

基于UHPLC-Q-TOF/MS结合网络药理学研究柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制

闻韬, 焦广洋, 赵梦沛, 岳小强, 张凤, 陈万生

Exploring effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis by UHPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology

WEN Tao, JIAO Guangyang, ZHAO Mengpei, YUE Xiaoqiang, ZHANG Feng, CHEN Wansheng

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202312061>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学与分子对接预测鸡骨草特征图谱研究

Prediction of characteristic chromatogram for Abri Herba based on network pharmacology and molecular docking

药学实践与服务. 2024, 42(8): 350-358 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202303048

基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479-486 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202401073

基于网络药理学和分子对接技术研究金芪清疏颗粒治疗社区获得性肺炎的潜在机制

Study on the potential mechanism of JQQSG for the treatment of CAP based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 471-478 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312014

丹参白术方“异病同治”冠心病、血管性痴呆、特发性膜性肾病的网络药理学作用机制研究

Network pharmacological mechanism of Danshen Baizhu prescription on the treatment of coronary heart disease, vascular dementia and idiopathic membranous nephropathy

药学实践与服务. 2025, 43(3): 143-150 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312027

基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

Study on the pharmacological effects and mechanism of Gegen-Zhimu herb pair in preventing and treating Alzheimer's disease by UHPLC-Q/TOF-MS metabolomics strategy

药学实践与服务. 2025, 43(1): 30-40 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202409035



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于 UHPLC-Q-TOF/MS 结合网络药理学研究柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制

闻 韬^{1a}, 焦广洋², 赵梦沛^{1a}, 岳小强^{1b}, 张 凤^{1a}, 陈万生^{1a,2} (1. 海军军医大学第二附属医院: a. 医疗保障中心药剂科, b. 中医科, 上海 200003; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

[摘要] **目的** 研究柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制。**方法** 采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术, 获取柴胡桂枝干姜汤体外及入血化学成分的一级、二级离子碎片, 结合对照品及文献上的信息进行比对, 对柴胡桂枝干姜汤的化学成分进行全面表征。在入血成分表征的基础上, 利用网络药理学方法, 对柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的机制进行探究, 并通过免疫组化结果进行验证。**结果** 柴胡桂枝干姜汤的入血成分表征出 24 种, 包括黄酮苷类 11 种, 脂肪酸类 3 种, 有机酸类 3 种, 姜辣素类 2 种, 黄酮类 2 种, 三萜类、脂肪醛类和氨基酸类各 1 种。其主要作用于 TNF- α 、IL-6、STAT3 以及 PTGS2 等靶点, 通过影响 IL-17 信号通路, AGE-RAGE 信号通路等发挥治疗作用。**结论** 首次利用 UHPLC-Q-TOF/MS 对柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制进行探索, 为柴胡桂枝干姜汤的进一步研究提供科学参考。

[关键词] 柴胡桂枝干姜汤; 慢性非萎缩性胃炎; UHPLC-Q-TOF/MS; 网络药理学

[文章编号] 2097-2024(2025)09-0455-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202312061

Exploring effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis by UHPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology

WEN Tao^{1a}, JIAO Guangyang², ZHAO Mengpei^{1a}, YUE Xiaoliang^{1b}, ZHANG Feng^{1a}, CHEN Wansheng^{1a,2} (1a. Department of Pharmacy, Medical Security Center, 1b. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treating chronic non-atrophic gastritis. **Methods** The primary and secondary ion fragments of chemical components of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction were obtained by UHPLC-Q-TOF/MS. Comparing with reference standards and literature information, a comprehensive characterization of the chemical constituents of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction was conducted. Then, the network pharmacology approach was applied to explore the therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis based on the components in plasma and verified by immunohistochemical results. **Results** A total of 24 absorbed components of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction were characterized, including 11 flavonoid glycosides, 3 fatty acids, 3 organic acids, 2 gingerols, 2 flavonoids and, 1 each of fatty aldehydes, triterpenoids and amino acids, which mainly acted on TNF- α , IL-6, STAT3, and PTGS2. It exerted therapeutic effects by modulating signaling pathways, including the IL-17 signaling pathway and the AGE-RAGE signaling pathway, etc. **Conclusion** This study provided the first exploration of the effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis by UHPLC-Q-TOF/MS, which could offer scientific references for its further research.

[Key words] Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction; chronic non-atrophic gastritis; UHPLC-Q-TOF/MS; network pharmacology

[作者简介] 闻 韬, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学, Email: wentao_nmu@163.com

[通信作者] 张 凤, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 临床药学和中药学, Tel: (021)51322403, Email: fengzhangky@aliyun.com; 陈万生, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 中药品质调控、临床系统生物学, Email: chenws126@126.com

慢性非萎缩性胃炎 (chronic non-atrophic gastritis, CNAG) 作为慢性胃炎的一种类型, 在中国发病率高达 49.3%, 严重影响患者的生活^[1]。柴胡桂枝干姜汤 (Chaihu-Guizhi-Ganjiang docetion, CGGD) 源自张仲景的《伤寒论》, 由柴胡、桂枝、干姜、天花粉、黄芩、牡蛎、炙甘草七味药组成, 主治胆热脾寒

之证^[2]。现代研究发现,柴胡桂枝干姜汤治疗消化系统疾病效果显著^[3]。然而,目前的研究多聚焦于典型病案分析与临床疗效上,缺乏其体内外成分的特征研究,更未见其治疗 CNAG 的机制研究^[4]。

因此,本研究基于血清药物化学分析方法,采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)技术对柴胡桂枝干姜汤的入血成分进行分析,同时结合网络药理学技术对其治疗 CNAG 的作用机制进行探讨,为后续开展实验验证提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与药材

柴胡(甘肃,批号:1051843)、黄芩(山东,批号:1032223)、干姜(四川,批号:1045063)、天花粉(河北,批号:1037043)、桂枝(广西,批号:1035433)、牡蛎(广东,批号:1041073)、炙甘草(内蒙古,批号:1040593)、清半夏(甘肃,批号:1042863)均购自上海蔡同德中药饮片有限公司。汉黄芩苷(批号:O0903AS)购自大连美仑生物技术有限公司;柠檬酸(批号:SM0425GA14)购自上海源叶生物科技有限公司。质谱级甲醇、乙腈购自德国 Merck 公司;质谱级甲酸购自美国 Fisher 公司;纯净水购自中国屈臣氏公司。1% 氨水、脱氧胆酸钠、无水乙醇、二甲苯、双氧水(货号:10011218)购自国药集团化学试剂有限公司;柠檬酸(pH=6.0)抗原修复液、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、苏木素染液(货号:R1004)购自上海睿宝和生物科技有限公司;STAT3 抗体(货号:9139)与 PTGS2 抗体(货号:12282)购自 Cell Signaling Technology 公司;TNF- α 抗体(货号:ab6671)与 IL-6 抗体(货号:ab9324)购自 Abcam 公司。

1.2 实验仪器

UHPLC-Q-TOF/MS, 包含 1290 Infinity 型 UHPLC 及 6530 型 Q-TOF/MS 系统(美国 Agilent 公司);L-200 型冷冻干燥机(瑞士 Buchi 公司);Centrifuge 5810 R 型高速冷冻离心机、Mini spin 微型离心机(德国 Eppendorf 公司);BSA124S-CW 型分析天平(德国 Sartorius 公司);SK7200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);VX200 涡旋振荡器(美国 Labnet 公司)脱水机与包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

1.3 混合对照品溶液的制备

分别精密称取汉黄芩苷和柠檬酸对照品 1 mg,加入适量甲醇,配制成二者浓度为 10 μ g/ml 的混合

对照品溶液备用。

1.4 柴胡桂枝干姜汤供试品溶液的制备

将柴胡、黄芩、干姜、桂枝、天花粉、牡蛎、炙甘草、清半夏按照 8:3:2:3:4:10:2:2 的配比称取后,加入 8 倍量水浸泡过夜,回流提取 1 h,重复 2 次,滤过,合并滤液,100 $^{\circ}$ C 下常压浓缩得到浸膏,出膏率为 33.77%。精密称取浸膏 2.45 g,加入 24.5 ml 20% 甲醇溶解,超声处理(500 W, 40 kHz) 30 min,放冷,摇匀,提取液于 3 000 r/min 离心 10 min,取上层溶液于 1.5 ml 离心管中,于 14 500 r/min 离心 10 min,静置 10 min 后,再次取上清液 14 500 r/min 离心 10 min,吸取上清液 150 μ l 于进样小瓶中待分析。

1.5 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 18 只,体重为 200~220 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(苏)2021-0013。饲养环境温度 20~24 $^{\circ}$ C,湿度 50%~70%,12 h 光照与黑暗交替循环,自由饮食进水。适应性喂养 1 周后,随机分为正常组(6 只)、模型组(6 只)与给药组(6 只)。除正常组外,其余两组大鼠每日饮用 0.02% 氨水、每周 5 次 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液灌胃、饥饿交替饮食(禁食 1 d,饱食 2 d),连续给予 10 周。最后 4 周内,给药组每日给予柴胡桂枝干姜汤 36.72 g/kg(相当于人体等效剂量的 4 倍)灌胃,正常组大鼠每日给予同体积生理盐水灌胃。末次给药后,分别于第 0.5、1、2、4、8 h 进行眼眶取血,取 1.0 ml 置于抗凝管中,于 4 $^{\circ}$ C 下 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液,将不同组别血浆分装,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;同时取不同组别大鼠胃组织置于多聚甲醛中固定,待后续免疫组化分析。

1.6 血浆样本供试品溶液的制备

将同一只大鼠不同时间点的血浆各取 50 μ l 混合,加入 4 倍体积(含 200 ng/ml 华法林)甲醇溶液,涡旋振荡 3 min,4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液后继续在 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,置于冷冻干燥机中冻干。残渣用 130 μ l 80% 甲醇溶液复溶,涡旋振荡 3 min,在 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 条件下继续离心 10 min,收集上清液至进样小瓶待进样分析。

1.7 色谱与质谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m);柱温为 35 $^{\circ}$ C;流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~15 min, 5%~22%B; 15~20 min, 22%~24%B;

20 ~ 28 min, 24% ~ 40%B; 28 ~ 47 min, 40% ~ 95%B; 47 ~ 50 min, 95%B); 流速为 0.3 ml/min; 检测波长为 254、280、360 nm; 进样量 3 μ l。

电喷雾离子源(ESI), 分别在正、负离子模式下采集数据; 离子源温度 350 $^{\circ}$ C; 毛细管电压分别为 3.5 kV(正离子)和 4.0 kV(负离子); 雾化气压力 45 Psi; 干燥气流速 11 L/min; 鞘气流速 11 L/min; 鞘气温度 350 $^{\circ}$ C; 碎片电压 140 V。

1.8 化学成分筛选与鉴定

通过中国知网(CNKI)、重庆维普、PubMed、Web of Science 等数据库查阅国内外最新文献, 采集柴胡桂枝干姜汤组方 8 种药材的化学成分信息, 构建各单味药材及柴胡桂枝干姜汤化学成分数据库。利用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0、MSdial 4.70 及 MSfinder 3.60 等软件, 结合相关标准品二级碎片信息、相关文献及公共数据库 Massbank、PubChem 及 HMDB 的一、二级离子碎片信息对化学成分进行分析鉴定, 筛选出质量数匹配容差 $\leq \pm 8$ ppm 的化学成分, 并对其来源药材进行归属。同样的, 以体外成分分析结果为数据库, 对其入血原型成分进行识别。

1.9 网络药理学分析

1.9.1 入血成分与疾病潜在作用靶点的筛选

通过 PubChem 网站获取已鉴定的柴胡桂枝干姜汤入血化学成分的分子结构式与 Canonical SMILES 号, 导入 SwissTargetPrediction 网站^[5], 获取其作用的靶点信息, 并与 Uniprot 网站比对获取其基因信息^[6]。分别在 OMIM、DrugBank、GeneCard、DisGeNet 网站以“Chronic Gastritis”为关键词, 搜索整理疾病相关靶点^[7-9]。在线绘制韦恩图, 输入成分作用靶点与疾病相关靶点, 获取交集靶点。

1.9.2 PPI 网络互作图的构建

将获取到的交集靶点导入 STRING 12.0 数据库, Organisms 选择“Homo sapiens”, 最低要求交互分数设为 0.4, 生成靶点蛋白间相互作用的关系网络, 导出数据后使用 Cytoscape v3.9.1 软件, 计算其度值, 按照度值大小, 构建 PPI 网络互作图^[10]。

1.9.3 GO 生物富集分析及 KEGG 通路分析

将交集靶点导入 DAVID 在线数据库进行 GO 生物富集分析及 KEGG 通路分析, 物种选择为“Homo sapiens”, Select Identifier 选择为“Official_Gene_Symbol”, 将结果按照 P 值大小进行排序, 选取 $P < 0.05$ 的前 10 条通路进行可视化处理^[11]。

1.9.4 疾病-成分-靶点-通路网络图的构建

将上述结果导入 Cytoscape v3.9.1, 构建“疾病-

成分-靶点-通路”网络关系可视化图。

1.10 靶点验证

应用免疫组化方法对上述靶点进行验证。将胃组织切片依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中浸泡 15 min, 而后依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、85% 乙醇和 75% 乙醇中浸泡 5 min, 最后用蒸馏水洗将石蜡切片脱蜡, 高温修复抗原。加入 3% 的过氧化氢溶液, 室温避光孵育 25 min, 加入 3% 的牛血清进行封闭。分别加入一抗 TNF- α 、IL-6、STAT3 和 PTGS2, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗覆盖组织, 室温孵育 50 min。经 DAB 显色、细胞核复染、脱水封片后进行显微镜镜检, 图像采集分析。

2 结果

2.1 基于的柴胡桂枝干姜汤入血成分表征

按“1.8”项下方法, 在柴胡桂枝干姜汤中共表征出 248 种化学成分。在此基础上, 通过比较含药大鼠血浆、体外成分以及空白大鼠血浆, 进一步确定了柴胡桂枝干姜汤的 24 种入血原型成分, 其中 2 种经过对照品比对, 主要包含黄酮苷类 11 种, 脂肪酸类 3 种, 有机酸类 3 种, 姜辣素类 2 种, 黄酮类 2 种, 脂肪醛类、三萜类及氨基酸类各 1 种, 其具体信息参见表 1。总离子流图及入血成分提取离子流图见图 1。

2.2 基于网络药理学对柴胡桂枝干姜汤治疗 CNAG 的作用机制预测

2.2.1 柴胡桂枝干姜汤的潜在作用靶点

按“1.9.1”项下方法, 分别获得成分靶点 405 个, 疾病相关靶点 328 个。将二者取交集, 得到 23 个交集靶点, 如图 2 所示。

2.2.2 PPI 网络构建

经过“1.9.2”项下方法分析 23 个交集靶点, 去除游离节点(GPR35)后, 得到 22 个蛋白节点和 99 条相互作用连线, 平均度值 8.61。导入 Cytoscape 可视化, 度值大则节点大且色深, 最终筛选出肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)、信号转导和转录激活剂 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、前列腺素 G/H 合酶 2(prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase, PTGS2)4 个核心靶点, 详见图 3。

2.2.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 数据库, 对 23 个交集靶点进行了 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。在 $P < 0.05$ 条件下, 筛选出 48 条 GO 功能结果: 生物进程

表 1 柴胡桂枝干姜汤入血原型成分分析

编号	RT(<i>t</i> /min)	<i>m/z</i>	理论分子量	分子式	离子模式	MS/MS	误差(ppm)	名称	类别
B1	0.973	118.085 7 116.071 0	117.079 0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	58.065 4, 72.080 9	-4.74 -5.65	缬氨酸	氨基酸类
B2*	1.508	215.015 8 191.018 9	192.027 0	C ₆ H ₈ O ₇	[M+Na] ⁺ [M-H] ⁻	85.028 2 111.007 7	-1.26 -3.92	柠檬酸	有机酸类
B3	2.678	231.078 4	192.115 0	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	[M+K] ⁺	127.039 3, 149.899 7	1.62	4-(1-甲基乙基)苯甲醇乙酸酯	有机酸类
B4	6.645	165.055 0	166.063 0	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	91.914 5, 103.920 7	-3.98	阿卓乳酸	有机酸类
B5	11.509	568.202 8	550.168 6	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	[M+NH ₄] ⁺	116.070 0, 175.118 3, 217.081 5, 403.228 4	3.64	芹糖甘草苷	黄酮苷类
B6	13.018	549.160 9 547.145 8	548.153 0	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	237.993 4 520.907 8	0.45 -0.93	白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷同分异构体	黄酮苷类
B7	21.096	447.092 2 445.075 6	446.084 9	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	271.060 7 267.044 7	-0.31 -4.00	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B8	21.169	433.113 4	432.105 6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	271.062 1	1.21	木蝴蝶苷A	黄酮苷类
B9	21.464	314.232 4	296.198 8	C ₁₇ H ₂₈ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	127.123 1	-0.63	6-姜二醇	姜辣素类
B10	21.585	461.108 1 459.092 4	460.100 6	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	270.053 3, 285.075 9 268.037 4, 283.062 7	0.02 -2.58	千层纸素A-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B11	21.799	447.092 3 445.075 9	446.084 9	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	271.059 3 269.046 5	-0.30 -2.28	黄芩素-6- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B12	22.976	477.103 5 475.087 2	476.095 5	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	301.071 4 284.031 3, 299.055 5	0.88 -1.89	高黄芩-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B13	23.434	447.093 0 445.076 4	446.084 9	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	271.061 1 269.044 4	1.59 -2.63	去甲汉黄芩素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B14*	23.530	461.108 7 459.091 8	460.100 6	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	285.076 6 268.036 4, 283.060 2	1.69 -2.29	汉黄芩苷	黄酮苷类
B15	23.824	449.107 8	448.100 6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	271.060 7	-1.07	槲皮苷	黄酮苷类
B16	24.858	491.120 2	490.111 1	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	315.089 3	3.30	5,7-二羟基-8,2'-二甲氧基黄芩-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	黄酮苷类
B17	29.363	353.230 9	330.240 6	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M+Na] ⁺	109.100 4	-0.11	松油酸	脂肪酸类
B18	29.920	285.076 2	284.068 5	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	270.052 2	2.31	芫花素	黄酮类
B19	30.079	315.086 9	314.079 0	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	285.040 5	2.01	黄芩黄酮 I	黄酮类
B20	31.364	293.174 9	294.183 1	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M-H] ⁻	68.995 7, 177.089 7	-2.97	6-姜酚	姜辣素类
B21	37.594	298.274 0	280.240 2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺		-1.11	亚油酸	脂肪酸类
B22	39.448	471.346 8 469.330 8	470.339 6	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	121.096 5, 235.169 6 225.924 4	-0.51 -3.47	甘草次酸	三萜类
B23	45.358	284.294 9	266.261 0	C ₁₈ H ₃₄ O	[M+NH ₄] ⁺	83.086 0, 95.085 7	0.88	9-十八烯醛	脂肪醛类
B24	46.217	281.249 1	282.255 9	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻		1.43	油酸	脂肪酸类

注：“*”表示经过对照品比对鉴定的化学成分。

(biological process, BP)24 条,如炎症反应、对异生素刺激的反应等;细胞组分(cell component, CC)9 条,如细胞质、质膜等;分子功能(molecular function, MF)15 条,如酶结合、血红素结合等(图 4)。同时,富集到 27 条 KEGG 通路,涉及癌症途径、IL-17 信号通路等(图 5)。

2.2.4 “疾病-成分-靶点-通路”网络图

将上述 24 种化学成分,23 个交集靶点及 20 条 KEGG 通路导入 Cytoscape 进行可视化处理,共得到 64 个节点,233 条边。度值大则节点大且色深,具体结果见图 6。

2.3 大鼠胃组织免疫组化结果

通过免疫组化对网络药理学分析的结果进行进一步的验证,如图 7 所示,模型组大鼠胃组织中

TNF、IL-6、STAT3 及 PTGS2 表达较正常组显著升高,经 CGGD 治疗后表达降低。

3 讨论

柴胡桂枝干姜汤源自小柴胡汤,关于其所主病机的探讨众说纷纭,譬如少阳病兼汗下津伤、少阳病兼表邪未解等^[12]。自刘渡舟提出其病机核心为“胆热脾寒”后,逐渐被大多数医者所认可。在此基础上,众多医者应用柴胡桂枝干姜汤治疗消化系统疾病特别是 CNAG,均取得了满意的疗效^[13]。柴胡和黄芩作为方中君药,柴胡畅气散火,黄芩清热燥湿、泻火解毒,二者合力和解少阳,对抗“胆热”。干姜和桂枝作为臣药,可以温中散寒,共解“脾寒”^[14]。

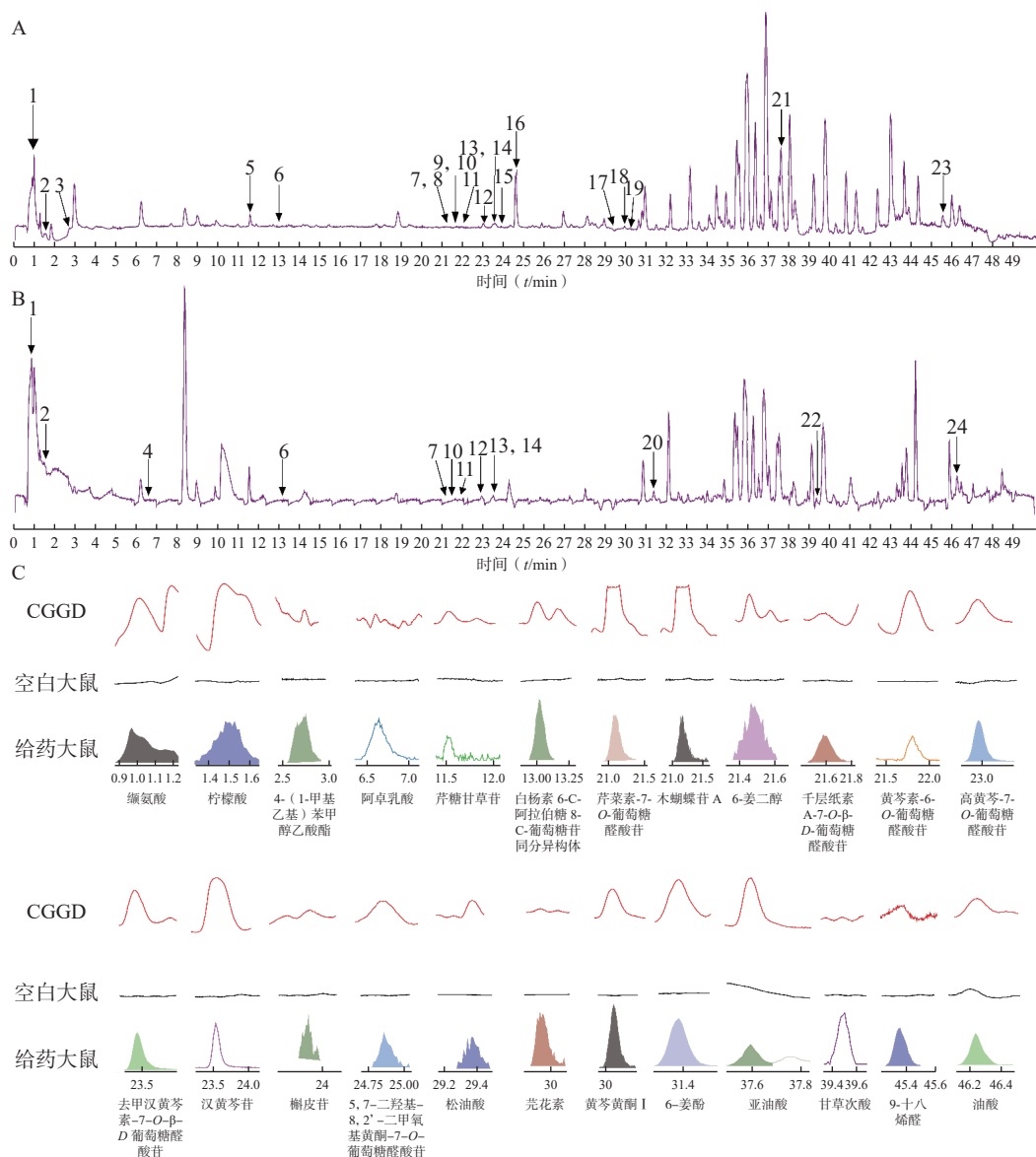


图 1 柴胡桂枝干姜汤含药血浆的总离子流图及入血成分的离子流图
A. 正离子模式; B. 负离子模式; C. 入血成分离子流图

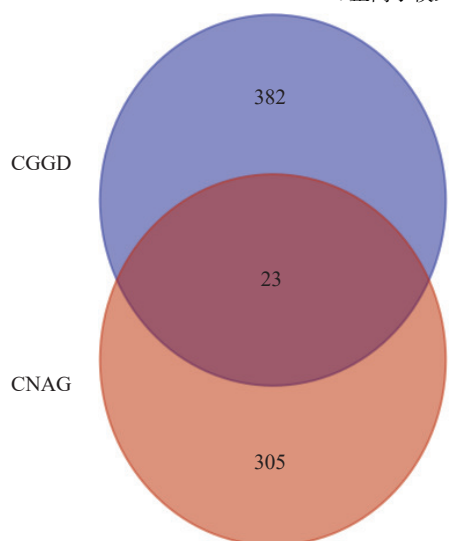


图 2 柴胡桂枝干姜汤 (CGGD) 与慢性非萎缩性胃炎 (CNAG) 的交集靶点韦恩图

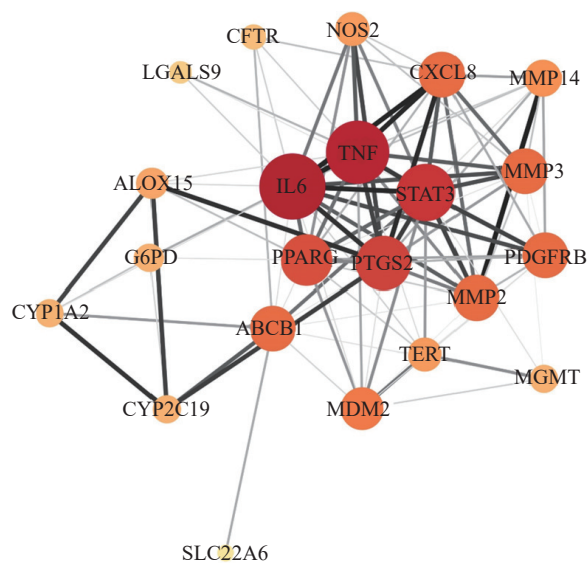


图 3 交集靶点蛋白相互作用关系网络图

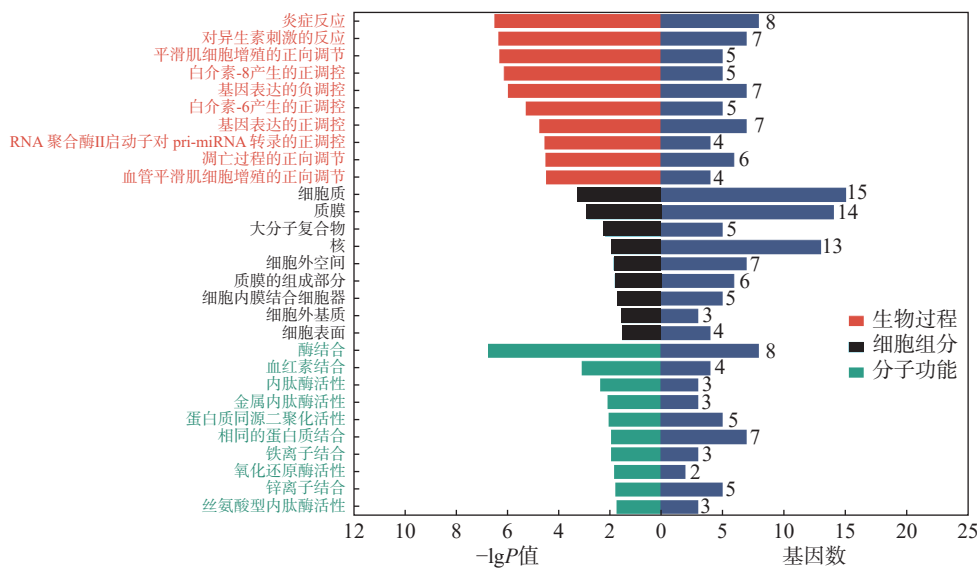


图 4 GO 生物富集分析结果

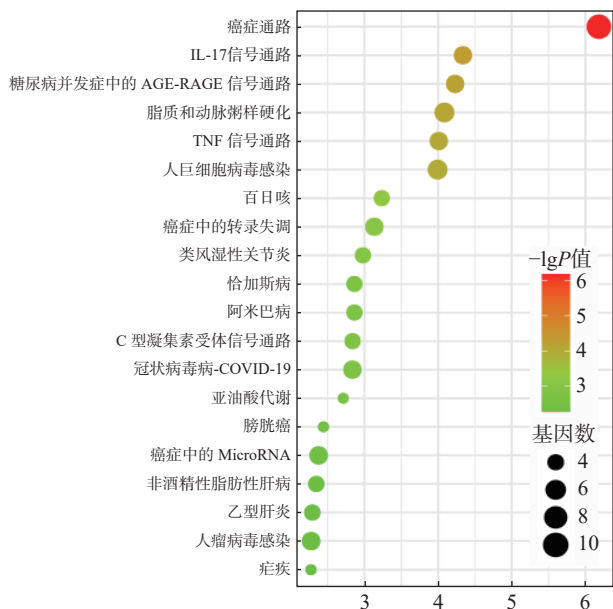


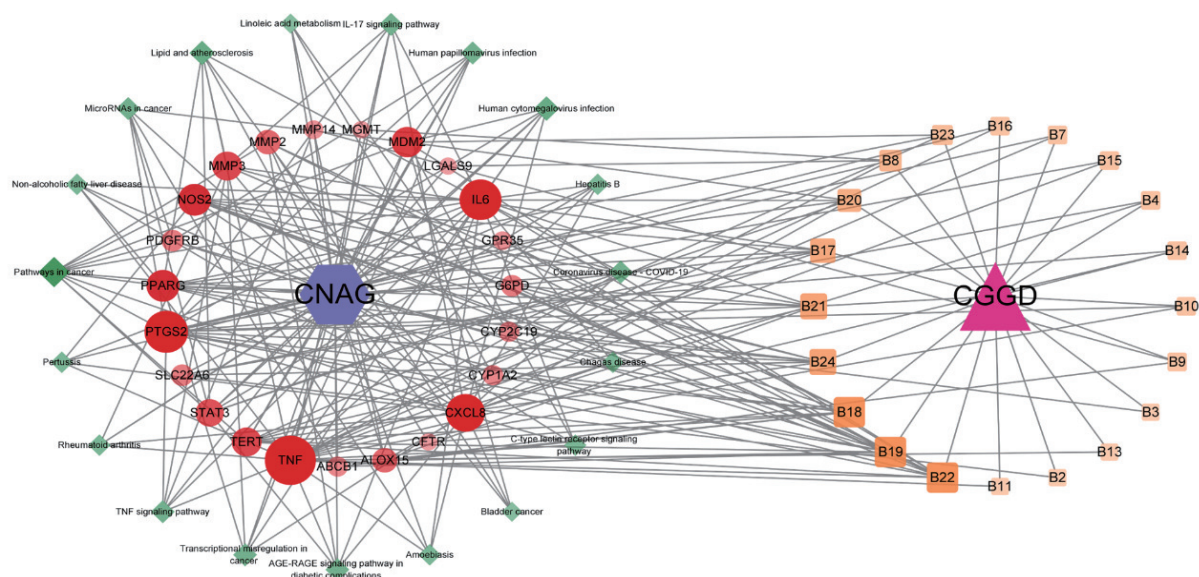
图 5 KEGG 通路富集分析结果

为了深入探究该方治疗胆热脾寒型 CNAG 的物质基础,本研究首次采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术,鉴定出其 248 种体外化学成分及 24 种入血原型成分。在单体分子方面,槲皮苷通过多种机制发挥胃保护作用,如缓解炎症、减轻胃蛋白酶及胃酸分泌等;芫花素作为新兴化合物,能抑制活性氧(ROS)及促炎物质(如 IFN- γ 等)的产生,这些都有助于黄芩的清“热”作用^[15-16]。6-姜酚是干姜中的高药理活性成分之一,已证实具有抗肿瘤、抗增殖、抗侵袭和抗炎作用,涉及到 Bax/Bcl2、p38/MAPK、Nrf2、TNF- α 、ERK1/2、SAPK/JNK、ROS/NF- κ B/COX-2 等等;同时,它还能改善大鼠胰岛素抵抗及异位脂质沉积,进而改善能量代谢,这可能是干姜抗“寒”

作用的机制之一^[17-18]。炙甘草虽为使药,其化学成分亦具有多种药理活性,如甘草次酸通过 PI3K/AKT 途径发挥抗炎作用并能够抑制磷脂酶 A2^[19-20]。同时,甘草次酸还常作为局部抗炎剂使用^[21]。

网络药理学结果进一步表明,柴胡桂枝干姜汤的主要作用靶点包括 TNF、IL-6、STAT3 和 PTGS2。TNF,由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白,存在 TNF- α 和 TNF- β 两种亚型。TNF- α 和 IL-6 是经典的促炎因子,其中 TNF- α 诱导多种信号,主要通过 NF- κ B 调节的蛋白发挥促炎作用,激活产生 IL-6 的转录因子,并能自诱导其表达^[22-23]。TNF- α 与 IL-6 的过度表达会增加慢性胃炎的风险,且胃炎治愈后其表达受抑。不仅仅是 TNF- α ,在慢性胃炎大鼠中,TNF- β 表达也升高^[24]。STAT3 磷酸化及其相关通路的持续激活促进胃黏膜肠化生^[25]。PTGS2 (即 COX-2)的表达量与幽门螺旋杆菌感染及胃黏膜炎症程度密切相关,是非甾体抗炎药的作用靶点^[26]。进一步的免疫组化结果证实,柴胡桂枝干姜汤通过调节这些靶点表达发挥治疗作用。

KEGG 通路富集分析表明,柴胡桂枝干姜汤治疗 CNAG 的交集靶点主要集中在 IL-17、AGE-RAGE、C 型凝集素受体和亚油酸代谢等通路。IL-17 信号通路除激活 NF- κ B 及 MAPK 通路增强炎症反应外,还可维持黏膜免疫和屏障完整性促进消化道上皮的修复^[27-28]。AGE-RAGE 通路被认为与慢性炎症反应与氧化应激相关,可通过 PI3K/AKT、JAK/STAT 通路等诱导细胞损伤^[29]。C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)调节细胞、发育、稳态和免疫反应,能激活 NLRP3、NLRC4 或者 caspase 8 炎症小体,导致 IL-1 β 的产生^[30]。亚油酸



注: 方形为入血成分, 圆形为作用靶点, 菱形为 KEGG 通路; CNAG: 慢性非萎缩性胃炎, CGGD: 柴胡桂枝干姜汤。

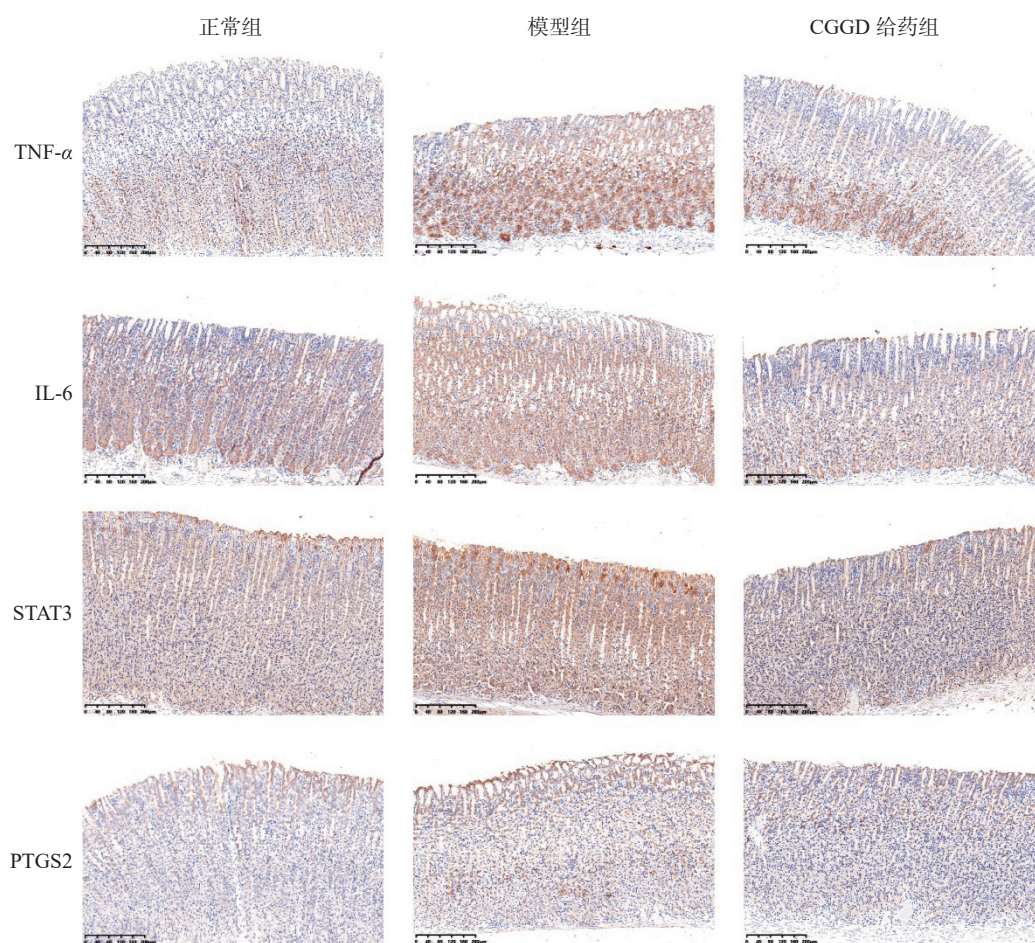


图7 柴胡桂枝干姜汤对 CNAG 大鼠胃组织 TNF- α 、IL-6、STAT3 及 PTGS2 的影响 (免疫组织化学, 10 \times)

IL-6 和 MCP-1 的产生, 保护组织免受活性氧的破坏^[31]。

综上所述,本研究首次采用 UHPLC-Q-TOF/MS

技术对柴胡桂枝干姜汤的化学成分及入血成分进行了表征,揭示其疗效的物质基础。结合网络药理学,深入探讨了该方剂在治疗 CNAG 的疗效机制,为其进一步研究提供了科学依据和理论支撑。然而,柴胡作为该方的主要药材,可能受到体内吸收及代谢的影响,其原型入血成分即使通过对照品进行比对也未能找出,推想极有可能生成新的代谢物来发挥作用,也为后续研究开辟了新的探索空间。

【参考文献】

- [1] DU Y, BAI Y, XIE P, et al. Chronic gastritis in China: a national multi-center survey[J]. *BMC Gastroenterol*, 2014;14: 21.
- [2] 李云虎, 田凤艳, 王春勇, 等. 85 例柴胡桂枝干姜汤病例资料回顾性分析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(6): 944-947.
- [3] 李陆军, 陶永梅. 柴胡桂枝干姜汤现代临床应用 [J]. *中医药学报*, 2015, 43(3): 140-3.
- [4] 毛奕懿, 张淑文, 安世栋, 等. 从“肝热脾寒”运用柴胡桂枝干姜汤经验探析 [J]. *天津中医药*, 2023, 40(04): 427-430.
- [5] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [6] CONSORTIUM U. UniProt: the universal protein knowledge-base in 2021[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [7] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM. org: online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [8] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [9] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [10] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [11] SHERMAN B T, HAO M, QIU J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists(2021 update)[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [12] 曾天玉, 郭玉红, 刘清泉. 刘清泉应用柴胡桂枝干姜汤临床经验 [J]. *北京中医药*, 2021, 40(11): 1207-1208.
- [13] 梁曼青, 刘万里, 苏坤涵, 等. 柴胡桂枝干姜汤治疗消化系统疾病的临床研究概况 [J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39(2): 189-193.
- [14] 张慈安, 刘焯, 岳小强. 柴胡桂枝干姜汤在消化系统疾病中应用举隅 [J]. *浙江中医杂志*, 2023, 58(9): 695-696.
- [15] CHEN J R, LI G M, SUN C, et al. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of quercitrin[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(4): 1545-1575.
- [16] EL MENYIY N, ABOULAGHRAS S, BAKRIM S, et al. Genkwanin: an emerging natural compound with multifaceted pharmacological effects[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115159.
- [17] DE LIMA R M T, DOS REIS A C, DE MENEZES A A P M, et al. Protective and therapeutic potential of ginger(*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: a comprehensive review[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(10): 1885-1907.
- [18] 詹权操, 刘宇哲, 席雨蒙, 等. 6-姜辣素改善老年大鼠脂肪组织胰岛素抵抗的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(6): 1642-1649.
- [19] TU B R, LIANG J F, OU Y, et al. Novel 18 β -glycyrrhetic acid derivatives as a Two-in-One agent with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 122: 105714.
- [20] ASL M N, HOSSEINZADEH H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 709-724.
- [21] KOWALSKA A, KALINOWSKA-LIS U. 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2019, 41(4): 325-331.
- [22] AGGARWAL B B, GUPTA S C, KIM J H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 651-665.
- [23] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.
- [24] TONG Y L, WANG R L, LIU X, et al. Zuojin Pill ameliorates chronic atrophic gastritis induced by MNNG through TGF- β 1/PI3K/Akt axis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113893.
- [25] JIN D C, HUANG K T, XU M, et al. Deoxycholic acid induces gastric intestinal metaplasia by activating STAT3 signaling and disturbing gastric bile acids metabolism and microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2120744.
- [26] PARK H S, WIJERATHNE C U B, JEONG H Y, et al. Gastro-protective effects of Hwanglyeonhaedok-Tang against *Helicobacter pylori*-induced gastric cell injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216: 239-250.
- [27] AMATYA N, GARG A V, GAFFEN S L. IL-17 signaling: the Yin and the Yang[J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(5): 310-322.
- [28] LI X X, BECHARA R, ZHAO J J, et al. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1594-1602.
- [29] SHEN C Y, LU C H, WU C H, et al. The development of Maillard reaction, and advanced glycation end product(AGE)-receptor for AGE(RAGE)signaling inhibitors as novel therapeutic strategies for patients with AGE-related diseases[J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5591.
- [30] BROWN G D, WILLMENT J A, WHITEHEAD L. C-type lectins in immunity and homeostasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(6): 374-389.
- [31] VILLACORTA L, MINARRIETA L, SALVATORE S R, et al. *In situ* generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 522-531.

【收稿日期】 2023-12-23 【修回日期】 2024-06-03

【本文编辑】 李睿旻