

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学探讨夏枯草茎叶抗炎有效成分及其作用机制

谭知浩^{1,2}, 肖志葵^{1,2}, 罗弘杉^{1,2}, 李亚梅^{1,2*}, 林丽美^{1,2*}

1. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS)、网络药理学、分子对接及分子动力学模拟探究夏枯草茎叶总酚抗炎有效成分及其作用机制。方法 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对夏枯草茎叶水提物中成分进行分析; 使用 Swiss Target Prediction、GeneCards 和 OMIM 数据库筛选夏枯草抗炎作用对应的靶点; 使用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建关键靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络; 通过 Metascape 数据库对关键靶点进行基因本体论 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析; 通过 TCMSP、PDB 数据库对已鉴定的成分与核心靶点进行分子对接; 采用 amber18 软件包, 取对接结合能前 3 位的对接复合物分别进行 200 ns 的分子动力学模拟。结果 共鉴定出异迷迭香酸苷、紫草酸、染料木素、槲皮素和丹参酚酸 Y 等 22 个化合物, 其中酚酸类 16 种, 黄酮类 6 种。基于鉴定出的化合物通过网络药理学得到 502 个潜在抗炎靶点, PPI 分析发现肿瘤蛋白 (TP53)、信号传导和转录激活蛋白 3 (STAT3)、转录因子 AP-1 (JUN)、低氧诱导因子-1A (HIF1A)、黏着连接蛋白 β 1 (CTNNB1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (CASP3)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等为核心靶点, 富集分析发现核心靶点可能通过调节程序性死亡受体 1 (PD-1)、白细胞介素-17 (IL-17) 和晚期糖基化终末产物 (AGE)/AGEs 受体 (RAGE) 等信号通路发挥抗炎作用, 分子对接与分子动力学模拟实验表明已鉴定出的成分与关键靶点均能自由结合, 结合能前 3 位的分子与受体蛋白复合物具有较稳定构象, 结合后不会导致其构象发生持续的、显著的改变。结论 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和网络药理学可实现对夏枯草茎叶抗炎物质基础挖掘和机制预测, 有助于夏枯草非药用部位资源的开发利用。

关键词: 夏枯草茎叶; 酚酸类; 抗炎; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟; 异迷迭香酸苷

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)04-0795-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.007

Effective components of *Prunella vulgaris* stem and leaf and their anti-inflammatory mechanism based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology

TAN Zhi-hao^{1,2}, XIAO Zhi-kui^{1,2}, LUO Hong-shan^{1,2}, LI Ya-mei^{1,2}, LIN Li-mei^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the effective components of *Prunella vulgaris* stem and leaf total phenols and their anti-inflammatory mechanisms based on UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation. **Methods** UHPLC-Q-TOF-MS/MS was used to analyze the total phenols in the aqueous extract of *Prunella vulgaris* stem and leaf. Using databases such as Swiss Target Prediction, GeneCards, and OMIM to screen the target corresponding to the anti-inflammatory effect of *Prunella vulgaris*. The key target protein interaction (PPI) network was constructed using STRING database and Cytoscape software. GO function and KEGG signal pathway enrichment analysis of key targets were conducted through Metascape database. Molecular docking between identified components and core targets was conducted by TCMSP and PDB databases. amber18

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 湖南省教育厅重点项目 (20A380)

作者简介: 谭知浩, 男, 硕士研究生, 主要从事中药分析学研究。E-mail: haoyue9881@qq.com

*通信作者: 李亚梅, 女, 实验师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: yameili@hnucm.edu.cn

林丽美, 女, 教授, 主要从事中药分析学研究。E-mail: lizasmile@163.com

software package was used to simulate 200 ns molecular dynamics of the docking complexes with the top 3 positions of bonding energy. **Results** A total of 22 compounds were identified, including salviaflaside, lithospermic acid, genistein, quercetin, and salvianolic acid Y, among which 16 kinds of phenolic acids and 6 kinds of flavonoids were identified. Based on the identified compounds, 502 potential anti-inflammatory targets were identified through network pharmacology. PPI analysis found that TP53, STAT3, JUN, HIF1A, CTNNB1, CASP3, and TNF were the core targets. Enrichment analysis revealed that core targets may play an anti-inflammatory role by regulating signaling pathways such as programmed death receptor 1 (PD-1), interleukin-17 (IL-17), and advanced glycation end-products/AGEs receptor (AGE-RAGE). The results of molecular docking and molecular dynamics simulation showed that the identified components were free to bind to the key targets, and the binding energy of the top 3 molecules and the receptor protein complex had relatively stable conformation, which did not lead to sustained and significant changes in conformation after binding. **Conclusion** Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS technology and network pharmacology, we can realize the basic excavation and mechanism study of anti-inflammatory substances in the stems and leaves of *Prunella vulgaris*, which is helpful to the development and utilization of the resources of non medicinal parts of *Prunella vulgaris*.

Key words: *Prunella vulgaris* stem and leaf; phenolic acids; anti-inflammation; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulation; salviaflaside

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科多年生草本植物, 药用部位为果穗, 具有清肝泻火、明目、散结消肿之功效, 主治目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰癧、癭瘤、乳痈、乳癖、乳房胀痛^[1]。夏枯草植株茎高达 30 cm, 其中非药用部位(茎叶)所占生物量比例大, 果穗仅占小部分, 造成了夏枯草资源的大量浪费。前期研究发现, 不同产地夏枯草茎叶与果穗化学成分相似, 两者均具有较强抗炎活性^[2], 进一步研究发现夏枯草茎叶总酚具有较好的抗炎活性, 为夏枯草非药用部位茎叶的有效组分^[3]。因此, 为探究夏枯草茎叶总酚抗炎的有效成分和作用机制, 本实验采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对夏枯草茎叶总酚类成分进行鉴定, 并利用网络药理学预测所鉴定成分的抗炎机制, 再通过分子对接和分子动力学模拟实验进行验证, 为夏枯草非药用部位资源的利用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验所用夏枯草采收于江西药材基地, 经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥全草。

1.2 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱系统、Agilent 1290 型高效液相色谱系统、6454Q-TOF 质谱仪(美国安捷伦公司); AL104 型万分之一电子天平(德国梅特勒托利多公司); DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

2 方法

2.1 夏枯草茎叶总酚制备与鉴定

2.1.1 夏枯草茎叶总酚的制备 取干燥的夏枯草茎叶, 剪短, 粉碎, 过 60 目筛。精密称定夏枯草茎叶样品 1.0 g, 加入 30 倍量的蒸馏水, 回流提取 120 min、提取 3 次, 将提取液浓缩后冷冻干燥得到夏枯草茎叶总酚。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定夏枯草茎叶总酚 10 mg, 以甲醇作为溶剂, 配制质量浓度为 2 mg/mL 的溶液。将样品离心(13 000 r/min, 离心半径 4 cm, 10 min), 取上清液进行质谱分析。

2.1.3 检测方法 色谱条件: 安捷伦 ZORBAX Eclipse Puls C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B), 梯度洗脱, 0~10 min: 10%→20% A, 10~15 min: 20%→38% A, 15~25 min: 38%→80% A, 25~28 min: 80%→100% A, 28~32 min: 100% A, 32~34 min: 100%→5% A; 体积流量: 0.3 mL/min; 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

质谱条件: 负离子模式, 电喷雾电离(ESI), 干燥气(氮气)体积流量: 8 L/min; 干燥气温度: 320 °C; 雾化器压力: 35 psi (1 psi=6 895 Pa); 毛细管电压: 3 000 V; 碰撞诱导解离电压: 150 V; Skimmer 电压: 65 V; 数据采集(*m/z*): 50~1 100。数据采集和处理分别采用 MassHunter Acquisition Software 和 MassHunter Workstation software (VB.04.00) 软件(美国安捷伦公司)。

2.1.4 化合物结构鉴定 按照上述质谱条件进样后, 得到负离子模式下质谱数据, 采用 Qualitative

Navigator B.08.00 质谱分析软件进行数据采集和预测化合物分子式, 收集文献报道中已发现的夏枯草的酚酸和黄酮类成分, 根据保留时间、分子式和裂解规律等信息进行数据比对, 确认化学成分及结构信息, 并推导化合物的质谱裂解规律。

2.2 基于网络药理学预测夏枯草茎叶抗炎作用机制

2.2.1 成分相关靶点筛选 通过 DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca>)^[4] 查询所鉴定化合物的 SMILES 号, 未检索到的化合物利用 ChemDraw 绘制化合物结构, 获得 mol 格式文件后使用 Open Babel 分子格式转换工具获得 SMILES 号, 上传 SMILES 号于 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>)^[5], 设置属性为“Homo sapiens”, 获取靶点信息。

2.2.2 炎症相关靶点筛选及共同靶点 采用“inflammation”作为关键词, 检索 GenCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[6], OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)^[7], TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)^[8], 得到炎症相关靶点。在 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 上取依据成分所获靶点和炎症相关靶点的交集, 得共同靶点。

2.2.3 PPI 网络构建 将上述得到的共同靶点上传至 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>)^[9], 选择“Homo sapiens”为物种, 靶点关联的置信度为 0.40, 获取 PPI 网络图, 并通过 Cytoscape_v3.9.1 软件^[10]分析, 利用 cytoHubba 插件中的 MCC 算法识别 PPI 网络的 hub 基因。

2.2.4 核心靶标的基因本体论 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 将前 20 位的核心靶点导入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>)^[11]进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 设置“Homo sapiens”为物种, 然后利用微生物信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化分析。

2.2.5 分子对接 取已鉴定 22 个成分与排名前 10 位的核心靶点进行分子对接。从 TCMSP 数据库 (<http://tcmisp-e.com>)^[12]获取小分子的 mol2 格式文件, 未得到 mol2 格式文件的小分子从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[13]下载 sdf 格式文件, 后使用 Chem3D 软件获得 mol2 格式文件。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)^[14]下载

核心靶点的 3D 结构 pdb 格式文件。采用 AutoDockTools-1.5.6 软件^[15]对小分子和靶蛋白数据进行加氢、去水等处理并保存为 pdbqt 格式文件, 采用 Vina 软件进行对接打分, 采用 Discovery Studio 2019 Client 软件对对接结果进行可视化分析, 做出热图分析。

2.2.6 分子动力学模拟 取对接结合能前 3 位的对接复合物分别进行 200 ns 的分子动力学模拟, 考察小分子与靶蛋白结合的稳定性。模拟过程采用 amber18 软件包^[16]实施。蛋白使用 ff14SB 力场参数, 小分子配体则使用 gaff 通用力场参数, 并使用 ANTECHAMBER 模块计算其 AM1-BCC 原子电荷。将蛋白-小分子复合物载入 tleap 模块, 自动添加氢原子和拮抗离子以中和电荷。选择 TIP3P 显性水模型, 设置周期性边界条件。工作流程如下: (1) 约束蛋白 (和小分子) 重原子, 对水分子进行 10 000 步 (含 5 000 步最速下降法和 5 000 步共轭梯度法) 能量最小化; 随后放开约束, 对整个体系进行 10 000 步能量优化。(2) 在 50 ps 内将体系缓慢加热至 300。(3) 在 npt 系综下对体系进行 50 ps 的平衡。(4) 将体系在 npt 系综下进行 200 ns 的分子动力学模拟, 步长 2 fs。每隔 40 ps 保存一次轨迹数据, 并用 CPPTRAJ 模块进行相关分析。

3 结果

3.1 夏枯草茎叶总酚的鉴定

通过比对文献报道中已发现的夏枯草的酚酸和黄酮类成分化合物的保留时间、质荷比、二级碎片离子及化合物裂解规律等质谱信息, 共鉴定出 22 个化合物, 其中酚酸类 16 种, 黄酮类 6 种, 未发现新的化学成分, 夏枯草茎叶的总离子流图见图 1, 化学成分鉴定结果见表 1。

3.2 基于网络药理学预测夏枯草目标成分抗炎作用机制

3.2.1 成分和疾病靶点的筛选 在 Swiss Target Prediction 数据库中, 鉴定的 22 个化学成分删除重复靶点后得 542 个靶点。合并 GeneCards 数据库、OMIM 数据库和 TDD 数据库中的靶点, 去重后得 11 137 个炎症相关靶点。将成分和疾病靶点在 Venny 2.1 上取交集, 得 503 个共同靶点, 见图 2。

3.2.2 PPI 网络构建及核心靶点筛选 将药物和疾病交集靶点上传至 STRING 数据库, 导出 TSV 文件, 通过 Cytoscape_v3.9.1 软件的 cytoHubba 插件的 MCC 算法识别 PPI 网络的 hub 基因, 取前 20 位

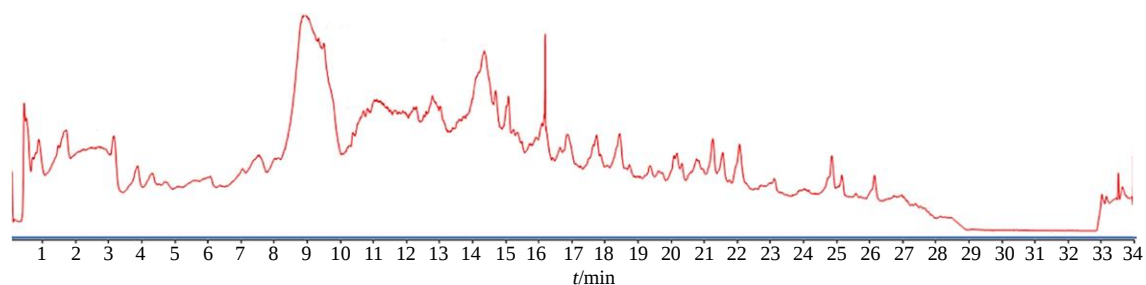


图 1 夏枯草茎叶在负离子模式下总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of *Prunella vulgaris* stem and leaf under negative ion mode

表 1 夏枯草茎叶 22 种成分 MS/MS 数据

Table 1 MS/MS data of 22 components in stems and leaves of *Prunella vulgaris*

序号	tr/min	实测值[M-H] ⁻	理论值	分子式	化合物	特征离子	类型	夏枯草酚酸成分参考文献	成分鉴定参考文献
1	1.246	137.022 9	137.024 4	C ₇ H ₆ O ₃	salicylic acid	93.034 0	酚酸类	[17]	[18]
2	2.741	353.087 3	353.087 8	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	chlorogenic acid	135.044 9、161.023 9、179.035 3、191.056 0	酚酸类	[17]	[19]
3	2.906	179.035 0	179.035 0	C ₉ H ₈ O ₄	caffeic acid	135.044 8	酚酸类	[17]	[20]
4	3.120	193.050 2	193.050 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ferulic acid	135.044 8、179.034 5	酚酸类	[17]	[21]
5	3.137	137.025 5	137.024 4	C ₇ H ₆ O ₃	p-hydroxybenzoic acid	121.029 3	酚酸类	[17]	[22]
6	3.500	181.050 7	181.050 6	C ₉ H ₁₀ O ₄	dihydrocaffeic acid	137.061 8	酚酸类	[23]	[24]
7	3.826	163.039 7	163.040 1	C ₉ H ₈ O ₃	m-coumaric acid	119.049 8	酚酸类	[3]	[3]
8	4.206	163.039 7	163.040 1	C ₉ H ₈ O ₃	p-hydroxycinnamic acid	119.049 8	酚酸类	[25]	[21]
9	4.748	153.019 3	153.019 3	C ₇ H ₆ O ₄	2,5-dihydroxybenzoic acid	109.028 6、137.024 1	酚酸类	[17]	[26]
10	4.762	197.045 0	197.045 5	C ₉ H ₁₀ O ₅	danshensu	123.044 3、135.044 9、179.034 4	酚酸类	[17]	[27]
11	5.362	153.018 2	153.019 3	C ₇ H ₆ O ₄	3,4-dihydroxybenzoic acid	109.028 8、137.024 1	酚酸类	[17]	[26]
12	7.365	347.076 6	347.077 2	C ₁₇ H ₁₆ O ₈	asterric acid	135.044 8、197.045 1、331.081 7	酚酸类	[3]	[3]
13	7.535	359.076 6	359.077 2	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	rosmarinic acid	161.023 8、179.034 4、197.045 0	酚酸类	[17]	[27]
14	12.618	521.129 1	521.130 1	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	salviaflaside	135.045 0、161.024 2、179.034 6、359.076 5	酚酸类	[17]	[23]
15	12.700	537.103 5	537.103 8	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	lithospermic acid	161.024 2、197.045 0、493.113 7	酚酸类	[3]	[3]
16	13.948	717.145 1	717.146 1	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	salvianolic acid Y	161.023 9、311.055 7、357.061 3	酚酸类	[3]	[3]
17	9.543	609.146 1	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	rutinum	581.186 9、463.087 9	黄酮类	[28]	[26]
18	10.411	447.093 2	447.093 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	isoorientin	327.050 0、357.061 0	黄酮类	[29]	[30]
19	10.903	445.113 4	445.114 0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	tilianin	283.061 1、151.039 6	黄酮类	[25]	[31]
20	11.449	253.049 9	253.050 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	daidzein	137.023 7、225.148 9	黄酮类	[23]	[23]
21	13.217	269.045 4	269.045 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	genistein	133.029 0	黄酮类	[23]	[23]
22	13.253	301.035 2	301.035 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetin	151.039 4、179.034 7	黄酮类	[28]	[32]

作为核心靶点进行展示，见图 3。

3.2.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 将上述得到的核心靶点在 Metascape 数据库进行 GO 分析和

KEGG 富集分析，以 $P < 0.01$ 为筛选条件得到 GO 分析结果中生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 相关条目分别为 564、31、33 个。以

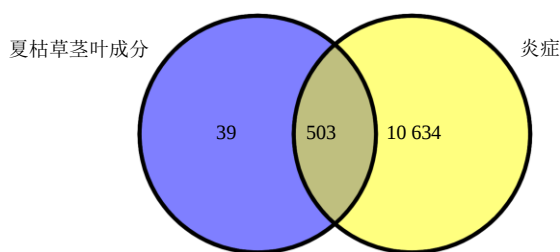


图 2 夏枯草目标化学成分与炎症相关靶点的韦恩图

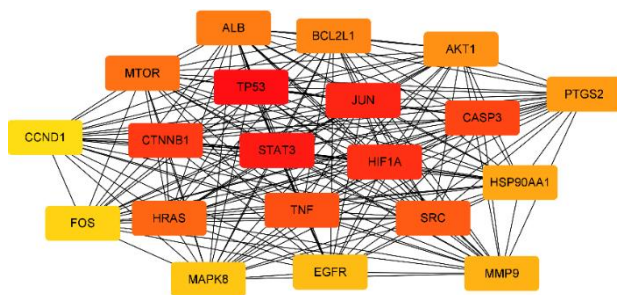
Fig. 2 Venny diagram of aim chemical components of *Prunella vulgaris* and inflammation related targets

图 3 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram

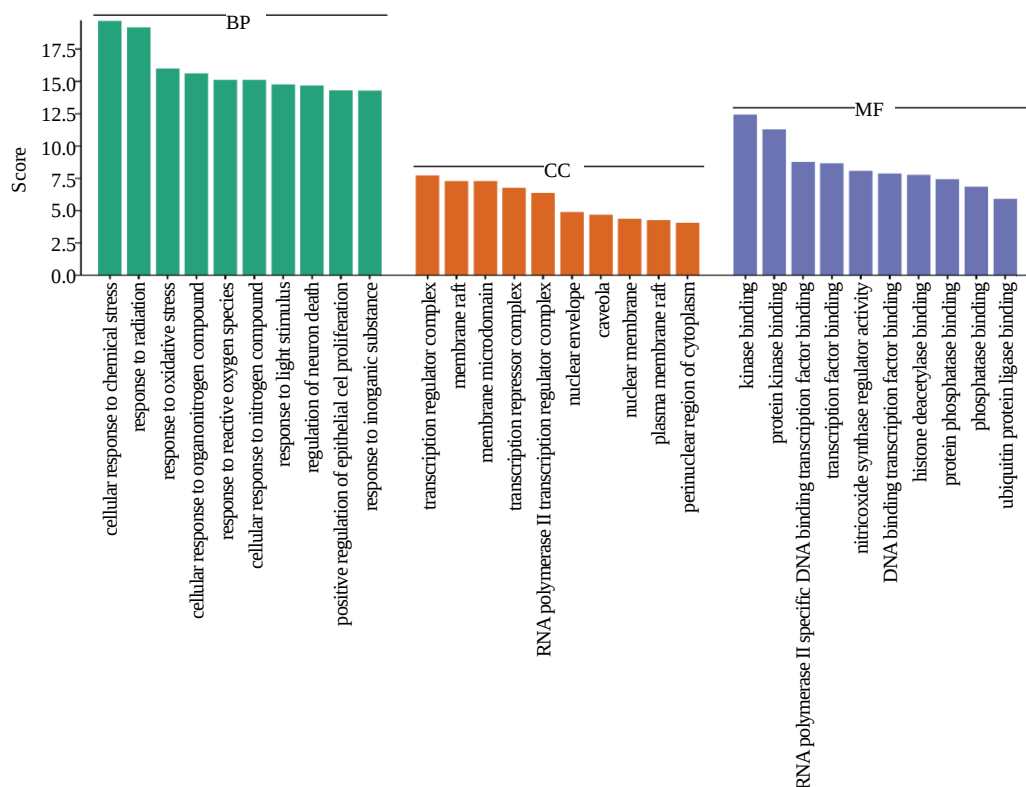


图 4 GO 功能分析

Fig. 4 GO function analysis

-lgP 值来衡量 GO 富集程度, 每组选取前 10 条绘制条形图, 见图 4。GO 功能分析表明, 细胞对化学应激的反应 (cellular response to chemical stress)、对辐射的反应 (response to radiation) 和对氧化应激的反应 (response to oxidative stress) 等是主要参与的 BP; 转录调节复合物 (transcription regulator complex)、膜筏 (membrane raft) 和膜微区 (membrane microdomain) 等为主要 CC; MF 主要与激酶结合 (kinase binding)、蛋白激酶结合 (protein kinase binding) 以及 RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合和转录因子结合 (RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding) 等相关。通路分析得到 130 条 KEGG 富集条目, 以 -lgP 值为条件, 前 20 条通路见图 5。KEGG 富集结果显示, PD-1 信号通路 (PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway) 和 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications) 等为主要富集的通路。

3.2.4 分子对接 对接靶蛋白分别为肿瘤蛋白 (TP53)、信号传导和转录激活蛋白 3 (STAT3)、转

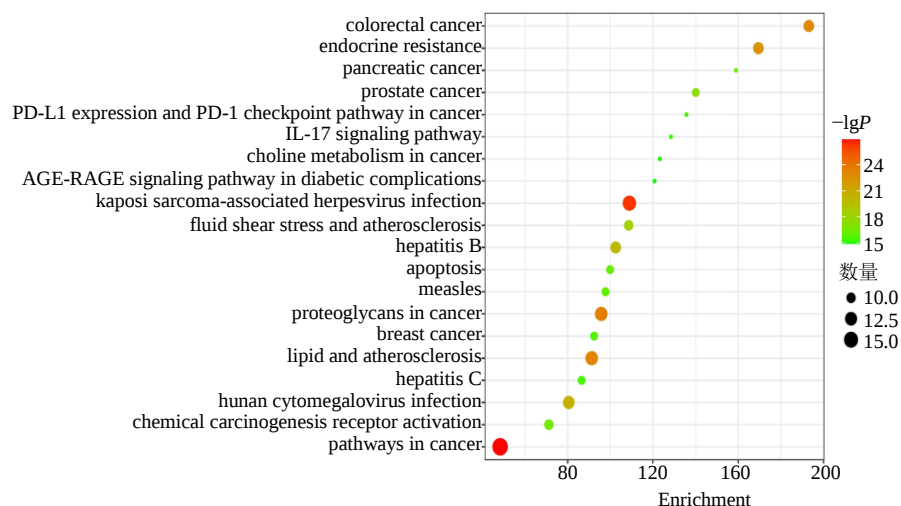


图 5 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

录因子 AP-1 (JUN)、低氧诱导因子-1A (HIF1A)、黏着连接蛋白 β 1 (CTNNB1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (CASP3)、肿瘤坏死因子 (TNF)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、HRAS、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)，结合能热图见图 6，取结合能前 3 位的复合物进行可视化分析，见图 7。如图 7 所示，异迷迭香酸昔结合于受体蛋白表面一个较深的凹槽内，两者具有较好的形状互补性；该结合凹槽具有很好的亲水性能，推测异迷迭香酸昔主要与受体形成亲水作用而稳定结合；与小分子形成氢键作用的残基包括 Asn239、Lys1681、Pro1679、Ser234、

Arg238、Asp280、Arg315、Tyr277 等。紫草酸结合于蛋白-DNA 复合物中 DNA 分子的凹槽内，二者具有较好的形状互补性；紫草酸结合在 DNA 小沟内，主要通过氢键作用稳定结合；紫草酸中的羟基氧、羰基氧可以和多个 DNA 残基形成氢键作用。紫草酸结合于受体蛋白表面一个较深的凹槽内，二者具有较好的形状互补性；该结合凹槽具有很好的亲水性能，推测紫草酸主要与受体形成亲水作用；与紫草酸形成氢键作用的残基包括 Asn239、Lys1681、Pro1679、Ser234、Arg238、Asp280、Arg315、Tyr277 等。

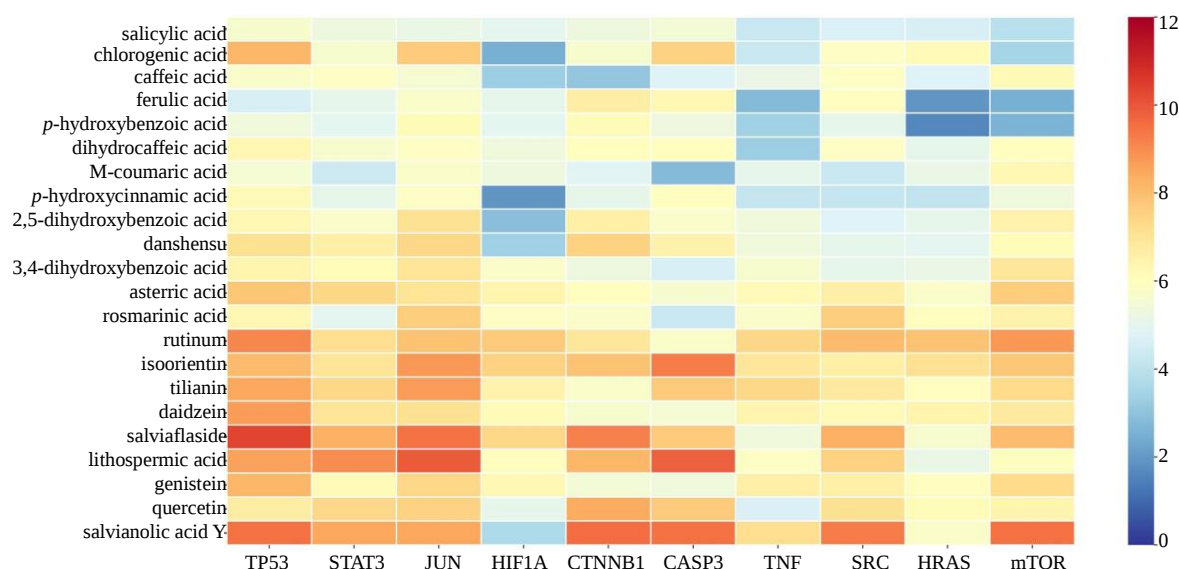


图 6 分子对接数据热图分析

Fig. 6 Heat map analysis of molecular docking data

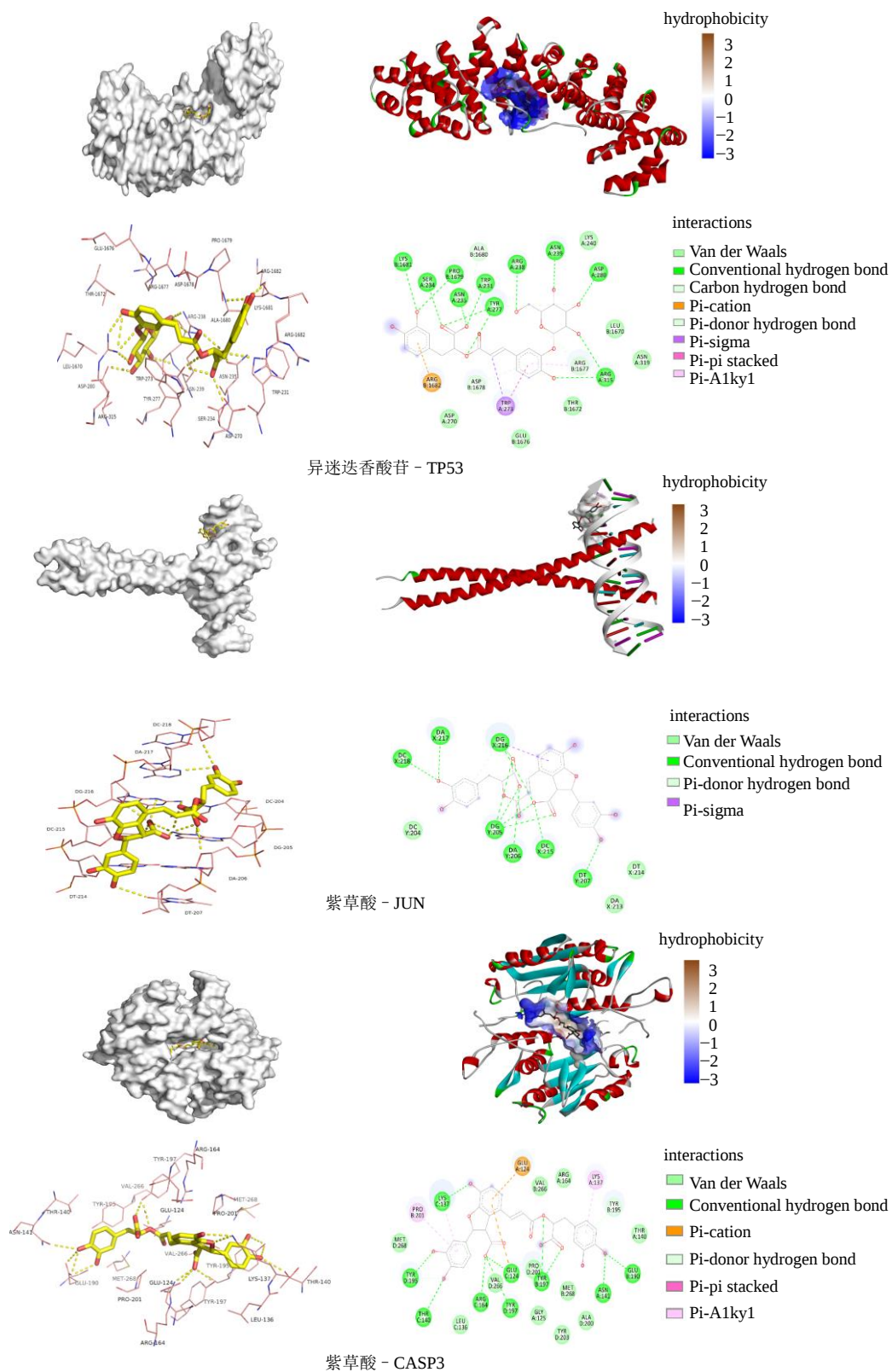


图 7 分子对接可视化图

Fig. 7 Visualization of molecular docking

3.2.5 分子动力学模拟 结合能前 3 位的分子对接复合物的 200 ns 分子动力学模拟的均方根偏差 (RMSD) 见图 8。图 8A 为异迷迭香酸苷与 TP53, 从图中可知, 蛋白的 RMSD 波动均较为平缓, 尤其是 60 ns 后, RMSD 稳定在 2.5 Å (1 Å=0.1 nm) 附近。图 8B 为紫草酸与 JUN, 蛋白的 RMSD 波动均较为平缓, RMSD 稳定在 3 Å 附近。图 8C 为紫草酸与 CASP3, 蛋白的 RMSD 波动均较为平缓, 尤其是 80 ns 后, RMSD 稳定在 2.5 Å 附近。上述结果说明, 小分子结合了受体蛋白后, 不会导致其构象发生持续的、显著的改变, 进一步证明了对接结果的可靠性。

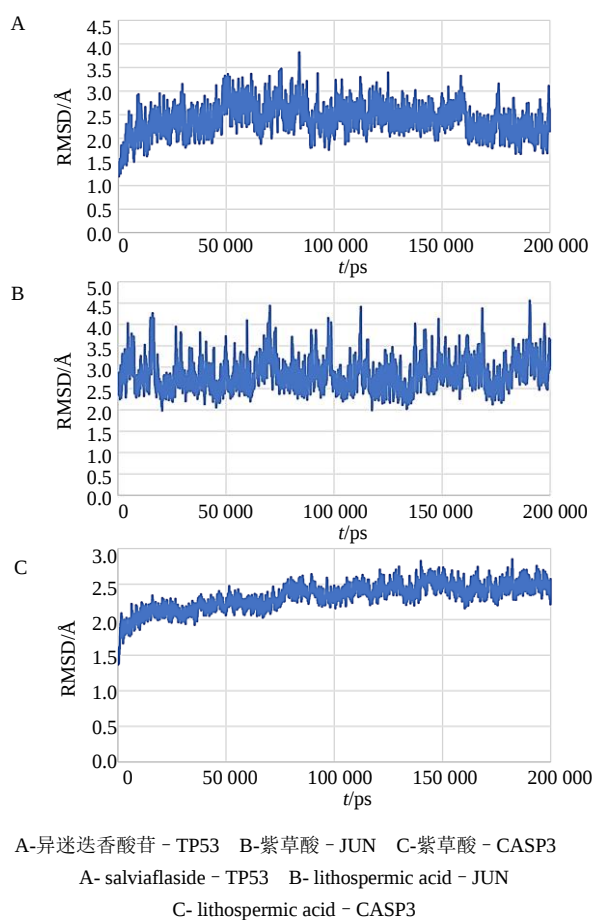


图 8 分子动力学模拟的 RMSD 曲线

Fig. 8 RMSD curve of molecular dynamics simulation

4 讨论

夏枯草茎叶总酚组分以酚酸类和黄酮类成分为主, 通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术共鉴定出 16 种酚酸类成分, 6 种黄酮类成分, 鉴定出的成分以咖啡酸及其衍生物 (二氢咖啡酸、迷迭香酸和异迷迭香酸苷等) 为代表性的化学成分。其中, 迷迭香

酸的主要药理作用为抗炎作用和抗氧化性, 广泛用于各类疾病, 如神经炎、抑郁症、肝炎、结肠癌、银屑病等^[33]。15.6~500 μg/mL 迷迭香酸可抑制脂多糖诱导的角质形成细胞株 (HaCaT) 的过度增殖和异常表达, 连续 7 d 给 40 mg/(kg·d) 迷迭香酸可显著减轻咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠皮炎模型的角质细胞增生和炎症反应, 其机制与降低白细胞介素 (IL)-23 的表达, 抑制 Th17 主导的炎症反应, 下调 Janus 激酶 2 (JAK2) /信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路有关^[34]。迷迭香酸可抗脂多糖诱导的神经炎症, 缓解小鼠的记忆和行为障碍, 其机制与减轻脂多糖引起的氧化应激, 降低乙酰胆碱酯酶活性, 抑制促炎细胞因子 TNF-α、IL-6、caspase-3 和 c-Jun 表达水平有关^[35]。咖啡酸可清除炎症环境中由中性粒细胞和巨噬细胞产生的氧自由基, 降低促炎症因子的表达来发挥抗炎作用^[36]。

网络药理学研究发现所鉴定成分抗炎的关键靶点主要有 TP53、STAT3、JUN、HIF1A、CTNNB1、CASP3 和 TNF。TP53 为抑癌基因, 炎症与癌症密切相关, 炎症的发展有助于癌症的形成, TP53 对于炎症具有普遍抑制作用, TP53 缺失小鼠较野生型小鼠对于炎症更敏感, 表现出更严重的炎性浸润, 其抗炎机制与抑制重要的炎症转录因子核因子-κB (NF-κB) 有关^[37]。JUN 蛋白为 AP-1 的转录因子, 在许多人类纤维化疾病中高表达, JUN 的表达选择性刺激成纤维细胞, 诱导多器官纤维化的发展。此外, 炎症因子、非酯化脂肪酸、氧化应激反应等可通过激活 c-Jun 氨基端激酶信号通路诱导肝细胞凋亡, 在小鼠体内 JUN 的持续表达可诱导多器官严重纤维化和脂肪肝^[38-39]。另有研究证实 JUN 是病理性皮肤瘢痕形成的关键调控因子, 靶向其下游效应因子 CD36 可能为一种抗疤痕形成的治疗策略^[40]。CASP3 通过特异性裂解一系列底物而导致细胞凋亡, 是细胞凋亡的重要执行者, 其有助于无菌炎症和自身炎症性疾病的发展^[41]。

GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果表明, 核心靶点涉及的生物学过程主要包括对化学刺激的反应、对氧化应激的反应、对活性氧的反应、对辐射的反应、对光刺激的反应、神经元死亡的调节等, 这些过程与夏枯草所具有的抗化学性炎症、抗氧化作用、抗紫外线损伤、抗神经炎等主要抗炎作用相关, 表明所鉴定的夏枯草成分具有代表性。KEGG 通路富集分析结果表明核心靶点主要富集在

PD-1、IL-17 和 AGE-RAGE 信号通路, PD-1 信号通路由 PD-1 受体及其配体 PD-L1 和 PD-L2 组成, 主要通过抑制 T 细胞激活发挥维持外周免疫耐受方面的作用。靶向 PD-1 阻断其抑制 T 细胞激活来增强抗癌免疫反应的策略目前效果显著, 而 PD-1 信号通路也与炎症疾病密切相关, 如自身免疫反应、慢性感染和败血症等^[42]。IL-17 为重要的促炎细胞因子, 在多种炎症疾病和自身免疫性疾病中发挥重要作用, 基于靶向 IL-17 的策略已开发出治疗银屑病、银屑病性关节炎和强直性脊柱炎的药物^[43]。晚期糖基化终末产物 (AGEs) 及其受体 (RAGE) 在各种细胞和组织中均有表达, 主要促进糖尿病肾病及并发症的发生和发展, RAGE 的表达可导致糖尿病肾病患者的慢性组织损伤和修复机制的抑制^[44]。分子对接结果表明所鉴定的成分与关键靶点均能自由结合 (结合能 < 0 kcal/mol), 选取结合能前 3 位的分子对接复合物进行 200 ns 分子动力学模拟后发现小分子与受体蛋白结合稳定, 进一步证明了对接结果的可靠性。

综上, 本研究鉴定了夏枯草茎叶水提物中的总酚类成分, 发现其发挥抗炎作用的主要物质基础可能为咖啡酸及其衍生物, 通过作用于 TP53、STAT3、JUN、HIF1A、CTNNB1、CASP3 和 TNF 等多个关键靶点, 调节 PD-1、IL-17 和 AGE-RAGE 等信号通路发挥抗炎作用, 研究表明这些成分可能为夏枯草茎叶发挥抗炎药效的物质基础, 可为阐明夏枯草茎叶抗炎药效物质基础及资源开发提供基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bai Y, Xia B, Xie W, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella* [J]. *Food Chem*, 2016, 204: 483-496.
- [2] 严东, 谢嘉驰, 周亚敏, 等. 基于液质联用技术及抗炎与抗氧化活性研究夏枯草茎叶和果穗的替代性 [J]. *中国药学杂志*, 2016, 51(10): 792-797.
- [3] 罗弘杉, 谭知浩, 徐春芳, 等. 夏枯草茎叶总酚酸提取工艺优化及其化学成分研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(5): 700-706.
- [4] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(1): 1074-1082.
- [5] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTarget Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(web server issue): W32-W38.
- [6] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [7] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online mendelian inheritance in man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(database issue): 789-798.
- [8] Zhu F, Shi Z, Qin C, et al. Therapeutic target database update 2012: A resource for facilitating target-oriented drug discovery [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(database issue): 1128-1136.
- [9] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): 605-612.
- [10] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [11] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [12] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [13] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(1): 1388-1395.
- [14] Desaphy J, Bret G, Rognan D, et al. sc-PDB: A 3D-database of ligandable binding sites-10 years on [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1): 399-404.
- [15] Morris G M, Huey R, Olson A J. Using AutoDock for ligand-receptor docking [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2008, 24(1): 8-14.
- [16] Lee T S, Cerutti D S, Mermelstein D, et al. GPU-accelerated molecular dynamics and free energy methods in amber18: Performance enhancements and new features [J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(10): 2043-2050.
- [17] 罗敏, 何婷, 龚磊, 等. 夏枯草中 16 种酚类化合物含量的测定及其与抗氧化活性的相关性分析 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(1): 299-306.
- [18] Vonaparti A, Lyris E, Panderi I, et al. Direct injection horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. III. Determination of salicylic acid by liquid chromatography/quadrupole

- time-of-flight mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(5): 1403-1410.
- [19] Lin P, Wang Q, Liu Y, *et al.* Characterization of chemical profile and quantification of representative components of DanLou tablet, a traditional Chinese medicine prescription, by UHPLC-Q/TOF-MS combined with UHPLC-TQ-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 180: 113070.
- [20] Otsuka F A, Santos R B, Chaves L F, *et al.* Identification of caffeic acid and rutin by UHPLC MS/MS and antioxidant activity of *Commelina erecta* Lineu. in cell culture [J]. *An Acad Bras Ciênc*, 2020, 92(1): e20190491.
- [21] Nan X, Su S, Ma K, *et al.* Bioactive fraction of *Rhodiola algida* against chronic hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension and its anti-proliferation mechanism in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216: 175-183.
- [22] Nešović M, Gašić U, Tosti T, *et al.* Physicochemical analysis and phenolic profile of polyfloral and honeydew honey from Montenegro [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(5): 2462-2471.
- [23] Lin T F, Qiu J N, Zhang S, *et al.* Screening out the anti-insomnia components from *Prunella vulgaris* L. based on plasma pharmacokinetics combined with pharmacodynamic experiments and UPLC-MS/MS analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114373.
- [24] Redeuil K, Smarrito-Menozi C, Guy P, *et al.* Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(29): 4678-4688.
- [25] 马伟, 刘西岭, 邵国泉, 等. 夏枯草的化学成分研究进展 [J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2018, 34(12): 31-32.
- [26] Chen Y, Cai X, Li G, *et al.* Chemical constituents of radix *Actinidia chinensis* planch by UPLC-QTOF-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(7): e5103.
- [27] Shao X, Zhao J, Wang X, *et al.* Rapid screening and quantitative determination of active components in qing-hua-yu-re-formula using UHPLC-Q-TOF/MS and HPLC-UV [J]. *J Anal Methods Chem*, 2018, 2018: 8535127.
- [28] 张笑, 黄天生, 李黎. 夏枯草抗胃癌细胞的成分及其机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 255-258.
- [29] 杨慧珍, 李映, 葛喜珍. 夏至草、益母草及夏枯草的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 北京联合大学学报, 2021, 35(2): 85-92.
- [30] Nam T G, Lee S M, Park J H, *et al.* Flavonoid analysis of buckwheat sprouts [J]. *Food Chem*, 2015, 170: 97-101.
- [31] Li Q, Liu Y, Han L, *et al.* Chemical constituents and quality control of two *Dracocephalum* species based on high-performance liquid chromatographic fingerprints coupled with tandem mass spectrometry and chemometrics [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(21): 4071-4085.
- [32] Aksay O, Selli S, Kelebek H. LC-DAD-ESI-MS/MS-based assessment of the bioactive compounds in fresh and fermented caper (*Capparis spinosa*) buds and berries [J]. *Food Chem*, 2021, 337: 127959.
- [33] Luo C, Zou L, Sun H, *et al.* A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 153.
- [34] Zhang M, Li N, Cai R, *et al.* Rosmarinic acid protects mice from imiquimod induced psoriasis-like skin lesions by inhibiting the IL-23/Th17 axis via regulating Jak2/Stat3 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4526-4537.
- [35] Thingore C, Kshirsagar V, Juvekar A. Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory impairment using Rosmarinic acid in mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(2): 299-313.
- [36] 张雯, 孙雅丽, 王琳, 等. 咖啡酸及其衍生物药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(8): 103-106.
- [37] Barabutis N, Schally A V, Siejka A. P53, GHRH, inflammation and cancer [J]. *EBioMedicine*, 2018, 37: 557-562.
- [38] 马燕花, 邱晓青, 师霞, 等. JNK/c-Jun 信号通路对非酒精性脂肪性肝炎脂性凋亡的影响 [J]. 医学综述, 2017, 23(9): 1675-1679.
- [39] Wernig G, Chen S Y, Cui L, *et al.* Unifying mechanism for different fibrotic diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(18): 4757-4762.
- [40] Griffin M F, Borrelli M R, Garcia J T, *et al.* JUN promotes hypertrophic skin scarring via CD36 in preclinical *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(609): eabb3312.
- [41] Fischer F A, Chen K W, Bezbradica J S. Posttranslational and therapeutic control of gasdermin-mediated pyroptosis and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 661162.
- [42] Qin W, Hu L, Zhang X, *et al.* The diverse function of PD-1/PD-L pathway beyond cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2298.
- [43] Amatya N, Garg A V, Gaffen S L. IL-17 signaling: The yin and the yang [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(5): 310-322.
- [44] Yan S F, Ramasamy R, Schmidt A M. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response [J]. *J Mol Med*, 2009, 87(3): 235-247.