

# 基于网络药理学和细胞实验探讨草乌治疗关节炎的作用机制

柳思洋<sup>1</sup>, 冷雪娇<sup>1</sup>, 李新亮<sup>1</sup>, 阚宏飞<sup>1</sup>, 汤书婉<sup>1</sup>, 符胜男<sup>1</sup>, 李存玉<sup>1,2</sup>, 郑云枫<sup>1,2</sup>, 彭国平<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学和细胞实验探讨草乌治疗关节炎的作用机制。**方法** 于TCMSP数据库筛选草乌的活性成分, PharmMapper、SwissTargetPrediction数据库获取成分靶点, OMIM、Drugbank、GeneCards数据库获得关节炎疾病靶点; 通过STRING平台筛选成分和疾病交集靶点并进行PPI分析; 通过Metascape平台对交集靶点进行GO和KEGG分析; 利用Cytoscape软件进行可视化分析; 通过AutoDockTools和PyMol软件进行分子对接和图像处理。通过细胞实验对网络药理学研究结果进行验证, 利用PMA诱导THP-1细胞向巨噬细胞转变, 通过LPS和ATP刺激巨噬细胞构建炎症模型, MTT法检测细胞毒活性, ELISA法测定促炎因子和MAPK8蛋白表达。**结果** 共获得8种草乌活性成分、72个交集靶点, 143条信号通路。草乌通过骨髓白细胞免疫反应和细胞外基质分解等生物过程, 作用于MAPK8、PIK3CD、MTOR、MAPK14、AKR1C2、GSTP1等关键靶点, 并可通过调控松弛素信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B信号通路、钙信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路等治疗关节炎。草乌8种活性成分与6个关键靶点均存在分子对接位点。草乌提取物能降低IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平和MAPK8蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 草乌能通过多成分、多靶点、多通路、多机制治疗关节炎, 其机制在于调节MAPK通路, 抑制炎症因子, 阻断炎症反应。

**关键词:** 草乌; 关节炎; 网络药理学; 分子对接; THP-1细胞

**中图分类号:** R966

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)06-2095-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.054

关节炎, 又称“痹症”, 泛指发生在人体关节及其周围组织的炎症性疾病<sup>[1]</sup>, 包括骨关节炎和类风湿性关节炎。草乌为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根<sup>[2-3]</sup>。在古代, 草乌常用于治疗风寒湿痹, 关节疼痛<sup>[2]</sup>。现代临床中, 草乌常以配伍的形式治疗各类关节炎。草乌、川乌配伍可治疗类风湿性关节炎及痛风性关节炎<sup>[4]</sup>; 草乌、川乌合甘草可治疗类风湿性关节炎; 草乌等药材制成的草乌风湿酒, 以草乌甲素为代表的草乌生物碱类成分具有较好的抗炎活性<sup>[5-8]</sup>。但目前草乌对关节炎的作用机制尚未明确, 缺乏其治疗关节炎的药效物质基础及分子机制方面的系统性研究。

网络药理学是一门基于系统生物学的理论, 对生物系统进行网络分析, 选取特定信号节点进行多靶点药物分子设计的学科。分子对接技术是通过受体的特征以及受体和药物分子之间的相互作用方式来进行药物设计的方法。本研究通过网络药理学及分子对接技术预测草乌治疗关节炎的关键靶点和潜在作用机制, 基于诱导THP-1巨噬细胞模型进行抗炎实验验证相关靶点, 以期为草乌用于治疗关节炎提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 草乌活性成分筛选** 通过中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)检索草乌成分, 以口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$ , 类药性(DL)  $\geq 0.18$ 为标准进行筛选。

**1.2 成分-靶点网络构建** 将筛选后得到的活性成分上传到PharmMapper数据库<sup>[9]</sup>和SwissTargetPrediction数据库<sup>[10]</sup>进行成分作用靶点的预测, 删除重复靶点<sup>[11-12]</sup>, 通过UniProt数据库对预测靶点名称进行匹配规范。将活性成分和靶点导入Cytoscape 3.9.1软件<sup>[13]</sup>, 构建草乌“活性成分-靶点”网络图。

**1.3 关节炎疾病靶点的获取** 以“arthritis”为关键词, 在OMIM<sup>[14]</sup>、Drugbank<sup>[15]</sup>、GeneCards数据库<sup>[16]</sup>进行检索, 删除重复靶点, 通过UniProt数据库对预测靶点名称进行匹配规范。

**1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 利用Venny 2.1.0平台构建草乌活性成分靶点和关节炎相关疾病靶点韦恩图, 找出交集靶点。利用STRING平台<sup>[17]</sup>构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络模型。将结果导入Cytoscape软件, 计算各节点度值(Degree), 绘制草乌-关

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074006)

作者简介: 柳思洋(1995—), 男, 硕士生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 15851805040, E-mail: 1002974139@qq.com

\*通信作者: 彭国平(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂精制及新药。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@126.com

节炎交集靶点 PPI 网络, 利用 network analyzer 功能进行网络特征分析。

1.5 GO 和 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 平台<sup>[18]</sup>对筛选出的共同靶基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析, 对所预测的化学成分靶点进行富集分析, 保留  $P \leq 0.01$  的结果, 进行可视化处理, 分析草乌治疗关节炎潜在的生物过程和信号通路。

1.6 草乌-成分-靶点-信号通路网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 Merge 功能构建草乌“成分-靶点-通路”网络, 利用 network analyzer 功能进行网络特征分析。

1.7 分子对接 选取草乌“成分-靶点-通路”网络中中度值前 6 的靶点作为对接对象, 在 PDB 数据库<sup>[19]</sup>中获得靶点蛋白结构, 利用 PubChem 数据库<sup>[20]</sup>获得草乌活性成分的 2D 结构。使用 AutoDockTools 软件进行原蛋白质处理及分子对接, 选取最合适的构象, 使用 PyMol 软件做出 3D 结合模式图。

### 1.8 细胞实验

1.8.1 药物 草乌保存于南京中医药大学药学院, 经南京中医药大学严辉教授鉴定为正品。取草乌 6 kg, 加入 4% Ca (OH)<sub>2</sub> 和 10 倍量水, 回流提取 2 h, 重复 2 次。合并滤液, 采用 AB-8 大孔树脂富集生物碱, 在 50 °C 下减压回收得到浸膏, 冷冻干燥得到冻干粉 13.8 g。

1.8.2 细胞株 人单核细胞白血病细胞 THP-1 细胞系购于国家实验细胞资源共享平台。

1.8.3 试剂与仪器 佛波酯 (PMA)、LPS、ATP、DMSO 购于美国 Sigma 公司; RPMI-1640 培养基购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司; Ca (OH)<sub>2</sub> 购于国药集团化学试剂有限公司。MAPK8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 试剂盒购于泉州市睿信生物技术有限公司。多功能酶标仪购于美国 Molecular Devices 公司。

1.8.4 细胞培养 THP-1 细胞使用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱中培养。待生长期后, 细胞以每孔  $2 \times 10^6$  个的密度接种于 6 孔板中, 加入 50 ng/mL PMA 诱导细胞贴壁培养 24 h, 弃上清, PBS 冲洗 3 遍, 加入 RPMI-1640 培养基和 100 ng/mL LPS 刺激 4 h, 再加入 5 mmol/L ATP 刺激 3 h, 诱导巨噬细胞向 M1 型分化, 构建巨噬细胞炎症模型。

1.8.5 MTT 法检测细胞毒性 待生长期后, 细胞以每孔  $7 \times 10^4$  个的密度接种于 96 孔板中, 加入 50 ng/mL PMA 诱导细胞贴壁培养 48 h, 弃上清, PBS 冲洗 3 遍, 加入 RPMI-1640 培养基和 100 ng/mL LPS 刺激 4 h, 再加入 5 mmol/L ATP 刺激 3 h, 用 0、2.5、5、10、50、100  $\mu\text{g/mL}$  草乌提取物处理 44 h, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT, 孵育 4 h, 弃去液体加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 振荡 15 min, 使甲瓚充分溶解, 在 490 nm 波长处检测吸光度, 计算细胞毒性。

1.8.6 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平 将细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基的 12 孔板中, 在

37 °C 下培养 18 h, 加入 50 ng/mL PMA 培养 24 h, 弃上清, 换为无血清 RPMI-1640 不完全培养, 饥饿处理 12 h, 加入 0、2.5、5、7.5、10  $\mu\text{g/mL}$  草乌提取物过夜, 加入 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 4 h, 再加入 5 mmol/L ATP 刺激 3 h, 收集 500  $\mu\text{L}$  上清液, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 同时设置对照组、LPS+ATP 刺激组, 严格按照相关试剂盒说明书操作, 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平。

1.8.7 ELISA 法检测 MAPK8 蛋白表达 细胞培养方法同“1.8.6”, 加 0、5、10、20、50、100  $\mu\text{g/mL}$  草乌提取物过夜, 加入 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 4 h, 再加入 5 mmol/L ATP 刺激 3 h, 收集细胞, 12 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 冰上裂解 30 min。在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 同时设置对照组、LPS+ATP 刺激组, 严格按照相关试剂盒说明书操作, 检测 MAPK8 蛋白表达。

1.8.8 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 草乌活性成分选取 通过 TCMS 检索共获得 27 种草乌活性成分, 设置 OB  $\geq 30\%$  且 DL  $\geq 0.18$  进行筛选, 共获得 8 种草乌活性成分, 见表 1。

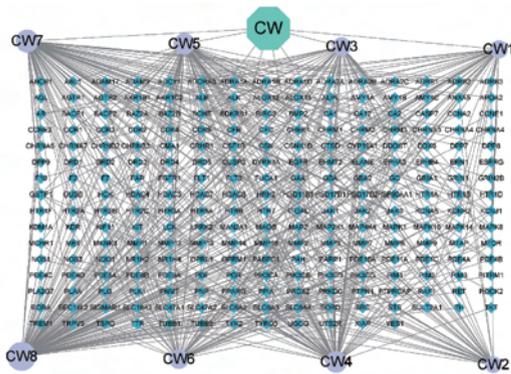
表 1 草乌活性成分

ID	名称	Pubchem ID	OB/%	DL
CW1	次乌头碱	441737	31.39	0.26
CW2	多根乌头碱	441742	51.73	0.73
CW3	脱氧乌头碱	21598997	30.96	0.24
CW4	乙酰乌头碱	21599000	37.05	0.20
CW5	草乌甲素	157539	34.13	0.21
CW6	滇乌头碱	155569	33.56	0.20
CW7	欧乌头碱	441749	34.48	0.72
CW8	伊佐特林	133323	39.53	0.51

2.2 成分靶点网络构建 得到 1 个药物节点、8 个活性成分节点、237 个靶点节点、505 条边, 见图 1。8 种活性成分共同作用的靶点有 1 个, 为骨形态发生蛋白 2 (BMP2); 7 种活性成分共同作用的靶点有 4 个, 包括醛缩酮还原酶家族 1 成员 C2 (AKR1C2)、丝裂原活化蛋白激酶 10 (MAPK10)、Sigma ( $\sigma$ ) 非阿片样细胞内受体 1 (SIGMAR1)、钠依赖性血清素转运体 (SLC6A4)。其中 BMP2、MAPK10 能介导炎症反应, 提示这些靶点可能是草乌作用于关节炎的靶点。

2.3 关节炎疾病靶点的获取 OMIM 数据库得到靶点 42 个, Drugbank 数据库得到靶点 144 个, GeneCards 数据库得到靶点 6 960 个, 截取相关性评分在中位数以上 ( $\geq 2.61$ ) 的靶点, 共 870 个, 匹配规范后共获得疾病靶点 1 010 个。

2.4 PPI 网络构建 将草乌活性成分的 237 个靶点与关节炎疾病的 1 010 个靶点制作成韦恩图, 见图 2, 获得交集靶点 72 个, 为草乌治疗关节炎的潜在作用靶点。PPI 作用网络见图 3A, 包括 72 个相互作用节点和 453 条相互作用关



注：CW 为草乌，CW1~CW8 分别为次乌头碱、多根乌头碱、脱氧乌头碱、乙酰乌头碱、草乌甲素、滇乌头碱、欧乌头碱、伊佐特林。

图 1 活性成分-靶点网络图

系，平均自由度为 12.6。其中，评分  $\geq 0.999$  的包括 SRC-PGR、SRC-AR。PPI 网络图可视化见图 3B，节点越大，自由度越高越重要，边越粗说明此边连接的关系越密切。按照自由度从高到低得到核心靶点分别为肉瘤基因（SRC）、基质金属蛋白酶 9（MMP9）、雷帕霉素靶蛋白（MTOR）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK1），这些靶点均能通过直接或者间接的关系参与关节炎的反应及发展。

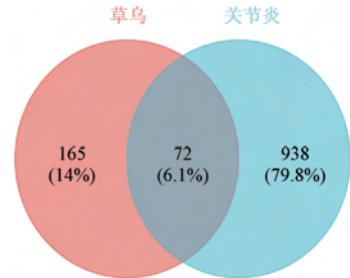


图 2 成分预测靶点与疾病预测靶点的交集靶点

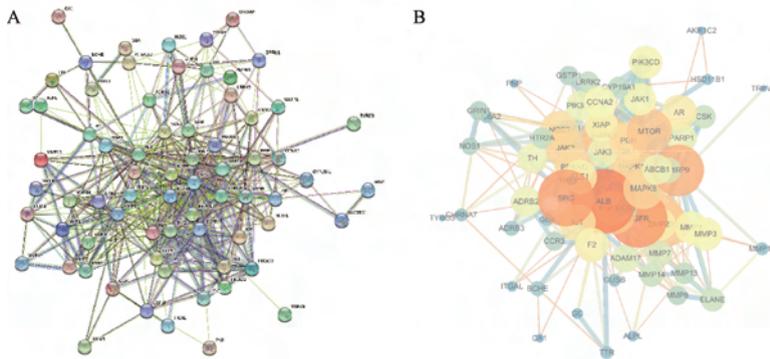


图 3 PPI 网络

2.5 GO 和 KEGG 富集 GO 富集显示，主要生物过程包括骨髓白细胞免疫反应和细胞外基质分解，主要细胞组成包括膜筏、受体、细胞外基质、特殊颗粒等，分子功能涉及四氢生物嘌呤结合、儿茶酚胺结合、MAP 激酶活性等，见图 4。KEGG 富集发现，72 个关键靶点显著富集在 143 条通路上。涉及松弛素信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B 信号通路、钙信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路等。图 5 为富集程度前 14 位的通路集群。这些通路直接或者间接介导参与关节炎的发生及发展过程。结果显示，草乌活性成分作用靶点的生物学过程较为多样化，体现了其多成分、多靶点、多途径的特点。

2.6 草乌-成分-靶点-信号通路网络构建 将草乌的活性成分、活性成分与疾病关键靶点及富集前 14 条信号通路进行可视化分析，得到 1 个药物节点、8 个活性成分节点、48 个关键靶点节点、14 个通路节点和 233 条边，见图 6。丝裂原活化蛋白激酶 8（MAPK8，又名 JNK、JNK1、SAPK1）、磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸 3-激酶催化亚基 delta（PIK3CD）、雷帕霉素靶蛋白（MTOR）、丝裂原活化蛋白激酶 14（MAPK14，p38- $\alpha$ ）、重组人醛酮还原酶家族 1 成员 C2（AKR1C2）、谷胱甘肽硫转移酶 P1（GSTP1）等为关键靶点，提示 MAPK8、PIK3CD、MTOR、MAPK14、

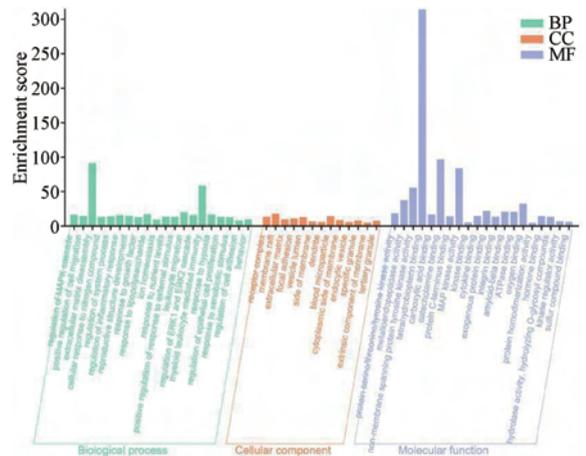


图 4 GO 功能富集结果条形图

AKR1C2、MAPK14 在草乌发挥治疗关节炎作用的过程中起关键性作用。

2.7 分子对接结果 分子对接结合能低于  $-4.25$  kcal/mol，分子与靶点有一定的结合活性；分子对接结合能低于  $-5.5$  kcal/mol，分子与靶点有较好的结合活性；分子对接结合能低于  $-8$  kcal/mol，分子与靶点有较强的结合活性。结果显示，草乌的活性成分次乌头碱、多根乌头碱、脱氧乌头碱、

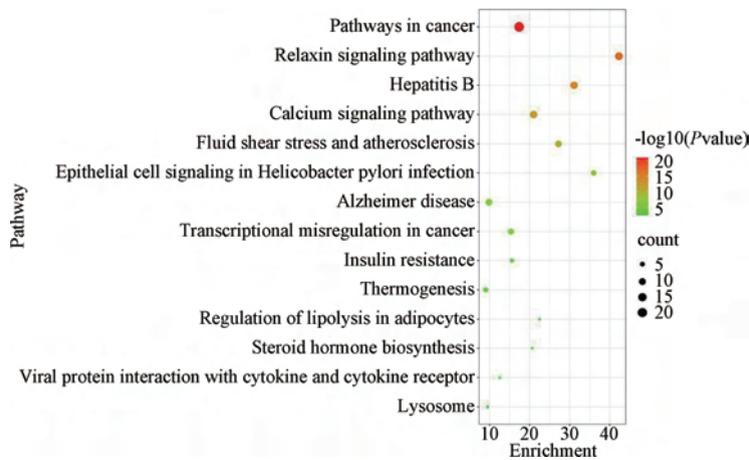
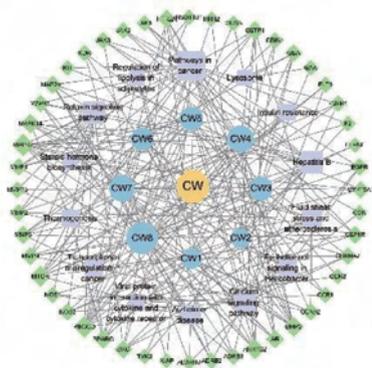


图5 KEGG通路富集结果气泡图



注：CW为草乌，CW1~CW8分别为次乌头碱、多根乌头碱、脱氧乌头碱、乙酰乌头碱、草乌甲素、滇乌头碱、欧乌头碱、伊佐特林。

图6 “成分-靶点-通路”网络图

乙酰乌头碱、草乌甲素、滇乌头碱、欧乌头碱、伊佐特林与关键靶点 MAPK8、PIK3CD、MTOR、MAPK14、AKR1C2、GSTP1均有比较好的结合位点，提示草乌的有效成分与靶点之间有氢键、 $\pi$ - $\pi$ 共轭、疏水堆积等分子间作用力，对应的最低结合能见表2。结果显示，MAPK8与多个活性成分对接结果最优，草乌甲素与多个蛋白对接结果最优。其中，选取各活性成分与蛋白、各蛋白与活性成分最合适的构象，使用PyMol做出3D结合模式图，见图7。

表2 草乌活性成分与关键靶点的最低结合能

有效成分	最低结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )					
	MAPK8	PIK3CD	MTOR	MAPK14	AKR1C2	GSTP1
伊佐特林	-8.48	-7.19	-7.88	-7.80	-8.71	-6.64
乙酰乌头碱	-12.86	-10.75	-13.65	-12.26	-12.66	-11.23
欧乌头碱	-9.57	-8.69	-7.59	-8.48	-9.30	-8.08
草乌甲素	-13.46	-9.45	-13.00	-13.59	-13.40	-11.04
滇乌头碱	-14.83	-11.32	-13.11	-14.48	-14.25	-14.00
次乌头碱	-13.84	-9.87	-12.89	-11.12	-11.32	-9.76
脱氧乌头碱	-14.48	-10.76	-10.47	-12.19	-13.90	-11.32
多根乌头碱	-13.50	-11.07	-12.22	-10.56	-13.53	-10.11

## 2.8 细胞实验结果

### 2.8.1 草乌对 THP-1 M1 型巨噬细胞毒性的影响 与对照

2098

组比较，各质量浓度草乌对细胞活性均无明显变化 ( $P > 0.05$ )，表明 0~100  $\mu\text{g/mL}$  草乌对巨噬细胞无毒性，见图8。

2.8.2 草乌对 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞促炎因子的影响 与对照组比较，LPS+ATP 刺激组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平升高 ( $P < 0.01$ )；与 LPS+ATP 刺激组比较，5、7.5、10  $\mu\text{g/mL}$  草乌提取物组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平降低 ( $P < 0.01$ )，见图9。

2.8.3 草乌对 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞 MAPK8 蛋白表达的影响 与对照组比较，LPS+ATP 刺激组细胞 MAPK8 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )；与 LPS+ATP 刺激组比较，5、10、20、50、100  $\mu\text{g/mL}$  草乌提取物组细胞 MAPK8 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见图10。

## 3 讨论

草乌具有抗炎、镇痛等多种作用，常单味或者配伍用于治疗各种关节炎。大量研究发现，草乌的药理作用主要来源于活性成分生物碱<sup>[21]</sup>，次乌头碱、脱氧乌头碱、乙酰乌头碱、滇乌头碱、草乌甲素等均能不同程度地缓解炎症反应，起到镇痛作用<sup>[22-24]</sup>。但关联程度较高的活性成分伊佐特林和欧乌头碱及草乌单味药或配伍治疗关节炎的机制研究较少。本研究基于网络药理学和分子对接技术筛选草乌的活性成分及潜在作用靶点，探讨其治疗关节炎的作用机制。

GO富集显示，草乌通过骨髓白细胞免疫反应和细胞外基质分解等生物过程治疗关节炎。白细胞是人体非常重要的免疫细胞，其转移和定位的过程直接决定炎症反应持续的时间。白细胞穿过内皮屏障后，与细胞外基质直接相互作用，该作用影响其粘附、滞留、迁移、活化。特殊颗粒主要存在于成熟的中性粒细胞中，进而参与炎症反应。四氢生物蝶呤 (BH4) 一方面直接参与关节炎的病理过程，另一方面参与具有促炎和抗炎双重特性的一氧化氮的合成。儿茶酚通过神经-体液机制或者自分泌/旁分泌的方式作用于肾上腺素能受体，发挥促炎效应，而 MAP 激酶与炎症和癌症都有密切的关系。

KEGG 富集显示，草乌可以通过调控 Relaxin、PI3K-

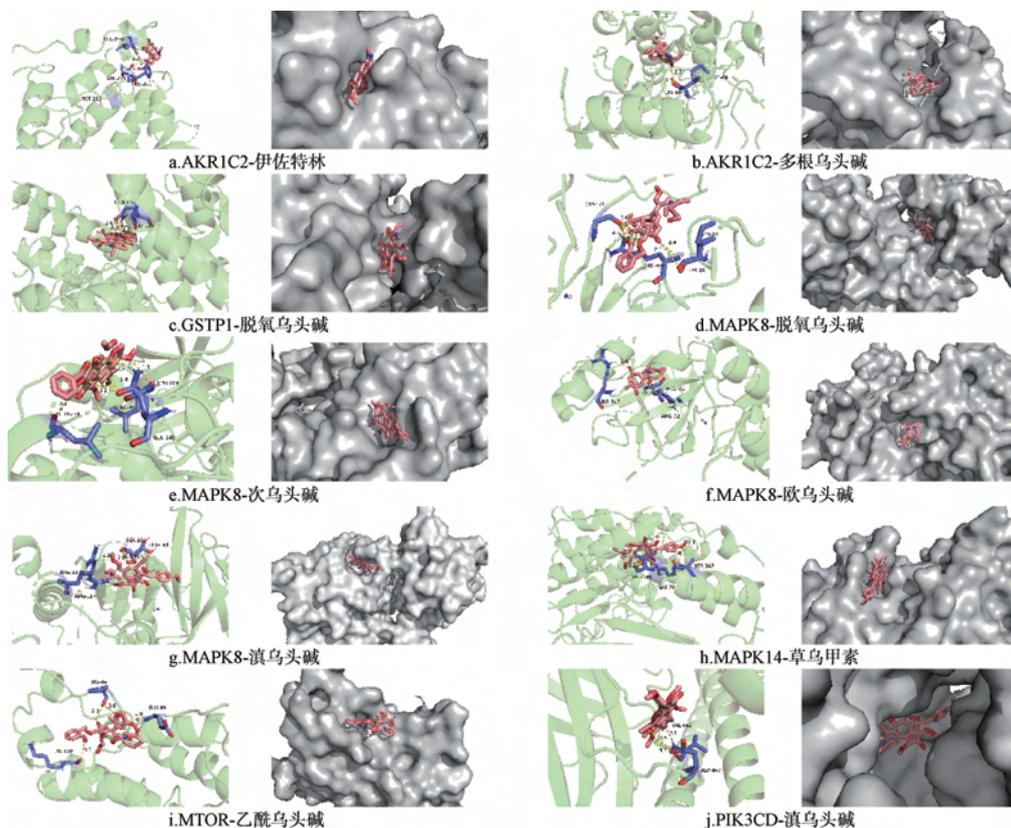


图7 草乌活性成分与关键靶点的分子对接情况

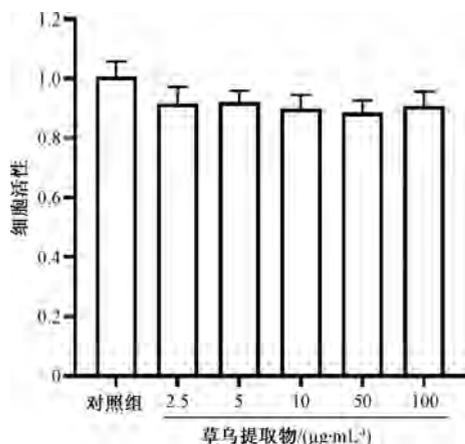
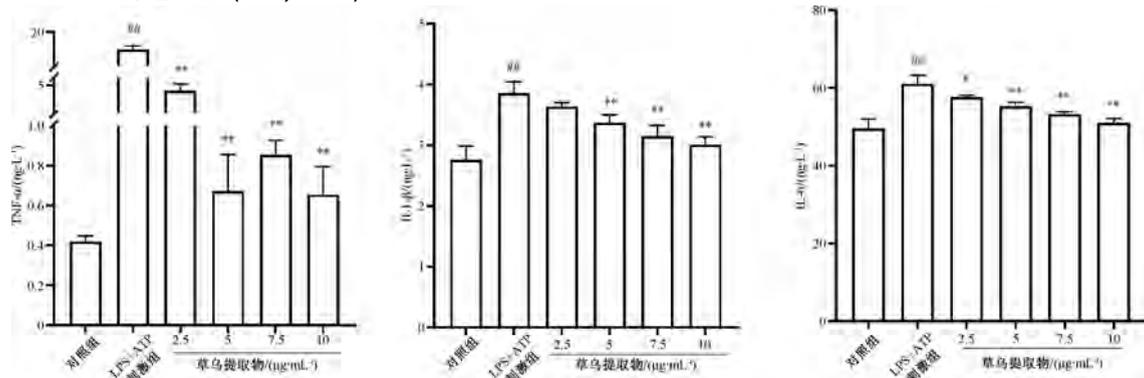


图8 草乌提取物对M1型巨噬细胞的药物毒性作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

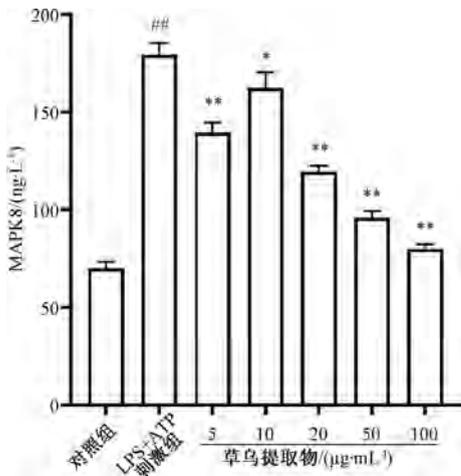
Akt、Calcium、MAPK、MTOR等信号通路治疗关节炎。研究发现松弛素信号通路能抑制炎症活化，MAPK、MTOR通路抑制剂均能抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等多种炎症因子的释放，阻断炎症反应<sup>[25]</sup>。其中，IL-1 $\beta$ 能促进内皮细胞粘附分子、肾小球系膜细胞COX-2、软骨细胞基质金属蛋白酶的表达，与类风湿关节炎、骨关节炎等疾病的发生密切相关。PI3K家族在转导细胞内信号及炎症、肥胖、肿瘤和免疫性疾病的发病机制中有着重要作用<sup>[26]</sup>。

本研究通过体外实验对草乌的抗炎活性进行药效学验证，结果显示草乌提取液可抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等的产生，减轻炎症效应，呈现较好的“量-效”关系。进一步实验显示草乌提取液能下调细胞原核MAPK8的表达。MAPK8是原核蛋白，其为MAPK-JNK/SAPK通路上



注：与对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与LPS+ATP刺激组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图9 草乌对LPS+ATP诱导的巨噬细胞促炎因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与LPS+ATP刺激组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ 。

图10 草乌对LPS+ATP诱导的巨噬细胞MAPK8蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

的重要蛋白。该通路激活后，MAPK8蛋白表达增加。通过上述实验本研究初步证实了草乌治疗关节炎可能通过调节（抑制）MAPK信号通路，阻断炎症反应。具体的亚信号通路可能是MAPK-JNK/SAPK信号通路。

综上所述，通过TCMSP数据库和相关文献对草乌进行检索得到活性成分和潜在靶点，潜在靶点包括MAPK8、PIK3CD、MTOR、MAPK14等。利用网络药理学初步阐述了草乌治疗关节炎的潜在活性成分、作用靶点、发挥药效的关键生物学通路，从分子水平揭示了草乌治疗关节炎可能的作用机制，可为后期草乌的药物开发提供理论依据。

#### 参考文献：

[1] Chen Y, Yang Y, Wang F, et al. Antiviral effect of baicalin phospholipid complex against duck hepatitis A virus type 1[J]. *Poult Sci*, 2018, 97(8): 2722-2732.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：247.

[3] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海：科学技术出版社，2014.

[4] 靖芳. 裴正学教授应用复方川草乌合剂治疗风湿病之举隅[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(16): 118-120.

[5] Wangchuk P, Navarro S, Shepherd C, et al. Diterpenoid alkaloids of *Aconitum laciniatum* and mitigation of inflammation by 14-*O*-acetylneoline in a murine model of ulcerative colitis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 12845.

[6] Li X J, Jiang J Y, Shi S S, et al. A RG-II type polysaccharide purified from *Aconitum coreanum* alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting the NF- $\kappa$ B signal pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99697.

[7] 米硕, 韩舒, 刘凯洋, 等. 基于药效团和分子对接探究诃子制草乌通过瞬时受体电位香草酸1介导的减毒机制[J]. *世界中医药*, 2023, 18(12): 1645-1652.

[8] 支美汝, 韩舒, 刘凯洋, 等. 生草乌和诃子制草乌细胞毒性及抗炎作用的比较研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(22): 2701-2705.

[9] Wang X, Shen Y H, Wang S W, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.

[10] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.

[11] 郝佳梦, 常丽萍, 王璐, 等. 基于网络药理学及实验验证探究芪苈强心胶囊治疗射血分数保留型心衰的作用机制[J]. *中草药*, 2022, 53(14): 4365-4375.

[12] 伊帕尔古丽·阿皮孜, 王昭志, 贺宏吉, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨骆驼蓬种子抗肝癌作用机制[J]. *中国药理学*, 2022, 31(7): 517-529.

[13] Franz M, Lopes C T, Huck G, et al. Cytoscape.js: a graph theory library for visualisation and analysis[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(2): 309-311.

[14] Amberger J S, Hamosh A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A knowledge base of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1-12.

[15] Law V, Knox C, Djoumbou Y, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D1091-D1097.

[16] Stelze R G, Rosen R, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-33.

[17] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.

[18] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.

[19] Bueley S K, Berman H M, Kleywegt G J, et al. Protein data bank (PDB): The single global macromolecular structure archive [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1607: 627-641.

[20] Kim S, Thiessen P A, Bolton E E, et al. PubChem substance and compound databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1202-D1213.

[21] 彭劭. 草乌中生物碱类化学成分的研究[D]. 长春：吉林大学，2014.

[22] Zhan X D, Zhang W Q, Sun T, et al. Bulleyaconitine effectively relieves allergic lung inflammation in a murine asthmatic model [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1656-1662.

[23] Zhang L W, Feng M X, Li Z Y, et al. Bulleyaconitine A prevents Ti particle-induced osteolysis via suppressing NF- $\kappa$ B signal pathway during osteoclastogenesis and osteoblastogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7067-7079.

- [24] 孙甜, 吕业超, 唐小牛, 等. 草乌甲素对LPS诱导的RAW264.7细胞抗炎作用及相关机制研究[J]. 泰山医学院学报, 2020, 41(5): 321-327.
- [25] 隆艳艳, 焦顺昌. mTOR抑制剂对炎症相关细胞因子分泌的影响[J]. 解放军医学院学报, 2015, 36(12): 1252-1254; 1265.
- [26] Burke J E, Williams R L. Synergy in activating class I PI3Ks [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(2): 88-100.

## 基于UPLC-Q-TOF-MS结合分子网络技术快速表征大花红景天的化学成分

骆前飞<sup>1</sup>, 王瑞<sup>1\*</sup>, 王峥涛<sup>2</sup>, 吕智<sup>3</sup>, 程康<sup>3</sup>, 石燕红<sup>4,5\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 3. 上海相宜本草化妆品股份有限公司研发创新中心, 上海 200444; 4. 上海中医药大学中医药国际标准化研究所, 上海 201203; 5. 上海市中医药国际标准化研究院, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 对大花红景天的化学成分进行全面表征分析, 为其药效物质基础研究提供参考。**方法** 采用UPLC-Q-TOF-MS结合分子网络技术, 并与文献报道数据比较, 结合质谱裂解特征规律分析, 以及分子网络中对已知和未知化合物节点的关联分析, 对大花红景天的化学成分进行快速表征。**结果** 从大花红景天中共鉴定118个化合物, 包括有机酸53个, 黄酮类33个, 醇苷类19个, 其他类13个, 其中8个化合物为首次在大花红景天中发现。**结论** UPLC-Q-TOF-MS联合分子网络策略能够快速、全面、系统地分析鉴定大花红景天中的化学成分, 为今后进一步阐明其药效、质量标准及资源开发利用提供科学依据。

**关键词:** 大花红景天; UPLC-Q-TOF-MS; 分子网络; 裂解规律; 成分表征与鉴定

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)06-2101-14

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.055

红景天为景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulate* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥根及根茎<sup>[1]</sup>, 所含化学成分复杂多样, 主要包含醇苷类、黄酮类、有机酸类、苯丙素类、挥发性成分和多酚类<sup>[2-10]</sup>, 具有抗氧化、美白、抗衰老、抗炎和心血管调节等多种活性<sup>[11]</sup>。中药化学成分的系统表征与鉴定是阐明其作用机理的前提和基础, 目前, 国内外学者对大花红景天化学成分做了相关研究, 王云美、皮立等<sup>[12-13]</sup>采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分别从红景天中鉴定出了45和31个挥发油成分; 倪付勇等<sup>[14]</sup>采用电喷雾电离质谱、核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)、核磁共振碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)等技术从红景天中分离确定14个黄酮化合物; 俞文胜等<sup>[15]</sup>鉴定了红景天中12个多元酚类化合物, 霍佳丽等<sup>[16]</sup>采用HPLC-MS技术确定了红景天中12个化学成分。针对以上情况, 有必要建立一个系统、全面的化学成分表征方法, 深度挖掘红景天中的有效成分。

基于LC-MS/MS数据的分子网络(molecular networking, MN)技术已广泛应用于中药化学成分定性表征和天然生物活性分子发现, 可鉴定已知化合物、类似物及新化合物<sup>[17-21]</sup>。目前, LC-MS/MS结合分子网络技术已经运用到多种药用植物的快速分析和鉴定中, 如夏天无<sup>[22]</sup>、炮附片<sup>[18]</sup>、龙葵叶<sup>[23]</sup>等。本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪(UPLC-Q-TOF-MS)联合分子网络技术对红景天中的化学成分进行快速分析, 为后期分离纯化和阐明药效物质基础提供依据。

### 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 infinity II超高效液相色谱仪、Agilent 6546 Q-TOF质谱仪, 配置Agilent MassHunter工作站(美国Agilent公司); Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国Waters公司); AE200S电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限

收稿日期: 2024-01-18

基金项目: 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划—中医药国际标准化高地建设项目[ZY(2021-2023)-0212]; 相宜本草高校联合项目(SZY2021-912)

作者简介: 骆前飞(1998—), 女(仡佬族), 硕士生, 从事中药活性成分与质量评价研究。E-mail: 2746984101@qq.com

\*通信作者: 王瑞(1973—), 博士, 教授, 从事中药药效物质基础与质量评价研究。Tel: (21) 51322181, E-mail: ellewang@163.com

石燕红(1986—), 博士, 副研究员, 从事中药活性成分与国际标准研究。Tel: (21) 51322249, E-mail: yhs\_lucky@163.com