

基于网络药理学和分子对接探讨银花泌炎灵片 抗急性肾盂肾炎的作用机制*

张鑾荣¹ 刘玉伟¹ 王嘉¹ 刘麟轩¹ 刘星雨¹ 刘金平¹ 王翠竹¹ 刘传贵² 郝秀华^{1**}

¹吉林大学药学院, 长春 130021; ²人参创新药物开发国家地方联合工程研究中心, 长春 130021

[摘要] **目的** 分析鉴定银花泌炎灵片的化学成分及其治疗急性肾盂肾炎的机制。**方法** 通过液相色谱-质谱 (LC-MS) 联用技术对银花泌炎灵片的化学成分进行分析和鉴定, 通过网络药理学和分子对接技术探讨其可能的作用机制。**结果** LC-MS 技术新鉴定出银花泌炎灵片中 101 个化学成分。网络药理学分析得到核心靶点 126 个; 拓扑学分析筛选出肿瘤坏死因子等 10 个关键靶点, 葛根素等 28 个活性成分; 通路富集分析筛选出晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体等关键信号通路; 分子对接结果表明, 关键成分和关键靶点的结合能均小于 -5 kJ/mol, 可形成稳定的氢键。**结论** 银花泌炎灵片含多种结构类型化学成分, 可通过“多靶点-多通路”发挥抗急性肾盂肾炎作用。

[关键词] 银花泌炎灵片; 急性肾盂肾炎; 化学成分; 网络药理学; 分子对接

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2025.05.010

Exploring the mechanism of action of Yinhua Miyanling Tablets against acute pyelonephritis based on network pharmacology and molecular docking

Zhang Liurong¹, Liu Yuwei¹, Wang Jia¹, Liu Linxuan¹, Liu Xingyu¹,
Liu Jinping¹, Wang Cuizhu¹, Liu Chuangui², Hao Xiuhua^{1**}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021; ² National and Local United Engineering R&D Center of Ginseng Innovative Drugs, Changchun 130021

** Corresponding author; Hao Xiuhua, email: haoxh@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To analyse and identify the chemical components of Yinhua Miyanling Tablets, and to explore the mechanism treating acute pyelonephritis. **Methods** To conduct analysis and identification of the chemical components in Yinhua Miyanling Tablets by integration of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and to explore the possible mechanisms of action by network pharmacology and molecular docking technology. **Results** A total of 101 chemical components were newly identified in Yinhua Miyanling Tablets by LC-MS. A total of 126 core targets were screened out based on network pharmacology. Based on network pharmacological strategy, a total of 10 key targets such as tumor necrosis factor, 28 key active chemical components such as Puerarin and key pathways such as advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products (AGE-RAGE) were screened out for the hypolipidemic effect of Yinhua Miyanling Tablets. The molecular docking results show that the binding energies between key components and the key targets were all less than -5 kJ/mol, and stable hydrogen bonds can be formed. **Conclusion** Yinhua Miyanling Tablets contain a variety of structural types of chemical components that could exert an anti-acute pyelonephritis effect through “multi targets-multi pathways”.

[Key words] Yinhua Miyanling Tablets; Acute pyelonephritis; Chemical components; Network pharmacology; Molecular docking

急性肾盂肾炎是指肾盂黏膜及肾实质的急性感染性疾病, 若不能得到及时有效的治疗, 后期可并发脓毒血症、感染性休克, 或发展为慢性肾盂肾炎、慢性肾衰竭, 危及患者生命安全^[1]。因此积极治疗急性肾盂肾炎, 对防治及避免急性并发症发生和引起肾实质损害具有重要意义。急性肾

盂肾炎发病率较高, 可发生于任何年龄, 多发于 65 岁以上的老年人, 发病率为 1.5%~3.5%^[2]。目前的治疗方案主要为抗感染治疗, 但是我国基层医疗机构广谱抗菌药物的广泛使用甚至滥用导致病原菌的耐药率逐年上升, 老年急性肾盂肾炎患者治疗难度大大增加^[3]。临床上常选择抗生素干

收稿日期: 2024-10-21 修回日期: 2024-12-31 录用日期: 2025-01-01

* 吉林省中成药二次开发科技创新中心 (YDZJ202402035CXJD、20210502005ZP); 吉林省科技发展计划项目重大科技专项 (20240208009JH)

** 通信作者: 郝秀华, 电子邮箱 haoxh@jlu.edu.cn

预, 可能会提高尿路感染病原菌的耐药性, 亦可能引起肠道菌群失调, 进而引起肠道内大量致病菌繁殖, 造成二重感染^[4]。中成药由于其高效低毒的特点, 在急性肾盂肾炎的治疗中得到越来越广泛的应用。

银花泌炎灵片是中药复方制剂, 处方组成包括金银花、半枝莲、蒿蓄等 10 味中药。具有清热解毒、利湿通淋的功效, 临床上用于治疗急性肾盂肾炎、急性膀胱炎等, 单独服用或与其他抗生素合并使用都取得了较好的疗效^[5]。随着中成药二次开发的不断推进, 银花泌炎灵片的研究日渐丰富, 在化学成分研究中, 韩柳等^[6]报道了采用液相色谱-质谱 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 联用技术结合 UNIFI 天然产物分析平台, 在负离子模式下快速分析与鉴定了银花泌炎灵片乙醇提取物中的 61 个化学成分; 张庆贺等^[7]采用气相色谱-质谱联用技术 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析了银花泌炎灵片中的挥发油成分, 共检出 30 个化学成分, 鉴定了其中的 21 种成分, 包括棕榈酸、棕榈酸乙酯、亚油酸乙酯类等成分。但对该制剂的化学成分研究仍不够全面, 需要进一步地分析和鉴定。

为了对银花泌炎灵片的化学成分进行更全面的分析鉴定, 本论文拟采用 LC-MS 技术, 在正、负离子模式下, 分别对银花泌炎灵片的 70% 乙醇提取物的正己烷、乙酸乙酯、正丁醇各萃取部位及水残留部分进行化学成分分析。在此基础上, 开展了银花泌炎灵片治疗急性肾盂肾炎的网络药理学分析, 应用分子对接技术初步验证关键成分与关键靶点之间的结合情况, 为银花泌炎灵片治疗肾盂肾炎提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药品与试剂 银花泌炎灵片 (吉林华康药业股份有限公司, 生产批号 20180434, 规格 0.5 g/片), 甲醇 (广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 货号 1.17112.023), 95% 乙醇 (广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 货号 1.17002.453), 正己烷 (广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 货号 1.15006.013), 乙酸乙酯 (广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 货号 1.19128.013), 正丁醇 (广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 货号 1.17030.023), 质谱用水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司, 货号 4545454), 甲酸 (美国 Fisher 公司, 货号 A117-50), UPLC-MS 级乙腈 (美国 Fisher 公司, 货号 A955-4), 标准品奎尼酸 (生产批号 WJ-110885)、蔗糖 (生产批号 111507-202406)、木犀草素 (生产批号 111520-200504)、原儿茶酸 (生产批号 110810-201007)、咖啡酸 (生产批号 110885-201703) 均购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 实验仪器 Xevo G2-XS 型 Q-TOF 四级杆飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司), ACQUITYU-PLC 型二元泵和样品管理器 (美国 Waters 公司), V1.7 UNIFI 科学信息学系统 (美国 Waters 公司), N-A35 型氮气发生器 (上海金浪科技有限公司), PTX-FA210S 分析天平 (福建华志电子科技有限公司), RE-2000A 旋转蒸发器 (上海贤德实验仪器有限公司)。

1.1.3 在线数据库与分析软件 网络药理学与分子对接所需的数据库及网址: Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>), SymMap (<https://www.symmap.org/>), ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), Genecards (<https://www.genecards.org/>), Malacard (<https://www.malacards.org/>), String (<http://string-db.org/cgi/input.pl>), Gprofiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/convert>), OmicShare Tools (<https://www.omicshare.com/tools/>), Metascape (<http://metascape.org/>), Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), PDB (<https://www.rcsb.org>)。网络药理学与分子对接所需的软件: Cytoscape 3.9.1, Chemdraw 3D 22.0, Autodocktools 1.5.7, AutoDock Vina 4.2.6, Pymol 2.3.0。

1.2 实验方法

1.2.1 化学成分分析 制备银花泌炎灵片提取物并进行富集分析, 设定合适的化学成分测定色谱条件、质谱条件, 采集数据并进行处理^[8]。将筛选所得化合物的质谱碎片和保留时间与文献或对照品进行比对, 进行初步鉴定。

1.2.2 网络药理学研究 ①化学成分靶点与疾病靶点的预测: 基于化学成分分析鉴定得到的化合物, 通过数据库以及查阅文献预测各化合物的靶点。以“Acute pyelonephritis”为检索词, 通过数据库查阅文献预测急性肾盂肾炎相关的靶点。②核心靶点的预测及蛋白质互作网络 (Protein-protein interaction networks, PPI) 的构建: 将预测的化学成分作用靶点与急性肾盂肾炎相关靶点取交集获核心靶点, 将靶点上传至 String 数据库, 并设置置信区间 (Confidence interval 0.90), 隐藏离散节点等相关参数, 生成 PPI。将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件获得 PPI 图, 并进行 PPI 拓扑分析^[9]。将度值排序前十的靶点作为关键靶点。③网络构建: 对所得核心靶点进行分类, 构建“银花泌炎灵片-单味药-化学成分-靶点-急性肾盂肾炎”网络; 采用 Cytoscape 3.9.1 软件生成网络图后进行拓扑分析, 以高出平均度值为指标筛选为活性化合物。④基因本体 (Gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析: 将核心靶点导入 Gprofiler 数据库, 转换获得交集靶点的 Ensemble IDs, 并将其上传至 OmicShare Tools 进行 GO 分析, 得到 GO 分析直方图。将核心靶点导入

Metascape 数据库, 进行 KEGG 富集分析, 下载数据文件, 上传至 OmicShare Tools, 得到 KEGG 气泡图。

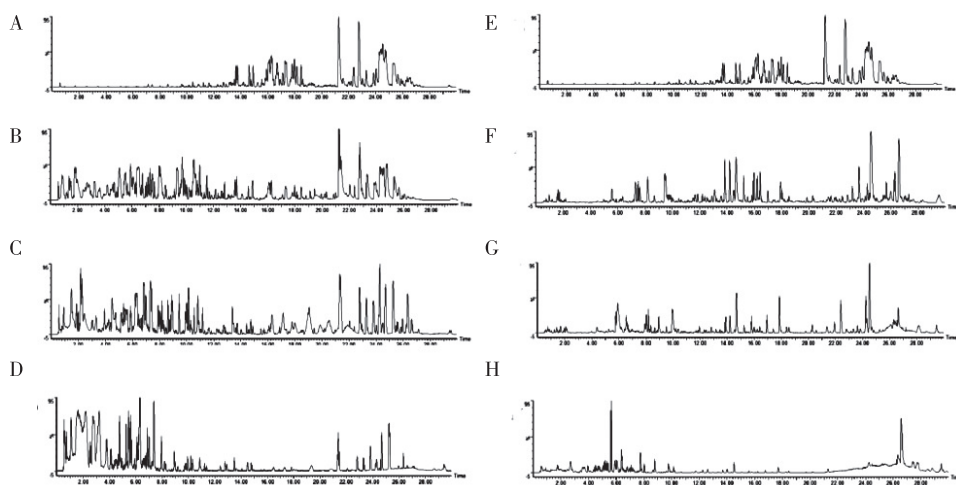
1.2.3 分子对接 ①配体的选择和准备: 取网络药理学研究中度值大于平均值的前 10 个化合物作为配体。从 Pubchem 数据库中下载所有化合物的结构; 使用 Chemdraw 3D 22.0 软件, 对配体进行能量最小化处理; 使用 Autodocktools 1.5.7 工具, 对配体进行计算并分配电荷、识别原子类型、设置柔性键等处理。②受体的选择和准备: 综合文献以及网络药理学筛选结果, 选择信号转导和转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、白细胞介素-6 (Interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-10 (Interleukin 10, IL-10) 等 10 个关键靶点作为受体。从 PDB 蛋白质结构数据库中下载上述受体的 3D 结构, 保存为 “.pdb” 格式文件。使用 Autodocktools 1.5.7 工具, 对受体进行去水、加氢、计算并平均分配电荷、识别原子类型等处理, 导出为 “.pdbqt” 格式文件。③分子对接: 经过预处理的受体蛋白和小分子配体使用 AutoDock Vina 4.2.6 进行半柔性对

接^[10]。并利用 Pymol 2.3.0 软件对对接结果进行可视化处理, 评估受体-配体的结合程度。

2 结果

2.1 银花泌炎灵片化学成分分析

正、负离子模式下, 银花泌炎灵片的基峰离子流色谱图见图 1, 按照极性由小到大排列, 负离子模式下所检出的化学成分多于正离子模式下所检出的化学成分。根据精确分子量、对照品保留时间、典型碎片分析, 在韩柳等^[6]的基础上, 从银花泌炎灵片中新鉴定出 101 种化合物 (负离子模式下鉴定出 85 种, 正离子模式下鉴定出 17 种, 其中槲皮素既可以在正离子模式中鉴定出, 也可以在负离子模式中鉴定出), 这些化合物分别在正己烷层 15 种、乙酸乙酯层 41 种、正丁醇 11 种、水层 34 种。所鉴定出的化合物的信息见表 1, 包括黄酮类 41 种、萜类 29 种、酚酸类 14 种、有机酸类 4 种、苯丙素类 2 种、蒽醌类 1 种、糖类 2 种、生物碱类 2 种以及其他类 6 种。虽对银花泌炎灵片的乙醇提取物进行了进一步的富集, 但从基峰离子流图中可以发现, 仍存在很多未鉴定的化学成分, 在未来的工作中将进一步展开研究。



注: 负离子模式下, A 为正己烷层, B 为乙酸乙酯层, C 为正丁醇层, D 为水层; 正离子模式下, E 为正己烷层, F 为乙酸乙酯层, G 为正丁醇层, H 为水层

图 1 负离子和正离子模式下基峰离子流图

Fig. 1 BPI chromatograms in ESI⁻ mode and ESI⁺ mode

表 1 银花泌炎灵片中所鉴定的化学成分

Tab. 1 Chemical compounds identified from Yinhuo Miyanling Tablets

序号	保留时间	分子式	理论值	计算值	质量偏差	MS ^E 碎片	鉴定结果
1	0.59	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.116 2	342.115 8	-1.21	387.114 0, 161.046 3, 143.035 0, 89.024 1	乳糖
2 ^S	0.62	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.063 4	192.063 9	2.91	191.056 7, 173.046 2, 127.040 5	奎尼酸
3 ^S	0.62	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.116 2	342.115 7	-1.45	387.113 9, 209.067 3, 179.057 3, 135.031 0, 119.036 3	蔗糖
4	0.74	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 0	123.032 0	-0.44	124.039 3, 80.049 6, 78.033 9	烟酸

续表1

序号	保留时间	分子式	理论值	计算值	质量偏差	MS ^E 碎片	鉴定结果
5	0.74	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390.116 2	390.115 0	-3.09	389.107 7,345.119 2,227.056 8,165.056 6	去乙酰车叶草苷酸
6	0.74	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390.116 2	390.115 0	-3.09	389.107 7,209.045 1,179.036 4,119.036 2	水晶兰苷
7	0.92	C ₇ H ₆ O ₅	170.021 5	170.021 9	1.95	169.014 6,125.024 1,107.014 9	没食子酸
8	1.43	C ₇ H ₁₀ O ₅	174.052 8	174.053 4	3.15	219.051 6,111.008 8	莽草酸
9	1.49	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 6	154.026 9	2.05	153.019 6,109.029 7	龙胆酸
10 ^S	1.49	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 6	154.026 9	2.05	153.019 7,109.029 7,108.022 1,91.019 4	原儿茶酸
11	1.74	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	354.094 6	-1.45	353.087 9,191.056 6,179.035 0	1-O-咖啡酰奎宁酸
12	1.85	C ₉ H ₆ O ₃	162.031 7	162.031 3	-2.65	163.038 7,145.028 3,135.998 8,107.004 3	伞形花内酯
13	1.91	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376.136 9	376.136 3	-1.66	375.129 0,213.077 5,169.088 2,151.077 7,113.025 6	马钱苷酸
14	2.00	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 7	138.032 0	2.42	137.024 8,119.014 8,92.027 1	对羟基苯甲酸
15	2.19	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	354.094 5	-1.53	353.087 2,191.056 7,173.046 9,179.036 3,135.046 5	隐绿原酸
16	2.46	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	406.147 5	406.147 0	-1.38	451.313 5,243.088 2,225.044 2	山梔苷甲酯
17	2.56	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	354.095 1	0.13	353.087 9,191.056 7,179.035 0,173.046 4	绿原酸
18	2.56	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	354.095 1	0.13	353.211 2,191.056 7,215.056 1,137.025 5	新绿原酸
19	2.58	C ₉ H ₆ O ₄	178.026 6	178.026 8	1.20	177.019 6,134.005 8,108.022 2	5,7-二羟基色原酮
20 ^S	2.70	C ₉ H ₈ O ₄	180.042 3	180.042 5	1.44	179.035 2,135.045 5	咖啡酸
21	3.05	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496.158 1	496.158 0	-0.10	495.150 8,357.116 1	氧化芍药苷
22	3.25	C ₇ H ₆ O ₂	122.036 8	122.037 3	4.58	121.030 1,93.034 4,92.027 1,91.019 7	对羟基苯甲醛
23	3.44	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374.121 3	374.122 5	3.26	397.111 7,195.065 3,177.054 9,151.039 0,107.04926	断马钱子酸
24 ^S	3.58	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.052 8	198.053 5	3.44	197.045 9,179.036 0,135.045 8	丹参素
25	3.79	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374.121 3	374.120 4	-2.28	373.113 2,167.072 4,149.062 1	京尼平苷酸
26	4.46	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.073 6	256.074 7	4.41	301.072 9,135.045 9	甘草素
27	4.48	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.189 8	610.188 4	-2.19	655.186 6,301.073 0,165.056 5	新橙皮苷
28	4.50	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196.073 6	196.073 3	-1.35	197.080 6,179.070 4,151.039 3	芍药内酯 B
29	4.52	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.131 9	404.130 9	-2.48	403.123 6,225.076 9,173.046 7, 125.025 5	梔子苷
30	4.69	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.052 8	198.053 2	1.69	197.045 9,169.015 1,124.017 3	没食子酸乙酯
31	4.69	C ₈ H ₈ O ₃	152.047 3	152.047 7	2.20	151.040 4,197.045 9,135.045 8	香兰素
32	4.69	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079 0	290.078 3	-2.40	335.076 9,137.025 5,125.024 9,123.009 6	儿茶素
33	4.76	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358.126 4	358.125 3	-3.03	403.123 5,195.067 2,179.057 5,151.078 5,125.025 8	当药苷/獐牙菜苷
34	4.76	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.131 9	404.130 8	-2.69	403.123 5,179.057 5	断氧化马钱子苷
35	4.76	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.131 9	404.130 8	-2.69	403.123 5,179.057 5,125.025 8	秦艽苷 A
36	4.83	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.158 5	594.156 7	-3.04	593.149 3,433.128 3,275.059 0	肥皂草苷
37	4.97	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	548.153 0	548.151 1	-3.43	593.319 1,295.060 8	葛根素芹菜糖苷
38	4.97	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.158 5	594.156 6	-3.16	593.319 6,503.124 9,473.108 8,311.057 2	山柰酚-3-O-芸香糖苷
39	5.35	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.131 5	402.133 3	4.55	447.131 5,373.092 5,355.086 9	川陈皮素
40	5.45	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	388.136 9	388.136 1	-2.07	433.134 4,225.077 9,207.066 2,123.009 9	京尼平苷
41	5.45	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	388.136 9	388.136 1	-2.07	433.134 4,225.077 9,207.066 2	马鞭草苷

续表1

序号	保留时间	分子式	理论值	计算值	质量偏差	MS ^E 碎片	鉴定结果
42	5.49	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326.100 2	326.099 2	-2.86	371.097 6,165.056 6,223.061 5	白果内酯
43	5.51	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095 5	464.093 4	-4.39	463.227 1,151.004 4,285.040 5	异槲皮苷
44	5.52	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.131 9	404.131 1	-1.96	403.124 2,241.072 9,127.041 5	鸡屎藤次苷甲酯
45	5.59	C ₉ H ₁₆ O ₃	172.109 9	172.109 9	0.01	217.108 2,153.097 8,125.098 6	1-脱氧杜仲醇
46	5.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 7	302.041 2	-4.85	303.048 5,161.012 3,107.017 7	飞燕草素
47	5.73	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416.110 7	416.110 6	-0.27	461.108 8,291.090 6,267.066 0	葛根素
48	5.73	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304.058 3	304.057 6	-2.25	303.050 3,285.039 9,177.019 7,153.019 9,151.004 5	花旗松素
49	5.97	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.403 8	822.400 7	-3.73	867.196 7,351.193 5,353.235 6	甘草酸
50	6.08	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095 5	464.096 5	2.29	465.103 8,153.018 9	杨梅苷
51	6.21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.105 6	432.107 2	3.61	433.114 5,415.103 6,397.091 8,379.082 2,313.071 6	牡荆苷
52	6.24	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.147 9	564.145 4	-4.45	609.304 6,431.098 3	6-C-阿拉伯糖基-8-C-葡萄糖基-芹菜素
53	6.24	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 4	610.150 9	-4.11	609.310 6,285.040 4	槲皮素 3-O-新橙皮糖苷
54	6.24	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 4	610.150 9	-4.11	609.310 6,431.098 3	槐属黄酮苷
55	6.24	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 4	610.150 9	-4.11	609.310 6,301.035 3,300.027 5	芦丁
56	6.31	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478.111 1	478.109 2	-4.08	477.101 9,314.043 1,165.057 0	异鼠李素-3-葡萄糖苷
57	6.35	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100 6	448.101 9	2.99	449.109 2,287.055 5	木犀草苷
58	6.51	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.104 9	188.105 0	0.50	187.097 7,169.087 7,125.097 8	杜仲醇
59	6.56	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100 6	448.099 9	-1.41	447.230 6,284.032 9	山柰酚-3-O-葡萄糖苷
60	6.59	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462.116 2	462.115 6	-1.27	461.108 4,286.044 5	香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷
61	6.78	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.063 4	288.062 9	-1.77	287.055 6,269.045 9	二氢山柰酚
62	6.78	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.063 4	288.062 9	-1.77	287.055 6,161.025 1	圣草酚
63	6.88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	516.124 9	-3.70	515.265 8,353.087 5,191.057 2,173.036 1	3,5-二咖啡酰奎宁酸
64	6.88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	516.124 9	-3.70	515.298 8,353.087 5,173.046 5	4,5-二咖啡酰奎宁酸
65	7.00	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.205 4	624.203 1	-3.73	623.195 8,461.165 5,315.050 1,161.025 0	麦角甾苷
66	7.01	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	638.221 1	638.219 4	-2.55	637.212 2,285.039 9,	肉苁蓉苷 C
67	7.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100 6	448.099 1	-3.21	447.091 9,285.040 8	野黄芩苷
68	7.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100 6	448.099 1	-3.21	447.230 2,285.040 8	紫云英苷
69	7.14	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.084 9	446.084 3	-1.37	445.077 0,269.045 9	黄芩苷
70	7.23	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.179 2	580.178 2	-1.70	579.170 9,268.054 7,271.061 6	柚皮苷
71	7.77	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	246.125 6	246.124 5	-4.50	247.131 8,229.121 9,149.094 8,119.085 4,105.070 1	姜黄醇酮
72	7.94	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.068 5	272.068 0	-1.83	317.066 2,151.004 3	柚皮素
73	7.98	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	202.120 5	202.120 8	1.35	201.113 5,139.113 6,111.082 2	癸二酸
74	8.03	C ₁₅ H ₈ O ₆	284.032 1	284.032 5	1.28	283.025 2,239.035 6	大黄酸
75	8.74	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	652.236 7	652.235 2	-2.28	651.228 0,193.052 3,175.041 3	肉苁蓉苷 D

续表1

序号	保留时间	分子式	理论值	计算值	质量偏差	MS ^E 碎片	鉴定结果
76	8.77	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.120 9	372.120 7	-0.54	371.113 4,329.065 0	橙黄酮
77	8.77	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₀	505.194 8	505.195 7	1.83	506.203 0,344.148 7	升麻酰胺
78	8.82	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	592.179 2	592.181 2	3.44	593.188 5,447.129 7,285.075 3,242.057 5	蒙花苷
79	8.94	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047 7	286.047 9	0.41	285.040 6,133.030 7	木犀草素
80	8.96	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 7	302.042 1	-1.86	301.034 8,303.050 3,151.004 6	槲皮素
81 ^S	9.36	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 8	270.052 4	-1.57	269.045 1,151.004 3,117.035 3,107.014 5	芹菜素
82	9.50	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.074 0	330.073 3	-1.95	329.066 0,314.043 0,299.056 7,271.025 3	棕矢车菊素
83	9.51	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	430.308 3	430.306 8	-3.62	431.314 0,269.138 0	鲁斯可皂苷元
84	9.87	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.058 3	316.057 5	-2.42	315.050 1,300.027 0,151.004 4	异鼠李素
85	9.91	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.063 4	300.063 0	-1.41	299.056 0,284.032 4	羟基芫花素
86	9.97	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	1044.550 5	1044.546 2	-4.14	1089.544 4,603.388 6,469.324 0	酸枣仁皂苷 B
87	10.56	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330.240 6	330.239 6	-3.10	329.232 3,99.082 2,171.103 1,293.212 2	三棱酸
88	10.56	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330.240 6	330.239 6	-3.10	329.232 2,127.113 7,139.113 8,211.134 0,229.144 5	天师酸
89	11.66	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.089 6	344.089 1	-1.56	345.096 3,330.072 8	异泽兰黄素
90	12.24	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	942.518 8	942.521 9	3.24	943.530 0,781.472 1,599.396 4	大豆皂苷I
91	12.45	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.068 5	284.068 4	-0.22	283.061 1,117.000 3,268.037 6	芫花素
92	13.47	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.466 0	780.463 4	-3.35	779.456 1,327.217 5	柴胡皂苷 D
93	13.60	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	928.503 2	928.500 7	-2.62	927.493 5,603.386 0,327.217 7	川续断皂苷VI
94	14.79	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.089 6	344.089 6	-0.06	343.213 1,313.035 8,328.058 9	石吊兰素
95	16.93	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.355 3	472.353 9	-2.78	471.346 7,279.232 9,195.139 4	麦珠子酸
96	17.31	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O	254.141 9	254.140 8	-4.25	299.139 0,196.090 8	麦角醇
97	17.37	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470.339 6	470.339 7	0.28	471.347 0,453.335 2,425.347 4,317.209 6	甘草次酸
98	21.28	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360 3	456.359 3	-2.38	455.521 5,340.285 7	白桦脂酸
99	21.34	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	438.349 8	438.350 7	2.21	439.358 0,423.350 5	Lucialdehyde A
100	24.26	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	370.189 3	370.188 0	-3.48	415.186 2,353.164 0	异钩藤酸
101	26.76	C ₃₅ H ₄₈ O ₉	612.329 8	612.332 7	4.66	635.321 9,561.286 6	苦楝子醇

注:^S 为与标准品对比鉴定

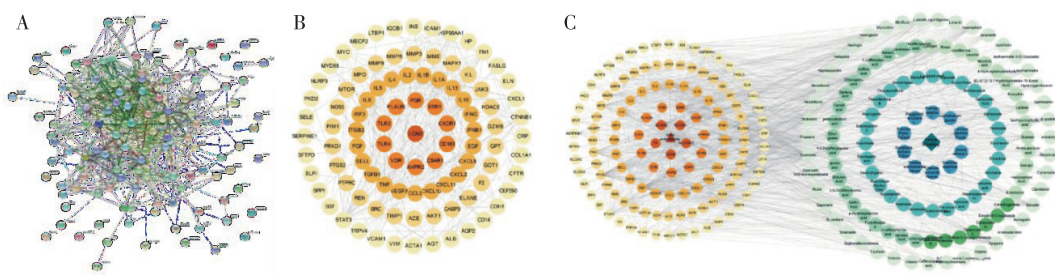
2.2 药物分子靶点网络分析

2.2.1 化学成分靶点与疾病靶点的预测 搜索出与银花泌炎灵片化学成分相关的生物靶点 1 333 个,与急性肾盂肾炎相关的生物靶点 2 693 个。

2.2.2 核心靶点的预测 将获得的化学成分靶点与疾病靶点取交集,得 126 个核心靶点。在核心靶点中,酶占最大比例 [31.75% (40/126)]。基于 String 数据库得到的靶点间相互作用网络、基于 Cytoscape 3.9.1 得到的靶点间相互作用网络见图 2A、2B。选取度值最高的 10 个靶点作为银花泌炎灵片抗急性肾盂肾炎的关键靶点: STAT3、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)、基质金属蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP9)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (Prostaglandin-endoperoxide syn-

thase 2, PTGS2)、促分裂原活化蛋白激酶 1 (Mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、白细胞介素-2 (Interleukin 2, IL-2)、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT serine/threonine kinase 1, AKT1) 和热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1 (Heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1), 颜色深的节点度值越高。

2.2.3 PPI 网络的构建 构建“银花泌炎灵片-单味药-化学成分-靶点-急性肾盂肾炎”相互作用网络,如图 2C 所示,网络中共有 251 个节点和 1 441 个连接,平均度值为 12,有 28 个化学成分的度值高于平均度值,可作为潜在的活性物质,其中排名前十的化学成分为葛根素、柚皮素、黄芩苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、异鼠李素、山柰酚、咖啡酸、没食子酸。



注: A 为基于 String 数据库的 PPI 网络图, B 为基于 Cytoscape 3.9.1 的 PPI 网络, C 为“银花泌炎灵片-单味药-化学成分-靶点-急性肾盂肾炎”的网络图

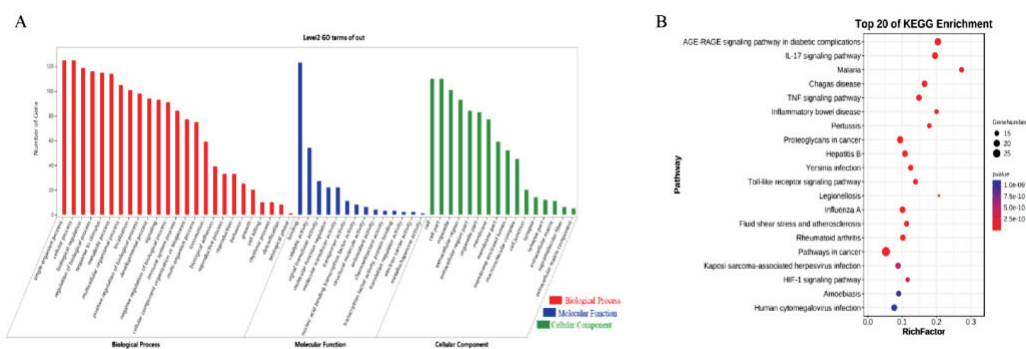
图 2 网络药理学分析结果

Fig. 2 The network pharmacological analysis results

2.2.4 GO 和 KEGG 富集分析结果

2.2.4.1 GO 富集分析结果 如图 3A 所示, GO 富集分析得到 55 个条目, 包括 25 个生物过程 (Biological process, BP)、14 个分子功能 (Molecular function, MF) 和 16 个细胞成分 (Cellular component, CC)。条目的高度与富集程度成正比, 结果表明, 富集程度最高的为 BP, 主要为单体过程和细胞过程, 其次在 MF 中, 连接富集程度也较高, 提示银花泌炎灵片中核心靶点可能主要通过上述 BP 发挥其抗急性肾盂肾炎作用。

2.2.4.2 KEGG 信号通路分析结果 如图 3B 所示, 将交集靶点导入 Metascape 数据库共获得 199 条相关信号通路, 根据 P 值排序, 得到前 20 条信号通路, 导入 Omicsshare 云平台生成高级气泡图。靶点数目越多则气泡越大, 同时气泡颜色表示 P 值的大小。结合文献, 将 20 条通路进一步筛选得到 3 条关键通路: 晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (Advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路、白细胞介素-17 (Interleukin 17, IL-17) 信号通路和 Toll 样受体信号通路。



注: A 为 GO 富集分析直方图, B 为 KEGG 富集气泡图

图 3 GO 与 KEGG 富集分析

Fig. 3 GO and KEGG pathway enrichment analysis

2.2.4.3 小结 通过网络药理学分析, 得到 10 个关键靶点和 28 个活性物质。基于 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 得到 3 条关键信号通路, 包括 AGE-RAGE、IL-17 和 Toll 样受体信号通路。采用网络药理学方法, 能更好地从“多成分、多靶点、多通路”研究并探讨银花泌炎灵片治疗急性肾盂

肾炎的现代药理作用机制。

2.2.5 分子对接 选择度值排名前十的化学成分进行分子对接, 结果如表 2 所示, 结合能排名前三的化学成分为关键成分。黄芩苷、葛根素和木犀草素这 3 种关键成分与 10 个蛋白分子进行分子对接, 结合能均小于 -5 kJ/mol, 与各蛋白的结合模式图见图 4。

表 2 关键化学成分与关键靶点对接的结合能 (kcal/mol)

Tab. 2 Binding energy of key ingredients docking with key targets (kcal/mol)

化合物	STAT3	IL-6	IL-10	TNF	MMP9	PTGS2	MAPK1	IL-2	AKT1	HSP90AA1	平均值
黄芩苷	-8.9	-11.0	-8.0	-9.6	-11.1	-9.9	-8.2	-5.9	-11.6	-9.2	-9.3
葛根素	-8.2	-9.7	-8.4	-9.9	-9.8	-7.8	-8.5	-5.7	-11.1	-7.5	-8.6

续表2

化合物	STAT3	IL-6	IL-10	TNF	MMP9	PTGS2	MAPK1	IL-2	AKT1	HSP90AA1	平均值
木犀草素	-7.9	-9.5	-7.4	-8.7	-10.7	-8.8	-8.7	-6.7	-10.4	-7.6	-8.6
槲皮素	-7.8	-9.3	-7.3	-8.6	-10.6	-8.1	-8.7	-6.7	-10.2	-7.4	-8.4
芹菜素	-7.5	-9.2	-7.6	-8.6	-10.2	-8.8	-8.3	-6.6	-10.5	-7.2	-8.4
柚皮素	-7.6	-8.8	-7.5	-8.5	-10.5	-8.9	-8.4	-6.6	-10.3	-7.2	-8.4
山萘酚	-7.8	-9.1	-7.5	-8.5	-10.0	-7.8	-7.8	-6.4	-10.5	-7.5	-8.2
异鼠李素	-7.6	-8.6	-7.5	-8.4	-9.4	-8.7	-7.6	-6.3	-10.2	-7.6	-8.1
咖啡酸	-6.2	-7.3	-6.8	-6.5	-7.8	-6.4	-6.1	-5.3	-7.6	-5.9	-6.5
没食子酸	-6.0	-6.0	-5.4	-6.1	-7.1	-6.2	-5.5	-4.4	-6.6	-5.8	-5.9

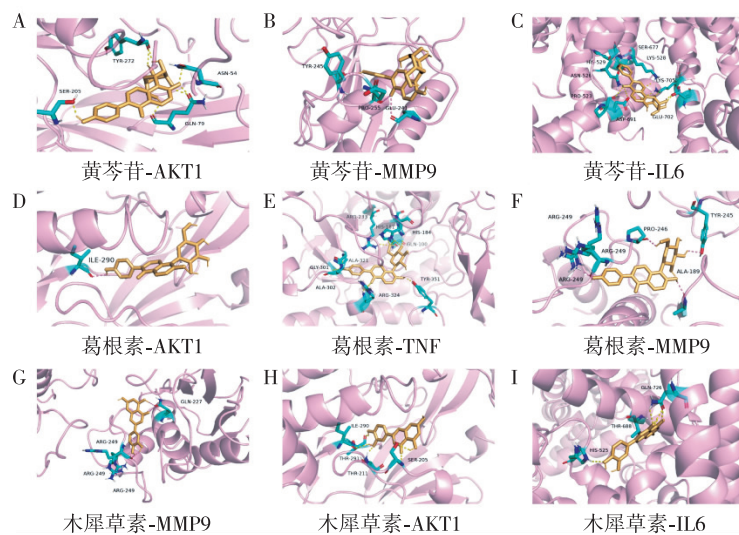


图4 化合物与关键靶点的结合模式

Fig. 4 Binding modes of compounds to a major target

3 讨论

老年急性肾盂肾炎患者机体功能降低, 免疫力低, 合并多种疾病, 通过给予抗生素治疗, 可能会引起泌尿系统反复感染、肠道菌群失调, 大大增加急性肾盂肾炎的治疗难度^[11]。中医药具有辨证施治、组方灵活等优势, 能有效治疗由于抗生素引起的肠道菌群失调等疾病^[12]。银花泌炎灵片在治疗急性肾盂肾炎中取得了较好的疗效^[5]。

本文采用 LC-MS 技术结合 UNIFI 天然产物解析平台快速分析鉴定了银花泌炎灵片乙醇提取液正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水层等 4 个萃取层中的化学成分, 首次鉴定出的化学成分有 101 种。基于上述的化学成分, 进行了银花泌炎灵片抗急性肾盂肾炎的网络药理学研究与分子对接, 筛选得到 3 个关键成分, 分别为黄芩苷, 葛根素和木犀草素; 10 个关键靶点, 分别为 STAT3、IL-6、IL-10、TNF、MMP9、PTGS2、MAPK1、IL-2、AKT1 和 HSP90AA1, 分子对接结合能均小于 -5 kJ/mol, 表明关键成分与关键靶点有良好的结合活性^[13]; 以及 3 个关键通路, 包括 AGE-RAGE、IL-17 和 Toll

样受体信号通路。关键靶点 STAT3、IL-6、IL-10、TNF、MMP9 已被证实与急性肾盂肾炎的发生有一定的相关性^[14]。PTGS2、MAPK1、IL-2、AKT1 和 HSP90AA1 关键靶点虽未被证实在急性肾盂肾炎中发挥关键作用, 但在治愈其他炎症中发挥着关键作用, 可为继续探究急性肾盂肾炎的机制提供新思路。

对于筛选得到的关键通路, Toll 样受体通路已被探究在急性肾盂肾炎中的具体作用途径^[15]。急性肾盂肾炎的发生依赖细菌脂多糖及肽聚糖与 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 的结合, 激活髓样分化因子 88、Toll 样受体白细胞介素-1 受体衔接蛋白、Toll 样受体白细胞介素-1 受体适配器诱导干扰素 β 包含域相关衔接分子、Toll 样受体白细胞介素-1 受体适配器诱导干扰素 β 包含域等接头蛋白, 促进核因子 κ B 的激活, 进一步促进炎症反应的发生。AGE-RAGE、IL-17 通路虽未被探究, 但这两条通路同样起着重要作用^[16]。因此, 仍需要今后进一步验证。

本研究初步阐明了银花泌炎灵片的化学组成,

可为后续研究提供科学数据, 也为其质量控制提升和临床应用提供基础。基于网络药理学与分子对接, 初步探讨了银花泌炎灵片抗急性肾盂肾炎的“多成分-多靶点-多通路”的作用机制, 预测得到的靶点与通路可为今后研究提供思路, 也为临床老年急性肾盂肾炎患者的治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 李倩, 张庆娟, 朱江, 等. 459例急性肾盂肾炎致病菌的流行病学与细菌谱分析[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2018, 16(6): 29-32.
Li Q, Zhang Q J, Zhu J, et al. Epidemiology and bacterial spectrum analysis of 459 cases of acute pyelonephritis [J]. *Int J Transplant Hemopurif*, 2018, 16(6): 29-32.
- [2] Lagu T, Rothberg M B, Shieh M S, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(3): 754-761.
- [3] 曹雯, 廖祖春, 宋斌, 等. 老年急性肾盂肾炎患者感染危险因素及病原菌耐药情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(6): 690-694.
Cao W, Liao Z C, Song B, et al. Risk factors of infection and drug resistance analysis of acute pyelonephritis in elderly patients [J]. *Int J Lab Med*, 2021, 42(6): 690-694.
- [4] 于建忠, 吴阳阳, 孟玲玲. 清利通淋汤加减治疗湿热型急性肾盂肾炎的临床观察[J]. 中国中医急症, 2022, 31(7): 1209-1211.
Yu J Z, Wu Y Y, Meng L L. Clinical observation on the treatment of damp-heat type acute pyelonephritis by addition and subtraction of Qingli Tongyin Tang[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2022, 31(7): 1209-1211.
- [5] 张文婷, 苗润培, 赵启菡, 等. 银花泌炎灵片治疗尿路感染临床与基础研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2403-2410.
Zhang W T, Miao R P, Zhao Q H, et al. Clinical and fundamental research Yinhuo Miyanling Tablets in treating urinary tract infection [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2019, 44(11): 2403-2410.
- [6] 韩柳, 王翠竹, 董庆海, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MSE技术的银花泌炎灵片提取液全成分分析[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(2): 81-84.
Han L, Wang C Z, Dong Q H, et al. Analysis of total components of Yinhuo Miyanling Tablets based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Jilin Med Univ*, 2022, 43(2): 81-84.
- [7] 张庆贺, 刘海宇, 林美好, 等. 银花泌炎灵片挥发油化学成分的GC-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 99-101.
Zhang Q H, Liu H Y, Lin M Y, et al. GC-MS analysis of volatile oil constituents of Yinhuo Miyanling Tablet [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(15): 99-101.
- [8] 刘云鹤. 美花风毛菊化学成分、抗溃疡性结肠炎作用及药代动力学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
Liu Y H. Chemical composition, antiulcerative colitis effect and pharmacokinetics of Meihua pachyderm [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [9] Zhao J D, Wang J T, Liu J X, et al. Effect and mechanisms of kaempferol against endometriosis based on network pharmacology and in vitro experiments [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 254.
- [10] Eberhardt J, Santos-martins D, Tillack A, et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [11] 陈安琴, 蒋伟芳. 三金片联合左氧氟沙星治疗急性肾盂肾炎的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1900-1902.
Chen A Q, Jiang W F. Clinical efficacy observation of Sanjin Tablets combined with levofloxacin in the treatment of acute pyelonephritis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(4): 1900-1902.
- [12] 李秋明, 张亚杰. 健脾止泻颗粒对脾虚证及抗生素肠道菌群失调模型小鼠的微生物调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(12): 1119-1120.
Li Q M, Zhang Y J. Effects of Jianpi Zhixie Granules on intestinal microecology in rats with spleen deficiency syndrome and alteration of intestinal flora induced by antibiotics [J]. *J Basic Chin Med*, 2010, 16(12): 1119-1120.
- [13] 赵璐, 张明泉, 徐耿瑞. 基于网络药理学和分子对接技术研究寒痉汤治疗高血压病的作用机制[J]. 中医临床研究, 2022, 14(27): 1-10.
Zhao L, Zhang M Q, Xu G R. Prediction of the potential mechanism of Hanjing decoction in treatment of hypertension based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Clin J Chin Med*, 2022, 14(27): 1-10.
- [14] Pevzner I B, Zorova L D, Galkin F A, et al. Mitochondria-associated matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute renal pathologies [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 166(3): 334-338.
- [15] 姚静, 杨彦坤, 杨柳, 等. 急性肾盂肾炎发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(6): 1071-1075.
Yao J, Yang Y K, Yang L, et al. Research advances in pathogenesis of acute pyelonephritis [J]. *Med Recapitulate*, 2017, 23(6): 1071-1075.
- [16] 花卉, 刘聪, 何宇霞, 等. 基于网络药理学探究血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 208-221.
Hua H, Liu C, He Y X, et al. Mechanism of Xueniao Capsule in treatment of acute pyelonephritis based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(2): 208-221.