

## 气滞胃痛颗粒中香附抗炎镇痛作用的构效组学

郑莹<sup>1,2,3</sup>, 刘思聪<sup>1,2,3</sup>, 罗曦<sup>1,2,3</sup>, 齐冰<sup>1,2,3</sup>, 王帅<sup>1,2,3</sup>, 包永睿<sup>1,2,3</sup>, 李天娇<sup>1,2,3</sup>, 王亮<sup>4</sup>,  
姚东<sup>1,2,3</sup>, 孟宪生<sup>1,2,3\*</sup>

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;
2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心, 辽宁大连 116600;
3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600;
4. 华润三九医药股份有限公司, 广东深圳 518110)

**[摘要]** 目的:采用构效组学的研究方法,阐释香附发挥抗炎镇痛作用的药效物质。方法:基于课题组前期体外药效筛选,开展香附黄酮组分体内药效研究,并通过中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)、药效预测靶点数据库(PharmMapper)和Swiss TargetPrediction等数据库及文献调研获取香附黄酮类成分及作用靶点,采用疾病相关基因与突变位点数据库(DisGeNET)和人类孟德尔遗传数据库(OMIM)等数据库收集抗炎镇痛靶点,取交集靶点作为香附黄酮抗炎镇痛的直接作用靶点,构建核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。基于构效组学的研究方法,以靶点为桥梁,将香附中一类或多类化学成分结构与药效紧密关联,将化学成分按照结构分类,并通过SYBYL-X 2.1.1、PyMOL及Discovery Studio 4.5 visualizer软件将成分与核心靶点进行分子对接,选取整体对接活性最好的2个靶点,探讨化合物结构与靶点的关系。结果:香附黄酮对小鼠甲醛致痛模型具有良好的抗炎镇痛作用,筛选获得香附黄酮成分18个和直接作用靶点115个,分析得到高活性的核心靶点为蛋白激酶B1(Akt1)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、细胞肿瘤抗原p53(TP53)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)。香附黄酮成分按照结构类型分为双黄酮类、黄酮醇类、黄酮类及黄烷类,经分子对接筛选,成分与TP53和PTGS2整体对接活性最好。构效组学研究结果表明,双黄酮类结构是香附黄酮中整体与靶点结合最好的结构,但其多羟基醚化带来与PTGS2结合活性的明显下降;糖苷与PTGS2有更好的结合,而黄酮醇的A环引入长链烃基则与TP53结合更佳,B环取代基的变化不是影响结合活性的主要因素;3,4-二羟基黄烷结构与TP53的结合活性优于3-羟基黄烷,但与PTGS2的结合未表现出优势。结论:该研究基于香附黄酮抗炎镇痛的药效作用基础上,采用构效组学研究方法,可以分析香附黄酮抗炎镇痛的物质基础,同时构效组学为中药药效物质的阐释提供新思路新方法。

**[关键词]** 香附; 黄酮; 抗炎镇痛; 构效组学; 分子对接

**[中图分类号]** R284.2;R285;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0153-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20231611 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231116.1418.003>

**[网络出版日期]** 2023-11-16 17:15:12

### Structure-activity Omics on Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Cyperi Rhizoma in Qizhi Weitong Granules

ZHENG Ying<sup>1,2,3</sup>, LIU Sicong<sup>1,2,3</sup>, LUO Xi<sup>1,2,3</sup>, QI Bing<sup>1,2,3</sup>, WANG Shuai<sup>1,2,3</sup>, BAO Yongrui<sup>1,2,3</sup>,  
LI Tianjiao<sup>1,2,3</sup>, WANG Liang<sup>4</sup>, YAO Dong<sup>1,2,3</sup>, MENG Xiansheng<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Dalian 116600, China;

**[收稿日期]** 2023-06-26

**[基金项目]** 中央引导地方科技发展专项(2021JH6/10500012);辽宁省科技创新领军人才项目(XLYC1902116);辽宁省教育厅基本科研项目(JYTQN2023474)

**[第一作者]** 郑莹,博士,讲师,从事生药药效物质及作用机制研究,E-mail:355809621@qq.com

**[通信作者]** \* 孟宪生,教授,博士生导师,从事药效物质组学和作用机制整合研究,E-mail:mxsvvv@126.com

2. Liaoning Multi-dimensional Analysis of TCM Technical Innovation Center, Dalian 116600, China;
3. Liaoning Province Modern TCM Research and Engineering Laboratory, Dalian 116600, China;
4. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China)

**[Abstract]** **Objective:** To elucidate the pharmacodynamic substances responsible for the anti-inflammatory and analgesic effects of Cyperi Rhizoma by structure-activity omics. **Method:** On the basis of the previous *in vitro* efficacy study by our research group, this study explored the *in vivo* efficacy of the flavonoids in Cyperi Rhizoma. The flavonoids in Cyperi Rhizoma and their targets were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), PharmMapper, Swiss TargetPrediction, and available articles. The targets of the anti-inflammatory and analgesic effects were collected from DisGeNET and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The common targets shared by flavonoids and the effects were selected as the direct targets of flavonoids endowing Cyperi Rhizoma with anti-inflammatory and analgesic effects, and protein-protein interaction (PPI) network of the core targets was constructed. The method of structure-activity omics was employed to correlate the structure and efficacy of one or more classes of chemical components in Cyperi Rhizoma with the targets as a bridge. The components were classified according to structure. Molecular docking of components to core targets was carried out via SYBYL-X 2.1.1, PyMol, and Discovery Studio 4.5 visualizer. Two targets with the highest binding affinity were selected to explore the relationship between compound structures and targets. **Result:** The flavonoids in Cyperi Rhizoma exerted anti-inflammatory and analgesic effects on the mouse model of pain induced by formaldehyde. Eighteen components and 115 direct targets were screened out, and the core targets with high activities were protein kinase B1 (Akt1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), cellular tumor antigen p53 (TP53), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). According to the structures, the flavonoids in Cyperi Rhizoma were classified into bioflavonoids, flavonols, flavones, and flavanes. The molecular docking results showed that flavonoids of Cyperi Rhizoma had the highest binding affinity to TP53 and PTGS2. The results of structure-activity omics showed that bioflavonoids represented the best binding structure to the targets, while their polyhydroxyl etherification resulted in a significant decrease in the binding affinity to PTGS2. Glycosides had higher binding affinity to PTGS2. The introduction of the long-chain hydrocarbon group to the A ring of flavonols facilitated the binding to TP53, while the change of B ring substituents was not the main factor affecting the binding affinity. The 3, 4-dihydroxyl flavane outperformed 3-hydroxyl flavane in the binding to TP53, while the two compounds showed similar binding affinity to PTGS2. **Conclusion:** The method of structure-activity omics was used to analyze the material basis for the anti-inflammatory and analgesic effects of flavonoids in Cyperi Rhizoma. Structure-activity omics provides new ideas for revealing the pharmacodynamic substances of traditional Chinese medicine.

**[Keywords]** Cyperi Rhizoma; flavonoids; anti-inflammatory and analgesic effects; structure-activity omics; molecular docking

香附始载于《名医别录》<sup>[1]</sup>,具有疏肝解郁,理气宽中,调经止痛的功效,常用于肝郁气滞,胸胁胀痛,疝气疼痛等症状。据《本草纲目》记载,香附为“气病之总司,女科之主帅”,主要用于调和气血,治疗妇科疾病和胃肠道疾病<sup>[2-4]</sup>;在《古代经典名方目录(第一批)》中,以香附药材组方的经典名方有5个<sup>[5]</sup>,虽功效不同,但均具有止痛作用,表明香附作为镇痛药应用于临床具有悠久的历史。现代研究

表明,香附含有挥发油类、黄酮类、生物碱类、三萜及甾醇类等多种化学成分,具有抗炎、抑菌、镇痛、抗抑郁、抗肿瘤、神经保护、降糖调脂和雌激素样作用等多重药理活性<sup>[6-8]</sup>,在抗炎镇痛方面疗效显著。

中药作为传统中医理论的载体,因化学成分复杂,共同发挥多向调节的作用,决定了其多靶点、多途径的作用特点。因此,中药研究应遵从传统中医的“辨证论治”和“整体观念”理论,以整体、动态的

角度建立药物与疾病的联系<sup>[9-10]</sup>,这与中药构效组学理论的学科交叉应用和整体网络分析、再整合的手段不谋而合。中药构效组学从成分结构出发,采用网络药理学分析和分子对接的技术手段,研究化学成分结构与作用靶点的相互关系,提供了从分子层面探讨中药成分与复杂疾病间关联的机会,为解析中药药效物质基础和阐释其多靶点、多途径的协同作用机制奠定基础。

炎症的本质是致炎因子对机体的损伤与机体抗损伤反应的斗争过程。急性炎症主要表现为充血、渗出和水肿,核心病机为邪气内聚,多为热毒、寒毒;慢性炎症则表现为增生、变性和坏死,核心病机为癥瘕集聚,多为血瘀、痰凝、气滞,因此常采用导邪外出、清解毒邪、扶正祛邪、活血化瘀的治疗法则<sup>[11-12]</sup>。气滞胃痛颗粒为辽宁华润本溪三药有限公司独家保护品种,被2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)、《国家基本药物目录(中成药)》等书目收录,属名优大品种之列,为临床治疗肝郁气滞,胃脘疼痛的常用药。其中臣药香附为血中气药,擅调血理气,既疏肝木郁滞又兼散表邪,亦能行气而和血<sup>[13]</sup>,协助君药发挥疏肝解郁、理气止痛之功效。课题组在前期气滞胃痛颗粒及组成药材的体外药效实验研究中发现,香附黄酮组分对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7有较好的保护作用,表明香附黄酮具有良好的抗炎镇痛作用<sup>[14]</sup>。在此基础上,本文通过体内实验验证香附黄酮组分的抗炎镇痛作用,并从构效组学的角度,探讨香附黄酮类成分结构与作用靶点的关系,分析黄酮类成分对抗炎镇痛核心靶点的分子调控机制,为解析香附黄酮发挥抗炎镇痛作用的物质基础及深入探究其作用机制提供研究方向。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级健康昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(18~22)g,购于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2013-0009。本研究中的动物实验获得辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号20150702)。

**1.2 药材与试剂** 香附(辽宁华润本溪三药有限公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* 的干燥根茎,批号20141002);AB-8树脂(天津南开合成树脂有限公司);阿司匹林(拜耳医药保健有限公司,国药准字HJ20160685,规格100mg/片,批号81285595);甲醛(丹东市龙海试剂厂,批号20081108);甲醇溶液

(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司,批号20100808);氢氧化钾(KOH,分析纯,天津凯信化学工业有限公司,批号20100824);生理盐水(吉林省都邦药业股份有限公司,批号1004280104);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号080-9002)。

**1.3 仪器与设备** HHS型电子恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);ACCULAB ALC-11C.4型电子天平(德国赛多利斯集团);FW-80型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗器械仪器厂);HS6150型超声波清洗器(天津恒奥科技发展有限公司);CP225D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);P1000型微量移液器(法国吉尔森公司);SUNRISE型酶标仪(瑞士TECAN公司);UV-1800型紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 根据课题组前期对香附黄酮提取纯化工艺的考察<sup>[14]</sup>,取香附粉末,加入8倍量60%乙醇,回流提取3次,每次2h,测定提取物得率为14.6%。提取液经AB-8树脂纯化,上样体积与树脂体积比为3:10,采用5倍柱体积的50%乙醇溶液洗脱,浓缩洗脱液,定容,采用紫外分光光度法测定香附黄酮含量,计算纯度为63.44%。

**2.2 动物造模、分组与给药<sup>[15-18]</sup>** 实验小鼠随机分为4组,空白组、模型组、阿司匹林组( $0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及香附黄酮组( $6.00\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组10只,雌雄各半,各组按给药剂量连续灌胃3d,2次/d。第3天给药1h后,用自制足体积测量器测量每只小鼠右后肢体积(以右后足关节为界),再用微量注射器向小鼠右后肢足跖部皮下注射2.5%甲醛溶液20 $\mu\text{L}$ ,24h后用自制足体积测量器测量每只小鼠右后肢体积,记录小鼠足肿胀度并计算右后足肿胀率及镇痛抑制率。

**2.3 甲醛致痛模型对小鼠体内前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)含量的影响** 于小鼠右踝关节处剪下炎足,称质量,剥皮后浸于盛有3mL预冷生理盐水的离心管中浸泡1h,取出炎足,浸出液离心,取上清液2mL,加2mL  $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH-甲醇溶液,混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴静置20min,稍冷后,于紫外分光光度计278nm下测定吸光度A,计算PGE<sub>2</sub>含量,比较各组间差异<sup>[19]</sup>。

**2.4 统计学方法** 统计分析采用SPSS 23.0软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。*t*检验分析用于检测组间差异的统计学意义, $P<0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

### 3 构效组学分析

**3.1 数据库及软件** 中药系统药理数据库和分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/index.php>) ; PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) ; Swiss TargetPrediction 数据库 (<http://old.swisstargetprediction.ch/>) ; DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>) ; 在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM, <https://omim.org/>) ; 检索互作基因 (STRING) 数据库 (<https://string-db.org/>) ; UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) ; RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/structure/1DOL>) ; PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) ; Cytoscape 3.7.2 软件、SYBYL-X 2.1.1 软件、PyMOL 软件、ChemOffice 2019 软件、Discovery Studio 4.5 visualizer 软件。

**3.2 活性成分及潜在靶点获取** 通过 TCMSP 和 PubChem 数据库及文献报道检索香附的化学成分, 结合 PharmMapper 和 Swiss TargetPrediction 数据库, 筛选得到香附黄酮类成分及其作用靶点。在 DisGeNET 数据库、OMIM 数据库分别输入“炎症 (inflammation/inflammatory)、疼痛 (pain)”, 并检索、去重、汇总后获得抗炎镇痛的作用靶点。

**3.3 活性成分核心靶点筛选** 将香附黄酮类成分靶点与抗炎镇痛作用靶点取交集, 认为是香附黄酮抗炎镇痛的直接作用靶点, 并将靶点转化为 gene symbol 格式。采用 STRING 数据库构建香附黄酮抗炎镇痛核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 将结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 根据度值 (degree) 及中位数进行网络优化。

**3.4 结构靶标分析** 将香附黄酮成分的 2Dmol2 文件导入 ChemOffice 2019 软件, 选择 MM2 进行能量最小化, 得到香附中活性成分的最低能量 3Dmol2 文件; 将所有直接作用靶点导入 UniProt 数据库, 选择物种为智人, 寻找清晰度高的氨基酸作为对接基团, 将氨基酸 ID 输入 RCSB PDB 数据库下载 PDB 格式文件。采用 SYBYL-X 2.1.1 软件对蛋白质进行去水加氢操作, 选择自动模式产生活性口袋, 再将香附黄酮成分的最低能量 3Dmol2 文件与之对接, 并通过 PyMOL 软件将对接结果进行美化加工。又通过 Discovery Studio 4.5 visualizer 软件的 2D 图表展示高分对接的键合形式, 对上述对接结果进行综合分析。综合评分是以模拟结合能, 反映配体与受体的结合亲和力, 综合考虑了极性作用、疏水作用、熵和溶剂化等因素<sup>[20]</sup>, 综合评分值越大, 配体与受

体结合越稳定, 越有可能存在相互作用。当综合评分 > 5 分表明化合物与靶点可能存在较好的结合, 当综合评分 > 7 分, 说明存在较强的结合<sup>[20-22]</sup>。

将香附黄酮各成分按照母核结构进行分类, 结合分子对接综合评分结果, 对各成分与核心靶点的结合活性进行分析, 探讨化合物不同结构与靶点的结合规律及特点或取代基变化对化合物与靶点结合能力的影响等因素, 研究多结构与多靶点的作用关系。

### 3.5 香附黄酮药效

**3.5.1 小鼠甲醛致痛模型实验** 在小鼠甲醛致痛实验中, 香附黄酮组足肿胀率明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 足肿胀度抑制率达到 70% 以上, 表明香附黄酮对小鼠甲醛致痛模型诱发的足肿胀有很好的抑制作用, 见表 1。

表 1 小鼠甲醛致痛实验 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Experiment of formaldehyde-induced pain model in mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	24 h 后右后足 肿胀率/%	24 h 后右后足 平均肿胀度	肿胀度 抑制率/%
模型组		62.93±7.02	0.075±0.008	-
阿司匹林组	0.04	13.30±3.04 <sup>1)</sup>	0.032±0.004 <sup>1)</sup>	57.33
香附黄酮组	6.00	13.03±3.15 <sup>1)</sup>	0.018±0.004 <sup>1)</sup>	76.00

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

### 3.5.2 对小鼠甲醛致痛模型体内 PGE<sub>2</sub> 含量影响

研究表明, PGE<sub>2</sub> 是炎症的主要介质, 可以诱发原发性疼痛并延长痛觉感受器的敏感化, PGE<sub>2</sub> 的表达水平可以在一定程度上作为判断疼痛程度的指标。与空白组比较, 模型组 PGE<sub>2</sub> 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ), 表明甲醛致痛模型造成炎症疼痛引发小鼠体内 PGE<sub>2</sub> 含量升高, 香附黄酮组差异无统计学意义; 与模型组比较, 香附黄酮组 PGE<sub>2</sub> 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ), 表明香附黄酮通过抑制 PGE<sub>2</sub> 含量升高达到抑制疼痛的作用。见表 2。

表 2 香附黄酮对小鼠甲醛致痛模型体内 PGE<sub>2</sub> 含量的影响 ( $n=10$ )

Table 2 Effect of flavonoids from Cyperi Rhizoma on PGE<sub>2</sub> content in mice in a formaldehyde-induced pain model ( $n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub> 含量 ( $\bar{x} \pm s$ ) /μg·g <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub> 抑制 率/%
空白组		82.34±5.29	
模型组		101.12±4.35 <sup>1)</sup>	
阿司匹林组	0.04	70.82±6.29 <sup>2)</sup>	29.96
香附黄酮组	6.00	77.36±3.13 <sup>2)</sup>	23.50

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$

### 3.6 构效组学分析

**3.6.1 香附黄酮化学活性成分** 基于课题组前期基础,通过搜索 TCMSP 和 PubChem 数据库及查阅文献<sup>[23-25]</sup>,筛选得到香附黄酮类成分 18 个,见增强出版附加材料。

**3.6.2 香附黄酮抗炎镇痛核心靶点分析** 将香附黄酮抗炎镇痛直接作用靶点导入 STRING 数据库构建核心靶点 PPI 网络,通过 Cytoscape 3.7.2 软件功能对靶点网络进行分析,共计 115 个节点,1 869 条边。依据度值的中位数进行筛选,度值较高的靶点蛋白激酶 B1(Akt1)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、TP53、过氧化物合酶 2(PTGS2)、基质金属蛋白酶(MMP)-9 为高活性的核心靶点,提示香附黄酮可能通过这些靶点蛋白发挥抗炎镇痛作用。见增强出版附加材料。

**3.6.3 香附黄酮化学结构分类** 将香附黄酮成分按照结构进行分类,包括穗花杉双黄酮、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、7-去甲基银杏双黄酮和金松双黄酮 5 个双黄酮类结构,槲皮素、异鼠李素、芦丁、山柰酚、杨梅酮和 8-异戊烯基山柰酚 6 个黄酮醇类结构,木犀草素、苜蓿素和金圣草(黄)素 3 个黄酮类结构,以及(-)-儿茶素、(+)-儿茶素、阿福豆素和 resivit 4 个黄烷类结构。见增强出版附加材料。

**3.6.4 关键核心靶点筛选** 选取核心靶点 Akt1、IL1B、TP53、PTGS2、MMP-9 与黄酮类成分进行分子对接筛选,共计 90 次对接,每次取靶点蛋白的前 20 个优势构象为对接受体,最终以最佳对接构象的综合评分作为分子对接结果,评分值越高认为结合活性越好,5 个核心靶点与 18 个香附黄酮成分对接可视化结果见增强出版附加材料。结果显示综合评分>5 分的高活性对接共 64 个,分别为 Akt1 对接 9 个、IL1B 对接 15 个、TP53 对接 16 个、PTGS2 对接 17 个及 MMP-9 对接 7 个,其中>7 分的对接包括 IL1B 对接 1 个、TP53 对接 6 个、PTGS2 对接 3 个,可以看出靶点 TP53 和 PTGS2 与香附黄酮的总体结合活性高于其他靶点,可能在香附黄酮抗炎镇痛作用中发挥主要作用。见增强出版附加材料。

**3.6.5 香附黄酮化学结构与靶点结合关系** 目前已知的香附黄酮类成分结构包括双黄酮类、黄酮醇类、黄酮类和黄烷类等,几类结构与靶点 TP53 和 PTGS2 总体表现出较好的结合活性。双黄酮类结构是香附黄酮中整体与靶点结合活性最好的结构,与 TP53 和 PTGS2 结合的综合评分多集中在 6~9 分,但当 A 环酚羟基醚化同时 B 环多个酚羟基醚化(金松双黄酮)后,结合活性呈下降趋势,尤其与 PTGS2

的结合活性明显降低,表明多羟基醚化可能是影响双黄酮类结合活性的因素之一。见增强出版附加材料。

黄酮醇类结构,包括 1 个黄酮醇苷(芦丁)和 5 个黄酮醇苷元(山柰酚、异鼠李素、杨梅酮、槲皮素和 8-异戊烯基山柰酚),糖苷芦丁在香附黄酮中表现出与 PTGS2 最佳的结合活性,综合评分>10 分,但与 TP53 的结合较黄酮醇苷元未表现出明显的优势。黄酮醇苷元以山柰酚结构为基础,表现为 A 环或 B 环取代基的变化,当 B 环引入 1 个羟基(槲皮素)或 1 个甲氧基(异鼠李素)或引入 2 个羟基(杨梅酮)时,表现出与 TP53 的结合活性稍有增加而与 PTGS2 的结合活性略低,总体差别不大,表明 B 环取代基的变化不是影响结合活性的主要因素;但在 A 环间苯二酚结构的 8 位上引入长链烷基(8-异戊烯基山柰酚),则显示出与靶点 TP53 更好的结合活性,说明 A 环引入长链烷基对结合活性有一定影响。见增强出版附加材料。

香附黄酮类结构对靶点 PTGS2 和 TP53 表现出相似的结合规律,整体结合较好,综合打分>5,但是总体活性差别不大,主要是大金圣草(黄)素、木犀草素和苜蓿素三者结构相近,仅是 B 环取代基结构的区别,木犀草素 B 环 3 位为羟基,金圣草(黄)素 B 环 3 位为甲氧基,苜蓿素则在金圣草(黄)素结构的基础上,在 B 环 5 位引入甲氧基,可见 B 环取代基的醚化对活性影响不大。而 B 环醚化可能带来与靶点 TP53 更好的结合活性。见增强出版附加材料。

香附黄烷类结构整体表现出与 PTGS2 更好的结合活性,且活性差别不大,综合评分 5~6 分;而与 TP53 的对接中,3,4-二羟基黄烷(resivit)的结合活性优于 3-羟基黄烷类[(-)-儿茶素、(+)-儿茶素和阿福豆素],且 B 环羟基数量对活性有一定影响,仅链接 1 个羟基(阿福豆素)时结合活性最差。见增强出版附加材料。

分子对接模拟的部分化合物与靶点结合模式构象图见增强出版附加材料,3D 构象中中间蓝色部分为活性化合物结构,外周彩色部分为靶点蛋白,化合物与靶点的多种氨基酸残基表现出相互作用。以芦丁和穗花山双黄酮的对接结果为例,芦丁结构中的羟基与 TP53 活性中心的 SER99、MET160、ASP208、THR211、ARG213 等氨基酸残基以氢键形式相结合,B 环与氨基酸残基 PRO98 存在烷基疏水作用,结构中其余部分与 LEU264、ARG267、ILE254、THR256、GLU258、GLY262、SER215、

VAL97等氨基酸残基以范德华力相结合;与PTGS2活性中心的ARG367、GLY225、GLU236、ASP229、PHE142、LEU224等氨基酸残基以氢键形式相结合,C环部分与LEU224存在烷基疏水作用,A环与GLU236存在阴离子- $\pi$ 作用,B环与SER143存在 $\sigma$ - $\pi$ 共轭作用,同时其他部分与氨基酸残基表现出范德华力的作用。穗花杉黄酮结构中的羟基与TP53活性中心的GLY262及ARG213以氢键形式相结合,芳环与ARG 267存在阳离子- $\pi$ 作用、与ASP208及GLU258存在阴离子- $\pi$ 作用,同时还与LEU264、PRO98及LEU206存在烷基疏水作用,结构中其余部分与ASN263、SER99、ASP207及HIS214等氨基酸残基以范德华力相结合;在与PTGS2的结合中,除了表现出氢键、阳离子- $\pi$ 作用、烷基疏水作用及范德华力外,芳环还与PHE142存在 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用、与LEU 224存在 $p$ - $\pi$ 共轭作用。

#### 4 讨论

构效组学是在中药成分化学结构的基础上,运用计算机虚拟筛选技术,研究中药中不同种类化合物结构与药效之间关系的一门学科。中药多成分、多靶点的作用方式决定了中药研究的复杂性,传统的研究方法存在周期间长、成本高、效率低等问题,将计算机辅助筛选技术应用于中药研究可以极大地降低初始筛选的时间和成本,构效组学研究方法的建立为中药药效物质及作用靶点的快速筛选提供了可能。同时,针对已知的疾病靶点,也可以通过构效组学研究对可能作用于靶点的药效物质进行分析和预测,寻找具有疗效的中药或药效成分,指导新药开发和应用。

本研究采用构效组学的研究方法,对香附黄酮发挥抗炎镇痛作用的“直接作用靶点-核心靶点-关键核心靶点”进行逐级筛选,通过分析成分与靶点的对接活性,推测靶点TP53和PTGS2可能在香附黄酮抗炎镇痛中发挥关键作用。TP53基因是重要的抑癌基因之一,p53是其表达的蛋白,当TP53基因发生缺失、突变或调节紊乱时,不仅失去抑癌功能,还将直接影响其编码的突变型p53蛋白,产生促进癌细胞增殖、抑制细胞凋亡等功能<sup>[26-27]</sup>。脱氧核糖核酸(DNA)受损时,基因不稳定,遗传信息发生改变,p53可以参与DNA的修复过程,当DNA的受损无法修复时,p53会引导受损细胞进入凋亡过程<sup>[28]</sup>,这一表现也体现了“扶正祛邪”的中医理论。PTGS2的基因表达产物环氧化酶-2(COX-2)在炎症刺激时大量表达,参与应激情况下神经元连接的退

化、发烧反应、炎症情况下肠道细胞的保护、血管系统平滑肌的血管松弛和血小板的血管收缩等<sup>[29]</sup>。在炎症反应的初始阶段,COX-2作为血管扩张剂导致肿胀、水肿和热原作用,同时引起缓激肽、前列腺素的产生和释放增多,从而引起疼痛。PGE<sub>2</sub>增加痛觉感受器对致痛物质的敏感性,加重疼痛<sup>[30]</sup>。因此抑制COX-2能起到良好的抗炎镇痛作用,即体现香附“活血化瘀、理气止痛”之功效。

研究表明,黄酮类化合物在炎症的不同阶段可以通过抑制蛋白激酶和转录因子、清除自由基、影响花生四烯酸代谢和参与免疫调节等多种途径发挥抗炎作用<sup>[31]</sup>。香附黄酮成分与其抗炎镇痛靶点的分子对接结果表明,成分与靶点具有较好的结合能力,尤其靶点TP53和PTGS2可能是主要的作用靶点。文献记载,芦丁通过上调p53诱导人脑胶质瘤细胞凋亡,且抑制p53可消除芦丁诱导的细胞凋亡<sup>[32]</sup>;穗花杉双黄酮通过调控B16F-10黑色素瘤细胞中的p53基因,调控B16F-10细胞、肿瘤相关巨噬细胞和腹膜巨噬细胞中一氧化氮和促炎因子的产生,从而促进细胞凋亡<sup>[33]</sup>;银杏双黄酮在大鼠关节炎模型中显示出良好的抗关节炎活性和镇痛活性<sup>[34]</sup>;木犀草素可以有效地抑制小鼠在热板和尾浸泡试验中由热应激源及乙酸和谷氨酸等化学应激源引起的痛觉<sup>[35]</sup>;芦丁、7-去甲基银杏双黄酮、银杏双黄酮、异鼠李素及儿茶素等成分均能调节COX-2的表达水平<sup>[36-40]</sup>。可见黄酮类成分是香附抗炎镇痛作用的主要成分类型之一,这与课题组前期的药效组分研究结果一致。

构效组学分析分别采用PyMOL和Discovery Studio 4.5 visualizer两个软件进行分子对接模拟,通过立体和平面构象对化合物与靶点的结合进行综合评价,结果显示香附黄酮与靶点的对接活性整体较好,化合物与靶点的氨基酸残基表现出范德华力、氢键、烷基疏水作用、阳离子- $\pi$ 作用、阴离子- $\pi$ 作用、 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用、 $p$ - $\pi$ 共轭作用及 $\sigma$ - $\pi$ 共轭作用等多种不同的键合形式,在稳定结合构象上有重要的作用。而结合活性受双方电子效应、能量匹配性、作用位点及基团空间结构等多种因素的影响<sup>[41]</sup>,使得不同结构与靶点表现出不同的结合特点。从核心靶点TP53和PTGS2的对接结果来看,双黄酮类结构是香附黄酮中整体与靶点结合最好的结构,但双黄酮类的多羟基醚化带来与PTGS2结合活性的明显下降;黄酮醇类的糖苷与PTGS2有更好的对接活性,而苷元的A环引入长链烷基则与

TP53结合更佳;黄酮醇苷元和黄酮类成分B环取代基的变化对应的综合评分变化不大,可能不是影响结合活性的主要因素;黄烷类结构中3,4-二羟基黄烷与TP53的结合活性优于3-羟基黄烷,但与PTGS2的结合未表现出优势。

本研究在中医理论“整体观念”的指导下,将传统中医理论与现代技术手段相结合,以药效组分筛选为基础,通过计算机虚拟筛选技术,寻找香附黄酮抗炎镇痛作用的核心靶点,再从成分的结构出发,在分子水平上探讨黄酮成分与核心靶点的相互作用关系和特点,分析香附黄酮通过多成分、多靶点协同发挥抗炎镇痛作用的药效机制,同时验证了药效组分筛选的准确性。本研究为快速筛选药效物质基础及作用靶点提供新思路,为阐明药效物质基础、探究作用机制及开发中药先导化合物提供研究方向,为评价和优化已知中药的临床疗效、指导临床用药提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 陶弘景. 名医别录[M]. 尚志钧, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [2] 陈志坚, 胡璇, 刘国道. 香附的化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(36): 113-115.
- [3] 潘少斌, 孔娜, 李静, 等. 香附化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2019, 21(10): 1429-1434.
- [4] 吴彬, 刘晓俊, 阙慧卿, 等. 基于中医传承辅助平台分析含香附中成药的用药规律[J]. 中国药业, 2019, 28(13): 5-9.
- [5] 夏玲, 严辉, 郭盛, 等. 经典名方中香附的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(10): 159-166.
- [6] 张晶, 刘莉, 徐慧荣, 等. 香附化学成分及药理作用研究新进展[J]. 化学工程师, 2021(3): 55-57, 7.
- [7] 汪晓蓉, 邸莎, 赵林华, 等. 香附的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2019, 39(10): 1297-1300.
- [8] 王蕾, 段文兰, 段云凤, 等. 中药香附的化学成分研究[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2021, 30(1): 6-11.
- [9] 张彦琼, 李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015(6): 883-892.
- [10] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [11] 刘松, 牟浩亚, 卢云等. 炎症的中医治疗思路[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(10): 68-70.
- [12] 杨翰林, 罗川晋, 吴伟. 湿热与瘀热类炎症的中医思考[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(3): 464-467.
- [13] 李亚慧, 姚贺之, 柴露露, 等. 基于古代文献挖掘的中医治疗郁证组方规律研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11): 1510-1514.
- [14] 孟宪生. 气滞胃痛方现代研究与实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 303-357.
- [15] 关业枝, 袁征, 张首亚, 等. 复方风湿宁注射液镇痛作用的实验研究[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(4): 534-537.
- [16] 王晓玲, 乐健, 洪战英, 等. 中药镇痛实验的研究进展[J]. 药学服务与研究, 2011, 11(3): 213-217.
- [17] DE CAMPOS R O, PAULINO N, DA SILVA C H, et al. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats [J]. J Pharm Pharmacol, 1998, 50(10): 1187-1193.
- [18] ZHANG Y, WANG J Z, WU Y J, et al. Anti-inflammatory effect of recombinant human superoxide dismutase in rats and mice and its mechanism [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(5): 439-444.
- [19] HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain [J]. Pain, 1987, 30(1): 103-114.
- [20] JAIN A N. Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine [J]. J Med Chem, 2003, 46(4): 499-511.
- [21] 钟倩雯, 朱安, 王旗. 柴胡皂苷及其代谢产物潜在靶点蛋白预测和部分验证 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(2): 105-111.
- [22] LUO L, WANG H, HUANG G, et al. Pharmacological mechanisms of Tinglizi against chronic heart failure determined by network pharmacology and molecular docking [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2152399.
- [23] PIRZADA A M, ALI H H, NAEEM M, et al. *Cyperus rotundus* L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 174: 540-560.
- [24] 罗淑文. 香附醇提物中具有解热镇痛作用的物质基础研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [25] 徐燕, 李大祥, 凌铁军, 等. 香附化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 214-218.
- [26] 濮晓红, 叶庆. TP53基因在特定血液病和淋巴瘤中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014(2): 186-190.
- [27] 卞春安, 李忠佑, 许有涛, 等. 突变型p53蛋白在肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2015(1): 23-28.

- [28] HAM S W, JEON H Y, JIN X, et al. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26 (3) : 409-425.
- [29] MALEKI S J, CRESPO J F, CABANILLAS B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chem*, 2019, 299:125124.
- [30] DESAI S J, PRICKRIL B, RASOOLY A. Mechanisms of phytonutrient modulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer[J]. *Nutr Cancer*, 2018, 70(3):350-375.
- [31] 孙松娴,石银龙,濮文渊,等. DNA损伤检查点——中药治疗恶性肿瘤的潜在分子机制[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(7):1538-1541,后插5.
- [32] YAN X, HAO Y, CHEN S, et al. Rutin induces apoptosis via P53 up-regulation in human glioma CHME cells[J]. *Transl Cancer Res*, 2019, 8(5) : 2005-2013.
- [33] GURUVAYOORAPPAN C, KUTTAN G. Amentoflavone stimulates apoptosis in B16F-10 melanoma cells by regulating Bcl-2, p53 as well as caspase-3 genes and regulates the nitric oxide as well as proinflammatory cytokine production in B16F-10 melanoma cells, tumor associated macrophages and peritoneal macrophages[J]. *J Exp Ther Oncol*, 2008, 7 (3):207-218.
- [34] ADNAN M, RASULA, HUSSAIN G, et al. Ginkgetin: A natural biflavone with versatile pharmacological activities[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145:111642.
- [35] FAN X, DU K, LI N, et al. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of luteolin in mice [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2018, 37 (4):351-364.
- [36] FIDELES L S, DE MIRANDA J, MARTINS C, et al. Role of rutin in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: Prevention of histological damage and reduction of inflammation and oxidative stress [J]. *Molecules*, 2020, 25(12):2786.
- [37] LI M, LI B, HOU Y, et al. Anti-inflammatory effects of chemical components from *Ginkgo biloba* L. male flowers on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Phytother Res*, 2019; 33 (4) : 989-997.
- [38] SUNIL M A, SUNITHA V S, SANTHAKUMARAN P, et al. Protective effect of (+)-catechin against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 cells through downregulation of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29 (4):1139-1155.
- [39] SON J K, SON M J, LEE E, et al. Ginkgetin, a Biflavone from *Ginkgo biloba* leaves, inhibits cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(12):2181-2184.
- [40] TSAI S W, LIN C C, LIN S C, et al. Isorhamnetin ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in the rats of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019, 41 (4) : 504-512.
- [41] 谢晓兰,郑守真,高平章. 分子对接研究辛基酚与N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的相互作用[J]. *泉州师范学院学报*, 2016, 34(2):20-25.

[责任编辑 顾雪竹]