

联合体内外多维化学物质组和分子对接策略的炮附子抗炎药效物质基础研究

尹贻慧¹, 张 凯^{2*}, 陈 倩¹, 焦鸣杰¹, 陈冬玲¹, 张 佳¹, 李 飞^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488

摘要: 目的 挖掘炮附子 *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* 潜在的抗炎药效物质基础。方法 采用超高效液相色谱-质谱联用法 (UPLC-MS) 鉴别炮附子的体内外多维化学物质组; 通过蛋白互作网络、拓扑学分析以及相关文献筛选疾病靶点并结合分子对接技术筛选与目标蛋白结合良好的化合物。结果 鉴定了炮附子中 53 个化学成分、37 个入血成分; 确定 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9) 受体、纤溶酶原 (plasminogen, PLG) 受体为关键靶蛋白, 发现卡拉可林、宋果灵、海替生、易混翠雀花碱、黄草乌碱丁、绣线菊碱 C、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、三小叶翠雀碱 E、裸翠雀亭等 21 个化合物为炮附子潜在的抗炎药效物质。结论 所建立的方法充分考虑中药饮片化学成分复杂性, 从多个层次逐步推进, 方便快捷地筛选出炮附子潜在的抗炎药效物质, 可为中药药效物质筛选提供借鉴。

关键词: 炮附子; 化学物质组; 分子对接; 抗炎; 药效物质基础; 卡拉可林; 黄草乌碱丁; 三小叶翠雀碱 E

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3785-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.005

Study on pharmacodynamic material basis of processed *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* combined with *in vivo* and *in vitro* multi-dimensional chemical substance group and molecular docking strategy

YIN Yi-hui¹, ZHANG Kai², CHEN Qian¹, JIAO Ming-jie¹, CHEN Dong-ling¹, ZHANG Jia¹, LI Fei¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To excavate the potential anti-inflammatory pharmacodynamic material basis of processed *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (Pao Fuzi in Chinese). **Methods** Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) was used to identify the multi-dimensional chemical substance group of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* *in vivo* and *in vitro*; Protein interaction network, topological analysis and related literatures were used to screen disease targets, and then molecular docking technology was used to screen for compounds that bind well to the target proteins. **Results** A total of 53 chemical components of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and 37 components that enter the blood were identified; TLR4 receptor, MMP9 receptor, and PLG receptor were identified as the key target proteins, and 21 compounds such as karakoline, songorine, hetisine, condelphine, sachaconitine, spiradine C, benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhypaconitine, trifoliolamine E, and denudatine were found to be the potential anti-inflammatory pharmacodynamic materials. **Conclusion** The established method fully considered the complexity of the chemical components of traditional Chinese medicine decoction pieces and advanced from multiple levels gradually. It is convenient and quick to screen out the potential anti-inflammatory pharmacodynamic material of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*. The idea can provide a reference for the screening of pharmacodynamic material of Chinese medicine.

Key words: processed *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; chemical substance group; molecular docking; anti-inflammation; pharmacodynamic material basis; karakoline; sachaconitine; trifoliolamine E

收稿日期: 2022-12-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973479)

作者简介: 尹贻慧, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制理论及原理研究。E-mail: 2806462095@qq.com

*通信作者: 张 凯, 博士研究生。E-mail: zk006086@163.com

李 飞, 教授, 硕士生导师。E-mail: 602110@bucm.edu.cn

炮附子是东汉时期医圣张仲景通过干热法加工附子制备的炮制品,在《伤寒杂病论》的 12 个经方中均有应用^[1],具有治疗“风湿相搏,骨节烦疼”的抗炎药效。根据本课题组前期研究^[2],这种与《中国药典》制法相异的特色炮制方法,能有效避免附子水处理法造成的成分流失。且药理实验研究表明,干热法制备的附子具有更显著的抗炎药效^[3]。目前经典理论认为,附子的抗炎药效物质为饮片中的双酯型生物碱乌头碱、新乌头碱、次乌头碱,及苯甲酰乌头碱、苯甲酰中乌头碱、苯甲酰次乌头碱等单酯型生物碱^[4]。然而随着中药药物化学学科的不断发展和提取分离、分析鉴定手段的进步,截至目前共发现了 100 多个附子的化学成分。近年有研究报道一些附子生物碱如附子灵、宋果灵同样具有抗炎作用^[5-6],提示可能还有抗炎药效物质尚未得到发掘,仅以经典成分进行药效研究存在一定的局限性。中药成分复杂,治疗疾病具有多成分相互协调的作用特点,并形成作用机制复杂的系统。因此挖掘更多药效物质,建立多活性成分研究体系更符合中药的治疗特征。

体内外多维化学物质组关联分析充分考虑到中药分离单体成分的困难,以及中药进入体内的原型成分和代谢产物浓度低导致的识别困难,建立了基于超高效液相色谱-质谱靶向数据分析方法,用于中药体外到体内化学物质组的快速定性分析。以体外研究结果为参考,体内研究结果为指导,逐层递进分析,基于网络药理学筛选出作用于疾病靶点的成分,预测关键靶蛋白^[7]。分子对接是利用计算机模拟并预测药物成分与靶蛋白的结合模式,从而筛选出活性较高的化合物。其操作简单、方便快捷,被广泛应用于筛选中药的活性成分和药效物质的研究^[8]。

本研究联合体内、外多维化学组与分子对接策略探讨炮附子抗炎的药效物质基础。采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap/MS)鉴别炮附子的体内、外化学物质组,利用网络药理学结合文献验证筛选关键靶蛋白,通过分子对接初步筛选炮附子潜在的抗炎药效物质。研究立足于中药化学成分的整体性及对机体的整体调控作用,有层次性和导向性的筛选炮附子抗炎的药效物质,快速地发掘药效成分,提高筛选效率。

1 材料

1.1 仪器、数据库与软件

Thermo Ultimate 3000 超高效液相色谱、Thermo LTQ-Orbitrap 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);

HC-3518 离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); BT 125D Sartorius 电子天平(德国 Sartorius 公司); SB25-12 DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Chempider(<http://www.chemspider.com>); Swiss Target Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>); Genecards(<http://www.genecards.org/>); GeneMANIA(<https://genemania.org/>); STRING(<https://string-db.org/>); Protein Data Bank(<https://www.rcsb.org/>); Xcalibur 4.2 化学工作站; Cytoscape 3.7.2; ChemDraw Professional 15.0; AutoDock Tools-1.5.6; ChemBio3D Ultra 14.0; AutoDock Vina; AutoDock Tools-1.5.6。

1.2 试药与试剂

生附片(批号 190601)购自四川江油中坝附子科技发展有限公司,经北京中医药大学石晋丽教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品;炮附片为北京中医药大学中药炮制系实验室在前期对炮附片炮制工艺及质量控制研究^[9-11]的基础上制备,其质量符合《中国药典》2020 年版标准; LC-MS 级乙腈(批号 194036)、甲酸(批号 190284)、甲醇(批号 205068)均购自美国 Thermo-Fisher 公司;水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂为色谱纯。

1.3 动物

健康雄性 SPF 级小鼠 20 只,体质量(20±2)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学良乡校区动物实验中心,温度(23±2)℃,湿度(35±5)%。所有实验程序均按照国家法律和地方指南进行。该动物实验获得了北京中医药大学动物伦理委员会的批准(BUCM-4-2020092903-3117)。

2 方法

2.1 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 的炮附子体外-体内化学物质组的分析

2.1.1 炮附子体外化学物质组分析样品的制备

(1)炮附子供试品的制备:将河砂置热锅内,用武火加热,至滑利容易翻动时,投入净制并大小分档的生附片,不断翻炒,至鼓起,内外皆黄时,取出,筛去河砂,放凉。

(2)炮附子供试品溶液的制备:取炮附子饮片 5 g,加 10 倍量水,浸泡 30 min,大火煮沸后保持微沸 30 min,倾出第 1 次煎液,4 层纱布滤过;药渣再加 8 倍量水,大火煮沸后保持微沸 30 min,倾出第 2 次煎

煮液, 4 层纱布滤过, 合并 2 次煎液, 减压浓缩至 0.1 g/mL, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 炮附子体内化学物质组分析样品的制备

(1) 动物分组及给药: 实验之前进行 3 d 适应性喂养, 自由饮水和进食。小鼠随机分为 2 组, 每组各 10 只, 给药组 ig 给予剂量为 5 g/(kg·d) 炮附子水煎液, 空白组 ig 给予剂量为 33 mL/(kg·d) 蒸馏水, 分别给药 7 d。

(2) 血清样本的采集和处理: 末次 ig 给药前, 小鼠禁食不禁水 12 h, 于 ig 后 1 h, 两组小鼠分别从眼眶静脉丛取血, 置于离心管中, 静置 30 min, 在 15 000 r/min 离心 15 min 后分离血清, 再以 15 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 将同一组别的血清等量混合, 以消除个体差异。分别取 2 组血清 400 μ L, 各加入 1200 μ L 乙腈。冰水浴超声处理 10 min, 涡旋混匀 1 min, 将其在 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 移取上清液, 氮气吹干, 加入 100 μ L 70% 甲醇水复溶, 并在 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。移取上清液用于 UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 进样分析。

2.1.3 分析条件 色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~7 min, 4%~15% B; 7~24 min, 15%~30% B; 24~30 min, 30%~33% B; 30~40 min, 33%~60% B; 40~50 min, 60%~100% B; 50~52 min, 100% B; 52~53 min, 100%~4% B; 53~57 min, 4% B; 体积流量为 0.2 mL/min, 进样量为 5 μ L; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

质谱条件: HESI 离子源, 正离子模式扫描, 质量扫描范围为 m/z 50~2000; 离子源温度为 350 $^{\circ}$ C, 电离源电压、毛细管电压、管透镜电压分别为 4 kV、35 V 和 110 V; 辅助气体流量为 20 arb, 鞘气体积流量为 40 arb, 二者均为氮气; 一级质谱采用傅里叶变换高分辨全扫方式, 数据扫描分辨率为 30 000; 二、三级质谱采用数据依赖性扫描方式获取; 运用 CID 碎裂方式。

2.1.4 数据分析 根据质谱在正离子模式下扫描提供化合物的精确相对分子质量、准分子离子、多级离子碎片信息、保留时间并结合文献报道鉴定炮附子体外原型化学物质组; 以体外化学物质组为指导, 通过对比空白血清, 排除内源性基质的干扰, 阐明体内化学物质组。

2.2 基于网络药理学的炮附子抗炎靶蛋白的筛选

2.2.1 获取成分靶点与疾病靶点 获取入血成分

的“Canonical SMILES”或化学结构式, 在 Swiss Target Prediction 网站上, 选择物种为“Homo sapiens”, 进行靶点的预测, 构建成靶点数据库; 登陆 Genecards, 搜索“inflammation”的靶点。选取 score>8 的疾病靶点, 去重后构建疾病靶点数据库。

2.2.2 直接靶点、间接靶点的获取与蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建与分析 取成分靶点与疾病靶点的交集, 得到直接靶点, 将直接靶点导入 GeneMANIA 数据库中, 获取间接作用靶点; 将直接靶点和间接靶点导入 STRING 数据库中, 获得作用关系结果文件, 将文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析, 利用“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑学分析。以“Degree”值作为参考, 结合文献报道, 选取靶点作为下一步进行分子对接的靶蛋白。

2.3 基于分子对接策略的炮附子抗炎药效物质的筛选

2.3.1 配体小分子的准备 在 Pubchem 网站中查找入血成分即配体小分子的 2D 结构并用 ChemDraw Professional 15.0 绘制, 保存为 cdx 格式; 在 ChemBio3D Ultra 14.0 软件里打开后, 依次选择“Calculations”-“MM2”-“Minimize Energy”将配体能量最小化, 结果保存为 mol2 格式; 在 AutoDock Tools-1.5.6 软件里打开 mol2 文件, 进行自动加氢及电荷, 将小分子文件转换成 pdbqt 格式。

2.3.2 受体靶蛋白的准备 Protein Data Bank 网站中, 根据 PDB ID 下载受体靶蛋白的 pdb 格式文件; 在 AutoDock Tools-1.5.6 软件里进行极性氢原子添加以及非极性氢的合并, 以 pdbqt 格式保存。

2.3.3 对接过程及结果评价 在 AutoDock Tools-1.5.6 软件设置 GridBox 的大小, 使其完全包裹受体靶蛋白的空腔, 以便在对接过程中较全面地搜寻结合位点, 将设置的参数文件保存为 gpf 格式。采用 AutoDock Vina 对配体和受体进行半柔性分子对接。通过查阅文献报道^[12-14], 选取具有显著抗炎疗效的吡咯美辛、醋酸地塞米松及阿司匹林作为本实验的阳性药, 将阳性药物分别与抗炎靶蛋白进行分子对接, 以阳性药物对接结果的结合自由能 (binding energy, ΔG)、估计抑制常数 (inhibit constant, K_i)^[15]的平均值为参考衡量药物小分子与受体蛋白的结合能力, 炮附子化学成分与靶蛋白对接结果的 ΔG 和 K_i 越小, 表明结合越稳定。

3 结果

3.1 炮附子体内化学物质组表征

基于“2.1.3”项的条件,在正离子模式下得到炮附子水煎液及入血成分的总离子流图见图 1。鉴别出炮附子水煎液中 53 个化学成分及 37 个入血成分,其中包含 6 个去甲基化代谢物。通过查阅文献报道^[16],这些代谢物的原型成分可能是异塔拉乌头定、尼奥灵、乌头碱、塔拉地萨敏、14-乙酰塔拉胺等,具体数据见表 1。

3.2 炮附子抗炎靶蛋白的确定

3.2.1 成分作用靶点与疾病靶点的获取 根据获取入血成分“Canonical SMILES”格式的分子结构及化学结构式,在 Swiss Target Prediction 网站上,预测 294 个可能的成分靶点;共获得去重后的疾病靶点 142 个。

3.2.2 直接靶点、间接靶点的获取与抗炎靶蛋白的选择 共得到 12 个直接靶点与 20 个间接靶点;基于 PPI 网络的构建与拓扑学分析,并结合文献报道^[17-19],初步选取 Degree 值排名前 3 的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9)、纤溶酶原 (plasminogen, PLG) 为抗炎的靶蛋白, PPI 网络的可视化效果图见图 2。

3.3 分子对接结果

3.3.1 炮附子体内化学物质组与 3 个靶蛋白的对接

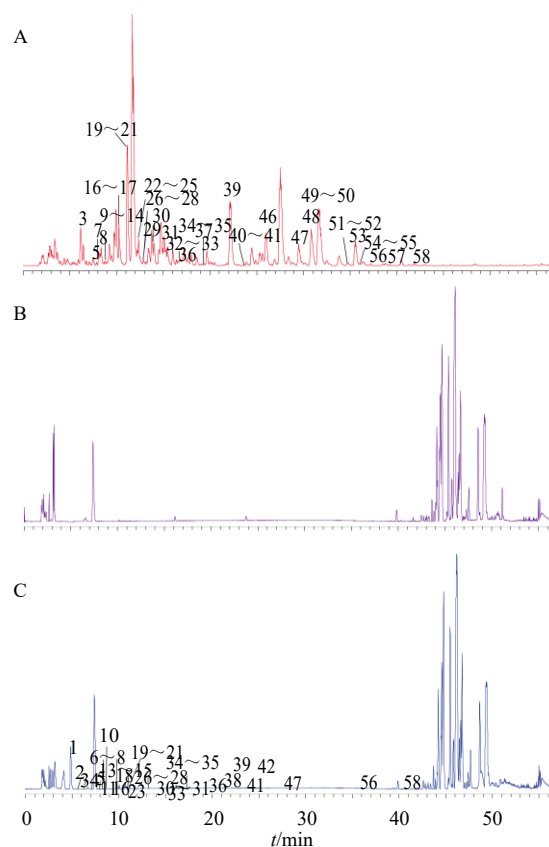


图 1 炮附子水煎液 (A)、空白组小鼠血清样品 (B) 及给药组小鼠血清样品 (C) 总离子流图

Fig. 1 Total ion currents of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* decoction (A), serum samples of blank group (B) and serum samples of administration group (C)

表 1 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 的炮附子体内、外化学物质组成成分分析

Table 1 Analysis of chemical composition of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* in vivo and in vitro based on UPLC-LTQ-Orbitrap/MS

峰号	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	MS ² 碎片	MS ³ 碎片	误差 ($\times 10^{-6}$)	来源
1	5.13	去甲基异塔拉乌头定	C ₂₂ H ₃₅ NO ₅	394.258 79	394.258 82	376.247 44		0.052	S*
2	5.46	去甲基尼奥灵	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆	424.269 36	424.269 04	406.258 00		-0.764	S*
3	6.18	川附胺/多根乌头定	C ₂₂ H ₃₅ NO ₅	394.258 79	394.258 48	376.303 44	358.339 51	-0.811	P, S
4	7.08	16- <i>O</i> -去甲基乌头碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₉	486.269 75	486.269 29	436.230 07		-0.963	S*
5	7.92	9-去羟基森布星 A	C ₂₃ H ₃₇ NO ₇	440.264 27	440.263 31	422.310 09	404.367 58	-2.201	P, S
6	8.00	去甲基塔拉地萨敏	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	408.274 44	408.274 05	390.263 15		-0.979	S*
7	8.09	森布星 A	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆	424.269 36	424.268 98	406.403 96, 388.375 76	388.272 92, 356.347 69	-0.906	P, S
8	8.37	新乌头原碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₉	486.269 75	486.268 49	436.311 25	404.256 59	-2.608	P, S
9	8.63	8- <i>O</i> -桂皮酰新欧乌林碱	C ₃₃ H ₄₆ NO ₇	569.334 70	569.333 44	550.435 73	518.397 40	-2.221	P
10	8.87	森布星 B	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆	424.269 36	424.268 89	406.367 43	388.270 36	-1.118	P, S
11	9.19	卡拉可林	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄	378.263 88	378.263 76	360.361 18	328.263 37	-0.331	P, S
12	9.19	秦岭翠雀碱 F	C ₂₂ H ₃₃ NO ₆	408.238 06	408.240 02	390.314 15	358.233 43	4.791	P
13	9.25	异塔拉乌头定	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	408.274 44	408.274 02	390.342 74	372.284 76	-1.053	P, S
14	9.72	乌头原碱	C ₂₅ H ₄₁ NO ₉	500.285 40	500.284 48	450.305 02	418.270 36	-1.855	P, S

续表 1

编号	t_R/min	成分	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	MS ² 碎片	MS ³ 碎片	误差 ($\times 10^{-6}$)	来源
15	9.94	宋果灵	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	358.237 67	358.237 30	340.240 33	322.224 85, 214.098 30	-1.034	P, S
16	10.29	海替生	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	330.206 37	330.206 02	312.263 00	294.276 64	-1.061	P, S
17	10.34	去甲猪毛菜碱	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.101 90	180.101 91	161.940 90	133.971 76	0.027	P
18	11.05	去甲基-14-乙酰塔拉胺	C ₂₅ H ₃₉ NO ₆	450.285 01	450.284 97	432.273 96		-0.099	S*
19	11.08	次乌头原碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₈	470.274 84	470.272 98	438.342 01	406.244 35	-3.963	P, S
20	11.13	附子灵	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	454.279 92	454.278 08	436.362 21	404.317 35	-4.070	P, S
21	11.69	尼奥灵	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	438.285 01	438.283 14	420.369 45	388.228 42	-4.277	P, S
22	12.19	N-乙基北海道乌头碱 B	C ₂₄ H ₃₇ NO ₅	420.274 44	420.273 44	402.338 84	384.300 54	-2.403	P
23	12.27	易混翠雀花碱	C ₂₅ H ₃₉ NO ₆	450.285 01	450.283 97	432.386 11	400.380 37, 414.322 60	-2.319	P, S
24	12.38	去氢翠雀胺	C ₂₄ H ₃₇ NO ₇	452.264 27	452.262 73	420.337 52	388.276 49	-3.425	P
25	12.70	去氧乌头原碱	C ₂₅ H ₄₁ NO ₈	484.290 49	484.288 76	452.293 30	420.353 55	-3.580	P
26	13.29	黄草乌碱丁	C ₂₃ H ₃₇ NO ₄	392.279 53	392.278 56	360.227 94	342.296 11	-2.486	P, S
27	13.52	塔拉地萨敏	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	422.290 09	422.288 94	390.356 05	358.282 53	-2.746	P, S
28	13.75	裸翠雀亭	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.258 40	344.257 48	326.288 76	209.061 49	-2.689	P, S
29	14.40	欧乌头碱	C ₂₂ H ₃₃ NO ₃	360.253 32	360.252 44	328.249 91	296.298 10	-2.444	P
30	14.97	14-乙酰尼奥灵	C ₂₆ H ₄₁ NO ₇	480.295 57	480.293 76	462.294 01	430.353 85	-3.787	P, S
31	15.46	展花乌头宁	C ₂₅ H ₄₁ NO ₆	452.300 66	452.299 50	420.423 80	388.337 40	-2.575	P, S
32	16.43	翠雀它明	C ₂₄ H ₃₅ NO ₈	466.243 54	466.242 13	448.380 40	416.324 43	-3.032	P
33	16.58	绣线菊碱 C	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃	356.222 02	356.221 41	296.132 02	144.947 75, 278.150 21	-1.713	P, S
34	17.12	14-乙酰萨卡可尼亭	C ₂₅ H ₃₉ NO ₅	434.290 09	434.288 73	402.338 23	324.179 38	-3.154	P, S
35	17.26	14-乙酰塔拉胺	C ₂₆ H ₄₁ NO ₆	464.300 66	464.299 01	432.391 82	400.324 31	-3.563	P, S
36	17.99	10-羟基-苯甲酰新乌头胺	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₁	606.290 88	606.288 70	556.432 43, 574.432 56	524.375 00	-3.608	P, S
37	19.50	紫草乌头碱	C ₂₉ H ₃₉ NO ₆	498.285 01	498.283 42	480.375 95	462.340 30	-3.200	P
38	20.99	16-O-去甲基苯甲酰乌头碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590.295 97	590.295 65	540.259 34		-0.547	S*
39	22.15	苯甲酰新乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590.295 97	590.293 52	540.304 87, 558.382 93	508.319 27, 476.326 05	-4.155	P, S
40	23.93	焦翠雀宁碱	C ₃₁ H ₄₁ NO ₇	540.295 57	540.293 58	522.392 21	504.415 22	-3.700	P
41	24.46	苯甲酰乌头原碱	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	604.311 62	604.309 02	554.387 45	522.313 54	-4.307	P, S
42	26.00	苯甲酰次乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	574.301 05	574.299 32	542.341 49	510.340 70	-3.027	P, S
43	27.10	次乌头碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	616.311 62	616.310 00	566.364 26	534.357 06	-2.633	P
44	27.53	脱水苯甲酰新乌头原碱	C ₃₁ H ₄₁ NO ₉	572.285 40	572.282 71	522.347 11	490.350 52	-4.715	P
45	28.29	去氧苯甲酰次乌头碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₈	558.306 14	558.303 96	540.447 14	508.360 53	-3.911	P, S
46	28.46	苯甲酰去氧乌头原碱	C ₃₂ H ₄₅ NO ₉	588.316 70	588.314 58	556.453 80	524.400 45	-3.618	P
47	29.68	苯甲酰丽乌辛	C ₃₁ H ₄₃ NO ₇	542.311 22	542.309 45	510.314 76	478.345 03	-3.281	P, S
48	30.85	焦乌头碱	C ₃₂ H ₄₃ NO ₉	586.301 05	586.298 65	536.398 74	504.289 73	-4.108	P
49	31.26	脱水中乌头碱	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₀	614.295 97	614.294 25	522.403 50	490.265 81	-2.805	P
50	31.68	焦次乌头碱	C ₃₁ H ₄₁ NO ₈	556.290 49	556.288 39	524.362 49	492.298 65	-3.782	P
51	34.15	露乌碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₈	584.321 79	584.319 58	566.420 65	534.399 66	-3.789	P
52	34.88	丽江乌头碱	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	628.348 00	628.345 76	536.355 83	504.257 32	-3.578	P
53	35.56	焦脱氧乌头碱	C ₃₂ H ₄₃ NO ₈	570.306 14	570.303 77	538.380 68	506.244 51	-4.162	P
54	36.36	14-O-茴香酰新乌宁碱	C ₃₂ H ₄₅ NO ₈	572.321 79	572.320 01	484.263 79	456.387 54	-3.117	P
55	36.89	脱水乌头碱	C ₃₄ H ₄₅ NO ₁₀	628.311 62	628.309 75	568.401 12	508.396 85	-2.981	P
56	37.20	三小叶翠雀碱 E	C ₃₉ H ₄₁ NO ₁₁	700.275 23	700.273 32	578.342 53	414.241 46	-2.738	P, S
57	39.30	三小叶翠雀碱 F	C ₃₉ H ₄₁ NO ₁₀	684.280 32	684.278 32	562.379 94	398.195 98	-2.927	P
58	41.87	月桂基乙二醇胺	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	274.274 05	274.273 32	256.231 63	101.861 30	-2.683	P, S

P 为炮附片水煎液, S 为含药血清中的原型成分, S* 为含药血清中的代谢产物

P is decoction of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, S is the prototype component in medicated serum, S* is the metabolite in medicated serum,

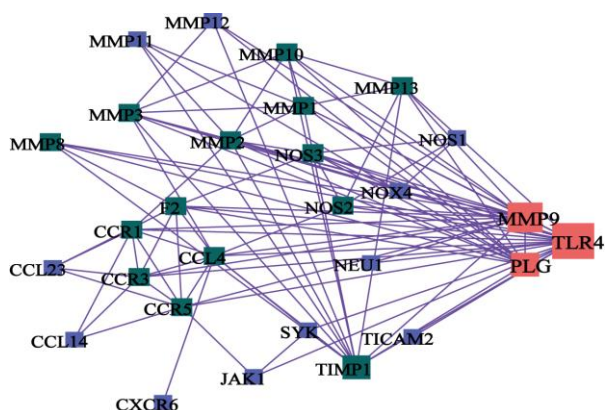


图2 炎症靶蛋白交互网络示意图

Fig. 2 PPI network of inflammation target proteins

结果 在炮附子体内化学物质组与 3 个靶蛋白的对接结果(表 2)中,共筛选出 21 个潜在的抗炎药效物质。其中可以同时与 3 个靶点稳定结合的有 11 个,为卡拉可林、宋果灵、海替生、易混翠雀花碱、黄草乌碱丁、绣线菊碱 C、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、三小叶翠雀碱 E、裸翠雀亭;能同时与 2 个靶点稳定结合的有 5 个,为森布星 A、次乌头原碱、附子灵、14-乙酰尼奥灵、森布星 B;能与 1 个靶点稳定结合的有 5 个,为新乌头原碱、异塔拉乌头定、乌头原碱、尼奥灵、塔拉地萨敏。与 TLR4、MMP9、PLG 结合力最强的分别为异塔拉乌头定、绣线菊碱 C、三小叶翠雀碱 E。

表2 炮附子体内化学物质组与靶蛋白对接结果

Table 2 Docking results of chemical substance group in body of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and target proteins

组别	序号	化合物	TLR4 (4G8A)			MMP9 (4H3X)			PLG (2PK4)		
			$\Delta G/$	$K_i/$	对接	$\Delta G/$	$K_i/$	对接	$\Delta G/$	$K_i/$	对接
			(kJ·mol ⁻¹)	(μmol·L ⁻¹)	情况	(kJ·mol ⁻¹)	(μmol·L ⁻¹)	情况	(kJ·mol ⁻¹)	(μmol·L ⁻¹)	情况
阳性药	1	吡啶美辛	-32.2	2.25		-29.7	6.21		-20.9	215.33	
	2	醋酸地塞米松	-36.8	0.35		-28.9	8.70		-22.6	109.59	
	3	阿司匹林	-27.2	17.10		-22.6	109.59		-19.2	423.11	
平均值			-32.2	6.57		-27.2	41.50		-20.9	249.34	
炮附子	1	森布星 A	-31.8	2.67	-	-27.2	17.10	+	-21.3	181.87	+
	2	新乌头原碱	-32.2	2.25	+	-24.7	47.10	-	-20.1	301.84	-
	3	卡拉可林	-35.1	0.69	+	-28.5	10.30	+	-21.3	181.87	+
	4	异塔拉乌头定	-37.2	0.29	+	-26.4	23.97	-	-20.1	301.84	-
	5	乌头原碱	-32.2	2.25	+	-25.1	39.79	-	-19.7	357.37	-
	6	宋果灵	-36.8	0.35	+	-27.6	14.44	+	-21.8	153.61	+
	7	海替生	-36.8	0.35	+	-30.1	5.24	+	-23.0	92.56	+
	8	次乌头原碱	-34.3	0.97	+	-25.9	28.38	-	-20.9	215.33	+
	9	附子灵	-33.9	1.15	+	-25.9	28.38	-	-20.9	215.33	+
	10	尼奥灵	-34.7	0.82	+	-26.4	23.97	-	-19.2	423.11	-
	11	易混翠雀花碱	-34.7	0.82	+	-28.5	10.30	+	-21.3	181.87	+
	12	黄草乌碱丁	-35.1	0.69	+	-28.9	8.70	+	-21.3	181.87	+
	13	塔拉地萨敏	-33.9	1.15	+	-25.9	28.38	-	-20.5	254.94	-
	14	14-乙酰尼奥灵	-34.3	0.97	+	-25.9	28.38	-	-21.3	181.87	+
	15	展花乌头宁	-30.1	5.24	-	-23.8	66.03	-	-20.1	301.84	-
	16	绣线菊碱 C	-34.7	0.82	+	-32.6	1.90	+	-22.6	109.59	+
	17	苯甲酰新乌头原碱	-36.4	0.42	+	-28.0	12.20	+	-21.8	153.61	+
	18	苯甲酰乌头原碱	-35.6	0.58	+	-27.2	17.10	+	-21.8	153.61	+
	19	苯甲酰次乌头原碱	-36.4	0.42	+	-31.0	3.74	+	-23.4	78.18	+
	20	三小叶翠雀碱 E	-35.1	0.69	+	-31.4	3.16	+	-25.5	33.60	+
	21	月桂基乙二醇胺	-19.2	423.11	-	-18.8	500.95	-	-15.5	1 934.18	-
	22	裸翠雀亭	-36.8	0.35	+	-30.5	4.43	+	-20.9	215.33	+
	23	森布星 B	-34.3	0.97	+	-28.0	12.20	+	-20.5	254.94	-

“+”为阳性结果,“-”为阴性结果

“+” is positive result, “-” is negative result

3.3.2 潜在药效物质与 3 个靶蛋白氨基酸残基的作用情况 炮附子中筛选出的 21 种潜在的抗炎药效物质与 3 个靶蛋白氨基酸残基的作用情况见表 3。为直观地展示化合物与靶蛋白的结合模式以及化合物与周围氨基酸残基的相互作用,以异塔拉乌头定与 TLR4、绣线菊碱 C 与 MMP9、三小叶翠雀碱 E 与 PLG 的结合为例,做出化合物与靶蛋白对接的 3D 模型与二维平面图,如图 3 所示。异塔拉乌头定稳定地结合在由 Leu212、Phe104、Glu111、Ala107、

Arg106、Glu266、His159、Asn185、Lys186、Ser184、Asn114 组成的疏水口袋中,其 5 号氧原子与 Thr115、Ser103、Asn265 形成 3 个氢键;MMP9 的活性空腔主要由 Val216、Gly215、Gly217、Tyr248、Gly186、Asp185 组成,绣线菊碱 C 很好地占据空腔,其 1 号氧原子与 Tyr218 形成 1 个氢键;三小叶翠雀碱 E 的 2 号氧原子与 Thr66 形成氢键,其环状结构与 Gly19、Lys20、Lys21、Cys22、Ser24 存在疏水作用。

表 3 潜在的药效物质与靶蛋白氨基酸残基的相互作用

Table 3 Interaction between potential pharmacodynamic substances and amino acid residues of target proteins

序号	化合物	TLR4		MMP9		PLG	
		氢键作用	疏水作用	氢键作用	疏水作用	氢键作用	疏水作用
1	森布星 A	/	/	Ala146	Val151、Ile150、Leu147、Pro254	Ser69、Arg71、Trp72	Val70
2	新乌头原碱	Asn339、Lys362、Arg264	Lp4202、Myr205、Val93、Glu92、Lp5203、Dao204	/	/	/	/
3	卡拉可林	Arg460、His458	His529、Gln505、Asn486、Gln507、Gly480、His458、Ser482	Val216、Gly217、Gly215、Tyr248	Thr29、Ser24	Thr66、Ser27	
4	异塔拉乌头定	Thr115、Ser103、Asn265	Leu212、Phe104、Glu111、Ala107、Arg106、Glu266、His159、Asn185、Lys186、Ser184、Asn114	/	/	/	/
5	乌头原碱	His458、Gln507、Arg460、Ser482	His458、Thr459、Gly480、Gln505、His456	/	/	/	/
6	宋果灵	Arg106、Ser103、Ser184	Thr112、Leu212、Glu111、Asn114、Glu266、His159、Thr115、Ala107	Ala150、Leu256、Val151、Ala146	Gln7、Ser8、Gly6	His3、Asp5、Gly4	
7	海替生	Ser184、Thr112、His159、Glu111	Val113、Phe104、Glu266、Lys186	Leu256、Ala150、Val151、Ala146	Trp72、Aca100、Asp55	Tyr74、Asp57	
8	次乌头原碱	Ser184、Ser103	Phe104、Arg106、Thr112、Val113、Asn114、Nag201、Glu266、His159	/	Thr47	Gly45、Pro38、Pro42	
9	附子灵	Lys186、Ser184、Ser103、Asn114	Asn185、Leu212、Glu111、His159、Ala107、Arg106、Glu266、Phe104	/	Ser24、Thr29	Pro30、Gln23、Asn49、Lys21	
10	尼奥灵	Ser482、His458、Arg460	Arg460、Asn481、Ser482、His456、Gln505、Gln507、Gly480	/	/	/	/
11	易混翠雀花碱	Asn486	Gln507、His458、Gly480、Gln505、Arg460、Ser482	Gly215、Asp185、Tyr218、Tyr248	Ser24、Asn49、Thr29	Lys21、Thr66、Pro30、Ser27	
12	黄草乌碱丁	Ser103、His159	Arg106、Thr112、Ala107、Ser184、Nag201、Glu266	Tyr218、Tyr248、Gly186、Asp185	Asp0	Cys80、Lys78、Gln-1、Cys1	
13	塔拉地萨敏	Ser103	Glu111、His159、Asn114、Glu266、Phe104、Val113	/	/	/	/
14	14-乙酰尼奥灵	Ser482、Arg460、His458、Gln505	Gln507、Thr459、His458、His456、Gly480	/	Thr66、Thr29、Ser24、Ser27	Pro30、Asn49	

续表 3

序号	化合物	TLR4		MMP9		PLG	
		氢键作用	疏水作用	氢键作用	疏水作用	氢键作用	疏水作用
15	绣线菊碱 C	Gln436、Lys435	Arg460、His458、Phe408、Tyr218 His431、Leu434		Val216、Gly215、Lys21 Gly217、Tyr248		Thr66、Asp67、 Pro68、Lys20
16	苯甲酰新乌头原碱	His456、Ser482、 Gly480、Gln505	His458、Thr459、Ser482、Ala146 Asn481、Arg460、His431		Glu252、Thr251、Thr47 Phe221、Gly253		Pro38、Pro42、 Gly45、Arg10
17	苯甲酰乌头原碱	Thr232、Lys230、 Asp209、Asp181	Asp99、Arg234、Arg106、Ala146 Leu108、Asn156、Leu155、 Val132、Glu154		Gly253、Thr251、Thr47 Phe221、Glu252		Leu46、Pro42、 Pro38、Gly45
18	苯甲酰次乌头原碱	Asp209	Gly97、Asp99、Ser98、Arg106、Lys184、Asp185、 Lys72、Cys105、Leu108、Glu154	Tyr218、Val216、Cys22、Ser24 Gly217、Asp185	Gly215、Tyr248		Ser27、Ser26、 Thr29、Thr66
19	三小叶翠雀碱 E	Arg90、Asn339、 Gln436	Lp4202、Lp5203、Thr413、Lys184、Tyr218 Arg382、Gly384、Lys362、 Ser360、Asn383、Phe408、 Asn361		Val216、Gly217、Thr66 Gly215、Asp185、 Tyr248、Tyr218		Ser24、Cys22、 Lys21、Lys20、 Gly19、Pro68、 Thr65、Asp67
20	裸翠雀亭	Glu266、Ser103、 Asn114、Thr112	His159、Ser184、Phe104、Tyr248 Thr115、Glu111、Val113		Tyr218、Asp185、Thr66 Arg249、Phe250		Lys20、Gly19、 Lys21、Asp67
21	森布星 B	Ser103、Ser184	Phe104、Arg106、Val113、Asn114	Asp185	Asp185、Tyr218 /	/	/

“/” 表述为无相互作用

“/” indicates non-interaction

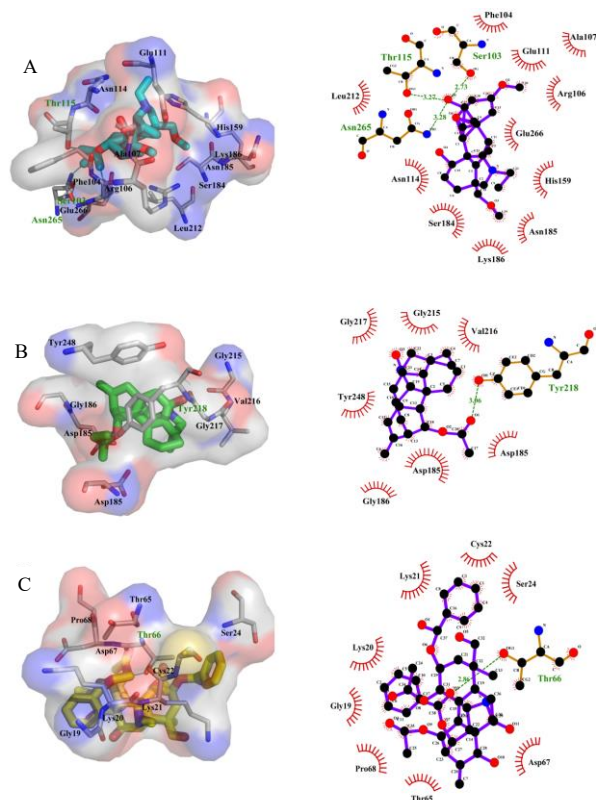


图3 异塔拉乌头定与TLR4 (A)、绣线菊碱 C 与 MMP9 (B)及三小叶翠雀碱 E 与 PLG (C) 对接的 3D 模型图与二维平面图

Fig. 3 3D model diagram and two-dimensional plan diagram of isotalatzidine and TLR4 (A), spirathine C and MMP9 (B) and trifoliolazine E and PLG (C) docking

4 讨论

4.1 体内、外化学物质组的建立

中药经历炮制加工过程的化学成分变化，最终以饮片的形式通过体内传输发挥临床疗效，其功效是药效物质基础经过体外变化和体内吸收、代谢后生物效应的综合体现。因此，明确饮片化学物质组“体外-体内”的传递-转化过程，能为药效物质的筛选提供清晰的路径。本研究基于体内、外多维化学物质组首先对炮附子水煎液中的化学成分进行表征，鉴定得到 53 个化合物，继而对入血成分进行分析，鉴定出 37 个化合物，其中 6 个代谢物主要是由 C₁₉-二萜生物碱成分去甲基化转化，这些原型成分可能是潜在的活性成分。文献研究表明，C₁₉-二萜生物碱具有消炎、止痛等多种药理活性^[20]，其中双酯型 C₁₉-二萜生物碱可能是通过白细胞趋化作用，影响前列腺素的代谢，最终表现出抗炎作用^[4]。本研究系统地阐释了炮附子“体外化学物质组-体内化学物质组”的传递，明确了炮附子化学成分经口服由体外传递到体内可能发挥药效的成分，便于炮附子抗炎药效物质的进一步筛选。

4.2 炎症靶蛋白的选择与确定

中药治疗疾病，可能是一种成分作用于多个靶蛋白，也可能是多种成分作用于同一个靶蛋白^[21]，因此科学合理地选择具有代表性的靶蛋白，对筛选中药潜在的活性成分具有重要意义。网络药理学通

过建立并分析成分-靶点-疾病之间的关系网络,可以预测疾病发生发展过程中的关键靶蛋白。本研究基于网络药理学、构建 PPI 网络并对其进行拓扑学分析最终根据“Degree”值选择并确定了抗炎的靶蛋白 TLR4、MMP9、PLG。研究表明,TLR 作为介导天然免疫的重要模式识别受体,在炎症的发生和发展中起着重要作用^[22];TLR4 作为关键上游受体,广泛存在于多种细胞表面,在脂多糖介导的免疫反应中极其重要,能选择性的识别细菌脂多糖,激活 TLR4 信号通路,通过释放促炎因子、趋化因子诱导炎症反应^[23],控制着炎症信号的细胞内转导和核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的活化入核,导致众多促炎因子白细胞介素-17 (interleukin 17, IL-17)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 的释放增加,形成炎症反应^[17]。MMP9 是明胶酶家族主要成员,在免疫炎症、细胞凋亡等过程中发挥作用。正常情况下 MMP9 表达水平极低;在炎症状态下,炎症因子、血管细胞粘附分子会诱导 MMP9 的表达,促进免疫炎症细胞的迁移并上调 MMP9 活性,与机体的炎症反应密切相关^[18]。PLG 是一种糖蛋白,纤溶酶原促进纤维蛋白溶解并增强炎症反应^[24],纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活剂抑制剂影响 PLG 的水平变化,抑制纤溶酶原激活物因子表达可降低炎症因子水平,减轻炎症反应^[19]。以上文献研究进一步佐证了本研究选取靶蛋白的合理性。

4.3 基于分子对接策略进一步筛选炮附子潜在的抗炎药效物质

中药化学成分复杂,使中药药效物质基础的研究面临艰难与挑战,是长期以来制约中药现代化发展的瓶颈^[25]。目前对于中药药效物质的研究主要是利用中药指纹图谱、血清药理学、药动学等技术,虽然能够在一定程度上阐明中药的部分药效物质,但实验周期长、成本高且难以全面揭示整体的药效物质基础^[26]。基于以上研究现状,本研究采用分子对接技术,通过计算机模拟实现了对中药药效物质大规模地虚拟筛选,缩短了实验周期、节省了实验成本。共筛选出 21 个潜在的抗炎药效物质,其中卡拉可林、宋果灵、海替生、易混翠雀花碱、黄草乌碱丁、绣线菊碱 C、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、三小叶翠雀碱 E、裸翠雀亭能与 3 个抗炎靶蛋白稳定结合。已有文献报道,宋果灵在体外实验中表现出抗风湿活性,其抗

炎机制可能与抑制炎症细胞因子的产生和下调缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 TLR4 的表达水平有关^[27];苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对角叉莱胶引起的大、小鼠后踝关节肿,组织胺引起的皮肤渗透性增加,受精鸡胚浆膜囊上肉芽组织形成均有明显的抑制作用^[28];除此以外,朱瑞丽等^[29]发现苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱还对脂多糖刺激的巨噬细胞均有抗炎作用,下调巨噬细胞两种炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌量,这与本研究虚拟筛选的结果一致。卡拉可林、海替生、易混翠雀花碱、黄草乌碱丁、绣线菊碱 C、三小叶翠雀碱 E、裸翠雀亭鲜有文献报道其抗炎药效,这为后续炮附子抗炎药效物质的开发提供了理论指导。本研究还筛选出新乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉地萨敏、次乌头原碱、乌头原碱等化合物, Li 等^[5]通过网络药理学分析和高通量筛选表明新乌头原碱、附子灵、尼奥灵是抑制炎症反应的药效物质,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的异常活化有关。Liu 等^[30]通过建立细胞胰腺炎模型发现塔拉地萨敏、次乌头原碱是抗急性胰腺炎的有效成分。Zeng 等^[31]推测乌头原碱可能是治疗慢性关节炎的主要活性物质,机制是乌头原碱通过抑制 NF- κ B、活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) c1 的激活及树突状细胞-特异性跨膜蛋白 (dendritic cell-specific transmembrane protein, DC-STAMP) 的表达,抑制巨噬细胞 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞。以上文献报道进一步佐证了本研究虚拟筛选的药效物质的合理性。此外筛选出的单体化合物森布星 A、异塔拉乌头定、海替生、14-乙酰尼奥灵、森布星 B 的抗炎活性尚不十分明确,有待于进一步地实验验证。

4.4 基于体内外化学物质组联合计算机虚拟筛选的研究模式展望

目前中药活性物质的筛选研究,开始阶段纳入的单体成分,常来源于一些线上数据库。以常用的中药系统药理学数据库分析平台 (TCMSP) 为例^[32],研究者根据纳入标准设立较高的筛选阈值,导致大量的经典中药活性成分被剔除。例如,采取口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 40\%$,且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的标准^[33-34],已被证实具有显著抗炎药效的乌头碱并不会被纳入筛选的范

围内 (OB=7.87%, DL=0.23)。本研究采用液质联用技术鉴别饮片及血清内的化学成分, 以此来代替传统的线上数据库筛选, 以体外饮片的鉴别作为“标杆”对照, 含药血清的鉴别作为最终结果。这种方法虽不能表征出包含中药全部成分的化学物质组, 但保证了纳入对象为吸收入血的中药成分。另一方面, 根据 Orbitrap 高分辨、高灵敏、进样量少的检测特点, 使得血容量较少的小鼠也可进行研究, 检测限上的响应结果反映了供试体系内相对含量较高的离子, 也就是说, 鉴别结果为中药体系内含量较高的化学成分, 在不考虑彼此效价强度的基础上, 这种结果也契合逻辑上的量效关系, 即含量越高, 药效越强。计算机虚拟筛选模式凭借较好的预测精度及导向性优势, 对药效物质的筛选有一定的参考价值, 一定程度上避免了研究的盲目性^[35]。

本研究采取的体内、外化学物质组联合计算机虚拟筛选的研究模式, 基于体外-体内成分挖掘、虚拟多靶标筛选、活性成分预测与文献验证相结合的策略, 在理论上评价中药化学成分对效应靶点的结合能力, 快速筛选中药的药效物质^[36]。对于中药复杂体系的研究具有一定的启示和帮助, 然而预测结果仍有可能出现假阳性、假阴性, 后期尚需要实现进一步的实验验证。

本研究联合体内、外多维化学物质组和分子对接策略筛选出森布星 A、新乌头原碱、卡拉可林、异塔拉乌头定、乌头原碱、宋果灵、海替生、次乌头原碱、附子灵、尼奥灵等 21 个化合物与炎症靶点的对接结果优于阳性药, 为炮附子潜在的抗炎药效物质。发现卡拉可林、宋果灵、海替生、易混翠雀花碱、黄草乌碱丁、绣线菊碱 C、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、三小叶翠雀碱 E、裸翠雀亭 11 个化合物与 3 个炎症靶蛋白均能稳定结合, 可能是值得发掘的具有潜力的药效物质。目前的文献报道可部分验证本研究的筛选结果, 但仍有一些药效物质的抗炎效果缺乏文献佐证, 今后的研究可进行相关的药理实验进一步验证其抗炎活性并明确量、毒、效的关系, 保证临床用药的安全有效。本研究为炮附子抗炎药效物质的筛选及进一步的机制研究提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 傅文录. 张仲景应用附子的经验 [J]. 河南中医, 2013,

33(12): 2045-2049.

- [2] 彭诗涛, 张先灵, 袁金凤, 等. 基于张仲景学术思想的炮附子 4 种炮制方法的比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(5): 716-721.
- [3] 熊秋韵, 李梦婷, 缪璐琳, 等. 附子不同炮制品抗炎、镇痛和提高免疫功能作用的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 123-127.
- [4] 张晓晨, 郑清阁, 杨菁华, 等. 附子 C₁₉ 二萜生物碱结构及活性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 531-541.
- [5] Li P, Lv B, Jiang X Q, et al. Identification of NF- κ B inhibitors following Shenfu injection and bioactivity-integrated UPLC/Q-TOF-MS and screening for related anti-inflammatory targets *in vitro* and *in silico* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 658-667.
- [6] 李瑞煜, 张定堃, 韩雪, 等. 基于代谢组学方法的制附片煎煮过程成分变化规律及煎煮时限探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 38-45.
- [7] 刘舒, 宋凤瑞, 皮子凤, 等. 基于质谱技术的“体外-体内”多维化学物质组逐层递进关联分析策略用于中药体内药效物质基础研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(8): 1448-1452.
- [8] Zhang L, Wei T T, Li Y, et al. Functional metabolomics characterizes a key role for N-acetylneuraminic acid in coronary artery diseases [J]. *Circulation*, 2018, 137(13): 1374-1390.
- [9] 彭诗涛, 张先灵, 袁金凤, 等. 基于张仲景学术思想的炮附子 4 种炮制方法的比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(5): 716-721.
- [10] 陈炯, 谭鹏, 吴月娇, 等. 砂烫生附片与炮附片制备前后 6 种生物碱的变化 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1342-1345.
- [11] 彭诗涛, 柴冲冲, 袁金凤, 等. 炮附片 HPLC 特征图谱及炮制前后比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(12): 2563-2568.
- [12] 余玲, 康倩, 刘霞, 等. 雷公藤红素与吲哚美辛对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的协同抗炎作用研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(11): 1807-1813.
- [13] 黄越燕, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定中药及保健食品中非法添加 17 种抗炎镇痛类化学药的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 246-254.
- [14] 李婧宜, 王赛楠, 董艳梅. 非甾体类抗炎药对人牙髓细胞的抗炎修复作用 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2020, 52(1): 24-29.
- [15] 刘永杰, 向慧龙, 陈浩, 等. 基于分子对接技术石菖蒲中抗抑郁活性成分的筛选 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2612-2619.
- [16] 丁劲峰, 宋祥和, 季阳, 等. 乌头类生物碱体内代谢机理研究进展 [J]. 中国法医学杂志, 2019, 34(4):

- 375-378.
- [17] 徐颖, 王爽, 秦婷婷, 等. 复方银花解毒颗粒对脂多糖致幼龄大鼠急性肺炎模型的抗炎作用及TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 203-210.
- [18] 温晓洲, 孙爱华, 李广平, 等. 基质金属蛋白酶 9 的研究进展 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2021, 26(2): 216-218.
- [19] 张红, 任东升, 陶雅非. 低频超声促透通络止痛中药对膝骨关节炎尿激酶型纤溶酶原激活物系统及炎症因子的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(8): 1149-1154.
- [20] 王勇, 刘宁, 宋凤瑞, 等. 乌头碱型 C₁₉ 去甲二萜生物碱的结构多样性 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 350-353.
- [21] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [22] Zhu Y G, Qu J M. Toll like receptors and inflammatory factors in sepsis and differential expression related to age [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(1): 56-61.
- [23] 张娟, 尚德静. Toll 样受体 4(TLR4)信号通路及其靶向药物的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(7): 657-662.
- [24] Ny L, Parmer R J, Shen Y, *et al.* The plasminogen receptor, Plg-RKT, plays a role in inflammation and fibrinolysis during cutaneous wound healing in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1054.
- [25] 王元清, 严建业, 师白梅, 等. 中药复方药效物质基础研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(5): 99-102.
- [26] 李亚美, 杜智敏. 基于多学科交叉的中药药效物质基础研究方法和思路概述 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1644-1648.
- [27] Zhang L J, Siyiti M, Zhang J, *et al.* Anti-inflammatory and anti-rheumatic activities *in vitro* of alkaloids separated from *Aconitum soongoricum* Stapf [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 493.
- [28] 张金玲, 毛绒, 杜光. 川乌生物碱类成分及药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2019, 38(8): 1048-1051.
- [29] 朱瑞丽, 易浪, 董燕, 等. 附子中 3 种乌头原碱对巨噬细胞的抗炎作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5): 908-913.
- [30] Liu X, Wang X L, Wu L, *et al.* Investigation on the spectrum-effect relationships of Da-Huang-Fu-Zi-Tang in rats by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS method [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 606-612.
- [31] Zeng X Z, He L G, Wang S, *et al.* Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW_{264.7} cells by suppressing NF- κ B and NFATc₁ activation and DC-STAMP expression [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(2): 255-263.
- [32] 单丽芳, 康国娇, 张超, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨四物汤抗乳腺癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3943-3953.
- [33] 张欢欢, 刘寒, 向净匀, 等. 基于网络药理学的四逆汤抗心肌缺血损伤的分子机制研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(3): 265-277.
- [34] 苏晓鹏, 晏军, 张潞潞, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-丹参药对治疗肝癌的作用机制与实验验证 [J]. 世界中医药, 2022, 17(24): 3449-3455.
- [35] 杨文字, 万德光, 杨鑫岷. 虚拟筛选辅助揭示中药药效物质基础的思路与初步实践 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1665-1672.
- [36] 毕肖林, 马世堂, 狄留庆, 等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5229-5234.

[责任编辑 王文倩]