

基于谱-效关系筛选菊茎叶总黄酮抗氧化物质基础及其机制探讨

巫梦莹¹,陈慧芳^{1,2},程冉冉¹,
丁杨飞¹,熊俊伟¹,夏成凯³,吴德玲^{1,4,5,6},张伟^{1,4,5,6*}

¹安徽中医药大学药学院,合肥 230012; ²安庆医药高等专科学校,安庆 246052;

³亳州职业技术学院 安徽中药材种植联合研究中心,亳州 236800;

⁴安徽中医药大学国家中医药管理局中药炮制技术传承基地;⁵省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心;

⁶中药饮片制造新技术安徽省重点实验室,合肥 230012

摘要:为探讨菊茎叶总黄酮(total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium*, TFCSL)抗氧化应激的活性成分,阐明其药效物质基础和作用机制。采用HPLC建立不同批次TFCSL指纹图谱;以高浓度葡萄糖诱导人脐静脉内皮细胞建立氧化损伤模型,将丙二醛含量、乳酸脱氢酶含量和超氧化物歧化酶活性作为药效指标;采用灰色关联度和偏最小二乘法分析其谱-效关系确定抗氧化药效物质基础;基于网络药理学结合分子对接探究核心靶点及作用通路。从12批次TFCSL指纹图谱中确定12个共有峰,指认其中9个化学成分;各批次总黄酮样品均可减少细胞凋亡、降低丙二醛及乳酸脱氢酶含量、提高超氧化物歧化酶活性;综合2种数学模型确定峰5(芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷)、峰6(异绿原酸C)、峰7(香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷)为抗氧化物质基础;筛选出的3个活性成分作用于抗氧化应激的33个靶点;关键靶点为TNF、CASP3、EDNRA、XDH、PTGS2、MMP2,主要涉及脂质和动脉粥样硬化信号通路、IL-17信号通路、糖尿病并发症AGE-RAGE信号通路、TNF通路、MPKA通路等信号通路;分子对接结果显示活性成分与关键靶点之间均有较好的结合力。表明TFCSL抗氧化应激的物质基础可能为芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷,推测通过TNF、CASP3等靶点作用动脉粥样硬化信号通路、IL17信号通路发挥作用,体现菊茎叶多成分、多靶点抗氧化的作用特点。

关键词:菊茎叶;总黄酮;氧化应激;谱效关系

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)3-0464-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.3.010

Screening of antioxidative material basis of total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* based on the spectrum-effect relationship and its mechanism

WU Meng-ying¹, CHEN Hui-fang^{1,2}, CHENG Ran-ran¹,
DING Yang-fei¹, XIONG Jun-wei¹, XIA Cheng-kai³, WU De-ling^{1,4,5,6}, ZHANG Wei^{1,4,5,6*}

¹School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

²Anqing Medical College Anqing, Anqing 246052, China;

³Bozhou Vocational and Technical College, Joint Research Center for Chinese Herbal Medicine of Anhui of IHM, Bozhou 236800, China;

⁴Anhui University of Chinese Medicine State Administration of Traditional Chinese Medicine Traditional Chinese Medicine Processing and Inheritance Base;

⁵MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials;

⁶Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China

收稿日期:2023-09-28 接受日期:2023-12-22

基金项目:国家自然科学基金(81973485);安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2020A0889);江苏省研究生科研创新计划(KYCX22_2029);

安徽省高校优秀青年骨干教师国内访问研修项目(gxgnfx2022124)

*通信作者 E-mail:zhangwei@ahcm.edu.cn

Abstract: In order to explore the antioxidant chemical constituents of total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* (TFCSL), and to reveal its pharmacodynamic material basis and mechanism of action. In this study, HPLC was used to establish the fingerprints of different batches of TFCSL; high glucose concentration induced oxidative damage model in human umbilical vein endothelial cells, and malondialdehyde, lactate dehydrogenase and superoxide dismutase activities were used as indicators of drug efficacy; gray correlation and partial least squares were used to analyze the spectral-efficacy relationship to determine the antioxidant efficacy substances of TFCSL; based on network pharmacology combined with molecular docking to explore the core targets and pathways of action. Twelve common peaks were identified from the fingerprints of 12 batches of TFCSL, and 9 chemical components were designated; all batches of total flavonoid samples reduced apoptosis, lowered malondialdehyde and lactate dehydrogenase content, and increased superoxide dismutase activity; peak 5 (apigenin-7-O- β -D-glucoside), peak 6 (isochlorogenic acid C) and peak 7 (diosmetin-7-O- β -D-glucoside) were selected as the basis for TFCSL antioxidant substances by integrating two mathematical models; the three screened active ingredients acted on 33 targets of anti-oxidative stress; the key targets were TNF, CASP3, EDNRA, XDН, PTGS2, MMP2, etc., which were mainly involved in signaling pathways such as lipid and atherosclerosis signaling pathways, IL-17 signaling pathway, diabetic complications AGE-RAGE signaling pathway, TNF pathway, MPKA pathway, and other signaling pathways; the molecular docking results showed that there was good binding between the active ingredients and the key targets. It indicates that the material basis of TFCSL anti-oxidative stress may be apigenin-7-O- β -D-glucoside, isochlorogenic acid C, diosmetin-7-O- β -D-glucoside, and it is speculated that it plays a role in the role of atherosclerosis signaling pathway and IL17 signaling pathway through the targets of TNF and CASP3, reflecting the role of multi-components and multi-targets of stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* in the function of anti-oxidation.

Key words: stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium*; total flavonoids; oxidative stress; spectrum-effect relationship

菊花有着悠久的临床应用历史,随着对菊花中活性成分研究的不断深入,菊花有关加工产品越来越多,而菊茎叶作为菊花采收副产物,通常作为畜牧饲料使用或被丢弃^[1],目前还缺乏深入系统的研究。前期研究表明,菊花茎叶中含有黄酮类、酚酸类、多糖类、挥发油类、核苷类、氨基酸类等资源性化学成分,与菊花成分多为相似^[2,3],同样具有抗氧化、抗炎、降低血脂、改善肠道功能失调等药理作用^[4-6]。目前已有研究表明菊茎叶总黄酮(total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium*, TFCSL)具有良好的抗菌、抑制自由基作用,此外,菊茎叶提取物对过氧化叔丁醇诱导的人肝细胞氧化应激也具有一定的保护作用^[7-9]。因此菊茎叶也可以作为总黄酮类活性成分的提取原料,这对减少资源浪费有重要意义。

中药谱效关系研究是将中药中各成分的指纹图谱与药效结果联系起来,通过多种数据处理模型阐明各成分对药效贡献率,从而确定出与药效相关的化合物群^[10]。网络药理学是一种药物研究的新模式,交叉应用于靶点预测、作用机制及生理病理过程分析,多角度建立药物相关靶点,进而揭示复杂疾病机制^[11]。分子对接是计算机辅助药物设计的一种方法,从分子水平阐明中药活性成分与靶点的相互作用及位置。血管内皮细胞通过分泌具有调节血管

功能的活性物质维持动态平衡,高糖会导致人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增加活性氧的生成量,进而产生氧化应激,造成其功能障碍。同时测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平能更准确地反映血管内皮细胞内氧化应激状态。本研究通过建立不同批次TFCSL指纹图谱,探讨共有峰与抗氧化应激活性的相关性,从而筛选物质基础;利用Gene Cards和OMIM等数据库筛选疾病靶点,构建中药-成分-靶点网络,预测抗氧化关键作用靶点及机制;结合分子对接探索小分子与蛋白之间的相互作用,以期提高菊花采收副产物菊茎叶的利用价值,为后期菊资源的综合开发利用提供理论依据,提高中药的资源再利用。

1 材料与方法

1.1 试验药物

12批菊茎叶样品(S1~S12)在2021年11月均采集于亳州谯城区,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat.的干燥茎叶。

1.2 细胞

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(批号:22053101,苏州北纳创联生物技术有限公司),于内皮细胞专用培养基(endothelial cell medium, ECM)中培养。

1.3 试剂

ECM 培养基(批号 35924, ScienCell Research Laboratories); 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(批号 CR0013, SparkJade); 胰酶细胞消化液(2.5% 胰酶)(批号 C0201, Beyotime); 总超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、微量丙二醛(MDA)测定试剂盒(批号 20220402、20220408、20220908, 南京建成生物工程研究所); 增强型 CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 CA0001、EC0001, 碧云天生物技术研究所); 香叶木素、芹菜素、香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 B、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、绿原酸(批号 MUST-21061005、MUST-21040401、MUST-21040401、MUST-21030602、MUST-19010201、MUST-21030304, 成都曼思特生物科技股份有限公司); 异绿原酸 C、隐绿原酸、咖啡酸(批号: PS001057、PS001110、PS010522, 成都普思生物科技有限公司); 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、芦丁、异鼠李素(批号: CFS201502、CFS202004、CFS202103, 武汉天植生物技术有限公司), 纯度均>98%; 葡萄糖(批号 C220410F2, 湖北科伦药业有限公司); HPLC 级甲酸(批号 C13217140, 上海麦克林生化科技有限公司), 纯度≥99%; 抗坏血酸(Vc)(C12873349, 纯度>99%, 上海麦克林生化科技有限公司); HPLC 级乙腈(批号 20210531, 纯度≥99%, 安徽天地高纯溶剂有限公司)。

1.4 仪器

LC-20ADXR 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, 二极管阵列检测器, 四元低压泵, 自动进样器); SpectraMax iD5 型荧光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.5 方法

1.5.1 菊茎叶总黄酮 HPLC 指纹图谱的建立

1.5.1.1 溶液的制备

精密称定 25.0 g 菊茎叶粉末, 在 85 ℃ 下分别按照 1:20、1:15、1:15 的比例加入 50% 乙醇, 加热回流, 合并浓缩提取液。调节提取液 pH 为 4.0, 4 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液。将 AB-8 大孔树脂与上清液 2:1 装柱, 先后以水、70% 乙醇冲洗, 收集 70% 乙醇洗脱物^[12], 蒸干, 即得 TFCNL。取适量用 70% 甲醇溶解稀释, 作为供试品溶液。

精密称定绿原酸、异绿原酸 C、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、芹菜素、异鼠李素、异绿原酸 B、隐绿原

酸、芦丁、香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、香叶木素适量, 置容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 作为混合对照品溶液。

1.5.1.2 色谱条件

XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 甲酸(B); 梯度洗脱(0~5 min, 8% A→10% A; 5~11 min, 10% A→14% A; 11~14 min, 14% A→17% A; 14~18 min, 17% A→17.5% A; 18~28 min, 17.5% A→18% A; 28~33 min, 18% A; 33~43 min, 18% A→18.5% A; 43~53 min, 18.5% A→19% A; 53~68 min, 19% A→30% A; 68~83 min, 30% A→52% A; 83~85 min, 52% A→8% A; 85~90 min, 8% A); 柱温: 30 ℃; 检测波长: 348 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L。

1.5.1.3 方法学考察

精密度: 取同一批次 TFCNL 样品, 按“1.5.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“1.5.1.2”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 采集图谱, 计算各共有峰峰面积及保留时间的 RSD 值。

重复性: 取 TFCNL 样品, 按“1.5.1.1”项下方法复制制备供试品溶液 6 份, 按照“1.5.1.2”项下色谱条件进样采集图谱, 计算各共有峰峰面积及保留时间的 RSD 值。

稳定性: 取 TFCNL 样品, 按“1.5.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“1.5.1.2”项下色谱条件进样测定, 计算各共有峰峰面积及保留时间的 RSD 值。

1.5.1.4 相似度评价

将 12 批 TFCNL 样品指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)”进行相似度分析。

1.5.2 菊茎叶总黄酮对高糖诱导 HUVEC 氧化损伤的保护作用

1.5.2.1 葡萄糖诱导细胞氧化应激损伤模型的最佳浓度的筛选

HUVEC 采用专用培养基 ECM 于 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养^[13]。取生长状态良好的 HUVEC 细胞, 调整细胞密度为 8 × 10³ 个/孔, 接种于 96 孔板中, 并置于 CO₂ 培养箱进行培养, 待细胞贴壁并且状态稳定后, 弃去原有的培养基, PBS 清洗后加入含 1% 血清的培养基饥饿处理 12 h。弃去原先孔板中的培养基, PBS 清洗后加入不同浓度梯度葡萄糖溶液(10、20、30、40、50、100、150、200 mmol/L)建立氧

化损伤模型,每个浓度设三个复孔,置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,轻轻摇匀后,在 37 ℃ 下避光孵育 2 h,450 nm 下测定其吸光度值,按照公式(1)计算细胞存活率(*R*),实验重复三次。

$$R = [(A_1 - A_2) / (A_3 - A_2)] \times 100\% \quad (1)$$

式中,*A*₁ 为给药组吸光度值,*A*₂ 为空白组吸光度值,*A*₃ 为对照组吸光度值。

1.5.2.2 筛选菊茎叶总黄酮对高糖诱导细胞氧化应激损伤保护作用的最适浓度

细胞接种于 96 孔板中,设置 8 个实验组:空白对照组(control, Con)、高糖损伤模型组(high glucose injury group, HG)、TFC SL 给药组(200、400、600、800、1 000 μg/mL)和阳性对照组(25 μg/mL Vc),同样使用 CCK-8 检测细胞活力,方法同“1.5.2.1 项”。

1.5.2.3 氧化应激生化指标检测

实验分 Con 组、HG 组,不同批次 TFC SL 组和 Vc 组。每组设置 3 个复孔。收集细胞,加入 PBS 超声充分裂解后,离心取上清,按照试剂盒说明书分别测定 MDA 含量、LDH 含量和 SOD 活力。

1.5.2.4 统计学处理

用软件进行统计学处理分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间两两比较采用 *t* 检验,多组使用单因素方差分析(ANOVA),*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

1.5.3 谱-效关系研究

1.5.3.1 灰色关联度分析

采用初值化变换法对原始数据进行无量纲化处理。将体外细胞实验各药效指标作为比较序列{X₀(t)},各共有峰面积作为参考序列{X_i(t)},根据文献^[14]计算得到各组关联度 *r*。

1.5.3.2 偏最小二乘法

将标准化处理的不同批次共有峰面积数据设为自变量 Y,各样品抗氧化药效指标作为因变量 X,通过 SIMCA-P 14.1 软件进行数据处理,得到变量投影重要性系数(variable importance in projection, VIP)值。

1.5.4 网络药理学研究

根据谱-效分析结果,筛选出关键活性成分,利用中药系统药理学技术平台 TCMS (http://tcmsp.com/tcmfsp.php) 对芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷相关蛋白

靶点进行检索。使用“Oxidative Stress”作为关键词,分别在 Gene cards (<https://www.genecards.org/>) 数据库和 OMIM (<https://omim.org/>) 获得氧化应激人类基因相关靶点,其中 Gene Cards 数据库获取的疾病相关靶点根据基因靶点数量取其中位数处理,获取适当数量相关性高的靶点。将疾病靶点与活性成分的作用靶点取交集,即 TFC SL 抗氧化应激的靶点,将以上活性成分及治疗靶点交集数据导入 Cytoscape 3.10.0 软件,构建“药物-活性成分-关键靶点基因”网络。将交集基因导入到 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 进行分析,其结果导入 Cytoscape 3.10.0 软件,获得蛋白质-蛋白质相互作用 PPI 网络图,并进行核心靶点拓扑分析。将核心作用靶点在 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中进行基因本体论 GO 和 KEGG 富集分析。

1.5.5 分子对接

PubChem 数据库得到化学成分的 3D 结构信息,PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶蛋白的 3D 结构,使用 Discovery Studio 2019 软件对靶蛋白进行去除水分子,删除原配体,添加氢键等前处理操作,根据 PDB 晶体的原配体的空间位置定义活性口袋,运行精准分子对接(CDOCKER)模拟活性成分与蛋白对接。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验

取同一批次(编号:S12)制备供试品溶液,按“1.5.1.2”项下色谱条件,重复进样 6 次,计算其相对保留时间 RSD 为 0.017% ~ 1.4%,相对峰面积 RSD 为 0.15% ~ 1.3%,结果表明仪器精密度良好。

2.1.2 稳定性试验

取同一批次(编号:S12)制备供试品溶液,分别在 0、2、4、6、12、24 h,按“1.5.1.2”项下色谱条件进行测定,对主要色谱共有峰进行分析,计算其相对保留时间 RSD 为 0.051% ~ 1.7%,相对峰面积 RSD 为 0.13% ~ 1.2%。表明样品溶液在 24 h 内相对稳定。

2.1.3 重复性试验

取同一批次(编号:S12)的样品 6 份,按“1.5.1.1”项方法制备供试品溶液,按“1.5.1.2”项下色谱条件进行测定,计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.041% ~ 2.0%,相对峰面积 RSD 为 0.17% ~ 2.9%,表明该方法重复性良好。

2.2 指纹图谱的建立及相似度评价

2.2.1 指纹图谱的建立及共有峰标定

将12批次TFCSDL样品按“1.5.1.1”项下方法制得供试品溶液,按照“1.5.1.2”项下的色谱条件进样测定。将各批次TFCSDL HPLC图谱数据导入到

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版本)”,设定(S8)为参照图谱,采用中位数法,时间窗的宽度默认为0.1 min,经过多点校正后将色谱峰自动匹配,生成12批TFCSDL HPLC指纹图谱见图1。

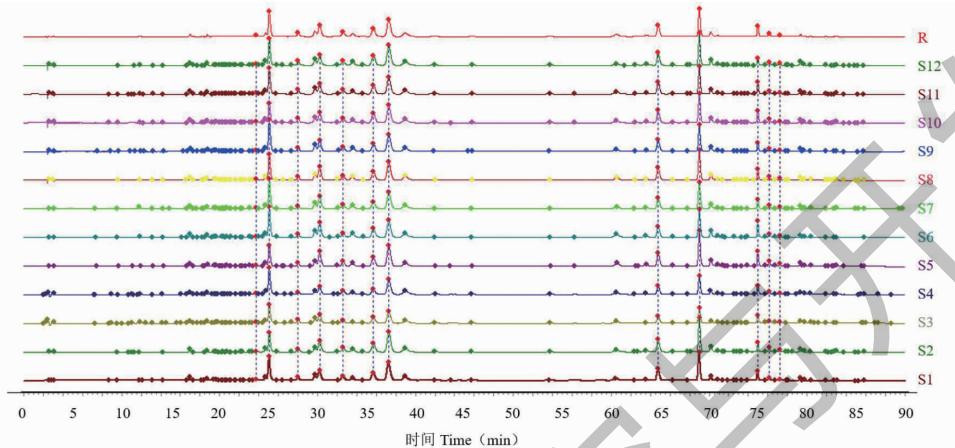


图1 12批次TFCSDL的HPLC指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 12 batches of TFCSDL

通过对对照品色谱图(见图2)指认,共标定12个共有峰,确定其中的9个成分(见图3),分别是芦丁(1号峰)、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷(2号峰)、异绿原酸B(3号峰)、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷(5号峰)、异绿原酸C(6号峰)、香叶木素-7-O- β -D-葡萄

糖苷(7号峰)、芹菜素(10号峰)、香叶木素(11号峰)、异鼠李素(12号峰)。

2.2.2 相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件”对12批TFCSDL样品的指纹图谱进

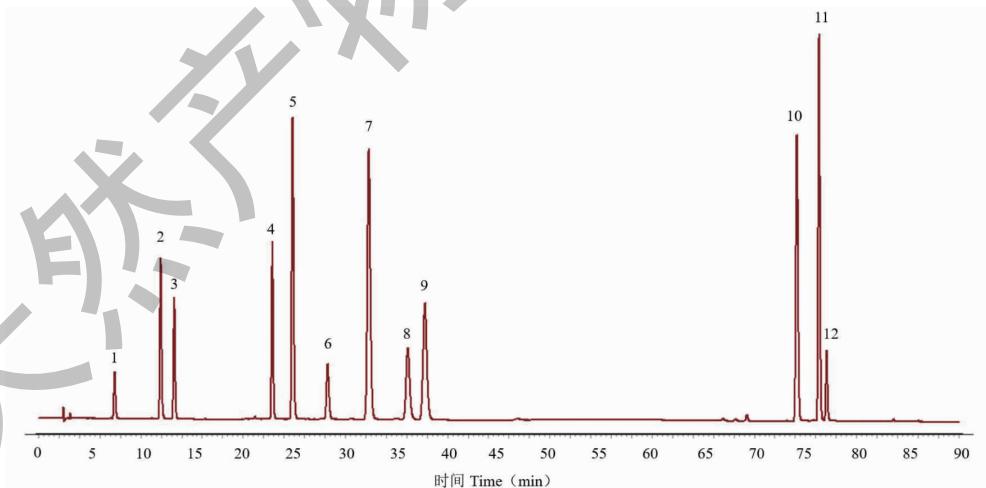


图2 混合对照品溶液HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substance

注:1:绿原酸;2:咖啡酸;3:隐绿原酸;4:芦丁;5:木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷;6:异绿原酸B;7:芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷;8:异绿原酸C;9:香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷;10:芹菜素;11:香叶木素;12:异鼠李素。Note:1:Chlorogenic acid;2:Caffeic acid;3:Cryptochlorogenic acid;4:Rutin;5:Luteolin-7-O- β -D-glucoside;6:Isochlorogenic acid B;7:Apigenin-7-O- β -D-glucoside;8:Isochlorogenic acid C;9:Diosmetin-7-O- β -D-glucoside;10:Apigenin;11:Diosmetin;12:Isorhamnetin.

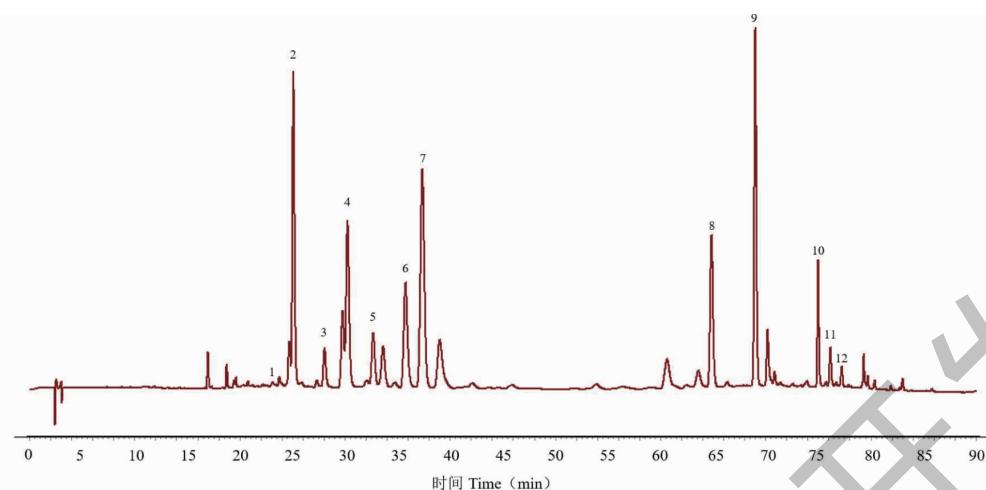


图 3 TFC SL HPLC 指纹图谱共有峰

Fig. 3 Common peaks in HPLC fingerprint of TFC SL

行相似度分析,结果见表 1。12 批样品相似度在 0.951~0.998,表明相似度良好,各批次样品化学成分组成较一致。其中 8 号峰分离度好,峰形良好,含量稳定,故将其作为参照峰(S),计算得到各批次菊

花样品指纹图谱共有峰的相对保留时间的 RSD 值为 0.052%~0.72%,说明各批次样品化学成分组成差异较小。

表 1 TFC SL 样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 1 Similarity evaluation results of HPLC fingerprints of TFC SL

编号 No.	相似度 Similarity												对照 Reference
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
S1	1.000												
S2	0.991	1.000											
S3	0.985	0.958	1.000										
S4	0.979	0.946	0.989	1.000									
S5	0.989	0.997	0.960	0.944	1.000								
S6	0.988	0.968	0.993	0.984	0.974	1.000							
S7	0.991	0.970	0.990	0.990	0.972	0.995	1.000						
S8	0.997	0.988	0.987	0.976	0.990	0.993	0.994	1.000					
S9	0.993	0.970	0.991	0.993	0.969	0.993	0.998	0.992	1.000				
S10	0.993	0.996	0.967	0.951	0.994	0.975	0.972	0.990	0.975	1.000			
S11	0.998	0.986	0.986	0.979	0.985	0.990	0.989	0.996	0.993	0.993	1.000		
S12	0.998	0.991	0.978	0.973	0.985	0.980	0.985	0.993	0.990	0.993	0.996	1.000	
对照 Reference	0.999	0.989	0.988	0.981	0.988	0.993	0.994	0.999	0.995	0.991	0.998	0.996	1.000

2.3 菊茎叶总黄酮对高糖诱导 HUVEC 细胞氧化应激模型的影响

2.3.1 氧化应激模型的建立

不同浓度葡萄糖作用于 HUVEC 后,与空白组相比,当浓度为 10 mmol/L 时,细胞即出现活力明显

下降($P < 0.01$),如图 4 所示。采用 GraphPad prism 软件做拟合曲线图,计算 IC_{50} 值为 50.4 mmol/L。这提示 50.4 mmol/L 葡萄糖能引起 HUVEC 适度损伤,后续实验将选取 50 mmol/L 作为高糖诱导 HUVEC 损伤的工作浓度。

2.3.2 不同浓度菊茎叶总黄酮对高糖下 HUVEC 的影响

如图 5 所示, TFCSL 对高糖诱导 HUVEC 氧化损伤均具有保护作用,且呈质量浓度依赖性,其中 TFCSL 质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 HUVEC 细胞氧化损伤保护效果最好,与阳性药 Vc 相当。

2.3.3 菊茎叶总黄酮调节 HUVEC 内 MDA、LDH、SOD 水平

如图 6 所示,HG 组细胞内 MDA、LDH 含量较

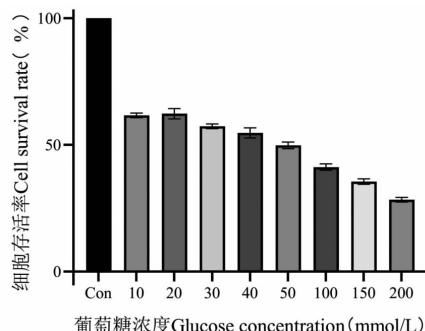


图 4 葡萄糖对 HUVEC 活力的影响

Fig. 4 Effect of glucose on the activity of HUVEC

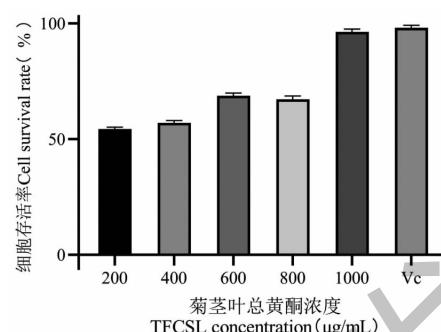


图 5 TFC SL 对氧化损伤 HUVEC 活力的影响

Fig. 5 Effect of TFC SL on the activity of oxidative damaged HUVEC

空白对照组分别显著升高至 5.636 nmol/mL、85.61 U/gprot, SOD 活力分别明显下降至 6.659 U/gprot, 表明高糖引起细胞氧化损伤并导致胞内 LDH 释放含量增加,MDA 水平过高,SOD 活力减弱。经 TFC SL 处理后,能有效降低高糖诱导的 MDA、LDH 水平增加,同时能明显改善 SOD 水平降低,具有统计学差异($P < 0.01$)。

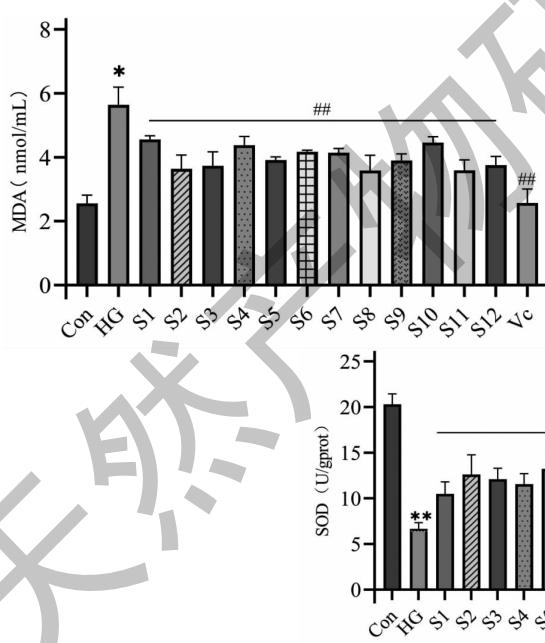


图 6 TFC SL 对损伤 HUVEC 中 MDA、LDH、SOD 的影响

Fig. 6 The effect of TFC SL on MDA, LDH, and SOD in damaged HUVEC

注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 HG 组比较, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with HG, ## $P < 0.01$.

2.4 谱效关系研究

2.4.1 灰色关联度分析

由表 2 可知,12 个共有峰与抗氧化应激活性关

联度均大于 0.6,当关联度 $r > 0.6$ 时,表示成分与药效有关联性, r 越大,成分与药效的关联性越强^[15]。12 个峰关联度都较高,说明 TFC SL 的抗氧化作用是

不同化学成分协同作用的结果。由表 2 可知,与抑制 LDH 产生关联度大于 0.9 的峰有 4 个,其关联度大小依次为峰 6(异绿原酸 C) > 峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷) > 峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷) > 峰 2(木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷);对于抑制高糖诱导 MDA 产生,其中峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 6(异绿原酸 C) 等贡献较大;与 SOD 活性关联度均大于

0.9 的峰有 3 个,其大小依次为峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷) > 峰 6(异绿原酸 C) > 峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷),对增强氧化损伤细胞的 SOD 活性贡献较大。综合考虑各指标与 TFC SL 中各共有峰的关联度,发现其中存在共有药效成分,即峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 6(异绿原酸 C)、峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷),这些共有药效成分是 TFC SL 发挥抗氧化应激作用的物质基础。

表 2 MDA、LDH、SOD 与各特征峰峰面积的关联度

Table 2 The correlation between MDA, LDH, SOD and the area of each characteristic peak

峰号 Peak	化学成分 Compound	LDH 关联度 LDH correlation	MDA 关联度 MDA correlation	SOD 关联度 SOD correlation
1	芦丁 Rutin	0.833	0.88	0.852
2	木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Luteolin-7-O- β -D-glucoside	0.905	0.889	0.875
3	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	0.867	0.855	0.836
4	峰 4 Peak 4	0.88	0.861	0.899
5	芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Apigenin-7-O- β -D-glucoside	0.917	0.908	0.903
6	异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	0.919	0.901	0.919
7	香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Diosmetin-7-O- β -D-glucoside	0.906	0.903	0.922
8	峰 8 Peak 8	0.889	0.862	0.861
9	峰 9 Peak 9	0.882	0.854	0.880
10	芹菜素 Apigenin	0.854	0.838	0.871
11	香叶木素 Diosmetin	0.645	0.658	0.648
12	异鼠李素 Isorhamnetin	0.888	0.853	0.888

2.4.2 偏最小二乘回归法

偏最小二乘回归法(partial least squares regression, PLSR)主要通过建立线性多元模型,以揭示因变量与自变量之间的相关性^[16]。VIP 值是反映自变量对因变量解释能力的一个重要指标,其值越大说明该自变量对因变量的解释能力越强,即相应色谱峰对应的化合物对药效的影响越强^[17]。一般认为当 VIP > 1 时,自变量在解释因变量时具有显著重要性^[18]。分析结果如图 7,峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 1(芦丁)、峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 11(香叶木素)、峰 2(木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷)共 5 个共有峰的 VIP 值 > 1,表明这些成分对 LDH 抑制率的贡献度最大;峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 3(异绿原酸 B)、峰 6(异绿原酸 C)、峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)共 4 个峰对抑制 MDA 水平的贡献度最大;峰 11(香叶木素)、峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)等 3 个共有峰对增加 SOD 活性的贡献度最大。

2.5 网络药理学分析

根据谱效分析结果,筛选出关键化合物,共得到芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C 和香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷共 105 个相关靶点基因,去重后得到 77 个。分别将从 GeneCards 和 OMIM 两个数据库中检索“氧化应激”相关靶点,并将相关靶点进行合并去重后最终获得氧化应激相关基因共 1790 个。将 TFC SL 活性成分对应靶基因取交集,共获得 33 个共同靶点,两者共同的基因可能是 TFC SL 抗氧化的潜在作用基因。将成分、共同靶点导入 Cytoscape 3.10.0 软件,剔除与共同靶点无作用关系的成分,构建“中药-成分-靶点”网络图(见图 8)。

PPI 网络分析能够了解基因间的关系,确定分子间的关联性。通过 STRING 数据库对交集靶点进行 PPI 分析,隐藏游离点基因后,共包含 33 个节点,153 条边(见图 9),按度值大小进行分类排序,TNF、CASP3 是度值较高的靶点,认为是 TFC SL 抗氧化的关键作用靶点。

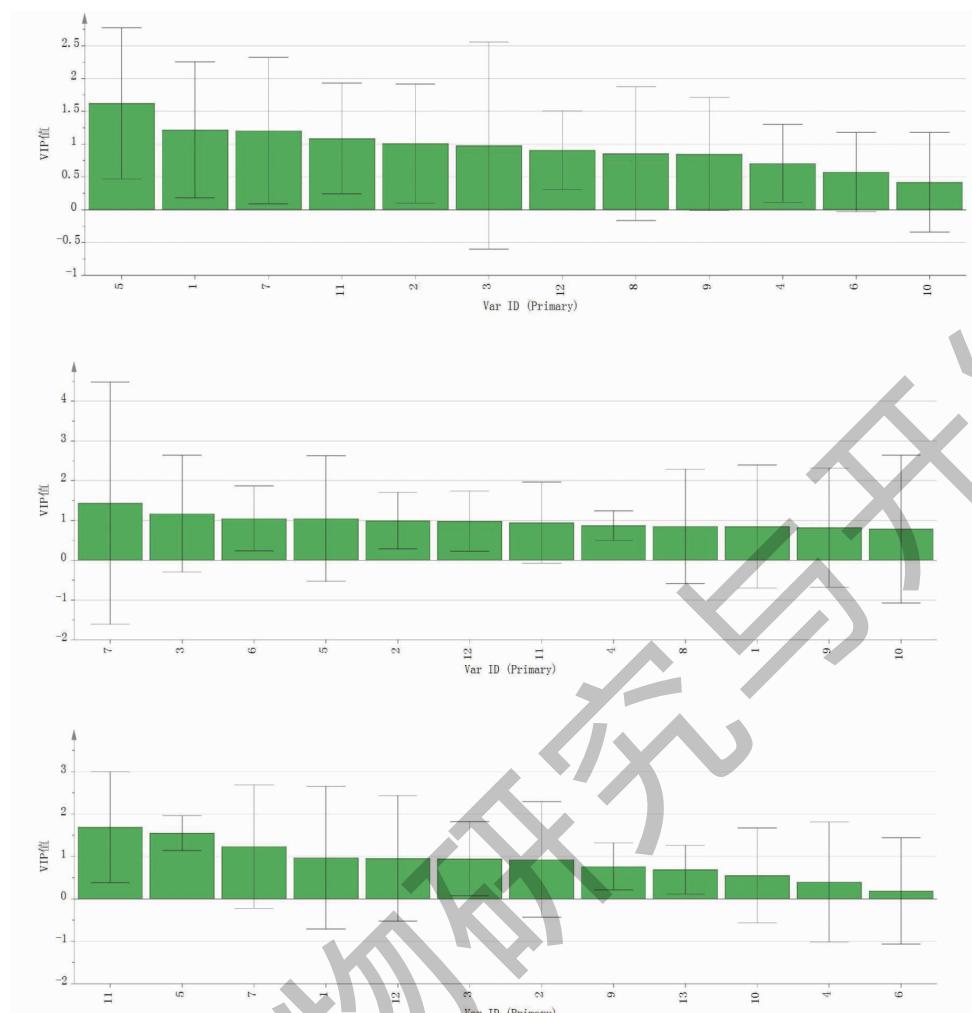


图 7 TFCSDL 指纹图谱与 LDH、MDA、SOD VIP 值
Fig. 7 Fingerprint of TFCSDL and VIP value of LDH, MDA, SOD

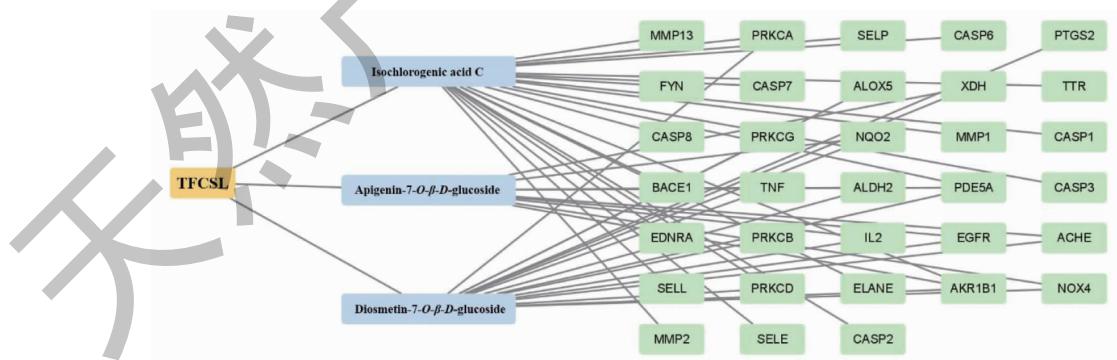


图 8 TFCSDL“中药-成分-靶点”图
Fig. 8 TFCSDL " traditional Chinese medicine-component-target"

利用 DAVID 数据库对获得的核心靶点进行 GO 生物功能富集和 KEGG 通路富集分析(见图 10)。选取智人(Homo Sapiens)物种的“Gene Ontology”

项,得到包含生物过程(biological process, BP)141 个条目,主要涉及凋亡过程正调控、信号转导、对脂多糖的反应蛋白磷酸化等方面;细胞组成(cellular

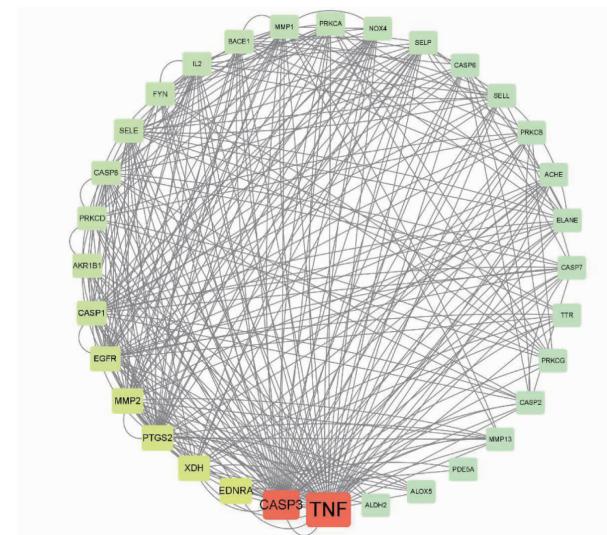


图 9 TFCSL 抗氧化应激 PPI 网络分析图

Fig. 9 PPI network analysis of antioxidant stress of TFCSL

component, CC) 23 个条目, 主要涉及细胞外间隙、细胞质基质、细胞质膜、细胞质、核质等方面。分子功能(molecular function, MF) 35 个条目, 主要涉及蛋白质结合、相同蛋白结合、ATP 结合、酶结合、内肽酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等方面。KEGG 通路富集分析通过微生信进行可视化, 这些通路主要富集在脂质和动脉粥样硬化信号通路、IL-17 信号通路、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、TNF 通路、MPKA 通路等。

2.6 分子对接

将通过谱-效关系筛选到的活性成分(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷), 与网络药理学选出的 TFCSL 抗氧化应激的关键作用靶点(TNF、CASP3)进行分子对接, 以揭示活性成分与 TNF(PDB 编号 1A8M)、CASP3(PDB 编号 1CP3)之间的相互作用和亲和力, 初步推断 TFCSL 抗氧化应激机制。一般用结合能来评估成分与靶点的结合能力, 大于 0 表明可以自由结合, 结合能越高表明受体与配体之间的亲和力越大, 二者发生相互作用的可能性就越高^[19]。三种化合物与各蛋白对接的结合能如表 3 所示。

以 TNF 为例, 配体(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C 和香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)与对接的二维和三维图如图 11~13 所示。结果表明, 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷与氨基酸残基 LEU57、SER9 具有氢键作用, 与 LYS11 产生盐桥作用, 与 PRO12、ALA156、ASP10、LYS11 产生范德华作用, 与 LYS11

形成碳氢键。异绿原酸 C 与 ASP10、SER52、LYS11 具有氢键作用, 与 LEU157、SER9、LEU55、GLY54、LYS11 产生范德华力, 与 PRO12 形成碳氢键, 与 LYS11 产生盐桥作用, 其母核主要与氨基酸残基 ALA156、PRO12、LYS11 形成疏水结合 Pi-Alkyl 作用。香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷与 ASP10、LYS11、ALA156、LEU157、SER9、GLY54、GLU53、PRO12 产生范德华力, 与 LEU157、SER9、ASP10、LYS11 具有氢键作用, 与 SER9 形成碳氢键, 黄酮母核中的苯环参与 π -阳离子、 π -阴离子、 π -Sigma、 π -烷基等相互作用力的形成。这些相互作用力分别使芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、异绿原酸 C、香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷与 TNF 结合并产生抑制作用。同理, 这些作用力使各活性成分与 CASP3 靶点蛋白结合并产生抑制作用。

3 讨论与结论

本研究建立 12 批 TFCSL 样品 HPLC 指纹图谱, 确定 12 个共有峰, 并通过标准品对其中 9 个峰进行指认。高糖环境下可导致 HUVEC 受损和生理因子分泌紊乱, 具体表现为促进细胞凋亡, 上清液中 LDH、MDA 含量显著增高, SOD 活性显著降低。经 TFCSL 处理后除可明显抑制细胞凋亡外, 还可以改善氧化应激相关因子水平, 保护 HUVEC 正常生理功能。利用灰色关联度分析法和偏最小二乘回归法分析各共有峰与抗氧化活性之间的相关性, 推测峰 5(芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷)、峰 6(异绿原酸 C)、峰 7(香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷)为 TFCSL 抗氧

化应激的物质基础。

对谱-效相关分析所得的3种成分与抗氧化应激作用进行网络药理学分析,构建活性成分-靶点网

络,筛选出TNF、CASP3可能为关键靶点,KEGG富集分析表示菊花茎叶总黄酮抗氧化可能与TNF通路、MPKA通路、IL-17信号通路等相关。GO富集分

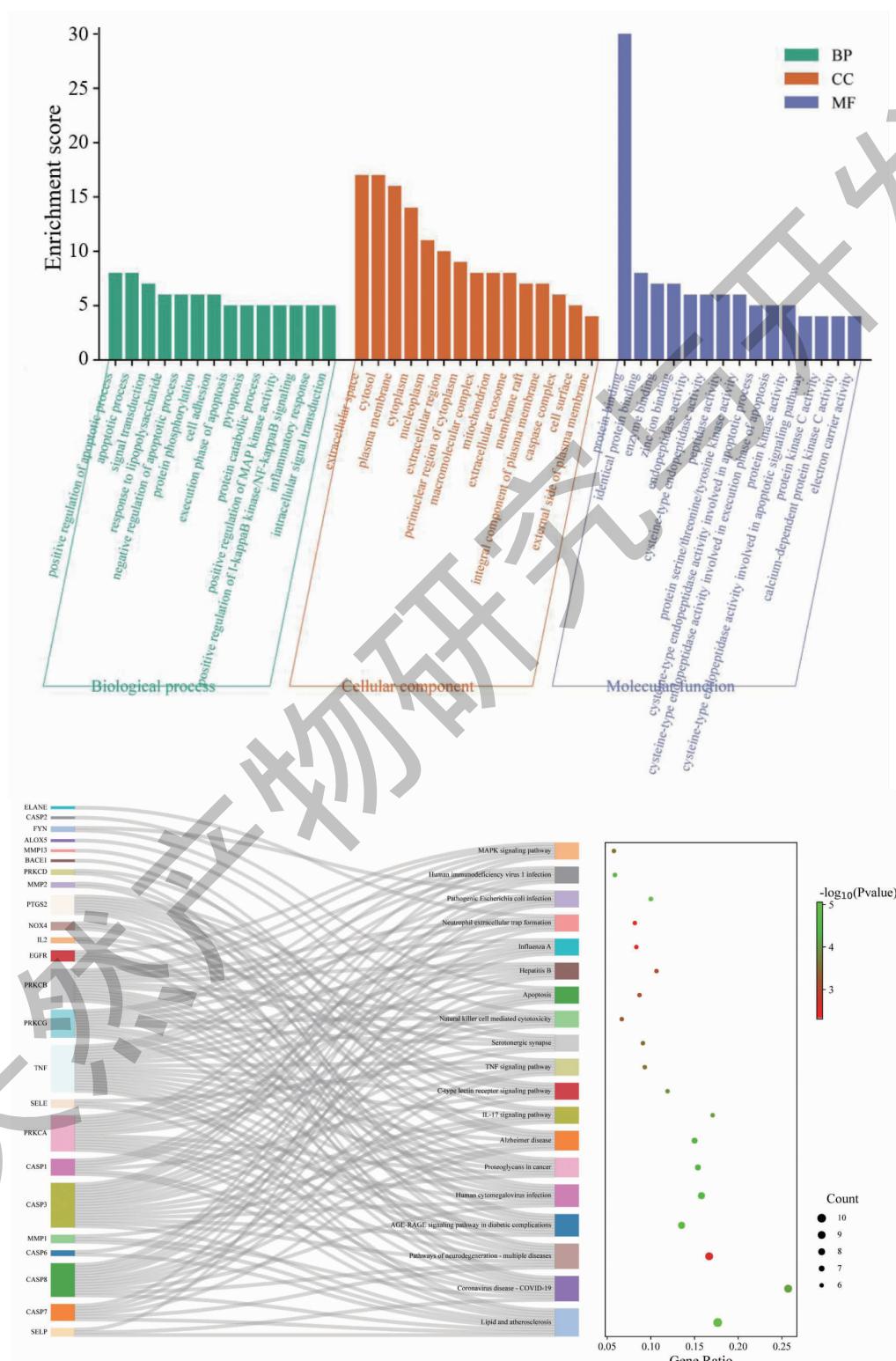


图 10 GO 生物功能、KEGG 通路富集图

Fig. 10 GO biological function and KEGG pathway enrichment map

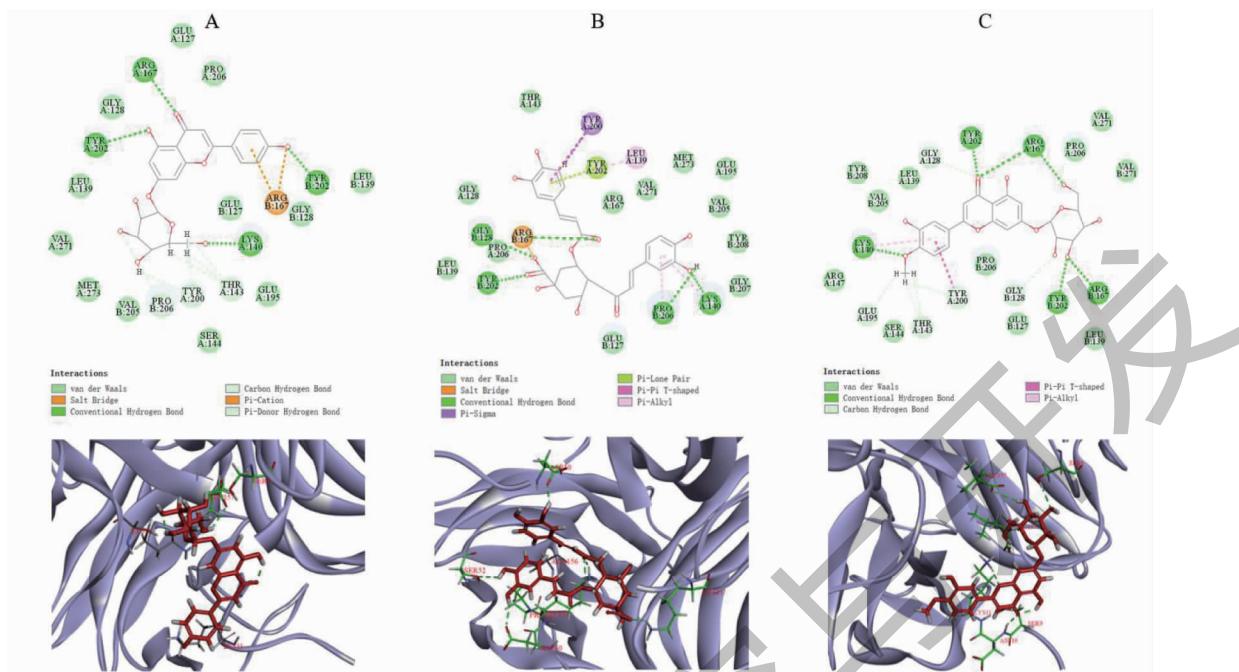


图 11 化合物与 TNF 对接的 2D 和 3D 图

Fig. 11 2D and 3D diagrams of the docking of compounds with TNF

注:A 为芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷;B 为异绿原酸 C;C 为香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷。Note: A : Apigenin-7-O- β -D-glucoside ; B : Isochlorogenic acid C ; C : Diosmetin-7-O- β -D-glucoside.

表 3 TFCSL 活性成分与关键靶点的结合能

Table 3 The binding energy of active components and key targets of TFCSL

化合物 Compound	结构 Structure	结合能 -CDOCKER energy (kcal/mol)	
		TNF	CASP3
芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Apigenin-7-O- β -D-glucoside		19.3	32.5
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C		50.0	39.4
香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Diosmetin-7-O- β -D-glucoside		9.74	18.9

析可能通过蛋白激酶活性、ATP 结合、酶结合等分子功能,以及信号传导和调控细胞生物过程发挥抗氧化应激作用。TNF 是重要促炎因子之一,其中 TNF- α 可以刺激血管扩张增加血管内皮细胞通透性,芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷可通过抑制 MAPK 通路缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎,调节 TNF- α 表达^[20];现代药理研究表明异绿原酸 C 可降低巨噬细胞中 TNF- α 的表达及转录^[21];CASP 除了在凋亡过程中起重要作用外,也促进促炎细胞因子的产生,香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷对去血清条件下血管内皮细胞有保护作用,降低细胞内 ROS 水平,下调 CASP3 水平^[22]。

通过对 Discovery Studio 软件分子对接结果的分析比较,发现 TFCSL 中 3 个主要活性成分与 TNF、CASP3 具有较为稳定的结合活性。通过进一步筛选对接结果,发现 3 种成分与 TNF、CASP3 蛋白作用残基大部分都是相同的,其中与受体相互作用种类多且作用较强的共同残基主要有:SER9、LYS11、PRO12、ALA156、ASP10、LYS11,推断它们可能为受体的活性位点残基。

我国菊资源分布广泛,但目前对菊花的开发利用存在着不足,其他非用药部位如根、茎、叶等中研究报道相对较少。菊非药用部位的化学成分与菊花极其相似,具有显著的生物学活性,但由于缺乏深入研究,导致这些有效成分未得到合理的利用与开发。本研究对 TFCSL 抗氧化应激活性进行初步的研究与探讨,后续增加对未明确的共有峰进行结构解析,并结合药理实验对其功能进一步开发,以期为菊茎叶的开发利用与产业化方向提供科学依据和参考。

参考文献

- Chang XW, Wei DD, Su SL, et al. Analysis and evaluation of multiple types of chemical constituents in stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* from different geographical origin [J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2020, 22:564-572.
- Tao HJ. Mingyi Bielu(名医别录) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982:27.
- Zhu L, Guo JM, Yang NY, et al. Distribution and dynamic changes of chemical constituents from non-medicial parts of *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药), 2014, 45:425-431.
- Liu DS, Chen CL, Che XH, et al. Compare to antioxidant activity of *Chrysanthemum morifolium* flower, leaf and stem [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2016, 22:40-44.
- Li Y, Liu XJ, Su SL, et al. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of chrysanthemum stem and leaf extract on zebrafish inflammatory bowel disease model [J]. *Molecules*, 2022, 27:2114.
- Cheol JS, Cheol WK, Ri R, et al. Plasma lipidomics reveals insights into anti-obesity effect of *Chrysanthemum morifolium* Ramat leaves and its constituent luteolin in high-fat diet-induced dyslipidemic mice [J]. *Nutrients*, 2020, 12:2937.
- Wu YL. Study on the protective effect and mechanism of RLMTF on HUVEC following oxidative injury [D]. Hengyang: University of South China(南华大学), 2012.
- Habib Y, et al. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:8609213.
- Kim YS, Hwang JW, Park PJ, et al. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Chrysanthemum boreale* on t-BHP induced oxidative stress in chang cells [J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2014, 43:60-66.
- Liu L, Li WL, Ding JX. Researches on pharmacodynamic material basis of traditional Chinese medicine based on "spectrum-activity" correlation analysis [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:410-415.
- Ren Y, Deng YJ, Ma HB, et al. Research progress and challenges of network pharmacology in field of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药), 2020, 51:4789-4797.
- Zhang M. Study on the purification and antioxidant activity of total flavonoids and chlorogenic acid from chrysanthemum stems and leaves [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine(山东中医药大学), 2015.
- Zhang H, Ding JR, Yuan YC. Xiaoke Tongbi Formula(消渴通痹方) regulates the RhoA/ROCK signaling pathway and cytoskeleton of high glucose-induced human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Med Pharmacol*(中医药理与临床), 2023, 39:25-28.
- Jiang SY, Song XY, Zhng DD, et al. Spectrum-effect relationship between UPLC fingerprint of *Smilax china* and anti-pelvic inflammation in rats [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44:3323-3329.
- He L. The GC-MS analysis of volatile oil of *Lobelia chinensis* Lour and study on their anti-tumor spectrum-effect relationship [D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2022.
- Yan XC, Shuo JW, Qing FZ, et al. A Strategy for screening the lipid-lowering components in *Alismatis Rhizoma Decocction* based on spectrum-effect analysis [J]. *J Anal Methods*

- Chem, 2022, 2022, 2363242.
- 17 Jiang XL, Zhang JQ, Xu RR, et al. Spectrum-activity relationships between UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS fingerprints and anti-influenza virus of *Saposhnikovia divaricata* different polar parts [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:473-481.
- 18 Chen LX, Zhang HM, Zhang ZJ. Study on the spectrum-effect relationship between UPLC fingerprint and alkaline phosphatase activity in osteosarcoma MG63 cell line of *Drynariae Rhizoma* [J/OL]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发):1-17[2023-12-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20230523.1204.004.html>.
- 19 Hu X, Liu W, He M, et al. Comparison of the molecular mechanisms of Fuzi Lizhong Pill and Huangqin Decoction in the treatment of the cold and heat syndromes of ulcerative co-
- ritis based on network pharmacology [J]. Comput Biol Med, 2023, 159:106870.
- 20 Hu YY, Guan XT, He ZL, et al. Apigenin-7-O-glucoside alleviates DSS-induced colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. J Funct Foods, 2023, 104:1756-4646.
- 21 Chen HY, Yao PF, Han YQ, et al. "Component-target-efficacy" network analysis and experimental verification of Qingkailing oral preparation [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志)2023, 48:170-182.
- 22 Wang YH, Yang HY, Fu SL, et al. Comparison of biological activities of diosmetin and diosmetin-7-O- β -D-glucopyranoside [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:1193-1198.

(上接第 519 页)

- 24 Liu BQ, Liu JF, Huang DF, et al. Separation and purification of hydroxytolol and oleuropein from *Olea europaea* L(olive) leaves using macroporous resins and a novel solvent system [J]. J Sep Sci, 2020, 43:2619-2625.
- 25 Li W, Jiao L, Liao CY, et al. Mass Transfer mechanisms for decolorizing resin adsorption of alkaline degradation products of hexose [J]. Food Sci(食品科学), 2022, 43:53-60.
- 26 Xiong GH, Liu HY, Zhao DF, et al. Dynamics, thermodynamics and characterization analysis of D201 resin adsorption of SO_4^{2-} [J]. Fine Chem(精细化工), 2015, 32:1243-1247.
- 27 Ho YS. Second-order kinetic model for the sorption of cadmium onto tree fern: a comparison of linear and non-linear methods [J]. Water Res, 2006, 40:119-125.
- 28 Jiang H, Li J, Chen L, et al. Adsorption and desorption of chlorogenic acid by macroporous adsorbent resins during extraction of *Eucommia ulmoides* leaves [J]. Ind Crops Prod, 2020, 149:112336.
- 29 Pei D, Wu XY, Liu Y, et al. Different ionic liquid modified hypercrosslinked polystyrene resin for purification of catechins from aqueous solution [J]. Colloid Surface A, 2016, 509:158-165.
- 30 Dabrowski A, Podkoscieilny P, Hubicki Z, et al. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review [J]. Chemosphere, 2005, 58:1049-1070.
- 31 Zhang CX, Bai FC, Pan ZY, et al. The adsorption model and mechanism of organic polymer hygroscopic materials [J]. Polym Mater Sci Eng(高分子材料科学与工程), 2012, 28: 83-87.