

气滞胃痛颗粒中白芍抗炎镇痛作用的构效组学

齐冰^{1,2,3}, 罗曦^{1,2,3}, 郑莹^{1,2,3}, 孟莹^{1,2,3}, 王帅^{1,2,3}, 包永睿^{1,2,3}, 李天娇^{1,2,3},
韩凌⁴, 舒心莹^{1,2,3}, 孟宪生^{1,2,3*}

- (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,阐释白芍总苷发挥抗炎镇痛作用的药效物质。方法:在课题组前期体外药效筛选的基础上,采用甲醛致小鼠足肿胀模型,开展白芍总苷体内抗炎镇痛药效研究;运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM),检索互作基因(String)等网络数据库,获取并筛选白芍抗炎镇痛活性成分的核心靶点;采用计算机虚拟筛选技术将不同类型的白芍总苷与核心靶点进行对接,以各靶点与活性结构的综合评分总分为遴选原则,得到高结合活性的关键核心靶点,以靶点为桥梁,将白芍中一类或多类化学成分结构与药效紧密关联,通过白芍总苷各类结构与药效靶点结合规律,探讨分析构效关系。结果:白芍总苷在体内具有良好的抗炎镇痛药效,筛选得到23个白芍活性成分,其发挥抗炎镇痛作用的核心靶点为表皮生长因子受体(EGFR),信号传导及转录激活因子3(STAT3),血管内皮生长因子A(VEGFA),细胞肿瘤抗原p53(TP53),原癌基因转录因子(JUN);按照母核进行结构归类,其中蒽烷单萜苷类成分16个,蒽烯单萜苷类成分4个,单萜内酯苷类成分2个,单萜酮类成分1个;经对接评分筛选得到关键核心靶点为EGFR、STAT3;通过活性结构与关键核心靶点的构效分析发现,母核上的酮基及苯环上基团的引入,会对结合活性造成影响。结论:该研究基于白芍总苷抗炎镇痛的药效作用,采用构效组学研究方法,可以分析白芍总苷抗炎镇痛的物质基础,为中药药效物质的阐释提供新思路新方法。

[关键词] 白芍; 白芍总苷; 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)21-0169-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231816 **[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.20231222.1254.002>

[网络出版日期] 2023-12-22 16:00:30

Structure-activity Omics on Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Paeoniae Radix Alba in Qizhi Weitong Granules

QI Bing^{1,2,3}, LUO Xi^{1,2,3}, ZHENG Ying^{1,2,3}, MENG Ying^{1,2,3}, WANG Shuai^{1,2,3}, BAO Yongrui^{1,2,3},
LI Tianjiao^{1,2,3}, HAN Ling⁴, SHU Xinying^{1,2,3}, MENG Xiansheng^{1,2,3*}

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

[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)

[第一作者] 齐冰,博士,讲师,从事药物分析研究,E-mail:qbs0820@sina.com

[通信作者] * 孟宪生,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

[Abstract] **Objective:** To elucidate the active compounds for the anti-inflammatory and analgesic effects of *Paeoniae Radix Alba* from structure-activity omics. **Method:** On the basis of the previous *in vitro* efficacy study by our research group, a mouse model of foot swelling was induced by methyl aldehyde and used to study the anti-inflammatory and analgesic effects of total glycosides of *Paeoniae Radix Alba* *in vivo*. The core targets of the active compounds for the anti-inflammatory and analgesic effects of *Paeoniae Radix Alba* were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and Search Tool for Recurring Instances of Neighbouring Genes (STRING). Molecular docking was conducted for the total glycosides of *Paeoniae Radix Alba* with the core targets, and the key core targets with high binding affinity were screened out according to the comprehensive score of each target and active structure. The structure-activity relationship was analyzed with targets as a bridge through the combination of compound structures and pharmacological effects. **Result:** The total glycosides of *Paeoniae Radix Alba* had good anti-inflammatory and analgesic effects *in vivo*. The core targets of 23 active components of *Paeoniae Radix Alba* were epidermal growth factor receptor (EGFR), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), cellular tumor antigen p53 (TP53), and proto-oncogene transcription factor (JUN). According to the structure of the parent nucleus, there were 16 pinane monoterpene glycosides, 4 pinene monoterpene glycosides, 2 monoterpene lactone glycosides, and 1 monoterpene ketone. The key core targets screened out by molecular docking were EGFR and STAT3. The structure-activity analysis of the active compound structures and the key core targets showed that the introduction of ketone group and benzene ring group on the parent nucleus affected the binding activity. **Conclusion:** This study analyzed the material basis for the anti-inflammatory and analgesic effects of total glycosides of *Paeoniae Radix Alba* from structure-activity omics, providing new ideas and methods for revealing the pharmacodynamic substances in traditional Chinese medicine.

[Keywords] *Paeoniae Radix Alba*; total glycosides of *Paeoniae Radix Alba*; anti-inflammatory and analgesic effects; structure-activity omics; molecular docking

气滞胃痛颗粒是2020年版《中华人民共和国药典》收录的非处方中成药,由中国工程院院士、全国著名中医专家王永炎教授等多位专家精心研制,是治疗胃痛系列疾病的经典中药复方,该方由柴胡、白芍、枳壳、香附(炙)、延胡索(炙)、甘草(炙)6味药材组成,具有疏肝理气、和胃止痛的功效。炎症是西医的概念,中医理论体系中并无炎症一词,但有研究发现炎症反应与中医理论中气滞血瘀有密切关系^[1-2],如气滞血瘀证出现的局部红肿、疼痛、偶有发热等症状与局部炎症出现的症状基本一致。气滞血瘀多因情志内伤,抑郁不遂,气机阻滞,而致血瘀。肝主疏泄的功能,在气机运行中起着关键作用,因此气滞血瘀证同肝主疏泄的功能密切相关,故可采用疏肝活血中药进行治疗。

气滞胃痛颗粒中以白芍作为臣药,具有补血敛阴,柔肝止痛功效,与柴胡、香附等疏肝解郁药物同用,为治疗诸痛之良药,防止理气药香燥伤阴之弊。白芍是毛茛科植物芍药 *Paeonia ladiiflora* 的干燥根,具有养血调经,敛阴止汗,柔肝止痛,平抑肝阳等功

效^[3]。现代药理研究表明其具有抗炎、保肝、镇痛、养血等药理药效。白芍所含的化学成分众多,主要发挥生理活性的物质为单萜糖苷类化学成分-白芍总苷,此外还含有黄酮类、三萜类、鞣质类及多糖类等化合物^[4]。虽有大量文献证实白芍具有抗炎镇痛的药理作用^[5-6],但由于白芍中含有多种活性成分及复合物,且各活性成分在中医药理论指导下的整体作用及相互作用不明确,难以挖掘出真正发挥药效的物质基础,形成药物、机制的整体网络。

课题组前期对所含白芍的气滞胃痛颗粒进行系统研究^[7],按其疏肝理气、和胃止痛的功效,开展抗炎止痛、抗溃疡、促胃肠动力的精准研究,明确复方配伍药材药效组分和作用机制。针对抗炎镇痛的功效,在体外建立脂多糖(LPS)所致小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型,采用塞唑蓝(MTT)比色法,以细胞增殖率为指标,明确白芍总苷对巨噬细胞具有明显的保护作用。本研究基于此基础,在体内构建甲醛致小鼠足肿胀模型,以足肿胀相对抑制率,体内前列腺素 E₂(PGE₂)相对含量为指标,

明确白芍总苷在体内的抗炎镇痛作用,进一步运用构效组学的研究方法,对白芍总苷不同类型的化学成分与抗炎镇痛关键核心靶点的关系进行深入探讨分析,科学、系统地揭示白芍总苷发挥抗炎镇痛作用的物质基础及作用机制,为后期实验研究及临床用药提供合理的数据支撑。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康昆明种小鼠,雌雄各半,体重质量(18~22)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号为SCXK(辽)2013-0009。本研究经辽宁中医药大学伦理委员会批准(批准号20150702),所有程序均严格遵循动物使用和护理伦理原则。

1.2 药材与试剂 白芍(辽宁华润本溪三药有限公司,经辽宁中医药大学张慧教授鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根,批号20140615);苯甲酸对照品(顺勃生物有限公司,批号100419-200301);阿司匹林(拜耳医药保健有限公司,批号81285595,国药准字HJ20160685,规格100 mg/片);甲醛(丹东市龙海试剂厂,批号20081108);生理盐水(吉林省都邦药业股份有限公司,批号1004280104);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);PGE₂(96T)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,货号E03P0012)。

1.3 仪器与设备 UV-1800型紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);Agilent 1100 Series型高效液相色谱仪(配有DAD、自动进样器、ChemStation工作站,安捷伦科技有限公司);HSS型电子恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);HC-2517型高速离心机(科大创新股份有限公司);P1000型微量移液器(法国吉尔森公司);Milli-Q超纯水处理装置(美国Millipore公司)。

2 方法

2.1 药物制备 依课题组前期提取纯化研究方法^[7],取白芍粉末,加6倍量50%乙醇,加热回流提取3次,每次2 h,合并过滤,回收乙醇,稀释为的药液,95%乙醇沉至90%,冷藏10 h,采用HPD-100型大孔吸附树,以1 g·mL⁻¹(生药)的上样浓度、以(药材/湿树脂)2:1的上柱量上柱,用5倍柱体积(5BV)50%乙醇以2 BV·h⁻¹速度进行洗脱,收集洗脱液,水浴挥干,即得白芍总苷活性部位提取物,以苯甲酸为对照品经高效液相色谱测定,计算出白芍总苷含量为18.72 mg·g⁻¹。

2.2 动物造模、分组与给药 模型构建依据文献方法^[8-12],采用随机原则,将昆明种小鼠按体质量及性别分为空白组、模型组、阿司匹林组及白芍总苷组,每组10只,雌雄各半,阿司匹林组0.04 g·kg⁻¹、白芍总苷组15.00 g·kg⁻¹,各给药组按剂量灌胃给药3 d,2次/d,空白及模型组给予等量的生理盐水,在第3天给药1 h后,各组先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),后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 μL,24 h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 甲醛致小鼠疼痛对小鼠体内PGE₂含量的影响 依文献[12-13]方法,将小鼠右踝关节处剪下炎足,称重,剥皮后加入4℃预冷的生理盐水3 mL,浸泡1 h,取出炎足,将浸出液离心后取上清液2 mL,加入0.15 mol·L⁻¹ KOH-甲醇溶液2 mL,混匀,50℃水浴20 min,放冷后用紫外分光光度计测定吸光度A,计算PGE₂含量,比较各组间差异。

2.4 统计分析 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>)、Swiss Target Prediction 数据库(<http://old.swisstargetprediction.ch/>)、疾病相关基因与突变位点数据库(DiGeNET, <http://www.disgenet.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)、UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)、Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、STRING 数据库(<https://string-db.org/>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Cytoscape 3.7.2软件、SYBYL-X 2.1.1软件、ChemOffice2019软件、PyMOL软件、Discovery Studio 4.5 visualizer软件。

3.2 活性成分潜在靶点获取 在课题组前期对白芍总苷组分研究的基础上,结合文献报道,运用TCMSP数据库、PubChem等数据库搜集白芍总苷的活性成分信息,同时运用Pharm Mapper、Swiss TargetPrediction、TCMSP等数据库搜集活性成分的作用靶点。

将“inflammation”“inflammatory”“pain”作为检索词分别输入到DiGeNET数据库、OMIM数据库

中,经汇总、去重等数据处理后得到抗炎镇痛疾病作用靶点。

3.3 活性成分核心靶点筛选 采用 Venny 2.1 将白芍活性成分靶点与抗炎镇痛作用靶点取交集,明确白芍发挥抗炎镇痛药效的直接作用靶点。将交集靶标上传到 STRING 数据库,构建靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,所得结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件,绘制蛋白相互作用网络图,使用 Network Analysis 网络分析功能,进行拓扑分析,计算 PPI 网络中各节点的度值(degree),筛选排名前 5 位的靶点作为白芍抗炎镇痛活性成分的核心靶点。

3.4 结构靶标分析 将白芍总苷活性成分依据母核特点进行归类,运用 SYBYL-X 2.1.1 软件,以经最小化能量处理后的结构作为配体分子,以核心靶点作为受体蛋白,进行半柔性分子对接运算,依据得到的对接综合评分,评价二者的结合能力。同时运用 Discovery Studio 4.5 visualizer 软件,进一步分析结构与蛋白对接键作用类型。根据各靶点与结构对接总评分,筛选得到关键核心靶点,构建白芍总苷各结构类型与关键核心靶点的映射关系,对其进行探讨分析。

4 结果

4.1 白芍总苷体内药效

4.1.1 甲醛小鼠致痛实验 实验结果表明,与模型组比较,白芍总苷组及阿司匹林组小鼠 24 h 后右后足的平均肿胀率及 24 h 后右后足的平均肿胀度均明显降低($P<0.05$),表明白芍总苷有抑制甲醛刺激引发足肿胀的功效。结果见表 1、表 2。

表 1 各组小鼠致痛足肿胀率($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Swelling rate of painful foot in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	24 h 后右后足肿胀率/%
模型组		62.93 $\pm$ 7.02
阿司匹林组	0.04	13.30 $\pm$ 3.04 ¹⁾
白芍总苷组	15.00	22.71 $\pm$ 4.19 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$ (表 2 同)

表 2 各组小鼠肿胀抑制率($n=10$)

Table 2 Swelling inhibition rate of each group ($n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	24 h 后右后足平均肿胀度($\bar{x}\pm s$)	肿胀度抑制率/%
模型组		0.075 $\pm$ 0.008	—
阿司匹林组	0.04	0.032 $\pm$ 0.004 ¹⁾	57.33
白芍总苷组	15.00	0.027 $\pm$ 0.004 ¹⁾	64.00

4.1.2 甲醛法致痛对大鼠体内 PGE₂ 含量影响 由表 3 可知,与空白组比较,模型组 PGE₂ 含量明显升高($P<0.05$),说明本实验引发的小鼠足部炎性疼痛模型成立,白芍总苷组 PGE₂ 含量明显降低($P<0.05$),说明白芍总苷能使甲醛刺激小鼠引发炎性疼痛所导致 PGE₂ 含量低于正常水平;与模型组相比,白芍总苷组小鼠的 PGE₂ 含量明显减低($P<0.05$),表明白芍总苷对 PGE₂ 所引发的炎性疼痛有显著的抑制作用,抑制率为 39.37%。

表 3 甲醛致小鼠疼痛对体内 PGE₂ 含量的影响($n=10$)

Table 3 Effect of pain induced by formalin on PGE₂ content in mice ($n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PGE ₂ 含量($\bar{x}\pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	PGE ₂ 抑制率/%
空白组		82.34 $\pm$ 5.29	
模型组		101.12 $\pm$ 4.35 ²⁾	
阿司匹林组	0.04	70.82 $\pm$ 6.29 ^{1,2)}	29.96
白芍总苷组	15.00	61.31 $\pm$ 2.68 ²⁾	39.37

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

4.2 构效组学分析

4.2.1 白芍总苷化学活性成分 基于白芍总苷的抗炎镇痛作用,经数据库及文献搜集筛选,共得到白芍总苷活性成分 23 个,各成分信息,见增强出版附加材料。

4.2.2 白芍总苷抗炎镇痛核心靶点分析 经筛选得到抗炎镇痛靶点 3 074 个,与白芍总苷活性成分交集靶点 102 个,STRING 得到交集靶点 PPI 关系后,在 Cytoscape 3.7.2 软件中删去 6 个没有参与互作关系的节点,得到蛋白相互作用网络图,共计得到 96 个节点和 627 条边,依据各靶点 Degree 值,得到排名前 5 位的核心靶点 EGFR(degree=51)、STAT3(degree=47)、VEGFA(degree=46)、TP53(degree=43)、JUN(degree=38),见增强出版附加材料。

4.2.3 白芍总苷化学结构分类 白芍总苷为白芍中单萜及其苷类化合物的总称。依据其母核的结构,将 23 个活性成分分为 4 个结构类型,蒽烷单萜苷类成分 16 个,蒽烯单萜苷类成分 4 个,单萜内酯苷类成分 2 个及单萜酮类成分 1 个。

4.2.4 关键核心靶点筛选 将核心靶点 EGFR、STAT3、VEGFA、TP53、JUN 作为分子对接的蛋白受体,23 个活性成分作为小分子配体进行分子对接,每次对接显示前 20 个优势构象,对接 23 次,共计 460 个构象,每次对接仅展示最佳构象的得分,对接结果评分见增强出版附加材料,对接结果可视化,

见增强出版附加材料。

表中的综合评分,代表分子对接分值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^[12],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^[14-16]。该值越高,则表示配体与受体结合所需要的自由能就越小,结合就越稳定^[17]。由结果可见,白芍总苷成分与5个核心靶点均具有结合活性,其中分数>7的高结合活性对接36个;分数位于5~7分的较好对接69个;11个对接有一定的结合活性。

由对接可视化结果图可见,靶点EGFR及STAT3在各靶点评分总分中位居一、二,说明二者与白芍总苷成分具有高结合活性,是白芍总苷发挥抗炎镇痛作用的关键核心靶点,故选取EGFR和STAT3用于进一步的构效组学研究。

4.2.5 白芍总苷化学结构与关键核心靶点结合关系 由综合评分可知,白芍总苷中蒽烷单萜苷、蒽烯单萜苷、单萜内酯苷以及单萜酮类结构总体与靶点EGFR及STAT3均结合较好,综合评分>4分,蒽烷单萜苷类化合物总体上表现出与2个靶点更高的结合活性,单萜酮则表现出最低的结合活性。

芍药苷及其衍生物的蒽烷单萜苷类结构与EGFR具有强烈的对接活性,综合评分在6~9分。芍药苷表现出较好的EGFR结合活性,而芍药苷羟基硫酸酯化后形成的芍药苷亚硫酸酯结合活性下降,芍药苷氧化后的氧化芍药苷,苯环上引入甲氧基的牡丹皮苷E,苯环上仅保留一个甲氧基的牡丹皮苷D及去掉苯甲酰基的8-O-去苯甲酰基芍药苷,活性依次降低,均弱于芍药苷,表明芍药苷中的苯甲酸酯部分对对接活性有较大影响,苯环上引入基团会导致结合活性的下降。将芍药苷的糖基部分成酯,得到没食子酰芍药苷及没食子酰氧芍药苷,苯甲酰芍药苷及苯甲酰氧芍药苷,结合活性没有显著改变,而牡丹皮苷H和牡丹皮苷J则活性降低,表明酯基苯环上取代基对结合活性有一定影响,引入1个羟基或羟基成醚不利于与靶点的结合。见增强出版附加材料。

而在与靶点STAT3的对接中,蒽烷单萜苷类结构综合评分在5~7分,总体结合活性低于EGFR,表明此类结构对STAT3、EGFR均有较好结合,但是更倾向于通过靶点EGFR发挥抗炎镇痛作用。从整体

来看,苯环氧化后的结构活性明显提高(牡丹皮苷E、牡丹皮苷D、氧化芍药苷与芍药苷,牡丹皮苷H与牡丹皮苷J、没食子酰氧芍药苷与没食子酰芍药苷、苯甲酰氧芍药苷与苯甲酰芍药苷)。芍药苷糖基成酯(牡丹皮苷J、没食子酰芍药苷及苯甲酰芍药苷)活性整体没有显著改变,将芍药苷羟基酯化后的芍药苷亚硫酸酯活性有所提高。当芍药苷8位氧去掉苯甲酰基(8-O-去苯甲酰基芍药苷)后,活性增加,而糖基2位氧原子进一步形成苯甲酸酯(牡丹皮苷I),活性没有明显改变,表明8位苯甲酸酯对活性有一定影响,而糖基2位苯甲酸酯对活性没有明显影响。见增强出版附加材料。

蒽烯单萜苷类结构与EGFR及STAT3靶点的对接活性均弱于蒽烷单萜苷,综合评分在5~7分,其中 α -蒽烯(β -蒽烯-10-烯基- β -巢菜苷)为此类结构中最佳;单萜内酯苷类结构与EGFR对接活性较好,综合评分7分,但与靶点STAT3对接活性较低,其中苯甲酰芍药内酯苷结合活性<5;单萜酮类结构与两个靶点均表现出最低的结合活性,综合评分分别为5.290 1和4.176 4分,表明具有酮基的母核结构使对接活性显著下降。见增强出版附加材料。

通过化合物与关键核心靶点的对接键结合模式分析,对上述所探讨的规律进行进一步的分析与验证。在与靶点EGFR的结合中,苯甲酰芍药苷与EGFR中的GLY719、VAL726、ASN842等氨基酸残基以范德华力相互作用,蒽烷母核与PHE723、ALA722等以疏水键相结合,与母核相连的苯甲酰基团中的羰基与LYS745以氢键结合,而糖基部分的羰基则与ARG841相结合。芍药内酯苷与EGFR中的LEU799、PRO914THR725等氨基酸残基以范德华力相互作用,芍药内酯苷中的苯环及蒽烷母核中的烷基以疏水键的形式分别与SER720、PRO877等相结合,SO41与糖基部分的羟基氧以氢键相结合。在与STAT3的结合中,芍药内酯苷与SYS157、ASO140、LYS105等氨基酸残基以范德华力相结合,糖基的3位及4位羟基分别与残基ASN145、SER144以氢键形式相互作用。芍药苷与TYR178、SER144、GLU24等氨基酸残基以范德华力相结合,蒽烷母核上的烷基以疏水键形式与残基LEU1结合,糖基片段上3位及4位羟基上的氢分别与ASN145、Q51401通过氢键作用力相互连结。见增强出版附加材料。

5 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。中药含有众多复杂的化学成分,其发挥疗效也具有多途径、多靶点协同作用的特征,因此阐明中药的药效物质基础是一项艰难而复杂的工程,更是制约中医药实现现代化和国际化的壁垒^[18-20]。构效组学研究的方法是将活性结构与药效靶点建立联系的一种综合的多重虚拟筛选策略,该策略可用于整合海量信息,构建生物信息综合网络,分析成分与靶点的潜在联系,解决中药复杂物质体系物质基础及作用机制不明晰的问题,为中医药的创新发展提供了新的方法。对于已知结构的化合物,可通过计算机筛选,将化合物精准定位至药效靶点,创建虚拟环境模拟体内受体配体结合的相互作用,可以在理论上初步评价药物是否具有药效活性,进而靶向展开药理实验验证其准确性,节省实验成本,实现对复杂物质体系药效物质基础的快速筛选。同样,对于新发现的疾病靶点,也可按此方法反向筛选,快速寻找作用该靶点的活性化合物。

本研究在前期体外药效的基础上,开展白芍总苷体内抗炎药效研究,对具有明确抗炎镇痛药效的白芍总苷进行构效组学分析,从构效组学研究结果发现,各结构类型的白芍总苷与抗炎镇痛核心靶点均有较好的结合活性,通过剖析各结构类型与各靶点的对接总分得知,蒽烷单萜苷类结构主要的高活性结合靶点为 EGFR,而蒽烯单萜苷类结构则更倾向于靶点 STAT3,单萜内酯苷类结构与各靶点对接活性无显著差异,而单萜酮在各靶点对接中均表现出相对较低的结合评分,进一步的构效分析发现,母核上的酮基及苯环上基团的引入,会对结合活性造成影响。蒽烷单萜苷类为白芍总苷的主要成分类型,芍药苷及苯甲酰芍药苷是具有蒽烷单萜苷类结构的白芍总苷。高卓维等^[21]研究表明,芍药苷能通过抑制 Src/STAT3 信号通路的激活,从而抑制 P-Src 及磷酸化的 STAT3 蛋白的表达水平,级联抑制基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)。MMP-2 和 MMP-9 是基质金属蛋白酶,在炎症早期阶段,炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)等的释放能够促进 MMP-2、MMP-9 的表达,而过表达的 MMP-2、MMP-9 会使炎症细胞向更深层的组织中浸润^[22-23]。苯甲酰芍药苷能抑制 LPS 诱导的小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平,缓解急性肺损伤症状,其机制与降低核转录因子- κ B 激酶亚基 β 抑制因子(IKK β)、核转录

因子- κ B p65(NF- κ B p65)磷酸化水平及总 NF- κ B p65 水平,抑制 IKK β /NF- κ B 信号的活化有关。具有单萜内酯苷类结构的芍药内酯苷被 ZHOU 等^[24]证明可阻断星形胶质细胞的激活,从而降低其磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(p-JNK)的过高表达,进而降低趋化因子配体 1(CXCL1)的含量,抑制炎症反应。本研究通过 PPI 网络筛选得到白芍总苷抗炎镇痛的核心靶点 EGFR、STAT3、VEGFA、TP53、JUN。据报道,当 EGFR 被磷酸化后,可激活下游磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)、NF- κ B 等信号通路,而这些信号通路都参与炎症反应^[25]。STAT3 基因编码的蛋白质属于 STAT 蛋白质家族,其被受体相关的激酶 Tyr705 磷酸化,形成二聚体后转移至细胞核内,担任转录因子,调控细胞间的信号转导,参与免疫炎症反应。STAT3 可通过激活 NF- κ B 从而促进多种促炎介质的释放,而炎症介质中的 IL-6 还可激活 STAT3^[26]。TP53 是一种抑癌基因,参与和调控炎症反应及肿瘤的发生与发展,张国梁等^[27]研究发现,TP53 可通过抑制 IL-6 减轻软骨损伤,同时还可抑制 MMP 的侵袭活性,从而达到延缓炎症进程的治疗目的。综上,白芍中芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷等活性成分,调控 EGFR、STAT3 及 TP53 等关键核心蛋白,进而发挥疏肝活血功效,达到抗炎镇痛药效,作为气滞胃痛颗粒中的臣药,其善疏肝理气止痛,以助君药之力。

总而言之,本研究采用构效组学研究的方法,将具有抗炎镇痛药效组分的白芍总苷的活性结构与抗炎镇痛靶点建立映射关系,通过计算机虚拟筛选技术,探讨分析不同结构类型的单萜苷类化合物与药效靶点的作用规律,从而明确单萜苷类结构发挥抗炎镇痛药效的核心靶点,阐明影响单萜苷类化合物抗炎镇痛活性的结构单元,二者相互依托,相辅相成,互为依据,为精准辨识白芍抗炎镇痛的化学成分群及靶向作用机制的研究提供理论依据,同时也为解决中药或中药复方复杂物质体系中药效物质不明确,作用机制不明晰问题提供新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 朱俊玲,潘赐明,丁家雯. 急性脑梗死中医证素与危险因素的相关性分析[J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 133-136, 158.
- [2] 何浩强,陈光,高嘉良,等. 气滞血瘀证生物学基础研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4167-4171.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:108.
- [4] 张腾腾,居正,姬雨思,等. 白芍化学成分及分析方法研究进展[J]. 广州化工,2020,48(18):20-21,30.
- [5] 陈琪,何祥玉,周曼佳,等. 白芍的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床医学研究与实践,2021,6(11):187-189.
- [6] 房伟. 白芍总苷的镇痛、抗炎活性研究[J]. 中外医疗,2017,36(13):124-125,134.
- [7] 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,2018:271-316.
- [8] 许雯雯,王帅,孟宪生,等. 基于抗炎镇痛作用的气滞胃痛颗粒有效组分活性研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(2):295-298.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain[J]. Pain,1987,30(1):103-114.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 全建波,秦尚尚,雷珊,等. 4-羟氨基- α -吡喃酮甲酰胺类似物的3D-QSAR及分子对接研究[J]. 原子与分子物理学报,2019,36(3):397-405.
- [18] 林丽美,王智民,朱晶晶,等. 适宜于中医药特点的复方药效物质基础研究模式的探讨[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2861-2863.
- [19] 曹俊岭,李祖伦,付强,等. 中药及复方整合作用的研究[J]. 中草药,2007,38(1):附2-附4.
- [20] 屠鹏飞,史社坡,姜勇. 中药物质基础研究思路与方法[J]. 中草药,2012,43(2):209-215.
- [21] 高卓维,陈广鸿,符路娣. 芍药苷抑制Src/STAT3信号通路协同替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖和迁移[J]. 实用医学杂志,2020,36(23):3199-3205.
- [22] NISSI R, TALVENSAARI-MATTILA A, KOTILA V, et al. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure [J]. Reprod Biol Endocrinol,2013,11:2.
- [23] PATTERSON M L, ATKINSON S J, KNUPER V, et al. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain [J]. FEBS Lett, 2001, 503 (2/3):158-162.
- [24] ZHOU D, ZHANG S, HU L, et al. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase by paeoniflorin attenuates neuroinflammation and ameliorates neuropathic pain [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):83.
- [25] ELSON D A, RYAN H E, SNOW J W, et al. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing[J]. Cancer Res,2000,60(21):6189-6195.
- [26] 郑培永,张莉,柳涛,等. 下丘脑STAT3在非酒精性脂肪性肝病大鼠发病中的作用及降脂颗粒的干预[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(8):753-757.
- [27] 张国梁,王跃文,普日布苏荣,等. p53/miR-502-5p/TRAF2通路对骨关节炎软骨细胞损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(7):1283-1290.
- [责任编辑 顾雪竹]