

基于 GC-MS 成分分析结合网络药理学预测当归挥发油质量标志物 (Q-Marker)

柳小莉¹, 黄小英², 张小飞^{2,3}, 王梁凤², 朱丽云², 徐杰², 陈青垚², 杨明^{1,2*}, 王芳^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712000

摘要: 目的 预测当归挥发油质量标志物 (quality marker, Q-Marker)。方法 采用 GC-MS 检测当归挥发油化学成分, 网络药理学构建成分-靶点网络、蛋白-蛋白互作网络、成分-靶点-通路网络、靶点-组织分布网络预测当归挥发油 Q-Marker, 分子对接验证 Q-Marker 生物活性, 查阅文献佐证 Q-Marker 有效性。结果 18 批次当归挥发油 GC-MS 分析获得了 5 个共有成分, 以共有成分为 Q-Marker 候选成分做网络药理学分析, 预测藁本内酯与丁烯基酞内酯为当归挥发油 Q-Marker, Q-Marker 作用于核心靶点 PIK3R1、CHRM1、CHRM2、SRC、CREBBP, 通过重要通路肌动蛋白细胞骨架调节, 分布于大脑皮层、胆囊、平滑肌、前列腺、膀胱、扁桃体、基底神经节及海马中发挥药理作用; 分子对接中藁本内酯、丁烯基酞内酯与核心靶点有较好的结合能力, 体现当归挥发油 Q-Marker 较好的生物活性, 文献佐证了 Q-Marker 有效性。结论 预测的 Q-Marker 为当归挥发油质量标准的建立及当归挥发油质量评价奠定物质基础。

关键词: 当归挥发油; 质量标志物; GC-MS; 网络药理学; 分子对接; 丁烯基酞内酯; 藁本内酯

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)09-2696-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.020

Q-Marker prediction of volatile oil of *Angelicae Sinensis Radix* based on GC-MS analysis combined with network pharmacology

LIU Xiao-li¹, HUANG Xiao-ying², ZHANG Xiao-fei^{2,3}, WANG Liang-feng², ZHU Li-yun², XU Jie², CHEN Qing-yao², YANG Ming^{1,2}, WANG Fang²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To predict the quality marker (Q-Marker) of the volatile oil of Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*, ASR).

Methods GC-MS was applied to detect chemical components of volatile oil of ASR. Network pharmacology was used to construct component-target network, protein-protein interaction network, component-target-pathway network and target-tissue network, so as to predict the Q-Marker. Molecular docking was used to verify the biological activity and literature was consulted to confirm the effectiveness of Q-Marker. **Results** Five common components were obtained from 18 batches of volatile oil of ASR in GC-MS analysis. Further network pharmacology analysis of the common components showed that *trans*-ligustilide and 3-butylidene-1(3*H*)-isobenzofuranone were predicted as Q-Marker. Q-Marker played pharmacological effect through acting on core targets PIK3R1, CHRM1, CHRM2, SRC, CREBBP, which were distributed in cerebral cortex, gallbladder, smooth muscle, prostate, urinary bladder, amygdala, basal ganglia, and hippocampal formation through one important pathway of regulation of actin cytoskeleton. The Q-Marker of volatile oil of ASR had a good binding ability with the core target, reflecting the good biological activity, which was

收稿日期: 2021-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703720); 江西省重大科技研发专项 (20194ABC28009)

作者简介: 柳小莉 (1988—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药制剂新工艺、新技术研究。

*通信作者: 杨明, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂新工艺、新技术研究。Tel: (0791)87119032 E-mail: mingyang26@126.com

王芳, 女, 博士, 副教授, 主要从事中药制剂学研究。Tel: (0791)87118645 E-mail: cat689apple@163.com

confirmed by the literature. **Conclusion** The predicted Q-Marker can provide the material foundation for the establishment of quality standard and the quality evaluation of volatile oil of ASR.

Key words: volatile oil of *Angelicae Sinensis Radix*; Q-Marker; GC-MS; network pharmacology; molecular docking; 3-butyldiene-1(3H)-isobenzofuranone; *trans*-ligustilide

当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 秋末采挖, 性甘、辛、温, 归肝、心、脾经, 有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效^[1]。中药材天地网大数据中心平台分析, 甘肃省、云南省及青海省为当归主产地。当归化学成分由挥发油和非挥发油组成, 其中当归挥发油为次生代谢物, 常以水蒸气蒸馏法提取^[2], 具有易挥发及促皮肤渗透的特点^[3], 在心血管系统、脑及中枢神经系统、胃肠道系统、镇痛抗炎等^[4-9]方面有较好的药理作用, 以吸嗅或皮肤给药途径应用于芳香疗法中。当归挥发油与其主要活性成分藁本内酯在心脑血管系统^[10]有较强的药理作用; 根据《中国心血管健康与疾病报告 2019》, 中国心血管疾病死亡率居于首位^[11]; 鉴于挥发油芳香走串, 可快速发挥疗效的特点会使当归挥发油在心血管疾病应用中有潜在优势。

当归挥发油质量是保障药效及安全应用的基础。现阶段当归挥发油缺乏质量相关研究, 本研究预测当归挥发油质量标志物 (quality marker, Q-Marker), 以期为当归挥发油质量评价奠定物质基础。当归挥发油提取后, GC-MS 分析挥发油化学成分, 以找出共有成分; 数据库中查找共有成分作用靶点, 构建和分析成分-靶点网络、蛋白-蛋白互作网络、靶点-组织网络、成分-靶点-通路网络, 并对基因本体 (gene ontology, GO) 与京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 逐次获得与多靶点-多通路-多组织关系中最密切的成分为当归挥发油 Q-Marker^[12]; 最后, 通过分子对接技术, 将核心靶点匹配的最佳化合物作为对照组, 将对照组和 Q-Marker 分别与核心靶点的结合能力进行比较, 验证 Q-Marker 的生物活性; 查阅文献, 佐证 Q-Marker 的有效性。

1 材料

1.1 仪器

7890A/5975C 型 GC-MS 仪器, 美国安捷伦公司; SXKW 型数显控温电热套, 北京市永光明仪器股份有限公司; TB-214 型电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 800Y 高速多功能粉碎机, 永康

市铂欧五金制品有限公司。

1.2 试药

无水乙醇 (批号 19060102)、无水硫酸钠 (批号 1804081) 均购自西陇科学股份有限公司; 当归药材购自成都慧锄科技有限公司, 分别为云南省 6 批次 (S₁ 曲靖富源、S₂ 大理洱源、S₃ 迪庆香格里拉、S₄ 迪庆开屏、S₅ 曲靖会泽、S₆ 大理鹤庆), 甘肃省 6 批次 (S₇ 渭源会川、S₈ 岷县西寨、S₉ 陇南宕昌、S₁₀ 岷县岷阳、S₁₁ 陇南成县、S₁₂ 渭源彭峰), 青海省 6 批次 (S₁₃ 西宁大通、S₁₄ 海东互助、S₁₅ 西宁湟中、S₁₆ 西宁湟源、S₁₇ 海东民和、S₁₈ 海东乐都), 共 18 批次药材, 经江西中医药大学葛菲教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 当归挥发油提取

课题组前期对提取工艺优化后当归挥发油提取率达到 0.7%, 实验按照优化工艺提取挥发油: 当归药材 (S₁~S₁₈) 粉碎为粗粉; 分别称取 300 g 当归粗粉, 装入 5 L 圆底烧瓶中, 加入 3000 mL 水, 浸泡 2 h 后开始提取, 提取时间 9 h^[13]; 收集索氏提取器中当归挥发油, 加入适量无水硫酸钠, 静置 12 h; 移取当归挥发油, 依次按产地对应标记为 S₁~S₁₈, 装入棕色玻璃瓶中, 阴凉柜 4 °C 保存。

2.2 当归挥发油 GC-MS 分析

2.2.1 制样方法 移取当归挥发油 10 μL, 无水乙醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀后加适量无水硫酸钠, 0.22 μm 有机滤膜滤过, 取续滤液于进样瓶中, 即得当归挥发油样品溶液。

2.2.2 检测条件^[13] 安捷伦 HP-5 MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) 色谱柱; 进样口温度 250 °C; 进样量 1 μL, 分流比 40:1; 体积流量 1 mL/min; 程序升温: 80 °C 保持 0 min, 3 °C/min 升温至 167 °C, 保持 2.5 min, 2 °C/min 升温至 202 °C, 保持 0 min, 4 °C/min 升温至 260 °C, 保持 2 min; 质谱采用 EI 离子源, 离子源温度 230 °C, 电离能量 70 eV, 扫描范围为全扫描, 四级杆温度 150 °C, 溶剂延迟时间 3 min。

2.2.3 方法学考察

(1) 精密度试验: 取当归挥发油样品 (S₁₀),

按“2.2.1”项下制样方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下检测条件连续进样 6 次，记录藁本内酯峰面积。藁本内酯峰面积 RSD 为 0.05%，表明仪器精密度良好。

(2) 重复性试验：取当归挥发油样品 (S_{10})，按“2.2.1”项下制样方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.2”项下条件进行检测，记录藁本内酯峰面积。藁本内酯峰面积 RSD 为 0.07%，结果表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性试验：取当归挥发油样品 (S_{10})，按“2.2.1”项下制样方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下条件分别于 0、4、8、12、24、48 h 进行检测，记录藁本内酯峰面积。藁本内酯峰面积 RSD 为 0.09%，结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.4 化学成分分析 当归挥发油样品 $S_1 \sim S_{18}$ 按照“2.2.1”项下制样方法制备样品溶液，按“2.2.2”项下检测条件获得 18 批次当归挥发油总离子流图 (图 1)。

根据安捷伦 7890A/5975C 气相色谱质谱仪中数据库 NIST14.L 检索，分析各批次当归挥发油化学成分信息，得到当归挥发油 5 个共有成分 (图 2)，共有成分信息见表 1。共有成分相对含量总和达 95%，表明这 5 个成分在当归挥发油中有代表性，将共有成分作为 Q-Marker 的候选成分。

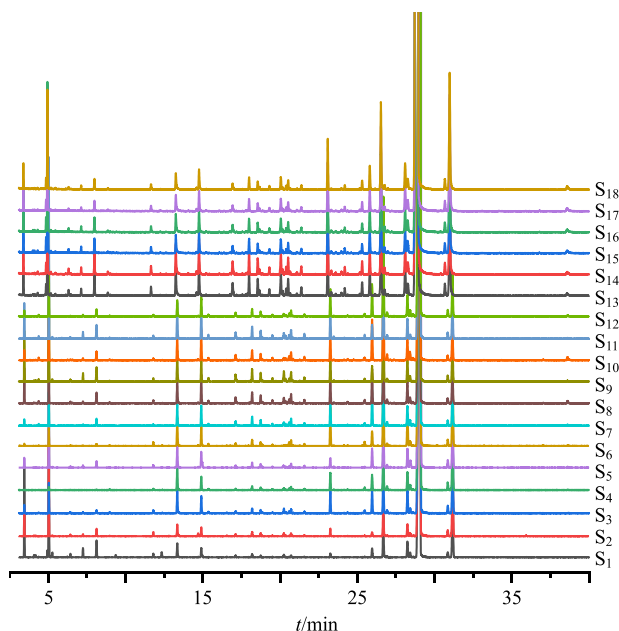
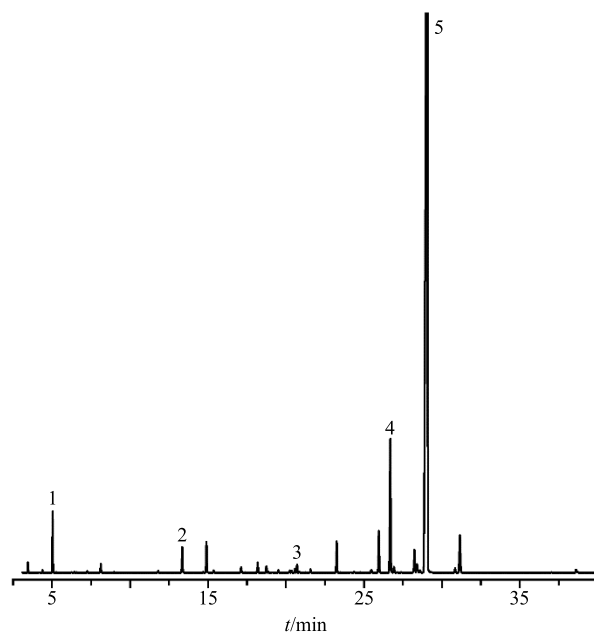


图 1 当归挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion current diagram of volatile oil of ASR



1-反式 β -罗勒烯 2-对乙烯基愈疮木酚 3- β -甜没药烯 4-丁烯基酞内酯 5-藁本内酯
1-*trans*- β -ocimene 2-2-methoxy-4-vinylphenol 3- β -bisabolene
4-3-butylidene-1(3*H*)-isobenzofuranone 5-*trans*-ligustilide

图 2 当归挥发油共有成分

Fig. 2 Common components of volatile oil of ASR

表 1 共有成分信息

Table 1 Common ingredients information

共有成分	t_R /min	相对含量/%
反式 β -罗勒烯	5.008 4	2.087 1
对乙烯基愈疮木酚	13.316 8	0.737 2
β -甜没药烯	20.542 4	0.198 1
丁烯基酞内酯	26.635 9	4.164 3
藁本内酯	29.030 7	87.483 8

2.3 网络药理学分析

2.3.1 候选化合物靶点预测 共有成分作为 Q-Marker 候选化合物，通过检索数据库 TCMSP^[14] 及 SwissTargetPrediction^[15]，查找候选化合物作用靶点；靶点合并，除去重复值，UniProt 数据库^[16]规范靶点基因名，得到与 5 个化合物相关的 112 个靶点。将化合物与靶点导入 Cytoscape 3.2.1 软件中构建成成分-靶点网络图，见图 3 (V 形节点代表化合物，圆形节点代表靶点，节点大小代表度值大小)；其中化合物丁烯基酞内酯 (3-butylidene-1(3*H*)-isobenzofuranone)、藁本内酯 (*trans*-ligustilide) 与对乙烯基愈疮木酚 (2-methoxy-4-vinylphenol) 的度值分别为 68、59、41，这 3 个成分对应的靶点更多，影响更大。

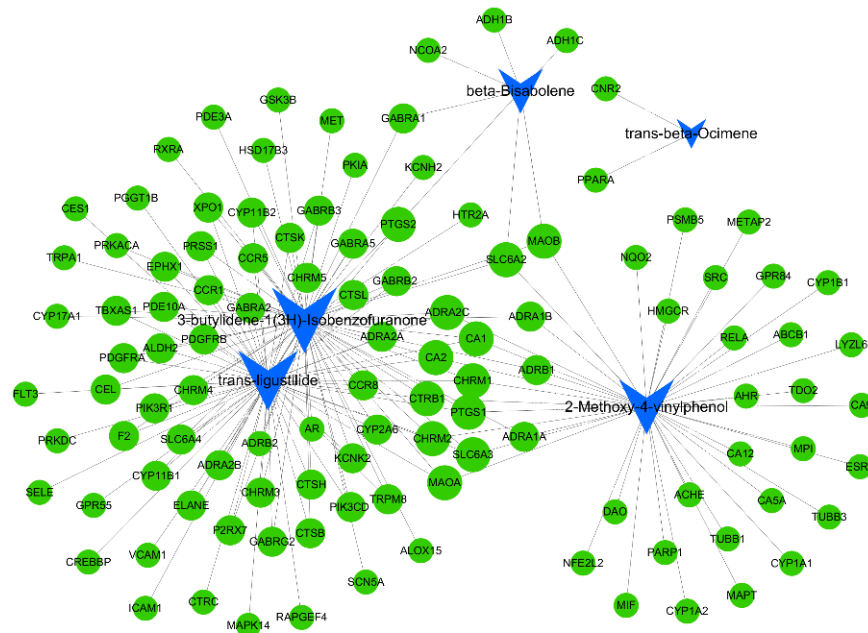


图 3 成分-靶点网络图

Fig. 3 Component-target network

2.3.2 蛋白与蛋白互作 (protein-protein interaction network, PPI) 网络分析 将 112 个靶点导入 STRING^[17]数据库中, 限定物种为“人”, 设置蛋白交互参数评分值大于 0.9, 去掉网络中单一节点, 其他参数不变, 结果保存成 tsv 格式, 保留文件中节点和结合率评分信息, 导入 Cytoscape3.2.1 构建 PPI 网络, 结果见图 4 (节点大小代表度值大小); 选取网络中度值 (degree) 大于中位数且大于 9 的靶点作为关键靶点, 获得 7 个关键靶点, 分别为磷脂酰

肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha, PIK3R1, degree 16)、趋化因子受体 5 型 CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, degree 13)、激活肽片段 2 (Activation peptide fragment 2, F2, degree 11)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC, degree 11)、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1 (muscarinic acetylcholine receptor M1, CHRM1, degree 10)、CHRM2 (degree 10)、CREB 结合蛋白 (CREB-binding protein, CREBBP, degree 10)。

2.3.3 GO 与 KEGG 富集分析 运用 R 语言 (clusterProfiler) 对 7 个关键靶点进行 GO 功能富集分析, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC) 及 KEGG 通路富集分析。GO 分析结果共获得 435 个条目, 其中 BP 353, MF 53, CC 29, 以 $P < 0.05$ 及伪发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 对 GO 条目进行筛选, 结果见表 2; 生物过程为脂质激酶活性的调节、蛋白质向细胞核定位的正调控、细胞蛋白质定位的正调控等; 分子功能为胰岛素受体结合、乙酰胆碱受体活性、磷脂酰肌醇磷脂酶 C 活性等; 细胞组成为胆碱能突触。

KEGG 分析获得 42 条通路, 对 $P < 0.05$ 的通路进行筛选, 结果见表 3; 前 8 条通路为肌动蛋白细胞骨架调节、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、病毒

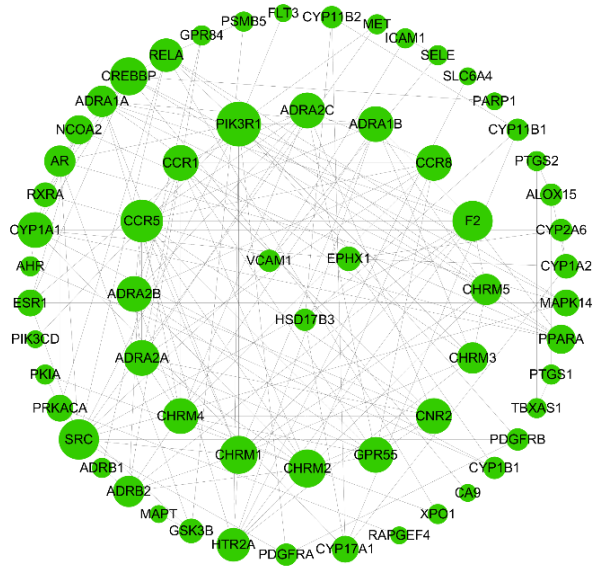


图 4 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network

表 2 GO 功能富集结果
Table 2 Go enrichment analysis results

类别	ID	基因功能	基因数
BP	GO:0043550	脂质激酶活性的调节 (regulation of lipid kinase activity)	3
BP	GO:1900182	蛋白质向细胞核定位的正调控 (positive regulation of protein localization to nucleus)	3
BP	GO:1903829	细胞蛋白质定位的正调控 (positive regulation of cellular protein localization)	4
BP	GO:0014068	磷脂酰肌醇 3-激酶信号的正调控 (positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling)	3
BP	GO:0007207	磷脂酶 C-激活 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体信号通路 (phospholipase C-activating G protein-coupled acetylcholine receptor signaling pathway)	3
BP	GO:0019216	脂质代谢过程的调节 (regulation of lipid metabolic process)	4
BP	GO:1900180	蛋白质向细胞核定位的调控 (regulation of protein localization to nucleus)	3
BP	GO:0051049	细胞内转运的调节 (regulation of intracellular transport)	4
BP	GO:0014066	磷脂酰肌醇 3-激酶信号转导的调控 (regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling)	2
MF	GO:0005158	胰岛素受体结合 (insulin receptor binding)	2
MF	GO:0015464	乙酰胆碱受体活性 (acetylcholine receptor activity)	2
MF	GO:0004435	磷脂酰肌醇磷脂酶 C 活性 (phosphatidylinositol phospholipase C activity)	2
MF	GO:0004629	磷脂酶 C 活性 (phospholipase C activity)	2
MF	GO:0004993	G 蛋白偶联血清素受体活性 (G protein-coupled serotonin receptor activity)	2
MF	GO:0099589	5-羟色胺受体活性 (serotonin receptor activity)	2
MF	GO:0099528	G 蛋白偶联神经递质受体活性 (G protein-coupled neurotransmitter receptor activity)	2
MF	GO:0016907	G 蛋白偶联乙酰胆碱受体活性 (G protein-coupled acetylcholine receptor activity)	2
CC	GO:0098981	胆碱能突触 (cholinergic synapse)	2

表 3 KEGG 信号通路结果
Table 3 KEGG signaling pathway results

ID 编号	KEGG 信号通路	基因数
hsa04810	肌动蛋白细胞骨架的调节 (regulation of actin cytoskeleton)	5
hsa05167	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 (kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)	4
hsa05203	病毒致癌作用 (viral carcinogenesis)	4
hsa04024	cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)	4
hsa04725	胆碱能突触 (cholinergic synapse)	3
hsa04919	甲状腺激素信号通路 (thyroid hormone signaling pathway)	3
hsa04611	血小板激活 (platelet activation)	3
hsa05161	乙型肝炎 (hepatitis B)	3

致癌作用、cAMP 信号通路等,说明筛选出的 7 个关键靶点可能通过这些通路达到干预或治疗疾病的目的。

2.3.4 成分-靶点-通路网络构建 将 3 个重要成分、7 个关键靶点、8 条通路,在 Cytoscape 3.2.1 软件中构建成分-靶点-通路网络图,见图 5 (蓝色 V 形节点代表化学成分、绿色圆形节点代表关键靶点、蓝绿色方形节点代表通路,节点大小代表度值大小)。

以成分、靶点、通路的连接度 (degree) 为参

考值,得出藁本内酯 (degree 6) 和丁烯基酞内酯 (degree 5) 有较高的连接度,因此将藁本内酯与丁烯基酞内酯作为当归挥发油的 Q-Marker。7 个关键靶点中 PIK3R1 (degree 9)、CHRM1 (degree 7)、CHRM2 (degree 7)、SRC (degree 6)、CREBBP (degree 5) 连接度较高,表明这 5 个靶点的作用尤为重要,为核心靶点;8 条通路中肌动蛋白细胞骨架的调节 (regulation of actin cytoskeleton) 的度值为 5 为最大值,是最为重要的通路。

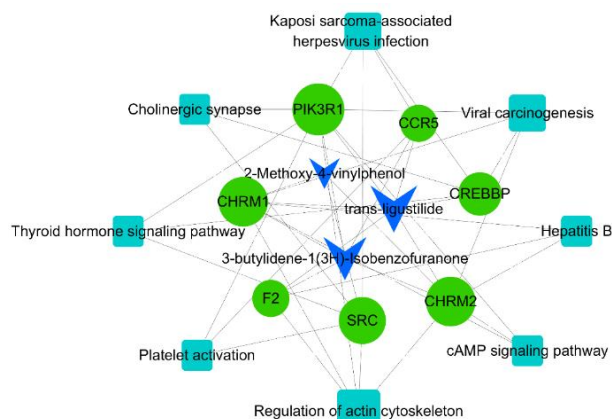


图 5 成分-靶点-通路网络图
Fig. 5 Network of component-target-pathway

2.3.5 核心靶点组织分布 由 The Human Protein Atlas 数据库^[18]查找 5 个核心靶点 PIK3R1、CHRM1、CHRM2、SRC、CREBBP 的组织分布数据, 下载 tsv 格式文件, 共获得 305 条组织 (tissue) 数据, 对数据中表达量大于 10 的组织进行分析, 筛选出 147 条数据; 应用 Cytoscape 3.2.1 软件构建靶点-组织网络图, 见图 6 (绿色圆形节点代表核心靶点、棕色菱形节点代表人体组织或器官, 节点大小代表度值大小)。靶点-组织网络中, CREBBP 与 53 个组织相连接, PIK3R1 与 50 个组织相连接, SRC 与 32 个组织相连接, CHRM1 与 7 个组织相连接, CHRM2 与 5 个组织相连接; 选取度值最大的组织, 分别为大脑皮层 (cerebral cortex)、胆囊 (gallbladder)、平滑肌 (smooth muscle)、前列腺 (prostate)、膀胱 (urinary bladder)、扁桃体 (amygdala)、基底神经

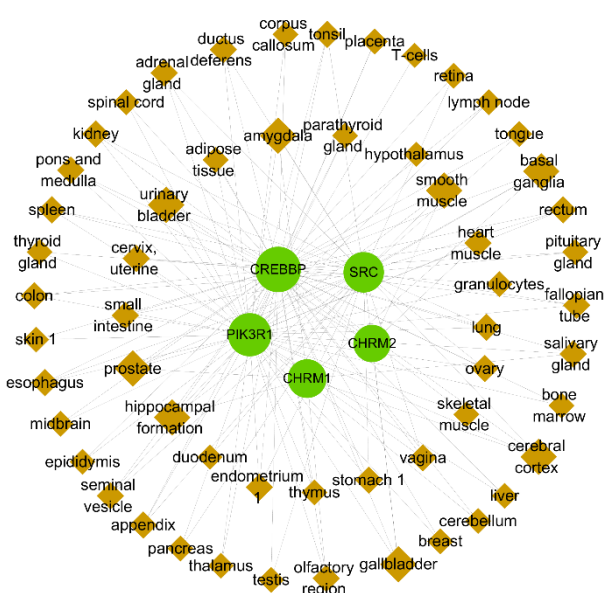


图 6 靶点-组织网络图
Fig. 6 Network of target-tissue

节 (basal ganglia)、海马 (hippocampal formation), 结合 The Human Protein Atlas 数据库中表达量值, 计算核心靶点在各组织的表达量, 见表 4。

靶点 PIK3R1、CHRM1、CHRM2、SRC、CREBBP 在大脑皮层、胆囊、平滑肌、前列腺、膀胱、扁桃体、基底神经节及海马这 8 个组织中, 表达量平均值都在 15 以上, 其中大脑皮层的表达量最高, 平均值为 29.95。

2.4 分子对接分析

2.4.1 受体与配体结构获取 Q-Marker 藁本内酯与丁烯基醚内酯为配体, 在 PubChem 数据库^[19]下

表 4 核心靶点组织分布与表达量

Table 4 Main distribution tissues and expression levels of core targets

基因	组织/器官	表达量	平均值	基因	组织/器官	表达量	平均值	基因	组织/器官	表达量	平均值
PIK3R1	大脑皮层	50.30	29.95	CHRM1	前列腺	28.20	20.43	PIK3R1	基底神经节	24.30	18.95
CHRM1	大脑皮层	34.70		SRC	前列腺	19.90		CHRM1	基底神经节	22.00	
CREBBP	大脑皮层	18.80		CREBBP	前列腺	18.40		CREBBP	基底神经节	17.50	
SRC	大脑皮层	16.00		PIK3R1	前列腺	15.20		SRC	基底神经节	12.00	
SRC	胆囊	42.10	26.75	SRC	膀胱	26.40	21.15	PIK3R1	海马	24.00	16.65
CHRM2	胆囊	25.50		PIK3R1	膀胱	25.20		CREBBP	海马	17.10	
CREBBP	胆囊	21.30		CHRM2	膀胱	14.00		SRC	海马	11.30	
PIK3R1	胆囊	18.10		CREBBP	膀胱	19.00		CHRM1	海马	14.20	
PIK3R1	平滑肌	36.30	28.33	PIK3R1	扁桃体	26.00	17.30				
CHRM2	平滑肌	32.80		CREBBP	扁桃体	17.20					
CREBBP	平滑肌	17.00		CHRM1	扁桃体	13.20					
SRC	平滑肌	27.20		SRC	扁桃体	12.80					

载 3D 结构 sdf 格式文件；核心靶点 PIK3R1、CHRM1、CHRM2、SRC、CREBBP 为受体，在 RSCB PDB 数据库^[20]中物种选择“人”，选择分辨率高的 3D 结构，下载 pdb 格式文件；将 RSCB PDB 数据库各靶点对应的配体(unique ligand)作为对照化合物^[21]，结果见表 5，下载对照化合物 3D 结构 sdf 格式文件。Openbabel 3.1.1 软件转换化合物格式。

2.4.2 分子对接与可视化 AutoDockTools1.5.6 软

表 5 靶点-对照化合物信息

Table 5 Information of targets-control compounds	
靶点	对照化合物
PIK3R1	丙三醇 (glycerin)
CHRM1	丙三醇 (glycerin)
CHRM2	甲基东莨菪碱 (methscopolamine)
SRC	磷酸核糖 (phosphotyrosine)
CREBBP	(3 <i>R</i>)- <i>N</i> -[3-(7-methoxy-3,4-dihydroquinolin-1(2 <i>H</i>)-yl)propyl]-3-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline-5-carboxamide (2O4)

件对受体和配体进行去水、加氢、加电荷处理，并获得最佳活性位点，在 AutoDock-vina1.1.2 中输入命令符进行分子对接计算，得到配体与受体的结合能，结果见表 6。结合能越小对接效果越好，配体越容易与受体结合。Pymol2.4.0 软件进行分子对接可视化处理；Q-Marker 与靶点蛋白结合位置见图 7

表 6 AutoDock vina 计算结果

Table 6 AutoDock vina calculation results of ligand and receptor

化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	PIK3R1	CHRM1	CHRM2	SRC	CREBBP
丙三醇	-4.4				
丙三醇		-3.5			
甲基东莨菪碱			-6.0		
磷酸核糖				-5.1	
2O4					-7.4
藁本内酯	-6.3	-6.0	-6.0	-4.8	-5.1
丁烯基酚内酯	-6.3	-6.0	-6.0	-4.8	-5.1

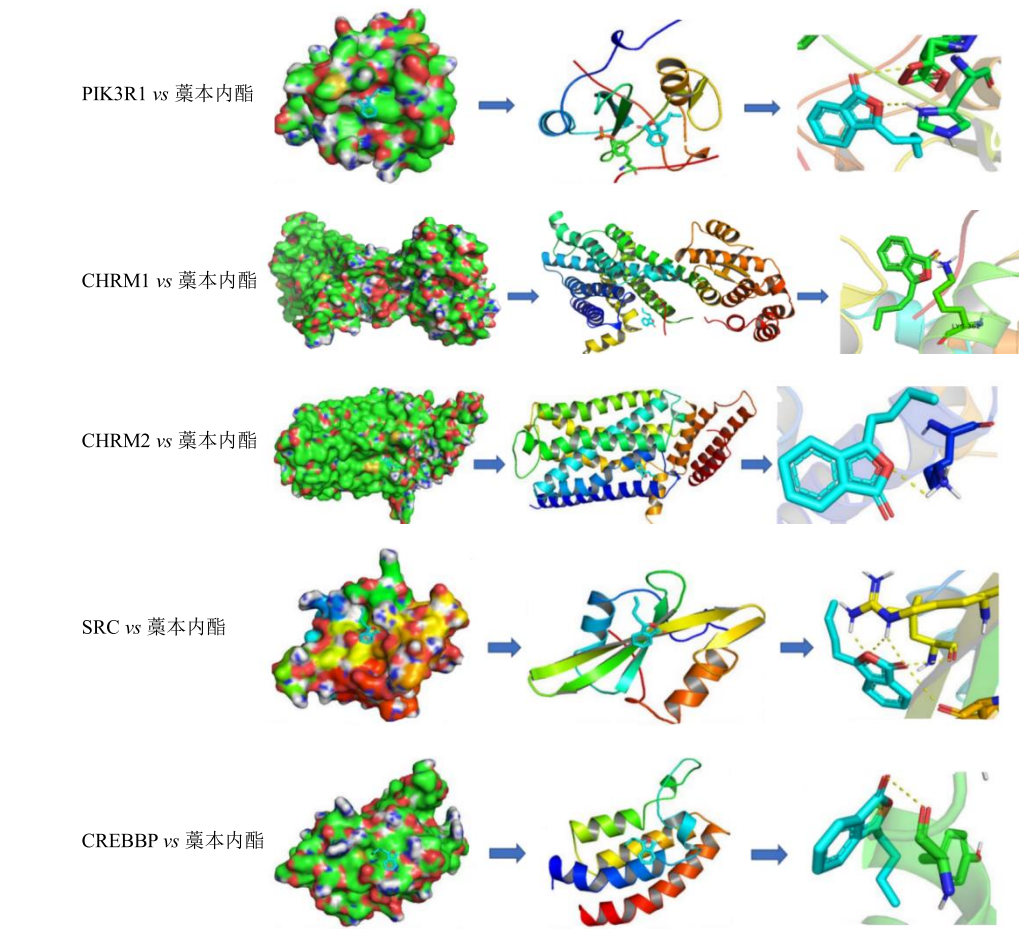


图 7 藁本内酯与靶点分子对接图

Fig. 7 Molecular docking map of *trans*-ligustilide and targets

(图中依次呈现出球状、条状与结合点位置)。藁本内酯与丁烯基酞内酯化学结构相似、相对分子质量相近,两者经配体处理后,获得的最优结构与蛋白结合能力一致,因此,可视化中仅展示藁本内酯(*trans*-ligustilide)的分子对接图。

Q-Marker 藁本内酯、丁烯基酞内酯与 PIK3R1、CHRM1 结合能分别为 26.371、25.115 kJ/mol (−6.3、−6.0 kcal/mol), 比对照化合物丙三醇的值更小; 相对于丙三醇, Q-Marker 与 PIK3R1、CHRM1 的结合能力更好。藁本内酯、丁烯基酞内酯及甲基东莨菪碱在靶点 CHRM2 上结合能都为 25.115 kJ/mol (−6.0 kcal/mol), 这 3 个化合物与 CHRM2 的结合能力一致。藁本内酯、丁烯基酞内酯与 SRC、CREBBP 的结合能分别为 20.092、21.348 kJ/mol (−4.8、−5.1 kcal/mol), 比对照化合物磷酸核糖与 2O4 的结合能大, Q-Marker 与 SRC、CREBBP 的结合能力弱于磷酸核糖与 2O4。一般而言, 结合能 affinity 值小于 16.743 kJ/mol (−4.0 kcal/mol) 时, 表明配体有较强

的生物活性^[22]。与对照组比较以及 affinity 值分析, Q-Marker 藁本内酯、丁烯基酞内酯在核心靶点上都有较好的结合能力, 表明预测的当归挥发油 Q-Marker 有较好的生物活性。

2.4.3 Q-Marker 有效性佐证 预测的 Q-Marker 良好的生物活性通过分子对接技术得以验证, 有效性通过文献佐证。从文献中归纳后当归挥发油 Q-Marker 药效组织、作用及应用见表 7。文献中, 藁本内酯与丁烯基酞内酯在大脑、平滑肌、前列腺、膀胱、海马、结直肠发挥作用, 与预测的组织分布(大脑皮层、胆囊、平滑肌、前列腺、膀胱、扁桃体、基底神经节及海马)基本一致, 应用于心脑血管系统、呼吸系统、生殖系统、中枢神经系统、胃肠道系统, 发挥着不同程度的药效作用。

核心靶点 PIK3R1 为磷脂酰肌醇 3-激酶, 对胰岛素的代谢有重要作用, 它与癌症、免疫缺陷与发育障碍有关^[37]。CHRM1 与 CHRM2 为毒蕈碱乙酰胆碱受体, 是与精神障碍有关的基因; CHRM1 有

表 7 Q-Marker 文献信息

Table 7 Literature information of Q-Marker

Q-Marker	组织	作用	应用	文献
藁本内酯	支气管平滑肌	能对抗组胺、乙酰胆碱	平喘	23
	脑神经	抑制乙酰胆碱酯酶、抑制磷脂酰肌醇-3 羟基酶信号通路	老年痴呆	24
	大脑皮层和海马	促进脑神经发育及中枢胆碱乙酰转移酶活性, 提高海马	慢性脑缺血	24
	双侧颈动脉	区神经元的功能		
	脑神经	神经保护作用	出血性脑卒中	25
	脑神经	神经保护作用	阿尔茨海默病	26
	大脑	降低缺血脑组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达量及其酶活性、减轻继发 NO 水平的升高、干扰 NO 所介导各种途径的细胞毒性	局部脑缺血损伤	27
	血管平滑肌和子宫平滑肌	抑制活性氧类(reactive oxygen species, ROS)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK, P38)的表达, 下调丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号	子宫微循环调节	28
	血管平滑肌	抑制血管平滑肌细胞增殖和细胞周期	预防心血管疾病	29
	大脑	体内外抗凋亡作用	缺血性中风	30
	中枢神经系统	中枢抑制作用, 安定镇静作用	失眠	31
丁烯基酞内酯	结直肠	抗肿瘤作用, 诱导细胞周期阻滞和凋亡	结直肠癌	32
	大脑	提升细胞摄取细胞周期及凋亡调节因子	胶质母细胞瘤	33
	前列腺	诱导前列腺癌内质网应激	前列腺癌	34
	脑神经	神经保护作用	帕金森病	35
	膀胱	激活线粒体内源性途径导致癌细胞死亡	膀胱癌	36
	脑血管平滑肌	上调血管内皮生长因子表达	脑缺血微循环	28
	支气管平滑肌	对抗组胺、乙酰胆碱	平喘	23

乙酰胆碱受体兴奋作用,能影响睡眠的快速眼球运动期^[38],与迟发性运动障碍相关;CHRM2 有乙酰胆碱受体抑制作用,与多种神经精神疾病(包括谵妄、痴呆、抑郁、精神分裂症)有关^[39]。SRC 为原癌基因酪氨酸蛋白激酶,被鉴定为癌基因^[40]。CREBBP 为 CREB 结合蛋白,是对造血非常重要的肿瘤抑制基因,可以维持身体正常的造血功能^[41]。核心靶点相应的作用,与当归 Q-Marker 免疫调节、神经保护、抑制相关酶活性、抗肿瘤作用等相关。

Q-Marker 最重要的通路肌动蛋白细胞骨架的调节(regulation of actin cytoskeleton),对多功能的、普遍存在的细胞骨架蛋白有调节作用,用于神经元的建立和维持^[42]。此外,肌动蛋白细胞骨架可以改变突触和神经元形态中神经递质受体的水平,能够在杏仁核中介导学习和记忆的形成^[43]。肌动蛋白细胞骨架的调节作用与 Q-Marker 神经保护作用相关。

3 讨论

当归药材采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,GC-MS 方法分析 18 批次当归挥发油化学成分,获得 5 个共有成分,分别为反式 β -罗勒烯、对乙烯基愈疮木酚、 β -甜没药烯、丁烯基酯内酯、藁本内酯。以共有成分作为 Q-Marker 获选成分,通过网络药理学预测藁本内酯和丁烯基酯内酯为当归挥发油 Q-Marker。Q-Marker 藁本内酯,别名东当归酯内酯,对心脑血管系统有较强的药理作用^[44];丁烯基酯内酯为 3-亚丁基-1(3H)-异苯并呋喃酮的别名,有解痉、平喘、抗惊厥、镇痛等作用^[45]。

核心靶点 PIK3R1、CHRM1、CHRM2、SRC、CREBBP 与当归 Q-Marker 免疫调节、神经保护、抑制相关酶活性、抗肿瘤作用等相关。最主要的通路肌动蛋白细胞骨架的调节与 Q-Marker 神经保护作用相关。基因本体富集分析中生物过程主要涉及脂质激酶活性的调节,蛋白质向细胞核定位的正调控等;分子功能涉及胰岛素受体结合,乙酰胆碱受体活性等;细胞组成主要为胆碱能突触。核心靶点主要分布于大脑皮层、胆囊、平滑肌、前列腺、膀胱、扁桃体、基底神经节及海马中,并有较高的表达量,其中大脑皮层尤为显著;文献报道挥发油多作用于大脑皮层与海马中^[46-50]。分子对接验证了 Q-Marker 与核心靶点有较好的结合能力,理论上证实了 Q-Marker 较好的生物活性。通过文献佐证, Q-Marker 在大脑、平滑肌、前列腺、膀胱、海马、结直肠发挥作用,与核心靶点组织分布基本一致;

核心靶点、通路、Q-Marker 存在紧密的相关性。

当前中药挥发油缺乏质量标准,质量问题严峻,存在安全隐患;Q-Marker 为中药挥发油的质量评价、质量控制等研究奠定物质基础。本文预测当归挥发油 Q-Marker 为藁本内酯与丁烯基酯内酯,同时阐明了 Q-Marker 的作用机制,并从理论上验证了 Q-Marker 的生物活性,为当归挥发油质量标准的建立及当归挥发油质量奠定评价指标。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 140.
- [2] 孙敏,马清林,刘峰林,等. 当归挥发油研究新进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(16): 56-58.
- [3] 陈振鹤,吴国泰,牛亨惠,等. 当归挥发油研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(2): 25-29.
- [4] 刘倍吟,魏程科,李应东. 当归挥发油对高血压模型大鼠血压及血管炎症反应的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(11): 71-74.
- [5] 李敏,孙虹,李琰,等. 不同产地当归对血小板聚集及凝血时间活性的比较 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(2): 47-50.
- [6] 罗慧英,杨林,杨焕,等. 当归挥发油对脑缺血大鼠血液流变学的影响及防止血栓形成的研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29(4): 1-4.
- [7] 朱丽娟,罗建云,张安平,等. 当归挥发油通过抑制自噬减轻缺血再灌注神经细胞损伤 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 56-59.
- [8] 程小平,吴国泰,刘峰林,等. 当归挥发油对实验性胃肠动力障碍的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4): 54-56.
- [9] 刘琳娜,贾敏,梅其炳,等. 乙醇提取新鲜当归油的抗炎镇痛作用 [J]. 中国药房, 2002, 13(9): 14-15.
- [10] 姚淞允,张开霞,马强,等. 藁本内酯的临床前研究进展 [J]. 药学服务与研究, 2019, 19(2): 106-110.
- [11] 中国心血管健康与疾病报告 2019 [J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(9): 1145-1156.
- [12] 梅茜,夏金鑫,郭爽,等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [13] 张小飞,詹娟娟,吴司琪,等. 当归挥发油提取工艺优化及其乳化芳香成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 27-31.
- [14] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [15] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of

- protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [16] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [17] von Mering C, Huynen M, Jaeggi, *et al.* STRING: A database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [18] Thul P J, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome [J]. *Protein Sci*, 2018, 27(1): 233-244.
- [19] Kim S, Shoemaker B A, Bolton E E, *et al.* Finding potential multitarget ligands using PubChem [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1825: 63-91.
- [20] Nurminen A, Farnum G A, Kaguni L S. Pathogenicity in POLG syndromes: DNA polymerase gamma pathogenicity prediction server and database [J]. *BBA Clin*, 2017, 7: 147-156.
- [21] 王梁凤, 柳小莉, 李慧婷, 等. 基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1909-1917.
- [22] 陈佳, 李伟, 刘征, 等. 基于 GEO 数据库的 DPN 相关靶点挖掘及与芍药苷分子对接研究 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4): 514-518.
- [23] 吴国泰, 王瑞琼, 杜丽东, 等. 当归挥发油药理作用研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(4): 87-92.
- [24] 荔淑楠, 马骏, 臧凯宏, 等. 当归藁本内酯抗老年痴呆作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 674-677.
- [25] Han L, Liu D L, Zeng Q K, *et al.* The neuroprotective effects and probable mechanisms of ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63:43-57.
- [26] Kuang X, Chen Y S, Wang L F, *et al.* Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(1): 169-178.
- [27] 倪竹南, 吕圭源, 楼招欢, 等. 当归挥发油化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, (7): 93-95.
- [28] 姚楠, 王志旺, 付晓艳, 等. 当归挥发油及其苯酚类成分对平滑肌作用的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2738-2742.
- [29] Lu Q, Qiu T Q, Yang H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1/3): 136-140.
- [30] Wu Q, Mao Z G, Liu J, *et al.* Ligustilide attenuates ischemia reperfusion-induced hippocampal neuronal apoptosis via activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 979.
- [31] 杨雪婷, 张多, 刘雪. 当归有效成分提取及药理作用研究进展 [A] // 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集 [C]. 哈尔滨: 中国商品学会, 2017: 524-529.
- [32] Chang K F, Chang J T, Huang X F, *et al.* Antitumor effects of *n*-butylidenephthalide encapsulated in lipopolyplexes in colorectal cancer cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(10): doi: 10.3390/molecules25102394.
- [33] Lin Y L, Huang X F, Chang K F, *et al.* Encapsulated *n*-butylidenephthalide efficiently crosses the blood-brain barrier and suppresses growth of glioblastoma [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 749-760.
- [34] Chiu S C, Chen S P, Huang S Y, *et al.* Induction of apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in human prostate cancer cells by *n*-butylidenephthalide [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33742.
- [35] Fu R H, Harn H J, Liu S P, *et al.* *N*-butylidenephthalide protects against dopaminergic neuron degeneration and α -synuclein accumulation in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85305.
- [36] Chiu S C, Chiu T L, Huang S Y, *et al.* Potential therapeutic effects of *n*-butylidenephthalide from *Radix Angelica Sinensis* (Danggui) in human bladder cancer cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 523.
- [37] Dornan G L, Stariha J T B, Rathinaswamy M K, *et al.* Defining how oncogenic and developmental mutations of PIK3R1 alter the regulation of class IA phosphoinositide 3-kinases [J]. *Structure*, 2020, 28(2): 145-156.
- [38] Niwa Y, Kanda G N, Yamada R G, *et al.* Muscarinic acetylcholine receptors Chrm1 and Chrm3 are essential for REM sleep [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(9): 2231-2247.
- [39] Boiko A S, Ivanova S A, Pozhidaev I V, *et al.* Pharmacogenetics of tardive dyskinesia in schizophrenia: The role of CHRM1 and CHRM2 muscarinic receptors [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2020, 21(1): 72-77.
- [40] Sirvent A, Mevizou R, Naim D, *et al.* Src family tyrosine kinases in intestinal homeostasis, regeneration and tumorigenesis [J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2014.
- [41] Holmstrom S R, Wijayatunge R, McCrum K, *et al.* Functional interaction of BRCA1 and CREBBP in murine hematopoiesis [J]. *iScience*, 2019, 19: 809-820.
- [42] Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 147.
- [43] Lamprecht R. The role of actin cytoskeleton in memory

- formation in amygdala [J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9, doi: 10.3389/fnmol.2016.00023.
- [44] 杨志军, 顾宁. 藁本内酯心血管药理作用研究概况 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(2): 211-213.
- [45] 赵映兰, 林彩, 邓莉, 等. 当归中丁烯苯酐含量的测定方法研究 [J]. 中国药业, 2008(19): 8-9.
- [46] 胡海燕, 雷磊, 陈翔, 等. 清心开窍方挥发油对 AD 大鼠大脑皮层及海马区 GFAP 及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(7): 927-932.
- [47] Quartu M, Serra M P, Boi M, *et al.* Effect of acute administration of *Pistacia lentiscus* L. essential oil on rat cerebral cortex following transient bilateral common carotid artery occlusion [J]. *BioMed Central*, 2012, 11(1): <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-8>.
- [48] 盛艳梅, 孟宪丽, 李春雨, 等. 川芎挥发油对大鼠大脑皮层神经细胞体外存活及脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 536-538.
- [49] Rombolà L, Corasaniti M T, Rotiroti D, *et al.* Effects of systemic administration of the essential oil of bergamot (BEO) on gross behaviour and EEG power spectra recorded from the rat hippocampus and cerebral cortex [J]. *Funct Neurol*, 2009, 24(2): 107-112.
- [50] Grbić G, Ćulić M, Martać L, *et al.* Effect of camphor essential oil on rat cerebral cortex activity as manifested by fractal dimension changes [J]. *Arch Biol Sci*, 2008, 60(4): 547-553.

[责任编辑 郑礼胜]