

基于 GC-MS 与生物信息学探讨矮地茶中挥发油治疗慢性阻塞性肺疾病的主要活性成分及作用机制

刘国伦^{1,2,3}, 赵迪^{1,2}, 冯素香^{1,2,3*} (1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046; 3.河南中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046)

摘要: 目的 基于 GC-MS 技术和系统生物学方法预测矮地茶挥发性成分治疗慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的作用机制。方法 采用 GC-MS 分析矮地茶挥发油成分并通过面积归一化法确定各成分的相对含量, 利用 TCMID、TCMSP、PharmMapper 数据库筛选矮地茶挥发油主要活性成分与靶点, 运用 Cytoscape 软件构建矮地茶“成分-靶点”网络, OMIM、Genecards 数据库挖掘 COPD 相关靶点, 利用 String 数据库和 Cytoscape 软件构建并绘制蛋白互作网络; 通过 Metascape 数据库进行通路富集分析; 进一步借助 Discovery Studio(Version4.5)软件评估化合物与核心靶点的亲和能力。结果 筛选出 5 个主要共有活性成分, 潜在靶点 154 个, 核心靶点包括 NTRK1、TNF、VEGFA、MAPK1 和 M2C2。通过 GO 富集分析得到 2 665 个条目($P<0.05$), 其中包括生物过程 2 220 条, 分子功能 233 条, 细胞组分 212 条。KEGG 通路为 242 条($P<0.05$), 主要涉及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、NF- κ B 信号通路。分子对接结果显示石竹烯、蛇麻烯、依兰烯与核心靶点有较高的结合能力。结论 矮地茶挥发油可能通过 TNF、VEGFA、MAPK1 等靶点调节 VEGF、TNF、NF- κ B 等通路治疗 COPD。

关键词: 矮地茶; 挥发油; 气相色谱-质谱联用; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R281.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0038-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.005

引用本文: 刘国伦, 赵迪, 冯素香. 基于 GC-MS 与生物信息学探讨矮地茶中挥发油治疗慢性阻塞性肺疾病的主要活性成分及作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 38-46.

Exploring the Main Active Components and Mechanism of Volatile Oil in *Ardisia Japonica* for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Based on GC-MS and Bioinformatics

LIU Guolun^{1,2,3}, ZHAO Di^{1,2}, FENG Suxiang^{1,2,3*} (1.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2.Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P.R. China, Zhengzhou 450046, China; 3.Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To predict the mechanism of action of the volatile components of *Ardisia japonica* in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease(COPD) based on GC-MS technology and systems biology. **METHODS** GC-MS method was used to analyze the volatile oil of *Ardisia japonica* and the relative content of each component was determined by the area normalization method. The main active components and targets of the volatile oil of *Ardisia japonica* were screened by TCMID, TCMSP, and PharmMapper database. The “component-target” network of *Ardisia japonica* was constructed by Cytoscape software. OMIM and Genecards database was used to mine COPD related targets, String database and Cytoscape software was used to construct and map protein-protein interaction network; conduct pathway enrichment analysis was established through Metascape database; further rely on Discovery Studio(Version4.5) to evaluate the affinity of the compound with the core target of COPD. **RESULTS** A total of 5 main common active components and 154 potential targets were screened. The core targets included NTRK1, TNF, VEGFA, MAPK1 and M2C2. Through GO enrichment analysis, 2 665 items($P<0.05$) were obtained, including 2 220 items for biological processes, 233 items for molecular functions, and 212 items for cell components. There were 242 KEGG pathways($P<0.05$), mainly involving vascular endothelial growth factor(VEGF), tumor necrosis factor(TNF), and NF- κ B signaling pathways. The results of molecular docking showed that caryophyllene, humulene, and ylangene had high binding ability to the core target. **CONCLUSION** *Ardisia japonica* volatile oil may regulate VEGF, TNF, NF- κ B and other pathways to treat COPD through TNF, VEGFA, MAPK1 and other targets.

KEYWORDS: *Ardisia japonica*; volatile oil; GC-MS; network pharmacology; molecular dockin

基金项目: 河南省科技攻关项目(212102311095); 河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2153)

作者简介: 刘国伦, 男, 硕士生 E-mail: 726972582@qq.com *通信作者: 冯素香, 女, 博士, 教授 E-mail: fengsx221@163.com

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续存在的呼吸系统症状和气流受限为特征的进行性、继发性、致命性疾病^[1-2]。COPD 主要临床表现为咳嗽咳痰、胸闷气短, 常伴有肺动脉高压、肺纤维化、慢性肺源性心脏病等, 且兼具病程长、病情复杂等特点, 严重降低患者生活质量^[3-4]。

矮地茶为紫金牛科植物紫金牛的干燥全草, 广泛分布于陕西长江流域以南各地, 又名紫金牛、平地木、叶下红。《神农本草经》记载, 矮地茶味辛性平, 归肺肝经, 有化痰利湿、活血通络之功效, 临床常用于治疗咳嗽咳痰、湿热黄疸等, 是中医临床治疗肺部疾病的常用药物^[5-7], 抗癆丸^[8]、紫茶颗粒皆以矮地茶为君药。现代药理学研究表明, 矮地茶中含有丰富的生理活性成分, 其中挥发油是矮地茶的主要化学成分, 有抗菌抗炎、止咳平喘、抗过敏等功效, 但目前关于矮地茶挥发油化学成分方面的研究报道较少。因此, 本研究采用水蒸气蒸馏法对矮地茶进行挥发油的提取, 结合气质联用技术对矮地茶挥发油进行分析, 通过峰面积归一化法计算挥发油的相对含量, 并基于系统生物学及生物信息学等多学科理论, 从整体网络角度分析矮地茶挥发油在治疗 COPD 的作用机制, 并通过受体与药物分子之间的相互作用方式研究分子间相互作用来预测其结合模式及亲和力^[9-10], 为矮地茶质量控制与治疗 COPD 的作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

TRACE1300-TSQ8000EVO 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 公司); Xcalibur 工作站(Thermo Scientific 公司); 质谱数据库(NIST2.2); ME204E 型万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); ZDHW 型 5 000 mL 调温电热套(北京中性伟业仪器有限公司)。

乙醚、无水硫酸钠均为分析纯。6 个不同产地矮地茶药材, 经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为紫金牛科植物矮地茶(*Ardisia japonica* Blume)的干燥全草, 见表 1。

1.2 数据库与软件

中药系统药理学分析数据库(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>); DrugBank 数据(<https://www.drugbank.ca>); STITCH_数据库

表 1 矮地茶样品信息来源

Tab. 1 Sources of information about the samples of *Ardisia japonica*

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20170701	江西樟树	S4	20180401	湖北宜昌
S2	20150401	安徽亳州	S5	20180601	江苏江阴
S3	20190809	福建泉州	S6	20160806	广西桂林

(<http://stitch.embl.de>); UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>); 在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>); 治疗靶点数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>); Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); metascape 数据库(<https://metascape.org/>); Cytoscape3.7.2 软件, Discovery Studio 4.5 Client 软件。

2 方法

2.1 矮地茶挥发油的提取

参照中国药典 2020 年版(四部)通则中“2204 挥发油测定法”项下“甲法”操作: 称取矮地茶粗粉, 加 10 倍量水, 浸泡 4 h, 提取 9 h 得黄色透明液体。经无水硫酸钠除水, 即得矮地茶挥发油。

2.2 GC-MS 分析

2.2.1 GC 条件 色谱柱: HP-FAAP 石英毛细管柱(30 m×0.250 mm, 0.25 μm); 载气为氦气; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样方式为分流进样, 分流比 20 : 1, 进样量为 1 μL; 进样口温度 230 °C; 程序升温: 60 °C, 保持 3 min, 以 18 °C·min⁻¹ 升温至 120 °C, 再以 6 °C·min⁻¹ 升温至 200 °C, 保持 7 min; 溶剂延迟 3 min。

2.2.2 MS 条件 EI 离子源; 离子源温度: 230 °C; 传输线温度: 250 °C; 电子能量: 70 eV; 倍增管电压: 1.8 kV; 质量范围: *m/z* 35~550。

2.2.3 矮地茶挥发油分析 取“2.1”项下的矮地茶挥发油, 加适量石油醚溶解后, 按“2.2”项下条件进样分析, 记录色谱质谱数据, 通过 HP-MSD 化学工作站检索 NIST 标准质谱图库, 同时结合相关的质谱图文献解析, 确认矮地茶挥发油的化学成分及对应化合物的结构, 采用峰面积归一化法确定各化合物的相对含量。

2.3 生物信息学分析

2.3.1 矮地茶挥发油化学成分与 COPD 靶点的筛选 基于 GC-MS 获得的矮地茶挥发油化学成分信息, 通过检索库 TCMID、TCMSP、Swiss Target Prediction、Pubchem 等数据库筛选 Probability>0

及查阅相关文献,将查找化合物的靶点合并;并通过 OMIM、Genecards、DrugBank 数据库搜索 “Chronic obstructive pulmonary disease” 筛选出 COPD 靶点,去除 gifts ≤ 27 的靶点,除去重复的基因和假阳性基因,并通过 Uniprot 数据库将其规范化。

2.3.2 蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及核心靶点的筛选 为明确 COPD 靶点与矮地茶挥发油之间相互作用关系,将矮地茶与 COPD 靶点取交集,将交集靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件,利用 BisoGenet 插件构建 PPI 网络图,使用 Cytoscape 中的 Cyto-CNA 插件、“Analysis Network”工具得到蛋白相互作用网络之间的相关参数。基于“度(DC)”“间性中心性(BC)”“亲和中心性(CC)”参数,对 PPI 网络进行拓扑分析。

2.3.3 通路富集分析 将矮地茶挥发油与 COPD 的交集靶点导入 Metascape 数据库,限定物种为“人类(Homo sapiens)”,进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析,以 $P<0.05$ 为筛选标准,并进行可视化处理。

2.3.4 分子对接 在上述步骤结果基础上,选择靶点数目最多的活性成分作为配体。在 PPI 网络中选择 “degree” 最大的靶点作为受体,进行分子对接。分子对接研究基础步骤如下:在 PubChem CID 下载活性成分的三维结构,使用 Chem3D 20.0 软件对其进行 mol2 格式的转换。在 PDB 数据库下载 PPI 核心靶点蛋白晶体结构,用 PyMOL 对蛋白进行结构处理和优化后作为受体;AutoDockTools1.5.6 软件对受体和配体进行去水、加氢、加电荷处理,并获得最佳活性位点,在 AutoDockTools-vina 1.1.2 中输入命令符进行分子对接计算,得到配体与受体的结合能,其结果采用 Discovery Studio 4.5 软件进行可视化处理。

3 结果与分析

3.1 挥发油成分鉴定

按“2.2.2”项下检测条件获得 6 个批次矮地茶挥发油总离子流图,见图 1,提取率见表 2。根据 TRACE1300-TSQ8000EVO 型气相色谱-质谱联用仪中数据库 NIST14.L 检索,分析不同产地挥发油化学成分信息,获得 51 个共有成分,按 NIST17 数据库中匹配度 $>60\%$ 、面积占比 $>1\%$ 及其潜在药

理作用进行初步筛选,分析出依兰烯、石竹烯、顺式-佛手柑、蛇麻烯、石竹烯醇 5 个主要活性成分,见图 2,信息见表 3^[11-19]。

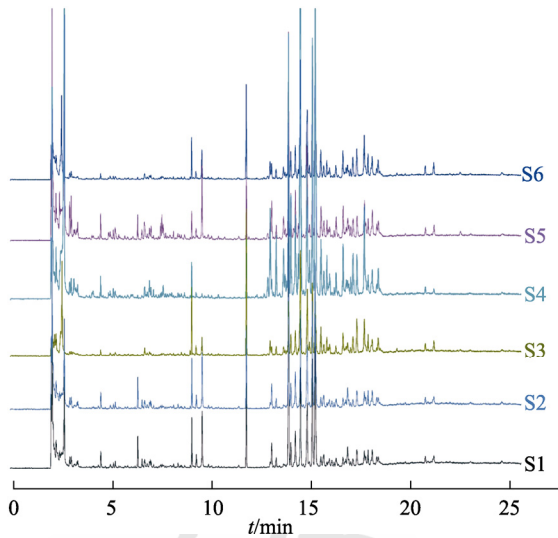


图 1 矮地茶挥发油总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagram of the volatile oil of *Ardisia japonica*

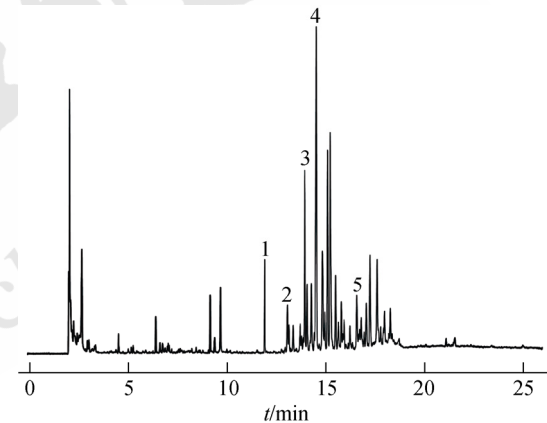


图 2 矮地茶主要活性成分

1-依兰烯; 2-石竹烯; 3-顺式-佛手柑; 4-蛇麻烯; 5-石竹烯醇。

Fig. 2 Main active components of *Ardisia japonica*

1-ylangene; 2-caryophyllene; 3-cis- α -bergamotene; 4-humulene; 5-caryophyllenyl alcohol.

表 2 不同产地挥发油提取率

Tab. 2 Extraction rate of volatile oil from different origins

编号	产地	称样量/ g	提取率/ %	编号	产地	称样量/ g	提取率/ %
S1	江西樟树	300	0.35	S4	湖北宜昌	300	0.35
S2	安徽亳州	300	0.34	S5	江苏江阴	300	0.33
S3	福建泉州	300	0.34	S6	广西桂林	300	0.34

3.2 矮地茶挥发油成分靶点图

通过 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库查找候选化合物作用靶点,去除重复值并规范靶

表 3 不同产地共有成分信息

Tab. 3 Common ingredient information for different origins

共有成分	分子式	峰面积/%	几率/%	保留时间/min	参考文献
石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	6.07	83.87	20.45	[11-14]
蛇麻烯	C ₁₅ H ₂₄	14.38	79.28	9.78	[13]
依兰烯	C ₁₅ H ₂₄	1.50	76.96	6.00	[13-14]
顺式-佛手柑烯	C ₁₅ H ₂₄	2.02	74.39	3.46	[13]
十二甲基环六硅氧烷	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	2.26	62.41	14.17	—
石竹烯醇	C ₁₅ H ₂₆ O	2.08	61.95	12.02	[11]
己醛	C ₆ H ₁₂ O	0.94	52.60	15.82	[14]
4,5,9,10-脱氢-异长叶烯	C ₁₅ H ₂₀	2.39	50.99	16.94	[13]
樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	1.13	35.50	17.45	[11-13]
6-甲基-5-庚烯-2-酮	C ₈ H ₁₄ O	0.53	33.62	13.24	[12]
冰片	C ₁₀ H ₁₈ O	1.77	30.71	15.24	[13]
二辛酸盐	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0.07	30.51	9.26	[18]
顺-菖蒲烯	C ₁₅ H ₂₂	1.00	27.62	15.96	[12]
乙酸龙脑酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.06	27.54	21.57	[14]
2,6,6,9-四甲基-三环[5.4.0.0(2,8)]十一碳-9-烯	C ₁₅ H ₂₄	0.03	26.80	4.62	[12]
顺式- $\alpha,\alpha,5$ -三甲基-5-乙炔基四氢-2-呋喃甲醇	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.18	26.55	13.92	[14]
异胆酸乙酯	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	0.33	26.19	13.54	—
己酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	1.11	25.33	3.05	[14]
反式-1,5,5,8-四甲基-3,7-环十一烷二烯-1-醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.14	22.65	7.10	[13]
反式-2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	0.56	21.45	8.13	[13]
13-庚炔-1-醇	C ₁₇ H ₃₂ O	0.26	20.74	17.04	[14]
花柏烯	C ₁₅ H ₂₄	1.59	19.74	6.98	[13]
香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	0.56	19.34	3.35	[12,13,18]
4,5,6,6 α -四氢-1,9-二羟基-2,10-二甲氧基-5-甲基-苯并环庚诺[2,3,4]异喹啉	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	0.01	19.26	21.13	[17]
2-[4-甲基-6-(2,6,6-三甲环己-1-烯基)六-1,3,5-三烯基]环己-1-烯-1-甲醛	C ₂₃ H ₃₂ O	0.24	18.10	8.89	[14]
律草烷-1,6-二烯-3-醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.21	14.82	13.12	[13]
吡啶	C ₈ H ₇ N	0.80	13.77	8.33	[14]
十氢-4 α -甲基-1-亚甲基-7-(1-甲基乙烯基)-[4 α R-(4 α ,7 α ,8 α)]-萘	C ₁₅ H ₂₄	6.52	13.41	9.34	[19]
4-乙基邻二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	0.20	13.19	10.61	[13]
6-甲基-2-亚乙基-3,5-七烯醇	C ₁₀ H ₁₄ O	0.15	12.39	22.91	[18]
2,6-二甲基-3,5-庚二烯-2-醇	C ₉ H ₁₆ O	0.22	10.94	4.18	[15]
4 α ,8-二甲基-1,2,3,4,4 α ,5,6,8 α -八氢-2-(1-异丙烯基)-萘	C ₁₅ H ₂₆ O	0.18	10.70	10.27	[12]
左旋半乳糖	C ₈ H ₁₆ O ₈	0.29	10.64	25.40	[18]
十五烷酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.21	10.33	12.93	[12]
α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	0.21	9.13	21.96	[13]
1-甲基-1-乙炔基-2,4-双(1-甲基乙烯基)-[1S-(1 α ,2 α ,4 α)]-环己烷	C ₁₅ H ₂₄	0.82	8.86	7.93	[13]
杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	0.17	6.91	23.69	[13]
(1R,2S,4R)-2,7,7-三甲基双环[2.2.1]庚烷-2-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.11	6.71	10.52	[16]
Z,Z-2,5-十五碳二烯-1-醇	C ₁₅ H ₂₈ O	0.31	6.68	21.81	[12]
顺式-(-)-2,4 α ,5,6,9 α -六氢-3,5,5,9-四甲基(1H)苯并环庚烯	C ₁₅ H ₂₄	1.30	6.62	22.53	[13]
Z,Z,Z-4,6,9-壬十三烯	C ₁₉ H ₃₄	0.17	6.50	23.74	[17]
芳香二烯	C ₁₅ H ₂₄	2.74	5.55	4.75	[17]

点基因名，筛选出 154 个潜在靶点。将化合物与靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件中构建成成分-靶点网络图，见图 3(V 形节点代表化合物，圆形节点代

表靶点，节点大小代表度值大小)，其中石竹烯、蛇麻烯、依兰烯、顺式-佛手柑、石竹烯醇的 degree 值分别为 42，41，33，22，17。

3.3 药物疾病靶点间 PPI 网络

通过检索 GenCards、OMIM、DrugBank 数据库整理分别得到 COPD 相关靶点 5 136, 853, 1 034 个, 将 3 个数据库搜索的结果汇总去除重复值得到 5 440 个与 COPD 相关的靶点。将其与成分靶点经 Venn 分析处理后得到 40 个交集靶点。为明确疾病与成分靶点间的相互作用关系, 将其导入到 Cytoscape3.7.2 软件中, 利用 BisoGenet 插件构建 PPI 网络, 此网络共有 6 222 个节点, 136 515 条边, 利用 Cytoscape 软件中的 CytoNCA 插件计算得到相关参数, 并根据“DC”“BC”“CC”3 个参数, 选取中值以上的指标作为关键指标进行筛选, 分析出网络图有 40 个节点, 417 条边。Degree 值> 500 的靶点包括 NTRK1、TNF、VEGFA、MAPK1、MCM2。

3.4 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

通过 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO 生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular components, CC)和分子功能(molecular functions, MF)富集分析,以 $P<0.05$ 为筛选标准,得到 2 665

个条目, 包含 2 220 个 BP 条目, 233 个 MF 条目, 212 个 CC 细胞组成条目, 见图 4。GO BP 主要涉及对乙酰胆碱的细胞反应(cellular response to acetylcholine)、突触后信号转导(aftertouch signal transduction)、跨突触信号(trans-synaptic signaling)等; GO MF 主要涉及 G 蛋白偶联胺受体活性(G protein-coupled amine receptor activity); GO CC 主要涉及膜筏(membrane raft)、突触膜(synaptic membrane)、突触前膜(presynaptic membrane)。得到 KEGG 信号通路 242 条($P<0.05$), 主要涉及神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway)、NF- κ B 信号通路(NF-kappa B signaling pathway), 见图 5。

3.5 分子对接

为了进一步合理确证矮地茶挥发油治疗 COPD 的药效物质基础,以结合能 $\leq -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$) 作为筛选标准,筛选出石竹烯、蛇麻

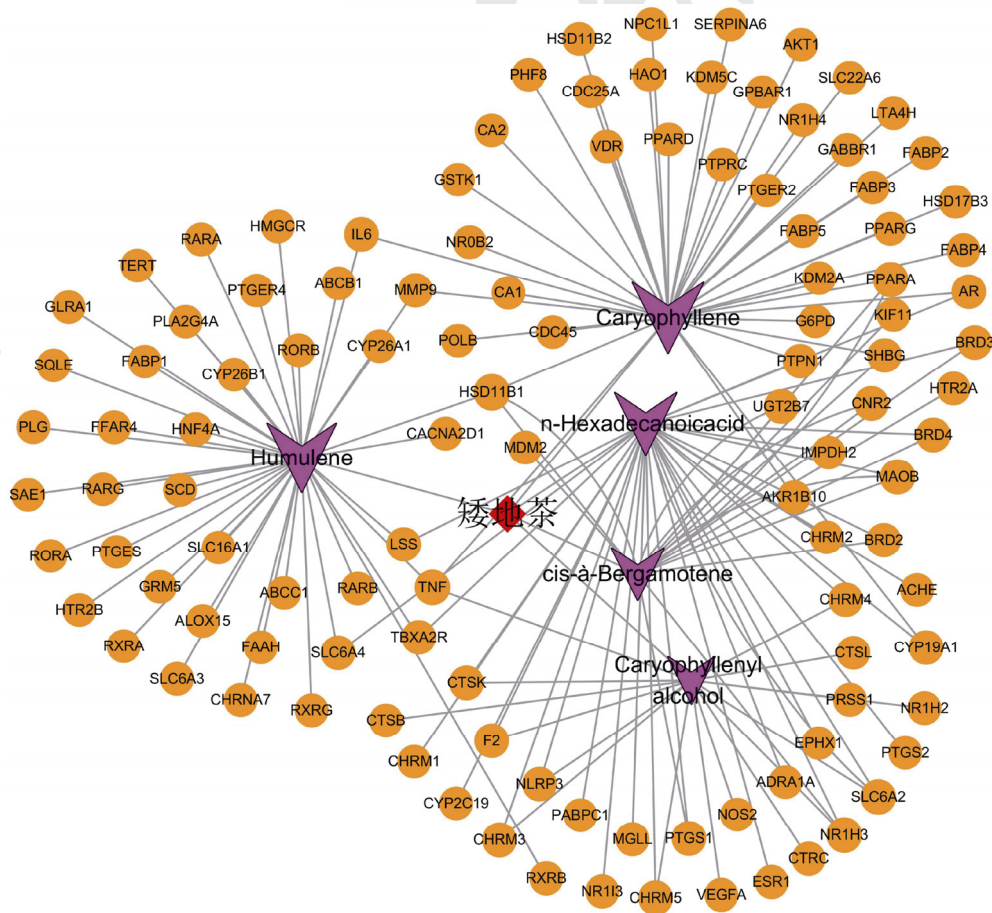


图 3 成分-靶点网络图

Fig. 3 Composition-target network diagram

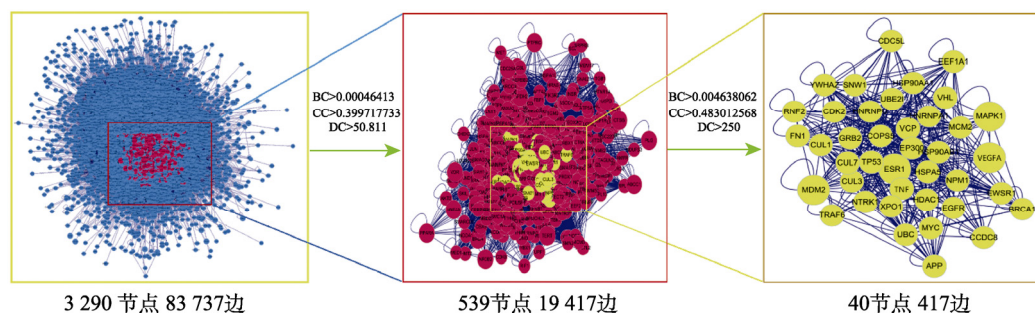


图4 矮地茶与 COPD 交集靶点 PPI 网络

Fig. 4 Interaction network of target PPI between *Ardisia japonica* volatile oil and COPD

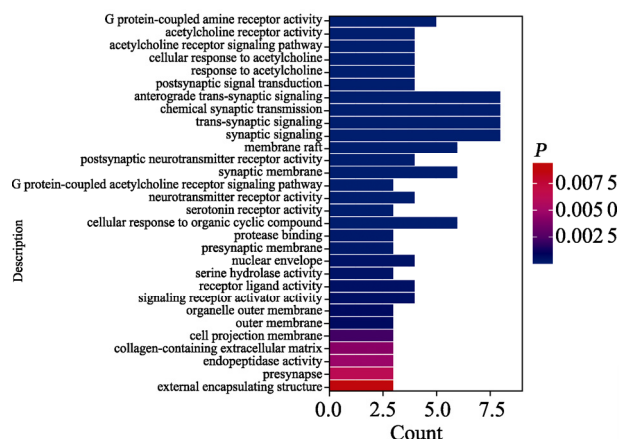


图5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

烯、依兰烯、顺式-佛手柑、石竹烯醇分别与核心靶点(TNF、NTRK1、VEGFA、MAPK1、M2C2)进行对接, 参数见表 3。其中 TNF、NTRK1、VEGFA、MAPK1 和 M2C2 靶点蛋白的 PDB ID 分别为 4J6G, 5T89, 3kme, 7kp8, 4tuz。结果显示石竹烯、蛇麻烯和依兰烯和 MAPK1, TNF, VEGFA 蛋白与成分的结合能结果均 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 靶点与蛋白中的氨基酸分子可形成稳定的构象, 化合物和蛋白受体间的结合活性越高, 两者的结合能值会越低。

其中蛇麻烯与 TNF 键合能最低为 $-10.9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 蛇麻烯与 TNF 之间主要作用力有碳氢键、范德华力相互作用, 与其 A 链 GLY 32、ASP 106、GLN 105 通过范德华力相结合, 与 LEU 156、CYS 166、ALA 52 存在 3 个常规碳氢键; 石竹烯与 MCM2 结合能为 $-7.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 与其 A 链 LEU 525 通过范德华力相结合, 与 ALA 350、LEU 384、LEU 387、TRP 383 存在 4 个常规碳氢键, 与 LEU 346 形成 π -alkyl 相互作用; 依兰烯与 NTRK1 结合能为 $-8.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 稳定性较高, 与 A 链 TYR 118, GLY 120、B 链 VAL 122, GLY 121

通过范德华力相结合。与 A 链 LEU 57、ILE 154, B 链 LEU 57, C 链 LEU: 57 存在 4 个常规碳氢键。顺式-佛手柑-MAPK1 与 A 链 GLN 105, LYS 114、ASP 111 通过范德华力相结合, 与 A 链 LEU 156、ALA 52、VAL 39 存在 3 个常规碳氢键; 石竹烯醇-VEGFA 与 A 链 PRO 437 形成常规氢键, THR 347、GLY 349、GLY 346 通过范德华力结合, ALA 439、VAL 402、HIS 405 存在 3 个常规碳氢键, 见表 4 和图 6, 其分子对接参数见表 5。分子对接的结果初步验证石竹烯、蛇麻烯和依兰烯和 MAPK1、TNF、VEGFA 具有较高亲和力, 与网络药理学预测结果相符。

表4 矮地茶挥发油主要活性成分与核心靶点分子对接

Tab. 4 Main active components of *Ardisia japonica* volatile oil docked with the core target molecules

化合物	结合能/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$				
	TNF	NTRK1	VEGFA	MAPK1	MCM2
依兰烯	-9.2	-8.7	-6.4	-8.0	-5.4
石竹烯	-9.2	-7.6	-7.4	-5.1	-7.4
顺式-佛手柑	-8.6	-5.4	-5.3	-9.7	-3.9
蛇麻烯	-10.9	-7.9	-5.1	-7.8	-4.5
石竹烯醇	-7.7	-4.8	-9.8	-6.6	-2.4

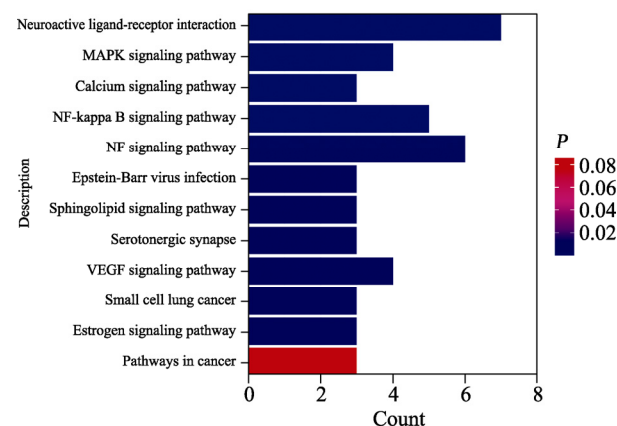


图6 KEGG 分析

Fig. 6 KEGG analysis

表 5 分子对接参数

Tab. 5 Molecular docking parameters

PDB ID	靶点	成分	活性盒子坐标		
4J6G	TNF	蛇麻烯	$x=-24.893$	$y=18.824$	$z=-0.409$
3kme	VEGFA	石竹烯醇	$x=-16.258$	$y=11.399$	$z=40.448$
7kp8	MAPK1	顺式-佛手柑	$x=28.868$	$y=-0.441$	$z=7.522$
5T89	NTRK1	依兰烯	$x=16.324$	$y=38.696$	$z=44.645$
4tuz	MCM2	石竹烯	$x=6.444$	$y=5.914$	$z=25.401$

4 讨论

挥发油为矮地茶主要成分之一，但其具有成分复杂、活性成分不明确等问题，给矮地茶挥发油的质量控制带来了困难。本研究结合 GC-MS 技术与系统生物学方法，对 6 种不同产地的矮地茶药材采用水蒸气蒸馏法提取挥发油，筛选出石竹烯、蛇麻烯、依兰烯、顺式-佛手柑、石竹烯醇 5 个

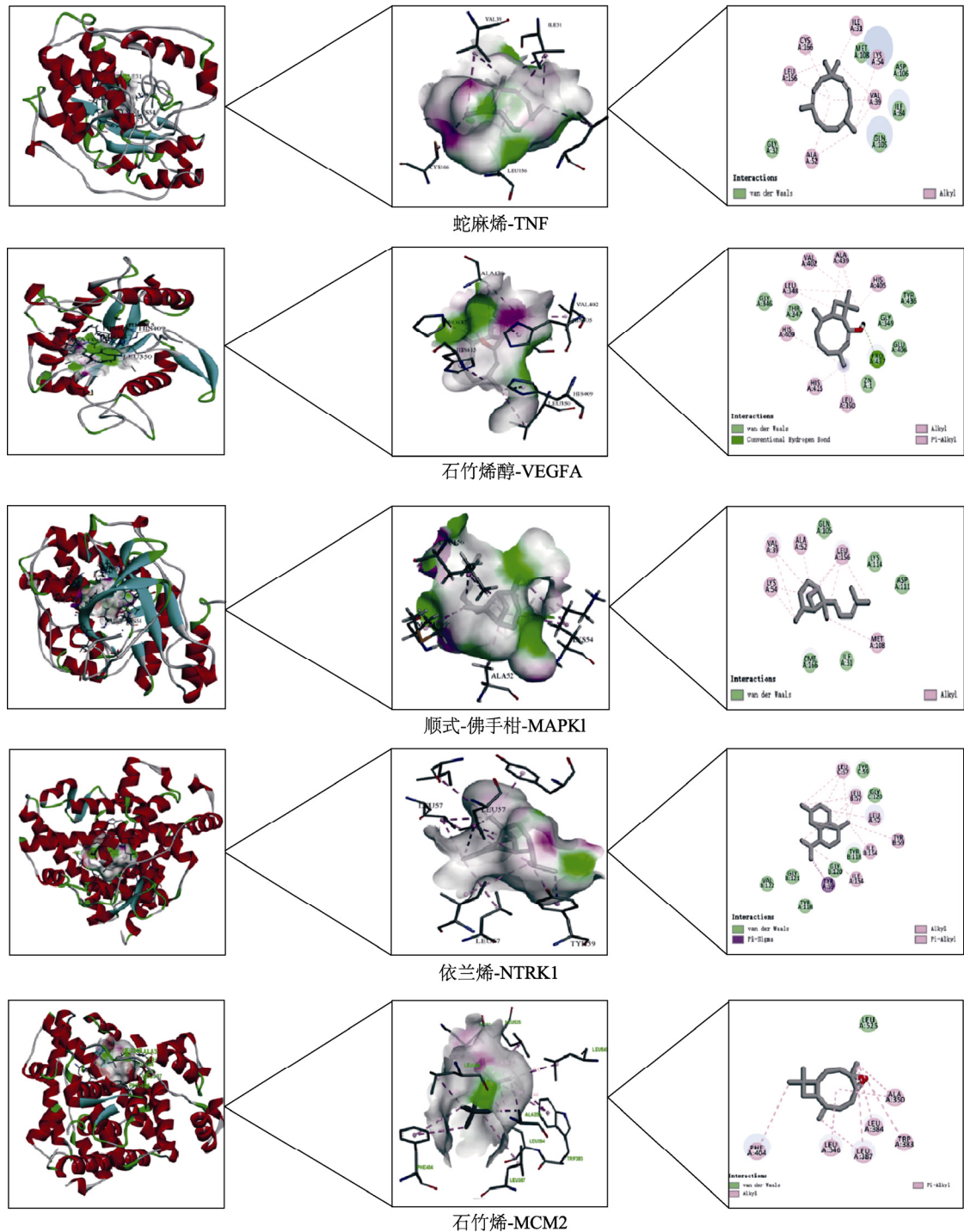


图 7 分子对接

Fig. 7 Molecular docking

共有成分, 并从关键靶标、疾病通路等方面进行全面研究, 石竹烯具有抑制小鼠巨噬细胞增殖, 促进细胞凋亡, 同时还可降低 AKt、促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)、环氧合酶(COX)-1、COX-2 等蛋白水平来发挥抗炎作用^[20], 蛇麻烯可通过抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素- 1β (IL- 1β)的作用, 可有效防止感冒、肺炎等呼吸道疾病病毒侵入人体^[21]。石竹烯醇对气管平滑肌有显著的松弛作用具有显著的平喘作用^[22]。顺式-佛手柑具有理气化痰、止呕消胀、舒肝健脾多种药用功能。对老年人的气管炎、哮喘病有明显的缓解作用^[23-24], 推测这可能是矮地茶挥发油平喘、治疗气管炎的主要活性成分。从矮地茶-疾病蛋白互作网络中分析出 40 个交集基因与 5 440 个 COPD 密切相关的靶点相吻合, 其中 VEGFA(血管内皮生长因子 A)、TNF(肿瘤坏死因子)、MAPK 的度值最高, 提示这 3 个靶点可能是矮地茶挥发油治疗 COPD 的核心靶点。

GO 富集结果显示, 靶基因涉及 40 个作用靶点主要分布于 2 665 个 GO 功能过程, 靶基因主要涉及 G 蛋白偶联受体活性、对乙酰胆碱的细胞反应、突触后信号转导、膜筏等生物过程, 揭示了矮地茶挥发油可能通过调控肺部组织细胞的生成、增殖和抑制氧化、应激, 诱导的细胞凋亡治疗 COPD; KEGG 通路富集结果显示, 矮地茶挥发油治疗 COPD 主要涉及为 NF- κ B 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路以及 VEGF 信号通路等。相关文献表明, TNF 可促进 T 细胞产生各种炎症因子, 诱导多种细胞内信号通路, 包括细胞凋亡和细胞存活以及炎症和免疫力^[25]; MAPK 信号通路在炎症反应中发挥重要作用, 分别涉及 ERK1/2、JNK、p38MAPK 介导的三条级联反应, 该通路的激活可促进炎症细胞因子的生成而加剧炎症反应^[26-27]。VEGFR-2 是内皮细胞中 VEGF 驱动反应的主要介体, 是生理和病理性血管生成中的关键信号转导者, VEGF 与 VEGFR-2 的结合导致不同信号通路的级联, 参与介导内皮细胞增殖和迁移并促进其存活和血管通透性的基因上调从而促进肺部血管的新生^[28-29]。NF- κ B 通路作为炎症反应的关键信号传导因子, 在炎症细胞因子介导的炎症反应中起中心作用, 该通路激活可引起哮喘、类风湿性关节炎、肠炎等多种慢性炎症性疾病炎症蛋白的表达, 可通过调节该通路的下游

产物 TNF- α 、IL- 1β 的表达进而产生反馈调节抑制 NF- κ B 活性表达^[30-31]。因此, 推测这些信号通路及通路相互作用关系可能为矮地茶治疗 COPD 的作用机制之一。分子对接结果表明, 石竹烯、蛇麻烯、依兰烯与 VEGFA、TNF、MAPK 靶点具有较高亲和力, 进一步合理确证矮地茶挥发油治疗 COPD 的药效物质基础。由此亦可证实矮地茶挥发油具有良好的抗炎、宣肺化痰、止咳平喘的作用, 也突出活血通络为治疗 COPD 的主要方法。

综上所述, 本研究采用 GC-MS、系统生物学以及分子对接技术初步探讨矮地茶挥发油治疗 COPD 的分子作用机制, 建立中药成分与疾病靶点、信号通路间相互作用关系, 为后续准确治疗疾病寻找最高效的治疗途径与方法, 也为临床上中药治疗 COPD 提供了新的研究方向。

REFERENCES

- [1] XI Y J, TANG X, TANG S H, et al. Analysis of medication regularity of classical prescription in treatment of COPD based on multi-target efficacy evaluation system of Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(21): 5710-5718.
- [2] FU Z Y, LIU X H, REN J X, et al. Meta-analysis of Tanreqing Injection in treatment of chronic obstructive pulmonary disease with respiratory failure[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(6): 889-894.
- [3] ZHAO K, YANG H X, GAO Y Y. Progress of β_2 adrenoceptor agonist and anticholinergic agent for COPD[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2021, 40(3): 172-178.
- [4] WANG J, GUO Y J. Etiological characteristics of pulmonary infection in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease patients and assessment of prognosis[J]. Chin J Nosocomiol(中华医院感染学杂志), 2021, 31(10): 1522-1526.
- [5] ZHOU X, LIU M H, WANG M, et al. Observation of the clinical effect of Miao medicine *Ardisia japonica* and *Lespedeza cuneata* on COPD patients with stable phlegm and blood stasis and Qi and Yin deficiency syndrome[J]. Tradit Chin Med, 2019, 8(5): 329-340.
- [6] HU J, WANG, Z Y, KANG M, et al. Chemical constituents of *Ardisia faberi*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(14): 2048-2051.
- [7] LIU B, HU F L, LEI F H, et al. Chemical constituents of *Ardisia fordii*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42(3): 560-562.
- [8] LI H Z. Clinical study on Kanglao Pills combined with moxifloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis[J]. Drugs & Clin(现代药物与临床), 2017, 32(2): 267-270.
- [9] WANG T H, LUO Y Y, WANG Y C, et al. Study on active components and mechanism of volatile oil of *Citri reticulatae* preventing and treating Alzheimer's disease based on GC-MS

- and network pharmacology[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31(17): 2093-2100.
- [10] LIU X L, HUANG X Y, ZHANG X F, et al. Q-Marker prediction of volatile oil of *Angelicae Sinensis Radix* based on GC-MS analysis combined with network pharmacology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(9): 2696-2706.
- [11] ZENG L Y, WANG Z Y, HE C W. Research progress on chemical composition and pharmacological action of *Ardisia japonica*[J]. Guangxi Sci(广西科学), 2019, 26(5): 484-489.
- [12] LU J Q, HU J, TANG Y X, et al. Analysis of the chemical constituents of essential oil from *Ardisia japonica* by GC-MS[J]. China Pharm(中国药业), 2012, 21(1): 10-11.
- [13] HU W J, JIANG X M, ZHANG T, et al. Compared analysis on the constituents and their contents of the volatile oil from different parts in *Ardisia japonica*[J]. Guangdong Agric Sci(广东农业科学), 2013, 40(3): 66-70.
- [14] NI S F, HUANG J, PAN Y J, et al. Analysis of volatile oils from *Ardisia japonica* (homsted) BL. between aerial and underground parts[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2004, 24(3): 257-261.
- [15] WANG J, ZHANG R, REN T, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of the *Cortusa matthioli* subsp. *pekinensis* (Primulaceae)[J]. Conserv Gene Res, 2017(9): 603-605.
- [16] CHEN X W, SONG L K, XIE J. Research progress on *Ardisia japonica*[J]. Guizhou Agric Sci(贵州农业科学), 2009, 37(11): 79-82.
- [17] 靳志娟. 紫金牛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(25): 3432-3436.
- [18] WU X, YE Y S, LIU H, et al. *Ardisia medogensis* (Primulaceae), a new species from Xizang, China[J]. Phytotaxa, 2018, 373(1): 91.
- [19] WANG J, ZHANG R T, REN T, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of the *Cortusa matthioli* subsp. *pekinensis* (Primulaceae)[J]. Conservation Genet Resour, 2017, 9(4): 603-605.
- [20] CAO G X, LI R R, LIU J, et al. B-caryophyllene protects cerebral cortical neurons against cerebral ischemia and reperfusion in rats by improving antioxidant activities[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2016, 32(1): 56-60.
- [21] 日本研究发现冬天喝啤酒有助防感冒[J]. 中国食品学报, 2012(12): 122.
- [22] ZHOU C L, QIAN Z Y. Inhibitory effect of β -caryophyllenol on airway inflammation and elimination OFR of asthmatic models in Guinea pigs[J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2006, 13(5): 373-376.
- [23] 许茹, 钟凤林, 王树彬. 中药佛手的本草考证[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1975-1978.
- [24] ZHANG S D, YANG H Y, ZENG J, et al. Research progress on Citri Sarcodactylis Fructus[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(8): 3510-3514.
- [25] MA S H, WANG H F, LIU J L, et al. Inhibition of paeoniflorin on TNF- α -induced TNF- α receptor type I/nuclear factor- κ B signal transduction in endothelial cells[J]. Chin J Integra Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2016, 36(3): 339-344.
- [26] 张曼, 戴建业, 张齐, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/MAPK 信号通路探讨大黄灵仙方对胆管细胞炎症反应的影响效果[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39: 20-24, 266.
- [27] WANG L M, ZHU Y J, TANG Y H. Study on anti-inflammatory mechanism of Compound Xuanshen Liyan mixture on chronic pharyngitis model rabbits based on ERK/p38 MAPK signaling pathway[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(2): 179-183.
- [28] BIAN Y Q, MA J, REN Y, et al. Discovery of intervention effect of Chinese herbal formulas on COVID-19 pulmonary fibrosis treated by VEGFR and FGFR inhibitors[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(7): 1481-1487.
- [29] FANG D F, WANG X Q, WANG C J, et al. Study on the effect of simvastatin combined with ezetimibe on glycolipid and level of VEGF, IL-1 β , CRP of type 2 diabetes mellitus with atherosclerosis rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(1): 49-52.
- [30] XIAO A H, LI H W, YAN C L, et al. Research progress on the regulation of NF- κ B/MAPKs/JNK signaling pathway intervening inflammatory response by Chinese herbal compound and its active ingredients in the treatment of AS[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医学报), 2019, 47(6): 109-114.
- [31] WU Y J, SU J, HUANG P J, et al. Buddleoside prevents TNF- α -induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway[J]. Chin Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(5): 637-643.

收稿日期: 2021-11-15

(本文责编: 曹粤锋)