

# 基于网络药理学探讨臭灵丹抗炎的作用机制

周永芝<sup>1</sup>, 舒腾云<sup>1</sup>, 宋玉莹<sup>1</sup>, 郑立雄<sup>2</sup>, 李海舟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500;

<sup>2</sup>国家中药现代化工程研究中心西南分中心 云南维和药业股份有限公司, 玉溪 653101

**摘要:** 基于 LC-MS 和网络药理学对臭灵丹乙酸乙酯部位 (ethyl acetate fraction of *Laggerae Herba*, ELH) 进行成分和靶点通路分析, 并通过 LPS (lipopolysaccharides, LPS) 诱导 RAW 264.7 炎症模型探讨 ELH 抗炎的作用机制。通过 Griess 实验, 比较臭灵丹不同萃取部位的抗炎活性; 利用 LC-MS 对 ELH 的化学成分进行分析; 基于网络药理学预测和筛选 ELH 发挥抗炎的核心成分, 靶基因和主要通路, 并用分子对接和蛋白免疫印迹 (Western blot) 对靶点和通路进行验证。Griess 实验结果表明, ELH 可显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放 NO, 抑制率达 103.07%, 是臭灵丹发挥抗炎作用的活性部位; LC-MS 分析得到 ELH 中 23 个化学成分, 包括 21 个倍半萜, 1 个黄酮, 1 个有机酸; 基于 4 个数据库, 获得 66 个共同靶点; 蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI) 分析发现获得白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等 degree 值大于 40 的 6 个核心靶点; GO、KEGG 富集分析发现, 核心靶点可能通过 PI3K-Akt、IL-17、NF- $\kappa$ B 和 TNF 等信号通路发挥抗炎作用; 分子对接结果显示 23 个化学成分与核心靶点具有良好的结合能力; Western blot 实验结果显示 ELH 处理后 Akt 的磷酸化水平和 NF- $\kappa$ B 表达显著下降 ( $P < 0.05$ )。综上, ELH 能抑制 AKT 磷酸化, 在一定程度上抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 从而发挥抗炎作用。

**关键词:** 臭灵丹; 网络药理学; 炎症; 分子对接; LC-MS 分析

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)8-1420-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.8.016

## Anti-inflammatory mechanism of *Laggerae Herba* based on network pharmacology

ZHOU Yong-zhi<sup>1</sup>, SHU Teng-yun<sup>1</sup>, SONG Yu-ying<sup>1</sup>, ZHENG Li-xiong<sup>2</sup>, LI Hai-zhou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Kunming University of Science and Technology, Faculty of Life Science and Technology, Kunming 650500, China;

<sup>2</sup>National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Weihe Pharmaceutical Co., Ltd., Yuxi 653101, China

**Abstract:** This study aims to analyze the components and target pathways of the ethyl acetate fraction of *Laggerae Herba* (ELH) based on LC-MS and network pharmacology, exploring its anti-inflammatory mechanisms *in vitro* using an lipopolysaccharides (LPS)-induced RAW 264.7 inflammatory model. The anti-inflammatory activities of various extracts of *Laggerae Herba* were assessed using the Griess assay. Additionally, LC-MS was utilized to analyze the chemical components of ELH. Network pharmacology aided in predicting and screening the core components, target genes, and principal pathways that mediate anti-inflammatory effects, which were then confirmed through molecular docking and Western blot analysis. Results from the Griess assay demonstrated that ELH significantly inhibited NO release in LPS-induced RAW 264.7 cells, achieving an inhibition rate of 103.07% and identifying it as the active fraction. LC-MS analysis revealed 23 chemical components in ELH, including 21 sesquiterpenes, one flavonoid, and one organic acid. Using four different databases, 66 common targets were identified. Protein-protein interaction (PPI) analysis pinpointed six core targets, including interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF), each with a degree value exceeding 40. GO and KEGG enrichment analyses indicated that these core targets

收稿日期: 2024-01-22 接受日期: 2024-06-28

基金项目: 国家自然科学基金 (181360643); 昆明理工大学药食同源学科方向支持项目 (331814078324)

\* 通信作者 E-mail: lihaizhou@kust.edu.cn

could modulate anti-inflammatory effects through the PI3K-Akt, IL-17, NF- $\kappa$ B, and TNF signaling pathways. Molecular docking confirmed the strong binding affinity of the 23 chemical components to the core targets. Western blot results indicated significant reductions in Akt phosphorylation and NF- $\kappa$ B expression post-ELH treatment ( $P < 0.05$ ). In conclusion, ELH can inhibit Akt phosphorylation and, to a certain extent, suppress the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway induced by LPS in RAW 264.7 cells, thereby exerting potent anti-inflammatory effects.

**Key words:** Laggerae Herba; network pharmacology; inflammation; molecular docking; LC-MS analysis

炎症反应是多种疾病的早期症状,是以防御为主的主要病理反应,能够保护受损的组织器官以及抵抗病原体等对机体的损伤,主要表现为红、肿、热、痛<sup>[1]</sup>。炎症可能是急性过程,也可能是慢性过程,急性炎症发生于消除感染或组织损伤时体内修复;相反,慢性炎症是有害的,并与严重的疾病有关,如动脉粥样硬化、哮喘、神经退行性疾病和癌症等<sup>[2]</sup>。炎症发生中,会释放一系列炎症因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、一氧化氮(nitric oxide, NO)、白介素(interleukin, IL, 如 IL-1、IL-6、IL-8)等。炎症过程中 NO 是由诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)产生的,而前列腺素(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)是由环氧合酶(cyclooxygenase, COX)在各种炎症模型中合成的,因此,抑制 NO 和 PGE<sub>2</sub> 的产生以及抑制 iNOS 和 COX-2 基因表达是治疗炎症性疾病的有效途径<sup>[3]</sup>。

中药材臭灵丹是菊科植物翼齿六棱菊的根及全草,作为我国具有民族及地方特色的民间常用中草药,具有历史悠久的药用记载和确切的临床疗效。臭灵丹一般在秋季茎叶茂盛时采割,干燥。主要分布在云南、四川、西藏等处,在云南民间地区主要用于治疗感冒、咽喉炎、支气管炎、发烧等疾病<sup>[4]</sup>。臭灵丹含有大量的挥发油成分,是臭灵丹中一类具有生物活性的次生代谢产物,包括单萜类、倍半萜类以及芳香族酚类化合物<sup>[5]</sup>;还含有非挥发性组分,主要是黄酮、绿原酸、生物碱等化学成分<sup>[6]</sup>;臭灵丹疗效确切,具有抗菌、抗炎、抗病毒、护肝、抗氧化、杀虫、驱虫、抗真菌、镇静、止泻和抗结核病等药理活性,在治疗急性呼吸道感染引起的高热、急性扁桃体炎、支气管炎和流行性腮腺炎、感冒及咳嗽等方面具有较好的临床效果<sup>[7]</sup>。

臭灵丹具有抗炎活性,但是其作用机制尚不明确,因此本研究借助网络药理学分析,通过构建“药物-成分-靶点疾病-作用通路”整合网络,充分阐释臭灵丹活性成分的整体功能,方便对臭灵丹化学成分对应的靶点和疾病进行全面分析,并运用分子对

接进行虚拟验证,通过 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型,在体外探讨臭灵丹潜在的抗炎机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药材与试剂

臭灵丹药材购买于云南省昆明市新菊花村药材市场,由昆明理工大学生命科学与技术学院李海舟教授鉴定为菊科植物翼齿六棱菊(*Laggera pterodonta* (DC.) Benth.)干燥地上部分,保存于昆明理工大学科楼药物化学生物化学实验室(样品号:20230415)。

石油醚、乙酸乙酯(批号:52004B、15028D,工业级,云南聚科贸易有限公司);乙腈、甲酸、磷酸(批号:0114190304、2022052012、2023071406,分析纯,德国 Merck 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号:3230821002,纯度 $\geq 99.5\%$ ,Solarbio);对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、脂多糖(批号:C15243283、C15545414、C15423172,纯度 $\geq 99.5\%$ 、纯度 $\geq 98\%$ 、纯度 $\geq 98\%$ ,上海麦克林生化有限公司);总 NOS 抑制剂(L-NMMA,批号:091323230915,纯度 $\geq 99\%$ ,碧云天生物技术公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 B1A9001251,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);Akt、 $\beta$ -actin(批号:5500016078、550017469, ABclonal);NF- $\kappa$ B、P-Akt(批号:AF2862264、AF11093235, Affinity);PBS、MEM 培养基、青霉素/链霉素溶液(批号:MA0015-Nov-241、MA0217-Oct-271、MA0110-Nov-2811, MeilunBio)。

### 1.2 仪器

色谱柱 ZORBAX SB C18、Agilent 液质联用仪(美国安捷伦公司);酶标仪(Tecan Switzerland);凝胶成像系统(BIO-RAD);微量核酸蛋白定量仪(Life Real)。

### 1.3 细胞

巨噬细胞 RAW 264.7(小鼠腹腔单核巨噬细胞)购自中国科学院昆明动物研究所。

### 1.4 样品制备

臭灵丹 2 kg 干燥粉碎,用 95% 的乙醇(药材 10

倍量)超声提取4次,合并提取液,减压浓缩,得臭灵丹浸膏156 g,浸膏加适量水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯进行萃取,减压浓缩干燥,得到石油醚溶剂部位(petroleum ether fraction of *Laggerae Herba*, PLH)、乙酸乙酯溶剂部位(ethyl acetate fraction of *Laggerae Herba*, ELH)、水溶剂部位(water fraction of *Laggerae Herba*, WLH)三个粗提物组。称取100 mg ELH,定容于100 mL容量瓶中,取1 mL定容后的样品,用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤三次到液相小瓶中,用于LC-MS分析。

## 1.5 细胞实验

### 1.5.1 Griess 试剂的配制

Griess I液:量取3 mL的 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 溶液,称取500 mg的无水对氨基苯磺酸,加适量超纯水溶解。将溶解后的混合溶液转入50 mL的容量瓶中定容,定容后的溶液进行除菌除杂操作,放入4  $^\circ\text{C}$ 冰箱贮存备用<sup>[8]</sup>。

Griess II液:取50 mg的盐酸萘乙二胺与3 mL的 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 加适量超纯水溶解。将溶解后的混合溶液转入50 mL的容量瓶中定容。定容后的溶液进行除菌除杂操作,放入4  $^\circ\text{C}$ 冰箱贮存备用。

### 1.5.2 LPS 溶液的配制

准确称取5.0 mg的LPS样品,倒入5 mL灭菌水溶解,充分搅拌使其完全溶解,把制成的溶液放入-20  $^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

### 1.5.3 不同溶剂萃取部位溶液的配制

使用DMSO将PLH, ELH和WLH配制成100 mg/mL母液,用培养基稀释,最后样品的终浓度为0.1 mg/mL。

### 1.5.4 细胞培养

调配90% DMEM培养基,向其中加入10% PBS以及1%青霉素与链霉素。将实验细胞置于调配完成的培养基中,放入恒温培养箱中培养,设定温度为37  $^\circ\text{C}$ 。定期更换DMEM培养液以保证细胞生长,持续观察细胞状态直至细胞生长态势良好,覆盖率达90%以上后对细胞进行传代。

### 1.5.5 不同溶剂萃取部位体外抗炎活性检测

将生长良好的RAW 264.7细胞以 $6 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板中,培养24 h,将细胞分为正常对照组(control group, Con); DMSO组(DMSO group, DMSO); L-NMMA阳性对照组(L-NMMA positive control group, L-NMMA),加入终浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  L-NMMA与0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS; 模型组(model

group, Mod),加入终浓度为0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS; PLH组(PLH group, PLH),加入终浓度为0.1 mg/mL PLH与0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS; ELH组(ELH group, ELH),加入终浓度为0.1 mg/mL ELH与0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS; WLH组(WLH group, WLH),加入终浓度为0.1 mg/mL WLH与0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS。加入药物处理24 h后,收集细胞上清液,在上清液中加入配制完全的Griess I试剂,混合物放置于摇床,震荡10 min,再加入Griess II试剂,置于摇床,震荡4 min,保证实验过程持续避光。使用酶标仪,在540 nm处检测样品混合物的光密度值,按照公式(1)计算NO产生抑制率(I)。

$$I = (OD_1 - OD_2) / (OD_1 - OD_3) \times 100\% \quad (1)$$

式中, $OD_1$ 为模型组的光密度值; $OD_2$ 为实验组的光密度值; $OD_3$ 为DMSO组的光密度值。

### 1.5.6 相关蛋白表达检测

共分为四组,正常对照组(control group, Con)、模型组(model group, Mod),0.1 mg/mL和0.2 mg/mL ELH组。将生长良好的RAW 264.7细胞接种于100 mm的培养皿中,细胞密度达到80%以上加入不同浓度的ELH(0.1 mg/mL和0.2 mg/mL)和LPS(0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )共同孵育24 h,去掉上清液,用冰冷10% PBS洗涤细胞1次,将细胞用刮刀刮到EP管里面,加入组织裂解液进行裂解,离心,去上清。细胞蛋白提取后,进行蛋白浓度测定,计算蛋白上样量,采用Western blot法对AKT、磷酸化AKT和NF- $\kappa$ B蛋白进行检测。

## 1.6 LC-MS 分析条件

### 1.6.1 色谱条件

色谱柱为ZORBAX SB  $\text{C}_{18}$  (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈(A),0.1%甲酸水溶液(B);柱温为40  $^\circ\text{C}$ ;流速为0.35 mL/min;进样量为3  $\mu\text{L}$ ,检测波长为195 nm,220 nm,254 nm。液相梯度洗脱条件为:0~5 min,10%  $\rightarrow$  15% A;5~20 min,15%  $\rightarrow$  50% A;20~25 min,50%  $\rightarrow$  90% A;25~27 min,90%  $\rightarrow$  100% A。

### 1.6.2 质谱条件

分析在负离子模式下进行;喷雾电压4 000 V;扫描范围设定为100~1 500;雾化器温度350  $^\circ\text{C}$ ;雾化器压力40 psi;干燥器流速10 L/min;毛细管电压4 000 V;透镜电压120 V;碎裂电压175 V。

### 1.6.3 定性分析

对臭灵丹的乙酸乙酯溶剂部位采用LC-MS进

行定性分析,得到臭灵丹总离子流。使用 Qualitative Analysis B.07.00 软件,根据化合物的一级质谱信息,结合臭灵丹相关文献,进行成分的结构鉴定。

## 1.7 臭灵丹网络药理学分析

### 1.7.1 臭灵丹化合物靶向预测

如图 1 所示,使用 Swiss Target Prediction 数据库<sup>[9]</sup> (<https://www.swisstargetforection.ch/>) 和 PharmMapper 数据库<sup>[10]</sup> (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 来预测化合物的靶点。Swiss Target Prediction 数据库在预测结果中选取 Probability > 0.05 的靶点进行分析。从 PharmMapper 数据库中选择 Norm Fit > 0.5 的靶点,用 UniPort 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 校正靶点名称。最后,将两个数据库检索到的所有靶点取合集,得到臭灵丹化合物的潜在靶点。

### 1.7.2 炎症潜在靶点的筛选

以“inflammation”为关键字,获取 DisGeNet 数据库<sup>[11]</sup> (<https://www.disgenet.org/home/>) 中与炎症相关的靶点,并选择 Score-gda > 0.2 的靶点进行分析。以“inflammation”为关键字,获取 GeneCards<sup>[12]</sup> (<https://www.genecards.org>) 数据库中炎症相关的靶点,并选择 Score > 7 的靶点。最后,将两个数据库中检索到的结果取合集,得到炎症的潜在靶点。

### 1.7.3 GO、KEGG 富集分析

通过 MetaScape 平台 (<https://www.metascape.org>) 对交集进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析,选择物种为“Homo sapien”。以  $P < 0.05$  为筛选限制条件,按 LogP 由小到大进行排序,选出前十个数据进行 GO 富集分析,了解目标基因在细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 中的数目和富集情况。采用气泡图对 KEGG 通路富集分析,以  $P < 0.05$  为筛选限制条件,计算 Gene Ratio,选出 19 个数据进行 KEGG 富集分析,寻找和分析生物体系系统中的相互作用。借助 Cytoscape 3.10.1 平台,构建化合物-靶点-疾病网络图。

### 1.7.4 PPI 网络的构建

利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 对疾病-化合物靶点取交集,得到 66 个共同靶点,将共同靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 平台进行分析,物种限于“Homo sapien”,创建 PPI 网络图,下载 tsv 格式的数据,导入 Cytoscape3.10.1,选取 degree 值大于 40 的节点作为关

键靶点。

### 1.7.5 分子对接

用 Auto Dock vina 软件进行分子对接,靶蛋白结构通过 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 下载,用 PyMOL 软件对蛋白进行去除水分子和配体<sup>[13]</sup>。分值越低则代表受体和配体亲和力越高,配体-受体结合的构象越稳定<sup>[14]</sup>,结合能 < -5 kcal/mol 的说明化合物和靶点具有较好的结合能力,用 PyMOL 和 proteins.plus (<https://proteins.plus/>) 进行可视化。

## 1.8 统计学分析

数据采用 GraphPadPrism 9.0 软件进行统计学分析,通过单因素方差分析进行组间比较,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果分析

### 2.1 臭灵丹抗炎活性评价

如图 1 所示,通过 Griess 实验结果可知,脂多糖诱导后,炎症因子 NO 表达显著增加 ( $P < 0.001$ ),说明炎症模型建模成功。经 0.1 mg/mL 臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位、0.1 mg/mL 臭灵丹石油醚溶剂部位、0.1 mg/mL 臭灵丹水溶剂部位作用于 RAW 264.7 细胞 24 h 后,NO 表达量均有降低 ( $P < 0.01$ ),其中,臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位组 NO 表达量显著降低 ( $P < 0.001$ ),抑制率达 103.07%,比臭灵丹石油醚溶剂部位和水溶剂部位的抗炎活性更好,是臭灵丹抗炎的活性部位。

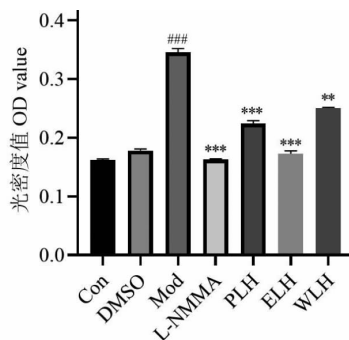


图 1 不同溶剂萃取部位对 LPS 诱导 RAW2647 细胞中 NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of different solvent extraction parts on NO level in RAW 264.7 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 Con 组比较,###  $P < 0.001$ ;与 Mod 组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ 。Note:Compared with Con,###  $P < 0.001$ ; Compared with Mod,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ 。

### 2.2 臭灵丹 LC-MS 检测成分

臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位样品溶液在负离子模

式下的总离子流如图2所示,共分析确认23个化学成分(见表1和图3),包含21个倍半萜、1个黄酮、1个有机酸。

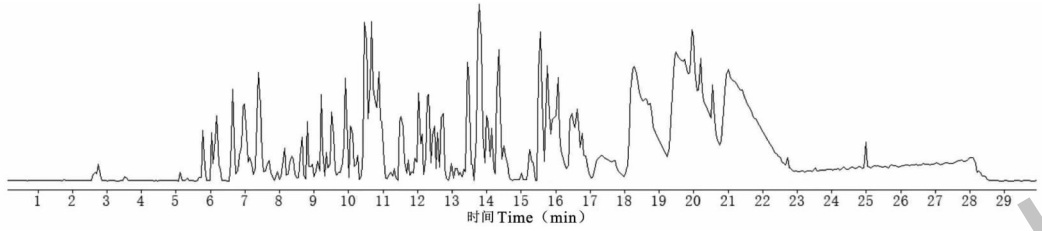


图2 臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位在负离子模式下的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of ELH in negative ion mode

表1 臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位中化学成分的鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents in ELH

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>		误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	化合物 Compound	分子式 Chemical formula
		测量值 Measured value	计算值 Calculated value			
1	6.60	515.119 4	515.119 0	0.78	异绿原酸 Isochlorogenic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>
2	8.38	265.144 8	265.144 0	3.02	1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -Dihydroxy-5,11(13)-diene-eudesman-13-oic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
3	9.18	265.144 5	265.144 0	1.89	2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -Dihydroxy pterodontic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
4	9.85	265.144 8	265.144 0	3.02	1 $\beta$ ,9 $\beta$ -Dihydroxy-5,11(13)-diene-eudesman-13-oic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
5	9.93	267.160 2	267.159 6	2.25	5 $\beta$ -Hydroxyilicic acid	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>
6	10.18	267.159 8	267.159 6	0.75	3 $\alpha$ -Hydroxyilicic acid	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>
7	10.50	221.192 1	221.190 5	7.23	Isointerm edeol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
8	10.65	221.190 7	221.190 5	0.90	Juniper camphor	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
9	11.91	249.149 5	249.149 1	1.61	1 $\beta$ -Hydroxy pterodontic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>
10	12.90	373.092 7	373.092 3	1.07	金腰素乙 Chrysosplenetin	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
11	13.73	249.149 7	249.149 1	2.41	3 $\beta$ -Hydroxy pterodontic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>
12	14.06	251.165 3	251.164 7	2.39	冬青酸 Illicic acid	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
13	14.14	247.134 4	247.133 4	4.05	臭灵丹酮酸 Pterodnic acid	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>
14	14.36	247.133 8	247.133 4	1.62	Tessaric acid	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>
15	14.53	247.134 4	247.133 4	4.05	3-Oxo-1,11(13)-dien-udesman-12-oic acid	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>
16	15.51	249.150 3	249.149 1	4.82	5 $\alpha$ -Hydroxycostic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>
17	16.47	263.165 6	263.164 7	3.42	(3 $\beta$ ,10 $\alpha$ )-3-Methoxyeudesma-4,11(13)-dien-12-oic acid	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
18	16.06	251.167 3	251.164 7	2.39	Laggerone B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
19	18.74	231.138 9	231.138 5	1.73	3,5,11(13)-Trieneudesma-12-oic acid	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
20	19.47	231.138 9	231.138 5	1.73	Eudesma-4(14),11(13)-dien-12,5 $\beta$ -olide	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
21	19.94	233.155 5	233.154 2	5.58	5,12-Diene-eudesmane-13-oic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
22	20.19	233.154 9	233.154 2	3.00	臭灵丹酸 Pterodontic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
23	20.59	233.155 1	233.154 2	3.86	Costic acid	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>

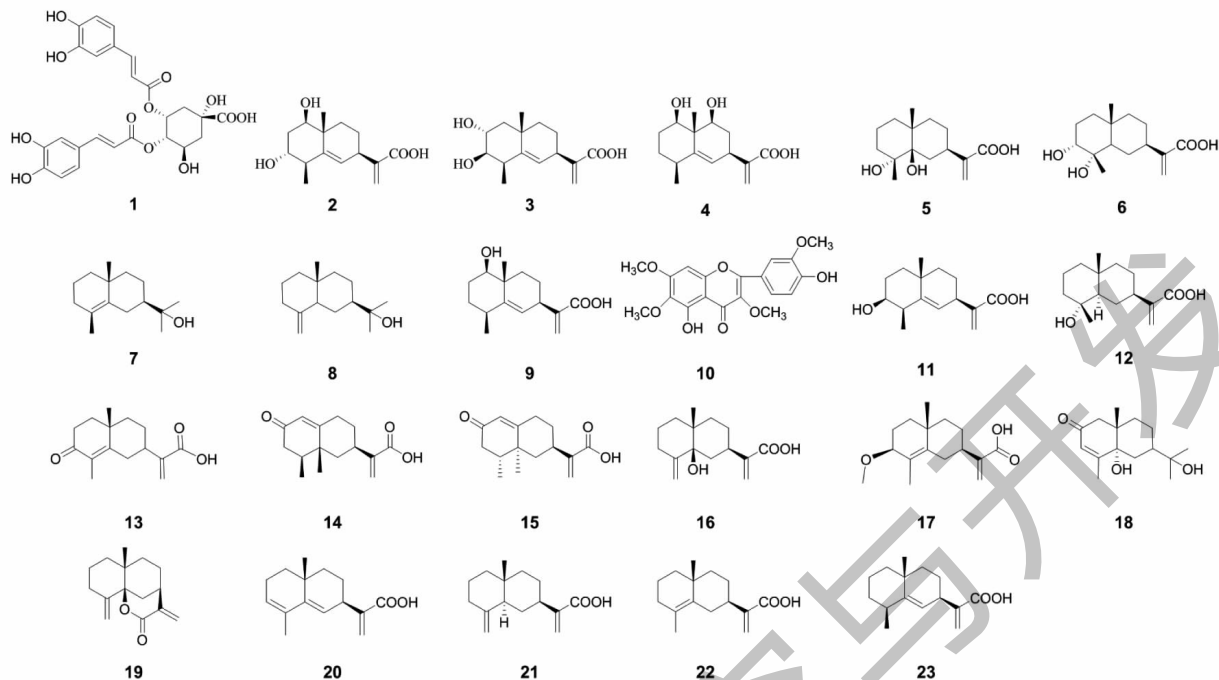


图3 LC-MS分析得到的化合物

Fig. 3 Compounds obtained by LC-MS analysis

### 2.3 成分靶点的获取

实验分析结果显示,将 Swiss Target Prediction 数据库、PharmMapper 数据库、DisGeNet 数据库和

GeneCards 数据库得到的基因通过 Venn 图取交集,共得到 66 个共同靶点(见图 4)。

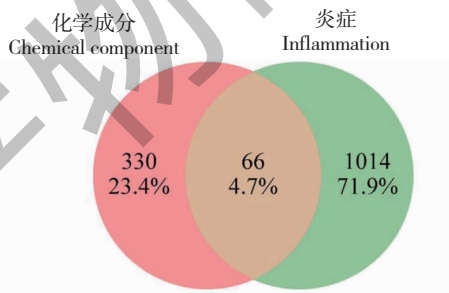


图4 臭灵丹化学成分靶点与炎症靶点韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of chemical components target and inflammatory target

### 2.4 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析结果显示了 66 个共同靶点在各个 GO term 的数目和富集情况,其中 1094 条与 BP 相关,51 条与 CC 相关,100 条与 MF 相关。按照  $P$  值从小到大排序,取前 10 个条目绘制,纵坐标为基因数,横坐标 GO term(见图 5A)。BP 主要涉及对细菌的反应,对脂多糖的反应,对脂质的细胞反应,对生物刺激的细胞反应,对脂多糖的细胞反应,炎症反应的调节,对外部刺激的反应的正向调节等;CC 主要涉及质膜小区,膜的外部成分,质膜的外部成分,

细胞-基质结合,质膜胞浆侧的外部成分,胞浆侧膜等;MF 主要涉及蛋白激酶结合,配体激活的转录因子活性等。

KEGG 通路富集分析结果显示(见图 5B),66 个共同靶点基因共涉及 147 条信号通路,按照  $P$  值排序,取前 19 个条目绘制,纵坐标为信号通路,横坐标 Gene Ratio,圆点越大表示该通路上富集的基因数越多。这些通路主要涉及血脂和动脉粥样硬化、癌症途径、TNF 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、结核病、C 型凝集素受体信号通

路、乙型肝炎、IL-17 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、JAK-STAT 信号通路、花生四烯

酸代谢、炎症性肠病、MAPK 信号通路、mTOR 信号通路等。

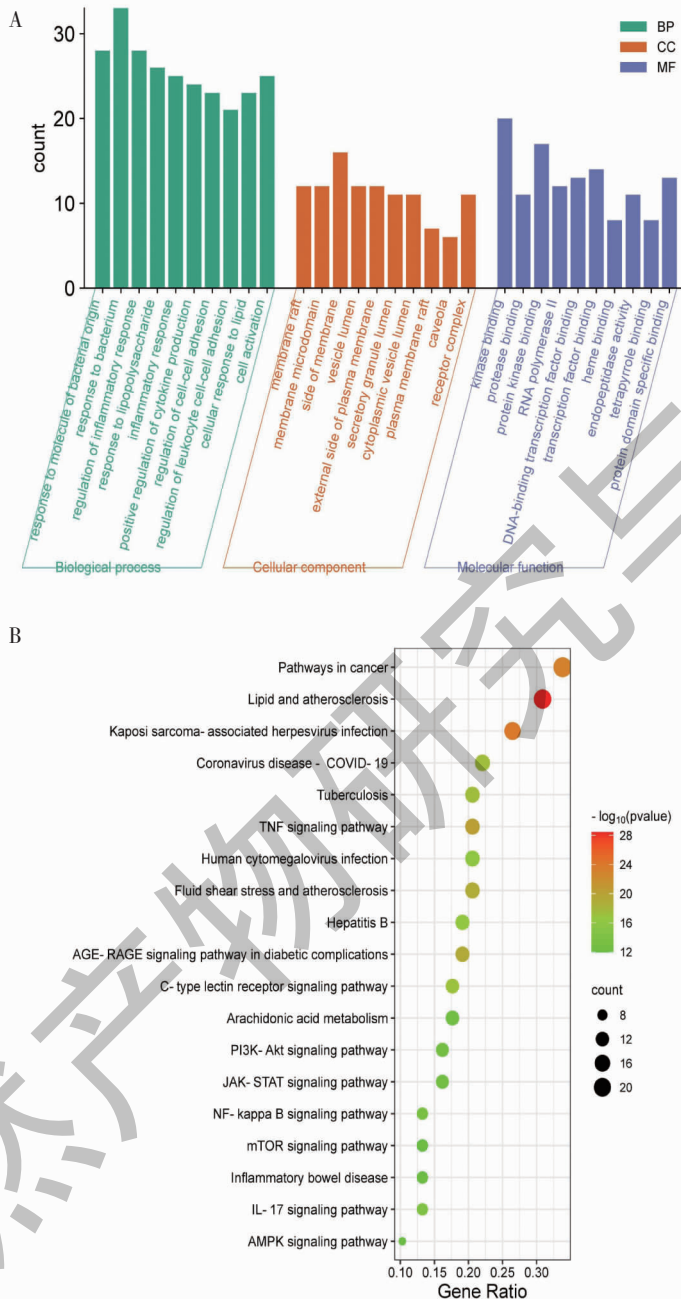


图5 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis

## 2.5 PPI 网络分析

对 66 个共同靶点之间的相互作用进行可视化分析(见图 6),根据 degree 值依次分散,越靠近中心,degree 值越大,分析得到 degree 值大于 40 的六

个核心靶点:IL6、TNF、蛋白激酶 B(AKT)、白蛋白(albumin, ALB)、趋化因子 CXCL8(C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)。







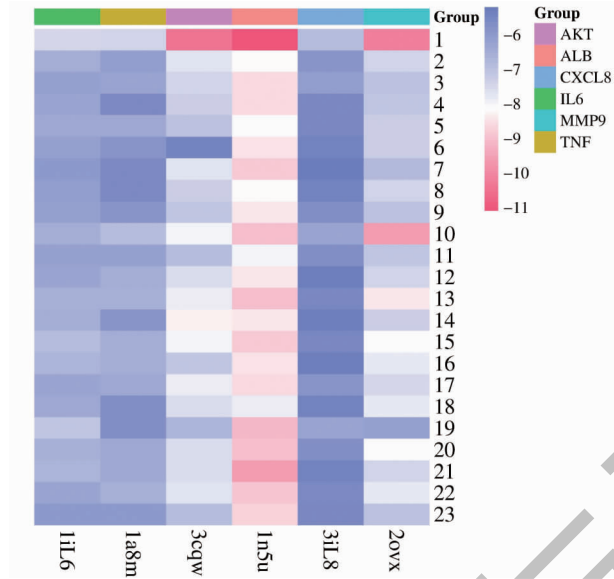


图 8 化合物与靶点对接结合能热图

Fig. 8 Heat map of docking binding energy of compounds to targets

注:右侧序号对应表 1 中的化合物。Note: The numbers on the right side corresponds to the compounds in Table 1.

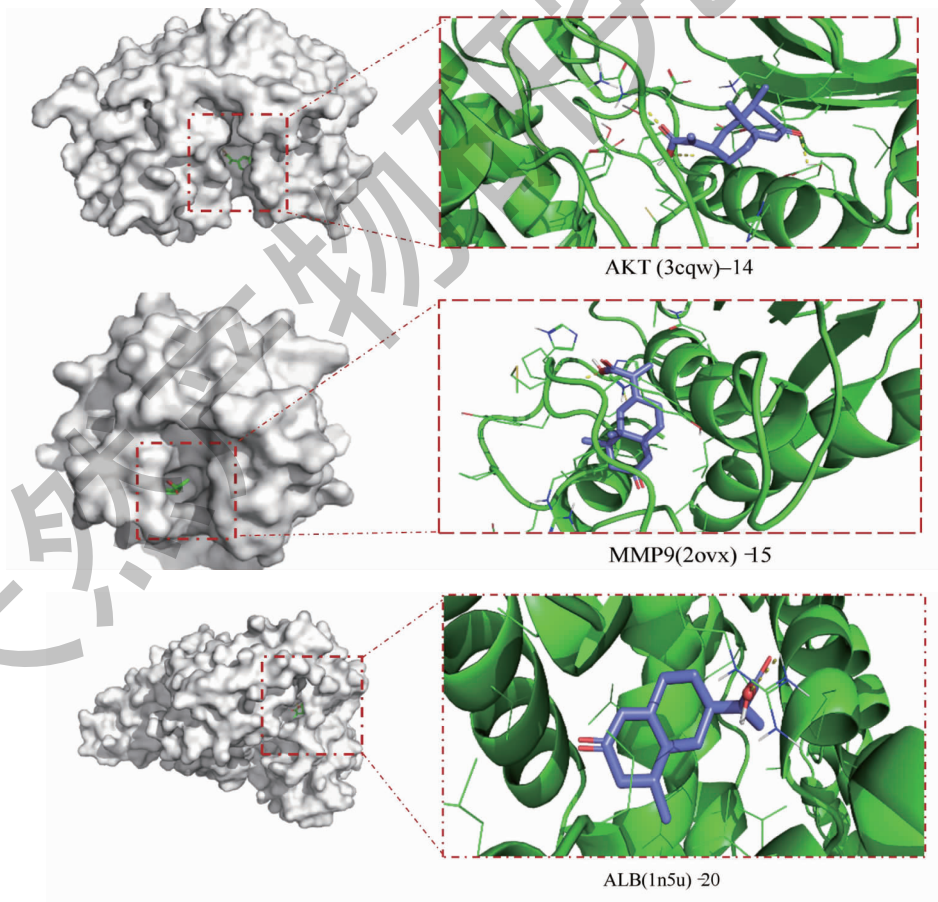


图 9 分子对接结果

Fig. 9 Results of molecular docking

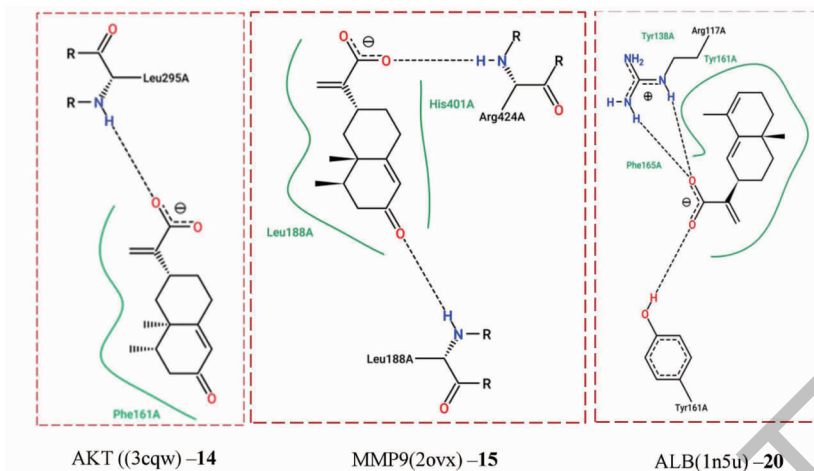


图 10 对接后的二维可视化结果分析图

Fig. 10 Two-dimensional visualization result analysis diagram after docking

### 2.8 臭灵丹对炎症相关蛋白表达的影响

检测臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位对 LPS 诱导的炎症相关蛋白表达的影响。结果显示 LPS 刺激后 Akt 的磷酸化表达和 NF-κB 表达明显增加,加入 0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL 臭灵丹乙酸乙酯溶剂部

位处理后,发现 Akt 的磷酸化水平和 NF-κB 表达显著性下降(见图 11),并呈现出一定的浓度依赖性,说明臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位能抑制 AKT 磷酸化,降低 NF-κB 信号通路磷酸化蛋白的表达。

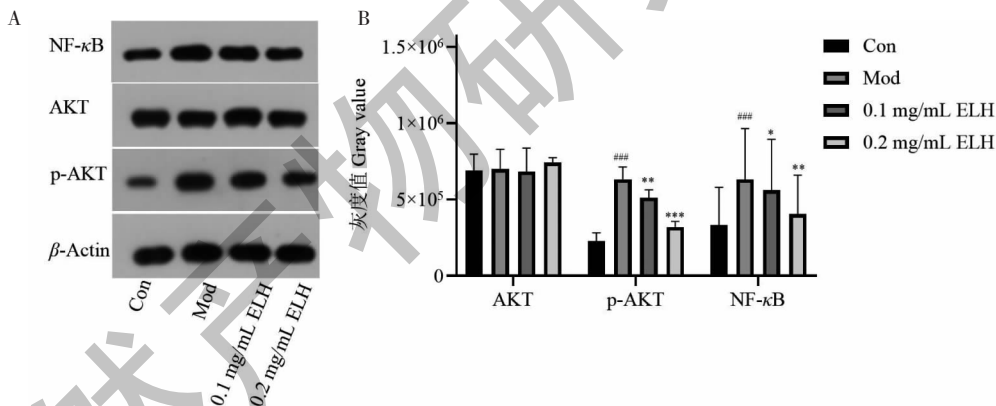


图 11 臭灵丹乙酸乙酯溶剂部位对 LPS 诱导的炎症相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of ELH on the expression of inflammation-related proteins induced by LPS( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 Con 组比较,###  $P < 0.001$ ;与 Mod 组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ 。Note:Compared with Con,###  $P < 0.001$ ;Compared with Mod,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3 讨论与结论

本研究通过 Griess 实验,发现 ELH 对 NO 的抑制率达 103.07%,是臭灵丹发挥抗炎作用的活性部位,运用 LC-MS 分析得到 23 个化合物,主要化学成分为倍半萜类、黄酮类和有机酸类,根据臭灵丹-化学成分-核心靶点-信号通路网络图可知,匹配靶点较多的前五个成分为异绿原酸、金腰素乙、臭灵丹酸、冬青酸和 (3β, 10α)-3-methoxyeudesma-4, 11

(13)-dien-12-oic acid,degree 值大于 15,是发挥抗炎作用的主要成分。有研究表明,分别用 TNF-α 和甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株刺激细胞,可以激活 NF-κB 信号通路,加入臭灵丹酸进行干预处理,发现臭灵丹酸对于两种不同刺激源诱发的 NF-κB 信号通路活化具有抑制作用<sup>[15]</sup>。有研究发现臭灵丹酸可作用于 H1N1 聚合酶复合体蛋白或核蛋白,促进 PD-L1/2 的激活和抑制 RIG-I/NF-κB/STAT1/I 型干

扰素通路达到抗炎效果<sup>[16]</sup>。异绿原酸能够抑制 NF- $\kappa$ B 和 TLR4 两个信号转导通路的激活,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 炎性细胞因子的表达,对 LPS 诱发的小鼠乳腺组织的炎性损伤起到保护作用<sup>[17]</sup>。臭灵丹总黄酮能够抑制 p38/MAPK 信号通路,并在核酸水平上抑制炎症因子表达,表明其抗炎药效具有多靶点作用的特点<sup>[18]</sup>。倍半萜组分能够作用于病毒复制的早期阶段,抑制 p38/MAPK 通路,进而抑制 NF- $\kappa$ B 通路和 COX-2,阻止细胞因子和趋化因子表达的增加<sup>[19]</sup>。

通过网络药理学技术,筛选得到 ELH 发挥抗炎作用的 66 个共同靶点,PPI 网络拓扑分析推测 ELH 可能调控 IL6, TNF, AKT, ALB, CXCL8, MMP9 等靶点,发挥抗炎的作用,这些靶点与炎症的发生发展密切相关。其中,IL6, TNF- $\alpha$  是重要的炎症因子,它们在炎症反应、免疫调节、细胞生长和分化等多种生物学过程中起着关键作用。研究发现, CXCL8 可以激活 MAPK 和 PI3K 信号通路,促进 IL-1、TNF- $\alpha$  等炎症因子的释放,吡嗪加双氧酶 1 可以上调 NFATc2 激活 CXCL8 促进中性粒细胞的招募<sup>[20]</sup>。ALB 有助于维持免疫系统的正常功能,在炎症反应中,ALB 的水平受到一定的影响,其水平变化可以作为评估炎症状态的一个间接指标,尤其是在监测慢性炎症和营养不良时。AKT 具有 3 种形式,分别是 AKT1、AKT2 和 AKT3,调节炎症因子的表达和免疫细胞的激活,调控炎症反应和细胞分化等<sup>[21]</sup>。MMP9 是一组在结构上具有同源性的蛋白内肽酶,MMP-9 的表达和活化与炎症反应密切相关,刺激 MMP-9 分泌增加,会导致生长因子、炎症介质释放增多<sup>[22]</sup>。由此推测,ELH 可能通过调控上述靶点,减少炎症因子分泌,发挥抗炎作用;分子对接结果也显示,23 个化合物与六个核心靶点形成氢键和疏水作用力,亲和力高,表明 ELH 具有抗炎的良好分子基础。

对 KEGG 通路进行富集分析结果显示,ELH 发挥抗炎作用的主要通路有 TNF 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、IL-17 信号通路、JAK-STAT 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路。TNF 信号通路较为显著, TNF- $\alpha$  是一种由单核细胞产生的多功能细胞因子在炎症反应中起促进作用,可以激活 NF- $\kappa$ B 通路,使促炎细胞因子上调<sup>[23]</sup>。PI3K/AKT 信号通路介导细胞外和细胞内信号,可以激活下游因子 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 复合物被解离,二聚体进入细胞核,调节编码炎症因子的表达<sup>[24]</sup>。IL-17 信号通路是一个重要的促

炎症细胞因子,可以激活下游 NF- $\kappa$ B、JNK 等信号通路,促进炎症的表达<sup>[25]</sup>。JAK-STAT 信号通路对于组织细胞的炎症反应和免疫应答至关重要,阻断 JAK-STAT 信号通路可以抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中的 iNOS、COX-2 的表达和 NO、PGE2、IL-6 的释放,可以调节免疫反应达到抗炎的作用<sup>[26]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一个核转录因子,与炎症、免疫反应以及细胞凋亡等生物过程密切相关,它在细胞内的作用涉及到多个信号通路的调控<sup>[21]</sup>。Western blot 实验结果显示 ELH 处理后 Akt 的磷酸化水平和 NF- $\kappa$ B 表达显著性下降,推测 ELH 通过抑制 PI3K-Akt、IL-17 和 TNF 等信号通路,进而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路发挥抗炎作用。

综上所述,本文主要利用 LC-MS 和网络药理学筛选出 ELH 发挥抗炎作用的主要化学成分,核心靶点和主要通路,并通过分子对接和 Western blot 进行靶点通路验证,推测 ELH 中异绿原酸、金腰素乙、臭灵丹酸化学成分可能调控 IL-6、TNF、ALB、AKT、CXCL8、MMP9 等靶点调控多条信号通路,降低炎症因子的分泌,调控炎症的发生发展,发挥抗炎作用,体现了 ELH 多靶点、多通路作用的特点。本研究为臭灵丹的民间用药提供了理论参考,但其更深入的药效物质基础、作用靶点及机制还需进一步探究。

#### 参考文献

- 1 Wang J, Wu Y. Mass intraoperative endothelial glycocalyx shedding affects postoperative systemic inflammation response[J]. BMC Anesthesiol, 2024, 24: 76-86.
- 2 Gowd V, Kass JD, Sarkar N, et al. Role of Sam68 as an adaptor protein in inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81: 89-91.
- 3 Dong L, Du H, Zhang M, et al. Anti-inflammatory effect of rhein on ulcerative colitis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and regulating gut microbiota[J]. Phytother Res, 2022, 36: 2081-2094.
- 4 Cao CS, Liu BL, Shen W, et al. Research on antiproliferative effect of flavones isolated from *Laggera pterodonta* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35: 2171-2184.
- 5 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, et al. Eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from *Laggera alata* [J]. J Nat Prod, 2003, 66: 1078-1081.
- 6 Wu YH, Zhou CX, Li XP, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of the total flavonoids of *Laggera pterodonta* on acute and chronic inflammation models [J]. Phytother Res, 2006, 20: 585-590.

- 7 Getahun T, Sharma V, Gupta N. The genus *Laggera* (Asteraceae)-ethnobotanical and ethnopharmacological information, chemical component as well as biological activities of its essential oils and extracts: a review [J]. Chem Biodivers, 2019, 6: e1900131.
- 8 Wang QQ, Han S, Li XX, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of verbascoside on LPS-induced RAW 264. 7 cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 4217-4222.
- 9 Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. Swisstargetprediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: 32-38.
- 10 Wang X, Shen Y, Wang S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45: 356-360.
- 11 Piñero J, Ramírez-Anguita, Sañch-Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics; 2019 update [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48: 845-855.
- 12 Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1. 30. 1-1. 30. 33.
- 13 Song LY, Li LH, Bi ST. Study on the mechanism of Astragali Radix extract in treating hypoxic-ischemic encephalopathy based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2024, 36: 520-527.
- 14 Ye JR, Liu R, Cheng C, et al. Mechanism of active ingredients from *Scutellaria Radix* on alcoholic liver disease based on network pharmacology and molecular docking and effect verification [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 1602-1612.
- 15 Guan WD, Li J, Chen QL, et al. Pterodontic acid isolated from *Laggera pterodonta* inhibits viral replication and inflammation induced by influenza a virus [J]. Molecules, 2017, 22: 1738-1752.
- 16 Wang YT, Zeng ZQ, Chen QL, et al. Pterodontic acid isolated from *Laggera pterodonta* suppressed RIG-I/NF- $\kappa$ B/STAT1/Type I interferon and programmed death-ligand 1/2 activation induced by influenza A virus *in vitro* [J]. Inflammopharmacology, 2019, 27: 1255-1263.
- 17 Gao RF, Fu YH, Wei ZK, et al. Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 729: 54-58.
- 18 Huang WY, Wang YY, Wang XH. Research on antiviral efficacy of *Laggera pterodonta* (DC.) Benth aetherolea *in vivo* and *in vitro* on the basis of ethnomedicines experience [J]. J Sichuan Tradit Chin Med (四川中医杂志), 2016, 34: 59-62.
- 19 Wang YT, Zhou BG, Lu JG, et al. Inhibition of influenza virus via a sesquiterpene fraction isolated from *Laggera pterodonta* by targeting the NF- $\kappa$ B and p38 pathways [J]. BMC Complement Altern M, 2017, 17: 25-33.
- 20 Walle T, Kraske JA, Liao B, et al. Radiotherapy or chestrates natural killer cell dependent antitumor immune responses through CXCL8 [J]. Sci Adv, 2022, 8: 4050-4069.
- 21 Wang JJ, Fu DD, Senouthai S, et al. Critical roles of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B survival axis in angiotensin II-induced podocyte injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 20: 5134-5144.
- 22 Lahdentausta L, Leskelä J, Winkelmann A, et al. Serum MMP-9 diagnostics, prognostics, and activation in acute coronary syndrome and its recurrence [J]. J Cardiovasc Transl, 2018, 11: 210-220.
- 23 Jannie P, Mehmet C, Christoffer S, et al. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20: 64-77.
- 24 Yang P, Qian F, Zhang M, et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis [J]. J Leukocyte Biol, 2019, 106: 1233-1240.
- 25 Liang D, Wang QL, Zhang WB, et al. JAK/STAT in leukemia: a clinical update [J]. Mol Cancer, 2024, 23: 25-37.
- 26 Xu B, Huang M, Qi H, et al. Tomatidine activates autophagy to improve lung injury and inflammation in sepsis by inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK pathways [J]. Mol Genet Genomics, 2024, 299: 14-24.