

· 论著 · 一次研究 ·

基于网络药理学和UPLC-MS/MS探讨消石利胆丸治疗胆石症的作用机制



袁明洋¹, 付锦洲², 黄中强¹, 严红梅¹, 张义生¹, 李娟²

1. 武汉市中医医院 武汉市中医药研究所国家中管局中药制剂三级实验室 (武汉 430014)

2. 湖北中医药大学 教育部中药资源和中药复方重点实验室 (武汉 430065)

【摘要】目的 利用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 分析消石利胆丸的化学成分, 结合网络药理学和分子对接技术探讨消石利胆丸治疗胆石症的作用机制。**方法** 通过 UPLC-MS/MS 分析和对照品比对, 分析消石利胆丸的药效成分; 通过检索中药系统药理数据库与分析平台 (TCMSP)、中医百科全书 (ETCM) 数据库获得成分的潜在作用靶点, 应用 DisGeNET 数据库挖掘胆石症相关疾病靶点, 两者交集得到潜在作用靶点并导入 String 数据库, 建立靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 应用 Cytoscape 3.9.1 构建“药物-成分-靶点”网络; 对核心靶标进行 GO 和 KEGG 富集分析, 最后选取活性强度前 5 位的化合物作为配体与筛选后的疾病靶点基因进行分子对接, 并通过 RAW264.7 细胞验证抗炎活性, RT-PCR 法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子 mRNA 表达情况。**结果** UPLC-MS/MS 筛选出消石利胆丸中 30 个化合物, 其中汉黄芩素、槲皮素、黄芩素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素为消石利胆丸的关键成分。网络药理学筛选得到与胆石症相关靶点 107 个, 其中血清白蛋白、细胞肿瘤抗原 p53、雌激素受体、TNF、胰岛素为其核心靶点。GO 分析表明作用于炎症反应、类固醇结合等, KEGG 主要涉及脂质和动脉粥样硬化、TNF 信号通路等。分子对接分析和体外抗炎活性筛选显示消石利胆丸通过黄芩素、槲皮素、大黄素等成分调控 TNF 等相关炎症因子抑制一氧化氮的生成, 具有一定的抗炎活性。**结论** 消石利胆丸通过黄芩素等成分调控 TNF 等相关通路抑制炎症反应, 从而起到治疗胆石症的效果。

【关键词】 消石利胆丸; 胆石症; 化学成分; 超高效液相色谱-串联质谱; 网络药理学

Exploring the mechanism of Xiaoshi Lidan pills in the treatment of cholelithiasis based on network pharmacology and UPLC-MS/MS

YUAN Mingyang¹, FU Jinzhou², HUANG Zhongqiang¹, YAN Hongmei¹, ZHANG Yisheng¹, LI Juan²

1. Wuhan Research Institute of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Level 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China

2. Key laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202403143

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (国中医药人教函 [2022] 226 号); 武汉市卫健委项目 (WZ22C68); 武汉中青年医学骨干人才培养工程 (武卫通 [2020] 5 号)

通信作者: 李娟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: lz198207@126.com

Corresponding author: LI Juan, Email: lz198207@126.com

【Abstract】Objective To analyze the chemical components of Xiaoshi Lidan pills by using UPLC-MS/MS and explore the mechanism of Xiaoshi Lidan pills in the treatment of cholelithiasis through network pharmacology and molecular docking techniques. **Methods** The pharmacologically active components of Xiaoshi Lidan pills were analyzed through UPLC-MS/MS and compared with standard references. Potential targets of these components were obtained by searching the TCMSP and ETCM databases, and disease-related targets for cholelithiasis were identified using the DisGeNET database. The overlapping targets were used to construct a protein-protein interaction (PPI) network in the String database, and a "drug-component-target" network was built using Cytoscape 3.9.1. GO and KEGG enrichment analyses were performed for the core targets. Finally, the top 5 compounds with strong activity were selected as ligands for molecular docking with the screened disease target genes. The anti-inflammatory activity was verified by RAW264.7 cells, and the mRNA expression of TNF- α and other inflammatory factors was detected by RT-PCR. **Results** UPLC-MS/MS identified 30 compounds in Xiaoshi Lidan pills, among which baicalin, quercetin, wogonin, baicalein-7-*O*-glucuronide, and emodin were identified as key components of Xiaoshi Lidan pills. Network pharmacology identified 107 targets associated with cholelithiasis, with Alb, TP53, ESRI, TNF, and INS identified as core targets. GO analysis indicated the involvement in inflammation response and steroid binding, while KEGG pathways were primarily related to lipid metabolism, atherosclerosis, and the TNF signaling pathway. Molecular docking analysis and anti-inflammatory screening *in vitro* showed that Xiaoshi Lidan pills exhibited certain anti-inflammatory activity by regulating inflammatory factors such as TNF and inhibiting NO production through baicalein, quercetin, emodin and other components. **Conclusion** Xiaoshi Lidan pills exerts its therapeutic effect on cholelithiasis by regulating TNF-related pathways through components such as baicalin, thereby inhibiting the inflammatory response.

【Keywords】 Xiaoshi Lidan pills; Cholelithiasis; Chemical composition; UPLC-MS/MS; Network pharmacology

胆石症是一种常见的消化系统疾病，临床以腹部剧痛、发热、黄疸等为主要症状，其病因复杂，致病因素多过程复杂，如基因因素、环境因素、代谢过程、胆囊功能、生活习惯等均会造成胆囊结石^[1]。中医学中并无胆石症病名，而是将其归类于“胆胀”“胁痛”“黄疸”等之中，认为胆石症是由湿热浊毒与胆汁相互作用而成^[2]。近年来，胆囊结石的发生率显著增高^[3]，手术治疗是目前最主要、最有效的方法，但术后残石率及复发率较高^[4]。消石利胆丸由柴胡、枳实、白芍、木香、黄芩、郁金、鸡内金、厚朴、焦山楂、大黄等组成，来源于武汉市中医医院临床经验方，主要用于治疗胆石症、胆囊炎所致胆绞痛、大便秘结、厌油、寒颤高热，以及结石引起的阻塞性黄疸等症。方中柴胡、郁金、枳实疏肝行气，白芍缓肝和中，黄芩、大黄苦寒利胆，鸡内金健脾

消积，山楂入肝导滞，厚朴宽中理气，共奏疏肝利胆之功效^[5]。多年临床用药发现，该制剂具有良好的消石作用，可明显加快胆汁排出量，显著促进胆囊平滑肌收缩，从而促使炎症产物或结石的排出，改善临床症状^[5]。因前期对该制剂研究不够深入，使其在二次开发上面临诸多困难，因此急需对其进行系统研究，以期为后续医疗机构制剂的转化奠定基础。

超高效液相色谱-串联质谱 (ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 具有高灵敏度、高分辨率、高分离度等优点，能够准确地鉴定复方化学成分。网络药理学是一门新兴的生信学科，其以网络的形式探究疾病机制和药物作用机制，同时包含了医学、生物学、计算机科学、生物信息学等多学科基础理论，能够系统地预测中药有

效活性成分及药物作用机制^[6]。中药讲究配伍，擅长使用药物之间的相互协调制衡以达到治疗调和作用，这一点恰好与网络药理学多靶点、多途径、协调作用相对应。基于此，本研究应用网络药理学和分子对接技术联合 UPLC-MS/MS，探究消石利胆丸治疗胆石症所参与的活性成分作用于胆石症相关靶点的过程或机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

ExionLCT™ AD 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱（美国科学出口公司）；Scientz-100F 冻干机（宁波新芝生物科技有限公司）；莱驰 MM 400 研磨仪（德国莱驰公司）；MS105DM 电子天平（瑞士梅特勒公司）；5804r 离心机（德国艾本德公司）；酶标仪（美国伯腾公司）；PCR 仪（瑞士罗氏公司）。

1.2 主要药品与试剂

大黄素对照品（批号：C18F8Q29652，纯度 98.0%）、黄芩素对照品（批号：C07M10Y87479，纯度 98.0%）购自上海源叶生物科技有限公司；槲皮素对照品（成都瑞芬思德丹生物科技有限公司，批号：RDD-H00902210024，纯度 98.0%）；DMEM 高糖培养基（北京素莱宝科技有限公司，批号：20210325）；胎牛血清（浙江天杭生物科技股份有限公司，批号：20080502）；CCK-8 试剂盒（白鲨兰杰柯科技有限公司，批号：P23000015343）；脂多糖（德国默克公司，批号：0000185317）；一氧化氮（NO）检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：061322221109）；TRIzol[天根生化科技（北京）有限公司，批号：X1215]；反转录试剂盒（批号：962329F26W06）和 Real Universal 荧光定量试剂 SYBR Green（批号：962303F08W09）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水；消石利胆丸（批号：202111262）由武汉市中医医院提供。

1.3 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 由华中科技大学同济医学院免疫学教研室馈赠；引物由上海生物工程股份有限公司合成；样品成分定性和定量分析由迈维代谢完成。

1.4 方法

1.4.1 样品提取

样品置于冻干机中干燥后，用研磨仪研磨（频率：30 Hz）1.5 min 至粉末状。称取 50 mg 粉末，加入 1 200 μ L 预冷的 70% 甲醇水内标提取液，每 30 min 涡旋 1 次，每次持续 30 s，共涡旋 6 次，15 294 \times g 离心 3 min 后吸取上清，于 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后备用。

1.4.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱（100 mm \times 2.1 mm，1.8 μ m）；流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）- 0.1% 甲酸乙腈溶液（B），洗脱梯度（0~9.0 min，5%~95%B；9.0~10.0 min 95%B；10.0~11.1 min，95%~5%B；11.1~14.0 min，5%B）；流速：0.35 mL \cdot min⁻¹；柱温：40 $^{\circ}$ C；进样量：2 μ L。

1.4.3 质谱条件

采用电喷雾离子源，温度：550 $^{\circ}$ C；离子喷雾电压：5 500 V（正离子模式）/-4 500 V（负离子模式）；离子源气体 I、气体 II 和气帘气分别设置为 50、60、25 psi，碰撞诱导电离参数设置为高；三重四级杆扫描采用多反应监测模式，并将碰撞气体（氮气）设置为中等；通过进一步的去簇电压和碰撞能优化，完成了各个多反应监测离子对的去簇电压和碰撞能；根据每个时期内洗脱的代谢物，在每个时期监测 1 组特定的多反应监测离子对。

1.4.4 化学成分分析

基于迈维代谢自建数据库 MetWare database，根据二级谱信息进行物质定性，利用三重四级杆质谱的多反应监测定量分析，采用 Analyst 1.6.3 软件处理质谱数据。

1.4.5 消石利胆丸治疗胆结石的网络药理学预测

（1）消石利胆丸成分靶点与相关疾病靶点收集。应用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，<https://old.tcmsp-e.com/index.php>）以及中医药百科全书数据库（ETCM，<http://www.tcmip.cn/ETCM/>）检索 UPLC-MS/MS 检测平台所得物质对应靶点。将靶点导入 String 数据库（<https://cn.string-db.org/>）对所得成分靶点进行规范验证得到官方基因名称并联合 UniProt 数据库（<https://www.uniprot.org/>）查缺补漏，补全成分靶点基因名称。采用疾病靶点数据库（DisGeNET，<https://www.disgenet.org/>）检索胆石症及其相关病症如

“gallstone” “Cholelithiasis” “cholecystitis” 等，获得胆石症相关靶点。

(2) 韦恩图及成分靶点网络图构建。将所得成分靶点以及胆石症相关靶点分别导入 Venny 2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 作图并取交集，交集靶点即为消石利胆丸治疗胆石症潜在作用靶点。将成分与靶点分类整理之后导入 Cytoscape 3.9.1 软件，搭建消石利胆丸治疗胆石症的成分-靶点网络图。

(3) 消石利胆丸-胆石症靶点蛋白互作网络构建。将交集靶点导入 String 数据库，设置物种类型为“Homo sapiens”，其他均为默认值，分析构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI)。下载数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，绘制 PPI 网络图，使用软件插件 CytoNCA 分析 PPI 网络筛选出核心靶点。

(4) 基于 DAVID 生物数据库关键靶点的 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。将交集靶点导入 DAVID 生物数据库 (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对相关靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析，以深入探究消石利胆丸与胆石症交集靶点在信号通路中的作用方式，作用路径及生物过程等。

1.4.6 关键成分与核心靶点的分子对接验证

将成分与靶点分类整理之后导入 Cytoscape 3.9.1 软件，使用 CytoNCA 分析，以介数中心性为参照筛选出前 5 位核心成分；同时将得到的前 5 位核心靶点再次导入 String 数据库检索相关蛋白并结合文献确定蛋白质结构数据库 (RCSB Protein Data Bank, RCSB PDB) 编号并下载，导入 AutoDockTools 1.5.7 软件对蛋白分子删减水分子和加氢；应用 TCMSp 数据库和 PubChem 数据库检索得到相关成分分子的 3D 结构文件，导入 AutoDockTools 1.5.7 软件准备对接前的处理；进行半柔性分子对接后计算最低结合能保存结果后，导入 PyMOL 进行可视化处理。

1.4.7 关键成分的抗炎活性验证

(1) CCK-8 法检测 RAW264.7 细胞存活率。RAW264.7 细胞培养条件为含 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养液、于 37 °C、5% CO₂ 恒

温培养箱中培养；取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中，接种密度为 1×10^4 个/孔，24 h 后分别换成含黄芩素 (25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、槲皮素 (25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、大黄素 (25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、消石利胆丸提取物 (25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DMEM 培养液，继续孵育 24 h 后，弃上清，加 10 μL 的 CCK-8，90 μL 培养基继续孵育 0.5 h 后，酶标仪检测各孔 570 nm 的吸光度 (*A*) 值，根据公式计算细胞存活率：细胞存活率 (%) = $(1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$ (对照组不含药物)。

(2) Griess 法检测 RAW264.7 细胞 NO 分泌量。将 RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中，培养 24 h 后，细胞培养液更换为含各浓度药物的 DMEM 培养液 (根据 MTT 细胞活力实验选择浓度分别为 50、25、12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，并加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激细胞分泌 NO，每组 3 个复孔；继续培养 24 h 后，收集细胞培养上清，按照 NO 检测试剂盒检测 NO 生成量，计算 NO 释放率：NO 释放率 (%) = $(\text{样品孔 } A \text{ 值} - \text{空白孔 } A \text{ 值}) / (\text{对照孔 } A \text{ 值} - \text{空白孔 } A \text{ 值}) \times 100\%$ (对照孔不含药物)。

(3) RT-PCR 检测 TNF- α mRNA 表达水平。给药 4 h 后，收集细胞，使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析，反应体系 20 μL ，PCR 扩增反应条件为：95 °C 15 min，95 °C 10 s，60 °C 40 s，延伸 72 °C 32 s，共 40 个循环，并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 mRNA 相对表达量。引物序列如下： β -actin：上游 CCTGACTGACTACCTCATGAAG，下游 GACGTAGCACAGCTTCTCCTT；TNF- α ：上游 CTGGTATGAGCCCATCTATC，上游 CGAAGTGGTGGTCTTGTG。

2 结果

2.1 消石利胆丸的化学成分分析

消石利胆丸在正负离子模式下的总离子流见图 1，初步鉴定出多个化合物，包括酚酸类、木脂素类、萜类、生物碱、蒽醌、香豆素等多种类型。结合峰面积数据，中国药典及各级标准中规定的化学成分，并采用标准品比对，共筛选出 30 个化合物，具体峰面积数值以及对应成分名称等信息见表 1。

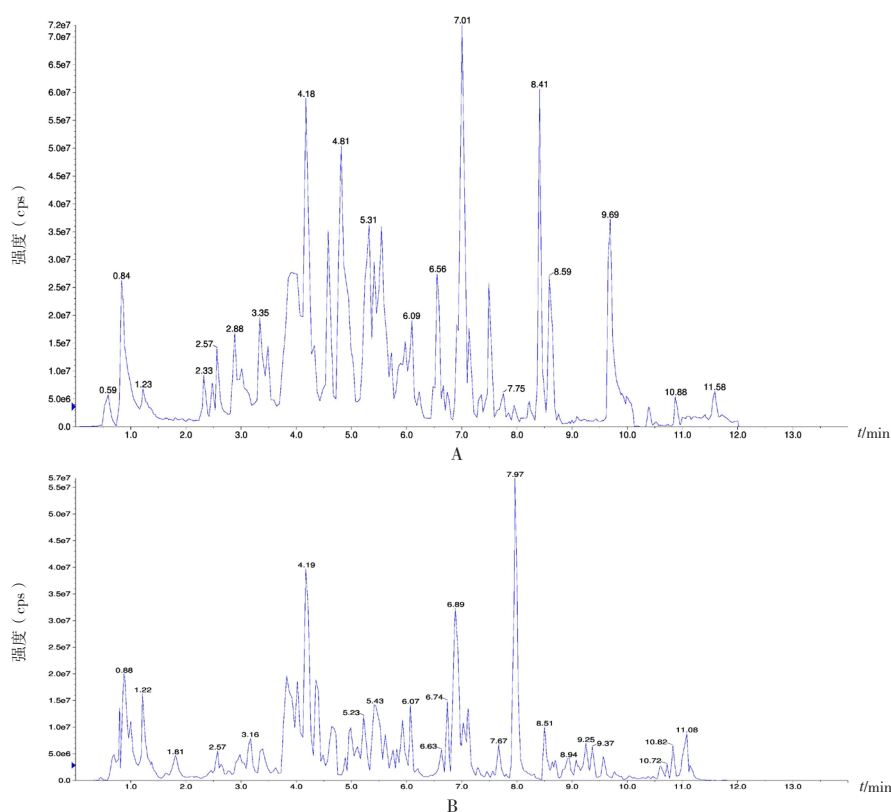


图1 消石利胆丸正 (A)、负 (B) 离子模式下的总离子流图

Figure 1. Total ion current diagram of Xiaoshi Lidan pills in positive (A) and negative (B) ion mode

表1 消石利胆丸中化学成分的UPLC-MS/MS分析

Table 1. UPLC-MS/MS analysis of chemical components in Xiaoshi Lidan pills

物质	保留时间	峰面积	分类	分子式	来源	编号
<i>N</i> -甲基酪胺 (<i>N</i> -methyltyramin)	1.31	6.88×10^6	其他类	$C_9H_{13}NO$	枳实	LD15
大麦芽碱 (hordenine)	1.38	2.19×10^6	生物碱	$C_{10}H_{15}NO$	麦芽	LD25
表没食子儿茶素 (epigallocatechin)	2.76	1.02×10^4	黄酮	$C_{15}H_{14}O_7$	其他	LD24
丁香苷 (syringin)	2.87	7.00×10^4	酚酸类	$C_{17}H_{24}O_9$	木香、枳实	LD19
松柏苷 (coniferin)	2.87	1.56×10^5	酚酸类	$C_{16}H_{22}O_8$	枳实、半夏	LD26
氧化芍药苷 (oxypaeoniflorin)	2.90	2.38×10^5	萜类	$C_{23}H_{28}O_{12}$	白芍	LD18
芍药苷 (paeoniflorin)	3.63	4.62×10^6	萜类	$C_{23}H_{28}O_{11}$	白芍	LD8
番泻苷 B (sennoside B)	3.68	4.31×10^4	醌类	$C_{42}H_{38}O_{20}$	大黄	LD21
木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (luteolin-7- <i>O</i> -glucuronide)	3.89	1.58×10^8	黄酮	$C_{23}H_{22}O_{12}$	枳实、麦芽	LD29
柚皮素-7- <i>O</i> -新橙皮糖苷 (naringenin-7- <i>O</i> -Neohesperidoside)	4.02	1.24×10^7	黄酮	$C_{27}H_{32}O_{14}$	枳实	LD16
橙皮素-7- <i>O</i> -芸香糖苷 (hesperetin-7- <i>O</i> -rutinoside)	4.20	8.51×10^7	黄酮	$C_{28}H_{34}O_{15}$	枳实	LD30
大黄酸 (rheic acid)	4.38	8.59×10^7	醌类	$C_{15}H_8O_6$	大黄	LD4
芦荟大黄素 (aloemodin)	4.59	2.94×10^6	醌类	$C_{15}H_{10}O_5$	大黄	LD3
槲皮素 (quercetin)	5.12	6.65×10^4	黄酮	$C_{15}H_{10}O_7$	柴胡、山楂	LD20
黄豆黄素 (glycitein)	5.31	5.60×10^5	黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	其他	LD27
肉桂醛 (cinnamaldehyde)	5.93	5.78×10^3	酚酸类	C_9H_8O	木香、郁金	LD28
黄芩素 (baicalein)	5.98	4.68×10^6	黄酮	$C_{15}H_{10}O_5$	黄芩、半夏	LD14

续表1

物质	保留时间	峰面积	分类	分子式	来源	编号
柴胡皂苷A (saikosaponin A)	6.49	1.07 × 10 ⁷	萜类	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	柴胡	LD1
汉黄芩素 (wogonin)	6.93	6.33 × 10 ⁷	黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	黄芩	LD9
金合欢素 (acacetin)	7.14	2.22 × 10 ⁶	黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	黄芩	LD17
榄香素 (elemicin)	7.40	3.45 × 10 ⁴	酚酸类	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	郁金	LD22
甲基丁香酚 (methyleugenol)	7.44	2.23 × 10 ⁴	酚酸类	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	柴胡、厚朴	LD23
柴胡皂苷D (saikosaponin D)	7.47	6.66 × 10 ⁶	萜类	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	柴胡	LD2
大黄素 (emodin)	7.95	4.92 × 10 ⁷	醌类	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄	LD5
和厚朴酚 (honokiol)	7.98	5.67 × 10 ⁷	木脂素和香豆素	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	厚朴	LD13
木香炔内酯 (costunolide)	8.42	2.89 × 10 ⁷	萜类	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	木香	LD10
厚朴酚 (magnolol)	8.51	4.10 × 10 ⁷	木脂素和香豆素	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	厚朴	LD12
去氢木香内酯 (dehydrocostus lactone)	8.58	4.06 × 10 ⁷	萜类	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	木香	LD11
大黄酚 (chrysophanic acid)	9.08	1.24 × 10 ⁶	醌类	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	半夏、大黄、木香	LD6
大黄素甲醚 (physcion)	9.57	4.93 × 10 ⁶	醌类	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	大黄	LD7

2.2 消石利胆丸活性成分靶点

2.2.1 消石利胆丸治疗胆石症靶点预测

将筛选到的化合物经过 TCMSP 数据库和 ETCM 数据库检索共得到靶点并去除重复后共 315 个。应用 DisGENT 数据库检索后得到胆石症有关疾病基因去除重复后 1 373 个，与同样去除重复后的成分基因进行匹配最终得到 107 个交集基因并绘制 Venn 图 (图 2)，此为预测的消石利胆丸治疗胆石症潜在靶点。将成分与靶点整理后导入 Cytoscape 3.9.1 软件，绘制“消石利胆丸-活性成分-靶点”网络图 (图 3)，介数中心性^[7]排名前 5 的有汉黄芩素、槲皮素、黄芩素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素，表明这几种成分在消石利胆丸治疗结石症中可能起着重要作用。

2.2.2 消石利胆丸治疗胆石症靶点的PPI网络搭建与分析

将交集所得 107 个靶点上传到 String 数据库选择 TSV 文件并下载，将文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件绘制 PPI 网络图 (图 4)。以介数中心性为指标，得到排名前 10 的的靶点 (表 2)，这些靶点为消石利胆丸治疗胆石症的关键靶点。

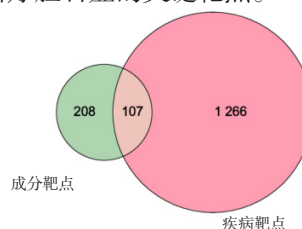


图2 消石利胆丸成分靶点与胆石症疾病靶点Venn图
Figure 2. Venn diagram of Xiaoshi Lidan pills ingredient targets and cholelithiasis disease targets

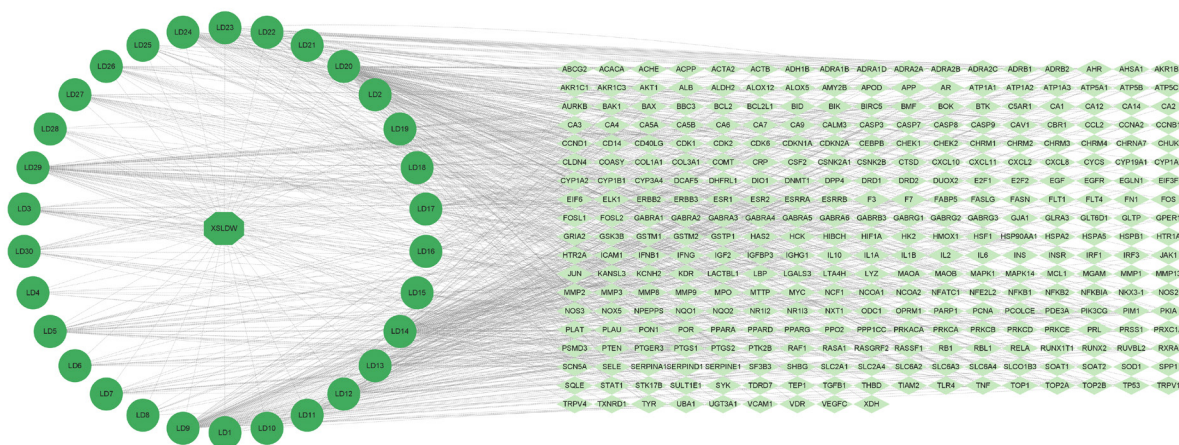


图3 消石利胆丸-活性成分-靶点网络图

Figure 3. Xiaoshi Lidan pills-active ingredient-target network diagram

注：左边外圈代表中药编号 (见表1)，内圈代表消石利胆丸，右边方形代表靶点基因。

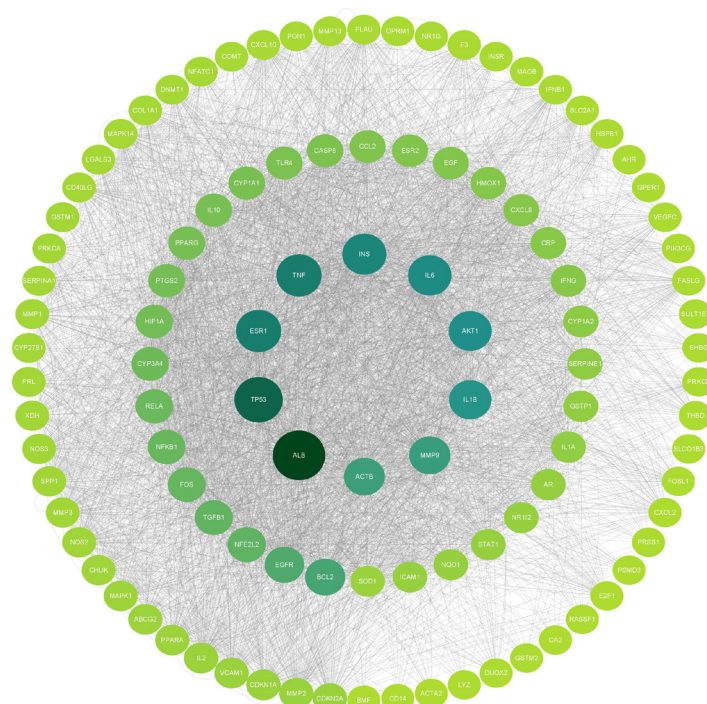


图4 消石利胆丸治疗胆石症靶点的PPI网络

Figure 4. PPI network of targets for Xiaoshi Lidan pills to treat cholelithiasis

注：圆圈代表靶点，连线代表靶点间存在相互作用关系，颜色越深代表相互作用关系越紧密。

表2 介数中心性排名前10的的靶点

Table 2. Top 10 targets of betweenness

靶点名称	介数中心性	度值
血清白蛋白 (Alb)	522.653 923 3	172
细胞肿瘤抗原p53 (TP53)	414.221 523 3	170
雌激素受体1 (ESR1)	330.295 516 0	148
肿瘤坏死因子 (TNF)	329.592 087 4	174
胰岛素 (INS)	299.741 743 4	166
白细胞介素-6 (IL-6)	282.135 521 4	170
蛋白激酶B (AKT1)	269.175 903 2	166
白细胞介素-1 β (IL-1B)	252.468 861 0	164
基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)	219.158 985 8	150
β -肌动蛋白 (ACTB)	210.911 028 7	156

2.2.3 消石利胆丸治疗胆石症靶点的GO功能富集及KEGG通路富集分析

采用 DAVID 数据库对 107 个交集靶点进行 GO 富集分析得到结果 (图 5)，相关生物过程 556 个，主要有基因表达的正向调控、炎症反应、转录的正向调节，DNA 模板化、细胞对脂多糖的反应等过程。包括细胞组成 44 个主要为细胞外域、细胞外分泌体、大分子复合物、染色质等细胞成分。涉及分子功能 109 个，主要为酶结合、类固醇结合、相同的蛋白质结合、转录

共激活因子结合等分子功能。同时使用 DAVID 数据库对 107 个交集靶点进行 KEGG 通路富集分析得到信号通路 163 条，以 P 为参照筛选前 40 条通路 (图 5)，结果显示消石利胆丸治疗胆石症主要富集于糖尿病并发症中的高级糖基化终末产物-受体 (AGE-RAGE) 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、TNF 信号通路等通路上发挥作用。结果表明消石利胆丸通过作用于多条通路对胆石症进行预防与治疗。

2.3 消石利胆丸治疗胆石症靶点的分子对接分析

以介数中心性为参照筛选出的核心靶点与核心活性成分进行分子对接，进一步验证消石利胆丸治疗胆石症的作用及机制 (表 3)。研究报告结合能绝对值 $> 5.00 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 代表结合稳定， $> 7.00 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 代表具有强烈的结合活性。活性成分与靶点 TNF (7KPA) 结合能均大于 $7.00 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (图 6)，黄芩素、大黄素与靶点结合能均大于 $5.00 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。分子对接结果表明消石利胆丸活性成分与胆石症靶点有良好的结合能力。

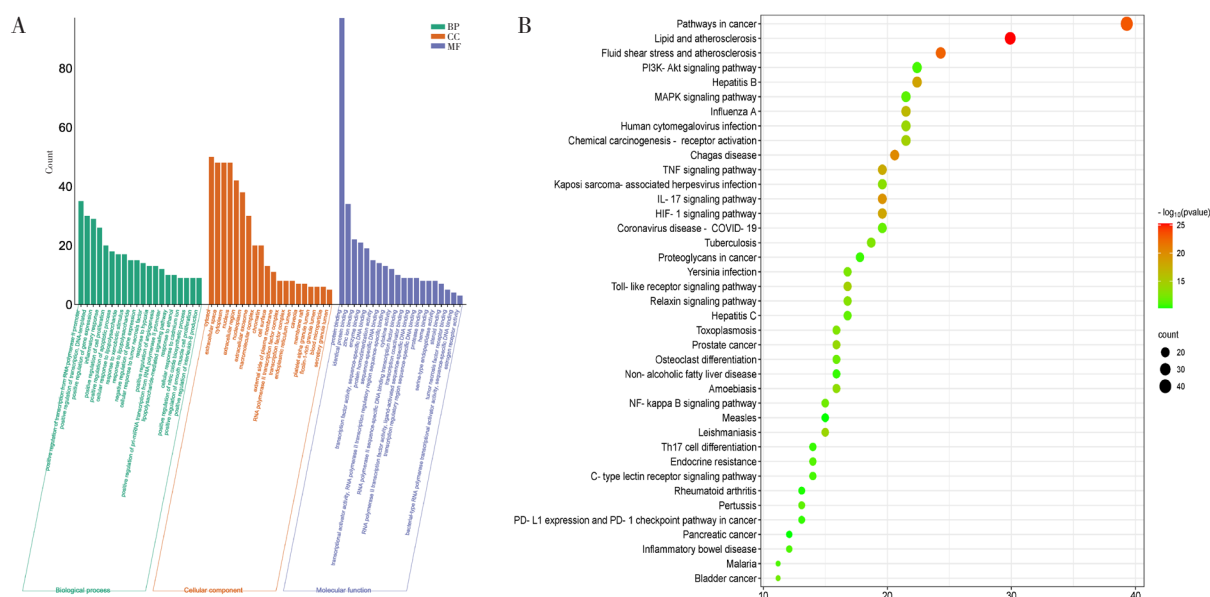


图5 消石利胆丸治疗胆石症靶点GO和KEGG分析图

Figure 5. GO and KEGG analysis chart of Xiaoshi Lidan pills' targets for treating cholelithiasis

注：A. GO的富集分析；B. KEGG的富集分析。

表3 活性成分与相关靶点分子对接最低结合能 (kcal · mol⁻¹)

Table 3. Minimum binding energy of docking active ingredients and related target molecules (kcal · mol⁻¹)

核心成分	Alb (1YSX [*])	TP53 (3DAB [*])	ESR1 (5KRA [*])	TNF (7KPA [*])	INS (1DEI [*])
汉黄芩素 (5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮)	-6.25	-5.47	-4.97	-7.12	-5.27
槲皮素	-5.86	-6.01	-4.61	-7.07	-5.89
黄芩素	-5.70	-6.02	-5.29	-8.45	-6.00
木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷	-5.08	-2.90	-2.75	-7.24	-4.95
大黄素	-6.63	-6.43	-5.70	-7.11	-6.26

注：^{*}为蛋白RCSB PDB编号。

2.4 消石利胆丸和关键成分的抗炎活性验证

2.4.1 消石利胆丸和关键成分对细胞存活率的影响

50 μg · mL⁻¹ 以下的消石利胆丸提取物、槲皮素和大黄素在 50 μmol · L⁻¹ 下细胞存活率均大于 90%，无明显细胞毒性；大黄素在 100 μmol · L⁻¹ 有一定的细胞毒作用，结果见图 7。

2.4.2 消石利胆丸和关键成分对NO分泌量的影响

结果见图 8，脂多糖可显著促进 RAW264.7 细胞 NO 的释放 (P < 0.01)，说明模型诱导成功。与模型组相比，消石利胆丸提取物可显著抑制 LPS 诱导 NO 产生 (P < 0.01)，具有一定的剂量依耐性。槲皮素、黄芩素和大黄素等均可抑制 NO 生成，其中槲皮素的抑制效果较好，3 个浓度的抑制率均大于 50%。

3 讨论

胆石症根据结石部位可分为胆囊结石、肝外胆管结石及肝内胆管结石，其中胆囊结石最为常见，约占 50%^[8-9]。细菌、寄生虫等诱发胆囊胆汁代谢障碍致使胆汁淤滞、阻碍胆道或者胆囊收缩能力降低等，不利于胆汁排泄，从而导致胆囊炎、胆石症^[5]。中医将胆结石归类于“胆胀”“胁痛”“黄疸”等之中，认为胆石症的病因与肝郁气滞、饮食不节及内伤湿热有关，因而疏肝利胆、清热化湿是临床最常用的方法^[2, 5]。消石利胆丸由柴胡、大黄、白芍、黄芩、郁金、厚朴、木香、枳实、山楂、鸡内金、麦芽等多味药组成，其中柴胡、郁金、枳实疏肝止痛，白芍缓肝和中，黄芩、大黄为苦寒之物清热利胆，山楂、鸡内金、麦芽健脾消食，厚朴宽中理气，配伍可行疏肝利胆之效。

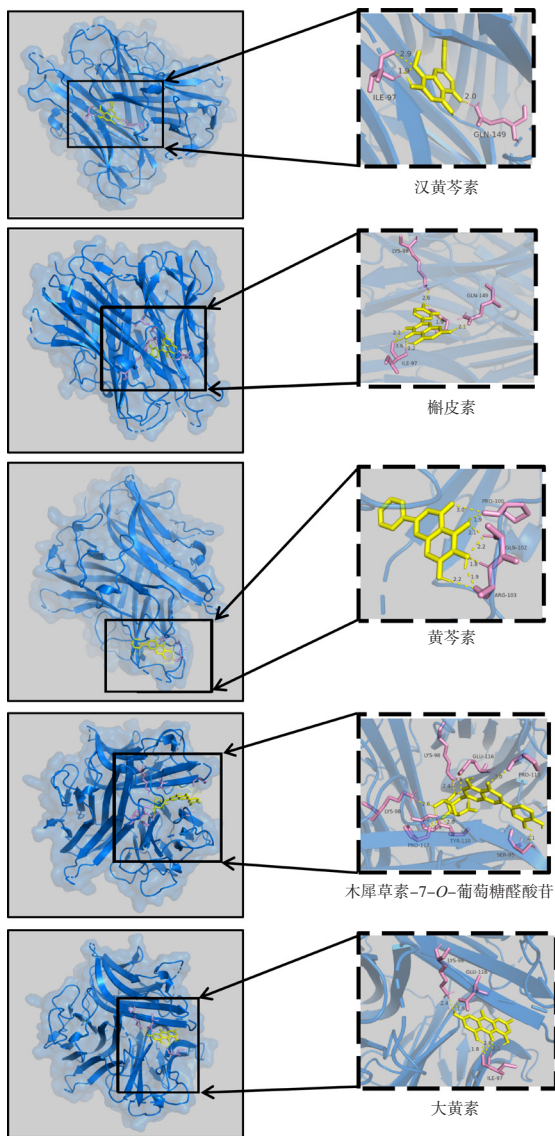


图6 汉黄芩素、槲皮素、黄芩素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素与TNF对接模式图
Figure 6. Diagram of the docking model of wogonin, quercetin, baicalein, luteolin-7-O-glucuronide, emodin and TNF

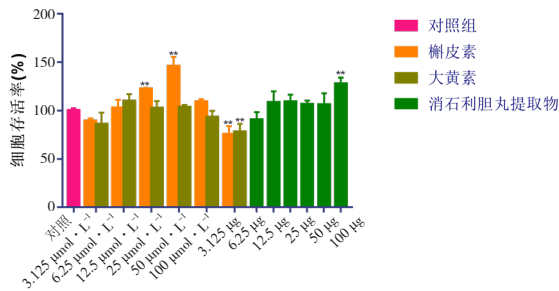


图7 消石利胆丸和关键成分对细胞存活率的影响
Figure 7. Effects of Xiaoshi Lidan pills and key components on cell survival rate

注：与对照组相比较，**P<0.01。

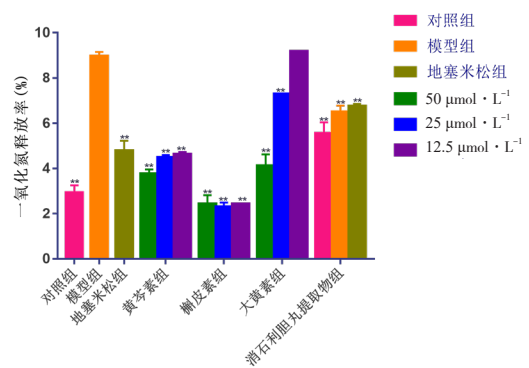


图8 消石利胆丸和关键成分对LPS诱导的RAW264.7细胞产生NO的影响

Figure 8. Effects of Xiaoshi Lidan pills and key ingredients on NO production in LPS-induced RAW264.7 cell

注：与模型组相比较，**P<0.01。

本研究通过UPLC-MS/MS检测结合文献调研，从消石利胆丸中筛选鉴定出30个活性成分，并采用网络药理学筛选得到与胆石症相关靶点107个，其中汉黄芩素、槲皮素、黄芩素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素、柴胡皂苷D、肉桂醛、去氢木香内酯等是治疗胆石症的关键成分。有研究显示胆石症患者TNF-α、IL-6、CA19-9等炎症因子水平明显升高，表明这些炎症因子与胆石症有着密切联系^[10]。黄芩苷和柚皮苷可抑制促炎因子，促进抗炎因子水平^[11-12]；汉黄芩素可以有效抑制TGF-β1表达，改善肾结石大鼠的生化指标及病理状况，且浓度越高效果越好^[13]；槲皮素是一种能够选择性抑制环氧化酶-2活性及巨噬细胞炎症反应的化合物^[14]；另有相关实验证明大黄素可以使小鼠体内IL-6、TNF-α、IL-1β等炎症因子水平降低而具有较强的抗炎效果^[15]。

GO富集分析发现，消石利胆丸相关靶点通过炎症反应、与类固醇结合等分子功能发挥作用。KEGG富集分析结果显示，消石利胆丸主要作用于脂质和动脉粥样硬化、IL-17信号通路、TNF信号通路等发挥作用。通过PPI网络分析可以得知ALB、TP53、ESR1、TNF、INS为消石利胆丸治疗胆石症核心靶点。ALB是体内主要的蛋白质，具有维持血浆胶体渗透压、结合运输物质等功能^[16]；TP53可以调控胆囊癌细胞的增殖，促进细胞凋亡，从而参与胆囊癌的发生发展^[17]；雌激素能够与肝中的ESR1结合，刺激体内的胆固醇分泌，增加胆汁中的胆固醇，导致肝脏中胆汁

的积聚和胆结石的形成^[18]；TNF- α 由脂肪组织分泌产生，研究显示胆石症患者体内 TNF- α 的表达与胆囊壁白细胞数量呈正相关，而慢性胆石症患者 TNF- α 的表达高于急性胆囊炎患者^[19]。因而，消石利胆丸有效活性成分可通过与以上靶点结合而发挥治疗胆结石作用。分子对接分析显示蛋白 TNF- α 与黄芩素的最低结合能绝对值最大，且与汉黄芩素、槲皮素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素对接结合能绝对值均大于其他蛋白，表明消石利胆丸可能通过抑制 TNF- α 基因表达的作用从而起到预防治疗胆石症的效果。

综上所述，消石利胆丸中发挥主要作用的活性成分包括汉黄芩素、槲皮素、黄芩素、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷、大黄素等，核心靶点为 ALB、TP53、ESR1、TNF、INS 等。GO 分析表明通过炎症反应、类固醇结合等发挥作用，KEGG 主要涉及脂质和动脉粥样硬化、TNF 等信号通路。同时分子对接和体外抗炎活性筛选结果显示，消石利胆丸通过黄芩素、槲皮素、大黄素等成分调控 TNF 等相关通路抑制炎症反应，从而起到治疗胆石症的效果，体现了中药复方治疗疾病多成分、多靶点、多途径的特点。

尽管如此，本实验通过网络药理学预测出的机制仅局限于动物基因水平上，没有在动物蛋白水平进行验证同时未搭建体内动物模型来验证预测，后续还需设计相关实验证实结论；同时，本次研究仅用对照品从液质 1 617 个成分筛选主要的活性成分进行网络药理学分析预测，不能充分研究消石利胆丸对胆石症的治疗机制，后续还需扩大范围进行更充分的分析。

参考文献

- 1 葛宏升. 胆囊结石形成机理及影响因素的最新研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(59): 144-145. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.59.067.
- 2 肖丽君, 甘苡榕, 刘春丽, 等. 中西医对胆石症的认识及其治疗复方中高频单味中药作用机制研究进展[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(1): 231-235. [Xiao LJ, Gan YR, Liu CL, et al. Understanding of cholelithiasis in traditional Chinese and western medicine and research progress of mechanism of action of compound high frequency single Chinese medicine in its treatment[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2023, 19(1): 231-235.] DOI:

10.11954/ytetyy.202301054.

- 3 魏奇锋. 中西医结合治疗老年胆囊炎胆石症临床观察[J]. 光明中医, 2020, 35(19): 3095-3097. [Wei QF. Observation on the therapeutic effect of integrated traditional Chinese and western medicine in treating senile cholecystitis and cholelithiasis[J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2020, 35(19): 3095-3097.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-8914.2020.19.049.
- 4 唐乾利, 刘祖军, 伍松合, 等. 大黄灵仙胶囊降低胆石术后残石率及复发率疗效观察[J]. 新中医, 2002, 34(6): 17-19. [Tang QL, Liu ZJ, Wu SH, et al. A clinical observation of Dahuang Lingxian capsule for decreasing residual stone rate and recurrence rate of cholelithiasis after operation[J]. Journal of new chinese medicine, 2002, 34(6): 17-19.] DOI: 10.3969/j.issn.0256-7415.2002.06.007.
- 5 高秀珍, 方达任, 陈学兵. 消石利胆丸利胆作用的实验研究[J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9(2): 44-44. DOI: 10.3969/j.issn.1008-987X.2007.02.022.
- 6 涂慧, 陈林, 周代俊, 等. 基于指纹图谱和网络药理学对经典名方五味消毒饮质量标志物的预测分析[J]. 中国药师, 2024, 27(4): 557-569. [Tu H, Chen L, Zhou DJ, et al. Quality marker prediction analysis of Wuwei disinfection decoction based on fingerprint and network pharmacology[J]. China Pharmacist, 2024, 27(4): 557-569.] DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202401123.
- 7 Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120. DOI: 10.1016/S1875-5364(13)60037-0.
- 8 Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, et al. Meta- and orthogonal integration of influenza "OMICS" data defines a role for UBR4 in virus budding[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(6): 723-735. DOI: 10.1016/j.chom.2015.11.002.
- 9 时昭红, 任顺平, 唐旭东, 等. 消化系统常见病急性慢性胆囊炎、胆石症中医诊疗指南(基层医生版)[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 793-800. <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTOTAL-BXY202002081.htm>.
- 10 秦胜利. 腹腔镜胆囊切除术对急性结石性胆囊炎患者术后 TNF- α 、IL-8 及 CRP 的影响[J]. 河南外科学杂志, 2017, 23(5): 31-32. DOI: 10.16193/j.cnki.hnwk.2017.05.017.
- 11 姜希红, 刘树民. 黄芩药理作用及其化学物质基础研究[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2004-2010. [Jiang XH,

- Liu SM. Research on Pharmacological Effects and Substance Basis of *Scutellaria Baicalensis*[J]. *China Pharmacist*, 2020, 23(10): 2004–2010.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-049X.2020.10.032](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-049X.2020.10.032).
- 12 Bayram P, Aksak Karamese S, Ozdemir B, et al. Two flavonoids, baicalein and naringin, are effective as anti-inflammatory and anti-oxidant agents in a rat model of polymicrobial sepsis[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45(5): 597–606. DOI: [10.1080/08923973.2023.2197143](https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2197143).
- 13 刘敬峰, 张峰, 曲志梅. 汉黄芩素对肾结石大鼠生化指标、肾组织病理及 TGF- β 1 的研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(12): 149–153,224. [Liu JF, Zhang F, Qu ZM. Effects of Wogonin on Biochemical indexes, Renal Histopathology and TGF- β 1 in Renal Calculi Rats[J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 49(12): 149–153,224.] DOI: [10.13192/j.issn.1000-1719.2022.12.040](https://doi.org/10.13192/j.issn.1000-1719.2022.12.040).
- 14 牛国敏, 张复华, 杨国雷, 等. 磷酸腺苷活性激酶/环氧化酶-2 在槲皮素抑制 K562 白血病细胞增殖中的作用 [J]. *黑龙江医学*, 2017, 41(4): 297–298. DOI: [10.3969/j.issn.1004-5775.2017.04.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-5775.2017.04.003).
- 15 张春玲, 梁超, 王宝爱, 等. 大黄素通过调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路对老年脑出血模型大鼠炎症因子的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(24): 2992–2996. [Zhang CL, Liang C, Wang BA, et al. Emodin regulates HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway and affects inflammatory factors in rats with cerebral hemorrhage in elderly[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2022, 38(24): 2992–2996. DOI: [10.3969/j.issn.1000-484X.2022.24.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-484X.2022.24.009).
- 16 王欣汝, 梁剑琦. AIP、ALB 和 UA 检测在早期糖尿病肾病中的临床应用价值 [J]. *医学理论与实践*, 2023, 36(12): 2085–2087. DOI: [10.19381/j.issn.1001-7585.2023.12.041](https://doi.org/10.19381/j.issn.1001-7585.2023.12.041).
- 17 周盈, 温桂海, 史增辉. TP53、NLRP3、miR-551b 在胆囊癌组织中的表达及与临床病理特征和预后的关系 [J]. *河北医科大学学报*, 2023, 44(4): 423–427, 433. [Zhou Y, Wen GH, Shi ZH. The expression of TP53, NLRP3, and miR-551b in gallbladder cancer tissues and their relationship with clinicopathological characteristics and prognosis[J]. *Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2023, 44(4): 423–427, 433.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-3205.2023.04.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-3205.2023.04.011).
- 18 Sun H, Warren J, Yip J, et al. Factors influencing gallstone formation: a review of the literature[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 550. DOI: [10.3390/biom12040550](https://doi.org/10.3390/biom12040550).
- 19 Kasprzak A, Szmyt M, Malkowski W, et al. Analysis of immunohistochemical expression of proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6, and TNF- α) in gallbladder mucosa: comparative study in acute and chronic calculous cholecystitis[J]. *Folia morphologica*, 2019, 74(1): 65–72. DOI: [10.5603/FM.2015.0011](https://doi.org/10.5603/FM.2015.0011).
- 收稿日期: 2024 年 03 月 06 日 修回日期: 2024 年 08 月 29 日
本文编辑: 周璐敏 洗静怡