

基于网络药理学及体外实验探究野蚕豆根 抗氧化活性及其作用机制

刘鑫澜^{1,2}, 朱朋艳², 马金蓉^{1,2},
王星月², 韦茜², 高艳梅³, 张冬英^{2*}, 袁文娟^{2*}

¹云南农业大学食品科学技术学院; ²云南农业大学理学院, 昆明 650201; ³云南省红河州食品药品检验所, 蒙自 661199

摘要: 利用网络药理学和体外实验探讨野蚕豆根抗氧化活性物质基础及作用机制。首先, 采用 DPPH 法、ABTS 法、清除羟自由基法对野蚕豆根进行体外抗氧化实验验证; 通过 TCMSp 数据库和文献搜索筛选出野蚕豆根中的活性物质, 同时收集其作用靶点; 借助 OMIM、GeneCards 数据库获得氧化应激相关疾病靶点; 将野蚕豆根成分靶点与氧化应激靶点取交集, 通过 STRING 数据库构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI); 利用 R 语言对交集靶点进行基因本体 (GO, Gene Ontology) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析; 借助 AutoDock 1.5.7 软件对核心成分及关键靶点基因进行分子对接, 通过 Pymol 进行可视化操作; 利用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测进行机制验证。结果显示, 野蚕豆根提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟基自由基有一定的清除能力, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.166、0.054 和 0.180 mg/mL; 从野蚕豆根中共筛选出 22 个活性成分, 86 个成分靶点以及 84 个交集靶点, 其中包括 STAT3、HSP90AA1、HDAC1 等 23 个核心靶点; GO 富集分析共得到了 3 386 个条目, 主要包括碳水化合物结合、核受体活性等分子功能。KEGG 富集分析共得到了 211 个条目, 主要包括 PI3K-Akt 信号通路、化学致癌-受体激活等通路; 分子对接结果显示, 野蚕豆根中活性成分与核心靶点间结合效应较强, 结合能均小于 -1.2 kcal/mol; Western blot 结果表明, 野蚕豆根提取物能明显上调 p-PI3K 蛋白及 p-Akt 蛋白的表达。本研究初步表明野蚕豆根提取物可通过激活 PI3K-Akt 信号通路从而发挥抗氧化作用, 为后期野蚕豆根抗氧化活性的研究与应用提供理论依据及参考。

关键词: 野蚕豆根; 抗氧化活性; 网络药理学; 分子对接; 体外实验; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0155-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.017

Antioxidant activity and mechanism of *Centranthera grandiflora* Benth roots based on network pharmacology and *in vitro* experiments

LIU Xin-lan^{1,2}, ZHU Peng-yan², MA Jin-rong^{1,2},
WANG Xing-yue², WEI Xi², GAO Yan-mei³, ZHANG Dong-ying^{2*}, YUAN Wen-juan^{2*}

¹College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University;

²College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

³Honghe Prefecture Institute for Food and Drug Control of Yunnan Province, Mengzi 661199, China

Abstract: To explore the antioxidant activity and mechanism of *Centranthera grandiflora* Benth roots based on network pharmacology and *in vitro* experiments. Antioxidant activity were evaluated by DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay, and hydroxyl radical scavenging method. The TCMSp database, and literature mining were used to collect active ingredients of *C. grandiflora* roots, target genes related to oxidative stress were collected through the OMIM and GeneCards database, and protein interaction networks (PPI) were constructed through the STRING database. GO and KEGG enrichment analyses were performed on the potential targets using the R language. Molecular docking of key active ingredients with poten-

收稿日期: 2023-08-08

接受日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金 (32060084); 云南省农业基础研究联合专项重点项目 (202301BD070001-025); 国家大学生创新创业训练计划 (202210676023, X202210676105)

* 通信作者 E-mail: yuwanwj0805@126.com.

tial targets using AutoDock 1.5.7 software. The results showed that *C. grandiflora* roots extract had a certain ability on DP-PH, ABTS, and hydroxyl radicals scavenging, with IC₅₀ values of 0.166, 0.054 and 0.180 mg/mL, respectively. Twenty-two active ingredients of *C. grandiflora* roots, 86 target genes, and 84 intersection targets were collected, including STAT3, HSP90AA1, HDAC1, etc. Go function enrichment analysis found 3386 items, including molecular functions such as carbohydrate binding and nuclear receptor activity. KEGG pathway enrichment analysis found 211 items ($P < 0.05$), involving PI3K/AKT, and other signaling pathways related to *C. grandiflora* roots. The molecular docking results showed that the predicted key component, showed good binding to the core targets, binding energies < -1.2 kcal/mol. The Western blot results showed that the extract of *C. grandiflora* roots significantly upregulated the expression of p-PI3K and p-Akt proteins. The above results suggest that the extract of *C. grandiflora* roots can exert antioxidant activity by activating the PI3K-Akt signaling pathway. This study provides a reference for the study on the clinical use and application of *C. grandiflora* roots.

Key words: *C. grandiflora* Benth roots; antioxidant activity; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* experiments; mechanism

野蚕豆根,为玄参科(Scrophulariaceae)胡麻草属(*Centranthera*)植物大花胡麻草(*Centranthera grandiflora* Benth)的根,主要分布在云南、贵州、广西等地^[1,2]。野蚕豆根为药食同源类植物,富含多种活性物质,如环烯醚萜、苯乙醇苷、紫罗兰酮、类胡萝卜素、单萜等多类化合物^[3,4],具有抗氧化、抗炎、抗凝血和心肌缺血以及促进伤口愈合等生理活性^[5-7]。古籍记载用其泡酒,来防治脑血栓、脑梗等疾病^[8]。在云南被当作彝族药材种植,广泛用于民族医药。目前的研究主要集中在野蚕豆根的提取分离,以及活性研究^[9]。野蚕豆根富含环烯醚萜苷类物质,具有抗氧化、降脂保肝以及预防心脑血管疾病的功效^[10,11],具有很大的开发潜力。

氧化应激是指机体受到刺激,造成体内产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致与抗氧化物的失衡,从而引起的一种应激状态^[12],能够引发心血管疾病、神经系统疾病和癌症等^[13]。由于加工合成的抗氧化剂会对健康产生潜在的危害,因此人们更加致力于去寻求天然的抗氧化剂^[14,15]。天然抗氧化剂具有疗效显著、毒副作用较低等特点^[16],越来越受到人们关注。野蚕豆根作为一种天然药物,具有良好的抗氧化活性,但关于其具体的活性成分及作用机制研究较少。

网络药理学是从系统层面揭示药物在机体中的调节网络的一门新兴学科。通过构建“药物、活性成分、靶点、疾病”之间的复杂网络关系,可以预测药物的作用机制,尤其适用于中药开发的多靶点药物的作用机制预测^[17]。本文借助网络药理学分析了野蚕豆根的主要活性成分及成分靶点,深入探讨其抗氧化作用的分子机制,并通过体外抗氧化实验以及生物学手段进行了验证,为深入开展野蚕豆根

基础实验研究提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 数据库与软件

TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmssp.php>)、Swiss target prediction 数据库 (<http://www.Swisstargetprediction.ch>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、VENNY 2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny>)、微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>)、STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)、蛋白质结构数据库 (<https://www.alphaFold.ebi.ac.uk/>)、Cytoscape 3.8.0、AutoDockTools 1.5.7、PyMOL。

1.1.2 实验试剂与仪器

野蚕豆根采自云南省屏边县和平乡镇,由云南省红河州食品药品检验所高艳梅老师鉴定为玄参科胡麻草属植物大花胡麻草 *Centranthera grandiflora* Benth 的根。C2C12 小鼠成肌细胞(云南农业大学普洱茶教育部重点实验室细胞库);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(批号:CU6GJC-ZG)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)(批号:C15513541)、RIPA 裂解液(批号:20230309)(索莱宝生物公司);兔抗 PI3K 抗体(货号:4249S)、p-PI3K 抗体(货号:17366S)、AKT 抗体(货号:9272S)、p-AKT 抗体(货号:4060S)(CST 公司);胎牛血清(批号:1010D053,美国赛默飞世尔科技公司);PVDF 膜(批号:A30683441,Millipore 公司);脱脂奶粉(批号:D6340, BD 公司);V_C(批号:

1007101)、水杨酸(批号:20191101)、硫酸亚铁(批号:20201011)、无水乙醇(批号:20230701)、过硫酸钾(批号:20190103)(分析纯,天津大茂化学试剂厂)。

BSA224W-CW型万分之一电子天平(Sartorius公司);CO₂气体培养箱(BINDER公司);超净工作台(AIRTECH公司);Multiskan Mk3型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 野蚕豆根体外抗氧化实验验证

1.2.1.1 野蚕豆根提取物的制备

将1 kg干燥的野蚕豆根药材研磨成粗粉,用60%的乙醇,在温度为50℃下超声提取1 h,重复3次,后减压浓缩得到浸膏337.5 g,留存备用。

精密称取野蚕豆根提取物(the extract of *C. grandiflora* Benth roots, CGE)适量,用乙醇溶解并稀释到一定体积,制成浓度依次为10、20、40、80、160、320 μg/mL的溶液用作抗氧化活性研究。

1.2.1.2 DPPH法测定抗氧化活性

精密吸取100 μL不同浓度的野蚕豆根提取物溶液(10、20、40、80、160、320 μg/mL)和100 μL 0.3 mmol/L DPPH无水乙醇溶液,放入96孔板中,经均匀混合后,于37℃下,避光保存30 min,在波长517 nm处检测吸光值A₁。用100 μL无水乙醇溶液代替DPPH溶液测得吸光值A₂。同时测得100 μL DPPH的无水乙醇溶液和100 μL无水乙醇溶液在该条件下的吸光值A_d。采用V_c作为阳性对照。每份样品平行实验3次。DPPH自由基清除率(R)按公式(1)进行计算。

$$R = [1 - (A_1 - A_2) / A_d] \times 100\% \quad (1)$$

1.2.1.3 ABTS法测定抗氧化活性

精密吸取100 μL不同浓度的野蚕豆根提取物溶液(10、20、40、80、160、320 μg/mL)和100 μL ABTS工作液,置96孔板中,经均匀混合后,于37℃下,避光保存30 min,在波长734 nm处检测吸光值A₃。用100 μL水代替ABTS工作液测得吸光值A₄。同时测得100 μL ABTS工作液和100 μL水的混合液在该条件下的吸光值A_e。采用V_c作为阳性对照。每份样品平行实验3次。ABTS自由基清除率(R)按公式(2)计算。

$$R = [1 - (A_3 - A_4) / A_e] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.1.4 清除羟自由基能力测定

精密吸取100 μL不同浓度的野蚕豆根提取物

溶液(10、20、40、80、160、320 μg/mL)放入96孔板中,同时加入浓度为6.0 mmol/L硫酸亚铁溶液和10.0 mmol/L水杨酸-乙醇溶液各100 μL,再加6.0 mmol/L的H₂O₂溶液100 μL,置于37℃下,避光放置10 min,在波长510 nm下检测吸光度A₅。蒸馏水作为样品对照A₆,样品溶剂作为空白对照A₀。以V_c作阳性对照。每个样品平行实验3次。羟自由基清除率(R)按公式(3)计算。

$$R = [1 - (A_5 - A_6) / A_0] \times 100\% \quad (3)$$

1.2.2 野蚕豆根抗氧化机制的网络药理学预测

1.2.2.1 药物成分潜在靶点预测

在TCMSP数据库以及知网、万方和PubMed等平台进行文献检索,挖掘出野蚕豆根中的化学成分。从Pubchem网站中下载这些化合物的Smile格式,然后在Swiss target prediction数据库中,以物种“Homo sapiens”,以Probability > 0.01为条件筛选成分靶点。利用Uniprot数据库规范与作用成分相关的靶点蛋白,获得靶点对应的基因名^[18]。

1.2.2.2 疾病分子靶点预测

通过OMIM数据库、GeneCards数据库,输入“oxidative”检索相关靶点,去重汇总后得到氧化应激的相关作用靶点。将野蚕豆根的成分靶点和氧化应激的作用靶点利用Venny 2.1.0作韦恩图,获得共同靶点。

1.2.2.3 蛋白互作网络分析

在STRING数据库上对得到的交集靶点进行可视化分析。在过滤条件为“Homo sapiens”的情况下,得到了蛋白互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)。借助Cytoscape 3.8.0分析获得的PPI网络数据信息,使用拓扑学方法并根据度值(degree centrality, DC)、介度中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CC)来确定核心靶点^[17]。

1.2.2.4 GO和KEGG分析

利用cluster Profiler等R语言,进行交集靶点的基因本体(Gene Ontology, GO)分析以及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析。一般选取P值 < 0.01的GO、KEGG项目,来进行显著分析^[18]。利用Cytoscape 3.8.0软件,构建野蚕豆根的“活性成分-作用靶点-通路”图。

1.2.2.5 分子对接

利用PubChem数据库,对野蚕豆根中的化学成

分中进行检索,下载对应 3D 结构的 SDF 文件。在蛋白质结构数据库中下载靶蛋白结构的 PDB 文件。然后利用 AutoDock 1.5.7 软件对靶点蛋白等进行去水、加氢等修饰,之后进行分子对接以及计算最小结合能。用 Affinity(kcal/mol)值,来评价结合能力。Affinity 数值越低,代表配体与受体结合越稳定。之后再通过 Pymol 进行可视化操作。

1.2.3 野蚕豆根抗氧化作用机理验证

1.2.3.1 细胞培养

将 C2C12 细胞复苏后,在含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液进行培养观察。当细胞生长状态到 80% 左右,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。之后在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中进行培养换液,根据细胞状态及密度定期进行换液或传代。

1.2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)验证

取对数生长期 C2C12 细胞,接于 60 mm 细胞培养皿中,设置成 6 组,即:空白对照组、V_C 阳性对照组(10 μg/mL)、过氧化氢模型组(600 μmol/L H₂O₂)、野蚕豆根提取物低、中、高(200、300、400 μg/mL)剂量组。造模和用药时,模型组更换为含有 H₂O₂ 的培养基,野蚕豆根提取物组为低、中、高处理组的培养基预处理 20 h,再更换为含有 H₂O₂ 的培养基处理 4 h。

用 RIPA 缓冲液在冰上裂解不同组的 C2C12 细胞,在裂解液中提取总蛋白,然后使用 BCA 定量。后经 10% SDS-PAGE 电泳,在 PVDF 膜上进行转移,使用 5% 脱脂牛奶进行封闭操作。TBST 洗膜后,在 4 °C 摇床上孵育一抗 PI3K(1:750)、p-PI3K(1:1000)、p-Akt(1:1000)、Akt(1:500)、β-tublin(1:2000) 16~24 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,随后室温下加入 HRP 标记的兔抗(1:5000)孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入 ECL 发光液,分别

采用全自动成像分析系统和 Image J 软件进行显影和分析。以 β-tublin 为内参,分析相关蛋白的相对表达水平。

2 结果

2.1 野蚕豆根体外抗氧化实验验证

2.1.1 DPPH 法测定抗氧化活性

由图 1A 可知,野蚕豆根提取物溶液和 V_C 溶液的 DPPH 自由基清除能力均随浓度增加而增强,且 V_C 溶液的清除能力较好。随着浓度的增加,野蚕豆根提取物溶液的 DPPH 自由基清除能力在逐步接近 V_C 溶液。在 80 μg/mL 后,清除能力显著增加。在 320 μg/mL 时野蚕豆根提取物溶液的清除能力较强,清除率为 73.86%。同时,经拟合计算得到野蚕豆根提取物溶液对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.166 mg/mL,表现出较强的抗氧化活性。

2.1.2 ABTS 法测定抗氧化活性

由图 1B 可知,野蚕豆根提取物溶液和 V_C 溶液的 ABTS 自由基清除能力均随浓度增加而增强,浓度在 10~320 μg/mL 范围时清除率与提取液和 V_C 浓度呈正相关。在 320 μg/mL 时,野蚕豆根提取物溶液的清除率达到 83.89%。同时,经拟合计算得到野蚕豆根提取物溶液对 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值为 0.054 mg/mL,表现出较强的抗氧化活性。

2.1.3 羟自由基清除能力

由图 1C 可知,野蚕豆根提取物溶液和 V_C 溶液对羟自由基都有着较好的清除效果。可以看出浓度在 10~80 μg/mL 范围内,野蚕豆根提取物溶液表现出和 V_C 溶液接近的清除能力。浓度在 80 μg/mL 后,野蚕豆根提取物溶液和 V_C 溶液的清除能力都随着浓度显著增加。在 320 μg/mL 时,野蚕豆根提取物溶液的清除率 59.15%。虽然野蚕豆根提取物溶液对羟自由基的清除能力相对较低,但是其仍能

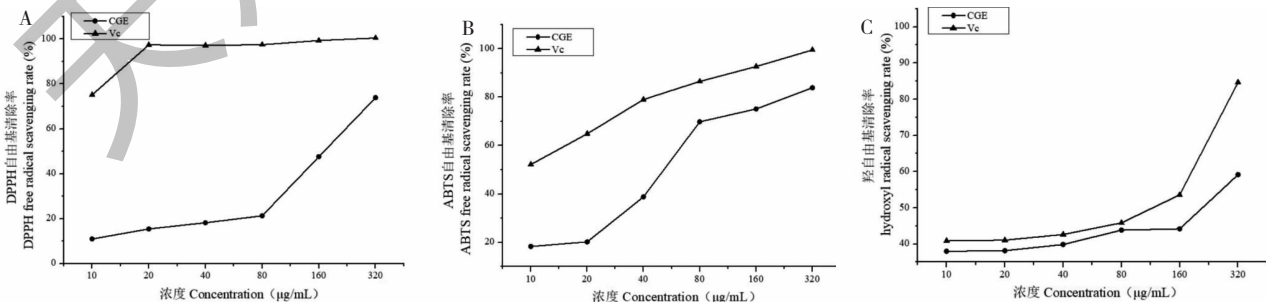


图 1 野蚕豆根提取物和 V_C 的体外抗氧化活性

Fig. 1 *In vitro* antioxidant activity of CGE and V_C

达到 60% 左右的清除率,可表明其是一种清除羟自由基的有效成分。同时,经拟合计算得到野蚕豆根提取物对羟自由基的 IC_{50} 值为 0.180 mg/mL,表现出较强的抗氧化活性。

2.2 野蚕豆根活性成分与靶点

通过 TCMSP 数据库以及文献检索,去除无效成分后,筛选得到了 22 个野蚕豆根活性成分(见表 1)。同时获得了 86 个活性成分的作用靶点。

表 1 野蚕豆根的活性成分信息

Table 1 Detail information of active compounds in *C. grandiflora* roots

序号 No.	编号 No.	化合物 Compound	化学式 Chemical formula	参考文献 Reference
1	CG1	桃叶珊瑚苷 Aucubin	$C_{16}H_{24}O_9$	5
2	CG2	玉叶金花苷 Mussaenoside	$C_{17}H_{26}O_{10}$	5
3	CG3	8-表马钱子苷 8-Epiloganin	$C_{17}H_{26}O_{10}$	5
4	CG4	8-表马钱子苷酸 8-Epiloganic acid	$C_{16}H_{24}O_{10}$	5
5	CG5	梓醇 Catalpol	$C_{16}H_{24}O_9$	5
6	CG6	栀子新甙甲酯 Gardoside methyl ester	$C_{17}H_{24}O_{10}$	5
7	CG7	京尼平苷酸 Geniposidic acid	$C_{16}H_{22}O_{10}$	5
8	CG8	6-O-甲基桂碱 6-O-Methylaucubin	$C_{16}H_{24}O_9$	5
9	CG9	车前苷 A Plantainoside A	$C_{23}H_{26}O_{12}$	3
10	CG10	荷包花苷 A Calceolarioside A	$C_{23}H_{26}O_{11}$	3
11	CG11	麦角甾苷 Acteoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	3
12	CG12	大花胡麻草苷 A Centrantheroside A	$C_{21}H_{36}O_9$	3
13	CG13	大花胡麻草苷 B Centrantheroside B	$C_{27}H_{46}O_{14}$	3
14	CG14	大花胡麻草苷 C Centrantheroside C	$C_{19}H_{30}O_9$	3
15	CG15	大花胡麻草苷 D Centrantheroside D	$C_{19}H_{30}O_9$	3
16	CG16	大花胡麻草苷 E Centrantheroside E	$C_{22}H_{38}O_{12}$	3
17	CG17	新黑蒴苷 Neo-melanoside	$C_{19}H_{32}O_9$	3
18	CG19	杜鹃红素 Azafrin	$C_{27}H_{38}O_4$	4
19	CG21	地黄紫罗兰苷 C Rehmaionoside C	$C_{19}H_{32}O_8$	3
20	CG22	β -谷甾醇 β -Stiosterol	$C_{30}H_{52}O$	3
21	CG23	甘露醇 Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	4
22	CG24	β -胡萝卜苷 β -Daucosterol	$C_{35}H_{60}O_6$	3

2.3 野蚕豆根抗氧化应激靶点的获取

在 OMIM 数据库、GeneCards 数据库中,共筛选得到了 14 187 个氧化应激的疾病靶点。将其与 86

个药物活性成分靶点取交集,构建韦恩图(见图 2),共得到 82 个交集靶点。

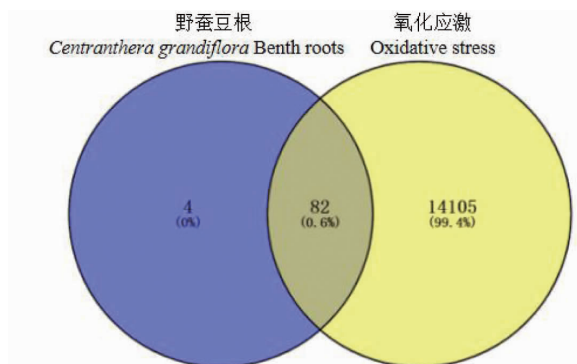


图 2 野蚕豆根活性成分与氧化应激交集靶点

Fig. 2 Intersecting targets of active ingredients of *C. grandiflora* roots and oxidative stress

2.4 药物分子-疾病靶点 PPI 网络构建

运用 STRING 数据库,对野蚕豆根治疗氧化应激的 82 个交集靶点进行蛋白互作分析,构建 PPI 网络,并在 Cytoscape3. 8. 0 中进行可视化分析(见图 3)。结果共获得 75 个节点和 212 条节点之间的连线。节点是野蚕豆根与氧化应激交集靶点编码的蛋白,节点间的连线即为度(degree)。节点的连线越

多,表示相互作用越多,靶点的作用越重要^[17]。图中圆形面积越大表示其相连的靶点越多,度值越高。为了进一步筛选 PPI 网络中的核心靶点蛋白,在 Cytoscape3. 8. 0 中对 PPI 网络的节点进行拓扑学分析,选择出大于 DC、BC、CC 中位数的目标值。共得到 STAT3、HSP90AA1、HDAC1、PPARG 等 23 个核心靶点(见表 2)。

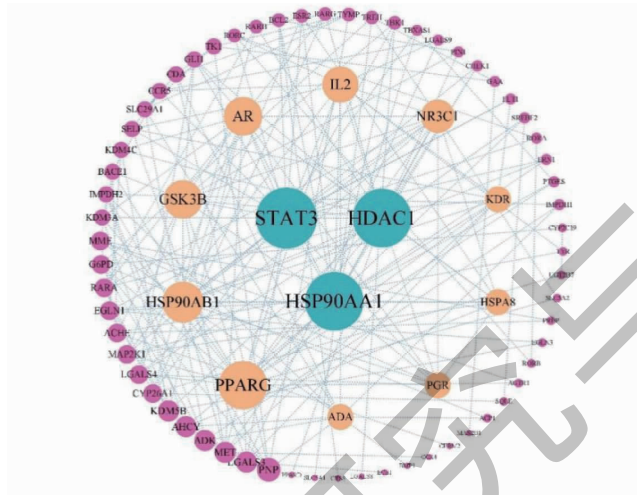


图 3 蛋白-蛋白互相作用图

Fig. 3 Protein-protein interaction diagram

表 2 PPI 网络核心靶点

Table 2 Core targets of PPI network

靶点 Target	度值 Degree centrality	介度中心性 Betweenness centrality	接近中心性 Closeness centrality
STAT3	23	0.160 124	0.483 660
HSP90AA1	22	0.177 137	0.500 000
HDAC1	22	0.176 355	0.477 419
PPARG	18	0.246 206	0.493 333
HSP90AB1	15	0.028 919	0.435 294
GSK3B	14	0.073 643	0.440 476
AR	14	0.023 941	0.411 111
IL2	13	0.144 003	0.462 500
NR3C1	12	0.019 557	0.443 114
PGR	9	0.039 266	0.402 173
KDR	9	0.014 148	0.406 593
HSPA8	9	0.017 633	0.402 174
ADA	9	0.090 777	0.368 159
MET	7	0.027 418	0.377 551
LGALS3	7	0.038 773	0.397 849
KDM5B	7	0.014 613	0.344 186
AHCY	7	0.083 968	0.397 849
RARA	6	0.013 533	0.344 186

续表 2 (Continued Tab. 2)

靶点 Target	度值 Degree centrality	介度中心性 Betweenness centrality	接近中心性 Closeness centrality
G6PD	6	0.120 759	0.389 473
EGLN1	6	0.019 683	0.352 381
BACE1	5	0.022 162	0.371 859
TBK1	4	0.027 027	0.364 532
RORC	4	0.019 828	0.352 381

2.5 GO 和 KEGG 富集通路分析

对野蚕豆根治疗氧化应激的 82 个交集靶点进行 GO 富集分析。GO 分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cell component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 个部分。结果共得到了 3 386 个 GO 富集条目,其中有 2 847 个条目与生物过程方面有关,188 个条目与细胞组成方面相关、351 个条目与分子功能方面有关。由 P 值从小到大,排列出每个部分的前 10 个条目(见图 4)。在生物过程方面,野蚕豆根主要参与细胞内受体信号通路 (intracellular receptor signaling pathway)、核苷生物合成过程 (nucleoside biosynthetic process)、糖基化合物代谢过程 (glycosyl compound metabolic process)、RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始 (tran-

scription initiation from RNA polymerase II promoter)、糖基化合物生物合成过程 (glycosyl compound biosynthetic process) 等过程。在细胞组成方面,野蚕豆根主要作用于细胞质囊泡腔 (cytoplasmic vesicle lumen)、富含纤维胶凝蛋白-1 的颗粒管腔 (ficolin-1-rich granule lumen)、囊泡腔 (vesicle lumen)、溶酶体腔 (lysosomal lumen)、富含纤维胶凝蛋白-1 的颗粒 (ficolin-1-rich granule) 等部位。在分子功能方面,野蚕豆根主要富集在碳水化合物结合 (carbohydrate binding)、核受体活性 (nuclear receptor activity)、转录辅激活因子结合 (transcription coactivator binding)、单糖结合 (monosaccharide binding)、配体活化转录因子活性 (ligand-activated transcription factor activity) 等。

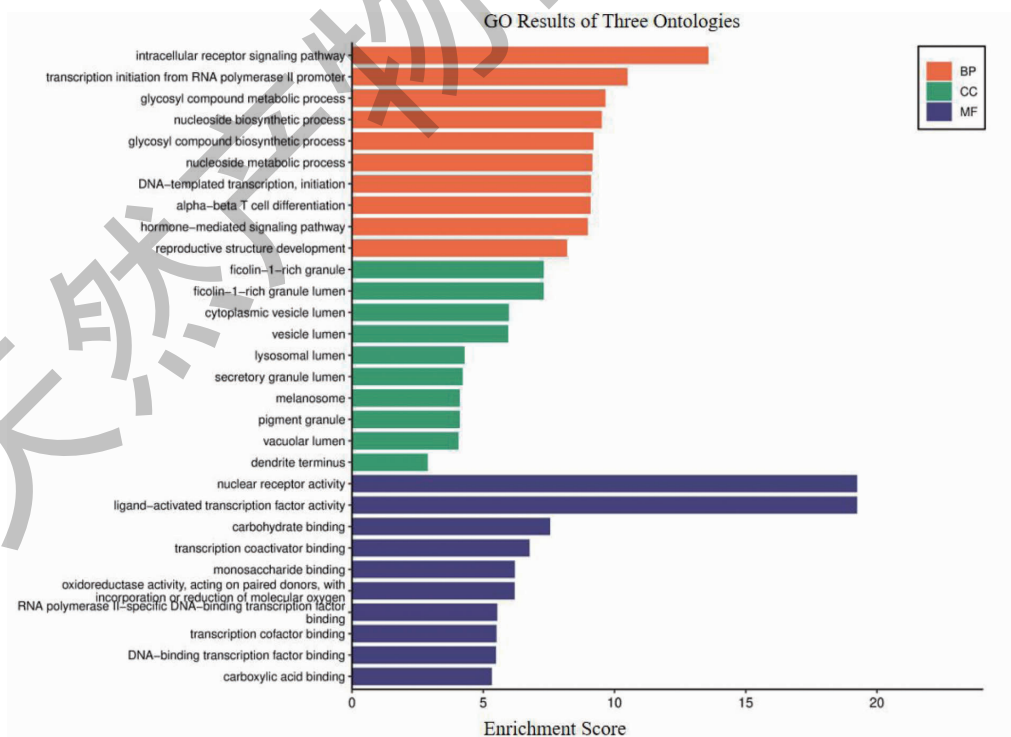


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

KEGG 通路富集分析共富集到了相关通路 211 条。由 P 值进行排序,筛选出排名前 10 名的通路,并作出气泡图(见图 5)。结果显示,野蚕豆根抗氧化应激的作用靶点主要富集在 PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、化学致癌-受体激活

(chemical carcinogenesis-receptor activation)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)等通路。

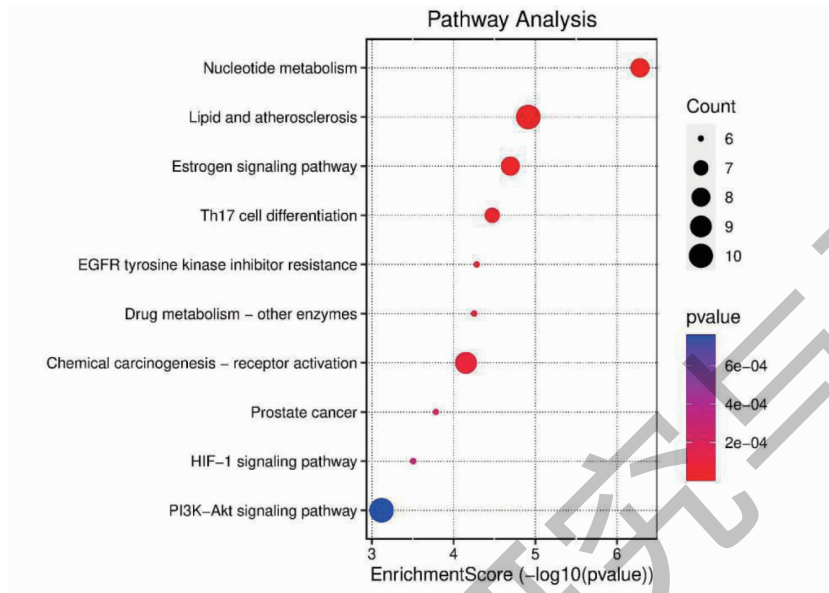


图 5 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway

2.6 野蚕豆根“活性成分-作用靶点-通路”网络的构建

为了进一步探究作用机制,构建了野蚕豆根“活性成分-作用靶点-通路”图(见图 6)。结果可

见,野蚕豆根内单一活性成分可作用多个靶点,不同的靶点也会包含于不同的活性成分中,且参与多条通路。说明野蚕豆根可能通过多成分、多靶点、多通路调控和抑制氧化应激的发生。

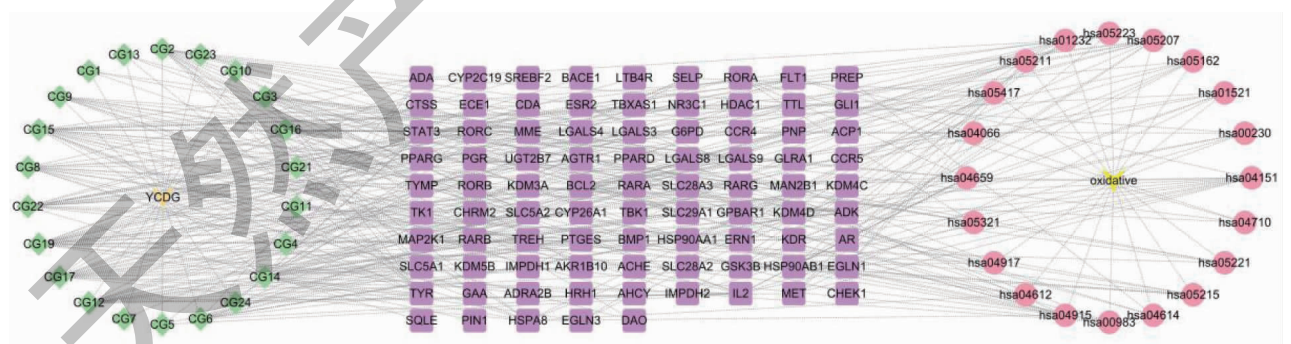


图 6 野蚕豆根“活性成分-作用靶点-通路”网络

Fig. 6 Network prediction of active compound-target-pathway of *C. grandiflora* roots

注:绿色菱形节点代表野蚕豆根活性成分;紫色正方形节点代表作用靶点;粉色圆形节点代表通路。Note: The green diamond-shaped nodes represent the active ingredient of *C. grandiflora* roots; The Purple square nodes represent targets; The pink circular nodes represent pathways.

2.7 分子对接验证

为进一步明确野蚕豆根抗氧化应激的活性成分与关键靶点之间的结合效应,选取了部分活性成分

与“活性成分-靶点-通路”网络中前 3 个的关键靶点 STAT3、HDAC1 及 HSP90AA1 进行分子对接(见表 3)。通常认为,分子对接结合能小于 0 时说明两分

子具有自发结合能力,分子对接结合能小于-1.2 kcal/mol 时则表明两分子结合良好^[17]。结果显示,所有对接的活性成分与靶点均具有良好的结合活性。杜鹃红素和 β -谷甾醇的结合能最低,其中杜鹃

红素为野蚕豆根中的特征性成分,因此在 Pymol 软件中选取杜鹃红素完成可视化分析,分析具体结合情况(见图7)。

表3 作用成分与核心靶点对接的结合能

Table 3 Binding energy for docking of active ingredients with key targets

活性成分 Active component	结合能 Binding energy(kcal/mol)		
	STAT3	HSP90AA1	HDAC1
杜鹃红素 Azafrin	-4.93	-4.7	-4.87
β -谷甾醇 β -Stiosterol	-5.78	-5.49	-5.63
桃叶珊瑚苷 Aucubin	-1.97	-1.17	-3.37
玉叶金花苷 Mussaenoside	-2.17	-2.28	-2.57
8-表马钱子苷 8-Epiloganin	-3.54	-2.52	-2.00
栀子新甙甲酯 Gardside methyl ester	-4.21	-3.11	-2.62
6-O-甲基月桂酸碱 6-O-Methylaucubin	-3.00	-1.90	-2.42
新黑蒴苷 Neo-melasmoside	-2.34	-1.31	-1.40
大花胡麻草苷 D Centrantheroside D	-2.97	-2.36	-1.75
大花胡麻草苷 E Centrantheroside E	-4.30	-3.23	-3.58
梓醇 Catalpol	-1.49	-1.72	-2.57

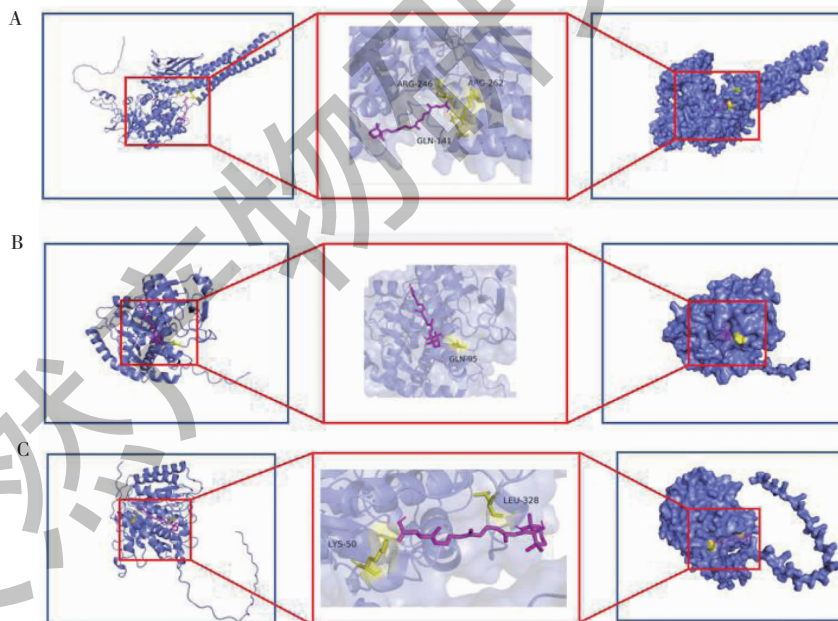


图7 杜鹃红素与靶蛋白的分子对接过程

Fig. 7 Molecular docking process between azafrin and target protein

注:A 杜鹃红素与 STAT3;B 杜鹃红素与 HSP90AA1;C 杜鹃红素与 MAPK3。第一列为对接总体图;第二列为残基作用图;第三列为包裹图。

Note:A; Azafrin and STAT3;B; Azafrin and HSP90AA1;C; Azafrin and MAPK3. The first column is the overall diagram of the docking;The second column is the residue interaction diagram;The third column is the encapsulation diagram.

2.8 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达

在本次实验中,采用体外抗氧化模型已验证了

野蚕豆根具有较好的抗氧化活性。同时,通过 KEGG 通路富集,发现 PI3K/Akt 信号通路与野蚕豆根抗氧化应激密切相关。因此采用 Western blot 对

PI3K-Akt 通路的相关蛋白的表达进行检测。结果显示,与过氧化氢模型组相比,野蚕豆根提取物低、中、高处理组细胞中 p-PI3K 和 p-Akt (Ser473) 的表

达水平均被显著上调 ($P < 0.05$) (见图 8),起到抗氧化作用。

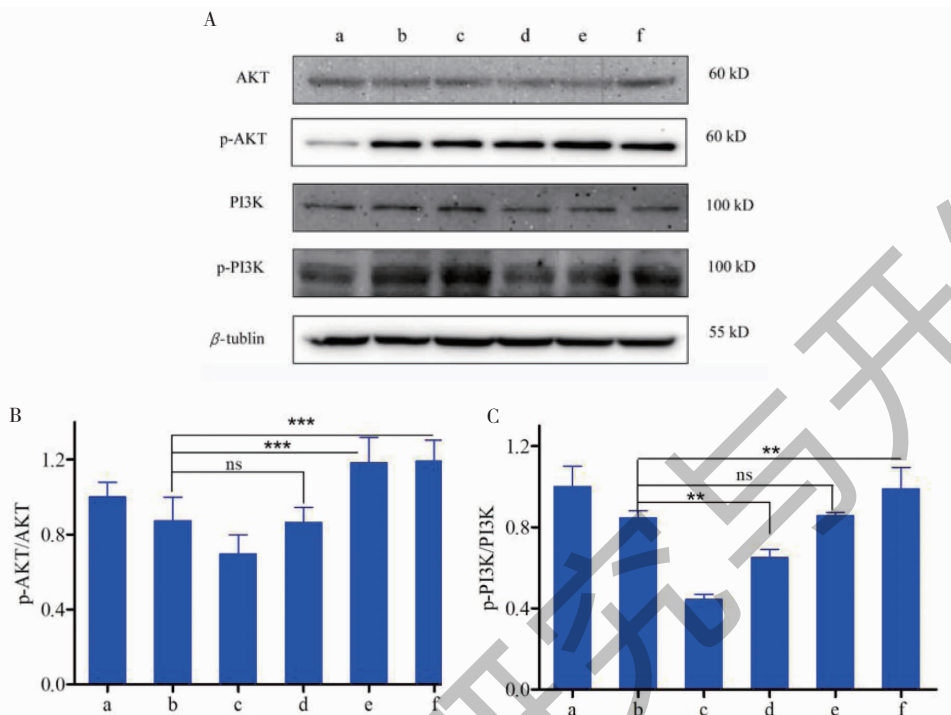


图 8 野蚕豆根提取物对关键蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of extract from *C. grandiflora* roots on the expression of key proteins

注:A:PI3K/AKT 通路蛋白表达的 Western blot 检测结果;B:各组 p-AKT 与 AKT 相对表达量比较;C:各组 p-PI3K 与 PI3K 相对表达量比较; a:空白对照组;b: V_C 阳性对照组;c: H_2O_2 模型组;d:CGE 低剂量组(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$);e:CGE 中剂量组(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$);f:CGE 高剂量组(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。Note:A:Western blot detection results of PI3K/AKT pathway protein expression;B:Comparison of the relative expression of P-AKT and AKT in each group;C:Comparison of the relative expression of P-PI3K and PI3K in each group;a:Blank control group;b: V_C positive control group;c: H_2O_2 model group;d:CGE low dose group (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$);e:CGE medium dose group (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$);f:CGE high dose group (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3 讨论与结论

野蚕豆根是我国的一种传统中药,含有环烯醚萜类、苯乙醇类、类胡萝卜素等多种活性物质,具有抗氧化、降糖、抗凝血和心肌缺血等多种药理活性。目前,对于野蚕豆根抗氧化活性的研究也在逐渐深入,但关于其具体的活性成分和机制还尚未发掘。为了进一步探究野蚕豆根抗氧化应激的作用机制,本文借助体外抗氧化实验、网络药理学、分子对接技术以及 Western blot 检测对其进行进一步研究。

通过体外抗氧化实验,发现了野蚕豆根提取物具有 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基的清除能力,且在一定浓度范围内,野蚕豆根提取物的三种自由基清除率具有一定的线性关系。在浓度为 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,3 种自由基的清除率分别为 73.86%、83.89%、59.15%, IC_{50} 值分别为 0.166

mg/mL、0.054 mg/mL 和 0.180 mg/mL,表现出良好的抗氧化能力。

通过文献以及相关数据库的筛选,得到了 22 个野蚕豆根的活性成分,包括桃叶珊瑚苷、杜鹃红素、 β -谷甾醇、栀子新甙甲酯、梓醇等。其中桃叶珊瑚苷在野蚕豆根中含量最高,具有抗氧化、抗菌、抗癌等广泛的活性^[19]。Nrf2 是抗氧化应激的核心转录因子,调控下游抗氧化因子的激活和表达,维持细胞稳态^[20]。有研究发现桃叶珊瑚苷可通过 Nrf2 介导的抗氧化途径来抑制小鼠破骨细胞的分化,从而减缓骨质疏松的发展^[21]。杜鹃红素是一种天然的类胡萝卜素,是野蚕豆根中的重要活性成分。研究发现,野蚕豆根中的杜鹃红素可以通过增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性等,来发挥对细胞氧化应激损伤的保护作用。同时,还可以通过激

活 Nrf2-ARE 通路,起到对心肌损伤的保护活性^[5]。梓醇是也是一类环烯醚萜苷类的化合物,具有抗炎、抗氧化等广泛的药理活性。研究发现,梓醇还可通过上调 Nrf2 和 HO-1 的表达,增加 SOD 的活性,降低 MDA 的活性,减少脑细胞凋亡的发生,促进 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白的表达,减轻氧化应激损伤^[22]。

在蛋白互作网络分析中,获得了野蚕豆根活性成分抗氧化应激的 82 个作用靶点。主要包括 STAT3、HSP90AA1、HDAC1、PPARG、HSPAB1 等 23 个核心靶点。热休克蛋白(HSPs)是一种分子伴侣蛋白,它可以改变其他蛋白质的结构和相互作用,并由热休克和其他化学和物理应激诱导^[23]。HSP90AA1 和 HSP90AB1 同属于 HSPs 中的 HSP90 家族。当发生氧化应激时,会激活细胞内热休克蛋白的表达。研究发现,HSP90 可通过调节 Keap1 (I-Nrf2)-Nrf2 信号途径来调节机体的氧化损伤。在氧化应激的状态下,HSP90 会与 Keap1 发生相互反应,促使 Keap1 与 Nrf2 复合物的解离,从而释放 Nrf2。通过 Nrf2 及其下游蛋白的转录激活来保护细胞免受氧化应激^[24,25]。STAT3 是氧化应激后细胞存活的重要介导因子,具有强大的增殖作用和凋亡抵抗作用^[26]。研究表明,STAT3 可以通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-XL 的表达以及促进 caspases 的失活,来发挥其细胞保护作用^[27,28]。HDAC1 是一类催化组蛋白和非组蛋白去乙酰化的酶,能够通过组蛋白和转录因子的去乙酰化降低抗氧化酶的表达^[29]。同时有研究发现,抑制 HDAC1 的表达可以通过改善细胞活力以及增加 SOD 活性等,防止化学缺氧诱导的 H9c2 细胞氧化应激失衡^[30]。

KEGG 富集分析表明野蚕豆根发挥抗氧化能力主要与 PI3K/Akt 信号通路、核苷酸代谢通路、雌激素信号通路等有关。其中 PI3K/Akt 信号通路在抗氧化应激中有着重要地位它广泛存在于哺乳动物中细胞中,具有良好的神经保护性。PI3K/Akt 信号通路的激活将促进 Akt 级联的磷酸化,防治氧化损伤^[31]。研究表明,通过调控 PI3K/Akt 信号通路,可以改善软骨细胞以及 H9c2 心肌细胞的凋亡和氧化应激^[32,33]。

分子对接结果显示,野蚕豆根的活性成分与核心靶点间存在良好的结合效应,其相互结合能力较强,作用密切。

PI3K 属于细胞质脂类激酶。当 PI3K 磷酸化的

同时,会招募并引起 Akt 的磷酸化,从而调控氧化应激、凋亡等生理活动^[31]。Western blot 检测结果发现,野蚕豆根正丁醇提取物能够促进蛋白 PI3K 以及 Akt 的磷酸化,从而激活 PI3K/Akt 信号通路,改善氧化应激。

综上所述,本文采用体外抗氧化实验对野蚕豆根的抗氧化活性进行了评价。借助网络药理学、分子对接技术对野蚕豆根抗氧化应激的活性成分、作用靶点、信号通路等进行了预测。最后利用 Western blot 检测对其作用机制加以验证。结果表明,野蚕豆根提取物清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.166、0.054 和 0.180 mg/mL,验证了其具有良好的抗氧化活性。网络药理学结果显示,野蚕豆根可通过多成分、多靶点、多通路来改善氧化应激,其中 PI3K/Akt 信号通路可能是其发挥抗氧化作用的关键通路。Western blot 检测进一步发现,野蚕豆根提取物可通过促进 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白的磷酸化从而激活该通路,发挥抗氧化活性,进而验证了野蚕豆根抗氧化应激的作用机制,为野蚕豆根在抗氧化应激作用的深入研究上提供了方向以及奠定了基础。

参考文献

- 1 Editorial Committee of Flora of China. Flora of China(中国植物志)[M]. Science Press:Beijing,China,1979:344-346.
- 2 Compilation Group of Yunnan Traditional Chinese Medicine. Yunnan Traditional Chinese Medicine(云南中草药)[M]. Kunming:The Peoples Press of Yunnan,2011:86.
- 3 Liao L. Investigation into the bioactive components and chemical constituents from the roots of *Centranthera grandiflora* Benth[D]. Shanghai:Shanghai University of Traditional Chinese Medicine(上海中医药大学),2014.
- 4 Liang J,Zhang J,Ma X,et al. Identification of chemical constituents from *Centranthera grandiflora* [J]. Chin Bull Bot(植物学通报),1984,2:Z47-Z43.
- 5 Yang S,Chou G,Li Q. Cardioprotective role of azafrin in against myocardial injury in rats via activation of the Nrf2-ARE pathway[J]. Phytomedicine,2018,47:12-22.
- 6 Li L,Li H,Yan H,et al. Response surface optimization of extraction process and antioxidant activity of total iridoid glycosides from *Centranthera grandiflora* Benth [J]. Chin Food Addit(中国食品添加剂),2021,32:18-25.
- 7 Gao X,Dong W,Xia C,et al. *Centranthera grandiflora* alleviates alcohol-induced oxidative stress and cell apoptosis[J]. Chin J Nat Med,2022,20:572-579.

- 8 Li L, Li S, Zhao J, et al. Study on the pharmacognosy characteristics of the *Centranthera grandiflora* Benth and the microscopic characteristics of the primitive plant *Centranthera grandiflora* [J]. South Chin Agric (南方农业), 2021, 15: 5-8.
- 9 Zhang X, Li C, Wang L, et al. Analysis of *Centranthera grandiflora* Benth transcriptome explores genes of catalpol, acteoside and azafrin biosynthesis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 6034.
- 10 Hang M, Zhang L, Li Y. Research progress on the chemical structure and pharmacological effects of aucubin and their derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 19: 4105-4113.
- 11 Li L, Shan R, Chen Y, et al. The effect of total Iridoid glycosides of *Centranthera grandiflora* Benth on the liver function of nonalcoholic fatty liver rats [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacology (中国民族民间医药杂志), 2021, 30: 25-28.
- 12 Surapon T. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. World J Diabetes, 2015, 6: 456-480.
- 13 Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review [J]. Eur J Med Chem, 2015, 46: 55-74.
- 14 Liang X, Gao Y, Pan Y, et al. Purification, chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides isolated from *Mycena dendrobii* [J]. Carbohydr Polym, 2018, 203: 45-51.
- 15 Surwase SU, Patil MS. *In vivo* and *in vitro* anti oxidant activity of ethanolic extraction of *Justicia gendarussa* Burm leaves [J]. J Pharm Res Int, 2021, 2021: 2922-2931.
- 16 Li J, Ran T. Traditional Chinese medicine (TCM) therapy [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1010: 261-280.
- 17 Liu J, Shi J, Guo J, et al. Anxiolytic-like effect of Suanzaoren-Wuweizi herb-pair and evidence for the involvement of the monoaminergic system in mice based on network pharmacology [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23: 7.
- 18 Zhang S, Zhu J, Ju Y, et al. Drosophila model and network pharmacology to explore novel targets and novel active components of Chinese traditional medications for treating kidney stones [J]. Pharmacol Res Modern Chin Med, 2023, 6: 100220.
- 19 Kartini K, Abigail MI, Finna S, et al. Characteristics, isolation methods, and biological properties of aucubin [J]. Molecules, 2023, 28: 4154.
- 20 Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88: 314-336.
- 21 Zhang Y, Liu X, Li Y, et al. Aucubin slows the development of osteoporosis by inhibiting osteoclast differentiation via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant pathway [J]. Pharm Biol, 2021, 59: 1556-1565.
- 22 Wang J, Zhang Y, Zhang M, et al. Feasibility of catalpol intranasal administration and its protective effect on acute cerebral ischemia in rats via anti-oxidative and anti-apoptotic mechanisms [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 279-296.
- 23 Coskunpinar E, Akkaya N, Yildiz P, et al. The significance of HSP90AA1, HSP90AB1 and HSP90B1 gene polymorphisms in a Turkish population with non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2014, 34: 753-757.
- 24 Surkakant K, Jaiswal K. Hsp90 interaction with INrf2 (Keap1) mediates stress-induced Nrf2 activation [J]. J Biol Chem, 2014, 289: 11568.
- 25 Tennille P, Kaushik V, Murugesan V, et al. Activation of Hsp90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells [J]. Am J Physiol. Cell physiology, 2008, 295: C1281-C1291.
- 26 Mohammed HA, Ahmed E. Lycorine ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats: emphasis on antioxidant, anti-inflammatory, and STAT3 inhibition effects [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15: 369.
- 27 Sanae H, Keita T, Qi HZ, et al. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and independent mechanisms [J]. J Clin Invest, 2003, 112: 989-998.
- 28 Grandis J R, Drenning S D, Zeng Q, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4227-4232.
- 29 Dunaway LS, Pollock J, Ennifer S. HDAC1: an environmental sensor regulating endothelial function [J]. Cardiovasc Res, 2021, 18: 1885-1903.
- 30 Li Y, Zhang Z, Zhou X, et al. Histone deacetylase inhibition protects against hypoxia-induced swelling in H9c2 cardiomyocytes through regulating cell stiffness [J]. Circ J, 2017, 82: 192-202.
- 31 Pompura SL, Margarita D. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. J Leukoc Biol, 2018, 103: 1065-1076.
- 32 Tiehanl C, Lan Y, Lu Y, et al. Isoorientin ameliorates H2O2-induced apoptosis and oxidative stress in chondrocytes by regulating MAPK and PI3K/Akt pathways [J]. Aging, 2023, 15: 4861-4874.
- 33 Chen X, Zhang H, Feng M, et al. A novel peptide HSP-17 ameliorates oxidative stress injury and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by activating the PI3K/Akt pathway [J]. Ann Transl Med, 2022, 10: 1357.