

引用:邓丹萍,谢天喜,刘向儒,等.基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS整合网络药理学探讨三仁汤治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用机制[J].陕西中医药大学学报,2023,46(5):39-47.

基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 整合网络药理学探讨三仁汤治疗新型 冠状病毒肺炎的潜在作用机制^{*}

邓丹萍¹ 谢天喜^{1**} 刘向儒¹ 孙志² 薛连平¹ 周胜楠²
何平¹ 曾祥嵩¹ 唐晓涛¹ 方艳琳¹ 陈路军¹ 彭小飞¹

(1.郴州市中医医院,湖南 郴州 423000;2.郑州大学第一附属医院,河南 郑州 450052)

摘要:目的 通过 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术明确经典名方三仁汤中的主要化学成分,并通过网络药理学进一步探讨其治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制。方法 根据 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术得到的二级质谱裂解碎片信息,对三仁汤进行分析鉴定。在 PubChem 数据库中下载质谱定性分析出的化合物的 2D 结构,导入 Swiss ADME 平台进行初步筛选,并借助 Swiss Target Prediction 数据库寻找三仁汤潜在作用靶点。通过 Gene Cards 数据库检索与新型冠状病毒肺炎(Corona virus disease 2019,COVID-19)相关的疾病靶点。使用 Draw Venn Diagram 网站,获取三仁汤和 COVID-19 共同作用的靶点。使用 STRING 数据库构建共同靶点互作网络(PPI),Cytoscape 3.7.2 软件构建三仁汤“中药-活性成分-靶点-疾病”网络图。最后通过 Metascape 平台对三仁汤治疗 COVID-19 相关靶点进行 KEGG 和 GO 富集分析。结果 通过质谱法从三仁汤 8 味中药中鉴定了 37 种化学成分。进一步筛选出 22 个活性成分,将三仁汤的 533 个潜在作用靶点与 COVID-19 的 482 个 COVID-19 靶点基因的靶点进行交集,得到了 58 个共同靶点,其中出现频次较高的有 AVEGFA、EGFR、IL-6、AKT1、JUN、ICAM1 等。通过 GO 富集分析得到了 551 条($P < 0.05$)信号通路,KEGG 富集分析得到了 118 条($P < 0.05$)信号通路,其基因数目在与炎症反应及肺损伤保护相关的多条通路上富集较多,与冠状病毒、SARS-CoV-2、人巨细胞病毒、甲型流感、乙型肝炎病毒感染相关。结论 本研究基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对三仁汤的成分进行系统分析,能够充分表征三仁汤的药效物质;三仁汤可通过多靶点、多通路达到对新型冠状病毒肺炎的治疗作用。

关键词:新型冠状病毒肺炎(COVID-19);三仁汤;UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术;网络药理学

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2023)05-0039-09

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2023.05.007

截至 2022 年 7 月 20 日,全球新型冠状病毒肺炎(Corona virus disease 2019,COVID-19)确诊病例累计已超过 5.6267 亿例,死亡病例累计超 636.8 万例,全球疫情仍处于高位,病毒还在不断变异,对全球人民健康生命造成了极大的威胁^[1]。新型冠状病毒传播速度快、传染性强,可经呼吸道飞沫和密切接触传播^[2]。中医在这场防治疫情的战争中发挥着积极作用,在全国抗疫的全链条、全过程、全周期的不同阶段都取得了成效^[3]。

新型冠状病毒肺炎属于中医疫病范畴,以人

群普遍易感、聚集性发病、症状类似等为特点,多为轻型和普通型。国家卫健委和中医药管理局在《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第九版)》^[4]中将 COVID-19 轻型分为寒湿郁肺、湿热蕴肺,普通型分为湿毒郁肺、寒湿阻肺、疫毒夹燥,病因病机指导“湿邪”为患。吴鞠通在《温病条辨》云^[5]：“头痛恶寒，身重疼痛，舌白不渴，脉弦细而濡，面色淡黄，胸闷不饥，午后身热，状若阴虚，病难速已，名曰湿温。汗之则神昏耳聋，甚则目瞑不欲言，下之则洞泄，润之则病深不解，长夏深秋冬

^{*} 基金项目:郴州市重点研发及技术创新专项项目(ZDYF2020189)

^{**} 通讯作者:谢天喜,副主任医师。E-Mail:2022742608@qq.com

日同法,三仁汤主之。”

郴州市中医医院(以下简称我院)第一时间与郴州市定点医院组成中医协同救治小组,对湘南地区确诊的40例病人均采取中医药协同治疗,其中34例病人使用三仁汤,均已治愈出院,无重症^[6]。三仁汤由薏苡仁、苦杏仁、白豆蔻、厚朴、滑石、通草、淡竹叶、法半夏8味中药组成,治疗湿温病初起,邪在气分,湿重于热,以上焦为中心而弥漫三焦、郁阻表里之证,治法为宣畅气机、清热利湿。

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术集液相色谱的高分离能力与质谱的高灵敏度,强专属性于一体,近年来广泛用于药物成分的分析,该法可获得更详细的分子结构信息,使药物微量成分的分析成为可能^[7]。UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术可以快速识别复杂方剂中的各类化学成分,对进一步的药效学和药动力学研究具有重要意义^[8]。网络药理学^[9]基于系统生物学的理论,构建“多成分-多靶点-多途径”的中药网络,对揭示中药复方的潜在作用机制具有巨大贡献。

目前新型冠状病毒3CL水解酶和ACE2已为药物开发的热点靶标^[10-11]。本研究在三仁汤的临床实效性基础上,使用UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术鉴定三仁汤的化学成分,再经网络药理学研究,探索三仁汤治疗COVID-19的潜在作用机制,为该复方治疗新型冠状病毒肺炎提供理论支撑。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UHPLC-Q-Orbitrap液相色谱-质谱联用系统;Ultimate 3000超高效液相色谱仪(美国Dionex公司);Q Exactive型高分辨质谱(美国Thermo Fisher Scientific公司);AL104型万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo上海有限公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂 药材为三仁汤:参照吴鞠通《温病条辨》^[5]原方比例,组成为苦杏仁15 g,厚朴6 g,滑石18 g,白豆蔻6 g,通草6 g,淡竹叶6 g,薏苡仁18 g,法半夏15 g(以上药物购自华润三九郑州公司);试剂包括甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(产自美国Fisher公司)。

2 实验方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC® BEH

C₁₈柱(2.1×100 mm,1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A),乙腈(B);梯度程序为:0~4.0 min,5% B;4.0~51 min,5% B~100% B;51~56 min,100% B;56~56.2 min,100% B~5% B;56.2 min~60 min,5% B。柱温40℃,进样器温度4℃,进样量5 μL,流速0.2 mL·min⁻¹。

2.1.2 质谱条件 采用UHPLC-Q-Exactive液质联用仪进行样品分析,离子源为HESI源(heated ESI),离子传输管温度320℃,辅助气温度为300℃,鞘气、辅助气的体积流量分别为45、15 μL·min⁻¹;检测方式采用正负离子Full MS/dd-MS²模式,其中一级全扫描的分辨率为70000 FWHM,数据依赖的二级扫描分辨率为17500 FWHM,碰撞能梯度为20、40、60 eV,质荷比窗口宽度设置为2,质量扫描范围80~1200 m/z。

2.2 供试品溶液的制备 取三仁汤0.5 g溶于20 mL甲醇,超声提取20 min,4°离心机6000 r/min,离心10 min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过,待用。

2.3 化合物结构分析 根据“2.1”下的色谱、质谱条件进样,根据高分辨质谱提供的准分子、离子和加荷离子信息推测得到化合物的精确相对分子质量,用Xcalibur 4.0软件对分子式进行初步拟合,再根据质谱提供的保留时间以及碎片离子信息,对样品中化学成分进行准确识别。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 三仁汤活性成分及靶点的筛选 在PubChem数据库中下载质谱法定性得到的37个化合物的2D结构,导入Swiss ADME网站进行筛选,通过筛选的化合物在Swiss Target Prediction平台预测潜在靶点。

2.4.2 新型冠状病毒肺炎相关靶点的筛选 基于Gene Cards数据库,以“COVID-19”为关键词,获取COVID-19相关的疾病靶点。

2.4.3 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络的构建

将上述得到的药物靶点和疾病靶点各自删除重复后,在Draw Venn Diagram网站生成韦恩图,得到三仁汤和COVID-19共同作用的靶点。将三仁汤的活性成分设为drug,COVID-19设为disease,上述得到的交集基因设为gene,建立Network和Type文件,并分别导入到Cytoscape 3.7.2软件中构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。

2.4.4 PPI 网络的构建 将上述得到的共有靶点导入 STRING(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)数据库构建 PPI 网络,蛋白种属为“homo sapiens”,置信度为 0.4,其他参数不变,得到蛋白相互作用关系的网络图,下载 TSV 格式。将该 TSV 文件导入到 Cytoscape 3.7.2 软件,并使用 cytoHubba 功能进行拓扑分析,获得核心靶点的 PPI 网络图。

2.4.5 GO 与 KEGG 富集分析 将三仁汤防治 COVID-19 的交集靶点上传到 Metascape 平台中进行 GO 和 KEGG 富集分析,设定参考值 $P < 0.05$ 、富集因子 > 1.5 、最小计数值为 3。最后在微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)网站进行 GO 和 KEGG 富集分析可视化。

3 结果

3.1 三仁汤化学成分的定性研究 采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS,按“2.1”项中的检测条件检测供试品溶液并对三仁汤中的化学成分进行分析,得到正离子模式与负离子模式下的总离子流图(TIC),结果见图 1、图 2。通过查阅中英文文献与相关数据库,收集单味药材的化学成分信息,建立本研究的化学成分数据库。使用 Xcalibur4.0 软件对供试品进行一级质谱分析,确定其分子离子峰,并结合精确相对分子质量初步拟合其分子式。在此基础上,根据二级质谱得到化合物的碎片离子信息,从三仁汤中鉴定了 37 种化学成分,见表 1。

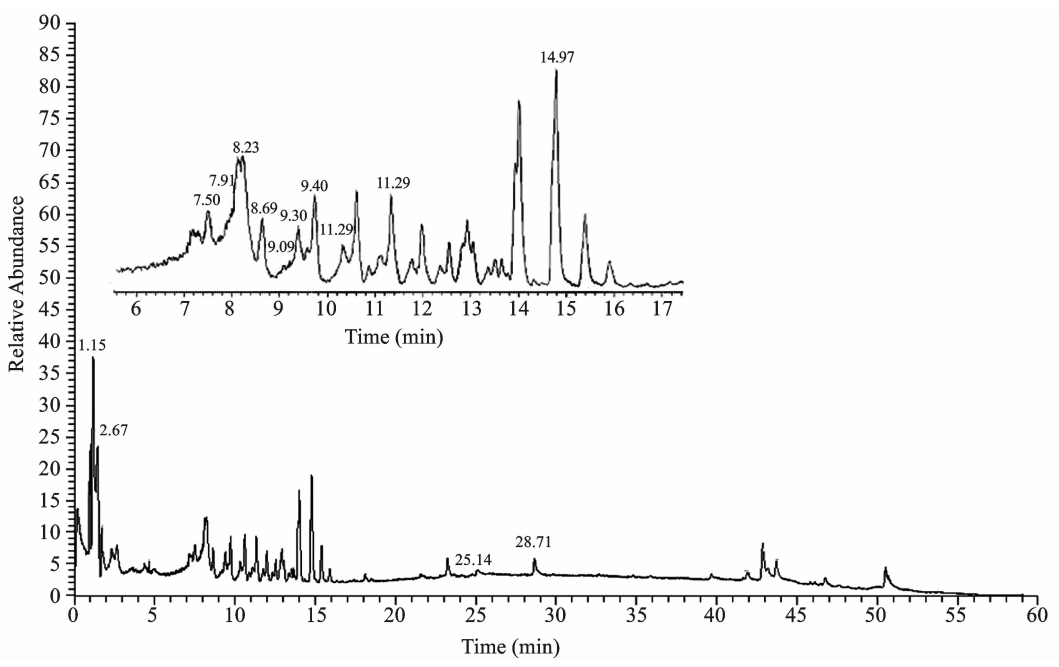


图 1 正离子模式下供试品溶液的总离子流色谱图

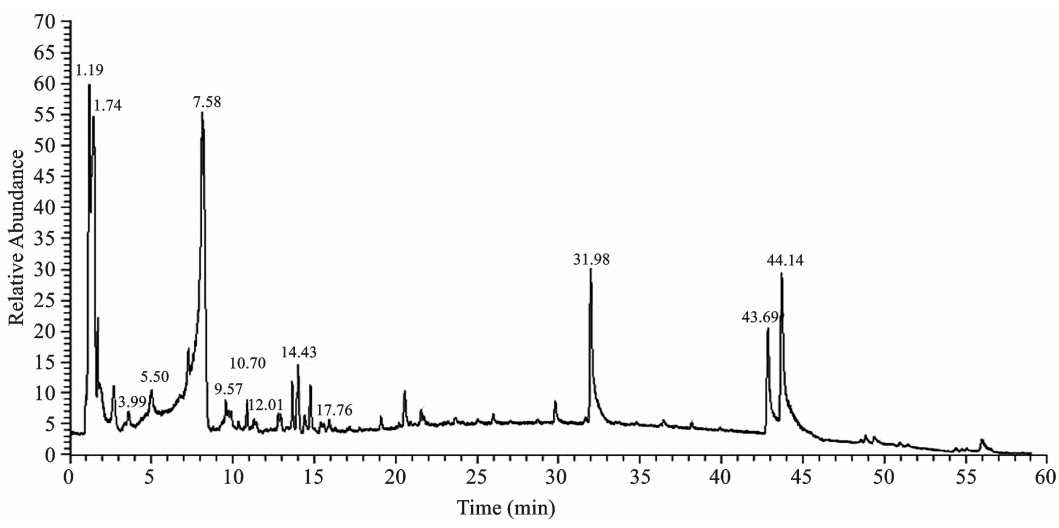


图 2 负离子模式下供试品溶液的总离子流色谱图

表 1 三仁汤 37 种化学成分质谱信息

化合物	化合物	分子式	t_R/min	模式	理论值(m/z)	实测值(m/z)	误差	碎片离子	来源
苦杏仁仁	Amygdalin	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$	8.23	P	458.16568	458.16507	1.347	$458.16[\text{M}+\text{H}]^+ , 296.11[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4]^+ , 278.10[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4-\text{H}_2\text{O}]^+ , 260.09[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4-2\text{H}_2\text{O}]^+ , 200.07[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{10}\text{H}_{30}\text{O}_4]^+ , 172.08[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_4-\text{CO}]^+$	苦杏仁
甘草苷	Liquiritin	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	17.76	N	417.11910	417.11932	3.144	$255.07[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+ , 121.03[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_7]^+$	苦杏仁
左旋千金藤碱	L-Stepholidine	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	9.09	P	328.15433	328.15424	-0.288	$328.15[\text{M}+\text{H}]^+ , 313.13[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+ , 190.09[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2]^+ , 176.07[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2]^+ , 166.09[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2-\text{CH}_3]^+ , 137.06[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}]^+$	苦杏仁
									苦杏仁
儿茶素	Gallocatechin	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	9.30	P	291.08631	291.08374	-2.575	$291.08[\text{M}+\text{H}]^+ , 139.04[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3]^+$	苦杏仁
乌药碱	Coclaurine	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	8.69	P	286.14377	286.14291	-3.005	$286[\text{M}+\text{H}]^+ , 269[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+ , 254[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_4\text{O}]^+ , 237[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{O}_2]^+ , 209[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_2]^+$	苦杏仁
没食子酸	Gallic acid	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	1.92	N	169.01424	169.01428	6.687	$169.01[\text{M}-\text{H}]^- , 125.02[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^+ , 107.01[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^- , 97.03[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$	苦杏仁
扁桃腈	Mandelonitrile	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$	2.67	P	134.06004	134.05995	-0.675	$134.06[\text{M}+\text{H}]^+ , 106.06[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{N}]^+ , 78.05[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CO}]^+$	苦杏仁
邻苯二甲酸	Phthalic acid	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$	7.58	N	165.01933	165.01895	4.332	$165.02[\text{M}-\text{H}]^- , 121.03[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^+ , 77.04[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}_2]^+$	苦杏仁
绿原酸	Chlorogenic acid	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	3.99	N	353.08780	353.08801	3.686	$353.09[\text{M}-\text{H}]^- , 191.06[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^+ , 179.04[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5]^+ , 173.05[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4]^+ , 135.05[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CO}_2]^+$	苦杏仁
4-氨基-2-甲基 喹琳尿素	4-Amino-2-methylqui- noline urea	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$	13.72	N	261.13569	261.13434	-1.005	$261.13[\text{M}-\text{H}]^- , 187.10[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}]^- , 169.09[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2]^+$	苦杏仁
									苦杏仁
光甘草定	Glabridin	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$	11.29	P	325.14343	325.14316	-0.848	$325.14[\text{M}+\text{H}]^+ , 175.08[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2]^+ , 135.04[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2]^+ , 107.05[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2-\text{CO}]^+$	苦杏仁
亚麻酸	Linolelaic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	28.71	P	279.23185	279.23148	-1.349	$279[\text{M}+\text{H}]^+ , 149[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2]^+ , 121[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2-2\text{CH}_3]^+ , 79[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2-5\text{CH}_3]^+ , 65[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2-6\text{CH}_3]^+$	苦杏仁
利卡林 B	Licanin B	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$	11.29	P	325.14343	325.14316	-0.848	$325.14[\text{M}+\text{H}]^+ , 201.09[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2]^+$	白豆蔻
桉油精	eucalyptol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	25.14	P	155.14304	155.14301	-0.205	$155.14[\text{M}+\text{H}]^+$	白豆蔻
α -蒎烯	α -Pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	25.14	P	137.13247	137.13249	0.094	$137.13[\text{M}+\text{H}]^+ , 109.10[\text{M}+\text{H}-2\text{CH}_3]^+ , 95.09[\text{M}+\text{H}-3\text{CH}_2]^+ , 81.07[\text{M}+\text{H}-4\text{CH}_2]^+$	白豆蔻
脱氢二异 丁香酚	Dehydrodisoengenol	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$	14.97	P	327.15908	327.15900	-0.262	$327.16[\text{M}+\text{H}]^+ , 295.13[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_4\text{O}]^+ , 263.11[\text{M}+\text{H}-2\text{CH}_4\text{O}]^+ , 203.11[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2]^+ , 137.06[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2]^+$	白豆蔻
									白豆蔻
棕榈酸	Palmitic acid	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	44.14	N	255.23290	255.23299	4.440	$255.23[\text{M}-\text{H}]^-$	薏苡仁
壬二酸	Azelaic acid	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	14.43	N	187.09758	187.09744	5.102	$187.10[\text{M}-\text{H}]^- , 169.09[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^- , 125.10[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^+$	薏苡仁
油酸	Oleic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	46.72	N	281.24860	281.24866	4.100	$281.25[\text{M}-\text{H}]^-$	薏苡仁

续表 1 三仁汤 37 种化学成分质谱信息

化合物	化合物	分子式	t _R /min	模式	理论值(m/z)	实测值(m/z)	误差	碎片离子	来源
亚油酸	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	43.69	N	279.23295	279.23282	3.450	279.23[M-H] ⁻	薏苡仁
对羟基苯甲酸	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	5.50	N	137.02441	137.02417	6.199	137.02[M-H] ⁻ , 119.01[M+H-H ₂ O] ⁻ , 109.03[M+H-CO] ⁻ , 93.03[M+H-CO ₂] ⁻	薏苡仁
组氨酸	L-Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	1.02	P	156.07675	156.07683	0.493	156.08[M+H] ⁺ , 110.07[M+H-CHOOH] ⁺ , 93.04[M+H-CHOOH-NH ₃] ⁺	法半夏
精氨酸	Arginine acid	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	1.23	P	175.11895	175.11903	0.444	175.12[M+H] ⁺ , 158.09[M+H-NH ₃] ⁺ , 130.10[M+H-NH ₃ -CO] ⁺	法半夏
谷氨酸	L-glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	1.14	P	148.06043	148.06038	-0.367	148.06[M+H] ⁺ , 130.05[M+H-H ₂ O] ⁺ , 102.05[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 84.04[M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ , 56.05[M+H-2H ₂ O-2CO] ⁺	法半夏
脯氨酸	Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	1.16	P	116.07060	116.07060	-0.044	98.06[M+H-H ₂ O] ⁺ , 74.02[M+H-C ₃ H ₆] ⁺ , 70.07[M+H-COOH] ⁺	法半夏
腺苷	Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.20	P	268.10403	268.10403	-0.002	136.06[M+H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁺ , 119.03[M+H-C ₃ H ₈ O ₄ -NH ₃] ⁺	法半夏
琥珀酸	Butane diacid	C ₄ H ₆ O ₄	1.74	N	117.01933	117.01917	7.989	117.02[M-H] ⁻ , 99.01[M+H-H ₂ O] ⁻ , 73.03[M+H-H ₂ O-CO] ⁻	法半夏
甜菜碱	Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.15	P	118.08625	118.08614	-0.975	118.09[M+H] ⁺ , 100.08[M+H-H ₂ O] ⁺ , 59.07[M+H-C ₂ H ₃ O ₂] ⁺	厚朴
厚朴碱	Magnocurarine	C ₁₆ H ₂₄ NO ₃ ⁺	7.50	P	314.17430	314.17560	-4.2	314.17[M+H] ⁺ , 269.12[M-C ₂ H ₇ N] ⁺ , 237.09[M-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH] ⁺ , 175.08[M-C ₂ H ₇ N-C ₆ H ₆ O] ⁺ , 107.05[M-C ₁₂ H ₁₇ NO ₂] ⁺	厚朴
厚朴苷 B	Magnolioside B	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	9.57	N	785.25096	785.25104	1.49	785.25[M-H] ⁻ , 623.22[M+H-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 477.16[M+H-C ₉ H ₆ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 161.02[M+H-C ₂₈ H ₄₀ O ₁₇] ⁻	厚朴
木兰花碱	Magnoflorine	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	9.40	P	342.16920	342.17050	-3.9	342.17[M+H] ⁺ , 297.11[M-C ₂ H ₇ N] ⁺ , 282.09[M-C ₂ H ₇ N-CH ₃] ⁺ , 265.09[M-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH] ⁺ , 237.09[M-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH-CO] ⁺	厚朴
厚朴苷 A	Magnolioside A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	13.65	N	623.19580	623.19812	1.722	623.20[M-H] ⁻ , 461.17[M+H-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 315.11[M+H-C ₉ H ₆ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 161.02[M+H-C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂] ⁻ , 135.05[M+H-C ₉ H ₆ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁻	厚朴
厚朴酚	Magnolol	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	31.98	N	265.12340	265.12341	4.163	265.12[M-H] ⁻ , 247.11[M+H-H ₂ O] ⁻ , 224.08[M+H-C ₃ H ₅] ⁻	厚朴
牡荆素	vitexin	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	12.01	N	431.09837	431.09866	3.217	431.10[M-H] ⁻ , 269.05[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	淡竹叶
红苳苳	Orientin	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	10.70	N	447.09328	447.09348	2.890	447.09[M-H] ⁻ , 429.08[M+H-H ₂ O] ⁻ , 357.06[M+H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ , 285.04[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	淡竹叶
阿魏酸奎尼酸	Feruloylquinic acid	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	7.91	P	369.11800	369.11511	-7.853	369.11[M+H] ⁺ , 177.05[M+H-C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁺ , 149.06[M+H-C ₇ H ₁₂ O ₆ -CO] ⁺ , 145.03[M+H-C ₇ H ₁₂ O ₆ -CH ₄ O] ⁺	淡竹叶
半乳糖	Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.19	N	181.07066	179.05597	5.336	179.06[M-H] ⁻ , 161.05[M+H-H ₂ O] ⁻ , 143.04[M+H-2H ₂ O] ⁻ , 89.02[M+H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ , 71.01[M+H-C ₃ H ₆ O ₃ -H ₂ O] ⁻	通草

到 Cytoscape 3.7.2 软件,并使用 cytoHubba 插件进行拓扑分析,可视化结果如图 5。节点越大,颜色

越深,越靠近中心代表 degree 值越高。

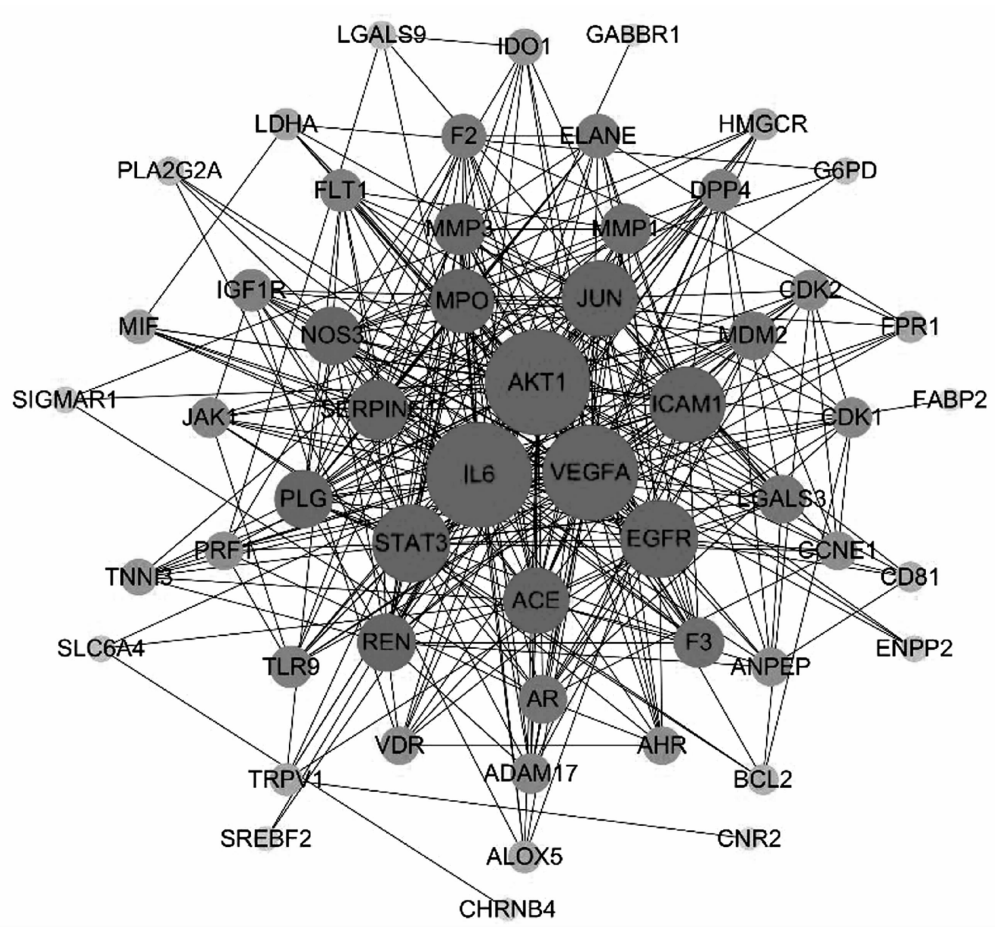


图 5 三仁汤治疗 COVID-19 的 PPI 网络图

3.2.5 三仁汤治疗 COVID-19 靶点富集分析 将三仁汤治疗 COVID-19 的 58 个相关靶点上传到 Metascape 平台中进行 KEGG 和 GO 富集分析,设定参考值 $P < 0.05$ 、富集因子 > 1.5 、最小计数值为 3。KEGG 富集分析筛选得出 118 个条目,见图 6。纵轴表示通路名称,横轴表示富集因子,气泡面积大小表示该通路上基因富集的数目。上述核心靶点参与的生物学过程主要包括 HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、基化终产物及其受体信号转导通路 (AGE-RAGE signaling pathway)、癌症信号通路 (Pathways in cancer)、抗 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、PI3K-Akt 信号转导通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、化学致癌受体激活 (Chemical carcinogenesis receptor activation)、冠状病毒疾病——COVID-

19 (Corona virus disease - COVID-19) 等。

GO 功能富集分析筛选得出 551 个条目,其中生物过程 (Biological process, BP) 条目 402 个,细胞组成 (Cellular component, CC) 条目 68 个,分子功能 (Molecular function, MF) 相关条目 81 个,分别取 BP、CC、MF 前 5 条在微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 网站进行可视化,见图 7。生物过程主要集中在 (Positive regulation of cell migration)、炎症反应 (Inflammatory response)、白细胞迁移的调节 (Regulation of leukocyte migration) 等,细胞组成主要集中在细胞外基质 (Extracellular matrix)、膜筏 (Membrane raft)、囊腔 (Vesicle lumen) 等,分子功能主要集中在肽酶的活动 (Peptidase activity)、病毒受体的活动 (Virus receptor activity) 和蛋白酶绑定 (Protease binding) 等。

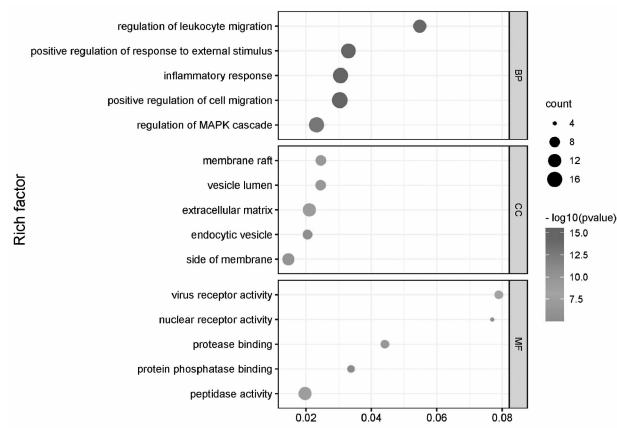


图6 三仁汤治疗 COVID-19 的核心靶点
KEGG 信号通路富集分析

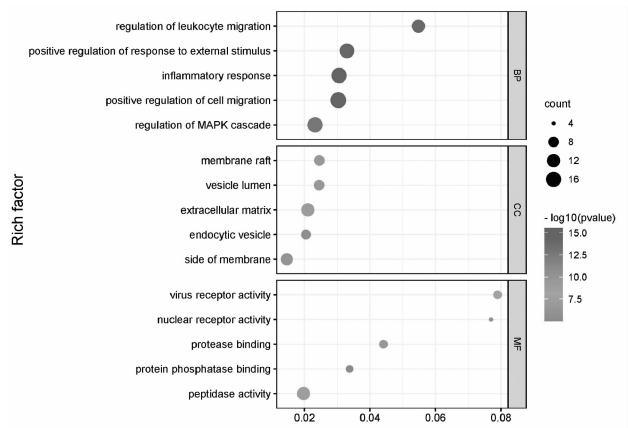


图7 三仁汤治疗 COVID-19 的核心靶点
GO 信号通路富集分析

4 讨论

此次抗击疫情过程中,中医药全程深度介入治疗,充分证明了中医药在疫情防治中的重要作用,凡是中医药参与治疗的确诊患者,治愈率高、死亡率低^[12-13]。COVID-19 起病隐匿,传变迅速,缠绵难愈。近年来,诸多文献研究本次疫病的成因为湿、毒、瘀、燥,强调“湿邪”贯穿于疾病的始终^[14-15]。三仁汤重在上中下三焦分消湿浊,辅以甘寒,化湿而不伤阴,清热而不伤中土^[16]。该方以苦杏仁之宣降开水之上源“气化则湿亦化”;豆蔻仁、厚朴、法半夏辛开苦降,温运中州,恢复脾胃升降以助运化;薏苡仁、淡竹叶、滑石、通草淡渗于下,使湿邪从小便而去^[17]。三焦同治,使湿热上下分消,肺气得以宣肃。

本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对三仁汤中的化学成分进行分析,鉴定了 37 种化学成分。采用中药网络药理学方法,将质谱法定性出 37 个化合物及靶标进行网络分析,得到 22 个化合物、533 个三仁汤潜在作用靶点。将三仁汤 533 个活性成分靶点基因与 482 个 COVID-19 靶点进行交集,得到 82 个节点:靶点 58 个,化合物 22 个,中药 1 个,疾病 1 个,225 条相互作用的边,靶点主要涉及了病毒感染、免疫调节、细胞凋亡和炎症反应等方面,其中出现频次较高的有血管内皮生长因子(AVEGFA)、表皮生长因子受体(EGFR)、白细胞介素 6(IL-6)、蛋白激酶(AKT1)、原癌基因(JUN)、细胞间黏附分子-1(ICAM1)等。VEGFA 是一种与血管和神经生成有关的神经营养因子;EGFR 与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转

移及细胞凋亡的抑制有关;IL-6 是活性较强的炎症因子,与肿瘤生长、血管形成和免疫调节等反应密切相关,且 IL-6 与肺损伤的发生发展密切相关^[18];AKT1 参与包括细胞凋亡和葡萄糖代谢在内的细胞过程,与癌症的发生有关;ICAM1 参与细胞的识别,细胞的活化和信号转导,细胞的增殖与分化,细胞的伸展与移动,与免疫应答、炎症发生、凝血、肿瘤转移以及创伤愈合等有关^[19-22]。

三仁汤对 COVID-19 的治疗通过 GO 富集分析得到了 551 条($P < 0.05$)信号通路,KEGG 富集分析得到了 118 条($P < 0.05$)信号通路。其中基因数目在与炎症反应及肺损伤保护相关的多条通路上富集较多,主要包括:HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、基化终产物及其受体信号转导通路(AGE-RAGE signaling pathway)、癌症信号通路(Pathways in cancer)、抗 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、PI3K-Akt 信号转导通路(PI3K-Akt signaling pathway)、化学致癌受体激活(Chemical carcinogenesis- receptor activation)、冠状病毒疾病——COVID-19(Corona virus disease - COVID-19)、细胞衰老(Cellular senescence)、肿瘤的转移(Transcriptional misregulation in cancer)等,与冠状病毒、SARS-CoV-2、人巨细胞病毒、甲型流感、乙型肝炎病毒感染相关。例如:HIF-1 信号通路在免疫性炎症、病毒感染、细菌感染、巨细胞代谢等炎症疾病中起重要作用^[23];抗 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂与炎症因子相关,对间质性肺病的预防和治疗提供依据^[24];PI3K-Akt 信号转导通路使细胞周期维持运行,是抑制细胞凋亡,

促进细胞生长增殖的重要因素^[25-26];冠状病毒疾病——COVID-19 则与 COVID-19 的治疗密切相关。

综上所述,本研究基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对三仁汤的成分进行系统分析,能够充分表征三仁汤的药效物质;三仁汤可通过多靶点、多通路达到对新型冠状病毒肺炎的治疗作用。

参考文献

[1] 中国国家应急广播. 世卫组织:全球新冠肺炎确诊病例超 5.6267 亿例 [EB/OL]. (2022-07-21) [2022-07-21]. http://www.cneb.gov.cn/yjxw/gjxw/20220721/t20220721_525924165.html.

[2] Siordia JA Jr. Epidemiology and clinical features of COVID-19: A review of current literature [J]. Journal of clinical virology, 2020, 127: 104357.

[3] 央视网.《焦点访谈》20220411 战“疫”中的中医药力量 [EB/OL]. (2022-04-12) [2022-05-01]. <https://tv.cctv.com/2022/04/11/VIDEnSXkQjEi16Ybjk8GF2w9220411.shtml>.

[4] 国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)的通知 [EB/OL]. [2022-03-14]. <https://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202203/b74ade1ba4494583805a3d2e40093d88.shtml>.

[5] 吴塘. 温病条辨 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2012: 54.

[6] 邓丹萍, 陈路军. 基于三焦气化理论辨证运用三仁汤对新型冠状病毒肺炎的应用分析 [J]. 辽宁中医, 2020, 47 (3): 76-80.

[7] 张志斐, 张兰桐. 高效液相色谱-质谱联用技术在药学研究中的应用 [J]. 河北医科大学学报, 2005 (3): 226-229.

[8] 曾银珠, 杨凤琼. 高效液相色谱-质谱联用技术在药物分析中的应用 [J]. 生物化工, 2021, 37 (1): 160-166.

[9] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nature Chemical Biology, 2008 (4): 682-690.

[10] 杨小林, 袁永亮, 张杰, 等. 基于网络药理学和分子对接探寻升降散抗新型冠状病毒潜在作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51 (7): 1795-1803.

[11] 刘畅, 周枝, 尹志刚, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究金银花入血成分干预新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37 (2): 264-274.

[12] 黄明, 杨丰文, 张俊华, 等. 张伯礼: 此次中医药抗疫过程的一些经验和反思 [J]. 天津中医药, 2020, 37 (7): 722-725.

[13] 陈婧, 王文清, 施春阳, 等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-

19) 中医药防治的思考 [J]. 中草药, 2020, 51 (5): 11066-1112.

[14] 杨家耀, 苏文. 90 例普通型新型冠状病毒肺炎患者中医证候与体质分析 [J]. 中医杂志, 2020, 61 (8): 645-649.

[15] 李晓风, 杜武勋. 基于五运六气理论对新型冠状病毒感染的肺炎的几点思考 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (3): 13-16.

[16] 杨荣禄, 刘兰林. 刘兰林教授运用三仁汤化裁论治三焦湿热证经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2015, 39 (9): 689-691.

[17] 代有羲. 张福利教授基于吴鞠通气化理论运用三仁汤治疗湿热型感冒的回顾性研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2019.

[18] 杨坤, 景一娴, 薛成军, 等. IL-6 和 ST2 在普通型新型冠状病毒肺炎患者中的表达及其临床意义研究 [J]. 现代医药卫生, 2022, 38 (4): 653-657.

[19] Jian, George L, Leilei C, et al. Interleukin 23 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-Kappa B induced matrix metalloproteinase 9 expression [J]. Plos One, 2012, 7 (9): e46264.

[20] 陈安艳, 王连青, 申振涛, 等. 血清 IL-6、IL-10、IL-17 及 IL-33 水平与食管癌患者放射性肺损伤关系的研究 [J]. 癌症进展, 2019, 17 (23): 2825-2829.

[21] 施敏, 刘富林, 夏旭婷, 等. 藿香正气散治疗新型冠状病毒肺炎伴胃肠道症状的网络药理学研究 [J]. 中国医药导报, 2021, 18 (9): 24-29.

[22] 毛毅, 余荷, 梁宗安, 等. 静脉滴注 COVID-19 人免疫球蛋白治疗新型冠状病毒肺炎一例 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2021, 18 (9): 24-29.

[23] Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity [J]. Immunity, 2014, 41 (4): 518-528.

[24] 高明朗, 邓宇, 赖凯, 等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂相关间质性肺病的研究进展 [J/OL]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2022: 1-8 [2022-07-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1492.R.20220223.1111.004.html>.

[25] 刘龙燕, 卢健棋, 陈文鹏等. 中医药防治心力衰竭相关信号通路研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29 (12): 954-960.

[26] 张伟, 靳晓晔, 戴贵东, 等. 苦参碱调控 ADMA 代谢通路抑制异丙肾上腺素诱导大鼠慢性心力衰竭的作用 [J]. 陕西中医药大学学报, 2022, 45 (5): 109-113.