



基于网络药理学与体外试验研究酸枣仁缓解 奶牛乳房炎的机制

王 甜^{1,2}, 徐茂林¹, 朱梓萌¹, 邓 娴¹, 韩 博^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 塔里木大学动物科学与技术学院, 阿拉尔 843300)

摘 要: 本研究基于网络药理学、分子对接和体外试验, 开展酸枣仁抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导奶牛乳房炎的机制。通过TCMSP和Swiss Target Prediction Pharm Mapper筛选酸枣仁核心成分和潜在靶点, 结合DisGeNET、OMIM和GeneCards等数据库检索获得奶牛乳房炎相关靶点; 利用Venny、STRING数据库和Cytoscape 3.8.0软件进行拓扑分析, 构建药物靶点和疾病靶点互作网络图, 筛选治疗奶牛乳房炎核心靶点, 再对核心靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析, 采用AutoDock对核心靶点和活性成分进行分子对接和可视化分析。构建LPS诱导奶牛乳腺上皮细胞(bMECs)炎症模型, CCK-8、qRT-PCR、Western blot、ELISA分析酸枣仁对bMECs炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)和核心靶点mRNA及蛋白表达的影响。结果表明: 筛选出酸枣仁有效活性成分9个, 治疗奶牛乳房炎潜在靶点235个。PPI网络图获得表皮生长因子受体(EGFR)、雌激素受体1(ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基 α 受体(PIK3CA)核心靶点4个。GO和KEGG富集分析显示, 主要参与细胞质钙信号系统上调, 受体复合和类固醇结合等生物过程, 涉及肿瘤中的中心碳代谢、内分泌耐药、胰岛素耐药及表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。分子对接显示, 酸枣仁核心成分白桦脂酸和胡萝卜苷与ESR1有较好的结合性。体外试验结果显示, 酸枣仁醇提物可显著抑制LPS诱导bMECs的IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和ESR1、PI3KCA、PPARG mRNA及ESR1蛋白表达。综上所述, 酸枣仁可通过白桦脂酸等活性成分调控核心靶点ESR1等发挥治疗奶牛乳房炎的作用。

关键词: 奶牛乳房炎; 酸枣仁网络药理学; 白桦脂酸分子对接; 奶牛乳腺上皮细胞; 炎症因子

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1711-11

Mechanism of Ziziphi Spinosae Semen Alleviated Bovine Mastitis through Network Pharmacology and *in vitro* Experiments

WANG Tian^{1,2}, XU Maolin¹, ZHU Zimeng¹, DENG Xian¹, HAN Bo^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: This study aimed to investigate the mechanism of Ziziphi Spinosae Semen in inhibiting LPS-induced bovine mastitis using network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments. The core components and potential targets of Ziziphi Spinosae Semen were screened through TCMSP, Swiss Target Prediction and Pharm Mapper databases, while bovine mastitis-related targets were obtained from DisGeNET, OMIM and GeneCards databases. Venny, STRING

收稿日期: 2025-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172928)

作者简介: 王 甜, 博士生, 主要从事兽医内科学与诊断学相关研究, E-mail: 1351750164@qq.com

* 通信作者: 韩 博, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: hanbo@cau.edu.cn

database and Cytoscape 3.8.0 software were used for topological analysis to construct compound-target and disease-target interaction networks. Hub targets for treating bovine mastitis were screened and subjected to GO functional and KEGG pathway enrichment analyses. Molecular docking and visualization were performed between hub targets and active components using AutoDock. An LPS-induced inflammatory model was established in bMECs, with CCK-8 assay, qRT-PCR, Western blot and ELISA used to analyze the effects of Ziziphi Spinosae Semen on inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and hub targets at mRNA and protein levels. Results showed that: 9 bioactive components of Ziziphi Spinosae Semen and 235 potential therapeutic targets for bovine mastitis were identified; PPI analysis revealed 4 hub targets: epidermal growth factor receptor (EGFR), estrogen receptor 1 (ESR1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA); GO and KEGG enrichment analyses indicated predominant involvement in biological processes including positive regulation of cytosolic ion concentration, receptor complex formation, and steroid binding, with significant associations to pathways such as central carbon metabolism in cancer, endocrine resistance, insulin resistance, and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance; Molecular docking demonstrated high binding affinity between ESR1 and the key components of Ziziphi Spinosae Semen, betulinic acid and daucosterol. *In vitro* experiments confirmed that Ziziphi Spinosae Semen bioactive components significantly suppressed the LPS-induced upregulation of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and ESR1, PI3KCA, PPARG mRNA and ESR1 protein levels in bMECs. In conclusion, Ziziphi Spinosae Semen exerts therapeutic effects against bovine mastitis primarily through bioactive components like betulinic acid by modulating key targets including ESR1. This study provides a scientific foundation for developing Ziziphi Spinosae Semen based therapeutic strategies for bovine mastitis intervention.

Keywords: bovine mastitis; Ziziphi Spinosae Semen network pharmacology; molecular docking; bovine mammary epithelial cells; inflammation factors

* **Corresponding author:** HAN Bo, E-mail: hanbo@cau.edu.cn

奶牛乳房炎(乳腺炎)是严重危害奶牛养殖业的一种疾病^[1],是由病原微生物侵入乳腺组织引发局部炎症反应的一种疾病^[2]。可导致奶牛产奶量下降、乳品质量降低和治疗成本增加^[3]。目前,青霉素类、头孢类和大环内酯类等抗生素仍是治疗奶牛乳房炎的主要方法,但长期使用抗生素会导致细菌耐药性增加、乳制品药物残留、肠道微生态紊乱以及养殖成本上升等不良后果^[4]。基于此,中草药、抗菌肽和噬菌体等安全高效的天然替代疗法已成为奶牛乳房炎防控的热点^[5]。中药方剂七草乳康粉(金银花、蒲公英、紫花地丁、王不留行、路路通、黄芪和甘草)口服5 d,可显著降低奶牛隐性乳房炎乳样中的体细胞数,还降低血清炎症因子TNF- α 和IL-8水平,细菌治愈率达到81.8%^[6]。黄芩-红花-蒲公英-金银花提取物对奶牛乳房炎性金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无乳链球菌和乳房链球菌均有体外抑制

作用,可使SD大鼠镇痛率达26.1%,消炎率为12.1%,解热效果高达52.8%^[7]。蛇床子素可浓度依赖性地抑制脂磷壁酸诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症因子释放^[8]。但是,这些中草药存在生物利用度低和靶向递送差等核心问题,使奶牛乳房炎治疗不尽人意。酸枣仁(Ziziphi Spinosae Semen)含有皂苷、黄酮、生物碱和脂肪酸等多种活性成分,具有靶向抗炎、镇静和抗氧化等作用^[9]。可激活AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路,减少细胞凋亡^[10],改善心肌损伤^[11]。借助过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR α)的激活来抑制炎症反应和氧化应激^[12]。但其在奶牛乳房炎防治中的作用尚不明确。因此,本研究通过网络药理学筛选酸枣仁核心成分,对其治疗奶牛乳房炎的核心靶点进行分子对接验证,通过体外试验证实酸枣仁的治疗作用。旨在阐明酸枣仁缓解奶牛乳房炎的潜在机制,为开发低耐药性

和高利用度的中药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

奶牛乳腺上皮细胞 bMECs 由本实验室保存。DMEM 培养基、0.25% 胰酶(批号:6124494、2868000,美国 Gibco 公司),胎牛血清(批号:48102802A,浙江百迪生物科技有限公司),TransZol Up Plus RNA Kit(批号:P51101,北京全氏金生物),HiScript III All-in-one RT SuperMixPerfect for qPCR、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(批号:7E139214、7E1891B5,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),无酶无菌水、CCK-8 试剂盒、脂多糖(批号:20240903、240007003、3231030007,北京索莱宝科技有限公司),ESR1 Estrogen Receptor α Rabbit pAb(批号:T11270940,沈阳万类生物科技有限公司),IL-1 beta Polyclonal antibody、Multi-rAbTM HRP-Goat Anti-Rabbit Recombinant Secondary Antibody (H+L)(批号:16806-1-AP、RGAR001,武汉三鹰生物技术有限公司),牛肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、牛白细胞介素 1 β (IL-1 β)、牛白细胞介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒(批号:20250630-N683388L、20250630-N248991L、20250630-N138834D,上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 主要仪器与设备

二氧化碳培养箱 371(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);ABI StepOne Plus 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);NanoDrop 1000 微量分光光度计(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 酸枣仁活性成分筛选 通过 TCMSP (<http://lsp.Nwu.Edu.cn/tcmsp.php>)、SwissTarget-Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库搜索酸枣仁靶点,舍弃重复项,筛选得到关键靶点,即得其对应的靶点基因名称。

1.3.2 奶牛乳房炎及致病菌相关靶点筛选 从 DisGeNET、OMIM、GeneCards 等数据库检索相关靶点。纳入金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、乳房链球菌、牛支原体和鲍曼不动杆菌等常见病原体相关靶点检索并搜集有关乳房炎的靶点,对结果汇总后删除重复基因,即得奶牛乳房炎靶基因。

1.3.3 酸枣仁活性成分蛋白靶点筛选和蛋白相互

作用(Protein-protein interaction, PPI)网络图分析

对酸枣仁与乳房炎的靶基因进行交集,得到交集靶点。将上述所得靶点导入 STRING(<https://cn.string-db.org>)数据库,构建酸枣仁与奶牛乳房炎共同靶蛋白的 PPI 网络图。导出 PPI 网络图并将结果下载为 TSV 格式文件,用 Cytoscape 3.8.0 软件对网络图进行深入分析。

1.3.4 靶点 GO 功能注释和 KEGG 富集分析 酸枣仁与奶牛乳房炎的交集靶点数据基于 R 语言的分析功能进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。按校正 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准进行筛选,并依据 P 值由小到大排序,分别选取 GO 分析前 10 位、KEGG 分析前 20 位的靶点进行绘图。

1.3.5 “酸枣仁成分-奶牛乳房炎靶点-信号通路”网络图构建 筛选核心靶点,利用 Cytoscape 3.9.1 软件,进行网络拓扑结构分析,绘制“酸枣仁-奶牛乳房炎靶点-信号通路 PPI 网络图”。

1.3.6 分子对接 使用分子对接来评估活性成分与其靶点之间的结合强度。根据在 PPI 网络中最大团中心性(maximal clique centrality, MCC)算法排名,选择前 4 位相关靶点和前 4 个化合物进行分子对接。在 Pubchem 数据库下载核心化合物三维结构 sdf 文件。以关键靶点为受体,受体的 pdb 文件在 RCSB 数据库中获取。在 Autodock 中进行对接,统计记录对接分数。

1.3.7 奶牛乳腺上皮细胞体外验证 细胞增殖:采用《中国药典》(2020 年版)及石宇浩等^[13]提及的方法,制备酸枣仁醇提物,提取物用 DMSO 溶解制备酸枣仁醇提物。复苏液氮中保存的 bMECs,加入完全培养基(DMEM+10% 胎牛血清),在 37℃、5% CO₂ 中稳定传代 3~5 代,调整细胞浓度至 5 000·孔⁻¹,在 96 孔板中培养至贴壁,设置 0、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800、1 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酸枣仁醇提物与 bMECs 共孵育 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 反应液,37℃孵育 1 h 后,测定 450 nm 吸光度值,测定细胞增殖。

试验分组:设置溶剂对照组(含细胞和 0.01% DMSO 的完全培养基);LPS 模型组(完全培养基+10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 1 h);酸枣仁提取物低剂量组(完全培养基+提取物 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12 h+10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 1 h);中剂量组(完全培养基+提取物 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12 h+10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 1 h);高剂量组(完全培养基+提取物

200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 12 h+10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 1 h), 每组 3 个复孔。

细胞炎性因子和核心靶点 mRNA 表达分析: bMECs 接种至 24 孔板中, 培养过夜至细胞贴壁, 细胞处理结束后, 细胞用 PBS 漂洗 3 次, TransZol Up Plus RNA Kit 提取各组细胞 mRNA, 测定 RNA 浓度和纯度。根据 HiScript III All-in-one RT Super-MixPerfect for qPCR 操作步骤合成 cDNA, Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 检测样品中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎性因子和 ESR1、PI3KCA、PPARG、EGFR mRNA 转录, 以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因相对转录量。

细胞炎性因子和主要靶点蛋白的 Western blot 检测: RIPA 裂解不同处理组细胞, 离心后取上清, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜至 PVDF 膜; 封闭 1 h, 一抗 ESR1 (稀释倍数为 1:500)、IL-1 β (稀释倍数为 1:1 000)、GAPDH (稀释倍数为 1:5 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, HRP 标记二抗 (稀释倍数为 1:5 000) 室温 1 h, ECL 显影, 用 Image J 软件测量灰度值并分析。

细胞分泌炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 ELISA 检测: 收集不同处理组细胞上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 去除细胞碎片。样本与标准品同时加入预包被板, 一抗孵育 (37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h), 洗涤, 酶标二抗孵育 (37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), TMB 显色 (室温避光 15 min) 和终止反应, 酶标仪测定 450 nm 吸光度, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算各组细胞培养上清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 浓度。

1.3.8 数据处理 采用 SPSS 统计分析各组数据, 以“平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$)”表示, 采用单因素方

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence design of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence
IL-1 β	F: ATGACTTCCAAGCTGGCTGTTG R: TTGATAAATTTGGGGTGGAAAG
IL-6	F: CACTCCATTTCGCTGTCT R: GTGTCTCCTTGCTGCTT
TNF- α	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: GGGCCATACAGCTCCACAAA
ESR1	F: ACTGTCTCAGCCCTTGACTTC R: CTCGTTGGCTTGGATCTGGT
PI3KCA	F: CACCAGAACTGCCAAAGCAC R: AGCCATTTCATTCACCTGGG
PPARG	F: AAGAGCTGACCCGATGGTTG R: GGTTCACAAAGCCGGGGATA
EGFR	F: GGGAGCTACCCTCTCAAGGA R: GGGGCTGGAAGTTTATGGCT
GAPDH	F: TCACCAACTGGGACGACA R: GCATACAGGGACAGCACA

差进行分析 (one-way ANOVA), Graphpad Prism 软件绘制统计图, $P<0.05$ 差异显著。

2 结 果

2.1 酸枣仁活性成分筛选

通过 TCMS 和 Swiss Target Prediction Pharm Mapper 数据库获取酸枣仁化学成分。筛选口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 的活性成分, 包括酸枣仁环肽、白桦脂酸和美洲茶酸等 9 个有效成分 (表 2)。

表 2 酸枣仁的活性成分

Table 2 The active components of Ziziphi Spinosae Semen

Mol 编号 Mol ID	化合物 Compound	口服生物利用度/% Oral bioavailability (OB)	类药性 Drug-likeness (DL)
MOL001521	美洲茶酸 Ceanothic acid	33.41	0.77
MOL001522	(S)-樟叶木防己碱 (S)-Coclaurine	42.35	0.24
MOL001525	胡萝卜苷 Daucosterol	36.91	0.75
MOL001527	酸枣仁皂苷 A Jujuboside A	34.96	0.62
MOL001532	植物甾醇 Phytosterol	36.91	0.75
MOL001539	酸枣仁环肽 Sanjoinenine	67.28	0.79
MOL001542	异荛草素 Swertisin	31.83	0.75
MOL001546	酸枣仁宁碱 Zizyphusine	41.53	0.55
MOL000211	白桦脂酸 Betulinic acid	55.38	0.78

2.2 酸枣仁和奶牛乳房炎作用靶点筛选

通过 GeneCards 和 OMIM 等数据库检索到奶牛乳房炎靶点 178 个、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等常见病原菌靶点 11 913 个,合计靶点 12 091 个;通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库搜索酸枣仁的药物靶点 285 个。将酸枣仁靶点和奶牛乳房炎疾病靶点交集得到交集靶点 235 个(图 1A)。

利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建酸枣仁成分-奶牛乳房炎靶点-信号通路网络图显示,其中药物成分酸枣仁环肽、白桦脂酸、美洲茶酸和胡萝卜苷等在网络中的 Degree 值较大,疾病靶点 PTGES、HSD11B1、CYP51A1、RORC 等的连接边线和相关关联较多(图 1B),酸枣仁减轻奶牛乳房炎的作用是多靶点多通路协同作用。

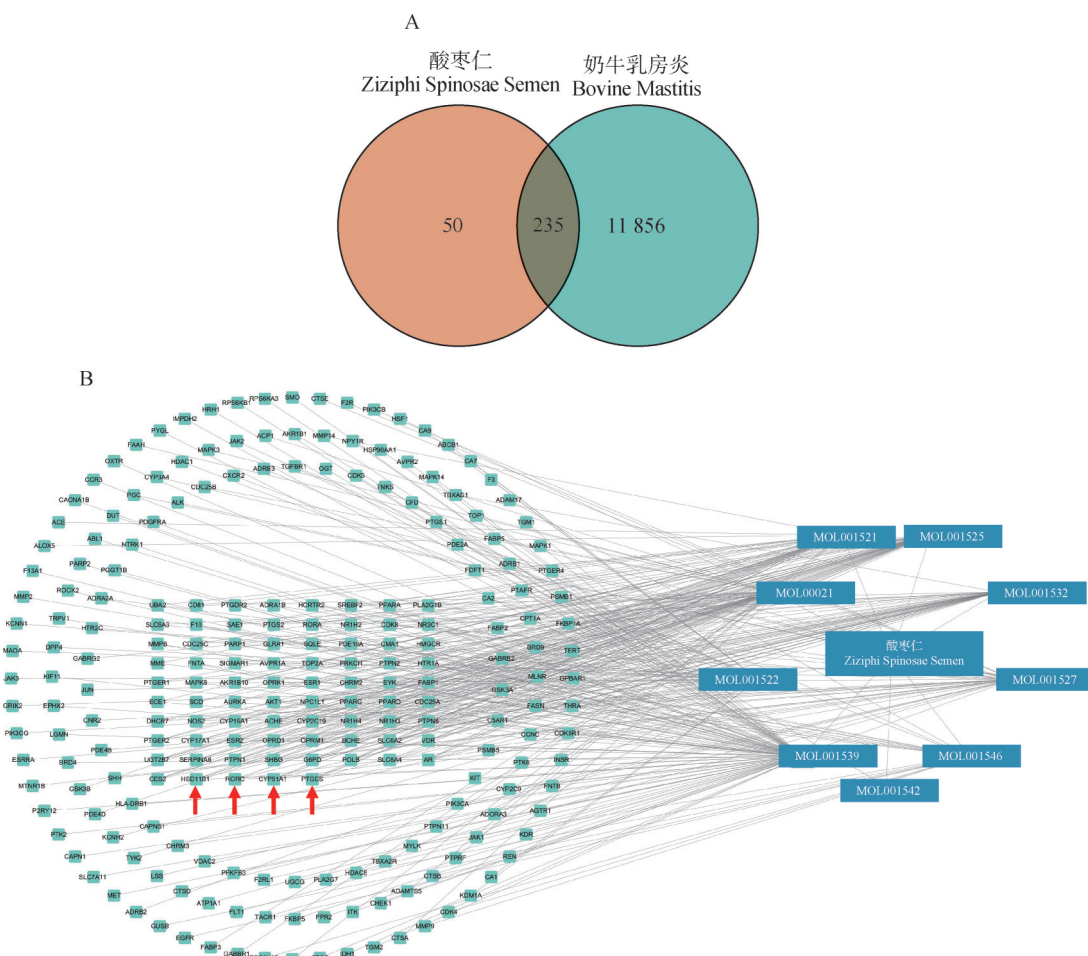


图1 酸枣仁与奶牛乳房炎交集靶点 Venn 图(A)及药物-成分-靶点网络图(B)

Fig. 1 Venn diagram of Ziziphi Spinosae Semen and bovine mastitis (A) and drug-component-target network diagram (B)

2.3 交集靶点基因功能分析

通过 GO 富集分析,以 $P < 0.05$ 作为标准,共筛选出 588 个条目,包括 352 个生物过程基因(BP)、72 个细胞组分基因(CC)、164 个分子功能基因(MF),选取各模块排名前 10 条目绘制富集图,包括细胞质钙信号系统上调,受体复合和类固醇结合等生物过程(图 2A)。KEGG 富集分析得到 143 条信号通路($P < 0.05$),结果显示:酸枣仁-奶牛乳房炎的交集靶点基因主要涉及肿瘤中心碳代谢,内分泌

耐药,胰岛素耐药,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路(图 2B)。

2.4 核心靶点蛋白互作网络图分析

通过 Cytoscape 3.8.0 软件对 STRING 数据库中的 47 个关键靶点进行 PPI 网络可视化分析(图 3)。根据 MCC 算法得到排名前 4 的靶点为 EGFR、ESR1、PPARG、PIK3CA。

2.5 分子对接验证

采用 AutoDock 软件将“酸枣仁药物-成分-奶牛

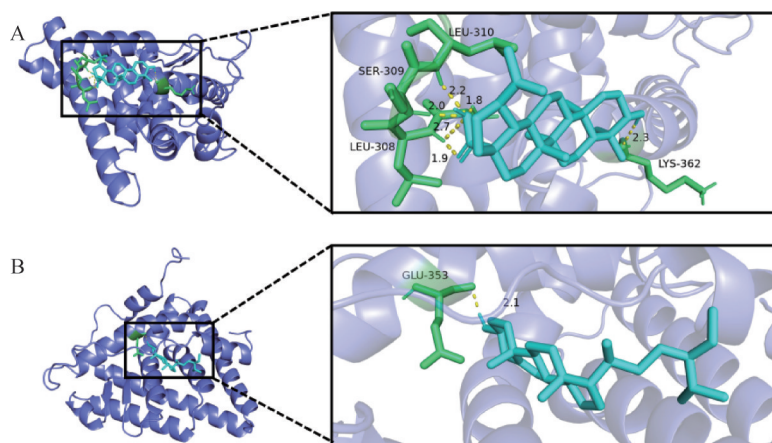
2.6.1 酸枣仁醇提取物对bMECs毒性的研究 基于CCK-8测定不同浓度酸枣仁醇提取物对bMECs毒性的影响,结果如图7所示。与对照组比较,酸枣仁

醇提取物浓度 $\leq 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率无明显变化;随着酸枣仁醇提取物浓度的增加,细胞存活率逐

渐降低。因此,后续试验选取 50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为低中高浓度分组试验。

表 3 分子与核心靶点的分子对接(结合能)

核心靶点 Core target	酸枣仁环肽 Sanjoinenine	白桦脂酸 Betulinic acid	美洲茶酸 Ceanothic acid	胡萝卜苷 Daucosterol
EGFR	-22.59	-33.35	-34.35	-34.48
ESR1	-27.95	-36.69	-31.51	-36.57
PPARG	-26.02	-24.98	-25.65	-34.18
PIK3CA	-28.24	-32.30	-25.56	-30.71

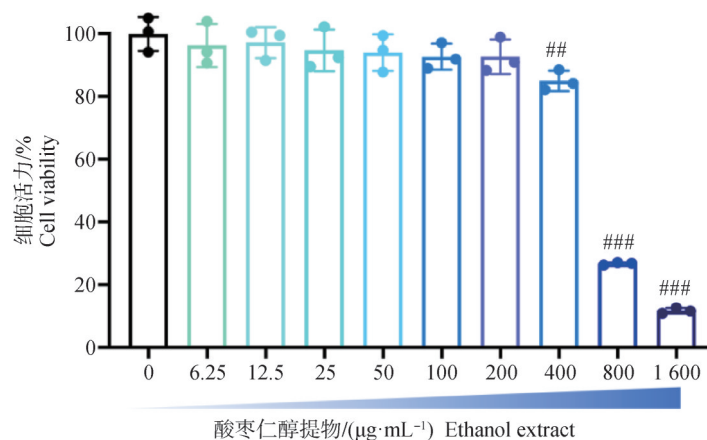


A. 白桦脂酸-ESR1; B. 胡萝卜苷-ESR1

A. Betulinic acid-ESR1; B. Daucosterol-ESR1

图 4 分子与靶点对接

Fig. 4 Docking results of compounds with targets



数据为“ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$ 。与对照组相比, ##. $P<0.01$, ###. $P<0.001$

The data is represented as “ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$. Compared with control group, ##. $P<0.01$, ###. $P<0.001$

图 5 酸枣仁醇提取物对 bMECs 细胞活力的影响

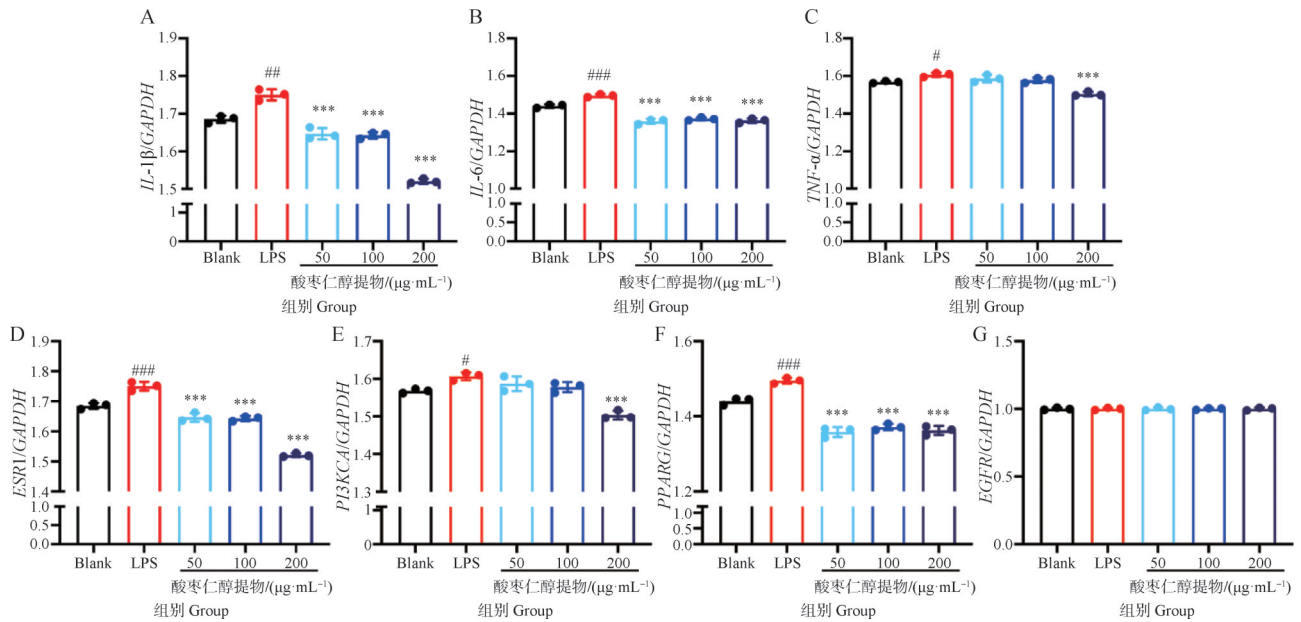
Fig. 5 Effect of ethanol extract of Ziziphi Spinosa Semen on the viability of bMECs

2.6.2 酸枣仁醇提取物对 LPS 诱导 bMECs 炎症因子和核心靶点的 mRNA 和蛋白表达的影响

图 6 所示,与对照组相比,LPS 诱导 bMECs 的试验组细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 ESR1、

PI3KCA、*PPARG* 的 mRNA 转录水平均显著上调, 添加不同浓度酸枣仁醇提取物使上述炎症因子及 *ESR1*、*PI3KCA*、*PPARG* 的 mRNA 转录水平均下调, 且高浓度组的转录水平显著下调 ($P < 0.01$); 而与对照组相比, LPS 组中 bMECs 的 EGFR 无显著变化, 添加不同浓度酸枣仁醇提取物后, EGFR 的 mRNA 与 LPS 组无显著差异。结合分子对接中白

桦脂酸与 *ESR1* ($-36.69 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、胡萝卜苷与 *ESR1* ($-36.57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、胡萝卜苷与 *PPARG* ($-34.18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的高结合活性, 说明酸枣仁醇提取物对 LPS 诱导的 bMECs 炎症因子、*ESR1*、*PI3KCA*、*PPARG* 的 mRNA 转录具有抑制作用, 表明酸枣仁通过多靶点协同调控炎症通路。



数据为“ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$ 。与空白对照组相比, #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, ###, $P < 0.001$; 与模型组 (LPS) 相比, ***, $P < 0.001$

The data is represented as “ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$. Compared with blank control group, #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, ###, $P < 0.001$; Compared with model group (LPS), ***, $P < 0.001$

图6 酸枣仁醇提取物对bMECs炎症因子和核心靶点mRNA转录的影响

Fig. 6 Effects of ethanol extract of Ziziphi Spinosae Semen on inflammatory cytokines and core targets mRNA transcription in bMECs

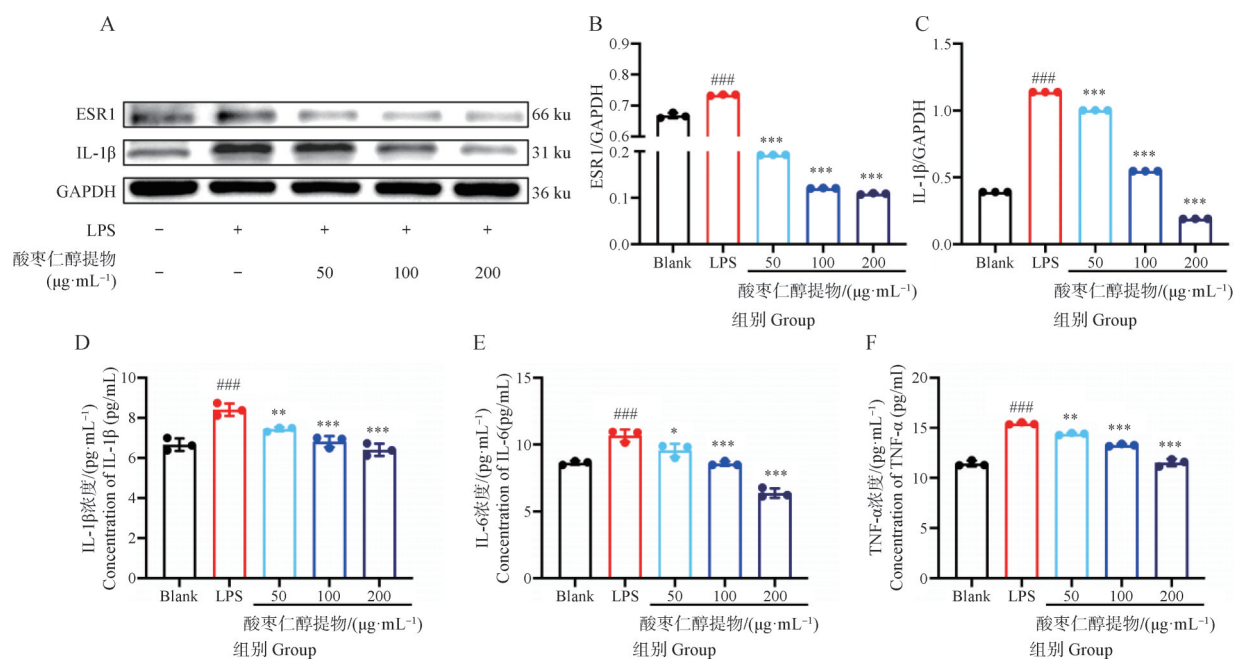
蛋白表达结果如图7所示, 与对照组相比, LPS 处理可显著上调 IL-1β 和 ESR1 蛋白表达及 IL-1β、IL-6、TNF-α 的释放。酸枣仁醇提取物可随浓度变化抑制 IL-1β 和 ESR1 蛋白表达及 IL-1β、IL-6、TNF-α 的释放。

3 讨论

本研究基于 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 平台获得酸枣仁环肽、白桦脂酸和美洲茶酸等 9 个活性成分。据报道, 白桦脂酸^[14]、胡萝卜苷^[15]、酸枣仁皂苷 A^[16] 等有抗炎作用。酸枣仁与奶牛乳房炎相关基因交集获得 235 个交集靶点, 提示酸枣仁与奶牛乳房炎存在密切联系。

其中核心靶点主要参与类固醇代谢与炎症等

过程, 而 PPI 网络筛选出的 EGFR、ESR1、PPARG、PI3KCA 作为核心靶点, qPCR 结果显示, 酸枣仁同时下调 *ESR1*、*PPARG*、*PI3KCA* 的 mRNA 转录, 表明酸枣仁可能通过多靶点途径缓解奶牛乳房炎: 1) 酸枣仁可能通过调控 EGFR/MAPK 信号通路发挥治疗作用。EGFR 作为一种受体酪氨酸激酶 (RTK), 其功能活性主要受磷酸化修饰调控, 而非转录水平变化。本研究虽未观察到酸枣仁醇提取物对 EGFR mRNA 表达的显著影响, 但网络药理学分析提示, 其活性成分与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等通路密切相关。已有研究表明, LPS 刺激可通过 TLR4 与 EGFR 之间的串扰作用, 激活 MAPK 通路, 进而促进 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等炎症因子的表达, 诱发细胞炎症损伤^[17]。因此推测, 酸枣仁中的



数据为“ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$ 。与空白对照组相比, $###P<0.001$; 与模型组(LPS)相比, $*$. $P<0.05$, $**$. $P<0.01$, $***$. $P<0.001$

The data is represented as “ $\bar{x} \pm s$ ”, $n=3$. Compared with blank control group, $###$. $P<0.001$; Compared with model group (LPS), $*$. $P<0.05$, $**$. $P<0.01$, $***$. $P<0.001$

图7 酸枣仁醇提物对bMECs炎症因子和ESR1蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of ethanol extract of Ziziphi Spinosa Semen on inflammatory cytokines and ESR1 protein expression in bMECs

活性成分可能通过抑制EGFR蛋白的磷酸化过程,阻断其下游MAPK通路的过度激活,从而减轻炎症反应。2)酸枣仁可能通过调控细胞钙离子浓度和自噬途径发挥。PPARG作为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ,是核受体超家族的重要成员,在代谢调控、细胞分化和免疫炎症反应中起关键作用。研究发现,LPS可抑制PPARG及其下游酶活性,进而影响氧化应激和自噬过程^[18]。值得注意的是,奶牛乳房炎早期PPARG基因表达上调^[19]。酸枣仁活性成分与钙离子稳态调控和吞噬作用等过程相关,提示其可能通过调控细胞钙离子浓度和自噬途径发挥治疗作用。3)酸枣仁可能通过PI3K-Akt/mTOR通路介导cAMP信号发挥治疗作用。PIK3CA是PI3K α 的催化亚基,在PI3K/Akt/mTOR信号通路中起重要作用。LPS主要通过激活PI3K-Akt和mTOR信号通路诱导bMECs炎症反应^[20]。网络分析显示,酸枣仁活性成分与PI3K/Akt信号通路激活和cAMP信号传导密切相关,提示其可能通过调控PI3K-Akt/mTOR通路介导cAMP信号发挥治疗作用。4)酸枣仁可能通过结合ESR1受体,调控炎症反应。ESR1作为核受体超家族成员,在与雌激

素结合后可促进受体二聚化及核转位,进而通过结合DNA上的雌激素应答元件(ERE)调控下游基因转录。Zhang等^[21]研究发现,刺芒柄花素可通过ESR1/NLRP3/Caspase-1通路改善LPS通过TLR4受体引起的气道炎症。ER α 作为ESR1编码的核受体蛋白,白桦脂酸可上调其mRNA和蛋白表达,促进雌激素释放,缓解线粒体介导的细胞凋亡^[22]。雌二醇(E2, 50 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 24 h)可增强bMECs对金黄色葡萄球菌的抵抗能力,通过ER α 调控先天免疫,抑制金黄色葡萄球菌感染诱导TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA高转录^[23]。结合本研究中,白桦脂酸和胡萝卜苷与ESR1的较高结合能,提示酸枣仁可能通过竞争性拮抗雌激素受体抑制奶牛乳腺组织的炎症反应。

体外试验发现,在LPS诱导的bMECs中,酸枣仁醇提物能有效抑制TNF- α 、IL-1 β 和IL-6炎症因子及ESR1的表达。结合分子对接结果,推测酸枣仁可能结合ESR1配体结合域,调控雌激素通路,抑制LPS诱导的炎症因子表达,发挥抗炎作用。

白桦脂酸、胡萝卜苷、美洲茶酸、酸枣仁环肽均为非水溶性化合物,酸枣仁醇提物采用标准工艺制

备,文献已证实其含白桦脂酸、胡萝卜苷、美洲茶酸等活性成分^[13, 24]。未来研究将通过色谱技术进一步量化提取物中各成分比例。尽管本研究为单独验证白桦脂酸等单体成分的作用,但分子对接表明其与核心靶点(ESR1)结合力强,且白桦脂酸可抑制NF- κ B通路减轻炎症^[25],胡萝卜苷可通过P38/NF- κ B/NLRP3缓解炎症反应^[15]。后期,也将进一步分离各活性成分单体,明确其作用机制。

4 结 论

本研究阐明酸枣仁通过多靶点调控(ESR1/PI3KCA/PPARG)抑制奶牛乳房炎的炎性因子释放,达到从“抗菌”到“宿主免疫代谢重编程”的治疗变化。酸枣仁通过与激素受体结合,为替代抗生素防控奶牛乳房炎的研究提供数据支持。

参考文献(References):

- [1] SHARUN K, DHAMA K, TIWARI R, et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review[J]. *Vet Q*, 2021, 41(1): 107-136.
- [2] HEIKKILÄ A, LISKI E, PYÖRÄLÄ S, et al. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis[J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(10): 9493-9504.
- [3] BOBBO T, RUEGG P, STOCCO G, et al. Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(6): 4868-4883.
- [4] GOMES F, HENRIQUES M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches[J]. *Curr Microbiol*, 2016, 72(4): 377-82.
- [5] EL-SAYED A, KAMEL M. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2021, 53(2): 236.
- [6] IMAM B, OLADEJO A, WU X, et al. Anti-inflammatory and antibacterial potential of qicao rukang powder in bovine subclinical mastitis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021(27): 2148186.
- [7] YE D, SUN J, LI Y. Evaluation of toxicity, bacteriostatic, analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activities of Huangqin-Honghua-Pugongying-Jinyinhua Extract[J]. *Vet Sci*, 2021, 8(12): 330.
- [8] 徐小博, 杨天雨, 司志敏, 等. 蛇床子素抗奶牛乳腺炎的网络药理学分析和实验验证[J]. *天然产物研究与开发*, 2025, 37(10): 1953-1961, 1973.
XU X B, YANG T Y, SI Z M, et al. Anti-inflammatory effect of osthole in bovine mastitis based on network pharmacology analysis and experimental verification[J]. *Natural Product Research and Development*, 2025, 37(10): 1953-1961, 1973. (in Chinese)
- [9] WANG D, HO C, BAI N. Ziziphi Spinosae Semen: An updated review on pharmacological activity, quality control, and application[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(7): e14153.
- [10] ZHONG Y, LUO R, LIU Q, et al. Jujuboside A ameliorates high fat diet and streptozotocin induced diabetic nephropathy via suppressing oxidative stress, apoptosis, and enhancing autophagy[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 159: 112697.
- [11] BI A, LIU R, XIE M, et al. Semen Ziziphi Spinosae alleviates cardiomyocyte apoptosis in rats with coronary heart disease via the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway activation[J]. *Phytomedicine*, 2025, 142: 156743.
- [12] ZHANG W, CHENG Q, YIN L, et al. Jujuboside A through YY1/CYP2E1 signaling alleviated type 2 diabetes-associated fatty liver disease by ameliorating hepatic lipid accumulation, inflammation, and oxidative stress[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 400: 111157.
- [13] 石宇浩, 南 易, 郑 伟, 等. 酸枣仁种皮和种仁化学成分定性及半定量分析[J]. *色谱*, 2024, 42(3): 234-244.
SHI Y H, NAN Y, ZHENG W, et al. Qualitative and semiquantitative analyses of the chemical components of the seed coat and kernel of Ziziphi Spinosae Semen[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2024, 42(3): 234-244. (in Chinese)
- [14] PRADOS M, GARCÍA-MARTÍN A, UNCITIBROCETA J, et al. Betulinic acid hydroxamate prevents colonic inflammation and fibrosis in murine models of inflammatory bowel disease[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(7): 1124-1138.
- [15] ZHANG F, WANG M, ZHA Y, et al. Daucosterol alleviates alcohol-induced hepatic injury and inflammation through P38/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Nutrients*, 2023, 15(1): 223.
- [16] LU W, WU Z, ZHANG C, et al. Jujuboside exhibits

- an antiepileptogenic effect in the rat model via protection against traumatic epilepsy-induced oxidative stress and inflammatory responses [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7792791.
- [17] PRICE J, SHELDON I. Granulosa cells from emerged antral follicles of the bovine ovary initiate inflammation in response to bacterial pathogen-associated molecular patterns via Toll-like receptor pathways [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(5): 119.
- [18] MA N, WEI G, ZHANG H, et al. Cis-9, Trans-11 CLA Alleviates lipopolysaccharide-induced depression of fatty acid synthesis by inhibiting oxidative stress and autophagy in bovine mammary epithelial cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 11(1): 55.
- [19] PASSE PEREIRA H, LIMA VERARDO L, MORENA DEL CAMBRE AMARAL WELLER M, et al. Going further post-RNA-seq: *In silico* functional analyses revealing candidate genes and regulatory elements related to mastitis in dairy cattle [J]. *J Dairy Res*, 2021, 88(3): 286-292.
- [20] WANG J, HU Q, YANG J, et al. Differential expression profiles of lncRNA following lps-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 758488.
- [21] ZHANG L, WU Q, HUANG Y, et al. Formononetin ameliorates airway inflammation by suppressing ESR1/NLRP3/Caspase-1 signaling in asthma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115799.
- [22] YANG C, CHEN Y, YANG M, et al. Betulinic acid alleviates zearalenone-induced uterine injury in mice [J]. *Environ Pollut*, 2023, 316(Pt 1): 120435.
- [23] MEDINA-ESTRADA I, LÓPEZ-MEZA J E, OCHOA-ZARZOSA A. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6120509.
- [24] 卞振华, 张文明, 唐静月, 等. 基于血清代谢组学和网络药理学研究酸枣仁提取物治疗失眠的效应物质及作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 188-202.
- BIAN Z H, ZHANG W B, TANG J Y, et al. Effective substance and mechanism of Ziziphi Spinosae Semen extract in treatment of insomnia based on serum metabolomics and network pharmacology [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47(1): 188-202. (in Chinese)
- [25] ZHOU Z, CHOI J W, SHIN J Y, et al. Betulinic acid ameliorates the severity of acute pancreatitis via inhibition of the NF- κ B signaling pathway in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6871.

(编辑 白永平)