肠，被肠道微生物代谢利用，可抑制肠道炎症反应<sup>[6]</sup>。但 GSL 治疗炎症性肠病的作用及分子机制研究甚少，缺乏实验验证。因此，在既往研究的基础上，本研究利用网络药理学方法和分子对接技术，拟对 GSL 治疗 IBD 的潜在作用机理进行预测，通过对预测结果进行实验验证，为研发 IBD 治疗的有效药物提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库及软件

数据库：PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)；SEA (<http://sea.bkslab.org/>)；SuperPred (<http://prediction.charite.de/>)；TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/>)；GeneCards (<https://www.genecards.org/>)；OMIM (<http://omim.org/>)；CTD (<http://ctdbase.org/>)；Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)；微生物信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)；Uniprot (<http://www.uniprot.org/>)；RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>)；CB-Dock (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/blinddock.php>)；STRING (<https://string-db.org/>)；Metascape (<https://metascape.org/>)。

软件：Graphpad Prism 8、Cytoscape 3.8.2。

### 1.2 主要仪器

CoDa 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)；GelDocXR 型凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)；Axio Vert.A1 型荧光倒置显微镜（德国 ZEISS 公司）；Centrifuge 5810R 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；SM-CJ-1D 型紫外超净工作台（苏净实业科技有限公司）；BSC-1100IIA2-X 型超净生物安全柜（山东博科诊断科技有限公司）；RI-150 型 37 °C 恒温培养箱（美国 Thermo science 公司）。

### 1.3 主要试剂与药物

葡聚糖硫酸钠（纯度：99%，批号：C12750877，上海麦克林生化科技有限公司）；酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号：063016HLP104840701、063016HLP202680701，上海将来实业股份有限公司）；小鼠粪便隐血试剂盒（批号：0701A22，上海酶联生物科技有限公司）；的细胞增殖与毒性检测（cell vitality test kit，CCK-8）试剂盒（批号：A109295084，北京博奥森生物技术有限公司）；髓过氧化物酶检测试剂盒（批号：063016HLP103670701，上海将来实业股份有限公司）；趋化因子配体1检测试剂盒（批号：063016HLP201500701，上海将来实业股份有限公司）；地塞米松（批号：LOT20235125，北京索莱宝科技有限公司）；硫代葡萄糖苷由新疆医科大学药理教研室提取与鉴定。

#### 1.4 动物

采用 60 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠，购于北京维通利华实验动物科技有限公司，动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0006，雌雄对半，鼠龄 6~8 周，体重 18~22 g。SPF 级实验动物使用许可证号 SYXK（新）2016-0002，光照 12 h/d，黑暗 12 h/d，温度  $21 \pm 2$  °C，湿度 40%~45%。该实验由新疆医科大学实验动物中心伦理委员会对实验动物进行审定并通过，伦理批号：IACUC-20211016-39。

#### 1.5 网络药理学分析

##### 1.5.1 药物-疾病靶点预测

借助 PubChem、SEA、SuperPred 和 TargetNet 数据库，以“硫代葡萄糖苷”为关键词，经过数据去重处理后，收集 GSL 的目标靶点。利用 GeneCards、OMIM 以及 CTD 数据库，以“Inflammatory bowel disease”为关键词进行检索，去掉重复后得到 IBD 的相关靶点。通过 Venny2.1 绘制韦恩图，获得了 GSL 作用靶点与 IBD 相关靶点交集靶点。

##### 1.5.2 PPI 网络构建及核心靶点筛选

利用 STRING 数据库检索获得的药物和疾病的交集靶点后导入，选择 Homo Sapiens 蛋白种属，0.7 为阈值，建立蛋白互作关联网络图。导入 STRING 互作分析结果数据，利用 Cytoscape3.8.2 软件中的 NetworkAnalyzer 功能拓扑学分析蛋白互作关联网络图，采用 Degree 值  $> 5$  作为筛选条件，最终选取 10 个满足连通性要求的靶点作为核心的交集靶点。

##### 1.5.3 基因功能和通路富集分析

利用 STRING 数据库，GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析 GSL 治疗 IBD 的靶点，总结其基因功能及其在信号通路中的作用。以  $P < 0.05$  为筛选条件，按差异显著性大小进行排序，获得 KEGG 通路富集前 16 条结果绘制气泡图。

#### 1.5.4 药物-核心靶点分子对接校验

整理 GSL-IBD 核心靶点 PPI 网络图中度值前 10 的靶点，即 PIK3R1、GRB2、CDK1、ITGB1、CDC25C、NFKB1、NRAS、CYP2C19、TOP2A、CDK5 作为 GSL 治疗 IBD 的潜在靶点，利用 Uniprot 将得到的靶点转化为蛋白，与 GBC 进行分子对接。从 Pubchem 数据库中检索 GBC 的 3D 结构，以配体的形式保存。从 RCSBPDB 数据库获得 GSL 靶蛋白 3D 结构，找到受体。通过 CB-Dock 平台对接，分析 GSL 与靶蛋白之间的亲和力和对接位点。结合能  $< 0$  kcal/mol ( $1 \text{ kcal} = 4.186 \text{ kJ}$ ) 时，表示配体与受体能自发进行结合，结合能  $< -5$  kcal/mol 时，表示两者结合活性较好；结合能  $< -7$  kcal/mol 时，表示结合较强且稳定<sup>[7]</sup>。

### 1.6 动物实验

#### 1.6.1 动物造模分组及给药

随机将 60 只小鼠分 6 组，分别为空白对照组 (control, Con)、模型组<sup>[8]</sup> (model, Mod)、GSL 低 (GSL in low dose, GSL-L)、中 (GSL in medium dose, GSL-M)、高剂量组 (GSL in high dose, GSL-H)、地塞米松组 (dexamethasone group, DEX)，每组 10 只小鼠。空白对照组自实验开始至结束，小鼠自由饮用蒸馏水。Mod、GSL-L、GSL-M、GSL-H、DEX 组小鼠每日自由饮用 2% 葡聚糖硫酸钠盐 (dextran sulfate sodium, DSS) 溶液，自由进食。实验期间，Con、Mod 组按 0.2 mL/10 g 灌胃灭菌水。GSL 组小鼠以 20、40、80 mg/kg 浓度的 GSL 溶液按 0.2 mL/10 g 灌胃，DEX 组以 0.4 mg/kg 腹腔注射，每日 1 次，连续处理 7 d。

#### 1.6.2 疾病活动指数评分

在实验过程中观察各组小鼠的饮食、活动、精神及毛发情况。观察小鼠的粪便性状，并使用隐血试剂盒检测便血，试剂 2 min 后仍不显色为正常；加入试剂后初显浅蓝褐色，逐渐呈明显蓝褐色，提示阳性 (++)，为隐血；加入试剂后立即呈现蓝黑褐色，提示阳性 (++++)，为肉眼血便。造模开始后计算小鼠疾病活动指数<sup>[9]</sup> (disease activity index, DAI)， $DAI = (\text{体重下降评分} + \text{粪便性状评分} + \text{便血评分}) / 3$ ，具体评分标准如表 1 所示。如 Mod 组的 DAI 评分明显高于 Con 组，且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，则表示 IBD 造模成功。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

记分	体重下降	粪便性状	便血
Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Blood stool
0	0	正常粪便	正常
1	1~5	介于两者之间	介于两者之间
2	6~10	半稀便	隐血

3	11~15	介于两者之间	介于两者之间
4	> 15	水样便	肉眼血便

### 1.6.3 ELISA 检测结肠组织中细胞因子

在冰上对小鼠结肠组织进行匀浆处理，在 4 °C 下，将匀浆液 3 500 r/min 离心 15 min，收集上清液，按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、趋化因子配体 1 (chemokine ligand 1, CXCL1)、IL-6、IL-18、干扰素 $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、IL-10 水平。

### 1.6.4 肠道通透性检测

处理小鼠前，禁食不禁水 12 h，用 1 mg/mL 异硫氰基荧光素-葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-DEX) 灌胃，4 h 后乙醚麻醉小鼠，眼眶静脉丛取血，在 3 500 r/min 离心 15 min。吸取样品 100  $\mu$ L 于 480 nm 和 520 nm 波长处检测荧光强度。

## 1.7 细胞实验

### 1.7.1 CCK8 法测定人结直肠腺癌细胞增殖活性

对人结直肠腺癌细胞 (CaCo2) 计数，按照  $1 \times 10^5$  个/mL 稀释成细胞悬液，每孔 100  $\mu$ L 接种至 96 孔板，选用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液在培养箱中孵育 24 h，Mod 组与 GSL 组加入 2% DSS 造成 IBD 模型，GSL 组加入不同浓度的 GSL 溶液，每个浓度设 6 个复孔，使 GSL 培养液的终浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10、20、50、100  $\mu$ mol/L，孵育 48 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液，轻轻摇匀，在 37 °C 下孵育 1 h，酶标仪于 450 nm 处测定吸光度。

### 1.7.2 ELISA 检测脂多糖诱导的 CaCo2 细胞释放细胞因子

将 CaCo2 细胞稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液，计数后每孔接种 100  $\mu$ L 至 96 孔板，在培养箱内以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液孵育 24 h，将细胞分为 5 组：空白对照组 (control group, Con)、模型组 (model group, Mod)、GSL (低、中、高) 剂量组 (GSL-L、GSL-M、GSL-H)。Con 组不作处理；Mod 组加入 1  $\mu$ g/mL 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)；GSL-L、GSL-M、GSL-H 加入 1  $\mu$ g/mL LPS 和各 25、50、100  $\mu$ mol/L 的 GSL 溶液，每个浓度设 3 个复孔，孵育 48 h，收集细胞上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度。

## 1.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取结肠组织蛋白；取 20  $\mu$ L 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (10%) 电泳 (120 V, 2 h)；电转法将蛋白转至聚偏氟乙烯膜 (250 mA, 2 h)；10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；一抗 4 °C 过夜孵育；二抗室温孵育 2 h。凝胶成像仪检测蛋白条带，Image-Pro Plus 软件分析条带灰度值。

## 1.9 统计学方法

选择 GraphPad 软件进行分析，数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，两组间比较采用  $t$  检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学预测结果

#### 2.1.1 药物-疾病交集靶点结果

运用 SEA、SuperPred 和 TargetNet 数据库整合去重得到 GSL 作用靶点 136 个，经 GeneCards、OMIM 和 CTD 数据库筛选得到 6 872 个 IBD 相关的靶点，将上述两者取交集后得到 92 个疾病和药物共同靶点（见图 1）。

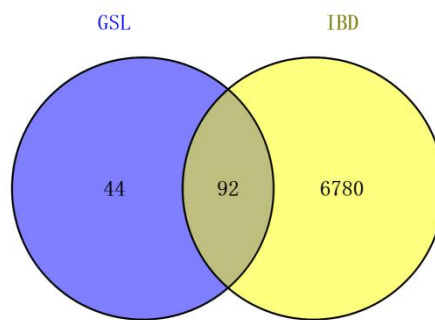


图 1 GSL 与 IBD 交集靶点

Fig. 1 Intersection target of GSL and IBD

#### 2.1.2 蛋白质互作网络分析及关键靶点获取结果

在 STRING 在线网站上导入 92 个交叉靶点进行分析，建立蛋白互作（protein-protein interaction, PPI）网络图（见图 2A）。将交集靶点数据导入 Cytoscape 软件得到靶点 PPI 图，靶点大小及颜色深浅随与该靶点相互作用的靶点数变化，靶点间连线宽度与颜色深浅表示两靶点相互作用的密切程度（见图 2B）。其中相关性较高的节点分别是磷脂酰肌醇-3 激酶调节亚基 1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit1, PIK3R1）、生长因子受体结合蛋白 2（growth factor receptor-bound protein 2, GRB2）、细胞周期蛋白依赖性激酶 1（cyclin-dependent protein kinase 1, CDK1）、整合素亚基 $\beta$ 1（integrin  $\beta$ 1, ITGB1）、细胞分裂周期蛋白 25 同源蛋白 C（cell division cycle 25C, CDC25C）、核因子 $\kappa$ B 亚基 1（nuclear factor kappa B subunit 1, NFKB1）、神经母细胞瘤 RAS 病毒癌基因同源物（neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, NRAS）、细胞色素 P450 2C9（cytochrome P450 2C9, CYP2C19）、拓扑异构酶 II $\alpha$ （topoisomerases type II $\alpha$ , TOP2A）、细胞周期蛋白依赖性激酶 5（cyclin-dependent kinase 5, CDK5）等。结果表明，这些节点在 PPI 网络中与炎症性肠病密切相关，可能在 GSL 治疗 IBD 过程中发挥重要作用。

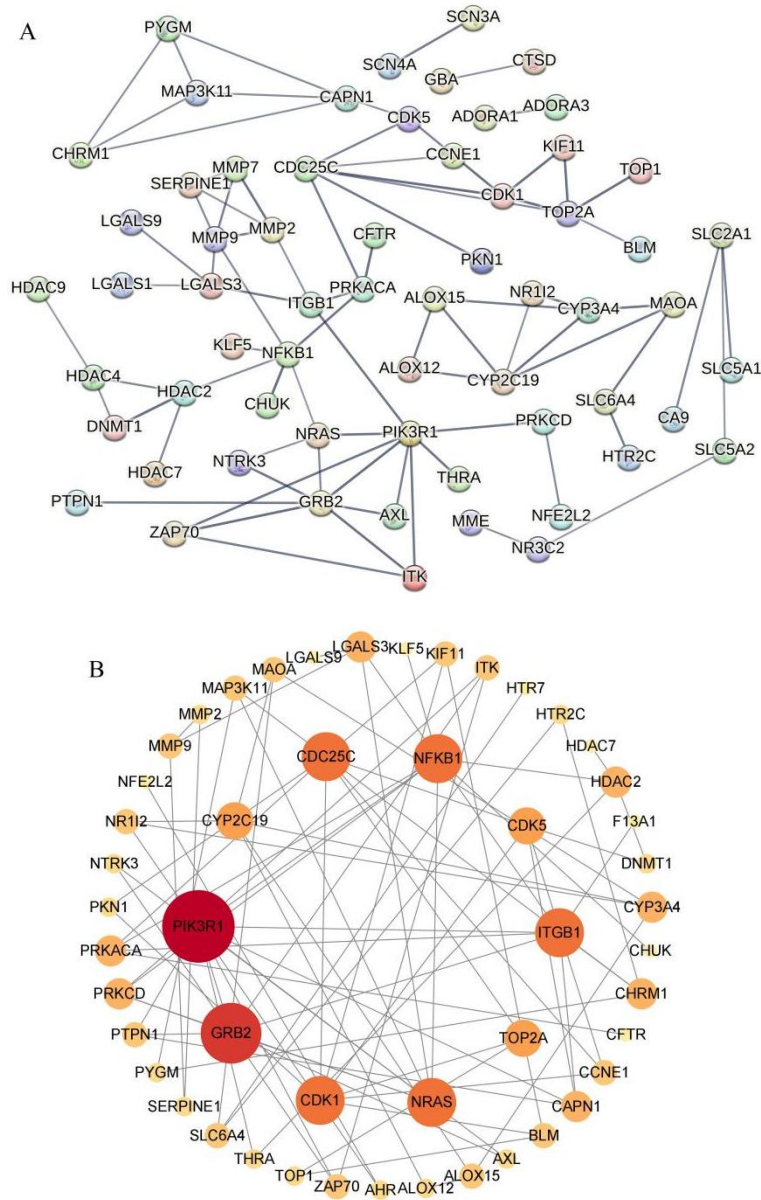


图 2 蛋白质网络互动图

Fig. 2 Protein network interaction map

注：A：GSL 与 IBD 交集靶点蛋白互动图；B：PPI 网络互动图。

Note: A: Mapping of intersection target proteins of GSL and IBD; B: PPI network interaction map.

### 2.1.3 GO 功能分析及 KEGG 通路富集分析

GO 分析包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (cellular component, MF) 及细胞组分 (molecular function, CC)，结果证明，核心靶点主要参与炎症反应过程、调节体液水平和激酶活性、细胞对化学应激的反应、肽分解代谢等生物过程；具有蛋白激酶活性、激酶结合、神经递质受体活性、外肽酶活性多条分子功能。获得的细胞组成主要与受体复合物和细胞质的核周区域相关 (见表 2，图 3A)。经过 KEGG 通路分析共得到 16 条信号途径



( $P < 0.05$ )，核心靶点主要集中在 TRP 通道的炎症介质调节、神经活性配体-受体相互作用、血清素能突触等信号途径（见图 3B）。

表 2 GO 功能分析

Table 2 GO functional enrichment analysis

GO-ID	基因功能名称 Gene function name	类别 Category	基因比例 Gene ratio	基因 Gene
GO:0071417	细胞对有机氮化合物的反应 Cellular response to organonitrogen compound	BP	0.037	<i>AHR</i> 、 <i>APEX1</i> 、 <i>BLM</i>
GO:0009725	对激素的反应 Response to hormone	BP	0.024	<i>APEX1</i> 、 <i>CSNK2B</i> 、 <i>GAI</i>
GO:0003013	循环系统进程 Circulatory system process	BP	0.033	<i>ADORA1</i> 、 <i>ADORA2B</i> 、 <i>BRS3</i>
GO:0030425	树突 Dendrite	CC	0.019	<i>ADAM10</i> 、 <i>ADORA1</i> 、 <i>CDK5</i>
GO:0005667	转录调节复合物 Transcription regulator complex	CC	0.018	<i>AHR</i> 、 <i>APEX1</i> 、 <i>KLF5</i>
GO:0043235	受体复合物 Receptor complex	CC	0.017	<i>AHR</i> 、 <i>AXL</i> 、 <i>CHUK</i>
GO:0019900	激酶结合 Kinase binding	MF	0.022	<i>ADAM10</i> 、 <i>CCNE1</i> 、 <i>CDC25C</i>
GO:0004672	蛋白激酶活性 Protein kinase activity	MF	0.023	<i>AXL</i> 、 <i>CDK1</i> 、 <i>CDK5</i>
GO:0140297	DNA 结合转录因子结合 DNA-binding transcription factor binding	MF	0.023	<i>AHR</i> 、 <i>APEX1</i> 、 <i>KLF5</i>

注：表中数据取富集分数前三位。

Note: The data in the table are taken from the top three enrichment scores.

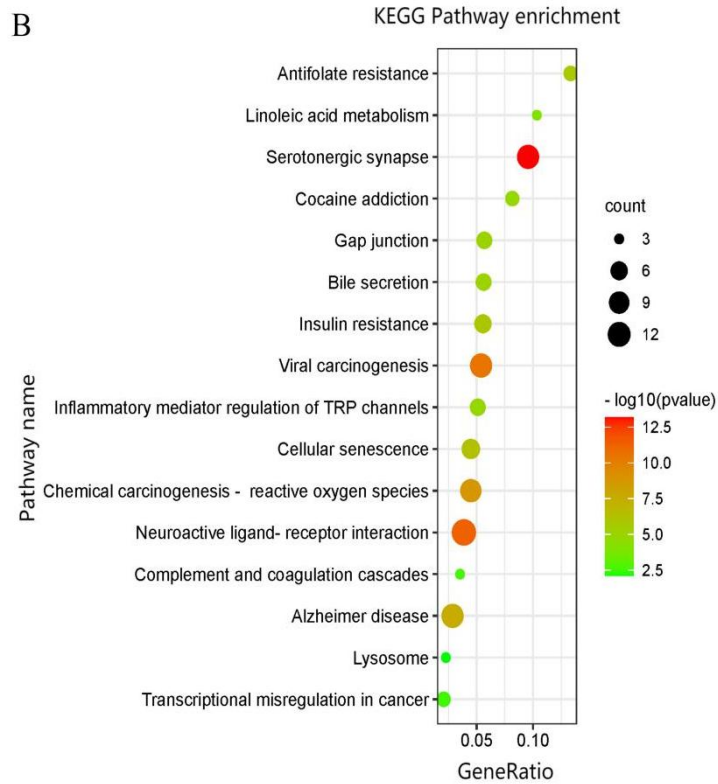
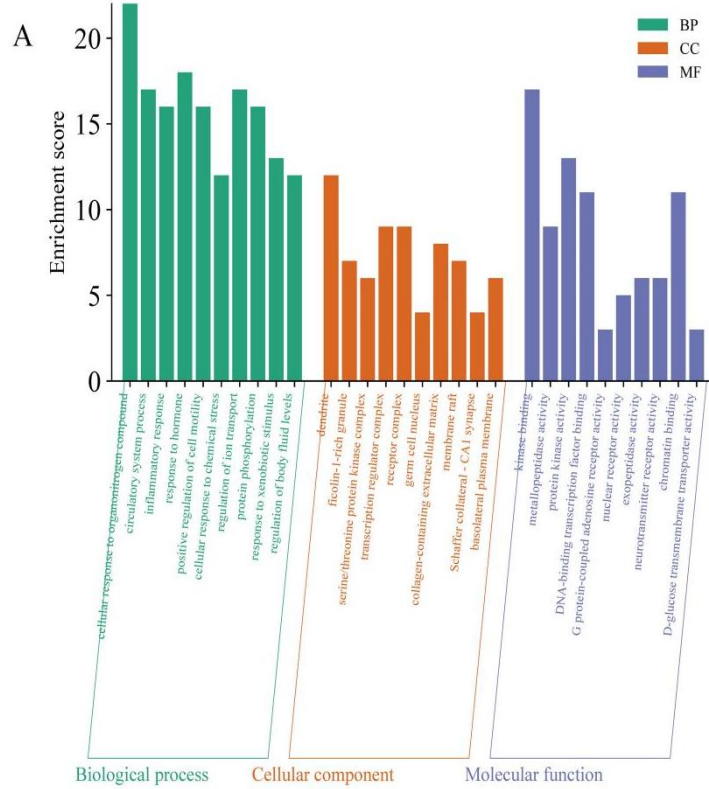


图 3 富集分析图

Fig. 3 Enrichment analysis plot

注：A：Go 富集分析图；B：KEGG 富集分析图。

Note: A: GO enrichment analysis diagram; B: KEGG enrichment analysis diagram.

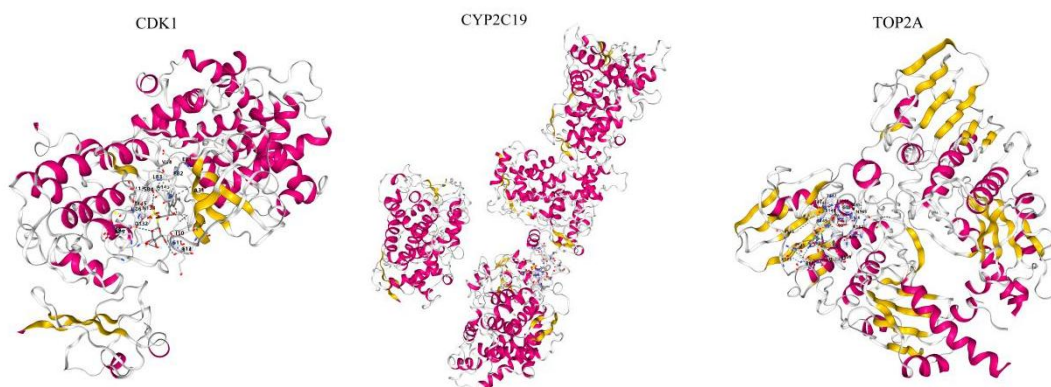
#### 2.1.4 分子对接验证

GBC 与核心靶点的分子对接结果表明，结合能最高的前三位靶点是 TOP2A、CDK1、CYP2C19，结果见表 3、图 4。

表 3 GBC 与预测靶点的结合能

Table 3 Binding energy of GBC with predicted target

靶点 Target	结合能 Binding energy (kcal/mol)	
	GBC	DEX
TOP2A	-10.40	-10.50
CDK1	-9.0	-7.90
CYP2C19	-8.60	-8.50
NRAS	-8.50	-7.50
CDK5	-8.0	-7.80
CDC25C	-7.40	-7.20
ITGB1	-7.30	-7.40
NFKB1	-7.10	-6.50
GRB2	-6.90	-7.40
PIK3R1	-6.50	-6.30



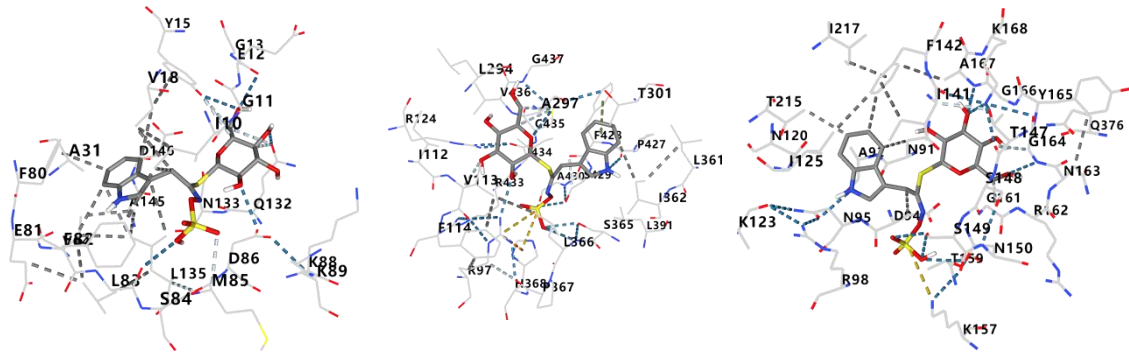


图 4 GBC 与预测靶点的分子对接图

Fig. 4 Molecular docking of GBC with predicted targets

## 2.2 动物实验结果

### 2.2.1 GSL 对 IBD 小鼠体质量的影响

如图 5 示, 饮用 2.5% 的 DSS 溶液后的第 2 d, 小鼠便溏, 活动能力下降, 大便潜血阳性, 进食及饮水量下降, Mod 组与 Con 组比较, 小鼠体重在造模第 4 d 明显下降 ( $P < 0.001$ )。造模第 7 d, IBD Mod 组小鼠与 Con 组相比体重明显下降 ( $P < 0.001$ ); 与 IBD Mod 组相比, 给予中、高剂量 GSL 后, 小鼠体重下降幅度明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), 给予低剂量 GSL 小鼠体重差异无统计学意义; 结果表明中、高剂量 GSL 可以明显减小 IBD 小鼠体重下降幅度; 与 IBD Mod 组比较, 给予阳性药地塞米松后的小鼠体重下降幅度明显减轻 ( $P < 0.01$ ), 表明地塞米松可以明显减小 IBD 小鼠体重下降幅度。中、高剂量 GSL 组小鼠与 DEX 组小鼠的体重差异没有统计学意义。

图 5 GSL 对炎症性肠病小鼠体重变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

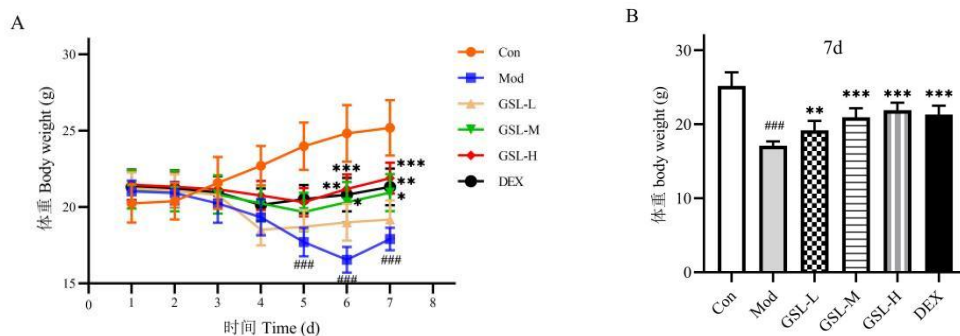


Fig. 5 Effect of GSL on weight change of IBD mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

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

### 2.2.2 GSL 对 IBD 小鼠 DAI 评分的影响

如图 6 示, IBD Mod 组的小鼠症状随着造模时间的延长加重, DAI 评分上升, 在第 4 d 开始出现不同程度的肉眼血便。造模第 7 d, IBD Mod 组小鼠 DAI 评分明显高于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), 表明小鼠 IBD 模型造模成功; GSL-M、GSL-H 组 GSL 治疗后的小鼠 DAI 评分明显低于 IBD Mod 组 ( $P < 0.001$ ); GSL-L 组与 Mod 组 DAI 评分比较, 差异没有统计学意义; 表明 GSL 可以降低 IBD 小鼠 DAI 评分, GSL-H 组治疗效果更显著。与 IBD Mod 组相比, 给予阳性药物地塞米松治疗后的小鼠 DAI 评分明显下降 ( $P < 0.001$ ), GSL-H 组小鼠 DAI 评分明显低于 DEX 组 ( $P < 0.001$ ), 表明地塞米松可以降低 IBD 小鼠 DAI 评分, 且高剂量的 GSL 具有更好的治疗效果。

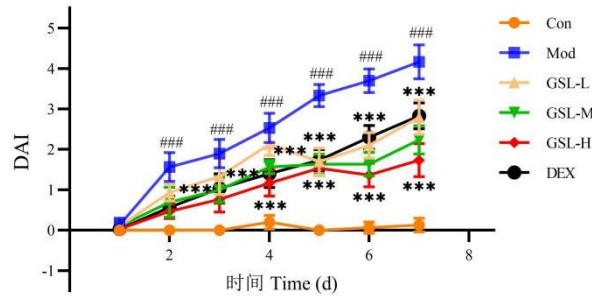


图 6 GSL 对炎症性肠病小鼠 DAI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 6 Effect of GSL on DAI score in IBD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 2.2.3 GSL 对小鼠炎症因子水平的影响

如图 7 所示, Mod 组小鼠结肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MPO、CXCL1、IL-6、IL-18、IFN- $\gamma$  水平明显高于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), 高剂量 GSL 干预后以上细胞因子水平明显下降 ( $P < 0.001$ )。阳性药地塞米松干预后, 以上细胞因子水平明显下降 ( $P < 0.001$ ), GSL-H 组与 DEX 组比较差异无统计学意义。GSL-H 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MPO、CXCL1、IL-6、IL-18、IFN- $\gamma$  值较 GSL-L 组明显降低 ( $P < 0.001$ ), 表明高剂量 GSL 抗炎效果更好。如图 10H 示, Mod 组 IL-10 水平明显低于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), 高剂量 GSL 干预后 IL-10 水平明显上升 ( $P < 0.001$ ), 阳性药地塞米松干预后, IL-10 水平显著上升 ( $P < 0.001$ ), 与 DEX 组相比, GSL-L 组 IL-10 水平差异没有统计学意义。

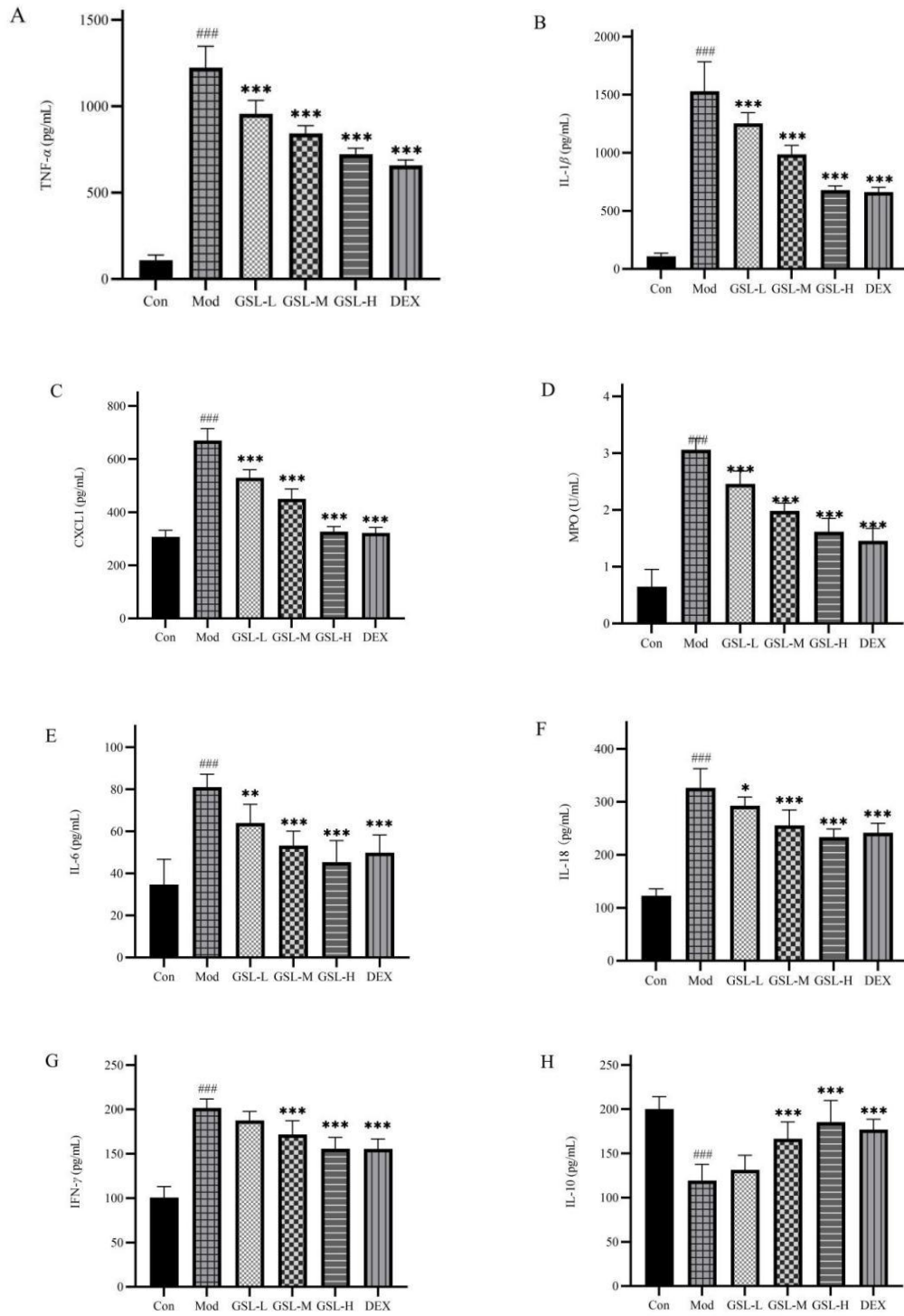


图 7 GSL 对炎症性肠病小鼠炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 7 Effects of GSL on the levels of inflammatory factors in IBD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

#### 2.2.4 GSL 对肠通透性的影响

Mod 组的肠通透性比 Con 组明显增高 ( $P < 0.001$ )，低、中、高剂量 GSL 干预后肠通透性明显下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，阳性药物地塞米松干预后肠通透性明显下降 ( $P < 0.001$ )，GSL-H 组肠通透性明显高于 DEX 组 ( $P < 0.001$ ) (见图 8)。

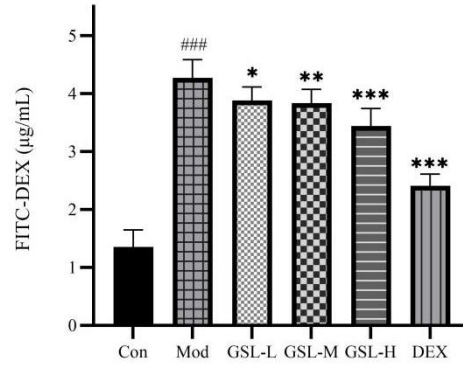


图 8 GSL 对炎症性肠病小鼠肠通透性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 8 Effect of GSL on intestinal permeability of IBD mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

### 2.2.5 GSL 对结肠组织 CDK1 和 TOP2A 蛋白表达水平的影响

蛋白免疫印迹 (Western blot) 结果表明，Mod 组 CDK1 和 TOP2A 蛋白表达较 Con 组表达升高 ( $P < 0.05$ )；与 Mod 组比较，GSL-L、GSL-M、GSL-H 组中 CDK1 和 TOP2A 蛋白表达较 Mod 组明显降低，且表现出剂量依赖性 ( $P < 0.01$ ) (见图 9)。

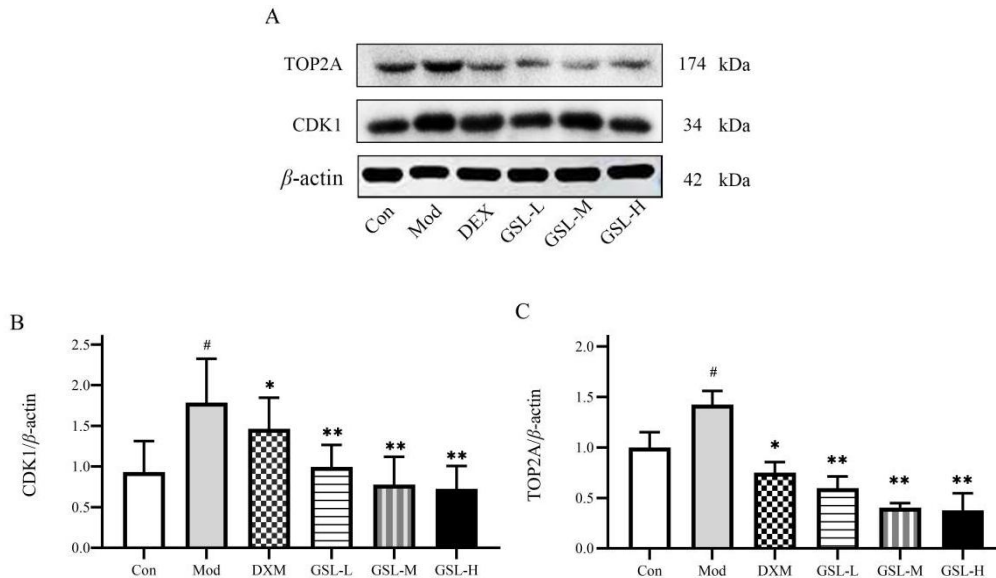


图 9 GSL 对结肠组织 CDK1 和 TOP2A 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 9 Effects of GSL on CDK1 and TOP2A levels in colon tissue ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

## 2.3 细胞实验

### 2.3.1 GSL 对 CaCo2 细胞增殖活性的影响



GSL 在 0~10  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内对 CaCo2 细胞增殖无影响; GSL 在浓度为 20、50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$  的范围内, 与 Mod 组比较, CaCo2 细胞增殖增加 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ ) (见图 10)。

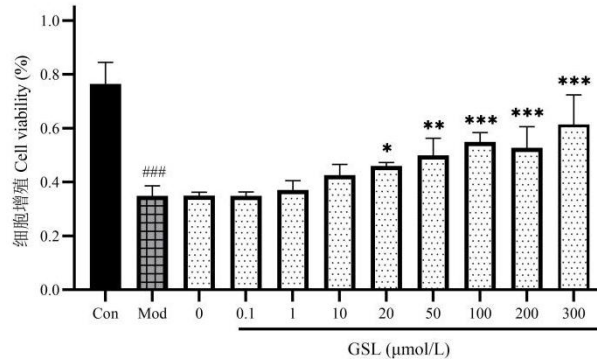


图 10 GSL 对 Caco2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 10 Effect of GSL on proliferation of Caco2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

### 2.3.2 GSL 对 LPS 诱导 CaCo2 细胞释放细胞因子的影响

如图 11A 示, Mod 组 TNF- $\alpha$ 水平明显高于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), 中、高剂量 GSL 干预后 TNF- $\alpha$ 水平明显下降 ( $P < 0.001$ ), 阳性药地塞米松干预后, TNF- $\alpha$ 水平明显下降 ( $P < 0.001$ ), GSL-M、GSL-H 组中 TNF- $\alpha$ 水平与 DEX 组之间的差异没有统计学意义。如图 11B 示, Mod 组 IL-10 水平明显低于 Con 组 ( $P < 0.001$ ), 中、高剂量 GSL 干预后 IL-10 水平明显上升 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ ), 阳性药地塞米松干预后, IL-10 水平明显上升 ( $P < 0.01$ ), 与 DEX 组相比, GSL-M、GSL-H 组中 IL-10 水平差异没有统计学意义。

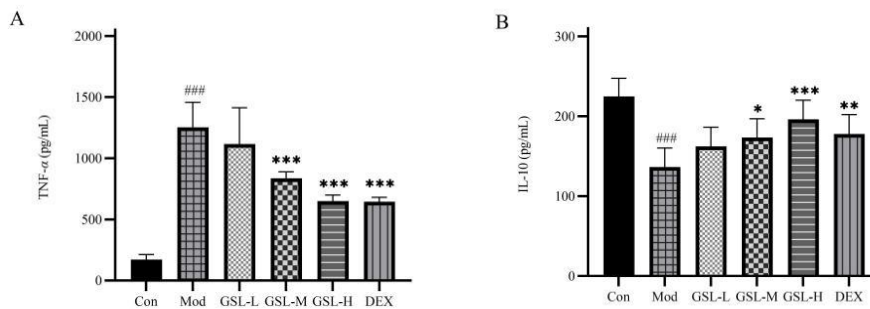


图 11 GSL 对 CaCo2 细胞分泌炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 11 Effect of GSL on the secretion of inflammatory cytokines in Caco2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )



### 3 讨论

结球甘蓝属于十字花科蔬菜，具有杀菌消炎、治疗溃疡、抗癌等多种作用。本研究通过网络药理学方法对其主要活性成分 GSL 进行治疗 IBD 靶点预测，并通过实验验证证明 GSL 抗 IBD 的药理作用。PPI 网络分析表明，与治疗 IBD 有关的前 10 位靶点分别是 *PIK3R1*、*GRB2*、*CDK1*、*ITGB1*、*CDC25C*、*NFKB1*、*NRAS*、*CYP2C19*、*TOP2A*、*CDK5*。其中，结合能较高的基因靶点主要有 *TOP2A*、*CDK1*、*CYP2C19* 等。

*TOP2A* 基因的表达与包括胃癌、肝癌、肺癌等在内的多种癌症有关，该基因的表达与患癌风险呈正相关，癌变组织中 *TOP2A* 的表达水平显著高于正常组织<sup>[10]</sup>。IBD 患者在长期患病后，其癌变风险明显增加<sup>[11]</sup>。*TOP2A* 作为一种核蛋白，在 DNA 合成、RNA 转录等过程中有重要作用。*TOP2A* 基因在肿瘤组织中过表达，是胃癌等癌症的独立不良预后因素，参与包括细胞分裂过程、癌基因调控以及细胞间质转变等过程，该基因的表达诱导上皮间质转化，该过程促进肿瘤细胞向远处转移与免疫细胞浸润<sup>[12]</sup>，通过抑制 *TOP2A* 基因的表达，有望减少炎性细胞对肠道组织的浸润，在一定程度上抑制 IBD 导致的结肠癌等癌症的发展，有进一步研究的意义。

*CDK1* 是细胞周期调控中的重要因子，可以通过对凋亡因子的调节来促进细胞活力，其表达水平上调也与肿瘤的发生发展密切相关。研究显示，*CDK1* 基因高表达于结直肠癌组织中，并促进癌细胞的增殖和迁移，降低该基因表达会起到抑制癌症的效果<sup>[13]</sup>。在 IBD 的发生发展中，肠道微生物的作用十分重要，与肠道免疫系统共同维持肠道内稳态，而细胞自噬影响肠道微生物间的平衡，*CDK1* 的表达与细胞自噬水平呈正相关<sup>[14]</sup>。GSL 可能通过下调 *CDK1* 基因的表达，抑制自噬过程，减轻肠道炎症反应，对其进行分析研究对 IBD 的监测和治疗尤为重要。

*CYP2C19* 基因具有多态性，其编码的酶可参与质子泵抑制剂等药物代谢<sup>[15]</sup>。在患者服用药物时，*CYP2C19* 同工酶发挥其代谢作用，其中强代谢型代谢作用最强，抑制该基因表达可延长药物作用时间。通过上述文献，GSL 与该基因的表达密切相关，可通过调控该基因对 IBD 的治疗提供帮助。

该研究通过 GO 功能富集分析了 GSL 治疗 IBD 的 92 个靶点，结果涉及到调节炎症反应的过程、体液水平和激酶活性的调节、肽类分解代谢、化学刺激下细胞的反应等生物学过程。通过 KEGG 富集分析得到了 16 条与 GSL 治疗 IBD 相关的信号通路，包括 TRP 通道的炎症介质调节等通路。TRP 离子通道参与痛觉、温觉、触觉、感受外激素等多种感觉信息的传导，可发挥人体化学感受器的作用，并且其中部分通道与毒性感知相关度较高。研究证实，TRP 通道可在肠道细胞中表达，并在肠蠕动、细胞分泌、黏膜稳态、组织保护、上皮修复等环节中发挥着重要作用。其中，TRPV4 通道在 IBD 患者结肠神经纤维高表达，在肠道内发挥着促炎作用。TRPA1 通道在 IBD 患者结肠组织上皮细胞、巨噬细胞及肠神经节中表达，且在炎性组织中表达上调，它在激活后减少释放多种炎性神经肽、细胞因子和趋化因

子,对肠道有保护作用。这些研究结果表明,GSL可以通过抑制TRP通道在抗炎等方面发挥作用,对IBD的治疗有着重要意义<sup>[16,17]</sup>。

IBD患者的肠道黏膜存在炎症反应,且其上皮细胞屏障受损,肠道内微生态失衡,研究发现,由于免疫反应异常引起的肠黏膜通透性增高,与炎症、感染等因素密切相关,是IBD发病的主要原因之一<sup>[18]</sup>。参与炎症免疫反应调节的重要物质TNF- $\alpha$ 和炎症因子IL-1 $\beta$ 是引发肠道炎症的关键因素,在IBD的进程中起着举足轻重的作用<sup>[19]</sup>。有实验表明,缺乏IL-10受体的小鼠易发生严重的肠道炎症,且IL-10可通过诱导结肠黏膜紧密连接蛋白上调或缺失来调节肠道屏障功能,可能因此过程减轻IBD的肠道炎症反应<sup>[20]</sup>。

在实验中,通过对炎症性肠病小鼠给予GSL治疗,证实GSL可以有效缓解小鼠结肠炎的症状,在实验剂量下使用,未发现明显的毒性反应。GSL可减轻DSS引起的小鼠体重下降、粪便性状及便血症状,显著降低DAI评分。GSL使小鼠体内抗炎因子水平升高、促炎因子水平下降,在一定程度上保护了肠黏膜屏障。GSL与TOP2A、CDK1等核心靶点的结合分值均较高,表现出较强的结合活性。

本研究预测了GSL治疗炎症性肠炎的作用靶点,并采用分子对接及动物实验对GSL药效进行验证,明确GSL通过抑制TOP2A、CDK1蛋白表达,缓解肠道炎症反应,发挥治疗IBD作用,为GSL抗IBD的分子机制深入研究提供了理论依据。

#### 参考文献

- 1 Liu Y,Liu Y,Sun ZQ,et al.Treatment of inflammatory bowel disease by targeting M1/M2 macrophage polarization balance with traditional Chinese medicine and active components:a review[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2024,30:276-286.
- 2 Chen ML,Fan XT,Liu YY,et al.Study on the mechanism of action of Baitouweng decoction in treatment of inflammatory bowel disease based on network pharmacology and molecular docking[J].Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2022,33:997-1002.
- 3 Yan SC,Pan GF.Analysis of the mechanism of Tongxie decoction for treating colitis associated colorectal cancer based on network pharmacology[J].Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2022,24:190-197.
- 4 Zhao JC,Yu J,Tan ZW,et al.Recent advances in glucosinolates metabolism in fermented cruciferous vegetables[J].Food Sci(食品科学),2021,42:381-389.
- 5 Dong L.Study on Glucosinolate component and content in *Brassica oleracea* L. germplasm and cabbages infected by clubroot[D].Chongqing:Southwest University(西南大学),2013.
- 6 Peng P,Qing ZX,Tian Y,et al.Research progress on motivating factors of glucosinolate in Cruciferae[J].Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2019,10:886-891.
- 7 Cai JL,Li XP,Zhu YL,et al.Mechanism of Huangjing Qianshi decoction in treatment of prediabetes based on network pharmacology and molecular docking[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2022,47:1039-1050.
- 8 Li L,Feng ZZ,Wang H,et al.Effect of sanguisorbae radix on gut microbiota in acute ulcerative colitis rats[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1274-1281.
- 9 Li XL,Wu YH,Li HL,et al.Preventive effect of Gehua Jiecheng decoction in IL-6/JAK2/STAT3 pathway in

- "inflammation-cancer transformation" of ulcerative colitis with spleen deficiency and damp-heat[J].Chin J Immunol(中国免疫学杂志),2024,40:1454-1460.
- 10 Lu XH,Yu P,Tao H,et al.Correlation between *TOP2A* gene expression and the number of CD4<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma and its clinical prognostic significance[J].Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志),2022,38:24-31.
  - 11 Huang ZG,Liu ZJ.Intestinal epithelial dysplasia and cancerization in inflammatory bowel disease[J].World Chin J Digestol(世界华人消化杂志),2010,18:3097-3100.
  - 12 Wang M,Zhang DF.Expression and significance of *TOP2A* in liver cancer based on bioinformatics analysis[J].Hubei Univ Med(湖北医药学院学报),2022,41:252-257.
  - 13 Zhang JL.MiR-378a-5p inhibits the malignant progression of colorectal cancer by downregulating CDK1[D].Wuhu:Wannan Med Coll(皖南医学院),2022.
  - 14 Ouyang XS,Xu LZ.Progress in the treatment of inflammatory bowel disease by regulating intestinal mucosal barrier with traditional Chinese medicine through autophagy[J].Informa Tradit Chin Med(中医药信息),2023,40:82-88.
  - 15 Wang C.Efficacy of quadruple therapy on expression of MMP and TIMP-1 in patients with *Helicobacter pylori*-related gastric ulcer according to *CYP2C19* polymorphism[J].Chin Rem Clin(中国药物与临床),2022,22:208-211.
  - 16 Holzer P.Transient receptor potential(TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system[J].Pharmacol Ther,2011,131:142-170.
  - 17 Palm NW,Zoete MRD,Cullen TW,et al.Immunoglobulin a coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease[J].Cell,2014,158:1000-1010.
  - 18 Migliorini P,Italiani P,Pratesi F,et al.The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases[J].Autoimmun Rev,2020,19:102617.
  - 19 Zhu F,Fan H,Liu XX.Role of MIR-155 in pathogenesis of inflammatory bowel disease[J].World Chin J Digestol(世界华人消化杂志),2019,27:1070-1075.
  - 20 Jiao J,Jiang XS,Zhao YY,et al.Effects of ursodeoxycholic acid combined with *Bifidobacterium* on inflammatory factors and intestinal flora in mice with colitis[J].Chin J Microecol(中国微生态学杂志),2021,33:524-530.

收稿日期: 2024-07-11

接受日期:

基金项目: 新疆维吾尔自治区科学技术厅自然科学基金面上项目(2022D01C190); 新疆医科大学第15期大学生创新训练基金(S202010760036)

\*通信作者 E-mail: 15009911373@163.com