

· 数据挖掘 ·

## 基于指纹图谱和网络药理学的江枳壳质量标志物预测分析

王慧, 梁燕青, 于兴泰, 刘璐, 曾金祥, 刘红宁, 张寿文\*

(江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 基于指纹图谱和网络药理学方法分析预测地道药材江枳壳中潜在的质量标志物(Q-Marker)。方法: 对18批江枳壳药材分别建立超高效液相色谱(UPLC)、气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱, 并结合化学计量学方法, 筛选出Q-Marker候选成分。运用网络药理学构建“核心成分-靶点-通路”网络, 预测江枳壳Q-Marker及核心靶点, 再用分子对接方法验证江枳壳Q-Marker生物活性。结果: 18批江枳壳药材运用UPLC、GC-MS指纹图谱结合化学计量学分析, 共筛选出9个Q-Marker候选成分, 通过网络药理学分析, 预测川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯为江枳壳Q-Marker, 作用于核心靶点转化蛋白p21/H-Ras-1(HRAS)、肿瘤蛋白抗原p53(TP53)、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、转录因子AP-1(JUN)、糖原合成酶激酶-3β(GSK3B)、肿瘤坏死因子(TNF)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A(CDKN1A)、环磷酸腺苷(cAMP)依赖性蛋白激酶催化亚基α(PRKACA)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、环腺苷酸反应元件结合蛋白1(CREB1), 发挥胃肠动力、抗抑郁、抗炎、抗肿瘤等作用; 分子对接表明川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯与筛选出的10个核心靶点有较好的结合能力, 体现了江枳壳Q-Marker较好的生物活性。结论: 从挥发性和非挥发性成分两方面着手全面预测江枳壳Q-Marker, 为江枳壳药材质量的控制和进一步研究其药效相关机制提供参考。

**[关键词]** 江枳壳; 质量标志物; 指纹图谱; 网络药理学; 分子对接; 川陈皮素; 新橙皮苷; 橙皮内酯; 柚皮苷; D-柠檬烯

**[中图分类号]** R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0198-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220617 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220311.0911.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-11 17:05

### Predictive Analysis of Quality Markers of Jiangxi Aurantii Fructus Based on Fingerprint and Network Pharmacology

WANG Hui, LIANG Yanqing, YU Xingtai, LIU Lu, ZENG Jinxiang,

LIU Hongning, ZHANG Shouwen\*

(Jiangxi University of Chinese Medicine, Research Center for Traditional Chinese Medicine Resources and Ethnic Minority Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze and predict the potential quality markers (Q-Marker) in the Genuine medicinal materials Jiangxi Aurantii Fructus based on fingerprints and network pharmacology. **Method:** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) fingerprints were established for 18 batches of Jiangxi Aurantii Fructus, combined with chemometric methods to screen out candidate Q-Marker components. Use network pharmacology to construct a "core component-target-pathway" network to predict the Q-Marker and core targets of Jiangxi Aurantii Fructus, and then verify the

**[收稿日期]** 2021-12-13

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1700903); 江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-11)

**[第一作者]** 王慧, 在读硕士, 从事中药资源开发与利用研究, E-mail: 283203346@qq.com

**[通信作者]** \* 张寿文, 教授, 博士生导师, 从事中药资源开发与利用研究, E-mail: wtzsw@163.com

biological activity of Jiangxi Aurantii Fructus Q-Marker by molecular docking method. **Result:** The 18 batches of Jiangxi Aurantii Fructus use UPLC, GC-MS fingerprints combined with chemometric analysis, a total of 9 Q-Marker candidate components were screened out. Through network pharmacological analysis, it is predicted that nobiletin, neohesperidin, meranzin, naringin and *D*-limonene are the Q-Marker of Jiangxi Aurantii Fructus, acting on the core targets transforming protein p21/H-Ras-1 (HRAS), cellular tumor antigen p53 (TP53), mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8), transcription factor AP-1 (JUN), glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3B), tumor necrosis factor (TNF), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A), cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PRKACA), cysteine aspartate-specific protease-9 (Caspase-9), cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 (CREB1), exerting gastrointestinal motility and antidepressant, anti-inflammatory, anti-tumor, etc.; molecular docking shows that nobiletin, neohesperidin, meranzin, naringin and *D*-limonene and the selected 10 core targets have good binding ability, reflecting the better biological activity of the Q-Marker of Jiangxi Aurantii Fructus. **Conclusion:** The Q-Marker of Jiangxi Aurantii Fructus can be comprehensively predicted from the two aspects of volatile and non-volatile components, providing a reference for the quality control of Jiangxi Aurantii Fructus and the further study of its pharmacodynamic mechanism.

**[Keywords]** Jiangxi Aurantii Fructus; quality marker; fingerprint; network pharmacology; molecular docking; nobiletin; neohesperidin; meranzin; naringin; *D*-limonene

枳壳为芸香科植物酸橙及其栽培变种的干燥未成熟果实,味苦、辛、酸,性微寒,归脾、胃经,具有理气宽中、行滞消胀的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,枳壳具有调节胃肠道<sup>[2]</sup>、抗抑郁<sup>[3]</sup>、抗菌<sup>[4]</sup>、降血脂<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、保肝<sup>[8]</sup>等作用。枳壳主产于江西、四川、湖南、重庆、浙江等地,其中以江西枳壳的品质为最佳,是江西省四大“道地药材”之一<sup>[9]</sup>,习称“江枳壳”。

化学成分是中药产生药理活性的物质基础,但这种物质基础不是一种有效单体化合物,而是多种成分的有效组方。中药质量标志物(Q-Marker)由刘昌孝院士提出,其将中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分相关联,为中药的品质评价及质量控制研究指明了新方向<sup>[11]</sup>。网络药理学拥有系统性和整体性的特点,其作为一种建立在系统生物学和网络生物学基础上的新兴研究方法,被广泛应用于单味药及复方药治疗疾病多靶点作用机制的预测与研究<sup>[12-13]</sup>,同时还可以作为一种辅助分析方法,对于挖掘中药材、饮片和复方药Q-Marker发挥着重要的作用<sup>[14-15]</sup>。

枳壳中含有黄酮类、挥发油类、香豆素类、生物碱类<sup>[9]</sup>等多种有效成分,筛选并确定道地品种江枳壳的Q-Marker,对其质量评价及其重要。现有研究多从挥发性成分或者非挥发性成分二选一作为出发点研究中药材中的Q-Marker,很少同时考虑中药材中的这两大类成分,比较片面<sup>[16-18]</sup>。本研究建立了江枳壳超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱、气相

质谱(GC-MS)指纹图谱,全面考虑其挥发性和非挥发性成分,通过化学计量学分析筛选出Q-Marker候选成分,运用网络药理学方法预测江枳壳Q-Marker,再用分子对接验证江枳壳Q-Marker生物活性,为进一步阐明江枳壳的道地性和完善其品质优劣评价标准提供参考依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** Triple-TOF 5600<sup>+</sup>型高分辨质谱仪(美国AB SCIEX公司),配备 DuoSpray 离子源和 LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);7008 型手提式万能粉碎机(杭州绿博仪器有限公司);GZX-9076MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CP-214 型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司);Centrifuge 5430 R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);7890A/5975C 型气相质谱联用仪(美国 Agilent 公司,7697A 型顶空进样器,质谱检索数据库 NIST17.L)。

**1.2 试剂** 对照品柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川橙皮素、桔皮素(北京中科质检生物技术有限公司,批号分别为 20041803、20031701、20041707、C0150200400、J02211807014,纯度均≥98%);乙腈、甲醇(色谱级,德国 Merck 公司);甲酸[质谱级,赛默飞世尔科技(中国)公司];水为超纯水。

**1.3 药材** 江枳壳药材于2020年7月分别采集于江西新干、樟树等地,经江西中医药大学付小梅教授鉴定为芸香科植物酸橙栽培变种香橙(*Citrus*

aurantium ‘Xiangcheng’)、臭橙(*C. aurantium* ‘Xiucheng’)的干燥未成熟果实,见表1。

表1 18批江枳壳药材的产地信息

Table 1 Origin information of 18 batches of Jiangxi Aurantii Fructus

编号	产地	基原植物
S1~S3	萍乡市上栗县	臭橙
S4~S6	抚州市南城县	香橙
S7~S9	九江市彭泽县	香橙
S10~S12	上饶市鄱阳县	臭橙
S13~S15	樟树市中洲镇	香橙
S16~S18	吉安市新干县	香橙

## 2 方法

### 2.1 UPLC 指纹图谱分析

**2.1.1 供试品溶液制备** 将江枳壳药材干燥、粉碎,粉末过三号筛,分别精密称取各药材粉末 0.1 g,加入甲醇 10 mL,静置 1 h,超声提取 30 min,取出,离心 10 min(1 万  $r \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心半径 10 cm),取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,即得。

**2.1.2 对照品溶液制备** 分别精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川橙皮素、桔皮素对照品适量,置于量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为 0.220、0.205、0.193、0.180、0.255  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.1.3 色谱条件** Agilent ZORBAX Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 10%~20%B; 5~7 min, 20%B; 7~13 min, 20%~22%B; 13~16 min, 22%~35%B; 16~25 min, 35%~55%B; 25~30 min, 55%~95%B; 30~32 min, 95%B; 32~32.1 min, 95%~10%B; 32.1~37 min, 10%B);流速 0.25  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.4 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),正离子模式扫描采集数据,扫描范围  $m/z$  50~1 500,离子喷雾电压 5 500 V,离子源温度 500  $^{\circ}\text{C}$ ,雾化气压力 344.75 kPa,气帘气压力 241.32 kPa,去簇电压 100 V,碰撞能量 35 eV,碰撞能量差 15 eV。

**2.1.5 数据采集及分析** 将 18 批江枳壳药材、对照品分别按 2.1.1 和 2.1.2 项下方法制备供试品溶液、对照品溶液,按照 2.1.3 和 2.1.4 项下色谱和质谱条件进行超高压液相色谱四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)分析,并记录色谱条件下测定的 UPLC 图。

将各色谱图导入“中国色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版),建立指纹图谱,确定共有峰。依据对照品溶液色谱图以及 UPLC-Q-TOF-MS 分析得到的样品正离子流色谱图,对共有峰成分进行鉴定。将共有峰峰面积导入 SIMCA-P 14.1 软件,进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),根据变量重要性投影(VIP)值 $>1$ ,筛选出组间样本的差异性化合物,作为江枳壳非挥发性成分 Q-Maker 候选化合物。

### 2.2 GC-MS 指纹图谱

**2.2.1 顶空进样条件** 分别精密称取江枳壳药材粉末 0.70 g,放入 20 mL 顶空瓶中,用密封钳压盖封口置于样品盘中。样品瓶加热温度 110  $^{\circ}\text{C}$ ,定量环温度 120  $^{\circ}\text{C}$ ,传输线温度 130  $^{\circ}\text{C}$ ,样品瓶加热时间 15 min。

**2.2.2 气相色谱条件** Agilent HP-5MS 柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ),进样口温度 280  $^{\circ}\text{C}$ ,载气为高纯氦气;体积流量 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,分流比 10:1,进样量 1  $\mu\text{L}$ ;程序升温条件为起始温度 45  $^{\circ}\text{C}$ ,以 5  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 110  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 1 min,以 10  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 230  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 1 min 后结束。

**2.2.3 质谱条件** 电子轰击离子源(EI),电子碰撞能量 70 eV;离子源温度 230  $^{\circ}\text{C}$ ,传输线温度 280  $^{\circ}\text{C}$ ,四级杆温度 150  $^{\circ}\text{C}$ ,溶剂延迟时间 3 min,全扫描模式,扫描范围  $m/z$  50~650。

**2.2.4 数据分析** 将 GC-MS 分析得到的总离子流色谱图导入《中国色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 版),建立指纹图谱,确定共有峰<sup>[19]</sup>。运用数据库 NIST17.L 鉴定江枳壳样品挥发油中共有峰的化学成分。将共有峰峰面积导入 SIMCA-P 14.1 软件,进行 PCA、OPLS-DA 分析,根据 VIP $>1$ ,筛选出组间样本的差异性化合物,作为江枳壳挥发性成分 Q-Maker 候选化合物。

### 2.3 网络药理学分析

**2.3.1 靶点信息的搜集** 通过检索数据库中中药系统药理学分析平台(TCMSP)<sup>[20]</sup>、Swisstargetprediction<sup>[21]</sup>,查找 Q-Marker 候选化合物的作用靶点,将两个数据库得到的靶点取交集,删去重复项。将结果导入 UnitProt 数据库<sup>[22]</sup>,限定物种为人,转换为统一的基因名。运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点网络,依据度(degree)值筛选出重要成分。

**2.3.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析** 将搜集到的靶点导入 STRING 11.5 数据库<sup>[23]</sup>,限定物

种为人,去掉网络中单一节点,其他参数不变,结果保存为 tsv 格式文件,在 Cytoscape 3.7.2 软件中打开并构建 PPI 网络。

**2.3.3 基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析** 运用 David 数据库对关键靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

**2.3.4 成分-靶点-通路网络构建** 将以上得出的重要成分、关键靶点、通路,运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点-通路网络,以 degree 值为参考,选出江枳壳的 Q-Marker、核心靶点、重要通路。

### 2.4 分子对接分析

**2.4.1 受体和配体结构的获取** 以 Q-Marker 为配体,在 Pubchem 数据库<sup>[24]</sup>中下载 3D 结构 sdf 格式文件,运用 Openbabel 3.1.1 转换格式;以核心靶点为受体,在 RSCB PDB 数据库中物种选择“人”,下载 3D 结构的 pdb 格式文件。

**2.4.2 分子对接及可视化** 运用 AutoDockTools 1.5.6 软件分别对受体和配体进行去水、加氢、加电荷处理,AutoDockvina 1.1.2 进行分子对接,得到配体与受体的结合能。PyMOL 2.4.0 软件进行分子对接可视化处理。

## 3 结果

### 3.1 UPLC 指纹图谱分析

**3.1.1 方法学考察** 参照文献<sup>[25]</sup>进行方法学考察,记录各色谱图,并计算各共有峰的相对峰面积相对标准差(RSD),结果均<3.0%,说明仪器精密度、方法重复性、供试品溶液在 24 h 内稳定性均良好。

**3.1.2 UPLC 指纹图谱的建立** 将 18 批江枳壳样品的 UPLC 色谱图导入“中国色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版),建立指纹图谱,得到 16 个共有峰,以 S1 为参照谱图,采用中位数法,时间窗宽度 0.1,进行多点校正和峰匹配后,生成对照指纹图谱 R,见图 1。以对照指纹图谱 R 为参照,计算各样品中共有峰相似度,见表 2。结果显示,各样品指纹图谱相似度均>0.990,表明 18 批江枳壳样品相似度较高,质量较为稳定,但各样品中同一色谱峰的峰面积不同,说明所含成分的含量存在一定差异。

**3.1.3 UPLC 主要共有峰的鉴定** 利用对照品对共有峰进行鉴定,确定了柚皮苷(峰 4)、橙皮苷(峰 5)、新橙皮苷(峰 6)、川陈皮素(峰 14)、桔皮素(峰 16),见图 2。

在正离子模式下江枳壳样品的 UPLC-Q-TOF/MS 总离子流图,见图 3。将指纹图谱匹配到的 16 个

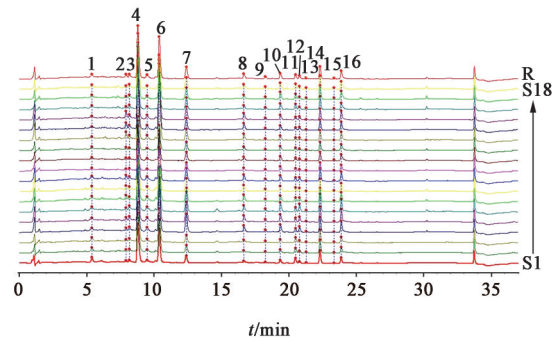


图 1 江枳壳样品的 UPLC 指纹谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of Jiangxi Aurantii Fructus samples

表 2 江枳壳样品相似度

Table 2 Similarity results of Jiangxi Aurantii Fructus samples

编号	相似度
S1	0.993
S2	0.996
S3	0.997
S4	0.997
S5	0.994
S6	0.991
S7	0.998
S8	0.998
S9	0.999
S10	0.993
S11	0.995
S12	0.996
S13	0.992
S14	0.995
S15	0.995
S16	0.995
S17	0.995
S18	0.995

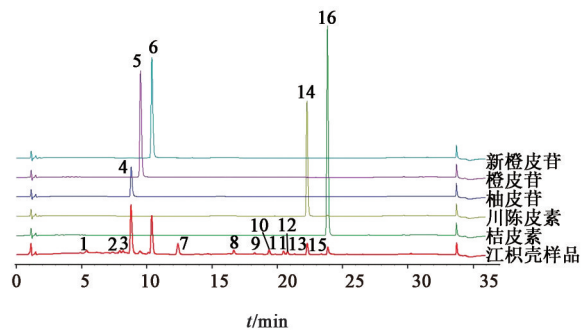


图 2 江枳壳样品与对照品的 UPLC 比对结果

Fig. 2 Comparison results of Jiangxi Aurantii Fructus sample and the reference substance by UPLC

共有峰,依据保留时间在总离子流图中找到对应的特征峰,并且根据一级和二级质谱数据以及参考文

献对其进行快速鉴定,共鉴定了其中13个共有峰可能代表的化学成分,鉴定结果见表3。

表3 江枳壳样品指纹图谱中共有成分的UPLC-Q-TOF/MS鉴定

Table 3 Identification results of common components in fingerprint of Jiangxi Aurantii Fructus by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	$t_R$ /min	化合物	分子式	$[M+H]^+$	主要离子碎片	参考文献
3	8.172	芸香柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	581.187 9	435.130 6, 273.077 5, 153.018 9, 147.065 4	[26]
4	8.773	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	581.187 9	435.128 6, 273.077 3, 153.018 4, 147.064 9	[26]
5	9.463	橙皮苷	$C_{28}H_{34}O_{15}$	611.198 7	465.141 7, 303.088 7, 153.018 9, 151.075 9	[26]
6	10.380	新橙皮苷	$C_{28}H_{34}O_{15}$	611.198 5	465.140 3, 303.088 4, 153.018 7, 151.075 7	[26]
7	12.360	橙皮内酯	$C_{15}H_{16}O_4$	261.113 4	243.102 6, 189.056 1, 159.044 9, 131.049 6	[26]
8	16.546	枸橼苷	$C_{28}H_{34}O_{14}$	595.203 7	449.147 0, 287.093 2, 153.018 6	[26]
10	19.412	异橙黄酮	$C_{20}H_{20}O_7$	373.129 4	358.105 7, 343.082 4, 315.087 6	[27]
11	20.392	异橙皮内酯	$C_{15}H_{16}O_4$	261.113 5	243.102 4, 189.055 6, 159.044 8, 131.049 6	[28]
12	20.800	5,6,7,4'-四甲氧基黄酮	$C_{19}H_{18}O_6$	343.119 1	328.095 4, 313.072 3, 285.076 8	[27]
13	21.155	柠檬苦素	$C_{26}H_{30}O_8$	471.202 7	453.192 3, 425.197 4, 161.060 2	[29]
14	22.286	川陈皮素	$C_{21}H_{22}O_8$	403.140 7	388.117 3, 373.094 2, 358.070 3, 355.083 1	[26]
15	23.318	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	$C_{22}H_{24}O_9$	433.150 7	418.127 5, 403.103 4, 385.093 0	[30]
16	23.876	桔皮素	$C_{20}H_{20}O_7$	373.129 5	358.105 7, 343.082 9, 325.071 9, 135.044 2	[27]

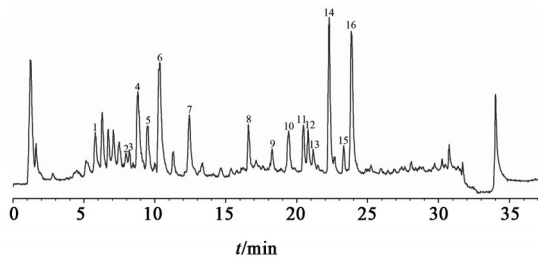


图3 江枳壳样品在正离子模式下的UPLC-Q-TOF/MS总离子流  
Fig. 3 Total ion chromatograms of Jiangxi Aurantii Fructus in positive ion mode of UPLC-Q-TOF/MS

**3.1.4 UPLC共有峰PCA** 将16个共有峰峰面积导入SIMCA-P 14.1软件,对样品进行主成分分析,得分图见图4,18批江枳壳样品被分为两类,S1~S3、S10~S12聚为一类,S4~S9、S12~S18聚为一类,说明江枳壳药材之间存在一定差异。

**3.1.5 UPLC共有峰OPLS-DA** 对18批江枳壳药材共有峰峰面积进行OPLS-DA分析,得分图见图5。结果显示,与PCA分析结果一致,分为两大类,江枳壳药材之间存在差异。VIP>1的变量为组间样本的主要差异变量,且VIP值越大,表明该成分对组间差异的贡献越大,结果见图5,VIP>1的色谱峰依次为峰6、4、7、3、14,根据对照品确认以及质谱鉴定,峰6为新橙皮苷、峰4为柚皮苷、峰7为橙皮内酯、峰3为芸香柚皮苷、峰14为川陈皮素。即江枳壳(挥发油除外)主要差异成分为新橙皮苷、柚皮苷、橙皮内酯、芸香柚皮苷、川陈皮素,将这5个成分

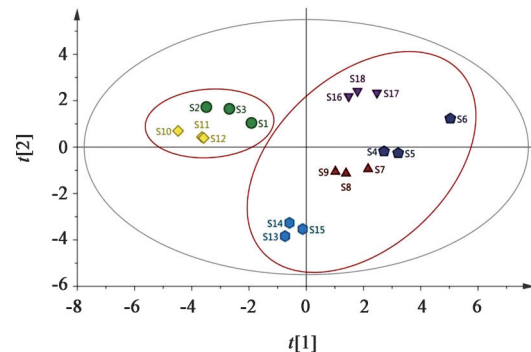
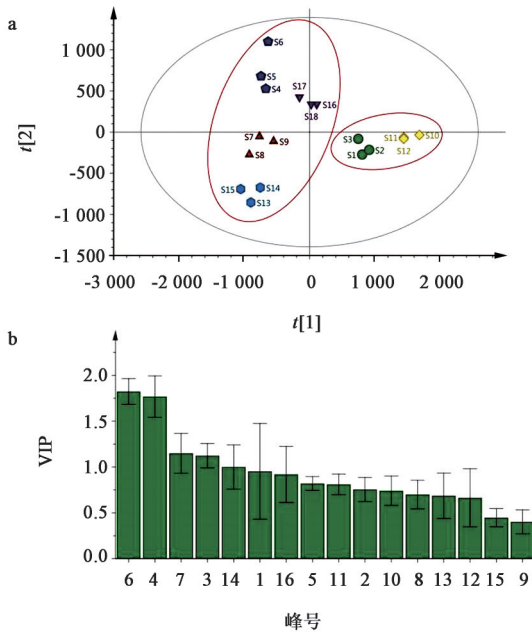


图4 江枳壳(非挥发性成分)PCA得分图  
Fig. 4 PCA score plot of Jiangxi Aurantii Fructus (non-volatile components)

作为江枳壳(挥发油)Q-Marker的候选成分。

### 3.2 GC-MS指纹图谱分析

**3.2.1 GC-MS指纹图谱的建立** 将18批江枳壳药材的GC-MS总离子流图导入“中国色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004版),建立指纹图谱,得到23个共有峰,以S1为参照谱图,采用中位数法,时间窗宽度0.1,进行多点校正和峰匹配后,生成对照指纹图谱R,见图6。以对照指纹图谱R为参照,计算各样品挥发油中共有峰相似度,见表4。结果显示,各样品挥发油指纹图谱相似度均>0.994,表明18批江枳壳样品挥发油相似度较高,质量较为稳定,但各样品挥发油中同一色谱峰的峰面积不同,说明所含成分的含量存在一定差异。



注: a. OPLS-DA得分; b. VIP值(图8同)

图5 江枳壳(非挥发性成分)OPLS-DA得分及VIP值  
Fig. 5 OPLS-DA score and VIP plot of Jiangxi Aurantii Fructus (non-volatile components)

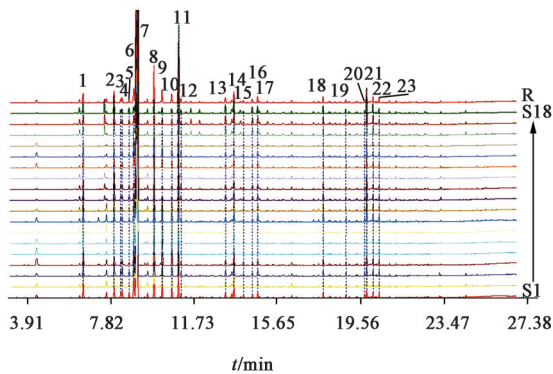


图6 江枳壳药材挥发油指纹谱  
Fig. 6 Fingerprint of Jiangxi Aurantii Fructus volatile oil

**3.2.2 GC-MS主要共有峰的鉴定** 将江枳壳药材GC-MS指纹图谱匹配到的23个共有峰,依据保留时间在GC-MS总离子流图中找到对应的特征峰,根据安捷伦7890A/5975C气相色谱质谱仪中数据库NIST17.L检索,分析得到16个共有峰可能代表的化学成分,鉴定结果见表5。

**3.2.3 GC-MS共有峰PCA** 将23个共有峰峰面积导入SIMCA-P 14.1软件,对样品进行主成分分析,得分图见图7,18批江枳壳样品被分为两类,S10~S12、S16~S18聚为一类,S1~S9、S13~S15聚为一类,说明江枳壳药材挥发油之间存在一定差异。

**3.2.4 GC-MS共有峰OPLS-DA** 对18批江枳壳药材GC-MS指纹图谱共有峰峰面积进行OPLS-DA分

表4 江枳壳药材挥发油相似度

Table 4 Similarity results of Jiangxi Aurantii Fructus volatile oil

样品	相似度
S1	0.998
S2	0.998
S3	0.998
S4	0.994
S5	0.996
S6	0.994
S7	0.996
S8	0.997
S9	0.994
S10	0.999
S11	0.999
S12	0.999
S13	1.000
S14	1.000
S15	1.000
S16	0.996
S17	0.996
S18	0.997

析,得分图见图8。结果显示,与PCA分析结果一致,分为两大类,江枳壳药材挥发油之间存在差异。VIP>1的变量为组间样本的主要差异变量,且VIP值越大,表明该成分对组间差异的贡献越大,结果见图8,其中VIP值>1的色谱峰依次为7、11、8、9,根据鉴定结果表5可知,峰7为D-柠檬烯、峰11为芳樟醇、峰8为γ-萜品烯、峰9为反-α,α-5-三甲基-5-乙基四氢化-2-咪喃甲醇。即江枳壳挥发油的主要差异成分为D-柠檬烯、芳樟醇、γ-萜品烯、反-α,α-5-三甲基-5-乙基四氢化-2-咪喃甲醇,将这4个成分作为江枳壳(挥发油)Q-Marker的候选成分。

### 3.3 网络药理学分析

**3.3.1 候选化合物靶点预测及成分-靶点网络的构建** 将以上指纹图谱筛选出的新橙皮苷、柚皮苷、橙皮内酯、芸香柚皮苷、川陈皮素、D-柠檬烯、芳樟醇、γ-萜品烯、反-α,α-5-三甲基-5-乙基四氢化-2-咪喃甲醇共9种成分作为Q-Marker的候选成分,通过检索TCMSP、SwissTargetPrediction数据库查找Q-Marker候选化合物的作用靶点,并用UnitProt数据库规范靶点基因名,得到与9个化合物相关的118个靶点。将化合物与靶点导入Cytoscape 3.7.2软件构建成分-靶点网络图,见增强出版附加材料

表5 江枳壳挥发油指纹图谱中共有成分鉴定

Table 5 Identification results of common components in fingerprint of Jiangxi Aurantii Fructus volatile oil

峰号	$t_R$ /min	化合物中文名称	化合物英文名称	分子式	CAS号	相对质量分数/%
2	7.982	$\beta$ -月桂烯	$\beta$ -myrcene	$C_{10}H_{16}$	123-35-3	1.52
3	8.297	正辛醛	octanal	$C_8H_{16}O$	124-13-0	0.64
5	8.685	$\alpha$ -萜品烯	$\alpha$ -terpinene	$C_{10}H_{16}$	99-86-5	0.75
6	8.906	邻-异丙基甲苯	o-cymene	$C_{10}H_{14}$	527-84-4	3.34
7	9.078	<i>D</i> -柠檬烯	<i>D</i> -limonene	$C_{10}H_{16}$	5989-27-5	66.64
8	9.859	$\gamma$ -萜品烯	$\gamma$ -terpinene	$C_{10}H_{16}$	99-85-4	6.32
9	10.24	反- $\alpha$ , $\alpha$ -5-三甲基-5-乙烯基四氢化-2-呋喃甲醇	trans-linalool oxide (furanoid)	$C_{10}H_{18}O_2$	34995-77-2	1.52
11	10.997	芳樟醇	linalool	$C_{10}H_{18}O$	78-70-6	3.63
13	13.209	4-萜烯醇	terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	562-74-3	0.71
14	13.606	( <i>R</i> )- $\alpha$ , $\alpha$ -4-三甲基-3-环己烯-1-甲醇	( <i>R</i> )- $\alpha$ , $\alpha$ ,4-trimethylcyclohex-3-ene-1-methanol	$C_{10}H_{18}O$	7785-53-7	1.67
15	14.048	癸醛	decanal	$C_{10}H_{20}O$	112-31-2	0.37
18	17.796	( <i>Z</i> )-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇乙酸酯	( <i>Z</i> )-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	141-12-8	0.45
19	18.857	石竹烯	caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	87-44-5	0.36
20	19.744	$\gamma$ -衣兰油烯	$\gamma$ -muurolene	$C_{15}H_{24}$	30021-74-0	0.28
22	20.135	$\alpha$ -法尼烯	$\alpha$ -farnesene	$C_{15}H_{24}$	502-61-4	0.42
23	20.421	$\Delta$ -杜松烯	(+)-delta-cadinene	$C_{15}H_{24}$	483-76-1	0.50

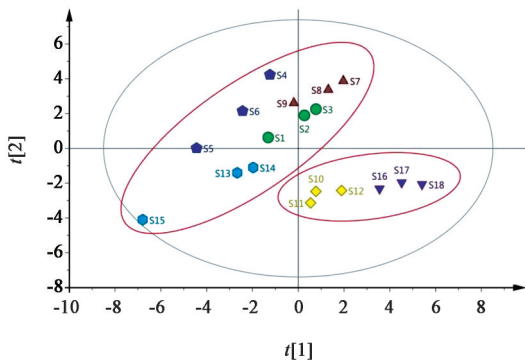


图7 江枳壳挥发油 PCA 得分

Fig. 7 PCA score of Jiangxi Aurantii Fructus volatile oil

(V形节点代表化合物,圆形节点代表靶点,节点大小和颜色深浅代表度值大小);其中化合物川陈皮素(nobiletin)、柚皮苷(naringin)、新橙皮苷(neohesperidin)、芸香柚皮苷(narirutin)、橙皮内酯(meranzin)、*D*-柠檬烯(*D*-limonene)的degree值分别为47、33、32、24、18、15,这6个成分对应的靶点更多,影响更大,作为江枳壳的重要成分。

**3.3.2 PPI网络分析** 将118个靶点导入STRING数据库,将结果保存为tsv格式文件导入Cytoscape 3.7.2软件构建PPI网络,见增强出版附加材料(degree值越大,节点越大,颜色越深);以degree值>2倍中位数筛选关键靶点,得到23个关键靶点,分别

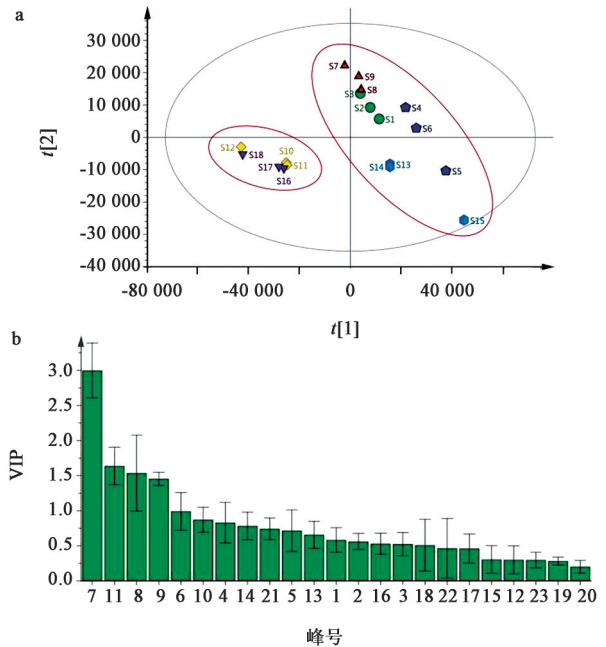


图8 江枳壳挥发油 OPLS-DA 得分图及VIP值

Fig. 8 OPLS-DA score and VIP plot of Jiangxi Aurantii Fructus volatile oil

为P-糖蛋白1(按同源性)[ABC1, degree 20]、糖皮质激素受体(NR3C1, degree 23)、细胞肿瘤抗原p53(TP53, degree 54)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9, degree 20)、热休克蛋白HSP90 $\alpha$ (HSP90AA1, degree 37)、

前列腺素G/H合酶2(PTGS2, degree 39)、转录因子AP-1(JUN, degree 45)、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8, degree 24)、肿瘤坏死因子(TNF, degree 52)、雌激素受体(ESR1, degree 45)、转化蛋白p21/H-Ras-1(HRAS, degree 40)、雄激素受体(AR, degree 31)、孕激素受体(PGR, degree 27)、糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK3B, degree 26)、环腺苷酸反应元件结合蛋白1(CREB1, degree 37)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPARG, degree 37)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPARA, degree 27)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9, degree 36)、细胞分裂蛋白激酶2(CDK2, degree 25)、cAMP依赖性蛋白激酶催化亚基 $\alpha$ (PRKACA, degree 20)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(CDKN1A, degree 24)、细胞色素P450 19A1(CYP19A1, degree 20)、雌激素受体 $\beta$ (ESR2, degree 19)。

**3.3.3 GO与KEGG富集分析** 利用DAVID数据库对23个关键靶点进行GO和KEGG通路富集分析,两者均以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。GO富集分析共获得158个条目,其中生物过程(BP)107个,细胞组分(CC)12个,分子功能(MF)39个;KEGG富集分析共获得74条通路。以 $P < 0.05$ 及伪发现率(FDR)  $< 0.05$ 对GO条目和KEGG通路进行筛选,选取前20个进行可视化分析。

GO分析结果为BP主要富集在RNA聚合酶II启动子转录的正调控、转录的正调控、信号转导、RNA聚合酶II启动子的转录起始、对药物的反应、基因表达的负调控、细胞增殖的负调控、Ras蛋白信号转导、有丝分裂细胞周期的G<sub>2</sub>/M转换等方面;CC主要富集在核、核质、胞质溶胶、蛋白质复合物、核染色质;MF主要富集在蛋白质结合、酶结合、序列特异性DNA结合、转录因子活性等。KEGG富集到癌症的途径、前列腺癌、乙型肝炎、雌激素信号通路、丙型肝炎、HTLV-I感染等通路。见增强出版附加材料。

**3.3.4 成分-靶点-通路网络构建** 运用Cytoscape 3.7.2软件将6个重要成分、23个关键靶点、63条通路构建成成分-靶点-通路网络图(黄色V形节点代表化学成分、红色圆形节点代表关键靶点、蓝色正六边形节点代表通路)。见增强出版附加材料。

以各节点之间连接的degree值为参考,川陈皮素(nobiletin, degree 14)、新橙皮苷(neohesperidin, degree 6)、橙皮内酯(meranzin, degree 6)、柚皮苷(naringin, degree 3)、D-柠檬烯(D-limonene, degree

3)连接度较高,所以将川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯作为江枳壳的Q-Marker;靶点HRAS(degree 35)、TP53(degree 33)、MAPK8(degree 31)、JUN(degree 27)、GSK3B(degree 24)、TNF(degree 23)、CDKN1A(degree 21)、PRKACA(degree 20)、Caspase-9(degree 18)、CREB1(degree 18)的连接度较高,说明这10个靶点的作用尤为重要,可以作为核心靶点;通路癌症的途径(degree 14)、乙型肝炎(degree 10)、前列腺癌(degree 9)、雌激素信号通路(degree 8)、HTLV-I感染(degree 8)、PI3K/Akt信号通路(degree 8)连接度较高,为重要通路。

### 3.4 分子对接分析

**3.4.1 分子对接及可视化** 以Q-Marker川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯为配体,在PubChem数据库<sup>[24]</sup>中下载3D结构sdf格式文件;以核心靶点HRAS、TP53、MAPK8、JUN、GSK3B、TNF、CDKN1A、PRKACA、Caspase-9、CREB1为受体,在RSCB PDB数据库中物种选择“人”,下载3D结构的pdb格式文件。

运用AutoDockTools 1.5.6软件分别对受体和配体进行去水、加氢、加电荷处理,AutoDockvina 1.1.2进行分子对接,得到配体与受体的结合能。一般认为,结合能 $< 0$ ,说明配体分子与受体蛋白能自发结合, $< -4.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ( $1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$ )时,表明配体与受体有较强的结合能力,且值越小表示结合能力越强,配体越容易与受体结合<sup>[31-32]</sup>。江枳壳Q-Marker与核心靶点分子对接结果,得分 $\leq -4.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的成分占98%,对接得分 $> -4.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的成分占2%,见表6。因此,本研究中江枳壳Q-Marker与靶点之间有较强的结合能力。以结合能较高的3组靶蛋白为例,①PRKACA与Q-Marker的结合能力:柚皮苷 $>$ 新橙皮苷 $>$ 川陈皮素 $>$ D-柠檬烯 $>$ 橙皮内酯;②GSK3B与Q-Marker的结合能力:柚皮苷 $>$ 新橙皮苷 $>$ 橙皮内酯 $>$ 川陈皮素 $>$ D-柠檬烯;③HRAS与Q-Marker的结合能力:柚皮苷 $>$ 新橙皮苷 $>$ 川陈皮素 $>$ 橙皮内酯 $>$ D-柠檬烯。由表6可知,柚皮苷、新橙皮苷与靶点蛋白的结合能力最强,其次是川陈皮素、橙皮内酯、D-柠檬烯。根据受体与配体结合能力和化合物结构多样性,选取柚皮苷、新橙皮苷与靶点PRKACA、GSK3B、HRAS、Caspase-9进行分子对接可视化处理,见增强出版附加材料。

**3.4.2 Q-Marker有效性佐证** 核心靶点HRAS为转化蛋白p21/H-Ras-1,是胃癌通路的靶点之一<sup>[33]</sup>。

表6 江枳壳Q-Marker与核心靶点分子对接

Table 6 Molecular docking results of Q-Marker and core target protein of Jiangxi Aurantii Fructus

化合物	结合能/kcal·mol <sup>-1</sup>									
	HRAS	TP53	MAPK8	JUN	GSK3B	TNF	CDKN1A	PRKACA	Caspase-9	CREB1
川陈皮素	-7.7	-5.1	-5.5	-5.2	-6.5	-6.0	-4.7	-7.8	-6.1	-5.5
新橙皮苷	-8.5	-5.6	-6.8	-5.7	-8.8	-7.6	-6.3	-9.6	-7.9	-6.2
橙皮内酯	-6.8	-5.5	-5.6	-4.8	-7.2	-5.7	-4.5	-7.1	-5.9	-4.7
柚皮苷	-8.8	-5.8	-6.5	-5.8	-9.1	-7.7	-5.7	-9.7	-7.9	-7.0
D-柠檬烯	-5.6	-4.6	-4.8	-3.8	-5.7	-4.2	-4.1	-7.3	-5.2	-4.2

TP53为细胞肿瘤抗原p53,通过调节凋亡、细胞生长,影响肿瘤血管的生成等过程发挥抗癌的作用,并在基因组稳定性中起作用<sup>[34]</sup>。MAPK8参与细胞各种过程,如增殖、分化、迁移及程序性细胞死亡,且已被证实在行为、学习和记忆等方面起到关键调节作用<sup>[35]</sup>。JUN为转录因子AP-1,张景霞等<sup>[36]</sup>运用网络药理学方法和分子对接技术推测MAPK8、JUN、TNF是抗抑郁的关键靶点。GSK3B除了参与葡萄糖代谢外,还参与关键的细胞内信号通路的调节,包括细胞周期、基因表达和凋亡<sup>[37]</sup>;GSK3B活性增加是抑郁症和双相情感障碍患者主要情感发作的状态标志<sup>[38]</sup>。TNF为肿瘤坏死因子,是巨噬细胞/单核细胞在急性炎症期间产生的一种炎症细胞因子,负责细胞内多种信号事件,导致坏死或凋亡。对于抵抗感染和癌症很重要<sup>[39]</sup>。CDKN1A是一种参与胃癌发生的肿瘤抑制基因,是基于组蛋白去乙酰化酶抑制剂治疗的潜在靶点<sup>[40]</sup>。PRKACA是为了应对由多种激素和神经递质引起的G蛋白偶联受体激活而产生的<sup>[41]</sup>;有研究证明,PRKACA在多种癌症的发生、发展中起到重要作用<sup>[42]</sup>。Caspase-9广泛表达于人类的正常组织,如神经组织、肝脏、胃和肺等,且参与线粒体介导的凋亡途径<sup>[43]</sup>。CREB1与双相II型障碍有关<sup>[44]</sup>。核心靶点相应的作用,与江枳壳Q-Marker促进胃肠动力、抗抑郁、抗炎、抗肿瘤等相关。

#### 4 讨论

通过UPLC指纹图谱、GC-MS指纹图谱及化学计量学分析,找到9个江枳壳Q-Marker的候选成分,并运用网络药理学预测了5个Q-Marker,分别为川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯。川陈皮素能显著降低肺肿瘤的发生<sup>[45]</sup>,并且对抑郁症有较强的药理作用<sup>[46]</sup>;新橙皮苷能调节胃肠运动<sup>[47]</sup>、抗抑郁<sup>[46]</sup>;橙皮内酯对调节胃肠运动的乙酰胆碱酯酶有明显抑制作用<sup>[47]</sup>;柚皮苷能发挥抗抑

郁<sup>[46]</sup>、降血脂<sup>[48]</sup>、肝脏保护<sup>[49]</sup>的作用;D-柠檬烯有很好的促进胃肠动力的作用<sup>[50]</sup>,同时还具有一定的祛痰、镇咳、抗菌、溶石等作用<sup>[51]</sup>。

核心靶点HRAS、TP53、MAPK8、JUN、GSK3B、TNF、CDKN1A、PRKACA、Caspase-9、CREB1与江枳壳Q-Marker促进胃肠动力、抗抑郁、抗炎、抗肿瘤等相关。最主要的通路癌症的途径与Q-Marker抗肿瘤有关。基因本体富集分析中生物过程主要涉及RNA聚合酶II启动子转录的正调控、信号转导等;细胞组成主要为核、核质等;分子功能主要涉及蛋白质结合、酶结合等。分子对接验证了Q-Marker与核心靶点有较好的结合能力,理论上证实了Q-Marker较好的生物活性。

当前中药质量常常以单个成分来评价,缺少多指标成分评价,本文从挥发性和非挥发性物质两方面着手,全面预测了江枳壳Q-Marker为川陈皮素、新橙皮苷、橙皮内酯、柚皮苷、D-柠檬烯,同时分析了Q-Marker的作用机制,并从理论上验证了Q-Marker的生物活性,为江枳壳质量评价奠定了基础。后续仍需通过药效实验进行验证,以进一步确定本研究预测结果的准确性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:257.
- [2] 滕建业. 枳壳促进胃动力化学物质组的筛选及作用机理研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [3] WU M, ZHANG H, ZHOU C, et al. Identification of the chemical constituents in aqueous extract of Zhi-Qiao and evaluation of its antidepressant effect [J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6925-6940.
- [4] 施学骄,张杰红,樊丹青,等. 枳实、枳壳挥发油化学成分及抑菌活性的比较研究[J]. *中药与临床*, 2012, 3(2): 25-27, 31.
- [5] 李顺文,吴琦,赵诗云,等. 枳壳总黄酮降血脂作用的

- 实验研究[J]. 实用中西医结合临床, 2013, 13(3): 91, 94.
- [6] 何英杰, 谢红旗, 伍睿宇, 等. HPLC-DPPH快速测定枳壳抗氧化活性成分[J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1131-1135.
- [7] YEN J H, LIN C Y, CHUANG C H, et al. Nobiletin promotes megakaryocytic differentiation through the MAPK/ERK-dependent EGR1 expression and exerts anti-leukemic effects in human chronic myeloid leukemia (CML) K562 cells [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 877.
- [8] 李桃园, 王昕, 赵旋, 等. 柚皮素对四氯化碳致小鼠化学性肝损伤中氧化应激介质生成影响的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(6): 420-423.
- [9] 陈欢, 高萌, 罗小泉, 等. 不同产地枳壳药材中12种有效成分的主成分分析和判别分析[J]. 中草药, 2019, 50(14): 3433-3437.
- [10] 陈欢. 江枳壳道地性的研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [11] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [12] 杨阳. 利用网络药理学方法探讨连夏宁心方治疗冠心病痰热证药理学机制的临床与基础研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [13] 王强, 刘敏莹, 韩隆胤, 等. 基于网络药理学探讨断藤益母汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 150-158.
- [14] 孙媛, 王璐, 彭梅梅, 等. 甘草不同炮制品的指纹图谱研究及质量标志物预测分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5209-5218.
- [15] 梅茜, 夏金鑫, 郭爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [16] 李媚, 陈盛君, 王协和, 等. 广藿香UPLC指纹图谱研究及基于网络药理学的广藿香潜在质量标志物预测[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2665-2677.
- [17] 柳小莉, 黄小英, 张小飞, 等. 基于GC-MS成分分析结合网络药理学预测当归挥发油质量标志物(Q-Marker)[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2696-2706.
- [18] 朱丽云, 柳小莉, 郑琴, 等. 陈皮挥发油质量标志物预测及GC-MS定量分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6403-6409.
- [19] 高家菊, 梅佳华, 普娟, 等. 不同产地苍艾挥发油的GC-MS指纹图谱研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021: 1-7.
- [20] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [21] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [22] UNIPROT C T. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2699.
- [23] VON MERING C, HUYNEN M, JAEGGI D, et al. STRING: A database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [24] KIM S, SHOEMAKER B A, BOLTON E E, et al. Finding potential multitarget ligands using PubChem [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1825: 63-91.
- [25] 李灿, 曾娟, 龙雨青, 等. HPLC指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价枳壳药材质量[J]. 天然产物研究与开发, 2022, doi: 51.1335.q.20220125.0856.002.
- [26] 祝婧, 袁恩, 牟俊雍, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS分析江西特色炮制工艺对枳壳化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 142-153.
- [27] HE Y, LI Z, WANG W, et al. Chemical profiles and simultaneous quantification of aurantii fructus by use of HPLC-Q-TOF-MS combined with GC-MS and HPLC methods [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2189.
- [28] LI P L, LIU M H, HU J H, et al. Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* 'Tomentosa' by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90: 167-179.
- [29] LIU W, ZHOU C, YAN C, et al. Characterization and simultaneous quantification of multiple constituents in *Aurantii Fructus immaturus* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(6): 456-463.
- [30] 张栋健, 李薇, 何庆文, 等. UHPLC-Q-TOF-MS分析枳壳炮制前后成分变化[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2070-2080.
- [31] 陈佳, 李伟, 刘征, 等. 基于GEO数据库的DPN相关靶点挖掘及与芍药苷分子对接研究[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4): 514-518.
- [32] 陈康, 金晨, 程玉瑶, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨鸡血藤治疗肺癌的分子作用机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 837-844.
- [33] WANG Y, CHU F, LIN J, et al. Erianin, the main active ingredient of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl,

- inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and *in vitro* experimental verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114399.
- [34] 黄秀芳, 庾国桢, 童晶晶. 基于网络药理学分析陈皮的药理作用机制[J]. *中成药*, 2019, 41(12): 3038-3045.
- [35] 王金梦, 杨玉, 刘星玥, 等. 基于信号通路的中药抗抑郁作用机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 115-118.
- [36] 张景霞, 赵重博, 李凡, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的白芍治疗抑郁症作用机制探讨[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(9): 1582-1589.
- [37] GRIMES C A, JOPE R S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65(4): 391-426.
- [38] DINIZ B S, TALIB L L, JOAQUIM H P, et al. Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: marker of depressive episode severity and cognitive impairment? [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2011, 12(3): 216-222.
- [39] IDRIS H T, NAISMITH J H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s)[J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(3): 184-195.
- [40] WISNIESKI F, CALCAGNO D Q, LEAL M F, et al. CDKN1A histone acetylation and gene expression relationship in gastric adenocarcinomas [J]. *Clin Exp Med*, 2017, 17(1): 121-129.
- [41] CALEBIRO D, BATHON K, WEIGAND I. Mechanisms of aberrant PKA activation by C $\alpha$  subunit mutations [J]. *Horm Metab Res*, 2017, 49(4): 307-314.
- [42] DINH T A, JEWELL M L, KANKE M, et al. MicroRNA-375 suppresses the growth and invasion of fibrolamellar carcinoma [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(4): 803-817.
- [43] 刘向芳, 王璐, 陈洁, 等. 基于网络药理学探讨猫爪草治疗肺结核的作用机制[J]. *大理大学学报*, 2021, 6(2): 39-45.
- [44] 施波, 陈建民, 赵俊雄, 等. CREB1基因与抑郁症和双相II型障碍的关联研究[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2021, 41(10): 1303-1307.
- [45] SUN Y, HAN Y, SONG M, et al. Inhibitory effects of nobiletin and its major metabolites on lung tumorigenesis [J]. *Food Funct*, 2019, 10(11): 7444-7452.
- [46] ZHANG X, HAN L, LIU J, et al. Pharmacokinetic study of 7 compounds following oral administration of Fructus Aurantii to depressive rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 131.
- [47] WANG Y K, ZHOU Z M, DAI M Y, et al. Discovery and validation of quality markers of Fructus Aurantii against acetylcholinesterase using metabolomics and bioactivity assays [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(11): 2189-2205.
- [48] 周燕文, 时雪峰. 柚皮苷对实验性2型糖尿病大鼠的作用研究[J]. *中国药师*, 2012, 15(4): 471-474.
- [49] AKAMO A J, ROTIMI S O, AKINLOYE D I, et al. Naringin prevents cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats by attenuating oxidative stress, fibrosis, and inflammation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112266.
- [50] 郑莹, 王帅, 孟宪生, 等. 中药枳壳挥发油成分气相色谱-质谱联用分析和促进胃肠动力药效研究[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(3): 516-518.
- [51] 何英杰. 湘枳壳有效成分指纹图谱构建及活性分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.

[责任编辑 顾雪竹]