

大承气汤通过内源性抗菌肽 mCRAMP 对脓毒症小鼠肠屏障的保护作用及机制

李袁袁^{1,2}, 钟旋³, 刘磊⁴, 孙淑亚¹, 凌家俊^{1*}, 林荣锋^{1,2*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学研究院, 广东 东莞 523808; 3. 广东省妇幼保健院, 广州 511442;

4. 广州中医药大学第四临床医学院, 深圳市中医院, 广东 深圳 518033)

[摘要] 目的: 采用分子对接和体内动物实验探讨大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障的保护作用及分子机制。方法: 采用文本挖掘方法筛选大承气汤的活性成分, 利用 AutoDock Tools 和 Discovery Studio 分子对接软件研究其关键活性成分与脓毒症主要作用靶点紧密连接蛋白-1(Claudin-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、抗菌肽(mCRAMP)、Toll样受体4(TLR4)和髓样分化因子88(MyD88)的相互作用。动物实验采用 C57BL/6 小鼠 50 只, 每组 10 只, 随机分成 5 组, 分别为假手术组、模型组、大承气汤低、高剂量(4、8 g·kg⁻¹)组和乌司他丁(50 000 U·kg⁻¹)组。造模前、手术当天和术后, 各组给予相应的药物进行干预。除假手术组外, 其余各组小鼠均采用盲肠结扎穿刺法(CLP)制备脓毒症模型。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清 D-乳酸水平, 评估肠黏膜通透性; 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察回肠组织病理变化, 评估肠黏膜损伤程度及炎症浸润; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠回肠组织 Claudin-1 和 Occludin 蛋白表达水平, 评估肠机械屏障功能; 采用 ELISA 检测小鼠回肠组织 TNF- α 和 IL-6 水平, 评估肠道炎症水平; 采用免疫组化(IHC)观察回肠组织 mCRAMP 蛋白表达; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠回肠组织内 mCRAMP、TLR4 和 MyD88 的基因表达水平, 探讨大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障的保护机制。结果: 分子对接结果表明, 采用文本挖掘方法所筛选出的 10 个大承气汤活性成分中多数与脓毒症靶点具有结合活性, 主要通过范德华力、氢键和其他共轭体系相连。动物实验结果表明, 与模型组比较, 大承气汤低、高剂量组小鼠血清 D-乳酸水平显著降低($P < 0.01$); 回肠组织损伤、黏膜水肿减少, 小肠绒毛完整性较好, 炎症细胞浸润减少; 回肠组织 Claudin-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 回肠组织 IL-6 水平显著降低($P < 0.01$); 回肠组织 mCRAMP 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$); 回肠组织 TLR4 和 MyD88 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$); 大承气汤高剂量组小鼠回肠组织 TNF- α 水平显著降低($P < 0.01$)和 Occludin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), 大承气汤低剂量组小鼠回肠组织 Occludin 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。结论: 大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障具有保护作用, 其可减轻肠组织炎症水平, 修复肠黏膜损伤, 提高肠紧密连接蛋白水平, 降低肠黏膜通透性, 作用机制可能与内源性抗菌肽 mCRAMP 蛋白和基因表达的增加及其下游 TLR4/MyD88 炎症通路基因的下调有关。

[关键词] 大承气汤; 脓毒症; 肠屏障; 抗菌肽; Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)

[中图分类号] R284; R285; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)06-0020-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231813 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231215.1602.012>

[网络出版日期] 2023-12-18 12:40:29

Da Chengqitang Protects Intestinal Barrier in Septic Mice via Endogenous Antimicrobial Peptide mCRAMP

LI Yuanyuan^{1,2}, ZHONG Xuan³, LIU Lei⁴, SUN Shuya¹, LING Jiajun^{1*}, LIN Rongfeng^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,

[收稿日期] 2023-09-05

[基金项目] 广东省中医药局科研课题面上项目(20211045); 东莞广州中医药大学研究院培育项目(2023PY0203)

[第一作者] 李袁袁, 在读硕士, 从事中药新药研究及药物制剂新技术研究, E-mail: 20211110130@stu.gzucm.edu.cn

[通信作者] * 凌家俊, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事现代化药物制剂及药代动力学研究, Tel: 020-39398043, E-mail: lj@gzucm.edu.cn;

* 林荣锋, 博士, 助理研究员, 从事中药新药研究及药物制剂新技术研究, Tel: 020-36357215, E-mail: linrongfeng@gzucm.edu.cn

Guangzhou 510006, China;

2. Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China;

3. Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, China;

4. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine,
Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China)

[Abstract] **Objective:** Molecular docking and animal experiments were employed to explore the protective effect and mechanism of Da Chengqitang (DCQD) on intestinal barrier in septic mice. **Method:** Text mining method was used to screen the active ingredients in DCQD. AutoDock Tools and Discovery Studio were used to study the interactions of active components with the core target proteins [claudin-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, endogenous antimicrobial peptide mCRAMP, Toll-like receptor 4 (TLR4), and myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)] in sepsis. Fifty C57BL/6 mice were randomized into sham, model, low- and high-dose ($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) DCQD, and ulinastatin groups ($n=10$). Before, during, and after the day of modeling surgery, each group was administrated with corresponding drugs. The mice in other groups except the model group were subjected to modeling by cecal ligation and puncture. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the serum level of *D*-lactic acid to assess intestinal mucosa permeability. Hematoxylin-eosin staining was employed to observe the histopathological changes in the ileum and assess the intestinal mucosal damage and inflammatory infiltration. Western blotting was employed to determine the expression levels of tight junction proteins claudin-1 and occludin in the ileal tissue, which were indicative of the bowel barrier function. The TNF- α and IL-6 levels were measured by ELISA to assess the intestinal inflammation. The expression of mCRAMP in the ileal tissue was observed by immunohistochemistry. The mRNA levels of mCRAMP, TLR4, and MyD88 in mouse ileal tissue were determined by Real-time polymerase chain reaction, on the basis of which the mechanism of DCQD in protecting the intestinal barrier of septic mice was explored. **Result:** Molecular docking results showed that most of the 10 active ingredients of DCQD that were screened out by text mining could bind to sepsis targets by van der Waals force, hydrogen bonding, and other conjugated systems. The results of animal experiments showed that compared with the model group, low- or high-dose DCQD lowered the *D*-lactic acid level in the serum ($P<0.01$), alleviated damage to the ileal tissue and mucosal edema, protected the small intestine villus integrity, reduced inflammatory cell infiltration, promoted the expression of claudin-1 ($P<0.01$), lowered the IL-6 level ($P<0.01$), up-regulated the mRNA and protein levels of mCRAMP ($P<0.01$), and down-regulated the mRNA and protein levels of TLR4 and MyD88 ($P<0.01$) in the ileal tissue. In addition, high-dose DCQD lowered the TNF- α level and promoted the expression of occludin in the ileum tissue ($P<0.01$), and low-dose DCQD up-regulated the protein level of occludin in the ileum tissue ($P<0.05$). **Conclusion:** DCQD has a protective effect on intestinal barrier in septic mice. It can reduce intestinal inflammation, repair intestinal mucosal damage, improve the tight junction protein level, and reduce intestinal mucosal permeability by up-regulating the mRNA and protein levels of mCRAMP and the down-regulating the expression of genes in the TLR4/MyD88 pathway.

[Keywords] Da Chengqitang; sepsis; intestinal barrier; antimicrobial peptide; Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)

脓毒症是宿主对感染的反应失调引起的致死性多器官功能障碍综合征(MODS)^[1],其死亡率高且预后差^[2]。脓毒症发病机制复杂,但主要表现为以急性胃肠道损伤为首发,继而引发多个器官功能障碍^[3]。故胃肠道常被认为是脓毒症导致多器官功

能衰竭时最先受累的靶器官,也是促进脓毒症病情进展关键器官^[4]。脓毒症治疗的关键在于减少MODS的发生率,而肠屏障损伤是导致MODS的“扳机”^[5]。肠屏障功能在脓毒症的发生发展起关键作用,纠正或防治肠屏障功能障碍对于治疗脓毒症

具有重要意义^[6]。

中医认为脓毒症致急性胃肠损伤(AGI)主要病机为毒邪内蕴,气机逆乱,脾胃升降失和,腑气不通^[7]。大承气汤源于张仲景《伤寒杂病论》,为急下存阴的第一方。全方具有泻下、峻下热结之功效,主治阳明腑实证、热结旁流证、里实热证,多治疗以“痞、满、燥、实”为主要表现且以急腹症为多见的急性病,是治疗腑气不通型脓毒症的推荐用药^[8]。大承气汤可改善脓毒症胃肠功能障碍患者临床症状^[6],恢复胃肠功能和减轻炎症反应^[9],并且对急性胰腺炎肠黏膜屏障障碍^[6]、术后早期炎性肠梗阻^[10]、急性胃肠损伤^[11]等疾病均具有良好的治疗效果。诸多证据表明大承气汤在诊治脓症患者胃肠功能障碍方面颇具疗效^[9],但其对脓毒症肠屏障的保护作用及机制尚不明确,且其对脓毒症动物模型肠屏障的保护作用尚未见报道。

Cathelicidin 抗菌肽家族在抗炎、促进细胞凋亡和加强细胞吞噬等方面起重要作用^[12],其在中和内毒素时通过抑制 Toll 样受体 4(TLR4)[脂多糖(LPS)的受体]诱导白细胞介素等信号通路而显示出抗炎作用^[13]。注射外源性 Cathelicidin 抗菌肽 mCRAMP 可调节 LPS 与 TLR4/髓样分化蛋白-2(MD-2)结合,抑制炎症信号通路,对肠屏障具有保护作用^[14]。最新研究发现,增加体内内源性 Cathelicidin 抗菌肽的表达亦可能成为改善脓毒症肠屏障的重要治疗手段^[15]。

本文基于分子对接和动物实验探讨大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障的保护作用及对内源性抗菌肽 mCRAMP 的影响,以期为大承气汤临床治疗脓毒症胃肠功能障碍提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级 C57BL/6J 小鼠 50 只,雄性,体重 23~25 g,购自广州中医药大学动物实验中心,许可证号 SYXK(粤)2019-0202,在广州中医药大学中药学院动物房饲养,温度控制在(23±2)℃,相对湿度 45%~60%,每日明暗交替 12 h/12 h。本实验经过广州中医药大学中药学院实验动物伦理委员会批准,伦理审批号 ZYD-2021-276。

1.2 药品与试剂 大承气汤(大黄 12 g、枳实 12 g、厚朴 24 g、芒硝 9 g),分别取四川新绿色药业科技发展有限公司生产的大承气汤中药配方颗粒与以上传统饮片相当的量(大黄配方颗粒批号 20120030,厚朴配方颗粒批号 21020002,枳实配方颗粒批号 20120002,芒硝配方颗粒批号 20090155),用煮沸的

蒸馏水溶解,配制成 1 g·mL⁻¹ 药液,4℃ 保存备用^[16]。注射用乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司,国药准字 H19990134,规格 100 000 U/瓶,批号 032104073);小鼠 D-乳酸酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号 MU30743);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,批号分别为 RX202412M、RX203049M);苏木素-伊红(HE)染液(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0105);BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光液(杭州弗德生物科技有限公司,批号分别为 FD2001、FD8030);抗封闭蛋白-1(Claudin-1)抗体、抗紧密连接蛋白(Occludin)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab180158、ab216327);兔抗 Cathelicidin 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-4735R);TRIzol Reagent[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP424];逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 K1622);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测试剂盒(美国 Genecopies 公司,批号 AOPR-1200)。

1.3 仪器 ST16 型离心机(美国 Thermo Fisher 公司);DG5033A 型多功能酶标仪(南京东华电子有限公司);7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司);SMA4000 型微量核酸定量仪(美国 Merinton 公司);JXFSTPR 型低温冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);BV-2 型垂直电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分子对接

2.1.1 活性成分的筛选 采用人工文本挖掘方法,以“大承气汤”和“成分”为检索词在中国知网(CNKI)、维普网(VIP)和万方数据(Wanfang Data)上检索,以“Dachengqi”和“component”为检索词在美国国家医学图书馆(PubMed)上检索,得到已公开发表的大承气汤成分研究相关文献(检索日期均为 2022 年 3 月 1 日),剔除重复或不含信息的文献,将符合要求的文献进行逐一查阅,并作统计分析。列出成分名称、所属样本类别(制剂成分、血液成分、肠组织成分、其他成分)和文献出处,属于同一样本类别的化学成分取并集,分别得到大承气汤制剂成分、大承气汤入血成分和大承气汤入肠成分,三者取交集得到制剂、血液及肠组织均能检出的大承气汤活性成分,用于分子对接实验。

2.1.2 活性成分与脓毒症的靶点对接 检索

UniProt数据库和PDB查询下载脓毒症关键蛋白[Claudin-1、TNF- α 、IL-6、mCRAMP、TLR4和髓样分化因子88(MyD88)的PDBQT文件,从TCMSP数据库中获得活性成分的3D结构,导入到Autodock软件,对活性成分进行加氢,蛋白去水加氢,进行对接,并在Discovery Studio软件分析活性成分和蛋白的相互作用。

2.2 动物实验

2.2.1 分组与给药 50只C57BL/6J小鼠按体质量随机分为假手术组、模型组、大承气汤低剂量、大承气汤高剂量组、乌司他丁组5组,每组10只。大承气汤按照等效剂量[小鼠剂量=(12+12+24+9)/70 kg \times 10=8.1 g \cdot kg⁻¹]或1/2等效剂量计算,并结合前期课题组实验结果,给予小鼠相应的药物:大承气汤低、高剂量组在术前3 d,手术当天和术后3 d每日灌胃给药大承气汤(剂量分别为4 g \cdot kg⁻¹和8 g \cdot kg⁻¹[16]),术前2 h腹腔注射乌司他丁1次和术后3 d每日腹腔注射乌司他丁1次(剂量为5万U \cdot kg⁻¹)。假手术组和模型组小鼠在术前3 d,手术当天和术后3 d每日灌胃给药等体积生理盐水,1次/d,连续7 d。

2.2.2 脓毒症模型的制备 除假手术组,其余各组小鼠均按照文献[17]的方法,采用盲肠结扎穿孔法建立脓毒症模型。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg \cdot kg⁻¹)麻醉,剃毛,沿腹中线切开约1 cm切口,暴露盲肠,距离盲肠末端50%处用无菌4号线结扎,无菌21G针在结扎远端血管较少的区域穿刺2次,稍稍挤出少量盲肠内容物,缝合伤口。假手术组小鼠仅打开腹腔,游离盲肠,不结扎穿刺。观察小鼠情况,当出现活动减少、饮水减少、萎靡不振、呼吸急促等现象代表脓毒症小鼠模型构建成功[17]。

2.2.3 ELISA检测小鼠血清D-乳酸和回肠组织TNF- α 、IL-6的水平 按照ELISA试剂盒说明书检测血清D-乳酸水平;按照ELISA试剂盒要求检测回肠组织TNF- α 和IL-6水平。

2.2.4 HE染色检测小鼠回肠组织病理变化 小鼠脱颈椎处死后,取回肠组织并将其固定在4%多聚甲醛中,石蜡包埋并切成5 μ m的切片,用HE染色,脱水、封片,于显微镜下观察小鼠回肠组织病理变化并拍照。

2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠回肠组织Claudin-1、Occludin蛋白表达 用含有苯甲磺酰氟(PMSF)和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解回肠组织,4 $^{\circ}$ C,12 000 r \cdot min⁻¹,离心10 min(离心

半径8.8 cm),收集上清即为总蛋白。BCA法测定蛋白质浓度,等量蛋白灭活后上样。按照需求配置不同浓度的SDS-PAGE胶进行电泳。将蛋白转在PVDF膜,5%的脱脂牛奶(0.5%TBST配),在摇床上室温封闭1 h;放入按抗体说明书稀释的一抗Claudin-1(1:1 000)、Occludin(1:1 000)中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;二抗后进行化学发光显色,暗盒显影。采用Image J软件分析条带光密度。

2.2.6 免疫组化(IHC)法检测小鼠回肠组织mCRAMP蛋白表达情况 取2.2.4石蜡包埋组织,切片;脱蜡水化后使用柠檬酸钠溶液进行抗原热修复,过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,滴加一抗(1:100)4 $^{\circ}$ C过夜,次日二抗(1:200)37 $^{\circ}$ C孵育2 h,用DAB法进行显色,中性树胶封片,显微镜下观察mCRAMP蛋白阳性表达,拍照并使用Image Pro-Plus(IPP)6.0进行分析。

2.2.7 Real-time PCR检测小鼠回肠组织mCRAMP、TLR4、MyD88表达水平 使用TRIzol试剂按照说明书要求提取小鼠回肠组织总RNA,使用逆转录试剂盒合成cDNA,再Real-time PCR检测试剂盒制备反应体系,反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸35 s;循环40个周期。绘制熔解曲线,采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法,以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,计算mCRAMP、TLR4、MyD88 mRNA的表达水平。引物序列见表1,由广州四和生物科技股份有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA	104
	下游 CACACGCAGCTCATTGTAGA	
mCRAMP	上游 GCTGTGGCGGTCACTATCAC	116
	下游 TGTCTAGGGACTGCTGGTTGA	
TLR4	上游 ATGGCATGGCTTACACCACC	129
	下游 GAGGCCAATTTGTCTCCACA	
MyD88	上游 GGGGCATTTCACTGCTT	116
	下游 CACGAGCCCTTCTTTTCTT	

2.2.8 统计学分析 使用Statistics 26.0进行统计学分析,计量资料符合正态分布的使用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,不符合正态分布则用M(P_{25} , P_{75})描述。如数据符合正态分布,多组资料比较时采用单因素方差分析(One-way ANOVA),先使用Levene法检查方差是否齐性,方差齐时,多组间均数两两比较采用

最小显著性差异法(LSD);方差不齐时,采用Brown-Forsythe(矫正方差),再用Dunnett's T3法进行两两比较。不符合正态分布的两组计量资料比较采用非参数Kruskal-Wallis H检验。以 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 分子对接

3.1.1 活性成分 检索得到大承气汤化学成分研究相关文献142篇,剔除重复或不含信息的文献66篇,剩余符合要求的文献76篇,统计得到大承气汤制剂成分73个,大承气汤入血成分14个,大承气汤入肠成分10个,三者取交集的韦恩图见增强出版附加材料,交集得到制剂、血液及肠组织均能检出的大承气汤活性成分共10个,见表2。

表2 大承气汤10个活性成分

Table 2 Ten active components of Da Chengqitang

No.	来源	化学成分	英文名	CAS	MOL
1	大黄	芦荟大黄素	aloe-emodin	481-72-1	MOL000471
2	大黄	大黄酸	rhein	478-43-3	MOL002268
3	大黄	大黄素	emodin	518-82-1	MOL000472
4	大黄	大黄酚	chrysophanol	481-74-3	MOL001729
5	大黄	大黄素甲醚	rheochrysophanol	521-61-9	MOL000476
6	厚朴	厚朴酚	magnolol	528-43-8	MOL000210
7	厚朴	和厚朴酚	honokiol	35354-74-6	MOL005955
8	枳实	橙皮苷	hesperidin	520-26-3	MOL007930
9	枳实	柚皮素	naringenin	480-41-1	MOL004328
10	枳实	柚皮苷	naringin	10236-47-2	MOL005812

3.1.2 活性成分与Claudin-1对接结果 如表3所示,除大黄素甲醚、橙皮苷和柚皮苷外,其余7个活性成分与肠黏膜Claudin-1结合能均 $< -4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$),表明活性成分和配体具有一定结合活性。其中,大黄酚与Claudin-1蛋白结合能力最好,与161号PHE形成Conventional Hydrogen Bond(氢键),与160号GLU形成非共价键的 π -Anion相互作用(阴离子与“缺电子”芳香 π 体系的作用),与148号PHE形成非共价键的Pi-Pi Stacked(π - π 堆积作用),与145号VAL形成疏水作用的Pi-Alkeyl(π -烷基作用),与161号PHE形成Unfavorable Donor-Donor作用,见增强出版附加材料。

3.1.3 活性成分与TNF- α 、IL-6对接结果 大承气汤活性成分与TNF- α 、IL-6蛋白对接结合能见表3。除橙皮苷和柚皮苷外,其余8个活性成分与TNF- α 的对接结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明小分子与受体

表3 10个活性成分与不同蛋白的对接结合能

Table 3 Docking binding energy of active ingredients with different proteins

化学成分	最低结合能/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$					
	Claudin-1	TNF- α	IL-6	mCRMAP	TLR4	MyD88
芦荟大黄素	-4.40	-5.58	-5.66	-4.11	-5.19	-5.24
大黄酸	-4.22	-5.49	-5.81	-4.48	-5.34	-5.25
大黄素	-4.23	-5.74	-5.78	-4.36	-5.76	-5.43
大黄酚	-4.47	-5.69	-4.92	-4.47	-5.82	-5.77
大黄素甲醚	-3.88	-5.60	-5.08	-4.31	-5.31	-5.27
厚朴酚	-4.16	-5.11	-5.74	-3.41	-4.56	-5.46
和厚朴酚	-4.40	-5.22	-6.09	-4.19	-5.41	-5.39
橙皮苷	-1.45	-4.05	-2.90	-2.47	-3.28	-3.03
柚皮素	-4.27	-5.32	-5.84	-4.22	-5.58	-5.01
柚皮苷	-1.67	-3.11	-6.14	-1.44	-2.03	-3.72

蛋白之间有良好的结合活性。其中,大黄素与TNF- α 对接结合能最好,与121号GLY形成Halogen(Fluorine)氟键,与57号LEU形成Alky烷基化作用,与59号TYR、119号TYR、151号TYR形成 π -烷基作用,见增强出版附加材料。

除大黄酚和橙皮苷外,其余8个活性成分与IL-6的对接结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$;表明小分子与受体蛋白之间有良好的结合活性。柚皮苷与IL-6的结合能力最强,与179号ARG、182号ARG形成氢键,见增强出版附加材料。

3.1.4 活性成分与mCRAMP、TLR4、MyD88对接结果 如表3所示,除柚皮苷、厚朴酚、橙皮苷外,其余7个活性成分与内源性抗菌肽的对接结合能均 $< -4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明具有一定的结合活性。其中,大黄酸与内源性抗菌肽mCRAMP结合能力最好,与54号ARG、55号LEU、33号ARG、58号LEU形成氢键,与57号ASP形成Pi-Sigma作用,与55号LEU形成 π -烷基作用,见增强出版附加材料。

除厚朴酚、橙皮苷、柚皮苷外,其余7个成分与TLR4的结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$;大黄酚与TLR4结合能力最强,与173号ASN形成Unfavorable Donor-Donor作用,见增强出版附加材料。

除橙皮苷、柚皮苷外,其余8个活性成分与MyD88的对接结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明均具有良好的结合活性。大黄酚与MyD88结合能力最好,与29号GLN形成氢键,与27号ASP形成Pi-Lone-Pair(π -孤对电子作用)与58号ALA、28号PRO、32号TRP形成 π -烷基作用,与66号PRO形成Carbon Hydrogen Bond(碳-氢键),见增强出版附加材料。

3.2 动物实验验证

3.2.1 大承气汤对小鼠血清D-乳酸和回肠组织TNF- α 、IL-6的影响 与假手术组比较,模型组小鼠血清D-乳酸含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组血清D-乳酸水平均显著下降($P<0.01$)。其中,大承气汤高剂量组小鼠血清D-乳酸水平与乌司他丁组差异无统计学意义,显示出降低肠

黏膜通透性作用。见表4。与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织TNF- α 和IL-6水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤低剂量组小鼠回肠组织TNF- α 水平有降低趋势,但差异无统计学意义,而IL-6水平显著下降($P<0.01$),大承气汤高剂量组和乌司他丁组小鼠回肠组织TNF- α 和IL-6水平均显著下降($P<0.01$)。

表4 大承气汤对脓毒症小鼠的血清D-乳酸和回肠组织TNF- α 、IL-6水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

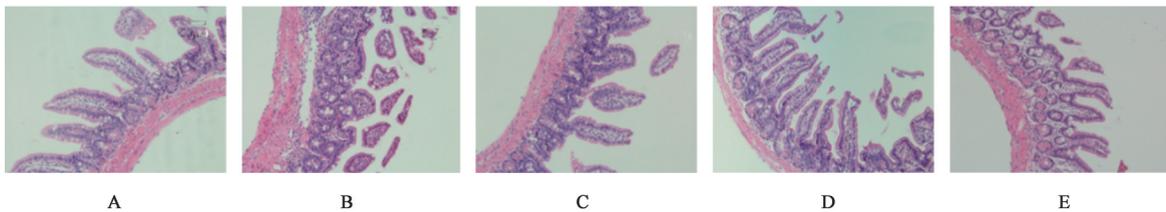
Table 4 Effect of D-lactate levels in serum and TNF- α and IL-6 in ileum of mice by Da Chengqitang ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	D-乳酸/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·g ⁻¹	IL-6/ng·g ⁻¹
假手术组		14.72 \pm 1.22	15.49 \pm 1.04	27.20 \pm 1.84
模型组		53.28 \pm 5.81 ¹⁾	35.44 \pm 3.38 ¹⁾	60.25 \pm 3.84 ¹⁾
大承气汤低剂量组	4 g·kg ⁻¹	44.29 \pm 2.95 ²⁾	29.62 \pm 2.76	52.77 \pm 3.26 ²⁾
大承气汤高剂量组	8 g·kg ⁻¹	31.35 \pm 3.70 ²⁾	26.52 \pm 0.67 ²⁾	43.76 \pm 4.53 ²⁾
乌司他丁组	50 000 U·kg ⁻¹	31.70 \pm 3.47 ²⁾	17.13 \pm 1.26 ²⁾	33.00 \pm 2.51 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表6、表7同)

3.2.2 大承气汤对小鼠回肠组织病理变化 假手术组小鼠同视野内,小肠绒毛数量多、形态完整且排列整齐;模型组小肠绒毛锐化、破损严重、排列错乱,损伤严重。与模型组比较,大承气汤低、高剂量

和乌司他丁组小鼠小肠绒毛完整性、整齐性等情况均得到明显的改善,提示大承气汤可减轻脓毒症小鼠的回肠损伤和水肿,改善回肠组织病理。见图1。



注:A.假手术组;B.模型组;C、D.大承气汤低、高剂量组;E.乌司他丁组(图2、图3同)

图1 大承气汤对脓毒症小鼠回肠组织的病理变化(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Pathological changes of ileal tissue of mice by Da Chengqitang (HE, $\times 200$)

3.2.3 大承气汤对小鼠回肠组织紧密连接Claudin-1、Occludin蛋白表达情况 与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织Claudin-1、Occludin蛋白表达均显著下调($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠回肠组织Claudin-1蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤低剂量组小鼠回肠组织Occludin蛋白表达明显升高($P<0.05$),大承气汤高剂量组和乌司他丁组小鼠回肠组织Claudin-1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),提示大承气汤对脓毒症小鼠的肠黏膜屏障具有保护作用。见图2和表5。

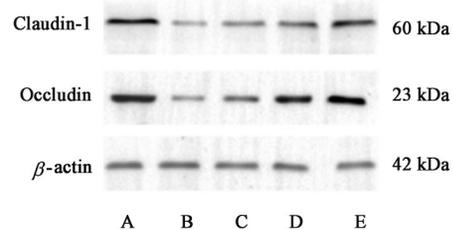


图2 各组小鼠回肠组织中紧密连接相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of tight junction protein in ileal tissue of mice

3.2.4 大承气汤对小鼠回肠组织抗菌肽mCRAMP表达 与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织内源性抗菌肽mCRAMP蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤低剂量、大承气高剂量和

乌司他丁组小鼠回肠组织内源性抗菌肽mCRAMP蛋白表达均显著升高($P<0.01$)。见图3和表6。

3.2.5 各组小鼠回肠组织抗菌肽mCRAMP、TLR4、MyD88 mRNA表达情况 与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织内源性抗菌肽mCRAMP mRNA含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤低剂

表5 大承气汤对脓毒症小鼠回肠组织紧密连接情况表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Expression of tight junction protein in ileal tissue of mice by Da Chengqitang ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	Claudin-1 / β -actin	Occludin / β -actin
假手术组		1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		0.18±0.04 ¹⁾	0.24±0.03 ¹⁾
大承气汤低剂量组	4 g·kg ⁻¹	0.32±0.03 ³⁾	0.40±0.11 ²⁾
大承气汤高剂量组	8 g·kg ⁻¹	0.43±0.02 ³⁾	0.66±0.07 ³⁾
乌司他丁组	50 000 U·kg ⁻¹	0.75±0.08 ³⁾	0.95±0.05 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

量、大承气高剂量和乌司他丁组小鼠回肠组织内源性抗菌肽 mCRAMP mRNA 均显著升高 ($P<0.01$);与假手术组比较,模型组小鼠回肠组织 TLR4、

表6 大承气汤对脓毒症小鼠回肠组织抗菌肽 mCRAMP 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Immunohistochemistry results of mCRAMP protein expression in ileum of mice by Da Chengqitang ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	mCRAMP
假手术组		10.98±1.43
模型组		48.76±0.77 ¹⁾
大承气汤低剂量组	4 g·kg ⁻¹	59.45±4.08 ²⁾
大承气汤高剂量组	8 g·kg ⁻¹	75.44±2.08 ²⁾
乌司他丁组	50 000 U·kg ⁻¹	92.38±3.97 ²⁾

MyD88 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,大承气汤低剂量、大承气高剂量和乌司他丁组小鼠回肠组织 TLR4、MyD88 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$)。见表7。

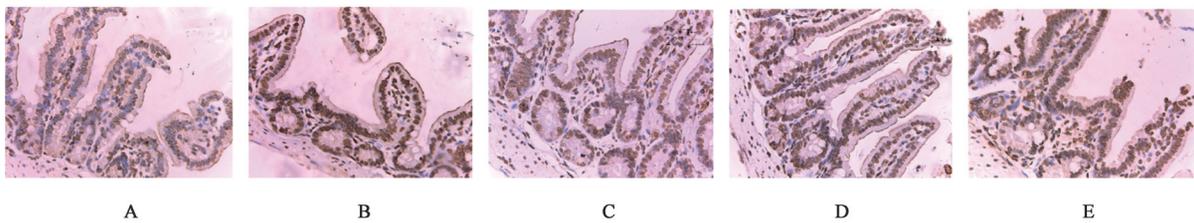


图3 大承气汤对脓毒症小鼠回肠组织抗菌肽 mCRAMP 表达 (IHC, ×400)

Fig. 3 Pathological changes of tight junction protein in ileal tissue of mice in each group (IHC, ×400)

表7 大承气汤对脓毒症小鼠回肠组织 mCRAMP、TLR4、MyD88 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Effect of mCRAMP, TLR4, and MyD88 mRNA expression in ileum tissues of mice by Da Chengqitang ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量	mCRAMP	TLR4	MyD88
假手术组		0.11±0.03	0.36±0.03	0.20±0.03
模型组		1.03±0.10 ¹⁾	1.04±0.07 ¹⁾	1.04±0.10 ¹⁾
大承气汤低剂量组	4 g·kg ⁻¹	1.40±0.11 ²⁾	0.66±0.03 ²⁾	0.69±0.11 ²⁾
大承气汤高剂量组	8 g·kg ⁻¹	1.62±0.12 ²⁾	0.57±0.03 ²⁾	0.48±0.02 ²⁾
乌司他丁组	50 000 U·kg ⁻¹	1.84±0.15 ²⁾	0.49±0.04 ²⁾	0.34±0.06 ²⁾

4 讨论

肠屏障功能障碍会导致肠菌及内毒素易位进而加剧脓毒症,是近年来脓毒症治疗的研究热点^[18]。当肠屏障功能被破坏,肠年膜通透性增加,肠道中各种毒素产物将会大量入血,可促进细胞因子、炎症因子释放,导致多器官功能衰竭综合征,加剧脓毒症的进程^[19]。D-乳酸是肠道微生物的代谢产物,其一般在肠道内含量丰富。脓毒症引起的肠黏膜炎症损伤可增加D-乳酸经受损黏膜入血,将导致血清中D-乳酸的显著上升,可反映肠黏膜通透性

的增加^[20]。肠屏障由机械屏障、化学屏障、免疫屏障与生物屏障共同构成,其中机械屏障最为重要^[21]。因此,肠上皮细胞和细胞间紧密连接形成的机械屏障是维持肠屏障完整结构和正常功能的基础^[22]。Claudin-1 和 Occludin 是组成紧密连接的重要结构蛋白,故检测回肠组织紧密连接蛋白 Claudin-1 和 Occludin 表达水平是评估肠屏障紧密损伤的关键指标^[23-24]。紧密连接蛋白位于肠上皮细胞的顶端,一旦其缺失、变异或表达异常可进一步增加肠粘膜通透性。分子对接结果显示,文本挖掘方法所筛选出的10个活性成分中有7个与Claudin-1均具有一定亲和力,以大黄酚结合能力最好(结合能为-4.47 kcal·mol⁻¹),大黄素次之(结合能为-4.23 kcal·mol⁻¹)。大黄素分子对接结果与文献关于其对多种疾病肠屏障均具有保护作用的报道相符^[25-27]。动物实验结果显示,模型组小鼠血清D-乳酸水平显著上升,回肠组织损伤严重,小肠绒毛断裂,肠道炎症浸润及水肿显著增加,改善小肠绒毛排列、数量、形态,紧密连接蛋白表达显著下降,肠黏膜通透性增加,反映肠屏障受损严重。大

承气汤可显著降低小鼠血清D-乳酸含量,改善回肠组织炎症损伤和黏膜受损,显著增加肠黏膜紧密连接蛋白的表达,降低肠黏膜通透性,保护肠屏障功能。

脓毒症往往导致炎症风暴发生,TNF- α 和IL-6常被认为是评估脓毒症炎症严重程度的重要指标^[28],同时也是脓毒症的关键靶点^[17]。分子对接结果显示,文本挖掘方法所筛选出的10个活性成分中有8个与TNF- α 和IL-6均具有良好的结合活性,以大黄素结合能力最好(结合能为 $-5.74\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)。大黄素的分子对接结果与文献关于其减少相关炎症因子释放的报道相符^[29-30]。动物实验结果显示,模型组小鼠回肠组织炎症因子TNF- α 和IL-6显著上升,大承气汤可显著降低脓毒症引起的回肠组织TNF- α 和IL-6水平上升。鉴于肠道炎症损伤可引起肠屏障的破坏^[31],大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障功能的保护作用可能与其可减轻肠道炎症损伤所显示出的抗炎活性有关。

Cathelicidin抗菌肽在小鼠体内以mCRAMP形式存在^[32]。最新研究表明,内源性抗菌肽mCRAMP对CLP诱导的脓毒症小鼠肠道屏障完整性具有保护作用,可缓解脓毒症;在CLP构建的脓毒症模型小鼠中,内源性抗菌肽mCRAMP表达的升高具有保护性作用;敲除mCRAMP基因导致CLP小鼠死亡率增加,肠道屏障受损加重,肠道炎症因子和炎症通路表达上调;使用药物促进mCRAMP表达上调,可对CLP小鼠发挥预防和治疗的保护性作用^[15]。本研究分子对接结果显示,大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚、和厚朴酚与柚皮素等7个成分与抗菌肽mCRAMP均具有一定亲和力(结合能均 $<-4\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$),与动物实验中大承气汤可上调回肠组织mCRAMP基因和蛋白表达的结果互相印证。本研究发现大承气汤对CLP小鼠肠屏障具有保护作用,并首次证实大承气汤可上调肠道内源性抗菌肽mCRAMP基因和蛋白表达水平,下调其下游肠道TLR4/MyD88炎症通路的基因表达,提示大承气汤对脓毒症小鼠肠屏障的保护作用可能与内源性抗菌肽mCRAMP表达的上调有关。文本挖掘所筛选出的10个活性成分中除柚皮素外其余9个均为配方颗粒出厂质控指标,因此文本挖掘筛选得到的活性成分虽然不能完全代表动物实验所用大承气汤的活性成分,但也在一定程度作出了反映。分子对接结果仅推导出大承气汤通过mCRAMP对脓毒症肠屏障起保护作用的

可能性(该可能性由动物实验得到了验证),但由于饮片(产地、质量、批次)或剂型(汤剂、颗粒剂)不同,实验所用大承气汤化学成分不一定与数据挖掘所得的化学成分相吻合,不能说明上述10种成分即为大承气汤发挥药效的物质基础。未来可采用超高效液相色谱-串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)结合蛋白组学共同考察大承气汤体内外成分变化与对脓毒症肠屏障保护作用的相关性探讨其物质基础^[33]。

综上所述,大承气汤可减轻肠道炎症,抑制回肠组织损伤和水肿、降低肠道通透性、增加肠紧密连接蛋白表达,对脓毒症小鼠肠屏障功能起保护作用。其作用机制可能和其抗炎活性有关,可能与内源性抗菌肽mCRAMP mRNA和蛋白表达的增加及其下游TLR4/MyD88炎症信号通路的下调有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WU D, SHI Y, ZHANG H, et al. Epigenetic mechanisms of Immune remodeling in sepsis: Targeting histone modification [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(2): 112.
- [2] RONCO C, CHAWLA L, HUSAIN-SYED F, et al. Rationale for sequential extracorporeal therapy (SET) in sepsis [J]. Crit Care, 2023, 27(1): 50.
- [3] 梁杰勇,梁杰聪,农祖婵,等. 通腑法在脓毒症常见合并症治疗中的运用研究进展[J]. 广西中医药, 2023, 46(3): 71-75.
- [4] 唐玉秀,韦瑶,金钧. 肠-肺轴以及粪菌移植在脓毒症中的作用[J]. 肠外与肠内营养, 2023, 30(3): 179-184.
- [5] 陈立,李兰,陈伯钧,等. 通腑理肺汤对脓毒症肠屏障损伤肠组织Claudin-1 mRNA及蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 1793-1795.
- [6] 张耿坤,房汉南,陈淑怀. 大承气汤对急性胰腺炎患者肠黏膜功能及恢复进程的影响[J]. 临床医学工程, 2023, 30(4): 487-488.
- [7] 于佳琪,梁群,刘雨默,等. 中医药治疗脓毒症胃肠功能障碍的研究进展[J]. 中国中医急症, 2023, 32(3): 545-547, 551.
- [8] 沙俊生,张楠,孙维义,等. 大承气汤在脓毒症治疗中的相关研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(17): 274-282.
- [9] 刘军,刘松. 大承气汤灌肠治疗危重症伴胃肠功能障碍的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(31): 58-60.
- [10] 周密,王东军,关媛媛,等. 大承气汤联合奥曲肽及常

- 规疗法治疗术后早期炎性肠梗阻疗效及安全性的Meta分析[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(1):39-45.
- [11] 陈敏, 王倩. 大承气汤联合西医常规治疗干预脓毒症伴急性胃肠损伤的临床研究[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(S1):20-22, 102.
- [12] NAGAOKA I, TAMURA H, REICH J. Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):21175973.
- [13] 徐浩宇, 路凡. 内源性抗菌肽的活性及人工制备的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(1):85-89.
- [14] ZHANG L, WEI X, ZHANG R, et al. Design and development of a novel peptide for treating intestinal inflammation[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1841.
- [15] HO J, CHAN H, LIANG Y, et al. Cathelicidin preserves intestinal barrier function in polymicrobial sepsis[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1):47.
- [16] 付智慧, 赵灵灵, 周霖, 等. 基于网络药理学探讨大承气汤治疗脓毒症的作用机制及关键靶点通路验证[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20):5351-5361.
- [17] 熊申明, 任章朋, 史梦婕, 等. 基于mTOR通路和自噬探讨香菇多糖改善脓毒症小鼠肺损伤的作用机制[J]. 中草药, 2022, 53(7):2071-2077.
- [18] HANZHI L, YUFAN L, WEILEI B, et al. Erythropoietin-mediated IL-17 F attenuates sepsis-induced gut microbiota dysbiosis and barrier dysfunction[J]. *Biomedecine Pharmacotherapie*, 2023, 165:115072.
- [19] 邓捷, 黄尚卿, 刘江涛, 等. 间充质干细胞移植对脓毒症小鼠肠道损伤的保护作用与机制的初步探讨[J]. 四川大学学报:医学版, 2023, 54(3):565-573.
- [20] 郭宁珂, 余汉, 谭磊, 等. 小白菊内酯对脓毒症大鼠肠屏障功能的保护作用[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(20):2068-2074.
- [21] LI B, DOU Z, ZHANG L, et al. Ghrelin alleviates intestinal dysfunction in sepsis through the KLF4/MMP2 regulatory axis by activating SIRT1[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:646775.
- [22] 谷月, 王育民. 脓毒症相关肠黏膜机械屏障损伤机制的研究进展[J]. 中国临床研究, 2023, 36(10):1495-1499.
- [23] WANG Y, WANG Y, MA J, et al. YuPingFengSan ameliorates LPS-induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 312:116452.
- [24] 杨家霖, 蔡冰洁, 戴玉豪, 等. 基于微生物-脑-肠轴探讨益气解毒方抗缺血性中风作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231817.
- [25] 石凯歌, 段志军. 大黄素修复肠屏障的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9):130-133.
- [26] HUA Z, WANG Y, CHEN W, et al. Emodin protects against intestinal dysfunction and enhances survival in rat model of septic peritonitis through anti-inflammatory actions[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(8):e942.
- [27] XU Y Y, ZHU M, WU J, et al. A mannitol-modified emodin nano-drug restores the intestinal barrier function and alleviates inflammation in a mouse model of DSS-induced ulcerative colitis[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1):98.
- [28] JANG S Y, KIM S Y, SONG H A, et al. Protective effect of hydrangenol on lipopolysaccharide-induced endotoxemia by suppressing intestinal inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(Pt A):111083.
- [29] 韩思琪, 哈伟, 师彦平. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(1):303-316.
- [30] 吴丛宇, 周悦, 上官璐茜, 等. 大黄的药理作用机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5):634-643.
- [31] ZHENG J R, JI C L, ZHAN L H, et al. Effect of *Tetragium hemsleyanum* on sepsis and mechanism based on network pharmacology and experimental verification[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2022, 47(17):4744-4754.
- [32] ZHOU Q, PAN L L, XUE R, et al. The anti-microbial peptide LL-37/CRAMP levels are associated with acute heart failure and can attenuate cardiac dysfunction in multiple preclinical models of heart failure[J]. *Theranostics*, 2020, 10(14):6167-6181.
- [33] GE N, YAN G L, SUN H, et al. Version updates of strategies for drug discovery based on effective constituents of traditional Chinese medicine[J]. *AHM*, 2023, 3(3):158-179.

[责任编辑 顾雪竹]