

王政, 宋祖晨, 余蕊宏, 等. 基于数据库挖掘、网络药理学和试验验证探究葡萄籽多酚缓解溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 78-85.

WANG Z, SONG Z C, YU R H, et al. The mechanism of grape seed polyphenols in alleviating ulcerative colitis based on database mining, network pharmacology and experimental validation [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 78-85.

## 基于数据库挖掘、网络药理学和试验验证探究葡萄籽多酚缓解溃疡性结肠炎的作用机制

王政, 宋祖晨, 余蕊宏, 周彦彤, 马岩, 刘振广\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 本试验旨在探究葡萄籽多酚缓解葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎的机制。试验选用 GEO 数据库中的两个数据集, 使用 sva 包对其进行整合后, 通过加权基因共表达网络的方法鉴定与溃疡性结肠炎相关的基因模块, 并利用基因本体论数据库和京都基因与基因组百科全书数据库对基因功能进行注释; 使用液相色谱-质谱联用技术检测葡萄籽多酚主要成分, 选取含量前 10 的成分, 利用 TCMSP、DrugBank、SwissTargetPrediction 等数据库和靶点预测工具获取其作用的靶点, 并与先前鉴定的溃疡性结肠炎相关模块的基因取交集, 使用蛋白质-蛋白质相互作用网络分析, 得到葡萄籽多酚缓解溃疡性结肠炎的关键靶点; 使用分子对接验证葡萄籽多酚主要成分与关键靶点的连接活性; 利用 Raw264.7 细胞系, 通过荧光定量 PCR 鉴定葡萄籽多酚对关键靶点基因的影响。结果表明, 有 3 个基因模块与溃疡性结肠炎表型高度相关, 且模块内的基因主要与炎症反应、细胞周期和代谢、细胞的趋化等功能相关; 葡萄籽多酚的主要成分分别为儿茶素、表儿茶素、原花青素 B2、刺柄芒花素等, 这些成分作用的靶点基因与溃疡性结肠炎相关模块的基因有 15 个相同, 而在这 15 个基因中, 前列腺素内过氧化物合酶 2、基质金属酶 9、白介素-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  因为在网络中有最高的连接度而被认为是关键靶点; 葡萄籽多酚含量最高的 10 个成分与这 4 个靶点均具有良好的连接活性, 荧光定量 PCR 也证明了葡萄籽多酚能影响这 4 个靶点基因的表达。综上, 葡萄籽多酚最有可能通过影响前列腺素内过氧化物合酶 2、基质金属酶 9、白介素-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  来缓解溃疡性结肠炎。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 网络药理学; 分子对接; 加权基因共表达网络; 葡萄籽多酚; 作用机制

**中图分类号:** S853.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)06-0078-08

## The mechanism of grape seed polyphenols in alleviating ulcerative colitis based on database mining, network pharmacology and experimental validation

WANG Zheng, SONG Zuchen, YU Ruihong, ZHOU Yantong, MA Yan, LIU Zhenguang\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the mechanisms by which grape seed polyphenols alleviate ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium. Two datasets from the GEO database were selected and integrated using the sva package. Weighted gene co-expression network analysis was employed to identify gene modules associated with ulcerative colitis. Gene functions were annotated using gene ontology databases and the kyoto encyclopedia of genes and genomes database. Then, the main components of grape seed polyphenols were detected using liquid chromatography-mass spectrometry. The top 10 components were selected, and their target genes were predicted using databases such as TCMSP, DrugBank, and Swiss Target Prediction. The intersection of the target genes of grape seed polyphenols and the identified ulcerative colitis-related modules was determined. Protein-protein interaction network analysis was performed to identify key targets of grape seed polyphenols in alleviating ulcerative colitis. Next, molecular docking was employed to validate the binding activity between the main components of grape seed polyphenols and key targets. Finally, the effects of grape seed polyphenols on the expression of the key target genes were validated using fluorescence quantitative PCR in Raw264.7 cells. The results showed that three modules were highly correlated with the phenotype of ulcerative colitis, with genes being mainly associated with inflammatory responses, cell cycle and metabolism, and cell chemotaxis. The main components of grape seed polyphenols included catechin, epicatechin, procyanidin B2, and procyanidin C1, among

收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32273048)

第一作者: 王政, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 刘振广, 副教授, 硕导, 研究方向: 中药免疫药理与疫苗佐剂, E-mail: lzg199011@163.com。

others. Fifteen target genes overlapped between these components and the genes in the ulcerative colitis-related modules. Among these, cyclooxygenase-2 (PTGS2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) exhibited the highest connectivity in the network and were considered key targets. The top 10 components of grape seed polyphenols showed good binding activity with these four targets, as confirmed by fluorescence quantitative PCR, which demonstrated the ability of grape seed polyphenols to influence the expression of these key target genes. In conclusion, grape seed polyphenols are most likely to alleviate ulcerative colitis by affecting PTGS2, MMP9, IL-6, and TNF- $\alpha$ .

**Keywords:** ulcerative colitis; network pharmacology; molecular docking; weighted gene co-expression network analysis; grape seed polyphenols; mechanism

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 会导致结肠和直肠黏膜的发炎和溃疡, 典型症状为血性腹泻、里急后重、体重减轻<sup>[1]</sup>。在宠物临床中, UC 常见于犬猫, 主要由犬猫误食骨片、木枝等坚硬、尖锐且不易消化的异物所致<sup>[2]</sup>。临床上 UC 治疗主要采用 5-氨基水杨酸和皮质类固醇等药物, 但大多具有较强的副作用, 亟需开发新型的治疗剂<sup>[3]</sup>。在我国的兽药生产研发上, 大多数新兽药以大动物为主, 针对宠物用的药品严重不足<sup>[4]</sup>。饮食干预, 近年来也被认为是治疗疾病的一种策略, 富含多酚的饮食可以提供针对溃疡性结肠炎的保护作用<sup>[5]</sup>。膳食多酚作为药食同源的天然化合物, 其在缓解 UC 等复杂性疾病上显示出多成分, 多靶点, 价格低廉, 副作用小的优势<sup>[6]</sup>。因此, 开发天然多酚作为宠物临床上缓解 UC 的药物具有重要意义。

葡萄籽多酚 (grape seed polyphenols, GSP) 中含有原花青素、儿茶素、表儿茶素等多种抗氧化、抗炎的活性成分, 在临床上有极高的使用价值<sup>[7]</sup>。武报佳等<sup>[8]</sup>研究表明, GSP 可以抑制大鼠的 NF- $\kappa$ B 信号通路。WANG 等<sup>[9]</sup>研究也表明, GSP 可以通过抑制炎症和细胞凋亡来改善 DSS 诱导的结肠炎。但由于 GSP 成分的复杂性, 其具体机制尚不清晰。当前研究通常采用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 诱导小鼠的 UC, 该方法具有操作简便、价格低廉、成功率高等优势, 为溃疡性结肠炎治疗药物的筛选提供了模型基础。

加权基因共表达网络 (weighted correlation network analysis, WGCNA)<sup>[10]</sup> 是一种针对 RNA-seq 数据的新型系统生物学技术, 可用于划分基因模块, 构建基因表达网络并揭示基因和表型的相关性, 其具有灵敏度高, 信息损失少等优点。使用 WGCNA 可以鉴定疾病的潜在治疗靶点。XU 等<sup>[11]</sup>通过 WGCNA 鉴定 AGAP2-AS1 和 GOLGA7B 为胆管癌的潜在治疗靶点。

网络药理学<sup>[12]</sup>由 Hopkins 提出, 其可以通过构建药物-活性成分-靶点之间的网络关系, 来预测中药及复方的作用机制。天然多酚与中药复方同样有多成分、多靶点的特点, 也可以利用网络药理学预测其

作用机制。Liu 等<sup>[13]</sup>利用网络药理学发现, 桑黄多酚的主要活性化合物柑橘素和水杨醛内酯可通过结合 TP53、STAT3 等关键靶点治疗结肠癌。

基于以上观点, 本研究对来自 GEO 数据库的两个 RNA-seq 数据集进行 WGCNA 分析, 鉴定出 UC 相关基因。并选取 GSP 为研究对象, 使用液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS) 检测其主要成分, 利用网络药理构建成分与靶点网络, 与 WGCNA 鉴定的靶点进行筛选后获得关键靶点, 使用分子对接预测 GSP 主要成分与关键靶点的结合能力, 最后使用小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 验证 GSP 对关键靶点基因表达的影响, 为 GSP 缓解 UC 的应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

甲醇 (赛默飞世尔科技公司); 乙腈 (赛默飞世尔科技公司); 超纯水 (默克密理博公司); 甲酸 (西格玛奥德里奇公司); 葡萄籽多酚 (尖峰天然产物研究开发有限公司); RAW264.7 (鼠源) 单核-巨噬细胞 (赛维尔生物科技有限公司); TRIzol (西格玛奥德里奇公司); DMEM 培养基、小牛血清、青霉素-链霉素双抗 (GIBCO 公司); 脂多糖 (西格玛奥德里奇公司); 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒 (诺唯赞生物科技股份有限公司)。

### 1.2 RNA-seq 数据获取

数据集在 GEO 数据库中的编号为 GSE137942 和 GSE215772, 两个数据集试验模型相同, 均为自由饮水 DSS 7 d 后构建的小鼠 UC 模型, 样本均为结肠组织样本。将表达量均整理为每百万条映射读取的千碱基转录本片段数 (FPKM) 后, 使用 R 包 SVA 去除批次效应。

### 1.3 基因模块鉴定和注释

使用 R 包 WGCNA 构建无标度网络, 将基因根据相关性划分为 11 个模块, 其中软阈值设定为 30。对每个模块计算其特征向量, 并计算各模块与 UC 表型的相关系数和相关系数的显著性。选取相关系数绝对值最高的 3 个模块, 对每个模块的基因使用 R 包

clusterProfiler 分别进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。

#### 1.4 液相色谱-质谱联用检测葡萄籽多酚成分

称取 300 mg GSP 溶解于 1 mL 甲醇, 涡旋振荡 2 min, 加入 3 粒钢珠研磨 5 min (50 Hz), 冰浴超声萃取 20 min。涡旋振荡 2 min, 静置 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 进行液相色谱与质谱联用检测。

色谱分析条件如下。正离子模式为: 色谱柱为美国 Waters ACQUITY UPLC® BEH C8 (1.7 μm, 2.1×100 mm Column); 柱温为 50 °C, 进样体积为 4 μL, 流动相 A 相为 0.1% 甲酸/水, 流动相 B 相为 0.1% 甲酸/乙腈, 流速为 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 5% B 相为起始浓度, 0~2 min, B 相保持在 5%, 2~37 min, B 相由 5% 变为 99%, 37~42 min, B 相保持在 100%, 42.1~45 min, B 相保持在 5%。

负离子模式为: 色谱柱为美国 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 (1.8 μm, 2.1×100 mm Column); 柱温为 50 °C, 进样体积为 4 μL, 流动相 A 相为 6.5 mmol/L 碳酸氢铵/水, 流动相 B 相为 6.5 mmol/L 碳酸氢铵/90% 甲醇/水, 流速为 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 5% B 相为起始浓度, 0~2 min, B 相保持在 5%, 2~42 min, B 相由 5% 变为 99%, 42~47 min, B 相保持在 99%, 47.1~50 min, B 相保持在 5%。

质谱分析如下。质谱一级全扫描+IDA 二级子离子扫描-正离子模式: 源温为 550 °C, 气帘气流速为 35 psi, 去簇电压为 80 V, MS 碰撞能量为 10 eV, MSMS 模式碰撞电压为 (40±15) eV, 一级质谱扫描范围为 70~1 050 Da, 二级质谱扫描范围为 50~1 050 Da。质谱一级全扫描+DDA 二级子离子扫描-负离子模式: 源温为 350 °C, 气帘气流速为 35 psi, 去簇电压为 -80 V, MS 碰撞能量为 -10 eV, MSMS 模式碰撞电压为 (-35±15) eV, 一级质谱扫描范围为 70~1 050 Da, 二级质谱扫描范围为 50~1 050 Da。

#### 1.5 葡萄籽多酚相关靶点筛选

选取 GSP 含量前 10 的成分, 将每个成分依此输入 TCMS 数据库 (<https://tcmsp.com/tcmsp.php>)、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 获取其靶点, 对于两个数据库均没有靶点的成分使用 SwissTarget Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>), 选取物种为 “Mus musculus”, 进行靶点预测。使用 String 数据库 (<https://string-db.org>) 对靶点名字进行规范。最后使用 R 包 homologene 对来源于 “Homo sapiens” 的靶点进行同源转换, 使所有靶点统一为

“Mus musculus” 的靶点。

#### 1.6 葡萄籽多酚-主要成分-靶点网络图构建

将 1.4 所得的 GSP 主要成分和 1.5 所得的靶点输入 Cytoscape 中, 构建 “GSP-成分-靶点” 网络。

#### 1.7 葡萄籽多酚缓解溃疡性结肠炎关键靶点的筛选

取 1.3 鉴定的 3 个核心模块的基因与 1.5 构建的靶点的交集, 将所得靶点导入到 String 数据库 (<https://string-db.org/>), 构建交集靶点网络, 取网络中连接度最高的 4 个靶点作为 GSP 缓解 UC 的关键靶点。

#### 1.8 分子对接

在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 下载 1.7 中获得的 4 个靶点的蛋白结构, 分别为白介素 6 (IL6, PDB 编号为 2I3y), 肿瘤坏死因子 α (TNF-α, PDB 编号为 2TNF), 前列腺素内过氧化物合酶成 2 (PTGS2, PDB 编号为 3nt1), 基质金属蛋白酶 9 (MMP9, 使用 alphafold 预测)。在 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 1.4 获得的含量前 10 的化合物的 2D 结构。使用 PyRx 对化合物和靶点蛋白进行预处理后进行分子对接。对接结果使用 Plip (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 和 PyMol 可视化。

#### 1.9 荧光定量 PCR (qPCR)

收集培育好的 Raw264.7, 接种于 12 孔板中, 将其分为 Blank 组、GSP-L 组、GSP-H 组和 LPS 组, 每组 6 重复。37 °C 培养 12 h 后, Blank 组每孔加入含 0.1% 二甲基亚砜的 DMEM 培养基作为对照, 其余组均加入含脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的 DMEM 培养基 (LPS 终浓度为 1 μg/mL), GSP-L 和 GSP-H 组另外补充 GSP, GSP 终浓度分别为 100 μg/mL 和 200 μg/mL。培养 24 h 后, 收集细胞, 使用 TRIzol 提取总 RNA, qPCR 按照诺维赞公司试剂盒操作说明进行, 内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。引物由擎科生物科技股份有限公司合成, 如表 1 所示。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列 (3'→5')
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTC
GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL6-F	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC
IL6-R	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF-F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
TNF-R	GCTACGACGTGGGCTACAG
PTGS2-F	TTCAACACACTCTATCACTGGC
PTGS2-R	AGAAGCGTTTGGCGTACTCAT
MMP9-F	CTGGACACCCAGACACTAAAG
MMP9-R	CTCCGGCAAGTCTTCAGAG

### 1.10 数据处理与结果统计

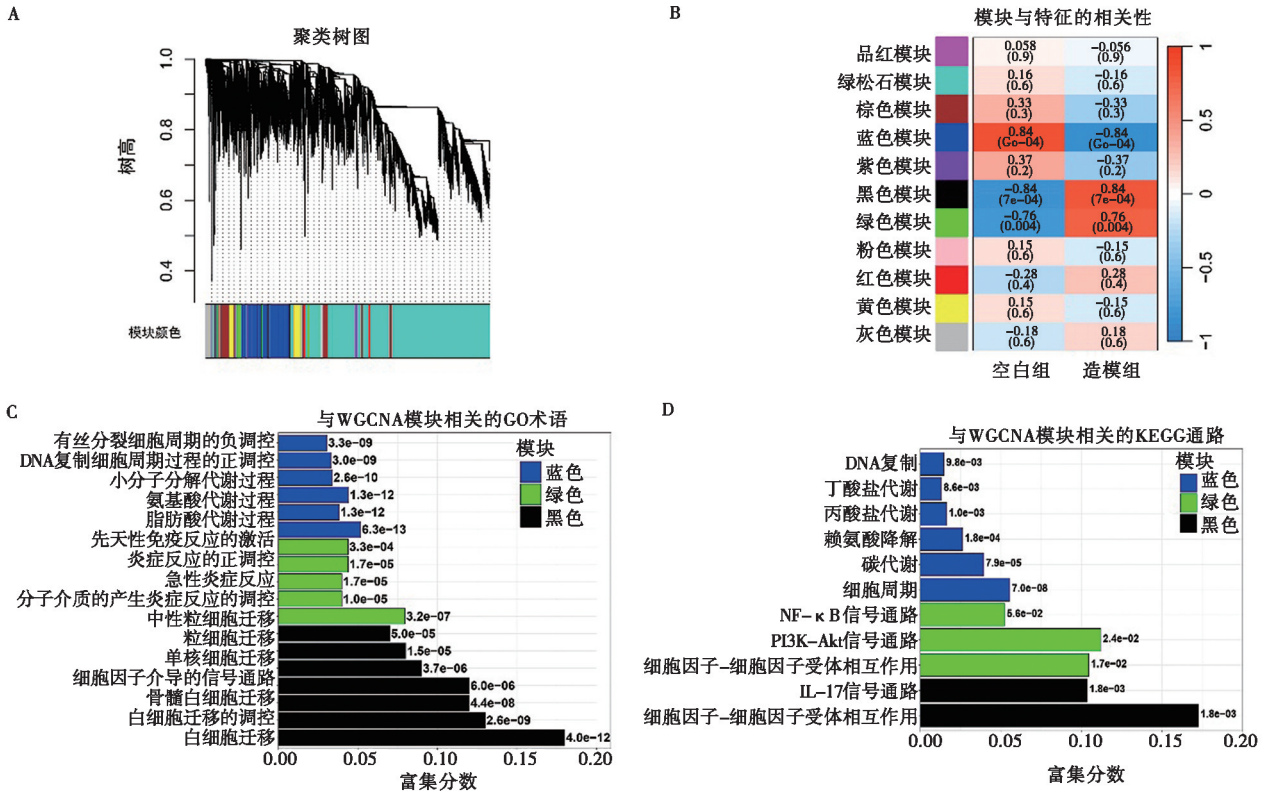
结果数据以“平均值±标准误”表示，使用 R 包 stats 进行单因素方差分析，利用 Tukey 法进行事后多重比较分析显著性，以  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 UC 相关基因模块的鉴定和注释

从 GEO 数据库中下载编号为 GSE197342 和 GSE215772 的 2 个 RNA-seq 数据集，如图 1A 所示，使用 WGCNA 将基因根据表达的相似性聚类为 11 个模块。计算每个模块的特征值与 UC 表型的相关系数和统计显著性，如图 1B 所示，得到两个与 UC 表型显著正相关的基因模块，黑色模块 ( $P = 7 \times 10^{-4}$ ) 和绿色模块 ( $P = 0.004$ )，相关系数分别为 0.84 和 0.76，一个与 UC 表型显著负相关的基因模块，蓝色

模块 ( $P = 6 \times 10^{-4}$ )，相关系数为  $-0.84$ 。对得到的 3 个模块的基因分别进行 GO 和 KEGG 通路的富集分析，来注释这些基因的功能。如图 1C 所示，GO 分析表明，黑色模块的基因主要与白细胞迁移、细胞因子介导的信号通路、单核细胞迁移等相关；绿色模块的基因主要与调节炎症反应、急性炎症反应、先天免疫反应激活等相关；蓝色模块的基因功能主要与脂肪代谢、氨基酸代谢、细胞周期的正调节等相关。如图 1D 所示，KEGG 通路富集分析表明，黑色模块的基因在 IL-17 信号通路中富集，绿色模块的基因在 PI3K-Akt 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路中富集，蓝色模块的基因在细胞周期、碳代谢、丙酸盐代谢和丁酸盐代谢等通路中富集。简而言之，黑色模块的基因与细胞的趋化有关，绿色模块的基因与炎症反应有关，蓝色模块的基因与细胞周期和代谢功能有关。



A. 所有基因的聚类树和它们对应的模块；B. 各基因模块特征值与 UC 表型的相关系数和相关性的显著性水平；C. 绿色、黑色和蓝色模块内基因的 GO 富集分析结果；D. 绿色、黑色和蓝色模块内基因的 KEGG 通路富集分析结果。P 值以数值型式显示。

图 1 UC 相关基因模块的鉴定和注释

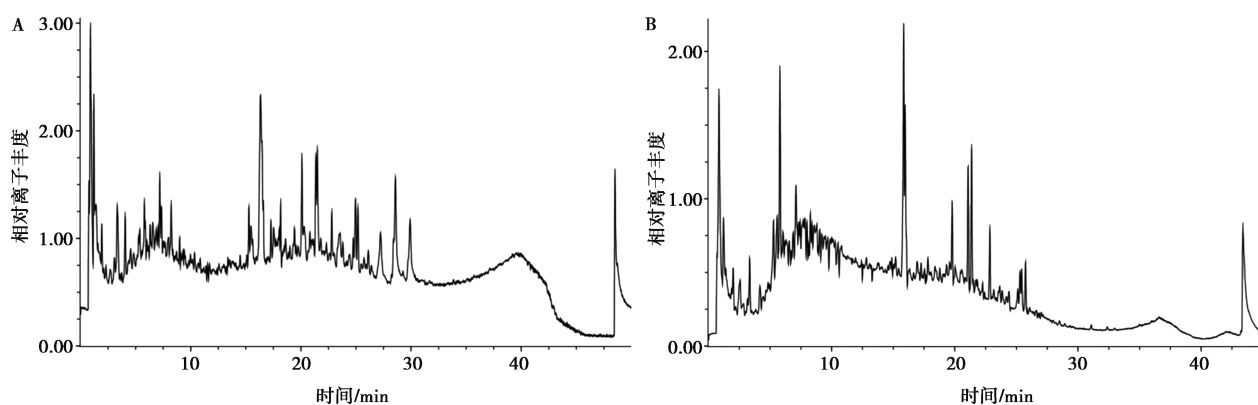
### 2.2 GSP 主要成分分析

使用 LC-MS 获取 GSP 的正离子和负离子色谱，如图 2 所示，根据保留时间和核质比比数据库，注

释化合物。计算峰面积获得化合物的百分率，选取含量前 10 的成分，结果如表 2 所示。

表 2 葡萄籽多酚主要成分

PubChem ID	成分名称	百分率/%
24096399	(Z)-5, 8, 11-三羟基十八碳-9-烯酸	21.23
9064	儿茶素	11.11
72276	(-)-表儿茶素	7.50
122738	原花青素 B2	6.82
54675866	3, 4-二羟基苯甲酸	4.26
60961	腺苷	4.21
2266	壬二酸	3.65
6140	苯丙氨酸	2.83
10690	葡萄糖酸	2.17
5280378	刺柄芒花素	2.13



A. 正离子; B. 负离子。

图 2 GSP 的 LC-MS 总离子流图

### 2.3 GSP 缓解 UC 的潜在靶点筛选

如图 3A 所示, 综合利用 TCMSp、DrugBank 数据库和 SwisstargetPrediction 靶点预测网站, 共找到 GSP 的 10 个主要成分的 86 个靶点。与 2.1 中鉴定出的 3 个模块的合计 1 586 个基因取交集, 得到与 GSP 缓解 UC 相关的 15 个靶点, 如图 3B 所示。将 15 个靶点导入到 String 数据库, 获取蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图, 如图 3C 所示, 选择连接度最高的 4 个靶点作为关键靶点, 分别为 PTGS2、MMP9、IL6 和 TNF- $\alpha$ 。

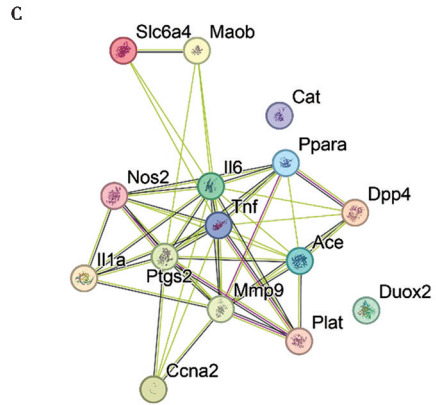
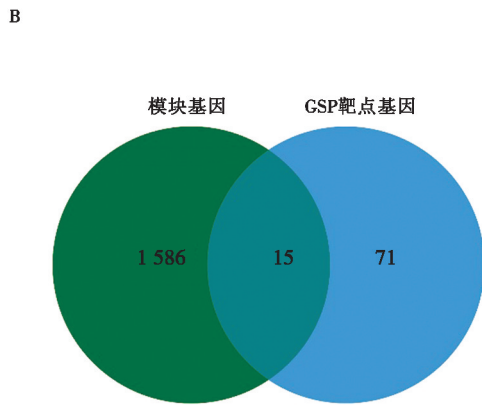
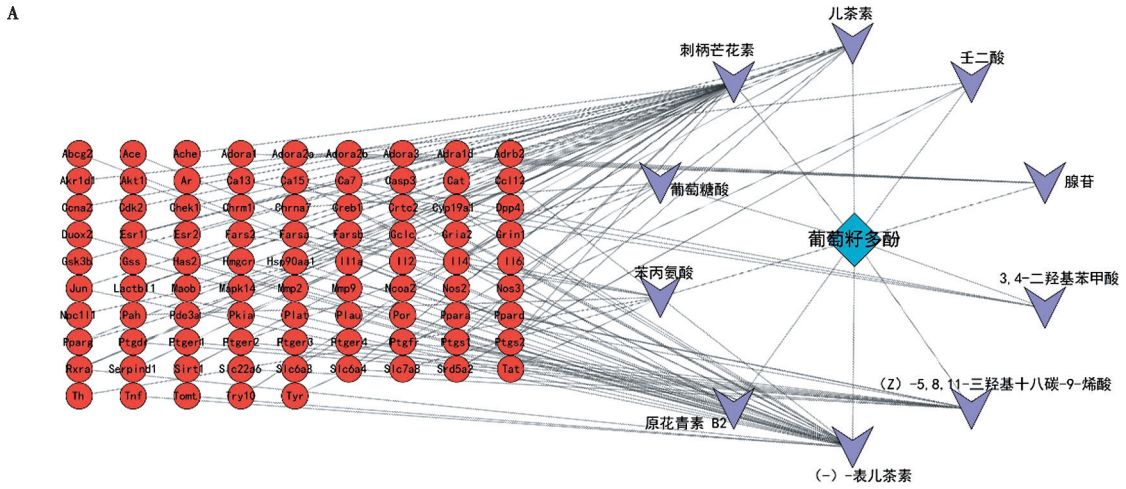
### 2.4 分子对接

选用 2.3 中得到的 4 个关键靶点, 与 2.2 中得到的 GSP 含量最高的 10 个成分进行分子对接。对接结果, 如图 4A 所示, GSP 主要成分中的儿茶素、表儿

茶素、原花青素 B2、刺柄芒花素与 4 个靶点均具有良好的结合活性, 尤其是原花青素 B2 和 PTGS2, 结合能达到了 48.6 J/mol。如图 4B 所示, 本研究也预测了部分主要成分和核心靶点的潜在位点, 具体的结合位点如表 3 所示。

### 2.5 qPCR 验证 GSP 对关键靶点基因的影响

为了进一步验证 WGCNA、网络药理和分子对接预测结果的准确性, 本研究对 Raw264.7 细胞进行了 qPCR 试验。结果如图 5 所示, 在 LPS 作用后, 关键靶点对应的基因 MMP9、PTGS2、TNF、IL6 的表达量均显著上升, 而在补充 GSP 后, 这种趋势被逆转。这进一步证明了 GSP 主要成分与关键靶点具有良好的互动潜力。

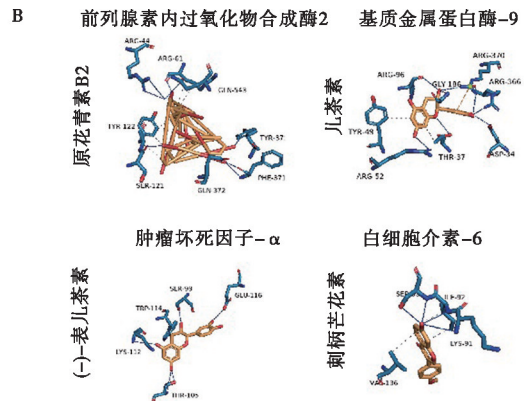
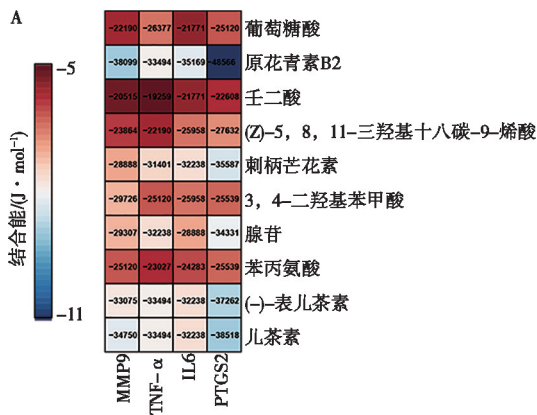


A. GSP 10 个主要成分与靶点的互作网络图，菱形代表 GSP，倒三角形代表 GSP 主要成分，圆形代表主要成分对应的靶点；B. 模块基因与 GSP 主要成分的靶点的韦恩图；C. 交集靶点的 PPI 网络互作图。

图 3 GSP 缓解 UC 潜在靶点的筛选

表 3 葡萄籽多酚主要成分与靶点的潜在结合位点

成分	靶点	结合位点
原花青素 B2	PTGS2	ARG-44、ARG-61、GLN-543、TYR-37、PHE-371、GLN-372、SER-121、TYR-122
儿茶素	MMP9	TYR-49、ARG-52、ARG-96、THR-37、GLY-186、ARG-370、ARG-366、ASP-34
表儿茶素	TNF- $\alpha$	LYS-112、TRP-114、SER-99、THR-105、GLU-116
刺柄芒花素	IL6	SER-83、ILE-92、LYS-91、VAL-136



A. 分子对接结合能图；B. 结合位点图。

图 4 GSP 主要成分和关键靶点的分子对接结果

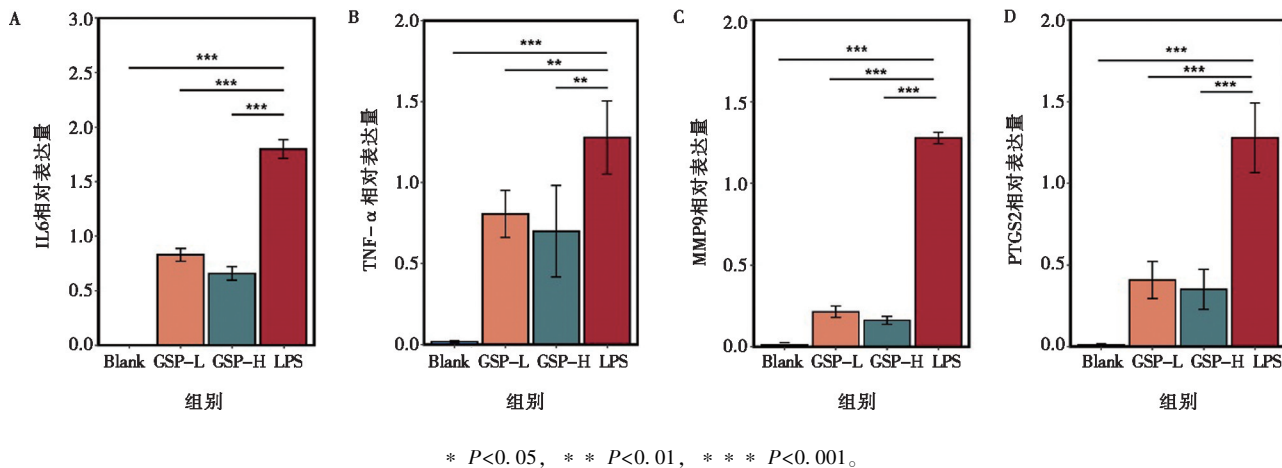


图5 GSP对关键靶点基因的影响

### 3 讨论

传统的网络药理学对于疾病的靶点的筛选依托于 Genecard、OMIM、Malacards 等数据库，其疾病的靶点往往仅限于人类<sup>[14]</sup>。本研究将 WGCNA 应用于小鼠 UC 模型的 RNA-seq 数据，筛选出小鼠 UC 的相关靶点，并对药物的靶点进行物种间的同源转换，使得网络药理学可以应用于小鼠模型上。Yin 等<sup>[15]</sup>也将网络药理学应用到其他动物上，探究了乌梅散治疗仔猪腹泻的机制。

在 WGCNA 筛选的 3 个基因模块中，蓝色模块与 UC 表型有显著的负相关性，GO 富集分析显示，蓝色模块基因与氨基酸代谢和脂肪酸代谢有关，这表明，UC 的一个显著特征可能是氨基酸和脂肪酸代谢紊乱。Diab 等<sup>[16]</sup>研究表明 UC 患者的结肠黏膜组织存在氨基酸代谢和脂肪酸代谢的紊乱，这与本研究的结果是一致的；黑色模块和绿色模块与 UC 表型有显著的正相关性，KEGG 通路富集分析显示，黑色模块基因与 IL-17 信号通路有关。IL-17 主要由 Th17 细胞特异性产生<sup>[17]</sup>，当免疫调节功能失调时，Th17 细胞异常增殖并产生大量促炎细胞因子，这些细胞因子可以募集其他炎症细胞，导致 UC 的不断发展<sup>[18]</sup>。GO 富集分析的结果也表明，黑色和绿色模块的基因与炎症反应和细胞募集相关，这与 Th17 细胞异常增殖的导致的变化是一致的。因此，UC 的另一个显著特征可能是 Th17 细胞的失衡。

使用 LC-MS 检测了 GSP 成分，我们发现 GSP 中存在大量的儿茶素、表儿茶素和原花青素 B2。儿茶素、表儿茶素属于黄烷醇类化合物，原花青素 b2 属于黄酮类化合物<sup>[19]</sup>，儿茶素被报道对于能够调节奶牛乳腺上皮细胞的炎症反应和氧化应激，表儿茶素则

被证明其对于 NF- $\kappa$ B 通路的抑制，原花青素 B2 则能够诱导巨噬细胞的 M2 极化<sup>[20-22]</sup>。这些结果都表明了 GSP 对于 UC 的治疗潜力。

基于网络药理，本研究筛选出 GSP 缓解 UC 的 4 个关键靶点：IL6、TNF- $\alpha$ 、PTGS2、MMP9。IL6、TNF- $\alpha$  是炎症反应中的重要细胞因子，IL6 被报道能够激活 NF- $\kappa$ B 信号通路，从而诱发炎症<sup>[23]</sup>，通过 TNF- $\alpha$  转化酶抑制 TNF- $\alpha$  的产生也被报道可用于治疗慢性结肠炎<sup>[24]</sup>，这些报道表明 IL6 和 TNF- $\alpha$  是 UC 发展中可调控的靶点；PTGS2 对应的蛋白—前列腺素内过氧化物合酶 2，是花生四烯酸合成前列腺素合成的限速酶<sup>[25]</sup>，当巨噬细胞受到炎症刺激后，会合成并释放前列腺素<sup>[26]</sup>，花生四烯酸衍生的前列腺素又会作为促炎介质进一步加重炎症<sup>[27]</sup>。因此，抑制 PTGS2，可以通过抑制前列腺素的合成来打破这种“炎症循环”，这进一步表明了 PTGS2 作为缓解 UC 的靶点的可行性；MMP9 被报道会通过降解上皮来介导组织损伤，MMP9 抑制剂联合 JAK 抑制剂能有效缓解 DSS 引起的 UC<sup>[28]</sup>，这些证据表明，MMP9 是缓解 UC 的潜在靶点。

分子对接结果表明，对于 4 个靶点，GSP 均具有特定的成分与其有良好的结合潜能。针对 TNF- $\alpha$  的单抗是临床上治疗 UC 重要的药物<sup>[29]</sup>，但部分患者具有对抗 TNF 单抗的不响应性，这大大限制了抗 TNF 单抗的使用范围，相较之下，GSP 作为一个多成分，多靶点的药物，显示出其独特的优势。

综上，本研究以 GSP 和 UC 作为研究对象，通过 WGCNA 鉴定 UC 相关基因模块，并用网络药理学初步揭示了 GSP 在小鼠 UC 模型上通过多成分作用于多靶点的缓解作用，为 GSP 的后续研究提供了理论基础。

## 参考文献:

- [1] JEYASEELAN T C, ARACHCHI D S S, KESHIGA G. Molecular identification of phytoplasma associated with brinjal little leaf disease in Sri Lanka [J]. *J Plant Pathol*, 2023, 105 (4): 1661-1667.
- [2] 李佳新, 禹彬彬, 范开. 犬猫溃疡性结肠炎的中兽医治疗 [J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56 (1): 80.
- [3] BERRE C L, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402 (10401): 571-584.
- [4] 俞峰, 唐娜, 朱怡平, 等. 试论我国宠物临床用药困局与破局之道 [J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57 (11): 116-118.
- [5] RITCHIE L E, STURINO J M, CARROLL R J, et al. Polyphenol-rich sorghum brans alter colon microbiota and impact species diversity and species richness after multiple bouts of dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2015, 91 (3): fiv008.
- [6] ZHAO Y, JIANG Q. Roles of the polyphenol-gut microbiota interaction in alleviating colitis and preventing colitis-associated colorectal cancer [J]. *Adv Nutr*, 2021, 12 (2): 546-565.
- [7] 林维晟, 陈梦赐, 解田, 等. 葡萄籽有效成分研究进展 [J]. *化肥设计*, 2023, 61 (5): 7-16.
- [8] 武报佳, 郭华, 邢慧敏, 等. 葡萄籽多酚对心肌梗死大鼠 NF- $\kappa$ B 信号通路及肾功能的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21 (8): 1409-1414.
- [9] WANG Y, WANG Y, SHEN W, et al. Grape seed polyphenols ameliorated dextran sulfate sodium-induced colitis via suppression of inflammation and apoptosis [J]. *Pharmacology*, 2020, 105 (1): 9-18.
- [10] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
- [11] XU L, XIAO T, XU L, et al. Identification of therapeutic targets and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma via WGCNA [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 977992.
- [12] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (10): 1110-1111.
- [13] LIU X, CUI S, LI W, et al. Elucidation of the anti-colon cancer mechanism of *Phellinus baumii* polyphenol by an integrative approach of network pharmacology and experimental verification [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253 (Pt 6): 127429.
- [14] 刘颖, 张天婵, 张梦颖. 基于网络药理学和分子对接探究桂枝茯苓丸治疗异位妊娠的作用机制 [J]. *中医学报*, 2023, 38 (12): 2647-2658.
- [15] YIN H, LIU W, JI X, et al. Study on the mechanism of Wumei San in treating piglet diarrhea using network pharmacology and molecular docking [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1138684.
- [16] DIAB J, HANSEN T, GOLL R, et al. P003 metabolomics for improved patient stratification in inflammatory bowel disease: characterisation of the ulcerative colitis metabolome [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14 (Supplement 1): S130-S131.
- [17] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27 (1): 485-517.
- [18] JIANG P, ZHENG C, XIANG Y, et al. The involvement of TH17 cells in the pathogenesis of IBD [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2023, 69: 28-42.
- [19] 张慧文, 张玉, 马超美. 原花青素的研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36 (5): 296-304.
- [20] 于井成. 儿茶素对 LTA 诱导的奶牛乳腺炎的炎症反应与氧化应激反应的作用 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [21] ZHANG H, DENG A, ZHANG Z, et al. The protective effect of epicatechin on experimental ulcerative colitis in mice is mediated by increasing antioxidation and by the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68 (3): 514-520.
- [22] TIAN Y, YANG C, YAO Q, et al. Procyanidin B2 activates PPAR to induce M2 polarization in mouse macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1895.
- [23] LI M, LAN L, ZHANG S, et al. IL-6 downregulates hepatic carboxylesterases via NF- $\kappa$ B activation in dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107920.
- [24] SONG Y, KIM Y R, KIM S M, et al. RNAi-mediated silencing of TNF- $\alpha$  converting enzyme to down-regulate soluble TNF- $\alpha$  production for treatment of acute and chronic colitis [J]. *J Control Release*, 2016, 239: 231-241.
- [25] VOGEL L K, SÆBØ M, HØYER H, et al. Intestinal PTGS2 mRNA Levels, PTGS2 gene polymorphisms, and colorectal carcinogenesis [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e105254.
- [26] HUMES J L, BONNEY R J, PELUS L, et al. Macrophages synthesise and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli [J]. *Nature*, 1977, 269 (5624): 149-151.
- [27] JANG Y, KIM M, HWANG S W. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17 (1): 30.
- [28] KIM S, CARR B, TONG L, et al. Combination therapy of selective MMP9 inhibitor and JAK inhibitor is effective to induce disease control in mouse DSS model of colitis; 593 [J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 10: 111.
- [29] PUGLIESE D, FELICE C, PAPA A, et al. Anti TNF- $\alpha$  therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13 (3): 223-233.