DOI:10.16016/j.2097-0927.202303087

质谱法联合网络药理学分析侗药“马镫艾”的抗炎功效

范 超[1],张在其[2],罗 莉[3],朱俊宇[3],梁华平[3],郭元彪[1] 610031 成都,西南交通大学附属医院成都市第三人民医院实验医学部[1];418000 湖南 怀化,湖南医药学院侗医药研究湖南省重点实验室[2];400042 重庆,陆军特色医学中心战伤感染与特需药品研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[3]

[**摘要**] **目的** 阐明侗药“马镫艾”(Madeng'ai,MDA)根部水提物抑制炎症的潜在药效物质及机制。**方法** 首先采用质谱技术对 MDA 水提物的化学成分进行鉴定,再利用 Swiss Target Predict 数据库和 Omim、Disgenet 及 Genecards 数据库分别筛选出疾病和药物靶点,取交集后获得药物-疾病共同靶点;通过软件 Cytoscape 3.9.1 构建“药物-成分-疾病-靶点”网络并筛选出核心组分;通过 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction networks,PPI);使用 David 数据库进行基因本体论(gene ontology,GO)分析与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析;最后,采用 RT-qPCR 和 Western blot 的方法在体外研究 MDA 水提物对几种典型炎症因子 mRNA 水平的影响及可能的信号通路。**结果** 质谱法在 MDA 水提物中一共鉴定出了 29 种化合物,排名前五位的分别为:委陵菜酸、鞣花酸、原花青素 C1、儿茶素和原花青素 B1。通过数据库检索并去重后共获得 104 个药物-疾病共同靶点,其中 TNF-α、IL-6、AKT1 及 ALB 等可能是其核心作用靶点。GO 功能富集分析一共获取到 761 个条目,其中与生物学过程相关的共 600 条,涉及到细胞组分的共 52 条,涉及到分子功能的共 109 条;KEGG 通路富集分析共得到 160 条相关信号通路,其中包含 NF-κB、MAPK、PI3K-AKT 等信号通路。与正常对照组相比,模型组(LPS 组)TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的含量显著升高($P<0.05$),p38、ERK 及 JNK 的磷酸化水平显著上调($P<0.05$);与模型(LPS)组相比,MDA 处理组 TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的含量显著降低($P<0.05$),p38、ERK 及 JNK 的磷酸化水平显著下调($P<0.05$)。**结论** 本研究预测了侗药 MDA 水提物具备多种抗炎活性成分,并且可通过 MAPK 等多条信号通路发挥抗炎作用。

[**关键词**] 侗药;“马镫艾”水提物;超高液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱;网络药理;炎症
[**中图法分类号**] R284.2; R297.2; R319 [**文献标志码**] A

Anti-inflammation of Chinese Dong herb Madeng'ai by UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology

FAN Chao[1], ZHANG Zaiqi[2], LUO Li[3], ZHU Junyu[3], LIANG Huaping[3], GUO Yuanbiao[1] [1]Department of Experimental Medicine, Chengdu Third People's Hospital Affiliated to Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan Province, 610031; [2]Hunan Provincial Key Laboratory of Dong Medicine Research, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan Province, 418000; [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Wound Infection and Drug, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the potential active components and anti-inflammation mechanism of a Chinese herb from Dong ethnic minority, Madeng'ai (MDA). **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was taken to analyze and identify the major components of MDA. The potential active targets of MDA were retrieved in

[**基金项目**] 重庆市博士“直通车”科研项目(CSTB2022BSXM-JCX0009),重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2021jcyj-msxmx0234)
[**通信作者**] 郭元彪,E-mail:guo.ybiao@yahoo.com
梁华平,E-mail:13638356728@163.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the Swiss Target Prediction database, and the disease-related targets were searched in the Omim, Disgene and Genecards databases. The common targets of active components and inflammation were obtained for the potential targets of MDA in the treatment against inflammation. The "drug-disease-target" network and protein-protein interaction (PPI) network were separately constructed by Cytoscape 3.9.1 and String database. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses of the overlapping targets were performed through David database. Finally, RT-qPCR and Western blotting were conducted to determine the mRNA levels of several inflammation-related factors and the possible signaling pathways in RAW264.7 cells after LPS treatment. **Results** There were 29 compounds identified by UPLC-Q-TOF/MS, and the top 5 were tormentic acid, ellagic acid, procyanidin C1, epicatechin and procyanidin B1. There were 104 core targets of MDA docking inflammation through database retrieval and after duplicate removal, and TNF-α, IL-6, AKT1 and ALB might be the core targets. A total of 761 GO items were enriched, including 600 items concerning biological processes, 52 items on cell components, and 109 items involving molecular functions. KEGG analysis screened out 160 signal pathways, mainly focusing on NF-κB, MAPK, PI3K-AKT and so forth signaling pathways. Compared with the normal control group, the mRNA levels of TNF-α, IL-6, IL-1β and CCL2 were increased significantly in the model group (LPS treatment group) ($P<0.05$), and the phosphorylation levels of p38, ERK and JNK were obviously up-regulated ($P<0.05$). While, MDA treatment notably declined the mRNA levels of TNF-α, IL-6, IL-1β and CCL2 ($P<0.05$), and down-regulated the phosphorylation levels of p38, ERK and JNK when compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Our study forecasts that the water extract of MDA, a Chinese traditional herb from Dong minority, has the potential active ingredients in treatment of inflammation, and shows anti-inflammatory effects through multiple pathways, such as MAPK pathway.

[**Key words**] Dong medicine; Madeng'ai; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; inflammation

Supported by the "Through Train" Project for Poctorial Scientific Research of Chongqing (CSTB2022BSXM-JCX0009) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2021jcyj-msxmx0234). Corresponding author: GUO Yuanbiao, E-mail: guo.ybiao@yahoo.com; LIANG Huaping, E-mail: 13638356728@163.com

炎症是指机体受到某些刺激如感染、外伤等损伤因子的刺激所发生的一种以防御反应为主的基本病理过程,局部症状表现为红、肿、热、痛或功能障碍[1]。炎症发生时会诱导机体产生一系列免疫反应,同时诱导免疫细胞发生变化,从而在损伤部位引起细胞增殖和组织修复。在持续的炎症刺激或抑炎机制失效的情况下,炎症可能转变为慢性疾病[2-3]。有研究表明,炎症在糖尿病、神经退行性疾病、癌症、炎症性肠病和心血管疾病等慢性疾病的发生中起着关键作用,严重的炎症甚至可能发展成脓毒症,从而引起多器官功能障碍,最终导致死亡[4-5]。

目前临床上最有效的抗炎药物仍然是以激素类药物为主,但这类药物引起的不良反应较多且重,为了改善这一状况,越来越多的研究者把目光放在了具有抗炎活性的药用植物上,并成功研制出了多种植物抗炎药物,如口炎清颗粒、青藤碱、白芍总苷及莲花清瘟颗粒等[6-8]。"马镫艾"(Madeng'ai,MDA)是一种传统的侗族植物药,经湖南省侗族医药研究重点实验室鉴定为 *Potentilla freyniana Bornm*(*P. freyniana*)原变种,它的根部在民间常被用于清热解毒,治疗癌症及外出血等[9-10]。已有研究[11]表明 MDA 水提物对人类正常致病菌及多耐药细菌如铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和鲍曼不动杆菌都具有很好的抑菌效果,并且可以促进伤口的愈合,而有关其抗炎成分及具体机制仍待证明和进一步研究,因此本文在质谱分析技术的基础上联合网络药理学和体外实验初步探讨了 MDA 发挥抗炎功效的潜在活性物质及相关机制,从而为后续的深入研究和药物开发提供思路和参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

本研究所用试剂有:RNA 提取试剂 TRIzol、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;胰蛋白酶、细胞培养液 RPMI-1640、胎牛血清(FBS)、青-链霉素(PS)和胰蛋白酶购自 Gibco 公司;JNK、p-JNK、p65、p-p65、p38、p-p38、β-actin、ERK、p-ERK 一抗及酶标二抗购自美国

Danvers 公司;CCK-8 检测试剂盒、BCA 试剂盒、总蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术限公司;LPS 购自美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器

本研究所用仪器有:Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);Agilent Q-TOF 6545 LC/MS 高分辨串联质谱(安捷伦科技有限公司);CO_2 细胞培养箱(美国 ThermoFisher Scientific 公司);Bio-Rad PCR 仪 CFX96(美国 BIO 公司);化学发光检测系统(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)。

1.3 MDA 水提物的制备

在 4.5 kg MDA 干燥根中加入 17 倍体积的水,每次浸泡 1 h,共 2 次,并将 2 次得到的水提取物混合后在 70℃下浓缩成糊状,然后依次分批冻干,待样品干燥后制成粉末,4 ℃冷藏保存备用。

1.4 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定

取样品约 0.1 g,精密称量后置于 15 mL 离心管中,加入 20%甲醇 5 mL,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,摇匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液待测。色谱柱:Waters CORTECS UPLC T3 (2.1×100 mm,1.6 μm);柱温:30;流速:0.3 mL/min;进样量:2 μL;检测波长:190~400 nm。流动相:A 相为乙腈,B 相为 0.1%甲酸水溶液。质谱检测模式为 ESI-Negative/Positive ion mode,具体参数见表 1。

表 1 质谱参数设置表

MS 参数	参数值	MS/MS 参数	参数值
质量范围	50~1 700	二级质量范围	50~1 700
干燥气温度/(L/min)	325	碰撞能量(eV)	±40
干燥气流速/(L/min)	8		
雾化气压力/psi	45		
鞘气温度/℃	325		
鞘气流速/(L/min)	8		
毛细管电压/V	4 000		
喷嘴电压/V	1 000		
裂解电压/V	175		
锥孔电压/V	60		
基准质量	☑pos 121.0508&922.0097		
	☑neg 197.8073&1033.9881		

1.5 MDA 水提物抗炎成分的网络药理学分析

1.5.1 药物成分及靶点筛选 根据质谱鉴定的结果,在 Pubchem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)中筛选出对应化合物的结构,并将其一一导入 Swiss Target Prediction 数据库(www.swisstargetprediction.ch/)或 TCMSP 数据库(https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php),将预测得分大于 0 的靶点作为药物靶点,通过 Uniprot 数据库(https://www.uniprot.org/)对靶点名称进行标准化统一,最终剔除重复的靶点。在 Omim、Disgenet 和 Genecards 数据库中分别输入“anti-inflammatory”和“inflammation”两个关键词进行搜索,得到相应的疾病靶标。

1.5.2 “药物-成分-疾病-靶点”网络图的构建与分析

将分析得到的药物-疾病共同靶点和相关的活性成分导入 Cytoscape3.9.1 软件,绘制“药物-成分-疾病-靶点”网络图。使用 Network Analyzer 对该网络图进行拓扑分析,用 Degree 值表示该成分与作用靶点的关联个数,Degree 值越大说明该成分越重要。

1.5.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction networks,PPI)的构建与分析 将上述药物-疾病共同靶点输入到 String 数据库(https://string-db.org/)进行检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,相互作用阈值≥0.4,从而构建蛋白相互作用的 PPI 网络。为了更直观地反映靶点的相关性,也可将数据导入 Cytoscape 软件绘制蛋白相互作用网络图。其中,节点的大小、颜色深浅随节点 Degree 值的大小变化,最外圈为 degree>50 的靶点。通过 Network Analyzer 进行拓扑分析,可获得核心靶点。

1.5.4 交集靶点的 GO 分析和 KEGG 通路分析

使用 David 数据库(https://david.ncifcrf.gov/)对共同靶点进行基因本体论(gene ontology,GO)分析与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析,以 $P<0.05$ 为筛选标准,使用 R 语言对富集结果进行可视化,分别绘制条形图和气泡图。

1.6 细胞实验

1.6.1 细胞培养 将冻存在陆军特色医学中心外研所实验室的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 复苏后,在含有 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素和 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中 37 ℃,5% CO_2 进行细胞培养。待细胞传代培养至最佳状态再行细胞实验。

1.6.2 CCK-8 实验 用胰酶消化培养皿中的 RAW264.7 细胞,300×g 离心 5 min,将细胞沉淀用培养基重悬后进行计数,并以 5×10^4/孔的密度重新接种到 96 孔板中,分别加入 200 μL 稀释好的不同浓度的 MDA 溶液,浓度依次为:0.001、0.01、0.1、1.0、10、50、100、1 000 和 10 000 μg/mL。37 ℃、5% CO_2 培养 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,4 h 后测定 450 nm 处的吸光值[D(450)]。

1.6.3 RT-qPCR 检测 将 RAW264.7 细胞以 2×10^6/孔接种在 6 孔板上,分 4 组:正常对照组、LPS 组、MDA 处理组及阳性药物(20 μg/mL 地塞米松,

Dexamethasone,DEX)对照组。37 ℃、5% CO_2 培养4 h,再用PBS清洗细胞2遍,每孔加1 mL TRIzol试剂提取总RNA,反转录将RNA合成互补DNA,并使用SYBR Premix在BioRad CFX96上通过RT-qPCR检测靶因子的mRNA水平,用β-actin作为内参基因。实验用到的引物序列见表2。

1.6.4 Western blot 将RAW264.7细胞以2×10^6/孔接种在6孔板上,共分为8组:正常对照组,MDA组,LPS 30、60、120 min组和LPS+MDA 30、60、120 min组。将处理好的各组细胞用WI裂解液充分裂解提取总蛋白,BCA定量后上样电泳。使用10%的SDS-PAGE凝胶作为分离胶,先70 V分离30 min,再120 V分离60 min,最后用快速转膜仪将分离后的蛋白转移到PVDF膜上,再用TBST配制5%的脱脂奶粉,封闭膜1 h,以减少非特异性结合,接下来孵育一抗(p-p65、p65、p-p38、p-38、p-ERK、ERK、p-JNK和JNK 1∶1 000稀释),4 ℃下过夜。次日用TBST洗膜后再孵育相应的二抗,60 min后再用TBST洗膜3次以上,最后加显影液,使用增强化学发光仪读取反应条带。

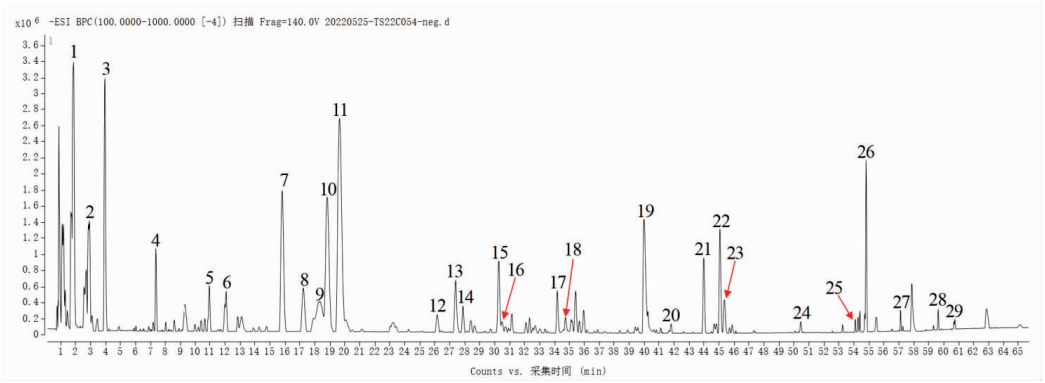
1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据统计分析,所有计量数据均以$\bar{x}\pm s$表示,组间差异采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA水提物的UPLC-Q-TOF-MS检测

通过UPLC-Q-TOF-MS法共鉴定出29种化合物,鉴定质谱图见图1,鉴定结果见表3。



A:负离子模式;B:正离子模式;C:紫外色谱图 ↙:示质谱检测化合物的基峰位置

图1 MDA水提物的UPLC-Q-TOF-MS基峰离子流图

表 2 实验用的各引物序列(5′-3′)

基因	正义	反义
CCL2	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
IL-1β	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	ACCACGGCCTTCCCTACTTC	CTCATTTCCACGATTTCCCAG
TNF-α	GAGTCCGGGCAGGTCTACTTT	CAGGTCACTGTCCCAGCATCT
β-actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

表 3 MDA 水提物成分质谱鉴定结果

序号	t_R/min	*m/z* 值	分子式	鉴定结果	MS/MS
1	1.84	191.020 3	$C_6H_8O_7$	柠檬酸	111.008 7;87.008 2;85.028 8;67.018 3;57.034 1
2	2.90	481.063 1	$C_{20}H_{18}O_{14}$	…	300.999 0;275.020 4;257.008 6;229.015 3
3	3.94	169.014 5	$C_7H_6O_5$	没食子酸	169.013 8;125.023 9
4	7.33	153.019 2	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸	108.019 6;91.016 4;65.001 5;53.037 5
5	10.93	451.124 4	$C_{21}H_{24}O_{11}$	儿茶素-7-O-葡萄糖苷	361.090 7;331.081 4
6	12.06	345.083 1	$C_{14}H_{18}O_{10}$	没食子酸-6-O-甲基-β-D-葡萄糖	124.015 3;123.009 0;107.013 2;59.014 0
7	15.80	633.074 6	$C_{27}H_{22}O_{18}$	柯里拉京	463.052 2;300.999 9;275.020 3;257.007 3
8	17.22	801.080 7	$C_{34}H_{26}O_{23}$	…	757.082 8;633.071 7;614.045 2;300.988 5
9	18.30	577.136 0	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B1	451.102 3;425.086 9;407.077 0;289.070 9;125.024 2
10	18.81	577.136 5	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B2	451.102 4;425.086 3;407.077 3;289.071 6
11	19.64	289.072 3	$C_{15}H_{14}O_6$	儿茶素	245.080 4;203.070 5;187.037 8;151.039 2;125.024 0;
12	26.17	291.014 9	$C_{13}H_8O_8$	短叶苏木酚酸	247.024 4;219.029 2;191.034 0
13	27.38	865.200 3	$C_{45}H_{38}O_{18}$	原花青素 C1	407.076 0;289.072 1;287.055 5;161.024 1;125.023 5
14	27.88	577.135 5	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B3	451.102 4;425.088 1;407.076 1;289.070 9;125.023 2
15	30.27	289.072 2	$C_{15}H_{14}O_6$	表儿茶素	245.083 4;221.081 2;203.071 1;151.039 7;137.024 7;125.024 4
16	30.47	449.108 8	$C_{21}H_{22}O_{11}$	圣草酚-7-O-葡萄糖苷	287.055 7;269.044 5;259.059 8;125.022 9
17	34.17	729.146 1	$C_{37}H_{30}O_{16}$	原花青素 B2 3-O-没食子酸酯	577.134 9;559.125 6;425.088 0;407.076 7;287.055 5;269.045 8
18	34.71	577.135 2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B4	451.102 4;425.088 1;407.076 1;289.070 9;125.023 2
19	39.97	300.999 6	$C_{14}H_6O_8$	鞣花酸	283.996 2;226.997 6;173.024 6;145.028 6;129.033 7
20	41.79	447.056 7	$C_{20}H_{16}O_{12}$	…	315.014 5;299.991 1
21	43.96	447.058 0	$C_{20}H_{16}O_{12}$	…	315.013 5;299.990 7;270.986 9
22	45.04	461.072 9	$C_{21}H_{18}O_{12}$	3-O-甲基鞣花酸-4′-O-鼠李糖苷	315.015 4;299.989 9
23	45.34	315.015 3	$C_{15}H_8O_8$	3-O-甲基鞣花酸	299.990 7;270.988 6;216.005 4;200.011 1;160.016 6
24	50.44	549.161 1	$C_{26}H_{30}O_{13}$	芹糖甘草苷	429.112 8;255.065 6
25	54.09	679.370 1	$C_{36}H_{56}O_{12}$	…	617.366 8;517.315 8;473.326 2;439.283 7
26	54.88	695.402 3	$C_{36}H_{58}O_{10}$	野蔷薇苷	649.394 8;487.343 4
27	57.10	693.386 3	$C_{36}H_{56}O_{10}$	…	485.326 9;467.314 9
28	59.63	485.327 4	$C_{30}H_{46}O_5$	…	485.329 2;467.317 5;373.287 3
29	60.58	487.342 6	$C_{30}H_{48}O_5$	委陵菜酸	487.343 6;469.331 2

2.2 MDA 水提物抗炎活性成分的靶点

将质谱鉴定得到的 29 种化合物在 Pubchem 数据库中进行筛选,最终获取到 21 个活性成分的结构;将成分信息导入 Swiss 数据库进行靶点筛选,最后采用 Uniprot 数据库对靶点名称进行规范统一,去除重复靶点后共筛选到 285 个药物靶点;通过 Omim、Disgenet 和 Genecards 数据库共筛选到 861 个抗炎靶点,二者取交集后获得 104 个药物-疾病的共同潜在靶点,使用 R4.2.1 软件绘制韦恩图(图 2)。

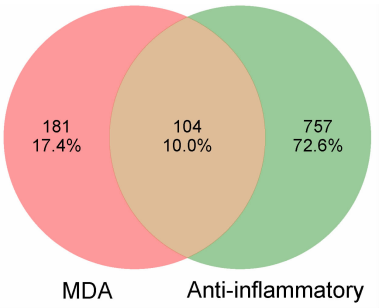


图 2 MDA 水提物活性成分靶点与炎症相关靶点韦恩图

2.3 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图,筛选核心成分

将104个共同靶点和相关活性成分导入Cytoscape软件中,绘制“药物-成分-靶点-疾病”网络图(如图3)。Network Analyzer拓扑分析的结果显示排名前五的核心成分分别是:委陵菜酸(Tormentic acid)、鞣花酸(Ellagic acid)、原花青素C1(Procyanidin C1)、儿茶素(Epicatechin)、原花青素B1(Procyanidin B1),这表明MDA可能通过多成分的协同作用发挥抗炎功能。

2.4 PPI网络的构建与核心靶点分析

将上述104个药物-疾病共同靶点输入到String数据库中进行检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,相互作用阈值≥0.4,得到PPI网络(图4A)。通过Cytoscape软件绘制蛋白相互作用网络图(图4B)。其中节点的大小、颜色深浅按节点Degree值大小变化,最外圈为degree>50的靶点。最后通过Network Analyzer进行拓扑分析,选取degree值大于平均分的基因作为核心靶点,采用R 4.2.1将degree排名前20的靶点绘制条形图(图4C)。

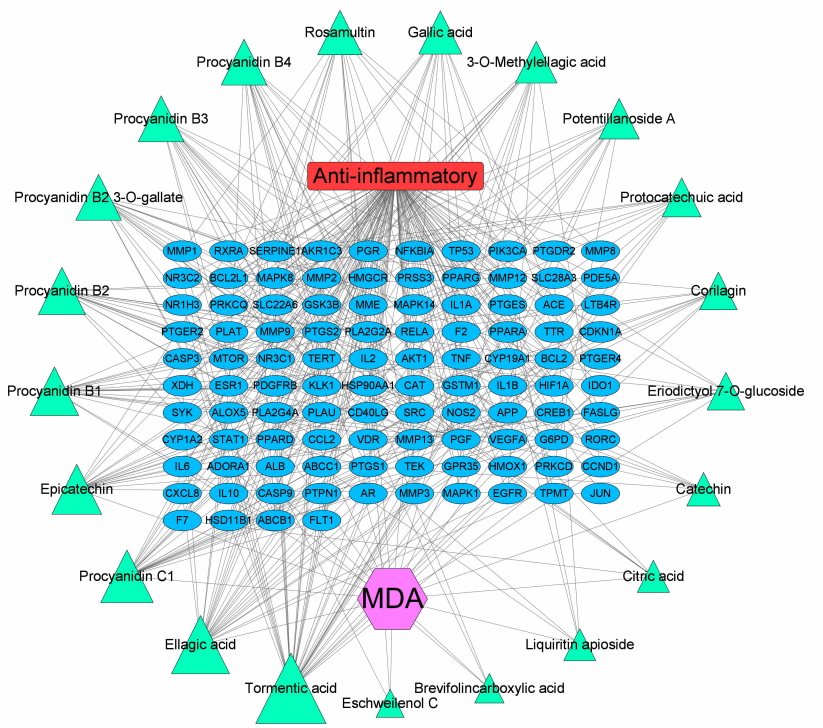
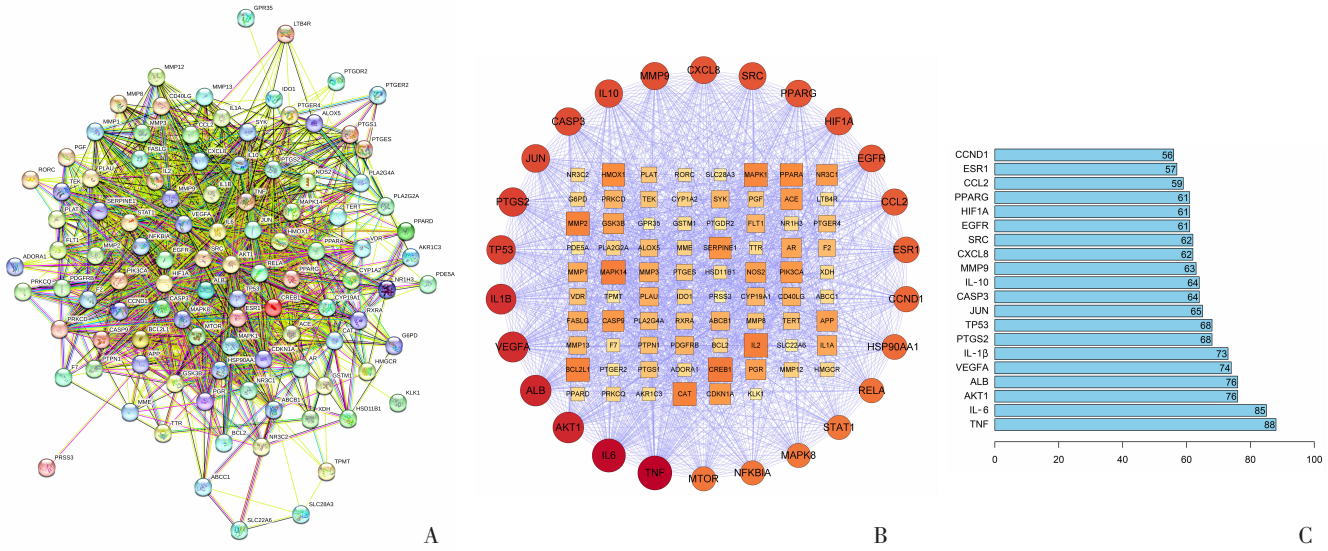


图3 MDA水提物“药物-成分-疾病-靶点”网络图



A:PPI网络图;B:潜在核心靶点网络图;C:潜在核心靶点条形图

图4 MDA水提物抗炎网络图

2.5 GO 功能分析与 KEGG 通路分析

将上述 104 个共同靶点经 David 数据库做 GO 富集分析,得到生物过程(biological process,BP)条目 600 条,主要与炎症反应通路、细胞凋亡的调控、基因表达的正向调控等信号通路有关;细胞组成(cellular component,CC)条目 52 条,主要涉及质膜、细胞外间隙、胞外区等;分子功能(molecular function,MF)条目 109 条,主要涉及蛋白结合、蛋白激酶结合、内肽酶结合等,选取每部分 P 值排名前 10 的条目绘制条形图(图 5)。同理,经 David 数据库 KEGG 富集分析后共得到 160 条 KEGG 通路,以富集到该通路的核心靶点个数和-Log10(P) 来衡量 KEGG 富集程度,选取P 值排名前 20 的通路绘制 KEGG 富集的气泡图(图 6),GO 功能分析与 KEGG 通路分析的结果表明 MDA 水提物组分可通过多途径、多靶点发挥抗炎作用。

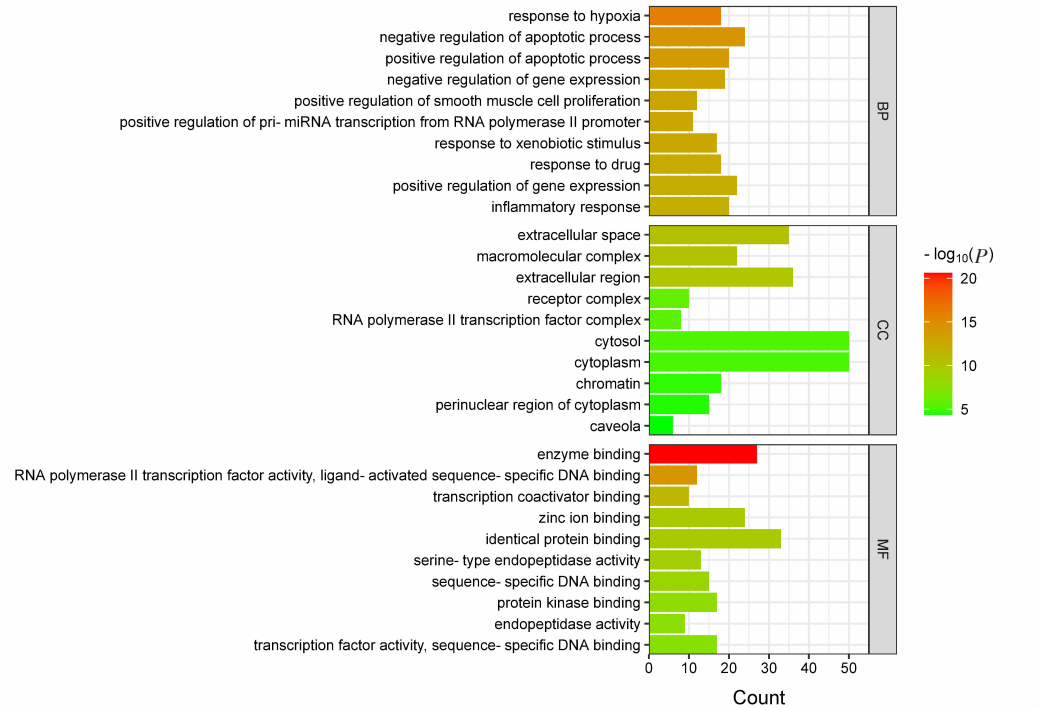


图 5 MDA 水提物潜在抗炎靶点的 GO 功能富集分析

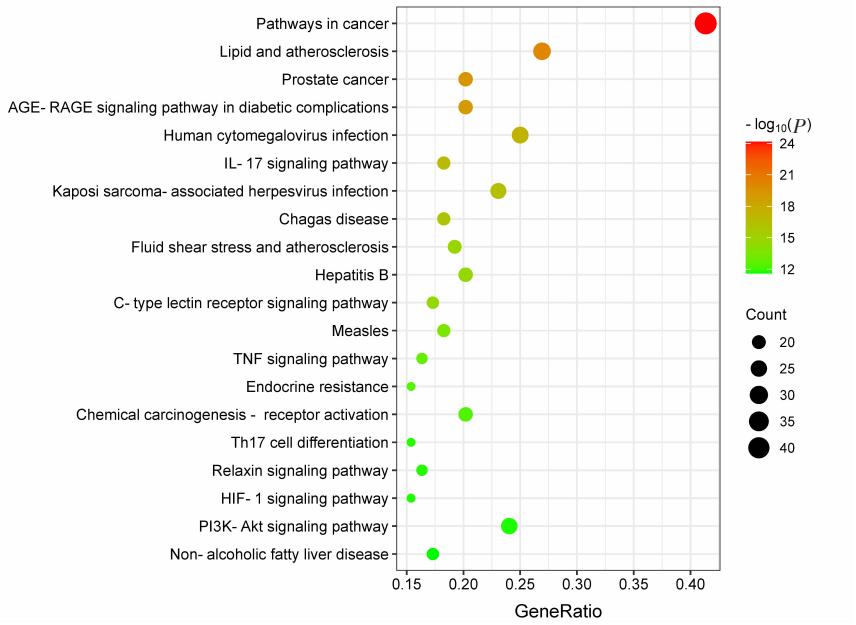


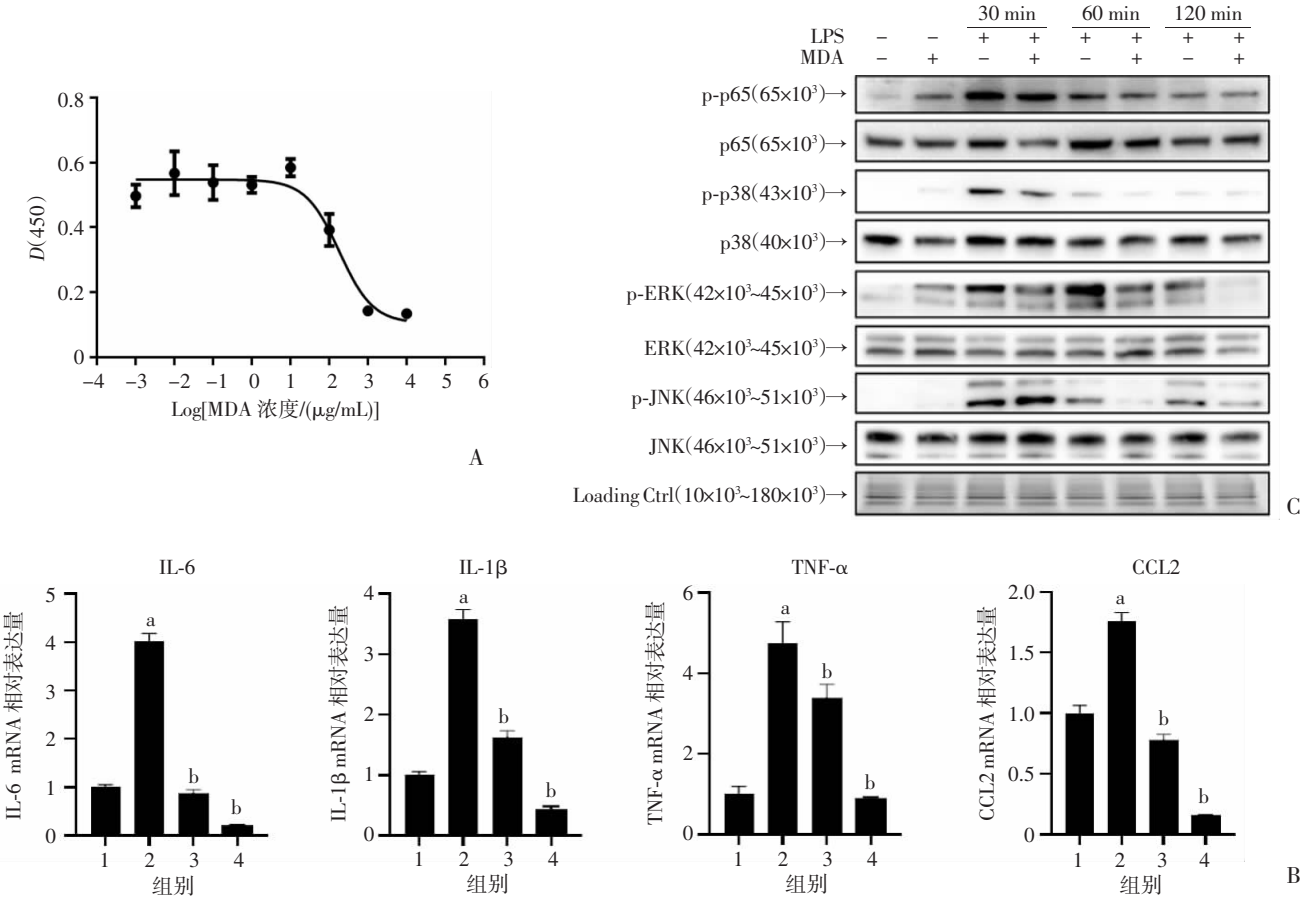
图 6 MDA 水提物潜在抗炎作用靶点的 KEGG 通路富集分析

2.6 MDA 水提物对 RAW264.7 细胞炎症因子及通路蛋白的影响

CCK-8 的实验结果表明 MDA 浓度在 100 μg/mL 及以上时对细胞具有毒性(图 7A),本研究最终选择 50 μg/mL 作为 MDA 对细胞的安全剂量。参照网络药理分析的结果初步选择 4 种炎症因子进行细胞实验:与正常对照组相比,LPS 组 TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的 mRNA 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,MDA 组 TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的 mRNA 水平显著降低($P<0.05$,图 7B)。结合网药结果选择实验室最常用的几种通路蛋白初步验证该药物是否可通过多条途径抑制炎症反应:与正常对照组相比,LPS 组 p65、p38、JNK 及 ERK 的磷酸化水平显著上调($P<0.05$);与 LPS 组相比,MDA 药物处理组 p38、JNK 及 ERK 的磷酸化水是显著下调的($P<0.05$,图 7C),而 p65 的磷酸化水平未见显著改变。上述结果表明 MDA 水提物的抗炎功能可能与 MAPK 信号通路相关且具有多条途径。

3 讨论

炎症是机体抵御损伤和感染的第一道防线,可以激活先天和适应性免疫以应对挑战,对机体起着一定的保护作用[11]。炎症反应时机体会产生一系列的炎性细胞及炎症因子,当这些因素失控时可能会引起机体损伤甚至死亡。有研究表明,某些炎症或趋化因子的失调在许多疾病如脓毒症、阿尔兹海默症、帕金森综合征、癌症等的发生和发展过程中起着关键作用。越来越多的研究表明,植物中不仅含有丰富的抗炎活性成分且毒副作用较小,已成为开发新型抗炎药物的热点方向。近期,我们实验室首次证实了另一种侗药



1:正常对照组; 2: LPS 组; 3: LPS+MDA 组;4: LPS+DEX 组

A:CCK-8 实验检测细胞活性;B:细胞炎症因子的 mRNA 相对表达量 a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与 LPS 组比较;C:炎症相关通路蛋白的磷酸化水平变化

图 7 MDA 水提物对 RAW264.7 细胞炎症因子及通路蛋白的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

"Jiao Mei Gu"水提物可以通过抑制 NF-κB 活性从而减轻 LPS 介导的小鼠炎症反应[12]以及通过抑制 M1 巨噬细胞的极化从而减弱酵母多糖 A 诱导的炎症,并且通过质谱法定量分析了该植物所含有的化学成分及含量[13]。本文的研究对象"马镫艾"(MDA)也是一种传统的侗族药物,经湖南省侗族医药研究重点实验室鉴定为 *Potentilla freyniana Bornm*(*P. freyniana*)原变种,其根部在民间常被用于清热解毒,治疗癌症及外出血等[9-10]。已经有报导表明,MDA 水提物能有效抑制普通细菌及几种临床常见多重耐药菌的生长,具有很好的抗感染的作用,同时还能促进伤口的愈合[11]。感染与炎症既有本质区别也有密切联系[14],因此本文旨在采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术联合网络药理学以及体外实验的方法初步探讨 MDA 水提物抑制炎症的潜在药效物质及机制,并为后续研究提供思路和参考。

通过高效液相色谱串联质谱技术在 MDA 水提物中一共检测到 29 种化合物,经过 Pubchem 数据库筛选后获取到 21 个成分的结构;将这 21 个成分信息导入 Swiss 数据库进行筛选得到 285 个药物靶点,再通过 Omim、Disgenet 和 Genecards 数据库筛选得到 861 个抗炎靶点,二者取交集后共获得 104 个药物-疾病的共同潜在靶点。采用 Cytoscape 3.9.1 构建"药物-成分-疾病-靶点"网络再进行拓扑分析,筛选出具有抗炎活性的核心成分,其中排名前五的分别是:委陵菜酸(Tormentic acid)、鞣花酸(Ellagic acid)、原花青素 C1(Procyanidin C1)、儿茶素(Epicatechin)、原花青素 B1(Procyanidin B1)。目前对于委陵菜酸报导较多的是它对肝脏和血管内皮的保护作用以及对妇科癌症的抗癌作用[15-17],而有关炎症方面还未见广泛的报道;鞣花酸属于天然多酚化合物,具备抗炎、抑菌、抗病毒等多种药理活性,国内外已有较多关于其抗炎功能与机制的报导[18-19];原花青素和儿茶素都属于天然的抗氧化剂,有研究表明:原花青素 Bl 可抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症[20];儿茶素可通过 AMPK/SIRT1 信号通路抑制促炎性因子和炎性酶的表达,同时促进抗炎性因子的表达发挥显著的抗炎作用[21-22];而关于原花青素 C1 的抗炎作用和机制有待进一步研究。综上,侗药 MDA 充分具备抗炎药物的成药潜力。

从 PPI 网络可视化分析的结果来看,TNF-α、IL-1β、IL-6、ALB、AKT1 等可能是 MDA 发挥抗炎作用的核心靶点。参照上述结果,用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 作为工具细胞,采用 LPS 诱导细胞建立炎症模型,挑选其中几种常见的炎症因子进行体外验证。IL-1β 是 IL-1 家族中的重要成员,具有较强的促炎活性,可诱导多种促炎介质的产生,如 IL-6[23];而 IL-6 是一种继发性炎症介质,被激活后可反过来作用于肝脏产生急性期蛋白,如全 C 反应蛋白(CRP)、纤维蛋白原和纤溶酶原激活物抑制剂等[24];与 IL-1β 相似,TNF-α 是一种多效性促炎细胞因子,属于 TNF 配体超家族,在调节多种发育和免疫过程中发挥着不同的作用,包括炎症、分化、脂质代谢和凋亡[25-28];CCL2 是一种重要的监测炎症和免疫的因子,参与了许多炎性疾病的发病机制,是常见的治疗靶点之一。由体外实验结果可见,与正常对照组相比,模型组 TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的 mRNA 水平显著升高($P<0.05$);而与模型组相比,MDA 组 TNF-α、IL-6、IL-1β 及 CCL2 的 mRNA 水平是显著降低的($P<0.05$)。因此,MDA 可能通过以上四个核心靶点发挥抗炎作用,与网络药理分析的结果一致,接下来我们将继续验证其余筛选出的核心靶点,争取找出更多相关的有效靶点。通过对筛选出的 104 个抗炎相关靶点进行 GO 和 KEGG 通路分析发现 MDA 的生物过程主要涉及炎症反应通路、细胞凋亡的调控、基因表达的正向和负向调控等;其抗炎活性主要涉及癌症通路、脂质与动脉粥样硬化、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路、MAPK 信号通路等。基于网络药理分析的结果,我们采用 Western blot 的方法初步检测了 MDA 对几种最常见的炎症通路蛋白的调控情况,结果显示:与正常对照组相比,模型组 p65、p38、JNK 及 ERK 的磷酸化水平显著上调($P<0.05$);而与模型组相比,MDA 组 p38、JNK 及 ERK 的磷酸化水平从 30 min 开始显著下调($P<0.05$),而 p65 的磷酸化水平未见明显变化,由此推测 MDA 发挥抗炎作用的机制很可能与 MAPK 信号通路密切相关且具有多条抗炎路径,其具体的分子机制及其他可能的信号通路是接下来的研究重点。

综上所述,本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术联合网络药理学以及体外实验的方法预测了侗药"马镫艾"水提物发挥抗炎功效的潜在药效物质及相关机制通路,为后续的深入研究提供了重要的思路和参考。

参考文献:

[1] HE F, ANTONUCCI L, KARIN M. NRF_2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer [J]. Carcinogenesis, 2020, 41(4): 405-416. DOI: 10.1093/

carcin/bgaa039.

[2] YEUNG Y T, AZIZ F, GUERRERO-CASTILLA A, *et al*. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(14): 1449-1484. DOI: 10.2174/1381612824666180327165604.

[3] SOEHNLEIN O, LIBBY P. Targeting inflammation in atherosclerosis—from experimental insights to the clinic[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(8): 589-610. DOI: 10.1038/s41573-021-00198-1.

[4] WÖLFLE U, HOFFMANN J, HAARHAUS B, *et al*. Anti-inflammatory and vasoconstrictive properties of *Potentilla erecta*—A traditional medicinal plant from the Northern hemisphere[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 204: 86-94. DOI: 10.1016/j.jep.2017.03.058.

[5] CAPLAN A, FETT N, ROSENBACH M, *et al*. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: a comprehensive review: gastrointestinal and endocrinologic side effects[J]. J Am Acad Dermatol, 2017, 76(1): 11-16. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.02.1239.

[6] ZHANG R R, MENG N N, LIU C, *et al*. PDB-1 from *Potentilla discolor* Bunge induces apoptosis and autophagy by downregulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in A549 cells[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 129: 110378. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110378.

[7] LIU W W, ZHANG Y J, ZHU W N, *et al*. Sinomenine inhibits the progression of rheumatoid arthritis by regulating the secretion of inflammatory cytokines and monocyte/macrophage subsets[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2228. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02228.

[8] DHAIBAN S, AL-ANI M, ELEMAM N M, *et al*. Targeting chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 619-633. DOI: 10.2147/JIR.S270872.

[9] WU J, ZHANG Z Q, ZHOU X D, *et al*. New terpenoids from *Potentilla freyniana* Bornm. and their cytotoxic activities[J]. Molecules, 2022, 27(12): 3665. DOI: 10.3390/molecules27123665.

[10] CAI W, LI K L, QIN S H, *et al*. Rapid identification and systematic mechanism of flavonoids from *Potentilla freyniana* Bornm. based on UHPLC-Q-exactive orbitrap mass spectrometry and network pharmacology[J]. Int J Anal Chem, 2021, 2021: 6619959. DOI: 10.1155/2021/6619959.

[11] TANG Z R, ZHAO Y N, ZHANG Z Q, *et al*. Study of the antimicrobial activity of the Chinese Dong ethnic minority medicine, madeng'ai[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 3678240. DOI: 10.1155/2022/3678240.

[12] LI W, LUO L, ZHU J Y, *et al*. Water extract of *Cayratia albifolia* C. L. Li root relieves zymosan A-induced inflammation by restraining M1 macrophage polarization[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153901. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153901.

[13] LUO L, ZHANG W, ZHANG Z Q, *et al*. The water extract of "Jiao Mei Gu" attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response via inhibiting NF-κB activity in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 259: 112882. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112882.

[14] DONG Y Z, ZHAO Q L, WANG Y G, *et al*. Network pharmacology-based investigation of potential targets of astragalus membranaceous-angelica sinensis compound acting on diabetic nephropathy[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19496. DOI: 10.1038/s41598-021-98925-6.

[15] LI X, WEI S Z, NIU S Q, *et al*. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis[J]. Comput Biol Med, 2022, 144: 105389. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2022.105389.

[16] WANG Z Y, WANG X, ZHANG D Y, *et al*. Traditional Chinese medicine network pharmacology: development in new era under guidance of network pharmacology evaluation method guidance[J]. China J Chin Materia Medica, 2022, 47(1): 7-17. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210914.702.

[17] TAO J Y, YAN S L, ZHOU C Y, *et al*. Total flavonoids from *Potentilla kleiniana* Wight et Arn inhibits biofilm formation and virulence factors production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114383. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114383.

[18] D'ELIA R V, HARRISON K, OYSTON P C, *et al*. Targeting the cytokine storm for therapeutic benefit[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(3): 319-327. DOI: 10.1128/CVI.00636-12.

[19] MUNJAL A, KHANDIA R. Atherosclerosis: orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition[M]//Advances in protein chemistry and structural biology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 85-122. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.11.002.

[20] BEIZAVI Z, ZOHOURI M, ASADIPOUR M, *et al*. IL-27, a pleiotropic cytokine for fine-tuning the immune response in cancer[J]. Int Rev Immunol, 2021, 40(5): 319-329. DOI: 10.1080/08830185.2020.1840565.

[21] SARAIVA M, VIEIRA P, O'GARRA A. Biology and

therapeutic potential of interleukin-10[J]. J Exp Med, 2020, 217(1). DOI: 10.1084/jem.20190418.

[22] LIANG W G, TRIANDAFILLOU C G, HUANG T Y, *et al*. Structural basis for oligomerization and glycosaminoglycan binding of CCL5 and CCL3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(18): 5000-5005. DOI: 10.1073/pnas.1523981113.

[23] HUA X L, GE S D, ZHANG M, *et al*. Pathogenic roles of CXCL10 in experimental autoimmune prostatitis by modulating macrophage chemotaxis and cytokine secretion [J]. Front Immunol, 2021, 12: 706027. DOI: 10.3389/fimmu.2021.706027.

[24] DENG T Y, SHEN P, LI A M, *et al*. CCDC65 as a new potential tumor suppressor induced by metformin inhibits activation of AKT1 via ubiquitination of ENO1 in gastric cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(16): 8112-8128. DOI: 10.7150/thno.54961.

[25] IGLESIAS D E, CREMONINI E, FRAGA C G, *et al*. Ellagic acid protects Caco-2 cell monolayers against inflammation-induced permeabilization[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 776-786. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.022.

[26] LIN X, WEI Y Y, LI Y, *et al*. Tormentic acid ameliorates hepatic fibrosis in vivo by inhibiting glycerophospholipids metabolism and PI3K/Akt/mTOR and NF-κB pathways: based on transcriptomics and metabolomics[J]. Front. Pharmacol, 2022, 13: 801982. DOI: 10.3389/fphar.2022.801982.

[27] SHEINENZON A, SHEHADEH M, MICHELIS R, *et al*. Serum albumin levels and inflammation[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 184: 857-862. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.140.

[28] ZHENG K N, LV B J, WU L L, *et al*. Protecting effect of emodin in experimental autoimmune encephalomyelitis mice by inhibiting microglia activation and inflammation via Myd88/PI3K/Akt/NF-κB signalling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 9322-9344. DOI: 10.1080/21655979.2022.2052671.

(收稿:2023-03-15;修回:2023-05-29)

(编辑 邓强庭)