

## 基于网络药理学与实验验证探讨三叶青解热作用及机制

周洁<sup>1</sup>, 陈如兵<sup>1</sup>, 蒋学春<sup>1</sup>, 占靛卉<sup>1</sup>, 黎玲玲<sup>1</sup>, 吴林飞<sup>2</sup>, 陈翠婷<sup>1</sup>, 浦锦宝<sup>1\*</sup>

1. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007

2. 浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315500

**摘要:** **目的** 利用网络药理学及分子对接探讨三叶青解热的作用机制, 并对预测结果进行实验验证。 **方法** 运用 GeneCards、DisGeNet 等数据库筛选三叶青和发热的靶点, 获取两者交集靶点, 构建活性成分-靶点网络。然后采用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建共有靶点的蛋白相互作用 (PPI) 网络。使用 Metascape 数据库对共有靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。最后运用 AutoDock 软件对三叶青活性成分与核心靶蛋白进行分子对接, 并将网络药理学预测结果进行体内实验验证。 **ip** 脂多糖诱导小鼠发热模型, 并结合三叶青水提物 (2.5、12.5、25 g/kg) 及阿司匹林 *ig* 给药, 随后检测各组小鼠肛温, 并用 ELISA 试剂盒检测血清中发热相关的细胞因子 [肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$ 、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的水平, Western blotting 检测各组小鼠下丘脑组织中对应预测靶点的相对表达。 **结果** 网络药理学结果表明, 三叶青可能作用于 98 个靶点, 与癌症通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号通路有关。分子对接结果表明大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、花青素 B1、木犀草素与热休克蛋白 90 $\alpha$  型 1 (HSP90AA1)、一氧化氮合酶 (NOS) 2、NOS3 3 个核心靶蛋白具有较强的结合活性和稳定的结合构象。动物实验显示, 与模型组比较, 三叶青水提物 2.5、12.5、25 g/kg 组体温及血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  均显著下降 ( $P < 0.05$ ), Western blotting 检测显示, 三叶青水提物 2.5、12.5、25 g/kg 组中下丘脑组织中 HSP90AA1、NOS2、NOS3 表达水平均下调 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 三叶青在解热的同时可以降低炎症及发热相关细胞因子的表达, 此外三叶青的解热作用与抑制 HSP90AA1、NOS2 和 NOS3 蛋白表达有关。

**关键词:** 三叶青; 解热; 网络药理学; 分子对接; 大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 花青素 B1; 木犀草素

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)09-2212-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.003

## Antipyretic effect and its mechanism of *Tetrastigma hemsleyanum* by network pharmacology and experimental verification

ZHOU Jie<sup>1</sup>, CHEN Rubing<sup>1</sup>, JIANG Xuechun<sup>1</sup>, ZHAN Lianghui<sup>1</sup>, LI Lingling<sup>1</sup>, WU Linfei<sup>2</sup>, CHEN Cuiting<sup>1</sup>, PU Jinbao<sup>1</sup>

1. Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

2. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315500, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the antipyretic mechanisms of *Tetrastigma hemsleyanum* based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** GeneCards, DisGeNet, and other databases were used to screen the targets of *T. hemsleyanum* and fever, obtain the intersection targets of the two, and construct the active ingredient-target network. Then, STRING database and Cytoscape software were used to construct a shared target PPI network. GO and KEGG pathway enrichment analysis were performed for common targets using Metascape database. Finally, AutoDock software was used to perform molecular docking between the active ingredients of *T. hemsleyanum* and the core target protein, and the predicted results of network pharmacology were verified *in vivo*. *Ip* lipopolysaccharide induced fever model of mice, combined with water extract of *T. hemsleyanum* (2.5, 12.5, 25 g/kg) and aspirin were given *ig*, and then anal temperature of mice in each group was measured. The levels of fever-related cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and PGE<sub>2</sub>) in serum were detected by ELISA kit, and the relative expression of corresponding predicted targets in hypothalamus tissues

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304808); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2024KY877); 浙江省中医药科技计划项目 (2023ZR076)

作者简介: 周洁, 女, 副研究员, 博士, 主要研究方向为中药药理学。E-mail: kenzei@163.com

\*通信作者: 浦锦宝, 男, 研究员, 硕士, 主要研究方向为药用资源学。E-mail: pjb0225@163.com

of each group was detected by Western blotting. **Results** Network pharmacological results showed that *T. hemsleyanum* may act on 98 targets related to cancer pathways, AGE-RAGE signaling pathways in diabetes complications. Molecular docking results showed that emodion-1-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, procyanidin B1, and luteolin had strong binding activity and stable binding conformation with the three core target proteins HSP90AA1, NOS2 and NOS3. The animal experiments showed that compared with the model group, the body temperature and serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  of water extract of *T. hemsleyanum* 2.5, 12.5, and 25 g/kg groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Western blotting detection showed that, the expression levels of HSP90AA1, NOS2, and NOS3 in *T. hemsleyanum* 2.5, 12.5, and 25 g/kg water extract groups were down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Antipyretic effect of *T. hemsleyanum* can reduce the expression of inflammation and febrile related cytokines. In addition, the antipyretic effect of *T. hemsleyanum* is related to the inhibition of the expression of HSP90AA1, NOS2 and NOS3 proteins.

**Key words:** *T. hemsleyanum*; antipyretic; network pharmacology; molecular docking; emodion-1-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside; procyanidin B1; luteolin

发热是最常见的临床症状，通常由于感染、组织损伤、炎症、移植物排斥反应等因素导致人体温度超出正常范围<sup>[1]</sup>。外源性热源首先突破自然屏障进入机体，被免疫细胞如单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞识别，随后产生内源性致热物质如细胞因子[如白细胞介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等]<sup>[2]</sup>。这些致热细胞因子进入血液后，激活位于脑血管系统的受体，透过血脑屏障向下丘脑体温调节中枢传递信号，从而引发发热相关介质如前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)的合成和释放，导致体温调定点升高，产热增加，散热减少，最终引发发热<sup>[3]</sup>。持续高热若不及时干预，可能会导致组织损伤、缺氧昏厥、感染等并发症，危及生命<sup>[4]</sup>。

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 是一种葡萄科的崖爬藤植物。三叶青性凉无毒，味甘微苦，具有清热解毒、活血祛风的功效。其地下块根和全草都可入药，历来被用于治疗发烧、小儿热惊厥、哮喘、肝炎、风湿等疾病，是民间常用的中草药<sup>[5]</sup>。现代药理研究表明，三叶青治疗高热惊厥、腹痛、肺炎、哮喘、肝炎、抗肿瘤具有显著疗效<sup>[6]</sup>。有研究发现三叶青提取物能明显降低干酵母和 2,4-二硝基苯酚引起的大鼠发热体温<sup>[7-9]</sup>，然而关于三叶青的解热机制的研究仍然有限，仍有待进一步深入研究以阐明其活性成分和相关机制。

脂多糖是一种多糖和脂质成分，是革兰阴性菌细胞壁的组成部分，其致热机制涉及激活巨噬细胞释放内源性致热原进入血液，刺激致热介质如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub>的释放，从而在各器官中引发氧化应激、炎症反应和细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。脂多糖常用于复制动物模型中的发热，其诱导的发热通常伴有嗜睡和轻度腹泻症状，代表经典的炎症性发热模型。

网络药理学将药理学、分子生物学和生物信息学相整合，用于阐述中药有效成分、相关靶点、通路及疾病之间的相互关系<sup>[12-13]</sup>。因此，本研究采用网络药理学方法筛选三叶青中解热活性化合物及其作用靶点，并进一步通过三叶青对脂多糖致小鼠高温模型的验证，以明确其解热作用及潜在机制，为三叶青作为解热药物提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 48 只，购自杭州医学院，体质量(20 $\pm$ 2)g，生产许可证 SCXK(浙)2019-0002，饲养于浙江省中医药研究院，使用许可证 SYXK(浙)2019-0010，自由饮食饮水，光照节律为昼夜各半照明(12 h 光照/12 h 黑暗)，相对湿度在 50%~60%、温度保持在 22~25 °C。所有实验动物的饲养、使用以及动物的处理都遵循中国实验动物伦理委员会的相关规定伦理审查(批号：浙中研动物伦理审字第[2023]033 号)。

### 1.2 实验仪器

BS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司)，超低有机物型纯水仪(Sartorius Stedim 公司)，HPX-9052MBE 干燥机(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司)，KW-8 多通道动物体温记录仪(南京卡尔文生物科技有限公司)，Epoch 功能酶标仪(BioTek 公司)，TC-15 套式恒温机(新华医疗器械厂)，R-210 旋转蒸发器(BUCHI 公司)，5430R 离心机(Eppendorf)，Eclipse80i 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司)，tissue lyser II 组织研磨仪(Qiagen)，HPX-9052MBE 电热恒温培养箱(上海博讯医疗仪器有限公司)，ImageQuant LAS 500 一体化成像仪(Cytiva 公司)，EPS300 蛋白电泳仪(上海天能公司)，Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司)，

JK-300DB 数控超声波清洗器 (合肥金妮尼克医疗科技有限公司), Waters ACQUITY UPLC I-Class/XEVO G3 QTOF-MS/MS (美国 Waters 公司)。

### 1.3 药物和试剂

三叶青饮片由浙江广胜药业有限公司提供 (批号 20221211)。小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附法试剂盒 (江苏酶标生物科技有限公司 (货号 MB-2899A、MB-2868A)), PGE<sub>2</sub> 酶联免疫吸附法试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号 ML037542), 热休克蛋白 90 $\alpha$  型 1 (HSP90AA1) 一抗及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 IgG (货号 AF7140、AF2811) 均购自自碧云天生物有限公司, 一氧化氮合酶 (NOS) 2 和 NOS3 一抗购自 Proteintech 公司 (货号 18985-1-AP、27120-1-AP), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0011), 氯化钠溶液 (山东齐都药业有限公司, 货号 2B21062505), 脂多糖购自美国 Sigma 公司 (批号 0000211694), 阿司匹林肠溶片 (德国拜耳医药有限公司, 规格 100 mg, 批号 BJ76479), 甲酸 (成都科隆化学品有限公司, 色谱纯, 批号 2020060201), 乙腈 (德国 Merck 公司, 色谱纯, 批号 JB126230)。

### 1.4 三叶青水提物的制备及成分分析

三叶青水提物提取方法: 取三叶青饮片 25 g, 加入 12 倍蒸馏水浸泡 30 min 后回流提取 3 次, 每次 2 h。合并滤液浓缩至质量浓度为 2.5 g/mL, 然后依次稀释至 1.25、0.25 g/mL, 每只小鼠按照 10 mL/kg ig 给药 (折合成生药计为 25、12.5、2.5 g/kg)。

对本批次三叶青水提取物进行化学成分分析, 采用 Waters ACQUITY UPLC I-Class/XEVO G3 QTOF-MS/MS 系统, 对数据库结合文献所得三叶青的有效成分进行了指征。色谱条件: 色谱柱 ACQUITY HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m); 流动相为 0.01% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (洗脱程序 0~3 min, 1% B; 3~15 min, 1%~20% B; 15~25 min, 20%~99% B; 25~27 min, 99%~1% B; 27.1~30 min, 1% B), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 体积流量 0.3 mL/min。质谱条件: 离子化方式 ESI<sup>-</sup>, 扫描方式 MSE, 扫描范围  $m/z$  50~1 200, MSE 碰撞能量 15~70 eV, 毛细管电压 1.0 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120  $^{\circ}$ C, 脱溶剂气温度 450  $^{\circ}$ C, 锥孔气体积流量 50 L/h, 脱溶剂气流速 950 L/h。

### 1.5 三叶青活性成分的选择和靶点预测

通过文献查找<sup>[14-15]</sup>并结合 TCMSP 中药系统药理学数据库与分析平台 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 TCMID 中药综合数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/437>) 查找三叶青的活性成分, 基于药物相似性 (DL)  $\geq 0.18$  和口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$  对活性成分进行筛选。去除冗余靶点, 并从 UniProt 数据库获取靶蛋白的基因名。

### 1.6 发热靶点筛选

在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、CTD (<http://ctdbase.org/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中搜索关键词 “fever” 识别与发热相关的靶点, 去除冗余靶点以最终确定特定的发热相关靶点。

### 1.7 三叶青解热潜在靶点预测

将三叶青的活性成分和已识别的发热靶点上传至 Bioinformatic 生物信息学平台, 通过维恩图 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制药物靶点与疾病靶点的映射, 得到两者的交集靶点, 作为三叶青解热的潜在作用靶点。

### 1.8 活性成分 - 靶点网络和蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建

将活性成分和交集靶点输入 Cytoscape 3.7.1, 构建活性成分 - 靶点网络并进行拓扑属性分析。将交集靶点上传至 STRING v11.0 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 物种设为 “人” 并设置可信度阈值为 0.4, 删除游离节点, 构建 PPI 网络图。

### 1.9 基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 路径分析

使用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对三叶青解热的靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 利用 Bioinformatic 平台对生物功能、通路进行可视化分析, 依据  $P < 0.01$  筛选三叶青解热的生物功能及信号通路。

### 1.10 成分 - 靶点的分子对接

本实验还筛选了 “成分 - 靶点” 网络中的 degree 值排名前 12 位的靶点作为受体, 并将与受体对应的 12 种活性成分作为配体, 利用 Autodock 软件进行分子对接, 以分子对接结合能作为评价活性成分与靶点蛋白的结合活性。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载化合物结构并利用 Chem 3D 软件将 SDF 格式转化为 mol2 格式文件,

从 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶蛋白的 PDB 格式的 3D 结构, 使用 Pymol 软件去除水分子与配体, 使用 AutoDock Tools1.5.6 软件加氢、计算电荷、对接范围框选等, 保存为 pdbgt 格式。

### 1.11 实验动物筛选

取 ICR 小鼠 48 只, 适应性饲养 5 d 后, 模拟测小鼠肛温 (包括捉拿、固定、安放直肠测温仪) 以适应实验操作, 每日测量肛温 2 次, 连续 3 d, 将单次体温超过 38 °C 或 2 次体温变化超过 0.5 °C 的小鼠剔除, 筛选出合格小鼠 41 只, 体温为 (37.5 ± 0.5) °C。

### 1.12 分组与给药

将上述体温合格小鼠随机分为对照组、模型组、阿司匹林 0.2 g/kg 组及三叶青 2.5、12.5、25 g/kg 组。除对照组外, 其余各组均 ip 脂多糖溶液 0.1 mg/kg 后 ig 相应药物。直肠温度每小时测量 1 次, 考察时间共 8 h。计算每组小鼠与对照组在相同时刻点的直肠温度差 ( $\Delta_T$ )。

### 1.13 酶联免疫吸附测定

收集眼眶采集的血液样本, 以 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清分装在离心管中, 然后储存在 -80 °C 冰箱备用。按照 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> 细胞因子的 ELISA 试剂盒说明书操作, 在酶标仪 450 nm 波长测定吸光度, 绘制标准曲线, 根据标准曲线检测并比较各组小鼠血清中相应的细胞因子浓度。

### 1.14 Western blotting 检测解热相关蛋白

小鼠麻醉后快速取脑, 剥离下丘脑 (以灰结节

及视交叉之间的中心点为中心确定), 精密称定 0.02 g 下丘脑组织 200  $\mu$ L 裂解液 (含 PMSF 和磷酸酶抑制剂, 现配现用) 中组织匀浆。按文献报道<sup>[16]</sup> 对各蛋白进行检测。蛋白上样后依次进行电泳、转膜、5% 脱脂奶粉进行封闭。使用 TBST 洗膜 3 次后, 4 °C 摇床孵育一抗 (NOS2 1:1 000, NOS3 1:1 000, HSP90AA1 1:1 000) 过夜, 分别使用山羊抗兔/小鼠二抗 (1:3 000) 室温孵育 1.5 h, 滴加配制好的 ECL 显色液后使用 Bio-Rad 凝胶成像系统对膜曝光采集图像。用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。设置 GAPDH 蛋白为内参蛋白。

实验组目的蛋白相对含量 = (实验组目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值) / (对照组目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值)

### 1.15 统计分析

结果使用 SPSS 20.0 软件分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间比较单因素方差分析 (ANOVA), 而组内多重比较采用 Tukey's 检验进行分析。

## 2 结果

### 2.1 三叶青活性成分和靶点的选择

根据 DL  $\geq$  0.18 和 OB  $\geq$  30% 的条件对三叶青活性成分进行筛选, 共得到 12 个化学成分, 见表 1。

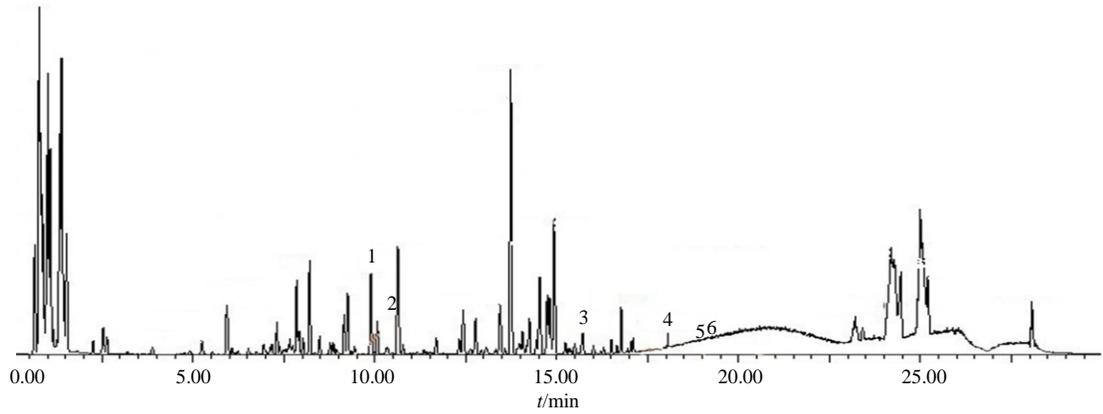
### 2.2 三叶青水提取物的成分分析

在 ESI 负离子模式下鉴定了三叶青饮片水提物质谱信息, 儿茶素、异牡荆素、原花青素 B1、槲皮素在样品中响应值较高, 而山柰酚、异鼠李素响应值相对较低, 见图 1、表 2。

表 1 三叶青活性成分

Table 1 Active compounds in *T. hemsleyanum*

MOL ID	化合物名称		DL	OB/%
	英文名称	中文名称		
MOL002464	1-monolinolein	1-亚油酸甘油单脂	0.30	37.18
MOL000359	$\beta$ -sitosterol	$\beta$ -谷甾醇	0.75	36.91
MOL002288	emodion-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	大黄素-1-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	0.80	44.81
MOL000492	(+)-catechin	儿茶素	0.24	54.83
MOL000098	quercetin	槲皮素	0.28	46.43
MOL000006	luteolin	木犀草素	0.25	36.16
MOL004564	kaempferid	山柰素	0.27	73.41
MOL000422	kaempferol	山柰酚	0.24	41.88
MOL005190	eriodictyol	圣草酚	0.24	71.79
MOL002322	isovitexin	异牡荆苷	0.72	31.29
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李素	0.31	49.60
MOL000004	procyanidin B1	原花青素 B1	0.66	67.87



1-原花青素 B1, 2-儿茶素, 3-异牡荆苷, 4-槲皮素, 5-山柰酚, 6-异鼠李素。  
1-procyanidin B1, 2-(+)-catechin, 3-isovitexin, 4-querceetin, 5-kaempferol, 6-isorhamnetin.

图 1 三叶青水提取物基峰图

Fig. 1 Base peak of water extract of *T. hemsleyanum*

表 2 重点成分结构信息

Table 2 Structural information of key components

成分	结构式	$t_R$ /min	$m/z$	质量数误差	$t_R$ 误差/min	碎片离子数	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
儿茶素	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	10.62	289.072 7	0.000 9	0.03	25	25.217
槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	18.05	301.036 3	0.000 9	0.01	15	0.820
山柰酚	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	19.01	285.041 2	0.000 7	0.00	25	0.096
异牡荆苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	15.43	431.099 4	0.001 0	0.03	24	3.301
异鼠李素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	19.15	315.050 8	-0.000 3	0.01	18	0.145
原花青素 B1	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	9.88	577.313 5	-0.000 1	0.01	25	13.456

### 2.3 发热靶点的选择

GeneCards 数据库得到发热靶点 447 个 (相关性评分  $\geq 5$ ), OMIM 数据库得到 74 个, CTD 数据库得到 33 个, DisGeNET 数据库得到 1 021 个。去重后汇总得到 1 317 个发热相关的靶点, 绘制维恩图, 见图 2。活性成分 - 疾病靶点取交集共有 98 个靶点, 推测为三叶青解热作用的潜在靶点。

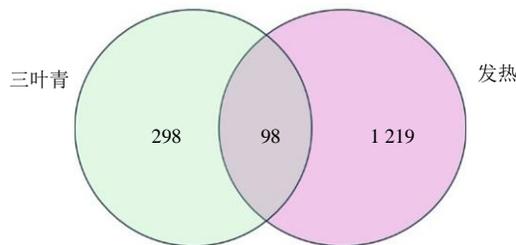


图 2 三叶青与发热靶点交集维恩图

Fig. 2 Cross-target Venn diagram of *T. hemsleyanum* and fever

### 2.4 活性成分 - 交集靶点网络的构建

活性成分 - 交集靶点网络由 12 个化合物节点、98 个靶点节点和 933 条边构成, 如图 3 所示, 按

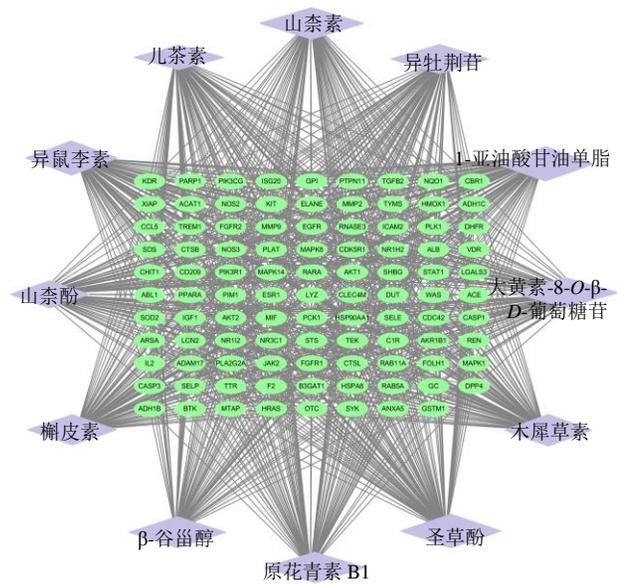


图 3 活性成分 - 交集靶点相互作用网络

Fig. 3 Interaction network of active ingredients-intersection targets

degree 值排名前 5 位的活性成分是 1-亚油酸甘油单脂 (degree=82)、原花青素 B1 (degree=82)、木犀

草素 (degree=81)、圣草酚 (degree=81)、异鼠李素 (degree=80)。此外,按 degree 值排名前 12 位的靶点依次为丝裂原激活蛋白激酶 8 (MAPK8)、表皮生长因子受体 (EGFR)、基质金属蛋白酶 (MMP)、X-连锁凋亡蛋白抑制因子 (XIAP)、HSP90AA1、胰岛素样生长因子 1 (IGF1)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、MAPK14、NOS2、热休克蛋白 8 (HSPA8)、NOS3、MAPK1,提示上述靶点可能是三叶青的潜在解热的重要靶点。

## 2.5 PPI 网络的构建

如图 4 所示, PPI 网络包含 96 个节点和 955 条边。节点表示潜在靶点,节点的大小和颜色强度反映其重要程度。边表示潜在靶点之间的相互作用。网络的平均连通性为 19.9,表明这些潜在靶点之间的相互作用较强。颜色较深且节点较大的靶点在整个 PPI 网络中占据关键地位,其变化能给网络带来较大的影响,提示上述靶点在三叶青解热的过程中发挥着关键作用。

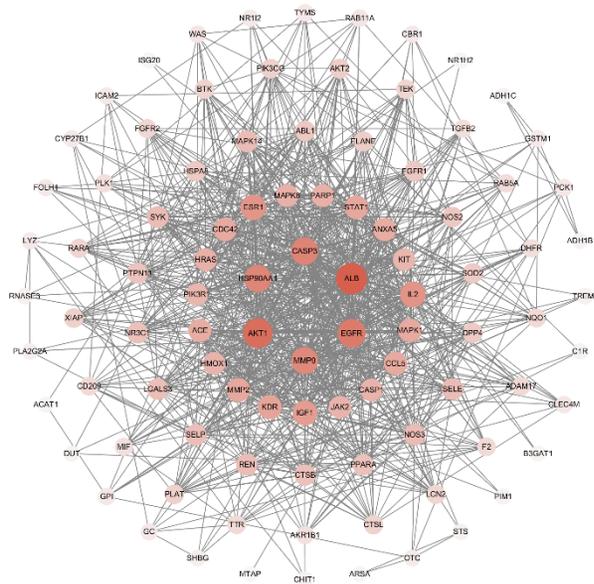


图 4 交集靶点 PPI 关系网络

Fig. 4 Intersection target PPI relationship network

## 2.6 GO 富集分析和 KEGG 路径分析

对三叶青活性成分-靶点网络中的 98 个靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。以  $P < 0.01$  为筛选条件,以得到富集基因数量较多的生物过程和代谢通路。GO 分析揭示了 5 334 个条目,其中 4 329 个与生物过程 (BP) 相关,包括激素反应、细菌反应、细胞迁移的正调控、腺体发育和细胞因子产生的正调控等。分子功能 (MF) 类别包含 659 个条目,

包括蛋白激酶活性、激酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、内肽酶活性和羧酸结合。细胞成分 (CC) 类别包括 346 个条目,与囊泡腔、膜筏、富含集蛋白 1 的结构、内吞囊泡和细胞质的核周区等结构相关。

KEGG 通路分析确定了 264 条重要通路,主要涉及癌症、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号、脂质代谢和动脉粥样硬化、流体剪切应力、动脉粥样硬化等,见图 5。

## 2.7 成分和靶点的分子对接

对排名前 6 位的“活性成分-潜在靶点”进行分子对接,见表 3。使用 AutoDock 软件进行分子对接。结合能用于评估活性成分和靶蛋白之间的相互作用,如图 6 所示,木犀草素与 HSP90AA1、NOS2、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷与 NOS2、NOS3、原花青素 B1 与 NOS2、NOS3,表现出较强的亲和力,表明三叶青通过这些有效成分、靶点相互作用发挥其解热作用。

## 2.8 三叶青水提物对脂多糖诱导发热模型小鼠肛温的影响

如图 7 所示,与模型组相比,三叶青水提物 2.5、12.5、25 g/kg 组在给药后 1~2 h 内体温显著降低 ( $P < 0.01$ )。从 4 h 开始三叶青水提物 25 g/kg 组的解热作用逐渐优于阿司匹林组。上述结果表明三叶青水提物具有良好的解热活性。

## 2.9 三叶青水提物对脂多糖诱导发热模型小鼠致热和炎症介质的影响

与对照组相比,模型组中炎症和致热细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub> 的水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,三叶青 2.5、12.5、25 g/kg 组均能显著降低血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 PGE<sub>2</sub> 水平 ( $P < 0.01$ ),且呈一定的剂量相关性,见图 8。

## 2.10 三叶青水提物对解热相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组中 HSP90AA1、NOS2 和 NOS3 蛋白相对表达水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。与模型组相比,三叶青 2.5、12.5、25 g/kg 组的 HSP90AA1、NOS2、NOS3 蛋白相对表达水平均有所下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ),表明三叶青可以降低上述致热相关蛋白的表达,见图 9。

## 3 讨论

在本研究中,共筛选出三叶青的 12 种活性成分。将基因名称添加到这些成分的相应靶点上,汇总去重后共得到了 396 个药物靶点和 1 317 个与“发热”疾病状态相关的靶点。通过绘制韦恩图,

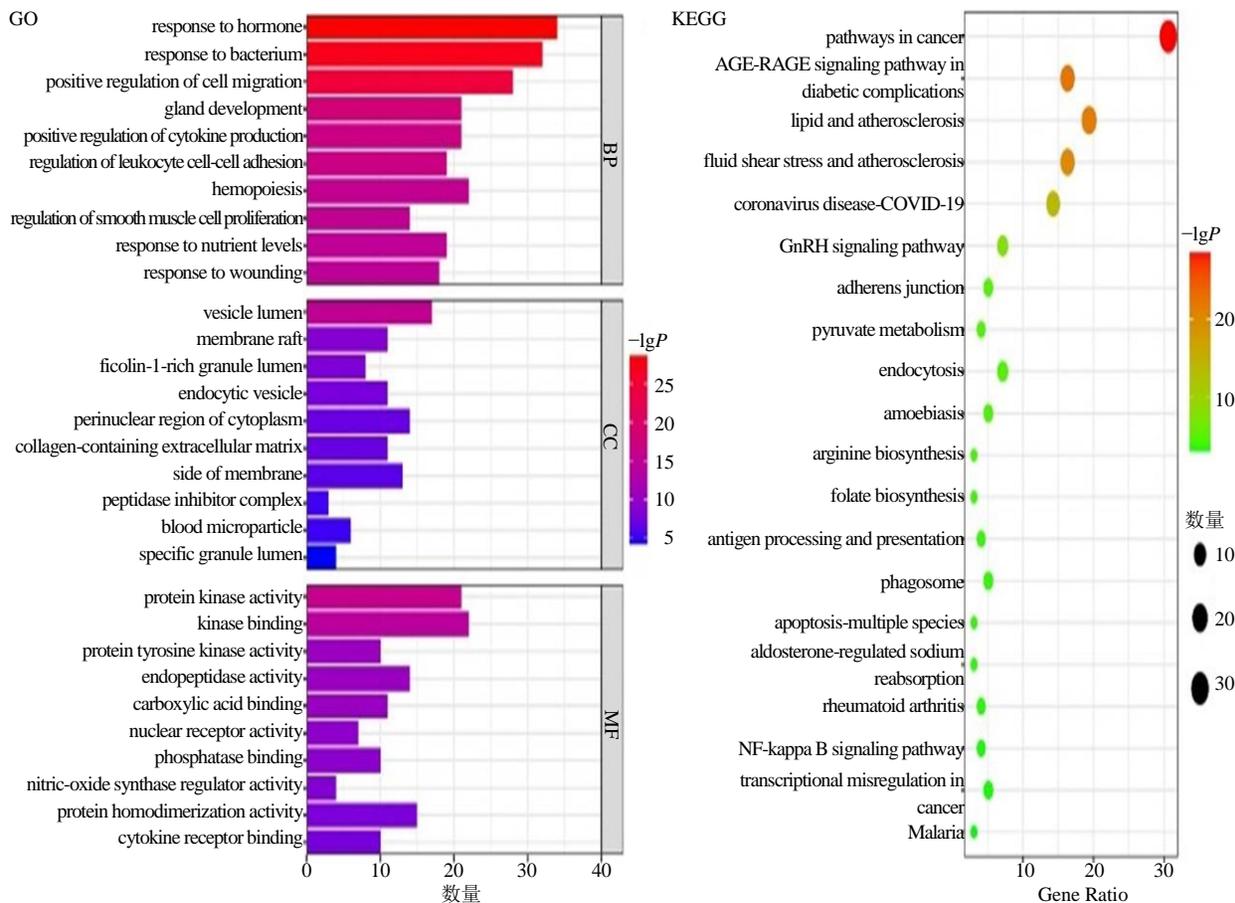


图 5 GO 功能和 KEGG 通路分析

Fig. 5 GO function and KEGG pathway enrichment terms

表 3 排名前 6 位的活性成分与潜在靶点对接结合能

Table 3 Top 6 active ingredients are combined with potential targets for docking energy

靶点	PDB ID	成分	结合能/(kcal mol <sup>-1</sup> )
NOS2	3E7G	1-亚油酸甘油单脂	-10.9
NOS2	3E7G	原花青素 B1	-10.7
NOS3	3EAH	原花青素 B1	-10.7
NOS3	3EAH	大黄素-1-O-β-D-葡萄糖苷	-10.5
HSP90AA1	4BQG	木犀草素	-10.0
NOS2	3E7G	木犀草素	-10.0

找出了这些活性成分与发热靶点的交集,得到 98 个共有靶点,推测为三叶青解热作用的潜在靶点。通过富集分析揭示了这些潜在靶点涉及的功能和通路,并通过构建的“药材-活性成分-潜在靶点”网络筛选较为核心的活性成分和潜在靶点,最后通过分子对接及实验验证,深入挖掘三叶青解热的潜在靶点和作用机制。

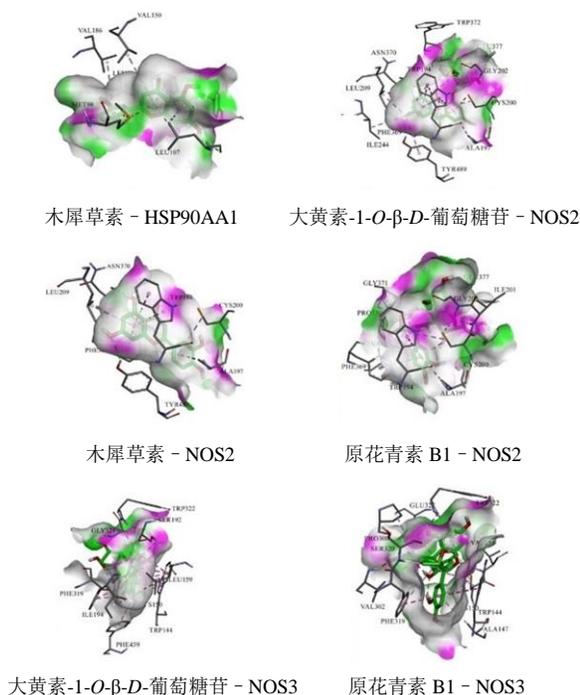
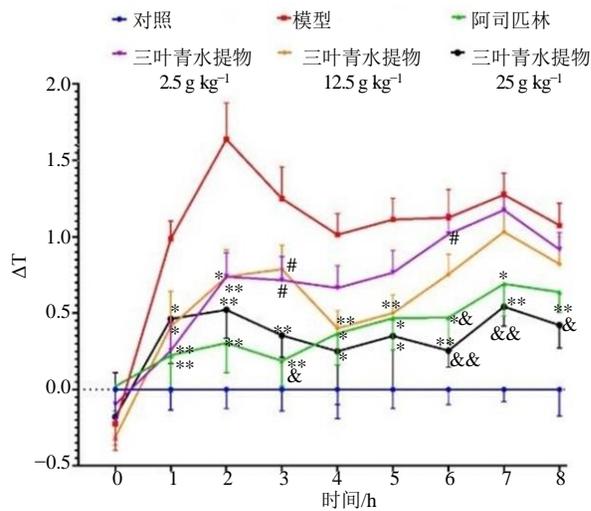


图 6 分子对接模式图

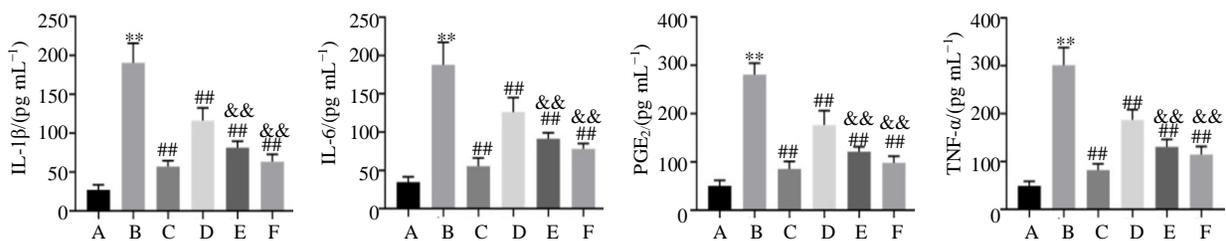
Fig. 6 Molecular docking model diagram



与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与阿司匹林组比较: # $P < 0.05$ ; 与三叶青水提取物 2.5 g kg<sup>-1</sup>组比较: & $P < 0.05$  && $P < 0.01$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs aspirin group; & $P < 0.05$  && $P < 0.01$  vs *T. hemsleyanum* water extract 2.5 g kg<sup>-1</sup> group.

图 7 三叶青水提取物对脂多糖诱导小鼠在不同时间点肛温的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of *T. hemsleyanum* water extract on anal temperature at different time points in mice induced by lipopolysaccharide ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



A-对照, B-模型, C-阿司匹林, D-三叶青水提取物 2.5, E-三叶青水提取物 12.5, F-三叶青水提取物 25。与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ ; 与三叶青水提取物 2.5 g kg<sup>-1</sup>组比较: && $P < 0.01$ 。

A-control, B-model, C-aspirin, D-*T. hemsleyanum* water extract 2.5 g kg<sup>-1</sup>, E-*T. hemsleyanum* water extract 12.5 g kg<sup>-1</sup>, F-*T. hemsleyanum* water extract 25 g kg<sup>-1</sup>. \*\* $P < 0.01$  vs control group; ### $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs *T. hemsleyanum* water extract 2.5 g kg<sup>-1</sup> group.

图 8 各组血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>, and TNF- $\alpha$  in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

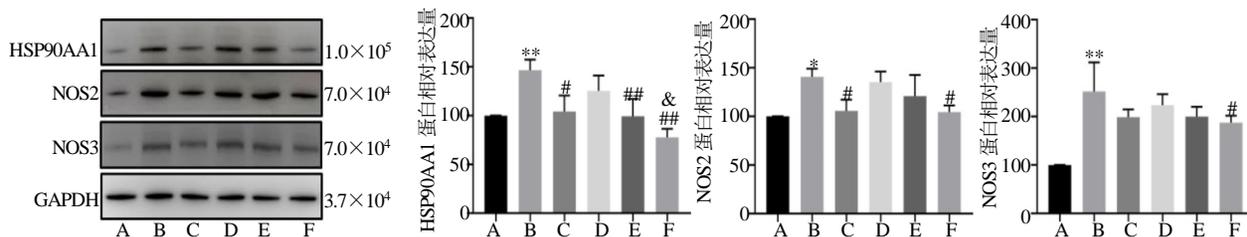
发现,发热会导致 T 细胞中 HSP90 蛋白上调,包括 HSP90AA1 和 HSP90AB1<sup>[24-25]</sup>。NOS2 主要在上皮细胞和免疫细胞中表达,受到细胞刺激或损伤后被激活,导致大量合成一氧化氮(NO)。NOS2 介导的 NO 生成在调控炎症病理反应中起着重要作用,并参与多种炎症疾病的发生和发展<sup>[26]</sup>。NOS3 主要在血管内皮中表达,负责内皮细胞内 NO 的生成<sup>[27]</sup>。研究认为源自 NOS3 生成的 NO 可能在内毒素血症早期加剧炎症反应,诱导发热及血管通透性增加<sup>[28]</sup>。

针对三叶青解热活性成分进行了文献检索,发现 12 个关键活性成分中大多数是具有抗病毒、抗菌、抗炎和抗氧化功能的黄酮类化合物,缓解炎症的关键在于减少炎症细胞因子和炎症介质的生成并抑制其相关功能,抗炎药物的主要作用之一就是调节炎症介质<sup>[17]</sup>。木犀草素的抗炎特性部分是通过调节这些介质实现的,并在多种体内和体外模型中得到了验证。木犀草素可以抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-13、TNF- $\alpha$  和干扰素 (IFN) - $\beta$  的生成。此外,木犀草素还可以抑制趋化因子,如 CCL2、CXCL2、CXCL8、CXCL9,这些趋化因子在调节免疫细胞迁移和定位中起着重要作用<sup>[18]</sup>。原花青素 B1 对人体单核细胞具有抗炎作用<sup>[19-20]</sup>。原花青素 B1 可能通过作为 TLR4/MD-2 激活 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路以及 TNF- $\alpha$  生成的竞争性拮抗剂来介导抗炎作用<sup>[21-22]</sup>。此外,大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷是一种从多种传统药用植物中获得的羟基蒽醌苷,在以往的研究中具有显著的抗氧化和抗肿瘤特性。

基于上述三叶青的药效物质基础研究后,对发热相关的核心靶点和信号通路进行筛选和富集,得到相关靶点 96 个。HSP90AA 作为一种 ATP 依赖性的分子伴侣,能促进局部炎症反应的发生<sup>[23]</sup>。研究

提示这些靶点在三叶青解热作用中的起着关键性作用。分子对接验证选择了解热关键靶点与相应化合物进行对接,结果表明,木犀草素与 HSP90AA1、NOS2,大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷与 NOS2、NOS3,原花青素 B1 与 NOS2、NOS3 形成了稳定的分子构象,符合传统中药的多靶点作用机制。表明三叶青可能通过这些活性成分与潜在靶点的结合来发挥解热活性。

此外,本研究还在动物实验中对三叶青解热作



A-对照, B-模型, C-阿司匹林, D-三叶青水提物 2.5, E-三叶青水提物 12.5, F-三叶青水提物 25。与对照组比较: \*P < 0.05 \*\*P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05 ##P < 0.01; 与三叶青水提物 2.5 g kg<sup>-1</sup>组比较: &P < 0.05。

A-control, B-model, C-aspirin, D-*T. hemsleyanum* water extract 2.5 g kg<sup>-1</sup>, E-*T. hemsleyanum* water extract 12.5 g kg<sup>-1</sup>, F-*T. hemsleyanum* water extract 25 g kg<sup>-1</sup>. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 vs control group; #P < 0.05 ##P < 0.01 vs model group; &P < 0.05 vs *T. hemsleyanum* water extract 2.5 g kg<sup>-1</sup> group.

图 9 Western blotting 检测三叶青解热相关蛋白的表达 (  $\bar{x} \pm s, n = 3$  )

Fig. 9 Western blotting was used to detect the expression of antipyretic related proteins (  $\bar{x} \pm s, n = 3$  )

用进行验证, 药理实验结果表明, 三叶青具有良好的解热活性, 可降低脂多糖诱导的发热模型小鼠的体温。通过对血清的 ELISA 检测发现三叶青水提物可以抑制外周内源性致热致炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub> 的产生, 并且可以通过抑制 HSP90AA1、NOS2、NOS3 3 个蛋白的表达来起到解热的作用, 验证了分子对接的结果。结合文献三叶青解热作用和活性基础物质的研究, 提示网络药理学和分子对接预测三叶青解热的可靠性。

综上所述, 本研究基于网络药理学对三叶青解热作用的成分基础和机制进行了探索, 揭示了三叶青发挥解热药效的靶点, 并结合实验手段进行了验证, 以上结果可为三叶青解热相关研究提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] Erdem H, Al-Tawfiq J A, Abid M, et al. Infectious causes of fever of unknown origin in developing countries: An international ID-IRI study [J]. *J Intensive Med*, 2024, 4(1): 94-100.

[2] Guimarães N C, Alves D S, Vilela W R, et al. Mitochondrial pyruvate carrier as a key regulator of fever and neuroinflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 90-101.

[3] Huang Y, Yao P, Leung KW, et al. The Chinese medicinal herbs of spleen-meridian property regulate body temperature in yeast-induced fever rats [J]. *Phytomedicine*, 2020, 74: 152815.

[4] Nguyen T, Chen X, Chai J W, et al. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activities of *Periplaneta americana* extract and underlying mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109753.

[5] Lu J J, Zhu B Q, Zhou F M, et al. Polysaccharides from the

aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg induce bidirectional immunity and ameliorate LPS-induced acute respiratory distress syndrome in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 838873.

[6] Zhan L H, Pu J B, Zheng J R, et al. *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg ameliorates lipopolysaccharide induced sepsis via repairing the intestinal mucosal barrier [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112741.

[7] Fu S Y, Bao X D, Wang Z J, et al. Antipyretic effect of inhaled *Tetrastigma hemsleyanum* polysaccharide on substance and energy metabolism in yeast-induced pyrexia mice via TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323: 117732.

[8] Ji T, Ji W W, Wang J, et al. A comprehensive review on traditional uses, chemical compositions, pharmacology properties and toxicology of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113247.

[9] Hu W Y, Zheng Y J, Xia P G, et al. The research progresses and future prospects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: A valuable Chinese herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113836.

[10] Abdel Razak F S, AlJoofy I K, Zaki N H. *In vivo* evaluation of immunomodulatory activity of lipopolysaccharide zinc oxide nanoparticles (LPS-ZnNPS) [J]. *Arch Razi Inst*, 2022, 77(5): 1821-1829.

[11] Li P, Zhou K W, Li J H, et al. Acetylcholine suppresses LPS-induced endothelial cell activation by inhibiting the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2022, 33(4): 79-89.

[12] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.

[13] 王伸盛, 张新中, 张岱男, 等. 基于网络药理学、分子对接技术及实验验证探讨新橙皮苷治疗创伤性脑损伤作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(4): 857-866.

- [14] Lou T L, Ji T, Peng X, *et al.* Extract from *Tetrastigma hemsleyanum* leaf alleviates *Pseudomonas aeruginosa* lung infection: Network pharmacology analysis and experimental evidence [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 587850.
- [15] 郑静茹, 季春莲, 占靓卉, 等. 基于网络药理学与实验验证探讨三叶青治疗脓毒症的作用及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(17): 4744-4754.
- [16] Crowe A. Transcriptomic and western blot characterisation of the human CLEFF4 clone, a new rapid cell line replacement for the Caco2 model [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2024, 199: 114291.
- [17] Shi Y S, Yang L, Yu M F, *et al.* Seasonal variation influences flavonoid biosynthesis path and content, and antioxidant activity of metabolites in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg [J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0265954.
- [18] Conti P, Caraffa A, Gallenga C E, *et al.* Powerful anti-inflammatory action of luteolin: Potential increase with IL-38 [J]. *Biofactors*, 2021, 47(2): 165-169.
- [19] Gao W, Yu T T, Li G M, *et al.* Antioxidant activity and anti-apoptotic effect of the small molecule procyanidin B1 in early mouse embryonic development produced by somatic cell nuclear transfer [J]. *Molecules*, 2021, 26(20): 6150.
- [20] Thuy P T, Quan P M, Duc D X, *et al.* The antioxidative potential of procyanidin B1: DFT (density functional theory) and docking approaches [J]. *J Mol Model*, 2022, 28(11): 356.
- [21] Byun E B, Sung N Y, Byun E H, *et al.* The procyanidin trimer C1 inhibits LPS-induced MAPK and NF- $\kappa$ B signaling through TLR4 in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 450-456.
- [22] Sung N Y, Yang M S, Song D S, *et al.* The procyanidin trimer C1 induces macrophage activation via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1-3): 218-228.
- [23] Zhang H, Wang H H, Zhang Q, *et al.* Bu-Shen-Tian-Jing formulas alleviate the mitochondrial damage induced by oxidative stress in ovarian granulosa cells exposed to DEHP through the HDAC3-HSP90AA pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 1387-1400.
- [24] Turan M. Genome-wide analysis and characterization of HSP gene families (HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90) in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*) (Diptera: Culicidae) [J]. *J Insect Sci*, 2023, 23(6): 27.
- [25] Wang B, Zhang L K, Deng F, *et al.* Hsp90 $\beta$  is critical for the infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *Virologica Sinica*, 2024, 39(1): 113-122.
- [26] Miranda K M, Ridnour L A, Cheng R Y S, *et al.* The chemical biology of NO that regulates oncogenic signaling and metabolism: NOS2 and its role in inflammatory disease [J]. *Crit Rev Oncog*, 2023, 28(1): 27-45.
- [27] Dobrijevic Z, Stevanovic J, Robajac D, *et al.* Association between nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphisms and diabetic nephropathy: An updated meta-analysis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2024, 586: 112197.
- [28] Youness R A, Assal R A, Abdel Motaal A, *et al.* A novel role of sONE/NOS3/NO signaling cascade in mediating hydrogen sulphide bilateral effects on triple negative breast cancer progression [J]. *Nitric Oxide*, 2018, 80: 12-23.

[责任编辑 高源]