



基于网络药理学和分子对接技术分析马齿苋对奶牛乳腺炎的抗炎机制

丁涛^{1,2}, 苗宇航^{1,2}, 辛杰^{1,2}, 马文妍^{1,2}, 浮怀琳³, 胡菊梅⁴, 杜军^{1,2*}

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021; 3. 青海省海西州农牧特色产业指导服务中心, 海西 817000; 4. 青海省循化县农业农村和科技局, 海东 811100)

摘要: 基于网络药理学、分子对接技术挖掘马齿苋主要活性成分抑制奶牛乳腺炎的关键靶点, 体外细胞试验验证其可能的作用机制。利用TCMSP数据库检索马齿苋的活性成分及对应靶点, 使用GeneCards数据库和OMIM数据库检索奶牛乳房炎的疾病靶点, 并于马齿苋活性成分靶点进行交集整合, 并构建PPI网络。DAVID数据库进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析, AutoDock软件进行分子对接验证。最后, CCK-8法测定马齿苋提取物对奶牛乳腺上皮细胞的影响, LPS诱导MAC-T构建体外炎症模型, RT-qPCR检测关键靶点、IL-17信号通路以及炎症相关因子表达情况。结果显示: 共筛选到马齿苋10种活性成分及188个对应靶点, 从GeneCards和OMIM数据库中筛选出2495个奶牛乳腺炎的相关靶点, 通过Venn平台共找到40个共表达靶点。通过PPI网络得到ALB、TNF、IL6、IL1B、MMP9等10个关键靶点, 涉及AGE-RAGE、脂质和动脉粥样硬化、癌症、IL-17、PI3K-AKT等信号通路。体外细胞试验表明, 马齿苋能够增加MAC-T中ALB的含量, 并提供IL-17信号通路下调炎症因子MMP9、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8、IFN- γ 基因的转录, 上调抑炎因子IL-10基因的转录。本研究揭示了马齿苋中能够通过抑制IL-17信号通路来抑制炎症因子的释放, 从而抑制奶牛乳腺炎症反应。

关键词: 网络药理学; 马齿苋; 分子对接; 奶牛乳腺炎

中图分类号: S857.26; S853.74

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0500-13

Analysis of the Anti-inflammatory Mechanism of *Portulaca oleracea* L. on Mastitis in Dairy Cows Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

DING Tao^{1,2}, MIAO Yuhang^{1,2}, XIN Jie^{1,2}, MA Wenyan^{1,2}, FU Huailin³, HU Jumei⁴, DU Jun^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources with Western Characteristics, Ministry of Education, Yinchuan 750021, China; 3. Haixi Farming and Animal Husbandry Characteristic Guidance Service Centre, Haixi 817000, China; 4. The Agriculture, Rural Affairs and Science and Technology Bureau of Xunhua County, Qinghai Province, Haidong 811100, China)

Abstract: Based on network pharmacology and molecular docking technology, the key targets of the main active components of *Portulaca oleracea* L. (POL) to inhibit mastitis in dairy cows were explored, and the possible mechanism of action was verified by *in vitro* cell experiments. The TCMSP database was used to search the active ingredients and corresponding targets of POL. The GeneCards database and OMIM database were used to search the disease targets of dairy cow

收稿日期: 2025-01-20

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2024AAC03118); 国家自然科学基金项目(32160044)

作者简介: 丁涛, 硕士生, 主要从事病原生物学与宿主免疫研究, E-mail: taoding113@163.com

* 通信作者: 杜军, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: dujun@nxu.edu.cn

mastitis, and the intersection and integration of the active ingredient targets of POL were carried out, and the PPI network was constructed. DAVID database was used for GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis, and AutoDock software was used for molecular docking verification. Finally, the effect of purslane extract on bovine mammary epithelial cells was determined by CCK-8 method. LPS induced MAC-T to construct an *in vitro* inflammation model. RT-qPCR was used to detect the expression of key targets, IL-17 signaling pathway and inflammation-related factors. Results showed that a total of 10 active components and 188 corresponding targets of POL were screened. A total of 2 495 targets related to mastitis in dairy cows were screened from the GeneCards and OMIM databases, and a total of 40 co-expressed targets were found through the Venn platform. Ten key targets such as ALB, TNF, IL6, IL1 B, and MMP9 were obtained through the PPI network, involving AGE-RAGE, lipid and atherosclerosis, cancer, IL-17, PI3K-AKT and other signaling pathways. In vitro cell experiments showed that purslane could increase the content of ALB in MAC-T, and provide IL-17 signaling pathway to down-regulate the transcription of inflammatory factors *MMP9*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-8* and *IFN- γ* genes, and up-regulate the expression of anti-inflammatory factor *IL-10* gene. This study revealed that purslane can inhibit the release of inflammatory factors by inhibiting the IL-17 signaling pathway, thereby inhibiting the inflammatory response of dairy cow mammary gland.

Keywords: network pharmacology; *Portulaca oleracea* L.; molecular docking; dairy cow mastitis

* **Corresponding author:** DU Jun, E-mail: dujun@nxu.edu.cn

奶牛乳腺炎是由奶牛乳腺组织感染引起的炎症反应,它影响奶牛健康,降低奶牛生产性能,导致奶产量下降,给奶牛养殖行业带来巨大的经济损失^[1-2]。引起奶牛乳腺炎的病原微生物主要有细菌、真菌、放线菌、支原体和病毒^[3-4]。当前抗生素是治疗奶牛乳腺炎的主要手段,但抗生素广泛使用导致的病原菌耐药率增加和在奶制品中的残留问题困扰着奶牛产业的发展^[5]。寻找能够代替抗生素的中草药及其活性成分成为了研究热点。

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.),一种药食同源的植物,其味酸、性寒,具有凉血解毒、除湿通淋、止痢等功效。现代医学研究表明马齿苋含有丰富的活性物质,具有抗菌、抗氧化、抗衰老、降血压、增强免疫等活性功能,常用于治疗细菌性痢疾、疮疡痈疖、湿癣、湿疹等^[6-7]。有研究表明,在奶牛的饲料中每日添加 1 500 mg·kg⁻¹的马齿苋干粉,15 d 后对其奶量进行测定,发现产奶量比对照组的提高了近 1.2 倍^[8]。此外,通过抑菌实验发现马齿苋对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌有较好的抑菌作用,而在中药复方中,含有马齿苋、鱼腥草、蒲公英这三种中药对奶牛乳腺炎的临床治愈具有较好的效果^[9]。但马齿苋抑制奶牛乳腺炎症的确切机制尚未明晰。

网络药理学基于“疾病-基因-靶点-药物”相互作用的关系,能够系统综合地观察药物对于疾病的干预与影响^[10]。分子对接技术能够在短时间内对大量化合物进行筛选,快速找到与受体结合能力强的分子,并且可以直观地展示分子与受体的结合方式,可以更好地理解药物与靶标之间的相互作用机制^[11]。因此本文利用药理学数据库,结合疾病靶点数据库,分析马齿苋中抑制炎症反应的主要活性成分、作用的核心靶点以及主要的信号通路,并通过体外细胞试验验证马齿苋抑制奶牛乳腺炎症的作用机制,为马齿苋的开发与利用提供科学依据,为奶牛乳腺炎的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>); UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>); Venn 平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>); STRING 是数据库(<https://cn.string-db.org/>); DAVID 数据库(<https://davidbioinformatics.nih>).

gov/); 微生信在线分析平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>); Cytoscape3.9.1 软件; AutoDock1.5.7 软件; PyMOL3.1 软件。

1.2 细胞

奶牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, MAC-T) 由本实验室保存。

1.3 药物与试剂

马齿苋购自上海源叶生物科技有限公司; Cell Counting Kit-8 试剂盒购自赛文创新 (北京) 生物科技有限公司; DMEM-High Glucose 培养液、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 ED-TA ($2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶, $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 酚红) 均购自以色列 BI 公司; HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.4 网络药理学

1.4.1 马齿苋活性成分的筛选及其对应靶点筛选 通过 TCMSP 数据库检索马齿苋成分, 将搜索结果按照口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 进行筛选, 在 Related Targets 选项中获取筛选得到的活性成分所对应的靶点蛋白名称, 删除重复靶点后, 使用 UniProt 数据库中的 UniProtKB 检索选项将蛋白名称转换成基因名称, 通过 Cytoscape3.9.1 软件构建“马齿苋活性成分-潜在靶点”网络图。

1.4.2 奶牛乳腺炎相关靶点的获取 以“bovine mastitis”为关键词, 通过使用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库检索奶牛乳腺炎的相关靶点, 将结果记录在表格中; 将“1.4.1”获得的马齿苋相关活性成分靶点与奶牛乳腺炎相关靶点导入 Venn 平台构建韦恩图。

1.4.3 蛋白质互作网络的绘制 将“1.4.2”获得的交集靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质互作 (Protein-protein interaction, PPI) 网络图, 将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析。

1.4.4 交集靶点的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库, 选择物种 *Bos taurus*, 以 $P \leq 0.05$ 为标准, 进行 GO 功能和 KEGG 信号通路分析, 并使用微生信平台进行可视化。

1.4.5 分子对接验证 从 Uniport 数据库中下载关键靶点的晶体结构, 在 TCMSP 数据库中下载马齿苋活性成分的 MOL2 格式文件, 利用 AutoDock

软件对蛋白进行加氢, 对活性组分进行加电荷、确定配体的路径以及进行可旋转键的搜索与定义, 随后使用 AutoDock Vina 对马齿苋活性成分与关键靶点展开半柔性对接, 选取对接结合能打分排序前 5 位的最佳结合构象用于对接结合模式分析, 并用 PyMOL 软件进行分子对接作图。

1.5 细胞试验

1.5.1 细胞复苏与培养 将冻存的 MAC-T 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无菌水中水浴 30 s 。待细胞完全融化后离心 ($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 弃上清, 用 1 mL 完全培养基重悬后接种于细胞培养皿中, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱内培养。当细胞生长至培养皿 $80\%\sim 90\%$ 时进行消化后传代。

1.5.2 马齿苋提取物的制备 称取马齿苋药材 120 g , 粉碎机粉碎, 加入 10 倍体积的蒸馏水煎煮 2 h , 过滤得到的水提液放在烧杯中备用, 向残渣中再次加入 10 倍体积的蒸馏水煎煮 2 h , 过滤, 重复两次后将得到的水提液合并, 浓缩干燥得到 4 g 马齿苋干粉。

1.5.3 试验分组 取生长状态良好的 MAC-T, 设置 4 个试验组: 1) 空白对照组; 2) 模型组: $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 MAC-T 24 h ; 3) 试验组: 不同浓度马齿苋 (0 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 40 、 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理组。

1.5.4 CCK-8 法筛选马齿苋作用浓度和时间 96 孔板每孔接种 1×10^4 个 MAC-T, 待细胞贴壁后用不同浓度 (0 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 40 、 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的马齿苋处理细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 3 、 6 、 12 、 24 h 后, 加入 CCK-8 工作液, 继续培养 2 h , 酶标仪检测 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值, 根据公式计算细胞活力。

1.5.5 qRT-PCR 检测相关基因的转录情况 将各处理组按 $4\times 10^5\cdot\text{孔}^{-1}$ 接种至 6 孔板中, 待处理时间完毕后, 收集细胞, Trizol 法提取总 RNA, 反转录后, 采用 Bio-Rad iQ5 Real-time PCR 检测系统, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 以 $\beta\text{-actin}$ 为内参、对排名前 5 的关键靶点 *ALB*、*TNF*、*IL-6*、*IL-1 β* 、*MMP9*、*IL-17* 信号通路相关基因 *IL-17A*、*IL-17RA*、*Act1*、*TRAF6* 和炎症相关基因 *IL-8*、*IFN- γ* 和 *IL-10* 基因进行检测, 反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火/延伸, 共 40 个循环; 熔解曲线: $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , 扩增结束后得到 *Ct* 值, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个基因的相对转录水平。引物委托上海生工生物公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer	反向引物(5'→3') Reverse primer
<i>β-actin</i>	CGTCCGTGACATCAAGGAGAAGC	GGAACCGCTCATTGCCGATGG
<i>IL-17A</i>	AGTCTGGTGGCTCTTGTGAAGG	CATGCTGCGGGAAGTTCTTGTC
<i>IL-17RA</i>	CTTACAGACGCCAATGAAGGTGAG	CTCCTCGTGCCGCCTGAC
<i>Act1</i>	TCCTCCGCCTGCCTCTCC	TCTCACAGCCGACACATAGCC
<i>TRAF6</i>	GGAGGCTGGCAGGCTGAAG	GGTGGTGGCAGTGAGGAGAC
<i>ALB</i>	GTGTTCTCTGCTTGACCTGATGTG	GGTGTAAACGAACATGAGCCTGTAAC
<i>MMP9</i>	AAGCGTGATTGTGAAGACCATACTC	GAAGTGATCCTGGCAGAAGTAAGC
<i>IL-1β</i>	ATGAAGAGCTGCATCCAACACCTG	ACCGACACCACCTGCCTGAAG
<i>TNF-α</i>	CTGGCGGAGGAGGTGCTCTC	GGAGGAAGGAGAAGAGGCTGAGG
<i>IL-6</i>	CACTGACCTGCTGGAGAAGATGC	CCGAATAGCTCTCAGGCTGAACCTG
<i>IL-8</i>	ACACATTCCACACCTTTCCAC	ACCTTCTGCACCCACTTTTC
<i>IL-10</i>	GGACCAACTGCACAGCTT	GTGGCATCACCTCTTCCA
<i>IFN-γ</i>	GGCAGCTAACCTAAGCAAGA	CAAAGTAGTGGCTCAGAATCC

2 结 果

2.1 马齿苋活性成分与对应靶点

通过 TCMSP 数据库检索马齿苋,以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为筛选条件,由表 2 可知,共筛选到木犀草素、槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚、花生四烯酸、 β -胡萝卜素、环阿屯醇、5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基)色满-4-酮、异甜菜素和异甜菜甙 10 种活性成分及 188 个对应靶点。通过构建马齿苋活性成分-潜在作用靶点网络(图 1),发现马齿苋的 10 个活性成分与预测靶点之间存在着错综复杂的相互作用关系。

2.2 奶牛乳腺炎靶点的获取

在 GeneCards 数据库检索到 177 个奶牛乳腺炎靶点,OMIM 数据库检索到 2 343 个奶牛乳腺炎靶点。将以上数据库获得的靶点合并删除重复值后,最终得到 2 495 个奶牛乳腺炎靶点。将筛选的 188 个马齿苋活性成分对应靶点与 2 495 个奶牛乳腺炎靶点上传至 Venn 平台,绘制韦恩图,得到交集靶点 40 个(图 2)。

2.3 蛋白质互作网络构建

将“2.2”获得的 40 个靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质互作网络图,将结果以 TSV 格式导出到 Cytoscape3.9.1 软件,使用度值大小来表示节点大小,度值越大,节点越大,说明其所代表的靶点越重要,结果如图 3 所示。

2.4 交集靶点的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

通过使用 DAVID 数据库对马齿苋活性成分抑制奶牛乳腺炎的靶点进行 GO 注释分析,共得出 114 条条目,其中 BP 有 74 条,CC 有 19 条,MF 有 21 条,各取前 10 条进行可视化处理得到 GO 生物学模块(图 4)。KEGG 分析得出 98 条通路,取前 20 条通路在微生信平台进行可视化处理(图 5)。

2.5 分子对接结果

根据度值,将马齿苋的活性成分以及马齿苋抑制奶牛乳腺炎的关键靶点进行排序,从中选取度值排名前 5 的活性成分(槲皮素、山奈酚、木犀草素、 β -谷甾醇和花生四烯酸)和关键靶点(ALB、TNF、IL6、IL1B 和 MMP9)进行分子对接,结果见图 6 所示,除 TNF 靶点与花生四烯酸结合能高于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 外,其余结合能均低于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明对接结果良好,其中 ALB 靶点与 β -谷甾醇的结合能最低,为 $-39.33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,结合最稳定。选取结合能最低的前 5 个组合利用 PyMOL 软件进行对接可视化,使分子对接结果更直观(图 7)。

2.6 马齿苋作用浓度和时间

通过 CCK-8 法检测各处理组在不同时间下对 MAC-T 活力的影响。结果如图 8 所示,与空白对照组相比,在作用 6 h 时,马齿苋浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞活力显著高于空白对照组,因此后续试验选取马齿苋作用浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,作用时间

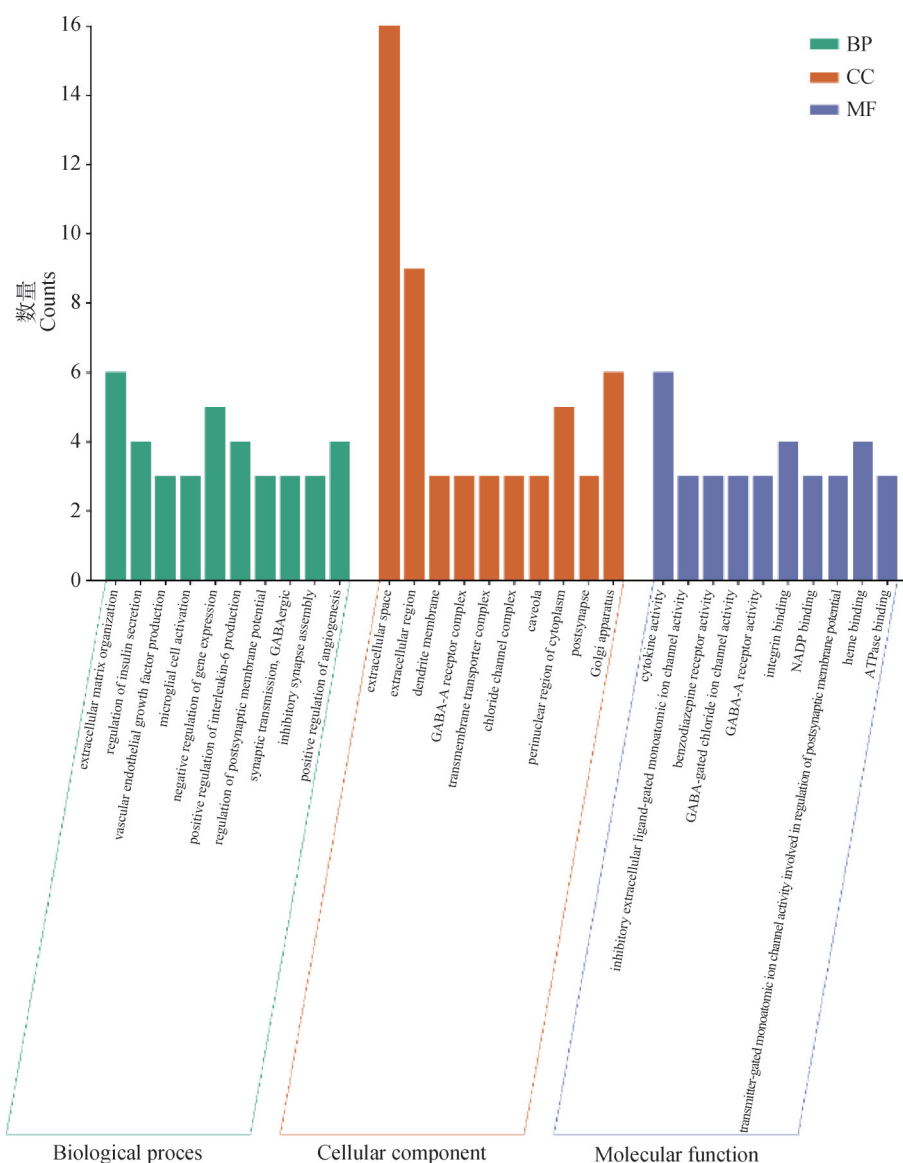


图4 GO功能注释

Fig. 4 GO function annotation

MAC-T炎症^[18]。体外试验证明,β-胡萝卜素能够通过调节NLRP3炎症小体抑制小鼠乳腺炎^[19]。本研究检索到马齿苋含有木犀草素、槲皮素、β-谷甾醇、山奈酚等多种活性成分,这些活性成分能够在不同程度上抑制组织和细胞炎症反应。因此,马齿苋有望成为一种治疗奶牛乳腺炎的潜在药物。

在马齿苋减轻奶牛乳腺炎的40个靶点中,ALB、TNF、IL-6、IL-1B和MMP9被认为是核心靶点,可能在马齿苋抑制奶牛乳腺炎中起主要作用。ALB是奶牛乳腺炎的一个重要血清生化指标,其含量的降低与乳腺炎的发生和病情严重程度密切相关,可作为奶牛乳腺炎的血液学诊断指标^[20-21]。

TNF、IL-6和IL-1B能够促进炎症反应并参与免疫调节,是导致奶牛乳腺炎的主要炎症因子^[22-23]。IL-6被认为是检测奶牛乳腺炎的标志物,奶牛血清中TNF-α、IL-1B的含量变化可以作为奶牛隐性乳腺炎的诊断指标^[24-25]。MMP9属于基质金属蛋白酶家族,主要由中性粒细胞和巨噬细胞合成和分泌,在炎症反应中起重要作用^[26]。研究表明,MMP9作为IL-17信号通路下游炎症因子的一种,分泌过多会促进炎症发生^[27]。此外,在患有乳腺炎的奶牛的牛奶中MMP9的含量也显著高于健康奶牛^[28]。

GO功能富集分析显示,马齿苋活性成分能够在细胞外空间、胞外区、枝晶膜等部位通过参与炎

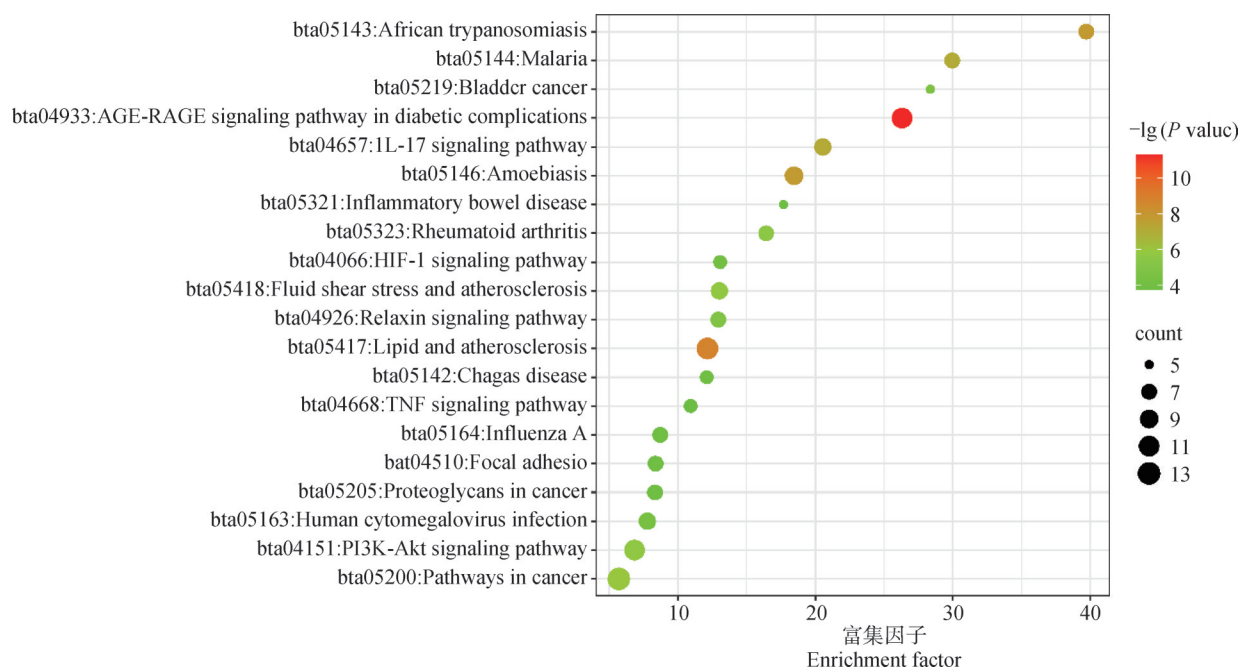


图5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

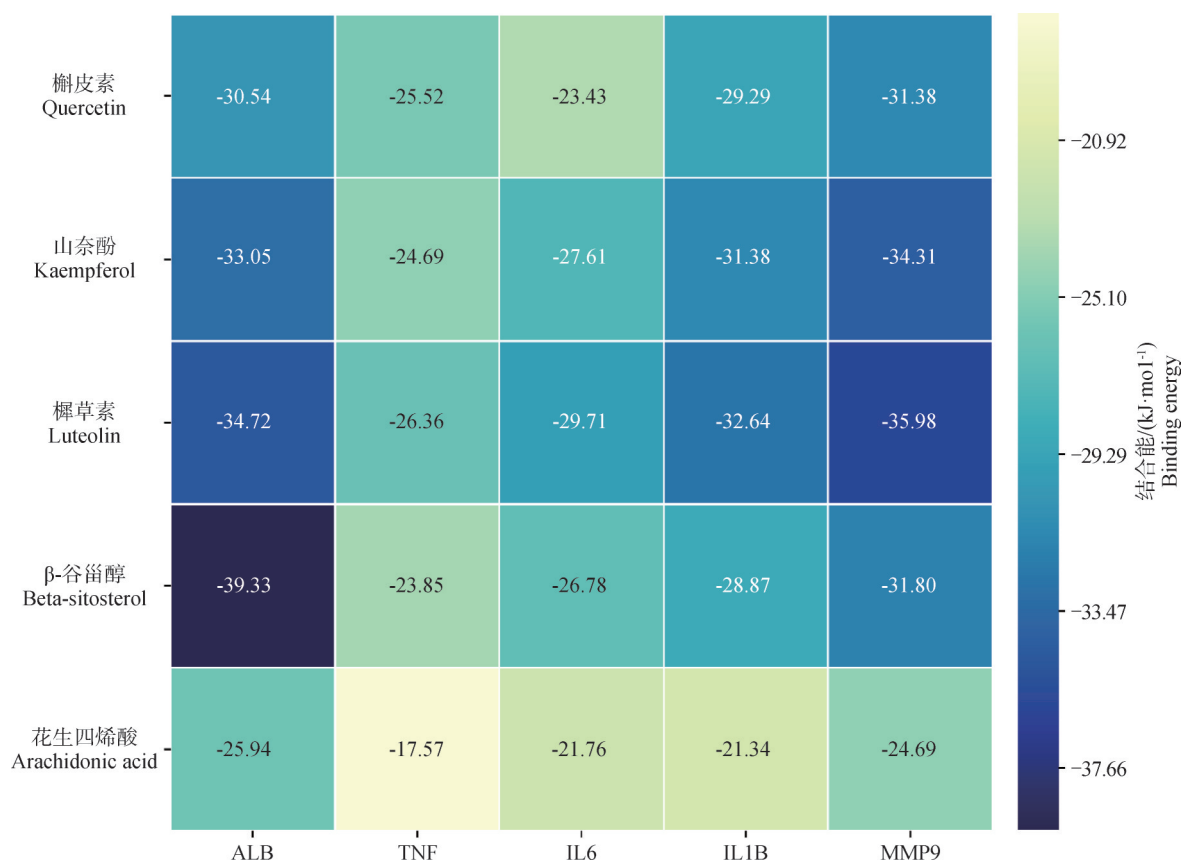


图6 分子对接结合能图

Fig. 6 Molecular docking binding energy diagram

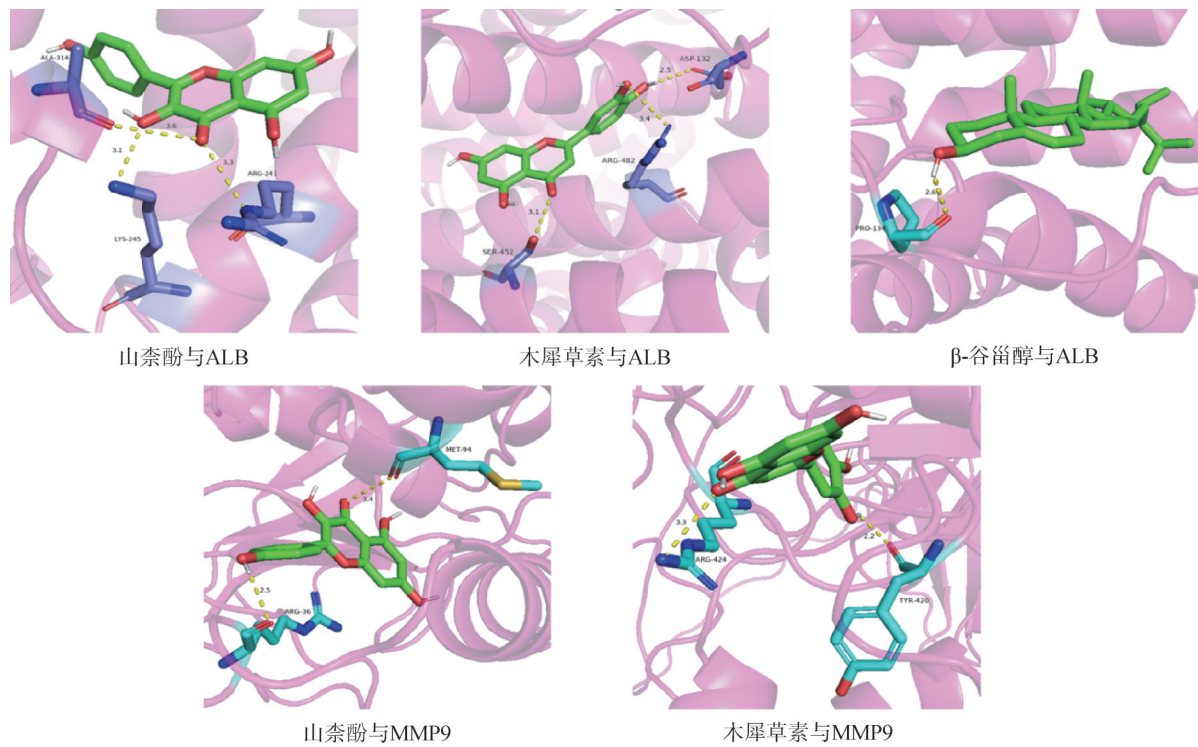
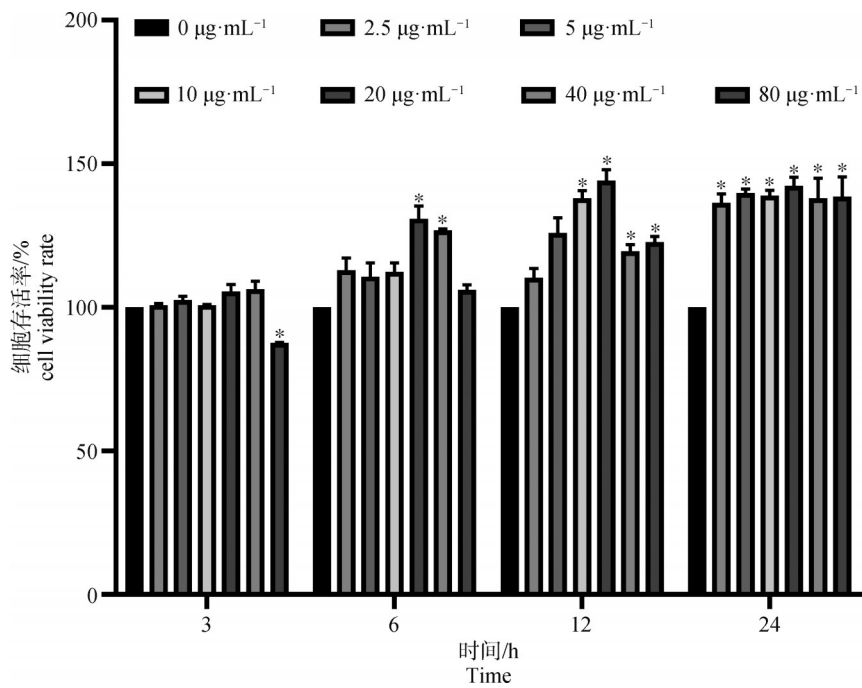
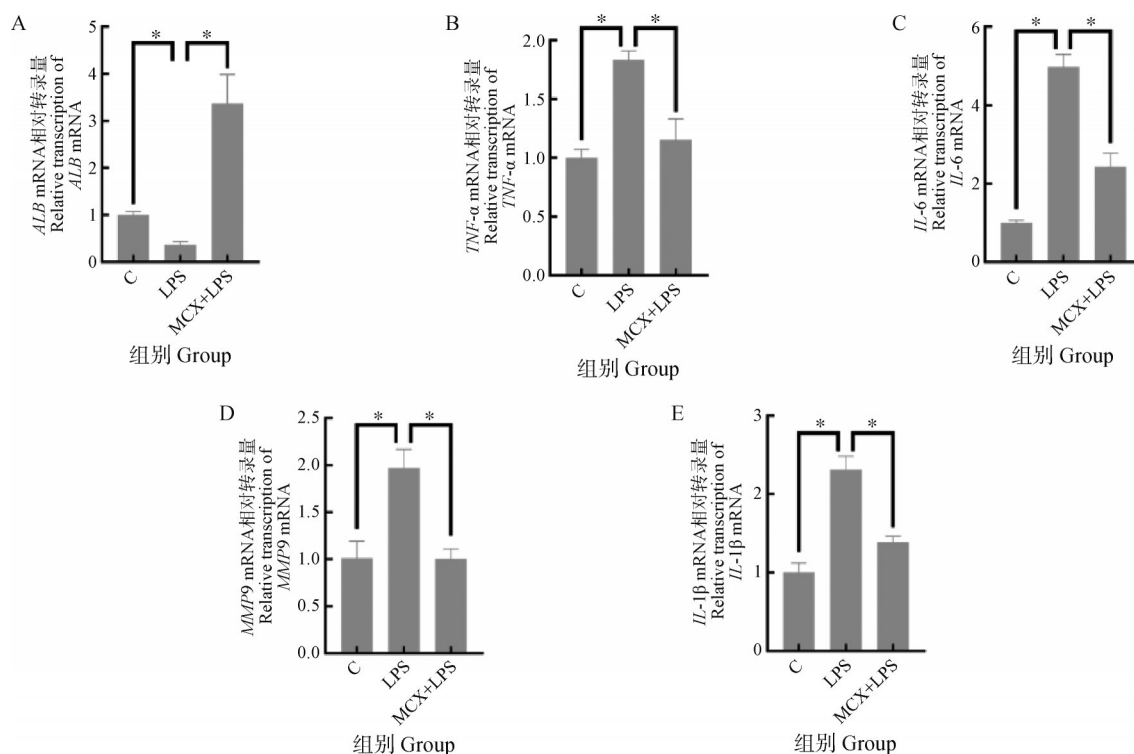


图 7 马齿苋的部分核心化合物与猪炎症反应关键靶点的分子对接模式
Fig. 7 Molecular docking mode of some core compounds of *Portulaca oleracea* and key targets of porcine inflammatory response



*. $P < 0.05$
图 8 不同浓度马齿苋及不同作用时间对 MAC-T 活力的影响
Fig. 8 Effects of different concentrations of *Portulaca oleracea* and different action time on MAC-T activity



20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 马齿苋处理 MAC-T 12 h 后相关基因转录情况: A. *ALB*; B. *TNF- α* ; C. *IL-6*; D. *IL-1 β* ; E. *MMP9*. *. $P < 0.05$

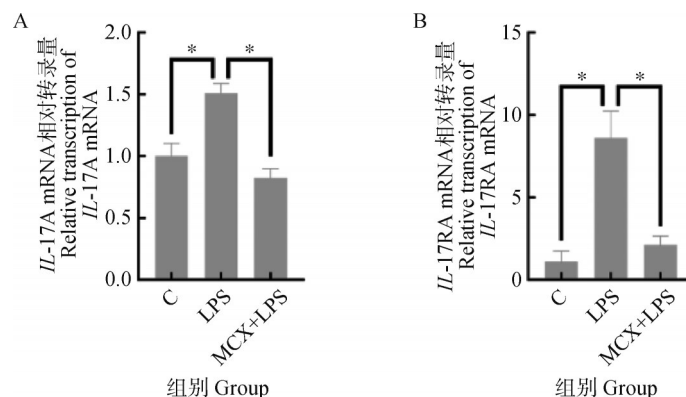
Genes transcription of MAC-T after 12 h treatment with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ purslane: A. *ALB*; B. *TNF- α* ; C. *IL-6*; D. *IL-1 β* ; E. *MMP9*. *. $P < 0.05$

图9 马齿苋对 MAC-T 关键靶点的影响

Fig. 9 Effects of purslane on key targets of MAC-T

症反应的正调控、IL-6 和 IL-8 产生的正调控等生物进程发挥作用。KEGG 功能富集显示, IL-17 信号通路可能是马齿苋治疗奶牛乳腺炎的关键信号通路。IL-17 主要由辅助性 T 细胞 (TH17) 产生, 可以直接或间接诱导多种细胞因子、趋化因子和炎症因子的表达。IL-17 能够泛素化 TRAF6, 进而激活 NF- κ B 和 MAPK 通路, 进一步诱导 TNF、IL-1 β 、

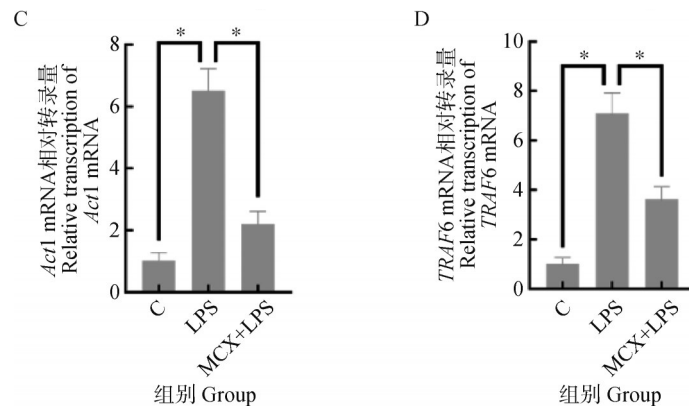
IL-6 分泌的增加, 参与炎症反应^[29]。研究表明, 槲皮素能够抑制 TH17 细胞和 IL-17 的产生, 从而减轻机体炎症反应^[30]。山奈酚能够显著抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 的表达, 并恢复 Th17/Treg 失衡^[31]。与之相反, IL-17 信号通路的激活会加剧炎症反应的发生, IL-6、IL-1 β 与 IL-8 的分泌^[32]。



(图10 Fig.10)

(转下页 Carried forward)

(续图 10 Continued)

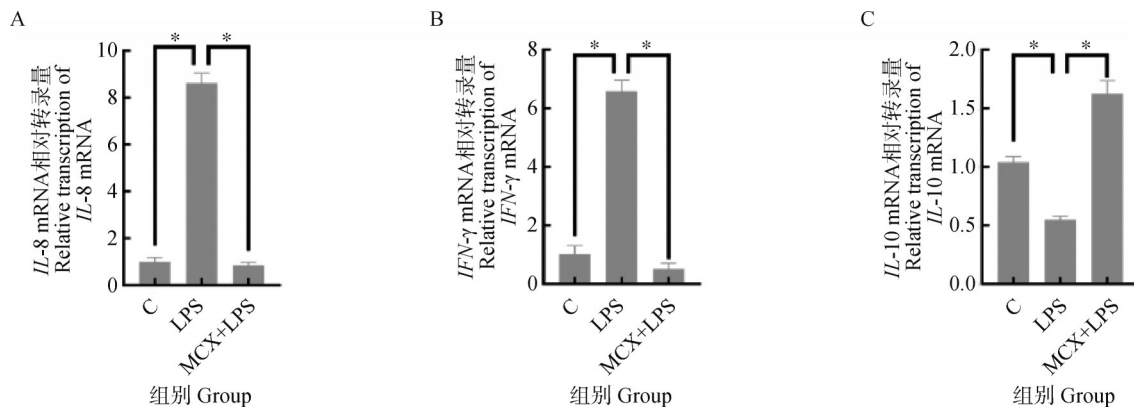


20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 马齿苋处理 MAC-T 12 h 后相关基因转录情况: A. *IL-17A*; B. *IL-17RA*; C. *Accl1*; D. *TRAF6*。*. $P < 0.05$

Genes transcription of MAC-T after 12 h treatment with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ purslane: A. *IL-17A*; B. *IL-17RA*; C. *Accl1*; D. *TRAF6*. *. $P < 0.05$

图 10 马齿苋对 MAC-T IL-17 信号通路的影响

Fig. 10 Effects of purslane on MAC-T IL-17 signaling pathway



20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 马齿苋处理 MAC-T 12 h 后相关基因转录情况: A. *IL-8*; B. *IFN-γ*; C. *IL-10*。*. $P < 0.05$ 。

Genes transcription of MAC-T after 12 h treatment with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ purslane: A. *IL-8*; B. *IFN-γ*; C. *IL-10*. *. $P < 0.05$ 。

图 11 马齿苋对 MAC-T 炎症相关基因的影响

Fig. 11 Effects of *Portulaca oleracea* on MAC-T inflammation-related genes

因此,本研究通过体外试验对网络药理学结果进行验证,结果发现,马齿苋能够显著增加 MAC-T 中 ALB 的含量,并且能够通过抑制 IL-17 信号通路,抑制下游炎症因子的释放,表明马齿苋可以通过 IL-17 信号通路来调节细胞因子的表达,从而降低 MAC-T 的炎症水平。

综上所述,本研究通过网络药理学对马齿苋调控奶牛乳腺炎的潜在作用靶点及通路进行预测,并结合体外细胞试验验证了马齿苋能够通过 IL-17 信号通路下调奶牛乳腺上皮细胞促炎因子的表达,从而抑制奶牛乳腺炎的炎症反应,为后续奶牛乳腺炎的治疗提供新的实验依据。

4 结 论

本研究通过网络药理学筛选得到 ALB、TNF、IL-6、IL-1B 和 MMP9 是马齿苋治疗奶牛乳腺炎的核心靶点,并且 KEGG 富集分析显示 IL-17 信号通路是其发挥调控作用的重要通路,qRT-PCR 验证结果表明,马齿苋可以通过 IL-17 信号通路抑制下游炎症因子的表达,进而减轻奶牛乳腺炎的炎症反应,为今后奶牛乳腺炎的防治策略研究提供理论依据。

参考文献 (References):

[1] 乔 勋,石元军. 奶牛乳房炎诊断和治疗方法的研究

- 进展[J]. 中国乳业, 2023(4):72-75.
- QIAO X, SHI Y J. Research progress on diagnosis and treatment of mastitis in dairy cows[J]. *China Dairy*, 2023(4):72-75. (in Chinese)
- [2] MUES L, KEMPER N, BLUMENBERG J A. Occurrence and diagnostic of intermittent shedding of staphylococcus aureus in bovine mammary infection[J]. *Front Vet Sci*, 2025, 12:1523698.
- [3] 卢智奇, 侯丽娥, 吴非凡, 等. 奶牛乳腺炎的影响因素及防治措施研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2023, 42(6):26-31.
- LU Z Q, HOU L E, WU F F, et al. Research progress on influencing factors and prevention measures of dairy cow mastitis[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023, 42(6):26-31. (in Chinese)
- [4] TONG X, BARKEMA H W, NOBREGA D B, et al. Virulence of bacteria causing mastitis in dairy cows: A literature review[J]. *Microorganisms*, 2025, 13(1):167.
- [5] PIRES A J, PEREIRA G, FANGUEIRO D, et al. When the solution becomes the problem: a review on antimicrobial resistance in dairy cattle[J]. *Future Microbiol*, 2024, 19(10):903-929.
- [6] 张亚楠, 曹梦杰, 王 君. 马齿苋提取物的生物学功能及其在动物养殖中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2024, 47(17):166-170.
- ZHANG Y N, CAO M J, WANG J. Research progress on biological function and its application of *Portulaca oleracea* extract in animal breeding[J]. *Feed Research*, 2024, 47(17):166-170. (in Chinese)
- [7] 张红岩, 雷 霆, 高凤仙. 马齿苋的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2022, 34(2):765-771.
- ZHANG H Y, LEI T, GAO F X. Biological functions of purslane and its application in livestock and poultry production[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(2):765-771. (in Chinese)
- [8] 陈国妮, 孙飞龙, 闫亚茹. 马齿苋的活性成分及其在畜牧业中的应用[J]. 饲料广角, 2015, (17):44-47.
- CHEN G N, SUN F L, YAN Y R. The active ingredients of purslane and its application in animal husbandry[J]. *Feed China*, 2015, (17):44-47. (in Chinese)
- [9] 姚 燕, 李 展. 中草药在奶牛乳房炎防治中的应用[J]. 中国畜牧业, 2017(5):50-51.
- YAO Y, LI Z. Application of Chinese herbal medicine in prevention and treatment of cow mastitis[J]. *China Animal Industry*, 2017(5):50-51. (in Chinese)
- [10] MACIEJEWSKA-TURSKA M, GEORGIEV M I, KAI G, et al. Advances in bioinformatic methods for the acceleration of the drug discovery from nature[J]. *Phytomedicine*, 2025, 139:156518.
- [11] YU Y, XU S, HE R, et al. Application of molecular simulation methods in food science: Status and prospects[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(6):2684-2703.
- [12] 牟瑞营, 马国成, 郭光礼, 等. 木犀草素对LPS诱导的小鼠乳腺炎保护作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(3):181-184, 295.
- MU R Y, MA G C, GUO G L, et al. Study on the protective effect of luteolin on LPS-induced mastitis in mice[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(3):181-184, 295. (in Chinese).
- [13] 王 桃, 曹 璐, 米晓钰, 等. 基于肿瘤坏死因子信号通路探讨槲皮素对小鼠乳腺炎模型的作用机制[J]. 动物营养学报, 2022, 34(6):3972-3982.
- WANG T, CAO L, MI X Y, et al. To explore the mechanism of quercetin on mouse mastitis model based on tumor necrosis factor signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(6):3972-3982. (in Chinese)
- [14] JIANG M, LV Z, HUANG Y, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bovine mammary epithelial cells by suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9:915726.
- [15] FAN Y, SHEN J, LIU X, et al. β -Sitosterol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and lipogenesis disorder in bovine mammary epithelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19):14644.
- [16] 刘莉莉, 陈 敏. β -谷甾醇对脂多糖诱导的小鼠乳腺上皮细胞炎症反应及乳蛋白合成的影响[J]. 动物营养学报, 2023, 35(9):5994-6003.
- LIU L L, CHEN M. Effects of β -sitosterol on lipopolysaccharide-induced inflammatory response and milk protein synthesis in mouse mammary epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(9):5994-6003. (in Chinese)
- [17] 卢 挺, 董伟韬, 陈 艳, 等. 非靶向脂质组学探究花生四烯酸对奶牛乳腺上皮细胞的影响[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(10):2086-2092.
- LU T, DONG W T, CHEN Y, et al. Exploring effect of arachidonic acid on bovine mammary epithelial cells through non-targeted lipidomics[J]. *Chinese Journal*

- of *Veterinary Science*, 2023, 43 (10) : 2086-2092. (in Chinese)
- [18] MENG M, HUO R, MA N, et al. β -carotene alleviates LPS-induced inflammation through regulating STIM1/ORAI1 expression in bovine mammary epithelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113 (Pt A) : 109377.
- [19] 葛鑫, 陈潇菲. β -胡萝卜素调节 NLRP3 炎症小体抑制金黄色葡萄球菌性乳腺炎的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45 (06) : 623-628.
- GE X, CHEN X F. Inhibitory effect on β -carotene of *Staphylococcus aureus* mastitis by regulating NLRP3 inflammasome [J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2022, 45 (06) : 623-628. (in Chinese)
- [20] 葛影影, 王根林, 张震, 等. 奶牛乳房炎血清学相关指标的变化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018 (3) : 39-43.
- GE Y Y, WANG G L, ZHANG Z, et al. Changes of serological indexes of mastitis in dairy cows [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018 (3) : 39-43. (in Chinese)
- [21] 齐宏亮, 李婧, 张涌, 等. 乳房炎奶牛组织和血液病理学研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35 (8) : 99-102.
- QI H L, LI Q, ZHANG Y, et al. Advance in histopathology and hemopathology of dairy cows with mastitis [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35 (8) : 99-102. (in Chinese)
- [22] 王振宇, 王泽青, 刘占宏, 等. 中兽药散剂治疗奶牛临床型乳房炎的研究[J]. 中国乳业, 2022 (7) : 30-35.
- WANG Z Y, WANG Z Q, LIU Z H, et al. Traditional Chinese veterinary medicine for clinical mastitis in dairy cows [J]. *China Dairy*, 2022 (7) : 30-35. (in Chinese)
- [23] KONG X, WANG M, GUO Z, et al. Evaluation the protective role of baicalin against H_2O_2 -driven oxidation, inflammation and apoptosis in bovine mammary epithelial cells [J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11 : 1504887.
- [24] SAKEMI Y, TAMURA Y, HAGIWARA K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis [J]. *J Dairy Res*, 2011, 78 (1) : 118-121.
- [25] 苗苗, 魏勇, 成宇, 等. 奶牛血清中 TNF- α 、IL-1 β 的含量变化及相关基因的 mRNA 表达量[J]. 今日畜牧兽医, 2024, 40 (4) : 11-13.
- MIAO M, WEI Y, CHENG Y, et al. The changes of TNF- α , IL-1 β and mRNA expression of related genes in serum of dairy cows [J]. *Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2024, 40 (4) : 11-13. (in Chinese)
- [26] VANDOOREN J, VAN DEN STEEN P E, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48 (3) : 222-272.
- [27] DONG Y, ZHAO H, MAN J, et al. MMP-9-mediated regulation of hypoxia-reperfusion injury-related neutrophil inflammation in an in vitro proximal tubular cell model [J]. *Ren Fail*, 2021, 43 (1) : 900-910.
- [28] CAGGIANO N, SMIRNOFF A L, BOTTINI J M, et al. Protease activity and protein profile in milk from healthy dairy cows and cows with different types of mastitis [J]. *Int Dairy J*, 2018, 89 : 1-5.
- [29] FENG Y, ZHENG C, ZHOU Z, et al. IL-17A neutralizing antibody attenuates eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* by involving IL-17RA/Traf6/NF- κ B signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 384 (1) : 111554.
- [30] KIM H R, KIM B M, WON J Y, et al. Quercetin, a plant polyphenol, has Potential for the prevention of bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. *J Med Food*, 2019, 22 (2) : 152-161.
- [31] LI N, CHEN S, DENG W, et al. Kaempferol attenuates gouty arthritis by regulating the balance of Th17/Treg cells and secretion of IL-17 [J]. *Inflammation*, 2023, 46 (5) : 1901-1916.
- [32] CHEN H L, LO C H, HUANG C C, et al. Galectin-7 downregulation in lesional keratinocytes contributes to enhanced IL-17A signaling and skin pathology in psoriasis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131 (1) : e130740.

(编辑 白永平)