

复方中草药对兔生长性能 和肠道健康的影响

徐翔飞^{1,2}, 黄盼², 崔雪梅², 季权安², 肖琛闻², 韦强², 黄叶娥², 鲍国连^{1,2}, 刘燕²
(1. 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要:为了研究复方中草药对兔生长性能、免疫功能、肠道消化酶活性、抗氧化能力、肠道形态和肠道微生物的影响,本试验选取 72 只 5 周龄健康新西兰大白兔,随机分成对照组 (CN, 饲喂基础饲料) 和中草药组 (CM, 基础饲料中添加 600 mg/kg 复方中草药), 每组 36 只, 试验周期为 42 d。每周测定各组兔的采食量和体增重, 计算平均日采食量 (ADFI)、平均日增重 (ADG) 和料重比 (F/G); 试验第 21、42 天, 每组随机选择 4 只健康兔, 采血分离血清, 检测生化指标和免疫指标; 试验结束 (第 42 天), 收集兔小肠肠段, 通过 ELISA 检测小肠黏膜消化酶活性和抗氧化指标, 苏木精-伊红 (H. E.) 染色观察小肠绒毛形态, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测紧密连接蛋白 mRNA 的相对表达量, 高通量测序分析盲肠微生物多样性。结果显示, 两组间 ADFI、ADG 和 F/G 均差异不显著 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 在试验第 21 天时, 中草药组兔血清中总胆固醇 (Tchol) 含量极显著降低 ($P < 0.01$); 在试验第 42 天时, 中草药组兔血清中免疫球蛋白 M (IgM) 含量和回肠黏膜中分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量显著升高 ($P < 0.05$); 肠道中消化酶 (α -淀粉酶、糜蛋白酶和胰蛋白酶) 活性显著升高 ($P < 0.05$); 空肠中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著升高 ($P < 0.05$), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性显著降低 ($P < 0.05$), 十二指肠和空肠中丙二醛 (MDA) 含量显著降低 ($P < 0.05$); 空肠绒毛长度 (V) 显著增长 ($P < 0.05$), 隐窝深度 (C) 显著降低 ($P < 0.05$), 绒毛长度与隐窝深度比值 (V/C) 极显著升高 ($P < 0.01$); 十二指肠中闭锁蛋白 (Occludin) mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), 回肠中膜周蛋白 (ZO-1) 和 Occludin mRNA 相对表达量也显著上调 ($P < 0.05$); 盲肠内容物细菌 16S rRNA 基因的菌群丰富度指数 (Chao1) 丰度值显著升高 ($P < 0.05$); 盲肠在属水平分类上的主要优势菌群为梭菌属 (*Clostridiales*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 等。结果表明, 兔日粮中添加中草药饲料添加剂能增强机体免疫力和抗氧化能力, 维持肠道黏膜形态的完整, 提高肠道消化酶活性, 改善肠道菌群。

关键词: 复方中草药; 兔; 生长性能; 消化酶; 肠道发育; 肠道微生物

中图分类号: S858.291

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2024)01-0134-10

Effects of Compound Chinese Herbal Medicine on Growth Performance and Intestinal Health in Rabbits

XU Xiangfei^{1,2}, HUANG Pan², CUI Xuemei², JI Quanan², XIAO Chenwen²,
WEI Qiang², HUANG Yee², BAO Guolian^{1,2}, LIU Yan²

(1. College of Animal Science and Technology · College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: To investigate the effects of compound Chinese herbal medicine on the growth performance, immune function, intestinal digestive enzyme activity, antioxidant capacity, intestinal morphology, and intestinal microbiota of rabbits, 72 healthy 5-week-old New Zealand White rabbits were randomly divided into Control group (CN, fed with basic feed) and Chinese herbal medicine group (CM, basic feed supplemented with 600 mg/kg of compound Chinese herbal medicine) with 36 rabbits in each group. The experimental period lasted for 42 days. Feed intake and body weight gain were measured weekly, and average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and feed-to-gain ratio (F/G) were calculated. On days 21 and 42 of the experiment,

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 浙江省“领雁”研发攻关计划项目 (2023C02047); 浙江省重点研发计划项目 (2021C02007, 2021C02068-7); 国家现代农业产业技术体系建设专项基金 (CARS-43-C-2)

作者简介: 徐翔飞 (1997-), 男, 硕士生, 从事动物营养学研究, E-mail: xxf428359139@163.com

通信作者: 鲍国连, E-mail: baoguolian@163.com; 刘燕, E-mail: ly-liuyan@163.com

four healthy rabbits were randomly selected from each group, and blood was collected to detect biochemical and immune indicators. At the end of the experiment (day 42), the small intestine segments were collected, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the enzyme activity and antioxidant indicators of the intestinal mucosa, hematoxylin-eosin (H. E.) staining was performed to observe intestinal villus morphology, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression of tight junction protein mRNA, and high-throughput sequencing was employed to analyze cecal microbial diversity. The results showed no significant differences ($P > 0.05$) in ADFI, ADG, and F/G between the two groups. Compared with the CN group, on day 21 of the experiment, the serum total cholesterol (Tchol) content in the CM group was significantly decreased ($P < 0.01$). On day 42, the CM group exhibited a significant increase in serum immunoglobulin M (IgM) contents and secretory immunoglobulin A (sIgA) contents in the ileal mucosa ($P < 0.05$). Additionally, there was a significant increase in intestinal digestive enzyme activities (α -amylase, trypsin, and chymotrypsin) ($P < 0.05$); increased superoxide dismutase (SOD) activity in the jejunum ($P < 0.05$), decreased glutathione peroxidase (GSH-Px) activity ($P < 0.05$), and significantly reduced malondialdehyde (MDA) contents in the duodenum and jejunum ($P < 0.05$). Furthermore, the CM group exhibited a significant increase in villus length (V) in the jejunum ($P < 0.05$), a significant decrease in crypt depth (C) ($P < 0.05$), and a highly significant increase in the villus height to crypt depth ratio (V/C) ($P < 0.01$). The relative expression of *occludin* mRNA significantly upregulated in the duodenum ($P < 0.05$), and the relative expression of *zona occludens-1* (ZO-1) and *occludin* mRNA in the ileum also significantly upregulated ($P < 0.05$). Moreover, there was a significant increase in the richness index (Chao1) of bacterial communities in cecal contents ($P < 0.05$), with main dominant bacterial genera at the genus level of *Clostridiales* and *Akkermansia*. In conclusion, the addition of compound Chinese herbal medicine to rabbit diets enhanced immunity and antioxidant capacity, maintained the integrity of the intestinal mucosa, increased intestinal digestive enzyme activity, and improved intestinal microbiota.

Key words: compound Chinese herbal medicine ; rabbit ; growth performance ; digestive enzyme ; intestinal development ; intestinal microbiota

Corresponding authors:BAO Guolian , E-mail : baoguolian@163.com , LIU Yan , E-mail : ly-liuyan@163.com

在实际生产中,抗生素在控制病原菌和促进动物生长方面发挥了重要作用^[1]。但抗生素滥用导致的细菌耐药性和食品抗生素残留等问题对动物和公共健康构成了重大威胁^[2]。中草药作为一种天然绿色的饲料添加剂,含有多种活性成分,具有无毒、无耐药性、功能性强、经济实用、不良反应小和无残留等优点,可提高饲料转化率,增强机体抗病能力、抗氧化应激能力和抗菌抗病毒功能,增强动物繁殖性能^[3]。有研究认为,在饲料中合理使用中草药添加剂可以有效提高动物产品的安全性和质量以及动物免疫力^[4]。肠道不仅是消化场所,肠道屏障功能对机体健康也有重要作用,肠道屏障包括肠黏膜上皮、肠道菌群和肠道紧密连接蛋白等。兔的消化系统非常脆弱,故极易患胃肠疾病^[5]。断奶兔腹泻率和死亡率的升高给养兔业带来了严重的经济损失。本试验拟研究复方中草药作为饲料添加剂对兔生长性能以及免疫功能、肠道消化酶活性、抗氧化能力、肠道形态和肠道微生物的影响,为中草药作为替抗添加剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物 本试验在浙江省农业科学院实验动物养殖中心进行,试验开始前对兔笼进行高温消毒,选取 72 只体重相近的 5 周龄健康新西兰大白

兔,预饲养 7 d 后进行试验。试验全程所有兔按分组笼养,自由采食和饮水,每日清理粪便。

1.2 主要试剂和仪器 复方中草药,购自北京生泰尔公司。氯化钠、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾等试剂,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;血清生化和免疫指标检测试剂盒,均购自上海酶联生物科技有限公司;小肠黏膜消化酶和抗氧化酶检测试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;文库制备试剂盒,购自纽英伦生物技术公司。电子天平和电子秤,均购自德国赛多利斯集团;高速冷冻离心机,购自赛默飞世尔科技有限公司;光栅式多功能酶标仪,购自上海美谷分子仪器有限公司;GS200 自动生化分析仪,购自杭州 Genius 电子公司。

1.3 动物分组和处理 将 72 只大白兔随机分成对照组(Control, CN)和中草药组(Chinese herbal medicine, CM),每组 36 只,每组 4 个重复,每个重复 9 只,试验期为 42 d。根据初筛的试验结果选择合适的中草药剂量。CN 组饲喂基础饲料,基础日粮组成和营养水平如表 1 所示;CM 组饲喂混有 600 mg/kg 复方中草药的基础饲料,复方中草药的主要活性成分包含黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*)、山茱萸(*Cornus officinalis*)、杜仲叶提取物(*Eucommia ulmoides* leaf extract)、白头翁(*Cynanchum auriculatum*)和黄柏(*Phellodendron cortex*)。

表 1 基础饲料组成和营养水平
Table 1 Composition and nutrient level of basic diet

饲料组成 Diet composition	含量(%) Percentage	营养水平 Nutrient level	含量 Content
玉米 Corn	14	总能量(kCAL/kg) Total energy	3 826.88
麦麸 Wheat bran	18	粗蛋白(%) Crude protein	13.42
豆粕 Bean meal	8	钙(%) Calcium	1.43
苜蓿草粉 Alfalfa meal	30.67	总磷(%) Total phosphorus	0.51
麦芽根 Malt root	10	赖氨酸(%) Lysine	0.719
统糠 37 Chaff 37	16	蛋氨酸(%) Methionine	0.234
石粉 Limestone	0.83	胱氨酸(%) Cystine	0.268
食盐 NaCl	0.5		
预混剂 Premix ^a	2		

注:a:预混剂为每千克饲料提供 50 mg 铁、10 mg 铜、5 mg 锰、25 mg 锌、0.2 mg 碘、0.15 mg 硒、0.1 mg 钴、6 000 IU 维生素 A、1 000 IU 维生素 D、30 mg 维生素 E、1 μg 维生素 K3、2 mg 维生素 B1、6 mg 维生素 B2、50 mg 维生素 B3、2 mg 维生素 B6、5 mg 泛酸、20 mg 叶酸、50 mg 胆碱和 200 μg 生物素

Note:a:The premix provides per kilogram of diet with 50 mg iron, 10 mg copper, 5 mg manganese, 25 mg zinc, 0.2 mg iodine, 0.15 mg selenium, 0.1 mg cobalt, 6 000 IU vitamin A, 1 000 IU vitamin D, 30 mg vitamin E, 1 μg vitamin K3, 2 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 50 mg vitamin B3, 2 mg vitamin B6, 5 mg pantothenic acid, 20 mg folic acid, 50 mg choline, and 200 μg biotin

1.4 样品采集 试验第 21、42 天,从各组中随机选择 4 只健康兔,通过兔耳动脉采血收集血样,用于血清生化和免疫指标检测。试验结束后(第 42 天),将兔颈椎脱臼处死,从十二指肠到回肠(十二指肠、空肠和回肠)分别剪取 3 cm 的肠段和 5 cm 的肠段各 2 份,2 份 3 cm 肠段经生理盐水洗涤后保存于 -80 ℃,用于肠道消化酶和抗氧化酶检测;1 份 5 cm 肠段置 4% 多聚甲醛固定,用于绒毛形态评估;另 1 份 5 cm 肠段用于收集黏膜样品,保存于 -20 ℃,用于分析肠黏膜紧密连接蛋白的 mRNA 相对表达量。用无菌管采集盲肠内容物,储存在 -80 ℃,用于微生物多样性分析。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 生长性能 每周测定各组兔的采食量和体增重,计算平均日采食量(Average daily feed intake, ADFI)和平均日增重(Average daily gain, ADG),根据公式(1)计算料重比(Feed-to-gain ratio, F/G)。

料重比 = 平均日采食量(g/d) ÷ 平均日增重(g/d) (1)

1.5.2 血清生化和免疫指标 试验第 21、42 天通过兔耳动脉采集 5 mL 血液样品,将血样于 4 ℃、3 000 × g 离心 10 min,收集血清。血清样品送至杭州师范大学附属医院,测定生化指标,包括总胆固醇(Total cholesterol, Tchol)、高密度脂蛋白(High-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)和甘油三酯(Triglyceride, TG)。采用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清中免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)和免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M, IgM),以及肠道黏膜中分泌型免疫球蛋白 A(Secretory immunoglobulin A, sIgA)水平,均按试剂盒说明书进行操作。

1.5.3 小肠黏膜消化酶和抗氧化指标 采用 ELISA 测定小肠黏膜中 α-淀粉酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性;测定小肠黏膜抗氧化指数,包括谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量。

1.5.4 小肠绒毛形态 将于 4% 多聚甲醛溶液中固定超过 24 h 的小肠组织样品切成约 1 cm 的小块包埋切片,进行苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, H. E.)染色。通过光学显微镜观察小肠绒毛长度(Villus length, V)和隐窝深度(Crypt depth, C),每个切片随机选择至少 5 个绒毛和隐窝,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析程序(Image-Pro Plus 6.0 Media Cyber netics, 美国)测量数据后取平均值,计算绒毛长度与隐窝深度比值(V/C)。

1.5.5 肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量 取 50 mg 小肠样品加入 1 mL 裂解液,匀浆后于 3 000 × g 离心 10 min,取 450 μL 上清液,提取总 RNA。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 软件(Thermo Scientific, 美国)评估 RNA 的完整性和纯度。采用实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测膜周蛋白(Zonula occludens-1, ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)和闭合蛋白(Claudin)基因的表达,反应体系(20 μL):2 × TransStart® Tip Green qPCR SuperMix 10 μL, TransStart® II One-step RT Enzyme Mix 0.4 μL, Passive Reference Dye 0.4 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, RNA 模板 1.6 μL, 无 RNA 酶水补足。PCR 循环条件设置:50 ℃ 初始变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 94 ℃ 扩增

5 s,60 ℃ 扩增 34 s,进行 40 个循环。所有样本进行 3 次重复。反应完成后,通过熔解曲线分析 qRT-PCR 产物的纯度。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glycer-

aldehyde 3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的 mRNA 相对表达量^[6]。所有检测基因及其引物信息见表 2。

表 2 紧密连接蛋白基因的 qRT-PCR 引物信息
Table 2 Primer details for tight junction protein genes

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Prime sequence	产物大小(bp) Product size	来源 Accession
ZO-1	F:CCTGCGAAACCCACCAAA R:ATGCTGTCGAAAGGTCAGGG	293	XM_008269782. 1
Claudin	F:GCAAGAGGCCGTATCCAGAG R:AGTCCGTCTCGTAGTGGTCT	193	NM_001089316. 1
Occludin	F:GGAGCAAAAGATGCCGATGG R:AATTGACAGGGGTCAAAGGGT	207	XM_008262320. 1
GAPDH	F:TGTTTGTGATGGGCGTGAA R:CCTCCACAATGCCGAAGT	129	NC_013676. 1

1.5.6 高通量测序分析盲肠微生物多样性 从盲肠内容物样品中提取总基因组 DNA,使用特异性引物(F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3' 和 R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增标准细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区域,使用凝胶提取试剂盒纯化 PCR 产物。使用 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒制备文库,在 Illumina MiSeq 平台(Illumina Technologies,美国) 进行相关测序。过滤后高质量的序列都以 97% 的相似性水平聚类成操作分类单位(Operational taxonomic unit,OTU),在 QIIME2 软件中使用 Naive Bayes 分类器对代表性序列进行注释。通过 α 多样性指数(包括 Chaol 指数、Shannon 指数和 Pielou-e 指数) 评估肠道微生物多样性。

1.5.7 数据分析 试验数据使用 SPSS 19.0 软件进行统计,通过单因素方差分析(One-way ANOVA) 和最小显著差异(Least significant difference,LSD) 进行两两比较。所有数据均表示为“平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)”, $P < 0.05$ 判定为具有显著性差异, $P < 0.01$ 判定为具有极显著性差异意义。使用 GraphPad Prism 8.0 制图。

2 结果

2.1 复方中草药对兔生长性能的影响 由表 3 可知,与对照组相比,中草药组兔的末重、ADG 和 ADFI 有增加趋势,且 F/G 降低,但差异均不显著($P > 0.05$)。结果表明,基础饲料中添加复方中草药对兔的生长性能无显著影响。

2.2 复方中草药对兔血清生化指标的影响 由图 1 可知,在试验第 21、42 天时,基础饲料添加复方中草药对兔血清中 HDL、LDL 和 TG 含量的影响均

不显著($P > 0.05$);与对照组相比,中草药组兔血清中 Tchol 含量在试验第 21 天时极显著降低($P < 0.01$),在试验第 42 天时差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 复方中草药对兔生长性能的影响
Table 3 Effects of compound Chinese herbal medicine on growth performance of rabbits

指标 Indicator	对照组 CN	中草药组 CM
初重(g) Initial dody weight	682. 8 \pm 58. 66	675. 6 \pm 46. 96
末重(g) Final dody weight	1 215 \pm 125. 3	1 221 \pm 108. 2
平均日增重(g) ADG	12. 62 \pm 1. 41	12. 98 \pm 1. 89
平均日采食量(g) ADFI	106. 24 \pm 3. 24	107. 72 \pm 2. 50
料重比 F/G	8. 41 \pm 1. 61	8. 29 \pm 1. 24

2.3 复方中草药对兔免疫指标的影响 由图 2 可见,与对照组相比,中草药组兔血清中 IgG 含量在试验第 21、42 天时均无显著变化($P > 0.05$),血清中 IgM 含量在试验第 42 天时显著提高($P < 0.05$)。试验结束(即第 42 天),与对照组相比,中草药组兔回肠中 sIgA 含量显著升高($P < 0.05$),十二指肠和空肠中 sIgA 含量变化不显著($P < 0.05$)。

2.4 复方中草药对兔小肠黏膜消化酶活性影响 由图 3 可见,与对照组相比,中草药组兔空肠中 α -淀粉酶活性、十二指肠中糜蛋白酶活性和回肠中胰蛋白酶活性均显著升高($P < 0.05$)。

2.5 复方中草药对兔小肠黏膜抗氧化指标的影响 由图 4 可见,与对照组相比,中草药组兔空肠中 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),十二指肠和空肠中

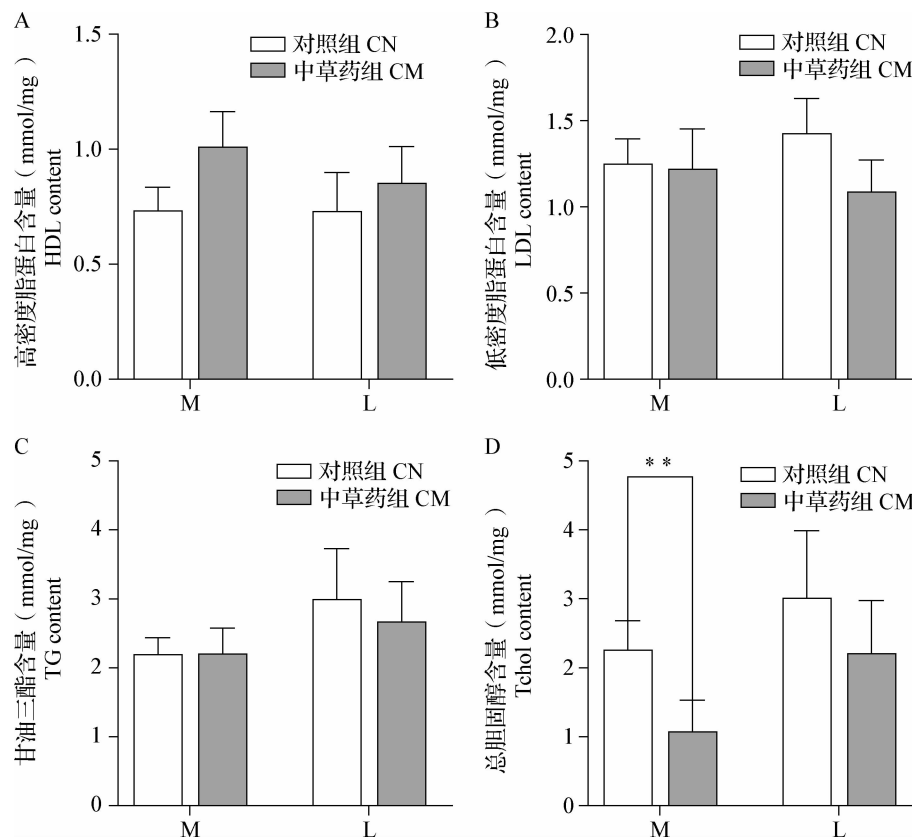


图1 复方中草药对兔血清生化指标的影响

Fig.1 Effects of compound Chinese herbal medicine on serum biochemical indicators of rabbits

A: 高密度脂蛋白含量; B: 低密度脂蛋白含量; C: 甘油三酯含量; D: 总胆固醇含量

M: 试验中期, 即第 21 天; L: 试验末期, 即第 42 天; 与对照组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; 下同

A: High density lipoprotein content; B: Low density lipoprotein content; C: Triglyceride content; D: Total cholesterol content

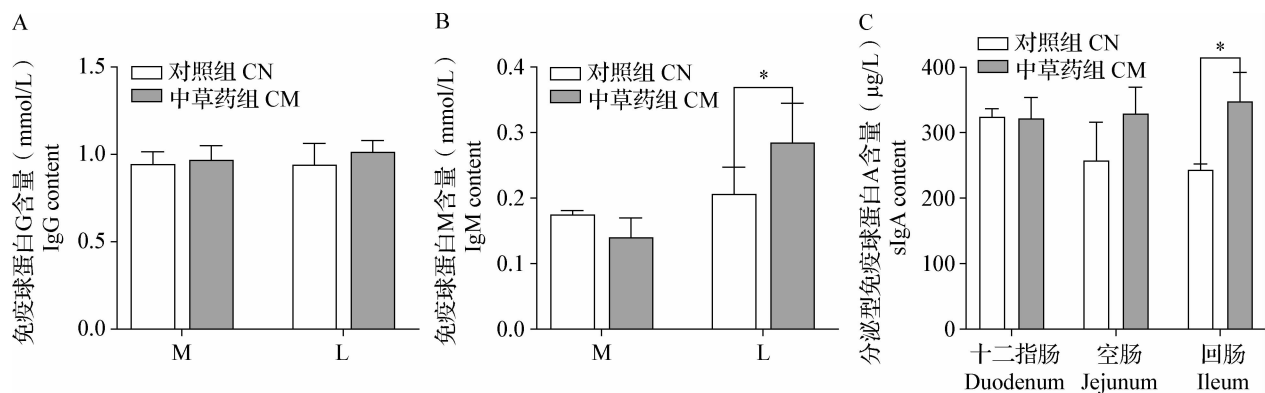
M: Mid-trial, day 21; L: End-trial, day 42; Compared with the CN group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. The same as below

图2 复方中草药对兔免疫指标的影响

Fig.2 Effects of compound Chinese herbal medicine on immune indicators of rabbits

A: 血清中免疫球蛋白 G 含量; B: 血清中免疫球蛋白 M 含量; C: 十二指肠、空肠和回肠的肠道黏膜中分泌型免疫球蛋白 A 含量

A: IgG content in serum; B: IgM content in serum; C: sIgA content in the intestinal mucosa of duodenum, jejunum and ileum

MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 空肠中 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$)。

2.6 复方中草药对兔小肠绒毛形态的影响 由图

5A~5C 可见, 与对照组相比, 中草药组兔空肠的绒毛长度显著增长 ($P < 0.05$), 隐窝深度显著降低 ($P < 0.05$), 绒毛长度与隐窝深度比值极显著升高

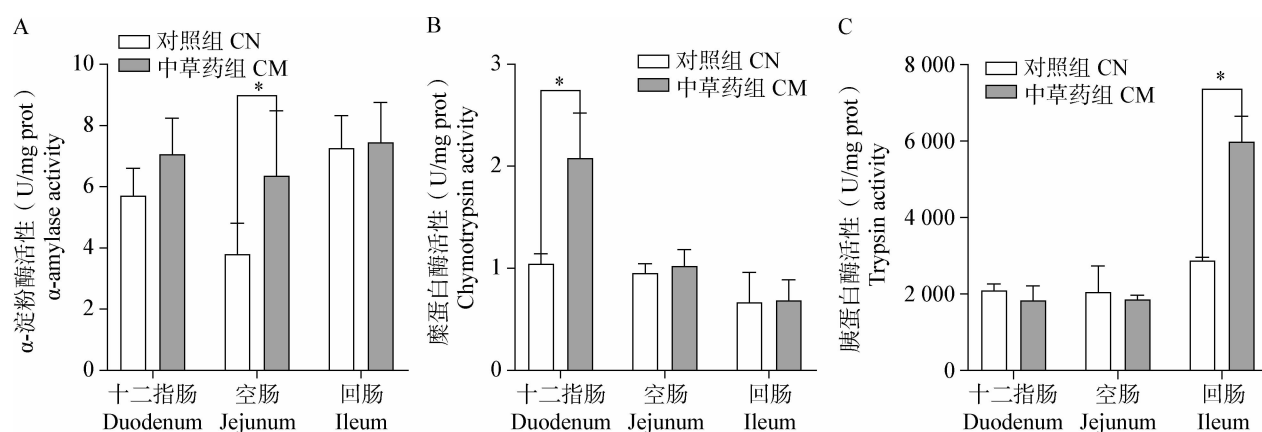


图3 复方中草药对兔小肠黏膜消化酶活性的影响

Fig.3 Effects of compound Chinese herbal medicine on intestinal digestive enzyme activities of rabbits

A:α-淀粉酶活性; B:糜蛋白酶活性; C:胰蛋白酶活性

A:α-amylase activity; B:Chymotrypsin activity; C:Trypsin activity

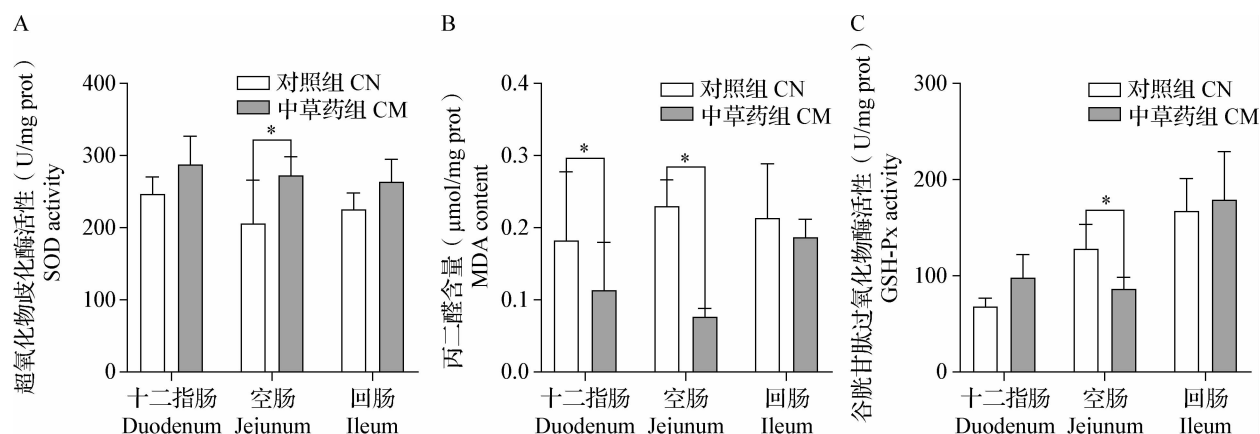


图4 复方中草药对兔小肠黏膜抗氧化指标的影响

Fig.4 Effects of compound Chinese herbal medicine on intestinal mucosal antioxidant indicators of rabbits

A:超氧化物歧化酶活性; B:丙二醛含量; C:谷胱甘肽过氧化物酶活性

A:Superoxide dismutase activity; B:Malondialdehyde content; C:Glutathione oxidase activity

($P < 0.01$)。由图 5D 小肠 H. E. 染色观察可见,对照组兔小肠绒毛出现了明显的断裂和一定程度的损伤,绒毛密度较低;而中草药组兔小肠绒毛生长状态良好,数量较多,密度较大,完整性较好。

2.7 复方中草药对兔肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的影响 如图 6 所示,与对照组相比,中草药组兔十二指肠中 ZO-1 和 Claudin mRNA 相对表达量没有显著变化($P > 0.05$),Occludin mRNA 相对表达量显著上调($P < 0.05$);空肠中 ZO-1、Claudin 和 Occludin mRNA 相对表达量没有显著变化($P > 0.05$);回肠中 ZO-1 和 Occludin mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$),Claudin mRNA 相对表达量无显著变化($P > 0.05$)。

2.8 复方中草药对兔盲肠微生物多样性的影响

通过 Chaol、Shanon 和 Pielou-e 指数分析盲肠微生物的多样性和均匀性,结果如图 7A 所示,与对照组相比,中草药组兔盲肠内容物细菌 16S rRNA 基因的 Chaol 丰度值显著升高($P < 0.05$),Shanon 和 Pielou-e 指数呈增加趋势,但差异不显著($P > 0.05$)。兔盲肠内容物属水平下的菌群分类如图 7B 所示,中草药组兔盲肠中的优势菌群为梭菌属(*Clostridiales*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)、疣微菌属(*Ruminococcaceae*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)、考拉菌属(*Phascolarctobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroidales*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae*)、粪球菌属(*Coprococcus*)、类杆菌属(*Bacteroidetes*)和肠球菌属(*Enterococcus*),其中 *Clostridiales* 和 *Akkermansia* 占比较对照组显著升高($P < 0.05$)。

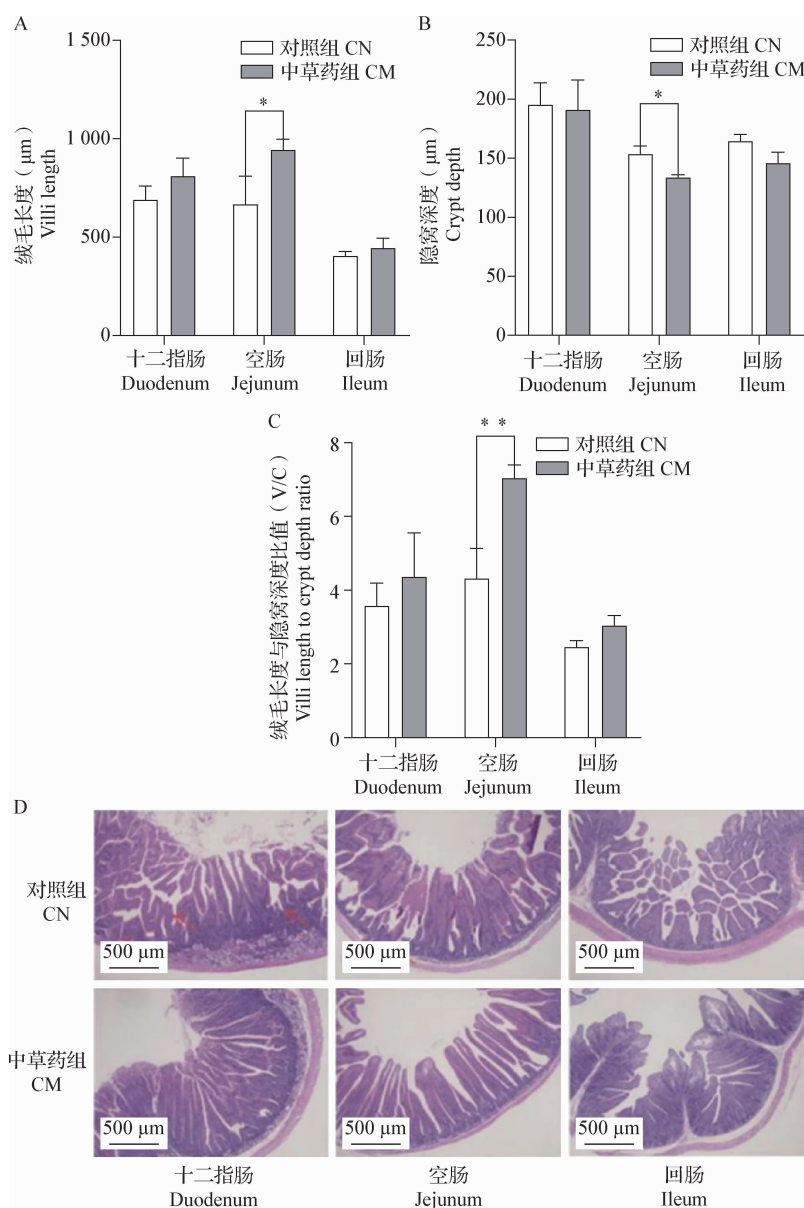


图5 复方中草药对兔小肠绒毛形态的影响

Fig.5 Effects of compound Chinese herbal medicine on intestinal villi morphology of rabbits

A:绒毛长度; B:隐窝深度; C:绒毛长度与隐窝深度比值; D:小肠形态 H. E. 染色观察(40×)

A: Villus length; B: Crypt depth; C: Villus length to crypt depth ratio; D: H. E. staining observation of small intestine morphology (40 ×)

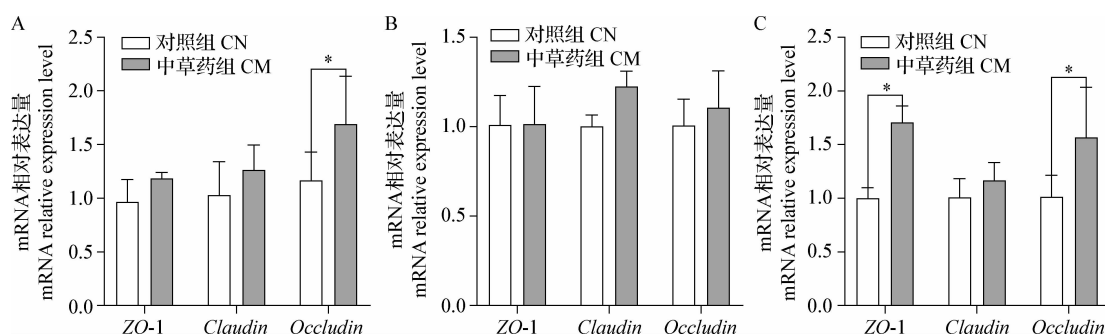


图6 复方中草药对兔肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of compound Chinese herbal medicine on the mRNA relative expression of tight junction protein in rabbit intestinal mucosa

A:十二指肠; B:空肠; C:回肠

A: Duodenum; B: Jejunum; C: Ileum

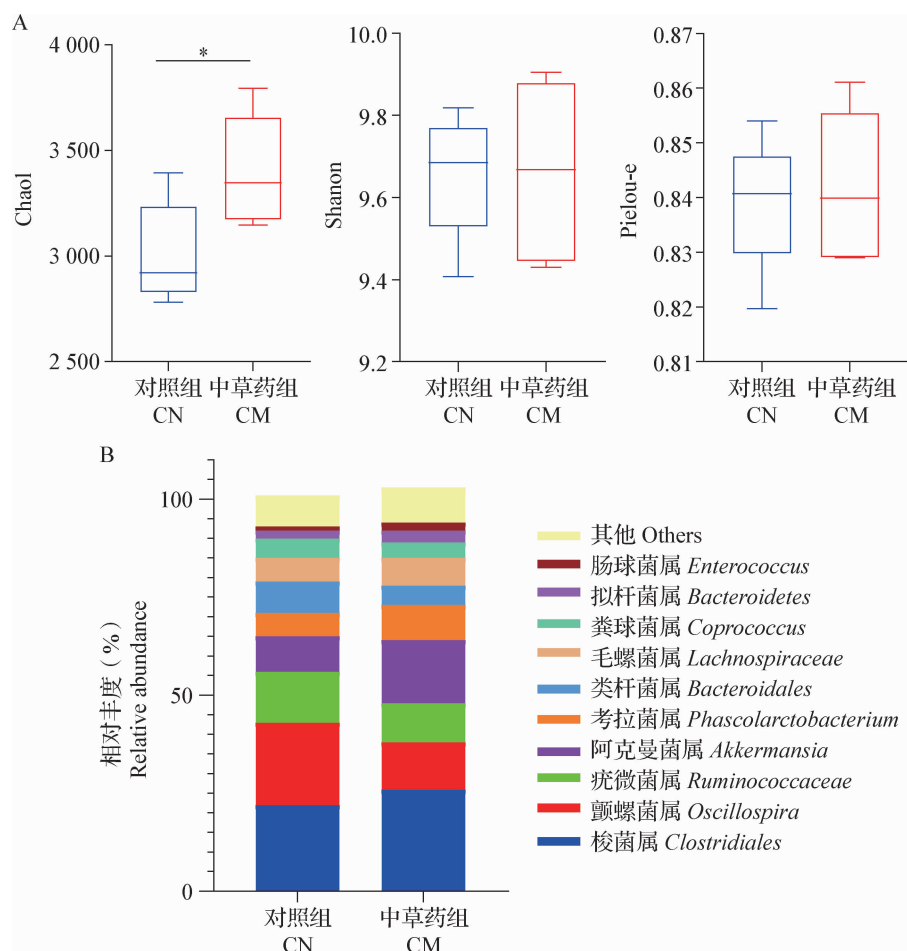


图7 复方中草药对兔盲肠微生物多样性的影响

Fig. 7 Effects of compound Chinese herbal medicine on cecal microbial diversity of rabbits

A:盲肠微生物的多样性和均匀性分析; B:盲肠微生物的菌群分类

A: Diversity and homogeneity analysis of cecal microbiota; B: Classification of cecal microbial flora

3 讨论

随着畜牧行业的快速发展,饲料添加剂和抗生素抗性等问题备受关注。中草药有促进消化酶分泌、提高免疫力和增强食欲等作用,被认为是理想的饲料添加剂^[7]。有研究表明,黄芪多糖可以改善动物肠道健康,提高免疫力,从而提高动物的生长性能^[8]。本试验结果显示,补充复方中草药对兔子的ADG、ADFI和F/G没有显著影响,这与Liu等^[9]的试验结果相同,饲料中添加艾蒿对兔的生长性能没有影响;Zhang等^[10]在肉鸡上应用复方中草药也得到同样的结果。但Yeh等^[11]报道显示,饲料中添加中草药可增加仔猪的ADFI。这些结果表明,中草药对生长性能的影响可能与动物种类、生长周期和中草药使用剂量等有关。

血脂可以反映机体脂类代谢水平,血脂过高与糖尿病、中风、心肌梗死和脂肪肝等一系列疾病密切

相关^[12],临床上通过测定HDL、LDL、TG和Tchol等指标来判断体内血脂水平^[13]。赵香菊等^[14]研究显示,中药水蛭超微粉可降低大耳白兔的血脂。本试验结果显示,饲料中添加中草药可显著降低兔体内Tchol含量,故推测中草药有降低血脂的作用。

血清免疫球蛋白(IgG和IgM)和肠道分泌型免疫球蛋白(sIgA)作为评价动物免疫力的指标,对动物机体健康起着重要作用。王婧等^[15]研究显示,在饲料中添加杜仲、黄芪、党参、山楂和鱼腥草等常见的中草药,可以显著提高断奶仔猪血清中IgG、IgM和IgA抗体含量。在本试验中,中草药组兔血清中IgM含量显著提高,但IgG含量的变化不显著,这可能与中草药配方有关。sIgA作为肠黏膜的主要免疫球蛋白,是肠黏膜的第一道防御线,能抵御各种内源性共生菌和外源性病原菌^[16]。李姣清等^[17]研究发现,饲料中添加复方中草药制剂可使三黄鸡回肠中sIgA分泌量增加30.95%。该结果与本试验结

果一致,中草药组兔回肠黏膜中 sIgA 含量显著增加,表明饲料中添加该中草药配方可有效增强兔肠道的免疫功能。

消化酶能够直接影响营养物质的分解和吸收,从而影响动物的生长性能。淀粉和蛋白质主要由 α -淀粉酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶等消化。本试验发现,饲料中添加中草药显著提高了肠道中 α -淀粉酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性,说明中草药能刺激消化酶的分泌,从而加强对淀粉和蛋白质等营养物质的消化吸收,提高养分利用率,最终提高饲料利用率。动物肠道上皮细胞经常暴露于氧化应激环境中,例如致病菌、摄入的药物、细菌代谢的产物和代谢过程中产生的氧化剂等,这些物质产生的活性氧会导致肠道上皮细胞的氧化损伤。体内活性氧自由基发生变化,会引起机体的生理和病理性反应,从而导致氧化应激^[18]。抗氧化酶可以保护机体免受氧化损伤并增强防御能力。GSH-Px 和 SOD 可去除过氧化物和羟基自由基,保护细胞膜的结构和功能^[19-20]。MDA 是检测脂质过氧化最常用的指标之一。王佳敏等^[21]研究显示,饲料中添加黄芪复方颗粒可显著增加 SOD 活性,降低 MDA 含量。与本试验结果一致,中草药组兔空肠中 SOD 活性显著提高,十二指肠和空肠中 MDA 含量显著降低,表明该中草药配方能够提高兔肠道的抗氧化能力,从而减轻兔断奶应激,这可能与配方中黄芪的抗氧化作用有关^[21]。

小肠是营养物质消化吸收的主要场所,小肠的形态(绒毛高度和隐窝深度)是衡量其消化吸收功能的主要指标。绒毛是小肠吸收营养物质的主要部位,隐窝深度的变化能够反映肠上皮细胞的增殖和发育情况^[22]。有研究表明,添加复方中草药可使仔猪回肠的绒毛高度增加,隐窝深度显著降低^[23]。与本试验结果一致,中草药组兔小肠绒毛长度显著增长,隐窝深度显著降低,绒毛长度与隐窝深度比值显著升高,表明添加中草药后肠道分泌功能提高,吸收能力增强。

紧密连接蛋白是上皮细胞之间的一种粘连复合物,与粘附连接、间隙连接和桥粒共同构成上皮细胞连接复合体,在细胞旁途径发挥重要作用^[22]。紧密连接蛋白是肠屏障的重要组成部分,ZO-1、Occludin 和 Claudin 是细胞间紧密连接的重要蛋白质,紧密连接蛋白与外界环境的相互作用可介导多个信号通路以改变跨上皮通透性,影响肠屏障的完整性,从而引起各种肠道疾病^[23]。杨晋^[24]研究显示,饲料中添加 400 mg/kg 海藻多糖可显著上调

仔猪空肠和回肠中紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 mRNA 表达量。本试验结果显示,中药组兔回肠中 ZO-1 和 Occludin mRNA 相对表达量显著高于对照组。研究表明,Occludin 和 ZO-1 基因的上调可减轻局部炎症,改善肠道屏障通透性^[25]。

动物肠道微生物菌群组成与其居住的生活环境、摄入的营养物质和自身的基因组等相关,菌群积极参与宿主营养代谢、免疫防御和信号传导等。盲肠微生物菌群的数量和密度可影响动物机体对营养物质的消化吸收和肠道健康^[26]。本试验结果显示,中草药组兔盲肠内容物微生物基因的 Chaol 丰度值显著高于对照组,说明添加该中草药配方可以提高兔盲肠微生物多样性;在属水平分类下,中草药组兔盲肠中优势菌群为 Clostridiales、Oscillospira、Ruminococcaceae 和 Akkermansia 等。Clostridiales 和 Oscillospira 是厚壁菌门的成员,它们是严格厌氧菌,能够发酵碳水化合物,为宿主提供营养^[27]。Akkermansia 属于疣微菌门,可改善肠道屏障的完整性^[28]。

综上所述,在基础饲料中添加该复方中草药饲料添加剂对兔的生长性能影响不显著,但可以显著提高兔的肠道消化酶活性和抗氧化能力,增强机体免疫功能,降低血脂,维持肠道形态的完整性以及盲肠内容物微生物的多样性。

参考文献:

- [1] Bacanlı M, Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food[J]. Food Chemical Toxicology, 2019, 125: 462-466.
- [2] Bach Knudsen K E. Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets[J]. Proceedings of Nutrition Society, 2001, 60(3): 291-299.
- [3] Li T, Wang P, Guo W, et al. Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application[J]. ACS Nano, 2019, 13(6): 6770-6781.
- [4] 杨春花. 复方中草药添加剂对肉鸭生长性能与血清生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(17): 35-38.
- [5] Zhu Y, Wang C, Li F. Impact of dietary fiber/starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61(10): 771-784.
- [6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] Ran M, Cha C, Xu Y, et al. Traditional Chinese herbal medicine complex supplementation improves reproductive performance, serum biochemical parameters, and anti-oxidative capacity in periparturient dairy cows[J]. Animal Biotechnology, 2020, 33(4): 1-10.
- [8] Wu S. Effect of dietary Astragalus membranaceus polysaccharide

- on the growth performance and immunity of juvenile broilers[J]. Poultry Sciences,2018,97(10):3489-3493.
- [9] Liu L,Zuo W,Li F. Dietary addition of *Artemisia argyi* reduces diarrhea and modulates the gut immune function without affecting growth performances of rabbits after weaning[J]. Animal Sciences,2019,97(4):1693-1700.
- [10] Zhang P F,Shi B L,Su J,et al. Relieving effect of *Artemisia argyi* aqueous extract on immune stress in broilers[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl),2017,101(2):251-258.
- [11] Yeh H S,Weng B C,Lien T F. Effects of Chinese traditional herbal medicine complex supplementation on the growth performance,immunity and serum traits of pigs[J]. Animal Sciences,2011,82(6):747-52.
- [12] 苏蓉,于德水. 高脂血症的危害及防治[J]. 中国当代医药,2009,16(8):128-129.
- [13] 王敏,魏益民,高锦明. 苦荞胚油对高脂血大鼠血脂及脂质过氧化作用的影响[J]. 中国粮油学报,2006(4):45-49.
- [14] 赵香菊,王留. 中药水蛭超微粉对大耳白兔血脂代谢的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(23):174-176.
- [15] 王婧,陈晓兰,王姐姐,等. 中草药添加剂对断奶仔猪生长性能和免疫功能影响的研究[J]. 中国饲料,2018(20):32-35.
- [16] Mantis N J,Rol N,Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut[J]. Mucosal Immunology,2011,4(6):603-611.
- [17] 李姣清,余史婷,况伟,等. 饲料中添加复方中草药制剂对三黄鸡生长性能和肠道健康的影响[J]. 中国饲料,2021(11):55-59.
- [18] Muri J,Kopf M. Redox regulation of immunometabolism[J]. Nature Review. Immunology,2021,21(6):363-381.
- [19] Wang Y B,Du W,Fu A K,et al. Intestinal microbiota and oral administration of *Enterococcus faecium* associated with the growth performance of new-born piglets[J]. Beneficial Microbes,2016,7(4):529-538.
- [20] Liu P,Zhao H,Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi):a well-known Chinese tonic[J]. Aging and Disease,2017,8(6):868-886.
- [21] 王佳敏,王延东,梁锐,等. 饲料中添加黄芪复方颗粒对肉鸡生长、免疫及抗氧化功能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2020,56(8):199-203.
- [22] 闫炎,孟凡茹,魏语泽,等. 肠道紧密连接及调控通路研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2022,59(1):44-49.
- [23] 侯海锋,李茜. 发酵中草药渣对断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响[J]. 中国饲料,2017(21):21-24.
- [24] 杨晋. 海藻多糖替代抗生素对断奶仔猪生长性能和肠道屏障功能的影响[D]. 南昌:江西农业大学,2019.
- [25] 温雪婷,肖英平,吕文涛,等. 肉鸡肠道紧密连接蛋白基因表达的发育性变化[J]. 动物营养学报,2020,32(10):4963-4971.
- [26] 郭贵海,王崇文. 肠道菌群调节剂的研究进展[J]. 临床内科杂志,2002(2):88-90.
- [27] Konikoff T,Gophna U. *Oscillospira*: a central, enigmatic component of the human gut microbiota[J]. Trends Microbiology,2016,24(7):523-524.
- [28] Dao M C,Everard A,Aron-wisnewsky J,et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology[J]. Gut,2016,65(3):426-436.

基于网络药理学和分子对接分析 车前草防治畜禽腹泻的作用机制

韦国旺¹, 黄甫克¹, 胡湘云², 盛 双³, 韦良炬¹, 韦宣亦⁴

(1. 广西河池市科学技术情报研究所, 广西 河池 547000; 2. 广西农业职业技术大学畜牧研究院, 广西 南宁 530007;
3. 广西河池市技术开发中心, 广西 河池 547000; 4. 广西河池市技术市场服务中心, 广西 河池 547000)

摘要:为了运用网络药理学和分子对接技术分析车前草的药理活性及其防治畜禽腹泻的作用机制,本试验利用传统中药系统药理学分析平台(TCMSP)获得车前草的有效活性成分和靶点,利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建车前草-活性成分-靶点网络;通过 GeneCards 和 OMIM 数据库查询腹泻疾病靶点,提取药物与疾病交集靶点;通过 STRING 数据库对交集靶点进行蛋白质相互作用网络(PPI)分析,使用 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化处理绘制 PPI 图;利用 DAVID 数据库对靶点进行富集分析;通过分子对接技术对有效活性成分和关键靶点进行对接验证。结果显示,车前草活性成分有木犀草素、黄芩素、豆甾醇、高车前素、6-羟基木犀草素、谷甾醇和黄芩苷,可作用于 α -丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、肿瘤蛋白 P53(TP53)、肿瘤坏死因子(TNF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(CASP3)、白细胞介素 6(IL-6)、表皮生长因子受体(EGFR)、细胞周期蛋白 D1(CCND1)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)等关键靶点;GO 功能富集分析显示与生物过程相关的条目 154 条,与细胞组分相关的条目 55 条,与分子功能相关的条目 105 条;KEGG 通路条目 82 条,主要参与调控癌症和磷脂酰肌醇-3 激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PI3K-AKT)信号通路;车前草的有效活性成分木犀草素和黄芩素与关键靶点 AKT1 可稳定结合。结果表明,车前草可以通过木犀草素、黄芩素、豆甾醇和高车前素等多种活性成分作用于 AKT1、TP53、TNF、CASP3 和 IL-6 等关键靶点上,通过参与多种癌症和 PI3K-AKT 信号通路的调控防治畜禽腹泻。

关键词:车前草;腹泻;网络药理学

中图分类号:S859.7

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)03-0119-07

Mechanisms of *Plantago asiatica* L. in the Prevention and Treatment of Livestock and Poultry Diarrhea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

WEI Guowang¹, HUANG Fuke¹, HU Xiangyun², SHENG Shuang³, WEI Liangju¹, WEI Xuanyi⁴

(1. Guangxi Hechi Institute of Science and Technology Information, Hechi 547000, China; 2. Institute of Animal Husbandry, Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530007, China; 3. Guangxi Hechi Technology Development Center, Hechi 547000, China; 4. Guangxi Hechi Technology Market Service Center, Hechi 547000, China)

Abstract: In order to analyze the pharmacological activity and the mechanism of *Plantago asiatica* L. in preventing and treating livestock and poultry diarrhea using network pharmacology and molecular docking technology, this study utilized the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) analysis platform to obtain active components and targets of *Plantago asiatica* L. *Plantago asiatica* L.-active component-target network was constructed using Cytoscape 3.7.1 software. Targets related to diarrhea diseases were obtained from the GeneCards and OMIM databases, and the intersection targets between drugs and diseases were extracted. The protein-protein interaction network (PPI) analysis of intersection targets was conducted using the STRING database, and the PPI network was visualized and processed using Cytoscape 3.7.1 software. Enrichment analysis of targets was performed using the DAVID database. Molecular docking technology was employed to dock and verify the active components and key targets. The results showed that the active components of *Plantago asiatica* L. included luteolin, baicalin, stigmasterol, dinatin, 6-hydroxyluteolin, sitosterol, and baicalin. These components acted on key targets such as AKT1, TP53, TNF, CASP3, IL-6, EGFR, CCND1, and MMP9. Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed 154 entries related to biological processes, 55 entries related to cellular components, and 105 entries related to molecular functions. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

收稿日期:2023-04-06

基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目(桂科 AA19254007);河池市本级科技计划项目(河科 A1842-1-1.1)

作者简介:韦国旺(1972-),男,高级经济师,本科,主要从事科技开发与技术经济研究,E-mail:25767434@qq.com

通信作者:胡湘云,E-mail:821995274@163.com

pathway analysis identified 82 entries, primarily involved in the regulation of cancer and the phosphatidylinositol 3-kinase-serine/threonine-protein kinase (PI3K-AKT) signaling pathway. The effective active components luteolin and baicalin of *Plantago asiatica* L. can stably bind to the key target AKT1. The results indicate that *Plantago asiatica* L., through active components such as luteolin, baicalin, sitosterol, and dinatin, acts on key targets including AKT1, TP53, TNF, CASP3, and IL-6. This involvement in various cancer-related and PI3K-AKT signaling pathways contributes to preventing and treating livestock and poultry diarrhea.

Key words: *Plantago asiatica* L. ; diarrhea ; network pharmacology

Corresponding author: HU Xiangyun , E-mail : 821995274@163.com

畜禽腹泻是由多种病因(病毒性、细菌性、寄生虫性等)引起的常见肠道性疾病,其发病率高,对畜禽健康危害大,会造成畜禽营养不良、生长发育障碍,给畜牧业带来严重的经济损失^[1]。而生产上常使用抗生素治疗畜禽腹泻,可能导致耐药性、药物残留和环境污染等问题,随着“无抗”时代的到来,根据中兽医“治未病”的理论,在饲料中添加药食同源的天然植物为最佳的替抗方案^[2]。

车前草(*Plantago asiatica* L.)属车前科车前属,是《中华人民共和国药典》收录的常用中药,在我国黑龙江、河北、江苏、广西和海南等大部分地区广泛分布,该药价格低廉,具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗腹泻等生物学功能^[3]。《中华人民共和国药典》记载了车前草具有良好的抗腹泻作用。研究发现,车前草可以有效缓解蓖麻油诱导的小鼠腹泻^[1],其多糖有抗仔猪腹泻效应^[4],生产上在牛日粮中添加车前草干粉可以治疗胃肠疾病^[3]。然而,目前关于车前草防治畜禽腹泻有效活性成分及其作用机制的系统研究鲜有。因此,本试验通过网络药理学和分子对接技术分析车前草防治畜禽腹泻的有效活性成分及潜在作用机制,以期在生产上更有效利用车前草及进一步机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 车前草有效活性成分和靶点的筛选 通过传统中药系统药理学分析平台(The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)查询“车前草”,设置口服生物利用度(Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 筛选车前草有效活性成分和靶点,同时通过蛋白质信息数据库 Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)进行蛋白名称的标准化转化,之后将车前草、车前草有效活性成分和靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建车前草-活性成分-靶点网络。

1.2 腹泻靶点和交集靶点的获取 在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和在线人类

孟德尔遗传数据库(Online medelian inheritance in man, OMIM)(<https://www.omim.org/>)查询“diarrhea”,搜集腹泻相关靶点合并去重,绘制韦恩图,提取药物与疾病交集靶点作为车前草治疗畜禽腹泻的潜在作用靶点。

1.3 蛋白相互作用网络的构建和关键靶点的获取

为明确各靶点间的相互作用,将 1.1 获得的车前草有效活性成分和 1.2 获得的药物和腹泻疾病交集的靶点导入 STRING 数据库(<http://string-db.org/>),选择置信度 ≥ 0.700 (high),构建蛋白质相互作用网络(Protein-protein interaction network, PPI),将产生的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化分析,利用其“Network Analyzer”功能分析网络拓扑特征,得到 PPI。

1.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 将车前草作用于腹泻的靶点通过注释、可视化和综合发现数据库(The database for annotation, visualization and integrated discovery, DAVID)(<http://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,通过设置 $P < 0.05$ 筛选 GO 条目和 KEGG 通路,并通过微信在线平台(www.bioinformatics.com.cn)对结果进行可视化处理。

1.5 活性成分和关键靶点的分子对接验证 在 TCMSP 数据库下载车前草有效活性成分结构,在蛋白质结构数据库(Protein data bank, PDB)(<http://www.rcsb.org/>)下载关键靶点的蛋白结构,以 PDB 格式保存。经过 Autodock Vina 软件对蛋白进行脱水、加氢键等处理后,进行分子对接。

2 结 果

2.1 车前草有效活性成分和靶点的筛选 基于 TCMSP 数据库得到车前草的 10 个有效活性成分,去除无靶点的成分,最终获得 7 个有效活性成分,分别为木犀草素(Luteolin)、黄芩素(Baicalein)、高车前素(Dinatin)、6-羟基木犀草素(6-hydroxyluteolin)、

谷甾醇 (Sitosterol)、黄芩苷 (Baicalin) 和 豆甾醇 (Stigmasterol), 合并去重共获得 113 个靶点。通过 Cytoscape 3. 7. 1 软件构建车前草-活性成分-靶点网络, 结果见图 1, 网络中共涉及 121 个节点 (1 个中药、7 个活性成分和 113 个药物作用靶点) 和 159 条连线。以节点的度值代表与节点连接的连线的数目,

将其大小作为相互作用的衡量标准, 这 7 个活性成分的度值分别为木犀草素 57、黄芩素 37、豆甾醇 31、高车前素 17、6-羟基木犀草素 6、谷甾醇 3、黄芩苷 2。连接度值越高, 说明该成分的作用靶点越多, 为关键成分, 结果表明, 度值比较高的木犀草素、黄芩素、豆甾醇和高车前素为车前草治疗腹泻的关键活性成分。

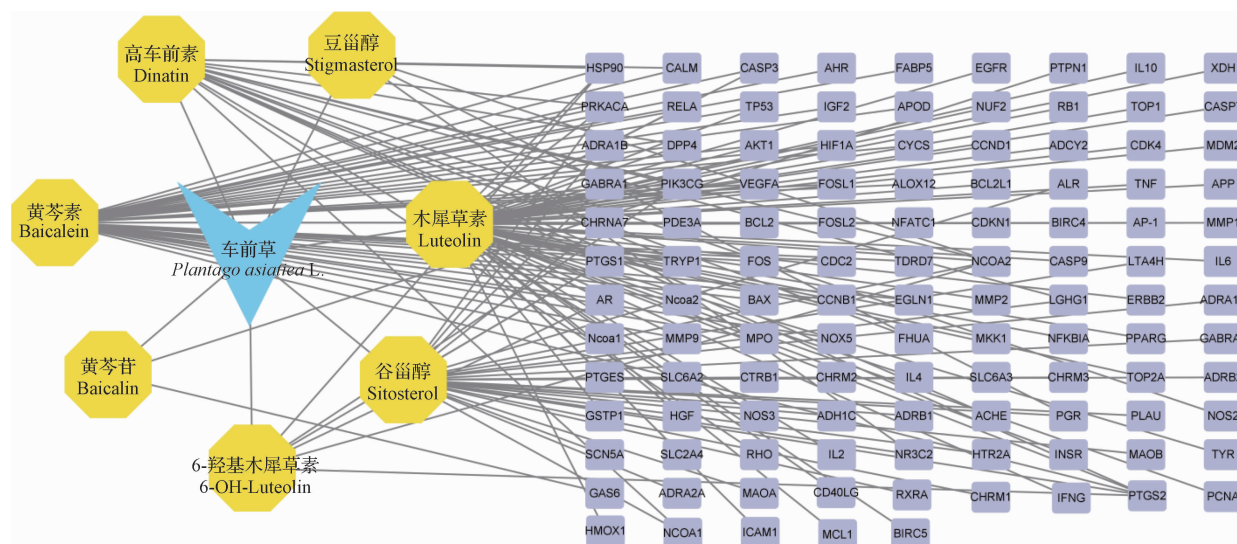


图 1 车前草-活性成分-靶点网络图

Fig. 1 *Plantago asiatica* L. -active component-target network

黄色节点: 车前草活性成分; 紫色节点: 车前草作用靶点; 连线: 活性成分和靶点间的相互作用关系

Yellow nodes: Active components of *Plantago asiatica* L.; Purple nodes: Targets of *Plantago asiatica* L.;

Connections: Interaction relationships between active components and targets

2.2 腹泻靶点和交集靶点的获取 通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库获得腹泻靶点 6 073 个, 将车前草作用靶点与疾病靶点取交集, 共获得 84 个交集基因 (图 2)。

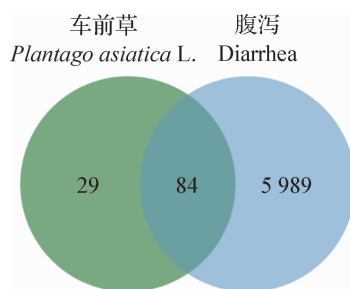


图 2 车前草活性成分靶点与腹泻靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of *Plantago asiatica* L. active compound targets and diarrhea targets

2.3 蛋白相互作用网络的构建和关键靶点的获取 通过 STRING 数据库构建 PPI, 选择置信度 ≥ 0.700 (high), 去除游离靶点, 共得到 84 个节点和 375 条边, 平均节点度为 8.93。将所获得的 STRING 数据导入 Cytoscape 3. 7. 1 绘制同心圆 PPI 网络图 (图 3),

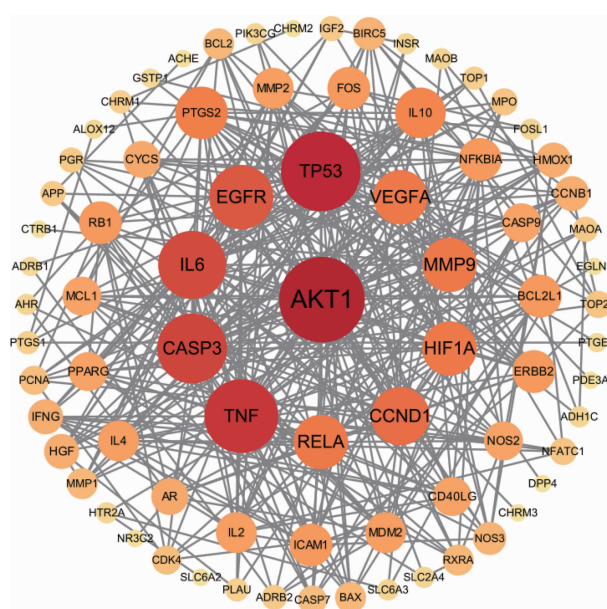


图 3 车前草核心靶点同心圆 PPI 网络图

Fig. 3 Core target concentric PPI network of *Plantago asiatica* L.

节点: 作用靶点; 连线: 蛋白间相互作用

Nodes: Action targets; Connections: Protein-protein interactions

各节点表示作用靶点,其颜色越深,半径越大,说明度值越大,相互作用越强。其中,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Serine/threonine-protein kinase 1, AKT1) 度值最大(36),位于同心圆中心,其次是肿瘤蛋白 P53 (Tumor protein p53, TP53) (31)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) (30)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3, CASP3) (28)、白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) (27)、表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) (25)、细胞 G1/S 期特异细胞周期蛋白 D1 (G1/S-specific cyclin-D1, CCND1) (22)、基质金属蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP9) (20) 等,以上可能是车前草治疗畜禽腹泻的关键靶点。

2.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 将 2.3

获得的 84 个靶点通过 DAVID 数据库分析得 GO 功能富集条目 314 条,其中生物过程 (Biological process, BP) 154 条,细胞组分 (Cellular component, CC) 55 条,分子功能 (Molecular function, MF) 105 条,分别取 P 值由小到大的前 10 个条目进行可视化处理 (图 4),可见车前草通过调控细胞凋亡、增殖和转录等过程发挥作用。筛选得到 KEGG 通路条目 82 条,取 P 值较小的前 20 个条目绘制显著性气泡图 (图 5),气泡颜色越红代表富集程度越高,气泡越大代表富集基因数越多,可见车前草通过调控癌症通路和磷脂酰肌醇-3 激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase-serine/threonine-protein kinase, PI3K-AKT) 信号通路等多种信号通路发挥作用。

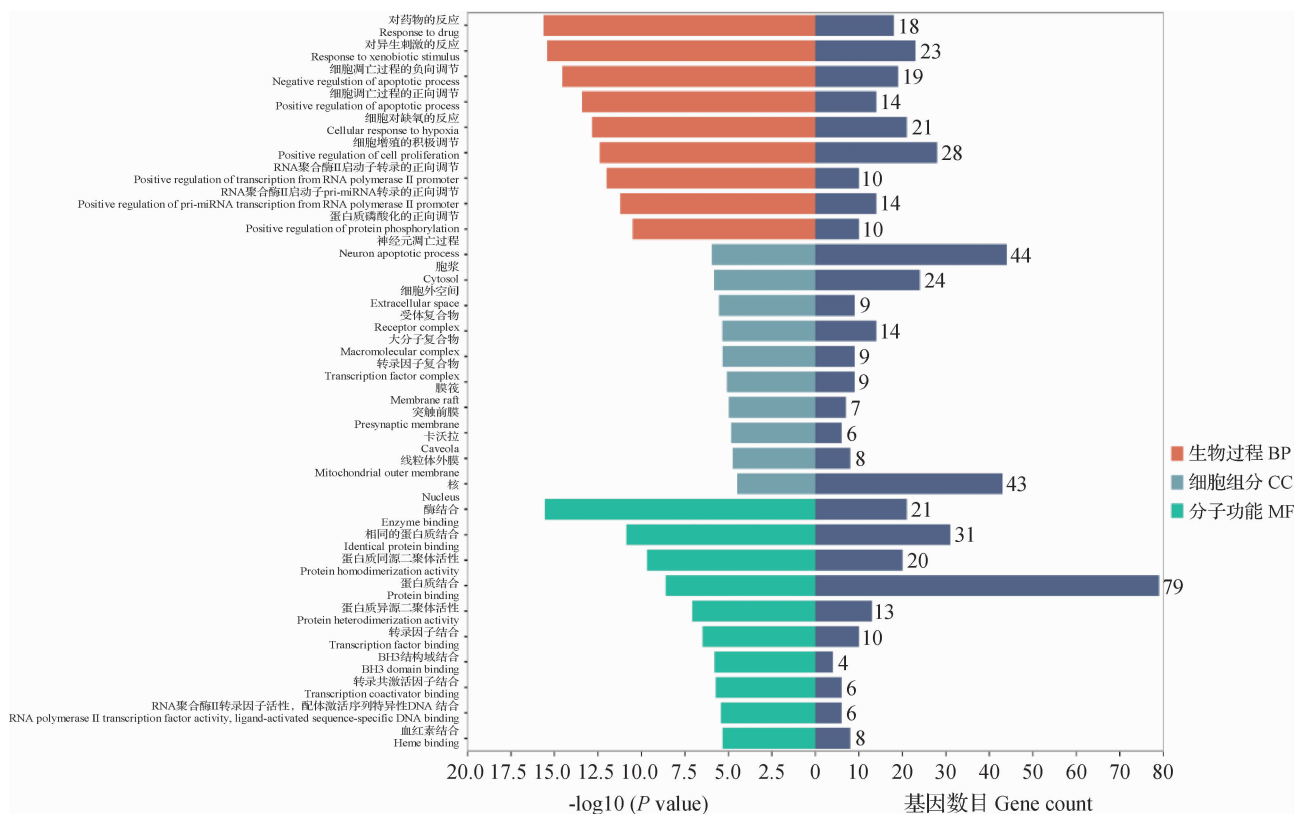


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis

2.5 活性成分和关键靶点的分子对接验证 将车前草排名前二的有效活性成分木犀草素、黄芩素与 PPI 排名第一的作用靶点 AKT1 进行分子对接分析 (图 6), 木犀草素与 AKT1 对接结合能为 -9.654 kJ/mol, 黄芩素与 AKT1 对接结合能为 -9.493 kJ/mol。结合能小于 0 表明两者可以自由结合, 结合能越低, 表明活性成分和关键靶点的结合越稳定。

3 讨论

本试验根据 TCMSP 数据库,筛选到车前草通过活性成分木犀草素、黄芩素、豆甾醇和高车前素发挥治疗腹泻的作用。以往的研究发现,这几种成分都有抗炎、免疫调节和抗菌等药理作用。木犀草素能够下调 *TNF* 和 *IL-6* 等基因表达来保护肠黏膜屏障^[5,6], 不仅能减轻试验小鼠的结肠炎症状,还能上

调肌酸激酶活性以增加钠离子和钾离子浓度,减少肠内容物体积和重量,发挥抗腹泻作用^[7]。黄芩素能抑制小鼠结肠炎,还可通过提高凋亡蛋白浓度导致癌细胞发生自噬,或通过 PI3K-AKT 信号通路诱导细胞自噬来发挥抗癌作用^[8-9]。豆甾醇属于类固

醇,类似于甾体类激素,可以降低仔猪腹泻率^[10]。高车前素具有较好的治疗腹泻的作用,能显著减少蓖麻油诱导小鼠腹泻模型的腹泻次数^[11-12]。综上,车前草的多种活性成分都具有治疗畜禽腹泻的作用。

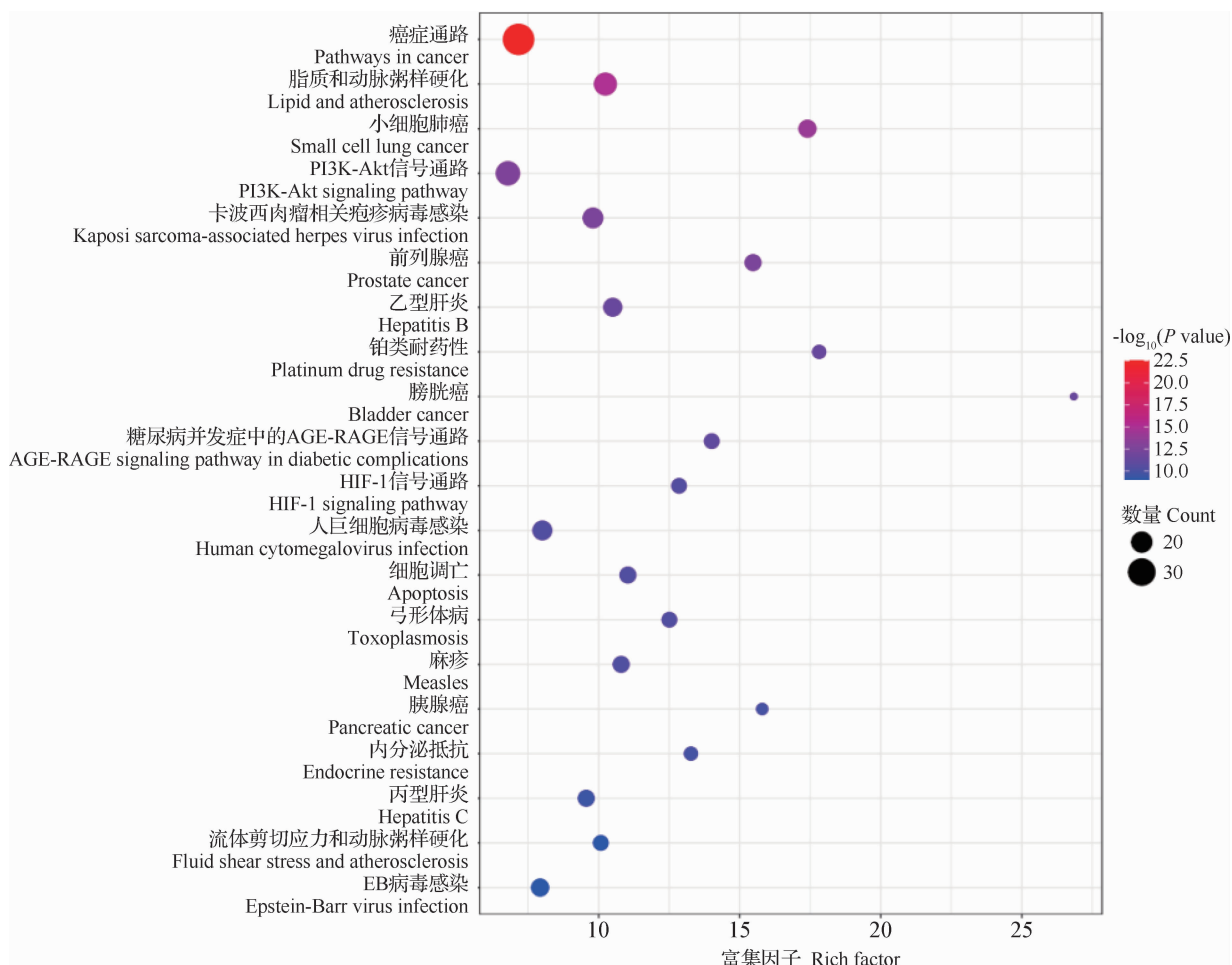


图5 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

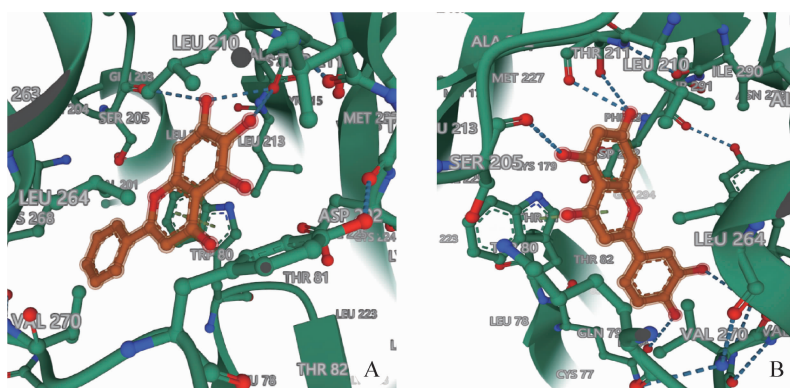


图6 有效活性成分与关键靶点的分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking pattern diagram of effective active components and key targets

A: 木犀草素-AKT1; B: 黄芩素-AKT1
A: Luteolin-AKT1; B: Baicalein-AKT1

通过构建车前草有效活性成分和腹泻交集靶点的 PPI 图分析筛选出度值大的靶点,即为车前草治疗腹泻的关键靶点,其中,AKT1 可参与体内葡萄糖的吸收转运,调控细胞自噬和凋亡等生物过程,其被 PI3K 磷酸化后能调控促炎因子 TNF 和 IL-6 的释放^[13],促炎因子可上调 *MMP9* 基因表达量^[14],参与机体炎症反应,通过调控肠道稳态和肠细胞自噬过程调节肠道炎症和胃癌等疾病的发生发展^[15-16]。而 *CCND1*、*EGFR*、*TP53* 和 *CASP3* 共同参与调节细胞生长、增殖和凋亡等过程。*EGFR* 与细胞外调节蛋白激酶通路 (Extracellular regulated protein kinases 1/2, *ERK* 1/2),诱导与细胞周期和增殖相关基因表达,同时能刺激 DNA 结合蛋白酶反应,导致炎症反应,影响肠屏障,最终引起腹泻^[17-18]。*CCND1* 和 *TP53* 在细胞周期调控中起重要作用,炎症可诱导 *TP53* 突变,使其过度表达引起细胞异常增殖,导致胃癌和肠癌等多种癌症的发生^[19-20]。*CASP3* 是半胱氨酸蛋白酶家族中的重要成员,为细胞凋亡过程关键酶,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,可诱导细胞发生凋亡,还与癌症发生相关^[21]。由此推测,车前草主要通过以上关键靶点通过调控炎症发生和细胞生长共同发挥止泻作用。

GO 功能富集结果显示,车前草可能通过对药物的反应、对异生外刺激的反应、调节细胞凋亡和转录过程、对细胞增殖的积极调节等来治疗腹泻。KEGG 通路富集分析结果显示,车前草作用于腹泻的关键靶点主要富集于:(1)与疾病有关的信号通路:癌症、脂质和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、乙型肝炎等,提示其关键靶点与多种癌症通路相关,腹泻是胃癌和肠癌等多种癌症的临床表现之一,同时胃肠炎症也会诱导肿瘤的发生^[22];(2)与细胞生物过程相关的信号通路:PI3K-Akt 信号通路和缺氧诱导因子-1 (Hypoxia inducible factor-1, *HIF-1*) 信号通路等。PI3K-Akt 信号通路能调控细胞凋亡和细胞自噬等多种生物过程,该通路被激活后能磷酸化凋亡蛋白 Bax,使其丧失活性,同时 PI3K/Akt 还是肿瘤细胞重要的信号通路,参与调节胃癌和肠癌等肿瘤发生发展过程,通过调控细胞因子的释放在肠道炎症反应中发挥重要作用^[23-24]。*HIF-1* 是一种缺氧信号通路,参与细胞外基质形成和血管新生,可以调节肠道功能和保护肠道屏障,还与炎症性肠病的发生相关^[25]。因此,车前草可能通过以上通路保护胃肠道屏障,减少炎症反应,调控细胞自噬和凋亡过程以发挥抗腹泻作用。然而,脂质和动脉粥样硬化等部分疾病通路是

否与腹泻相关,还需要进一步验证。

活性成分和关键靶点的分子对接结果显示,车前草的有效活性成分木犀草素和黄芩素,与关键靶点 AKT1 的结合能均小于 0 kJ/mol,初步证实车前草有效活性成分与关键靶点可稳定结合,且结合力良好,提示木犀草素和黄芩素通过作用于 AKT1 从而发挥止泻功能。

综上所述,本试验通过网络药理学方法获得车前草主要活性成分为木犀草素、黄芩素、豆甾醇和高车前素等,活性成分作用于 AKT1、*TP53*、TNF、*CASPS* 和 IL-6 等靶点,通过干预癌症、PI3K-Akt 信号通路和 *HIF-1* 信号通路在机体发挥抗腹泻作用,这为阐明车前草的药理活性及其防治畜禽腹泻的作用机制提供理论支撑,为进一步挖掘车前草的功能和拓宽其应用提供研究思路。

参考文献:

- [1] 任涌志,高凌飞,王小婷,等. 车前草水提物抗腹泻作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(18):168-170.
- [2] 张吉鹏. 非洲猪瘟常态化下,车前草的营养活性及其在饲料替抗组学产品中的保健应用[J]. 猪业科学,2021,38(10):80-83.
- [3] 董世鹏,孙晶晶,宁小萌,等. 车前草提取物的生物学作用及其在动物生产中的应用研究[J]. 饲料研究,2022,45(14):150-153.
- [4] 田明,何鑫森,冯艳忠,等. 车前草多糖抗仔猪腹泻效应的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(6):118-121.
- [5] 李越. 木犀草素对葡聚硫酸钠诱导的小鼠实验性结肠炎的防治作用[D]. 武汉:武汉大学,2018.
- [6] 王碧莹. 木犀草素对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞损伤的保护机制及其在杨树花种提取与富集工艺的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2019.
- [7] 秦跃. 车前草超微粉的制备、质量鉴定及抗腹泻作用探究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [8] 郑敏敏,柳洁,赵清. 药用植物黄芩的生物学研究进展及展望[J]. 生物技术通报,2023,39(2):1-14.
- [9] 邵晓晓,王伟中,马国龙,等. 黄芩素通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对小鼠结肠炎的干预作用[J]. 温州医科大学学报,2022,52(11):861-867.
- [10] Hu Q,Zhuo Z,Fang S,*et al.* Phytosterols improve immunity and exert anti-inflammatory activity in weaned piglets[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2017,97(12):4103-4109.
- [11] 陈春林,王健,戈悦欣,等. 高车前素药理作用研究进展[J]. 宜春学院学报,2019,41(12):17-20.
- [12] 任涌志. 车前草抗蓖麻油诱导腹泻有效成分的筛选[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [13] Zhu Y,Shi Y,Ke X,*et al.* RNF8 induces autophagy and reduces inflammation by promoting AKT degradation via ubiquitination in ulcerative colitis mice[J]. The Journal of Biochemistry,2020,168(5):445-453.
- [14] 寇明星. 猪 *MMP7* 和 *MMP9* 基因组织表达模式及其与哺乳仔

- 猪腹泻的关联分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [15] Ruder B, Atreya R, Becker C. Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8):1887.
- [16] Waldner M J, Foersch S, Neurath M F. Interleukin-6-a key regulator of colorectal cancer development [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 8(9):1248-1253.
- [17] Sipos F, Muzes G, Valcz G, *et al.* Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis [J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(4):440-448.
- [18] Eissa N, Hussein H, Mesgna R, *et al.* Catestatin regulates epithelial cell dynamics to dynamics to improve intestinal inflammation [J]. *Vaccines*, 2018, 6(4):67.
- [19] 刘健, 王沐廷. 细胞周期蛋白 D1 在乳腺癌、结直肠癌及食管癌中的研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2023, 20(1):165-169.
- [20] Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function [J]. *Frontiers in Bioscience Landmark*, 2000, 5(3):424-437.
- [21] 尹德恩, 李讨讨, 蒋海涛. 湖羊 *CASP3* 基因的序列分析及其再临床型乳腺炎乳腺组织中的表达特征 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(1):12-19.
- [22] 张渊智, 李世荣, 盛剑秋, 等. 594 例原发性结直肠癌患者的临床流行病学研究 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2010, 19(2):103-107.
- [23] 田忠, 夏婧, 王新颖. PI3K/Akt 信号通路及其在鼻咽癌发生发展中的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(4):678-680.
- [24] 成慧娟, 吕小平. PI3K-AKT 信号转导通路与炎症性肠病关系的研究进展 [J]. *广东医学*, 2014, 35(2):297-299.
- [25] 唐含林. 肠上皮细胞来源的 HIF-1 α 在炎症性肠病中的保护作用及机制研究 [D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.

(责任编辑 冯 茹)

枳椇子黄酮的含量测定及其 抗氧化作用的分子机制

刘菁华^{1,2}, 骆洁雅¹, 郭鹏¹, 叶子¹, 杨娟¹, 王柯琪¹, 严湘儒¹, 杨盛刚³, 黄劲^{1,2}

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学贵州省病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:为了测定枳椇子黄酮的含量并探究其抗氧化作用的潜在机制。本试验以枳椇子为原料,采用醇提法提取其黄酮成分,通过紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量,并进一步采用 CavityPlus 和分子对接分析枳椇子黄酮与超氧化物歧化酶(SOD)相互作用的位点、氨基酸残基和化学键。结果显示:枳椇子总黄酮含量为 8.23 mg/g;枳椇子黄酮主要成分可能结合于 SOD 同源二聚体交界面且靠近锌离子的一凹陷区域,其 5 个主要成分,即双氢杨梅素、双氢槲皮素、槲皮素、双氢山柰酚和山柰酚与 SOD 的结合能范围为 $-8.5 \sim -8.3$ kcal/mol,且上述 5 个主要成分均与 SOD 的 A 链的 Gly147 和 B 链的 Gly147 有直接作用,并通过氢键、疏水作用力和静电作用力等非共价键相连。结果表明,枳椇子富含黄酮,可通过其黄酮成分与 SOD 直接结合以增加 SOD 活性,本试验为枳椇子抗氧化作用机制的研究及其产品的开发提供了科学依据。

关键词:枳椇子; 黄酮; 超氧化物歧化酶; 抗氧化作用; 分子对接

中图分类号:S853.7

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)02-0120-06

Content Determination of Flavonoids in *Hovenia dulcis* and Its Molecular Mechanism of Antioxidant Effect

LIU Jinghua^{1,2}, LUO Jieya¹, GUO Peng¹, YE Zi¹, YANG Juan¹, WANG Keqi¹,
YAN Xiangru¹, YANG Shenggang³, HUANG Jin^{1,2}

(1. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Key Laboratory of Pathogenic Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to determine the content of flavonoids in *Hovenia dulcis* and explore the potential mechanism of its antioxidant effect. The study used *Hovenia dulcis* as the raw material, extracted its flavonoid components using alcohol extraction, determined the total flavonoid contents by ultraviolet-visible spectrophotometry, and further used CavityPlus and molecular docking to analyze the interaction sites, amino acid residues, and chemical bonds of flavonoids in *Hovenia dulcis* with superoxide dismutase (SOD). The results showed that the total flavonoid content of *Hovenia dulcis* was 8.23 mg/g. The main components of flavonoids in *Hovenia dulcis* may bind to the interface of the SOD homodimer near a zinc ion in a concave area. The binding energies of the five major components, namely dihydromyricetin, dihydroquercetin, quercetin, dihydrokaempferol and kaempferol, with SOD ranged from -8.5 to -8.3 kcal/mol. These five major components directly interacted with Gly147 of chain A and Gly147 of chain B of SOD, connected by non-covalent bonds such as hydrogen bonds, hydrophobic forces, and electrostatic forces. The results indicate that *Hovenia dulcis* is rich in flavonoids, and its flavonoid components can directly bind to increase the activity of SOD. This study provides a scientific basis for the study of the antioxidant mechanism of *Hovenia dulcis* and the development of its products.

Key words: *Hovenia dulcis*; flavonoids; superoxide dismutase; antioxidant effect; molecular docking

Corresponding authors: HUANG Jin, E-mail: huangjin@gmc.edu.cn; YANG Shenggang, E-mail: ysgpharm@gmc.edu.cn

收稿日期:2022-04-14

基金项目:贵阳市科技局科技计划项目(筑科合 GY2017-36);大学生创新创业训练项目(201710660028)

作者简介:刘菁华(1999-),女,硕士生,研究方向为药物筛选及作用机制,E-mail:865510408@qq.com

骆洁雅(2000-),女,本科生,就读于临床医学专业,E-mail:754068258@qq.com

注:骆洁雅与刘菁华对本文具有同等贡献

通信作者:黄劲,E-mail:huangjin@gmc.edu.cn;杨盛刚,E-mail:ysgpharm@gmc.edu.cn

枳椇子为鼠李科(Rhamnaceae)鼠李属(*Hovenia*)植物枳椇(*Hovenia dulcis*)的干燥成熟带肉质花序轴的果实和种子,性平味甘,具有除烦止渴、清退湿热、解酒毒之功效^[1]。枳椇子黄酮作为一种天然抗氧化剂^[2-4],在枳椇子中含量较高,主要包括双氢杨梅素、双氢槲皮素、槲皮素、双氢山萘酚和山萘酚 5 种成分^[3]。研究显示,枳椇子黄酮可通过提高生物体内抗氧化酶的活性,增强自由基的清除,进而减少自由基介导的氧化应激对肝脏的损伤,达到解酒保肝的作用^[5-6]。因此,针对枳椇子黄酮产品的开发日益受到关注。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是一种重要的特异性清除自由基的抗氧化酶,普遍存在于生物体内^[7]。SOD 由 2 个亚基组成,能催化超氧离子生成 H_2O_2 和 O_2 ,使机体免受超氧离子的侵害,在抗炎、抗衰老和抗肿瘤等方面具有重要的作用^[7]。有研究显示,多种黄酮或黄酮类化合物,如绿茶黄酮和白藜芦醇等能通过与 SOD 结合,稳定其构象,从而影响其催化活性^[8-10]。然而,目前鲜有枳椇子黄酮与 SOD 相互作用的报道,为进一步探讨枳椇子黄酮抗氧化活性的作用机制,本试验以槲皮素作为对照品,利用分光光度法测定枳椇子黄酮含量,并采用分子对接分析枳椇子黄酮与 SOD 的相互作用,为枳椇子产品深加工和枳椇子黄酮抗氧化应激作用机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 中药材和主要试剂 枳椇子,购自遵义药材批发市场,经贵州医科大学药学院杨盛刚副教授鉴定为优质药材。甲醇、乙醇、无水三氯化铝($AlCl_3$)、冰醋酸和槲皮素等试剂,均为分析纯,购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 主要仪器 UV-2700 紫外可见光分光光度计(日本岛津仪器有限公司),HH-2 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司),EL204 电子天平(美国 Mettler Toledo 科技有限公司),DFT-100 高速中药粉碎机(温岭大得中药器械有限公司),实验室超纯水机(美国 Millipore 公司),RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 软件 AutoDock 4.2.6 和 AutoDock Tools 1.5.6(美国 Scripps 研究所),PyMol 2.4(美国 DeLano Scientific LLC 公司),LigPlot⁺(欧洲分子生物实验室 EMBL-EBI)。

1.4 方法

1.4.1 枳椇子供试品储存液的制备 参照参考文献[11]的方法制备枳椇子提取液。准确称取枳椇子 100 g,碾碎成粉末过 80 目筛,加蒸馏水(料液比

1:6),冷凝回流煎煮 2 次,合并滤液,即得水提液。取水提液 100 mL,加入 100 mL 乙醇,过夜沉淀。隔日使用布氏漏斗进行粗过滤,再经过 0.45 μm 滤膜过滤,使用旋转蒸发仪除去乙醇,水浴锅 80 $^{\circ}C$ 加热 3 h 制备浸膏,使用甲醇溶解配制浓度为 100 mg/mL 的供试品储存液。

1.4.2 枳椇子总黄酮含量的测定 准确称取槲皮素 0.005 g 于 50 mL 容量瓶中,甲醇溶解并定容得 100 $\mu g/mL$ 的对照品储备液。准确吸取对照品储备液 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mL,分别置于 6 个 10 mL 容量瓶中,加入浓度为 0.1 mol/L 的 $AlCl_3$ 甲醇溶液 2 mL、浓度为 0.2 mol/L 的醋酸溶液 4 mL,加甲醇定容至刻度,摇匀静置 40 min 后备用。以未加对照品储备液的溶液作为调零溶液,用紫外可见光分光光度计在 190 ~ 800 nm 波长范围内进行紫外-可见光吸收光谱(Ultraviolet and visible spectrogram, UV-Vis)全波段扫描,选择最大吸收波长作为后续的检测波长。以吸光度值为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。将供试品储存液(100 mg/mL)用甲醇稀释 10 倍,准确吸取 0.625 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 0.1 mol/L 的 $AlCl_3$ 甲醇溶液 2 mL、0.2 mol/L 的醋酸溶液 4 mL,加甲醇定容至刻度,在对照品最大吸收波长处检测其吸光度值,按照公式(1)计算样品的总黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V}{m} \quad (1)$$

式中, $C(\text{mg/mL})$ 为枳椇子总黄酮浓度, $V(\text{mL})$ 为供试品储存液的体积, $m(\text{g})$ 为枳椇子质量。

1.4.3 配受体准备 从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取枳椇子黄酮的主要成分:双氢杨梅素(PubChem CID:161557)、双氢槲皮素(PubChem CID:439533)、槲皮素(PubChem CID:5280343)、双氢山萘酚(PubChem CID:122850)和山萘酚(PubChem CID:5280863)三维(3 Dimensions, 3D)结构的 sdf 格式文件,通过 OpenBabel 3.1.1(<http://openbabel.org/>)^[12]将其转化为 pdb 格式文件,导入 AutoDock Tools 1.5.6^[13]中,对配体进行加极性氢,计算 Gasteiger 电荷,添加原子类型,设置可扭转键,将位置和电荷等结构信息保存为 pdbqt 格式文件。然后,从 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)中获取 SOD 同源二聚体(PDB ID:4B3E)的晶体结构,通过 PyMol 2.4 删除晶体中的原配体和水分子,保存为 pdb 格式文件,通过 AutoDock Tools 1.5.6 对酶进行加氢,计算电荷,保存为 pdbqt 格式文件。由于 SOD 是一类含铜锌离子的金属酶,且铜锌离子在酶促反应的进行和 SOD 结

构的稳定方面具有重要作用,因此将铜和锌离子的电荷数设为 +2.0,保存于 SOD 的 pdbqt 格式文件中。

1.4.4 槲槲子黄酮与 SOD 的分子对接 使用北京大学来鲁华和裴剑锋团队开发的 CavityPlus 软件^[14] (<http://pkumdl.cn:8000/cavityplus/index.php>) 中 CorrSite2.0 模块预测槲槲子黄酮主要成分与 SOD 相互作用的潜在位点,以 Z-score 分值作为评判标准,得分高于 0.5 且数值越大,则表明该位点作为结合口袋的潜力越大;运用 AutoDock 4.2.6 软件中半柔性对接的方法,以拉马克遗传算法 (Lamarckian genetic algorithm, LGA) 进行构象搜索,设置对接参数 Number of GA Run 为 50、Maximum number of evals 为 3 000 000、Maximum number of generations 为 30 000,其他参数为默认值,然后将槲槲子黄酮 5 个主要成分依次与 SOD 的结合位点对接;将上述对接结果导入 PyMol 2.4 和 LigPlot⁺ 中,分析配体与受体之间相互作用的氨基酸和化学键。

2 结果

2.1 槲皮素对照品的 UV-Vis 全波段扫描 结果见图 1,槲皮素对照品显色在 421 nm 处出现最大吸收值,因此后续试验选用 421 nm 作为检测波长。

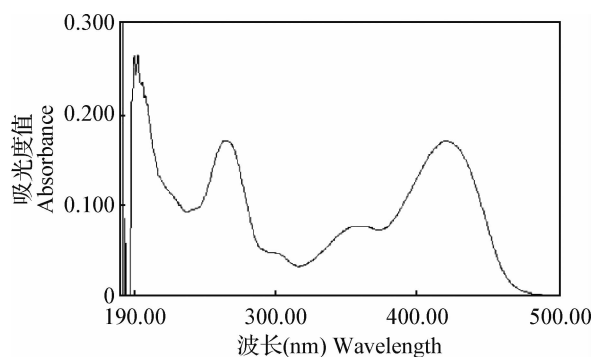


图 1 槲皮素对照品 UV-Vis 扫描

Fig. 1 UV-Vis scan of quercetin standard solution

2.2 槲槲子总黄酮含量的测定 根据槲皮素对照品的吸光度值,绘制标准曲线(图 2),得槲槲子总黄酮浓度线性回归方程为 $Y = 0.078\ 70X + 0.001\ 006$, $R^2 = 0.999\ 6$,其中 X 为黄酮质量浓度, Y 为吸光度值。根据回归方程和公式(1)计算,槲槲子总黄酮含量为 8.23 mg/g。

2.3 槲槲子黄酮与 SOD 相互作用位点的分析 从 Protein Data Bank 获得的 SOD 同源二聚体的三维结构见图 3,将其导入 CavityPlus 软件预测槲槲子黄酮主要成分与 SOD 相互作用的潜在位点,结果显示,其相互作用的活性位点共有 7 个,分别为 Site1 ~ 7 (图 4);Site1 ~ 7 的 Z-score 分值分别是 1.03、2.19、

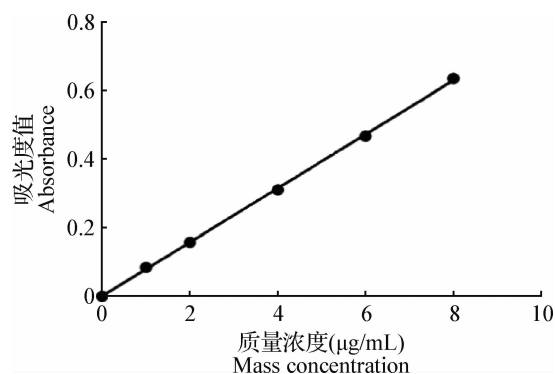


图 2 槲皮素对照品标准曲线

Fig. 2 Standard curve of quercetin standard solution

0.06、-0.67、-0.13、0.06 和 -0.40,其中 Site2 的 Z-score 分值最高,为 2.19,推测两者结合位点为 SOD 中 2 条链交界面且靠近锌离子的一凹陷区域,即 Site2 为槲槲子黄酮与 SOD 的结合位点,故后续选用此位点作为槲槲子黄酮与 SOD 的对接口袋。

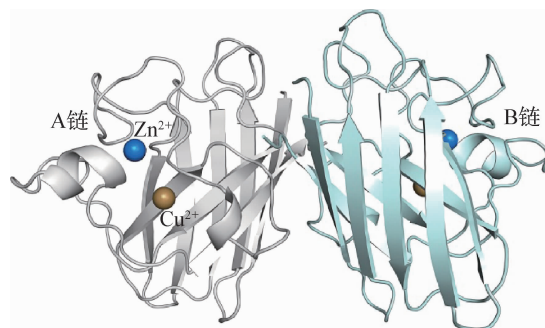


图 3 SOD 同源二聚体的三维结构

Fig. 3 3D structure of SOD homodimer

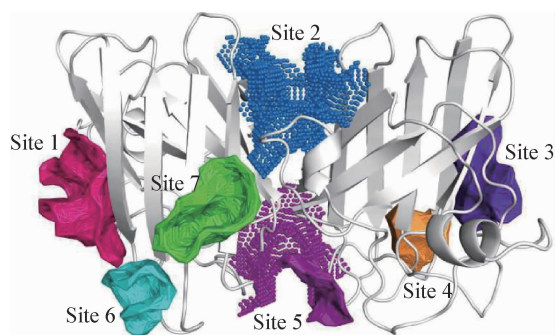


图 4 槲槲子黄酮主要成分与 SOD 潜在结合位点预测

Fig. 4 Prediction of potential binding sites between major components of flavonoids in *Hovenia dulcis* and SOD

2.4 槲槲子黄酮与 SOD 相互作用的氨基酸和化学键 分子对接结果见图 5,槲槲子黄酮 5 个主要成分均能与 SOD 直接作用,其结合能范围为 -8.5 ~ -8.3 kcal/mol,结合配受体间相互作用的氨基酸和氢键数量见表 1,提示槲槲子黄酮化合物均能与 SOD 形成稳定的复合物。

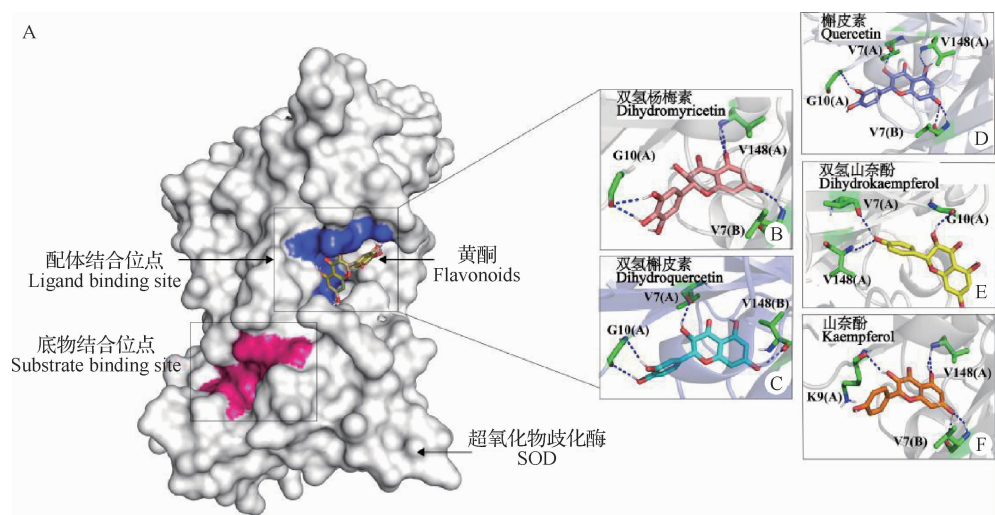


图 5 枳椇子黄酮与 SOD 的分子对接

Fig.5 Molecular docking between flavonoids in *Hovenia dulcis* and SOD

A:枳椇子黄酮 5 个主要成分与 SOD 的分子对接;B~F:分别为双氢杨梅素、双氢槲皮素、槲皮素、双氢山奈酚和山奈酚与 SOD 的结合模式
A: Molecular docking of five main components of flavonoids in *Hovenia dulcis* with SOD; B-F: Binding mode of dihydromyricetin, dihydroquercetin, quercetin, dihydrokaempferol, kaempferol with SOD, respectively

表 1 枳椇子黄酮主要成分与 SOD 相互作用的氨基酸和化学键

Table 1 Amino acids and chemical bonds involved in the interaction between major components of flavonoids in *Hovenia dulcis* and SOD

化合物 Compound	化合物结构 Structure of compound	氢键数(个) H-bond number	相互作用的氨基酸残基 Interacting amino acid residues
双氢杨梅素 Dihydromyricetin		5	L8 (A) , K9 (A) , G10 (A) , G147 (A) , V148 (A) ; V7 (B) , N53 (B) , G147 (B)
双氢槲皮素 Dihydroquercetin		4	V7 (A) , G10 (A) , S107 (A) , G147 (A) ; C111 (B) , G147 (B) , V148 (B)
槲皮素 Quercetin		5	V7 (A) , L8 (A) , K9 (A) , G10 (A) , C146 (A) , G147 (A) , V148 (A) ; V7 (B) , N53 (B) , G147 (B)
双氢山奈酚 Dihydrokaempferol		3	V7 (A) , K9 (A) , G10 (A) , G147 (A) , V148 (A) ; K9 (B) , N53 (B) , G147 (B)
山奈酚 Kaempferol		5	K9 (A) , G147 (A) , V148 (A) ; V7 (B) , L8 (B) , N53 (B) , C146 (B) , G147 (B)

注:括号中的 A、B:分别表示 SOD 分子的 A 链和 B 链
Note: A and B in parentheses: Chain A and chain B of the SOD molecule, respectively

为探究枳椇子黄酮抗氧化作用分子机制,用 PyMol 2.4 和 LigPlot⁺ 分析枳椇子黄酮与 SOD 相互作用的氨基酸和成键作用,结果如图 6 所示,枳椇子黄酮 5 个主要成分分别与 SOD 的多个氨基酸残基发生相互作用,其互作的氨基酸残基见表 1,枳椇子黄酮 5 个主要成分

均与 SOD 中 A 链的 Gly147 和 B 链的 Gly147 氨基酸残基有直接作用。进一步分析两者相互作用的化学键发现,枳椇子黄酮的酚羟基和苯环分别通过氢键和疏水作用力与 SOD 发生相互作用(图 6)。如图 7 所示,静电作用力也进一步起到稳定复合物的作用。

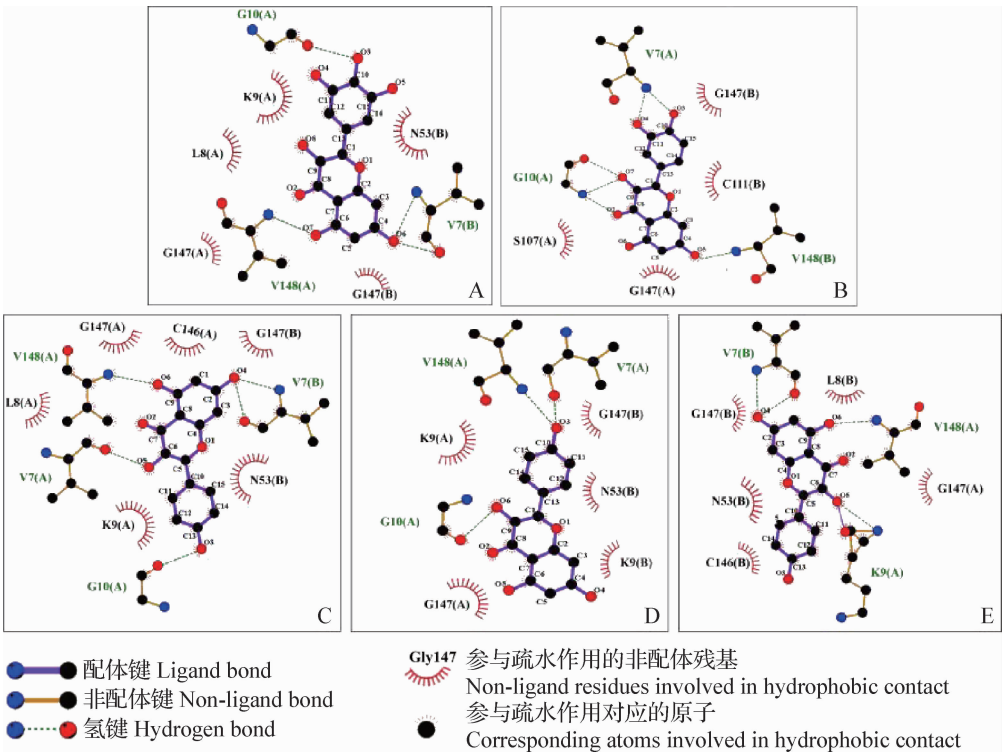


图 6 枳椇子黄酮与 SOD 相互作用化学键的二维平面图

Fig. 6 2D diagram of chemical bonds between flavonoids in *Hovenia dulcis* and SOD

A: 双氢杨梅素; B: 双氢槲皮素; C: 槲皮素; D: 双氢山萘酚; E: 山萘酚

黑色/绿色氨基酸字母和数字;SOD 分子;紫色的 3 个六元环:分别代表枳椇子黄酮的 5 个主要成分

A: Dihydromyricetin; B: Dihydroquercetin; C: Quercetin; D: Dihydrokaempferol; E: Kaempferol

Black/green amino acid letters and numbers;SOD molecule; Three six-membered rings in purple;Five major components of flavonoids in *Hovenia dulcis*

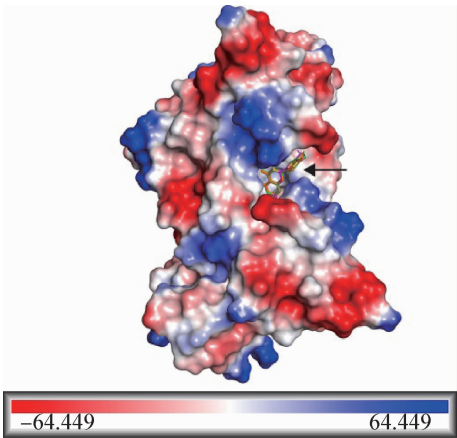


图 7 枳椇子黄酮与 SOD 对接的静电作用力

Fig. 7 Electrostatic forces of flavonoids in *Hovenia dulcis* interacting with SOD based on molecular docking

3 讨论

枳椇子作为药食同源植物枳椇的果实和种子,富含黄酮类、生物碱类、皂苷和糖苷等多种生物活性物质^[3],尤其是枳椇子黄酮具有较好的抗氧化和抗炎活性。研究表明,双氢杨梅素、双氢槲皮素、槲皮素、双氢山萘酚和山萘酚是枳椇子黄酮中主要的 5 种活性成分,对酒精性肝损伤、糖尿病和肿瘤等疾病有一定的干预治疗作用^[4,6,15],其作为功能性食品或膳食补充剂具有良好的市场开发潜力^[16]。目前市场上的相关产品有枳椇子解酒饮料、枳椇子胶囊和枳椇子酸奶等^[17],但是枳椇子深加工产品比较缺乏。本试验采用醇提法对贵州省遵义地区的枳椇子黄酮含量进行评估,采用紫外-可见分光光度法

测得枳椇子总黄酮含量为 8.23 mg/g, 这为后续枳椇子产品深加工提供了参考。

SOD 是重要的抗氧化酶, 通过清除氧自由基, 维持机体的氧化与抗氧化平衡^[7-8]。本课题组在前期研究中发现, 枳椇子含药血清能显著提高细胞的 SOD 酶活性, 减少自由基介导的氧化应激对肝细胞的损伤, 进而发挥对酒精性肝损伤细胞的保护作用^[5]。同时有文献报道, 枳椇子抗氧化活性与其所含的黄酮密切相关, 枳椇子黄酮可通过增加 SOD 活性, 进而参与多种疾病的干预和治疗^[5,18], 但其作用机制尚不清楚。为进一步探索枳椇子黄酮抗氧化应激的潜在分子机制, 本试验采用分子对接、计算机模拟分析枳椇子黄酮与 SOD 之间的相互作用, 结果显示, 两者结合位点为 SOD 中 2 条链交界面且靠近 Zn^{2+} 的一凹陷区域, 其结合能为 $-8.5 \sim -8.3 \text{ kcal/mol}$; 进一步分析相互作用的基团和化学键, 发现枳椇子黄酮通过氢键、疏水作用力和静电作用力与 SOD 发生直接作用。有研究通过核磁共振 (Nuclear magnetic resonance, NMR) 和电喷雾质谱 (Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) 技术发现, 绿茶中的茶黄酮和表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin gallate, EGCG) 以及白藜芦醇等多酚类化合物可与 SOD 形成稳定的复合物^[8-9,19-20]。有研究表明, 配受体间相互作用的氢键、疏水作用力和静电作用力等非共价键具有降低反应结合能, 增加酶结构稳定性的作用^[9,20]。结合本试验中枳椇子黄酮主要成分与 SOD 相互作用的化学键, 提示枳椇子黄酮可能通过氢键等非共价键与 SOD 结合, 进而促进其与底物的结合, 增强其抗氧化损伤作用。

综上所述, 本试验采用醇提法提取枳椇子黄酮成分, 紫外-可见分光光度法测定黄酮含量, 并进一步采用分子对接分析枳椇子黄酮与 SOD 相互作用的潜在分子机制, 为后续探索枳椇子黄酮抗氧化应激作用机制及挖掘枳椇子产品的附加价值提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 谢宗万, 于友岑. 全国中草药名鉴: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 464-472.
- [2] Jong S P, In-Sook K, Shaheed U R, *et al.* HPLC determination of bioactive flavonoids in *Hovenia dulcis* fruit extracts[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2016, 54(2): 130-135.
- [3] 彭玲. 枳椇子化学成分及质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [4] 胥彦琪, 徐子金, 肖小年. 葛枳黄酮固体饮料的配方优化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 253-259.
- [5] 黄劲, 高霄, 雷依丽, 等. 枳椇子含药血清对酒精性肝损伤的抗氧化作用[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(11): 104-107.
- [6] Taheri Y, Suleria H A, Martins N, *et al.* Myricetin bioactive effects; moving from preclinical evidence to potential clinical applications[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2020, 20(1): 241.
- [7] Parascandolo A, Laukkanen M O. Carcinogenesis and reactive oxygen species signaling; interaction of the NADPH oxidase NOX1-5 and superoxide dismutase 1-3 signal transduction pathways[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2019, 30(3): 443-486.
- [8] Zhuang X, Zhao B, Liu S, *et al.* Non-covalent interactions between superoxide dismutase and flavonoids studied by native mass spectrometry combined with molecular simulations[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11720-11726.
- [9] Ray S S, Nowak R J, Brown R H, *et al.* Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(10): 3639-3644.
- [10] 倪志华, 张玉明, 邓传怀, 等. 荧光光谱法研究白藜芦醇与超氧化物歧化酶的相互作用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(11): 2496-2501.
- [11] 吕国红, 钟晓凌, 张江, 等. 分光光度法测定枳椇子总黄酮含量的比较分析[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(12): 394-396.
- [12] O'Boyle N M, Banck M, James C A, *et al.* Open Babel: an open chemical toolbox[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2011, 3: 33.
- [13] Wang Z, Sun H, Yao X, *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18(18): 12964-12975.
- [14] Xie J, Wang S, Xu Y, *et al.* Uncovering the dominant motion modes of allosteric regulation improves allosteric site prediction[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2022, 62(1): 187-195.
- [15] 陈醇, 郝靖宇, 冯昊天, 等. 一种枳椇子、葛根、益生菌配方产品醒酒及肝损伤保护作用研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(2): 91-97.
- [16] Ku Y S, Ng M S, Cheng S S, *et al.* Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1717.
- [17] 顾逸菲, 李江, 赵福权, 等. 发酵型枳椇子黄酒抗氧化能力及活性成分的分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 368-375.
- [18] Bonnay F, Veloso A, Steinmann V, *et al.* Oxidative metabolism drives immortalization of neural stem cells during tumorigenesis[J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1490-1507.
- [19] Zhao B, Zhuang X, Pi Z, *et al.* Determining the effect of catechins on SOD1 conformation and aggregation by ion mobility mass spectrometry combined with optical spectroscopy[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29(4): 734-741.
- [20] Wright G S A. Bacterial evolutionary precursors of eukaryotic copper-zinc superoxide dismutases[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(9): 3789-3803.

中西医结合治疗犬青光眼的病例报告

菅玉双¹, 米 洁², 范小雨¹, 刘佳琦¹, 刘婧雯¹, 麻武仁^{1,2}

(1. 西北农林科技大学动物医学院 中兽医研究所, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学
西安动物医院, 陕西 西安 710065)

摘要:青光眼指一类眼压升高的疾病,中医属青风内障范畴,在犬、猫临床中较常出现。该病常见的治疗方法为西医保守药物治疗,严重者进行手术治疗,中西医结合治疗较为少见。笔者采取中西医结合的方式治疗1例犬青光眼病例,取得良好成效。本文对该病例报告进行归纳总结,以期采用中西医结合方法治疗犬青光眼提供参考。

关键词:犬; 青光眼; 中西医结合

中图分类号:S858.292

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)04-0130-03

Integrative Medicine for the Treatment of Canine Glaucoma: A Case Report

JIAN Yushuang¹, MI Jie², FAN Xiaoyu¹, LIU Jiaqi¹, LIU Jingwen¹, MA Wuren^{1,2}

(1. Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Xi'an Veterinary Teaching Hospital, Northwest A&F University, Xi'an 710065, China)

Abstract: Glaucoma refers to a category of diseases characterized by elevated intraocular pressure, and it falls within the domain of traditional Chinese medicine as a type of Qingfeng cataract. It is a common condition in clinical practice among dogs and cats. The conventional treatment methods involve Western medicine with conservative drug therapy and, in severe cases, surgical intervention. However, the integration of traditional Chinese medicine and Western medicine in the treatment of glaucoma is less commonly reported. In this paper, the author reported a case of canine glaucoma treated with integrative medicine (combining traditional Chinese veterinary medicine and Western medicine), achieving favorable outcomes. Consequently, this paper aims to provide insights and references for the combined approach in the treatment of glaucoma in dogs.

Key words: dog; glaucoma; integrative medicine

Corresponding author: MA Wuren, E-mail: vetma@nwafu.edu.cn

青光眼是由眼压升高导致的一类疾病,眼压升高直接压迫视神经,产生相应的症状,甚至导致失明^[1-2]。在临床上,犬的眼压高于25 mmHg,猫的眼压高于27 mmHg,则怀疑其患有青光眼^[3-4]。本文报告1例青光眼患犬,经西医保守药物治疗后效果不佳,遂转诊本院进行中医治疗,中医诊断为青风内障,患犬经中西医结合治疗效果良好,无复发情况且无不良预后。现将其诊疗过程报告如下,以供参考。

1 基本情况

柴犬,雄性,未绝育,年龄4.5岁,体重11.8 kg,就诊前1天晚上仍正常,就诊当日早晨突发左眼眼睑痉挛,羞明,食欲废绝。

2 临床检查和诊断

临床检查发现,患犬左眼角膜内皮水肿,触诊眼部敏感,瞳孔散大且对光无反射;左眼泪液量为17 mm/min,右眼为18 mm/min;左眼眼压88 mmHg,右眼眼压23 mmHg;角膜荧光染色后平整且无荧光残留;左眼裂隙灯检查未见明显异常,无房水闪辉。综合临床表现和检查,西医诊断为左眼急性青光眼,高度疑似急性闭角型青光眼,中医诊断为左眼青风内障。

3 治疗和转归

确诊当日(12月2日)立即使用拉坦前列素滴眼液和布林佐胺噻吗洛尔滴眼液对患犬点眼,3次/d,2种滴眼液使用间隔时间为15~20 min。1 h后测量得患犬左眼眼压84 mmHg,降压效果不明显,遂静脉注射甘露醇55 mL(规格:250 mL,50 g),6 h后左眼眼压降至78 mmHg。

收稿日期:2022-02-25

作者简介:菅玉双(1997-),女,硕士生,研究方向为临床兽医学,E-mail:1293175975@qq.com

通信作者:麻武仁,E-mail:vetma@nwafu.edu.cn

12月3日复查,主诉患犬有好转,疼痛感不明显,食欲有所恢复但不明显。临床检查发现,患犬左侧患眼能轻微睁开,但依然有羞明,左眼眼压降至74 mmHg,右眼 26 mmHg。检查过程中患犬极度紧张,轻微触碰即有明显反应,舌色粉红,脉象沉而有力。由于降眼压药物治疗效果不甚明显,患犬眼压无法降至正常范围,有丧失视力的风险,而本院暂时不满足青光眼手术的条件,根据主人意愿加入中医治疗方案。当日追加中药处方:熟地黄 8 g,酒萸肉 3 g,菊花 2 g,枸杞子 4 g,泽泻 1 g,茯苓 1 g,菟丝子 0.5 g,当归 4 g,白芍 1 g,知母 2.5 g,黄柏 0.5 g,桑寄生 1 g,粉末混合后按照 0.1 g/(kg·bw) 剂量口服,3 次/d。

12月4日复查,主诉患犬到早晨为止进食中药 3 次,前 1 晚睡眠很安稳,食欲恢复正常。临床检查发现,患犬左侧患眼能睁开,与右眼接近;左眼眼压降至 36 mmHg,右眼眼压 24 mmHg;左眼恐吓反应阴性,右眼正常。决定继续维持用药,进一步观察。

12月5日复查,主诉患犬的精神状态进一步好转,左眼眼睑反射基本恢复正常。临床检查发现,患犬恐吓反应有轻微反应,左眼眼压 20 mmHg,右眼眼压 26 mmHg。开具医嘱:2 种滴眼液改为每晚 1 次,继续维持中药治疗,3 d 后复查若眼压持续正常,滴眼液改为 1 次/2 d,3 d 后再复查;若持续正常,则停用滴眼液,1 周后复查。如果出现异常,随诊。

12月8日复诊,主诉患犬已经基本恢复正常,未发现有明显异常。临床检查发现,患犬左眼眼压 23 mmHg,右眼眼压 21 mmHg,基本康复。继续按照医嘱维持中药用药,2 个月后复诊,患犬左眼眼压 23 mmHg。治疗期间患犬的眼压变化如图 1 所示。

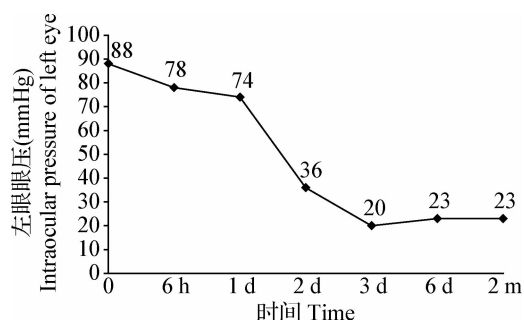


图 1 治疗期间患犬眼压变化

Fig. 1 Changes in intraocular pressure of affected dog during treatment

h:小时; d:天; m:月

h:Hour; d:Day; m:Month

4 讨论

关于青光眼的治疗,西医根据病情使用各类降眼压滴眼液和手术疗法为主,中医则配合中药或针灸疗法予以治疗^[5]。

本病例患犬发病急,眼压急剧升高,泪液量正常,荧光染色未见异常,裂隙灯检查患眼角膜平整,未见其他眼科疾病,故暂且排除继发性青光眼。就诊当日立即对患犬采用滴眼液治疗,降眼压效果不明显,考虑到患眼眼压过高随时都有失明的危险,但受多种因素限制,无法对其实施手术,经主人同意引入中医治疗。

中医对于青光眼的介绍首次记载于中医眼科学专著《秘传眼科龙木论》,认为青光眼属“五风内障”范畴^[6]。《证治准绳》中提到青风、绿风和黄风是疾病发展的 3 个过程,分别与急性闭角型青光眼的前驱期、急性期和绝对期的发展过程相吻合^[7]。患青风时,瞳孔有轻度散大或不散大,角膜水肿较轻,书中描述为“视瞳神内有气色昏蒙,如青山笼淡烟也”^[8]。本病例患犬发病急,患眼出现水肿、羞明敏感等症状,中医诊断为青风内障,对应西医中的急性闭角型青光眼临床前期。

中医学认为青光眼与肝密切相关,肝与目同属五行中的“木”,且“肝开窍于目”^[9]。本病例患犬在临床诊断时还出现恐惧、敏感等情志异常的表现,可能为肝气虚。《灵枢本神》描述“肝气虚则恐”,肝气不足则患者出现疏泄功能失常、情志失主、焦虑抑郁,主要症状为善恐善惊^[10],故治疗时应着重考虑补益肝气、疏肝理气。

本病例所用处方中的熟地黄、酒萸肉、菊花、枸杞子、茯苓和泽泻为杞菊地黄丸的成分,有滋肝补肾、益气固表的作用,对患眼羞明流泪也具有良好功效。枸杞子可补益肝肾之精,除此之外,研究表明,枸杞子也有保护视神经的功效^[11];茯苓和泽泻具有渗湿利尿的作用,可使房水顺畅排出^[12];菟丝子为平补肝肾脾三脏之要药,配合使用可加强疗效。另外,患犬脉象沉而有力,中医诊断为热邪内郁,配合菊花、知母、黄柏和桑寄生起到清肝祛热、活血祛瘀的作用。多味药配伍服用共同发挥滋阴、养肝和明目的功效。

参考人医临床发现,长期使用抗青光眼滴眼液的患者,极易出现眼部干涩、羞明、异物感、烧灼感和视力下降等眼表损害^[13]。翟楠等研究表明,杞菊地黄丸与局部玻璃酸钠(海露)联合使用对长期使用抗青光眼滴眼液患者的干眼情况有较好的疗

效^[14]。加入中药后,本病例患犬眼压下降明显,患眼可以睁开,且羞明的情况也得到极大改善;此外,患犬燥热不安的情绪也得到缓解,睡眠质量恢复良好。中西医结合用药2日后患眼眼压降至正常,且预后良好。

青光眼治疗方法主要是降低眼压,阻止视神经受损。目前,西医对青光眼主要采取药物治疗。本病例中使用的滴眼液主要是通过直接或间接作用于房水来实现眼压的快速下降^[15-17]。然而,目前在临床应用上还没有保护视觉神经的药物获得批准^[18],西医治疗在视觉功能的保护和残存视觉功能的康复治疗等方面仍有明显局限性。中药的化学成分复杂多样,可通过多靶点、多环节和多途径对视神经起到保护作用,在青光眼视神经保护方面已经彰显出独特优势^[19]。西医治疗结合中医辨证治疗可快速降低眼压,保护视神经,达到事半功倍的效果。

参考文献:

- [1] Komáromy A M, Bras D, Esson D W, *et al.* The future of canine glaucoma therapy[J]. *Veterinary Ophthalmology*, 2019, 22(5): 726-740.
- [2] 葛坚. 青光眼研究进展与前景[J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(3): 286-288.
- [3] 董轶, 林中天, 张雅裴, 等. 小动物眼科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 111-128.
- [4] Weinreb R N, Aung T, Medeiros F A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2014, 311(18): 1901-1911.
- [5] 刘静远, 江冰. 青光眼的中医分型与治疗[J]. *家庭医学(下半月)*, 2021(2): 20-21.
- [6] 佚名. 秘传眼科龙木论[M]. 接传红, 高健生, 整理. 北京: 人民卫生出版社出版, 2006.
- [7] 接传红, 高健生, 宋剑涛, 等. 青风、绿风、黄风内障与闭角型青光眼的辨误[J]. *中国中医眼科杂志*, 2010, 20(3): 178-180.
- [8] 王肯堂. 证治准绳·眼目集[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1993: 193-195.
- [9] 郑嘉琦, 俞莹. 中医治疗青光眼的研究进展[J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31(5): 362-364 + 377.
- [10] 李江伟, 刘倩宏, 王贤婧, 等. 从“肝气虚”角度论治青风内障[J]. *中医药导报*, 2021, 27(10): 184-187.
- [11] Li S Y, Yang D, Yeung C M, *et al.* Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16380.
- [12] 郭明璐, 路雪婧. 中医药治疗青光眼的研究进展[J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2019, 9(3): 165-167.
- [13] 王琛, 王丽, 武蓓, 等. 局部应用抗青光眼药物致患者干眼症发生的影响因素分析[J]. *中国药房*, 2019, 30(10): 1424-1427.
- [14] 翟楠, 李懿, 刘丹. 中西医结合疗法对长期使用抗青光眼眼水患者干眼的临床效果观察[J]. *名医*, 2021(6): 129-130.
- [15] 谢宇庭, 郭晓梅, 张鹏宇. 青光眼治疗药物在兽医眼科应用研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(5): 60-65.
- [16] 王海鑫. 青光眼相关基因药物关联分析[D]. 成都: 电子科技大学, 2020.
- [17] 文晓霞, 谭德文. 青光眼视功能损害及药物治疗研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2010, 10(1): 97-99.
- [18] 张丽霞, 姚孟莹. 建立“治未病”思想指导下的中西医结合青光眼防治体系的思考[J]. *中国中医眼科杂志*, 2019, 29(5): 343-346.
- [19] Chan H C, Chang R C, Koon-Ching Ip A, *et al.* Neuroprotective effects of Lycium barbarum Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma[J]. *Experimental Neurology*, 2007, 203(1): 269-273.

(责任编辑 冯 茹)