

基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS和网络药理学分析胆黄连的 泻肝胆实火机制

冉倩, 楼冠华, 曾海蓉, 黄勤挽, 王瑾*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS和网络药理学阐明胆黄连泻肝胆实火的物质基础、作用机制及炮制原理。方法:采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术鉴定胆黄连的化学成分,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~80%B; 20~30 min, 80%~95%B; 30~30.1 min, 95%~5%B; 30.1~35 min, 5%B),流速0.2 mL·min⁻¹,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式扫描,扫描范围 m/z 100~1 500。在此基础上,选择肝胆实火的临床表现和病因作为媒介,利用在线数据库对胆黄连泻肝胆实火的潜在药效物质基础、作用靶点和作用特征进行预测分析。从炮制后新增活性成分的作用特点入手,运用网络药理学探究胆汁制黄连的炮制原理。结果:分析并鉴定了胆黄连中19种成分,其中6种为炮制后新增的胆酸类成分。药物本身的生物碱类成分巴马汀、甲基黄连碱、表小檗碱、小檗碱、小檗红碱、黄连碱、药根碱和新增的胆酸类成分甘氨酸猪去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、猪去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸是胆黄连潜在的药效物质基础。预测筛选出与胆黄连泻肝胆实火作用相关靶点66个。胆汁赋予的胆酸类成分与黄连的生物碱成分有16个共同作用靶点和多条相同的信号通路,且肝胆实火的多个病灶为胆酸类成分的靶器官。胆黄连通过作用于白蛋白(ALB),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(CASP3),丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14),糖皮质激素受体(NR3C1)等靶点和白细胞介素-17(IL-17)信号通路,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,MAPK信号通路等通路发挥对肝胆实火证的治疗作用。结论:胆黄连呈现了多成分、多靶点、多途径泻肝胆实火的作用特点,且炮制辅料胆汁和炮制药物黄连具有协同作用,胆汁可增强药物在病灶的作用强度,印证了黄连经胆汁制后泻肝胆实火作用增强的炮制理论。

[关键词] 胆黄连; 胆汁; 生物碱; 胆酸; 肝胆实火; 网络药理学; 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)

[中图分类号] R22;R96;R28;O657.6;C37 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)13-0181-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201057

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200210.1829.003.html>

[网络出版日期] 2020-2-11 9:22

Study on Mechanism of Reducing Excess Fire of Liver and Gallbladder of Bile Processed Coptidis Rhizoma Based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS and Network Pharmacology

RAN Qian, LOU Guan-hua, ZENG Hai-rong, HUANG Qin-wan, WANG Jin*

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** Based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS and network pharmacology, the material basis, processing principle and molecular mechanism of bile processed Coptidis Rhizoma (BPRC) for reducing excess fire of liver and gallbladder were elucidated. **Method:** The chemical ingredients of BPRC were analyzed by UPLC-Q-Orbitrap HRMS. Chromatographic separation was achieved with 0.1% formic acid solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase in gradient elution (0-20 min, 5%-80%B; 20-30 min, 80%-95%B; 30-

[收稿日期] 20191212(011)

[基金项目] 四川省中医药管理局中医药基础研究项目(2018JC011);成都市科技局科技惠民技术研发项目(2015-HM01-00401-SF);四川高校科研创新团队建设计划项目(18TD0017)

[第一作者] 冉倩,在读硕士,从事中药炮制学研究,E-mail:1503883287@qq.com

[通信作者] *王瑾,在读博士,副教授,从事中药炮制原理研究,E-mail:wangjin0816@126.com

30.1 min, 95%-5%B; 30.1-35 min, 95%-5%B)。The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, electrospray ionization (ESI) was applied and operated in positive and negative ion modes, the acquisition range was *m/z* 100-1 500. Based on the clinical manifestations and pathogenic factors of excess fire of liver and gallbladder, the potential effective ingredients, targets and functional characteristics of BPRC were predicted and analyzed by online database. Based on the characteristics of the new active ingredients after processing, the processing principle of BPRC was investigated by network pharmacology. **Result:** A total of 19 ingredients in BPRC were identified, six of which were newly added cholic acids after processing. It was determined that the alkaloids, including worenine, epiberberine, jatrorrhizine, coptisine, berberrubine, berberine, palmatine and cholic acids, including glycohyodeoxycholic acid, taurohyodeoxycholic acid, glycochenodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid and taurochenodeoxycholic acid, were identified as material basis of BPRC. A total of 66 targets of reducing excess fire of liver and gallbladder of BPRC were screened. There were 16 common targets and multiple same signaling pathways between cholic acids and alkaloids of BPRC, and many lesions of excess fire of liver and gallbladder were target organs of cholic acids. By acting on some targets, including albumin (ALB), Caspase-3 (CASP3), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), glucocorticoid receptor (NR3C1) and other targets and some signaling pathways, including interleukin (IL)-17, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), MAPK and other pathways, BPRC could reduce excess fire of liver and gallbladder. **Conclusion:** BPRC has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway on reducing excess fire of liver and gallbladder. Bile and Coptidis Rhizoma have synergistic effect and bile can enhance the intensity of BPRC in lesions, which confirms the processing theory that the effect of BPRC on excess fire of liver and gallbladder enhance after being processed by bile.

[Key words] bile processed Coptidis Rhizoma; bile; alkaloids; cholic acids; excess fire of liver and gallbladder; network pharmacology; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS)

胆黄连为黄连与胆汁拌炒所得,是黄连的炮制品之一。猪胆汁苦寒,《本草蒙筌》记载“治诸火邪,依各制炒……肝胆火盛欲呕,必求猪胆汁炒”^[1]。以苦寒的胆汁炮制苦寒的黄连,可达相资为制的炮制目的,使黄连清热泻火的功效更加显著,长于泻肝胆实火。已有的研究表明胆汁作为重要的炮制辅料,可增加黄连生物碱成分的溶出^[2-3],但炮制后新增的辅料成分在胆黄连泻肝胆实火作用中是否与黄连生物碱类成分产生协同作用仍有待研究。

中药饮片化学成分的复杂性,成分之间的协同作用以及多靶点、多器官的作用特点使其作用机制难以阐释。网络药理学强调“网络靶点,多组分治疗学”的概念^[4],该技术已成功应用于多种药用植物作用机制的研究^[5-6]。将该技术应用于中药饮片及其靶基因网络的研究,可以为阐明药物的作用机制奠定基础。基于以上思路和方法,本实验采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS分析胆黄连的化学成分,并以肝胆实火的临床表现和病因为媒介进行网络药理学分析。即首先确定胆黄连的药效物质基础,然后从炮制后新增的成分的作用特点入手揭示其

炮制原理,再从疾病相关靶点入手阐明其作用机制,以期为黄连胆汁制后长于泻肝胆实火提供分子生物学方面的理论解释,并为胆黄连的后续实验研究提供参考。

1 材料

UPLC-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),FA1204C型1/1万电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司),AUW220D型1/10万电子分析天平(日本岛津公司)。

木兰花碱、格兰地新、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-17071711, MUST-17110502, MUST-17031901, MUST-072011, MUST-17110702, MUST-17061705, MUST-17022604, MUST-17110105,除盐酸药根碱纯度为94%外,其他对照品纯度均>98%),甲基黄连碱和氧化小檗碱对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为 PRF8050223,

PRF7042106, 纯度均>98%), 小檗红碱对照品(成都普菲德生物技术有限公司, 批号16121302, 纯度>98%), 水为超纯水, 乙腈和甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。黄连药材采自重庆石柱县冷水镇, 经成都中医药大学黄勤挽教授鉴定为毛茛科黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎, 经炮制加工为黄连饮片。取黄连饮片1 kg, 用猪胆汁190 mL 闷润5 h 后于175 °C炒制23 min(本课题组前期研究所得的胆黄连最佳炮制工艺), 得胆黄连饮片。

2 方法

2.1 溶液的制备 分别精密称取黄连或胆黄连粉末(过二号筛)约0.2 g, 置于250 mL锥形瓶中, 精密加入1.5%盐酸甲醇溶液50 mL, 密塞, 称定质量, 超声50 min(功率250 W, 频率40 kHz), 放冷, 称定质量, 加甲醇补足失重, 摇匀, 过滤, 经0.45 μm微孔滤膜过滤, 即得黄连和胆黄连供试品溶液。分别精密称取盐酸黄连碱、非洲防己碱、木兰花碱、小檗红碱、甲基黄连碱、盐酸巴马汀、表小檗碱、氧化小檗碱、盐酸小檗碱、格兰地新、盐酸药根碱对照品适量, 用甲醇配制成质量浓度分别为800, 272, 308, 248, 104, 214, 508, 310, 414, 534, 328 mg·L⁻¹的单一对照品储备液。分别取上述储备液适量, 混匀, 即得混合对照品溶液。

2.2 UPLC-Q-Orbitrap HRMS数据采集

2.2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~80%B; 20~30 min, 80%~95%B; 30~30.1 min, 95%~5%B; 30.1~35 min, 5%B), 流速0.2 mL·min⁻¹, 进样量设定2 μL, 柱温30 °C。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式扫描, 喷雾电压3.2 kV, 鞘气流速30 arb, 辅助气流速10 arb, 离子源温度350 °C, 辅助气加热温度350 °C, 全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/dd MS²), 扫描范围 *m/z* 100~1 500, 一级分辨率35 000, 二级分辨率17 500, 碰撞能量设定了20, 40, 60 eV 共3个梯度。

2.3 胆黄连活性成分的筛选 利用TCMSP数据库(中药系统药理学数据库, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>), 选择口服生物利用度≥30%和药物相似性≥0.18^[7]对炮制药物的活性生物碱类成分进行综合筛选。利用SwissADME在线平台(<http://swissadme.ch/>), 以Lipinski类药五原则^[8]筛选炮制

辅料赋予的活性胆酸类成分。

2.4 活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的筛选

采用ChemDraw Pro 17软件构建活性成分的3D结构, 导入PharmMapper在线数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)以获得成分作用的人类蛋白靶点, 选择匹配度最高的前20个人类靶点蛋白作为活性成分潜在作用靶标, 并使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)校正人类蛋白靶点的正式名称, 得到其对应的基因名和UniProt号。

肝胆实火证的临床表现主要为头晕胀痛、失眠、目赤、口苦口干、急躁易怒等^[9], 且与炎症、精神刺激密切相关^[10-11], 故以mental stimulation, inflammation, dizziness and distending pain, insomnia, impatient and irritable, congested eyes, bitter taste或dry mouth为关键词, 在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)进行检索, 得到疾病相关基因。将疾病相关基因和PharmMapper在线数据库筛选所得的药物潜在作用靶标导入jvenn生物信息学网站(交互式韦恩图制作平台, <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>)进行韦恩分析, 以共同基因作为活性成分泻肝胆实火作用相关靶点。将活性成分泻肝胆实火作用相关的不同临床表现的靶点导入jvenn生物信息学网站进行韦恩分析, 选取共同基因作为“活性成分泻肝胆实火作用最相关的靶点”。

2.5 炮制辅料的作用分析

2.5.1 韦恩分析 将炮制辅料猪胆汁赋予的活性胆酸类成分的基因靶点与炮制药物自身的活性生物碱类成分的基因靶标导入jvenn生物信息学网站进行韦恩分析, 探究两者是否具共同靶点和协同作用。

2.5.2 活性胆酸类成分的靶基因的器官定位分析 BioGPS数据库(统筹和查询基因注释的数据库, <http://biogps.org/>)可提供基因在各个组织的表达分布情况。将辅料赋予的活性胆酸类成分的靶点导入BioGPS数据库, 物种选择human, 得到相关基因在不同组织器官中的基因表达数据集, 导出到Excel 2010软件生成活性胆酸类成分的靶基因的器官定位表达热图, 热图中颜色越深表示基因在该组织中表达和分布越多。

2.6 活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的富集分析和通路分析 采用DAVID数据库(生物分子功能注释系统, <https://david.ncicrf.gov/home.jsp>), 选择Homo sapiens, Count≥4, P≤0.05作为筛选条件对

活性成分泻肝胆实火作用相关的66个靶点进行基因本体(GO)富集分析;将活性成分泻肝胆实火作用相关的66个靶点的UniProt号导入京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<https://www.kegg.jp/>)进行信号通路和疾病分析;采用GraphPad Prism 5.01软件生成相应柱状图。

2.7 活性成分泻肝胆实火作用相关的核心靶点的确定 将活性成分泻肝胆实火作用相关的66个靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>),以Homo sapiens为分析条件,得活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的互作关系,并将结果导出保存为TSV格式文件,导入Cytoscape 3.7.2软件进行靶点关系挖掘。选取紧密度(closeness),介度(betweenness)和拓扑系数(topological coefficient)大于等于相应均值,且度值(degree)>10的靶点作为“中心靶点”。将“中心靶点”与“活性成分泻肝胆实火作用最相关的靶点”进行韦恩分析,共同靶点即为活性成分泻肝胆实火作用相关的核心靶点。

2.8 网络图的构建 采用Cytoscape 3.7.2软件绘制胆黄连泻肝胆实火的“活性成分-作用靶点-信号

通路”网络图。

3 结果

3.1 胆黄连炮制前后化学成分的鉴定 结合对照品对比和查阅文献[12-14],对一些色谱峰进行结构归属判断,鉴定出19个化合物,结果见表1和图1,其中有13个为黄连和胆黄连共有的生物碱类成分,6个为胆汁炮制后新增的胆酸类成分。

3.2 活性成分的筛选 TCMSP数据库筛选出活性生物碱类成分共计7种,分别为巴马汀、甲基黄连碱、表小檗碱、小檗碱、小檗红碱、黄连碱、药根碱。黄连胆汁制后新增的胆酸类成分来源于炮制辅料猪胆汁,其中符合Lipinski类药五原则的活性胆酸类成分包括甘氨酸去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、猪去氧胆酸、甘氨酸去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸。

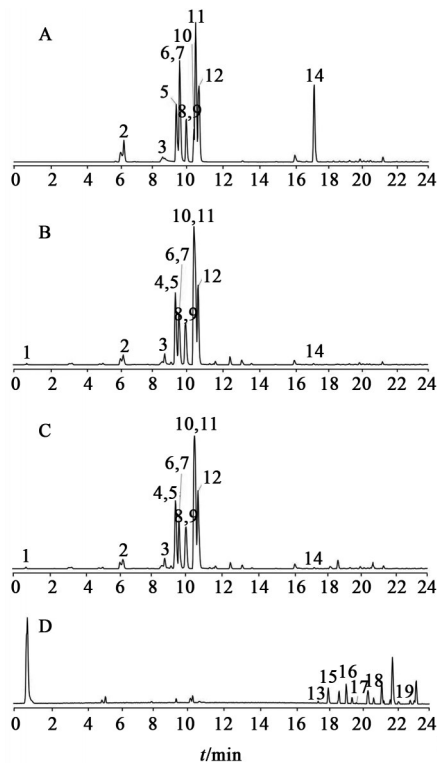
3.3 活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的筛选 GeneCards数据库检索得到6040个与精神刺激相关的基因,8843个与炎症相关的基因,198个与头晕胀痛相关的基因,1895个与失眠相关的基因,174个与烦躁易怒相关的基因,3159个与目赤相关的基因,269个与口苦相关的基因,1931个与口干相关的基因。采用PharmMapper在线数据库筛选

表1 胆黄连的化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical components from bile processed Coptidis Rhizoma

No.	t/min	加合离子	m/z 理论值	m/z 实测值	误差/ppm	化学式	化合物
1	0.81	[M+H] ⁺	104.1075	104.1074	-0.96	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	胆碱 choline ³⁾
2	6.43	[M+H] ⁺	342.1704	342.1699	-1.46	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	木兰花碱 magnoflorine ^{1,3)}
3	8.85	[M+H] ⁺	322.1079	322.1075	-1.24	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	格兰地新 groenlandicine ^{1,3)}
4	9.22	[M+H] ⁺	324.1236	324.1233	-0.93	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺	去亚甲基小檗碱 demethyleneberberine ³⁾
5	9.27	[M+H] ⁺	338.1392	338.1385	-2.07	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	药根碱 jatrorrhizine ^{1,3)}
6	9.48	[M+H] ⁺	320.0923	320.0921	-0.62	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄ ⁺	黄连碱 coptisine ^{1,3)}
7	9.68	[M+H] ⁺	336.1236	336.1233	-0.89	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	表小檗碱 epiberberine ^{1,3)}
8	10.03	[M+H] ⁺	322.1079	322.1074	-1.55	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	小檗红碱 berberrubine ^{1,3)}
9	10.06	[M+H] ⁺	338.1392	338.1387	-1.48	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	非洲防己碱 columbamine ^{1,3)}
10	10.51	[M+H] ⁺	334.1079	334.1075	-1.20	C ₂₀ H ₁₆ NO ₄ ⁺	甲基黄连碱 worenine ^{1,3)}
11	10.55	[M+H] ⁺	336.1235	336.1231	-1.19	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	小檗碱 berberine ^{1,3)}
12	10.79	[M+H] ⁺	352.1548	352.1553	1.42	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	巴马汀 palmatine ^{1,3)}
13	17.31	[M-H] ⁻	498.2884	498.2903	3.81	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	牛磺猪去氧胆酸 taurohyodeoxycholic acid ²⁾
14	17.51	[M+H] ⁺	352.1107	352.1101	-1.70	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	氧化小檗碱 oxyberberine ^{1,3)}
15	17.87	[M-H] ⁻	464.3033	464.3022	-2.37	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	甘氨酸胆酸 glyhyocholic acid ²⁾
16	18.86	[M-H] ⁻	448.3057	448.3037	-4.46	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	甘氨酸猪去氧胆酸 glycohyodeoxycholic acid ²⁾
17	19.46	[M-H] ⁻	498.2884	498.2899	3.01	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	牛磺鹅去氧胆酸 taurochenodeoxycholic acid ²⁾
18	20.90	[M-H] ⁻	448.3057	448.3072	3.35	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	甘氨酸鹅去氧胆酸 glycochenodeoxycholic acid ²⁾
19	22.19	[M-H] ⁻	391.2843	391.2861	4.60	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	猪去氧胆酸 hyodeoxycholic acid ²⁾

注: ¹⁾与对照品比对精确鉴定; ²⁾胆黄连特有; ³⁾黄连和胆黄连共有。



A. 混合对照品; B. 黄连; C, D. 胆黄连
图1 黄连和胆黄连在正离子模式(A, B, C)和负离子模式(D)下的总离子流

Fig. 1 Total ion flow chromatograms of *Coptidis Rhizoma* and bile processed *Coptidis Rhizoma* in positive mode (A, B, C) and negative mode (D)

得到胆黄连的潜在靶基因,其中与炎症相关基因有64个,与精神刺激相关基因52个,与头晕胀痛或失眠相关的基因30个,与急躁易怒或目赤相关的基因42个,与口苦口干相关的基因17个,见图2。由图2可知,有11个“活性成分泻肝胆实火作用最相关的靶点”与肝胆实火证的主要临床表现和病因均相关,分别为ALB, BRAF, CASP3, FGFR1, HMGCR, MAPK14, MME, NR3C1, SHBG, TTR 和 VDR,见表2。

3.4 炮制辅料的作用分析

3.4.1 韦恩分析 药物本身的活性生物碱类成分和辅料赋予的活性胆酸类成分有16个共同作用靶点,包括BACE1, CCNA2和CDK2等,见表2,表明药物本身的生物碱成分和辅料赋予胆酸类成分具有协同作用。

3.4.2 活性胆酸类成分的靶基因的器官定位分析 肝胆实火多由精神过度刺激,火热之邪内侵等原因导致。根据中医理论的整体观,“肝”发生疾病后一定会连累全身多个脏腑,损伤机体多种脏腑阴阳,导致机体紊乱。肝失调达,临床表现为急躁易

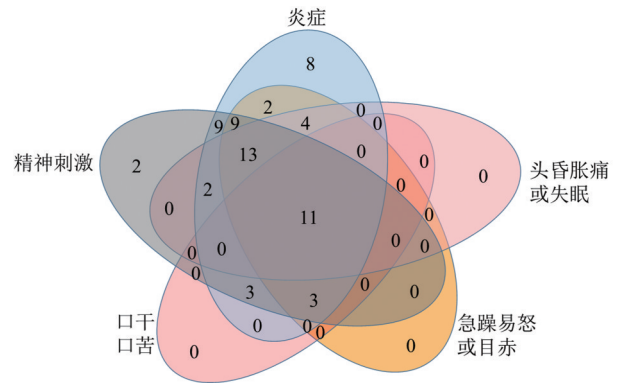


图2 不同临床表现的活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的韦恩分析

Fig. 2 Venn analysis of targets related to effect of active ingredients with different clinical manifestations on reducing excess fire of liver and gallbladder

怒;肝火上炎,循经头目,导致头晕目胀,面红目赤;火扰心神,导致失眠多梦;肝热传胆,胆气上逸,导致口苦;火热伤津,导致口干。结合肝胆实火的临床表现以及西医理论体系对这些临床表现的组织器官定位可知,肝胆实火相关病灶可能涉及肝、心、肾、下丘脑、舌等全身多个组织器官。辅料赋予胆黄连的活性胆酸类成分可以作用于全身多个组织器官,特别是肝、下丘脑、舌等,与肝胆实火的病灶相符,见图3。结果表明胆汁炮制可增强黄连在多个病灶的作用强度,从而快速恢复肝胆实火导致的机体紊乱现象,这与黄连胆汁制后泻肝胆实火作用增强的炮制理论相符。

3.5 活性成分泻肝胆实火作用相关靶点的GO富集分析和KEGG分析 GO富集分析表明分子功能以锌离子结合、三磷酸腺苷(ATP)结合和类固醇激素受体活性最为显著;生物过程涉及转录、凋亡、蛋白水解等;在细胞组分中,细胞质、细胞外泌体和核质占比较大。KEGG分析筛选出了179条与代谢或疾病相关的信号通路,包括一些癌症相关通路、代谢相关通路、白细胞介素-17(IL-17)通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路和MAPK通路等;疾病包括一些癌症、动脉粥样硬化、乙型或者丙型肝炎、酗酒和发热等,见图4。

3.6 活性成分泻肝胆实火作用相关核心靶点的确定 采用STRING数据库和Cytoscape 3.7.2软件进行靶点关系挖掘,得到closeness, betweenness和topological coefficient大于或者等于相应均值,且degree>10的靶点共计11个,其交互拓扑学分析参数见表3。在此基础上筛选得到4个与活性成分泻肝胆实火作用相关的核心靶点,包括ALB, CASP3,

表2 胆黄连所治疾病的相关分子靶标

Table 2 Related molecular targets of disease treated by bile processed *Coptidis Rhizoma*

No.	UniProt 号	蛋白靶点	No.	UniProt 号	蛋白靶点
1	P52895	醛缩酮还原酶家族1成员C2(AKR1C2)	34	P33316	脱氧尿苷三磷酸酶(DUT)
2	P02768	白蛋白(ALB)	35	P03372	雌激素受体1(ESR1)
3	P10275	雄激素受体(AR)	36	P62508	雌激素相关受体γ(ESRRG)
4	O15382	支链氨基酸转氨酶2(BCAT2)	37	P62942	FK506结合蛋白1A(FKBP1A)
5	P00918	碳酸酐酶2(CA2)	38	Q16772	谷胱甘肽S-转移酶A3(GSTA3)
6	P42574	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(CASP3)	39	Q9BY41	组蛋白脱乙酰酶8(HDAC8)
7	P43235	组织蛋白酶K(CTSK)	40	P28845	皮质类固醇11β脱氢酶同工酶1(HSD11B1)
8	P22102	三功能嘌呤生物合成蛋白腺苷-3(GART)	41	Q16539	丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)
9	P04035	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGCR)	42	P08581	肝细胞生长因子受体(MET)
10	P50135	组胺N-甲基转移酶(HNMT)	43	Q495T6	膜金属肽链内切酶(MME)
11	P08238	90 kDa热休克蛋白αB1(HSP90AB1)	44	P08254	MMP3
12	P52732	驱动蛋白家族成员11(KIF11)	45	Q13126	5'-甲硫腺苷磷酸化酶(MTAP)
13	P61626	溶菌酶C(LYZ)	46	Q08499	环磷酸腺苷(cAMP)特异性3',5'-环磷酸二酯酶4D(PDE4D)
14	P27338	胺氧化酶[含黄素]B(MAOB)	47	P14555	膜相关磷脂酶A2(PLA2G2A)
15	P03956	基质金属蛋白酶1(MMP1)	48	P04278	性激素结合球蛋白(SHBG)
16	P51512	MMP16	49	Q00796	山梨醇脱氢酶(SORD)
17	P22894	MMP8	50	O00204	羟基类固醇硫酸基转移酶2B1(SULT2B1)
18	P06401	孕酮受体(PGR)	51	P56817 ¹⁾	β-分泌酶1(BACE1)
19	P10826	维甲酸受体β(RARB)	52	P20248 ¹⁾	细胞周期蛋白A2(CCNA2)
20	P13631	维甲酸受体γ(RARG)	53	O61847 ¹⁾	细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)
21	P02753	视黄醇结合蛋白4(RBP4)	54	O14757 ¹⁾	细胞周期检测点激酶1(CHEK1)
22	P35398	维甲酸相关孤儿核受体α(RORA)	55	P29373 ¹⁾	细胞维甲酸结合蛋白2(CRABP2)
23	P19793	维甲酸X受体α(RXRA)	56	P11362 ¹⁾	成纤维细胞生长因子受体1(FGFR1)
24	P49743	维甲酸X受体β(RXRB)	57	P08263 ¹⁾	谷胱甘肽S-转移酶A1(GSTA1)
25	P06702	S100钙结合蛋白A9(S100A9)	58	P09211 ¹⁾	谷胱甘肽S-转移酶P1(GSTP1)
26	P10828	甲状腺激素受体β(THRβ)	59	P14061 ¹⁾	雌二醇17β-脱氢酶1(HSD17B1)
27	P49638	生育酚转移蛋白(TTPA)	60	P07900 ¹⁾	90 kDa热休克蛋白αA1(HSP90AA1)
28	P11473	维生素D受体(VDR)	61	Q5GIT4 ¹⁾	激酶功能区受体(KDR)
29	P16442	ABO组织血型系统转移酶(BGAT)	62	P39900 ¹⁾	MMP12
30	P42330	醛缩酮还原酶家族1成员C3(AKR1C3)	63	P04150 ¹⁾	糖皮质激素受体(NR3C1)
31	Q93088	甜菜碱-同型半胱氨酸S-甲基转移酶1(BHMT)	64	O15530 ¹⁾	磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)
32	P15056	B-Raf原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(BRAF)	65	P02766 ¹⁾	转甲状腺素蛋白(TTR)
33	Q02127	二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)	66	P18031 ¹⁾	非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶1(PTPN1)

注：¹⁾生物碱类成分和胆酸类成分共有的分子靶标。

MAPK14和NR3C1。

3.7 “活性成分-作用靶点-信号通路”网络的构建 “活性成分-作用靶点-信号通路”网络分析见图5,结果发现不同成分有多个相同和不同的靶点,各个靶点对应多条信号通路,体现了胆黄连多成分、多靶点、多途径的作用特点。胆酸类成分和生

物碱类成分具有多条相同的信号通路,表明辅料胆汁可多靶点、多途径使黄连泻肝胆实火作用增强。

4 讨论

胆黄连由黄连经胆汁拌炒所得,用于治疗由精神过度刺激和火热之邪内侵等引起的肝胆实火证,临床疗效被确切。近年研究表明,黄连可以多靶

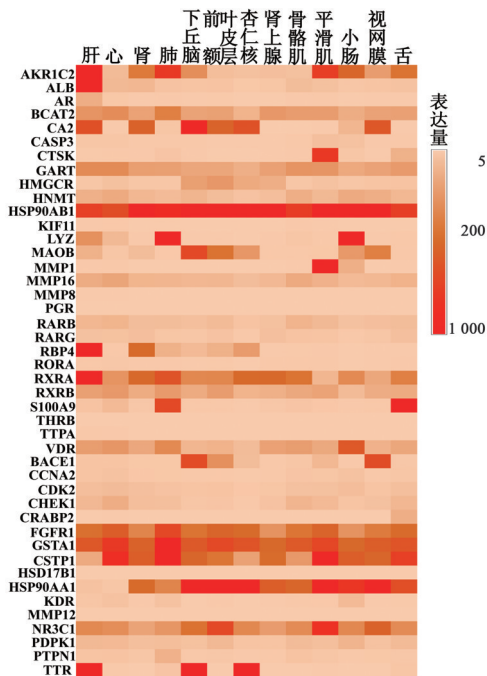
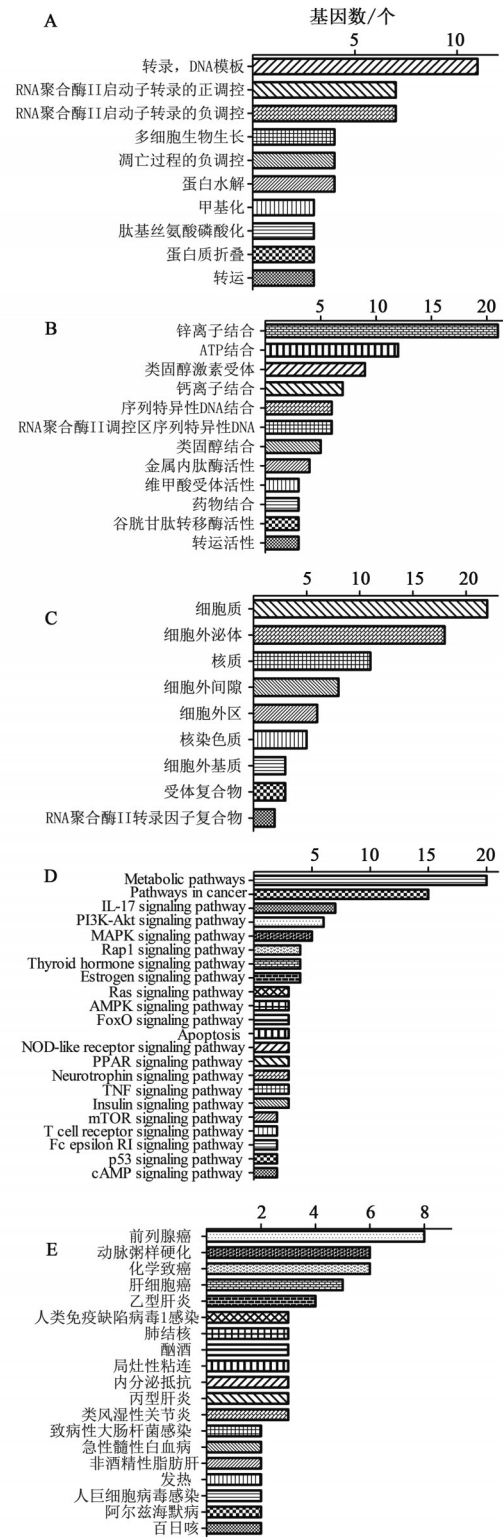


图3 胆黄连炮制辅料赋予活性成分靶基因的器官定位表达热分析
Fig. 3 Heat map of organ location expression of target genes of active cholic acids given by processing excipient of bile processed *Coptidis Rhizoma*

点、多途径、多组织参与机体炎症、氧化-抗氧化失衡和各种应激反应的调节,从而对多种疾病具有治疗作用^[16]。也有证据表明胆汁酸可调节胃肠道反应,参与全身代谢以及情志调节^[17]。这些研究均为黄连的作用机制研究提供了线索和依据,因此,本文首先采用高分辨质谱对胆黄连的复杂成分进行了快速分析鉴定,然后利用网络药理学方法筛选活性成分,预测其泻肝胆实火相关靶点,分析辅料胆汁的炮制作用,最后进行GO富集分析,KEGG信号通路分析和核心靶点筛选。

本文研究发现黄连经胆汁制后生物碱类成分的种类未发生改变,但新增了6个辅料赋予的胆酸类成分,提示其可能与黄连胆汁制后泻肝胆实火作用增强有关。基于高分辨质谱和网络药理学筛选出7个生物碱成分和5个胆酸类成分作为胆黄连泻肝胆实火的物质基础,再利用PharmMapper数据库和GeneCards数据库筛选出了与胆黄连活性成分泻肝胆实火作用相关的基因靶标66个,体现了胆黄连“多成分、多靶点”泻肝胆实火的作用特点。分析肝胆实火的发病机制和临床表现,发现肝胆实火相关病灶涉及全身多个组织器官,而辅料赋予胆黄连的胆酸类成分可增强胆黄连在多个器官(病灶)的作用强度,且胆酸类成分和生物碱类成分具有多个共



A. 生物过程; B. 分子功能; C. 细胞组分; D. KEGG 信号通路; E. KEGG 疾病分析

图4 胆黄连泻肝胆实火作用相关靶点的GO富集和KEGG分析
Fig. 4 GO enrichment and KEGG analysis of targets related to function of bile processed *Coptidis Rhizoma*

同靶标,可产生协同作用,从而快速恢复肝胆实火导致的机体紊乱现象,诚如《药鉴》所记载,胆汁制

表3 胆黄连中心靶点的交互拓扑学分析参数

Table 3 Topological analysis parameters of interaction among core targets of bile processed *Coptidis Rhizoma*

核心靶点	度值	介度	紧密度	拓扑系数
ALB	34	0.380 9	0.639 2	0.149 9
ESR1	24	0.134 0	0.590 5	0.194 4
CASP3	21	0.138 9	0.558 6	0.216 5
AR	20	0.093 4	0.563 6	0.214 3
HSP90AA1	19	0.151 1	0.558 6	0.212 4
MAPK14	15	0.046 7	0.525 4	0.267 9
PGR	15	0.027 4	0.525 4	0.266 7
HSP90AB1	13	0.024 1	0.476 9	0.307 7
KDR	13	0.007 4	0.504 1	0.300 0
CDK2	12	0.022 7	0.500 0	0.300 0
NR3C1	11	0.049 3	0.512 4	0.296 3

黄连“取其入部而泻之也”^[15]。GO分析和KEGG信

号通路分析显示,胆黄连相关基因分子功能复杂多样,可多途径、多过程、多层次发挥治疗作用,体现了传统中药饮片多靶点、多途径的作用优势。KEGG疾病分析显示,胆黄连对发热和肝炎等肝胆实火相关病证具有调节作用,筛选出了MAPK14, CASP3, ALB, NR3C1共4个核心靶点。文献研究也证实黄连对MAPK14^[16], CASP3^[18]和ALB^[19]具有调节作用,牛磺鹅去氧胆酸可与NR3C1结合,促进糖皮质激素受体的磷酸化及糖皮质激素反应成分的激活^[20-21],提示这4个靶点可能是胆黄连泻肝胆实火的核心靶点。

综上所述,本文对胆黄连的化学成分和网络药理学进行了分析,研究了胆黄连泻肝胆实火的主要药效物质和潜在作用机制,以及辅料的炮制作用,可为胆黄连的后续研究提供参考,但还需体内外活性评估和药理实验来进一步验证。

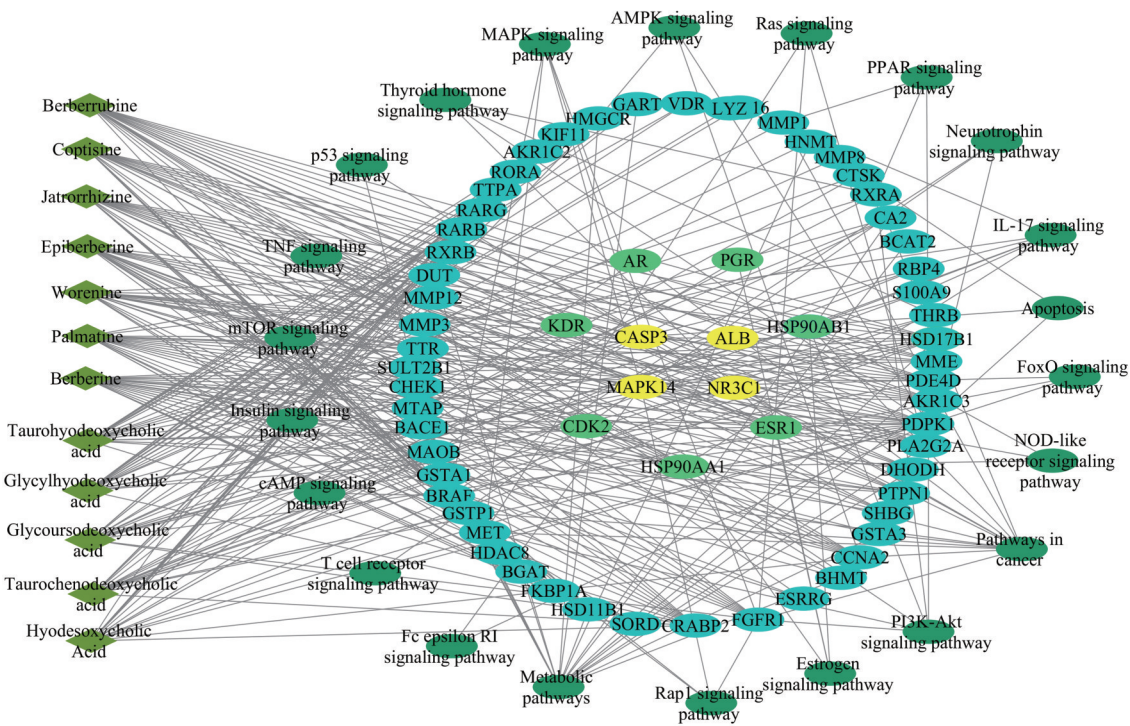


图5 胆黄连的“活性成分-作用靶点-信号通路”网络关系

Fig. 5 "Active ingredients-targets-signaling pathways" network of bile processed *Coptidis Rhizoma*

[参考文献]

[1] 陈嘉谟.本草蒙筌[M].王叔民,周超凡,校注.北京:人民卫生出版社,1988.
[2] 王静,吕佳,袁子民,等.猪胆汁炮制对黄连中生物碱类成分溶出的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(5):5-8.
[3] 白而力.不同辅料炮制对黄连生物碱类成分含量的

影响[J].亚太传统医药,2016,12(13):38-39.
[4] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11):682-690.
[5] GOGOI B, GOGOI D, SILLA Y, et al. Network pharmacology-based virtual screening of natural products from *Clerodendrum* species for identification

- of novel anti-cancer therapeutics [J]. Mol Biosyst, 2017, 13(2):406-416.
- [6] LIAO M L, SHANG H H, LI Y Z, et al. An integrated approach to uncover quality marker underlying the effects of *Alisma orientale* on lipid metabolism, using chemical analysis and network pharmacology [J]. Phytomedicine, 2017, 45:93-104.
- [7] 魏志成, 童东, 杨娟, 等. 基于网络药理学的沙棘总黄酮治疗心肌缺血的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1238-1244.
- [8] 吉日本巴图, 范娜, 王蕊, 等. 基于分子对接技术探讨残黄片退黄作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10):154-161.
- [9] 张家锡. 中医学基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2001.
- [10] 张漪婷, 蒋福升, 窦晓兵. 上火与炎症相关性探析[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(2):152-154, 162.
- [11] 翟昌明. 三草降压汤对肝火亢盛证 SHR 心脏 NF- κ B/NLRP3/IL-1 β 信号通路调控的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2019.
- [12] 李娅琦, 王梓轩, 肖治均, 等. 猪胆粉主要胆酸类成分的定性定量分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9):1842-1849.
- [13] 王文鑫, 刘传鑫, 张丛, 等. 基于 LC-MS 和分子对接策略分析金芪降糖片治疗 2 型糖尿病的药效物质基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20192414.
- [14] 陈俊, 陈聪, 彭小芝, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS/MS 的葛根黄芩黄连汤主要成分分析及鉴定[J]. 中药材, 2019, doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.09.022.
- [15] 杜文燮. 药鉴[M]. 北京:中国中医药出版社, 1993.
- [16] WANG J, RAN Q, ZENG H R, et al. Cellular stress response mechanisms of *Rhizoma Coptidis*: a systematic review [J]. Chin Med, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0184-y.
- [17] 杨化冰, 邹小娟, 刘洪涛. 从胆汁酸功能探讨《内经》“凡十一藏取决于胆”[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10):2464-2466.
- [18] ZHANG X L, LIANG D, LIAN X, et al. Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and inhibits apoptosis induced by high glucose in renal tubular epithelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism [J]. Apoptosis, 2016, 21(6):721-736.
- [19] JIA Q, ZHANG L, ZHANG J, et al. Fecal microbiota of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients causes hepatic inflammation of germ-free rats and berberine reverses it partially [J]. Biomed Res Int, 2019, doi:10.1155/2019/4530203.
- [20] 毛伟, 钱英红, 关红, 等. TCDCA 对 AA 大鼠滑膜组织糖皮质激素受体基因表达的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(5):9-10, 14, 288.
- [21] 毛伟, 李培锋, 刘明强, 等. 牛磺鹅去氧胆酸与大鼠肝脏糖皮质激素受体结合力的初探[J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版, 2011, 32(2):28-30.
- [责任编辑 刘德文]