

基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病作用机制

姜 晨, 徐荣佳, 崔师妍, 徐鹏昊, 夏泽鲁, 杨洪涛*

天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心 肾病科, 天津 300384

摘要: **目的** 采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 挖掘益肾化湿颗粒的主要成分, 并结合网络药理学探究益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病的作用靶点及机制。 **方法** 采用质谱技术对益肾化湿颗粒主要成分进行准确定性, 并运用 TCMS、ETCM、SymMAP 数据库获得活性成分靶点; 采用 GeneCards、OMIM 等数据库获得 IgA 肾病的疾病靶点, 对药效疾病靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析, 进一步运用 Cytoscape_v3.8.2 构建“活性成分-靶点-通路”网络; 应用 Autodock 软件对筛选靶点及主要活性成分进行分子对接, 进行结合位点模拟验证。 **结果** 共鉴定出益肾化湿颗粒主要成分 68 个, 包括香豆素类、三萜类和黄酮类等化合物; 共获得益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病活性成分 43 个, 活性成分与疾病交集靶点 74 个, 其中包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 、皮质醇受体基因等; 涉及通路包括肿瘤坏死因子信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路、晚期糖基化产物-晚期糖基化终末产物受体信号通路等。分子对接结果显示, 柴胡皂苷 A、黄芪甲苷 III、黄芪甲苷 IV、泽泻醇 A 与 IgA 肾病的预测靶点有良好的结合活性。 **结论** 益肾化湿颗粒能够通过抗炎、调节免疫、改善类固醇效应等治疗 IgA 肾病, 具有多成分、多靶点、多途径的特点。

关键词: 益肾化湿颗粒; IgA 肾病; HPLC-Q-TOF-MS/MS; 网络药理学; 柴胡皂苷 A; 黄芪甲苷 III; 黄芪甲苷 IV; 泽泻醇 A
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)21-6576-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.016

Mechanism of Yishen Huashi Granules in treatment of IgA nephropathy based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology

JIANG Chen, XU Rong-jia, CUI Shi-yan, XU Peng-hao, XIA Ze-lu, YANG Hong-tao

National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Department of Nephrology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300384, China

Abstract: Objective To discover the main components of Yishen Huashi Granules (益肾化湿颗粒) by high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS), and explore the target and mechanism of Yishen Huashi Granules in treatment of IgA nephropathy by network pharmacology. **Methods** Mass spectrometry was used to accurately characterize the main components of Yishen Huashi Granules, and the active component targets were obtained by TCMS, ETCM, and SymMAP databases; Disease targets of IgA nephropathy were obtained by GeneCards, OMIM and other databases, gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis were performed on drug-effective disease targets, and “active ingredients-targets-pathway” network was further constructed by Cytoscape_v3.8.2; Autodock software was used for molecular docking of screening target and main active ingredients, and binding site simulation verification was carried out. **Results** A total of 68 main components of Yishen Huashi Granules were identified, including coumarins, triterpenoids, and flavonoids. A total of 43 active components of Yishen Huashi Granules for treating IgA nephropathy were obtained, 74 targets were obtained at the intersection of active ingredients and diseases, including peroxisome

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 益肾化湿颗粒临床应用研究和基础研究开放课题 (康药合字 2020336)

作者简介: 姜 晨 (1982—), 女, 博士, 副主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。

Tel: 18622662919 E-mail: jcdactor_tcm@163.com

*通信作者: 杨洪涛 (1963—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。

Tel: (022)27986565 E-mail: tjtcmt@126.com

proliferator-activated receptor γ , cortisol receptor genes, etc.; Tumor necrosis factor signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, advanced glucose glycation products-advanced glycation end products receptor signaling pathway were involved. Molecular docking results showed that saikosaponin A, astragaloside III, astragaloside IV, alisol A had good binding activity with the predicted targets of IgA nephropathy. **Conclusion** Yishen Huashi Granules can treat IgA nephropathy through anti-inflammatory, immune regulation and steroid effects. It has the characteristics of multiple components, multiple targets and multiple pathways.

Key words: Yishen Huashi Granules; IgA nephropathy; HPLC-Q-TOF-MS/MS; network pharmacology; saikosaponin A; astragaloside III; astragaloside IV; alisol A

IgA 肾病是我国乃至世界范围内最常见的慢性进展性原发性肾小球疾病。尽管大部分患者呈良性进展, 但仍有 10%~25% 的患者于 10 年后进展至终末期肾脏病, 因其难治性及发展迅速的特点, 严重影响着公众健康。目前其复杂的发病机制尚未完全阐明, 有效的治疗方法(如糖皮质激素、肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻断剂等)仍存在争议。近 30 年, 中医药治疗 IgA 肾病疗效显著, 并在药理学、多系统组学研究等方面取得重大进展。因此, 在难治性慢性肾脏病领域发挥中医药优势, 深入探索中医药治疗 IgA 肾病的有效方法及药物确切作用机制意义重大。

益肾化湿颗粒的主要药效物质包含香豆素类、三萜类和黄酮类等成分。目前文献报道了以现代色谱技术鉴定益肾化湿颗粒中重要药味的化学成分, 如卢秋梅等^[1]以薄层色谱法定性和高效液相色谱法测定处方中人参、黄芪、甘草、黄连、陈皮、独活、白芍的主要化学成分。但由于鉴定的药物数目不全、药物化学成分数目较少等原因, 尚不能较系统地反映益肾化湿颗粒的整体化学成分特征。目前, 由于中药复杂体系的科学内涵与中药“多成分、多靶点”的物质基础和作用机制, 网络药理学在复方优化、中药活性成分筛选及辨识等方面表现出了极大的优势, 为进一步研究提供了重要手段。

基于此, 本研究拟采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS), 并以鉴定得到的化学成分为切入点, 利用网络药理学方法预测其预防或治疗 IgA 肾病的活性成分和作用靶点, 通过基因本体(gene ontology, GO)数据库和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库分析其作用特点, 进一步采用分子对接技术对活性成分和关键靶点进行验证, 为深入研究益肾化湿颗粒主要活性成分治疗 IgA 肾病的药效物质基础及作用机制提供数据支持。

1 材料

1.1 药品与试剂

益肾化湿颗粒(10 g/袋, 批号 20201118)购自广州康臣药业有限公司; 色谱级甲酸购自阿拉丁公司; 乙醇(分析纯)购自北京化工厂; 纯水使用 Mill-Q 纯水机制备。

1.2 仪器

HPLC-Q-TOF-MS/MS(美国 Waters 公司); 万分之一电子天平(海精密科学仪器有限公司); 涡旋仪(北京优晟联合科技有限公司); 离心机(美国 Sigma 公司); 移液枪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SHIZ-95B 型循环式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.3 数据库与软件

中药系统药理分析平台(TCMSP, <http://tcmispw.com/>); ETCM 网站(www.tcmip.cn/etcm/index.php/home/index/index.html); SymMAP 网站(<http://www.symmap.org/>); Meatascape 网站(<https://metascape.org/gp/index.html>); Genecards 数据库(<https://www.genecards.org>); OMIM 数据库(<http://www.omim.org>); Pharmgkb 数据库(<https://www.pharmgkb.org>); TID 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd>); DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca>); Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>); RCSB 蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>); PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>); Cytoscape 3.7.2 软件; Autodock Vina 1.5.6 软件; MassLynx V4.2 软件; Pymol 2.5.1 软件。

2 方法

2.1 供试品的制备

取益肾化湿颗粒(碾成粉末)100 mg, 置于 10 mL 量瓶内, 加入水适量, 超声溶解, 放冷至室温后定容, 得到质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 色谱条件

Waters X select HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (210 mm×1.8 mm, 1.8 μm); 柱温为 45 °C; 样品室温度为 4 °C; 进样体积为 5 μL; 载气体积流量为 3.0 L/min; 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 洗脱程序: 0~11 min, 16% B; 11~22 min: 6%~28% B; 22~32 min, 28%~47% B; 32~40 min, 7%~63% B; 40~42 min, 63%~85% B; 42~48 min, 85%~100% B; 48~50 min, 1% B。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源, V 模式; 正、负离子模式; 负离子模式: Lockmass 采用 LEA([M-H]⁻ 553.277 5); 正离子模式: Lockmass 采用 LEA([M+H]⁺ 555.293 1)。毛细管电压为 2.5 kV; 锥孔电压为 45 V; 离子源温度为 100 °C; 脱溶剂气温度为 300 °C; 脱溶剂氮气体积流量为 600 L/h; 锥孔气体积流量为 50 L/h; 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; m/z 50~1700; 碰撞能为 21 eV。

2.4 益肾化湿颗粒活性成分和靶点筛选

以类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18、口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) ≥ 30% 为筛选条件, 利用 PubChem 数据库获得成分的分子式, 在 TCMSP、ETCM、SymMAP 数据库搜集益肾化湿颗粒活性成分, 通过挖掘文献补充靶点。

2.5 IgA 肾病疾病靶点筛选

IgA 肾病疾病靶点的搜集以 “IgA nephropathy” 为关键词, 检索 5 个疾病靶点数据库 (Genecards、OMIM、Pharmgkb、TID、DrugBank), 通过 Uniprot 数据库将靶点蛋白信息转化为 Uniprot ID, 合并重复靶点基因, 与获得的成分靶点基因进行比对获取

交集靶点。

2.6 互作关系靶点关系与信号通路分析

将 IgA 肾病、益肾化湿颗粒主成分交集靶点经 metascape 平台注释进行蛋白互作 (protein protein interaction, PPI) 分析, 应用 MCODE 算法识别 PPI 网络内的模块。对每个模块进行通路和过程富集分析, 对其进行功能进行描述。并通过 metascape 平台输出的 KEGG 及 GO 分析结果输入 cytoscape 软件进行可视化。

2.7 活性成分与靶点的分子对接验证

利用 Autodock 软件对潜在作用靶点和活性成分进行分子对接。选择度值 ≥ 5、OB ≥ 30%, 从 RCSB 蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载候选蛋白的晶体结构, 从 PubChem 数据库获得活性成分的二维结构文件, 通过去水、加氢、转换格式, 对接结果参考结合能大小, 对接能量值 ≤ -25.10 kJ/mol 表示有较好的结合活性, 利用 Pymol 软件对结果进行输出优化。

3 结果

3.1 益肾化湿颗粒成分鉴定

益肾化湿颗粒的提取总离子流图 (total ion chromatography, TIC) 见图 1, 通过对负离子模式的成分解析, MassLynxV4.2 工作站得到可能的元素组成, 对误差小于 10 以内的分子式进行文献匹配, 共获得 68 个主峰化合物, 包括香豆素类化合物 (A)、三萜类化合物 (B)、黄酮类化合物 (C)、苷类化合物 (D)、异喹啉类生物碱 (E)、内酯类化合物 (F)、醇类化合物 (G)、酚类化合物 (H)、有机酸类化合物 (I), 结合出峰先后进行顺序标号见表 1, 与文献报道益肾化湿颗粒的主要药效物质基础一致^[1]。

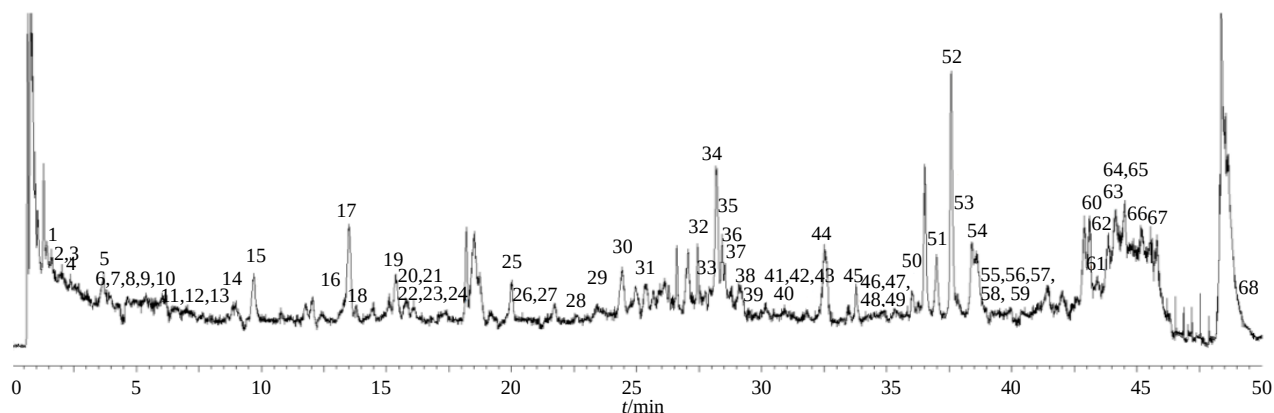


图 1 正离子模式下益肾化湿颗粒总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatography of Yishen Huashi Granules in positive ion mode

表 1 益肾化湿颗粒成分鉴定

Table 1 Composition identification of Yishen Huashi Granules

峰号	来源	化合物	tr/min	分子式	相对分子质量	m/z		MS/MS	编号
						理论值	实际值		
1	柴胡	异绿原酸 A	1.47	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.452 0	517.452 9	517.453 1	418.559 8, 201.822 7	H2
2	甘草	刺芒柄花素	1.80	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.262 2	269.262 7	269.262 7	177.592 7, 139.757 0	C11
3	半夏	原儿茶醛	1.87	C ₇ H ₆ O ₃	138.122 7	139.122 8	139.123 0	92.406 3, 55.105 6	H3
4	独活	蛇床子素	2.32	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244.292 1	245.294 0	245.293 4	93.498 8, 52.249 3	A6
5	茯苓	去氢土莫酸	3.91	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	484.711 0	485.712 7	485.713 0	351.948 9, 224.623 0	B5
6	甘草	甘草皂苷 E2	4.13	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	820.911 8	821.912 4	821.912 4	478.687 9, 323.163 0	B8
7	黄芪	黄芪皂苷 I	4.15	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869.041 0	870.042 4	870.041 9	280.626 6, 170.904 9	B20
8	白芍	氧化芍药苷	5.17	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496.462 7	497.462 9	497.462 2	395.334 7, 213.599 7	D3
9	羌活	异欧前胡内酯	5.49	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.282 2	271.283 7	271.284 3	63.132 0, 99.711 9, 59.669 8	A8
10	黄连	小檗碱	5.74	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	336.361 2	337.361 5	337.361 8	251.499 5, 123.287 0	E1
11	独活	伞形酮	7.34	C ₉ H ₆ O ₃	162.140 9	163.141 2	163.141 6	82.955 3, 65.706 5	A3
12	茯苓	芍药苷	7.70	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	480.462 3	481.463 0	481.462 9	370.240 6, 263.352 8	D4
13	陈皮	橙皮苷	7.89	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.561 6	611.563 5	611.562 9	340.173 0, 157.630 0	C8
14	白芍	儿茶素	9.07	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.271 1	291.273 1	291.273 2	323.468 0, 214.571 0	C12
15	陈皮	5-去甲川陈皮素	10.44	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.370 9	389.371 1	389.370 5	367.127 5, 325.877 5	C2
16	黄连	巴马汀	13.32	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.401 9	353.403 2	353.403 4	332.580 0, 129.653 2	E3
17	陈皮	芸香柚皮苷	13.38	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.532 6	581.533 4	581.532 9	114.744 7, 107.118 7	C4
18	陈皮	圣草次苷	14.34	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596.532 4	597.533 6	597.533 6	393.107 7, 277.086 7	C6
19	大枣	齐墩果酸	15.73	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.701 8	457.703 8	457.703 8	459.945 4, 211.972 9	B18
20	柴胡	柴胡皂苷 B2	15.75	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.982 2	781.984 2	781.984 8	304.494 7, 101.928 1	B15
21	独活	川白芷素	16.12	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.240 8	229.242 4	229.241 7	418.728 4, 192.311 7	A5
22	白芍	芍药苷	16.74	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	480.462 7	481.463 3	481.463 4	287.301 7, 181.122 7	D5
23	柴胡	柴胡皂苷 A	17.09	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.981 2	781.982 5	781.983 0	483.106 9, 313.512 3	B16
24	防风	紫花前胡苷元	17.65	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	246.262 2	247.264 0	247.264 5	229.231 0, 141.974 3	A7
25	柴胡	柴胡皂苷 D	19.80	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.981 1	781.981 4	781.981 5	371.154 0, 56.117 4	B17
26	黄芪	毛蕊异黄酮	20.68	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.260 9	285.261 9	285.261 3	195.955 3, 100.601 6	C13
27	防风	升麻苷	20.91	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	468.451 4	469.452 8	469.452 9	373.170 5, 178.544 8	I3
28	茯苓	猪苓酸 C	22.82	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	482.692 1	483.692 3	483.692 9	96.772 2, 157.715 8	B7
29	半夏	胡萝卜苷	23.82	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	576.841 9	577.842 6	577.842 2	245.322 5, 202.583 3	D6
30	白术	白术内酯 III	24.21	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	248.321 2	249.321 6	249.322 0	214.586 7, 179.056 6	F1
31	甘草	甘草酸	25.90	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.931 4	823.932 5	823.932 0	214.235 7, 201.475 3	B19
32	羌活	东莨菪苷	27.52	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.312 6	355.314 4	355.314 9	206.006 6, 145.246 2	A1
33	白术	白术内酯 I	27.84	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	230.300 9	231.301 2	231.301 7	70.352 1, 69.477 2	F1
34	独活	东莨菪亭	27.99	C ₁₀ H ₈ O ₄	192.171 8	193.173 0	193.172 3	109.477 6, 146.846 8	A2
35	陈皮	欧前胡素	28.26	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.282 0	271.283 1	271.282 6	214.586 7, 179.056 6	A11
36	茯苓	野樱苷	28.50	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	295.291 3	296.291 5	296.290 8	221.091 9, 180.397 5	D1
37	独活	二氢欧山芹素	28.58	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	246.261 7	247.262 6	247.262 1	233.164 9, 178.054 4	A10
38	黄连	甲基黄连碱	29.08	C ₂₀ H ₁₆ NO ₄	334.342 4	335.344 4	335.344 1	300.003 3, 171.795 7	E4
39	白术	白术内酯 II	29.51	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.321 0	233.323 1	233.323 0	225.182 5, 61.324 8	F1
40	甘草	甘草苷	31.06	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.392 6	419.394 1	419.394 1	270.280 0, 152.596 6	C1
41	陈皮	芹菜苷	31.78	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.492 6	565.493 3	565.492 9	369.120 8, 195.127 9	C7
42	生姜	8-姜辣醇	31.80	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	322.441 6	323.443 7	323.443 7	291.771 3, 147.173 5	G2
43	白芍	芍药内酯苷	32.24	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	480.462 7	481.463 3	481.463 7	363.614 0, 133.168 7	D7
44	人参	人参皂苷 Ro	32.33	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	957.102 5	958.103 1	958.102 7	152.964 9, 64.350 4	B1
45	独活	白花前胡醇	33.41	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	278.302 4	279.303 4	279.303 1	251.835 6, 193.940 6	A4
46	泽泻	泽泻醇 B	34.31	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.702 0	473.702 7	473.702 1	297.576 1, 123.761 4	B9
47	白芍	苯甲酰芍药苷	34.76	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	584.572 2	585.572 9	585.572 3	445.178 9, 245.510 9	D2
48	陈皮	柚皮苷	35.21	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.532 0	581.533 0	581.533 3	425.379 7, 326.777 0	C5
49	羌活	紫花前胡苷	35.52	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	408.401 3	409.403 1	409.402 9	358.143 5, 182.773 2	A9
50	白芍	没食子酸	35.60	C ₇ H ₆ O ₅	170.121 1	171.123 0	171.122 5	95.908 0, 68.191 3	H1
51	防风	去甲升麻素	37.36	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	292.281 3	293.283 1	293.283 0	165.933 4, 77.997 8	I1
52	防风	升麻素	37.82	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	306.311 6	307.313 5	307.313 4	235.593 2, 205.996 1	I2
53	泽泻	泽泻醇 A	37.87	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	490.712 6	491.713 9	491.714 6	410.221 8, 358.071 4	B10
54	泽泻	泽泻醇 C	38.38	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528.721 4	529.721 8	529.722 1	466.715 0, 186.436 9	B11
55	人参	人参皂苷 Rg ₁	39.26	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.012 4	802.013 0	802.012 6	363.653 8, 183.673 1	B2
56	陈皮	川陈皮素	39.77	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.391 0	403.391 4	403.391 5	358.329 6, 137.405 9	C3

续表 1

峰号	来源	化合物	tr/min	分子式	相对分子质量	m/z		MS/MS	编号
						理论值	实际值		
57	羌活	香豆酸	39.81	C ₆ H ₄ O ₄	140.092 3	141.093 3	141.092 6	75.443 9, 53.240 3	F3
58	生姜	10-姜辣醇	40.28	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	350.490 8	351.492 0	351.491 8	213.368 9, 138.089 9	G1
59	陈皮	柠檬苦素	40.41	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	470.511 6	471.513 3	471.513 8	369.454 9, 287.080 5	B18
60	人参	人参皂苷 Rb ₂	43.56	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 079.262 1	1 080.263 6	1 080.263 9	433.188 9, 369.488 5, 263.194 5	B3
61	生姜	6-姜烯酚	43.60	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276.372 6	277.373 6	277.373 7	124.736 7, 64.723 4	G3
62	黄芪	黄芪皂苷 II	43.82	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	827.002 4	828.003 6	828.003 9	385.601 3, 68.367 9	B12
63	黄芪	黄芪甲苷	44.12	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.971 6	785.973 7	785.973 2	204.458 5, 148.422 6	B14
64	黄连	药根碱	44.52	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338.382 1	339.383 9	339.383 9	243.499 4, 130.822 7	E2
65	黄芪	黄芪皂苷 III	44.55	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	827.002 4	828.002 4	828.003 0	468.041 9, 268.200 0	B13
66	甘草	异甘草苷	45.28	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.392 6	419.394 2	419.393 8	366.681 1, 109.463 8	C9
67	人参	人参皂苷 Re	45.70	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947.151 0	948.151 4	948.151 3	498.586 3, 420.388 4, 197.679 9	B4
68	茯苓	茯苓酸	49.10	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	528.761 3	529.761 7	529.761 9	434.552 7, 248.597 9	B6

3.2 益肾化湿颗粒活性成分和作用靶点筛选

由表 1 可知, 益肾化湿颗粒主要成分包括芍药苷、柴胡皂苷 A、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、人参皂苷 Rg₁、黄芪皂苷、茯苓酸等, 基本反映了益肾化湿颗粒的化学物质组成。选取鉴定的全部益肾化湿颗粒活性成分作为目标成分, 其中 61 个成分被 PubChem 数据库收录, 利用 TCMSP、ETCM、SymMAP 数据库, 获取 235 个成分的相关靶点。另外 7 个成分如紫花前胡苷元、去甲升麻素、5-去甲川陈皮素等由于相关研究不多, 未找到作用靶点。构建“活性成分-靶点-通路”网络, 结果表明有 43 个成分参与调控 IgA 肾病的分子网络, 其中茯苓酸、川陈皮素等在调控网络中影响程度较大, 同时具有良好的 OB, 可为益肾化湿颗粒预防或治疗 IgA 肾病提供新的活性成分。

3.3 IgA 肾病疾病靶点筛选

以“IgA nephropathy”为关键词, 检索 5 个疾病靶点数据库 (Genecards、OMIM、Pharmgkb、TID、Drug Bank), 得到 1415 个与 IgA 肾病相关的作用靶点, 通过 Uniprot 数据库将靶点蛋白信息转化为 Uniprot ID, 合并重复靶点基因, 与获得的成分靶点基因进行比对, 最终获得 74 个治疗 IgA 肾病潜在的靶点基因 (图 2), 并经 metaspice 平台注释进行 PPI 分析, 应用 MCODE 算法识别 PPI 网络内的模块。对每个模块进行通路和过程富集分析, 对其进行功能进行描述。根据 *P* 值, 保留 3 个最佳评分项描述相应模块的功能 (图 3), 主要与急性炎症反应、血管内皮生长因子正向调节、CD4⁺ T 细胞因子产生、生长发育、白细胞分化等过程相关, 其中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor



图 2 药物与疾病交集靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of intersection targets of drugs and diseases

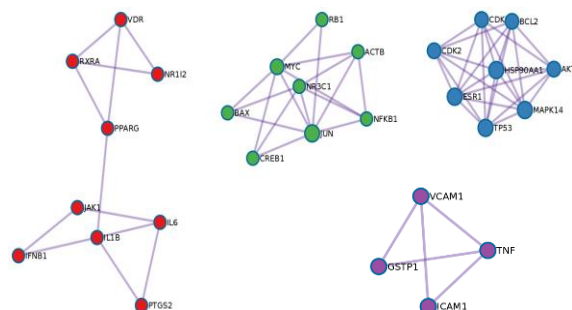


图 3 药物与疾病交集靶点 PPI 分析

Fig. 3 PPI analysis of intersection targets of drugs and diseases

gamma, PPAR γ)、谷胱甘肽硫转移酶 P1 (glutathione S-transferase pi-1, GSTP1)、IL-1 β 、核受体亚家族 3C 组成员 2 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, NR3C1)、核受体视黄酸 X 受体 α (retinoid X receptor alpha, RXRA)、原癌基因 *Jun* (JUN)、核因子- κ B (nuclear factor kappa B subunit, NF- κ B) 为筛选的核心靶点。

3.4 交互靶点及通路分析

GO 功能注释是通过生物过程 (cellular component, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cellular component, CC) 对基因进行注释和分类。如图 4 所示, 交集靶点涉及药物

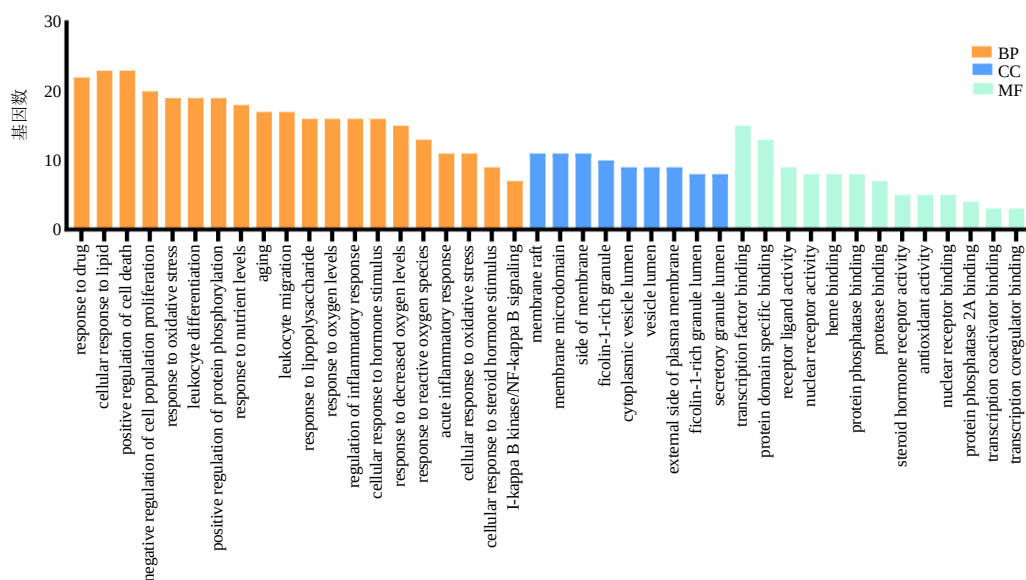


图 4 交集靶点 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of intersection targets

反应、类固醇激素反应及结合、急性炎症反应、脂质反应、氧化应激、抑制细胞增殖、白细胞分化等 20 个 BP 条目；膜筏、薄膜侧面、无花果酶 1 颗粒、细胞质小泡腔、囊泡腔等 9 个 CC 条目；转录因子活性、蛋白质结构域特异性结合、类固醇激素受体活性等 13 个 MF 条目。

对 BP 富集条目展示对应药效靶点，其中 GSTP1 与炎症、脂代谢、营养及药物反应密切相关（图 5）。谷胱甘肽硫转移酶家族在解毒和抗氧化防御系统中发挥重要作用，可通过调控丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases, MAPK）、

NF-κB、信号转导及转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）通路的相互作用参与抗炎、促凋亡过程，在以系膜细胞增殖为主的 IgA 肾病中提供潜在的治疗机制。

如图 6 所示，益肾化湿颗粒可能通过作用于脂质与动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）信号通路、TNF 信号通路、晚期糖基化产物（advanced glycation end products, AGE）-晚期糖基化终末产物受体（receptor for advanced glycation end products, RAGE）信号通路、IL-17 信号通路等治疗 IgA 肾病。

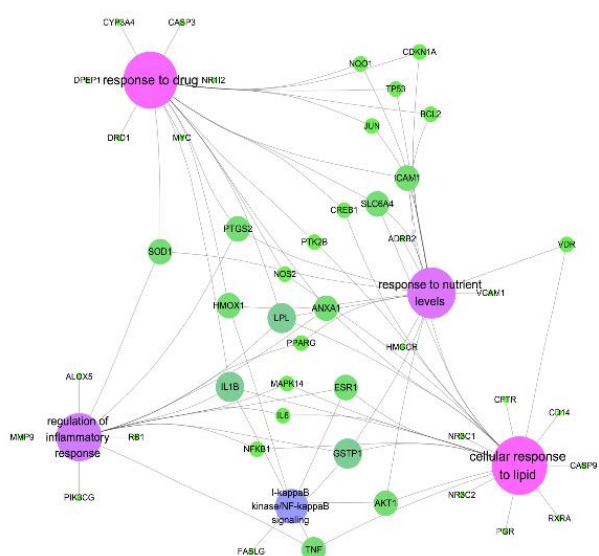


图 5 BP 富集条目对应靶点

Fig. 5 BP enrichment items correspond to targets

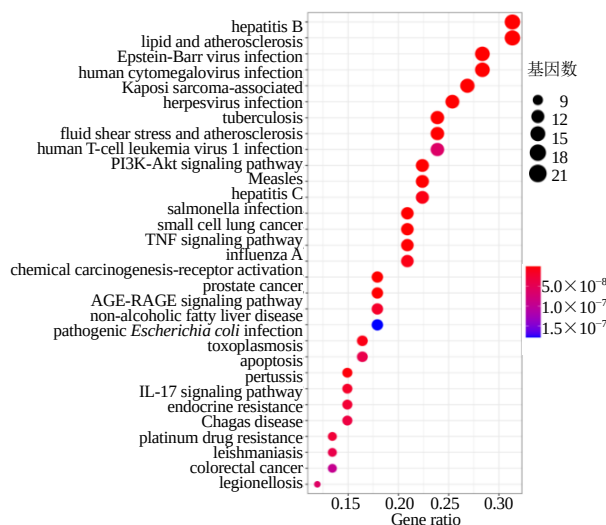


图 6 交集靶点 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of intersection targets

3.5 “活性成分-靶点-通路”网络的构建

选择 KEGG 通路富集结果前 20 条中的与 IgA 肾病发生、发展相关的 14 条信号通路,集中展示活性成分对作用靶点的所在通路。43 个主要活性成分可能通过作用于 74 个靶点,在 14 条信号通路中发挥作用,绘制益肾化湿颗粒“活性成分-疾病-通路”的网络交互机制图(图 7)。

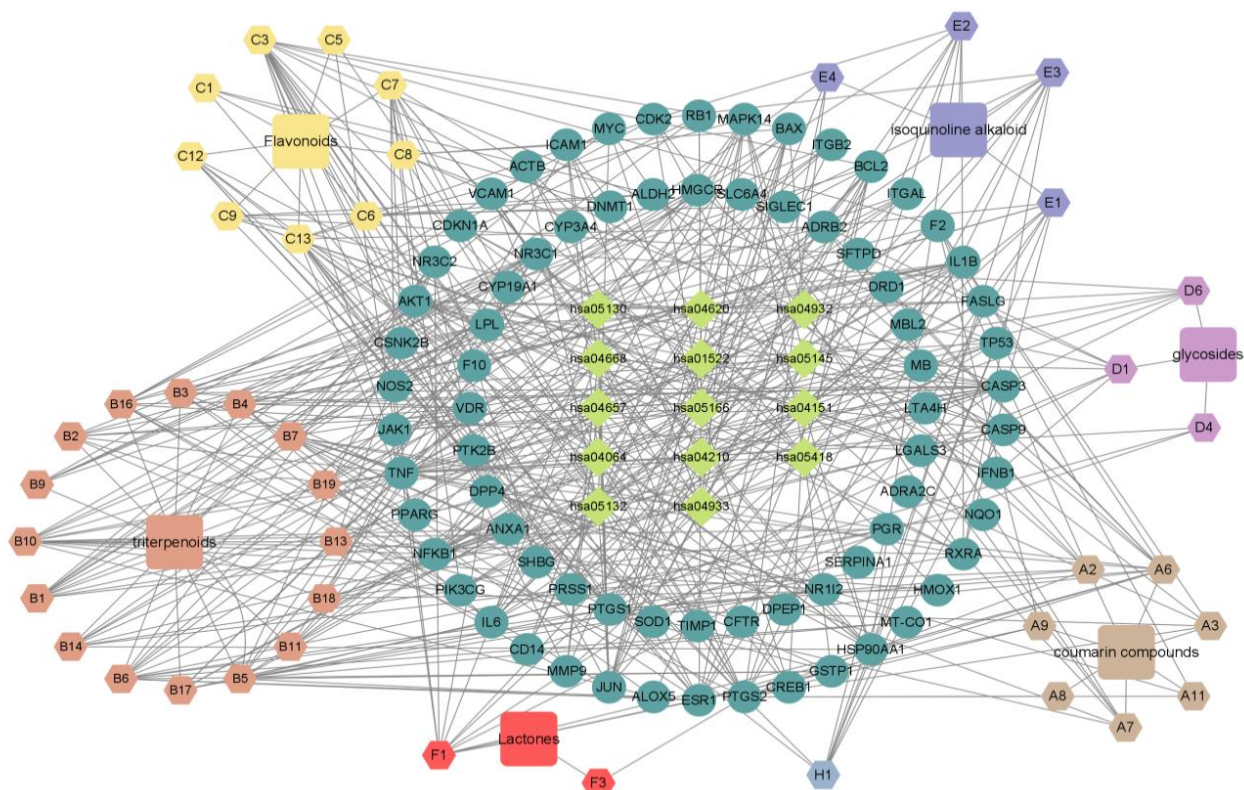


图 7 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 7 “Active components-targets-pathway” network

表 2 核心活性成分与核心蛋白结合能

Table 2 Binding energies of core active compounds and core proteins

序号	化学成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)							
		GSTP1	IL-1β	IL-6	JUN	NF-κB	NR3C1	PPARγ	TNF
F1	白术内酯 I	-31.35	-27.59	-28.01	-26.33	-27.17	-35.11	-35.11	-32.19
	白术内酯 II	-32.60	-28.01	-26.75	-25.50	-24.66	-35.11	-35.11	-30.10
	白术内酯 III	-31.77	-29.26	-28.84	-26.75	-25.92	-36.37	-34.69	-30.51
B2	人参皂苷 Rg ₁	-29.68	-28.42	-28.42	-31.35	-28.84	-28.42	-30.10	-34.69
B6	茯苓酸	-33.86	-30.10	-28.01	-26.75	-28.42	-29.26	-30.93	-35.95
B10	泽泻醇 A	-33.02	-36.37	-30.51	-29.26	-29.26	-37.20	-33.02	-37.62
B13	黄芪甲苷 III	-35.53	-37.62	-31.77	-33.02	-35.95	-34.28	-32.19	-39.29
B14	黄芪甲苷 IV	-30.51	-30.10	-29.26	-28.84	-33.02	-29.68	-29.26	-39.29
B16	柴胡皂苷 A	-34.28	-34.69	-33.02	-32.19	-34.28	-33.02	-31.35	-39.71
C3	川陈皮素	-29.26	-25.92	-23.83	-25.08	-27.17	-25.92	-32.60	-32.60

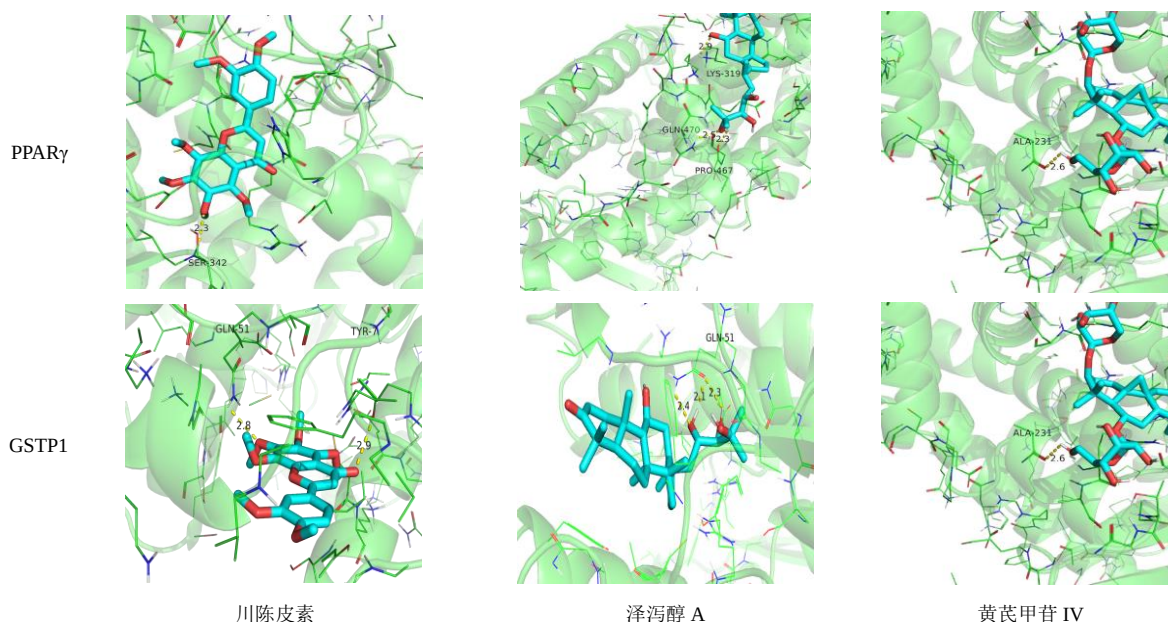


图 8 部分蛋白和化合物的分子对接图

Fig. 8 Molecular docking of some proteins with ingredients

4 讨论

益肾化湿颗粒为李杲《脾胃论》之名方“升阳益胃汤”化裁而来，此方乃东垣治所生受病肺经之方，后世在临床实践中逐渐扩大了此方的应用范围，将此方用于治疗 IgA 肾病便是其中之一。IgA 肾病在中医学属“尿血”“水肿”“肾风”“尿浊”等范畴，以本虚标实为基本病机特点，本虚以脾肾气虚为主，标实以湿热及水湿之邪为常。国医大师张琪教授强调脾胃失调是慢性肾病的病机关键，善于以脾论治慢性肾脏病^[2]。杨洪涛教授传承发展了张琪教授从脾治肾思想，探索以益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病^[3]。益肾化湿颗粒中重用黄芪为君，以升阳固表、益气利水；配伍人参、白术、茯苓、炙甘草补气养胃；柴胡、独活、羌活、防风为升举清阳、祛风除湿；半夏、陈皮、泽泻、黄连除湿清热；白芍固护阴液，防升阳祛风燥湿太过；全方共奏益肾健脾、升阳化湿、祛风利水之功效。既往临床与动物实验研究显示，益肾化湿颗粒可调节慢性微炎症状态、改善内皮细胞功能、减轻氧化应激损伤，从而发挥肾脏保护作用^[4-8]。本研究发现益肾化湿颗粒的 43 个活性成分与 74 个 IgA 肾病疾病靶点密切相关，并通过 14 条信号通路发挥作用。分子对接结果显示，黄芪甲苷 III、黄芪甲苷 IV、柴胡皂苷 A、人参皂苷、泽泻醇 A 等活性成分与 IgA 肾病的关键靶点对接分数较高，表明有良好的结合活性。根据网络拓扑

结合 PPI 分析，得到益肾化湿颗粒可通过 TNF、IL-6、IL-1 β 、PPAR γ 、GSTP1、NF- κ B、NR3C1、RXRA、JUN 等 9 个核心基因调控 IgA 肾病。

脾虚证是 IgA 肾病中医病机本虚证的主要体现，脾虚运化障碍下，水谷精微转运异常，引发能量代谢障碍，可促使线粒体功能及结构发生改变，健脾益气之法可调控线粒体自噬水平，在修复 IgA 肾病损伤组织中起调节作用^[9]。PI3K/Akt 通路是参与细胞自噬与凋亡的关键通路，过度激活进而促进 β -链蛋白核移位介导细胞增殖，在 IgA 肾病患者 B 淋巴细胞、系膜细胞及单核细胞增殖发挥作用^[10]。PI3K 亦可激活单核细胞其表面受体 CD89，变体后与聚合性 IgA 形成 IgA1-CD89 免疫复合物，影响 IgA 肾病疾病进展^[11]。PI3K/Akt 通路的下游分子肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53, p53) 介导转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) /酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK) /STAT3 通路促进 IgA 肾病肾间质纤维化^[12]。黄芪甲苷可通过调控 PI3K/Akt/p53 信号通路抑制 IgA 肾病肾小球系膜细胞增生^[13]。GSTP1 可抑制 PI3K/Akt 诱导的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的激活而促进自噬下调炎症小体水平，保护线粒体免受氧化应激损伤^[14]，本研究发现 GSTP1 是益肾化湿颗粒作用的关键基因之一，体现了健脾益气药物用以治疗 IgA 肾病的重要靶点。此外，脾

虚证影响 B 细胞抗体表达使体液免疫功能异常,表现为免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)和补体的含量异常^[15-16]。糖皮质激素通常作为 IgA 肾病有效的治疗方式来调控免疫。皮质醇受体基因 NR3C1 不仅反馈糖皮质激素功能,并作为其他转录因子的调节器,影响炎症反应、细胞增殖和目标组织的分化^[17]。在 IgA 肾病患者中, NR3C1 影响 IgA 肾病异常表达的各种下游分子^[18], 本研究发现, 益肾化湿颗粒中人参皂苷、茯苓酸、泽泻醇 A 等多种成分均可与皮质醇受体基因 NR3C1 有效对接, 提示益肾化湿颗粒有助于发挥糖皮质激素效能。

“风湿扰肾”是 IgA 肾病患者中免疫炎症启动系膜细胞活化的病机关键, 该环节与活动期/进展期 IgA 肾病病理损伤密切相关。“风”“湿”等致病因素在现代医学中被认为是导致免疫炎症反应的重要因素。本研究中黄芪主要成分黄芪皂苷可通过调控 TGF- β 1/Smad 通路激活, 调控 p38 活化和 NF- κ B 的表达, 从而抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子表达, 减轻炎症反应^[19]。白术所含的白术内酯 I 调控 CD14、TLR4 和 MyD88 的表达, 抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子水平, 减弱 NF- κ B 的活性和细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) 和 p38 MAPK 的磷酸化, 并通过抑制 TNF- α 和 IL-6 的产生, 从而发挥抗炎作用。柴胡皂苷 A 可抑制 c-Jun/MAPK、NF- κ B 的通路信号转导继而减轻炎症反应^[20-22]。黄芪甲苷作为经典抗炎、调节免疫单体可以减轻 IL-1 β 及 NF- κ B 的释放, 发挥肾保护作用^[23]。以上结果阐述为益肾化湿治疗 IgA 肾病关键靶点提供了坚实的药效基础。

PPAR 家族调控参与细胞增殖、分化以及炎症和免疫相关蛋白的表达。PPAR γ 主要在脂肪组织、肠、肾上皮和免疫系统中表达, 其编码蛋白 PPAR γ 可抑制 p65 的磷酸化和核易位从而调控 NF- κ B 表达, 进一步降低 TNF- α 水平, 在炎症反应及 IgA 肾病的发生和发展中发挥重要作用^[24]。PPAR 家族 (PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ) 同时也是参与调控脂肪细胞分化和葡萄糖稳态关键细胞因子^[25]。脂代谢紊乱常与肾功能及肾间质纤维化有直接关系, 是 IgA 肾病进展关键危险因素。RXRA 则是 PPAR 家族通路激活关键转录因子^[26], 抑制 PPAR α /RXRA 通路, 氧化脂肪酸水平下调继而血清三酰甘油水平升高, 促进 IgA 肾病肾小球硬化进展^[27-28]。本研究

显示益肾化湿颗粒中的茯苓酸、黄芪皂苷、泽泻醇 A、川陈皮素等均能与 PPAR γ 对接, 发挥调控免疫炎症及维持细胞脂代谢稳态作用。

本研究还发现益肾化湿颗粒可通过调控 TNF 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路等发挥治疗作用。其中 TNF、IL-6、IL-1 β 、NF- κ B 均为重要的免疫、炎症因子, PPAR γ 、RXRA、GSTM1 为介导代谢环节的效应因子, RXRA 为 PI3K/Akt 信号通路的关键靶点, 介导的信号通路与 IgA 肾病的炎症反应和脂代谢过程密切相关。免疫、炎症与代谢三方失调参与 IgA 肾病病理损伤的全过程, 本研究发现这些关键蛋白也均显著富集在 TNF 信号通路、IL-17 信号通路等 5 条信号通路上, 从一定程度上展示了益肾化湿颗粒能够多靶点、多通路预防或治疗 IgA 肾病。

综上所述, 益肾化湿颗粒中的活性成分与炎症、代谢、免疫调节等相关蛋白成功对接, 可调控 TNF、PI3K/Akt、IL-17、AGE-RAGE 等多条关键信号通路, 通过抗炎、调节免疫、代谢、改善类固醇效应等过程协同治疗 IgA 肾病。基于网络药理学与分子对接技术预测结果与已有文献结果较为接近, 体现出本研究结论的科学性, 可为深入阐释益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病的物质基础和作用机制提供依据。本研究基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探究益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病的潜在机制, 为进一步明确益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病提供了理论依据和研究方向, 益肾化湿颗粒具体作用靶点将在后续实验中进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 卢秋梅, 黎倩, 黄艳霞, 等. 益肾化湿颗粒质量标准提高研究 [J]. 中国药业, 2020, 29(13): 80-84.
- [2] 李莲花, 张佩青. 张琪教授从脾胃治疗慢性肾脏病的经验 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(5): 386-387.
- [3] 王耀献, 杨洪涛, 裴明. 益肾化湿颗粒治疗肾脏病临床应用专家共识 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2020, 9(3): 97-101.
- [4] 胡漪玲, 关文明, 徐伟芹. 益肾化湿颗粒联合舒洛地特对早期老年糖尿病肾病氧化应激及内皮功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 211-214.
- [5] 张国胜, 侯小静, 朱广领. 益肾化湿颗粒和舒洛地特软胶囊联合治疗糖尿病肾病的疗效 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(24): 6910-6912.

- [6] 刘秀艳. 益肾化湿颗粒联合缬沙坦对尿毒症患者微炎症状态及残存肾功能的影响 [J]. 河北医药, 2017, 39(14): 2143-2145.
- [7] 张玥. 益肾化湿颗粒联合缬沙坦治疗慢性肾小球肾炎的临床研究 [J]. 世界中医药, 2017, 12(1): 68-70.
- [8] 傅奕, 陈帮明, 李鑫, 等. 益肾化湿颗粒联合雷公藤多苷片治疗糖尿病肾病的疗效研究 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6045-6049.
- [9] Wu C Y, Hua K F, Yang S R, *et al.* Tris DBA ameliorates IgA nephropathy by blunting the activating signal of NLRP3 inflammasome through SIRT1- and SIRT3-mediated autophagy induction [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 13609-13622.
- [10] Cox S N, Sallustio F, Serino G, *et al.* Altered modulation of WNT-beta-catenin and PI3K/Akt pathways in IgA nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(4): 396-407.
- [11] 方心紫, 金善善, 王小琴. IgA 肾病分子机制研究进展 [J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(12): 784-787.
- [12] Yang R H, Xu X, Li H L, *et al.* p53 induces miR199a-3p to suppress SOCS7 for STAT3 activation and renal fibrosis in UUO [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43409.
- [13] 庞爽, 赵栓, 徐夏莲, 等. 基于网络药理学和体外细胞实验分析黄芪治疗 IgA 肾病的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 139-147.
- [14] Dong X, Yang Y, Zhou Y, *et al.* Glutathione S-transferases P1 protects breast cancer cell from adriamycin-induced cell death through promoting autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(10): 2086-2099.
- [15] 朱萱萱, 严士海, 顾和亚, 等. 温脾实肠法治疗脾阳虚证实验研究: 兼论对免疫系统功能的影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(9): 27-29.
- [16] 聂建华, 欧阳文娟, 阮时宝, 等. 土人参根健脾益气功效及其作用机制的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(3): 200-201.
- [17] Cartwright T, Perkins N D, L Wilson C. NFKB1: A suppressor of inflammation, ageing and cancer [J]. *Febs J*, 2016, 283(10): 1812-1822.
- [18] Cox S N, Pesce F, El-Sayed Moustafa J S, *et al.* Multiple rare genetic variants co-segregating with familial IgA nephropathy all act within a single immune-related network [J]. *J Intern Med*, 2017, 281(2): 189-205.
- [19] 赵夏, 许传文, 徐艳梅. 黄芪皂苷调节 TGF- β 1/Smad 通路对尿毒症腹膜透析大鼠钙磷代谢的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4): 24-28.
- [20] Lai K N, Leung J C, Chan L Y, *et al.* Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: Glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): F945-F955.
- [21] Quiñones M, Al-Massadi O, Folguez C, *et al.* p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1 [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3432.
- [22] Tolstonog G V, Deppert W. Metabolic sensing by p53: Keeping the balance between life and death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(30): 13193-13194.
- [23] 韩海燕. 黄芪甲苷治疗慢性肾脏疾病研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 678-680.
- [24] Liu B, He Y, Lu R, *et al.* Zhen-wu-tang protects against podocyte injury in rats with IgA nephropathy via PPAR γ /NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 635-647.
- [25] Wang J, He L, Yan W, *et al.* The role of hypertriglyceridemia and treatment patterns in the progression of IgA nephropathy with a high proportion of global glomerulosclerosis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(2): 325-335.
- [26] Gorla-Bajszczak A, Juge-Aubry C, Pernin A, *et al.* Conserved amino acids in the ligand-binding and tau(i) domains of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha are necessary for heterodimerization with RXR [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 147(1/2): 37-47.
- [27] Zuo N, Suzuki Y, Sugaya T, *et al.* Protective effects of tubular liver-type fatty acid-binding protein against glomerular damage in murine IgA nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(7): 2127-2137.
- [28] Xue Y F, Guo C Z, Hu F, *et al.* PPARA/RXR signaling regulates the fate of hepatic non-esterified fatty acids in a sheep model of maternal undernutrition [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(2): 158548.

[责任编辑 李亚楠]