

李文举,罗福龙,王凤忠,等. 金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 79-89.
Li WJ, Luo FL, Wang FZ, et al. Exploring the mechanism of *Lonicerae japonicae flos* water extract in the treatment of sepsis [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 79-89.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.011

金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究

李文举^{1,2}, 罗福龙^{1,2}, 王凤忠², 贯东艳², 范蓓², Alberto Carlos Pires Dias³,
王琼^{2,4*}, 钟武^{1,5*}

(1.西南医科大学附属医院急诊医学部,四川 泸州 646000;2.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;
3.葡萄牙米尼奥大学生物系,分子和环境生物学中心,中葡药食植物资源研究中心,葡萄牙 布拉加 4710-057;
4.西南医科大学附属医院中医医院中葡中医药国际合作中心,四川 泸州 646000;5.四川省康复医院,成都 611139)

【摘要】 目的 研究金银花水提物(LJFWE)的成分,并研究金银花水提物改善脓毒症的相关机制,利用RAW 264.7小鼠巨噬细胞在体外验证其对败血症的影响。**方法** (1)用超高效液相色谱-高分辨质谱技术(UPLC-QE Orbitrap MS)测定金银花水提物的主要成分;(2)使用多个疾病数据库收集脓毒症靶点并结合生物信息学分析金银花水提物改善脓毒症潜在靶点;(3)建立小鼠RAW264.7巨噬细胞脓毒症模型,利用RT-qPCR研究金银花水提物对脓毒症核心靶点基因及炎症因子的调控作用。**结果** 用UPLC-QE Orbitrap MS在正、负离子模式下进行检测的结果与本地库及文献对比得到23个活性成分。预测出木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸可能为金银花改善脓毒症的主要活性成分,MAPK8、TP53、RELA、MAPK1及MYC可能为金银花改善脓毒症的关键靶点。RT-qPCR实验结果显示,与模型组相比较,金银花给药组中5个关键靶点基因(MAPK8、TP53、RELA、MAPK1、MYC)及炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10、iNOS、TNF- α)表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸可能为金银花水提物治疗脓毒症的主要有效成分,靶点基因MAPK8、TP53、RELA、MAPK1、MYC及炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10、iNOS、TNF- α)可能为金银花水提物治疗脓毒症的关键靶点,该研究为后续金银花治疗脓毒症的作用机制研究提供理论基础。

【关键词】 金银花;脓毒症;超高效液相色谱-高分辨质谱;RAW264.7细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0079-11

Exploring the mechanism of *Lonicerae japonicae flos* water extract in the treatment of sepsis

LI Wenju^{1,2}, LUO Fulong^{1,2}, WANG Fengzhong², GUAN Dongyan², FAN Bei², Alberto Carlos Pires Dias³, WANG Qiong^{2,4*}, ZHONG Wu^{1,5*}

(1. Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193.

3. Sino-PT Research Center for Medicinal and Food Plant Resources, Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, 4710-057, Braga, Portugal.

4. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 5. Sichuan Provincial Rehabilitation Hospital, Chengdu 611139)

【基金项目】 泸州市-西南医科大学联合课题(2019LZXNYDJ32);中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务(CAAS-ASTIP-2020-IFST);泸州市高端人才引进项目(刘新民团队);国家重点研发计划(2016YFE0131380)。

【作者简介】 李文举(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:创伤、脓毒症。E-mail:2551840559@qq.com

【通信作者】 钟武(1973—),男,教授,研究方向:创伤、脓毒症研究。E-mail:zhongwu2876@sina.com

王琼(1975—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:食药资源神经精神调节作用研究。E-mail:luyiwangqiong@163.com

* 共同通信作者

[Abstract] **Objective** To analyze the components of *Lonicerae japonicae flos* (the dried flower bud or newly bloomed flower of *Lonicerae japonicae* Thunb.) water extract (LJFWE) and its potential mechanism on improving sepsis, and to verify its effects on sepsis *in vitro* using RAW 264.7 murine macrophages cells. **Methods** (1) UPLC-QE Orbitrap MS was used to identify LJFWE compounds and search for the target genes on improving sepsis. (2) The multiple disease databases were used to build a sepsis target database. (3) RT-PCR was used to verify the core genes adjusted by LJFWE in sepsis, after the establishment of the RAW 264.7 cell sepsis model. **Results** 23 active components on improving sepsis were obtained under the UPLC-QE Orbitrap MS in positive and negative ion modes with comparing the local database and literature, including Luteolin, kaempferol, quercetin, loganin and caffeic acid in LJFWE. MAPK8, TP53, RELA, MAPK1 and MYC were predicted as the key targets. RT-qPCR results showed that LJFWE down-regulated the expression of inflammation-related factors (IL-1 β , IL-6, IL-10, iNOS, TNF- α) and five key target genes (MAPK8, TP53, RELA, MAPK1, MYC) compared with the model group. **Conclusions** Luteolin, kaempferol, quercetin, loganin, and caffeic acid may be the effective ingredients in the treatment of sepsis in LJFWE. MAPK8, TP53, RELA, MAPK1 and MYC and inflammation-related factors (IL-1 β , IL-6, IL-10, iNOS, TNF- α) may be the key targets of LJFWE in the treatment of sepsis. This study provided a theoretical basis for further verification of the mechanism of *Lonicerae japonicae flos* in the treatment of sepsis.

[Keywords] *Lonicerae japonicae flos*; sepsis; UPLC-QE Orbitrap MS; RAW 264.7 cell

脓毒症 (sepsis) 是 ICU 常见重症之一, 因为其起病快, 病死率高的特点, 目前已经成为国际上讨论的主要健康问题^[1]。在脓毒症的疾病发生发展过程中, 免疫调节失衡所导致的过度炎症和免疫抑制状态是导致多器官损伤的主要原因。目前主要以抗菌及多种支持治疗方案管理脓毒症患者, 但长期的侵入性检查、治疗易导致感染, 包括抗生素的过度使用出现的耐药性等副作用都在影响着脓毒症的治疗。因此, 中药结合抗生素方案逐渐成为脓毒症临床治疗探索的策略之一^[2-3]。

最新药理学研究表明, 金银花 (*Lonicerae japonicae flos*) 是一种具有抗炎、抗菌、免疫调节、抗氧化及抗病毒及等功能的中草药^[4]。其复方制剂如痰热清、热毒宁及金银花单体中部分成分被证明对脓毒症炎症抑制及免疫调节等有较好的辅助治疗效果^[5-6]。但目前对金银花改善脓毒症免疫状态的机制研究较少, 且由于金银花成分复杂, 二者相关结合研究存在困难。因此, 我们首先使用超高效液相色谱-高分辨质谱技术对金银花水提物进行成分分析。在此基础上, 通过小鼠 RAW264.7 巨噬细胞构建脓毒症细胞模型, 进而通过体外实验研究金银花改善脓毒症的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购于北京大学医学部。

1.2 主要试剂及仪器

金银花产自山东, 购自北京太洋树康药业有限责任公司 (批号 2008113), 经水提、浓缩、喷雾干燥、粉碎而成; DMEM 培养基 (Thermo Scientific, 批号 11965092); 胎牛血清 (Gibco, 批号: 10099141); LPS (Sigma 公司, 批号 12880); RNA 提取试剂盒 (艾德莱, 批号 RN28); cDNA 反转录试剂盒 (Promega, 批号 A5000); NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus (novoprotein, 批号: E096-01B)。细胞培养箱 (美国, Thermo); 酶标仪 (美国, MolecuLar Devices); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5430R)。UPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (赛默飞世尔科技公司); 超高效液相色谱系统 (赛默飞, Ultimate3000); 色谱柱 LO90AC18 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.7 μ m)。

1.3 实验方法

1.3.1 金银花水提物成分检测及活性靶点研究

(1) UPLC-QE-Orbitrap-MS 分析金银花水提物成分

精密移取金银花提取物 1 mg, 用 1 mL 70% 甲醇溶解, 超声处理 15 min, 离心 (1000 r/min, 10 min), 取上清, 过微孔滤膜 (0.22 μ m), 进行超高效液质 (UPLC-QE-Orbitrap-MS) 分析。色谱柱为 Waters UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.8 μ m); 流动相 A (甲酸水溶液: 0.1%), B (甲酸乙腈溶液: 0.1%); 梯度洗脱条件为 0~15 min: 5% B $\rightarrow$ 90% B; 15~20 min: 90% B, 20~20.1: 90% B $\rightarrow$ 5% B, 20.1

~30 min; 5% B; 流速为 0.3 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量为 5 μ L。该系统与 QE Orbitrap 质谱仪(美国 Thermo Fisher Science)相连。电喷雾离子源, 正、负离子切换全扫描(100~1500 Da 扫描范围), 离子源温度 320℃, 电离源电压 3.8 kV(+), 辅助气加热温度: 350℃, 分辨率 70000, 载气为高纯氮气, 鞘气流速 25 L/min, 辅助气流速 8 L/min, 碰撞能量 15、30、45 eV。使用 Compound Discoverer (2.1.0.401 版) 导入数据, 结合本地 OTCML 数据库进行成分预测。

(2) 金银花水提物活性成分的对靶点研究

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP: Traditional Chinese Medicine Database and Analysis Platform)、Swiss 靶点预测平台(Swiss Target Prediction)及相关文献检索筛选金银花活性成分及靶点数据, 通过 Perl 脚本对药物有效成分及对应靶点进行匹配。在 uniprot (<https://www.uniprot.org>) 依次选择“human”、“reviewed”下载最新所有已经验证的人类基因靶点信息数据包, 通过 Perl 脚本匹配金银花活性成分及对应靶点 Gene Symbol。

1.3.2 脓毒症疾病靶点研究

从 GEO 数据库下载 GSE28750^[7]、GSE54514^[8]、GSE67652^[9]、GSE69528^[10] 的脓毒症表达谱数据。GSE28750 包括 10 例脓毒症和 20 名健康人群的全血样本。GSE54514 基于基因芯片平台 GPL6947 (35 例脓毒症, 18 例健康样本), GSE67652 基于芯片平台 GPL16699 (12 名脓毒症患者及 12 名健康志愿者), 数据集 GSE69528 基于平台 GPL10558 (28 名健康人和 83 名脓毒症患者)。根据平台中的注释信息, 使用探针 ID 来识别相应的基因。使用 R 软件的 Limma 软件包(版本: 3.40.2)研究 mRNA 的差异表达, 校正数据批次。在 GEO 中分析了调整后的 P 值以纠正假阳性结果。以“Adjusted $P < 0.05$ 且 $\log_2$ (倍数变化) > 1 或 $\log_2$ (倍数变化) < -1 ”为阈值筛选差异表达基因。同时, 以关键词“sepsis”、“septic”、“septic shock”在 Genecard (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库搜索脓毒症疾病靶点, 使用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对疾病靶点进行靶点基因识别转换, 与 GEO 分析所得差异基因进行整合, 消除重复项, 最终得到脓毒症靶点基因数据库。

1.3.3 金银花水提物活性成分与脓毒症靶点相关性研究

基于 1.3.1、1.3.2 所整理的数据库, 使用 R 包根据金银花活性成分靶点与金银花水提物-脓毒症复合靶点预测出金银花治疗脓毒症活性成分, 通过 Perl 脚本和 Cytoscape 软件构建金银花活性成分-脓毒症靶点网络。

1.3.4 金银花水提物活性成分与脓毒症靶点蛋白质互作网络及核心基因研究

在上述分析结果的基础上, 我们将金银花活性成分对应靶点与脓毒症靶点基因数据库进行匹配, 得到金银花-脓毒症复合靶点, 上传至 STRING (<https://string-db.org/>) 在线平台进行蛋白质网络互作用(PPI)分析。本研究使用 STRING 数据库根据既往研究及大数据预测靶点基因来标注靶点基因与其他基因之间的功能交互作用, 并通过网络图形予以展示。我们可以认为处于节点的基因在生物过程中发挥更重要的作用。并将蛋白质互作网络图导入 Cytoscape 软件中, 使用 CytoNCA 插件计算靶点基因 BC、CC、Degree、Eigenvector、LAC、Network, 筛选出大于所有参数中位数的基因, 生成核心基因网络^[11]。

1.3.5 金银花治疗脓毒症的具有生物标志物特征的核心基因

为了对 1.3.4 中核心网络的基因赋予临床诊疗价值, 本研究使用受试者操作特征曲线(ROC)对核心网络的基因进行分析。通过比较 ROC 曲线下面积(AUC)评估所选金银花靶点对脓毒症治疗特性, 筛选其中 AUC > 0.8 的基因作为金银花水提物治疗脓毒症的潜在靶点基因。

1.3.6 金银花水提物对 RAW264.7 脓毒症细胞模型潜在靶点基因和炎症因子 mRNA 表达干预研究

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 使用完全培养基(含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基)在细胞培养箱中孵育(5% CO_2 , 37℃), 选择细胞 80% 密度时进行实验。除对照组外, 模型组和实验组均使用 LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 RAW264.7 细胞进行造模, 其中实验组造模前使用浓度为 75 $\mu\text{g/mL}$ 的金银花水提取物预处理 2 h。造模 24 h 后按照说明书流程使用 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA、反转录和实时荧光定量, 并计算各组中金银花水提物治疗脓毒症相关炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、iNOS)和关键靶点基因的相对表达量。 β -actin、IL-1 β 、IL-6、

MAPK1 和 MYC 等引物由擎科生物(中国,上海)设计、合成(表 1)。

1.4 统计学方法

实验数据统计学分析及图片生成均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行,结果用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 Student *t* 检验,以 $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金银花水提物的主要成分

UPLC-QE-Orbitrap-MS 检测结果显示,在正、负

离子流模式下共鉴定出 59 个可能的金银花水提物成分。经 TCMS_P、Swiss 数据库及网络文献检索分析出金银花水提物活性成分 23 个,预测出对应靶点 386 个。金银花水提物总离子流图见图 1,金银花水提物活性成分见表 2。

2.2 金银花水提物治疗脓毒症的活性成分和靶点

联合分析 GEO 数据库中的四个基因芯片(GSE28750、GSE54514、GSE67652、GSE69528)发现了 1298 个与脓毒症相关的差异表达基因(图 2A)。此外,整合了 Genecard、OMIM、TDD、Drugbank 4 大数据库的疾病靶标 2533 个(图

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	
β-actin	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG	R:CCAGTTGCTAACAATGCCATGT
IL-10	F:GTGGAGCAGGTGAAGAGTGA	R:TCGGAGAGAGGTACAAACGAG
IL-6	F:GCCCTCTTGGGACTGATGCT	R:GTGACTCCAGCTTATCTCTTGGT
IL-1β	F:AAATACCTGTGGCCTTGGGC	R:CTTGGGATCCACACTCTCCAG
TNF-α	F:TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG	R:GGTCTGGGCCATAGAAGTGA
iNOS	F:GAGGCCCAGGAGGAGAGATCCG	R:TCCATGCAGACAACCTTGGTGTTG
AKT1	F:TCGTGTGGCAGGATGTGTAT	R:ACACACTCCATGCTGTCATCTT
TP53	F:CACGTACTCCTCCCCTCA	R:CACCCGGATAAGATGCTGGG
MAPK1	F:ACCAACCTCTCGTACATCGG	R:TTCTCATGTCTGAAGCGCAGT
RELA	F:CTGCCGAGTAAACCGGAAC	R:GCCTGGTCCCGTGAAATACA
MAPK8	F:CCACCAAAGATCCCGGACAA	R:GCTGCACCTGTGCTAAAGGA
MYC	F:CTAGTGCTGCATGAGGAGACA	R:CTGGTGAGTGGAGACGTGG
JUN	F:GCACATCCACCACTACACCGA	R:GGGAAGCCTGTTCTGGCTAT
FOS	F:ATGGGCTCTCCTGTCAACAC	R:GTCTTCACCATTCGCCGCTCT

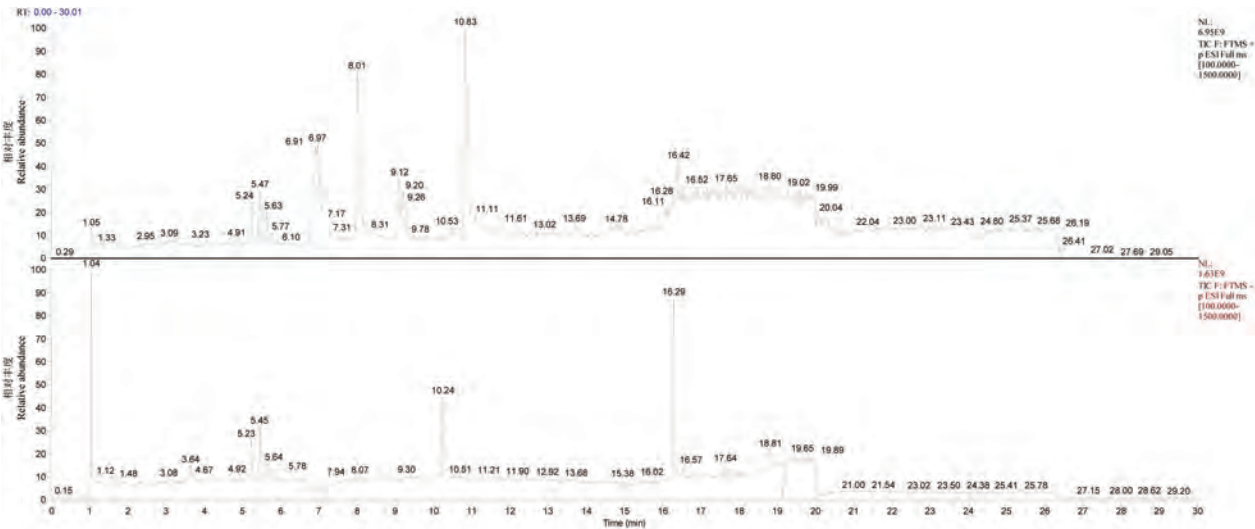


图 1 金银花水提物总离子流图

Figure 1 Total ion current chromatogram of *Lonicera japonica flos*

2B),将疾病靶标与 GEO 分析结果相结合并消除重复值,进而确定了 3831 个脓毒症相关靶点。将金银花的活性成分靶标与脓毒症的疾病靶标进行匹配,筛选出 244 个金银花和脓毒症的复合靶标(图 2C)。使用 Cytoscape 软件生成金银花水提物治疗脓毒症靶点-成分网络图(图 3),按照 Degree 度值对化合物进行排名,木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸为排名前五的金银花水提物治疗脓毒症成分。

2.3 金银花水提物治疗脓毒症的核心靶点网络

将 244 个共同靶点上传至 STRING,生成蛋白质相互作用网络图,置信度得分设置为 0.4,共有 244 个节点,4902 条边,平均节点度值 40.2(图 4A)。将上述 PPI 网络导入 cytoscape 后使用 CytoNCA 插件对 PPI 网络进行 BC、CC、Degree、Eigenvector、LAC、Network 计算分析,再使用 Perl 脚本筛选出所有条件都大于中位值的核心基因,循环计算 2 次(第二次循环 Betweenness > 21.0496、Closeness > 0.5212、Degree>9、Eigenvector>0.1078、LAC>4.125、Network >5.0142),最终预测出 17 个核心靶点基因(图 4B、4C)(表 3): MYC、ESR1、SRC、JUN、RB1、CCND1、MAPK8、TP53、NFKBIA、FOS、MAPK1、AKT1、HSP90AA1、PIK3R1、RELA、TNF、EGFR。

2.4 金银花治疗脓毒症的具有生物标志物特征的核心基因

脓毒症诊断特性的 ROC 曲线结果显示核心靶点基因 MAPK8、TP53、RELA、MAPK1 和 MYC 的 ROC 曲线下面积(AUC) > 85($P < 0.05$)。对脓毒症诊断特异性、敏感性均大于 80,表现出了对脓毒症诊断较好的较好敏感性和特异性,进而选取作为金银花水提物治疗脓毒症的具有生物标志物特性的关键靶点基因进一步验证分析。见图 5。

2.5 金银花水提物对脓毒症相关靶点和炎症因子的调控作用

用 RT-qPCR 测量脓毒症 8 个关键靶点基因(MAPK8、JUN、RELA、AKT1、MAPK1、TP53、MYC、FOS)及相关炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10、iNOS、TNF- α)的相对表达水平。结果显示,与正常组相比,LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中脓毒症相关关键靶点基因和炎症因子表达显著上调($P < 0.05$)。与模型组相比,金银花药物干预组 MAPK8、TP53、RELA、MAPK1、MYC 和炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-10、

iNOS、TNF- α 表达显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6、图 7。

表 2 金银花水提物成分表
Table 2 Constituents of *Lonicerae japonicae flos* water extract

出峰时间 (min) RT	化合物名 Name	分子式 Formula	分子量 Molecular weight
1.998	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951
5.071	金丝桃苷 Hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955
5.702	异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268
5.071	异槲皮苷 Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955
3.068	绿原酸 Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951
3.632	1-咖啡酰奎宁酸 1-Caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951
4.071	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268
4.108	断氧化马钱苷 Secoxyloganin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.1319
5.32	1,3-二咖啡酰奎宁酸 1,3-Dicaffeoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268
10.661	槲皮素 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.0427
4.649	莫诺苷($\alpha + \beta$) Morroniside	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	406.1475
5.702	3,5-二-O-咖啡酰基奎宁酸 3,5-Dicaffeoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.1268
5.067	木犀草苷 Cynaroside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1006
4.174	咖啡酸 Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.0423
3.941	马钱子苷 Loganin	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	390.1526
3.739	对羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317
1.998	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	126.0317
3.739	原儿茶醛 Protocatechualdehyde	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317
5.067	荭草苷 Orientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1006
1.049	烟酸 Nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032
7.069	木犀草素 Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.0477
1.105	右旋奎宁酸 Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.0634
7.069	山奈酚 Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.0477

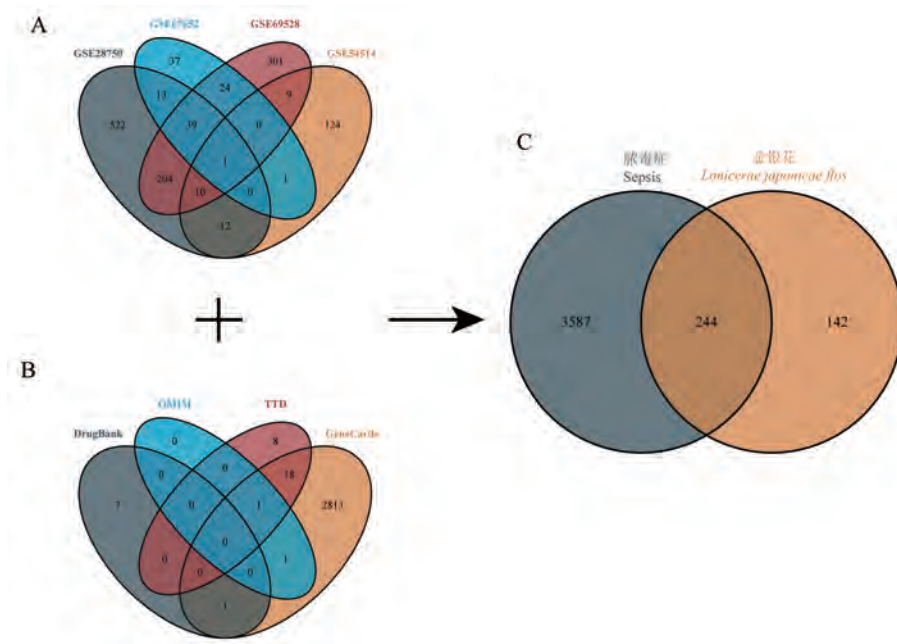


图2 金银花活性成分靶点与脓毒症靶点韦恩图

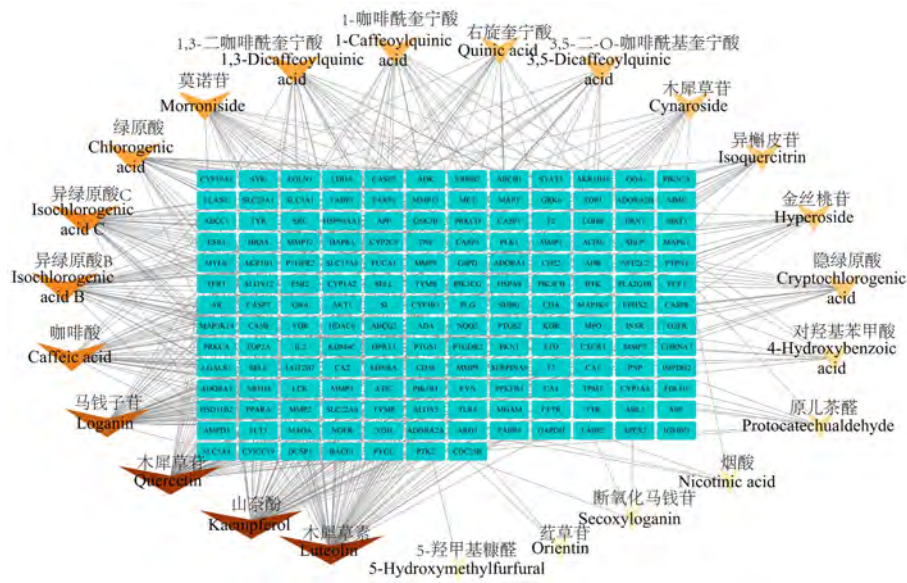
Figure 2 Venn diagram of *Lonicerae japonicae flos* active ingredient target genes and sepsis target genes

图3 金银花活性成分-脓毒症靶点网络图

Figure 3 *Lonicerae japonicae flos* active ingredient-sepsis target network

3 讨论

本研究中,金银花水提物对细胞脓毒症模型炎症显示出显著的抑制作用。通过 UPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS 检测得到金银花水提物主要成分,结合网络药理学对金银花进行成分分析及脓毒症治疗机制预测,发现金银花水提物的五种主要成分木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸参与抑制脓毒症炎症,进一步研究实验表明,MAPK8、

TP53、RELA、MAPK1、MYC 可能为金银花作用于脓毒症的关键药物靶点。

金银花水提物对脓毒症作用靶点的调控作用明显。导致脓毒症炎症反应失衡的相关靶点和通路很多,包括 MAPK、NF- κ B、IL-17、AMPK 及 mTOR 等通路及靶点。其中,MAPK 通路在致炎条件刺激下通过 ERK、JNK、P38 等途径在调控炎症因子生成

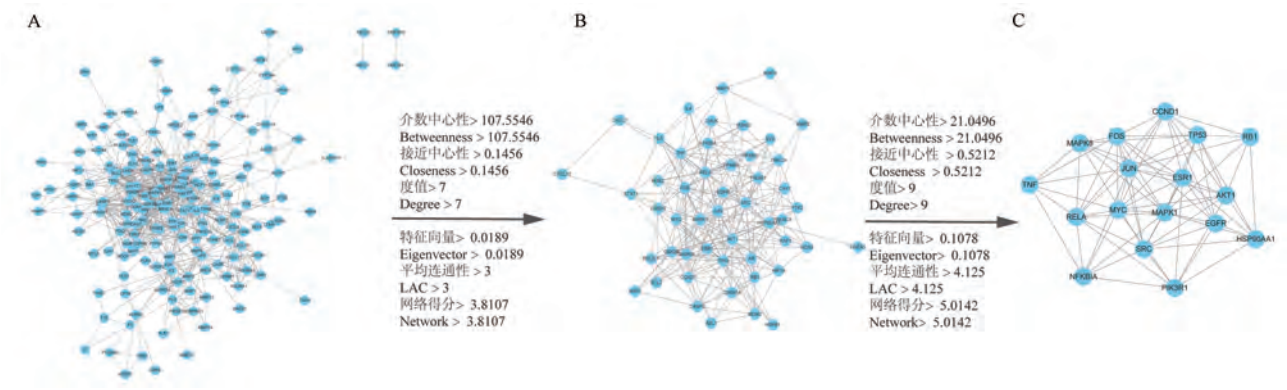


图 4 金银花-脓毒症基因靶点 PPI 网络图和核心靶点网络图
Figure 4 *Lonicerae japonicae flos* sepsis PPI network and hub genes network

表 3 金银花治疗脓毒症核心基因
Table 3 *Lonicerae japonicae flos* sepsis hub genes

基因名 Name	介数中心性 Betweenness	接近中心性 Closeness	度值 Degree	特征向量 Eigenvector	平均连通性 LAC	网络得分 Network
MYC	37. 52297	0. 569767	16	0. 208489	7. 125	9. 405417
ESR1	70. 69118	0. 583333	16	0. 205618	6. 875	9. 494838
SRC	229. 3595	0. 636364	22	0. 23249	6. 272727	12. 49145
JUN	137. 5753	0. 628205	23	0. 267375	8. 086957	15. 34108
RB1	42. 76485	0. 556818	14	0. 165577	5. 571429	7. 737926
CCND1	26. 45909	0. 538462	13	0. 17223	5. 846154	6. 817677
MAPK8	70. 62577	0. 569767	15	0. 180303	5. 066667	7. 113209
TP53	127. 9422	0. 620253	23	0. 256084	8	16. 34232
NFKBIA	22. 40634	0. 544444	13	0. 150243	6. 153846	8. 512446
FOS	24. 27865	0. 563218	14	0. 187525	7	8. 509402
MAPK1	194. 747	0. 653333	24	0. 272913	7. 666667	14. 99922
AKT1	208. 1612	0. 644737	25	0. 262363	6. 96	15. 83603
HSP90AA1	226. 0607	0. 6125	20	0. 203326	5. 8	10. 75064
PIK3R1	34. 73842	0. 550562	12	0. 146295	4. 5	5. 606277
RELA	216. 2185	0. 628205	23	0. 223358	6. 347826	14. 42423
TNF	126. 8067	0. 576471	17	0. 155512	4. 705882	8. 535943
EGFR	49. 87631	0. 576471	14	0. 162915	5. 285714	6. 936896

方面发挥重要作用。本次研究发现 MAPK 通路中的 MAPK8、MAPK1 与下游通路 RELA、TP53 及 MYC 在金银花水提物改善脓毒症炎症过程中起了关键作用。MAPK8、MAPK1 与 RELA、TP53 及 MYC 在先前的文献研究被提及通过 MAPK/NF- κ B、MAPK/P53、MAPK/c-MYC 通路^[12-14]在免疫介导多种炎症疾病中发挥作用。其中,TP53 为肿瘤抑制基因,败血症期间 T 淋巴细胞中的 P53 表达可能有助于增强 T 细胞的凋亡,导致免疫功能障碍^[15],TP53 通过负向调节 mTOR 通路,在真菌脓毒症期间通过自噬-凋亡途径对促进 CD4T 细胞细胞自噬发挥重要的作用^[16-17]。MAPK1 和 MAPK8 是 MAPK 通路中的主要亚族,当炎症反应发生时,中 MAPK1 通过 NOD 样通路将外部信号由细胞膜传递到细胞核,促进由 NF- κ B 信号通路介导的各种炎症因子(如:

TNF- α 和 IL-1 β)的释放,加重细胞损伤^[18]。另有针对 MAPK3/MAPK1 信号通路的靶向药物在治疗如小鼠海马体炎症^[19]、系统性红斑狼疮^[20]及急性肺部炎症^[21]等各种炎症性疾病中具有重要的价值^[21]。最新研究表明,在莲花清瘟治疗小鼠脓毒症急性肺损伤实验中,通过网络药理学分析及实验验证,同样筛选出 TP53、MAPK1、MAPK8 为脓毒症治疗关键靶点基因,并可能通过抑制 P53 介导的内在细胞凋亡途径减轻 LPS 诱导的急性肺损伤^[22]。另一关键靶点基因 RELA 在机体免疫过程中可被 IL-1 β 以及 TNF- α 等细胞因子激活,进而活化 NF- κ B 发挥促炎作用^[23]。还可通过 MAPK/c-Myc 通路调节巨噬细胞极化来减轻败血症诱导的急性肺损伤^[24]。上述文献研究表明,我们的实验结果符合这 5 个靶点基因在脓毒症炎症相关信号通路中所涉及

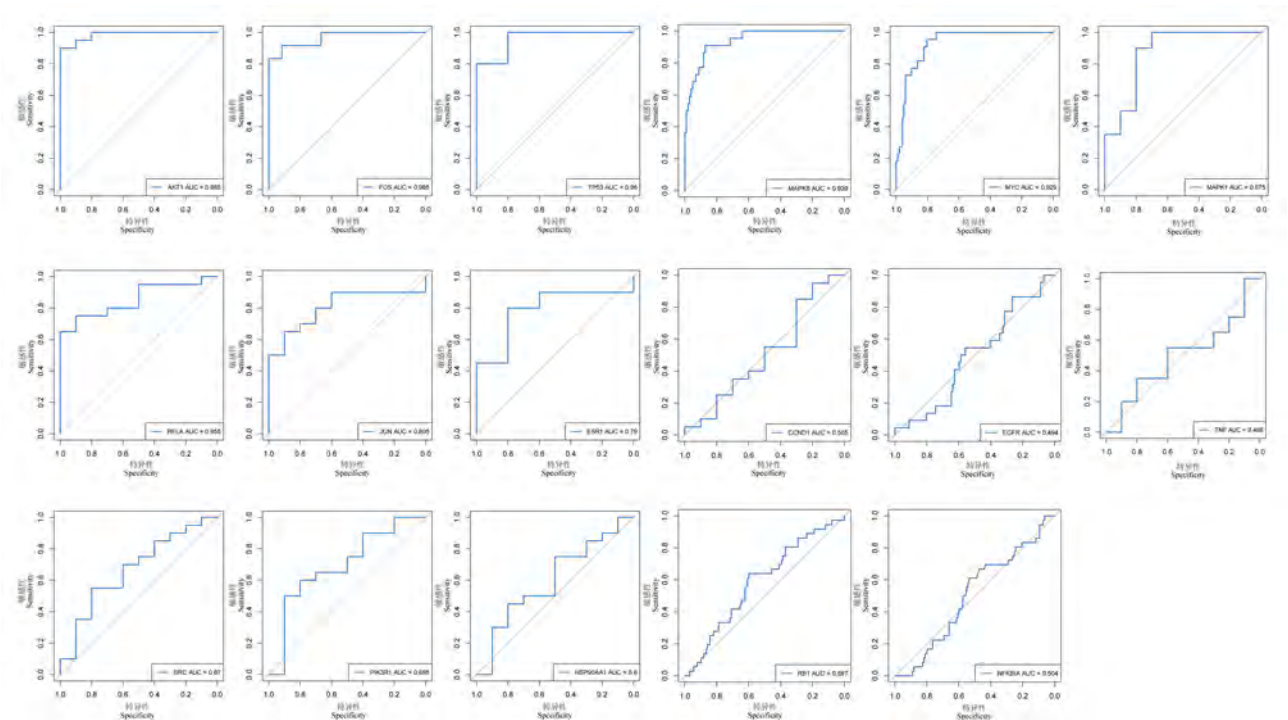
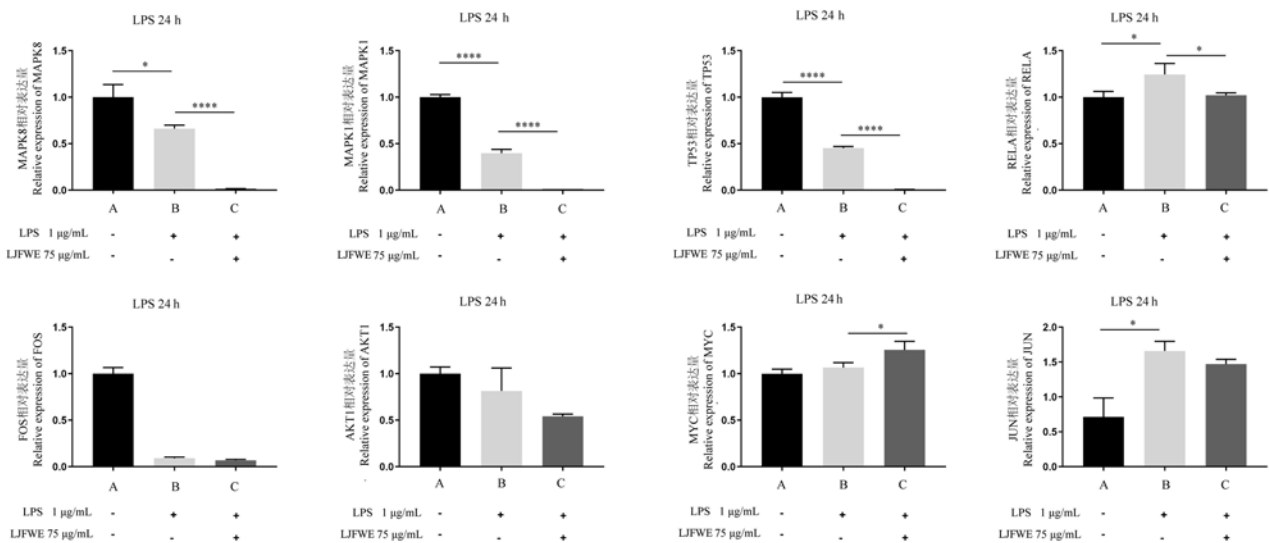


图 5 金银花治疗脓毒症核心基因 ROC 曲线

Figure 5 *Lonicerae japonicae flos* sepsis hub genes ROC curve

注: A: 对照组; B: 模型组; C: 金银花药物干预组。与对照组相比, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 金银花对脓毒症关键靶点基因相对表达量的调控作用

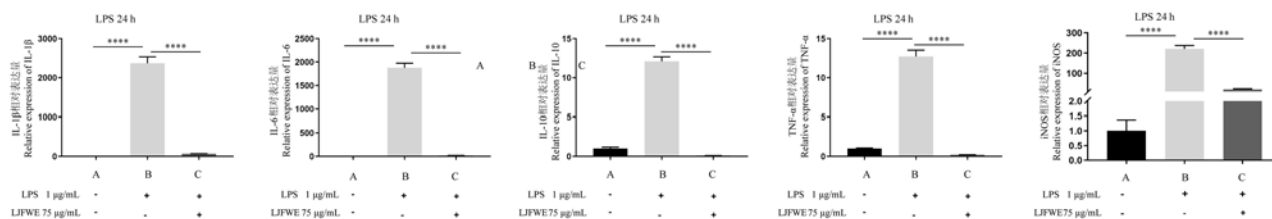
Note. A, Control group. B, Model group. C, *Lonicerae japonicae flos* intervention group. Compared with the control group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

Figure 6 Effect of *Lonicerae japonicae flos* on relative expression of sepsis related hub genes

的基因的表达情况,金银花水提物在 LPS 脓毒症细胞模型中抑制了 TP53、MAPK8、MAPK1、RELA 表达,上调 MYC 基因表达。这表明金银花水提物中的多种活性成分可能通过作用于上述靶点及所在通路,调控过度炎症反应和免疫抑制来改善脓毒症的免疫失调,以及改善随后导致的多器官功能障碍和

并发症。

长期大量的临床观察研究表明,脓症患者免疫功能受损所导致的炎症反应失调是脓症患者病情进展的重要原因^[25-26],而金银花所含的主要成分在预防和改善脓毒症方面的作用已有初步探索。本研究使用 RT-qPCR 对脓毒症细胞模型的炎症实



注:A:对照组;B:模型组;C:金银花药物干预组。与对照组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图7 金银花对脓毒症相关炎症基因相对表达量的调控作用

Note. A, Control group. B, Model group. C, *Lonicera japonica flos* intervention group. Compared with the control group, **** $P < 0.0001$.

Figure 7 Effect of *Lonicera japonica flos* on relative expression of sepsis related inflammatory genes

验结果表明,LPS造模后,IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 等炎症因子及其诱导基因iNOS均高表达。与针对单一靶点的西药不同,中药可以通过多成分作用于多靶点来进行整体施治。当代中医认为脓毒症发生发展主因“毒”、“瘀”、“虚”。邪气侵袭,正邪交争,生痰生瘀,继而脉络瘀滞,致使脏腑不得气血濡养,机能紊乱,甚者内闭外脱。同时邪气流注亦可令正气渐伤,日久邪实正虚,正气将绝^[2,27]。目前中医治疗脓毒症首选清热解毒疗法,其中单味中药金银花及提取物在目前研究中表现出良好的免疫调节功效^[28]。金银花是我国传统清热解毒中药之一,药理学分析表明金银花的主要成分为黄酮、有机酸、挥发油及其他类物质,具有显著的清热解毒、抗炎、抗菌及抗氧化等功效。近年来的研究显示出金银花水提取物的某些成分在预防和改善脓毒症方面有较好的效果,特别是其中的黄酮及有机酸类化合物,如绿原酸^[29]、金丝桃苷^[30]、槲皮素^[31]、异槲皮苷^[32]及木犀草苷^[6]等成分在既往研究中均被证明可预防脓毒症及其并发症,并且能减少脓毒症过程中炎症因子产生。既有研究表明,木犀草素可以改善脓毒症小鼠的急性肺损伤^[33];在LPS诱导的巨噬细胞和小鼠模型中,抑制高迁移率族蛋白B1,降低炎症因子释放和脓毒症小鼠死亡率^[34]。山奈酚可减轻小鼠脓毒症盲肠结扎穿孔模型的急性肺损伤^[35],和白杨素协同作用时能提高败血症小鼠的存活率^[36]。槲皮素能通过减轻炎症和氧化应激、降低TOLL样受体的基因表达,调节免疫状态,改善脓毒症器官损伤^[37]。马钱子苷通过调节巨噬细胞极化和抑制NLRP3炎症小体激活减轻脓毒症诱导的急性肺损伤^[38]。咖啡酸衍生物绿原酸及咖啡酸苯乙酯可降低脓毒症大鼠的炎症和氧化应激^[39]。在本研究中,同样含有木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸五种主要成分的金银花水提取物在LPS脓毒症模型中抑制了炎症因子IL-1 β 、IL-6、IL-10、

TNF- α 、iNOS基因mRNA的表达,进一步证实了上述早期发现。

近几年研究发现,脓毒症患者早期同时存在炎症反应过度激活和免疫抑制状态,二者相互作用,共同影响脓毒症的发生发展^[40]。这也解释了为什么单纯地抗感染治疗并不能明显改善脓毒症患者预后。现在,我们可以利用超高效液相质谱技术分析中药有效成分和生物信息学大数据分析相关靶点,筛选出金银花改善脓毒症的基因并探索其机制,为金银花在脓毒症的临床治疗找到关键靶点,为后期药物研发提供理论依据和实验基础。

综上,我们对金银花治疗脓毒症的活性成分及药物-脓毒症核心靶点进行了研究,发现金银花治疗脓毒症具有多成分、多靶点的特点,并找出金银花治疗脓毒症可能的活性成分木犀草素、山奈酚、槲皮素、马钱子苷和咖啡酸,以及金银花防治脓毒症的机制与调控MAPK及下游通路靶点TP53、MAPK8、MAPK1、RELA、MYC和调控的炎症因子IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、iNOS有关。此研究为金银花活性成分如何发挥治疗脓毒症的深入研究提供参考,也为相关疾病治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(7): 417-427.
- [2] Fan TT, Cheng BL, Fang XM, et al. Application of Chinese medicine in the management of critical conditions: a review on sepsis [J]. Am J Chin Med, 2020, 48(6): 1315-1330.
- [3] Joachim RB, Altschuler GM, Hutchinson JN, et al. The relative resistance of children to sepsis mortality: from pathways to drug candidates [J]. Mol Syst Biol, 2018, 14(5): e7998.
- [4] Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ, et al. The ethanol extract of *Lonicera japonica* (Japanese honeysuckle) attenuates diabetic nephropathy by inhibiting p-38 MAPK activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Planta Med, 2014, 80(2-3): 121-129.

- [5] 李国新, 窦静, 房颖, 等. 他汀类药物联合痰热清注射液治疗脓毒症合并急性肺损伤疗效及对外周血 HMGB1、IL-6、IL-17、IL-33 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(16): 1781-1786.
- [6] Wang Z, Chen W, Li Y, et al. Reduning injection and its effective constituent luteolide protect against sepsis partly via inhibition of HMGB1/TLR4/NF- κ B/MAPKs signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113783.
- [7] Sutherland A, Thomas M, Brandon RA, et al. Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis [J]. Crit Care, 2011, 15(3): R149.
- [8] Parnell GP, Tang BM, Nalos M, et al. Identifying key regulatory genes in the whole blood of septic patients to monitor underlying immune dysfunctions [J]. Shock, 2013, 40(3): 166-174.
- [9] Vieira Da Silva Pellegrina D, Severino P, Vieira Barbeiro H, et al. Septic shock in advanced age: transcriptome analysis reveals altered molecular signatures in neutrophil granulocytes [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128341.
- [10] Pankla R, Buddhisa S, Berry M, et al. Genomic transcriptional profiling identifies a candidate blood biomarker signature for the diagnosis of septicemic melioidosis [J]. Genome Biol, 2009, 10(11): R127.
- [11] Tang Y, Li M, Wang J, et al. CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks [J]. Biosystems, 2015, 127: 67-72.
- [12] Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119214.
- [13] Zhu J, Bing C, Wilding JPH. 1 α ,25(OH) $_2$ D attenuates IL-6 and IL-1 β -mediated inflammatory responses in macrophage conditioned medium-stimulated human white preadipocytes by modulating p44/42 MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Diabetol Metab Syndr, 2019, 11: 9.
- [14] Chen Y, Li L, Zhang J, et al. Dexmedetomidine alleviates lipopolysaccharide-induced hippocampal neuronal apoptosis via inhibiting the p38 MAPK/c-Myc/CLIC4 signaling pathway in rats [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(11): 5533-5547.
- [15] Zhang H, Xu CF, Ren C, et al. Novel role of p53 in septic immunosuppression: involvement in loss and dysfunction of CD4 $^+$ T lymphocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(1): 452-469.
- [16] Tiwari M, Sharma LK, Vanegas D, et al. A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2: modulation of autophagy [J]. Autophagy, 2014, 10(6): 1054-1070.
- [17] Wang H, Bai G, Cui N, et al. T-cell-specific mTOR deletion in mice ameliorated CD4 T-cell survival in lethal sepsis induced by severe invasive candidiasis [J]. Virulence, 2019, 10(1): 892-901.
- [18] Guo MF, Dai YJ, Gao JR, et al. Uncovering the mechanism of astragalus membranaceus in the treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 5947304.
- [19] Chang J, Zhang Y, Shen N, et al. MiR-129-5p prevents depressive-like behaviors by targeting MAPK1 to suppress inflammation [J]. Exp Brain Res, 2021, 239(11): 3359-3370.
- [20] Zhao X, Li S, Wang Z, et al. miR-101-3p negatively regulates inflammation in systemic lupus erythematosus via MAPK1 targeting and inhibition of the NF- κ B pathway [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 359.
- [21] Di Paola R, Crisafulli C, Mazzone E, et al. Effect of PD98059, a selective MAPK3/MAPK1 inhibitor, on acute lung injury in mice [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2009, 22(4): 937-950.
- [22] Yang R, Yang H, Wei J, et al. Mechanisms underlying the effects of Lianhua Qingwen on sepsis-induced acute lung injury: a network pharmacology approach [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 717652.
- [23] Muxel SM, Laranjeira Silva MF, Carvalho Sousa CE, et al. The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages [J]. J Pineal Res, 2016, 60(4): 394-404.
- [24] Zhang Y, Huang T, Jiang L, et al. MCP-induced protein 1 attenuates sepsis-induced acute lung injury by modulating macrophage polarization via the JNK/c-Myc pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105741.
- [25] Misra AK, Levy MM, Ward NS. Biomarkers of Immunosuppression [J]. Crit Care Clin, 2020, 36(1): 167-176.
- [26] Davis FM, Schaller MA, Dendekker A, et al. Sepsis induces prolonged epigenetic modifications in bone marrow and peripheral macrophages impairing inflammation and wound healing [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(11): 2353-2366.
- [27] Zhao GZ, Chen RB, Li B, et al. Clinical practice guideline on traditional Chinese medicine therapy alone or combined with antibiotics for sepsis [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(6): 122.
- [28] 赵国桢, 赵京霞, 陈腾飞, 等. 近年中医文献中药治疗脓毒症的用药情况分析 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(5): 764-767.
- [29] Lee CH, Yoon SJ, Lee SM. Chlorogenic acid attenuates high mobility group box 1 (HMGB1) and enhances host defense mechanisms in murine sepsis [J]. Mol Med, 2013, 18(1): 1437-1448.
- [30] Zhang J, Liu Y, Liu L. Hyperoside prevents sepsis-associated cardiac dysfunction through regulating cardiomyocyte viability and inflammation via inhibiting miR-21 [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111524.
- [31] Feng J, Liu Z, Chen H, et al. Protective effect of cynaroside on sepsis-induced multiple organ injury through Nrf2/HO-1-dependent macrophage polarization [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 174522.
- [32] Huang SH, Xu M, Wu HM, et al. Isoquercitrin attenuated cardiac dysfunction via AMPK α -dependent pathways in LPS-treated mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(24): e1800955.
- [33] 孙力超, 陈旭, 姚尧, 等. 木犀草素对脓毒症小鼠急性肺损

- 伤的保护作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(6): 717-723.
- [34] 毕爱静. 木犀草素通过抑制 HMGB1 释放发挥抗炎作用的机理研究[D]. 南京: 南京大学, 2015.
- [35] Rabha DJ, Singh TU, Rungsung S, et al. Kaempferol attenuates acute lung injury in caecal ligation and puncture model of sepsis in mice [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(2): 63-78.
- [36] Harasstani OA, Tham CL, Israf DA. Kaempferol and chrysin synergies to improve septic mice survival [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 92.
- [37] Karimi A, Naeini F, Asghari Azar V, et al. A comprehensive systematic review of the therapeutic effects and mechanisms of action of quercetin in sepsis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153567.
- [38] Zhang J, Wang C, Wang H, et al. Loganin alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107529.
- [39] Alici O, Kavakli HS, Koca C, et al. Value of caffeic acid phenethyl ester pretreatment in experimental sepsis model in rats [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 810948.
- [40] Angus DC, Opal S. Immunosuppression and secondary infection in sepsis: part, not all, of the story [J]. *JAMA*, 2016, 315(14): 1457-1459.

[收稿日期]2021-11-27

(上接第 47 页)

- [6] Hu Q, Wang Q, Han C, et al. Sufentanil attenuates inflammation and oxidative stress in sepsis-induced acute lung injury by downregulating KNG1 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 4298-4306.
- [7] Liu J, Huang X, Hu S, et al. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats by inhibition of caveolin-1 downstream signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109314.
- [8] 李梦倩, 李彬, 董铁立. 右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤时 RIPK3/MLKL 介导程序性坏死的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(9): 909-912.
- [9] Zhang L, Tai Q, Xu G, et al. Lipoxin A4 attenuates the lung ischaemia reperfusion injury in rats after lung transplantation [J]. *Ann Med*, 2021, 53(1): 1142-1151.
- [10] Mo Y, Sun YY, Liu KY. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8): 1388-1396.
- [11] 温文, 郭光伟, 黄志刚, 等. 芬太尼联合丙泊酚对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国现代医生*, 2014, 52(15): 10-13.
- [12] 许畅, 俞晨晨, 李桦, 等. 舒芬太尼与右美托咪啶联合用药在大鼠中的药动学及其镇静作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 1(33): 63-69.
- [13] 丁荷蓓, 王珣, 陈为国. 右美托咪定联合舒芬太尼对大鼠认知功能的影响及机制研究 [J]. *河北医药*, 2019, 41(17): 2681-2684.
- [14] Gao W, Jiang T, Liu YH, et al. Endothelial progenitor cells attenuate the lung ischemia/reperfusion injury following lung transplantation via the endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 157(2): 803-814.
- [15] Wu GC, Liao WI, Wu SY, et al. Targeting of nicotinamide phosphoribosyltransferase enzymatic activity ameliorates lung damage induced by ischemia/reperfusion in rats [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 71.
- [16] Liao WI, Wu SY, Tsai SH, et al. 2-methoxyestradiol protects against lung ischemia/reperfusion injury by upregulating annexin a1 protein expression [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 596376.
- [17] Singh R, Dubey V, Wolfson D, et al. Quantitative assessment of morphology and sub-cellular changes in macrophages and trophoblasts during inflammation [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(7): 3733-3752.
- [18] Li Y, Feng YF, Liu XT, et al. Songorine promotes cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2 induction during sepsis [J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101771.
- [19] Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, et al. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1 [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1232-1240.
- [20] Amin FU, Shah SA, Badshah H, et al. Anthocyanins encapsulated by PLGA@PEG nanoparticles potentially improved its free radical scavenging capabilities via p38/JNK pathway against A β_{1-42} -induced oxidative stress [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 12.
- [21] Yang X, Pan W, Xu G, et al. Mitophagy: A crucial modulator in the pathogenesis of chronic diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 245-254.
- [22] Liu X, Cao H, Li J, et al. Autophagy induced by DAMPs facilitates the inflammation response in lungs undergoing ischemia-reperfusion injury through promoting TRAF6 ubiquitination [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(4): 683-693.
- [23] Zhang J, Wang JS, Zheng ZK, et al. Participation of autophagy in lung ischemia-reperfusion injury *in vivo* [J]. *J Surg Res*, 2013, 182(2): e79-e87.
- [24] Thapalia BA, Zhou Z, Lin X. Autophagy, a process within reperfusion injury: an update [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8322-8341.
- [25] 王建伟, 李佳, 曹利艳, 等. 右美托咪定对大鼠离体肺缺血再灌注损伤时自噬的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(11): 1401-1404.

[收稿日期]2021-09-28