

【实验研究】

网络药理学结合谱效关系及分子对接探讨五味甘露抗炎物质基础及作用机制

蔡维维¹, 朱雪锐², 张仕杰¹, 侯豹¹, 陈静³, 米玛³, 孙海建¹, 邱丽颖^{1*}

1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

2. 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

3. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 基于网络药理学结合谱效关系及分子对接, 探讨五味甘露抗炎的物质基础及作用机制。方法 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、Genecards、Pubchem、UniProt、中国学术期刊全文数据库 (CNKI) 等数据库筛选五味甘露的活性成分及抗炎的作用靶点, 利用STRING数据库、Cytoscape3.7软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并筛选核心靶点, 利用Metascape数据库进行基因本体 (GO) 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。将细胞炎症模型与高效液相色谱法相结合分析五味甘露不同极性部位的抗炎活性和药效成分。采用Discovery Studio Lib Dock软件将主要药效成分与核心靶点进行分子对接, 并进行可视化分析。结果 网络药理学分析共获取五味甘露抗炎成分125个, 潜在抗炎靶点251个, 得到核心靶点131个, 包括肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 重要靶点。KEGG通路富集分析, 共富集到20条相关通路, 其中涉及基因较多的包括脂质与动脉粥样硬化和类风湿性关节炎 (RA) 等通路, 诸多通路均涉及NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NLRP3) 核心靶点。五味甘露的醋酸乙酯相能够抑制炎症相关的NLRP3、IL-1 β 、TNF的表达, 且其中总黄酮含量最高, 为 $(305.0 \pm 11.4) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。LC-MS图谱分析和分子对接实验显示醋酸乙酯相中山柰酚、杨梅素、异荭草素、异槲皮苷和黄芪苷等黄酮类物质的离子强度远远高于单味药材且其母核结构与NLRP3受体蛋白的7个氨基酸活性位点有显著的相互作用。结论 五味甘露抗炎的主要物质为黄酮类, 可通过抑制NLRP3炎症小体的活化起到抗炎作用。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 五味甘露; 谱-效关系; 抗炎; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 09-1944-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.002

Molecular mechanism of Tibetan medicine Wuwei Ganlu on anti-inflammatory effect based on network pharmacology combined with spectrum effect relationship and molecular docking

CAI Weiwei¹, ZHU Xuerui², ZHANG Shijie¹, HOU Bao¹, CHEN Jing³, MI Ma³, SUN Haijian¹, QIU Liying¹

1. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

3. University of Tibetan Medicine, Tibet 850000, China

Abstract: Objective To explore the material basis and mechanism of Wuwei Ganlu on anti-inflammatory based on network pharmacology combined with spectrum effect relationship and molecular docking. **Methods** The active ingredients and anti-inflammatory targets of Wuwei Ganlu were obtained using databases such as TCMSP, Genecards, Pubchem, UniProt, and CNKI, then core targets and protein interaction networks were screened by STRING database and Cytoscape 3.7 software. Metascape was used to perform GO and KEGG signal pathway enrichment of core targets. Subsequently, the cellular inflammation model combined

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 国家自然科学基金-面上项目(82170424); 国家自然科学基金-青年项目(81700364); 藏医药“十四五”规划内涵建设一期项目(2021zyygh002); 2020年中医学(藏医)博士点建设科研支撑计划项目(BSDJS-20-05)

第一作者: 蔡维维(1988—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事天然产物的感染与修复药理学研究。E-mail: caiweiwei@jiangnan.edu.cn

*通信作者: 邱丽颖(1965—), 女, 教授, 博士, 主要从事天然产物的感染与修复药理学研究。E-mail: qiulydoc@sina.com

with high-performance liquid chromatography was used to analyze the anti-inflammatory activity and pharmacological components of different polar parts of Wuwei Ganlu. Finally, discovery Studio Lib Dock software was applied to connect the main pharmacological components with the core targets for molecular docking and visual analysis. **Results** Through network pharmacological analysis, a total of 125 anti-inflammatory components of Wuwei Ganlu and 251 potential anti-inflammatory targets, as well as 131 core targets were obtained, including TNF, IL-6, IL-1 β . The KEGG pathway enrichment analysis enriched 20 related pathways, including lipid and atherosclerosis, and rheumatoid arthritis pathways, which all involved NLRP3 core targets. In addition, the ethyl acetate phase of Wuwei Ganlu can inhibit the expression of NLRP3, IL-1 β and TNF with a total flavonoid content of $(305 \pm 11.4) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. LC-MS spectrum analysis and molecular docking experiments showed that the ion strength of flavonoids such as naphthol, myricetin, isoquercetin, and astragaloside in the ethyl acetate phase was much higher than that of single medicinal herbs, and their mother nucleus structure had significant interactions with the seven amino acid active sites of the NLRP3 receptor protein. **Conclusion** The main anti-inflammatory substances of Wuwei Ganlu are flavonoids, which can exert anti-inflammatory effects by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Wuwei Ganlu; spectral-effect relationship; anti-inflammation; NLRP3

复方五味甘露是藏药典籍《四部医典》中的经典方剂^[1],已经被列入国家级非物质文化遗产名录。五味甘露主方是由藏麻黄、刺柏、烈香杜鹃、水柏枝和大籽蒿组成,主要用于治疗各种皮肤病、风湿、类风湿性关节炎(RA)、痛风、关节肿胀和强直性脊柱炎等自身免疫性疾病^[2-4],在这些疾病的发生发展均涉及到炎症反应,而巨噬细胞是这类炎症过程的主要贡献者,参与到炎症反应的起始、放大和消退阶段^[5]。

五味甘露作为藏药经典复方,具有有效成分复杂、药理作用广泛和作用靶点多的特性,导致五味甘露药效组分和机制无法诠释清楚。网络药理学是从药理学新兴分支的一门学科,基于系统生物学、基因组学、蛋白组学等学科理论,运用高通量组学数据分析、网络数据库检索和分子对接模拟等现代技术,可以预测出药物与疾病的相关性,诠释药物-基因-靶点-疾病相互作用的调节机制^[6-7]。中药谱效关系研究可实现中药化学成分与药效间的关联,阐述发挥药效的物质基础。

因此,本研究将基于网络药理学理论,结合谱效关系及分子对接技术,以中药有效物质提取分离理论为指导,寻找五味甘露抗炎的物质基础及初步机制探讨,以期解析五味甘露抗炎的关键物质基础,为五味甘露制剂的制备提供质量标准参考。

1 材料

1.1 药物

藏麻黄、刺柏、烈香杜鹃、水柏枝、大籽蒿购自安国市药源商贸有限公司,经西藏藏医药大学米玛教授鉴定为麻黄科藏麻黄 *Ephedra saxatilis* Royle ex Florin 全株、柏科刺柏 *Juniperus formosana* Hayata 枝条、杜鹃花科烈香杜鹃 *Rhododendron*

anthopogonoides Maxim 枝条、桤柳科水柏枝 *Myricaria laxiflora* (Franch.) P. Y. Zhang et Y. J. Zhang 嫩枝、菊科蒿属大籽蒿 *Artemisia sieversiana* Ehrhart ex Willd 植物的干燥成熟果实。

1.2 RAW264.7 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7,购自中国科学院细胞库(上海)。将细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。待细胞生长到 85%~90% 的融合度后,进行传代或铺板,以便进行后续实验。

1.3 主要试剂

DMEM 高糖培养基和胎牛血清(批号:SH30022、SH30071.03,赛默飞世尔科技公司);脂多糖(LPS,批号:L2880,质量分数:≥99%,美国 Sigma 公司);三磷酸腺苷(批号:11140965001, Sigma 公司);RNA 逆转录试剂、SYBR Green Master Mix(批号:15662ES、11200ES,上海翌圣生物科技公司)。

1.4 主要仪器

全自动荧光定量 PCR 系统(LightCycler 480II, 美国罗氏公司);PCR 扩增仪(Mastercycler®X50i, 德国艾本德公司);RE-52A 旋转蒸发仪(RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂);高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC I-Class plus, 美国 Waters 公司);高分辨质谱仪(Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS, 赛默飞世尔科技公司);Milli-Q 纯水仪(EQ7000, 美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学预测

2.1.1 五味甘露抗炎成分及潜在作用靶点的获取
从中药系统药理分析平台(TCMSP, <http://tcmspnw.com>).

com/)收集藏麻黄和大籽蒿两味中药的成分,首先设定口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 及类药性(DL) ≥ 0.18 ,然后将符合标准的药物活性成分筛选出来。从万方、维普和知网(CNKI)将获得的烈香杜鹃、刺柏和水柏枝的相关活性成分整理并输入TCMSP数据库中获得OB、DL及潜在作用靶点等信息。最后利用UniProt(<https://www.uniprot.org/>)数据库,筛选去重,即得到药物相关的靶点基因名称。

2.1.2 与炎症相关疾病靶点的筛选 以“inflammation”为关键词,在GeneCards数据库中(<https://www.genecards.org>)进行检索,可以获得相关的靶点信息。以Relevance score为筛选目标,通过中位数进行筛选作为疾病特异性靶点。

2.1.3 五味甘露抗炎成分与疾病交集靶点的获取 通过Venny在线绘图工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>),输入五味甘露抗炎成分的作用靶点和炎症潜在靶点,绘制药物-疾病靶点交集图并获得共同靶点基因信息。

2.1.4 药物-疾病靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将Venny图交集得到的靶点数据输入到STRING数据库(<https://string-db.org/>),利用Cytoscape 3.10.0软件绘制PPI网络图。

2.1.5 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 运用Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行GO功能分析和KEGG信号通路富集分析,GO功能分析包括生物过程(BP)、分子功能(MF)、细胞组成(CC),并借助微生信-在线生物信息分析进行可视化分析。

2.2 五味甘露抗炎物质基础研究及谱效关系分析

2.2.1 五味甘露有效成分的提取与分离

的藏麻黄、刺柏、杜鹃、水柏枝和大籽蒿药材用粉碎机单独粉碎,过2号筛。然后分别称取各药材60 g混合,在60℃水浴下回流2次进行提取,料液比1:10,每次提取2 h,合并提取液,滤过,减压旋蒸烘干得五味甘露水提物药粉,记为W1。

取五味甘露水提物干粉420 g,用适量去离子水溶解混悬,按图1所示进行极性萃取,分别获得石油醚萃取相(W2)、醋酸乙酯萃取相(W3)、正丁醇萃取相(W4)。

2.2.2 各萃取相总黄酮含量测定 精密称取100 mg芦丁对照品,置于100 mL量瓶中,然后加70%乙醇定容至刻度并摇匀,作为储备液。精密吸取对照品储备液0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08 mL于试管中,用70%乙醇定容至1 mL并摇匀。随后,各加入0.5 mL 5%亚硝酸钠溶液,摇匀,静置6 min;再加入0.5 mL 10%硝酸铝溶液,摇匀,静置6 min;接着加入5 mL 4%氢氧化钠溶液,最后加入3 mL 70%乙醇溶液,摇匀,静置15 min。取200 μL 上述各反应液于510 nm波长处测定吸光度,绘制标准曲线。精密称取W1~W4各100 mg,用70%乙醇定容至100 mL,取1 mL样液,按照标准曲线制作方法操作,测定各组样品中总黄酮的含量。

2.2.3 五味甘露不同提取物的抗炎效果评价 选用LPS刺激RAW264.7细胞建立细胞炎症模型。设置对照组、模型组、给药组。比较W1~W4在巨噬细胞炎症模型下的抗炎效果。将处于对数生长期的RAW 264.7细胞以每孔 5×10^5 个铺入6孔板,并设置对照组、模型组及给药组。待细胞贴壁后,给药组分别加入为50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ W1, 10、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ W2, 10、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ W3, 10、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ W4。同时加入质量浓度为1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的LPS进行诱导,对照组只加入完全培养基和磷酸盐缓冲液(PBS),模型

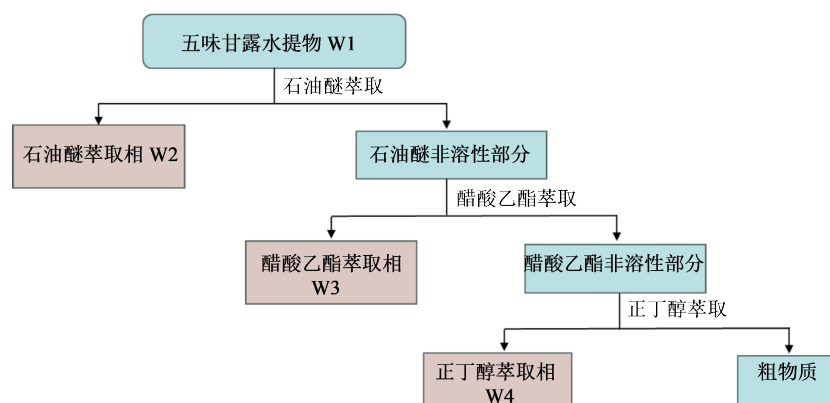


图1 五味甘露提取分离流程

Fig. 1 Extraction and separation process of Wuwei Ganlu

组只加入 LPS 和 PBS, 不给予药液, 在培养箱中孵育 4 h 后, 弃旧培养基, 给药组加 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP, 同时再加入同样浓度的萃取相样品, 对照组只加入完全培养基和 PBS, 模型组只加 ATP 和 PBS, 继续放入培养箱中孵育 0.5 h。

用 PBS 溶液将 6 孔板中的各组 RAW264.7 细胞清洗 2 遍, 使用 TRIzol 试剂充分裂解细胞, 按照

RNA 提取说明书进行操作, 并将终浓度 RNA 进行调整定量。随后取 $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA 逆转录成 cDNA 后, 用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR 检测, 以 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*NLRP3* mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。内参及目的基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
<i>β-actin</i>	CTGAGAGGGAAATCGTGC GTGAC	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG
<i>TNF-α</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGAC	TGGGAGTAGACAAGGTACAAC
<i>IL-1β</i>	GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG	TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG
<i>NLRP3</i>	GCCGTCTACGTCTTCTTCTTTCC	CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG

2.2.4 超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)成分解析 按“2.2.1”项提取方法, 分别获得烈香杜鹃、水柏枝、刺柏、大籽蒿和藏麻黄水提物药粉, 并依次标记为 W5、W6、W7、W8、W9。

分别称取 10 mg 样本 W1、W3、W5-W9, 加入 $0.06\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲醇配置 L-2-氯苯丙氨酸内标 $20\text{ }\mu\text{L}$, 挥干处理后, 加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇-水(1:1)复溶, 并置于冰水浴超声提取 30 min, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。静置 12 h 后, 将样品取出, $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。用注射器小心吸取上清液 $150\text{ }\mu\text{L}$, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机过滤器滤过后, 存储在进样瓶, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以备后续进样。

使用 ACQUITY UPLC I-Class plus 超高效液相串联 QE 高分辨质谱仪组成的液质联用系统, 按以下色谱条件进行分析: 色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$), 柱温 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流动相 A-水(含 0.1% 甲酸), B-乙腈(含 0.1% 甲酸), 体积流量 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样体积 $2\text{ }\mu\text{L}$, 离子源 ESI, 按以下洗脱条件进行: $0\sim 2\text{ min}$, 5%B; $2\sim 4\text{ min}$, 5%~30%B; $4\sim 8\text{ min}$, 30%~50%B; $8\sim 10\text{ min}$, 50%~80%B; $10\sim 14\text{ min}$, 80%~100%B; $14\sim 15\text{ min}$, 100%B。正离子扫描模式和负离子扫描模式下的质谱扫描范围设置为 $m/z\text{ }70\sim 1\text{ }200$ 。扫描分辨率为 70 000(全扫描)。喷雾正离子扫描模式的电压设置为 $3\text{ }800\text{ V}$, 负离子扫描模式为 $-3\text{ }000\text{ V}$ 。在正、负离子模式下, 鞘气流速分别为 40、35 Arb, 辅助气体流速分别为 10、8 Arb, 毛细管温度设定为 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 成分-靶点分子对接技术

运用 Discovery Studio 2019 版软件进行成分-靶点分子对接。输入关键靶点“NLRP3”到 PDB (<http://www1.rcsb.org/>) 检索相关蛋白靶点^[8]。筛选原则: 选择“Homo sapiens”; “Refinement Resolution”数值为 1.5~2.0。在搜索出来的结果中选择核苷酸结合寡聚化结构域样受体含 pyrin 结构域蛋白 3(NLRP3, PDB ID: 7PZC) 的蛋白结构, 并下载 PDB 格式。活性成分从 Pubchem 数据库下载 SDF 格式。活性物质和靶点蛋白导入软件中, 对蛋白进行去水、加氢、位点分析等处理后, 对单体进行同分异构体分析。最后以处理后靶点蛋白和化合物的执行分子对接, 导出活性物质与蛋白对接反应部位三维立体图和平面图进行分析。

2.4 统计学处理

数据用 GraphPad Prism 进行可视化处理, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组数据比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 五味甘露抗炎成分及作用靶点的获取 从 TCMSP 数据库、CNKI、万方和维普等数据库获得五味中药的有效化学成分, 其中, 麻黄 22 种、大籽蒿 19 种、烈香杜鹃 23 种、水柏枝 23 种、刺柏 23 种(表 2)。通过 TCMSP 数据库将上述化学成分的作用靶点导出。其中, 麻黄具有靶点 207 个, 大籽蒿具有靶点 185 个, 烈香杜鹃具有靶点 199 个, 水柏枝具有靶点 112 个, 刺柏具有靶点 70 个, 将潜在靶点合并去重, 共得到 251 个具有活性成分的潜在靶点(图 2)。

表2 五味甘露活性成分信息

Table 2 Information on active ingredients of Wuwei Ganlu

编号	MOL编号	化合物	OB/%	DL	靶点/个
DJ3	MOL004368	金丝桃苷(hyperin)	6.94	0.77	9
DJ17	MOL004020	棉子素(gossypetin)	35.00	0.31	10
DJ19	MOL007979	广寄生苷(avicularin)	2.06	0.70	4
DJ20	MOL000702	扁蓄苷(guajavarin)	29.65	0.70	4
DJ21	MOL009847	胡麻素(pedalitin)	34.02	0.31	8
DJ22	MOL002902	咖啡酸乙酯(ethyl caffeate)	103.85	0.07	4
DJ23	MOL006218	咖啡酸甲酯(methyl caffeate)	30.68	0.06	7
DJ25	MOL000910	大根香叶酮(germacron)	32.50	0.07	8
DJ26	MOL002215	齐墩果酸(oleanic acid)	8.41	0.77	3
DJ27	MOL000511	熊果酸(ursolic acid)	16.77	0.75	55
DJ28	MOL001310	表白桦脂酸(epibetulinic acid)	15.66	0.78	7
DJ29	MOL012441	(1S,4aS,8aS)-7-异亚丙基-1,4a-二甲基-1-十烷醇[(1S,4aS,8aS)-7-isopropylidene-1,4a-dimethyl-1-decalinol]	33.39	0.10	10
DJ31	MOL002063	芹子烯(γ -selinene)	22.23	0.08	10
DJ32	MOL006710	秦皮苷[8-(β -D-glucopyranosyloxy)-7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one]	36.76	0.42	5
ZMH1	MOL010788	白天竺葵苷元(leucopelargonidin)	57.97	0.24	5
ZMH3	MOL010489	香附(resivit)	30.84	0.27	4
ZMH5	MOL004798	花翠素(delphinidin)	40.63	0.28	8
ZMH11	MOL001494	青果(mandenol)	42.00	0.19	3
ZMH12	MOL001755	24-乙基胆甾-4-烯-3-酮(24-ethylcholest-4-en-3-one)	36.08	0.76	2
ZMH13	MOL001771	高良姜(poriferast-5-en-3 β -ol)	36.91	0.75	2
ZMH14	MOL002881	香叶木素(diosmetin)	31.14	0.27	10
ZMH15	MOL004328	柚皮素(naringenin)	59.29	0.21	37
ZMH17	MOL005043	菜油甾醇(campest-5-en-3 β -ol)	37.58	0.71	1
ZMH18	MOL005190	圣草素(eriodytyol)	71.79	0.24	9
ZMH19	MOL005573	羌花素(genkwanin)	37.13	0.24	14
ZMH20	MOL005842	柳穿鱼黄素(pectolinarigenin)	41.17	0.30	12
ZMH21	MOL007214	白矢车菊素[(+)-leucocyanidin]	37.61	0.27	4
ZMH22	MOL011319	邻苯二甲酸丁辛酯(truflex OBP)	43.74	0.24	7
DZH1	MOL002235	泽兰黄醇素(EUPATIN)	50.80	0.41	16
DZH3	MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75	3
DZH5	MOL004112	万寿菊素(patuletin)	53.11	0.34	11
DZH6	MOL004609	茵陈黄酮(areapillin)	48.96	0.41	17
DZH7	MOL005229	青蒿黄素(artemetin)	49.55	0.48	23
DZH9	MOL007274	玄参黄酮(skrofullein)	30.35	0.30	11
DZH10	MOL007401	线菊素(cirsiliol)	43.46	0.34	10
DZH11	MOL007404	牡荆黄素(vitexin _{qt})	52.18	0.21	15
DZH12	MOL007412	甲氧基万寿菊素(DMQT)	42.60	0.37	10
DZH13	MOL007415	[(2S)-2-[[[(2S)-2-(苯甲酰氨基)-3-苯基丙酰基]氨基]-3-苯基丙基]乙酸盐{[(2S)-2-[[[(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropyl] acetate}	58.02	0.52	5
DZH14	MOL007423	芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷(6,8-di-c-glucosylapigenin _{qt})	59.85	0.21	16
DZH15	MOL007424	青蒿素(artemisinin)	49.88	0.31	15

表 2 (续)

编号	MOL 编号	化合物	OB/%	DL	靶点/个
DZH16	MOL007426	去氧青蒿素(deoxyartemisinin)	54.47	0.26	1
SBZ1	MOL000360	阿魏酸(FER)	39.56	0.06	16
SBZ2	MOL003177	丁香醛(syringaldehyde)	67.06	0.05	11
SBZ4	MOL001906	没食子酸甲酯(methylgallate)	30.91	0.05	5
SBZ5	MOL000513	鞣酸(3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	31.69	0.04	15
SBZ7	MOL001778	芥子醛(sinapaldehyde)	63.16	0.07	6
SBZ9	MOL005125	4-甲氧基苯甲酸(ANN)	29.69	0.03	6
SBZ10	MOL000365	丁香脂素(syringaresinol)	3.29	0.72	9
SBZ11	MOL006931	异落叶松脂醇(isolariciresino)	6.96	0.39	23
SBZ12	MOL002650	松柏醇(coniferol)	44.88	0.05	18
SBZ15	MOL004362	阿福豆苷(afzelin)	3.83	0.70	4
SBZ16	MOL005889	鼠李素(rhamnetin)	2.40	0.30	24
SBZ19	MOL003044	木犀草素(chryseriol)	35.85	0.27	18
SBZ20	MOL000251	鼠李柠檬素(rhamnocitrin)	12.90	0.27	19
SBZ22	MOL000351	鼠李素(rhamnazin)	47.14	0.34	23
CB3	MOL005958	4-羟基-3-甲基苯乙酮(4-hydroxy-3-methylacetophenone)	38.53	0.03	2
CB4	MOL007387	2-甲氧基对苯二酚(2-mohydrop)	44.80	0.03	4
CB5	MOL001300	苯乙醇(PEL)	44.03	0.02	6
CB6	MOL001599	α -荜澄茄醇(α -cubebol)	64.81	0.09	12
CB7	MOL003789	香豆素(coumaran)	50.90	0.03	4
CB8	MOL001700	脱氧鬼臼毒素(deoxypodophyllotoxin)	37.75	0.83	20
CB9	MOL000532	去甲络石苷元(nortrachegenin)	5.95	0.43	8
CB10	MOL005612	3,4-二甲氧基苯酚(3,4-dimethoxyphenol)	73.36	0.03	6
CB11	MOL002558	伞形酮(skimmetin)	27.37	0.05	10
CB12	MOL000117	伞花烃(cymol)	27.20	0.02	2
CB13	MOL000475	茴香脑(anethole)	32.49	0.03	15
CB15	MOL000232	(R)-(+)- α -松油醇[(R)-(+)- α -terpineol]	46.30	0.03	21
CB16	MOL005492	4-甲氧基-1,2-苯并二唑(4-methoxy-1,2-benzodioxole)	57.08	0.04	4
CB17	MOL004786	4-松油醇(4-terpineol)	40.75	0.03	3
CB18	MOL003027	9-表位-(E)-石竹烯[9-epi-(E)-caryophyllene]	30.28	0.09	14
CB20	MOL000018	(+/-)-异冰片[(+/-)-isoborneol]	86.98	0.05	13
CB21	MOL011445	α -柏木烯(α -cedrene)	50.90	0.10	4
CB22	MOL011982	β -柏木烯(β -cedrene)	56.53	0.11	8
CB23	MOL000908	β -榄香烯(β -elemene)	25.63	0.06	25
A1	MOL002823	草药素(herbacetin)	36.07	0.27	14
A2	MOL004576	紫杉醇(taxifolin)	57.84	0.27	12
B1	MOL000358	β -谷甾醇(β -sitosterol)	36.91	0.75	38
C1	MOL000492	(+)-儿茶素[(+)-catechin]	54.83	0.24	11
D1	MOL006769	异槲皮素(isoquercetrin)	3.86	0.78	2
D2	MOL000701	槲皮素(quercitrin)	4.04	0.74	9
D3	MOL004564	山柰苷(kaempferid)	73.41	0.27	17
D4	MOL000414	咖啡酸酯(caffeate)	54.97	0.05	9
E1	MOL000197	肉桂烯(myrcene)	24.96	0.02	2
F1	MOL012445	4-[(3R)-3-羟基丁基]苯酚{4-[(3R)-3-hydroxybutyl]phenol}	43.89	0.04	10
F2	MOL000635	香兰素(vanillin)	52.00	0.03	11

表2 (续)

编号	MOL 编号	化合物	OB/%	DL	靶点/个
G1	MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31	37
H1	MOL004083	怪柳黄素(tamarixetin)	32.86	0.31	15
J1	MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76	31
J2	MOL000006	木犀草素(luteolin)	36.16	0.25	57
K1	MOL000098	槲皮素(querccetin)	46.43	0.28	154
L1	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	63

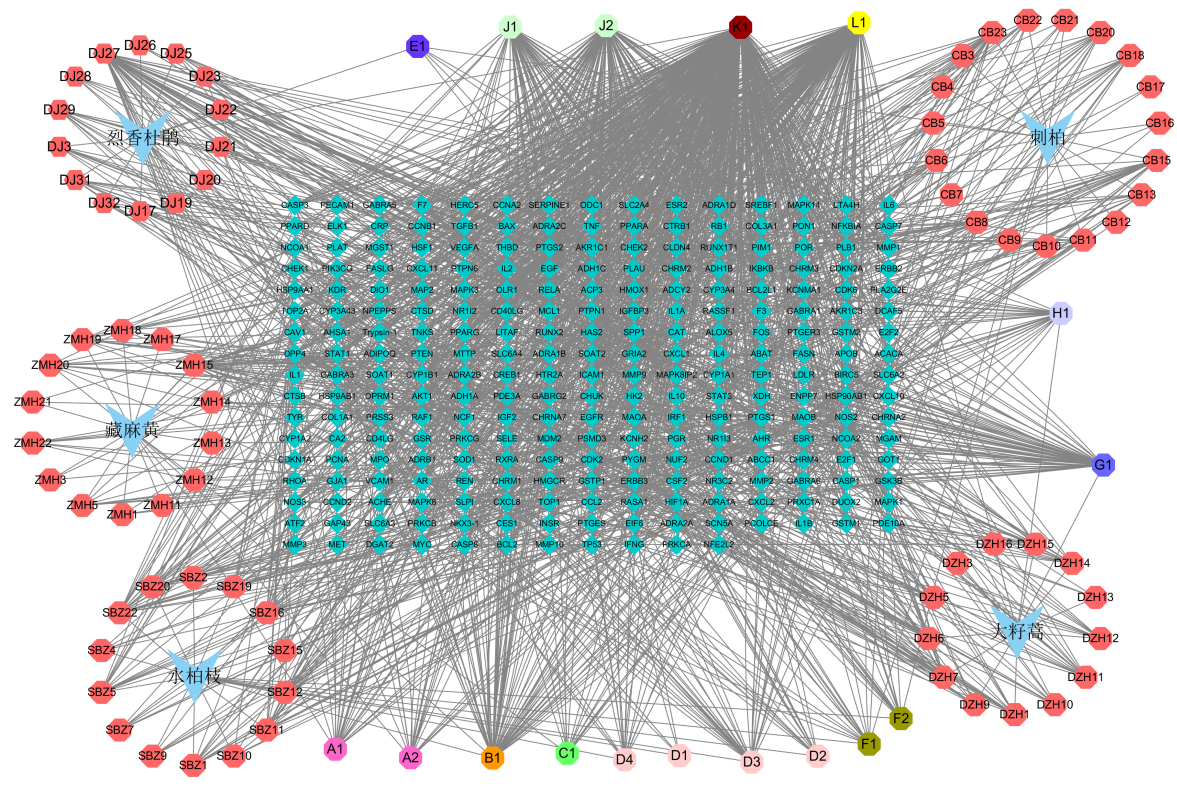


图2 五味甘露抗炎成分靶点网络图

Fig. 2 Network diagram of anti-inflammatory components of Wuwei Ganlu

3.1.2 五味甘露和疾病预测靶点蛋白交集图绘制 通过 Genecard 数据库检索,获得相关靶点 11 109 个,筛选 2 次中位数后仍然有 2 778 个,考虑到疾病网络过于庞大,于是将第 2 次中位数的 2 倍作为筛选目标,筛选后获得 1 397 个疾病靶点。使用 Venny 在线绘图工具将五味甘露 251 个成分靶点和 1 397 个疾病靶点分别输入,找到 131 个共同靶点基因信息(图 3-A)。

3.1.3 构建药物-疾病核心靶点 PPI 网络图 度值越大靶点图标越大,颜色越深,越有可能为药物治疗疾病的核心靶点。如图 3-B 所示,图中 TNF、IL-6、IL-1 β 等图标大、颜色深,可能为五味甘露抗炎的核心靶点。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 对药物-疾病核心靶点进行 GO 功能富集分析(图 4)发现,作用靶点基因主要富集的 BP 包括对 LPS 的反应、炎症反应调节、细胞分化的负调控、氧化应激反应的调节、细胞间黏附的调控、对外部刺激反应的负调控、miRNA 转录的调控等;CC 包括囊泡腔、膜筏、薄膜侧面、细胞外基质、细胞质核周区、富含 ficolin-1 的颗粒管腔、转录调节复合体、受体复合体、溶解液等;MF 功能包括细胞因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、蛋白质同源二聚活性、趋化因子受体结合、肿瘤坏死因子受体结合、整合素结合、激酶调节活性、血红素结合、金属内肽酶活性、蛋白激酶活性、蛋白酶结合、羧酸结合、肽结

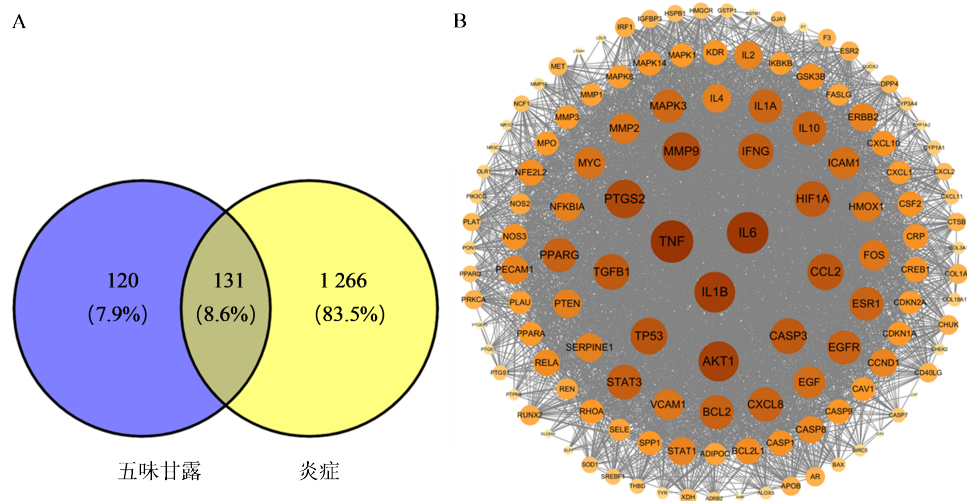


图3 五味甘露潜在作用靶点与炎症靶点的韦恩图(A)和PPI网络(B)

Fig. 3 Venn diagram (A) and PPI network (B) of potential targets of Wuwei Ganlu and inflammation

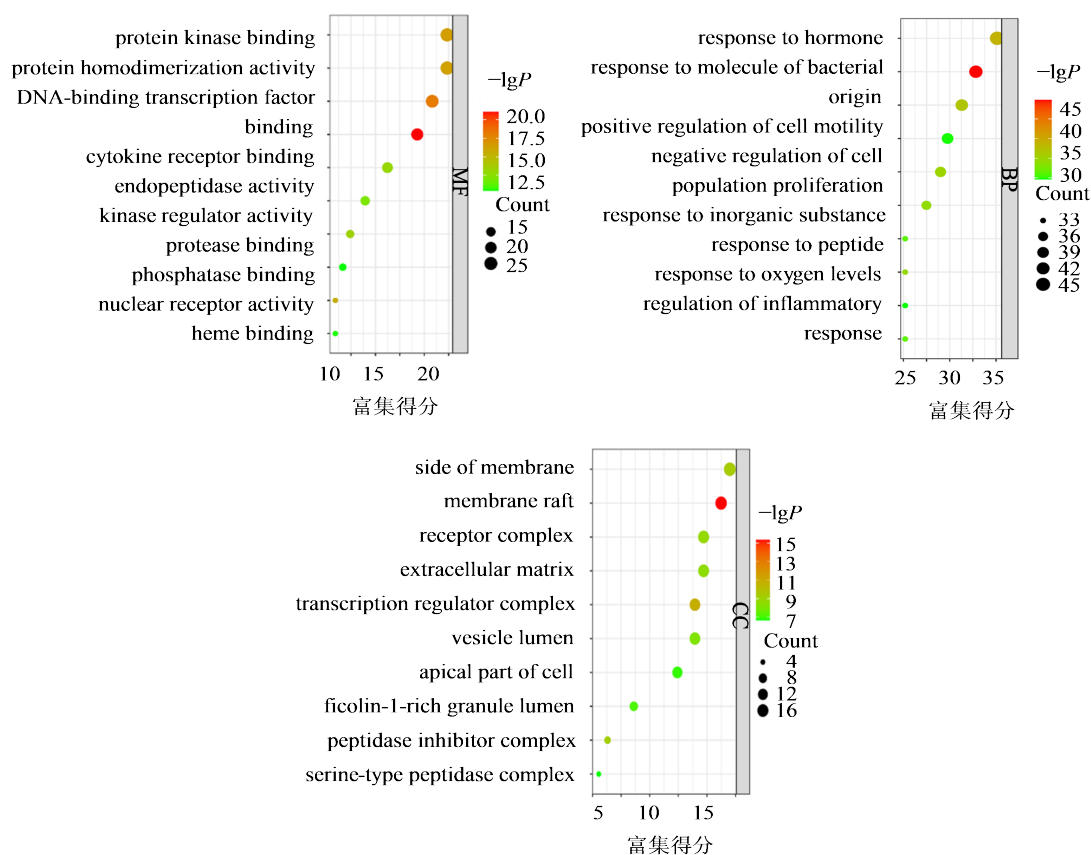


图4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

合等。

KEGG 通路富集分析涉及 131 个基因,参与调控的通路有 20 条,其中涉及基因较多的包括脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路和 RA 等通路(图 5)。将 KEGG 中 hsao5417 等前几条通路导入 Gene map 查看通路,发现在众多通

路中都存在 NLRP3 这个关键靶点。NLRP3 炎症小体由 NLRP3、细胞凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和 Caspase-1 (cysteinyl aspartate specific proteinase)组成。NLRP3 募集 ASC 和 Caspase-1 形成炎症小体并加工 IL-1 β 的前体,对 IL-1 β 的成熟和释放至关重要。NLRP3 炎症小体激活后,通过激活的 Caspase-1

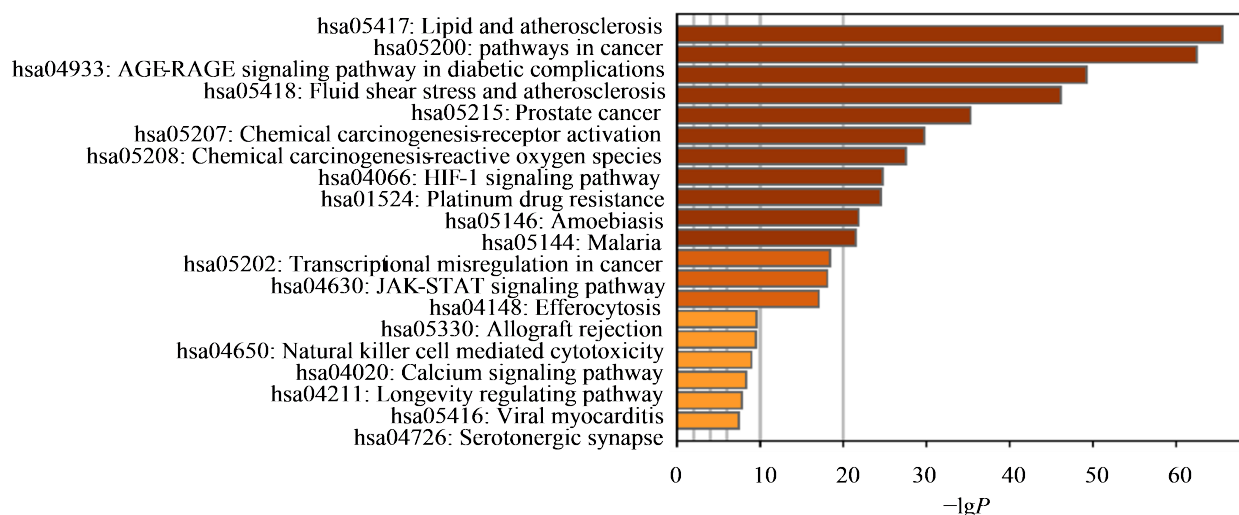


图5 KEGG通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

将促炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 从无活性的前体转化为活性形式,并促使其释放。可以说,NLRP3 小体在自身免疫性疾病的病理发展过程中起着至关重要的作用,基于此,围绕 NLRP3 小体进行系列实验验证五味甘露的抗炎作用。

3.2 谱效关系分析

3.2.1 五味甘露不同萃取相的提取分离得率 五味甘露不同萃取相得率见表3,结果显示大部分物质都在粗物质中,在有机萃取相中,W2得率最低,W4得率较高,表明五味甘露中大部分物质极性偏大。

3.2.2 不同萃取相中总黄酮质量分数测定结果 如表3所示,W3的总黄酮质量分数远远高于W2和W4。其中W3的总黄酮质量分数为(305.0 $\pm$ 11.4)mg $\cdot$ g $^{-1}$,其次为W4,粗物质中总黄酮质量分数最少,仅为7.1 mg $\cdot$ g $^{-1}$ 。

表3 五味甘露不同极性萃取物得率

Table 3 Yield of different polar extracts of Wuwei Ganlu

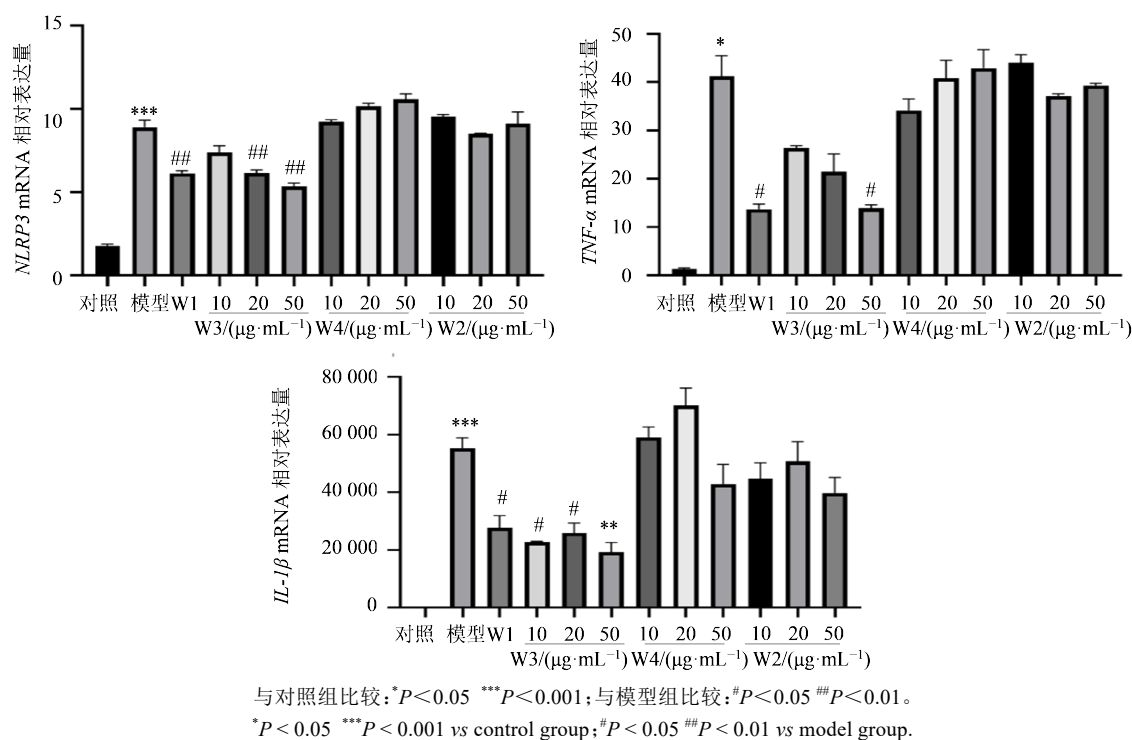
组分	质量/g	总黄酮/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	得率/%
W1	—	35.10 $\pm$ 0.60	—
W2	0.1	37.31 $\pm$ 4.38	0.023
W3	7.2	305.00 $\pm$ 11.40	1.700
W4	23.6	68.70 $\pm$ 3.60	5.600
粗物质	165.1	7.10 $\pm$ 0.20	39.300

3.2.3 不同萃取相抗炎效果评价 通过 LPS 构建巨噬细胞炎症模型结合实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)发现,与模型组比较,W1 和 W3 能够显著抑制 NLRP3 mRNA 的表达。同时,炎症因子 IL-1 β 和

TNF- α 的 mRNA 表达也有所降低,而 W2、W4 的炎症因子表达与模型组没有显著差异(图6)。结合表3中不同组分黄酮含量分析,可以确定五味甘露 W1 中起抗炎作用的主要是黄酮类物质,且主要存在于 W3 中。基于此,对 W3 进行 LC-MS 分析,探讨五味甘露抗炎的物质基础。

3.2.4 UPLC-Q-TOF-MS 成分解析 采用 UPLC-Q-Exactive MS 技术对五味甘露 W1、W3 和单味药材溶液 W5~W9 进行分析,如图7所示。化合物的鉴定基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,使用 The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps(v2.3)和 METLIN 数据库以及自建库(上海鹿明生物公司提供)进行定性,共匹配出 13 000 多种化合物。通过与相关数据库进行对比,按照 class 分类级别对五味甘露中 13 000 多种化合物进行分类,由于分类多所以选用化合物数量最多的 9 类,其他类合并为 others。数据库对 6 000 多种化合物进行了明确分类,如表4所示。结合细胞实验结果,物质基础分析从“Flavonoids”分类入手,进行详细分析。对 W3 和 W5~W9 的质谱数据和五味甘露进行分析,以“Flavonoids”分类为主要分析目标,其黄酮化合物数量统计如图7所示。

3.2.5 五味甘露抗炎活性物质分析 为了进一步验证推测,对黄酮类化合物进一步筛选。筛选标准如下:(1)Score 总打分,满分 60 分(一级谱图+二级谱图+同位素打分),至少满足 $\geq$ 36。score 分值越高,化合物定性可信度越高,数据越可靠。(2)Fragmentation Score 二级打分,满分 100 分,分值大于 0,即说明有二级谱图信息,分数越高越好。五味

图6 五味甘露不同萃取相对NLRP3、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)Fig. 6 Effects of different extractions of Wuwei Ganlu on NLRP3, TNF- α and IL-1 β mRNA expression($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

甘露筛选后的黄酮类物质如表5所示。将Class分类下的黄酮类物质,通过离子强度(intensity)来进行纵向对比,将W1中的化合物离子强度比作“1”,算出W5~W9及W3中化合物相对比值(W5~W9及W3中化合物离子强度/W1化合物强度)。如表6,可以看出,W3中黄酮类物质含量远远大于W1及W5~W9中的黄酮类物质,比如 kaempferol、myricetin、isorientin、isoquercitrin 及 astragalin 等。前面研究表明,W1和W3能够抑制NLRP3 mRNA的表达,因此,W3中黄酮含量很高的化合物如: kaempferol、myricetin、isorientin、isoquercitrin 和 astragalin 等极有可能也是W1中发挥抗炎效果的化合物。

3.3 五味甘露黄酮类活性单体与NLRP3蛋白靶点的对接分析

为了进一步找到W1中黄酮类化合物与NLRP3蛋白靶点的分子作用基团,将“谱-效”关系分析得到的活性单体与NLRP3蛋白靶点进行对接分析。

以 kaempferol、myricetin、isorientin、isoquercitrin 及 astragalin 5个单体为配体,NLRP3蛋白靶点为受体进行分析,得出 kaempferol、myricetin、isorientin、isoquercitrin 及 astragalin 与蛋白受体对接分数分别为 94.89、101.93、114.15、

115.29和107.71,表明NLRP3的受体靶点蛋白与五味甘露中多种黄酮单体对接较好,可能为五味甘露中黄酮类化合物治疗“布真病”的共同作用位点。

图8所示为五味甘露中活性成分与NLRP3靶点对接示意图,5个化合物均进入了NLRP3蛋白活性位点,并与活性位点的关键残基形成氢键或阳离子- π 等作用力关系。其中 kaempferol 与NLRP3蛋白残基 GLU416 形成1个氢键,与 LYS383 形成阳离子- π 作用; myricetin 与残基 GLY421、ARG423、CYS418、GLY373 和 LEU378 形成5个氢键,与 LYS383 形成烷基- π 作用; isororientin 与残基 ALA377 形成1个氢键,与 ARG379 形成阳离子- π 作用; isoquercitrin 与残基 ALA377、GLY421 形成2个氢键,与 ARG379 形成阳离子- π 作用; astragalin 与残基 ARG423、SER381 形成2个氢键,与 LYS383 形成阳离子- π 作用。

4 讨论

五味甘露作为中药复方,目前对整体复方成分的报道很少,仅有部分学者对单独的各味药材进行了一定化学成分的分析。五味甘露中五味药材包含的主要有黄酮类、挥发油、萜类、生物碱类和鞣质类等成分。对于大籽蒿、烈香杜鹃和刺柏中的黄酮类化合物,所报道的有槲皮素、槲皮苷、山柰酚和芦

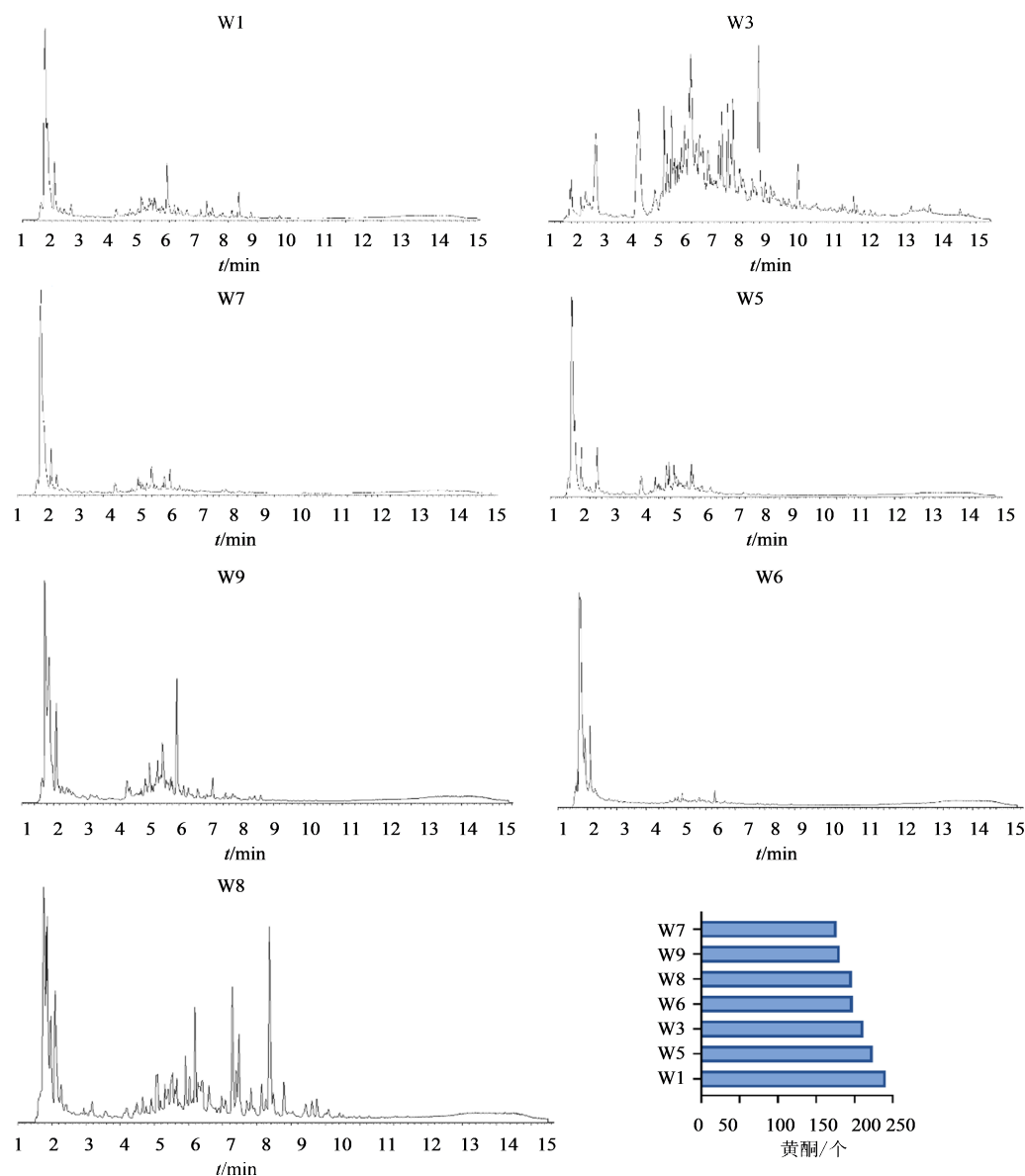


图 7 W1、W3 和 W5~W9 的总离子图和黄酮数量统计图
Fig. 7 Total ion map of W1, W3, W5—W9 and quantity of flavonoids

表 4 五味甘露分类化合物统计
Table 4 Wuwei Ganlu class compound statistics

分类	数量	占比/%
苯及其取代衍生物	534	3.44
羧酸及其衍生物	943	6.07
脂肪酰基	1 896	12.20
黄酮类化合物	241	1.55
有机氧化合物	1 037	6.67
聚酮类	554	3.56
异戊二烯脂质	1 008	6.49
类固醇和类固醇衍生物	249	1.60
未分类	5 844	37.60
其他	3 235	20.82

丁等成分可以发挥抗炎、抗菌和抗氧化等功效^[9-12]。刺柏的挥发油成分 α -蒎烯和柠檬烯等成分显示出一定的抗菌、抗肿瘤和杀菌作用^[13]。藏麻黄最典型的化学成分是麻黄碱和其类似物为主的生物碱类,在生物体内体现出较强的抗炎、抗氧化及抗肿瘤活性^[14-15]。

水柏枝的水提物和醇提物含有儿茶素和酚酸等鞣质类具有抗肿瘤和体外细胞活性^[16]。烈香杜鹃中所含的苦艾素和葑草苦素等萜类,有抗肿瘤和抗过敏等活性^[12, 17]。同时,五味甘露药浴作为藏医最常用的一种治疗 RA、关节肿胀的药物,多年临床研究表明,五味甘露药浴治疗 RA 的总有效率达 90% 以上^[18-21],治疗途径通常与其减少患者体内类风湿因子的形成、增加 CD8⁺ 细胞和恢复免疫系统

表5 五味甘露 class 分类下筛选出的黄酮类物质
Table 5 Wuwei Ganlu flavonoids screened under class classification

ID	m/z	保留时间/min	黄酮类物质	分子式	评分	碎片分数
1	465.10	4.72	异槲皮苷(isoquercitrin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	58.91	97.79
2	611.16	4.62	芦丁(rutin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	57.44	93.44
3	449.11	4.98	黄芪苷(astragalin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	56.90	89.00
4	593.19	5.29	枫香素 4'-[3-乙酰非生物基-(1→2)-葡萄糖苷](liquiritigenin 4'-[3-acetylapiosyl-(1→2)-glucoside])	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	56.63	86.53
5	305.06	4.60	二氢槲皮素(taxifolin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	56.31	87.10
6	375.11	8.78	紫花牡荆素(casticin)	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	56.10	86.66
7	463.12	5.10	芍药素-3-O-葡萄糖苷(peonidin 3-O-glucoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	55.12	85.67
8	287.05	5.27	山柰酚(kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	55.00	80.64
9	319.04	4.70	杨梅素(myricetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	55.00	81.70
10	449.11	4.60	异荭草苷(isoorientin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	54.80	79.63
11	399.14	6.12	4'-甲基甘草甜素 7-鼠李糖苷(4'-methylliquiritigenin 7-rhamnoside)	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	54.63	80.56
12	389.12	9.78	蒿黄素(artemetin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	54.44	78.81
13	257.08	5.88	(2S)-甘草苷元[(2S)-liquiritigenin]	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	54.31	77.27
14	479.12	4.90	矮牵牛素葡萄糖苷(petunidin 3-glucoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	54.09	79.24
15	291.09	3.54	表儿茶素(epicatechin)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	53.58	74.45
16	437.11	4.60	紫杉醇-3-阿拉伯糖苷(taxifolin 3-arabinoside)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	53.34	71.82
17	435.09	4.92	槲皮素-3-阿拉伯糖苷(quercetin 3-arabinoside)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	53.00	69.71
18	609.18	4.68	香叶木苷(diosmin)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	52.75	71.71
19	591.17	4.10	根皮素木糖基半乳糖苷(phloretinxylosylgalactoside)	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	50.64	62.94
20	475.12	3.06	儿茶素-7-O-β-吡喃葡萄糖苷(catechin 7-O-β-D-glucopyranoside)	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	50.57	62.80
21	611.16	4.06	人参黄酮苷(panasenoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	50.53	63.84
22	355.12	5.06	3,3'-二羟基-4',5,7-三甲氧基黄烷(3,3'-dihydroxy-4',5,7-trimethoxyflavan)	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	50.43	60.57
23	414.23	10.58	(S)-(E)-2'-(3,6-二甲基-2-庚烯基)-3'-4',7-三羟基黄烷酮[(S)-(E)-2'-(3,6-dimethyl-2-heptenyl)-3',4',7-trihydroxyflavanone]	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	50.34	62.73
24	305.10	3.76	4-甲基表儿茶素(4-methyl-epicatechin)	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	49.70	53.39
25	453.30	9.40	龙舌兰皂苷配基(hecogenin)	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	49.14	57.53
26	401.17	5.29	9-氟泼尼松(9-fluoroprednisolone)	C ₂₁ H ₂₇ FO ₅	48.80	55.59
27	303.05	4.72	花翠素(delphinidin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	48.50	48.14
28	287.05	6.79	花青素(cyanidin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	47.14	40.76
29	317.14	4.90	5'-羟基-3',4',7-三甲氧基黄烷(5'-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavan)	C ₁₈ H ₂₀ O ₅	46.64	38.83
30	357.17	7.65	杨梅酮(myricanone)	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	46.13	48.62
31	485.13	3.76	柿醌(diospyrin)	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₃	45.50	43.29
32	305.10	4.24	4'-邻甲基-(-)-表儿茶素[4'-o-methyl(-)-epicatechin]	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	45.24	35.04
33	378.12	3.74	龙舌兰黄烷酮(agamanone)	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	45.07	34.70
34	408.16	5.19	原花青素 B7(procyanidin dimer B7)	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	43.62	31.10
35	453.14	3.54	8-C-吡喃葡萄糖基异丙肾上腺素(8-C-glucopyranosylepicatechin)	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	42.37	21.40
36	302.10	3.66	法尔尼西纳(farnisin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	41.89	39.94
37	377.08	3.12	甲基柠檬素(limocitrol)	C ₁₈ H ₁₆ O ₉	40.50	13.30
38	271.06	6.66	高良姜黄素(norizalpinin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	40.43	8.49
39	415.17	6.71	异黄烷酮 C(heteroflavanone C)	C ₂₃ H ₂₆ O ₇	39.54	15.60
40	595.20	2.97	枸橼苷(poncirin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	39.43	15.01

表 5 (续)

ID	m/z	保留时 间/min	黄酮类物质	分子式	评分	碎片 分数
41	399.14	4.88	2'-羟基-3',4',5',7,8-五甲氧基黄烷(2'-hydroxy-3',4',5',7,8-pentamethoxyflavan)	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	39.27	3.10
42	443.13	5.23	2',4',6'-三羟基二氢查尔酮-2'-葡萄糖(2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone-2'-glucoside)	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	39.18	5.34
43	287.05	4.94	5,7,3',4',5'-五羟基黄烷酮(5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	39.00	1.87
44	380.17	9.91	2',8-二羟基-3',4',5',7-四甲氧基黄烷(2',8-dihydroxy-3',4',5',7-tetramethoxyflavan)	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	39.00	5.55
45	463.12	4.64	4'-O-甲基表儿茶素 7-O-葡萄糖醛酸(4'-O-methylepicatechin 7-O-glucuronide)	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	38.82	2.86
46	412.03	2.60	3-硫酸异鼠李素(isorhamnetin 3-sulfate)	C ₁₆ H ₁₀ O ₁₀ S ₂	37.94	3.41
47	451.18	2.10	二氢环阿托明宁(dihydrocycloartomunin)	C ₂₆ H ₂₆ O ₇	36.53	0.10

表 6 五味甘露、单味药材及乙酸乙酯相中黄酮类化合物离子强度相对比值

Table 6 Relative ratio of ionic strength of flavonoids in Wuwei Ganlu, single herbs and ethyl acetate

化合物	离子强度值						
	W1	W7	W5	W8	W6	W9	W3
(2S)-甘草苷元	1	0	0	0	0	1	207
山柰酚	1	0	0	0	0	0	143
蒿黄素	1	0	0	6	0	0	105
紫花牡荆素	1	0	0	1	0	0	96
槲皮素 3-阿拉伯糖苷	1	0	3	0	0	0	91
矮牵牛素葡萄糖苷	1	0	2	0	0	1	89
杨梅素	1	0	2	0	0	0	86
高良姜黄素	1	0	0	0	0	0	82
黄芪苷	1	0	1	0	0	0	71
5,7,3',4',5'-五羟基黄烷酮	1	0	4	0	0	0	58
2',8-二羟基-3',4',5',7-四甲氧基黄烷	1	0	0	0	1	0	56
花翠素	1	0	9	0	0	0	55
芍药素 3-O-葡萄糖苷	1	0	0	0	2	0	52
异槲皮苷	1	0	7	0	0	0	49
异荭草苷	1	0	14	0	0	0	45
(S)-(E)-2'-(3,6-二甲基-2-庚烷基)-3',4',7-三羟基黄烷酮	1	0	0	15	0	0	26
花青素	1	0	0	0	0	0	25
法尔尼西纳	1	0	1	0	0	0	8
紫杉醇 3-阿拉伯糖苷	1	0	2	0	0	0	7
二氢槲皮素	1	0	2	0	0	0	6
芦丁	1	0	2	0	0	1	5
4'-O-甲基表儿茶素 7-O-葡萄糖醛酸	1	0	2	0	0	0	3
杨梅酮	1	0	0	0	0	0	2
4'-甲基甘草甜素 7-鼠李糖苷	1	0	0	0	0	0	2
异黄烷酮 C	1	0	0	4	0	0	2
5'-羟基-3',4',7-三甲氧基黄烷	1	1	0	0	0	0	2
3,3'-二羟基-4',5,7-三甲氧基黄烷	1	0	0	0	0	0	1

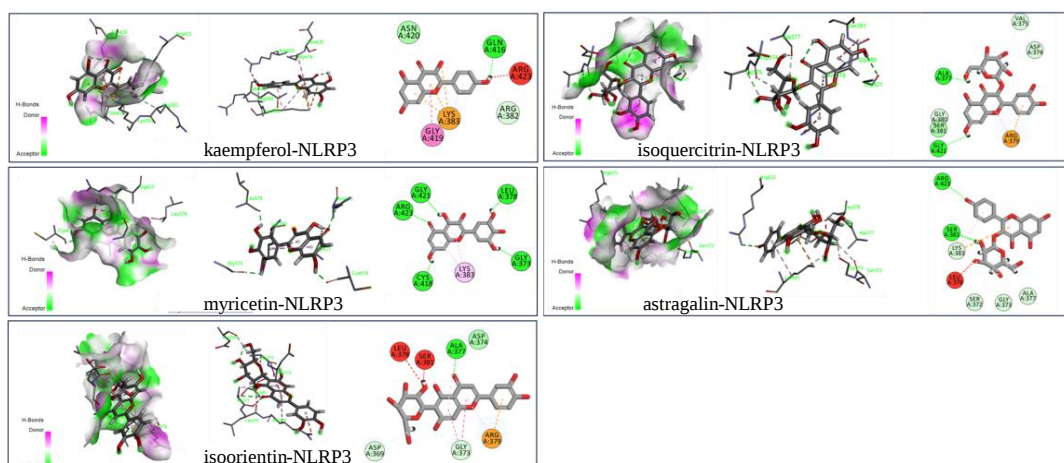


图8 五味甘露中黄酮单体与NLRP3受体蛋白对接结合示意图及结合作用分析

Fig. 8 Interaction of flavonoid monomer and NLRP3 receptor protein combined diagram and combined action analysis in Wuwei Ganlu

的平衡有关^[22-23]。动物实验研究表明,五味甘露具有明显的抗炎作用,对急性非特异性炎症渗出和关节肿胀等均有明显的抑制作用^[24-25]。有报道表明,五味甘露可以抑制踝关节滑膜组织中JNK1蛋白的表达水平^[26-27],降低关节炎模型大鼠血清中NF- κ B、TNF- α 、IL-4和EGF含量而降低炎症反应^[28-29]。

因此,基于五味甘露对于关节炎具有良好的抗炎作用,本研究通过网络药理学分析,对五味甘露藏药复方的成分复杂性和炎症靶点的多样性进行了分析,共获取中药复方五味甘露抗炎成分125个,潜在抗炎靶点251个,疾病靶点1397个,取药物与疾病交集共得到核心靶点131个。通过KEGG分析发现筛选得到的多种炎症通路均涉及到NLRP3小体。随后以中药有效物质提取分离理论为指导,通过LPS建立RAW264.7细胞炎症模型,追踪抑制NLRP3活性的有效萃取相,来反向分析W1中的抗炎活性物质,最终得到有效组分为W3,其总黄酮含量为 $(305.0 \pm 11.4) \text{ mg g}^{-1}$ 。通过分析W1、W5~W9和W3的LC-MS图谱显示,W3中山柰酚、杨梅素、异荭草素、异槲皮苷和黄芪苷等具有抗炎的黄酮类物质的离子强度远远高于W5~W9。通过分子对接实验发现,选取的5个黄酮单体的C₆-C₃-C₆的母核结构在NLRP3受体蛋白的活性位点内显示出与7个氨基酸有显著相互作用,且对接分数均>90。

综上所述,本研究通过将网络药理学与“谱-效”关系及分子对接相结合,以抑制细胞炎症为指导,将混合物中的化合物按极性进行分离,最终确定W1中的黄酮类物质为抗炎活性物质,可为后面的

五味甘露制剂提供质量标准的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 纳顺达来, 赛西娅. 试述五味甘露药浴[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12(6): 47.
NaShun D L, Sai X Y. A brief introduction of Wuwei Ganlu medicinal bath [J]. J Med & Pharm Chin Minorities, 2006, 12(6): 47.
- [2] 苗巍, 张之智, 吕文豪, 等. 五味甘露药浴颗粒联合塞来昔布治疗类风湿关节炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(1): 164-168.
Miao W, Zhang Z Z, Lü W H, et al. Clinical study on Wuwei Ganlu Medicated Bath Granules combined with celecoxib in treatment of rheumatoid arthritis [J]. Drugs Clin, 2023, 38(1): 164-168.
- [3] 丁荣, 王静, 喻莲慧, 等. 基于网络药理学研究藏药五味甘露药浴颗粒治疗RA的分子作用机制[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2639-2650.
Ding R, Wang J, Yu L H, et al. Molecular mechanism of Tibetan medicine Wuwei Ganlu Yaoyu Granules on RA based on network pharmacology [J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(11): 2639-2650.
- [4] 多吉占堆, 旺久, 土旦桑布. 藏医“五味甘露”药浴对AS的临床疗效观察[J]. 西藏科技, 2021, 7(9): 71-73.
Dorjee C, Wang J, Tudan S P. Clinical efficacy of Tibetan medicine "five flavors nectar" medicinal bath on AS [J]. Xizang Sci Technol, 2021, 7(9): 71-73.
- [5] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-

- 6440.
- [6] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 156-160.
- Zhuang Y S, Cai B C, Zhang Z L. Application progress of network pharmacology in traditional Chinese medicine research [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2021, 37(1): 156-160.
- [7] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用研究与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [8] Burley S K, Berman H M, Kleywegt G J, et al. Protein data bank (PDB): The single global macromolecular structure archive [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1607: 627-641.
- [9] 彭瑶, 曾嵘, 吴尚洁, 等. 一测多评法测定藏族药烈香杜鹃中5种黄酮类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2229-2236.
- Peng Y, Zeng R, Wu S J, et al. Content determination of five flavonoids in Tibetan medicine *Rhododendron anthopogonoides* by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(9): 2229-2236.
- [10] 肖远灿, 胡凤祖, 杜玉枝, 等. HPLC法测定藏药烈香杜鹃不同部位7个黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(8): 1325-1330.
- Xiao Y C, Hu F Z, Du Y Z, et al. Determination of seven flavones in different parts of Tibetan medicine *Rhododendron anthopogonoides* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(8): 1325-1330.
- [11] Nuermaiti M, Turak A, Yang Q, et al. Sesquiterpenes from *Artemisia Sieversiana* and their anti-inflammatory activities [J]. Fitoterapia, 2021, 154: 104996.
- [12] 李海亮, 陈海魁, 徐福利, 等. 大籽蒿精油化学成分及其抗菌抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2016, 2(20): 63-68.
- Li H L, Chen H K, Xu F L, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia sieversiana* [J]. Food Sci, 2016, 2(20): 63-68.
- [13] 武雪. 藏药刺柏和圆柏药材质量标准的提高研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- Wu X. Study on improving the quality standard of *Sabina chinensis* and *Juniperus formosana* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2015.
- [14] Zhang B M, Wang Z B, Xin P, et al. Phytochemistry and pharmacology of genus *Ephedra* [J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(11): 811-828.
- [15] Guenaou I, Nait Irahah I, Errami A, et al. Bioactive compounds from *Ephedra fragilis*: Extraction optimization, chemical characterization, antioxidant and AntiGlycation activities [J]. Molecules, 2021, 26(19): 5998.
- [16] Qazi A K, Siddiqui J A, Jahan R, et al. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(4): 522-533.
- [17] Khan S, Nisar M, Khan R, et al. Evaluation of chemical constituents and antinociceptive properties of *Myricaria elegans* Royle [J]. Chem Biodivers, 2010, 7(12): 2897-2900.
- [18] 先巴. 藏医五味甘露浴疗法治疗类风湿性关节炎的临床有效性研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(30): 160, 166.
- Xian B. Clinical efficacy study of Tibetan medicine's Five Ingredient Ganlu Bath therapy in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Cardiovas Dis e-J Integr Tradit Chin & West Med, 2020, 8(30): 160, 166.
- [19] 仁欠肖. 藏医"五味甘露浴疗法"治疗类风湿性关节炎的临床有效性研究 [J]. 医学食疗与健康, 2020, 6(19): 25-25, 27.
- Ren Q X. Clinical effectiveness study of Tibetan medicine's "Wuwei Ganlu bath therapy" in treating rheumatoid arthritis [J]. Med Diet Health, 2020, 6(19): 25-25, 27.
- [20] 多果. 藏医"五味甘露浴疗法"治疗类风湿性关节炎的临床有效性研究 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(23): 100-101.
- Duo G. Clinical effectiveness study of Tibetan medicine's "Wuwei Ganlu bath therapy" in treating rheumatoid arthritis [J]. Clin J Chin Med, 2018, 10(23): 100-101.
- [21] 拉浪措. 藏医"五味甘露药浴汤散"治疗类风湿性关节炎的临床有效性研究 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2020, 7(27): 165-166.
- La L C. Clinical efficacy study of Tibetan medicine "Wuwei Ganlu Yaoyu Tang San" in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. e-J Pract Gynecol Endocrinol, 2020, 7(27): 165-166.
- [22] 扎桑. 探讨藏药浴对类风湿性关节炎的免疫调整作用 [J]. 世界最新医学信息文摘 (连续型电子期刊), 2017, 17(6): 181, 185.
- Za S. Exploring the immunomodulatory effect of Tibetan medicine bath on rheumatoid arthritis [J]. World Latest Med Inform, 2017, 17(6): 181, 185.
- [23] 杨莉莉, 王婷婷, 李元, 等. 藏药浴基本药物组成、药浴处方及藏药浴临床效果研究 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(5): 38-41.
- Yang L L, Wang T T, Li Y, et al. Study on the basic drug

