

UPLC-Q-TOF-MS、GC-MS 联合网络药理学及分子对接技术分析经典名方清胃散治疗牙周炎的作用机制

孟颖¹, 蒋志涛¹, 严国俊², 沈晶³, 孙戡平⁴, 王媛媛², 曹杰楠², 夏梦莹², 潘金火^{2*}

(1. 南京中医药大学附属张家港医院 药学部, 江苏 张家港 215699; 2. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023; 3. 江苏省无锡市惠山区中医医院 药学部, 江苏 无锡 214177; 4. 江苏省金湖县人民医院 药学部, 江苏 淮安 211699)

[摘要] 基于色谱-质谱和网络药理学-分子对接技术分析经典名方清胃散治疗牙周炎的作用机制。利用 UPLC-Q-TOF-MS、GC-MS 技术分析清胃散化学成分;经 TCMSp 数据库筛选清胃散活性成分及靶蛋白后利用 SwissTargetPrediction 数据库进行靶点预测;利用 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库获取牙周炎相关治疗靶点;运用 Venny 2.1 构建韦恩图并得到交集靶点,运用 Cytoscape 3.7.2 构建“化合物-靶点-疾病”网络;利用 clusterProfiler R 功能包对潜在作用靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,构建“化合物-靶点-通路”网络,并利用分子对接技术验证活性成分与靶点蛋白的结合活性。通过色谱-质谱技术共分析得到清胃散中 189 种化学成分,筛选后得到 39 种活性成分对应 180 个潜在作用靶点与牙周炎相关,活性成分作用靶点富集分析得到 92 条 KEGG 通路,“化合物-靶点-通路”网络共涉及 20 条 KEGG 通路、34 种活性成分和 99 个靶点,分子对接结果验证关键化合物与关键靶点有较好结合力。该研究初步表明,经典名方清胃散通过多成分、多靶点、多途径发挥治疗牙周炎的作用,体现了中药复杂系统的作用特点,为清胃散后续的物质基准及关键质量属性研究提供了理论依据。

[关键词] 经典名方;清胃散;牙周炎;UPLC-Q-TOF-MS;GC-MS;网络药理学;分子对接

Mechanism of Qingwei Powder in treatment of periodontitis based on UPLC-Q-TOF-MS, GC-MS, network pharmacology and molecular docking

MENG Ying¹, JIANG Zhi-tao¹, YAN Guo-jun², SHEN Jing³, SUN Kan-ping⁴, WANG Yuan-yuan², CAO Jie-nan²,
XIA Meng-ying², PAN Jin-huo^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Zhangjiagang Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Zhangjiagang 215699, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Department of Pharmacy, Wuxi Huishan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214177, China; 4. Department of Pharmacy, Jinhu County People's Hospital, Huaian 211699, China)

[Abstract] The present study explored the mechanism of Qingwei Powder (QP) in the treatment of periodontitis based on chromatography-mass spectrometry and network pharmacology-molecular docking techniques. UPLC-Q-TOF-MS and GC-MS were used to identify the chemical constituents of QP. The active components and targets were screened out through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSp), and their targets were predicted using SwissTargetPrediction. Targets related to periodontitis were obtained from GeneCards, OMIM, and DisGeNET. Venn diagram was constructed using Venny 2.1 to obtain the intersection targets. Cytoscape 3.7.2 was used to construct the "chemical component-target-disease" network. The targets were analyzed for Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment by clusterProfiler R, and the "chemical component-target-pathway" network was constructed. The binding activity of the active components to

[收稿日期] 2021-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773910,82074004);国家重点研发计划项目(2019YFC1710603)

[通信作者] *潘金火,博士,教授,硕士生导师,研究方向为中药制剂及质量分析,E-mail: panjinhuo@163.com

[作者简介] 孟颖,E-mail: eropink@163.com

the target proteins was verified by molecular docking. A total of 189 chemical components were obtained by UPLC-Q-TOF-MS and GC-MS, including 39 active components with 180 potential targets related to periodontitis. Target enrichment analysis of the active components yielded 92 KEGG pathways. Twenty KEGG pathways, 34 active components, and 99 targets were involved in the "chemical component-target-pathway" network. Molecular docking verified a good binding ability of the key targets to the key compounds. This study preliminarily indicates that QP is effective in treating periodontitis through multiple components, multiple targets, and multiple pathways, which reflects the complex system of Chinese medicine. This study provides the theoretical foundation for the subsequent research on the material basis and key quality attributes of QP.

[Key words] classical prescription; Qingwei Powder; periodontitis; UPLC-Q-TOF-MS; GC-MS; network pharmacology; molecular docking

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20211027.403

牙周炎(periodontitis)是一种慢性非传染性疾病(noninfectious chronic disease, NCD),总患病率为45%~50%^[1],严重的牙周炎是世界上第六大流行疾病^[2]。近年来,多项研究报道了牙周炎与类风湿关节炎、2型糖尿病、动脉粥样硬化性心血管疾病、脑血管疾病、呼吸系统疾病、骨质疏松症等多种全身性疾病的相关性^[3-8]。目前,牙周炎的治疗方法分为手术治疗和药物治疗,以抑制细菌生长、消除炎症,常用药为阿莫西林、甲硝唑、头孢拉定等^[9-10]。

中医学认为,牙周炎属于“牙宣”“牙痛”“齿衄”等范畴,可分为胃火炽盛、肾阴亏虚、气血亏虚等证型^[11]。中医强调疾病的整体治疗,在牙周炎的治疗上具有独特优势。中药方剂对牙周炎的治疗可从胃论治、从肾论治、从气血论治^[12],代表方剂有清胃散、补肾固齿丸、玉女煎等。经典名方清胃散为国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》^[13]中的第46号方,出自金代李东垣所著《兰室秘藏》,由当归、黄连、地黄、牡丹皮、升麻5味药组成,用于治疗胃火牙痛,现代临床常用于治疗牙周炎。现代药理学研究发现,清胃散水煎液对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 有一定的抑制作用,能增强巨噬细胞的吞噬能力,增强机体的非特异性免疫功能^[14]。

本研究以严格遵循古代传统煎药工艺的经典名方清胃散为研究对象,采用UPLC-Q-TOF-MS和GC-MS技术分析清胃散的化学成分,并采用网络药理学结合分子对接技术对其治疗牙周炎的药效成分与作用机制进行探究,以期经典名方清胃散物质基准及关键质量属性的确定提供理论依据。

1 材料

超高效液相色谱仪(Shimadzu 30AD,配有 LC-

30AD 二元液相泵、SIL-30SD 自动进样器、DGU-20A5R 在线脱气机、CTO-30A 柱温箱),Sciex Triple TOF 5600+系统(AB Sciex),数据采集软件 Analyst TF 1.6(AB Sciex),数据处理软件 PeakView 1.2(AB Sciex),固相萃取柱(Waters Sep-pak C₁₈, WAT 043395),超纯水机(上海和泰仪器公司,型号 Master-S 15/30),气相色谱-质谱联用仪(Agilent, 7890 A-5975 C),智能恒温电热套(巩义市予华仪器有限责任公司,型号 ZNHW-II),多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司,型号 400Y),陶瓷煲(江西省康舒陶瓷有限公司),多功能高速离心机(基因有限公司,型号 1736R)。

C7-C30 烷烃标准液(Sigma公司,批号 XA18333V),甲醇(质谱级,CNW公司,批号 4.000306.4000),无水硫酸钠(分析纯,南京化学试剂股份有限公司,批号 20110238),无水乙醇(分析纯,上海泰坦化学有限公司,批号 20035273)。

所用药材均由南京中医药大学药学院刘训红教授采购并鉴定,升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom. 的干燥根茎(吉林柳河,批号 2019051101),牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮(安徽亳州,批号 2019040601),黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎(重庆石柱,批号 HL-18001),当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根(甘肃岷县,批号 DG-18001),地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根(河南武陟,批号 DH-18001)。

2 方法

2.1 清胃散化学成分研究

2.1.1 经典名方清胃散的“古今转换” 随着历史朝代更迭,度量衡的改变及不同时代的医家观点、用

药特点的改变,不同时期的中药剂量也随之而变,影响着古代经典名方的应用与发展,成为经典名方研发剂量换算中的争论焦点^[15]。经文献考证,清胃散原处方组成与用量如下:当归身 1.2 g、黄连 1.2 g、生地黄(酒制) 1.2 g、牡丹皮 2.0 g、升麻 4.0 g。原处方制法与用法如下:研为细末,都作一服,加水一盏半(150 mL),煎至一盏(100 mL),去渣,冷后服用。

2.1.2 UPLC-Q-TOF-MS 供试品溶液的制备 取饮片最粗粉 9.6 g,置陶瓷煲中,加水 150 mL,电陶炉最大功率 2 200 W 加热至沸,转 100 W 保持微沸,煎煮 20 min,滤过。取滤液 10 mL 加无水乙醇 10 mL,混匀,离心。取上清液,过固相萃取柱,收集洗脱液,即得。

2.1.3 GC-MS 供试品溶液的制备 处方量扩大 20 倍,取饮片最粗粉 192 g,置 5 000 mL 圆底烧瓶中,加水 3 000 mL,连接挥发油提取装置,电热套加热,大火煮沸后转小火保持微沸,煎煮提取 5 h。将挥发油采集至离心管中,加入适量无水硫酸钠脱水,吸取上层挥发油于离心管中,加入挥发油 3 倍量甲醇溶解,混匀后转移至液相小瓶中,即得。

2.1.4 UPLC-Q-TOF-MS 条件 液相色谱条件: ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相乙腈(A)-0.15%甲酸(B),梯度洗脱(0~15 min, 10%~60% A; 15~30 min, 60%~95% A);流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 35 ℃,进样体积 3 μL。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正负离子模式扫描,雾化气体为氮气,TEM 为 550 ℃,DP 为 60/-60 V,CE 为 35/-35 eV,ISVF 为 4 500/-4 500 V, Gas1 为 55 psi (1 psi ≈ 6.895 kPa), Gas2 为 55 psi, Curtain Gas 为 35 psi,一级母离子扫描范围 *m/z* 99~1 999,二级子离子扫描范围 *m/z* 49~999,开启动态背景扣除(DBS)。

2.1.5 GC-MS 条件 气相毛细管柱(0.25 μm×250 μm×30 m),高纯度氦气载气(>99.999%),进样口温度 250 ℃,接口温度 250 ℃,离子源温度 230 ℃,离子化电压 70 eV,扫描范围 *m/z* 40~550,流速 1.0 mL·min⁻¹,分流比 30:1。采用程序升温:初始温度 45 ℃,在此温度下保持 2 min;以 15 ℃·min⁻¹的速率升温至 120 ℃,保持 3 min;再以 10 ℃·min⁻¹的速率升温至 180 ℃,保持 3 min;再以 5 ℃·min⁻¹的速率升温至 220 ℃,保持 5 min;再以 5 ℃·min⁻¹的速率升温至 250 ℃,保持 5 min;最后以 5 ℃·min⁻¹的速

率升温至 300 ℃,保持 7 min。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 清胃散活性成分的筛选 利用 TCMSp 数据库查找对应化合物的药代动力学参数(ADME),选择口服生物利用度(OB) ≥ 30%,类药性(DL) ≥ 0.18 作为中药活性成分的筛选标准^[16],共得到清胃散中 52 个候选化合物,其中当归 5 个,地黄 5 个,黄连 15 个,牡丹皮 13 个,升麻 26 个。

2.2.2 对应靶点的获得 利用 TCMSp 数据库检索 52 个候选化合物的相应靶点,使用 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对其进行靶点预测。去除 13 个与靶点无关的化合物,得到 39 个化合物,确定了 409 个靶点蛋白。借助 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)数据库将筛选获得的 409 个靶点蛋白名称转化为对应的官方基因名(gene symbol),筛除非人类靶点蛋白。

2.2.3 牙周炎相关靶点的筛选 在 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>)和 DisGeNET 数据库(www.disgenet.org/)中检索关键词“periodontitis”,获取牙周炎相关治疗靶点,将 3 个数据库的结果进行合并,筛选并删除重复靶点,得到牙周炎治疗靶点。

2.2.4 “化合物-靶点-疾病”网络的构建 将上述中药活性成分对应的靶点基因与牙周炎相关治疗靶点取交集,共获得 180 个潜在作用靶点,导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,构建“化合物-靶点-疾病”网络,计算每个活性成分作用的靶点数量,筛选出交互网络中具有拓扑重要性的节点。

2.2.5 蛋白相互作用(PPI)网络的构建 将潜在作用靶点上传至 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),设置物种为“homo sapiens”,获得高置信度的 PPI 网络,在 Cytoscape 3.7.2 软件中对网络进行分析,使用“Network Analyzer”工具计算每个靶点的度中心性(DC)、介数中心性、贴近中心性,筛选出交互网络中具有拓扑重要性的节点。

2.2.6 生物信息分析 基于 R 语言软件 clusterProfile Version 3.12.0 对潜在作用靶点从生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3 个层面进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析和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,筛选 $P < 0.05$ 的条

目,用 R 包(ggplot2)绘图将显著性前 20 的条目可视化。最后在 Cytoscape 3.7.2 软件中构建“化合物-靶点-通路”网络。

2.2.7 分子对接验证 利用 TC MSP 数据库获得主要活性成分分子结构,保存为 mol 2 格式,利用 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载 DC 前十靶点蛋白的 3D 晶体结构,保存为 PDB 格式。首先利用 PyMOL 软件对靶点蛋白去水、去配体操作,保存为 PDB 格式;接着将处理后的靶点蛋白导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件,对其进行加氢,计算电荷,保存为 pdbqt 格式;将活性成分的 mol2 格式文件导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件,检测总电荷,分配电荷,查看柔性可旋转键,保存为 pdbqt 格式。获取靶点蛋白的 Grid Box 数据,最后运行 Vina 进行分子对接。采用 PyMOL 软件将分子对接结果可视化。

3 结果

3.1 清胃散化学成分研究

3.1.1 清胃散水煎液 UPLC-Q-TOF-MS 分析 在拟定的分析条件下,清胃散在正、负离子模式下的总离子流图见图 1。通过对质谱信息进行比对分析,并根据保留行为结合化学成分库及相关文献报道进行结构鉴定,共鉴定了 116 种成分。

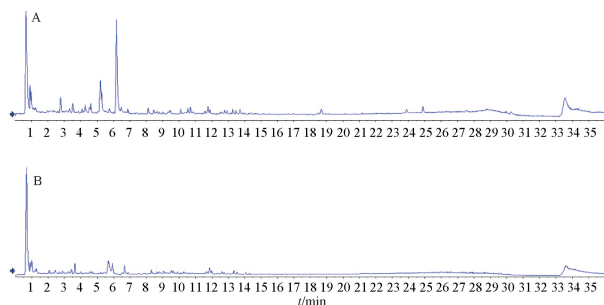


图 1 清胃散正(A)、负(B)离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Qingwei Powder in positive (A) and negative (B) ion modes

3.1.2 清胃散挥发油 GC-MS 分析 在拟定的分析条件下,清胃散的 GC-MS 总离子流图见图 2。通过对质谱信息进行比对分析,并根据保留行为结合 NIST 11 数据库进行结构鉴定,共鉴定了 81 种挥发性成分。

3.2 清胃散网络药理学研究

3.2.1 “化合物-靶点-疾病”网络分析 药物活性成分-疾病靶点交集韦恩图见图 3,共获得 180 个潜

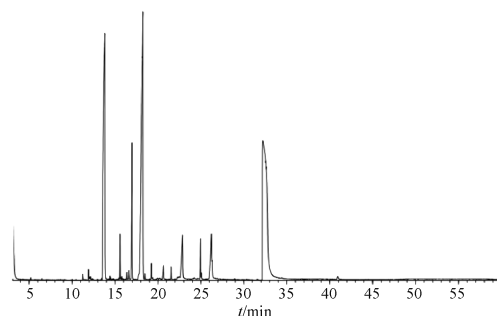


图 2 清胃散 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of Qingwei Powder by GC-MS

在作用靶点。清胃散治疗牙周炎的“化合物-靶点-疾病”网络见图 4,该网络包含 225 个节点(39 个活性成分,180 个潜在作用靶点)和 863 条边,表明了化合物与靶标的相互作用。与靶点相关的 39 个活性成分的基本信息及其作用于牙周炎的潜在作用靶点数量见表 1,其中 N25(quercetin, 槲皮素,作用于 54 个靶点)、N7(palmatine, 巴马汀,作用于 53 个靶点)、N6(epiberberine, 表小檗碱,作用于 43 个靶点)、N4(berberine, 小檗碱,作用于 40 个靶点)、N15(isoferulic acid, 异阿魏酸,作用于 39 个靶点)、N2(ferulic acid, 阿魏酸,作用于 39 个靶点)、N29(kaempferol, 山柰酚,作用于 27 个靶点)、N10[(Z)-ligustilide, Z-藁本内酯,作用于 26 个靶点]、N16[(E)-ligustilide, E-藁本内酯,作用于 23 个靶点]、N17(beta-sitosterol, β -谷甾醇,作用于 22 个靶点)的潜在作用靶点数量较多,因此,它们可能是清胃散作用于牙周炎的关键活性化合物。

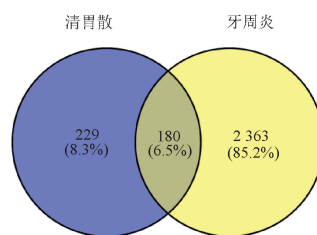


图 3 清胃散活性成分靶点与牙周炎治疗相关靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of targets of active components of Qingwei Powder and periodontitis

3.2.2 PPI 网络分析 清胃散治疗牙周炎的潜在作用靶点蛋白 PPI 网络见图 5,隐藏孤立节点后,网络包括 137 个节点、896 条边,靶点 DC 中位数为

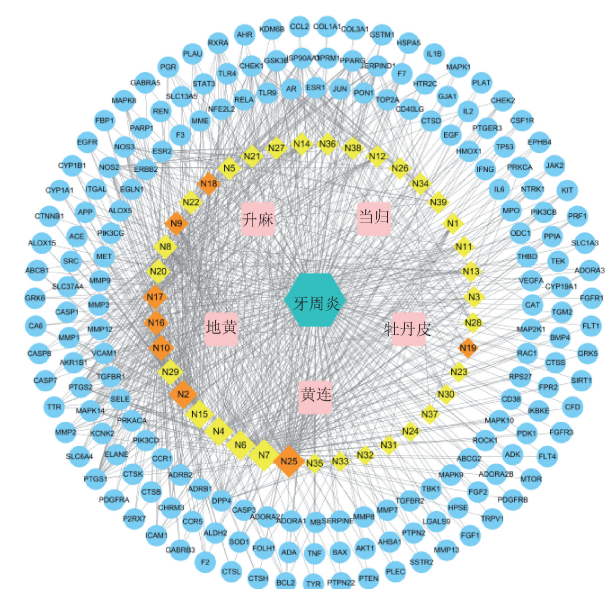


图4 清胃散治疗牙周炎的“化合物-靶点-疾病”网络

Fig. 4 "Chemical component-target-disease" network of Qingwei Powder in the treatment of periodontitis

9.5, 介数中心性中位数为 0.002 053 935, 贴近中心性中位数为 0.416 256 16, 满足上述参数卡值且 DC 前十的靶点为 IL6 (DC = 64)、VEGFA (DC = 61)、TP53 (DC = 56)、AKT1 (DC = 56)、STAT3 (DC = 56)、MAPK8 (DC = 55)、MAPK1 (DC = 55)、EGF (DC = 54)、EGFR (DC = 47)、TNF (DC = 47), 可作为网络的核心节点, 可推测清胃散的有效成分可能主要通过上述靶点发挥治疗牙周炎的作用。

3.2.3 GO 和 KEGG 通路分析 利用 R 语言对 180 个潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 通路分析。结果显示, 共有 3 006 个 GO 项目显著富集 ($P < 0.05$), 2 761 个在 BP 中富集, 99 个在 CC 中富集, 146 个在 MF 中富集, 见图 6, 主要涉及氧化应激反应、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的正调控、ERK1 和 ERK2 级联、对细菌起源分子的反应、对活性氧的反应、对脂多糖的反应、营养水平反应、丝裂原活化蛋白激酶的正调控等生物过程。

总共 92 条 KEGG 通路显著富集, 包括 HIF-1 信号通路、松弛素信号通路、IL-17 信号通路、细胞凋亡、PI3K-AKT 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、MAPK 信号通路等, 见图 7。以上结果说明清胃散可通过调节多个生物过程及多个通路的协调作用来治疗牙周炎。

取显著性前 20 的 KEGG 通路作“化合物-靶点-通路”网络, 见图 8, 网络共有 153 个节点和 833 条边, 涉及 20 条 KEGG 通路, 34 种活性成分和 99 个靶点, 说明清胃散治疗牙周炎的药理过程涉及多成分、多靶点、多途径。

3.2.4 分子对接 从 PDB 数据库获取的 DC 前十的核心靶点蛋白信息见表 2。通过 Vina 软件计算获得的活性成分与靶点蛋白的最低结合能见图 9, 分子对接模式示例见图 10。结合能 < 0 表明配体分子可以与受体蛋白自发结合, 结合能 $\leq -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明配体分子与受体蛋白具有良好的结合活性^[17-18]。由图 9 可知, 大部分配体与活性成分分子最低结合能 $\leq -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明靶点蛋白和活性成分具有较好的亲和力。由图 10 可知, 活性成分能够与靶点蛋白通过氢键等多种分子间作用力结合。

4 讨论

清胃散是治疗胃火牙痛的经典名方, 现代临床常用于治疗牙周炎^[19]、口腔炎^[20]等属胃火上攻者。方以黄连苦寒直折胃腑之火, 为君药; 升麻为臣, 清热解毒; 生地黄凉血滋阴, 牡丹皮凉血清热, 共为臣药; 当归身养血活血, 以助消肿止痛, 用为佐药; 升麻兼为阳明引经药, 散火解毒兼以引经为使。诸药合用, 共奏清胃凉血之功。

“化合物-靶点-疾病”网络分析结果显示, 槲皮素、巴马汀、表小檗碱、小檗碱、阿魏酸、异阿魏酸、山柰酚、藁本内酯、 β -谷甾醇等化合物的潜在作用靶点较多, 在牙周炎的治疗中可能发挥重要作用。槲皮素来源于清胃散中黄连、牡丹皮 2 味药, 具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种功能, 近年来作为一种天然化合物在口腔治疗中的应用日益受到人们的关注。研究发现, 槲皮素对口腔癌、牙周炎、龋齿的体内外治疗均有较好的疗效^[21-23], 其对 2 型糖尿病牙周炎大鼠的牙周组织具有一定保护作用, 并有助于降低血糖值和血清 AGEs 含量^[24]。巴马汀、表小檗碱、小檗碱均来源于清胃散中的黄连。研究发现, 小檗碱能恢复牙龈卟啉单胞菌感染诱导的骨间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨相关基因表达下调, 并通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMSCs 成骨分化^[25]; 盐酸小檗碱在一定浓度范围内能提高牙周膜细胞的增殖活性、蛋白合成及 ALP 活性, 抑制实验性牙周炎模型牙周组织中

表 1 清胃散活性成分

Table 1 Active components of Qingwei Powder

编号	TCMSP 标识 /PubChem 标识	化合物	相对分子 质量	OB /%	DL	药物来源	靶点 数量
N1	MOL002819	catalpol	362.37	5.07	0.44	地黄	8
N2	MOL000360	ferulic acid	194.20	39.56	0.06	当归、地黄、升麻	39
N3	MOL003333	verbascoside	624.65	2.94	0.62	地黄	7
N4	MOL001454	berberine	336.39	36.86	0.78	黄连	40
N5	MOL001458	coptisine	320.34	30.67	0.86	黄连	15
N6	MOL002897	epiberberine	336.39	43.09	0.78	黄连	43
N7	MOL000785	palmatine	352.44	64.6	0.65	黄连	53
N8	MOL007006	oxypaeoniflorin	496.51	12.98	0.78	牡丹皮	20
N9	MOL000874	paeonol	166.19	28.79	0.04	牡丹皮、升麻	19
N10	MOL002122	(<i>Z</i>)-ligustilide	188.24	53.72	0.07	当归、升麻	26
N11	6449879	cimicifugic acid A	448.40	-	-	升麻	7
N12	6449880	cimicifugic acid B	448.40	-	-	升麻	11
N13	10002902	cimicifugic acid E	432.40	-	-	升麻	7
N14	6450179	cimicifugic acid F	432.40	-	-	升麻	13
N15	MOL005928	isoferulic acid	194.20	50.83	0.06	升麻	39
N16	MOL011782	(<i>E</i>)-ligustilide	190.26	23.5	0.07	当归、升麻	23
N17	MOL000358	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75	当归、升麻	22
N18	MOL000449	stigmasterol	412.77	43.83	0.76	当归、地黄、升麻	16
N19	MOL000359	sitosterol	414.79	36.91	0.75	地黄、牡丹皮、升麻	3
N20	MOL002903	(<i>R</i>)-canadine	339.42	55.37	0.77	黄连	21
N21	MOL002894	berberrubine	322.36	35.74	0.73	黄连	14
N22	MOL002904	berlambine	351.38	36.68	0.82	黄连	18
N23	MOL002907	corchoroside A _{qt}	404.55	104.95	0.78	黄连	3
N24	MOL000622	magnograndiolide	266.37	63.71	0.19	黄连	1
N25	MOL000098	quercetin	302.25	46.43	0.28	黄连、牡丹皮	54
N26	MOL002668	worenine	334.37	45.83	0.87	黄连	11
N27	MOL000492	(+)-catechin	290.29	54.83	0.24	牡丹皮	14
N28	MOL007374	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl] methylene } barbituric acid	312.30	43.44	0.30	牡丹皮	5
N29	MOL000422	kaempferol	286.25	41.88	0.24	牡丹皮	27
N30	MOL000211	mairin	456.78	55.38	0.78	牡丹皮	3
N31	MOL007382	mudanpioside-H _{qt}	336.37	42.36	0.37	牡丹皮	1
N32	MOL007384	paeonidanin _{qt}	330.41	65.31	0.35	牡丹皮	1
N33	MOL012081	(2 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-24,25-epoxy-3-beta-(beta-D-xylopy- ranosyloxy)-9,19-cyclolanost-7-ene-16,23-dione _{qt}	468.74	40.10	0.76	升麻	1
N34	MOL000483	(<i>Z</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4- hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	313.38	118.35	0.26	升麻	11
N35	MOL011991	23- <i>epi</i> -26-deoxyactein _{qt}	470.76	47.64	0.35	升麻	1
N36	MOL012053	cimicifugic acid	372.40	83.02	0.45	升麻	13
N37	MOL001924	paeoniflorin	480.51	53.87	0.79	升麻	2
N38	MOL012052	tuberosine A	343.41	102.67	0.34	升麻	13
N39	MOL012078	visamminol	276.31	50.01	0.23	升麻	11

TNF- α 、IL-1 β 的表达,证实盐酸小檗碱可促进创伤愈合和组织再生^[26]。阿魏酸来源于清胃散中当归、地黄、升麻 3 味药。研究发现,含有阿魏酸的抗氧化剂精油凝胶治疗可降低与广泛性牙龈炎症相关的附着丧失的风险^[27];阿魏酸钠可能通过抑制牙周组织

VEGF 表达改善伴糖尿病的牙周炎牙周组织微循环^[28]。山柰酚来源于清胃散中的牡丹皮,是一种具有抗癌、抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等多种功效的黄酮类化合物^[29]。研究发现,山柰酚能够有效减少牙周炎大鼠的牙槽骨吸收、附着丧失以及 MMP-1

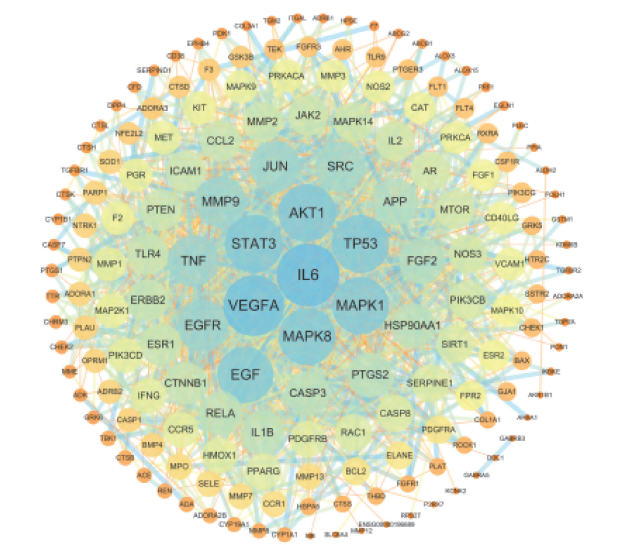


图5 清胃散治疗牙周炎的潜在作用靶点 PPI 网络
Fig. 5 PPI network of potential targets of Qingwei Powder in the treatment of periodontitis

和 MMP-8 的产生,山柰酚的应用可能是一种有价值的治疗方案,以防止牙槽骨吸收和附着水平^[30]。

对 PPI 网络进行分析后发现, IL6、VEGFA、TP53、AKT1、STAT3、MAPK8、MAPK1、EGF、EGFR、TNF 等靶点蛋白与其他蛋白相互作用较多,在网络中占据核心地位,同时对靶点蛋白和活性成分进行分子对接模拟,验证了两者之间良好的结合活性。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异作用于血管内皮细胞的细胞因子,对新生血管增生以及血管通透性均具有重要的调控作用,近年来被认为在牙周炎的病理过程中起着重要的生理病理作用^[31]。研究发现,慢性牙周炎患者的牙龈组织中 VEGF 存在过表达现象,进而促进血管增生及血管通透性增高,对炎症反应起促进作用^[32]。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种在炎症应答以及许多其他生理和病理

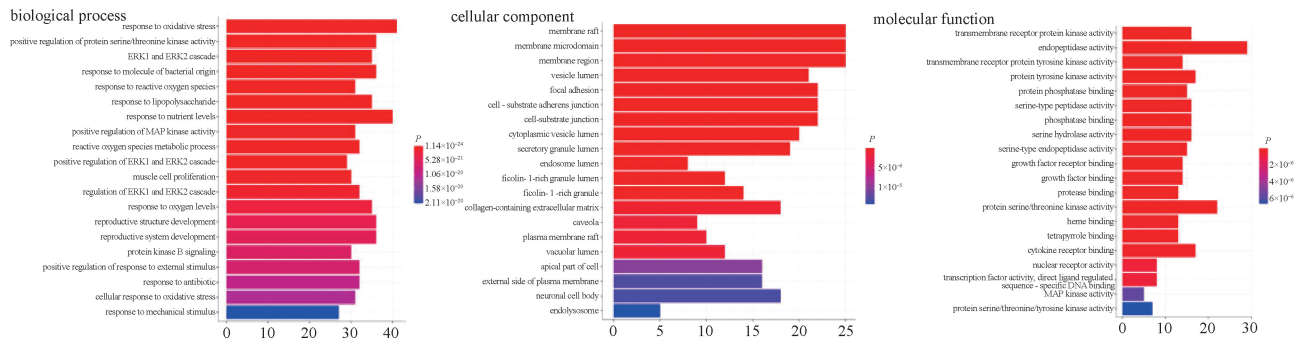


图6 清胃散潜在作用靶点 GO 功能富集分析
Fig. 6 GO function enrichment analysis of potential targets of Qingwei Powder

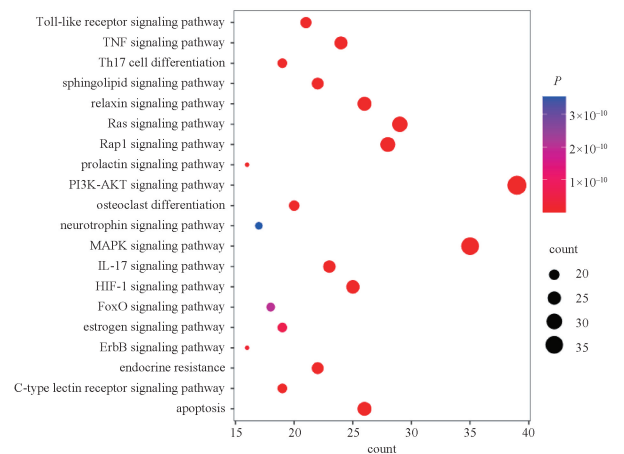


图7 清胃散潜在作用靶点 KEGG 通路富集分析
Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of Qingwei Powder

过程中发挥中药作用的细胞因子^[33]。研究发现,慢性牙周炎组牙龈 EGF 表达水平显著高于健康对照组,且 EGF 表达水平随着牙周疾病严重程度指标而增加,说明 EGF 是牙周炎症和骨质破坏过程中的重要调节子^[34]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种主要由巨噬细胞分泌的细胞因子,通常情况下可对免疫应答进行调节,但其大量产生将对机体免疫平衡产生影响。研究发现,慢性牙周炎患者血液均可见 TNF- α 水平变化^[35], TNF- α 可增加黏附分子、趋化因子及炎性介质的生成,促进疾病的发生与发展^[36-37]。

GO 和 KEGG 富集分析结果显示,清胃散对牙周炎的治疗过程主要涉及氧化应激反应、ERK1 和

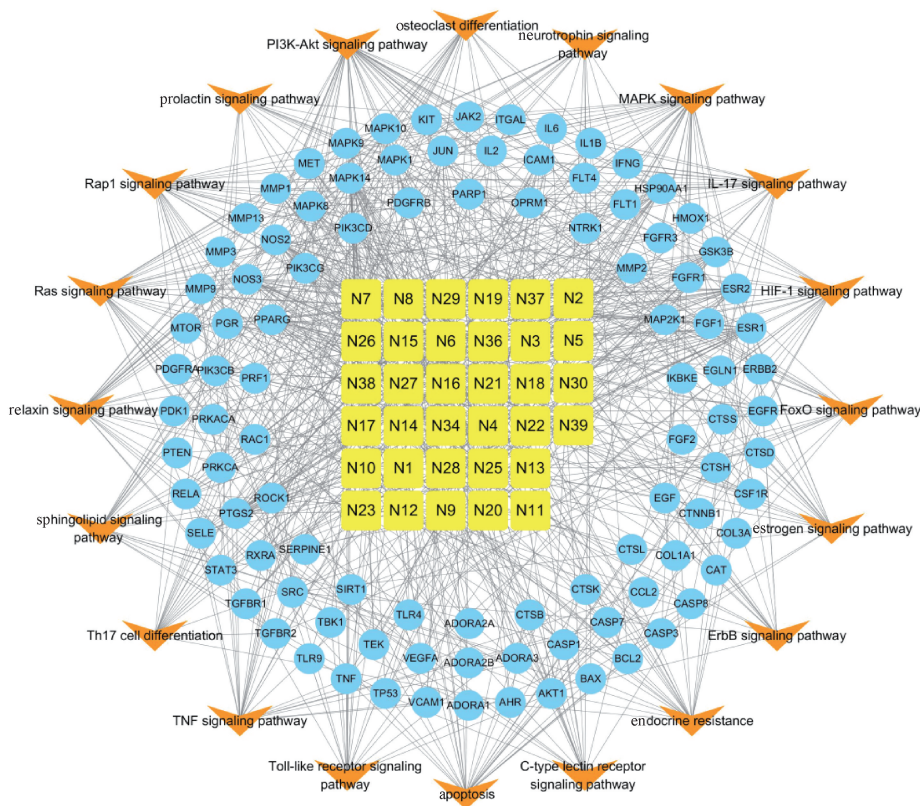


图 8 清胃散治疗牙周炎的“化合物-靶点-通路”网络

Fig. 8 "Chemical component-target-pathway" network of Qingwei Powder in the treatment of periodontitis

表 2 核心靶点蛋白分子信息

Table 2 Molecular information of core target proteins

基因名称	蛋白名称	PDB 标识	配体 标识
IL6	interleukin-6	5FUC	NAG
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	3C7Q	XIN
TP53	cellular tumor antigen p53	6GGA	EY2
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	4EKL	ORF
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	6NUQ	KQV
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	4G1W	G1W
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	3W8Q	AGS
EGF	pro-epidermal growth factor	1HLT	OG6
EGFR	epidermal growth factor receptor	4LRM	YUN
TNF	tumor necrosis factor	5MU8	JNI

ERK2 级联、对细菌起源分子的反应、对活性氧的反应、对脂多糖的反应等生物过程,以及 HIF-1 信号通路、松弛素信号通路、IL-17 信号通路、细胞凋亡、PI3K-AKT 信号通路等通路。有研究认为牙周病患者唾液和龈沟液的氧化/抗氧化活性的平衡被打破,这些患者的牙周膜更易受活性氧(reactive oxygen species, ROS)的损伤作用,在 ROS 的作用下牙周膜

细胞、牙龈上皮细胞发生潜在的细胞损伤和细胞溶解,出现氧化损伤,造成炎症状态^[38]。近期研究证明,低氧情况下 HIF-1 α 可能通过多条信号通路发挥促炎作用、诱导细胞自噬和凋亡,并在牙周炎的发生发展及预后中发挥重要作用^[39]。IL-17 是一种促炎性因子,可通过影响雷帕霉素靶蛋白通路信号传导调控骨形成^[40]。研究发现,IL-17 表达与牙槽骨吸收破坏有关,IL-17A 和 Th17 细胞是牙周炎症过程中牙槽骨破坏的关键因素^[41];牙周炎患者牙周组织中 IL-17 水平远高于正常牙周组织,IL-17 是牙周炎发生过程中的重要促炎性因子^[42]。

本研究利用色谱-质谱技术和网络药理学-分子对接技术,从清胃散水煎液中分析得到 189 种化学成分,构建了清胃散治疗牙周炎的“化合物-靶点-疾病”网络,筛选出槲皮素、巴马汀、小檗碱、阿魏酸、异阿魏酸、山柰酚、藁本内酯等 39 种活性成分及 180 种潜在作用靶点,通过 PPI 网络筛选出 IL6、VEGFA、EGF、TNF 等核心靶点,GO 和 KEGG 富集分析进一步探究潜在作用靶点蛋白参与表达的生物

	IL6	VEGFA	TP53	AKT1	STAT3	MAPK8	MAPK1	EGF	EGFR	TNF
quercetin	-6	-8	-7.9	-7.7	-5.5	-7.4	-9.2	-8.3	-8.5	-7.4
palmitate	-5.8	-7.6	-6.8	-6.9	-4.8	-6.7	-8	-6.6	-7.3	-6.9
kaempferol	-6	-8.1	-7.6	-7.2	-5.3	-7.1	-9.1	-7.2	-8.2	-7
isoferulic acid	-5.2	-5.9	-6.2	-6.2	-4.2	-5.9	-6.6	-6.4	-6.1	-5.8
ferulic acid	-4.9	-5.5	-6.1	-6.3	-4.2	-5.8	-6.8	-6	-6	-6
epiberberine	-5.6	-8.3	-7.6	-8.5	-5.4	-7.4	-9.5	-7.8	-8.9	-7.8
beta-sitosterol	-6	-8.5	-5.8	-8.5	-5.9	-8.1	-7.7	-7.2	-8.1	-8.3
berberine	-6.7	-8.3	-8.1	-8.2	-5.5	-7.8	-9.2	-8.2	-8.6	-8.4
(Z)-ligustilide	-5.3	-6.6	-6.3	-6.7	-4.3	-6.4	-7.5	-6.7	-7.1	-6.9
(E)-ligustilide	-5.1	-6.6	-6.3	-6.8	-4.4	-6.2	-7.7	-6.6	-7.1	-6.9

结合能/
kcal·mol⁻¹

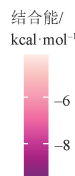


图9 分子对接最低结合能热图

Fig. 9 Heat map of the lowest binding energy for molecular docking

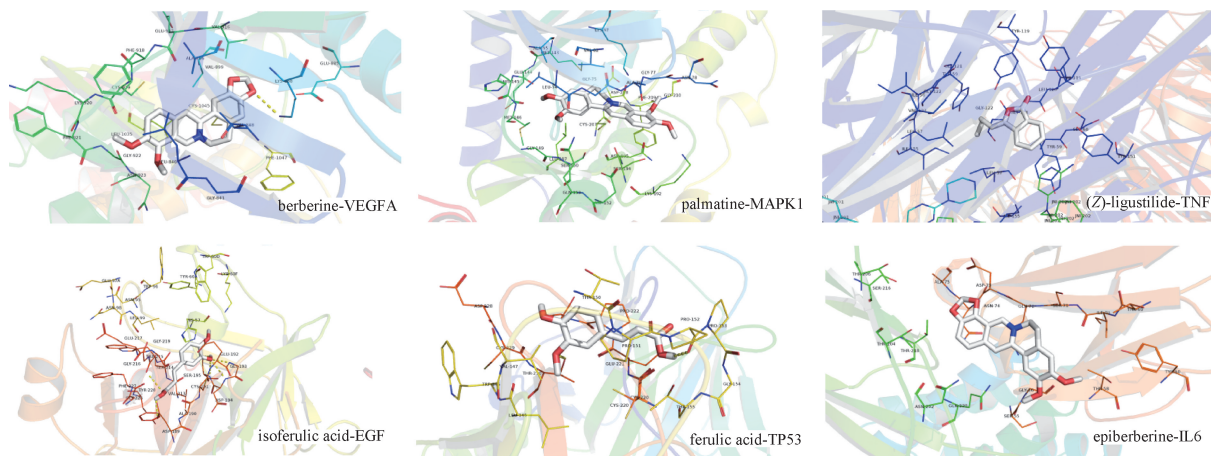


图10 核心成分与靶点对接示意图

Fig. 10 Docking diagram of core components with targets

学通路,富集到氧化应激反应、HIF-1 信号通路、IL-17 信号通路等生物过程和通路,构建了清胃散治疗牙周炎的“化合物-靶点-通路”网络,并验证了清胃散中潜在活性成分与靶点蛋白的结合活性。综上所述,经典名方清胃散通过多成分、多靶点、多途径发挥治疗牙周炎的作用,体现了中药复杂系统的作用特点,为经典名方清胃散后续的物质基准及关键质量属性研究提供了相关理论依据。

[参考文献]

- [1] KASSEBAUM N J, BERNABE E, DAHIYA M, et al. Global burden of severe periodontitis in 1990—2010: a systematic review and Meta-regression [J]. J Dent Res, 2014, 93(11): 1045.
- [2] PATINI R, SYADERINI E, LAJOLO C, et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic re-

view [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(18): 5775.

- [3] MOLON R S, ROSSA C J, THURLINGS R M, et al. Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: current evidence and potential biological interactions [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4541.
- [4] GRAVES D T, CORREA J D, SILVA T A. The oral microbiota is modified by systemic diseases [J]. J Dent Res, 2019, 98(2): 148.
- [5] SANZ M, MARCO A, JEPSEN S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report [J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(3): 268.
- [6] JIMENEZ M, KRALL E A, GARCIA R I, et al. Periodontitis and incidence of cerebrovascular disease in men [J]. Ann Neurol, 2009, 66(4): 505.
- [7] HOBBS S, CHAPPLE I L, SAPEY E, et al. Is periodontitis a comorbidity of COPD or can associations be explained by shared risk factors/behaviors? [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,

- 2017, 12: 1339.
- [8] WANG C J, MCCAULEY L K. Osteoporosis and periodontitis [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2016, 14(6): 284.
- [9] 李焕宝. 阿莫西林联合甲硝唑治疗慢性牙周炎的效果探究 [J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2020, 7(6): 57.
- [10] GRAZIANI F, KARAPETSA D, ALONSO B, et al. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? [J]. *Periodontol* 2000, 2017, 75(1): 152.
- [11] 成思源. 中西医结合治疗牙周炎的研究进展 [J]. *医疗装备*, 2021, 34(14): 187.
- [12] 杜瑞. 中药提取物及方剂治疗牙周炎的研究进展 [J]. *光明中医*, 2020, 35(24): 4012.
- [13] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知 [EB/OL]. [2021-09-01]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [14] 崔有晨. 清胃散治疗胃火炽盛型牙周炎临床观察 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(8): 97.
- [15] 李兵, 侯西娟, 刘思鸿, 等. 经典名方复方制剂研发的文献考证要点与策略 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(21): 1.
- [16] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964.
- [17] 杨珏, 罗霄, 刘芳, 等. 基于网络药理学和分子对接分析厚朴治疗消化性溃疡的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17): 4522.
- [18] 曾玉, 韩瑞婷, 周庆伟. 基于网络药理学与分子对接技术探讨痰热清注射液治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(15): 3960.
- [19] 孟颖, 徐泳, 严国俊, 等. 清胃散加减方治疗牙周炎的 Meta 分析 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(10): 1539.
- [20] 蔡懿, 吴钱生, 龙文玲, 等. 火郁发之论治放疗后口腔炎临床观察 [J]. *光明中医*, 2018, 33(8): 1130.
- [21] ZHAO J, FANG Z, ZHA Z, et al. Quercetin inhibits cell viability, migration and invasion by regulating miR-16/HOXA10 axis in oral cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 847: 11.
- [22] CHENG W C, HUANG R Y, CHANG C Y, et al. Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats [J]. *J Periodontal Res*, 2010, 45(6): 788.
- [23] PATRA J K, KIM E S, OH K, et al. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 343.
- [24] 郭晓雨. 槲皮素对糖尿病牙周炎大鼠牙周组织的作用及其血清 AGEs 水平的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020.
- [25] ZHANG R, YANG J, WU J, et al. Berberine promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells with therapeutic potential in periodontal regeneration [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 851: 144.
- [26] 张小恒. 盐酸小檗碱对人牙周膜细胞生物学活性及大鼠牙周组织 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [27] MARTIN B J, CAMPBELL P M, TERRY T D, et al. A randomized controlled trial evaluating antioxidant-essential oil gel as a treatment for gingivitis in orthodontic patients [J]. *Angle Orthod*, 2016, 86(3): 407.
- [28] 赵颖, 邓云贞, 朱春晖, 等. 阿魏酸钠改善伴糖尿病牙周炎大鼠牙周组织微循环 [J]. *口腔生物医学*, 2018, 9(4): 173.
- [29] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展 [J]. *广东医学*, 2010, 31(8): 1064.
- [30] BALLI U, CETINKAYA B O, KELES G C, et al. Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol [J]. *J Periodontal Implant Sci*, 2016, 46(2): 84.
- [31] ZHANG Z, SHUAI Y, ZHOU F, et al. PDLSCs regulate angiogenesis of periodontal ligaments via VEGF transferred by exosomes in periodontitis [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(5): 558.
- [32] 胡运苑, 苏黎, 梁惠均. VEGF 和 ICAM-1 在慢性牙周炎患者牙龈组织中的表达及意义 [J]. *现代诊断与治疗*, 2019, 30(3): 347.
- [33] FANG L, CHENG J C, CHANG H M, et al. EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(12): 4932.
- [34] 徐颖, 孟键. 慢性牙周炎患者表皮生长因子表达的免疫组织化学研究 [J]. *山西医药杂志*, 2016, 45(12): 1395.
- [35] 姜梅, 徐俊仙, 翁静婷. 血清脂联素、超敏 C-反应蛋白、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子- α 联合检测在慢性牙周炎患者早期诊断中的应用价值 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(18): 2248.
- [36] 黄静文. 慢性牙周炎患者外周血 T 淋巴细胞中 PD-1 和 PD-1L 的表达量及其与炎症反应程度的相关性 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(2): 262.
- [37] SHOKOHI T, ASLANI N, AHANGARKANI F, et al. *Candida infanticola* and *Candida spencermartinsiae* yeasts: possible emerging species in cancer patients [J]. *Microb Pathog*, 2018, 115(21): 353.
- [38] SUI L, WANG J, XIAO Z, et al. ROS-scavenging nanomaterials to treat periodontitis [J]. *Front Chem*, 2020, 8: 595530.
- [39] 余海波, 袁晓, 郭庆圆. 转录因子 HIF-1 α 与口腔疾病关系的研究进展 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2018, 34(2): 125.
- [40] BERINGER A, NOACK M, MIOSSEC P. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(3): 230.
- [41] DUTZAN N, ABUSLEME L. T helper 17 cells as pathogenic drivers of periodontitis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1197(1): 107.
- [42] BUNTE K, BEIKLER T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3394.