

基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨丝穗金粟兰水提物抗炎镇痛药效物质及作用机制

甄丹丹¹, 黄耀斌^{2#}, 卢显兴³, 陈景敏^{4*}, 丘 琴¹, 张 淼¹, 史俊豪¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530022

2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530200

3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530200

4. 玉林市中医医院, 广西 玉林 537100

摘要: 目的 利用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS) 分析丝穗金粟兰 *Chloranthus fortune* 水提物的主要成分, 并结合网络药理学的方法对其抗炎镇痛药效物质及作用机制进行预测分析。方法 结合 ChemSpider 数据库、mzCloud 平台及现有文献研究, 对目标化合物二级质谱特征碎片离子进行比对确认, 鉴定丝穗金粟兰水提物的化学成分; 通过 FAFDrug4 数据库筛选丝穗金粟兰水提物的活性成分, 运用 Pharmmapper 平台和 Uniprot 数据库预测丝穗金粟兰的成分靶点, GeneCards 平台获得相关疾病靶点, 利用 Venny 平台获得成分和疾病的交集靶点; 通过 String 数据库和 Cytoscape3.7.0 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并筛选核心靶点, 利用 David 数据库对潜在的核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 并构建“活性成分-靶点-通路”网络。结果 从丝穗金粟兰水提物中共鉴定 45 个成分, 包括有机酸类、黄酮类、香豆素类、倍半萜类、含氮类化合物; 筛选出 33 种活性成分, 活性成分与疾病交集靶点 70 个; 通过 PPI 网络筛选出核心靶点 13 个; 富集分析显示, 丝穗金粟兰主要参与蛋白磷酸酶结合、胰岛素受体结合、蛋白激酶活性等功能, 通过酪氨酸激酶受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、酪氨酸激酶抑制剂耐药等通路抗炎镇痛。通过对“活性成分-靶点-通路”网络分析进一步得到 5 个关键靶点和 8 个关键活性成分。结论 通过结合 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学的方法阐明了丝穗金粟兰是通过多成分、多靶点、多途径发挥抗炎镇痛的作用, 为丝穗金粟兰的进一步质量评价及药理活性的研究提供参考。

关键词: 丝穗金粟兰; 抗炎镇痛; 活性成分; 药效物质基础; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学; 木犀草素; 绿原酸; 新绿原酸; 迷迭香酸; 依斯坦布林 A; 莽草酸; 石竹素; 原儿茶酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3903-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.017

Anti-inflammatory and analgesic substances and mechanisms of aqueous extracts of *Chloranthus fortune* based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology

ZHEN Dan-dan¹, HUANG Yao-bin², LU Xian-xing³, CHEN Jing-min⁴, QIU Qin¹, ZHANG Miao¹, SHI Jun-hao¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China

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

3. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

4. Yulin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yulin 537100, China

Abstract: Objective To analyze the main components of the aqueous extract of *Chloranthus fortune* by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and predict its anti-inflammatory and analgesic

收稿日期: 2022-12-01

基金项目: 广西中医药大学“桂派杏林青年英才”培养项目 (2022C032); 中药学广西一流学科 (桂教科研[2018]12 号); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研[2013]20 号); 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字[2014]32 号); 广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目 (J13162); 广西重点学科壮药学 (桂教科研[2013]16 号); 国家重点研发计划资助项目 (2019YFC1712300)

作者简介: 甄丹丹 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药与药学的科研与教学。E-mail: 8zhen@163.com

***通信作者:** 陈景敏 (1975—), 女, 本科, 副主任护师, 从事脑病临床护理和医院药学工作。E-mail: 294363022@qq.com

#共同第一作者: 黄耀斌 (1983—), 男, 本科, 主管中药师, 从事药学科研究和医院药学工作。E-mail: 350365847@qq.com

potent substances and mechanisms by combining network pharmacology methods. **Methods** Based on ChemSpider database, mzCloud platform and existing literature research, the secondary mass spectra of target compounds were compared and confirmed to identify the chemical composition of the aqueous extracts of *C. fortune*. The active ingredients of the aqueous extracts of *C. fortune* were screened by the FAFDrug4 database. The constituent targets of *C. fortune* were predicted using the PharmMapper platform and Uniprot database. The relevant disease targets were obtained using GeneCards platform, and the intersection targets of constituents and diseases were obtained using Venny platform. PPI network was constructed by using String database and Cytoscape 3.7.0 software, and the core targets were screened. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of potential core targets were performed by using David database, and “active ingredient-target-pathway” network was constructed. **Results** A total of 45 components, including organic acids, flavonoids, coumarins, sesquiterpenoids and nitrogen-containing compounds, were identified from the aqueous extracts of *C. fortune*. A total of 33 active components were screened and 70 active components and disease intersection targets were identified. A total of 13 core targets were screened through PPI network. Enrichment analysis showed that *C. fortune* mainly participated in protein phosphatase binding, insulin receptor binding, protein kinase activity and other functions, and presented the effects of resisting inflammation and pain through tyrosine kinase receptor signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, tyrosine kinase inhibitor resistance and other pathways. Five key targets and eight key active components were further obtained through the analysis of the “active ingredient-target-pathway” network. **Conclusion** By combining UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology, it is clarified that *C. fortune* plays an anti-inflammatory and analgesic role through multi-component, multi-target and multi-channel, which provides reference for further quality evaluation and pharmacological activity research of *C. fortune*.

Key words: *Chloranthus fortune* (A. Gray) Solms-Laub; anti-inflammatory and analgesic activity; active components; pharmacophore basis; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; luteolin; chlorogenic acid; neochlorogenic acid; rosmarinic acid; istanbulin A; shikimic acid; epoxycaryophyllene; protocatechuic acid

丝穗金粟兰为金粟兰属植物丝穗金粟兰 *Chloranthus fortune* (A. Gray) Solms-Laub 的全草，有祛风散寒、活血止痛、解毒消肿的功效，适用于治疗类风湿关节炎、跌打肿痛、慢性肠胃炎、疮疖肿毒等。目前对其抗炎镇痛药效物质基础的研究鲜有报道。中药化学成分复杂，传统的鉴别方法在未知成分的结构解析方面存在一定困难。液质联用技术将液相与质谱的优势相结合，可以快速分离和鉴定中药中的复杂成分，在中药的成分分析、质量控制及中药血清药物化学方面具有一定优势^[1]。网络药理学是大数据背景下的产物，融合了多门学科的概念和方法，通过构建“药物活性成分-疾病-靶点”网络，可以从整体上分析多成分中药的作用机制。因此，广泛运用于中药或民族药的研究中^[2-3]。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对丝穗金粟兰水提物中的化学成分进行解析并采用网络药理学的方法对其抗炎和镇痛潜在药效物质及作用机制进行预测，为丝穗金粟兰今后药理活性及质量标准的研究提供数据支撑。

1 材料

1.1 药材与试剂

丝穗金粟兰采自广西来宾市金秀县，经广西中医药大学朱意麟实验师鉴定为金粟兰属植物丝穗金

粟兰 *C. fortune* (A. Gray) Solms-Laub 的全草。乙腈和甲醇均为质谱纯，购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；水为超纯水，购自美国默克公司；甲酸和乙酸铵均为质谱纯，购自上海安谱科学仪器有限公司。

1.2 仪器

TripleTOF 5600 型高分辨质谱仪（美国 SCIEX 公司）；UltiMate 3000 型超高效液相色谱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取丝穗金粟兰药材剪碎成 1 cm 大小，称取 500 g，加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min，回流提取 2 次，每次 1.5 h，用医疗纱布滤过，合并 2 次滤液并浓缩成浸膏，精密称取丝穗金粟兰水提物浸膏 250 mg，转移置 10 mL 量瓶中并加入 50% 甲醇溶液，定容至刻度，超声 15 min，滤过后滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.2 色谱条件

Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；正离子模式流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈（B），负离子模式流动相为 2 mmol/L 乙酸铵溶液（A）-乙腈（B）。正、负离子

均梯度洗脱: 0~1.5 min, 5% B; 1.5~2.5 min, 5%~10% B; 2.5~14 min, 10%~40% B; 14~22 min, 40%~95% B; 22~25 min, 95% B; 25~26 min, 95%~5% B; 26~30 min, 5% B。体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 3 μ L。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源; 雾化气压 60 psi (1 psi=6.895 kPa); 辅助气压 60 psi; 气帘气压 35 psi; 温度 650 °C; 喷雾电压 5000 V (正离子模式) 或 -4000 V (负离子模式), 在每个数据采集循环中, 筛选出强度最强且大于 100 的分子离子进行采集对应的二级质谱数据。一级采集范围 m/z 50~1200, 轰击能量 30 eV, 每 50 毫秒采集 10 张二级谱图。

2.4 丝穗金粟兰活性成分和靶点筛选

将解析得到的丝穗金粟兰成分上传至 FAFDrug4 (fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr) 数据库进行活性成分的筛选^[4]。

2.5 炎症和疼痛的靶点筛选

将获取的丝穗金粟兰活性成分导入 Phrammapper (<http://www.lilab-ecust.cn/phrammapper/>) 平台预测潜在的作用靶点, 使用 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 平台进行校正。采用 GeneCards (<http://www.genecards.org/>) 平台, 分别以炎症 (inflammation) 和疼痛 (pain) 为检索词, 进行搜索, 获得疾病靶点, 并分别取前 10% 作为候选靶点, 利用 Venny 平台获得成分和疾病的交集靶点作为潜在抗炎和镇痛的药效靶点。

2.6 交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建及富集分析

将交集靶点上传 String (<https://string-db.org/>) 数据库, 筛选条件为 “Homo sapien”, 置信度为 0.9, 构建 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.7.0 软件中 Network Analyser 插件进行分析, 获取丝穗金粟兰抗炎镇痛的核心靶点, 筛选条件为大于介数中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 和度值这 3 项的平均值。利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对潜在的核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.7 “活性成分-靶点-通路”网络构建

将核心靶点、与核心靶点相关的活性成分、关键通路导入到 Cytoscape 3.7.0 软件中, 构建 “活

成分-靶点-通路”网络, 并以高于 BC、CC 和度值这 3 项的平均值为条件筛选出核心成分。

3 结果

3.1 丝穗金粟兰水提物成分分析

将丝穗金粟兰水提物样品按 “2.2” “2.3” 项下条件进行分析, 得到丝穗金粟兰水提物样品在正、负离子模式下的总离子流图, 见图 1。采用 Peakview1.2 计算分子式, 对比理论值和实际值, 结合 ChemSpider、mzCloud 和维谱数据库及现有文献研究, 从丝穗金粟兰水提物中共推测了 45 个成分, 其中有机酸 25 个、黄酮类 3 个、香豆素类 7 个、倍半萜 5 个、含氮类有机物 5 个, 具体信息见表 1。

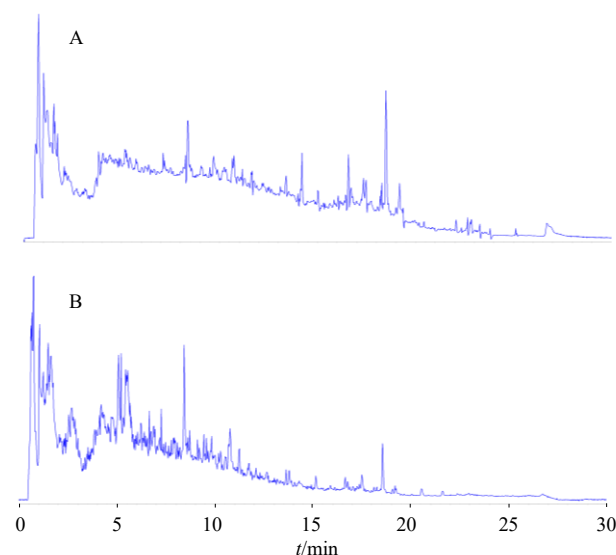


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下丝穗金粟兰水提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of aqueous extract of *C. fortune* in positive (A) and negative (B) ion modes

3.2 网络药理学预测分析

3.2.1 丝穗金粟兰活性成分的筛选及药效靶点的预测 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的分析结果得到丝穗金粟兰成分 45 种, 经 FAFDrugs4 数据库筛选, 获得 33 种主要活性成分 (表 1), 包括绿原酸、新绿原酸、迷迭香酸等。将上述 33 种活性成分导入到 Phrammapper 数据库, 并利用 UniProt 数据库进行查询, 去重后共收集到 457 个靶点。

3.2.2 炎症和疼痛相关靶点筛选 在 GeneCards 数据库中检索获得与炎症相关的靶点 1090 个, 与疼痛相关的靶点 1218 个。与活性成分 457 个靶点匹配后, 交集得到 70 个丝穗金粟兰抗炎镇痛的潜在作用靶点, 见图 2。

表 1 丝穗金粟兰水提取物中化学成分的鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents in aqueous extracts of *C. fortune*

序号	t _R /min	分子式	离子模式	分子离子峰 (<i>m/z</i>)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 (<i>m/z</i>)	鉴定	类别
				理论值	实测值				
1	0.52	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.019 7	191.020 4	3.5	129.019 4, 111.009 1	柠檬酸 ^[5]	a
2	0.55	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.014 3	133.014 7	3.4	133.013 9, 115.003 9	苹果酸 ^[6]	a
3	0.65	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175.119 0	175.118 1	-4.9	158.092 8, 130.096 9, 116.071 5	精氨酸 ^[7]	c
4	0.66	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.056 1	191.056 7	2.6	191.056 6, 173.045 7, 127.040 8	奎宁酸 ^[8-9]	a
5	0.84	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.045 6	197.045 5	-0.3	179.035 2, 135.045 6, 123.044 5	丹参素 ^[6]	a
6	0.94	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.019 3	153.019 4	0.5	153.019 6, 109.030 0, 108.022 3	原儿茶酸 ^[10]	a
7	1.02	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	151.040 1	151.040 5	2.6	109.030 1	香草醛 ^[11]	a
8	1.12	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	182.081 2	182.080 4	-4.2	182.082 9, 147.042 8, 136.075 8, 123.044 3	酪氨酸 ^[12]	c
9	1.16	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.104 0	268.103 8	-0.9	136.062 1	腺苷 ^[13]	c
10	1.23	C ₅ H ₅ N ₃ O	[M+H] ⁺	152.056 7	152.055 9	-5.2	135.029 7, 110.035 5	鸟嘌呤 ^[14]	c
11	1.48	C ₈ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	167.035 0	167.034 7	-1.8	123.046 7	香草酸 ^[15]	a
12	1.51	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.035 0	179.035 0	0.1	179.035 0, 135.045 8, 107.050 2	咖啡酸 ^[16]	a
13	1.90	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.040 1	163.040 5	2.6	163.038 5, 119.050 7	对香豆酸 ^[17]	a
14	2.29	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	537.103 9	537.105 5	3.1	339.051 7, 295.061 1, 179.036 3	紫草酸 ^[18]	a
15	2.33	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 8	353.086 4	-4.0	191.056 0, 179.035 6, 173.046 5, 135.045 7	新绿原酸 ^[19-20]	a
16	2.52	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 4	137.024 4	-0.1	137.023 7	3-羟基苯甲酸 ^[8]	a
17	2.68	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 8	353.087 2	-1.7	191.056 4, 179.035 2, 173.046 0, 135.045 8	绿原酸 ^[19-20]	a
18	2.89	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 8	353.087 6	-0.6	191.056 2, 179.035 1, 173.045 6, 135.045 5	隐绿原酸 ^[19-20]	a
19	3.60	C ₉ H ₁₀ O ₂	[M-H] ⁻	149.060 8	149.061 4	4.0	149.060 2, 121.028 9	4-乙烯基愈创木酚 ^[6]	a
20	4.38	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 6	193.050 4	-1.2	178.026 5, 149.059 8, 134.038 0	异阿魏酸 ^[21]	a
21	4.54	C ₉ H ₈ O ₂	[M-H] ⁻	147.045 2	147.045 6	3.1	103.056 8	肉桂酸 ^[8]	a
22	4.82	C ₁₀ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	207.029 9	207.029 3	-2.9	192.005 9	秦皮素 ^[22]	c
23	4.87	C ₅ H ₅ N ₃	[M+H] ⁺	136.061 8	136.617 0	-0.1	136.062 6, 119.036 6	腺嘌呤 ^[23]	c
24	5.07	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	521.130 1	521.130 2	0.2	359.094 1, 197.046 8, 161.025 2, 135.045 9	4-O-吡喃葡萄糖基 迷迭香酸 ^[20]	a
25	5.36	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	151.040 1	151.040 7	4.2	151.040 6, 136.016 0, 108.022 2	尼泊金甲酯 ^[6]	a
26	5.45	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻	359.077 2	359.077 5	0.7	197.046 4, 179.035 8, 161.025 5, 135.046 4	迷迭香酸 ^[19-20]	a
27	6.01	C ₉ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	177.019 3	177.019 9	3.2	177.019 0, 149.024 3, 133.030 1, 105.035 4	秦皮乙素 ^[24]	c
28	6.24	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.119 5	515.199 2	-0.4	353.089 5, 191.055 9, 173.046 5	异绿原酸 b ^[25]	a
29	6.31	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	227.091 4	227.090 2	-5.3	149.094 6, 209.079 1	京尼平 ^[26]	b
30	6.46	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	221.045 6	221.045 0	0.4	190.997 9, 177.092 5	异嗟皮啶 ^[19-20]	c
31	6.55	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 2	195.063 9	-6.6	195.065 4, 177.052 5, 149.078 1	阿魏酸 ^[16]	a
32	6.58	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.119 5	515.119 3	-0.6	353.088 3, 191.057 4, 173.045 6	异绿原酸 a ^[25]	a
33	6.79	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.119 5	515.117 1	-4.7	353.087 6, 191.054 6, 173.045 3	异绿原酸 c ^[25]	a
34	7.11	C ₉ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	147.044 1	147.044 1	0	147.044 4, 119.049 7	香豆酸 ^[27]	c
35	7.91	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	221.045 6	221.046 5	4.3	206.023 2	秦皮素啶 ^[22]	c
36	7.96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.088 8	463.088 7	1.1	300.028 3, 301.037 0, 271.025 3, 255.029 7	异槲皮苷 ^[28]	b
37	8.47	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	[M+H] ⁺	325.091 8	325.092 2	1.3	163.038 7, 145.026 4, 135.043 2	茵芋苷 ^[29]	c
38	8.56	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M-H] ⁻	263.128 9	263.128 8	-0.3	219.139 6, 125.060 6	依斯坦布林 A ^[19]	d
39	8.63	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.055 0	287.053 5	-5.3	213.054 8, 153.018 5	木犀草素 ^[30-31]	b
40	8.70	C ₉ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	163.039 0	163.038 4	-3.7	163.039 8, 145.028 8, 135.044 3, 117.034 7, 107.050 3	伞形花内酯 ^[29]	c
41	9.25	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	[M+H] ⁺	249.148 5	249.148 3	-0.9	231.137 5, 213.125 4, 203.142 6, 163.110 8	白术内酯III ^[15]	d
42	12.61	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	[M-H] ⁻	261.113 2	261.113 3	0.3	217.122 8, 147.086 3	8β,9α-二羟基林丹- 4(5),7(11)-二烯- 8α,12 内酯 ^[19]	d
43	12.81	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	231.139 6	231.137 9	-0.3	213.126 3, 185.132 7, 157.100 9	白术内酯I ^[15]	d
44	19.03	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	233.153 6	233.153 4	-0.9	215.142 9, 187.147 7, 145.101 0	白术内酯II ^[15]	d
45	20.71	C ₁₅ H ₂₄ O	[M+H] ⁺	221.190 0	218.990 0	0.4	203.178 7, 221.189 0	石竹素 ^[32]	a

a~c 依次为有机酸类、黄酮类、香豆素类、倍半萜类、含氮类化合物

a~c are organic acids, flavonoids, coumarins, sesquiterpenes and nitrogenous compounds

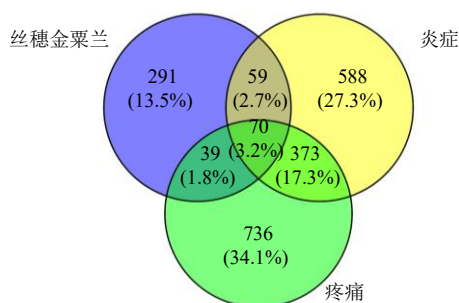


图 2 丝穗金粟兰活性成分-抗炎镇痛靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of active ingredient-anti-inflammatory and analgesic targets of *C. fortune*

3.2.3 PPI 网络 将上述活性成分抗炎镇痛的 70 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库平台, 得到由 54 个节点及 182 条边组成的 PPI 网络, 见图 3, 节点代表潜在作用靶点, 图中节点越大表示该节点度值越大。进一步应用 Cytoscape 3.7.0 软件计算网络节点的拓扑参数, 度值、BC、CC 的平均数依次为 6.740、0.028、0.418, 基于以上 3 个参数进行筛选, 最终得到 13 个核心靶点, 见表 2。

3.2.4 GO 功能富集分析 通过 David 数据平台对 13 个核心靶点进行生物功能分析, 以 $P < 0.01$ 为条件, 共筛选得到 189 个 GO 条目, 其中生物过程 139 条、细胞组成 22 条、分子功能 27 条。将生物过程、分子功能和细胞组成中排名前 10 的条目绘制成图 (图 4), 基因数代表主要活性成分富集在该通路下

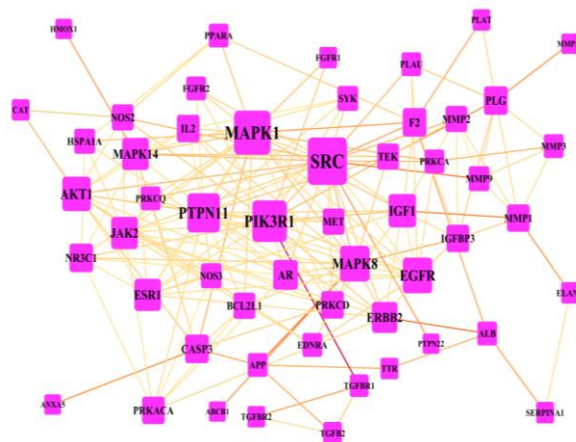


图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI network

表 2 核心靶点

Table 2 Core targets

靶点	度值	BC	CC
SRC	24	0.20	0.60
MAPK1	21	0.13	0.55
PIK3R1	19	0.13	0.55
PTPN11	17	0.05	0.52
MAPK8	14	0.11	0.51
EGFR	14	0.04	0.51
AKT1	13	0.05	0.49
IGF1	12	0.06	0.51
MAPK14	11	0.06	0.48
ERBB2	11	0.05	0.48
CASP3	8	0.06	0.45
IGFBP3	7	0.03	0.43
F2	8	0.06	0.46

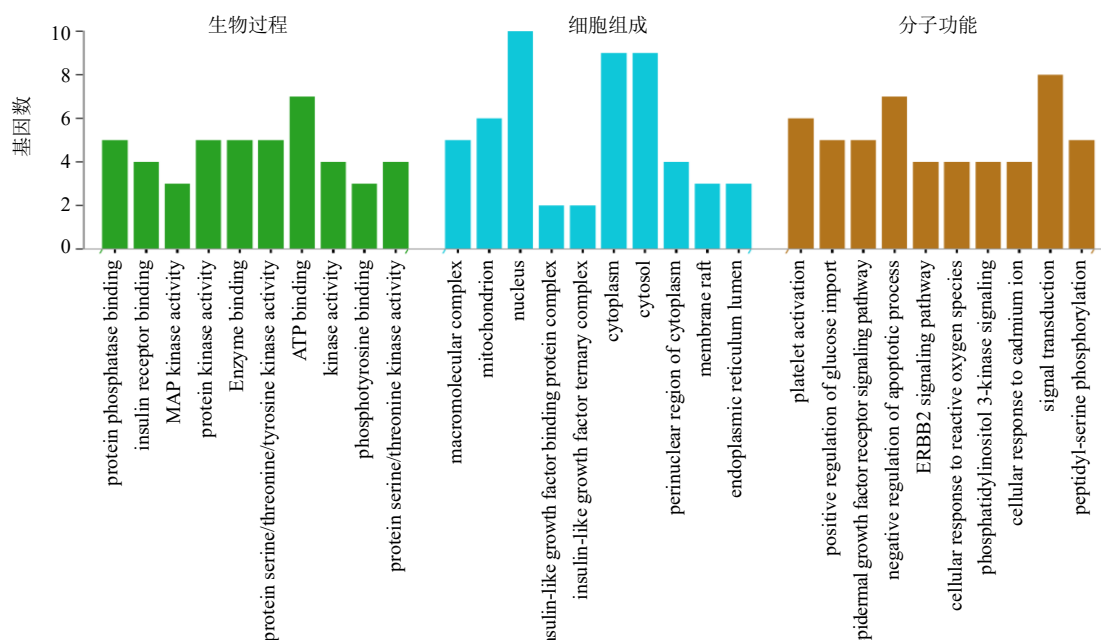


图 4 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 4 GO function enrichment analysis (top 10)

的靶点数目。结果显示,生物过程方面,丝穗金粟兰活性成分主要参与蛋白磷酸酶结合、胰岛素受体结合、蛋白激酶活性等;细胞组成方面,主要参与细胞核、线粒体、分子复合物等;分子功能主要涉及血小板激活、信号传导、凋亡过程的负调控等。综上所述,丝穗金粟兰的活性成分可通过调控多种生物学途径联合发挥抗炎镇痛作用。

3.2.5 KEGG 通路富集分析 通过 David 数据平台将潜在作用靶点与 KEGG 信号通路进行匹配,以 $P < 0.01$ 为筛选条件,共富集得到信号转导 Ras 信号通路、酪氨酸激酶受体 ErbB2 信号通路、FoxO 信号通路等 128 条。结合文献研究,筛选出 P 值最小的前 16 条信号通路进行后续研究,并绘制气泡图(图 5)。图中节点越大,表示富集在这条通路上的靶点数量越多。

3.2.6 “活性成分-靶点-通路”网络 将丝穗金粟兰活性成分、潜在靶点、前 16 条 KEGG 通路导入到 Cytoscape 3.7.0 软件,构建“活性成分-靶点-通路”网络见图 6。该网络共有 62 个节点,321 条相互作用连线,其中红色节点代表活性成分,共 33 个;黄色节点代表 13 个核心潜在作用靶点;紫色节点代表通路,共 16 条。节点越大,度值越高。应用 Network Analyzer 分析对网络进行分析,活性成分的度值、BC、CC 的平均数依次为 6.727、0.004、0.501;关键靶点的度值、BC、CC 的平均数依次为 24.692、

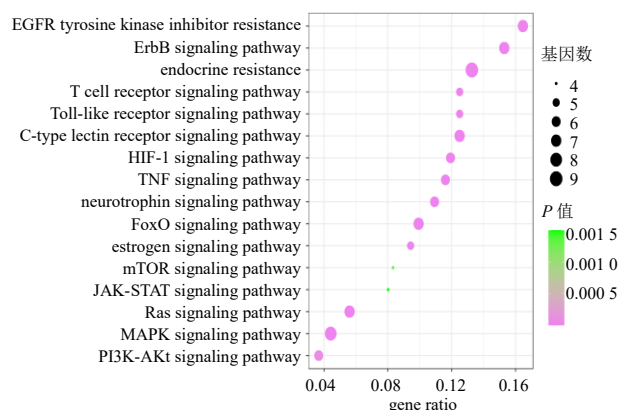


图 5 KEGG 通路富集分析 (前 16)

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis (top 16)

0.063、0.521。基于以上 3 个参数进行筛选,最终得到 5 个核心靶点,依次为蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、非受体酪氨酸激酶 (sarcoma receptor coactivator, SRC)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和内糖苷酶 F2; 8 个关键活性成分,分别为木犀草素、绿原酸、新绿原酸、迷迭香酸、依斯布林 A、莽草酸、石竹素和原儿茶酸。通过分析网络图发现,丝穗金粟兰活性成分中,同一活性成分能同时作用于多个靶点,而相同靶点亦对应多种活性成分,说明丝穗金粟兰化学成分能够多成分、多靶点发挥治疗抗炎和镇痛作用。

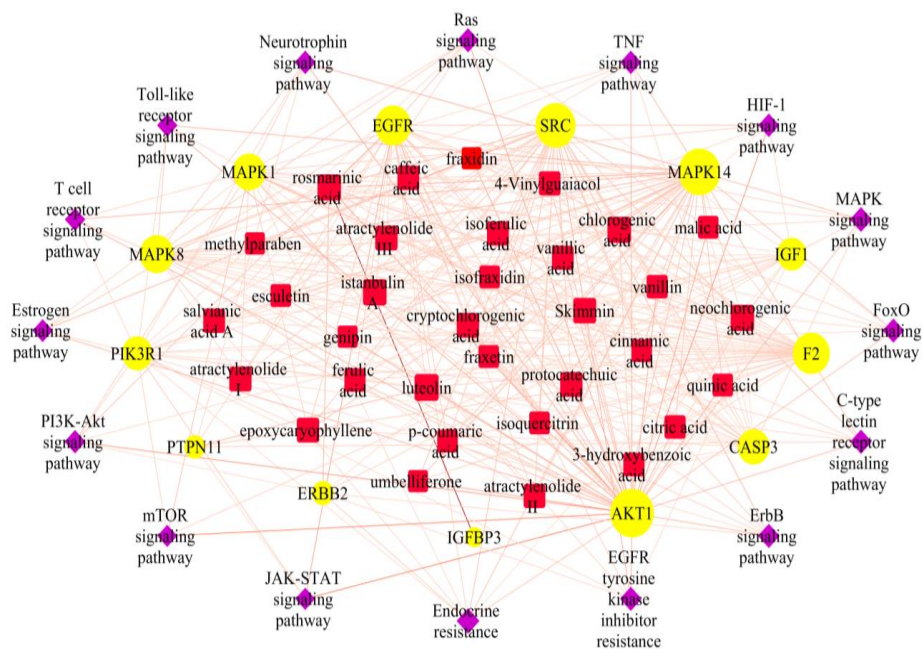


图 6 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 6 “Active ingredient-target-pathway” network

4 讨论

本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术从丝穗金粟兰水提物中解析出 45 种化学成分, 其中有机酸 25 个、黄酮类 3 个、香豆素类 7 个、倍半萜 5 个、含氮类有机物 5 个。运用网络药理学的方法, 本研究共筛选出丝穗金粟兰水提物活性成分 33 个, 与抗炎镇痛相关的靶点 70 个, 涉及 AKT1、F2、MAPK14、SRC、EGFR、ErbB2、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, CASP3)、MAPK8 等核心靶点, 说明丝穗金粟兰发挥抗炎和镇痛作用具有多成分、多靶点的优势。针对上述“活性成分-靶点-通路”网络分析, 发现原儿茶酸、木犀草素、绿原酸、新绿原酸、迷迭香酸、依斯坦布林 A、莽草酸、石竹素 8 个活性成分在网络中度值较大。研究表明, 原儿茶酸可以抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 的分泌, 对多数炎症性疾病有一定治疗作用^[33-34]。绿原酸类成分是具有解热、镇痛、抗炎作用的一类成分, 能够通过抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活, 从而减轻炎症的发生^[35]。此外, 绿原酸与 AKT1、CASP3、F2、IGF1、MAPK14、MAPK8、磷脂酰肌醇-3 激酶调节亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、SRC 这 8 个靶点有关联。此外, 原儿茶酸也可以通过调节沉默信息调节因子 1 (SIRT1)/NF- κ B 途径抑制脂多糖激活的 BV₂ 小胶质细胞的炎症反应^[36]。通过 PPI 网络分析可知 SRC、MAPK1、PIK3R1、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 11 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor 11, PTPN11)、MAPK8、EGFR、AKT1、IGF1 在网络中所占的度值较大, 极可能为丝穗金粟兰治疗炎症和疼痛性疾病过程中发挥重要作用的关键靶标。

为进一步研究丝穗金粟兰抗炎镇痛的潜在机制, 对 PPI 网络筛选出的 13 个核心靶点通路富集分析得到 128 个富集条目, 其中 ErbB 信号通路、TNF 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等条目 P 值显著性较高 ($P < 0.01$), 可能为其发挥抗炎镇痛作用重要通路之一。TNF 是一种促炎细胞因子, 其异常分泌可导致炎症的发生, 研究表明可以通过调

控 TNF 信号通路发挥抗炎镇痛的作用^[37]。免疫系统的细胞表达存在各种模式识别受体, 这些受体在清除病原体时会存在无法区分自身和非自身分子, 持续的 TLR 信号传导会导致炎症性疾病。TLR 是最显著的模式识别受体, 其在对病原体感应时会引起炎症反应, TLR 拮抗剂的开发是目前免疫疾病研究的热点^[38]。本研究发现 13 个潜在靶点中有 3 个富集在 Toll 样信号通路上, 分别为 MAPK8、MAPK1、AKT1、PIK3R1、MAPK14, 可能为丝穗金粟兰调控该通路的关键靶点。

综上, 丝穗金粟兰可能通过原儿茶酸、木犀草素、绿原酸、新绿原酸、迷迭香酸、依斯坦布林 A、隐绿原酸等 33 个成分调控 SRC、MAPK1、PIK3R1、PTPN11、MAPK8、EGFR、AKT1、IGF 等 13 个核心靶点进而影响 ErbB 信号通路、TNF 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等 16 条通路来发挥抗炎镇痛作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu L L, Tang X L, Hao F R, et al. Hepatotoxicity and nephrotoxicity assessment on ethanol extract of *Fructus Psoraleae* in Sprague Dawley rats using a UPLC-Q-TOF-MS analysis of serum metabolomics [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(6): e5064.
- [2] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [3] Meng Y X, Li X J, Guan J Q. Network-based pharmacology to predict the mechanism of Ginger and *Forsythia* combined treatment of viral pneumonia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2021, 14(9): 964-971.
- [4] Lagorce D, Bouslama L, Becot J, et al. FAF-Drugs4: Free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(22): 3658-3660.
- [5] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [6] 侯小涛, 韦棣婷, 夏中尚, 等. 基于血清药物化学的厚藤治疗急性痛风性关节炎质量标志物研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2638-2652.
- [7] 侯娅, 马阳, 邹立思, 等. 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术的不同产地太子参水提物化学组成分析 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(15): 275-280.
- [8] Li J, Wang S P, Wang Y Q, et al. Comparative metabolism study on chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and neochlorogenic acid using UHPLC-Q-TOF MS coupled with network pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(3): 212-224.
- [9] 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术分

- 析黄连中非生物碱类成分 [J]. 中药材, 2020, 43(2): 354-358.
- [10] 杨璐萌, 杨凌鉴, 贾璞, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的广枣果肉化学成分分析 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(2): 159-166.
- [11] 王少敏, 胡青, 季申. GC/MS 法和 UPLC/Q-TOF-MS 法研究丹香冠心注射液中的有效成分 [J]. 中成药, 2012, 34(1): 78-84.
- [12] 蒋鹏娜, 李竹英, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的平喘颗粒化学成分分析 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(5): 42-53.
- [13] 王艺, 冯丽萍, 黄李璐, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术快速鉴定木芙蓉花化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(12): 2042-2052.
- [14] 张水寒, 蔡萍, 陈林, 等. 高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱分析雪峰虫草化学成分 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 817-821.
- [15] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5496-5513.
- [16] 李志强, 张皓男, 何明珍, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF/MS 分析的长鞭红景天化学成分及其体外抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2361-2365.
- [17] 晏利芝, 王英锋, 余启荣. 大鼠灌胃白花蛇舌草有效部位提取物血浆中代谢产物的液质分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1301-1304.
- [18] Chen Y, 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.
- [19] Lin P, Dai Y, Yao Z H, et al. Metabolic profiles and pharmacokinetics of Qingre Xiaoyanning Capsule, a traditional Chinese medicine prescription of *Sarcandrae Herba*, in rats by UHPLC coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(4): 784-796.
- [20] Zhou H, Liang J L, Lv D, et al. Characterization of phenolics of *Sarcandra glabra* by non-targeted high-performance liquid chromatography fingerprinting and following targeted electrospray ionisation tandem mass spectrometry/time-of-flight mass spectrometry analyses [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2390-2398.
- [21] 孙进华, 李先荣. UPLC-LTQ-Orbitrap 快速鉴定丹参川芎嗪注射液中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 64-67.
- [22] 苏日娜, 罗维早, 魏荣锐, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术的特色藏族药高原荨麻化学成分快速识别研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1607-1614.
- [23] 宋玉玲, 汪海林. 超高效液相色谱-串联质谱法测定氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷 [J]. 色谱, 2010, 28(12): 1123-1127.
- [24] 黄斌, 胡燕珍, 李雪, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析乌蕨中的化学成分 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(9): 155-159.
- [25] 兰晓燕, 朱龙波, 黄显章, 等. 艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7630-7637.
- [26] 王晓燕, 张丽, 王添琦, 等. 梔子化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 407-410.
- [27] 高越. 基于组学和网络药理学的养心氏片抗心衰作用机理研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [28] 谭林威, 金辉辉, 刘永祥, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析肠炎宁片中主要化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4124-4132.
- [29] 顿珠次仁, 邓敏芝, 朱根华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速分析裂叶独活中香豆素类成分 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(1): 105-114.
- [30] 孙彩虹, 田野, 李瑞明, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学的连夏消痞颗粒治疗功能性消化不良的潜在药效物质基础研究 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(1): 44-51.
- [31] 吕渭升, 位翠杰, 潘晓君, 等. UPLC-MS/MS 法分析旋覆花蜜炙后化学成分的变化 [J]. 中国药房, 2021, 32(20): 2478-2484.
- [32] 李佳美, 徐伟, 张雪, 等. 基于 HPLC-MS/MS 对枇杷叶水提组分分析及萜类物质的结构鉴定 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 295-303.
- [33] 刘畅, 程晓丹, 孙家安, 等. 绿原酸通过调控 miR-223/NLRP3 轴减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2022, 47(3): 280-288.
- [34] Wu H Q, Wang J, Zhao Q, et al. Protocatechuic acid inhibits proliferation, migration and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 969-976.
- [35] Zhou X F, Zhang B W, Zhao X L, et al. Chlorogenic acid supplementation ameliorates hyperuricemia, relieves renal inflammation, and modulates intestinal homeostasis [J]. *Food Funct*, 2021, 12(12): 5637-5649.
- [36] Kaewmool C, Kongtawelert P, Phitak T, et al. Protocatechuic acid inhibits inflammatory responses in LPS-activated BV₂ microglia via regulating SIRT1/NF- κ B pathway contributed to the suppression of microglial activation-induced PC12 cell apoptosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2020, 341: 577164.
- [37] Conaghan P G, Cook A D, Hamilton J A, et al. Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(6): 355-363.
- [38] Tiotiu A, Kermani N Z, Badi Y, et al. U. Sputum macrophage diversity and activation in asthma: Role of severity and inflammatory phenotype [J]. *Allergy*, 2021, 76(3): 775-788.

[责任编辑 李亚楠]