

广金钱草挥发油基于 TRP 通道的抗炎作用研究

杨欣, 李亚辉, 李来来, 刘明, 钱海兵*

贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

摘要: **目的** 筛选广金钱草挥发油抗炎作用的关键化学成分及靶标蛋白。**方法** 采用水蒸气蒸馏法提取广金钱草中的挥发油, 通过气相色谱-质谱联用法鉴定其化学成分, 采用峰面积归一化法测定其化学成分的相对含量。基于中药系统药理学技术平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP) 建立小分子配体库, 借助 Swiss Target Prediction 在线进行反向靶标预测, 通过 KOBAX 3.0 筛选抗炎通路, 采用分子对接技术 (SYBYL 2.1) 将关键小分子与瞬时受体电位 (TRP) 通路中的靶标蛋白进行能量匹配, 基于 Cytoscape 3.5.1 构建化学成分-靶标网络模型。**结果** 从广金钱草挥发油中共检测出 48 个色谱峰, 通过质谱库及文献检索确定 33 种化合物结构, 占挥发油总量的 90.1%。关键化学成分 17 个, 共筛选出 88 个靶标蛋白, TRP 通路包括 11 个潜在靶标。分子对接发现叶绿醇、三十一烷、法尼基丙酮和角鲨烯等为广金钱草挥发油发挥抗炎作用的关键化学成分。TPRV1、PRKCB 和 PRKCD 为抗炎关键靶标蛋白。**结论** 初步筛选了广金钱草挥发油抗炎的关键靶点及活性成分, 为其产品的开发和应用提供理论依据。

关键词: 广金钱草; 挥发油; 瞬时受体电位通路; 分子对接; 叶绿醇; 三十一烷; 法尼基丙酮; 角鲨烯

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0134-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.021

Anti-inflammatory effects of volatile oils of *Desmodium styracifolium* via regulation of TRP channels

YANG Xin, LI Ya-hui, LI Lai-lai, LIU Ming, QIAN Hai-bing

Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To screen out the key chemical constituents and target protein of essential oil of *Desmodium styracifolium* for its anti-inflammatory effect. **Methods** Steam distillation method was used to extract the volatile oils from *D. styraci folium*, and its chemical constituents were identified by GC-MS, and the relative content of chemical constituents was determined by peak area normalization. The small molecule ligand library was established based on Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP). Reverse target prediction was conducted online using Swiss Target Prediction, the anti-inflammatory pathways were screened by KOBAX 3.0, conducting energy match between the key small molecular and the target protein in the TRP channels by molecular docking (SYBYL2.1). Construction of chemical constituents-targets network model was based on Cytoscape 3.5.1. **Results** A total of 48 chromatographic peaks were detected from *D. styracifolium* volatile oils, and 33 kinds of compound structure were determined by searching in mass spectral database and document retrieval, which account for 90.1% of total volatile oils. There were 17 key chemical constituents, and 88 target proteins were selected. TRP channels included 11 potential targets. Through molecular docking, we found that the phytol, hentriacontane, farnesyl acetone, and squalene were the key anti-inflammatory chemical constituents of *D. styraci folium* volatile oils. TPRV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1), PRKCB (protein kinase C, beta), and PRKCD (protein kinase C, delta) (degree > 10) are the key anti-inflammatory target protein. **Conclusion** We preliminarily select the key anti-inflammatory target and active constituents of *D. styraci folium* volatile oils from this study, and this research provides the theoretical basis for the development and application of its products.

Key words: *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.; volatile oil; TRP channels; molecular docking; phytol; hentriacontane; farnesyl acetone; squalene

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才 [2017] 5735 号-11); 2017 年度贵阳中医学院博士启动项目 (20170005); 贵州省普通高等学校特色重点实验室 (黔教合 KY 字 [2017] 006); 贵州省国内一流建设学科 (中药学) (GNYL [2017] 008 号)

作者简介: 杨欣 (1987—), 女, 讲师, 博士研究生, 中药天然药物药效物质基础研究。Tel: 15519017619 E-mail: yangxin9876@126.com

*通信作者 钱海兵, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药及民族药的应用基础研究。E-mail: hbqian@163.com

挥发油是中药活性成分之一,也称为芳香油或精油,具有广泛的药理作用,发挥化湿、解表和行气等功效,可以预防局部或全身疾病。目前,国内外学者已对中药挥发油的提取及抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用进行深入研究,并取得了显著的成果^[1]。中药挥发油化学成分非常复杂,在疾病中共同发挥作用,导致结果或机制的复杂性。因此,一些简单的药理学方法不能系统地揭示中药挥发油化学成分在体内的作用机制。目前,科学技术的不断发展、多学科的相互交叉为挥发油药效的评价提供了高效、快速的方法^[2]。靶点筛选借助计算机模拟分析、生物信息学和分子网络数据等,从不同角度预测药物发挥药效的作用机制,成为药效评价体系不可缺少的一部分^[3]。利用计算机辅助药物平台可以评价挥发油的药效,预测发挥药理作用的靶标蛋白(基因),整体、系统、全面地研究挥发油-靶标-通路-疾病之间的关联性,为挥发油的药理作用及产品开发等提供理论依据和技术支撑。

广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. 为临床常用中药材,又名金钱草、马蹄草、马蹄香等,以“马蹄草”记载于《岭南采药录》,为豆科植物广金钱草的干燥地上部分^[4],不仅可以药用,还可以食用。广金钱草广泛分布在我国广东、广西、福建等地,在越南、缅甸、印度等国家也有分布。其药理作用有抗炎、抗氧化、保肝利胆等,民间广泛用于治疗肝、肾、胆结石,临床上主要用于治疗泌尿系统结石。广金钱草的主要化学成分为生物碱类、萜类、黄酮类、挥发油和甾醇类等^[5]。有关广金钱草挥发油抗炎作用的分子机制研究较少^[6],因此本研究采用水蒸气蒸馏法提取广金钱草中的挥发油,通过气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术鉴定其化学成分,用峰面积归一化法测定其化学成分的相对质量分数。借助在线软件预测广金钱草挥发油化学成分的靶标蛋白,对靶标蛋白进行通路及蛋白相互作用分析,采用分子对接技术将其小分子和瞬时受体电位(TRP)通道靶标蛋白进行能量匹配,为其挥发油的开发和应用提供理论依据。

1 材料与仪器

广金钱草采自广西南宁,经贵阳中医学院药学院周静教授鉴定为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. 的干燥地上部分,密封室温放置于样本室,编号为201811005,备用。

KDM-2000 电热套(江苏杰瑞尔电器有限公司); Agilent 6890/5975C 气质(GC-MS)联用仪(美国 Agilent 公司); UX2200H 电子天平(精度 0.01 g, 日本岛津公司); 挥发油提取器(厦门海标科技有限公司); LK-400A 摇摆式中药粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司); 正己烷、无水 Na₂SO₄ 均为国产分析纯。

司); Agilent 6890/5975C 气质(GC-MS)联用仪(美国 Agilent 公司); UX2200H 电子天平(精度 0.01 g, 日本岛津公司); 挥发油提取器(厦门海标科技有限公司); LK-400A 摇摆式中药粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司); 正己烷、无水 Na₂SO₄ 均为国产分析纯。

2 方法

2.1 广金钱草挥发油的提取

参照《中国药典》2015年版水蒸气蒸馏法提取,取干燥的广金钱草 100 g,粉碎,过 3 号筛(50 目),并混合均匀^[7]。置于 2 L 圆底烧瓶中,加入 1 L 蒸馏水浸泡过夜,加正己烷 1 mL,连续提取 5 h,用旋转蒸发器回收正己烷,得到具有芳香气味的透明油状液体 2.2 mL,可能含有极少量正己烷,GC-MS 检测可以忽略,经无水 Na₂SO₄ 干燥,终产物置于 4 °C 的低温冰箱中冷藏备用。

2.2 GC-MS 条件

广金钱草挥发油样品采用 GC-MS 联用仪进行分析,色谱柱为 FB-5MSI(30 m×0.25 mm,0.25 μm)弹性石英毛细管柱,初始温度 48 °C(保留 2 min),以 4 °C/min 升温至 220 °C,再以 15 °C/min 升温至 310 °C,保留 5 min,运行时间 56 min;汽化室温度 250 °C;柱前压 52 kPa,载气流量 1.0 mL/min,分流,分流比 20:1,溶剂延迟时间 5.0 min。离子源(EI)温度 230 °C;四极杆温度 150 °C;射电流 34.6 μA;电子能量 70 eV;发倍增器电压 1 659 V;接口温度 280 °C;质量范围 *m/z* 29~450。

2.3 小分子的优化处理

通过中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP)下载广金钱草小分子的 mol2 结构,基于 SYBYL 2.1 (Tripos)对广金钱草小分子加氢和加电荷^[8],每个分子进行 Minimize 能量优化及加氢处理,优化参数为:优化次数 10 000,能量收敛标准 0.000 5 kcal/(mol·nm),选择 Tripos 标准分子力场和添加 Gasteiger-Hückel 电荷,基于 Powell 能量梯度法优化得到最低能量构象,进行能量优化的目的是寻找配体分子的最低能量构象以模仿自然体系中的分子稳定构象,保存为 SLN 格式。

2.4 靶标蛋白筛选

SwissADME (<http://www.swissadme>)具有多个模块,本研究采用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[9]模块,该模块能根

据化学成分的 2D 和 3D 结构精确预测生物活性分子靶点。通过 Swiss Target Prediction 进行靶标预测, 输入主要化学成分的简化分子线性输入规范 (simplified molecular input line entry specification, SMILES), Organism 选择 Homo Sapiens, 每个化学成分通过 ChemAxon molconvert 工具生成 20 种不同构象, 每个构象有 18 维特征向量, 根据曼哈顿距离和 logistic 回归模型进行评分。系统默认每个化学成分输出 15 个靶标蛋白, 包括蛋白名称、基因名称、Uniprot ID 等信息。

2.5 通路分析

靶标通路分析基于 KOBAS (KEGG orthology based annotation system) 在线分析 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)^[10], 通过 KOBAS 软件的 ID 映射 (ID Mapping) 功能模块, 将检索的基因 ID 通过 Blast 或直接映射到相应的基因名称, 这些基因通过数据库富集到相应的通路 (pathway)、GO (Gene Ontology) 功能、疾病 (disease)。在基因列表中输入基因 ID, 物种选择: 人源 (homo sapiens), 选择 KEGG pathway, 在线分析完成, 输出结果。得到靶标蛋白所参与的所有途径, 筛选出靶标蛋白显著参与的途径 ($P \leq 0.01$), 通过 Rstudio 中的 ggplot2 绘制前 10 条通路, 包括通路名称、富集因子、富集分析的 P 值和 Q 值等。富集因子通过计算所得, 数值越大表示富集程度越大。

2.6 分子对接

采用药物分子设计模拟 SYBYL 2.1 软件的 Surflex-Dock 模块完成分子对接研究^[11]。基于 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)^[12-16] 下载 transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TPRV1, PDBID: 2PNN)、Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TPRV4, PDBID: 4DX1)、transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TPRV2, PDBID: 2F37)、protein kinase C gamma (PRKCG, PDBID: 2E73)、protein kinase C beta (PRKCB, PDBID: 1A25)、protein kinase C alpha (PRKCA, PDBID: 4DNL)、protein kinase C theta (PRKCT, PDBID: 2ENJ)、protein kinase C delta type regulatory subunit (PRKCD, PDBID: 1YRK)、protein kinase C eta (PRKCH, PDBID: 3THO) 和 protein kinase C epsilon (PRKCE, PDBID: 1GMI) 的晶体结构。选用 AMBER7 FF99 力场进行能量优化; 选

择 Automatic 模式产生活性口袋, 优化完毕后保存为 SFXC 文件作为对接文件, 其他所有参数均采用 Sybyl 默认值。利用 Surflex-Dock 分子对接模块的 Total-Score 打分函数对小分子与靶标相互作用进行评分, 综合考虑了极性作用、疏水作用、焓和溶剂化等因素, 该值越大, 表明对接复合物越稳定, 小分子化合物与大分子蛋白的匹配结合作用越好。Total-Score 大于 5.0 表明小分子与靶点有较好的结合活性, 大于 7.0 表明分子与靶点的结合构型具有强烈的活性。

2.7 相互作用分析

Ligplot 作为经典的配体与蛋白二维相互作用作图软件, 应用较广泛, 氢键和疏水作用基于 HBPLUS 程序计算, 以 2D 的形式展示结构, 方便观察。本研究基于 Ligplot 1.4.5 版本, 将挥发油关键化学成分与靶标蛋白 merg 以 PDB 格式保存, 导入 Ligplot 软件中, 自动计算形成的氢键、疏水作用和结构比对。

3 结果

3.1 挥发油化学成分

通过 GC-MS 联用仪对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对 Wiley275 和 Nist2005 标准质谱图, 鉴定出其中的特征成分, 以面积归一化法计算广金钱草挥发油各组分的相对含量, 得到其总离子流图 (图 1), 确定了 33 种挥发性化学成分 (表 1)。本实验由于柱温升高速率较快 (缩短检测时间), 导致背景偏高, 呈现出基线上移状态, 但是进行检索时已经扣除峰谷背景, 上移未对数据检索带来过多干扰。

广金钱草挥发油中共鉴定出 33 个化合物, 占挥发油总量的 90.1%, 质量分数较高的为六氢法尼基丙酮、二十二烷、二十三烷、二十四烷、二十五烷、二十六烷、二十七烷等 17 个化学成分 (质量分数 $> 1\%$), 占挥发油总量的 86.436%, 作为分子对接的配体库。

3.2 通路分析

借助 Swiss Target Prediction 筛选广金钱草挥发油主要化学成分的靶标蛋白。Swiss Target Prediction 系统默认每个化学成分输出 15 个靶标蛋白, 17 个化学成分共筛选出 255 个, 去除重复出现的靶标蛋白, 共筛选出 88 个靶标蛋白, 参与 110 条代谢途径。采用 Rstudio 的 ggplot2 输出前 10 条显著通路 (图 2)。10 条通路中包括 inflammatory mediator regulation of TRP channels (P 值 = 1.26×10^{-10})。

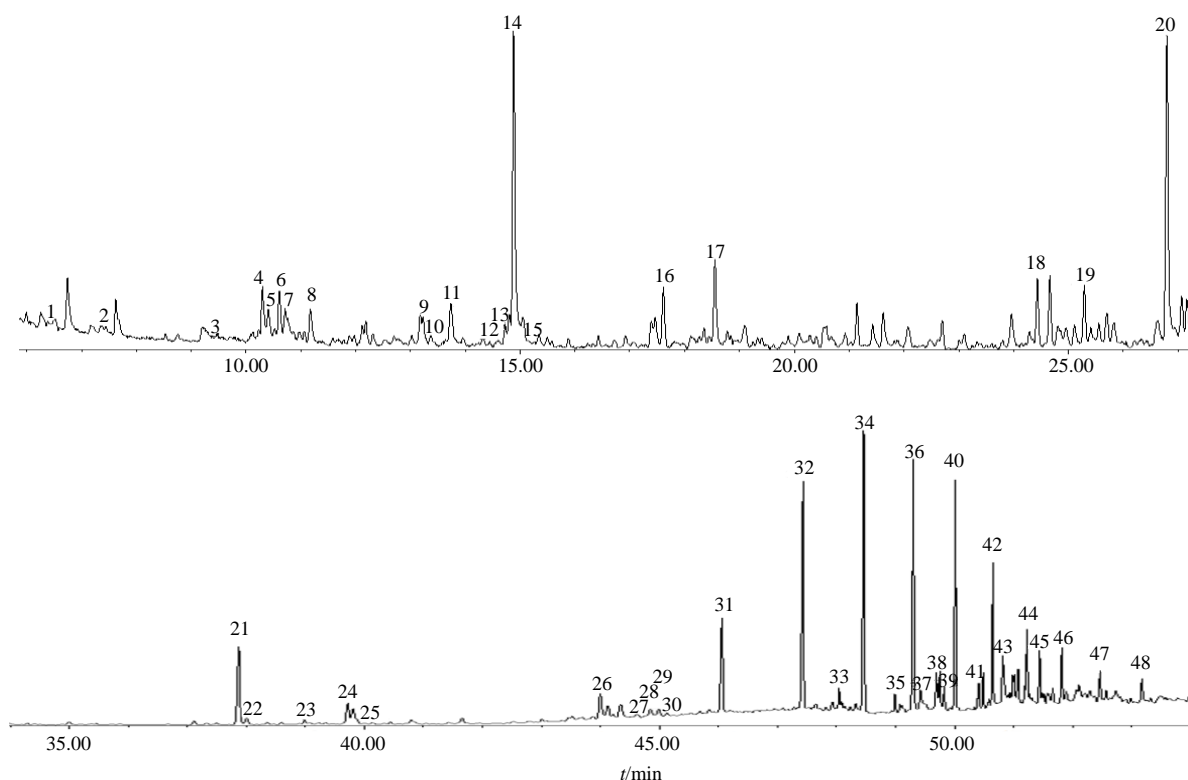


图 1 挥发油成分总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of component of volatile oils

3.3 分子对接

TRP 通路包括 11 个潜在靶标, 其中 Bradykinin receptor B1 (BDKRB1) 没有原配体, 将不深入研究, 将小分子与 TRP 通路中的 10 个靶标蛋白进行能量匹配, 筛选重要的抗炎靶标蛋白 (表 2)。Surflex-Dock 具有速度快、准确性高, 对接结果以 Total Score、C-Score、D-Score、Crash 和 Polar 等参数值输出, 配体与受体结合稳定性以 Total-Score 值的大小来评价, 以 Total-Score 等于或大于 5 为阈值, 挑选对接效果好的化合物。

3.4 化学成分-靶标网络模型构建

化学成分-靶标网络模型基于开源的复杂网络分析与可视化平台 Cytoscape 3.5.1 进行绘制^[17], 根据度 (degree) 的大小筛选关键靶点及化学成分, 整个网络包括化学成分和靶标 2 类节点 (node), 分别计算网络每个节点的度, 整个网络中节点的大小与此节点的度呈正比, 即与此节点相连的边越多, 度越大, 节点也就越大。结果表明叶绿醇、三十一烷、法尼基丙酮、角鲨烯、2-硬脂酸单甘油酯和 1-棕榈酸单甘油酯为广金钱草挥发油发挥抗炎的关键化学成分, 分子对接总分大于 50。TPRV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V,

member 1)、PKCB (protein kinase C, beta) 和 PKCD (protein kinase C, delta) 为广金钱草挥发油调节的关键靶标蛋白 (degree > 10), 分子对接总分大于 90 (图 3)。

3.5 相互作用分析

基于 Ligplot 1.4.5 软件对广金钱草挥发油关键化学成分 (Total-Score > 50) 和 TPRV1、PRKCD 的相互作用进行分析, 结果以氢键、疏水作用和结构比对输出, 筛选关键的氨基酸位点。结构比对结果见表 3、4, 叶绿醇、三十一烷、法尼基丙酮、角鲨烯、2-硬脂酸单甘油酯和 1-棕榈酸单甘油酯与 TPRV1 相互作用有很大的相似性, 结构比对中可以看出 Lys155、Tyr194、Leu163、Tyr199 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同 (表 3); 同样这些化合物与 PRKCD 的相互作用有很大的相似性, 结构比对中可以看出 Ala61、Asp60、Try64、Glu23、Gln8 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同 (表 4)。可以推测这些残基就是 TPRV1 和 PRKCD 的重要残基, 其在决定酶的催化特性中起到了重要作用。

4 讨论

炎症在多种疾病中扮演重要角色, 主要指机体组织损伤或病原体感染时产生的复杂反应, 导致各

表1 广金钱草挥发油中的化学成分

Table 1 Chemical composition in volatile oils of *D. styracifolium*

编号	<i>t</i> /min	化合物	分子式	相对分子质量	质量分数/%
1	6.75	1-己醇 (1-hexanol)	C ₆ H ₁₄ O	102	0.098
2	7.62	壬烷 (nonane)	C ₉ H ₂₀	128	0.062
3	9.20	—	—	—	0.053
4	10.30	1-辛烯-3-酮 (1-octen-3-one)	C ₈ H ₁₄ O	126	0.068
5	10.40	1-辛烯-3-醇 (1-octen-3-ol)	C ₈ H ₁₆ O	128	0.038
6	10.60	6-甲基-5-庚烯-2-酮 (6-methyl-5-hepten-2-one)	C ₈ H ₁₄ O	126	0.063
7	10.71	2,2,4,6,6-五甲基庚烷 (2,2,4,6,6-pentamethylheptane)	C ₁₂ H ₂₆	170	0.054
8	11.18	辛醛 (octanal)	C ₈ H ₁₆ O	128	0.050
9	13.18	—	—	—	0.041
10	13.23	γ-萜品烯 (γ-terpinene)	C ₁₀ H ₁₆	136	0.035
11	13.73	正辛醇 (1-octanol)	C ₈ H ₁₈ O	130	0.071
12	14.73	—	—	—	0.016
13	14.80	—	—	—	0.034
14	14.88	壬醛 (nonanal)	C ₉ H ₁₈ O	142	0.485
15	15.06	—	—	—	0.039
16	17.61	4-萜烯醇 (4-terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.094
17	18.55	癸醛 (decanal)	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.130
18	24.66	大马士酮 (β-damascenone)	C ₁₃ H ₁₈ O	190	0.097
19	25.29	—	—	—	0.076
20	26.80	香叶基丙酮 (geranyl acetone)	C ₁₃ H ₂₂ O	194	0.458
21	37.87	六氢法尼基丙酮 (hexahydrofarnesylacetone)	C ₁₈ H ₃₆ O	268	6.524
22	38.01	—	—	—	0.684
23	39.00	—	—	—	0.319
24	39.72	法尼基丙酮 (farnesyl acetone)	C ₁₈ H ₃₀ O	262	2.104
25	41.66	二十烷 (eicosane)	C ₂₀ H ₄₂	282	0.834
26	44.00	二十一烷 (heneicosane)	C ₂₁ H ₄₄	296	2.462
27	44.13	—	—	—	1.092
28	44.35	叶绿醇 (phytol)	C ₂₀ H ₄₀ O	296	1.379
29	44.85	—	—	—	1.038
30	44.99	—	—	—	0.873
31	46.06	二十二烷 (docosane)	C ₂₂ H ₄₆	310	6.228
32	47.43	二十三烷 (tricosane)	C ₂₃ H ₄₈	324	12.835
33	48.04	4,8,12,16-四甲基十七烷-4-内酯 (4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide)	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324	0.937
34	48.46	二十四烷 (tetracosane)	C ₂₄ H ₅₀	338	15.035
35	48.99	—	—	—	0.785
36	49.30	二十五烷 (pentacosane)	C ₂₅ H ₅₂	352	11.648
37	49.42	1-棕榈酸单甘油酯 (1-monopalmitin)	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	1.395
38	49.75	—	—	—	1.475
39	49.82	—	—	—	0.693
40	50.01	二十六烷 (hexacosane)	C ₂₆ H ₅₄	366	8.748
41	50.48	—	—	—	1.264
42	50.64	二十七烷 (heptacosane)	C ₂₇ H ₅₆	380	5.338
43	50.81	2-硬脂酸单甘油酯 (2-monostearin)	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	358	2.646
44	51.23	二十八烷 (octacosane)	C ₂₈ H ₅₈	394	2.684
45	51.44	角鲨烯 (squalene)	C ₃₀ H ₅₀	410	2.104
46	51.81	二十九烷 (nonacosane)	C ₂₉ H ₆₀	408	2.529
47	52.46	三十烷 (triacontane)	C ₃₀ H ₆₂	422	1.303
48	53.18	三十一烷 (hentriacontane)	C ₃₁ H ₆₄	437	1.474

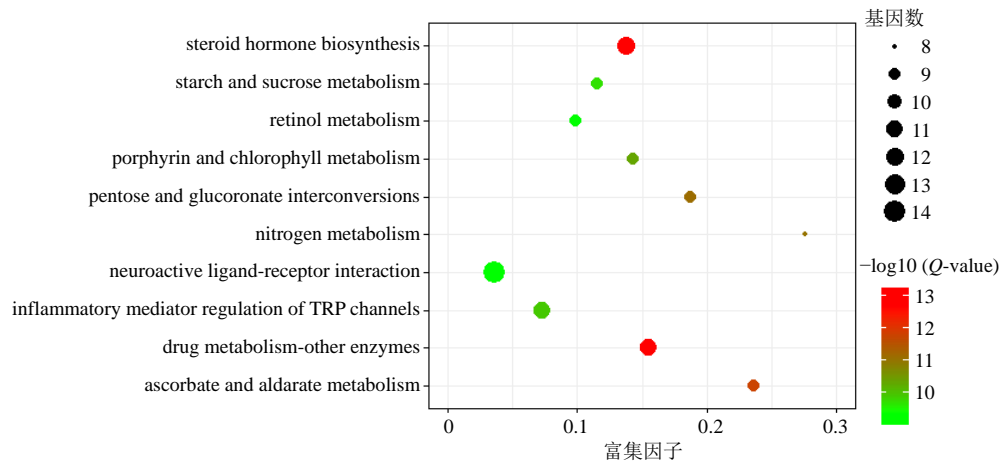


图 2 靶标蛋白通路分析

Fig. 2 Analysis of target protein pathway

表 2 活性成分与靶标蛋白分子对接

Table 2 Docking of active components with target protein molecules

化合物	分子对接得分										总计
	TPRV4	TPRV2	TPRV1	PRKCA	PRKCB	PRKCD	PRKCE	PRKCG	PRKCQ	PRKCH	
六氢法尼基丙酮	4.21	4.56	6.68	3.21	4.81	6.83	4.19	4.34	4.12	6.12	49.07
法尼基丙酮	3.91	4.29	5.66	3.85	5.46	6.83	3.58	6.17	5.55	6.12	51.42
二十一烷	2.20	4.67	5.90	3.43	4.69	6.83	1.20	4.75	4.36	4.94	42.97
叶绿醇	4.40	5.47	6.31	4.33	5.61	5.57	5.40	4.58	5.79	6.31	53.77
二十二烷	3.19	4.99	6.07	5.16	5.67	5.02	2.55	4.95	4.95	4.22	46.77
二十三烷	4.43	5.78	7.00	3.21	5.21	5.31	2.82	4.93	3.94	3.30	45.93
二十四烷	4.29	4.41	6.50	3.72	5.35	5.76	3.61	6.14	3.78	4.99	48.55
二十五烷	2.16	4.35	6.91	4.55	4.98	5.64	2.66	3.71	4.27	1.75	40.98
1-棕榈酸单甘油酯	4.65	3.28	7.21	2.90	6.67	7.40	3.73	5.83	5.88	4.63	52.18
二十六烷	3.41	5.69	2.83	4.23	4.79	7.10	3.25	3.76	4.06	3.12	42.24
二十七烷	4.14	4.86	6.10	3.37	5.24	7.30	3.85	5.90	4.54	5.60	50.90
2-硬脂酸单甘油酯	3.25	4.58	7.17	4.96	5.71	8.48	5.37	4.50	7.29	4.23	55.54
二十八烷	2.60	4.10	7.46	3.04	6.22	3.02	-0.92	4.19	4.46	5.16	39.33
角鲨烯	4.38	6.36	7.32	3.74	5.77	6.77	3.86	5.66	5.13	2.87	51.86
二十九烷	3.44	4.96	6.51	4.23	6.13	5.74	3.67	6.48	4.24	3.55	48.95
三十烷	2.54	3.34	6.93	1.60	3.47	— ¹	2.67	3.93	5.35	2.16	31.89
三十一烷	6.87	4.71	6.97	5.50	3.97	9.03	2.83	3.28	5.19	5.44	53.79
总计	64.07	80.40	109.53	65.03	90.65	102.63	54.32	83.10	82.90	74.51	— ²

—¹-三十烷与蛋白激酶 Cδ (PRKCD) 没有结合; —²-化合物或蛋白未进行加合分析

—¹-triacontane does not bind to protein kinase C delta (PRKCD); —²-no additive analysis of compounds or proteins

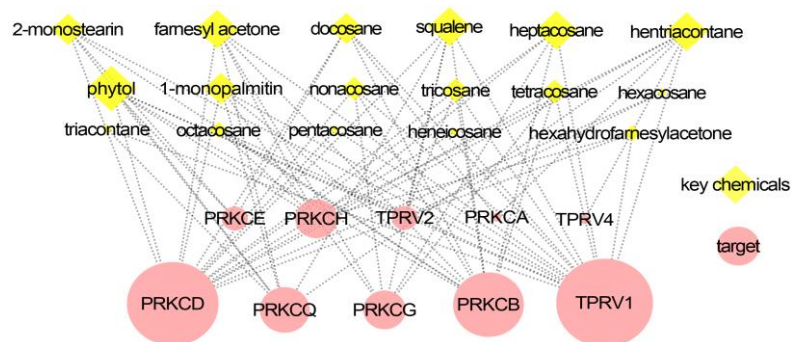


图 3 化学成分-靶标网络模型

Fig. 3 Chemical composition-target network model

表 3 关键化学成分与 TPRV1 形成的氢键及疏水作用

Table 3 Hydrogen bond and hydrophobic action between key chemical components and TPRV1

化学成分	相互作用类型	相互作用关键氨基酸
叶绿醇	氢键	Glu210
	疏水作用	Phe235、Gln202、Tyr194、Leu163、Asn164、Lys160、Tyr199、Lys155
三十一烷	氢键	—
	疏水作用	Arg211、Phe235、Pro243、Gln202、Tyr194、Leu163、Tyr199、Thr153、Glu210、Tyr198、Lys155、Arg242、Asp196
法尼基丙酮	氢键	Arg115、Lys160
	疏水作用	Lys155、Phe235、Tyr194、Leu163、Asr164、Phe118、Tyr199、Glu210
角鲨烯	氢键	—
	疏水作用	Lys155、Gln202、Tyr194、Leu163、Phe118、Asp150、Glu152、Arg114、Lys160、Pro151、Tyr199、Asn164
2-硬脂酸单甘油酯	氢键	Lys160、Arg155
	疏水作用	Lys155、Tyr199、Leu163、Tyr194、Phe118、Arg114、Asn164、Asp196、Tyr198、Thr153
1-棕榈酸单甘油酯	氢键	Lys155、Lys160、Arg115
	疏水作用	Arg211、Phe235、Gln202、Tyr194、Leu163、Asp150、Phe118、Tyr199、Glu210

表 4 关键化学成分与 PRKCD 形成的氢键及疏水作用

Table 4 Hydrogen bond and hydrophobic action between key chemical components and PRKCD

化学成分	相互作用类型	相互作用关键氨基酸
叶绿醇	氢键	Arg67、His62、Cxl124、Met1
	疏水作用	Ala61、Ala2、Glu123、Ile6、Pro9、Gln8、Tyr64、Lys48、Asp60
三十一烷	氢键	—
	疏水作用	Ala61、His62、Val11、Tyr10、Asp60、Phe12、Lys48、Tyr64、Gln8、Pro9、Ile6、Glu123、Phe4、Arg67
法尼基丙酮	氢键	Arg67、His62、Cxl124、Met1
	疏水作用	Ala61、Asp60、Lys48、Phe4、Tyr64、Gln8、Glu123、Ala2
角鲨烯	氢键	—
	疏水作用	Ala61、His62、Asp60、Lys48、Pro49、Tyr64、Gln8、Pro9、Ile6、Glu123、Phe12、Arg67
2-硬脂酸单甘油酯	氢键	Tyr10、Arg67、His62、Met1、Cxl124、Lys48
	疏水作用	Ala61、Asp60、Tyr64、Gln8、Pro9、Glu123、Ala2
1-棕榈酸单甘油酯	氢键	Glu34、Met1、Cxl124、Arg67
	疏水作用	His62、Ala61、Asp60、Lys48、Tyr64、Gln8、Ile6、Glu123、Phe4

种炎症疾病。TRP 通道是一类离子通道，可以被热激活，TRPV1~4 为典型的热敏瞬时受体电位通道^[18]。炎症疾病的发生导致 TRP 离子通道的功能失调，因此 TRP 通道成为关键的药物作用靶点，受到广泛的关注。蛋白激酶 C 分布于机体各种细胞中，对突触传递有一定的影响，可通过磷酸化调节蛋白的活性，逐级磷酸化，放大信号，导致细胞反应^[19]。蛋白水解酶激活蛋白激酶 C 可以增强瞬时感受器电位香草素受体 1 (TRPV1) 的敏感性。神经递质、生长因子和肽类物质等多种炎症介质可以激活 TRPV1^[20]，在炎症和疼痛中发挥重要作用^[21]。TRPV2 与 TRPV1 有 50% 的同源性，与炎症引起的痛觉增敏可能相关^[22]。TRPV4 可以被多种理化刺激激活，

在心血管、消化系统、呼吸系统等广泛表达，参与疾病的发生、发展^[23]。总之，TRP 通道在炎症和疼痛中具有重要作用，以拮抗 TPRV1、TPRV2 和 TPRV4 靶点的表达开展挥发油抗炎研究，有望为挥发油抗炎作用寻找新的切入点。

广金钱草为民间常用中药材，药理作用多样，但对其挥发性物质的研究较少，尤其抗炎分子机制研究尚未明确^[24]。挥发油能被机体快速吸收，药理作用主要集中在抗炎、抗氧化、抗肿瘤等。本研究筛选出广金钱草挥发油发挥抗炎的关键成分及靶点，通过相互作用进一步明确重要的氨基酸残基。结果表明，广金钱草挥发油与 PRKCB、TPRV1 和 PRKCD 有较强的结合，这可能是其发挥抗炎作用的主要分子机制。基

于计算机辅助平台建立挥发油药理作用靶点快速筛选方法,为挥发油药效评价提供新思路,同时为挥发油动物和细胞实验研究提供理论支撑。

参考文献

- [1] 曾南,王建,夏厚林,等. 芳香开窍药药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(1): 76-79.
- [2] Campbell S T, Franks C E, Borne A L, et al. Chemoproteomic discovery of a ritanserin-targeted kinase network mediating apoptotic cell death of lung tumor cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(5): 1246-1255.
- [3] 程彬峰,侯媛媛,姜民,等. 基于网络药理学的清肺消炎丸抗炎机制的初步研究 [J]. 药学报, 2013, 48(5): 686-693.
- [4] 刘学,崔健,陈新. 广金钱草现代研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(4): 84-85.
- [5] 刘茁,董焱,王宁,等. 金钱草的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 422-437.
- [6] 陈丰连,王术玲,徐鸿华. 广金钱草挥发油的气相色谱-质谱分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 22(4): 302-303.
- [7] 刘瑞来,刘俊劭,林志鑫,等. 不同方法提取的金钱草叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(12): 7036-7037.
- [8] Spitzer R, Jain A N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2012, 26(6): 687-699.
- [9] Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, doi: 10.1093/nar/gkr483.
- [10] Dainaa A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep42717.
- [11] 林桂源,姚华聪,郑细娜,等. 基于分子对接技术的常用降糖中药有效成分虚拟筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 202-206.
- [12] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 235-242.
- [13] Lishko P V, Procko E, Jin X, et al. The ankyrin repeats of trpv1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity [J]. *Neuron*, 2007, 54(6): 905-918.
- [14] Inada H, Procko E, Sotomayor M, et al. Structural and biochemical consequences of disease-causing mutations in the ankyrin repeat domain of the human TRPV4 channel [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(31): 6195-6206.
- [15] McCleverty C J, Koesema E, Patapoutian A, et al. Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain [J]. *Protein Sci*, 2006, 15(9): 2201-2206.
- [16] Sutton R B, Sprang S R. Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺ [J]. *Structure*, 1998, 6(11): 1395-1405.
- [17] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [18] Holzer P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1): 142-170.
- [19] Steinberg S F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms [J]. *Physiology*, 2012, 27(3): 130-139.
- [20] Frazier W J, Xue J, Luce W A, et al. MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: The route of crosstalk to G-protein-coupled receptors [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50071.
- [21] Starowicz K, Makuch W, Osikowicz M, et al. Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: Possible CB1- and TRPV1-mediated mechanisms [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(4): 1746-1755.
- [22] Nabissi M, Morelli M B, Santoni M, et al. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(1): 48-57.
- [23] Alessandri-Haber N, Yeh J J, Boyd A E, et al. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat [J]. *Neuron*, 2003, 39(3): 497-511.
- [24] 杨全,程轩轩,郭楚楚,等. 广金钱草种子的化学成分和 DPPH 自由基清除活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2517-2521.