

· 监管技术 ·

基于网络药理学和分子对接的四妙凉血颗粒质量控制研究

石文清¹, 唐春丽^{2*}, 杨力龙², 黄庆², 农必华², 林忆龙³ (1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

摘要 目的: 通过网络药理学和分子对接筛选四妙凉血颗粒(SMLXC)对急性痛风性关节炎(AGA)的潜在有效成分, 并测定SMLXC中3个成分的含量。方法: 通过TCMSP和BATMAN-TCM数据库, 获取SMLXC中药材的活性成分, 同时检索TCMSP、Swiss Target Prediction、STITCH数据库进行靶点预测。使用OMIM、GeneCards数据库查找AGA疾病靶点, 通过Venny 2.1软件筛选成分靶点和疾病靶点的交集作为SMLXC治疗AGA的作用靶点。通过David数据库进行GO和KEGG富集分析。通过靶点网络分析, 寻找相关通路的关键靶点。使用Discovery Studio进行分子对接, 筛选抗炎核心成分, 通过高效液相色谱法测定其中3个成分的含量。结果: 筛选出与SMLXC相关的活性化合物102个, 药物相关靶点239个; SMLXC与AGA的共同靶点30个; GO富集分析显示, SMLXC治疗痛风主要与细胞因子的活性调控、炎症反应等109条生物过程有关; KEGG富集分析显示, SMLXC可能通过TNF、NLRs和TLR等信号通路治疗痛风; 可视化分析显示, PTGS2、MAPK14、MAPK1、IL-6等12个靶点可能是SMLXC治疗AGA的关键靶点; 分子对接结果显示, 小檗碱、落新妇苷等5个化合物与PTGS2有良好的对接活性。含量测定实验结果表明, SMLXC中含量测定结果由高到低依次分别为小檗碱($2.0008 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、落新妇苷($1.6583 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、山奈酚($1.5428 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。结论: SMLXC通过干预炎症、细胞因子的活性调控等相关通路达到治疗AGA的作用, 建立的SMLXC的含量测定方法准确、稳定, 为控制SMLXC的质量提供实验依据。

关键词: 四妙凉血颗粒; 急性痛风性关节炎; 网络药理学; 分子对接; 质量控制

中图分类号: R917; R614 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)05-0511-15
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.05.005

Study on Quality Control of Simiao Liangxue Capsules Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Shi Wenqing¹, Tang Chunli^{2*}, Yang Lilong², Huang Qing², Nong Bihua², Lin Yilong³ (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. The First Affiliated Hospital to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract Objective: The potential effective ingredients of Simiao Liangxue capsule (SMLXC) against acute gouty arthritis (AGA) were to be screened by network pharmacology and molecular docking, and the content

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号 2020GXNSFAA259059)

作者简介: 石文清 Tel: 13077611756; E-mail: 1479812799@qq.com

通信作者: 唐春丽 Tel: 18978913964; E-mail: 1207298289@qq.com

of three anti-inflammatory components in SMLXC was to be determined. **Methods:** The active compounds of SMLXC were obtained from TCMSP and BATMAN-TCM databases, and target prediction was performed by retrieving TCMSP, Swiss Target Prediction and STITCH databases. The AGA-related disease targets were retrieved by OMIM and GeneCards databases. The intersection of ingredient targets and disease targets screened by Venny 2.1 software was taken as SMLXC therapeutic targets against AGA. GO and KEGG enrichment analyses were performed by DAVID database. Through target network analysis, the key targets of related pathways were found. The anti-inflammatory core components were screened by Discovery Studio to conduct molecular docking, and the content of three components in SMLXC was determined by high performance liquid chromatography. **Results:** A total of 102 active compounds related to SMLXC, 239 drug-related targets and 30 shared targets of SMLXC and AGA were screened. GO enrichment analysis indicated that the SMLXC treatment for gout might be related to 109 biological processes, such as the active regulation of cytokine and inflammatory response. KEGG enrichment analysis also showed that SMLXC might treat gout through signaling pathways, including TNF, NLRs and TLR. Visualization analysis indicated that 12 targets, including PTGS2, MAPK14, MAPK1, and IL-6, might be the key targets for SMLXC treatment of AGA. The results of molecular docking showed that five compounds including berberine and astilbin, etc. had good docking activity with PTGS2. The results of the content determination showed that the content of berberine in SMLXC was the highest ($2.0008 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), followed by astilbin ($1.6583 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) and kaempferol ($1.5428 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). **Conclusion:** SMLXC might achieve the therapeutic effect against AGA by intervening in inflammation, active regulation of cytokines and other related pathways, and an accurate and stable content determination method of SMLXC was established, which may lay an experimental basis for controlling the quality of SMLXC.

Keywords: Simiao Liangxue capsules; acute gouty arthritis; network pharmacology; molecular docking; quality control

急性痛风性关节炎 (Acute Gout Arthritis, AGA) 是临床常见炎症性关节疾病, 临床特点为起病急、病情重、变化快, 临床常用治疗药物有非甾体抗炎药、糖皮质激素等^[1], 不良反应明显, 如消化不良、恶心、呕吐、肝毒性、肾毒性等。因此, 需不断从丰富的中药资源中寻找能够有效治疗AGA的药物。四妙汤出自《疡医大全》, 由黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝组方而成, 具有清热祛湿、宣痹止痛的功效, 主治痛风之湿热蕴结之证^[2], 是治疗AGA代表性的方剂。四妙凉血方是广西中医药大学第一附属医院基于四妙汤方加减药味而得, 由黄柏、苍术、王不留行、牛膝、薏仁等12味中药组成, 对AGA治疗效果显著。课题组拟将该方开发成四妙凉血颗粒 (Simiao Liangxue Capsule, SMLXC)。前期已经对SMLXC的制备工艺进行了优化研究^[3], 但其作用机制及质量控制尚未进行系统研究。运用网络药理学方法对中药成分进行有效性分析, 并结合高效液相色谱法 (HPLC) 进行

质量控制, 是目前研究的热点^[4]。因此, 本文采用网络药理学方法虚拟筛选活性成分及其作用靶点, 分析作用机制, 指导制剂的含量测定, 为明确SMLXC治疗AGA的作用机制以及进行制剂的质控研究提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A高效液相色谱仪 (日本岛津公司); PRACTUM224-1CN电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); TGL-16G离心机 (上海安亭科学仪器厂); KQ3200B超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GZX-9420MBE电热恒温鼓风干燥箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试药

SMLXC (课题组按照工艺^[3]制备, 规格为20 g/袋, 批号20200401、20211101、20211102、20211103; 苍术、黄柏、王不留行、牛膝、薏仁、土茯苓、萆薢、威灵仙、地龙、丹皮、毛冬青、茯

苓, 均为中药饮片, 购自南宁市宾阳县万润堂本草有限公司中药饮片厂; 对照品小檗碱 (批号110715-201821)、槲皮素 (批号100081-201610)、黄芩素 (批号110715-201821)、山奈酚 (批号110861-202013)、汉黄芩素 (批号111514-201706)、落新妇苷 (批号111798-201805), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇为色谱纯, 购自美国TEDIA试剂公司 (AS1122-801)、水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

1.3 数据库及软件

Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmssp.php>), Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), Stitch (<http://stitch.embl.de/>), Unified Protein Database (UniProt, <https://www.uniprot.org/>), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <https://www.omim.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), Venny (version 2.1, <https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), String (version 11.0, <https://string-db.org/>), Cytoscape (version 3.6.1), David (version 6.7, <https://david-d.ncifcrf.gov/home.jsp>), Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>), Discovery Studio Client (version 16.1.0)。

2 方法

2.1 活性化合物筛选及其潜在作用靶点分析

通过TCMSP和BATMAN-TCM数据库, 以口服生物利用度 (Oral Bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为化合物的筛选条件, 检索12味药材中的活性化合物。在TCMSP和BATMAN-TCM等数据库中, 对所得到的化合物进行靶点预测, 利用UniProt数据库对所有靶点进行靶点蛋白和基因信息校正, 以物种为“Homo Sapiens”的筛选靶点, 进行去重整理, 即得化合物的潜在作用靶点。

2.2 疾病靶点筛选及化合物作用靶点分析

以“Gout Arthritis”为关键词检索OMIM、GeneCards 数据库得到靶点, 通过UniProt数据库校

正基因名, 合并去重, 即得疾病靶点。采用Venny绘制韦恩图, 提取成分靶点和AGA疾病靶点的交集, 作为化合物治疗AGA的作用靶点。

2.3 GO/KEGG富集分析

通过David数据库对作用靶点进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集分析、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析。

2.4 炎症靶点的网络分析和可视化

提取炎症通路中的靶点, 即炎症靶点导入STRING数据库, 设置蛋白种类为“Homo Sapiens”, 最低相互作用评分设置为“Medium Confidence (0.4)”, 隐藏离散靶点, 其余参数默认, 获得靶点互作关系, 保存为TSV格式文件, 导入Cytoscape可视化拓扑网络。

2.5 分子对接

从PubChem数据库下载化合物的SDF格式文件。从PDB数据库中下载蛋白靶点的PDB格式文件, 用Discovery Studio Client软件对蛋白进行去水、加氢处理后, 定义蛋白中原配体的坐标为该蛋白分子对接的活性位点, 进行分子对接^[5], 计算结合能 (Binding Energy)。结合能的数值越低, 表明预测的配体与受体结合越紧密, 筛选结合较强的化合物作为抗炎活性核心成分。

2.6 含量测定

2.6.1 色谱条件

2.6.1.1 落新妇苷色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸 = 15 : 85; 流速: 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 291 nm; 进样量: 10 μ L。

2.6.1.2 山奈酚色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇 (A) - 0.4%磷酸 (B), 0~23 min, 10%B~30%B; 23~78 min, 30%B~55%B。流速: 0.7 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 371 nm; 进样量: 10 μ L。

2.6.1.3 小檗碱色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.3%磷酸 (每100 mL加入十二烷基硫酸钠0.08 g) = 50 : 50; 流速: 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长:

345 nm; 进样量: 10 μL 。

2.6.2 对照品溶液的制备

分别取落新妇苷、山奈酚、小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成小檗碱 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山奈酚 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、落新妇苷 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 即得。

2.6.3 供试品溶液的制备

取SMLXC(批号20200401)约5 g, 精密称定, 置100 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 称重, 超声处理(40 kHz, 100 W) 40 min, 放冷, 再次称重, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 离心($12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液, 即得。

2.6.4 阴性对照溶液的制备

2.6.4.1 落新妇苷阴性对照溶液

按处方量取缺土茯苓的中药饮片, 加水煎煮两次, 每次1 h, 第一次10倍量水, 第二次9倍量, 合并两次煎煮液, 浓缩(60 $^{\circ}\text{C}$)至相对密度1.08后, 水浴蒸干, 取干膏3 g, 按“2.6.3”节下方法制成落新妇苷阴性对照溶液。

2.6.4.2 山奈酚阴性对照溶液

按处方量取缺丹皮、牛膝的中药饮片, 加水煎煮两次, 每次1 h, 第一次10倍量水, 第二次9倍量, 合并两次煎煮液, 浓缩(60 $^{\circ}\text{C}$)至相对密度为1.08后, 水浴蒸干, 取干膏3 g, 按“2.6.3”节下方法制成山奈酚阴性对照溶液。

2.6.4.3 小檗碱阴性对照溶液

按处方量取缺黄柏的中药饮片, 加水煎煮两次, 每次1 h, 第一次10倍量水, 第二次9倍量, 合并两次煎煮液, 浓缩(60 $^{\circ}\text{C}$)至相对密度为1.08后, 水浴蒸干, 取干膏3 g, 按“2.6.3”节下方法制成小檗碱阴性对照溶液。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性试验

分别取供试品(批号20200401)、对照品、阴性对照溶液适量, 分别在“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节色谱条件下进样测定。

2.7.2 线性关系考察

取对照品适量, 分别配制成含落新妇苷0.0320、0.2020、0.3535、0.5050、0.7575、1.0100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液; 含山奈酚0.0140、0.0560、0.0980、0.1400、0.2100、0.2800 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

的对照品溶液; 含盐酸小檗碱0.0350、0.1400、0.2750、0.4250、0.5500、0.7500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液; 分别在“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节色谱条件下进样测定, 以峰面积为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X)进行线性回归。

2.7.3 精密度试验

取“2.6.2”节下的对照品溶液, 分别在“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节下色谱条件连续进样6次, 记录落新妇苷、山奈酚、小檗碱的峰面积, 计算RSD值。

2.7.4 稳定性试验

取“2.6.3”节下的供试品溶液(批号20200401), 分别在“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节下色谱条件, 在0、2、4、6、8、12、24 h进样测定, 分别记录落新妇苷、山奈酚、小檗碱的峰面积, 计算RSD值。

2.7.5 重复性试验

取6份“2.6.3”节下的供试品溶液(批号20200401), 分别在“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节下色谱条件进样测定, 分别记录落新妇苷、山奈酚、小檗碱的峰面积, 计算RSD值。

2.7.6 回收率试验

取已知含量的SMLXC(批号20200401)9份, 每份称取1 g, 精密称定, 分别置50 mL具塞锥形瓶中, 分成3组, 分别加入相当于供试品中各成分含量的50%、100%和150%的混合对照品溶液适量, 再按“2.6.1.1”“2.6.1.2”“2.6.1.3”节下色谱条件进行测定, 记录峰面积并计算加样回收率。

3 结果

3.1 化合物、成分靶点、疾病靶点和作用靶点

通过TCMSP和BATMAN-TCM数据库共检索得到102个化合物, 其中苍术9个、牛膝20个、黄柏37个, 王不留行2个, 土茯苓14个, 绵萆薢1个, 威灵仙7个, 丹皮7个, 茯苓13个, 薏仁9个, 地龙0个, 毛冬青0个, 如表1所示。共检索到1420个化合物靶点, 利用Uniprot数据库确定各靶点人类基因简称, 去重, 得到239个潜在作用靶点。通过查询OMIM、GeneCards数据库得到AGA疾病靶点183个, 将SMLXC的239个潜在作用靶点与痛风相关的183个靶点导入Bioinformatics & Evolutionary Genomics取交集, 筛选得到前列腺素内过氧化物合酶2(Prostaglandin-

endoperoxide Synthase 2, PTGS2)、一氧化氮合酶2 (Nitric Oxide Synthase 2, NOS2)、前列腺素内过氧化物合酶1 (Prostaglandin-endoperoxide Synthase 1, PTGS1)、过氧化物酶体增生激活受

体 γ (Peroxisome Proliferative Activated Receptor, Gamma, PPARG) 等30个靶点作为SMLXC抗AGA的作用靶点, 如图1所示。

表1 SMLXC中102个活性化合物的OB和DL

编号	化合物	OB/%	DL	来源
MOL000173	Wogonin	30.68	0.23	苍术、牛膝
MOL000179	2-Hydroxyisoxypyl-3-hydroxy-7-isopentene-2, 3-dihydrobenzofuran-5-carboxylic	45.2	0.2	苍术
MOL000184	NSC63551	39.25	0.76	苍术
MOL000186	Stigmasterol 3-O-beta-D-glucopyranoside_qt	43.83	0.76	苍术
MOL000188	3 β -Acetoxyatractylone	40.57	0.22	苍术
MOL000085	Beta-daucosterol_qt	36.91	0.75	苍术、牛膝
MOL000088	Beta-sitosterol 3-O-glucoside_qt	36.91	0.75	苍术
MOL000092	Daucosterin_qt	36.91	0.76	苍术
MOL000094	Daucost0erol_qt	36.91	0.76	苍术
MOL001454	Berberine	36.86	0.78	黄柏、牛膝
MOL001458	Coptisine	30.67	0.86	黄柏、牛膝
MOL002641	Phellavin_qt	35.86	0.44	黄柏
MOL002636	Kihadalactone A	35.86	0.44	黄柏
MOL013352	Obacunone	43.29	0.77	黄柏
MOL002643	Delta 7-stigmastenol	37.42	0.75	黄柏、牛膝
MOL002644	Phellopterin	40.19	0.28	黄柏
MOL002651	Dehydrotanshinone II A	43.76	0.4	黄柏
MOL002652	Delta7-dehydrosophoramine	54.45	0.25	黄柏
MOL002656	Dihydrniloticin	36.43	0.81	黄柏
MOL002659	Kihadanin A	31.6	0.7	黄柏
MOL002660	Niloticin	41.41	0.82	黄柏
MOL002662	Rutaecarpine	40.3	0.6	黄柏
MOL002663	Skimmianin	40.14	0.2	黄柏
MOL002666	Chelerythrine	34.18	0.78	黄柏

续表 1

编号	化合物	OB/%	DL	来源
MOL002668	Worenine	45.83	0.87	黄柏
MOL002670	Cavidine	35.64	0.81	黄柏
MOL002671	Candletoxin A	31.81	0.69	黄柏
MOL002672	Hericenone H	39	0.63	黄柏
MOL002673	Hispidone	36.18	0.83	黄柏
MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75	黄柏、牛膝
MOL000622	Magnograndiolide	63.71	0.19	黄柏
MOL000762	Palmidin A	35.36	0.65	黄柏
MOL000785	Palmatine	64.6	0.65	黄柏
MOL000787	Fumarine	59.26	0.83	黄柏
MOL000790	Isocorypalmine	35.77	0.59	黄柏
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	王不留行、土茯苓、牛膝 威灵仙、薏仁、黄柏
MOL000098	Quercetin	46.43	0.28	王不留行、土茯苓、牛膝 黄柏、丹皮
MOL001131	Phellamurin_qt	56.6	0.39	黄柏
MOL001455	(S)-Canadine	53.83	0.77	黄柏
MOL001771	Poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	黄柏
MOL002894	Berberrubine	35.74	0.73	黄柏
MOL005438	Campesterol	37.58	0.71	黄柏
MOL006392	Dihydroniloticin	36.43	0.82	黄柏
MOL006401	Melianone	40.53	0.78	黄柏
MOL006413	Phellochin	35.41	0.82	黄柏
MOL006422	Thalifendine	44.41	0.73	黄柏
MOL013117	4, 7-Dihydroxy-5-methoxyl-6-methyl-8-formyl-flavan	37.03	0.28	土茯苓
MOL013118	Neostilbin	40.54	0.74	土茯苓
MOL013119	Enhydrin	40.56	0.74	土茯苓
MOL013129	(2R, 3R)-2-(3, 5-Dihydroxyphenyl)-3, 5, 7-trihydroxychroman-4-one	63.17	0.27	土茯苓

续表 1

编号	化合物	OB/%	DL	来源
MOL001736	(-)-Taxifolin	60.51	0.27	土茯苓
MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75	土茯苓、牛膝、威灵仙
MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	土茯苓、丹皮、薏仁
MOL004328	Naringenin	59.29	0.21	土茯苓
MOL004567	Isoengelitin	34.65	0.7	土茯苓
MOL004575	Astilbin	36.46	0.74	土茯苓
MOL004576	Taxifolin	57.84	0.27	土茯苓
MOL004580	Cis-Dihydroquercetin	66.44	0.27	土茯苓
MOL000546	Diosgenin	80.88	0.81	绵萆薢
MOL005603	HeptylPhthalate	42.26	0.31	威灵仙
MOL002372	(6Z, 10E, 14E, 18E)-2, 6, 10, 15, 19, 23-Hexamethyltetracos-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaene	33.55	0.42	威灵仙
MOL005594	ClematosideA'_qt	37.51	0.76	威灵仙
MOL005598	Embinin	33.91	0.73	威灵仙
MOL001663	Oleanolic Acid	32.03	0.76	威灵仙
MOL000211	Mairin	55.38	0.78	丹皮
MOL000492	(+)-Catechin	54.83	0.24	丹皮
MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24	丹皮、牛膝
MOL007374	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-Furyl]methylene]barbituric acid	43.44	0.3	丹皮
MOL000874	Paeonol	28.79	0.04	丹皮
MOL001006	Poriferasta-7, 22E-dien-3beta-ol	42.98	0.76	牛膝
MOL012461	28-Norolean-17-en-3-ol	35.93	0.78	牛膝
MOL012505	Bidentatoside, ii_qt	31.76	0.59	牛膝
MOL012537	Spinoside A	41.75	0.4	牛膝
MOL012542	β -Ecdysterone	44.23	0.82	牛膝
MOL002776	Baicalin	40.12	0.75	牛膝
MOL002897	Epiberberine	43.09	0.78	牛膝

续表 1

编号	化合物	OB/%	DL	来源
MOL002714	Baicalein	33.52	0.21	牛膝
MOL003847	Inophyllum E	38.81	0.85	牛膝
MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76	牛膝
MOL000275	Trametenolic Acid	38.71	0.8	茯苓
MOL000276	7, 9 (11) -Dehydropachymic Acid	35.11	0.81	茯苓
MOL000279	Cerevisterol	37.96	0.77	茯苓
MOL000282	Ergosta-7, 22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72	茯苓
MOL000283	Ergosterol Peroxide	40.36	0.81	茯苓
MOL000287	3-Beta-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic Acid	38.7	0.81	茯苓
MOL000289	Pachymic Acid	33.63	0.81	茯苓
MOL000290	Poricoic Acid A	30.61	0.76	茯苓
MOL000291	Poricoic Acid B	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	Poricoic Acid C	38.15	0.75	茯苓
MOL000296	Hederagenin	36.91	0.75	茯苓
MOL001323	Sitosterol Alpha1	43.28	0.78	茯苓
MOL000300	Dehydroeburicoic Acid	44.17	0.83	茯苓
MOL001494	Mandenol	42	0.19	薏仁
MOL008121	2-Monoolein	34.23	0.29	薏仁
MOL000953	CLR	37.87	0.68	薏仁
MOL001323	Sitosterol Alpha1	43.28	0.78	薏仁
MOL002372	(6Z, 10E, 14E, 18E) -2, 6, 10, 15, 19, 23 -Hexamethyltetracos-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaene	33.55	0.42	薏仁
MOL002882	[(2R) -2, 3-Dihydroxypropyl] (Z) -octadec-9-enoate	34.13	0.3	薏仁
MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	薏仁
MOL008118	Coixenolide	32.4	0.43	薏仁

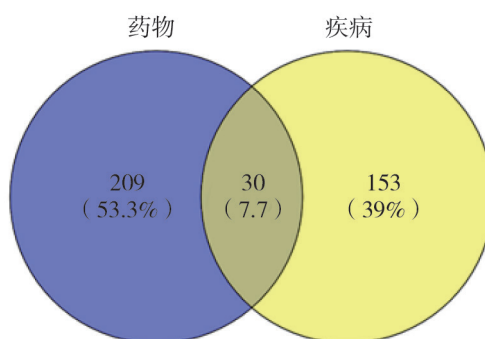


图1 化合物靶点与疾病靶点韦恩图

3.2 GO、KEGG富集分析

GO功能富集分析显示, 30个靶点富集到109个条目, 取排名前五的条目进行分析, 如图2所示。其中, 生物过程 (Biological Process, BP) 排名靠前的是细胞因子的活性调控、生物合成、炎症反应、氧化还原反应等; 细胞组成分析 (Cellular Component, CC) 主要富集在细胞间隙、细胞核、细胞溶质、细胞外间质、蛋白质的细胞外基质; 分子功能 (Molecular Function, MF) 主要包括金

属离子结合、细胞因子活性、血红素结合、染色质结合、配体依赖的核受体转录共激活活性。以 *P* 值由小到大列举了前20个通路, 结果如图2所示。其中与AGA相关的有肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF)、NOD样受体 (NOD-like Receptors, NLRs)、Toll样受体 (Toll-Like Receptor, TLR) 等信号通路。上述结果表明, SMLXC治疗AGA的作用机理与炎症免疫调节有关。

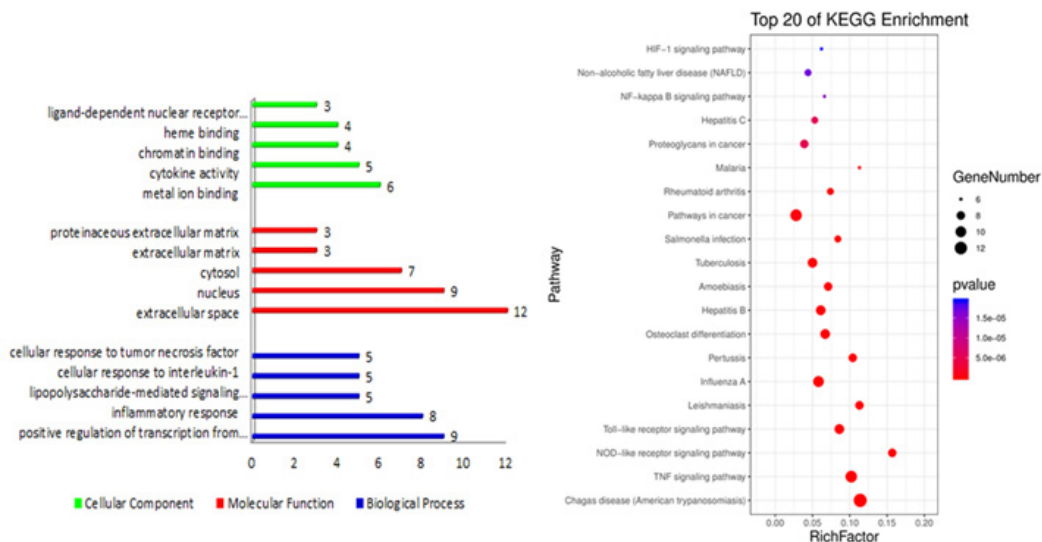


图2 靶点的GO和KEGG富集分析

3.3 炎症靶点网络分析和可视化

取与AGA密切相关的信号通路TNF、NLRs、TLR进行炎症靶点网络化分析, 从中提取得到一个节点的度值 (Degree) 排名前12的靶点是PTGS2 (12)、MAPK1 (11)、MAPK14 (11)、IL-6 (10)、CCL2 (10)、TNF (10)、MMP9 (10)、RELA (9)、IL-1 β (10)、MMP3

(9)、CXCL8 (10)、PIK3CG (2), 括号内数值是Degree值, 将其导入STRING数据库建立蛋白互作网络图, 如图3所示。由图3可知, 该网络包含12个蛋白、56条关系线条, 预期边缘数为16, 平均节点度为9.33, 局部聚类系数为0.957, 其中PTGS2节点度最高, 与抗炎密切相关。

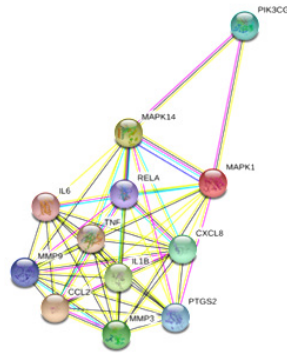


图3 炎症通路相关靶点的网络互作图

3.4 分子对接

上述结果表明, SMLXC治疗AGA的作用与炎症免疫调节有关, 作用靶点可能是PTGS2, 即环氧化酶2 (Cyclooxygenase, COX2)。在药理学上, 抑制COX2则可以发挥抗炎作用。因此, 本文通过分子对接技术虚拟筛选COX2的抑制剂, 作为抗炎的活性成分, 以便指导下一步SMLXC制剂的含量测定工作。选取PTGS2 (PDB: 4RS0) 作为分子对接受体, 30个化合物中只有25个化合物可以对接到PTGS2的活性口袋中与PTGS2结合能力较强的前5

个化合物, 分别为山奈酚、槲皮素、落新妇苷、花旗松素、小檗碱。因此, 将基因PTGS2分别与山奈酚、槲皮素、落新妇苷、花旗松素、小檗碱进行分子对接, 具体结果见表2和图4。

3.5 方法学考察

3.5.1 专属性试验

专属性试验结果见图5-7。由图可知, 各色谱峰的分度良好, 理论塔板数按落新妇苷、山奈酚、小檗碱计算不低于3000, 阴性无干扰。

表2 化合物与PTGS2的对接结合能

化合物	CAS 号	结合能 / (kcal · mol ⁻¹)
山奈酚	520-18-3	- 415.6078
槲皮素	117-39-5	- 390.4876
落新妇苷	29838-67-3	- 384.4207
花旗松素	480-18-2	- 366.5459
小檗碱	2086-83-1	- 125.1678

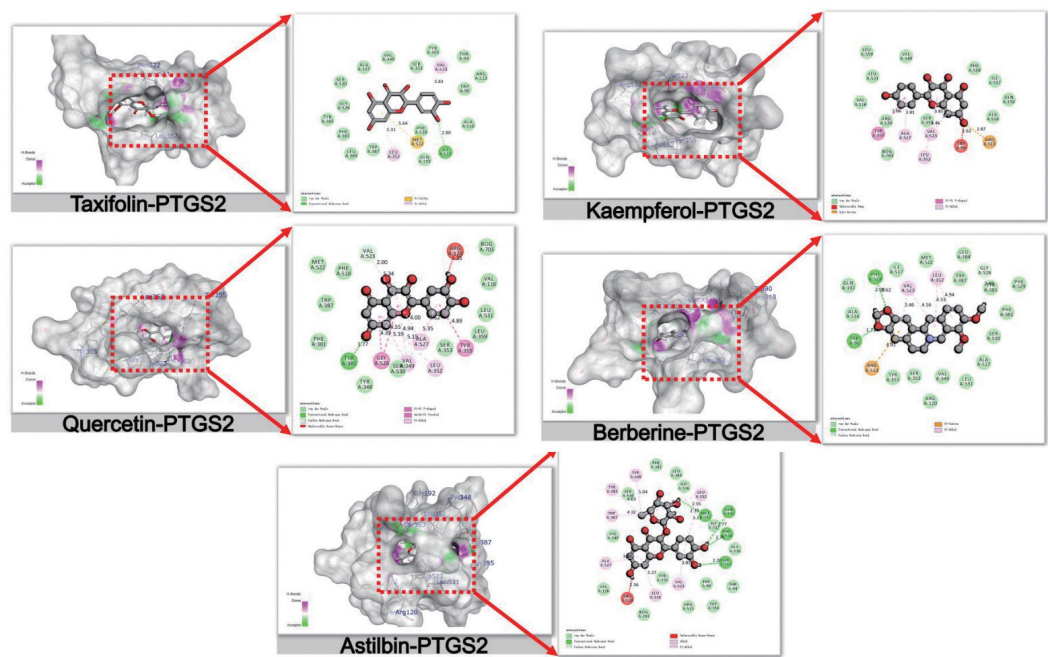
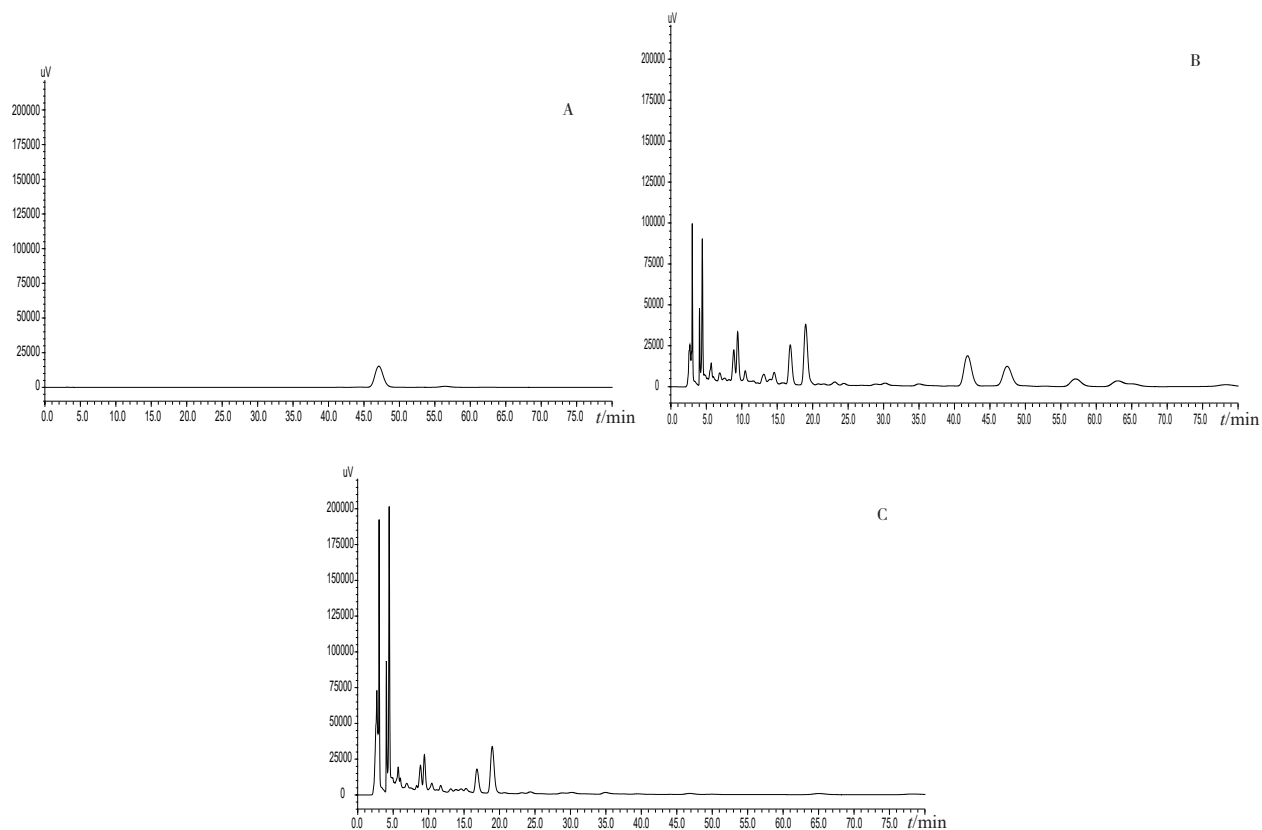
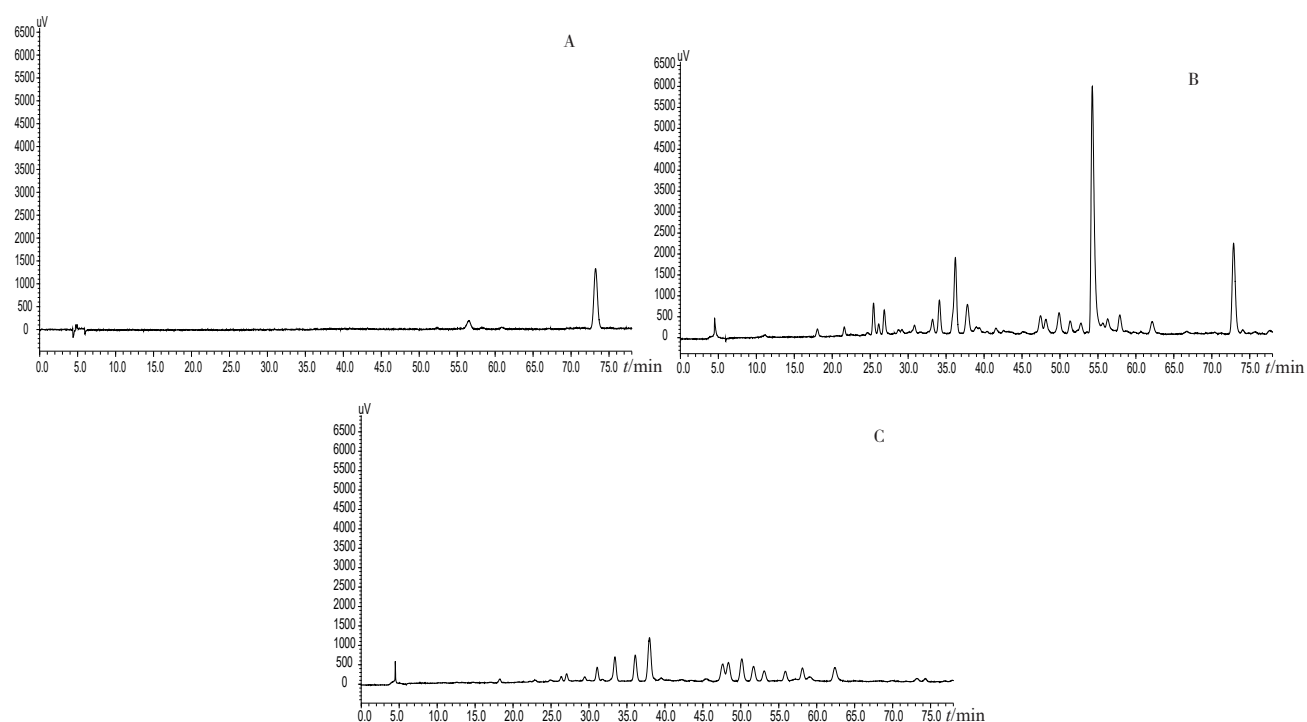


图4 化合物与PTGS2的对接模式图



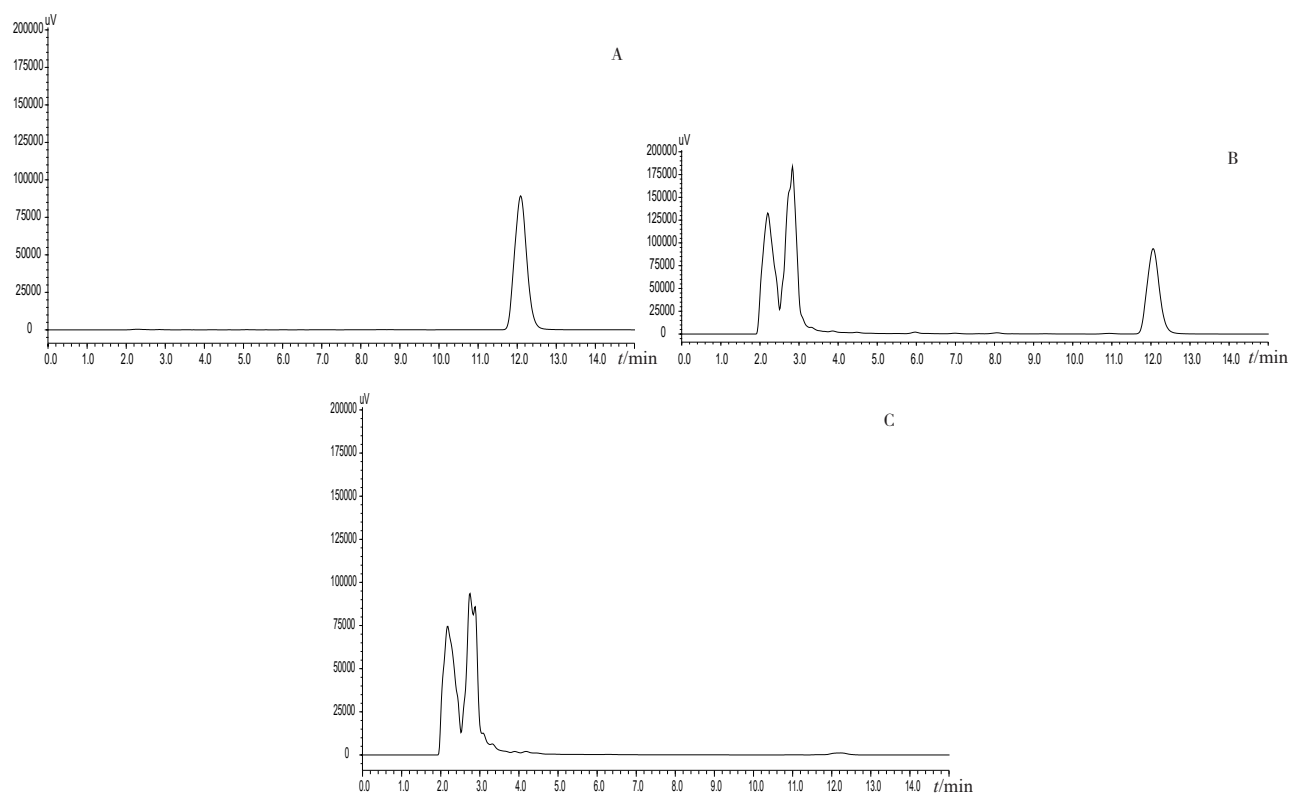
A. 落新妇苷对照品溶液；B. SMLXC 样品；C. 缺土茯苓阴性对照溶液；1. 落新妇苷。

图5 SMLXC中落新妇苷HPLC图



A. 山奈酚对照品溶液; B. SMLXC 样品; C. 缺丹皮、牛膝阴性对照溶液; 1. 山奈酚。

图6 SMLXC中山奈酚HPLC图



A. 盐酸小檗碱对照品溶液; B. SMLXC 样品; C. 缺黄柏阴性对照溶液; 1. 盐酸小檗碱。

图7 SMLXC中盐酸小檗碱HPLC图

3.5.2 线性关系考察

落新妇苷、山奈酚和小檗碱的标准曲线分别为： $Y=2 \times 10^6 X+8276$ ， $R^2=0.9999$ ； $Y=2.345 \times 10^4 X+653.63$ ， $R^2=0.9997$ ； $Y=4 \times 10^6 X+2560$ ， $R^2=0.9999$ 。结果表明，落新妇苷、山奈酚和小檗碱进样量分别在0.320~10.10 μg 、0.140~2.800 μg 、0.350~7.575 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系。

3.5.3 精密度试验

落新妇苷、山奈酚、小檗碱峰面积的RSD分别为1.2%、1.5%、0.9%（ $n=6$ ），表明方法精密度良好。

3.5.4 稳定性试验

落新妇苷、山奈酚、小檗碱峰面积的RSD分别

为1.8%、1.2%、1.7%（ $n=6$ ），表明各成分在24 h内稳定。

3.5.5 重复性试验

落新妇苷、山奈酚、小檗碱含量的RSD值分别为1.5%、1.2%、0.9%（ $n=6$ ）。结果表明，该测定方法重复性良好。

3.5.6 加样回收率

测得落新妇苷、山奈酚、小檗碱平均回收率分别为97.2%、98.50%、101.2%，RSD均不高于2%，表明方法准确度良好。

3.5.7 落新妇苷、山奈酚和小檗碱含有量测定

分别按“2.1.2”节下方法制备供试品溶液，分别按“2.2.3”“2.3.4”节下方法测定落新妇苷、山奈酚、小檗碱含量，结果见表3。

表3 SMLXC中3个成分含量测定结果（ $n=3$ ， $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ）

编号	落新妇苷	山奈酚	小檗碱
20211101	1.2400	1.2451	1.6580
20211102	1.7214	1.7776	2.1683
20211103	2.0135	1.6057	2.1761
平均值	1.6583	1.5428	2.0008

4 讨论

本研究运用网络药理学的方法筛选出SMLXC的活性化合物102个，作用靶点239个。GO富集分析显示，SMLXC治疗痛风主要与细胞因子的活性调控、生物合成、炎症反应、氧化还原反应等相关；KEGG富集分析提示SMLXC可能通过TNF、NLRs、TLR等信号通路对急性痛风性关节炎进行干预。

炎症靶点网络分析和可视化显示这三条通路的核心靶点有PTGS2、MAPK14、MAPK1、IL-6、TNF、IL-1 β 、CCL2等。丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK）可由多种炎症因子所激活并促进炎症进程的发展，其p38亚型对炎症细胞因子的响应值极高，p38MAPK-siRNA能特异性抑制p38MAPK信号通路的活化，降低相关炎症因子IL-6、TNF的表达水平，从而发挥抗炎作用^[6]。IL-6是一种广泛的促炎关键因

子，其主要通过浸润内皮细胞，诱导细胞黏附分子、P-selectin及E-selectin的表达，致使白细胞大量聚集、黏附，从而参与炎症级联反应^[7]。TNF具有广泛的促炎特性，包括多种炎症因子的产生以及巨噬细胞的激活和通过NF- κ B途径上调生存蛋白^[8-9]。IL-1 β 属于促炎基因，能促进炎症小体的活化，伴随炎症的发生其表达会逐渐升高。PTGS2又称作COX2基因，该基因能将花生四烯酸转化为前列腺素H2（PTGS2）^[10]，PTGS2可导致细胞黏附增加、表型改变、抗凋亡等。趋化因子2（CCL2）不但可以趋化炎症细胞，如中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等向病变部位聚集，还可以诱导其他细胞因子如IL-2、IL-6或细胞黏附分子的合成^[11-13]。痛风是由于尿酸盐在体内的过量沉积，进而激发炎症细胞、炎症因子等，导致急性关节炎，而SMLXC中的抗炎核心化合物可能是通过干预TNF、NLRs、TLR等与炎症相关的通路，从而影响

PTGS2、IL-6、TNF、IL-1 β 等促炎因子的水平,达到治疗痛风的目的。

通过分子对接技术虚拟筛选COX2的抑制剂,选取抗炎核心靶点PTGS2(Degree值最大)作为分子对接受体,结果显示,与PTGS2结合能力较强的前8个化合物分别为山奈酚、槲皮素、落新妇苷、花旗松素、黄芩素、汉黄芩素、儿茶素、小檗碱。

有研究表明,落新妇苷通过NF- κ B信号通路治疗类风湿性关节炎等炎症疾病,同时也可以抑制转化生长因子- β 和结缔组织生长因子的表达、抑制尿酸钠和PGE2的形成来保护肾脏^[14];山奈酚通过抑制2个诱导酶COX2和iNOS的表达,从而减少LPS诱导的RAW 264.7细胞中炎性产物PGE2和NO的生成^[15];小檗碱下调炎性因子的机制可能是通过抑制硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)介导NLRP3炎性体活化,使TXNIP、IL-1 β 等的mRNA的表达被抑制,从而减轻MSU晶体诱导的大鼠的炎症^[16];槲皮素、汉黄芩素、黄芩素可选择性地抑制COX2发挥抗炎活性^[17-19],但由于含量太少,不足以达到定量要求,故选择SMLXC中小檗碱、落新妇苷、山奈酚3个化合物作为SMLXC治疗痛风潜在的有效化合物,并测定这3个成分的含量。

本研究借助网络药理学的方法,探索SMLXC干预AGA“多成分-多靶点-多通路”的网络关系,发现TNF、NLRs、TLR三条信号通路与SMLXC的抗炎作用密切相关,并预测PTGS2、MAPK14、MAPK1、IL-6等共12个核心靶点,然后借助分子对接虚拟筛选得到潜在的COX2抑制剂,如落新妇苷、小檗碱、山奈酚等,并通过高效液相色谱法测定其含量,可以为SMLXC的质量控制提供实验和理论依据。

参考文献:

- [1] 陈慧,庞学丰,李玉玲.基于网络药理学探讨四妙丸治疗类风湿关节炎的作用机制[J].风湿病与关节炎,2019,8(8):30-35.
- [2] 王靓怡,高明利,王丽敏,等.急性痛风性关节炎的中医治疗进展[J].风湿病与关节炎,2016,5(6):73-76.
- [3] 唐春丽,方雪湾,黄庆,等.四妙凉血颗粒的制备工艺研究[J].中药材,2020,43(2):419-422.
- [4] 朱素梅,覃仕娜,覃森,等.基于CiteSpace的2016-2021年国内外中药质量标志物研究文献的计量学分析[J].中草药,2021,52(9):2575-2588.
- [5] 黄敬群,孙文娟,王四旺,等.尿酸钠致急性痛风性关节炎模型大鼠与槲皮素的抗炎作用[J].中国组织工程研究,2012,16(15):2815-2819.
- [6] 王元芳,汪家鼎,吴青思,等.p38MAPK-siRNA脂质体递药系统的制备及体外抗炎作用的初步研究[J].华西药理学杂志,2020,35(2):131-134.
- [7] 李月,汤轶波,李韵歆,等.基于IL-6、JAK2/STAT3信号通路探讨复方当归注射液在缺血性卒中炎症反应中的作用[J].湖南中医药大学学报,2020,40(4):412-417.
- [8] 李涛,王礼,张廷.Foxp3磷酸化通过调控调节性T细胞功能对类风湿关节炎大鼠TNF- α 抑制状态影响的分子机制[J].临床和实验医学杂志,2020,19(9):921-924.
- [9] Tsai SC, Liang YH, Chiang JH, et al. Anti-inflammatory Effects of Calophyllum Inophyllum L. in RAW264.7 Cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(3):1096-1102.
- [10] Chi YS, Lim H, Park H, et al. Effects of Wogonin, a Plant Flavone from Scutellaria Radix, on Skin Inflammation: in Vivo Regulation of Inflammation-associated Gene Expression[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(7):1271-1278.
- [11] 王庆哲,张恩崇,鞠培新,等.通过网络药理学探究四君子汤在前列腺癌治疗中的机制[J].实用药物与临床,2020,23(4):299-304.
- [12] Sun Z, Li Q, Hou R, et al. Kaempferol-3-O-glucorhamnoside Inhibits Inflammatory Responses Via MAPK and NF- κ B Pathways in Vitro and in Vivo[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 364(1):22-28.
- [13] Hossein MJ, Jeon SH, Kim SC, et al. In Vitro and in Vivo Anti-inflammatory Activity of Phyllanthus Acidus Methanolic Extract[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168(20):217-228.
- [14] 李中华,钟进军,杨青,等.落新妇苷通过抗炎和软骨基质降解对膝骨性关节炎小鼠的治疗作用研究[J].广西医科大学学报,2021,38(11):2115-2120.
- [15] 陈美珺,金宏伟,陈振胜,等.山奈酚对脂多糖诱导RAW264.7细胞中COX-2和iNOS表达及产物生成的影响[J].沈阳药科大学学报,2013,30(12):982-990.
- [16] Ghorbani N, Sahebari M, Mahmoudi M, et al. Berberine

- Inhibits the Gene Expression and Production of Proinflammatory Cytokines by Mononuclear Cells in Rheumatoid Arthritis and Healthy Individuals[J]. Curr Rheumatol Rev, 2021, 17 (1) : 113-121.
- [17] 杨颖, 王芸芸, 蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23 (5) : 24-28.
- [18] Chi YS, Cheon BS, Kim HP. Effect of Wogonin, A Plant Flavone from Scutellaria Radix, on the Suppression of Cyclooxygenase-2 and the Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase in Lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 Cells[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61 (10) : 1195-1203.
- [19] 张倩, 李惠香, 刘攀, 等. 黄芩素的体外抗炎及抗氧化活性研究[J]. 烟台大学学报 (自然科学与工程版), 2018, 31 (3) : 232-238.
- [20] 刘艳, 陆波, 曹蔚蔚, 等. 环氧化酶-2及其抑制剂的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2008 (2) : 90-102.
- (收稿日期 2021年11月20日 编辑 李亚徽)