

基于特征图谱及网络药理学的大柴胡汤质量标志物研究

吕恬仪¹, 刘亚楠¹, 任越¹, 徐裕彬³, 张媛², 魏胜利^{2*}, 张燕玲^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 国家中医药管理局中药信息工程重点实验室, 北京 102488; 2. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 102488; 3. 河北橘井药业有限公司, 河北 安国 071000)

摘要: 大柴胡汤临床应用广泛、疗效确切, 为治疗胆囊炎的经典方剂。然而其成分多样、作用复杂, 传统质控指标难以反映其整体功效。因此本研究基于特征图谱和网络药理学预测大柴胡汤质量标志物, 以期对大柴胡汤整体质量进行有效控制。研究首先利用虚拟筛选技术获得 35 个大柴胡汤潜在药效成分。其次采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 建立 15 批大柴胡汤的特征图谱, 结合对照品, 指认化学成分。初步将芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、柴胡皂苷_{b₂}、柴胡皂苷_{b₁} 定为大柴胡汤潜在质量标志物。最后利用网络药理学技术手段, 构建“成分-靶点-通路-生命过程”网络图, 探究其治疗胆囊炎的作用机制, 进而明确质量标志物的准确性。结果显示潜在质量标志物可作用于多靶点从而达到抗炎、调节代谢等目的, 进而联合治疗胆囊炎。质量标志物与大柴胡汤主要药理作用吻合, 可表征大柴胡汤的整体功效。该研究结合特征图谱及网络药理学, 挖掘大柴胡汤的质量标志物, 为大柴胡汤的质量控制及评价提供依据。

关键词: 大柴胡汤; 质量标志物; 虚拟筛选; 特征图谱; 网络药理学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1477-09

Study on Q-markers of Da Chaihu decoction based on specific chromatogram and network pharmacology

LÜ Tian-yi¹, LIU Ya-nan¹, REN Yue¹, XU Yu-bin³, ZHANG Yuan²,
WEI Sheng-li^{2*}, ZHANG Yan-ling^{1*}

(1. Key Laboratory of TCM Information Engineering, National Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Engineering Research Center of Standardized Production of Chinese Medicinal Materials, Ministry of Education, Beijing 102488, China; 3. Hebei Jujing Pharmaceutical Co., Ltd., Anguo 071000, China)

Abstract: Da Chaihu decoction is a classic prescription for the treatment of cholecystitis that is widely used in clinical practice, and has a definite curative effect. However, due to its diverse components and complex functions, the traditional indexes fail to capture its overall efficacy. Therefore, this study analyzed and predicted the quality markers (Q-markers) of Da Chaihu decoction based on specific chromatogram and network pharmacology to provide a reference for the comprehensive control of the quality. The study obtained 35 potential practical components of Da Chaihu decoction through virtual screening. The specific chromatogram of 15 batches of Da Chaihu decoction was established by HPLC-DAD with neohesperidin as a reference. Compared with the chromatographic peaks and the reference substance, the chemical components were assigned to predict the nine components of albi-florin, paeoniflorin, naringin, hesperidin, neohesperidin, baicalin, wogonoside, saikosaponin _{b₂}, saikosaponin _{b₁} as

收稿日期: 2021-12-15; 修回日期: 2022-03-04.

基金项目: 北京市科学技术委员会基金资助项目 (Z201100005420005).

*通讯作者 Tel: 13810778920, E-mail: zhangyanling@bucm.edu.cn;

Tel: 13683336930, E-mail: weishengli@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1800

Q-markers of Da Chaihu decoction. Finally, the network of the "components-key targets-signal pathways-biological processes" was constructed by network pharmacology to explore the mechanism of Da Chaihu decoction in treating cholecystitis to clarify the accuracy of Q-markers. The results indicated that potential Q-markers could act on multiple targets to regulate inflammatory and metabolism, and then combine to treat cholecystitis. Q-markers could combine with the pharmacologic action of Da Chaihu decoction, which could elucidate the overall efficacy of Da Chaihu decoction. This study explored the Q-markers of Da Chaihu decoction combined with the specific chromatogram and network pharmacology, which provided a basis for the quality control and evaluation of Da Chaihu decoction.

Key words: Da Chaihu decoction; quality marker; virtual screening; specific chromatogram; network pharmacology

大柴胡汤始载于医圣张仲景所著《伤寒论》，由柴胡、黄芩、芍药、半夏(洗)、枳实(炙)、大黄、大枣、生姜组成，具有和解少阳、内泻热结之功。其常用于治疗胆囊炎、胰腺炎等消化系统疾病，疗效明晰。然而，现有研究多集中于临床^[1]及药理探究^[2]，质量研究^[3]相对薄弱。为提升大柴胡汤质量标准，合理的评价指标亟待明确。

2016年，刘昌孝院士首次提出质量标志物的概念，认为质量标志物是构建中药质量追溯系统、保证生产质量的关键因素。其以“五原则”为核心，关联质量控制与药效，进而表征方剂的整体功效^[4]。而特征图谱具有整体性与动态性的特点，能够客观反映汤剂所含成分，可揭示成分的特征性、溯源性及可测性。网络药理学可从“药物-疾病-靶点”全方位解析方剂成分-药效的关联，从而体现成分的有效性及其配伍的合理性。基于此，本研究以特征图谱结合网络药理学模式确定大柴胡汤的质量标志物，为其质量控制及临床应用提供科学依据。思路图如图1所示。

材料与方法

实验仪器 ACCHROM 6000 高效液相色谱仪(北京华谱科仪科技有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius BT25S 型电子分析天平(北京塞利多斯仪器有限公司); YP6002B 电子天平(上海力辰邦西仪器科技有限公司); A60 型液体加热器(潮州市潮安区康雅电器有限公司)。

试剂与药材 柴胡皂苷_{b₂}(批号 DST191020-010, 99.41%)、柚皮苷(批号 DSTDY009901, 98.50%)、橙皮苷(批号 DSTDC003801, 98.84%)、新橙皮苷(批号 DST200817-039, 98.63%)、黄芩苷(批号 DST200227-023, 98.66%) 均购于成都德思特生物技术有限公司; 芍药苷(批号 PS000825, 99.74%) 购于成都普思生物科技股份有限公司; 芍药内酯苷(批号 O31GB166251, 91.40%)、柴胡皂苷_{b₁}(批号 A22GB146239, 99.70%)、汉黄芩苷(批号 R31M9F62605, 98.9%)、没食子酸(批号 C17D10C105977, 99.06%) 购于上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈、磷酸，色谱级(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 纯净水(屈臣氏)。

各饮片由河北橘井药业、河北仁心药业、甘肃九州天润中药产业有限公司、云南旭禾姜业提供，均经过北京中医药大学刘春生教授鉴定。采用随机数表法对各饮片进行随机组合并排序，制备 15 批大柴胡汤标准煎液供试品，其组合信息见表 1。P1~P6、P8~P10、P13、P14 的北柴胡来自河北，P7、P11、P12、P15 来自山西; P1、P5~P7、P9~P13 的黄芩来自内蒙古，P2、P4、P8、P15 来自山西，P3、P14 来自河北; P1、P4、P6~P9、P12~P15 的白芍来自安徽，P2、P3、P5、P10、P11 来自浙江; P1、P2、P4、P7、P9、P10、P12、P13、P15 的大黄来自四川，P3、P5、P6、P8、P11、P14 来自甘肃; P1、P4、P7、P10 的炒枳实来自重庆，P2、P3、P5、P6、P9、P13~P15 来自江西，P8、P11、P12 来自四川; P1、P9、P12、P15 的姜半夏来自甘肃，P2~P8、P10、P11、P13、P14 来自河北; P1~P4、P6、P8、P10、P11、P14、P15 的大枣来自新疆，P5、

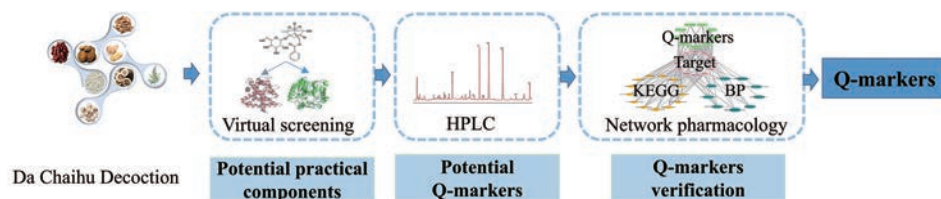


Figure 1 Technical route of the discovery of Da Chaihu decoction Q-markers. HPLC: High-performance liquid chromatography; KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes; BP: Biological process; Q-markers: Quality markers

P7、P9、P12 来自河北, P13 来自山东; P1~P15 的生姜来自云南。

大柴胡汤潜在药效成分获取 本研究利用中药系统药理学数据库 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[5] 结合文献检索大柴胡汤各中药成分。后利用 Discovery Studio 4.0 (DS 4.0) 对成分进行预处理。通过 Minimize ligands 模块在 CHARMM 力场下采用最陡下降法和共轭梯度法相结合的能量优化算法, 对成分进行能量最小化分析。随后对分子进行多构象的生成, 选择 BEST 模式, 生成 255 个构象, 从而构建大柴胡汤成分三维结构数据库。基于 DS 4.0 软件中 PharmaDB 数据库 (共 2 676 个靶标, 5 780 个晶体结构的基于受体结构药效团模型) 进行反向找靶研究, 搜索方式选择柔性搜索。选取打分值在 0.9 以上的匹配结果, 保留所有与大柴胡汤成分具有潜在相互作用的靶点^[6]。

将反向找靶获得的靶点上传至 Cytoscape 3.8.1, 构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPIN)。运用 cyto Hubba 插件, 计算 PPIN 节点的节点度、紧密度、介质性^[7], 得到关键靶点。构建大柴胡汤成分-关键靶点网络图, 取度值排名靠前的 35 个成分作为大柴胡汤的关键潜在药效成分。

大柴胡汤特征图谱建立 为进一步确定成分的可测性、特有性及溯源性, 研究利用 HPLC, 建立大柴胡汤的特征图谱, 对特征峰进行归属, 并经对照品进行指认。

色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱: (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-0.05% 磷酸水 (B); 梯度洗脱 (0~5 min, 3%~3% A; 5~10 min, 3%~10% A; 10~15 min, 10%~12% A; 15~25 min,

12%~16% A; 25~30 min, 16%~16% A; 30~50 min, 16%~20% A; 50~55 min, 20%~20% A; 55~75 min, 20%~25% A; 75~85 min, 25%~46% A; 85~90 min, 46%~85% A; 90~100 min, 85%~85% A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。

对照品溶液的制备 精密称取对照品芍药内酯苷 10.01 mg、芍药苷 11.30 mg、柚皮苷 11.26 mg、橙皮苷 11.30 mg、新橙皮苷 10.90 mg、黄芩苷 11.55 mg、汉黄芩苷 5.30 mg、柴胡皂苷 b₂ 5.36 mg、柴胡皂苷 b₁ 5.89 mg、没食子酸 5.21 mg 置于 10 mL 量瓶内, 加甲醇溶解, 作为储备液。精密移取上述储备液置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 依据古籍记载制备大柴胡汤煎液。取北柴胡 110.4 g、黄芩 41.4 g、白芍 41.4 g、大黄 27.6 g、生姜 69.0 g、姜半夏 60.0 g、炒枳实 58.3 g、大枣 55.2 g, 加水 2 400 mL, 武火煮至沸腾转文火煎煮 110 min, 得 1 200 mL 煎液。去渣滓后文火煎煮 180 min, 得煎液 600 ± 10 mL。将大柴胡汤标准煎液定容于 1 000 mL 量瓶中, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶内, 加入一定量的纯甲醇, 摇匀, 超声提取 10 min (频率 40 kHz, 功率 300 W), 静置, 放冷, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。同法制备单味药及阴性供试品溶液。

方法学考察 新橙皮苷为大柴胡汤的主要活性成分, 其保留时间稳定居中、峰面积适中, 故将其定为参照峰。

精密度 精密吸取同一供试品溶液, 按“色谱条件”项下操作, 连续进样测定 6 次, 以新橙皮苷为参

Table 1 Fifteen batches of decoction pieces corresponding to the material reference of Da Chaihu decoction

Class	Bupleuri Radix	Scutellariae Radix	Paeoniae Radix Alba	Rhei Radix et Rhizome	Aurantii Fructus Immaturus	Pinelliae Rhizome		Zingiberis Rhizome Racens
						Praeparatum Cumzingibere et Alumine	Jujubae Fructus	
P1	211210204	229201205	07220048	01021006	629201202	D002210101	007200704	SJ21060301
P2	25821003	27920031	063201206	Y077201001	22220009	D002201207	77320003	SJ21060310
P3	Y17121010	229191104	063201203	060300102	22221002	D01320009	007200703	SJ21060301
P4	25821003	27920031	063210302	01021007	629201202	D01320004	007200705	SJ21060309
P5	211210204	229200103	063201205	009200103	22220019	D002201209	007200707	SJ21060312
P6	25821009	229191102	Y049210401	060300101	22220008	D002201208	77321001	SJ21060305
P7	25821007	229201204	07221009	01021006	629201204	D002201205	007200706	SJ21060308
P8	221210401	27920055	Y049210401	060300103	629210301	D002201204	007200705	SJ21060306
P9	Y17121010	229201204	07221014	009210401	22220016	D002210102	007200707	SJ21060310
P10	25821009	229201203	063201203	01021005	629201203	D002201206	007200704	SJ21060308
P11	25821006	229191102	063201204	060300104	629210301	D01321001	77320008	SJ21060312
P12	25821007	229201205	063210303	Y007200601	629201201	D002201203	007200706	SJ21060305
P13	221210401	229210301	063201202	009200102	22220009	D01320008	Y006201101	SJ21060312
P14	211210204	229191103	07220048	009200104	22221002	D01320010	77320003	SJ21060303
P15	25821006	27921019	07220048	009201201	22220019	D002201201	007200703	SJ21060305

照峰, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间 RSD 值。

重复性 按照“供试品溶液的制备”项下平行制备 6 份大柴胡汤供试品溶液, 按“色谱条件”项下进样测定, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间 RSD 值。

稳定性 精密吸取同一供试品溶液, 在 0、2、4、8、10、12 和 24 h 后按“色谱条件”项下进样测定, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间 RSD 值。

特征图谱的建立及分析 将 15 批大柴胡汤的图谱以 cdf 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A), 以 S1 的图谱为参照图谱, 采用中位数法, 设置时间窗宽度为 0.2 min, 进行多点校正和色谱峰匹配, 得叠加特征图谱。并将特征图谱与单味药、阴性供试品比对, 对特征峰进行归属。

网络药理学分析 大柴胡汤为治疗胆囊炎的首选方剂, 研究利用网络药理学技术手段, 构建大柴胡汤潜在质量标志物治疗胆囊炎的蛋白互作网络, 以明确大柴胡汤潜在质量标志物的有效性及准确性。

大柴胡汤成分靶点及疾病靶点交集获取 以慢性胆囊炎 (chronic cholecystitis)、急性胆囊炎 (acute cholecystitis)、胆囊炎 (cholecystitis) 为关键词, 分别检索 OMIM (<https://www.omim.org/>)^[8]、MalaCards (<https://www.malacards.org/>)^[9]、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)^[10] 数据库, 获得疾病靶点。并基于前期反向找靶结果获取大柴胡汤潜在质量标志物的作用靶点。利用 Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 平台将大柴胡汤成分靶点映射到胆囊炎作用靶点中, 得到大柴胡汤治疗胆囊炎的潜在靶点。

大柴胡汤成分-胆囊炎网络构建 将成分与疾病交集靶点上传至 STRING11.0 数据库 (<http://string-db.org/>)^[11], 选择置信度大于 0.4, 构建 PPIN, 并在 Cytoscape 3.8.1 中进行可视化。

节点拓扑参数、基因功能 (GO) 富集与通路 (KEGG) 富集分析 为明确潜在质量标志物作用胆囊炎参与的生物过程及信号通路, 将交集靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)^[12], 进行 GO 与 KEGG 富集分析。以 $P < 0.05$ 作为筛选条件, 获得大柴胡汤成分参与的生物过程及信号通路。

此外计算 PPIN 中节点的节点度、紧密度、介质性。按照公式 (1) 计算, 取综合打分值排名前 20% 的靶点, 作为关键靶点。

$$w_i = \frac{d_i - \bar{d}}{d_s} + \frac{b_i - \bar{b}}{b_s} + \frac{c_i - \bar{c}}{c_s} \quad (1)$$

其中, w_i 为靶点综合打分值; \bar{d} 为度值均值; d_s 为度

值标准偏差; \bar{b} 为介质性均值; b_s 为介质性标准偏差; \bar{c} 为紧密度均值; c_s 为紧密度标准偏差。

成分-靶点-通路-生物过程网络构建及分析 综合拓扑分析、GO 和 KEGG 通路富集分析的结果, 将成分、靶点、通路、生物过程相对应, 导入 Cytoscape 3.8.1 软件, 构建大柴胡汤治疗胆囊炎的“成分-靶点-通路-生物过程”网络。

结果

1 大柴胡汤潜在关键药效成分

基于 TCMSP 数据库及文献检索共获得大柴胡汤各中药成分共 117 个。为使后续大柴胡汤成分指认更具针对性, 将成分进一步筛选。认为大柴胡汤所含成分作用的关键靶点越多, 成分越重要。因此取度值排名靠前的 35 个成分, 作为大柴胡汤潜在关键药效成分, 如表 2 所示。

2 大柴胡汤特征图谱建立

基于前期获得的潜在关键药效成分, 对大柴胡汤特征图谱进行指认, 以期获得可测的、特有的、稳定的活性成分。

2.1 方法学考察 精密度考察结果显示, 各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 值均依次小于 0.13%、3.7%, 表明该仪器精密度良好。重复性考察结果显示, 各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 值均依次小于 0.16%、4.7%, 表明该方法重复性良好。稳定性考察结果显示, 各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 值均依次小于 0.17%、3.6%, 表明该样品稳定性良好。

2.2 特征图谱的建立及分析 共标定 19 个共有峰, 按照保留时间依次编号为 1~19。通过比较单饮片煎液、缺阴性煎液, 将共有峰进行归属。峰 2、峰 3、峰 4、峰 5、峰 8、峰 9、峰 10 (柚皮苷)、峰 11 (橙皮苷)、峰 12 (新橙皮苷) 属于炒枳实; 峰 6 (芍药内酯苷)、峰 7 (芍药苷) 属于白芍; 峰 13 (黄芩苷)、峰 14、峰 15 (汉黄芩苷)、峰 16 属于黄芩; 峰 17 (柴胡皂苷 b_2)、峰 18 (柴胡皂苷 b_1) 属于北柴胡; 峰 19 属于大黄。峰 1 (没食子酸) 存在于白芍及大黄中, 属于两药共有峰。大柴胡汤全方、单味药及各指标性成分对比色谱图见图 2。15 批大柴胡汤的图谱相似度均大于 0.93, 说明大柴胡汤的化学成分基本稳定, 不同批次间的差异较小, 生成的对照图谱具有代表性。

2.3 大柴胡汤潜在质量标志物确定 依据质量标志物“五原则”的可测性、特有性、溯源性, 分析大柴胡汤特征图谱。对特征峰进行归属, 发现没食子酸存在于白芍、大黄中, 并不具有特征性, 不将其纳入标准。芍药内酯苷、芍药苷来源于白芍; 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮

Table 2 The latent pharmacodynamic components of Da Chaihu decoction. MOL ID: Molecule identity document

MOL ID	Compound	MOL ID	Compound
MOL004648	Troloxerutin	MOL002276	Sennoside E _{qt}
MOL002909	5,7,2,5-Tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	MOL002288	Emodin-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside
MOL006936	10,13-Eicosadienoic	MOL002776	Baicalin
MOL002259	Physcion diglucoside	MOL002879	Diop
MOL007930	Hesperidin	MOL002931	Scutellarin
MOL002933	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	MOL001645	Linoleyl acetate
MOL005030	Gondoic acid	MOL001918	Paeoniflorin
MOL002497	8-Gingerol	MOL009754	Oroxin A
MOL000552	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	MOL004695	Saikosaponin b ₂
MOL002927	Skullcapflavone II	MOL013068	Wogonoside
MOL001829	Emodin-1- <i>O</i> -glucoside	MOL002235	Eupatin
MOL000415	Rutin	MOL002293	Sennoside D _{qt}
MOL002366	Emodin methyl ether-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	MOL004718	α -Spinasterol
MOL002467	6-Gingerol	MOL001927	Albiflorin
MOL005812	Naringin	MOL004693	Saikosaponin b ₁
MOL008698	Dihydrocapsaicin	MOL007979	Avicularin
MOL013383	Neohesperidin	MOL000010	Vernicin
MOL002360	Chrysophanol-8- <i>O</i> -glucoside		

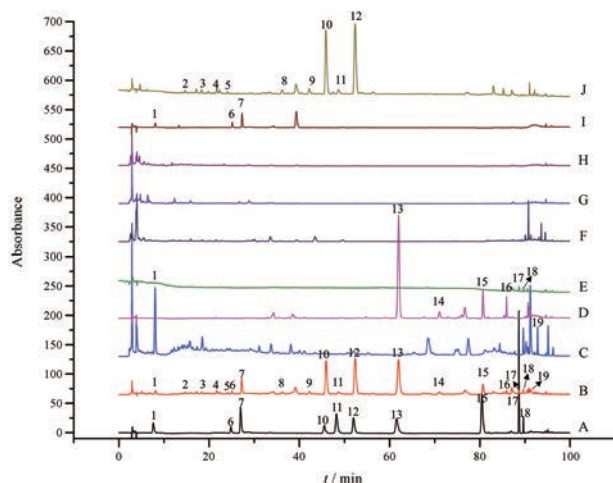


Figure 2 Comparative chromatograms of Da Chaihu decoction, single-flavor drugs and index components. A: Mixed standard solution; B: Da Chaihu decoction; C: Rhei Radix et Rhizome; D: Scutellariae Radix; E: Bupleuri Radix; F: Zingiberis Rhizome Racens; G: Pinelliae Rhizome Praeparatum Cumzingibere et Alumine; H: Jujubae Fructus; I: Paeoniae Radix Alba; J: Aurantii Fructus Immaturus. 1: Gallic acid; 6: Albiflorin; 7: Paeoniflorin; 10: Naringin; 11: Hesperidin; 12: Neohesperidin; 13: Baicalin; 15: Wogonoside; 17: Saikosaponin b₂; 18: Saikosaponin b₁

昔源于炒枳实; 黄芩昔、汉黄芩昔源于黄芩; 柴胡皂昔 b₂、柴胡皂昔 b₁ 源于北柴胡。可见其成分在单饮片及全方煎液中均可被检测到, 体现了质量的传递与溯源。基于此, 将以上成分暂定为大柴胡汤潜在质量标志物。

3 网络药理学分析

将成分与疾病进行整体关联, 可进一步明确大柴胡汤潜在质量标志物的有效性。基于此, 研究对大柴胡汤进行网络药理学研究。

3.1 大柴胡汤成分-胆囊炎网络构建及分析 基于 OMIM、MalaCards、GeneCards 数据库, 去重后共获得 705 个疾病靶点。基于反向找靶得到大柴胡汤潜在质量标志物靶点 412 个。后得到大柴胡汤成分与疾病的交集靶点共 66 个。将交集靶点输入 STRING 数据库, 利用 Cytoscape 3.8.1 将其可视化, 部分结果如图 3 所示。

3.2 节点拓扑参数、GO 与 KEGG 富集分析 经拓扑分析共获得 13 个关键靶点, 包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、白介素 6 (interleukin-6, IL6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、雌激素受体 1 (liver carboxylesterase 1, ESR1)、肉瘤病毒癌基因 (GTPase HRas, HRAS)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3) 等, 以上可能为大柴胡汤治疗胆囊炎的关键靶标。经 GO 富集分析, 生物学过程、细胞组分以及分子功能各富集得到 253、29、58 条目。研究显示潜在质量标志物参与的生物学过程为丝裂原活化蛋白激酶的调控、一氧化氮生物合成过程、蛋白激酶 B 调控、胆汁酸和胆盐转运、胆汁酸代谢等过程; 细胞组分主要参与细胞外间隙、膜筏等定位; 分子功能主要涉及 RNA 聚合酶的转录、类固醇结合、一氧化氮合酶调节等。KEGG 共富集得到 93 条通路, 部分结果如图 4, 主要参与缺氧诱导因子信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、叉头框转录因子信号通路 (FoxO signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、RAS 相关

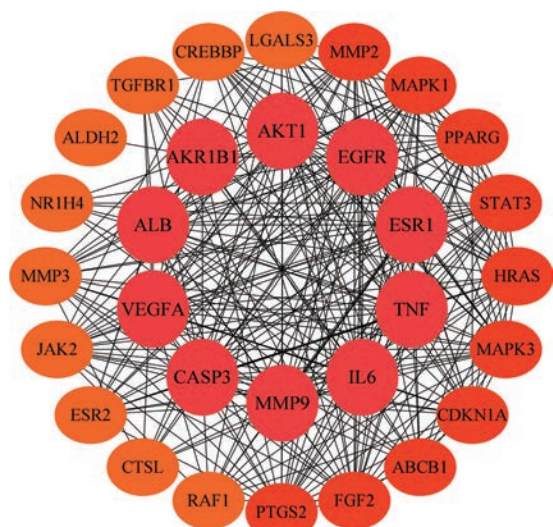


Figure 3 Protein-protein interaction network (PPIN) of intersection among Da Chaihu decoction components and cholecystitis targets. AKT1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; AKR1B1: Aldo-keto reductase family 1 member B1; ALB: Afamin; VEGFA: Vascular endothelial growth factor A; CASP3: Caspase-3; MMP9: Matrix metalloproteinase-9; IL6: Interleukin-6 receptor subunit alpha; TNF: Tumor necrosis factor; ESR1: Estrogen receptor; EGFR: Epidermal growth factor receptor; LGALS3: Galectin-3; CREBBP: CREB-binding protein; TGFBR1: TGF-beta receptor type-1; ALDH2: Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial; NR1H4: Bile acid receptor; MMP3: Stromelysin-1; JAK2: Janus kinase 2; ESR2: Estrogen receptor beta; CTSL: Procathepsin L; RAF1: RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; PTGS2: Prostaglandin G/H synthase 2; FGF2: Fibroblast growth factor 2; ABCB1: ATP-dependent translocase ABCB1; CDKN1A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1; MAPK3: Mitogen-activated protein kinase 3; HRAS: GTPase HRas; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; PPARG: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1; MMP2: 72 kDa type IV collagenase

蛋白信号通路 (Rap1 signaling pathway)、胰岛素抵抗 (insulin resistance pathway)、胆汁分泌 (bile secretion) 等信号通路。

3.3 成分-靶点-通路-生物过程网络构建及分析 为进一步明确成分的有效性, 研究将成分、关键靶点、生物过程、信号通路进行联合分析, 如图5。

炎症伴随胆囊炎的始终, 炎症因子会使胆囊部位产生水肿、坏死、疼痛等病理过程, 因此阻断炎症介质显得尤为重要。MAPK通路参与细胞增殖、凋亡、炎症反应等过程; Rap1通路可对细胞的迁移、分化进行调控。受病理刺激后, MAPK活化启动炎症介质的产生, 调控IL-1 β 、IL-6、IL-8等炎症因子的表达, MAPK通路

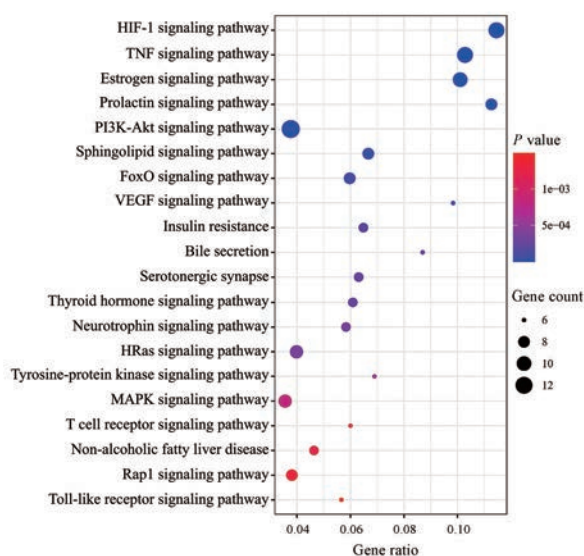


Figure 4 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway. HIF-1: Hypoxia inducible factor-1; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinases; FoxO: Forkhead box O

又可激活TNF信号通路, 从而参与全身炎症反应。而Rap1为MAPK上游信号通路^[13], 可参与巨噬细胞免疫应答过程, 显著减轻多种病因引起的炎症反应。本研究结果表明潜在质量标志物可能通过作用于IL6、TNF、ESR1、EGFR、MAPK3等靶点, 调节MAPK、TNF、Rap1等信号通路, 参与一氧化氮生物合成、MAPK级联等生物过程, 缓解炎症反应, 从而达到治疗胆囊炎的目的。

胆囊炎的重要诱因因为高脂饮食, 其常伴随着多种代谢性疾病的发生。因此调节代谢紊乱, 可一定程度上控制胆囊炎的发生发展。FoxO信号通路参与转录、代谢、免疫等过程; PI3K-AKT通路调控细胞的生长、增殖; HIF-1信号通路参与血管生成、糖降解, 从而适应低氧环境。FoxO为胰岛素的下游通路, 其连接PI3K-AKT通路, 共同影响血糖的吸收与代谢, 并调节胰岛素的敏感性水平。而HIF-1又可激活PI3K-AKT信号通路, 共同调控糖类和脂质代谢。且相关研究报道, 其HIF-1 α 在胆囊癌患者中有较高表达^[14]。胰岛素抵抗是代谢综合征类疾病的主要发病机制, 表现为机体维持正常血糖水平下降。当机体发生胰岛素抵抗时, 肝脏合成胆固醇增加, 促使结石形成, 胆道淤积, 引起胆道系统炎症反应。胆汁分泌可帮助脂类吸收, 调节糖脂代谢, 促进胆汁外排, 发挥利胆作用^[15]。研究结果显示潜在质量标志物可能作用于AKT1、HRAS等靶点, 调节PI3K-AKT、胰岛素抵抗、胆汁分泌等信号通路, 参与胆汁酸和胆盐转运、胆汁酸代谢、血糖稳态等生物过程, 调节代谢, 进而治疗胆囊炎。

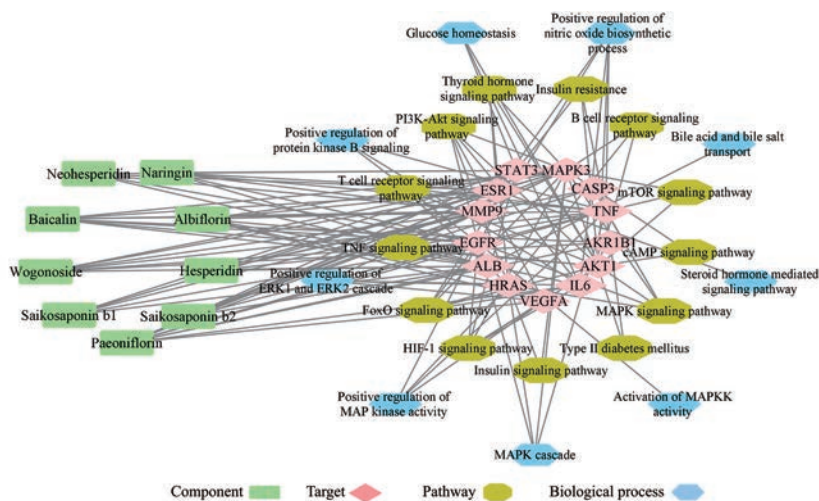


Figure 5 Components-key targets-signaling pathways-biological processes diagram. cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; mTOR: Mammalian target of rapamycin; ERK1: Extracellular regulated protein kinases 1

讨论

本研究基于质量标志物“五原则”,结合特征图谱与网络药理学,共得到9个成分作为大柴胡汤的质量标志物。其建立的特征图谱准确度高、稳定性好,可用于大柴胡汤的质量控制,同时证明潜在质量标志物的可测性、特有性及传递性。然而虚拟筛选虽使特征图谱的指认更具针对性,但质量标志物的整体性及有效性有待进一步验证。因此本研究引入网络药理学技术,进一步证明质量标志物可表征大柴胡汤的整体功效。

胆囊炎发病机制为炎症反应、代谢紊乱、胆汁滞留、细菌感染等。大柴胡汤是治疗胆囊炎的经典名方,临床常用药效可归结为抗炎^[16,17]、降脂^[18,19]、降糖^[20]。君药柴胡中皂苷类成分柴胡皂苷_{b₂}、柴胡皂苷_{b₁}^[21,22],臣药黄芩、枳实中黄酮类成分黄芩苷^[23,24]、汉黄芩苷^[25]、柚皮苷^[26,27]、橙皮苷^[28,29]、新橙皮苷^[30],佐药白芍中萜类成分芍药苷^[31,32]、芍药内酯苷^[33]均与大柴胡汤药效密切相关。经网络药理学分析,潜在质量标志物可通过作用IL6、TNF、ATK1等靶点,发挥抗炎、调节代谢等作用,从而达到治疗胆囊炎目的。文献报道,IL6为促炎细胞因子,其生成的炎症介质被释放到细胞外可引起炎症反应;TNF为肿瘤坏死因子,其可刺激内皮细胞,导致炎症及内源性发热。已有研究表明柴胡皂苷_{b₂}^[21]、橙皮苷^[28]、芍药苷^[31,32]、芍药内酯苷^[33]均可作用于IL6、TNF靶点,参与炎症相关疾病的治疗。ATK1为蛋白激酶,可调节代谢过程,参与胰岛素诱导的葡萄糖转运蛋白易位至细胞表面来调节葡萄糖摄取^[34]。Yuan等^[35]与Wu等^[36]研究发现芍药苷、橙皮苷可调控ATK1的表达,从而可改善代谢。结果表明大柴胡汤可通过多成分协同作用治疗胆囊炎,体现了中药对疾病多成分、多靶

点、多途径的调控理念,可初步证明大柴胡汤质量标志物的有效性及配伍合理性。但为增强大柴胡汤质量标志物的准确性及可信度,后期还可通过体外实验进一步验证。

本研究未对姜半夏、生姜、大枣进行峰的指认,主要因为HPLC检测存在局限性,对某些成分无响应或响应值低,如大枣中的多糖,在紫外条件下无吸收。其次,一些特殊成分,如生姜中挥发性成分,长时间煎煮使其消失。半夏主要成分为核苷类成分,其受热不稳定,易分解,有文献对包含半夏的方剂进行研究,但均未对半夏进行指认。同时考虑到半夏、生姜、大枣为佐使药,对于整方的贡献并不突出,加之其相关成分报道较少,因此质量标志物并未将大柴胡汤的八味中药全部涵盖。后期可对大柴胡汤的浸膏得率及pH值进行考察,进一步提高大柴胡汤质量控制的全面性。

作者贡献: 吕恬仪负责实验研究及文章撰写;刘亚楠参与部分实验研究;任越参与文章思路的确定和论文的修改;徐裕彬、张媛、魏胜利、张燕玲指导文章写作并审校全文。

利益冲突: 本研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Song XX, Huang JF, Tian M, et al. Pharmacological effect and clinical application of Da Chaihu decoction [J]. Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报), 2019, 47: 112-116.
- [2] Sun KB, Zhang XY, Zhang JX, et al. Effect of chemical components in Da Chaihu decoction on animal model of pancreatitis: a Bayesian network meta analysis [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报), 2021, 40: 342-349.
- [3] Liu XQ. Studies on HPLC fingerprints of Da Chaihu decoction and Guifu Dihuang Prescription (大柴胡汤和桂附地黄方的化

- 学成分指纹图谱研究) [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2014.
- [4] Huo MQ, Peng S, Ren Y, et al. Discovery and application of traditional Chinese medicine efficacy markers based on systematic traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 3245-3250.
- [5] Ru J, Li P, Wang J, et al. TC MSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [6] Gao FF, Pei YL, Ren Y, et al. Possible mechanisms by which Polygonati Rhizoma opposes atherosclerosis based on network pharmacology and molecular docking analyses [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2642-2650.
- [7] Gong BJ, Ren Y, Ma J, et al. Study on mechanism of Tibetan medicine Zuomua decoction in treatment of hypertension based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 5383-5392.
- [8] Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D789-D798.
- [9] Rappaport N, Twik M, Plaschkes I, et al. MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: D877-D887.
- [10] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-30.
- [11] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
- [12] Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4: P3.
- [13] Shah S, Brock EJ, Ji K, et al. Ras and Rap1: a tale of two GTPases [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 54: 29-39.
- [14] Wu TJ, Xu B, Zhao GH, et al. IL-37 suppresses migration and invasion of gallbladder cancer cells through inhibition of HIF-1 α induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 8179-8185.
- [15] Li Y, Gao XX, Qin XM. Advances in research of traditional Chinese medicine for promoting bile secretion and excretion [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 81-90.
- [16] Zheng YH, Chen JF, She L, et al. Clinical effects of modified Da Chaihu decoction on acute cholecystitis [J]. *J Emerg Tradit Chin Med (中国中医急症)*, 2018, 27: 462-464.
- [17] Tan C, Wenrong AN, Liu J, et al. Influence of ChaiHu and DaHuang in different proportions on anti-inflammatory and analgesic effects of Da Chaihu decoction [J]. *West J Tradit Chin Med (西部中医药)*, 2016, 29: 8-10.
- [18] Cui H, Li Y, Wang Y, et al. Da Chaihu decoction ameliorates high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through remodeling the gut microbiota and modulating the serum metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584090.
- [19] Chen J. Clinical observation on treating 45 cases of hyperlipemia with the Da Chaihu decoction [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2019, 11: 65-67.
- [20] Zhang XH. Clinical observation on treatment of type 2 diabetes with Da Chaihu decoction [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med (云南中医中药杂志)*, 2018, 39: 44-45.
- [21] Shin JS, Im HT, Lee KT. Saikosaponin b₂ suppresses inflammatory responses through IKK/I κ B/NF- κ B signaling inactivation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *Inflammation*, 2019, 42: 342-353.
- [22] Luo J, Wang J, Yang J, et al. Saikosaponin B₁ and saikosaponin D inhibit tumor growth in medulloblastoma allograft mice via inhibiting the Hedgehog signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2022. DOI: 10.1007/s11418-022-01603-8.
- [23] Chen G, Chen X, Niu C, et al. Baicalin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment 1 via Nrf2 [J]. *J Endocrinol*, 2018, 240: 81-98.
- [24] Wang X, Xie L, Long J, et al. Therapeutic effect of baicalin on inflammatory bowel disease: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114749.
- [25] Zhu ZW, Jiang Q, Luo Y, et al. Synergistic effect of baicalin and wogonoside on NF- κ B signaling pathway based on medium-efficiency equation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2020, 26: 84-91.
- [26] Ge SN. Naringin Protects Against Perfluorooctane Sulfonate-Induced Liver Injury Mice (柚皮苷保护 PFOS 诱导的小鼠肝损伤的研究) [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [27] Kong F, Ding Z, Zhang K, et al. Optimization of extraction flavonoids from exocarpium citri grandis and evaluation its hypoglycemic and hypolipidemic activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 262: 113178.
- [28] Zhao J, Tian S, Lu D, et al. Systems pharmacological study illustrates the immune regulation, anti-infection, anti-inflammation, and multi-organ protection mechanism of Qing-Fei-Pai-Du decoction in the treatment of COVID-19 [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153315.
- [29] Pla-Pagà L, Valls RM, Pedret A, et al. Effect of the consumption of hesperidin in orange juice on the transcriptomic profile of subjects with elevated blood pressure and stage 1 hypertension: a randomized controlled trial (CITRUS study) [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40: 5812-5822.
- [30] Wang XH, Dai C, Wang J, et al. Therapeutic effect of neohesperidin on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19: 741-749.

- [31] Mao X, Chen WJ, Li YF, et al. An exploration into the therapeutic effects and molecular mechanisms of paeoniflorin in the treatment of adjuvant-induced arthritis rats by a network pharmacology-based research strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2000-2010.
- [32] Lai X, Wei J, Ding X. Paeoniflorin antagonizes TNF- α -induced L929 fibroblastoma cells apoptosis by inhibiting NF- κ Bp65 activation [J]. *Dose Response*, 2018, 6: 1559325818774977.
- [33] Cai Z, Liu J, Bian H, et al. Albiflorin alleviates ovalbumin (OVA)-induced pulmonary inflammation in asthmatic mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11: 7300-7309.
- [34] Peng Z, Aggarwal R, Zeng N, et al. AKT1 regulates endoplasmic reticulum stress and mediates the adaptive response of pancreatic β cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40: e00031-20.
- [35] Yuan N, Gong L, Tang K, et al. An integrated pharmacology-based analysis for antidepressant mechanism of Chinese herbal formula Xiao-Yao-San [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 284.
- [36] Wu J, Ye X, Yang S, et al. Systems pharmacology study of the anti-liver injury mechanism of citri reticulatae pericarpium [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 618846.