

简化栀芩汤的抗炎药效物质基础及作用机制研究

王坤^{1#}, 刘洋^{1#}, 殷玥¹, 肖潇¹, 周雪娇¹, 袁智英¹, 叶良红^{5*}, 徐晓玉^{1,2,3,4*}

(1. 西南大学药学院&中医药学院, 重庆 400715; 2. 西南大学医院, 重庆 400715; 3. 国家中医药管理局高水平中药药理学重点建设学科, 重庆 400715; 4. 重庆市中医康复学重点建设学科, 重庆 400715; 5. 重庆市铜梁区中医院, 重庆 402560)

摘要: 探讨简化栀芩汤抗炎作用的效果、主要药效成分及其作用机制。采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导炎症小鼠模型, 观察简化栀芩汤抗炎效果; 网络药理学方法预测简化栀芩汤主要化学成分及其主要作用机制; 动物实验验证简化栀芩汤抗炎作用机制 (本实验获得西南大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: IACUC-20210825-02)。简化栀芩汤对炎症小鼠具有显著的抗炎作用, 能显著改善小鼠宏观整体形态, 降低体温、饮水量, 增加自主活动次数; 减轻肝、肺、脾、胸腺炎症病理损伤; 降低血清和尿液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 含量; 升高血清免疫因子 IgG、IgA、IgM 含量。网络药理学预测得到简化栀芩汤 66 个潜在抗炎活性成分, 涉及 132 个炎症靶点, 其抗炎关键信号通路涉及 PI3K/AKT、TNF、JAK-STAT 等。动物实验证明简化栀芩汤能显著降低炎症小鼠肺组织 JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF 信号通路相关蛋白的表达。本研究结果表明, 简化栀芩汤具有显著的抗炎作用, 其抗炎的主要药效成分有槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、汉黄芩、豆甾醇、木犀草素、黄芩新素等, 其抗炎的主要作用机制是显著抑制了 JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF 信号通路蛋白的表达。

关键词: 简化栀芩汤; 炎症药效学; 作用机制; 药效物质基础; 网络药理学

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2245-10

The material basis and mechanism of action of anti-inflammatory effects of simplified Zhiqin Decoction

WANG Kun^{1#}, LIU Yang^{1#}, YIN Yue¹, XIAO Xiao¹, ZHOU Xue-jiao¹, YUAN Zhi-ying¹,
YE Liang-hong^{5*}, XU Xiao-yu^{1,2,3,4*}

(1. School of Pharmacy & School of Traditional Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Southwest University Hospital, Chongqing 400715, China; 3. State Administration of Traditional Chinese Medicine High-level Chinese Medicine Pharmacology Key Construction Discipline, Chongqing 400715, China; 4. Chongqing Chinese Medicine Rehabilitation Key Construction Discipline, Chongqing 400715, China; 5. Tongliang District Hospital of Traditional Chinese Medicine in Chongqing, Chongqing 402560, China)

Abstract: The anti-inflammatory effect of simplified Zhiqin Decoction was observed by using lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation mouse model. The main chemical constituents and the main mechanism of action of simplified Zhiqin Decoction were predicted by network pharmacology. Animal experiments verified the anti-inflammatory mechanism of simplified Zhiqin Decoction (this experiment was

收稿日期: 2023-07-03; 修回日期: 2023-12-27.

基金项目: 重庆市科卫联合中医药科技项目 (zy201802041); 重庆市中医康复学重点建设学科 (2021-4322190044).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13062319833, E-mail: xxy0618@sina.com;

Tel: 86-23-45659279, E-mail: 542624495@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0817

approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Southwest University, approval number: IACUC-20210825-02). Simplifying Zhiqin Decoction has a significant anti-inflammatory effect on inflammatory mice, can significantly improve the overall macro shape of mice, reduce body temperature, water intake, increase the number of autonomous activities; alleviate liver, lung, spleen, thymus inflammation and pathological damage; decrease tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) content in serum and urine. The contents of serum immune factors IgG, IgA and IgM were increased. Network pharmacology predicted 66 potential anti-inflammatory active components of simplified Zhiqin Decoction involving 132 inflammatory targets, and the key anti-inflammatory signaling pathway involved PI3K/AKT, TNF, JAK-STAT, etc. Animal experiments show that simplified Zhiqin Decoction can significantly reduce the expression of JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF signaling pathway related proteins in lung tissue of inflammatory mice. The results of this study showed that simplified Zhiqin Decoction had significant anti-inflammatory effects, and its main anti-inflammatory components were quercetin, β -sitosterol, kaempferol, wogonin, stigmaterol, luteolin, neobaicalein, etc. The main mechanism of its anti-inflammatory action is that it significantly inhibits the expression of JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF signaling pathway protein.

Key words: simplified Zhiqin Decoction; inflammatory pharmacodynamics; mechanism of action; pharmacodynamic material basis; network pharmacology

简化栀芩汤化裁于南宋李迅所撰外科专著《集验背疽方·卷一》栀子黄芩汤。栀子黄芩汤原方由清热解毒、凉血、益气等12味中药组成,主治“发背疮溃后,因饮食有伤,调摄不当,发热不住”。简化栀芩汤保留栀子黄芩汤中苦寒清热、泻火解毒的主要药物连翘、栀子、黄芩,并以苦泄通降的王不留行取代漏芦,全方简化为4味药组成。方中连翘辛凉解表,归肺心小肠经,清热解毒、散结消肿,既为疏散风热、泻火解毒之代表,又为著名的疮家之圣药,重用为君药。栀子苦寒,归肺胃心三焦经,功效清热泻火、凉血解毒、利尿,与连翘共为君药。黄芩苦寒,归肺胆小肠经,清热泻火、燥湿解毒,为清泄肺热之要药,为臣药。王不留行性凉味苦,归肝胃膀胱经,具有活血化瘀、下乳消肿、利尿通淋的功效,为佐药。现代药理研究显示,简化栀芩汤药物连翘^[1-3]、栀子^[4,5]、黄芩^[6,7]、王不留行^[8,9]具有显著解热、抗炎、抗菌、消肿等作用^[10]。简化栀芩汤临床应用对感染性肺炎、肺脓肿、化脓性扁桃炎等有显著疗效,但发挥作用的物质基础及其作用机制不明。

本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导炎症小鼠模型验证简化栀芩汤抗炎疗效,以网络药理学方法预测简化栀芩汤抗炎的主要药效物质成分及其作用机制,并进一步采用炎症小鼠模型实验验证简化栀芩汤抗炎作用机制。旨在为阐释简化栀芩汤的作用机制及其申报医院制剂,提供药效学、主要药效成分和作用机制的实验研究依据。

材料与方法

动物 7周龄KM雌性小鼠78只,体重18~22g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[生产许可证

号:SCXKS(湘)2019-0004],动物质量合格证号:NO.430727210102736185。饲养于西南大学药学院实验动物中心[实验动物使用许可证号SYXK(渝)2020-0006],所有实验操作均符合西南大学动物实验伦理委员会(批准号:IACUC-20210825-02)的要求。实验室温度:20±2℃;湿度:55%±15%;光照:12h/12h明暗交替。饲养和使用均符合中国《实验动物管理条例》和《西南大学实验动物管理条例》。

仪器 电脑数字型体温计(欧姆龙MC-347);全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞BC-2600Vet型);酶标仪(美国BioTek ELx800型);全自动化学发光图像分析系统(上海天能Tanon5200R)等。

主要试剂 LPS(批号21228497)购自广州硕谱生物科技有限公司;地塞米松片(2862105078)购自石药集团欧意药业有限公司。ELISA试剂盒:小鼠一氧化氮(nitric oxide, NO)(RXWB0246-96)、小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(RX2100610)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(RX2100708)、小鼠白细胞介素-6(IL-6)(RX2100622)、小鼠前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)(RX2100693)、小鼠IgG(RX20109987)、小鼠IgA(RX20109955)、小鼠IgM(RX20109965)购自上海优选生物科技有限公司;一抗抗体:TNF- α (17590-1-AP)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)(66444-1-Ig)、细胞核因子(NF- κ Bp65)(乙酰化Lys314/Lys315)多克隆抗体(10745-1-AP)、前列腺素内过氧化物合成酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)(27308-1-AP)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)(67121-1-Ig)、苏氨酸激酶(AKT)(60203-2-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -actin抗体

(K200059M)、 β -tubulin 抗体 (K200059M)、GAPDH 抗体 (K200057M) 购自北京索莱宝科技有限公司; 山羊抗兔 IgG (TA140003) 购自美国 OriGene 公司。

数据库及软件 中药系统药理学数据库 TCMSP (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, <https://old.tcmisp-e.com/index.php>); 中医药整合药理学研究平台 TCMIP (Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index>); 中国知网 CNKI (<https://cnki.net/>); 生物医学数据库 Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>); GeneCards 基因组注释数据库平台 (<https://www.genecards.org/>); STRING11.5 数据库 (<https://string-preview.org/>) 获取蛋白与蛋白相互作用的 PPI 数据; OMIM 遗传数据库 (Online Mendelian Inheritance in Man, <https://omim.org/>); UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/>); Cytoscape 3.9.1 数据库 (<https://cytoscape.org/index.html>) 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络; 生物信息学和化学信息学数据库 DRUGBANK (<https://go.drugbank.com/>); 微生信在线绘图 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>); RCSB Protein Data Bank (PDB) 数据库查询靶点 (<https://www.rcsb.org/>); Sybyl X (Version 2.1.1) 为美国 Tripos 公司产品。

简化栀芩汤水煎液的制备与质量控制 简化栀芩汤由连翘 120 g、栀子 120 g、黄芩 60 g、王不留行 30 g 组成。制备方法: 加 12 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 过滤; 药渣再加 8 倍量水, 煎煮 30 min 过滤, 合并两次滤液; 用旋转蒸发器浓缩至 1:1 (每 1 mL 相当于 1 g 药材) 浓度, 放冰箱备用。

采用 HPLC 法同时测定栀子苷、王不留行黄酮苷、黄芩苷、连翘苷的含量。C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 乙腈-0.3% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长: 238 nm, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。连翘苷、王不留行黄酮苷、栀子苷、黄芩苷之间分离度均大于 1.5; 连翘苷质量浓度在 0.093~37.2 μ g \cdot mL $^{-1}$, 王不留行黄酮苷质量浓度在 0.107~42.8 μ g \cdot mL $^{-1}$, 栀子苷质量浓度在 0.051~102 μ g \cdot mL $^{-1}$, 黄芩苷质量浓度在 0.072~72 μ g \cdot mL $^{-1}$; 线性关系良好, $r = 0.9990 \sim 0.9996$; 回收率为 90.44%~93.16%, 符合《中国药典》2020 版规定。

造模、模型成功判定标准与分组给药 取 KM 雌性小鼠适应性喂养 1 周, 连续 3 天测直肠温度, 筛选体温波动在 0.8 $^{\circ}$ C 之内的小鼠。将筛选出的 72 只 KM 小鼠随机分为空白组、模型组、地塞米松 (DXM, 5 mg \cdot kg $^{-1}$) 组、简化栀芩汤 1、2 和 4 g \cdot kg $^{-1}$ 组, 每组 12 只。其剂量设计是以该方临床常用剂量为基础, 按人与小鼠体表

面积折算法计算, 并经动物预实验获得的结果。按照 0.1 mL/10 g 灌胃给药, 模型组和空白组给予等体积生理盐水, 连续 7 天。末次给药前测体温 3 次, 给药 30 min 后, 模型组和实验组按 0.1 mL/10 g 腹腔注射 LPS 溶液 (100 μ g \cdot kg $^{-1}$), 空白组注射等量生理盐水。

与正常组小鼠相比, 同时满足以下 3 条即为小鼠炎症模型成功: ① 精神萎靡、自主活动减少、饮水量增多、腹泻; ② 体温显著升高; ③ 血清和尿液中 NO、PGE $_2$ 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-6 显著升高。

简化栀芩汤抗炎作用效果判定指标检测 造模后, 观察各组炎症小鼠体态、活动、肛门、粪便。于 1、2、4 和 6 h 测量肛温。小鼠每 4 只一笼, 每天一次连续 3 天定时测定每笼总给水量、总剩水量, 计算每只进水量。第 3 天测定结束后摘眼球取血, 血静置离心, 按试剂盒说明书操作测定血清和尿液中 NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE $_2$ 含量和血清 IgA、IgM、IgG 含量。取肺、肝、脾、胸腺进行 H&E 染色观察。

网络药理学预测简化栀芩汤活性成分 口服利用度 (OB) 和药物相似性 (DL) 是药物筛选过程中的两个重要参数, 常被用作化合物的活性评价依据。在 TCMSP 中, 根据 OB $\geq 30\%$ 且 DL ≥ 0.18 的 2 个 ADME 属性值筛选活性成分及相关蛋白靶点^[11,12], 并根据 Pubmed、CNKI 已发表的文献报道补充活性化合物及靶点。采用 Uniprot 蛋白质数据库规范靶点蛋白名称。

炎症靶点的获得 在 GeneCards、Pubmed、OMIM、DRUGBANK、CNKI 数据库中, 以“inflammation”为关键词, 筛选炎症靶点。合并去重后, 与活性成分靶点取交集, 获得简化栀芩汤治疗炎症的潜在靶点。

药物-成分-靶点图的构建 采用 Excel 2016 处理简化栀芩汤治疗炎症潜在靶点, 分析药物、活性成分、靶点之间关系。数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 建立药物-成分-靶点网络图。以节点表示药物、成分、靶点, 边表示两个节点之间的关系。

简化栀芩汤抗炎蛋白相互作用图的制作及核心蛋白的筛选 将简化栀芩汤治疗炎症靶点导入 STRING 11.5, 选择“multiple proteins”, 将 Organism 设置为“Homo”进行筛选, 选择置信度为 0.900, 获取 PPI 关系, 建立 PPI 网络, 计算 degree 获取关键靶点。

核心靶点 GO 和 KEGG 通路分析 采用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 并将结果用微生信在线软件分析, 作气泡图。

分子对接验证简化栀芩汤活性成分和关键靶点结合程度 由 RCSB-PDB 数据库获得关键靶点的 PDB-ID。从 Pubchem 中获取简化栀芩汤活性成分的 3D 分子结构文件。在 chem3D 中转化成 mol2 格式。将关键

靶点导入 SYBYL2.1.1 软件进行预处理。采用药物分子设计模拟 SYBYL2.1.1 软件的 Surflex-Dock 和模块完成分子对接^[13]。

动物实验检测 TNF- α 及上游相关通路关键蛋白的表达 取小鼠肺组织, 免疫组化法检测 TNF- α 表达。Western blot 法检测肺组织 TNF- α 及其上游通路 JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF 蛋白的表达量。

统计学分析 数据应用 SPSS 27.0 统计软件处理。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均值间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 简化栀芩汤具有显著的抗炎作用效果

1.1 简化栀芩汤显著减轻炎症小鼠腹泻, 降低体温、饮水量, 增加活动 与正常组相比, 模型组小鼠毛发直立粗糙, 眼睛久闭, 反应迟钝, 精神萎靡, 肛门红肿, 大便稀溏, 腹泻严重, 体温在 1、2 h 显著降低, 在 4、6 h 显著升高, 饮水量显著升高, 活动和站立次数显著降低 (均 $P < 0.01$)。与模型组相比, 简化栀芩汤小鼠组毛发平整光滑, 反应灵敏, 精神较好, 肛门红肿及腹泻轻微, 1、2 和 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组在 4、6 h 体温显著降低 (图 1A), 饮水量显著降低 (图 1B), 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组活动和站立次数显著增加 (图 1C、D) (均 $P < 0.01$)。

1.2 简化栀芩汤显著减轻炎症小鼠肺、肝、脾、胸腺病理损伤 正常小鼠肺组织未见肺泡壁增厚和肺泡间隔增宽, 细支气管、肺泡结构完整, 管腔及肺泡内未见浆液性分泌物及炎性细胞浸润。与正常组相比, 模型组肺泡间隔增宽, 肺间隙有炎性细胞浸润 (图 2 箭头所示), 形成成片实质区, 细支气管壁结构被破坏。与模型组相比, 简化栀芩汤 2 和 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肺泡间隔增厚现象减轻, 炎性细胞浸润减少。

正常组小鼠肝小叶结构完整, 肝索呈放射状有序排列, 核大小均一, 边缘清晰且分布均匀。与正常组相比, 模型组肝窦内红细胞淤积, 肝索排列紊乱, 肝细胞

呈片状坏死, 局部有炎性细胞浸润 (图 2 箭头处), 部分肝小叶结构被破坏。与模型组相比, 简化栀芩汤 1 和 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肝组织损伤减轻。

正常组胸腺结构完整, 胸腺分叶清楚, 皮质和髓质区域清晰可见, 胸腺小体散在胸腺髓质中。与正常组相比, 模型组胸腺分叶不清楚, 皮质与髓质界限不清晰。与模型组相比, 简化栀芩汤组胸腺分叶明显, 小叶中的分区清晰明显。

正常组脾脏表面有光泽, 镜下观察可见白髓、边缘区、红髓界限清晰。与正常组相比, 模型组脾脏变大, 结构被破坏, 脾脏分区界限模糊, 白髓区域扩大, 红髓缩小, 白髓的脾小体出现增生, 大量淋巴细胞及巨噬细胞增生。与模型组相比, 简化栀芩汤组病理变化有所缓解, 可区分白髓、边缘区及红髓 (图 2)。

1.3 简化栀芩汤显著降低炎症小鼠血清和尿液中 NO 和炎症因子含量 与正常组相比, 模型组血清和尿液中的 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量均显著升高, 血清 IL-6 升高 (均 $P < 0.05$)。与模型组相比, 简化栀芩汤 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组血清和尿液中 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低, 血清中 IL-6 含量显著降低 (均 $P < 0.05$) (图 3A~J)。

1.4 简化栀芩汤显著升高炎症小鼠血清免疫因子含量 与正常组相比, 模型组血清中免疫因子 IgA、IgG、IgM 含量显著降低 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 简化栀芩汤 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组免疫因子 IgA、IgG、IgM 含量显著升高 (均 $P < 0.05$) (图 3K~M)。

2 简化栀芩汤的 HPLC 色谱图及主要成分含量测定结果

取简化栀芩汤各待测成分对照品溶液、供试品溶液各 20 μL 进样, 得到色谱图 (图 4)。测得每剂 (连翘 12 g、栀子 12 g、黄芩 6 g、王不留行 3 g) 中, 含连翘苷 9.27 mg、栀子苷 866 mg、黄芩苷 55.7 mg、王不留行黄酮苷 8.3 mg。

3 简化栀芩汤主要成分预测结果

通过数据库及文献筛选出 66 个化学成分, 连翘 13 个, 王不留行 13 个, 栀子 8 个, 黄芩 27 个。其中共有

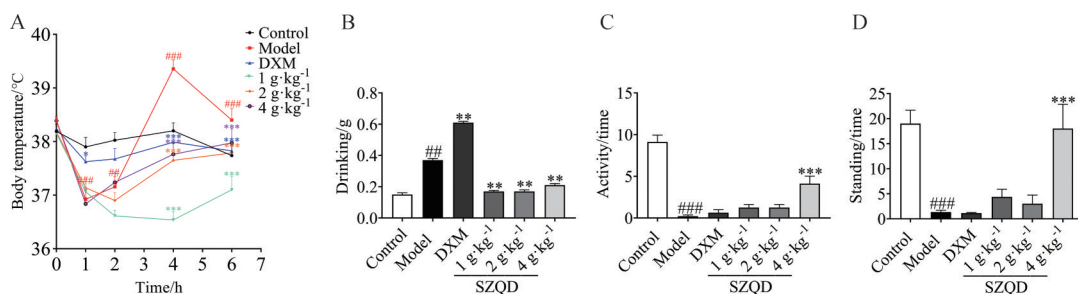


Figure 1 Effect of simplified Zhiqin Decoction (SZQD) on macroscopic indices in inflammatory mice. A: Body temperature of inflammatory mice; B: Drinking of inflammatory mice; C: Number of voluntary activities of inflammatory mice; D: Number of standing of inflammatory mice. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$. $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs model group. DXM: Dexamethasone

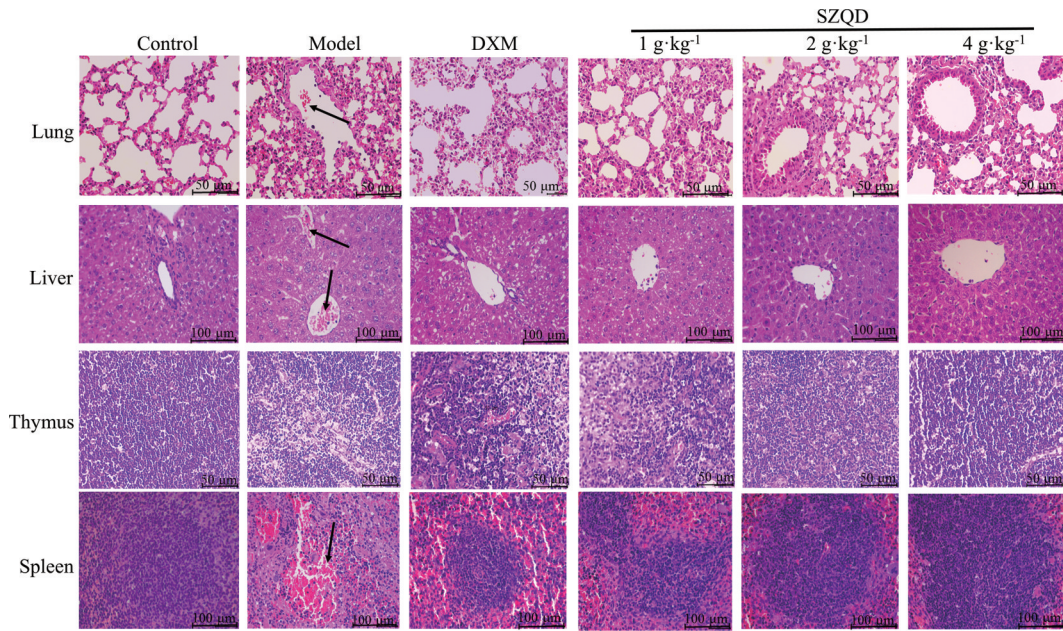


Figure 2 Effect of SZQD on pathologic injury of lung, liver, spleen and thymus in inflammatory mice. In the model group, lung tissue was infiltrated with inflammatory cells (indicated by arrows), and the walls of fine bronchial tubes were destroyed (bar=50 μm). Hepatocytes were necrotic and infiltrated with inflammatory cells (indicated by arrows, bar=100 μm). The thymus was not clearly lobulated, and the boundaries between the cortex and the medulla were unclear (bar=50 μm). There were large numbers of lymphocytes and macrophages proliferating in the spleen (indicated by arrows, bar=100 μm). The pathologic damage of lungs, liver, thymus, and spleen was significantly reduced in different dose groups of SZQD

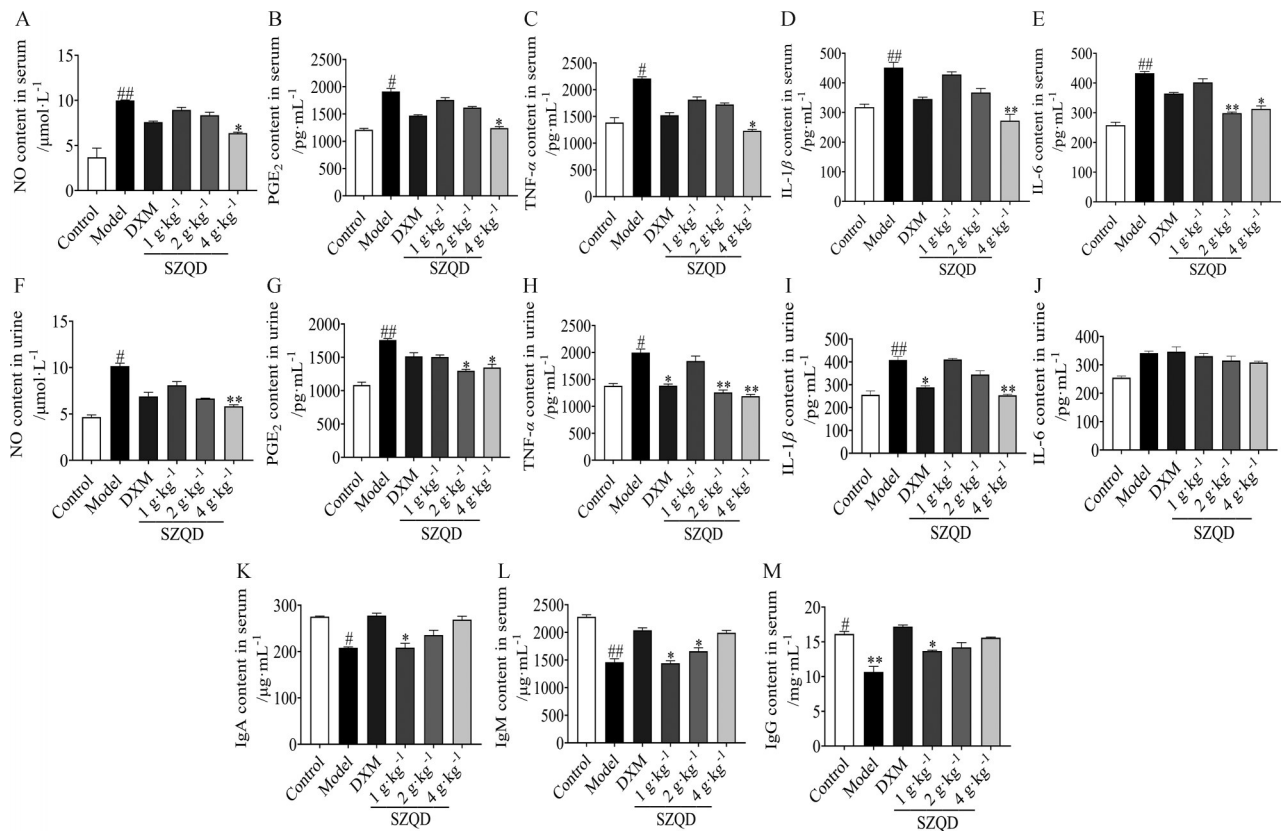


Figure 3 Effect of SZQD on inflammatory factors and immunoglobulins in inflammatory mice. NO (A, F), PGE₂ (B, G), TNF- α (C, H), IL-1 β (D, I), IL-6 (E, J) content in serum and urine, respectively; K: IgA content; L: IgM content; M: IgG content. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

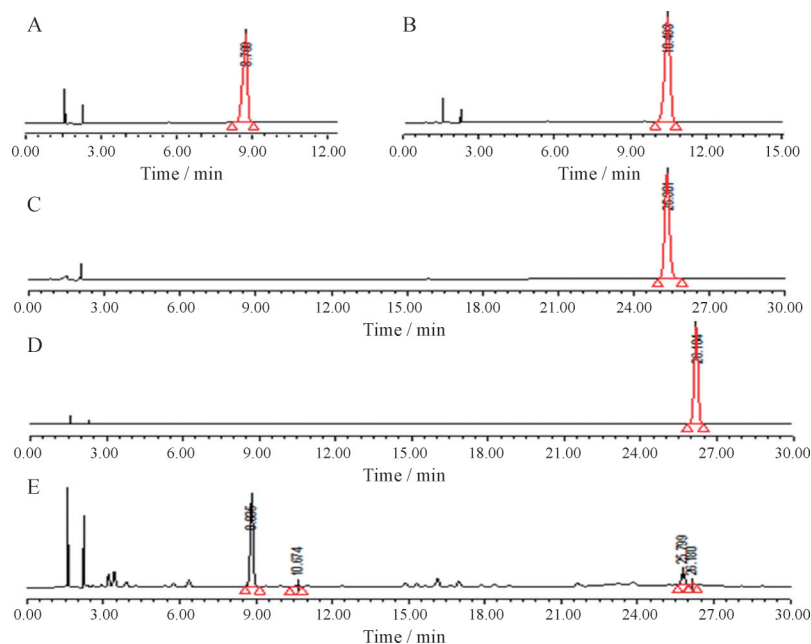


Figure 4 SZQD main components of reference solution and test product solution HPLC chromatogram. A: Geniposide; B: Vaccarin; C: Baicalin; D: Phillyrin; E: Test sample

成分5个, 槲皮素 (quercetin) 来源于连翘、王不留行、栀子; β -谷甾醇 (β -sitosterol) 来源于连翘、栀子、黄芩; 山柰酚 (kaempferol) 来源于连翘、栀子; 豆甾醇 (stigmasterol) 来源于王不留行、栀子、黄芩; 汉黄芩 (wogonin) 来源于连翘、黄芩。此外, 木犀草素 (luteolin) 来源于连翘; 黄芩新素 (neobaicalein) 来源于黄芩。66个成分的药理作用靶点共有234个。

4 简化栀芩汤抗炎作用主要机制预测结果

4.1 简化栀芩汤抗炎作用靶点预测结果 通过数据库筛选获得炎症相关的靶点2334个。取此炎症靶点2334个与简化栀芩汤成分的作用靶点234个交集, 获得简化栀芩汤抗炎靶点132个。将其66个成分与132个抗炎靶点相对应, 导入Cytoscape3.9.1建立简化栀芩汤化学成分-靶点图。结果显示, 成分与靶点之间有1309种连接方式, 表明简化栀芩汤发挥抗炎作用是通过多成分、多靶点、综合作用起效的。

4.2 简化栀芩汤抗炎作用核心靶点、KEGG通路和GO富集分析结果 对成分-靶点图进行分析, 获得蛋白网络互作图, 并根据degree筛选关键靶点, 获得排名前30的靶点作为核心靶点, 它们共有106种相互作用关系。取排名前20的通路及相应的靶点对应作图, 结果显示简化栀芩汤抗炎作用主要涉及PI3K/AKT、TNF、JAK2-STAT等通路。生物过程主要包括RNA聚合酶II启动子转录的正调控、胶原分解代谢过程、细胞外基质分解等; 主要涉及的细胞成分为蛋白质细胞外基质、细胞外区、细胞外空间等; 主要涉及的分子功能

为金属内肽酶活性、酶结合、序列特异性DNA结合等。表明简化栀芩汤抗炎作用是通过多个生物过程、多个细胞成分、多个分子功能协同发挥作用的。

4.3 简化栀芩汤成分-靶点-通路构建结果 将排名前20的通路及靶点对应, 再与成分对应, 采用Cytoscape3.9.1作图。结果显示, 简化栀芩汤抗炎作用的机制可能是其核心成分与核心靶点相结合, 通过TNF、PI3K/AKT、JAK-STAT等通路发挥的(图5A)。

4.4 简化栀芩汤活性成分与关键靶点分子对接结果 从蛋白质晶体结构数据库RCSB中获取靶点PDB格式。经Cytoscape内置插件对成分-靶点互作图评分, 根据degree排名发现27个成分与靶点作用紧密。将27个成分与30靶点对接并评分。评分标准为: docking score > 4.25, 表明药物与靶点具有一定的结合活性; docking score > 5.0, 表明药物与靶点的结合活性较好; docking score > 7.0, 则表明药物与靶点结合具有很强活性。结果显示, docking score > 5者占36.36%, docking score > 4.25者占总数49.80%, 对接结果图中, 颜色越深, 对接活性越好。分子对接提示简化栀芩汤具有很好的抗炎活性(图5B, 表1)。

5 简化栀芩汤能显著降低炎症小鼠TNF- α 及其上下游通路蛋白的表达

5.1 简化栀芩汤显著降低炎症小鼠肺组织中TNF- α 蛋白的表达量 与正常组相比, 模型组TNF- α 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 简化栀芩汤4 g·kg⁻¹组TNF- α 表达量显著降低 ($P < 0.01$) (图6)。

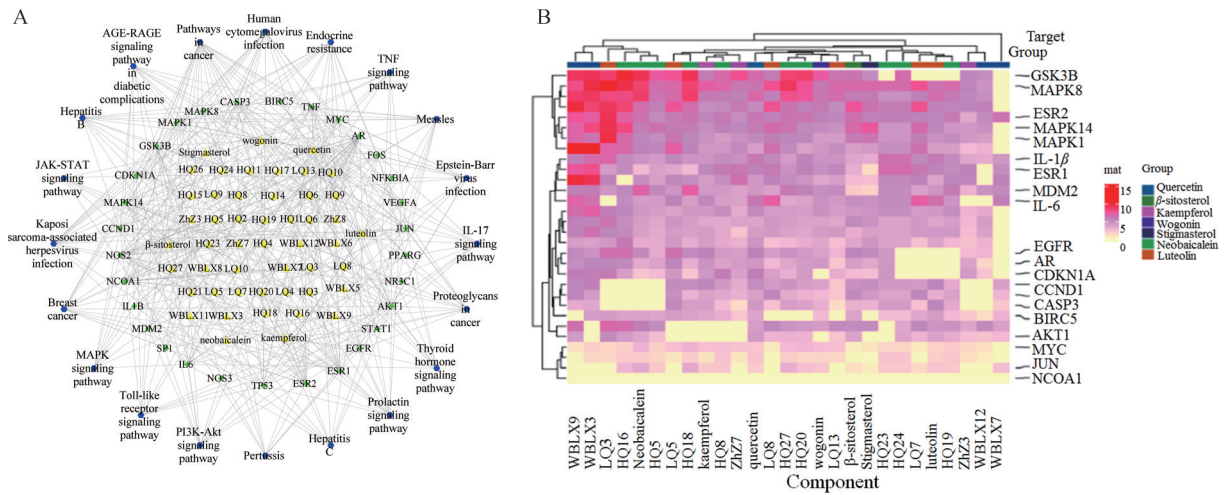


Figure 5 Network pharmacology predicts the outcome of SZQD anti-inflammatory effects. A: Anti-inflammatory component-target-pathway diagram of SZQD; Yellow: Components; Green: Targets; Blue: Major pathways involved in inflammation; B: Results of docking of anti-inflammatory components of SZQD with molecular targets of inflammation

Table 1 Molecular docking results of possible anti-inflammatory major components of SZQD

Target	Quercetin	β -Sitosterol	Kaempferol	Wogonin	Stigmasterol	Luteolin	Neobacalein
TNF- α	3.911 3	3.048 8	3.939 4	3.941 6	3.744 2	4.142 2	3.720 0
IL-1 β	6.045 8	3.388 5	4.300 9	4.432 0	3.106 1	5.919 4	4.491 5
IL-6	6.068 6	4.744 3	5.133 0	4.567 0	4.672 6	6.425 3	3.907 3
MAPK8	6.209 8	6.655 9	7.154 6	6.014 7	6.742 9	6.272 2	8.462 6
GSK3B	6.580 4	6.229 9	5.849 8	7.240 7	4.911 8	0	9.148 9

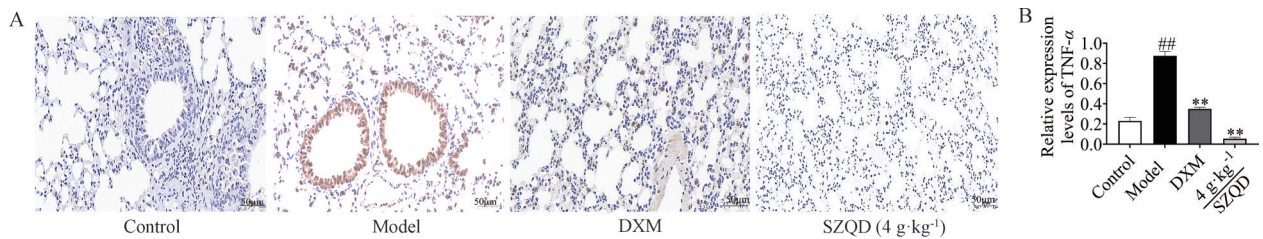


Figure 6 Effect of SZQD on the expression of TNF- α in lung tissues of inflammatory mice. A: Immunohistochemical results; B: Immunohistochemical statistical results. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group. Bar=50 μm

5.2 简化栝苈汤显著降低 LPS 所致炎症小鼠肺组织 JAK2/STAT 通路蛋白的表达 与正常组相比, 模型组小鼠肺组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT5、STAT3、p-STAT3 蛋白表达量显著升高 (均 $P < 0.05$)。与模型组相比, 简化栝苈汤 1 g·kg⁻¹ 组小鼠肺组织 p-JAK2、p-STAT5、STAT3 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$); 2 g·kg⁻¹ 组 p-STAT5 蛋白显著降低 ($P < 0.01$); 4 g·kg⁻¹ 组 JAK2、p-JAK2、p-STAT5、STAT3、p-STAT3 蛋白均显著降低 ($P < 0.01$) (图 7)。

5.3 简化栝苈汤显著降低炎症小鼠 PI3K/AKT 通路蛋白的表达 与正常组相比, 模型组 PI3K、AKT、p-AKT 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 简化栝苈汤 1 和 2 g·kg⁻¹ 组 AKT 表达量均显著降低 ($P < 0.05$); 简化栝苈汤 4 g·kg⁻¹ 组 PI3K、AKT、p-AKT 表达

量均显著降低 ($P < 0.05$) (图 8)。

5.4 简化栝苈汤显著降低炎症小鼠 NF- κ B p65 及下游靶标 TNF- α 、PTGS2 蛋白表达 与正常组相比, 模型组 NF- κ B p65、PTGS2 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 简化栝苈汤 1 和 4 g·kg⁻¹ 组 NF- κ B p65、PTGS2 蛋白表达量均显著降低, 2 g·kg⁻¹ 组 TNF- α 、PTGS2 表达量均显著降低 ($P < 0.01$) (图 9)。

讨论

本文的研究预测出中药复方简化栝苈汤抗炎作用的主要成分群。组成该方的 4 味中药共 66 个主要活性成分, 涉及 132 个炎症靶点。活性成分与关键靶点分子对接结果提示: 槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、汉黄芩、豆甾醇、木犀草素、黄芩素的抗炎作用较好。槲皮素

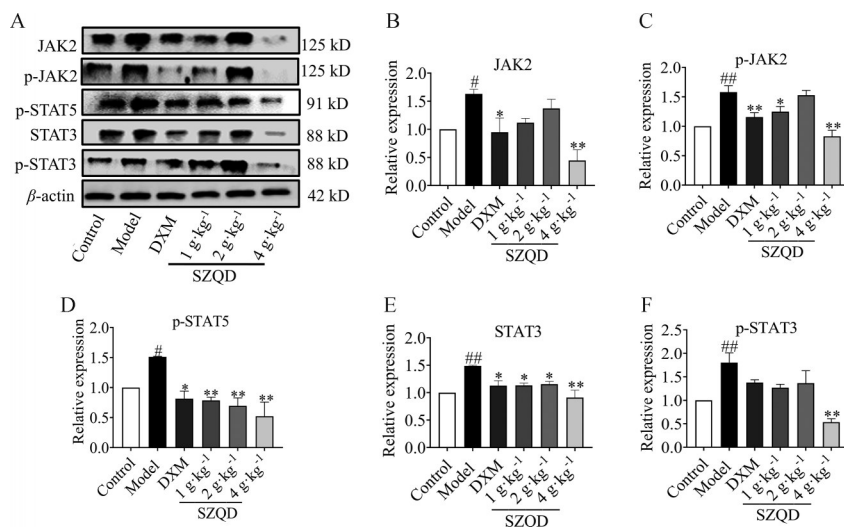


Figure 7 Effect of SZQD on protein expression of JAK2/STAT pathway in lung tissues of inflammatory mice. A: JAK2/STAT pathway protein expression diagram; B: JAK2 protein expression; C: p-JAK2 protein expression; D: p-STAT5 protein expression; E: STAT3 protein expression; F: p-STAT3 protein expression. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

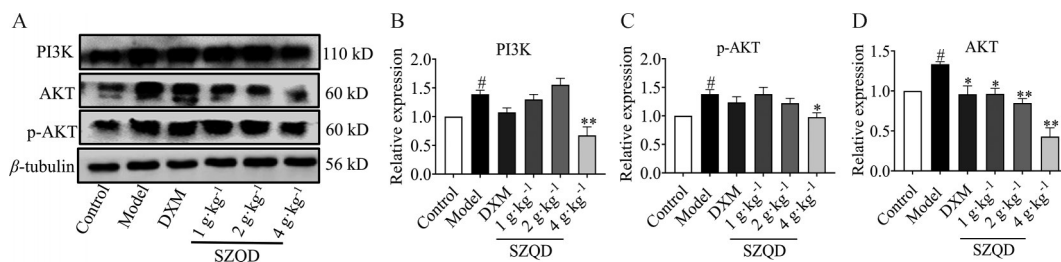


Figure 8 Effect of SZQD on PI3K/AKT pathway protein expression in lung tissues of inflammatory mice. A: PI3K/AKT pathway protein expression diagram; B: PI3K protein expression; C: p-AKT protein expression; D: AKT protein expression. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

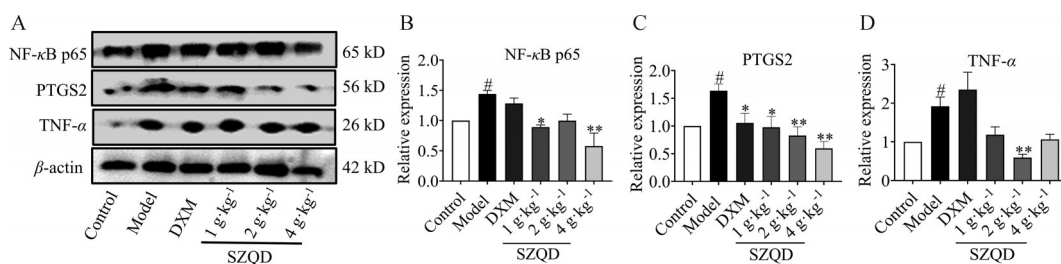


Figure 9 Effect of SZQD on the expression of NF- κ B p65 and downstream targets TNF- α and PTGS2 proteins in lung tissues of inflammatory mice. A: TNF- α pathway protein expression diagram; B: NF- κ B p65 protein expression; C: PTGS2 protein expression; D: TNF- α protein expression. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

来源于连翘、王不留行、栀子; β -谷甾醇来源于连翘、栀子、黄芩; 豆甾醇来源于王不留行、栀子、黄芩; 汉黄芩来源于连翘和黄芩; 山柰酚为连翘和栀子共有成分; 木犀草素来源于连翘; 黄芩新素来源于黄芩。连翘、栀子、黄芩是临床应用中常见的配伍组合^[14], 上述活性成分的抗炎作用及其机制均有相应实验研究报道。槲皮素的抗炎作用机制与抑制 TLR4/NF- κ B 相关信号通路相关^[15]; β -谷甾醇可通过 TNF 信号通路、MAPK 信号通

路发挥抗炎作用^[16]; 山柰酚能显著抑制脂多糖刺激的 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 的释放^[17]; 汉黄芩的抗炎作用机制与抑制 TNF- α 、IL-6 的释放相关^[18]; 豆甾醇可干预 MAPK3、PRKACA 的 mRNA 和蛋白表达, 调控细胞因子的释放, 发挥抗炎作用^[19]; 木犀草素抑制 PI3K/AKT 信号通路发挥抗炎作用^[20], 并且能够协同发挥抗炎、抗氧化作用^[21-23]。这些成分可能是简化栀芩汤发挥抗炎活性的重要物质基础。

本文验证了简化椴苓汤抗炎作用效果。本实验造模所使用的LPS导致炎症发生的病理作用机制,主要是通过TLRs活化PI3K/AKT通路,PI3K/AKT可激活IKK β ,使I κ B α 泛素化降解,激活NF- κ B p65游离入细胞核,调控TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等基因的转录,升高TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等蛋白的表达^[24-26]。实验证明简化椴苓汤能显著改善LPS导致的炎症小鼠腹泻,降低体温、饮水量,增加自主活动能力;减轻肺、肝、脾、胸腺炎症损伤;降低炎症小鼠血清及尿中细胞炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO、PGE₂含量;升高炎症小鼠血清免疫因子IgG、IgA、IgM含量。其中,简化椴苓汤4.0 g·kg⁻¹组能显著降低药效学观察蛋白和作用机制信号通路蛋白的表达,反映出该剂量能稳定地发挥抗炎作用效果,并充分体现出简化椴苓汤抗炎作用的机制。

本文揭示出简化椴苓汤抗炎作用机制的信号通路,预测并验证了简化椴苓汤抗炎作用机制与调控JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF- α 信号通路有关。TNF- α 是炎症反应的重要因子^[27],既受上游PI3K/AKT通路的调控,又反作用于上游通路PI3K/AKT,并能刺激下游炎症因子的产生^[28,29]。此外,PI3K/AKT通路也受JAK2/STAT信号通路调控^[30]。PTGS2是花生四烯酸代谢通路中的重要合成酶,与炎症反应密切相关,是NF- κ B的下游靶标。机体发生炎症时,NF- κ B被激活,刺激PTGS2蛋白表达,加速炎症的发生发展^[31,32]。可见JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF信号通路在炎症中发挥重要作用。网络药理学预测发现,简化椴苓汤抗炎作用涉及的主要生物过程为RNA聚合酶II启动子转录的正调控、胶原分解代谢过程、细胞外基质分解等;主要涉及的细胞成分为蛋白质细胞外基质、细胞外区、细胞外空间等;主要涉及的分子功能为金属内肽酶活性、酶结合、序列特异性DNA结合等;主要涉及的生物信号通路蛋白为PI3K/AKT、TNF、JAK-STAT等。虽然在KEGG和GO分析中,JAK2/STAT、PI3K/AKT、TNF不是排名最靠前的通路,但JAK2/STAT、PI3K/AKT、TNF通路的靶点与简化椴苓汤成分结合更为紧密,且是最公认的炎症通路^[16,17,19]。网络药理学预测结果和文献研究皆表明简化椴苓汤的抗炎作用机制可能与JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF信号通路相关。进一步采用炎症小鼠模型验证结果表明,简化椴苓汤能显著抑制JAK2、p-JAK2、p-STAT5、STAT3、p-STAT3、PI3K、AKT、p-AKT、NF- κ B p65、TNF- α 、PTGS2蛋白表达。依据网络药理学预测和采用LPS导致的炎症小鼠模型实验验证结果,本课题组认为简化椴苓汤抗炎作用的机制,与其抑制JAK2/STAT-PI3K/AKT表达及NF- κ B活化入核、降低TNF- α 的基因转

录、抑制炎症因子IL-1 β 、IL-6、NO、PGE₂、PTGS2的生成与释放,减轻组织炎性损伤密切相关。

综上所述,简化椴苓汤具有显著抗炎效果,药效物质基础主要有槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、木犀草素、汉黄芩、黄芩新素等,其抗炎作用机制与抑制JAK2/STAT-PI3K/AKT-NF- κ B-TNF信号通路相关。本研究为简化椴苓汤临床应用的科学性,以及进一步申报医院制剂,提供了药效学、主要药效成分和主要作用机制的实验依据。

作者贡献:王坤负责动物实验,采集分析数据和论文框架;刘洋负责动物实验、数据分析、撰写并修改论文;肖潇、周雪娇、袁智英参与动物实验;殷玥、叶良红指导实验;徐晓玉负责研究方案设计、论文结构及修改定稿、学术把关。

利益冲突:本研究与任何组织和个人均不存在利益冲突。

References

- [1] Yang HX, Liu QP, Zhou YX, et al. Forsythiasides: a review of the pharmacological effects [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 971491.
- [2] Weng JJ, Xie YL, Zhang XS, et al. Compatibility rules of prescriptions containing *Forsythiae Fructus* in Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions and anti-inflammatory mechanism: an exploration based on data mining and network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27: 181-193.
- [3] Gong L, Wang C, Zhou H, et al. A review of pharmacological and pharmacokinetic properties of forsythiaside A [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105690.
- [4] Xu CK, Zhang CB, Yang JP, et al. Textual research on *Gardeniae Fructus* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2020, 26: 183-191.
- [5] Chen J, Tchivelekete GM, Zhou X, et al. Anti-inflammatory activities of *Gardenia jasminoides* extracts in retinal pigment epithelial cells and zebrafish embryos [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22: 700.
- [6] Liao H, Ye J, Gao L, et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110917.
- [7] Jia MQ, Gao Y, Liu L, et al. Study on the mechanism of action of *Scutellaria baicalensis* against RSV pneumonia based on metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2023, 58: 1780-1789.
- [8] Yuan DJ, Wu KY, Huang XB. Effects of *Vaccaria Semen* on the inflammatory response and oxidation of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide and H₂O₂ [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2021, 43: 1919-1923.

- [9] Mao X, Yao RM, Bao YY, et al. Effect of polysaccharides from seeds of *Vaccaria segetalis* in alleviating urinary tract infection induced bladder injury by inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 3388-3393.
- [10] Li L, Xu SJ. Anti-inflammatory effect and molecular mechanism of Chinese medicine [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2020, 47: 655-658.
- [11] Wang JL, Yang B, Zheng DD, et al. The possible mechanisms of Erhuang decoction in the treatment of acute lung injury based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 244-256.
- [12] Liu J, Liu J, Tong X, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to discover the potential pharmacological mechanism of Huai Hua San against ulcerative colitis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3255-3276.
- [13] Li X, Wei SZ, Niu SQ, 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.
- [14] Wu ZS, Ji P, Wei YM, et al. Protective effect of *Scutellaria Radix-Forsythiae fructus* in an acute pneumonia mouse model induced by lipopolysaccharide [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 2022, 30: 800-809.
- [15] Zhang DM, Yang Q, Liu M. Research progress of the mechanism of quercetin in prevention and treatment of acute liver injury [J]. *Drug Clin* (现代药物与临床), 2023, 38: 3166-3173.
- [16] Dai JM, Guo WN, Tan YZ, et al. Wogonin alleviates liver injury in sepsis through Nrf2-mediated NF- κ B signalling suppression [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25: 5782-5798.
- [17] Qu Y, Li X, Xu F, et al. Kaempferol alleviates murine experimental colitis by restoring gut microbiota and inhibiting the LPS-TLR4-NF- κ B axis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 679897.
- [18] Wu LC, Li JF, Zhang TT, et al. Study on anti-inflammatory effect of stigmasterol based on network pharmacology and cell experiments [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2022, 44: 609-615.
- [19] Wen S, He L, Zhong Z, et al. Stigmasterol restores the balance of Treg/Th17 cells by activating the butyrate-PPAR γ axis in colitis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 741934.
- [20] Zhou XN, Han C, Song PY, et al. Study on the anti-inflammatory effects of luteolin and quercetin *in vitro* [J]. *Prog Vet Med* (动物医学进展), 2017, 38: 56-61.
- [21] Chandra R, Singh S, Ganguly C. β -Sitosterol & quercetin enhances brain development in iodine deficient rat models [J]. *Nutr Health*, 2022. DOI: 10.1177/02601060221122209.
- [22] Parvez MK, Al-Dosari MS, Basudan OA, et al. The anti hepatitis B virus activity of sea buckthorn is attributed to quercetin, kaempferol and isorhamnetin [J]. *Biomed Rep*, 2022, 17: 89.
- [23] Zhu ZW, Jiang Q, Luo Y, et al. Synergistic effect of baicalin and baicalin on regulation of NF- κ B signaling pathway based on medium effect equation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 84-91.
- [24] Reddi KK, Li H, Li W, et al. Berberine, a phytoalkaloid, inhibits inflammatory response induced by LPS through NF- κ B pathway: possible involvement of the IKK α [J]. *Molecules*, 2021, 26: 4733.
- [25] Xiang M, Liu T, Tian C, et al. Kinsenoside attenuates liver fibroinflammation by suppressing dendritic cells *via* the PI3K-AKT-FoxO1 pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 177: 106092.
- [26] Tong Y, Liu L, Wang R, et al. Berberine attenuates chronic atrophic gastritis induced by MNNG and its potential mechanism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 644638.
- [27] van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23: 289-303.
- [28] Wei X, Zhou R, Chen Y, et al. Systemic pharmacological verification of Baixianfeng decoction regulating TNF-PI3K-AKT-NF- κ B pathway in treating rheumatoid arthritis [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105519.
- [29] Zhang X, Chen WN, Song N, et al. Based on molecular interaction network to explore the mechanism of action of Danlou Tablets in regulating PI3K/AKT/NF- κ B/TNF pathway to prevent nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2022, 38: 1324-1332.
- [30] Jie XL, Luo ZR, Yu J, et al. Pi-Pa-Run-Fei-Tang alleviates lung injury by modulating IL-6/JAK2/STAT3/IL-17 and PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway and balancing Th17 and Treg in murine model of OVA-induced asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116719.
- [31] You Z, Yang Z, Cao S, et al. The novel KLF4/BIG1 regulates LPS-mediated neuro-inflammation and migration in BV2 cells *via* PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2022, 488: 102-111.
- [32] Chen Z, Zhang X, Xing Z, et al. OLFM4 deficiency delays the progression of colitis to colorectal cancer by abrogating PMN-MDSCs recruitment [J]. *Oncogene*, 2022, 41: 3131-3150.