

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80952

枸杞的抗炎活性成分及作用机理

史小飞

(内黄县市场监督管理局, 河南 安阳 456399)

摘要: [目的] 探究枸杞的抗炎活性成分及作用机理。[方法] 运用网络药理学和分子对接技术筛选枸杞抗炎作用的主要成分及作用靶点, 结合细胞试验, 以 RAW264.7 炎症细胞模型评价枸杞提取物的抗炎活性, 并利用皮尔逊相关系数法分析主要成分与炎症因子之间的关联性。[结果] 通过 TCMSp、Uniprot、OMIM 等在线数据库筛选出 34 种枸杞主要成分及 123 个共有靶点基因, 由蛋白互作网络图收集到 *IL-6*、*TP53*、*JUN*、*TNF*、*AKT1*、*IL1B* 等核心靶点, 由“药物—成分—靶点”网络图可获得槲皮素、 β -谷甾醇、黄豆黄素、甾醇、阿托品等关键成分; KEGG 富集得到了癌症信号通路、脂质和动脉粥样硬化等信号通路。分子对接结果表明, β -谷甾醇、甾醇与关键靶点的结合能相对较低, 亲和力较强。细胞试验进一步验证了枸杞提取物中槲皮素、 β -谷甾醇、甾醇浓度与炎症因子 *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 生成量之间存在负相关性。[结论] 枸杞中潜在的抗炎活性成分为槲皮素、 β -谷甾醇、甾醇, 可能是通过调节 *AKT1*、*IL1B* 等核心靶点来发挥抗炎作用。

关键词: 枸杞; 活性成分; 靶点; 活性; 抗炎

Anti-inflammatory active ingredients and mechanisms of action of *Lycii fructus*

SHI Xiaofei

(Neihuang County Market Supervision Administration, Anyang, Henan 456399, China)

Abstract: [Objective] To explore the anti-inflammatory active ingredients and mechanisms of action of *Lycii fructus*. [Methods] Network pharmacology and molecular docking techniques were used to screen the main components and targets of *Lycii fructus* with anti-inflammatory effects. Combined with cell experiments, the anti-inflammatory activity of *Lycii fructus* extract was evaluated using the RAW264.7 inflammatory cell model. The Pearson correlation coefficient method was used to analyze the correlation between the main components and inflammatory factors. [Results] A total of 34 main components and 123 common target genes of *Lycii fructus* were screened through online databases such as TCMSp, Uniprot, and OMIM. Core targets, including *IL-6*, *TP53*, *JUN*, *TNF*, *AKT1*, and *IL1B*, were identified through the protein-protein interaction network. Key components such as quercetin, β -sitosterol, daidzein, stigmasterol, and atropine were obtained from "drug-component-target" network. KEGG pathway enrichment analysis revealed cancer signaling pathway, lipid signaling pathway, and atherosclerosis signaling pathway. Molecular docking results showed that β -sitosterol and stigmasterol exhibited relatively low binding energies and strong affinities with key targets. Cell experiments further confirmed a negative correlation between the concentrations of quercetin, β -sitosterol, and stigmasterol in *Lycii fructus* extract and the production of inflammatory factors *TNF- α* , *IL-6*, and *IL-1 β* . [Conclusion] The potential anti-inflammatory active ingredients in *Lycii fructus* are quercetin, β -sitosterol, and stigmasterol, which may exert anti-inflammatory effects by regulating core targets such as *AKT1* and *IL1B*.

Keywords: *Lycii fructus*; active ingredients; target; activity; anti-inflammatory

炎症是指机体对物理创伤、细菌感染、病毒入侵等刺激产生的一种自我防御反应^[1-2], 广泛存在于细胞、组织

通信作者: 史小飞 (1986—), 男, 内黄县市场监督管理局工程师, 硕士。E-mail: 1025628665@qq.com

收稿日期: 2024-09-13 改回日期: 2025-02-10

引用格式: 史小飞. 枸杞的抗炎活性成分及作用机理[J]. 食品与机械, 2025, 41(3): 151-160.

Citation: SHI Xiaofei. Anti-inflammatory active ingredients and mechanisms of action of *Lycii fructus*[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 151-160.

及器官中^[3],适当的炎症有助于提升免疫力,杀灭病原体,维持组织功能,但持续的炎症将增加罹患癌症、糖尿病、高血压、肥胖等慢性病的风险。膳食中的非营养成分黄酮、酚酸、花色苷、胡萝卜素等具有明显的抗炎特性^[4],能够缓解和降低机体的炎症反应,促进健康。

枸杞(*Lycii fructus*)中富含多糖、类胡萝卜素、类黄酮等多种活性成分^[5],是中国传统中药材。在“健康中国”战略背景下,枸杞药食同源的独有特性备受消费者青睐,其灵活多样的应用形式,覆盖了大健康产业的众多领域,如中成药、保健食品、药膳、药酒、煲汤等。现代临床研究表明,枸杞在保肝护肝、防止视网膜病变、治疗干眼病、减缓视觉疲劳、关节炎、糖尿病等方面具有良好的应用价值^[6],而以上疾病均与炎症反应密不可分^[7]。Kim等^[8]研究发现,枸杞提取物可能通过下调NF- κ B结合活性来抑制iNOS表达,从而达到抗炎目的。Wang等^[9]发现,枸杞乙酸乙酯提取物可以降低丙二醛、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素1 β (IL-1 β)和IL-6水平,显著减轻肥胖大鼠的氧化应激和炎症反应。虽然枸杞的研究不断深入,但利用大数据深度挖掘枸杞抗炎作用的研究较少,这是由于枸杞成分复杂,靶点众多,很难深入研究。此外关于枸杞功能活性的研究以多糖为主,非多糖成分鲜有报道。研究拟基于网络药理学全面分析“药物—成分—疾病”之间的作用关系^[10],并采用细胞试验进一步验证炎症因子与相关成分之间的关联性,探讨枸杞发挥抗炎作用的物质基础及机理,为其功能健康产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7细胞:中国科学院细胞库;

宁夏枸杞:河南张仲景大药房股份有限公司;

豆甾醇、 β -谷甾醇、槲皮素:纯度95%,上海源叶生物科技有限公司;

甲醇(色谱纯)、LPS脂多糖:国药集团化学试剂有限公司;

DMEM培养基:上海源叶生物科技有限公司;

胎牛血清:浙江天杭生物科技股份有限公司;

白细胞介素-6(IL-6)试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒、白细胞介素-1 β (IL-1 β)试剂盒:上海酶联科研试剂盒公司。

1.2 仪器与设备

恒温CO₂细胞培养箱:CO2-2X100-Z型,上海赫田科学仪器有限公司;

旋转蒸发仪:RE-2000A型,上海亚荣生化仪器厂;

分析电子天平:321XJ型,上海精科实业有限公司;

超声波清洗机:LanJ-J02DP型,广东蓝鲸超声波清洗技术有限公司;

台式高速多功能冷冻离心机:TGL-21型,四川蜀科仪器有限公司;

多孔电热恒温水浴锅:HH-ZK4型,郑州卓成仪器科技有限公司;

全自动酶标仪:YP-96-1型,山东优云谱光电科技有限公司;

超高效液相色谱仪:1290 Infinity II型,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 网络药理学分析

(1) 枸杞活性成分筛选及靶点收集:利用TCMSP数据库(<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)收集枸杞活性成分,以“枸杞”中文名为检索对象,以口服生物利用度(OB)>30%,类药原则(DL)>0.18为检索条件,筛选出有效活性成分。通过Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)查询Gene name,选择Human进行筛选,合并去重,收集靶点。

(2) 疾病靶点的收集:通过OMIM数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、TTD数据库(<https://db.idrblab.net/ttd/>)检索相关炎症靶点,以“inflammation”为关键检索词,将数据库靶点基因汇总并去重整理。将药物成分靶点和炎症靶点导入到Venny 2.1.0(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)在线作图,收集共有靶点。

(3) 构建蛋白相互作用网络图:利用STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建互作网络图,将共有靶点导入表格,设置“Minimum required interaction score”为High confidence(0.9),隐藏网络中不相关的节点,设置为3个Clusters,提交获取靶点蛋白—蛋白互作图(PPI),将.tsv结果导入到Cytoscape 3.8.0软件作图,筛选关键靶点基因。

(4) 构建“药物—成分—靶点”网络图:将共有靶点及药效成分导入Cytoscape 3.8.0,构建“药物—成分—靶点”网络图。

(5) GO功能富集及KEGG通路分析:将共有靶点输入到Metascape数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),species设定为H.sapiens,显著性 $P<0.01$,分别进行GO功能富集和KEGG通路富集,其中GO功能富集涉及到分子功能、生物学过程、细胞组成,KEGG Pathway富集关键靶点可能涉及到的信号通路。汇总数据,利用微生信在线作图工具(<http://bioinformatics.com.cn/?keywords=pathway>)分别绘制GO功能富集图和KEGG信号通路富集气泡图。

(6) 分子对接:根据Degree大小,选择PPI网络图中

排名前6的关键靶点与枸杞关键药效成分进行分子对接,通过 Pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的 sdf 文件,并利用 OpenBible 软件转换为 pdb 文件。利用 Uniprot 数据库和 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载关键靶点蛋白的 3D 结构。利用 Pymol 2.4.0 软件对受体蛋白去水、去除配体等前处理,通过 AutoDockTools-1.5.6 软件进行加氢、计算电荷数及与配体小分子进行分子对接,利用 PLIP 网站 (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 在线分析可视化对接结果,明确受体和配体间相互作用位点,并利用 Pymol 2.4.0 软件作图。

1.3.2 体外细胞试验

(1) 枸杞提取物的制备:将市售的 10 批枸杞去蒂,60℃干制 6 h,粉碎,过 40 目筛。分别准确称取不同批次枸杞粉末 2.0 g,加入 30 mL 甲醇,30℃超声提取 2 h,滤渣重新提取,共 3 次,合并滤液,真空浓缩至干,干燥器内保存。

(2) 细胞培养:配制高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素),于 5% CO₂、37℃下进行细胞传代培养,所有试验均在第 6~10 代进行。

(3) MTT 法测定细胞成活率:参照崔艳艳等^[11]的方法略修改。收集细胞对数期的细胞,调整细胞数量为 1.5×10^6 个/孔,每孔 100 μL,以 1 μg/mL LPS 于 37℃下常规培养 24 h,加入梯度浓度的枸杞提取物(0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μg/mL),同时设置正常对照组(NC 组)和模型组(含 1 μg/mL LPS,不含枸杞提取物),每组设置 3 个复孔,每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去培养液,加入 150 μL 的 DMSO 溶液,避光振荡 5 min,测定 490 nm 处吸光值,按式(1)计算存活率。

$$c = \frac{A_0}{A_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——细胞存活率, %;

A_0 ——给药组吸光值;

A_1 ——空白组吸光值。

(4) 给药方案与分组:参照李雪珊等^[12]的方法略修改。准确称取适量不同批次的枸杞提取物(FLE),以二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制 1 mg/mL 母液,以 DMEM 培养基溶液稀释制备 100, 200, 400 μg/mL 含药培养液。

取对数期 RAW264.7 细胞,调整细胞数量为 1.5×10^6 个/孔,接种到 6 孔板,离心弃去原培养基,PBS 缓冲液清洗 3 遍,离心,加入含药 DMEM 培养基。将细胞分为对照组(CON 组,不做处理)、给药组(分别设置低、中、高剂量组,不同浓度 FLE+1 μg/mL LPS)、MOD 组(MOD, 1 μg/mL LPS),除对照组外其他组均预先用 1 μg/mL LPS 构建炎症模型,给药组预先用 LPS 诱导处理 1 h,再加入药

物培养液,各组均培养 24 h。

(5) ELISA 法检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平:收集的各组细胞上清液未稀释,严格按照说明书,采用试剂盒检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平。

1.3.3 枸杞提取物中槲皮素、豆甾醇、β-谷甾醇含量测定

(1) 槲皮素:参照 T/NAIA 0202—2023。

(2) 豆甾醇、β-谷甾醇:参照石敏等^[13]的方法。色谱条件:Xtimate-C₁₈ 柱子(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇—水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 为 93:7),流速 1 mL/min,柱温 30℃,波长 210 nm,进样量 10 μL。分别吸取 1, 2, 4, 6, 8 μL 混标溶液,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得豆甾醇标准曲线为 $Y=322.71X+80.52$, $R^2=0.9967$; β-谷甾醇标准曲线为 $Y=174.6X+58.1$, $R^2=0.9930$ 。将不同稀释浓度的枸杞提取物过 0.45 μm 微孔膜,进样量 10 μL,保留时间分别为 21.04, 24.08 min,根据标准曲线回归方程计算豆甾醇、β-谷甾醇含量。

1.4 数据分析

利用 Excel 软件处理数据,结果以平均数±标准差表示,利用 SPSS 22.0 中单因素 ANOVA 方差分析进行组内差异性分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著,以 $P<0.01$ 表示差异极显著。利用 Cytoscape 3.8.0 构建网络化展示图。

2 结果与分析

2.1 枸杞的药效成分及靶点

经过 TCMSP 数据库共检索到 188 个成分,经筛选获得 46 种成分,利用 Uniprot 数据库规范化处理,最终为 34 种成分(见表 1)。根据“Target name”获取 Uniprot ID,并转换为 Gene name,经去重得到 195 个靶点。

2.2 炎症靶点收集

以“inflammation”为关键词,分别通过 OMIM 数据库、TTD 数据库、Gencard 数据库检索疾病靶点基因,经合并去重处理,共获得炎症靶点基因 2 563 个。将药物成分靶点与疾病靶点进行取交集处理,绘制韦恩图(见图 1)。由图 1 可知,收集到共有靶点 123 个,表明枸杞发挥抗炎作用机制与 *PGR*、*PTGS2*、*ADH1C*、*GABRA1*、*NR3C2*、*PTGS1*、*IGHG1*、*SLC6A3*、*ADRB2*、*PLAU*、*LTA4H*、*PRKACA*、*GABRA3*、*CHRNA7*、*PIK3CG*、*GABRA2*、*GABRA5*、*SLC6A4*、*OPRM1*、*BCL2*、*BAX*、*CASP9*、*JUN*、*CASP3* 等靶点基因密切相关。

2.3 蛋白—蛋白(PPI)网络互作图

将共有靶点基因导入 STRING 数据库,构建蛋白互作网络图,将生成的 .tsv 文件数据导入到 Cytoscape 3.8.0 软件进行作图分析,结果见图 2,颜色越深、圆形越大代表靶点越关键。以 Degree≥47、Betweenness≥605.8、Closeness≥0.55 为筛选条件,获得枸杞抗炎的关键靶点基

表 1 枸杞子的主要药效成分及靶点
Table 1 Main active ingredients and targets of *Lycii fructus*

MOL ID	名称	OB/%	DL
MOL001323	α 1-谷甾醇	43.28	0.78
MOL003578	环阿屯醇	38.69	0.78
MOL001494	亚麻油酸乙酯	42.00	0.19
MOL001495	亚麻酸乙酯	46.10	0.20
MOL001979	羊毛甾醇	42.12	0.75
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
MOL005406	阿托品	45.97	0.19
MOL005438	菜油甾醇	37.58	0.71
MOL006209	花色素苷	47.42	0.76
MOL007449	24-亚甲基苯酚	44.19	0.75
MOL008173	西托糖苷	36.91	0.75
MOL008400	黄豆黄素	50.48	0.24
MOL000953	胆固醇	37.87	0.68
MOL009604	14b-孕烷	34.78	0.34
MOL009617	24-乙基胆甾-22-烯醇	37.09	0.75
MOL009618	24-乙基胆甾-5,22-二烯醇	43.83	0.76
MOL009620	24-甲-31-norlanost-9(11)-烯醇	38.00	0.75
MOL009621	24-亚甲基-8-烯醇	42.37	0.77
MOL009622	岩皂甾醇	43.78	0.76
MOL009633	31-去甲羊毛甾-9(11)-烯醇	38.35	0.72
MOL009634	31-去甲羊毛甾醇	42.20	0.73
MOL009635	4,24-甲基烯醇	37.83	0.75
MOL009639	4-甲基-7-烯胆烷醇	38.13	0.71
MOL009640	4 α ,14 α ,24-三甲基胆甾-8,24-二烯醇	38.91	0.76
MOL009641	4 α ,24-二甲基胆甾-7,24-二烯醇	42.65	0.75
MOL009642	4 α -甲基-24-乙基胆甾-7,24-二烯醇	42.30	0.78
MOL009644	6-氟吲哚-7-脱氢胆固醇	43.73	0.72
MOL009646	7-O-甲基木犀草素-6-C- β -葡萄糖苷	40.77	0.30
MOL009650	阿托品	42.16	0.19
MOL009677	羊毛甾醇-8-烯-3 β -醇	34.23	0.74
MOL009678	羊毛甾醇-8-烯醇	34.23	0.74
MOL009681	钝叶醇	42.55	0.76
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28

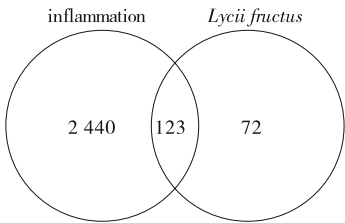


图 1 韦恩图

Figure 1 Venn diagram

因:*IL-6*(白细胞介素-6)、*IL1B*(白细胞介素 1B)、*TNF*(肿瘤坏死因子)、*TP53*(细胞肿瘤抗原 p53)、*AKT1*(丝氨酸/苏

氨酸蛋白激酶)、*JUN*(转录因子 AP-1),Degree 依次为 58, 55, 52, 51, 49, 47, 表明这些靶点在枸杞发挥抗炎活性中起到了至关重要的作用。*IL-6*为炎症反应的重要指标之一,炎症越严重,*IL-6*水平越高。*IL1B*是对抗感染的前炎症因子,参与调节炎症因子的分子表达^[14]。*TNF*为重要的炎症介质,可以触发激活多通路参与全身炎症反应,如 *TNF*、丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)途径^[15]。*TP53*参与调节细胞的凋亡和增殖^[16],在传统的炎症通路中 *p53* 是关键靶点,促进细胞分化、激活氧化应激反应^[17]。磷脂酰肌醇 3-激酶(*PI3K*)作为一种脂质激酶,可诱导蛋白激酶 B (*AKT*)磷酸化,响应细胞外信号调节细胞存活、生长和血管生成^[18]。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(*PI3K/AKT/mTOR*)是介导细胞炎症及免疫应答的重要信号通路,通路激活后,*AKT1* 是该信号通路的关键靶点,信号激活后 *AKT* 蛋白磷酸化,启动炎症因子转录,诱发炎症^[19]。综上,枸杞可能通过调控多种通路控制关键靶点来发挥抗炎作用。

2.4 药物—成分—靶点网络图

利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“药物—成分—靶点”网络图,结果如图 3 所示。图中颜色选用黄—绿—紫渐变填充,颜色深浅和形状大小代表 Degree 越大。Degree 越高表明该药效成分对枸杞抗炎活性的影响越大。由图 3 可知,Degree 排名前 5 的成分分别为 MOL00098(degree: 105)、MOL000358(degree: 21)、MOL008400(degree: 17)、MOL000449(degree: 12)和 MOL009650(degree: 10),因此槲皮素、 β -谷甾醇、黄豆黄素、豆甾醇、阿托品最能体现枸杞的抗炎效果。槲皮素是一种抗炎、抗氧化的黄酮类物质,在自然界中分布广泛。曹璐等^[20]发现,槲皮素可能通过 *PI3K-AKT/NF- κ B* 信号通路改善小鼠上皮细胞的炎症反应,降低 *TNF- α* 、*IL-6* 的表达。豆甾醇、 β -谷甾醇是植物细胞膜的重要组成部分,属于植物甾醇类物质。大量研究^[21]表明,植物甾醇能够明显缓解炎症反应。冯思敏等^[22]以葡聚糖酸钠诱导的结肠炎小鼠为模型,发现豆甾醇和 β -谷甾醇能有效降低 *IL1B*、*IL-6* 及环氧合酶 *COX-2* 的 mRNA 表达量,改善急性肠炎症状。吴力超等^[23]发现,豆甾醇能够下调 *MAPK3* 上调 *PRKACA* 表达,通过调控雌激素信号通路影响炎症反应。此外,豆甾醇是雷公藤、赤芍等治疗风湿性关节炎、牙周炎等疾病的关键活性成分^[24-25]。黄豆黄素属于大豆异黄酮,具有雌激素活性,能够通过调节 *NF- κ B* 和 *JNK* 信号通路抑制细胞炎症反应^[26]。阿托品是一种抗胆碱药,在临床上常被用作睫状肌麻痹剂、散瞳剂以及弱视治疗剂^[27],但在炎症方面的应用研究较少;陈杰等^[28]将长托宁与阿托品联用可有效改善有机磷农药中毒患者的炎症症状。综上,枸杞是通过多组成分发挥抗炎作用的。

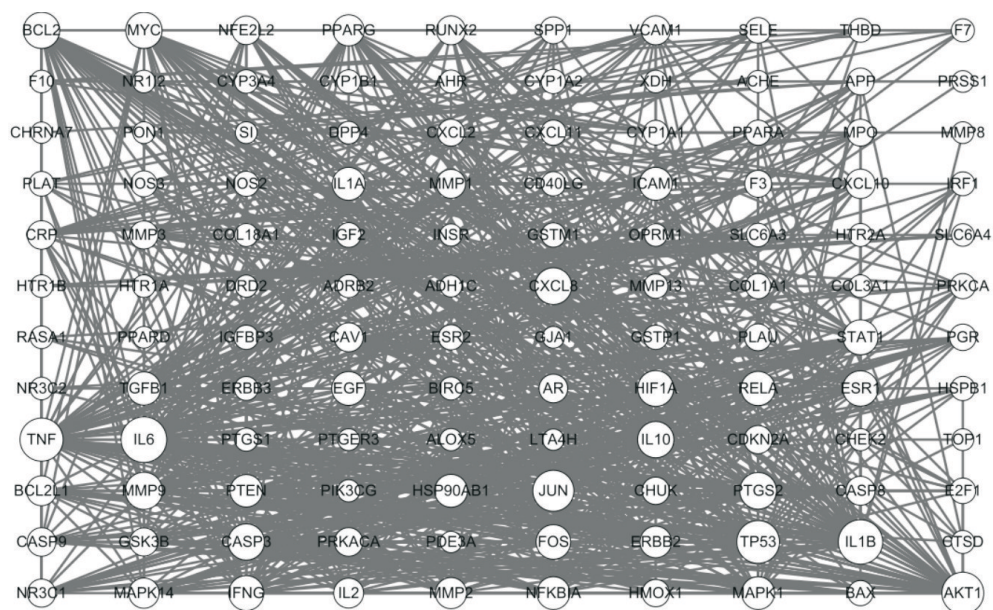
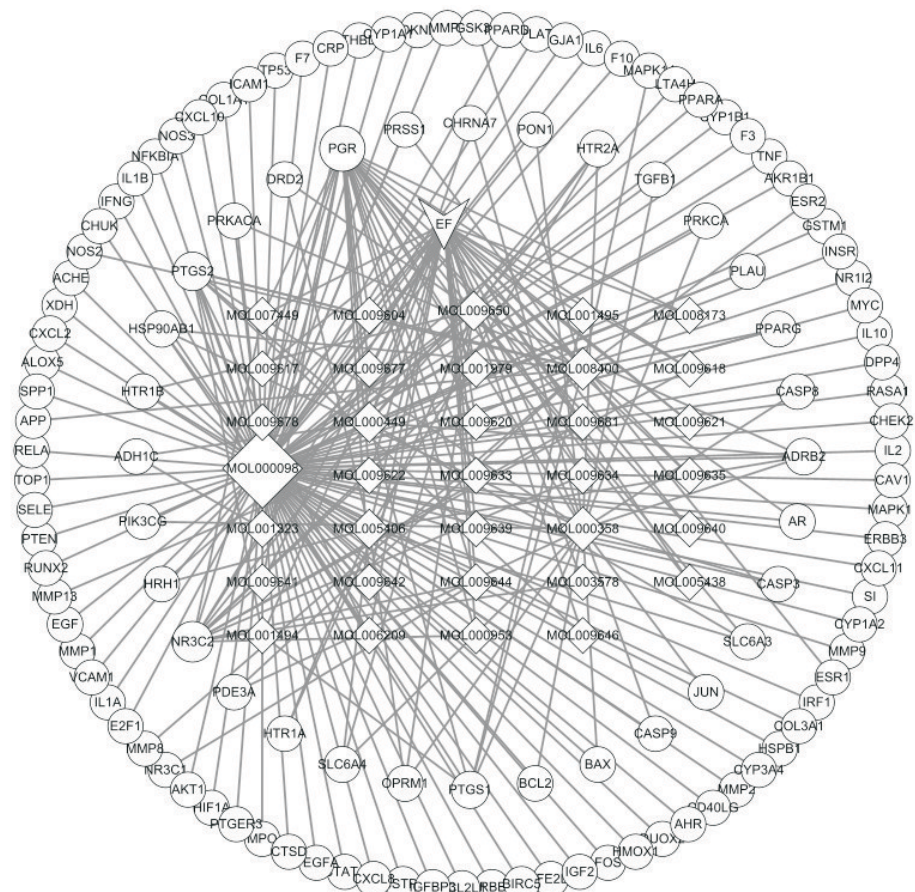


图2 PPI网络图

Figure 2 PPI network diagram



椭圆代表靶点基因;矩形代表成分;三角形代表药物

图3 “药物—成分—靶点”网络图

Figure 3 "Drug-ingredient-target" network diagram

2.5 GO 富集和 KEGG 通路分析

将药物和疾病交集靶点导入到 Metascape 数据库, 分别进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析(见图 4)。GO 富集的生物学过程(BP)涉及到细胞对脂质的反应(cellular response to lipid)、细胞对氮化合物的反应(cellular response to nitrogen compound)、对激素的反应(response to hormone)、对氧气水平的反应(response to oxygen levels)、细胞运动的正向调节(positive regulation of cell motility)、对外源性刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)、对有机物的反应(response to inorganic substance)等, 细胞组成(CC)主要为细胞核、蛋白和细胞质等, 涉及到膜筏(membrane raft)、分泌颗粒腔(secretory granule lumen)、细胞外基质(extracellular matrix)、受体复合物(receptor complex)、转录调节复合物(transcription regulator complex)等, 分子功能(MF)涉及到转录因子结合(transcription factor binding)、核受体活性(nuclear receptor activity)、细胞因子受体结合(cytokine receptor

binding)、丝氨酸水解酶活性(serine hydrolase activity)等。KEGG 富集到 20 个信号通路, 其中富集显著性较高的通路为癌症信号通路(Pathways in cancer)、脂质和动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、化学致癌—雌激素受体(Chemical carcinogenesis-receptor activation), 其中涉及癌症信号通路相关的基因靶点有 49 个, 涉及脂质和动脉粥样硬化通路的基因靶点有 34 个, 涉及糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路的基因靶点有 26 个, 涉及化学致癌—雌激素受体的靶点基因有 27 个。因此, 癌症信号通路富集靶点基因较多, 与枸杞抗炎机理研究关联越密切, 许多的炎症信号通路与癌症通路交联, 细胞因子失调时, 癌症就会发生, 如 NF- κ B 通路经常被用于炎症信号通路研究, 其与癌症有着密切关联, 持续激活的 NF- κ B 通路能够促进提高癌症细胞基因表达水平, 如 *IL1B*、*TNF*、*IL-6* 等^[29]。

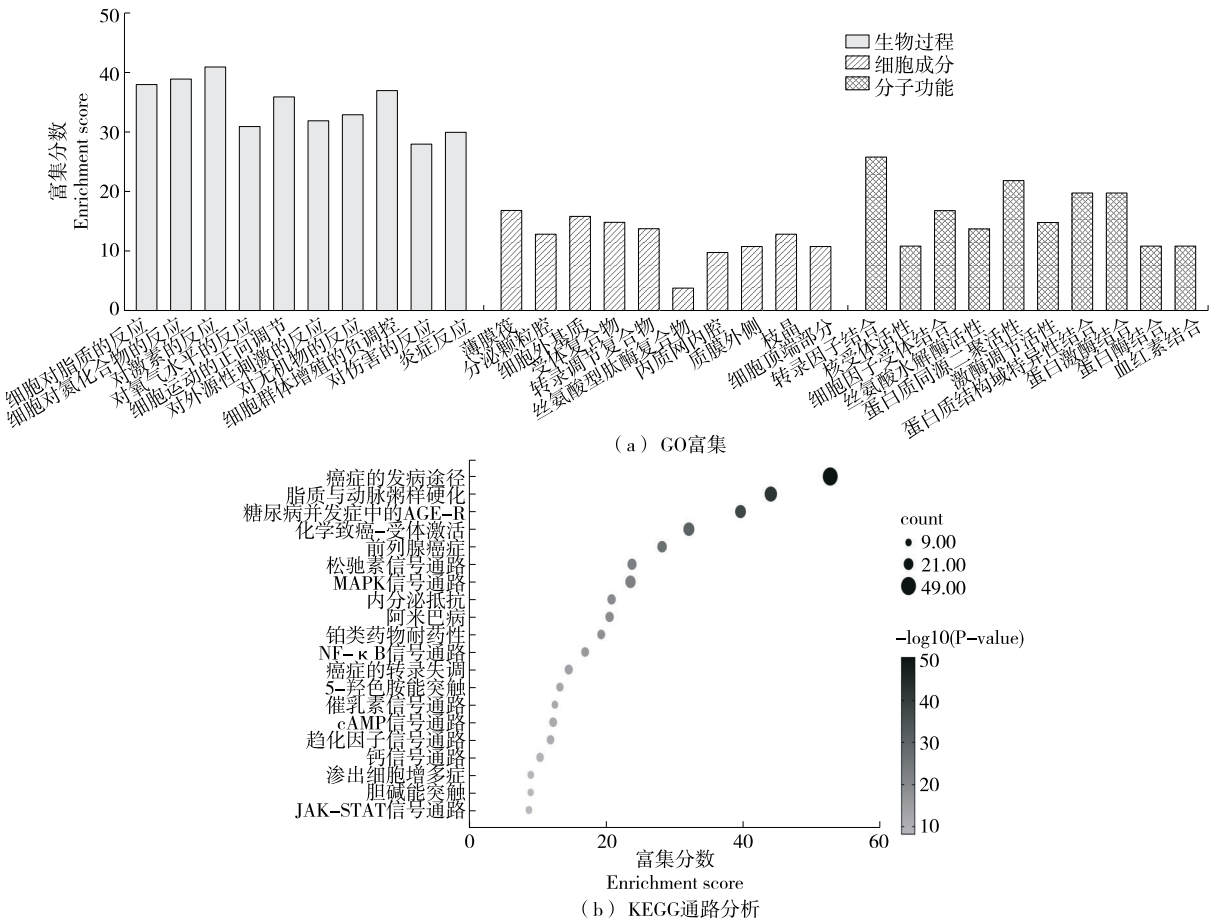


图4 GO 功能富集和 KEGG 信号通路分析

Figure 4 GO functional enrichment and KEGG signaling pathway analysis

2.6 分子对接

分子对接是虚拟筛选药物活性成分的重要手段,配体和受体由于氢键、疏水效应、范德华力等吸引在一起,一般结合能 <0 ,被认为结合能力较强,且值越小亲和力越强^[30]。利用 AutoDockTools-1.5.6 软件分别对药效成分及关键靶点进行对接分析,结果如图 5 所示。由图 5 可知,5 种成分与关键靶点 *IL-6* (PDB ID: 1ALU)、*IL1B* (PDB ID: 5R8Q)、*TP53* (PDB ID: 3Q05)、*TNF* (PDB ID: 2AZ5)、*AKT1* (PDB ID: 1UNQ)、*JUN* (PDB ID: 5T01) 的结合能均 <0 ,表明药物成分与靶点的亲和力较强。相比于其他成分, β -谷甾醇、豆甾醇与各关键靶点的结合能均相对较低,由于不同靶点与活性成分之间的结合位点不同,因此发挥的作用差异较大。

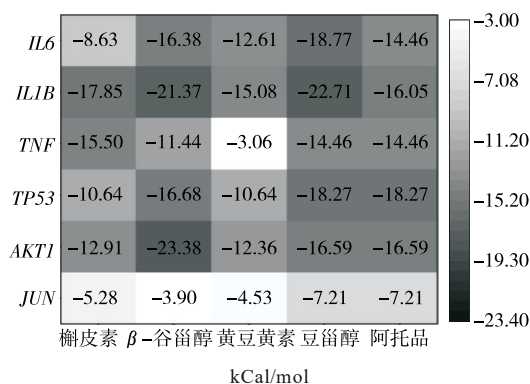


图 5 分子对接结果

Figure 5 Molecular docking results

由图 6 可知, β -谷甾醇与 *AKT1* 的氢键作用结合位点为 VAL-4,疏水作用力位点为 LEU-28、ARG-48、GLU-49、PRO-51、LYS-30、ILE-6,豆甾醇与 *AKT1* 的氢键结合位点为 GLU-95,疏水作用力位点为 PRO-24、TRP-11、GLU-91。 β -谷甾醇与 *IL1B* 的疏水作用力结合位点为 MET20、VAL41,豆甾醇与 *IL1B* 的疏水作用力位点为 LYS-63、VAL-41、VAL-40、MET20、GLN38。

2.7 槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇含量

由表 2 可知,槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇随着低、中、高剂量组呈递增趋势,三者之间的浓度差异显著($P<0.05$)。

2.8 枸杞提取物对 RAW264.7 细胞存活率的影响

由图 7 可知,相比 NC 组,模型组(1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS)对 RAW 264.7 细胞存活率的影响较小。经 LPS 刺激后,梯度系列枸杞提取物作用于细胞,与模型组相比,细胞存活率明显升高($P<0.05$),无细胞抑制作用,故选择 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续试验。

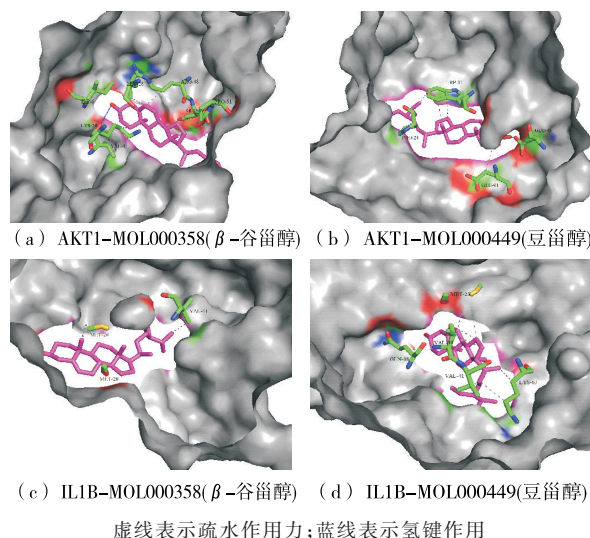


图 6 分子对接示意图

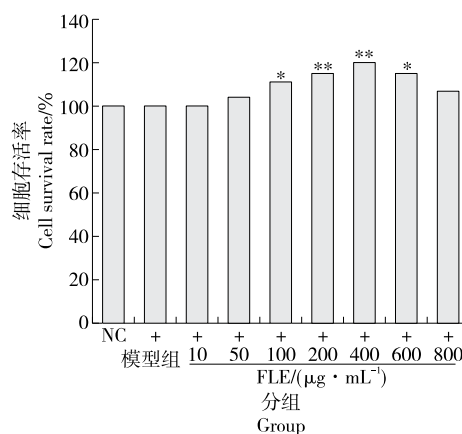
Figure 6 Schematic diagram of molecular docking

表 2 槲皮素、豆甾醇及 β -谷甾醇含量[†]

Table 2 Content of quercetin, sitosterol, and β -sitosterol

	$\mu\text{g/mL}$		
组别	槲皮素	β -谷甾醇	豆甾醇
低剂量组(100 $\mu\text{g/mL}$)	8.62 ± 0.77^c	1.07 ± 0.22^c	0.62 ± 0.04^c
中剂量组(200 $\mu\text{g/mL}$)	14.67 ± 1.06^b	2.62 ± 0.45^b	1.02 ± 0.09^b
高剂量组(400 $\mu\text{g/mL}$)	23.66 ± 3.07^a	4.83 ± 0.46^a	1.71 ± 0.28^a

[†] 同列小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。



与模型组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$;+表示 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS

图 7 枸杞提取物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

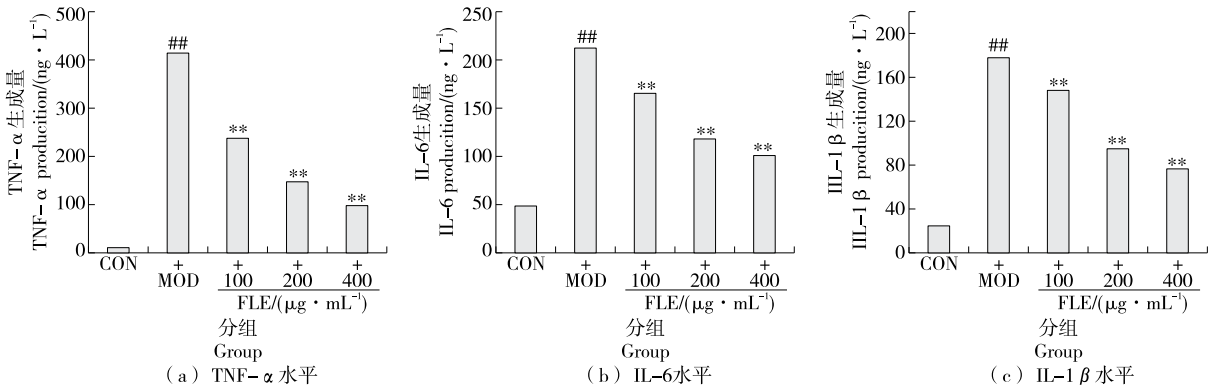
Figure 7 Effect of *Lycii fructus* extract on the survival rate of RAW264.7 cells

2.9 枸杞提取液对 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响

由图 8 可知,相比 CON 组,MOD 组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P<0.01$);相比 MOD 组,经 100,

200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 提取物作用后, 细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 释放水平分别降低了 42.5%, 64.5%, 76.3%; 细胞 IL-6 水平分别降低了 22.3%, 44.5%, 52.6%; 细胞 IL-1 β 水平分别降低了 16.4%,

46.9%, 57.1%, 均有明显下降 ($P<0.01$), 且存在一定的剂量—依赖关系, 单因素 ANOVA 方差分析表明高、中、低剂量组间存在显著性差异 ($P<0.05$)。



##表示与 CON 组存在极显著差异 ($P<0.05$); **表示与 MOD 组存在极显著差异 ($P<0.01$); + 表示 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS

图 8 各组细胞的 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 生成水平

Figure 8 Levels of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, and IL-1 β production in cells from each group ($n=10$)

2.10 相关性热图分析

由图 9 可知, 槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇含量与 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平之间整体上存在负相关性, 其中槲皮素与 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平之间的相关系数 r 分别为 $-0.931\ 33$, $-0.835\ 38$, $-0.883\ 23$, β -谷甾醇与 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平之间的相关系数分别为 $-0.883\ 9$, $-0.811\ 6$, $-0.838\ 5$, 豆甾醇与 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平之间的相关系数分别为 $-0.869\ 66$, $-0.679\ 08$, $-0.795\ 58$ 。由此推断槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇可能是枸杞缓解炎症反应的主要成分。

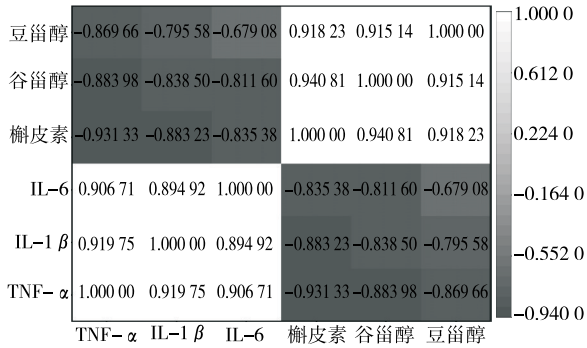


图 9 相关性热图

Figure 9 Correlation heat map

3 结论

通过多种数据库及软件对数据进行收集、分析, 探讨了枸杞的抗炎机制, 构建了“药物—成分—靶点”网络图, 并进一步以细胞试验验证了发挥抗炎作用的主要成分。结果表明, 枸杞中共筛选出 34 种抗炎活性成分, 195 个靶

点, “inflammation” 疾病靶点 2 563 个, 共有靶点基因 123 个, 其中主要药效成分包括槲皮素、 β -谷甾醇、黄豆黄素、阿托品、豆甾醇, 核心靶点包括 IL-6、TP53、JUN、TNF、AKT1、IL1B; 通过 KEGG 富集到 20 条信号通路, 主要与癌症信号通路、脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等相关。分子对接结果表明, 药效成分与关键靶点之间的结合能均 <0 , 亲和力较强, 其中 β -谷甾醇、豆甾醇与各靶点的结合能均相对较低, 其中与 AKT1、IL1B 的结合活性相对较强; 枸杞提取物能够有效降低炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 的生成量, 且相关性分析显示, 槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇含量与 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 水平之间存在负相关性, 且槲皮素的相关性更显著。

综上, 枸杞的主要药效成分槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇等通过调控癌症信号通路、脂质与动脉粥样硬化等信号通路发挥抗炎作用。枸杞提取物能够降低细胞炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 释放水平, 且槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇可能是其发挥抗炎作用的主要物质基础。试验从细胞水平初步确定枸杞活性成分槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇对炎症缓解有一定改善作用, 针对发挥主要作用的信号通路及关键靶点还需进一步结合相关靶点基因的 mRNA 表达和蛋白表达水平进行验证, 从而明确枸杞发挥抗炎作用的调控机理。

参考文献

[1] 张天, 徐慧, 全吉淑, 等. 草苈蓉多糖抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体活化及细胞焦亡机制研究[J]. 食品与机械, 2024, 40 (5): 137-145.
ZHANG T, XU H, QUAN J S, et al. Study on the mechanism of

- Boschniakia rossica* polysaccharide inhibiting the activation of inflammasomes and pyroptosis in J774A. 1 macrophages[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 137-145.
- [2] 郑振霄, 朱凯, 戴志远. 南极磷虾油对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1): 23-31.
- ZHENG Z X, ZHU K, DAI Z Y. Inhibitory effect of *Antarctic krill* oil on LPS induced inflammatory response in RAW264.7 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1): 23-31.
- [3] 傅丽娟, 邢路娟, 张万刚. 食源性抗炎活性肽的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 343-352.
- FU L J, XING L J, ZHANG W G. Research progress on food derived anti-inflammatory peptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 343-352.
- [4] 付永平, 刘如明, 肖建辉. 植物源天然产物抗炎活性研究进展[J]. 医药导报, 2020, 39(5): 666-671.
- FU Y P, LIU R M, XIAO J H. Progress on anti-inflammatory activities of plant-derived natural products[J]. Medical of Review, 2020, 39(5): 666-671.
- [5] 贾晓凤, 高蝶, 刘金旺, 等. 超声波辅助双水相法提取枸杞叶黄酮及其胰脂肪酶抑制活性[J]. 食品与机械, 2024, 40(8): 144-151.
- JIA X F, GAO D, LIU J W, et al. Extraction of flavonoids from *Goji* (*Lycium barbarum* L.) leaves by ultrasonic-assisted two-phase aqueous method and the inhibitory activity of the extract on pancreatic lipase [J]. Food & Machinery, 2024, 40(8): 144-151.
- [6] 杨露, 赵冉, 吴镇槐, 等. 枸杞原浆抗氧化及增强免疫活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(9): 18-21, 28.
- YANG L, ZHAO R, WU Z H, et al. Antioxidant capacity and immunoenhancing activity of *Lycium barbarum* protoplasm[J]. Food & Machinery, 2022, 38(9): 18-21, 28.
- [7] 刘文倩, 高耀, 张立伟, 等. 基于网络药理学研究连翘抗炎作用机制[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(1): 208-219.
- LIU W Q, GAO Y, ZHANG L W, et al. Study on anti-inflammatory mechanism of *Forsythiae fructus* based on network pharmacology[J]. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 2023, 46(1): 208-219.
- [8] KIM B S, SONG Y K, LIM H H, et al. The inhibitory effect of *Lycii fructus* on LPS-stimulated NF- κ B Activation and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages[J]. The Journal of Korean Medicine, 2008, 29(1): 47-59.
- [9] WANG Y, SU H, YUAN J C, et al. Antiobesity effects of *Lycii fructus* in high-fat diet/fructose-induced obese rats[J]. Pharmacognosy Magazine, 2020, 16(68): 87.
- [10] 张琪, 常久, 季巍巍, 等. 网络药理学在中医药领域的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(11): 186-190.
- ZHANG Q, CHANG J, JI W W, et al. Research progress of network pharmacology in the TCM field[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2024, 31(11): 186-190.
- [11] 崔艳艳, 袁永旭, 郭明坤, 等. 叉分蓼多糖结构表征及其对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 128-138.
- CUI Y Y, YUAN Y X, GUO M K, et al. Structural characterization of *Polygonum divaricatum* L. polysaccharide and its inhibitory effect on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells[J]. Food Science, 2024, 45(24): 128-138.
- [12] 李雪珊, 覃癸铭, 石慧颖, 等. 岭南山竹子提取物 oblongifolins A 的体外抗炎作用及机制研究[J]. 中国药房, 2024, 35(10): 1 209-1 214.
- LI X S, QIN G M, SHI H Y, et al. Study on *in vitro* anti-inflammatory effects and mechanisms of oblongifolins A extracted from *Garcinia oblongifolia*[J]. China Pharmacy, 2024, 35(10): 1 209-1 214.
- [13] 石敏, 黄少军, 郭静婕, 等. HPLC 法同时测定牛大力中豆甾醇和 β -谷甾醇含量[J]. 广西农学报, 2024, 39(1): 72-81.
- SHI M, HUANG S J, GUO J J, et al. Simultaneous determination of stigmasterol and β -sitosterol in *Millettia speciosa* Champ. by HPLC[J]. Journal of Guangxi Agriculture, 2024, 39(1): 72-81.
- [14] 陈丽萍, 顾玲, 聂珍琳, 等. IL1B 启动子区多态性与癌症风险的 meta 分析[J]. 中国医疗设备, 2012, 27(11): 31-36.
- CHEN L P, GU L, NIE Z L, et al. Meta analysis of IL1B promoter region polymorphism and cancer risk[J]. China Medical Devices, 2012, 27(11): 31-36.
- [15] 蒋红霞, 陈婉君, 许炜炜, 等. 基于网络药理学研究厚朴温中汤治疗脾胃虚寒型胃病的潜在靶点和机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1 764-1 773.
- JIANG H X, CHEN W J, XU W W, et al. Potential targets and mechanism of Houpuwenzhongtang for the treatment of spleen and stomach deficiency cold stomach disease based on network pharmacology[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(9): 1 764-1 773.
- [16] 陈中, 张嘉玲, 杨敬萍, 等. 抑癌基因 TP53 及新家族成员 TP63 和 TP73 的研究新进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(1): 57-62.
- CHEN Z, ZHANG J L, YANG X P, et al. The research progression of tumor suppressor TP53 and the new family members TP63 and TP73[J]. Journal of Inner Mongolia Medical University, 2013, 35(1): 57-62.
- [17] 杨益言, 王卫东. *p53* 动力学: 从细胞命运到炎症免疫[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2024, 44(12): 1 090-1 094.
- YANG Y Y, WANG W D. *p53* dynamics: from determining cell fate to inflammation and immune regulation[J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2024, 44

- (12): 1 090-1 094.
- [18] ZHU M, LI D, WU Y, et al. TREM-2 promotes macrophage-mediated eradication of *Pseudomonas aeruginosa* via a PI3K/Akt pathway[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2014, 79(3): 187-196.
- [19] 宋超, 管雪婷, 袁巧云, 等. 密生波罗花中神经酰胺类成分的抗炎作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 46-54.
- SONG C, GUAN X T, YUAN Q Y, et al. Anti-inflammatory effects of ceramides from *Incarvillea compacta*[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 46-54.
- [20] 曹璐, 王桃, 陈艳, 等. 槲皮素对 LPS 诱导小鼠乳腺上皮细胞炎症的保护机制[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(6): 1 218-1 228.
- CAO L, WANG T, CHEN Y, et al. Protective mechanism of quercetin against LPS-induced inflammation in mouse (*Mus musculus*) mammary epithelial cells[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(6): 1 218-1 228.
- [21] 刘雅谦, 李琳, 孙万成, 等. 植物甾醇的抗炎性研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(5): 93-99.
- LIU Y Q, LI L, SUN W C, et al. Progress on anti-inflammatory properties of phytosterols[J]. China Oils and Fats, 2022, 47(5): 93-99.
- [22] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 80-86, 94.
- FENG S M, NING K, SHAO P, et al. Research on the β -sitosterol and stigmasterol therapeutic effect of acute colitis in mice[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(12): 80-86, 94.
- [23] 吴力超, 李俊峰, 张婷婷, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨豆甾醇抗炎作用[J]. 中成药, 2022, 44(2): 609-615.
- WU L C, LI J F, ZHANG T T, et al. Discussion on anti-inflammatory effect of stigmasterol based on network pharmacology and cell experiment[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(2): 609-615.
- [24] ANTWI A O, OBIRI D D, OSAFO N, et al. Stigmasterol alleviates cutaneous allergic responses in rodents[J]. BioMed Research International, 2018, 2 018(1): 3984068.
- [25] 周巧, 刘健, 忻凌, 等. 基于网络药理学和分子对接探究新凤胶囊“异病同治”类风湿关节炎和骨关节炎作用机制[J]. 中医临床杂志, 2023, 35(10): 1 965-1 973.
- ZHOU Q, LIU J, XIN L, et al. Exploring the mechanism of action of Xinfeng capsules in rheumatoid arthritis and osteoarthritis by "treating different diseases with the same" based on network pharmacology and molecular docking[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 35(10): 1 965-1 973.
- [26] 胡胜兰, 肖昊, 王丽, 等. 大豆异黄酮对体外氧化应激仔猪肠上皮细胞的影响及机制研究[J]. 动物营养学报, 2021, 33(12): 6 699-6 708.
- HU S L, XIAO H, WANG L, et al. Effects and mechanism research of soybean isoflavones on intestinal epithelial cells of piglets under oxidative stress *in vitro*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(12): 6 699-6 708.
- [27] 李锡谦, 康平, 周玉. 阿托品对形觉剥夺性近视模型大鼠的改善作用及作用机制[J]. 河北医学, 2023, 29(1): 76-81.
- LI X Q, KANG P, ZHOU Y. Ameliorative effects and mechanism of action of atropine in rats with form deprivation myopia model[J]. Hebei Medicine, 2023, 29(1): 76-81.
- [28] 陈杰, 祁天明, 董晓光, 等. 长托宁联合阿托品对急性有机磷农药中毒患者炎症反应及心肌损伤的影响[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(2): 151-154.
- CHEN J, QI T M, DONG X G, et al. Influence of penethylidine hydrochlorid combined with atropine on myocardial damage and inflammation in patients with acute organophosphorus intoxication[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2019, 22(2): 151-154.
- [29] 刘华, 杨春娟, 吴高松, 等. NF- κ B 信号介导的慢性炎症与癌症形成的关系[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(2): 221-223.
- LIU H, YANG C J, WU G S, et al. Relationship between chronic inflammation and cancer intervened by NF- κ B pathway[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2017, 20(2): 221-223.
- [30] 陈珊, 李波, 葛正行, 等. 基于网络药理学及分子对接与实验验证苗药抑癌汤经 WNT/ β -catenin 信号通路抑制小细胞肺癌增殖的作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(7): 1 847-1 861.
- CHEN S, LI B, GE Z X, et al. Based on network pharmacology and molecular docking and experimental verification of the mechanism of Miao-Yi-Ai-Tang inhibiting the proliferation of small cell lung cancer through WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2024, 26(7): 1 847-1 861.