

# 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS和网络药理学探讨归脾丸抗焦虑作用机制

白桦芳<sup>a</sup>, 秦绯旭<sup>b</sup>, 针涛<sup>a</sup>, 苑楠楠<sup>a</sup>, 孙立新<sup>a\*</sup>(沈阳药科大学, a.药学院, b.中药学院, 辽宁 本溪 117004)

**摘要:** 目的 阐明归脾丸中的化学成分, 并初步探究其抗焦虑作用机制。方法 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术对归脾丸中化学成分进行准确定性, 并结合网络药理学和分子对接分析归脾丸抗焦虑的重要成分、关键靶点及通路。结果 鉴定出苯丙素类、黄酮及其苷类、蒽类及其苷类、生物碱类、有机酸类、挥发油类、寡糖酯类、氨基酸类、其他类等9类共116种化合物, 网络药理学和分子对接深入挖掘得到归脾丸抗焦虑的9个重要成分、10个核心靶点和15条焦虑症相关信号通路。结论 预测归脾丸可能通过调节5-HT、GABA等神经递质的水平, HPA、HPG等内分泌系统以及降低炎症因子的表达发挥抗焦虑作用, 充分体现了多成分、多靶点、多通路协同作用发挥抗焦虑作用的特点。

**关键词:** 归脾丸; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 化学成分; 焦虑症; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0025-13

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.004

引用本文: 白桦芳, 秦绯旭, 针涛, 等. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS和网络药理学探讨归脾丸抗焦虑作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 25-37.

## Mechanism of Guipi Pills in Treatment of Anxiety Disorder Based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS and Network Pharmacology

BAI Huafang<sup>a</sup>, QIN Feixu<sup>b</sup>, ZHEN Tao<sup>a</sup>, YUAN Nannan<sup>a</sup>, SUN Lixin<sup>a\*</sup>(Shenyang Pharmaceutical University, a.College of Pharmacy, b.College of Chinese Medicine, Benxi 117004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To clarify the chemical composition of Guipi pills and to explore its mechanism of action in the treatment of anxiety disorder. **METHODS** The UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology was used to accurately characterize the chemical components in Guipi pills, and the important components, key targets and pathways of Guipi pills in the treatment of anxiety disorder were analyzed by combining network pharmacology and molecular docking. **RESULTS** A total of 116 compounds belonging to 9 categories were identified, including phenylpropanoids, flavonoids and their glycosides, terpenoids and their glycosides, alkaloids, organic acids, volatile oils, oligosaccharide esters, amino acids and so on. Through in-depth exploration of network pharmacology and molecular docking, 9 important components, 10 core targets and 15 anxiety disorder-related signaling pathways of returning to Guipi pills in the treatment of anxiety disorder were obtained. **CONCLUSION** It is predicted that Guipi pills may play a role in the treatment of anxiety disorder by regulating the level of neurotransmitters such as 5-HT and GABA, and reducing the expression of inflammatory factors such as HPA and HPG, which fully embodies the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway synergistic effect in the treatment of anxiety disorder.

**KEYWORDS:** Guipi pills; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; chemical composition; anxiety disorders; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

归脾丸出自《医学六要·治法汇》卷七, 由党参、炒白术、炙黄芪、炙甘草、茯苓、制远志、炒酸枣仁、龙眼肉、当归、木香和大枣(去核)11味中药组成, 具有益气补血, 健脾养心之功效<sup>[1]</sup>。焦虑症又称焦虑性神经症, 是神经症这一大类疾病中最常见的一种, 以焦虑情绪体验为主要特征。

有研究表明, 心脾两虚是焦虑症的病因之一<sup>[2]</sup>。目前西医主要以地西泮、帕罗西汀等化学药物治疗为主, 但这类药物存在依赖性、药物间相互作用和不良反应等缺点<sup>[3]</sup>。近年来, 中医药治疗焦虑症取得了一定疗效。现已有临床研究表明, 归脾丸配合丁螺环酮治疗广泛性焦虑疗效好, 且不良反

基金项目: 辽宁省教育厅“辽宁特聘教授滚动支持项目”(辽教函[2018]35号)

作者简介: 白桦芳, 女, 硕士 E-mail: 1974522880@qq.com \*通信作者: 孙立新, 女, 博士, 教授 E-mail: slx04@163.com

应少<sup>[4]</sup>,但缺乏相关的药效物质基础研究。

近年来网络药理学研究方法逐渐成熟,可通过构建“药物-靶点-通路-疾病”关系网来全面、系统地认识药物作用靶点以及疾病的本质。现网络药理学主要基于数据库和文献报道分别收集各药味信息,但在工艺转移过程中可能会损失一些成分,导致该方法收集到的信息不完全可靠。因此,本研究采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术,对归脾丸化学成分进行分析,在此基础上,结合网络药理学方法探究归脾丸已知活性成分的抗焦虑作用机制,为系统分析归脾丸抗焦虑药效物质基础提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Vanquish Flex 超高效液相色谱仪、Q-Exactive TM 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱、TraceFinder 4.1 工作站均购自美国 Thermo 公司;BSA224S-CW 29192063 电子天平(万分之一)、CPA225D 电子天平(十万分之一)均购自赛多利斯科学仪器有限公司;KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 数据库和软件

TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>)、CTD 数据库(<https://ctdbase.org/>)、String 网站(<https://string-db.org/>)、David 6.7 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)、微生信网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)、RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)、ChemSpider 数据库(<http://www.chemspider.com/>)、Cytoscape 3.7.1 软件、AutoDock Tools 1.5.6 软件、AutoDock Vina 1.1.2 软件、Pymol 2.4.0 软件、OpenBabel 3.1.1 软件。

### 1.3 药品与试剂

归脾丸(浓缩丸,九芝堂股份有限公司,批号:202003020);阿魏酸对照品(宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号:20150328;含量 $\geq 98\%$ );腺苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Z04N8J47423;含量 $\geq 99\%$ );甘草素对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:N1120AS;含量 $\geq 98\%$ );对照品黄芪甲苷(批号:J25F10T81373)、藁本内酯(批号:B20492)、茯苓酸(批号:P07D10S105271)、党参炔苷(批号:P22A10F95635)、

酸枣仁皂苷 A(批号:Z18M11X113209)、白术内酯 I(批号:P08J9F50979)、甘草次酸(批号:HM0327KA14)、异甘草素(批号:H03D9Z76567)、甘草酸(批号:P18A11F111597)、细叶远志皂苷(批号:R23N8F49013)、远志山酮 III(批号:P27A11S122507)、木香烃内酯(批号:Z23N10S103919)、去氢木香内酯(批号:Z02J11S107434)、甘草苷(批号:Z13J11X108109)、斯皮诺素(批号:Y25O9H73433)均购自上海源叶生物科技有限公司,含量均 $\geq 98\%$ ;甲醇、乙腈均为质谱纯,购自美国 Sigma 公司;甲酸为质谱纯,购自美国 Fisher 公司;水为纯净水,购自杭州娃哈哈集团有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 化学成分数据库的建立

通过检索国内外与归脾丸各味中药相关的科学文献和 TCMSP 数据库,总结现有文献中归脾丸药味的化学成分,并通过文献调研及 PubChem 数据库,建立了包括化合物名称、分子式、精确分子量和二级质谱信息的归脾丸化学成分数据库。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 取各对照品适量,精密称定,加 70%甲醇配制成含黄芪甲苷、藁本内酯、腺苷、茯苓酸、党参炔苷、酸枣仁皂苷 A、白术内酯 I、甘草苷、异甘草素、甘草次酸、甘草素、甘草酸、斯皮诺素、细叶远志皂苷、远志山酮 III、木香烃内酯、去氢木香内酯、阿魏酸 0.175 5, 0.200 0, 0.166 5, 0.276 0, 0.172 5, 0.200 0, 0.177 5, 0.141 0, 0.138 0, 0.156 0, 0.148 5, 0.160 5, 0.136 5, 0.163 5, 0.151 5, 0.180 0, 0.192 0, 0.274 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品,研细,取细粉约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 20 mL,称定质量,超声(250 W, 40 KH)30 min,放冷,70%甲醇补足失重,摇匀,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。精密量取续滤液 200  $\mu\text{L}$  置 5 mL 量瓶中,用 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,取续滤液,得供试品溶液。

### 2.3 色谱及质谱条件

**2.3.1 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7  $\mu\text{m}$ );流动相:0.1%

甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~14.5 min, 10%→27%B; 14.5~16 min, 27%→38%B; 16~21 min, 38%→62.5%B; 21~31 min, 62.5%→100%B; 31~31.1 min, 100%→10%B; 31.1~34.1 min, 10%B; 柱温: 35 °C; 体积流量: 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 5 μL。

**2.3.2 质谱条件** 离子源: HESI 源; 扫描方式: ESI<sup>+</sup>, ESI<sup>-</sup>; Full MS/ddMS<sup>2</sup>; 雾化气: N<sub>2</sub>; 碰撞气: He; 质量扫描范围: 100~1 500 Da; 离子源温度: 130 °C; 毛细管电压: ESI<sup>+</sup> 3.8 kV, ESI<sup>-</sup> 3.0 kV; 碰撞能量: 20, 40, 60 V; 脱溶剂气体温度正负离子模式下分别为 310, 350 °C; 毛细管温度: 320 °C。

## 2.4 色谱峰的鉴定及归属

本研究结合正、负离子模式下检测所得的精确分子质量, 通过 TraceFinder 4.1 Geranal Quan 软件计算其精确分子式、提取色谱图, 将一级质谱数据与数据库化合物的分子式对比, 对化合物进行初步鉴定。采用 MS<sup>2</sup> 模式获得化合物的碎片离子, 根据离子的裂解情况并结合混合对照品、文献及 PubChem 数据库对比化合物的二级碎片, 进一步比对推测。

通过 TraceFinder 4.1 Geranal Quan 软件提取离子流色谱图进行数据处理, 寻找数据库中目标化合物。共鉴定出 116 个化合物, 包括 4 个苯丙素类、23 个黄酮及其苷类、24 个萜类及其苷类、4 个生物碱类、19 个有机酸类、9 个挥发油类、8 个寡糖酯类、7 个氨基酸类、18 个其他类化合物。供试品溶液总离子流图及化合物质谱信息, 结果见图 1、表 1。

## 2.5 网络药理学

**2.5.1 关键靶点的富集** 通过向 Swiss Target Predict 数据库提交各活性成分的 SMILES 结构式, 预测得到 102 个活性成分的相关靶点 895 个。以“anxiety disorder”为关键词搜索 CTD 数据库获得 93 989 个疾病相关基因, 以 inference score ≥ 67.35 作为筛选条件, 得到焦虑症最终靶点信息 1 473 个。取活性成分作用靶点与疾病相关靶点交集, 获得 346 个交集靶点。

**2.5.2 成分-靶点网络构建** 将活性成分和交集靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建“成分-靶点”网络图, 结果见图 2。该网络包含 448 个节点和 2 201 条边, 其中蓝色 V 形代表活性成分, 红色矩

形代表交集靶点。应用 Cytoscape 3.7.1 软件中“Network Analyzer”功能进行网络分析, 根据节点连接度(Degree)值筛选出茯苓新酸 E、邻苯二甲酸二丁酯、3,4,5-三甲氧基肉桂酸、异甘草黄酮醇、13-Hydroxyoctadecadienoic acid、乌拉尔宁、甘草素、甘草次酸、亚麻酸、甘草查尔酮 B 等 10 个重要成分。

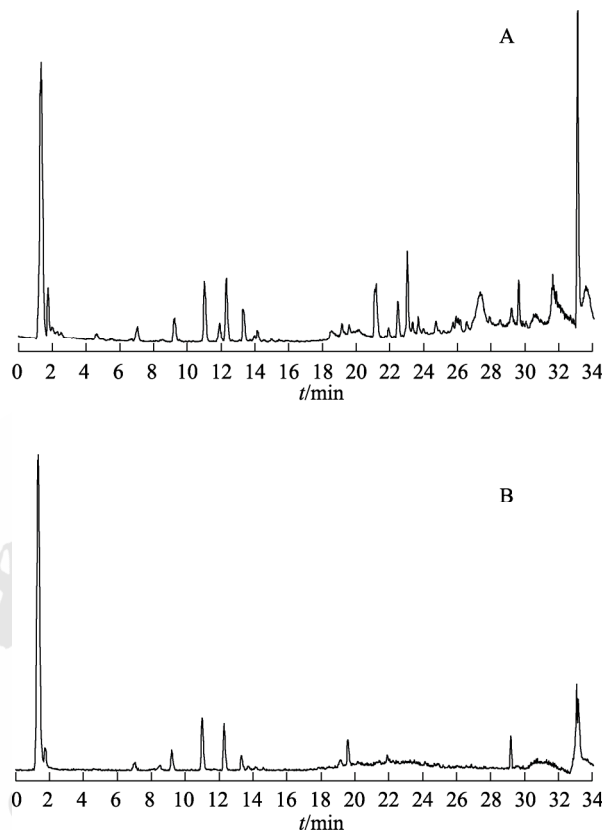


图 1 供试品溶液在正离子模式(A)和负离子模式(B)下的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of test solution in positive ion mode(A) and negative ion mode(B)

**2.5.3 蛋白相互作用网络的构建与核心基因筛选结果分析** 将交集靶点导入 String 11.0 数据库限定物种为人, 隐藏游离节点, 设置置信度 ≥ 0.9 获取蛋白质相互作用数据信息, 构建蛋白质相互作用网络, 结果见图 3。将 String 结果导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 并通过 CytoHubba 插件中的 Degree 算法筛选得到交互作用评分在前 10 的基因, 结果见图 4, 提示这些基因在蛋白质相互作用中发挥了关键作用。

**2.5.4 基因本体生物学过程(gene-ontology biology process, GO)和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** 利用 David 6.8 数据库对 10 个核心靶点

表 1 归脾丸活性成分

Tab. 1 Active compounds of Guipi pills

| 序号  | 化合物                                                                 | $t_R/\text{min}$ | [M+H] <sup>+</sup> /[M+Na] <sup>+</sup> |                            |                              | [M-H] <sup>-</sup> /[M-H+HCOOH] <sup>-</sup> |                            |                           | 分子式                                                           | 类型 |
|-----|---------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------|----|
|     |                                                                     |                  | 质荷比( $m/z$ )                            | 误差<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                         | 质荷比( $m/z$ )                                 | 误差<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                      |                                                               |    |
| N1  | 精氨酸 <sup>[5]</sup>                                                  | 1.17             | 175.119 0                               | -2.8                       | 175, 158, 116, 70            |                                              |                            |                           | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | h  |
| N2  | <i>N</i> -isovaleryl-glycine <sup>[6]</sup>                         | 1.26             | 160.096 8                               | -3.1                       | 160, 142                     |                                              |                            |                           | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>                | i  |
| N3  | L-脯氨酸 <sup>[7]</sup>                                                | 1.28             | 116.070 6                               | -2.8                       | 70, 116, 117                 |                                              |                            |                           | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | h  |
| N4  | L-缬氨酸 <sup>[8]</sup>                                                | 1.31             | 118.086 3                               | -1.8                       | 118, 72, 55                  |                                              |                            |                           | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | h  |
| N5  | D-果糖 <sup>[9]</sup>                                                 | 1.31             |                                         |                            |                              | 179.055 6                                    | 0.7                        | 59, 71, 89                | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                 | i  |
| N6  | 奎尼酸 <sup>[6]</sup>                                                  | 1.34             |                                         |                            |                              | 191.056 1                                    | -2.2                       | 191, 127, 85              | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                 | e  |
| N7  | L-苹果酸 <sup>[10]</sup>                                               | 1.39             |                                         |                            |                              | 133.013 7                                    | 1.9                        | 71, 115, 133              | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                  | e  |
| N8  | 蔗糖 <sup>[11]</sup>                                                  | 1.41             |                                         |                            |                              | 341.108 4                                    | 1.8                        | 341, 179, 113, 89, 71, 59 | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | i  |
| N9  | 甜菜碱 <sup>[12]</sup>                                                 | 1.42             | 118.086 3                               | -1.9                       | 56, 59, 118                  |                                              |                            |                           | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | d  |
| N10 | L-酪氨酸 <sup>[13]</sup>                                               | 1.54             | 182.081 2                               | -3.5                       | 182, 91                      |                                              |                            |                           | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                | h  |
| N11 | <i>dl</i> -亮氨酸 <sup>[11]</sup>                                      | 1.58             | 132.101 9                               | -2.5                       | 132, 86, 56                  |                                              |                            |                           | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                | h  |
| N12 | <i>N</i> -(1-deoxy-D-fructos-1-yl)pyroglutamic acid <sup>[14]</sup> | 1.68             |                                         |                            |                              | 290.088 1                                    | 3.1                        | 290, 200, 170, 128        | C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub>               | h  |
| N13 | 腺嘌呤 <sup>[15]</sup>                                                 | 1.72             | 136.061 8                               | -3.2                       | 136, 95, 119, 108            |                                              |                            |                           | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>                  | i  |
| N14 | 腺苷*                                                                 | 1.72             | 268.104 0                               | -5.6                       | 136                          |                                              |                            |                           | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | i  |
| N15 | 烟酸 <sup>[16]</sup>                                                  | 1.74             | 124.039 3                               | -2.6                       | 124, 106                     |                                              |                            |                           | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>                 | e  |
| N16 | 对甲苯酚 <sup>[17]</sup>                                                | 2.25             | 109.064 8                               | -0.8                       | 65, 109                      |                                              |                            |                           | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O                               | i  |
| N17 | 邻甲酚 <sup>[18]</sup>                                                 | 2.25             | 109.064 8                               | -0.8                       | 65, 109                      |                                              |                            |                           | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O                               | i  |
| N18 | 5-羟甲基糠醛 <sup>[7]</sup>                                              | 2.26             | 127.039 0                               | -3.2                       | 127, 109, 81, 53             |                                              |                            |                           | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | i  |
| N19 | 西伯利亚远志糖 A5 <sup>[19]</sup>                                          | 3.72             | 541.152 8                               | -3.1                       | 541, 379                     |                                              |                            |                           | C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>               | g  |
| N20 | 西伯利亚远志糖 A6 <sup>[19]</sup>                                          | 3.80             | 571.163 3                               | -3                         | 571, 409                     |                                              |                            |                           | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>               | g  |
| N21 | 乌药碱 <sup>[20]</sup>                                                 | 4.70             | 286.143 8                               | -5.1                       | 107, 143, 269, 286           |                                              |                            |                           | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>               | d  |
| N22 | 维采宁II <sup>[20]</sup>                                               | 4.94             |                                         |                            |                              | 593.150 6                                    | 2.5                        | 593, 297                  | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>               | b  |
| N23 | 香草酸 <sup>[21]</sup>                                                 | 4.94             |                                         |                            |                              | 167.034 4                                    | -1.7                       | 108                       | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                  | e  |
| N24 | 核黄素 <sup>[12]</sup>                                                 | 4.95             | 377.145 6                               | -5.6                       | 243, 282, 359, 377           |                                              |                            |                           | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | i  |
| N25 | <i>dl</i> -苯丙氨酸 <sup>[13]</sup>                                     | 4.96             | 166.086 3                               | -3.8                       | 166, 103                     |                                              |                            |                           | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | h  |
| N26 | 9H-吡啶[3,4- <i>b</i> ]咪唑 <sup>[22]</sup>                             | 5.66             | 169.076 0                               | -3.8                       | 169, 129                     |                                              |                            |                           | C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                 | d  |
| N27 | 绿原酸 <sup>[14]</sup>                                                 | 5.87             |                                         |                            |                              | 353.087 3                                    | 3                          | 93, 173, 191              | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>                | a  |
| N28 | 远志酸 <sup>[19]</sup>                                                 | 7.04             |                                         |                            |                              | 487.306 0                                    | -0.3                       | 487, 406, 141, 110        | C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>                | c  |
| N29 | 远志山酮III*                                                            | 7.45             | 569.150 1                               | -2.6                       | 317, 287                     | 567.135 0                                    | 2.6                        | 567, 345, 315, 272, 258   | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>               | b  |
| N30 | 毛蕊异黄酮 <sup>[23]</sup>                                               | 7.95             | 447.128 6                               | -2.8                       | 270, 253, 225                |                                              |                            |                           | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>               | b  |
| N31 | 异阿魏酸 <sup>[11]</sup>                                                | 7.96             |                                         |                            |                              | 193.050 1                                    | 1.6                        | 149, 193                  | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                | e  |
| N32 | 阿魏酸*                                                                | 8.05             |                                         |                            |                              | 193.050 1                                    | 1.5                        | 193, 134, 149             | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                | e  |
| N33 | 斯皮诺素*                                                               | 8.21             | 609.181 4                               | -3.1                       | 447, 429, 351, 327, 297, 285 | 607.166 3                                    | 2.1                        | 445, 427, 307             | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>               | b  |
| N34 | 甘草苷*                                                                | 8.45             |                                         |                            |                              | 417.118 6                                    | 0.4                        | 255, 135                  | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                | b  |
| N35 | $\gamma$ -萜品烯 <sup>[24]</sup>                                       | 8.53             | 137.132 5                               | -2.9                       | 56, 77, 94, 136              |                                              |                            |                           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                               | c  |
| N36 | 环五(异)亮氨酸 <sup>[14]</sup>                                            | 9.28             | 566.427 6                               | -4.7                       | 566, 548, 435                |                                              |                            |                           | C <sub>30</sub> H <sub>55</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> | i  |
| N37 | ( <i>E</i> )-3-咪唑丙烯酸 <sup>[11]</sup>                                | 11.42            | 188.070 6                               | -3                         | 188, 170, 146                |                                              |                            |                           | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                | i  |
| N38 | 对羟基苯甲酸 <sup>[13]</sup>                                              | 11.62            |                                         |                            |                              | 137.023 9                                    | 2.8                        | 137, 93                   | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | e  |
| N39 | 6-阿魏酰斯皮诺素 <sup>[25]</sup>                                           | 11.65            |                                         |                            |                              | 783.213 6                                    | 3.4                        | 307, 783                  | C <sub>38</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub>               | b  |
| N40 | 壬二酸 <sup>[21]</sup>                                                 | 11.75            |                                         |                            |                              | 187.097 0                                    | 2.2                        | 187, 125, 97              | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>                 | e  |
| N41 | 洋川芎内酯 H <sup>[11]</sup>                                             | 12.94            | 247.094 1                               | -3.6                       | 247, 207                     |                                              |                            |                           | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>                | f  |
| N42 | 芹糖甘草苷 <sup>[26]</sup>                                               | 13.13            | 551.175 9                               | -2.4                       | 257, 419                     |                                              |                            |                           | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>               | b  |
| N43 | 党参炔苷*                                                               | 13.28            | 419.167 6                               | -2.5                       | 419, 149, 71                 |                                              |                            |                           | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>                | i  |

续表 1

| 序号  | 化合物                                      | $t_R/\text{min}$ | [M+H] <sup>+</sup> /[M+Na] <sup>+</sup> |                        |                              | [M-H] <sup>-</sup> /[M-H+HCOOH] <sup>-</sup> |                        |                     | 分子式                                                           | 类型 |
|-----|------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|----|
|     |                                          |                  | 质荷比( $m/z$ )                            | 误差( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                         | 质荷比( $m/z$ )                                 | 误差( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                |                                                               |    |
| N44 | 异甘草苷 <sup>[26]</sup>                     | 13.74            |                                         |                        |                              | 417.118 6                                    | 0.1                    | 417, 255, 135       | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                | b  |
| N45 | 细叶远志苷 A <sup>[19]</sup>                  | 13.84            | 705.200 1                               | -2.6                   | 705, 423                     | 681.203 1                                    | 1.1                    | 681, 443, 179, 137  | C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>               | g  |
| N46 | 芒柄花苷 <sup>[26]</sup>                     | 14.01            | 431.133 7                               | -2.9                   | 269, 254                     |                                              |                        |                     | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                | b  |
| N47 | 甘草查尔酮 B <sup>[26]</sup>                  | 14.25            | 287.091 4                               | -3.6                   | 287, 193, 121                |                                              |                        |                     | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>                | b  |
| N48 | 甘草素*                                     | 14.69            | 257.080 8                               | -3.5                   | 119, 137, 147, 239, 257      | 255.065 7                                    | 2.9                    | 153, 135, 119       | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>                | b  |
| N49 | 3,4,5-三甲氧基肉桂酸 <sup>[27]</sup>            | 15.42            | 239.091 4                               | -3.1                   | 163, 190, 221                |                                              |                        |                     | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>                | a  |
| N50 | 远志糖苷 C <sup>[19]</sup>                   | 15.89            | 791.236 9                               | -2.2                   | 791                          | 767.239 9                                    | 3.4                    | 529, 205            | C <sub>35</sub> H <sub>44</sub> O <sub>19</sub>               | g  |
| N51 | 皮脂酸 <sup>[28]</sup>                      | 15.91            |                                         |                        |                              | 201.112 7                                    | 2.2                    | 139, 201            | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>                | c  |
| N52 | 黄豆黄素 <sup>[29]</sup>                     | 15.97            | 285.075 8                               | -3.5                   | 285, 270                     | 283.060 6                                    | 5.1                    | 283, 268            | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                | b  |
| N53 | 毛蕊异黄酮 <sup>[12]</sup>                    | 15.97            | 285.075 8                               | -3.5                   | 285, 270, 253, 225           |                                              |                        |                     | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                | b  |
| N54 | 环四(异)亮氨酸 <sup>[14]</sup>                 | 16.00            | 453.343 5                               | -2.7                   | 453, 435, 322, 228, 209      |                                              |                        |                     | C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> | i  |
| N55 | 远志寡精 J <sup>[19]</sup>                   | 17.08            |                                         |                        |                              | 1 307.387 8                                  | 3.4                    | 1 307, 1 161, 1 119 | C <sub>59</sub> H <sub>72</sub> O <sub>33</sub>               | g  |
| N56 | Z-丁烯基苯酚 <sup>[21]</sup>                  | 17.78            | 189.091 0                               | -3                     | 189, 161, 147, 105           |                                              |                        |                     | C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>                | f  |
| N57 | 远志寡精 D <sup>[19]</sup>                   | 17.83            |                                         |                        |                              | 1 337.398 3                                  | 3.2                    | 1 337, 1 161, 1 039 | C <sub>60</sub> H <sub>74</sub> O <sub>34</sub>               | g  |
| N58 | 远志寡精 H <sup>[19]</sup>                   | 17.92            |                                         |                        |                              | 1 349.398 3                                  | 3                      | 1 349, 1 161, 1 039 | C <sub>61</sub> H <sub>74</sub> O <sub>34</sub>               | g  |
| N59 | 甘草皂苷 A <sub>3</sub> <sup>[26]</sup>      | 18.08            | 985.463 9                               | -3                     | 407, 435, 453, 471, 615, 809 |                                              |                        |                     | C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub>               | c  |
| N60 | Saussureamine A <sup>[7]</sup>           | 18.08            | 348.216 9                               | -3.5                   | 348, 302, 128, 100, 70       |                                              |                        |                     | C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>               | d  |
| N61 | 远志寡精 A <sup>[19]</sup>                   | 18.10            |                                         |                        |                              | 1 379.408 9                                  | 3                      | 1 379, 1 203, 1 161 | C <sub>62</sub> H <sub>76</sub> O <sub>35</sub>               | g  |
| N62 | 9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸 <sup>[13]</sup> | 18.54            |                                         |                        |                              | 327.217 2                                    | 6.1                    | 211                 | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>                | e  |
| N63 | 细叶远志皂苷*                                  | 18.99            |                                         |                        |                              | 679.369 4                                    | 1.2                    | 425, 455            | C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>12</sub>               | c  |
| N64 | 茯苓新酸 E <sup>[30]</sup>                   | 19.00            | 501.321 1                               | -3.3                   | 501, 455                     |                                              |                        |                     | C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>                | c  |
| N65 | 酸枣仁皂苷 A*                                 | 19.02            |                                         |                        |                              | 1 205.595 5                                  | -2.4                   |                     | C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>26</sub>               | c  |
| N66 | 9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸 <sup>[13]</sup>     | 19.10            |                                         |                        |                              | 329.232 8                                    | 5.7                    | 211, 229            | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>                | e  |
| N67 | 5,6,7-trimethoxycoumarin <sup>[31]</sup> | 19.13            | 237.075 8                               | -4.1                   | 237, 184, 149                |                                              |                        |                     | C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                | a  |
| N68 | 当药素 <sup>[25]</sup>                      | 19.16            | 447.128 6                               | -4.2                   | 267, 149                     |                                              |                        |                     | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>               | b  |
| N69 | 黄芪甲苷*                                    | 19.25            | 807.450 1                               | -3                     | 184, 125, 86                 |                                              |                        |                     | C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>               | c  |
| N70 | 异甘草素*                                    | 19.32            | 257.080 8                               | -3.5                   | 119, 137, 147, 239, 257      | 255.065 7                                    | 1.8                    | 135, 119            | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>                | b  |
| N71 | 芒柄花素 <sup>[12]</sup>                     | 19.56            | 269.080 8                               | -5                     | 254, 213                     | 267.065 7                                    | 2.4                    | 267, 252            | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>                | b  |
| N72 | 香豆素 <sup>[7]</sup>                       | 19.60            | 147.044 1                               | -3.8                   | 147, 129, 103, 91            |                                              |                        |                     | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                  | a  |
| N73 | 甘草酸*                                     | 19.61            |                                         |                        |                              | 821.396 0                                    | -0.6                   | 351, 193            | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>               | c  |
| N74 | 甘草次酸*                                    | 19.62            | 471.346 9                               | -4.2                   | 425, 471                     | 469.331 8                                    | 1.9                    | 425, 469            | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>                | c  |
| N75 | 甘草皂苷 K <sub>2</sub> <sup>[26]</sup>      | 19.62            | 823.411 1                               | -4.6                   | 407, 435, 453                |                                              |                        |                     | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>               | c  |
| N76 | 对香豆酸 <sup>[21]</sup>                     | 19.67            |                                         |                        |                              | 163.039 5                                    | 1.8                    | 163, 119, 93        | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                  | e  |
| N77 | 1-苯乙酮 <sup>[21]</sup>                    | 19.92            | 121.064 8                               | -2.7                   | 121, 105, 93, 75             |                                              |                        |                     | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O                               | f  |
| N78 | 3-丁烯基-7-羟基苯酚 <sup>[21]</sup>             | 20.23            |                                         |                        |                              | 203.071 4                                    | -0.8                   | 203, 174, 145, 117  | C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>                | f  |
| N79 | 洋川芎内酯 C <sup>[21]</sup>                  | 20.64            |                                         |                        |                              | 203.071 4                                    | -0.7                   | 203, 160, 145, 132  | C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>                | f  |
| N80 | 鸢尾黄素 <sup>[32]</sup>                     | 21.16            | 301.070 7                               | -3.3                   | 301, 286                     |                                              |                        |                     | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                | b  |
| N81 | 乌拉尔宁 <sup>[26]</sup>                     | 21.28            | 357.133 3                               | -5.3                   | 283, 301, 357                |                                              |                        |                     | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>                | b  |
| N82 | 白术内酰胺 <sup>[33]</sup>                    | 21.30            | 230.153 9                               | 1.6                    | 129, 141, 145                |                                              |                        |                     | C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> ON                            | C  |
| N83 | 尿苷 <sup>[30]</sup>                       | 21.52            | 245.077 4                               | 4.7                    | 133, 245                     |                                              |                        |                     | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>  | i  |
| N84 | odoratin <sup>[12]</sup>                 | 21.54            | 315.086 3                               | -4.6                   | 137, 300                     |                                              |                        |                     | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                | b  |

续表 1

| 序号   | 化合物                                                         | $t_R/\text{min}$ | [M+H] <sup>+</sup> /[M+Na] <sup>+</sup> |                            |                                  | [M-H] <sup>-</sup> /[M-H+HCOOH] <sup>-</sup> |                            |                         | 分子式                                             | 类型 |
|------|-------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|----|
|      |                                                             |                  | 质荷比<br>( $m/z$ )                        | 误差<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                             | 质荷比<br>( $m/z$ )                             | 误差<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 碎片离子                    |                                                 |    |
| N85  | 洋川芎内酯 A <sup>[11]</sup>                                     | 21.75            | 193.122 3                               | -3.3                       | 193, 175, 147, 137, 105, 53      |                                              |                            |                         | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | f  |
| N86  | 白术内酯 III <sup>[13]</sup>                                    | 21.75            | 249.148 5                               | -3.9                       | 204                              |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>  | c  |
| N87  | 呋喃倍半萜 <sup>[33]</sup>                                       | 21.83            | 231.138 0                               | -3.4                       | 91, 105, 117, 175, 231           |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N88  | 甘草异黄酮 A <sup>[26]</sup>                                     | 22.03            | 355.117 6                               | -4.5                       | 107, 159, 173, 355               | 353.102 5                                    | 1.7                        | 107, 253, 284           | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | b  |
| N89  | 异甘草黄酮醇 <sup>[26]</sup>                                      | 22.10            | 355.117 6                               | -4.1                       | 355, 337, 201, 151               |                                              |                            |                         | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | b  |
| N90  | 甘草利酮 <sup>[26]</sup>                                        | 22.18            | 383.148 9                               | -4                         | 137, 257, 327                    | 381.133 8                                    | 4.5                        | 351, 381                | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>  | b  |
| N91  | 美洲茶酸 <sup>[25]</sup>                                        | 22.40            |                                         |                            |                                  | 485.326 7                                    | 2.8                        | 485, 472                | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>  | c  |
| N92  | 藜本内酯*                                                       | 22.94            | 191.106 7                               | -3.6                       | 173, 163, 145, 117, 105, 91      |                                              |                            |                         | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | f  |
| N93  | 香草酸乙酯 <sup>[11]</sup>                                       | 22.97            | 197.081 4                               | 6                          | 121, 151                         |                                              |                            |                         | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | e  |
| N94  | 丁烯基苯酞异构体 <sup>[21]</sup>                                    | 23.09            | 189.090 7                               | -1.5                       | 189, 171, 131                    |                                              |                            |                         | C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | f  |
| N95  | 木香炔内酯*                                                      | 23.25            | 233.153 6                               | -4.2                       | 215, 187, 145, 131               |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N96  | 白术内酯 II <sup>[34]</sup>                                     | 23.25            | 233.153 6                               | -4.2                       | 91, 105, 131, 145, 159, 187, 215 |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N97  | 甘草异黄酮 B <sup>[26]</sup>                                     | 23.33            |                                         |                            |                                  | 351.086 9                                    | 0.9                        | 199, 265, 283, 321, 351 | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>  | b  |
| N98  | 3β-羟基苍术酮 <sup>[33]</sup>                                    | 23.37            | 233.153 6                               | -4.2                       | 117, 145, 172, 184               |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N99  | 白术内酯 I*                                                     | 23.58            | 231.138 0                               | -3.6                       | 213, 185                         |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N100 | 去氢木香内酯*                                                     | 23.91            | 231.138 0                               | -0.9                       | 213, 195, 185, 157, 145, 131     |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | c  |
| N101 | 反式-2-己烯基-β-槐糖苷 <sup>[13]</sup>                              | 24.65            |                                         |                            |                                  | 423.186 6                                    | -5.8                       | 261                     | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub> | i  |
| N102 | 13-Hydroxyoctadecadienoic acid <sup>[6]</sup>               | 24.74            |                                         |                            |                                  | 295.227 9                                    | 1.1                        | 295, 277, 171           | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>  | e  |
| N103 | 亚麻酸 <sup>[21]</sup>                                         | 24.84            | 279.231 9                               | -3.9                       | 95, 279                          | 277.216 8                                    | 5                          | 57, 277                 | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>  | e  |
| N104 | 茯苓新酸 BM <sup>[30]</sup>                                     | 24.93            |                                         |                            |                                  | 497.326 7                                    | 2.9                        | 421, 497                | C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>  | c  |
| N105 | 9S-Hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid <sup>[6]</sup> | 25.32            |                                         |                            |                                  | 293.212 2                                    | 2.1                        | 293, 193, 86            | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>  | e  |
| N106 | 脱氢香橙烯 <sup>[33]</sup>                                       | 25.38            | 203.179 4                               | -2.3                       | 121, 133, 147, 161, 175, 203     |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>                 | c  |
| N107 | 16A-羟基松萜新酸 <sup>[35]</sup>                                  | 25.56            |                                         |                            |                                  | 469.331 8                                    | 1.9                        | 451, 469                | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>  | c  |
| N108 | 苍术酮 <sup>[33]</sup>                                         | 25.72            | 217.158 7                               | -2.9                       | 217, 199, 157, 143, 121          |                                              |                            |                         | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O               | c  |
| N109 | 邻苯二甲酸酐 <sup>[36]</sup>                                      | 26.08            | 149.023 3                               | -2.7                       | 149, 150                         |                                              |                            |                         | C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>    | i  |
| N110 | 邻苯二甲酸二丁酯 <sup>[30]</sup>                                    | 26.11            | 279.159 1                               | -3.9                       | 149, 57                          |                                              |                            |                         | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>  | i  |
| N111 | 亚油酸 <sup>[21]</sup>                                         | 26.60            |                                         |                            |                                  | 279.232 4                                    | 5                          | 279, 97                 | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | e  |
| N112 | 茯苓酸*                                                        | 28.16            |                                         |                            |                                  | 527.373 6                                    | 2.4                        | 120                     | C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>5</sub>  | c  |
| N113 | 肉桂醛 <sup>[37]</sup>                                         | 29.11            | 133.064 8                               | -2.3                       | 89, 90, 133                      |                                              |                            |                         | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O                 | f  |
| N114 | 党参炔醇 <sup>[13]</sup>                                        | 30.04            | 235.132 9                               | -4.3                       | 199                              |                                              |                            |                         | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>  | i  |
| N115 | 棕榈酸 <sup>[21]</sup>                                         | 31.23            |                                         |                            |                                  | 255.232 4                                    | 1.4                        | 255                     | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | e  |
| N116 | 11-反-十八烯酸 <sup>[21]</sup>                                   | 31.38            |                                         |                            |                                  | 281.248 1                                    | 3.1                        | 281, 197, 182           | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>  | e  |

注：a-苯丙素类，b-黄酮及其苷类，c-萜类及其苷类，d-生物碱类，e-有机酸类，f-挥发油类，g-寡糖酯类，h-氨基酸类，i-其他类。\*化合物经与对照品比对确认。

Note: a-phenylpropanoids, b-flavonoids and their glycosides, c-terpenoids and their glycosides, d-alkaloids e-organic acids, f-volatile oils, g-oligosaccharide ester, h-amino acid, i-other classes. \*Compounds were confirmed by comparing with reference substance.

蛋白进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，以  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。GO 富集分析根据  $P < 0.01$  的条件筛选出 73 条条目，生物过程、细胞组成、分子功能分别为 50, 11, 12 条，导入微生信网站作图，见图 5。KEGG 通路富集分

析根据  $P < 0.01$  的条件筛选出 71 个 KEGG 富集条目，对 71 条通路进行整合发现，主要涉及肿瘤、免疫系统、内分泌系统、神经系统等相关的信号通路。本研究仅对与焦虑症密切相关的 15 条信号通路及相应靶点进行作表展示，结果见表 2。

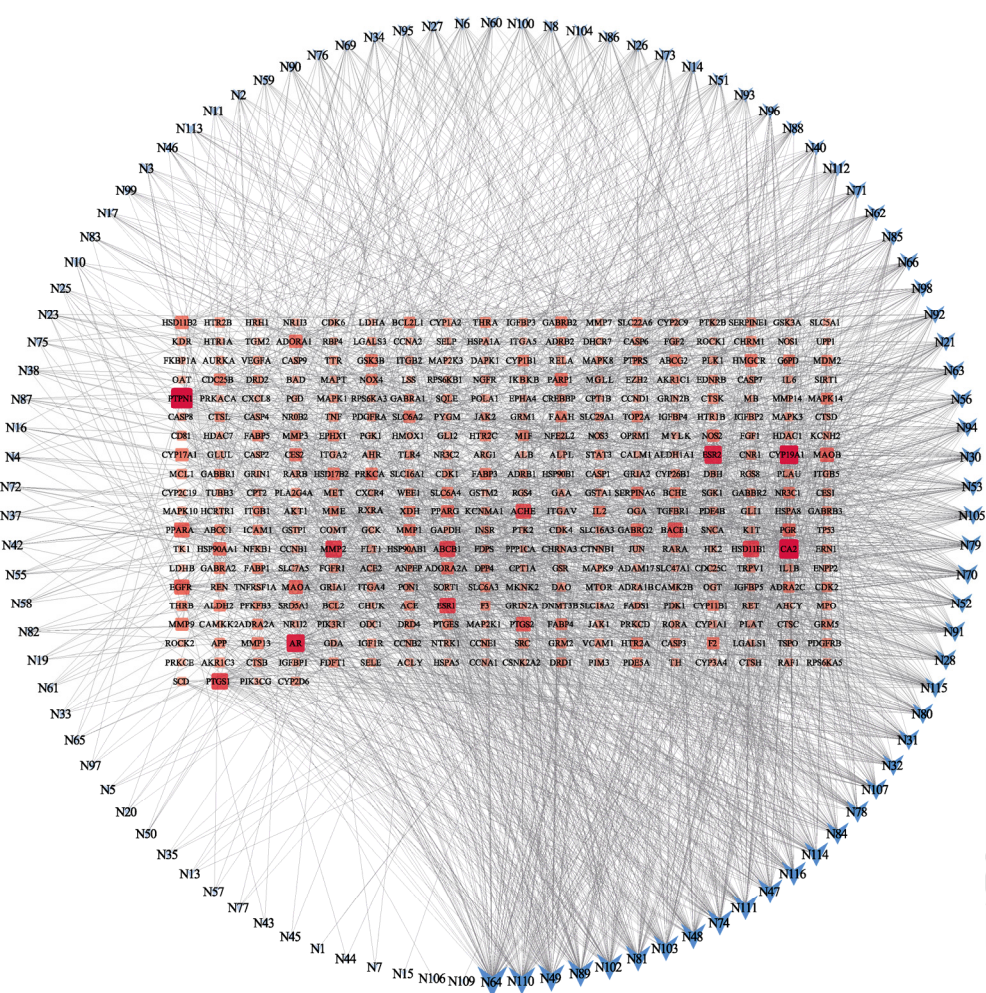


图2 “成分-靶点”网络图  
Fig.2 “Compounds-targets” network

**2.5.5 成分-靶点-通路网络构建** 将10个关键靶点、9个重要成分(化合物13-hydroxyoctadecadienoic acid的相关靶点与关键靶点无交集,因此不参与网络构建)及71条信号通路导入Cytoscape 3.7.1软件绘制“成分-靶点-通路”网络图,结果见图6,该网络包含90个节点和362条边,其中绿色圆形代表重要成分,红色三角形代表关键靶点,蓝色矩形代表通路。以Degree值为参考,发现9个化合物Degree值差异不大,均可能是归脾丸的关键成分;MAPK3、MAPK1、PIK3R1、AKT1、MAPK8的连接度高于其他靶点,可能是归脾丸发挥药效的关键靶点;71条信号通路差异性不大,均可能是归脾丸的关键信号通路。

**2.5.6 分子对接验证** 选择“2.5.5”项中的9个重要成分以及临床抗焦虑药物帕罗西汀作为分子对接的配体小分子,MAPK3(PDB ID: 2ZOQ)、PIK3R1(PDB ID: 5SXX)、AKT1(PDB ID: 4EKK)、MAPK1(PDB ID: 4IZ5)、MAPK8(PDB ID: 2GMX)、

TP53(PDB ID: 6RZ3)、SRC(PDB ID: 1YOM)、STAT3(PDB ID: 6NUQ)、HSP90AA1(PDB ID: 5NJX)、APP(PDB ID: 6HAR)等10个关键靶点作为分子对接的蛋白大分子,用AutoDock Tools1.5.6和AutoDock Vina1.1.2进行分子对接,以对接得到的结合能值作图,结果见图7。结果表明,重要成分和关键靶点间结合能均 $<0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,亲和力良好。其中,APP、TP53与各重要成分亲和力较好,推测归脾丸的抗焦虑作用可能与APP、TP53密切相关。根据结合能结果,将APP、TP53与10个化合物的对接结果导入PyMOL2.4.0进行可视化,结果见图8。可以发现各成分与靶点蛋白间均能形成氢键,且氢键长度较短,表明两者间亲和力良好。且分子对接和可视化分析均表明甘草次酸与临床常用的抗焦虑药物有相似表现。

### 3 讨论

#### 3.1 条件优化

本研究分别对提取方式、提取溶剂、提取时

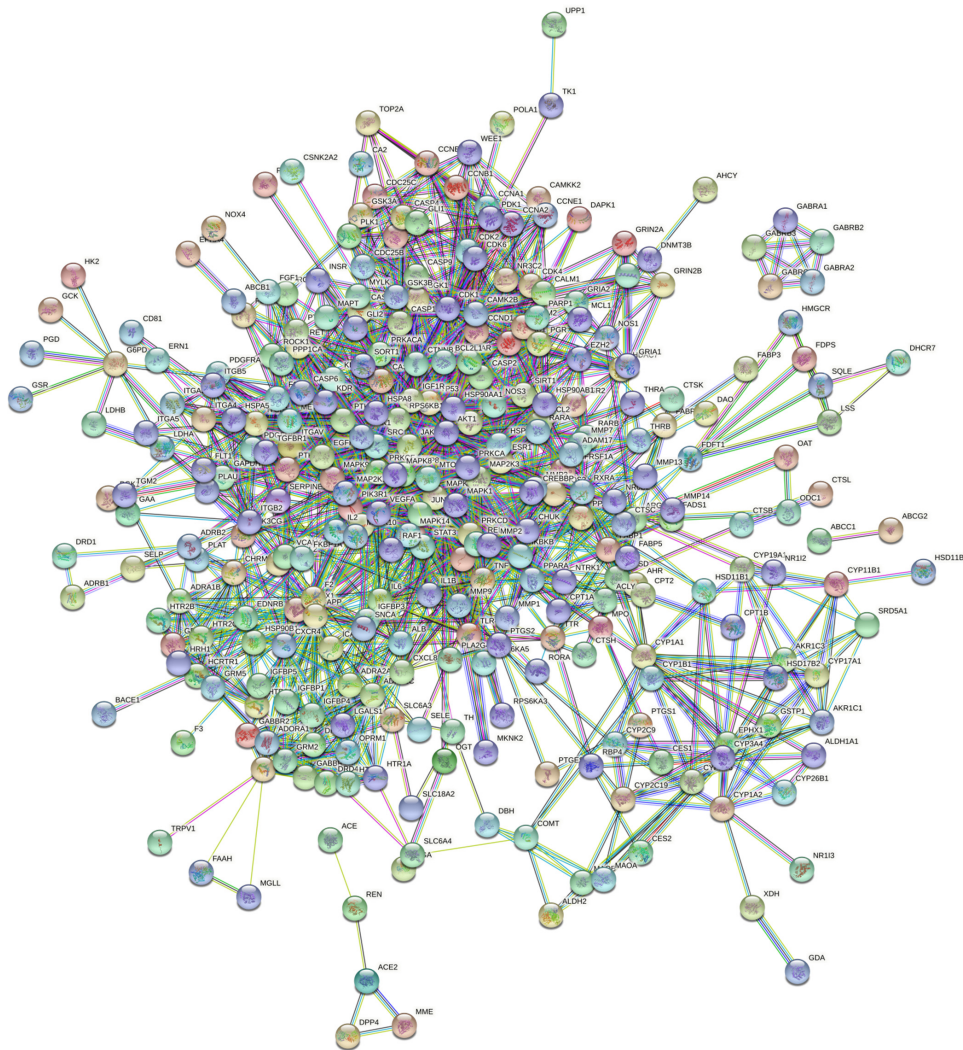


图3 蛋白质相互作用网络  
Fig. 3 Network of protein-protein interaction

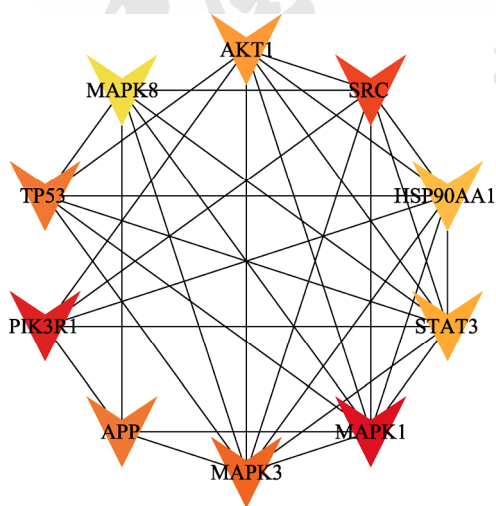


图4 10个核心基因交互网络图  
Fig. 4 Interaction network diagram of 10 core genes

间、流动相的组成以及碰撞能量进行考察后确定最优条件为70%甲醇-水超声提取30 min后以乙腈

-0.1%甲酸水溶液为流动相进行洗脱，质谱碰撞能量为20, 40, 60 eV。在此条件下，归脾丸样品中色谱峰数量较多、质谱响应较好。

### 3.2 网络药理学结果分析

本研究通过网络药理学得到9个归脾丸抗焦虑重要成分，10个关键靶点。已有文献报道，甘草次酸具有神经保护作用<sup>[38]</sup>，茯苓新酸E可抗惊厥和催眠<sup>[39]</sup>，甘草素有抗抑郁作用<sup>[40]</sup>。APP基因可促进神经细胞生长分化，增加神经突触的可塑性，参与细胞信号转导等<sup>[41]</sup>。HSP90AA1能够通过上调VEGF蛋白缓解局部缺血损伤情况，改善脑部微循环与脑代谢异常<sup>[42-45]</sup>。分子对接结果也表明，归脾丸重要成分与关键靶点的亲和力良好。

GO和KEGG通路分析发现，作用靶点主要富集在15条信号通路。ERBB2有诱导GABA传递以及神经营养作用<sup>[46]</sup>，MAPK信号通路涉及的

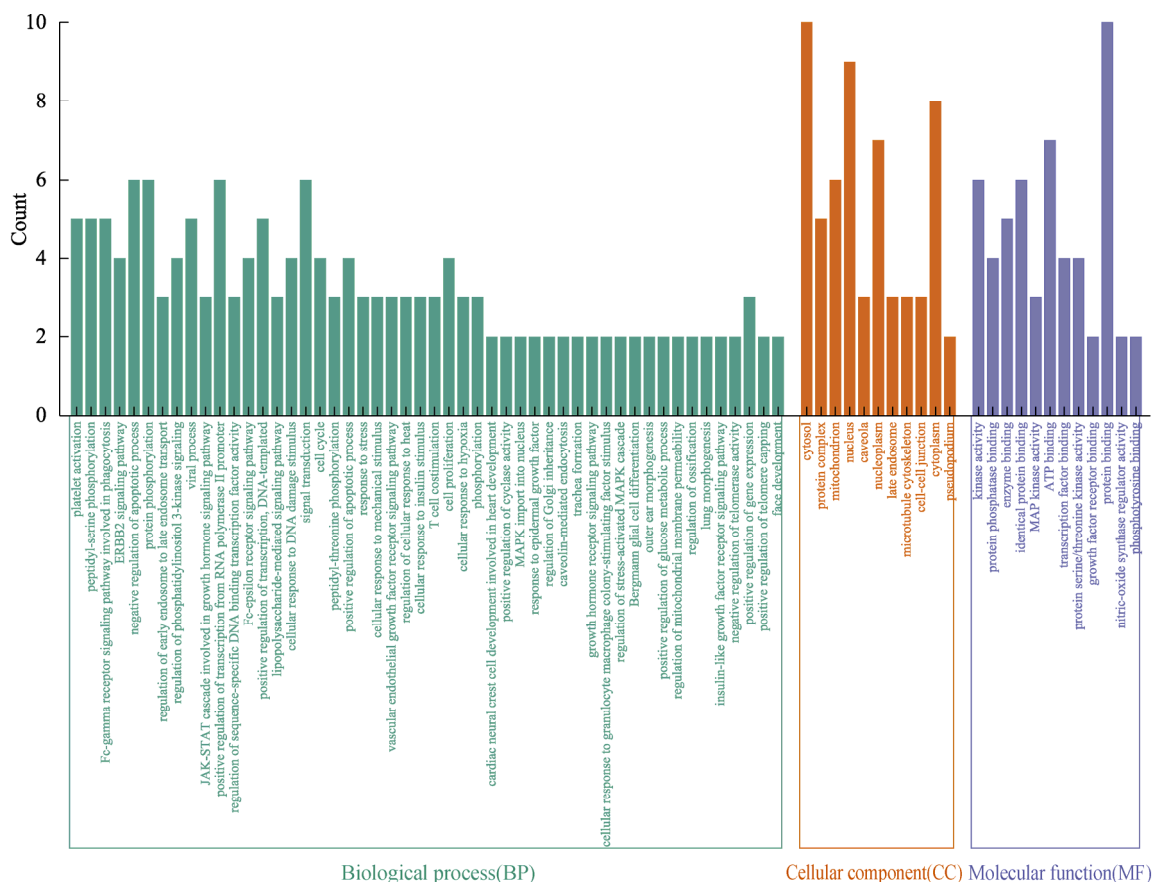


图 5 GO 功能富集分析图

Fig. 5 GO functional enrichment analysis diagram

表 2 KEGG 通路富集分析信息

Tab. 2 KEGG pathway enrichment analysis information

| 条目       | 通路                                   | 基因                                         | P 值                   |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| hsa04012 | ErbB signaling pathway               | MAPK8, SRC, MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3     | $3.99 \times 10^{-8}$ |
| hsa04915 | Estrogen signaling pathway           | HSP90AA1, SRC, MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3  | $6.72 \times 10^{-8}$ |
| hsa04919 | Thyroid hormone signaling pathway    | SRC, MAPK1, AKT1, PIK3R1, TP53, MAPK3      | $1.43 \times 10^{-7}$ |
| hsa04722 | Neurotrophin signaling pathway       | MAPK8, MAPK1, AKT1, PIK3R1, TP53, MAPK3    | $1.77 \times 10^{-7}$ |
| hsa04068 | FoxO signaling pathway               | MAPK8, STAT3, MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3   | $3.08 \times 10^{-7}$ |
| hsa04611 | Platelet activation                  | SRC, MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3            | $1.43 \times 10^{-5}$ |
| hsa04151 | PI3K-Akt signaling pathway           | HSP90AA1, MAPK1, AKT1, PIK3R1, TP53, MAPK3 | $3.29 \times 10^{-5}$ |
| hsa04621 | NOD-like receptor signaling pathway  | HSP90AA1, MAPK8, MAPK1, MAPK3              | $4.15 \times 10^{-5}$ |
| hsa04150 | mTOR signaling pathway               | MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3                 | $4.61 \times 10^{-5}$ |
| hsa04024 | cAMP signaling pathway               | MAPK8, MAPK1, AKT1, PIK3R1, MAPK3          | $7.49 \times 10^{-5}$ |
| hsa04912 | GnRH signaling pathway               | MAPK8, SRC, MAPK1, MAPK3                   | $1.78 \times 10^{-4}$ |
| hsa04010 | MAPK signaling pathway               | MAPK8, MAPK1, AKT1, TP53, MAPK3            | $1.95 \times 10^{-4}$ |
| hsa04540 | Gap junction                         | SRC, MAPK1, MAPK3                          | $5.50 \times 10^{-3}$ |
| hsa04723 | Retrograde endocannabinoid signaling | MAPK8, MAPK1, MAPK3                        | $7.19 \times 10^{-3}$ |
| hsa04726 | Serotonergic synapse                 | APP, MAPK1, MAPK3                          | $8.63 \times 10^{-3}$ |

ERK1/2 信号通路可介导 GABA 的分泌<sup>[47]</sup>, 胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)阻断垂体促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元中的强直性逆

行内源性大麻素通路, 增加了突触前末梢的 GABA 释放, 进而激活 GnRH 神经元, 导致下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)的微调<sup>[48]</sup>。甲状腺激素信号通路能够

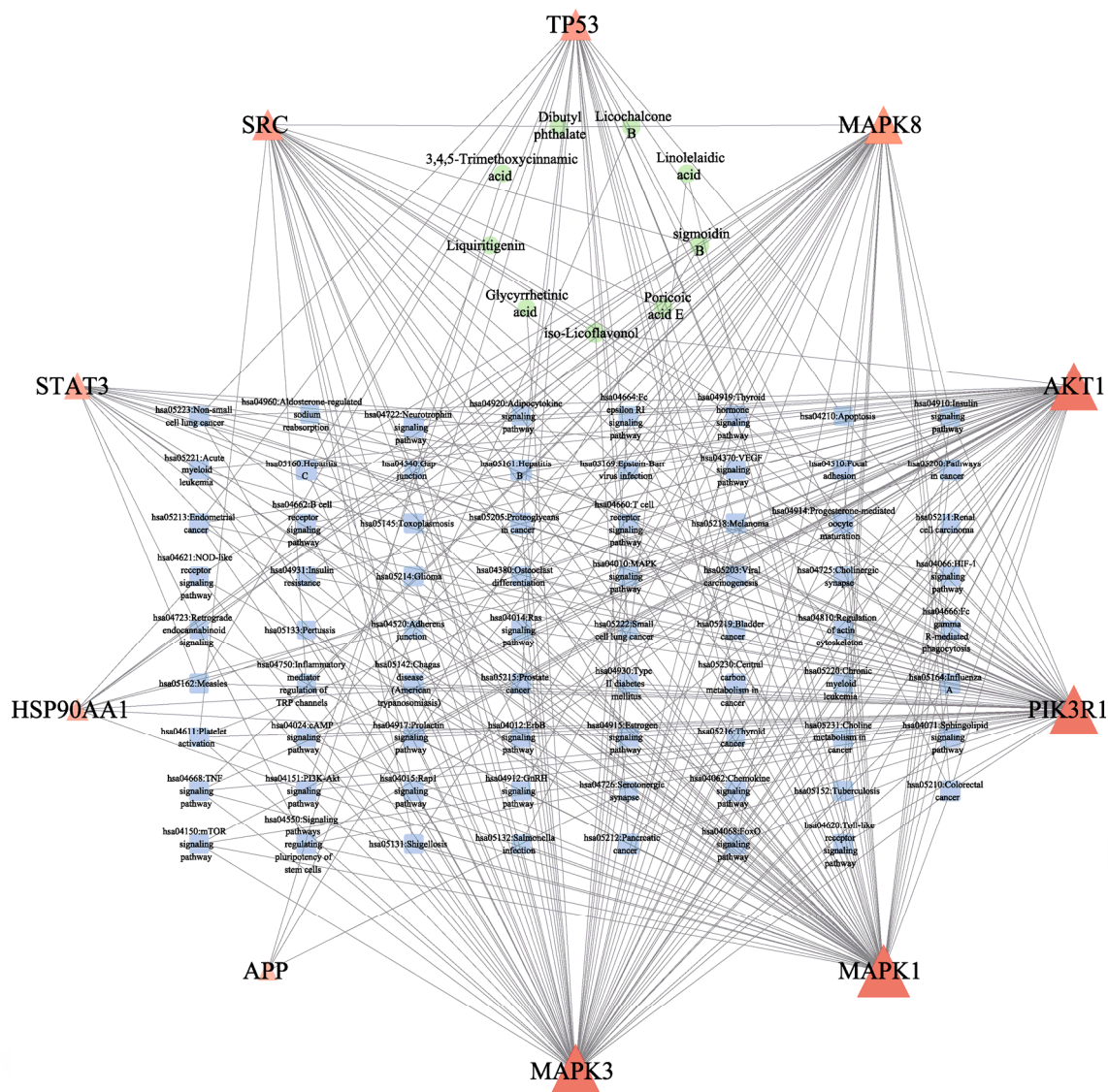


图6 “成分-靶点-通路”网络图  
Fig.6 “Compound-target-pathway” network

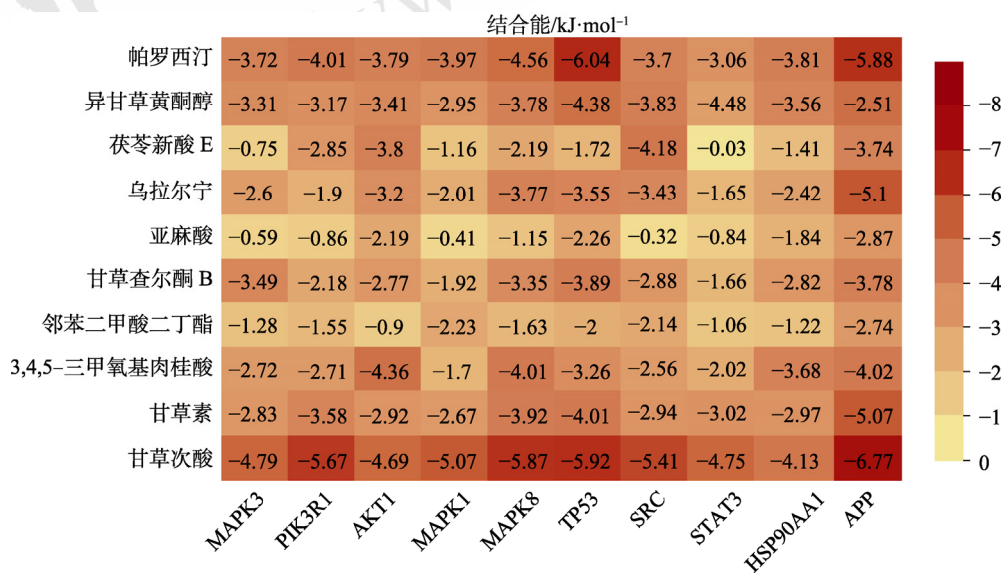


图7 重要成分与关键靶点分子对接结合能热图  
Fig.7 Heat map of binding energy between important components and key targets molecules decoction

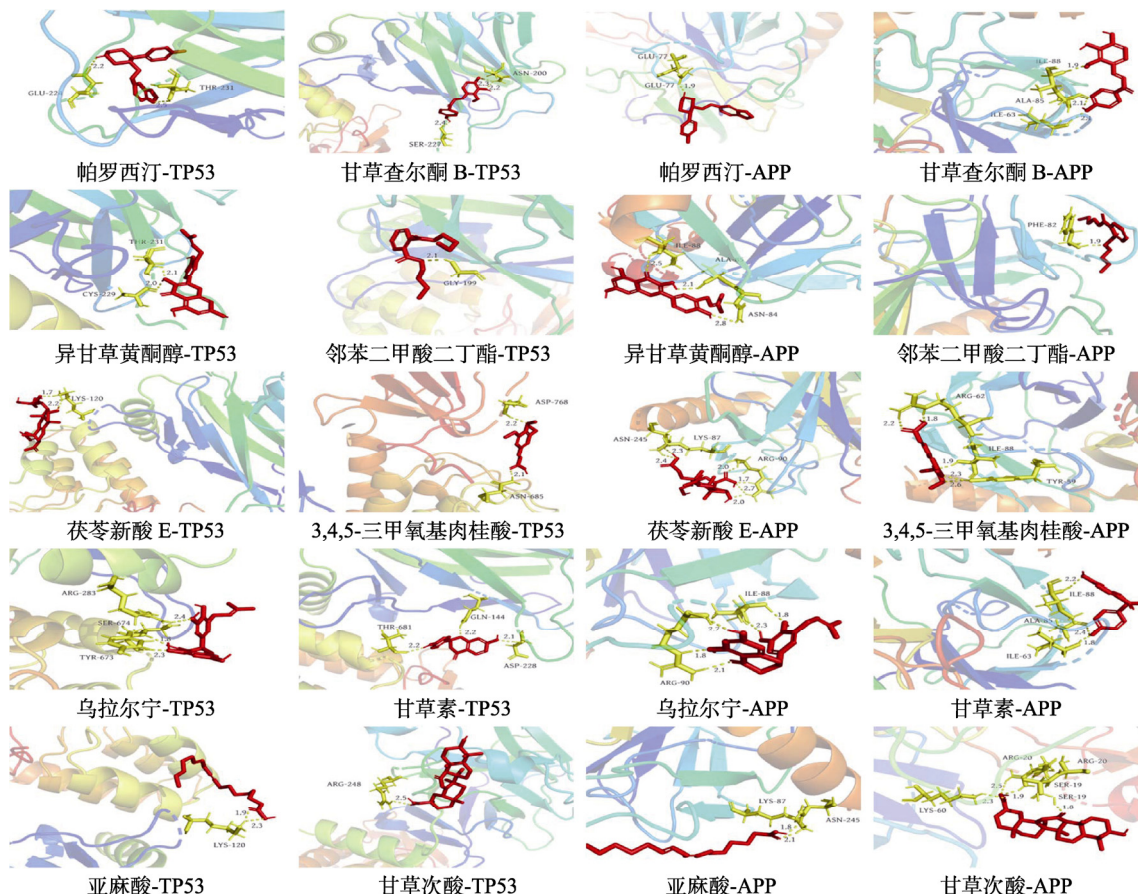


图 8 活性成分与靶点的最佳对接构象  
Fig. 8 Optimal docking conformations of compounds and targets

抑制由  $\text{Ca}^{2+}$  超载引起下游 p53 蛋白表达诱发的炎症反应和细胞凋亡<sup>[49]</sup>。临床研究表明,焦虑症患者的严重程度与血小板活化标志物 P 选择素的升高水平呈正相关,血小板活化后可释放 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)等与焦虑症发生密切相关的生物活性物质<sup>[50]</sup>。cAMP 信号通路在情绪调节中起着重要的作用,5-HT<sub>1A</sub> 受体激活后能抑制腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),减少 cAMP 的形成,抑制 PKA 介导的磷酸化,产生抗焦虑作用<sup>[51]</sup>。缝隙连接在维持神经元功能方面发挥着重要的作用<sup>[52]</sup>。PI3K/AKT 信号通路的激活能够介导 FoxO1 磷酸化, p-FoxO1 自细胞核中移位至细胞质中,失去对 TLR4 的转录调控活性<sup>[53]</sup>。海马中 TLR4 表达抑制可以减少其下游 NF- $\kappa$ B 活化并诱导一系列炎症反应,从而降低机体对焦虑的易感性<sup>[54]</sup>。此外, PI3K/AKT 信号通路的激活最终会使下游的 mTOR 得到调控, PI3K/Akt-mTOR 可以促进细胞

生长,抑制细胞凋亡的产生<sup>[55]</sup>。

综上,本研究采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 对归脾丸进行化学成分分析,共鉴定出 116 个化合物。通过网络药理学对 116 个成分进行挖掘,共得到归脾丸抗焦虑的 9 个重要成分、10 个核心靶点及 15 条焦虑症相关通路。预测归脾丸可能通过调节 5-HT、GABA 等神经递质的水平, HPA、HPG 等内分泌系统以及降低炎症因子的表达发挥抗焦虑作用, APP、TP53 基因最为关键。充分体现了中药多成分、多靶点、多通路协同作用发挥治疗效果的特点。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 816-817.
- [2] 朱晓旭, 谢鸣. 焦虑症中医药治疗研究现状[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(3): 62-65.
- [3] 冯超英. 焦虑症的药物治疗研究进展[J]. 医药导报, 2006, 25(5): 447-450.
- [4] 黄东, 何晓艳, 杨左兵, 等. 中西医结合治疗广泛性焦虑心脾两虚证 36 例[C]//中国中西医结合学会精神疾病专业委员会. 中国中西医结合学会精神疾病专业委员会第十届学术会议论文集, 2010: 4.

- [5] Pubchem. Arginine[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6322>.
- [6] KHAN M N, UL HAQ F, RAHMAN S, et al. Metabolite distribution and correlation studies of *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus nummularia* using LC-ESI-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020(178): 112918.
- [7] LI J, LI M, YE K, et al. Chemical profile of Xian-He-Cao-Chang-Yan formula and its effects on ulcerative colitis[J]. J Ethnopharmacol, 2021(267): 113517.
- [8] Pubchem. L-valine[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6287>.
- [9] Pubchem. D-(-)-Fructose[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5984>.
- [10] Pubchem. L-Malic acid[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/222656>.
- [11] LEI D M, YAO C L, CHEN X B, et al. Chemical analysis of constituents in classical prescription Danggui Buxue Decoction based on RP-Q-TOF-MS and HILIC-Q-TOF-MS[J/OL]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), (2021-03-31). <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20210330.301>.
- [12] ZHANG J. The study on mass spectrometry identification and multi-component quantitative studies of Huangqi herb pair and its compound preparation[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015: 148.
- [13] AN T Y, CHEN X H, ZHANG M, et al. Rapid analysis on chemical constituents in roots of *Codonopsis tangshen* by UPLC coupled with Q-Exactive quadrupole-orbitrap mass spectrometry[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(7): 1533-1542.
- [14] NIU Y, WANG S F. Analysis on chemical constituents in Danggui-Shaoyao-San by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(8): 1056-1062.
- [15] Pubchem. Adenine[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6322>.
- [16] Pubchem. Nicotinic acid[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/938>.
- [17] Pubchem. p-Cresol[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2879>.
- [18] Pubchem. o-Cresol[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/335>.
- [19] CHAI S W, YANG F, YU H J, et al. Analysis of chemical constituents of Radix Polygalae by UPLC/ESI-Q-TOF MS[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2018, 35(1): 60-64.
- [20] YAN Y, LI Q, DU C H, et al. Investigation of the potentially effective components of Semen Ziziphi Spinosae based on “in vitro to in vivo” translation approach[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2017, 52(2): 283-290.
- [21] ZHANG J H, WU W D, LIU J T, et al. Rapid analysis of chemical constituents of Huoxue Zhitong Capsules based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(12): 3139-3146.
- [22] Pubchem. 9H-Pyrido[3,4-B]indole[DB/OL]. USA, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64961>.
- [23] ZHANG J, QIU X H, XU W, et al. Characteristic spectrum analysis of chemical components in Sanqi Oral Liquid by UPLC-MS/MS[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(5): 1572-1576.
- [24] Pubchem. gamma-Terpinene[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7461>.
- [25] MAO Y N, WU W Q, KANG Y, et al. Rapid analysis of chemical components in Zizyphi Spinosae Semen by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(24): 4884-4891.
- [26] CHEN M Q, WANG Y J, FENG F. Analysis of chemical components of Zhi-zi-Gan-Cao-Chi Decoction based on UPLC-Q-exactive orbitrap-MS[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2021, 49(8): 97-103.
- [27] Pubchem. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/735755>.
- [28] Pubchem. Sebacic acid[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5192>.
- [29] Pubchem. Glycitein[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5317750>.
- [30] WANG Q, LI B B, HUANG W J, et al. Analysis of chemical constituents of Shenqi Jiangtang Granule based on UPLC-Q/TOF MS and GC-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(6): 1568-1581.
- [31] Pubchem. 5,6,7-Trimethoxycoumarin[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/148724>.
- [32] Pubchem. Tectorigenin[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281811>.
- [33] ZHONG Y M, FENG Y F, GUO J. Rapid identification of components from Atractylodis macrocephalae rhizoma based on UPLC/Q-TOF MS[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2015, 36(1): 72-77.
- [34] HUANG X F, OUYANG H, LI J M, et al. Identification of characteristic constituents in atractylodis macrocephalae rhizoma from different regions by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(23): 27-33.
- [35] LIU J X, WEI J, WU J C, et al. Identification of chemical constituents in Suanzaoren Tang granules by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(12): 1-12.
- [36] Pubchem. Phthalic anhydride[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6811>.
- [37] Pubchem. 3-Phenylprop-2-enal[DB/OL]. USA, 2004-09-16, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/307>.
- [38] KAO T C, SHYU M H, YEN G C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(2): 754-761.
- [39] GAO Y Q, YAN H, JIN R R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from *Poria cocos* is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain[J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2528-2535.
- [40] SU Q, TAO W W, HUANG H, et al. Protective effect of liquiritigenin on depressive-like behavior in mice after

- lipopolysaccharide administration[J]. *Psychiatry Res*, 2016(240): 131-136.
- [41] TREMML P, LIPP H P, MÜLLER U, et al. Enriched early experiences of mice underexpressing the beta-amyloid precursor protein restore spatial learning capabilities but not normal openfield behavior of adult animals[J]. *Genes Brain Behav*, 2002, 1(4): 230-241.
- [42] OHNUKI H, INOUE H, TAKEMORI N, et al. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signaling in angiogenesis[J]. *Blood*, 2012, 119(11): 2688-2698.
- [43] YARDEN Y, SLIWKOWSKI M X. Untangling the ErbB signalling network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127-137.
- [44] XU C L. Risk factors inpatientswith chest stuffiness associated with anxiety/depression and the combined intervention with yixinshu capsule: A systemic review and meta-analysis[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017: 84.
- [45] WEI J L, XIANG X, ZHAO L Y, et al. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression and its clinical significance[J]. *China Cancer(中国肿瘤)*, 2019, 28(5): 387-394.
- [46] BARROS C S, CALABRESE B, CHAMERO P, et al. Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system[J]. *PNAS*, 2009, 106(11): 4507-4512.
- [47] ZHANG Z J, GUO M X, XING Y. ERK activation effects on GABA secretion inhibition induced by SDF-1 in hippocampal neurons of rats[J]. *Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志)*, 2015, 31(5): 443-447.
- [48] BÁLINT F, CSILLAG V, VASTAGH C, et al. Insulin-like growth factor 1 increases GABAergic neurotransmission to GnRH neurons via suppressing the retrograde tonic endocannabinoid signaling pathway in mice[J]. *Neuroendocrinology*, 2021, 111(12): 1219-1230.
- [49] CHEN L. The neuroprotective effect and transcriptome study of caffeoylquinic acid derivative (MQA) on cerebral ischemia in rats[D]. Shihezi: Shihezi University, 2019: 57.
- [50] LIU Y P, JIANG X, JIA H, et al. Pathogenesis and prospect on platelet activation in acute coronary syndrome complicated with anxiety disorder[J]. *Clin Res Pract(临床医学研究与实践)*, 2018, 3(14): 193-195.
- [51] 朱春辉. 通过环磷酸腺苷信号通路治疗焦虑症的研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(28): 4011-4014.
- [52] SUN J D, LIU Y, YUAN Y H, et al. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37(5): 1305-1320.
- [53] MEDIWALA S N, SUN H Y, SZAFRAN A T, et al. The activity of the androgen receptor variant AR-V7 is regulated by FOXO1 in a PTEN-PI3K-AKT-dependent way[J]. *Prostate*, 2013, 73(3): 267-277.
- [54] FU S N, WANG J T, HAO C G, et al. Tetramethylpyrazine ameliorates depression by inhibiting TLR4-NLRP3 inflammasome signal pathway in mice[J]. *Psychopharmacology*, 2019, 236(7): 2173-2185.
- [55] LV Q H, GU C Y, CHEN C J. Venlafaxine protects methylglyoxal-induced apoptosis in the cultured human brain microvascular endothelial cells[J]. *Neurosci Lett*, 2014(569): 99-103.

收稿日期: 2021-11-08  
(本文责编: 蔡珊珊)