

• 论 著 •

绿原酸联合连翘苷调控细胞因子风暴的网络药理分析及基于 TLR4/TRAFF6/PI3KC3 通路的协同抗炎作用*

彭善鑫¹, 刘婷婷², 朱晓松¹, 王丽萍¹, 刘海燕^{3△}

(临沂市人民医院: 1. 医院感染管理部; 2. 心血管内科; 3. 护理部, 山东 临沂 276000)

[摘要] **目的** 基于网络药理学和体外实验探究绿原酸联合连翘苷调控细胞因子风暴的机制。**方法** 利用 Swiss Target Prediction、PharmMapper、SEA 和 TCMSP 数据库预测绿原酸和连翘苷的靶点, 在 GeneCards、OMIM、DRUGBANK 和 DisGeNET 数据库获取细胞因子风暴的靶点, 筛选交集靶点绘制 Venn 图, 以 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白质相互作用网络, 采用 DAVID 数据库进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。以脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建细胞因子风暴模型; 采用细胞计数试剂-8(CCK-8)法检测巨噬细胞存活率; 采用 Griess 法检测细胞上清液中一氧化氮(NO)含量; 以酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶-2(COX-2)的水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TNF 受体相关因子(TRAFF4)、TNF 受体相关因子 6(TRAFF6)、磷酸肌醇-3-激酶 3(PIK3C3)蛋白表达。**结果** 网络药理分析获得绿原酸联合连翘苷治疗细胞因子风暴的 8 个核心网络靶点[丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、白蛋白(ALB)、低氧诱导因子 1 α (HIF1A)、IL-6、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、酪氨酸激酶(SRC)、Toll 样受体 4(TLR4)]; 富集关键通路包括 PI3K/AKT 信号通路等。体外实验结果显示, 与对照组比较, 模型组中 NO、TNF- α 、IL-6 的释放量和 iNOS、COX-2 蛋白表达量均显著升高($P < 0.001$)。与模型组比较, 给药后 NO、TNF- α 、IL-6、iNOS、COX-2 的水平均显著降低($P < 0.001$)。与单药给药组比较, 绿原酸和连翘苷(1:1)联合用药组炎症指标下降更明显($P < 0.001$)。与模型组比较, 给药组 TLR4、TRAFF6、PIK3C3 的蛋白表达和 PI3K3C 的磷酸化水平显著下降。**结论** 绿原酸联合连翘苷能协同抑制促炎细胞因子的表达, 调控细胞因子风暴, 可能通过 TLR4/TRAFF6/PI3K3C 信号通路实现。

[关键词] 绿原酸; 连翘苷; 细胞因子风暴; 网络药理; TLR4/TRAFF6/PI3K3C 信号通路

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.20.005

中图法分类号: R969

文章编号: 1009-5519(2024)20-3447-08

文献标识码: A

Network pharmacology analysis of chlorogenic acid combined with forsythoside

in regulating cytokine storm and synergistic anti-inflammatory effect

based on TLR4/TRAFF6/PI3KC3 pathway*

PENG Shanxin¹, LIU Tingting², ZHU Xiaosong¹, WANG Liping¹, LIU Haiyan^{3△}

(1. Department of Hospital Infection Management; 2. Department of Cardiovascular Medicine;

3. Department of Nursing, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanisms by which chlorogenic acid combined with forsythoside regulates cytokine storms through network pharmacology and in vitro experiments. **Methods** The targets of chlorogenic acid and forsythoside were predicted using Swiss Target Prediction, PharmMapper, SEA, and TCMSP databases. Targets related to cytokine storms were retrieved from GeneCards, OMIM, DRUGBANK, and DisGeNET databases. Intersection targets were identified and depicted in a Venn diagram. A protein interaction network was constructed using the STRING database and Cytoscape software. Gene Ontology(GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) enrichment analyses were performed using the DAVID database. A cytokine storm model was established in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide

* 基金项目: 山东省中医药科技发展计划面上项目(2021M020); 山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QH114)。

作者简介: 彭善鑫(1990—), 博士研究生, 主管技师, 主要从事中药药理学、非编码 RNA 生物学功能的研究。△ 通信作者, E-mail: liu_hai_y@163.com。

(LPS). Cell viability was assessed using the Cell Counting Kit-8(CCK-8) method. Nitric oxide(NO) levels in the supernatant were measured by the Griess method. Levels of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), interleukin-6(IL-6), inducible nitric oxide synthase(iNOS), and cyclooxygenase-2(COX-2) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The expression of TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), and phosphatidylinositol 3-kinase 3(PIK3C3) proteins were analyzed by Western blot. **Results** Network pharmacology analysis identified eight core network targets for the treatment of cytokine storms with chlorogenic acid and forsythoside, including serine/threonine-protein kinase (AKT1), albumin (ALB), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A), IL-6, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), tyrosine kinase (SRC), and Toll-like receptor 4 (TLR4). Key pathways included the phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(AKT) signaling pathway. In vitro experiments showed that compared to the control group, levels of NO, TNF- α , IL-6, iNOS, and COX-2 were significantly higher in the model group($P < 0.001$). After treatment, levels of NO, TNF- α , IL-6, iNOS, and COX-2 significantly decreased compared to the model group($P < 0.001$). The combined treatment of chlorogenic acid and forsythoside(1 : 1) more effectively reduced inflammatory indicators compared to single treatments($P < 0.001$). Protein expression of TLR4, TRAF6, PIK3C3, and phosphorylation levels of PIK3C3 significantly decreased in the treatment group compared to the model group. **Conclusion** Chlorogenic acid combined with forsythoside synergistically suppresses the expression of pro-inflammatory cytokines and regulates cytokine storms, potentially through the TLR4/TRAF6/PIK3C3 signaling pathway.

[**Key words**] Chlorogenic acid; Forsythoside; Cytokine storm; Network pharmacology; TLR4/TRAF6/PI3K3C signaling pathway

细胞因子风暴是机体对外界刺激产生的一种炎症反应,表现为促炎与抗炎机制的失衡,是临床表现凶险的重要因素之一,可由感染、药物等多种因素诱发,会导致高炎症状态下的组织损伤与器官功能障碍^[1-2]。抗炎经典药物糖皮质激素常作为免疫抑制剂遏制细胞因子风暴,但其安全性仍存在争议^[3]。既往的药理学研究表明,中药作用靶点广泛,在清除抗原、调节免疫和保护组织等方面都发挥着重要作用,在调控细胞因子风暴的发生、进展、转归阶段均有一定的效果^[4]。绿原酸(CGA)是金银花、菊花等药材的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化应激、免疫调节等多种生理活性,研究发现 CGA 可以通过靶向 TLR4/3 缓解氧化应激介导的炎症小体蛋白 3/核转录因子- κ B (NLRP3/NF- κ B)轴反应减轻炎症反应^[5-6]。连翘苷(Phil)是中药连翘的主要活性成分,主要有降血脂、抗炎、抗氧化及脑神经系统保护方面的作用^[7]。有研究发现,Phil 能降低 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞中诱导型一氧化氮(iNOS)和环氧化酶(COX)-2 蛋白的表达,并下调促炎因子,如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[8]。尽管对 CGA 和 Phil 调控炎症反应的研究较多,CGA 和 Phil 2 种中药单体联合作用调控细胞因子风暴的研究鲜有报道。

网络药理学旨在分析药物与疾病之间的内在关联^[9-10]。通过这种方法可以构建“药物-靶点-基因-疾

病”的互作网络,寻找药物的主要靶点,再利用数据库分析,进而明确药物治疗疾病的机制^[11]。目前,这种方法广泛应用于中医药复方研究中。

本研究从 CGA 和 Phil 2 种中药单体入手,采用网络药理分析和脂多糖(LPS)体外细胞因子风暴模型,探究 CGA 联合 Phil 调控细胞因子风暴的作用机制,以期为 CGA 联合 Phil 在治疗细胞因子风暴临床应用方面提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(目录号:SCSP-5036)购于中国科学院上海细胞库;LPS(纯度: $\geq 98\%$;批号:L8880)、CGA[纯度:高效液相色谱仪(HPLC) $\geq 98.0\%$;批号 SC8210]、Phil(纯度:HPLC $\geq 98.0\%$;批号:SP8220)、地塞米松(DEX,纯度:HPLC $\geq 98.0\%$;批号 SD9530)购于北京索莱宝生物技术有限公司;胎牛血清、DMEM、细胞计数试剂-8(CCK-8)试剂盒分别购于美国 Gibco 公司、美国 Hyclone 公司、日本同仁化学研究所;小鼠 IL-6 和 TNF- α 的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于杭州联科生物科技股份有限公司;NO 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;小鼠 iNOS ELISA 试剂盒购于北京中昊新生物科技有限责任公司;小鼠 COX-2 ELISA 试剂盒和 TLR4 兔抗体(批号:CSB-PA001434)购于武汉华美生物工程有限公司;TRAF6 兔抗体(批号:ab33915)、

PI3KC3 兔抗体(批号:ab40776)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔抗体(批号:ab9485)购于 Abcam 公司;phospho-PI3KC3(Ser249)兔抗体(批号:13857S)购于 Cell Signaling Technology 公司;羊抗兔二抗购于中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析

1.2.1.1 Phil 和 CGA 作用靶点的预测 检索中药系统药理学数据与分析平台(TCMSP)^[11](<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)获得 Phil 和 CGA 的 2D 结构,并进行 3D 模型分子转换成 Canonical SMILES,然后将 2D 结构及 Canonical SMILES 分别导入 PharmMapper(<http://lilab-ecust.cn/pharm-mapper/index>)、SwissTargetPrediction(<http://swiss-targetprediction.ch/>)、SEA(<https://sea.bkslab.org/>)^[12]数据库对 Phil 和 CGA 的潜在靶点进行预测,在去除二者重复值后,即为 Phil 和 CGA 的潜在靶标蛋白,并通过 UniProt 数据库转换基因名称。

1.2.1.2 细胞因子风暴可能靶点的获取 以“Cytokine Storm”为检索词,在人类基因数据库(GeneCards,<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)、药物靶点数据库(DRUG-BANK,<https://go.drugbank.com/>)、DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/home/>)中检索,校正去除重复值,获取疾病靶点^[11]。

在微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)上,将获得的药物靶点与疾病靶点相互映射作 Venn 图,交集即为 Phil 和 CGA 联合治疗细胞因子风暴的作用靶点。进一步使用 Cytoscape3.8.2 软件,构建 Phil 和 CGA 联合治疗细胞因子风暴作用靶点的可视化网络。

1.2.1.3 蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将药物-疾病交集靶点上传至 STRING(<https://string-db.org/>)数据库进行 PPI 网络构建,物种设置为“Homo sapiens”,结果储存为 TSV 格式,将 TSV 文件导入 Cytoscape3.8.2 中进行可视化网络,并利用 CytoHubba 插件进行拓扑分析,将 degree、最大邻域分量(MNC)前 10 名的靶点,取两者共有靶点即为核心靶点^[12]。

1.2.1.4 基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将药物-疾病交集靶点上传至 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析,基因标识符选择 OFFICIAL_GENE_SYMBOL,物种设置为“Homo sapiens”,根据 Count 选取排名前 10 名的 GO 功能条目,并以 $P < 0.05$ 筛选

CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴的可能作用通路。后在微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)上绘图进行展示^[13]。

1.2.2 细胞实验验证方法

1.2.2.1 细胞培养 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(目录号:SCSP-5036)用含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基置于含 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的恒温细胞培养箱中培养。

1.2.2.2 CCK-8 法检测细胞毒性 依照 CCK-8 实验方法,测定不同浓度(12.5、25、50、100、200、400 μg/mL)的 CGA、Phil、地塞米松及其与 1 μg/mL 的脂多糖(LPS)联合对 RAW264.7 细胞的安全用药毒性^[13]。

1.2.2.3 细胞实验分组 为确定 CGA、Phil 对 LPS 诱导细胞炎症的调控作用,以 1 μg/mL 的 LPS 构建体外细胞炎症模型,实验分组为:对照组、模型组、LPS+CGA 低剂量组、LPS+CGA 中剂量组、LPS+CGA 高剂量组、LPS+Phil 低剂量组、LPS+Phil 中剂量组、LPS+Phil 高剂量组、LPS+CGA+Phil 组(联合用药组,含 5 种不同配比组合)、阳性对照组(LPS+25 μg/mL DEX)。将对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞接种于六孔板,按照实验分组,除正常组和模型组(仅 1 μg/mL LPS)外,首先用 LPS 刺激细胞 2 h,再选取 CCK-8 实验获得的安全用药浓度,分别用 CGA、Phil、二药联合及 DEX(阳性对照)处理 24 h,培养结束后,收集细胞或上清液,检测以下实验指标。

1.2.2.4 细胞上清液 NO、TNF-α、IL-6 释放量检测 参照 NO 测定试剂盒说明书采用 Griess 法检测 RAW264.7 细胞上清中的 NO 释放量;参照 ELISA 试剂盒说明书检测 RAW264.7 细胞上清液 TNF-α、IL-6 水平。

1.2.2.5 细胞中 iNOS 和 COX-2 水平检测 参照 ELISA 试剂盒说明书检测 iNOS 和 COX-2 水平。

1.2.2.6 采用蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测 TLR4、TRAF6、PI3K3C 蛋白表达水平 按“1.3.5”项下的方法获取细胞裂解后的上清液,测浓度后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳),经转膜、封闭,一抗、二抗孵育后,增强型化学发光试剂(ECL)显影,获取蛋白印迹图片。GAPDH 作为参照。

1.3 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间的差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 “成分-靶点-疾病”网络和 PPI 网络的构建与分析 通过 TCMSP、PharmMapper、SwissTargetPre-

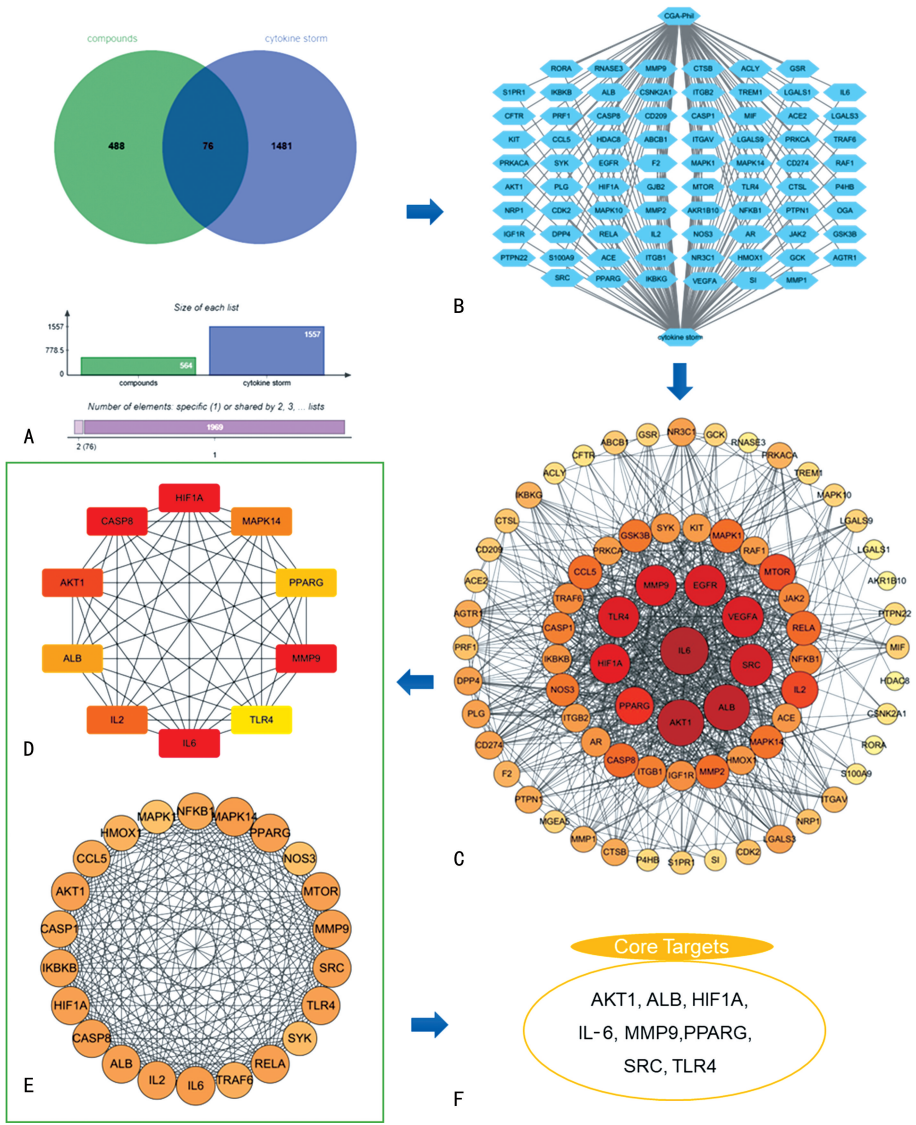
diction 和 SEA 数据库共获取 564 个药物靶点;通过 GeneCards、OMIM、DRUGBANK 和 DisGeNET 数据库共获取 1 557 个疾病靶点;利用 Venn 图获得 76 个交集靶点(图 1A)。利用 Cytoscape3. 8. 2 软件构建“CGA 联合 Phil-共同靶点-细胞因子风暴”关系网络(图 1B),结果显示,该网络共有 78 个节点、152 条边。

将 76 个共同靶点导入 STRING 数据库,筛选出结合评分 $\geq 0. 4$ 的靶点,剔除孤立靶点,得到包含 75 个靶点的 PPI 网络(图 1C),运用 CytoHubba 插件分析,得到的 degree 和 MNC 前 10 的靶点,二者结果一致(图 1D)。运用 MCODE 插件进行子网络分析,得到分值最高(Score=19. 419)的子网络(图 1E),与上述结果取交集,得到 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴的核心靶点(图 1F)。8 个核心网络靶点分别为 AKT1、ALB、HIF1A、IL6、MMP9、PPARG、SRC、

TLR4。

2. 2 GO 功能分析和 KEGG 通路分析 对 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴的潜在作用靶点进行 GO 富集分析,得到 GO 条目 251 个($P<0. 01$),其中生物过程(BP)条目 182 个,包括凋亡过程的负向调控、细胞增殖的正向调控、炎症反应等;细胞组分(CC)条目 29 个,包括细胞膜、细胞质、细胞外泌体等;分子功能(MF)条目 40 个,包括蛋白结合、ATP 结合、酶结合等。各类别 count 前 10 位的条目见图 2A。

KEGG 通路富集分析筛选得到 127 条通路($P<0. 01$),包括磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路等,这些通路可能与 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴有关。选 count 较大的前 20 条通路进行可视化。见图 2B。

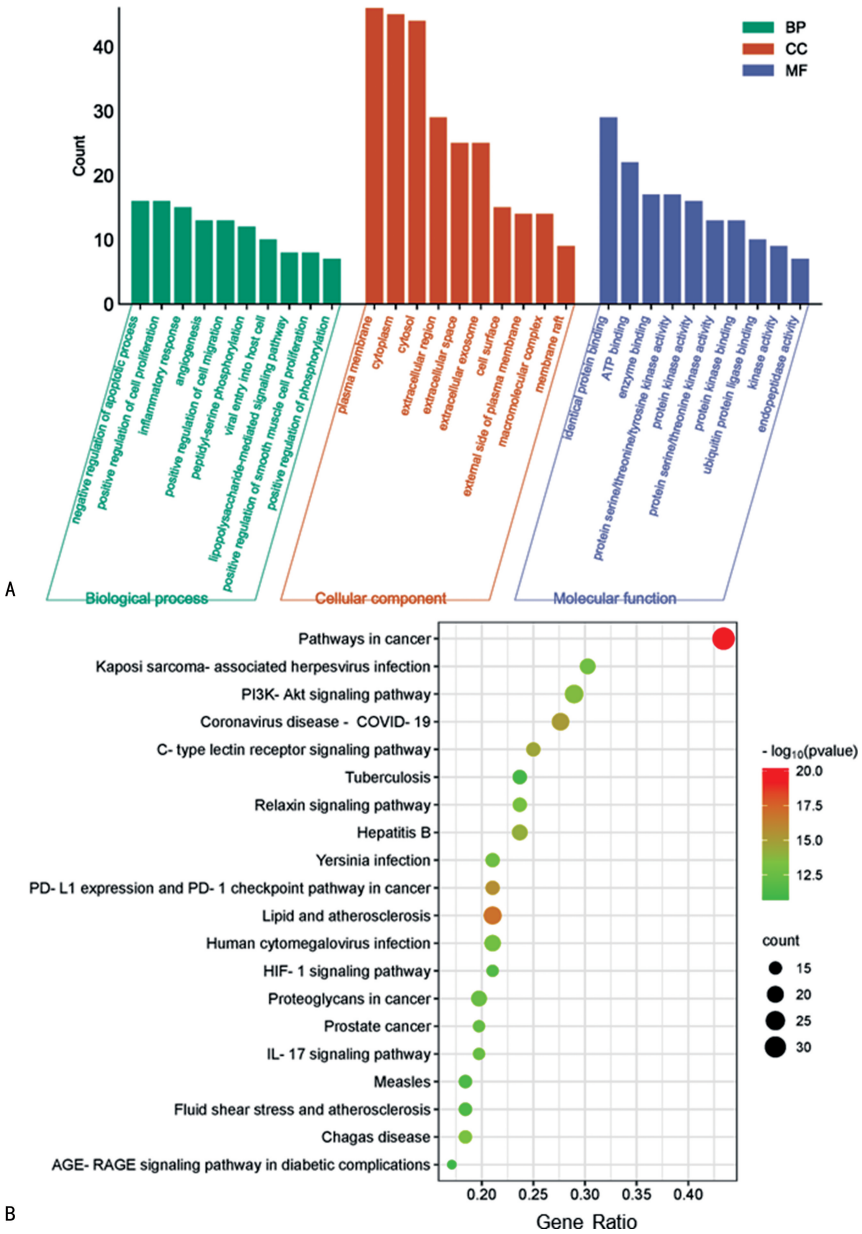


注:A. 化合物与疾病交集靶点 Venn 图;B. 化合物-疾病交集靶点关系网络图;C. PPI 网络;D. 基于 CytoHubba 拓扑分析;E. 基于 MCODE 网络模块分析;F. 核心靶点。

图 1 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴的潜在靶点分析

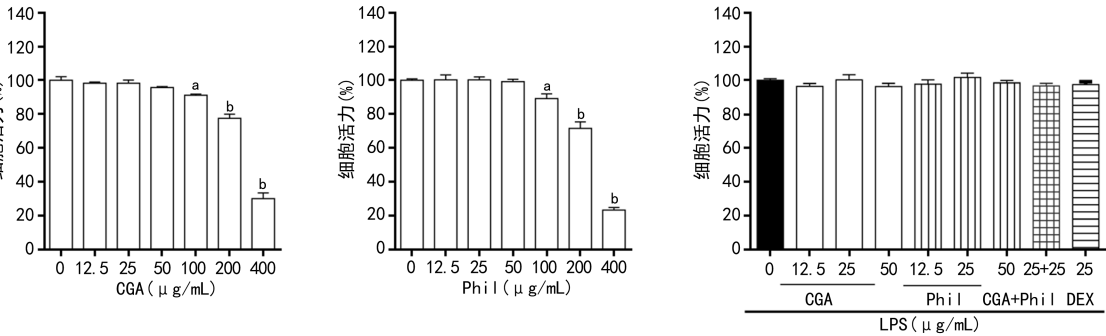
2.3 化合物对细胞活力的影响 CGA、Phil 浓度在 0~50 $\mu\text{g/mL}$ 时 RAW264.7 细胞活力无明显影响 ($P>0.05$),故后续实验中选取 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$

浓度作为 CGA 和 Phil 的低、中、高剂量浓度。见图 3。



注:A. GO 富集分析;B. KEGG 通路富集分析(Top20)。

图 2 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴靶点的 GO、KEGG 分析



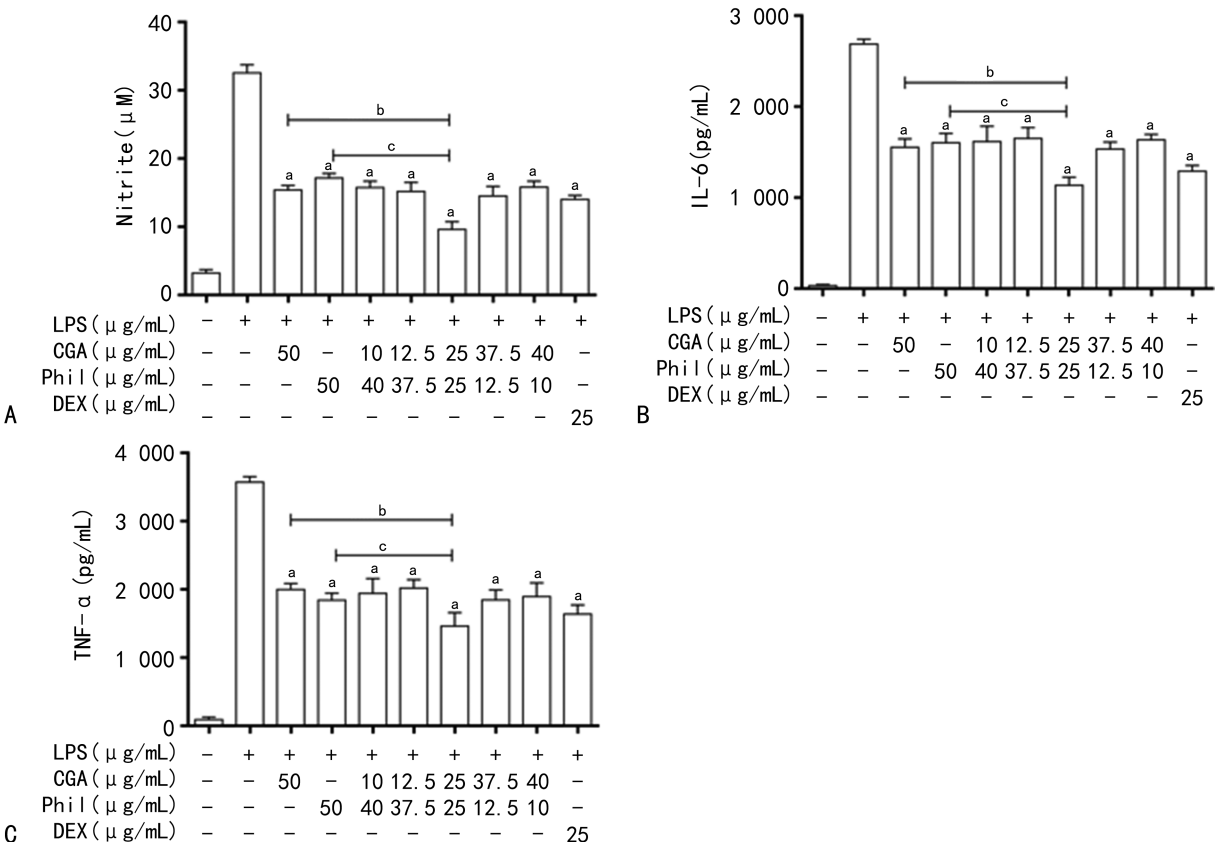
注:与正常组比较,^a $P<0.001$,^b $P<0.05$ 。

图 3 不同浓度 CGA、Phil 和 DEX 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

2.4 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、IL-6 和 TNF- α 释放量的影响 与对照组比较, LPS 刺激诱导 RAW264.7 细胞产生明显的炎症反应,使得细胞上清中 NO、TNF- α 、IL-6 的释放量均显著升高($P<0.001$);与模型组比较,给药组和阳性对照组细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 水平均降低($P<0.001$),且与药物剂量成浓度依赖性;与高剂量单药组比较,CGA 和 Phil(1:1)联合用药组中 NO、TNF- α 、IL-6 的水平均更低($P<0.001$),鉴于联合用

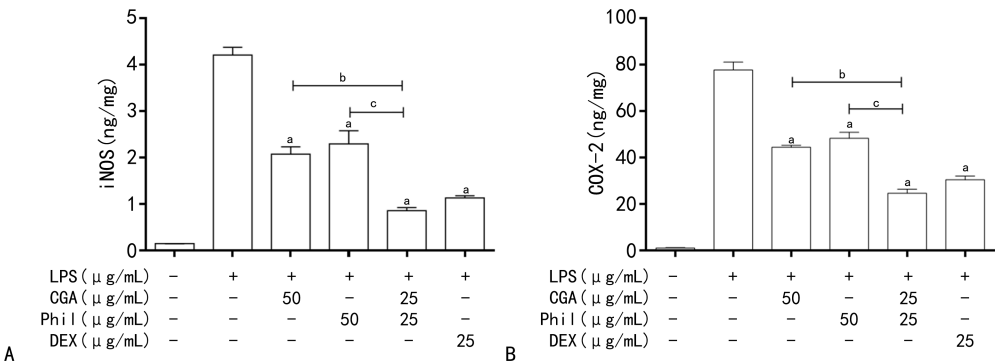
药组效果最佳,后续实验选取联合用药组进行研究。见图 4。

2.5 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 iNOS、COX-2 蛋白表达水平的影响 CGA、Phil 及二者联用能显著降低 LPS 诱导的 iNOS、COX-2 在 RAW264.7 细胞中的表达水平($P<0.001$);与高剂量单药组比较,CGA 和 Phil(1:1)联合用药组中 iNOS、COX-2 蛋白表达水平均更低($P<0.001$)。见图 5。



注:A. NO;B. IL-6;C. TNF- α ;与模型组比较,^a $P<0.001$;与 CGA 高剂量组比较,^b $P<0.001$;与 Phil 高剂量组比较,^c $P<0.001$ 。

图 4 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、IL-6 和 TNF- α 释放量的影响



注:A. iNOS;B. COX-2;与模型组比较,^a $P<0.001$;与 CGA 高剂量组比较,^b $P<0.001$;与 Phil 高剂量组比较,^c $P<0.001$ 。

图 5 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达水平的影响

2.6 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 TLR4、TRAF6、PI3K3C 蛋白表达水平和 PI3K3C 磷

酸化水平的影响 与对照组比较,模型组巨噬细胞内的 TLR4、TRAF6、PI3K3C 蛋白表达和 PI3K3C 磷酸

化水平均明显增加;与模型组比较,CGA、Phil 的高剂量给药组和联用组及阳性对照组的 TLR4、TRAF6、PI3K3C 蛋白表达水平均显著降低,PI3K3C 磷酸化水平也显著降低。见图 6。

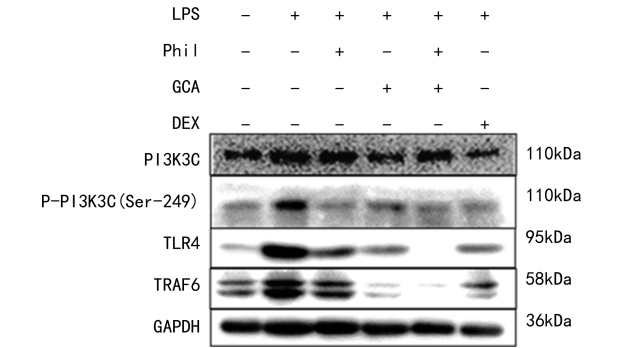


图 6 CGA 和 Phil 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4、TRAF6 和 PI3K3C 蛋白表达的影响

3 讨 论

细胞因子风暴进展迅速,病情危重,临床以细胞因子-白细胞正反馈环路下的高炎性组织损伤及其伴发的免疫、凝血功能异常为特征,涉及多种外感传染病及内伤杂病的急危重症阶段^[14]。细胞因子风暴是高致病病原微生物[严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS)、新型冠状病毒肺炎(COVID-19)]感染患者死亡率上升的重要潜在因素^[2]。促炎因子 IL-6、TNF- α 是引起细胞因子风暴的关键因子,利用其特异性抑制剂、阻断剂遏制细胞因子风暴一直是药物研究的热点^[15]。目前,治疗细胞因子风暴大多采用糖皮质激素等西药进行治疗,但糖皮质激素可能会诱发二次感染、病程延长等不良反应,且存在严重后遗症风险^[3,16],而中药因作用靶点广泛、不良反应少,具有重要的研究价值,有望从中药中发掘治疗细胞因子风暴的有效药物。

本研究采用网络药理方法获得 CGA、Phil2 个中药单体联合治疗细胞因子风暴的 8 个核心网络靶点,分别为 AKT1、ALB、HIF1A、IL-6、MMP-9、PPARG、SRC、TLR4。KEGG 通路富集结果显示,PI3K/AKT 信号通路、病原菌[COVID-19、人巨细胞病毒(HCMV)、乙型肝炎病毒(HBV)、鼠疫杆菌等]感染、IL-17 信号通路等,可能与 CGA 联合 Phil 治疗细胞因子风暴有关。

巨噬细胞是炎性细胞因子风暴的重要参与者,介导了炎症过程中各种免疫病理的发展,包括过度分泌多种炎症介质和炎性细胞因子(NO、TNF- α 、IL-6 等)^[17]。NO、TNF- α 、IL-6 的过量释放与炎症的发生、发展密切相关,抑制 NO、TNF- α 、IL-6 的过度表达是减轻炎症的重要手段^[18-19]。本研究表明,CGA 和 Phil 在 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组及联合用药组能有

效降低 NO、TNF- α 、IL-6 的释放量,且呈剂量依赖性。这提示 CGA 和 Phil 调控细胞因子风暴与抑制 NO、TNF- α 、IL-6 的释放有关。另外,本研究发现,联合用药组对 LPS 诱导的炎症介质和炎性细胞因子的释放的抑制作用要强于高剂量单药组。

作为重要的信号转导分子,NO 的过度产生在炎症疾病发病机制中起着关键作用^[20]。iNOS 是促炎介质 NO 合成的关键酶,COX-2 是一种诱导型环氧化酶,在正常生理状态下的细胞中,iNOS 和 COX-2 的表达水平极少,当细胞受到刺激时,iNOS 和 COX-2 表达水平急剧上调,从而进一步调控炎症因子 NO 和前列腺素 E2(PGE2)的产生,加剧炎症反应^[21]。本研究表明,CGA 和 Phil 显著降低 LPS 诱导的 iNOS 和 COX-2 蛋白表达水平,联合用药组的效果要好于高剂量单药组。

TLR4 是一种模式识别受体,能被 LPS 诱导激活,引起促炎因子大量释放,最终可能在体内引发细胞因子风暴,导致严重的脓毒症^[22]。本研究发现,LPS 刺激巨噬细胞后,TLR4 的蛋白表达水平显著增加,而 CGA、Phil、联合用药及 DEX 能够显著降低其水平。TRAF6 在 LPS 与 TLR4 结合后被募集,进而诱导促炎反应信号的发生^[23]。进一步研究发现,LPS 刺激巨噬细胞后,TRAF6、PI3K3C 的蛋白表达水平及 PI3K3C 的磷酸化水平均显著升高。而 CGA、Phil、联合用药及 DEX 能够显著降低其水平。

综上所述,CGA 和 Phil 及其联合用药可通过降低 LPS 诱导的 iNOS 和 COX-2 表达,抑制 NO、TNF- α 、IL-6 炎症介质的释放,从而发挥抗炎作用,其机制可能是与下调 TLR4/TRAF6/PI3K3C 信号通路有关。本研究发现,CGA 和 Phil 联用治疗细胞因子风暴的效果强于高剂量单药治疗效果,表明单体联用在抗炎活性方面具有巨大的开发潜力。

参考文献

[1] 刘亮,孟圆,高全立. 细胞因子风暴综合征和细胞因子释放综合征的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2022,49(12):607-611.

[2] 张彬彬,于国华,史渊源. 细胞因子风暴及其中药防治的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2022, 28(1):161-166.

[3] 高玲,杨茜,黄英,等. 基于细胞因子风暴理论探讨中药在病毒性肺炎中的应用[J]. 中药药理与临床,2020,36(2):17-23.

[4] 尹明星,曹艳,施春阳,等. 中药防治细胞因子风暴的研究进展[J]. 中草药,2020,51(5):1089-1095.

[5] BISHT A, DICKENS M, RUTHERFURDMA-RKWICK K, et al. Chlorogenic acid potentiates the anti-inflammatory activity of curcumin in LPS-stimulated THP-1 cells [J]. *Nutrients*, 2020, 12(9):2706.

[6] JAIN S, SAHA P, SYAMPRASAD N P, et al. Targeting TLR4/3 using chlorogenic acid ameliorates LPS+POLY I:C-induced acute respiratory distress syndrome via alleviating oxidative stress-mediated NLRP3/NF-κB axis [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2023, 137(10):785-805.

[7] ZHANG D, QI B Y, LI D X, et al. Phillyrin relieves lipopoly saccharide-induced AKI by protecting against glycocalyx damage and inhibiting inflammatory responses[J]. *Inflammation*, 2020, 43(2):540-551.

[8] SONG H Y, JEONG D E, LEE M. Osmanthus fragrans bioactivity-guided extract optimization of var. leaves and anti-inflammatory activities of phillyrin [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(8):1545.

[9] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10):1110-1111.

[10] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11):682-690.

[11] 杨永芳, 彭善鑫, 王恺悦, 等. 脉络舒通丸治疗缺血性卒中的网络药理学分析和实验验证[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(23):6466-6475.

[12] 刘柯周, 云鑫, 丁军颖. 基于网络药理学探究虎杖苷通过 SIRT1/HMGB1 对炎症巨噬细胞 RAW264.7 极化的调控机制[J]. *免疫学杂志*, 2023, 39(5):369-378.

[13] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, et al. cyto-Hubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4):S11.

[14] 甄建华, 于河, 谷晓红. 细胞因子风暴中医辨证要点解析[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(6):763-769.

[15] ROOT-BERNSTEIN R. Innate receptor activation patterns involving TLR and NLR synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and sepsis cytokine storms: a review and model making novel predictions and therapeutic suggestions[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4):2108.

[16] CAPLAN A, FETT N, ROSENBACH M, et al. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: a comprehensive review [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 76:1-9.

[17] PARK H H, KIM M J, LI Y, et al. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF-κB and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2):296-302.

[18] LI J, CHEN J, HUANG P, et al. The Anti-Inflammatory mechanism of flaxseed linusorbs on Lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages by modulating TLR4/NF-κB/MAPK pathway[J]. *Foods*, 2023, 12(12):2398.

[19] 贾小演, 赵晓歌, 谢丹, 等. 囊荷根茎乙醇提取物对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的影响[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(3):71-77.

[20] 杜青, 陈林, 贺炜, 等. 黄精多糖对 RAW 264.7 细胞活性及炎症因子 TNF-α、IL-6、iNOS 表达的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(8):2676-2679.

[21] SINGH G, KAUR J, KAUR M, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of imperatorin: evidences for involvement of COX-2, iNOS, NF-κB and inflammatory cytokines[J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(2):176-185.

[22] WU S, LIN C, ZHANG T, et al. Pentamidine alleviates inflammation and lipopolysaccharide-induced sepsis by inhibiting TLR4 activation via targeting MD2[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:835081.

[23] ZENG X Z, ZHANG Y Y, YANG Q, et al. Artesunate attenuates LPS-induced osteoclastogenesis by suppressing TLR4/TRAF6 and PLCγ1-Ca²⁺-NFATc1 signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2):229-236.

(收稿日期:2024-02-26 修回日期:2024-07-23)