

【实验研究】

基于LC-MS关联网络药理学的当归鸡血藤汤治疗再生障碍性贫血的质量标志物(Q-Marker)预测分析

许桑¹, 唐志安¹, 胡志强¹, 马铁梁¹, 吴霞², 郭明鑫^{1*}

1. 扬州大学医学院 宜兴临床学院, 江苏 宜兴 214200

2. 广东药科大学 新药研发中心, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析当归鸡血藤汤(DJD)的化学成分, 通过网络药理学探讨DJD治疗再生障碍性贫血(AA)的作用机制, 并预测其潜在的质量标志物(Q-Marker)。**方法** 通过LC-MS分析DJD化学成分, 利用Swiss Target Prediction预测化学成分对应靶点, 再通过GeneCards、OMIM、PharmGKB和TTD等数据库查询AA靶点, 利用Cytoscape 3.9.1绘制“成分-靶点”及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。基于R语言与微生信得到基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析可视化图, 最后使用分子对接对网络药理学预测结果进行初步验证。**结果** 经LC-MS鉴定出DJD中38个化合物, 通过Swiss Target Prediction预测得到536个成分靶点, 药物与疾病共有靶点196个, 运用Cytoscape 3.9.1筛选出主要活性成分为白芍苷R₁、芍药内酯苷、striatissporolide A、紫柳花素、黄芩素、高车前素、柚皮素、染料木苷、东莨菪内酯和隐丹参酮; 经PPI分析得出前10名核心蛋白分别为磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、蛋白激酶B(Akt1)、白细胞介素-6(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)、Caspase-3、表皮生长因子受体(EGFR)、信号传导及转录激活子3(STAT3)、热休克蛋白90A(HSP90AA1)、非受体酪氨酸激酶(SRC)和B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(BCL2); 经GO富集分析得2718条目, KEGG富集分析得到包含磷脂酰肌醇-3/蛋白激酶B(PI3K/Akt)等161条通路; 分子对接结果显示关键靶点与活性成分结合效能较低, 具较好的亲和力。**结论** 基于DJD化学成分识别, 结合网络药理学与分子对接验证, 预测隐丹参酮、白芍苷R₁、染料木苷及芍药内酯苷可以作为DJD治疗AA的候选Q-Markers。

关键词: 当归鸡血藤汤; 再生障碍性贫血; 液相色谱-质谱联用; 网络药理学; 质量标志物; 隐丹参酮; 白芍苷R₁; 染料木苷; 芍药内酯苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2024)08-1706-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.006

Prediction analysis of quality markers (Q-Marker) of Danggui Jixueteng Decoction in treating aplastic anemia based on LC-MS combined with network pharmacology

XU Sang¹, TANG Zhi'an¹, HU Zhiqiang¹, MA Tieliang¹, WU Xia², GUO Mingxin¹

1. The Affiliated Yixing Clinical School of Medical School of Yangzhou University, Yixing 214200, China

2. New Drug Research and Development Center of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents of Danggui Jixueteng decoction (DJD) based on LC-MS, and explore the mechanism of DJD in treating aplastic anemia (AA) through network pharmacology, and identify its potential quality markers (Q-Marker). **Methods** The chemical components of DJD were analyzed by LC-MS, and the corresponding targets were predicted by Swiss Target Prediction. Then AA targets were obtained by GeneCards, OMIM, PharmGKB and TTD database, and the "component-target" and protein-protein interaction (PPI) maps were drawn by Cytoscape 3.9.1. The visualization of GO and KEGG enrichment analysis was obtained by R language and micro-information. Finally, the content of network pharmacology prediction was preliminarily verified by molecular docking. **Results** 38 compounds were identified by LC-MS, 536 targets were predicted by Swiss Target Prediction, and there were 196 common targets. The main active compounds were identified by Cytoscape3.9.1 as

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774314); 无锡市中医药管理局项目(ZYYB29)

第一作者: 许桑, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: staff1855@yxph.com

*通信作者: 郭明鑫, 男, 硕士, 研究方向为中药药效物质研究。E-mail: guomingxin94@126.com

paeoniflorin R₁, albiflorin, striatisporolide A, butein, baicalein, hispidulin, naringenin, genistin, scopolitin and cryptotanshinone; By PPI analysis, the top ten core proteins were glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), protein kinase B (AKT1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), Caspase-3, epidermal growth factor receptor (EGFR), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), heat shock protein 90A (HSP90AA1), non-receptor tyrosine kinase (SRC protein, SRC) and B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (BCL-2); 2 718 items were obtained by GO enrichment analysis, and 161 pathways such as PI3K/Akt were obtained by KEGG enrichment analysis. Molecular docking results showed that the binding efficiency of key targets and active components is low and they have good affinity. **Conclusion** Based on the identification of DJD chemical constituents, combined with network pharmacology and molecular docking verification, it was predicted that cryptotanshinone, paeoniflorin R₁, genistin and genistin can be used as Q-Marker for DJD to treat AA.

Key words: Danggui Jixueteng decoction; aplastic anemia; liquid chromatography-mass spectrometry; network pharmacology; molecular docking; quality markers (Q-Marker); cryptotanshinone; paeoniflorin R₁; genistin; genistin

再生障碍性贫血(AA)是一组由多种原因引起的骨髓造血衰竭综合征,其特征是骨髓造血细胞增殖减少和外周血白细胞减少,临床以贫血、出血和感染为主要表现^[1]。再生障碍性疾病的确切病因尚不清楚,可能与化学药物、辐射、病毒感染和遗传因素有关。目前,治疗AA的主要方法是造血干细胞移植(HSCT)和免疫抑制治疗。由于患者的年龄、可供移植的供体、移植抗宿主病的风险等因素,限制了AA患者HSCT的选择和应用。此外,长期使用免疫抑制剂会伴随肾毒性和神经毒性等不良反应^[2]。中药通过多途径、多靶点作用对机体的造血功能进行调控,可有效避免这些不良反应的发生。

当归鸡血藤汤(Danggui Jixueteng Decoction, DJD)记载于《中医伤科学》中,由当归、熟地黄、鸡血藤、白芍、龙眼肉及丹参组成,具有补血养血、活血通络等功效。对各种关节痛(包括肌肉关节痛、足跟痛、腰腿痛)以及肿瘤放化疗引起的白细胞和血小板减少症有一定的治疗作用^[3]。本课题组前期药效学研究发现,DJD能够明显促进AA模型大鼠造血功能的修复,可减少AA大鼠的骨髓病理损伤^[4]。但具体哪些是有效成分,以及它们发挥药理作用的机制还不清楚。

由于大多数成分缺乏紫外吸收,液相色谱-紫外检测(LC-UV)方法在实践中受到限制。液相色谱-质谱(LC-MS)技术作为一种先进的分析技术,具有灵敏度高、分析时间短等优点,在一定程度上避免了分离成分的繁琐和耗时,已成为中药提取物分析的理想工具^[5]。中药复方的质量主要取决于所含的化学成分,由于其成分的复杂性,目前中药复方的质量标准尚不完善。网络药理学是全面了解中药复方治疗疾病机制的有效工具。该技术可以为化学成分与相应的生物靶标之间的联系提供桥梁,并

可用于质量标志物(Q-Marker)的预测^[6]。在本研究中,首先建立LC-MS方法分析DJD的化学成分,然后结合网络药理学与分子对接方法,初步预测DJD治疗AA的候选Q-Marker,以期为其临床应用及进一步开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

UltiMate 3000RS型液相色谱仪、Q-Exactive高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);旋转蒸发器(日本EYELA公司);HH-4数显恒温水浴锅(常熟澳华仪器有限公司);BP210D分析天平(万分之一,德国Sartorius公司)。

1.2 材料

当归(产地甘肃,批号221103461)、鸡血藤(产地广西,批号221103301)、熟地黄(产地焦作,批号220700209)、白芍(产地亳州,批号221000289)、丹参(产地江苏,批号21050061)、龙眼肉(产地广西,批号221101781);药材经宜兴市人民医院徐超副主任中药师鉴定,分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根炮制加工品、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、无患子科植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的假种皮。甲酸(质谱级, Aladdin); 甲醇(质谱级, Thermo); 其他试剂均为分析纯; 水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 DJD样品制备

根据《中医伤科学》,称取当归15 g、鸡血藤15 g、熟地黄15 g、丹参9 g、白芍9 g、龙眼肉6 g,用8倍量的蒸馏水浸泡1 h后,加热至沸腾后再煎煮30 min,滤过。用6倍量的蒸馏水继续煎煮滤渣30 min,滤过。

合并两次滤液,加入到旋转蒸发仪中,减压浓缩得到供试药液。

1.4 液相与质谱条件

色谱条件:色谱柱为AQ-C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为0.1%甲酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~1 min, 2% B; 1~5 min, 2%~20% B; 5~10 min, 20%~45% B; 10~15 min, 45%~75% B; 15~20 min, 75%~95% B; 20~27 min, 95% B; 27~28 min, 95%~5% B; 28~30 min, 5% B);体积流量为0.3 mL·min⁻¹;柱温为35℃;进样量为5 μL。

质谱条件:ESI源,正负离子切换扫描采集。MS条件:采集范围 m/z 100~1 500;温度300℃;电喷雾电压(Spray Voltage)3.2 kV;碰撞能(CE)30、40、60 V;分辨率70 000(full mass);17 500(DD-MS²)。

1.5 化合物鉴别策略

通过查找DJD方中的6味中药相关文献,结合Chemical Book和ChemSpider等数据库建立化学成分信息库。根据所建立的方法在正、负离子模式下进行检测,采集的高分辨液质数据通过CD 3.3(Compound Discoverer 3.3, Thermo Fisher)完成数据初步整理,根据保留时间、质谱碎裂规律及特征碎片归属进行分析,确定各色谱峰对应的目标化合物。

1.6 DJD治疗AA的网络药理学预测

1.6.1 DJD化学成分靶点及疾病靶点筛选 基于LC-MS成分分析的结果,将鉴定出的化合物分别输入Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和TCMSP数据库检索相关靶点,汇总、删除重复靶点后得到化学成分对应的靶点集合。以“aplastic anemia”为关键词,在人类基因数据库(GeneCards, <https://genealacart.geneCards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)、药物遗传学与药物基因组学知识库(PharmGKB, <https://www.pharmgkb.org/>)及药物靶标数据库(TTD, <http://db.idrblab.net/ttd/>)进行检索,获取AA相关靶基因。合并各数据库检索出的靶基因,去除重复与假阳性靶基因,运用UniProt数据库对靶基因进行校正,获取候选靶基因。应用Cytoscape 3.9.1中构建“成分-疾病-靶点”网络并进行拓扑分析,度值排名前10位得分成分确定为DJD治疗AA的关键活性成分。

1.6.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 运用String数据库(<https://string-db.org/>)探究DJD治

疗AA的PPI网络。限定物种为人(Homo Sapiens),构建PPI网络关系图。运用Cytoscape 3.9.1软件中的CytoNCA插件对String数据库生成的PPI条目进行网络拓扑分析,以度中心性大于该组中位数,介数中心性和紧密中心性大于该组平均值为指标,筛选出网络中关键节点,即为DJD治疗AA的核心蛋白靶点。

1.6.3 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 基于DAVID(<https://David.Ncicrf.gov/>)数据库和R语言对获取的交集靶基因的细胞成分(CC)、分子功能(MF)、生物学过程(BP)以及KEGG信号通路进行富集分析,输出富集结果并绘制气泡图。

1.7 分子对接

运用Autodock Vina分子对接软件对关键活性成分与核心蛋白展开分子对接模拟,具体步骤如下:通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取活性成分的三维结构,通过RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取蛋白靶点三维结构,运用Autodock Vina分子对接软件对蛋白受体及活性成分结构进行预处理后展开分子对接模拟,计算对接结合能,并绘制对接热图。

2 结果

2.1 化学成分靶点与疾病靶点

根据“1.4”项条件进行检测,DJD样品正、负离子模式下的总离子流图见图1。根据保留时间、质谱碎裂规律及特征碎片归属进行分析,共分析鉴定38个化合物,见表1。

将鉴定到的化学成分查询其Smiles结构后导入Swiss Target Prediction预测靶点,并结合TCMSP数据库,汇总、去重得到536个靶点。以“aplastic anemia”为关键词,检索GeneCards、OMIM、PharmGKB和TTD数据库,经汇总与去重后获得

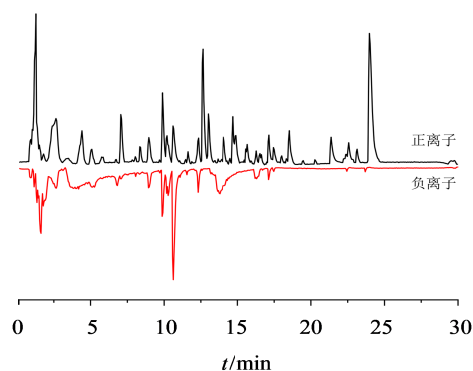


图1 DJD总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of DJD

表 1 DJD 化学成分鉴定结果
Tab 1 Identification of chemical constituents of DJD

序号	t_R / min	化合物	分子式	误差/ ($\times 10^{-6}$)	理论值 m/z	实验值 m/z	离子碎片	离子模式	来源
1	1.3	精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	4.00	175.119 5	175.118 8	158、130、116	[M+H] ⁺	丹参
2	4.4	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	2.98	268.104 6	268.103 8	136	[M+H] ⁺	未归属
3	5.3	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	3.55	169.013 7	169.013 1	125、107	[M-H] ⁻	白芍
4	5.3	焦性没食子酸	C ₆ H ₆ O ₃	6.40	125.023 9	125.023 1	—	[M-H] ⁻	白芍
5	6.8	京尼平苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	-0.54	373.113 5	373.113 7	211、167、123	[M-H] ⁻	当归
6	8.3	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	2.01	199.060 6	199.060 2	—	[M+H] ⁺	鸡血藤
7	9.6	striatisporolide A	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	2.44	213.112 7	213.112 2	—	[M+H] ⁺	未归属
8	9.9	芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	2.70	481.171 0	481.169 7	197	[M+H] ⁺	白芍
9	10.1	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2.21	271.060 6	271.060 0	244、137	[M+H] ⁺	鸡血藤
10	10.2	白芍苷 R ₁	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	1.66	481.171 0	481.170 2	197	[M+H] ⁺	白芍
11	10.5	车叶草苷酸	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	-0.81	491.140 1	491.140 5	445、293	[M+Ac] ⁻	鸡血藤
12	10.7	phlinoside A	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	-1.15	785.250 4	785.251 3	623、121	[M-H] ⁻	未归属
13	10.8	藜芦酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.73	183.065 7	183.065 2	—	[M+H] ⁺	未归属
14	11.0	根皮素	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	2.18	275.091 9	275.091 3	139	[M+H] ⁺	未归属
15	11.1	香兰素	C ₈ H ₈ O ₃	4.63	151.039 5	151.038 8	123	[M-H] ⁻	当归
16	11.1	4-甲基香豆素基- α -D-吡喃葡萄糖苷	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	2.36	339.108 0	339.107 2	279、261、183	[M+H] ⁺	未归属
17	11.3	东莨菪内酯	C ₁₀ H ₈ O ₄	1.55	193.050 1	193.049 8	165、137	[M+H] ⁺	当归
18	11.4	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	2.20	273.076 3	273.075 7	152、146	[M+H] ⁺	未归属
19	11.6	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	2.05	195.065 7	195.065 3	180、156	[M+H] ⁺	当归、地黄
20	12.1	染料木苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.39	433.113 5	433.112 9	270	[M+H] ⁺	鸡血藤
21	12.3	芍药内酯苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	2.70	481.171 0	481.169 7	197	[M+H] ⁺	白芍
22	12.5	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	-0.63	477.066 9	477.067 2	409、152	[M-H] ⁻	鸡血藤
23	12.7	紫柳花素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	3.30	273.076 3	273.075 4	255、171、137	[M+H] ⁺	鸡血藤
24	12.7	橘皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	0.00	609.181 9	609.181 9	447、423、285	[M-H] ⁻	未归属
25	13.1	黄豆黄苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	2.24	447.129 1	447.128 1	271	[M+H] ⁺	鸡血藤
26	13.2	杜鹃花酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	2.67	187.097 0	187.096 5	169、145	[M-H] ⁻	当归
27	13.2	刺芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	1.86	431.134 2	431.133 4	269、254、236	[M+H] ⁺	鸡血藤
28	13.4	伞形花内酯	C ₉ H ₆ O ₃	3.68	163.039 5	163.038 9	145、135、117	[M+H] ⁺	未归属
29	13.4	异丹叶大黄素	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	-0.78	257.081 4	257.081 6	211、137	[M-H] ⁻	鸡血藤
30	13.8	丹酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	-6.95	719.161 2	719.166 2	521	[M+H] ⁺	丹参
31	14.3	苯甲酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	1.71	585.197 2	585.196 2	277、249	[M+H] ⁺	白芍
32	15.7	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	2.97	269.081 4	269.080 6	256、236、213	[M+H] ⁺	鸡血藤
33	16.5	罗汉松脂素	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	3.06	359.149 5	359.148 4	341、267	[M+H] ⁺	鸡血藤
34	17.9	丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	2.03	295.133 4	295.132 8	277、233	[M+H] ⁺	丹参
35	18.1	积雪草酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	-0.82	487.342 3	487.342 7	335	[M-H] ⁻	未归属
36	18.5	隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	3.37	297.149 0	297.148 0	279、253	[M+H] ⁺	丹参
37	22.4	黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2.95	271.060 6	271.059 8	254、114	[M+H] ⁺	白芍
38	22.5	高车前素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-0.67	299.055 6	299.055 8	284	[M-H] ⁻	未归属

AA 相关靶基因 2 968 个。运用 UniProt 数据库对预测到的靶点信息格式进行标准化,将上述二者所得靶点用 Venny 2.1.0 获得交集基因共 196 个,见图 2。

运用 Cytoscape 3.9.1 构建 DJD 的“成分-靶点”网络关系图。如图 3 所示,该网络共包含 574 个节点和 1 820 条边,每条边则代表 DJD 中各中药所包

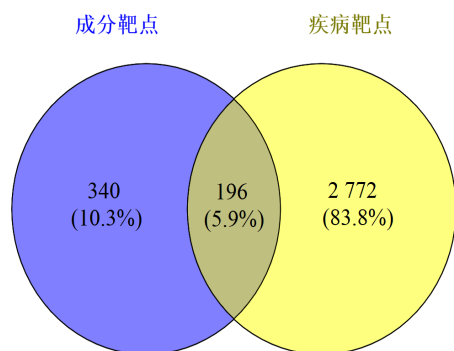


图2 DJD成分靶点与AA靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of DJD component target and AA target

含的活性成分与交集靶基因间的相互作用关系,同一活性成分存在于多个中药组分中且作用于多个交集靶基因,而一个交集靶基因也同时受多个活性成分影响。对活性成分进行度值排序,排名前10位的成分依次为: striatisporolide A (Com 7)、紫柳花素 (Com 23)、黄芩素 (Com 37)、高车前素 (Com 38)、柚皮素 (Com 18)、染料木苷 (Com 20)、白芍苷 R_1 (Com 10)、东莨菪内酯 (Com 17)、芍药内酯苷 (Com 21)、隐丹参酮 (Com 36)。因此,推测以上活性成分在治疗AA的过程中发挥了关键作用,可作为DJD的潜在Q-Marker。

2.2 PPI网络

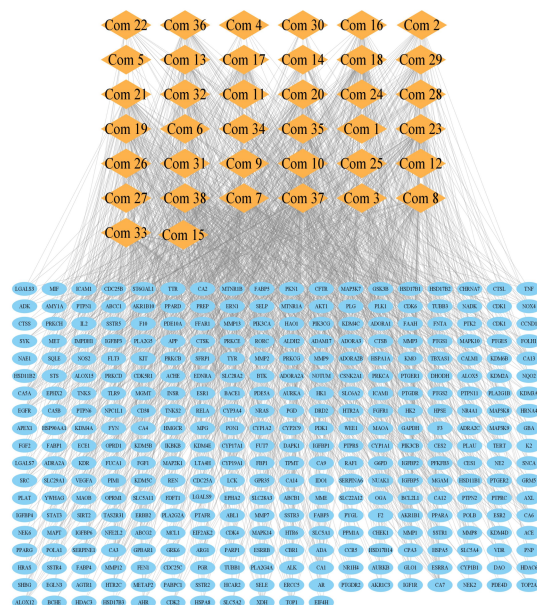
应用String数据库对196个交集靶基因所对应

的蛋白进行相互作用分析,构建PPI网络,见图4。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、蛋白激酶B(AKT1)、白细胞介素-6(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)、CASP3、表皮生长因子受体(EGFR)、信号传导子及转录激活子3(STAT3)、热休克蛋白90A(HSP90AA1)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(BCL2)分别与138、125、115、111、109、106、104、101、96和92个蛋白发生相互作用,为DJD潜在治疗AA的关键蛋白。

2.3 交集靶基因的GO功能和KEGG富集分析

对交集靶基因进行GO功能富集分析,共富集到2718个条目,其中包含CC条目78个,主要有胞液、细胞质、细胞核及浆膜等;BP条目2093个,主要有凋亡过程的负调控、信号转导、RNA聚合酶II启动子的转录正调控及蛋白质磷酸化等;MF条目129个,主要有蛋白质结合、ATP结合、相同蛋白质结合及蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等。各选取排名前10的富集条目,并根据每个项目的P值、Q值及富集在其上的基因数目绘制气泡图,见图5,图形越大代表靶点数量越多,反之亦然;颜色表示P值,P值越小颜色越偏向红色,P值越大则越偏向绿色。

基于DAVID数据库对交集靶基因进行KEGG通路富集分析,共富集到了161条通路($P < 0.05$)。选取排名前20的富集通路,根据每个通路的P值、Q



椭圆形蓝色圈代表相关靶点;橘黄色菱形代表DJD成分。

The oval blue circle represent related targets; orange diamonds represent components.

图3 DJD成分-靶点网络图

Fig. 3 Components-targets network diagram of DJD

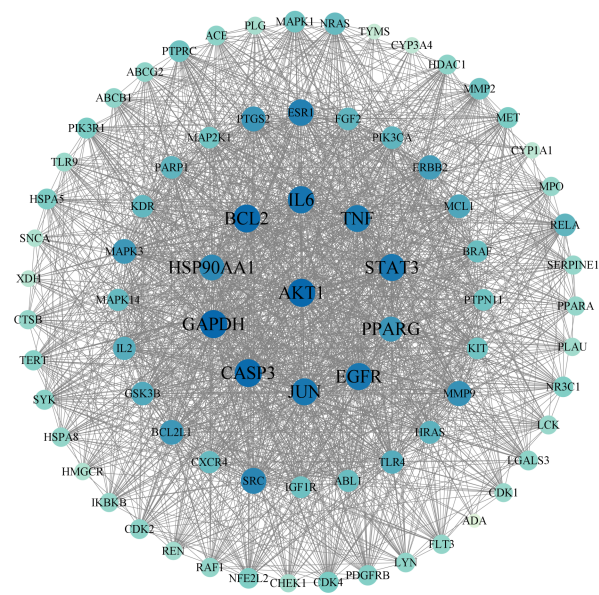


图4 交集靶点PPI网络

Fig. 4 PPI network of intersection target

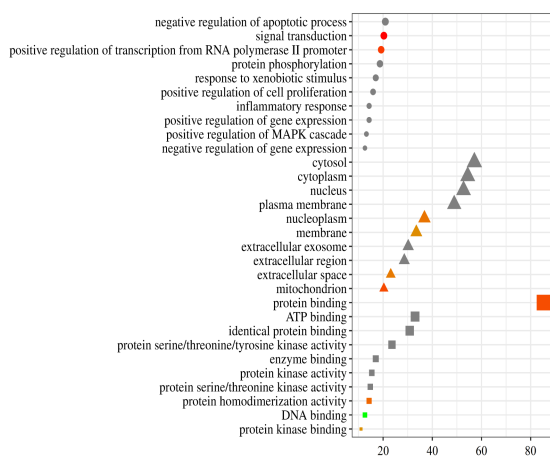


图5 GO富集分析气泡图

Fig. 5 GO functional enrichment analysis bubble diagram

值及富集在其上的基因数目绘气泡图,见图6。主要涉及到磷脂酰肌醇-3/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药性及Ras信号通路。左侧表示通路名称,颜色表示 P 值, P 值越小颜色越偏向红色, P 值越大则越偏向蓝色。

2.4 分子对接验证

运用 AutoDock Vina 将 striatisporolide A、紫柳花素、黄芩素、高车前素、柚皮素、染料木苷、白芍苷 R_1 、东莨菪内酯、芍药内酯苷、隐丹参酮分别与关键蛋白 GAPDH、AKT1、IL6、TNF、CASP3、EGFR、STAT3、HSP90AA1、SRC 及 BCL2 进行分子对接验证,以结合能为评价指标,结合能越小,则对接效果

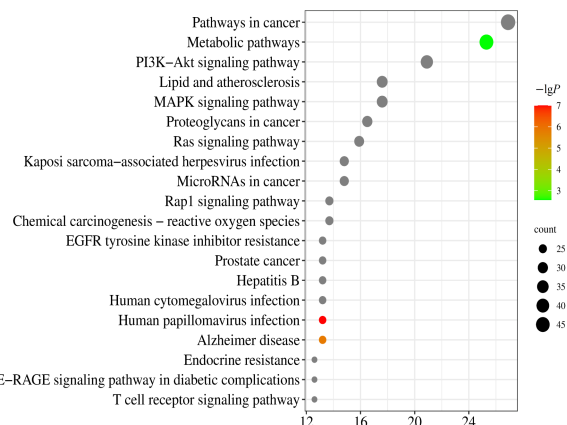


图6 KEGG通路富集分析气泡图

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis bubble diagram

越好。结果见图7,活性成分与不同核心蛋白间的结合能均小于 $-16.74 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其中,隐丹参酮、染料木苷、白芍苷 R_1 与 Akt1 和 SRC 蛋白对接结合能均小于 $-33.47 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 可作为候选 Q-markers,分子对接模拟见图8。由此证明,上述3个成分对 Akt 蛋白和 SRC 蛋白的干预作用在 AA 的治疗过程中至关重要。

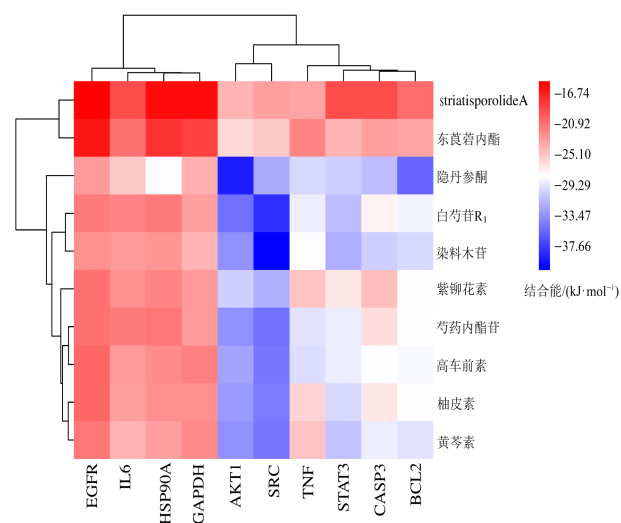


图7 DJD核心成分与核心蛋白分子对接结合能热图

Fig. 7 Binding energy heatmap of DJD key ingredient and target protein molecule

3 讨论

在本研究中,基于系统的化学成分识别策略建立了 LC-MS 技术,并将其应用于 DJD 中化学成分的快速分离与表征。进一步整合网络药理学和分子对接技术,获取成分与疾病的交集靶点进行 PPI 分析、GO 和 KEGG 富集分析。由结果可知,从 DJD 中共鉴定出 38 个化合物,获取 DJD 治疗 AA 的潜在作

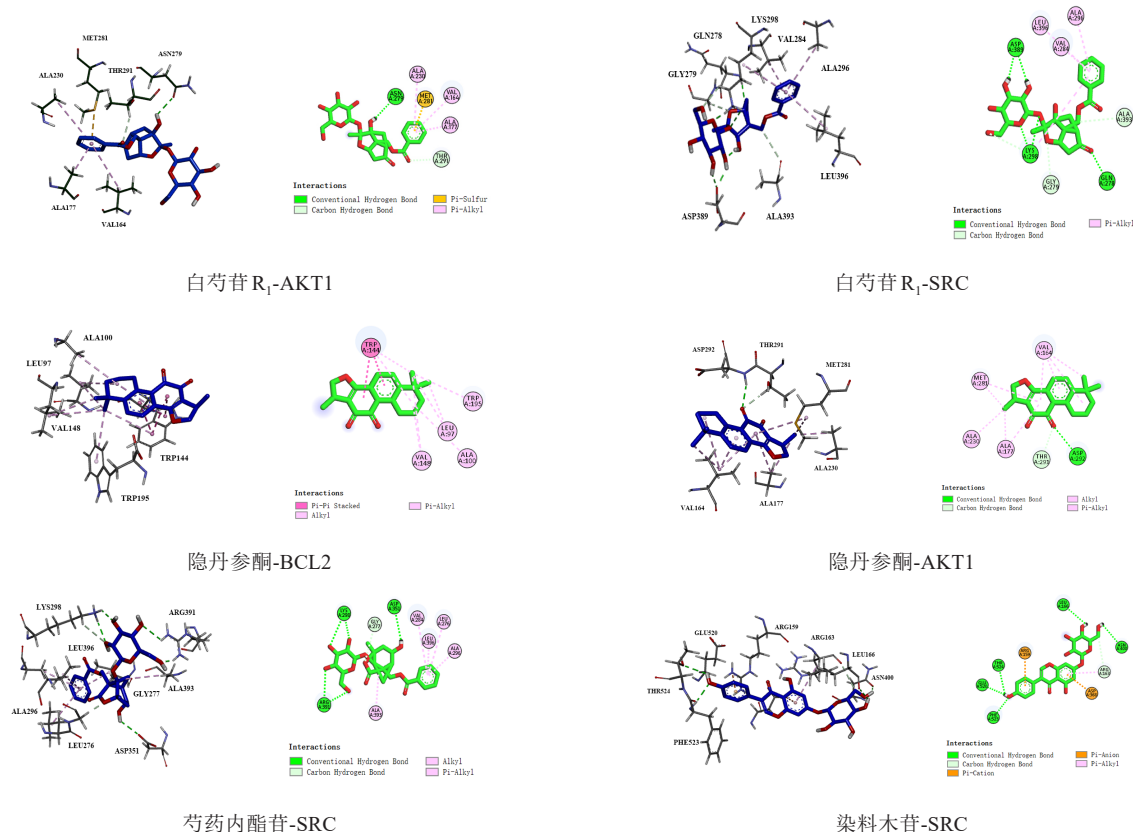


图8 候选Q-Marker与AKT1和SRC蛋白的分子对接模拟图

Fig. 8 Molecular docking simulation diagram of Q-Marker of DJD and key targets

用靶点 196 个,经过网络拓扑学分析,度值较高的成分有隐丹参酮、染料木苷、striatisporolide A、紫柳花素、黄芩素、高车前素、柚皮素、白芍苷 R₁、东莨菪内酯和芍药内酯苷,度值较高的靶点包括 GAPDH、AKT1、IL6、TNF、CASP3、EGFR、STAT3、HSP90AA1、SRC 和 BCL2 等,说明这些核心成分和靶点与 DJD 治疗 AA 密切相关。经 GO 富集分析得 2 718 条目,KEGG 富集分析得 PI3K/Akt 等 161 条通路;分子对接结果显示关键靶点与活性成分结合能较低,具较好的亲和力。

DJD 由当归、熟地黄、龙眼肉、白芍、丹参、鸡血藤组成,主骨伤患者后期气血虚弱、肿瘤经化疗或放疗期间有白细胞及血小板减少者^[3]。配方中的当归、白芍、丹参能补血活血,地黄有滋阴养血、养精补髓之功效,鸡血藤具有活血补血、调经止痛、舒筋活络的功效,6 味药配伍对气血虚弱和免疫功能有良好的调节作用,常见临床应用有再生障碍性贫血、化疗后骨髓抑制、类风湿关节炎及骨折等^[7]。然而,目前关于 DJD 的药效物质和作用机制的报道很少。本研究采用 LC-MS 技术对 DJD 的成分进行分析。结果显示,38 种成分主要来自丹参、白芍、鸡血

藤和当归,未检测到熟地黄和龙眼肉中的化学成分。据文献报道,熟地黄和龙眼肉的成分中以多糖为主^[8-9],中药多糖可促进免疫器官和免疫细胞的生长,并通过与免疫细胞表面受体结合激活多种信号通路,增加骨髓造血功能^[10]。因此,考虑到检测方法的局限性,不能忽视熟地黄和龙眼肉在 DJD 中的重要地位。

运用 Cytoscape 3.9.1 构建 DJD 活性“成分-靶点”网络关系图。通过网络拓扑分析,对活性成分进行度值排序,度值越高该成分越重要,筛选出主要活性成分芍药内酯苷、染料木苷、白芍苷 R₁、东莨菪内酯、隐丹参酮、紫柳花素、黄芩素、高车前素和柚皮素等。紫柳花素可以减轻急性脊髓损伤后的炎症细胞浸润和脊髓水肿程度,减少脊髓组织内的细胞凋亡数目,有效抑制脊髓损伤导致的 IκB 激酶/核因子 κB (IKK/NF-κB) 信号通路的激活,为其在脊髓损伤治疗中的应用提供了分子生物学基础^[11]。临床补血药常选用白芍,其最主要的化学成分是单萜苷及多元酚类化合物,已有研究发现,白芍对失血法致小鼠血虚模型有补血作用。白芍中除芍药苷外的其他成分如芍药内酯苷对综合放血法模型

小鼠具有补血作用,芍药内酯苷对该模型起效剂量低、作用强,补血作用更好^[12-13]。丹参化学成分主要由水溶性酚酸类及脂溶性丹参酮类化合物组成。有研究通过评价靶点拓扑参数筛选网络中的关键靶点,最后基于分子对接进行丹参酚酸类及丹参酮类成分辨识,预测丹参活血化癥功效标志物。结果表明丹参活血化癥功效的潜在标志物为丹酚酸B、丹酚酸A、丹参酮II_A、丹参酮I^[14]。

AKT1 蛋白是DJD治疗AA的核心蛋白,KEGG富集分析中PI3K/Akt信号通路是富集靶点最多,差异性非常显著的通路。近年来,随着相关研究的不断深入和发展,PI3K/Akt信号通路在骨髓造血中的作用越来越为人所知。研究表明,激活PI3K/Akt信号通路可增强造血功能^[15]。PI3K/Akt信号通路异常激活会导致造血干细胞(HSC)倾向于进行更多的分化而减少了自我更新,破坏HSC的稳态维持,造成HSC的耗竭。同时还会伴随发生髓系细胞异常增殖和白血病等恶性血液系统疾病^[16]。在分子对接验证中看到,10个核心化学成分与AKT1蛋白结合良好,结合能均小于 $-16.74\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中隐丹参酮、芍药苷内酯、白芍苷R₁与AKT1蛋白结合能更是小于 $-33.47\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

综上,本研究整合3种技术手段,预测DJD可能通过芍药内酯苷、染料木苷、白芍苷R₁、隐丹参酮、紫柳花素、黄芩素和柚皮素等关键成分,作用于AKT1、SRC、IL6和TNF等靶点,通过干预PI3K/Akt通路发挥治疗AA的作用。预测隐丹参酮、白芍苷R₁、染料木苷及芍药内酯苷可以作为DJD治疗AA的Q-Marker。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ye M, Liu G X, Yang Y J, et al. Network pharmacology and experimental verification of the potential mechanism of Er-Xian Decoction in aplastic anemia [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 17385.
- [2] Chang H, He G S, Fu R, et al. Efficacy and safety of eltrombopag in Chinese patients with refractory or relapsed severe aplastic anemia [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 18955.
- [3] 李超, 王玉, 汪钰, 等. 盐酸川芎嗪注射液联合环孢素A治疗再生障碍性贫血的临床研究及其对血清炎症因子的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(6): 1301-1305.
- [4] 郭明鑫, 李文静, 孙瑶湘, 等. 当归鸡血藤汤对再生障碍性贫血模型大鼠骨髓造血功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(23): 3434-3438.
- [5] Guo M X, Li W J, Sun Y X, et al. Research regarding the way Danggui Jixueteng Decoction affects the hematological function of the bone marrow in rats with aplastic anemia [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(23): 3434-3438.
- [6] Wageed M, Mahdy H M, Kalaba M H, et al. Development of LC-MS/MS analytical method for the rapid determination of Diquat in water and beverages [J]. Food Chem, 2024, 438: 137869.
- [7] Wang D N, Ding J M, Feng X F, et al. Identification of Q-Markers from Hedan Tablet by employing "spider-web" mode and taking compounds' hepatotoxicity into account [J]. Chin Herb Med, 2022, 14(4): 612-621.
- [8] 陈希西, 韩嵩, 樊根豪, 等. 活血化癥类中药现代药理学研究进展 [J]. 天津中医药, 2023, 40(2): 250-257.
- [9] Chen X X, Han S, Fan G H, et al. Research progress of modern pharmacology of traditional Chinese medicine for promoting blood circulation and removing stasis [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2023, 40(2): 250-257.
- [10] Xu S, Bi J L, Jin W F, et al. Determination of polysaccharides composition in *Polygonatum sibiricum* and *Polygonatum odoratum* by HPLC-FLD with pre-column derivatization [J]. Heliyon, 2022, 8(5): e09363.
- [11] Bai Y, Zhou Y, Li X, et al. Longan pulp polysaccharides regulate gut microbiota and metabolites to protect intestinal epithelial barrier [J]. Food Chem, 2023, 422: 136225.
- [12] 赖梦亭, 肖平, 方悦悦, 等. 中药多糖免疫调节作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3337-3348.
- [13] Lai M T, Xiao P, Fang Y Y, et al. Research progress on immune regulation mechanism of traditional Chinese medicine polysaccharide [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(10): 3337-3348.
- [14] 鲁明. 紫柳花素对大鼠急性脊髓损伤后的神经保护作用及其机制的实验研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2013.
- [15] Lu M. Neuroprotection and mechanisms of butein on acute spinal cord injury in rats [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2013.
- [16] Yang X Z, Wei W. CP-25, a compound derived from paeoniflorin: Research advance on its pharmacological actions and mechanisms in the treatment of inflammation and immune diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41

- (11): 1387-1394.
- [13] 张建军, 黄银峰, 王丽丽, 等. 白芍、赤芍及芍药苷、芍药内酯苷对综合放血法致血虚小鼠补血作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3358-3362.
- Zhang J J, Huang Y F, Wang L L, et al. Comparative study on effects of blood enriching on mouse model of blood deficiency syndrome induced by compound method of bleeding, starved feeding and exhausting of *Paeoniae Radix Alba* and *Paeoniae Radix rubra*, paeoniflorin and albiflorin [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(19): 3358-3362.
- [14] 马婧, 陈茜, 边亚倩, 等. 基于系统中药学的丹参活血化瘀功效标志物研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3259-3265.
- Ma J, Chen X, Bian Y Q, et al. Study on efficacy markers of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* for promoting blood circulation and removing blood stasis based on systematic traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(14): 3259-3265.
- [15] Zeng M, Zhang Y, Zhang X L, et al. Two birds with one stone: YQSSF regulates both proliferation and apoptosis of bone marrow cells to relieve chemotherapy-induced myelosuppression [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115028.
- [16] 张英驰, 程涛, 袁卫平. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在造血干细胞中作用的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(1): 245-249.
- Zhang Y C, Cheng T, Yuan W P. Recent studies on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in hematopoietic stem cells [J]. J Exp Hematol, 2013, 21(1): 245-249.

【责任编辑 袁永兵】