

基于高分辨质谱和网络药理学探究南昆山毛叶红茶的抗炎机理

鲁森, 王瑞, 高雄, 林慧纯, 陈忠正, 张媛媛, 陈旭洁, 黄秋颜, 李斌, 林晓蓉

Exploring Analytics of Mechanisms Behind the Anti-inflammatory Activity of Black Tea from *Camellia ptilophylla* Chang Based on High-resolution Mass Spectrum and Network Pharmacology

LU Sen, WANG Rui, GAO Xiong, LIN Huichun, CHEN Zhongzheng, ZHANG Yuanyuan, CHEN Xujie, HUANG Qiuyan, LI Bin, and LIN Xiaorong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040214>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

南昆山毛叶茶三种多酚的分离纯化及抗氧化研究

Isolation, Purification and Antioxidant Activities of Three Kinds of Polyphenol Monomers from *Camellia ptilophylla* Chang

食品工业科技. 2020, 41(5): 31-39 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.006>

基于网络药理学探讨预知子抗抑郁的作用机制

Mechanism of Anti-depression Mechanism of Akebiae Fructus Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 8-15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110295>

南昆山毛叶茶对tBHP诱导损伤NIH3T3细胞的保护效果

Protective Effect of *Camellia ptilophylla* Chang on the tBHP-Induced NIH3T3 Cells

食品工业科技. 2021, 42(2): 90-98 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040170>

基于网络药理学探讨桦褐孔菌降血糖功效成分及作用机制

Action Mechanism of *Inonotus obliquus* in the Treatment of Diabetes and the Material Basis of Pharmacodynamics Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(22): 18-29 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040268>

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yigancao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070092>

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010111>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

鲁森, 王瑞, 高雄, 等. 基于高分辨质谱和网络药理学探究南昆山毛叶红茶的抗炎机理 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(2): 30–39. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040214

LU Sen, WANG Rui, GAO Xiong, et al. Exploring Analytics of Mechanisms Behind the Anti-inflammatory Activity of Black Tea from *Camellia ptilophylla* Chang Based on High-resolution Mass Spectrum and Network Pharmacology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(2): 30–39. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040214

· 未来食品 ·

基于高分辨质谱和网络药理学探究南昆山毛叶红茶的抗炎机理

鲁森¹, 王瑞², 高雄³, 林慧纯², 陈忠正¹, 张媛媛¹, 陈旭洁¹, 黄秋颜¹, 李斌^{1,*}, 林晓蓉^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2. 深圳市质量安全检验检测研究院, 广东深圳 518000;

3. 广东省科学院微生物研究所, 广东广州 510070)

摘要:目的: 探究南昆山毛叶红茶抗炎功效发挥的化学基础及分子机制。方法: 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap high resolution-mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术分析其醇提物活性组分, 通过网络药理学预测其抗炎活性组分、作用靶点和信号通路, 利用分子对接技术验证抗炎活性组分与靶点的相互作用能力, 采用体外炎症细胞模型验证活性组分对炎性介质一氧化氮的抑制作用。结果: 从南昆山毛叶红茶中鉴定出 213 种活性组分, 并筛选出花青素、柚皮素、木犀草素、槲皮素等核心抗炎多酚类组分; 收集到潜在抗炎靶点 493 个, 并预测了肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等 9 个关键靶点和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等多条信号通路; 初步证明 11 种抗炎活性组分、特别是木犀草素等 9 种多酚类物质能与主要靶点稳定结合, 且木犀草素、槲皮素能够明显抑制脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生一氧化氮 (nitric oxide, NO), 半抑制浓度分别为 18.91、43.76 $\mu\text{mol/L}$ 。结论: 南昆山毛叶红茶通过木犀草素、槲皮素等多酚类物质作用于肿瘤坏死因子等多个靶点和丝裂原活化蛋白激酶等多条通路发挥抗炎活性。本研究为深入揭示南昆山毛叶茶的抗炎活性提供了理论研究基础。

关键词: 南昆山毛叶茶, 抗炎, 作用机理, 高分辨质谱, 网络药理学

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)02-0030-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040214



本文网刊:

Exploring Analytics of Mechanisms Behind the Anti-inflammatory Activity of Black Tea from *Camellia ptilophylla* Chang Based on High-resolution Mass Spectrum and Network Pharmacology

LU Sen¹, WANG Rui², GAO Xiong³, LIN Huichun², CHEN Zhongzheng¹, ZHANG Yuanyuan¹,
CHEN Xujie¹, HUANG Qiuyan¹, LI Bin^{1,*}, LIN Xiaorong^{1,*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Shenzhen Institute of Quality and Safety Inspection and Research, Shenzhen 518000, China;

3. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

收稿日期: 2023-04-23

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2022A1515011080); 广东省自然科学基金青年提升项目 (2023A1515030190); 国家农业农村部农业科技创新条件提升建设工程项目 (2020-440100-012846)。

作者简介: 鲁森 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 茶叶理化及功能活性研究, E-mail: 17079454008@163.com。

* 通信作者: 李斌 (1960-) 女, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶精深加工、天然产物功能特性, E-mail: bli@scau.edu.cn。

林晓蓉 (1986-) 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品纳米技术、茶叶精深加工, E-mail: xiaoronglin@scau.edu.cn。

Abstract: Objective: In order to explore the mechanisms behind the anti-inflammatory potentials of black tea from *Camellia ptilophylla* Chang (*C. ptilophylla*) (BTCP). Method: The bioactive components of the methanol extracts of BTCP were firstly detected via ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS). Additionally, the bioactive components, targets, and signal pathways involved in the anti-inflammatory effects of BTCP were predicted by network pharmacology (NP). Then, the interactions between the bioactive components and the targets were evaluated using molecular docking (MD). Finally, Inflammatory cell model was used to verify the inhibitory effects of the bioactive components on nitric oxide *in vitro*, a pro-inflammatory cytokine. Result: A total of 213 active components were identified from BTCP, and the core anti-inflammatory polyphenols such as anthocyanin, naringin, luteolin and quercetin were screened. In addition, 493 potential anti-inflammatory targets were collected, and tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL-6) were predicted. IL-6 and other nine key targets and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and other signaling pathways. Preliminary results showed that eleven anti-inflammatory active components, especially nine polyphenols such as luteolin, could stably bind to the main target, and luteolin and quercetin could significantly inhibit the production of nitric oxide (NO) in mouse macrophage RAW264.7 induced by lipaccharide. The semi-inhibitory concentrations were 18.91 and 43.76 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Conclusion: Polyphenol compounds such as luteolin in BTCP would exert remarkable anti-inflammatory activity through the regulation on multiple targets including TNF and IL-6 and various pathways such as PI3K-Akt and MAPK. The present study provides a theoretical basis for further elucidation of the anti-inflammatory potentials of *C. ptilophylla*.

Key words: *Camellia ptilophylla*; anti-inflammatory; mechanism; high-resolution mass spectrometry; network pharmacology

茶叶是世界三大无酒精饮料之一,富含茶多酚、咖啡碱、茶氨酸等特殊次生代谢组分,具有“安心、益气、聪察、少卧、轻身、耐老”等保健功效^[1]。20 世纪 80 年代,中山大学山茶科分类权威张宏达教授在广东省龙门县发现了天然低咖啡碱茶树资源—南昆山毛叶茶(*Camellia ptilophylla* Chang)^[2],不同于普通茶树(*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)以咖啡碱为主要嘌呤生物碱,南昆山毛叶茶不含或仅含少量咖啡碱,但可可碱含量高达 3%~7%;而儿茶素类物质以没食子儿茶素没食子酸酯(Gallocatechin gallate, GCG)等反式构象为主^[3-4],花青素含量高^[5],具有较强的抗炎^[6]、抗氧化^[7-8]、抗癌^[9-10]、降血脂^[5]等活性,特别是其红茶、绿茶的抗炎活性均显著强于普通茶树^[11-12]。本团队前期研究发现,GCG 等儿茶素是南昆山毛叶绿茶主要的抗炎活性组分,能够有效抑制一氧化氮合成酶和 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达,降低炎性介质 NO 的产生^[12]。但其红茶的抗炎活性组分及其作用机制尚未系统研究。南昆山毛叶红茶通过全发酵工艺加工而成,由于酶促氧化等生化作用,其理化组成明显改变,且多种活性组分间存在复杂的相互作用,因而其抗炎等功能活性的发挥可能存在多靶点、多通路等特点^[13-14],仅通过传统的理化分析、细胞模型和分子生物学研究技术,难以全面分析其理化组分,系统揭示其功能特性及相关机制。

超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术具有高分离效能、高灵敏度和高分辨率等优势,近年来已成为食品、医药、生物等复杂体系化合物组成分析的有效手段。网络药理学借助计算机和数据库,通过对现有基因、靶点、疾病和药物等信息的分析和模拟,预测药物、靶点、疾病之间的关系,为进一步采用细胞、

动物模型及分子生物学等技术,靶向验证药物的作用机制提供依据。基于此,本研究以南昆山毛叶红茶醇提物为研究材料,利用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术更全面地鉴定其活性组分,通过网络药理学等方法预测其抗炎活性组分、作用靶点及相关信号通路,借助分子对接技术验证主要抗炎活性组分与靶点的结合能力,最后通过脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞模型验证核心活性组分的抗炎特性,为深入阐释这一珍稀茶树资源的抗炎等功能特性提供前期理论研究基础,为利用高分辨质谱结合网络药理学技术预测茶叶功能特性及作用机制提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

南昆山毛叶茶春梢 1 芽 2~3 叶,采自广东省龙门县南昆山同一年份的 3~4 月,按全发酵加工工艺制成红茶,磨碎后筛取 20~30 目,备用;小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC);表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素(Epigallocatechin gallate, EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯、儿茶素、儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素、GCG、没食子酸、可可碱、咖啡碱、茶碱、茶氨酸、茶黄素、茶黄素双没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-3-没食子酸酯、染料木素、大豆苷、山柰酚、圣草酚、花旗松素、虫草素、芹黄素、高良姜素、杨梅素、白杨素、木犀草素 上海源叶生物技术有限公司;槲皮素、芦丁、半乳糖醇、原花青素 上海麦克林生化有限公司;乙酰丁香酮、3-羟基黄酮、5-羟基黄酮、7-羟基黄酮碱(以上试剂均为色谱纯)、

LPS、磺胺、N-(1-萘基)乙二胺二盐酸 Sigma 公司; L-谷氨酰胺 广州昂飞生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基(含酚红)、青霉素(100 U/mL)/链霉素(100 μ g/mL) 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 美国 Gibco 公司。

Milli-Q Integral 3 纯水机 德国 Merck-Millipore 公司; AL204 电子分析天平 梅特勒托利多仪器有限公司; HWS-24 电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; Centrifuge 5804R 冷冻高速离心机 德国 Eppendorf 公司; Q-Exactive-Ultimate 3000 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱、HERAcell 150i CO₂ 细胞培养箱 美国 Thermo Scientific 公司; VersaMax 酶标仪 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 南昆山毛叶红茶活性组分的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析 参考 Zhang 等^[15]的方法制备南昆山毛叶红茶醇提物。称取磨碎茶样 0.2 g, 放入 10 mL EP 管中, 加入 70 °C 的 70% 甲醇水溶液 5 mL, 立即移入 70 °C 水浴中, 浸提 10 min(隔 5 min 搅拌一次), 取出。以转速 3500 r/min 离心 10 min, 用注射器吸取上清液至 10 mL 容量瓶。残渣用 70% 甲醇水溶液重复提取一次。合并上清液, 用一级水定容至 10 mL, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 待用。

参考林家正^[16]的方法, 通过 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析南昆山毛叶红茶醇提物代谢组分。色谱条件: 色谱柱为 Acquity UPLC T3 柱 1.8 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm, Waters, USA。流动相 A 为 0.1% 甲酸-水, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈, 流速: 0.4 mL/min; 温度: 50 °C; 流动相线性梯度洗脱为: 0 min, 5% B; 0.5 min, 5% B; 18 min, 40% B; 20 min, 90% B; 20.9 min, 90% B; 21 min, 5% B; 25 min, 5% B。进样量为 3 μ L。质谱条件: 扫描模式为正离子和负离子电喷雾模式, 毛细管电压为 3500 V, 毛细管温度为 300 °C, 鞘气流速设置为 45 psi, 辅助气温度和流速分别为 350 °C 和 10 L/min, 质谱质荷比扫描范围: 70~1000 m/z。

利用 Xcalibur 软件和 Amdis 软件对原始数据进行处理, 将得到的一级质谱数据和二级质谱数据分别与 1.1 中标准化合物以及 NIST 数据库、mzCloud 数据库和 HMDB 数据库中的化合物数据进行对比, 鉴定南昆山毛叶红茶醇提物的活性组分。

1.2.2 南昆山毛叶红茶抗炎机制的网络药理学预测

利用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)收集已鉴定活性组分的 SMILES 号, 并导入到 Swiss Target Prediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)预测各组分的潜在作用靶点, 合并、去除重复, 收集南昆山毛叶红茶的潜在作用靶点。

以“inflammation”为关键词, 分别通过人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>), 孟

德尔遗传代谢数据库(OMIM, <https://omim.org/>), DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)和 TTD 数据库(<http://bid.nus.edu.sg/group/cjttd/>)筛选炎症相关的靶点, 并将 GeneCards 数据库中相关靶点的 relevance score 大于平均值的相关靶点和其他 3 个数据库的相关靶点合并, 去除重复, 收集炎症的作用靶点。进而利用 Venny 2.1.0 在线网站(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制南昆山毛叶红茶潜在作用靶点和炎症靶点的韦恩图, 根据交集筛选南昆山毛叶红茶的潜在抗炎靶点。

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)对潜在抗炎靶点基因做蛋白相互作用(Protein-protein interaction, PPI)分析, 物种选择为“Homo sapiens”, 设置置信度(confidence)>0.4, 得到蛋白相互作用网络, 并将网络导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 利用拓扑学参数确定南昆山毛叶红茶的关键抗炎靶点。

利用计算机 R 语言中“ClusterProfiler”、“enrichplot”和“org.s.eg.db”等程序包对交集靶点进行基因注释(Gene Ontology, GO)功能富集和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集。筛选 $P<0.05$ 的富集结果, 根据富集条目数可视化显示 GO 排名前 10 的功能和 KEGG 排名前 20 的通路, 预测南昆山毛叶红茶抗炎靶点相关的分子功能和信号通路。

将上述代谢组分、作用靶点、信号通路, 导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 建立南昆山毛叶红茶抗炎的“组分-靶点-通路”网络, 根据 Degree、平均最短路径、介值大小, 筛选南昆山毛叶红茶的核心抗炎活性组分。

1.2.3 南昆山毛叶红茶抗炎机制的分子对接验证

通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库获得上述核心抗炎组分的 2D 结构, 导入 Chem3D 软件, 进行能量最小化处理, 得到优化后的 3D 结构, 作为配体; 同时利用 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>)数据库获得上述关键靶点的 3D 蛋白结构, 通过 PyMOL 软件去除水分子和配体, 作为受体; 利用 AutoDock 软件中的 Grid box 功能, 设置蛋白原配体为对接盒子中心, 并对配体小分子可能发生的区域进行设定; 利用 AutoDock Vina 分子模拟软件对活性组分配体和蛋白受体进行分子对接分析; 利用 PyMOL 软件对分子对接进行可视化处理, 根据对接结合能评估核心抗炎组分与关键靶点的结合能力, 初步验证南昆山毛叶红茶的抗炎分子机制。

1.2.4 南昆山毛叶红茶活性组分体外细胞模型抗炎作用验证

1.2.4.1 细胞培养 RAW264.7 细胞经解冻复苏后, 置于含 5% 的 CO₂ 培养箱(37 °C)中培养, 培养液成分为 88% 的 DMEM 高糖培养基(含酚红)、1% 的青霉素(100 U/mL)/链霉素(100 μ g/mL)溶液、10% 的胎牛血清与 1% 的 L-谷氨酰胺(4 mmol/L)。用细胞

刮刀刮取细胞继代,每次间隔 2~3 d。

1.2.4.2 实验处理及加样 RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/mL 的浓度接种到 96 孔培养板中,每孔细胞液体积为 200 μL ,于 5% 的 CO_2 培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)中培养 24 h。弃去旧培养液,添加 100 μL 不同浓度的木犀草素、槲皮素、GCG 和 EGC 溶液及 100 μL LPS 溶液(终浓度为 100 ng/mL),混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 培养箱中培养 24 h。

1.2.4.3 NO 含量检测 取 100 μL 细胞上清液与 100 μL Griess 试剂(磺胺:N-(1-萘基)乙二胺二盐酸=1:1)混合,避光放置 10 min 后,在 542 nm 波长下用酶标仪测定 NO 含量。

1.3 数据处理

利用 Excel 及 GraphPad prism 9.0 软件对数据进行统计处理,并利用 GraphPad prism 9.0 软件作图,以 $P<0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果与分析

2.1 南昆山毛叶红茶活性组分鉴定

本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术,分别在正、负离子模式下分析南昆山毛叶红茶醇提物组成,其总离子流图如图 1 所示。通过与标准品和公开数据库的一级和二级质谱数据比对,共鉴定出活性组分 213 种,其中正离子模式下鉴定出 160 种,负离子模式下鉴定出 53 种。进一步按多酚类、有机酸、黄酮糖苷、生物碱、氨基酸、核苷酸及其他类对活性组分进行分类(表 1),多酚类组分占比最高,总数多达 76 种。除普通茶树中常见的表没食子儿茶素没食子酸酯等 8 种儿茶素和槲皮素、杨梅素、花青素等多酚类组分外,还鉴定出普通茶树不含或含量极低的儿茶素-3,5-二没食子酸酯(gallocatechin-3,5-digallate, GC-3,5-diGA)和 1,2,4,6-四没食子酰葡萄糖(1,2,4,6-tetragalloyl glucose, 1,2,4,6-GA-glc),以及由 GCG 和儿茶素合成的茶黄素-3-没食子酸酯的新

型同分异构体^[11]。本团队前期研究发现,南昆山毛叶茶多酚总量显著高于云南大叶种,但其儿茶素总量却低于后者,显示南昆山毛叶茶含有更多非儿茶素的多酚类物质^[6]。此结果表明,利用高分辨质谱技术,在更全面鉴定出南昆山毛叶红茶醇提物化学组分数量的同时,还鉴定出其特殊组分,为进一步利用网络药理学预测其抗炎活性组分及作用机制提供了物质组成的基础数据。

表 1 南昆山毛叶红茶醇提物主要活性组分类别
Table 1 Categories of metabolic compounds in the methanol extracts of black tea from *Camellia pitilophylla*

类别	多酚类	有机酸类	黄酮糖苷类	生物碱类	氨基酸类	核苷酸类	其他
个数	76	38	20	5	20	14	40

2.2 南昆山毛叶红茶抗炎靶点预测

为初步收集南昆山毛叶红茶的抗炎靶点,首先将上述 213 种活性组分的 SMILES 号上传至 Swiss Target Prediction 数据库,预测其作用靶点并去除重复,共得到 920 个潜在作用靶点;同时利用 GeneCards、TTD、OMIM 和 DisGeNET 等 4 个数据库收集炎症靶点,共得到 3092 个炎症靶点,如图 2a 所示。进而利用韦恩图分析炎症靶点与南昆山毛叶红茶活性组分作用靶点的交集靶点,结果如图 2b 所示,共获得南昆山毛叶红茶潜在抗炎靶点 493 个。

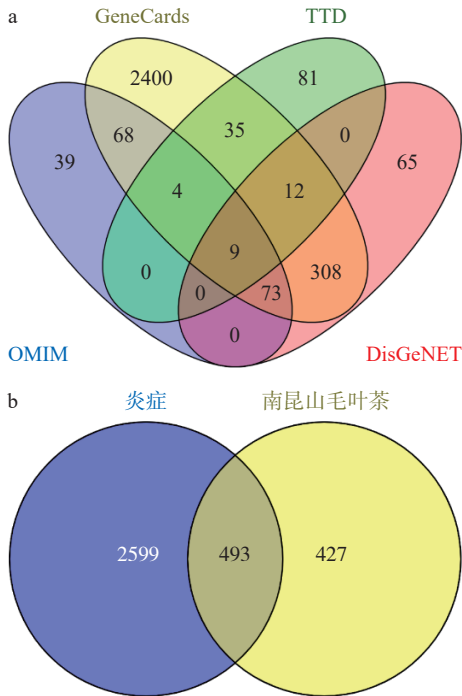


图 2 南昆山毛叶红茶抗炎靶点收集

Fig.2 Target collection of anti-inflammatory effects of black tea from *Camellia pitilophylla*

注: a: 炎症靶点收集; b: 炎症靶点和南昆山毛叶红茶靶点交集。

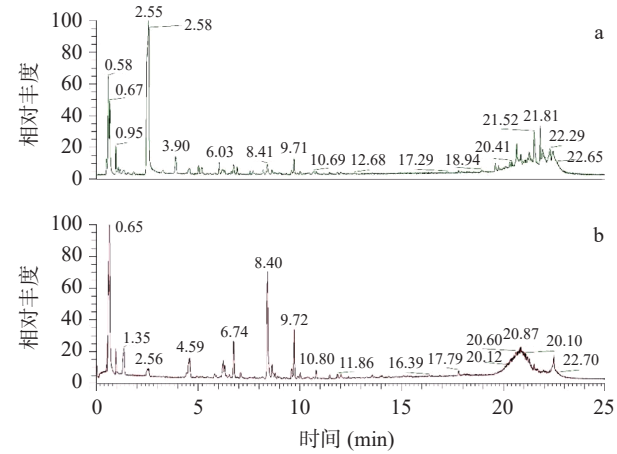


图 1 南昆山毛叶红茶醇提物的总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram for the methanol extracts of black tea from *Camellia pitilophylla*

注: a: 正离子模式; b: 负离子模式。

将上述 493 个潜在抗炎靶点输入 String 平台,得到 PPI 网络,将其导入 Cytoscape 3.8.0 软件进行网络可视化处理。将连线多、Degree 高的靶点作为

关键靶点^[17], 筛选出排名前 30 的靶点作图, 结果如图 3 所示。进一步筛选 Degree>200 的靶点作为南昆山毛叶红茶核心抗炎靶点, 共筛选出 TNF、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase1, AKT1)、IL-6、白蛋白(albumin, ALB)、肿瘤蛋白 p53(Tumor Protein p53, TP53)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、表皮生长因子受体基因(epidermal growth factor receptor, EGFR)、连环蛋白 β 1(catenin beta 1, CTNNB1)等 9 个关键抗炎靶点。

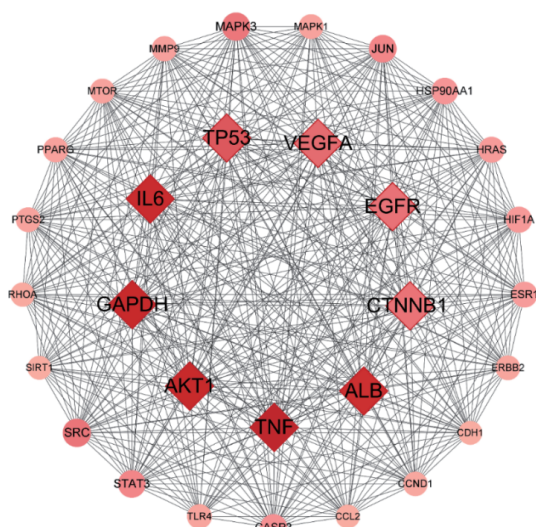


图 3 南昆山毛叶红茶抗炎靶点的 PPI 网络

Fig.3 PPI network for the anti-inflammatory targets of black tea from *Camellia pitilophylla*

本团队前期利用 LPS 诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞炎症模型研究发现, 500 $\mu\text{g/mL}$ 的南昆山毛叶红茶水提取物和乙醇/乙酸乙酯提取物对 TNF- α 产

生的抑制率分别为 50.63% 和 81.01%, 对 IL-6 产生的抑制率高达 84.18% 和 96.75%; 在基因转录水平上, 南昆山毛叶红茶两种提取物均可下调 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达, 减少促炎介质产生^[11,14]; 抑制 LPS 诱导的核转录因子 κB (nuclear factor kappaB, NF- κB)信号通路激活^[11], 说明 TNF- α 和 IL-6 是南昆山毛叶红茶发挥抗炎作用的主要靶点。这与本研究基于网络药理学的预测结果相互印证。此外, 已有研究表明, AKT1^[18]、GAPDH^[19]、ALB^[20]、VEGFA^[21]、EGFR^[22]、CTNNB1^[23]、TP53^[24]等靶点也是炎症反应的相关作用靶点。这一预测结果表明, 南昆山毛叶红茶可能通过多个作用靶点发挥抗炎功能活性。

2.3 南昆山毛叶红茶抗炎靶点的功能与通路分析

为进一步预测南昆山毛叶红茶抗炎活性发挥的分子机制, 本研究利用 R 语言软件对上述收集的 493 个潜在抗炎靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析一共富集了 3465 个生物过程、162 个细胞组分和 318 个分子功能的相关条目, 选取富集结果前 10 的相关条目进行可视化处理, 结果如图 4 所示。由图可知, 南昆山毛叶红茶潜在抗炎靶点主要参与丝裂原活化蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase, MAPK)级联反应调节、应对肽、氧化应激反应等生物过程, 存在于膜筏、膜微结构域、神经元细胞体等细胞组分, 主要行使丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶活性、肽链内切酶活性、酰胺结合活性等分子功能。表明南昆山毛叶红茶的活性组分可能通过上述途径发挥抗炎活性。富集的生物过程中, MAPK 级联反应包括 MAPK 激酶激酶、MAPK 激酶和 MAPK 3 个顺序激活的蛋白激酶, 可通过激活靶因子控制炎症反应, 并且 MAPK 家族的 p38 MAPK 和 NF- κB 激酶亚单位 β 抑制剂磷酸化后可启动炎症因子的转录^[25]。氧化应激和蛋白质氧化可由过多的活

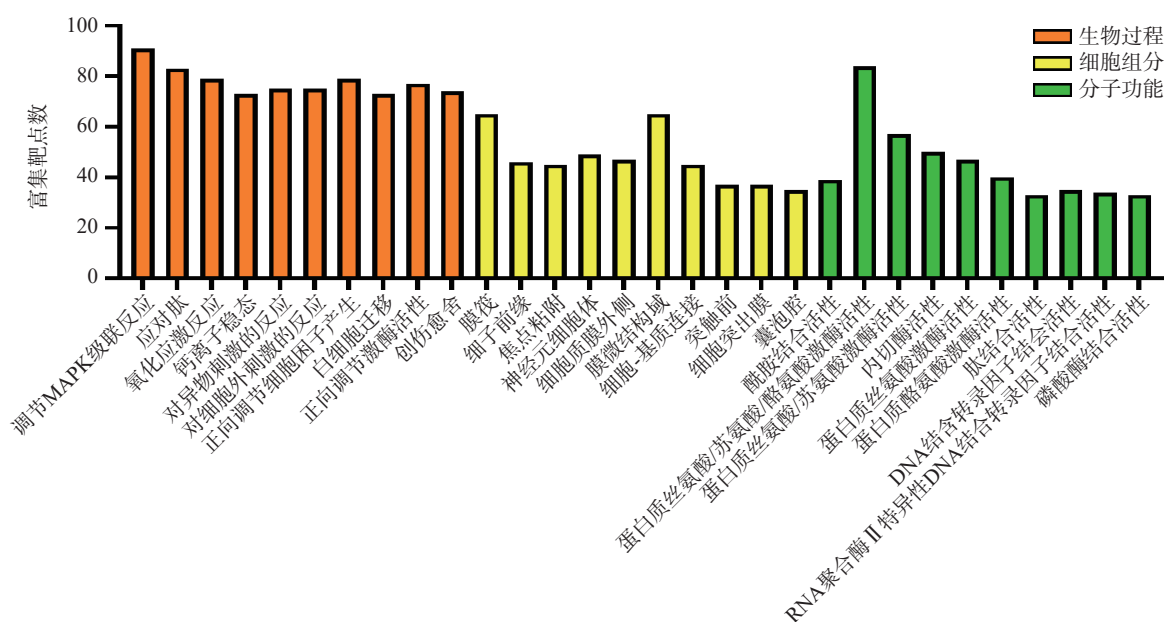


图 4 南昆山毛叶红茶潜在抗炎靶点的 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of the potential anti-inflammatory targets of black tea from *Camellia pitilophylla*

性氧簇(reactive oxygen species, ROS)引起,而蛋白质氧化会导致过氧化物酶的释放,后者可作为一种炎症信号^[26]。另外,由糖尿病引发的氧化应激会提高促炎细胞因子以及 NF- κ B 水平^[27],说明氧化应激与炎症反应密切相关。这些生物过程参与炎症反应,可为后续南昆山毛叶红茶进行抗炎分子机制研究提供理论依据。

KEGG 通路分析一共富集了 193 条相关通路(图 5),显示排名前 20 的富集通路包括磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路、MAPK 信号通路、神经活性配体-受体相互作用通路、脂质和动脉粥样硬化通路、癌症中的蛋白聚糖通路、人巨细胞病毒感染通路、Ras 信号通路、化学致癌-受体激活通路、Rap1 信号通路、焦点粘附通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染通路、乙型肝炎病毒通路、流体剪切力和动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、前列腺癌通路、HIF-1 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路、T 细胞受体信号通路、内分泌耐药性通路、胰腺癌通路。

炎症模型研究发现,南昆山毛叶红茶提取物可通过下调 PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路抑制炎症反应^[11],与本研究利用网络药理学预测的抗炎活性相关分子机制一致。此外,神经疾病和癌症相关通路也被富集为南昆山毛叶红茶抗炎的主要相关通路,已有研究证明,神经疾病患者的血液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的水平升高^[28],并且炎症反应过程中产生的 TNF- α 等细胞因子可诱导正常细胞癌变,并促进肿瘤细胞增殖和转移^[29-30],说明神经疾病和癌症与炎症反应有关,可作为后续深入研究南昆山毛叶红茶抗炎功效的切入点。

2.4 南昆山毛叶红茶核心抗炎活性组分筛选

为进一步预测南昆山毛叶红茶醇提物中对其抗炎功效起作用的关键活性组分,将上述鉴定的

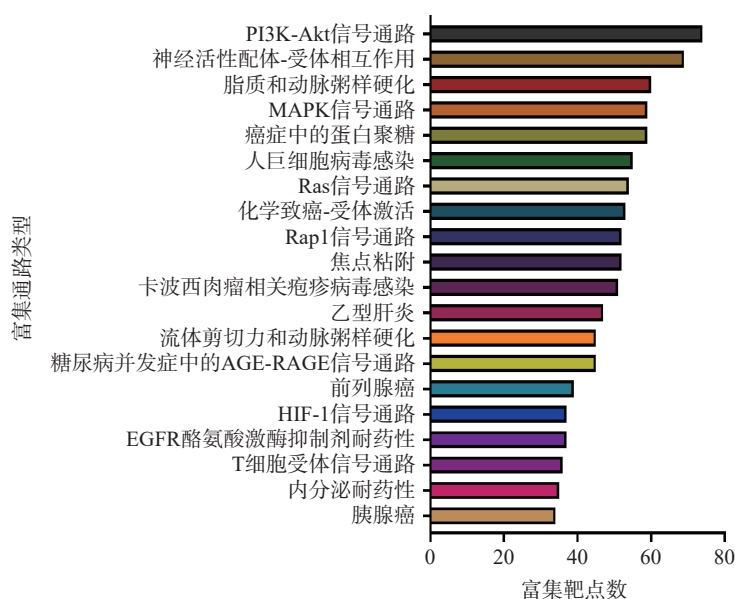


图 5 南昆山毛叶红茶潜在抗炎靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig.5 KEGG pathway enrichment analysis of the potential anti-inflammatory targets of black tea from *Camellia ptilophylla*

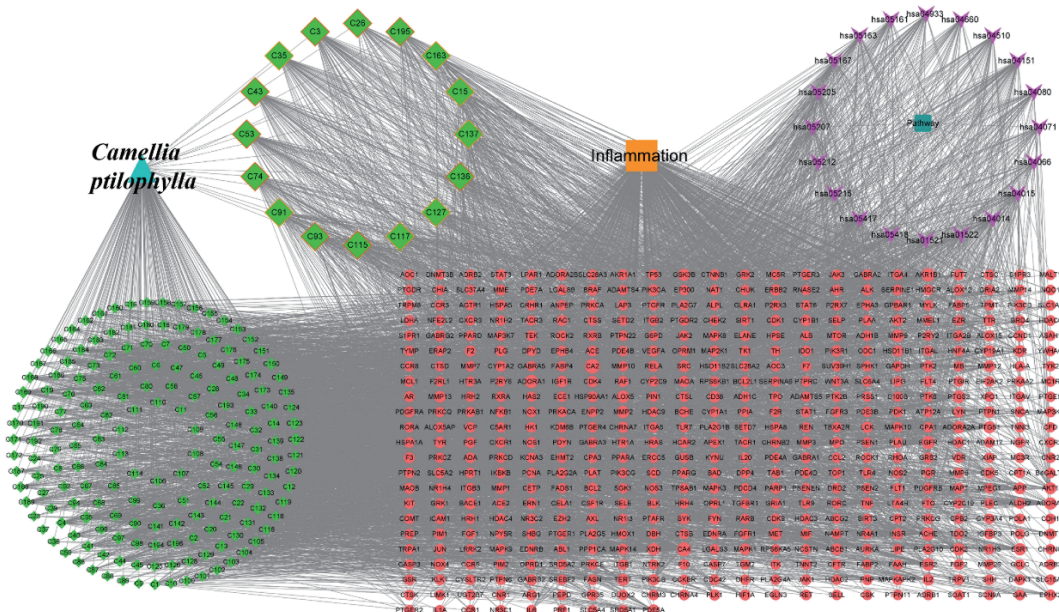


图 6 南昆山毛叶红茶抗炎的组分-靶点-通路网络

Fig.6 Component-target-pathway network of the anti-inflammatory activity of black tea from *Camellia ptilophylla*

213 种活性组分和收集的 493 个潜在抗炎靶点,以及 KEGG 通路富集分析的前 20 条通路导入 Cytoscape 3.8.0 软件,建立南昆山毛叶红茶抗炎的“组分-靶点-通路”网络(图 6)。该网络包括 712 个节点和 5777 条边,绿色、红色、紫色节点分别表示组分、靶点、通路,节点的大小显示 Degree 的大小。由图 6 可知,每个节点平均有 8.11 条连线,表明组分、靶点和通路之间有较强的联系;以 Degree、平均最短路径及介值等拓扑学参数综合评价节点的关键程度,结果如表 2 所示。筛选 Degree>60 的活性组分作为南昆山毛叶红茶核心抗炎活性组分,排名前 16 的有邻苯二甲酸二丁酯、辣椒素、L-茶氨酸、柚皮素、锦葵素、花青素、诺米林、大黄酚、杜鹃素、木犀草素、二氢杨梅素、3-羟基黄酮、芹菜素、异鼠李素、杨梅素、槲皮素,其中 14 种为多酚类物质。这一研究结果提示,多酚类物质是南昆山毛叶红茶的核心抗炎组分。

表 2 南昆山毛叶红茶关键抗炎活性组分的拓扑学参数

Table 2 Topological parameters of the key anti-inflammatory components of black tea from *Camellia ptilophylla*

名称	序号	Degree	平均最短路径	介值	种类
邻苯二甲酸二丁酯	C3	73	2.499297	0.010675	其他
辣椒素	C43	68	2.507736	0.008444	多酚类
L-茶氨酸	C115	67	2.634318	0.001545	氨基酸
柚皮素	C132	67	2.507736	0.006318	多酚类
锦葵素	C122	66	2.513361	0.004017	多酚类
花青素	C53	65	2.516174	0.003715	多酚类
诺米林	C136	64	2.518987	0.008606	多酚类
大黄酚	C195	64	2.5218	0.003105	多酚类
杜鹃素	C74	64	2.518987	0.006574	多酚类
木犀草素	C117	62	2.524613	0.002888	多酚类
二氢杨梅素	C137	62	2.524613	0.006549	多酚类
3-羟基黄酮	C15	62	2.524613	0.003967	多酚类
芹菜素	C35	62	2.524613	0.003009	多酚类
异鼠李素	C91	62	2.524613	0.002779	多酚类
杨梅素	C127	61	2.527426	0.002687	多酚类
槲皮素	C163	61	2.527426	0.002668	多酚类

多酚类物质广泛存在于各类药用、食用植物中,其可通过抑制参与炎症相关的转录因子和调节酶,在抗炎作用中发挥重要作用^[31]。本研究预测的南昆山毛叶红茶核心抗炎组分如木犀草素、槲皮素、花青素等已证明具有抗炎特性^[32-34],但这些多酚类物质对南昆山毛叶红茶抗炎活性的“构效”及其“量效”作用还有待进一步研究。

2.5 南昆山毛叶红茶抗炎机制分子对接验证

为初步验证南昆山毛叶红茶的抗炎分子机制,利用分子对接技术评估上述 9 个关键抗炎靶点和 Degree 排名前 9 的抗炎活性组分,以及木犀草素、槲皮素的对接结合能,以非甾体类抗炎药物阿司匹林^[35-37]为对照。核心靶点 TNF、GAPDH、AKT1、IL6、ALB、TP53、VEGFA、EGFR、CTNNB1 在 RCSBPDB 数据库的编号分别为 5UUI、1U8F、1UNQ、1ALU、

6YG9、4MZI、4KZN、5UG8、7AFW。结果由图 7 可见,85% 以上的活性组分与靶点间的对接结合能都小于-5 kcal/mol;9 种多酚类物质与关键靶点的对接结合能均小于阿司匹林,说明南昆山毛叶红茶的核心抗炎活性组分与关键靶点间亲和力较强^[38]。进而,利用 PyMOL 软件对 AKT1-大黄酚、ALB-杜鹃素、EGFR-辣椒素等 8 组对接结合能较低的靶点与组分间的分子对接结果进行可视化处理,从图 8 结果可知,大黄酚与 AKT1 的 LYS-8 和 HIS-13 形成氢键,杜鹃素与 ALB 的 LYS-199 形成氢键,辣椒素与 EGFR

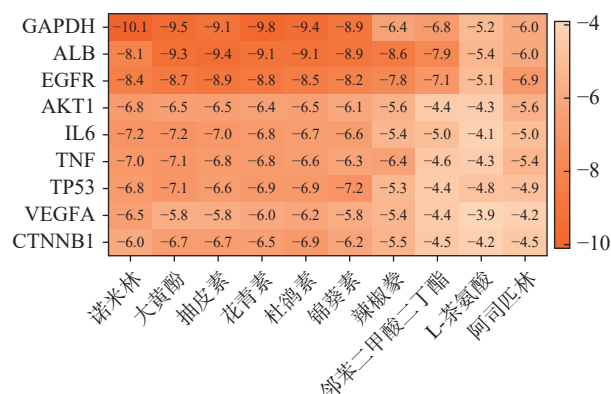
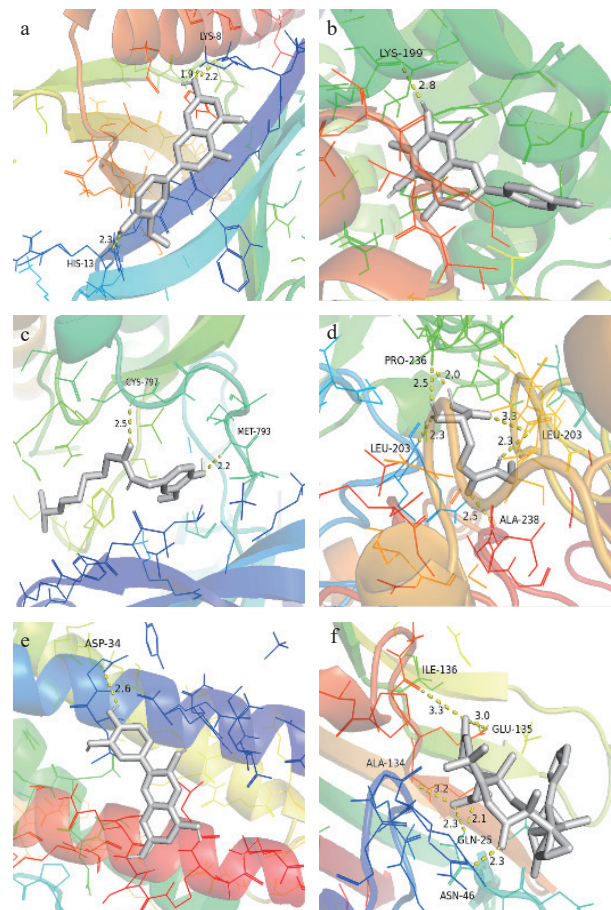


图 7 南昆山毛叶红茶核心抗炎活性组分和关键抗炎靶点的对接结合能热图

Fig.7 Heat map of the docking binding energy between the key anti-inflammatory components and the key targets of black tea from *Camellia ptilophylla*



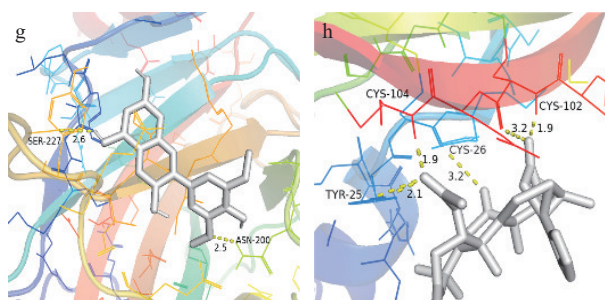


图 8 南昆山毛叶红茶核心抗炎活性组分和关键抗炎靶点的分子对接图

Fig.8 Molecular docking diagram of the key anti-inflammatory components and the key targets of black tea from *Camellia pitilophylla*

注: a: AKT1-大黄酚; b: ALB-杜鹃素; c: EGFR-辣椒素; d: GAPDH-L-茶氨酸; e: IL6-花青素; f: TNF-诺米林; g: TP53-锦葵素; h: VEGFA-柚皮素。图中彩色模型为蛋白质受体,灰色模型为小分子配体,黄色虚线为氢键(Å)。

的 MET-793 和 CYS-797 形成氢键。说明这些多酚类核心抗炎组分均能通过氢键与关键抗炎靶点的不同氨基酸残基稳定结合。

2.6 南昆山毛叶红茶主要抗炎活性组分的体外细胞模型验证

本研究选取网络药理学预测 Degree 值较高的木犀草素(Degree=62)、槲皮素(Degree=61),南昆山毛叶红茶中含量最高的 GCG (Degree=29)^[6],以及 Degree 值较低的 EGC (Degree=6)作为验证组分,以 LPS 诱导的 RAW264.7 体外炎症细胞模型,比较活性组分处理后炎性介质 NO 的产生量,以评价其抗炎活力,结果如图 9 所示。这四种组分均能抑制 NO 的生成,具有抗炎活力,但其抑制 NO 生成的

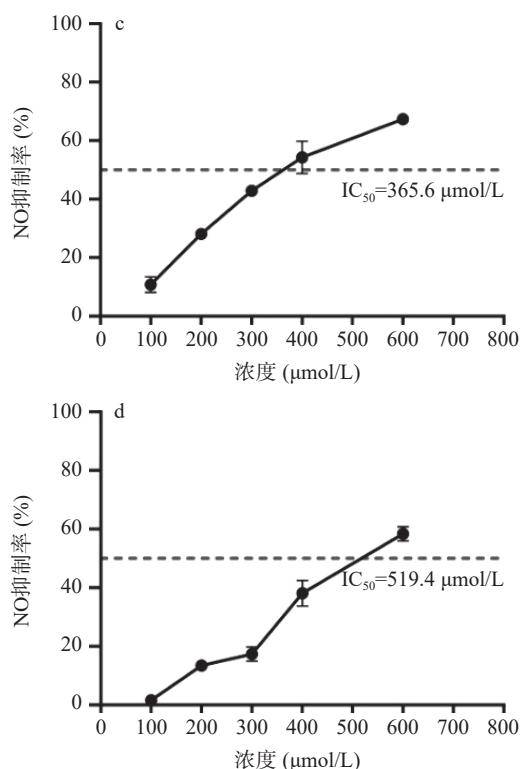


图 9 南昆山毛叶红茶核心抗炎活性组分抑制 NO 生成效果

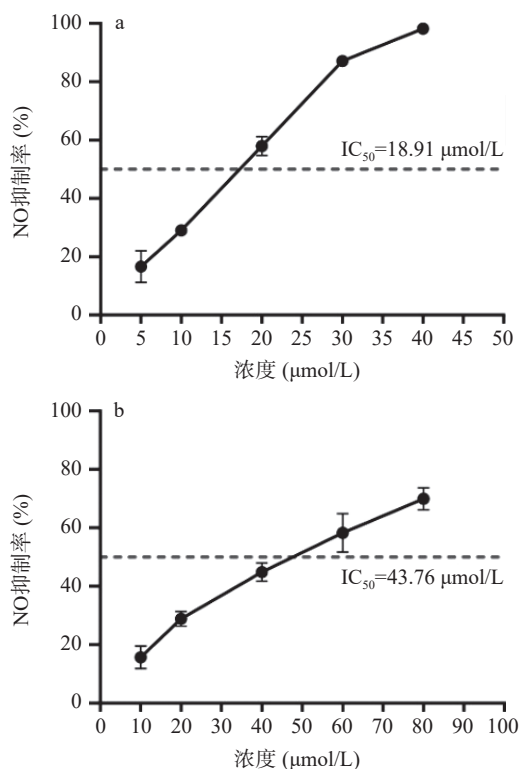
Fig.9 Inhibitory effects on NO production of the key anti-inflammatory components of black tea from *Camellia pitilophylla*.

注: a: 木犀草素; b: 槲皮素; c: GCG; d: EGC。

IC₅₀ 值差异较大,木犀草素为 18.91 μmol/L、槲皮素为 43.76 μmol/L、GCG 为 365.6 μmol/L、EGC 为 519.4 μmol/L。木犀草素、槲皮素显示了较强的抗炎活性,GCG、EGC 的抗炎活性相对较弱。这一体外细胞系验证结果与网络药理学预测显示了一致的抗炎活力强弱变化趋势。研究表明,木犀草素通过下调 p-STAT3 抑制 RAW264.7 细胞中 IL-6、TNF-α 的分泌和炎症因子 iNOS、IL-1β 的表达,发挥抗炎作用^[39];槲皮素通过 PTEN/PI3K/JNK 信号通路减轻小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的炎症^[40],但关于 GCG 和 EGC 对 RAW264.7 细胞炎症的影响研究较少。

3 结论

本研究利用 UPLC-Q-Obitrap HRMS 技术结合网络药理学、分子对接、体外细胞模型等方法,探究了南昆山毛叶红茶发挥抗炎功能的活性组分及分子机制:从南昆山毛叶红茶醇提取物中鉴定出 213 种活性组分,其中 76 种为多酚类组分;预测出 TNF、GAPDH、AKT1、IL6、ALB、TP53、VEGFA、EGFR、CTNNB1 等 9 个关键抗炎靶点和 PI3K-AKT、MAPK 等主要抗炎信号通路;构建了南昆山毛叶红茶抗炎“组分-靶点-通路”网络,筛选出木犀草素、槲皮素、邻苯二甲酸二丁酯、辣椒素、L-茶氨酸、柚皮素、锦葵素、花青素、诺米林、大黄酚、杜鹃素等 16 种抗炎活性组分;利用分子对接技术验证了木犀草素、辣椒素、柚皮素、槲皮素等 9 种多酚组分与关键靶点具有



较好的结合力;RAW264.7 体外细胞模型验证了核心活性组分具有较强的抗炎特性。这些研究结果为靶向揭示南昆山毛叶红茶抗炎等功能特性的活性组分和分子机制,深入挖掘这一珍稀茶树资源的健康功效提供了理论研究基础。未来可在南昆山毛叶红茶醇提物的基础上,利用 UPLC-Q-Obitrap HRMS 等技术,更全面地鉴定这一特殊资源的活性组分;在构效组分鉴定的基础上,深入开展量效关系的研究,并更全面地对网络药理学预测的南昆山毛叶红茶等茶类的抗炎等功能活性的相关分子机制进行深入的验证研究。

参考文献

- [1] 姜新兵. 神农与茶之事渊源考略[J]. 中国茶叶, 2019, 41(11): 60-64. [JIANG X B. A study on the origin of Shen Nong and tea[J]. Chinese Tea, 2019, 41(11): 60-64.]
- [2] 张宏达, 叶创兴, 张润梅, 等. 中国发现新的茶叶资源——可可茶[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1988(3): 131-133. [ZHANG H D, YE C X, ZHANG R M, et al. A discovery of a new tea resource—cocoa tea tree containing theobromine from China[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1988(3): 131-133.]
- [3] 叶创兴, 郑新强, 袁长春, 等. 无咖啡因茶树新资源可可茶研究综述[J]. 广东农业科学, 2001(2): 12-15. [YE C X, ZHENG X Q, YUAN C C, et al. A review of research on new resource-cocoa tea from decaffeinated tea plants[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2001(2): 12-15.]
- [4] YANG X R, YE C X, XU J K, et al. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC[J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1132-1136.
- [5] LI K, LIU C, TAM J C, et al. *In vitro* and *in vivo* mechanistic study of a novel proanthocyanidin, GC-(4→8)-GCG from cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) in antiangiogenesis[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014, 25(3): 319-328.
- [6] LIN X, CHEN Z, ZHANG Y, et al. Interactions among chemical components of Cocoa tea (*Camellia ptilophylla* Chang), a naturally low caffeine-containing tea species[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1175-1185.
- [7] 曾卫强, 蒋建敏. 可可茶抗氧化作用初探[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(20): 37-38. [ZENG W Q, JIANG J M. A Preliminary study on the antioxidant activity of cocoa tea[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2010, 19(20): 37-38.]
- [8] LI K, SHI X, YANG X, et al. Antioxidative activities and the chemical constituents of two Chinese teas, *Camellia kucha* and *C. ptilophylla*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(5): 1063-1071.
- [9] GAO X, LI X, HO C T, et al. Cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) induces mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells via ROS generation and PI3K/Akt signaling pathway[J]. Food Research International, 2020, 129: 108854.
- [10] YANG X, WANG Y, LA K, et al. Inhibitory effects of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) in human hepatocellular carcinoma HepG2 *in vitro* and *in vivo* through apoptosis[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(9): 1051-1057.
- [11] GAO X, LIN X, HO C, et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of water extract from black cocoa tea[J]. Food Research International, 2022, 161: 111831.
- [12] GAO X, LIN X, LI X, et al. Cellular antioxidant, methylglyoxal trapping, and anti-inflammatory activities of cocoa tea (*Camellia ptilophylla* Chang)[J]. Food & Function, 2017, 8(8): 2836-2846.
- [13] 应思慧. 南昆山毛叶茶活性组分抗炎、抗癌相互作用及分子机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2022. [YING S H. Combinational inhibitory effects and molecular mechanism of major Bioactive compounds from *Camellia ptilophylla* Chang on inflammation and carcinogenesis[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2022.]
- [14] 高雄. 南昆山毛叶茶抗癌、抗炎、抗氧化及丙酮醛捕获功能特性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017. [GAO X. Anti-cancer, anti-inflammatory, antioxidant, and methylglyoxal trapping properties of cocoa tea[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2014.]
- [15] ZHANG L Q, WEI K, CHENG H, et al. Accumulation of catechins and expression of catechin synthetic genes in *Camellia sinensis* at different developmental stages[J]. Botanical Studies, 2016, 57(1): 31.
- [16] 林家正. 红光光照对茶鲜叶萎凋中代谢产物的影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021. [LIN J Z. Effect of red light on the metabolites of fresh tea leaves withering[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2021.]
- [17] 杨娟, 豆佳红, 孙悦龙, 等. 基于网络药理学与分子对接和实验验证探讨费菜抗炎作用的分子机制[J]. 食品工业科技, 2023, 44(4): 12-21. [YANG J, DOU J H, SUN Y L, et al. Molecular mechanism of *Phedimus aizoon* (Linnaeus)'t Hart. on anti-inflammatory effect based on network pharmacology and molecular docking and experiment research[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(4): 12-21.]
- [18] CHEN R, MOSCA G, DIETRICH M, et al. Akt1 regulates the development of inflammation and tissue regeneration during acute pancreatitis[J]. Pancreatology, 2016, 16(3, Supplement 1): S13-S14.
- [19] De JESUS A, KEYHANI-NEJAD F, PUSEC C M, et al. Hexokinase 1 cellular localization regulates the metabolic fate of glucose[J]. Molecular Cell, 2022, 82(7): 1261-1277.
- [20] 吴旭斌, 杨成梯, 余静, 等. 炎症在高血压病患者肾功能损害中的作用[J]. 高血压杂志, 2003(1): 19-21. [WU X B, YANG C T, YU J, et al. The significance of inflammation on renal damage in patients with essential hypertension[J]. Chinese Journal of Hypertension, 2003(1): 19-21.]
- [21] 张敏杰, 刘畅, 方翼. 糖尿病肾病肾组织的自噬与凋亡及炎症的相互关系[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(19): 1972-1975. [ZHANG M J, LIU C, FANG Y. The Interrelationship between autophagy, apoptosis and inflammation in diabetic nephropathy renal tissue[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2017, 33(19): 1972-1975.]
- [22] TAO X, LIU H, XIA J, et al. Processed product (*Pinelliae Rhizoma Praeparatum*) of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. Alleviates the allergic airway inflammation of cold phlegm via regulation of PKC/EGFR/MAPK/PI3K-AKT signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 295: 115449.
- [23] SAITTA C, LANZA M, BERTUCCIO A, et al. Evaluation of CTNNB1 and TP53 variability in patients with hepatocellular carcinoma and occult hepatitis B virus infection[J]. Cancer Genetics, 2015, 208(10): 513-516.
- [24] SIMONS R L, LEI M, CARTER S, et al. Inflammation medi-

ates the effect of discrimination, religiosity, and friendship network on expression of the TP53 cancer suppressor gene[J]. *Ssm-Population Health*, 2019, 7: 100389.

[25] 巩婷婷, 司凯, 刘会平, 等. MAPK 级联调控细胞生长及其在免疫、炎症及癌症中作用的研究进展[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(12): 1721–1728. [GONG T T, SI K, LIU H P, et al. Research advances in the role of MAPK cascade in regulation of cell growth, immunity, inflammation, and cancer[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2022, 47(12): 1721–1728.]

[26] SALZANO S, CHECONI P, HANSCHMANN E, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(33): 12157–12162.

[27] PRABHAKAR O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2013, 386(8): 705–710.

[28] BEHL T, RANA T, ALOTAIBI G H, et al. Polyphenols inhibiting MAPK signalling pathway mediated oxidative stress and inflammation in depression[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 146: 112545.

[29] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(5): 361–371.

[30] SANTIBAÑEZ J F, QUINTANILLA M, BERNABEU C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions[J]. *Clinical Science*, 2011, 121(6): 233–251.

[31] GONZÁLEZ-GALLEGO J, GARCÍA-MEDIAVILLA M V, SÁNCHEZ-CAMPOS S, et al. Chapter 28-Anti-inflammatory, immunomodulatory, and prebiotic properties of dietary flavonoids[M]. WATSON R R, PREEDY V R, ZIBADI S. Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition). Academic Press, 2018: 327–345.

[32] LESJAK M, BEARA I, SIMIN N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 68–75.

[33] LI F, LANG F, WANG Y, et al. Cyanidin ameliorates endotoxin-induced myocardial toxicity by modulating inflammation and

oxidative stress through mitochondria and other factors[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 120: 104–111.

[34] ZHOU Z, CHEN J, ZHANG Z, et al. Solubilization of luteolin in PVP40 solid dispersion improves inflammation-induced insulin resistance in mice[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 174: 106188.

[35] 潘丽婷, 陈桢玥, 陆国平. 阿司匹林在动脉粥样硬化中的抗炎作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2012, 32(4): 519–523.

[PAN L T, CHEN Z Y, LU G P. Anti-inflammatory action of aspirin in atherosclerosis[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2012, 32(4): 519–523.]

[36] 王桂红, 王拥军. 小剂量阿司匹林在动脉粥样硬化中的抗炎作用[J]. *中国卒中杂志*, 2008(4): 291–296. [WANG G H, WANG Y J. The Action of anti-inflammation of low-dose Aspirin in atherosclerotic disease[J]. *Chinese Journal of Stroke*, 2008(4): 291–296.]

[37] 王士博. 阿司匹林对阿尔茨海默病模型鼠海马区炎症因子表达影响及机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017. [WANG S B. The effects and mechanisms of Aspirin on inflammatory factors of hippocampal neurons in AD model rats[D]. Shanghai: Naval Medical University, 2017.]

[38] KUN-YI H, SAMIK G, HIROAKI K. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.

[39] 祝珊珊, 谭博文, 秦飞, 等. 槲皮素通过 PTEN/PI3K/JNK 信号通路减轻小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(3): 510–519. [ZHU S S, TAN B W, QIN F, et al. Quercetin attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide-induced mouse RAW264.7 macrophages via regulating PTEN/PI3K/JNK pathway[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2023, 39(3): 510–519.]

[40] 王旭光, 陈根殷, 陈妙萍. 木犀草素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 COX-2 及 mPGES-1 表达的影响[J]. *中草药*, 2007, 30(10): 1263–1266. [WANG X G, CHEN G Y, CHEN M P. Effect of luteolin on COX-2 and PEGS-1 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(10): 1263–1266.]