

整合血清药物化学、网络药理学及分子动力学模拟探究萆薢分清丸防治慢性肾衰的活性成分及作用机制

杨圣洁¹, 安亚冉¹, 徐香农¹, 魏雨婕¹, 孙志¹, 赵松峰¹, 段飞², 刘丽伟^{1*}, 左莉华^{1*}

1. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 基于血清药物化学、网络药理学及分子动力学模拟探究萆薢分清丸潜在活性成分、治疗慢性肾衰的关键靶点和作用机制。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 进行萆薢分清丸体内外成分分析, 结合色谱峰保留时间、精确相对分子质量、碎片离子、中性丢失等信息进行化合物指认。采用 SwissTarget Prediction 预测药物靶点。基于 GeneCards、OMIM、TTD、DisGeNET 数据库获取疾病靶点, 使用 STRING 数据库构建关键靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络, 利用 Cytoscape 软件构建核心靶点基因网络图和“成分-靶点-通路”图, 通过 Metascape 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。基于 CB-DOCK2 数据库对关键的活性成分和作用靶点进行分子对接验证, 对分子对接后结合能小于 -8 kcal/mol 的配体与蛋白质复合物通过 Gromacs 2022 进行分子动力学模拟。**结果** 萆薢分清丸体外定性得到 36 个化学成分, 大鼠 ig 给药后在血清样本中检测到 18 个入血成分。其中山柰酚、白杨素、乔松素等为萆薢分清丸发挥治疗慢性肾衰药效的关键成分, 蛋白激酶 B1 (Akt1)、白蛋白 (ALB)、表皮生长因子受体 (EGFR)、信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC) 等为萆薢分清丸治疗慢性肾衰的主要靶点, 涉及到癌症通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、叉头框转录因子 O 亚族信号 (FoxO) 信号通路等。分子对接显示 Akt1、ALB、EGFR、STAT3、SRC 靶点与药物成分具有较高的亲和力。分子动力学进一步验证大黄素与 ALB、大黄素与 EGFR、乔松素与 ALB 和山柰酚与 STAT3 靶点结合稳定。**结论** 萆薢分清丸可能通过山柰酚、大黄素、乔松素等关键药效成分, 作用于 Akt1、STAT3、EGFR 等核心靶点, 调控 MAPK、FoxO、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 等信号通路等发挥治疗慢性肾衰作用。

关键词: 萆薢分清丸; 慢性肾衰; 血清药物化学; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟; 山柰酚、白杨素、乔松素

中图分类号: R287.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)02-0311-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.02.007

Active components and mechanism of action of Bixie Fenqing Pills in treatment of chronic renal failure based on serum pharmacology combined with network pharmacology and molecular dynamics simulations

YANG Shengjie¹, AN Yaran¹, XU Xiangnong¹, WEI Yujie¹, SUN Zhi¹, ZHAO Songfeng¹, DUAN Fei², LIU Liwei¹, ZUO Lihua¹

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To explore the potential active ingredients of Bixie Fenqing Pills, and the key targets for its treatment of chronic renal failure based on serum pharmacology, network pharmacology and molecular dynamics simulation. **Methods** *In vitro* and *in vivo* chemical profiling of Bixie Fenqing Pills was characterized using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. Compound identification was performed by integrating retention times, accurate molecular masses, fragment ions, and neutral loss patterns. Drug targets were predicted using SwissTargetPrediction. Disease-related targets were retrieved from GeneCards, OMIM, TTD, and DisGeNET databases. PPI networks

收稿日期: 2025-12-01

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (24A360025)

作者简介: 杨圣洁, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质和作用机制研究。E-mail: a13007550381@163.com

*通信作者: 刘丽伟, 主管药师, 研究方向为中药药效物质和作用机制研究。E-mail: cpuliuliwei@126.com

左莉华, 副主任药师, 研究方向为中药药效物质和作用机制研究。E-mail: zuoliuhua2013@126.com

of key targets were constructed using the STRING database. Cytoscape was utilized to visualize core target gene networks and “component – target – pathway” relationships. GO and KEGG pathway enrichment analyses were carried out through the Metascape platform. Molecular docking was performed to verify the binding affinities between key active compounds and core targets using CB-Dock2. Molecular dynamics simulations were conducted using GROMACS 2022 for ligand–protein complexes with docking energies below -8 kcal/mol. **Results** The external qualitative analysis of the Bixie Fenqing Pills yielded 36 chemical components. After intragastric administration to rats, 18 components that entered the bloodstream were detected in the serum samples. Among them, kaempferol, chrysin, and pinostrobin were the key components of Bixie Fenqing Pills that exert therapeutic effects on chronic renal failure. Akt1, ALB, EGFR, STAT3, and SRC were the main targets of Bixie Fenqing Pills in treatment of chronic renal failure, involving cancer pathways, MAPK signaling pathways, and FoxO signaling pathways, etc. Molecular docking shows that the Akt1, ALB, EGFR, STAT3, and SRC targets had a high affinity with the drug components. Molecular dynamics further validates the stable binding of emodin with ALB, emodin with EGFR, pinostrobin with ALB, and kaempferol with STAT3 targets. **Conclusion** Kaempferol, emodin, and pinostrobin are considered as the key bioactive components of Bixie Fenqing Pills, which may exert therapeutic effects against chronic renal failure by acting on the core targets (Akt1, STAT3, EGFR, etc.) and regulating critical pathways such as MAPK, FoxO, and HIF-1 signaling pathways.

Key words: Bixie Fenqing Pills; chronic renal failure; serum pharmacochimistry; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulations; kaempferol; chrysin; pinostrobin

慢性肾衰是指多种原因造成的慢性进行性肾实质损害, 导致肾脏明显萎缩, 无法维持其基本功能, 病死率高, 严重威胁患者生命健康^[1-2]。目前, 临床尚无针对性治疗药物。中医学认为慢性肾衰属本虚标实之证, 本虚为脾肾亏虚; 标实为湿浊、血瘀, 需以健脾补肾、活血化瘀、解毒化湿之法治之, 具有多成分多靶点作用特点的中药在治疗慢性肾衰中具有独特优势^[3-4]。萆薢分清丸收录于《中国药典》2025 年版一部, 由粉萆薢、益智仁、石菖蒲、甘草、乌药 5 味药材组成, 具有温肾补脾、分清泌浊的功效, 用于治疗肾不化气, 清浊不分, 小便频数, 时下白浊^[5]。本研究整合血清药物化学、网络药理学及分子动力学模拟技术^[6], 系统鉴定萆薢分清丸的体内外化学成分, 筛选治疗慢性肾衰关键活性成分与核心靶点, 阐明其作用通路, 为萆薢分清丸的药效机制阐释及质量标准提升提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Q-Exactive 质谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Heraeus Fresco 17 Centrifuge 型微量冷冻离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); BX7200HP 型超声波清洗器 (上海 CIMO 医疗器械制造有限公司); N-1300 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

萆薢分清丸 (广州白云山医药集团股份有限公

司白云山制药总厂, 规格每 20 粒重 1 g, 生产批号 4210001)。甲醇、乙腈均为质谱级购自美国 Thermo Fisher 公司。水为超纯水, HPLC 级甲酸购自上海阿拉丁生物科技有限公司。

对照品: 原儿茶醛 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-24060618)、原儿茶酸 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-25103013)、5-羟甲基糠醛 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-24102711)、山柰酚 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-24111807)、甘草酸 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-25022604)、大黄素 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-24112011)、乔松素 (质量分数 $>98\%$, 批号 MUST-25082913)、杨芽黄素 (质量分数 $>98\%$, MUST-25062519)、白杨素 (质量分数 $>98\%$, MUST-25121302) 购于成都曼斯特生物科技有限公司。诺卡酮 (质量分数 $>98\%$, 批号 180308) 购于北京中科仪友化工技术研究院。

1.3 动物

SD 大鼠 12 只, 雄性, 体质量 210~250 g, 购自郑州大学河南省实验动物中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2022-0001。实验前在 12 h 昼夜循环的动物房内适应性喂养 7 d, 自由获取饲料和饮用水。动物实验由郑州大学第一附属医院科研项目伦理审查委员会审查 (批准许可证号 2026-KY-0052-001)。

2 方法

2.1 体内外成分分析

2.1.1 动物分组、给药及样本采集 12 只大鼠随机分为空白组和萆薢分清丸含药血清组, 适应性饲养

1 周。给药前 12 h 大鼠禁食不禁水。萆薢分清丸成人临床用量为 18 g/70 kg, 参照药理实验动物体表面积等效剂量换算标准, 人与大鼠的剂量换算系数取 6.25。经计算, 大鼠等效给药剂量为 1.6 g/kg。萆薢分清丸组大鼠采用 ig 1.6 g/kg 萆薢分清丸混悬液, 对照组大鼠 ig 0.1% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 7 d^[7]。于给药后 0.5、1、2、3、4 h, 采用眼眶取血的方式各取 1 mL 于 EP 管中, 静置约 1 h, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 空白组血清处理方法与给药组一致。

2.1.2 样本前处理 精密称取萆薢分清丸颗粒 1 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 80% 甲醇 40 mL, 设定超声功率 200 W、超声频率 20 kHz, 室温下超声 30 min 后, 取混悬液 1 mL 置于离心管中, 离心 10 min (4 °C、13 000 r/min), 再取上清液 100 μ L, 过滤, 置于进样瓶中, 待测。取不同采血点血清各 100 μ L, 涡旋 30 s, 加 3 倍量乙腈, 涡旋 3 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μ L 上清, 置于进样瓶中, 待测。

2.1.3 液质联用条件 色谱条件: ACQUITY UPLC[®]HSS C₁₈ 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 40 °C, 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 5 μ L。流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (程序为 0~4.0 min, 5% B; 4.0~51.0 min, 5%~100% B; 51.0~56.0 min, 100% B; 56.0~56.2 min, 100%~5% B)。质谱条件: Q Exactive 高分辨质谱仪, 离子源为 HESI 源 (Heated ES), 离子传输管和辅助气温度分别为 320、300 °C, 辅助气流速为 10 μ L/min; 正离子模式下: 喷雾电压为 3.50 kV, 鞘气流速为 40 μ L/min; 负离子模式下: 喷雾电压为 2.80 kV, 鞘气流速为 38 μ L/min。本研究采用正、负离子同时扫描的 Full MS/dd-MS² 模式, 即一级全扫描及自动触发二级质谱扫描模式, 碰撞能梯度为 20、40、60 eV, 扫描范围 m/z 80~1 200。

2.1.4 萆薢分清丸体内代谢产物鉴定 根据 2.1.3 项下的色谱、质谱条件对萆薢分清丸、萆薢分清丸含药血清及空白血清进行分析, 结合色谱峰保留时间、相对分子质量、碎片离子等信息解析体内化学成分。

2.2 生物信息学研究

2.2.1 入血成分靶点搜集 在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载 18 个入血成分的 2D 结构, 通过 SwissTargetPrediction 数据

库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测。

2.2.2 慢性肾衰相关靶点的筛选 基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、TTD (<https://ttd.idrblab.net/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), 以 “chronic renal failure” 为关键词, 获取慢性肾衰相关的疾病靶点。

2.2.3 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络的构建 将上述得到的药物靶点和疾病靶点各自删除重复后, 求交集得到萆薢分清丸和慢性肾衰共同作用的靶点。将萆薢分清丸活性成分、慢性肾衰、交集基因建立 Network 和 Type 文件, 并导入到 Cytoscape 3.7.2 软件构建 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络。

2.2.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 将上述得到的共有靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 蛋白种属为 “homo sapiens”, 置信度为 0.4, 其他参数不变, 得到蛋白相互作用关系的网络图, 下载 TSV 格式。将该 TSV 文件导入到 Cytoscape 3.7.2 软件, 并使用 cytoHubba 插件进行拓扑分析, 获得萆薢分清丸治疗慢性肾衰的关键靶点。

2.2.5 基因本体论 (GO) 功能和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 在 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>) 进行 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析。

2.2.6 “成分-靶点-通路”网络的构建 将萆薢分清丸活性成分、治疗慢性肾衰的前 5 个核心靶点关键靶点、KEGG 富集的前 10 条通路通路建立 Network 和 Type 文件, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建 “成分-靶点-通路”网络。

2.2.7 分子对接验证 根据 “成分-靶点-通路”网络图筛选 degree 值较高的靶点, 从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载该蛋白靶点的 3D 晶体结构 pdb 文件。根据 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络筛选关键活性成分, 从 PubChem 数据库中下载活性成分对应的 SDF 文件。通过 Chem 3D 软件将 2D 结构优化并保存为 3D 结构的 mol2 格式, 并在 CB-Dock2 数据库进行分子对接。

2.2.8 分子动力学模拟验证 采用 Gromacs 2022 开展分子动力学模拟, 通过 pdb2gmx 工具及 AutoFF 网页获取力场参数, 受体蛋白用 amber14sb 力场, 配体用 GAFF2 力场。经 1 nm TIP3P 型立方体水盒

子溶剂化,借 gmx genion 工具添加离子以实现电中性。长程静电相互作用采用 PME 方法处理,截断距离 1 nm,以 SHAKE 算法约束所有键,Verlet 蛙跳算法设积分步长 1 fs。模拟前先经能量优化,随后在 310 K、恒压 NPT 条件下运行 100 ns。模拟中利用 g-rmsd、g-rmsf 等工具计算均方根偏差(RMSD)、均方根波动(RMSF)、氢键(HBonds)、回旋半径(Rg)和溶剂可及表面积(SASA)和吉布斯自由能(Gibbs free energy)^[8]。

3 结果

3.1 体内外成分鉴定结果

萆薢分清丸、空白血清及萆薢分清丸含药血清正、负离子模式下的总离子流图如图 1 所示。萆薢分清丸体外共鉴定出 36 种化学成分,见表 1。包括黄酮类 16 个、萜类 6 个、生物碱类 5 个、酚类 2 个、香豆素类 2 个、苯丙素类 1 个、蒽醌类 1 个、呋喃类 1 个、芳香烃类 1 个、甾体类 1 个。萆薢分清丸体内入血成分鉴定出 18 个成分。其中黄酮类 7

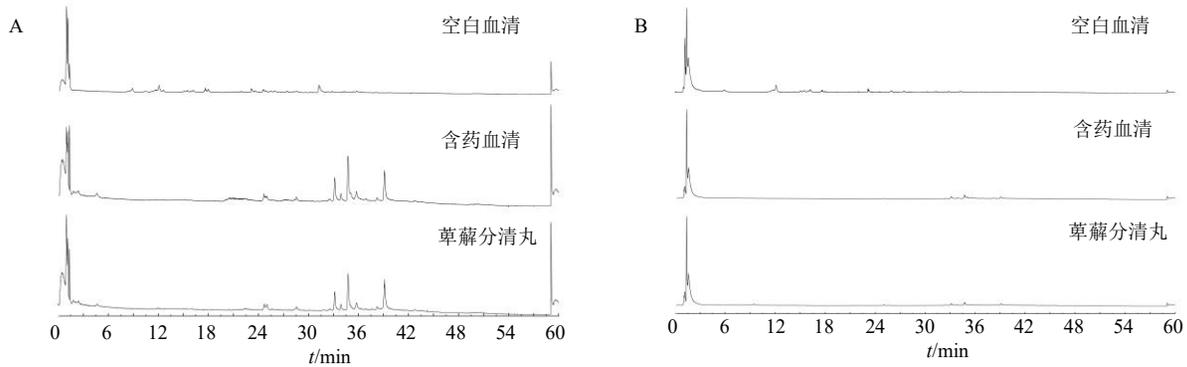


图 1 萆薢分清丸、空白血清及含药血清在正离子模式(A)和负离子模式(B)下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Bixie Fenqing Pills, blank serum, and drug-containing serum in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

表 1 萆薢分清丸 36 个化学成分质谱信息

Table 1 Mass spectrum information of 36 chemical components of Bixie Fenqing Pills

编号	成分名称	分子式	t_R /min	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	二级离子碎片	来源
					理论值	实测值			
B1	细辛醚 [#]	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	23.59	[M+H] ⁺	209.117 22	209.116 59	-3.017	194.093 4、181.977 3、168.992 7	石菖蒲
D1	原儿茶醛 ^{#*}	C ₇ H ₆ O ₃	4.25	[M-H] ⁻	137.024 41	137.023 93	-0.153	137.024 2、119.013 0、108.021 5	益智仁
D2	原儿茶酸 ^{#*}	C ₇ H ₆ O ₄	5.88	[M-H] ⁻	155.033 88	155.033 47	-3.130	155.033 4、109.029 3、91.018 6	益智仁
E1	大黄素 ^{#*}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	17.68	[M-H] ⁻	269.045 54	269.045 21	-1.400	269.045 2、241.058 8、225.055 7	粉萆薢
F1	5-羟甲基 糠醛 [*]	C ₆ H ₆ O ₃	1.84	[M+H] ⁺	127.038 97	127.038 82	-1.186	127.038 8、97.028 9、69.033 4	粉萆薢
H1	芹糖异甘 草苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	14.5	[M+H] ⁺	551.175 91	551.175 91	-1.574	551.175 9、419.133 1、257.080 2	甘草
H2	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	14.81	[M+H] ⁺	255.066 28	255.065 57	-2.792	255.065 5、147.043 7、137.021 3	甘草
H3	杨芽黄素 ^{#*}	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	20.27	[M+H] ⁺	267.066 28	267.065 80	-1.805	267.065 8、254.056 4、226.061 9	益智仁
H4	Kanzonol R [#]	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	30.17	[M+H] ⁺	371.185 30	371.184 33	-2.614	371.183 5、355.150 1、313.070 1	甘草
H5	Kanzonol J	C ₂₆ H ₃₀ O ₅	31.54	[M+H] ⁺	423.221 66	423.220 67	9.615	423.179 4、311.054 2、221.189 6	甘草
H6	光甘草酮 [#]	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	9.50	[M+H] ⁺	393.206 03	393.208 80	7.030	393.208 8、311.054 3、205.064 4	甘草
H7	乔松素 ^{#*}	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	11.56	[M+H] ⁺	257.080 83	257.080 26	-2.238	257.080 2、222.066 9、179.085 2	甘草
H8	白杨素 ^{#*}	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	14.59	[M+H] ⁺	255.065 18	255.064 90	-1.001	253.179 5、209.080 4、143.033 7	益智仁、 甘草
H9	5-甲氧基光 甘草酮	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	18.45	[M+H] ⁺	337.143 43	337.140 26	-9.419	221.153 1、203.142 0、119.085 0	甘草
H10	甘草黄酮醇	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	25.78	[M+H] ⁺	355.117 61	355.117 31	-0.858	281.044 1、173.060 0、121.029 0	甘草
H11	乌拉尔宁	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	22.25	[M+H] ⁺	371.112 52	371.111 88	-2.073	371.111 8、315.085 4、297.074 9	甘草

表 1 (续)

编号	成分名称	分子式	t_R/min	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	二级离子碎片	来源
					理论值	实测值			
H12	甘草异黄酮 A	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	25.78	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.117 61	355.117 31	-0.858	299.054 6、153.017 9、79.054 8	甘草
H13	kanzonol H	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_5$	30.65	$[\text{M}+\text{H}]^+$	425.232 25	425.230 96	-3.035	369.169 7、165.054 2、151.038 5	甘草
H14	山柰酚*	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	15.26	$[\text{M}-\text{H}]^-$	285.040 46	285.076 20	0.036	285.043 7、241.053 9、65.620 1	益智仁、乌药、甘草、粉萆薢
H15	甘草宁 G	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$	32.61	$[\text{M}+\text{H}]^+$	353.138 35	353.137 54	-2.294	353.107 6、297.075 0、165.058 8	甘草
H16	甘草黄酮醇	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	25.78	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.117 61	355.116 55	-2.998	355.116 5、175.075 2、121.028 1	甘草
Q1	异香兰素	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	5.15	$[\text{M}+\text{H}]^+$	151.040 06	151.039 70	-2.499	109.018 8、95.048 9、80.049 4	益智仁
S1	去甲波尔定	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$	7.97	$[\text{M}+\text{H}]^+$	314.138 68	314.138 21	-1.511	237.090 4、222.066 9、205.064 2	乌药
S2	波尔定	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	8.42	$[\text{M}+\text{H}]^+$	328.154 33	328.153 87	-1.416	297.111 4、265.086 2、205.064 3	乌药
S3	牛心果碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	9.56	$[\text{M}+\text{H}]^+$	330.169 98	330.169 49	-1.498	192.101 5、143.048 9、137.059 5	乌药
S4	网脉碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	9.54	$[\text{M}+\text{H}]^+$	330.169 98	330.169 46	-1.589	330.169 4、300.158 4、207.112 8	乌药
S5	甜菜碱	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	1.79	$[\text{M}+\text{H}]^+$	118.086 25	118.085 98	-2.330	118.085 9、117.073 8、59.073 1	益智仁
T1	乌药醚内酯#	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$	23.05	$[\text{M}+\text{H}]^+$	261.112 13	261.111 69	-1.706	261.109 6、243.104 0、215.106 2	乌药
T2	乌药醇#	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	26.64	$[\text{M}+\text{H}]^+$	231.137 95	231.137 60	-1.542	231.137 2、195.116 4、185.132 4	乌药
T3	诺卡酮#	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	28.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	219.174 33	219.174 01	-1.514	121.100 8、91.053 9、79.053 9	益智仁
T4	新乌药内酯#	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$	23.54	$[\text{M}+\text{H}]^+$	245.117 22	245.116 78	-1.799	181.014 1、171.992 6、156.990 3	乌药
T5	乌药醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	26.63	$[\text{M}+\text{H}]^+$	231.137 95	231.137 68	-1.196	231.137 6、213.127 1、195.116 6	乌药
T6	甘草酸*	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_{16}$	19.88	$[\text{M}-\text{H}]^-$	821.396 50	821.395 63	-1.070	821.395 6、351.055 5、289.056 7	甘草
X1	考迈斯托醇	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$	20.36	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.044 44	269.044 19	-0.966	241.086 0、227.065 6、225.053 8	甘草
X2	甘草香豆素	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	24.54	$[\text{M}+\text{H}]^+$	369.133 26	369.132 45	-3.114	369.132 5、313.069 9、285.075 2	甘草
Z1	豆甾醇	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$	54.02	$[\text{M}+\text{H}]^+$	413.377 79	413.377 29	-1.216	413.377 2、159.980 5、147.983 4	益智仁

*由对照品比对确定, #鉴定到的入血成分, B-苯丙素类, D-酚类, E-蒽醌类, F-呋喃类, H-黄酮类, Q-芳香烃类, S-生物碱类, T-萜类, X-香豆素类, Z-甾体类。

*compound identified by reference standards, #compound detected in blood, B-phenylpropanoids, D-phenols, E-anthraquinones, F-furans, H-flavonoids, Q-aromatic hydrocarbons, S-alkaloids, T-terpenoids, X-coumarins, Z-steroids.

种、萜类 4 种、苯丙素类 1 种、酚类 2 种、生物碱类 2 种、芳香烃类 1 种、蒽醌类 1 种。

3.2 生物信息学研究

3.2.1 萆薢分清丸活性成分的筛选与靶点的预测

萆薢分清丸入血成分均通过 SwissADME 数据库 (<https://swissadme.ch/>) 筛选, 利用 SwissTarget Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 下载活性成分的靶点表格, 规定 $\text{probability} \geq 1$ 倍中位数为筛选条件, 合并去重后得到 545 个潜在作用靶点, 见图 2。

3.2.2 慢性肾衰靶点的筛选

在 GenenCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中, 以 “chronic renal failure” 为关键词, 设置 $\text{relevance score} \geq 30$ 为筛选条件。将关键词输入到 OMIM、TTD 数据库。在 DisGeNET 数据库中, 筛选出 score 值 ≥ 2 倍中位数的靶点。最后将 4 个数据库得到的靶点求并集, 删去重复项后共得到 2 110 个慢性肾衰候选靶点。

3.2.3 核心靶点的筛选及 PPI 网络图的构建

将萆薢分清丸活性成分对应的 545 个靶点与慢性肾衰相关的 2 110 个疾病靶点取交集, 得到 215 个萆薢分清丸防治慢性肾衰的潜在靶点, 见图 3。将获得的 215 个核心靶点上传至 STRING 数据库, 蛋白种属为 “homo sapiens”, 置信度为 0.4, 删除游离靶点, 得到 PPI 网络的 TSV 文件, 将其导入 Cytoscape 3.7.2 构建 PPI 网络, 见图 4, 该网络共有 218 个节点, 3 957 条边。根据 degree 值筛选前 5 个核心靶点是蛋白激酶 B1 (Akt1)、白蛋白 (ALB)、表皮生长因子受体 (EGFR)、信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC), 见表 2、图 5。这些靶点可能在萆薢分清丸治疗慢性肾衰中产生重要的调节功能。

3.2.4 生物过程和通路富集分析

通过 Metascape 数据库对 215 个靶点进行 KEGG 富集分析, 共获得 109 条结果 ($P < 0.01$), 根据 P 值排序结果, 筛选

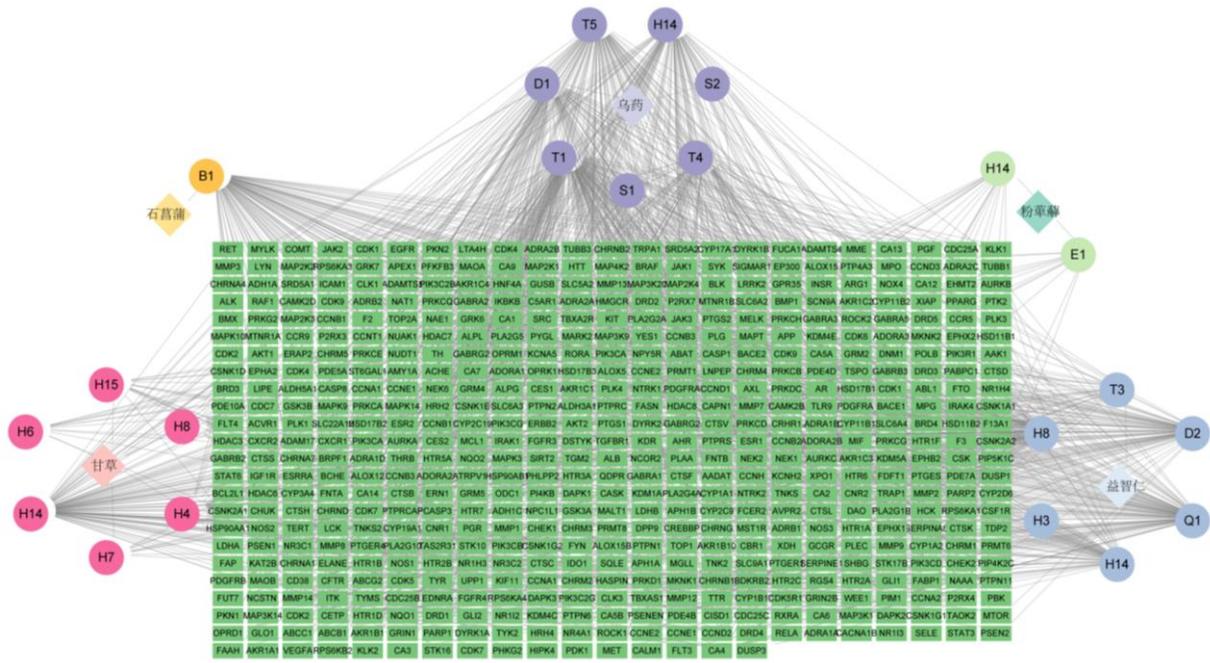


图 2 药物成分基于 SwissTargetPrediction 预测的 545 个基因靶点

Fig. 2 545 Gene targets predicted for the drug component based on SwissTargetPrediction



图 3 药物靶点与疾病靶点 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of drug targets and disease targets

表 2 根据 degree 值筛选前 10 个核心靶点

Table 2 Top 10 core targets selected based on degree values

排序	靶点	degree 值
1	Akt1	150
2	ALB	141
3	EGFR	130
4	STAT3	125
5	SRC	122
6	CASP3	119
7	ESR1	113
8	HSP90AA1	110
9	MAPK3	108
10	MMP9	104

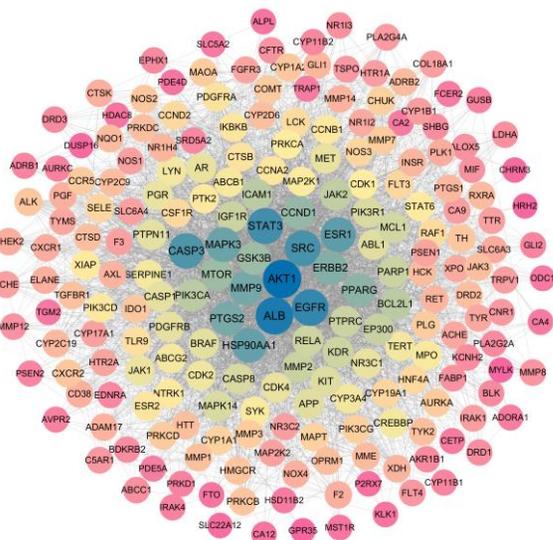


图 4 萆薢分清丸治疗慢性肾衰竭的 PPI 网络

Fig. 4 PPI Network for the treatment of chronic renal failure with Bixie Fenqing Pills

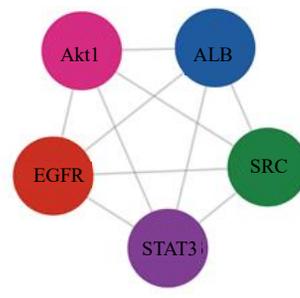


图 5 PPI 网络中前 5 个核心靶点

Fig. 5 Top five core targets in the PPI network

出 10 条排名最高的富集通路, 见图 6, 包括癌症通路、丝裂原激活蛋白激酶信号通路、叉头框转录因子 O 亚族信号 (FoxO) 信号传导通路等。GO 功能

富集分析,主要包括生物过程(BP)、细胞组成(CC)与分子功能(MF),共获得 494 个 GO 富集分析结果($P < 0.01$),根据 P 值排序后,分别选取前 10 个 BP、CC、MF 组成 GO 富集分析柱形图,见图 6。BP 分析发现萆薢分清丸防治慢性肾衰的靶点富集

在蛋白质磷酸化调控、激素水平调节、氨基酸修饰等;CC 分析发现其富集在脂筏、膜侧、细胞质核周区、受体复合物等;MF 分析发现其富集在跨膜受体蛋白酪氨酸激酶结合、蛋白激酶结合以及血红素结合等。

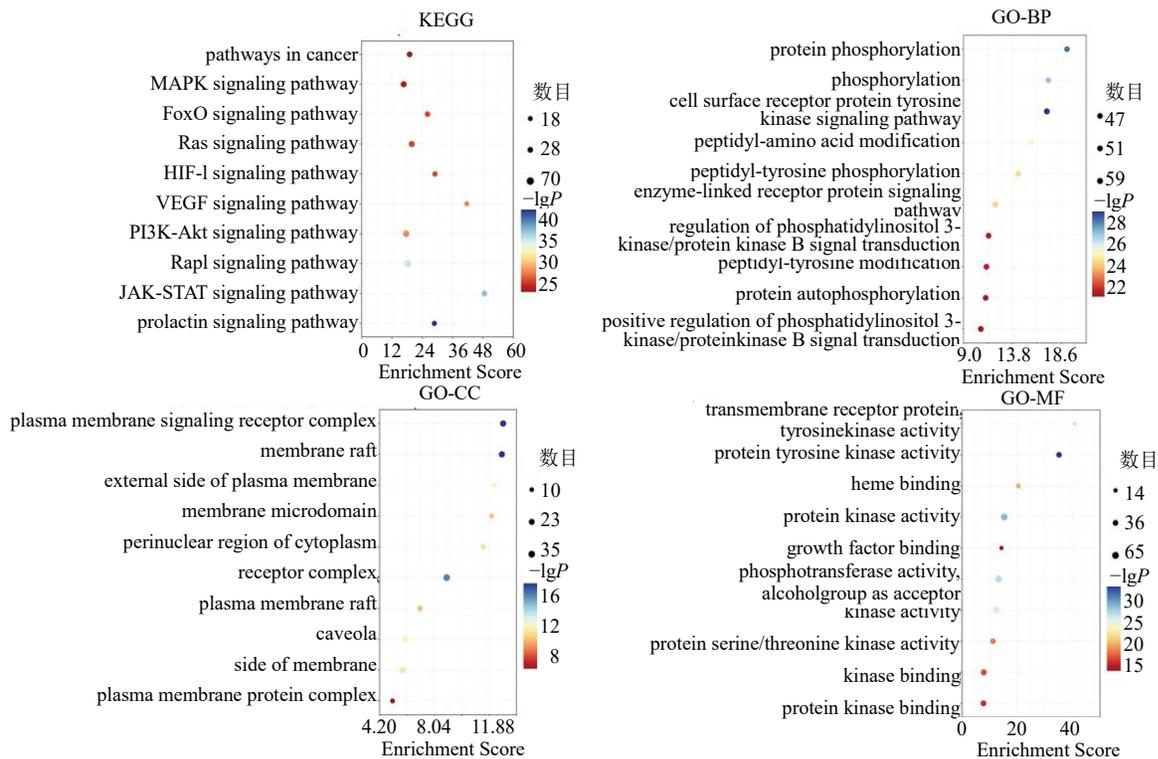


图 6 KEGG 通路和 GO 功能富集分析

Fig. 6 KEGG pathway and GO function enrichment analysis

3.2.5 “活性成分 - 核心靶点 - 通路”网络图的构建 将萆薢分清丸根据 degree 值筛选的前 5 个核心靶点、靶点相对应的成分和前 10 条信号通路导入 ChiPlot, 绘制“活性成分 - 核心靶点 - 通路”图, 见图 7。其中原儿茶酸、山柰酚、白杨素、大黄素、乌药醇、乔松素、细辛醚对应的靶点多, 提示这些成分可能是萆薢分清丸治疗慢性肾功能衰竭的主要活性成分。

3.3 分子对接验证

以前 5 个核心靶点 Akt1、ALB、EGFR、STAT3、SRC 为受体进行结合能力预测, 以山柰酚、大黄素、乔松素、白杨素、乌药醇、新乌药内酯、异香兰素、原儿茶酸、原儿茶醛、细辛醚为配体, 在 CB-Dock2 网站进行分子对接, 见图 8。一般认为结合能小于 -5.0 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$) 有较好的结合活性, 本实验分子对接的得分均小于 -5.0 kcal/mol , 见表 3。

3.4 分子动力学模拟分析

结合分子对接结果筛选结合能小于 -8.0 kJ/mol 的 4 对靶点与成分 (STAT3 与山柰酚、ALB 与大黄素、ALB 与乔松素、EGFR 与大黄素) 进行分子动力学模拟分析。RMSD 偏差越小, 构象稳定性越好。利用 RMSD 对仿真系统的平衡性进行评估, 如图 9 所示, ALB - 大黄素复合物体系在 95 ns 后达到平衡, 最终在 3.1 \AA ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$) 上下波动。EGFR - 大黄素复合物体系在 95 ns 后达到平衡, 最终在 3.6 \AA 上下波动。ALB - 乔松素复合物体系在 20~95 ns 稳定波动, 在 95 ns 后呈现上下波动, 最终在 2.8 \AA 以下波动。STAT3 - 山柰酚复合物体系在 20~85 ns 稳定波动, 在 85 ns 后呈现上下波动, 最终在 1.9 \AA 以下波动。因此, 大黄素、乔松素和山柰酚小分子分别与 ALB、EGFR、STAT3 靶蛋白结合时表现出较高稳定性。ALB - 大黄素、EGFR - 大黄素、ALB - 乔松素、STAT3 - 山柰酚复合物的回旋半径

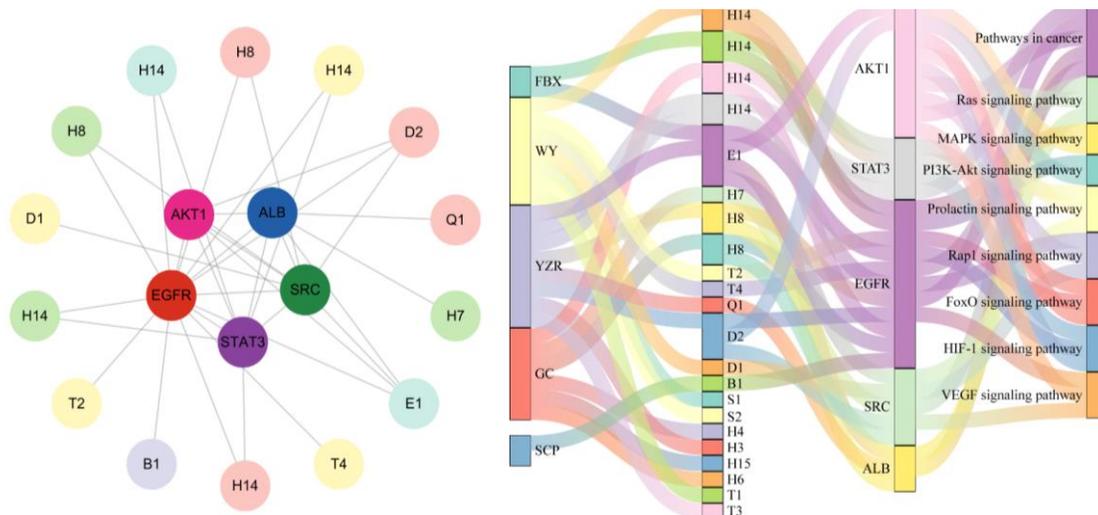


图 7 “药物-成分-靶点-通路”桑吉图
Fig. 7 “Drug-component-target-pathway” sankey diagram

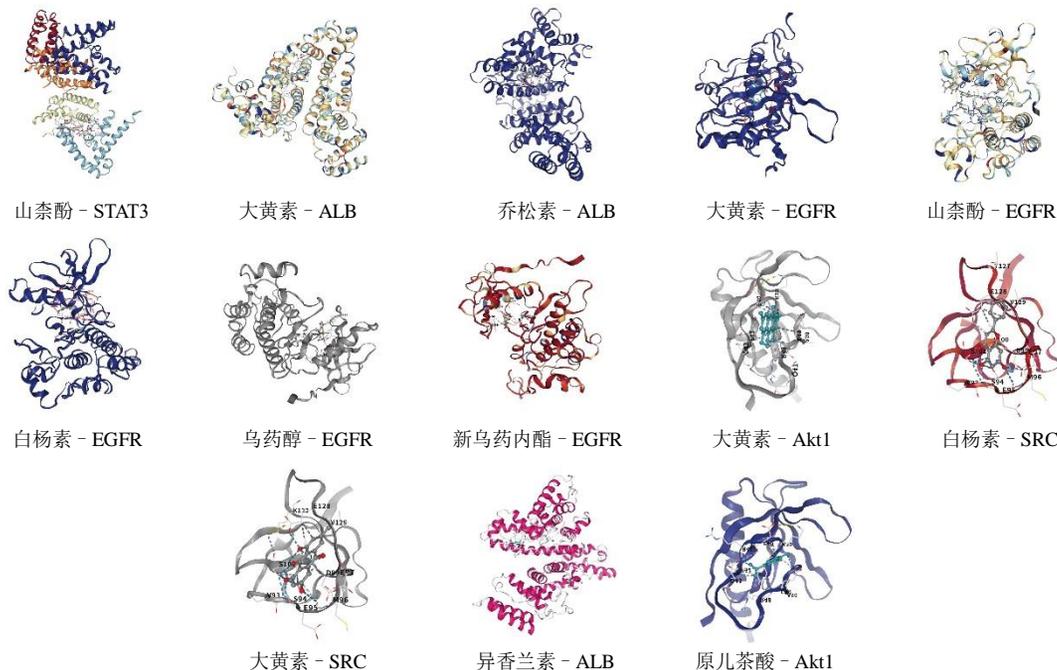


图 8 药物成分与核心靶点分子对接图
Fig. 8 Molecular docking diagram of drug components with core target molecules

在运动过程中波动稳定如图 9 所示，小分子 - 靶蛋白复合物在运动过程中未发生明显的扩张与收缩。SASA 评估蛋白质表面积，模拟计算靶蛋白和小分子之间的溶剂可及表面积，图 9 结果显示，ALB - 大黄素、EGFR - 大黄素、ALB - 乔松素和 STAT3 - 山柰酚受体与配体结合后，复合物的 SASA 无明显变化，配体的结合对蛋白结构影响较小。氢键在配体与蛋白质的结合中起着重要的作用。动力学过程

中的小分子与靶蛋白之间的氢键数量（图 9），ALB - 大黄素小分子与靶蛋白之间的氢键数量为 0~5 个，在大多数情况下，复合物大约有 3 个氢键。EGFR - 大黄素小分子与靶蛋白之间的氢键数量为 0~4 个，在大多数情况下，复合物约有 2 个氢键。ALB - 乔松素小分子与靶蛋白之间的氢键数量为 0~4 个，在多数情况下，复合物约有 1 个氢键。STAT3 - 山柰酚小分子与靶蛋白之间的氢键数量为

表 3 药物成分与核心靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results for drug components and core targets

受体	配体	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
STAT3	山柰酚	-8.6
ALB	大黄素	-8.6
ALB	乔松素	-8.4
EGFR	大黄素	-8.1
EGFR	山柰酚	-7.7
EGFR	白杨素	-7.6
EGFR	乌药醇	-7.6
EGFR	新乌药内酯	-7.2
Akt1	大黄素	-6.6
SRC	白杨素	-6.4
SRC	大黄素	-6.3
ALB	异香兰素	-5.6
Akt1	原儿茶酸	-5.4

0~9 个, 在大多数情况下, 复合物约有 6 个氢键。该配体与靶蛋白具有良好的氢键相互作用。

RMSF 显示蛋白质中氨基酸残基的柔性大小。如图 10 所示, ALB - 大黄素、EGFR - 大黄素、ALB - 乔松素复合物的 RMSF 值相对较低(大多在 3 Å 以下), STAT3 - 山柰酚复合物的 RMSF 值相对较低(大多在 2 Å 以下), 因此其灵活性较低, 稳定性较高。

自由能景观图 (free energy landscape, FEL) 展示在蛋白质与配体分子动力学模拟过程中, 基于 RMSD 和 Rg 计算得出的自由能分布。图中使用颜色梯度来表示自由能的高低, 从红色(高能量)到蓝色(低能量)逐渐递减。模拟的动态过程如图 11 所示。

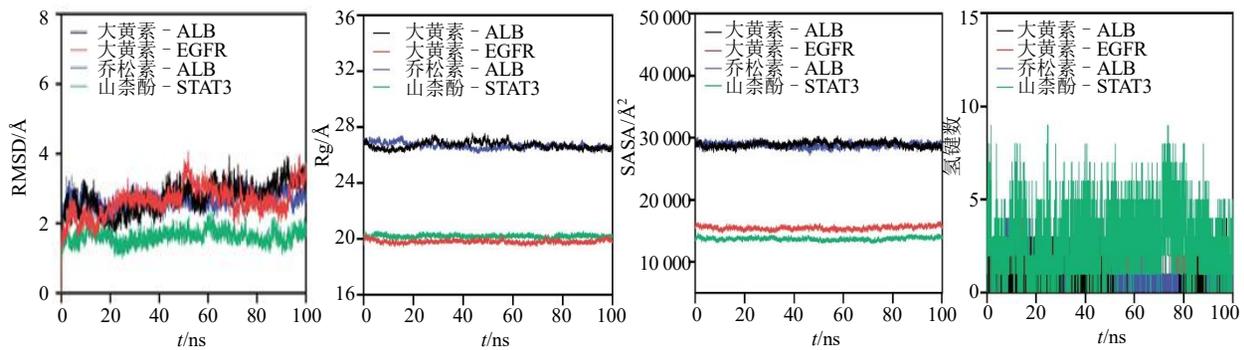


图 9 药物成分与核心靶点 RMSD、Rg、SASA 和 Hbond 图

Fig. 9 RMSD, Rg, SASA and Hbond diagrams for drug components and core targets

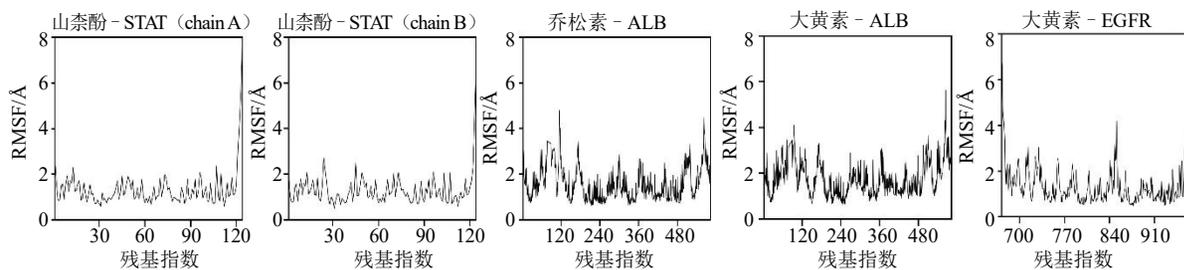


图 10 药物成分与核心靶点 RMSF 图

Fig. 10 RMSF plot of drug components and core targets

4 讨论

慢性肾衰作为一种进行性、不可逆的肾脏功能损害性疾病, 其发病机制复杂, 临床治疗手段有限。中医药在延缓慢性肾衰进展方面展现出独特优势。萆薢分清丸作为温肾健脾、分清泌浊的中成药, 在临床治疗泌尿系统疾病中疗效确切。本研究整合 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术、网络药理学、分子对接及分子动力学模拟, 构建“成分-靶点-通路”

多维网络, 系统揭示萆薢分清丸多成分、多靶点、多通路协同治疗慢性肾衰的潜在作用机制。本研究首先通过体内外成分分析, 从萆薢分清丸中鉴定出 36 个化学成分, 并在给药大鼠血清中发现 18 个入血成分, 这些入血成分可能是其直接或间接发挥药理作用的药效物质基础。网络药理学核心分析筛选出的 215 个交集靶点, 构成萆薢分清丸防治慢性肾衰的潜在作用网络。PPI 网络分析表明, Akt1、ALB、

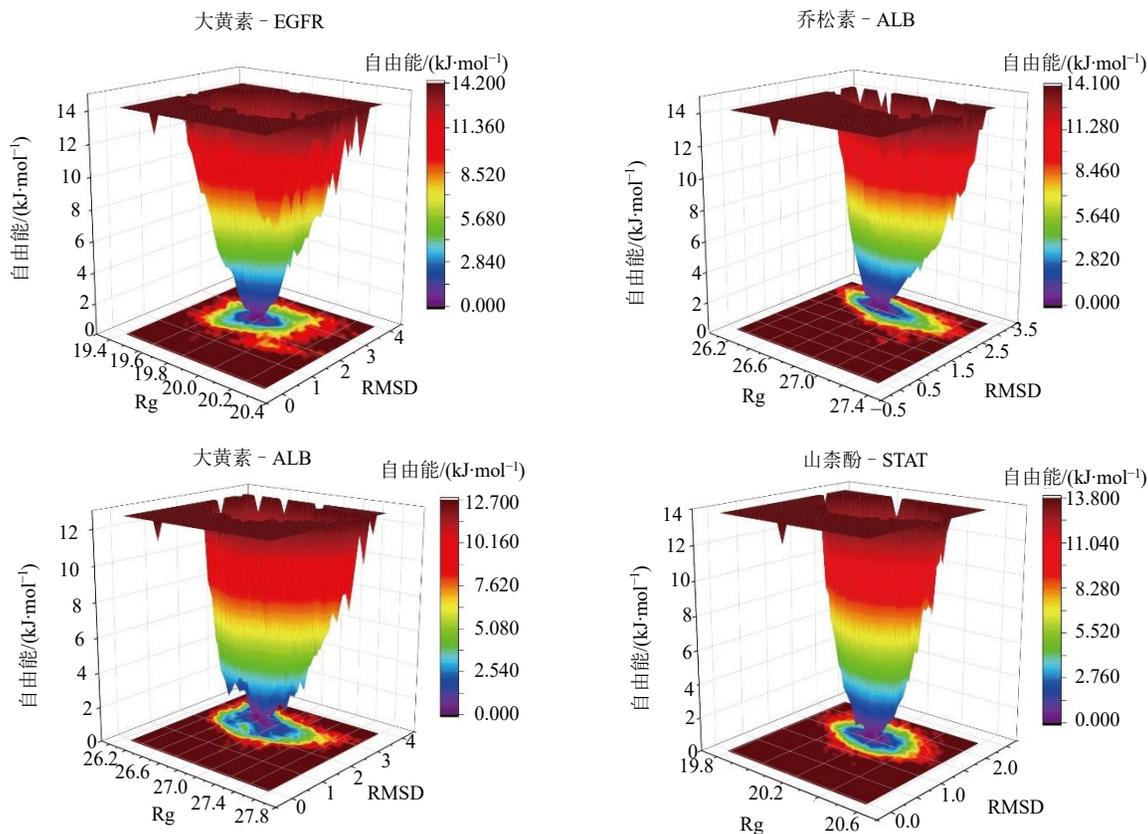


图 11 药物成分与核心靶点吉布斯自由能图

Fig. 11 Gibbs free energy diagram of drug components and core targets

EGFR、STAT3、SRC 等靶点处于网络的核心位置，在药效发挥中可能起关键调控作用。Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路的核心节点，广泛参与细胞存活、增殖与代谢调控，同时也是介导慢性肾衰竭炎症损伤与肾纤维化的关键靶点^[9-10]。STAT3 作为 JAK-STAT 通路的关键转录因子，其异常活化与慢性肾衰竭肾脏炎症、肾间质纤维化的病理进程高度相关^[11]。EGFR 和 SRC 作为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的上游调控因子，可共同介导细胞生长、分化与炎症信号传递，参与慢性肾衰竭的病理发展^[12]。ALB 为血浆主要载体蛋白，能够结合药物活性成分、影响其体内分布与代谢以间接调控药效，同时其表达水平也与慢性肾衰竭肾脏损伤及机体营养状态密切相关，参与疾病的间接调控^[13-16]。

KEGG 通路富集分析结果进一步揭示萆薢分清丸作用机制的系统性。富集到的 MAPK 信号通路、FoxO 通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路及血管内皮生长因子信号通路 (VEGF) 等信号通路，均是调

控慢性肾衰核心病理环节，即炎症反应^[17]、氧化应激^[18]、细胞凋亡^[19]及纤维化^[20]的关键通路。MAPK 通路的激活可促进肾脏成纤维细胞活化和炎症因子释放^[21]。FoxO 通路参与调节细胞自噬与抗氧化应激。HIF-1 通路在肾组织缺氧环境下被激活，可上调促纤维化因子表达^[22]。多条癌症通路被显著富集，反映慢性肾衰进程中存在的异常细胞增殖、凋亡抵抗等与癌症相似的细胞行为调控机制。萆薢分清丸通过干预这些共通的细胞信号转导过程，恢复肾脏细胞的稳态，从而延缓慢性肾衰进展。

分子对接结果为“成分-靶点”互作预测提供计算依据。对接结果显示，核心活性成分山柰酚、大黄素、乔松素等与生物信息学中对应的核心靶点 STAT3、ALB、EGFR 等各自结合，且结合构象稳定。其中，STAT3-山柰酚、ALB-大黄素、ALB-乔松素和 EGFR-大黄素这 4 组复合物结合能最低，结合紧密。而分子动力学模拟从动态角度验证这 4 组复合物的结合稳定性。在模拟过程中，各体系 RMSD、Rg 和 SASA 值均在合理范围内平稳波动，

表明复合物结构紧凑、构象稳定。氢键分析显示, STAT3 与山柰酚之间平均可形成 6 个氢键, 远高于其他组合, 这为山柰酚作为 STAT3 强效抑制剂的潜力提供结构生物学层面的支持。RMSF 分析进一步证实, 配体的结合并未引起蛋白骨架的剧烈波动, 复合物整体柔性较低, 结构刚性高, 结合模式可靠。本研究的结果与中医药理论高度契合。慢性肾衰病机以“脾肾亏虚”为本, “湿浊血瘀”为标。本研究筛选出的关键成分, 如甘草、葶藶中的山柰酚具有活血化瘀效果^[23], 粉葶藶中的大黄素能够泄浊解毒^[24], 乌药、石菖蒲中的乔松素^[25]、细辛醚^[26]可以温肾化湿行气, 符合“健脾补肾、活血化瘀、解毒化湿”。从现代科学层面阐释葶藶分清丸君臣佐使配伍, 通过多靶点、多通路协同作用, 共同奏效的科学内涵。

甘草酸是《中国药典》2025 年版一部记载葶藶分清丸的含量测定指标成分^[5], 陈格等^[27]通过高效液相色谱法测定葶藶分清丸中甘草酸的含量来评价药物质量。但中药复方的疗效依赖多成分协同, 单一成分难以全面反映其药效物质基础, 更无法关联疗效, 是当前传统中药复方质量标准的普遍局限性。本研究通过网络药理学和分子对接筛选得到的山柰酚、大黄素、乔松素等成分作为核心药效成分, 可作为葶藶分清丸的质量标志物, 为葶藶分清丸质量控制提供思路。

综上所述, 本研究阐明葶藶分清丸可能通过山柰酚、大黄素、乔松素等关键药效成分, 作用于 Akt1、STAT3、EGFR 等核心靶点, 调控 MAPK、FoxO、HIF-1 等信号通路, 在干预炎症、氧化应激、纤维化等慢性肾衰关键病理环节中发挥综合治疗作用, 揭示葶藶分清丸“多成分-多靶点-多通路”的协同作用机制。本研究不仅为葶藶分清丸的药效物质基础提供理论依据, 也为传统中药复方从“化学质控”向“药效导向质控”的标准提升提供实验支撑与科学范例。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郑雪红, 许正锦. 慢性肾衰的中医药治疗进展 [J]. 中医研究, 2024, 37(7): 91-96.
- [2] 梁景秀, 田大虎. 中医药在慢性肾衰竭治疗中的应用及研究进展 [J]. 中国民间疗法, 2025, 33(4): 100-103.
- [3] 陈金娜, 谢丽萍, 黄源铭, 等. 中医药治疗慢性肾衰的研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2024, 38(1): 81-83.

- [4] 王语鑫, 王柏森, 王圣治. 中医外治法治疗慢性肾衰竭的研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2025, 39(11): 24-27, 148-150.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 1638-1639.
- [6] 苏燃, 陈一镠, 易楚, 等. 整合数据挖掘、网络药理学、分子对接和分子动力学模拟探索延胡索用药规律与机制 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 5135-5150.
- [7] 张明昊, 杜婧雯, 张童, 等. 葶藶分清丸通过调控尿酸盐转运蛋白表达水平干预高尿酸血症大鼠的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(3): 1-8.
- [8] Mark P, Nilsson L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K [J]. *J Phys Chem A*, 2001, 105(43): 9954-9960.
- [9] 葛自豪, 张琳琪, 董朋涛. 中医药靶向调控 PI3K/AKT 信号通路治疗慢性肾衰竭研究进展 [J/OL]. 辽宁中医杂志 (2025-07-17) [2026-01-30]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250716.1812.041>.
- [10] 李雪, 张云龙, 宋子毅, 等. 中药通过 PI3K/Akt 信号通路干预肾间质纤维化的研究进展 [J]. 中国药房, 2024, 35(14): 1795-1800.
- [11] 王东, 王亿平, 余敏, 等. 清热化湿祛瘀法对慢性肾衰竭湿热证患者瘦素介导的 JAK/STAT 信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(9): 777-782.
- [12] 卢奇奇, 余超, 汪志平. p38MAPK 信号通路诱发糖尿病肾病的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(8): 2011-2016.
- [13] 吴芊葭, 程锦国, 林崇泽, 等. 肾病1号方对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化及 FAK-Ras-MAPK 通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2025, 42(7): 1744-1749.
- [14] 吴焯. 慢性肾功能衰竭血液透析患者血浆白蛋白水平与营养状况的研究 [J]. 蛇志, 2025, 37(2): 220-224.
- [15] 杨梅, 郭宗琳, 任婷婷. 血清 C 反应蛋白与白蛋白比值、白细胞介素-22、肝素结合蛋白对慢性肾衰竭血液透析患者并发感染的早期预测价值 [J]. 中国血液净化, 2024, 23(12): 915-919.
- [16] 杨培, 周茜茜, 聂雪平. 血清 Cys-C、尿微量白蛋白/肌酐比值水平与儿童慢性肾衰竭患儿血液透析治疗预后的关系 [J]. 基层医学论坛, 2023, 27(17): 39-41.
- [17] 吴振华, 孙乔, 王欣冉, 等. 基于 mTOR/HIF-1 α 信号通路探讨补肾活血泄浊方对慢性肾衰竭大鼠糖代谢及炎症反应的影响 [J]. 中成药, 2025, 47(5): 1629-1634.
- [18] 章甜, 倪晨, 李悦达. 肾衰宁胶囊联合复方 α 酮酸片对老年慢性肾衰竭患者疗效及对氧化应激和凝血功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(15): 3654-3657.
- [19] 周亮, 徐亦曾, 王琛. 肾衰II号方抑制线粒体动力学介导的凋亡改善慢性肾衰竭大鼠肾小管损伤的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2025, 20(6): 1138-1144.
- [20] 吕森浩, 李怀玉, 涂欣欣, 等. 肾衰泄浊汤改善肾纤维

- 化的体内外实验研究 [J]. 世界中医药, 2024, 19(23): 3612-3618.
- [21] 王世卫, 马民凯, 韩佳, 等. 加味真武汤对慢性肾衰竭大鼠 ASK1/MAPK/NF- κ B 信号通路及肾纤维化的影响 [J]. 四川中医, 2023, 41(4): 38-42.
- [22] 孙秀丽, 冯国微, 侯国存, 等. 慢性肾衰竭大鼠 HIF-1 表达对贫血及微炎症状态的影响 [J]. 中国医师杂志, 2016, 18(10): 5.
- [23] 王超, 魏翠婷, 李润, 等. 山柰酚通过改善肾小管上皮细胞的氧化应激与炎症反应减轻 1 型糖尿病小鼠肾损伤 [J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(3): 261-269.
- [24] 李瑞杰, 项瑞君, 寻明亮, 等. 大黄素抑制 HK-2 细胞凋亡改善大鼠肾草酸钙结晶的作用机制 [J]. 医学研究与战创伤救治, 2025, 38(8): 821-827.
- [25] 张来军, 郑乃纳, 胡仕坤, 等. 乔松素调节 STING/TBK1/IRF3 信号通路对糖尿病心肌病大鼠心肌炎症的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2025, 36(2): 175-181.
- [26] 邱路雅, 杨刚, 金琼, 等. 石菖蒲根茎化学成分及抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4617-4624.
- [27] 陈格, 候斌, 叶放. 高效液相色谱法测定萆薢分清丸中甘草酸的含量 [J]. 国际医药卫生导报, 2005(17): 142-143.

[责任编辑 高源]