

基于化学成分相似性的川贝母茎叶药效研究

戴 静¹, 刘博文¹, 刘晓凤², 杨 杰³, 王执一¹, 邓 妍¹, 徐玉玲^{1*}, 刘 涛^{4,5}

1. 成都大学 四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610106
2. 四川天一学院, 四川 德阳 618000
3. 四川康晨生物科技有限公司, 四川 成都 611630
4. 四川省抗病毒中药产业化工程技术研究中心, 四川 成都 610106
5. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

摘要: 目的 在化学成分指引下对川贝母 *Fritillaria cirrhosa* 茎叶的药效作用进行研究, 为川贝母茎叶的综合开发利用提供依据。方法 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 方法检测川贝母茎叶及鳞茎中的化学成分, 比较两者的相似性, 推测川贝母茎叶的功效。选择两者有代表性的 30 个共有化学成分, 采用网络药理学方法研究川贝母茎叶对肺炎、支气管炎、支气管哮喘的作用靶点及其机制, 并通过动物实验对其进行药效验证。结果 检测得到川贝母茎叶与鳞茎共有成分 759 个, 筛选前 30 种主要化学成分, 搜索得到药物潜在靶点共 1816 个; 检索得到支气管哮喘靶点 2358 个、肺炎靶点 5014 个、支气管炎靶点 1964 个; 川贝母茎叶对肺炎、支气管炎、支气管哮喘的共同靶点有 333 个, 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析得到 GO 条目 762 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程条目 617 个、细胞组成条目 50 个、分子功能条目 95 个, 分别占 81%、7%、12%; 涉及的京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路主要有代谢通路和癌症通路等。氨水引咳实验及化痰实验结果显示, 茎叶水提组与可待因组和急支糖浆组比较, 咳嗽次数无显著差异, 均能显著增加小鼠酚红排泄量。结论 川贝母茎叶与鳞茎化学成分基本相同, 可能与鳞茎具有相似的功效, 川贝母茎叶中的异鼠李素-7-O-葡萄糖苷 (isorhamnetin-7-O-glucoside)、精胺 (spermine)、N-乙酰基-L-色氨酸 (N-acetyl-L-tryptophan)、 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid) 等成分可能通过 CCND1、EP300、CDK2、INS、EGF、CDC42、DNMT1、PARP1 等靶点, 调节代谢通路和癌症通路等信号通路, 发挥其止咳化痰作用, 可为川贝母茎叶的进一步开发利用提供依据。

关键词: 川贝母; UPLC-MS/MS; 网络药理学; 止咳化痰; 异鼠李素-7-O-葡萄糖苷; 精胺; N-乙酰基-L-色氨酸; γ -亚麻酸

中图分类号: R285; R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4942-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.019

Efficacy research of stems and leaves of *Fritillaria cirrhosa* based on similarity of chemical components

DAI Jing¹, LIU Bo-wen¹, LIU Xiao-feng², YANG Jie³, WANG Zhi-yi¹, DENG Yan¹, XU Yu-ling¹, LIU Tao^{4,5}

1. Sichuan Institute of Antibiotic Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China
2. Sichuan Tianyi College, Deyang 618000, China
3. Sichuan Kangchen Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611630, China
4. Sichuan Engineering Research Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine Industrialization, Chengdu 610106, China
5. College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: **Objective** Under the exploration of the chemical composition, the pharmacodynamic reaction of the stems and leaves of Chuanbeimu (*Fritillaria cirrhosa*) was studied, which provides a basis for the comprehensive development and utilization of the stems and leaves of *F. cirrhosa*. **Methods** The UPLC-MS/MS method was used to detect the chemical components of the stems, leaves and bulbs of *F. cirrhosa*, then the similarity of the chemical components was compared and its efficacy was speculated. Under

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2017YFC1701900); 四川省科技成果转化示范项目 2020ZHCG0073; 四川省科学技术厅 2020 年省级科技计划项目 (20YYJC1839); 2020 广西壮瑶药重点实验室开放课题 (GXZYKF2020-04)

作者简介: 戴 静 (1997—), 硕士研究生, 研究方向为中药新药开发研究。Tel: 15102879297 E-mail: 3091619772@qq.com

***通信作者:** 徐玉玲 (1975—), 硕士, 副教授, 主要从事中成药新药开发及再评价工作。Tel: (028)61302236 E-mail: xuyuling@cdu.edu.cn

the basis of the 30 representative common chemical components of the stems, leaves and bulbs of *F. cirrhosa* and the guidance of network pharmacology, the targets and mechanisms of the stems and leaves of *F. cirrhosa* against pneumonia, bronchitis, and bronchial asthma were studied, and its efficacy was verified by animal experiments. **Results** A total of 759 constituents in stems, leaves and bulbs of *F. cirrhosa* were identified by UPLC-MS/MS method, and a total of 1816 potential drug targets were obtained by screening the top 30 main chemical components; The number of targets for bronchial asthma was 2358, the number of targets for pneumonia was 5014, and the number of targets for bronchitis was 1964; The stems and leaves of *F. cirrhosa* had 333 common targets for pneumonia, bronchitis and bronchial asthma. GO functional enrichment analysis obtained 762 GO entries ($P < 0.05$), which included 617 biological process (BP) entries, 50 cell composition (CC) entries and 95 molecular function (MF) entries, accounting for 81%, 7% and 12% respectively; KEGG signaling pathways involved mainly included metabolic pathways and pathways in cancer, etc. The results of the ammonia water cough and the phlegm-resolving experiment showed that there was no significant difference in the number of coughs between the stem and leaf water extraction group and the codeine group and the emergency syrup group, and both of them significantly increased the mice phenol red excretion. **Conclusion** The stems and leaves of *F. cirrhosa* have basically the same chemical composition as the bulbs, and may have similar effects with the bulbs. The isorhamnetin-7-O-glucoside, spermine, *N*-acetyl-*L*-tryptophan, γ -linolenic acid and other ingredients may regulate metabolic pathways and pathways in cancer and other signaling pathways through CCND1, EP300, CDK2, INS, EGF, CDC42, DNMT1, PARP1 and other targets, exerting their cough-reducing and phlegm-reducing effects, which can provide the references for the further development and utilization of the stems and leaves of *F. cirrhosa*.

Key words: *Fritillaria cirrhosa* D. Don; UPLC-MS/MS; network pharmacology; cough-reducing and phlegm-reducing; isorhamnetin-7-O-glucoside; spermine; *N*-acetyl-*L*-tryptophan; γ -linolenic acid

川贝母 *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* 为百合科植物川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don、暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia、甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim、梭砂贝母 *F. dela-uayi* Franch.、太白贝母 *F. taipaiensis* P. Y. Li 或瓦布贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen 的干燥鳞茎, 为我国传统可用于保健食品的名贵中药材, 具有清热润肺、化痰止咳、散结消痈之功效^[1-3]。川贝母主产于我国四川甘孜州、阿坝州及青海、甘肃和西藏交界地区, 主要生长在山坡草丛或阴湿的小灌木丛中。川贝母为 3~4 年生草本植物, 由于生长环境特殊且种子休眠期长、自然萌发率低、野生资源过度采挖等原因而日趋濒危^[4]。由于川贝母疗效显著, 使用安全, 市场需求日益增大, 随之栽培技术发展及种植基地的扩大, 川贝母年产量可达上千吨, 其茎叶生物蕴藏量较大, 每年在产地均自然枯苗未得到开发利用, 造成了资源浪费^[5-7]。吴启秀等^[8]通过 HPLC-ELSD 法发现川贝母地上部分的生物碱成分与鳞茎的大部分相同, 但未见系统的化学成分比较研究。药物中所含的化合物是其药效活性的物质基础, 目前多数研究基于一种或几种代表性化合物相似性对药物的药效进行预测, 其科学性有待进一步研究。

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 借助于 HPLC 的理论及原

理, 涵盖了小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术, 增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量; 质谱分析是通过制备、分离、检测气相离子来检测化合物的一种专门技术, 是一种同时具备高特异性和高灵敏度的普适性方法; 超高效液相色谱-串联质谱 (ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 联用技术具有分析速度快、特异性强、灵敏度高、准确度高、稳定性高和多指标同时分析等特点, 已成为小分子物质 (包括目标物及其代谢产物) 定量分析的首选方法。网络药理学是从整体上探索药物与疾病的相关性, 其利用计算机模拟和各种数据库筛选药物分子作用靶点, 预测其信号通路和作用机制, 采用相关软件进行化合物-靶标-通路网络可视化, 经过拓扑参数分析筛选关键节点^[9-11], 可对中药的药效和作用机制进行理论预测。本研究采用 UPLC-MS/MS 方法对川贝母茎叶及鳞茎中的化学成分进行了测定, 比较其差异, 根据化学成分的相似性来推测茎叶的主要功效, 并通过网络药理学对川贝茎叶对肺炎、支气管炎、支气管哮喘的作用机制进行初步探究, 采用动物药理实验对其药效进行验证, 以期对川贝茎叶的开发利用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu Nexera X2 超高效液相色谱 (日本岛

津公司); Applied Biosystems 4500 QTRAP 串联质谱(美国应用生物系统公司); Scientz-100F 冻干机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Retsch 研磨仪 [MM 400, 弗尔德(上海)仪器设备有限公司]; LabServ 移液枪(广州誉维生物科技仪器有限公司); 高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司)。

1.2 材料与试剂

川贝母茎叶(批号 20200918B2, 四川康晨生物科技有限公司), 经成都大学刘涛研究员鉴定为川贝母 *F. cirrhosa* D. Don 的茎叶; 川贝母药材(批号 20200918B1, 四川康晨生物科技有限公司), 经成都大学刘涛研究员鉴定为川贝母 *F. cirrhosa* D. Don 的鳞茎; 甲醇(色谱纯, Merck); 乙腈(色谱纯, Merck)。苯酚红(批号 20190801, 天津市天新精细化工开发中心); 氨水(批号 2016080501, 成都市科龙化工试剂厂); 磷酸可待因(批号 20180433, 青海制药厂有限公司); 急支糖浆(批号 18110256, 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司); 盐酸溴己新(批号 20190322, 浙江万邦药业有限公司); 水为怡宝纯净水。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠 80 只, 体质量 (20 ± 2) g, 雌雄各半; 均购于成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川) 2015-030。所有动物实验遵循国家或机构的有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法

2.1 UPLC-MS/MS 检测

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Agilent SB-C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 水(含 0.1% 甲酸, A)-乙腈(含 0.1% 甲酸, B); 洗脱梯度: 0~9 min, 5%~95% B; 9~10 min, 95% B; 10~11.1 min, 95%~5% B; 11.1~14 min, 5% B; 体积流量 0.35 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 4 μL。

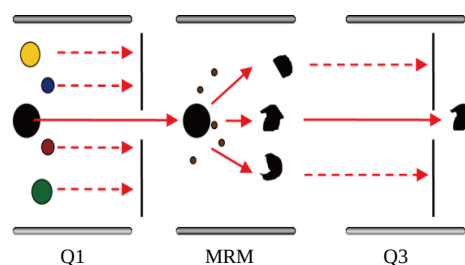
2.1.2 质谱条件 线性离子阱(LIT)和三重四极杆(QQQ)扫描是在三重四极杆线性离子阱质谱仪(Q TRAP), AB4500 Q TRAP UPLC/MS/MS 系统上获得的, 该系统配备了 ESI Turbo 离子喷雾接口, 可由 Analyst 1.6.3 软件(AB Sciex)控制运行正负两种离子模式。ESI 源操作参数如下: 离子源, 涡轮喷雾; 源温度 550 °C; 离子喷雾电压(IS) 5500 V(正离子模式)/-4500 V(负离子模式); 离子源气体 I(GSI)、气体 II(GSII)和帘气(CUR)分

别设置为 344.7、413.7、172.4 kPa, 碰撞诱导电离参数设置为高。在 QQQ 和 LIT 模式下分别用 10、100 μmol/L 聚乙二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。QQQ 扫描使用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 并将碰撞气体(氮气)设置为中等。通过进一步的碰撞能量(DP)和去簇电压(CE)优化, 完成了各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对。

2.1.3 供试品溶液的制备 川贝母及川贝母茎叶样品用高速粉碎机粉碎后过 3 号筛, 过筛后样品放置于冻干机中真空冷冻干燥; 利用研磨仪研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉末状; 称取 100 mg 的粉末, 溶解于 1.2 mL 70% 甲醇提取液中; 每 30 分钟涡旋 1 次, 每次持续 30 s, 共涡旋 6 次, 样本置于 4 °C 冰箱过夜; 12 000 r/min 离心 10 min 后, 吸取上清, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过样品, 并保存于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。质控样本(QC)由川贝母鳞茎、川贝母茎叶样本提取物等量混合制备而成。

2.1.4 质谱数据处理 定性定量原理: 基于嘉兴迈维代谢生物科技有限公司自建数据库 MWDB (metware database), 根据二级谱信息进行物质定性, 分析时去除了同位素信号, 含 K⁺、Na⁺、NH₄⁺ 的重复信号, 以及本身是其他更大相对分子质量物质的碎片离子的重复信号。

代谢物定量是利用三重四级杆质谱的 MRM 模式分析完成(图 1)。MRM 模式中, 四级杆首先筛选目标物质的前体离子(母离子), 排除掉其他相对分子质量物质对应的离子以初步排除干扰; 前体离子经碰撞室诱导电离后断裂形成很多碎片离子, 碎片离子再通过三重四级杆过滤选择出所需要的 1 个特征碎片



Q1 代表母离子, Q3 代表子离子

Q1 represents the parent ion, Q3 represents the daughter ion

图 1 质谱多反应监测模式示意图

Fig. 1 Schematic diagram of mass spectrometry multi-reaction monitoring mode

离子,排除非目标离子干扰,使定量更为精确,重复性更好。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,对所有物质质谱峰进行峰面积积分,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正^[9-10]。

基于代谢数据库,对样本的代谢物进行了质谱定性定量分析。通过三重四级杆筛选出每个物质的特征离子,在检测器中获得特征离子的信号强度(CPS),用 MultiaQuant 软件打开样本下机质谱文件,进行色谱峰的积分和校正工作,每个色谱峰的峰面积代表对应物质的相对含量,最后导出所有色谱峰峰面积积分数据保存^[11-13]。

2.2 网络药理学预测

2.2.1 数据库与软件 运用的数据库有 PharmMapper 数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); STRING 数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>); DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>); VENNY(<https://bioinfogp.cnb.csic.es>); 运用的软件有数据分析和绘图软件 Cytoscape 3.6.0.prism 6。

2.2.2 核心靶标获取 根据色谱峰面积,筛选出 30 种主要化学成分,通过 PubChem 数据库,检索得到化学成分的 3D 结构,在 PharmMapper 数据库中检索得到化学成分对应靶点的 UniprotID,运用 DAVID 数据库,导入 UniprotID,转化为基因名;根据咳嗽相关的临床表型合集,查找临床表现的英文词条,以支气管哮喘(bronchial asthma)、支气管炎(bronchitis)、肺炎(pneumonia)为检索词,通过 GeneCards 数据库进行疾病靶点预测分析,建立咳嗽的相关基因集。利用 Venny2.0 网站找出成分基因与疾病基因的交集基因。

2.2.3 靶点通路分析 为进一步观察作用靶标的生物学功能,将所有交集基因导入到 DAVID 数据库中对其进行通路富集分析。在 DAVID 的基因列表通用管理面板中复制粘贴基因列表,Select Identifier 选择“OFFICIAL GENE SYMBOL”,List Type 设置为“Gene List”,提交基因列表;为所提交的基因列表选择对应的物种“Homo Sapiens”,选择基因本体论(gene ontology, GO)生物学过程富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析,点击“Functional Annotation Chart”获得通路富集结

果^[14-16]。将 3 种 GO 分析结果分别选择前 20 个用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制柱状图。选择 KEGG 分析结果前 20 条信号通路使用 Omicshare 数据库(<http://www.omicshare.com>)绘制成气泡图。

2.2.4 PPI 网络构建 根据 KEGG 信号通路富集分析结果,选择前 30 个通路,整理出对应基因,上传到 STRING 数据库中,选择“Multiple proteins”,选择物种人类“Homo sapiens”,点击“search”,保存分析结果图片及文件。

2.2.5 “成分-靶标-通路”网络构建及分析 根据 KEGG 信号通路富集分析结果前 30 个通路对应基因,找出对应化学成分,再根据 PPI 网络文件,构建成分、核心靶标和关键通路之间相互作用关系表,导入 Cytoscape 3.6.0 软件中,运用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“药材-成分-靶标-通路”网络图,并进行可视化分析,进一步探讨川贝母茎叶止咳作用的分子机制。

2.3 药效实验

2.3.1 川贝母茎叶水提物制备 在 5 L 圆底烧瓶中加入 300.0 g 川贝母茎叶,加入 3 L 水,浸泡 1 h,开始加热,回流提取 1 h,将提取液滤过,80 °C 减压浓缩成浸膏,再 80 °C 减压干燥得到水提取物 21.641 3 g。

2.3.2 小鼠氨水引咳实验 取昆明种小鼠 40 只,适应性喂养 3 d 后,随机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半。分别为模型组(纯化水)、川贝母茎叶水提组(0.50 g/kg)、可待因组(12 mg/kg)和急支糖浆组(0.02 mL/g)。均 ig 给药,剂量为 0.02 mL/g,连续 7 d,于末次给药 1 h 后,将小鼠置于自制密闭玻璃容器内,超声雾化喷入氨水,20 s 后立即取出小鼠,记录小鼠咳嗽潜伏期和 3 min 内咳嗽次数。

2.3.3 小鼠酚红排泄实验 取昆明种小鼠 40 只,适应性喂养 3 d 后,随机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半。分别为模型组(纯化水)、川贝母茎叶水提组(0.50 g/kg)、溴己新组(4.8 mg/kg)和急支糖浆组(0.02 mL/g)。各组动物 ig 给予相应药物,对照组给予等量蒸馏水,1 次/d,连续给药 3 d,第 3 天 ig 给药 30 min 后,ip 一定质量浓度酚红 10 μ L (0.5 mg)/g 体重,注射后 30 min,处死动物,剥离气管周围组织,剪下自甲状软骨至气管分支处的一段气管,放入盛有 2 mL 0.9%氯化钠溶液试管中,加 0.1 mL 氢氧化钠(1 mol/L),于 546 nm 波长处测定吸光度(A)。以酚红质量浓度(0.1、0.3、0.5、2.5、5.0、12.5 mg/L)为横坐标(X),对应 A 值为纵坐标(Y),

绘制标准曲线,得曲线方程 $Y=0.102\ 68\ X+0.019\ 69$, $r=0.999\ 9$,由标准曲线法计算酚红排泄量。

3 结果

3.1 川贝母茎叶成分检测

3.1.1 质谱数据定性定量分析 利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。得到混样 QC 样本的总离子流图 (total ions current, TIC),见图 2。MRM 代谢物检测多峰图 (多物质提取的离子流谱图, XIC),见图 3。

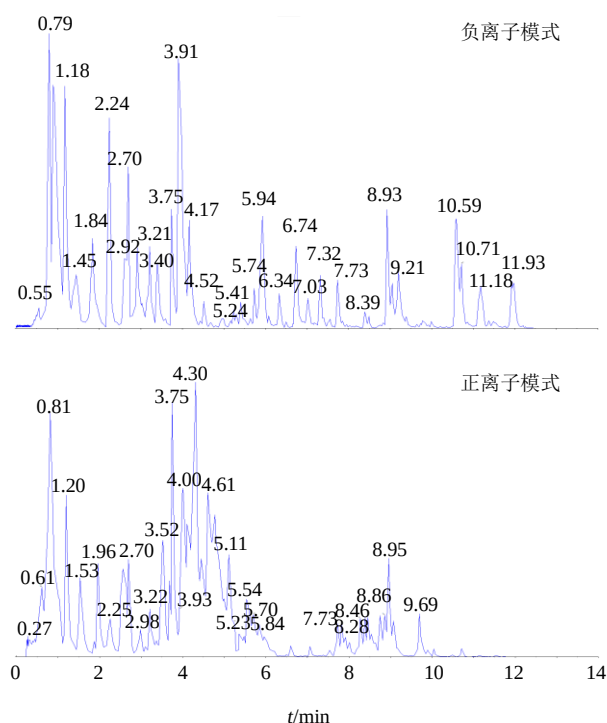


图2 混样 QC 样品质谱分析总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of mixed sample mass spectrometry analysis

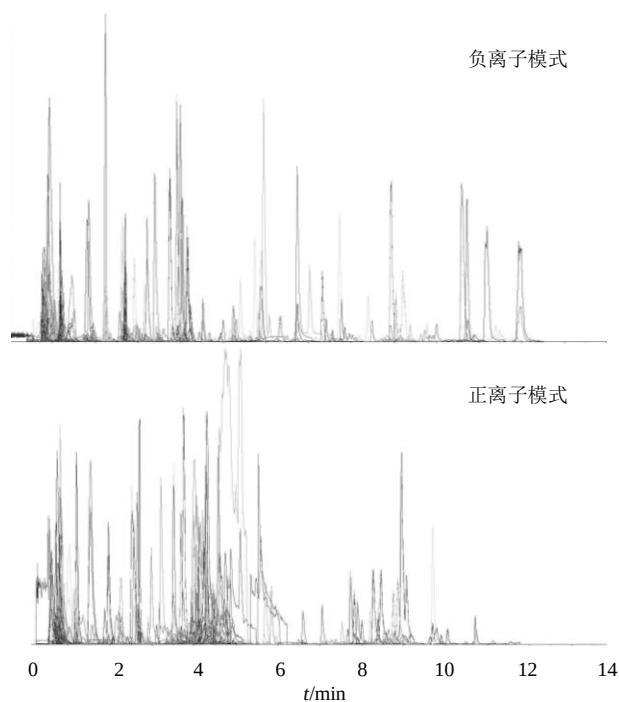
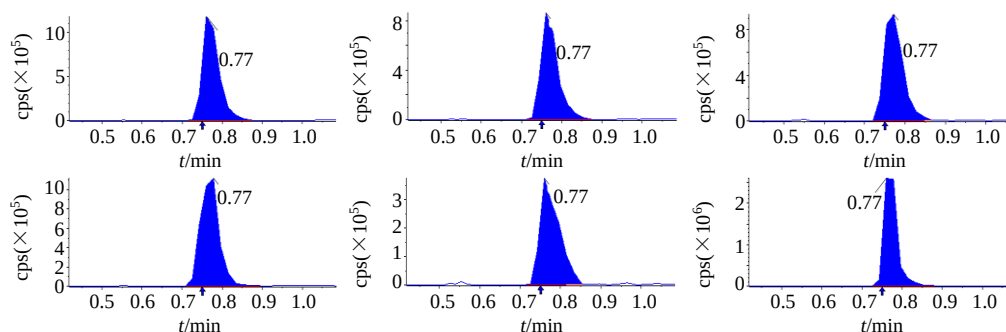


图3 MRM 代谢物检测多峰图

Fig. 3 Multimodal graph of MRM metabolite detection

为了比较所有检测到的代谢物中每个代谢物在不同样本中的物质含量差异,根据代谢物保留时间与峰形的信息,对每个代谢物在不同样本中检测到的质谱峰进行校正,以确保定性定量的准确。图 4 展示了随机抽取的代谢物 (*L*-threo-3-methyl-aspartate) 在不同样本中的定量分析积分校正结果。

3.1.2 川贝母茎叶成分鉴定 在 UPLC-MS/MS 检测条件下,对数据进行分析得出,从川贝母鳞茎中检测了 767 个化学成分,从川贝母茎叶中检测了 833 个化学成分,交集成分 759 个,占总成分 90.2%,见图 5,占川贝母鳞茎成分的 98.96%,表明茎叶与



图中为随机抽取的代谢物在不同样本中的定量分析积分校正结果,峰面积代表物质在样本中相对含量, cps 为某代谢物离子检测的离子流强度
The figure shows the quantitative analysis and integral correction results of randomly selected metabolites in different samples; the peak area represents the relative content of the substance in the sample; cps is the ion current intensity of a certain metabolite ion detection

图4 代谢物定量分析积分校正图

Fig. 4 Integration calibration chart of metabolite quantitative analysis

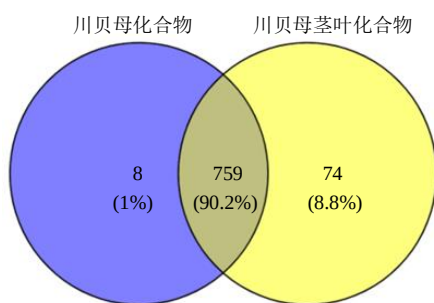


图 5 川贝母与川贝母茎叶化合物交集

Fig. 5 Intersection of compounds from *Fritillariae* *Cirrhosae* Bulbus and stems and leaves of *F. cirrhosa*

鳞茎可能有相同的清热润肺、化痰止咳、散结消痈的功效^[17-18]，在临床上可用于肺炎、支气管炎、支气管哮喘的治疗。根据峰面积显示，交集成分主要有生物碱、有芬酸类、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物等，包括 2-甲基-3-氧代琥珀酸、鄂贝乙素、2-(甲酰氨基)苯甲酸、3-羟基-3-甲基谷氨酸、西贝母碱等。根据其峰面积大小进行排序，再参考《中国药典》2020 版一部“川贝母”项下质量标准中定量测定指标，筛选出 30 种主要成分，如表 1 所示。

3.2 网络药理学结果

3.2.1 核心靶标获取 将筛选出的 30 种主要化学成

表 1 川贝母茎叶与鳞茎主要交集成分

Table 1 Main intersection of compounds from stems, leaves and bulbs of *F. cirrhosa*

序号	相对分子质量	分子式	电离模式	化合物	物质一级分类	CAS 号
pme3146	146	C ₅ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	2-甲基-3-氧代琥珀酸	有机酸	—
mws1589	411	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	[M+H] ⁺	鄂贝乙素	生物碱	125409-58-7
mws1382	165	C ₈ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻	2-(甲酰氨基)苯甲酸	酚酸类	3342-77-6
pme2529	162	C ₆ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	3-羟基-3-甲基谷氨酸	氨基酸及其衍生物	503-49-1
pmb2228	429	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	[M+H] ⁺	西贝母碱	生物碱	61825-98-7
pmb2799	278	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	γ-亚麻酸*	脂质	506-26-3
Rfmb091	278	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	α-亚麻酸*	脂质	463-40-1
Hmgn001653	137	C ₇ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	葫芦巴碱	生物碱	535-83-1
pmb0484	103	C ₅ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	胆碱	生物碱	62-49-7
Lmbn005369	278	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	十八碳-9E,13E,15Z-三烯酸	脂质	25575-00-2
pmd0136	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	槲皮素-3-O-洋槐糖苷*	黄酮	52525-35-6
Zmyn005384	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	反油酸	脂质	112-79-8
mws0191	117	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	甜菜碱	生物碱	107-43-7
Lmbn004790	202	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	[M+H] ⁺	精胺	生物碱	71-44-3
Xmdn001002	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	[M-H] ⁻	肉豆蔻酸	脂质	544-63-8
pmn001669	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	异鼠李素-7-O-葡萄糖苷 (蔓菁苷)*	黄酮	6743-96-0
pmf0174	154	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	2,3-二羟基苯甲酸*	有机酸	303-38-8
Lmhn003373	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷*	黄酮	5041-82-7
pmp000086	246	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	N-乙酰-L-色氨酸	氨基酸及其衍生物	1218-34-4
Lmhp009590	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	山柰酚-3-O-新橙皮糖苷*	黄酮	32602-81-6
Hmsp000364	141	C ₆ H ₁₁ N ₃ O	[M+H] ⁺	组氨酸	生物碱	501-28-0
pme0006	115	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	L-脯氨酸	氨基酸及其衍生物	147-85-3
Zmhn001926	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	亚油酸	脂质	60-33-3
mws0028	166	C ₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	D-木糖酸	有机酸	526-91-0
pme1137	138	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	原儿茶醛	酚酸类	139-85-5
pmp001251	415	C ₂₇ H ₄₅ NO ₂	[M+H] ⁺	鄂贝啶碱	生物碱	25650-70-8
pmn001407	413	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	[M+H] ⁺	新贝甲素	生物碱	96997-98-7
pmb0874	383	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	[M+H] ⁺	琥珀酰腺苷	核苷酸及其衍生物	4542-23-8
pmp001270	575	C ₃₃ H ₅₃ NO ₇	[M+H] ⁺	伊贝碱苷 A	生物碱	98985-24-1
Hmln002189	429	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	[M+H] ⁺	贝母碱	生物碱	18059-10-4

*表示存在同分异构体

*indicates the presence of isomers

分,通过 PharmMapper 数据库搜索得到药物潜在靶点共 1816 个,主要包括基因组多蛋白、细胞分裂蛋白 ftsZ 同源物 1、无机焦磷酸酶、脱氧苏氨酸合酶、FKBP12-雷帕霉素复合物相关蛋白等;通过 GeneCards 数据库检索得到支气管哮喘靶点 2358 个、肺炎靶点 5014 个、支气管炎靶点 1964 个,通过 Venny2.0 得出主要成分对肺炎、支气管炎、支气管哮喘的交集基因有 333 个(图 6),包括 GLRB、ANXA1、VDR、DNMT1、GCDH、MERTK、ECE1、SYP、TPO、NMT1 等,对应靶点包括髓过氧化物酶、膜联蛋白 A5、肌红蛋白、补体 C2、溶菌酶、芳基硫酸酯酶 A、乳铁蛋白、

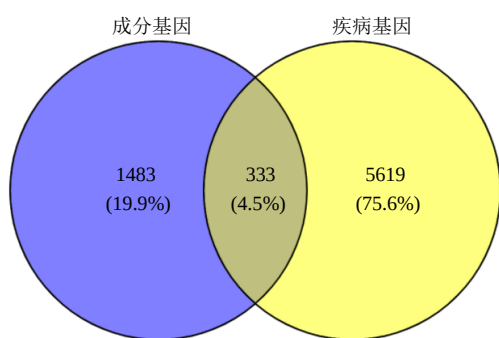


图 6 成分基因与疾病基因交集

Fig. 6 Intersection of component genes and disease genes

腺苷同型半胱氨酸酶、去铁素、膜联蛋白 A4 等。

3.2.2 靶点通路分析 DAVID 中 GO 功能富集分析得到 GO 条目 762 个 ($P < 0.05$), 其中包括代谢过程、有机物代谢过程、有机氮化合物代谢过程、氮化合物代谢过程、细胞代谢过程、初级代谢过程、对刺激的反应、多细胞生物过程的调控、对有机物质的反应、发展过程等生物过程 (biological process, BP) 条目 617 个, 包括细胞质、细胞内受体、胞质溶胶、细胞器腔、细胞器、膜结合细胞器等细胞组成 (cellular component, CC) 条目 50 个, 包括结合、催化活性、蛋白质结合、有机环状化合物结合、离子结合、杂环化合物结合、小分子结合等分子功能 (molecular function, MF) 条目 95 个, 分别占 81%、7%、12%。分别选择前 20 个用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制柱状图, 结果见图 7。KEGG 通路富集筛选得到 125 条信号通路 ($P < 0.05$), 涉及代谢途径、癌症的途径、病毒致癌、前列腺癌、Ras 信号通路、Rap1 信号通路、百日咳、局灶性粘连、EB 病毒感染结核等。选择前 30 条信号通路, 使用 Omicshare 数据库绘制气泡图, 见图 8, 前 30 条通路的 PPI 网络图见图 9, 具体信息见表 2。

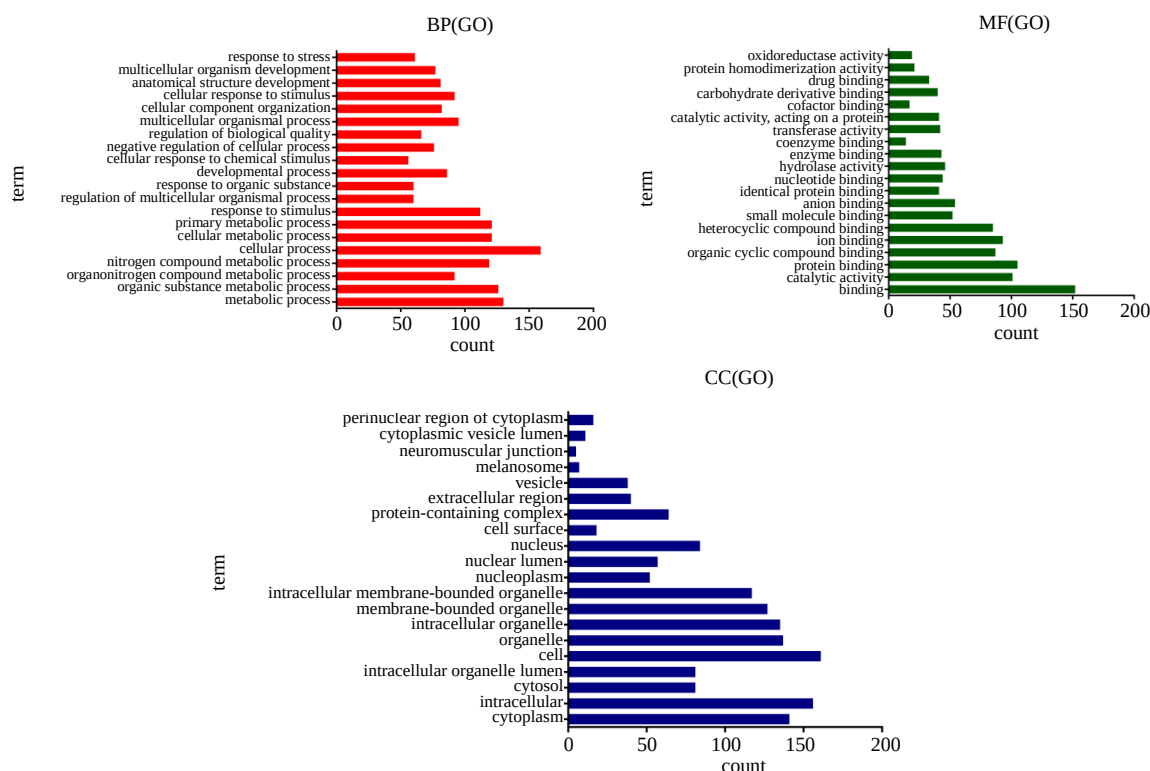


图 7 交集基因 GO 富集分析前 20 个通路

Fig. 7 Top 20 pathways of intersection genes by GO enrichment analysis

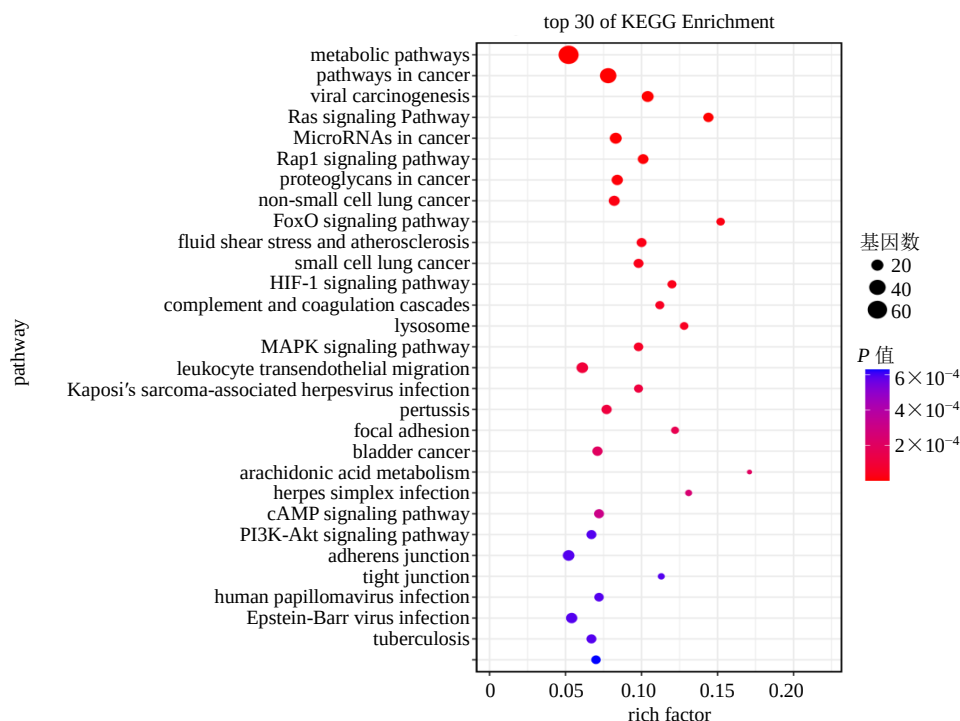


图 8 交集基因 KEGG 富集分析前 30 个通路气泡图

Fig. 8 Bubble chart of top 30 pathways of intersection genes by KEGG enrichment analysis

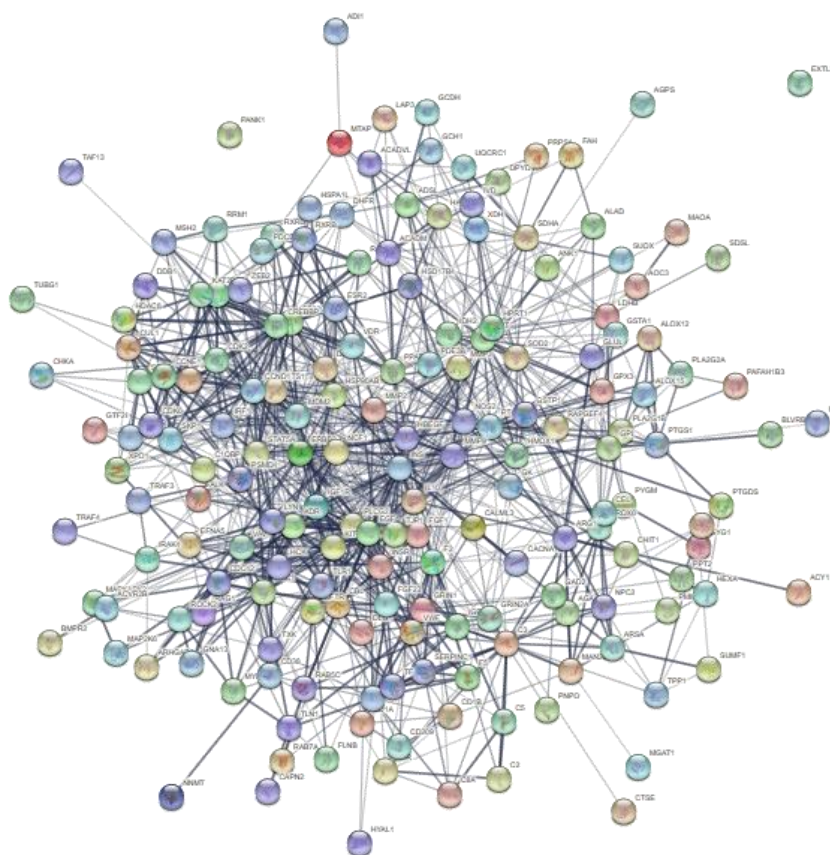


图 9 KEGG 前 30 条通路基因 PPI 网络图

Fig. 9 PPI network diagram of top 30 pathway genes of KEGG

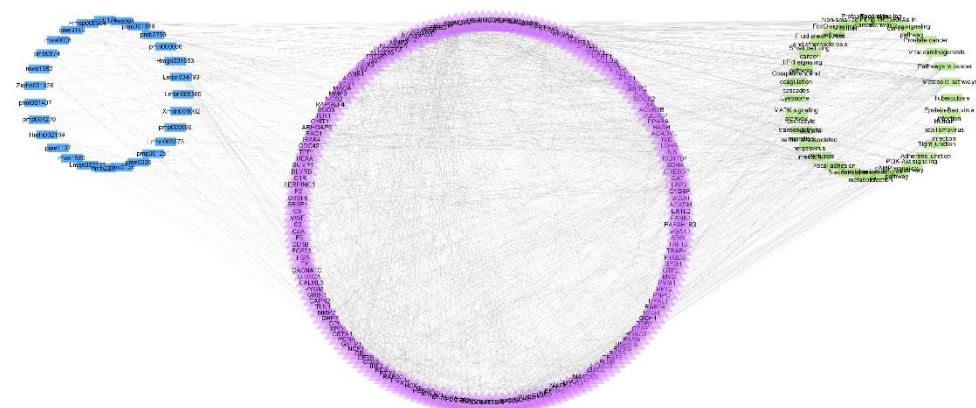
表 2 川贝母茎叶与川贝母交集成分基因与咳嗽疾病交集基因 KEGG 通路

Table 2 KEGG pathway of intersection component genes of stems and leaves from *F. cirrhosa* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and intersection of cough disease genes

序号	通路	可视基因数	背景基因数	强度	错误发现率
hsa01100	metabolic pathways	65	1250	0.49	5.73×10^{-13}
hsa05200	pathways in cancer	40	515	0.66	1.04×10^{-12}
hsa05203	viral carcinogenesis	19	183	0.79	1.39×10^{-7}
hsa05215	prostate cancer	14	97	0.93	3.61×10^{-7}
hsa04014	Ras signaling pathway	19	228	0.69	2.27×10^{-6}
hsa05206	microRNAs in cancer	15	149	0.77	5.52×10^{-6}
hsa04015	Rap1 signaling pathway	17	203	0.69	7.95×10^{-6}
hsa05205	proteoglycans in cancer	16	195	0.68	1.94×10^{-5}
hsa05223	non-small cell lung cancer	10	66	0.95	1.94×10^{-5}
hsa04068	FoxO signaling pathway	13	130	0.77	2.50×10^{-5}
hsa05418	fluid shear stress and atherosclerosis	13	133	0.76	2.88×10^{-5}
hsa05222	small cell lung cancer	11	92	0.85	2.97×10^{-5}
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	11	98	0.82	4.74×10^{-5}
hsa04610	complement and coagulation cascades	10	78	0.88	4.74×10^{-5}
hsa04142	lysosome	12	123	0.76	5.58×10^{-5}
hsa04010	MAPK signaling pathway	18	293	0.56	0.000 10
hsa04670	leukocyte transendothelial migration	11	112	0.76	0.000 11
hsa05167	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	14	183	0.65	0.000 11
hsa05133	pertussis	9	74	0.85	0.000 16
hsa04510	focal adhesion	14	197	0.62	0.000 20
hsa05219	bladder cancer	7	41	1.00	0.000 20
hsa00590	arachidonic acid metabolism	8	61	0.89	0.000 25
hsa05168	herpes simplex infection	13	181	0.63	0.000 31
hsa04024	cAMP signaling pathway	13	195	0.59	0.000 59
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	18	348	0.48	0.000 59
hsa04520	adherens junction	8	71	0.82	0.000 59
hsa04530	tight junction	12	167	0.63	0.000 59
hsa05165	human papillomavirus infection	17	317	0.50	0.000 59
hsa05169	epstein-barr virus infection	13	194	0.60	0.000 59
hsa05152	tuberculosis	12	172	0.61	0.000 63

3.2.3 网络构建及分析 成分-靶点网络由 Cytoscape 3.7.0 构建得到 121 个节点,如图 10 所示,其中蓝色为对应化学成分、紫色为对应基因、绿色为对应通路。结果采用度 (degree)、平均最短路径 (average shortest path length, ASPL)、中介中心度 (betweenness centrality, BC) 和接近中心性 (close to centrality, CC) 排序确定关键节点,网络中度值 $\geq$ 中位数 (成分度值中位数=6.6,靶标度值中位数=14.9,通路度值中位数=15.7) 的成分分别是精胺 (spermine)、异鼠李素-7-O-葡萄糖苷 (isorhamnetin-7-O-glucoside)、组蛋白醇 (histidinol)、N-乙酰基-L-

色氨酸 (N-acetyl-L-tryptophan)、 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid)、2,3-二羟基苯甲酸 (2,3-dihydroxybenzoic acid)、琥珀酰腺苷 (succinyladenosine)、2-甲基-3-氧代琥珀酸 (2-methyl-3-oxosuccinic acid)。靶标有 INS、EGF、CCND1、ERBB2、EP300、IL10、CAT、MDM2、CREBBP、PTGS2、CDC42、MMP9、IGF1R、KDR、CDK2 等。通路主要有代谢途径 (metabolic pathways)、癌症的通路 (pathways in cancer)、病毒致癌通路 (viral carcinogenesis)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt



蓝色代表川贝母茎叶与川贝母交集成分，紫色代表对应靶标，绿色代表相关通路

Blue represents the component intersection of *Fritillaria cirrhosa* stems and leaves with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; Purple represents the corresponding target; Green represents related pathways.

图 10 川贝母茎叶与川贝母交集成分-靶标-通路网络图

Fig. 10 Intersection component of *F. cirrhosa* stems and leaves with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*-target-pathway network diagram

signaling pathway)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)、人乳头瘤病毒感染通路 (human papillomavirus infection)、花生四烯酸代谢通路 (arachidonic acid metabolism)、结核 (tuberculosis)、百日咳 (pertussis) 等, 见表 3。

以上研究表明, 川贝母茎叶中含有对咳嗽有效

的化学成分, 对肺炎、支气管炎和支气管哮喘可能具有一定药效, 并通过多靶点多通路相结合的治疗机制发挥其治疗作用。

3.3 药效实验结果

3.3.1 止咳实验 采用 SPSS 软件进行数据方差分析, 氨水引咳小鼠的影响见表 4。与模型组比较,

表 3 网络中通路的拓扑参数分析

Table 3 Topological parameter analysis of pathways in network

聚类系数	度	离心率/ (r·min ⁻¹)	名称	压力/ Pa	拓扑系数	聚类系数	度	离心率/ (r·min ⁻¹)	名称	压力/ Pa	拓扑系数
0.059 615	65	3	代谢途径	44 818	0.058 242	0.205 128	13	4	单纯疱疹感染	3082	0.182 788
0.257 692	40	4	癌症的途径	12 140	0.155 117	0.179 487	13	4	cAMP 信号通路	1834	0.174 268
0.333 333	19	4	病毒致癌	2664	0.194 959	0.282 051	13	4	EB 病毒感染	1318	0.200 358
0.309 942	19	4	Ras 信号通路	2980	0.183 144	0.318 182	12	4	溶酶体	746	0.206 439
0.352 941	18	4	MAPK 信号通路	2628	0.194 836	0.272 727	12	5	紧密连接	1208	0.209 44
0.509 804	18	4	PI3K-Akt 信号通路	1174	0.232 389	0.242 424	12	4	结核	1650	0.175 853
0.360 294	17	4	Rap1 信号通路	2056	0.200 692	0.218 182	11	4	小细胞肺癌	1222	0.247 847
0.382 353	17	4	人乳头瘤病毒感染	2688	0.209 106	0.381 818	11	4	HIF-1 信号通路	662	0.260 977
0.400 000	16	4	蛋白聚糖在癌症中的通路	1316	0.233 135	0.418 182	11	4	白细胞跨内皮迁移	560	0.236 915
0.409 524	15	4	癌症中的 MicroRNA 通路	1174	0.235 821	0.400 000	10	4	非小细胞肺癌	648	0.271 429
0.615 385	14	4	前列腺癌	488	0.255 989	0.733 333	10	5	补体和凝血级联	296	0.255 738
0.428 571	14	4	局灶性黏连	1204	0.237 714	0.333 333	9	4	百日咳	1076	0.192 519
0.512 821	13	4	FoxO 信号通路	1120	0.253 147	0.642 857	8	4	花生四烯酸代谢	72	0.261 161
0.230 769	13	4	流体剪切应力与动脉粥样硬化	1356	0.180 128	0.321 429	8	5	黏附连接	220	0.338 785
0.205 128	13	4	卡波济氏肉瘤相关疱疹病毒感染	1548	0.185 944	0.857 143	7	5	膀胱癌	46	0.372 671

表4 对氨水引咳小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effects on mice with cough induced by ammonia water ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	咳嗽潜伏期/s	3 min 内咳嗽次数/次
模型	48.29±26.25	37.70±14.21
可待因	101.17±20.59 [*]	20.00±7.13 [*]
急支糖浆	123.78±22.69 ^{**}	5.80±1.75 ^{**}
茎叶水提物	91.73±37.50 [*]	13.10±9.93 [*]

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与茎叶水提物组比较: [△] $P<0.01$, 下同

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.01$ vs stem and leaf water extract group, same as below

茎叶水提组、可待因组和急支糖浆组均能显著延长小鼠咳嗽潜伏期并减少小鼠咳嗽次数 ($P<0.05$ 、 0.01); 茎叶水提组与可待因组和急支糖浆组比较, 咳嗽潜伏期无显著差异, 咳嗽次数茎叶水提组与可待因组无显著差异。

3.3.2 化痰实验 采用 SPSS 软件进行数据方差分析, 小鼠酚红排泄量比较见表 5。与模型组比较, 茎叶水提组、溴己新组和急支糖浆组均能显著增加小鼠酚红排泄量 ($P<0.05$ 、 0.01); 茎叶水提组与溴己新组和急支糖浆组比较, 有极显著差异 ($P<0.01$)。

表5 对小鼠酚红排泄量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Comparison of phenol red excretion in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	酚红排泄量/(mg·L ⁻¹)
模型	0.24±0.07
溴己新	1.18±0.78 ^{*△△}
急支糖浆	1.10±0.87 ^{*△△}
茎叶水提物	2.91±1.68 ^{**}

4 讨论

我国“十三五”中医药科技创新专项规划中要求对药用资源最大化进行综合利用, 川贝母作为我国传统中药材, 对肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、痰中带血、瘰癧、乳痈、肺痈等临床病症具有极好的疗效^[17-20], 其非药用部分茎叶药用价值的开发利用具有极其重要的意义。

药物的药效与其物质基础有相关性, 药物中所含的化合物是其药效活性的物质基础, 本研究采用 UPLC-MS/MS 方法, 对川贝母茎叶及鳞茎的化学成分进行定性定量研究, 测定出了近千种化合物, 解决了目前仅基于一种或几种代表性化合物相似性对

药物的药物的药效进行预测的问题。在本研究条件下, 川贝母茎叶与其鳞茎的化合物种类重合率达到 90.2%, 表明两者可能具有相似的药效。

网络药理学具有整体性、系统性和注重药物与靶点间相互作用的特点, 与中医药学的基本特点相吻合, 可在一定程度上解决传统中药研究中“单一成分-单一靶点-单一途径”的局限性。本研究采用 UPLC-MS/MS 及高通量筛选的方法代替数据库筛选, 定性定量地检测出川贝母茎叶及鳞茎所含成分, 解决了一般网络药理学多采用数据库直接筛选药材化学成分进行分析, 忽略了所筛选成分含量的高低^[21]的问题。由于工作量和论文篇幅的限制, 不能对共有的 759 个成分都进行分析。由于所用样本检测采用相对定量, 故可以用峰面积代表代谢物成分高低。本研究以检测成分的峰面积为依据, 选择了 30 种化学成分, 采用网络药理学对川贝母茎叶治疗支气管炎、肺炎和支气管哮喘 3 种咳嗽疾病的交集基因网络药理学数据推测, 筛选出其治疗机制的 28 种主要化学成分、178 种对应靶标和 30 种治疗通路, 其中包含结核、百日咳等与咳嗽相关的通路, 表明其对支气管炎、肺炎和支气管哮喘具有较好疗效。在此基础上, 采用动物药理实验表明川贝母茎叶水提物具有止咳化痰的作用, 对网络药理学研究结果进行了进一步的验证。基于实验分析的需要, 在 UPLC-MS/MS 实验中, 2 种供试品使用 70% 甲醇作为提取溶媒, 比较两者在同一提取条件下成分的不同, 结果表明两者成分基本一致, 在此信息提示下, 本实验对川贝母茎叶的止咳化痰药效作用进行了研究探讨, 在药效实验中, 基于药材传统的临床用法, 以水为溶媒对其提取, 确认其药效。

本研究方法即通过 UPLC-MS/MS 及高通量筛选对非药用部位及药材主要成分进行定性定量分析, 通过主要成分的对比, 根据两者主要成分的相似性, 推测该非药用部位是否具有与对应药材相同的药效, 再根据网络药理学推测和药理学实验验证是否具有相应药理作用, 可为中药材非药用部位以及对应药渣的开发研究提供新的路线。

本研究基于代谢组学数据库的分析方式对植物的化学组成进行分析存在一定局限性, 如数据库收录数据不完全, 植物的次生代谢产物多样, 但分析结果能为下一步研究提供参考。目前采用的小鼠氨水引咳药理模型和气管段酚红排泄量对茎叶的药效进行了验证, 模型较为简单, 仍有待进一步研究。

志谢: 嘉兴迈维代谢生物科技有限公司对川贝母茎叶及鳞茎进行 UPLC-MS/MS 检测及分析数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 38.
- [2] 周琪, 雷乾娅, 赵军宁, 等. 川产道地药材川贝母 (栽培品) 鉴别与品质研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 225-230.
- [3] 徐云, 谢慧敏, 谢慧淦, 等. 不同采收期栽培卷叶贝母与暗紫贝母的质量比较 [J]. 华西药学杂志, 2018, 33(5): 515-518.
- [4] 张剑光, 徐彦, 刘圆, 等. 响应面设计法优化川贝母茎和叶中总生物碱的提取工艺 [J]. 食品科学, 2013, 34(10): 11-15.
- [5] 刘博文, 戴静, 杨杰, 等. 川贝母药渣综合质量研究 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3): 241-245.
- [6] 赵军宁, 田兴军, 彭成, 等. 川产道地药材资源保障与高质量发展策略 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 181-190.
- [7] 熊浩荣, 马朝旭, 国慧, 等. 川贝母野生基原植物资源分布和保育研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2573-2579.
- [8] 吴启秀, 王曙, 严晓梁, 等. 栽培川贝母的地上部分与鳞茎中总生物碱的比较 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(6): 712-713.
- [9] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [10] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物研究 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-1122.
- [11] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在物质基础研究 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.
- [12] 胡雪岩, 程丹丹, 侯媛媛, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术的治咳川贝枇杷滴丸在家兔体内的定性定量研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 103-108.
- [13] 董林毅, 张韻慧, 郭婷婷, 等. UPLC-Q-TOF-MS 测定治咳川贝枇杷滴丸中 6 种有效成分的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(10): 830-833.
- [14] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3633-3638.
- [15] 王倩倩, 谭勇, 刘雯霞, 等. 贝母化学成分及药理作用的研究进展 [A] // 全国第 9 届天然药物资源学术研讨会论文集. [C] 广州, 中国自然资源学会, 2010: 734-738.
- [16] 赵婉, 姜海, 王知斌, 等. 贝母属植物的药理作用概述 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(11): 97-100.
- [17] 潘峰, 苏雪梅, 杨楠, 等. 一株川贝母内生真菌的分离鉴定及其产贝母类生物碱分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(7): 1149-1154.
- [18] Kim M, Kim Y B. A network-based pharmacology study of active compounds and targets of *Fritillaria thunbergii* against influenza [J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 89: 107375.
- [19] 姚运秀, 潘春晖, 王晨, 等. 网络药理学在中药复方的研究进展与应用策略 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3): 257-263.
- [20] 方清茂, 彭文甫, 董永波, 等. 基于遥感与 GIS 技术的川产道地药材川贝母适宜区研究——以暗紫贝母为例 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 214-218.
- [21] 刘涛, 赵灵丽, 钟林江, 等. 基于网络药理学的复方当归注射液作用机制研究 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3): 225-229.

[责任编辑 王文倩]