

生血宁片有效成分及其治疗肾性贫血的作用机制研究

汪月丹^{1,2a}, 尚飞³, 方锦颖^{1,2a}, 张娇^{1,2a}, 张子义^{2b}, 李文歌^{1,2a*}(1.北京中医药大学, 北京 100029; 2.中日友好医院, a.肾内科, b.国际部, 北京 100029; 3.北京化工大学分析测试中心, 北京 100029)

摘要: 目的 检测生血宁片主要化学成分, 并预测其治疗肾性贫血的有效成分及潜在的作用机制。方法 根据甲醇提取液色谱质谱信息, 并结合对照品的质谱碎片裂解规律和文献数据, 对生血宁片化学成分进行鉴定; 利用 SwissTargetPrediction 网站预测成分的作用靶点及 GeneCards 数据库收集肾性贫血相关靶点, 获得交集靶点; 通过 String 数据库构建蛋白相互作用网络及 Metascape 网站对交集靶点基因进行基因本体功能富集分析及 KEGG 通路富集分析, 最后利用分子对接进一步分析。结果 通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术共推出生血宁片提取液中 24 个化学成分, 其中 9 个为可能的活性成分, 对应作用靶点 363 个; 筛选出 2 722 个与肾性贫血相关的疾病靶点, 疾病-药物交集靶点 166 个, 涉及与肾性贫血相关的信号通路 186 条, 通路主要与肿瘤、抗纤维化、炎症、氧反应等方面相关。分子对接结果显示, 筛选的生血宁片活性成分西得罗、焦脱镁叶绿酸 a、二甲基原卟啉 IX 二甲酯、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a 等与 SRC、HSP90AA1、PIK3CA 等潜在靶点之间结合力较强。结论 生血宁片可能通过补充铁元素、减轻炎症状态、抗纤维化等方面改善肾性贫血。

关键词: 生血宁片; 肾性贫血; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)11-1481-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221593

引用本文: 汪月丹, 尚飞, 方锦颖, 等. 生血宁片有效成分及其治疗肾性贫血的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1481-1489.

Study on the Active Components of Shengxuening Tablet and Its Mechanism in the Treatment of Renal Anemia

WANG Yuedan^{1,2a}, SHANG Fei³, FANG Jinying^{1,2a}, ZHANG Jiao^{1,2a}, ZHANG Ziyi^{2b}, LI Wenge^{1,2a*}(1.Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2.China-Japan Friendship Hospital, a.Department of Nephrology, b.Department of International, Beijing 100029, China; 3.Analysis and Testing Center, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the main chemical constituents and the potential molecular mechanism of Shengxuening tablets in treating renal anemia. **METHODS** The chemical constituents of Shengxuening tablets were identified according to the mass spectrometric fragment cleavage pattern. Swisstargetprediction website was used to screen the corresponding action targets of active components of Shengxuening tablets, and GeneCards database was used to screen related targets of renal anemia, getting intersection targets. String database was used to identify protein-protein interaction network. Genome ontology function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of the target of Shengxuening tablets on renal anemia were performed through Metascape website. The above results were verified by molecular docking. **RESULTS** Twenty-four chemical constituents of Shengxuening tablets extract were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS technology, among which nine were active components, corresponding to 363 targets. A total of 2 722 disease targets related to renal anemia were retrieved, including 166 disease-drug intersection targets, 186 pathways related to renal anemia, which were mainly related to cancer, anti-fibrosis, inflammation, oxygen response. Molecular docking results showed that siderol, pyropheophorbide a, dimethylprotoporphyrin IX dimethyl ester, 31,32-dihydro-phaeophorbide-a could bind well with SRC, HSP90AA1, PIK3CA. **CONCLUSION** Shengxuening tablets may improve renal anemia by supplementing iron, improving inflammatory status and anti-fibrosis.

KEYWORDS: Shengxuening tablets; renal anemia; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; molecular docking

贫血是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)常见的并发症, 全球范围内 CKD 患病率约为 9.1%^[1]。荟萃分析显示, 209 311 例 CKD 患者中有 84 882(41%)例患者处于贫血状态^[2]。严重贫血导致

血流动力学改变, 影响患者生活质量、增加不良预后风险^[3]。生血宁片主要成分是蚕沙提取物, 在其制备过程中将蚕沙通过浸提、溶解皂化、抽提、酸析、洗涤、铁代络合等步骤制成铁叶绿酸钠及叶绿

作者简介: 汪月丹, 女, 硕士, 住院医师 E-mail: 1053071606@qq.com

*通信作者: 李文歌, 男, 博士, 主任医师, 教授 E-mail: wenge_lee2002@126.com

素衍生物^[4]。蚕沙具有祛风除湿、活血定痛的功效；现代药理学研究表明，蚕沙能改善贫血、消炎抑菌、抗肿瘤、降血糖等^[5]。临床上联合使用生血宁片与红细胞生成刺激剂治疗 CKD 患者的肾性贫血^[6-7]。

目前对于生血宁片有效成分治疗肾性贫血的机制尚缺乏全面系统的认识。本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术联合网络药理学及分子对接方法，构建生血宁片与肾性贫血相互作用网络，以期为进一步研究和开发生血宁片提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Xevo G2QTof 液质联用仪(美国 Waters 公司)、ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Masslynx v4.1 数据处理系统。甲醇、乙腈、甲酸为质谱级(美国 Fisher 公司)、亮氨酸脑啡肽(StandardsKit for TOF G2-S)均购自美国 Waters 公司；所有用水均为去离子水。生血宁片(国药准字 Z20030088, 武汉联合药业有限责任公司, 批号: 20210802; 规格: 每粒装 0.25 g)。叶酸、β-胡萝卜素、胆固醇对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 100074-202016, 100445-201802, 111618-202002; 纯度均>98.0%)。

1.2 样品溶液的配制

准确称量 300 mg 生血宁片，粉碎得到药品粉末，加入 4 mL 甲醇，漩涡振荡 30 s 后超声提取 15 min，在 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上层清液，过 0.2 μm 有机滤膜，供检测使用。

1.3 分析条件

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B)溶液, 各含 0.1%甲酸; 梯度洗脱(0~1 min, 95%B; 1~3 min, 95%→85%B; 3~8 min, 85%→50%B; 8~11 min, 50%→0%B; 11~13 min, 0%B; 13~13.1 min, 0%→95%B; 13.1~15 min, 95%B), 柱温为 45 °C, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 1 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺), 采用 MS 全扫描模式, 扫描范围为 *m/z* 50~1 800, 扫描时间为 0.1 s, 检测时间为 15 min。

低能量碰撞电压(CE)为 6 V, 高能量碰撞电压为 15~45 V; 正离子模式毛细管电压均为 2 kV, 锥孔电压为 40 V, 离子源温度为 100 °C, 脱溶剂化温度为 400 °C, 锥孔气体流量为 10 L·h⁻¹, 脱溶剂化气体流量为 800 L·h⁻¹。

1.4 生血宁片有效成分-肾性贫血基因靶点网络的构建

通过人类代谢组数据库(<https://hmdb.ca/>)对分析鉴定的化合物检索查询 SMILES 号, 将 SMILES 号导入 SwissADME 网站(<http://www.swissadme.ch/>), 收集生血宁片的主要活性成分。根据 Lipinski 五规则及相关文献对成分毒物动力学(absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME)参数进行设置, 筛选出生血宁片在人体内生物活性较高的成分, 筛选条件: “GI absorption”为 “High”, “Druglikeness”中 “Lipinski” “Ghose” “Veber” “Egan” “Muegge” >2 项为 “Yes”。通过 SwissTargetPrediction 网站 (<http://swisstargetprediction.ch>)查找相关作用靶点, 纳入 “Probability>0”的成分作用靶点。使用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)校正基因靶点名称, 限定物种为 “Human”, 获取 UniProt ID, 得到药物靶点 ID。从 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)获取与肾性贫血相关的靶点, 根据 “相关性评分”进行分段, 以相关性评分的中位数 2.46 为分界, 去除相关性较低的疾病靶点, 并导入 UniProt 数据库的相应 UniProt ID, 得到疾病靶点 ID。将前期获得的生血宁片成分对应靶点及肾性贫血相关的靶点取交集, 得到疾病-药物交集基因靶点。将药物-疾病交集基因靶点及药物有效成分制作 network 文件及 type 文件。2 个文件通过 Cytoscape 3.8.2 软件获得生血宁片有效成分-肾性贫血基因靶点网络, 并对其进行调整及美化。

1.5 蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建

通过 String 数据库(<https://string-db.org/>), 输入前期获得的疾病-药物交集基因靶点, 物种选择人 (*Homo sapiens*), 将最低相互作用评分设置为 “highest confidence(0.900)”, 其余设置均为默认值, 以确保结果的准确性, 去除网络中的单一节点, 构建 PPI 网络。将结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行拓扑分析, 通过 Degree 值筛选得到 PPI 网络核心基因。

1.6 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析及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

使用前期获得药物-疾病交集基因靶点, 通过 Metascape 网站(www.metascape.org/gp/index.html)对基因靶点进行富集分析, 包括 GO 功能富集分析

及 KEGG 生物信号通路富集分析,GO 功能富集分析包含 3 个部分分别是:细胞组分、分子功能、生物过程。导入交集基因靶点,物种选择人类(“*H. sapiens*”),设定 $P<0.01$,筛选出具统计学意义的细胞组分、分子功能、生物学过程和信号通路。

1.7 分子对接

基于上述步骤的结果,选择 PPI 网络中“Degree”值最大的 5 个靶点作为受体,与筛选后的生血宁片活性成分进行分子对接。具体对接方法如下:在 PDB 数据库下载分辨率最高的受体的人源性蛋白结构,在 PubChem 网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载生血宁片主要各活性成分的 SDF 三维结构则作为配体。逐一导入 AutoDockTool、AutoDockVina 软件进行结构常规预处理,然后逐一对药物的主要活性成分和蛋白进行对接,并记录结果、制作热力图。对接能绝对值最高的分子对接结果导入 Pymol 进行绘制对接分子结构图。

2 结果

2.1 UPLC-Q-TOF-MS 数据结果及成分分析

采用正离子模式进行扫描,对生血宁片提取液进行分析。由于色谱系统中金属元素对各色谱峰的色谱行为存在一定影响,检测过程中消除了金属离子的干扰,因此结果中不显示叶绿素衍生物的铁代络合物形式。生血宁片正离子模式下总离子流图见图 1。通过比较成分保留时间、分子精确质量、同位素、碎片离子,并查阅相关文献及人类代谢组数据库(<https://hmdb.ca/>)进行特征峰的确认^[8-21]。从生血宁片提取液中推测出了 24 个化合物,见表 1,其中具有 4 个吡咯环结构的成分,

共 6 个,分别为二氢卟吩 e6(chlorin e6)、二氢卟吩 p6(chlorin p6)、脱镁叶绿酸盐 A(pheophorbide A)、焦脱镁叶绿酸 a(pyropheophorbide a)、二甲基原卟啉 IX 二甲酯(dimethylprotoporphyrin IX dimethyl ester)、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a(31,32-dihydrophaeophorbide-a)。在生血宁片提取液中未找到叶酸、 β -胡萝卜素、胆固醇对应的化合物特征峰值。

生血宁片的主要成分为二氢卟吩 e6 及二氢卟吩 p6,其鉴定过程如下:二氢卟吩 e6 的分子式为 $C_{34}H_{36}N_4O_6$,相对分子质量为 596.673, m/z 597.271 为 $[M+H]^+$ 峰,碎片离子 m/z 538.252 8 为 $[M-C_2H_2O]^+$ 峰,二氢卟吩 p6 的分子式为 $C_{33}H_{34}N_4O_6$,相对分子质量为 582.646, m/z 583.255 为 $[M+H]^+$ 峰,碎片离子 m/z 539.266 0 为 $[M-C_2O_2H]^+$ 峰。

2.2 生血宁有效成分及靶点的收集及筛选

通过 SwissADME 网站检索并通过筛选后得到生血宁片有效成分 9 个,具体包括:1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-癸酮[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone]、脱氢植物鞘氨醇(dehydrophytosphingosine)、苯乙酸辛酯(octyl phenylacetate)、植物鞘氨醇(phytosphingosine)、西得罗(siderol)、焦脱镁叶绿酸 a(pyropheophorbide a)、二甲基原卟啉 IX 二甲酯(dimethylprotoporphyrin IX dimethyl ester)、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a(31,32-dihydrophaeophorbide-a)、年葵酮 B(annuionone B)。通过 SwissTargetPrediction 网站获得上述有效成分的作用靶点并去重复靶点后,共得到对应的 363 个靶点,经 Uniprot 数据库去除非人类来源的靶点,校正靶点后得到 363 个靶点。

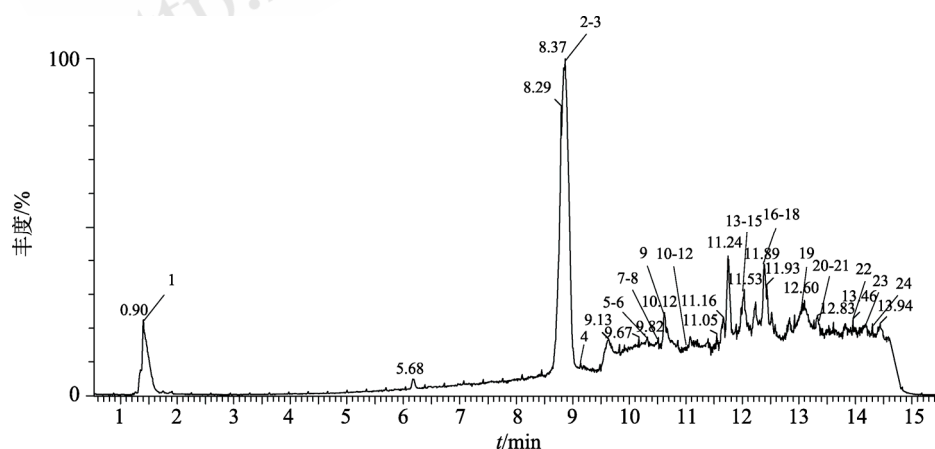


图 1 生血宁片正离子模式下总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of Shengxuening tablet in positive ion mode

表 1 推测生血宁片化合物结构信息表

Tab. 1 Speculated compound structure information of Shengxuening tablet

编号	推测化合物	分子式	偏差	保留时间/ min	测量值/ m/z	理论值/ m/z	碎片离子
1	glycerophosphocholine ^[8]	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	3.30	0.90	258.111	257.221	203.053 6, 185.043 1, 127.039 9
2	(3β,22α)-12-oleanene-3,22,24,29-tetrol-3-[arabinosyl-(1->3)-arabinoside] ^[9]	C ₄₀ H ₆₆ O ₁₂	0.84	8.36	739.463	738.945	650.171 2, 353.216 5, 265.165 3, 221.139 2, 177.113 0, 133.087 1
3	momordicoside D ^[10]	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₃	-0.61	8.41	783.488	783.000	757.103 5, 649.171 0, 604.165 6, 501.173 4, 500.159 9, 489.158 3, 266.986 7, 240.991 4, 128.995 4
4	(9Z,11E,13E,15Z)-4-oxo-9,11,13,15-octadecatetraenoic acid	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	2.26	8.60	291.196	290.397	251.664 0, 177.119 8, 155.069 5, 133.087 2
5	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	1.92	9.76	279.196	278.387	205.108 0, 155.071 3
6	dehydrophytosphingosine ^[11]	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	1.52	9.81	316.285	315.491	205.108 2, 155.071 5
7	octyl phenylacetate	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	3.03	9.99	249.186	248.361	213.110 9, 205.107 8, 155.070 7
8	phytosphingosine ^[12]	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	1.10	10.05	318.301	317.507	213.114 2, 205.107 2, 155.071 1
9	chlorin e6 ^{*[13]}	C ₃₄ H ₃₆ N ₄ O ₆	0.94	10.12	597.271	596.673	538.252 8, 465.228 0, 407.22 67, 205.106 6, 155.071 4
10	2-Hydroxy-3-(palmitoyloxy)propyl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate ^[12]	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	0.39	10.46	496.340	495.630	381.172 6, 213.114 0, 205.109 2, 155.072 2
11	chlorin p6 ^{*[13]}	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₆	0.09	10.58	583.255	582.646	539.266 0, 503.242 9, 421.240 9, 205.109 5, 155.071 6
12	pheophorbide A ^{*[14]}	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	-0.27	10.64	593.276	592.684	539.266 2, 537.263 5, 381.171 0, 365.262 6, 249.134 2, 205.107 6, 155.071 4
13	dimethylprotoporphyrin IX dimethyl ester ^{*[15]}	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₄	0.31	11.37	591.296	590.711	565.244 0, 536.274 1, 535.271 0, 435.250 6, 326.209 1, 159.116 5, 123.082 3
14	siderol ^[16]	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	-0.03	11.46	347.258	346.504	263.202 2, 193.124 2
15	pyropheophorbide a ^{*[14]}	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₃	-1.55	11.53	535.270	534.648	507.275 1, 433.202 8, 205.109 4, 123.082 3
16	31,32-dihydro-phaeophorbide-a ^{*[14]}	C ₃₅ H ₃₈ N ₄ O ₅	-0.94	11.74	595.291	594.700	549.249 8, 477.236 2, 339.290 8, 137.097 8, 123.081 8
17	moreollin ^[17]	C ₃₅ H ₄₂ O ₈	1.28	11.84	591.296	590.703	575.301 0, 474.242 7, 159.117 9, 123.082 6
18	gamma-tocotrienol ^[18]	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	0.25	11.89	411.326	410.632	339.289 4, 147.119 2, 123.082 0
19	aralia cerebroside ^[19]	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₀	2.13	12.51	732.564	732.040	664.624 4, 663.455 0, 607.392 9, 551.330 6, 495.266 9, 439.204 7, 298.277 5, 280.263 7, 133.101 4, 123.083 0
20	cerebroside B ^[20]	C ₄₁ H ₇₇ NO ₉	-0.05	12.87	728.567	728.051	613.484 7, 580.529 8, 554.515 5, 536.503 0, 530.489 2, 282.280 4, 276.268 8, 137.090 5, 123.081 5
21	annuionone B ^[21]	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	2.72	12.97	223.133	222.280	159.116 2, 135.116 6, 123.081 5
22	1,1'-(1,4-dihydro-4-nonyl-3,5-pyridinediyl) bis[1-dodecanone]	C ₃₈ H ₆₉ NO ₂	-0.71	13.46	572.540	571.960	512.503 1, 429.095 0, 355.070 8, 221.085 3, 123.080 9
23	culinariside	C ₄₅ H ₈₇ NO ₁₀	-0.46	13.61	802.640	802.173	692.658 9, 64.585 8, 622.575 8, 599.505 1, 597.488 4, 577.517 2, 551.502 3, 355.069 2, 280.264 2, 262.256 3, 123.081 4
24	1,1'-(1,4-dihydro-4-nonyl-3,5-pyridinediyl) bis[1-decanone]	C ₃₄ H ₆₁ NO ₂	2.90	13.83	516.479	515.854	429.089 8, 341.017 0, 221.089 9, 138.091 6, 123.080 9

注: *代表具有 4 个吡咯环结构。

Note: *Represented the compound had four pyrrole ring structures.

2.3 肾性贫血靶点筛选

从 Gene Cards 数据库共收集到与肾性贫血相关的基因 5 972 个, 去除相关性评分低于中位数 2.46 的疾病靶点, 纳入 2 984 个基因。经 Uniprot 数据库去除非人类来源的靶点, 校正靶点后获得

疾病靶点 2 722 个。

2.4 药物-疾病靶点交集

通过 Excel 将前期获得的生血宁片的靶点及肾性贫血的靶点取交集, 得到疾病-药物交集靶点 166 个。

2.5 成分-靶点的网络构建

上述结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件获得的生血宁片有效成分-肾性贫血基因靶点网络见图 2。其中绿色六边形代表生血宁片的有效成分,均以编号代替。黄色菱形代表交集靶点。

2.6 PPI 网络构建

通过 String 数据库构建 PPI 网络,去除网络中的单一节点,共有基因 125 个,连线 390 条。将结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件,构建可视化 PPI 网络,见图 3。根据 Degree 值设置节点大小, Degree 值越大,节点越大,颜色越深。根据 Degree 值得到 PPI 网络核心基因靶点。Degree 值最大的 5 个基因靶点: SRC、HSP90AA1、PIK3CA、ESR1、PTK2。

2.7 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

通过 Metascape 网站进行富集分析, GO 生物学过程富集分析共得到 1 641 条结果,前 10 条涉及蛋白磷酸化(protein phosphorylation)、激素应答(response to hormone)、运动的正向调节(positive regulation of locomotion)、血液循环(blood circulation)、离子稳态(ion homeostasis)、对无机物的反应(response to inorganic substance)、管形态发生(tube morphogenesis)、细胞对脂质的反应

(cellular response to lipid)、造血或淋巴器官的发育(hematopoietic or lymphoid organ development)、对伤害的反应(response to wounding)、调节炎症反应(regulation of inflammatory response)。

GO 细胞组分富集分析共得到结果 120 条,前 10 条涉及膜筏(membrane raft)、受体复合物(receptor complex)、真空管腔(vacuolar lumen)、细胞顶端部分(apical part of cell)、富含纤维胶凝蛋白-1 的颗粒(ficolin-1-rich granule)、内吞膜泡(endocytic vesicle)、膜的侧面(side of membrane)、转录调节因子复合物(transcription regulator complex)、细胞器外膜(organelle outer membrane)、黏着斑(focal adhesion)。

GO 分子功能富集分析共得到 176 条结果,前 10 条涉及蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、激酶结合(kinase binding)、跨膜受体蛋白激酶活性(transmembrane receptor protein kinase activity)、内肽酶活性(endopeptidase activity)、蛋白酶结合(protease binding)、蛋白磷酸酶结合(protein phosphatase binding)、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合(RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding)、核受体

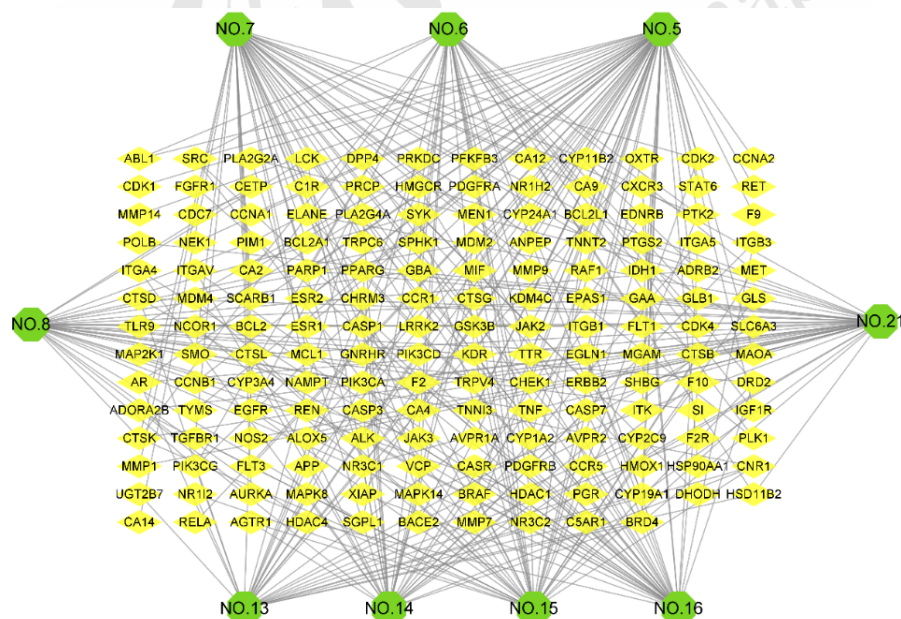


图 2 生血宁片有效成分-肾性贫血基因靶点网络

生血宁片成分以编号代替: NO.5[1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-癸酮], NO.6(脱氢植物鞘氨醇), NO.7(苯乙酸辛酯), NO.8(植物鞘氨醇), NO.13(西得罗), NO.14(焦脱镁叶绿酸 a), NO.15(二甲基原卟啉 IX 二甲酯), NO.16(31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a), NO.21(年葵酮 B)。

Fig. 2 Active component of Shengxuening tablet-gene target of renal anemia network

Composition of Shengxuening tablet was replaced by serial number: NO.5[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone], NO.6(dehydrophytosphingosine), NO.7(octyl phenylacetate), NO.8(phytosphingosine), NO.13(siderol), NO.14(pyrophaeophorbide a), NO.15(dimethylprotoporphyrin ix dimethyl ester), NO.16(31,32-dihydro-phaeophorbide-a), NO.21(annuionone B).

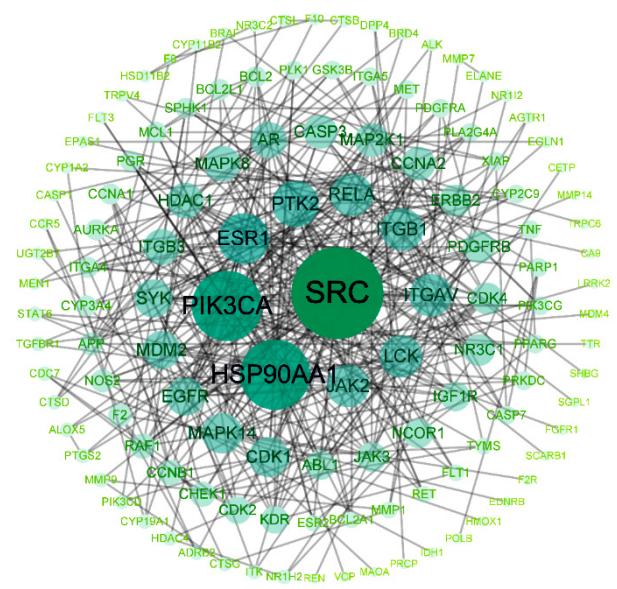


图 3 PPI 网络
Fig. 3 PPI network

活性(nuclear receptor activity)、病毒受体活性(virus receptor activity)、非膜跨越蛋白酪氨酸激酶活性(non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity)、血红素结合(heme binding)。GO 富集分析结果前 20 条见图 4。

KEGG 信号通路富集分析共得到 186 条结果, 前 10 条涉及肿瘤通路(pathways in cancer)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、肿瘤中的微核糖核酸(microRNAs in cancer)、细胞凋亡(apoptosis)、乙型肝炎(hepatitis B)、黄体酮介导的卵母细胞成熟(progesterone-mediated oocyte

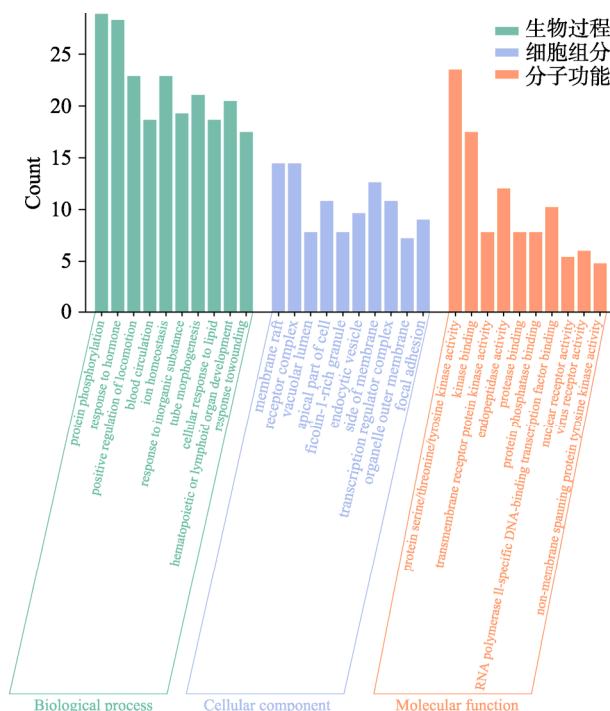


图 4 GO 富集分析条形图
Fig. 4 Bar chart of GO enrichment analysis

maturation)、病毒致癌(viral carcinogenesis)、钙信号通路(calcium signaling pathway)、磷脂酶 D 信号通路(phospholipase D signaling pathway)、癌症中的转录失调(transcriptional misregulation in cancer)。KEGG 富集分析前 20 条结果见图 5。

2.8 分子对接结果

选取 PPI 网络中“Degree”值最大 5 个靶点:

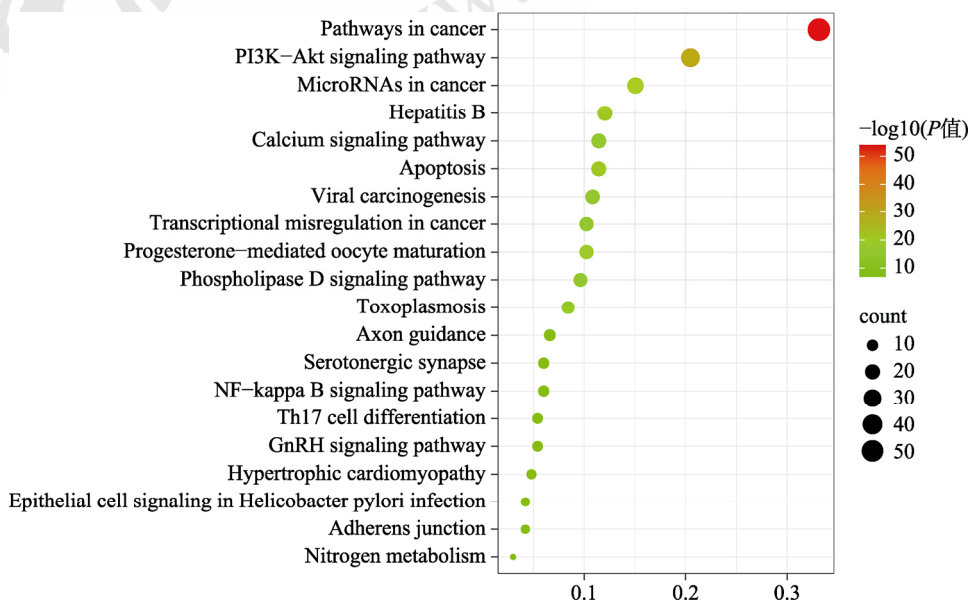


图 5 KEGG 功能富集分析气泡图
Fig. 5 Bubble diagram of KEGG functional enrichment analysis

SRC、HSP90AA1、PIK3CA、ESR1、PTK2；与生血宁片的 9 个主要活性成分：1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-癸酮、脱氢植物鞘氨醇、苯乙酸辛酯、植物鞘氨醇、西得罗、焦脱镁叶绿酸 a、二甲基原卟啉 IX 二甲酯、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a、年葵酮 B 进行分子对接，得到的数据经过热图分析结果见图 6，其中，对接得分 $\leq -9.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (1 cal=4.18 J)的成分占有 14 个，占 31.1%，其余对接得分均居于 $-9.0\sim -5.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。一般认为对接得分 $\leq -5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时，药物活性成分与靶点具有较好的结合活性， $< -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示有强烈的结合活性。因此，本研究中生血宁片的主要活性成分与主要靶点之间具有较强烈的结合能力。同时可以发现西得罗、焦脱镁叶绿酸 a、二甲基原卟啉 IX 二甲酯、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a 与主要靶点结合分数较高。综上，推测西得罗、焦脱镁叶绿酸 a、二甲基原卟啉 IX 二甲酯、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a 等成分可能是生血宁片治疗肾性贫血的主要有效成分，SRC、HSP90AA1、PIK3CA 可能是其主要作用靶点。结合能绝对值最高的二甲基原卟啉 IX 二甲酯与 SRC 的分子对接结构示意图见图 7。

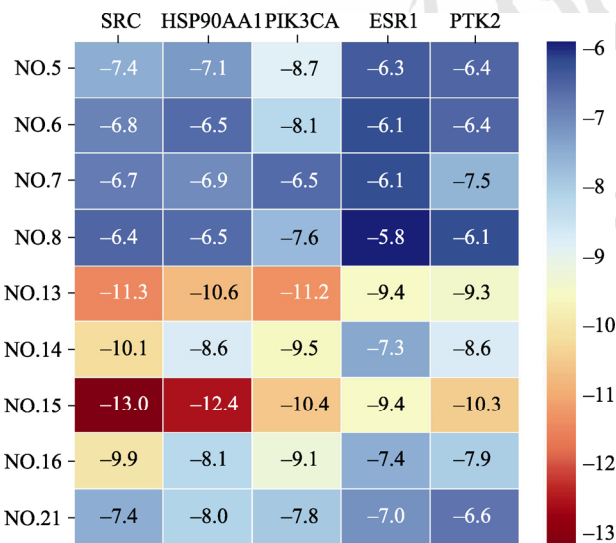


图 6 分子对接结果热力图

生血宁片成分以编号代替：NO.5[1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-癸酮]、NO.6(脱氢植物鞘氨醇)、NO.7(苯乙酸辛酯)、NO.8(植物鞘氨醇)、NO.13(西得罗)、NO.14(焦脱镁叶绿酸 a)、NO.15(二甲基原卟啉 IX 二甲酯)、NO.16(31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a)、NO.21(年葵酮 B)。

Fig. 6 Thermal diagram of molecular docking results
Composition of Shengxuening tablet was replaced by serial number: NO.5[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone], NO.6(dehydrophytosphingosine), NO.7(octyl phenylacetate), NO.8(phytosphingosine), NO.13(siderol), NO.14(pyrophosphoramide a), NO.15(dimethylprotoporphyrin ix dimethyl ester), NO.16(31,32-dihydro-phaeophorbide-a), NO.21(annuionone B).

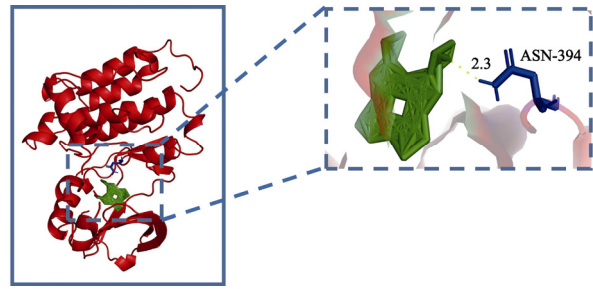


图 7 二甲基原卟啉 IX 二甲酯与 SRC 的分子对接结构图
Fig. 7 Molecular docking structure between dimethylprotoporphyrin ix dimethyl ester and SRC

3 讨论

CKD 患者贫血的重要原因包括促红细胞生成素生成不足、铁代谢紊乱、微炎症状态等^[22]。临床研究及动物试验均表明，生血宁片能高效补充生物态铁^[23]、抑制铁调素的表达^[6,24]、改善微炎症状态^[25]以及刺激骨髓细胞增殖^[26-27]。本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术，快速鉴定生血宁片成分，并整合网络药理学及分子对接技术探究其治疗肾性贫血的作用机制，为后续研究生血宁片的有效成分及其治疗肾性贫血相关机制提供了方法和理论基础。

本研究于生血宁片提取液中未找到叶酸、β-胡萝卜素、胆固醇对应的化合物特征峰值，考虑可能是制备过程中成分的破坏。因此，既往基于蚕沙成分而研究生血宁片的治疗机制缺乏严谨性^[28]。人体血红蛋白的结构是 4 个吡咯环中间连接一个亚铁离子，与血红素结构相似的血红素铁更易被机体吸收利用^[29]。焦脱镁叶绿酸 a、二甲基原卟啉 IX 二甲酯、31,32-二氢-脱镁叶绿酸盐 a 为具有 4 个吡咯环结构的化合物，其铁代络合物可能为生血宁片高效补充生物态铁的原因。叶绿素衍生物的全身活性，包括调节氧化应激、调节外源性代谢系统、影响癌症相关基因表达以及刺激骨髓中粒细胞的产生并增加外周血中性粒细胞的丰度^[30]。西得罗作为一种被分离出的叶片分泌物成分，具有抗肿瘤潜力及抗菌活性^[31]。

SRC、HSP90AA1、PIK3CA 均与细胞增殖分化、凋亡、纤维化及炎症密切相关。SRC 是一种非受体蛋白酪氨酸激酶，是肾纤维化的关键靶点之一，抑制 SRC 的活性可减少肾成纤维细胞激活和减缓肾纤维化进程^[32]。CKD 发展过程中，肾促红细胞生成素生成细胞转变为成肌纤维细胞，失去产生促红细胞生成素的能力^[33]。PIK3CA 基因编

码的 p110 α 蛋白是激活磷脂酰肌醇 3-激酶的催化亚单位^[34], 炎症、氧化应激可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶调控低氧诱导因子的表达和活性^[35], 从而影响红细胞生成、铁代谢等^[36]。HSP90AA1 是热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1, 作为应激诱导蛋白, 调节核蛋白高迁移率族蛋白 B1 从细胞核到细胞质的易位及分泌。细胞外高迁移率族蛋白 B1 通过激活各种受体诱导炎症、细胞因子产生和免疫细胞募集^[37]。

综上, UPLC-Q-TOF-MS 可实现生血宁片中化学成分的快速鉴定, 生血宁片可能通过补充铁元素、减轻炎症状态、抗纤维化等方面改善肾性贫血。

REFERENCES

- [1] COLLABORATION G B D C K D. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709-733.
- [2] INKER L A, GRAMS M E, LEVEY A S, et al. Relationship of estimated GFR and albuminuria to concurrent laboratory abnormalities: An individual participant data meta-analysis in a global consortium[J]. Am J Kidney Dis, 2019, 73(2): 206-217.
- [3] HE J, SHLIPAK M, ANDERSON A, et al. Risk factors for heart failure in patients with chronic kidney disease: The CRIC (chronic renal insufficiency cohort) study[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(5): e005336.
- [4] 魏克民, 浦锦宝, 祝永强, 等. 蚕砂提取物研制中药 II 类新药生血宁片[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(9): 9-10.
- [5] HUANG H Q, YANG H S, NIE J. On the function of silkworm excrement[J]. Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药), 2019, 50(7): 8-9.
- [6] TANG X J, RONG S, MEI C L, et al. Clinical effects of Shengxuening Tablets on renal anemia patients with non-dialysis chronic kidney disease[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41(2): 316-321.
- [7] FAN G J, PAN J, LIU Y Y. Clinical observation of shengxuening tablets combined with erythropoietin in treatment of renal anemia in hemodialysis patients[J]. Hubei J Tradit Chin Med(湖北中医杂志), 2017, 39(1): 6-8.
- [8] LIU W H, TANG J C, CHANG J X. RUNX3 regulates trastuzumab resistance of gastric cancer cells: A metabolomic analysis based on UPLC-Q Exactive Focus Orbitrap mass spectrometry[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2022, 42(4): 498-508.
- [9] TAN G F, LUO Q, LI Y R, et al. Expression of β -amyran gene and analysis of oleanolic saponins in *Sechium edule*[J]. Plant Physiol J(植物生理学), 2021, 57(6): 1363-1370.
- [10] HSIAO P C, LIAW C C, HWANG S Y, et al. Antiproliferative and hypoglycemic cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia*[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(12): 2979-2986.
- [11] LI R Z, LIN J, WANG X X, et al. Nontargeted metabolomic analysis of *Anoectochilus roxburghii* at different cultivation stages[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(23): 4624-4630.
- [12] LI Y, SHAO X, LI C Y, et al. Mechanism of Kudiezi injection against myocardial ischemia based on metabonomics in rats with myocardial ischemia[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(3): 789-798.
- [13] NIE J, HU H S, CHEN X Y, et al. Study on fingerprint of shengxuening tablets[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(20): 3502-3506.
- [14] WU S M, JIANG Y W, HUA J J, et al. Effects of different full drying methods on the chlorophyll degradation in green tea as analyzed by UPLC-Q-exactive orbitrap-MS[J]. Food Sci(食品科学), 2022, 43(8): 44-51.
- [15] LOULEB M, GALVÁN I, LATROUS L, et al. Detection of porphyrins in hair using capillary liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6230.
- [16] XIA H J, CHU M Y, XU Y T, et al. Inhibitory activities of ginkgolic acid monomers from *Ginkgo biloba* sarcotesta on xanthine oxidase *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30(8): 1387-1391.
- [17] NIE Y, LI Z Y, YAO W F. Chemical composition analysis of Frying Toosendan Fructus by liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2013, 17(6): 943-945.
- [18] HABIB H, FINNO C J, GENNITY I, et al. Simultaneous quantification of vitamin E and vitamin E metabolites in equine plasma and serum using LC-MS/MS[J]. J Vet Diagn Invest, 2021, 33(3): 506-515.
- [19] YIN T T, BAI Y X, ZHUANG F F, et al. Chemical constituents of *Lactuca elata*[J]. J Xinxiang Med Univ(新乡医学院学报), 2016, 33(2): 91-95.
- [20] NIE D, YANG Y, ZHAO X, et al. The secondary metabolites isolated from *Penicillium chrysogenum* S-3-25 and their bioactivities[J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2021, 40(5): 1-8.
- [21] JIANG L Z, LIU X J, YUAN P, et al. Stereoselective synthesis of (+)-annuonone A and (-)-annuonone B[J]. J Nat Prod, 2017, 80(4): 805-812.
- [22] 中国医师协会肾脏内科医师分会肾性贫血指南工作组. 中国肾性贫血诊治临床实践指南[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(20): 1463-1502.
- [23] ZENG Q, WANG X H, YANG L P, et al. Shengxuening versus oral iron supplementation for the treatment of renal anemia: A systematic review[J]. J Transl Int Med, 2020, 8(4): 245-254.
- [24] MEI H, WU N N, HUANG X, et al. Possible mechanisms by which silkworm faeces extract ameliorates adenine-induced renal anaemia in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2021(266): 113448.
- [25] YI Y, LU Y H, JI Q Q. Comparison of the effects of shengxuening and iron sucrose on anemia, oxidative stress and micro-inflammation state in hemodialysis patients[J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27(5): 660-662.
- [26] DING L, XU L L, JIN Y X, et al. Efficacy of SXN in the

- treatment of iron deficiency anemia: A phase IV clinical trial[J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2019(2019): 8796234.
- [27] DING L, TAN Y X, XU L L, et al. Shengxuening extracted from silkworm excrement mitigates myelosuppression via SCF-mediated JAK2/STAT3 signaling[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(6): e2100139.
- [28] LI T H, WANG X, CHEN Y G, et al. Potential clinical mechanism of Shengxuening on network pharmacology in the treatment of anemia[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2021, 41(17): 1749-1755.
- [29] PISKIN E, CIANCIOSI D, GULEC S, et al. Iron absorption: Factors, limitations, and improvement methods[J]. ACS Omega, 2022, 7(24): 20441-20456.
- [30] HAYES M, FERRUZZI M G. Update on the bioavailability and chemopreventative mechanisms of dietary chlorophyll derivatives[J]. Nutr Res, 2020(81): 19-37.
- [31] TOMOU E M, CHATZIATHANASIADOU M V, CHATZOPOULOU P, et al. NMR-based chemical profiling, isolation and evaluation of the cytotoxic potential of the diterpenoid siderol from cultivated *Sideritis euboica* Heldr[J]. Molecules, 2020, 25(10): 2382.
- [32] WANG J, ZHUANG S. Src family kinases in chronic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 313(3): F721-F728.
- [33] KOBAYASHI H, DAVIDOFF O, PUJARI-PALMER S, et al. EPO synthesis induced by HIF-PHD inhibition is dependent on myofibroblast transdifferentiation and colocalizes with non-injured nephron segments in murine kidney fibrosis[J]. Acta Physiol(Oxf), 2022, 235(4): e13826.
- [34] RATHINASWAMY M K, BURKE J E. Class I phosphoinositide 3-kinase(PI3K) regulatory subunits and their roles in signaling and disease[J]. Adv Biol Regul, 2020(75): 100657.
- [35] ZHANG H, XU R F, WANG Z C. Contribution of oxidative stress to HIF-1-mediated profibrotic changes during the kidney damage[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021(2021): 6114132.
- [36] MIMA A. Hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors for renal anemia in chronic kidney disease: Advantages and disadvantages[J]. Eur J Pharmacol, 2021(912): 174583.
- [37] KIM Y H, KWAK M S, LEE B, et al. Secretory autophagy machinery and vesicular trafficking are involved in HMGB1 secretion[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2345-2362.

收稿日期: 2022-04-30

(本文责编: 沈倩)