

三七化学成分分析及其抗炎机制的网络药理学探讨

庞会婷^{1,2}, 罗朵生^{1,2*}, 郭 姣^{1,2}

1. 广东药科大学 广东省代谢病中西医结合研究中心, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 利用超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用 (ultra performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight hybrid mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 分析三七的主要化学成分, 运用网络药理学研究三七抗炎的多成分、多靶标、多途径作用机制。方法 通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析三七的主要化学成分, 使用 DAVID 数据库进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析, 并运用 Cytoscape 3.6.1 软件绘制网络互作图, Image GP 工具绘制 GO 气泡图。结果 研究得到人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rg₁、月桂酸单甘油酯 (monolaurin) 等 22 个关键抗炎作用的活性成分和表皮生长因子受体 (EGFR)、信号传导蛋白和转录激活物 3 (STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶-14 (MAPK14) 等 31 个关键靶点。GO、KEGG 通路富集分析发现, 三七可能主要通过人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rg₁、月桂酸单甘油酯、β-胡萝卜苷 (β-daucosterol) 和人参环氧炔醇 (panaxydol) 等活性成分, 作用于 EGFR、STAT3、MAPK14、白介素-2 (IL-2) 等靶点, 调节癌症信号通路 (Pathways in cancer)、细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)、突触细胞黏附分子 (CAMs) 等信号通路发挥抗炎作用。结论 三七抗炎体现了多成分、多靶点、多途径的特点, 为进一步开展三七抗炎作用药效物质基础和作用机制研究提供了新的思路和方法。

关键词: 三七; UPLC-Q-TOF-MS; 抗炎; 网络药理学; GO 分析; KEGG 分析; 人参皂苷 Rh₁; 人参皂苷 Rg₁; 月桂酸单甘油酯; β-胡萝卜苷; 人参环氧炔醇; 表皮生长因子受体; STAT3; MAPK14; 白介素-2; 癌症信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5538-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.018

Study on chemical constituents of *Notoginseng Radix et Rhizoma* and network pharmacology of its anti-inflammatory mechanism

PANG Hui-ting^{1,2}, LUO Duo-sheng^{1,2}, GUO Jiao^{1,2}

1. Guangdong Metabolic Disease Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Research Center of Liver Regulating for Hyperlipemia, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To analyze the main chemical constituents of *Notoginseng Radix et Rhizoma* (NRR) by ultra performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight hybrid mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and to study on the mechanism of NRR with multi-components, multi-targets, and multi-pathways for the treatment of inflammatory based on network pharmacology. **Methods** The main chemical components in NRR were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS. DAVID database was used to analyze gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto gene and genome encyclopedia (KEGG) pathway analysis. In addition, Cytoscape 3.6.1 software was used to draw network interaction diagrams, and Image GP tool was used to draw GO bubble diagrams. **Results** A total of 22 active components (ginsenoside Rh₁, ginsenoside Rg₁, and monolaurin) of NRR and 31 related targets (EGFR, STAT3, MAPK14) were screened. GO and KEGG pathway enrichment analysis revealed that active components of NRR acted on EGFR, STAT3, MAPK14, IL2 targets, and may regulate pathways in cancer, Cytokine-cytokine receptor Interaction, CAMs and so on. **Conclusion** This study reflects the characteristics of multi-components, multi-targets, and multi-pathways of NRR in the aspect of anti-inflammatory, which may provides new ideas and methodology for further research on NRR.

收稿日期: 2020-05-09

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017B050504005); 广州市科技计划项目 (201803010069)

作者简介: 庞会婷 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药效评价与临床应用研究。E-mail: 1510472975@qq.com

*通讯作者 罗朵生 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: lds0901@163.com

Key words: *Notoginseng Radix et Rhizoma*; UPLC-Q-TOF-MS; anti-inflammatory; network pharmacology; gene ontology enrichment; KEGG analysis; ginsenoside Rh₁; ginsenoside Rg₁; monolaurin; β -daucosterol; panaxydol; EGFR; STAT3; MAPK14; IL-2; pathways in cancer

炎症是机体对各种炎症因子所致的损伤而发生的一种以防御为主的局部组织反应,包括局部组织的变质、变性、充血、坏死、体液和细胞的渗出与组织和细胞的增生,故局部以红肿热痛为主要表现,全身反应多见发热、白细胞增多,单核巨噬细胞增多,以及心脏、肝、肾的变性、坏死和功能障碍^[1]。炎症的持续存在对机体是有害的,在很多重大疾病的发生、发展过程中起着重要作用。市面上已出现多种相关药物如非甾体类抗炎药和甾体类抗炎药,但长期大量使用会引发多种脏器的不良反应,因此在使用过程中有一定的局限性。中药在治疗炎症方面具有疗效较好、毒副作用小等优点,成为研究新热点^[2]。

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的块根,具有止血、散瘀、定痛的功效。常用于治咳血、吐血、衄血、便血、外伤出血、跌打瘀痛、崩漏、产后血瘀腹痛、冠心病心绞痛等,是典型的中药材大品种^[3]。目前,含三七中成药品种共计 455 个,产品数量总计超过 2 000 个。2017 年,中华中医药学会发布了《中药大品种科技竞争力报告(2017 版)》,我国中药品种批准文号近六万个,而入围的中药大品种 548 个,其中有 48 个产品处方组成含三七^[4],高达 8.7%。按照临床治疗领域对 48 个含三七的中成药大品种进行分析,这些产品的临床主要治疗领域较为集中分布在心血管病领域、骨骼肌肉用药和妇科用药 3 个领域,上述疾病的发生、发展均与炎症密切相关,但三七抗炎的具体作用机制尚不明确。

中药具有多成分、多靶点作用特点,导致研究其治病机制时存在困难。网络药理学是以系统生物学为基础,利用生物网络数据库、各种生物网络构建方法和生物网络分析技术,通过网络构建工具,系统阐述“药物-基因-靶点-疾病”之间复杂网络关系的一门交叉学科^[5]。中医药研究的整体观与网络药理学的整体性相契合,将网络药理学的方法应用在中医药研究中已成为趋势。本研究拟将 UPLC-Q-TOF-MS 与网络药理学方法联合,预测三七抗炎活性成分、潜在作用靶点及作用机制,为三七临床应用和基础研究提供新的思路。

1 仪器与材料

Acquity 超高效液相色谱分析系统, Q-Tof micro 高分辨四级杆与飞行时间串联质谱仪(配有 lock-spray 接口), 美国 Waters 公司; Acquity UPLCTM BEH C₁₈ 反相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 美国 Waters 公司; BP210D 分析天平, 德国 Sartorius 公司; DL-360A 超声波清洗器(50 Hz, 400 W), 上海之信仪器有限公司; FRESCO17 低温高速离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Masslynx V4.1 数据软件处理系统, 美国 Waters 公司。

甲醇(HPLC 级), 德国 Merck 公司; 乙腈(UPLC 级), 德国 Merck 公司; Lockmass 脑啡肽(质量分数 $\geq 95\%$), 美国 Sigma 公司, 批号 L9133-50MG; 超纯水(优级), 屈臣氏; 甲酸(色谱纯), 德国 CNW 科技公司; 甲酸铵, Aladdin 公司, 批号 41470。

2 方法

2.1 三七化学成分分析

三七于云南文山采集, 经广东药科大学滕希峰副教授鉴定为五加科人参属植物三年生三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen。取三七 10 g, 粉碎, 过 5 号筛, 得药材粉末。精密称取三七粉末 0.3 g, 置锥形瓶中, 加入 60% 甲醇 1.5 ml, 超声 1 h, 吸取粗提液至离心管中, 离心 5 min(转速 12 000 r/min、温度 20 $^{\circ}$ C)。随后取适量上清液至进样瓶中, 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

色谱条件: 色谱系统为 Waters Acquity UPLC/Q-TOF Micro MS; 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 反相柱; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L; 体积流量 0.3 mL/min; 二元梯度洗脱, 流动相为 0.2 mol/L 甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)-乙腈; 梯度洗脱条件: 0~1.0 min, 2% 乙腈; 1.0~2.0 min, 2%~10% 乙腈; 2.0~5.1 min, 10%~25% 乙腈; 5.1~6.1 min, 25%~32% 乙腈; 6.1~8.1 min, 32%~38% 乙腈; 8.1~8.6 min, 38% 乙腈; 8.6~9.1 min, 38%~50% 乙腈; 9.1~9.6 min, 50%~55% 乙腈; 9.6~12.5 min, 55% 乙腈; 12.5~14.0 min, 55%~70% 乙腈; 14.0~16.1 min, 70%~100% 乙腈; 16.1~18.5 min, 100% 乙腈。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺):

毛细管电压 (capillary): 2 800 V, 锥孔电压 (sample cone): 20 V, 离子源温 (source temperature) 100 °C, 脱溶剂温度 (desolvation temperature) 350 °C, 脱溶剂 N₂ 体积流量为 500 L/h, 锥孔反吹 N₂ 体积流量为 50 L/h, 脱溶剂气为 N₂, 碰撞气体为 Ar; 采用 Lock mass 通路对实验数据采集进行实时校正, Lock mass 对照品溶液为脑啡肽 (10 µg/mL), 校正切换频率为 10 次/s, 扫描范围为 m/z 50~1 500。正离子模式下的 Lock mass 分别为 m/z 556.277 1^[6]。

根据 UPLC-TOF-MS 获得相应色谱峰对应化合物的精确相对分子质量, 得到化合物的分子式, 并通过文献进行对比, 对化合物进行定性分析, 筛选得到三七化学成分, 然后在 Pubchem 数据库中查询 Canonical SMILES 号。

2.2 三七作用靶点预测

通过查询 Swiss Target Prediction^[7]数据库, 将获得的 Canonical SMILES 号上传, 点击 Predict targets 进行分析, 输出化合物靶点信息^[8]。将得到的化合物靶点信息导入 Uniport^[9]数据库中, 选择物种为 “Homo Sapiens”, 进行批量标准化, 将审核过的基因下载。将审核过的三七主要活性成分的靶点与 CTD^[10]、Genecards^[11]数据库中查询到的与抗炎 (anti-inflammatory) 有关的靶点进行对比分析, 筛选出三七主要活性成分抗炎的潜在靶点。

2.3 蛋白-蛋白相互作用网络构建 (PPI)

将所得三七抗炎的潜在靶点导入 String^[12]数据库, 选择 “Multiple protein”, 物种选择为 “人源”, 得到蛋白相互作用关系, 导出相关数据并导入

Cytoscape 软件, 根据 score 值和 degree 值设定 node 和 edge 的颜色和大小粗细, 最后得到蛋白相互作用网络图。

2.4 GO 功能与模块分析、KEGG 富集通路分析

将筛选出的三七抗炎的潜在靶点输入 DAVID (the database for annotation, visualization and integrated discovery) 数据库进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析^[13]和基因本体 (gene ontology, GO) 生物学过程分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 得到相关分析结果。将 DAVID 数据库得到的 GO 富集分析结果导入 image GP 数据库, 得到 GO 分析结果。运用 “MCODE” 插件对所有具有统计学意义的 GO 生物过程聚类分析。

2.5 三七提取物活性成分-靶点-通路网络构建

采用 Cytoscape 3.6.1 软件中的 Merge 功能, 构建三七提取物活性成分-靶点-通路网络图。其中, 节点代表活性成分、靶点和信号通路, 边用来连接活性成分、靶点和信号通路。

3 结果

3.1 三七主要化学成分

通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 得到三七总离子流图, 见图 1。显示主要有 38 个色谱峰, 通过质谱提供的化合物相对分子质量信息, 并与已知文献进行对比, 总共得到 22 化合物, 主要包括月桂酸、monolaurin、 β -daucosterol、人参皂苷 Rh₁、人参皂苷 Rg₁ 等。具体成分见表 1。

3.2 活性成分靶点预测

按照方法 “2.2” 项中的方案, 将审核过的 725

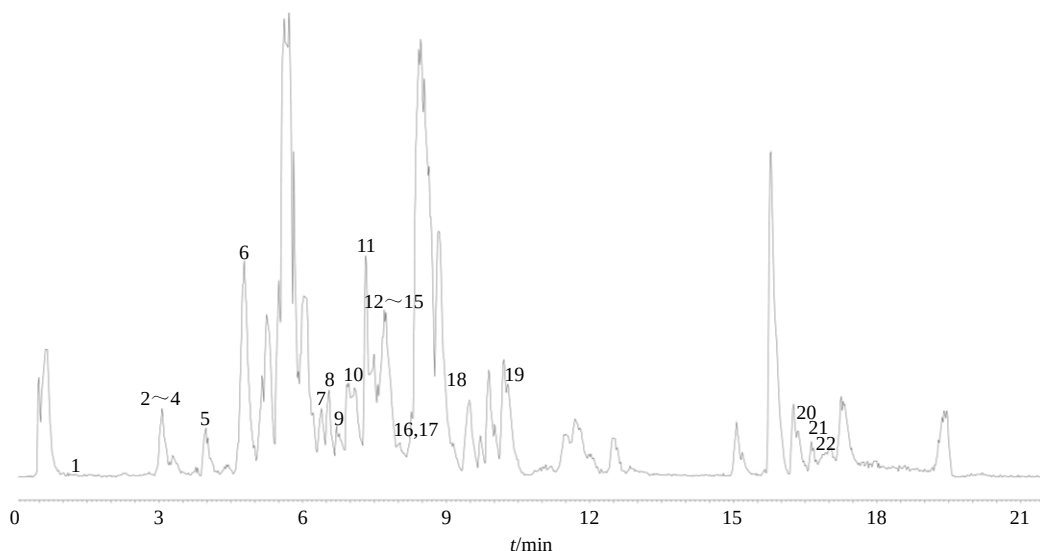


图 1 三七化学成分分析液质总离子流图

Fig. 1 Chemical composition analysis of NRR liquid total ion flow diagram

表 1 三七主要化学成分

Table 1 Main chemical constituents of NRR

编号	t/min	m/z	化学式	成分	编号	t/min	m/z	化学式	成分
1	1.211	286.047 729	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	kaempferol	12	7.782	1 446.475 464	C ₅₃ H ₉₀ O ₄₅	sanchinan A
2	2.989	302.235 700	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetin	13	7.789	638.439 392	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	ginsenoside Rh ₁
3	3.008	267.096 741	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	adenosine	14	7.844	576.438 965	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	β-daucosterol
4	3.104	260.177 643	C ₁₇ H ₂₄ O ₂	falcarindiol	15	7.844	622.444 458	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	ginsenoside Rh ₂
5	3.982	200.177 628	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	lauric acid	16	7.958	784.497 314	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	ginsenoside F ₂
6	4.762	274.214 417	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	monolaurin	17	7.983	784.497 314	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	ginsenoside Rg ₃
7	6.396	933.131 000	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	ginsenoside R ₁	18	9.053	476.386 566	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	20(R)-protopanaxatriol
8	6.572	770.481 628	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	notoginsenoside R ₂	19	10.382	278.188 202	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	panaxytriol
9	6.887	962.545 044	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	notoginsenoside R ₆	20	16.458	416.680 000	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	γ-tocopherol
10	7.159	800.492 188	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	ginsenoside Rg ₁	21	16.706	414.386 169	C ₂₉ H ₅₀ O	sitosterol
11	7.372	946.550 110	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	ginsenoside Re	22	16.912	260.177 643	C ₁₇ H ₂₄ O ₂	panaxydol

个靶点下载,再应用 GeneCards 数据库搜索与抗炎(anti-inflammatory)相关的靶点有 11 564 个,CTD 数据库搜索相关靶点有 43 541 个,2 个数据库重复靶点有 10 154 个。与上述 725 个靶点对比分析后,得到 31 个三七抗炎的潜在作用靶点。主要包括表皮生长因子受体(EGFR)、信号传导蛋白和转录激活物 3(STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶-14(MAPK14)、白介素-2(IL-2)等。详见表 2。

表 2 三七抗炎作用潜在靶点

Table 2 Potential target of anti-inflammatory action of NRR

序号	Uniprot ID	靶点	序号	Uniprot ID	靶点
1	P04229	HLA-DRB1	17	P51681	CCR5
2	P35228	NOS2	18	P03956	MMP1
3	P09917	ALOX5	19	P37231	PPARG
4	Q16539	MAPK14	20	P04150	NR3C1
5	P00533	EGFR	21	P78536	ADAM17
6	P08183	ABCB1	22	Q9Y2R2	PTPN22
7	P32246	CCR1	23	P04439	HLA-A
8	P10721	KIT	24	P05164	MPO
9	P35354	PTGS2	25	P02766	TTR
10	P23219	PTGS1	26	P00813	ADA
11	P14780	MMP9	27	P05231	IL6
12	P60568	IL2	28	P19320	VCAM1
13	P40763	STAT3	29	P16581	SELE
14	P01375	TNF	30	Q13093	PLA2G7
15	O60674	JAK2	31	P10145	CXCL8
16	P05362	ICAM1			

3.3 蛋白-蛋白相互作用网络构建

按照方法“2.3”项中的方案,最后得到蛋白相互作用网络图,见图 2。由图 2 可知,该网络图中包含有 31 个靶点、225 条边,degree 值越大,节点越大,而 combined score 值越大,边越粗,其中具有较大度值(degree 值>15)的蛋白质有 IL6、TNF、IL2、ICAM1、CXCL8 等。通过网络图,可以直观的发现化合物与靶点之间复杂的互作关系,进一步表征了三七通过多成分、多靶点的协同调控减缓炎症的作用特点。

3.4 靶点生物学功能注释

通过 Image GP 的 GO Enrichment Plot 插件对三七抗炎潜在靶点进行 GO 生物学功能分析,结果见

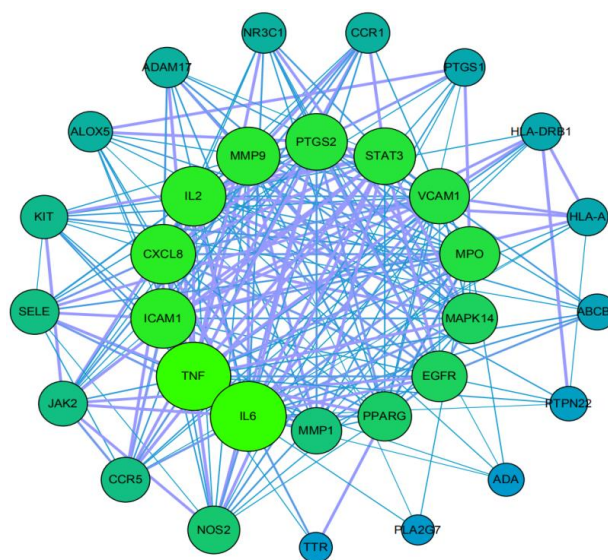


图 2 靶点间相互作用网络

Fig. 2 Interaction network among targets

图 3。GO 分析有 3 个分支，共富集到 23 条参与三七抗炎的生物学过程，主要包括炎症反应的调节、免疫系统发育、抗氧化活性、脂质结合、铁离子结

合、血红素结合、细胞迁移的正调控、过氧化物酶活动等。这些靶点通过参与炎症反应的过程，减缓炎症的发生、发展。

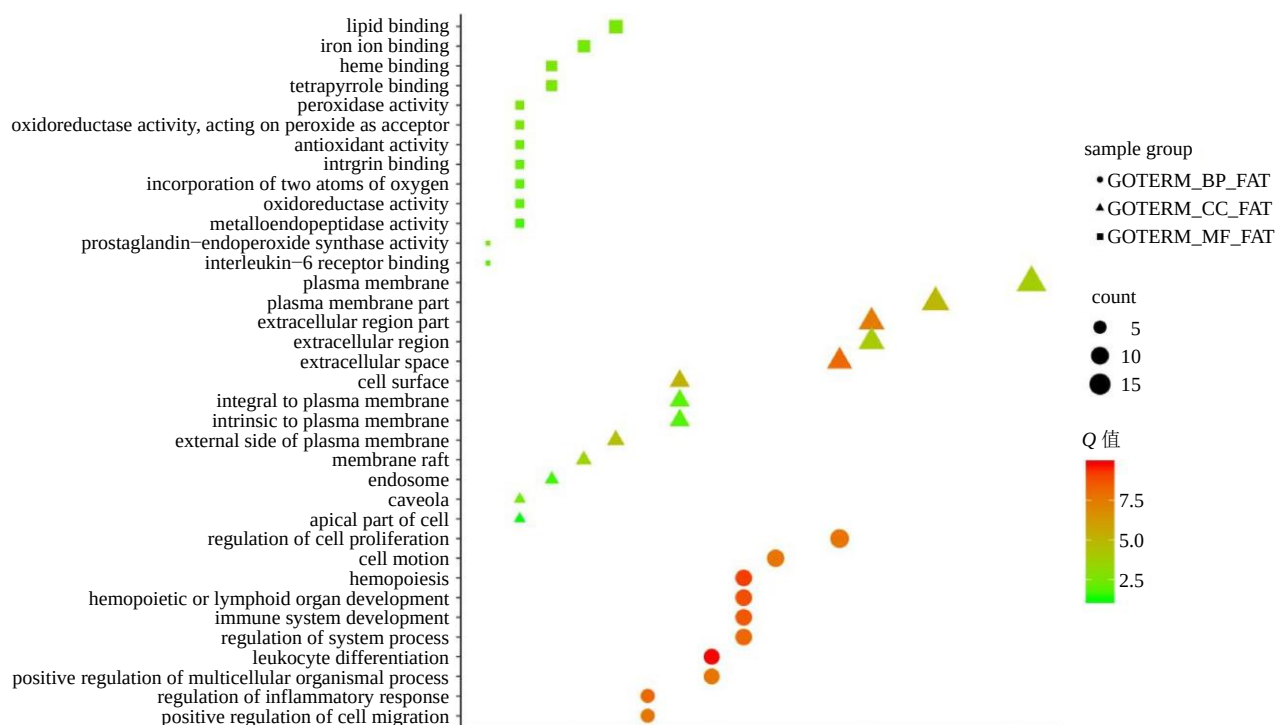


图 3 GO 生物学功能分析

Fig. 3 GO biological function analysis

3.5 潜在靶点 GO 生物过程模块分析子簇图

随着系统生物学研究的深入，发现生物分子并不以单体的形式进行工作，而通常是通过由相互作用的模块 (module) 组成的分子网络进行工作^[14]。按照 MCODE 聚类分析算法将 GO 生物过程进行模块分析，筛选得到 K-Core ≥ 2 的 9 个聚类模块 (图 4)，依次是核酸分解代谢过程、脂质代谢过程、毛发循环过程、生物体之间的种间相互作用、离子稳态、多细胞生物繁殖、昼夜睡眠/觉醒周期过程、免疫系统过程、解剖结构形态发生等生物过程。

3.6 KEGG 富集通路分析

将 31 个三七抗炎的潜在靶点输入 DAVID 进行 KEGG 通路富集分析。以 $P < 0.05$ 为筛选条件，发现有 20 条通路被富集 (图 5)。主要包括免疫系统：TLRs、Chemokine signaling pathway、NLR、Leukocyte transendothelial migration、Graft-versus-host disease，内分泌系统：Adipocytokine signaling pathway，信号转导：Jak-STAT signaling pathway，信号分子和相互作用：CAMs、Cytokine-cytokine receptor interaction，癌症通路：Pathways in cancer

等。上述通路中目前报道与炎症相关的主要有 Pathways in cancer、TLRs、Chemokine signaling pathway、Adipocytokine signaling pathway、Jak-STAT、NLR、CAMs。

3.7 三七活性成分-靶点-通路网络构建

按照方法“2.5”项中的方案构建三七活性成分-靶点-通路网络，由图 6 可知该网络有 73 个节点，包括 22 种成分、31 个靶点、20 条通路和 221 条边，节点越大，说明度值越大，与其相连的节点数越多，其中人参皂苷 Rg_1 、 Rh_1 及 monolaurin、 β -daucosterol 和 panaxydol 等度值较大，表明其是抗炎的重要活性成分。另外，靶点节点越大，靶点度越大，与其相连的成分越多，图中 EGFR、STAT3、MAPK14、IL2 等靶点节点较大，可能是三七发挥抗炎作用的重要靶点。其中 Pathways in cancer、Cytokine-cytokine receptor interaction、CAMs、Graft-versus-host disease 4 条通路节点较大，可能是三七发挥抗炎作用的重要通路。

4 讨论

以“三七”为关键词，通过 CNKI 检索 2009—

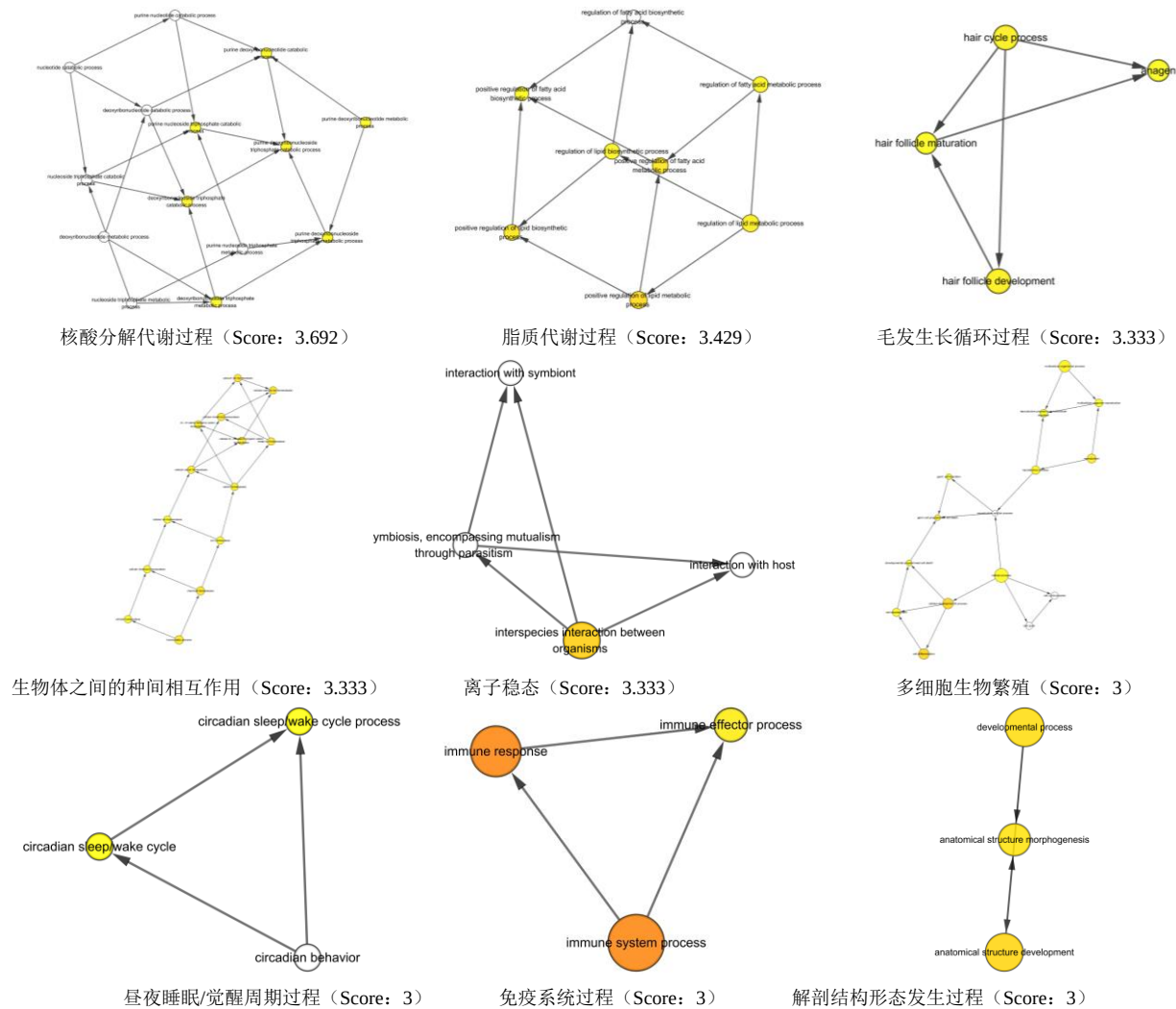


图 4 潜在靶点 GO 生物过程模块分析子簇图

Fig. 4 Subcluster diagram of potential target GO biological process module

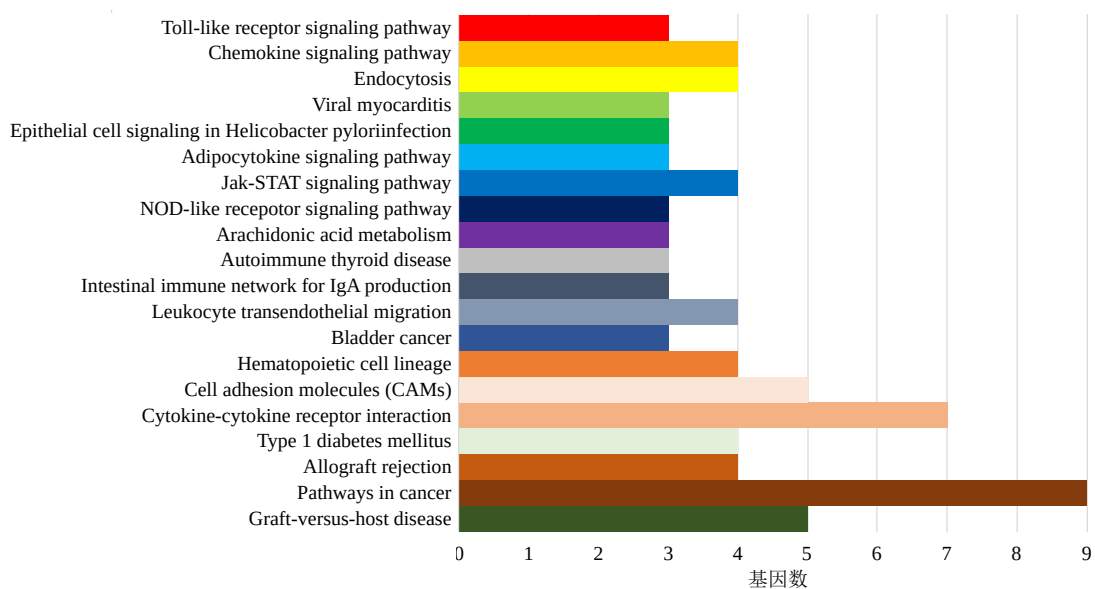


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

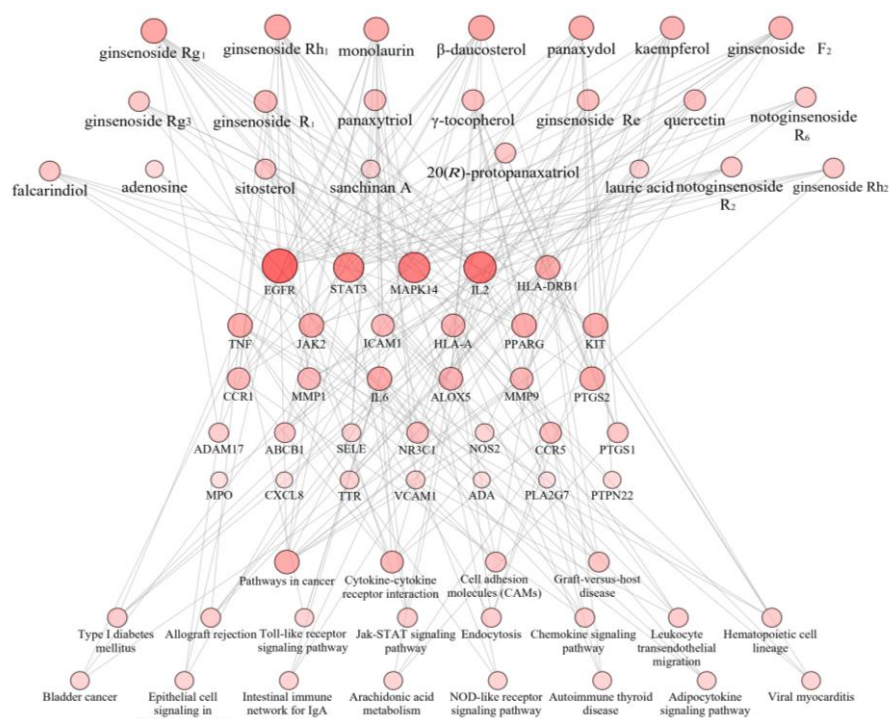


图 6 成分-靶点-通路图

Fig. 6 Compound-target-pathway network of NRR

2019 年发表的文献共计有 2 651 篇, 可见三七是研究热点。既往有关三七药效作用及机制的研究多集中在心脑血管疾病领域, 如冠心病、动脉粥样硬化、缺血性脑损伤等, 未见有探讨三七主要活性成分抗炎作用网络药理学研究的报道。炎症, 是多细胞生物的一种基本的“生命保险”机制, 但慢性炎症反应通常是有害的^[15]。因此, 研究三七主要活性成分抗炎作用机制, 对进一步扩大三七应用范围具有重要意义。

4.1 三七抗炎活性成分

以往三七抗炎作用相关的研究多集中在三七总皂苷上, 本实验通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析显示三七主要成分有 22 种, 其中人参皂苷 Rg₁、Rh₁ 及月桂酸单甘油酯 (monolaurin)、β-胡萝卜素 (β-daucosterol) 和人参环氧炔醇 (panaxydol) 等度值较大, 可能是三七抗炎的主要成分。

人参皂苷 Rg₁ 为三七总皂苷的主要成分, 任周新等^[16]研究发现, 三七总皂苷 (PNS) 通过抑制缺血脑组织中 TNF-α、IL-1β、ICAM-1 和 IL-8 的含量, 抑制中性粒细胞的趋化运动, 从而减少其在缺血脑组织的浸润和活化, 减轻脑组织损伤。姜辉等^[17]在肝纤维化小鼠研究中发现, PNS 能降低促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-1、TGF-β 的表达, 升高抑炎因子

IL-10 的表达从而缓解炎症的发展。Choi 等^[18]研究发现, 人参皂苷 Rh₁ 抑制炎症的作用与减少 MAPK 的磷酸化和激活以及 PKB/Akt 的激活有关。Zheng 等^[19]研究人参皂苷 Rh₁ (20 mg/kg) 对唑酮诱导的小鼠皮肤炎症的作用, 结果表明人参皂苷 Rh₁ 能明显抑制血清总白细胞介素-E (IL-E) 的水平, 减轻炎症特异性皮炎症状。张春晶等^[20]利用卵蛋白诱导小鼠哮喘模型, 通过检测小鼠血清中免疫球蛋白 IgE 和 IgG 的变化, 以及支气管肺泡冲洗液中的 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 的变化, 证实了人参皂苷 Rh₁ 对哮喘小鼠具有抑制炎症因子表达、调节免疫反应和改善肺组织病理变化的作用。赵敏洁^[21]在月桂酸单甘油酯对高脂膳食饲喂小鼠脂代谢紊乱的调节作用的研究中, 表明月桂酸单甘油酯能显著降低血清 TNF-α 和 IL-6 水平, 缓解高脂膳食诱发的低度系统炎症。

可见现有文献报道三七抗炎作用以人参皂苷 Rg₁、Rh₁ 和 monolaurin 较为多见, β-daucosterol、panaxydol 等的较少, 其抗炎的药效和作用机制, 同样值得进一步研究。

4.2 三七抗炎潜在作用靶点

由靶点蛋白相互作用网络图可知, EGFR、STAT3、MAPK14、IL-2 靶点节点较大, 与其相连的成分较多, 可能成为三七抗炎的主要潜在靶点。

研究发现白头翁汤能降低结肠组织的 EGFR 水平,并在干预早期控制小鼠肠道炎症发展,可能是通过下调 EGFR 抑制 PI3K-AKT 信号通路的激活,促进细胞凋亡,从而避免了继发的炎症反应^[22]。STAT3 是炎症发展过程中的重要节点,可通过介导炎症介质的细胞外信号调控肿瘤细胞、免疫细胞等的生物学行为,是慢性炎症促进肿瘤发生及肿瘤相关性炎症形成过程中不可或缺的关键性分子^[23]。MAPK14 即 p38 α 是 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 家族成员之一。MAPK14 作为 MAPK 家族中的重要成员之一,其表达异常可致机体生理功能紊乱,引发机体免疫功能失调,导致许多疾病的发生,与炎症反应密切相关。当机体受到不同的理化因素、炎症因子、脂多糖、紫外照射等刺激后,可通过活化 MAPK14 蛋白来激活 p38MAPK 通路,从而启动炎症级联反应^[24]。IL-2 是一种刺激细胞生长的因子,可以维持细胞的生存和抑制细胞凋亡,在机体免疫反应及细胞存活中扮演至关重要的角色。在免疫细胞中,IL-2 与 IL-2 受体相结合激活 Jak/STAT 信号通路、PI3K/Akt 信号通路和 MEK/ERK 信号通路,与炎症的发生密切相关^[25]。Dagenais-Lussier 等^[26]发现在 HIV-1 感染期间,持续的炎症与代谢活性的增强有关,代谢活性增强产物会通过 IL2 信号传导损害记忆性 CD4⁺ T-cells。

本研究发现人参皂苷 Rg₁、Rh₁ 和月桂酸单甘油酯等药效成分可与 EGFR、STAT3、MAPK14、IL2 等多个靶点形成相互作用,上述靶点在炎症的发生、发展中具有重要作用,但目前关于三七作用于上述靶点的研究报道尚不丰富,因此,后期可针对上述靶点进一步开展相关研究,为拓展三七应用范围提供依据。

4.3 三七抗炎分子机制

通过通路分析,本研究发现三七抗炎作用与癌症信号通路 (pathways in cancer)、细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor Interaction)、突触细胞黏附分子信号通路 (cell adhesion molecules, CAMs) 等密切相关。

4.3.1 癌症信号通路 癌症信号通路包含了与肿瘤形成 15 个信号转导通路特定标志物基因。其中 NF- κ B 通路、Cox-2 通路、STAT 通路与炎症的发生发展密切相关。NF- κ B 在癌症方面是一把双刃剑。一方面,NF- κ B 的激活是免疫防御的一部分,免疫细胞和抗癌细胞具有强活性时,会伴随着 NF- κ B 的

完全活化,靶向作用并消除转化细胞^[27]。另一方面,在许多类型的癌症中 NF- κ B 基本都处于激活状态,并且可以发挥多种促肿瘤发生功能。炎症反应的生理应激使 NF- κ B 活化,通常又导致抗凋亡基因的上调,从而提供细胞存活机制^[28]。STAT3 通路的过度活化能够诱导肿瘤的促炎微环境,与 IL-11 本身具有的抗炎作用相反,研究发现在 IL-11 受体基因缺失后,STAT3 激活作用减弱,并抑制了肿瘤细胞的增殖^[29]。研究表明 STAT3 的持续激活与乳腺癌、肺癌、宫颈癌等密切相关^[30]。Cox-2 与脂肪肉瘤^[31]、肾癌^[32]、胰腺癌^[33]等肿瘤的发生发展密切相关。

结合成分-靶点-通路网络可见癌症信号通路主要参与靶点为 EGFR、IL6 和 STAT3。其中人参皂苷 Rg₁、Rh₁ 及月桂酸单甘油酯、 β -胡萝卜素和人参环氧炔醇为 EGFR 相关的主要活性成分。月桂酸单甘油酯是与 IL6 相关的主要活性成分;人参皂苷 Rg₁、Rh₁ 和 β -胡萝卜素是与 STAT3 相关的主要活性成分。EGFR 的激活可致使细胞内酪氨酸激酶磷酸化,从而启动一连串的细胞内信号途径,包括 Ras-MAPK、PI3K-AKT 和 STAT 信号传导途径^[34]。这些信号传导途径在肿瘤细胞侵袭,转移和凋亡过程中起重要作用。STAT3 是信号转导和转录活化因子家族的重要成员之一,因其可介导细胞的恶性转化和肿瘤的生成而被确认为癌基因^[35-36]。STAT3 作为 EGFR 的下游信号蛋白之一,EGFR 激活后能促进 STAT3 磷酸化,进而促进肿瘤细胞生存。炎症因子 IL-6 通过活化 STAT3 信号通路,诱导 SOCS3 基因甲基化,进而导致 STAT3 通路失衡及持续活化^[37]。本研究结果为三七抑制肿瘤发展过程中的慢性炎症提供了新思路。

4.3.2 细胞因子受体相互作用 细胞因子是一种可溶性多肽,能够广泛参加机体的生理病理状态,影响机体的多种生物效应。KEGG 分析显示^[13],细胞因子受体相互作用差异基因主要涉及的信号通路出现在趋化因子家族和 TNF 家族中。

趋化因子属 G 蛋白偶联受体超家族成员,其主要作用是信号传递,广泛表达于内皮细胞、上皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞中^[38]。在炎症的发生过程中,血液中的淋巴细胞表面可表达不同类型的趋化因子和黏附因子受体,这些受体能够识别内皮细胞上表达的趋化因子和黏附因子蛋白,从而引起淋巴细胞构象改变,从而可穿过上皮细胞的单细胞层进入组织,并启动趋化因子信号梯度而发挥抗炎作

用^[39]。许多抑郁症患者的相应脑区都存在炎症反应,而介导炎症反应的趋化因子在其中发挥重要作用。趋化因子与抑郁症涉及的神经可塑性、单胺类神经递质减少及神经内分泌系统密切相关^[40]。

TNF作为一种重要的细胞因子,可诱导细胞内多种信号通路,包括凋亡、细胞存活、炎症、免疫等。被激活的TNF可与TNFR1, TNFR2结合,导致TNFR1或TNFR2的三聚体化。TNFR1信号可诱导许多基因的激活,主要受NF- κ B途径和MAPK级联两种不同的途径控制;TNFR2信号通路激活NF- κ B通路,包括PI3K依赖性NF- κ B通路和JNK通路,与炎症的发生发展密切相关。结合成分-靶点-通路网络可见细胞因子受体相互作用通路主要参与靶点是EGFR、IL6、IL2和TNF。其中IL6、IL2和TNF与NF- κ B密切相关,是细胞因子受体相互作用中的重要调控靶点。目前,有关三七介导NF- κ B的相关研究主要集中在心血管疾病领域,为下一步将三七应用范围拓展到抑郁症、溃疡性结肠炎、关节炎等疾病提供了线索。

4.4.3 CAMs CAMs是一类跨突触锚定的膜表面糖蛋白,在包括止血、免疫反应、炎症、胚胎发生和神经组织发育在内的一系列生物过程中起着关键作用。结合成分-靶点-通路网络可见CAMs通路主要参与靶点是HLA-DRB1和ICAM1。与HLA-DRB1相关的化学成分度值较小未做讨论。

ICAM-1又名CD54,属于黏附分子中免疫球蛋白超家族中的成员,是介导黏附反应的一个重要黏附分子。大量研究表明,ICAM-1是心血管功能的关键调节因子,在心血管疾病的发生和发展中起着重要作用。此外,有研究表明ICAM-1在呼吸道炎症中也发挥着重要作用,ICAM-1/LFA-1的相互作用使炎症细胞与血管内皮细胞黏附并募集浸润至哮喘患者的支气管,启动哮喘气道炎症和气道高反应性^[41]。本研究通过分析发现作用于ICAM1的主要成分为月桂酸单甘油酯和 β -胡萝卜素,但目前关于三七及其上述主要活性成分治疗呼吸道疾病的文献报道较少,为下一步将三七应用于呼吸道疾病发展过程中炎症的控制提供了新思路。

综上,本研究在分析三七主要化学成分的基础上,运用网络药理学的方法预测三七抗炎作用的潜在靶点及机制,发现人参皂苷Rh₁、Rg₁及monolaurin、 β -daucosterol等抗炎活性成分,EGFR、STAT3、MAPK14、IL2等潜在靶点和癌症信号通路、

细胞因子受体相互作用、CAMs等关键信号通路,为进一步开展三七抗炎机制研究和拓展临床应用提供依据。本研究也存在一些不足之处。因数据库中数据不够全面,获取的作用靶点不够精确等局限性,难以完全反映整体状况,且预测出的很多新靶点也需进一步的实验验证才更具说服力。

参考文献

- [1] 王翔朴. 卫生学大辞典 [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [2] 李鑫波, 谢晓丽. 中药皂苷类成分抗炎作用的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 1008-1016.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 李耿, 程煜华, 郭宇博, 等. 中药大品种科技竞争力报告 (2017版) [J]. 中国现代中药, 2018, 20(1): 6-13.
- [5] 邢心睿, 吕狄亚, 柴逸峰, 等. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2018, 36(2): 97-102.
- [6] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于UPLC/Q-TOF MS技术的白术药材化学成分快速识别研究 [J]. 质谱学报, 2015, 36(1): 72-77.
- [7] Swiss Target Prediction. Swiss institute of Bioinformatics [DB/OL]. [2019/10/1]. <http://www.swisstargetprediction.ch/>
- [8] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. Swiss target prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W32-W38.
- [9] UniProt Consortium. UniProt. [DB/OL]. [2019/10/1]. <http://www.uniprot.org/>.
- [10] CTD (Comparative Toxicogenomics Database) [DB/OL]. [2019/10/1]. <http://ctdbase.org/>.
- [11] GeneCard. [DB/OL]. [2019/10/1]. <https://www.genecards.org/>.
- [12] String homepage. [DB/OL]. [2019/10/1]. <https://string-db.org/>.
- [13] Kegg Ligand Database. Kyoto University [EB/OL]. [2019/11/1]. <https://www.genome.jp/kegg/>.
- [14] 李延恩. 蛋白质相互作用网络的模块结构辨识 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [15] Schultze J L, Rosenstiel P. Systems medicine in chronic inflammatory diseases [J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 608-613.
- [16] 任周新, 孙建宁, 赵辉, 等. 三七总皂苷对MCAO大鼠脑组织中性粒细胞浸润及相关炎症因子的抑制作用 [J]. 中成药, 2009, 31(9): 1345-1347.
- [17] 姜辉, 汪永忠, 刘晓闯, 等. 三七总皂苷对肝纤维化大鼠细胞因子的影响 [J]. 中药材, 2013, 36(7): 1123-1127.

- [18] Choi Y J, Yoon J H, Cha S W, *et al.* Ginsenoside Rh1 inhibits the invasion and migration of THP-1 acute monocytic leukemia cells via inactivation of the MAPK signaling pathway [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(6): 911-919.
- [19] Zheng H, Jeong Y J, Song J M, *et al.* Oral administration of ginsenoside Rh₁ inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 511-518.
- [20] 张春晶, 李淑艳, 赵容杰, 等. 人参皂苷 Rh₁ 对哮喘模型小鼠炎症因子表达的抑制作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1): 163-167.
- [21] 赵敏洁. 基于多组学策略研究月桂酸单甘油酯对高脂膳食饲喂小鼠脂代谢的调节作用及机制 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [22] 缪志伟, 徐 艳, 宁丽琴, 等. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎分子机制的网络药理学分析及初步验证 [J/OL]. 中国中药杂志, 2020-05-04. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20191112.406>.
- [23] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 798.
- [24] 邢译文, 刘 鑫, 周林林, 等. miR-638 慢病毒载体的构建及其对 MAPK14 的靶向调控作用 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(9): 782-786.
- [25] 马洁娴. 白介素 2 联合地塞米松治疗气道过敏性炎症性疾病及其机制的探索 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [26] Dagenais-Lussier X, Aounallah M, Mehraj V, *et al.* Kynurenine reduces memory CD4 T-cell survival by interfering with interleukin-2 signaling early during HIV-1 infection [J]. *J Virol*, 2016, 90(17): 7967-7979.
- [27] Zou Y F, Li S H, Wu D, *et al.* Resveratrol promotes trophoblast invasion in pre-eclampsia by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2702-2710.
- [28] 李 歆. 雷公藤红素调控 NF- κ B 信号通路抑制 AKT/c-Met 诱导小鼠肝细胞癌作用机制初步研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [29] Putoczki T L, Thiem S, Loving A, *et al.* Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2): 257-271.
- [30] Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* STATs in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2474-2488.
- [31] 周张孜. COX-2 在脂肪肉瘤中的表达与预后的相关性研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2018.
- [32] 朱佳斌. 环氧木香内酯抑制肾癌细胞中 COX-2 表达机制的研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2018.
- [33] 孙 曦. 炎症介质 COX-2 表达与胰腺癌生物学特征的相关性研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2012.
- [34] Huang T T, Wang L, Liu D, *et al.* FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1 [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1501-1512.
- [35] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 798.
- [36] Yu H, Lee H, Herrmann A, *et al.* Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 736.
- [37] 储勤军. SOCS3 介导的 IL6/STAT3 炎症通路在结直肠癌发生发展中的作用及机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [38] Goldschmidt I, Karch A, Mikolajczyk R, *et al.* Immune monitoring after pediatric liver transplantation-the prospective ChilSFree cohort study [J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 1-9.
- [39] Naveca F G, Pontes G S, Chang A Y H, *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine already linked to neuronal damage [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2018, 113(6): e170542.
- [40] 郑清炼, 楚世峰, 任 倩, 等. 趋化因子与抑郁症关系的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 615-619.
- [41] Grzelewska-Rzymowska I, Pietrzkowicz M. Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation [J]. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2004, 16(92): 179-182.