

民间药材降真香抗炎质量标志物的研究

覃 淼^{1#}, 熊万娜^{2##}, 黄金梅¹, 刘 笑², 赵 颖², 黎 芳^{1,3}, 李英健^{4*}

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200; 2. 广西卫生职业技术学院药学系, 广西南宁 530023;
3. 广西中药制剂共性技术研发重点实验室, 广西南宁 530200; 4. 广西大学林学院, 广西南宁 530004)

摘要: 筛选海南、广西的民间药材降真香的抗炎质量标志物 (quality marker, Q-marker)。采用质谱分析、鉴定降真香的化学成分。通过网络药理学分析降真香抗炎活性成分、作用靶点和信号通路, 筛选降真香抗炎的潜在质量标志物。用高效液相色谱法验证潜在质量标志物, 体外实验验证潜在质量标志物的抗炎活性、作用靶点。实验方案经由广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查通过。结果从降真香提取物中分析、鉴定出31个化学成分。通过网络药理学筛选得到成分靶点727个、疾病靶点422个以及包括前列腺素G/H合酶2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2) 在内的作用靶点110个, 靶点主要富集在炎症反应、对脂多糖的反应等498个生物过程, TNF信号通路、Toll样受体信号通路等101条信号通路。通过高效液相色谱法可检测出降真香提取物中含有异鼠李素、芒柄花素、柚皮素、黄豆黄素、熊果酸和齐墩果酸。降真香含药血清以及6个成分可显著降低脂多糖诱导的RAW264.7炎症细胞的一氧化氮、白介素-6 (interleukin 6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α 的含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。异鼠李素等6个成分可视作潜在质量标志物。通过分子对接和体外环氧合酶2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 活性实验, 从6个潜在质量标志物中筛选、验证异鼠李素是PTGS2的抑制剂, 半数抑制浓度为 $9.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上, 降真香提取物具有显著体外抗炎作用, 其机制可能与调控IL-6、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1、PTGS2等靶点介导的TNF信号通路、Toll样受体信号通路有关。异鼠李素、芒柄花素、柚皮素、黄豆黄素、熊果酸和齐墩果酸可作为降真香的质量标志物, 其中异鼠李素可能是COX-2的抑制剂。

关键词: 降真香; 两粤黄檀; 抗炎; 质量标志物; 异鼠李素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3396-09

Identification of quality markers associated with the anti-inflammatory effects of Jiangzhenxiang, a folk medicine

QIN Miao^{1#}, XIONG Wan-na^{2##}, HUANG Jin-mei¹, LIU Xiao², ZHAO Ying², LI Fang^{1,3}, LI Ying-jian^{4*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Department of Pharmacy, Guangxi Medical College, Nanning 530023, China; 3. Key Laboratory of Common Technology of Traditional Chinese Medicine Preparation, Nanning 530200, China; 4. Forestry College of Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: We have identified anti-inflammatory quality markers (Q-markers) of Jiangzhenxiang. The chemical components of Jiangzhenxiang were identified by mass spectrometry and the substances that contribute to its anti-inflammatory activity, their targets and signaling pathways were analyzed by network pharmacology to identify potential Q-markers of the anti-inflammatory action of Jiangzhenxiang. The potential Q-markers were verified by high performance liquid chromatography, and *in vitro* experiments verified the anti-inflammatory activity and

收稿日期: 2022-06-29; 修回日期: 2022-09-02.

基金项目: 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目 (2022KY1391); 广西自然科学基金资助项目 (2020GXNSFAA238035); 国家自然科学基金资助项目 (81960872).

*共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13036883598, E-mail: 188848168@qq.com; 1281961142@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0796

the target of the potential Q-markers. The experimental scheme was approved the Guangxi University of Chinese Medicine Institutional Animal Ethical and Welfare Committee. The results show that 31 chemical components were identified by mass spectrometry from the Jiangzhenxiang extract. Through network pharmacological screening, 727 component targets, 422 disease targets and 110 targets including prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2) were obtained. These targets were mainly enriched in 498 biological processes including inflammatory response and response to lipopolysaccharide, with 101 pathways that included the TNF signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway and others. Isorhamnetin, formononetin, naringenin, glycitein, ursolic acid and oleanolic acid were detected by high performance liquid chromatography. Jiangzhenxiang medicated serum and 6 components thereof could significantly reduce the content of nitric oxide, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). These six components are regarded as the potential anti-inflammatory Q-markers of Jiangzhenxiang. Isorhamnetin was screened and verified from the 6 potential Q-markers as an inhibitor of PTGS2 by molecular docking and *in vitro* cyclooxygenase 2 (COX-2) activity assay. The half-inhibitory concentration of isorhamnetin was $9.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In summary, extracts of Jiangzhenxiang showed significant *in vitro* anti-inflammatory actions. The anti-inflammatory mechanism of Jiangzhenxiang appears to be related to regulation of TNF signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway mediated by IL-6, RAC alpha serine/threonine protein kinase, PTGS2 and other targets. Isorhamnetin, formononetin, naringenin, glycitein, ursolic acid and oleanolic acid could be regarded as the Q-markers of Jiangzhenxiang. Isorhamnetin appears to act as a COX-2 inhibitor.

Key words: Jiangzhenxiang; *Dalbergia benthamii* Prain; anti-inflammatory; Q-marker; isorhamnetin

降真香 (Jiangzhenxiang) 是豆科植物黄檀属 (*Dalbergia*) 中两粤黄檀 (*Dalbergia benthamii* Prain)、斜叶黄檀 (*Dalbergia pinnata*) 在生长过程中形成的一种由木质部及其分泌物共同组成的天然混合物, 主要分布在海南、广西。降真香具有活血化瘀、祛风湿、消肿止血及解毒等作用^[1], 海南民间常将其作为创伤外用。目前, 有关降真香的研究报道很少, 存在降真香植物基源混乱、无法定标准、药用价值尚未明确等问题。2018年, 广西大学李英健教授等起草、制订了《降真香鉴定方法》(广西壮族自治区地方标准, DB 45/T 1914-2018), 为降真香的鉴定提供了依据。本文采用质谱分析降真香的化学成分, 结合网络药理学筛选出降真香抗炎潜在质量标志物, 通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)、RAW264.7 细胞、分子对接和 COX-2 体外活性验证质量标志物的可测性和有效性, 为揭示降真香的作用成分、抗炎作用机制提供依据。

材料与方 法

动物与细胞 雄性 SPF 级 Blab/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2019-0004, 动物实验经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准 (DW20210628-072); RAW264.7 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院。

仪器 Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱 (美

国 Dionex 公司); Q-Exactive 组合型四级 Orbitrap 质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本株式会社岛津制作所); XSR205DU 型十万分之一电子分析天平 (美国 METTLER TOLEDO 公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); MCO-18AIC 型二氧化碳培养箱 (日本松下健康医疗器械株式会社); BDS400 型倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)。

药品与试剂 齐墩果酸 (批号 110709-201808, 质量分数 91.1%)、熊果酸 (批号 110742-201823, 质量分数 99.9%)、异鼠李素 (批号 110860-201611, 质量分数 99.8%) 和芒柄花素 (批号 111703-201504, 质量分数 95.0%) 均购自中国食品药品检定研究院; 柚皮素 (批号 PS010355, 质量分数 > 98.0%) 和黄豆黄素 (批号 PS000451, 质量分数 > 98.0%) 购自成都普思生物科技股份有限公司; 地塞米松 (批号 L1931006, 上海阿拉丁生物技术有限公司); 降真香由广西大学林学院李英健教授提供, 鉴定为两粤黄檀 *Dalbergia benthamii* Prain 的结香部位; 高糖培养基 (DMEM) 和胎牛血清购自 Biological Industries 公司; 噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 批号 1123A0517)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 713A032) 购于北京索莱宝科技有限公司; IL-6 (批号 TBGZ49R77H)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 V25SWFXEEF) 酶联免疫吸附试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; COX-2 抑制剂筛选试剂盒 (批号:

062522220629) 购于上海碧云天生物技术有限公司。

降真香提取物制备 取降真香提取物 30 g, 粉碎, 加 80% 乙醇 300 mL, 回流提取 1 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 干燥, 粉碎, 得到降真香提取物。经 HPLC 测定, 每 1 g 干膏中含异鼠李素 1.01 mg。

降真香含药血清的制备 取降真香提取物, 适量, 加 0.5% 羧甲基纤维素钠, 加水配成浓度为 0.1 g·mL⁻¹ 的混悬液。取 Blab/c 小鼠 5 只, 每天灌胃降真香提取物 3 g·kg⁻¹, 连续 7 天。实验末, 小鼠眼球取血, 离心 10 min (3 000 r·min⁻¹), 分别取血清, -20 °C 保存备用。

HPLC 分析 供试品溶液制备: 取降真香提取物 0.1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 滤过, 即得。对照品溶液制备: 精密称取异鼠李素、芒柄花素、柚皮素、黄豆黄素对照品适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 含异鼠李素、芒柄花素、柚皮素和黄豆黄素 0.1 mg 的溶液, 精密称取熊果酸和齐墩果酸适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 含熊果酸 0.06 mg、齐墩果酸 0.05 mg 的混合溶液, 滤过, 即得。液相条件: Symmetry[®] C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 异鼠李素、芒柄花素、柚皮素、黄豆黄素检测波长为 260 nm, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~30 min, 30% B; 30~60 min, 30%~70% B; 60~65 min, 70%~30% B; 65~80 min, 30% B); 熊果酸、齐墩果酸检测波长为 210 nm, 流动相为乙腈-甲醇-0.5% 醋酸铵溶液 (67:2:21)^[2]; 流速为 1 mL·min⁻¹。

质谱分析 供试品溶液制备: 取降真香提取物 0.2 g, 精密称定, 置于 2 mL 量瓶, 加甲醇定容, 滤过, 即得。液相条件: 色谱柱为 Hypersil GoLD C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.9 μm); 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 以 1% 甲酸溶液为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 梯度洗脱 (0~2 min, 5% B; 2~20 min, 5%~95% B; 20~23 min, 95% B; 23~25 min, 5% B)。质谱条件: Full-MS/dd-MS2 扫描模式; 一级设置 (分辨率: 70 000; AGC Target: 3e6; Maximum IT: 100 ms; Scan Range: *m/z* 100~1 000); 二级设置 (分辨率: 17 500; AGC Target: 1e5; Maximum IT: 50 ms; NCE: 30; Top N: 5)。

疾病靶点筛选 通过 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 检索“炎症”的疾病靶点 (关键词为“inflammation”), 其中 Genecards 数据库选取 Relevance score ≥ 13 的靶点。所有的靶点经 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 校正名称, 合并、去重。

成分的潜在作用靶点筛选 通过 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 收集每个化学成分中的“Related targets”, 得到靶点集 1; PubChem 数据库

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索化学成分的“Canonical SMILES”数据, 依次输入到 Swiss 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中, 选择“Homo sapiens”, 选取预测结果中参数 Probability > 0 的靶点, 得到靶点集 2。上述 2 个靶点集的靶点经 UniProt 数据库校正名称, 去重, 得到化学成分的作用靶点。将化学成分靶点、疾病靶点导入 Venny 2.1 在线分析工具, 绘制韦恩图, 取交集的靶点作为成分的潜在作用靶点。

靶点功能通路富集分析 将潜在作用靶点导入 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 进行基因本体 (gene ontology, GO) 生物学富集分析、京都基因组与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析。选择前 5 个条目和前 10 个通路作图。

“化学成分-靶点-通路”网络建立 将潜在作用靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>), 选择“Homo sapiens”物种, 保存文件格式为“TSV”, 建立靶点-靶点的互作关系。将化学成分-靶点、靶点-靶点、靶点-通路导入 Cytoscape 3.8.2, 建立“化学成分-靶点-通路”网络图。

MTT 法检测 将 RAW264.7 细胞 (每孔 1×10⁵ 个细胞) 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 用不同浓度的药物处理 24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg·mL⁻¹), 孵育 4 h, 加 150 μL 二甲基亚砷溶解活细胞产生的甲臜, 于 490 nm 处测定吸光度 *A* 值, 计算细胞存活率 (%)。存活率 (%) = $A_{\text{给药组}} / A_{\text{正常组}} \times 100\%$ 。

NO、IL-6 和 TNF-α 含量的测定 将 RAW264.7 细胞 (每孔 5×10⁵ 个细胞) 接种到 96 孔板中, 孵育 24 h 后, 用不同浓度的药物预处理 1 h 后, 用 LPS (1 μg·mL⁻¹) 刺激细胞 24 h, 收集上清。Griess 法检测一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平, ELISA 法检测 IL-6、TNF-α 的含量, 均按试剂盒说明书操作。

分子对接 从 PubChem 数据库下载熊果酸、异鼠李素等 6 种潜在质量标志物的 2D 结构文件。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载 PTGS2 蛋白受体 (PDB ID: 5IKR) 的 pdb 格式文件。以 PTGS2 原配体 ID8 的空间为活性口袋。将配体、受体导入 Discovery Studio 软件, 依次对小分子配体进行结构优化、添加立场等处理, 对 PTGS2 蛋白进行去水、去除多构象、补充非完整的氨基酸残基、加氢等处理。选择“Dock Ligands (Lib-Dock)”模块进行分子对接。

COX-2 体外活性检测 测定降真香提取物和异鼠李素在体外的 COX-2 活性。分别设置空白对照组、100% 酶活力对照组、阳性药塞来昔布组、降真香提取物组和异

鼠李素组。37 °C 孵育 10 min 后, 用酶标仪进行荧光检测, 激发波长为 560 nm, 发射波长为 590 nm。计算样品孔和空白对照孔的平均相对荧光值 (relative fluorescence unit, RFU), 并计算每个样品的抑制率 (%)。抑制率 (%) = $(RFU_{100\% \text{ 酶活性对照}} - RFU_{\text{样品}}) / (RFU_{100\% \text{ 酶活性对照}} - RFU_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。

数据及统计学分析 质谱分析中, 使用 Compound Discoverer 3.0 软件进行数据库检索及数据分析, 匹配的目标数据库包含 MzCloud、ChemSpider 数据库, 匹配度 > 80% 作为化合物鉴定与筛选的指标。数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 使用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行统计分析和绘图, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结果

1 降真香提取物的总离子流图及化学成分分析

降真香提取物进行 UPLC-Q-exactive-MS 检测分析, 获得了降真香提取物在正、负离子检测模式下的总离子流图 (图 1)。通过与各个数据库匹配, 发现匹配度大于

80% 的化学成分有 β -细辛脑 (β -asarone) 等 31 个 (表 1)。

2 潜在作用靶点的筛选及“化学成分-靶点-通路”网络分析

在 727 个降真香化学成分靶点和 422 个炎症靶点中, 交集靶点有 110 个, 结果见图 2A。选取度值 (degree) 排名前 20 个靶点建立“化学成分-靶点-通路”互作网络, 见图 2B。该网络包括 49 个节点和 349 条边, 度值排名靠前靶点有 IL-6、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (RAC alpha serine/threonine protein kinase, AKT1)、PTGS2 等, 化学成分有 19 个。

3 GO 和 KEGG 的富集分析

在 GO 富集分析中, 作用靶点富集在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、炎症反应、对脂多糖的反应、一氧化氮生物合成过程正调控等 498 个生物过程 (biological process, BP), 细胞外空间、细胞表面、细胞外区域等 48 个细胞组成 (cellular component, CC) 条目, 蛋白质结合、细胞因子活性、酶结合等 83 个分子功能 (molecular function, MF) 条目, 前 5 条目见图 3A。

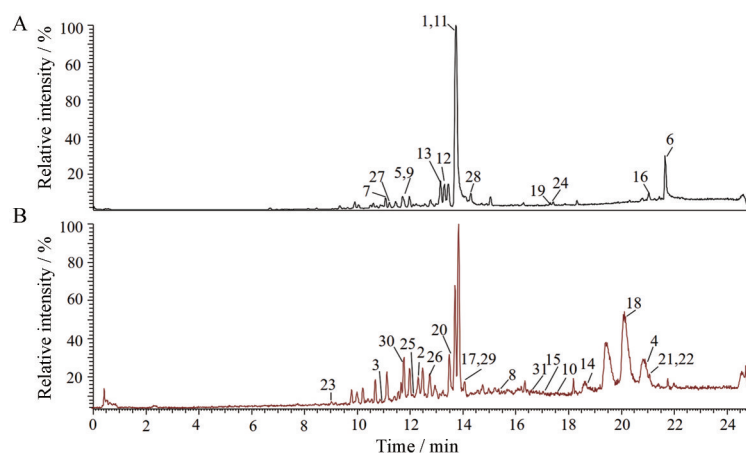


Figure 1 Total ion chromatograms of Jiangzhenxiang extract in positive mode (A) and in negative mode (B). The number of peak 1-31 in this figure was consistent with that in Table 1

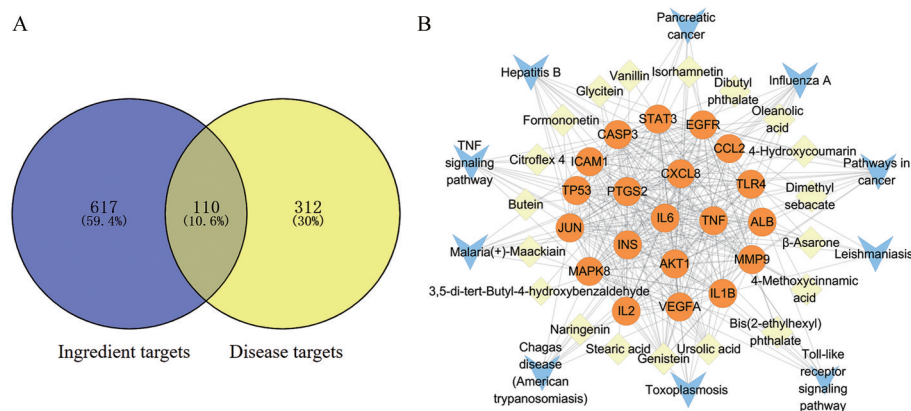
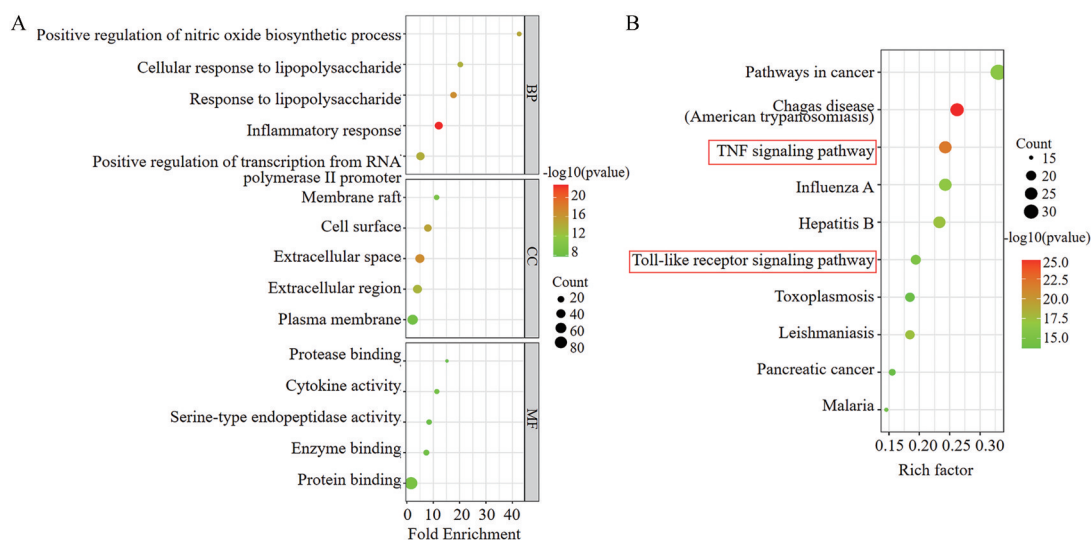


Figure 2 Venn diagrams of ingredient targets and disease targets (A) and interaction network diagram of ingredients-targets-pathways (B). Dark blue: Ingredient targets; Dark yellow: Disease targets; Blue v-shaped: Top 10 pathways; Yellow diamond: Ingredients; Orange round: Top 20 potential targets

Table 1 Chemical components of Jiangzhenxiang extract

No.	Name	Formula	Mw	RT/min	mzCloud best match/%
1	β -Asarone	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.1	13.7	85.6
2	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.1	12.3	85.9
3	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.1	10.9	88.8
4	Ursolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.4	20.5	82.0
5	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.1	11.8	95.3
6	Erucamide	C ₂₂ H ₄₃ NO	337.3	21.7	85.6
7	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.1	11.1	88.9
8	Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.3	15.4	86.0
9	Butein	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.1	11.8	81.4
10	Citroflex 4	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	360.2	17.6	80.6
11	Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	152.0	13.7	82.2
12	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.1	13.3	95.6
13	(+)-Maackiain	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.1	13.2	85.5
14	Dodecyl sulfate	C ₁₂ H ₂₆ O ₂ S	266.2	18.7	88.2
15	Tetradecanedioic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	258.2	17.1	81.2
16	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.3	21.0	97.4
17	Myristyl sulfate	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ S	294.2	14.2	85.7
18	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	255.3	20.1	81.3
19	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.2	17.2	82.9
20	4-Methoxycinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	160.1	13.5	84.3
21	Oleanolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	438.3	21.1	89.3
22	Bis(2-ethylhexyl)adipate	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370.3	21.1	82.9
23	Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.1	8.8	87.8
24	4-Hydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₃	162.0	17.3	80.7
25	Dimethyl sebacate	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230.2	12.2	87.1
26	Hexadecanedioic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286.2	12.6	84.4
27	Dodecanedioic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230.2	11.3	88.4
28	16-Hydroxyhexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	272.2	14.3	81.8
29	4-Dodecylbenzenesulfonic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ S	326.2	14.2	85.2
30	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₃	138.0	11.7	81.0
31	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzaldehyde	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	234.2	16.6	80.1

**Figure 3** Gene ontology (GO) enrichment analysis (A) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of 110 potential targets (B). BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function

KEGG 通路富集分析得到 TNF、Toll 样受体等 101 条信号通路, 前 10 条通路见图 3B。

4 潜在质量标志物筛选

如图 4、5 所示, 降真香提取物分别在 260、210 nm

下的供试品色谱中, 呈现与异鼠李素、芒柄花素、柚皮素、黄豆黄素、熊果酸和齐墩果酸色谱峰保留时间相同的多个色谱峰。据质量标志物的可测性原则, 将这 6 个化学成分作为降真香抗炎的潜在质量标志物。

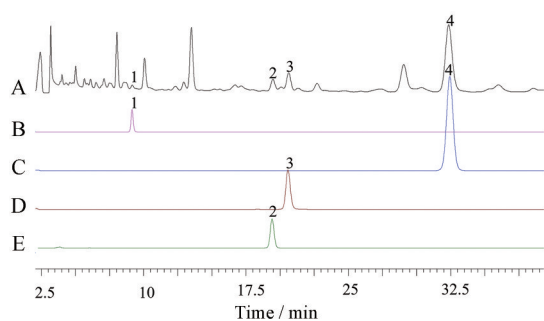


Figure 4 HPLC diagrams of the Jiangzhenxiang sample solution (A), glycitein (B), formononetin (C), isorhamnetin (D) and naringenin (E) standard solution at 260 nm. 1: Glycitein; 2: Naringenin; 3: Isorhamnetin; 4: Formononetin

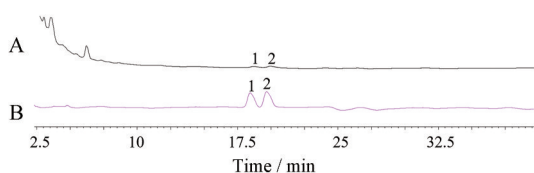


Figure 5 HPLC diagrams of the Jiangzhenxiang sample solution (A), mixed standards of ursolic acid and oleanolic acid (B) at 210 nm. 1: Oleanolic acid; 2: Ursolic acid

5 含药血清和潜在质量标志物对 RAW264.7 细胞活性的影响

MTT结果显示(图6),与空白组相比,10%含药血清、不同浓度阳性药地塞米松、不同浓度柚皮素、异鼠李素($12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、芒柄花素($12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和熊果酸($25, 12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均没有显著性差异($P > 0.05$)。提示在相应浓度下含药血清、潜在质量标志物对 RAW264.7 细胞没有毒性。

6 含药血清、潜在质量标志物对 NO、IL-6 和 TNF- α 水平的影响

与正常组相比,模型组 NO、IL-6 和 TNF- α 含量显

著升高($P < 0.01$),表明该条件下可成功建立细胞炎症模型。与模型组相比,阳性组、10%含药血清组、柚皮素、异鼠李素、芒柄花素、熊果酸、齐墩果酸和黄豆黄素组的 NO、IL-6 和 TNF- α 含量显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且与剂量正相关。其中,与阳性药(地塞米松)相比,10%含药血清组、异鼠李素组、熊果酸组($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 NO 含量减少(图7)。提示,降真香含药血清和潜在质量标志物均显示良好的体外抗炎作用。

7 潜在质量标志物与 PTGS2 的作用分析

经网络药理学分析,PTGS2 是 6 个潜在质量标志物的共同作用靶点,该基因编码是 COX-2,它在细胞中可被促炎细胞因子高度诱导,从而参与炎症反应病理过程。因此,推测 6 个潜在质量标志物可能抑制 COX-2 活性。本文通过分子对接从 6 个潜在质量标志物中筛选潜在的 COX-2 抑制剂。异鼠李素、黄豆黄素、柚皮素、芒柄花素、ID8 与活性位点的结合能分别为 $-314.318 7$ 、 $-97.866 6$ 、 $-133.514 5$ 、 $-94.079 3$ 、 $-166.834 8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,异鼠李素的结合能优于 ID8,表现出更强的结合能力。如图 8 所示,异鼠李素与氨基酸残基 TYR355、ARG120 形成氢键,芳环通过 Pi 键与 LEU352、ALA527、VAL349、VAL116 和 LEU531 作用。

8 降真香提取物、异鼠李素对 COX-2 活性的影响

以塞来昔布为阳性对照药,检测降真香提取物、异鼠李素对 COX-2 抑制作用。结果如图 9 所示,降真香提取物和异鼠李素对 COX-2 有显著的抑制作用,且在不同浓度范围之内呈剂量依赖关系,但半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})不同,降真香提取物、异鼠李素和塞来昔布的 IC_{50} 分别为 $15.81 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $9.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20.31 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可见,异鼠李素对 COX-2 的抑制效果较好,与分子对接结果相符。

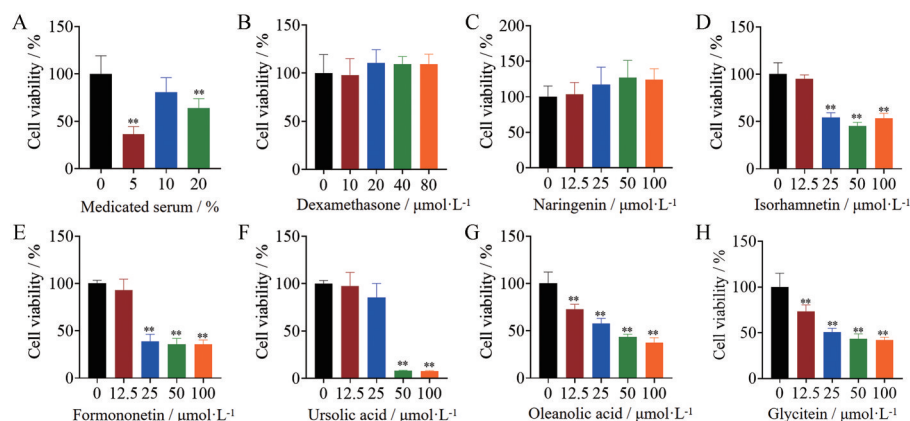


Figure 6 Effects on the viability of RAW264.7 cells after treated with medicated serum (A), dexamethasone (B), naringenin (C), isorhamnetin (D), formononetin (E), ursolic acid (F), oleanolic acid (G) and glycitein (H). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group

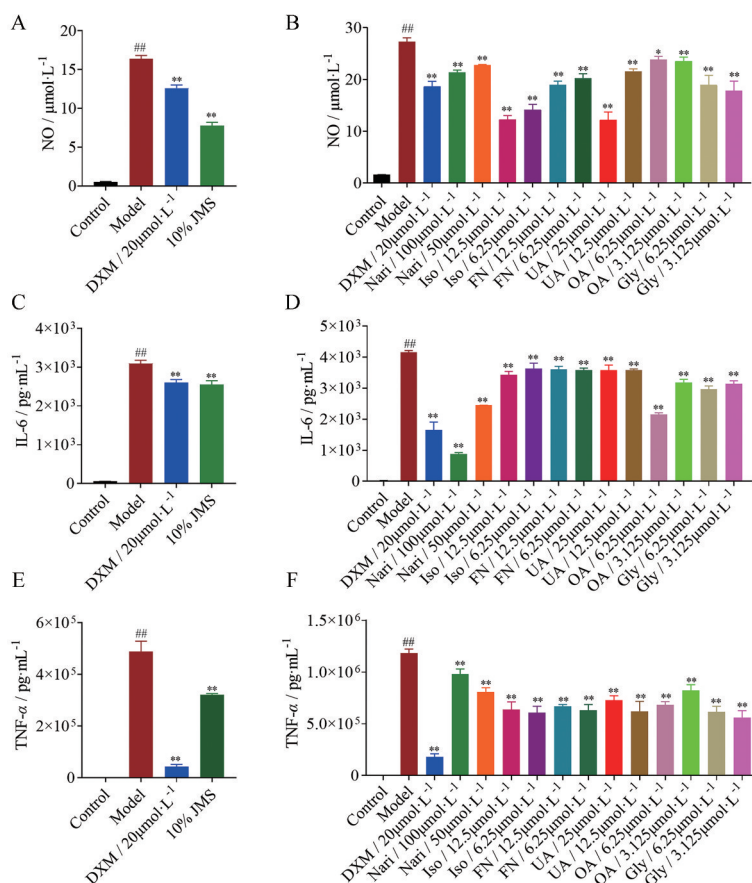


Figure 7 Effects of 10% Jiangzhenxiang medicated serum (JMS) and dexamethasone (DXM) on NO (A), IL-6 (C), TNF- α (E) of RAW264.7 cells. Effects of naringenin (Nari), isorhamnetin (Iso), formononetin (FN), ursolic acid (UA), oleanolic acid (OA) and glycitein (Gly) and dexamethasone (DXM) on NO (B), IL-6 (D), TNF- α (F) of RAW264.7 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

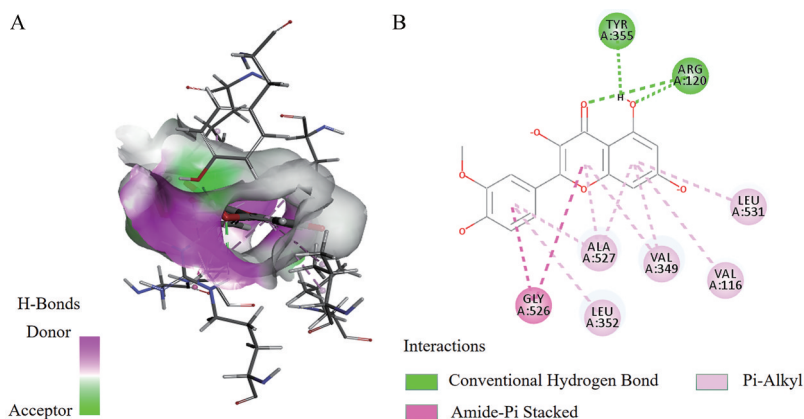


Figure 8 3D (A) and 2D (B) diagrams of the interaction of isorhamnetin with the amino acid residues of 5IKR

讨论

受《中国树木分类学》等著作的影响,“降真香”名称逐渐被简化为“降香”,因此“降真香”易误认为“降香”。同时,在《中药大辞典》、《中华本草》、《中华人民共和国药典》等权威本草中,降香的基源定为同属乔木降香黄檀 *Dalbergia odorifera* 茎和根的心材,因此降真香的基

源易误认为乔木降香黄檀 *Dalbergia odorifera* 茎和根的心材^[3]。国内一些研究团队对降真香的基源进行考证、研究:张丹雁团队^[1]等研究发现,海南大叶降真香和海南小叶降真香的藤本植物形态、药材性状特征及DNA条形码特征分别与两粤黄檀 *Dalbergia benthamii* Prain 和斜叶黄檀 *Dalbergia pinnata* 相吻合,提示降真

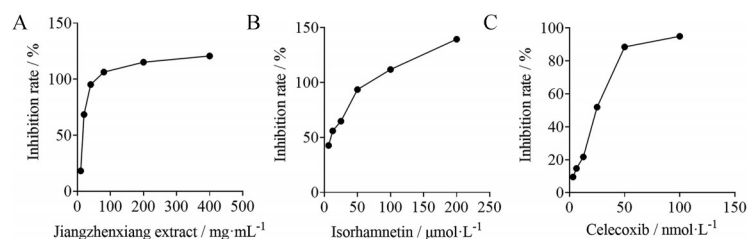


Figure 9 Dose-COX-2 inhibition curves of Jiangzhenxiang extract (A), isorhamnetin (B) and celecoxib (C)

香的基源应为黄檀属藤本植物而非同属的乔木; 本文李英健团队在参与制订降真香的鉴定方法过程中, 经系统考证, 证实降真香的基源为黄檀属藤本植物, 而非同属的乔木。

降真香作为一种海南民间药材, 常用于治疗外伤。抗炎是治疗外伤的关键, 推断降真香具有抗炎作用, 但其化学成分和抗炎机制尚未明确, 仍需要进一步开展实验进行验证。因此本文对降真香的抗炎作用、靶点和成分进行了研究。本文研究发现降真香可能通过调控 IL-6、AKT1、PTGS2 等介导的经典炎症免疫信号通路发挥抗炎作用。炎症是机体对伤害刺激的反应, 炎症发生时会产生许多细胞因子, 如 NO、IL-6 和 TNF- α 。NO 过量会通过增加白细胞的水肿和浸润来促进炎症的发生^[4]。IL-6 是由单核巨噬细胞等多种细胞活化产生的炎症因子, 具有刺激淋巴细胞和参与抗原特异性免疫应答的功能。过度激活 IL-6 和 TNF- α 可加重炎症反应程度, 对组织造成损害^[5]。目前 IL-6/IL-6R 靶向抑制剂已被证明能够改善类风湿性关节炎、全身型幼年特发性关节炎等部分炎症性疾病^[6]。因此, 抑制 NO、IL-6 和 TNF- α 的水平, 对于抗炎至关重要。本文结果显示, 降真香含药血清可降低 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的 NO、IL-6 和 TNF- α 含量, 提示降真香有良好的抗炎作用。

本文通过网络药理学进一步预测降真香的抗炎机制, 结果发现降真香的化学成分可能作用于 IL-6、AKT1、PTGS2 等 110 个靶点, 靶点富集在 TNF- α 信号通路、Toll 样受体信号通路等经典炎症免疫通路。TNF- α 在炎症、细胞增殖和细胞死亡中起着至关重要的作用, 可激活 PI3K 磷脂肌醇-3-激酶、AKT、核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶等信号通路, 从而减缓炎症发生的进程^[7,8]。Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 蛋白是 Toll 样受体家族成员之一, 是先天免疫系统中内毒素识别的受体, TLR4 活化后可通过不同的信号传导途径实现对 NF- κ B 通路的调控, 不仅可以激活下游 TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-6、COX-2 等促炎症细胞因子的表达, 以及激活炎症

小体通路 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3)^[9-11] 通路。已有研究发现高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)/TLR4/NF- κ B 信号通路可抑制肥大细胞脱颗粒并减轻过敏性炎症^[12]。本研究体外实验的确观察到降真香含药血清能抑制 TNF- α 、NO 表达, 提示其抗炎作用可能与上述信号通路有关。

另外, 本文研究还发现异鼠李素、熊果酸等 6 种化学成分可作为降真香的质量标志物, 异鼠李素可能是 COX-2 的抑制剂。质量标志物是存在于中药材和中药产品中固有的, 或者加工制备过程中形成的与中药功能属性密切相关的物质, 可反映中药的安全性和有效性, 具有可测性、有效性、特有性、传递与溯源性和处方配伍的五大特征。质量标志物的辨识是提高中药质量控制水平的关键。本文通过网络药理学技术, 筛选出治疗炎症的核心靶点, 构建“化学成分-靶点-通路”网络, 再依据质量标志物的可测性和度值的大小为依据, 去掉无法定量和度值过小的化学成分后, 筛选得到 6 种降真香抗炎的潜在质量标志物, 然后通过体外实验验证潜在质量标志物的抗炎作用, 从可测性、有效性方面识别了熊果酸、异鼠李素等 6 种化学成分可作为降真香的质量标志物。文献报道齐墩果酸、异鼠李素、芒柄花素和熊果酸均可通过抑制 NF- κ B 信号通路来抑制炎症反应^[13-16], 柚皮素也显示良好抗炎作用^[17], 与本文结果一致。为了进一步筛选质量标志物的作用靶点, 本文还通过分子对接研究 6 种质量标志物与 PTGS2 的结合作用, 最后体外实验证实异鼠李素、降真香提取物对 COX-2 有一定的抑制效果, 提示降真香抗炎作用与异鼠李素抑制 COX-2 活性有关。这与异鼠李素抑制 COX-2 表达的报道相符^[18]。

综上所述, 降真香的抗炎作用可能与异鼠李素等化合物作用于 PTGS2 等靶点, 通过调节 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路有关, 本文从可测性、有效性方面筛选出降真香抗炎质量标志物是异鼠李素、熊果酸等 6 种化合物。其中, 降真香中的异鼠李素是潜在的 COX-2 抑制剂。

致谢: 广西大学于凯博士提供分子对接及分析。

作者贡献: 覃淼为实验主要完成者及撰写; 熊万娜负责课题的设计、实验指导及提供修改意见; 黄金梅、刘笑、赵颖和黎芳参与部分实验及数据的处理分析; 李英健参与降真香品种的鉴定及提供修改意见。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang DY, Gao SJ, Zhang L, et al. Identification of original plant varieties of national Jiangzhenxiang conventionally used as medicine and incense in Hainan [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2016, 44: 147-150.
- [2] Qin SN, Zhu SM, Mo JR, et al. Screening and determination of effective content of Jingang Qingwen granules based on quality marker [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2021, 52: 7527-7537.
- [3] Wang XH, Xu MF, Wang LZ, et al. Overview of the pharmacy characteristics of climbing ancient Jiangzhenxiang [J]. Strait Pharm (海峡药学), 2020, 32: 22-26.
- [4] Hossen M, Amin A, Fu X, et al. The anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of the rhizome of *Atractylodes lancea*, involves Akt/NF- κ B signaling pathway inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 114183.
- [5] Zhang YJ. The Mechanism of miR-29a-Mediated Akt/NF- κ B Signaling Pathway in Electroacupuncture Repair of Intestinal Mucosal Barrier Injury in IBS (miR-29a 介导的 Akt/NF- κ B 信号通路在电针修复 IBS 肠黏膜屏障损伤中的机制研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [6] Zhao LP, Song DQ, Wang YX. Advances in small molecular inhibitors of IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2472-2484.
- [7] Wang Y, Yu Z, Wu JF, et al. Effects of Xiaoliu decoction on expressions of TLR4/NF- κ B/TNF- α signal pathways in adhesion [J]. Chin J Hum Sex (中国性科学), 2022, 31: 136-140.
- [8] Zhou X, Li J, WANG C. The effect of baicalin on the expression of TNF- α and MAPK signaling pathways in umbilical [J]. Jiangxi Med J (江西医药), 2021, 56: 1863-1867.
- [9] Chi YF, Liu S, Huang JB, et al. Huangqi decoction improved the inflammatory response of rats with diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B signal pathway [J]. J Clin Nephrol (临床肾脏病杂志), 2022, 22: 39-45.
- [10] Bai L, Liu GY, Wei XP, et al. Total flavonoids of peony flower regulate NLRP3 inflammasome and expression of inflammatory cytokines in gouty nephropathy rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 43-51.
- [11] Xu XF, Wang EL, Yang TY, et al. Research of influence on inflammation of Xieheyin on PCOS-IR mice based on intestinal mucosal barrier and TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 90-98.
- [12] Piao YH, Song YL, Wang ZG, et al. Glaucocalyxin a attenuates allergic responses by inhibiting mast cell degranulation through HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathways [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 201-207.
- [13] Dong N, Xue C, Zhang L, et al. Oleonic acid enhances tight junctions and ameliorates inflammation in salmonella typhimurium-induced diarrhea in mice *via* the TLR4/NF- κ B and MAPK pathway [J]. Food Funct, 2020, 11: 1122-1132.
- [14] Fu X, Qin T, Yu J, et al. Formononetin ameliorates cognitive disorder *via* PGC-1 α pathway in neuroinflammation conditions in high-fat diet-induced mice [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2019, 18: 566-577.
- [15] Li Y, Chi G, Shen B, et al. Isorhamnetin ameliorates LPS-induced inflammatory response through downregulation of NF- κ B signaling [J]. Inflammation, 2016, 39: 1291-1301.
- [16] Wang JB, Gao F, Hang WC, et al. Ursolic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in cow endometrial epithelial cells *via* NF- κ B pathway [J]. Chin J Anim Sci (中国畜牧杂志), 2021, 57: 261-264.
- [17] Rehman K, Khan I, Akash M, et al. Naringenin downregulates inflammation-mediated nitric oxide overproduction and potentiates endogenous antioxidant status during hyperglycemia [J]. J Food Biochem, 2020: e13422.
- [18] Seo K, Yang JH, Kim SC, et al. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: a potential role of HO-1 [J]. Inflammation, 2014, 37: 712-722.