

基于UHPLC-QTOF-MS/MS和TCMIP的牡丹皮治疗慢性肾炎活性成分筛选及作用机制分析

张 瞳^{1,2}, 秦月雯², 王 萍^{2*}, 赵能武^{1*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, UHPLC-QTOF-MS/MS)技术和中医药整合药理学研究平台 (Chinese Medicine Integrated Pharmacology Research Platform, TCMIP) v2.0 筛选牡丹皮治疗慢性肾炎的活性成分, 并初步分析其作用机制。方法 采用 UHPLC-QTOF-MS/MS, 分别在正、负离子扫描模式下对牡丹皮化学成分进行定性分析; 基于 TCMIP v2.0 收集牡丹皮的候选靶标谱和慢性肾炎的基因集; 基于 TCMIP v2.0 平台构建上述靶标间的蛋白间相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 根据网络特征值确定核心靶标; 通过 DAVID v6.8 软件 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体论 (genetic ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 筛选与慢性肾炎相关的通路作为核心通路; 圈定核心通路对应靶标的化学成分, 统计每个成分的靶点数量、靶点频次、成分含量; 根据统计结果确定牡丹皮治疗慢性肾炎的核心成分; 利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“成分-靶标-通路”多维关联网络。结果 在正、负离子模式下共鉴定了牡丹皮中 73 个化学成分; 通过分析 PPI 相互作用网络获得 123 个核心节点; KEGG 富集分析确定了 17 条慢性肾炎相关通路; 通过靶点数量、频次和响应值综合筛选得到 13 个核心成分。结论 牡丹皮中的 13 个核心成分可能通过调控核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路、肾素分泌通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路等 17 条通路治疗慢性肾炎, 为进一步研究牡丹皮治疗慢性肾炎的作用机制奠定了数据基础。

关键词: 牡丹皮; 慢性肾炎; 整合药理学; 活性成分; 作用机制; UHPLC-QTOF-MS/MS; 没食子酸; 芍药苷; 丹皮酚
中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)09-2756-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.019

Screening and mechanism analysis of active components of *Moutan Cortex* in treatment of chronic nephritis based on UHPLC-QTOF-MS/MS and TCMIP

ZHANG Tong^{1,2}, QIN Yue-wen², WANG Ping², ZHAO Neng-wu¹

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To screen the active components of *Mudanpi* (*Moutan Cortex*) in the treatment of chronic nephritis based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS/MS) and Chinese Medicine Integrated Pharmacology Research Platform (TCMIP v2.0). The mechanism of action was analyzed. **Methods** UHPLC-QTOF-MS/MS was used to qualitatively analyze the chemical components of *Moutan Cortex* in positive and negative ion scanning mode, respectively; The candidate target spectrum of *Moutan Cortex* and the gene set of chronic nephritis were collected based on TCMIP v2.0; The protein-protein interaction (PPI) network between the above targets was constructed based on TCMIP v2.0 platform, and the core targets of the network was determined according to the network eigenvalues. Gene ontology (GO) functional analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out by DAVID v6.8

收稿日期: 2022-01-20

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程 (C12021A04904)

作者简介: 张 瞳, 在读硕士研究生, 从事中药药理学研究。Tel: (010)64014411 E-mail: T249454@163.com

*通信作者: 王 萍, 博士, 研究员, 从事中药血清药物化学、中医方证代谢组学及脑卒中的发病机制研究。E-mail: hudielanwp@sina.com
赵能武, 教授, 主要从事民族医药及药用植物研究工作。E-mail: zhaonw1001@163.com

software (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), the pathways associated with chronic nephritis was selected as the core pathway; The chemical components of the corresponding targets of the core pathways were delineated, and the number of targets, target frequency and component content of each component were counted; the core components of *Moutan Cortex* in the treatment of chronic nephritis were determined according to the statistical results. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct the “component-target-pathway” multi-dimensional association network. **Results** A total of 73 chemical constituents in *Moutan Cortex* were identified in positive and negative ion modes; 123 core nodes were obtained by analyzing the PPI interaction network; 17 pathways associated with chronic nephritis were enriched by KEGG enrichment analysis; 13 key active ingredients were obtained through comprehensive screening of response values. **Conclusion** The 13 key active components in *Moutan Cortex* may treat chronic nephritis by regulating 17 pathways such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, etc. The results lay a certain foundation for further research on the mechanism of *Moutan Cortex* in the treatment of chronic nephritis.

Key words: *Moutan Cortex*; chronic nephritis; integrative pharmacology; active ingredients; mechanism of action; UHPLC-QTOF-MS/MS; gallic acid; paeoniflorin; paeonol

慢性肾炎属于炎性、免疫性疾病，具有起病形式多样化、病理类型复杂、病情进展缓慢及病程迁延难愈等特点。临床常用类固醇疗法治疗，但该方法有可能导致类固醇依赖^[1]。中医学者将慢性肾炎纳入中医学“肾风”“尿浊”“水肿”“肾消”“肾劳”等范畴，在饮食不节、七情内扰、劳累过度、外邪侵袭等内外因共同作用下，导致气阴两虚伴血瘀兼湿热。气虚不能化生津液，阴虚则津液不足，气阴两虚而虚象亦重，久病难愈而耗伤气阴，因而导致或加重气阴两虚证^[2]。气阴两虚则致湿热、瘀血、浊毒积聚阻于肾经，进一步加重肾脏的负担，从而导致肾小球及肾小管不同程度的损伤和萎缩，目前以补益脾肾、利水渗湿、滋阴清热、活血化瘀为主要治则^[3]。牡丹皮是毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮，味苦、辛，性微寒，归心、肝、肾经，具有清热凉血、活血化瘀的功效，用于热入营血、温毒发斑、吐血衄血、夜热早凉、无汗骨蒸、经闭痛经、跌扑伤痛、痈肿疮毒^[4]。牡丹皮是中医临床上治疗慢性肾炎的常用药^[5]。临床常用于治疗慢性肾炎的复方有六味地黄丸、牡丹散、萹藤散等，这些复方都含有牡丹皮，起到清热凉血、活血化瘀的作用，可治疗慢性肾炎病程中湿热、血瘀等证。而关于其治疗慢性肾炎的药效物质基础及其多成分、多靶点、多途径的网络调节机制尚未见报道。因此，本研究利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, UHPLC-QTOF-MS/MS）明确牡丹皮的成分组成，并基于中医药整合药理学研究平台（Chinese Medicine Integrated Pharmacology Research

Platform, TCMIP）对牡丹皮治疗慢性肾炎的主要药效成分和作用机制进行分析，识别其可能的药效成分群及作用靶点、通路，旨在为进一步深入研究牡丹皮治疗慢性肾炎的机制和临床用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱仪（UPLC-H-Class）、四极杆飞行时间质谱仪（Xevo G2-S QTOF），美国 Waters 公司；JP-500C 型高速多功能粉碎机，永康市久品工贸有限公司；CPA225D 型电子天平，德国赛多利斯公司。

1.2 试药

牡丹皮饮片（批号 119110153）购自山东鲁南制药股份有限公司提供，由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为牡丹 *P. suffruticosa* Andr. 的干燥根皮（符合《中国药典》2020 年版的相关要求）。对照品没食子酸（批号 201221027）、芍药苷（批号 21051210）、丹皮酚（批号 21031065）购自成都曼思特生物科技有限公司，质量分数均 $\geq 98\%$ ；质谱级甲醇、乙腈、甲酸，Fisher Scientific 公司；蒸馏水，深圳屈臣氏蒸馏水有限公司

1.3 化学成分确定

1.3.1 供试品溶液的制备 精密称取牡丹皮饮片粉碎（过 4 号筛），取粉末 1.0 g，精密称定，置于 5 mL 量瓶中，加入 70% 甲醇溶液至刻度，摇匀，超声处理 40 min（功率 150 W、频率 40 kHz），离心（3000 r/min）10 min，取上清液，过 0.22 μ m 微孔滤膜，取续滤液，即得。

1.3.2 混合对照品溶液的制备

分别取没食子酸、芍药苷、丹皮酚约 2 mg，精

密称定, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇分别制成 1.095、1.265、0.975 mg/mL 的母液。分别精密量取以上母液各 0.2 mL 至 2 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释并定容至刻度, 即得混合对照品溶液。

1.3.3 色谱条件 色谱柱为 Waters UHPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸-水 (A) 和 0.1% 甲酸-乙腈 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~4 min, 2.0%~5.0% B; 4~6 min, 5.0%~6.5% B; 6~9 min, 6.5%~10.0% B; 9~13 min, 10.0%~13.0% B; 13~20 min, 13.0%~20.0% B; 20~21 min, 20.0%~24.0% B; 21~26 min, 24.0%~28.0% B; 26~26.5 min, 28.0%~31.0% B; 26.5~31 min, 31.0%~36.0% B; 31~33 min, 36.0%~60.0% B; 33~33.5 min, 60.0%~98.0% B。体积流量 0.5 mL/min, 进样量为 2.0 μL, 柱温 40 °C。

1.3.4 质谱条件 质谱分析采用了四极杆飞行时间质谱, Xevo G2-S QTOF ESI 离子源, 电离方式为正负离子模式 (ESI 和 ESI⁺), 正离子毛细管电压 0.5 kV, 负离子毛细管电压 2.5 kV, 样品锥孔电压 40 V, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂温度为 450 °C, 雾化气温度 450 °C, 锥孔气体流量为 50 L/Hr, 溶剂挥发体积流量为 900 L/Hr, 质量扫描范围 *m/z* 50~1500。碰撞能量正离子模式下低碰撞能量为 40 eV, 高碰撞能量为 60 eV; 负离子模式下低碰撞能量为 60 eV, 高碰撞能量为 80 eV。液质系统由 Masslynx 4.1 软件控制, 并进行数据采集和图谱处理。

1.3.5 数据分析 通过 Waters UNIFI 数据处理软件对 Continuum 模式采集到的准分子离子峰信息进行分析, 将原始质谱数据导入 UNIFI 软件中, 选择误

差为 $-5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ 的分子式与 ETCM 数据库中牡丹皮化合物信息匹配, 对化合物进行初步鉴定, 选择目标化合物的二级碎片离子信息, 与现有文献报道提供的保留时间、裂解规律等信息进行比对, 进一步确认化合物的成分及结构。将汇总结果在 MassLynx V4.1 软件中通过提取离子及文献信息的方法人工鉴定并进行成分归属。

1.4 候选靶标的收集

1.4.1 化合物靶点的预测分析 基于鉴定所得的牡丹皮成分, 通过查找数据库 (PubChem、Chempider) 或运用 ChemDraw 软件下载或绘制结构式[结构式保存成 UNIFI 软件匹配格式的摩文件 (mol 格式)], 建立牡丹皮成分库。

TCMIP v2.0 平台的靶标预测是运用未知药物与已知药物化学结构相似原理, 使用 OpenBabel 软件进行成分化学指纹特征的提取, 并采用 Tanimoto 系数定义的相似度计算方法进行相似性打分, 其中 Tanimoto score ≥ 0.8 则相似性强。在“中药靶标预测”界面中, 导入牡丹皮化学成分的 mol 文件, 为提高靶标预测的可靠性, 选取相似性分数 ≥ 0.8 的靶标作为候选靶标, 导出去重获得牡丹皮的候选靶标群。

1.4.2 疾病候选靶标的收集 基于 TCMIP v2.0 的疾病相关分子集及其功能挖掘模块, 根据慢性肾炎的临床表型合集, 以临床表现的英文词条为检索词 (表 1), 建立慢性肾炎相关基因集。

1.5 蛋白间相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络信息

TCMIP v2.0 平台整合了 Reactome (<https://reactome.org/>, version 65)、HPRD (Human Protein

表 1 慢性肾炎的检索词

Table 1 Search words of related chronic kidney disease

疾病名称	表型	疾病名称	表型
albuminuria	蛋白尿	kidney disease induced by mesangial proliferation	系膜增生性肾病
chronic renal failure	慢性肾衰竭	minimal change glomerulonephritis	微小病变肾小球肾炎
chronic tubulointerstitial nephritis	慢性肾小管间质肾炎	nephritis, interstitial	间质性肾炎
decreased numbers of nephrons	肾单位数目减少	pyelonephritis	肾盂肾炎
diabetic nephropathy	糖尿病肾病	renal diseases	肾脏疾病
focal glomerulosclerosis	局灶性肾小球硬化	renal failure	肾衰竭
glomerulonephritis	肾小球肾炎	renal fibrosis	肾纤维化
glomerulopathy	肾小球疾病	renal inflammation	肾脏炎症
glomerulosclerosis	肾小球硬化	renal injury	肾损伤
glycosuria	糖尿症	renovascular hypertension	肾血管性高血压
hyperplasia of the leydig cells	间质细胞增生		
increased blood urea nitrogen	血尿素氮增加		

Reference Database, <http://www.hprd.org/>, Release 9)、MINT (Molecular INTeractionDatabase, <https://mint.bio.uniroma2.it/>, updated in August 2011)、InAct (IntActMolecular Interaction Database, <https://www.ebi.ac.uk/intact/>, version: 4.2.12)、DIP (Database of Interacting Proteins, <https://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/>, updated in Feb 13, 2017) 等数据库的 PPI 数据^[6], 可对药物与证候的 PPI 做全面的分析, 利用该平台, 可获得牡丹皮与慢性肾炎的 PPI 相互作用信息。

1.6 网络构建与分析及可视化

基于 TCMIP v2.0 平台中医药关联网络挖掘模块, 选择“证候-方剂”功能, 上传牡丹皮与慢性肾炎的候选靶标群。基于二者潜在靶标间的 PPI 相互作用计算网络特征值, 以“连接度 (degree)”的 2 倍中位数为卡值, 获得核心节点 (hubs) 后, 以核心节点的“连接度”“紧密度 (closeness)”“介度 (betweenness)”的中位数为卡值, 选取同时满足 3 个卡值的节点作为网络的核心靶标^[6]。通过 DAVID v6.8 软件 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体论 (genetic ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 筛选与慢性肾炎相关的通路作为核心通路。将核心通路、筛选到的核心靶标与化学成分对应并统计每个成分的靶点数量、靶点频次和成分频次。根据频次和 UHPLC-QTOF-MS/MS 响应值筛选核心成分。将得到的核心成分所包含的靶标作为潜在核心靶点。通过 Cytoscape 3.8.0 软件对“成分-靶标-通路”多维关联网络图进行可视化。

2 结果

2.1 化学成分分析

牡丹皮样品正负离子模式基峰离子流图见图 1。通过 Waters UNIFI 软件匹配后, 将 UNIFI 导出的结果进行初步筛选, 响应值大、误差小、加合离子多的成分匹配度高, 故保留误差 $<5 \times 10^{-6}$, 响应值大于 5000 的成分。根据 UNIFI 自动识别、文献报道和在线及离线质谱数据库的比对, 对成分进行鉴定, 结果见表 2、3。

单萜类是芍药属植物的主要活性成分。本研究中共鉴定了 29 个单萜及其苷类成分, 分别是 8-*O*-脱苯甲酰芍药苷 (8-*O*-debenzoylpaeoniflorin)、4-*O*-丁基芍药苷 (4-*O*-butylpaeoniflorin)、4-*O*-甲基没食子

酰氧基芍药苷 (4-*O*-methylgalloyloxypaeoniflorin)、4-*O*-甲基芍药苷 (4-*O*-methylpaeoniflorin)、4-*O*-甲基芍药苷 (4-*O*-methyloxypaeoniflorin)、4-邻甲基苯甲酰芍药苷 (4-*O*-methylbenzoyl-paeoniflorin)、9-*O*-丁基芍药苷 (9-*O*-butylpaeonidanin)、9-*O*-丁氧基芍药苷 (9-*O*-butyloxypaeonidanin)、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin)、苯甲酰氧芍药苷 (benzoyloxypaeoniflorin)、没食子酰芍药苷 (galloylpaeoniflorin)、没食子酰氧基芍药苷 (galloyloxypaeoniflorin)、牡丹皮苷 (mudanpioside) A、B、C、D、E、H、I、J、G, 芍药苷 (paeoniflorin)、芍药苷 A (paeonidanin A)、芍药苷 B (paeoniflorin B)、芍药苷内脂 (albiflorin)、芍药苷酮 (paeoniflorigenone)、芍药内酯 B (paeonilactone B)、氧化芍药苷 (oxypaeoniflorin)、氧化芍药碱 (oxypaeonidanin)。经 MassLynx 软件分析, 正离子模式下, 峰 18、19、20 鉴定的化合物分子式均确定为 $C_{23}H_{28}O_{11}$, 其中峰 18 相对丰度最高并有明显的 m/z 449 $[M-H-CH_2O]$ 环氧类结构特征碎片峰, 与对照品比对裂解规律和保留时间, 结合文献确定峰 18、19、20 分别为芍药内酯苷、牡丹皮苷 I、芍药苷^[7]。

芍药属植物中含有大量的没食子酸和没食子酸衍生物, 本研究中鉴定了没食子酸及其 7 个衍生物, 分别是葡萄糖没食子鞣苷 (glucogallin)、没食子酸甲酯 (methyl gallate)、1,3,4-三没食子酰葡萄糖 (1,3,4-trigalloylglucose)、1,2,3,4-四没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4-tetragalloylglucose)、1,2,3,4,6-五合金葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose)、1,3,6-三邻没食子酰葡萄糖 (1,3,6-tri-*o*-galloylglucose)、1,2,4,6-四没食子酰葡萄糖 (1,2,4,6-tetragalloylglucose)。正离子模式下, 通过与对照品比对裂解规律和保留时间确定峰 30 为没食子酸, 10 号峰具有相同的碎片 m/z 169 $[M-H]$ 和 125 $[M-H-CO_2]$, 鉴定为没食子酸甲酯 (methyl gallate)。峰 43 准分子离子峰为 167.069 7 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_9H_{10}O_3$, 与对照品比对裂解规律和保留时间, 鉴定为丹皮酚 (paeonol)。根据丹皮酚的裂解规律, 鉴定到 7 个丹皮酚衍生物, 包括丹皮酚苷 (paeonoside), 芹菜皂苷 (apiopaeonoside), 牡丹苷 (suffruticoside) A、C、D、E, 2,5-二羟基-4-甲基苯乙酮 (2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone)。由于峰 27、28 观测到的碎片信息有限, 不能归属具体化合物, 推测为 methyl vanillate 和牡丹苷 A、C。鉴定到的化合物中大部分为没食子酸和丹皮酚的衍

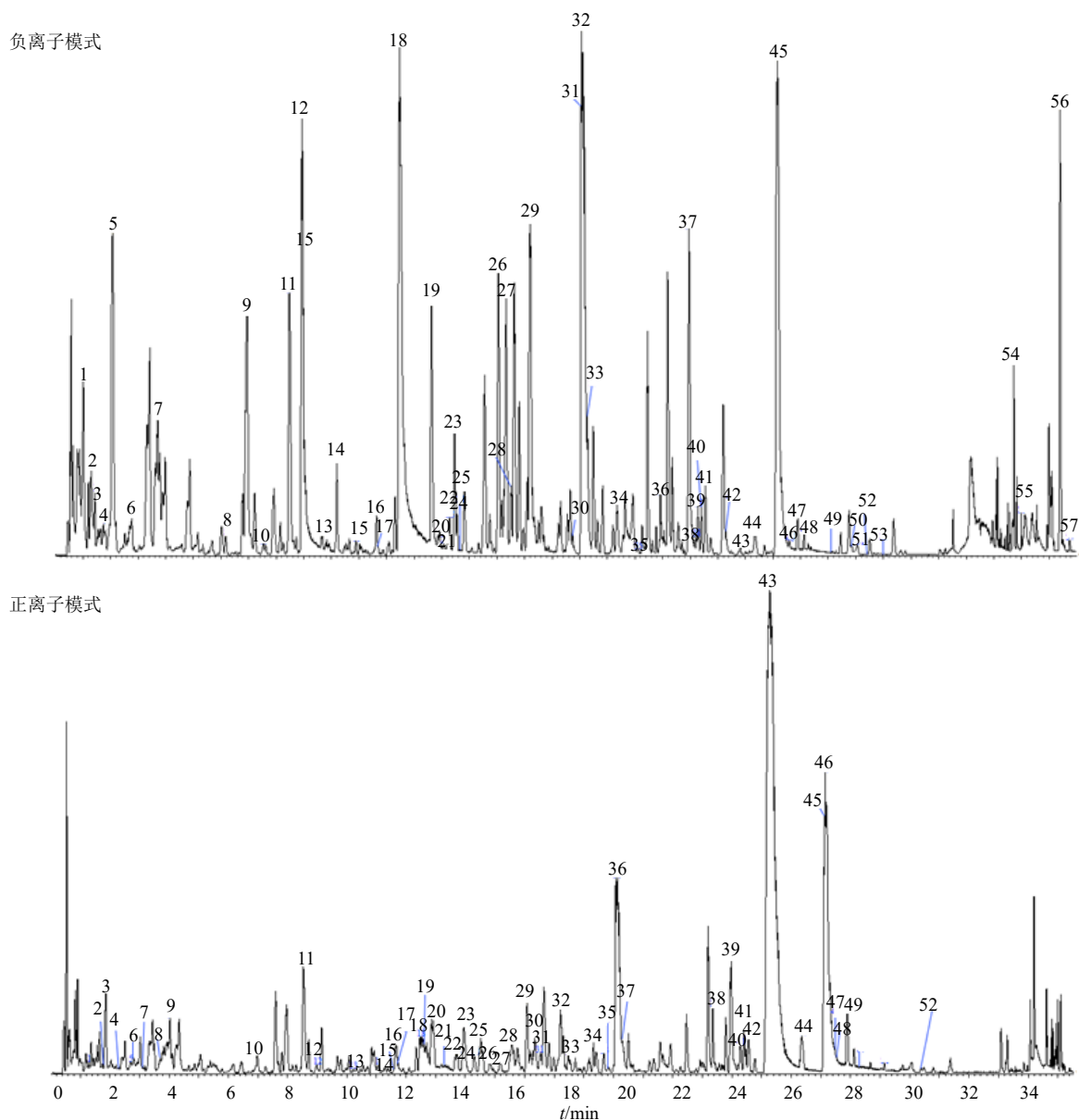


图 1 牡丹皮基峰离子流图

Fig. 1 Base peak intensity (BPI) chromatograms of *Moutan Cortex*

生物, 为验证 UNIFI 匹配结果, 相同条件下检测没食子酸和丹皮酚混合对照品, 保留时间和裂解规律与 UNIFI 匹配结果一致。

2.2 核心靶标的 PPI 网络分析

依据“2.1”项中鉴定到的成分, 在 TCMIP v2.0 平台上共收集到牡丹皮候选靶标 1001 个, 慢性肾炎相关靶标 300 个, PPI 网络核心节点 123 个。将牡丹皮治疗慢性肾炎的 123 个核心靶点上传至 STRING v11.0 数据库, 并运用 Cytoscape 3.8.0 软件进行网络构建和可视化, 度值取大于 2 倍中位数, 得到核心靶点的 PPI 网络, 见图 3。PPI 网络中有丝

分裂原激活蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、核因子- κ B 抑制因子 (nuclear factor- κ B inhibitor, NF- κ BIA)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL6)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 beta, IL1B) 等 18 个靶点出现在网络中, 表明其在 PPI 网络中发挥重要作用, 可视为牡丹皮治疗慢性肾炎的关键靶标。

2.3 多维关联网络可视化分析

2.3.1 牡丹皮治疗慢性肾炎靶点的 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

将这 123 个靶点导入 David, 对相关靶点蛋白进行 GO 功能注释分析, 包含细胞

表 2 正离子模式下牡丹皮的化学成分鉴定

Table 2 Identification of chemical components of *Moutan Cortex* in ESI⁺

峰号	<i>t_R</i> /min	<i>m/z</i>		误差 (×10 ⁻⁶)	响应值	加和离子	分子式	化合物名称	分类	与负离子模 式对应峰号
		实测值	理论值							
1	1.28	394.170 6	376.136 95	-0.4	7630	+NH ₄ , +K, +Na	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	8- <i>O</i> -debenzoylpaconiflorin	单萜类	2
2	1.85	344.169 7	326.13655	-2.0	4350	+NH ₄	C ₁₆ H ₂₂ O ₇	3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl-4-methoxyacetophenone	其他	48
3	1.86	268.103 7	267.096 75	-1.4	75 569	+H	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	adenosine	核酸类	4
4	2.29	240.123 0	222.089 21	-0.2	2114	+NH ₄	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	diethyl phthalate	其他	
5	2.66	362.145 2	344.110 73	1.7	4866	+NH ₄	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	mudanoside C	苷类	15
6	2.79	355.063 8	332.074 35	0.7	2785	+Na	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	glucogallin	没食子酸衍生物	6
7	3.11	345.153 8	344.147 12	-1.7	7552	+H	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	mudanpioside G	单萜类	8
8	3.64	482.151 1	464.116 61	1.4	6033	+NH ₄ , +K, +Na	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₄	mudanoside B	苷类	7
9	4.02	183.101 5	182.094 29	-0.4	3550	+H	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	deoxypaeonisuffrone	萜类	
10	6.98	185.044 5	184.037 17	0.5	18 909	+H	C ₈ H ₈ O ₅	methyl gallate	有机酸	9
11	8.54	291.086 4	290.079 04	0.2	143 880	+H	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(-)-catechin/(+)-catechin	黄酮类	11
	8.54	139.038 4	138.031 69	-4.1	10 328	+H	C ₇ H ₆ O ₃	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	有机酸类	21
12	8.98	519.147 8	496.158 08	0.9	24 009	+Na, +K, +NH ₄	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	oxypaeoniflorin	单萜类	12
13	10.22	549.157 4	526.168 64	-0.8	9041	+Na, +K, +NH ₄	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	mudanpioside E	单萜类	14
14	11.06	351.105 2	328.115 82	0.4	11 755	+Na, +K	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	paeonoside	苯乙酮	
15	11.59	227.090 8	226.084 12	-2.7	2108	+H	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	butyl gallate	酯类	
16	11.66	483.147 2	460.158 08	-0.2	56 112	+Na, +H, +K	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	apiopaeonoside	苯乙酮	16
17	11.73	645.201 0	622.210 90	1.4	19 000	+Na, +K	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₇	suffruticoside E	苯乙酮	17
18	12.48	498.197 3	480.163 16	0.7	194 509	+NH ₄ , +K, +Na	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	albiflorin	单萜类	18
19	12.62	503.152 8	480.163 16	0.8	70 317	+Na, +K	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	mudanpioside I	单萜类	
20	13.31	498.197 2	480.163 16	0.3	46 951	+NH ₄	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	paeoniflorin*	单萜类	
21	13.32	512.212 6	494.178 81	-0.1	8380	+NH ₄ , +Na	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	4- <i>O</i> -methylpaeoniflorin	单萜类	38
22	13.66	666.203 6	648.169 03	1.1	40 233	+NH ₄ , +K, +Na	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₆	galloyloxypaeoniflorin	单萜类	19
23	13.96	183.065 7	182.057 91	3.0	58 536	+H	C ₉ H ₁₀ O ₄	2,3-dihydroxy-4-methoxyacetophenone	苯乙酮	20
24	14.29	153.054 1	152.047 34	-3.6	7772	+H	C ₈ H ₈ O ₃	resacetophenone	苯乙酮	22
25	14.50	654.130 3	636.096 26	0.3	7489	+NH ₄ , +K, +Na	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	1,3,4-tri-galloylglucose	没食子酸衍生物	23
26	14.85	533.162 7	510.173 73	-0.5	23 158	+Na, +K, +NH ₄	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	4- <i>O</i> -methyloxypaeoniflorin	单萜类	35
	14.85	533.162 7	510.173 73	-0.5	23 158	+Na, +K, +NH ₄	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	oxypaeonidanin	单萜类	34
27	15.18	183.065 8	182.057 91	3.6	15 532	+H	C ₉ H ₁₀ O ₄	methyl vanillate	没食子酸衍生物	
28	15.57	635.158 7	612.169 03	0.7	107 872	+Na, +K	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside A	苯乙酮	27
	15.57	635.158 7	612.169 03	0.7	107 872	+Na, +K	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside C	苯乙酮	27
29	16.08	806.142 4	788.107 22	1.7	29 182	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	1,2,3,4-tetragalloylglucose	没食子酸衍生物	26
30	16.35	171.028 4	170.021 52	-2.3	9783	+H	C ₇ H ₆ O ₅	gallic acid*	有机酸	5
31	16.54	635.158 6	612.169 03	0.5	54 735	+Na, +H, +K	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside D	苯乙酮	28
32	17.22	650.207 9	632.174 12	-0.1	124 145	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	galloylpaeoniflorin	单萜类	29
33	17.53	319.117 4	318.110 34	-0.6	18 911	+H	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	paeoniflorigenone	单萜类	

续表 2

峰号	t_R/min	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	响应值	加和离子	分子式	化合物名称	分类	与负离子模式对应峰号
		实测值	理论值							
34	18.62	528.207 6	510.173 73	0.1	2320	+NH ₄ , +Na	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	mudanpioside D	单萜类	25
35	18.76	680.219 8	662.184 69	1.9	8255	+NH ₄ , +K, +Na	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₆	4-O-methylgalloyloxy paeoniflorin	单萜类	30
36	19.22	958.154 0	940.118 18	2.1	29 746	+NH ₄ , +Na	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	1,2,3,4,6-pentagalloylglucose	没食子酸衍生物	32
37	19.29	634.213 6	616.179 21	0.9	52 945	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₄	mudanpioside H	单萜类	33
38	22.36	648.229 4	630.194 86	1.1	74 655	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	mudanpioside J	单萜类	41
	22.36	169.049 4	168.042 26	-0.7	2874	+H	C ₈ H ₈ O ₄	vanillate acid	其他	
39	22.97	618.217 8	600.184 29	-0.4	192 185	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	benzoyl oxypaeoniflorin	单萜类	37
	22.97	618.217 8	600.184 29	-0.4	192 185	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	mudanpioside C	单萜类	37
40	23.29	303.050 4	302.042 65	1.4	33 659	+H	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetin	黄酮类	39
41	23.41	764.276 6	746.242 20	0.7	62 510	+NH ₄ , +K, +Na	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₇	paeoniflorin B	单萜类	40
42	23.56	648.229 0	630.194 86	0.5	60 439	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	mudanpioside B	单萜类	43
43	24.24	167.070 6	166.062 99	1.9	1340382	+H	C ₉ H ₁₀ O ₃	paeonol*	苯乙酮	42
44	25.36	197.080 6	196.073 56	-1.3	15 874	+H	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	paeonilactone B	单萜类	44
45	26.12	616.238 8	598.205 03	-0.1	23 298	+NH ₄	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₂	4-O-methylbenzoyl-paeoniflorin	单萜类	51
46	26.15	602.223 6	584.189 38	0.6	921 425	+NH ₄ , +H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	benzoyl paeoniflorin	单萜类	45
47	26.53	616.238 7	598.205 03	-0.3	8117	+NH ₄ , +Na	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₂	paeonidanin A	单萜类	50
48	26.59	287.054 9	286.047 74	-0.5	14 932	+H	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	kaempferol	黄酮类	46
49	26.89	632.235 5	614.199 94	2.8	96 229	+NH ₄ , +H, +K, +Na	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₃	mudanpioside A	单萜类	47
50	27.29	317.065 4	316.058 30	-0.5	9453	+H	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	isorhamnetin	黄酮类	
51	28.19	559.215 8	536.225 76	1.5	2362	+Na, +NH ₄	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	9-O-butylpaeonidanin	单萜类	
52	29.31	554.259 1	536.225 76	-0.9	2340	+NH ₄ , +K, +Na	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	4-O-butylpaeoniflorin	单萜类	

*表示与对照品对照

*contrast with reference

表 3 负离子模式下牡丹皮的化学成分鉴定

Table 3 Identification of chemical components of *Moutan Cortex* in ESI⁻

峰号	t_R/min	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	响应值	加和离子	分子式	化合物名称	分类	与正离子模式对应峰号
		实测值	理论值							
1	1.01	129.019 5	130.026 61	1.0	3914	-H	C ₅ H ₆ O ₄	mono-methyl maleate	其他	
2	1.27	421.135 6	376.136 95	1.1	78 315	+HCOO, -H	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	8-O-debenzoylpaeoniflorin	单萜类	1
3	1.36	243.062 5	244.069 54	1.0	5689	-H	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	uridine	苷类	
4	1.78	312.094 9	267.096 75	-0.1	4557	+HCOO, -H	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄	adenosine	核酸类	3
5	2.07	169.014 5	170.021 52	1.4	368 271	-H	C ₇ H ₆ O ₅	gallic acid*	有机酸	30
6	2.76	331.067 2	332.074 35	0.3	131 591	-H	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	glucogallin	没食子酸衍生物	6
7	3.70	463.109 6	464.116 61	0.6	359 064	-H	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₄	mudanioside B	苷类	8
8	6.18	389.145 6	344.147 12	0.7	41 232	+HCOO, -H	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	mudanpioside G	单萜类	7
9	6.94	183.030 1	184.037 17	0.9	308 411	-H	C ₈ H ₈ O ₅	methyl gallate	有机酸	10
10	7.47	407.098 6	408.105 65	0.7	6576	-H, +HCOO	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₀	iriflophenone 2-O-β-D-glucopyranoside	其他	
11	8.49	289.072 0	290.079 04	0.7	363 297	-H	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(-)-catechin/(+)-catechin	黄酮类	11
12	8.94	495.151 6	496.158 08	1.6	817 506	-H, +HCOO	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	oxypaeoniflorin	单萜类	12
13	9.66	635.089 4	636.096 26	0.7	49 799	-H	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	1,3,6-tri-O-galloylglucose	没食子酸衍生物	
14	10.20	525.161 4	526.168 64	0.1	156 684	-H, +HCOO	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	mudanpioside E	单萜类	13

续表 3

峰号	t_R/min	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	响应值	加和离子	分子式	化合物名称	分类	与负离子模式 对应峰号
		实测值	理论值							
15	10.85	343.103 6	344.110 73	0.5	4690	-H, +HCOO	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	mudanoside C	苷类	5
16	11.64	505.156 7	460.158 08	0.9	82 120	+HCOO, -H	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	apiopaeonoside	苯乙酮	16
17	11.70	667.209 1	622.210 90	0.0	27 131	+HCOO, -H	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₇	suffruticoside E	苯乙酮	17
18	12.48	525.161 2	480.163 16	-0.3	1 651 766	+HCOO, -H	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	albiflorin	单萜类	18
19	13.63	647.162 1	648.169 03	0.6	514 497	-H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₆	galloyloxypaeoniflorin	单萜类	22
20	13.93	181.050 2	182.057 91	-2.3	1305	-H	C ₉ H ₁₀ O ₄	2,3-dihydroxy-4-methoxyacetophenone	其他	23
21	14.01	137.024 3	138.031 69	-0.8	1 0742	-H	C ₇ H ₆ O ₃	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	有机酸	11
22	14.24	151.040 2	152.047 34	1.0	31 191	-H	C ₈ H ₈ O ₃	resacetophenone	苯乙酮	24
23	14.47	635.088 6	636.096 26	-0.6	244 630	-H	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	1,3,4-tri-galloylglucose	没食子酸衍生物	25
24	14.64	525.162 1	480.163 16	1.3	56 959	+HCOO	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	paeoniflorin*	单萜类	
25	14.82	555.172 7	510.173 73	1.5	146 011	+HCOO, -H	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	mudanpioside D	单萜类	34
26	16.06	787.099 7	788.107 22	-0.3	640 440	-H	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	1,2,3,4-tetragalloylglucose	没食子酸衍生物	29
27	16.33	611.161 6	612.169 03	-0.2	515 478	-H	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside A	苯乙酮	28
	16.33	611.161 6	612.169 03	-0.2	515 478	-H	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside C	苯乙酮	28
28	16.51	611.161 5	612.169 03	-0.4	152 321	-H, +HCOO	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	suffruticoside D	苯乙酮	31
29	17.20	631.166 8	632.174 12	-0.1	752 109	-H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	galloylpaeoniflorin	单萜类	32
30	18.74	661.176 7	662.184 69	-1.0	58 294	-H	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₆	4- <i>O</i> -methylgalloyloxypaeoniflorin	单萜类	35
31	19.03	787.097 3	788.107 22	-3.4	11 271	-H	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	1,2,4,6-tetragalloylglucose	没食子酸衍生物	
32	19.08	939.107 2	940.118 18	-3.9	2 600 278	-H	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose	没食子酸衍生物	36
33	19.28	615.170 4	616.179 21	-2.4	283 752	-H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₄	mudanpioside H	单萜类	37
34	20.38	509.164 7	510.173 73	-3.4	10 154	-H	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	oxypaeonidanin	单萜类	26
35	21.12	509.166 7	510.173 73	0.6	16 351	-H	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	4- <i>O</i> -methyloxypaeoniflorin	单萜类	26
36	21.99	181.050 3	122.036 78	-1.7	27 703	+CH ₃ COO	C ₇ H ₆ O ₂	benzoic acid	有机酸	
37	22.96	599.176 8	600.184 29	-0.3	622 339	-H, +HCOO	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	benzoyl oxypaeoniflorin	单萜类	39
	22.96	599.176 8	600.184 29	-0.3	622 339	-H, +HCOO	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	mudanpioside C	单萜类	39
38	23.19	493.170 4	494.178 81	-2.2	5037	-H	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	4- <i>O</i> -methylpaeoniflorin	单萜类	21
39	23.28	301.035 5	302.042 65	0.4	73 260	-H	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetin	黄酮类	40
40	23.41	791.239 0	746.242 20	-1.7	116 065	+HCOO, -H	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₇	paeoniflorin B	单萜类	41
41	23.56	629.187 6	630.194 86	0.0	153 850	-H, +HCOO	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	mudanpioside J	单萜类	38
42	24.27	165.056 0	166.062 99	1.8	45 160	-H	C ₉ H ₁₀ O ₃	2,5-dihydroxy-4-methylacetophenone	苯乙酮	43
	24.27	165.056 0	166.062 99	1.8	45 160	-H	C ₉ H ₁₀ O ₃	3-hydroxy-4-methoxyacetophenone	其他	
43	24.79	689.207 1	630.194 86	-2.3	4204	+CH ₃ COO	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	mudanpioside B	单萜类	42
44	25.35	195.066 3	196.073 56	0.0	43 837	-H	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	paeonilactone B	单萜类	44
45	26.16	629.187 4	584.189 38	-0.3	1 548 784	+HCOO, -H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	benzoyl paeoniflorin	单萜类	46
	26.16	629.187 4	630.194 86	-0.3	1 548 784	-H	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	mudanpioside J	单萜类	
46	26.59	285.040 5	286.047 74	0.3	34 905	-H	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	kaempferol	黄酮类	48
47	26.89	659.197 3	614.199 94	-1.2	104 800	+HCOO, -H	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₃	mudanpioside A	单萜类	49
48	27.19	325.129 3	326.136 55	0.1	2099	-H	C ₁₆ H ₂₂ O ₇	3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl-4-methoxyacetophenone	其他	2
49	28.14	551.213 3	552.220 68	-0.3	11 458	-H	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	9- <i>O</i> -butyloxypaeonidanin	单萜类	
50	28.86	657.217 3	598.205 03	-2.4	3 276	+CH ₃ COO	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₂	paeonidanin A	单萜类	47
51	29.16	657.216 5	598.205 03	-3.7	2 283	+CH ₃ COO	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₂	4- <i>O</i> -methylbenzoyl-paeoniflorin	单萜类	45
52	29.38	611.233 7	552.220 68	-1.3	6 278	+CH ₃ COO	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	4- <i>O</i> -butyloxypaeoniflorin	苷类	
53	29.90	287.222 6	242.224 58	-0.5	4 614	+HCOO	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	pentadecanoic acid	其他	
54	34.73	455.353 0	456.360 35	-0.1	102 657	-H, +HCOO	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	betulinic acid	三萜类	
55	35.00	453.337 8	454.344 70	0.8	29 446	-H, +HCOO	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	mudanpinic acid A	三萜类	
56	36.40	431.317 7	432.323 96	2.4	513 757	-H	C ₂₇ H ₄₄ O ₄	octadecyl caffeate	其他	
57	36.75	621.440 0	576.440 00	-0.8	37 344	+HCOO	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	daucosterol	三萜类	

*表示与对照品对照

*contrast with reference

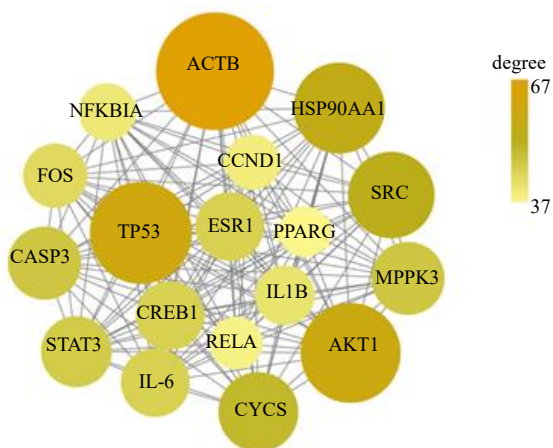


图3 牡丹皮治疗慢性肾炎的PPI核心网络

Fig. 3 PPI key network of *Moutan Cortex* in treatment of chronic nephritis

组分、分子功能和生物过程3个方面,选取P值最小的前10个进行做图呈现,如图4所示,这些蛋白在细胞组分方面主要参与氧化还原酶复合物、线粒体内膜、线粒体呼吸体等过程;在分子功能方面主要参与蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、配体-活化、泛素蛋白连接酶结合等功能;在生物过程方面主要涉及细胞对肽类激素刺激的反应、有机化合物氧化产生能量等过程;推测牡丹皮滋阴补肾、活血化瘀功效可能与以上功能过程相关。

以 $P < 0.05$ 为筛选条件,共富集到87条通路,经过进一步查询文献,从中筛选出19条与慢性肾炎可能相关的通路,包括Toll样受体信号通路、T细胞受体信号通路等炎症相关通路,也包括磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol-3-hydroxykinase,

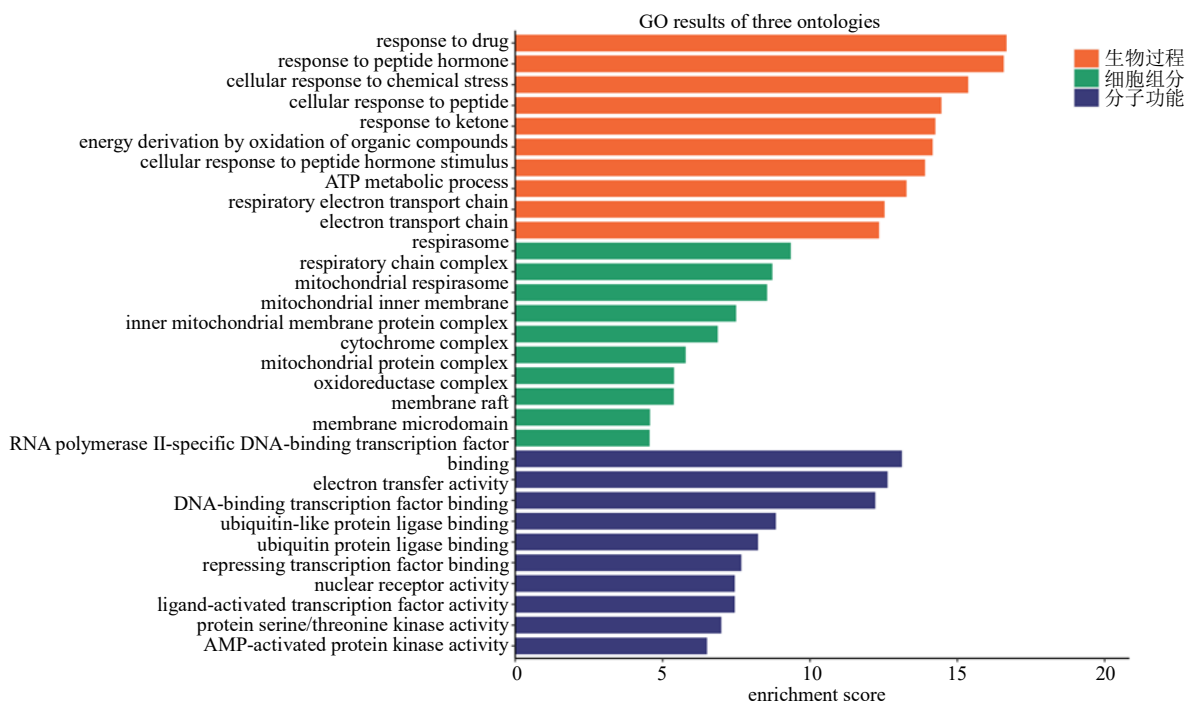


图4 核心靶点GO功能分析

Fig. 4 GO function analysis of core targets

PI3K)/蛋白激酶B (protein kinase B, Akt) 信号通路、NF- κ B 信号通路等肾纤维化相关通路,提示牡丹皮可能主要通过这些通路起到抗炎、抗氧化、保护肾脏细胞的作用。见表4。

2.3.2 牡丹皮治疗慢性肾炎的核心成分筛选 将筛选到的核心靶点与靶点所对应的化学成分进行靶点数量统计,选取频次大于频次中位数的成分再除去响应值 < 4000 的成分,剩下的13个作为核心成分,分别是没食子酸、腺苷、没食子酸甲酯、2,3-二

羟基-4-甲氧基苯乙酮、槲皮素、丹皮酚、乙酰香草酮、2,5-二羟基-4-甲基苯乙酮、儿茶素、白桦酸、芍药苷、牡丹皮苷F、牡丹皮苷G。主要为苯乙酮类、单萜苷类和没食子酸及其衍生物。“成分-靶标-通路”多维关联网络图见图5。

3 讨论

慢性肾脏疾病是一种慢性进行性发展的疾病,肾小管上皮细胞和血管内皮细胞受损后引起促炎因子的释放,这些因子会促进细胞外基质(extracellular

表 4 19 条与慢性肾炎可能相关的通路
Table 4 Information of 19 related pathways

编号	通路	富集靶点数	P 值
hsa04024:	cAMP signaling pathway	18	2.35×10^{-8}
hsa04062:	chemokine signaling pathway	17	6.17×10^{-8}
hsa04620:	Toll-like receptor signaling pathway	13	1.57×10^{-7}
hsa04020:	calcium signaling pathway	11	7.77×10^{-4}
hsa04068:	FoxO signaling pathway	13	2.03×10^{-6}
hsa04750:	inflammatory mediator regulation of TRP channels	11	4.69×10^{-6}
hsa04022:	cGMP-PKG signaling pathway	13	1.14×10^{-5}
hsa04151:	PI3K-Akt signaling pathway	19	1.42×10^{-5}
hsa04066:	HIF-1 signaling pathway	10	2.86×10^{-5}
hsa04621:	NOD-like receptor signaling pathway	8	3.58×10^{-5}
hsa04660:	T cell receptor signaling pathway	10	3.97×10^{-5}
hsa04010:	MAPK signaling pathway	15	7.42×10^{-5}
hsa04662:	B cell receptor signaling pathway	8	1.39×10^{-4}
hsa04630:	Jak-STAT signaling pathway	11	1.43×10^{-4}
hsa04152:	AMPK signaling pathway	10	1.99×10^{-4}
hsa04150:	mTOR signaling pathway	7	3.82×10^{-4}
hsa04064:	NF-kappa B signaling pathway	8	5.89×10^{-4}
hsa04540:	gap junction	8	6.32×10^{-4}
hsa04924:	renin secretion	7	6.52×10^{-4}

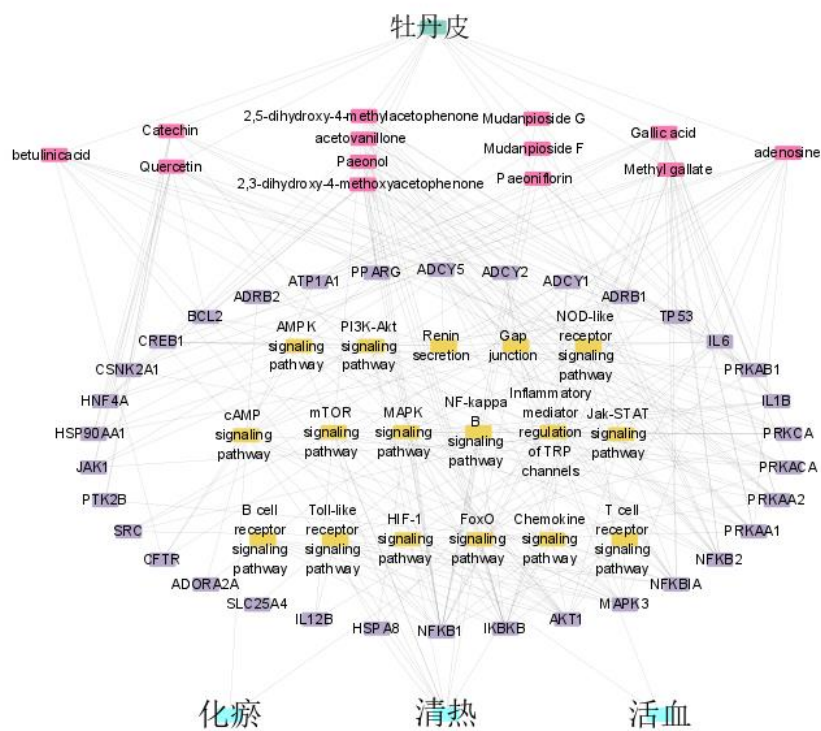


图 5 “成分-靶标-通路” 多维关联网络图

Fig. 5 Multi-dimensional network of “constituent-target-pathway”

matrix, ECM) 的分泌, 受损的上皮细胞、内皮细胞和活化的成纤维细胞释放基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP), 成纤维细胞的活化造成大量 ECM 沉积, 导致持续的慢性炎症, 肾脏受到持续的损伤后, 组织修复/再生异常导致其不能被完全修复, 致使正常组织被纤维组织替代、丧失功能, 最终引起肾功能衰竭。

本研究运用 UHPLC-QTOF-MS/MS 联合 UNIFI 数据库, 以及根据已有文献资料建立的牡丹皮化学成分库, 在正、负离子 2 种扫描模式下, 比较全面地预测了牡丹皮中的主要活性成分。ETCM 数据库中牡丹皮化合物多数为没食子酸、芍药苷、丹皮酚衍生化合物, 所以选用这 3 种对照品与 UNIFI 分析结果比对。明确活性成分后, 进一步结合 TCMIP 平台对牡丹皮治疗慢性肾炎的分子机制进行了初步分析, 得到了牡丹皮治疗慢性肾炎可能的 13 个关键活性成分, 34 个核心靶点和 17 条核心通路。其中, 多个成分均有文献报道具有确切的抗炎、抗肾纤维化作用。

牡丹皮中没食子酸和没食子酸甲酯在慢性肾病长期治疗中具有肾脏保护作用, 可调节 NF- κ B、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 等通路起到抗炎作用, 在多柔比星诱导的大鼠慢性肾炎模型中通过抑制 MMP-2, 诱导超氧化物歧化酶升高, 从而有效地抑制慢性肾炎中的炎症反应, 增加肾脏重量和肾小球体积^[8]。

牡丹皮中芍药苷类化合物芍药苷、牡丹皮苷 F、牡丹皮苷 G 可降低促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 和 IL-6 的表达。有报道芍药苷可以治疗系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MPGN) 大鼠血脂异常, 同时显著降低 24 h 尿蛋白并促进肾功能, 减轻系膜细胞增殖和炎症^[9]。

黄酮类化合物儿茶素、槲皮素除了具有抗炎、抗氧化作用外, 还可以通过激活肾上皮细胞中的 Na⁺, K⁺-2Cl⁻协同转运蛋白 1 提高 Cl⁻含量, 促进上皮细胞 Na⁺通道对 Na⁺的重吸收减少, 降低了体积依赖性升高的血压, 有效缓解慢性肾炎过程中血瘀症状。腺苷参与了传入和传出动脉血管张力的调节, 以及与肾素-血管紧张素系统的相互作用, 证明腺苷信号传导也参与肾小球反馈机制、钠重吸收和对急性损伤 (如缺血) 的适应性反应^[10]。

三萜类化合物白桦脂酸对腺嘌呤致慢性肾炎

大鼠的转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)、结缔组织生长因子、纤连蛋白、I 型胶原蛋白和羟脯氨酸等肾纤维化指标起到逆转作用, 白桦脂酸的肾保护和抗纤维化作用的生化机制可能是通过抑制促纤维化蛋白的产生, 从而阻碍肾组织损伤并改善肾功能, 具有肾保护潜力和抗纤维化活性^[11]。

牡丹皮中还含有大量的丹皮酚及丹皮酚衍生物 2,5-二羟基-4-甲基苯乙酮、去甲丹皮酚乙酰香草酮、2,3-二羟基-4-甲氧基苯乙酮等。这类化合物可以抑制 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 活化及 PI3K 和 Akt 磷酸化, 可能通过调控 PI3K/Akt 通路来治疗慢性肾炎, 且有报道抑制 PI3K 激活会减弱 ECM 积累, 而抑制 Akt 会导致梗阻性肾病中肌成纤维细胞标志物减少^[12-13]。一些间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 调节剂, 如 Bmi1 和胆绿素还原酶通过 PI3K/Akt 途径参与缺氧诱导的肾小管间质纤维化的治疗^[14]。

PPI 网络中显示, 18 个靶点在 PPI 网络中发挥重要作用, 可视为牡丹皮治疗慢性肾炎的关键靶标。其中 NFKBIA 是 NF- κ B 通路中重要的抑制剂。NF- κ B 是一种重要独特的核转录因子, 有研究证明 NF- κ B 可转录诱导黏附因子和单核细胞趋化因子, 吸引单核细胞到炎症部位, 同时转录一些炎症因子 (IL-1 β 、TNF 等) 扩大炎症反应, 促进肾纤维化的发展^[15]。MAPK3 是丝裂原活化蛋白激酶, 在 MAPK 信号通路中发挥重要作用, 有研究证明抑制 p38 MAPK 的表达可以减轻肾损伤^[16]。MAPK 作为 TGF- β 的下游通路, 过度激活可能促进梗阻肾脏和 TGF- β 1 处理的肾小管上皮细胞中的 EMT 过程^[17]。有研究证明灵芝酸可通过抑制 TGF- β /Smad 和 MAPK 信号通路治疗单侧输尿管梗阻 (unilateral ureters obstruction, UUO) 诱导的肾纤维化^[18]。本研究中 MAPK3、NF- κ BIA、IL6、IL1B 等 18 个靶点在 PPI 网络中处于关键位置, 牡丹皮活性成分主要通过这 18 个核心靶点发挥治疗慢性肾炎的作用。

“成分-靶标-通路”关联网分析显示, 牡丹皮活性成分可能通过调节趋化因子信号通路、Toll 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、NF- κ B 信号通路、NOD 样受体信号通路这 6 条通路发挥抗炎和清热作用。同时可能通过 cAMP 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等通路发挥抗纤维化和活血化瘀的作用。

综上所述,本研究运用UHPLC-QTOF-MS/MS技术结合中药整合药理学平台信息,分析了牡丹皮治疗慢性肾炎可能作用的靶点通路,初步阐述了牡丹皮滋阴补肾、活血化瘀的物质基础,为后续相关的机制研究和临床用药提供参考,还需通过进一步的实验研究加以验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Iijima K, Sako M, Kamei K, *et al.* Rituximab in steroid-sensitive nephrotic syndrome: Lessons from clinical trials [J]. *Pediatr Nephrol*, 2018, 33(9): 1449-1455.
- [2] 王世荣, 孙郁芝教授治疗慢性肾小球肾炎经验撮要 [J]. *中国民间疗法*, 2014, 22(11): 12-14.
- [3] 徐义峰, 王钰, 董辛, 等. 基于数据挖掘的国医大师治疗慢性肾小球肾炎用药规律分析 [J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(11): 2137-2141.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 172.
- [5] 徐义峰, 王钰, 董辛, 等. 基于数据挖掘的国医大师治疗慢性肾小球肾炎用药规律分析 [J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(11): 2137-2141.
- [6] 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.
- [7] 王镇方, 赵阳, 庞旭, 等. 利用UPLC-Q-TOF-MS^E快速分析四物汤中的化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(21): 3702-3708.
- [8] Peng C C, Hsieh C L, Wang H E, *et al.* Ferulic acid is nephrodamaging while gallic acid is renal protective in long term treatment of chronic kidney disease [J]. *Clin Nutr*, 2012, 31(3): 405-414.
- [9] Liu B H, Lin J, Bai L X, *et al.* Paeoniflorin inhibits mesangial cell proliferation and inflammatory response in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis through PI3K/AKT/GSK-3 β pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 978.
- [10] Oyarzún C, Garrido W, Alarcón S, *et al.* Adenosine contribution to normal renal physiology and chronic kidney disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 55: 75-89.
- [11] Sharma A, Thakur R, Lingaraju M C, *et al.* Betulinic acid attenuates renal fibrosis in rat chronic kidney disease model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 796-804.
- [12] Zhang X L, Liang D, Fan J Y, *et al.* Zinc attenuates tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via inhibition of HIF through PI3K signaling [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 173(2): 372-383.
- [13] Rodríguez-Peña A B, Grande M T, Eleno N, *et al.* Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2008, 74(2): 196-209.
- [14] Zeng R, Yao Y, Han M, *et al.* Biliverdin reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI₃-kinase and Akt [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2): 380-387.
- [15] Chen J L, Hartono J R, John R, *et al.* Early interleukin 6 production by leukocytes during ischemic acute kidney injury is regulated by TLR4 [J]. *Kidney Int*, 2011, 80(5): 504-515.
- [16] Gava E, Samad-Zadeh A, Zimpelmann J, *et al.* Angiotensin-(1-7) activates a tyrosine phosphatase and inhibits glucose-induced signalling in proximal tubular cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(6): 1766-1773.
- [17] Sholokh A, Klussmann E. Local cyclic adenosine monophosphate signalling cascades-roles and targets in chronic kidney disease [J]. *Acta Physiol*, 2021, 232(1): e13641.
- [18] Zhang X L, Liang D, Fan J Y, *et al.* Zinc attenuates tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via inhibition of HIF through PI3K signaling [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 173(2): 372-383.
- [19] Rodríguez-Peña A B, Grande M T, Eleno N, *et al.* Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2008, 74(2): 196-209.
- [20] Zeng R, Yao Y, Han M, *et al.* Biliverdin reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI₃-kinase and Akt [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2): 380-387.
- [21] Dou F, Liu, Y T; Liu L M, *et al.* Aloe-emodin ameliorates renal fibrosis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Rejuvenation Res*, 2019, 22(3): 218-229.

[责任编辑 潘明佳]