

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS、网络药理学和实验验证 探讨裸花紫珠抗 H1N1 活性成分及其作用机制

杨颖¹, 邵骏菁³, 许金珂⁴, 陈岩², 田景振^{1*}, 侯林^{2*}

¹山东中医药大学药学院, 济南 250355; ²山东中医药大学 青岛中医药科学院, 青岛 266000;

³济宁医学院基础医学院, 济宁 272067; ⁴山东省疾病预防控制中心, 济南 250014

摘要: 本实验首先对裸花紫珠的提取物进行萃取, 得到不同的萃取部位, 然后对各部位进行抗甲型流感病毒 H1N1 型(H1N1)活性筛选, 确定裸花紫珠乙酸乙酯萃取部位(EACN)具有较好的体外抗 H1N1 的活性。采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术对 EACN 进行定性分析。基于定性分析的结果, 进一步使用数据挖掘和网络药理学, 评估药物的活性成分、关键靶点和关键通路, 最后使用 H1N1 感染 BALB/c 小鼠模型对预测结果进行验证。结果显示, 在各个萃取部位中, 乙酸乙酯部位体外抗 H1N1 效果最佳, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 51 μg/mL, 半数细胞毒浓度(CC₅₀)为 859.4 μg/mL, 选择指数(SI, CC₅₀/IC₅₀)为 16.85。从 EACN 中鉴定出 34 种化合物, 在此基础上, 利用网络药理学, 筛选出和 EACN 抗 H1N1 相关的药物靶点 67 个, 靶点共涉及生物过程 491 个, 与抗 H1N1 相关的通路 147 个。H1N1 感染 BALB/c 小鼠实验结果发现, EACN 能改善 H1N1 感染引起的体重降低和肺指数的增加, 降低小鼠肺组织的病毒载量, 减轻小鼠肺组织的病理损伤, 降低外周血清中 TNF-α、IFN-γ、IL-1β 水平。实验结果提示 EACN 可能从直接抑制病毒、抗炎作用和免疫调节作用等多个途径发挥抗 H1N1 的作用。

关键词: 裸花紫珠; H1N1; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)2-0279-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.2.011

Study on the active components and mechanism of *Callicarpa nudiflora* against H1N1 based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS, network pharmacology and experimental validation

YANG Ying¹, SHAO Jun-jing³, XU Jin-ke⁴, CHEN Yan², TIAN Jing-zhen^{1*}, HOU Lin^{2*}

¹College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

²Qingdao Academy of Chinese Medical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Qingdao 266000, China;

³College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China;

⁴Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China

Abstract: In this experiment, the extracts of *Callicarpa nudiflora* were extracted to obtain different extraction parts, and then the sites were screened for anti-influenza A virus H1N1 (H1N1) activity, and it was determined that the ethyl acetate extraction part of *Callicarpa nudiflora* (EACN) had better anti-H1N1 activity *in vitro*. Qualitative analysis of EACN by ultra performance liquid chromatography-quaternary/orbitrap-high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) technique was performed. Based on the results of qualitative analysis, data mining and network pharmacology were further used to evaluate the active ingredients, key targets and critical pathways of the drug. Finally, the prediction results were validated using the H1N1 infected BALB/c mouse model. The results showed that the ethyl acetate extract had the best anti-H1N1 effect *in vitro*, with half inhibitory concentration (IC₅₀) of 51 μg/mL, half cytotoxic concentration (CC₅₀) of 859.4 μg/mL, and selection index (SI, CC₅₀/IC₅₀) value of 16.85. Thirty-four compounds were identified from EACN. On this basis, 67 drug tar-

收稿日期: 2023-07-06 接受日期: 2023-10-11

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2019QH007); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2021CXGC010511); 济南市“新高校 20 条”资助项目(2021GXRC028)

* 通信作者: Tel: 86-531-89628080; E-mail: tianjingzhen@163.com, houlin5027@163.com

gets related to EACN anti-H1N1 were screened using network pharmacology, including 491 biological processes and 147 pathways related to anti-H1N1. The experimental results of H1N1 infected BALB/c mice showed that EACN could improve the weight loss and lung index increase caused by H1N1 infection, reduce the viral load of mouse lung tissue, alleviate the pathological injury of mouse lung tissue, and reduce the levels of TNF- α , IFN- γ and IL-1 β in peripheral blood serum. The results suggest that EACN may play an anti-H1N1 role in many ways, such as direct inhibition of virus, anti-inflammatory effect and immunomodulatory effect.

Key words: *Callicarpa nudiflora*; H1N1; network pharmacology; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

中药裸花紫珠是马鞭草科植物裸花紫珠 (*Callicarpa nudiflora* Hook. & Arn.) 的干燥叶。裸花紫珠主要分布于海南、广西、广东等地区, 道地产区为海南省五指山区^[1]。裸花紫珠是 2020 版《中华人民共和国药典》唯一新增中药材, 其单方制剂裸花紫珠片和裸花紫珠胶囊被广泛地用于治疗血热毒盛所致的呼吸道、消化道出血及细菌感染性炎症。植物化学家已经从裸花紫珠中鉴定出 300 余种化合物, 包括苯丙素类、黄酮类、三萜类、二萜类、环烯醚萜类、挥发油类等^[14]。现代药理学研究证实裸花紫珠具有抗炎、抗血栓、抗肿瘤、抗菌和保肝等活性^[5-9]。在筛选具有抗病毒活性的中药的过程中, 发现裸花紫珠提取物具有良好的抗病毒 (如甲型流感病毒 H1N1 型 (H1N1)、肠道病毒 71 型等) 活性^[10,11]。甲型流感病毒感染是肺炎相关死亡病例的常见病因。严重的甲型流感病毒感染会引起双侧肺部浸润和低氧血症, 即急性呼吸窘迫综合征, 是甲型流感病毒导致死亡的主要原因之一^[12,13]。本实验围绕裸花紫珠的抗 H1N1 活性展开, 利用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用 (UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 对裸花紫珠有效部位的化学成分进行鉴定, 利用网络药理学对裸花紫珠抗 H1N1 的作用机制进行预测, 并进行实验验证, 初步探讨裸花紫珠抗 H1N1 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

中药裸花紫珠由江西普正药业股份有限公司提供, 经吴永忠研究员鉴定为马鞭草科植物裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* 的干燥叶, 标本存放于青岛中医药科学院药库, 标本号为 QKY221104。

磷酸奥司他韦颗粒 (批号 0582201015, 广东东阳光药业股份有限公司); DMEM 细胞培养液、胎牛血清、细胞消化液 (EDTA-0.25% 胰酶)、PBS、双抗、Opti-MEM 培养基均为 Gibco 品牌 (批号分别为 812207、10270-106、2323363、BYHC1713、HYT11280746、31985070); TPCK 胰蛋白酶 (Sigma, 批号

T8802)。

石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 (分析纯, 科隆化学试剂有限公司); 异氟烷 (易弗宁, 批号 20220202); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、血清免疫球蛋白 G (IgG)、白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号均为 11/2021); 标准品毛蕊花糖苷、阿魏酸、咖啡酸、木犀草苷、金圣草 (黄) 素和异槲皮苷采购自上海源叶 (批号分别为 Y21A9H59554、H25M6L1、Y25O8C46530、Y05D8H4 9919、Y10J11W118163、P25J9F65872, 纯度均为 >98%); 柚皮素、木犀草素、槲皮素、齐墩果酸购自大连美仑 (批号分别为 M0506AS、M0525AS、O1023AS、D0701AS, 纯度均为 >98%)。

TIANamp Virus DNA/RNA Kit (北京天根生化科技有限公司, W0229); BeyoFast-SYBR Green One-Step 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) Kit (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 110821220208); H1N1 引物 F: 5'-GTATGGACCTGCCGTAGC-3', R: 5'-GCTTCCACCAGGGTCTC-3'; GAPDH 引物 F: 5'-GGATGCTGCCCTTACCC-3', R: 5'-GTTACACCGACCTTCACC-3' (北京擎科生物科技股份有限公司)。

1.2 细胞与病毒

犬肾细胞 (MDCK 细胞, 作为 H1N1 的宿主)、H1N1 (病毒株为 A/Puerto Rico/8/1934), 均由山东省医学科学院提供。

1.3 动物

6 周龄 BALB/c 雌性小鼠 50 只, 体重 15 ~ 18 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2021-0006, 实验单位动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2017-0022。本研究在山东中医药大学动物护理使用专业委员会 (山东济南, 伦理审批号: SDUTCM20220415022) 的监管下进行。

1.4 主要仪器

超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用仪 (赛默飞世尔科技公司, Thermo Fisher Ultimate 3000

型及 Q Exactive 型);质谱工作站(赛默飞世尔科技公司, Xcalibur 3.0 型);小动物麻醉机(瑞沃德, R500IR);十万分之一天平(赛多利斯, CPA225D);低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司, SC-3610);生物安全柜、CO₂ 培养箱均采购自上海力申科学仪器公司(型号分别为 HFsafe-1200TE、HF90);酶标仪(Bio Tek, EPOCH2T);倒置显微镜(OLYMPUS CKX41);Real-time PCR 仪(瑞士 ROCHE 公司, Light Cycler 480 II 型)。

1.5 实验方法

1.5.1 裸花紫珠不同萃取物的制备

取适量裸花紫珠药材,粉碎,过 40 目筛,浸泡 30 min,依次用 8 倍量的 95% 乙醇、75% 乙醇和水进行提取,每种溶剂提取 2 h,合并三种溶剂的提取液,浓缩至 1 g/mL。依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种试剂萃取三次。合并萃取液,旋转蒸发至稠浸膏状,烘干,得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和萃余水四种萃取物。

1.5.2 体外抗病毒活性研究

将不同浓度的上述四种萃取物和磷酸奥司他韦接种至 MDCK 细胞,培养 48 h。利用 MTT 试剂盒检测四种萃取物和磷酸奥司他韦对 MDCK 细胞的 50% 细胞毒浓度(CC₅₀)。选择细胞存活率大于 90% 的最大药物浓度作为药物的非细胞毒浓度。H1N1 感染 MDCK 细胞的过程是在含有 1 000 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 2 μg/mL TPCK-胰酶的 Opti-MEM 培养基中进行。取 96 孔板,每孔接种浓度为 1 × 10⁵ 细胞/mL 的细胞悬液 100 μL,培养 24 h(37 °C, 5% CO₂)。将细胞板弃去细胞培养液且用 PBS 清洗两次,每孔分别加入 100 μL 不同浓度的各个萃取物或磷酸奥司他韦溶液和 100 μL H1N1 病毒稀释液(由 TCID₅₀ 为 1 × 10⁶ 的病毒原液稀释 100 倍得到)。培养 48 h 后用 MTT 试剂盒检测细胞存活率,并按照 Reed-Muench 法计算四种萃取物和磷酸奥司他韦对 H1N1 的半数抑制浓度(IC₅₀)^[14,15]。同时计算选择指数(SI, CC₅₀/IC₅₀)用来判断药物效果的安全范围,SI 越大安全范围越大。

1.5.3 化学成分分析

1.5.3.1 混合对照品溶液和样品溶液的制备

用甲醇溶解适量的对照品包括毛蕊花糖苷、阿魏酸、咖啡酸、木犀草苷、金圣草(黄)素、异槲皮苷、柚皮素、木犀草素、槲皮素和齐墩果酸,然后转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻线,摇匀。在 12 000 r/

min 的条件下离心 5 min,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,得到混合对照品溶液。

精密称取裸花紫珠乙酸乙酯萃取物(the ethyl acetate extraction part of *Callicarpa nudiflora*, EACN) 0.1 g,加甲醇溶解后转移至容量瓶,继续加甲醇定容至 10 mL,摇匀。在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,得到样品溶液。

1.5.3.2 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 乙酸水(B),梯度洗脱:0 ~ 35 min, 5% → 21% A; 35 ~ 40 min, 21% → 26% A; 40 ~ 45 min, 26% → 35% A; 45 ~ 50 min, 35% → 55% A; 50 ~ 55 min, 55% → 75% A; 55 ~ 60 min, 75% → 85% A。流速:0.3 mL/min;柱温箱温度:35 °C;进样体积:5 μL。

1.5.3.3 质谱条件

正离子模式的喷雾电压设置为 3 500 V,负离子模式为 3 000 V;毛细管温度 350 °C,辅助气体加热器温度 350 °C;扫描方式:全 MS(分辨率 70 000)和 MS/MS(分辨率 17 500)。扫描范围:M/z 80-1 200;阶跃归一化碰撞能量为 20、40 和 60 eV。UPLC-Q-Orbitrap-MS 的仪器控制、数据采集和分析使用 Xcalibur 软件 3.0(Thermo Fisher, CA, USA)进行。对于不能用对照品标出的化合物,根据数据库 MassBank(<https://massbank.eu/>)、FoodDB 数据库(<https://foodb.ca>)和文献数据^[2,16]中的高精度准分子离子、同位素分布和碎片模式进行了初步鉴定。

1.5.4 EACN 中化学成分相关靶点和 H1N1 相关靶点的获取

为了获取 EACN 中化学成分的靶点,我们利用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[17,18],逐个检索表 1 中的化学成分。在 PubChem 数据库中将“activity”设置为“active”,“taxids”设置为“9606”,在 Swiss Target Prediction 数据库中设置筛选条件为“homo spines”,Probability* > 0.05。合并两个数据库筛选的结果并通过 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)将靶标转换为基因符号。H1N1 的相关靶点来自于 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)三个数据库^[19,20]。利用 Venny 2.1 版平台(

fogp. cnb. csic. es/tools/venny/index. html) 获取“H1N1”相关靶点与 EACN 相关靶点交集。

1.5.5 GO、KEGG 富集分析和网络的构建

将活性成分与 H1N1 的重叠靶点导入至 Metascape 平台 (<http://www.metascape.org/>) 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析, 探讨药物作用的生物学过程, 描述基因靶点的功能, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC); 同样对上述基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 探讨药物作用的生物通路, 得到潜在靶点所富集的信号通路。GO 和 KEGG 富集分析条件均为 $P < 0.05$, 最小 count 为 3。富集结果通过在线可视化平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化。利用 Cytoscape 3.6.0 对药物-成分-靶点-通路-疾病网络进行可视化, 字体大小按照度值进行展示, 度值越高的节点, 字体越大。

1.5.6 EACN 体内抗 H1N1 研究

将小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组 (control, Con)、模型对照组 (model, Mod)、磷酸奥司他韦组 (oseltamivir phosphate, OP, 1.25 mg/mL)、EACN 高剂量组 (EACN-H, 7.8 mg/mL)、EACN 低剂量组 (EACN-L, 3.12 mg/mL)。适应性饲养 3 d 后, 利用小动物麻醉机对小鼠进行麻醉, 每只小鼠滴鼻给予 20 μ L H1N1 病毒稀释液, 空白对照组滴鼻给予等体积 PBS, 2 h 后灌胃给药 (0.2 mL/只), 每天称定小鼠体重。在给药 6 d 后, 利用小动物麻醉机对小鼠进行麻醉, 并使得小鼠在规定时间内安乐死, 采集外周血并摘取肺组织, 称定质量, 计算肺指数 (肺指数 = 肺质量/小鼠体质量 \times 100%)。将肺组织分为两份, 一份用 4% 甲醛固定, 经脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片、烘干后进行 HE 染色以观察肺部病变。另一份肺组织经组织匀浆并离心后, 上清液用 TIANamp Virus DNA/RNA Kit 提取病毒 RNA, 并利用 BeyoFast™ SYBR Green One-Step Real-time PCR Kit 对提取到的 RNA 进行反转录和扩增。将小鼠外周血置于 EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 下过夜后在 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清, ELISA 法检测血清 TNF- α 、IFN- γ 、IgG、IL-1 β 水平。

2 实验结果

2.1 裸花紫珠抗 H1N1 有效萃取部位的筛选

体外实验结果显示, 作为阳性对照, 磷酸奥司他

韦对 MDCK 细胞的 CC_{50} 为 565.8 μ g/mL, 对 H1N1 的 IC_{50} 为 45.01 μ g/mL, 选择指数 (SI) 为 12.57 (见图 1)。正丁醇、乙酸乙酯和石油醚三个萃取部位对 MDCK 细胞的 CC_{50} 分别为 1 280.0、859.4、71.5 μ g/mL。正丁醇、乙酸乙酯和石油醚三个萃取部位对 H1N1 的 IC_{50} 分别为 270、51、7.23 μ g/mL, SI 分别为 4.74、16.85、9.9 (见图 2~4), 萃余水部位没有明显

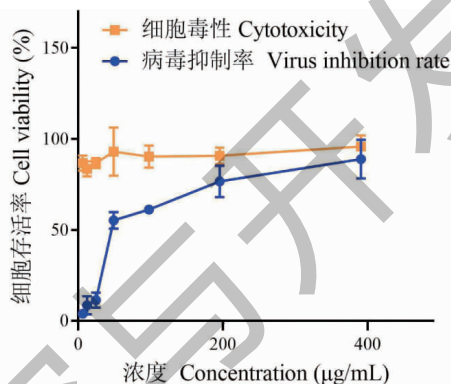


图 1 磷酸奥司他韦体外抗 H1N1 活性

Fig. 1 *In vitro* anti-H1N1 activity of oseltamivir phosphate

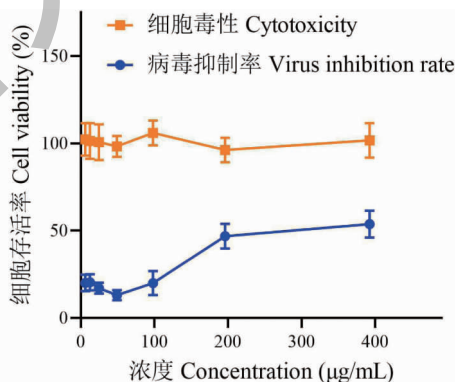


图 2 正丁醇萃取物体外抗 H1N1 活性

Fig. 2 *In vitro* anti-H1N1 activity of n-butyl alcohol extract

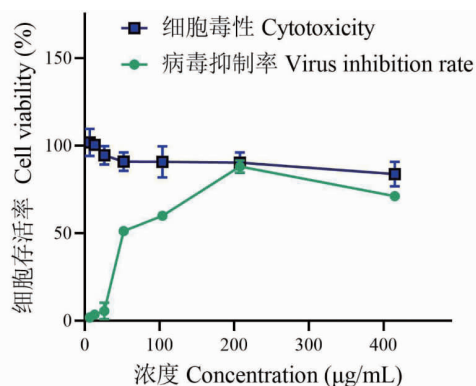


图 3 乙酸乙酯萃取物体外抗 H1N1 活性

Fig. 3 *In vitro* anti-H1N1 activity of ethyl acetate extract

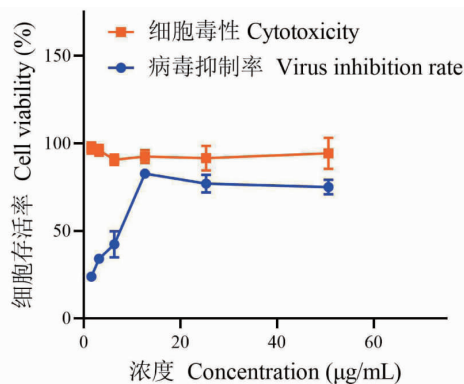


图4 石油醚萃取物体外抗 H1N1 活性

Fig. 4 *In vitro* anti-H1N1 activity of petroleum ether extract

的抗 H1N1 的活性,因此未对萃余水部位抗 H1N1 活性进行可视化。由实验结果可知,乙酸乙酯萃取部位有良好的抗 H1N1 活性且对 MDCK 细胞的毒性较低,因此将此部位认为是中药裸花紫珠的最佳活性部位。进一步对 EACN 的化学成分进行定性分析。

2.2 化学成分分析

采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对 EACN 化学成分进行表征。EACN 在正负离子模式下的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)见图 5~8。共鉴定出 34 个化合物(见表 1 和图 9),包括 14 个苯丙酸及其苷类,15 个黄酮及其苷类,2 个香

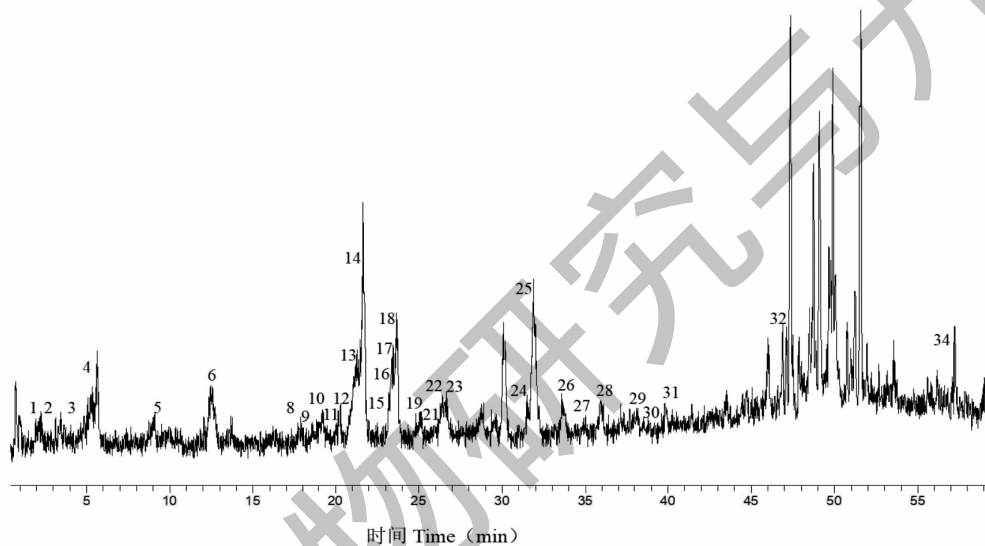


图5 EACN 在负离子模式下的总离子流图

Fig. 5 TIC of EACN in negative ion mode

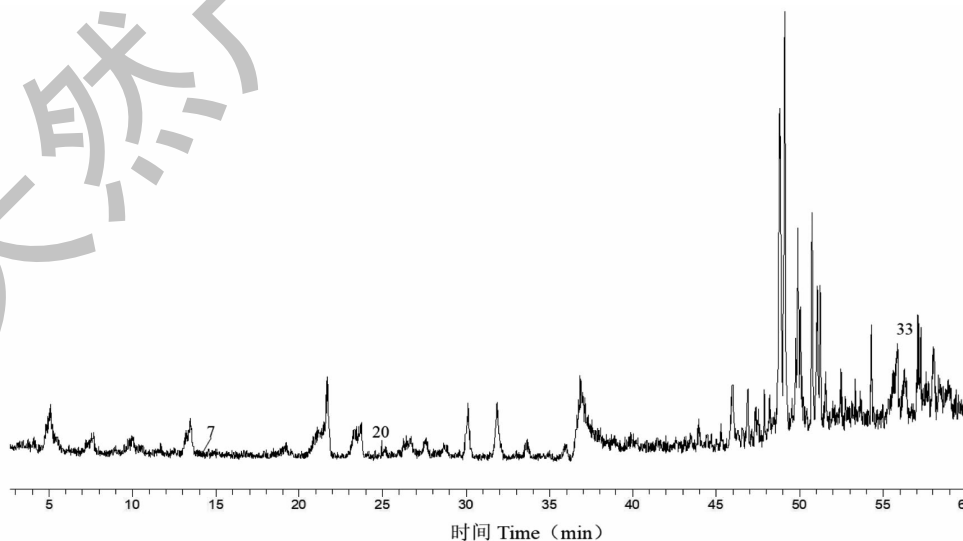


图6 EACN 在正离子模式下的总离子流图

Fig. 6 TIC of EACN in positive ion mode

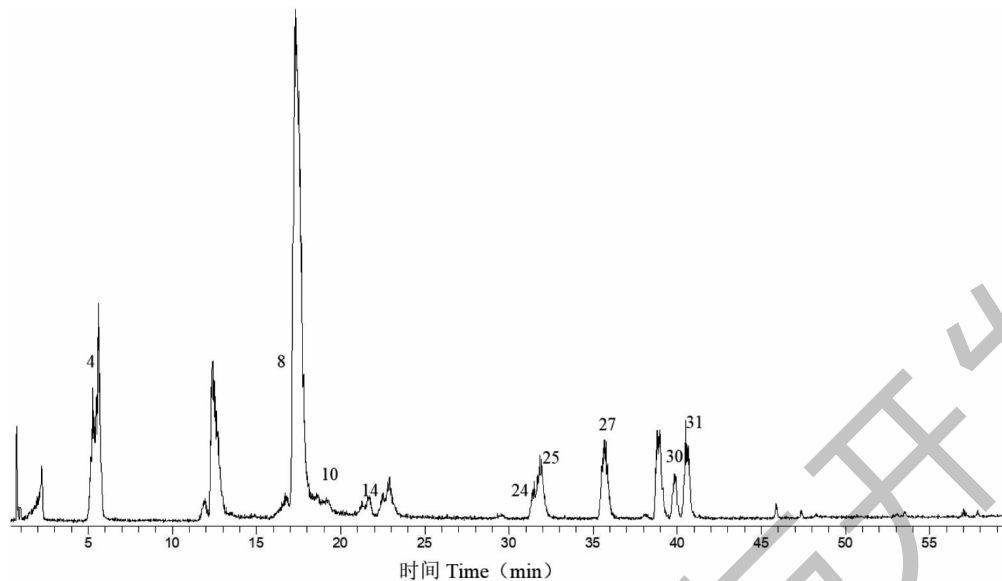


图7 混合对照品在负离子模式下的总离子流图

Fig. 7 TIC of mixed reference substance in negative ion mode

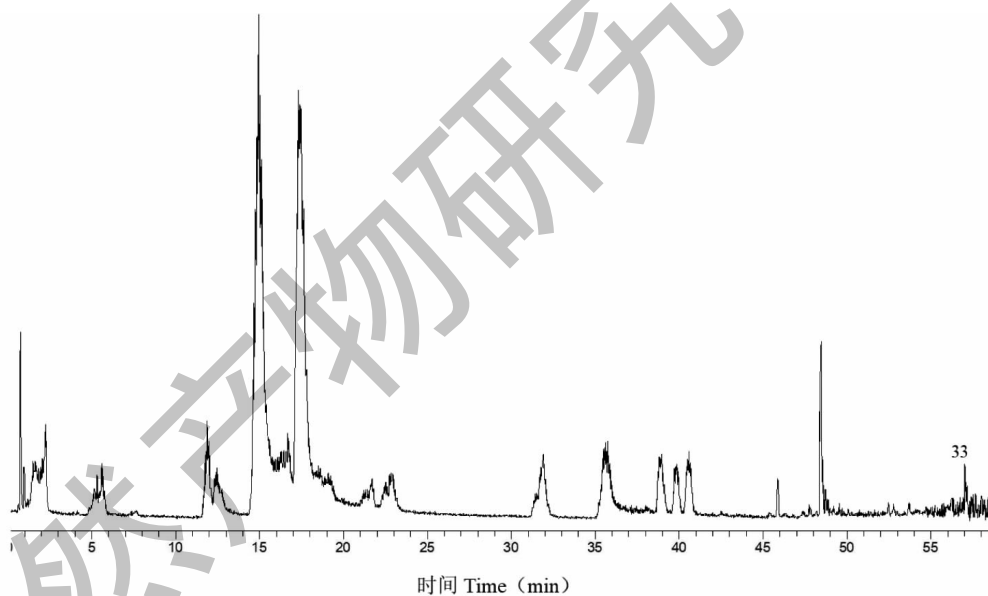


图8 混合对照品在正离子模式下的总离子流图

Fig. 8 TIC of mixed reference substance in positive ion mode

豆素, 2个三萜, 1个苯乙醇苷类。通过与混合标准品的保留时间和裂解规律对比确定了表1中的化合物4、8、10、14、24、25、27、30、31、33分别是咖啡酸、异槲皮苷、木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、柚皮素、金圣草(黄)素、异鼠李素和齐墩果酸。其余化合物是根据分子离子峰和其他碎片离子的特性以及裂解规律等, 参考 MassBank (<https://mass-bank.eu/>)、FoodB 数据库 (<https://foodb.ca>) 和文献数据^[2,16]进行初步的定性。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 活性成分靶点预测

口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 经常被作为筛选药物活性成分的条件^[21]。我们在筛选过程中发现如咖啡酸 (OB = 54.97%, DL = 0.05)、阿魏酸 (OB = 39.56%, DL = 0.06) 和毛蕊花糖苷 (OB = 2.94%, DL = 0.62) 等化合物不符合上述筛选条件, 但已有文献证明这些化合物能通过抑制病毒复制、

表 1 EACN 中鉴定出的化学成分

Table 1 The chemical components identified from EACN

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子量 Molecular weight	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value(m/z)	二级质谱碎片 Secondary mass spectrometry fragment(m/z)
1	0.73	连翘酯苷 E Forsythoside E	462.17	$C_{20}H_{30}O_{12}$	$[M-H]^-$	461.166 7	315.103 7、135.043 7、 113.022 9
2	3.85	1- <i>O</i> -咖啡酰-(6- <i>O</i> - <i>L</i> -吡喃鼠 李糖基)-吡喃葡萄糖苷 1- <i>O</i> -Caffeoyl-(6- <i>O</i> - <i>L</i> -rhamnopyranosyl)- glucopyranoside	488.15	$C_{21}H_{28}O_{13}$	$[M-H]^+$	487.145 6	179.034 0、161.023 2、 135.043 8
3	3.94	6- <i>O</i> -咖啡酰葡萄糖苷 6- <i>O</i> -Caffeoyl glucoside	342.09	$C_{15}H_{18}O_9$	$[M-H]^+$	341.088 0	215.055 9、179.034 0、 161.023 2
4	5.26	咖啡酸 Caffeic acid	180.04	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^+$	179.034 0	161.023 9、 135.043 8
5	9.01	4-羟基肉桂酸 4-Hydroxycinnamic acid	164.05	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^+$	163.038 9	119.048 8
6	12.67	秦皮乙素 6,7-Dihydroxycoumarin	178.03	$C_9H_6O_4$	$[M-H]^-$	177.018 3	133.028 1、 91.017 3
7	14.88	香豆素 Coumarin	146.04	$C_9H_6O_2$	$[M+H]^+$	147.043 9	103.054 6
8	18.53	异槲皮苷 Isoquercitrin	464.09	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 5	300.027 6、271.024 9、 255.029 6
9	18.61	梓醇 6-咖啡酸酯 Verninoside	524.15	$C_{24}H_{28}O_{13}$	$[M-H]^+$	523.145 7	323.072 6、179.033 3
10	19.14	木犀草苷 Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	448.10	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^+$	447.093 4	285.040 2
11	20.74	连翘酯苷 B Forsythoside B	756.25	$C_{34}H_{44}O_{19}$	$[M-H]^+$	755.240 7	447.149 2、161.023 2
12	20.77	Parvifloroside B	624.20	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^+$	623.198 3	461.166 1、161.023 2
13	21.28	杨梅素 Myricetin	318.04	$C_{15}H_{10}O_8$	$[M-H]^+$	317.030 2	299.019 2、137.023 1、 109.028 2
14	21.46	毛蕊花糖苷 Acteoside	624.20	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^+$	623.198 4	461.166 4、161.023 2、 133.028 1、113.022 9
15	23.15	山柰酚 Kaempferol	286.05	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^+$	285.040 5	199.039 0、151.002 6、 133.028 1、
16	23.29	柚皮芸香苷 Narirutin	580.18	$C_{27}H_{32}O_{14}$	$[M-H]^+$	579.172 1	217.061 4、151.002 4、 119.048 8、107.012 3
17	23.36	木犀草素 3'- <i>O</i> -葡萄糖苷 Luteolin-3'- <i>O</i> -glucoside	448.10	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^+$	447.093 4	285.040 2
18	23.56	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	624.20	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^+$	623.198 4	461.167 3、161.023 2、 133.028 1、113.022 9
19	25	金圣草(黄)素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷 Chrysoeriol-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	462.12	$C_{22}H_{22}O_{11}$	$[M-H]^+$	461.107 2	446.085 6、283.024 9、 255.031 3
20	25.14	阿魏酸 Ferulic acid	194.06	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M+H]^+$	195.063 9	177.054 4、145.028 3、 135.044 1、117.033 6
21	26	6-阿魏酰梓醇 6-Feruloylcatalpol	538.17	$C_{25}H_{30}O_{13}$	$[M-H]^+$	537.161 4	193.048 8、179.033 3、 161.021 0
22	26.39	Cistanoside C	638.22	$C_{30}H_{38}O_{15}$	$[M-H]^+$	637.214 2	461.168 8、193.048 8、 175.038 4
23	26.39	木犀草素 4'- <i>O</i> -葡萄糖苷 Luteolin-4'- <i>O</i> -glucoside	448.10	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^+$	447.093 4	285.040 2
24	31.52	槲皮素 Quercetin	302.04	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M-H]^+$	301.035 5	178.997 6、151.002 4

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子量 Molecular weight	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value(m/z)	二级质谱碎片 Secondary mass spectrometry fragment(m/z)
25	31.77	木犀草素 Luteolin	286.05	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	285.040 6	151.002 4、133.028 1
26	33.58	异地黄苷 Isomartynoside	652.24	$C_{31}H_{40}O_{15}$	$[M-H]^-$	651.229 9	475.182 3、193.049 8、 175.039 0、160.015 4
27	35.66	柚皮素 Naringenin	272.07	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	271.061 3	151.002 4、119.048 7、 107.012 3、93.032 9
28	35.95	地黄苷 Martynoside	652.24	$C_{31}H_{40}O_{15}$	$[M-H]^-$	651.229 9	475.181 4、193.049 8、 175.039 0、160.015 4
29	38.02	芹菜素 Apigenin	270.05	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.045 6	151.002 4、117.033 0、 107.012 3
30	39.99	金圣草(黄)素 Chrysoeriol	300.06	$C_{16}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	299.056 2	284.032 8、256.037 6
31	40.53	异鼠李素 Isorhamnetin	316.06	$C_{16}H_{12}O_7$	$[M-H]^-$	315.050 9	271.024 7、151.003 1
32	47.62	金合欢素 Acacetin	284.07	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	283.061 4	268.040 2
33	57.14	齐墩果酸 Oleanic acid	456.36	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M+H]^+$	457.367 8	439.357 1、411.361 6、 393.351 6
34	57.27	乌苏酸 Ursolic acid	456.36	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M-H]^-$	455.353 5	407.333 6

抑制神经氨酸酶的活性、降低甲型流感引起的炎症反应等途径发挥抗甲型流感的作用^[22-24]。因此本实验不将 OB 值和 DL 值作为筛选条件。共检索得到 466 个药物靶点和 1 225 个 H1N1 相关靶点。使用 Venny2.1 版平台将药物相关目标与疾病相关目标交叉得到 67 个共同靶点(见图 10),这些交叉靶点对应除 1-*O*-咖啡酰-(6-*O*-*L*-吡喃鼠李糖基)-吡喃葡萄糖苷、金圣草(黄)素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、柚皮芸香苷、parvifloroside B 以外的 29 个成分。

2.3.2 GO 和 KEGG 富集分析

采用 Metascape 数据库对得到的 67 个靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,得到 491 个 GO 条目,包括生物学过程 BP 条目 360 个,细胞组分 CC 条目 56 个,分子功能 MF 条目 75 个,按照 P 值进行从小到大排序,各选取前十个条目进行可视化(见图 11)。得到 17 个注释聚类的 147 个 KEGG 通路,删除明显与 H1N1 无关的抗癌通路、糖尿病通路等,按照 P 值从小到大排序,选前 25 个条目作为核心通路进行可视化(见图 12)。结果表明 GO 条目中与治疗 H1N1 有关的生物学过程包括蛋白质磷酸化的正调控(GO:0001934),氧化应激反应(GO:0006979)等;有关的细胞组分包括囊泡腔(GO:0031983),分泌颗粒腔(GO:0034774);有关的分子功能包括激酶结合

(GO:0019900),生长因子受体结合(GO:0070851)。

与 H1N1 相关的 KEGG 通路主要可以分为炎症、免疫调节,病毒三个模块,核心通路中,与炎症相关的通路包括 IL-17 信号通路(hsa04657),NF- κ B 信号通路(hsa04064)等;与免疫调节有关的通路包括 T 细胞受体信号通路(hsa04660),Th1 和 Th2 细胞分化(hsa04658)等,与病毒相关的通路包括甲型流感病毒通路(hsa05164)等。提示 EACN 抗病毒是一个多途径的作用。

2.3.3 药物-成分-靶点-通路-疾病网络分析

为了阐明 EACN 治疗 H1N1 感染的潜在机制,我们利用 Cytoscape v3.6.0 软件构建了药物-成分-靶点-通路-疾病网络(见图 13),三角形代表裸花紫珠,箭头代表基因符号,六边形代表成分,正方形代表通路,菱形代表 H1N1。通过网络分析发现度值最高的靶点 RELA (degree = 32),NF- κ B1 (degree = 31)都属于 NF- κ B 家族,在炎症反应、免疫应答等过程都发挥了重要作用。有 22 个活性成分都与 MMP2 (degree = 24)相连,但是在展示出的 25 个通路中,MMP2 只存在于白细胞跨内皮迁移中,提示 EACN 抗 H1N1 的一个重要潜在机制可能是调节白细胞的跨膜迁移。有 19 个化合物通过 11 个靶点作用于甲型流感病毒通路。药物通过作用于 PLG(对应 Plasmin)和

PRSS1(对应 Trypsin)影响 H1N1 的 M2 通道影响病毒的脱壳过程,还可以通过 PLG 作用于神经氨酸酶途径

影响病毒的释放过程。提示 PLG 和 PRSS1 可能是 EACN 直接作用于 H1N1 的关键靶点。

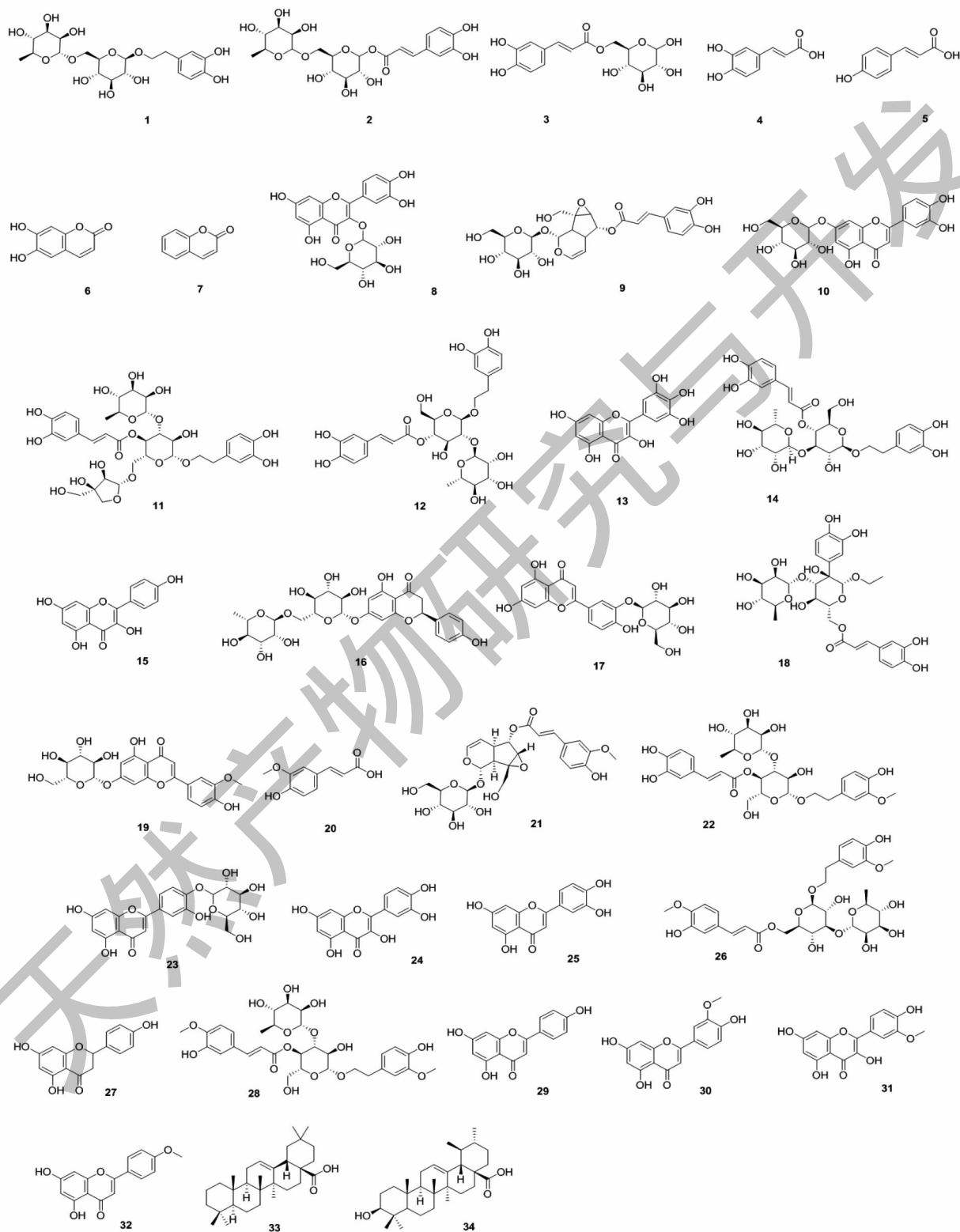


图9 EACN 中化学成分的结构式

Fig. 9 Structures of compounds in EACN

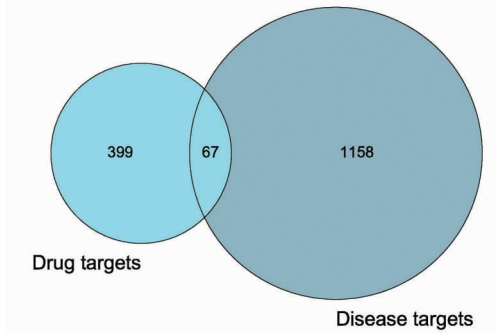


图 10 成分靶点与疾病靶点韦恩图

Fig. 10 Venn diagram of drug targets and disease targets

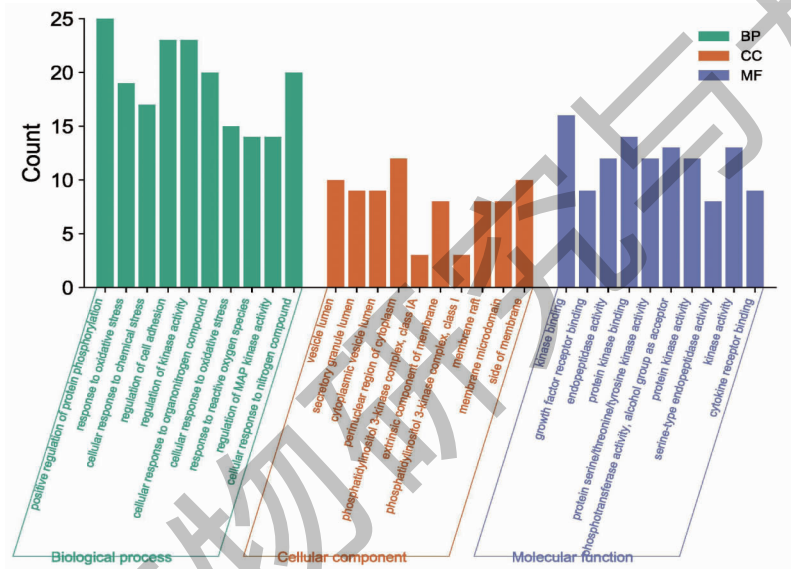


图 11 GO 富集分析

Fig. 11 GO enrichment analysis

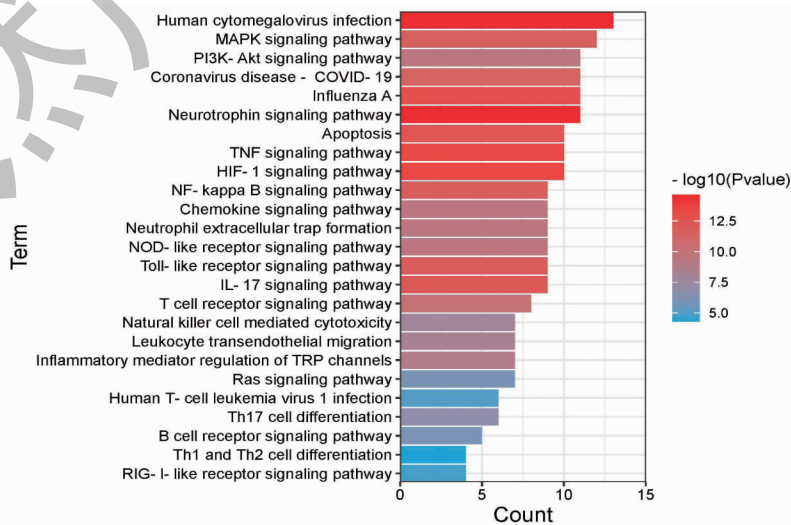


图 12 KEGG 富集分析

Fig. 12 KEGG enrichment analysis

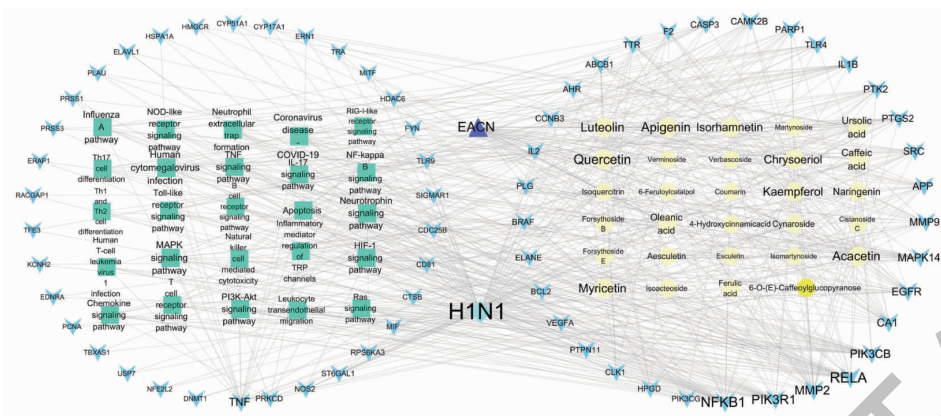


图 13 药物-成分-靶点-通路-疾病网络

Fig. 13 Drug-component-target-pathway-disease network

2.4 动物实验验证

KEGG 富集分析结果显示, EACN 能通过抑制病毒增殖作用、抗炎作用和免疫调节等多个途径发挥抗 H1N1 感染的作用。我们用 H1N1 感染 BALB/c 小鼠实验对预测结果进行了实验验证。

在感染 H1N1 后的第四天, Mod 组小鼠体重急剧降低, 并至第六天持续降低, 而与 Mod 组相比, EACN-H、EACN-L 和 OP 均能抑制小鼠体重的下降趋势(见图 14)。我们检测了 H1N1 病毒感染小鼠肺组织中 H1N1 的相对表达水平, RT-PCR 检测显示, Mod 组小鼠肺病毒载量显著高于 Con 组 ($P < 0.001$)。OP、EACN-H 和 EACN-L 能不同程度地降低 H1N1 在小鼠肺组织中的表达水平(见图 15)。这些结果说明, EACN 抑制了 H1N1 在小鼠肺组织的增殖。机体在清除病毒的过程中会对肺组织造成炎症损伤, 肺部炎症浸润会引起小鼠肺指数增加(见图 16), 与 Mod 组相比, OP、EACN-H 和 EACN-L 能显著降低小鼠的肺指数。病理切片结果显示(见图 17), 与 Mod 组相比, OP、EACN-H 和 EACN-L 能

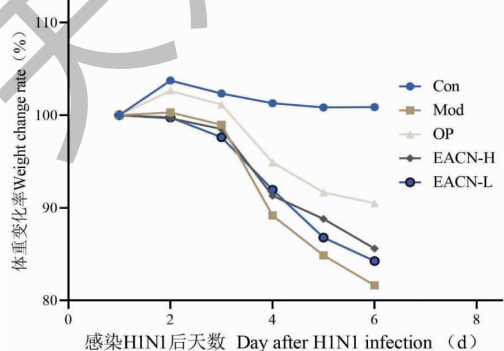


图 14 小鼠体重变化

Fig. 14 Weight change rate of mice

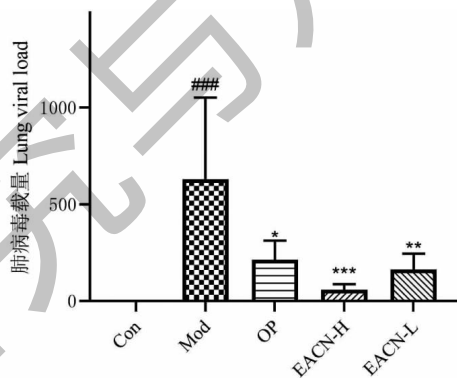


图 15 H1N1 感染小鼠肺组织病毒载量

Fig. 15 Viral load in the lung tissues of H1N1-infected mice
注:与 Con 组比较, ### $P < 0.001$;与 Mod 组比较, * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 下同。Note: Compared with Con, ### $P < 0.001$; Compared with Mod, * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

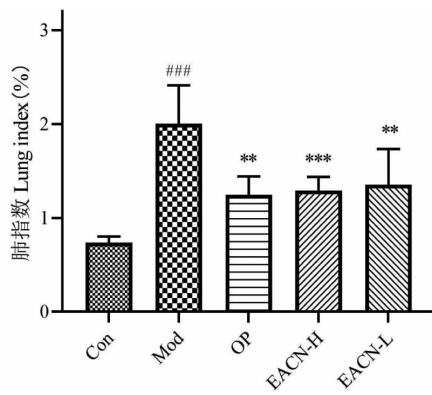


图 16 肺指数

Fig. 16 Lung index

减轻小鼠肺组织的炎症损伤。促炎细胞因子的过度表达增加了流感病毒的致病性, ELISA 实验结果显

示(见图 18), Mod 组小鼠血清中的炎症因子包括 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 含量均显著高于 Con 组小鼠。与 Mod 组比较, EACN 和 OP 治疗后小鼠血清中的 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 含量均显著降低。我们认为 EACN 组炎症因子含量的减少有助于减轻感染 H1N1 小鼠的炎性损伤。

IgG 主要存在于人体血清中, 占血清中免疫蛋白总量的 75%, 机体在流感病毒刺激下产生的抗体

主要以 IgG 为主^[25]。因此我们还检测了小鼠血清中 IgG 的水平(见图 18)。Mod 组小鼠的血清水平低于 Con 组小鼠但是不具有显著性, 而 EACN-H 组小鼠的血清 IgG 水平显著高于 Mod 组($P < 0.1$)。由此提示 EACN 对 H1N1 感染小鼠有一定的免疫调节作用。综上所述, 我们初步证明了 EACN 能通过抑制病毒增殖作用、抗炎作用和免疫调节等多个途径发挥抗 H1N1 感染的作用。

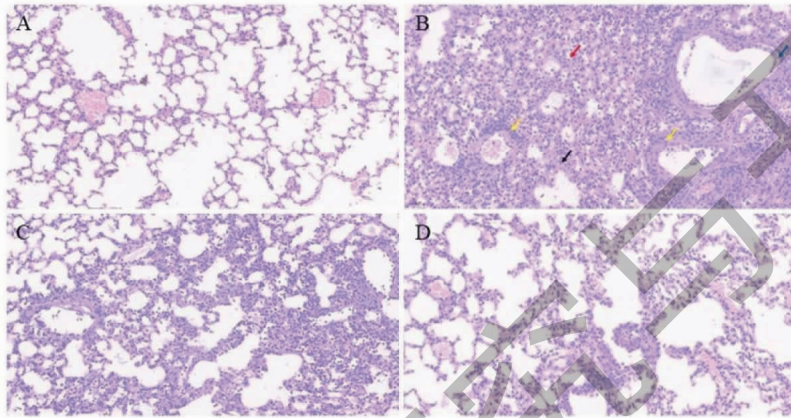


图 17 肺组织病理切片

Fig. 17 Pathological section of lung tissue

注: A: Con; B: Mod; C: OP; D: EACN-H.

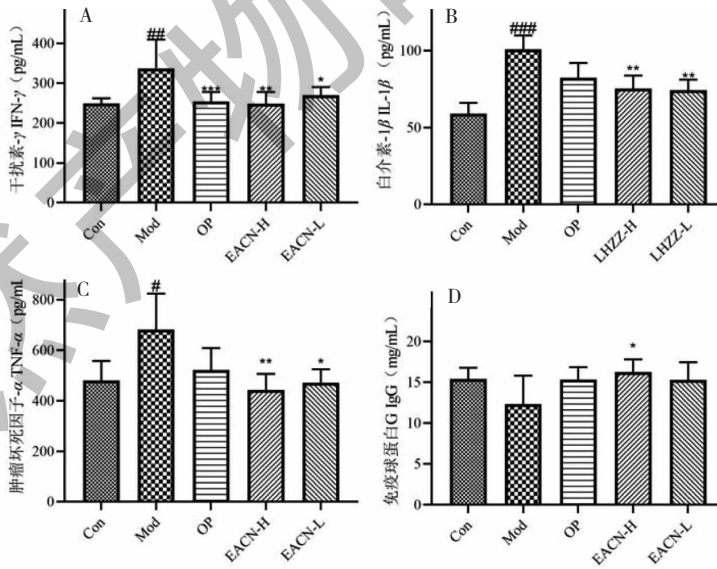


图 18 小鼠外周血清中 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 和 IgG 的水平

Fig. 18 The levels of IFN- γ , IL-1 β , TNF- α and IgG in the peripheral blood serum of mice

3 讨论与结论

甲型流感病毒对现在常用的 M2 通道抑制剂和 NA 抑制剂都产生了不同程度的耐药性。因此, 寻

找新的抗甲型流感的药物或者治疗方法已经成为亟待解决的问题。中医药在甲型流感病毒的临床治疗中发挥了重要作用^[26,27]。中医理论中的整体观念

将病人作为一个有机整体进行系统地调控,而网络药理学通过构建药物-成分-靶点-通路-疾病网络,探索网络各节点生物功能与疾病的互作关系与中医的整体观具有一致性^[28]。本实验首先筛选了中药裸花紫珠的主要抗 H1N1 的活性部位,并对该部位进行分析,鉴定得到 34 种化学成分。结合文献和数据库,得到药物与疾病的 67 个重叠靶点。通过交叉靶点的富集分析,我们推测 EACN 抗 H1N1 的重要生物过程可能是正向调节蛋白质磷酸化,对氧化应激的反应。KEGG 富集分析结果发现,EACN 中有 19 个化合物通过 11 个靶点作用于甲型流感病毒通路。药物通过作用于 PLG 和 PRSS1 影响 H1N1 的 M2 通道影响病毒的脱壳过程,还可以通过 PLG 作用于神经氨酸酶(NA)途径影响病毒的释放过程。提示 PLG 和 PRSS1 可能是 EACN 直接作用于 H1N1 的关键靶点,EACN 能通过影响 H1N1 的脱壳过程和释放过程,抑制 H1N1 的增殖。在药物-成分-靶点-通路-疾病网络中,RELA 和 NF- κ B1 是度值最高的两个靶点,它们所在的 NF- κ B 信号通路能促进 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等因子的表达而促进炎症反应,提示 EACN 可能能够作用于 RELA 和 NF- κ B1 等关键靶点调节 NF- κ B 信号通路等减轻炎症对机体的损伤。根据网络药理学预测的结果,EACN 能调节 T 细胞信号通路,影响 Th1 和 Th2 分化等发挥免疫调节作用。因此本研究对 EACN 抑制 H1N1 增殖作用、抗炎作用和免疫调节作用进行动物实验验证。实验结果发现 EACN 能改善 H1N1 感染引起的体重的降低和肺指数的增加,降低小鼠肺组织的病毒载量,减轻小鼠肺组织的病理损伤,降低外周血血清中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 水平,增加血清抗体 IgG 的水平。本研究首先利用体外实验筛选出裸花紫珠抗 H1N1 的活性萃取部位,并利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 和网络药理学对 EACN 抗 H1N1 的活性成分进行了预测,并对预测结果进行了动物实验验证,筛选出了 EACN 抗 H1N1 的潜在活性成分包括槲皮素、杨梅素、木犀草素、山柰酚、金圣草(黄)素、芹菜素和金合欢素等,初步证明了裸花紫珠能从直接抑制病毒、抗炎作用和免疫调节作用等多个途径发挥抗 H1N1 的作用。在后续的实验,需要对筛选出的单体化合物进行体内外实验验证,在 mRNA 和蛋白水平上进一步研究 EACN 抗 H1N1 的作用机制。

参考文献

1 Yang Y, Li ZY, Shao JJ, et al. *Callicarpa nudiflora* Hook. &

- Arn.: a comprehensive review of its phytochemistry and pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 246:113123.
- 2 Jones WP, Kinghorn AD. Biologically active natural products of the genus *Callicarpa*[J]. *Curr Bioact Compd*, 2008, 4:15-32.
- 3 Singh AK, Chanotiya CS, Yadav A, et al. Volatiles of *Callicarpa macrophylla*: a rich source of selinene isomers[J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5:269-272.
- 4 Feng SX, Zhang M, Yi B, et al. Research progress on chemical constituents in *Callicarpa nudiflora* and their pharmacological activities[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2017, 48:1015-1026.
- 5 Zheng DK, Chen WK, Ma SC, et al. Study on HPLC fingerprint of *Callicarpa nudiflora* and determination of ten components[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2015, 40:1776-1782.
- 6 Wang J, Zheng FH, Zhou ZQ, et al. n-Butanol-soluble chemical constituents from *Callicarpa nudiflora*[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2017, 52:1983-19837.
- 7 Li YM, Yang Y, Yang YF, et al. Composition analysis of different solvent extracts from *Callicarpa nudiflora* based on UPLC-Q-TOF MS/MS technology[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2020, 43:2707-2712.
- 8 Sun XC, Liu F, Yang XY, et al. Seco-labdane diterpenoids from the leaves of *Callicarpa nudiflora* showing nitric oxide inhibitory activity[J]. *Phytomedicine*, 2018, 149:31-41.
- 9 Xu HJ, Lu H, Zhu XC, et al. Inhibitory effects of luteolin-4'-O-beta-D-glucopyranoside on P2Y(12) and thromboxane A(2) receptor-mediated amplification of platelet activation *in vitro*[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42:615-624.
- 10 Yang Y, Shao JJ, Zhou QQ, et al. Optimization of the extraction process of *Callicarpa nudiflora* based on anti-H1N1 activity and AHP-CRITIC mixed weighting method[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2023, 38:2084-2090.
- 11 Yang Y, Shao JJ, Wen R, et al. Study on chemical constituents and anti-EV71 activity of the ethyl acetate extract of *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. before and after artificial gastroenteric fluid treatment[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2022, 37:2769-2773.
- 12 Herold S, Becker C, Ridge KM, et al. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment[J]. *Eur Respir J*, 2015, 45:1463-1478.
- 13 Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic(H1N1) 2009 Influenza. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infection[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362:1708-1719.

- 14 Geng Z, Li Y, Cui Q, et al. Exploration of the mechanisms of Ge Gen Decoction against influenza A virus infection [J]. Chin J Nat Med, 2019, 17: 650-662.
- 15 Chen GL, Lamirande EW, Yang CF, et al. Evaluation of replication and cross-reactive antibody responses of H2 subtype influenza viruses in mice and ferrets [J]. J Virol, 2010, 84: 7695-7702.
- 16 Yi B, Zhang M, Hu YM, et al. Analysis of constituents from different parts of *Callicarpa nudiflora* by UPLC-Q-TOF-MS / MS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 42-49.
- 17 Hao M, Cheng T, Wang Y, et al. Web search and data mining of natural products and their bioactivities in PubChem [J]. Sci China Chem, 2013, 56: 1424-1435.
- 18 Daina A, Michielin O, Zoete V. Swiss Target Prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47: W357-W364.
- 19 Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1. 30. 1-1. 30. 33.
- 20 Pinero J, Sauch J, Sanz F, et al. The DisGeNET cytoscape app: exploring and visualizing disease genomics data [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19: 2960.
- 21 Ye, XW, Deng, YL, Xia LT, et al. Uncovering the mechanism of the effects of *Paeoniae Radix Alba* on iron-deficiency anaemia through a network pharmacology-based strategy [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20: 130.
- 22 Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, et al. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication *in vitro* [J]. Int J Mol Med, 2014, 34: 1020-1024.
- 23 Cui MY, Xiao MW, Xu LJ, et al. Bioassay of ferulic acid derivatives as influenza neuraminidase inhibitors [J]. Arch Pharm, 2020, 353: e1900174.
- 24 Zhang Q, Lei HM, Wang PL, et al. Bioactive components from Qingwen Baidu decoction against LPS-induced acute lung injury in rats [J]. Molecules, 2017, 22: 692.
- 25 Li J, Hou W. Effect of "Hedyotis Diffusae Herba-Smilacis Glabrae Rhizoma" in treatment of lung adenocarcinoma based on network pharmacology [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 6261-6270.
- 26 Li YM. The clinical experience and the experience summarizes of the traditional Chinese medicine treating mild case type A H1N1 [J]. Acta Chin Med (中医杂志), 2010, 25: 442-443.
- 27 Wang YF, Guo JC, Wei W, et al. Research on therapeutic effect of TCM syndrome differentiation and treatment on novel H1N1 influenza [J]. Chin J Tradit Chin Med (中国中医杂志), 2012, 27: 2483-2485.
- 28 Chen J, Chen Q. Current situation and thinking of network pharmacology in the research of traditional Chinese medicine [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报), 2021, 35: 1-6.

(上接第 205 页)

- 23 Liu XC, Zhang LS, Wang FJ. Recent advances on immune regulation of herbal polysaccharide [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报), 2016, 30: 97-101.
- 24 Yang HY, Song XS, Wei ZM, et al. TLR4/MyD88/NFκB signaling in the rostral ventrolateral medulla is involved in the depressor effect of candesartan in stress-induced hypertensive rats [J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11: 2978-2988.
- 25 Liu WL, Mo HY. *Bletilla striata* polysaccharide inhibits tumor growth in colon cancer CT26 tumor-bearing mice by regulating immunity [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2021, 37: 941-945.