

# 基于代谢组学和网络药理学的蜡梅类黄酮组分评价

周丹, 赵彦贝, 王梓煦, 李庆卫\*

北京林业大学 园林学院 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083

周丹, 赵彦贝, 王梓煦, 李庆卫. 基于代谢组学和网络药理学的蜡梅类黄酮组分评价[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 602-617.

ZHOU Dan, ZHAO Yanbei, WANG Zixu, LI Qingwei. Evaluation of flavonoids in *Chimonanthus praecox* based on metabolomics and network pharmacology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 602-617.

**摘要:** 类黄酮是蜡梅发挥药理活性的关键功效成分。为了探究蜡梅类黄酮的潜在功效成分及发挥药理活性的作用机制, 本研究基于超高效液相色谱-串联质谱的广泛靶向代谢组学技术全面鉴定蜡梅的类黄酮组分, 结合网络药理学挖掘蜡梅功效类黄酮组分及其作用机制, 利用分子对接进一步验证网络预测结果, 最后进行不同品种蜡梅功效类黄酮含量评估。蜡梅广靶代谢分析中共鉴定出 387 种类黄酮组分, 不同品种蜡梅在黄酮类代谢物上存在显著差异。网络药理学分析鉴定出 96 种中药化学成分, 19 种功效活性物质, 181 个对应靶点, 2 504 个疾病靶点, 99 个交集靶点, 33 个核心靶点, 涉及 229 个基因功能条目和 99 条通路( $P \leq 0.05$ ), 显示出蜡梅类黄酮成分在抗氧化、抗炎、杀菌、抗病毒等方面的药理活性。拓扑分析筛选出三裂鼠尾草素、西伯利亚落叶松黄酮、异鼠李素、槲皮素、6-羟基木犀草素共 5 个核心成分与 SRC、PIK3R1、AKT1、ESR1、AKR1C3 共 5 个核心靶点。蜡梅功效类黄酮能够稳定地与关键作用靶点结合, 表明这些黄酮类化合物在与靶点的相互作用中具有潜在的生物活性。蜡梅类黄酮代谢产物发挥药理活性的作用机制具有多成分、多靶点和多通路的特点, 代谢组学和网络药理学的交叉应用可为深入研究蜡梅的药理功效和治疗机制提供理论依据。

**关键词:** 蜡梅; 类黄酮; 分子对接; 代谢组学; 网络药理学

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFD1000500); 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程(2019-KJC-02-10); 重点地区冬季景观树种蜡梅苗木储备驯化(1100024T000003064556)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFD1000500), the Beijing Landscaping Color Enhancement and Green Extension Technology Innovation Engineering (2019-KJC-02-10), and the Key Areas Winter Landscape Tree Species Wintersweet Seedling Reserve Domestication (1100024T000003064556).

\*Corresponding author. E-mail: lqw6809@bjfu.edu.cn

Received: 2024-07-05; Accepted: 2024-08-06; Published online: 2024-08-07

## Evaluation of flavonoids in *Chimonanthus praecox* based on metabolomics and network pharmacology

ZHOU Dan, ZHAO Yanbei, WANG Zixu, LI Qingwei\*

National Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** Flavonoids are key bioactive components for evaluating the pharmacological activities of *Chimonanthus praecox*. Exploring the potential flavonoids and pharmacological mechanisms of *C. praecox* lays a foundation for the rational development and efficient utilization of this plant. This study employed ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based widely targeted metabolomics to comprehensively identify the flavonoids in *C. praecox*. Network pharmacology was employed to explore the bioactive flavonoids and their mechanisms of action. Molecular docking was adopted to validate the predicted results. Finally, the content of bioactive flavonoids in different varieties of *C. praecox* was measured. The widely targeted metabolomics analysis identified 387 flavonoids in *C. praecox*, and the flavonoids varied among different varieties. Network pharmacology predicted 96 chemical components including 19 bioactive compounds, 181 corresponding targets and 2 504 disease targets, among which 99 targets were shared by the active components and the disease. Thirty-three core targets were predicted, involving 229 gene ontology terms and 99 pathways ( $P \leq 0.05$ ), which indicated that the flavonoids components of *C. praecox* exhibited pharmacological activities including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and antiviral activities. Topological analysis screened out five core components (salvigenin, laricitrin, isorhamnetin, quercetin, and 6-hydroxyluteolin) and five core targets (SRC, PIK3R1, AKT1, ESR1, and AKR1C3). The predicted bioactive flavonoids from *C. praecox* stably bound to key targets, which indicated that these flavonoids possessed potential bioactivities in their interactions with the targets. The flavonoids in *C. praecox* exerted pharmacological activities in a multi-component, multi-target, and multi-pathway manner. The combined application of metabolomics and network pharmacology provides a theoretical basis for in-depth studies on the pharmacological effects and mechanisms of *C. praecox*.

**Keywords:** *Chimonanthus praecox*; flavonoids; molecular docking; metabolomics; network pharmacology

蜡梅(*Chimonanthus praecox* L.)不仅是我国珍贵的冬季芳香观赏植物,也是重要的药用植物,其生物活性成分在制药、保健品及功能性食品开发中具有巨大潜力,被视为自然医药领域的宝贵资源<sup>[1]</sup>。最早关于食用蜡梅的历史记

载可追溯至 15 世纪的中国古籍《九黄本草》和《本草纲目》,蜡梅在缓解夏季炎热和解渴上的效果促使其成为传统的民间茶饮<sup>[2]</sup>。现代药理学发现,蜡梅提取物具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等活性,并已在临床上用于

咳嗽和类风湿关节炎等疾病的治疗<sup>[3]</sup>。其中,类黄酮是评价蜡梅药理活性的关键功效成分,开展类黄酮组分评价可为蜡梅药理机制研究和药用价值开发奠定理论基础<sup>[4]</sup>。

广泛靶向代谢组学作为天然产物分析中的前沿技术,能够通过高通量和多变量数据系统全面挖掘生物体内源性代谢产物,并精确鉴定药用植物的活性成分<sup>[5]</sup>,该技术已广泛应用于药用植物活性成分的开发。网络药理学是基于系统生物学、药理学和现代计算机技术的一门新兴学科,通过分析生物系统中特定信号节点的交互网络,预测活性物质与治疗目标之间的潜在分子关联,广泛应用于传统中药材的研究<sup>[6]</sup>。源自植物次生代谢产物的天然植物衍生化合物,因其良好的生物相容性、低副作用性以及独特的化学结构和生物活性,在功能食品和药物开发中具有广阔的应用前景<sup>[7]</sup>。这些植物的代谢物谱分析数据被广泛应用于生物活性先导物的发现、生物合成途径的阐释、安全性评估及植物源天然产物的质量控制等<sup>[8]</sup>。代谢组学和网络药理学的交叉应用,为深入研究蜡梅次生代谢物的药理功效和治疗机制提供技术支撑,有助于加速活性成分的筛选和发现<sup>[9]</sup>。目前,关于蜡梅类黄酮成分的研究已经通过体外实验、代谢组学、基因组学等方式,在活性成分筛选和药用潜力评估中取得一定进展,研究表明黄酮类化合物在人类中具有广泛的潜在生物学应用,包括抗菌、抗病毒、抗癌、心脏保护、抗衰老、抗糖尿病和辐射防护等<sup>[5]</sup>。Zhou 等<sup>[10]</sup>在蜡梅中通过超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)技术鉴定出 387 种类黄酮组分,其对 2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基和羟基自由基的半数抑制浓度(half-maximal inhibitory

concentration, IC<sub>50</sub>)分别为 0.984 mg/mL 和 1.084 mg/mL。王胜等<sup>[11]</sup>研究表明,蜡梅叶总黄酮对小鼠心肌缺血具有保护作用,机制可能涉及增强抗氧化能力和减少自由基生成。Meng 等<sup>[12]</sup>发现,蜡梅叶黄酮通过调节肠肝轴显著改善了非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL),同时通过上调核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)通路的蛋白表达增强氧化应激相关酶的活性。Lv 等<sup>[13]</sup>通过基因组数据分析,鉴定出柳叶蜡梅黄酮生物合成途径中的关键基因如 *fls* 和 *ufgt*。类黄酮作为蜡梅中的重要活性成分,其药理功效的具体作用机制尚未明晰。这阻碍了蜡梅关键药理活性成分的开发,成为蜡梅高功效优异种质资源发掘的关键瓶颈。

本研究采用 UPLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学方法,全面鉴定蜡梅中的黄酮类化合物,并结合网络药理学和分子对接技术,对蜡梅的活性成分、作用靶点和信号通路进行系统分析,鉴定功效黄酮类化合物。最后,基于功效类黄酮对不同品种蜡梅的药用价值进行评价,以期为其合理开发和高效利用提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料

以盛花期的素心(YS)、晕心(YY)和红心(YH)蜡梅(*Chimonanthus praecox* L.)花朵为供试材料,于 2022 年 12 月 25 采自河南省鄢陵(东经 114°02′-114°19′、北纬 33°46′-34°14′)。栽植地土壤条件一致,均为自然生长,无人工干预。采样时花朵处于完全开放状态,代谢活跃,能够反映其生理活性的峰值<sup>[14]</sup>。所选样本的生长状况和管理措施基本相同,样品采样后立即置于液氮中快速冷冻,并在-80 °C下保存,直到用于代谢组分析,确保样品中的代谢物得到充

分保护, 以便于后续的精准确分析。每个样本进行 3 次生物学重复。

## 1.2 方法

### 1.2.1 UPLC-MS/MS 分析

样本在真空冷冻干燥机(Scientz-100F, Scientz Biotechnology Co., Ltd.)中冷冻干燥后, 用研磨机(MM400, Retsch GmbH)研磨成粉末, 称量 50 mg 并与 70%预冷甲醇混合, 经涡旋、离心和 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 进行 UPLC-MS/MS 分析。采用 Agilent SB-C18 柱进行梯度洗脱, 流动相 A 为含 0.1%甲酸的超纯水, B 为含 0.1%甲酸的乙腈, 在 40  $^{\circ}\text{C}$ 、0.35 mL/min 流速下进行洗脱。质谱分析使用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 在正负离子模式下通过多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行, 利用自建数据库和二级质谱信息实现代谢物的精准鉴定。

### 1.2.2 功效类黄酮筛选与作用靶点预测

基于代谢组学鉴定获得的蜡梅类黄酮组分, 使用中药系统药理学数据库及分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)获取已鉴定黄酮类代谢物的相关靶点和疾病信息, 设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 5\%$ 和药物相似性(drug-likeness, DL) $\geq 0.14$  为标准筛选蜡梅功效类黄酮。通过 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取化合物的 SMILES 格式, 并利用 Swiss Target Prediction 数据库筛选黄酮类成分靶点, 设置物种为“*Homo sapiens*”, Probability $>0.1$ 。通过 Uniprot 数据库规范名称, 并采用 Cytoscape 软件绘制成分-靶点互作网络。

### 1.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将筛选得到的交集靶点导入 STRING 11.5 数据库。设置参数: 限制物种为“*Homo sapiens*”, 最低相互作用分数设为“high confidence $>0.9$ ”。使

用 Cytoscape 3.9.1 软件, 应用拓扑学方法对交集靶点进行进一步分析, 筛选出选择度、接近度和介数值大于其平均值的目标, 确定为核心靶点, 构建核心靶点的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

### 1.2.4 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析

通过 DAVID (database for annotation, visualization, and integrated discovery)数据库对 PPI 中连通度大于平均值的作用靶点进行 GO 生物学过程(gene ontology biological process)、GO 细胞成分(gene ontology cellular component)、GO 分子功能(gene ontology molecular function)及 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway enrichment)通路富集分析。以  $P<0.05$  为筛选条件, 将 DAVID 数据库分析结果导入微生信作图平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)以及 OmicShare Tools 平台(<https://www.omicshare.com/tools/home/index/index.html>), 输出 GO 功能注释分析条形图和 KEGG 通路富集分析气泡图。

### 1.2.5 功效靶点预测

通过 OMIM、DisGeNET 和 GeneCards 搜索“Antioxidant”“Anti-inflammatory”“Antibacterial”“Antiviral”蜡梅功效类黄酮相关作用靶点, 将作用靶点与化学成分关键靶点整合, 删除重复项后获得蜡梅功效类黄酮的关键作用靶点。

### 1.2.6 分子对接验证

筛选 PPI 中连通度排在前 5 的关键作用靶点, 从 PubChem 数据库下载有效成分的二维结构, 并使用 Chem3D 20.0 软件进行能量最小化处理, 生成并导出三维结构。接着, 从 PDB 数据库下载关键基因的三维结构, 利用 PyMOL 软件进行预处理, 包括去除水分子、移除溶剂分子和去除原配体等步骤。使用 Discovery Studio 对核心成分和核心靶点进行

加氢、电荷计算等操作,对对接结果进行可视化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜡梅类黄酮组分总体分析

基于代谢组学获得的 387 种蜡梅类黄酮组

分,共分为 10 个亚类(图 1A): 黄酮醇(139)、黄酮(101)、二氢黄酮(48)、黄烷醇类(26)、查耳酮(22)、其他类黄酮(15)、二氢黄酮醇(14)、异黄酮(11)、花青素(10)和橙酮类(1),所占比例分别为 28.68%、26.10%、13.95%、12.40%、5.68%、3.88%、3.62%、2.84%、2.58%和 0.26%。进一步

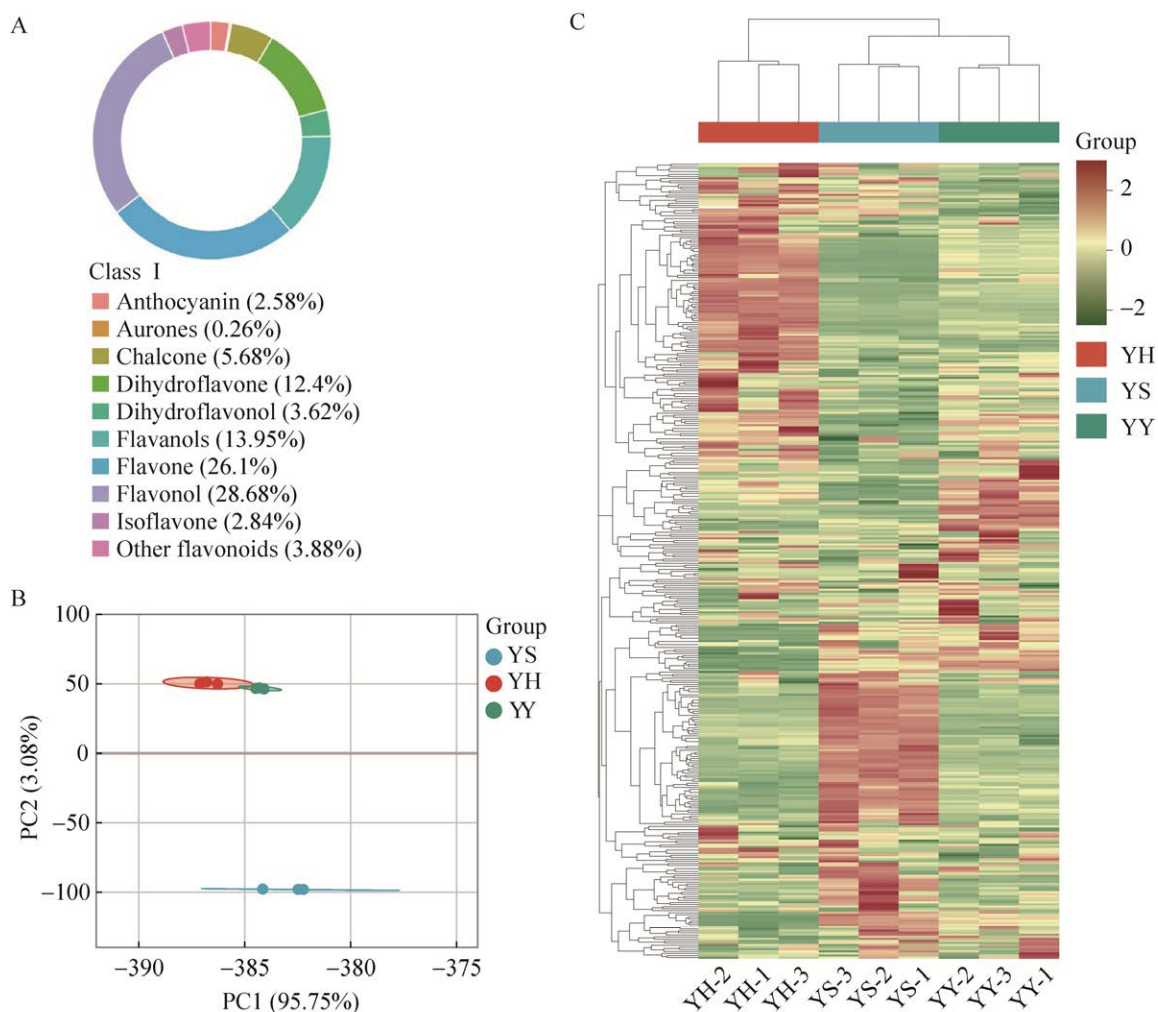


图 1 蜡梅类黄酮组分总体分析 A: 3 个蜡梅品种黄酮次生代谢产物的分类研究; B: 3 个蜡梅品种黄酮次生代谢物的主成分分析; C: 3 个蜡梅品种黄酮次级代谢物的层次聚类分析。YS: 素心蜡梅; YH: 红心蜡梅; YY: 晕心蜡梅。

Figure 1 Comprehensive analysis of flavonoid components in *Chimonanthus praecox*. A: Classification study of flavonoid secondary metabolites in three *Chimonanthus praecox* varieties. B: Principal Component Analysis (PCA) of flavonoid secondary metabolites in three *Chimonanthus praecox* varieties. C: Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of flavonoid secondary metabolites in three *Chimonanthus praecox* varieties. YS: Concolor group *Chimonanthus praecox*; YH: Patens group *Chimonanthus praecox*; YY: Intermedius group *Chimonanthus praecox*.

通过对样本进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 揭示了不同分组样本间及组内样本之间代谢物的差异(图 1B)。每个品种的 3 个生物学重复紧密聚集, 显示出良好的组内重复性。PCA 评分图显示组间代谢组分离的显著趋势, 这表明不同品种蜡梅在黄酮类代谢物上存在显著差异。两种主成分的累积方差占 98.83%, 第一主成分(PC1)的贡献值为 95.75%, 第二主成分(PC2)的贡献值为 3.08%。此外, 基于次级代谢产物的相对含量进行聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)(图 1C), 其代谢物的聚类热图和类别热图清楚地显示出生物重复序列之间组分的相似性和不同物种之间组分的差异。利用正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal projections to latent structures discriminant analysis, OPLS-DA)分析进一步筛选出不同蜡梅品种 YS、YH、YY 之间的类黄酮差异代谢物(图 2)。基于 OPLS-DA 模型评分图显示, 不同品种蜡梅之间的显著分离, 表明其类黄酮代谢产物存在显著差异(图 2A-2C)。模型的  $R^2X$  与  $R^2Y$  指标反映了变量 X 与 Y 的解释能力, 而  $Q^2$  指标预示了模型预测的准确性( $Q^2 > 0.9$ , 优秀模型;  $Q^2 > 0.5$ , 有效模型)<sup>[15]</sup>。在 YY 与 YH ( $Q^2 = 0.941$ ,  $R^2X = 0.619$ ,  $R^2Y = 1$ )、YH 与 YS ( $Q^2 = 0.975$ ,  $R^2X = 0.712$ ,  $R^2Y = 1$ )和 YY 与 YS ( $Q^2 = 0.956$ ,  $R^2X = 0.659$ ,  $R^2Y = 1$ )的成对比较中均体现出高可预测性和强拟合优度。使用标准( $P < 0.05$ ,  $VIP \geq 1$  和  $FC \geq 2$  或  $\leq 0.5$ )筛选差异代谢物, 在 YY 与 YH、YS 与 YH 和 YS 与 YY 比较组中分别鉴别出 51 种(15 种上调, 36 种下调)、106 种(53 种上调, 53 种下调)和 86 种(37 种上调, 49 种下调)差异显著的黄酮类化合物(图 2D-2F)。总体上, YS 中大部分黄酮类化合物的相对含量显著高于 YY 和 YH。

## 2.2 蜡梅功效类黄酮及潜在作用靶点筛选

基于代谢组学获得的 387 种蜡梅类黄酮组分, 在 TCMSP 数据库平台中搜索到其中的 96 种组分。以类药性  $DL \geq 0.15$  和口服生物利用度  $OB \geq 20\%$  为标准筛选到 28 种功效类黄酮(数据已提交至国家微生物科学数据中心, 编号 NMDCX0000428)。将对应靶点利用 Uniprot 数据库对靶点进行注释得到活性成分 19 个, 采用 SwissTargetPrediction 设置参数  $Probability \geq 0.1$ , 去除重复项后最终获得 181 个潜在作用靶点(图 3)。其中, OB 值最高的为圣草酚(71.79%), DL 值最高的为黄芩苷(0.75)。

## 2.3 蜡梅功效类黄酮潜在作用靶点的 PPI 网络构建

为进一步筛选蜡梅功效类黄酮的关键靶点, 将 19 种黄酮类化合物预测的 181 个潜在靶点通过 String 数据库进行最高可信度(0.900)的互作分析, 构建了潜在靶点的 PPI 网络(图 4)。在该网络中, 节点代表靶蛋白, 边表示靶蛋白的互作关系。节点面积越大颜色越深(从黄色到紫色), 表示连通度值越大; 边越粗, 则表示连通度越高。最终结果显示, 共获得 87 个节点和 159 条边, 平均连通度为 3.65, 在这些节点中, 有 33 个关键靶点的连通度高于平均值。连通度最高的 5 个靶点为 SRC、PIK3R1、AKT1、ESR1 和 AKR1C3, 这些靶蛋白位于互作网络的核心区域, 表明它们可能在调控网络中的关键生物过程和信号传导通路中起到重要作用。

## 2.4 蜡梅功效类黄酮的成分-靶点-通路-功效网络构建

通过 OMIM、DisGeNET 和 GeneCards 数据库共检索出 2 504 个抗氧化、抗炎、杀菌和抗病毒靶点。根据评分筛选出得分大于 5 的靶点, 通过 GeneCards 数据库搜索相关功效靶点。

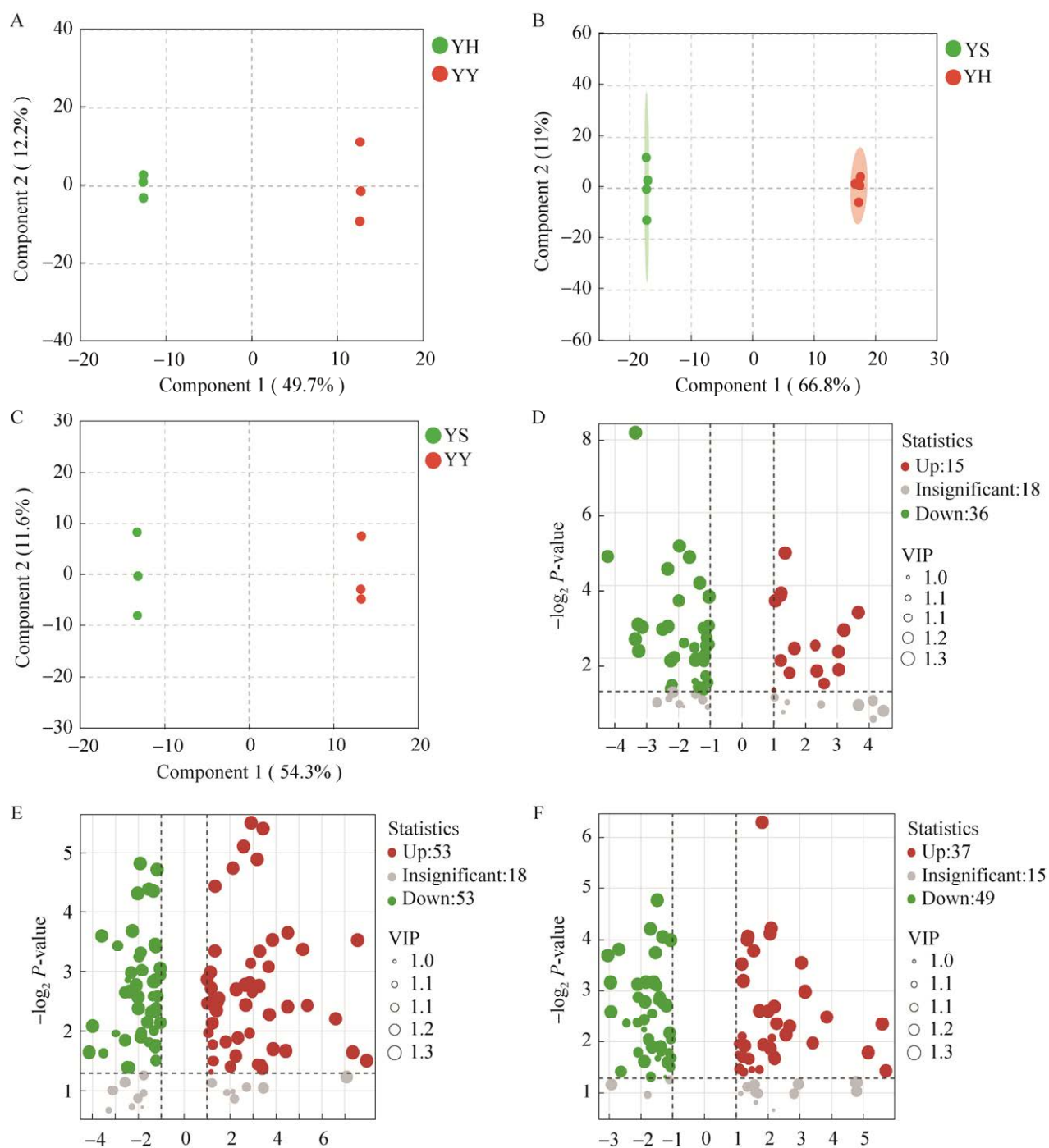


图 2 蜡梅类黄酮组分差异代谢物分析与筛选 A-C: 差异代谢物的 OPLS-DA 成对比较的评分图; D-F: 差异代谢物表达水平的火山图。YS: 素心蜡梅; YH: 红心蜡梅; YY: 晕心蜡梅。

Figure 2 Analysis and screening of differential metabolites in flavonoid components of *Chimonanthus praecox*. A-C: Score plots of pairwise comparisons of differential metabolites using OPLS-DA; D-F: Volcano plots of differential metabolite expression levels. YS: Concolor group *Chimonanthus praecox*; YH: Patens group *Chimonanthus praecox*; YY: Intermedius group *Chimonanthus praecox*.

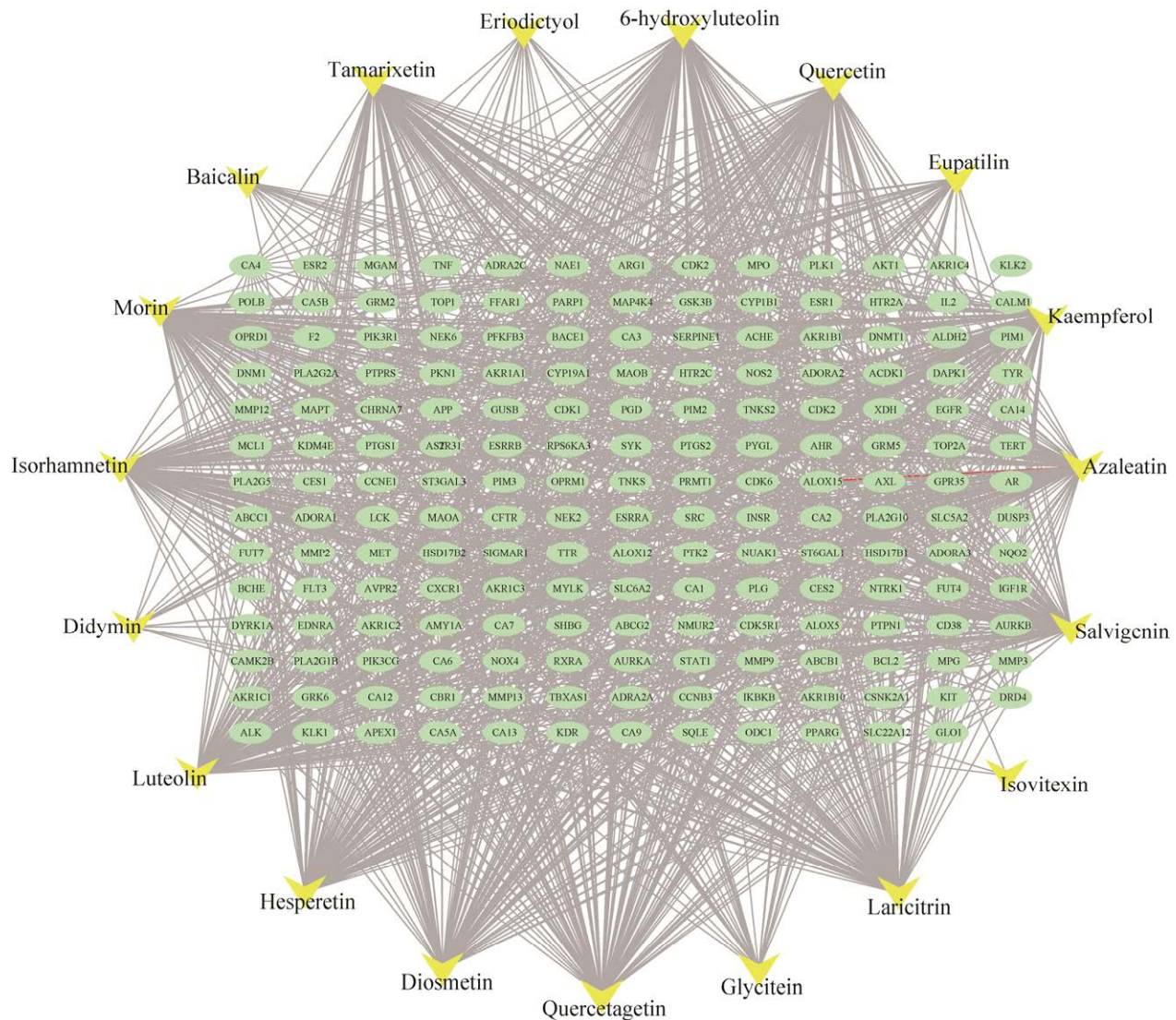


图3 蜡梅功效类黄酮与潜在作用靶点的互作网络

Figure 3 Interaction network of efficacious flavonoids and their potential action targets of *Chimonanthus praecox*.

对所有检索到的靶点进行去重和标准化处理,并与类黄酮的 33 个关键靶点进行交集分析。利用 Cytoscape 的 CytoNCA 插件进行网络参数计算,构建功效类黄酮的成分-靶点-通路-功效网络(图 5),结果显示网络包含 214 个节点(degree, DC)及 768 条连接边。其中,三裂鼠尾草素(salvigenin)、西伯利亚落叶松黄酮(laricitrin)、异鼠李素(isorhamnetin)、槲皮素(querquetin)、6-羟基木犀草素(6-hydroxyluteolin)、槲皮万寿菊

素(querquetagenin)、山柰酚(kaempferol)和桑色素(morin)等功效类黄酮节点度较大( $DC \geq 60$ ),可能是蜡梅潜在的中药质量标志物(Q-marker)。

## 2.5 蜡梅功效类黄酮关键作用靶点 GO 功能与 KEGG 信号通路富集分析

### 2.5.1 GO 功能富集

对 2.3 中筛选的 33 个蜡梅功效类黄酮关键作用靶点进行显著富集分析得到 229 条 GO 功能途径( $P \leq 0.05$ ),其中包括 151 条生物过程



(biological process, BP)、48 条分子功能(molecular function, MF)和 30 条细胞组分(cellular component, CC)。生物过程包括等磷酸化、负调控凋亡过程、蛋白质自磷酸化、促进平滑肌细胞增殖的正调控、促进蛋白激酶 B 信号传导的正调控、基因表达的负调控、促进蛋白质磷酸化的正调

控、蛋白质磷酸化等；分子功能涵盖氧化还原酶活性、蛋白激酶活性、酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、ATP 结合、蛋白激酶结合、胰岛素受体结合、相同蛋白质结合等。此外，细胞组分包含纺锤微管、胞液、细胞质、纺锤体中区、大分子复合物、细胞质的核周区、膜筏、受体复

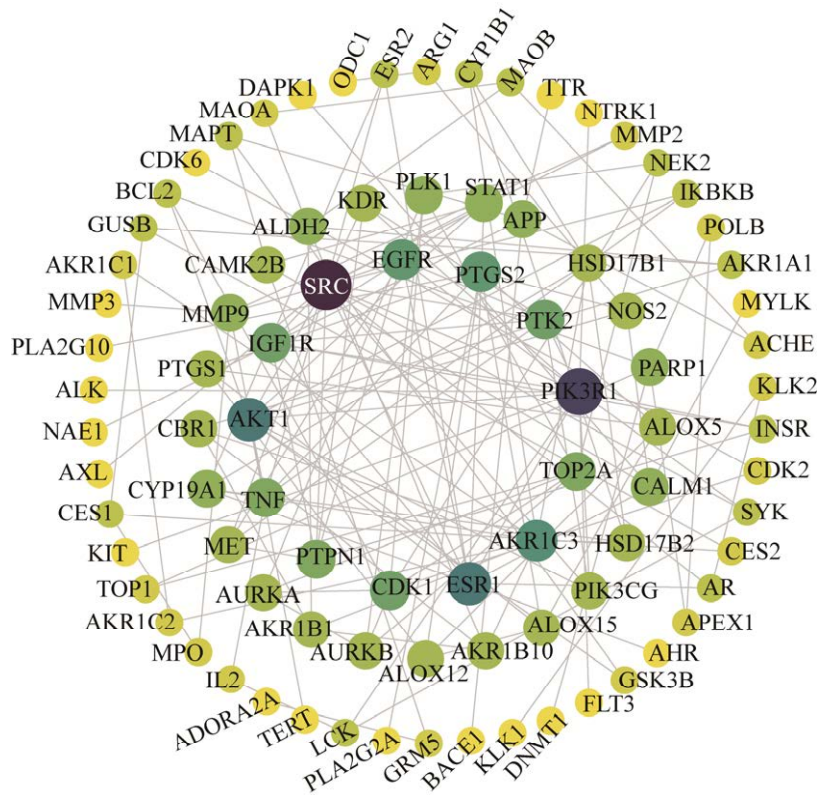


图 4 蜡梅功效类黄酮潜在作用靶点的 PPI 网络

Figure 4 PPI network of potential action targets of efficacious flavonoids of *Chimnanthus praecox*.

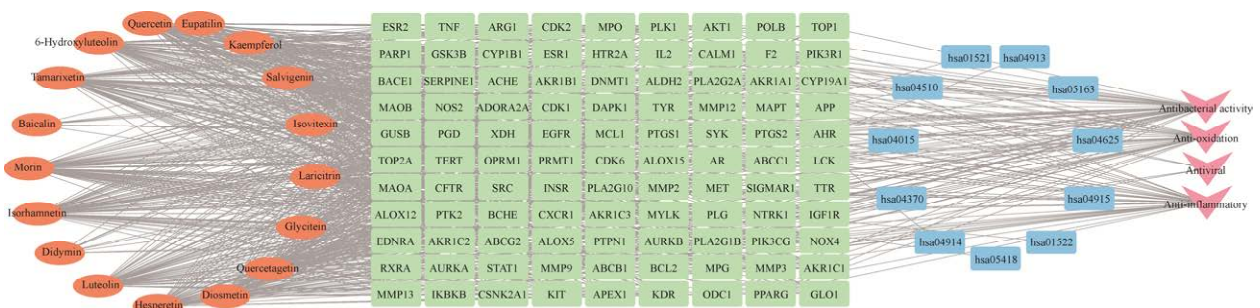


图 5 蜡梅功效类黄酮的成分-靶点-通路-功效网络

Figure 5 Network of component-target-pathway-efficacy of efficacious flavonoids in *Chimnanthus praecox*.

合体等。图 6 展示了根据  $P$  值排列的前 30 个富集的 GO 功能途径, 表明蜡梅功效类黄酮可能主要通过参与这些途径来发挥其药理活性。

### 2.5.2 KEGG 信号通路富集

通过筛选出的 33 个蜡梅功效类黄酮关键作用靶点, 总共富集到 112 条 KEGG 信号通路, 其中有 99 条信号通路富集显著( $P \leq 0.05$ ) (国家微生物科学数据中心, 编号 NMDCX0000428)。在这些显著富集的通路里, 与抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒等药理活性直接相关的通路分别有 6、14、11、17 条, 证实了蜡梅功效类黄酮在这些方面的药理活性。具体而言, 与抗氧化直接相关的通路有花生四烯酸代谢、化学致癌-活性氧

物种、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路等, 与抗菌相关的通路有趋化因子信号通路、FcεRI 信号通路、血小板激活、弓形虫病等, 与抗炎相关的通路有 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路、JAK-STAT 信号通路等, 与抗病毒相关的通路有 Toll 样受体信号通路、JAK-STAT 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等(图 7)。

### 2.6 蜡梅功效类黄酮与关键作用靶点蛋白分子对接

选取连通度最高的 5 个关键作用靶点蛋白 (SRC、PIK3R1、AKT1、ESR1、AKR1C3) 与靶点数量最多的 5 种功效类黄酮(三裂鼠尾草素、

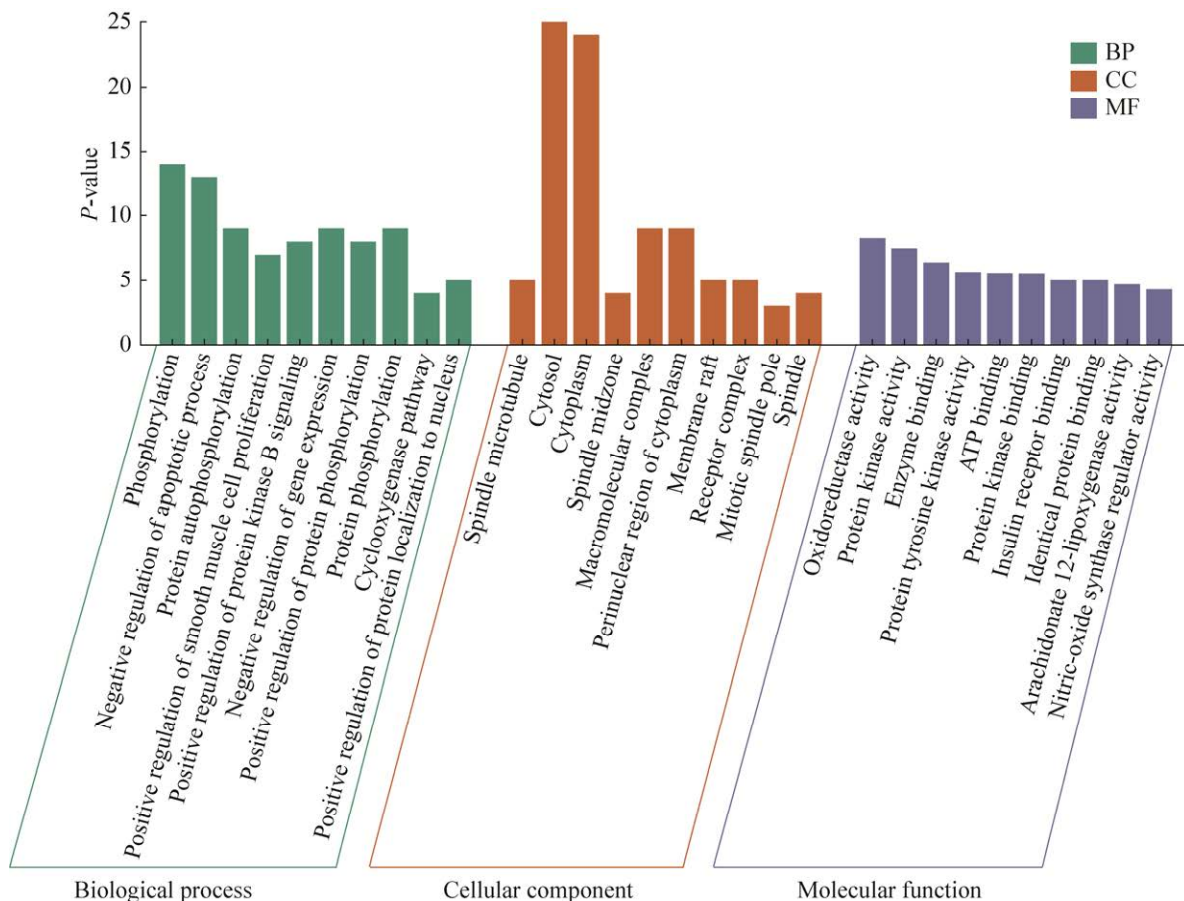


图 6 蜡梅功效类黄酮关键作用靶点的 GO 功能富集 BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。

Figure 6 GO functional enrichment of key action targets of efficacious flavonoids of *Chimonanthus praecox*. BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function.

西伯利亚落叶松黄酮、异鼠李素、槲皮素、6-羟基木犀草素)进行分子对接,结果如表1所示。结合能越低,配体和受体结合越稳定;结合能小于0说明可以自发结合,一般结合能小于-5 kcal/mol 被视为稳定结合的评分标准<sup>[16]</sup>。其中,对接得分 $\leq -8.5$  kcal/mol 的有6组,占24%;对接得分为-8.5~-8.0 kcal/mol 的有4组,占16%;对接得分为-5.0~-8.0 kcal/mol 的有15组,占60%。

表明,蜡梅类黄酮的活性成分与靶蛋白之间具有显著的结合能力,这验证了网络药理学预测结果的准确性和可靠性。进一步分析中,选取了对接活性最佳的5组配体-靶点组合,揭示了化合物与各靶点间的主要相互作用类型,包括氢键、盐桥、吸引力电荷、范德瓦尔斯力、 $\pi$ -阴离子、 $\pi$ - $\pi$ -烷基、 $\pi$ - $\sigma$ 等。其中,氢键作用是维持配体-受体复合物稳定性的关键力量(图8)。

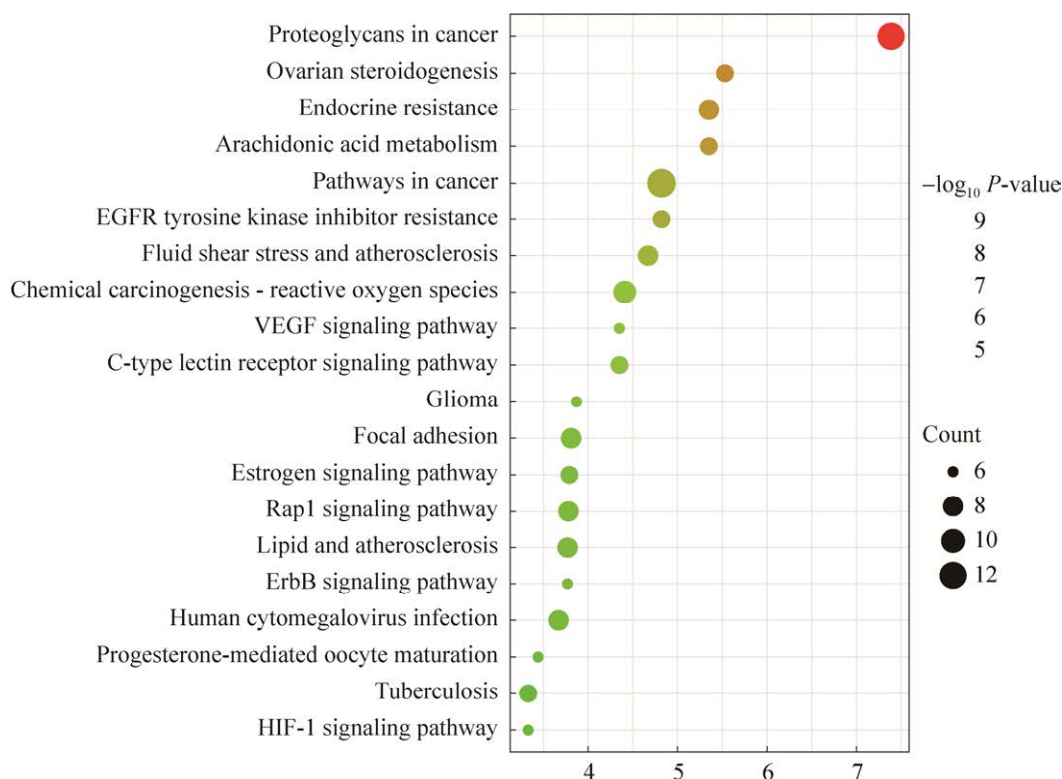


图7 蜡梅功效类黄酮关键作用靶点的GO功能富集

Figure 7 GO functional enrichment of key action targets of efficacious flavonoids of *Chimonanthus praecox*.

表1 蜡梅功效类黄酮和核心靶点结合能

Table 1 Binding energy of efficacious flavonoids from three *Chimonanthus praecox* varieties and core targets

Target	Binding energy (kJ/mol)				
	Salvigenin	Laricitrin	Isorhamnetin	Quercetagenin	6-Hydroxyluteolin
SRC	-5.7	-6.0	-5.8	-5.9	-6.2
PIK3R1	-5.9	-5.9	-6.1	-6.3	-6.2
AKT1	-7.7	-8.1	-8.9	-8.1	-8.2
ESR1	-7.3	-6.6	-8.0	-7.3	-8.3
AKR1C3	-9.2	-9.1	-9.1	-9.3	-9.4

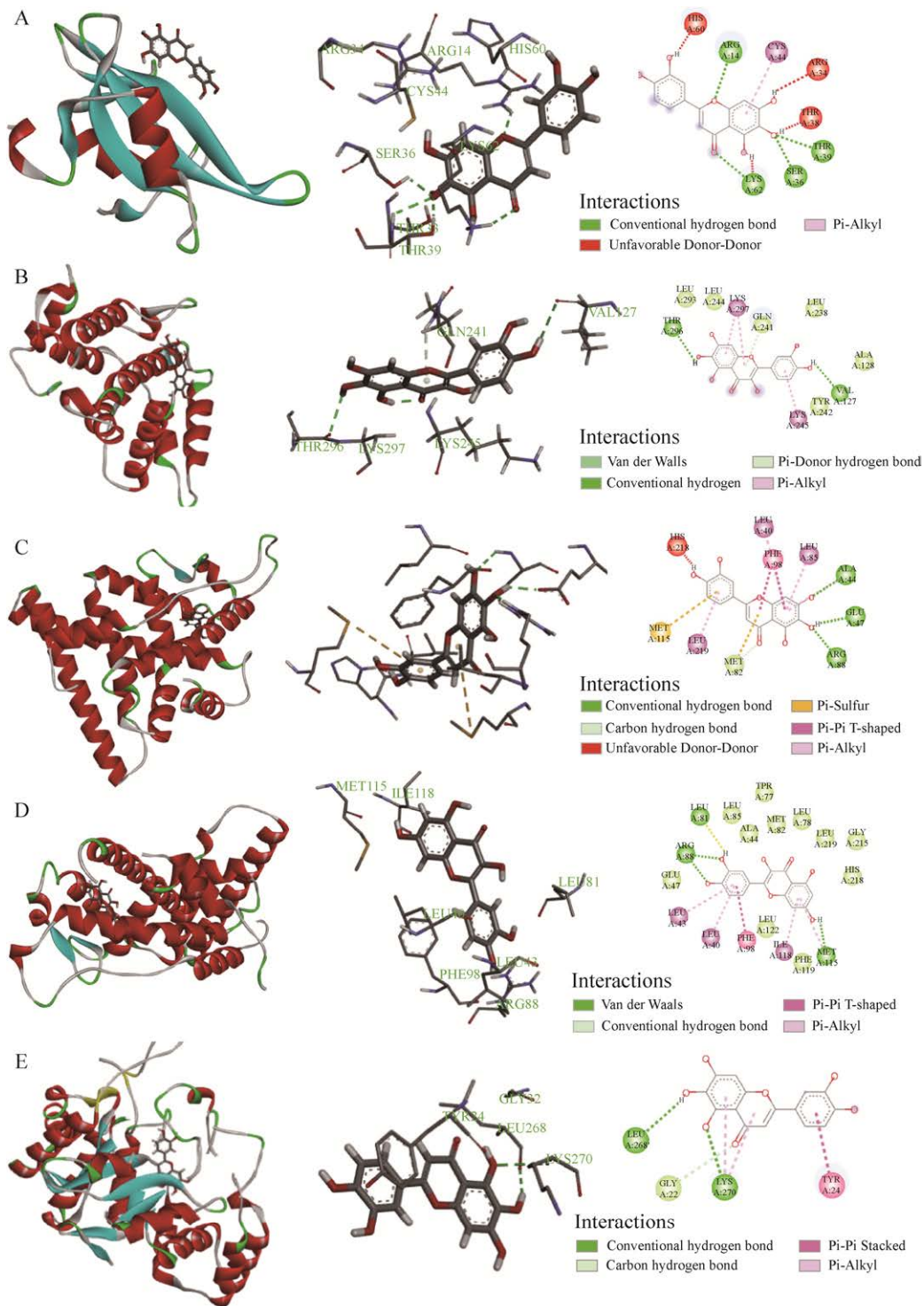


图 8 蜡梅功效类黄酮与关键作用靶点蛋白的对接构象 A: 6-羟基木犀草素与 SRC; B: 槲皮万寿菊素与 PIK3R1; C: 异鼠李素与 AKT1; D: 6-羟基木犀草素与 ESR1; E: 6-羟基木犀草素与 AKR1C3。

Figure 8 Docking conformations of efficacious flavonoids of *Chimonanthus praecox* with proteins of key action target. A: 6-Hydroxyluteolin with SRC; B: Quercetagenin with PIK3R1; C: Isorhamnetin with AKT1; D: 6-Hydroxyluteolin with ESR1; E: 6-Hydroxyluteolin with AKR1C3.

## 2.7 基于功效类黄酮的蜡梅种质资源评价

网络药理学鉴定出的 28 种功效类黄酮, 根据其在蜡梅中的含量可大致分为 3 类(图 9)。其中, 杜鹃黄素、条叶蓟素、桑色素、槲皮素、山柰酚、西伯利亚落叶松黄酮、桉柳黄素在素心蜡梅样本中的含量普遍较高。桉柳黄素、异鼠李素、六羟黄酮、异泽兰黄素、鹰嘴豆醇、二氢山柰素在晕心蜡梅样本中的含量普遍较高。三裂鼠尾草素、6-羟基木犀草素、六羟黄酮、木犀草素、香蜂草苷、花旗松素、香叶木素、异牡荆素、圣草酚在红心蜡梅样本中的含量普遍较高。值得注意的是, 不同功效类黄酮在各样本中的差异明显。例如, 异牡荆素在红心蜡梅和晕心蜡梅的含量差异达到 3.92 倍, 表没食子儿茶素在红心蜡梅和晕心蜡梅的含量差异达到 2.92 倍, 橙皮素在素心蜡梅和晕心蜡梅的含量差异达到 2.80 倍。这些差异揭示了不同品种蜡梅在功效类黄酮代谢物含量上的差异性, 进一

步证实了蜡梅在药理活性方面的多样性, 为其药用价值的评估和开发提供了理论依据。

## 3 讨论与结论

蜡梅作为一种具有悠久历史的药用植物, 其生物活性成分在制药、保健品及功能性食品开发中展现出巨大潜力, 是自然医药领域的宝贵资源<sup>[17]</sup>。尽管我国蜡梅种质资源丰富, 在化学成分研究方面取得了一定进展, 尤其是在活性成分筛选和药用潜力评估方面, 但对具体发挥药理活性作用的功效成分及其药理机制的研究仍相对较少。此外, 各类活性成分在蜡梅中的积累情况尚未明确, 这在很大程度上限制了蜡梅优质资源的合理利用和高效开发。利用现代研究手段科学评价蜡梅药用品质, 是发掘高功效优异种质的关键。代谢组学因其高通量、广覆盖、高精度的优点, 通过系统挖掘有机体内的代谢产物, 能够高效应用于药用植物潜在活性成分的发掘<sup>[18-19]</sup>。网络药理学基于系

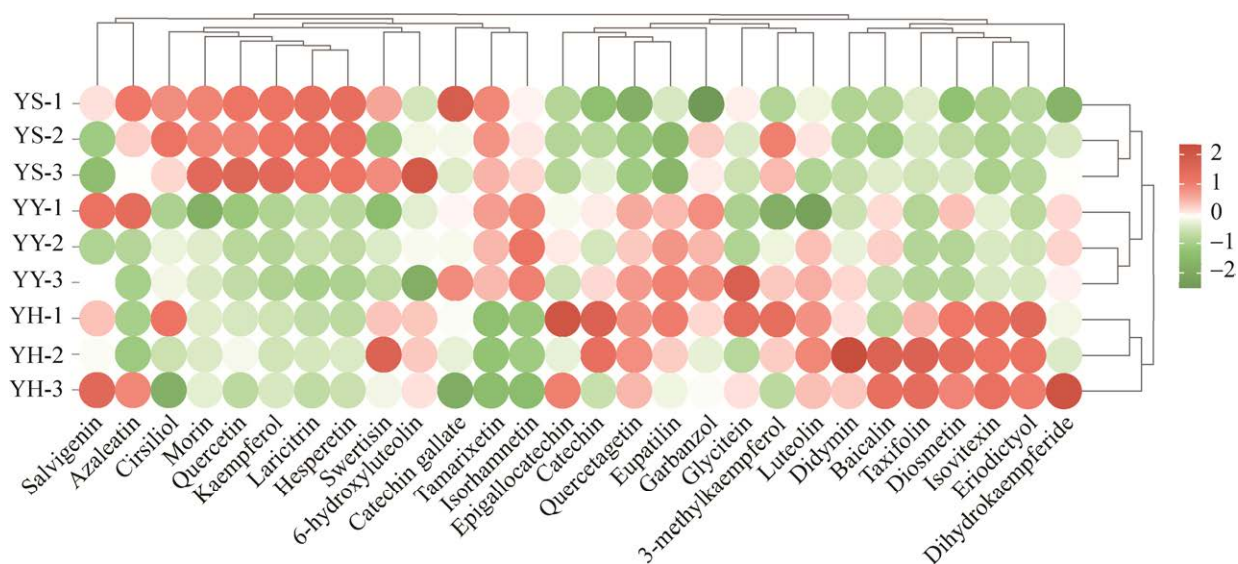


图 9 功效类黄酮在蜡梅中的差异 YS: 素心蜡梅; YH: 红心蜡梅; YY: 晕心蜡梅。

Figure 9 Difference of efficacious flavonoids in *Chimonanthus praecox*. YS: Concolor group *Chimonanthus praecox*; YH: Patens group *Chimonanthus praecox*; YY: Intermedius group *Chimonanthus praecox*.

统生物学理论,通过分析生物系统中特定信号节点的互作网络,预测活性物质与治疗对象之间的潜在分子关联,为深入研究蜡梅的药理功效和治疗机制提供技术支持<sup>[9]</sup>。代谢组学与网络药理学的交叉应用能够加速传统药用植物的活性成分的开发<sup>[20]</sup>。本研究首先利用广泛靶向代谢组学方法全面鉴定出蜡梅 387 种类黄酮组分,然后基于网络药理学筛选出 19 种功效类黄酮,并通过分子对接进一步验证。根据“活性成分-核心靶点-通路”网络图的筛选结果,精准识别出三裂鼠尾草素、西伯利亚落叶松黄酮、异鼠李素、槲皮素、6-羟基木犀草素、槲皮万寿菊素、山柰酚、桑色素作为蜡梅多种药理活性的关键化学物质。其中,三裂鼠尾草素可以通过降低血糖、甘油三酯和总胆固醇水平,同时增加胰岛素分泌和高密度脂蛋白水平,改善糖尿病及其心血管并发症<sup>[21-22]</sup>。作为单胺氧化酶-A (monoamine oxidase A, MAO-A)抑制剂,三裂鼠尾草素在帕金森病和阿尔茨海默病等神经退行性疾病中显示出潜在的治疗作用,可以通过抑制 MAO-A 活性,提高神经递质水平,减轻神经炎症和氧化应激<sup>[23]</sup>。西伯利亚落叶松黄酮通过抑制由肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )刺激产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),保护细胞免受氧化损伤,并通过减少基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)的分泌和防止胶原蛋白的降解,实现抗氧化作用;此外,它能够显著减少由 TNF- $\alpha$  诱导的炎症反应,通过降低促炎细胞因子如 IL-6 和 IL-8 的分泌,发挥抗炎作用。西伯利亚落叶松黄酮还通过促进树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟和功能恢复,逆转癌症引起的免疫抑制现象,从而增强机体的免疫反应<sup>[24]</sup>。这些结果表明,西伯利亚落叶松黄酮在抗氧化、抗炎和增强免疫方面具有重要的

药理潜力。异鼠李素具有抗癌、抗炎、抗氧化、抗血小板和抗凝血等药理活性,能够诱导癌细胞凋亡和抑制侵袭,减少炎症因子的产生,清除活性氧(ROS),增强抗氧化酶活性,并通过抑制血小板黏附和聚集发挥抗血栓作用<sup>[25]</sup>。此外,异鼠李素还能通过降低血脂和改善内皮功能,从而保护心血管<sup>[26]</sup>。这些多重作用机制使得异鼠李素在多种疾病的预防和治疗中具有重要的应用潜力。

通过对“活性成分-核心靶点-通路”网络图进行拓扑学分析,识别出蜡梅抗氧化作用中 5 个关键靶点,包括 SRC、PIK3R1、AKT1、ESR1、AKR1C3。其中, SRC 激酶抑制剂如达沙替尼 (Dasatinib)已用于治疗慢性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病,通过抑制 SRC 的活性来阻止癌细胞的生长和转移<sup>[27]</sup>。PIK3R1 是 PI3K 信号通路的一部分, PIK3R1 编码的 p85 $\alpha$  亚基调控 PI3K 的活性; PI3K 抑制剂如艾代拉利司 (Idelalisib)通过抑制 PI3K 通路来减少癌细胞的增殖和存活,被用于治疗某些类型的白血病和淋巴瘤<sup>[28]</sup>。AKT1 是 PI3K/AKT 信号通路的关键组成部分,调节细胞存活、增殖、代谢和生长; AKT 抑制剂通过阻断 AKT 信号通路来抑制肿瘤细胞的生长和存活,被用于治疗多种癌症<sup>[29]</sup>。ESR1 编码雌激素受体  $\alpha$ , 在雌激素依赖性基因表达和细胞增殖中发挥重要作用,尤其在乳腺癌细胞中高度表达,是乳腺癌细胞增殖的重要驱动因素<sup>[30]</sup>。AKR1C3 参与甾体激素、前列腺素和多环芳烃代谢; AKR1C3 抑制剂通过抑制雄激素和雌激素的合成,减少肿瘤细胞的生长,被用于治疗前列腺癌和乳腺癌<sup>[31]</sup>。从上述结果可以看出,不同化合物通过不同的靶点调控各自的通路,多个化合物可能协同作用于同一靶点并调控相同的通路。这反映了中药多成分、多靶点、多通路的协同作用特性,体现

了其复杂的药理机制。

本研究通过广泛靶向代谢组学全面鉴定出蜡梅中的黄酮类活性成分,应用网络药理学筛选出功效成分,精准识别并挖掘高药用价值的种质资源,为其他药用植物的研究提供了新方法。但是受限于数据库的完整性、分析软件和机体环境的差异,在后续研究中仍需结合临床试验,系统验证蜡梅黄酮类化合物的药用价值及其作用机制。通过进一步实验的完善为蜡梅药理活性作用机制提供理论依据,才能更好地指导蜡梅种质资源的开发与利用。

## REFERENCES

- [1] 何德颖,肖薇依,黎成,邹峥嵘. 蜡梅属植物精油成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(9): 1624-1636.  
HE DY, XIAO WY, LI C, ZOU ZR. Research progress on compositions and pharmacological activities of essential oil from *Chimonanthus Lindl*[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(9): 1624-1636 (in Chinese).
- [2] HU XF, DING ZB, CHEN Y, LUO JF, HE JM, YIN TP. Comparative study on the antioxidant activities of ten common flower teas from China[J]. Open Chemistry, 2019, 17(1): 841-848.
- [3] 徐金标,潘俊杰,吕群丹,程科军. 蜡梅科植物化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1957-1968.  
XU JB, PAN JJ, LÜ QD, CHENG KJ. Research advances on chemical constituents from Calycanthaceae plants and their pharmacological activities[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(10): 1957-1968 (in Chinese).
- [4] 赖瑞联,沈朝贵,龙宇,林炎娟,韦晓霞,吴如健. 基于代谢组学和网络药理学的橄榄类黄酮组分评价[J]. 食品科学, 2024, 45(12): 42-51.  
LAI RL, SHEN CG, LONG Y, LIN YJ, WEI XX, WU RJ. Evaluation of flavonoid components in Chinese olive by integrated use of metabolomics and network pharmacology[J]. Food Science, 2024, 45(12): 42-51 (in Chinese).
- [5] SHEN N, WANG TF, GAN Q, LIU SA, WANG L, JIN B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.
- [6] JIASHUO WU, ZHANG FQ, ZHUANGZHUANG LI, JIN WY, SHI Y. Integration strategy of network pharmacology in Traditional Chinese Medicine: a narrative review[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 42(3): 479-486.
- [7] BOUYAHYA A, OMARI NE, EL HACHLAFI N, JEMLY ME, HAKKOUR M, BALAHBIB A, EL MENYIY N, BAKRIM S, NACEIRI MRABTI H, KHOUCHLAA A, MAHOMOODALLY MF, CATAURO M, MONTESANO D, ZENGIN G. Chemical compounds of berry-derived polyphenols and their effects on gut microbiota, inflammation, and cancer[J]. Molecules, 2022, 27(10): 3286.
- [8] XIAO Y, HE C, CHEN YL, HO CT, WU X, HUANG YX, GAO Y, HOU AX, LI ZJ, WANG YL, LIU ZH. UPLC-QQQ-MS/MS-based widely targeted metabolomic analysis reveals the effect of solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* on the dynamic changes in the metabolite profile of dark tea[J]. Food Chemistry, 2022, 378: 131999.
- [9] ZHANG RZ, ZHU X, BAI H, NING K. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 123.
- [10] ZHOU J, ZHANG LC, LI QP, JIN WF, CHEN WY, HAN J, ZHANG YY. Simultaneous optimization for ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Sophora flavescens* using response surface methodology[J]. Molecules, 2018, 24(1): 112.
- [11] 王胜,周静,代时宇,文聚,杨燕,钱海兵. 蜡梅叶总黄酮对小鼠心肌缺血损伤的保护作用[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(1): 4-5.  
WANG S, ZHOU J, DAI SY, WEN J, YANG Y, QIAN HB. Protective effect of flavonoids from wintersweet leaf on myocardial ischemia injury in mice[J]. Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 36(1): 4-5 (in Chinese).
- [12] MENG WY, ZHAO ZT, CHEN LL, LIN SY, ZHANG Y, HE J, OUYANG KH, WANG WJ. Total flavonoids from *Chimonanthus nitens* oliv. leaves ameliorate HFD-induced NAFLD by regulating the gut-liver axis in mice[J]. Foods, 2022, 11(14): 2169.
- [13] LV QD, QIU J, LIU J, LI Z, ZHANG WT, WANG Q, FANG J, PAN JJ, CHEN ZD, CHENG WL, BARKER MS, HUANG XH, WEI X, CHENG KJ. The *Chimonanthus salicifolius* genome provides insight into magnoliid evolution and flavonoid biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2020, 103(5): 1910-1923.
- [14] ZHU L, LIAO JH, LIU YF, ZHOU CM, WANG X, HU ZG, HUANG BS, ZHANG JJ. Integrative metabolome and transcriptome analyses reveal the molecular mechanism underlying variation in floral scent during flower development of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 919151.
- [15] MABUCHI R, ADACHI M, ISHIMARU A, ZHAO HQ,

- KIKUTANI H, TANIMOTO S. Changes in metabolic profiles of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) muscle during cold storage as a freshness evaluation tool based on GC-MS metabolomics[J]. *Foods*, 2019, 8(10): 511.
- [16] LIU J, SHI JL, GUO JY, CHEN Y, MA XJ, WANG SN, ZHENG ZQ, LIN MX, HE S. Anxiolytic-like effect of Suanzaoren-Wuweizi herb-pair and evidence for the involvement of the monoaminergic system in mice based on network pharmacology[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2023, 23(1): 7.
- [17] 李帅岚, 邹峥嵘. 蜡梅属植物中黄酮和香豆素类成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3425-3431.
- LI SL, ZOU ZR. Research progress on flavonoids and coumarins from *Chimonanthus* plants and its pharmacological activities[J]. *Acupuncture Research*, 2018, 49(14): 3425-3431 (in Chinese).
- [18] RINSCHEN MM, IVANISEVIC J, GIERA M, SIUZDAK G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(6): 353-367.
- [19] XIAO Q, MU XL, LIU JS, LI B, LIU HT, ZHANG BG, XIAO PG. Plant metabolomics: a new strategy and tool for quality evaluation of Chinese medicinal materials[J]. *Chinese Medicine*, 2022, 17(1): 45.
- [20] SHARMA B, YADAV DK. Metabolomics and network pharmacology in the exploration of the multi-targeted therapeutic approach of traditional medicinal plants[J]. *Plants*, 2022, 11(23): 3243.
- [21] RAFATIAN G, KHODAGHOLI F, FARIMANI MM, ABRAKI SB, GARDANEH M. Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 371(1/2): 9-22.
- [22] NOORI S, HASSAN ZM, YAGHMAEI B, DOLATKHAH M. Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice[J]. *Cellular Immunology*, 2013, 286(1/2): 16-21.
- [23] SADEGHI H, MANSOURABADI A, REZVANI M, GHOBADI M, RAZAVI N, BAGHERI M. Salvigenin has potential to ameliorate streptozotocin-induced diabetes mellitus and heart complications in rats[J]. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 2016, 15(2): 1-12.
- [24] CHANG WA, HUNG JY, TSAI YM, HSU YL, CHIANG HH, CHOU SH, HUANG MS, KUO PL. Laricitrin suppresses increased benzo(a)pyrene- induced lung tumor-associated monocyte-derived dendritic cell cancer progression[J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(3): 1783-1790.
- [25] KHAN MS, KHAN W, MANICKAM M, TULSAWANI RK, MISRA KS, NEGI PS, AHMAD S. Quantification of flavonoids and nucleoside by UPLC-ms in Indian *Cordyceps sinensis* and its invitro cultures[J]. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2015, 49(4s): s59-s67.
- [26] FRAJACOMO FTT, DEMARZO MMP, FERNANDES CR, MARTINELLO F, BACHUR JA, UYEMURA SA, PEREZ SE, GARCIA SB. The effects of high-intensity resistance exercise on the blood lipid profile and liver function in hypercholesterolemic hamsters[J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2012, 37(3): 448-454.
- [27] LUO J, ZOU HL, GUO YB, TONG TY, YE LP, ZHU CM, DENG L, WANG B, PAN YH, LI P. SRC kinase-mediated signaling pathways and targeted therapies in breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2022, 24(1): 99.
- [28] AKINLEYE A, AVVARU P, FURQAN M, SONG YP, LIU DL. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2013, 6(1): 88.
- [29] PATEL JM, JESELSON RM. Estrogen receptor alpha and ESR1 mutations in breast cancer[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2022, 1390: 171-194.
- [30] BEHBOUDI S, BOSWELL S, WILLIAMS R. Cell-mediated immune responses to alpha-fetoprotein and other antigens in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver International*, 2010, 30(4): 521-526.
- [31] QIAN HY, LI G, ZHAO GD, LIU MZ, XU AY. Metabolic characterisation of the midgut of *Bombyx mori* varieties after BmNPV infection using GC-MS-based metabolite profiling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4707.