

基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术和网络药理学的金莲花抗炎药效物质基础及作用机制研究

蔡红业, 吴谨, 徐林忠

麻城市人民医院 药剂科, 湖北 麻城 438300

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS) 法、网络药理学和分子对接验证探讨金莲花抗炎的药效物质及机制。**方法** 根据质谱信息结合对照品、文献和数据库指认金莲花中化学成分信息; 借助 Swiss ADME 平台及查询文献来筛选金莲花潜在活性成分; 通过 Swiss Target Prediction 数据库预测金莲花活性成分的作用靶点; 采用 OMIM、GeneCards、DrugBank、DisGeNET 数据库获取炎症的相关靶点; 利用 Venn 图取药物活性成分靶点与疾病靶点交集后, 用 STRING 数据库构建蛋白质相互作用网络 (PPI); 用 Metascape 数据库对核心靶点进行基因本体论 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析; 借助 Cytoscape 软件构建“活性成分-炎症靶点-富集通路”网络; 采用分子对接技术进行初步验证。**结果** 从金莲花中共鉴别出 38 个化合物, 包括黄酮类 23 个, 有机酸类 10 个, 香豆素类 1 个, 单糖 2 个以及苯乙素类 2 个; 网络药理学研究表明, 金莲花可能通过鼠尾草素、黄酮素、香叶木素、阿魏酸、槲皮素和芹菜素等成分, 作用于肿瘤坏死因子 (TNF)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC) 等核心靶点, 来调节癌症中的途径 (pathways in cancer)、血脂与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /Akt、TNF、白细胞介素-17 (IL-17)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE)、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 等信号通路, 从而发挥抗炎作用; 分子对接验证结果表明, 金莲花抗炎药效成分与疾病靶点蛋白具有较强的结合活性。**结论** 揭示了金莲花通过多成分、多靶点、多通路联合发挥抗炎作用的机制, 为后续临床应用提供科学合理的理论基础。

关键词: 金莲花; 抗炎; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱; 网络药理学; 鼠尾草素; 黄酮素; 香叶木素; 阿魏酸; 槲皮素; 芹菜素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)05-1041-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.003

Material basis and mechanism of anti-inflammation effect of *Trollius chinensis* Bge. based on UHPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology

CAI Hong-ye, WU Jin, XU Lin-zhong

Department of Pharmacy, People's Hospital of Macheng City, Macheng 438300, China

Abstract: Objective To explore the anti-inflammation material basis and mechanism of *Trollius chinensis* Bge. based on UHPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology and molecular docking verification. **Methods** The chemical constituents of *Trollius chinensis* Bge. were identified according to the information of mass spectrometry combined with the standard, literature and database. Using Swiss ADME platform and literature inquiry to screen the potential active ingredients of *Trollius chinensis* Bge. Predicted the target of active components of *Trollius chinensis* Bge. by Swiss Target Prediction database. The relevant targets of inflammation were obtained from OMIM, GeneCards, DrugBank, and DisGeNET databases. After the intersection of drug active ingredient targets and disease targets was obtained using Venn diagram, protein-protein interaction network (PPI) was constructed by using STRING database. GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis were carried out through the Metascape database. The network of “active ingredients-inflammation targets-enrichment pathways” was constructed with the Cytoscape software. Molecular docking technology was used for preliminary verification. **Results** A total of 38 compounds were identified from *Trollius chinensis* Bge. including 23 flavonoids, 10

收稿日期: 2023-01-27

基金项目: 中国中医科学院中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 蔡红业, 男, 硕士, 研究方向为中药新制剂、新剂型的研究。E-mail: 786126871@qq.com

organic acids, 1 coumarin, 2 monosaccharides and 2 styrenes. Network pharmacological research showed that *Trollius chinensis* Bge. may acted on TNF, Akt1, VEGFA, PTGS2, EGFR, SRC and other core targets through salvigenin, cirsimaritin, diosmetin, ferulic acid, quercetin, apigenin and other active compounds, regulating pathways in cancer, lipid and atherosclerosis, PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, MAPK signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and other pathways, thus exert anti-inflammation effects. The results of molecular docking verification showed that the anti-inflammation components of *Trollius chinensis* Bge. had strong binding activity with disease target proteins. **Conclusion** Preliminatively revealing the anti-inflammation effects of *Trollius chinensis* Bge. through the combination of multi-components, multi-targets and multi-pathways, providing a scientific and reasonable theoretical basis for subsequent clinical application.

Key words: *Trollius chinensis* Bge.; anti-inflammation; UHPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; salvigenin; cirsimaritin; diosmetin; ferulic acid; quercetin; apigenin

炎症是机体对刺激产生的一种防御反应,一般对机体有利,但重度炎症则会损害机体^[1-2]。多数疾病都伴随着炎症的产生,因此寻求新型抗炎药物对于治疗炎症相关疾病具有重大意义。金莲花是毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花,为《中国药典》1977 年版一部收载品^[3]。该药具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗癌等药理活性作用,其主要由黄酮类、有机酸类、生物碱类、香豆素类等组成^[4-5]。现代药理学研究表明,金莲花中黄酮类、酚酸类以及生物碱类等成分均能抑制炎症介质一氧化氮(NO)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的释放,从而减轻炎症反应^[6]。金莲花的不同部位均具有抗炎作用,并且不同花部位总黄酮含量与抗炎活性强弱无相关性,说明有其他类型成分与黄酮类成分协同发挥抗炎作用^[7]。大量临床研究表明,金莲花单味药制剂已广泛应用于治疗慢性咽炎、扁桃体炎、牙周炎等炎症疾病^[8-13],其疗效显著甚至抗炎作用高于临床常用抗炎药物^[14],可见金莲花在治疗炎症相关疾病方面具有广阔的应用前景。但是,目前对该药物发挥抗炎作用的活性成分及具体作用机制的认识尚不清晰。因此,本研究在 UHPLC-Q-TOF-MS 分析金莲花化学组成的基础上,结合数据网络的维度分析基因、蛋白、疾病以及药物之间的关联性,并通过分子对接进行初步验证,系统阐释金莲花发挥抗炎作用的物质基础及可能参与调控的分子机制,为金莲花药效机制的进一步研究和临床治疗提供科学的理论基础。

1 材料

1.1 仪器

UHPLC-Q-TOF-MS 系统:配有二元高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源(ESI)、MassHunter 质谱工作站(美国 Agilent 公司);Heal Force Smart 超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司)。

1.2 药材与试剂

金莲花(亳州中药材市场,产地为河北承德,批号 190718),经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花。苈草苷(批号 111777-202003)、牡荆苷(批号 111687-201704)、槲皮素(批号 100081-201610)、柚皮苷(批号 110722-201613)对照品均购自中国食品药品检定研究院;苈草素-2''-O- β -L-半乳糖苷(批号 PS010468)、香叶木素(批号 PS010395)对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司;甲醇、乙腈(质谱级,德国 Merck 公司);甲酸(色谱级,德国 Merck 公司);水为超纯水,其他均为分析纯。

2 方法

2.1 金莲花化学成分分析

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取苈草素-2''-O- β -L-半乳糖苷、苈草苷、牡荆苷、金丝桃苷、槲皮素、香叶木素 6 种对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加 70%甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,然后用 70%甲醇稀释制成含苈草素-2''-O- β -L-半乳糖苷 0.580 μ g/mL、苈草苷 0.505 μ g/mL、牡荆苷 0.910 μ g/mL、金丝桃苷 0.555 μ g/mL、槲皮素 0.535 μ g/mL、香叶木素 0.525 μ g/mL 的混合对照品溶液。经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后,即可上机检测。

2.1.2 供试品溶液的制备 取金莲花粉末约 1 mg,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 70%甲醇 25 mL,称重,超声 30 min,用 70%甲醇补足失重,摇匀,过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~2 min, 12%~33% B; 2~5 min, 33%~48% B; 5~7 min, 48%~55% B; 7~12 min, 55%~82% B; 12~17 min, 82%~92% B; 17~25 min, 92%~93% B)。体积流

量 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μ L。

2.1.4 质谱条件 ESI 离子源, 正离子检测模式, 鞘气温度 325 °C, 鞘气体积流量 10 mL/min, 喷雾电压 500 V, 雾化气压力 35 psi, 毛细管电压 4 000 V, 干燥气温度 350 °C, 干燥气体积流量 11 mL/min, 碎裂电压 150 V, 锥孔电压 65 V, 扫描范围为 m/z 50~1 500。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 金莲花活性成分的筛选及作用靶点预测 根据 UHPLC-Q-TOF-MS 分析结果, 借助 Swiss ADME 平台 (<https://www.swissadme.ch/>), 以胃肠吸收的得分为“high”、类药性至少通过 2 个“Yes”来筛选金莲花潜在活性成分; 结合相关文献研究报道, 将能吸收入血、药理活性较确切的化学成分也纳入到金莲花潜在活性成分中。将筛选的化合物通过 PubChem 数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索 Canonical SMILES 号, 并将其输入到 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中预测各潜在活性成分的作用靶点。利用 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 对预测的靶点进行校正^[15]。

2.2.2 金莲花抗炎有关靶点的收集 在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、DrugBank 数据库 (<http://go.drugbank.com>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>) 中以“inflammation”为关键词检索炎症相关靶点信息, 取 GeneCards 检索结果中 relevance score ≥ 5 的靶点, 与其他数据库检索结果合并, 删除重复项后得到炎症靶点。利用 Draw Venn Diagram 平台 (<http://bioinformatics.ugent.be/webtools/Venn/>) 获取炎症与活性成分交集靶点。

2.2.3 蛋白相互作用网络 (PPI) 网络的构建和筛选核心靶点 根据 Venn 分析得到的交集靶点导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 中, 预测交集靶点之间的蛋白互相作用关系, 保存 TSV 文件, 并将其导入 Cytoscape 3.9.1 中进行可视化处理, 利用软件的 Network Analyzer 工具计算网络拓扑特征, 其中度 (degree) 越大表示节点越重要, 故而以大于 degree 中位数的 2 倍为标准筛选 PPI 网络中的核心靶点。

2.2.4 基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 利用 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/gp/index.html>), 输入交

集靶点, 设置 $P < 0.01$, 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 进一步阐释金莲花有效活性成分治疗炎症的分子机制, 最后通过微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行绘图。

2.2.5 成分-靶点-通路网络的构建 运用 Cytoscape 3.9.1 软件, 以节点 (node) 代表活性成分、交集靶点和富集通路, 边 (edge) 代表它们之间的联系, 构建有效活性成分-炎症靶点-通路网络图, 并利用软件的 Network Analyzer 工具计算网络拓扑特征来筛选发挥抗炎作用的核心化学成分。

2.2.6 分子对接验证 根据 degree 值大小, 选择 PPI 中排名前 6 位的核心作用靶点与连接交集靶点数目最多的前 6 种活性成分依次进行分子对接验证。采用 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点蛋白 3D 结构的 PDB 格式文件, 利用 PyMOL 软件删除水分子和小分子配体, 并通过 AutoDock Tools 1.5.7 软件对蛋白分子补加氢, 最后保存为 pdbqt 格式。在 PubChem 数据库中下载活性成分 3D 结构的 SDF 格式文件, 并用 OpenBabel 2.4.1 软件将其转化为 Mol2 格式文件, 将其导入 AutoDock Tools 1.5.7 软件, 添加原子电荷, 分配原子类型, 默认所有柔性键可旋转, 并保存为 pdbqt 格式。将活性成分与靶点蛋白进行分子对接, 并通过 PyMOL 软件对分子对接结果进行可视化分析。

3 结果

3.1 金莲花主要成分分析与鉴定

应用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术, 得到正离子模式下金莲花提取物总离子流图 (TIC), 见图 1。通过二级碎片离子信息、部分对照品质谱裂解规律、基于 MassBank 数据库 (<https://massbank.eu/MassBank/>) 推测及相关文献报道比对等方法进行鉴定、推断, 共表征 38 个化合物, 包括黄酮类 23 个, 有机酸类 10 个, 香豆素类 1 个, 单糖 2 个以及苯乙素类 2 个, 各化学成分具体信息见表 1。

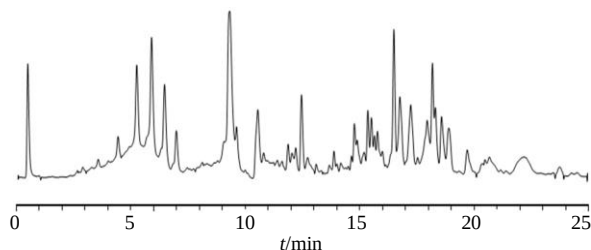


图 1 正离子模式下金莲花提取物总离子流图
Fig. 1 Total ion flow diagram of *Trollius chinensis* Bge. in positive ion mode

表 1 金莲花主要成分信息

Table 1 Information on main ingredients of *Trollius chinensis* Bge.

化合物名称	tr/min	分子式	[M+H] ⁺	误差	碎片离子	结构类型
荛草苷 ^a	3.213	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.106 6	-2.67	431.096 5[M+H-H ₂ O] ⁺ , 413.084 9[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 383.076 2[M+H-2H ₂ O-CH ₂ O] ⁺ , 329.064 9[M+H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ , 299.055 0[M+H-C ₅ H ₁₀ O ₅] ⁺	黄酮类
牡荆苷 ^a	3.628	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.109 7	-7.39	415.100 5[M+H-H ₂ O] ⁺ , 397.086 0[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 343.079 3[M+H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁺ , 313.073 7[M+H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ , 283.062 3[M+H-C ₅ H ₁₀ O ₅] ⁺	黄酮类
荛草素-2''-O-β-L-半乳糖苷 ^a	3.151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.158 4	-3.76	449.106 9[M+H-gal] ⁺ , 431.097 9[M+H-gal-H ₂ O] ⁺ , 413.083 5[M+H-gal-2H ₂ O] ⁺	黄酮类
香叶木素 ^{ab}	6.998	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 3	1.99	286.047 1[M+H-CH ₃] ⁺ , 258.053 0[M+H-CH ₃ -CO] ⁺	黄酮类
槲皮素 ^{ab}	3.378	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.051 3	4.62	285.037 6[M+H-H ₂ O] ⁺ , 275.100 7[M+H-CO] ⁺ , 153.248 9[M+H-C ₈ H ₆ O ₃] ⁺ (RDA 重排裂解)	黄酮类
金丝桃苷 ^a	1.807	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.102 1	-1.51	303.051 6[M+H-gal] ⁺	黄酮类
蒽黄素 ^b	8.003	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.084 8	-4.76	300.063 4[M+H-CH ₃] ⁺ , 282.053 7[M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 254.057 1[M+H-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺	黄酮类
异当药黄素	7.834	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.126 3	-5.14	429.116 7[M+H-H ₂ O] ⁺ , 385.091 2[M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺	黄酮类
荛草素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷	3.288	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.152 4	3.96	449.106 9[M+H-xyl] ⁺ , 431.049 5[M+H-xyl-H ₂ O] ⁺ , 329.061 7[M+H-xyl-C ₄ H ₈ O ₄] ⁺	黄酮类
2'''-甲基丁酰基荛草素	5.462	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	533.164 2	-2.25	431.093 1[M+H-C ₅ H ₈ O-H ₂ O] ⁺ , 329.065 3	黄酮类
2''-O-(2'''-甲基丁酰基)牡荆苷	6.006	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	517.169 7	-1.35	499.153 4[M+H-H ₂ O] ⁺ , 433.111 2[M+H-C ₅ H ₈ O] ⁺ , 415.101 7[M+H-C ₅ H ₈ O-H ₂ O] ⁺ , 397.127 9[M+H-C ₅ H ₈ O-2H ₂ O] ⁺	黄酮类
7-2''-O-(2'''-甲基丁酰基)荛草素	6.804	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	547.181 0	0.91	445.112 1[M+H-C ₅ H ₈ O-H ₂ O] ⁺ , 385.091 3[M+H-C ₅ H ₈ O-H ₂ O-C ₂ H ₄ O] ⁺ , 343.079 5, 313.069 5	黄酮类
2''-O-(2'''-甲基丁酰基)异当药黄素	7.345	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	581.183 3	-4.82	447.129 5[M+H-C ₅ H ₈ O] ⁺ , 429.118 4[M+H-C ₅ H ₈ O-H ₂ O] ⁺ , 411.304 1[M+H-C ₅ H ₈ O-2H ₂ O] ⁺	黄酮类
鼠尾草素 ^b	9.927	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.102 0	0	314.154 3[M+H-CH ₃] ⁺ , 296.462 1[M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 268.071 4[M+H-CH ₃ -CO] ⁺	黄酮类
异日本当药素	17.109	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.126 0	5.40	445.228 9[M+H-H ₂ O] ⁺ , 417.230 8[M+H-H ₂ O-CO] ⁺	黄酮类
2''-O-阿魏酰基牡荆素	11.562	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₃	609.162 2	3.12	591.146 2[M+H-H ₂ O] ⁺ , 429.116 9[M+H-C ₁₀ H ₁₁ O ₃] ⁺ , 399.107 2[M+H-C ₁₁ H ₁₃ O ₄] ⁺ , 385.093 9[M+H-C ₁₀ H ₁₁ O ₃ -CO ₂] ⁺	黄酮类
2''-O-香草酰基牡荆素	5.032	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₃	583.141 9	-4.63	565.302 9[M+H-H ₂ O] ⁺ , 550.737 9[M+H-H ₂ O-CH ₃] ⁺	黄酮类
6'''-HMG-2''-O-β-L-半乳糖苷牡荆素	3.967	C ₃₃ H ₃₈ O ₁₉	739.203 9	-5.55	721.186 4[M+H-H ₂ O] ⁺ , 433.114 4, 415.099 6, 313.071 5	黄酮类
6'''-HMG-2''-O-β-L-半乳糖苷荛草素	4.112	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₀	755.202 9	5.56	737.182 1[M+H-H ₂ O] ⁺ , 611.154 5, 449.107 2, 431.098 1, 383.075 0, 329.066 8	黄酮类
芹菜素 ^b	7.222	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.059 7	-1.48	153.016 5 (RDA 重排裂解), 135.082 1	黄酮类
柚皮苷	3.288	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.182 4	-7.05	491.787 6[M+H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁺ , 461.103 9[M+H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ , 431.849 5[M+H-C ₅ H ₁₀ O ₅] ⁺	黄酮类
6''-malonyl astragalin	3.703	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	535.106 9	-2.43	517.097 6[M+H-H ₂ O] ⁺ , 499.080 1[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 455.094 2[M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺ , 329.065 5[M+H-C ₇ H ₁₀ O ₇] ⁺ , 311.052 4[M+H-C ₇ H ₁₀ O ₇ -H ₂ O] ⁺	黄酮类
6''-malonyl cosmosiin	4.167	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	519.113 0	-0.58	475.132 8[M+H-CO ₂] ⁺ , 457.134 7[M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺ , 439.098 0[M+H-2H ₂ O-CO ₂] ⁺ , 313.0	黄酮类
藜芦酸 ^b	0.507	C ₉ H ₁₀ O ₄	183.064 3	-4.92	168.076 6[M+H-CH ₃] ⁺ , 165.049 3[M+H-H ₂ O] ⁺ , 137.057 6[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 124.045 6[M+H-CH ₃ -CO ₂] ⁺	有机酸类

续表 1

化合物名称	t_R/min	分子式	$[M+H]^+$	误差	碎片离子	结构类型
乌苏酸	15.627	$C_{30}H_{48}O_3$	457.366 9	-1.53	439.351 1 $[M+H-H_2O]^+$, 421.306 5 $[M+H-2H_2O]^+$, 393.922 7 $[M+H-2H_2O-CO]^+$	有机酸类
金莲花苷	14.733	$C_{19}H_{26}O_9$	399.161 3	-9.27	235.041 4 $[M+H-C_6H_{12}O_5]^+$, 219.011 7 $[M+H-C_6H_{12}O_6]^+$, 204.992 8 $[M+H-C_6H_{12}O_6-CH_3]^+$	有机酸类
咖啡酸 ^b	9.927	$C_9H_8O_4$	181.048 1	-7.73	163.110 8 $[M+H-H_2O]^+$, 145.100 7 $[M+H-2H_2O]^+$, 135.117 3 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 117.068 9 $[M+H-2H_2O-CO]^+$	有机酸类
香草酸 ^b	2.518	$C_8H_8O_4$	169.050 6	6.51	151.003 2 $[M+H-H_2O]^+$, 141.014 0 $[M+H-CO]^+$, 124.010 2 $[M+H-COOH]^+$	有机酸类
阿魏酸 ^b	0.884	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 9	3.59	151.098 8 $[M+H-CO_2]^+$, 133.084 6 $[M+H-CO_2-H_2O]^+$	有机酸类
原金莲酸 ^b	4.753	$C_{13}H_{16}O_4$	237.111 4	-2.95	181.043 7 $[M+H-C_4H_7]^+$, 169.049 3 $[M+H-C_5H_8]^+$	有机酸类
对羟基苯甲酸 ^b	16.521	$C_7H_6O_3$	139.038 1	-6.47	111.034 4 $[M+H-CO]^+$	有机酸类
藜芦酸葡萄糖酯 ^b	5.958	$C_6H_{12}O_6$	181.070 1	-3.31	163.110 8 $[M+H-H_2O]^+$, 145.100 7 $[M+H-2H_2O]^+$, 135.117 3 $[M+H-H_2O-CO]^+$	有机酸类
莽草酸 ^b	16.508	$C_7H_{10}O_5$	175.059 8	-1.71	131.010 6 $[M+H-CO_2]^+$, 115.039 6 $[M+H-C_2H_4O_2]^+$	有机酸类 (RDA 重排裂解)
七叶内酯 ^b	2.224	$C_9H_6O_4$	179.032 9	-5.59	151.024 4 $[M+H-CO]^+$, 133.012 7 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 123.041 3 $[M+H-2CO]^+$	香豆素类
鼠李糖 ^b	0.507	$C_6H_{14}O_6$	183.085 9	-2.18	168.076 6 $[M+H-CH_3]^+$, 165.049 3 $[M+H-H_2O]^+$, 137.087 9 $[M+H-H_2O-CO]^+$	多糖类
阿拉伯糖	18.682	$C_5H_{10}O_5$	151.061 2	7.28	123.080 2 $[M+H-CO]^+$, 105.069 4 $[M+H-H_2O-CO]^+$	多糖类
3,4-二羟基苯乙醇 ^b	2.858	$C_8H_{10}O_3$	155.069 5	-5.16	137.096 0 $[M+H-H_2O]^+$, 125.065 9 $[M+H-CH_2O]^+$, 119.072 4 $[M+H-2H_2O]^+$, 109.101 2 $[M+H-H_2O-CO]^+$	苯乙素类
4-羟基-3-甲氧基苯乙醇 ^b	2.518	$C_9H_{12}O_3$	169.086 2	1.77	151.003 2 $[M+H-H_2O]^+$, 141.014 0 $[M+H-CO]^+$, 124.110 2 $[M+H-C_2H_5O]^+$	苯乙素类

a 为对照品确定的成分; b 为 Swiss ADME 筛选作网络药理学的成分

a is the component determined by the reference substance; b for Swiss ADME screening network pharmacology components

3.2 金莲花网络药理学分析

3.2.1 金莲花活性成分筛选及作用靶点预测 根据 Swiss ADME 平台设定的药动学筛选方法, 筛选出 17 个活性成分(标注于表 1), 结合相关文献报道^[16-19]将不符合筛选标准但药效作用确切的荜茇、牡荆苷、荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷、金丝桃苷、异当药黄素和金莲花碱 6 个金莲花成分对其进行补充, 故而共获得 23 个金莲花潜在活性成分。通过 Swiss Target Prediction 数据库预测 23 个活性成分的作用靶点, 在 Uniprot 数据库校正成标准基因名称, 经去重汇总后共得到 302 个潜在作用靶点。

3.2.2 金莲花治疗炎症潜在靶点分析 根据 2.2.2 项下方法筛选炎症相关靶点 813 个, 再将预测靶点与疾病靶点基因映射以绘制 Venn 图, 得到交集靶点 87 个, 即金莲花抗炎作用的潜在靶点, 见图 2。



图 2 药物靶点与炎症靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of drug target and inflammation target

3.2.3 PPI 网络及核心靶点 通过 Venn 分析获得的 87 个重叠靶点上传到 STRING 数据库, 进行蛋白互作网络的构建, 隐藏游离靶点, 最终得到 85 个靶蛋白节点, 864 条边的 PPI 网络模型。同时, 保存 TSV 格式文件, 将其导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中进行可视化分析, 用 degree 作为参数计算 PPI 网络的拓扑特征, 筛选出大于 degree 值 2 倍中位数的核心靶点 13 个, 见图 3。将 degree 值从小到大排序, 排在前 6 位的核心靶点分别为肿瘤坏死因子(TNF)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC), 表明这些靶点对金莲花抗炎有着重要意义。

3.2.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 数据库对金莲花抗炎作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并对结果进行可视化处理。GO 功能富集分析显示共得到 1 454 个 GO 生物功能条目, 其中与生物过程 (BP) 相关的条目最多, 为 1 277 条, 主要涉及机体外部刺激反应、MAP 激酶活性、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联激活、转移酶活性、蛋白质磷酸化的正向调节、炎症反应的调节等生物过程; 与细胞组

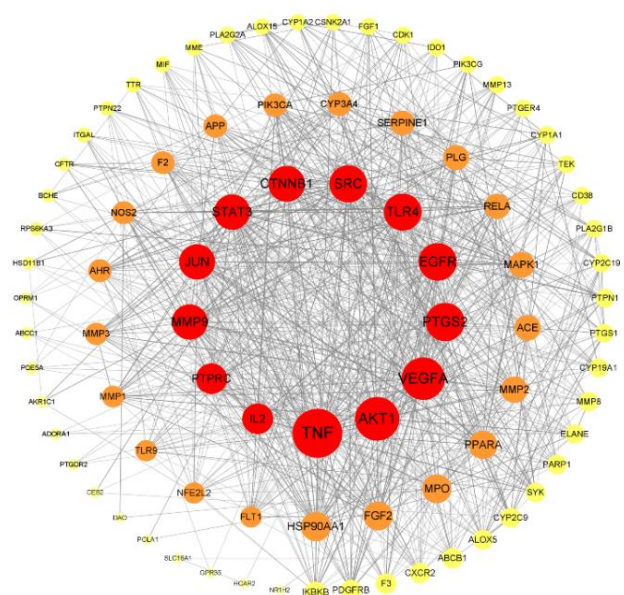


图 3 金莲花抗炎 PPI 可视化网络图

Fig. 3 Visual PPI network diagram of anti-inflammation of *T. chinensis* Bge.

分 (CC) 相关的条目有 74 条, 主要包括细胞基膜、分泌颗粒腔、膜微区、囊泡腔、细胞外基质、膜筏等; 与分子功能 (MF) 相关的条目有 103 条, 主要涉及芳香化酶活性、丝氨酸水解酶活性、丝氨酸型内肽酶活性、蛋白激酶活性、氧化还原酶活性、单加氧酶活性等。根据 P 值, 分别选取 BP、CC、MF 富集基因靠前条目绘制条形图, 结果见图 4 所示。KEGG 通路富集分析结果显示, 共获得 155 条金莲花抗炎信号通路, 主要是癌症中的途径 (pathways in cancer)、血脂与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-17 (IL-17)、MAPK、晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE)、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 等信号通路。通过 P 值且富集基因数目较多的条件对上述通路进行筛选, 选取排名靠前的 20 条通路绘制了气泡图, 见图 5。

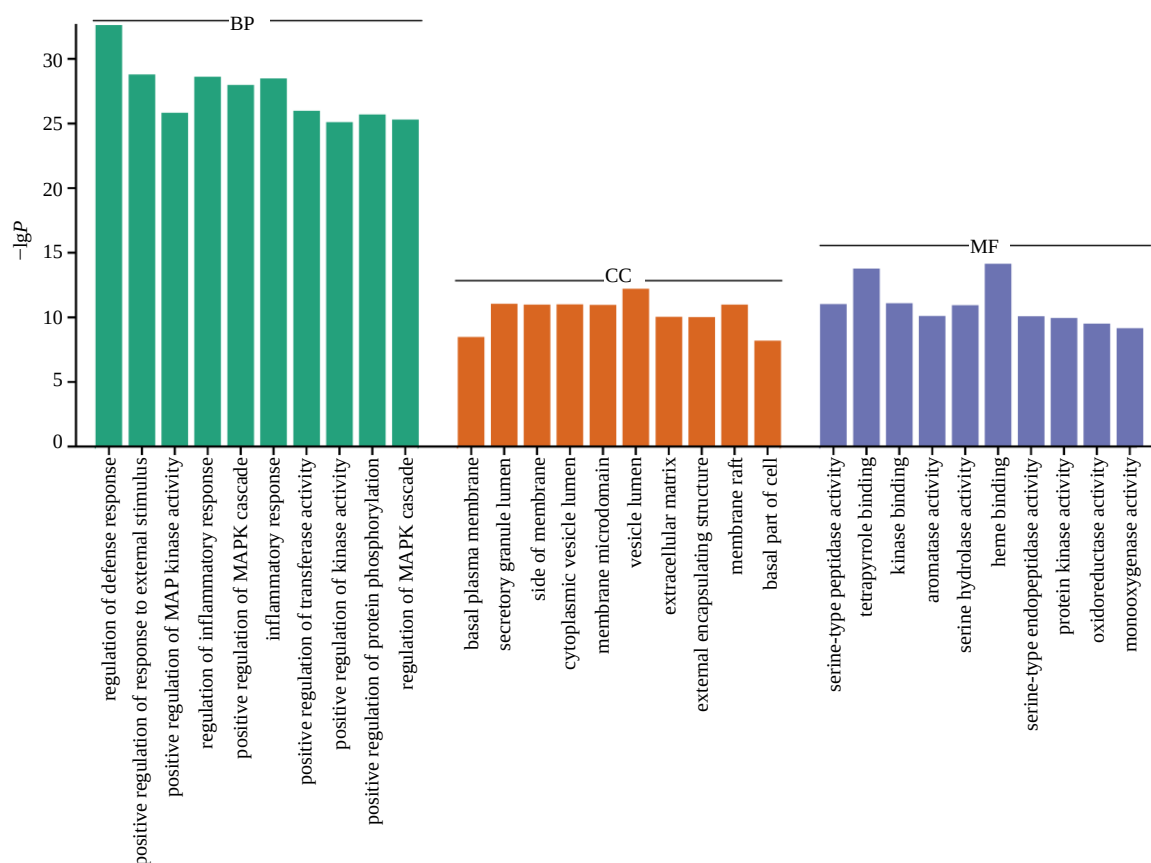


图 4 GO 功能富集分析图

Fig. 4 Analytic diagram of GO function enrichment

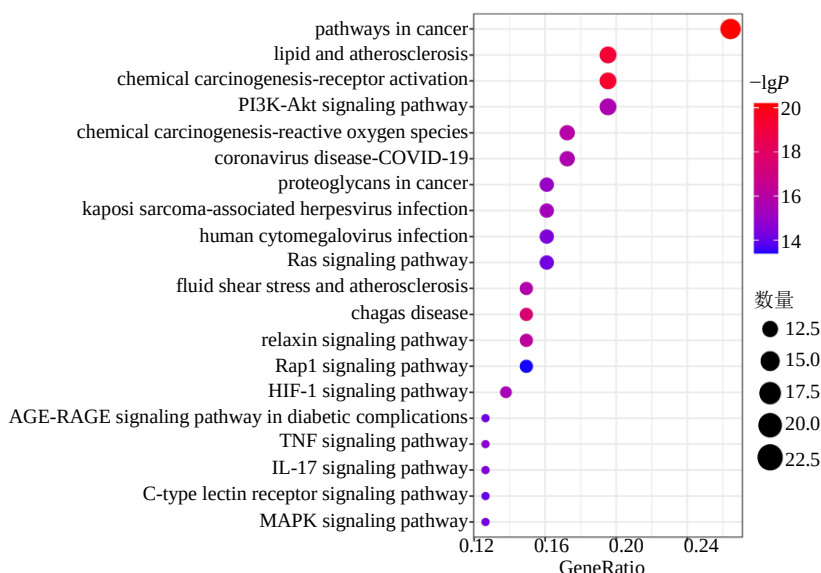


图 5 KEGG 通路富集分析图

Fig. 5 Enrichment analytic diagram of KEGG pathway

3.2.5 成分-靶点-通路网络 将金莲花抗炎活性成分与排名前 20 条信号通路及其富集靶点基因相关联, 运用 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建“活性成分-炎症靶点-富集通路”网络图, 见图 6。该网络包括 124 个节点(活性成分节点 17 个、炎症靶点节点 87 个、通路节点 20 个), 543 条边。根据网络拓扑参数 degree 值进行排序, 筛选出排名前 6 位的活性成分, 分别为鼠尾草素(salvigenin)、蓟黄素(cirsimaritin)、香叶木素(diosmetin)、阿魏酸(ferulic acid)、槲皮素(quercetin)和芹菜素(apigenin), 表明这些成分在抗炎过程中起关键作用。

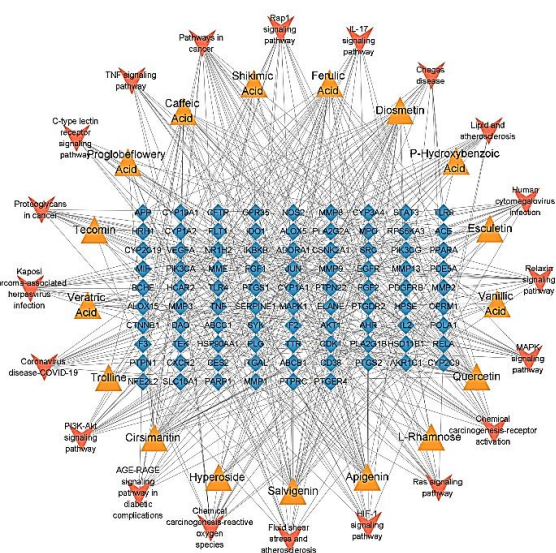


图 6 成分-靶点-通路网络图

Fig. 6 Ingredient-target-pathway network diagram

3.2.6 分子对接验证 将 PPI 中排名前 6 位的核心作用靶点与“成分-靶点-通路”网络中 degree 值排名前 6 位的活性成分采用 AutoDock Tools 1.5.7 软件依次进行分子对接验证, 结果见表 2。一般结合能小于 -5.0 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$) 时表示分子与靶点具有较好的结合活性^[20]。分子对接结果显示, 香叶木素和 TNF (PDBID: 2AZ5)、SRC (PDBID: 1O43), 鼠尾草素和 VEGFA (PDBID: 4KZN), 蓟黄素和 Akt1 (PDBID: 3CQW), 芹菜素和 PTGS2 (PDBID: 5F19)、EGFR (PDBID: 5UG9) 具有较高结合活性, 表明上述成分作用于这些靶点可能是金莲花发挥抗炎作用的潜在机制, 采用 PyMOL 软件进行可视化分析, 见图 7。可视化结果显示, 活性成分主要在谷氨酰胺 (GLN)、天冬酰胺 (ASN)、苏氨酸 (THR)、赖氨酸 (LYS)、谷氨酸 (GLU)、甘氨酸 (GLY)、酪氨酸 (TYR)、天冬氨酸 (ASP)、半胱氨酸 (CYS) 9 个亲水氨基酸残基结合位点形成氢键, 与缬氨酸 (VAL)、蛋氨酸 (MET)、亮氨酸 (LEU)、丙氨酸 (ALA) 4 个疏水氨基酸形成疏水作用, 其中香叶木素分别在 TNF 蛋白中氨基酸残基谷氨酰胺-125、天冬酰胺-92 及 SRC 蛋白的氨基酸残基赖氨酸-11、苏氨酸-106、谷氨酸-6 处形成氢键作用; 鼠尾草素与 VEGFA 蛋白的半胱氨酸-61、半胱氨酸-68、赖氨酸-107 形成氢键作用, 与亮氨酸-66 形成疏水作用; 蓟黄素和 AKT1 蛋白发生氢键相互作用的氨基酸残基结合位点为天冬氨酸-439、谷氨酸-228, 发生疏水作用的氨基酸残基结合位点为

表 2 活性成分与核心靶点结合能

Table 2 Binding energy of active components and core targets

化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)					
	TNF	Akt1	VEGFA	PTGS2	EGFR	SRC
鼠尾草素	-6.06	-5.56	-5.84	-6.17	-6.64	-5.04
蓟黄素	-5.78	-6.20	-5.74	-5.97	-6.83	-5.15
阿魏酸	-4.87	-5.02	-4.02	-4.59	-4.91	-3.81
香叶木素	-6.32	-5.77	-5.45	-6.03	-7.29	-5.36
芹菜素	-6.27	-5.95	-5.67	-6.59	-7.62	-5.28
槲皮素	-5.63	-5.35	-4.90	-5.84	-7.22	-4.78

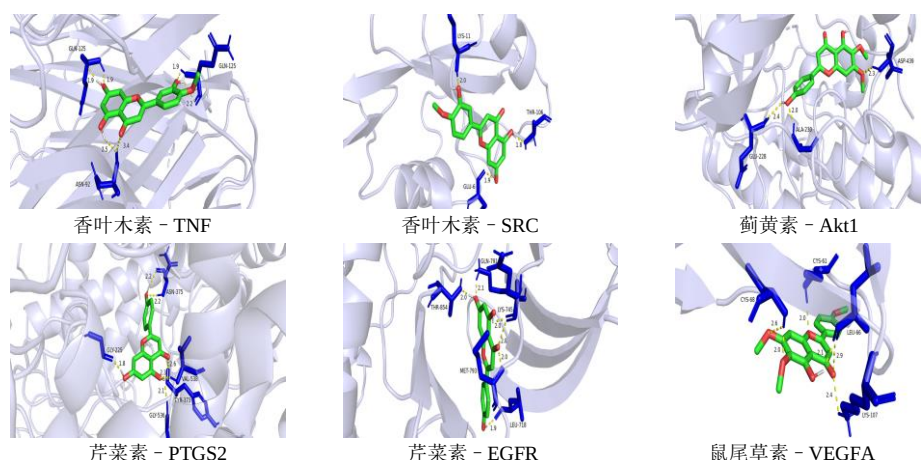


图 7 分子对接示意图

Fig. 7 The diagrams of molecular docking

丙氨酸-230; 芹菜素分别与 PTGS2 蛋白氨基酸残基缬氨酸-538 及 EGFR 蛋白氨基酸残基蛋氨酸-793、亮氨酸-718 形成疏水作用, 两种蛋白中其他亲水氨基酸残基如天冬酰胺-375、甘氨酸-225、甘氨酸-536、酪氨酸-373 及谷氨酰胺-791、赖氨酸-745、苏氨酸-854 均可与芹菜素形成氢键作用。

4 讨论

本研究通过 UHPLC-Q-TOF-MS 技术联合网络药理学的方法筛选出金莲花有效活性成分 23 个, 抗炎相应靶点基因 302 个, 将其与疾病数据库筛选的 813 个炎症靶点基因取交集得到 87 个金莲花抗炎作用的潜在靶点。通过 STRING 数据库构建 87 个蛋白靶点的 PPI 网络, 筛选出 TNF、Akt1、VEGFA、PTGS2、EGFR、SRC 等核心靶点 13 个。相关研究表明, TNF 蛋白表达水平与炎症反应显著相关^[21]; Akt1 作为 Janus 激酶 (JAK) /信号传导与转录激活因子 3 (STAT) 信号通路的重要组成基因之一, 其表达量降低可干预炎症反应的发生^[22]。

PTGS2 蛋白参与多条炎症反应信号通路, 实验发现抑制该蛋白表达能够减少炎症介质的产生^[23]。

KEGG 通路富集分析表明, 金莲花抗炎作用靶点主要富集在 pathways in cancer、lipid and atherosclerosis、PI3K/Akt、TNF、MAPK、IL-17、AGE-RAGE、HIF-1 等信号通路, 这里探讨了与炎症关系密切的 4 条信号通路。PI3K/Akt 信号通路在炎症反应过程中扮演重要角色, 研究发现降低该通路活化程度, 可以使 IL-6, 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-10 (IL-10) 等炎症因子的表达水平降低从而发挥抗炎作用^[24]; TNF 信号通路激活后产生的炎症因子 TNF- α 能够调控核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路, 促使相关蛋白的表达来加剧炎症损伤^[25]。MAPK 信号通路是经典的炎症反应通路之一, 其激活时会立即产生大量的炎症介质来干预炎症进程, 因此抑制该通路的激活可以有效减轻炎症反应^[26]。AGE-RAGE 信号通路激活后可以提高 NF- κ B 转录因子的表达水平, 从而促进下游炎症因子的产生来

加重炎症的发展^[27]。由此可见,多条信号通路可能通过协同的方式参与炎症发展进程。

成分-靶点-通路网络分析筛选得到金莲花治疗炎症相关的活性成分,主要为黄酮类和酚酸类化合物,包括鼠尾草素、黄酮素、香叶木素、阿魏酸、槲皮素和芹菜素等。有研究表明,黄酮素可以降低经脂多糖刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO、活性氧(ROS)、TNF- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和前列腺素 E₂(PGE₂)等炎症因子,明显下调 TNF- α 、IL-6 和 NO 蛋白的表达水平^[28];香叶木素具有显著抗炎活性,其机制可能是通过抑制 NF- κ B 通路活化水平,减少炎症因子释放来达到抗炎的目的^[29]。阿魏酸能够有效改善溃疡性结肠炎,其作用机制可能与硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)/NOD 样蛋白 3(NLRP3)通路调控半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、TXNIP、NLRP3 等,降低 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的浓度以及改善细胞形态、活力有关^[30]。槲皮素在植物中存在广泛,具有抗炎、抗氧化应激、抗癌等多种药理活性,药用潜力巨大,研究发现槲皮素可以调控 MAPK/TLR4 信号通路的激活程度,减少炎症介质的释放,来减轻炎症反应^[31]。芹菜素临床疗效明确,对动脉粥样硬化、炎症肠病等心血管及神经系统疾病在内的慢性炎症疾病的治疗具有重大意义,其作用机制是抑制 NF- κ B 通路被激活,下调促炎因子的转录^[32]。基于此,本研究将金莲花活性成分与核心靶点进行分子对接,结果显示,阿魏酸与靶点蛋白对接活性较低,其余成分与靶点均具有较好的结合活性。由此可见,金莲花活性成分进入机体后可能以多成分的形式协同作用于多个蛋白靶点及多条信号通路来发挥抗炎的作用。

综上所述,金莲花可能通过鼠尾草素、黄酮素、香叶木素、阿魏酸、槲皮素和芹菜素等核心化合物,作用于 TNF、AKT1、VEGFA、PTGS2、EGFR、SRC 等核心靶点,调控 pathways in cancer、lipid and atherosclerosis、PI3K/Akt、TNF、IL-17、MAPK、AGE-RAGE、HIF-1 等信号通路,干预机体外部刺激反应、MAPK 级联激活、蛋白质磷酸化的正向调节、炎症反应的调节等生物过程,发挥抗炎作用。该结论为金莲花抗炎的药效物质基础及作用机制进一步研究提供科学的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵灿,杜娜娜,郭丽娜,等.金莲花总黄酮和总酚酸的抗炎活性研究[J].中华中医药学刊,2015,33(11):2634-2638.
- [2] 刘辰,刘莉嘉,赵灿,等.金莲花总提取物人肠内菌转化前后的抗炎活性研究[J].中华中医药学刊,2016,34(3):612-614.
- [3] 中国药典[S].一部.1977:359.
- [4] 蔡红业,刘海松,郑国华,等.金莲花化学成分和药理活性研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(7):2340-2352.
- [5] 王家才,段星星,张波,等.基于网络药理学及体外实验研究金莲花黄酮抑制肺纤维化的机制[J].中草药,2023,54(7):2144-2154.
- [6] Liu L J, Hu X H, Guo L N, et al. Anti-inflammatory effect of the compounds from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(5): 1951-1957.
- [7] 李德利,方明月,王青青,等.金莲花不同花部提取物的抗炎活性[J].中国现代中药,2018,20(7):797-801.
- [8] 李天明,刘玉蓉.低温等离子射频消融术联合金莲花软胶囊治疗肥厚性咽喉炎的临床疗效探讨[J].四川解剖学杂志,2014,22(3):16-18.
- [9] 王金林,王领,杨银旗,等.金莲花软胶囊联合右美托咪定用于儿童扁桃体腺样体切除术后镇痛效果及对炎症因子、血流动力学的影响[J].中华中医药学刊,2022,40(8):205-208.
- [10] 徐克菲.金莲花软胶囊联合头孢替安治疗儿童急性化脓性扁桃体炎的临床研究[J].现代药物与临床,2020,35(10):2033-2036.
- [11] 林爱弟,蓝陈福,李司鹏.金莲花颗粒联合利巴韦林治疗小儿手足口病的临床疗效及对炎症细胞因子的影响[J].中国妇幼保健,2021,36(11):2556-2559.
- [12] 刘然,张晋玮,田野.金莲花口服液联合替硝唑治疗牙周炎的临床研究[J].现代药物与临床,2020,35(11):2224-2227.
- [13] 赵梦丽,张德蕴,闫大奇.金莲花口服液联合头孢拉定胶囊治疗牙周病的临床观察[J].中草药,2015,46(8):1200-1202.
- [14] 郭筠芳,赵章.金莲花软胶囊治疗急性咽喉炎 122 例临床观察[J].湖北中医杂志,2012,34(4):49.
- [15] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J].中草药,2021,52(14):4119-4129.
- [16] Li D Y, Wei J X, Hua H M, et al. Antimicrobial constituents from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(10): 1018-1023.
- [17] Shi D, Chen M, Liu L, et al. Anti-influenza A virus mechanism of three representative compounds from *Flos*

- Trollii* via TLRs signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112634.
- [18] Wang R, Wu X, Liu L, *et al.* Activity directed investigation on anti-inflammatory fractions and compounds from flowers of *Trollius chinensis* [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(2): 285-288.
- [19] Sun Y, Yuan H, Hao L, *et al.* Enrichment and antioxidant properties of flavone C-glycosides from trollflowers using macroporous resin [J]. *Food Chem*, 2013, 141(1): 533-541.
- [20] 宋微, 郭鑫, 巴音桑, 等. 基于网络药理学和分子对接的关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的作用机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(1): 48-57.
- [21] 金海峰, 王月飞, 郭林娜, 等. 依达拉奉通过抗炎、抗氧化对大鼠缺氧性肺动脉高压病理发展的抑制作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(21): 5324-5328.
- [22] 王学川, 李霄, 梁承远. 基于 JAK-STAT 信号通路的药物研究进展 [J]. *陕西科技大学学报*, 2019, 37(6): 79-86.
- [23] 覃淼, 熊万娜, 黄金梅, 等. 民间药材降真香抗炎质量标志物的研究 [J]. *药学学报*, 2022, 57(11): 3396-3404.
- [24] 李思翰, 练东银, 张广平, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨金骨莲提取物抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 29-35.
- [25] Zhu Y, Xu H, Chen H, *et al.* Proteomic analysis of solid pseudopapillary tumor of the pancreas reveals dysfunction of the endoplasmic reticulum protein processing pathway [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(10): 2593-2603.
- [26] 刘雅清, 刘滨, 马旭冉, 等. 黄芩汤对 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞的抗炎作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7): 20-28.
- [27] 陈文革, 杨朝晖, 黄高. 类风湿关节炎滑膜组织 RAGE 的表达及意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(9): 1256-1258.
- [28] 司丽君, 刘燕, 黄华. 薊黄素抗炎和免疫调节作用的研究 [J]. *华西药科学杂志*, 2022, 37(5): 518-522.
- [29] 余伟, 黄长山, 丁月超, 等. 香叶木素预处理通过抗炎和抗氧化发挥对小鼠肝缺血/再灌注的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(7): 1017-1022.
- [30] 余胜. 基于 TXNIP/NLRP3 通路对透脓散及其单体阿魏酸抑制溃疡性结肠炎的实验和临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [31] Mahmoud H A, Solahaye K S, Aghajani H, *et al.* Quercetin decreases Th17 production by down-regulation of MAPK-TLR4 signaling pathway on T cells in dental pulpitis [J]. *J Dent (Shiraz)*, 2018, 19(4): 259-264.
- [32] 丁敏芮, 曲彦洁, 安红梅. 芹菜素对心血管及神经系统疾病抗炎作用机制的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(7): 103-106.

【责任编辑 高源】