

基于化学成分差异的不同干燥方式熊胆粉镇痛作用研究

杨俊莉¹, 钟林江¹, 雷 阳², 邓 妍¹, 高天赐¹, 徐玉玲^{1*}, 刘 涛^{2,4}, 张 坤^{3*}

1. 成都大学药学院, 四川 成都 610106

2. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

3. 成都柏瑞泰生物科技有限公司, 四川 成都 610106

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

摘要:目的 采用超高效液相-三重四极杆-线性离子阱质谱(UPLC-QTRAP-MS)方法鉴定常压及减压干燥熊胆粉的化学成分, 明确其差异成分, 并以网络药理学理念为指导, 探索熊胆粉镇痛作用机制。方法 基于 UPLC-MS/MS 检测平台、数据库以及多元统计分析相结合的手段研究熊胆粉的化学成分差异; 借助 PharmMapper、Uniprot、GeneCards 数据库及文献, 获取熊胆粉成分和病毒性肝炎、胆囊炎及冠心病的作用靶点, 并采用动物试验对其药效进行验证; 对疾病靶标-药物靶标集做拓扑分析获得核心靶标, 并进行基因本体(GO)功能和基因与信号通路分析(KEGG)通路富集, 通过 Cytoscape3.8.2 软件构建成分-靶标-通路网络图。结果 常压干燥、减压干燥熊胆粉共有成分 721 个, 差异成分 8 个(L-焦谷氨酸、鸟苷 5'-单磷酸水合物、5,6-二氢胸腺嘧啶、7-甲基黄嘌呤、左旋甲状腺素、甲基间酪氨酸、大黄素 8-葡萄糖苷、益母草碱), 搜索得到差异成分潜在靶点共 1605 个; 检索得到病毒性肝炎靶点 7444 个、胆囊炎靶点 636 个、冠心病靶点 7563 个; 熊胆粉对病毒性肝炎、胆囊炎及冠心病的共同靶点有 282 个, GO 功能富集分析得到 GO 条目 759 个($P < 0.05$), 其中生物过程(BP)条目 717 个, 细胞组成(CC)条目 21 个, 分子功能(MF)条目 21 个; 熊胆粉中的鸟苷 5'-单磷酸水合物、甲基间酪氨酸、左旋甲状腺素及大黄素 8-葡萄糖苷等成分可能通过二氢硫辛酸脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase, DLD)、过氧化氢酶(atalase, CATC)及一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)等靶点, 调节代谢通路和癌症通路等信号通路发挥其镇痛作用。药效试验结果表明常压、减压干燥熊胆粉均对热板及醋酸所致小鼠疼痛有抑制作用, 且减压组镇痛作用强于常压组, 有显著性差异($P < 0.05$)。结论 干燥方式使得熊胆粉化学成分变异, 从而导致其镇痛作用差异, 初步探索了熊胆粉镇痛作用的机制, 建议大生产中采用减压干燥制备熊胆粉, 为熊胆粉合理应用提供了一定依据。

关键词:熊胆粉; 干燥方式; 差异成分; 镇痛作用; 网络药理学; 超高效液相-三重四极杆-线性离子阱质谱(UPLC-QTRAP-MS); 常压干燥; 减压干燥; L-焦谷氨酸; 鸟苷 5'-单磷酸水合物; 5,6-二氢胸腺嘧啶; 7-甲基黄嘌呤; 左旋甲状腺素; 甲基间酪氨酸; 大黄素 8-葡萄糖苷; 益母草碱; 二氢硫辛酸脱氢酶; 过氧化氢酶; 一氧化氮合酶 2

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5569-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.011

Analgesic effects of bear bile powder by different drying methods based on differences in chemical components

YANG Jun-li¹, ZHONG Lin-jiang¹, LEI Yang², DENG Yan¹, GAO Tian-ci¹, XU Yu-ling¹, LIU Tao^{2,4}, ZHANG Kun³

1. School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. Chengdu Boruitai Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610106, China

4. Sichuan Engineering Research Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine Industrialization, Chengdu 610106, China

收稿日期: 2021-01-19

基金项目: 成都市科技计划项目(2021-YF05-00080-SN); 2020 广西壮瑶药重点实验室开放课题(GXZYKF2020-04); 成都大学大学生创新创业训练计划项目(S201911079068)

作者简介: 杨俊莉, 硕士研究生, 研究方向为中成药质量再评价研究。Tel: (028)61302236 E-mail: 3270354441@qq.com

*通信作者: 徐玉玲, 副教授, 从事中成药再评价及中药资源综合利用研究。Tel: (028)84616167 E-mail: xuyuling6@cdu.edu.cn

张 坤, 成都市特聘专家, 从事中药配方颗粒和经典名方技术研发及产业化转移。

Tel: (028)60229648 E-mail: zhangkun@bright-biotech.com

Abstract: Objective To identify the chemical components of normal pressure and reduced pressure dried bear bile powder by UPLC-QTRAP-MS method, clarify the differential components, so as to explore the analgesic mechanism of bear bile powder with the concept of network pharmacology as a guide. **Methods** Based on the combination of UPLC-MS/MS detection platform, database and multivariate statistical analysis, the composition differences of bear bile powder were studied. With the help of PharmMapper, Uniprot, GeneCards databases and literatures, the composition of bear bile powder and targets related to viral hepatitis, cholecystitis and coronary heart disease were obtained, and its efficacy was verified by animal experiments; the core target of the “disease target-drug target set” was obtained by topological analysis, and the GO function and KEGG pathway enrichment were carried out, Cytoscape3.8.2 software was used to construct a “component-target-pathway” network diagram. **Results** A total of 721 common components in bear bile powder by atmospheric pressure drying and vacuum drying methods. There were eight differential composition including *L*-pyroglutamic acid, guanosine 5'-monophosphate hydrate, 5,6-dihydrothymine, 7-methylxanthine, levothyroxine, methyl-tyrosine, emodin 8-glucoside, leonurine. A total of 1605 differential composition potential targets, 7444 viral hepatitis targets, 636 cholecystitis targets, 7563 coronary heart disease targets were retrieved. There were 282 common targets of bear bile powder against viral hepatitis, cholecystitis and coronary heart disease, and 759 GO items were obtained by GO function enrichment analysis ($P < 0.05$), including 717 BP items, 21 CC items and 21 MF items. Guanosine 5'-monophosphate hydrate, methyl-tyrosine, levothyroxine and rhein 8-glucoside in bear bile powder may exerted its analgesic role by regulating signaling pathways such as metabolic and cancer pathways through dihydrolipoate dehydrogenase (DLD), catalase (atalase, CATC), nitric oxide synthase 2 (NOS2). The efficacy test results showed that both atmospheric pressure and decompression drying bear bile powder had inhibitory effect on the pain induced by hot plate and acetic acid in mice, and there was significant difference between atmospheric pressure and decompression group ($P < 0.05$), and the analgesic effect of decompression group was stronger than atmospheric pressure group. **Conclusion** This study shows that the drying method changes the chemical composition of bear bile powder, which leads to differences in its analgesic effects. The mechanism of the analgesic effect of bear bile powder is initially explored, and it is recommended to use reduced pressure drying to prepare bear bile powder in large-scale production, which provides a certain basis for reasonable application of bear bile powder.

Key words: Bear bile powder; drying method; differential composition; analgesic effect; network pharmacology; ultra-high performance liquid-triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (UPLC-QTRAP-MS); atmospheric drying; vacuum drying; *L*-pyroglutamic acid; guanosine 5'-monophosphate hydrate; 5,6-dihydrothymine; 7-methylxanthine; levothyroxine; methyl-tyrosine; emodin 8-glucoside; leonurine; dihydrolipoate dehydrogenase; catalase; nitric oxide synthase 2

熊胆为我国名贵中药材，药用为脊索动物门哺乳纲熊科熊属黑熊 *Selenaretos thibetanus* Cuvier 及棕熊 *Ursus arctos* Linnaeus 的胆囊，被誉为“药中黄金”^[1]。目前，广泛应用于临床的熊胆粉，为黑熊经胆囊手术引流胆汁干燥而得，具有清热解毒、平肝明目、杀虫止血等功效^[2]，属于原国家卫生部批准的一类新药。据《中国熊胆粉市场供需情况与发展趋势研究报告（2015—2020）》统计，由国家药品监督管理局正式批准的合法药品中，含熊胆粉的中药制剂有 243 种^[3]。据调查，熊胆粉现行大生产干燥方式多采用常压干燥，其干燥温度高、时间长，经济效益低，造成资源浪费。不同的干燥方式的加热方式及原理存在差异，必然会导致干燥产物的物理性质及成分含量的不同^[4-5]。目前未见熊胆粉的生产工艺对其化学成分及药理作用影响研究相关报道。

动物类中药是中药中极具特色的一部分，其药性峻猛，药效成分不明确。但多数动物类中药的质量标准可控性差，无法准确评价药材质量，在一定

程度上制约了动物类中药的发展。熊胆粉的化学成分主要包括胆酸类、胆固醇、色素类、磷脂、氨基酸、无机盐以及微量元素等^[6]。目前熊胆粉的研究热点主要集中在其含量较高的胆汁酸类成分，忽略了非胆汁酸类成分与其协同发挥药效的作用。文献研究发现，熊胆粉在肝胆系统、心脑血管系统及抗肿瘤等方面展示出良好的药效活性^[7]。林国华等^[8]发现熊胆粉能有效抑制肝胆疾病引起的腹痛；韩莹等^[9]、周超凡等^[10]报道熊胆粉能有效减轻冠心病等引起的胸痛。

超高效液相色谱-质谱联用技术（UPLC-MS）已被广泛应用于中药化学成分的快速鉴定、药物质量控制等多个研究领域^[11-12]，可通过将 LC-MS 扫描的碎片离子信息和化合物裂解规律与对照品或文献比对来快速、准确地分析中药中所含化学成分^[13-14]。

本研究遵循熊胆粉历史药用方法，结合现代制剂技术的发展，采用常压及减压干燥制备熊胆粉，采用 UPLC-QTRAP-MS 技术对常压、减压干燥熊胆

粉进行检测,比较其差异成分,并以网络药理学为指导,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^[15-16],探究常压、减压干燥熊胆粉对病毒性肝炎、胆囊炎及冠心病的潜在作用靶点及作用机制,并进行镇痛药效学验证,从整体上探索药物与疾病的相关性,为阐明熊胆粉药效物质基础、提高其质量控制水平奠定了基础。

1 仪器与材料

Shimadzu Nexera X2 CBM30A 超高效液相色谱,日本岛津有限公司;4500 QTRAP 串联质谱,Applied Biosystems 公司;100 μ L 移液枪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;1 mL 注射器、5 mL 注射器,湖南省绿洲惠康发展有限公司;800Y 高速多功能粉碎机,永康市铂欧五金制品有限公司;SHZ-C 型循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;FA2004 电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;DZF-6050A 真空恒温干燥箱,北京中兴伟业仪器有限公司;YLS-6B 智能热板仪,山东省医学科学院设备站。熊胆汁,采自四川养麝研究所,批号为 201905028,经成都大学刘涛研究员鉴定为熊科熊属黑熊 *S. thibetanus* Cuvier 胆汁;变色硅胶,成都市科隆化学药品有限公司,批号 2017050102;甲醇、乙腈,色谱纯,Merck 公司;水为怡宝纯净水,其余试剂均为分析纯,均购自成都市科隆化学药品有限公司。

SPF 级小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,成都达硕实验动物有限公司,批号为 190729,许可证号:SCXK(川)2015-030。所有动物实验遵循《四川省实验动物管理条例》有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 UPLC-QTRAP-MS 检测

2.1.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m),流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱:0~10.0 min, 95%~10% A;10.0~11.0 min, 10% A;11.0~11.1 min, 10%~95% A;11.1~14.0 min, 95% A;体积流量 0.35 mL/min;柱温 40 $^{\circ}$ C;检测波长 245 nm;进样量 5 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)操作参数如下:离子源,涡轮喷雾;

源温度 550 $^{\circ}$ 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 344.738、413.685、172.369 kPa(50、60、25.0 psi),碰撞诱导电离参数设置为高。在 QQQ 和 LIT 模式下分别用 10、100 μ mol/L 聚乙二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。QQQ 扫描使用 MRM 模式,并将碰撞气体(氮气)设置为中等。各离子对根据优化的去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

2.1.3 供试品溶液制备及分析 取洁净的熊胆汁供试样品,分别进行常压干燥(热风循环温度 105 $^{\circ}$ C;时间 36 h 18 min)和减压干燥(温度 65 $^{\circ}$ C;压力 -0.08 MPa;时间 25 h 53 min),研磨(30 Hz、1.5 min)至粉末状,即得熊胆粉;称量熊胆粉 50 mg,溶解于 1 mL 70%甲醇中,振荡 5 min,冰上静置 15 min;在 4 $^{\circ}$ C 条件下,12 000 r/min 离心 10 min,离心后吸取上清液 400 μ L 到对应的 EP 管中;静置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱,过夜;在 4 $^{\circ}$ C 条件下,12 000 r/min 再离心 3 min;离心后取上清 200 μ L 用微孔滤膜(0.22 μ m)滤过样品,于对应进样瓶内衬管中,用于 UPLC-MS/MS 分析。

2.2 网络药理学预测

2.2.1 数据库与软件 数据库:PharmMapper(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>); PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Uniprot(<https://www.uniprot.org/>); GeneCards(<https://www.gene-cards.org/>); STRING(<https://string-db.org/cgi/input.pl>); DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>); VENN Y(<https://bioinfogp.cnb.csic.es>);软件: Cytoscape 3.6.0; Prism 6。

2.2.2 核心靶标获取 通过 PubChem 数据库^[17],检索 UPLC-QTRAP-MS 检测出的常压、减压熊胆粉的 8 种差异成分的 3D 结构,在 PharmMapper 数据库中检索得到化学成分对应靶点的 Uniprot ID,运用 Uniprot 数据库,检索靶标名称,得到相应基因。根据腹痛、胸痛相关的临床表型合集,通过 GeneCards 数据库检索 virus hepatitis(病毒性肝炎)、cholecystitis(胆囊炎)、coronary disease(冠心病)疾病靶点,建立疾病的相关基因集。运用 Venny2.0 网站得到成分与疾病的交集基因。

2.2.3 靶点通路分析 运用 DAVID 数据库中进行基因本体(gene ontology, GO)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, 观察潜在作用靶标的生物学功能。依据通路富集结果, 选择前 20 个条目使用 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>) 绘制高级气泡图。

2.2.4 PPI 网络构建 根据药物靶点与疾病靶点的交集基因, 通过 STRING 数据库构建 PPI 网络。

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 20 个通路对应基因, 以及基因对应化合物, 构建成分、核心靶标和关键通路之间相互作用关系表, 运用 Cytoscape 3.8.0 软件构建成分-靶标-通路网络图, 进行可视化分析, 进一步探讨熊胆粉镇痛的分子机制。

2.3 镇痛药效实验

2.3.1 供试品溶液制备 分别取“2.1.3”项下所制备的常压、减压熊胆粉适量, 精密称定, 加入纯化

水配制成适宜质量浓度的溶液, 超声溶解 (功率 240 W, 频率 40 kHz), 即得。

2.3.2 热板法 取体质量 18~22 g 经痛阈筛选合格 (痛阈在 5~30 s) 的 SPF 级小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组: 生理盐水组 (5 mL/kg)、阿司匹林组 (0.08 g/kg)、常压干燥及减压干燥熊胆粉组 (0.208 g/kg)。给药前测定其自放在热板上至出现舔后足所需时间作为该鼠正常痛阈值, 连续 ig 给药 7 d, 于第 7 天测定给药后 30、60、90、120 min 时的痛阈值。

2.3.3 醋酸扭体法 取体质量 18~22 g 小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 10 只, 雌雄各 5 只。分组及给药剂量同热板法, ig 给药连续 7 d。末次给药 0.5 h 后 ip 0.6% 醋酸 0.2 mL/只, 观察 15 min 内各鼠扭体潜伏期及其出现扭体反应次数。

3 结果

3.1 熊胆粉成分鉴定

利用软件 Analyst 1.6.1 处理质谱数据。图 1、2

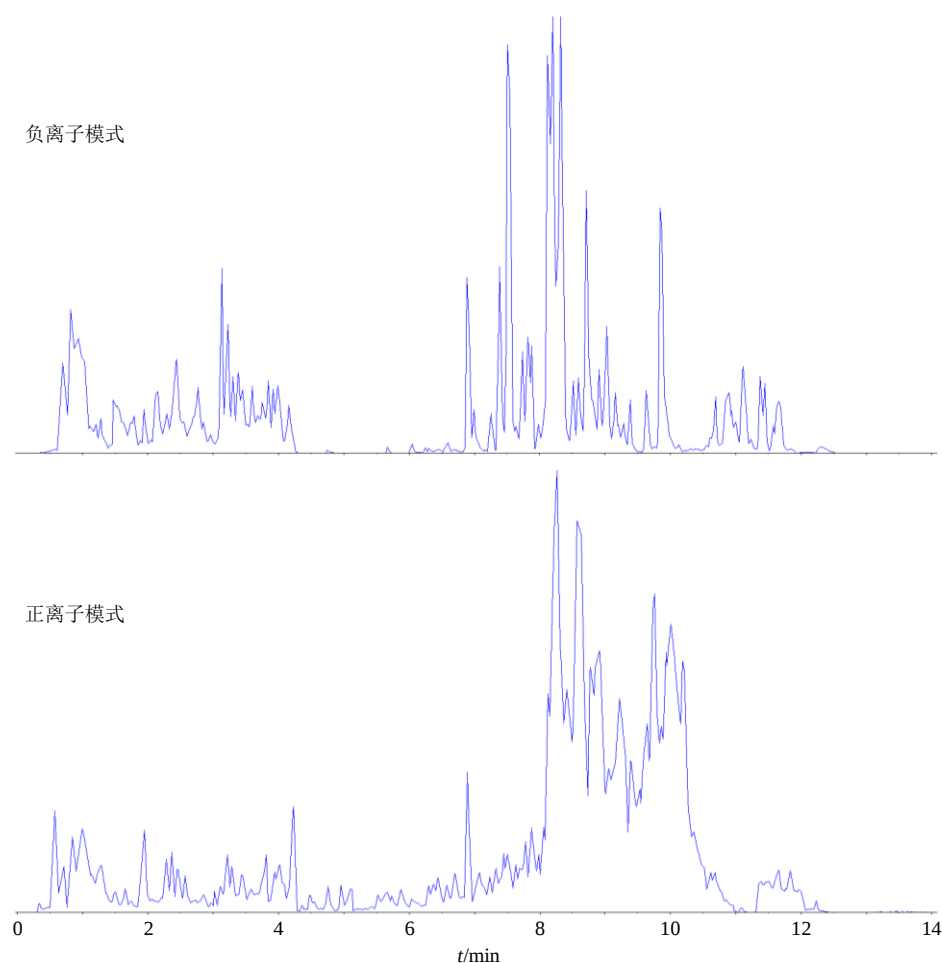


图 1 常压、减压熊胆粉混合质谱分析总离子流图

Fig. 1 Mass spectrometry total ion chromatogram of mixture of atmospheric and vacuum bear bile powder

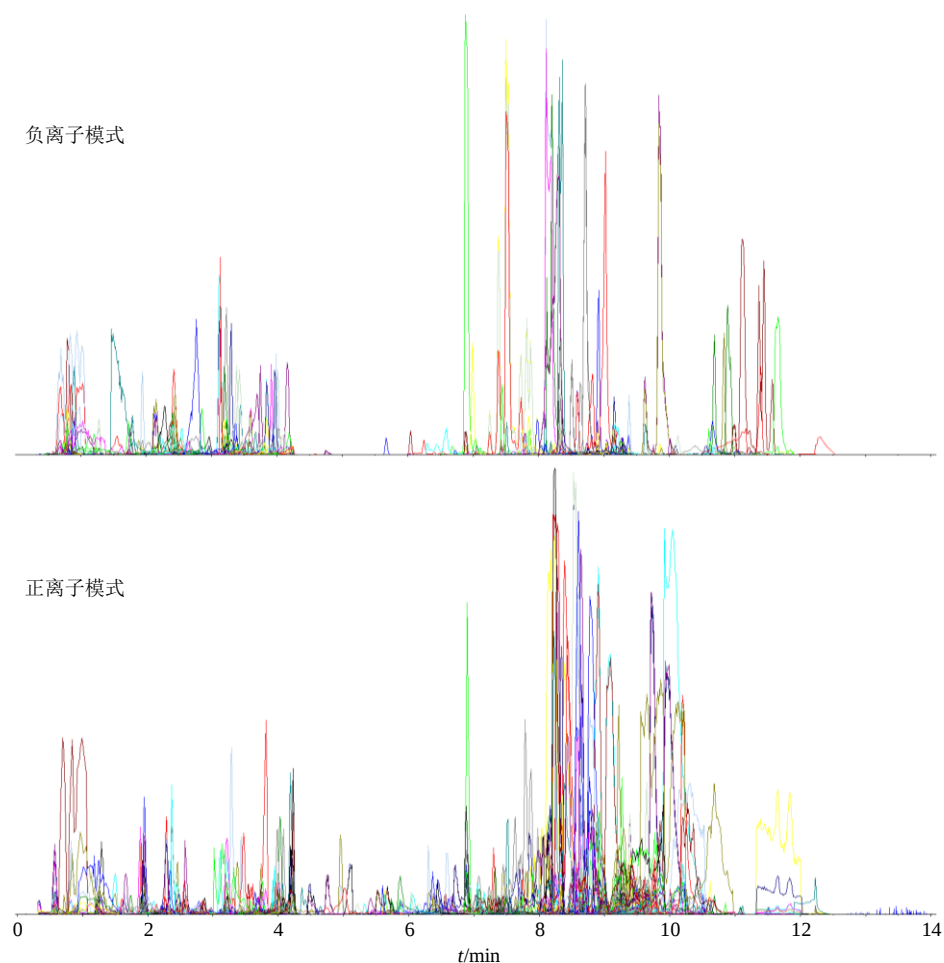


图 2 MRM 代谢物检测多峰图

Fig. 2 Multimodal graph of MRM metabolite detection

所示为混样质控 QC 样本的总离子流图 (total ions current, TIC) 及 MRM 代谢物检测多峰图 (多物质提取的离子流谱图, XIC)。

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, 对每个代谢物在常压、减压熊胆粉以及混合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 3 展示了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。

采用 UPLC-MS/MS 法对常压干燥、减压干燥熊胆粉进行成分定性及定量鉴定, 从常压干燥熊胆粉中发现了 724 个化学成分, 从减压干燥熊胆粉中发现了 726 个化学成分, 交集成分 721 个, 差异成分 8 个, 结果见表 1 和图 4, 其中差异成分为定性结果。根据峰面积显示, 交集成分主要有胆汁酸、甘油磷脂类、有机酸类、脂肪酰类、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物等, 包括甘氨酸熊脱氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、猪去氧胆酸、溶血磷脂酰胆碱、

棕榈油酸、马尿酸、犬尿酸等。

3.2 网络药理学结果

3.2.1 核心靶标获取 将筛选出的 8 种差异化学成分, 通过 PharmMapper 数据库搜索得到药物潜在靶点共 1605 个, 主要包括木葡聚糖内转糖基化酶、磷酸核糖胺-甘氨酸连接酶、谷氨酰-tRNA 还原酶、同质儿茶酸分解代谢双功能异构酶/脱羧酶、基因组多蛋白、核糖核酸酶 HII、蛋白 recA 等; 通过 GeneCards 数据库检索得到病毒性肝炎靶点 7444 个、胆囊炎靶点 636 个、冠心病靶点 7563 个, 通过 Venny2.0 得出差异成分对病毒性肝炎、胆囊炎、冠心病的交集基因有 282 个, 见图 5, 包括 Friend 白血病整合 1 转录因子 (friend leukemia integration 1, FLI1)、cGMP 抑制 3,5-环磷酸二酯酶 B (cGMP-inhibited 3,5cyclic phosphodiesterase B, PDE3B)、蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶 2 (protein-glutamine γ -glutamyltransferase 2, TGM2)、胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)、

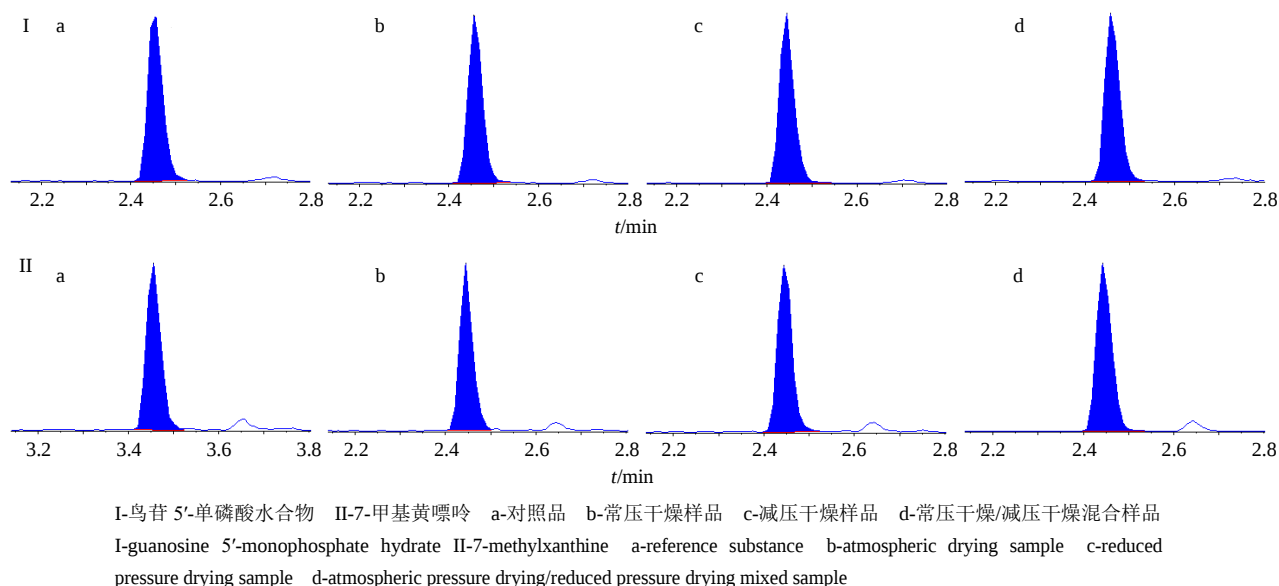


图 3 代谢物定量分析积分校正

Fig. 3 Quantitative analysis integration correction of metabolites

表 1 常压干燥、减压干燥熊胆粉差异成分

Table 1 Differential components of normal pressure drying and vacuum drying bear bile powder

编号	化学式	中文名称	英文名称	物质一级分类	物质二级分类	干燥方法
MEDN0017	C ₅ H ₇ NO ₃	L-焦谷氨酸	L-pyrroglutamic acid	氨基酸及其代谢物	氨基酸衍生物	常压干燥
MEDN0162	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	鸟苷 5'-单磷酸水合物	guanosine monophosphate	核苷酸及其代谢物	核苷酸及其代谢物	减压干燥
MEDP0154	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	5,6-二氢胸腺嘧啶	5,6-dihydro-5-methyluracil	核苷酸及其代谢物	核苷酸及其代谢物	常压干燥
MEDP0157	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	7-甲基黄嘌呤	7-methylxanthine	核苷酸及其代谢物	核苷酸及其代谢物	减压干燥
MEDP0186	C ₁₅ H ₁₁ L ₄ NO ₄	左旋甲状腺素	L-thyroxine	激素及激素相关物质	激素及激素相关物质	减压干燥
MEDP1362	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	甲基间酪氨酸	methyl-tyrosine	氨基酸及其代谢物	氨基酸及其代谢物	减压干燥
MW00006983	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素 8-葡萄糖苷	emodin 8-glucoside	蒽醌类衍生物	蒽醌类衍生物	减压干燥
MW00007498	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₅	益母草碱	leonurine	生物碱	生物碱	常压干燥

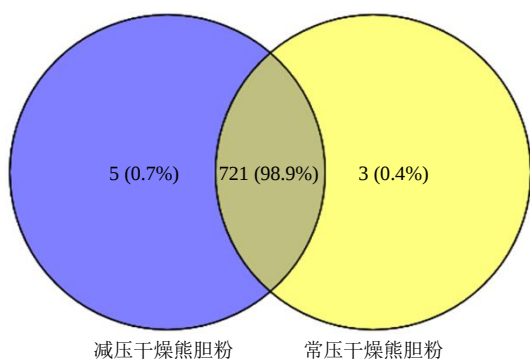


图 4 常压、减压熊胆粉成分交集图

Fig. 4 Composition diagram of normal pressure and reduced pressure bear bile powder

果糖醛缩酶 B (fructose-bisphosphate aldolase B, ALDOB)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Toll 样受体 1 (Toll-like receptor 1,

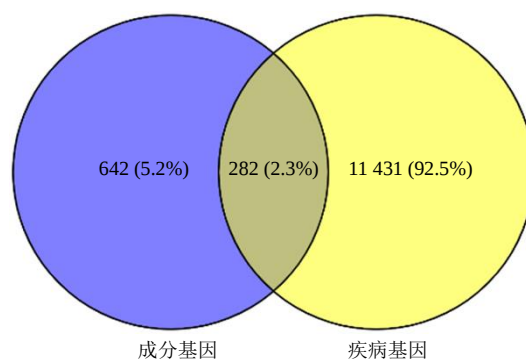


图 5 成分与疾病交集基因图

Fig. 5 Intersection gene map of components and diseases

TLR1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Fes/Fps (tyrosine-protein kinase Fes/Fps, FES)、半乳糖激酶 (galactokinase, GALK1)、Ras 相关蛋白 Rab-31 (Ras-related protein Rab-31, RAB31) 等。

3.2.2 靶点通路分析 DAVID 中 GO 功能富集分析得到 GO 条目 759 个 ($P<0.05$), 其中包括小分子代谢过程、有机物代谢过程、有机氮化合物代谢过程、细胞代谢过程、初级代谢过程、生物调节、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 processes, BP) 条目 717 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 21 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 21 个。

分别选择前 20 个用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制柱状图, 结果见图 6~8。KEGG 通路富集筛选得到 28 条信号通路 ($P<0.05$) 见表 2, 涉及癌症通

路、前列腺癌通路、原发性免疫缺陷通路、半胱氨酸和蛋氨酸的代谢、谷胱甘肽代谢等。选择前 20 条信号通路, 使用 Omicshare 数据库绘制气泡图, 见图 9, PPI 网络图如图 10 所示。

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 129 个节点, 如图 11 所示, 其中菱形为对应化学成分、椭圆形为对应基因、飞镖形为对应通路。结果采用度 (degree)、平均最短路径 (ASPL)、中介中心度 (BC) 和接近中心性 (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 = 12.5, 靶标度值中位数 = 5) 的成分分别是鸟苷 5'-单磷酸水合物、甲基间酪氨酸、左旋甲状腺素及大黄素 8-葡萄糖苷。靶标有二氢硫辛酸脱氢酶 (dihydrolipoyl dehydrogenase, DLD)、过氧化氢酶-2 (cationic amino acid transporter, CAT)、一氧

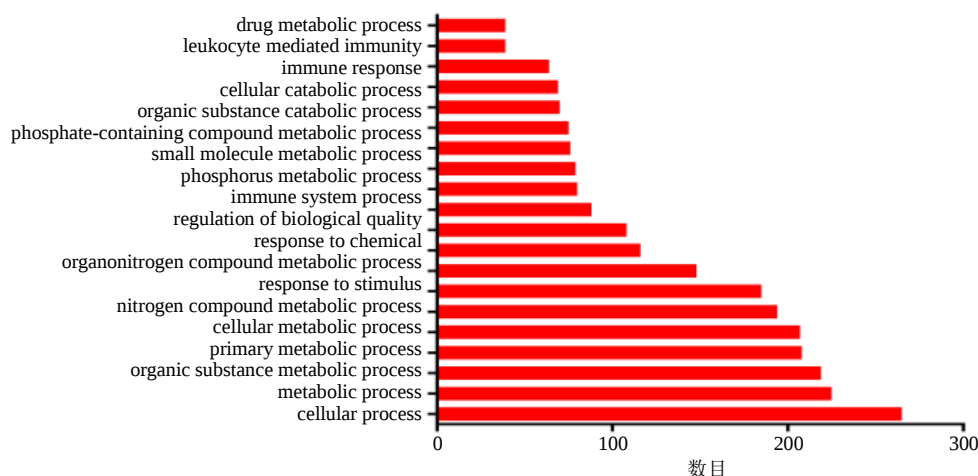


图 6 GO 富集分析 (生物过程)

Fig. 6 GO enrichment analysis (biological processes)

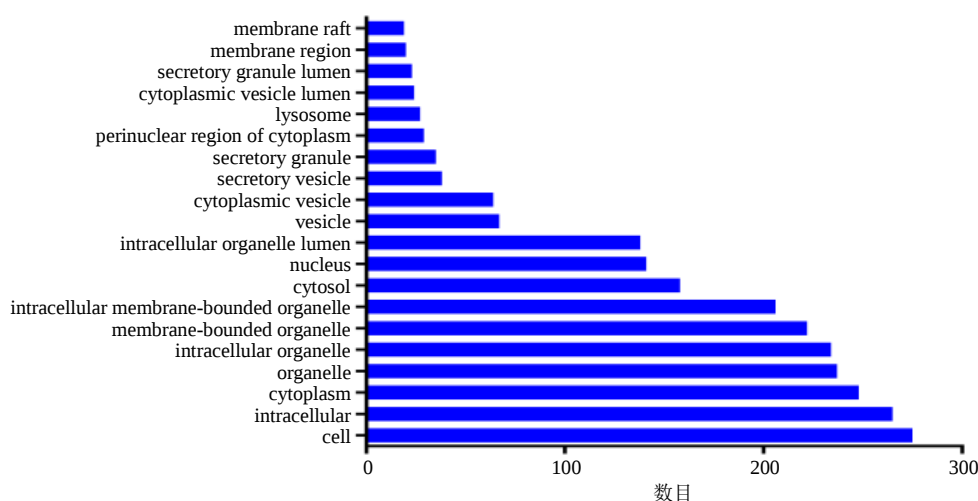


图 7 GO 富集分析 (细胞组成)

Fig. 7 GO enrichment analysis (cellular component)

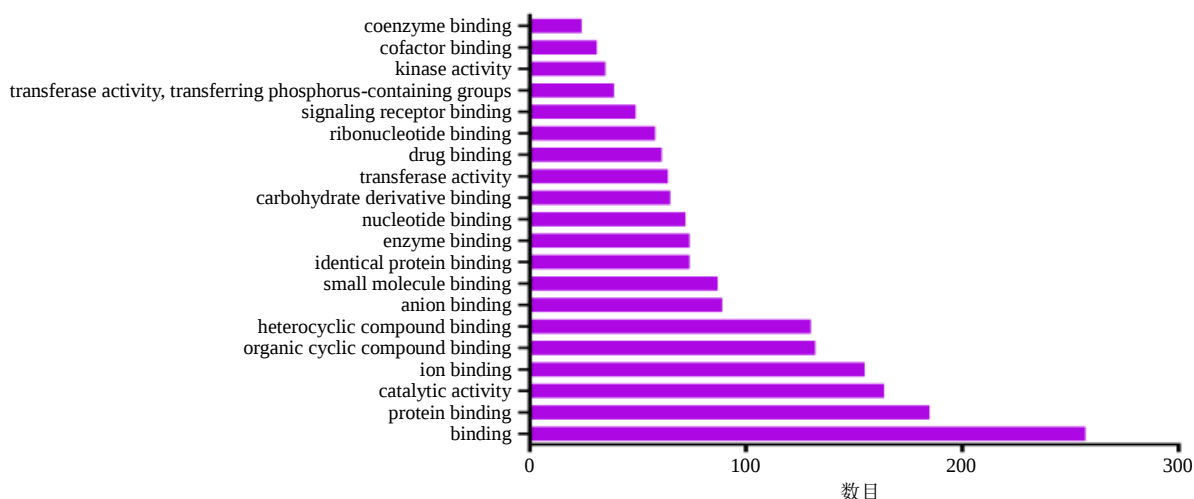


图 8 GO 富集分析 (分子功能)

Fig. 8 GO enrichment analysis (molecular function)

表 2 常压、减压干燥熊胆粉成分与疾病交集基因 KEGG 通路

Table 2 Intersection gene KEGG pathway between components and disease of normal pressure and reduced pressure dried bear bile powder

编号	通路	基因数	P 值	编号	通路	基因数	P 值
hsa01130	biosynthesis of antibiotics	25	1.300×10^{-8}	hsa04141	protein processing in endoplasmic reticulum	11	0.029 20
hsa01100	metabolic pathways	65	1.277×10^{-6}	hsa00380	tryptophan metabolism	5	0.030 31
hsa01200	carbon metabolism	13	1.247×10^{-4}	hsa00071	fatty acid degradation	5	0.035 47
hsa01230	biosynthesis of amino acids	9	1.263×10^{-3}	hsa00230	purine metabolism	11	0.037 10
hsa00280	valine, leucine and isoleucine degradation	7	2.522×10^{-3}	hsa05222	small cell lung cancer	7	0.040 67
hsa00220	arginine biosynthesis	5	2.550×10^{-3}	hsa00630	glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4	0.045 11
hsa00010	glycolysis/gluconeogenesis	8	3.601×10^{-3}	hsa01212	fatty acid metabolism	5	0.053 80
hsa00620	pyruvate metabolism	6	6.304×10^{-3}	hsa00030	pentose phosphate pathway	4	0.053 99
hsa00020	citrate cycle (TCA cycle)	5	0.011 43	hsa00052	galactose metabolism	4	0.058 72
hsa04146	peroxisome	8	0.011 54	hsa00330	arginine and proline metabolism	5	0.060 86
hsa05200	pathways in cancer	21	0.012 95	hsa04110	cell cycle	8	0.076 49
hsa00520	aminosugar and nucleotide sugar metabolism	6	0.013 55	hsa00350	tyrosine metabolism	4	0.085 10
hsa00051	fructose and mannose metabolism	5	0.014 33	hsa01210	2-oxocarboxylic acid metabolism	3	0.089 68
hsa00250	alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	0.019 47	hsa00360	phenylalanine metabolism	3	0.089 68

化氮合酶 (nitric oxide synthase 2, NOS2)、囊泡蛋白 (golgi transport 1, GOT1)、过氧化物酶体酰基辅酶 A 氧化酶 (peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase, ACOX)、甾醇 o-酰基转移酶 1 (acetyl-CoA acetyltransferase 1, ACAT1)、羟酸氧化酶 1 (hydroxyacid oxidase 1, HAO1)、Creb 结合蛋白 (CREB-binding protein, CREBBP)、腺苷酸琥珀酸裂解酶 (adenylosuccinate lyase, ADSL)、前蛋白转化酶枯草杆菌素 (proprotein carrier protein, PC)、精氨基琥珀酸合酶 (argininosuccinate synthase,

ASS)。通路主要有代谢通路和癌症通路。

3.3 药效实验结果

3.3.1 热板法 对小鼠热板致痛抑制作用如表 3 所示, 结果表明, 与生理盐水组比较, 常压、减压干燥熊胆粉均能在 60 min 显著提高小鼠痛阈值 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中常压与减压干燥组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3.3.2 醋酸扭体法 对小鼠醋酸扭体致痛抑制作用如表 4 所示, 结果表明, 常压、减压干燥熊胆粉对小鼠醋酸所致疼痛均有一定的抑制作用, 并能延长

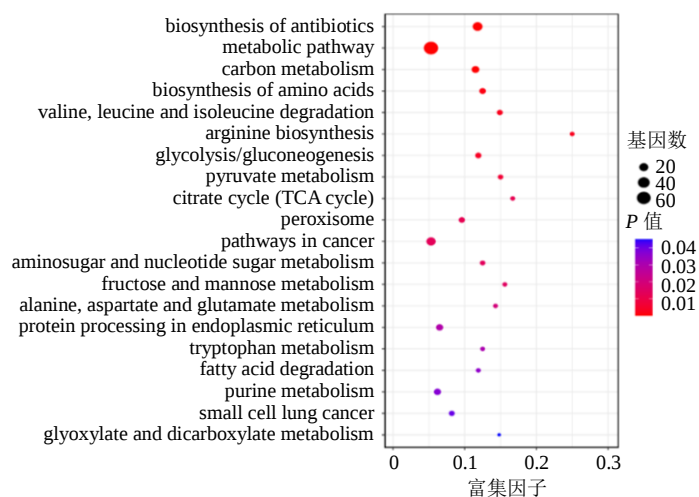


图 9 KEGG 富集分析前 20 个通路气泡图

Fig. 9 Bubble chart of top 20 channels of KEGG enrichment analysis

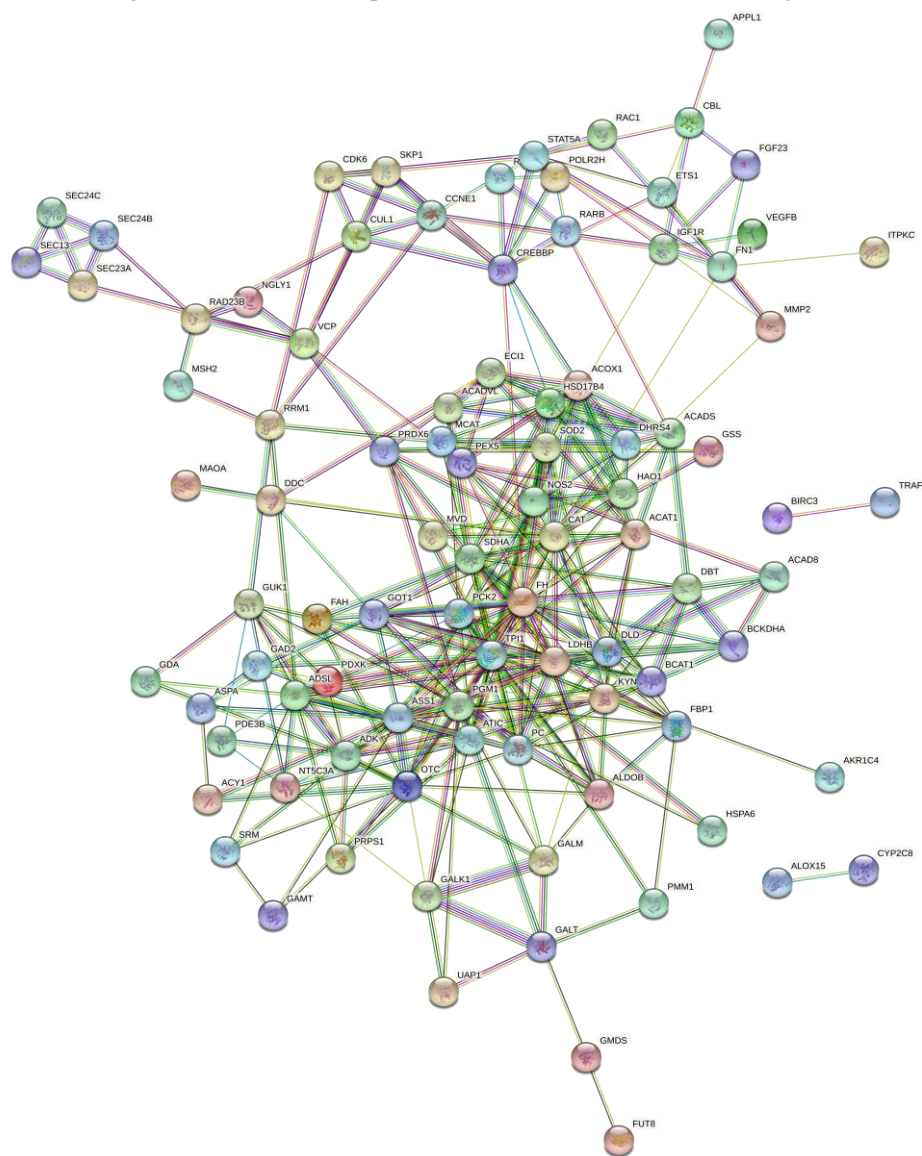


图 10 KEGG 前 20 条通路基因 PPI 网络图

Fig. 10 PPI network diagram of top 20 pathway genes of KEGG

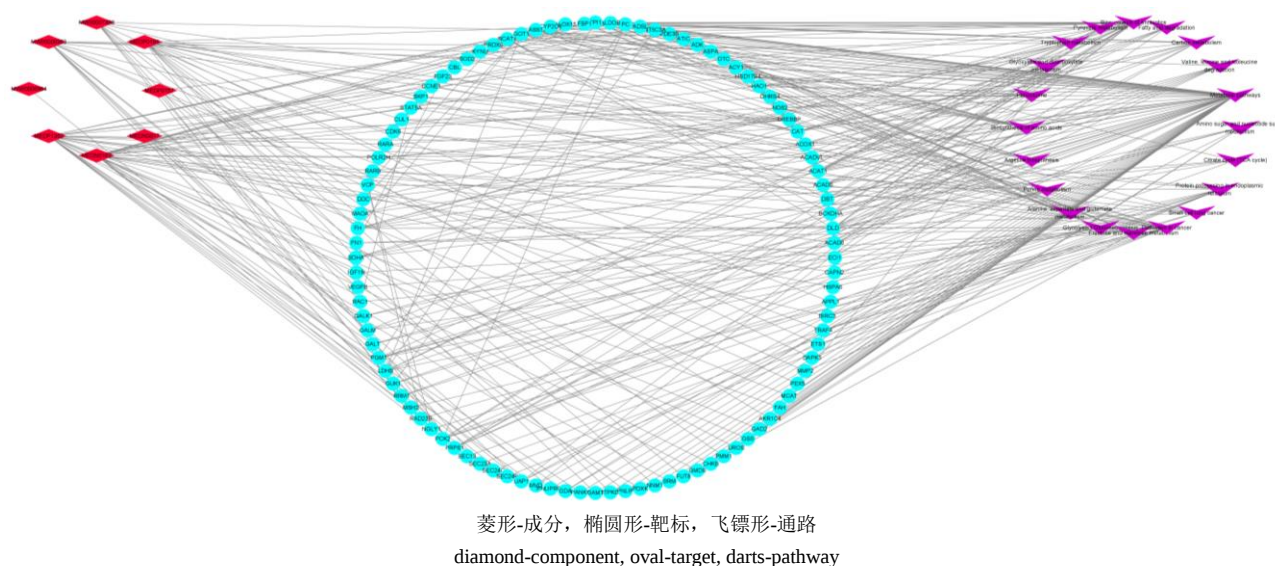


图 11 常压、减压熊胆粉差异成分-靶标-通路网络图

Fig. 11 Differential composition-target-pathway network diagram of normal pressure and reduced pressure dried bear bile powder

表 3 小鼠给药前后平均痛阈值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 3 Average pain threshold of mice before and after administration ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	给药前平均痛阈值/s	给药后不同时间平均痛阈值/s			
		30 min	60 min	90 min	120 min
生理盐水	19.69 ± 4.47	20.36 ± 13.66	16.29 ± 4.44	17.17 ± 10.78	15.72 ± 6.13
常压干燥	19.88 ± 6.28	20.44 ± 10.34	22.30 ± 15.09 ^{▲▲}	26.55 ± 18.94 ^{▲▲}	18.38 ± 6.59
减压干燥	19.83 ± 5.39	23.60 ± 14.87	28.68 ± 18.71 ^{**}	21.67 ± 14.65	20.16 ± 8.19
阿司匹林	18.79 ± 6.60	28.87 ± 19.22	26.04 ± 17.34	22.65 ± 13.90	19.64 ± 5.85

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与减压干燥组比较: ▲▲ $P < 0.01$, 表 4 同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal saline group; ▲▲ $P < 0.01$ vs vacuum drying group, same as table 4表 4 小鼠扭体潜伏期及 15 min 内平均扭体次数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 4 Latency period of mouse torsion and average times of torsion in 15 min ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	小鼠扭体潜伏期/min	15 min 内扭体次数
生理盐水	4.42 ± 2.51	36.10 ± 21.59
常压干燥	6.46 ± 2.80	15.80 ± 16.14 ^{**▲▲}
减压干燥	5.93 ± 2.80	22.50 ± 9.81 ^{**}
阿司匹林	8.80 ± 3.83	8.20 ± 5.65

小鼠发生扭体反应的潜伏期, 与生理盐水组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

4 讨论

熊胆粉的文献报道主要活性成分熊去氧胆酸 (ursodesoxycholic acid, UCDA) 可通过人工合成途径获得, 一定程度上为其替代品提供了可能性, 但有专家表明熊胆粉的功效在于其 UCDA 与其他多

种成分的协同作用, 人工合成 UCDA 难以完全替代其疗效。本研究采用 UPLC-MS/MS 及高通量筛选的方法代替数据库筛选, 分析测定了常压及减压干燥熊胆粉上千种化学成分, 明确其差异性, 高效研究其中活性成分, 排除与主治无关或毒性成分。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效进行预测的问题。同时, 在网络药理学指导下研究各组对多靶点的活性, 预测常压干燥及减压干燥差异成分镇痛作用机制, 通过拓扑参数分析得到常压干燥及减压干燥熊胆粉差异成分治疗病毒性肝炎、胆囊炎及冠心病 3 种疾病的关键成分有鸟苷 5'-单磷酸水合物、甲基间酪氨酸、左旋甲状腺素及大黄素 8-葡萄糖苷, 关键基因有 *FLII*、*PDE3B*、*TGM2*、*IGF1R*、*ALDOB*、*PCNA*、*TLR1*、*FES*、*GALK1*、*RAB31*, 涉及的关键通路有癌症通路及代谢通路。

文献研究表明熊胆粉可以显著调节丙型肝炎模型树鼯体内的牛磺酸及亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢、色氨酸代谢及初级胆汁酸代谢途径的扰动,从而治疗病毒性肝炎^[19]。常压、减压熊胆粉 8 种差异成分中大黄素和益母草碱为质谱实验中通过数据库检定出的成分,而目前文献报道熊胆粉成分大多为胆汁酸类、氨基酸类及微量元素等,未见报道大黄素、益母草碱,有待进一步进行分离鉴定,但文献研究表明,大黄素^[20]具有保护心血管、保肝护肺等生物活性,益母草碱^[21]也在文献报道中体现出有直接的保护心肌细胞损伤作用,这可能为熊胆粉治疗病毒性肝炎、胆囊炎及冠心病的药效物质基础提供依据。本实验结果表明,熊胆的主要药效物质基础除以往认识的熊去氧胆酸及牛磺熊去氧胆酸等胆汁酸成分外,还有氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物等,解决了动物药成分复杂,药效物质基础研究不明确,且功效与成分难以关联的问题。

在此基础上,对网络药理学研究结果进行了进一步的验证,结果表明常压干燥及减压干燥熊胆粉均具有镇痛作用,且 2 种干燥方式镇痛作用具有显著性差异,因而得出干燥方式使得熊胆粉的化学组成存在一定差异,导致其镇痛作用差异,且网络药理学得出结果中关键药效成分均来源于减压干燥,而常压干燥温度高,时间长,故本实验建议大生产中采用减压干燥制备熊胆粉,研究成果为后续制剂工艺的选择以及药效物质基础研究提供了参考。在分析成分的同时,发现其个别成分含量也存在差异,这也可能是造成其镇痛作用差异的原因,后续有待进一步研究。

研究基于 UPLC-QTRAP-MS 和网络药理学,揭示了熊胆粉镇痛的多成分、多靶点的协同抗菌作用特点,较合理地解释了熊胆粉在镇痛方面临床应用的科学性。但本研究仅采用了小鼠热板法和醋酸扭体模型对熊胆粉镇痛药效进行了验证,热板法为热刺激小鼠足部产生痛反应,即舔足反应,以小鼠出现舔足的时间作为痛反应指标;醋酸扭体模型为腹腔注射损伤物质引起受试动物腹痛,表现为“扭体反应”,即腹部内凹、躯干与后肢伸张、臀部高起。而不同动物模型其表现的镇痛作用机制有一定差异,因而导致实验结果差异,后续将进一步研究其作用机制。

志谢: 嘉兴迈维代谢生物科技有限公司对熊胆粉 UPLC-MS/MS 检测及分析数据的贡献。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 石岩,魏锋,林瑞超,等.熊胆粉中主要胆汁酸类成分的测定及分析[J].中国药学杂志,2016,51(22):1958-1961.
- [2] 南京中医药大学.中药大辞典[M].第2版.上海:上海科学技术出版社,2014:3156.
- [3] 韩莹,孙晖,邱丽萍,等.熊胆药用特殊价值及其药效物质基础研究[J].中医药信息,2020,37(1):12-18.
- [4] 刘涛,付春梅,唐玉,等.不同干燥方式对桑枝提取物物理指纹图谱及其总黄酮含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):34-38.
- [5] 李会伟,刘培,钱大玮,等.不同干燥方法及其影响因素对玄参药材初加工过程品质形成的影响[J].中国中药杂志,2015,40(22):4417-4423.
- [6] 何姣.猪胆粉中结合型胆甾酸的化学成分及生物活性研究[D].西安:西北大学,2012.
- [7] 秦山,雷秉钧,陈亚利,等.熊胆胶囊对病毒性肝炎患者退黄作用的临床研究[J].四川医学,2000,21(2):118-120.
- [8] 林国华,杜犀,吴朝,等.熊胆粉保肝抗癌作用机制研究进展[J].临床医学研究与实践,2020,5(18):196-198.
- [9] 韩莹,孙晖,邱丽萍,等.熊胆药用特殊价值及其药效物质基础研究[J].中医药信息,2020,37(1):12-18.
- [10] 周超凡,高国建,刘颖.熊胆粉研究进展述评[J].中国中药杂志,2015,40(7):1252-1258.
- [11] Liu M H, Tong X, Wang J X, et al. Rapid separation and identification of multiple constituents in traditional Chinese medicine formula Shenqi Fuzheng Injection by ultra-fast liquid chromatography combined with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 74: 141-155.
- [12] Zhang X X, Liang J R, Liu J L, et al. Quality control and identification of steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by fingerprint with HPLC-ELSD and HPLC-ESI-quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 91: 46-59.
- [13] 杨岱琳,佟玲,李晓稳,等. UPLC-Q-TOF/MS^E 方法分析养血清脑颗粒的化学成分[J].药科学报,2016,51(5):797-805.
- [14] Zhang A H, Zou D, Yan G L, et al. Identification and characterization of the chemical constituents of Simiao Wan by ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry coupled to an automated multiple data processing method[J]. J Sep Sci, 2014, 37(14):

- 1742-1747.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 韩莹, 孙晖, 邱丽萍, 等. 熊胆药用特殊价值及其药效物质基础研究 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 12-18.
- [20] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [21] 刘新华. 益母草碱的合成及其对心血管保护作用的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.

[责任编辑 郑礼胜]