

基于 UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学及分子对接 研究宽叶山蒿抗炎药效物质基础和作用机制

陈乐¹, 朱芸芸¹, 康利平², 郭超伟¹, 汪喻巧¹, 李双鸽¹, 杜鸿志^{1,2*}, 刘大会^{1*}

(1. 湖北中医药大学 中药资源中心, 湖北 武汉 430065;

2. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

摘要 基于对宽叶山蒿不同萃取组分的化学成分分析以及抗氧化和抗炎作用评价, 结合网络药理学、分子对接技术探讨宽叶山蒿发挥抗炎作用的药效物质和分子作用机制。采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术鉴定出宽叶山蒿 32 个化学成分, 其中水组分 7 个、正丁醇组分 21 个、乙酸乙酯组分 22 个; 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐自由基 (ABTS) 及铁离子自由基 (FRAP) 法测定不同萃取组分的抗氧化活性, 采用脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型, 以细胞上清液中一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平及细胞中相关炎症因子 mRNA 表达量为指标评价抗炎作用。结果表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分为其最佳抗氧化、抗炎活性组分。网络药理学分析结果显示, 鼠李黄素、异泽兰黄素、棕矢车菊素、木犀草素、泽兰黄酮等黄酮类成分可作用于 TNF、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、胱天蛋白酶-3 (CASP3) 和表皮生长因子受体 (EGFR) 等关键核心靶点, 通过调节磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-AKT)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路发挥抗炎作用。分子对接结果进一步显示上述核心成分与核心靶点间均具有良好的结合性能。该研究初步阐明了宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎的药效物质及作用机制, 为后续的临床应用和药物开发提供了依据。

关键词 宽叶山蒿; 乙酸乙酯组分; UPLC-Q-TOF-MS; 抗炎; 网络药理学; 分子对接; 分子机制

Anti-inflammatory material basis and mechanism of *Artemisia stolonifera* based on UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology and molecular docking

CHEN Le¹, ZHU Yun-yun¹, KANG Li-ping², GUO Chao-wei¹, WANG Yu-qiao¹, LI Shuang-ge¹, DU Hong-zhi^{1,2*}, LIU Da-hui^{1*}

(1. Resource Center for Chinese Materia Medica, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] This study aimed to explore the anti-inflammatory material basis and molecular mechanism of *Artemisia stolonifera* based on the analysis of the chemical components in different extracted fractions of *A. stolonifera* and their antioxidant and anti-inflammatory effects in combination with network pharmacology and molecular docking. Thirty-two chemical components were identified from *A. stolonifera* by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). Among them, there were 7, 21 and 22 compounds in water, *n*-butanol and ethyl acetate fractions, respectively. The antio-

收稿日期 2023-01-03

基金项目 江西中医药健康产业研究院科技项目; 国家中医药管理局青年岐黄学者项目; 湖北省教育厅高校优秀中青年科技创新团队项目 (T2021008); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

通信作者 * 刘大会, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源与中药质量评价, E-mail: liudahui@hbtc.edu.cn; * 杜鸿志, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制, E-mail: dhz3163@hbtc.edu.cn

作者简介 陈乐, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制, E-mail: chenle9169@163.com

oxidant capacity of different extracted fractions was evaluated by measuring their scavenging ability against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radicals and total antioxidant capacity [ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay]. The inflammatory model of RAW264.7 cells was induced by lipopolysaccharide (LPS), and the levels of nitrite oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in the supernatant and the mRNA expression of related inflammatory factors in cells were used to evaluate the anti-inflammatory effects. The results revealed that ethyl acetate fraction of *A. stolonifera* was the optimal antioxidant and anti-inflammatory fraction. By network pharmacology, it was found that flavonoids such as rhamnazin, eupatilin, jaceosidin, luteolin and nepetin could act on key targets such as TNF, serine/threonine protein kinase 1 (AKT1), tumor protein p53 (TP53), caspase-3 (CASP3) and epidermal growth factor receptor (EGFR), and regulate the phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways to exert the anti-inflammatory effects. Molecular docking further indicated excellent binding properties between the above core components and core targets. This study preliminarily clarified the anti-inflammatory material basis and mechanism of ethyl acetate fraction of *A. stolonifera*, providing a basis for the follow-up clinical application of *A. stolonifera* and drug development.

[Key words] *Artemisia stolonifera*; ethyl acetate fraction; UPLC-Q-TOF-MS; anti-inflammation; network pharmacology; molecular docking; molecular mechanism

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230224.201

九牛草始载于宋代《本草图经》“九牛草,生筠州山岗上”,明、清本草也有收载,但其基原植物一直不甚清楚,所以近、现代本草未再继续记载。本团队通过对古代文献著作中九牛草的本草文图考证、实地调查取样,并查阅中国科学院植物研究所标本馆藏蒿属标本,考证认为古代本草记载九牛草基原植物应为菊科植物宽叶山蒿 *Artemisia stolonifera* (Maxim.) Komar.,其为古代中药材艾叶的重要基原之一,值得进一步开发利用^[1]。本团队前期对宽叶山蒿叶片主要特征成分进行了初步分析,但解析的化合物信息仍不全面^[2]。目前围绕宽叶山蒿展开的药理活性研究还较少,活性组分也尚不明确^[3-4]。因此,需对宽叶山蒿化学成分和药理作用进行系统、深入地探究,从而为其开发利用提供更多的科学支撑。艾叶是我国传统大宗中药材,广泛用于治疗湿疹、皮炎、关节炎、结肠炎等炎症性疾病^[5]。宽叶山蒿作为艾近缘种,可能是潜在的抗炎药物开发来源,有必要进一步深入研究。此外,研究表明氧化应激与炎症发生、发展过程密切相关,如机体在氧化应激状态下大量积累的活性氧(ROS)可以直接启动 NF- κ B 转录因子通路,促使致炎症细胞因子的产生,因而抗氧化作用被认为是抗炎药物的重要机制之一^[6-7]。本文采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术深入解析宽叶山蒿不同极性萃取组分的化学组成,分别通过测定 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)、2,2'-联氮-

二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基(ABTS)清除率、总抗氧化能力(FRAP法)和以脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞炎症模型评价其抗氧化、抗炎作用,筛选出最佳活性组分,并结合网络药理学和分子对接探究最佳活性组分发挥抗炎作用的核心成分、核心靶点及可能的作用机制,以期为宽叶山蒿的开发利用及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 样品与试剂

实验用宽叶山蒿采自湖北省黄冈市蕲春县大同镇仙人台野生资源,经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为宽叶山蒿 *A. stolonifera*。

萃取用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);乙腈、甲醇均为色谱纯(德国 Merck 公司);DPPH(批号 B2119002,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);ABTS(批号 A02GS143434,上海源叶生物科技有限公司);总抗氧化能力(FRAP法)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);DMEM 培养基(北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(批号 A11H00K,美国 Gemini 公司);LPS(大连美仑生物技术有限公司);一氧化氮(nitrite oxide, NO)试剂盒(批号 S0021,上海碧云天生物技术有限公司);肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 20210113)均购自南京建成生物工程研究所;荧光定量 PCR 试剂盒(天

根生化科技有限公司); RAW264.7 细胞由华中科技大学同济医学院免疫学教研室馈赠。

1.2 仪器

Waters Acquity I-Class UPLC 液相色谱仪(包括二元高压溶剂管理器、自动进样器、柱温控制系统、PDA 检测器)串联 Waters Xevo G2-S 高分辨质谱系统(美国 Waters 公司); Bio-Tek Synergy 2 型酶标仪(美国 Gene 公司); 311 型 CO₂ 培养箱(美国 ThermoFisher Scientific 公司); LC480 型 RT-qPCR 仪(罗氏诊断产品有限公司)。

2 方法

2.1 宽叶山蒿不同萃取组分的制备

宽叶山蒿叶片阴干后粉碎过筛,精密称取粉末 150 g,分别用 8、6、6 倍量体积分数为 60% 的乙醇室温超声提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液。采用旋转蒸发仪(50 °C)减压浓缩至无醇味后,依次用同等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次,不同萃取组分分别浓缩后干燥,最终得到乙酸乙酯组分(EA) 4.1 g,正丁醇组分(BU) 5.4 g,水组分(WE) 12.1 g。石油醚组分因得量极少,舍弃。

精密称取各提取物粉末适量,分别用水或甲醇溶解后配制成质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的药液,经 0.22 μm 滤膜滤过,备用。

2.2 宽叶山蒿不同萃取组分的化学成分分析

采用本团队优化的 UPLC-Q-TOF-MS 进行化学成分分析^[8]。即色谱分析采用 Waters Acquity UP-LC HSS T3 超高效液相色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温 40 °C,流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)二元洗脱体系,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 1 μL,梯度洗脱(0~0.3 min, 2%~5% B; 0.3~1.0 min, 5% B; 1.0~10.0 min, 5%~28% B; 10.0~16.0 min, 28%~45% B; 16.0~19.0 min, 45%~70% B; 19.0~20.5 min, 70%~98% B; 20.5~24.0 min, 98% B; 24.0~24.2 min, 98%~2% B; 24.2~27.0 min, 2% B)。质谱采用 ESI 负离子模式,MS^E 采集模式。毛细管电压 2 000 V,锥孔电压 40 V,除溶剂气体为氮气,900 L·h⁻¹,除溶剂温度 450 °C,离子源温度 100 °C,扫描范围 *m/z* 50~1 200,碰撞气体为氦气。低能量扫描时 trap 电压为 6 eV,高能量扫描时 trap 电压为 50~70 eV。准确质量数用亮氨酸脑啡肽作校正液(554.262 0)。Mass-

Lynx 为操作系统。

2.3 宽叶山蒿不同萃取组分抗氧化能力的测定

2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定^[9] 精密称取各提取物粉末适量,配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的供试品母液,梯度稀释后得到质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。精密称取 5 mg DPPH,甲醇溶解定容,得到 0.2 mg·mL⁻¹ 的 DPPH 自由基储备液,在实验前用甲醇稀释至吸光度为 0.7±0.02 的 DPPH 工作液。取 50 μL 供试品溶液与 950 μL DPPH 工作液混合,避光室温振荡 30 min,取 200 μL 混合液于 96 孔板中,用酶标仪在 517 nm 下测定其吸光度 *A*₁,以甲醇为空白对照测得 *A*₀,则 DPPH 自由基清除能力=(1-*A*₁/*A*₀)×100%。维生素 C(Vit C)作为阳性对照,每组样品重复检测 3 次。

2.3.2 ABTS 自由基清除能力测定^[10] 7.0 mmol·L⁻¹ 的 ABTS 溶液和 2.45 mmol·L⁻¹ 的 K₂S₂O₈ 溶液等体积混合,在室温且黑暗条件下静置过夜(14 h),制得 ABTS 自由基储备液。实验前用无水乙醇稀释至吸光度为 0.7±0.02 的 ABTS 工作液。取上述各浓度供试品溶液 40 μL 与 960 μL ABTS 工作液混合,混匀后室温避光放置 6 min,移取 200 μL 混合液至 96 孔板中,用酶标仪在 734 nm 下测定其吸光度 *A*₁,以无水乙醇为空白对照测得 *A*₀,则 ABTS 自由基清除能力=(1-*A*₁/*A*₀)×100%。Vit C 作为阳性对照,每组样品重复检测 3 次。

2.3.3 总抗氧化能力测定 参照 T-AOC 试剂盒采用 FRAP 法测定上述供试品溶液的总抗氧化能力^[11]。即配制系列浓度梯度(1.0~10.0 mmol·L⁻¹)的 FeSO₄·7H₂O 溶液,移取 20 μL 按照试剂盒说明书方法加样反应,室温反应 6 min 后使用酶标仪于 593 nm 波长下测定吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标构建标准曲线。取 20 μL 供试品溶液替代 FeSO₄·7H₂O 溶液进行反应并检测,结果代入标准曲线即得抗氧化能力。Vit C 作为阳性对照,每组样品重复检测 3 次。

2.4 宽叶山蒿不同萃取组分抗炎作用的测定

2.4.1 MTT 法检测 RAW264.7 细胞存活率^[12] 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板,100 μL/孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。设置对照组和宽叶山蒿不同萃取组分组(12.5、25、50、100 μg·mL⁻¹),弃去上清液,各给药

组加入相应药物,对照组加入不含药物的 DMEM 培养基,培养 24 h 后每孔加入 15 μ L MTT 溶液,避光孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 100 μ L DMSO,避光振荡 10 min,于 490 nm 处测定吸光度(A),计算细胞存活率。

2.4.2 NO、TNF- α 和 IL-6 水平的测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 2×10^5 个/mL 接种于 24 孔板,每孔 1 mL,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组及宽叶山蒿 WE 组、BU 组和 EA 组(质量浓度均为 25 μ g $\cdot$ mL⁻¹),模型组和宽叶山蒿给药组均加入 LPS(1 μ g $\cdot$ mL⁻¹),各给药组再加入相应药物,对照组则加入等量不含药物的 DMEM 培养基,培养 24 h 后吸取上清,采用 Griess 法测定 NO 水平,ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.4.3 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达的测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。按上述方法进行分组、给药后弃去上清,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法测定各组细胞中 TNF- α 、IL-6、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 的表达量,以 β -actin 为内参,目的基因引物序列见表 1。

表 1 用于抗炎活性评价的引物序列

Table 1 Primer sequences used for the evaluation of anti-inflammatory activity

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
β -actin	GCTGACAGGATGCAGAAGG	TGGAAGGTGGACAGTGAAG
TNF- α	GGCATGGATCTCAAAGACA	GTGAGGAGCAGTAGTCCG
IL-6	CTGCAAGAGACTTCATCCAGTT	GAAGTAGGGAAGGCCGTGG
IL-1 β	CAACTGCACTACAGGCTCCG	GTGGGTCTGCCGTCTTTCAT
COX-2	ATTCCAAACCAGCAGACTCATA	CTTGAGTTTGAAGTGTAACCG
MCP-1	GCTACAAGAGGATCACCAGCAG	GTCTGGACCCATTCTCTTGG
iNOS	ACCATGAGGCTGAAATCCCA	TCCACAACCTCGCTCCAAGAT

2.5 宽叶山蒿最佳抗炎萃取组分的网络药理学分析

2.5.1 活性成分和疾病的靶点筛选 通过 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库检

索,获取宽叶山蒿乙酸乙酯萃取组分(EA)中 22 个化学成分的结构文件,保存为“SDF”格式。随后将各结构文件上传至 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)检索化学成分靶点,选取预测结果中置信度排名前 30 且“probability ≥ 0 ”的靶点,去除重复项后运用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)校正靶点名称为官方名称,得到活性成分靶点。以“inflammation”“oxidative stress”为关键词,通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)检索与炎症、氧化应激相关靶点,选择“score > 1.0 ”的靶点作为疾病靶点,删除重复项后,利用 UniProt 数据库校正,得到疾病相关靶点。借助 Venny 2.1 在线分析工具将活性成分靶点与疾病相关靶点取交集,即得宽叶山蒿乙酸乙酯萃取组分抗炎作用的潜在靶点。最后,采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物-成分-疾病-靶点”多层次网络图并进行拓扑学分析。

2.5.2 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建与分析 将上述获取到的“活性成分-疾病”交集靶点导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),物种限定为“*Homo sapiens*”,交互分数限定为 > 0.4 ,并去除无相互作用的单一靶点,最终绘制 PPI 网络。使用 Cytoscape 3.9.1 软件将下载得到的 TSV 格式结果文件进行可视化分析,并利用 cytoNCA 插件计算各靶点的度值(degree)、中介中心性(betweenness centrality)、接近中心性(closeness centrality),选取三者平均数及以上的交集靶点为关键核心靶点。

2.5.3 交集靶点的功能和通路富集分析 将上述交集靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)进行基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,限定物种为“*Homo sapiens*”,以 $P < 0.05$ 为筛选标准,并利用微生物信在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化作图。

2.6 分子对接

将基于网络药理学分析获得的前 5 个核心成分以及前 5 个关键靶点进行分子对接。首先从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取蛋白靶点 PDB 格式的 3D 结构文件,通过 PubChem 数据库获取核心成分的 SDF 结构文件,并通过 OpenBabel 2.4.1

转换成 PDB 格式文件; 然后运用 AutoDockTools 1.5.6 软件对蛋白靶点进行去水、加氢等操作, 设置合适的活性口袋及对接参数; 最后通过 AutoDock Vina 进行分子对接模拟, 并利用 PyMOL 软件进行可视化。

2.7 统计分析

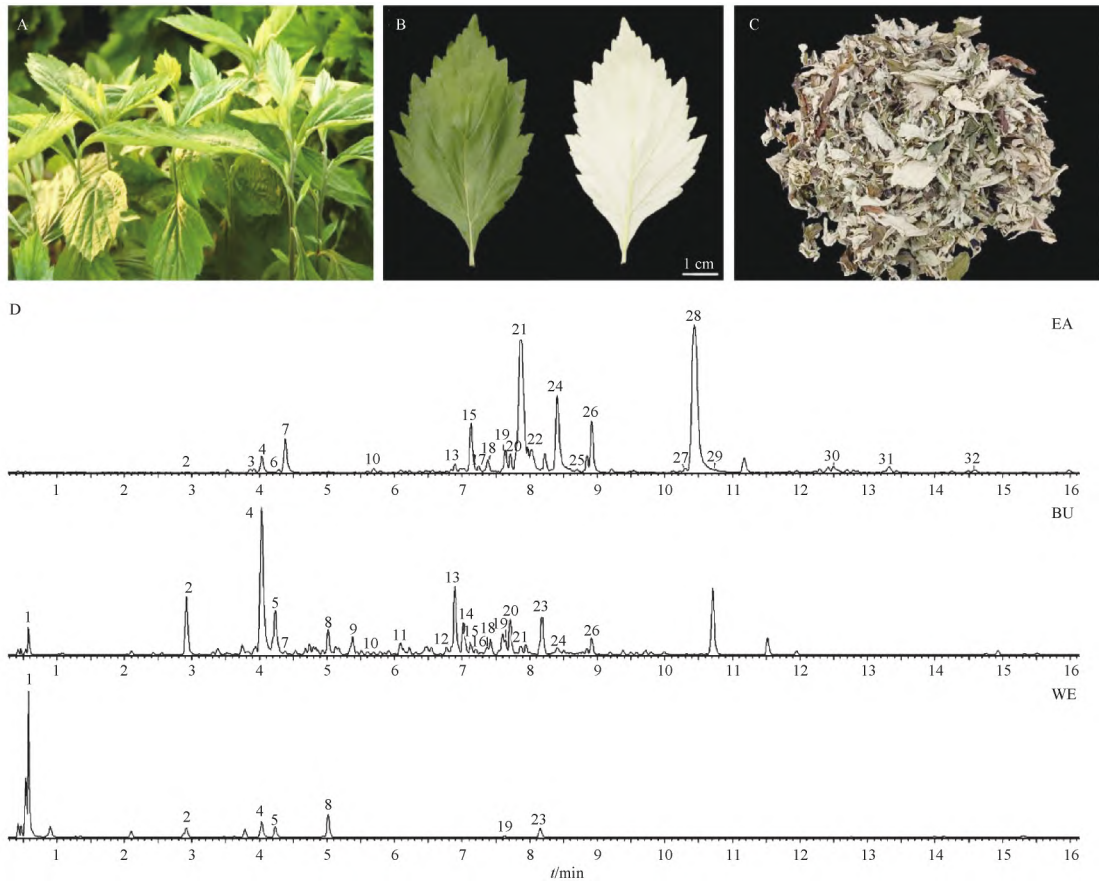
采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析, 所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 宽叶山蒿不同萃取组分的 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分鉴定

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术初步分析了宽叶山蒿不同溶剂萃取组分的化学组成, 在负离子模式下的基峰离子流 (BPI) 图谱见图 1。石油醚萃取组分

因得率较低, 且基本无化学成分, 因此予以舍弃。根据保留时间、准分子离子峰 ($[M-H]^-$)、主要碎片离子并参考文献数据^[2,13-14], 初步鉴定了 32 个化合物, 见表 2。其中, 在 WE 中初步鉴定 7 个化合物, 主要是以绿原酸 (chlorogenic acid)、新绿原酸 (neochlorogenic acid) 及隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid) 为主的单咖啡酰基奎宁酸类化合物; 从 BU 中鉴定 21 个化合物, 包含上述单咖啡酰基奎宁酸类化合物及以夏佛塔苷 (schaftoside)、芦丁 (rutin)、山柰酚-3-芸香糖苷 (kaempferol 3-rutinoside) 等为主的黄酮苷类化合物; EA 中鉴定化合物 22 个, 除少量的黄酮苷类化合物外, 主要包含以异绿原酸 A、B、C (isochlorogenic acid A、B、C) 等为主的二咖啡酰基奎宁酸类化合物及该组分独有的黄酮类化合物 (木犀草素 luteolin、棕矢车菊素 jaceosidin、鼠李素 rhamnazin、异泽兰黄素 eupatilin 等)。



EA: 乙酸乙酯组分; BU: 正丁醇组分; WE: 水组分 (图 2~5 同)。

图 1 宽叶山蒿植株 (A)、叶片 (B) 和药材 (C) 图及乙酸乙酯、正丁醇和水组分的 UPLC-Q-TOF-MS 基峰离子流图 (D)

Fig.1 Diagram of plant (A), leaf (B) and medicinal material (C) of *Artemisia stolonifera* and UPLC-Q-TOF-MS base peak ion chromatographs of ethyl acetate, *n*-butanol and water fractions (D)

表 2 宽叶山蒿不同萃取组分中主要化学成分的鉴定

Table 2 Identification of main chemical components in different extracted fractions of *Artemisia stolonifera*

No.	t_R /min	m/z [M-H] ⁻	分子式	MS/MS 特征离子	鉴定结果
1	0.58	191.055 1	C ₇ H ₁₂ O ₆	93.034 5, 87.007 9, 85.029 3, 59.014 0	奎宁酸(quinic acid) ^{1,2)}
2	2.92	353.086 9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.055 1, 179.034 5, 173.044 5, 161.025 2, 135.045 4	新绿原酸(neochlorogenic acid) ^{1,2,3)}
3	3.92	341.089 0	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	281.064 1, 251.056 4, 221.042 9, 203.030 5, 179.035 8, 177.053 2, 161.021 7, 135.043 4	咖啡酸-3-葡萄糖苷(caffeic acid 3-glucoside) ³⁾
4	4.03	353.087 3	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	191.055 5, 179.034 7, 173.045 8, 161.021 5, 135.044 4	绿原酸(chlorogenic acid) ^{1,2,3)}
5	4.23	353.087 0	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	191.056 4, 179.034 1, 173.045 5, 161.024 5, 135.044 6	隐绿原酸(cryptochlorogenic acid) ^{1,2)}
6	4.29	177.020 4	C ₉ H ₆ O ₄	133.029 7, 105.032 1	秦皮乙素(esculetin) ³⁾
7	4.38	179.034 0	C ₉ H ₈ O ₄	135.044 7, 134.037 0	咖啡酸(caffeic acid) ^{2,3)}
8	5.02	387.165 3	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	207.104 5, 163.112 8, 101.023 2, 59.013 4	羟基茉莉酸己糖(hydroxyjasmonic acid hexose) ^{1,2)}
9	5.37	593.150 5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	533.138 9, 503.115 2, 473.111 8, 383.077 6, 353.067 5, 117.035 2	芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷(apigenin-6,8-di-C-glucoside) ²⁾
10	5.70	367.102 9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	193.055 1, 191.055 4, 173.045 7	5-阿魏酰奎宁酸(5-feruloylquinic acid) ^{2,3)}
11	6.09	563.139 4	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	473.109 1, 443.097 0, 383.076 3, 353.065 6, 297.075 8	夏佛塔苷(schaftoside) ²⁾
12	6.77	609.145 9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.032 7, 300.026 4, 271.024 0, 243.029 0, 151.003 4	槲皮素-3-O-新橙皮苷(quercetin 3-O-neohesperidoside) ²⁾
13	6.89	609.144 7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.033 1, 300.026 4, 271.023 8, 243.028 7	芦丁(rutin) ^{2,3)}
14	7.02	533.129 0	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	473.109 7, 443.097 8, 383.076 1, 353.065 5, 325.070 9, 297.075 5	芹菜素-6,8-二-C-戊糖苷(apigenin-6,8-di-C-pentoside) ²⁾
15	7.13	463.087 7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301.033 3, 300.026 6, 271.023 8, 255.028 8, 151.002 4	槲皮素-3-O-葡萄糖苷(quercetin 3-glucoside) ^{2,3)}
16	7.20	461.071 6	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	327.052 3, 285.039 7	木犀草素-7-甘草酸(luteolin 7-glycuronic acid) ²⁾
17	7.24	447.092 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	284.033 2, 151.001 8	山柰酚-3-葡萄糖苷(kaempferol 3-glucoside) ³⁾
18	7.37	593.150 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.038 9, 284.031 4, 133.028 4	木犀草素-7-芸香糖苷(luteolin 7-rutinoside) ^{2,3)}
19	7.64	515.119 8	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 0, 335.076 9, 191.057 6, 179.034 9, 173.045 7, 161.025 7, 135.046 3	异绿原酸 B(isochlorogenic acid B) ^{1,2,3)}
20	7.71	593.150 5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.038 7, 284.031 6, 133.029 4	山柰酚-3-芸香糖苷(kaempferol 3-rutinoside) ^{2,3)}
21	7.87	515.119 1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.086 9, 335.079 3, 191.055 1, 179.034 5, 173.044 7, 161.024 3, 135.044 5	异绿原酸 A(isochlorogenic acid A) ^{2,3)}
22	8.02	515.118 8	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 1, 335.077 4, 191.055 7, 179.034 1, 173.045 1, 161.024 0, 135.044 8	异绿原酸 A 异构体(isochlorogenic acid A isomer) ³⁾
23	8.18	487.089 4	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	325.056 7, 163.024 7, 145.014 2	二-咖啡酸-二羟基戊二酸(2-caffeoyl-2-hydroxypentanedioic acid) ^{1,2)}
24	8.41	515.119 1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 1, 335.077 6, 191.055 7, 179.034 2, 173.045 2, 161.024 1, 135.044 7	异绿原酸 C(isochlorogenic acid C) ^{2,3)}
25	8.60	461.108 9	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	446.081 7, 284.030 7	鼠李柠檬素-3-O-葡萄糖苷(rhamnocitrin 3-O-glucoside) ³⁾
26	8.91	549.196 3	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	505.160 4, 387.164 6, 353.086 6	络石苷(tracheloside) ^{2,3)}
27	10.30	285.039 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	175.030 4, 151.000 3, 133.029 7	木犀草素(luteolin) ³⁾
28	10.44	207.065 6	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	179.034 6, 135.044 5	咖啡酸乙酯(ethyl caffeate) ³⁾
29	10.76	677.152 3	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	515.120 1, 353.086 8, 335.075 6, 191.055 5, 179.034 4, 173.044 8, 161.024 0, 135.044 9	3,4,5-三咖啡酰奎宁酸(3,4,5-tricafeoylquinic acid) ³⁾
30	12.50	329.066 6	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.041 1, 299.019 0, 145.030 0	棕矢车菊素(jaceosidin) ³⁾
31	13.32	329.232 7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.049 4, 299.012 9, 271.024 8, 132.025 9	鼠李毒素(rhamnazin) ³⁾
32	14.58	343.081 2	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	328.056 7, 313.034 9, 298.016 2, 132.019 1	异泽兰黄素(eupatilin) ³⁾

注: ¹⁾ 从水组分中鉴定的化合物; ²⁾ 从正丁醇组分中鉴定的化合物; ³⁾ 从乙酸乙酯组分中鉴定的化合物。

3.2 宽叶山蒿不同萃取组分的抗氧化作用

为评价宽叶山蒿的抗氧化作用并筛选出最佳抗氧化组分,测定了其不同萃取组分对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率及总抗氧化能力(FRAP),见图 2。在测定范围(0.2~1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),宽叶山蒿 3 个萃取组分在 3 个实验中均呈现较强的抗氧化能

力,并具有浓度依赖性。结果一致性地表明,3 个萃取组分的抗氧化能力依次为 $\text{EA}>\text{BU}>\text{WE}$ 。此外,在乙酸乙酯组分质量浓度达到 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力已接近于 Vit C,显示出优异的抗氧化能力。因此,宽叶山蒿乙酸乙酯组分为其最佳抗氧化组分。

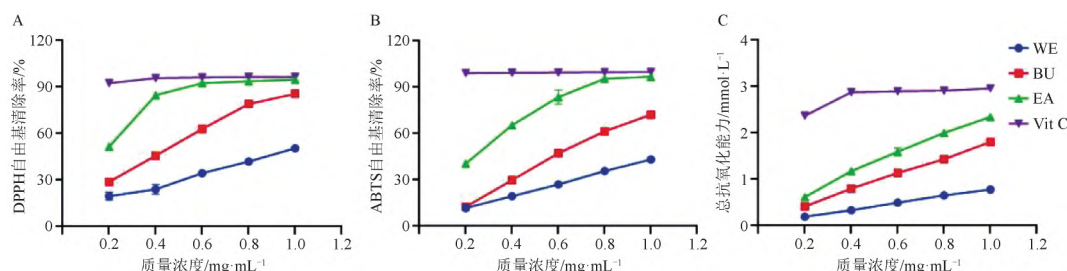


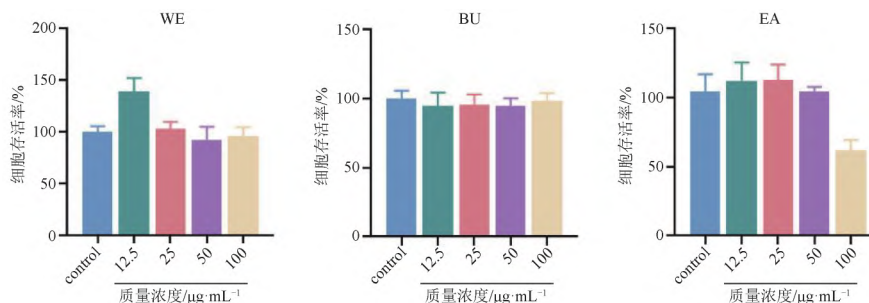
图 2 宽叶山蒿不同萃取组分对 DPPH (A) 和 ABTS (B) 自由基的清除能力及总抗氧化能力 (C) ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.2 Scavenging capacity against DPPH (A) and ABTS (B) free radicals and total antioxidant capacity (C) of different extracted fractions of *Artemisia stolonifera* ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 宽叶山蒿不同萃取组分的抗炎作用

3.3.1 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 通过 MTT 实验测定了宽叶山蒿不同萃取组分对 RAW264.7 细胞存活率的影响,见图 3。在测试质量浓度范围内(12.5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),宽叶山蒿水和正

丁醇组分处理后,细胞存活率均大于 90%,认定该浓度下无细胞毒性;而乙酸乙酯组分在质量浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率低于 70%,表明该组分无细胞毒性质量浓度为 12.5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此,应选取 $\leq 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度开展后续抗炎作用的评价。



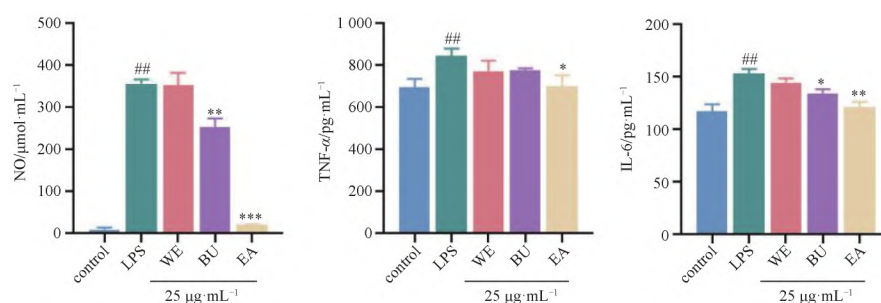
control.对照组(图 4~5 同)。

图 3 宽叶山蒿不同萃取组分对 RAW264.7 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.3 Effect of different extracted fractions of *Artemisia stolonifera* on survival rate of RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3.2 对 NO、TNF- α 和 IL-6 水平的影响 NO 作为炎症发生进程中的经典指标,几乎出现在所有抗炎药物的研究中^[15-17]。在本研究中,LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,细胞上清液中 NO 含量显著升高($P<0.01$);分别给予宽叶山蒿 3 个萃取组分(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)后,WE 组的 NO 含量与 LPS 组相比无明显变化,而 BU 和 EA 组呈现显著($P<0.01$)和极显著($P<0.001$)降低,EA 组已

恢复至接近正常组,表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分可能为其最佳抗炎组分。进一步地,测定细胞上清液中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平予以确证。结果与上述趋势一致,水组分几乎无降低炎症因子水平的能力,正丁醇组分的作用较弱,乙酸乙酯组分则均可显著降低 TNF- α 和 IL-6 的水平($P<0.05$ 、 $P<0.01$),表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分为其最佳抗炎作用组分,见图 4。



与对照组比较^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ (图 5 同)。

图 4 宽叶山蒿不同萃取组分对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF-α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.4 Effect of different extracted fractions of *Artemisia stolonifera* on NO, TNF-α and IL-6 levels in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3.3 对 TNF-α、IL-6、IL-1β、COX-2、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达的影响 采用 RT-qPCR 法测定宽叶山蒿不同萃取组分处理后对 RAW264.7 细胞中炎症因子基因表达的影响,见图 5。与对照组相比,LPS 刺激后 RAW264.7 细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β、COX-2、MCP-1 和 iNOS mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比,在 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质

量浓度下,宽叶山蒿 WE 组处理后上述基因表达水平均无显著改变,BU 组可显著降低细胞 TNF-α、IL-1β、COX-2 和 iNOS mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),而 EA 组细胞中上述炎症因子 mRNA 水平均呈极显著降低 ($P < 0.01$),进一步明确宽叶山蒿乙酸乙酯组分为其最佳抗炎活性组分,具备进一步深入研究的价值。

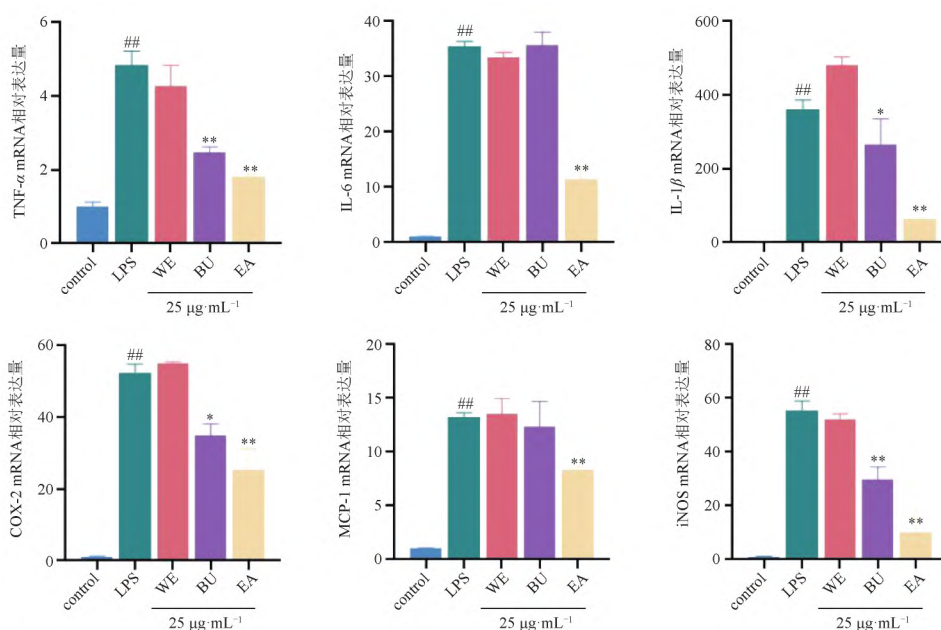


图 5 宽叶山蒿不同萃取组分对 RAW264.7 细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β、COX-2、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.5 Effect of different extracted fractions of *Artemisia stolonifera* on mRNA expressions of TNF-α, IL-6, IL-1β, COX-2, MCP-1 and iNOS in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 宽叶山蒿乙酸乙酯组分(EA) 活性成分及疾病靶点的筛选

上述实验结果表明,宽叶山蒿不同萃取组分中乙酸乙酯组分具有良好的抗氧化、抗炎作用。因此,采用网络药理学分析探究宽叶山蒿乙酸乙酯组分发挥抗炎作用的药效物质基础和作用机制。将 22 个化学成分信息导入 SwissTargetPrediction 数据库进行靶点筛选,共得到活性成分靶点共计 154 个;通过 GeneCards 数据库筛选出氧化应激相关靶点 6 116 个(score > 1.0),炎症相关靶点 3 123 个(score > 1.0),构建韦恩图得到宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎的潜在靶点 89 个,见图 6。

3.5 “药物-成分-疾病-靶点”网络筛选核心成分

利用 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“药物-成分-疾病-靶点”网络,见图 7,共包括 114 个节点(1 个药物节点、2 个疾病节点、22 个活性成分节点、89 个潜在靶点节点)和 547 条边。借助“Network Analyze”工具对网络进行拓扑分析,并根据度值调节节点大小,即度值越大,节点越大。选取度值 ≥ 20 的成分作为核心成分,得到宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用的

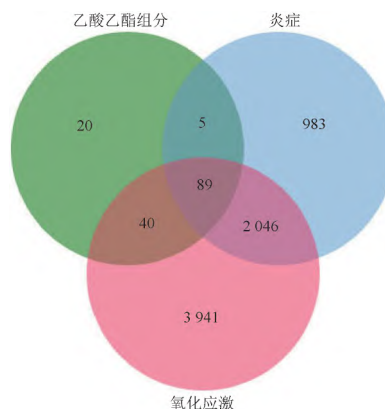


图6 宽叶山蒿乙酸乙酯组分活性成分靶点与氧化应激、炎症相关靶点韦恩图

Fig.6 Venn diagram of the targets of the active component in ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera* and those related to oxidative stress and inflammation

5 个核心成分,分别为鼠李素(rhamnazin)、异泽兰黄素(eupatilin)、棕矢车菊素(jaceosidin)、木犀草素(luteolin)和泽兰黄酮(nepetin),均为黄酮类化合物,见表 3,表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分可能通过多成分协同发挥抗炎作用。

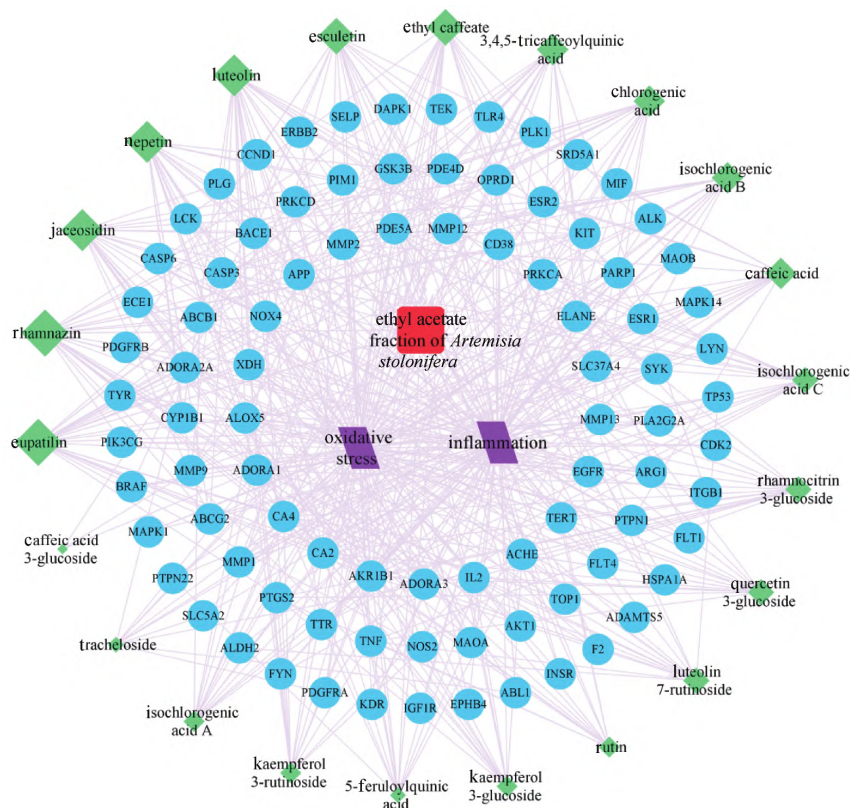


图7 宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用的“药物-成分-疾病-靶点”网络

Fig.7 "Drug-component-disease-target" network for the anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera*

表 3 宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用的核心成分及其拓扑学特征

Table 3 Core components for the anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera* and their topological characteristics

No.	化合物	CAS 号	中介中心性	接近中心性	度值
1	鼠李素(rhamnazin)	552-54-5	0.019 4	0.425 4	25
2	异泽兰黄素(eupatilin)	22368-21-4	0.017 8	0.425 4	25
3	棕矢车菊素(jaceosidin)	18085-97-7	0.014 2	0.419 1	23
4	木犀草素(luteolin)	491-70-3	0.013 6	0.416 1	22
5	泽兰黄酮(nepetin)	520-11-6	0.012 0	0.416 1	22

3.6 PPI 网络分析筛选关键核心靶点

利用 STRING 数据库分析 3.4 项下获取的宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎的 89 个潜在靶点,构建 PPI 网络。去除 1 个独立靶点(SLC37A4) 后,网络中共包含 88 个节点,1 568 条边,节点的颜色、大小和度值呈正相关,见图 8。通过分析可知,所有节点的度值、中介中心性和接近中心性的平均值分别为 35. 6、0. 010 9、0. 528 0,取三者平均值及以上筛选得

到 16 个靶点,提示它们可能是宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎的关键核心靶点,见表 4。排名前 5 的靶点度值均大于 100,分别为肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor,TNF)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(serine/threonine protein kinase 1,AKT1)、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53,TP53)、胱天蛋白酶-3(caspase-3,CASP3) 和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR) 。

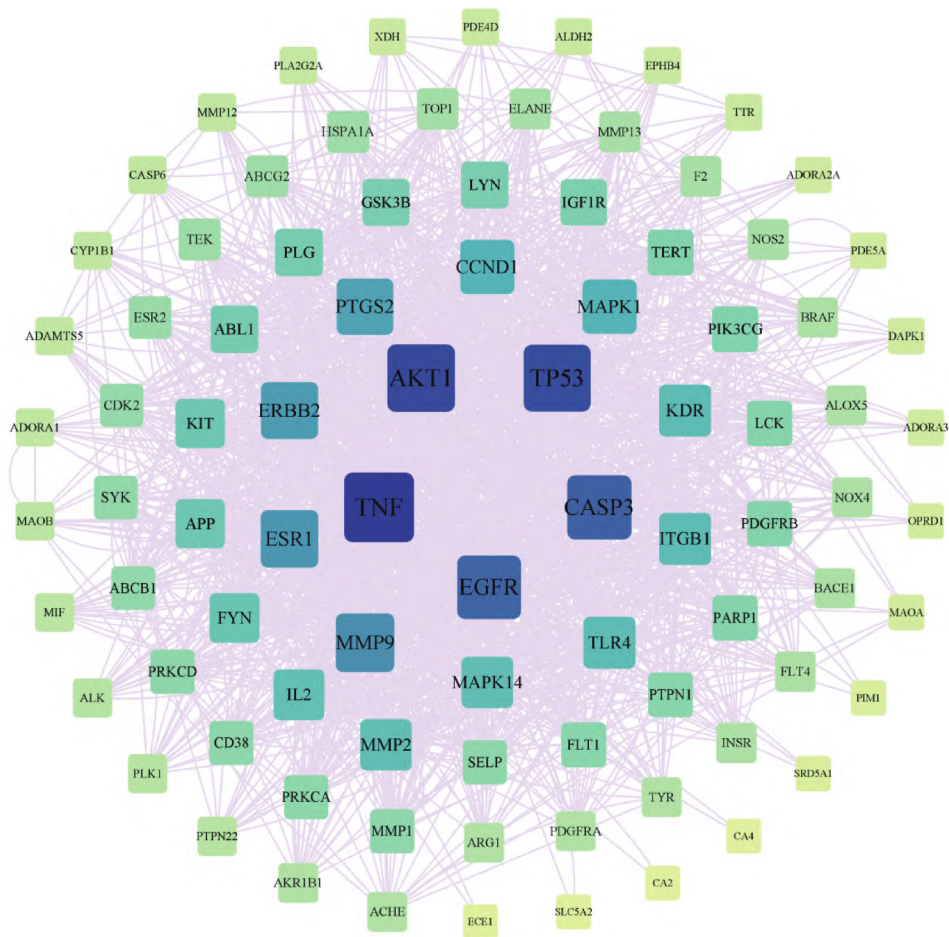


图 8 宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用的 PPI 网络

Fig.8 PPI network for the anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera*

表 4 宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用的关键核心靶点及其拓扑学特征

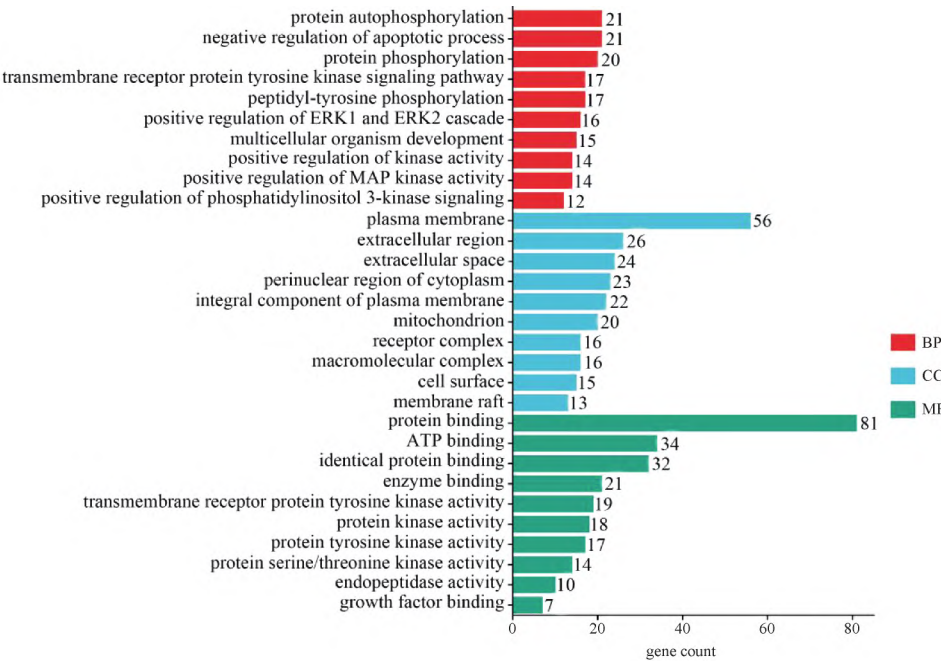
Table 4 Core targets for the anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera* and their topological characteristics

No.	基因名	UniProt ID	中介中心性	接近中心性	度值
1	TNF	P01375	0.132 1	0.790 9	128
2	AKT1	P31749	0.104 9	0.763 2	120
3	TP53	P04637	0.069 1	0.750 0	118
4	CASP3	P42574	0.077 2	0.725 0	108
5	EGFR	P00533	0.067 4	0.713 1	106
6	MMP9	P14780	0.055 1	0.659 1	88
7	ESR1	P03372	0.041 4	0.654 1	84
8	PTGS2	P35354	0.033 6	0.649 3	80
9	ERBB2	P04626	0.018 3	0.630 4	82
10	MAPK1	P28482	0.021 6	0.621 4	72
11	CCND1	P24385	0.018 8	0.612 7	72
12	MAPK14	Q16539	0.031 2	0.595 9	62
13	TLR4	O00206	0.016 6	0.595 9	64
14	MMP2	P08253	0.011 8	0.591 8	62
15	APP	P05067	0.060 1	0.587 8	54
16	PRKCD	Q05655	0.014 5	0.543 8	36

3.7 GO 和 KEGG 富集分析

应用 DAVID 数据库对上述 89 个潜在靶点进行 GO 和 KEGG 分析。以 $P < 0.05$ 为筛选条件得到宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎的 GO 分析,得到生物过程(biological process, BP) 条目 455 条,主要与蛋白自身磷酸化、凋亡过程的负调控、蛋白磷酸化、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等功能有关; 细胞组成(cellular component, CC) 条目得到 69 条,主要涉及质膜、胞外区、细胞外间隙等; 分子功能(molecular function, MF) 条目得到 102 条,主要涉及蛋白结合、三磷酸腺苷(ATP) 结合、相同蛋白结合及酶结合等, 见图 9。

KEGG 通路富集以 $P < 0.05$ 为筛选条件,共富集得到 140 条通路。选取排名前 20 的通路绘制气泡图,以富集到该通路的核心靶点个数和 $-\lg P$ 来衡量 KEGG 富集程度,见图 10。结果显示,富集的主要信号通路包括癌症(pathways in cancer)、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B, PI3K-AKT) 信号通路、肺癌蛋白多糖(proteoglycans in cancer)、丝裂原活化蛋白激



BP: 生物过程; CC: 细胞组成; MF: 分子功能。

图 9 宽叶山蒿乙酸乙酯组分潜在抗炎作用靶点的 GO 功能富集分析

Fig.9 GO functional enrichment analysis of the potential anti-inflammatory targets of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera*

酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、前列腺癌(prostate cancer) 等,主要涉及 TNF、

AKT1、TP53、CASP3、EGFR 等靶点,表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分可通过多途径、多靶点发挥抗炎作用。

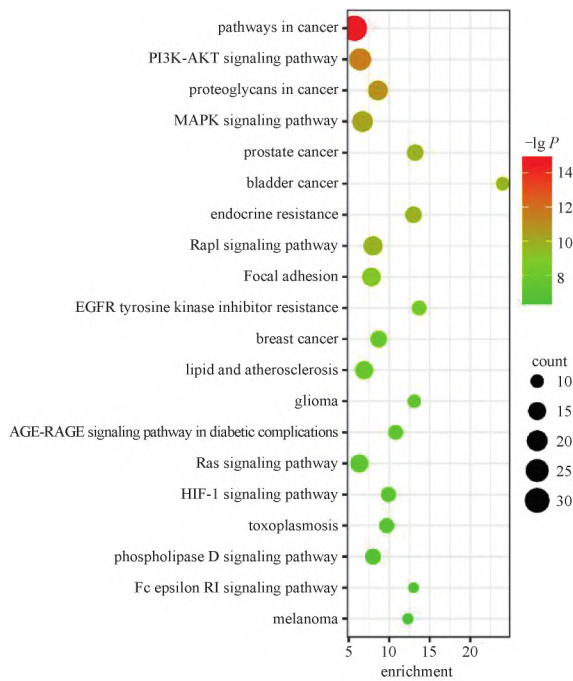


图 10 宽叶山蒿乙酸乙酯组分潜在抗炎作用靶点的 KEGG 通路富集分析
Fig.10 KEGG pathway enrichment analysis of the potential anti-inflammatory targets of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera*

3.8 核心成分与关键核心靶点的分子对接

选取“药物-成分-疾病-靶点”网络中度值大于 20 的 5 个核心成分(鼠李秦素、异泽兰黄素、棕矢车菊素、木犀草素和泽兰黄酮) 以及 PPI 网络中排名前 5 的关键核心靶点(TNF、AKT1、TP53、CASP3 和 EGFR,度值大于 100) 进行分子对接,见表 5。所有对接结合能均小于 $-5.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明 5 个核心成分和 5 个关键核心靶点间均有良好的结合能力^[17];结合能小于 $-7.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的有 15 组,提示它们强烈的结合活性;特别地,5 个核心成分均与 AKT1 有极强的结合能力,结合能均小于 $-9.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,部分对接构象见图 11。以上对接结果充分表明,宽叶山蒿乙酸乙酯组分中的活性成分均可自发地与 5 种核心蛋白结合,从而发挥抗炎活性。

表 5 宽叶山蒿乙酸乙酯组分中核心成分与关键核心靶点的结合能

化合物	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$				
	TNF (1XU1)	AKT1 (6S9W)	TP53 (6UPT)	CASP3 (7RN9)	EGFR (3IKA)
鼠李秦素(rhamnazin)	-6.0	-9.8	-7.5	-6.8	-7.8
异泽兰黄素(eupatilin)	-5.9	-9.3	-6.6	-6.7	-7.7
棕矢车菊素(jaceosidin)	-5.9	-9.7	-7.1	-7.0	-7.7
木犀草素(luteolin)	-6.2	-10.1	-7.5	-7.6	-7.8
泽兰黄酮(nepetin)	-6.0	-9.9	-6.8	-7.1	-7.7

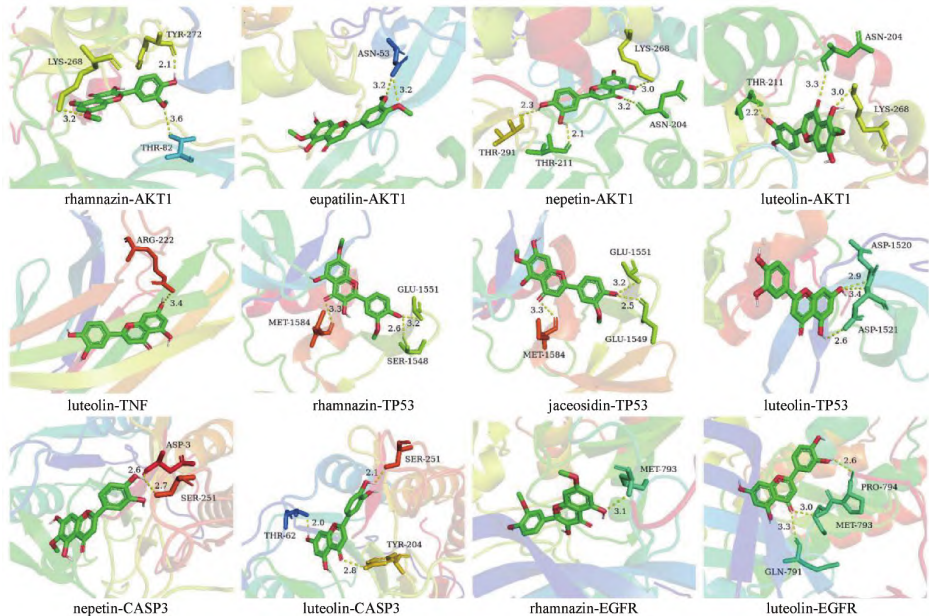


图 11 宽叶山蒿乙酸乙酯组分抗炎作用核心成分与关键核心靶点的分子对接
Fig.11 Molecular docking of core anti-inflammatory components and key targets of ethyl acetate fraction of *Artemisia stolonifera*

4 讨论

炎症是机体应对外界刺激时产生的防御反应,起初是机体的一种有益保护行为。然而,当体内炎症细胞浸润和炎症因子释放过多时,不受控制的炎症可能会导致身体不适和损伤,甚至可能危及生命^[18-19]。例如,新型冠状病毒引起的新型冠状病毒感染(COVID-19)可导致细胞因子风暴,严重影响人类生命健康^[9]。氧化应激可与炎症相互作用,诱发甚至加重炎症反应。越来越多的研究表明,植物及其次生代谢产物可通过其抗氧化应激、抗炎作用达到防病、治病的目的。如藏红花素是藏红花中发现的独特的水溶性类胡萝卜素,可通过降低 Nrf2/Keap1 途径的氧化应激,增加肠道紧密连接蛋白,改善肠道菌群组成,有效抑制 NLRP3 炎性小体,阻断 TLR4 信号,从而改善动脉粥样硬化进展^[24];从中药红景天中分离出来的单体成分红景天苷,通过 Nrf2/NF- κ B p65 通路介导对重症急性胰腺炎小鼠的抗氧化应激和抗炎作用^[21]。因此,寻找并开发具有良好抗氧化、抗炎作用的药物可促进人类健康发展。本文以菊科蒿属植物宽叶山蒿为研究对象,结合 UPLC-Q-TOF-MS 技术、抗氧化及抗炎作用评价和网络药理学分析策略,探讨宽叶山蒿最佳抗氧化、抗炎组分的药效物质基础和作用机制。

采用 UPLC-Q-TOF-MS 从宽叶山蒿不同极性萃取组分中共鉴定 32 个化学成分,主要包括单咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸等酚酸类成分,以及黄酮类、黄酮苷类成分。上述成分与艾叶的化学组成基本一致,也是艾叶具备良好抗炎活性的重要物质基础^[5,22-23]。此外,该结果相较本团队之前的报道在鉴定化合物数量上更为完善^[9],并首次对不同极性萃取组分进行了深入研究,可为宽叶山蒿今后的开发利用提供强有力的物质基础。然而,根据化合物组成及类型来看,宽叶山蒿乙酸乙酯萃取组分更为丰富。通过综合比较宽叶山蒿水、正丁醇、乙酸乙酯萃取组分对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力、总抗氧化能力及对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症的缓解作用,明确了乙酸乙酯萃取组分具备优异的抗氧化、抗炎作用。总之,上述结果充分表明,宽叶山蒿乙酸乙酯组分充分具备开发为抗炎药物的潜力。

为阐明宽叶山蒿乙酸乙酯组分发挥抗炎作用的核心成分和靶点,将该组分中 22 个化合物作为活性成分,采用网络药理学方法构建了“药物-成分-疾

病-靶点”网络,筛选出 5 个潜在的核心成分,分别为鼠李素、异泽兰黄素、棕矢车菊素、木犀草素和泽兰黄酮,均为黄酮类成分。众所周知,黄酮类成分因其结构中丰富的酚羟基而展示出较强的抗氧化能力^[24-25]。此外,以往的研究报道,鼠李素通过抑制 Nrf2 介导的抗氧化途径缓解 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤^[24];异泽兰黄素、棕矢车菊素和木犀草素在蒿属植物中含量丰富,且因较强的抗氧化及抗炎作用被广泛研究^[23,27]。然而,这些黄酮类成分仅包含在宽叶山蒿乙酸乙酯组分中,而未在水和正丁醇组分中检出。因此,宽叶山蒿乙酸乙酯组分中黄酮类成分是其发挥抗炎活性的重要物质基础。

通过网络药理学筛选得到 89 个潜在的抗炎靶点,PP1 网络预测得到 16 个与其他靶点具有良好互作关系的关键核心靶点,主要包括 TNF、AKT1、TP53、CASP3、EGFR 等。KEGG 通路富集发现,89 个交集靶点显著富集于 PI3K-AKT 信号通路和 MAPK 信号通路。PI3K-AKT 信号通路可被多种类型的细胞刺激或毒性损伤激活,并调节如转录、翻译、增殖、生长等基本的细胞功能^[28];PI3K 磷酸化 AKT,通过抗炎、抗氧化和抗凋亡活性发挥关键的神经保护作用,如 II 型髓系细胞触发受体(triggering receptor expressed on myeloid cells 2,TREM2)的激活通过 PI3K-AKT 信号通路减弱神经炎症,以改善小鼠术后认知功能障碍^[29]。MAPK 信号通路是所有真核生物高度保守的模块,参与机体对氧化应激和炎症的反应,如旋覆花总苷类提取物可以通过 MAPK/NF- κ B 信号通路的失活,以 TLR4 非依赖性方式抑制 COX-2 表达水平和 p65、p38、ERK 和 JNK 的磷酸化,从而缓解 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠的炎症反应和氧化应激^[30]。总之,PI3K-AKT 信号通路和 MAPK 信号通路可能与宽叶山蒿乙酸乙酯组分的抗炎作用密切相关,是其潜在的关键作用通路。此外,上述筛选的关键核心靶点绝大多数分布于 2 个通路中,且 5 个核心成分与 5 个关键核心靶点的分子对接结果表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分中黄酮类成分与关键靶点的亲和力强。

综上所述,本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,结合实验数据及网络药理学、分子对接分析充分表明宽叶山蒿乙酸乙酯组分可通过多成分、多靶点、多途径协同发挥抗炎作用,这对后续药物开发及临床应用具有参考意义。

参考文献

- [1] 罗丹丹,彭华胜,詹志来,等.九牛草的本草考证[J].中国中药杂志,2020,45(17):4081.
- [2] 罗丹丹,彭华胜,张元,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析比较宽叶山蒿与艾的化学成分[J].中国中药杂志,2020,45(17):4057.
- [3] CHOI E, KIM G. Effect of *Artemisia* species on cellular proliferation and apoptosis in human breast cancer cells via estrogen receptor-related pathway[J]. J Trad Chin Med, 2013, 33(5): 658.
- [4] LEE J H, LEE J M, LEE S H, et al. Comparison of artemisinin content and antioxidant activity from various organs of *Artemisia* species[J]. Horticult Environ Biotechnol, 2015, 56(5): 697.
- [5] 刘涛,廖晓凤,吴燕婷,等.艾叶有效成分抗炎作用及其机制的研究进展[J].中药新药与临床药理,2021,32(3):449.
- [6] DU H, HOU X, GUO Y, et al. Classic mechanisms and experimental models for the anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine[J]. Anim Models Exp Med, 2022, 5(2): 108.
- [7] 田新,李梓欣,战瑞雪,等.菊苣酸抗氧化及抗炎作用机制研究进展[J].中药材,2022,45(2):501.
- [8] CHEN L, LI J, ZHU Y, et al. Weed suppression and molecular mechanisms of isochlorogenic acid A isolated from *Artemisia argyi* extract via an activity-guided method[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(5): 1494.
- [9] 赵之丽.阴地蕨药材质量标准及其总黄酮抗氧化活性研究[D].武汉:湖北中医药大学,2018.
- [10] 黄李璐,郑雨,王希,等.木芙蓉叶抗氧化活性成分谱效关系研究[J].中国现代应用药学,2022,39(19):2489.
- [11] CHEN L, LIU Y, HUANG X, et al. Comparison of chemical constituents and pharmacological effects of different varieties of *Chrysanthemi Flos* in China[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(8): e2100206.
- [12] 朱芸芸,陈乐,魏晓晴,等.蕲艾治疗溃疡性结肠炎的活性筛选与作用评价[J].中草药,2021,52(16):4882.
- [13] HAN B, XIN Z, MA S, et al. Comprehensive characterization and identification of antioxidants in *Folium Artemisiae Argyi* using high-resolution tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2017, 1063: 84.
- [14] CHEN L, LI J, ZHU Y, et al. Caffeic acid, an allelochemical in *Artemisia argyi*, inhibits weed growth via suppression of mitogen-activated protein kinase signaling pathway and the biosynthesis of gibberellin and phytoalexin[J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 802198.
- [15] WANG X, CHENG K, LIU Z, et al. Bioactive constituents of *Mosla chinensis* cv. Jiangxiangru ameliorate inflammation through MAPK signaling pathways and modify intestinal microbiota in DSS-induced colitis mice[J]. Phytomedicine, 2021, 93: 153804.
- [16] SHI J J, LIU H F, HU T, et al. Danggui-Shaoyao-San improves cognitive impairment through inhibiting O-GlcNAc-modification of estrogen α receptor in female db/db mice[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114562.
- [17] WANG Y, FAN Z, YANG M, et al. Protective effects of E Se tea extracts against alcoholic fatty liver disease induced by high fat/alcohol diet: *in vivo* biological evaluation and molecular docking study[J]. Phytomedicine, 2022, 101: 154113.
- [18] LI H, FENG Y, SUN W, et al. Antioxidation, anti-inflammation and anti-fibrosis effect of phosphorylated polysaccharides from *Pleurotus djamor* mycelia on adenine-induced chronic renal failure mice[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 170: 652.
- [19] WANG Q, KUANG H, SU Y, et al. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(1): 9.
- [20] HAN S, SONG R, CAO Y, et al. Crocin mitigates atherosclerotic progression in LDLR knockout mice by hepatic oxidative stress and inflammatory reaction reduction, and intestinal barrier improvement and gut microbiota modulation[J]. J Funct Foods, 2022, 96: 105221.
- [21] CHEN C C, WANG Y H, SUN R Y, et al. Salidroside protects against caerulein with the LPS-induced severe acute pancreatitis through suppression of oxidative stress and inflammation in mice[J]. J Funct Foods, 2022, 96: 105179.
- [22] DUAN L, ZHANG C, ZHANG C, et al. Green extraction of phenolic acids from *Artemisia argyi* leaves by tailor-made ternary deep eutectic solvents[J]. Molecules, 2019, 24(15): 2842.
- [23] JEONG D, YI Y S, SUNG G H, et al. Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(3): 487.
- [24] 谭超杰,白丽丹,任晶,等.千斤拔总黄酮提取工艺的优化及其萃取相体外抗氧化活性研究[J].中国药理学杂志,2022,57(20):1710.
- [25] 王晴,钱玉梅,李红侠,等.道地药材王椰子花分级萃取总黄酮的抗氧化性及其对 CCl_4 致小鼠肝损伤的保护作用的研究[J].基因组学与应用生物学,2021,40(23):3181.
- [26] WU G R, DAI X P, LI X R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of rhamnagin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury and inflammation in rats[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017, 14(4): 201.
- [27] LI S, ZHOU S, YANG W, et al. Gastro-protective effect of edible plant *Artemisia argyi* in ethanol-induced rats via normalizing inflammatory responses and oxidative stress[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214: 207.
- [28] LI Y Y, TIAN Z H, SU S S, et al. Anti-apoptotic effect of Heidi-huangWan in renal tubular epithelial cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 302: 115882.
- [29] HAN X, CHENG X, XU J, et al. Activation of TREM2 attenuates neuroinflammation via PI3K/Akt signaling pathway to improve postoperative cognitive dysfunction in mice[J]. Neuropharmacology, 2022, 219: 109231.
- [30] ZHANG J, ZHANG M, ZHANG W H, et al. Total terpenoids of *Inula japonica* activated the Nrf2 receptor to alleviate the inflammation and oxidative stress in LPS-induced acute lung injury[J]. Phytomedicine, 2022, 107: 154377.

责任编辑 张宁宁