

经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究

丁 腾^{1,2}, 孙宇宏³, 杜 霞⁴, 王 乐¹, 龚伟玲¹, 彭秀娟², 党艳妮³, 刘 峰^{2,3*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712056

2. 陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075

4. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

摘要: 目的 利用色谱-质谱和网络药理学技术进行经典名方百合地黄汤的化学成分分析和药效成分作用机制的预测。方法 利用 LC-MS、GC-MS 技术分析百合地黄汤化学成分, 利用 TCMSP 数据库分析搜集化学成分、靶点信息, 利用 TTD、CTD 数据库搜集与靶点相关联的疾病, 并以抑郁症为目标进行筛选。Cytoscape 软件进行“化学成分-靶点-疾病”的网络图的构建, 通过 DAVID 在线分析, 对靶点进行 KEGG 通路分析, 并探究其药效成分和作用机制。结果 通过色谱-质谱分析共得到了 52 种化学成分; 通过网络药理手段得到百合地黄汤中的 25 种成分对应的 31 个靶点与抑郁症相关。结论 百合地黄汤治疗抑郁症具有“多向药理学”效应和“叠加”效应, 体现中药复杂系统的作用特点; 可能通过作用于 31 个靶点, 调节信号通路, 参与炎症反应、细胞凋亡、神经递质调节等过程, 发挥治疗抑郁症的作用。

关键词: 经典名方; 百合地黄汤; 抑郁症; 色谱-质谱联用; 网络药理学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1848-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.012

Chemical profiling and network pharmacology of classic herbal prescription Baihe Dihuang Decoction

DING Teng^{1,2}, SUN Yu-hong³, DU Xia⁴, WANG Le¹, GONG Wei-ling¹, PENG Xiu-juan², DANG Yan-ni³, LIU Feng^{2,3}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712056, China

2. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China

3. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Limited Company, Xi'an 710075, China

4. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

Abstract: Objective To analyze the chemical composition and predict the pharmacological mechanism of Baihe Dihuang Decoction by chromatography-mass spectrometry and network pharmacology. **Methods** LC/MS and GC/MS were used to analyze the chemical components of Baihe Dihuang Decoction. The target information of chemical components was collected by TCMSP database. TTD and CTD databases were used to collect diseases associated with targets, and depression was targeted for screening. Cytoscape software was carried out to draw “chemical composition-target-disease” network diagram, KEGG pathway analysis of target was performed by DAVID online analysis and its pharmacodynamic components and mechanism were explored. **Results** A total of 52 chemical constituents were obtained by chromatography-mass spectrometry analysis. The 31 targets corresponding to 25 components in Baihe Dihuang Decoction by network pharmacology were associated with depression. **Conclusion** Baihe Dihuang Decoction has the effect of “multi-directional pharmacology” and “superimposition” in the treatment of depression, reflecting the characteristics of the complex system of traditional Chinese medicine. It may play a role in the treatment of depression by acting on 31 targets, regulating the signaling pathway and participating in inflammatory reaction, apoptosis, and neurotransmitter regulation.

Key words: famous classical prescription; Baihe Dihuang Decoction; depression; chromatography-mass spectrometry; network pharmacology

百合地黄汤最早记载于东汉时期张仲景所著的《金匮要略》, 处方由鲜百合、鲜地黄组成, 鲜百合味甘, 性微寒, 归心、肺经; 鲜地黄味甘、苦, 性寒, 归心、肝、肾经^[1]。百合地黄汤具有养阴清热、

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721005-004-007)

*通信作者 刘 峰, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发和大品种技术改造及开发。

Tel: (029)88318318 E-mail: liufeng1720@163.com

补益心肺之功效,古代用于百合病之心肺阴虚内热证^[2],现代主要用于治疗抑郁症等病症^[3]。百合地黄汤临床药效确切,作为国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》中的品种,明确其煎液的物质构成,对于后续经典名方的质量控制、稳定性研究、制剂工艺参数优化乃至成药的包装选择具有一定的指导意义。液质联用技术对于复杂中药体系的化合物构成辨识具有快速、简便的优势,随着相关数据库化合物的充实,利用该技术能够成功对中药体系中的天然产物进行定性及定量研究^[4-6]。网络药理学可从多水平、多角度相关联的方法对药物进行研究分析,为复方中药研究开辟新的途径^[7-10]。本研究以经典名方百合地黄汤为研究对象,以严格遵循古方进行炮制的煎液为分析对象,利用色谱-质谱分析平台,对煎液中的物质构成进行初步研究,利用网络药理学技术对其治疗百合病中抑郁症的药效成分与作用机制进行探究。

1 仪器与材料

Waters H-class 超高效液相色谱仪(含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、自动进样器、柱温箱和 TUV 紫外检测器); Waters G2-XS QToF 质谱仪, Masslynx 工作站; Merck MilliQ 超纯水系统。系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、Uniport 数据库(Universal Protein, Uniprot, <http://www.uniprot.org>)、TTD 数据库(Therapeutic Target Database, TTD, <https://db.idrblab.org/ttd>)、CTD 数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD, <http://ctdbase.org>)、DAVID 基因富集分析网站(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)。

所用药材购自陕西兴盛德药业有限公司,经陕西中医药大学药学院胡本祥教授鉴定,产于湖南龙山县的鲜百合肉质鳞叶来源植物为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb., 河南温县产的鲜地黄块根来源于玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 均为《中国药典》2015 年版收载品种。

2 方法

2.1 百合地黄汤的成分分析

2.1.1 经典名方的“古今转换” 中药处方中药物剂量占据重要的地位,随着古今朝代的更迭,度量

衡的变化改变着不同时期的药物剂量,影响着当今古方的应用与发展。东汉时期《金匮要略》中记载的百合地黄汤原方为“百合七枚(擘),生地黄汁一升,上以水洗百合,渍一宿,当白沫出,去其水,更以泉水二升,煎取一升,去滓,内地黄汁,煎取一升五合,分温再服”。

根据已经出土的文物容量实际测量的算数平均值可推断^[11],东汉时期的“一升”约为现代的 200 mL,“一升”等于“十合”,“一合”约为现代的 20 mL,生地黄汁一升为生地黄汁 200 mL。百合药用剂量为“七枚”,但由于种间个体差异,因此对“七枚”的计量并未有准确的表述。据卫生部、国家中医药管理局制定的《医疗机构中药煎药室管理规范》中规定^[12],另煎药加水量一般为药量的 10 倍左右。百合的加水量为二升约为现代的 400 mL,可知七枚干百合的药用剂量约为 40 g。采用快速水分蒸发仪测量结果可知,干百合含水量约为 5%,鲜百合含水量约为 66%,经计算鲜百合的药用剂量约为 120 g。“一宿”为一夜,汉代一夜为“五更”,“一更”约为 2 h,“一宿”约为 10 h^[13]。

2.1.2 供试品溶液制备 鲜百合用清水冲洗泥沙,除去表面浮水,称取 120 g,掰开鳞茎用清水浸泡 10 h,去浮沫,用清水清洗干净放置备用;取含水量约为 70%鲜地黄 485 g 于研钵中捣烂,双层纱布绞取鲜地黄汁 200 mL 备用。取上述百合于烧杯中加超纯水 400 mL,置于电热套中(功率 300 W)加热煎煮至 200 mL,滤过,滤液中加入上述鲜地黄汁搅拌均匀,加热煎煮至 300 mL 即得。取百合地黄汤煎液稀释 50 倍,利用 UPLC-Q-TOF-MS 进行化学成分分析。

另取百合地黄汤煎液 20 mL,加醋酸乙酯(分析纯)2 mL 萃取,静置后取上清液,利用 GC-MS 进行挥发性化学成分分析。

2.1.3 UPLC-Q-TOF-MS 条件

(1)液相色谱条件:采用沃特世 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,梯度洗脱程序为 0~17 min, 98%~50% A; 17~20 min, 50%~98% A; 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 25 °C,进样量 5 μL。

(2)质谱条件:使用亮氨酸脑啡肽([leu5]-enkephalin, LE)作为质谱条件优化的基准物质,通过对离子源部分的相关参数进行优化最终得到的检测用质谱条件为电喷雾离子源(ESI);毛细管

电压 2.5 kV; 干燥气温度 400 °C; 干燥气体积流量 700 L/min; 雾化气压力 241.325 kPa (35 psi); 碎裂电压 30~60 V 动态变换; 正负离子模式下扫描检测, 采用 MS^E 扫描模式, 一级质谱扫描范围 m/z 50~1 200, MS^E 扫描范围 m/z 50~1 200; 采用 Lockspary 进行内标校正, 校正物质 LE, 外标校正物质甲酸钠。

2.1.4 LC-MS 数据分析 LC-MS 的数据采集由 Masslynx 工作站进行, 数据解析通过 Massbank、TCM Database@Taiwan 及 Metfrag 数据库等进行检索, 质谱数据的解析过程如下: 首先通过 TCM Database@Taiwan 构建百合地黄汤中百合、地黄的相关天然化合物数据库; 其次根据测得的数据, 利用 Masslynx 中 Elemental Composition 模块计算离子峰相对应的分子式, 以分子式及 $[M+H]^+$, $[M-H+HCOOH]^-$ 离子对应的精确相对分子质量为关键词, 检索在线及构建的 2 种药材化合物数据库, 相对分子质量检索时差异设定 $<1.0 \times 10^{-5}$, 对检索得到的结果利用 MS^E 碎片进行确证。

2.1.5 GC-MS 条件

(1) 色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS (250 $\mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m} \times 30 \text{ m}$, 325 °C); 进样方式为直接进样; 分流模式; 进样量 5 μL , 载气为氦气; 进样口温度 280 °C; 接口温度 280 °C。升温为初始温度 125 °C, 32 min 升至 280 °C, 保持 3 min。

(2) 质谱条件: EI 70 eV; 扫描范围 m/z 60~600; 容积延迟 3 min; 离子源温度 280 °C。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 百合地黄汤化学成分信息搜集整理 将经过实验研究分析所得的化学成分, 输入 TCMSP 数据库, 通过其数据库的计算, 搜集化学成分相关信息, 将化学成分及其 ADME 性质评价数据进行记录和整理, 建立百合地黄汤化学成分数据库。

2.2.2 靶标识别 使用一种将化学、基因组和药理信息有效整合的大规模发现药物靶向的系统方法, 基于随机森林法 (random forest, RF) 和支持向量机法 (support vector machine, SVM) 的模型进行靶点的收集工作, 这种优化模型对预测药物-靶点相互作用的性能显著, 符合率 82.83%, 灵敏度 81.33%, 特异性 93.62%, 该模型具有一定的可靠性和鲁棒性^[4]。靶点收集完毕后, 再利用 Uniprot 数据库查找出每个靶点的基因 ID, 每个靶点的基因 ID 都是独立唯一的, 以每个靶点的名称为关键词, 使用 TTD 数

据库检索其相关疾病, 未检索到相关联疾病的靶点则以基因 ID 为关键词, 在 CTD 数据库中进行检索, 获得所有靶点对应的疾病类型。筛选疾病一列中包含关键词“焦虑、抑郁”的进行标记, 再次确认筛选出疾病是否与焦虑、抑郁有关, 最终得到百合地黄汤中与百合病相关疾病有关的每味药材的药效成分及其对应靶点。

2.2.3 网路的构建和分析 Cytoscape^[15]是一个开源性网络可视化软件, 用于将生物分子相互作用网络、高通量表达数据和其他分子态集合到一个统一的框架中, 适用于几乎所有分子成分的相互作用系统, 目前开发到 3.6.1 版本。将通过筛选的药效成分、靶点利用 Cytoscape 3.6.1 以源节点和目标节点直接导入, 构建药材-药效成分-靶标网络, 通过对度值 (degree)、中介中心性 (betweenness)、接近中心性 (closeness) 的分析来探究百合地黄汤中关键化合物及其靶点。

2.2.4 京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 分析^[16] KEGG 是系统分析基因功能、基因组信息数据库。本研究利用 DAVID 基因富集分析网站, 对百合地黄汤进行 KEGG 通路富集分析, 将去重后与百合病相关的基因输入到对话框内, 选择 Official Gene Symbol 提交基因列表, 再选择 Pathways 中 KEGG pathway, 得到所有包含有百合地黄汤中与百合病相关的药效成分的靶点所构成的通路, 通过参考文献报道, 从中筛选出与百合病相关的通路, 对其进行分析并阐明药理学作用机制。

3 结果与分析

3.1 百合地黄汤煎液 LC-MS 分析结果

在拟定的分析条件下, 百合地黄汤在正、负离子模式下的总离子流图见图 1。通过对 MS、MS/MS 质谱信息进行比对分析, 并根据保留行为结合数据库 [METLIN、Massbank 和 Human Metabolome Database (HMDB)] 及相关文献报道进行结构鉴定, 共鉴定了 32 种成分 (表 1), 所有化合物的结构类型分为以下几类: 苯丙素苷类、酚酸糖苷类、百合皂苷类、环烯醚萜苷类、多糖类等。

3.2 百合地黄汤 GC-MS 分析结果

在拟定的分析条件下, 百合地黄汤的 GC-MS 总离子流图见图 2。通过对质谱信息进行比对分析, 并根据保留行为结合数据库 (NIST) 进行结构鉴定, 共鉴定了 20 种挥发性成分 (表 2), 主要为酮类、醛类、酚类等成分。

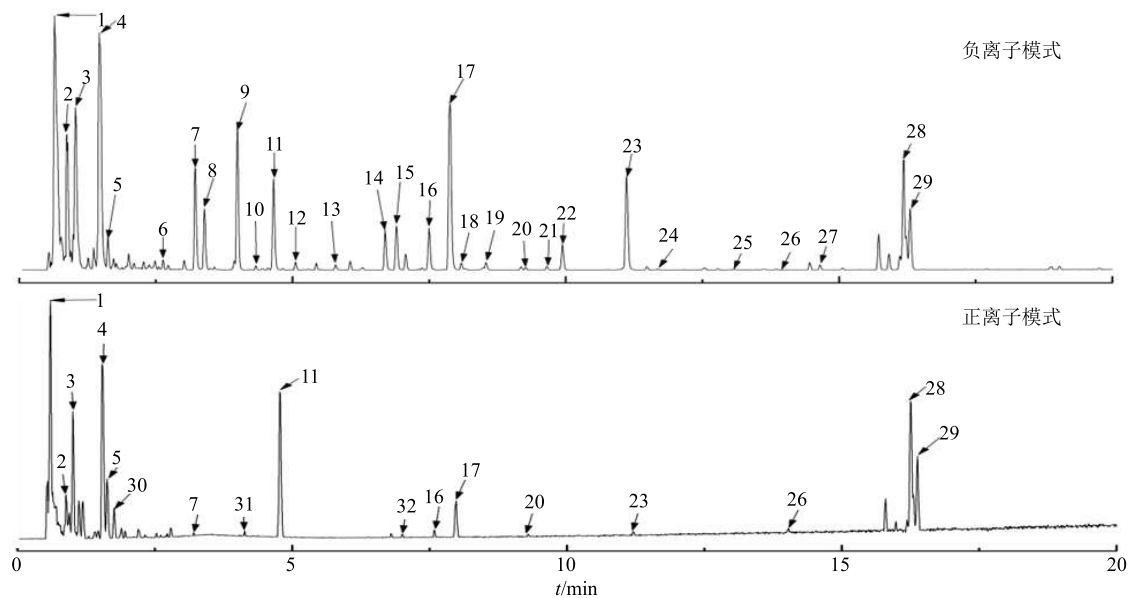


图 1 百合地黄汤总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of ethanol extract of Baihe Dihuang Decoction

表 1 百合地黄汤的 UPLC-Q-TOF-MS/MS^E 分析结果

Table 1 Chemical profiling of Baihe Dihuang Decoction by UPLC-Q-TOF-MS/MS^E

峰号	<i>t_R</i> /min	模式	<i>m/z</i>	误差/($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片离子	名称	归属
1	0.650 5	-/+	665.112 5	1.35	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	574.023 4, 502.232 5, 179.125 6	水苏糖	地黄
2	0.832 1	-/+	504.437 1	7.14	C ₁₈ H ₃₂ O ₁	161.022 6	棉子糖	地黄
3	1.037 1	-/+	191.019 6	2.09	C ₆ H ₈ O ₇	173.008 8, 129.018 6	柠檬酸	地黄
4	1.460 3	-/+	407.123 7	0.55	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	199.061 5, 169.050 6	梓醇	地黄
5	1.623 3	-/+	523.166 1	-3.82	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	343.102 4	蜜力特苷	地黄
6	2.630 8	-	396.125 7	7.82	C ₂₈ H ₄₄ O	378.132 3, 364.251 7, 309.083 6	麦角固醇	地黄
7	3.220 5	-/+	731.222 4	4.82	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₀	179.055 6	地黄苷 D	地黄
8	3.392 3	-	569.171 4	6.69	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	523.165 0, 181.049 5	地黄苷 A	地黄
9	3.990 1	-	393.139 9	7.78	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	—	益母草苷	地黄
10	4.331 2	-	623.112 5	3.53	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	461.024 4, 163.024 4	毛蕊花糖苷	地黄
11	4.660 7	-/+	827.265 6	2.51	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	545.171 6, 383.112 4, 179.057 0	毛蕊花糖	地黄
12	5.056 2	-	375.129 9	2.13	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	213.075 6, 169.085 7	8-表番木鳖酸	地黄
13	5.789 8	-	415.122 9	5.54	C ₂₉ H ₅₀ O	367.351 3, 225.637 3, 288.136 7	谷甾醇	地黄
14	6.693 6	-	415.125 6	5.54	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	163.038 2	王百合苷 C	百合
15	6.905 6	-	399.129 3	8.72	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	163.038 2	王百合苷 A	百合
16	7.493 6	-/+	345.156 3	-6.66	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	165.054 5	桃叶珊瑚苷	地黄
17	7.887 3	-/+	399.129 3	6.01	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	372.270 7, 313.005 5	秋水仙碱	百合
18	8.086 3	-	509.221 9	1.77	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₄	179.055 5	地黄苷 C	地黄
19	8.542 2	-	429.141 2	-4.89	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	205.106 5, 165.031 7	生育酚	地黄
20	9.274 1	-/+	387.129 4	0.77	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	225.076 4	京尼平苷	地黄
21	9.659 1	-	799.271 0	5.05	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	491.235 2, 161.012 7	肉苁蓉苷 A	地黄
22	9.936 7	-	435.222 1	-3.60	C ₁₉ H ₃₄ O ₈	435.223 0	地黄紫罗兰苷 A	地黄
23	11.110 1	-/+	441.140 1	-2.77	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₁	163.038 2	王百合苷 B	百合
24	11.586 2	-	461.237 8	4.12	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	—	去咖啡酰毛蕊花糖苷	地黄
25	13.087 1	-	523.179 6	-3.82	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	175.039 6	6- <i>O-E</i> -阿魏酰筋骨草醇	地黄
26	13.947 9	-/+	622.398 5	1.44	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	461.166 5, 161.002 4	异毛蕊花糖苷	地黄
27	14.460 5	-	504.221 5	2.77	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	—	甘露三糖	地黄
28	16.254 1	-/+	885.472 9	2.60	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	723.432 9, 709.417 9, 415.329 7	卷丹皂苷 A	百合
29	16.376 3	-/+	887.514 2	2.03	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	725.456 8	麦冬皂苷 D	百合
30	1.757 2	+	268.098 8	3.38	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.046 7	腺苷	地黄
31	4.133 2	+	151.041 1	-8.86	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	151.041 1	鸟苷	地黄
32	7.001 1	+	239.087 1	3.76	C ₉ H ₁₂ O ₅	—	地黄素 C	地黄

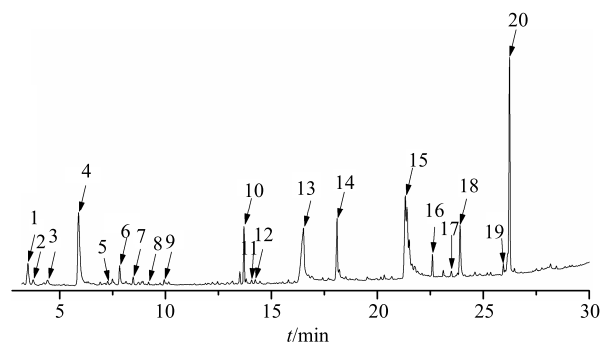


图 2 百合地黄汤 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of ethanol extract of Baihe Dihuang Decoction by GC-MS

表 2 百合地黄汤的 GC-MS 分析结果

Table 2 Analysis results for Baihe Dihuang Decoction by GC-MS

峰号	t_R/min	基峰	分子式	名称	归属
1	3.505	91	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	苯基乙醇	百合
2	3.748	104	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	苯甲醇	百合
3	4.427	120	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$	香豆酮	地黄
4	5.892	107	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	百合
5	6.915	73	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_2$	胡椒基醇	地黄
6	7.268	151	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	香草醛	百合
7	7.833	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$	安息香醛	百合
8	8.725	149	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$	3,4-(亚甲基二氧) 苯丙酮	地黄
9	9.939	137	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$	高香草醇	百合
10	13.702	109	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	环氧化蛇麻烯 II	地黄
11	14.064	73	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	肉豆蔻酸	百合
12	14.235	130	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$	色醇	地黄
13	16.511	194	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	反式阿魏酸	百合
14	18.096	73	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_2$	棕榈酸	百合
15	21.318	67	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	亚油酸	百合
16	21.397	69	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	十八烷酸	百合/地黄
17	23.108	98	$\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_3$	二十烷酸-2-羟乙基酯	百合/地黄
18	23.902	150	$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$	胡椒基胺	地黄
19	26.142	167	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$	2-甲基-4-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基) 3-2-丁烯醛	地黄
20	26.236	340	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_2$	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	百合/地黄

3.3 百合地黄汤网络药理学分析结果

3.3.1 药材-成分-靶点-疾病网络关系图的构建 通过对百合地黄汤中 52 个化学成分及其对应的靶点和靶点所对应的抑郁疾病进行关联汇总,并剔除

与该疾病不相关的化学成分及其靶点后,结果见表 3。通过软件绘制百合地黄汤药材-成分-靶点-疾病网络关系图,百合地黄汤药材-成分-靶点-疾病网络共包含 60 个节点,绿色椭圆形点表示药材有 2 味,蓝色矩形点表示化合物有 25 个,黄色矩形点表示靶点有 31 个,红色矩形点表示与百合病相关的疾病有 2 个,共 158 条边,分别表示了药材与化合物或化合物与靶点之间的联系,见图 3。由图 3 可以看出,百合地黄汤中存在 1 个化合物与多个靶点之间作用,也有不同化合物共同作用于 1 个靶点的现象,表明针对百合病等复杂疾病,中药无疑是较好的多靶点药物的重要开发来源。

度值较高的 2 个靶点为前列腺素 G/H 合成酶 2 (PTGS2, 度值=14) 和单胺氧化酶 A (MAOA, 度值=8),分别与 13 个化合物、6 个化合物相关联,因此 PTGS2 与 MAOA 是治疗抑郁症及相关病症的重要靶点。文献研究表明,炎症反应是诱导抑郁产生的原因之一,PTGS2 表达上调,刺激核转录因子- κB (NF- κB) 信号通路,诱导抑郁相关基因表达,引起抑郁样行为。MAOA 基因是抑郁症遗传学研究的重要基因之一,MAOA 基因作用于苯丙胺代谢通路,单胺类氧化酶过表达导致单胺类神经递质 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE) 减少,从而导致抑郁症的发生。

3.3.2 KEGG 通路富集分析 将与百合病相关的靶点与通路进行网络关系分析,结果见图 4。将 31 个靶点输入到 DAVID 在线分析工具中,收集到 24 条通路,根据文献筛选出 19 条与百合病相关的信号通路,百合地黄汤的 KEGG 通路分析结果见图 5。

百合地黄汤治疗抑郁症及其相关疾病的主要通路有神经活性的受体-配体相互作用、5-羟色胺能突触、钙信号通路、逆行内源性大麻素信号传导、多巴胺能突触等,百合地黄汤通过作用于上述信号通路,达到治疗疾病的目的。

3.3.3 网络构建及神经活性配体-受体相互作用通路 (neuroactive ligand-receptor interaction) 分析 抑郁症是百合病的一种临床表现形式,神经活性配体-受体相互作用通路参与调节神经活性配体受体相互作用而发挥活性作用,图 6 为该通路中药效成分、靶点、通路间网络关系图。网络图中包含 20 个节点 (1 个通路、8 个化合物,11 个靶点) 和 72 条边。以度值和接近中心性、中介中心性为指标,采用网

表 3 药材-药效成分-靶点网络的关键节点及其拓扑学性质

Table 3 Key nodes and topological properties of network of medicinal materials-medicinal ingredients-targets

节点	编码	名称	接近中心性	度值	中介中心性	节点	编码	名称	接近中心性	度值	中介中心性
成分	MOL000841	棉子糖	0.750 1	3	0.000 4	靶点	—	PTGS2	1.000 0	14	0.002 1
	MOL001456	柠檬酸	0.777 8	6	0.000 7		—	GABRA1	1.000 0	7	0.001 0
	MOL002819	梓醇	0.833 3	5	0.000 7		—	GRIA2	1.000 0	4	0.000 5
	MOL000298	麦角固醇	0.600 1	2	0.000 3		—	SOD1	1.000 0	2	0.000 1
	MOL003690	益母草苷	0.666 7	2	0.000 1		—	DPP4	1.000 0	6	0.000 9
	MOL003333	毛蕊花糖苷	0.666 7	2	0.000 2		—	BCL2	1.000 0	6	0.000 5
	MOL000358	谷甾醇	0.894 7	16	0.003 2		—	CASP3	1.000 0	3	0.000 1
	MOL003735	桃叶珊瑚苷	0.801 1	4	0.000 2		—	NR3C1	1.000 0	3	0.000 6
	MOL003701	京尼平苷	0.750 1	3	0.000 4		—	CHRM3	1.000 0	2	0.000 1
	MOL009481	王百合苷 B	0.666 7	2	0.000 1		—	CHRM1	1.000 0	6	0.000 5
	MOL001787	腺苷	0.666 7	3	0.000 1		—	SCN5A	1.000 0	2	0.000 1
	MOL003699	蜜力特苷	0.714 3	4	0.000 3		—	GABRA2	1.000 0	4	0.000 4
	MOL000778	6-O-E-feruloylajugol	0.666 7	2	0.000 3		—	CHRM4	1.000 0	2	0.000 1
	MOL002820	地黄苷 A	0.666 7	2	0.000 1		—	HTR2A	1.000 0	3	0.000 1
	MOL001300	苯基乙醇	0.600 1	3	0.000 1		—	GABRA5	1.000 0	2	0.000 1
	MOL001752	丁香酚	0.777 8	7	0.001 1		—	ADRA1A	1.000 0	4	0.000 1
	MOL000635	香草醛	0.751 2	6	0.000 6		—	ADRB2	1.000 0	5	0.000 3
	MOL007272	高香草醇	0.846 2	11	0.001 8		—	SLC6A4	1.000 0	3	0.000 1
	MOL001393	肉豆蔻酸	0.666 7	3	0.000 1		—	PON1	1.000 0	2	0.000 1
	MOL010286	色醇	0.666 7	4	0.000 3		—	GSTM2	1.000 0	2	0.000 2
	MOL000360	阿魏酸	0.846 2	11	0.002 1		—	GSK3B	1.000 0	2	0.000 3
	MOL000069	棕榈酸	0.800 3	5	0.000 7		—	MAOA	1.000 0	8	0.001 5
	MOL000131	亚油酸	0.666 7	3	0.000 1		—	SLC6A3	1.000 0	4	0.000 3
	MOL000860	十八烷酸	0.666 7	3	0.000 1		—	SLC6A2	1.000 0	5	0.000 4
	MOL000939	环氧化蛇麻烯 II	0.714 3	5	0.001 0		—	MAOB	1.000 0	6	0.000 7
靶点	—	ICAM1	1.000 0	3	0.000 4		—	PKIA	1.000 0	2	0.000 1
	—	SLC12A2	1.000 0	2	0.000 1		—	ADRB1	1.000 0	4	0.000 2
	—	CTSD	1.000 0	3	0.000 2	药材	—	百合	0.590 9	14	0.000 1
	—	NOS1	1.000 0	2	0.000 1		—	地黄	0.636 4	23	0.000 1

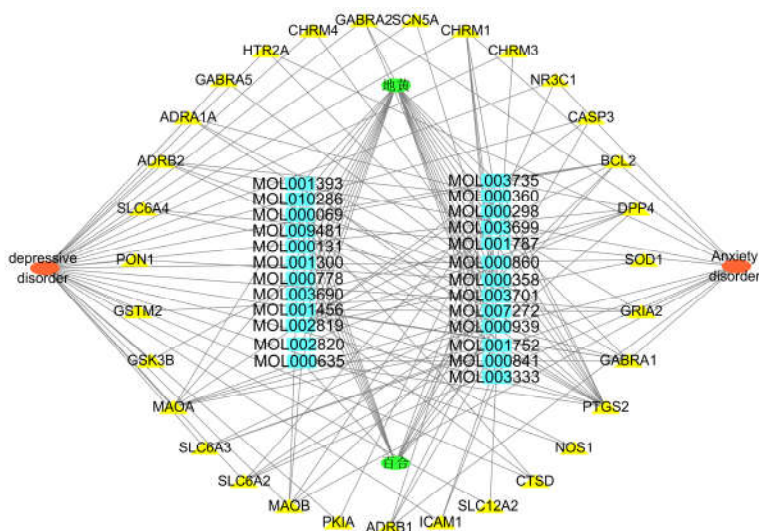


图 3 百合地黄汤药材-成分-靶点-疾病网络

Fig. 3 Medicinal materials-chemical composition-target-disease network of Baihe Dihuang Decoction

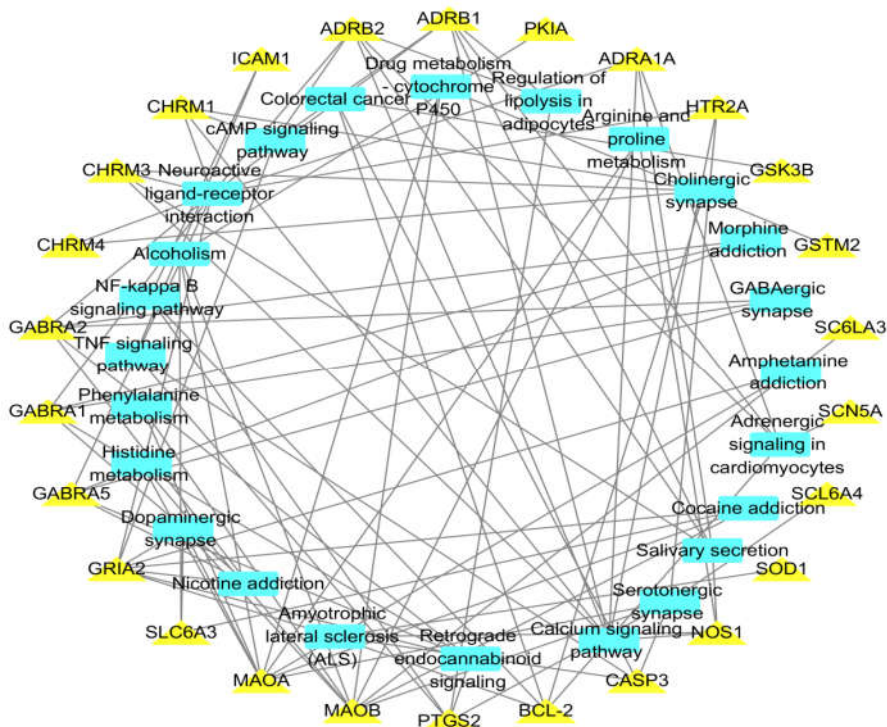


图 4 百合地黄汤靶点与通路的网络关系

Fig. 4 Target-pathway network of Baihe Dihuang Decoction

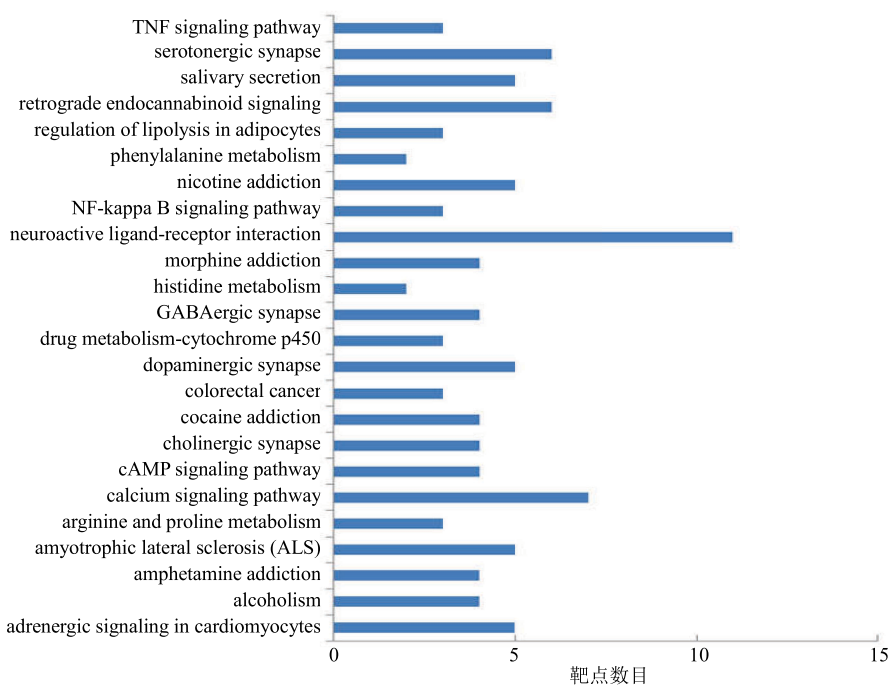


图 5 百合地黄汤的 KEGG 信号通路

Fig. 5 KEGG pathway of Baihe Dihuang Decoction

络关系的拓扑性质分析该网络图, 根据 3 个指数的数值判断百合地黄汤通过该通路治疗百合病的关键成分和靶标。此通路 with 抑郁症相关的靶点有 11 个,

见表 4。分析结果表明, GABAA1、CHRM1、ADRB2 这 3 个靶点的网络节点度较高, 其可能作为该通路治疗抑郁症的主要靶点。

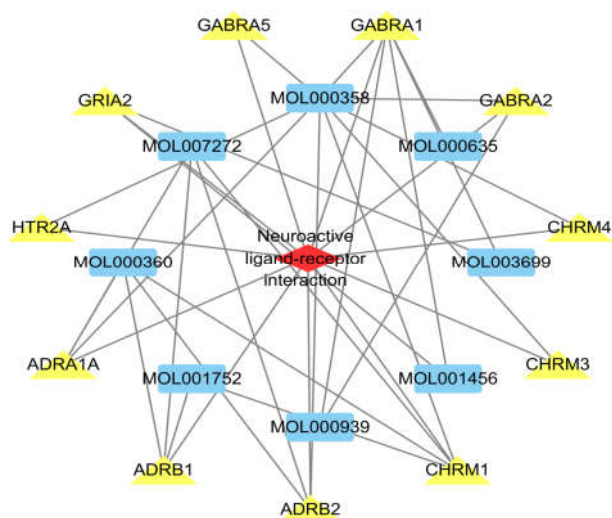


图6 Neuroactive ligand-receptor interaction 通路中化合物与靶点的网络关系

Fig. 6 Chemical composition-target network relationship in neuroactive ligand-receptor interaction pathway

表 4 神经活性配体-受体相互作用通路的靶点信息和网络分析

Table 4 Target and network analysis results for neuroactive ligand-receptor interaction pathway

编号	靶点名称	Uniport	基因	接近中心性	度值	中介中心性
1	muscarinic acetylcholine receptor M1	P11229	CHRM1	0.418 6	6	0.011 2
2	gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-2 subunit	P47869	GABRA2	0.409 1	4	0.006 0
3	alpha-1A adrenergic receptor	P35348	ADRA1A	0.409 1	4	0.004 6
4	glutamate receptor 2	P42262	GRIA2	0.391 3	4	0.006 3
5	gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	P14867	GABRA1	0.423 5	7	0.019 4
6	muscarinic acetylcholine receptor M4	P08173	CHRM4	0.367 3	2	0.000 6
7	muscarinic acetylcholine receptor M3	P20309	CHRM3	0.367 3	2	0.000 6
8	beta-1 adrenergic receptor	P08588	ADRB1	0.349 5	4	0.002 2
9	beta-2 adrenergic receptor	P07550	ADRB2	0.413 8	5	0.007 1
10	gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-5 subunit	P31644	GABRA5	0.367 3	2	0.000 6
11	5-hydroxytryptamine 2A receptor	P28223	HTR2A	0.375 2	3	0.001 9

单胺类假说认为, 引发抑郁症的主要原因是由 5-HT、多巴胺 (DA)、NE 的功能下降引起的。5-羟色胺受体 2A (HTR2A) 为 5-羟色胺能突触、钙离子传导途径、神经活性配体受体相互作用信号通路中共有的靶点, 百合地黄汤中谷甾醇可作用于 HTR2A 靶点, 研究表明^[18]通过抑制 5-HT_{2A} 功能亢进, 从而抑制磷脂酶 C 系统使得细胞浆内钙离子浓度恢复正常水平, 产生抗抑郁作用。邓海峰等^[19]研究表明, 毛蕊花糖苷可促进 5-HT、DA、NE 基因的表达, 使单胺类神经递质在脑内的含量增加, 从而起到抗抑郁活性作用。

4 讨论

4.1 古方制样的百合地黄汤化学成分构成分析

百合地黄汤按照古方采用新鲜百合及地黄进行制备得到的煎液中, 主要以多糖、糖苷类化合物为主, 多糖类主要是低聚多糖类化合物, 如毛蕊花糖、水苏糖; 糖苷类化合物中主要包括地黄中的环烯醚萜苷类化合物, 如地黄苷 A、D; 百合中的酚酸糖苷类化合物, 如王百合苷 A、B 等。糖苷类及多糖类化合物极性较大, 由于古方中的煎煮工艺选用水作为溶媒, 上述糖苷类化合物的糖苷键水解程度低, 保留了具有功能性的糖苷分子。

4.2 百合地黄汤对抑郁症治疗的分子机制分析

百合病在临床上表现为焦虑、抑郁症状, 其中抑郁症是百合病的主要临床表现形式^[17]。百合地黄汤对抑郁症主要通过配体-受体通路、多巴胺能突触通路、5-羟色胺能突触通路发挥了潜在的治疗作用, 具有多成分、多靶标、多通路整合调节作用特点。

肾上腺素 β_1 受体 (ADRB1) 为神经活性配体受体相互作用、唾液分泌、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、钙离子传导途径信号通路共有靶点。抑郁症受体假说中提出^[20], 抑郁症的发病机制是由于脑内肾上腺素 β_1 (AR β_1) 受体功能亢进而导致抑郁症的产生。百合地黄汤中高香草醇、阿魏酸等可作用于 ADRB1 靶点而抑制 AR β_1 受体的表达, 引起 NE 含量升高, 起到抗抑郁作用。调节凋亡因子 Bcl-2 参与抑郁症大鼠海马体星形胶质细胞凋亡。心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、胆碱能突触、NF- κ B 等信号通路均包

含 Bcl-2 靶点。百合地黄汤中梓醇、谷甾醇、桃叶珊瑚苷、京尼平苷等可作用于 Bcl-2 基因, 促进其基因的表达, 从而抑制大鼠海马星形胶质细胞的凋亡, 表现出抗抑郁行为^[21]。

本实验采用色谱-质谱分析法与系统药理学联合的方法, 利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 从百合地黄汤中分析得到 32 种化合物; 利用 GC/MS 技术得到 20 种化合物; 利用网络药理学“化学成分-靶点-疾病”模型对百合地黄汤中具体的化学成分治疗抑郁症的相关的 5 条通路和其相关靶点为主要分析研究对象。通过研究分析发现百合地黄汤中 25 种化学成分, 可能通过作用于 31 个靶点, 通过作用于靶点基因从而调节神经活性的受体-配体相互作用、5-羟色胺能突触、NF- κ B 信号通路、钙信号传导途径等信号通路, 参与炎症反应、神经递质分泌、神经细胞凋亡等过程发挥抗抑郁作用。该作用途径表明, 在中药复方中普遍存在“多向药理学”效应和“叠加”效应, 为中药低浓度效应提供潜在依据, 体现中药复杂系统的作用特点; 为经典名方百合地黄汤制剂的质量控制和机制研究提供了相关的理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 汉·张仲景. 金匱要略 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963.
- [3] 赵嫣虹, 范蕙淇, 唐 朝. 百合地黄汤治疗抑郁研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(15): 79-81.
- [4] Yang B, Li H, Ruan Q F, *et al.* A facile and selective approach to the qualitative and quantitative analysis of triterpenoids and phenylpropanoids by UPLC/Q-TOF-MS/MS for the quality control of *Ilex rotunda* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.05.002.
- [5] 张 杨, 冯宝民, 卢 轩. UPLC/Q-TOF-MS 联用技术在药物分析中的应用进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1992-1996.
- [6] 陈 莉. LC-Q-TOF-MS 在中药中的应用研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1): 292.
- [7] 李 静, 高 丽, 高 耀, 等. 基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 179-187.
- [8] 高 耀, 吴 丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3483-3492.
- [9] 谢盈或, 刘 璐, 李渊芳, 等. 基于网络药理学的四妙勇安汤在血管新生中的作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4319-4330.
- [10] Liu C X, Liu R, Fan H R, *et al.* Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.
- [11] 李宇航, 郭明章, 孙 燕, 等. 仲景方用药度量衡古今折算标准研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(9): 597-600.
- [12] 医疗机构中药煎药室管理规范 [S]. 2009.
- [13] 吕钰萍, 夏哲雷. 浅说古代计时文化 [J]. 中国计量, 2013(10): 63-64.
- [14] Yu H, Chen J, Xu X, *et al.* A systematic prediction of multiple drug-target interactions from chemical, genomic, and pharmacological data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37608.
- [15] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [16] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [17] 从 禹, 黄 明. 百合病病机探讨 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(3): 176-177.
- [18] 刘效巍, 许 晶, 李晓秋, 等. 慢性应激抑郁模型大鼠脑内 5HT_{1A} 和 5-HT_{2A} 受体的变化 [J]. 基础医学与临床, 2004, 24(2): 174-178.
- [19] 邓海峰, 孙纁利, 吴 琼, 等. 毛蕊花糖苷通过调控 BDNF-TrkB 信号通路改善 CUMS 大鼠的抑郁样行为 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9): 1633-1637.
- [20] 张 慧, 李晓秋, 许 晶. 抗抑郁剂对慢性应激抑郁大鼠脑内 β 肾上腺素受体作用机制研究 [J]. 精神医学杂志, 2009, 22(5): 328-330.
- [21] 金齐颖, 吴红芳, 张园园, 等. 慢性不可预见性温和应激对大鼠海马星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1226-1230.