

## 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 结合网络药理学 探究赤苍藤抗痛风的作用机制

何碧钻<sup>1</sup>, 廖万忠<sup>2</sup>, 庞良承<sup>1</sup>, 吴华锋<sup>1</sup>, 覃久芸<sup>1</sup>, 郭美美<sup>1</sup>, 张梅凤<sup>1</sup>, 向建丹<sup>1</sup>, 张琳佳<sup>1</sup>, 蒋伟哲<sup>1</sup>, 付书婕<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西科技大学, 柳州 545006)

**摘要** 目的: 基于超高效液相色谱—四极杆—静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS),结合网络药理学、分子对接技术和实验证,探究赤苍藤治疗痛风的潜在作用机制及靶点。方法:采用UPLC-QE-Orbitrap-MS分析,利用在线数据库SwissTargetPrediction获取活性成分靶点,通过GeneCards数据库筛选出痛风相关的疾病靶点。运用String数据库和Cytoscape 3.7.2软件构建蛋白质相互作用(PPI)网络图及“活性成分—靶点—信号通路”可视化调控网络图。借助DAVID数据库和Weishengxin—在线生物信息学分析、可视化云平台对共同靶点进行GO分析和KEGG通路富集分析。运用AutoDockTools 1.5.6软件,对核心靶点及其对应化合物进行分子对接验证,并通过动物实验对预测结果进行验证。结果:UPLC-QE-Orbitrap-MS分析显示,从赤苍藤中鉴定出75个成分,其中69个成分为赤苍藤中首次报道,其主要成分类别包括脂肪酰类、萜类、糖及糖苷类、苯丙素类、有机酸及其衍生物、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、酚类等。从数据库筛选出806个活性成分靶点及2358个疾病靶点交集,得到270个药物—疾病交集靶点。PPI网络图显示,STAT3、SRC、TP53、EGFR、AKT1、TNF、HSP90AA1、JUN、ERB2等为关键靶点;GO分析及KEGG分析预测结果显示,赤苍藤的抗痛风作用可能与PI3K/AKT、细胞凋亡、代谢抗炎等相关信号通路等有关。10个核心靶点及其对应化合物进行分子对接结果显示,蛋白对接具有较好的结合能力。体内实验显示,赤苍藤水提物能调节尿酸性肾病小鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮和24 h尿蛋白水平,改善小鼠肾脏组织损伤及细胞凋亡情况,调节小鼠PI3K/AKT通路中的核心蛋白。结论:赤苍藤药材蕴含丰富的化学成分,其可能通过STAT3等关键靶点及PI3K/AKT等信号通路发挥抗痛风作用;赤苍藤水提物可改善尿酸性肾病小鼠肾脏损伤。

**关键词** 赤苍藤; 痛风; UPLC-QE-Orbitrap-MS; 活性成分; 网络药理学; 分子对接

**中图分类号:** R285   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1005-930X(2025)04-0507-11

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.04.004

### Probing the mechanism of anti-gout action of *Erythropalum scandens* Bl. based on UPLC-QE-Orbitrap-MS combined with network pharmacology

HE Bizuan<sup>1</sup>, LIAO Wanzhong<sup>2</sup>, PANG Liangcheng<sup>1</sup>, WU Huafeng<sup>1</sup>, QIN Jiuyun<sup>1</sup>, GUO Meimei<sup>1</sup>, ZHANG Meifeng<sup>1</sup>, XIANG Jiandan<sup>1</sup>, ZHANG Linjia<sup>1</sup>, JIANG Weizhe<sup>1</sup>, FU Shujie<sup>1</sup>. (1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

**Abstract Objective:** To investigate the potential gout treatment mechanisms and targets of *Erythropalum scandens* Bl. through network pharmacology and molecular docking techniques and experimental validation based on ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-QE-Orbitrap-MS). **Methods:** The constituents of *Erythropalum scandens* Bl. were analysed by UPLC-QE-Orbitrap-MS, and the targets of the active ingredients were obtained using the online database SwissTargetPrediction, and the targets of gout-related diseases were screened out by GeneCards database. The String database and Cytoscape 3.7.2 software were used to construct the protein-protein interaction (PPI) network diagram and the active ingredient-target-pathway visualization and regulation network. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed on the common targets using the DAVID database and the Weishengxin-Online Bioinformatics Analysis, as well as Visualization Cloud Platform. The AutoDock Tools 1.5.6 software was used to validate the molecular docking of the core

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82460806)

[通信作者] 蒋伟哲, E-mail: jiangweizhe6812@163.com; 付书婕, E-mail: fsj99331785@126.com

[收稿日期] 2025-05-07

targets and their corresponding compounds, and the predicted results were verified by animal experiments. **Results:** UPLC-QE-Orbitrap-MS analysis showed that 75 components were identified from *Erythropalum scandens* Bl., among which 69 components were reported for the first time in *Erythropalum scandens* Bl. The main categories of these components included fatty acyls, terpenoids, sugars and glycosides, phenylpropanoids, organic acids and their derivatives, amino acids and their derivatives, nucleotides and their derivatives, and phenols, etc. From the database, 806 active ingredient targets and 2,358 disease targets were screened, resulting in 270 drug-disease intersection targets. and the PPI network diagram showed that STAT3, SRC, TP53, EGFR, AKT1, TNF, HSP90AA1, JUN and ERB2, etc., were the key targets. The results of the GO and KEGG enrichment analyses showed that the anti-gout effects of *Erythropalum scandens* Bl. might be related to PI3K/AKT, apoptosis, metabolic anti-inflammatory and other related signaling pathways. The molecular docking results of 10 core targets and their corresponding compounds showed that the docked proteins had a better binding energy. *In vivo* experiments confirmed that the aqueous extract of *Erythropalum scandens* Bl. could regulate serum uric acid (UA), creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), and 24-hour urinary protein levels in mice with uric acid nephropathy. Additionally, it ameliorated renal tissue damage and apoptosis while modulating key proteins in the PI3K/AKT signaling pathway of mice. **Conclusion:** *Erythropalum scandens* Bl. contains abundant chemical components, which may exert anti-gout effects through key targets such as STAT3 and signaling pathways such as PI3K/AKT. Additionally, the aqueous extract of *Erythropalum scandens* Bl. can alleviate renal damage in mice with urate nephropathy.

**Keywords** *Erythropalum scandens* Bl.; gout; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry; active ingredients; network pharmacology; molecular docking

痛风是全球第二大代谢性疾病,其发病率随人口老龄化和生活方式变化持续上升<sup>[1]</sup>。该病由持续的高尿酸血症发展为痛风性关节炎,最终导致痛风性肾病,严重影响患者生活质量甚至危及生命。目前临床常用药物如黄嘌呤氧化酶抑制剂、非甾体抗炎药等虽起效快,但存在胃肠道反应和肝肾损伤等副作用,治疗手段有限且复发率高,需寻找更安全、有效的治疗策略。

中药在痛风治疗中具有独特优势,常用清热利湿、活血通经类药物通过抗炎、调节免疫、降尿酸(UA)等多途径发挥作用<sup>[2]</sup>。赤苍藤(*Erythropalum scandens* Bl.)为铁青树科Olacaceae赤苍藤属*Erythropalum* Bl.多年生常绿藤本,在《中华本草》等典籍中记载其具有清热利湿、祛风活血之功效,广西民间常用于治疗水肿、风湿痹痛等疾病<sup>[3-5]</sup>。既往的研究表明,其茎叶水提物具有显著抗痛风活性,醇提物对高尿酸血症小鼠疗效良好且毒性低,并能保护血管内皮功能<sup>[6-8]</sup>。此外,研究表明,赤苍藤中的多糖成分具有抗氧化作用<sup>[9]</sup>。化学成分含有氨基酸、有机酸、脂肪酸等多种活性物质<sup>[10-14]</sup>,但具体药效物质基础尚不明确。本研究首次采用液质联用技术

系统分析赤苍藤化学成分,结合网络药理学预测其抗痛风靶点,并通过分子对接和体内实验进行验证,为赤苍藤的深入开发和临床应用提供理论基础和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物、主要仪器与试剂

实验用赤苍藤药材采购于广西壮族自治区崇左市天等县,经广西中医药大学中药研究员谢阳姣研究员鉴定为铁青树科植物赤苍藤*Erythropalum scandens* Bl.的茎。ACQUITY UPLC I-Classplus超高效液相色谱仪(二元高压泵、自动进样器、柱温箱,美国 Waters 公司); Thermo-Orbitrap-QE型高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)、Progenesis QIv 3.0 数据处理软件;超声波清洗机 F-060SD(深圳福洋科技集团有限公司);漩涡振荡器 TYXH-I(上海汗诺仪器有限公司);台式高速冷冻离心机 TGL-16MS(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);Odysse Clx 双色红外荧光成像系统(美国 Li Corodyse 公司); BX53(LED)荧光正置显微镜(奥林巴斯);URIT-8031全自动生化分析仪(桂林优利特医疗电

子有限公司)。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,购自美国 Thermo Fisher 公司; 氧嗪酸钾、腺嘌呤(上海麦克林生化科技股份有限公司); UA、肌酐(CRE)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); 蛋白酶裂解液(北京索莱宝生物科技有限公司); BCA 蛋白测定试剂盒、快速封闭缓冲液(上海碧云天生物科技有限公司); GAPDH、PI3K、AKT 抗体、p-AKT(武汉三鹰生物技术有限公司); p-PI3K 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ (上海凡科维生物技术有限公司)。

## 1.2 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSST3 (100 mm×2.1 mm, 1.8  $\mu$ m); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)—乙腈(B),洗脱梯度: 0~2.0 min, 5% B; 2.0~4.0 min, 5%~30% B; 4.0~8.0 min, 30%~50% B; 8.0~10.0 min, 50%~80% B; 10.0~14.0 min, 80%~100% B; 14.0~15.0 min, 100% B; 15.0~15.01 min, 100%~5% B; 15.1~16.0 min, 5% B; 体积流量 0.35 mL/min, 柱温 45 °C, 进样量 5  $\mu$ L。

## 1.3 质谱条件

加热电喷雾离子源 HESI, 正、负离子模式 FullMS/dd-MS<sub>2</sub>, 全扫描分辨率 70 000, 定量分辨率 17 500, 鞘气流速设定 35 L/min, 辅助气流量 8 L/min, 喷雾电压(IS)为+3 800 V、-3 000 V; 离子传输管温度 320 °C, 辅助气温度 350 °C, 扫描方式采用全扫描/数据依赖二级扫描(FullMS/dd-MS<sub>2</sub>), 质谱扫描范围  $m/z$  100~1 200, 碰撞能梯度为 10 eV、20 eV、40 eV。

## 1.4 供试品溶液的制备

取赤苍藤药材,用液氮研磨均匀后,称取约 100 mg 样本于 1.5 mL 离心管中;加入 1 mL 70% 的甲醇—水溶液( $v:v$ , 含 L-2-氯苯丙氨酸 4  $\mu$ g/mL), 涡旋震荡 1 min, 加入钢珠; -40 °C 冰箱中预冷 2 min 后, 放入研磨机中研磨(60 Hz, 2 min); 冰水浴超声提取 60 min, -40 °C 下静置 30 min; 离心 10 min(12 000 r/min, 4 °C), 取全部上清液过 0.22  $\mu$ m 的有机相滤膜; 4 °C 下静置过夜; 离心 10 min(12 000 r/min, 4 °C), 取全部上清液继续过 0.22  $\mu$ m 的有机相滤膜, 装入内衬管的 LC-MS 进样小瓶中待测。

## 1.5 化学成分鉴定

采用 ProgenesisQIv 3.0 软件(Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)对原始数据进行基线过滤、峰识

别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化。化合物的鉴定基于保留时间、精确质量数、二级质谱碎片离子等信息,应用 PubChem 数据库与标准品数据库或文献数据比对。

## 1.6 赤苍藤抗痛风靶点预测

**1.6.1 赤苍藤活性成分抗痛风靶点筛选** 鉴定出的化合物在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查询化合物 SMILES 号,未查询到的化合物利用 ChemDraw 绘制其结构式,保存为 SDF 格式。将化合物结构式 SDF 格式文件导入 SwissADME,筛选同时符合类药五规则≥2 项目且具有高胃肠道吸收性的化合物。使用 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)获取筛选后化合物的作用靶点,筛选标准为  $P > 0$ 。在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中检索痛风、高尿酸血症、痛风性关节炎、尿酸性肾病等疾病靶点。将化合物作用靶点与疾病靶点运用 HiplotPro 生物医学可视化平台(<https://hiplot.com.cn/home/index.html>)构建 Venn 图<sup>[15]</sup>,得到赤苍藤活性成分抗痛风作用靶点。

**1.6.2 赤苍藤抗痛风靶点蛋白相互作用(PPI)网络分析** 将赤苍藤活性成分潜在抗痛风作用靶点导入 String 数据库(<http://www.string-db.org/>),选择“multiple protein”,物种选择“Homo sapiens”,minimum required interaction score 设置为 0.7(high confidence),获得潜在靶点的相互作用关系,采用 Cytoscape 3.7.2 软件可视化构建靶点 PPI 网络图。

**1.6.3 基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 利用 metascape 数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)进行 GO 与 KEGG 通路富集分析,以  $P < 0.01$  为筛选条件,获得分析结果。采用微生信可视化平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)作图。

**1.6.4 “活性成分—靶点—信号通路”分析** 将核心靶点、与核心靶点相关的活性成分及前 10 的通路导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“活性成分—靶点—信号通路”网络,活性成分、靶点和通路用节点来表示,线表示活性成分与靶点、炎症与靶点之间的相互关系。

**1.6.5 核心成分和关键靶点的分子对接** 对赤苍藤中筛选出来的潜在活性成分与关键靶点进行分子对接验证。在 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)输入蛋白质 uniprot 的 entry 号查找 3D 结构,下载并

保存。运用 PyMOL、AutodockTools 1.5.6 软件对蛋白进行去水、去配体、配体可选转键和表面电荷获取等预处理操作。使用 AutodockTools 1.5.6 完成分子对接,用 PyMOL 软件进行对接分子的可视化。

### 1.7 动物实验验证

**1.7.1 实验动物** SPF 级雄性昆明小鼠,6~8 周龄,体质量( $20\pm2$ )g,购自广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003,动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004。饲养于自然昼夜节律光照环境,室温( $25\pm2$ )°C,湿度 60% $\pm5\%$ ,自由摄食和饮水。所有动物实验方案均经广西医科大学动物伦理与使用委员会审核批准(审批号:202312017)。

**1.7.2 赤苍藤水提取物(ES)的制备** 将风干的赤苍藤药材粉碎,分别称取 11.262 6 g、22.525 g、45.05 g 赤苍藤粉末,并按质量体积比加 12 倍水提取 2 次,每次 1 h,然后用纱布过滤,合并滤液在温度( $65\pm5$ )°C 下减压浓缩。按人与动物体表面积折算剂量,将浓缩液分别配置成 2.252 5 g/kg、4.505 g/kg、9.01 g/kg(以生药量计),分别作为 ES 低、中、高剂量。

**1.7.3 动物模型建立及分组给药** 用 200 mg/kg 氧嗪酸钾(PO)和 100 mg/kg 腺嘌呤(A)连续灌胃 1 周,建立尿酸性急性肾损伤模型<sup>[16-17]</sup>。将 48 只小鼠随机分为 6 组,即空白对照组(NC 组)、模型组(PO+A 组)、ES 低剂量组(2.252 5 g/kg,ES-L 组)、ES 中剂量组(4.505 g/kg,ES-M 组)、ES 高剂量组(9.01 g/kg,ES-H 组)和别嘌醇(AOP)组(15 mg/kg)<sup>[18-19]</sup>。将 AOP 溶于生理盐水中配置成一定浓度。PO 和 A 使用 0.3% CMC-Na 配置成混悬液,NC 组给予生理盐水。第 8 天,除 NC 组外,其它各组于造模后 1 h 分别给药,1 次/d,连续 14 d。实验期间每 3 d 记录一次体重。第 20 天,每组取 5 只小鼠放入代谢笼中,收集 24 h 尿液,麻醉后取血,处死动物后取肾组织。部分肾组织用 4% 多聚甲醛固定液固定,分别行苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色、TUNEL 染色;部分肾脏冻存于-80 °C 冰箱中,用于免疫蛋白印迹(western blotting)实验;另一部分肾脏组织用于炎症因子含量测定;血清和 24 h 尿液分别用于 UA、CRE、尿素氮(BUN)、

24 h 尿蛋白含量测定。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件处理数据,实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。通过单因素方差分析

进行多组间差异分析,组间两两比较选用 LSD-t 检验或非参数检验,以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 赤苍藤化学成分鉴定分析

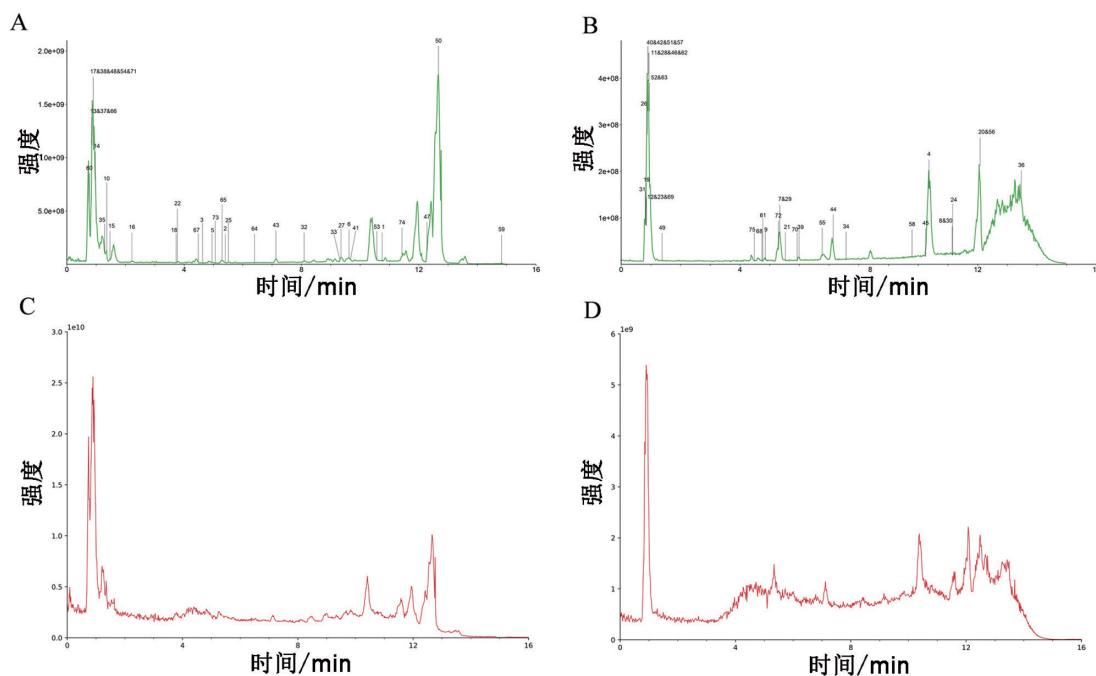
利用高效液相色谱—四极杆—静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS)对赤苍藤成分进行分析,分别获得 3 次正、负离子模式全扫描总离子流色谱(TIC)图(图 1A、图 1B)和全扫描基峰色谱(BPC)图(图 1C、图 1D),原始数据通过软件 ProgenesisQIv 3.0 软件进行预处理,基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布使用 TCM 数据库、QI 搜库对化合物进行定性。对部分鉴定到的中药成分与标准品库 LuMet-TCM 对照品信息进行比较分析,保留时间与标准品保留时间误差为 $\pm0.2$  min,一级分子量误差小于  $5\times10^{-6}$ ,实测 MS<sub>2</sub> 比对情况 3 个参考维度保留最后的鉴定和推测成分。最后鉴定出赤苍藤供试品中共 75 个化合物,71 个通过标准品库 LuMet-TCM 对照品谱图匹配鉴定,4 个通过公共库 HerbDB 的比对鉴定。其中,69 个成分为赤苍藤药材中首次报道。

### 2.2 网络药理学预测赤苍藤抗痛风作用研究

将文献收集到的 107 个化学成分与 UPLC-QE-Orbitrap-MS 鉴定得到的 75 个化学成分通过 SwissTargetADME 筛选得到 92 个活性成分,在 SwissTargetPrediction 预测活性成分靶点,去除重复靶点,获得 806 个活性成分靶点。从 GeneCards 数据库获取 2 358 个疾病靶点。利用 HiplotPro 生物医学可视化平台得到“活性成分—疾病”交集靶点 270 个,“活性成分—疾病”Venn 图,见图 2A。

### 2.3 PPI 网络的构建及核心靶点的获取

将 270 个“活性成分—疾病”交集靶点导入 String 数据库,得到蛋白关系网络数据 tsv 格式文件,在 Cytoscape 3.7.2 软件中生成可视化 PPI 网络图,靶点度值(Degree)与其重要性呈正相关关系(图 2B);靶点的颜色和大小共同体现了它们的重要性:性状越大、颜色越鲜明,则表明这个靶点的相互作用关系越密切。对共同靶点进行 Degree、中介中心性(BC)以及接近中心性(CC)平均值的综合分析,筛选出 28 个核心靶点,前 10 个核心靶点为 STAT3、SRC、TP53、EGFR、AKT1、TNF、HSP90AA1、GRB2、JUN、MAPK1,具体信息见表 1。



A:正离子模式下赤苍藤BPC图;B:负离子模式下赤苍藤BPC图;C:正离子模式下赤苍藤的TIC图;D:负离子模式下赤苍藤TIC图。

图1 正、负离子模式下赤苍藤的BPC图和TIC图

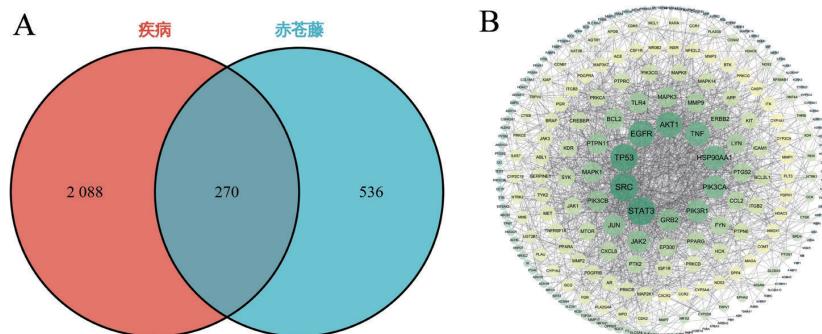


图2 赤苍藤活性成分—抗痛风靶点Venn图(A)和PPI图(B)

表1 前10个核心靶点

靶点	Degree	BC	CC
STAT3	71	0.07	0.49
SRC	70	0.11	0.50
TP53	69	0.11	0.50
EGFR	63	0.07	0.50
AKT1	61	0.06	0.48
TNF	55	0.08	0.48
HSP90AA1	54	0.06	0.46
GRB2	45	0.01	0.44
JUN	43	0.03	0.47
MAPK1	40	0.02	0.46

#### 2.4 GO富集分析和KEGG通路分析

将交集靶点数据导入metascape数据库,随后进行GO富集分析和KEGG通路分析( $P<0.01$ ,最小计数为3且丰富因子 $>1.5$ 为显著性阈值)。GO富集分析涵盖了生物过程(BP)、细胞组分(CC)以及分子功能(MF)3个维度,分别产生了836条、102条和259条的富集结果。KEGG分析鉴定出172条相关的通路。对KEGG通路富集结果中排名前10的通路进行可视化分析(图3A)。这些通路主要涉及EGFR/ER/PI3K/AKT与癌症相关途径的信号通路、AGE-RAGE代谢—炎症相关通路等多个重要的生物学过程。这些联系可能涉及代谢异常、炎症反应

和细胞信号转导等多个方面。对GO分析中BP、CC和MF前20个条目进行可视化处理(图3B)。在BP中,显著富集的条目与信号转导、蛋白质磷酸化、激酶级联调控等功能紧密相关;CC主要聚焦于质膜、

受体复合物、膜筏等细胞膜相关信号转导;而MF主要涉及蛋白质激酶活性、核受体功能、酶结合及ATP结合等分子功能,主要参与信号转导、表观遗传调控和细胞增殖调控。

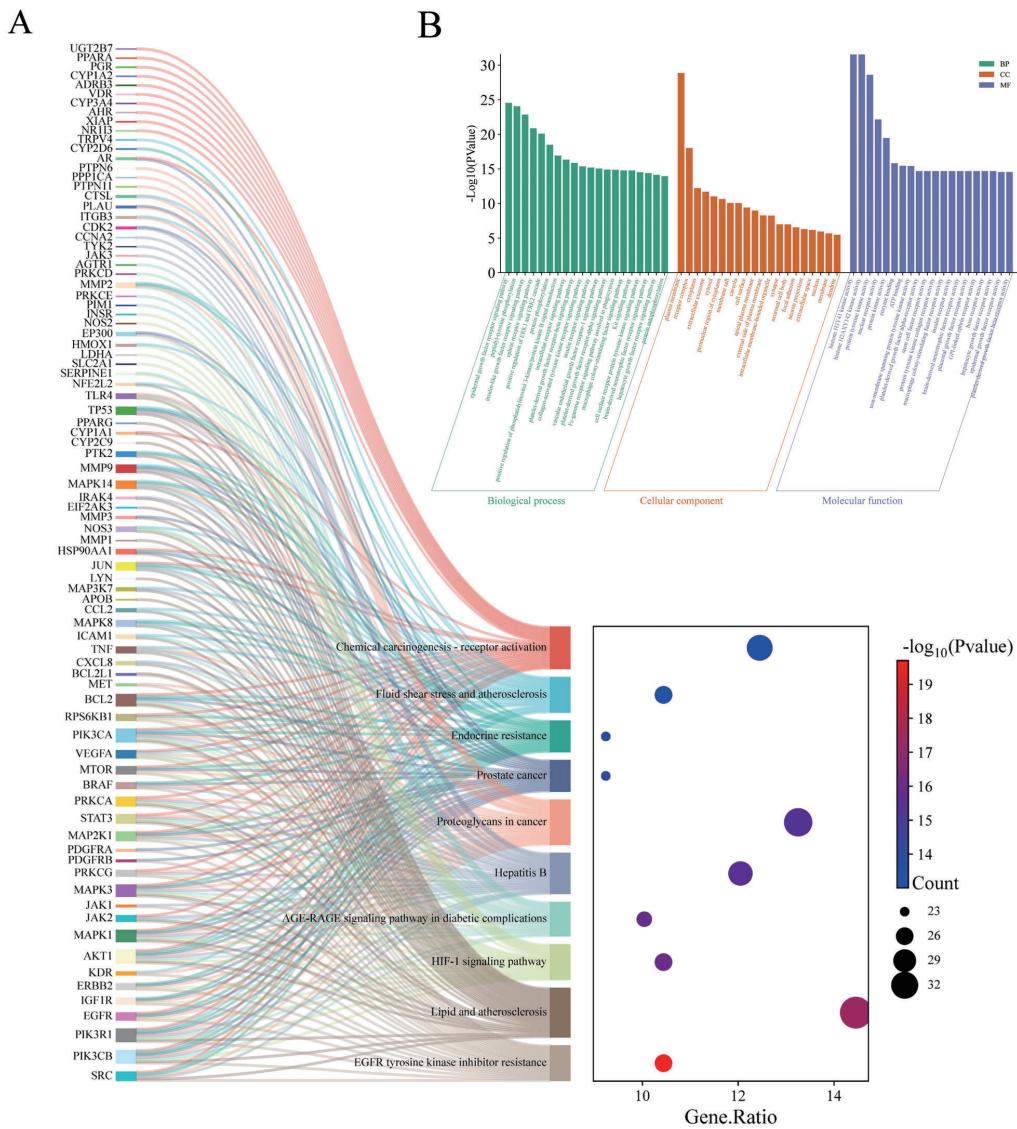


图3 KEGG(前10)GO通路分析(A)和GO(前20)富集分析(B)

## 2.5 “活性成分—靶点—信号通路”网络图的构建

将潜在核心靶点、核心靶点相关药物活性成分及前10条KEGG通路导入Cytoscape 3.7.2软件,构建“活性成分—靶点—信号通路”网络图,见图4。该网络共有98个节点、270条相互作用连线,其中蓝色菱形节点代表中药赤苍藤的活性成分,绿色圆形

节点代表核心靶点,共28个;红色倒三角节点代表10个富集通路。节点越大,Degree越高。经NetworkAnalyzer分析活性成分、潜在核心靶点及富集通路的Degree、BC、CC;基于3个参数得到关键活性成分,排名前5位的活性成分为蓖麻油酸、右旋蛇菰宁、芥子醛、石榴酸、12,13-二羟基-9Z-十八烯酸。

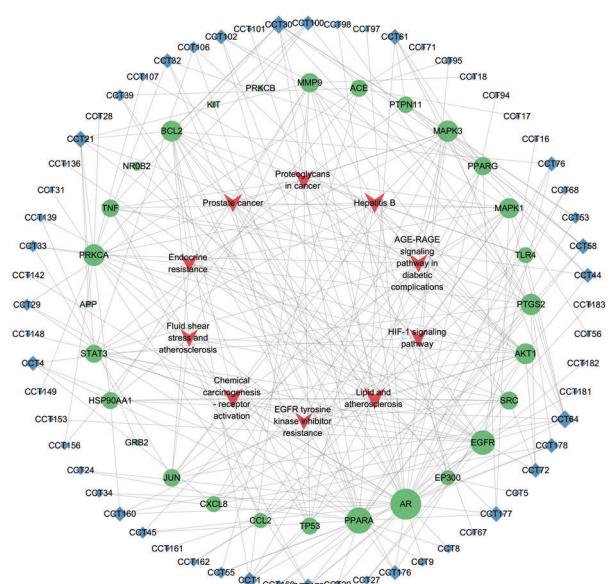


图4 “活性成分—靶点—信号通路”网络图

## 2.6 关键成分与核心靶点的分子对接验证

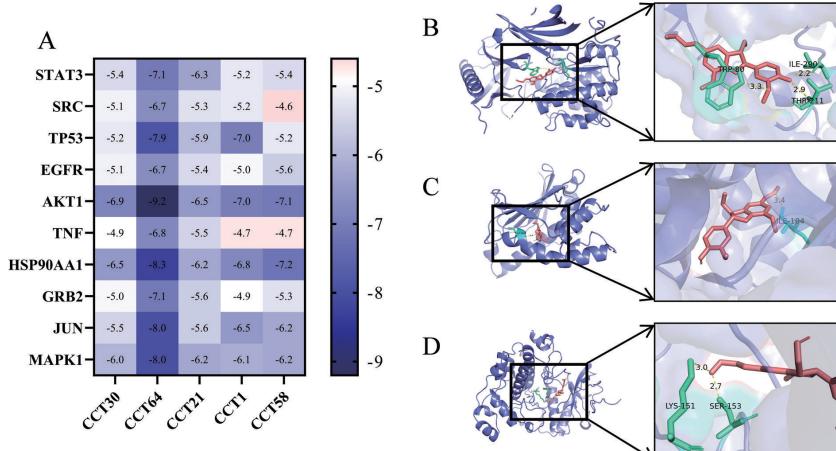
对Cytoscape 3.7.2软件筛选出的10个核心靶点——STAT3、SRC、TP53、EGFR、AKT1、TNF、HSP90AA1、GRB2、JUN、MAPK1,逐一与相应化合物进行分子对接验证(图5A)。在对接结果中,各组合能均低于-1.2 kcal/mol,证明这些组合均具备自然结合能力<sup>[20]</sup>;结合能低于-5.0 kcal/mol表明这些组合具有较好的结合能力<sup>[21]</sup>。检测到50组均具有自然结合能力,45组具有良好的结合能力,如活性成分蓖麻油酸(CCT30)、石榴酸(CCT1)等与核心靶点AKT1结合,右旋蛇菰宁(CCT64)与核心靶点AKT1、HSP90AA1、MAPK1的结合均展现出较好的

结合特性,见图5B、图5C、图5D。与活性成分在分子对接中表现优异,提示这些核心靶点在抗痛风方面可能发挥着重要作用。

## 2.7 动物实验结果

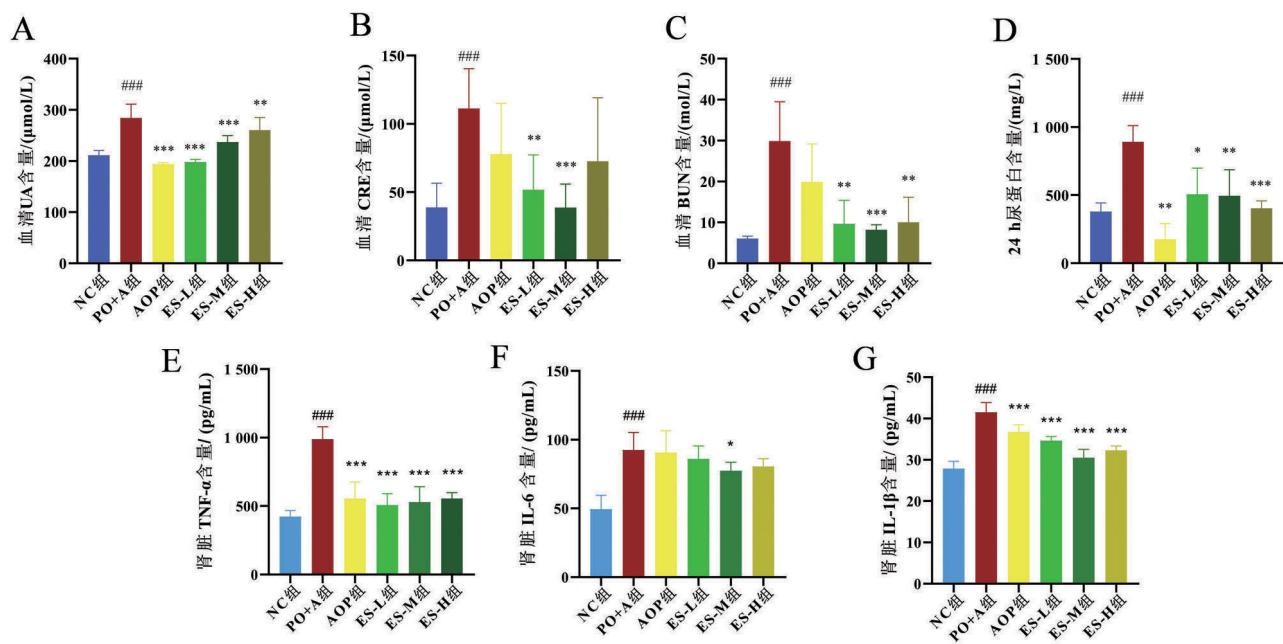
**2.7.1 ES对痛风性肾病小鼠UA、CRE、BUN、24 h尿蛋白及炎症因子含量的影响** 与NC组比较,PO+A组小鼠血清UA、CRE、BUN含量,24 h尿蛋白含量,肾组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量升高(均P<0.05);与PO+A组比较,ES各剂量组和AOP组血清UA含量、24 h尿蛋白含量及肾组织TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量降低,ES-L组和ES-M组血清CRE含量降低,ES-M组肾组织IL-6含量降低(均P<0.05),见图6。

**2.7.2 ES改善痛风性肾病小鼠肾脏病理改变** NC组小鼠肾脏呈均匀鲜红色,表面光滑无沉积物;PO+A组肾脏表面可见明显粉白色结晶斑块,提示UA代谢异常。各给药组肾脏色泽介于两者之间,部分区域保留鲜红色。如图7A所示,NC组肾小球结构完整,肾小管上皮细胞排列整齐,间质无异常增生或炎症细胞浸润;PO+A组肾小球体积缩小,周围基质增厚,肾小管管腔结构破坏,上皮细胞扁平化,部分管腔内可见细胞碎片,间质区域纤维组织增生伴炎症细胞聚集;病理评分高于NC组(P<0.05)。ES给药后,肾小管结构基本正常,仅少数管腔扩张,肾小管上皮细胞凋亡减少,肾小球萎缩程度降低,间质炎症细胞数量下降;病理评分较PO+A组降低(P<0.05),见图7B、图7C。



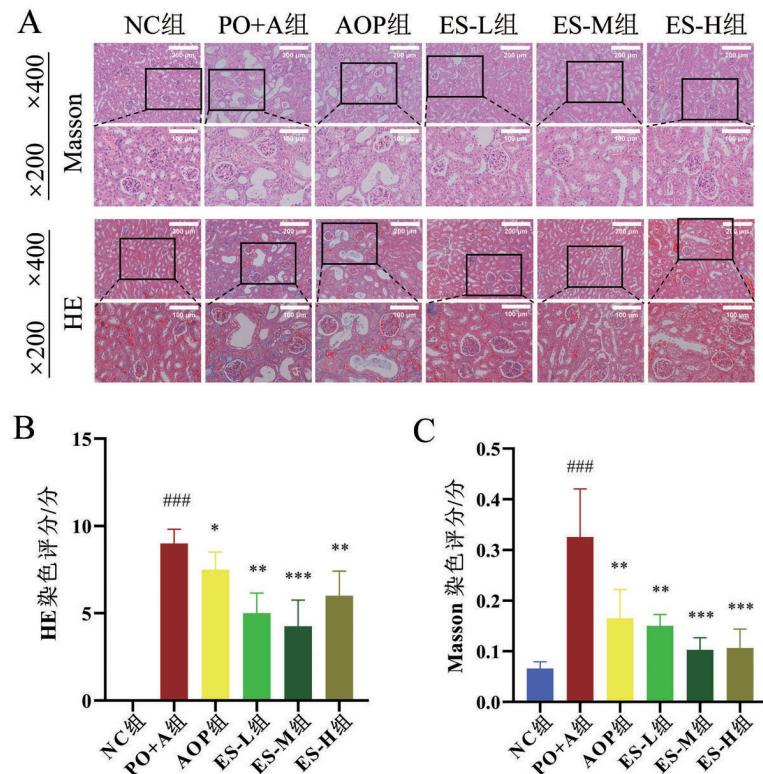
A:右旋蛇菰宁(CCT64)、石榴酸(CCT1)、芥子醛(CCT21)、12,13-二羟基-9Z-十八烯酸(CCT58)、蓖麻油酸(CCT30)与关键靶点对接热图;B:右旋蛇菰宁—AKT1;C:右旋蛇菰宁—HSP90AA1;D:右旋蛇菰宁—MAPK1。

图5 赤苍藤抗痛风关键靶点和代表性化合物对接配合物及对接热图



A: 血清UA含量; B: 血清CRE含量; C: 血清BUN含量; D: 24 h尿蛋白含量; E: 肾脏TNF- $\alpha$ 含量; F: 肾脏IL-6含量; G: 肾脏IL-1 $\beta$ 含量; 与NC组比较, \*\*\*P<0.001; 与PO+A组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

图6 ES对痛风性肾病小鼠血清UA、CRE、BUN、24 h尿蛋白含量及炎症因子含量的影响

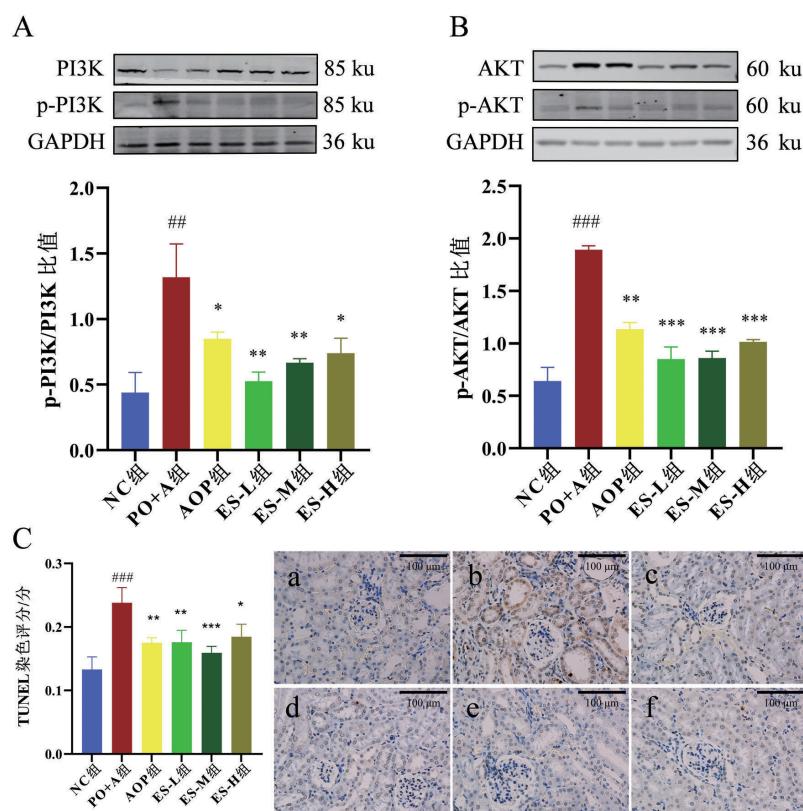


A: 肾组织HE染色和Masson染色图; B: 肾组织HE染色病理评分; C: 肾组织Masson染色病理评分; 与NC组比较, \*\*\*P<0.001; 与PO+A组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

图7 ES对痛风性肾病小鼠肾脏病理改变的影响

**2.7.3 ES 对痛风性肾病小鼠肾脏 PI3K/AKT 通路蛋白表达及细胞凋亡的影响** PO+A 组小鼠肾组织 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值较 NC 组升高 ( $P < 0.05$ ) , ES-M 组 p-PI3K 和 p-AKT 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ) , 见图 8A、图 8B。NC 组肾组织仅有少量分

布的凋亡细胞, PO+A 组肾脏组织 TUNEL 染色评分高于 NC 组 ( $P < 0.05$ ) 凋亡细胞数量增加; 与 PO+A 组相比, ES 各剂量组小鼠肾脏组织细胞凋亡数量明显减少, TUNEL 染色评分降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 8C。



A、B: Western blotting 实验结果; C: TUNEL 染色 ( $\times 400$ ) 结果; a: NC 组; b: PO+A 组; c: AOP 组; d: ES-L 组; e: ES-M 组; f: ES-H 组; 与 NC 组比较,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ ; 与 PO+A 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ,  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图 8 ES 对痛风性肾病小鼠肾脏 PI3K/AKT 通路蛋白表达及肾脏细胞凋亡的影响

### 3 讨 论

本研究利用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术, 从赤苍藤中共识别了 75 种化学成分, 鉴定并补充了赤苍藤中的部分化合物。这些成分包括: 20 种脂肪酰类、12 种糖及糖苷类、7 种氨基酸及其衍生物、6 种有机酸及其衍生物、6 种萜类、5 种苯丙素类、5 种酚类、3 种生物碱、3 种核苷酸及其衍生物、2 种吲哚及其衍生物、2 种羧酸及衍生物、2 种鞘脂类以及 2 种其它类型的化合物。运用网络药理学的研究方法, 赤苍藤抗痛风主要涉及 STAT3、SRC、TP53、EGFR、AKT1、TNF、HSP90AA1、GRB2、JUN、MAPK1 等核心靶点,

这些分子在细胞信号传导、细胞增殖、凋亡、免疫调节以及癌症的发生和发展中起着重要作用, 通过 GO 和 KEGG 信号通路富集分析发现, 赤苍藤抗痛风作用涉及代谢、炎症反应和细胞信号转导等多个方面。提示这些靶点和 BP 极可能是赤苍藤在治疗痛风疾病中的关键靶点及途径。

“药物—活性成分—靶点—信号通路—疾病”网络分析筛选出的前 5 个核心成分为右旋蛇菰宁、石榴酸、芥子醛、12,13-二羟基-9Z-十八烯酸、蓖麻油酸。研究表明, 石榴酸、右旋蛇菰宁、12,13-二羟基-9Z-十八烯酸等成分均具有很好的抗氧化、抗炎活性<sup>[22-24]</sup>。本研究通过分子对接分析, 预测了石榴酸、

右旋蛇菰宁、12,13-二羟基-9Z-十八烯酸等化学成分与 AKT1、MAPK1 等分子稳定结合。AKT1 作为 PI3K/AKT 信号传导通路中的关键分子,其在细胞内的蛋白表达水平对细胞代谢过程及炎症反应调控具有重要影响。从分子机制层面来看,AKT 蛋白能够对 p21 和 p27 等细胞周期抑制因子进行特异性磷酸化修饰,这种翻译后修饰作用可间接促进细胞增殖进程,还能通过磷酸化作用调控 Bad 等凋亡相关蛋白的功能状态,从而有效抑制这些蛋白的促凋亡活性<sup>[25]</sup>;研究还发现 AKT 能够激活 NF-κB 这一重要的转录调控通路,该激活作用可进一步增强其在细胞内的抗炎及凋亡生物学效应<sup>[26]</sup>。已有研究表明,中药可通过调节 PI3K/AKT 信号通路中的关键靶点改善痛风,如胡椒<sup>[27]</sup>、清热化浊降糖汤<sup>[28]</sup>、泽泻汤等。PI3K/AKT 通路位于 NF-κB 的上游,当 AKT 激活时,NF-κB 转位至细胞核,NF-κB 的激活可引发下游炎症反应,导致促炎细胞因子如 TNF-α、IL-6 的激活,这些细胞因子在肾脏疾病中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。本研究通过构建痛风性肾病小鼠模型验证 ES 抗炎、护肾的疗效。从调控代谢上看,一方面,ES 对血清 UA 的调节效果显著,减少 UA 在体内累积,从而减轻 UA 盐结晶对肾小管的直接损伤,与 HE 染色结果一致;另一方面,ES 明显改善小鼠 CRE、BUN 和 24 h 尿蛋白水平,直接改善小鼠肾脏状态,这可能与其抑制足细胞凋亡或维持基底膜完整性有关<sup>[30]</sup>,这一推断与 TUNEL 染色结果呈现的趋势一致。在分子机制层面,本研究检测小鼠肾脏炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 表达情况,提示 ES 能有效改善小鼠肾脏炎症水平,且可能与调控 PI3K/AKT 通路关键蛋白有关。体内实验结果显示,相较于 PO+A 组,ES 给药后小鼠肾脏病理损伤程度减轻,同时可抑制 PI3K 和 AKT 磷酸化。表明 ES 可能通过阻断 PI3K/AKT 信号传导来延缓肾脏纤维化进程。

综合所述,赤苍藤通过多种活性成分协同作用于 AKT、PI3K 等关键靶点,调控 PI3K/AKT 信号通路,从而发挥降低血 UA、抑制肾脏炎症反应、减少细胞凋亡等作用,可能具有治疗痛风、保护肾脏的作用。

## 参考文献:

- [1] CROSS M, ONG K L, CULBRETH G T, et al. Global, regional, and national burden of gout, 1990 – 2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of disease study 2021[J]. *The lancet rheumatology*, 2024, 6(8): 507-517.
- [2] 汪学良,张艳坤,彭江云,等.基于中医传承辅助平台的中医药辨治痛风用药规律分析[J].*时珍国医国药*, 2019, 30(10):2545-2548.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第24卷)[M].北京:科学出版社,1988: 46.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草(第5卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1999: 588-589.
- [5] 黄诗宇,张向军,李 婷,等.广西新兴药食同源蔬菜赤苍藤产业发展现状与发展对策[J].*中国瓜菜*, 2021, 34(8): 109-115.
- [6] 许崇摇,韦贵云,朱 丹,等.赤苍藤茎叶水提物抗痛风作用的实验研究[J].*中国药房*, 2019, 30(24): 3418-3422.
- [7] 黄元河,黎星星,潘乔丹,等.赤苍藤醇提物的急性毒性及对小鼠高尿酸血症的影响[J].*中国民族民间医药*, 2017, 26(5):52-54.
- [8] 潘乔丹,黄元河.赤苍藤对高尿酸血症大鼠血管内皮功能的影响[J].*中国民族民间医药*, 2020, 29(15): 13-15.
- [9] 潘乔丹,黄元河,唐海燕,等.赤苍藤和密蒙花多糖的含量测定及抗氧化研究[J].*食品研究与开发*, 2016, 37(22): 6-9.
- [10] 梁臣艳,张玄薇,李耀华,等.腥藤化学成分的研究(I)[J].*中药材*, 2017, 40(11): 2598-2600.
- [11] 梁臣艳,张 璐,唐云丽,等.赤苍藤化学成分的 GC-MS 分析[J].*广西中医药*, 2019, 42(4):54-56.
- [12] VR M. GC-MS determination of bioactive components of *Erythropalum scandens* Bl [J]. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2011, 1(9): 170-173.
- [13] 冯 旭,李耀华,梁臣艳,等.赤苍藤叶挥发油化学成分分析[J].*时珍国医国药*, 2014, 25(6): 1338-1339.
- [14] 潘乔丹,黄元河,莫绪秀,等.赤苍藤茎化学成分预实验及薄层色谱分析[J].*中国民族民间医药*, 2020, 29(19): 16-21.
- [15] HANBO C, PAUL C B. VennDiagram:a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. *BMC bioinformatics*, 2011, 12(35): 1471-2105.
- [16] 王 琳,沈嘉艳,谢招虎,等.高尿酸血症动物模型研究进

- 展[J].中国实验动物学报,2023,31(1):112-119.
- [17] 程雅欣,李佳.高尿酸血症和痛风动物模型及其建立方法的研究进展[J].中国实验动物学报,2023,31(2):251-256.
- [18] 李东东,刘伟伟,周子正,等.降尿酸方对尿酸性肾病大鼠肾脏细胞凋亡的影响[J].中国中医药信息杂志,2022,29(6): 49-54.
- [19] 王志刚,刘卓,马小军.丹黄化浊通瘀丸治疗痛风性肾病的临床研究[J].西部中医药,2024,37(4): 132-135.
- [20] 涂慕鑫,孟亦浩,王庆亮,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术和网络药理学探究竹叶青酒缓解急性肝损伤作用机理[J].中国酿造,2024,43(10):56-64.
- [21] 刘册家,刘羽康,张京华,等.北豆根配方颗粒的抗炎、抗肿瘤有效成分研究——基于UPLC-Q-TOF-MS/MS与网络药理学[J].西南大学学报(自然科学版),2024,46(11):227-240.
- [22] HOLIC R, XU Y, CALDO K M P, et al. Bioactivity and biotechnological production of punicic acid[J]. Applied microbiology and biotechnology,2018,102(8): 3537-3549.
- [23] LIM S Y, SUBEDI L, SHIN D, et al. A new neolignan derivative, balanophonin isolated from *Firmiana simplex* delays the progress of neuronal cell death by inhibiting microglial activation[J]. Biomolecules & therapeutics, 2017, 25(5): 519-527.
- [24] ZIMMER B, ANGIONI C, Osthues T, et al. The oxidized linoleic acid metabolite 12, 13-DiHOME mediates thermal hyperalgesia during inflammatory pain[J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids, 2018, 1863(7): 669-678.
- [25] SONG M Q, BODE A M, DONG Z G, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. Cancer research, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [26] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. Molecular cancer, 2023, 22(1): 138.
- [27] WU C, ZHANG Z Y, BAI L J, et al. *Piper longum* L. ameliorates gout through the MAPK/PI3K-AKT pathway[J]. Journal of ethnopharmacology, 2024, 330: 118254.
- [28] LIU P Y, XU Y, YE J X, et al. Qingre Huazhuo Jiangsuan Decoction promotes autophagy by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to relieve acute gouty arthritis [J]. Journal of ethnopharmacology, 2023, 302: 115875.
- [29] WANG Y Y, LIU Y Y, LI J, et al. Gualou Xiebai decoction ameliorates cardiorenal syndrome type II by regulation of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155172.
- [30] DAEHN I S. Glomerular endothelial cell stress and cross-talk with podocytes in early [corrected] diabetic kidney disease[J]. Frontiers in medicine, 2018, 5: 76.

#### 本文引用格式:

何碧钻,廖万忠,庞良承,等.基于UPLC-QE-Orbitrap-MS结合网络药理学探究赤苍藤抗痛风的作用机制 [J].广西医科大学学报,2025,42(4): 507-517. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.04.004

HE B Z, LIAO W Z, PANG L C, et al. Probing the mechanism of anti-gout action of *Erythropalum scandens* Bl. based on UPLC-QE-Orbitrap-MS combined with network pharmacology [J]. Journal of Guangxi medical university, 2025, 42(4): 507 -517. DOI: 10.16190/j. cnki. 45-1211/r. 2025.04.004