

基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS和网络药理学分析 桑姜感冒注射液治疗普通感冒的物质基础及作用机制

彭诚艺¹, 曾逸佳¹, 熊海均¹, 耿福能², 黄勤挽^{1*}, 张大永^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 好医生药业集团有限公司, 成都 610071)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)和网络药理学方法探索桑姜感冒注射液治疗普通感冒的物质基础和作用机制。方法:采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS鉴定桑姜感冒注射液中的化学成分,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 4%~15%A; 10~35 min, 15%~30%A; 35~45 min, 30%~33%A; 45~55 min, 33%~60%A; 55~58 min, 60%A),流速0.2 mL·min⁻¹,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式下扫描,扫描范围 m/z 100~1 500。利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)和GeneCards 5.0数据库筛选并预测桑姜感冒注射液化学成分的潜在作用靶点;利用STRING 11.0数据库和Cytoscape 3.7.2软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络模型;使用Metascape 3.5, Reactome数据库和京都基因与基因组百科全书(KEGG)对潜在靶点进行基因本体(GO)分析和通路分析;利用Cytoscape 3.7.2软件建立“药材-成分-核心靶点”网络。**结果:**分析鉴定了桑姜感冒注射液中54种成分,并以此为基础筛选出80个桑姜感冒注射液治疗普通感冒的潜在靶点。桑姜感冒注射液通过作用于白细胞介素(IL)-6,肿瘤坏死因子(TNF)和IL-10等靶点,以及IL-17信号通路, TNF信号通路,细胞因子受体相互作用等信号通路发挥治疗作用。**结论:**桑姜感冒注射液可能通过作用于炎症和免疫系统等相关的靶点及通路,干预炎性细胞因子的表达,整体调节机体的免疫功能,从而发挥治疗作用。

[关键词] 桑姜感冒注射液; 桑菊饮; 普通感冒; 网络药理学; 物质基础; 炎症; 免疫系统

[中图分类号] R22; R857.3; R28; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0155-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210350 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210105.1015.003.html>

[网络出版日期] 2021-01-05 14:45

Analysis of Material Basis and Mechanism of Sangjiang Ganmao Injection in Treatment of Common Cold Based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS and Network Pharmacology

PENG Cheng-yi¹, ZENG Yi-jia¹, XIONG Hai-jun¹, GENG Fu-neng²,
HUANG Qin-wan^{1*}, ZHANG Da-yong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Gooddoctor Pharmaceutical Group Co. Ltd., Chengdu 610071, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the material basis and mechanism of Sangjiang Ganmao injection (SG) in the treatment of common cold by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) and network pharmacology. **Method:** UPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to identify the chemical components of SG with mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-10 min, 4%-15%A; 10-35 min, 15%-30%A; 35-45 min, 30%-33%A; 45-55 min, 33%-60%A; 55-58 min, 60%A), flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, electrospray ionization (ESI) and scanning range of m/z 100-1 500 under positive and negative ion modes.

[收稿日期] 20200926(003)

[基金项目] 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(QNXZ2018023, XSGG2019008)

[第一作者] 彭诚艺,在读硕士,从事中药学研究, Tel: 028-61800231, E-mail: ceandanthony@163.com

[通信作者] * 黄勤挽, 博士, 教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 028-61800231, E-mail: hqw2163@163.com;

* 张大永, 硕士, 正高级工程师, 从事中药炮制学研究, E-mail: zdy@xinhehua.com

Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and GeneCards 5.0 database were used to screen and predict the potential targets of chemical components in SG, STRING 11.0 database and Cytoscape 3.7.2 software were used to construct protein-protein interaction (PPI) network model, gene ontology (GO) analysis and pathway analysis were performed on potential targets by Metascape 3.5, Reactome database and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Cytoscape 3.7.2 software was used to build the network of "herbs-ingredients-key targets". **Result:** A total of 54 components in SG were identified, and 80 potential targets of SG for treatment of common cold were predicted and screened based on this. SG exerted therapeutic effects by acting on targets such as interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF) and IL-10, and signaling pathways such as IL-17 signaling pathway, TNF signaling pathway and interaction of cytokine receptors. **Conclusion:** SG may interfere with the expression of inflammatory cytokines by acting on related targets and pathways such as inflammation and immune system, and regulate the immune function of the body as a whole, thereby exerting a therapeutic effect.

[**Keywords**] Sangjiang Ganmao injection; Sangjuyin; common cold; network pharmacology; material basis; inflammation; immune system

“感冒”一词最早出现在宋代《仁斋直指方》，在这之前多属于广义的“热病”或“伤寒”范畴。感冒可分为时行感冒和普通感冒^[1]，时行感冒具传染性和流行性，而普通感冒有外感六邪之因，以风邪为主，其中风寒、风热为主要外感病因。现代研究以时行感冒为主，少见关于普通感冒的研究。普通感冒是急性上呼吸道感染性疾病，大部分是由病毒引起的，临床表现主要有鼻塞、咳嗽、咽痛、头痛、发热等^[2-3]。虽然该疾病是一种自限性疾病，但多数情况下发病都合并细菌感染，易导致病情加重或出现严重并发症，治疗不慎将会威胁患者生命，而西医药对病毒性感冒无特异性的疗效^[4]。相比之下，治疗感冒的中药制剂种类多且疗效好，前景更为广阔。此前，中华中医药学会发布了相关指南，对普通感冒的诊断和治疗进行了规范^[5-6]，但多以经验和讨论为主，缺乏较为严谨的科学证据支撑。

桑姜感冒注射液配方是以经典名方桑菊饮为基础方加减化裁而得^[7]，由桑叶、菊花、连翘、紫苏、苦杏仁和干姜6味药材组成，具有散风清热、祛痰止咳之功效，适应症包括感冒、咳嗽、头痛及咽喉肿痛。该注射液虽药味组成简单，但全方温清并用，性味平和，为平散表邪、协调寒热之剂，且风寒、风热型感冒均适用，在临床治疗普通感冒时有着显著疗效^[8]。桑姜感冒注射液为中药制剂，无明确不良反应，且安全有效、价格合理，但目前对该制剂的研究较少^[9]，尤其在物质基础和作用机制研究方面。

网络药理学利用计算机科学和分子生物学等学科成果，可从整体上对中药物质基础和药理作用的现代内涵进行多层次解析^[10]。本研究拟利用超

高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 分析桑姜感冒注射液中的主要化学成分，以确定其物质基础；通过网络药理学研究思路构建“药材-成分-核心靶点”网络，揭示桑姜感冒注射液的组方规律和作用特点，预测其治疗普通感冒的潜在靶点及作用机制，可为该制剂的质量控制及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器和试剂 Vanquish型超高效液相色谱-Q-Exactive型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，UPH-I-10T型超纯水器(四川优普超纯科技有限公司)。木犀草素、芹菜素、连翘苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司，批号分别为 MUST-20102418, MUST20032615, MUST-20060811, 纯度均>98%)，绿原酸、牛蒡子苷、儿茶素对照品(中国食品药品检定研究院，批号分别为 0753-9607, 0819-9802, 877-200001, 纯度均>98%)，咖啡酸、芦丁、姜辣素、毛蕊花糖苷、苦杏仁苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司，批号分别为 140428, 151023, 140914, 150401, 16092001, 纯度均>98%)，桑姜感冒注射液(山西佳能达华禹制药有限公司，批号 190601)，水为超纯水，乙腈、甲酸为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

1.2 分析工具 中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP 2.3, <https://tcmssp.com/tcmssp.php>)，京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>)，UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)，GeneCards 5.0 数据库(<https://www.geneCards.com/>)

genecards.org/), 交互式韦恩图制作平台 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>), STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>), Metascape 3.5 数据库 (<http://metascape.org/>), Reactome 数据库 (<https://reactome.org/>), mzCloud 网络数据库 (<https://www.mzcloud.org/>), mzVault 本地谱库, Compound Discover 3.0 软件, Cytoscape 3.7.2 软件, R 4.0.3 软件。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 精密吸取桑姜感冒注射液 20 mL 置水浴上蒸干, 加 50% 甲醇 3 mL 使溶解, 过滤, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取木犀草素、芹菜素、连翘苷、绿原酸、牛蒡子苷、儿茶素、咖啡酸、芦丁、姜辣素、毛蕊花糖苷和苦杏仁苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 140, 101, 241, 327, 136, 88, 201, 80, 297, 103, 161 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 数据采集

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱 (0~10 min, 4%~15%A; 10~35 min, 15%~30%A; 35~45 min, 30%~33%A; 45~55 min, 33%~60%A; 55~58 min, 60%A), 流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 2 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子检测模式, 扫描范围 m/z 100~1 500, 喷雾电压设定 3.2 kV, 鞘气流速 30 arb, 辅助气流速 10 arb, 离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气加热温度选择 350 $^{\circ}\text{C}$, 全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd MS²), 一级分辨率 35 000, 二级分辨率 17 500, 碰撞能量设定 20, 40, 60 eV 共 3 个梯度。

2.4 潜在靶点的预测和筛选 以 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定出的化学成分为研究对象, 在 TCMSP 中查找各个成分相对应的靶点蛋白, 同时使用 UniProt 数据库查询这些靶点蛋白对应的人类基因名称, 进行名称统一和规范, 整合后筛去重复的靶点, 得到成分靶点。普通感冒常见的临床表现包括鼻塞、喷嚏、咳嗽、咽痛、头痛、发热, 故以 nasal obstruction, sneezing, cough, headache, fever, sore throat 为关键词, 在 GeneCards 5.0 数据库中进行检索, 将得到的 6 种靶点导入交互式韦恩图制作平台进行韦恩分析, 选择共同靶点作为疾病靶点, 将疾病靶点与成分靶点进行交集, 获得桑姜感冒注射液

治疗普通感冒的潜在靶点。

2.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 为分析靶点蛋白间的相互作用, 将潜在靶点导入 STRING 11.0 数据库, 规定物种为人类 (Homo sapiens), 选择 0.7 的高置信度以确保数据的可靠性, 导出结果。将所得结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 PPI 网络, 对所建网络进行可视化分析, 以节点 (node) 大小和颜色深浅反映度值 (degree) 的大小, 边 (edge) 的粗细设置用于反映结合分数的大小。

2.6 富集分析和通路分析 将潜在靶点导入 Metascape 3.5 数据库, 物种选择人类 (Homo sapiens), 进行个性化分析, 获取基因本体 (GO) 功能分析和 KEGG 通路分析结果, 用 Reactome 数据库进行通路注释分析, 同时使用 R 4.0.3 软件绘制气泡图, 实现数据结果的可视化。

2.7 “药材-成分-核心靶点”网络构建 把 PPI 网络中节点值大于平均值的靶点作为核心靶点, 在 Cytoscape 3.7.2 软件中分别导入核心靶点之间的相互作用关系、成分-核心靶点和成分-药材之间的对应关系, 利用 merge 功能合并成一个整体网络, 删去孤立节点, 得到桑姜感冒注射液治疗普通感冒的“药材-成分-核心靶点”网络模型图。

3 结果

3.1 桑姜感冒注射液化学成分的鉴定 使用 Compound Discover 3.0 软件分析 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结果, 结合 mzCloud 和 mzVault 数据库, 并参考文献 [11-16], 对化合物的相对分子量、保留时间 (t_{R}) 和碎片离子信息进行识别, 结果初步鉴定出了 54 个化学成分, 其中包含 21 个黄酮类成分, 13 个酚酸类成分, 6 个萜类成分, 13 个苯丙素类成分和 1 个生物碱类成分。通过查询 TCMSP 进一步对这些化学成分进行药味归属。化合物信息见表 1。

3.2 潜在靶点的预测 在 TCMSP 中分别查询上述 54 个成分对应的靶点蛋白, 通过 UniProt 数据库找到每个靶点蛋白对应的人类基因名称, 整理后得到成分靶点 255 个。通过检索 GeneCards 5.0 数据库获得与鼻塞相关的靶点 4 793 个, 与喷嚏相关的靶点 1 143 个, 与咳嗽相关靶点 4 400 个, 与头痛相关靶点 6 973 个, 与发热相关靶点 7 379 个, 与咽痛相关靶点 1 993 个, 筛选出这六类靶点中重复的部分, 得到共同的疾病靶点 444 个。利用 Venn 作图工具将成分靶点与疾病靶点进行交集分析, 得桑姜感冒注射液治疗普通感冒的潜在靶点 80 个。

3.3 PPI 网络构建与可视化分析 将 STRING 11.0

表1 桑姜感冒注射液化学成分的UPLC-Q-Orbitrap HRMS鉴定

Table 1 Qualitative analysis of chemical constituents in Sangjiang Ganmao injection by UPLC-Q-Orbitrap HRMS

化合物	t_R /min	加荷	m/z 预测值	m/z 实测值	δ /ppm	分子式	名称	二级碎片	归属
1	4.31	[M+H] ⁺	138.047 7	138.054 3	4.78	C ₇ H ₇ NO ₂	葫芦巴碱	94.065 3	A
2	4.67	[M-H] ⁻	173.052 8	173.045 0	-4.51	C ₇ H ₁₀ O ₅	莽草酸	111.044 0, 93.033 5, 73.0283 7	C
3	5.56	[M-H] ⁻	289.071 8	289.072 4	0.21	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素 ¹⁾	245.259 7	C
4	10.63	[M+H] ⁺	133.057 5	133.064 0	4.88	C ₉ H ₈ O	肉桂醛	105.070 0, 103.054 4, 79.054 6	C
5	11.44	[M+H] ⁺	165.047 3	165.054 0	4.06	C ₉ H ₈ O ₃	邻香豆酸	119.049 2	C
6	11.58	[M-H] ⁻	191.063 4	191.055 4	-4.18	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸	85.028 4, 101.023 2	A, B
7	12.07	[M-H] ⁻	461.172 4	461.165 8	-1.43	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	连翘酯苷 E	135.044 2, 131.034 0, 59.012 7	D
8	12.28	[M-H] ⁻	299.120 9	299.113 5	-2.47	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	红景天苷	119.034 1, 89.023 3, 71.012 7, 59.012 7	D
9	13.06	[M+H] ⁺	325.081 8	325.089 8	2.46	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	茵芋苷	163.038 6, 107.049 2	A
10	14.17	[M+H] ⁺	229.078 6	229.084 9	2.75	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	白藜芦醇	135.049 2, 107.049 2, 91.054 5	A
11	14.60	[M-H] ⁻	271.089 6	271.082 4	-2.66	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	熊果苷	109.028 4	D
12	15.27	[M+H] ⁺	465.092 8	465.100 3	1.61	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷	301.745 0, 179.430 3	A, B, D
13	15.59	[M-H] ⁻	353.095 1	353.087 5	-2.15	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 ¹⁾	163.038 5, 145.028 0, 135.043 8	A, B
14	15.78	[M+H] ⁺	355.092 4	355.100 5	2.27	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	东莨菪苷	193.049 1, 133.028 2	A
15	16.20	[M-H] ⁻	646.153 4	646.146 0	-1.15	C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₆	矢车菊素双葡萄糖苷	609.146 1	C
16	16.64	[M+H-H ₂ O] ⁺	135.120 1	135.116 2	-2.92	C ₁₀ H ₁₆ O	樟脑	135.116 5, 107.085 5, 93.070 1	B, C, D
17	16.95	[M+H] ⁺	153.233 0	153.226 5	-4.24	C ₁₀ H ₁₆ O	柠檬醛	107.085 6, 93.070 2, 81.070 3, 71.049 6	C, D
18	17.49	[M+NH ₄] ⁺	475.159 8	475.179 2	4.09	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	苦杏仁苷 ¹⁾	323.097 7, 89.023 3, 59.012 7	E
19	17.56	[M-H] ⁻	609.189 7	609.206 3	2.72	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷	108.829 1, 84.213 0	B
20	17.89	[M-H] ⁻	177.026 6	177.018 7	-4.47	C ₉ H ₆ O ₄	6,7-二羟基香豆素	133.028 5, 105.033 5, 92.994 7	C
21	17.48	[M-H] ⁻	563.147 9	563.141 1	-1.21	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	夏佛塔苷	511.122 0, 427.101 3, 295.059 5	B
22	18.00	[M-H] ⁻	177.026 6	177.018 9	-4.38	C ₉ H ₆ O ₄	瑞香素	147.028 6, 129.018 5, 121.028 4	A
23	18.23	[M+H] ⁺	361.081 8	361.089 8	2.20	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸	163.038 6, 135.043 8, 111.044 1	C
24	20.03	[M-H] ⁻	447.100 6	447.092 9	-1.71	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷	285.034 0, 284.032 2	B, C
25	21.20	[M-H] ⁻	623.206 8	623.197 9	-1.42	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	连翘酯苷 A	179.034 1, 161.023 4, 133.028 4	D
26	21.46	[M+H] ⁺	611.149 4	611.157 1	1.27	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁 ¹⁾	303.049 0, 85.028 7, 71.049 6	A, D
27	21.94	[M+H] ⁺	595.155 8	595.162 7	1.15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3-O-芸香糖苷	449.106 3, 287.054 0	A
28	22.92	[M-H] ⁻	463.095 5	463.088 9	-1.42	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷	300.027 0, 271.024 4, 151.002 5	D
29	22.95	[M+H] ⁺	449.099 2	449.106 1	1.54	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	紫云英苷	284.032 3, 255.029 4, 227.034 4	A, D
30	23.27	[M-H] ⁻	461.077 1	461.072 3	-1.05	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	野黄芩苷	287.054 2	C
31	23.60	[M+H] ⁺	287.046 4	287.053 0	2.30	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素 ¹⁾	153.017 9	A, B, D
32	24.97	[M-H] ⁻	515.126 8	515.119 7	-1.38	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 C	353.087 0, 173.044 6, 135.044 1	B
33	25.31	[M-H] ⁻	623.206 8	623.199 3	-1.20	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖苷 ¹⁾	161.023 5, 133.028 5, 113.023 4	D
34	25.42	[M+H] ⁺	579.159 0	579.167 5	1.46	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	野漆树苷	433.111 4, 271.059 1	B
35	25.47	[M-H] ⁻	519.195 8	519.188 6	-1.38	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	(+)-松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷	235.095 8, 175.075 0, 137.059 4	D
36	26.10	[M-H] ⁻	447.100 6	447.093 8	-1.51	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	三叶豆苷	284.032 3, 255.029 4, 277.034 4	C
37	26.49	[M-H] ⁻	515.126 8	515.119 4	-1.44	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,5-二咖啡酰奎宁酸	353.087 2, 191.055 2, 135.044 1	B
38	27.32	[M-H] ⁻	447.099 2	447.092 9	-1.41	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山柰酚-7-O-β-D-葡萄糖苷	285.034 0, 257.045 1, 151.112 7, 107.012 8	C
39	28.03	[M-H] ⁻	445.084 9	445.077 5	-1.67	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	271.059 2	C

续表 1

化合物	t_R/min	加荷	m/z 预测值	m/z 实测值	δ/ppm	分子式	名称	二级碎片	归属
40	29.08	[M+H] ⁺	301.062 0	301.068 8	2.25	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	香叶木素	286.046 4, 258.051 6	B
41	29.52	[M-H] ⁻	187.104 9	187.097 0	-4.25	C ₉ H ₁₆ O ₄	壬二酸	187.096 7, 125.096 1	B
42	29.65	[M-H] ⁻	179.042 3	179.033 9	-4.69	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸 ¹⁾	163.038 5, 135.043 8, 117.033 5	D
43	34.38	[M+NH ₄] ⁺	552.232 6	552.241 2	1.56	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	连翘苷 ¹⁾	355.153 2, 189.090 6, 137.059 5	D
44	35.62	[M+NH ₄] ⁺	552.236 7	552.241 3	0.83	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	牛蒡子苷 ¹⁾	373.163 6, 355.153 1, 137.059 5	D
45	35.82	[M+H] ⁺	593.179 2	593.183 6	0.74	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	蒙花苷	447.127 2, 285.074 9, 270.051 4	B
46	37.33	[M-H] ⁻	201.120 5	201.112 8	-3.84	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	葵二酸	183.101 8, 139.111 8	C
47	39.12	[M-H] ⁻	283.068 5	283.060 9	-2.68	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	金合欢素	242.056 6	B
48	39.92	[M-H] ⁻	459.100 6	459.093 3	-1.59	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	汉黄芩苷	283.060 7, 268.037 4, 113.023 4	D
49	42.48	[M+H-H ₂ O] ⁺	137.125 2	137.131 9	4.91	C ₁₀ H ₁₈ O	桉树脑	95.085 8, 81.070 3	A, B, C
50	43.95	[M+H] ⁺	271.052 8	271.058 3	2.01	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芹菜素 ¹⁾	151.002 5, 117.033 5	B, C
51	45.14	[M+H] ⁺	359.141 6	359.147 1	1.53	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	罗汉松树脂酚	122.036 3, 83.0012 7	D
52	47.83	[M-H] ⁻	135.124 7	135.128 5	2.81	C ₁₀ H ₁₆	柠檬烯	137.059 4	C
53	53.65	[M+H] ⁺	249.141 2	249.147 5	2.51	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	小白菊内酯	231.137 6, 111.080 6	B
54	57.61	[M+H-H ₂ O] ⁺	277.172 5	277.178 5	2.18	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	姜辣素 ¹⁾	177.090 7, 145.064 5, 137.059 5	F

注: ¹⁾表示与对照品比对后确认; A. 桑叶; B. 菊花; C. 紫苏; D. 连翘; E. 苦杏仁; F. 干姜。

数据库中获得靶点蛋白相互作用数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 PPI 网络, 见图 1。PPI 网络中共有 73 个节点(靶点蛋白), 578 条边(蛋白相互作用)。节点大小和颜色深浅代表度值的大小, 节点越大, 颜色越深, 其对应的度值越大; 边的粗细程度代表结合分数, 边越粗则结合分数值越大。在该网络中, 节点平均度值 15.84, 大于平均度值的核心节点共有 30 个, 见表 2, 其中白细胞介素-6(IL-6, 度值 47), 肿瘤坏死因子(TNF, 度值 46)和 IL-10(度值 38)靶点蛋白度值较高, 是 3 个关键靶点。

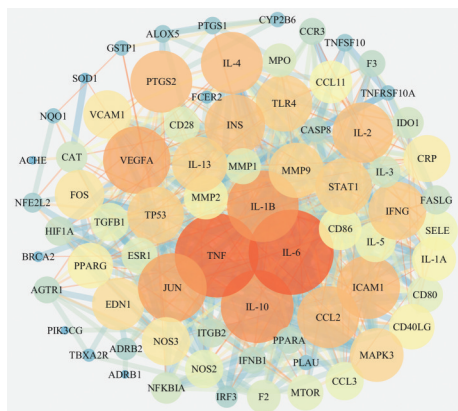


图 1 桑姜感冒注射液治疗普通感冒相关靶点的 PPI 网络
Fig. 1 PPI network of potential targets for treatment of common cold with Sangjiang Ganmao injection

3.4 富集分析和通路分析

3.4.1 GO 富集分析 将桑姜感冒注射液治疗普通感冒的潜在靶点导入 Metascape 3.5 数据库进行 GO

富集分析, 共得到基因 GO 条目 2 088 个 ($P < 0.05$)。其中生物过程(BP)相关的条目有 1 981 个, 主要涉及对脂多糖的反应、氧化应激反应和 T 细胞激活等方面; 分子功能(MF)相关的条目有 92 个, 其中信号转导受体激活剂、细胞因子受体结合和受体配体活性最为显著; 细胞组分(CC)相关的条目 15 个, 其中质膜的外侧、脂筏、膜微区和膜区占比最大。将基因 GO 条目按富集程度进行排序, 分别取 BP, MF 和 CC 的前二十绘制气泡图, 见图 2(A~C)。图中纵坐标为条目名称; 横坐标为基因比例, 代表每个条目的基因在整体基因中的占比; 点的颜色代表 P ; 点的大小代表基因数。

3.4.2 通路分析 利用 Metascape 3.5 对桑姜感冒注射液治疗普通感冒的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.05$), 并结合 KEGG 和 Reactome 数据库对通路进行注释分析, 见图 2(D) 和图 3。图 3 中黄色至白色线条代表潜在靶点富集的通路, 颜色越深, P 越小, 结果发现桑姜感冒注射液的潜在靶点主要涉及免疫系统、信号传导、程序性细胞死亡和基因表达等多个生物过程, 其中免疫系统涉及最多, 提示桑姜感冒注射液通过调控多个复杂的生物过程来治疗感冒, 且主要通过免疫调节发挥作用。KEGG 分析得到显著富集通路 124 条, 主要涉及炎症相关通路和一些疾病相关通路, 包括细胞因子和细胞因子受体相互作用, 甲型流感, IL-17 信号通路, TNF 信号通路和炎症性肠病等信号通路。

表2 桑姜感冒注射液治疗普通感冒的核心靶点

Table 2 Key targets of Sangjiang Ganmao injection for treatment of common cold

No.	靶基因	靶点名称	UniProt ID
1	CCL11	趋化因子(eotaxin)	P51671
2	CCL2	C-C基序趋化因子2(C-C motif chemokine 2)	P13500
3	CD40LG	CD40配体(CD40 ligand)	P29965
4	CD86	T淋巴细胞活化抗原CD86(T-lymphocyte activation antigen CD86)	P42081
5	CRP	C反应蛋白(C-reactive protein)	P02741
6	EDN1	内皮素1(endothelin-1)	P05305
7	FOS	人原癌基因c-Fos(proto-oncogene c-Fos)	P01100
8	ICAM1	细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule 1)	P05362
9	IFNG	γ-干扰素(interferon gamma)	P01579
10	IL-10	白细胞介素-10(interleukin-10)	P22301
11	IL-13	interleukin-13	P35225
12	IL-1A	interleukin-1α	P01583
13	IL-1B	interleukin-1β	P01584
14	IL-2	interleukin-2	P60568
15	IL-4	interleukin-4	P05112
16	IL-6	interleukin-6	P05231
17	INS	胰岛素(insulin)	P01308
18	JUN	转录因子激活蛋白-1(AP-1)[transcription factor activator protien-1(AP-1)]	P05412
19	MAPK3	丝裂原激活的蛋白激酶3(mitogen-activated protein kinase 3)	P27361
20	MMP2	基质金属蛋白酶2(72 kDa type IV collagenase)	P08253
21	MMP9	基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9)	P14780
22	NOS3	内皮型一氧化氮合酶3(endothelial nitric oxide synthase 3)	P29474
23	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	P37231
24	PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin G/H synthase 2)	P35354
25	STAT1	信号转导与转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta)	P42224
26	TLR4	Toll样受体4(Toll-like receptor 4)	O00206
27	TNF	肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)	P01375
28	TP53	细胞肿瘤抗原p53(cellular tumor antigen p53)	P04637
29	VCAM1	血管细胞粘附蛋白1(vascular cell adhesion protein 1)	P19320
30	VEGFA	血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A)	P15692

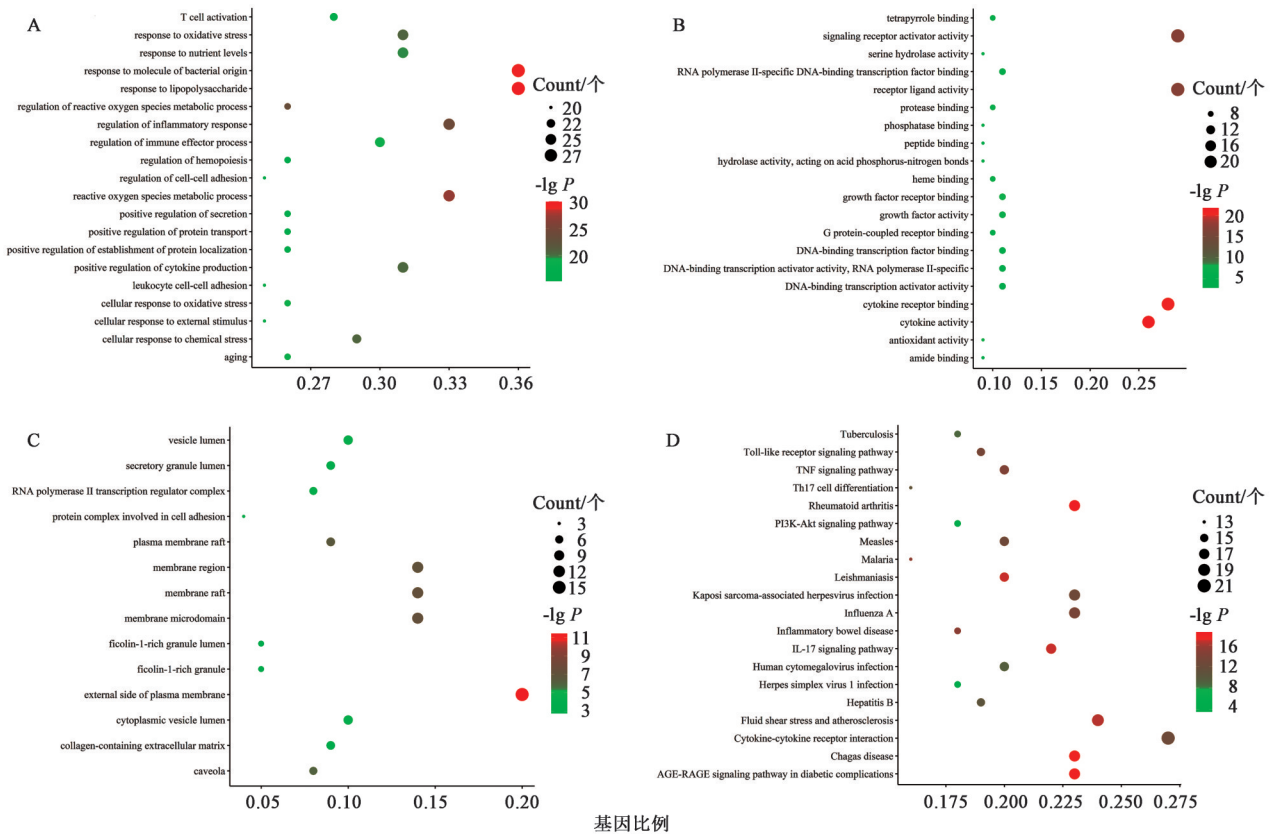
3.5 “药材-成分-核心靶点”网络构建 网络模型图见图4。使用Network Analyzer插件进行分析,该网络共有63个节点(包括27个成分,30个核心靶点和6种药材)和674条边,度值越大说明相连节点越多,在整个网络中的调控作用也就越大。度值较大的成分有木犀草素、芹菜素、迷迭香酸、芦丁、姜辣素和白藜芦醇,推测为桑姜感冒注射液的主要药效成分;度值较大的药材有桑叶和菊花,二者在桑姜感冒注射液的配方中并为君药。

4 讨论

桑姜感冒注射液在《温病条辨》的桑菊饮基础

上进行了加减辨证,紫苏、苦杏仁、干姜可治风寒,桑叶、菊花、连翘可治风热,仅此一方,却有2种功效,疗效甚佳。本研究首次利用UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术对桑姜感冒注射液中复杂的化学成分进行了快速分析与鉴定,为其质量控制奠定了基础,并结合GO富集分析和KEGG信号通路分析筛选出了其治疗普通感冒的核心靶点。

在PPI网络中存在多种靶点的相互作用,度值越大,说明桑姜感冒注射液通过该靶点治疗普通感冒的可能性越大,在PPI网络中得到了几个度值较高的关键靶点,分别为IL-6,IL-10和TNF。IL是在



A.BP; B.MF; C.CC; D.KEGG 信号通路

图 2 桑姜感冒注射液治疗普通感冒相关靶点的 GO 富集和 KEGG 通路分析

Fig. 2 GO enrichment and pathway analysis of targets related to Sangjiang Ganmao injection in treatment of common cold

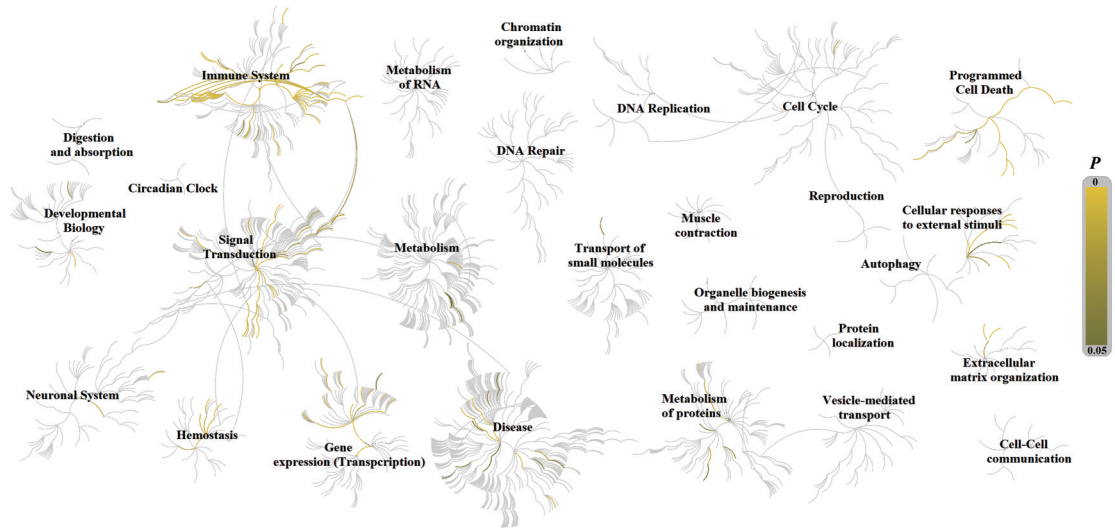


图 3 桑姜感冒注射液治疗普通感冒的 Reactome 通路分析

Fig. 3 Reactome pathway analysis of Sangjiang Ganmao injection in treatment of common cold

白细胞或免疫细胞间相互作用的淋巴因子,在激活与调节免疫细胞及炎症反应中发挥重要作用。IL-6是由单核巨噬细胞和T细胞产生的一类多功能蛋白质分子,参与机体的抗感染免疫和自身免疫;IL-10是由T细胞产生的具有免疫调节性的细胞因子,可以抑制细胞免疫应答、调控免疫细胞的分化和增

殖。IL-6是发热和急性期反应的重要介质,能够穿过血脑屏障^[17],在下丘脑内启动前列腺素E₂的合成,从而参与人体的体温调节;除此以外,在肌肉和脂肪组织中,IL-6还能够刺激能量变化,导致体温升高^[18]。巨噬细胞产生的TNF为TNF- α ,其生物学活性占TNF总活性的70%~95%,因此,目前常说的

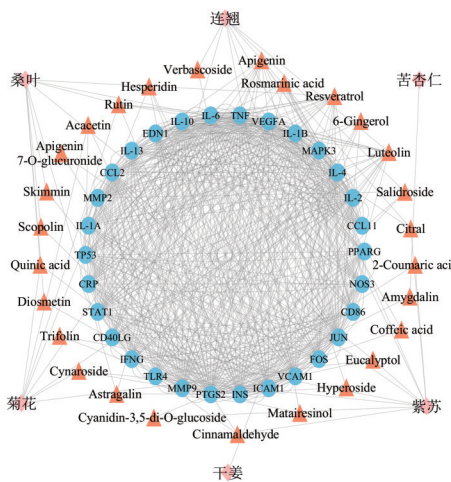


图4 桑姜感冒注射液治疗普通感冒的“药材-成分-核心靶点”网络模型

Fig. 4 Network model of "herbs-ingredients-key targets" of Sangjiang Ganmao injection in treatment of common cold

TNF 多指 TNF- α 。IL-6 作为抗炎细胞因子可对 TNF- α 产生抑制作用,对 IL-10 产生活化作用。在感冒病证中,清热解毒药可抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达,促进 IL-10 的表达,从而对炎症损伤进行修复^[19-20]。除了 IL,桑姜感冒注射液治疗普通感冒的核心靶点中还包括多种炎症反应相关因子,如 MAPK 家族, MMP, PTGS2, STAT1 和 NOS3。一氧化氮(NO)是一种反应性自由基,在炎症反应中具有重要作用, NOS3 能于血管内产生 NO,病理情况下诱导型 NO 合成酶合成大量的 NO,具有细胞毒作用,加重炎症反应,有研究证实芹菜素和木犀草素都具有抑制 NO 产生的作用^[21]。普通感冒是上呼吸道感染引发的炎症,桑姜感冒注射液很可能通过这些关键靶点调节免疫反应和抑制炎症反应。

从 KEGG 通路分析结果也可看出,桑姜感冒注射液治疗普通感冒的潜在靶点主要涉及免疫系统和炎症相关通路,例如,细胞因子和细胞因子受体相互作用信号通路可直接调控 IL-10, IL-2, TNF, IL-1A 和 IL-3; IL-17 信号通路调控 CCL11, IFNG, FOS 和 IL-4; TNF 信号通路调控 EDN1, ICAM1, MAPK3 和 E 选择素(SELE)。在桑姜感冒注射液的组方药味中,桑叶、菊花、紫苏、连翘等药材均含有大量的黄酮类成分^[22-25],是其发挥药效的主要成分,目前已有大量研究明确了黄酮类成分的抗炎作用^[26]。这些结果表明桑姜感冒注射液可以通过干预炎症细胞因子和免疫调节因子的表达来发挥治疗普通感冒的作用。

在“药材-成分-核心靶点”网络模型图中,调节

作用较大的药材有桑叶和菊花,其次是紫苏和连翘。在原方桑菊饮中,桑叶、菊花并为君药,能够直走上焦,疏散肺中风热,同时能够防止肝火犯肺^[27];苦杏仁除肺热,制上焦风燥,利胸膈气逆,连翘味苦,性微寒,去上焦诸热,二者共为佐药。在治疗感冒的中成药中,连翘和苦杏仁 2 味药材是高频使用药味^[28]。紫苏味辛,入血分,具有解表散寒、行气和胃的功效,其水提物解热作用显著^[29];干姜辛热,温肺化软,善治寒饮咳喘。桑姜感冒注射液在原方基础上加入紫苏、干姜 2 味药材,增强了散寒止咳的功效,从而提升疗效。这一结果也表明本研究采用的网络药理学思想在理论上验证了传统中药方剂的配伍规律。

综上所述,桑姜感冒注射液治疗普通感冒的临床疗效好,但其作用机制尚未得以阐释,基于此,本研究利用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术,从该方复杂的化学组分中初步确定了其物质基础,并运用网络药理学方法探讨了该制剂的核心靶点、生物学功能及信号通路,以期为其二次开发和临床应用提供实验依据和理论支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 吉冬. 基于古代文献对普通感冒的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [2] 中华中医药学会肺系病分会, 中国民族医药学会肺病分会. 普通感冒中医诊疗指南(2015版)[J]. 中医杂志, 2016, 57(8): 716-720.
- [3] 安娜, 吕佳康, 陈佳丽, 等. 普通感冒中药新药临床研究的思考[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(14): 1732-1734.
- [4] 王淑梅, 李凌霄, 吕增禄. 中药治疗风热感冒的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(6): 1075-1077.
- [5] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南·西医疾病部分[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 67-68.
- [6] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南·中医病症部分[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 24-26.
- [7] 谭瑾, 沈咏梅, 刘锦, 等. 桑姜感冒系列制剂浸膏制备工艺优化研究[J]. 中药与临床, 2018, 9(1): 22-24.
- [8] 赵友献. 桑姜感冒注射液治感冒疗效佳[J]. 中国民间疗法, 2000, 8(6): 44-45.
- [9] 吉红梅. 桑姜感冒注射液指纹图谱研究及其质量标准修订[J]. 西安: 西北大学, 2004.
- [10] 吴钉红. 网络药理学及其在中药领域的研究概述[J]. 广州化工, 2017, 45(11): 216-218.
- [11] 白海玉, 刘宝忠, 霍金海. 基于液质联用技术的野菊

- 花中黄酮成分分析[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6):826-830.
- [12] 陈永康,赵志刚,孙丽娟. 液相色谱-飞行时间质谱法快速鉴定紫苏叶中的化学成分[J]. 医药导报, 2013, 32(3):371-374.
- [13] 亢倩丽,李壮壮,范珊珊,等. 基于UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS的紫苏叶与紫苏梗化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13):156-162.
- [14] 肖观林,江洁怡,胥爱丽,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的布芍调脂胶囊化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14):190-199.
- [15] 张晨曦,刘素香,赵艳敏,等. 基于液质联用技术的连翘化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12):2053-2060.
- [16] 张恒斌,王亮. UPLC-Q-Orbitrap高分辨质谱定量分析风寒感冒颗粒中的11个成分[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10):1828-1835.
- [17] MINJEE K, MA D J, DAVID C, et al. Efficacy of the MDM2 inhibitor SAR405838 in glioblastoma is limited by poor distribution across the blood-brain barrier[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(9):1893-1901.
- [18] 林宗斌,冯喜英,久太,等. 白细胞介素6、白细胞介素15与疾病相关性的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版, 2018, 11(4):492-495.
- [19] FERGUSON-SMITH A C, CHEN Y F, NEWMAN M S, et al. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21 [J]. Genomics, 1988, 2(3):203-208.
- [20] 徐红日. 益气清瘟解毒合剂治疗流行性感胃的疗效评价及其部分作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2007:85-87.
- [21] SRISOOK K, SRISOOK E, NACHAIYO W, et al. Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 165:94-102.
- [22] 程力惠,李晓蒙. 贯叶连翘中总黄酮提取工艺的研究[J]. 中药材, 2008, 31(6):904-907.
- [23] 马尧,庄云. 紫苏不同部位总黄酮含量测定[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33):18775-18776.
- [24] 杨虎,马燮,陈虹,等. 分光光度法测定桑叶中黄酮总含量的研究[J]. 应用化工, 2006, 35(10):811-813.
- [25] 杨铭,吴志谊,吴川,等. 可见光及紫外光分光光度法测定菊花总黄酮含量的研究[J]. 广东化工, 2007, 34(9):113-114.
- [26] 魏江存,欧和生,滕红丽,等. 黄酮类成分抗炎活性及其作用机制的研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊:1-15 [2021-01-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20200817.1418.276.html>.
- [27] 徐慕鸽,魏凯峰.《温病条辨》桑菊饮方证探析[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(9):681-682.
- [28] 杨淑慧,陈丽平. 治疗感冒的中成药用药规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(2):245-247, 257.
- [29] 王静珍,陶上乘,邢永春,等. 紫苏与白苏药理作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(1):49-52, 64.

[责任编辑 刘德文]