百药煎不同菌种发酵品特征性成分差异比较及潜在分子作用机制探讨

王瑞生[1, 2]，曹文文[1]，张江山[1, 2]，张振凌[1, 2, 3*]，陈祎甜[1, 2]

1. 河南中医药大学，河南 郑州　450008
2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心，河南 郑州　450008
3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心，河南 郑州　450008

摘　要：目的　分析探讨黑曲霉 *Aspergillus niger*（BYJ.H-1）、米根霉 *Rhizopus oryzae*（BYJ.G-1）及蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*（HMB2）、巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*（HMB5）、伯顿丝孢毕赤酵母菌 *Burton Pichia pastoris*（HMY1）、克鲁维酵母菌 *Kluyveromyces*（HMY2）4 菌混合菌种 3 种优势菌种/群发酵的百药煎特征性成分差异及百药煎发挥“润肺化痰、止血止泻、解热生津”功效的潜在分子生物机制，为百药煎饮片的生产和临床应用提供参考。**方法**　以百药煎中没食子酸（gallic acid，GA）、表没食子儿茶素（epigallocatechin，EGC）、2,4,6-三-*O*-没食子酰-β-*D*-葡萄糖（2,4,6-tri-*O*-galloyl-β-*D*-glucose，TGβG）、2,4,6-三-*O*-没食子酰-α-*D*-葡萄糖（2,4,6-tri-*O*-galloyl-α-*D*-glucose，TGαG）4 种特征性成分的 HPLC 峰面积为指标，通过主成分降维（principal component analysis，PCA）结合聚类分析法（cluster analysis，CA）对比不同菌种发酵品的差异；在中医药理论基础上采用网络药理学预测百药煎治疗呼吸道疾病（respiratory disease，RD）、水液代谢失调（water metabolism imbalance，WI）和消化道出血（alimentary tract hemorrhage，AH）的分子生物学机制。**结果**　3 种优势菌种/群发酵品在聚类结果中存在交叉现象，群集的聚类趋势无规律且与菌种类别无关联；百药煎中的没食子酸、EGC、没食子酸甲酯（methyl gallate，MG）、没食子酸乙酯（ethyl gallate，EG）和表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin gallate，EGCG）5 种活性成分与 RD/WI/AH 间存在 99 个共有靶点，经过蛋白互作和网络拓扑分析后得到 98 个核心靶点，主要包括蛋白激酶 B1（protein kinase B 1，AKT1）、信号传导及转录激活蛋白 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）、表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）、丝裂原活化蛋白激酶 1/3（mitogen-activated protein kinase 1/3，MAPK1/3）等，基因本体（gene ontology，GO）分析结果显示这些靶点主要涉及激酶活性、连接酶结合和受体蛋白结合等分子生物功能，京都基因和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）分析结果显示有 154 条信号通路与百药煎治疗 RD/WI/AH 有关，主要涉及到病毒感染、癌变、细胞因子调节等信号通路。**结论**　3 种优势菌种/群发酵百药煎外在性状及内在成分无显著差异，百药煎的功效应用是多成分、多靶点、多途径协同作用的结果，研究为百药煎饮片的生产、质量控制和临床应用提供了参考。

关键词：百药煎；菌种；特征成分；主成分分析；聚类分析；网络药理学；黑曲霉；米根霉；蜡样芽孢杆菌；巨大芽孢杆菌；伯顿丝孢毕赤酵母菌；克鲁维酵母菌；没食子酸；表没食子儿茶素；2,4,6-三-*O*-没食子酰-β-*D*-葡萄糖；2,4,6-三-*O*-没食子酰-α-*D*-葡萄糖；呼吸道疾病；水液代谢失调；消化道出血

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)18 - 5524 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.006

Comparison of characteristic components of Baiyaojian fermented by different strains and its potential molecular mechanism

WANG Rui-sheng[1, 2], CAO Wen-wen[1], ZHANG Jiang-shan[1, 2], ZHANG Zhen-ling[1, 2, 3], CHEN Yi-tian[1, 2]

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
3. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education of Ministry, Zhengzhou 450008, China

收稿日期：2021-02-08

基金项目：国家重点研发计划“生物发酵技术的传统特色作豉、作曲工艺与装备研究”（2018YFC1707200）；河南中医药大学博士基金（RSBSJJ2019-09）

作者简介：王瑞生，讲师，研究方向为中药饮片质量及炮制作用机制研究。Tel: (0371)65676656　E-mail: wrsh900226@163.com

***通信作者：**张振凌，教授，研究方向为中药饮片质量及炮制作用机制研究。Tel: (0371)65676656　E-mail: zhangzl6758@163.com

Abstract: Objective To compare the differences of characteristic components of Baiyaojian fermented by *Aspergillus niger* (BYJ.H-1), *Rhizopus oryzae* (BYJ.G-1), and mixed strains of *Bacillus cereus* (HMB2), *Bacillus megaterium* (HMB5), *Burton Pichia pastoris* (HMY1), and *Kluyveromyces* (HMY2), analyze the potential molecular biological mechanism of Baiyaojian to exert the effects of "moistening lungs and eliminating phlegm, stopping bleeding and diarrhea, relieving fever and promoting fluid production", so as to provide reference for the production and clinical application of the decoction pieces. **Methods** Four characteristic components including gallic acid, epigallocatechin, 2,4,6-tri-*O*-galloyl-β-*D*-glucose (TGβG) and 2,4,6-tri-*O*-galloyl-α-*D*-glucose (TGαG) were selected, and then the HPLC characteristic peak areas of the four components were used as indicators to compare the differences of three different strains fermented products through principal component analysis (PCA) combined with cluster analysis (CA). Simultaneously, on the basis of traditional Chinese medicine theory, network pharmacology was used to predict the molecular biological mechanism of Baiyaojian for the treatment of respiratory disease (RD), water metabolism imbalance (WI) and alimentary tract hemorrhage (AH). **Results** There was a cross phenomenon in the clustering results of different strains fermented products, the clustering trend of clusters was irregular and not related to the type of strain. There were 99 common targets between five active ingredients including gallic acid, epigallocatechin, methyl gallate, ethyl gallate and epigallocatechin gallate and RD/WI/AH, then 98 core targets were obtained after protein interaction and network topology analysis that mainly including AKT1, STAT3, EGF, MAPK1/3 and so on. GO analysis results showed that these targets mainly involved molecular biological functions such as kinase activity, ligase binding, and receptor protein binding, etc. KEGG analysis results showed that there were 154 signal pathways related to Baiyaojian to treat RD/WI/AH, such as viral infection, canceration and cytokine regulation. **Conclusion** There was no significant difference in the external characters and internal components of three dominant strains/groups of fermented Baiyaojian. The efficacy of Baiyaojian was the result of multi-component, multi-target and multi-channel synergy. This study provides a reference for the production, quality control and clinical application of Baiyaojian pieces.

Key words: Baiyaojian; strains; characteristic components; principal component analysis; cluster analysis; network pharmacology; *Aspergillus niger*; *Rhizopus oryzae*; *Bacillus cereus*; *Bacillus megaterium*; *Hyphopichia burtonii*; *Kluyveromyces*; gallic acid; epigallocatechin; 2,4,6-tri-*O*-galloyl-β-*D*-glucose; 2,4,6-tri-*O*-galloyl-α-*D*-glucose; respiratory disease; water metabolism imbalance; alimentary tract hemorrhage

百药煎为五倍子同茶叶、酵曲等经发酵制成的块状物，有润肺化痰、止血止泻、解热生津的功效[1]。临床记载了百药煎在中成药中的应用，如其组成的金霜煎、结肠安胶囊、清咽丸等。李时珍曰[2]“百药煎功与五倍子不异。但经酿造，其体轻虚，其性浮收，且味带余甘……含噙尤为相宜”。相较于条件有限且质量波动较大的传统自然发酵，现代发酵法已经针对影响百药煎发酵质量的相关因素，如菌种、基质和温湿度等进行了研究和改良[3-8]，使其炮制工艺和饮片质量得到了较大改善。本课题组在前期研究中[9-11]利用微生物分离鉴定技术于传统发酵过程中分离筛选出了五倍子发酵百药煎的 3 种优势菌种/群：黑曲霉 *Aspergillus niger*（BYJ.H-1）、米根霉 *Rhizopus oryzae*（BYJ.G-1）和蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*（HMB2）、巨大芽孢杆菌菌株 *Bacillus megaterium*（HMB5）、伯顿丝孢毕赤酵母 *Burton Pichia pastoris*（HMY1）、克鲁维酵母菌株 *Kluyveromyces*（HMY2）4 菌混合菌群，并在恒温恒湿条件下分别进行发酵，均可以得到五倍子的发酵品百药煎，且主要指标成分没食子酸的含量都可以达到≥35%的要求[12]。但百药煎在发酵过程中的物质基础变化涉及到酚类、酯类和儿茶素类等多种化学成分[13]，不同菌种对其发酵质量的影响是否存在较大差异尚不明确，仅依据现行标准中的单一指标判断上述发酵品间的差异性有所片面，有必要根据其发酵过程中的特征性成分的变化进一步分析。

百药煎对于呼吸及消化系统的治疗和调理依赖于自身多种物质基础的协同作用[14-15]，但目前有关百药煎的物质基础和药理作用研究较少，使其功效作用机制研究难以深入到细胞分子层面。网络药理学[16]是一种基于大数据时代背景下融合系统生物学、分子生物学、药理学以及多种网络计算平台的新兴学科，可以在临床研究前实现跨微观（分子、生化网络）到宏观（组织、器官）的多层次理论模拟和分析，从而系统、动态地研究模型内多个元素（药物分子、靶标、细胞、组织、器官等）之间的相互作用，从可视化角度阐释中药多分子、多靶点、多途径的功效作用机制。

本实验在前期研究基础上，以五倍子发酵百药煎过程中 2 种新产生的成分 2,4,6-三-*O*-没食子酰-β-*D*-葡萄糖（2,4,6-tri-*O*-galloyl-β-*D*-glucose，TGβG）和 2,4,6-三-*O*-没食子酰-α-*D*-葡萄糖（2,4,6-tri-*O*-

galloyl-α-*D*-glucose，TGαG）及 2 种升高成分没食子酸和表没食子儿茶素（epigallocatechin，EGC）的 HPLC 峰面积为指标，采用主成分分析-聚类分析（principal component analysis-cluster analysis，PCA-CA）法对比 3 种不同菌种/群发酵品的差异；同时结合实验基础和网络药理学方法对百药煎“清热化痰、止血止泻、解热生津”功效的潜在分子作用机制进行探究，为百药煎的发酵炮制、质量控制、临床应用和饮片开发提供参考。

1 仪器和材料

1.1 仪器

2487 型高效液相色谱仪，上海通微分析技术有限公司；HWS-250 型恒温恒湿培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；SPL-250 型生化培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；LDZX-75KBS 型立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台，上海苏净实业有限公司；BSA224S-CW 型电子天平和 BT25S 型电子天平，赛多利斯科学仪器北京有限公司；400Y 型高速多功能粉碎机，永康市铂欧五金制品有限公司；GZX-9070 MBE 型数显鼓风干燥箱，上海博讯实业有限公司；KQ-500DV 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；W22 型电陶炉，佛山市顺德区启伟电器有限公司。

1.2 材料及试剂

五倍子购于安徽石田中药饮片有限公司，批号 160429，经河南中医药大学张振凌教授鉴定为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill.叶上的虫瘿，符合《中国药典》2020 年版五倍子项下的各项规定，百药煎均为实验室自制，制备方法见“2.1”项。茶叶，绿茶，河南信阳茶叶专业市场，批号 20160810；BYJ.G-1，实验室保藏，批号 20180118；BYJ.H-1，实验室保藏，批号 20190119；HMB2，实验室保藏，批号 20180702；HMB5，实验室保藏，批号 20180705；HMY1，实验室保藏，批号 20180711；HMY2，实验室保藏，批号 20180712；PDA/LB 培养基，自制，批号 20190809；没食子酸、EGC 对照品，成都普斯生物科技有限公司，批号分别为 PS000688、PS0230-0025，质量分数均≥99%；2,4,6-三-*O*-没食子酰-*D*-葡萄糖（TGG，由于 TGG 结构具有半缩醛，始终有 α 和 β 2 个互变异构体存在，因此对照品是 1 个，但是在色谱图上有 2 个峰）对照品，批号 20150824，自制，质量分数≥98.0%；三氟乙酸，上海麦克林生化科技有限公司，批号 202007015，分析纯；乙腈，美国 Thermo 公司，批号 20201016，色谱纯；甲醇，天津富宇精细化工有限公司，批号 20200713，分析纯。

1.3 数据库及平台

有机小分子生物活性数据库（PubChem，https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/），中药系统药理学数据库与分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology，TCMSP，http://tcmspw.com/tcmsp.php），蛋白质数据库（UniversalProtein，Uniprot，https://www.uniprot.org/），人类基因数据库（GeneCards-Human Genes，https://www.genecards.org/），交互式韦恩图平台（jvenn，http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html），功能蛋白关联网络（STRING，https://string-db.org/），高通量基因组数据分析工具平台（Bioconductor，https://bioconductor.org/）。

2 方法与结果

2.1 百药煎样品制备

取茶叶，分次加水煎煮，滤过，合并滤液，浓缩至适量，放凉，与五倍子细粉混合，制成软材，于 115 ℃高压蒸汽灭菌锅中灭菌 30 min，放至室温。分别接种 BYJ.H-1、BYJ.G-1 和 HMB2、HMB5、HMY1、HMY2 4 菌混合菌群，置温度 35 ℃，湿度 85%条件下发酵，待药块表面遍布白色“霉衣”时，取出，切成小方块，低温干燥。3 种菌种各发酵 9 批，批号分别为 BM1～BM9、BH1～BH9、BA1～BA9。

2.2 不同菌种发酵品特征性成分差异对比

2.2.1 供试品溶液的制备 取各批样品粉碎，过 4 号筛，取 0.2 g，精密称定，加入甲醇 50 mL，称质量后静置 2 h，超声提取 40 min，放冷至室温，用甲醇补足减失的质量，取续滤液，过 0.22 μm 滤膜，即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取没食子酸、EGC、TGG 对照品适量，精密称定后加甲醇溶解，配制成含没食子酸 0.1 mg/mL、EGC 0.3 mg/mL、TGG 0.02 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 样品测定 参照本课题组前期建立的 HPLC 法[12]测定 27 批百药煎样品，含量以干燥品计，色谱图见图 1，测定结果见表 1。

2.2.4 不同菌种发酵品 PCA-CA 分析

（**1**）特征性成分降维分析：采用 SPSS 20.0 软

件将原始数据标准化后进行降维，根据特征值＞1和累积方差贡献率＞80%，选取前 2 个成分作为降维后的主成分（表 2），并将主成分载荷转换为对应的特征向量（得分系数）后计算主成分得分，结果见表 3、4。

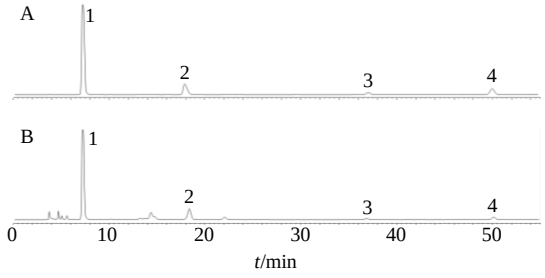

图 1 混合对照品 (A) 和百药煎样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and Baiyaojian sample (B)

（2）不同菌种发酵品聚类分析：以主成分得分为指标，采用 SPSS 20.0 软件对不同菌种发酵品进行 *k*-均值聚类分析，将群集数设置为 3 后输出聚类结果并进行可视化。结果显示，各聚类群集中的发酵品并非单一种类，不同菌种发酵品的聚类结果存在交叉现象，群集聚类趋势无规律且与菌种类别无关联，见图 2。

2.3 百药煎潜在分子作用机制探究

2.3.1 活性成分靶标及功效相关靶标筛选

（1）活性成分靶标筛选：鉴于百药煎基础研究过少，TCMSP 数据库并未收录相关信息，本实验在前期研究基础上[17]借助 PubChem 数据库对百药煎的活性成分进行整理（表 5），然后以各成分名称为关键词通过 TCMSP 和 Uniprot 数据库获取相关靶标的标准名称，结果共得到 158 个靶点，采用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点”可视化网络，见图 3。

（2）百药煎功效靶标筛选：依据中医药基础理论从“病、症、证”角度对百药煎的功效应用进行

表 1 百药煎不同菌种发酵品中 4 种特征成分峰面积

Table 1 Peak area of four characteristic components in different strains fermented products of Baiyaojian

编号	峰面积/mAU				编号	峰面积/mAU				编号	峰面积/mAU			
	没食子酸	EGC	TGαG	TGβG		没食子酸	EGC	TGαG	TGβG		没食子酸	EGC	TGαG	TGβG
BM1	4 966 272	807 949	38 948	83 258	BH1	4 968 119	809 660	100 278	219 979	BA1	4 889 246	823 710	0	0
BM2	4 960 862	798 010	31 754	74 738	BH2	4 997 877	818 180	0	0	BA2	4 966 166	822 861	0	0
BM3	4 952 288	823 060	34 700	78 176	BH3	4 996 734	818 842	105 427	232 141	BA3	4 774 339	827 148	0	0
BM4	4 961 577	811 329	32 818	74 049	BH4	4 977 333	819 830	101 690	0	BA4	4 741 520	795 133	0	0
BM5	4 985 087	842 767	27 925	63 298	BH5	4 976 157	815 959	0	0	BA5	4 837 108	798 774	0	0
BM6	4 956 063	828 713	0	0	BH6	4 971 436	827 965	101 298	228 686	BA6	4 894 800	800 829	0	0
BM7	4 831 217	802 811	0	0	BH7	4 971 610	823 246	0	222 974	BA7	4 952 171	810 866	0	12 461
BM8	4 933 963	790 351	0	0	BH8	4 971 767	823 545	99 249	226 131	BA8	4 865 669	807 868	0	15 550
BM9	4 970 865	806 335	0	0	BH9	5 017 233	853 094	0	0	BA9	4 926 160	839 941	0	19 649

表 2 主成分特征值及解释的总方差

Table 2 Principal component eigenvalues and explained total variance

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	2.130	53.26	53.26	2.130	53.26	53.26
2	1.093	27.33	80.59	1.093	27.33	80.59
3	0.521	13.02	93.61			
4	0.256	6.390	100.00			

表 3 主成分载荷及特征向量

Table 3 Principal component loads and eigenvectors

样本变量	载荷		特征向量	
	主成分 1	主成分 2	主成分 1	主成分 2
Z score (没食子酸)	0.723	0.402	0.495 51	0.384 42
Z score (EGC)	0.436	0.801	0.298 98	0.766 25
Z score (TGαG)	0.840	−0.394	0.575 31	−0.376 79
Z score (TGβG)	0.844	−0.367	0.578 02	−0.350 87

表 4 特征成分的标准化数据及主成分得分

Table 4 Standardized data of feature components and scores of principal components

编号	标准化数据（Z score）				主成分得分		编号	标准化数据（Z score）				主成分得分	
	没食子酸	EGC	TGαG	TGβG	主成分 1	主成分 2		没食子酸	EGC	TGαG	TGβG	主成分 1	主成分 2
BM1	0.471	−0.580	0.355	0.298	0.436	−0.502	BH6	0.546	0.759	1.937	1.976	2.754	−0.632
BM2	0.392	−1.245	0.172	0.200	0.036	−0.938	BH7	0.548	0.443	−0.634	1.910	1.144	0.119
BM3	0.268	0.431	0.247	0.239	0.542	0.256	BH8	0.550	0.463	1.885	1.947	2.621	−0.827
BM4	0.403	−0.354	0.199	0.192	0.319	−0.259	BH9	1.210	2.440	−0.634	−0.663	0.582	2.806
BM5	0.744	1.749	0.075	0.068	0.974	1.574	BA1	−0.647	0.474	−0.634	−0.663	−0.927	0.586
BM6	0.323	0.809	−0.634	−0.663	−0.346	1.215	BA2	0.469	0.417	−0.634	−0.663	−0.390	0.972
BM7	−1.489	−0.924	−0.634	−0.663	−1.762	−0.809	BA3	−2.315	0.704	−0.634	−0.663	−1.684	0.121
BM8	0.002	−1.758	−0.634	−0.663	−1.272	−0.875	BA4	−2.791	−1.438	−0.634	−0.663	−2.561	−1.703
BM9	0.537	−0.688	−0.634	−0.663	−0.687	0.151	BA5	−1.404	−1.194	−0.634	−0.663	−1.800	−0.983
BH1	0.498	−0.466	1.911	1.876	2.291	−1.544	BA6	−0.567	−1.057	−0.634	−0.663	−1.344	−0.556
BH2	0.929	0.104	−0.634	−0.663	−0.256	0.908	BA7	0.266	−0.385	−0.634	−0.519	−0.648	0.228
BH3	0.913	0.149	2.042	2.016	2.837	−1.012	BA8	−0.989	−0.586	−0.634	−0.484	−1.309	−0.421
BH4	0.631	0.215	1.947	−0.663	1.114	−0.094	BA9	−0.111	1.560	−0.634	−0.436	−0.205	1.544
BH5	0.614	−0.044	−0.634	−0.663	−0.457	0.673							

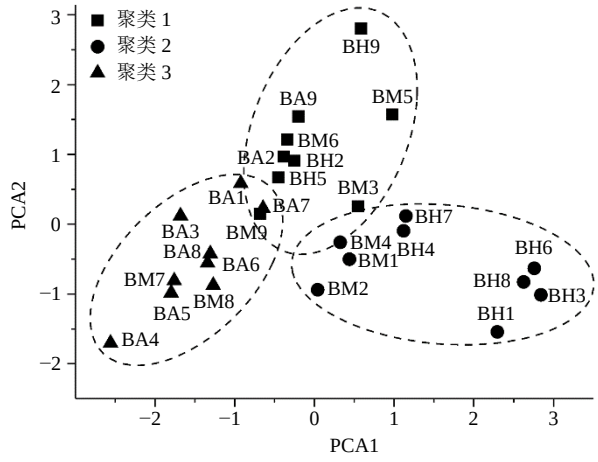

图 2 不同菌种发酵品 *k*-均值聚类散点图

Fig. 2 *K*-mean cluster scatter plot of different strains fermentation products

分析后整理出可供数据库检索的方向——呼吸道疾病（respiratory disease，RD）、水液代谢失调（water metabolism imbalance，WI）和消化道出血（alimentary tract hemorrhage，AH）并提取其中的主要关键词（图 4），然后通过 GeneCards 数据库进行检索，剔除重复及相关得分过低者，共得到 1916 个相关靶标，主要涉及多表皮生长因子结构样域 10（multiple epidermal growth factor-like domains protein 10）、抗肌萎缩蛋白（dystrophin）、骨成型蛋白受体 1A（bone morphogenetic protein receptor type 1A）、C-X-C 趋化因子基序配体 8（C-X-C motif chemokine ligand 8，CXCL8）等。

2.3.2 中药成分-功效靶点交集 基于 Jvenn 平台对百药煎及其功效相关靶点进行取交集处理，得到 99 个共有靶点，在 3 种病证中互有交集（图 5），这些靶点即为百药煎发挥功效的潜在作用靶点，包括丝氨酸/苏氨酸激酶 1（serine/threonine kinase 1，AKT1）、前列腺素 G/H 合成酶 1/2（prostaglandin-endoperoxide synthase 1/2，PTGS1/2）、信号传导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）等。

2.3.3 百药煎功效调控网络构建及可视化 在明确百药煎治疗 RD/WI/AH 的潜在作用靶点后，采用 Cytoscape 软件分别以“百药煎、活性成分、相关靶点、RD/WI/AH”为节点，4 者间的微观联系为网络属性，构建“药物-成分-靶点-疾病”调控网络（图 6），可明显看出百药煎是以多组分协同干预多个靶点起到治疗 RT/DS/HS 的作用。

2.3.4 共有靶点的蛋白互作及 PPI 网路拓扑分析 为进一步探究百药煎治疗 RD/WI/AH 的分子作用机制，将共有靶点上传至 STRING 平台查询靶点间的互作关系（置信度≥0.7），筛选后初步得到核心靶点的 PPI 网络图。剔除重复者及 PPI 网络外的离散靶点后，RD 相关网络具有 79 个节点、652 条边，WI 相关网络具有 78 个节点、619 条边，AH 相关网络具有 13 个节点、41 条边，共计 98 个核心靶点。

表 5 百药煎活性成分基本信息

Table 5 Basic information of active ingredients of Baiyaojian

名称	分子 ID	分子式	相对分子质量	生物利用度/%	类药性
没食子酸（gallic acid）	MOL000513	$C_7H_6O_5$	170.12	31.69	0.04
EGC［(−)-epigallocatechin］	MOL006791	$C_{15}H_{14}O_7$	306.27	24.18	0.27
没食子酸甲酯（methyl gallate）	MOL001906	$C_8H_8O_5$	184.15	30.91	0.05
没食子酸乙酯（ethyl gallate）	MOL001907	$C_9H_{10}O_5$	198.17	25.61	0.06
EGC 没食子酸酯［(−)-epigallocatechin gallate］	MOL006821	$C_{22}H_{18}O_{11}$	458.40	55.09	0.77
TGβG（2,4,6-tri-*O*-galloyl-β-*D*-glucose）	−	$C_{27}H_{24}O_{18}$	636.08	−	−
TGαG（2,4,6-tri-*O*-galloyl-α-*D*-glucose）	−	$C_{27}H_{24}O_{18}$	636.08	−	−

数据库尚未收录 TGαG 和 TGβG，相关信息来自笔者实验室的分离鉴定

TGαG and TGβG has not been included in the database, the relevant information comes from the isolation and identification of the author's laboratory

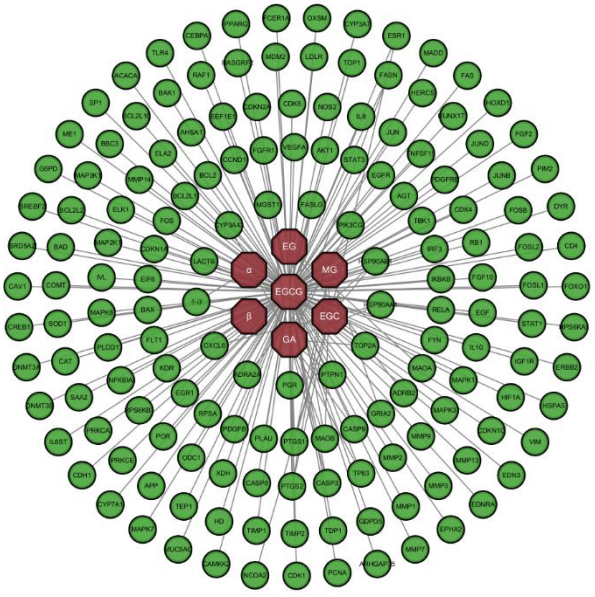

图 3 百药煎“成分-靶点”网络图

Fig. 3 “Component-target” network diagram of Baiyaojian

在此基础上利用 Cytoscape 软件中的 Network Analyzer 对 3 个网络进行拓扑分析，并依据节点度和边中心性将网络按顺时针降序布局，见图 7。

2.3.5 核心靶点的 GO 及 KEGG 富集分析 利用 Bioconductor 平台和 R 语言对上述具备互作关系的核心靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析，得到 112 个 GO 条目和 154 条 KEGG 信号通路，在错误发现率（FDR）＜0.05 的前提下依据 *P* 值降序排列后分别选取前 20 个进行分析并做可视化处理。结果发现，上述 GO 条目均与分子生物学功能相关，主要包括蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性（protein serine/threonine kinase activity）、泛素样蛋白连接酶结合（ubiquitin-like protein ligase binding）、磷酸酶结合（phosphatase binding）、泛素蛋白连接酶结合（ubiquitin protein ligase binding）、细胞因子受体结合（cytokine receptor binding）等，见图 8；上述 KEGG 信号通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、卡波西肉瘤疱疹病毒感染通路（Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection pathway）、人类巨细胞病毒感染通路（human cytomegalovirus infection pathway）、乙型肝炎通路（hepatitis B pathway）、癌蛋白聚糖通路（proteoglycans in cancer pathway）等，见图 9。对最为显著的 PI3K-Akt 信号通路的作用机制进行深入探究，发现药物可通过多个靶点作用在通路中的节点上，图 10 为其代谢通路图，图中标红的节点即为药物靶点主要作用节点。

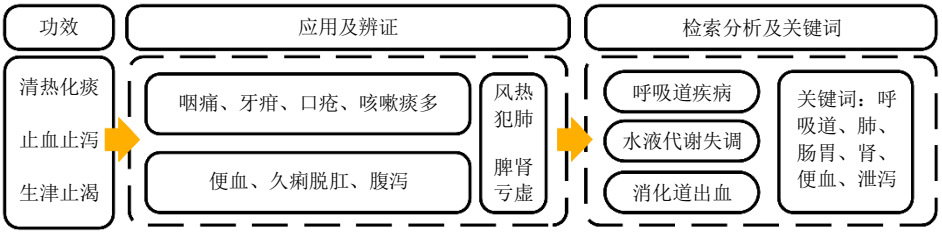

图 4 百药煎功效检索关键词分析

Fig. 4 Analysis of efficacy search key words of Baiyaojian

3 讨论

目前，对于百药煎成分变化与功效变化的内在

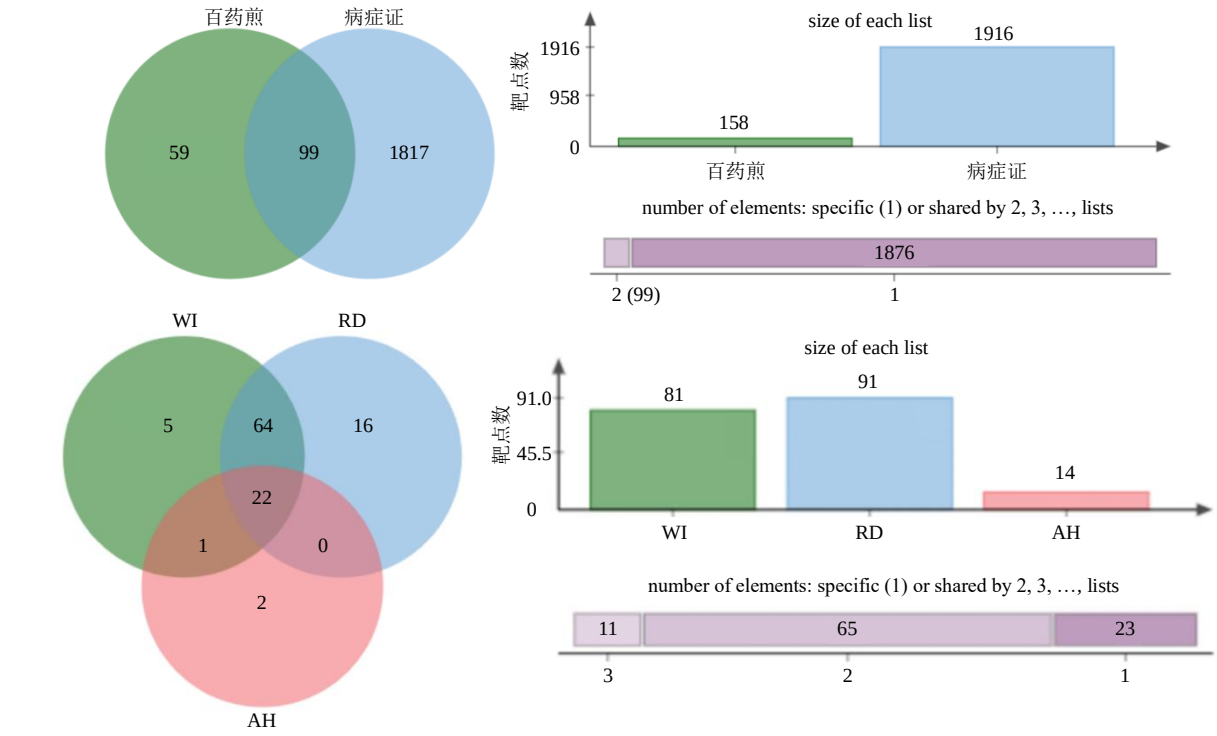

图 5　“药物靶点-疾病靶点”韦恩图

Fig. 5　Venn diagram of “drug target-disease target”

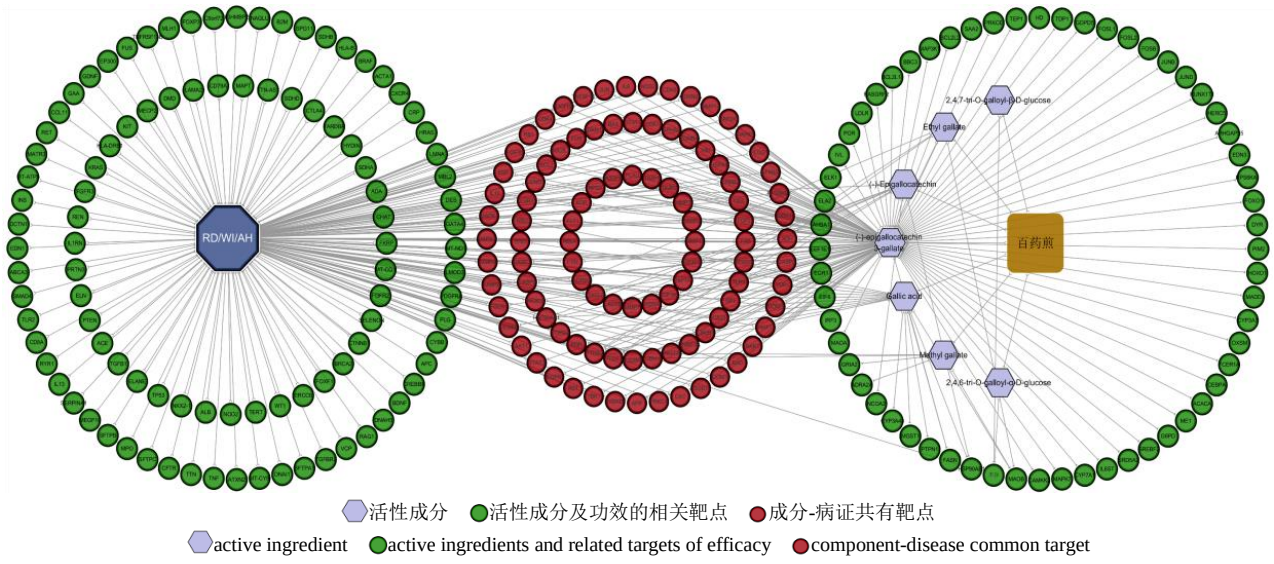

图 6　百药煎功效调控网络图

Fig. 6　Efficacy control network diagram of Baiyaojian

联系，尚无文献报到。本课题组前期主要对百药煎成分变化进行了深入研究，其中 TGG 为百药煎中首次发现的化合物，该化合物结构由于具有半缩醛，因此始终有 α 和 β 2 个互变异构体存在[12]，因此本研究将发酵后，百药煎中含量升高的成分没食子酸、EGC 以及 TGβG、TGαG 和等特征性成分作为指标进行研究。由于 TGG 为本课题组首次从百药煎中分离得到，得率较低；且不同菌种发酵百药煎中该成分含量差异较大，在使用标品制作标准曲线时误差较大，计算出的含量不准确，而峰面积作为指标更加准确，因此，在选择指标时选用峰面积为指标。

本研究以特征性成分为指标的 PCA-CA 分析结果显示 3 种关键优势菌种在五倍子发酵百药煎的化学成分变化过程中均可产生类似的特征性变化。有学者研究发现[17-18]，这种特征性变化可能是百药煎发酵后增效减毒作用机制产生的关键过程，即降低

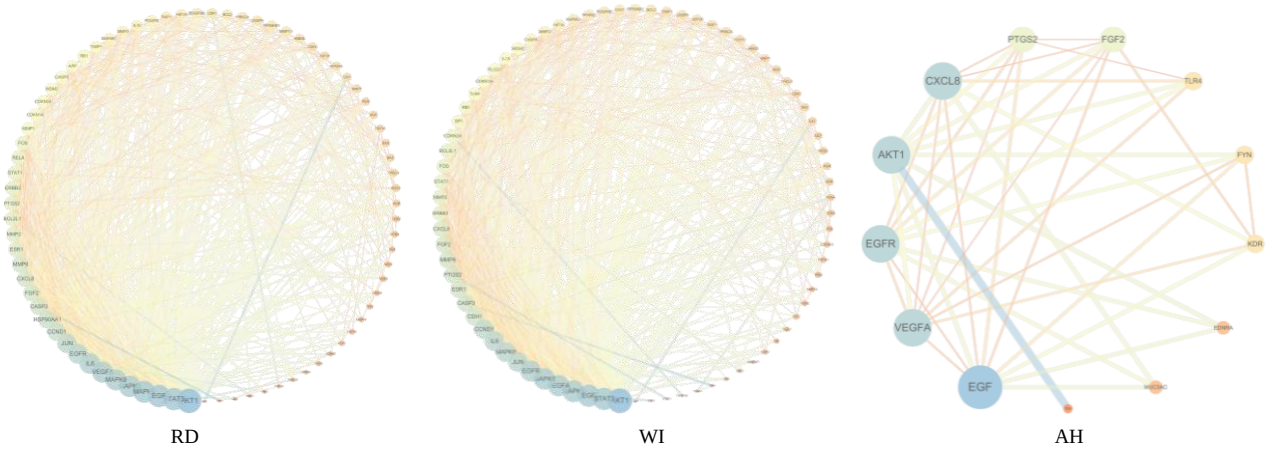

图 7　共有靶点的拓扑分析

Fig. 7　Topological analysis of shared targets

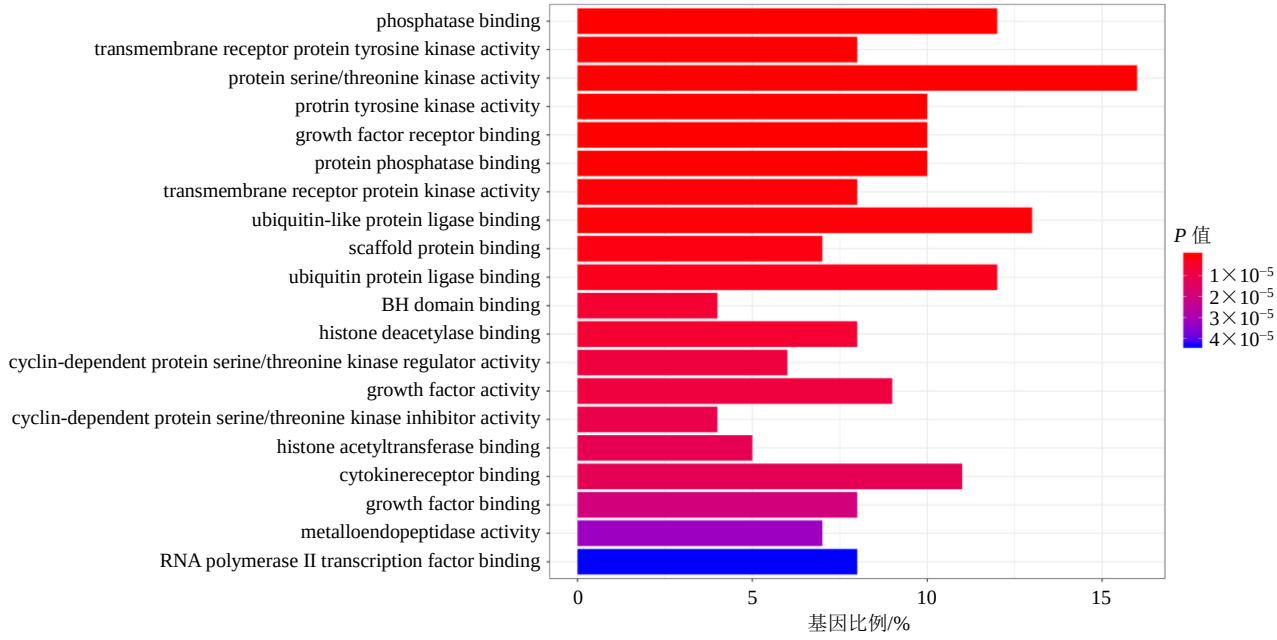

图 8　百药煎治疗 RD/WI/AH 核心靶点的 GO 富集分析

Fig. 8　Analysis of GO enrichment of Baiyaojian in treatment of RD/WI/AH core targets

鞣质含量减少其口腔涩味、胃肠道收敛刺激性和肝脏毒性的同时大量生成没食子酸、EGC 等相对分子质量小、易吸收的药效活性成分。结果显示上述 3 种优势菌种均可以完成这段关键的物质基础转化且结果基本一致，表明 3 种不同菌种发酵品间不存在明显差异性。此外，现行国家药典中尚未收录本品，相关省市的标准规范也仅以没食子酸为质控指标，不利于其临床疗效及用药安全性的保障，针对此现状，可利用一测多评或指纹图谱等多成分评价体系探究上述特征性成分作为质控指标的可行性。

网络药理分析结果显示，百药煎中的没食子酸、EGC、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯和 EGC 没食子酸酯 5 种活性成分对其适应病证存在潜在干预作用，可能是通过 AKT1、STAT3、EGF、MAPK1、MAPK3、CXCL8、血管内皮生长因子 A（vascular endothelial growth factor A，AVEGFA）、前列腺素氧化环化酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2，PTGS2）等核心靶点的协同作用达到治疗 RD/WI/AH 的目的。其中，AKT1 可以调节包括细胞增殖、凋亡、代谢和血管生成在内的多种生物过程，STAT3 作为急性期响应因子在多种炎症反应、免疫反应和基础能量代谢中具有重要作用，表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）则在体内外刺激各种表皮和上皮组织的生长，MAPK 作为 MAP 激酶

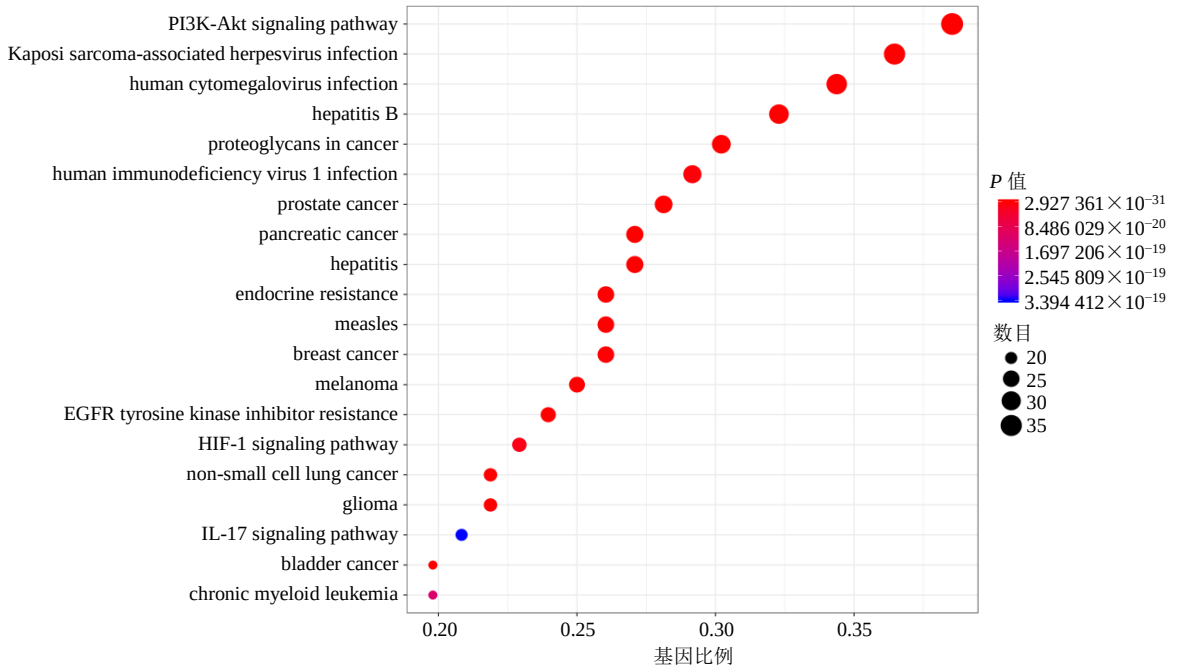

图 9　百药煎治疗 RD/WI/AH 的 KEGG 通路富集分析

Fig. 9　Analysis of KEGG path enrichment of Baiyaojian in treatment of RD/WI/AH

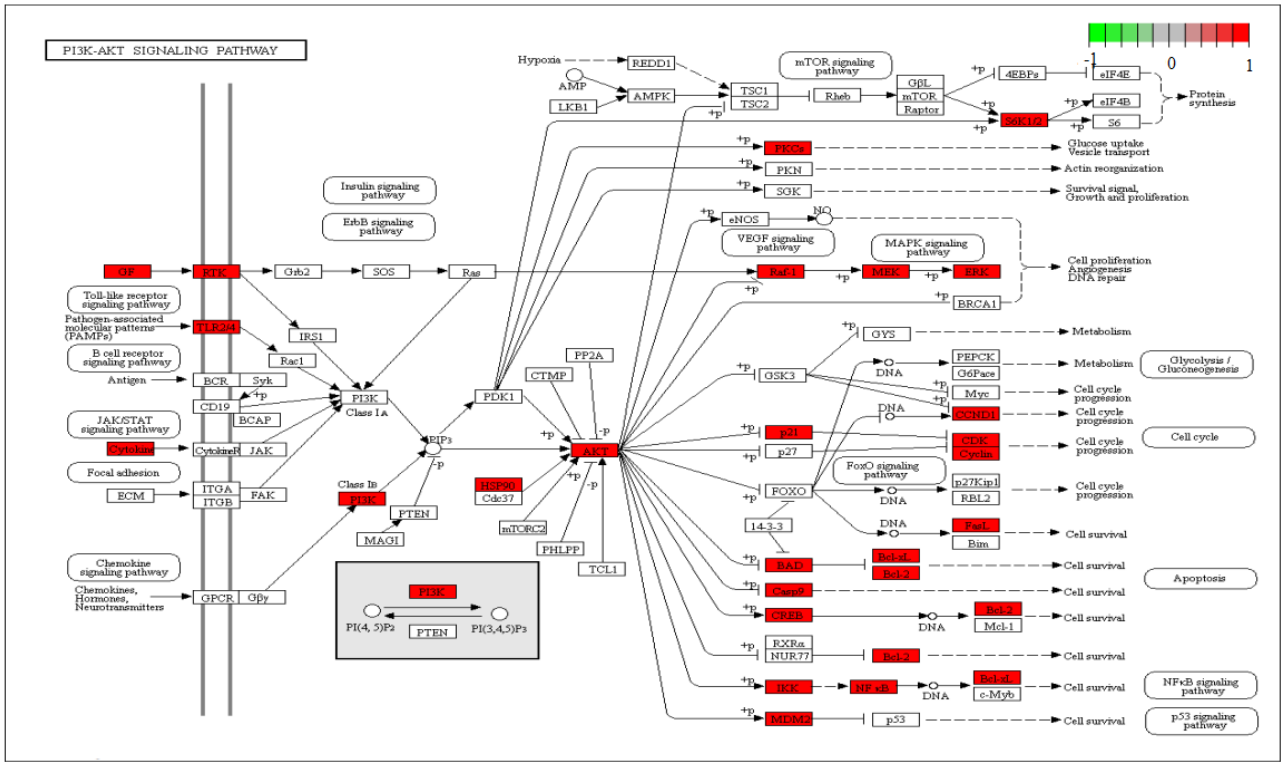

图 10　百药煎治疗 RD/WI/AH 的 KEGG 信号通路之一 (PI3K-Akt)

Fig. 10　One of KEGG signaling pathways of Baiyaojian in treatment of RD/WI/AH (PI3K-Akt)

信号传导途径的重要组成部分与呼吸及消化系统疾病（肝炎、百日咳等）密切相关，CXCL8 作为炎症刺激响应因子在呼吸道及消化道炎症（支气管炎、口腔炎、肺炎、胃炎等）发生中占据重要地位，上述各靶点所参与的生物过程要么涉及到呼吸系统和消化系统的炎症反应，要么涉及到循环系统的调节和破损组织的生长，而 RD/WI/AH 的产生恰好与此相关，证明百药煎很有可能是通过上述靶点间的协

同作用达到相应功效。GO 分析结果显示，核心靶点的表达主要涉及到激酶活性、连接酶及受体蛋白结合等分子功能；KEGG 通路分析结果显示，百药煎的功效发挥主要涉及病毒感染、癌变和细胞因子调节等信号通路，其中 PI3K-Akt 信号通路的基因富集率和差异性表达最为显著，该通路不仅参与多种生长因子、细胞因子和细胞外基质等的信号转导，还参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节[20]。

在 PI3K-Akt 信号通路传导过程中，相关生长因子与其受体酪氨酸激酶结合或 G 蛋白偶联受体结合，分别激活 IA 型和 IB 型 *PI3K* 基因，PI3K 可以催化磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸（PIP3）的生产，PIP3 可以作为第 2 个信使激活 Akt，Akt 经过一系列磷酸化反应后，可作用于多靶点，从而调控蛋白质合成、细胞凋亡、细胞周期、细胞增殖和 DNA 修复等过程[19-20]。“Reference Network”是直接从 KEGG 信号通路中提取的分支信号通路，体现了其中部分基因之间的相互作用信息，在 PI3K-Akt 信号通路中有 5 条这样的通路，本研究中的靶点主要富集在其中的 EGF-EGFR-PI3K 信号通路、EGF-EGFR-RAS-PI3K 信号通路、IGF-IGF1R-PI3K 信号通路及 EGF-EGFR-PI3K-NF-κB 信号通路上。在上述前 2 条分支信号通路中，基因主要分布在 GF、RTK、AKT 及 BAD 4 个节点上[21-22]。富集在 GF 节点上的基因有 *EGF*、*FGF2*、*FGF10*、*PDGFB* 及 *VEGFA*，主要负责编码一些活性因子。EGF 负责编码表皮生长因子超家族的成员，可刺激体内外各种表皮和上皮组织的生长。*FGF2* 和 *FGF10* 基因编码的蛋白是成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）家族的成员，FGF 可参与各种生物过程，包括胚胎发育，细胞生长，形态发生，组织修复，肿瘤生长和侵袭等[23]。

PDGFB 基因编码的蛋白包括血小板衍生生长因子（platelet derived growth factor，PDGF）和血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF），为中枢神经系统、肺、皮肤及血管平滑肌细胞的正常增殖以及血管和肾小球的正常发育所需，在伤口愈合中具有重要作用，可在多种发育过程中发挥作用[24]。VEGFA 也是 PDGF/VEGF 生长因子家族的一员，编码肝素结合蛋白，可诱发血管内皮细胞的增殖和迁移，对生理和病理性的血管生成都至关重要。富集在 RTK 节点上的基因有 *EGFR*、*FGFR1*、*FLT1*、*KDR*、*PDGFRB*、*IGF1R*、*EPHA2* 及 *ERBB2*，主要负责编码一些受体蛋白。*EGFR* 编码一种跨膜蛋白，是表皮生长因子的受体[25]。FGFR1 是 FGF2 和 FGF10 等纤维细胞生长因子的受体。*FLT1* 和 *KDR* 基因编码的蛋白为 VEGF 的受体（VEGFR）。PDGFRB 是 PDGF 的酪氨酸激酶受体。IGF1R 编码胰岛素样生长因子 1 受体，也是一种酪氨酸激酶。*EPHA2* 及 *ERBB2* 编码的蛋白也是一种酪氨酸激酶，前者编码的是一种肾素受体，后者则是 EGF 的受体。Akt 节点是 PI3K 通路中的关键节点，对应基因为 *Akt*，Akt 是一种蛋白激酶，依赖于 PI3K 通路激活。富集在 BAD 节点上的基因为 *BAD*，BAD 是 Bcl-X/Bcl-2 结合蛋白，主要参与调控细胞的存活及细胞的凋亡。

在 IGF-IGF1R-PI3K 上富集有研究基因的节点主要有 GF、RTK 及 Akt，通过此信号通路可参与蛋白质合成生物功能并调控 mTOR 信号通路[26-27]。在 EGF-EGFR-PI3K-NF-κB 信号通路上除 GF、RTK 及 Akt 3 个节点外，还有 TKK 及 NF-κB 2 个节点。TKK 节点对应的基因为 *IKBKB*，负责编码的蛋白是一种血清激酶，在 NF-κB 信号通路中起着重要作用。NF-κB 节点对应的基因为 *RELA*，它负责编码的蛋白为 NF-κB 家族的一员，NF-κB 是一种全细胞转录因子，几乎存在于所有细胞类型中，是一系列信号转导的终点。综上所述，百药煎是通过 EGF、FGF2、EGFR、FLT1 及 AKT 等多种基因来调控 PI3K-Akt 通路中的多种信号传导，从而参与蛋白质合成、细胞凋亡、细胞周期进程等多种生物功能，或参与调控 JAT/STAT 信号通路、NF-κB 信号通路及 mTOR 信号通路等旁支信号通路来发挥药物的功效，达到治疗 RD/WI/AH 的目的。百药煎是通过多个活性成分协同作用于多个信号通路中的多个靶点来实现“润肺化痰、止血止泻、解热生津”功效的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 四川省中药饮片炮制规范 [S]. 2015: 13.

[2] 明・李时珍撰. 本草纲目 (五十二卷图三卷) [M]. 清・张绍棠重订. 上海: 商务印书馆, 1954: 2236.

[3] 李柯柯, 张振凌, 于文娜, 等. 百药煎发酵过程中 pH 值与没食子酸含量动态变化的研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(7): 1637-1639.

[4] 胡梦, 王瑞生, 文雯, 等. 百药煎传统炮制过程中微生物的分离与初步鉴定及其鞣质水解能力测定 [J]. 中国

现代中药, 2017, 19(8): 1120-1125.

[5] 孙翼飞, 张振凌, 李柯柯, 等. 百药煎发酵过程中没食子酸含量动态变化的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1630-1633.

[6] 史莲莲, 邓德英, 张振凌, 等. 绿茶对五倍子发酵品的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 836-839.

[7] 胡梦. 百药煎传统炮制过程中微生物的分离、鉴定及降解鞣质最佳菌种组合的筛选 [D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2018.

[8] 张振凌, 王瑞生, 刘鸣昊, 等. 一种黑曲霉菌株及其发酵百药煎生成新成分的制备方法与应用: 中国, CN106635840A [P]. 2017-05-10.

[9] 张振凌, 李柯柯, 刘鸣昊, 等. 一种米根霉菌及其发酵百药煎的方法: 中国, CN106754418A [P]. 2017-05-31.

[10] 胡梦, 程玉冰, 张培燕, 等. 百药煎中转化鞣质生成没食子酸的最佳菌种组合筛选 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(4): 453-457.

[11] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2015: 432.

[12] 王瑞生, 史莲莲, 张振凌, 等. HPLC 指纹图谱研究五倍子发酵百药煎化学成分变化 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3734-3740.

[13] 吴玲芳, 袁永兵, 王坤凤, 等. 可水解鞣质单体化学与药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 290-299.

[14] 彭璐, 张志杰, 龚千锋, 等. 基于成分分析及抗菌活性的百药煎炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3805-3809.

[15] Wang R S, Ge X J, Sun Y F, *et al*. Screening of key species involved in Baiyaojian Fermentation based on gallic acid content [J]. *Int J Agric Biol*, 2019, 22(2): 319-325.

[16] 蒋文仪, 包艺运, 都广礼. 网络中药药理学研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(5): 122-126.

[17] Watrelot A A, Le Guernevé C, Hallé H, *et al*. Multimethod approach for extensive characterization of gallnut tannin extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 13426-13438.

[18] Ogawa S, Yazaki Y. Tannins from *Acacia mearnsii* de wild. bark: Tannin determination and biological activities [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): E837.

[19] Aoki M, Fujishita T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153-189.

[20] Pompura S L, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-349R.

[21] Ribes A, Oprescu A, Viaud J, *et al*. Phosphoinositide 3-kinases in platelets, thrombosis and therapeutics [J]. *Biochem J*, 2020, 477(22): 4327-4342.

[22] Vyas P, Vohora D. Phosphoinositide-3-kinases as the novel therapeutic targets for the inflammatory diseases: Current and future perspectives [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(14): 1622-1640.

[23] Annunziata M C, de Stefano A, Fabbrocini G, *et al*. Current recommendations and novel strategies for the management of skin toxicities related to anti-EGFR therapies in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39(9): 825-834.

[24] Zhao G N, Bailey C G, Feng Y, *et al*. Negative regulation of lens fiber cell differentiation by RTK antagonists Spry and Spred [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 170: 148-159.

[25] Vanlandewijck M, Lebouvier T, Andaloussi Mäe M, *et al*. Functional characterization of germline mutations in PDGFB and PDGFRB in primary familial brain calcification [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143407.

[26] Lacouture M E, Anadkat M, Jatoi A, *et al*. Dermatologic toxicity occurring during anti-EGFR monoclonal inhibitor therapy in patients with metastatic colorectal cancer: A systematic review [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2018, 17(2): 85-96.

[27] Deng L, Qian G Q, Zhang S, *et al*. Inhibition of mTOR complex 1/p70 S6 kinase signaling elevates PD-L1 levels in human cancer cells through enhancing protein stabilization accompanied with enhanced β-TrCP degradation [J]. *Oncogene*, 2019, 38(35): 6270-6282.

[责任编辑 郑礼胜]