

## • 药理与临床 •

## 复方芒果叶抗炎物质筛选和作用机制研究

刘颖<sup>1</sup>, 侯小涛<sup>2</sup>, 姜民<sup>3</sup>, 侯媛媛<sup>3</sup>, 张铁军<sup>4</sup>, 白钢<sup>3\*</sup>, 邓家刚<sup>1,2\*</sup>

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

2. 广西中医药大学, 广西中药药效研究重点实验室, 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 广西 南宁 530021

3. 南开大学, 天津 300071

4. 天津药物研究院, 天津 300193

**摘要:** **目的** 探究复方芒果叶的抗炎活性, 明确其抗炎药效物质基础, 初步阐明其网络调控机制。 **方法** 采用 UPLC-Q/TOF-MS 法结合核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 荧光素酶报告基因检测系统对复方芒果叶进行抗炎成分的筛选; 运用网络药理学对其中药效成分进行作用靶点与通路的预测; 并利用肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导人支气管上皮细胞 BEAS-2B 炎症模型以及采用酶联免疫法 (ELISA) 对复方芒果叶的抗炎活性进行验证。 **结果** 从复方芒果叶中筛选出 16 个主要抗炎成分; 预测这些抗炎成分分别作用于 40 个靶点并与 11 条炎症通路相关, 活性验证结果表明芒果苷、补骨脂素、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 3 个化合物均具有很好的抗炎作用, 且各成分间两两配伍具有协同作用。 **结论** 初步揭示了复方芒果叶抗炎作用与丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、黏着斑 (focal adhesion)、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路等多重调控机制有关。

**关键词:** 复方芒果叶; 抗炎; 谱效关系; 网络药理学; 芒果苷; 补骨脂素; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3760-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.015

## Screening and mechanism of anti-inflammatory ingredients in compound Mango leaves formula

LIU Ying<sup>1</sup>, HOU Xiao-tao<sup>2</sup>, JIANG Min<sup>3</sup>, HOU Yuan-yuan<sup>3</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>4</sup>, BAI Gang<sup>3</sup>, DENG Jia-gang<sup>1,2</sup>

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Collaborative Innovation Center for Research on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Nanning 530021, China

3. Nankai University, Tianjin 300071, China

4. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To investigate the anti-inflammatory activity of compound Mango leaves formula (CMLF) and illuminate the network regulated mechanism. **Methods** UPLC-Q/TOF-MS combined with NF- $\kappa$ B dual-luciferase reporter assay systems was used to screen the anti-inflammatory ingredients in CMLF, network pharmacology approach was utilized to forecast the targets and pathways, and then the anti-inflammatory effect was verified by TNF- $\alpha$  induced BEAS-2B cells inflammatory model and ELISA. **Results** Sixteen anti-inflammatory ingredients were screened out, and there were 40 targets working on 11 pathways respectively. **Conclusion** The anti-inflammatory multiple regulation mechanism of CMLF is related to MAPK, focal adhesion.

**Key words:** compound Mango leaves formula; anti-inflammation; spectra-efficiency relationship; network pharmacology; mangiferin; psoralen; ginsenoside Rg<sub>1</sub>

复方芒果叶 (compound Mango leaves formula, CMLF) 是广西名中医邓家刚教授根据多年临床经验总结形成的复方, 以止咳化痰的芒果叶为君药, 臣以健脾益气的五指毛桃、化痰宣通的三七等 5 味

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 广西科技基础条件平台项目 (10-046-04); 广西“八桂学者”工程专项经费资助 (厅发【2013】3 号)

作者简介: 刘颖 (1987—), 女, 博士在读, 研究方向为中药及天然药物药效研究。E-mail: cdzyb083@sina.com

\*通信作者 邓家刚, 博士生导师, 教授, 从事中药及天然药物药效研究。Tel: (0771)3137515 E-mail: 759319507@qq.com

白钢, 博士生导师, 教授, 从事复方药物与系统生物学研究。Tel: (022)23506792 E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

药材,共奏补肺益肾、止咳平喘、祛痰化瘀之功,从而达到防治肺纤维化的目的。炎症是机体对各种致炎因子所引起的局部损伤产生的防御免疫应答,是普遍存在于受损机体的基本病理过程<sup>[1]</sup>。肺纤维化早期主要的病理特点是下呼吸道急性炎症反应,包括肺泡炎、间质性肺炎、肺泡上皮受损、巨噬细胞及中性粒细胞等炎性细胞浸润,并伴随着大量成纤维细胞病理性增生转型<sup>[2]</sup>。因此,炎症反应是诱导肺纤维化发生的重要因素之一<sup>[3]</sup>。

前期研究结果表明,复方芒果叶可有效降低肺纤维化小鼠肺组织的炎症水平;病理研究显示,复方芒果叶可显著改善小鼠肺组织损伤,改善间质血管扩张、充血,改善支气管扩张,降低部分支气管腔、泡腔内的炎性渗出物;同时,复方芒果叶可明显降低小鼠肺组织炎症因子白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的表达水平<sup>[4]</sup>。以上结果提示,复方芒果叶的抗炎作用可能是其治疗肺纤维化的机制之一。本实验对复方芒果叶抗炎作用的药效物质基础进行研究,进一步探讨其抗炎作用并阐释其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

超高效液相色谱仪串联四极杆/飞行时间质谱(Waters Acquity UPLC-Q/TOF Premier); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); HF151UV 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(上海 Heal Force 公司); 倒置生物相差显微镜(日本 Olympus 公司); MIKRO 220R 型高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司); 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Modulus 荧光检测仪(美国 Turner Designs 公司)。

### 1.2 药品与试剂

复方芒果叶干膏(广西高校农作物废弃物功能成分研究协同创新中心提供,含芒果苷>1%); RPMI 1640 基础培养基(美国 HyClone 公司); 双抗(氨苄青霉素和链霉素)、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); TNF- $\alpha$  (美国 Peprotech 公司); 地塞米松(Dex, 美国 Sigma 公司); PGL4.32 质粒和海肾荧光素酶质粒、细胞裂解液、双荧光素酶报告基因试剂盒(美国 Promega 公司); 脂质体 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司); IL-6、IL-8 酶联免疫试剂盒(上海西唐生物有限公司); 色谱纯甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司); 色谱纯甲酸(比利时 Acros 公司); 超纯水由 Milli-Q 制备。

### 1.3 细胞

人支气管上皮细胞(BEAS-2B)购自上海拜力

生物技术有限公司。

## 2 方法

### 2.1 UPLC-Q/TOF-MS 分析

**2.1.1 样品制备** 取复方芒果叶干膏 0.1 g, 加入 50% 甲醇溶液 10 mL, 超声处理 20 min, 摇匀, 16 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 即得。

**2.1.2 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 二元梯度洗脱: 0~2 min, 2%~13% B; 2~6 min, 13%~20% B; 6~10 min, 20%~35% B; 10~11 min, 35%~40% B; 11~16 min, 40%~55% B; 16~18 min, 55%~100% B; 18~20 min, 100%~2% B; 柱温 35  $^{\circ}$ C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2.0  $\mu$ L。

**2.1.3 质谱条件** 正离子模式: 电喷雾离子源; V 模式; 毛细管电压 3.0 kV; 锥孔电压 30 V; 离子源温度 100  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 350  $^{\circ}$ C; 脱溶剂氮气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; 记录范围  $m/z$  50~1 500; Lockmass 采用 LEA ( $[M+H]^+=555.293\ 1$ )。负离子模式: 电喷雾离子源; V 模式; 毛细管电压 2.5 kV; 锥孔电压 45 V; 离子源温度 100  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 350  $^{\circ}$ C; 脱溶剂氮气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; 记录范围  $m/z$  50~1 500; Lockmass 采用 LEA ( $[M-H]^- = 553.277\ 5$ )。数据采集工作站为 MassLynx 4.1。

**2.1.4 馏份收集** 使用 96 孔深孔板进行馏份收集, 按照 UPLC 分离时间, 每隔 30 s 收集至 1 个孔。40  $^{\circ}$ C 减压干燥, 残渣用 100  $\mu$ L 细胞培养基溶解以进行生物活性分析。

### 2.2 复方芒果叶馏份对核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 抑制能力的测定

BEAS-2B 细胞培养于 96 孔板, 细胞融合至 60%~70% 时共转染 PGL4.32 及内参 Renilla 质粒, 转染 24 h 后加入复方芒果叶干膏 ( $1\times 10^{-5}$  g/mL)、各馏份 ( $1\times 10^{-5}$  g/mL)、Dex ( $1\times 10^{-5}$  mol/L) 孵育 6 h, 再加入 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 刺激 6 h 后裂解细胞, 用双荧光素酶报告基因试剂盒检测各组细胞 NF- $\kappa$ B 的表达量, 以相对荧光比值(相对荧光比值=Nf- $\kappa$ B 荧光值/内参 Renilla 荧光值)<sup>[5]</sup>表示。

### 2.3 化合物的鉴定

从一级质谱中测定得到化合物的  $[M+H]^+$  或  $[M-H]^-$  等准分子离子峰的相关信息, 通过这些化

合物的精确相对分子质量,结合各自二级质谱中的碎片信息分析其质谱裂解特征,并对比同类化合物的质谱裂解规律以及参考文献资料已报道的成分结构信息,推测化合物可能的结构。

## 2.4 网络药理学研究

利用 PharmMapper (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/>)和 UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>)进行靶标预测,利用 MAS3 (<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>)进行通路预测,利用 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)进行通路注释和分析,STRING (<http://string-db.org/>)进行蛋白互作分析。

## 2.5 抗炎成分活性验证及协同作用研究

按照“2.2”项方法测定对 NF- $\kappa$ B 的抑制能力。ELISA 方法测定 BEAS-2B 细胞中的 IL-6、IL-8 炎症因子的水平,操作按试剂盒说明书进行。

## 2.6 数据统计分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据统计,组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 抗炎活性成分的筛选

为了确认复方芒果叶中的抗炎活性成分,将复方芒果叶提取物经 UPLC 分离,再进行细胞水平的 NF- $\kappa$ B 抑制实验的筛选,比较各馏份对 NF- $\kappa$ B 的抑制效果。复方芒果叶抗炎成分的筛选结果见图 1,与 UPLC 保留时间相对应的 7 个馏份 (馏份 6、7、16、17、19、23、25) 对 NF- $\kappa$ B 具有较强的抑制效果,为抑制 NF- $\kappa$ B 表达的潜在活性物质。

### 3.2 抗炎活性成分鉴定以及结构分类

**3.2.1 复方芒果叶抗炎活性成分鉴定** 利用 UPLC-Q/TOF-MS 对细胞实验筛选出具有较强抗炎抑制效果的馏份有 7 个 (馏份 6、7、16、17、19、23、25),结合相关文献和二级质谱的裂解规律对 7 个馏份所包含的 16 个化合物进行分析。表 1 结果表明,复方芒果叶抗炎活性成分初步鉴定为鸢尾酮酚-3-C- $\beta$ -D-葡萄糖苷、没食子酸甲酯、芒果苷、鸢尾酮酚-3-C-(2-O-没食子酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖苷、2,4',6-

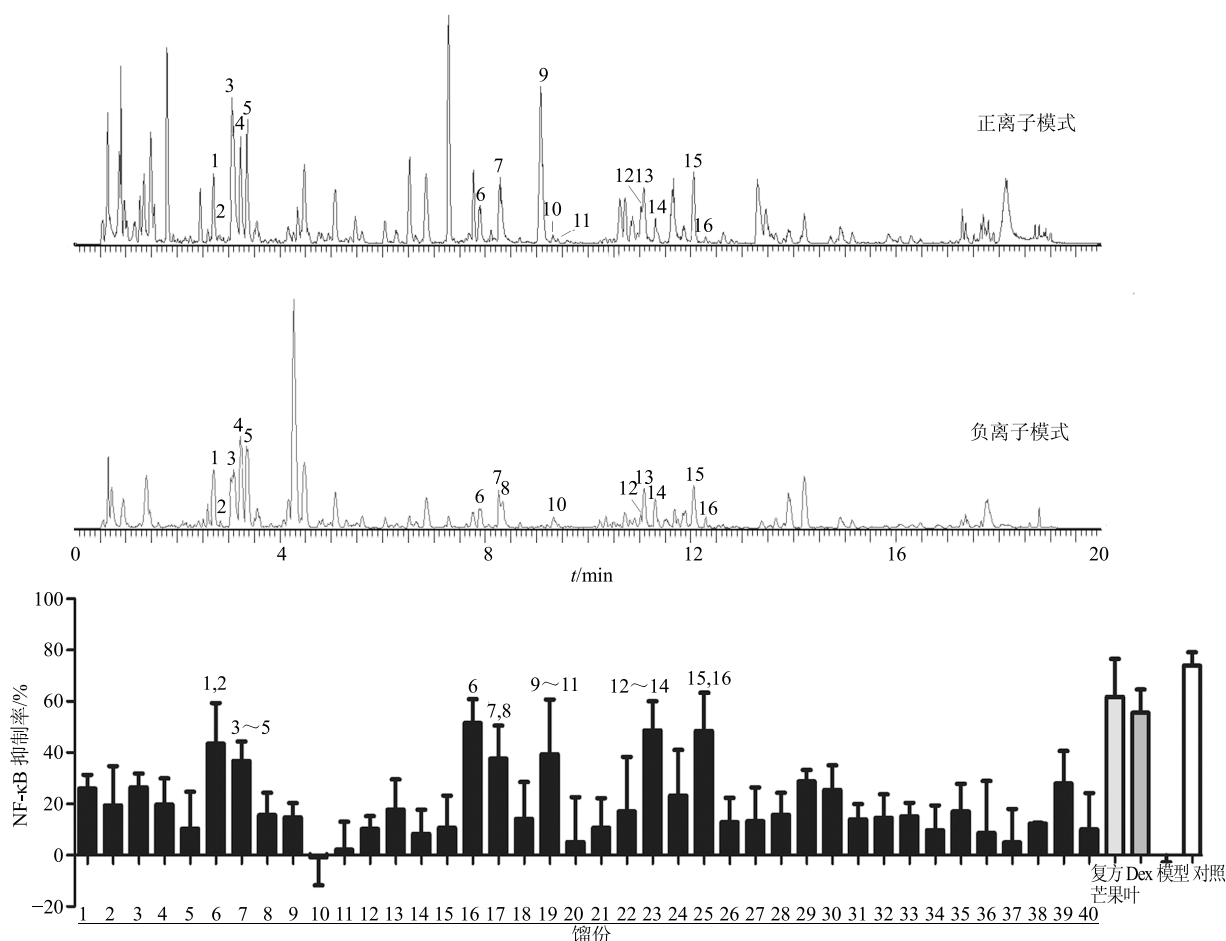


图 1 复方芒果叶 UPLC-Q/TOF-MS 总离子流图及抗炎活性成分筛选

Fig. 1 UPLC-Q/TOF-MS for CMLF and analysis on anti-inflammatory ingredients

表 1 复方芒果叶抗炎活性成分鉴定结果

Table 1 Identification of anti-inflammatory ingredients in CMLF

| 峰号 | 成分                                                               | $t_R/\text{min}$ | 离子模式 | MS ( $m/z$ ) | 分子式                                       | 碎片离子、( $m/z$ )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----|------------------------------------------------------------------|------------------|------|--------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 鸢尾酮酚-3- <i>C</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷                      | 2.70             | 负    | 407.098 6    | $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ | 407 [M-H] <sup>-</sup> , 317 [M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 287 [M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 245 [M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                   |
| 2  | 没食子酸甲酯                                                           | 2.84             | 负    | 183.028 4    | $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$          | 183 [M-H] <sup>-</sup> , 168 [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 124 [M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3  | 芒果苷                                                              | 3.10             | 负    | 421.077 9    | $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ | 421 [M-H] <sup>-</sup> , 331 [M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 301 [M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 259 [M-H-Glc] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                            |
| 4  | 鸢尾酮酚-3- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -没食子酰基)- $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷 | 3.23             | 负    | 559.112 5    | $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$ | 559 [M-H] <sup>-</sup> , 407 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 389 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 317 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 287 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> |
| 5  | 2,4',6-三羟基-4-甲氧基苯甲酮-3- <i>C</i> - $\beta$ - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷     | 3.35             | 负    | 421.115 7    | $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ | 421 [M-H] <sup>-</sup> , 331 [M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 301 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                           |
| 6  | 三七皂苷 R <sub>1</sub>                                              | 7.90             | 负    | 977.535 7    | $\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$ | 977 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 931 [M-H] <sup>-</sup> , 799 [M-H-Xyl] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 7  | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub>                                             | 8.26             | 负    | 845.494 6    | $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$ | 845 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 799 [M-H] <sup>-</sup> , 637 [M-H-Glc] <sup>-</sup> , 619 [M-H-Glc-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 475 [M-H-2Glc-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                   |
| 8  | 人参皂苷 Re                                                          | 8.33             | 负    | 991.555 3    | $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$ | 991 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 945 [M-H] <sup>-</sup> , 799 [M-H-Rha] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 9  | 补骨脂素                                                             | 9.09             | 正    | 187.039 7    | $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_3$       | 187 [M+H] <sup>+</sup> , 143 [M+H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 131 [M+H-2CO] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 10 | 大黄素甲醚                                                            | 9.32             | 正    | 285.076 1    | $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$    | 285 [M+H] <sup>+</sup> , 255 [M+H-HCHO] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 11 | 三七皂苷 R <sub>2</sub>                                              | 9.42             | 负    | 815.482 7    | $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$ | 815 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 769 [M-H] <sup>-</sup> , 805 [M+Cl] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 12 | 人参皂苷 Rg <sub>2</sub>                                             | 11.06            | 负    | 829.500 6    | $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$ | 829 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 783 [M-H] <sup>-</sup> , 637 [M-H-Rha] <sup>-</sup> , 619 [M-H-Rha-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 13 | 人参皂苷 Rh <sub>1</sub>                                             | 11.10            | 负    | 683.441 9    | $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$    | 683 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 637 [M-H] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 14 | 人参皂苷 Rb <sub>2</sub>                                             | 11.30            | 负    | 1 123.151 4  | $\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$ | 1 123 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 1 077 [M-H] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 15 | 甲基异茜草素-1-甲醚                                                      | 12.06            | 正    | 269.081 8    | $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$    | 269 [M+H] <sup>+</sup> , 291 [M+Na] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 16 | 三七皂苷 K                                                           | 12.29            | 负    | 991.555 3    | $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$ | 991 [M+HCOO] <sup>-</sup> , 945 [M-H] <sup>-</sup> , 783 [M-H-Glc] <sup>-</sup> , 765 [M-H-Glc-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 459 [M-H-3Glc] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                    |

三羟基-4-甲氧基苯甲酮-3-*C*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、补骨脂素、大黄素甲醚、三七皂苷 R<sub>2</sub>、人参皂苷 Rg<sub>2</sub>、人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>2</sub>、甲基异茜草素-1-甲醚、三七皂苷 K，共 16 个化合物。

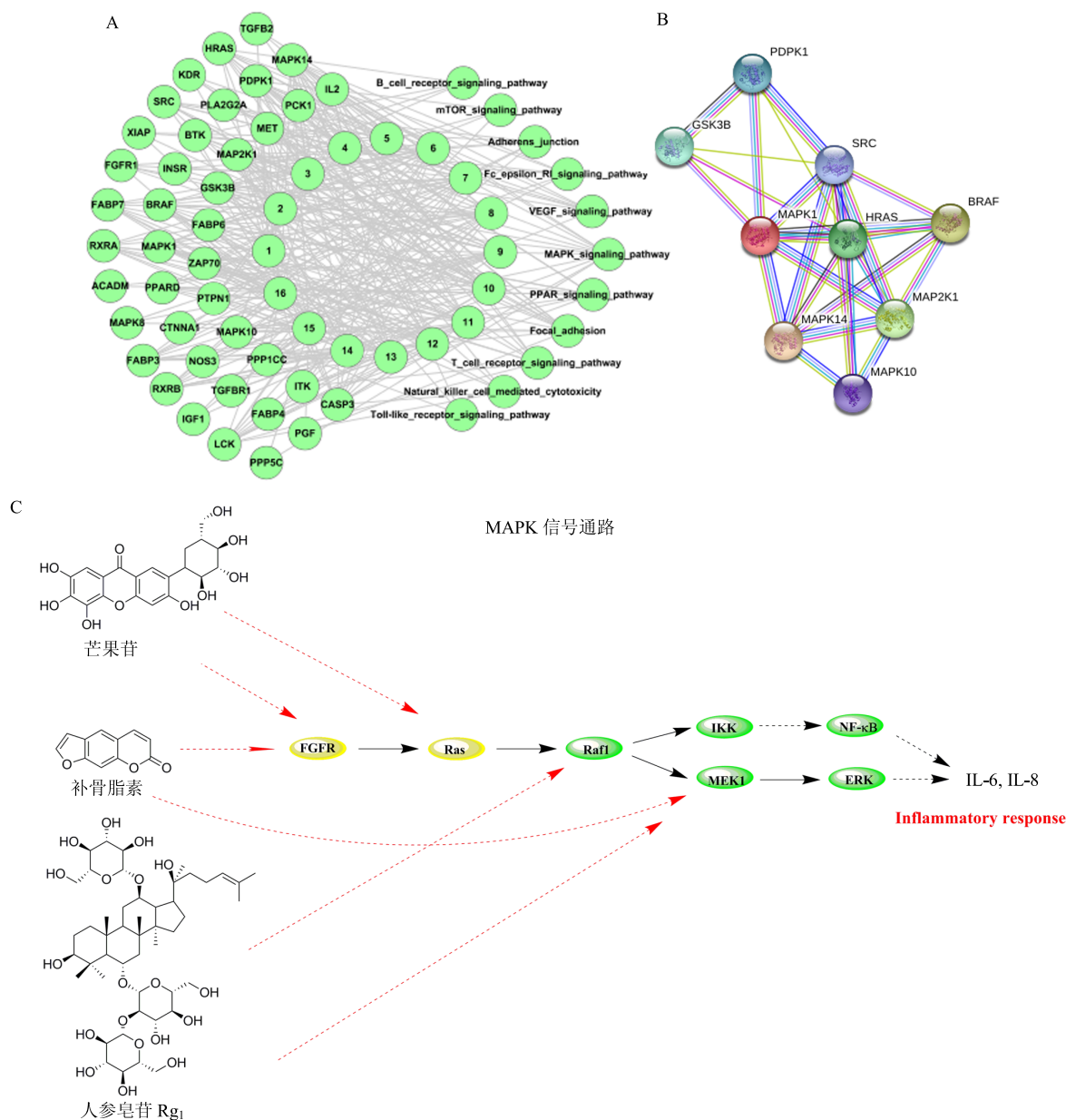
**3.2.2 复方芒果叶抗炎活性成分的分类** 复方芒果叶中鉴定的 16 个抗炎活性成分，其中皂苷类化合物 8 个（三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、三七皂苷 R<sub>2</sub>、人参皂苷 Rg<sub>2</sub>、人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>2</sub>、三七皂苷 K），二苯甲酮类化合物 3 个[鸢尾酮酚-3-*C*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、鸢尾酮酚-3-*C*-(2-*O*-没食子酰基)- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、2,4',6-三羟基-4-甲氧基苯甲酮-3-*C*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷]，黄酮类化合物 1 个（芒果苷），香豆素类化合物 1 个（补骨脂素），蒽醌类化合物 2 个（大黄素甲醚、甲基异茜草素-1-甲醚），酚酸类化合物 1 个（没食子酸甲酯）。

### 3.3 复方芒果叶网络药理学研究

**3.3.1 复方芒果叶抗炎成分的靶点、通路预测** 以上述筛选出的 16 个化合物为基础，通过预测复方芒果叶抗炎成分的靶点、通路，如图 2-A 所示，复方芒果叶的抗炎成分分别作用于 40 个靶点蛋白

（HRAS、BRAF、MAP2K1、MAPK1、MAPK14、PDPK1、GSK3B、SRC、FGFR1、MAPK8、MAPK10、CASP3、PCK1、IL2、TGFB2、XIAP、BTK、PLA2G2A、PTPN1、INSR、FABP6、PPP1CC、FABP7、LCK、ITK、MET、ZAP70、RXRA、FABP3、PPAR、RXRB、KDR、ACADM、CTNNA1、NOS3、FABP4、IGF1、TGFB1、PPP5C、PGF），这些靶点分别作用于 11 条炎症通路，包括丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、黏着斑（focal adhesion）通路、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）信号通路、Fc epsilon 受体 I（Fc epsilon RI）信号通路、T 细胞受体（T cell receptor）信号通路、B 细胞受体（B cell receptor）信号通路、自然杀伤细胞介导细胞毒性（natural killer cell mediated cytotoxicity）信号通路、Toll 样受体（Toll-like receptor）信号通路、PPAR 信号通路、黏着连接（adherens junction）信号通路、雷帕霉素靶蛋白（mTOR）信号通路。其中与复方芒果叶抗炎作用关联性比较高的通路为 MAPK、focal adhesion、VEGF 等通路。蛋白互作分析的结果显示，在 40 个靶点蛋白中，与炎症相关性最高的靶点蛋白有 9





1-鸢尾酮酚-3-C-β-D-葡萄糖苷 2-没食子酸甲酯 3-芒果苷 4-鸢尾酮酚-3-C-(2-O-没食子酰基)-β-D-葡萄糖苷 5-2,4',6-三羟基-4-甲氧基苯甲酰-3-C-β-D-吡喃葡萄糖苷 6-三七皂苷 R<sub>1</sub> 7-人参皂苷 R<sub>g1</sub> 8-人参皂苷 Re 9-补骨脂素 10-大黄素甲醚 11-三七皂苷 R<sub>2</sub> 12-人参皂苷 R<sub>g2</sub> 13-人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 14-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 15-甲基异茜草素-1-甲醚 16-三七皂苷 K

1-iriflophenone-3-C-β-D-glucoside 2-methyl gallate 3-mangiferin 4-iriflophenone-3-C-(2-O-galloyl)-β-D-glucoside 5-2,4',6-trihydroxy-4-methoxybenzophenone-3-C-β-D-glucopyranoside 6-notoginsenoside R<sub>1</sub> 7-ginsenoside R<sub>g1</sub> 8-ginsenoside Re 9-psoralen 10-phycion 11-notoginsenoside R<sub>2</sub> 12-ginsenoside R<sub>g2</sub> 13-ginsenoside Rh<sub>1</sub> 14-ginsenoside Rh<sub>2</sub> 15-rubiadin-1-methyl ether 16-notoginsenoside K

图2 复方芒果叶抗炎成分的网络药理图

Fig. 2 Network pharmacology of CMLF

个, 分别为 HRAS、BRAF、MAP2K1、MAPK1、MAPK10、MAPK14、GSK3B、PDPK1、SRC, 如图 2-B 所示。

**3.3.2 复方芒果叶抗炎成分对 MAPK 通路的协同增效作用** 在与复方芒果叶关联性较高的抗炎通路中 MAPK 通路为经典的抗炎通路, 以其为例研

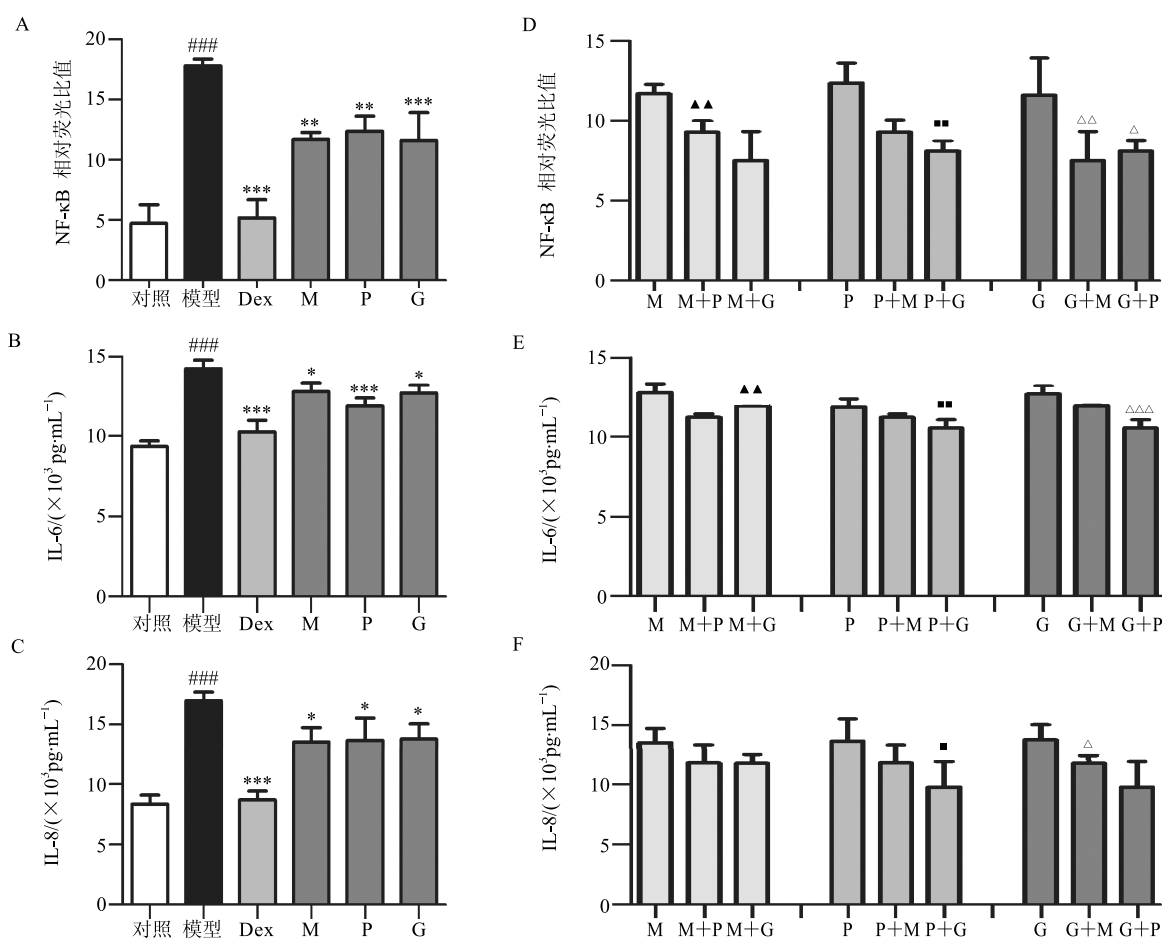
究对 MAPK 关联的化合物芒果苷、补骨脂素和人参皂苷 R<sub>g1</sub> 的靶点进行了进一步分析。如图 2-C 所示, 芒果苷可作用于 HRAS 和 FGFR1; 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 作用于 MAP2K1 和 BRAF, 而补骨脂素作用于 MAP2K1 和 FGFR1。预测结果显示, 3 个化合物可通过分别作用于 MAPK 通路中不同靶点蛋白, 从而

降低下游 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 的表达水平，最终抑制炎症反应的发生。

### 3.4 复方芒果叶抗炎成分活性验证和协同作用研究

**3.4.1 复方芒果叶抗炎成分活性验证** 利用相同质量浓度 ( $1 \times 10^{-5}$  g/mL) 的芒果苷、补骨脂素、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 分别作用于 BEAS-2B 细胞后对 MAPK 通路下游因子 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 表达水平进行检测。结果如图 3-A、B、C 所示，与对照组比较，模型组细胞中 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 的表达水平明显升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较，Dex 组、芒果苷组、补骨脂素组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组均显著性降低细胞中 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 的表达水平 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。研究证明芒果苷、补骨脂素、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 3 个化合物均具有很好的抗炎作用。

**3.4.2 基于 MAPK 通路的复方芒果叶抗炎成分的协同增效作用分析** 分别取相同质量浓度 ( $1 \times 10^{-5}$  g/mL) 的芒果苷、补骨脂素、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 两两混合给药，并利用 BEAS-2B 细胞炎症模型对 MAPK 通路下游因子 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 表达水平进行检测。结果如图 3-D、E、F 所示：芒果苷与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 协同作用后 NF- $\kappa$ B 表达水平明显低于芒果苷单独给药 ( $P < 0.01$ )；芒果苷与补骨脂素协同后 IL-6 表达水平明显低于芒果苷单独给药 ( $P < 0.01$ )；补骨脂素与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 协同作用后 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-8 表达水平均明显低于补骨脂素或人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 单独给药 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。研究证明通过配伍组合提高 MAPK 通路的抑制效果，复方芒果叶活性成分具有良好的协同抗炎作用。



与对照组比较：### $P < 0.001$ ；与模型组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ；与 M 组比较：▲▲ $P < 0.01$ ；与 P 组比较：■ $P < 0.05$  ■■ $P < 0.01$ ；与 G 组比较：△ $P < 0.05$  △△ $P < 0.01$  △△△ $P < 0.001$ ；M-芒果苷；P-补骨脂素；G-人参皂苷 Rg<sub>1</sub>。  
 ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group; ▲▲ $P < 0.01$  vs M group; ■ $P < 0.05$  ■■ $P < 0.01$  vs P group; △ $P < 0.05$  △△ $P < 0.01$  △△△ $P < 0.001$  vs G group; M-mangiferin; P-psoralen; G-ginsenoside Rg<sub>1</sub>.

图 3 复方芒果叶抗炎成分活性验证和协同作用分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Active verification and synergistic effect analysis of anti-inflammatory ingredient in CMLF ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

本研究从复方芒果叶中筛选出16个抗炎成分。其中,芒果苷来自芒果叶,三七皂苷类成分主要来自三七;补骨脂素来自五指毛桃。据文献报道,芒果苷可通过下调白细胞NF- $\kappa$ B基因表达来抑制脂多糖(LPS)诱导的慢性炎症<sup>[6-7]</sup>,并通过调节NF- $\kappa$ B、Nrf-2转录因子等来抑制不同的促炎信号通路中间体,如TNF- $\alpha$ <sup>[8]</sup>。三七皂苷类成分具有抗炎、止血、抗衰老、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[9]</sup>,三七皂苷R<sub>1</sub>可有效抑制血管内皮细胞中NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的水平<sup>[10]</sup>,人参皂苷Rg<sub>1</sub>能明显抑制LPS诱导的巨噬细胞NO和活性氧(ROS)的产生及吞噬微球的能力<sup>[11]</sup>。补骨脂素可抑制LPS刺激巨噬细胞释放的TNF- $\alpha$ 、NO、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)以及环氧合酶-2(COX-2)的表达<sup>[12]</sup>。另外,酚酸类成分没食子酸甲酯<sup>[13]</sup>、蒽醌类成分大黄素甲醚<sup>[14]</sup>均具有抗炎作用。

近年来,UPLC-Q/TOF-MS已被广泛应用于中药成分的分离和鉴定<sup>[15]</sup>。其具有较强的分离能力和较高的分辨率,将其运用于中药研究领域对中药成分分析的发展具有极大的促进作用。双荧光素酶报告基因系统在转录活性分析中被广泛应用,它是检测某些转录因子仅与其靶启动子中的特异顺序(顺式作用元件)共价结合的重要手段<sup>[16]</sup>。双荧光素酶报告基因系统具有灵敏性高、误差小、速度快等特点,可作为高通量筛选生物活性物质的快速简便的方法。NF- $\kappa$ B是一种核转录因子,在体内广泛分布并参与调控多种细胞因子、黏附分子和趋化因子等基因的转录激活,即具有转录激活功能的一种蛋白质。其在受到LPS、细胞因子、氧自由基和紫外线等刺激后被激活,可导致促炎细胞因子、NO、氧自由基以及前列腺素等炎性介质的产生,启动炎症反应。本实验运用UPLC-Q/TOF-MS结合双荧光素酶报告基因系统检测NF- $\kappa$ B在BEAS-2B肺上皮细胞中的表达情况,以期筛选出复方芒果叶中的抗炎活性成分。

网络药理学是通过构建“药物-靶点-疾病”的作用网络来分析药物对疾病的干预途径,以期为新药开发提供新的策略<sup>[17-18]</sup>。中医药治疗疾病的整体辨证观与网络药理学的理念吻合,中药复方多成分、多靶点、多途径形成的疾病干预网络调节了机体至平衡状态,从而达到治疗疾病的目的<sup>[19-20]</sup>。本研究运用网络药理学分析预测复方芒果叶多成分、

多靶点、多通路的抗炎网络机制,并基于MAPK通路,验证芒果苷、补骨脂素、人参皂苷Rg<sub>1</sub>的抗炎活性以及协同增效作用。结果提示复方芒果叶是通过多种信号途径发挥抗炎作用,且成分之间可能通过协同增效作用发挥抗炎作用。

本研究基本明确了复方芒果叶的抗炎药效物质基础,揭示复方芒果叶“成分-靶点-通路”的抗炎多重调控机制,初步阐释复方芒果叶及其配伍原则的科学性,为复方芒果叶临床应用提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] Krishnamoorthy S, Honn K V. Inflammation and disease progression [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(3): 481-491.
- [2] 徐慧蓉, 马小兵, 王献华. 肺纤维化相关因子研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2011, 38(10): 1953-1964.
- [3] Wollin L, Maillat I, Quesniaux V, et al. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis [J]. *J Pharmacol Exper Ther*, 2014, 349(2): 209-220.
- [4] 刘颖, 邓家刚, 白钢, 等. 复方芒果叶拮抗博来霉素致小鼠肺纤维化药效学研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 123-127.
- [5] Cheng B F, Hou Y Y, Wang L Q, et al. Dual-bioactivity-based liquid chromatography-coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry for NF- $\kappa$ B inhibitors and  $\beta$ 2AR agonists identification in Chinese medicinal preparation Qingfei Xiaoyan Wan [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(8): 2445-2452.
- [6] 卫智权, 邓家刚, 阎莉, 等. 芒果苷对脂多糖诱导慢性炎症的抗炎作用 [J]. *中国药理与临床*, 2011, 27(2): 43-45.
- [7] 卫智权, 阎莉, 邓家刚, 等. 芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠MAPK通路及血清细胞因子的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 52-58.
- [8] Saha S, Sadhukhan P, Sil P C. Mangiferin: A xanthone with multipotent anti-inflammatory potential [J]. *Biofactors*, 2016, 42(5): 459-474.
- [9] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1391.
- [10] Su P, Du S J, Li H, et al. Notoginsenoside R<sub>1</sub> inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced inflammatory cytokines production in human endothelial EA. hy926 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 770: 9-15.
- [11] 张亚兴, 孙成宏, 叶燕霞, 等. 人参皂苷Rg<sub>1</sub>对小鼠腹

- 腔巨噬细胞的影响 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(10): 894-898.
- [12] Huang G J, Deng J S, Huang S S, *et al.* Bioassay guided isolation and identification of anti-inflammatory active compounds from the root of *Ficus formosana* [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(26): 11008-11015.
- [13] Correa L B, Pádua T A, Seito L N, *et al.* Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: Inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophages [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(6): 1554-1566.
- [14] Hu B, Zhang H, Meng X, *et al.* Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 846-853.
- [15] Cheng X L, Wei F, Xiao X Y, *et al.* Identification of five gelatins by ultra performanceliquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62(2): 191-195.
- [16] 耿德玉, 原媛, 郭华荣. 双荧光素酶报告基因系统的应用研究进展 [J]. 科技资讯, 2012(21): 1.
- [17] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [18] Liu A L, Du G H. Network pharmacology: new guidelines for drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(12): 1472-1477.
- [19] Xue R, Fang Z, Zhang M, *et al.* TCMID: traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 1089-1095.
- [20] Liu Z H, Sun X B. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(6): 696-703.