

基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术和网络药理学的茵栀黄颗粒主要成分及作用机制研究[△]

范啸天*, 黄志鸿, 伍超, 陆珊, 谭影影, 巫志姍, 吴嘉瑞# (北京中医药大学中药学院临床中药系, 北京 102488)

中图分类号 R96;R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)05-0520-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.05.002

摘要 目的:探讨茵栀黄颗粒主要化学成分及其药理作用机制。方法:色谱柱选用 Waters 公司 ACQUITY PRM UPLC BEH C₁₈ Column with Van Guard FIT 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 梯度洗脱的流动相为 0.1% 甲酸溶液-乙腈;采用高分辨液质联用质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)正负离子扫描模式。并利用中药系统药理学数据库与分析平台和 Swiss Target Prediction 数据库对检测得到的化合物成分进行靶点预测,结合 Cytoscape 3.8.2 绘制关联网络图,对核心靶基因进行基因本体功能富集分析和京都基因与基因组百科全书通路富集分析,构建成分-靶点-通路网络图。利用 Autodock vina 软件对疾病靶点和茵栀黄颗粒的主要化学成分进行分子对接验证。结果:依据从精确相对分子质量数据和多级质谱碎片离子数据获得的结果,结合对照品比对以及文献报道,共从茵栀黄颗粒中分析鉴定了 68 个化学成分,其中有 14 个化合物经对照品比对完全确定,主要包括苯丙素类化合物如绿原酸,香豆素类化合物如滨蒿内酯,黄酮类化合物如黄芩素、黄芩苷。网络药理学分析得到 31 个茵栀黄颗粒治疗黄疸的主要靶点,经过度值筛选得到排序居前 5 位的主要靶点及重要的相关信号通路。推断茵栀黄颗粒可能通过脂质与动脉粥样硬化方式,影响类固醇激素生物合成,从而治疗黄疸的前期病变等。结论:本研究初探了茵栀黄颗粒的主要化学成分及相关药理作用机制,为茵栀黄颗粒的进一步深入研究提供了参考。

关键词 茵栀黄颗粒; UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 网络药理学; 化学成分

Main Components and Mechanism of Yinzhihuang Granules Based on UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS Technology and Network Pharmacology[△]

FAN Xiaotian, HUANG Zhihong, WU Chao, LU Shan, TAN Yingying, WU Zhishan, WU Jiarui (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the main chemical composition of Yinzhihuang granules and its pharmacological mechanism. **METHODS:** The chromatographic column was a Waters ACQUITY PRM UPLC BEH C₁₈ Column with Van Guard FIT(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), the mobile phase of gradient elution was 0.1% formic acid solution-acetonitrile; the high-resolution liquid mass spectrometry with positive and negative ion scanning mode (UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS) was used. The target prediction was performed on detected chemical components by using the TCMSP and Swiss Target Prediction database, association network diagram was drawn in combination with Cytoscape 3.8.2, the gene ontology function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome pathway enrichment analysis on the core target gene were conducted, so that the component-target-pathway network diagram was constructed. Molecular docking verification of the disease targets and the main chemical components of Yinzhihuang granules was performed by using Autodock vina software. **RESULTS:** According to the results obtained from accurate relative molecular mass data and multilevel mass spectrometry fragment ion data, combined with the reference substance and literature reports, a total of 68 chemical components were analyzed and identified from Yinzhihuang granules, among which 14 chemical compounds were fully identified by reference substance, mainly including phenylpropanoids such as chlorogenic acid, coumarins such as scoparone, flavonoids such as baicalin and baicalin glycosides. Totally 31 main targets of Yinzhihuang for the treatment of jaundice obtained from network pharmacological analysis, and the top 5 main targets and important related signaling pathways were obtained after degree screening. It was inferred that Yinzhihuang granules may affect steroid hormone biosynthesis through lipid and atherosclerotic ways, thus treating the early lesions of jaundice. **CONCLUSIONS:** This study initially explored the main

[△] 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 82074284)

* 硕士研究生。研究方向:临床中药学与网络药理学。E-mail: fxt980226@163.com

通信作者: 博士生导师。研究方向: 中医药大数据研究。E-mail: exogamy@163.com

chemical constituents of Yinzhihuang granules and related pharmacological mechanisms, and provided a reference for further in-depth research of Yinzhihuang granules.

KEYWORDS Yinzhihuang granules; UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; Network pharmacology; Chemical components

从中医理论的角度分析,清热解毒、利湿退黄是茵栀黄颗粒的功效,该药在治疗肝胆湿热性黄疸中有大量应用,患者的临床表现为面目悉黄、胸胁胀痛、恶心呕吐、小便黄而赤。茵栀黄颗粒在临床上的使用效果显著,被《中华人民共和国药典:一部》(2020年版)^[1]收录,作为急性慢性肝炎的推荐用药。随着茵栀黄颗粒在肝病治疗中的应用逐渐增多,对其质量控制的要求也越来越严格。然而,目前对于茵栀黄颗粒的研究仅限于单一或多种成分的定性分析和含量测定,物质基础研究薄弱,也尚不清楚药效学及作用机制,阻碍了茵栀黄颗粒进一步的临床使用^[2]。因此,本研究利用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术,对比已知数据库中68个化合物成分,最终确定出茵栀黄颗粒中存在的14个化合物成分。该方法可同时实现快速采集母、子离子的高分辨数据,特点是可以完整获得多级质谱碎片信息,结合了超高效液相色谱对复杂样品的高分离能力与质谱的高选择性、高灵敏度和能够提供相对分子质量与结构信息的优点。本研究通过对茵栀黄颗粒中化学成分的主要检测指标的定性分析,建立了茵栀黄颗粒中化学成分的网络药理学预测模型,采用网络药理学方法和技术,筛选出主要化学成分和重要靶点,通过可视化分析,探讨了茵栀黄颗粒的成分、基因靶点和途径之间的关系,并预测其潜在作用机制,对茵栀黄颗粒的临床使用和质量控制等提供了一定的理论基础。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000型超高效液相色谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);LTQ-Orbitrap XL型质谱仪(配有电喷雾离子源及 Xcalibur 2.1 化学工作站,美国 Thermo Scientific 公司);MTW120型万分之一电子天平(深圳东美测量仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

新绿原酸(CAS编号为906-33-2,规格为20 mg,HPLC≥98%),绿原酸(CAS编号为327-97-9,规格为20 mg,HPLC≥98%),栀子苷(CAS编号为24512-63-8,规格为20 mg,HPLC≥98%),1,3-二咖啡酰奎宁酸(CAS编号为30964-13-7,规格为20 mg,HPLC≥98%),木犀草苷(CAS编号为1268798,规格为20 mg,HPLC≥98%),3,4-二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸B)(CAS编号为14534-61-3,规格为20 mg,HPLC≥98%),3,5-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸A,CAS编号为89919-62-0,规格为20 mg,HPLC≥98%),4,5-二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸C)(CAS编号为57378-72-0,规格为20 mg,HPLC≥98%),黄芩苷(CAS编号为21967-41-9,规格为20 mg,HPLC≥98%),滨蒿内酯(CAS编号为120-08-1,规格为20 mg,HPLC≥98%),汉黄芩素(CAS编号为632-85-9,规格为20 mg,HPLC≥98%),黄芩素(CAS编号为491-67-8,规格为20 mg,HPLC≥98%),汉黄芩苷(CAS编号为51059-44-0,规格为20 mg,HPLC≥98%),千层纸素A(CAS编号为480-11-5,规格为20 mg,HPLC≥98%),均购自四川乐美天有限公司。甲醇、甲酸和乙腈(质谱级)购自赛

默飞世尔科技(中国)有限公司;水是屈臣氏瓶装蒸馏水;其他试剂均选取分析纯。

2 方法

2.1 茵栀黄颗粒定性检定样品制备

精密称量茵栀黄颗粒2.000 g溶于10倍量70%甲醇溶液中,超声提取30 min,6 000 r/min离心(离心半径4.9 cm,时间5 min),然后使用移液器吸取上清液,采用注射器装0.22 μm微孔滤膜进行过滤,冷藏储存待用。

2.2 对照品溶液的制备

使用精密天平称取各化合物对照品1.0 mg,使用移液器移取甲醇配制为1.0 mg/mL的单一对照品溶液。通过用上述各项单一对照品溶液精密量取后用甲醇稀释为储备液,制备出质量浓度为10 μg/mL的对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为ACQUITY PRM UPLC BEH C₁₈ Column with Van Guard FIT色谱柱(美国 Waters 公司,2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温30℃;流动相为0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)[梯度洗脱方法:0~5 min,1%B;5~14 min,1%~15%B;14~38 min,15%~35%B;38~55 min,35%~55%B;55~60 min,55%~95%B;60~66 min,95%B];流速0.2 mL/min;进样体积2 μL。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),负离子模式下:电离源电压-3.0 kV,毛细管电压-35 V,管透镜电压-110 V;正离子模式下:电离源电压4 kV,毛细管电压35 V,管透镜电压110 V;离子源温度350℃,碰撞电压6~10 V;干燥气流速15 L/min;鞘气流速为40 L/min,辅助气流速为20 L/min;数据采用傅里叶变换高分辨全扫描,质量扫描范围m/z:50~1 200,检测分辨率3 000。使用高纯氮气为鞘气和辅助气(纯度>99.99%)。质谱多级碎片离子检测采用数据依赖性扫描,选取相应度前3的离子进行多级碎裂,碎裂方式为CID碰撞诱导裂解,归一化裂解能量为35%。洗针液为甲醇;柱温箱温度为30℃。

2.5 数据采集和分析

原始数据通过Xcalibur 2.1分析软件进行处理,通过对原始数据进行分子离子峰提取与相关峰对齐,得到对应分子的离子峰。然后,利用软件内自带程序得到化合物的相对分子质量和相对分子质量分布。测量到的二级质谱片段与mz Cloud数据库和从文献中自建的本地中药成分数据库进行匹配。保留质量偏差<5 ppm的可识别化学成分。最后,利用离子碎片信息、精确的相对分子质量和比较推断对化合物进行进一步验证。

2.6 成分靶点搜集

本实验对14个中药化合物成分的靶标基于Swiss Target Prediction和中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库进行预测。TCMSP数据库所使用的预测方法是基于药物-蛋白关系对的相似性来预测中药组成化合物的潜在靶标。选取其中度值>20的蛋白作为本研究的潜在靶点。Swiss

Target Prediction 数据库是基于小分子和配体约束的立体图像相似性度量值进行预测,为实际目标选择的真实目标估计概率 P 值 ≥ 0.1 的潜在靶标。

2.7 黄疸疾病相关靶点筛选

以“icterus”和“jaundice”为关键词,在人类孟德尔遗传综合数据库、治疗靶点数据库、GeneCards 数据库、DrugBank 数据库为关键词进行黄疸相关疾病靶点筛选。合并获得的相关靶点,去重后得到相应的疾病靶点。

2.8 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建

成分靶点在 Uniprot 网站进行 gene symbol 转换,将得到的靶基因与黄疸相关靶基因整合后递交 R 软件中程序包计算,筛得二者交集靶基因作为茵栀黄颗粒治疗黄疸的潜在靶基因;将交集靶基因输入 String 数据库以构建 PPI 网络,其物种被限定为“homo sapiens”,筛选得到 PPI 关系,下转 tsv 格式文件后导入 Cytoscape 3.8.2 中,生成 PPI 网络图,使用 cytohubba 插件筛选后选出核心靶点。

2.9 核心靶点基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

利用 Cluster Profiler 数据库对核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,选择“homo sapiens”,设置 P (value) 为 0.01,进行了分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 和细胞组成 (CC) 3 项分析。同时,根据蛋白靶点与信号通路之间的相互关系,选取关键通路,模拟构建“成分-靶点-通路”网络。

2.10 分子对接验证

依据茵栀黄颗粒治疗黄疸的 2 条通路中靶点的度值,选取各通路排序靠前的关键靶点。随后从 PDB 数据库中下载活性成分的 SDF 格式文件,再通过 AutoDock Vina 软件,准备药物小分子对接的配体和蛋白质,预处理蛋白质、去除水分子、加氢原子和调整对接立场口袋大小。随后将 2 条通路中的靶蛋白依据度值大小进行关联性排序,选取度值高的前 5 个关键靶蛋白分别与绿原酸和滨蒿内酯做分子对接。最后,使用图像查看软件 Pymol 查看对接结果,并且截图标识对接位置。

3 结果

3.1 茵栀黄颗粒成分定性鉴别分析

线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱 (LTQ-Orbitrap MS) 具有分离效率高、扫描速度快、分辨率高和灵敏度高的特点,提供精确相对分子质量和 MS^n 多级质谱信息对一个化合物的结构进行更全面的描述。接下来通过离子碎片对比、精确相对分子质量参考、对照品比对以及综合文献分析可以确定出 14 个化合物^[3-14]。比较正负离子流图清晰程度,发现负离子结果较优质,在图中用数字表示出 14 个化合物分子离子峰所出现的时间。其中,1 为滨蒿内酯,2 为黄芩素,3 为汉黄芩素,4 为千层纸素 A,5 为新绿原酸,6 为绿原酸,7 为栀子苷,8 为黄芩苷,9 为汉黄芩苷,10 为异绿原酸 A,11 为木樨草甘,12 为异绿原酸 B,13 为 1,3 咖啡酰奎宁酸,14 为异绿原酸 C,见图 1—2。

3.2 茵栀黄颗粒化合物和黄疸相关靶点的获取

根据质谱数据、标准品比对以及数据库进行对比,可以明确获知茵栀黄颗粒中的 14 个化合物成分,将其导入 TCMS 数据库和 Swiss TargetPrediction 数据库中,获得 188 个化合物所对应的潜在靶标。通过 GeneCards 数据库获得黄疸的疾病靶

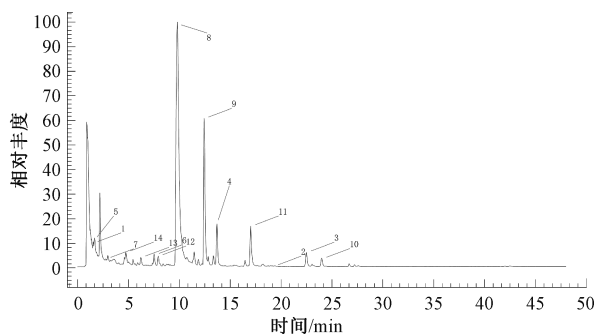


图 1 负离子模式下茵栀黄颗粒样品 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS of Yinzhihuang granule sample under negative ion mode

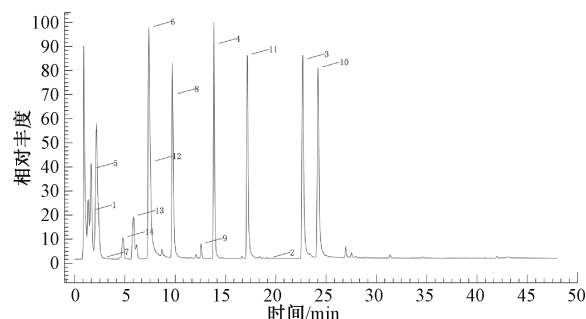


图 2 负离子模式下混合标准品 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatogram of UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS of mixed sample under negative ion mode

点 3365 个,靶点的 Relevance score 最大值为 9.41,最小值为 0.19,与多个数据库筛选结果合并,去除重复值,最终得到 3365 个黄疸疾病靶点。

3.3 成分-疾病靶点 PPI 网络的构建

将最终所获得的基因靶点与疾病靶点基因输入 Excel 软件取交集,获得 137 个交集靶点。将基因中交集的部分导入 String 11.0 平台,构建茵栀黄颗粒靶点之间的 PPI 网络,其基于 PPI 作用,剔除游离节点,选择 medium confidence 数值为 0.04 处理后,下载 tsv 格式文件后采用 Cytoscape 3.7.2 软件打开。利用 Cytohubba 插件筛选得到核心靶点 31 个,说明这 31 个可能是潜在治疗靶点,见图 3。

3.4 核心靶点的功能与通路的分析

利用 R 软件中代码调取 ClusterProfiler 数据库资源对核心靶点进行 GO 功能分析 ($P < 0.01$),选取度值与可信度综合排序居前 20 位的 GO 条目绘制气泡图,见图 4。由此发现,BP 在细胞对药物的反应 (cellular response to drug)、不饱和脂肪酸代谢过程 (unsaturated fatty acid metabolic process)、激素代谢过程 (hormone metabolic process) 和对氧化应激的反应 (response to oxidative stress) 等方面靶点富集较集中;MF 靶点主要富集在类固醇羟化酶活性 (steroid hydroxylase activity)、RNA 转录因子活性 (RNA polymerase II-specific)、单加氧酶活性 (monooxygenase activity) 和代谢过程 (protein serine/threonine/tyrosine kinase activity);作用靶点在 CC 中主要富集条目为膜筏 (membrane raft)、膜微区 (membrane microdomain)、突触

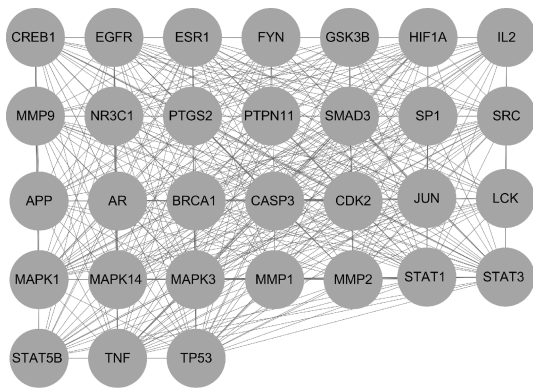


图 3 治疗靶点 PPI 网络图

Fig 3 Network diagram of PPI of treatment target

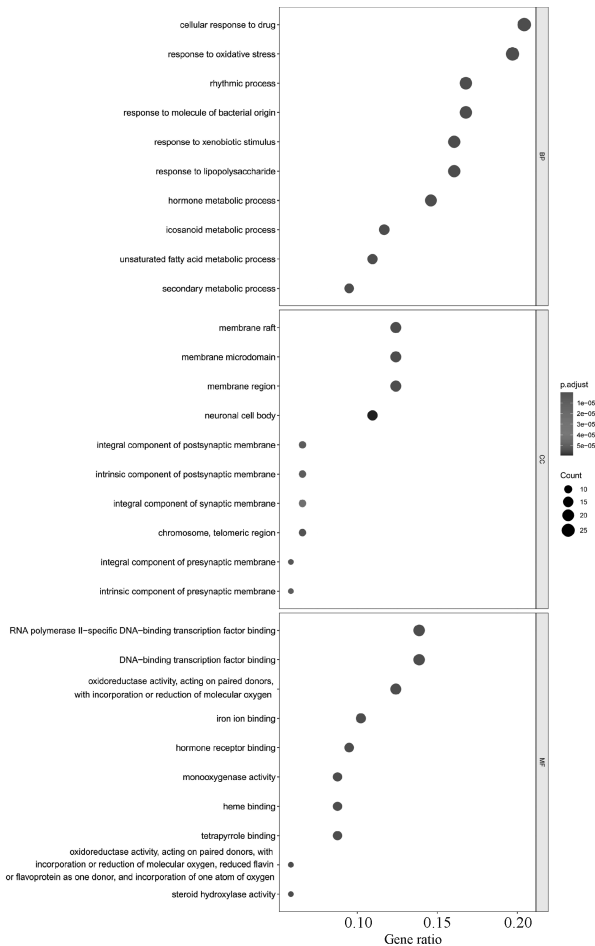


图 4 GO 条目气泡图

Fig 4 Bubble chart of GO entry

(glutamatergic synapse) 和神经元胞体 (neuronal cell body) 等。

KEGG 通路富集分析中,筛选得到度值与可信度综合排序居前 20 位 ($P < 0.01$) 的信号通路绘制生成气泡图,见图 5。由此可知,疾病方面为脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、乙型肝炎 (hepatitis B); 生物通路方面涉及类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis)、缺氧诱导因子 (HIF) 1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路、PD-L1 表达和 PD-1 表

达从而影响的癌症通路 (PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer)、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路和白细胞介素 (IL) 17 信号通路等。

图 4—5 中,横轴表示为靶基因所占百分比,纵轴表示为通路名称,通路富集基因数量为气泡面积, $-\text{Log}(P\text{-value})$ 值的大小表现为气泡颜色的不同,其值越大气泡颜色相应变深。

3.5 成分-核心靶点-通路网络图的构建

根据蛋白靶点与信号通路之间的相互关系,以 $P < 0.01$ 为条件筛选出关键通路 2 条,未发现靶基因不在相关通路的情况,新绿原酸、绿原酸、槲子苷、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草苷、异绿原酸 B (3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸)、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (异绿原酸 A)、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (异绿原酸 C)、滨蒿内酯、汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩苷和千层纸素 A,以上 14 个是得到的化学成分。然后构建“成分-核心靶点-通路”网络图,见图 6。其中,圆角矩形为药物,菱形与倒 V 字形为通路,八边形为化合物,圆形、三角形、六边形和斜四边形为疾病靶点;最内环的三角形为脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis) 通路的靶点,六边形为类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis) 通路的靶点,斜四边形为上述 2 个通路的共有靶点。

3.6 分子对接验证

将 31 个目的蛋白通过度值大小排序,筛选出前 5 位的靶点蛋白,即丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 1、MAPK3、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、CYP2C9 和 CASP3。通过 AutoDock Vina 软件将目的蛋白分别与绿原酸、滨蒿内酯进行分子对接。分子对接结果显示,MAPK1、MAPK3、TP53、CYP2C9 和 CASP3 分别与绿原酸、滨蒿内酯的最低结合能均 < -21.0 kJ/mol,见表 1;并制成分子对接图,见图 7。

表 1 分子对接重要靶点结合能表 (kJ/mol)
Tab 1 Binding energy table of important targets for molecular docking (kJ/mol)

靶点	绿原酸结合能	滨蒿内酯结合能
MAPK1	-28.4	-23.9
MAPK3	-31.8	-26.4
TP53	-32.7	-26.4
CYP2C9	-35.1	-31.4
CASP3	-37.3	-31.4

4 讨论

4.1 定性方法的优化

在茵栀黄颗粒的定性鉴别实验中,为了尽可能多地鉴定茵栀黄颗粒的成分,本研究采用了高剂量富集的方式。同时,在进样过程中,使用了预柱进行处理,极大减小了背景噪声的影响,并优化了峰形,使得分离更加完整,获得更加均匀一致的离子碎片。本研究中 14 种化合物的离子碎片信息因此而确定。

4.2 网络药理学研究结果

中医认为,黄疸主要由湿热感冒、血瘀脾虚引起,辨证分型以湿热蕴结为主,治以利湿利小便,治法以清热利湿、温中补虚和化瘀散结等为主。茵栀黄颗粒的药物组成为茵陈、黄芩、栀子和金银花 4 位中药,重用君药茵陈,因其善能清热利湿退黄,为治黄疸之主药;栀子为臣药,可清热降火、通利三焦,助茵陈引湿热从小便而去;黄芩泻热逐瘀,导瘀热而下,为

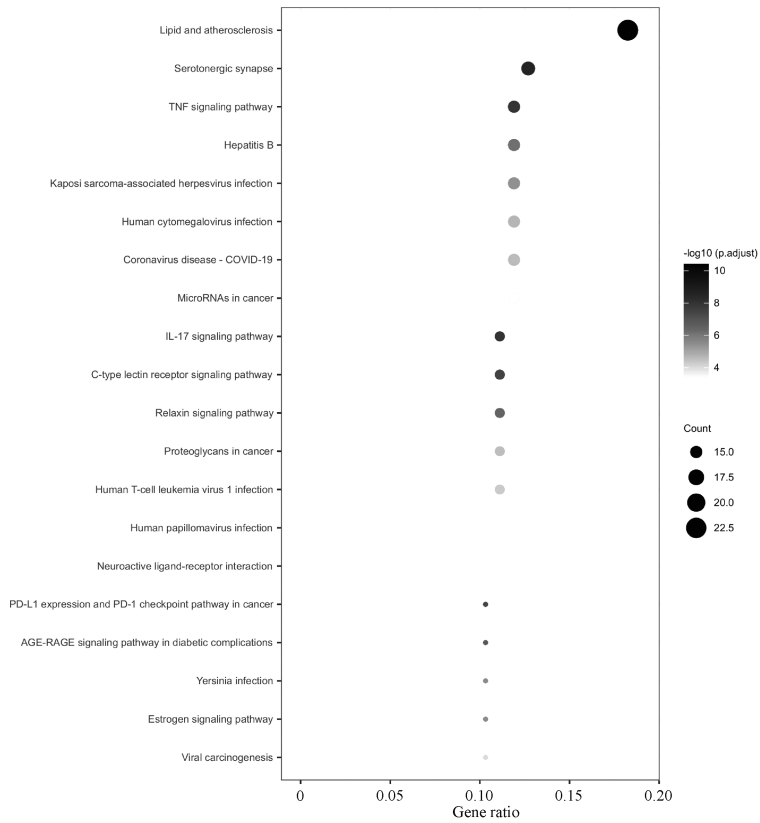


图5 KEGG 条目气泡图
Fig 5 Bubble chart of KEGG entry

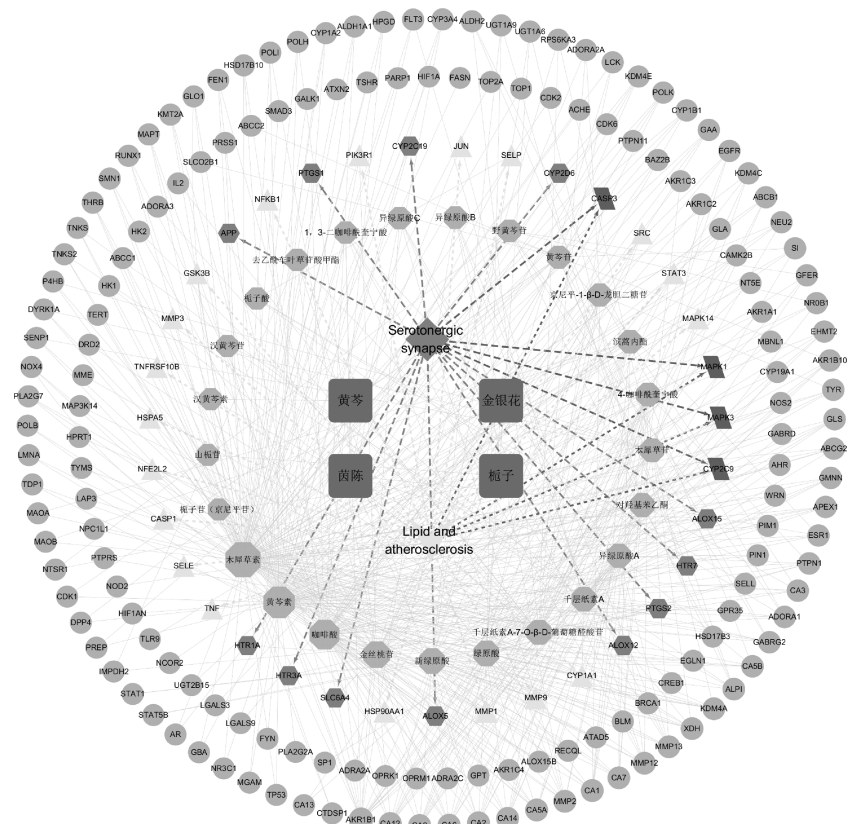
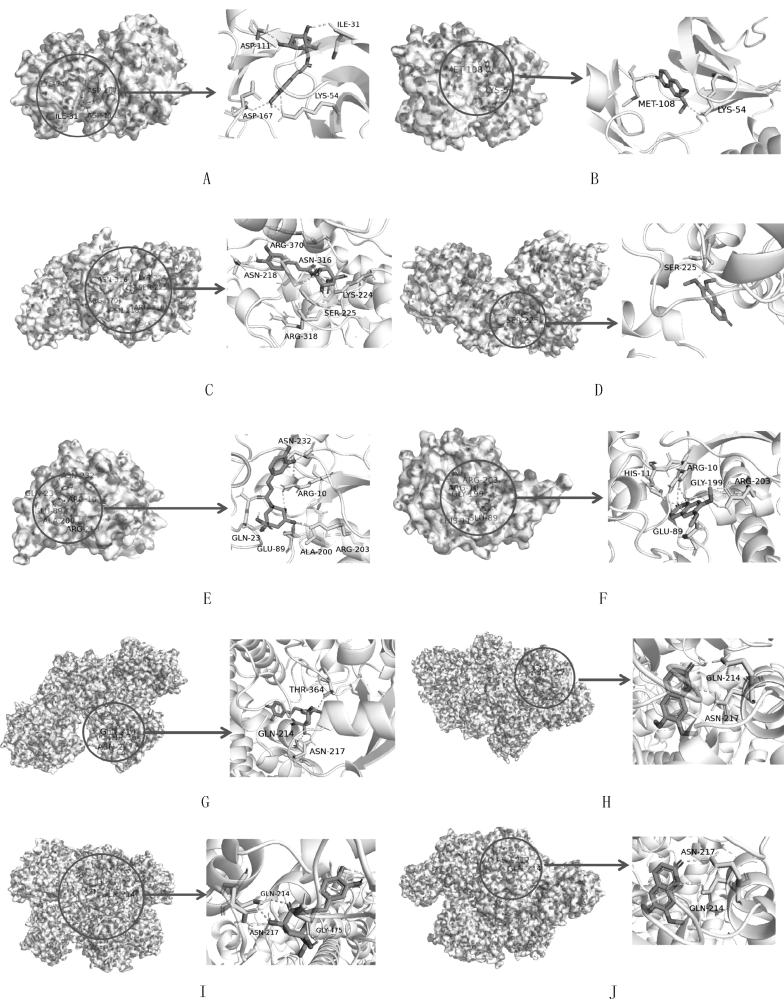


图6 茵栀黄颗粒成分-疾病核心靶点-疾病通路图
Fig 6 Component-Disease core targets-Disease pathway diagram of Yinzhihuang granules



A. 绿原酸与 MAPK1 对接图; B. 滨蒿内酯与 MAPK1 对接图; C. 绿原酸与 MAPK3 对接图; D. 滨蒿内酯与 MAPK3 对接图; E. 绿原酸与 TP53 对接图; F. 滨蒿内酯与 TP53 对接图; G. 绿原酸与 CYP2C9 对接图; H. 滨蒿内酯与 CYP2C9 对接图; I. 绿原酸与 CASP3 对接图; J. 滨蒿内酯与 CASP3 对接图
A. Docking diagram of chlorogenic acid and MAPK1; B. Docking diagram of scoparone and MAPK1; C. Docking diagram of chlorogenic acid and MAPK3; D. Docking diagram of scoparone and MAPK3; E. Docking diagram of chlorogenic acid and TP53; F. Docking diagram of scoparone and TP53; G. Docking diagram of chlorogenic acid and CYP2C9; H. Docking diagram of scoparone and CYP2C9; I. Docking diagram of chlorogenic acid and CASP3; J. Docking diagram of scoparone and CASP3

图 7 茵栀黄颗粒活性成分-黄疸疾病核心蛋白对接模式

Fig 7 Docking mode of active ingredient of Yinzhihuang granules-disease core protein of jaundice

佐药;使以金银花,帮助其他 3 药,以利湿与泄热相伍,使二便通利,前后分消,湿热得行,瘀热得下,则黄疸自退^[15-16]。

本研究采用网络药理学方法筛选出茵栀黄颗粒中的 25 种有效化学成分,并通过液质联用分析方法共收集到 14 种有效化学成分和 188 种相应靶点,并分析上述有效成分及靶点。绿原酸是最活跃的物质,其作用靶点最多,也是茵陈、栀子和金银花共有的化学成分。研究表明,绿原酸为黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、减轻肝毒性和预防肝纤维化等多重生物活性作用^[17]。现代药理学研究结果表明,滨蒿内酯具有影响 CYP2C9 从而反馈致使 CYP450 酶活性降低的作用,而活性低下的 CYP450 酶可能是导致黄疸疾病发生和发展的重要原因,滨蒿内酯作为退黄药物,其利胆退黄的作用基础可能是降低 CYP2C9 诱导活性的作用^[18]。

通过药物和疾病交叉获得 137 个交集靶点指标。关键的靶点蛋白包括蛋白激酶 1(AKT1)、TP53、IL-6、血管内皮生长因

子 A(VEGFA)、CASP3、TNF 和 MAPK8。AKT1 参与多种通路,包括 PI3K 和 EGFR,并通过炎症、细胞增殖、细胞迁移和纤维形成,在肝损伤中发挥独特作用^[19]。IL-6 能激活多种细胞内信号通路,是一种多功能细胞因子,在影响肝细胞凋亡、抗炎和抗氧化应激等方面发挥重要作用^[20]。VEGFA 作为高内皮特异性有丝分裂原,其在血管和血管生成中起重要调控作用。VEGF 在表达时,能够促进血管形成,在肝脏再生和肝损伤修复中发挥重要作用^[21-22]。通过对交集靶点进行 GO 功能富集分析,预测茵栀黄颗粒治疗黄疸可能涉及 DNA 转录因子结合、信号受体激活剂活性、细胞因子受体结合、泛素样蛋白连接酶和氧化还原酶活性等生物过程。经由基础的 KEGG 通路富集分析,发现茵栀黄颗粒可以通过脂质和动脉粥样硬化通路、类固醇激素生物合成通路对黄疸进行治疗。生物体内重要的信号转导系统之一为 MAPK,其参与介导细胞生长、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种生理过程^[23]。PI3K/Akt

信号通路是细胞内抑制细胞凋亡的关键性信号转导通路。研究结果证明,PI3K/Akt 通路激活具有抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡,保护肝脏的作用^[24-25]。HIF-1 为低氧浓度或缺氧应答的一个关键转录因子,通过激活参与细胞增殖、凋亡、血管生成和能量代谢的下游靶基因而影响肝细胞^[26]。

综上所述,本研究运用网络药理学方法,对茵栀黄颗粒治疗黄疸的活性成分、靶点和通路进行了系统性研究,论证了茵栀黄颗粒多成分、多靶点和多途径特性,对茵栀黄颗粒治疗黄疸的潜在作用机制进行了系统分析,并通过分子对接技术证实茵栀黄颗粒中的多种活性成分可作用于 MAPK1、MAPK3、CYP450 和 CASP3 蛋白。由上述论据推断,茵栀黄颗粒通过改良脂质变化来治疗黄疸。本研究综合使用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 液质联用成分分析方法与网络药理学方法,鉴定出茵栀黄颗粒成分以及预测茵栀黄颗粒治疗黄疸的潜在作用机制,上述结论及具体作用机制仍需进一步实验研究论证。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1244.

[2] 张利丹,谢雁鸣,谢婷婷. 真实世界的茵栀黄颗粒临床联合用药特征分析[J]. 中国药物警戒,2021,18(8):705-709.

[3] 张玉珊,刘谢英,姚新成,等. 高效液相色谱法同时测定茵栀黄颗粒中14个化学成分[J]. 药物分析杂志,2019,39(7):1229-1238.

[4] 范建伟,庄会芳,李艳芳,等. 茵栀黄颗粒的 HPLC 指纹图谱研究及共有峰归属分析[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(13):1342-1346,1352.

[5] 李艳芳,黄传亮,范建伟,等. 一测多评法测定茵栀黄颗粒中4个黄酮类成分的含量[J]. 食品与药品,2019,21(1):32-36.

[6] 范建伟,邓丽华,李蔚群,等. 一测多评法测定茵栀黄颗粒中4个环烯醚萜苷类成分[J]. 药物评价研究,2018,41(9):1648-1652.

[7] CAI Z C, WANG C C, ZOU L S, et al. Comparison of multiple bioactive constituents in the flower and the caulis of *Lonicera japonica* based on UFLC-QTRAP-MS/MS combined with multivariate statistical analysis[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1936.

[8] HAN Y K, KIM H, SHIN H, et al. Characterization of Anti-Inflammatory and antioxidant constituents from *Scutellaria baicalensis* using LC-MS coupled with a bioassay method [J]. *Molecules*, 2020, 25(16): 3617.

[9] ZHOU J, ZHANG Y J, LI N, et al. A systematic metabolic pathway identification of Common Gardenia Fruit (*Gardenia Fructus*) in mouse bile, plasma, urine and feces by HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1145: 122100.

[10] BOURGOU S, BETTAIEB REBEY I, MKADMINI K, et al. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of

its bioactive properties[J]. *Food Res Int*, 2017, 99(Pt 1): 702-712.

[11] DONG L C, FAN Y X, YU Q, et al. Synergistic effects of rhubarb-gardenia herb pair in cholestatic rats at pharmacodynamic and pharmacokinetic levels [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 175: 67-74.

[12] XU J, ZHOU R, LUO L, et al. Quality Evaluation of Decoction Pieces of *Gardenia Fructus* Based on Qualitative Analysis of the HPLC Fingerprint and Triple-Q-TOF-MS/MS Combined with Quantitative Analysis of 12 Representative Components [J]. *J Anal Methods Chem*, 2022, 2022: 2219932.

[13] FU Z W, LING Y, LI Z X, et al. HPLC-Q-TOF-MS/MS for analysis of major chemical constituents of Yinchen-Zhizi herb pair extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(4): 475-485.

[14] SUN S, XIE Z S, LIU E H, et al. Chemical profiling of Jinqi Jiangtang tablets by HPLC-ESI-Q-TOF/MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(3): 229-240.

[15] 胡泊,孟祥云,丁瑞洁,等. 基于网络药理学研究黄芩治疗慢性乙型病毒性肝炎的作用机制[J]. 宁夏医科大学学报,2022,44(3):296-302.

[16] 陈帅,刘军舰,尚海涛,等. 基于网络药理学、分子对接及实验探讨茵陈蒿汤调节阻塞性黄疸氧化应激的作用机制[J]. 天津医科大学学报,2021,27(6):595-602.

[17] 吴多虎,鲍传裕,李龙鹤,等. 绿原酸对大鼠阻塞性黄疸导致的肝纤维化的治疗作用[J]. 山西医科大学学报,2016,47(11):963-967.

[18] 毕红东,马安宁,刘杰,等. 滨蒿内酯基于 CAR 调控 CYP3A4 转录表达的作用机制[J]. 中国老年学杂志,2018,38(15):3744-3746.

[19] XIE Y Y, GUO C Y, LIU Y, et al. Dexmedetomidine activates the PI3K/Akt pathway to inhibit hepatocyte apoptosis in rats with obstructive jaundice [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4461-4466.

[20] 吴聪. 基于炎症因子角度观察补阳解毒化瘀方治疗慢性肝衰竭(阴黄证)的临床研究[D]. 南宁:广西中医药大学,2021.

[21] 阮四军,郭林泉,周凡. VEGF 与肝脏疾病的关系[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(13):1191-1196.

[22] 董晓灵,王曙光,张玉君,等. VEGF 对大鼠 50% 减体肝移植术后肝再生的影响[J]. 重庆医学,2008,37(9):959-961.

[23] 邱绘婷. P38MAPK-Phsp27 介导大鼠阻塞性黄疸血管低反应性的机制研究[D]. 福州:福建医科大学,2017.

[24] 刘焯,解雅英. 右美托咪定通过 PI3K/Akt 信号通路减轻梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡[J]. 内蒙古医科大学学报,2021,43(1):78-81.

[25] CUI X, QIAN D W, JIANG S, et al. *Scutellariae radix* and *Coptidis Rhizoma* improve glucose and lipid metabolism in T2DM rats via regulation of the metabolic profiling and MAPK/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3634.

[26] 周新玲. Hey、HIF-1、VEGF 联合检测对肝硬化及其不同分级的意义[D]. 泰安:泰山医学院,2013.

(收稿日期:2021-11-30 修回日期:2022-04-01)

(上接第 519 页)

[27] YANG L J, ZHANG Q, HUANG J Y, et al. Xianglian Pill ameliorates antibiotic-associated diarrhea by restoring intestinal microbiota and attenuating mucosal damage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113377.

[28] TANIUCHI S, HATTORI K, YAMAMOTO A, et al. Administration of *Bifidobacterium* to infants with atopic dermatitis; changes in fecal microflora and clinical symptoms [J]. *The Journal of Applied Research*, 2005, 5(2): 387-396.

[29] WEXLER H M. *Bacteroides*; the good, the bad, and the nitty-gritty [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4): 593-621.

[30] ZOLLNER-SCHWETZ I, HÖGENAUER C, JOAINIG M, et al. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(9): e74-e78.

[31] ZHENG B W, XU H, LV T, et al. Stool samples of acute diarrhea inpatients as a reservoir of ST11 hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00498-20.

[32] CHEN Y J, WU H, WU S D, et al. *Parasutterella*, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(11): 1844-1852.

(收稿日期:2022-04-17 修回日期:2022-04-28)