

基于 UPLC-Q-TOF-MS 及分子对接技术的丹参抗流感活性探究

郑燕^{1,3}, 江媛^{1,4}, 冯展^{1,3}, 曾铁鑫^{1,3}, 缪雨静^{1,2}, 张翔¹, 黄林芳^{1,2*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193

2. 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193

3. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000

4. 大理大学, 云南 大理 671000

摘要: **目的** 探讨丹参对神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的抑制活性,为抗流感药物开发提供潜在的中药资源。**方法** 使用NA抑制实验评估了丹参根提取物的抗流感病毒活性,采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)对丹参提取物中的活性化合物进行了初步鉴定,在乙醇提取物中鉴定出36种化合物。最后将鉴定出的8种主要化合物与NA靶标对接,并探讨了其NA抑制活性。**结果** 丹参乙醇提取物比石油醚提取物具有更好的NA抑制活性,8个化合物都表现出较强的对接效果。其中,紫草酸[半数抑制浓度(IC₅₀)=157.44 mol/L]和迷迭香酸(IC₅₀=204.74 mol/L)表现出良好的NA抑制活性,且高于奥司他韦酸(IC₅₀=361.83 mol/L)。对接结果与NA抑制活性分析结果一致。**结论** 丹参具有NA抑制活性,其临床研究有待进一步探索。

关键词: 丹参; 神经氨酸酶抑制; 抗流感活性; UPLC-Q-TOF-MS; 分子对接; 紫草酸; 迷迭香酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)15-4487-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.006

Research on anti-influenza activity of *Salvia miltiorrhiza* based on UPLC-Q-TOF-MS and molecular docking technology

ZHENG Yan^{1,3}, JIANG Yuan^{1,4}, FENG Zhan^{1,3}, ZENG Tie-xin^{1,3}, MIAO Yu-jing^{1,2}, ZHANG Xiang¹, HUANG Lin-fang^{1,2}

1. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Beijing 100193, China

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

4. Dali University, Dali 671000, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory activity of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on neuraminidase (NA) and provide potential Chinese medicine resources for anti-influenza drugs. **Methods** For the first time, the NA inhibition test was used to evaluate the anti-influenza virus activity of *S. miltiorrhiza* root extract. Later, ultra-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) were used to analyze the active compounds in *S. miltiorrhiza* extract. Preliminary identification, 36 compounds were identified in the ethanol extract. Finally, the eight main compounds were docked with NA targets, and their NA inhibitory activities were discussed. **Results** Ethanol extract had better NA inhibitory activity than petroleum ether extract, and all eight compounds showed a stronger docking effect. Among them, shikonic acid (IC₅₀ = 157.44 mol/L) and rosmarinic acid (IC₅₀ = 204.74 mol/L) showed the highest NA inhibitory activity, which was higher than that of oseltamivir acid (IC₅₀ = 361.83 mol/L). The docking results were consistent with the results of NA inhibitory activity analysis.

收稿日期: 2021-03-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82073960); 国家自然科学基金资助项目(U1812403-1); 国家外专局“一带一路”专项(T2017052); “一带一路”国家传统草药实物库及图片信息库建设(211905); 国家科技基础资源调查计划(2018FY100701)

作者简介: 郑燕(1997—), 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: zhengyan6886@163.com

***通信作者:** 黄林芳, 研究员, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; neuraminidase inhibition; anti-influenza activity; UPLC-Q-TOF-MS; molecular docking; shikonic acid; rosmarinic acid

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎^[1], 始载于《神农本草经》, 列为上品, 后世《吴普本草》《日华子本草》等均有记载^[2-5]。现代药理研究表明, 丹参具有多种生物学活性, 包括抗肿瘤、抗菌、消炎和心血管保护作用, 常用于治疗冠心病、肝炎、神经衰弱等疾病^[6-9]。近年来, 国内外学者研究了丹参的抗肿瘤和心血管疾病的保护作用^[10-12]及在流行性感冒病毒 (influenza virus) 感染过程中的抗流感病毒和免疫调节的作用^[13]。

流感是一种具有高发病率和死亡率的病毒感染性疾病, 严重威胁着人类健康, 近年来, 全世界每年约有 50 万人死于流感病毒^[14-15]。流行性感冒病毒是正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 的代表种, 简称流感病毒^[16]。人流感病毒分为甲、乙、丙 3 型, 且甲型流感易于变异^[17]。目前, 市场上有 2 种主要类型的抗流感药物, 为奥司他韦和扎那米韦。但这些抗流感药物存在较多不良反应^[18-19]。因此, 寻找和开发抗流感的中药资源迫在眉睫。

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 是一种先进的化学成分定量和定性分析工具^[20]。本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定了丹参提取物的化学成分, 将主要化学成分与神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 对接, 以可视化的方式探索其对流感病毒的抑制作用, 再进行 NA 抑制实验, 以进一步探索其抑制活性。实验流程见图 1。

1 材料

Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪 (包括 MassLynx V4.1 质谱工作站, 美国 Waters 公司), PURELAB Classic-UVF 纯水机 (英国 ELGA 公司)。甲醇 (色谱纯, Fisher), 甲酸 (色谱纯), 超纯水, 其他试剂为分析纯。

对照品紫草酸 (质量分数 98.1%, 批号 1053003)、迷迭香酸 (质量分数 95%, 批号 111871-201102)、丹酚酸 A (质量分数 96.3%, 批号 171217)、丹酚酸 B (质量分数 94.1%, 批号 150927)、丹参酮 II_A (质量分数 98.5%, 批号 110766-201121)、二氢丹参酮 (质量分数 98.9%, 批号 11041211)、隐丹参酮 (质量分数 94.8%, 批号 110852-201107) 和丹参酮 I (质量分数 97.6%, 批号 110867-201107) 购自成都曼思特生物科技有限公司。奥司他韦酸 (质

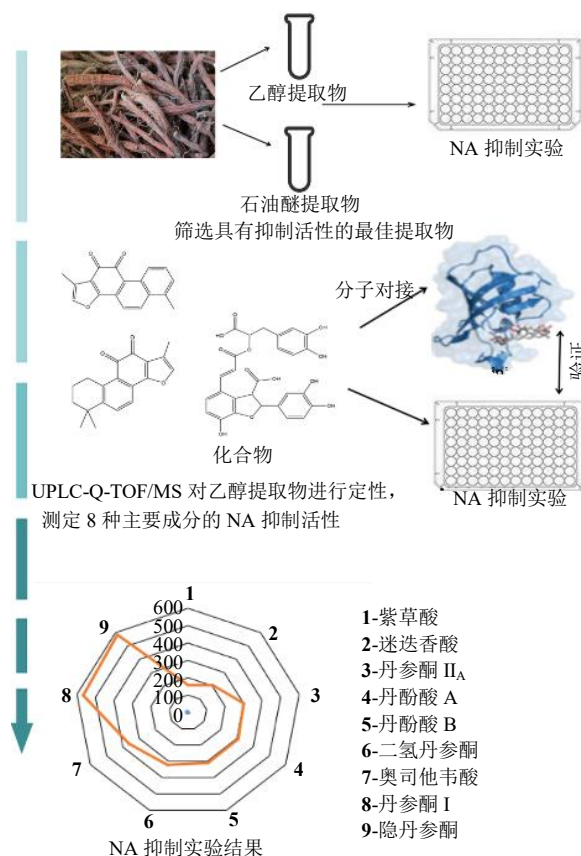


图 1 实验流程

Fig. 1 Flow chart

量分数 > 98%, 批号 S80494) 购自 Medchem Express (美国新泽西州 Monmouth Junction); NA 抑制剂筛选试剂盒 (批号 P0309), 碧云天生物技术有限公司 (中国上海)。

新鲜丹参采自云南省大理市, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 样品 (CMPB04801) 存放在中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

2 方法

2.1 待测样品制备

将干燥丹参样品粉碎为细粉, 取 500 g 细粉, 加入 2.5 L 石油醚, 浸泡 24 h, 后回收石油醚, 得石油醚提取物。残渣挥去石油醚, 残渣用 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h; 合并提取液, 减压回收乙醇至无醇味, 用等体积醋酸乙酯萃取 2 次, 合并醋酸乙酯萃取液 (上层), 浓缩至干, 得醋酸乙酯萃取

物。为进一步评估石油醚和乙醇提取物的抗流感病毒活性,使用 UPLC-Q-TOF-MS 对活性更好的提取物进行定性分析。取初提物,溶于甲醇,使其质量浓度为 5 mg/mL,后用 0.22 μm 微孔膜滤过,既得供试品溶液^[21-23]。

2.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1% 的甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~4 min, 5%~10% B; 4~8 min, 10%~15% B; 8~18 min, 15%~20% B, 18~22 min, 20%~30% B。进样量 2 μL , 进样温度 15 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾电离离子源 (ESI), 正/负离子模式检测 m/z 100~1200, 毛细管电压 2.2 kV (ESI⁻) 或 3.0 kV (ESI⁺), 锥孔电压 10~40 kV, 离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气 N_2 , 体积流量 60 L/h, 脱溶剂气 N_2 , 体积流量 800 L/h, 碰撞气 Ar, 碰撞压力 7.066 mPa, 质量校正质核比 m/z 556.277 1。使用甲酸钠校准质谱仪, 用亮氨酸-脑啡肽以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定体积流量进行外部参考。

2.3 NA 抑制实验

参照试剂盒说明书, 神经氨酸酶抑制试验在 96 孔微培养板中进行。设置 5 个样品组 (样品质量浓度分别为 25、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 个阳性药组 (阳性药质量浓度分别为 25、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 1 个空白组, 样品组及阳性药组设置 3 个重复。向每个孔中添加 70 μL 缓冲液和 10 μL NA, 后分别向样品组添加丹参提取物, 向阳性药组添加奥司他韦酸, 进行振荡混合 1 min, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 min。加入 10 μL NA 荧光底物后, 将混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 min 振荡 1 min。将激发波长设置为 322 nm, 发射波长设置为 450 nm, 在微孔板分光光度计上读取荧光值。按照公式计算抑制率。

$$\text{NA 抑制率} = 1 - (F_s - F_0) / (F_m - F_0)$$

F_m 为无药孔的荧光值, F_s 为样品的荧光值, F_0 为空白组的荧光值

2.4 统计分析

使用 IBM 19 (BM SPSS, 美国伊利诺伊州芝加哥) ^[24] 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

3 结果

3.1 丹参不同提取物的 NA 活性测定

乙醇和石油醚提取物的 NA 抑制活性见图 2, 奥司他韦酸作阳性对照。结果表明, 乙醇提取物比

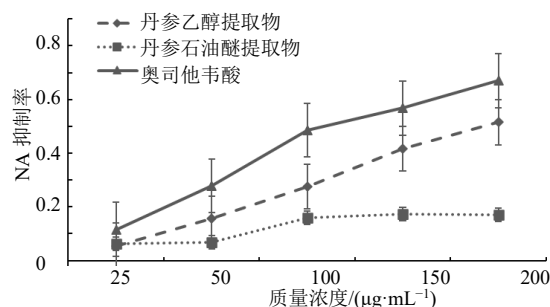


图 2 丹参石油醚及乙醇提取物的 NA 抑制活性

Fig. 2 NA inhibitory activity of PE and ethanol extract of *S. miltiorrhiza*

石油醚提取物具有更强的 NA 抑制活性。乙醇提取物的抑制活性随浓度的增加而增加, 故采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析丹参乙醇提取物。

3.2 丹参的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

由于丹酚酸和丹参酮分别在负离子和正离子扫描模式下敏感, 因此在正离子和负离子模式下均可获得丹参的质谱图 (图 3)。根据保留时间、分子离子、主要碎片并根据文献, 初步确定了 36 种化合物^[25-34]。鉴定出的化合物大致分为酚酸和醌, 主要化学结构见图 4, 化合物信息见表 1。

由于丹参显著的药理活性, 紫草酸、丹参酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸、原儿茶醛、原儿茶酸和其他衍生物引起了相当大的关注^[39-40]。丹酚酸 B 通常用作丹参的质量指标。丹参中的大多数酚酸由咖啡酸衍生物组成。负离子扫描模式中丹酚酸 B 的主要片段为 m/z 5193 21。据推测, 它去除了 1 个丹参素, 形式为 m/z 519.1, 去除了 2 个丹参素, 形式为 m/z 32。

大多数丹参二萜类化合物, 如二氢丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 I 和隐丹参酮, 均具有 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ 的二聚体^[41]。这些二萜类化合物的碎片离子主要为 H_2O 、 CH_3 和 CO 。丹参酮 II_A 在正离子扫描模式下的主要碎片为 m/z 280、277、262、252、249。我们推测 m/z 280 由 m/z 295 去除甲基 ($-\text{CH}_3$), m/z 277 通过 m/z 295 脱水 ($-\text{H}_2\text{O}$), m/z 262 通过 m/z 277 去除甲基 ($-\text{CH}_3$), m/z 249 通过去除 m/z 280 中的一氧化碳 ($-\text{CO}$) 导致 m/z 277 和 m/z 252 中的一氧化碳 ($-\text{CO}$) 损失。

3.3 主要化合物的分子对接

分子对接是分子建模的重要方法之一。其本质是 2 个或更多分子之间的识别。该过程涉及分子之

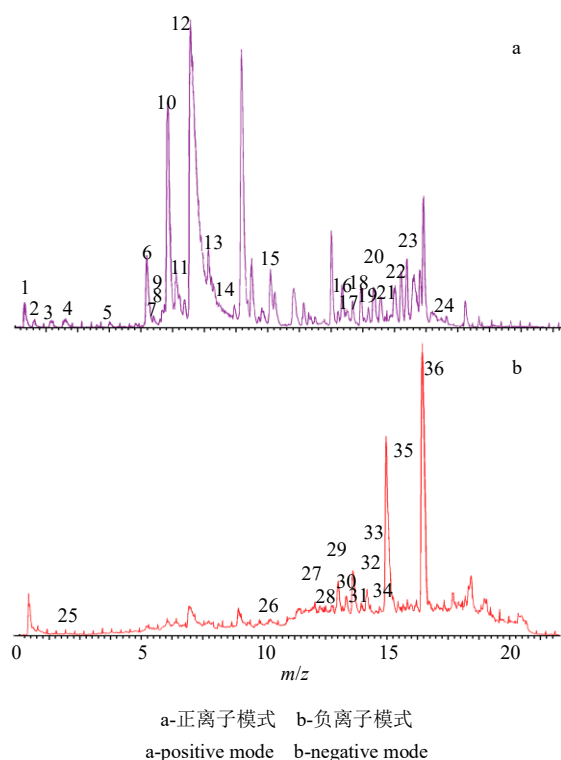


图 3 丹参乙醇提取物的基峰色谱图

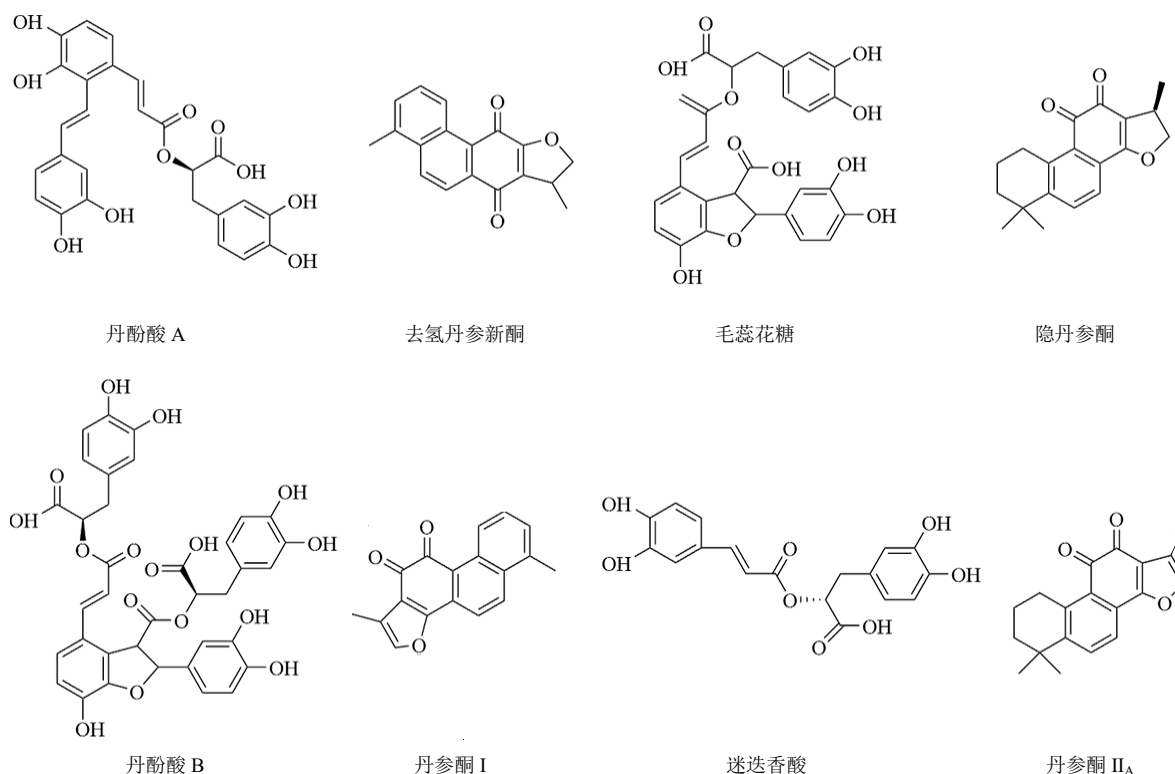
Fig. 3 Base peak chromatogram (BPC) of ethanol extract of *S. miltiorrhiza*

图 4 丹参主要化合物的结构

Fig. 4 Structural formula of main compounds from *S. miltiorrhiza*

间的空间匹配和能量匹配^[42]。分子对接操作环境 2014.09 (Chemical Computing Group Inc, Montreal, QC, Canada) 和蛋白质晶体 (PDB ID: 3TI3) 来自 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>)^[43]。本研究旨在模拟 NA 与丹参主要成分的识别与对接, 并比较 NA 抑制实验的结果。本研究选择 8 种主要化合物, 即紫草酚酸、迷迭香酸、丹酚酸 A、紫草酚酸 B、丹参酮 II_A、二氢丹参酮 I、二氢丹参酮、隐丹参酮和丹参酮 I, 利用 PharmaDB 目标数据库将这些化合物连接到 3TI3, 自由能绝对值高, 生物活性高。表 2 结果表明, 上述化合物生物活性大小分别为丹参酮 I (-38.908 kJ/mol) > 丹参酮 II (-7.826 kJ/mol) > 丹酚酸 B (-6.528 kJ/mol) > 紫草酚酸 (-5.549 kJ/mol) > 迷迭香酸 (-4.207 kJ/mol) > 二氢丹参酮 (3.013 kJ/mol) > 隐丹参酮 (-2.419 kJ/mol) > 丹酚酸 A (-0.508 kJ/mol)。自由能绝对值最高的前 4 种化合物与 NA 的结合方式见图 5。

3.4 丹参主要化合物的 NA 活性测定

NA 是分布在流感病毒包膜上的糖蛋白, 被认为是筛选抗甲型和乙型流感药物的重要靶标。结果表明, 与石油醚提取物相比, 丹参的乙醇提取物对

表 1 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定丹参乙醇提取物中的 36 种成分

Table 1 Thirty-six constituents identified in ethanol of *S. miltiorrhiza* extracts by UPLC-Q-TOF/MS

序号	<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	实验值 (<i>m/z</i>)	理论值 (<i>m/z</i>)	离子碎片	模式	参考文献
1	0.414	毛蕊花糖	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	827.266 9	827.248 3	665.205 3, 503.166 6, 383.130 3, 341.123 6, 179.078 6	N	35
2	0.790	丹参素	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 0	197.068 2	179.056 6, 151.062 5, 135.067 4, 123.066 8, 109.052 7	N	30,36
3	1.420	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 9	137.047 0	136.037 9, 119.014 1, 109.088 7, 108.043 0, 107.100 2,	N	35
4	2.023	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 4	179.058 9	135.068 8, 134.058 9, 359.088 7	N	35
5	3.767	丹酚酸 F	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.071 2	313.090 4	269.099 5, 254.080 2, 185.047 3, 159.066 9, 109.051 3	N	36
6	5.240	紫草酸	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	537.103 3	537.104 0	339.065 8, 313.085 9, 295.078 4, 185.047 1, 179.060 3, 135.066 7, 109.052 5,	N	25
7	5.248	丹酚酸 G	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	339.050 5	339.066 0	295.078 6, 277.071 9, 267.084 6, 239.093 1, 225.073 2, 209.076 7	N	35
8	5.407	1-hydroxy pinoselinol-1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	535.181 6	535.181 8	355.131 7, 339.065 5, 295.078 3, 269.101 1, 197.066 5, 179.077 2	N	35
9	5.442	丹酚酸 D	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.082 2	417.097 3	373.164 3, 339.065 8, 197.063 3, 179.078 0, 175.062 1, 157.053 8	N	25
10	6.050	迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.076 7	359.091 2	197.067 6, 179.056 9, 161.047 6, 133.052 7	N	25
11	6.390	丹酚酸 A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	493.113 5	493.117 9	313.086 4, 295.079 4, 185.046 0	N	25
12	6.960	丹酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.145 6	717.129 5	519.094 3, 339.068 4, 295.078 5, 185.045 9	N	25,37
13	7.993	3'- <i>O</i> -monomethylthio-spermidic acid B	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₆	731.161 2	731.146 1	551.117 9, 533.1105, 353.080 5, 335.067 0	N	35
14	8.690	丹酚酸 C	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	491.097 8	491.101 6	311.072 5, 293.064 5, 195.100 5	N	25
15	10.284	丹酚酸 B 二甲酯	C ₃₈ H ₃₄ O ₁₆	745.176 9	745.162 2	547.124 0, 339.064 1, 321.056 8	N	30
16	13.028	弥罗松酚	C ₂₀ H ₃₀ O	285.221 8	285.205 5	571.423 4, 309.226 5	N	30
17	13.120	委陵菜酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.342 3	487.347 2	975.659 1, 469.057 1	N	35
18	13.350	新隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	313.144 0	313.161 6	269.173 5, 241.178 5, 226.120 5, 213.148 7	N	35
19	13.679	1-phenanthreneacetic acid, 1,2,3,4-tetrahydro-1-hydroxy-6-methoxy-7-(1-methylethyl)-, ethyl ester	C ₂₂ H ₂₈ O ₄	355.190 9	355.206 1	711.289 2, 340.187 3, 295.081 2, 280.130 5	N	35
20	14.238	9(1 <i>H</i>)-phenanthrenone, 3-(acetyloxy)-2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-, (3 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)-	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	357.206 6	357.220 6	715.229 4, 297.203 2, 277.100 9	N	35
21	14.455	7 <i>α</i> -acetoxystyryleanone	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	373.201 5	373.211 2	345.219 3, 313.200 1	N	35
22	15.270	sugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	299.201 1	299.218 8	281.086 2, 253.147 4	N	35
23	15.525	micranthin B	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	371.185 8	371.200 0	356.177 1, 311.188 1, 296.146 3	N	35
24	17.050	anacardic acid	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	341.211 7	341.226 2	683.418 3, 299.188 3, 281.262 8	N	38
25	1.864	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.065 7	195.114 0	177.110 0, 162.003 3, 153.017 3, 149.060 1, 145.027 0, 135.040 8, 134.056 5, 117.015 8	P	38
26	10.307	丹参二醇 C	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313.107 6	313.144 1	335.126 1, 295.133 5, 267.137 8	P	38
27	12.500	tanshinone iib	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	311.128 3	311.128 4	293.118 3, 275.106 2, 267.138 7, 265.123 6, 251.107 5	P	38
28	12.760	小红参酮丙	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341.138 9	341.139 1	703.245 2, 295.133 7, 281.117 6, 263.107 7, 235.112 8	P	35
29	13.257	tanshinoldehyde	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	309.112 7	309.113 0	293.118 0, 281.116 9, 261.093 3, 235.112 8	P	35
30	13.610	二氢丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	279.102 1	279.101 8	579.181 9, 301.082 9, 261.091 2, 233.096 9, 205.101 4	P	26
31	14.009	去氢丹参新酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	281.154 2	281.117 2	263.107 4, 235.112 4, 221.094 0, 217.101 2, 207.116 3	P	37
32	14.160	丹参新酮 A	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	297.112 7	297.149 0	279.101 4, 269.152 7, 251.144 2, 237.094 1, 233.097 0, 223.149 5, 219.103 1, 209.097 2, 205.098 7, 191.406 1	P	26

续表 1

序号	t_R/min	化合物	分子式	实验值 (m/z)	理论值 (m/z)	离子碎片	模式	参考文献
33	14.339	trijuganone A	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_4$	295.097 0	295.133 1	277.124 3, 261.090 4, 233.097 7, 211.112 5, 197.135 2	P	35
34	14.978	隐丹参酮	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$	297.149 1	297.149 4	615.271 7, 593.210 3, 282.126 0, 279.138 2, 268.108 9, 254.094 4, 251.144 1, 237.092 5, 227.071 3, 209.097 6	P	35
35	15.091	丹参酮 I	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_3$	277.086 5	277.086 6	575.198 0, 259.1980, 249.074 5, 231.080 5	P	26
36	16.450	丹参酮 II _A	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$	295.133 4	295.134 0	611.240 8, 317.115 8, 277.123 8, 249.128 3, 207.081 5	P	26

N-负离子模式 P-正离子模式

N-negative mode P-positive mode

表 2 丹参中 8 种化合物的自由能值

Table 2 Free energy values of eight compounds of *S. miltiorrhiza*

化合物	自由能/($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
丹参酮 I	-38.908
丹参酮 II	-7.826
丹酚酸 B	-6.528
丹酚酸 A	-0.508
二氢丹参酮	3.013
迷迭香酸	-4.207
隐丹参酮	-2.419
紫草酸	-5.549

NA 的抑制作用更好。为了确认提取物的生物活性化合物,筛选了鉴定出的 8 种标准化化合物的 NA 抑制活性。奥司他韦酸用作阳性对照。结果表明,8 种化合物均显示抑制活性,并显示出剂量相关性作用(图 6)。8 种化合物的抗流感病毒 IC_{50} 依次为紫草酚酸(157.44 mol/L)>迷迭香酸(204.74 mol/L)>丹参酮 II_A(300.74 mol/L)>丹酚酸 A(307.86 mol/L)>丹参酸 B(310.07 mol/L)>二氢丹参酮(321.47 mol/L)>奥司他韦酸(361.83 mol/L)>丹参酮 I(566.09 mol/L)>隐丹参酮(584.57 mol/L)。研究结果表明,丹参提取物在体外具有抗流感病毒

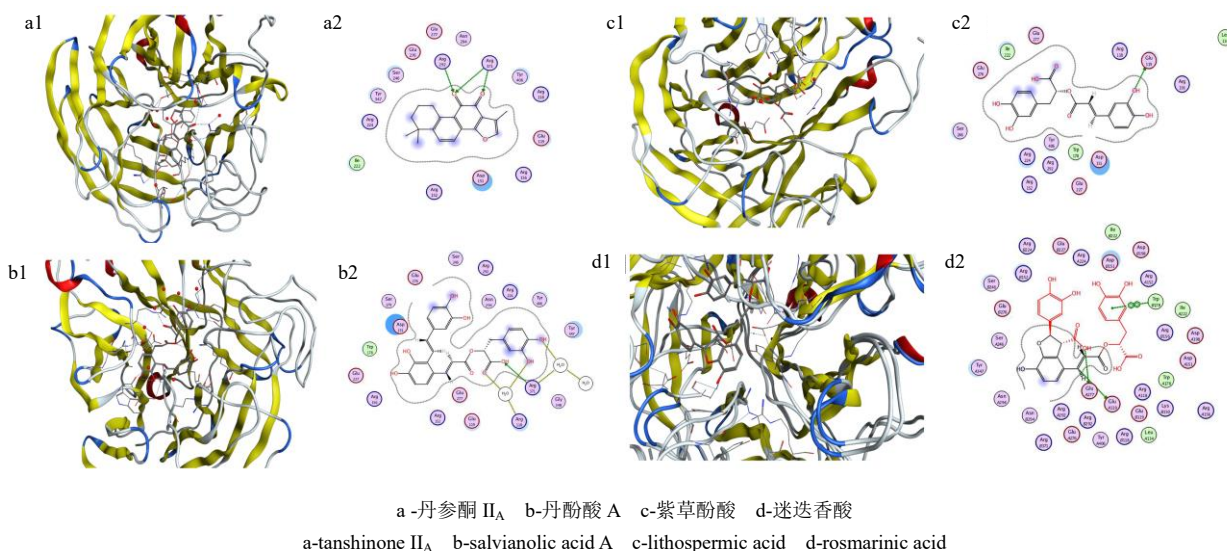


图 5 与 NA 对接的化合物的三维 (1) 和二维 (2) 图

Fig. 5 Three-dimensional (1) and two-dimensional (2) maps of compounds docking with NA

的活性,因此丹参具有抗病毒潜力,但尚需进一步研究验证。

4 讨论

流感是一种具有高度传染性的疾病,可导致高发病率和死亡率。抗病毒药物是治疗流感的有效方法,但是由于流感病毒的频繁突变,流感对药物逐

渐产生抗药性。由于流感病毒对药物的广泛耐药性,开发了市场上的扎那米韦、奥司他韦和帕拉米韦等药物。但是,这些药物具有副作用和其他缺点。因此,迫切需要寻找新的天然药物资源。然而,一些天然中草药具有抗流感作用,本研究为探究丹参的抗流感作用,通过 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定了丹参提

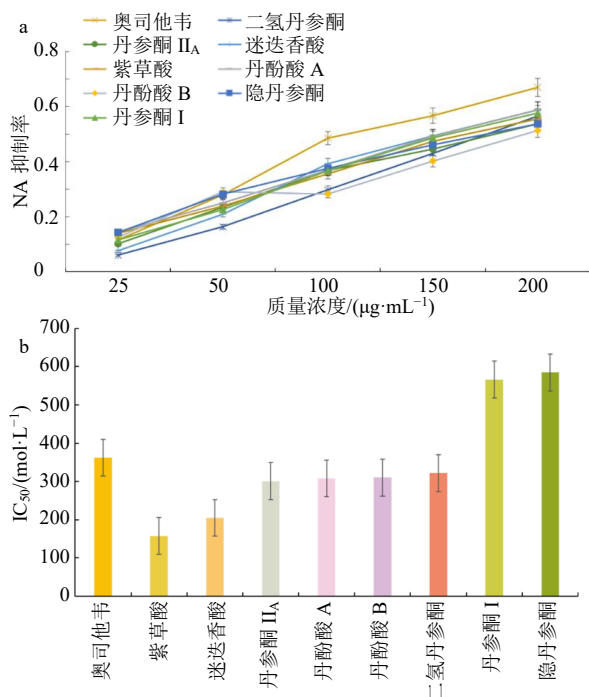


图 6 丹参乙醇提取物的 8 种成分的神氨酸酶抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$, a) 和 IC₅₀ (b)

Fig. 6 Neuraminidase inhibitory activity of eight constituents of ethanol extracts in *S. miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n=3$, a) and IC₅₀ (b)

取物的化学成分,并结合了 NA 活性测定和分子对接技术对主要活性成分进行了评估。初步确定了 36 种化合物。其中,4 种化合物(紫草酚酸、迷迭香酸、丹参酮 II_A、丹酚酸 A)与 NA 的亲合性良好。上述化合物均显示出 NA 抑制活性,其中丹酚酸 A 表现最佳。

中药是中国中医药事业传承和发展的物质基础,中药又因其含有许多化学成分,具有复杂性、多样性的特点,近年来研究发现中药在预防和治疗流感病毒中发挥极其重要的作用^[44]。丹参是大宗药材,迄今已有 2000 多年药用历史,具有较高的药用价值。明晰其化学成分,探究其主要化合物(紫草酚酸、迷迭香酸、丹参酮 II_A及丹酚酸 A)对 NA 的抑制活性,为将其开发为抗流感病毒的中药资源提供了理论依据。

丹参可能通过多途径、多靶点发挥抗病毒作用,为明晰其抗流感机制,还需对其体内抗病毒作用机制进行深入研究,为其临床抗流感病毒应用提供理论支撑。为进一步探究丹参抗流感潜在应用价值,课题组后期将在体内外对紫草酚酸,迷迭香酸,丹参酮 II_A及丹酚酸 A 的抗流感机制进行深入研究,

进一步阐明丹参抗流感病毒的机制。本研究为抗流感新药的研发提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cao J, Qi L W, Chen J, *et al.* Application of liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of compound Danshen preparations [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(4): 397-405.
- [2] Guo Y B, Li Y, Xue L M, *et al.* *Salvia miltiorrhiza*: An ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1401-1416.
- [3] Liu Y, Huang Y, Zhao C, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* injection on pulmonary heart disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(6): 1315-1331.
- [4] Shao M, Guo D, Lu W, *et al.* Identification of the active compounds and drug targets of Chinese medicine in heart failure based on the PPARs-RXR α pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112859.
- [5] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(3): 788-798.
- [6] de Caro C, Raucci F, Saviano A, *et al.* Pharmacological and molecular docking assessment of cryptotanshinone as natural-derived analgesic compound [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110042.
- [7] Hung Y C, Pan T L, Hu W L. Roles of reactive oxygen species in anticancer therapy with *Salvia miltiorrhiza* bunge [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5293284.
- [8] Yang X Y, Liu A L, Liu S J, *et al.* Screening for neuraminidase inhibitory activity in traditional Chinese medicines used to treat influenza [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): E1138.
- [9] 范吉林, 朱婷婷, 薛振宇, 等. 基于网络药理学探讨丹参-红花药对治疗冠心病的作用机制 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(24): 3740-3747.
- [10] Wang L L, Ma R F, Liu C Y, *et al.* *Salvia miltiorrhiza*: A potential red light to the development of cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(7): 1077-1097.
- [11] Zhou Y, Sun W, Chen J, *et al.* SmMYC_{2a} and SmMYC_{2b} played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22852.
- [12] Li F, Duan J L, Zhao M N, *et al.* A network pharmacology approach to reveal the protective mechanism of *Salvia miltiorrhiza*-*Dalbergia odorifera* coupled-herbs on

- coronary heart disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19343.
- [13] Quan F S, Compans R W, Cho Y K, *et al.* Ginseng and Salviae herbs play a role as immune activators and modulate immune responses during influenza virus infection [J]. *Vaccine*, 2007, 25(2): 272-282.
- [14] Ge Q, Filip L, Bai A, *et al.* Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference [J]. *PNAS*, 2004, 101(23): 8676-8681.
- [15] Sithisarn P, Michaelis M, Schubert-Zsilavecz M, *et al.* Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells [J]. *Antiviral Res*, 2013, 97(1): 41-48.
- [16] Zhang M M, Zhao H Q, Zhao Z G, *et al.* Rapid screening, identification, and purification of neuraminidase inhibitors from *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. by ultrafiltration with HPLC-ESI-TOF-MS combined with semipreparative HPLC [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(11): 2097-2104.
- [17] Karthick V, Ramanathan K. Virtual screening for oseltamivir-resistant a (H5N1) influenza neuraminidase from traditional Chinese medicine database: A combined molecular docking with molecular dynamics approach [J]. *Springerplus*, 2013, 2(1): 115.
- [18] He W, Wang W, Han H, *et al.* Molecular basis of live-attenuated influenza virus [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60413.
- [19] Wendel I, Matrosovich M, Klenk H D. SnapShot: evolution of human influenza A viruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3): 416-416.e1.
- [20] Zhang L, Shen H, Xu J, *et al.* UPLC-QTOF-MS/MS-guided isolation and purification of sulfur-containing derivatives from sulfur-fumigated edible herbs, a case study on ginseng [J]. *Food Chem*, 2018, 246: 202-210.
- [21] 王冬梅, 刘艾琳, 黄林芳, 等. 鸡屎藤抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位的UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(1): 44-48.
- [22] 王增绘, 王冬梅, 刘艾琳, 等. 山豆根抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(9): 912-916.
- [23] Zheng Y, Zhang X, Cao Y, *et al.* The exploration of neuraminidase inhibitory activity on *Fallopia denticulata*, an ethnic herb in China [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(4): e5024.
- [24] 时立. SPSS19 统计分析: 从入门到精通 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2012.
- [25] Chen Y, Zhang N, Ma J, *et al.* A Platelet/CMC coupled with offline UPLC-QTOF-MS/MS for screening antiplatelet activity components from aqueous extract of Danshen [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 178-183.
- [26] Liu M, Li Y G, Zhang F, *et al.* Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(14): 2256-2267.
- [27] Ma Z J, Zhang M, Song Z H. Characterization of tanshinones with quinone reductase induction activity from *Radix Salvia Miltiorrhiza* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(18): 2857-2866.
- [28] Xia L, Liu H L, Li P, *et al.* Rapid and sensitive analysis of multiple bioactive constituents in Compound Danshen preparations using LC-ESI-TOF-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3156-3169.
- [29] Xie W J, Zhang H J, Zeng J G, *et al.* Tissues-based chemical profiling and semi-quantitative analysis of bioactive components in the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by using laser microdissection system combined with UPLC-q-TOF-MS [J]. *Chem Cent J*, 2016, 10: 42.
- [30] Xu M, Guo H, Han J, *et al.* Structural characterization of metabolites of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* in normal and antibiotic-treated rats by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 858(1/2): 184-198.
- [31] Yang S T, Wu X, Rui W, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS analysis for identification of hydrophilic phenolics and lipophilic diterpenoids from *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Acta Chromatogr*, 2015, 27(4): 711-728.
- [32] Zhao Q, Song Z Q, Fang X S, *et al.* Effect of genotype and environment on *Salvia miltiorrhiza* roots using LC/MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 414.
- [33] Zhao X, Yang D H, Zhou Q L, *et al.* Identification of metabolites in WZS-miniature pig urine after oral administration of Danshen decoction by HPLC coupled with diode array detection with electrospray ionization tandem ion trap and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(6): 720-735.
- [34] Zhu Z Y, Zhang H, Zhao L, *et al.* Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(12): 1855-1865.

- [35] Yang S T, Wu X, Rui W, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS analysis for identification of hydrophilic phenolics and lipophilic diterpenoids from *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Acta Chromatogr*, 2015, 27(4): 711-728.
- [36] Xia L, Liu H L, Li P, *et al.* Rapid and sensitive analysis of multiple bioactive constituents in compound Danshen preparations using LC-ESI-TOF-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3156-3169.
- [37] Zhao Q, Song Z Q, Fang X S, *et al.* Effect of genotype and environment on *Salvia miltiorrhiza* roots using LC/MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 414.
- [38] Zhu Z Y, Zhang H, Zhao L, *et al.* Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(12): 1855-1865.
- [39] Cao J, Qi L W, Chen J, *et al.* Application of liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of compound Danshen preparations [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(4): 397-405.
- [40] 陈亮, 董长城. 二氢丹参酮对人非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞增殖、凋亡的影响及机制 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(12): 3206-3209.
- [41] Pang H Q, Wu L, Tang Y P, *et al.* Chemical analysis of the herbal medicine *salviae miltiorrhizae Radix et rhizoma* (Danshen) [J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 51.
- [42] Jhong C H, Riyaphan J, Lin S H, *et al.* Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico [J]. *Biofactors*, 2015, 41(4): 242-251.
- [43] Zhang X, Cao Y, Li J H, *et al.* Neuraminidase inhibitory activity and constituent characterization of *Fagopyrum dibotrys* [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): E1998.
- [44] 邓九零, 陶玉龙, 何玉琼, 等. 板蓝根抗流感病毒活性成分及其作用机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(8): 2029-2036.

[责任编辑 王文倩]