

# 川芎的抗炎物质筛选及其作用机制分析

马宁宁<sup>1</sup>, 范姗姗<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 杨珍<sup>1</sup>, 林梦雅<sup>1</sup>, 王昊<sup>1</sup>, 姜民<sup>2</sup>,  
张艳军<sup>1</sup>, 庄朋伟<sup>1</sup>, 宋丽丽<sup>1\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 南开大学, 天津 300071)

**[摘要]** 目的:研究川芎不同提取物 UPLC 指纹图谱与其抗炎药效之间的谱效关系,确定川芎的活性成分群,初步阐述其网络调控机制。方法:采用 UPLC-Q-TOF/MS 对川芎 8 组提取物的成分进行分析,以人支气管上皮细胞为研究对象,考察川芎不同提取物的抗炎作用。联用灰色关联分析(GRA)和偏最小二乘回归分析(PLSR)2 种方法建立其谱效关系;运用分子对接技术预测川芎有效成分的作用靶点,并利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)对其进行通路分析,阐释川芎的抗炎作用机制。结果:川芎的 95% 乙醇提取物,75% 乙醇提取物,50% 乙醇提取物,25% 乙醇提取物,结晶,石油醚萃取物和三氯甲烷萃取物对炎症细胞均具有抗炎的作用,其中川芎 95% 乙醇提取物的抗炎效果最为显著。确定了 3 种具有抗炎药效的成分(洋川芎内酯 A,Z-藁本内酯和新蛇床内酯);Z-藁本内酯可能通过环氧合酶-2(COX-2),细胞外调节蛋白激酶 2(ERK2),蛋白激酶 C(PKC),Janus 激酶 1(JAK1),JAK2,JAK3,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制蛋白激酶  $\beta$ (IKK $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )阻碍炎症信号传递,影响下游蛋白的表达,发挥抗炎作用;洋川芎内酯 A 和新蛇床内酯可能通过 COX-2,ERK2,PKC,磷酸酰肌醇 3-激酶  $\alpha$ (PI3K- $\alpha$ ),PI3K- $\gamma$ ,JAK1,JAK2,JAK3,IKK $\beta$ ,TNF- $\alpha$  阻碍炎症信号传递,影响下游蛋白的表达,发挥抗炎作用。结论:川芎中 3 种具有抗炎药效的成分为洋川芎内酯 A,Z-藁本内酯和新蛇床内酯,通过不同的靶点阻碍炎症的信号传递,影响下游蛋白的表达,从而发挥抗炎作用,揭示了川芎抗炎的主要活性成分、靶点及作用机制,为深入探讨其药理学作用提供了参考。

**[关键词]** 川芎; 抗炎; 谱效关系; 分子对接技术; 蛋白通路; 指纹图谱; 提取物

**[中图分类号]** R22;R282;R284;R945;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0140-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20181701

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1141.009.html>

**[网络出版时间]** 2018-06-14 15:47

## Screening of Anti-inflammatory Substances of Chuanxiong Rhizoma and Analysis of Its Mechanism

MA Ning-ning<sup>1</sup>, FAN Shan-shan<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, YANG Zhen<sup>1</sup>, LIN Meng-ya<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>,  
JIANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Yan-jun<sup>1</sup>, ZHUANG Peng-wei<sup>1</sup>, SONG Li-li<sup>1\*</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Nankai University, Tianjin 300071, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the spectrum-effect relationship between UPLC fingerprint and anti-inflammatory of different extracts of Chuanxiong Rhizoma, in order to determine the active ingredients of this herb and describe its network regulatory mechanism. **Method:** UPLC-Q-TOF/MS was used to analyze the components in 8 different extracts of Chuanxiong Rhizoma. The anti-inflammatory effect of extracts was investigated by human bronchial epithelial cells. The spectrum-effect relationship was established by grey correlation analysis (GRA) and partial least squares regression analysis (PLSR). Molecular docking technology was adopted to predict the targets of active components in Chuanxiong Rhizoma, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

**[收稿日期]** 20180307(014)

**[基金项目]** 天津市教委科研计划项目(2017KJ153)

**[第一作者]** 马宁宁,在读硕士,从事中药分析方面研究,E-mail:mningning646594@163.com

**[通信作者]** \*宋丽丽,博士,实验师,从事中药分析与代谢组学研究,E-mail:sl0204@163.com

database was employed to analyze the pathways in order to explain the anti-inflammatory mechanism of this herb. **Result:** The 95% ethanol extract, 75% ethanol extract, 50% ethanol extract, 25% ethanol extract, crystal, ligarine extract and chloroform extract all had anti-inflammatory effect on inflammatory cells, and 95% ethanol extract of Chuanxiong Rhizoma was the strongest. Three anti-inflammatory components were senkyunolide A, *Z*-ligustilide and neocnidilide. *Z*-ligustilide may inhibit the expression of downstream proteins by inhibiting the signal transduction to play anti-inflammatory effect through cyclooxygenase-2 (COX-2), extracellular regulated protein kinase 2 (ERK2), protein kinase C (PKC), Janus kinase 1 (JAK1), JAK2, JAK3, nuclear transcription factor- $\kappa$ B inhibitory protein kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); but signal channels of senkyunolide A and neocnidilide were COX-2, ERK2, PKC, phosphatidylinositol 3-kinase- $\alpha$  (PI3K- $\alpha$ ), PI3K- $\gamma$ , JAK1, JAK2, JAK3, IKK $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Conclusion:** Senkyunolide A, *Z*-ligustilide and neocnidilide are active components with anti-inflammatory effect in Chuanxiong Rhizoma. They may inhibit the expression of downstream proteins by inhibiting the signal transduction to play anti-inflammatory effect through different targets, which reveals the main active components, targets and mechanism of Chuanxiong Rhizoma and provides a reference for further study of its pharmacological role.

[**Key words**] Chuanxiong Rhizoma; anti-inflammatory; spectrum-effect relationship; molecular docking technique; protein pathways; fingerprints; extract

川芎具有活血行气、祛风止痛的功效,用于治疗胸痹心痛、月经不调、风湿痹痛等<sup>[1]</sup>。现代药理表明其具有抗炎作用<sup>[2]</sup>,但是关于其抗炎的药效成分及作用机制尚未见报道。中药谱效关系学是现代研究中药的一种非常重要的方法,能够很好地将中药化学成分指纹图谱与药效结合起来,建立“谱”与“效”之间的关系<sup>[3-5]</sup>;目前,该方法在中药药效物质基础研究中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。本实验拟建立川芎不同提取物的指纹图谱并进行抗炎活性评价,使用灰色关联分析和偏最小二乘回归分析 2 种方法建立川芎药效与指纹图谱之间的谱效关系,进而确定川芎的抗炎活性成分。

分子对接技术是根据锁钥原理及诱导契合原理,通过化学计量学方法模拟分子的几何结构和分子间作用力,根据空间匹配和能量匹配来预测分子间相互作用的方法,是发现和确认药物靶点快捷有效的新途径<sup>[7]</sup>。本实验拟采用分子对接技术,将川芎中具有抗炎活性的化合物与抗炎的相关靶点进行对接,预测并分析川芎抗炎的作用靶标、效应机制,为进一步探讨该药材的抗炎作用并阐释其作用机制提供参考。

## 1 材料

SYNAPT G2-Si 型质谱仪和 ACQUITY UPLC I-Class 型超高效液相色谱-Xevo G2 型 Q-TOF 质谱联用仪(美国 Waters 公司),FA2004N 型 1/1 万电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),HVE-50 型高压灭菌器(日本 Hirayama 公司),

ROTINA 380 型离心机(德国 Hettich 公司),3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司),Modulus 型荧光检测仪(美国 Turner Design 公司),iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),IX73 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

川芎药材购于上海华宇药业有限公司山东药源基地,经天津中医药大学中药鉴定学教研室李天祥教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎;阿魏酸和 *Z*-藁本内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110773-201614, 111737-201608,纯度分别为 99.0% 和 98.0%),洋川芎内酯 A 和新蛇床内酯对照品(自制,纯度均 > 98%),人源肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ (美国 PeproTech 公司,批号 900-M54),二甲基亚砜、地塞米松(美国 Sigma 公司,批号分别为 D5879, H37921967);DMEM/F12 培养基,转染试剂聚乙烯亚胺(PEI),双抗(氨苄青霉素、链霉素,100 $\times$ ),磷酸盐缓冲液(PBS),Hanks 液,胎牛血清(FBS),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 PM17FEB011, MKBF2634, 15140-122, 10010-023, 14065-056, 10099-141, 25200-056);双荧光素酶报告基因试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000170721);酵母浸出粉、胰蛋白胨、琼脂粉(北京鼎国生物工程公司,批号分别为 021100, e138916, A8190),酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海西唐生物有限公司,批号 69-22823),人支气管上皮 BEAS-2B 细胞(中国科学院生命科学院化学与细胞生物学研究所,批号 CP-H009)。

## 2 方法与结果

### 2.1 川芎提取物 UPLC-Q-TOF/MS 指纹图谱的建立

**2.1.1 川芎有效成分的提取** 取川芎药材粉末(过四号筛,下同)5份,每份10g。分别用95%乙醇,75%乙醇,50%乙醇,25%乙醇和水加热回流提取2次,滤过,合并滤液,减压浓缩,得相应提取物,依次记为S1~S5。另取药材粉末50g,加95%乙醇按上法提取,静置24h后析出结晶,得S6。95%乙醇提取物分别用石油醚、三氯甲烷萃取,萃取液减压浓缩得供试品,分别记为S7和S8。共得到8个组分。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 分别称取S1~S8适量,加50%乙醇制成生药质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的供试品溶液,超声(功率100W,频率40kHz)30min,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 精密称取洋川芎内酯A,Z-藁本内酯,新蛇床内酯和阿魏酸对照品各10.0mg,分别置于不同的10mL量瓶中,加甲醇

定容至刻度,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.1.4 色谱条件** ACQUITY UPLC HSS T3  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~6min,1%~50%B;6~12min,50%~60%B;12~17min,60%~85%B;17~20min,85%~1%B),柱温 $35\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量 $3\text{ }\mu\text{L}$ ,流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.1.5 质谱条件** 采用正、负离子模式,电喷雾离子源(ESI),离子源温度 $110\text{ }^\circ\text{C}$ ,毛细管电压2kV,脱溶剂气温度 $500\text{ }^\circ\text{C}$ ,脱溶剂气流量 $700\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,锥孔气流速 $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。相对分子质量记录范围 $m/z$  50~1500。

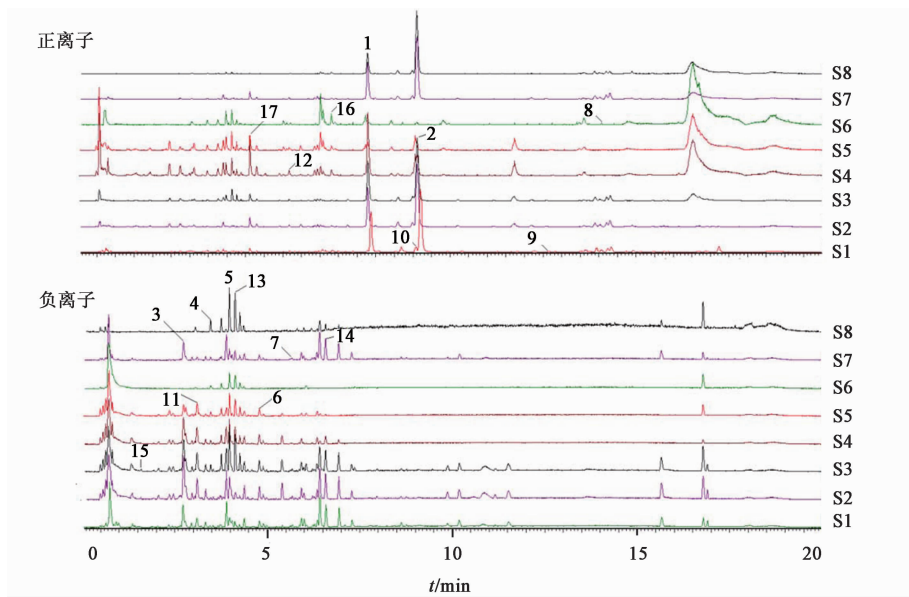
**2.1.6 UPLC 色谱峰的归属** 通过MassLynx 4.1工作站得到川芎8个不同溶剂提取物的正、负离子2种模式的UPLC叠加图。结果确定了26个色谱峰是为特征峰,其中共有峰有6个。而后对这26个特征峰进行定性分析,结合对照品和文献信息共鉴定出了17种化合物。见表1和图1。

表1 川芎提取物 UPLC-Q-TOF/MS 特征峰的指认

Table 1 Identification of characteristic peaks of Chuanxiong Rhizoma extracts by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	$t_R/\text{min}$	$\frac{[M+H]^+}{[M-H]^-}$ 理论值	$\frac{[M+H]^+}{[M-H]^-}$ 实测值	二级碎片离子	化学式	化合物
1 <sup>1)</sup>	7.87	193.1229	193.1257	175,147,137,119	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$	洋川芎内酯A
2 <sup>1)</sup>	9.20	191.1072	191.1083	173,145,135,117	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	Z-藁本内酯
3 <sup>2)</sup>	2.72	353.0873	353.0883	191,179,135	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	绿原酸 <sup>[8]</sup>
4 <sup>2)</sup>	3.33	367.1029	367.1041	235,191,145	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	3-O-阿魏酰奎宁酸 <sup>[9]</sup>
5 <sup>1)</sup>	3.90	193.0501	193.0500	178,149,134	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	阿魏酸
6 <sup>2)</sup>	4.80	207.1021	207.1031	189,171,161	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	洋川芎内酯F <sup>[10]</sup>
7 <sup>2)</sup>	5.68	189.0916	189.0928	184,171,161	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	E-丁烯苯酐或Z-丁烯苯酐 <sup>[8,11]</sup>
8 <sup>2)</sup>	14.08	381.2066	381.2078	335,191,149	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	藁本内酯二聚体或欧当归内酯A <sup>[8,12]</sup>
9 <sup>2)</sup>	12.56	383.2222	383.2233	355,191	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_4$	洋川芎内酯P <sup>[8]</sup>
10 <sup>1)</sup>	9.08	195.1385	195.1395	177,149	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$	新蛇床内酯
11 <sup>2)</sup>	3.10	167.0344	167.0353	137,124,123	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	香荚兰酸 <sup>[8]</sup>
12 <sup>2)</sup>	5.96	355.1182	355.1166	193,178,149,134	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$	阿魏酸松柏酯 <sup>[13]</sup>
13 <sup>2)</sup>	3.99	515.1190	515.1179	353,335,191,161	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	3,5-二咖啡酰奎宁酸 <sup>[14]</sup>
14 <sup>2)</sup>	6.58	205.0865	205.0884	161,116	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	4-羟基-3-丁基苯酐 <sup>[11-12]</sup>
15 <sup>2)</sup>	1.59	153.0344	153.0371	111,109	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	原儿茶酸 <sup>[10]</sup>
16 <sup>2)</sup>	6.74	223.0970	223.0671	203,159,119	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$	4,7-二羟基-3-丁基苯酐 <sup>[15]</sup>
17 <sup>2)</sup>	4.56	205.0865	205.0610	203,159,117	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$	洋川芎内酯B <sup>[16]</sup>

注:1)代表根据对照品确定物质;2)代表根据参考文献确定的物质。



1. 洋川芎内酯 A; 2. Z-藁本内酯; 3. 绿原酸; 4. 3-O-阿魏酰奎宁酸; 5. 阿魏酸; 6. 洋川芎内酯 F; 7. E-丁烯苯酐或 Z-丁烯苯酐; 8. 藁本内酯二聚体或欧当归内酯 A; 9. 洋川芎内酯 P; 10. 新蛇床内酯; 11. 香荚兰酸; 12. 阿魏酸松柏酯; 13. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 14. 4-羟基-3-丁基苯酐; 15. 原儿茶酸; 16. 4,7-二羟基-3-丁基苯酐; 17. 洋川芎内酯 B

图 1 川芎各提取物在正、负离子模式下的总离子流

Fig. 1 Total ion current of each extract of Chuanxiong Rhizoma under positive and negative ion modes

## 2.2 川芎提取物对细胞抗炎效果的评价<sup>[17]</sup>

**2.2.1 细胞培养** 采用 DMEM/F12 完全培养基培养 BEAS-2B 细胞, 培养基含有 10% FBS 和 1% 双抗, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**2.2.2 造模及分组** 选用 TNF- $\alpha$  刺激 BEAS-2B 细胞建立细胞炎症模型。将细胞分为空白组 (CON), 模型组 (MOD), 阳性地塞米松组 (DEX), 川芎 8 种不同提取物组 (S1 ~ S8) 共 11 组。

**2.2.3 细胞给药及核转录因子 (NF)- $\kappa$ B 的活性检测** 将 BEAS-2B 细胞培养于 96 孔板, 当细胞融合率达 50% ~ 70% 时双荧光素酶报告基因质粒瞬时转染。细胞培养液 (不添加血清) 培养细胞 12 h 使其同化, 将地塞米松 (浓度  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及川芎不同部位提取物 (质量浓度均为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 提前孵育 4 h 后加入  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  刺激细胞反应 12 h。将被动细胞裂解液 20  $\mu\text{L}$  加至 96 孔板的每个孔中, 振荡 30 min 得细胞裂解液。取细胞裂解液 20  $\mu\text{L}$ , 加入荧光素酶检测剂 100  $\mu\text{L}$ , 混匀, 用荧光检测仪检测并记录其荧光值。加入内参荧光素酶检测试剂 100  $\mu\text{L}$ , 同上述方法操作, 检测并记录其荧光值。按荧光素酶报告基因活性 = 荧光素酶活性 / 内参荧光素酶活性进行计算。

**2.2.4 川芎不同提取物的抗炎效果评价** 采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件对数据进行处理, 采用

单因素方差分析 (One-way ANOVA), 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。结果 CON, MOD, DEX, S1 ~ S8 的荧光素酶报告基因活性 ( $n=3$ ) 分别为 ( $90.98 \pm 0.188$ )%, ( $12.42 \pm 7.531$ )%, ( $79.35 \pm 3.741$ )%, ( $54.73 \pm 5.319$ )%, ( $52.77 \pm 5.391$ )%, ( $53.92 \pm 2.666$ )%, ( $41.85 \pm 5.148$ )%, ( $35.33 \pm 5.935$ )%, ( $51.05 \pm 3.493$ )%, ( $49.29 \pm 1.917$ )%, ( $39.26 \pm 4.143$ )%。其中 S1 ~ S4, S6 ~ S8 与 MOD 比较具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 说明这 7 组药物对细胞具有抗炎作用, 其中以川芎 95% 乙醇提取物的抗炎效果最好。

**2.3 谱效关系的建立** 中药谱效关系的数据处理方法有灰色关联分析 (GRA), 主成分分析 (PCA), 偏最小二乘回归分析 (PLSR), 人工神经网络 (ANNs), 双变量相关分析 (BCA), 多元线性回归 (MLR) 等, 不同的数据处理方法分析效率各不相同, 目前并无系统的方法要求<sup>[18-19]</sup>。选择 GRA 和 PLSR 建立川芎不同提取物指纹图谱与其抗炎疗效之间的谱效关系。

**2.3.1 GRA<sup>[20]</sup>** 对原始数据进行归一化和无量纲化处理后求绝对差序列, 将经过变换的母序列 (药效学指标) 记为  $X_0(k)$ , 子序列 (指纹图谱共有特征峰) 记为  $X_i(k)$ , 绝对差序列 =  $|X_0(k) - X_i(k)|$ ; 计算灰色关联系数  $[\eta(k)]$ , 计算公式为  $\eta(k) =$

$[\min |X_0(k) - X_i(k)| + \rho \times \max |X_0(k) - X_i(k)|] / [\max |X_0(k) - X_i(k)| + \rho \times \max |X_0(k) - X_i(k)|]$ ,  $\rho$  为分辨系数, 处于 0 ~ 1, 本实验中  $\rho$  取 0.5; 求关联度 ( $r$ ), 关联度计算公式为  $r = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \eta$  ( $n$  为子序列的数据个数), 见表 2。结果发现川芎提取物的 UPLC 指纹图谱中峰 14, 24, 25, 23, 17, 1, 7, 9, 3, 10, 13, 16, 21, 12, 22, 2 的关联度均 > 0.9, 说明这些色谱峰对川芎提取物的细胞抗炎药效作用发挥着重要影响。

表 2 川芎提取物抗炎药效的关联度分析  
Table 2 Correlation analysis of anti-inflammatory effect of Chuanxiong Rhizoma extracts

峰号	关联度	峰号	关联度
14	0.931 0	12	0.902 3
24	0.926 8	22	0.901 9
25	0.926 5	2	0.900 6
23	0.924 7	6	0.893 3
17	0.920 6	26	0.888 3
1	0.918 6	18	0.886 8
7	0.918 6	11	0.885 2
9	0.915 5	8	0.881 2
3	0.910 7	5	0.880 4
10	0.909 2	4	0.576 0
13	0.906 2	15	0.445 0
16	0.904 7	20	0.841 5
21	0.903 3	19	0.839 6

**2.3.2 PLSR<sup>[21]</sup>** 采用 SIMCA-P 12.0 数据处理软件, 经处理计算得到各变量标准化的回归系数和变量重要性投影 (VIP) 值见图 2。结果发现川芎提取物中的色谱峰有 15 个与抗炎作用呈正相关; 其余 11 个峰与抗炎作用呈负相关。一般而言, VIP 值 > 1, 说明其对模型有显著贡献, 结果发现峰 12, 20, 4, 5, 26, 23, 25, 10, 2, 1, 7, 14, 11 的 VIP 值 > 1, 说明在川芎提取物的 UPLC 指纹图谱中, 相对应的化合物对细胞抗炎药效作用发挥着重要影响。

**2.3.3 GAR 与 PLSR 联用** 将 GAR 和 PLSR 进行交叉对比, 最终确定峰 1, 2, 9, 10, 12, 14, 23, 25 为川芎提取物中对细胞抗炎作用发挥着重要影响的成分, 采用 UPLC-Q-TOF/MS 对不同川芎提取物药效成分进行解析, 经过与对照品比对及参考文献 [8, 11-13], 最终确定 1 号峰为洋川芎内酯 A, 2 号峰为 Z-藁本内酯, 10 号峰为新蛇床内酯。7 号峰可能为

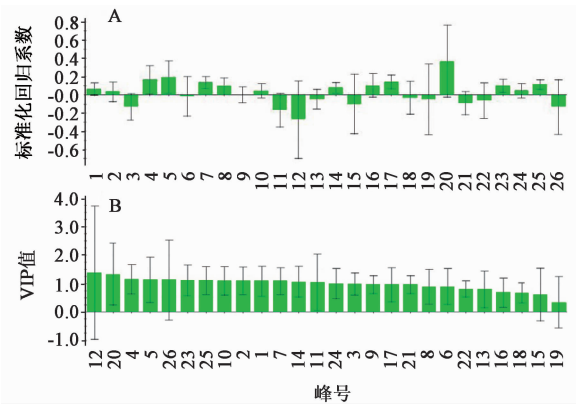


图 2 川芎提取物抗炎药效的 PLSR 标准化回归系数 (A) 及 VIP 值 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 PLSR standardized regression coefficients (A) and VIP values (B) of anti-inflammatory effect of Chuanxiong Rhizoma extracts ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

E-丁烯苯酐或 Z-丁烯苯酐, 12 号峰可能为阿魏酸松柏酯, 14 号峰可能为 4-羟基-3-丁基苯酐, 23 号峰和 25 号峰尚未确认。

**2.4 分子对接技术<sup>[22]</sup>** 从蛋白质结构数据库 (PDB) 中选择与抗炎作用相关的靶点环氧合酶-2 (COX-2, ID:3NT1), 细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK2, ID:4QP9), 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 抑制蛋白激酶  $\beta$  (IKK $\beta$ , ID:3RZF), Janus 激酶 1 (JAK1, ID:5E1E), JAK2 (ID:3UGC), JAK3 (ID:4HVD), 磷酸酰肌醇 3-激酶  $\alpha$  (PI3K- $\alpha$ , ID:4WAF), PI3K- $\gamma$  (ID:4WWO), 蛋白激酶 C (PKC, ID:4TXO) 和 TNF- $\alpha$  (ID:2AZ5) 进行分子对接研究。

**2.4.1 蛋白结构及配体分子的预处理** 利用 Discovery Studio 4.5 中 clean protein 模块对选择的蛋白中不完整的氨基酸残基进行补充, 并对其进行加氢及相应氨基酸残基的质子化处理。从中草药数据库 TCMD (Version 2009) 中找到所分析出的洋川芎内酯 A, Z-藁本内酯和新蛇床内酯的结构, 对其添加 CHARMm (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) 力场并进行能量最小化处理。

**2.4.2 分子对接筛选** 将上述处理好的蛋白, 根据其复合物中配体分子定义活性位点, 将复合物中配体分子抽取出来并重新对接回蛋白, 计算对接构象与晶体构象的均方根偏差 (RMSD), 确定分子对接筛选模式。根据确定的筛选模式, 利用 Discovery Studio 4.5 中 CDOCKER 模块计算选择蛋白与所分析出的化合物间的相互作用能, 根据计算得到的相互作用能及化合物在活性位点的情况确定最终结果。

**2.4.3 川芎抗炎作用的分子对接** 抽取所选蛋白 COX-2, ERK2, IKK $\beta$ , JAK1, JAK2, JAK3, PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$ , PKC, TNF- $\alpha$  中配体分子并重新对接回蛋白, 计算对接构象与晶体构象的 RMSD 分别为 0.029, 0.052, 0.204, 0.087, 0.037, 0.150, 0.091, 0.042, 0.041, 0.065 nm, 说明分子对接可以重复实验结果。利用上述分子对接模式对 3 种确定的活性化合物(洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯、新蛇床内酯)进行筛选, 见表 3。结果发现 Z-藁本内酯可能通过 COX-2, ERK2, PKC, JAK1, JAK2, JAK3, IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$  阻碍炎症信号传递, 影响下游蛋白的表达, 发挥抗炎作用; 洋川芎内酯 A 和新蛇床内酯可能通过 COX-2, ERK2, PKC, PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$ , JAK1, JAK2, JAK3, IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$  阻碍炎症信号传递, 影响下游蛋白的表达, 发挥抗炎作用。

表 3 川芎中抗炎活性成分与所选蛋白的分子对接相互作用能  
Table 3 Molecular docking of anti-inflammatory active components in Chuanxiong Rhizoma and these selected proteins

蛋白	Z-藁本内酯	洋川芎内酯 A	新蛇床内酯
COX-2	120.174 6	126.940 5	124.022 4
ERK2	115.071 0	116.365 8	123.489 9
IKK $\beta$	111.931 1	110.860 3	115.322 6
JAK1	118.669 3	114.858 8	119.496 9
JAK2	111.861 6	142.702 4	124.258 9
JAK3	111.861 6	142.702 4	124.258 9
PI3K- $\alpha$	-	107.126 4	105.985 3
PI3K- $\gamma$	-	111.973 8	113.035 4
PKC	129.209 7	119.299 7	140.064 4
TNF- $\alpha$	87.536 0	105.623 2	106.833 8

### 3 讨论

本实验建立了川芎提取物的 UPLC 指纹图谱, 分别对不同溶剂提取的 8 种川芎提取物进行细胞抗炎活性试验, 将 8 种不同川芎提取物平行称取 2 份, 分别测定不同质量浓度 ( $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  g·L $^{-1}$ ) 川芎提取物的抗炎活性, 结果显示质量浓度为  $1 \times 10^{-3}$  g·L $^{-1}$  时的抗炎活性最好, 药效最显著, 故  $1 \times 10^{-3}$  g·L $^{-1}$  作为整体给药质量浓度, 此剂量下川芎各提取物溶液均无明显颜色, 对后续测定无影响。通过噻唑蓝 (MTT) 细胞活力检测结果显示给药组与空白组无明显差异, 说明该剂量下给药无明显细胞毒性。数据处理方法的选择是建

立谱效关系中的关键一步, 不同分析方法的特点各不相同, 统计效率也有差异, 本实验联用了 GAR 与 PLSR, 可以更全面地分析川芎化学成分与抗炎药效之间的谱效关系, 得到的结果更可靠、有效。然后采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对不同川芎提取物药效成分进行解析, 确定了川芎产生抗炎药效作用的物质基础, 即洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯、新蛇床内酯。

PI3K 激酶作为 NF- $\kappa$ B 通路 & Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 3 (JAK/STAT3) 通路的“交汇”, 磷酸化的 PI3K 可以通过丙酮酸脱氢酶激酶同功酶-1/丝苏氨酸蛋白激酶 (PDK1/Akt) 通路激活 NF- $\kappa$ B 并促进诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达, 也可以通过丝苏氨酸蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Akt/mTOR) 通路促进 STAT3 的转录表达。PI3K 的抑制能在极大程度上抑制了 NF- $\kappa$ B 的活化, 减少 iNOS, 基质金属蛋白酶 9 (MMP-9), COX-2, 白细胞介素 (IL)-6, IL-1 $\beta$  的表达, 从而缓解炎症。JAK/STAT3 通路可介导多种细胞因子的转导, JAK 的磷酸化可激活 STAT3 进入细胞核并介导多种炎症因子生成, PI3K 的活化能够促进这一炎症应答过程, 增加 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-1 $\beta$ <sup>[23-25]</sup>。IKK $\beta$  作为 NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白, 掩盖了 NF- $\kappa$ B 的活化区域, 有效阻止了 NF- $\kappa$ B 的转录入核, 但 IKK $\beta$  却可以在三磷酸腺苷 (ATP) 的磷酸化作用下活化并暴露 NF- $\kappa$ B 的活化区域, 导致 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[26]</sup>。因此, IKK $\beta$  的抑制能有效中断炎症应答过程。抑制 PKC 后会进一步抑制下游的 ERK2 信号通路表达, ERK2 磷酸化活化后可以调控细胞核内 NF- $\kappa$ B 的表达, 进而抑制炎症相关因子的产生。由图 3 可知, Z-藁本内酯可能通过 COX-2, ERK2, PKC, JAK1, JAK2, JAK3, IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$  阻碍炎症信号传递, 影响下游蛋白的表达, 发挥抗炎作用; 洋川芎内酯 A 和新蛇床内酯可能通过 COX-2, ERK2, PKC, PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$ ,

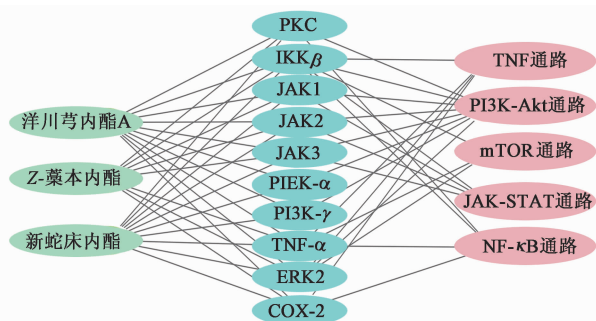


图 3 川芎中抗炎活性成分的作用靶点及相关通路  
Fig. 3 Targets of anti-inflammatory active components in Chuanxiong Rhizoma and their related pathways

JAK1, JAK2, JAK3, IKK $\beta$ , TNF- $\alpha$  阻碍炎症信号传递,进而影响下游蛋白的表达,发挥抗炎作用。本研究基本明确了川芎的抗炎药效物质基础,揭示了川芎“成分-靶点-通路”的抗炎多重调控机制,为该药材的临床应用提供了理论参考和实验依据,后续将对川芎的抗炎药效物质基础作进一步深入研究和探索。

[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,2015:40-41.

[2] 孙存霞,吴国林. 川芎中的化学成分的抗炎活性及其质量控制的研究[J]. 医药论坛杂志,2015,36(7):58-60.

[3] 秦昆明,郑礼娟,沈保家,等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考[J]. 中国中药杂志,2013,38(1):26-31.

[4] 蔡靓,张倩,杨丰庆. 中药谱效学的应用进展[J]. 中草药,2017,48(23):5005-5011.

[5] 李宇驰,徐妍,肖培云,等. 中药谱效学的研究进展[J]. 时珍国医国药,2017,28(3):673-675.

[6] 白关亚,何盼,李媛媛,等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(11):1-6.

[7] FANG J, LI Y, LIU R, et al. Discovery of multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease through systematic prediction of chemical-protein interactions [J]. J Chem Inf Model,2015,55(1):149-164.

[8] 杨岱琳,佟玲,李晓稳,等. UPLC-Q-TOF/MS<sup>E</sup> 方法分析养血清脑颗粒的化学成分[J]. 药学报,2016,51(5):797-805.

[9] WANG Z, Clifford M N. Comparison of the profiles of chlorogenic acids and their derivatives from three Chinese traditional herbs by LC-MS<sup>n</sup> [J]. Acta Pharm Sin,2008,43(2):185-190.

[10] 左莉华,周霖,李卓伦,等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的天丹通络胶囊中化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(5):1031-1040.

[11] 王镇方,赵阳,庞旭,等. 利用 UPLC-Q-TOF-MS<sup>E</sup> 快速分析四物汤中的化学成分[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3702-3708.

[12] ZHANG X L, LIU L F, ZHU L Y, et al. A high performance liquid chromatography fingerprinting and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry chemical profiling approach to rapidly find characteristic chemical markers for quality evaluation of dispensing granules, a case study on Chuanxiong Rhizoma [J]. J

Pharm Biomed Anal,2014,88:391-400.

[13] 杨艳,易进海,黄志芳,等. 川芎、当归和藁本中挥发油成分比较研究[J]. 中药材,2015,38(6):1212-1216.

[14] 宋洋,冯雪松. 无梗五加根化学成分的 UPLC-MS/MS 分析及与细柱五加、刺五加的比较[J]. 药物分析杂志,2014,34(6):958-965.

[15] 王璐,徐风,刘广学,等. HPLC-MS<sup>n</sup> 法分析当归乙酸乙酯提取物在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国药房,2014,25(47):4425-4430.

[16] 游飞祥,袁雪海,许浚,等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 的六经头痛片化学成分分析[J]. 中草药,2017,48(20):4157-4166.

[17] 林梦雅,张玉萍,李雅,等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J]. 中草药,2017,48(16):3447-3452.

[18] 徐晶晶. 基于抗氧化谱效关系分析的薄荷药材质量控制和评价方法研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.

[19] 朱春胜. 基于谱效关系的菊苣降尿酸物质基础及质量评价研究[D]. 北京:北京中医药大学,2016.

[20] 秦子茹,贺金华,顾政一,等. 一枝蒿不同溶剂提取物抗病毒作用的谱效关系研究[J]. 中国药房,2015,26(7):889-893.

[21] 姚元贵,张丽艳,谢立敏,等. 头花蓼不同极性部位抑菌作用的谱效学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(1):20-25.

[22] 刘存,刘丽娟,周超,等. 基于“蛋白质相互作用网络-分子对接技术-体外实验”三维模式分析青黛对慢性粒细胞白血病的的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(21):206-211.

[23] WU X, SONG M, Rakariyatham K, et al. Inhibitory effects of 4'-demethylnobiletin, a metabolite of nobiletin, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mouse ears [J]. J Agric Food Chem, 2015,63(51):10921-10927.

[24] YU Y, LI M, SU N, et al. Honokiol protects against renal ischemia/reperfusion injury via the suppression of oxidative stress, iNOS, inflammation and STAT3 in rats [J]. Mol Med Rep,2016,13(2):1353-1360.

[25] TONG F, ZHANG J, LIU L, et al. Corilagin attenuates radiation-induced brain injury in mice [J]. Mol Neurobiol,2016,53(10):6982-6996.

[26] LIU S, Misquitta Y R, Olland A, et al. Crystal structure of a human I $\kappa$ B kinase  $\beta$  asymmetric dimer [J]. J Biol Chem,2013,288(31):22758-22767.

[责任编辑 刘德文]