

UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合网络药理学、分子对接技术及实验验证预测瑶药三妹木抗炎作用的质量标志物 (Q-Marker)

英菲雨^{1,2,3}, 何石燕^{1,2,3}, 黎理^{1,2,3}, 马雯芳^{1,2,3}, 丘琴¹, 傅静⁴, 王孝勋^{1,2,3*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

2. 广西壮瑶药重点实验室, 广西 南宁 530200

3. 壮瑶药协同创新中心, 广西 南宁 530200

4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析鉴定三妹木 (*Lespedeza formosa*) 的化学成分, 结合网络药理学、分子对接及实验验证预测三妹木抗炎作用的质量标志物 (Q-Marker), 并测定其含量。 **方法** 运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对三妹木的化学成分进行分析; 采用网络药理学搜集与抗炎作用相关的作用靶点; 建立“中药活性成分-活性靶点-通路”网络图, 最终选取活性强度前 5 的化合物作为配体与筛选后的疾病靶点基因进行分子对接; 利用脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞, 构建体外炎症模型, 采用 Griess 法检测细胞上清液中一氧化氮 (NO) 的分泌量; 采用 HPLC 法对其中木犀草素、槲皮素、山柰酚进行含量测定。 **结果** 在瑶药三妹木提取物中共鉴定出 70 种化学成分; 富集分析得到与抗炎相关作用的 54 个潜在作用靶点, 交集作用靶点得到京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路 152 条 ($P < 0.01$); 分子对接验证成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素与靶点蛋白结合活性良好。 Griess 法显示, 与对照组比较, LPS 组 NO 释放量显著升高 ($P < 0.05$), 与 LPS 组相比, 各给药组 NO 释放量均显著降低 ($P < 0.05$)。含量测定结果显示, 木犀草素、槲皮素、山柰酚质量分数分别为 0.085~0.095、0.285~0.293、0.111~0.116 mg·g⁻¹。 **结论** 对瑶药三妹木化学成分进行了较全面地研究, 初步预测了三妹木发挥抗炎作用的质量标志物, 为三妹木物质基础及关键质量属性研究提供依据。

关键词: 三妹木; 液质联用; 网络药理学; 分子对接; 抗炎; 木犀草素; 槲皮素; 山柰酚

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)01-0121-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.012

UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with network pharmacology, molecular docking techniques and experiment validation to study quality markers of anti-inflammatory effects of Yao medicine *Lespedeza formosa*

YING Feiyu^{1,2,3}, HE Shiyan^{1,2,3}, LI Li^{1,2,3}, MA Wenfang^{1,2,3}, QIU Qin¹, FU Jing⁴, WANG Xiaoxun^{1,2,3}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. Collaborative Innovation Center for Zhuang and Yao Medicines, Nanning 530200, China

4. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To analyze the chemical composition of the Yao medicine *Lespedeza formosa* by UPLC-Q-TOF-MS/MS, and to analyze the quality markers of the Yao medicine *L. formosa* for its anti-inflammatory effect by combining network pharmacology and molecular docking technology and its content was determined. **Methods** The chemical composition of the Yao medicine *L. formosa* was analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS, and the network pharmacology was used to collect the targets related to anti-inflammatory effects, to establish the network diagram of "active ingredient-active target-pathway in traditional Chinese medicine",

收稿日期: 2024-07-22

基金项目: 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD21238031); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21196016); 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字 [2014] 32 号); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研 [2013] 20 号); 广西中医药大学 2023 年研究生创新项目 (YCSY2023012)

作者简介: 英菲雨 (1997—), 女, 锡伯族, 硕士研究生, 从事中药 (壮瑶药) 品种、质量及资源开发研究。E-mail: 1019390432@qq.com

*通信作者: 王孝勋 (1973—), 男, 博士, 研究员, 从事中药 (壮瑶药) 品种、质量及资源开发研究。E-mail: 407977122@qq.com

and the top five compounds were selected as the ligands to be molecularly docked with the screened disease target genes. The top five active compounds were selected as ligands to be molecularly docked with the screened disease target genes, and RAW264.7 cells were induced by LPS to construct an in vitro inflammation model, and the nitric oxide (NO) secretion in the cell supernatant was detected by the Griess method. Determination of the content of the components by HPLC method. **Results** A total of 70 chemical components were identified in the extract of the Yao medicine *L. formosa*; Enrichment analysis yielded 54 potential targets of action related to anti-inflammatory effects, and 152 KEGG pathways were obtained by intersecting the targets of action ($P < 0.05$); Molecular docking verified that the components apigenin, luteolin, kaempferol, diosmetin, and quercetin had good binding activity to the target proteins. The Griess method showed that the amount of NO release from the LPS group compared to the control group was significant ($P < 0.05$), and NO release was significant in all dosing groups compared to the LPS group ($P < 0.05$). The results of content determination showed that the contents of luteolin, quercetin, kaempferol were 0.085–0.095, 0.285–0.293 and 0.111–0.116 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion** A more comprehensive study on the chemical composition of the Yao medicine *L. formosa* was carried out, and the quality markers of *L. formosa* exerting anti-inflammatory effects were preliminarily predicted to provide a basis for the study on the material basis and key quality attributes of *L. formosa*.

Key words: *Lespedeza formosa* (Vog.) Koehne; UPLC-Q-TOF-MS/MS; network pharmacology; molecular docking; anti-inflammatory effect; luteolin; quercetin; kaempferol

瑶药三妹木为豆科植物胡枝子属美丽胡枝子 *Lespedeza formosa* (Vog.) Koehne 的干燥茎叶^[1], 别名为美丽胡枝子、马扫帚、假蓝根、三妹木、鸡丢枝等。《中国瑶药学》记载本品为瑶族民族常用药, 瑶药名为沙牛木, 多产于广西各地县市^[2], 具有清热凉血、祛风除湿、活血散瘀、消肿止痛的功效, 在中医中主治小便不利、风湿疼痛、跌打损伤、肺痛等。在瑶医中用于治疗风湿骨痛、关节痛、腰痛、跌打损伤、骨折、脱臼^[2], 在壮医中功效为调气道、利水道、清热毒、除湿毒、消肿痛^[3]。本课题组前期研究中表明, 三妹木提取物对酵母菌致发热大鼠有良好的解热抗炎作用, 其机制可能和降低血液和下丘脑促炎因子水平有关^[4]; 三妹木的不同部位总黄酮质量分数有所不同^[5]; 采用紫外-可见分光光度法测定三妹木的总黄酮质量分数在 31.84~75.85 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[6]。目前关于三妹木的研究较少, 在《中国药典》尚无收载, 但收录在《广西瑶药材质量标准(第二卷)》中。虽已有分析, 但并未明确阐明三妹木中具有抗炎作用的活性成分。

本研究运用超高效液相色谱串联四级杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS), 结合网络药理学和分子对接技术初步分析三妹木抗炎作用的化学成分, 为确定瑶药三妹木抗炎作用的质量标志物(Q-Marker)打下基础, 为三妹木药材的研究开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

分析天平(德国 Sartorius 公司); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 低温高速离心机(美

国 Beckman Coulter 公司); 毛细管超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 质谱仪(美国 AB SCIEX™M 公司); 冷冻离心机、电子天平均购自(德国 Eppendorf 公司); 洁净操作工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 超纯水机(美国 Merck Millipore 公司); 制冰机(日本 Panasonic 公司); 超低温冰箱(SANYO 公司); 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Agilent1260 型 HPLC(包括四级梯度泵、在线真空脱气机、标准自动进样器、智能化柱温箱和紫外检测器)购自安捷伦科技有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城工贸有限公司); BSA224S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ5200B 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Direct Q-5UV 超纯水仪(美国默克密理博公司)。

1.2 药材与试剂

三妹木药材均采自广西壮族自治区(表 1), 经广西中医药大学韦松基教授鉴定为豆科胡枝子属植物美丽胡枝子 *Lespedeza formosa* (Vog.) Koehne 的茎叶。药材干燥后粉碎, 过 3 号筛, 备用。

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

乙腈、甲醇(质量分数≥99.9%, 质谱级, Fisher Chemical, 美国); 甲酸(质量分数≥98.0%, 质谱级, Sigma-Aldrich, 德国); 无水乙醇(质量分数≥99.8%, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司);

表 1 药材信息

Table 1 Information on herbs

序号	药材批次	采收时间	药材产地	经纬度
1	SMM-1	2018.04.10	南宁市青秀区仙葫开发区	N22 °49 '35 " E108 °28 '43 "
2	SMM-2	2018.11.03	柳州市三江侗族自治县古宜镇	N25 °49 '56 " E109 °38 '2 "
3	SMM-3	2022.09.24	来宾市金秀县罗香乡	N23 °56 '24 " E110 °11 '24 "

甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技公司);芹菜素对照品(批号:YR-Q0009210408)、山柰酚对照品(批号:YR-S0120200601)、槲皮素对照品(批号:YR-H0070200324)、香叶木素对照品(批号:YR-X0078230103)、芒柄花素对照品(批号:YR-C0079201216)、夏佛塔苷对照品(批号:YR-X0009211112)、染料木苷对照品(批号:YR-R0009230103)、木犀草素对照品(批号:YR-M007230619)、木犀草苷对照品(批号:YR-M0010210603)、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷对照品(批号:YR-S0026210528)、甘草素对照品(批号:YR-G0020221130)、染料木素对照品(批号:YR-R008220322)、大豆苷对照品(批号:YR-D0077210915)、大豆苷元对照品(批号:YR-D0080230401)、杨梅素对照品(批号:YR-Y0219230207),均购自宝鸡市翊瑞生物技术有限公司,质量分数均>98%。胎牛血清(北京索莱宝科技有限公司,批号22110704);DMEM高糖培养液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20230512);二甲基亚砜(DMSO,细胞培养级,北京索莱宝科技有限公司,批号:3230221002);CCK-8细胞增殖检测试剂盒(上海百赛生物技术股份有限公司,批次:211104Z01-10);一氧化氮试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:052223230901);磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司,批号:2309009)。

1.3 实验数据库与软件

软件运行环境 Microsoft Windows 10 系统。

软件为 Chemdraw; Cytoscape3.9.1; AutoDock; PyMol; Discovery studio。

数据库: PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swisstarget 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); Gene cards 数据库(<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>); DisGenet 数据库(<https://www.disgenet.org/rdf>); 蛋白质数据库

(<http://www.uniprot.org/>); 蛋白互作网络数据库(<http://string-db.org/>); Venny 制作平台(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>); 微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>); DAVID 数据库: (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)等。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

称取三妹木药材粉末(SMM-1 过 3 号筛)2 g,精密称定 3 份,精密加入乙醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,冷却至室温,用乙醇补足质量。摇匀,13 000 r·min⁻¹离心 10 min,滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量于 10 mL 量瓶中,加入 75%乙醇定容至刻度线,摇匀,制成各对照品溶液,从各对照品溶液中吸取 10 μL 混合配制成混合对照品溶液,经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.3 UPLC-Q-ToF-MS/MS 条件

2.3.1 液相条件 色谱柱: Sepax GP-C₁₈ Column (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 120 Å); 柱温: 40 °C; 流动相 A 为 0.1%甲酸; 流动相 B 为 100%乙腈; 体积流量: 0.3 mL·min⁻¹。梯度洗脱(0~10 min, 5%~70% B; 10~18 min, 70%~100%, B; 18~21 min, 100%~5% B)。

2.3.2 质谱条件 电子喷雾离子源(ESI); 离子化方式: 正离子扫描和负离子扫描; 离子源温度: 500 °C(正离子)和 450 °C(负离子); 离子喷雾电压: 5 500 V(正离子)和 4 400 V(负离子); TOF-MS 质量扫描范围(*m/z*): 100~2 000; TOF-MS/MS 质量扫描范围(*m/z*): 50~2 000; 碰撞能量: (35±15) eV; 去簇电压: ±60 V; 二级质谱采用信息依赖获得,并采用高灵敏度模式。

2.4 三妹木成分数据分析

查阅国内外文献资料以及检索 PubChem 等数

数据库进行数据采集,整理三妹木药材所含的化学成分信息,包括化学成分、结构式、相对分子质量等,构建三妹木化学成分专属数据库。通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法获得色谱峰一级、二级质谱,计算出高分辨精确相对分子质量,快速推测各色谱峰对应化合物的分子式,运用 ChemDraw 软件绘制化合物结构并模拟碎片情况,与文献二级碎片进行对照,推断确认成分。

2.5 基于网络药理学对三妹木抗炎作用的预测分析

2.5.1 活性成分和抗炎靶点筛选 将 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定的化合物信息上传到 Pubchem 数据库中,检索其化学结构,导入到 Swiss ADME 平台中以胃肠道吸收(GI absorption)得分为“high”,类药性(druglike-ness)至少通过 2 个“yes”进行筛选。将筛选出的化合物的 canonical SMILES 输入到 Swiss Target Prediction 数据库中进行分子靶点预测,研究对象设置为人源基因。将得到的靶点进行合并去重,再利用蛋白质数据库对靶点基因进行规范统一,最终得到成分相关靶点。

以炎症(inflammation)为检索词,通过 Gene cards, OMIM, DisGenet 疾病靶点网站搜索已报道的和炎症相关的基因,去除重复基因,收集筛选与炎症相关的疾病靶点。将药物预测靶点和疾病靶蛋白一起导入 Draw Venn Diagram 系统平台,制作 Venn 交集图并提取两者交集靶点,得到三妹木活性成分的抗炎靶点。

2.5.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及富集分析 将交集靶点上传到 STRING 数据库,种类设置为“Homo sapiens”,其余参数为默认值,将结果以 TSV 格式导出。通过 Cytoscape 3.9.1 构建相互作用网络,并运用插件 Centiscape 2.2 进行筛选,将种类设置为“Homo sapiens”,其余功能选择默认选项,得到 PPI 网络图。最后对 PPI 网络图进行可视化处理和分析。

将发挥药效的靶点上传至 DAVID 数据库,选择生物过程(BP)、细胞组成(CC)和分子功能(MF)3 个模块绘制柱形图,进行基因本体(GO)生物过程富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,并实现数据可视化。

2.5.3 “活性成分-靶点-通路”网络构建 将成分、靶点以及通路导入到 Cytoscape 3.9.1 软件,构建并绘制中药活性成分-核心靶点-通路关系图,选出三妹木化学成分、核心靶点、重要通路。

2.6 分子对接

根据 Glide gscore 打分进行结果筛选,以度值排名前 5 的关键活性成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素作为配体,5 个核心靶点 TNF、IL-6、ALB、AKT1、GAPDH 为受体,导入到 AutoDock 软件进行分子对接,使用 Glide 模块对蛋白进行优化,最后筛选出的配体与靶标蛋白进行分子对接,得到化学成分与靶蛋白的分子对接结果。

2.7 实验验证

2.7.1 三妹木醇提取物的制备 称取三妹木药材粉末(SMM-1 过 3 号筛),分别加入 10 和 8 倍量 95%乙醇回流提取 2 次,合并滤液,减压浓缩得流浸膏(得膏率为 7.66%),三妹木醇提取物溶解于 DMEM 培养基中,配制成 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.7.2 细胞复苏与培养 RAW264.7 细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(含双抗)在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养,隔天换液,当瓶中贴壁细胞数达到培养瓶底部的 80%后倒出旧培养液,用 PBS 2 mL 清洗细胞,吸净培养基后加入 DMEM 培养基,用细胞刮刀轻轻刮下细胞使其脱落后按照 1:3 比例进行传代培养。

2.7.3 CCK-8 法测定细胞活性 取对数生长期 RAW264.7 细胞,以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔板中,每孔 100 μL 细胞悬液,每孔加入 100 μL 完全培养基。对照组细胞正常培养, LPS 组细胞加入 LPS ($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 72 h,三妹木醇提取物(25、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及芹菜素、山柰酚、槲皮素、木犀草素、香叶木素(12.5 、 25.0 、 $50.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)给药组分别加入相应药物溶液预处理 2 h,加入 LPS ($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理;放置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养,3 d 后各组分别加入 10% CCK-8 试剂,孵育 15 min,于酶标仪 450 nm 测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

2.7.4 Griess 法测定 RAW264.7 细胞 NO 释放量 将细胞(每孔 2×10^4)接种至 96 孔细胞培养板中,分为对照组、LPS 组、三妹木醇提取物及各对照品(芹菜素、山柰酚、槲皮素、木犀草素、香叶木素)给药组,提取物和对照品分 2 批实验考察。对照组细胞用 DMEM 培养液培养不给予药物诱导; LPS 组加入 LPS ($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),孵育 24 h;三妹木醇提取物(25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组及各对照品(12.5、

25.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 分别加入相应质量浓度药物, 然后加入 LPS ($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行刺激, 共同作用 24 h, 取细胞上清液, 使用 Griess 试剂盒测定 NO 含量。

2.8 潜在 Q-Marker 含量测定

2.8.1 色谱条件 Agilent 5 TC-C₁₈ ($5\text{ }\mu\text{m}$, $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$) 色谱柱; 检测器: UV 检测器; 以乙腈(A)-0.2%磷酸水(B)为流动相; 梯度洗脱(0~20 min, 90% B; 20~40 min, 90%~83% B; 40~60 min, 83%~70% B; 60~80 min, 70%~50% B); 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 320 nm。

2.8.2 供试品溶液的制备 称取三妹木药材粉末(过 3 号筛) 2 g, 精密称定平行 3 份, 精密加入乙醇 20 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 冷却至室温, 用乙醇补质量。摇匀, $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 滤液过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.8.3 对照品溶液的制备 精密称取木犀草素、槲皮素、山柰酚对照品适量于 10 mL 量瓶中, 加入 75% 乙醇定容至刻度线, 摇匀, 制成溶液, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 即得。

2.8.4 方法学验证

(1) 线性关系: 精密称取混合对照品溶液 3、5、10、15、20 μL 注入高效液相色谱仪, 按“2.8.1”项的色谱条件测定峰面积, 以混合对照品的质量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程及线性范围, 结果显示, 木犀草素、槲皮素、山柰酚的回归方程分别为 $Y=316.3X-1.461$ 、 $Y=112.0X+6.075$ 、 $Y=245.1X+2.444$, 线性范围分别为 $0.444\sim 2.96\text{ }\mu\text{g}$ 、 $0.615\sim 4.10\text{ }\mu\text{g}$ 、 $0.846\sim 5.64\text{ }\mu\text{g}$ 。相关系数均 ≥ 0.9998 。表明在各对照品相应线性范围内线性良好。

(2) 精密度试验: 取“2.8.3”项下的对照品溶液按照“2.8.1”项色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 各峰面积的 RSD 值均 $< 3\%$, 表明仪器的精密度良好。

(3) 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液, 按照“2.8.1”项的色谱条件, 分别在供试品溶液静置 0、2、4、8、12、16、24 h 后进样测定, 记录峰面积, 其峰面积的 RSD 值均 $< 3\%$, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

(4) 重复性试验: 按“2.8.2”项样品制备方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按照“2.8.2”项的色谱条件进样测定。记录峰面积。6 份同一方法制备的供试品溶液的质量分数的 RSD 值均小于 3%, 表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验: 精密称取已测定的三妹木样品 6 份, 每份约 1 g, 分别按照样品指标成分量 1:1 加取各对照品适量。按“2.8.2”方法下制备 6 份供试品溶液, 按“2.8.1”项的色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算各成分的平均加样回收率。结果表明, 木犀草素、槲皮素、山柰酚的平均加样回收率分别为 97.78%、99.91%、98.38%, RSD 分别为 1.48%、2.55%、1.05%, 均 $< 3\%$, 说明本实验提取方法准确可靠。

3 结果

3.1 三妹木化学成分分析

根据所建立方法进行检测, 正、负离子模式下的总离子流图如图 1 所示。经过与对照品的保留时间、精准相对分子质量比较, 根据保留时间、质谱碎裂片段及数据库比对, 共分析鉴定 70 个化合物(表 2), 其中包括黄酮类化合物、有机酸类化合物、氨基酸类化合物等。

3.2 网络药理学对三妹木抗炎作用的分析预测

3.2.1 三妹木化学成分及抗炎作用的靶点筛选 经筛选得到三妹木成分靶点 2 495 个, 炎症疾病靶点 1 024 个, 对炎症疾病靶点与成分靶点进行 Venn 图分析, 最终得到 329 个交集靶点(图 2)。

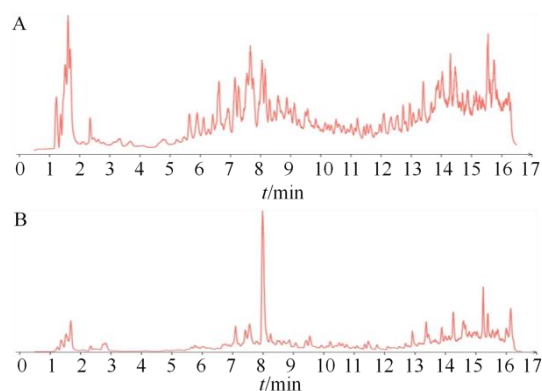


图 1 三妹木药材正(A)、负(B)离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagrams of positive (A) and negative (B) ionization modes

表 2 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定三妹木化学成分
Table 2 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of chemical constituents in *L. formosa*

序号	<i>t</i> /min	化学成分	分子式	离子模式	<i>m/z</i>	误差/($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子
1	1.19	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.019 7	0.434 2	87.008 8、111.008 8、129.019 3、191.019 7
2	1.30	山柰酚-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.115 9	1.797 5	115.002 5、133.012 0、154.377 0、190.935 3、245.078 8、299.062 9、327.054 9、357.061 8、393.049 7、399.069 4、411.177 4、429.084 5、447.095 7
3	1.35	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.119 6	2.298 2	103.005 3、109.028 6、113.037 1、133.014 6、149.047 1、167.032 1
4	1.39	葡萄糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	195.051 1	0.902 3	75.008 8、87.008 8、99.008 8、129.019 4、195.051 2
5	1.43	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.014 4	0.821 0	125.024 5、169.014 3
6	1.43	D-阿拉伯糖	C ₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	149.045 6	1.180 8	89.024 4、131.035 1、149.045 6
7	1.43	L-焦谷氨酸	C ₅ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻	128.034 0	3.372 3	128.034 3
8	1.60	栀子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	387.128 5	2.903 4	59.013 8、71.013 8、89.024 4、101.024 4、113.024 4、119.035 0、143.035 2、161.045 5、179.056 2、341.109 1
9	1.62	苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.054 3	1.343 0	89.024 4、115.003 7、133.014 3
10	2.37	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.037 1	0.466 1	108.021 7、123.045 0、152.011 5
11	2.43	葡萄糖醛酸	C ₆ H ₁₀ O ₇	[M-H ₂ O-H] ⁻	175.024 9	3.370 9	59.013 8、85.029 6、99.045 4、113.024 3、131.035 3、146.960 9、175.098 0
12	3.33	L-亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	132.065 8	0.903 4	86.096 4
13	3.36	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H ₂ O-H] ⁻	323.098 5	0.081 5	59.013 8、71.014 1、75.008 7、89.024 4、101.024 6、113.024 6、119.035 1、143.035 2、161.046 3、323.099 0
14	4.09	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.105 2	4.192 4	136.061 9
15	4.15	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	203.082 6	0.858 1	116.049 8
16	4.18	腺嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅	[M] ⁻	135.050 7	2.221 7	93.034 6、134.894 7、136.891 7
17	5.88	叶酸	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	[M] ⁻	441.138 0	0.903 4	50.975 0、57.505 9、59.013 9、146.952 2、194.241 2、200.949 7、213.112 7、214.116 2
18	6.01	(-)-表没食子儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	305.066 1	1.814 5	125.024 4、137.024 4、167.035 0、179.035 0、219.066 3、261.076 8、305.066 7
19	6.22	岩白菜素	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	327.074 8	0.869 0	101.027 4、113.019 6、121.024 6
20	6.38	L-(-)-阿拉伯糖醇	C ₅ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	153.074 5	0.013 3	106.065 1、107.068 6、134.060 1、135.063 7
21	6.42	根皮苷	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	[M+H] ⁺	475.100 5	1.787 1	100.042 7、110.037 7
22	6.45	刺桐碱	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	247.144 8	2.816 9	106.069 0、117.053 7、118.064 1、131.055 3、132.069 1、133.077 1、145.081 4、173.073 5、201.133 2
23	6.47	异荭草素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.091 0	1.756 5	133.038 1、151.038 7、171.051 8、199.043 3、201.018 5
24	6.57	N-乙酰-D-谷氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	[M-H] ⁻	188.056 5	1.265 2	101.023 3
25	6.58	苦杏仁苷	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	[M+Na] ⁺	480.147 9	0.653 3	109.035 7、112.016 2
26	6.68	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	205.097 0	0.858 1	146.060 2、188.070 8
27	6.69	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	135.045 5	4.852 0	120.016 6、135.045 2
28	6.97	牡荆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.097 4	4.474 3	135.042 0、159.045 1、161.026 2、173.031 3、189.021 5、191.096 7、196.049 7、205.117 1
29	7.07	染料木素 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.103 8	2.125 0	115.054 4、128.060 6、159.083 1、168.062 5、187.032 9、197.063 9、215.074 1、243.059 2、253.054 5、271.060 5
30	7.10	刺桐碱	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	247.144 8	0.515 7	60.080 8、86.096 5、119.085 6、124.087 0、146.060 2、175.148 3、188.070 9

表 2 (续)

序号	t/min	化学成分	分子式	离子模式	m/z	误差/($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子
31	7.14	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	291.086 4	0.346 1	123.044 1、139.039 1
32	7.32	芒果苷	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	423.098 0	1.178 7	273.039 7、303.050 4、327.050 5、339.050 3、369.061 4
33	7.37	二氢杨梅素	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	[M-H] ⁻	319.044 1	2.173 8	125.024 4、161.024 5、165.019 4、256.074 3、271.097 6
34	7.41	吡啶-3-甲醇	C ₉ H ₉ NO	[M+H-H ₂ O] ⁺	130.065 2	0.425 7	101.034 9
35	7.48	香叶木素 ¹	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	301.070 6	0.252 4	124.014 7、134.038 2、145.062 7、152.010 9、153.017 0、157.060 4、173.058 7
36	7.54	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 ¹	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	895.193 3	1.720 5	300.020 7、373.191 3、447.086 3
37	7.67	夏佛塔苷 ¹	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M+H] ⁺	565.168 0	0.808 4	295.060 3、325.071 0、349.071 2、379.081 7、391.081 6、427.102 7、445.093 4、481.113 6、511.123 9、529.132 8
38	7.78	荛草素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	449.105 6	0.188 5	299.055 2、311.055 2、329.065 8、339.087 1、353.066 0、367.081 8、383.076 6、395.076 5、413.087 2
39	7.91	大豆苷 ¹	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	417.115 6	4.783 2	225.065 3
40	8.21	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.160 8	0.633 1	85.028 5、303.050 4、304.054 0
41	8.47	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	465.103 5	0.402 7	303.050 2
42	8.47	杨梅素 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M-H] ⁻	317.030 4	0.239 7	151.003 8、178.998 7
43	8.59	山柰酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.156 5	0.076 2	287.055 3
44	8.71	木犀草苷 ¹	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	449.105 5	3.531 9	287.055 3
45	8.81	紫杉醇	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+Na] ⁺	609.228 3	2.595 1	101.098 7、109.026 7、111.045 4、113.102 1、117.058 3、121.065 3
46	8.84	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	153.054 4	1.149 9	65.038 7、93.033 5、111.044 1、125.059 8、153.054 7
47	8.96	染料木苷 ¹	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.096 6	3.828 6	269.045 1、431.098 4
48	9.02	木犀草素 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.054 0	1.119 6	105.038 6
49	9.05	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	447.097 1	1.170 2	69.033 5、85.028 5、87.044 1、97.028 5、115.039 1、133.049 6、145.050 0、150.076 5、302.073 3、303.085 0
50	9.24	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	303.089 1	0.264 8	153.018 2、163.039 2、177.054 7、285.076 2、302.073 3、303.085 0
51	9.30	积雪草苷	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	957.513 6	2.457 1	205.071 8、957.506 0、958.509 4
52	9.34	牡荆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.110 0	1.863 1	313.071 1、343.081 5、351.086 3、367.081 6、379.081 6、397.092 1
53	9.36	叶酸	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	[M-H] ⁻	440.133 6	3.853 7	101.024 5、117.037 4
54	9.37	芹菜素 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 9	1.397 5	197.061 0、224.174 1、225.055 8、269.045 6
55	9.88	迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻	359.150 2	0.282 0	160.053 6、175.076 4、178.063 8、192.079 2、329.139 9
56	9.89	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M+H] ⁺	377.084 4	1.694 5	100.964 8、105.031 3、111.007 7、119.048 9、125.053 9
57	10.50	圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	289.064 8	0.327 6	153.018 4、163.039 1、288.058 7、127.040 4、131.0517、135.048 2、163.039 9、205.048 0、243.061 8、245.062 5、253.041 5、271.119 1、289.056 4
58	10.53	槲皮素 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 0	0.040 2	121.029 6、151.003 7、178.998 6
59	10.53	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.071 7	0.076 3	109.029 5、123.045 2、137.024 4、203.071 5、245.082 0
60	10.79	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	147.045 4	4.840 8	119.049 2、147.044 2

表 2 (续)

序号	t/min	化学成分	分子式	离子模式	m/z	误差/($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子
61	10.86	葛根素	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	417.118 0	0.057 5	167.070 4、173.059 6、181.049 7、191.070 4、297.076 9、327.086 6、351.087 2、363.087 0、381.096 6
62	10.94	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	274.274 6	3.273 5	102.088 8
63	11.31	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.061 0	0.001 0	119.050 3、151.003 7、270.048 8、271.055 6
64	11.53	欧前胡素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	271.098 3	4.639 7	243.077 0、271.060 5
65	11.58	山柰酚 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.055 5	0.487 4	153.044 1
66	11.62	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.050 8	0.634 8	300.027 5
67	11.97	甘草素 ¹	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.064 0	4.803 4	119.050 3、135.008 8、153.019 4、255.066 3
68	12.16	芒柄花素 ¹	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	267.064 7	2.756 3	252.042 7、267.066 3
69	12.90	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M] ⁻	354.095 7	2.778 9	219.066 2、353.102 5、354.106 2
70	13.10	大豆苷元 ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	255.063 6	3.136 4	107.055 3、115.056 1、121.027 6、128.062 4

1-经对照品比对的成分。

1-component that has been compared to a control.

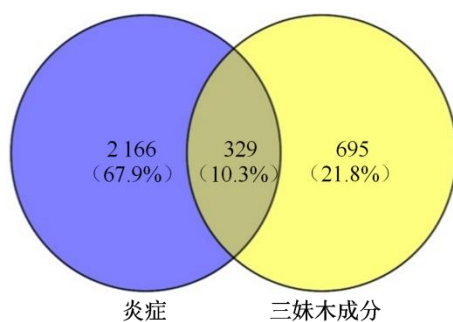


图 2 成疾病靶点的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagrams for disease targets-component targets

3.2.2 PPI 网络数据收集 对 PPI 网络图进行可视化处理和分析, 获得关键靶点。筛选前 PPI 网络图由 328 个节点和 6 638 条边组成, 以介度、紧密度和度值的中位数为筛选标准进行筛选, 筛选后得到 55 个靶基因构建的 PPI 网络中包含 54 节点和 1 011 条相互作用连线。PPI 中间值为 344.42, 紧密度值为 0.001 5, 度值为 40.47。其中, VEGFA、IL-6、TNF、GAPDH、ALB、AKT1、EGFR、SRC、CASP3、JUN、TP53、STAT3、HIF1A、MAPK3 这 14 个靶标在网络中节点最大且颜色最深(图 3), 可能与三妹木抗炎作用密切相关。从三妹木活性成分与抗炎关键靶点相互作用的网络中可以看出(图 4), 化合物芹菜素(apigenin)、木犀草素(luteolin)、山柰酚(kaempferol)、香叶木素(diosmetin)、槲皮素(quercetin)、杨梅素(kaempferoll-3-O-glucoside、myricetin)、甘草素[(2S)-liquiritigenin]、染料木素(genistein)、大豆苷(daidzein)等化合物在网络中节点最大且颜色最深, 推测其与三妹木抗炎作用密切相关。

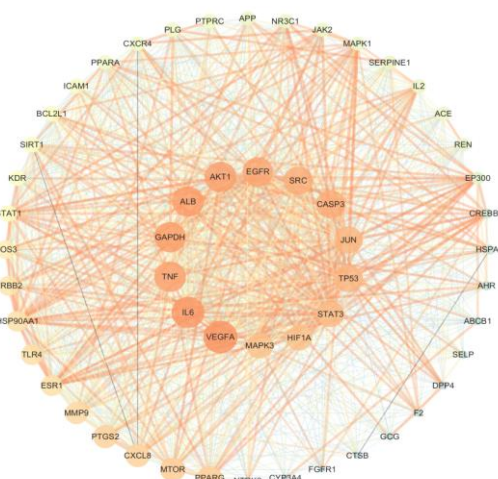


图 3 抗炎(潜在靶标)关键靶点 PPI 网络图

Fig. 3 Network diagram of key target interactions for anti-inflammatory (potential targets)

3.2.3 GO 及 KEGG 通路富集 GO 和 KEGG 分析均以 $P<0.01$ 、 $FDR<0.05$ 作为筛选条件, 表示具有统计学意义, 预测三妹木发挥抗炎作用的作用机制。将 54 个交集靶点输入 Metascape 数据库, 以 $P<0.01$ 为条件, 得到 BP 608 项、CC 75 项、MF 127 项。分别选取各组中 Count 最大的前 10 条(图 5), 基因数代表主要活性成分富集在该通路下的靶点数目。结果显示, BP 方面, 三妹木活性成分主要参与炎症反应、信号转导、细胞凋亡过程的负调节等; CC 方面, 主要参与质膜、细胞质、胞浆等; MF 主要涉及蛋白质结合、相同的蛋白质结合、ABC 转运蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等。综上所述, 三妹木的活性成分可通过调控多种生物学途径联合发挥抗炎作用。

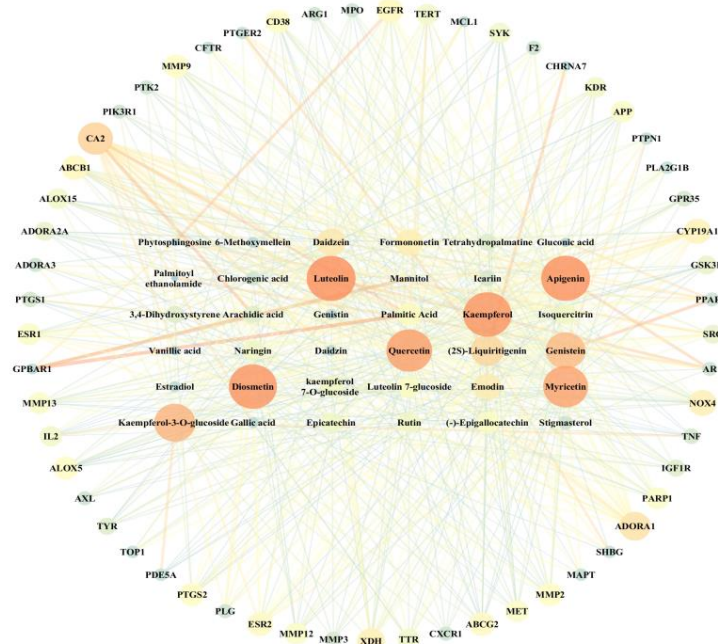


图 4 PPI 筛选后成分 - 靶点相互作用图

Fig. 4 Component-target interaction diagram after PPI screening

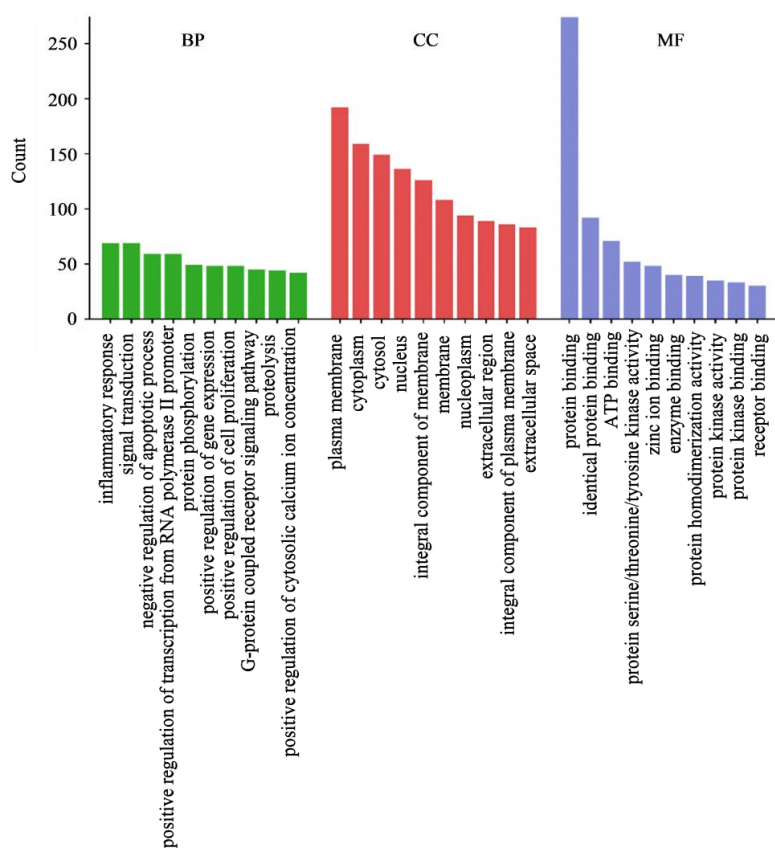


图 5 关键靶点 GO 功能分类

Fig. 5 GO functional categorization of key targets

为进一步体现网络药理学分析的全面性和系统性,同时展开 KEGG 通路分析。结果显示,54 个交集靶点富集于 152 通路 ($P<0.01$)。选择 Count 最大的前 20 条通路进行展示 (图 6), 其中关键靶点基因涉及的通路主要有 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、钙离子信号通路、Ras 信号通路、趋化因子信号通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信

号通路等,表明三妹木的主要活性成分通过作用于多条信号通路发挥抗炎作用。

3.2.4 成分-靶点-通路网络图的构建 将成分、靶点以及通路导入到 Cytoscape3.6.1 软件,以节点 (node) 表示成分、靶点和通路,边 (edge) 表示活性成分和作用靶点链接的相关度,构建并绘制中药成分-靶点-通路关系图 (图 7)。

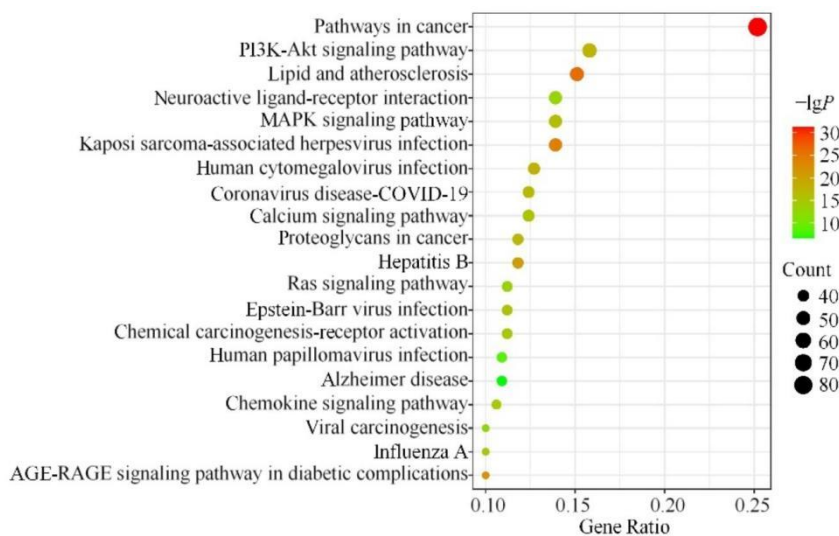


图 6 关键靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 Analysis of KEGG pathway enrichment statistics for key targets

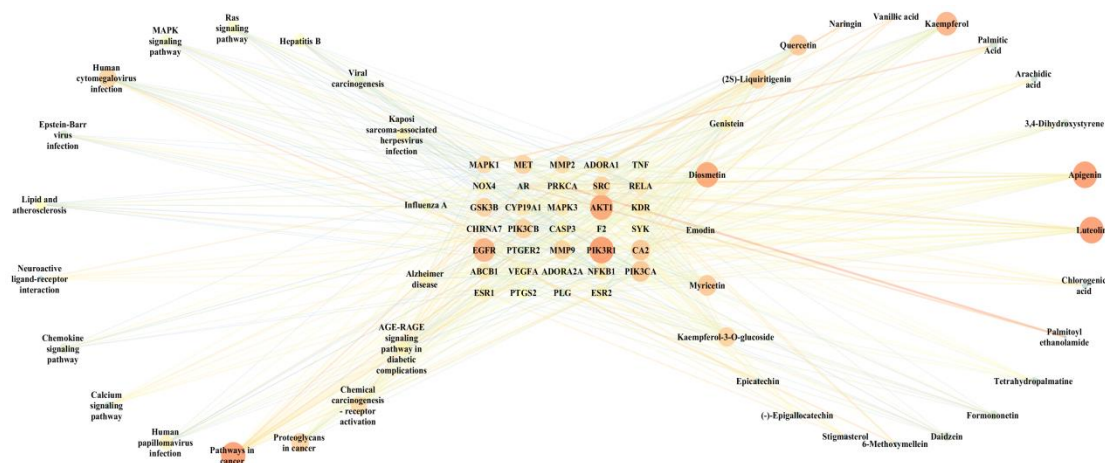


图 7 成分-靶点-通路关系图

Fig. 7 Ingredient-target-pathway relationship diagram

3.3 分子对接

为明确核心靶蛋白与三妹木抗炎潜在活性成分之间的结合能力,根据 Glide gscore 打分进行结果筛选,以度值排名前 5 的关键活性成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素作为配体,

5 个核心靶点 TNF、IL-6、ALB、AKT1、GAPDH 为受体, AutoDock Tools 软件进行分子对接,分子对接结果见表 3 和图 8, 结合能值越小代表该分子与蛋白对接得越好。由表 3 可知三妹木的潜在活性成分与抗炎的核心靶点之间关联性很强,即这些药

表 3 分子对接结果
Table 3 Molecular docking results

靶点名称	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
		芹菜素	木犀草素	山柰酚	香叶木素	槲皮素
TNF	1vyr	-26.79	-26.88	-27.34	-26.08	-29.30
	3rwn	-29.59	-30.35	-30.76	-27.80	-31.60
	6zsy	-29.30	-27.50	-28.17	-28.09	-27.80
IL6	1bgc	-28.13	-24.79	-26.46	-22.53	-23.41
	5gw9	-28.80	-28.30	-30.97	-25.67	-24.87
	5zo6	-26.63	-27.34	-23.45	-26.13	-26.54
ALB	3mrk	-30.01	-31.43	—	-30.14	-29.05
	4qn5	-25.75	-23.28	-20.02	-26.08	-20.98
	6hn1	-28.38	-27.55	-23.49	-26.00	-24.37
AKT1	1unq	-27.59	-25.96	-27.84	-24.41	-22.91
	1unr	-26.13	-26.71	-26.13	-26.71	-26.08
	7myx	-23.70	-27.21	-26.84	-25.58	-25.08
GAPDH	1lc0	-27.46	-26.08	-25.46	-25.50	-22.78
	6gg7	-24.79	-22.74	-21.23	-25.00	-19.40
	6o15	-22.86	-22.11	-24.66	-22.36	-23.41

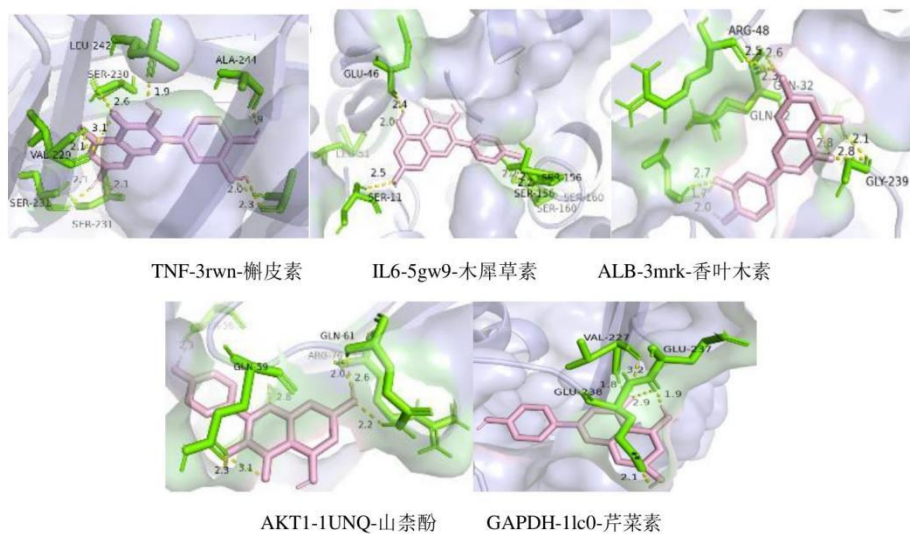


图 8 分子对接结果
Fig. 8 Molecules docking results

效成分与核心靶点基因可能是三妹木抗炎的药剂物质基础与主要作用靶点。使用 PyMol 和 Discovery studio 软件对代表性活性成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素与度值排名前 5 的靶点 TNF、IL-6、ALB、AKT1、GAPDH 的分子对接结果进行可视化分析。其中槲皮素与 TNF 蛋白结合能为-31.60 kJ·mol⁻¹，表明二者结合活性最优。

3.4 初步确定的三妹木抗炎 Q-Marker
通过网络药理学预测结果分析，初步确定芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素作为瑶药三妹木发挥抗炎作用的潜在 Q-Marker。

3.5 细胞实验验证
3.5.1 CCK-8 法测定细胞活性 CCK-8 测定如图 9 所示，给药组细胞存活率均大于 100%，说明各质量浓度三妹木醇提取物及各成分对 RAW264.7 细胞均

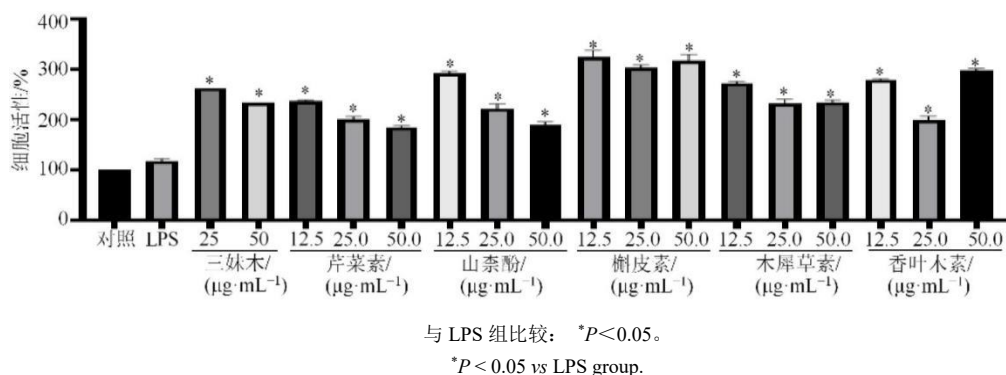


图 9 三妹木醇提取物及潜在 Q-Marker 对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect on RAW264.7 cell activity ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

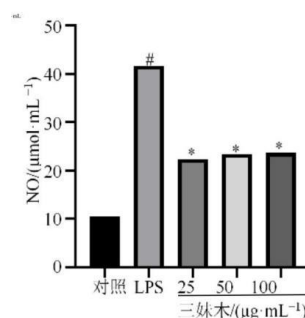
无细胞毒性, 且能促进 RAW264.7 细胞生长。

3.5.2 Griess 法测定 RAW264.7 细胞 NO 释放量
为确定三妹木是否发挥抗炎作用, 将不同浓度三妹木醇提取物的 NO 释放量进行对比。如图 10 所示, 与对照组相比, LPS 组的 NO 质量浓度显著升高 ($P < 0.05$), 说明 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞炎症模型成功。与 LPS 组相比, 三妹木醇提取物组 NO 释放量均显著降低 ($P < 0.05$), 表明三妹木醇提取物可显著抑制 LPS 诱导小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞 NO 的产生。

为确定三妹木质量标志物是否发挥抗炎作用, 将不同浓度对照品组的 NO 释放量进行对比。如图 11 所示, 与对照组相比, LPS 组的 NO 质量浓度显著升高 ($P < 0.05$), 说明 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞炎症模型成功。与 LPS 组比较, 各对照品低、中、高质量浓度组的 NO 释放量降低, 具有显著性 ($P < 0.05$), 可表明这 5 种 Q-Marker 可显著抑制 LPS 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 NO 的产生。

3.6 含量测定结果

精密称取 3 批三妹木药材, 按“2.8.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.8.1”项条件测定。测定结果如表 4 所示。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: * $P < 0.05$ 。
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs LPS group.

图 10 Griess 法测定 RAW264.7 细胞 NO 释放量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 NO release from RAW264.7 cells determined by Griess method ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

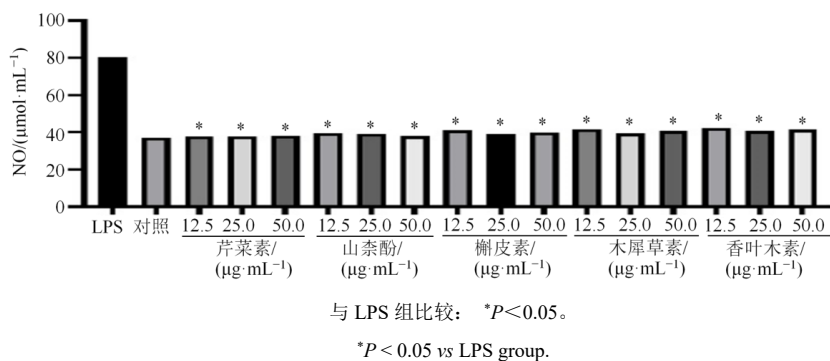


图 11 5 种质量标志物对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 11 NO release from RAW264.7 cells as determined by Griess method ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 4 三妹木 Q-Marker 测定结果

Table 4 Results of determination of content of *L. formosa*

序号	药材编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		木犀草素	槲皮素	山柰酚	总含量
1	SMM-1	0.092 8	0.291	0.114	0.497 8
2	SMM-1	0.094 7	0.289	0.114	0.497 7
3	SMM-1	0.095 0	0.291	0.111	0.49 7
5	SMM-2	0.092 8	0.287	0.113	0.492 8
6	SMM-2	0.092 1	0.286	0.114	0.492 1
7	SMM-2	0.090 2	0.291	0.110	0.491 2
10	SMM-3	0.084 6	0.293	0.110	0.487 6
11	SMM-3	0.086 8	0.285	0.116	0.487 8
12	SMM-3	0.087 5	0.288	0.114	0.489 5

4 讨论

中药 Q-Maker 是指中药材、中成药所含或在生产、炮制过程中形成的与中药功能特点密切相关的化学物质,作为反映中药安全性和有效性的标志物质用于质量控制^[14]。UPLC-Q-TOF/MS 可实现中药复杂成分的快速分离和鉴定,并可在无对照品的情况下分析化学成分而被广泛应用^[15-17]。本研究运用 UPLC-Q-TOF/MS 方法对三妹木进行成分分析,在瑶药三妹木醇提取物中共鉴定出 70 种化学成分,通过得到的特征离子碎片等信息进行质谱解析,明确其化学归属。

网络药理学以“疾病-基因-靶点相互作用网络”为基础,通过网络分析,系统全面地观察药物对疾病网络的干预和影响,揭示多分子药物对人体的协同作用^[18]。通过网络药理学的方法,将化学成分与抗炎靶点进行进一步的分析处理后分别确定瑶药三妹木发挥抗炎作用的关键靶点: VEGFA、IL-6、TNF、GAPDH、ALB、AKT1、EGFR、SRC、CASP3、JUN、TP53、STAT3、HIF1A、MAPK3; 关键化合物: 芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素、山柰酚-3-葡萄糖苷、杨梅素、甘草素、染料木素、大豆苷。GO 和 KEGG 分析均以 $P < 0.01$ 、 $FDR < 0.05$ 作为筛选条件,分别得到排名前 10 的 BP、CC、MF 和排名前 20 的 KEGG 信号通路。结果显示, BP 方面,三妹木活性成分主要参与炎症反应、信号转导、细胞凋亡过程的负调节等; CC 方面,主要参与质膜、细胞质、胞浆等; MF 主要涉及蛋白质结合、ABC 转运蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等。KEGG 通路富集结果表明三妹木产生抗炎作用可能与 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、TNF

信号通路等有关,其中 PI3K/Akt 信号通路是由磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟基的脂类激酶活性的 PI3K 及下游 Akt 组成, Akt 被磷酸化并被激活,进一步调控下游的靶基因。作为一种经典的信号通路, PI3K/Akt 参与生物体的免疫和炎症反应,对细胞增殖、凋亡、存活和新陈代谢非常重要^[19]。表明三妹木的主要活性成分通过作用于多条信号通路,调控多种生物学途径联合发挥抗炎作用。MAPK 信号通路是一个级联磷酸化的过程,可介导炎症反应和细胞因子的生成,在炎症反应中发挥着关键的调控作用^[20]。由此可见,所筛选的关键靶点与三妹木发挥抗炎作用具有密切关系。

通过分子对接验证表明,活性成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素与度值排名前 5 的靶点 TNF、IL-6、ALB、AKT1、GAPDH 结合活性较好,关联性较强,即这些药效成分与核心靶点基因可能是三妹木抗炎的药效物质基础与主要作用靶点。细胞实验结果表明,芹菜素、山柰酚、槲皮素、木犀草素、香叶木素可显著抑制 LPS 诱导小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞 NO 的产生。研究表明,芹菜素能通过抑制氧化应激和炎症减轻肾脏细胞损伤^[21],降低血清中 TNF- α 和 IL-6 的水平,并显著改善炎症细胞(如巨噬细胞)向肾组织的浸润^[22];木犀草素能显著降低小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平,减轻小鼠肝组织损伤程度、炎症细胞浸润和肝细胞凋亡;能显著抑制主要致病细胞因子 TNF- α 的表达^[23];山柰酚抑制了 MAPK 信号通路的表达,进而抑制了 TNF- β 、IL-1 β 、COX-2 胶原酶基因表达,从而减轻炎症反应^[24];山柰酚预处理能降低肝 I/R 小鼠的 IL-1 β 和 IL-6 水

平,并且可减弱肝组织中 NF- κ B 活化^[25];槲皮素可影响多种信号通路,包括 Tol 样受体 (TLR)、核因子 κ B (NF- κ B)/STAT、血红蛋白氧化酶-1 (HO-1)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和细胞外信号调节激酶 (ERK)^[26],从而发挥抗炎作用。活性成分芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素是三妹木发挥抗炎作用的潜在 Q-Marker,其作用机制可能与降低血清中 TNF、IL-6、Akt 等的水平相关,进而达到降低炎症反应。

采用 HPLC 含量测定的方法,对初步确定的三妹木 Q-Marker 进行可测性评价。结果显示木犀草素、槲皮素、山柰酚质量分数分别为 0.085~0.095、0.285~0.293、0.111~0.116 mg·g⁻¹。本研究可为三妹木抗炎作用机制的阐释提供参考,为进一步的实验验证研究提供思路。

本研究运用 UPLC-Q-TOF/MS 方法鉴定了瑶药三妹木主要化学成分,并结合网络药理和分子对接技术预测瑶药三妹木发挥抗炎作用的潜在作用靶点及通路,初步框定了芹菜素、木犀草素、山柰酚、香叶木素、槲皮素 5 个瑶药三妹木的 Q-Marker,并通过 Griess 法测定 RAW264.7 细胞 NO 释放量验证了所定 Q-Marker 的抗炎作用,探讨了 Q-Marker 发挥抗炎作用机制,为瑶药三妹木后续研究与开发提供理论依据。同时,本研究尚有不足之处,实验仅对三妹木的抗炎药效进行体外实验验证,无法完全模拟药物在生物体内的复杂环境。本研究并未对其信号通路进行验证。未来的研究将继续开展三妹木抗炎作用的药效及机制探究,为临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 冉先德. 中华药海 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1993.
Ran X D. *Chinese medicine sea* [M]. Harbin: Harbin Press, 1993.
- [2] 覃迅云. 中国瑶药学 [M]. 北京: 民族出版社, 2002.
Qin X Y. *Chinese Yao medicine* [M]. Beijing: The Ethnic Publishing House, 2002.
- [3] 朱华, 戴忠华. 中国壮药图鉴-上 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2017.
Zhu H, Dai Z H. *Illustrated Catalogue of Chinese Strong Medicines-Up* [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Publishing House, 2017.
- [4] 傅静, 许立拔, 张莹, 等. 美丽胡枝子不同提取部位对酵母菌致热大鼠发热的影响 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(14): 1642-1647.
- [5] 胡文波, 石森林, 高敏, 等. 美丽胡枝子不同部位总黄酮含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(6): 542-544.
Hu W B, Shi S L, Gao M, et al. Determination of flavonoids in defferent parts of *Lespedeza formosa* (vog.) koehne [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2008, 25(6): 542-544.
- [6] 张莹, 傅静, 王孝勋, 等. 把天门化学成分预试验及其总黄酮含量测定 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(3): 137-140, 192.
Zhang Y, Fu J, Wang X X, et al. Preliminary test of chemical components and determination of total flavonoids in the root of *Lespedeza formosa* [J]. *Hubei Agric Sci*, 2021, 60(3): 137-140, 192.
- [7] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 970-976.
Sun D M, Dong Y J, Xu A L, et al. Rapid analysis on flavonoids in Gegen Zhiju Soft Capsule by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(7): 970-976.
- [8] 李伟, 冯育林, 黎田儿, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物 [J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 504-516.
Li W, Feng Y L, Li T E, et al. Rapid analysis on flavonoids in *Glechoma longituba* (nakai) kupr by UPLC-Q-TOF/MS couple with diagnostic ions [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2016, 37(6): 504-516.
- [9] 高银鹤. 金银花水提取物的入血成分分析及抗炎活性成分研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2023.
Gao Y H. Analysis of blood components and anti-inflammatory active components of water extract of *Lonicera japonica* Thunb [D]. Yantai: Yantai University, 2023.
- [10] 任晓蕾, 霍金海, 孙国东, 等. 短瓣金莲花化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3475-3481.
Ren X L, Huo J H, Sun G D, et al. Analysis on chemical constituents from flowers of *Trollius ledebouri* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(23): 3475-3481.
- [11] 李振华, 徐金娣, 鞠建明, 等. 川楝子水提化学成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 496-501.
Li Z H, Xu J D, Ju J M, et al. Chemical constituents from water extract of *Toosendan Fructus* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(4): 496-501.
- [12] 蒋希羽, 庄楷, 张雅净, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-

- Orbitrap-MS 的桂枝茯苓丸化学成分分析 [J]. 中药材, 2021, 44(8): 1889-1894.
- Jiang X Y, Zhuang K, Zhang Y J, et al. Analysis of chemical constituents of Guizhi Fuling Pills based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(8): 1889-1894.
- [13] 刘仪滨, 陈慧, 朱茜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中色氨酸及其代谢物浓度 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(7): 742-749.
- Liu Y B, Chen H, Zhu Q, et al. Quantitative determination of tryptophan and its metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2019, 22(7): 742-749.
- [14] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- Liu C X, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [15] 廖翠平, 额尼日勒, 高雅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS/MS 技术的蒙药葶苈成分分析 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2122-2129.
- Liao C P, Enirile, Gao Y, et al. Study on chemical constituents of Mongolian medicine *Piperis Longi Fructus* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. China J Tradit Chin Med and Pharm, 2023, 38(5): 2122-2129.
- [16] 晏露婷, 宋永贵, 艾志福, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合多元统计分析比较不同品种牛膝药材化学成分的差异 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2160-2174.
- Yan L T, Song Y G, Ai Z F, et al. Comparison of differences in chemical components of different varieties of *Achyranthes bidentata* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology combined with multivariate statistical analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(7): 2160-2174.
- [17] 袁传裕, 胡俊杰, 李娟, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的疏肝和胃汤化学成分、HPLC 指纹图谱、化学模式识别及含量测定研究 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2183-2196.
- Yuan C Y, Hu J J, Li J, et al. Chemical composition, HPLC fingerprinting, chemical pattern recognition and content determination of Shugan Hewei Decoction based on UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(7): 2183-2196.
- [18] Goh K I, Cusick M E, Valle D, et al. The human disease network [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(21): 8685-8690.
- [19] 宋添力, 唐浪, 王一民, 等. 竹节参多糖通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对急性肝损伤大鼠的影响 [J]. 精细化工, 2023, 40(11): 2472-2479+2534.
- Song T L, Tang L, Wang Y M, et al. Effect of *Panax japonicus* polysaccharide on acute liver injury rats via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway [J]. Fine Chemicals, 2023, 40(11): 2472-2479+2534.
- [20] Wang D S, Wu Z X, Zhao C L, et al. KP-10/Gpr54 attenuates rheumatic arthritis through inactivating NF- κ B and MAPK signaling in macrophages [J]. Pharmacol Res, 2021, 171: 105496.
- [21] Wu Q J, Li W, Zhao J, et al. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137: 111308.
- [22] 李鹤, 王永光, 刘毅, 等. 芹菜素对大鼠肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(10): 1049-1056.
- Li H, Wang Y G, Liu Y, et al. The protective effect and mechanism of apigenin on renal injury in rats [J]. Chin J New Drugs, 2023, 32(10): 1049-1056.
- [23] 张琦. 木犀草素对急性免疫性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(3): 329-332.
- Zhang Q. Protective effects of luteolin on immune-mediated liver injury in mice [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2014, 34(3): 329-332.
- [24] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine [J]. Pharmacol Res, 2015, 99: 1-10.
- [25] 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(07): 1017-1022.
- Yu W, Huang C S, Ding Y C, et al. Pre-treatment with geranylgeranyl lignans exerts protective effects against hepatic ischaemia/reperfusion in mice through anti-inflammatory and antioxidant effects [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(07): 1017-1022.
- [26] 张冬梅, 杨强, 刘敏. 槲皮素防治急性肝损伤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(12): 3166-3173.
- Zhang D M, Yang Q, Liu M. Research progress on mechanism of quercetin in prevention and treatment of acute liver injury [J]. Drugs Clin, 2023, 38(12): 3166-3173.

[责任编辑 齐静雯]