

基于网络药理学探究油用牡丹抗炎活性成分和作用机制

武楠楠, 孙锦月, 何聪芬*

北京工商大学 化学与材料工程学院 植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048

摘要:通过网络药理学和体外实验,分析油用牡丹抗炎的有效成分和作用机制。对从中药数据库和文献中得到的油用牡丹成分进行 ADME 筛选,得到活性成分 91 种,其作用靶点 716 个。从疾病数据库中获得皮肤炎症靶点 1 009 个。对两者取交集得到 152 个油用牡丹抗炎靶点,对油用牡丹抗炎靶点进行蛋白质相互作用网络分析,根据蛋白关联度可知核心靶点涉及 TNF- α 、IL-6、PTGS2 等。对油用牡丹抗炎靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,主要涉及对炎症反应、细菌来源分子反应等生物过程。体外细胞实验采用脂多糖诱导的 RAW 264.7 炎症细胞模型,检测不同浓度的油用牡丹提取物对细胞分泌 TNF- α 、IL-6、NO、COX-2 的影响。结果显示,1%、0.5%、0.25%、0.13% 体积浓度下的油用牡丹提取物均抑制炎症损伤模型 TNF- α 、IL-6、NO、COX-2 的表达。

关键词:油用牡丹; COX-2; 抗炎; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R993

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0104-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.014

Anti-inflammatory active ingredients and mechanism of oil peony based on network pharmacology

WU Nan-nan, SUN Jin-yue, HE Cong-fen*

Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, School of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: Through network pharmacology and in vitro experiments, the active ingredients and mechanism of oil peony for anti-inflammatory were analyzed. ADME screening was carried out on the oil peony components obtained from TCMS database and 91 active ingredients and 716 targets were obtained. A total of 1 009 targets of skin inflammation were obtained from the disease database. Taking the intersection of the two, 152 anti-inflammatory targets of peony oil were obtained and the PPI network of them was constructed. The core targets involved TNF- α , IL-6, PTGS2 and so on. GO and KEGG enrichment analysis of oil peony anti-inflammatory targets mainly involved in biological processes such as the response to inflammation and the response to bacteria derived from molecules. The RAW 264.7 inflammatory cell model induced by lipopolysaccharide was used in the in vitro test, and the effects of different concentrations of oil peony extract on the secretion of TNF- α , IL-6, NO, and COX-2 were detected. The results showed that the concentrations of 1%, 0.5%, 0.25% and 0.13% could inhibit the expression of them in the inflammatory injury models.

Key words: oil peony; COX-2; anti-inflammatory; network pharmacology; mechanism

油用牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr, PSA) 又称油料牡丹,其籽实产量高、含油量高 (>22%),是毛茛科芍药亚科芍药属的一种灌木植物,主要分布在山东、河南、甘肃、四川、云南北部,陕西等地^[1]。油用牡丹作为我国新兴的木本油料植物,可以生产高品质的食用油。除去油用牡丹籽的油用价值外,它的籽油、花、叶、根等部位含有大量活性成分,具有较

高药用价值,如抗癌、抗氧化、降血压血脂、促进细胞再生、延缓衰老和美白等^[2-4]。近年来关于牡丹抗炎镇痛的作用多有报道,梁等证实野牡丹水煎液可抑制二甲苯所致的小鼠耳肿胀的炎症反应及醋酸所致的小鼠腹腔毛细血管通透性增加的疼痛反应^[5],但是关于油用牡丹抗炎作用机制及核心成分并不明确。

炎症是人体的一种自我保护机制,属于基本免疫反应,是人体暴露于紫外线、细菌病毒或有毒化学

物等时发生的基本病理过程。其症状一般为“红、肿、热、痛、功能障碍”^[6]。现代研究发现油用牡丹中含有不饱和脂肪酸、低聚萜类和单萜苷成分,具有很强的生物活性和良好的抗炎作用,对大肠杆菌、绿脓杆菌等皮肤有害菌也有相对较好的抑制效果^[8]。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是体内催化花生四烯酸合成前列腺素的关键酶。它属于膜结合蛋白,主要存在于哺乳动物细胞的微粒体中,是非甾体类抗炎药物的作用靶点。在哺乳动物细胞中,COX表达两个亚型,其中COX-1是由管家基因PTGS1编码的组成型酶,与正常细胞中前列腺素家族的合成有关,参与机体正常生理功能的维持;COX-2是一种由PTGS2基因编码的诱导型酶,细胞处于静息状态时不表达,当细胞受到各种刺激时,如促炎细胞因子、肿瘤促进剂、有丝分裂原和生长因子等,会在体内迅速合成^[8],从而参与炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等多种病理过程,是炎症过程中的一个重要诱导型酶^[9]。COX-2在正常生理状态下几乎不表达或可以忽略,然而,当皮肤发生炎症时,COX-2的表达被诱导^[10,11]。此外陈等研究表明COX-2和NF- κ B之间紧密相关^[12],NF- κ B是细胞中的一种转录调节因子,当其受到刺激因子时,会在体内活化诱导多种基因表达,产生多种细胞因子参与炎症反应。NF- κ B通过复杂的分子调控参与机体的慢性炎症反应^[13]。所以,COX-2的表达与炎症密切相关,以对COX-2活性的抑制率来评价样品的抗炎作用。

网络药理学基于“药物-靶点-基因-疾病”相互作用网络,系统全面地观察药物对疾病网络的干预和影响,从而揭示药物作用于人体的机制^[14]。本文通过网络药理学探究油用牡丹抗炎的活性成分及其作用机制,分析油用牡丹是否能作用于COX-2,并通过体外实验进行验证。以期为更好地开发油用牡丹的应用价值提供理论支撑和实验依据。

1 材料与方法

1.1 油用牡丹活性成分筛选及靶点获取

油用牡丹的成分来自TCMSP(<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、TCMID(<http://www.megabionet.org/tcmid/>)等数据库及相关文献^[15,16],在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取油用牡丹各个成分的sdf格式,将不能获取结构的化合物成分删除,并在Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)里进行

吸收、分布、代谢和排泄(ADME)筛选,选择口服生物利用度与类药性高的化合物进行靶点预测。筛查标准为生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[16]。

1.2 抗炎靶点的获取

在GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/search>)和OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库中使用与皮肤炎症相关的关键词“Dermatitis、Inflammatory reaction”进行检索,收集相关靶点,如果靶点过多,设置Score大于中位数的目标靶点为炎症的潜在靶点,合并3个数据库的靶点后,删除重复值,得到炎症靶点^[17,18]。

1.3 网络构建

1.3.1 油用牡丹抗炎靶蛋白互作网络构建

将油用牡丹活性成分靶点与炎症靶点做韦恩图取交集,即为油用牡丹抗炎靶点。将油用牡丹抗炎靶点导入String 11.5(<https://cn.string-db.org/>)数据库中,物种设置为“homo sapiens”,可信度设置为0.4,其余参数保持默认值。获取油用牡丹抗炎靶蛋白的互作关系(protein-protein interactions, PPI)。

1.3.2 油用牡丹抗炎活性成分-靶点网络构建

将筛选出的具有抗炎作用的油用牡丹活性成分与对应的抗炎靶点导入Cytoscape 3.7.1软件,构建“PSA-抗炎活性成分-作用靶点”网络模型,通过模型中度值(degree)大小筛选油用牡丹抗炎的核心成分和靶点。

1.4 油用牡丹抗炎靶点通路分析

将油用牡丹的抗炎靶点导入Metascape数据库(<https://metascape.org/gp/index.html>)(最后更新于2022-01-01),设定阈值为“homo sapiens”,限定分析类型分别为“GO Molecular Functions”“GO Biological Processes”“GO Cellular Components”“KEGG Pathway”,限定只展示 $P < 0.01$ 、最小计数为3、且富集因子 > 1.5 的GO和KEGG结果^[19]。分别对GO分析的CC、MF、BP以及KEGG的前20个集群做气泡图富集分析。

1.5 仪器与试剂

仪器: SpectraMaxM5 酶标仪(Molecular Devices)。

试剂:油用牡丹提取物(由山西纳安公司直接提供);DMEM高糖培养基;胎牛血清FBS(美国

Gibco); 双抗(含链霉素/青霉素)(上海源培生物); 脂多糖 LPS、CCK-8 试剂盒(Beyotime 中国上海); NO 检测试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂、COX-2 检测试剂盒(联科生物有限公司)。

细胞:小鼠巨噬细胞 RAW 264.7(华拓生物科技有限公司)。

1.6 细胞及培养

将 RAW 264.7 巨噬细胞接种于培养基(含 90% DMEM、10% 胎牛血清 FBS、1% 青霉素和链霉素)。置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养 1 ~ 2 d。当细胞融合 70% ~ 80% 进行传代,弃去培养基废液,PBS 清洗 2 次,每次加 1 mL 胰酶消化一定时间,加 3 mL 培养基终止消化,将细胞转移至离心管中,1 000 r/min,离心 4 min,弃上清,加 1 mL 培养基吹打悬浮,分装到三个已经加入 5 mL 培养基的培养瓶中,一瓶约 0.33 mL 细胞悬液,八字摇匀后写上相关信息,在显微镜下观察后放到培养箱中培养。

1.7 细胞活力检测

将 RAW 264.7 细胞按照每孔 5×10^4 个的密度接种于 96 孔板中过夜培养,待细胞贴壁后,弃去孔内培养基,实验设置对照组(仅含培养基),LPS 组(添加浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养基)和给药组(分别添加浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养基和 0.13%、0.25%、0.5%、1% 的油用牡丹提取物),每组设置 3 个重复孔。在 37 °C、5% CO₂ 下孵育 24 h 后,除去孔内培养基。向每孔加入 10 μL CCK8 溶液,将 96 孔板在培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.8 一氧化氮(NO)释放的检测

将 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中(每孔 1×10^4 个细胞),每孔 100 μL 。实验设置对照组(仅含培养基)、LPS 组(添加浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养基)和给药组(分别添加浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养基和 0.13%、0.25%、0.5%、1% 的油用牡丹提取物),每组设置 3 个重复孔。在 37 °C、5% CO₂ 的环境下孵育 24 h 后,收集上清液,用 Griess 法测定 NO 含量,用酶标仪检测 540 nm 下的吸光度。

1.9 TNF- α 、IL-6、COX-2 的分泌量的检测

将 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中(每孔 1×10^4 个细胞),每孔 100 μL 。实验设置对照组(仅含培养基),LPS 组(添加浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养基)和给药组(分别添加含 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的

培养基和 0.13%、0.25%、0.5%、1% 的油用牡丹提取物),每组设置 3 个重复孔。在 37 °C、5% CO₂ 的环境下孵育 24 h 后,用 ELISA 法检测各组的 TNF- α 、IL-6 和 COX-2 的分泌量。

2 结果

2.1 油用牡丹活性成分筛选及靶点获取

获得了油用牡丹 276 种成分,包括 41 种单萜苷类(monoterpene glucosides)、36 种酚及酚苷类(phenolics and phenolic glycosides)、18 种低聚芪类(oligostilbenes)、34 种黄酮类(flavonoids)、15 种三萜类(triterpenoids)、36 种脂肪酸类(fatty acids)、96 种其他类。经 ADME 筛选后,获得符合条件的 91 种油用牡丹成分,对这些成分进行靶点预测,共得到 716 个靶点。经网络拓扑分析,依据 Degree 值,使其大于其对应的阈值(Degree > 36.97),共筛选出 144 个核心靶点: AKR1B1、ALDH1A1、ABCB1、CCND1、NR3C1、ABCG2、CYP2C9、SLC6A4、MAPK3、EP300、KDR、STAT3、TP53、ERBB2、EGFR、HMGR、KIT、HPGDS、ALB、BCL2L1、UGT2B7、CASP3、HNF4A、TYMS、HSP90AA1、CYP3A4、CYP1A2、CTNNB1、COMT、TOP1、MTOR、DRD2、PTGS2、JUN、CYP2C19、HSP90AB1、SRC、CYP1A1、GSTP1、RELA、IL-6、OPRM1、DHFR、TNF- α 、ESR1、SLC2A1、HIF1A、AKT1、VEGFA、GSR、PRKCB、DPP4、CFTR、AR、PGR、PTPRC、ITGB1、AHR、MAPK1、MPO、MAPK14、CDK4、MDM2、PDGFRB、CREBBP、CGNE1、PIK3CA、CDK2、CCNA2、NTRK2、APP、YWHAG、SNCA、MAPT、PTPN11、FYN、PARP1、PTPN1、ALOX5、CDK1、JAK2、MME、IDH1、PRKCD、HDAC1、CDK5、NTRK1、ACE、HMOX1、CTSD、LGALS3、REN、PPARG、BACE1、TLR4、PLA2G1B、LRRK2、CXCL8、PPARA、SELE、GCG、F2、MMP9、ACHE、PLG、NOS3、AGTR1、PPP1CA、SLC6A3、GSK3B、CNR1、CHRM1、MAOB、ACLY、GCK、G6PC、LDHA、G6PD、FASN、HPRT1、CA9、PRKCA、PRKCG、CAMK2B、GRM5、GRM1、GRM2、TRPV1、ADRBK1、HDAC6、APEX1、CYP19A1、ESR2、CCNB1、MAP2K1、CDC25A、NOS2、CTSB、HSP。其中核心靶点包括 TNF- α 、IL-6 和编码 COX-2 的 PTGS2。

2.2 炎症靶点的获取

在 DisGenet、GeneCards、OMIM 数据库获得炎症靶点,经筛选后得到 1 009 个。

2.3 油用牡丹抗炎靶蛋白互作(PPI)网络构建

对油用牡丹的 716 个作用靶点和 1 009 个炎症靶点取交集,共得到 152 个油用牡丹抗炎靶点(见图 1)。在 String 数据库中得到这 152 个靶蛋白的互作关系,导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,依据靶点的 degree 值(degree 值越高,靶点越大)构建 PPI 网络(见图 2),共得到 18 932 条不同靶点之间的连线。

其中油用牡丹中 3-萜烯-2-醇成分(主要存在于花)作用于 TNF- α 靶蛋白、常春藤皂苷元(主要存在于籽粒、根)和亚麻酸(主要存在于籽)作用于 IL-6 靶蛋白、原儿茶酸(主要存在于花)和水杨酸(主要存在于花)作用于 ALB 靶蛋白,这些成分在油用牡丹抗炎效用中发挥关键作用。

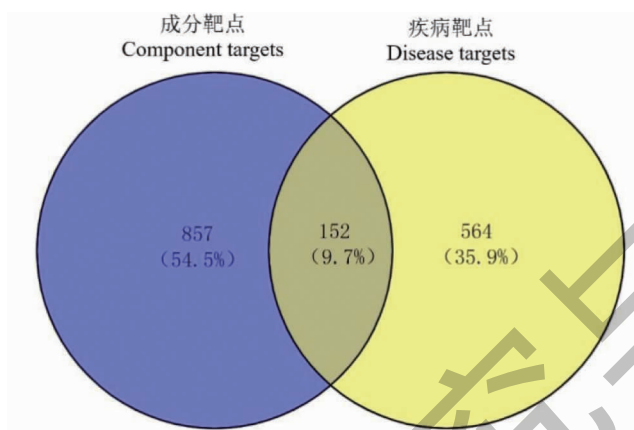


图 1 油用牡丹抗炎靶点韦恩图

Fig. 1 The venn diagram of PSA's anti-inflammatory targets

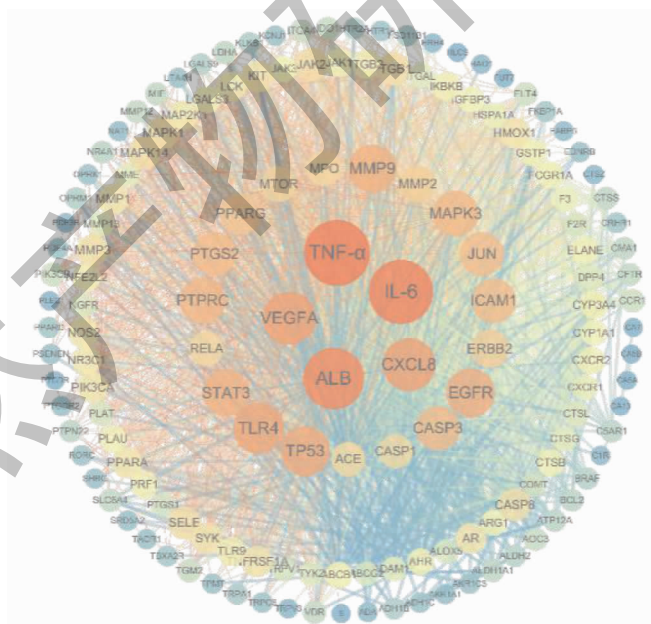


图 2 油用牡丹抗炎靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of anti-inflammatory targets of PSA

2.4 油用牡丹抗炎活性成分-靶点网络构建

通过“靶点-成分”的对应关系,依据筛选的 152 个抗炎靶点对应油用牡丹中的化合物,共得到油用牡丹的抗炎活性成分 86 种,见表 1^[15],大约占牡丹

总活性成分的三分之一,其中排名前 5 位的有效成分为己酸、paeonenoide C、10-羰基-癸酸、亚麻酸、苯并吡啶、十二烷酸,推测以上活性成分为油用牡丹抗炎的主要核心成分。采用 Cytoscape 3.7.1 软件构

建油用牡丹-抗炎活性成分-靶点网络,如图3所示,图中蓝色原点代表化合物,紫色原点代表油用牡丹抗炎靶点,共有713个节点,12 953条边。对油用牡丹成分进一步分析,结果显示,油用牡丹抗炎成分主

要为12类,分别是:酚及酚苷类、醇类、饱和脂肪酸类、黄酮类、不饱和脂肪酸类、芳香族类、三萜类、酯类、低聚芪类、单萜苷类、萜烯类和其他类。

表1 油用牡丹抗炎活性成分

Table 1 Anti-inflammatory active ingredients of PSA

编号 No.	成分 Ingredient	部位 Site	种类 Type
1	3-萜烯-2-醇 3-Carene-2-ol	花	醇类
2	8-甲氧基山柰酚 8-Methoxykaempferol	花粉	黄酮类
3	Paeonenoide A	根	三萜类
4	1,2,3,4-四甲氧基苯 1,2,3,4-Tetramethoxybenzene	花	芳香族类
5	1,3,6-三甲氧基苯 1,3,5-Trimethoxybenzene	花	芳香族类
6	10-癸基-癸酸 10-Oxo-decanoic acid	籽	饱和脂肪酸
7	15-甲基-11-十六烯酸 15-Methyl-11-hexadecenoic acid	籽	不饱和脂肪酸
8	2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	花	酯类
9	2,4-二叔丁基-苯酚 2,4-Di-tert-butylphenol	籽	芳香族类
10	23-羟基白桦脂酸 23-Hydroxybetulinic acid	根	三萜类
11	2-己基环丙烷辛酸 2-Hexylcyclopropanoic acid	籽	饱和脂肪酸
12	3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇 3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	花	醇类
13	30-降常春藤皂苷元 30-Norhederagenin	根	三萜类
14	4-壬烯醛 4-Nonenal	籽	其他类
15	8-癸基-辛酸 8-Oxo-octanoic acid	籽	饱和脂肪酸
16	9-癸基-壬酸 9-Oxo-nonanoic acid	籽	饱和脂肪酸
17	Akebonic acid	根	三萜类
18	Lawsonicin	根	酚及酚苷类
19	Paeonenoide C	根	三萜类
20	阿魏酸 Ferulic acid	花、籽	酚及酚苷类
21	白藜芦醇 Resveratrol	籽、根	低聚芪类
22	苯丙醇 Phenylpropanol	花	醇类
23	苯并吡啶 Pyridyl phenyl ketone	花	芳香族类
24	苯甲醇 Hydroxybenzyl alcohol	花	醇类
25	苯甲酸 Bbenzoic acid	籽、根	酚及酚苷类
26	苯氧乙醇 Phenoxyethanol	花	醇类
27	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	花	醇类
28	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	花	芳香族类
29	常春藤皂苷元 Hederagenin	籽、根	三萜类
30	橙花醇 Nerol	花	醇类
31	丹皮酚 Paeonol	籽、根	酚及酚苷类
32	豆蔻酸 Myristic acid	花、籽	饱和脂肪酸
33	对羟基苯甲醛 <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	花粉	酚及酚苷类
34	对羟基苯甲酸乙酯 Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	花	酯类
35	对羟基苯甲酸 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	籽、根	酚及酚苷类
36	对羟基苯乙酸 <i>p</i> -Hydroxyphenylacetic acid	籽	酚及酚苷类
37	对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	根	酚及酚苷类
38	二氢芳樟醇 Dihydrolinalool	花	醇类
39	反式白藜芦醇 <i>trans</i> -Resveratrol	籽	低聚芪类

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	成分 Ingredient	部位 Site	种类 Type
40	反式柠檬醛 <i>trans</i> -Citral	花	萜烯类
41	反式氧化芳樟醇 <i>trans</i> -Linalool oxide	花	醇类
42	芳樟醇 Linalool	花	醇类
43	槲皮素 Quercetin	花粉	黄酮类
44	虎杖苷 Polydatin	籽粕	酚及酚苷类
45	环己酮 Cyclohexanone	花	其他类
46	己二酸二异丙酯 Diisopropyl adipate	花	酯类
47	己酸 Caproic acid	花	饱和脂肪酸
48	芥子酸 Sinapic acid	籽	酚及酚苷类
49	咖啡酸 Caffeic acid	籽	酚及酚苷类
50	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	花	酯类
51	邻苯二甲酸二甲酯 Dimethyl phthalate	花	酯类
52	邻苯二甲酸二乙酯 Diethyl phthalate	花	酯类
53	没食子酸甲酯 Methyl gallate	根、花、叶	酚及酚苷类
54	没食子酸乙酯 Ethyl gallate	根、花、叶	酚及酚苷类
55	没食子酸 Gallic acid	籽、根、花、叶	酚及酚苷类
56	木犀草素 Luteolin	粉、花、叶	黄酮类
57	柠檬黄素 Limocitrin	花粉	黄酮类
58	羟基苯甲酸 Hydroxybenzoic acid	花叶	酚及酚苷类
59	芹菜素 Apigenin	籽、花、叶	黄酮类
60	壬二酸 Azelaic acid	籽	饱和脂肪酸
61	壬醛 Nonaldehyde	籽	其他类
62	肉桂醇 Cinnamic alcohol	花	醇类
63	肉桂醛 Cinnamic aldehyde	花	芳香族类
64	肉桂酸 Cinnamic acid	籽	酚及酚苷类
65	山柰酚 Kaempferol	籽、花	黄酮类
66	芍药二酮 Palbinone	根	三萜类
67	芍药苷元酮 Paeoniflorigenone	根	单萜苷类
68	蛇葡萄素 B Ampelopsin B	籽粕	低聚芪类
69	圣草素 Eriodictyol	籽	黄酮类
70	十二碳烯酸 Dodecenoic acid	籽	不饱和脂肪酸
71	十二烷酸 Lauric acid	籽	饱和脂肪酸
72	十六碳二烯酸 Hexadecadienoic acid	籽	不饱和脂肪酸
73	十七碳一烯酸 Heptadecenoic acid	籽	不饱和脂肪酸
74	十七烷酸 Heptadecanoic acid	籽	饱和脂肪酸
75	水杨酸 Salicylic acid	花	酚及酚苷类
76	顺式氧化芳樟醇 <i>cis</i> -Linalool oxide	花	醇类
77	香草酸 Vanillic acid	籽、根	酚及酚苷类
78	辛酸 Octanoic acid	籽	饱和脂肪酸
79	亚麻酸 Linolenic acid	籽	不饱和脂肪酸
80	氧化白藜芦醇 Oxyresveratrol	籽	低聚芪类
81	乙酰香草酮 Acetovanillone	根	酚及酚苷类

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	成分 Ingredient	部位 Site	种类 Type
82	异鼠李素 Isorhamnetin	花、叶	黄酮类
83	柚皮素 Naringenin	籽	黄酮类
84	原儿茶酸 Protocatechuic acid	花	酚及酚苷类
85	棕榈酸 Palmitic acid	籽	饱和脂肪酸
86	棕榈油酸 Palmitoleic acid	籽	不饱和脂肪酸

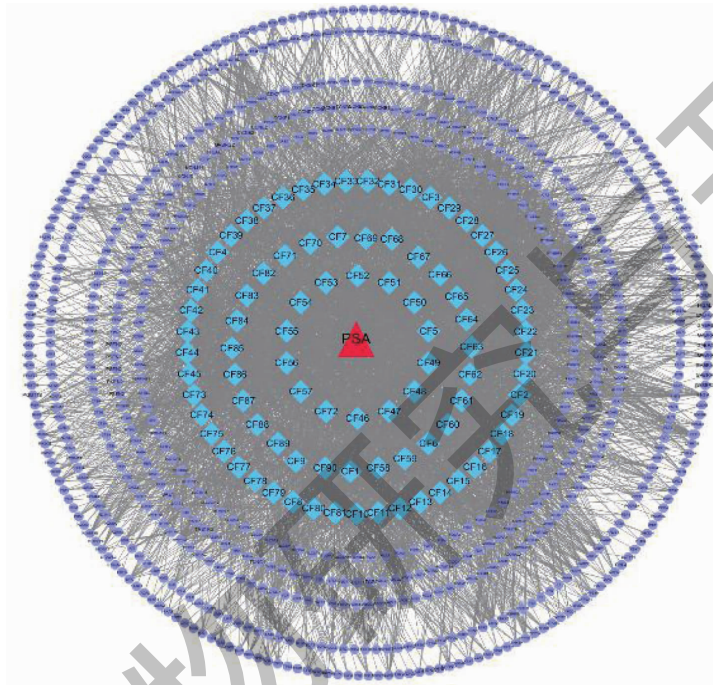


图 3 油用牡丹抗炎活性成分-靶点网络

Fig. 3 Anti-inflammatory active components of PSA-target network

2.5 油用牡丹抗炎靶点 GO 生物过程和 KEGG 通路富集分析

通过 Metascape 数据库对油用牡丹抗炎的 152 个靶点进行基因功能注释与通路富集分析。以显著性 $P < 0.01$ 为筛选条件,其中生物过程 (biological process, BP) 共 4 931 个条目,主要涉及炎症反应 (inflammatory response)、对细菌来源分子的反应 (response to molecule of bacterial origin)、细胞活化 (cell activation)、对激素的反应 (response to hormone)、运动的正向调节 (positive regulation of locomotion)、对细胞因子的反应 (response to cytokine) 等生物学过程;细胞组成 (cell component, CC) 共 419 个条目,主要涉及细胞膜筏 (membrane raft)、细胞膜侧 (side of membrane)、受体复合物 (receptor complex)、细胞外基质 (extracellular matrix) 等细胞区域;分子功能 (molecular function, MF) 共 851 个条

目,主要涉及内肽酶活性 (endopeptidase activity)、磷酸酶结合 (phosphatase binding)、碳酸脱水酶活性 (nuclear receptor activity)、蛋白酶结合 (carbonate dehydratase activity)、细胞因子受体结合 (protease binding) 等分子功能。

KEGG 通路富集分析以显著性 $P < 0.01$ 为筛选条件,共得到 261 条通路,其中与炎症相关的通路有癌症的途径 (pathways in cancer)、类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis)、NF- κ B 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)、白细胞跨内皮迁移 (leukocyte transendothelial migration)、TRP 通道的炎症介质调节 (inflammatory mediator regulation of TRP channels) 等,说明油用牡丹有效成分是通过调节多靶点多通路来发挥抗炎的功效的。

将 BP、CC、MF 和 KEGG 排名前 20 的条目进行可视化,如图 4~7 所示。

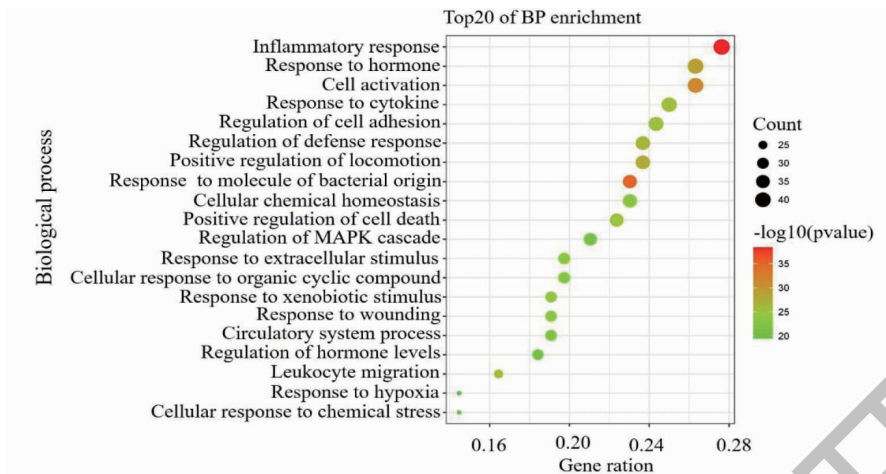


图 4 油用牡丹抗炎靶点 GO-BP 分析

Fig. 4 GO-BP analysis of PSA's anti-inflammatory targets

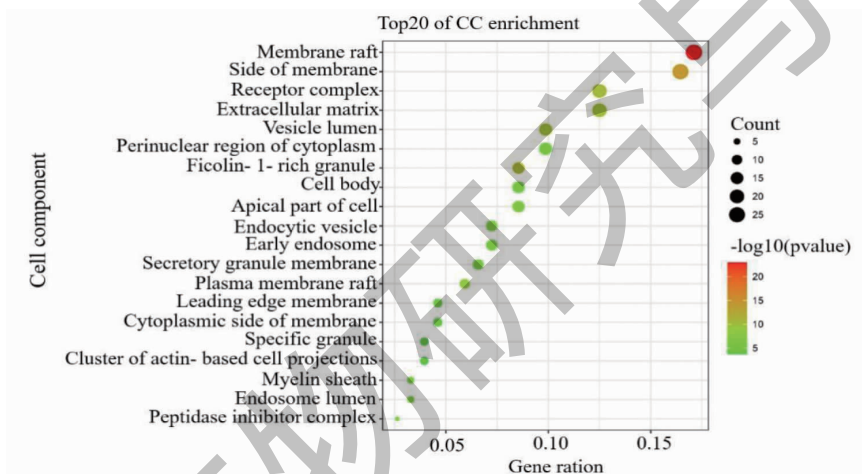


图 5 油用牡丹抗炎靶点 GO-CC 分析

Fig. 5 GO-CC analysis of PSA's anti-inflammatory targets

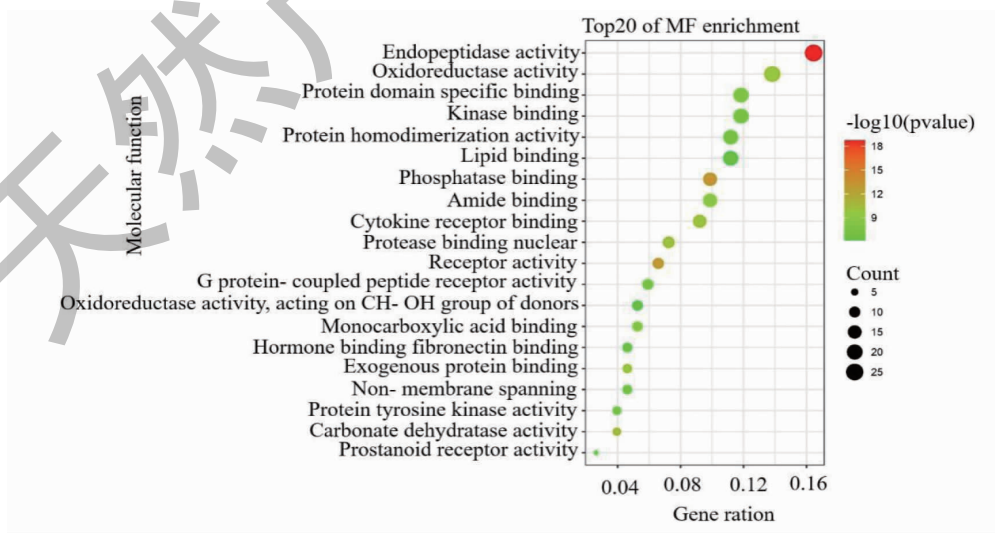


图 6 油用牡丹抗炎靶点 GO-MF 分析

Fig. 6 GO-MF analysis of PSA's anti-inflammatory targets

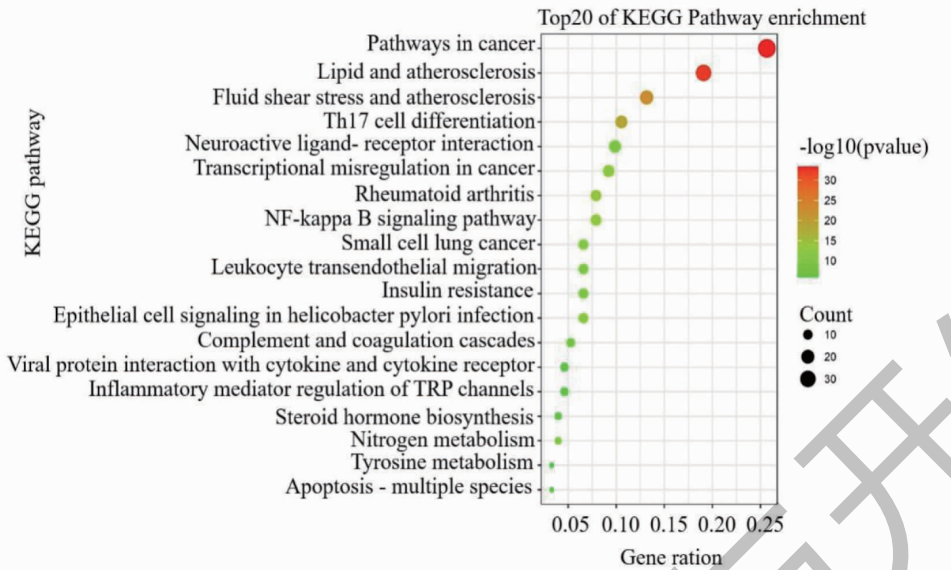


图7 油用牡丹抗炎靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG analysis of PSA's anti-inflammatory targets

炎症以炎性细胞的浸润和炎性因子的释放为特征,对血管系统活体组织中的损伤因子具有复杂的防御反应。促炎细胞因子主要包括 TNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)等^[20]。炎症因子与多种疾病关系密切,如炎症在肿瘤发生、发展、侵袭和转移中起重要作用,被认为是恶性肿瘤的重要生物学特征。15%~20%恶性肿瘤是由感染和无法控制的炎症引起的。肿瘤微环境中存在多种炎症因子,如 IL-1、IL-6、IL-12、IL-17、TNF- α 和 TGF- β ,它们不仅将炎症细胞募集到肿瘤部位以放大炎症效应,还促进肿瘤细胞的生长和转移,促进肿瘤血管及淋巴管的生成^[21,22]。NF- κ B 通过促进多种细胞因子(如 IL-6、IL-15、IL-17、IL-8、TNF- α 、COX-2)的表达,介导慢性炎症和癌症的形成^[23,24]。免疫炎性细胞产生的促肿瘤细胞因子产物,可以激活癌前细胞中的转录因子,如转录激活因子 3(STAT3)和激活蛋白 1(AP-1)等^[25,26]。

油用牡丹活性成分的抗炎靶点涉及 IL-6、TNF- α 等与炎症反应的多个重要靶点,此外还涉及 STAT3、NOS2、MAPK1 与癌症相关的重要靶点。再综合 GO 和 KEGG 分析,其中 BP 包括炎症反应和对细菌来源分子的反应,这两个生物学过程都和炎症反应具有一定的关系,此外 KEGG 分析中涉及 TRP 通道的炎症介质调节,以及多条与癌症发生相关的通路如癌症的途径、NF- κ B 信号通路、小细胞肺癌等等,因为炎症和癌症的发生存在着一定的关系,说明

油用牡丹的抗炎靶点可以作用于癌症发生的通路,减缓其中的炎症反应。

2.6 油用牡丹活性成分抗炎机制与 COX-2 的关系

油用牡丹的抗炎活性成分作用的靶点包括 PTGS1 和 PTGS2,可以调节编码 COX 基因,构建 PTGS1 和 PTGS2 两个靶点与其他油用牡丹抗炎靶点的 PPI 网络(见图 8、图 9),表明 PTGS1 可以与 IL-6、TNF- α 、PTGS2 等靶点相互作用,PTGS2 也可以与 IL-6、TNF- α 、PTGS1、ALB 等靶点相互作用。油用牡丹抗炎活性成分有 24 种可以作用于 PTGS1:15-methyl-11-hexadecenoic acid、2,4-二叔丁基-苯酚、3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol、30-降常春藤皂苷元、akebonic acid、lawsunicin、阿魏酸、白藜芦醇、苯并吡啶、常春藤皂苷元、橙花醇、对羟基苯乙酸、反式白藜芦醇、己二酸二异丙酯、芥子酸、咖啡酸、邻苯二甲酸二丁酯、蛇葡萄素 B、圣草素、十六碳二烯酸、亚麻酸、氧化白藜芦醇、柚皮素、棕榈油酸。31 种活性成分可以作用于 PTGS2:3-萜烯-2-醇、8-甲氧基山柰酚、10-羰基-癸酸、15-methyl-11-hexadecenoic acid、23-羟基白桦脂酸、3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol、30-降常春藤皂苷元、akebonic acid、paeonenoideA、阿魏酸、白藜芦醇、苯丙醇、苯并吡啶、常春藤皂苷元、橙花醇、对羟基苯乙酸、反式白藜芦醇、反式柠檬醛、芳樟醇、芥子酸、邻苯二甲酸二丁酯、木犀草素、柠檬黄素、芹菜素、山柰酚、蛇葡萄素 B、十六碳二烯酸、辛酸、亚麻酸、氧化白藜芦醇、棕榈油酸。而且油用

牡丹活性成分靶点可以作用于 NF-κB 信号通路,这表明油用牡丹对 COX-2 具有一定的抑制调节作用,可以减缓炎症反应。

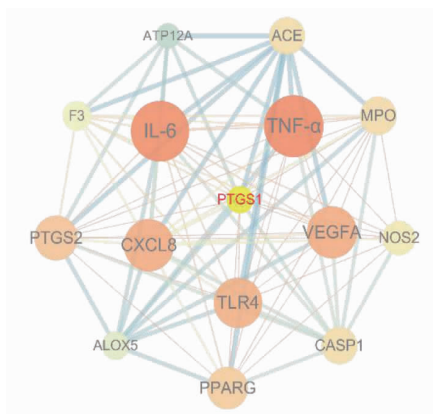


图8 PTGS1 的 PPI 网络
Fig. 8 PPI network of PTGS1

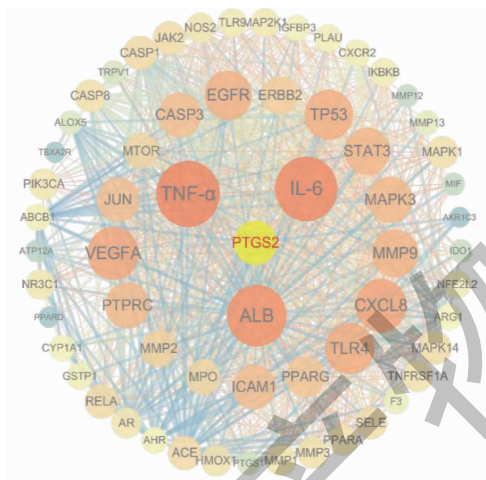


图9 PTGS2 的 PPI 网络
Fig. 9 PPI network of PTGS2

2.7 油用牡丹提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响

通过 CCK8 实验来评估油用牡丹提取物对细胞活性的影响^[27], RAW 264.7 细胞分别加入浓度为 0.13%、0.25%、0.5%、1% 的油用牡丹提取物,结果见图 10。用 CCK8 法检测细胞的存活率,发现在 0.13%、0.25%、0.5% 浓度下细胞的存活率均 > 100%,说明油用牡丹提取物在 0.13%、0.25%、0.5% 浓度对细胞均没有不良反应。与对照组相比,1% 油用牡丹提取物细胞的存活率有显著差异 ($P < 0.05$),说明该浓度下会影响细胞的正常生长,0.25% 油用牡丹提取物细胞的存活率最大,说明该浓度下最有利于细胞的生长。

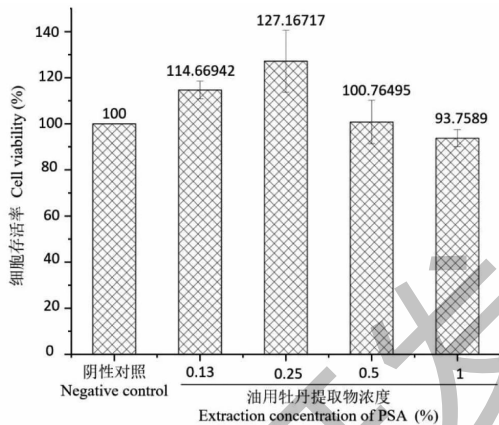


图 10 PSA 对细胞活力的影响
Fig. 10 Effects of PSA on cell viability

2.8 油用牡丹提取物对 RAW 264.7 细胞 NO 生成的影响

与 LPS 组比较,油用牡丹提取物在 0.13%、0.25%、0.5% 的浓度下均可降低 NO 的浓度 ($P < 0.05$)。其中,0.5% 的效果最为显著,与 LSP 组相比,使 NO 的生成降低了 38.57%。结果见图 11。

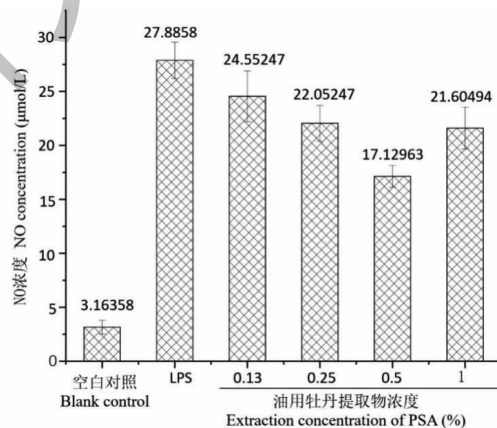


图 11 PSA 对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 NO 表达的影响

Fig. 11 Effect of PSA on NO expression in RAW 264.7 cell induced by lipopolysaccharide

2.9 油用牡丹提取物对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 TNF-α、IL-6、COX-2 表达的影响

与 LPS 组比较,不同浓度的油用牡丹提取物均可下调脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 TNF-α 蛋白、IL-6 蛋白和 COX-2 的含量 ($P < 0.05$)。结果见图 12-14。其中 0.5% 的油用牡丹提取物对 TNF-α 蛋白抑制效果较为显著,降低了 TNF-α 的蛋白的表达 64.06% 左右;1% 的油用牡丹提取物可显著下调 IL-6 蛋白的含量,使之下降 25.3% 左右;0.25% 油用牡

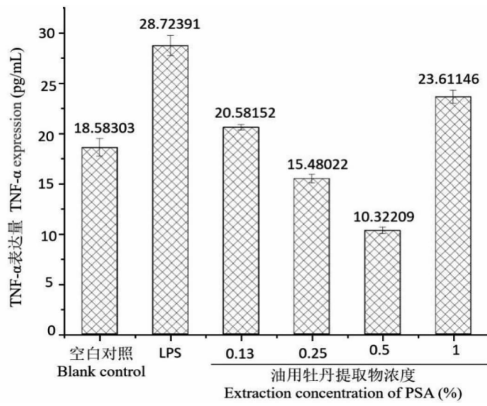


图 12 PSA 对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 TNF- α 表达的影响

Fig. 12 Effect of PSA on TNF- α expression in RAW 264.7 cell induced by lipopolysaccharide

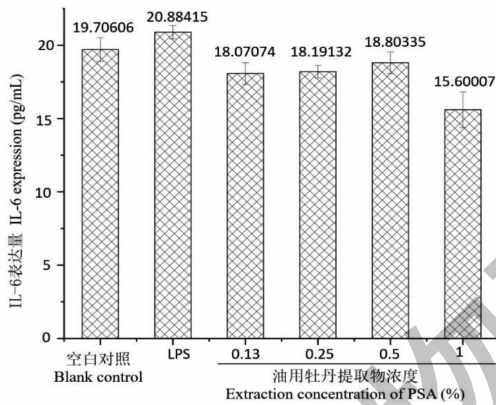


图 13 PSA 对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 IL-6 表达的影响

Fig. 13 Effect of PSA on IL-6 expression in RAW 264.7 cell induced by lipopolysaccharide

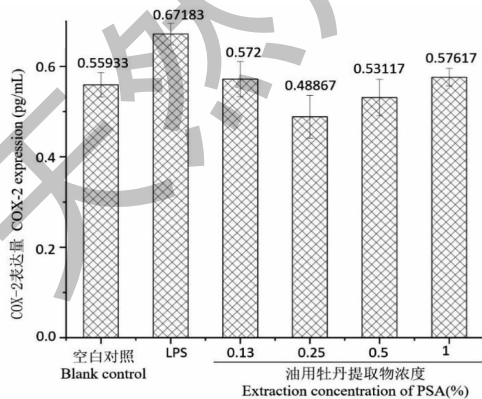


图 14 PSA 对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的 COX-2 表达的影响

Fig. 14 Effect of PSA on COX-2 expression in RAW 264.7 cell induced by lipopolysaccharide

丹提取物可显著下调 COX-2 的含量,降低了 COX-2 的表达 27.26% 左右。这一结果提示油用牡丹提取物可以抑制 LPS 诱导的炎症因子 TNF- α 、IL-6 的蛋白和 COX-2 表达,进而发挥抗炎作用。

3 结语

牡丹是我国特有的植物资源,其文化底蕴深厚,具有观赏和药用价值。油用牡丹的原种是从药用牡丹转化而来的,是近几年出现的新兴木本油料作物,含有 90% 以上的不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸不仅具有预防和修复心脑血管疾病的功效,还具有抗炎抗菌、抗氧化、延缓细胞衰老和防止皮肤干燥的功效^[28]。近些年,国家也在鼓励化妆品行业结合我国传统优势项目和特色植物资源研究开发化妆品^[29]。油用牡丹具有的功效与化妆品追求的功效如祛痘、滋养、修护、抗皱等高度吻合。网络药理学融合了高通量数据整合、数据挖掘、靶点预测等多种研究方法,可以综合分析植物多种成分和特定疾病之间的作用机制,所以通过网络药理学和体外实验探究油用牡丹的抗炎作用机制,为油用牡丹在化妆品领域开发应用提供依据。环氧酶(COX-2)在正常细胞中通常不表达,但可由炎症反应诱导产生,所以通过体外实验检测 COX-2 的含量可以评估细胞炎症反应的程度。

本文通过网络药理学筛选出了油用牡丹具有抗炎作用的 86 种活性成分,并构建了油用牡丹抗炎活性成分靶点的 PPI 网络,其中核心靶点包括 TNF- α 、IL-6、PTGS2 等。通过体外实验进一步证实油用牡丹提取物可以抑制 TNF- α 、IL-6、NO、COX-2 的表达。该结果为深入研究油用牡丹抗炎作用及进一步合理开发利用油用牡丹提供了依据。

参考文献

- 1 Chen HL, Yang YL, Zhang XY, et al. Research progress on *Paeonia suffruticosa* Andr. for oil[J]. Hubei Fore Sci Technol(湖北林业科技), 2013, 42: 41-44.
- 2 Han JG, Li XQ, Liu Z, et al. Potential applications of tree peony as an oil plant[J]. Cereals Oils(粮食与油脂), 2014, 27: 21-25.
- 3 Jiang Y. Study on preparation process and efficacy of tree peony essential oil and seed oil for cosmetics[D]. Yangzhou: Yangzhou University(扬州大学), 2019.
- 4 Zhou C. The study on peony seed oil as cosmetic base oil[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University(上海交通大学), 2015.

- 5 Liang CL, Zhou JY, Wu JB, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Melastoma candidum* and its influence on the immune function in mice[J]. *China Pharm*(中国药师), 2012, 15:1547-1550.
- 6 Yu D, Zhou W, Guo ZW, et al. Anti-inflammatory effect of mung bean peptide on lipopolysaccharide-induced macrophage RAW264.7[J]. *Chin Food Sci Technol*(中国食品学报), 2020, 20:41-48.
- 7 Niu YQ. Study on extraction and purification of oligostilbenes and monoterpene glycoside compounds from the byproducts of peony for oil[D]. Henan: Henan University of Science and Technology(河南科技大学), 2015.
- 8 McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2; the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:272-277.
- 9 Rundhaug JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis[J]. *Photochem Photobiol*, 2008, 84:322-329.
- 10 Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- κ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17:907-916.
- 11 Luo B, He CY, Lin ZN. Progress on involvement of cyclooxygenase-2 in toxic injury induced by environmental factors[J]. *J Environ Occup Med*(环境与职业医学), 2016, 33:711-716.
- 12 Chen FL, Wang XZ, Li JY, et al. Expression of COX-2 and NF- κ B in gastric carcinoma and their relationship[J]. *Chin J Clin Gastroenterol*(临床消化病杂志), 2003, 15:109-110.
- 13 Wang XC, Ji AG. NF- κ B signaling pathway and inflammatory response[J]. *Prog Physiol Sci*(生理科学进展), 2014, 45:68-71.
- 14 Zhang YQ, Li S. Progress in network pharmacology for modern research of traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29:883-892.
- 15 Dong L, Zhao XJ, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents and utilization of different parts of oil peony[J]. *Modern Food Sci Technol*(现代食品科技), 2021, 37:348-361.
- 16 Dan WC, He QY, Qu Y, et al. Molecular mechanism of Zhizhu pill in treatment of dyslipidemia based on network pharmacology[J]. *Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*(世界科学技术-中医药现代化), 2019, 21:2396-2405.
- 17 Song JB, Liao H, Li YP. Mechanism exploration of Astragali Radix in treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2020, 51:2988-2996.
- 18 Huang XF, Yu GZ, Tong JJ. Analysis of the pharmacological mechanism of Citri Reticulatae Pericarpium based on network pharmacology[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2019, 41:3038-3045.
- 19 Law V, Knox C, Djoumbou Y, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42:D1091-D1097.
- 20 Yao F, Yang HX. Analysis of the role of inflammatory factors in tumor development and metastasis[J]. *Drug Eval*(药品评价), 2016, 13:203.
- 21 Zhao W, Xu JJ. The role of TNF- α in inflammation and tumor[J]. *J Chin Convalescent Med*(中国疗养医学), 2012, 21:607-609.
- 22 Liu H, Yang CJ, Wu GS, et al. Relationship between chronic inflammation and cancer intervened by NF- κ B pathway[J]. *Pract Pharm Clin Remed*(实用药物与临床), 2017, 20:221-223.
- 23 Shen ZJ, Cheng HB, Shen WX, et al. Correlation between tumor inflammatory microenvironment and "cancerous toxin" pathogenesis[J]. *Beijing Tradit Chin Med Univ*(北京中医药大学学报), 2015, 38:14-17.
- 24 Ma SB, Lin DD, Liu HY. Inflammatory cytokines as therapeutic targets in tumor immunotherapy[J]. *Chin Bull Life Sci*(生命科学), 2016, 28:182-191.
- 25 You Q, Wu geng, Tu YM, et al. Preventive effect of naringin on cardiac NF- κ B inflammatory signal pathway in diabetic cardiomyopathy rats[J]. *Chin J Immunol*(中国免疫学杂志), 2013, 29:121-124.
- 26 Yang J, Yu XT, Guo L, et al. Anti-Inflammatory mechanism of honeysuckle based on network pharmacology[J]. *Inf Tradit Chin Med*(中医药信息), 2020, 37:9-13.
- 27 Ni ZY. Mechanism of CCK-8 on regulating the expressions of pro- and anti-inflammatory cytokines in inflammatory response[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University(河北医科大学), 2005.
- 28 Wang L, Yuan R, Meng J, et al. Development status and prospect of oil peony industry in China[J]. *China Oils Fats*(中国油脂), 2015, 40:S41-S43.
- 29 Li L, Meng XY, Li SW. Research and development trend of new natural raw materials for cosmetics[J]. *China Cosm Rev*(中国化妆品), 2021, 12:38-41.