

基于超高效液相色谱-质谱技术及网络药理学探究大血藤治疗脑梗死的有效成分及其潜在作用机制

刘佳利¹,任维^{1,2},杨思进^{1,2},汤润¹,毛琳慎¹,税丕先^{1*}

¹西南医科大学; ²西南医科大学附属中医医院,泸州 646000

摘要:本文通过超高效液相色谱-串联高分辨质谱技术、网络药理学及分子对接技术探讨大血藤化学成分治疗脑梗死的潜在药效物质和作用机制。采用超高效液相色谱-高分辨质谱技术对大血藤化学成分进行初步分析,鉴定得到大血藤中化学成分共 20 个,包括苯丙素类、蒽醌类、酚酸类和三萜类等。在化学成分分析基础上,通过网络药理学方法建立可视化的“化学成分-疾病靶标-生物通路”网络,筛选其治疗脑梗死的潜在核心靶点共 71 个,包括 PIK3CA、SRC 和 STAT3 等。KEGG 通路富集结果表明,大血藤可通过调控 HIF-1 信号通路、sphingolipid 信号通路、ErbB 信号通路等多条信号通路发挥作用。我们进一步对核心靶点进行分子对接验证,结果显示大血藤化学成分 3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷、紫罗兰酮苷、大黄素甲醚等与 APP、PIK3CA、STAT3 等靶点均具有良好的亲和性。本研究揭示了大血藤通过多成分、多靶点、多通路的调控发挥治疗脑梗死的潜在作用机制,为未来深入阐释大血藤治疗脑梗死的药效物质基础和作用机制提供有利线索及参考依据。

关键词:大血藤;脑梗死;成分分析;网络药理学;超高效液相色谱-串联高分辨质谱

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)3-0436-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.3.011

Study on the effective ingredients and potential mechanism of *Sargentodoxa cuneata* in the treatment of cerebral infarction based on UPLC-HR-MS and network pharmacology

LIU Jia-li¹, REN Wei^{1,2}, YANG Si-jin^{1,2}, TANG Run¹, MAO Lin-shen¹, SHUI Pi-xian^{1*}

¹Southwest Medical University;

²The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: This study aims to predict the potential targets and molecular mechanism of *Sargentodoxa cuneata* for the treatment of cerebral infarction (CI) based on ultra-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UPLC-HR-MS), network pharmacology and molecular docking. UPLC-HR-MS was used to conduct a preliminary analysis of the chemical composition of *S. cuneata*. A total of 20 chemical constituents, including phenylpropanoids, anthraquinones, phenolic acids and triterpenoids were identified in *S. cuneata*. Based on chemical composition analysis, visual “chemical composition-disease target-biological pathway” network was established through network pharmacology analysis, and a total of 71 potential core targets for the treatment of CI were selected, including PIK3CA, SRC, STAT3 and so on. The enrichment results of the KEGG pathway suggested that the pathway of these key targets is mainly related to HIF-1, ErBb, sphingolipid pathways and so on. The molecular docking of the core targets was further verified, and the results showed that 3,4-dihydroxyphenylethyl alcohol glucoside, cuneataside E and phycion had good affinity with APP, PIK3CA, STAT3 and other targets. In summary, this paper indicates that the components of *S. cuneata* act on multiple targets, participate in the regulation of multiple pathways to exert the mechanism of treating CI, which provides a basis and reference for further verifying the pharmacodynamic substance and mechanism of *S. cuneata* for the treatment of CI.

Key words: *Sargentodoxa cuneata*; cerebral ischemia; component analysis; network pharmacology; UPLC-HR-MS

卒中是造成我国国民减寿的第一病因,严重危害国民健康,影响全民健康水平。随着社会经济的发展及国民生活水平的提高,脑卒中的发病率逐年上升且日趋低龄化。根据发病类型的不同,脑卒中又分为缺血性卒中与出血性卒中。缺血性卒中又名脑梗死,有数据表明,在我国缺血性卒中人群约占卒中总人数的 85%^[1]。因此,如何减少脑梗死发病率、致残率、死亡率、恢复神经功能是目前中西医学者共同关注的难点和热点。

目前,西医对脑梗死的治疗手段主要为静脉溶栓、动脉溶栓和机械取栓三种,能为患者短期内重建病灶血运、缓解缺氧损伤、减少自由基产生等做出积极贡献^[2]。但部分患者远期预后较差,面临后遗症、并发症等问题。中医药治疗脑梗死具有其独特的优势,其适用范围广、副作用小、患者预后好并能提高神经功能恢复、降低病残率与复发率、提高患者生活质量。中医认为脑梗死病因病机与气虚血瘀、痰瘀阻窍等有关,随着对中风及“毒邪”的深入认识与研究,有学者提出了“中风热毒论”“毒损脑络”等观点,认为中风后产生的痰毒、热毒等均可损伤脑络^[3]。大血藤为木通科大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. Et Wils 植物的干燥藤茎,具有清热解毒、活血通经、祛风除湿等功效,并含有丰富的化学成分,如皂苷类、蒽醌类、有机酸类、木质素类、酚类等。常用于治疗肠痈腹痛、热毒疮疡、经闭、痛经、跌扑肿痛、风湿痹痛等^[4]。现代药理学研究表明,大血藤能改善脑海马和皮质区的损伤,可抑制微循环灌注量的下降从而减小梗死区域面积占比,降低死亡率^[4]。大血藤总酚酸可抑制脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织炎症反应、抑制脑细胞凋亡,同时,可降低脑缺血再灌注损伤大鼠的死亡率、降低神经功能缺失评分^[5]。通窍化栓方是临床治疗脑梗死的有效组方,其中大血藤为君药,该方主治功能核心为祛风、祛痰、祛瘀。Cai 等^[6]临床研究结果表明,通窍化栓汤可明显改善缺血性脑卒中患者的血液流变学指标,可改善血液的黏稠度、凝固性及细胞聚集性,具有理想的抗栓作用。目前,对于大血藤作用于心脑血管疾病的有效成分、作用靶点、作用通路等仍处于探索阶段,使得开发利用及临床推广受到了一定限制。因此,本研究拟在前期研究基础上,进一步分析大血藤的化学成分,阐明其有效成分作用于脑梗

死疾病的治疗靶点及作用通路,为深入研究大血藤治疗脑梗死提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(含自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机、低压四元梯度泵、PDA 检测器),美国 Waters 公司; LTQ Orbitrap velos pro 高分辨质谱仪,美国 Thermo Fisher 公司。大血藤饮片购自四川金方生物医药科技有限公司,批号:170987,产地:四川。表儿茶素、红景天苷(纯度均>98%)购自赛百草科技有限公司(北京,中国),批号 SH₁₉052904、19042901;甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵(HPLC 级),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超纯水,美国 Millipore 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 大血藤提取物溶液制备

中药大血藤,经西南医科大学中药学教授税丕先鉴定为正品。大血藤粉碎,过 3 号筛。取粉末 10 g,加 8 倍量无水乙醇,超声提取 0.5 h (250 W, 40 kHz),冷却至室温,12 000 r/min 离心 10 min,重复两次提取操作,合并上清液 A。滤渣加 10 倍量水超声提取 1 h (250 W, 40 kHz)。冷却至室温,12 000 r/min 离心 10 min,重复提取两次,合并上清液 B 备用。上清液 A、B 合并,旋转蒸发浓缩,冷冻真空干燥,获得大血藤提取物。精密称取大血藤粉末 1 g,置于 25 mL 锥形瓶中,加入 75% 甲醇 20 mL,精密称定,超声提取 1 h,冷却后用 75% 甲醇补足减失重量,摇匀。以 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得供试品待测液。

1.3 标准品溶液制备

精密称取表儿茶素、红景天苷标准品溶液各 1.00 mg,分别置于 5.00 mL 量瓶中,加适量甲醇稀释,定容至刻度,配成浓度为 200 μg/mL 的标准品储备液。检测前用甲醇稀释储备液 10 倍,待测。

1.4 色谱条件

色谱柱:HSS T3 柱(1.8 μm, 2.1 mm ID × 150 mm, Waters);35 °C 柱温;样品盘温度 4 °C;流动相 A:水(含 0.1% 甲酸);B:乙腈(含 0.1% 甲酸),梯度洗脱条件:0~5 min, 2% B;5~8 min, 2%→20% B;8~45 min, 20%→55% B;45~52 min, 55%→100% B;52~58 min, 100% B;58~58.5 min, 100%→2% B;58.5~65 min, 2% B;进样量 3 μL, 流速

0.2 mL/min。

1.5 质谱条件

对于高分辨质谱 LTQ Orbitrap 质谱仪,电喷雾(ESI)离子源参数设定如下:负离子扫描和正离子扫描模式,加热器温度为300℃,毛细管温度为350℃,毛细管电压为35 V,喷雾电压为±3.5 kV,鞘气(N₂)流速为35 arb,辅助气(N₂)流速为10 arb;样品一级质谱分别在正负离子模式下进行全扫描(分辨率R为60 000, m/z 扫描范围为100~1 500),二级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan, DDS)。数据采集和分析采用 Xcalibur, Mass Frontier 7.0 软件。

1.6 预测大血藤活性成分的靶点

利用中药分子机理生物信息学分析工具(Swiss Target Prediction),针对鉴定出的大血藤活性成分进行靶点的预测计算与匹配,选择Probability ≥ 0.05 的靶点作为候选基因。

1.7 获得脑梗死的疾病治疗靶标

以“Cerebral ischemia”“Cerebral infarction”等相关词段为关键词和搜索条件,在2个疾病靶点数据库(OMIM数据库, <http://www.omim.org/>; GeneCards数据库, <https://www.genecards.org/>)中进行检索,检索出脑梗死疾病在数据库中的疾病靶点并去除重复基因,获得脑梗死疾病的蛋白靶点。

1.8 分析“大血藤-潜在靶标-脑梗死”蛋白质相互作用并构建拓扑网络

利用String数据库,将成分和疾病交集的靶标进行检索处理,物种设置为“Homo sapiens(人类)”,

最低相互作用阈值设置为0.9,其余默认,得到靶标蛋白间的相互作用信息。将上述数据导入Cytoscape软件,构建“活性成分-靶点”网络,并使用其中的Network Analyzer计算拓扑参数,以betweenness centrality、closeness centrality、degree三个参数的中值为阈值以筛选大血藤治疗脑梗死的核心靶点。

1.9 识别功能模块、注释生物学信息、分析富集通路

利用DAVID数据库进行 gene ontology(GO)与KEGG分析,根据P<0.05筛选得出排列前二十位的生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cell component, CC)、分子功能(molecular function, MF)及KEGG结果,并使用R语言软件进行结果可视化操作。

1.10 采用分子对接验证

选择相互作用网络中degree值靠前的5个靶点,选取其相应的化学成分,在Pubchem数据库中下载化合物结构,并从PDB数据库中获得所对应蛋白复合物的3D结构。利用软件Discovery Studio 2019中的CDOKCER方法,使用半柔性分子对接方法,导入蛋白及化合物结构后,使其能量最小化,并进行加氢、去水等操作,选取活性位点、去除原始配体,构建分子对接模型,并分析对接结果。以结合能(-CDOKCER interaction energy, -CIE)>0为界,值越大,提示二者间相互作用能越强。

2 结果

2.1 大血藤主要化学成分

将大血藤供试品溶液和标准品混合溶液按上述

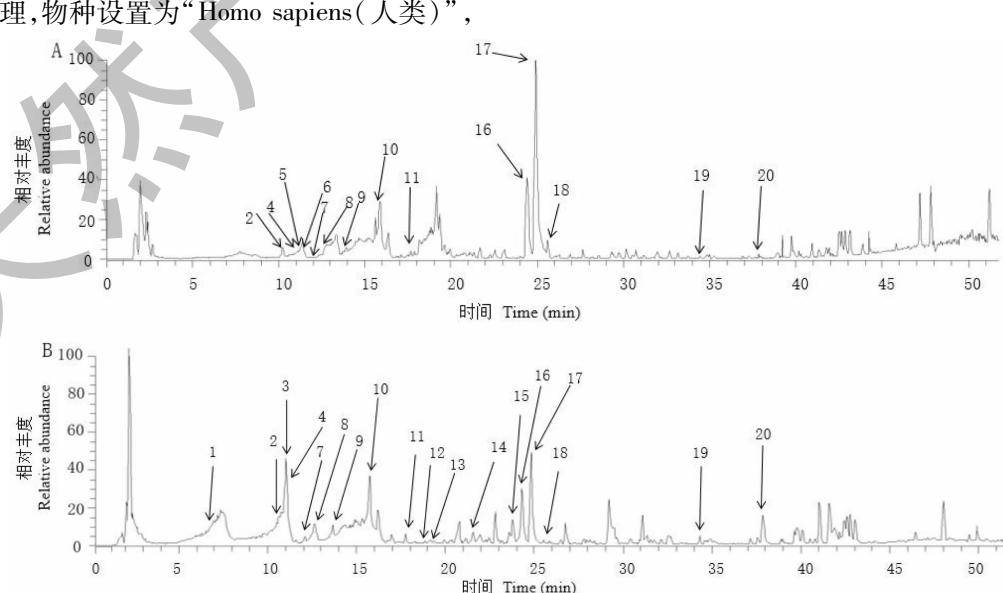


图1 正(A)、负(B)离子检测模式下的大血藤总离子流图

Fig. 1 TICs of *Sargentodoxa cuneata* in the positive(A), and negative(B) ion mode.

条件下的色谱及质谱条件进行 UPLC-HR-MS 分析, 得到正、负离子模式下的总离子流图 (typical total ion chromatograms, TICs, 见图 1), 响应均良好。利用 Xcalibur Qual Browser 软件, 对正、负离子模式下采集的大血藤提取物进行分析, 根据化合物正负离子模式下的高分辨质谱数据、同位素丰度、标准品比对确认, 结合碎片信息、标准品裂解规律及已有文献报道, 共鉴定及推测得到大血藤提取物中化合物共 20

种(见表 1), 包括苯丙素类、蒽醌类、酚酸类、三萜类等。其中酚酸类 12 种, 苯丙素类 4 种, 蒽醌类 3 种, 三萜类 1 种。20 种化合物中, 表儿茶素和红景天苷为通过对照品比对确认, 有一级及二级碎片的 13 个化合物为根据其二级碎片及裂解规律及文献比对确认, 没有碎片峰的 5 个化合物为根据其一级高分辨质谱数据、同位素丰度及与文献比对确认。

表 1 大血藤提取物 UPLC-HR-MSⁿ 数据Table 1 UPLC-HR-MSⁿ in the positive and negative ion mode data of the compounds detected in *S. cuneata*

序号 No.	保留时间 <i>t_R</i> (min)	离子形式 Ion form	分子量 Measured mass	化学式 Formula	误差 Error (ppm)	MS/MS 碎片 MS/MS fragment	鉴定 Identification	CAS
1	6.86	[M-H] ⁻	169.013 7	C ₇ H ₅ O ₅	3.256	-	没食子酸 Gallic acid [△]	149-91-7
2	10.45	[M-H] ⁻	167.034 64	C ₈ H ₇ O ₄	4.519	152.011 52, 123.045 23	香草酸 Vanillic acid [▲]	121-34-6
		[M + H] ⁺	169.049 26	C ₈ H ₉ O ₄	-1.628	151.039 35, 133.028 81, 125.060 05, 111.044 28		
3	10.83	[M-H] ⁻	153.019	C ₇ H ₅ O ₄	4.998	123.045 27, 109.029 53	原儿茶酸 Protocatechuic acid [▲]	99-50-3
4	11.03	[M-H] ⁻	315.106 96	C ₁₄ H ₁₉ O ₈	-1.536	135.045 27	3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷 3,4-Dihydroxyphenylethyl alcohol glucoside [▲]	N/A
		[M + H] ⁺	317.122 77	C ₁₄ H ₂₁ O ₈	-1.002	299.113 22, 281.102 57, 263.092 01, 221.081 33, 137.059 97		
5	11.37	[M + H] ⁺	155.070 04	C ₈ H ₁₁ O ₃	-1.488	-	羟基酪醇 Hydroxytyrosol [△]	10597-60-1
6	11.52	[M + H] ⁺	167.070 01	C ₉ H ₁₁ O ₃	-1.561	149.060 03, 149.060 03, 107.049 16, 93.069 79	罗布麻宁 Apocynin [▲]	498-02-2
7	12.07	[M-H] ⁻	359.096 77	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	-1.041	197.045 47, 182.022 25	丁香酸葡萄糖苷 Glucosyringic acid [▲]	33228-65-8
		[M + H] ⁺	361.111 94	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	-2.723	-		
8	12.41	[M-H] ⁻	197.045 1	C ₉ H ₉ O ₅	3.299	182.021 91, 166.998 40, 153.055 83, 138.032 21	丁香酸 Syringic acid [▲]	530-57-4
		[M + H] ⁺	199.059 72	C ₉ H ₁₁ O ₅	-1.909	155.070 66, 140.047 20		
9	13.95	[M-H] ⁻	299.112 55	C ₁₄ H ₁₉ O ₇	0.069	179.036 82, 113.024 77, 101.024 68, 95.013 77, 85.029 44	红景天苷 Salidroside [★]	10338-51-9
		[M + H] ⁺	301.127 69	C ₁₄ H ₂₁ O ₇	-1.625	-		
10	15.73	[M-H] ⁻	353.086	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-2.007	191.056 05, 179.035 11	绿原酸 Chlorogenic acid [▲]	327-97-9
		[M + H] ⁺	355.102 05	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	-0.869	163.039 44		
11	17.75	[M-H] ⁻	289.071 01	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	1.195	245.081 82, 205.050 70, 179.035 17, 137.024 49	(-)-表儿茶素 (-)-Epicatechin [★]	490-46-0
		[M + H] ⁺	291.086 18	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	-0.463	273.076 45, 165.055 11, 151.039 32, 139.039 32, 123.044 36		
12	18.65	[M-H] ⁻	367.101 65	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	-1.93	-	绿原酸甲酯 Methyl chlorogenicate [△]	29708-87-0
		[M + H] ⁺	419.170 99, 404.148 16, 401.161 07, 233.082 06			(+)-南烛木树脂酚-4'- <i>O</i> -β-D-葡萄糖苷 (+)-Lyoniresin-4-yl-β-D-glucopyranoside [▲]	N/A	
13	19.14	[M-H] ⁻	581.221 74	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₃	-1.94			

续表 1(Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 <i>t_R</i> (min)	离子形式 Ion form	分子量 Measured mass	化学式 Formula	误差 Error (ppm)	MS/MS 碎片 MS/MS fragment	鉴定 Identification	CAS
14	21.62	[M-H] ⁻	367.13849	C ₁₈ H ₂₃ O ₈	-0.692	-	绿原酸乙酯 Ethyl chloro-genate [△]	N/A
15	23.95	[M-H] ⁻	461.1431	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₀	-2.436	415.16058	4-羟苯乙基-6-O-咖啡酰基-β-D-葡萄糖苷 4-Hydroxyphenyl-ethyl-6-O-(E)-caffeoylel-β-D-glucoside [▲]	N/A
16	24.82	[M-H] ⁻	312.12292	C ₁₈ H ₁₈ NO ₄	-0.367	297.10065, 270.11337, 253.08675, 148.05319, 135.04539	<i>N</i> -反式阿魏酰酷胺 N-trans-Feruloyltyramine [▲]	66648-43-9
		[M+H] ⁺	314.13815	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	-1.072	177.05495, 145.02869		
17	25.04	[M-H] ⁻	253.04973	C ₁₅ H ₉ O ₄	0.77	-	大黄酚 Chrysophanic acid [△]	481-74-3
		[M+H] ⁺	255.06476	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	-1.668	-		
18	25.56	[M-H] ⁻	283.05957	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	-1.812	-	大黄素甲醚 Physcion [▲]	521-61-9
		[M+H] ⁺	285.07541	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	-1.193	270.05292, 257.08139, 229.08653, 167.03421, 147.04442		
19	34.34	[M-H] ⁻	487.34106	C ₃₀ H ₄₇ O ₅	-1.521	469.29492, 441.33664, 409.31110, 391.30023	积雪草酸 Asiatic acid [▲]	464-92-6
		[M+H] ⁺	489.35568	C ₃₀ H ₄₉ O ₅	-3.619	-		
20	37.86	[M-H] ⁻	269.0444	C ₁₅ H ₉ O ₅	-0.815	-	大黄素 Emodin [▲]	518-82-1
		[M+H] ⁺	271.05948	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	-2.287	239.07063, 221.06013, 211.07568, 193.06503, 153.01843		

注: [△]根据一级高分辨质谱数据、同位素丰度及与文献比对确认; [▲]根据二级碎片、裂解规律及与文献比对确认; ^{*}通过对照品比对确认。

Note: [△] Confirmed based on the first-order high resolution mass spectrometry data, isotope abundance and comparison with literature; [▲] Confirmed according to second-order fragmentation, fragmentation pattern and comparison with literature; ^{*} Confirmed by comparison with reference substance.

2.2 大血藤化学成分筛选及靶点预测

共筛选活性化合物 19 种,包括酚酸类化合物如红景天苷、原儿茶酸、没食子酸、罗布麻宁、丁香酸葡萄糖苷,苯丙素类化合物如绿原酸、*N*-反式阿魏酰酷胺,蒽醌类化合物大黄素、大黄酚,甾体类化合物如胡萝卜苷,三萜皂苷类如齐墩果酸等。这些化合物有耐缺氧、抗炎等药理作用,提示筛选的成分与文献报道基本一致。并从 Swiss Target Prediction 数据库中共匹配预测到相关靶点 393 个。

2.3 疾病靶标的预测

通过 OMIM 及 GeneCards 两个数据库,共获得 3 288 个脑梗死疾病相关的靶点。

2.4 “活性成分-靶点”的构建及关键靶点的筛选

取上述两者的交集,作为大血藤治疗脑梗死的潜在靶点,输入至 String 数据库中,进行 PPI 网络分析(见图 2),得到 266 个蛋白、1 073 条互作连线的蛋白网络,并将分析结果导入至 Cytoscape 软件中,构建大血藤的“活性成分-靶点”(见图 3),该网络由 285 个节点和 908 条边构成,红色“V”形为大血藤活

性化合物,蓝色矩形为潜在靶点。并依据 betweenness centrality、closeness centrality、degree 三个参数,共筛选出核心靶点 71 个,包括 PIK3CA、SRC、STAT3 等。并按照 degree 对 19 种活性成分进行排序,发现二氢愈创木脂酸、大黄酚、紫罗兰酮苷、大黄素甲醚排在前列(见表 2)。

2.5 GO 富集分析

GO 富集分析分为三个模块,即生物过程 BP, MF 和 CC。BP 显示靶基因主要集中在肽基酪氨酸磷酸化及自磷酸化(peptidyl-tyrosine phosphorylation, peptidyl-tyrosine autophosphorylation)、血小板激活(platelet activation)、上调细胞增殖(positive regulation of cell proliferation)、磷脂酰肌醇介导的信号转导(phosphatidylinositol-mediated signaling)、酪氨酸磷酸化(peptidyl-tyrosine phosphorylation)等(见图 4)。

MF 主要与 α2-肾上腺素能受体活动(alpha2-adrenergic receptor activity)、生长因子受体结合(growth factor receptor binding)、血小板活化因子受

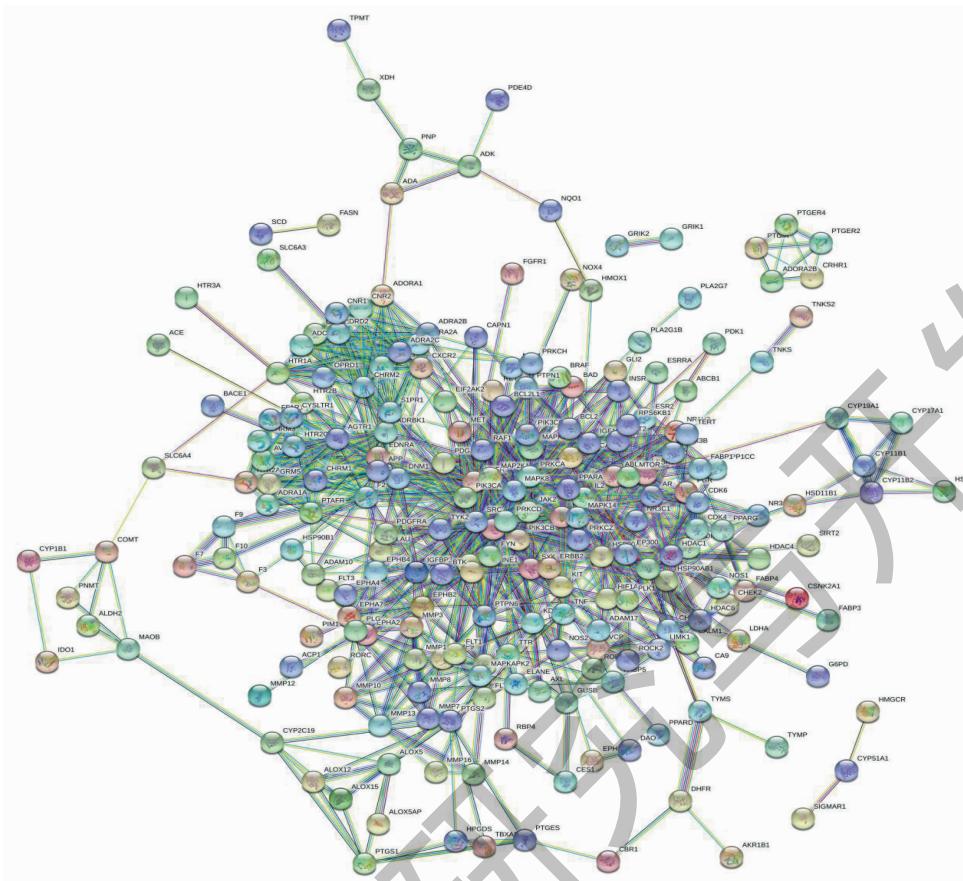


图2 核心靶点蛋白互作网络图

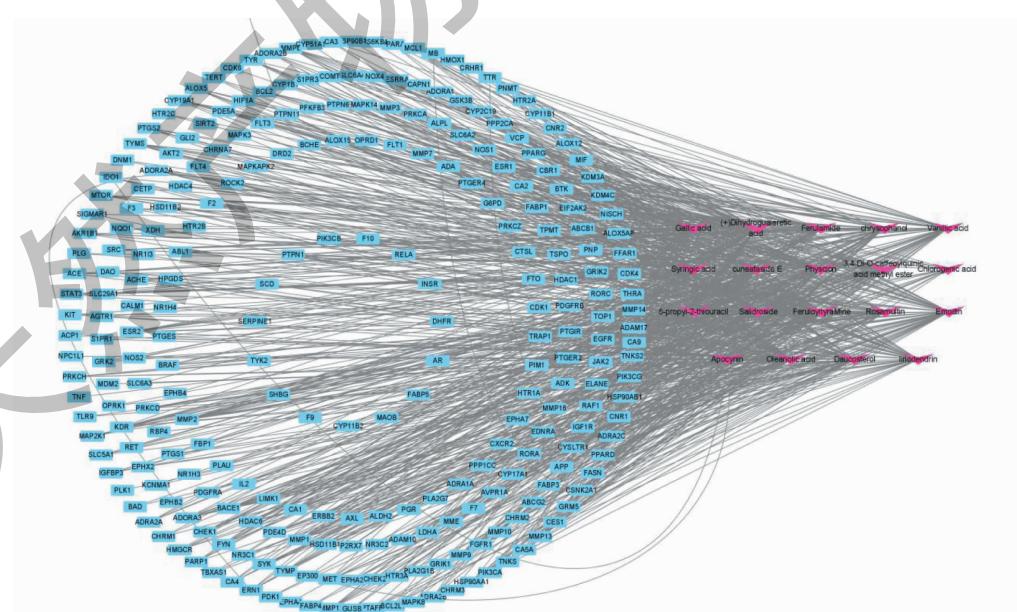
Fig. 2 The core target network of *S. cuneata* for cerebral ischemia

图3 大血藤化合物-靶点图

Fig. 3 “Ingredient-target network” of *S. cuneata*

注:红色为大血藤活性化合物,蓝色为各个化合物对应的靶点。Note: The red section is on behalf of the *S. cuneata* compounds, the blue section represents prediction targets.

表 2 排名前 20 大血藤治疗脑梗死的核心靶点拓扑信息

Table 2 Topological information of the top 20 core targets in the treatment of cerebral infarction by *S. cuneata*

靶点 Target	介度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality	连接度 Degree
PIK3CA	0.139 952 445	0.470 198 675	62
SRC	0.112 395 618	0.470 198 675	53
APP	0.111 843 135	0.430 303 03	43
MAPK3	0.072 093 846	0.451 271 186	41
STAT3	0.146 895 536	0.458 064 516	40
HSP90AA1	0.053 207 592	0.429 435 484	34
FYN	0.034 565 709	0.425 149 701	34
MAPK8	0.033 435 97	0.430 303 03	28
EP300	0.056 720 24	0.389 396 709	28
F2	0.035 615 149	0.398 876 404	27
JAK2	0.015 870 809	0.403 409 091	26
PRKCD	0.055 156 331	0.413 592 233	25
PTPN11	0.005 154 606	0.387 272 727	25
EGFR	0.020 294 767	0.421 782 178	24
RELA	0.030 114 366	0.428 571 429	23
PRKCA	0.027 158 989	0.399 624 765	22
AGTR1	0.012 180 823	0.367 241 379	22
S1PR1	0.036 139 356	0.408 829 175	21
ESR1	0.057 140 679	0.398 130 841	21
PIK3CA	0.139 952 445	0.470 198 675	62

体活性(platelet activating factor receptor activity)等有关(见图 5)。

CC 主要由分选内体(sorting endosome)、磷脂酰

肌醇 3-激酶复合物(phosphatidylinositol 3-kinase complex)、内体腔(endosome lumen)、伪足(pseudopodium)等组成(见图 6)。

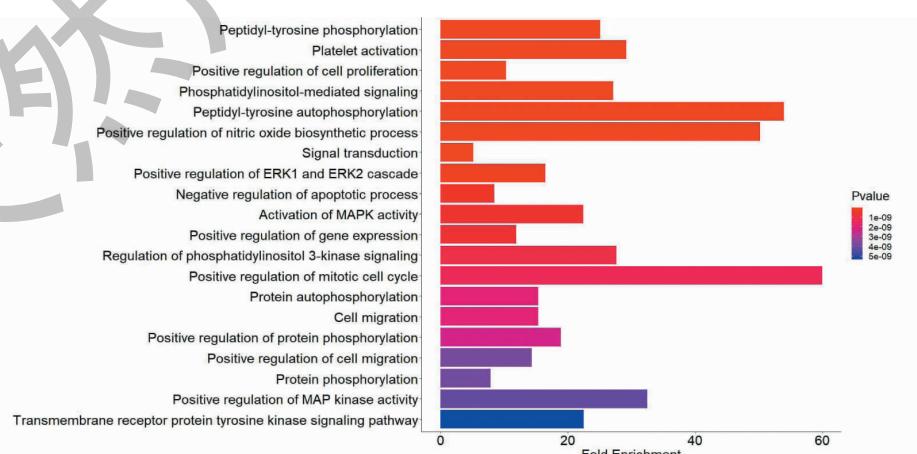


图 4 核心靶点的 GO-BP 富集分析

Fig. 4 GO-BP enrichment analysis on core targets

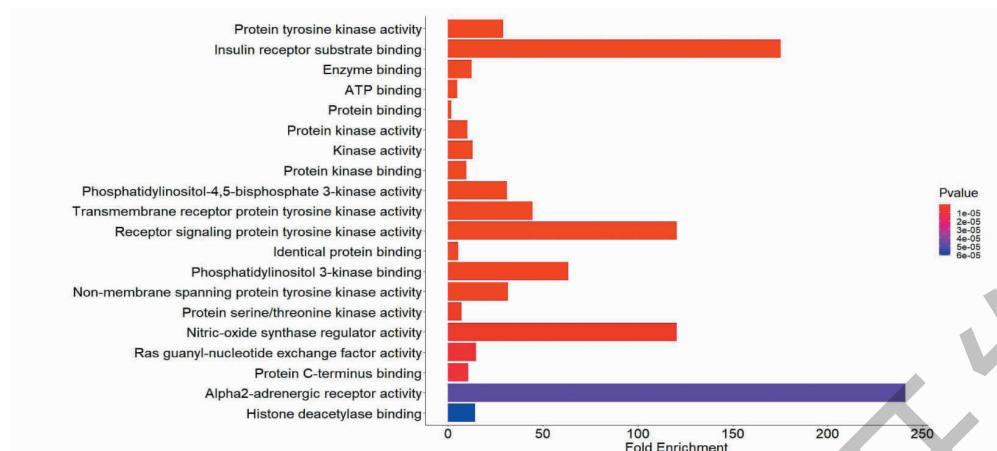


图 5 核心靶点的 GO-MF 富集分析

Fig. 5 GO-MF enrichment analysis on core targets

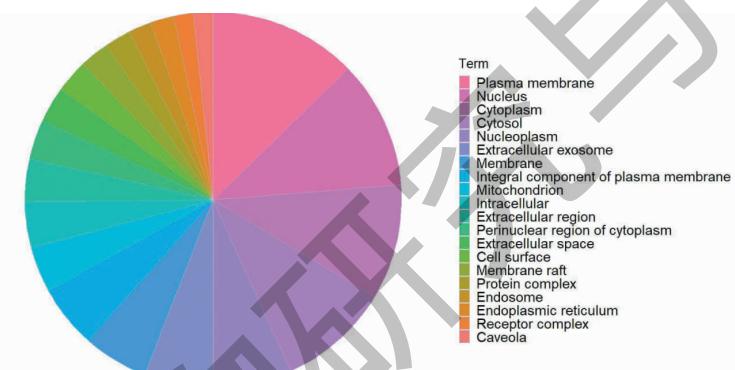


图 6 核心靶点的 GO-CC 富集分析

Fig. 6 GO-CC analysis on core targets

2.6 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析发现, 大血藤对脑梗死的药理作用涉及通路包括缺氧诱导因子-1 (HIF-1)、神经鞘

脂类 (sphingolipid)、响应胰岛素、ErbB、FOXO、催乳素 (prolactin)、雌激素 (estrogen) 等生物信号通路 (按 P 值排序, 见图 7)。

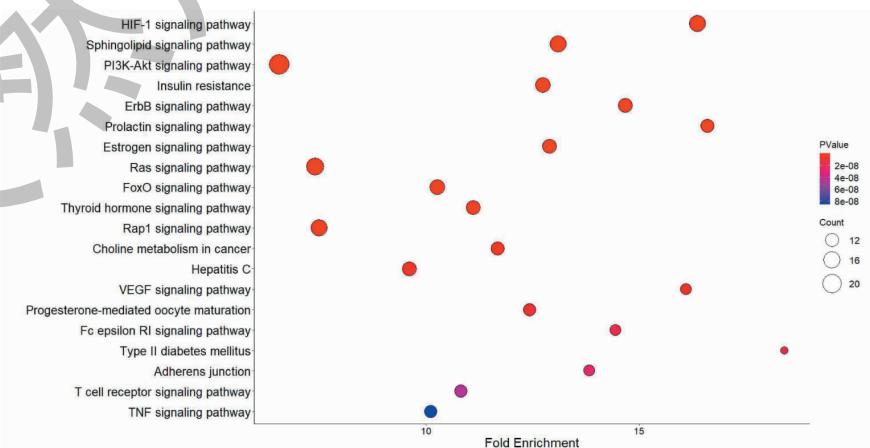


图 7 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis

2.7 分子对接验证

采用 PIK3CA、SRC、APP、MAPK3、STAT3 的分子对接模型与大血藤成分进行对接(见表 3),共对接 22 对。根据对接分值,选取排名前三进行分析。

3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷与 APP 主要以以下方式结合:与 A 链的 GLY-11、THR-72、ARG-128、ILE-126、ASP-32 形成氢键,与 A 链的 LYS-107、PHE-108、SER-35、TYR-185 形成碳氢键,与 A 链的

TYR-71 形成 π -烷基键。紫罗兰酮苷与 PIK3CA 主要以以下方式结合:与 A 链的 ARG-1770、SER-1774、ASP-1933、LYS-1776、LYS-1802 形成氢键,与 A 链的 MET-1772 形成烷基,与 A 链的 MET-1922 形成二硫键。紫罗兰酮苷与 STAT3 主要以以下方式结合:与 A 链的 ASP-181、ARG-221、ARG-254、ARG-24、ASP-48 形成氢键,与 A 链的 ILE-219、MET-258 形成烷基(见图 8)。

表 3 小分子与靶点蛋白的分子对接结果

Table 3 The docking result of small molecules with targets

靶点 Target	PDB 标识 PDB ID	化学成分 Chemical composition	结合能 Binding energy(kJ/mol)
APP	4D88	3,4-Di-O-caffeoylequinic acid methyl ester	-69.32
		(+) Dihydroguaiaretic acid	49.02
		Chlorogenic acid	44.4
		Emodin	42.38
		Ferulamide	-29.68
		Oleanolic acid	-41.17
		Cuneataside E	-69.08
		Physcion	-58.61
		(+) Dihydroguaiaretic acid	-46.75
		Chrysophanol	-37.28
MAPK3	6GES	Rosamultin	-29.83
		Cuneataside E	-56.28
		(+) Dihydroguaiaretic acid	-43.07
		Physcion	-34.11
		Chrysophanol	-24.49
SRC	1Y57	Gallic acid	-22.88
		Vanillic acid	-19.71
		Cuneataside E	-66.32
		Daucosterol	-50.5
		Physcion	-37.31
STAT3	1Q1M	Rosamultin	-28.99
		Ferulamide	-24.35

3 讨论与结论

通过构建的网络图中对度值排名前 5 的成分:二氢愈创木脂酸、大黄酚、紫罗兰酮苷、胡萝卜苷、大黄素甲醚进行成分分析。二氢愈创木脂酸对血小板活化因子受体结合有阻断作用,从而防止血小板凝集造成血栓的形成^[18]。大黄酚可能通过抑制 Bax 蛋白表达水平,减少 Beclin1 蛋白产生,减轻神经元

凋亡,从而发挥神经保护作用^[19]。胡萝卜苷神经保护作用与上调抗氧化蛋白,抑制 P38 丝裂原活化蛋白酶、应激激活蛋白激酶信号通路的活化有关。此外,有研究还发现,胡萝卜苷具有促神经干细胞增殖的作用^[20]。大黄素甲醚可通过降低 IL-1 β 、TNF- α 、ICAM-1 的表达,抑制 Caspase-3 的活性,从而减少神经细胞凋亡,发挥神经保护作用^[20]。

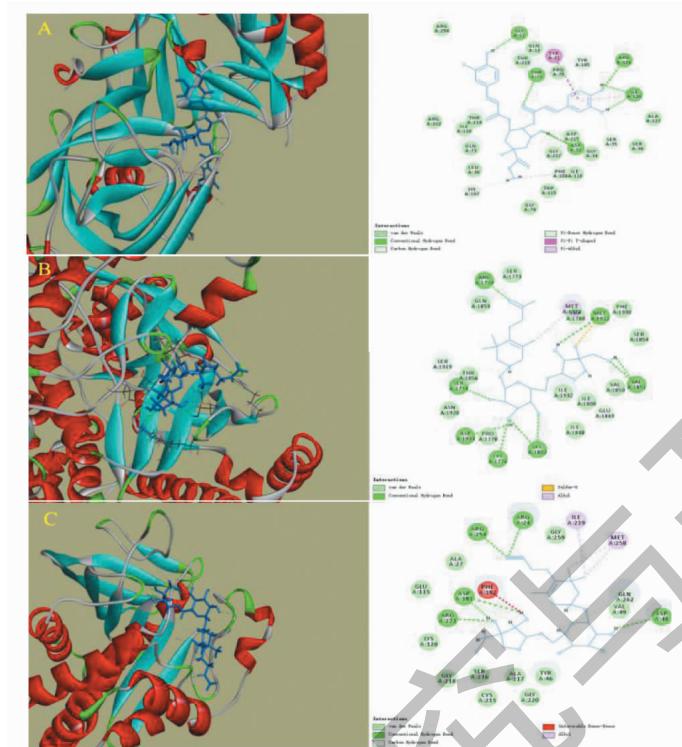


图 8 分子对接模型

Fig. 8 Molecular docking model

注:A:绿原酸甲酯-APP;B:大血藤苷 E-PIK3CA;C:大血藤苷 E-STAT3。Note: A: 4-O-caffeoylelagic acid methyl ester-APP; B: Cuneataside E-PIK3CA; C: Cuneataside E-STAT3.

根据筛选出的 71 个核心靶点,并对 PIK3CA、Src、STAT3、JAK2 等 degree 值较大的靶点进行文献分析。PIK3CA 是 PI3K/Akt/mTOR 途径的中心分子,与细胞增殖、血管生成和肿瘤发生有关。有研究表明,PIK3CA 蛋白在 OGD/R(氧糖剥夺/复氧诱导)的 SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)和脑组织中的表达明显受到抑制,激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,可有效提高 PIK3CA 表达水平从而减少线粒体介导的细胞凋亡,发挥神经保护作用^[21]。星形胶质细胞(Src)是中枢神经系统中最丰富的细胞,在脑梗死发生后,其能激活成为反应性星形胶质细胞,并形成胶质瘢痕。有研究表明 Src 是 Ang II 诱导星形胶质细胞激活的上游信号,其中 Src 可激活 ERK1/2 来刺激星形胶质细胞的生长,在脑损伤过程中发挥重要作用^[22]。JAK2/STAT3 的激活与神经元凋亡密切相关。有研究表明,JAK2 作为 STAT3 的上游信号分子,其能调节 STAT3 的磷酸化,从而介导 STAT3 激活的下游生物反应。JAK 磷酸化抑制剂可降低缺血大脑组织中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平,从而降低细胞凋亡率,缩小梗死面积^[23]。HSPs 是

因受有害刺激后细胞产生的一种应激蛋白,与肿瘤的产生、增殖及分化有关。有研究报告,HSP90 α 能在一定程度上保护缺氧神经细胞,并提高细胞耐缺氧能力,为半暗带内的血管再生争取了时间^[24]。综上,预测的核心靶点参与了脑梗死的发病机制,分析结果与大血藤、脑梗死等相关报道较为一致,推测大血藤化学成分可通过作用于这些核心靶点,从而发挥潜在的治疗机制。

通过 KEGG 富集分析结果可知,大血藤可能通过 HIF-1 信号通路、sphingolipid 信号通路、ErbB 信号通路等发挥防治脑梗死的作用。其中 HIF-1 信号通路是调节细胞应对缺氧状态的主要分子,其在细胞低氧状态时较敏感^[25]。目前已发现 HIF 途径可直接刺激活化近 80 种基因,其诱导的蛋白表达主要表现为提高缺氧细胞耐受力和存活力。Sphingolipid(神经鞘脂类)在神经生长分化过程中具有重要地位,外源性神经鞘脂类已被证实具有广泛的神经保护作用,其能发挥脑保护作用,并促进受损神经的修复等。有研究显示,静脉溶栓后配合神经鞘脂类注射液比单行静脉溶栓术的神经功能恢复更好。在衰

老过程和神经退行性疾病的发展过程中,大脑中的神经酰胺水平会逐渐增加,并介导神经细胞凋亡,发挥修复作用^[26]。NRG/ErbB 信号通路在脑梗死的保护作用机制中发挥着重要作用,有研究发现,在受到创伤的大脑组织中,神经细胞里的 NRG-1 β 及 ErbB 受体会被诱导。ErbB 信号能拮抗中枢神经系统炎症的产生,保护大脑神经元。还有研究发现,针刺可以通过调节 NRG/ErbB 通路,提高 ErbB 的表达水平,在一定程度上抑制神经元的凋亡及炎症因子的释放与表达,还可抑制单核细胞浸润、星形胶质细胞活化后与细胞因子产生,从而发挥抑制炎症反应,保护神经元细胞的作用^[27]。上述几条通路主要参与了氧化应激过程、神经修复、细胞凋亡、炎症反应等过程,可进一步推测大血藤化学成分可通过调节这些通路发挥治疗脑梗死的作用机理。此外,分子对接的结果,初步模拟了成分与靶点间的相互作用关系,在一定程度上验证了上述预测结果的可靠性^[28]。

综上,本研究通过结合 UPLC-HR-MS、网络药理学、分子对接等方法,对大血藤化学成分及治疗脑梗死的作用靶点、生物通路进行了研究与分析,构建了化学成分靶点间的相互作用关系并进行了验证。多方位阐释了大血藤通过多靶点、多通路机制发挥治疗脑梗死疾病的作用机制,且相关预测与文献报道相符,为未来深入研发大血藤治疗脑梗死的作用机制提供了基础与证据。

参考文献

- 1 Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2019 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis (中国脑血管病杂志), 2020, 17:272-281.
- 2 Lei Y, Guan WT, Leng S, et al. Mechanical thrombectomy for acute posterior circulation ischemia: research status and progress [J]. J Interv Radiol (介入放射学杂志), 2020, 29: 210-214.
- 3 Liu AH, Wei JL, Li H. Research on the thinking of the endogenous heat-toxin theory of apoplexy [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20:741-742.
- 4 Zhao D. Preliminary study of anti-inflammatory bone damage and its mechanism of Miao medicine *Sargentodoxa cuneata* [D]. Guiyang: Guizhou University(贵州大学), 2018.
- 5 Zhao S, Wu DX, Chen Q, et al. Study on mechanism for treating ischemic stroke of Siegesbeckiae Herba based on network pharmacology [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:2727-2735.
- 6 Cai J, Zhu GQ. Tongqiao huashuan decoction's effect on ischemic stroke patients' quality of life and its mechanisms [J]. World Chin Med(世界中医药), 2017, 12:83-86.
- 7 Zeng X, Wang H, Gong Z, et al. Antimicrobial and cytotoxic phenolics and phenolic glycosides from *Sargentodoxa cuneata* [J]. Fitoterapia, 2015, 101:153-61.
- 8 Tang J, Zhao KQ, Zhu RL, et al. Advances in study on chemical constituents isolated from *Sargentodoxa cuneata* [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2020, 39(7): 33-38.
- 9 Lv M, Su YF, Gao Y, et al. Chemical constituents in two species of *indigofera* Linn. [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2009, 40:356-360.
- 10 Han X, Zhang T, Wei Y, et al. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2002, 971:237-241.
- 11 Chen ZX, Gao YW, Liu DL, et al. Chemical constituents isolated from *Sargentodoxa cuneata* (II) [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2010, 41:867-870.
- 12 Chang J, Case R. Phenolic glycosides and ionone glycoside from the stem of *Sargentodoxa cuneata* [J]. Phytochemistry, 2005, 66:2752-2758.
- 13 Tian Y, Zhang HJ, Tu AP, et al. Phenolics from traditional Chinese medicine *Sargentodoxa cuneata* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40(7):628-631.
- 14 Tian J, Sun HD. Chemical constituents of *Clerodendrum indicum* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1999, 11(3):1-5.
- 15 Dong MS, Yu SS, Yu DQ, et al. Glucosides from the roots of *Capparis tenera* [J]. Chem Biodivers, 2007, 4:2852-2862.
- 16 Yin K, Gao HY, Li XN, et al. Chemical constituents of *Chaenomeles speciosa* (Sweet.) Nakai [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2006, 23:760-763.
- 17 Gao H, Wang Z. Triterpenoid saponins and phenylethanoid glycosides from stem of *Akebia trifoliata* var. *australis* [J]. Phytochemistry, 2006, 67:2697-705.
- 18 Han GQ, Michael NC, Wang SB. The research of sargent glo-ryvine lignin [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1986, 21(1):68-70.
- 19 Fang YL, Huang YY, Zhao YM, et al. Effects of chrysophanol on beclin1 and Bax protein expressions in mice with focal cerebral ischemia /reperfusion injury [J]. J Cap Med Univ (首都医科大学学报), 2019, 40:703-708.
- 20 Wang XP, Wu LL, Li LL, et al. Research status on pharmacological effects of daucosterol [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35:722-724.

- 21 Wang J, Wang A, He H, et al. Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108692.
- 22 Bali A, Jaggi AS. Angiotensin II-triggered kinase signaling cascade in the central nervous system [J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27: 301-315.
- 23 Gao HH, Gao LB, Wen JM. Genetic polymorphisms in the ESR1 gene and cerebral infarction risk: a meta-analysis [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33: 605-615.
- 24 Hu MJ, Liu Y, Wang JN, et al. Expression of heat shock protein 90 α in brain of MCAO rats with vascular endothelial growth factor 165 gene therapy [J]. *Shanghai Med J(上海医学)*, 2005, 28: 233-235.
- 25 Liu BN, Han BX, Liu F. Neuroprotective effect of p-Akt and HIF-1 α on ischemia rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7 (3): 221-225.
- 26 Lee HK, Jang JY, Yoo HS, et al. Neuroprotective effect of phytoceramide against transient focal ischemia-induced brain damage in rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38: 2241-2250.
- 27 Wang DY, Ma CC, Dong X, et al. Advances in neuroprotective effects of acupuncture on NRG/ErbB pathway after cerebral infarction [J]. *J Clin Acup(针灸临床杂志)*, 2019, 35 (10): 91-94.
- 28 Zhong JB, Liu WB, Wang H. Study on the mechanism of flavonoids from Isodonis Lophanthoidis Herba on alcoholic liver disease based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 667-675.

中药补骨脂中黄酮类榛仁球蛋白(Corylin)具有延长小鼠寿命的特性

抗衰老药物既能促进人体健康衰老,又能用于老年相关疾病的治疗。在过去的20年中,老龄化研究一直是一个活跃的研究领域。有研究表明,TOR和SIRT1在寿命中发挥调节作用。TOR信号减少有助于延长寿命,但由于候选物种类的不足和筛选方法的局限,只有少数化合物被成功鉴定具有延长寿命的功效。

近期,来自中国台湾长庚纪念医院的王彤红及其团队从《本草纲目》、《黄帝内经》和《神农本草经》等传统中药典中筛选出具有潜在长寿特性的33种单味中药和6种中药组方作为候选药物,开发并使用新的母体富集程序(MEP),成功筛选并鉴定出单味中药补骨脂(*Psoralea corylifolia*)中的活性纯化合物——黄酮类榛仁球蛋白(Corylin),在酵母细胞中靶向作用于GTR1蛋白,抑制了TOR1活性,有效延长了酵母的复制寿命(RLS)。在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中,通过RNA测序数据证实榛仁球蛋白能改善细胞衰老。在代谢应激条件下,证实榛仁球蛋白能减缓老年高脂小鼠相关代谢功能的下降,延长其寿命。本研究为人类抗衰老研究开辟了新的可能性,相关内容发表在《Nature Communications》杂志上。

谈宇锋编译自:<https://www.nature.com/articles/s41467-022-28908-2>

原文标题:The flavonoid corylin exhibits lifespan extension properties in mouse