

基于网络药理学和 UPLC 指纹图谱的紫苏质量标志物 (Q-Marker) 预测

张良琦^{1,2}, 陈凡^{1,2}, 张子桢^{1,2},
林云¹, 周春娇¹, 汤卓翰¹, 江星明^{1*}, 肖美凤^{1,2,3*}

¹湖南中医药大学药学院; ²中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室;
³中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 长沙 410208

摘要: 基于 UPLC 指纹图谱和网络药理学法分析并筛选紫苏潜在质量标志物 (Q-Marker)。首先建立 15 批紫苏叶及 14 批紫苏梗的指纹图谱, 并对不同来源、批次的紫苏叶和紫苏梗中的成分及含量进行比较, 标定紫苏不同部位指纹图谱的共有峰和非共有峰; 采用网络药理学法构建紫苏“成分-靶点”网络图, 并构建靶点蛋白互作网络图, 预测紫苏 Q-Marker。本研究建立的紫苏不同部位的指纹图谱, 共检测到了 5 种成分, 其中迷迭香酸、咖啡酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷为叶和梗的共有成分, 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷为紫苏叶特有成分。筛选得到包括 MAPK1、PIK3CA 等在内的 14 个核心靶点, 对以上靶点进行 GO 和 KEGG 功能分析可知涉及肿瘤坏死因子、新冠肺炎、脂质和动脉粥样硬化等通路, 最后构建“成分-靶点-通路”网络图, 选取排名前 4 的靶蛋白与 4 个成分进行分子对接验证, 结果显示成分与蛋白之间具有十分良好的结合性能。本实验基于 UPLC 法建立紫苏不同部位多成分含量测定方法, 此方法操作简单、准确度高, 可作为紫苏质量检测的参考方法; 同时结合网络药理学和分子对接技术预测迷迭香酸、咖啡酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷为紫苏潜在质量标志物, 以此来评价紫苏“多成分-多靶点-多通路”的协同作用, 为紫苏的质量控制提供了理论依据, 同时也为后续的紫苏药效物质基础和作用机制提供坚实的基础。

关键词: 紫苏; 指纹图谱; 质量标志物; 网络药理学; 化学成分

中图分类号: 284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1800-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.016

Prediction of Q-Marker in *Perilla frutescens* (L.) Britt based on UPLC fingerprint and network pharmacology

ZHANG Liang-qi^{1,2}, CHEN Fan^{1,2}, ZHANG Zi-an^{1,2},
LIN Yun¹, ZHOU Chun-jiao¹, TANG Zhuo-han¹, JIANG Xing-ming^{1*}, XIAO Mei-feng^{1,2,3*}

¹ College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine; ² Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine (TCM);

³ Property and Pharmacodynamic Key Laboratory of TCM, National Administration of TCM, Changsha 410208, China

Abstract: This study aims to analyze and predict the potential quality markers of different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt based on UPLC fingerprint analysis method and network pharmacology. The fingerprints of 15 batches of *P. frutescens* leaves and 14 batches of *P. frutescens* stems were established, and the components and contents of *P. frutescens* leaves and *P. frutescens* stems from different places of origin and batches were compared, and the common peaks and non-common peaks of different parts of *P. frutescens* were calibrated. Through network pharmacology to construct the visualization of 'target-protein' interaction network in *P. frutescens*, a 'component-target' network diagram was constructed to predict Q-Marker in *P. frutescens*. In

收稿日期: 2023-12-08

接受日期: 2024-07-12

基金项目: 湖南省中医药科研计划 (B2024010); 湖南中医药大学本科生科研创新基金 (2023BKS114); 湖南中医药大学研究生科研创新项目 (2024CX091, 2024XC168)

* 通信作者 Tel: 86-013974924591; E-mail: jxm519@hnu.cm.edu.cn, xiaomf.002@163.com

this study, a total of five components were detected in the fingerprints of different parts of *P. frutescens*, among which rosmarinic acid, caffeic acid, luteolin-7-*O*-glucuronide and luteolin-7-*O*-diglucuronide were common components of *P. frutescens* leaves and *P. frutescens* stems, and apigenin-7-*O*-glucuronide were unique components of *P. frutescens* leaves. Fourteen core targets including MAPK1, PIK3CA were screened by network pharmacology. GO and KEGG functional analysis of these targets showed that TNF, COVID-19, lipid and atherosclerosis signaling pathway were involved, and “component-target-pathway” network was finally constructed. The top four target proteins and four components were selected for molecular docking verification, The results showed that there was a very good binding performance between the components and the proteins. Based on UPLC fingerprint analysis and network pharmacology, rosmarinic acid, caffeic acid, luteolin-7-*O*-glucuronide and luteolin-7-*O*-diglucuronide were predicted to be potential Q-Marker for different parts of *P. frutescens*, highlighting the synergistic interactions of ‘multi-component multi-target multi-pathway’ in *P. frutescens*, which provided a theoretical framework for the quality control of *P. frutescens*, and also provided a robust foundation for the subsequent material basis and mechanism of *P. frutescens*.

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britt; UPLC fingerprint; quality marker; network pharmacology; chemical composition

紫苏叶和紫苏梗分别为唇形科植物紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britt) 的干燥叶 (或带嫩枝) 和干燥茎, 是我国批准的药食同源中药材。紫苏在中国种植约有 2 000 年历史, 明代李时珍曾记载: “紫苏嫩时有叶, 和蔬茹之, 或盐及梅卤作菹食甚香, 夏月作熟汤饮之”^[1], 2020 年版《中华人民共和国药典》中记载, 紫苏叶具有解表散寒, 行气和胃的功效, 常用于风寒感冒, 咳嗽呕恶, 妊娠呕吐; 紫苏梗具有理气宽中, 止痛, 安胎的功效, 常用于胸膈痞闷胃脘疼痛, 暖气呕吐, 胎动不安^[2]。现代药理学表明, 紫苏具有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗抑郁等药理作用^[3]。中药质量是保证其功效稳定性及应用安全性的基础, 紫苏为“同源异效”中药, 其不同部位所含的化学成分种类及含量有所不同, 并且极易受到栽培环境、种植技术的影响, 从而影响其质量, 最终导致其品质的参差不齐, 进一步影响临床应用^[4], 目前对于紫苏的质量研究手段较为单一, 并不能较好地控制紫苏的质量。

刘昌孝院士于 2016 年创造性提出了质量标志物 (Quality marker, Q-Marker) 的新概念, 其所建立的思维模式和研究方法着眼于全过程的物质基础特有、差异、动态变化和质量的传递性、溯源性, 有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系^[5]。在建立中药质量标准体系的过程中, 应充分考虑到中药的特性, 结合系统论和控制论的理论, 进行综合评价。中药指纹图谱技术是一个非常合理的切入点, 可以通过对中药整体特性的描述, 非常适用于现代中药质量标准的建立^[6]; 而网络药理学基于中药“多成分、多靶点”的作用特点, 能在分子水平上通过实验手段阐明其作用机制^[7], 已被广泛应用于单

味药及复方药治疗疾病的物质基础和多靶点作用机制预测。故本实验基于 Q-Marker 理论, 运用超高效液相色谱法找到潜在质量标志物; 运用网络药理学方法对紫苏成分、靶点、通路进行整理分析, 并预测紫苏不同部位潜在 Q-Marker, 以期为紫苏的作用机制和质量控制研究提供参考意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); JA3003 型十万分之一精密电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

不同产地的 15 批紫苏叶样品、14 批紫苏梗样品购自老百姓大药房有限公司和湖南千金大药房连锁有限公司, 具体产品批次及产地信息见表 1, 所有药材样品均由湖南中医药大学炮制教研室石继连教授鉴定, 为紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britt) 的不同部位。

对照品: 咖啡酸 (批号: DSTDK001301)、迷迭香酸 (批号: DST220215-027)、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 (批号: DSTDM006701)、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 (批号: DSTDM020601)、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 (批号: DSTDQ009001) (纯度均大于 98%, 湖南乐美天生物科技有限公司); 甲醇 (色谱纯, 批号: 22065109, 美国天地有限公司); 乙腈 (色谱纯, 批号: 22045174, 美国天地有限公司); 甲酸 (质谱纯, 批号: C2203135, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 纯净水 (批号: 20230629, 华润怡宝市售纯净水)。

表1 紫苏不同部位药材样品信息表

Table 1 Sample information of different parts of *P. frutescens*

样品编号 Sample No.	产地 Origin	药材 Medicinal material	批号 Batch No.	样品编号 Sample No.	产地 Origin	药材 Medicinal material	批号 Batch No.
S1	湖南	紫苏叶	220701	S16	广东	紫苏梗	A211117
S2	湖南	紫苏叶	220804	S17	湖南	紫苏梗	2212140
S3	湖南	紫苏叶	230302	S18	湖南	紫苏梗	20171102
S4	河北	紫苏叶	32622015	S19	河北	紫苏梗	2004014
S5	湖南	紫苏叶	211103	S20	湖南	紫苏梗	200701
S6	湖南	紫苏叶	220301	S21	湖南	紫苏梗	210601
S7	湖南	紫苏叶	220501	S22	湖南	紫苏梗	221102
S8	湖南	紫苏叶	221101	S23	湖南	紫苏梗	230102
S9	湖南	紫苏叶	230102	S24	湖南	紫苏梗	2004015
S10	湖南	紫苏叶	20210401	S25	湖南	紫苏梗	2301058
S11	湖南	紫苏叶	230102	S26	湖南	紫苏梗	222100412
S12	湖南	紫苏叶	22111	S27	湖南	紫苏梗	2022032402
S13	湖南	紫苏叶	220301	S28	湖南	紫苏梗	21120904
S14	江苏	紫苏叶	20210401	S29	广东	紫苏梗	210522
S15	江西	紫苏叶	20230106				

1.3 紫苏不同部位指纹图谱研究

1.3.1 样品溶液的制备

取样品适量,烘干、粉碎并过4号筛;精密称取样品粉末0.5 g置100 mL锥形瓶中,加入40%甲醇溶液60 mL后密封并称定质量记录,静置1 h后再超声提取1 h,取出后冷却,再次称重,用40%甲醇溶液补足损失液,摇匀,滤过。将滤液置于离心机中以3 000 r/min离心10 min,将上清液取出,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

1.3.2 对照品溶液制备

精密称定各对照品适量,用40%甲醇溶液溶解分别制得浓度为0.066 1 mg/mL咖啡酸溶液,0.490 0 mg/mL木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷溶液,0.214 2 mg/mL木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷溶液,0.520 0 mg/mL迷迭香酸溶液,0.404 0 mg/mL芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷溶液。

1.3.3 指纹图谱色谱条件

采用Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);流动相A(纯乙腈),流动相B(0.01%甲酸水),梯度洗脱(0~6 min,90%→87% A;6~12 min,87%→85% A;12~14 min,85%→81.5% A;14~18 min,81.5% A,18~

24 min,81.5%→78% A);柱温35 °C;检测波长330 nm;流速0.3 mL/min;进样量2 μL。

1.4 基于网络药理学预测紫苏不同部位潜在 Q-Marker

1.4.1 候选活性成分对应靶点筛选

利用PubChem、TCMSP和DrugBank数据库查询所筛选出的候选活性成分所对应的靶点,去重。将成分、靶点数据Cytoscape3.7.2软件,构建“成分-靶点”网络图。

1.4.2 靶点蛋白与蛋白互作网络分析

将筛选出的靶点导入String数据库后进行蛋白质与蛋白质的相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析。将涉及到的作用靶点导入String数据库,选择物种为“Homo Sapiens”,设置最低置信区间为≥0.900,并隐藏分离节点^[8],获得PPI网络图,将其导入Cytoscape3.7.2软件进行可视化处理分析。

1.4.3 GO和KEGG功能富集分析

将分析得到的核心靶点导入David网站,选取分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)的排名靠前的条目进行基因本体(gene ontolo-

gy,GO)功能富集分析;选取排名靠前的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路进行富集分析,GO和KEGG分析均以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义,绘制GO分析柱状图和KEGG分析气泡图。

1.4.4 “成分-靶点-通路”网络构建

将候选活性成分化学成分、核心靶点及排名靠前的KEGG信号通路导入Cytoscape3.7.2软件中构建“成分-靶点-通路”网络图。

1.4.5 分子对接验证

节点度值(degree值)表示每个节点连接的线条数,用来评估网络中每个节点的重要性,度值越大,表明蛋白之间的相关性越强,根据上述网络药理学

结果,选取PPI网络中节点度值排名靠前的核心靶点与关键活性成分进行分子对接^[9]。分析结合能,其中配体和受体的结合能体现两者能否形成稳定对接结构,如结合能 < -5 kcal/mol则说明结合构象相对稳定。

2 结果

2.1 紫苏不同部位指纹图谱研究

2.1.1 线性考察

取“1.3.2”项下对照品溶液,将其按一定比例稀释,按“1.3.3”项下色谱条件下进样,记录色谱图。以峰面积(Y)和对照品浓度(X ,mg/mL)进行线性回归,各对照品具体回归方程、相关系数及线性范围见表2。

表2 线性方程、相关系数和线性范围

Table 2 Linear equation, correlation coefficient and linear range

成分 Component	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	线性范围 Range of linearity (mg/mL)
咖啡酸 Caffeic acid	$Y = 3 \times 10^7 X - 134\ 94$	0.999 8	0.000 246 ~ 0.066
木犀草素-7- <i>O</i> -二葡萄糖醛酸苷 Luteolin-7- <i>O</i> -diglucuronide	$Y = 9 \times 10^6 X - 142\ 638$	0.999 3	0.014 3 ~ 0.241
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	$Y = 1 \times 10^7 X - 212\ 797$	0.999 0	0.008 08 ~ 0.404
木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 Luteolin-7- <i>O</i> -glucuronide	$Y = 8 \times 10^6 X - 128\ 767$	0.999 4	0.009 80 ~ 0.490
迷迭香酸 Rosmarinic acid	$Y = 2 \times 10^7 X - 212\ 797$	0.999 0	0.005 20 ~ 0.520

2.1.2 参照峰选择

选择含量较高,且稳定存在、色谱峰稳定、分离度较好的成分作为参照峰,本实验选择色谱峰5(迷迭香酸)作为参照峰。

2.1.3 精密度假考察

精密称取0.5 g的S15样品6份,按“1.3.1”项下制备供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明5个共有峰的相对峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)值均小于2.0%,相对保留时间的RSD值均小于0.37%,表明所建立的方法精密度假较好。

2.1.4 重复性考察

精密称取0.5 g的S15样品6份,按“1.3.1”项下制备供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明5个共有峰的相对峰面积

的RSD值均小于0.81%,相对保留时间的RSD值均小于0.41%,表明所建立的方法重复性较好。

2.1.5 稳定性考察

精密称取0.5 g的S15样品6份,按“1.3.1”项下制备供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件在0、2、4、8、12、24、48 h分别进样测定,记录色谱图,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明五个共有峰的相对峰面积的RSD值均小于0.56%,相对保留时间的RSD值均小于2.1%,表明所建立的方法稳定性较好。

2.1.6 加样回收实验

精密称取0.5 g的S15样品6份,加入浓度分别为0.005 7、0.068 0、0.129 8、0.021 3、0.137 3 mg/mL的咖啡酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷的混合对照品溶液60 mL,按“1.3.1”项下制备供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件连

续进样6次,计算得到咖啡酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷的平均加样回收率依次为103.8%、99.86%、105.5%、100.5%、101.6%,RSD依次为2.3%、3.2%、3.6%、3.4%、2.2%,结果表明所建立的含量测定方法可靠。

2.1.7 紫苏不同部位指纹图谱的建立

取紫苏梗14批、紫苏叶15批,按“1.3.1”项下样品溶液制备进行处理,按“1.3.3”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。将得到的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)”,采用中位数法,经多点校正后进行色谱峰匹配,生成紫

苏不同部位样品叠加指纹图谱(S1~S15、S16~S29)(见图1)及紫苏不同部位对照特征图谱(见图2),紫苏叶样品共标定了5个共有峰,紫苏梗样品共标定了4个共有峰。

2.1.8 共有峰的归属与指认

为进一步确认紫苏样品特征峰的化学信息,采用UPLC对紫苏叶样品对照特征图谱中共有峰中的5个色谱峰进行了指认,通过与混合对照品的UPLC指纹图谱(见图3)对照,分别鉴定为咖啡酸、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸。

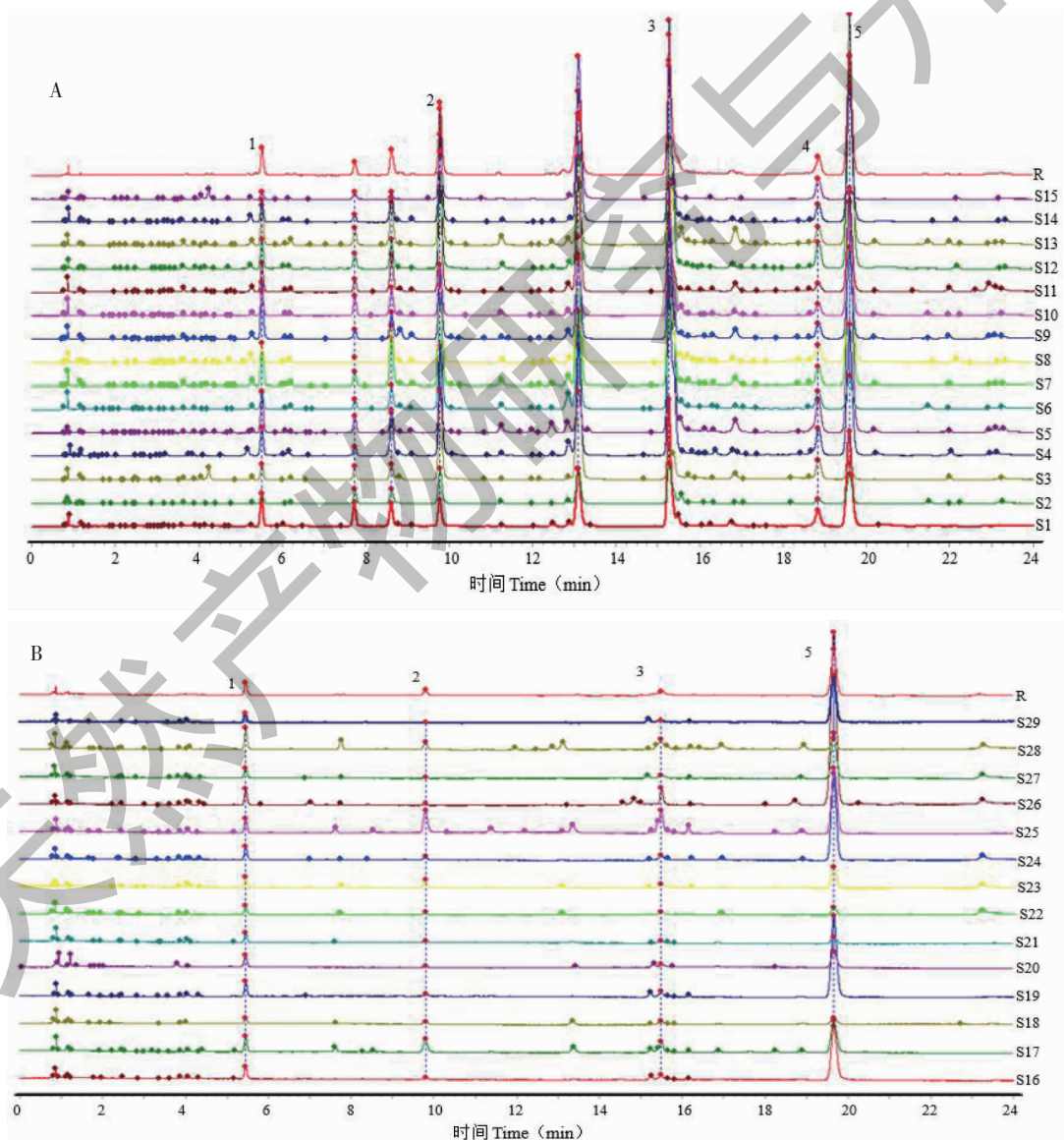


图1 紫苏不同部位 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of different parts of *P. frutescens*

注:A:叶;B:梗。Note:A:Leaf;B:Stem.

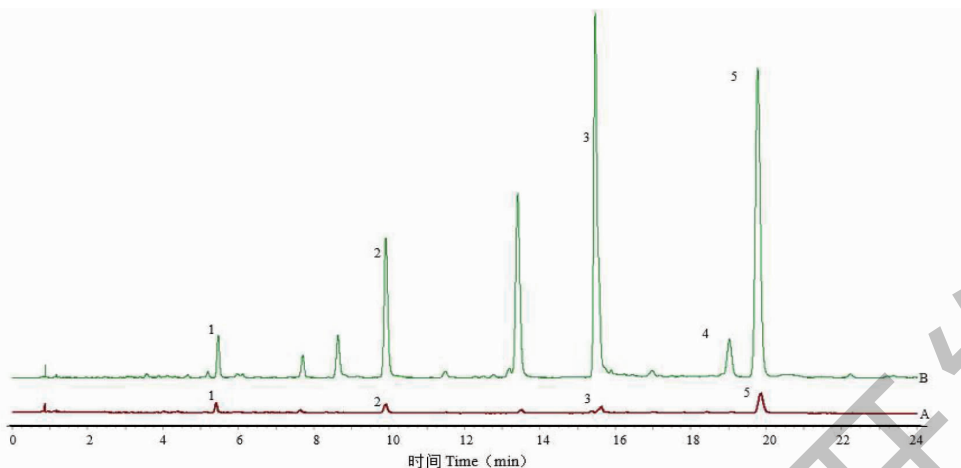


图2 紫苏不同部位对照特征图谱

Fig. 2 Control characteristic chromatogram of different parts of *P. frutescens*

注: A: 梗; B: 叶。1: 咖啡酸; 2: 木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷; 3: 木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷; 4: 芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷; 5: 迷迭香酸 (图3同)。Note: A: Stem; B: Leaf. 1: Caffeic acid; 2: Luteolin-7-*O*-diglucuronide; 3: Luteolin-7-*O*-glucuronide; 4: Apigenin-7-*O*-glucuronide; 5: Rosmarinic acid (Same as Fig. 3).

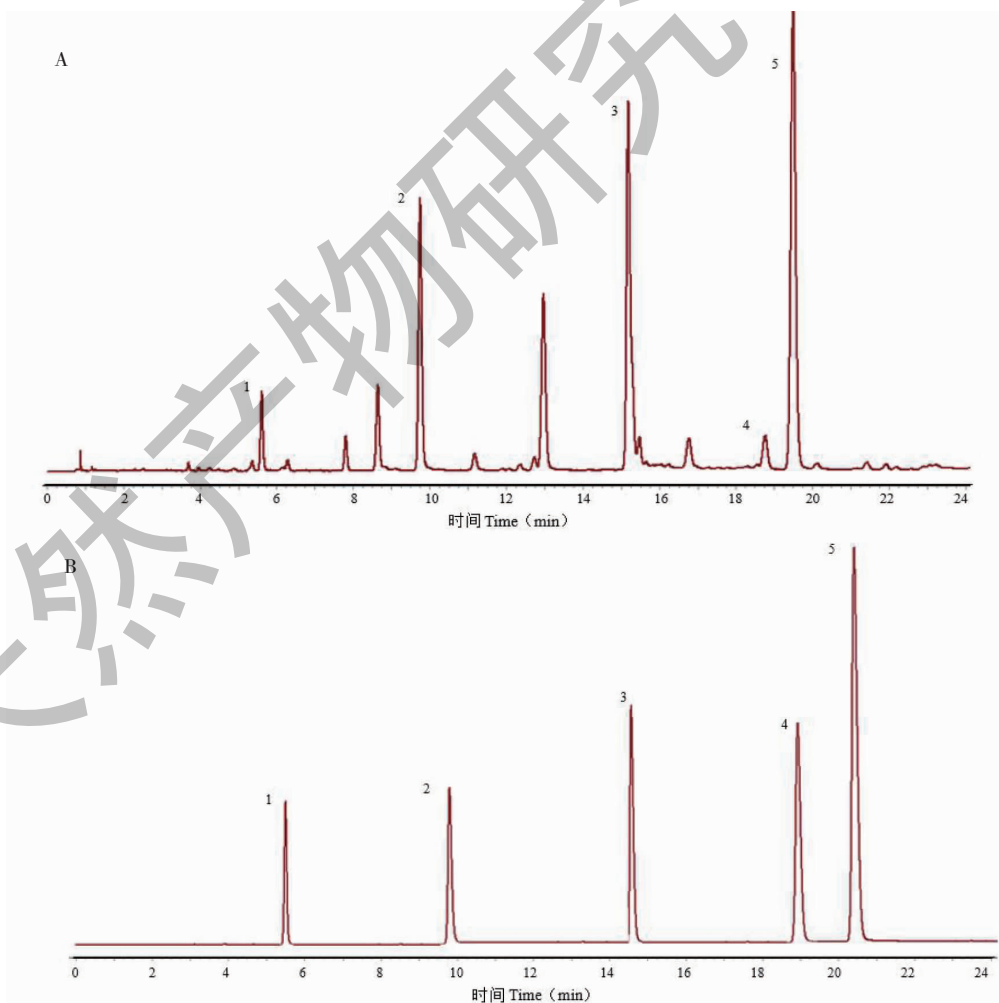


图3 S15 样品(A)和混合对照品(B)的UPLC图

Fig. 3 UPLC fingerprints of S15 sample (A) and mixed reference substances (B)

2.1.9 含量测定

取紫苏梗样品 14 批、紫苏叶样品 15 批,按“1.3.1”项下样品溶液制备进行处理,按“1.3.3”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,按“2.1.1”项下线性回归方程计算紫苏不同部位中 5 个成分的含量。结果表明紫苏叶中 5 种成分的含量分别为咖啡酸 0.016 ~ 0.071 mg/g、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 2.308 ~ 10.613 mg/g、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 1.676 ~ 23.067 mg/g、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 0.276 ~ 2.754 mg/g、迷迭香酸 0.674 ~ 13.233 mg/g;紫苏梗中 4 种成分的含量分别为咖啡酸 0.060 ~ 0.156 mg/g、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 0.037 ~ 0.901 mg/g、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 0.089 ~ 0.420 mg/g、迷迭香酸 0.178 ~ 4.257 mg/g。紫苏叶中各成分含量多高于紫苏梗,这与文献报道一致^[10]。

2.2 网络药理学分析

研究表明,酚酸和黄酮类成分为紫苏中的主要

化学成分^[10,11]。Zhang 等^[12]通过研究紫苏不同部位 8 种黄酮类和酚酸类化学成分发现,其均为紫苏中的高含量成分的同时均具有较强的生物活性,且木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷在植物中为非常见成分,因此对于评价紫苏的质量,该类成分值得关注。基于紫苏不同部位的指纹图谱研究结果,根据可测性和可溯性特点,以上 4 种成分均可以得到指认,故将以上 4 种成分确定为候选化合物,因此,本实验以紫苏叶及紫苏梗的 4 个共有成分作为研究对象,进行紫苏药效物质基础的网络药理学研究。

2.2.1 候选活性成分靶点筛选

将以上 4 种成分导入 PubChem、TCMSP 和 DrugBank 数据库,得到相关作用靶点,去重后共得到 79 个可能的活性作用靶点,将成分、靶点数据导入 Cytoscape3.7.2 软件,构建“成分-靶点”网络图(见图 4)。

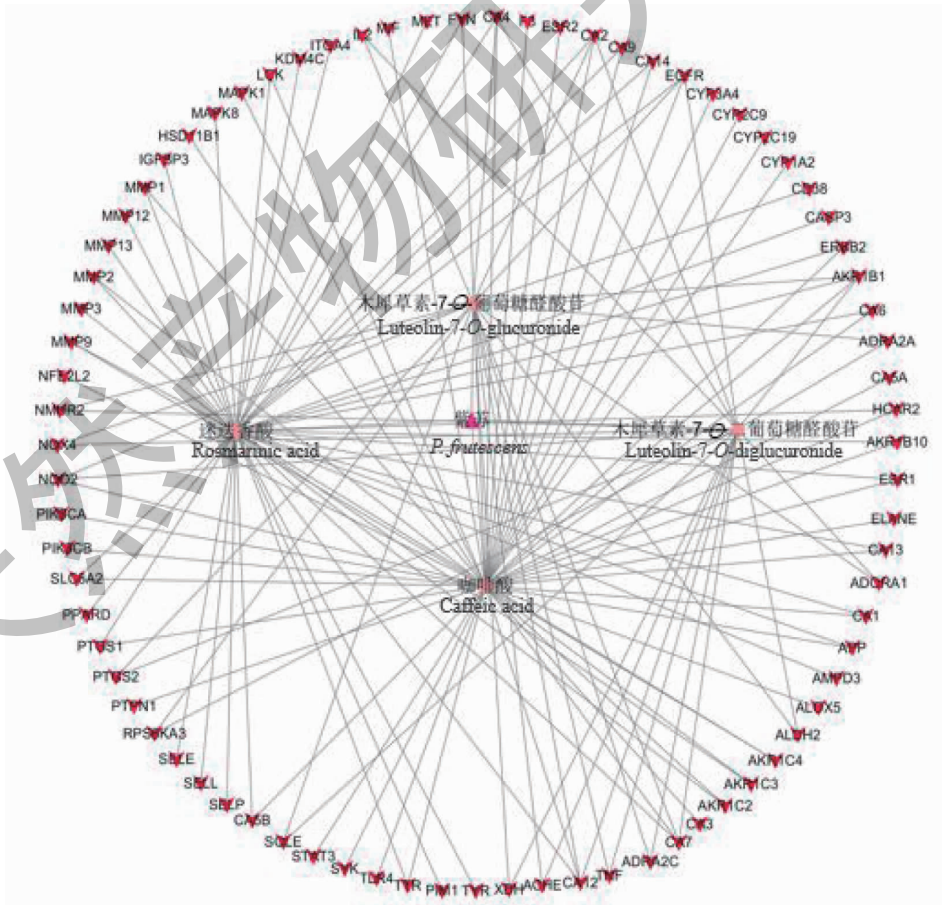


图 4 “成分-靶点”网络图

Fig. 4 "Component-target" network diagram

2.2.2 PPI 网络分析

将 4 个成分涉及到的 79 个作用靶点导入 String 数据库,获得 PPI 网络图,并进行可视化分析,如图 5 所示。图中靶点颜色越深、尺寸越大代表其拓

学参数越大。设置 degree 值 ≥ 10 且大于两倍中位数(18)作为核心靶点筛选条件,最终得到 14 个核心靶点(见表 3)。

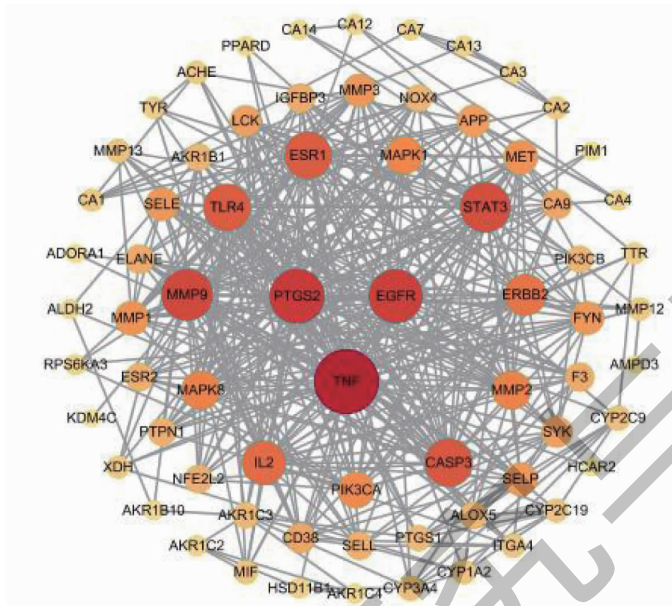


图 5 蛋白-蛋白互作网络可视化图

Fig. 5 Visualization of protein-protein interaction network

表 3 14 个核心靶点的节点度值

Table 3 The node degree values of 14 core targets

编号 No.	靶点 Target	全称 Full name	节点度值 Node degree
1	PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶 2 Cyclooxygenase-2	36
2	TNF	肿瘤坏死因子 α TNF-alpha	45
3	CASP3	胱天蛋白酶-3 Caspase-3	30
4	EGFR	表皮生长因子受体 erbB-1 Epidermal growth factor receptor erbB1	35
5	ESR1	雌激素受体-1 Estrogen receptor alpha	29
6	MMP2	基质金属蛋白酶 2 Matrix metalloproteinase 2	21
7	MMP9	基质金属蛋白酶 9 Matrix metalloproteinase 9	33
8	TLR4	Toll 样受体 4 Toll-like receptor 4	29
9	MAPK1	MAP 激酶 ERK2 MAP kinase ERK2	20
10	STAT3	信号转导子和转录激活子 3 Signal transducer and activator of transcription 3	32
11	MAPK8	c-Jun 氨基末端激酶 1 c-Jun N-terminal kinase 1	21
12	IL2	白细胞介素-2 Interleukin-2	26
13	ERBB2	受体蛋白酪氨酸激酶 erbB-2 Receptor protein-tyrosine kinase erbB-2	24
14	PIK3CA	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α 亚型 PI3-kinase p110-alpha subunit	19

2.2.3 GO 和 KEGG 功能富集分析

将得到的 14 个核心靶点导入 David 网站进行

GO 和 KEGG 富集分析,得到 GO 分析柱状图(见图 6)和 KEGG 分析气泡图(见图 7)。通过 GO 分析共

得到 169 条条目,其中包括 129 个生物过程,20 个分子功能,20 个细胞组分。分别筛选出 3 个功能的前 15 条条目构建 GO 分析柱状图,由图可知其生物过程主要在凋亡过程的负调控、凋亡过程的正向调控、基因表达正向调控等功能中显著表达;分子功能主要在蛋白结合、相同蛋白结合、丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸蛋白激酶活性等功能中显著表达;细胞组分主要在细胞质膜、细胞质、细胞核中显著表达。

通过 KEGG 富集分析共得到 116 条通路,筛选出前 15 条富集的通路,分别为癌症中的蛋白聚糖

(proteoglycans in cancer, hsa05205)、癌症中的信号通路 (pathways in cancer, hsa05200)、内分泌耐药 (endocrine resistance, hsa01522)、乙型肝炎 (hepatitis B, hsa05161)、糖尿病并发症中的 age-rage 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, hsa04933)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway, hsa04668)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis, hsa05417)、新冠肺炎信号通路 (coronavirus disease-COVID-19, hsa05171)、胰腺癌信号通路 (pancreatic cancer, hsa05212)、癌症

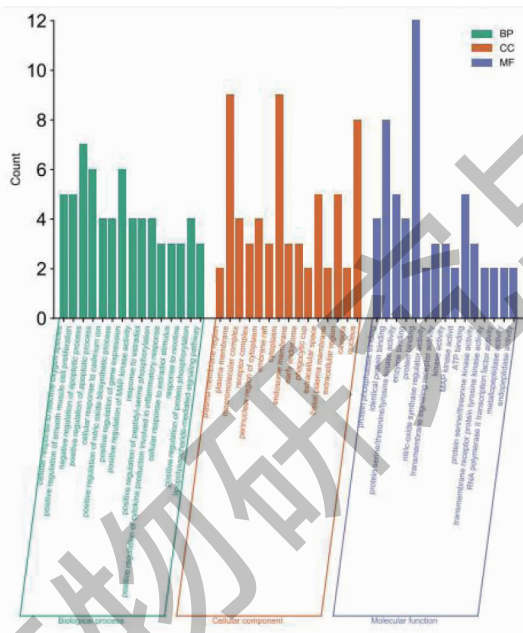


图 6 GO 分析柱状图

Fig. 6 Bar chart of GO analysis

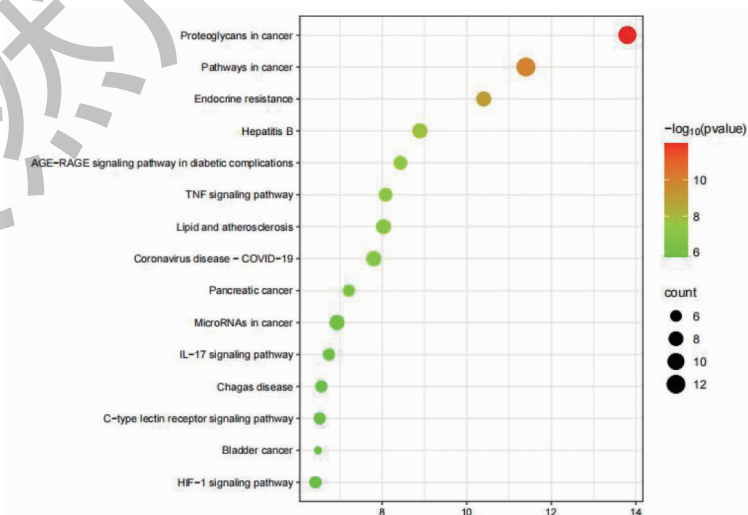


图 7 KEGG 分析气泡图

Fig. 7 Bubble map of KEGG analysis

中的微小 RNA (microRNAs in cancer, hsa05206)、信号传导通路 (signaling pathway, hsa04657)、恰加斯病 (chagas disease, hsa05142)、c 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway, hsa04625)、膀胱癌 (bladder cancer, hsa05219)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway, hsa04066)。

2.2.4 “成分-靶点-通路”网络构建

将 4 个化学成分、14 个核心靶点及前 15 个 KEGG 信号通路导入 Cytoscape3. 7. 2 软件中构建“成分-靶点-通路”网络图 (见图 8)。以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度 (degree) 为参考,发现咖啡酸 (degree = 10)、迷迭香酸 (degree = 8)、木犀草

素-7-O-二葡萄糖醛酸苷 (degree = 7)、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷 (degree = 7) 均有较好的连接度,均可能是紫苏的活性成分;在 14 个核心靶点中, MAPK1 (degree = 16)、PIK3CA (degree = 14)、MAPK8 (degree = 12)、EGFR (degree = 12) 的连接程度高于其他靶点,表明他们发挥了关键作用;在 15 条核心通路中,癌症中的蛋白聚糖 (degree = 12)、癌症中的信号通路 (degree = 11)、癌症中的微小 RNA (degree = 8)、新型冠状病毒信号通路 (degree = 8) 的连接程度高于其他通路,4 个活性成分主要通过调控以上通路发挥药效。以上结果表明,紫苏是通过调控不同通路的多个靶点,发挥疾病治疗作用。

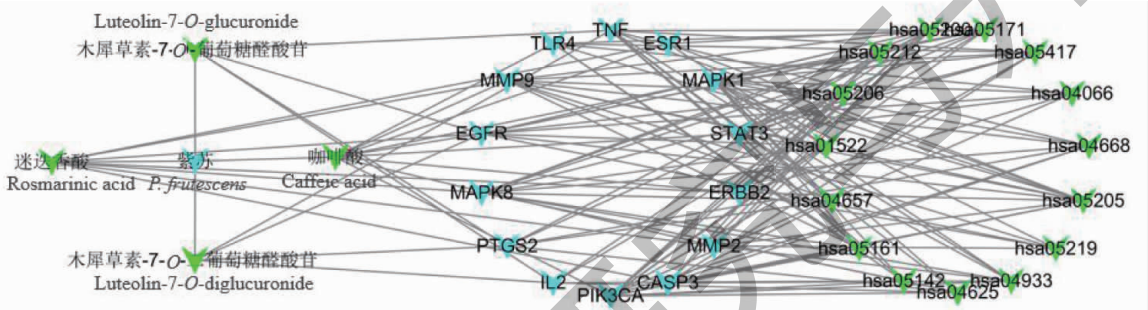


图 8 “活性成分-靶点-通路”网络图

Fig. 8 "Active ingredient-target-pathway" network diagram

2.3 分子对接验证

根据上述网络药理学结果,选取 PPI 网络中节点度值排名靠前的核心靶点与 4 个关键活性成分进行分子对接。紫苏 4 个活性成分与关键靶点分子的结合能如表 4 所示,将每个活性成分结合最稳定的对接结果进行可视化,结果如图 9 所示。由表 4 和图 9 可以看出迷迭香酸与 PTGS2 (PDB:5F19) 的结合能最高 (-7. 93 kcal/mol), 通过 VAL-769、ASN771、VAL774 在 PTGS2 的活性口袋与 12 个氢键结合;咖啡酸与 CASP3 (PDB:1NME) 的结合能最高

(-7. 0 kcal/mol), 通过 CYS-163、GIN-161、AGR-207、SER-120 在 CASP3 的活性口袋与 7 个氢键结合;木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷与 PTGS2 (PDB:5F19) 的结合能最高 (-9. 3 kcal/mol), 通过 THR-60、PHE-371、SER-126、GLN-372 在 PTGS2 的活性口袋与 13 个氢键结合;木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷与 EGFR (PDB:3POZ) 的结合能最高 (-7. 82 kcal/mol), 与 AGR-705、VAL-769、ALA-705、VAL-774 在 EGFR 的活性口袋与 15 个氢键结合。

表 4 成分与关键靶点的分子对接结果

Table 4 Binding result of components with its key targets

化合物 Compound	结合能 Binding energy (kcal/mol)			
	PTGS2	TNF	CASP3	EGFR
咖啡酸 Caffeic acid	-6.44	-6.73	-7.0	-6.83
迷迭香酸 Rosmarinic acid	-7.93	-6.99	-6.73	-4.63
木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷 Luteolin-7-O-diglucuronide	-4.4	-3.38	-6.15	-7.82
木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷 Luteolin-7-O-glucuronide	-9.3	-7.8	-7.14	-7.26

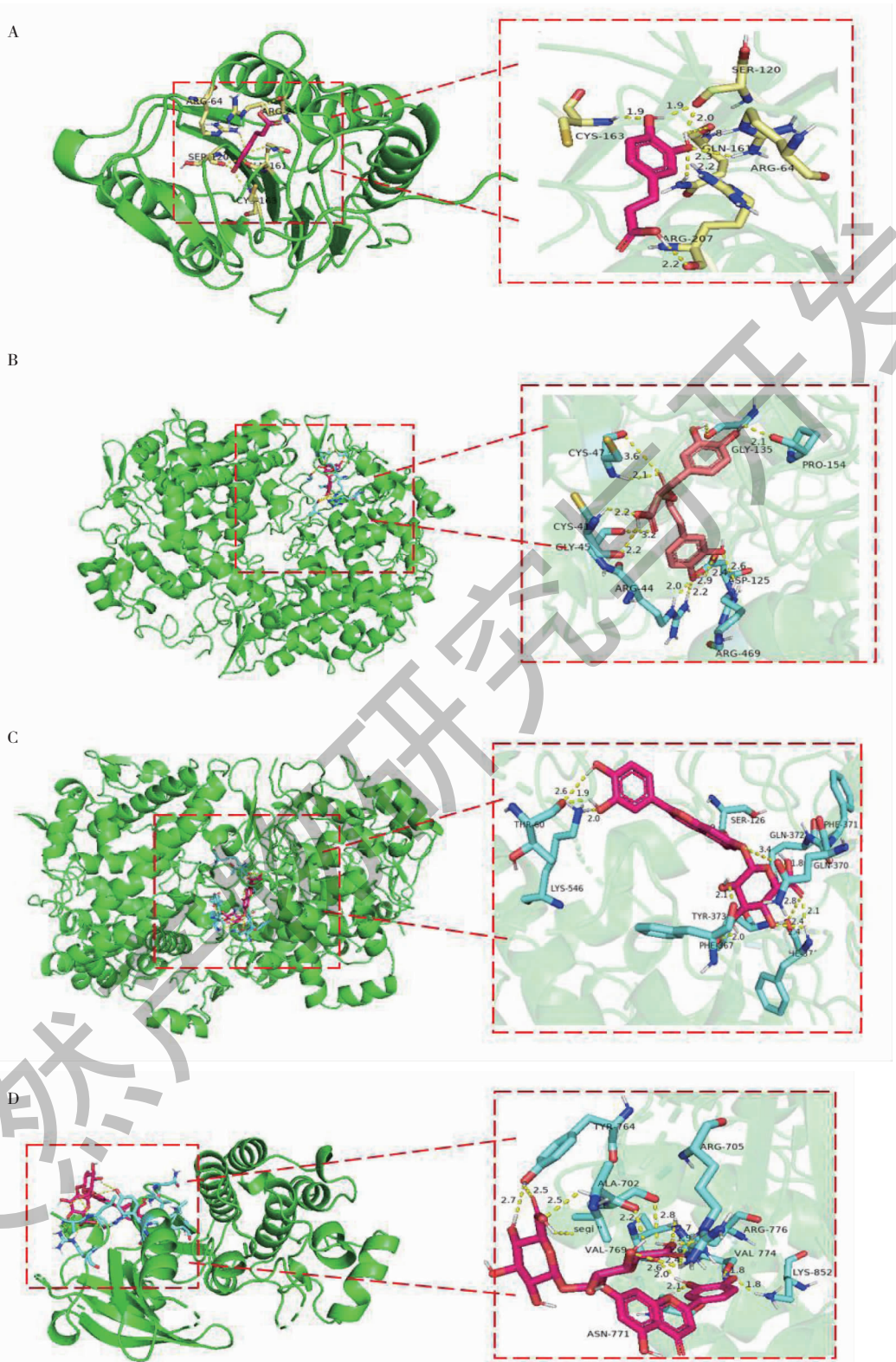


图9 紫苏活性成分与关键靶点的对接结果

Fig. 9 Docking results of active ingredients in *P. frutescens* with key targets

注:A: 咖啡酸-CASP3; B: 木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷-EGRF; C: 木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷-PTGS2; D: 迷迭香酸-PTGS2。Note: A: Caffeic acid-CASP3; B: Luteolin-7-O-diglycuronide-EGRF; C: Luteolin-7-O-glucuronide-PTGS2; D: Rosmarinic acid-PTGS2.

3 讨论与结论

“药食同源”思想在我国历史悠久。早在《素问》中就曾提到“药食同源”的概念:“空腹食之为食物,患者食之为药物”^[13]。随着生活品质的提高,人们对于健康养生的观念也更加强烈,紫苏作为药食同源中药在我国有着十分悠久的历史,前景十分广阔。但紫苏易受地区、环境等因素的影响,使得紫苏不同部位的生长发育存在差异,从而导致不同部位活性成分存在一定差异,最终表现为药理作用的差异性。迄今为止,紫苏的相关研究多聚焦于紫苏叶,对梗的研究甚少,且缺乏对紫苏质量的整体性和系统性的研究,从而导致其在药用开发方面的资源浪费。中医药高质量发展的关键核心是建立科学合理的中药质量评价体系和不断创新和完善中药质量评价模式,才能实现对中医药产业的正向引导,保证中药使用的安全有效^[14]。目前,关于紫苏的质量评价方法缺少整体性和特征性成分的评价,因此,建立一个更加系统且全面的方法来进行紫苏质量评价是很有必要的。

本研究首先考察了不同的色谱条件,对比了不同波长(230、330 nm)、不同流动相(甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液)、不同流速(0.2、0.3 mL/min)、不同进样量(1、2 μ L)等条件,结果表明在 330 nm 波长下,以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相,流速设置为 0.3 mL/min、进样量 2 μ L 为最优条件;同时考察了不同比例溶剂(40%、60%、80% 甲醇溶液),结果表明以 40% 甲醇为提取溶剂时,色谱峰峰数相对较多、峰面积值大、整体基线好,因此选择此浓度作为提取溶剂,方法学考察表明所建立的指纹图谱方法准确、可靠。结果表明,建立的 15 批紫苏叶、共有成分为 5 个,14 批紫苏梗共有成分为 4 个,除芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷外,木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、咖啡酸为紫苏不同部位的共有成分。从含量上来看,迷迭香酸的平均含量最高。不同批次的样品之间的相同化学成分含量存在一定差异,原因可能是因为不同地区种植的紫苏由于栽种环境的差异、会导致活性成分及含量发生变化^[5],并且由于储存时间及加工方式的不同,化学成分也会受到影响。

为阐明紫苏潜在作用的功效物质和核心靶点,本研究在 UPLC 指纹图谱基础上联合网络药理学技术,筛选出了 4 个潜在的药效关联物质,包括 2 个有

机酸类化合物(咖啡酸、迷迭香酸)和 2 个黄酮类化合物(木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷)。共筛选出了包括 PTGS2、TNF 在内的 14 个核心靶点,相关研究表明 PTGS2 主要产物前列腺素具有抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、抑制免疫监视、促进血管生成等生物活性^[15];TNF 在免疫反应调节、T 细胞介导的组织损伤、慢性炎症的发生发展等方面产生重要作用^[16];EGFR 在调节细胞增殖、存活和分化过程中有着重要作用^[17],以上均表明紫苏通过多靶点、多途径作用于多种疾病分子机制。GO 富集分析结果显示,核心靶点主要参与了凋亡过程的正(负)调控、基因的表达调控等生物过程。研究表明紫苏为天然的抗肿瘤药物,紫苏中的迷迭香酸能影响抗氧化因子水平,提高机体抗氧化能力导致肿瘤细胞的生长受到抑制^[18];同时紫苏中富含多种黄酮类化合物,在体外能显著促进肝癌细胞 HepG2 凋亡;提升免疫器官指数及外周免疫细胞数和血清细胞因子水平,从而达到体内抗肿瘤的效果^[19]。而 KEGG 富集分析结果显示,筛选出的前 15 条通路有 6 条与之相关,包括癌症中的蛋白聚糖、癌症中的信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、胰腺癌信号通路、癌症中的微小 RNA、膀胱癌这 6 条信号通路,表明紫苏具有良好的抗癌效应,具体作用机制有待研究者们进一步研究。中药作为我国的治病之本,在新冠肺炎暴发后,我国多省相继出台了以益气防外、疏风泄热、化湿为原则的中医药方案,KEGG 富集分析结果显示,紫苏作用于新冠肺炎信号通路,同时有关研究表明紫苏叶提取物能抑制 SARS-CoV 2 病毒 RNA 和蛋白质合成以及病毒诱导的细胞因子产生^[20],这将为也是临床上预防或治疗 COVID-19 提供科学的依据。

综上所述,本研究以 Q-Marker 理念为基础,基于指纹图谱方法,筛选出迷迭香酸、咖啡酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷作为潜在质量标志物。联合网络药理学方法对筛选出的活性成分进行靶点预测和相关通路富集,由筛选出的 14 个核心靶点可知,PTGS2、TNF、CASP3、EGFR、ESR1 和癌症中的信号通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子信号通路、脂质和动脉粥样硬化、新型冠状病毒信号通路、胰腺癌信号通路可能是紫苏发挥作用的关键靶点和信号通路。本研究初步分析紫苏不同部位潜在的质量标志物,能够为紫苏质量控制方法及体系的建立提供理论和实验依据,从而更好地

开发利用紫苏的“药食同源”属性,同时也能够成为含有紫苏的复方质量标志物的筛选的有力方法,提高质量控制水平。

参考文献

- Li SZ. Compendium of Materia Medica[M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 3027.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 353.
- He YP, Hao EW, Xie JL, et al. Advances in the study of pharmacology and basic chemical substances of *Perilla frutescens* (L.) Britt [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 3957-3968.
- Gu JL, Ren JQ, Wei XJ, et al. Research progress on distribution and functional analysis of active components in different organs of *Perilla frutescens* (L.) Britt [J]. J North Agr (北方农业学报), 2021, 49: 118-126.
- Liu CX, Chen SL, Xiao XH, et al. Chinese medicine quality marker (Q-Marker): a new concept for quality control of Chinese medicine products [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1443-1457.
- Zhang LJ. Application of chromatographic fingerprint in quality standard system of traditional Chinese medicine [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2009, 13: 1414-1417.
- Wang FX. Application and development of network pharmacology in Chinese medicine research [D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2022.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. Nucl Acids Res, 2017, 45: D362-D368.
- Zhang XW, Liu AM, Zhao JJ, et al. The mechanism of ephedra forsythia Chixiaodou decoction in treating eczema was studied by network pharmacology and molecular docking technique [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 894-901.
- Guo JQ. Evaluation of chemical constituents in *Perilla germplasm*. [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine (江西中医药大学), 2019.
- Zhang LQ, Li WJ, Xiao MF. Comparison of active components from different parts of *Perilla* and research progress in pharmacological action [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 6551-6571.
- Zhang CW, Guo JQ, Li WP, et al. Study on correlation of 8 phenolic acids and flavonoids in different parts of Pa-type *Perilla* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 3447-3451.
- Song XF, Lei YK, Liu L, et al. Research progress on the efficacy and mechanism of medicinal and edible homologous Mosaic plants on hyperuricemia [J]. Acta Agric Bor-Sin (华北农学报), 2021, 36: 195-201.
- Ma SC, Wang Y, Wei F. Practice and exploration of Chinese Traditional medicine quality control model in the past ten years [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2023, 58: 2-9.
- Popovics P, Awadallah WN, Kohrt SE, et al. Prostatic osteopontin expression is associated with symptomatic benign prostatic hyperplasia [J]. Prostate, 2020, 80: 731-741.
- Bhattacharyya S, Ghosh SS. Unfolding transmembrane TNF α dynamics in cancer therapeutics [J]. Cytokine, 2021, 137: 155303.
- Zhu J, Li Y, Wu X, et al. *In vivo* PET imaging of EGFR expression: an overview of radiolabeled EGFR TKIs [J]. Curr Top Med Chem, 2022, 22: 2329-2342.
- Venkatachalam K, Gunasekaran S, Jesudoss VAS, et al. The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis [J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65: 409-418.
- Wang YF. Study on antitumor activity of *Perilla* flavone and preparation of *Perilla* honey paste [D]. Jilin Agric Univ (吉林农业大学), 2022.
- Tang WF, Tsai HP, Chang YH, et al. *Perilla* (*Perilla frutescens*) leaf extract inhibits SARS-CoV-2 via direct virus inactivation [J]. Biomed J, 2021, 44: 293-303.