

刺桐碱促伤口愈合的网络药理学分析及实验验证

蔡维维, 张仕杰, 文媛媛, 侯豹, 孙海建, 邱丽颖*

江南大学无锡医学院, 无锡 214122

摘要: 本研究运用网络药理学和体内外实验模型探讨天然化合物刺桐碱 (hypaphorine, HYP) 促伤口愈合的作用机制。通过 SwissTargetPrediction 数据库挖掘 HYP 的作用靶点; 通过 GeneCards 数据库获取创伤愈合靶点; 将药物靶点与疾病靶点通过维恩在线筛选出交集靶点; 通过 String 数据库和 Cytoscape 3.7.1 构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI); 再借助 Metascape 和微生信-在线生物信息平台对核心靶点进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析; 最后通过建立细胞炎症模型及糖尿病大鼠背部创伤模型进行体内外实验验证。结果得到 HYP 的作用靶点 100 个, 伤口愈合靶点 6612 个, 共有靶点 60 个, 核心靶点 5 个。KEGG 富集通路主要包括与癌症的发病途径、PPAR 信号通路、化学致癌作用-活性氧等信号通路。体外细胞实验显示, HYP 可以通过抑制白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的表达抑制 RAW 264.7 细胞炎症过程以及通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 和磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated-protein kinase B, p-Akt) 的表达促进成纤维细胞迁移。动物实验显示, HYP 可以显著促进糖尿病大鼠慢性创面愈合, HE 和 Masson 染色结果表明 HYP 促进了糖尿病大鼠创伤部位再上皮化。免疫组织化学和 Western blot 结果表明, HYP 在慢性创面处抑制了炎症因子的释放, 加速了慢性创面从炎症期到组织再生期的过渡。综上所述, 本研究探究出 HYP 可能是通过调控 PPAR γ 通路, 抑制 NLRP3、IL-1 β 、TNF- α 、iNOS 的表达以及促进成纤维细胞增殖, 从而发挥促进慢性创伤愈合的作用。

关键词: 慢性创伤; 糖尿病; 刺桐碱; 网络药理学; 实验验证

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Network pharmacology analysis and experimental verification of hypaphorine for the treatment of wound healing

CAI Wei-wei, ZHANG Shi-jie,

WEN Yuan-yuan, HOU Bao, SUN Hai-jian, QIU Li-ying*

Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: To explore the mechanism of the natural compound hypaphorine in promoting wound healing, network pharmacology and *in vitro* and *in vivo* experimental models was used. The target of hypaphorine was digged through the SwissTargetPrediction database and wound healing targets were obtained through the GeneCards database; Then, intersecting targets between drug targets and disease targets were screened through Venn online and protein interaction networks (PPI) were constructed through a String database and Cytoscape 3.7.1; Further the Micro Bioinformatics Online Bioinformatics Platform and Metascape were utilized to conduct GO and KEGG enrichment analysis on the core targets; Finally, cellular inflammation and the mouse model of back injury in diabetes rats were established for *in vitro* and *in vivo* experimental verification. The results showed that there were 100 targets for the action of hypaphorine, 6612 targets for wound healing, 60 common targets, and 5 core targets.

The KEGG enrichment pathway mainly includes signaling pathways related to cancer pathogenesis, PPAR signaling pathway, chemical carcinogenesis reactive oxygen species, and so on. *In vitro* cell experiments have shown that HYP can inhibit the expression of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumour necrosis factor- α (TNF- α) and reactive oxygen species (ROS) to inhibit the inflammation process in RAW 264.7 cells and upregulate the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and phospho-Akt (p-Akt) to promotes fibroblast migration. Animal experiments showed that HYP could significantly promote the healing of chronic wounds in diabetes rats. The results of HE and Masson staining showed that HYP promoted the re-epithelization of wound sites in diabetes rats. Immunohistochemical and western blot results indicate that HYP inhibits the release of inflammatory factors in chronic wounds, accelerating the transition from the inflammatory phase to tissue regeneration phase. In summary, this study explores that HYP may regulate PPAR γ pathway to inhibit the expression of NLRP3, IL-1 β , TNF- α and iNOS, and promote the fibroblast proliferation, which play a role in promoting chronic wound healing.

Key words: chronic trauma; diabetes; hypaphorine; network pharmacology; experimental verification

皮肤伤口愈合是一个动态且复杂的生物过程，涉及多个组织细胞的协同作用，皮肤伤口修复过程是由三个连续的、动态的、相互重叠阶段组成：炎症反应期、增殖期和组织重塑期。炎症反应是机体自我防御过程，主要是关于先天免疫系统的激活，在此阶段适当的炎症细胞能够加速伤口愈合，但如果大量的炎症细胞聚集将会影响炎症阶段向增殖阶段的过渡，进而形成慢性伤口^[1]。在糖尿病患者伤口的炎症期，中性粒细胞和巨噬细胞聚集缓慢，伤口处炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 表达升高，使得炎症期延长，从而抑制肉芽组织的形成。伤口愈合增殖期是血管大量新生的阶段，为伤口愈合提供新鲜的氧气和营养物质。糖尿病组织中血管内皮生长因子和其他介质的减少，降低了组织内的基线血管分布，引起慢性伤口长期缺血，影响伤口愈合的增殖期^[2]。因此，能否抑制伤口组织中炎症因子表达和提高血管再生功能，可以作为临床治疗中评价药物是否具有促进糖尿病慢性伤口愈合作用的指标。近年来，基于系统生物学和生物网络平衡角度阐释疾病的网络药理学应用已成为研究中医药药理作用的主流方法之一^[3,4]，随着天然药物的化学成分与功效间的关系逐渐被更多的学者揭示，利用网络药理学手段探讨单体化合物与相关疾病之间的潜在联系，也成为了常用手段之一^[5,6]。

刺桐碱 (hypaphorine, HYP) 是从中药王不留行中分离得到的一种小分子吲哚类生物碱化合物 (结构式如图 1)，具有抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀的抗炎作用^[7]，进一步体外实验研究发现 HYP 能显著抑制炎症细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达的作用^[8]。基于此，我们借助网络药理学分析手段，从体内外水平上探讨刺桐碱促伤口愈合的机制。

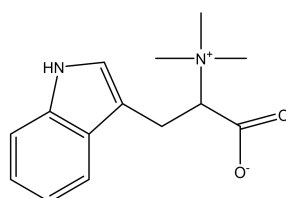


图 1 刺桐碱的结构式

Fig.1 Structures of hypaphorine

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用雄性 SD 大鼠，购自上海斯莱克生物科技有限公司（合格证编号：20220004006806），8 周龄，体重 200 g，饲养于医学院实验动物中心屏障环境。所有动物实验是在江南大学实验动物委员会的批准下进行，动物伦理编号：JN.No20211215S0360310[563]。

1.2 主要试剂及仪器

RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞系和 L929 小鼠成纤维细胞(中国科学院细胞库)；DMEM 高糖培养基和胎牛血清（批号：SH30022、SH30071.03，赛默飞世尔科技公司）；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）（批号：L2880，纯度：≥99%，美国 Sigma 公司）；刺桐碱（批号：B11334-1g，纯度：≥98%，上海士锋科技有限公司）；链脲佐霉素（批号：60256ES80，纯度：≥98%，翌圣生物科技（上海）股份有限公司）；苏木精-伊红染液、SABC 试剂盒、Masson 染色试剂盒（批号：D006-1-4、I001-1-1、D026-1-3，南京建城生物科技有限公司）；IL-1 β 、TNF- α 、PPAR γ 、Akt、p-Akt 及 iNOS 抗体（批号：16806-1-AP、17590-1-AP、16643-1-AP、80455-1-RR、66444-1-Ig、80517-1-RR，Proteintech 公司）； β -actin 及山羊抗兔二抗（批号：ab8226、ab6721，Abcam 公司）；DCFH-DA 活性氧荧光探针和 MCC950 试剂（批号：HY-D0940-37146、HY-12815A/CS542-7，MCE 公司）。

生物组织包埋机（EG1150H+C，徕卡仪器有限公司）；石蜡切片仪（RM2135，徕卡仪器有限公司）；数字切片扫描系统（Pannoramic MIDI，3DHISTECN 公司）；电子天平（AX2202ZH/E，奥豪斯仪器有限公司）；光学显微镜（IX73，OLYMPUS 公司）；冷冻离心机（5424R，德国 eppendorf 公司）；全自动化学发光分析仪（天能 5200Multi，上海天能科技有限公司）；流式细胞仪（Accuri C6 Plus，美国 BD 公司）；全自动荧光定量 PCR 系统（LightCycler 480 II，美国罗氏公司）。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 Hypaphorine 的靶点基因预测

通过 PubChem 数据库（<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）搜索王不留行刺桐碱的英文关键词“hypaphorine”，得到正确结构的“Canonical SMILES”，即“C[N+](C)(C)C(CC1=CNC2=CC=CC=C21)C(=O)[O-]”，随后将此导入 SwissTargetPrediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>），得到相关的预测靶点蛋白和基因名称。

1.3.2 创伤愈合相关靶点筛选

通过 GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org/>）搜索关键词“wound healing”，得到其相关靶点基因。

1.3.3 “HYP-wound healing”靶点交集图绘制

通过 Venny 在线绘图工具（<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>），输入 HYP 的预测靶点基因和伤口愈合潜在靶点，绘制疾病与药物的靶点交集图并获得共同靶点基因信息。

1.3.4 蛋白互作网络构建

将 Venny 图交集得到的靶点数据输入到 String 数据库 (<https://string-db.org/>)，利用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI) 图。

1.3.5 GO 和 KEGG 分析

运用 Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析，GO 功能分析包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC)，并借助微生物信-在线生物信息分析进行可视化分析。

1.4 体内外实验验证

1.4.1 细胞培养

RAW 264.7 细胞和 L929 成纤维细胞分别培养于含有 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清) 中，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，当细胞长满培养瓶底部 80% 时进行传代，将培养至对数生长期的细胞用于后续实验。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测 NLRP3、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平

将处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞以每孔 2×10^5 个/孔的密度接种于六孔板中，待贴壁后，按前期实验进行分组^[8]，设为空白对照组 (control, Con)、模型 (加入终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS) 组 (model, Mod)、HYP 低剂量 (1 μ g/mL 的 LPS 和 12.5 μ mol/L HYP) 组 (HYP in low dose, HYP-L)、HYP 中剂量 (1 μ g/mL 的 LPS 和 25 μ mol/L HYP) 组 (HYP in medium dose, HYP-M)、HYP 高剂量 (1 μ g/mL 的 LPS 和 50 μ mol/L HYP) (HYP in high dose, HYP-H) 组，于 37 °C 细胞培养箱中孵育 24 h。使用 TRIzol 试剂提取各组 RNA，再取 1 μ g 逆转录成 cDNA 后，用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR 检测，以 β -actin 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) mRNA 的相对表达量。内参及目的基因引物序列见表 1。

表 1 内参及目的基因 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences of internal reference and target genes

基因	引物序列 (5'→3')
Gene	Primer sequence (5'→3')
TNF- α	F: 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
	R: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
IL-1 β	F: 5'-GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG-3'
	R: 5'-TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG-3'
NLRP3	F: GCCGTCTACGTCTTCTCCTTCC
	R: CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG
β -actin	F: 5'-CATGGAGTCCTGTGGCATCC-3'

1.4.3 流式细胞术检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 表达水平

将处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞以每孔 1×10^5 个/孔铺入 6 孔板, 待贴壁后, 按 1.4.2 中分组培养 24 h 后收集细胞, 加入 DCFH-DA 活性氧荧光探针 (1:1000 无血清培养基稀释), 37°C 避光孵育 20 min。洗涤后利用流式细胞仪检测 FITC 在 488 nm 波长下的荧光光谱。

1.4.4 L929 细胞迁移实验

将处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞以每孔 1×10^5 个/孔铺入 6 孔板, 待贴壁后, 分为空白对照组 (control, Con)、模型组 (加入终浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS) (model, Mod)、HYP 高剂量 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 和 $50 \mu\text{mol}/\text{L}$ HYP) (HYP in high dose, HYP-H) 组, 培养 24 h 后, 收集各组培养基上清液, 离心, 去除细胞碎片, 即得到 3 组条件培养基 (记为 Con、Mod、HYP-H)。提前 12 h 将 L929 细胞按 2×10^5 个/孔的浓度培养于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 用 $200 \mu\text{L}$ 枪头的固定角度在培养板不同孔中划一条直线, PBS 洗去细胞碎片后, 每孔加入 1.5 mL 条件培养基 (设置为 Con 组、Mod 组、HYP-H 组), 并立即拍照, 记录 0 h 的初始划痕宽度, 随后分别于 24 h、48 h 拍照, 迁移距离用 Image J 软件测量, 按“细胞迁移距离=0 h 划痕距离-24/48 h 划痕距离”计算伤口的愈合情况, 实验重复 3 次。

1.4.5 L929 细胞中相关蛋白表达变化

将 L929 细胞按 5×10^5 个/孔的浓度培养于 6 孔板中, 贴壁培养 12 h 后, 加入不同组的 RAW 264.7 细胞培养液, 即为 Con 组、Mod 组、HYP-H 组, 作用 48 h 后, 用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 测定并调整蛋白浓度。然后进行蛋白变性, 电泳、转膜、封闭、孵育目的蛋白一抗溶液过夜, 随后孵育对应的二抗溶液 2 h, 最后按 ECL 显影液说明书操作上机显影, ImageJ 进行灰度分析。

1.4.6 糖尿病创口模型建立

参考之前的实验方法制备模型^[9]。36 只 SPF 雄性 SD 大鼠, 适应性喂养一周后按 $70 \text{ mg}/\text{kg}$ 腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 以诱导糖尿病大鼠。两周后, 待血糖稳定, 测空腹血糖浓度高于 $300 \text{ mg}/\text{dL}$, 视为糖尿病大鼠造模成功。随后将大鼠用异氟烷麻醉, 剪去背部毛发, 消毒处理后, 在大鼠背部两侧对称位置制作成直径 1 cm 的开放性创口。大鼠随机分为模型组 (生理盐水, Mod)、HYP 组 ($0.2 \text{ mg}/\text{mL}$)、MCC950 (NLRP3 抑制剂) 组, 每组 12 只, 建造创口当日记为第 0 d, 每天在创口处涂抹 $200 \mu\text{L}$ 。在创伤后的第 7、12、16 d 每组取 4 只创伤部位皮肤进行后续的免疫组织化学和蛋白印迹分析等实验。

创口愈合情况评估: 每天用直尺测量创口直径, 相机拍照记录。皮肤按以下方法计算大鼠背部慢性创面的愈合率: 愈合率=[(第 0 d 创口面积-第 n d 创口面积)/第 0 d 创口面积] $\times 100\%$ 。

1.4.7 创伤皮肤组织病理学检测

将大鼠皮肤组织脱水后, 于 4%多聚甲醛固定 48 h 以上, 根据需要修剪组织, 放入包埋

框中，流水冲洗 1 h。将流水冲洗好的组织，放入包埋机中，从包埋框中取出组织进行包埋，使皮肤的横截面于包埋的切面。包埋好的组织，放在切片机上，制作成厚度为 5 μm 的组织切片。

苏木素-伊红 (HE) 染色：根据 HE 染色试剂盒使用说明书，将脱蜡后的组织切片放入苏木素溶液 10 min，蒸馏水洗涤两遍，每遍 3 min，再放入伊红 30 s，增色液洗涤两遍，甩干，中性树脂封片。在显微镜下进行皮肤组织病理学观察。

Masson 染色：将各组脱蜡处理后的皮肤组织切片按 Masson 染色试剂盒使用说明染色后，用无水乙醇将多余的染色液冲洗干净，待乙醇挥发后，中性树脂封片，于显微镜下观察拍照并记录分析，胞质、肌纤维、红细胞和纤维素呈橙红色，胞核呈蓝褐色，胶原纤维被染成蓝色。

1.4.8 创伤皮肤组织炎症因子表达量检测

按以下流程进行免疫组化实验：①脱蜡后的组织切片用 3% H_2O_2 封闭 10 min，以灭活内源性酶。②热修复抗原：切片置于 0.01 mol/L 枸橼酸溶液中加热至沸腾持续 2-3 min 后，冷却至室温，此过程重复 1-2 次。③PBS 缓冲液洗涤两遍后，甩干，免疫组化笔圈中组织并滴上 5%BSA 封闭液，室温孵育 20 min。④甩干不洗，滴上稀释的抗体，玻片置于免疫组化湿盒，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。⑤PBS 洗涤两遍，孵育相应二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ ，20 min。⑥PBS 洗涤两遍，滴加 SABC 孵育，37 $^{\circ}\text{C}$ ，2 h。⑦PBS 洗两遍，滴加配好的显色液 DAB，室温显色 10 min 左右，蒸馏水终止反应。⑧细胞核复染 1 min，蒸馏水洗涤，终止反应，封片。在显微镜下进行观察。

1.4.9 Western blot 法检测皮肤组织中炎症因子表达量

称取 30 mg 皮肤组织于 EP 管中，加入 300 μL 缓冲液 (RIPA 裂解液：磷酸酶抑制剂：蛋白酶抑制剂为 100 : 1 : 1)，剪碎研磨，超声组织。置于冰上裂解 30 min 后，12000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，取上清。然后进行蛋白定量及变性，电泳、转膜、封闭和孵育，最后按 ECL 显影液说明书操作上机显影，ImageJ 进行灰度分析。

1.4.10 统计学处理

所有实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，每组数据至少来自三个独立性实验结果，GraphPad Prism 8.0 统计学数据软件进行处理， $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 网络药理学分析结果

通过网络药理学分析王不留行刺桐碱潜在作用靶点为 100 个 (见图 2)。通过 GeneCards 数据库收集创伤愈合潜在作用靶点 6612 个，将两者靶点进行合集分析，共同靶点为 60 个 (见图 3)。PPI 网络的构建及分析发现其潜在关键靶点为：过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)、C-X-C 基序趋化因子配体 8 (C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8, 又称 IL-8)、血小板衍生生长因子受体 β (platelet

derived growth factor receptor beta, PDGFR β)、组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB)、血管紧张素 I 转换酶 (angiotensin I converting enzyme, ACE) 和前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) (见图 4), 这些靶点均参与炎症过程, 说明刺桐碱促伤口愈合的作用主要是通过抑制炎症过程发挥其药理作用。

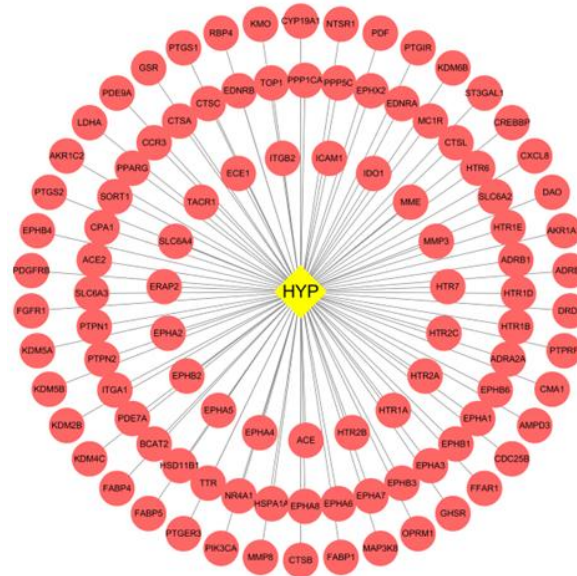


图 2 刺桐碱潜在作用靶点

Fig.2 Potential targets of hypaphorine

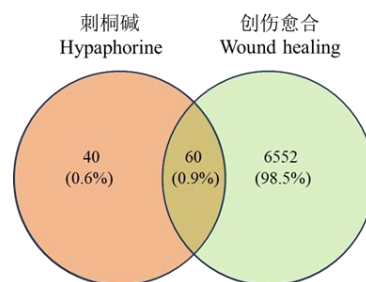


图 3 刺桐碱与伤口愈合交集靶点

Fig.3 Intersecting targets of hypaphorine and wound healing

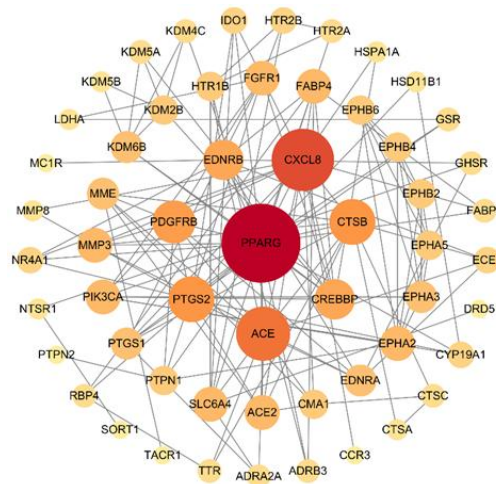


图 4 蛋白-蛋白相互作用网络图

Fig.4 Protein-protein interaction diagram

对刺桐碱与创伤愈合的交集基因进行 GO 功能富集分析发现，作用靶点基因主要富集在 20 个生物学过程，12 个细胞组成以及 14 个分子生物学功能。由基因数目由大到小排列出每个部分的前 10 个条目（见图 5）。在生物学过程方面，刺桐碱主要参与血液循环、激素水平的调节、对激素的反应、炎症反应的调节、细胞分泌的调节等过程；在细胞组成方面，刺桐碱主要参与空泡腔、膜筏、薄膜侧面、基于肌动蛋白的细胞投射簇、内体内腔、核膜、焦点粘连等过程；在分子生物学过程方面，刺桐碱主要参与跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、内肽酶活性、肽结合、G 蛋白偶联肽受体活性、氧化还原酶活性、肾上腺素受体活性、磷酸酯水解酶活性、蛋白质同源二聚活性等过程。

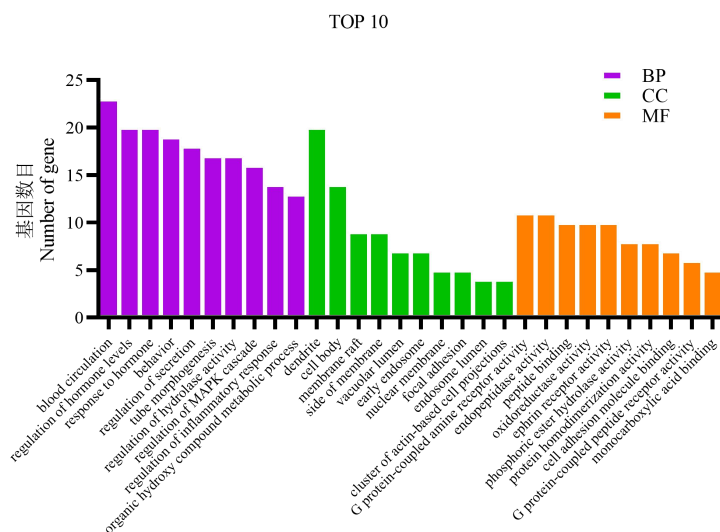


图 5 GO 功能富集分析

Fig.5 GO function enrichment analysis

对交集基因进行 KEGG 通路富集分析，筛选出前 13 条信号通路（见图 6），包括神经活性配体-受体相互作用（neuroactive ligand-receptor interaction）、肾素-血管紧张素系统（renin-angiotensin system）、脂肪细胞脂解的调控（regulation of lipolysis in adipocytes）、血清素能突触（serotonergic synapse）、癌症的发病途径（pathways in cancer）、肾素分泌（renin secretion）、PPAR 信号通路（PPAR signaling pathway）、粘合连接（adherens junction）、黑色素生成（melanogenesis）、化学致癌作用-活性氧（chemical carcinogenesis-reactive oxygen species）等。

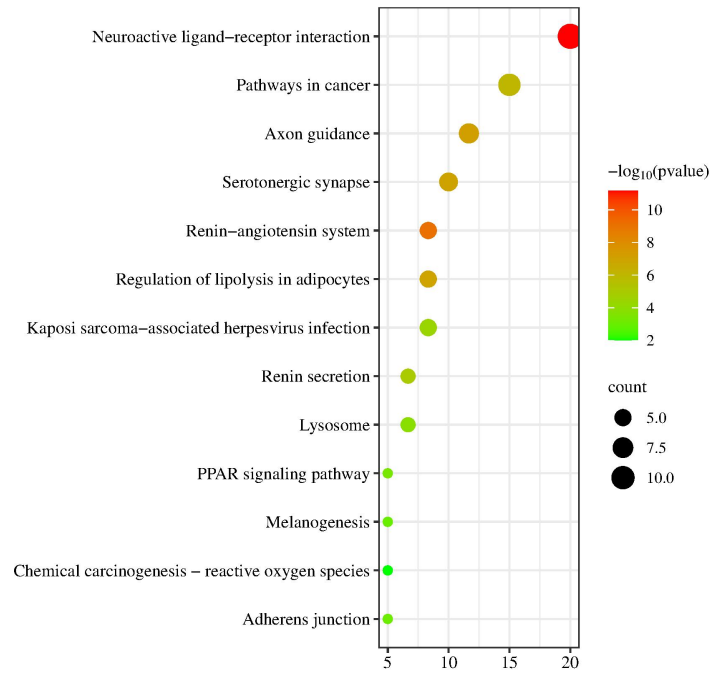


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig.6 KEGG pathway enrichment analysis

2.2 HYP 对 RAW 264.7 细胞中炎症因子表达的影响

由图 7 可知，与 Con 组相比，Mod 组中 NLRP3、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 的表达水平显著升高，而在不同剂量 HYP 处理组中，NLRP3、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 的表达水平显著降低。这表明 HYP 可以通过抑制 RAW 264.7 细胞中 NLRP3 炎症小体活化，进而抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的表达与分泌。

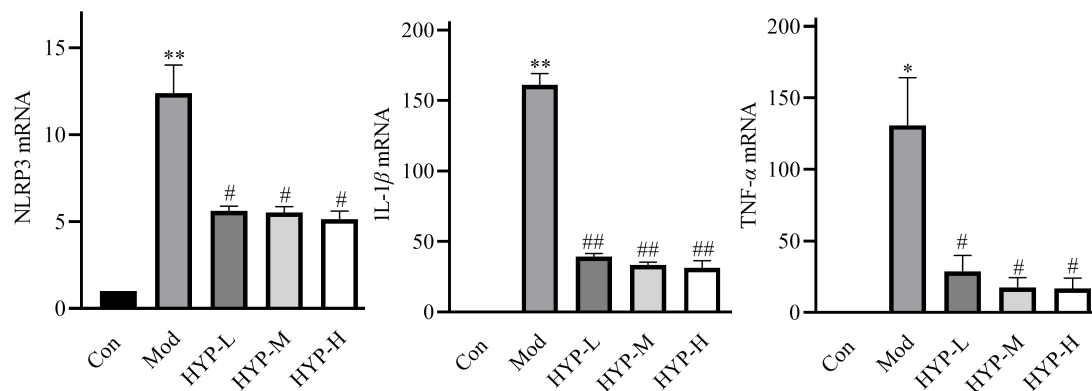


图 7 HYP 对炎症相关因子 NLRP3、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig.7 Effects of HYP on mRNA expression of inflammation related factors NLRP3, IL-1 β and TNF- α ($\bar{x} \pm s, n=4$)

注：与 Con 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 Mod 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

Note: Compared with Con, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with Mod, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.3 HYP 对 ROS 表达的影响

由图 8 可知，模型组中 RAW 264.7 细胞 ROS 表达水平显著升高 ($P<0.001$)，HYP 给

药后发现，低浓度的 HYP 对 ROS 表达的影响不明显，而 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ HYP 可以显著降低 ROS 的表达水平 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。这表明 HYP 具有抑制炎症细胞中 ROS 产生的作用。

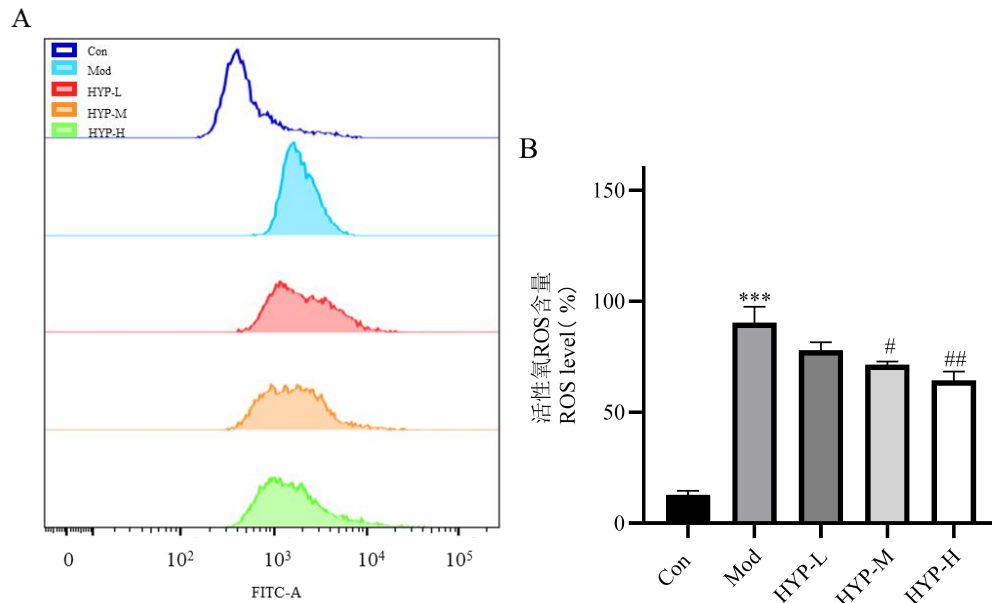


图 8 HYP 对 RAW 264.7 细胞 ROS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

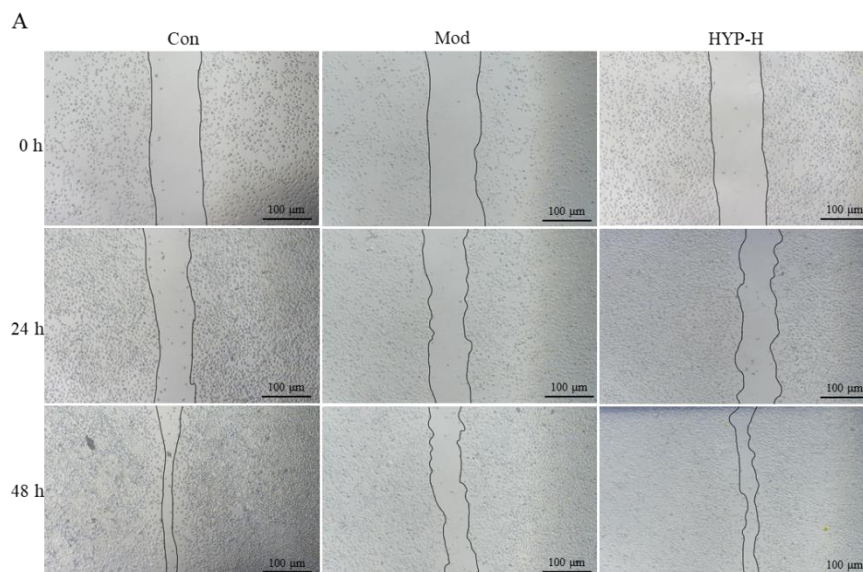
Fig.8 Effect of HYP on ROS expression in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

Note: Compared with Con, *** $P<0.01$; Compared with Mod, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.4 RAW 264.7 细胞上清液对 L929 细胞迁移能力的影响

以上实验结果已证实，HYP 具有抑制巨噬细胞炎症的作用，且 50 $\mu\text{mol/L}$ 时的效果最佳。因此，本文后续的细胞实验将以 50 $\mu\text{mol/L}$ HYP 进行研究。由图 9 可知，与 Con 组相比，Mod、HYP-H 上清液组在 24 h 时迁移距离没有明显变化；48 h 时，Mod 组细胞迁移距离明显小于 Con 组 ($P<0.01$)，而 HYP-H 组细胞的迁移与 Mod 组相比有明显的增大 ($P<0.05$)。



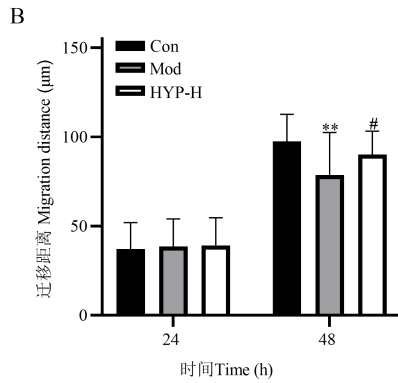


图9 RAW 264.7 细胞上清液对 L929 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.9 Effect of RAW 264.7 cell supernatant on the migration ability of L929 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与 Con 组比较, ** $P<0.01$; 与 Mod 组比较, # $P<0.05$ 。

Note: Compared with Con,** $P<0.01$; Compared with Mod,# $P<0.05$.

2.5 RAW 264.7 细胞上清液对 L929 细胞中相关蛋白表达的影响

用不同组的 RAW 264.7 细胞上清液处理 L929 细胞后, 如图 10 所示, 与对照组相比, Mod 组处理的 L929 细胞中 PPAR γ 表达下调, 同时 iNOS、IL-1 β 表达上调, 而采用 HYP-H 组的上清液处理后, 逆转 Mod 组中的蛋白上调与下调情况, 同时发现 HYP-H 组中 p-Akt 蛋白的活化上调。

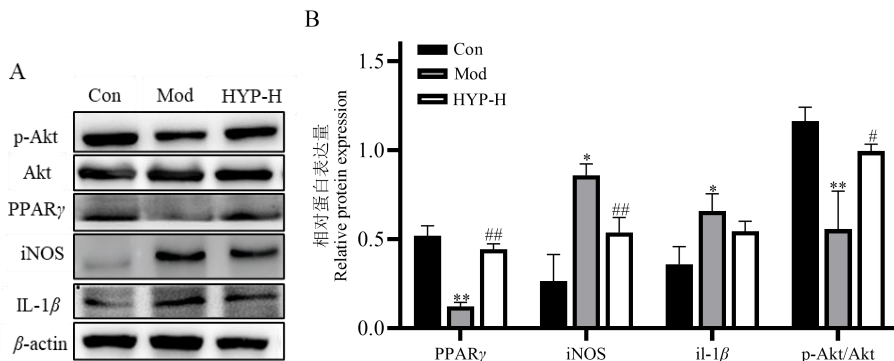


图 10 RAW 264.7 细胞上清液对 L929 细胞中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.10 Effect of RAW 264.7 cell supernatant on the expression of related proteins in L929 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与 Con 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Mod 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

Note: Compared with Con,* $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with Mod,# $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.6 糖尿病大鼠慢性创伤愈合情况的观察

我们通过 STZ 诱导大鼠糖尿病之后, 在大鼠背部构建开放性创伤模型。在创伤后第 3 d, 三组创口愈合没有显著差别。创伤后第 7 d, 伤口表面干燥, 没有明显的红肿, 与模型相比, HYP 和 MCC950 组创口结痂明显, 伤口直径明显缩小, 说明 HYP 和 MCC950 显著促进创伤愈合。在创伤后第 16 d, HYP 给药组大鼠背部皮肤创伤已经愈合, 可以清晰地观察到新鲜肉芽组织和新生血管, MCC950 组创伤愈合率达到 90%, 但是模型组中创伤仍然很明显。这表明与阳性对照相比, HYP 在促进慢性创伤愈合方面具有显著的作用 (见图 11)。

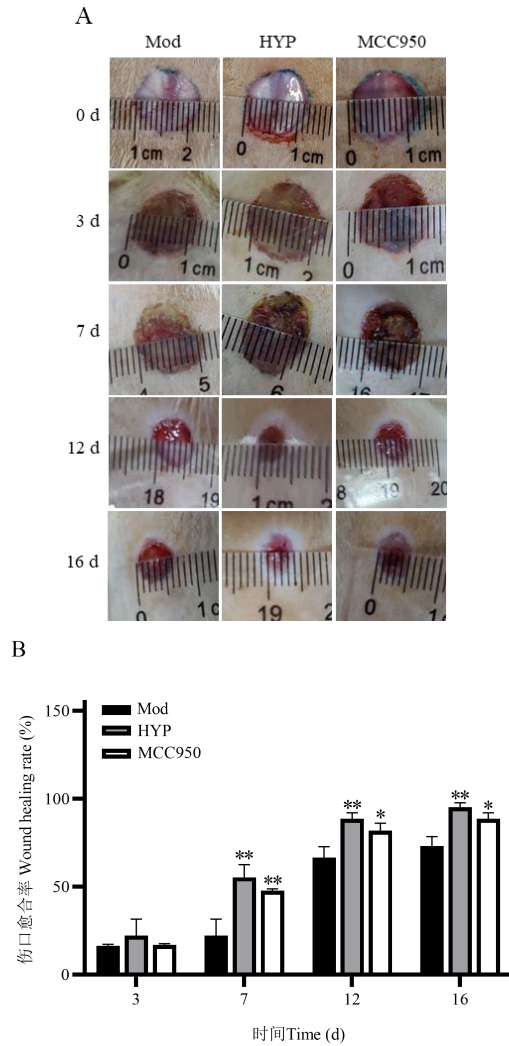


图 11 不同组糖尿病大鼠创伤愈合进展情况 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.11 Progress of wound healing in different groups of diabetes rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注：与 Mod 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Mod, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7 糖尿病大鼠创面皮肤组织形态学的变化

由图 12 可知，创伤后第 7 d，与 Mod 组相比，HYP 组和 MCC950 组的皮肤组织中炎症细胞数显著降低且创面血管再生明显。第 12 d，各组创面上皮组织开始逐渐形成，但 HYP 组和 MCC950 组的再上皮化速度明显快于模型组。HYP 和 MCC950 组胶原开始逐渐沉积，模型组仍有明显的炎性细胞浸润，表明创面皮肤仍处于炎性浸润状态。第 16 d，HYP 组和 MCC950 组已完成再上皮化，成纤维细胞也开始大量出现，此时，模型组也开始出现胶原沉积和血管再生。这些都表明 HYP 可以通过抑制慢性创伤炎症反应，促进创伤组织再上皮化和血管新生，加速慢性创口愈合。

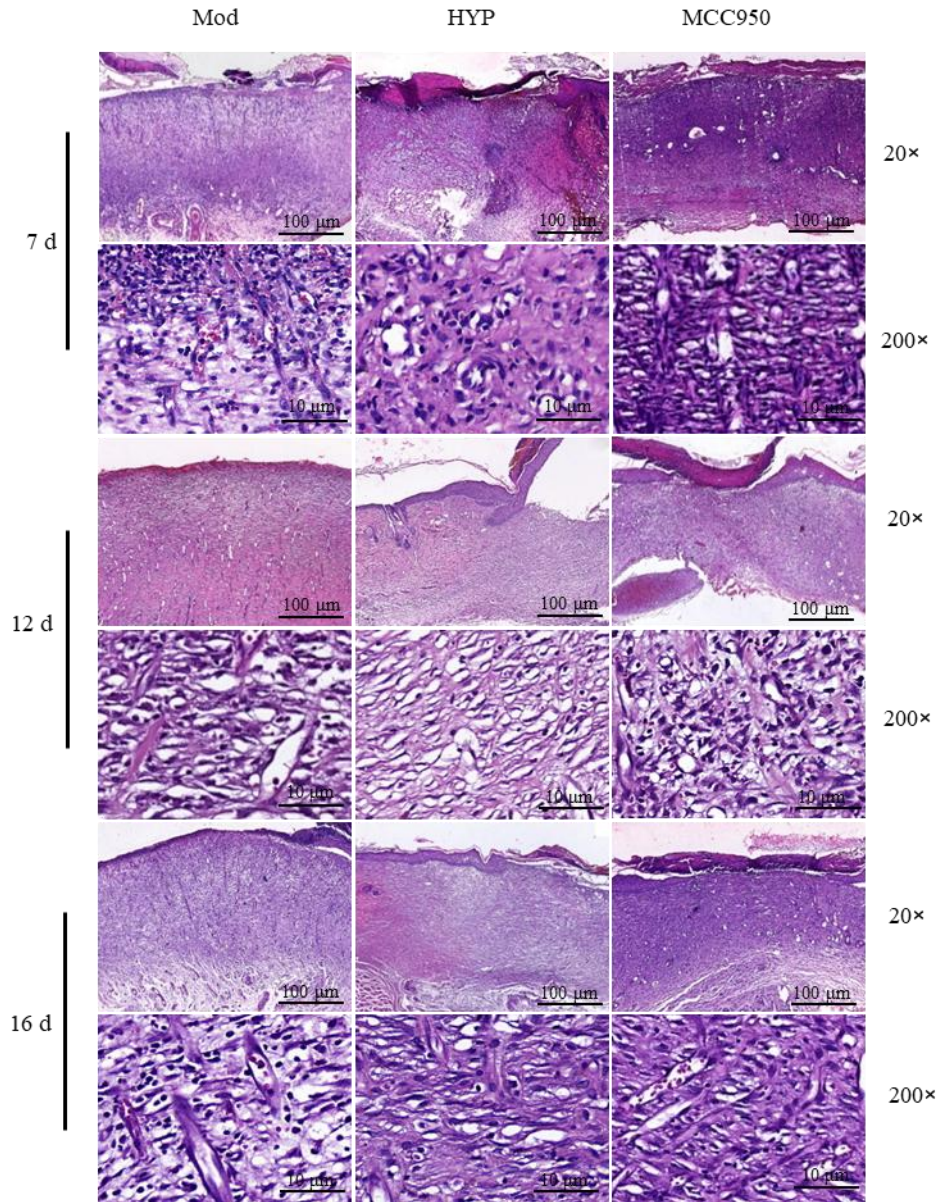


图 12 糖尿病大鼠创面皮肤组织 HE 染色

Fig.12 Histomorphological changes of wound skin in diabetes rats

2.8 糖尿病大鼠创面胶原纤维新生情况

胶原纤维的新生贯穿于创面愈合的炎症期、增殖期和重塑期，Masson 染色法可以将胶原纤维染成蓝紫色，可以通过对比蓝紫色的密度和深度可以判断各时间段创面处胶原纤维的含量。如图 13 所示，随着时间的增加，各组创面组织中的蓝色区域面积和密度越来越多，说明创面愈合过程中新生了大量胶原纤维。第 7 d，HYP 组和 MCC950 组优先于 Mod 组出现纤维沉积；第 12 d，HYP 组和 MCC950 组的胶原纤维沉积明显多于 Mod 组；第 16 d，各组胶原纤维大量合成，表现出有序的胶原纤维排列，HYP 组和 MCC950 组基本完成皮肤组织重塑过程，此结果与 HE 实验观察到的结果相一致，再次说明 HYP 可以促进创伤组织再上皮化和血管新生，加速慢性创口愈合。

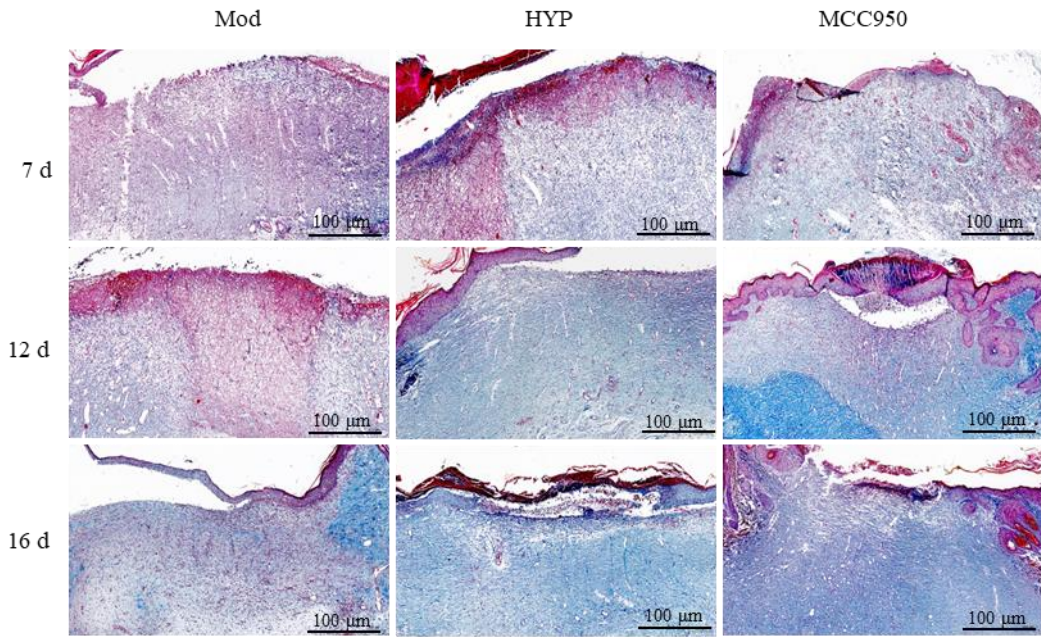


图 13 各组大鼠创面皮肤组织胶原纤维再生情况 (20×) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 13 Regeneration of collagen fibers in skin tissue of rats in each group (20×) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.9 糖尿病创伤中炎症因子表达的定性分析

如图 14 所示, 在创伤后第 7、12、16 d 的免疫组化结果表明, 随着慢性创面愈合, IL-1 β 和 TNF- α 的表达逐渐减少, 且与 Mod 相比, HYP 和 MCC950 组的炎症因子表达量明显减少, 表明 HYP 在慢性创伤炎症阶段发挥着重要作用。

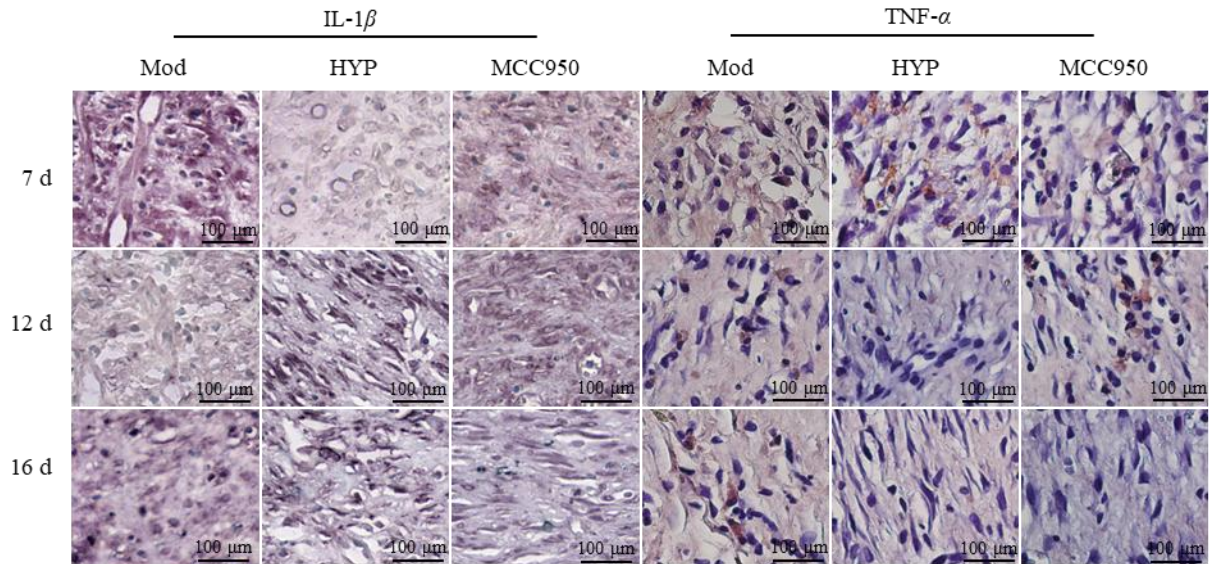


图 14 糖尿病创伤中炎症因子表达的定性分析 (400×) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.14 Qualitative analysis of inflammatory factors expression in diabetes rats (400×) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.10 糖尿病创伤中炎症因子表达的定量分析

如图 15 所示, western blot 实验也表明随着慢性创面愈合, IL-1 β 和 TNF- α 的表达逐渐减弱。创伤第 7 d, TNF- α 和 IL-1 β 的表达无明显变化。第 12 d, 随着慢性创面愈合, 各组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达逐渐减弱。HYP 组 TNF- α 和 IL-1 β 的表达明显低于模型组。第 16 d 的结果可

可以看出，三组皮肤组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平都比较低。以上结果表明，HYP 在慢性创伤炎症阶段发挥作用，改善炎症阻滞加速慢性创伤从炎症期向组织再生期过渡。

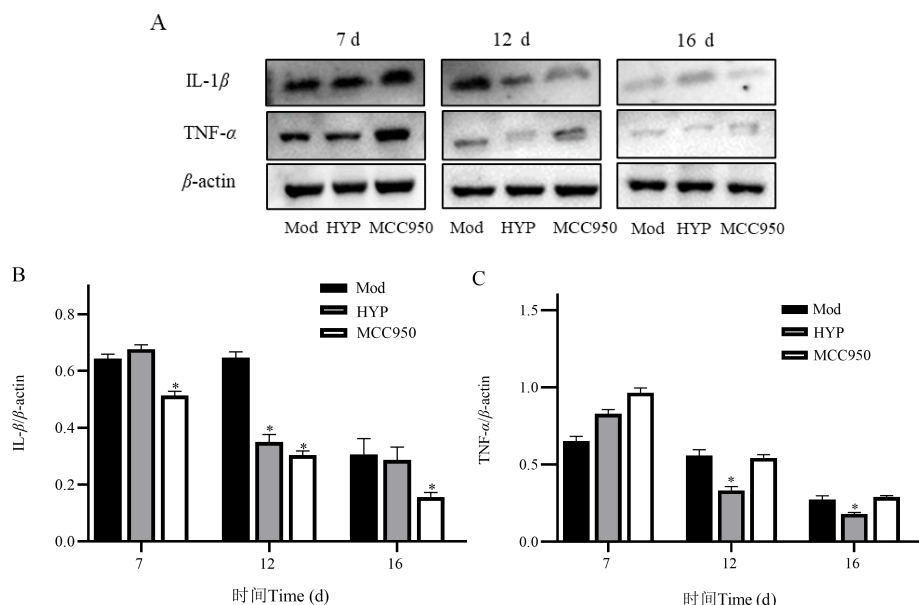


图 15 糖尿病创伤中炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig.15 Inflammatory factors expression in diabetes rats($\bar{x} \pm s, n=4$)

注：与 Mod 组比较，* $P<0.05$ 。

Note: Compared with Mod, * $P<0.05$.

3 讨论与结论

创伤愈合是维持皮肤完整的重要生理过程，由于创伤的形成与发生发展的病理过程复杂，临床治疗仍是全球关注的一个共同难题^[10]。本研究借助网络药理学对刺桐碱促创伤愈合的作用靶点进行 PPI 分析、GO 分析和 KEGG 通路分析，发现 PPAR γ 、CXCL8（又名 IL-8）、PDGFR β 、CTSB、PTGS2 等靶点为核心靶点，生物学过程与跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、炎症反应的调节、对脂多糖的反应等相关，KEGG 信号通路与癌症的发病途径、PPAR 信号通路、化学致癌作用-活性氧等相关。核心靶点 PPAR γ 、CXCL8（又名 IL-8）、CTSB、PTGS2 与炎症有着密切的相关性，PPAR γ 作为配体激活的转录因子，属于过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR）家族，具有调控脂质代谢、糖代谢、免疫炎症、细胞增殖和分化等方面的作用^[11]；CXCL8 是一种由多种细胞分泌的重要细胞因子，通过 CXCL8-CXCR1/2 轴在感染区域招募中性粒细胞引起炎症反应来增加病原体清除率，进而保护宿主免受进一步感染，并在获得性免疫中扮演重要调节作用^[12]；CTSB 是一种广泛表达于溶酶体上的半胱氨酸肽链内切酶，属于木瓜蛋白酶家族的成员，其在调节固有免疫、细胞外基质平衡、炎症和细胞凋亡中均发挥着重要的作用^[13]。PTGS2 是 PTGS 同工酶之一，属于诱导型表达的环加氧酶，其在正常生理状态下的多数组织内低表达，但当组织或细胞收到刺激，引起疼痛或炎症反应时，PTGS2 的表达就会大幅度上调^[14]。PDGFR β 是血小板衍生生长因子受体（PDGFRs）亚型之一，属于第三家族受体酪氨酸激酶，在生物体的生长、发育、血管形成和组织创伤修复

的过程中发挥着重要作用^[15]。因此,本文主要从抗炎和促血管新生两方面对刺桐碱与创伤愈合两者的关系进行实验验证。

创伤愈合过程中,局部炎症因子如 IL-1 β 和 TNF- α 会被扩增,进而导致创伤处的蛋白酶水平过度升高,使得慢性伤口内聚集炎症细胞,促进 ROS 的大量产生以及损害细胞外基质蛋白(Extracellular matrix, ECM),继而阻滞炎症过程^[16]。血管新生中内皮细胞和成纤维细胞的迁移是关键,细胞的迁移可以通过 PI3K-Akt 途径介导, Akt 的磷酸化可以上调促新生通路从而促进血管新生^[17]。通过构建 RAW 264.7 炎症细胞模型探讨 HYP 的抗炎及促血管新生的作用机制,实验结果显示,与 LPS 组相比, HYP 可以抑制巨噬细胞内 ROS 表达量以及炎症相关因子 NLRP3、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达。且用 HYP 处理后的巨噬细胞上清液作用于 L929 成纤维细胞,可以增强 L929 细胞的迁移能力,提高 PPAR γ 蛋白表达,抑制 iNOS、iL-1 β 等炎症相关蛋白表达,上调 Akt 蛋白的磷酸化。此部分结果与网络药理学分析结果相一致,表明 HYP 可以通过增强 PPAR γ 蛋白的表达,从而抑制炎症过程,通过促进 Akt 的磷酸化过程,促进成纤维细胞的增殖。

NLRP3 炎症小体是一个通过激活半胱天冬酶-1 调节先天免疫功能的分子平台,催化免疫细胞中 IL-1 β 和 IL-18 的蛋白水解过程和分泌^[18],所以,为了验证细胞实验结论,我们进一步构建了糖尿病大鼠创伤模型,并采用 MCC950(NLRP3 抑制剂)作为阳性对照药,评价 HYP 促进糖尿病慢性伤口的愈合作用。动物实验结果表明,与模型组相比, HYP 治疗组和 MCC950 组的创口从第 7 d 开始,伤口愈合明显,且皮肤组织炎症细胞数显著减少且胶原纤维和血管再生明显。随着创口的愈合, HYP 组和 MCC950 组 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平都一定程度受到抑制,此结果与细胞实验结果一致,说明 HYP 可以在慢性创伤炎症阶段发挥作用,抑制了炎症因子的产生,改善了炎症阻滞加速慢性创伤从炎症期向组织再生期的过渡。

因此本次实验设计基于网络药理学分析,从体内外水平上探讨了 HYP 对慢性创伤的促愈合作用,阐述了天然药物刺桐碱在改善创伤局部炎症促进伤口愈合方面的药理作用,为刺桐碱的产品化开发提供了实验理论依据。然而,本研究在探究炎症过程中成纤维细胞的生长情况以及动物实验分组中,仍存在分组不够全面的情况,这也是后续研究中需要全面考虑的问题,同时可以结合代谢组学等方法进一步阐明刺桐碱的抗炎促伤口愈合机制。

参考文献

- 1 Liu S.Multifunctional medical dressings for the treatment of diabetic chronic wounds[D].Hefei:University of Science and Technology of China(中国科学技术大学),2020:146.
- 2 Kolluru GK,Bir SC,Kevil CG.Endothelial dysfunction and diabetes:effects on angiogenesis,vascular remodeling,and wound healing[J].Int J Vasc Med,2012,2012:918267.
- 3 Xie CZ,Ren JX.Network pharmacology in research on efficacy of traditional Chinese medicine and compound prescriptions[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2024,30:198-207.
- 4 Zhuang YS,Cai BC,Zhang ZL.Application progress of network pharmacology in traditional Chinese medicine research[J].J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2021,37:156-160.
- 5 Chen BL,Zeng KP,Wang YC,et al.Network pharmacological analysis and verification of the mechanism of

- quercetin in the treatment of Parkinson's disease[J].Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2023,25:752-762.
- 6 Zhang QP,Fu JJ,Cheng ZP,et al.A network pharmacology-based approach to explore mechanism of kaempferol-7-*O*-neohesperidoside against prostate cancer[J].Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2024:146-154.
 - 7 Cai WW,Hou B,Chen XH,et al.Isolation,identification and its anti-inflammatory activity of hypaphorine from *Vaccaria segetalis*[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:616-620.
 - 8 Sun HJ,Cai WW,Wang X,et al.Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NF κ B and ERK pathways in RAW 264.7 cells[J].BMC Complement Altern Med,2017,17:120.
 - 9 Qi MT,Zhu XR,Yu XY,et al.Preparation of W/O hypaphorine–chitosan nanoparticles and its application on promoting chronic wound healing via alleviating inflammation block[J].Nanomaterials,2021,11:2830.
 - 10 Yu R,Zhang HL,Guo BL,et al.Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering[J].Nano-Micro Lett,2022,14:7-52.
 - 11 Guo X,Zong HH,Li DD,et al.The dual role of PPAR γ in tumors[J].Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报),2021,43:460-468.
 - 12 Shang LZ, Ji S, Shi LT, et al. Mechanism of modified erchentang on expression of CXCL8-CXCR1/2 axle genes in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26:40-48.
 - 13 Lu JL,Chen ZH,Bu XJ,et al.Elaidic acid induced hepatocyte pyroptosis via autophagy-CTSB-NLRP3 pathway[J].Food Chem Toxicol,2023,181:114060.
 - 14 Hou W,Lu JS,Zuo HW,et al.Protective effect of ursolic acid on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice by regulating PTGS2[J].Prac J Organ Transplant(Electronic Version)(实用器官移植电子杂志),2022,10:353-359.
 - 15 Wang R,Liu FB,Chen PP,et al.Gomisin D alleviates liver fibrosis through targeting PDGFR β in hepatic stellate cells[J].Int J Biol Macromol,2023,235:123639.
 - 16 Bourguignon LY.Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions[J].Am J Pathol,2014,184:1912-1919.
 - 17 Chen KQ,Li YQ,Zhang XH,et al.The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium:recent updates[J].Cell Death Dis,2022,13:513.
 - 18 Moon JS,Nakahira K,Chung KP,et al.NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J].Nat Med,2016,22:1002-1012.

收稿日期: 2024-01-24 接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81700364); 江南大学实验室管理专项研究课题(JDSYS201924) 大学生创新创业训练计划省级重点项目(202210295035Z); 国家自然科学基金-面上项目(82170424)

*通信作者 E-mail: qiulydoc@sina.com