

基于气相色谱-质谱联用结合网络药理学探究竹叶椒挥发油抗炎镇痛的作用机制

龚普阳¹, 潘烨华¹, 郭瑜婕², 哈立洋¹, 李晓朋¹, 顾健^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430000

摘要: 目的 探究竹叶椒 *Zanthoxylum armatum* 挥发油抗炎、镇痛的活性成分及作用机制。方法 采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 定性表征竹叶花椒挥发油成分, 并借助中药系统药理学数据库分析平台 (TCMSP)、PubChem、Swiss Target Prediction 和 Uniprot 数据库收集活性成分对应靶点。通过 GisGeNET 及 OMIM 数据库筛选炎症反应和疼痛的相关靶点, 采用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-疾病”网络。借助 STRING 及 BioGPS 数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络并分析靶点组织分布, 运用 DAVID 数据库对靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能及京都基因及基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。采用分子对接法验证竹叶花椒挥发油主要活性成分与核心靶点的相互作用。结果 从竹叶椒挥发油中鉴定成分 44 个, 预测得到其潜在抗炎、镇痛靶点 78 个, 关键靶点涉及前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、毒蕈碱型乙酰胆碱受体亚型 3 (muscarinic acetylcholine receptor M3, CHRM3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)、大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2, CNR2) 等。GO 分析结果表明筛选得到的靶点主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、质膜及酶结合等生物学过程。KEGG 通路富集分析得到 60 条信号通路, 涉及神经活性配体-受体相互作用、5-羟色胺能突触及胰岛素抵抗等相关通路。分子对接结果显示竹叶椒挥发油中芝麻素、胆甾烯基豆蔻酸酯和(-)- β -花柏烯等活性成分与核心靶点具有较好的亲和能力。结论 竹叶椒挥发油中多种活性成分能够作用于 PTGS2、CHRM3、PPARA 等靶点, 并通过多通路发挥抗炎、镇痛作用。

关键词: 竹叶椒挥发油; 气相色谱-质谱联用; 抗炎; 镇痛; 网络药理学; 芝麻素; 胆甾烯基豆蔻酸酯; (-)- β -花柏烯
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3296-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.017

Mechanism of volatile oil of *Zanthoxylum armatum* for anti-inflammation and analgesic based on gas chromatography-mass spectrometry integrated network pharmacology

GONG Pu-yang¹, PAN Ye-hua¹, GUO Yu-jie², HA Li-yang¹, LI Xiao-peng¹, GU Jian¹

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To explore the anti-inflammatory and analgesic active ingredients and mechanism of volatile oil of *Zanthoxylum armatum*. **Methods** The constituents in volatile oil of *Z. armatum* were characterized qualitatively by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Targets related to active ingredients were collected by traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP), PubChem, Swiss Target Prediction, and Uniprot. Targets related to inflammatory and pain were screened by GisGeNET and OMIM database, “compound-target-disease” network was established by Cytoscape software. Protein-protein interaction (PPI) network was established and tissue distribution of targets were analyzed by BioGPS and STRING database. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of

收稿日期: 2020-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274168); 国家自然科学基金资助项目 (81573563); 四川省重点研发项目 (20ZDYF3291); 中央高校科研业务费专项 (2020NZD06); 四川省中医药管理局花椒专项项目 (2018HJZX014)

作者简介: 龚普阳 (1990—), 讲师, 博士, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: gongpuyang1990@163.com

*通信作者: 顾健 (1967—), 教授, 博士生导师, 从事中药及民族药创新药物研究与开发。Email: gujiancd@163.com

targets were carried out by DAVID database. Molecular docking method was applied to verify the interaction between main active ingredients of volatile oil of *Z. armatum* and relevant core targets. **Results** A total of 44 compounds were identified in volatile oil of *Z. armatum*, 78 related targets including prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), muscarinic acetylcholine receptor M3 (CHRM3), peroxisome proliferator activated receptor α (PPARA), and cannabinoid receptor 2 (CNR2) were predicted. GO function enrichment analysis revealed that selected targets mainly involved in positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, plasma membrane, enzyme binding and other biological processes; Sixty signal pathways were screened by KEGG pathway enrichment analysis, including neuroactive ligand-receptor interaction, serotonergic synapse and insulin resistance. Molecular docking indicated that sesamin, cholesterol myristate, and (-)- β -chamigrene had a certain affinity with key targets. **Conclusion** The active ingredients in volatile oil of *Z. armatum* regulate multiple signaling pathways to ameliorate inflammation and pain through PTGS2, CHRM3, and PPARA.

Key words: volatile oil of *Zanthoxylum armatum* DC.; gas chromatography-mass spectrometry; anti-inflammation; analgesic; network pharmacology; sesamin; cholesterol myristate; (-)- β -chamigrene

竹叶椒为芸香科植物竹叶椒 *Zanthoxylum armatum* DC.的果实, 具有温中燥湿、散寒止痛的功效, 用于治疗脘腹冷痛、寒湿吐泻、蛔厥腹痛、龋齿牙痛等症^[1-2]。以其生药材为主要原料制备而成的竹叶椒片临床常用于治疗急性阑尾炎、腹痛及胃痛, 疗效显著^[3]。竹叶椒传统功效与现代临床研究均表明其具有抗炎、镇痛作用。挥发油是竹叶椒的主要活性组分之一, 包含烯烃、烷烃、醇类、酯类等多种成分。现代药理学研究表明, 竹叶椒挥发油能够显著抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的表达^[4]。网络药理学是系统生物信息学研究的重要工具, 利用网络可视化方法分析疾病与药物及靶点间复杂的相互作用关系, 具有整体性和系统性特点, 目前已广泛用于预测中药调控机体生物网络的作用机制^[5]。本研究整合气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析与生物信息学技术, 探究竹叶椒挥发油主要活性成分的作用靶点及信号通路, 预测竹叶椒挥发油多成分、多层次、多途径的抗炎、镇痛潜在作用机制, 为竹叶椒药用价值的深入研究与临床合理使用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材

竹叶椒购自四川省洪雅县, 经西南民族大学药学院顾健教授鉴定为芸香科花椒属植物竹叶椒 *Z. armatum* DC.的果实。

1.2 试剂

无水硫酸钠 (批号 20200612) 购自天津福晨化学试剂有限公司。

1.3 仪器

QP2010 Ultra GC-MS 仪 (日本 Shimadzu 公司); DZTW 型电子调温电热套 (浙江力凡仪器科技有限公司); JA2003 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 竹叶椒挥发油的 GC-MS 分析

2.1.1 竹叶椒挥发油的制备 采用水蒸气蒸馏法提取竹叶椒挥发油, 无水硫酸钠脱水, 精密吸取 1 mL, 经 0.22 μ m 滤膜滤过, 得到供 GC-MS 分析的挥发油样品。

2.1.2 气相色谱条件 DB-130 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m); 分流比为 150:1; 压力为 48 kPa; 柱箱温度为 50 $^{\circ}$ C; 进样温度为 300 $^{\circ}$ C; 吹扫体积流量为 3.0 mL/min; 色谱柱初始温度为 50 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 80 $^{\circ}$ C, 再以 15 $^{\circ}$ C/min 升温至 300 $^{\circ}$ C, 保持 20 min; 进样量为 2 μ L; 载气为氦气。

2.1.3 质谱条件 电子轰击 (EI) 离子源; 离子源温度为 230 $^{\circ}$ C; 接口温度为 300 $^{\circ}$ C; 溶剂延迟时间为 2.00 min; 每 0.3 秒扫描采集数据, 扫描速度为 2000, 扫描范围为 m/z 30~550。

2.2 竹叶椒挥发油成分的潜在作用靶点收集

基于 GC-MS 获得的竹叶椒挥发油化学成分信息, 采用中药系统药理数据库和分析平台 (TCMSP) 进行成分查询及靶点收集。对于 TCMSP 未收录的其他竹叶椒挥发油成分, 借助 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 查询成分相应 SMILES 号, 进一步采用 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测补充^[6]。

2.3 “成分-靶点-疾病”网络构建

在 OMIM (<http://www.omim.org/>) 和 GisGeNET (<http://www.disgenet.org>) 数据库中, 以“炎症反应”“疼痛”为关键词搜索相关靶点, 去除重复和假阳性靶点, 构建炎症反应、疼痛靶点数据集^[7]。分别构建“成分-靶点”和“疾病-靶点”网络模型, 运用 Cytoscape 3.7.2 软件将 2 个网络合并, 去除无关联节点, 得到竹叶挥发油抗炎、镇痛的活性成分及主要靶点, 借助 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将靶点名称转化为相应基因简称。

2.4 靶点的组织分布网络构建

将获得的靶点导入 BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>) 数据库, 获得靶点与组织的对应关系, 并采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“靶点-组织”网络, 以基因表达量为指标筛选前 10 个靶点主要分布的器官、组织或部位, 获得竹叶挥发油抗炎、镇痛靶点的组织分布^[8]。

2.5 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

将“2.3”项下获得的主要靶点输入 STRING 在线数据库 (<https://string-db.org/>), 设置“Homo sapiens”, 获得 PPI 关系, 结果保存为 RTF 格式, 将节点及结合作用评分数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行网络构建与分析, 筛选核心靶点^[9]。

2.6 基因本体论 (gene ontology, GO) 功能与京都基因及基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

将筛选得到的竹叶挥发油抗炎、镇痛靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 设置“Homo sapiens”, 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析^[10-11], 采用 Graphpad Prism 8 软件及在线绘图站 Omishare (<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>) 将结果可视化。

2.7 分子对接验证

通过 PDB 数据库下载前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、毒蕈碱型乙酰胆碱受体亚型 3 (muscarinic acetylcholine receptor M3, CHRM3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPARA) 和大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2, CNR2) 4 个核心靶点蛋白的晶体复合物, 借助 Discovery Studio 软件进行蛋白修饰, 去除其配体与非蛋白分子, 以 pdb 格式保存, 采用 Open Babel GUI 软件转为 pdbqt 格式。借助 PubChem 在线数据库获取主要活性成分的 2D 结构, 采用 Sybyl 软件对各成分进行能量优化。利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 以结合能评价竹叶挥发油潜在活性成分与 4 个靶点蛋白的结合能力^[12]。

3 结果

3.1 竹叶挥发油化学成分的定性表征

采用 GC-MS 法测定竹叶挥发油中的化学成分, 总离子流见图 1。通过气相色谱-质谱数据库 NIST08.LIB 数据匹配, 结合文献资料解析, 鉴定出竹叶挥发油化学成分 44 个, 其中烯烃类成分 23 个、醇类成分 7 个、酯类成分 2 个、苯及其衍生物 1 个、其他类型及未知成分 11 个。如表 1 所示, 芳樟醇占比最高, 为 29.78%; 柠檬烯占比为 15.35%, β -月桂烯占比为 14.42%。

3.2 “成分-靶点-疾病”网络的构建与分析

如图 2 所示, “成分-靶点-疾病”网络有 114 个节点、269 条边, 平均度值为 4.3, 节点颜色越深、面积越大代表度值越高。圆形节点为竹叶挥发油活性成分共 38 个, 其中 ZA42、ZA31、ZA38、ZA33、ZA43、ZA9、ZA23 和 ZA39 度值均 ≥ 5 , 度值 ≥ 2 的成分占总成分的 73.68%; 未预测到 ZA8、ZA3、ZA15 和 ZA37 抗炎、镇痛的作用靶点, 因此予以剔除。菱

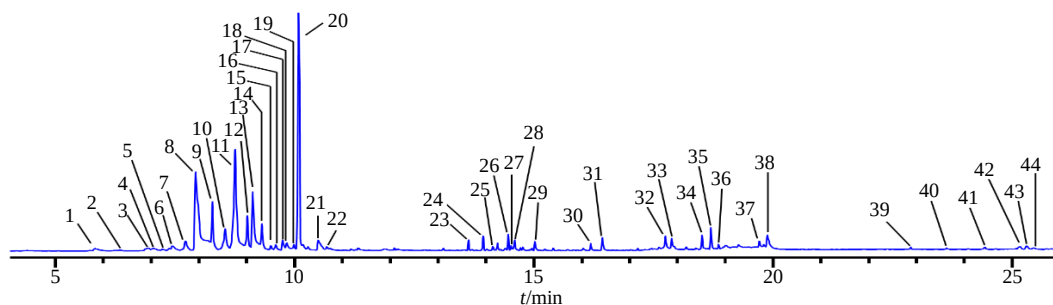


图 1 竹叶挥发油的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of GC-MS of volatile oil of *Z. armatum*

表 1 竹叶椒挥发油中化学成分的定性分析

Table 1 Qualitative analysis of chemical composition in volatile oil of *Z. armatum*

编号	tr/min	化学成分	占比/%	CAS 号
ZA1	5.825	1,3,5,5-tetramethyl-1,3-cyclohexadiene	0.58	4724-89-4
ZA2	6.327	γ -terpinene	0.26	99-85-4
ZA3	6.936	α -pinene	0.45	80-56-8
ZA4	7.041	3,3-dimethyl-6-methylidenecyclohexene	0.18	20185-16-4
ZA5	7.239	(-)-camphene	0.10	5794-04-7
ZA6	7.444	β -phellandrene	0.60	555-10-2
ZA7	7.716	cis-alloocimene	1.29	7216-56-0
ZA8	7.929	β -myrcene	14.42	123-35-3
ZA9	8.279	β -pinene	3.30	127-91-3
ZA10	8.546	O-cymene	2.87	527-84-4
ZA11	8.753	D-limonene	15.35	5989-27-5
ZA12	9.010	(S)-(-)-limonene	2.63	5989-54-8
ZA13	9.120	(Z)- β -ocimene	7.10	13877-91-3
ZA14	9.313	α -ocimene	2.84	502-99-8
ZA15	9.501	tricyclene	0.34	508-32-7
ZA16	9.606	5-ethylidene-1-methylcycloheptene	0.43	15402-94-5
ZA17	9.747	4-isopropenyltoluene	0.80	1195-32-0
ZA18	9.833	2-carene	0.74	554-61-0
ZA19	9.983	terpinolene	0.35	586-62-9
ZA20	10.093	β -linalool	29.78	78-70-6
ZA21	10.493	—	1.56	—
ZA22	10.672	—	0.20	—
ZA23	13.634	β -elemene	0.61	515-13-9
ZA24	13.942	(1R,4Z,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	0.89	118-65-0
ZA25	14.241	α -caryophyllene	0.38	6753-98-6
ZA26	14.465	germacrene D	0.89	23986-74-5
ZA27	14.524	(+)- β -selinene	0.27	17066-67-0
ZA28	14.600	(-)- β -chamigrene	0.76	18431-82-8
ZA29	15.022	($\pm$)-trans-nerolidol	0.63	40716-66-3
ZA30	16.189	1,8-cyclotetradecadiyne	0.45	1540-80-3
ZA31	16.433	methyl octadeca-6,9-diynoate	1.02	56847-03-1
ZA32	17.749	9-hexadecenoic acid	0.85	373-49-9
ZA33	17.881	palmitic acid	0.64	57-10-3
ZA34	18.517	—	0.87	—
ZA35	18.700	—	1.56	—
ZA36	18.862	—	0.27	—
ZA37	19.713	(-)-myrtenol	0.50	19894-97-4
ZA38	19.881	3-ethenyl-2-methylidenecyclopentane-1-carboxylic acid	1.59	108451-43-0
ZA39	22.881	farnesol	0.15	106-28-5
ZA40	23.627	δ -tocopherol	0.14	119-13-1
ZA41	24.429	β -tocopherol	0.23	148-03-8
ZA42	25.164	cholesterol myristate	0.34	1989-52-2
ZA43	25.301	sesamin	0.45	7076-24-6
ZA44	25.445	—	0.14	—

“—”代表未鉴定出

“—” means it has not been identified

形节点为交集靶点共 78 个, 度值均 ≥ 2 , 其中 PTGS2、CHRM3、PPARA、CNR2、肾上腺素能受体 $\alpha 1A$ (adrenergic receptor $\alpha 1A$, ADRA1A)、F10、免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 1$ (immunoglobulin heavy constant $\gamma 1$, IGHG1) 和非受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 1 (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1, PTPN1) 节点度值均 ≥ 5 , 度值 ≥ 3 的靶点占总靶点的

51.28%。

3.3 靶点与组织分布关联网络的构建与分析

如图 3 所示, 靶点-组织分布网络包含 126 个节点、782 条边, 平均度值为 9.63, 圆形节点代表潜在作用靶点, 长方形节点代表相关靶点可能分布的组织或器官, 边代表靶点与组织之间的相互作用关系。44 个靶点分布于淋巴组织, 43 个靶点分布于肝

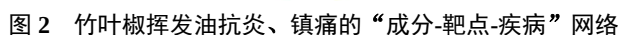


Fig. 2 “Ingredient-target-disease” network of volatile oil of *Z. armatum* on anti-inflammation and analgesic

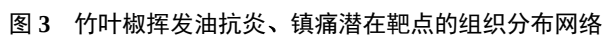


Fig. 3 Potential targets-tissue distribution network of volatile oil of *Z. armatum* on anti-inflammation and analgesic

脏, 41 个靶点分布于心肌细胞, 37 个靶点分布于心脏。此外, CD33、CD34、CD14、CD56 等靶点分布于抗原蛋白。因此, 竹叶椒挥发油可能通过作用于多种组织或器官的靶点, 从而发挥抗炎、镇痛作用, 且免疫调控可能是其主要作用机制之一。

3.4 PPI 网络的构建与分析

如图 4 所示, PPI 网络共有 75 个节点、519 条边, 平均度值为 13.8。PCYT1A、SIGMAR1、IGHG1 未参与 PPI, 因此予以剔除。度值 ≥ 3 的靶点占总靶

点的 93.33%，度值>20 的靶点主要包含 PTGS2、IL6、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、细胞肿瘤抗原 p53（cellular tumor antigen p53, TP53）、NOS3、 β -淀粉样蛋白前体蛋白（amyloid- β precursor protein, APP）、雌激素受体 1（estrogen receptor 1, ESR1）、IL1B 等。将 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件，筛选出大于平均度值的靶点 33 个见图 5，提示这些靶点可能在竹叶椒挥发油抗炎、镇痛中发挥重要作用。

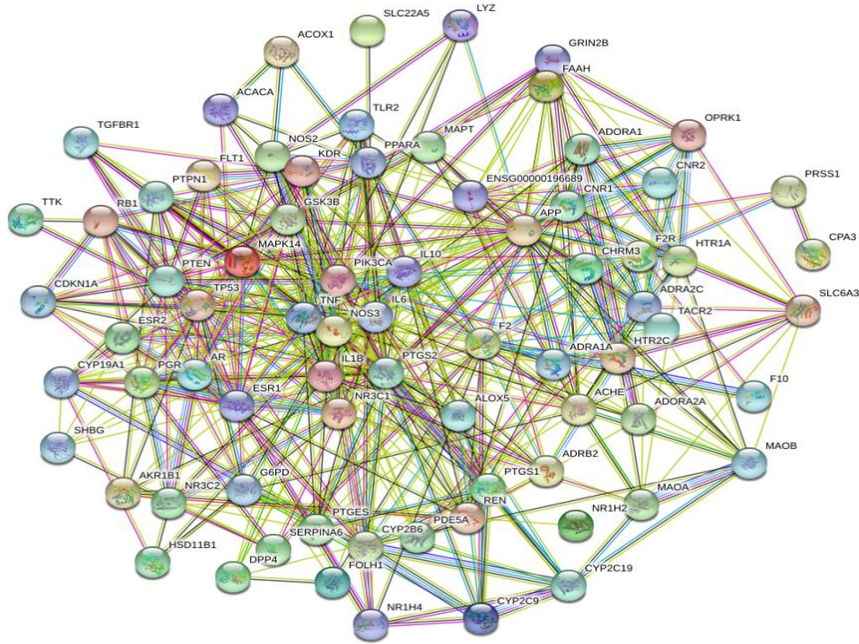


Fig. 4 PPI network of volatile oil of *Z. armatum* on anti-inflammation and analgesic

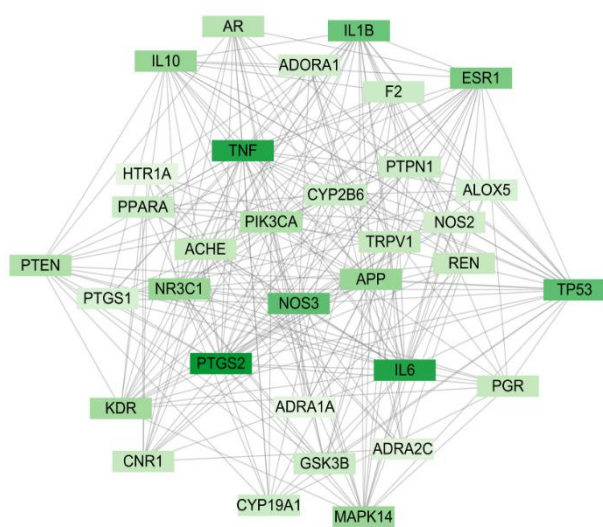


图5 竹叶椒挥发油抗炎、镇痛核心靶点的相互作用关系
Fig. 5 Key targets interaction of volatile oil of *Z. armatum* on anti-inflammation and analgesic

3.5 GO 功能分析

借助 DAVID 数据库对筛选得到的核心靶点进行 GO 功能分析, 即从生物过程、细胞组分和分子功能 3 个方面进行基因功能注释。共获得 130 个 GO 条目 ($P < 0.01$), 其中 85 个涉及生物过程、16 个涉及细胞组分、29 个涉及分子功能。以基因数进行降序排列, 各选取前 15 个条目, 如图 6 所示, 生物过程结果显示, 竹叶椒挥发油抗炎、镇痛的靶点主要与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、细胞增

殖负调控、信号转导、氧化还原进程、炎症反应等有关；分子功能结果显示，竹叶椒挥发油抗炎、镇痛作用主要与酶结合、锌离子结合、同蛋白结合、受体结合及序列特异性 DNA 结合等方面相关；细胞组分结果显示，竹叶椒挥发油可能作用于质膜、膜的整体组成、质膜的组成部分、胞外区、细胞外空间等，从而发挥抗炎、镇痛作用。

3.6 KEGG 靶点通路富集分析

共筛选得到 60 条信号通路, 选取 *P* 值较小的 20 条信号通路进行可视化, 如图 7 所示, 竹叶椒挥发油的抗炎、镇痛机制主要与神经活性配体受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse)、胰岛素抵抗 (insulin resistance)、花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)、钙信号通道 (calcium signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路相关。

3.7 竹叶椒挥发油中主要活性成分与核心靶点的分子对接

为进一步验证竹叶椒挥发油抗炎、镇痛核心靶点与活性成分间的相互作用, 筛选“成分-靶点-疾病”网络中 12 个活性成分(中心度值>3)及 2 种临床药物(阿司匹林、塞来昔布)与 4 个核心靶点(PTGS2、CHRM3、PPARA、CNR2)进行分子对

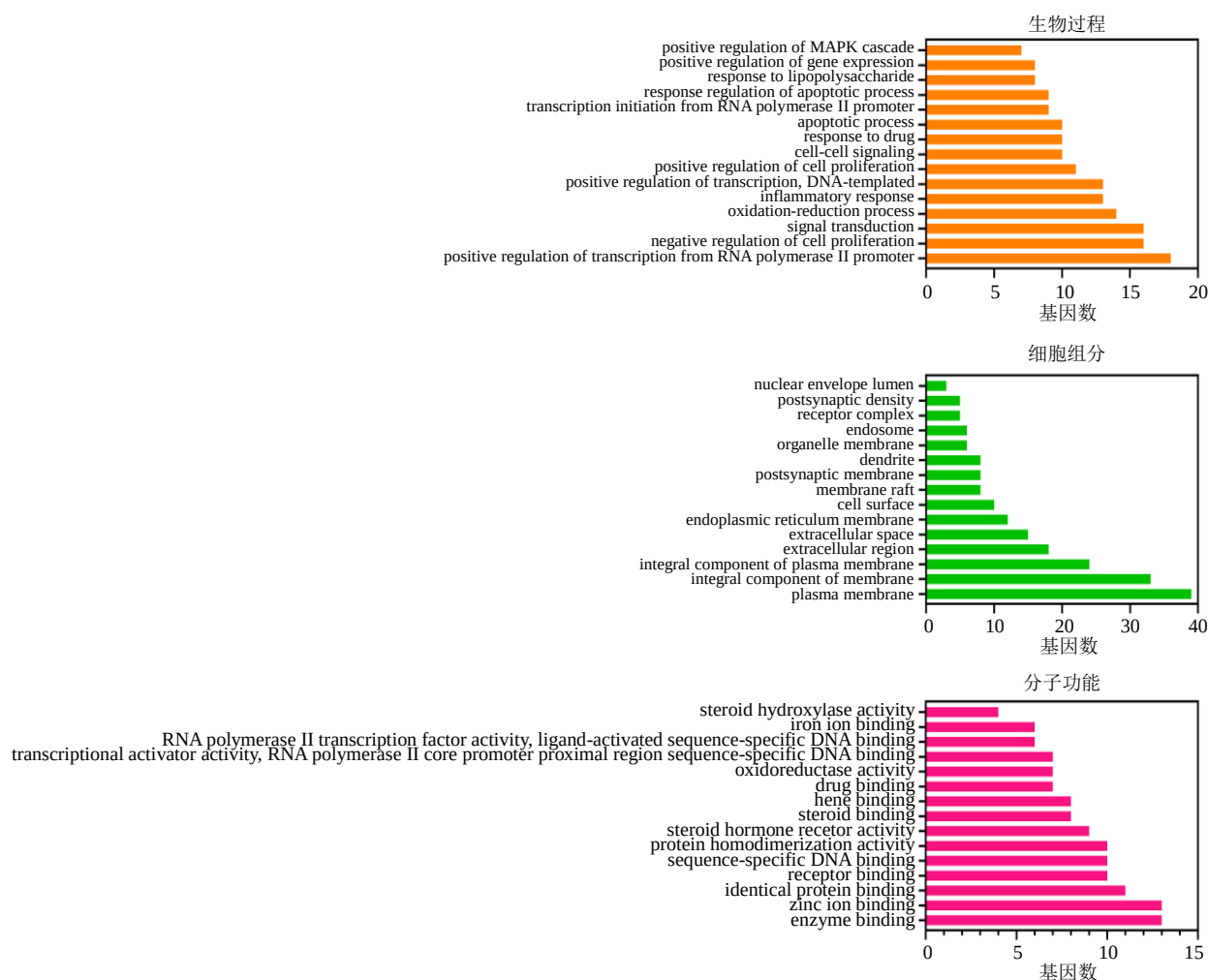


图 6 竹叶椒挥发油抗炎、镇痛潜在靶点的 GO 富集分析 (前 15)

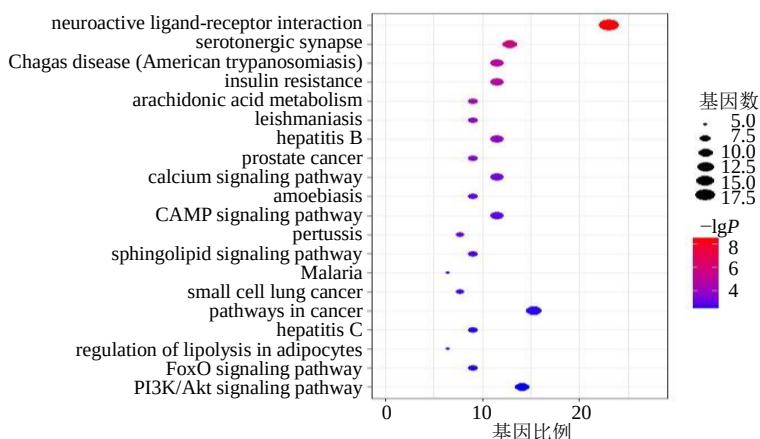
Fig. 6 GO enrichment analysis of potential anti-inflammation and analgesic targets of volatile oil of *Z. armatum* (top 15)

图 7 竹叶椒挥发油抗炎、镇痛潜在靶点 KEGG 富集分析的 20 条通路

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of 20 pathways of potential anti-inflammation and analgesic targets of volatile oil of *Z. armatum*

接分析, 结果如表 2 所示, 结合能越小, 表明配体与蛋白间的亲和力越高, 结合能 < -5.0 kJ/mol 表明活性成分与靶点具有较强的亲和活性。12 个活性成分与 4 个核心靶点的结合能均 < -6.5 kJ/mol, 表明

竹叶椒挥发油活性成分与 4 个核心靶点均有较好的亲和能力, 其中 ZA43、ZA28 与 PTGS2、CHRM3、PPARA 和 CNR2 的结合能均 < -10.0 kJ/mol, 且结合体构象较稳定, 分子对接模式见图 8。

表 2 竹叶椒挥发油主要活性成分与核心靶点的结合能

Table 2 Binding affinities of active ingredients of volatile oil of *Z. armatum* with core targets

化学成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
	PTGS2	PPARA	CHRM3	CNR2
ZA42	-8.3	-8.0	-9.4	-11.6
ZA31	-9.2	-6.9	-7.1	-7.1
ZA38	-7.5	-6.9	-6.7	-6.6
ZA33	-8.6	-7.3	-7.0	-6.8
ZA9	-7.4	-7.1	-7.4	-7.1
ZA43	-11.6	-11.8	-11.6	-12.0
ZA23	-8.9	-8.4	-8.4	-9.1
ZA39	-9.4	-7.8	-7.4	-8.1
ZA20	-7.1	-6.1	-6.1	-6.3
ZA28	-10.7	-10.6	-11.0	-10.9
ZA16	-8.6	-7.3	-7.6	-7.8
ZA4	-8.2	-6.9	-6.7	-7.2
阿司匹林	-6.7	-6.3	-6.5	-6.6
塞来昔布	-10.8	-9.2	-10.3	-11.1

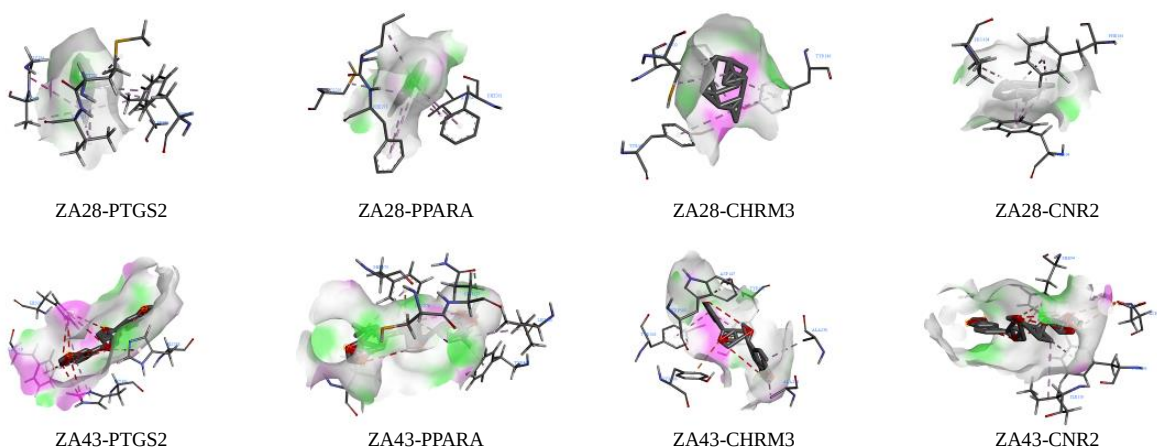


图 8 ZA28、ZA43 与 4 个核心靶点的分子对接

Fig. 8 Molecular docking of ZA28 and ZA43 with four core targets

4 讨论

竹叶椒又名山花椒、狗椒、野花椒等，始载于《本草图经》，是我国花椒种质资源的特色品种，主要分布于我国西南各省^[13]。竹叶椒在四川产量极为丰富，常用于治疗风湿、疼痛及跌打损伤等^[14]。为深入挖掘竹叶椒的药用资源价值，本研究基于中药多成分、多靶点的特点，应用生物网络分析结合分子对接预测竹叶椒挥发油抗炎、镇痛的“成分-靶点”相互作用，进而探索其潜在的作用机制。基于 GC-MS 的化学物质组研究定性鉴别竹叶椒挥发油中 44 个化学成分，其中芳樟醇、柠檬烯和 β -月桂烯占比较高，占比均 $>14\%$ ，与已报道的四川产竹叶椒挥发油组分表征结果一致^[15]。然而，相关研究表明浙江产竹叶椒中以桉叶油醇和 α -松油醇占比较高，分别为 37.96%、17.62%；湖北产竹叶椒则以桉叶油醇和萜品烯占比较高，占比分别为 36.19%、

21.31%^[13,16]。由此可见，与浙江和湖北等产地的竹叶椒相比，本研究所采用的四川产竹叶椒在挥发油组分的化学组成和主要成分含量上可能存在较大差别。因此，可进一步基于挥发油特征成分的“质量”进行不同产地的竹叶椒质量标志物（quality marker, Q-Marker）的筛选，从而为该药材产地的精准溯源和有效鉴别提供科学依据。

四川产竹叶椒挥发油中主要成分芳樟醇在醋酸、谷氨酸诱导的多种疼痛动物模型中均表现出显著镇痛作用^[17-18]；柠檬烯对溃疡性结肠炎和呼吸系统炎症损伤均具有改善作用^[19-20]；月桂烯对热板、福尔马林、坐骨神经压迫刺激诱导的小鼠疼痛均有明显抑制作用^[21-22]；芝麻素可显著抑制 LPS 诱导的小鼠足巨噬细胞中一氧化氮（nitric oxide, NO）、TNF- α 、IL-6、前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2）的表达和释放^[23]，提示竹叶椒挥发油可能通过多种

成分协同发挥抗炎、镇痛作用。

为进一步探讨竹叶椒挥发油抗炎、镇痛的作用机制,本研究构建“成分-靶点-疾病”网络筛选其可能的作用靶点蛋白群,并对相关靶点进行组织分布、PPI、GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析。组织分布结果显示,竹叶椒挥发油所对应的 78 个靶点主要富集于淋巴组织、肝脏、心肌细胞和心脏,为其针对特定组织或器官的抗炎、镇痛作用提供了一定依据。富集结果显示,竹叶椒挥发油抗炎、镇痛相关的通路主要涉及神经活性配体受体相互作用、5-羟色胺能突触、花生四烯酸代谢及 PI3K/Akt 信号通路等,并涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、酶结合、质膜等多种生物学过程。

综合“成分-靶点-疾病”网络与 PPI 分析结果,筛选得到 PTGS2 (对应 21 个成分)、CHRM3 (对应 9 个成分)、PPARA (对应 6 个成分)和 CNR2 为竹叶椒挥发油抗炎、镇痛的潜在核心靶点。PTGS2 是一种 PTGS 的诱导型同工酶 (COX-2), COX-2 是抑制前列腺素介导的炎性反应和疼痛的经典药物靶点。CHRM3 为毒蕈碱型乙酰胆碱受体,在胰腺炎、胆管炎、呼吸道炎性反应等疾病发生中具有重要作用^[24-26]。通过 M3-乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) /蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径介导的 CHRM3 受体的激活可能会促进 IL-8 表达,调节 CHRM3 表达可以作为一种潜在治疗炎症性疾病的方法^[27]。PPARA 主要参与脂肪酸及其衍生物的氧化代谢,PPARA 激动剂能够有效抑制多种炎性反应^[28-30]。在 LPS 刺激的人单核细胞中,PPARA 的激活能够通过调节活化因子蛋白-1 (activator protein-1, AP1) 和 NF- κ B 信号通路,从而抑制基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、组织因子 (tissue factor, TF) 等多种促炎分子的产生;小鼠巨噬细胞中 PPARA 缺乏后,其抗炎作用减弱,提示 PPARA 参与炎性反应的调控^[31]。CNR2 作为一种 G 蛋白偶联受体,为内源性大麻素系统的重要组成部分,与疼痛感知、炎性反应密切相关^[32]。CNR2 激动剂可改善结肠炎、动脉粥样硬化、多发性硬化及缺血再灌注损伤中的炎性反应,并能够有效减轻癌症诱发的骨疼痛^[33-34]。分子对接结果显示,竹叶椒挥发油中主要活性成分与 4 个核心靶点均具有较好的亲和力,验证了采用网络分析所筛选的 PTGS2、CHRM3、PPARA 和 CNR2

4 个核心靶点的可靠性。(–)- β -花柏烯、胆甾烯基豆蔻酸酯、芝麻素及 β -榄香烯等微量成分与 4 个核心靶点的亲和能力较强,结合能均 < -8.0 kJ/mol; 芝麻素与 4 个核心靶点的亲和力均优于阳性药物阿司匹林和塞来昔布,表明竹叶椒挥发油中除含量较高的芳樟醇等成分以外,多种微量成分仍可能通过多靶点协同发挥抗炎、镇痛作用。因此,可进一步结合亲和超滤及配体垂钓等实验技术验证以上活性成分与靶点的亲和作用及相关生物学活性。

综上所述,本研究基于 GC-MS 技术定性表征竹叶椒挥发油的化学成分,并结合网络药理学与分子对接筛选并验证其主要活性成分的作用靶点,初步探讨了竹叶椒挥发油抗炎、镇痛的潜在作用机制,为进一步阐明竹叶椒的抗炎、镇痛机制提供了一定的研究方向和数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈玉, 胡昀, 贺红武, 等. 竹叶椒化学成分的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3429-3434.
- [2] 熊艳, 蒋孟良, 吴学文. 竹叶椒挥发性成分的研究 [J]. 中药材, 2003, 26(6): 410-411.
- [3] Guo T, Deng Y X, Xie H, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethyl acetate fraction from *Zanthoxylum armatum* in mice [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(3): 347-351.
- [4] Lee J H, Chang K M, Kim G H. Composition and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* essential oil: Suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines and cellular adhesion [J]. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(10): 1762-1769.
- [5] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [6] 刘培, 孙芮芮, 张莉丹, 等. 基于网络药理学四君子汤治疗 2 型糖尿病的作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1548-1558.
- [7] 杨晓娟, 胡黄婉茵, 张海珠, 等. 基于网络药理学的气滞胃痛颗粒抗炎镇痛活性作用分析 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3094-3106.
- [8] 龚普阳, 郭瑜婕, 李晓朋, 等. 基于网络药理学与分子对接技术的金花清感颗粒防治新型冠状病毒肺炎的潜在药效物质研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1685-1693.
- [9] 孔艺, 吴红卫, 陈永, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的机制 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1785-1794.

- [10] Li X, Qin X M, Tian J S, *et al.* Integrated network pharmacology and metabolomics to dissect the combination mechanisms of *Bupleurum chinense* DC-*Paeonia lactiflora* Pall herb pair for treating depression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113281.
- [11] Jiang Y B, Zhong M, Long F, *et al.* Network pharmacology-based prediction of active ingredients and mechanisms of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) kudo against rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1435.
- [12] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在物质基础研究 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.
- [13] 路晓青, 江念, 黄志宝, 等. 竹叶椒果实精油成分分析及功能性评价 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 294-298.
- [14] 李航, 李鹏, 朱龙社, 等. 竹叶椒的化学成分研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(13): 1035-1037.
- [15] 樊丹青, 陈鸿平, 刘荣, 等. GC-MS-AMDIS 结合保留指数分析花椒、竹叶花椒挥发油的组成成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 63-68.
- [16] 王佩玲, 潘祖连, 张剑寒, 等. 浙产竹叶椒叶挥发性成分的GC-MS分析 [J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 47-50.
- [17] Peana A T, D'Aquila P S, Chessa M L, *et al.* (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 460(1): 37-41.
- [18] Batista P A, Werner M F, Oliveira E C, *et al.* Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 440(3): 299-303.
- [19] Yu L, Yan J, Sun Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 2339-2346.
- [20] Santana H S R, de Carvalho F O, Silva E R, *et al.* Anti-inflammatory activity of limonene in the prevention and control of injuries in the respiratory system: A systematic review [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(18): 2182-2191.
- [21] Paula-Freire L I, Molska G R, Andersen M L, *et al.* *Ocimum gratissimum* essential oil and its isolated compounds (eugenol and myrcene) reduce neuropathic pain in mice [J]. *Planta Med*, 2016, 82(3): 211-216.
- [22] Paula-Freire L I, Andersen M L, Molska G R, *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(8): 1220-1224.
- [23] 郭涛. 竹叶椒(*Zanthoxylum armatum* DC.)和筋櫟(*Z. avicenna* (Lam.) DC.)的化学成分及竹叶椒镇痛抗炎活性研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [24] Greverath L M, Leicht E, Wald de Chamorro N, *et al.* Evaluation of muscarinic acetylcholine receptor type 3 gene polymorphisms in patients with primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis [J]. *Hepatol Res*, 2020, 50(3): 321-329.
- [25] Kistemaker L E, Bos I S, Hylkema M N, *et al.* Muscarinic receptor subtype-specific effects on cigarette smoke-induced inflammation in mice [J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(6): 1677-1688.
- [26] Huang N, Murtaza G, Wang L J, *et al.* Chrm3 protects against acinar cell necrosis by stabilizing caspase-8 expression in severe acute pancreatitis mice model [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2618-2631.
- [27] Xu Z P, Song Y, Yang K, *et al.* M3 mAChR-mediated IL-8 expression through PKC/NF- κ B signaling pathways [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(6): 463-473.
- [28] Glass C K, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(1): 44-55.
- [29] Sagar D R, Kendall D A, Chapman V. Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces PPAR- α -mediated analgesia in a rat model of inflammatory pain [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(8): 1297-1306.
- [30] Devchand P R, Keller H, Peters J M, *et al.* The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control [J]. *Nature*, 1996, 384(6604): 39-43.
- [31] Pontis S, Ribeiro A, Sasso O, *et al.* Macrophage-derived lipid agonists of PPAR- α as intrinsic controllers of inflammation [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016, 51(1): 7-14.
- [32] 王丽娟, 万明, 安金刚. 寻常型银屑病患者血清和皮损组织中 CNR1 和 CNR2 表达 [J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(7): 1250-1252.
- [33] Hussain M T, Greaves D R, Iqbal A J. The impact of cannabinoid receptor 2 deficiency on neutrophil recruitment and inflammation [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(10): 1025-1029.
- [34] Marino S, Idris A I. Emerging therapeutic targets in cancer induced bone disease: A focus on the peripheral type 2 cannabinoid receptor [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 119: 391-403.

[责任编辑 李亚楠]