

# 基于HPLC-Q-Exactive MS和网络药理学探讨红花清肝十三味丸治疗非酒精性脂肪肝的药效物质基础及作用机制



郝霞<sup>1</sup>, 刘静<sup>2</sup>, 张谦<sup>2</sup>, 李君<sup>2</sup>

1. 巴彦淖尔市医院消化内科(内蒙古巴彦淖尔 015000)

2. 内蒙古医科大学药学院(呼和浩特 010110)

**【摘要】目的** 利用高分辨液相色谱-质谱联用仪,快速准确地对红花清肝十三味丸中复杂的化学成分进行分析鉴定,旨在明确其缓解非酒精性脂肪肝的有效成分,同时结合网络药理学和分子对接,探索红花清肝十三味丸潜在的作用机制。**方法** 使用甲醇和含有0.1%甲酸的水溶液作为流动相,进行梯度洗脱;采用正负离子交替扫描模式切换扫描,扫描范围  $m/z$  110~1 200;通过与对照品、参考文献与自建数据库比对后对复方中化合物进行识别鉴定;基于液质联用数据,通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库进一步筛选活性化合物,并利用 SwissTargetPrediction、GeneCards 等在线数据库预测分析红花清肝十三味丸在治疗非酒精性脂肪肝可能的靶点并进行 KEGG 与 GO 的富集分析;利用蛋白质-蛋白质相互作用网络筛选核心靶点;最后运用分子对接技术验证活性化合物与靶点的潜在结合活力。**结果** 从红花清肝十三味丸中共鉴定出 75 个化合物,其中黄酮类化合物 31 个,有机酸类化合物 17 个,鞣质类化合物 9 个,环烯醚萜类化合物 8 个,木质素类化合物 3 个及其他类化合物 7 个。利用网络药理学方法筛选出核心靶点 5 个:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、人表皮生长因子受体 2/酪氨酸激酶受体 2 (HER2/ERBB2)、磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基 1 (PI3KR1) 及非受体酪氨酸激酶 Src。KEGG 富集通路主要为:PI3K-AKT 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗通路、ERBB 信号通路。**结论** 对红花清肝十三味的复杂化学成分进行了快速准确地分析鉴定,同时探讨其治疗非酒精性脂肪肝的可能作用机制,为红花清肝的质量控制及后续研究提供科学参考。

**【关键词】** 红花清肝十三味丸;非酒精性脂肪肝;高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱;网络药理学;分子对接;胰岛素抵抗;氧化应激

**【中图分类号】** R285 **【文献标识码】** A

Exploration of the pharmacodynamic substance basis and mechanism of Honghua Qinggan Shisanwei pills in treating non-alcoholic fatty liver based on HPLC-Q-Exactive MS and network pharmacology

HAO Xia<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>2</sup>, LI Jun<sup>2</sup>

1. Department of Gastroenterology, Bayannur Hospital, Bayannur 015000, Inner Mongolia

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202403139

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(82360801);内蒙古自治区自然科学基金项目(2023QN08050);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY23135)

通信作者:李君,硕士,助理研究员,Email:nmg15547126231@sina.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

Autonomous Region, China

2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Corresponding author: LI Jun, Email: nmg1554712623l@sina.com

**【Abstract】Objective** To rapidly and accurately analyze and identify the complex chemical components in Honghua Qinggan Shisanwei pills by high performance liquid chromatography-Q-Exactive mass spectrometry (HPLC-Q-Exactive MS), clarify the active ingredients for the alleviation of non-alcoholic fatty liver disease, and explore the potential mechanism of action of Honghua Qinggan Shisanwei pills by network pharmacology and molecular docking. **Methods** Gradient elution was performed using methanol and aqueous solution containing 0.1% formic acid as mobile phases. The scan was switched by alternating positive and negative ion scanning modes with the scanning range of  $m/z$  110-1 200. The compounds in the formula were identified by comparing them with reference substance, references, and self-constructed databases. Based on liquid chromatography-mass spectrometry data, active compounds were further screened using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database. Possible targets of Honghua Qinggan Shisanwei pills were predicted and analyzed using online databases such as SwissTargetPrediction and GeneCards, followed by KEGG and GO enrichment analyses. The core targets were identified using the protein-protein interaction network. Finally, molecular docking technology was employed to verify the binding viability of the active compounds with the targets. **Results** A total of 75 compounds were identified from Honghua Qinggan Shisanwei pills, including 31 flavonoids, 17 organic acids, 9 tannins, 8 cyclic enol ether terpenes, 3 lignans and 7 others. 5 core targets were identified using network pharmacological methods: serine/threonine kinase 1 (AKT1), epidermal growth factor receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor 2/tyrosine kinase receptor 2 (HER2/ERBB2), phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 (PI3KR1) and non-receptor tyrosine kinase Src. The KEGG enrichment pathways mainly included the PI3K-AKT signaling pathway, the EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance pathway and the ERBB signaling pathway. **Conclusion** The complex chemical components of Honghua Qinggan Shisanwei pills were rapidly and accurately identified. Additionally, the potential mechanisms for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease were investigated, providing a scientific reference for the quality control of Honghua Qinggan Shisanwei pills and subsequent research.

**【Keywords】** Honghua Qinggan Shisanwei pills; Non-alcoholic fatty liver disease; High performance liquid chromatography-Q-Exactive mass spectrometry; Network pharmacology; Molecular docking; Insulin resistance; Oxidative stress

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种由于代谢功能障碍, 导致肝脏内甘油三酯过度积累引起的一种常见的肝脏疾病<sup>[1]</sup>, 与肥胖、2型糖尿病、胰岛素抵抗和高脂血症等密切相关。在蒙医理论中, 将 NAFLD 归于“通拉嘎未消化症”<sup>[2]</sup>, 认为是由于体内三根失调、巴达干增多、希拉功能紊乱等, 致使肝

脏中精华与糟粕的分解受到阻碍, 未消化的精华在肝脏中过度堆积无法代谢, 从而诱发 NAFLD。由于 NAFLD 的致病机制复杂, 而传统蒙药复方具有多成分、多靶点的特点, 在调节代谢功能和改善肝脏脂肪积累方面展现出独特的治疗优势。

红花清肝十三味丸 (又名古日古木-13味丸, 以下简称 HHQG) 是收录在《中华人民共

和国卫生部药品标准》中的经典蒙药方剂<sup>[3]</sup>，具有清肝热、解毒、杀黏等多种作用，是蒙医肝胆科常用复方制剂<sup>[2]</sup>。尽管 HHQG 治疗 NAFLD 效果显著，但对其化学成分及作用机制尚未见到系统的报道。本研究通过高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (high performance liquid chromatography-Q-Exactive mass spectrometry, HPLC-Q-Exactive MS) 技术和网络药理学分析方法对 HHQG 中复杂化学成分及其治疗 NAFLD 的潜在机制进行初步探讨，为该药的药效物质基础和临床应用提供有效的数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

Ulti-Mate 3000 型色谱仪和 Q-Exactive 高分辨率质谱仪 (赛默飞世尔科技中国有限公司)；AP135W 型高精度电子天平 (日本岛津公司)；C-2L-MRE 型旋转蒸发仪 (上海舍岩仪器有限公司)；98-I-BN 型电子调温电热套 (天津市泰斯特仪器有限公司)；KH-500DV 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

绿原酸 (批号: 110753-202018)、芦丁 (批号: 100080-202012)、阿魏酸 (批号: 110773-201914)、栀子苷 (批号: 110749-201718)、川楝素 (批号: 111824-201804)、槲皮素 (批号: 10081-201810)、异鼠李素 (批号: 110860-202012)、木犀草素 (批号: 111520-202107)、去氢木香内酯 (批号: 111525-202313) 对照品均购自中国食品药品检定研究院；原儿茶酸 (批号: PU0918-0025)、芹菜素 (批号: PS011063)、柯里拉京 (批号: PS011824) 对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司；HHQG (内蒙古蒙药股份有限公司, 批号: 2021061)；甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 基于 HPLC-Q-Exactive MS 的 HHQG 成分鉴定

① 供试品溶液制备：将 HHQG 粉碎，过 60 目筛，称取约 2.0 g 至锥形瓶中，加 85% 甲醇 10 mL，称重，超声 (功率: 250 W，频率: 40 kHz) 处理 30 min，冷却至室温，85% 甲醇补重，

摇匀，经 0.22 μm 滤膜过滤，于 4 °C 条件下储存、待用。

对照品溶液制备：精密称取绿原酸、芦丁、阿魏酸、异鼠李素、芹菜素、去氢木香内酯、栀子苷、川楝素、槲皮素、木犀草素、原儿茶酸和柯里拉京对照品分别置于 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇溶解，定容，获得浓度分别为 541、198、225、420、310、211、213、238、427、316、209、187 μg/mL 的对照品储备液；取上述各储备液 100 μL 至 10 mL 量瓶中，用 85% 甲醇定容得混合对照品溶液，于 4 °C 条件下储存、待用。

② 色谱条件：色谱柱：Agilent ZORBAX SB-Aq 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~3 min, 5% A；3~8 min, 5%→30% A；8~18 min, 30%→50% A；18~30 min, 50%→75% A；30~35 min, 75%~95% A；35~40 min, 95% A)；流速：0.8 mL/min；柱温：35 °C，进样量：5 μL。

质谱条件：采用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI)，于正、负离子模式下进行检测，全质量扫描分辨率为 70 000，二级质谱分辨率为 17 500，扫描范围为  $m/z$  110~1 200，碰撞能量为 30 eV，喷雾电压为 3.50 kV (+) 和 4.0 kV (-)，离子传输管温度 300 °C (+) 和 400 °C (-)，辅助气温度 350 °C，辅助气体积流量 30 L/min<sup>[4-6]</sup>。

③ 成分数据库建立及化合物鉴定。基于 PubMed、CNKI、中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSAP) 数据库对 HHQG 全方及各单味药材进行检索，建立包括化合物名称、分子式、精确分子量等信息的本地数据库<sup>[4-17]</sup>。随后，取供试品溶液及对照品溶液进样，获得正、负离子模式下总离子流图，使用 Xcalibur 3.0 软件对总离子流图进行处理，以自建数据库为基础，并以一级质谱偏差在  $1 \times 10^{-5}$  以内为原则，对 HHQG 成分进行辨识分析，阐明 HHQG 所含具体化学成分。

④ 潜在活性化合物筛选。在药物研发中，ADME (吸收、分布、代谢、排泄) 参数的筛选是评估化合物成药性的重要环节<sup>[18]</sup>。药物相似性 (drug-likeness, DL) 是基于化合物的结构和药理学特性的计算得分，用于评估其作为药物的潜力，DL 低于 0.18 的化合物往往表现出较差的药

物相似性和成药潜力<sup>[19]</sup>；口服生物利用度（oral bioavailability, OB）指药物通过口服途径进入全身循环的比例，口服药物的OB值在30%及以上，表明其能够在人体中达到有效浓度<sup>[20]</sup>。故此将液质鉴定出的化合物导入TCMSP在线数据库，设置DL $\geq$ 0.18、OB $\geq$ 30%为条件，筛选HHQG活性化合物。

### 1.3.2 基于活性化合物的网络药理学分析

①构建“活性化合物-潜在治疗靶点”相互作用网络。在PubChem网站查询并下载活性化合物的SDF格式文件，导入PharmMapper网站，以拟合分数 $>$ 0.9作为条件筛选各活性化合物作用靶点，合并去重，获得HHQG作用靶点；以“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词，在GeneCards、人类孟德尔遗传在线数据库（Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM）、PharmGKB、比较毒理学数据库（Comparative Toxicogenomics Database, CTD）、DrugBank 5个在线数据库对NAFLD进行疾病靶点搜索，合并去重，获得疾病靶点；将活性化合物作用靶点与NAFLD疾病靶点导入Venny 2.1在线软件作图工具平台绘制韦恩图，获得HHQG治疗NAFLD的潜在靶点；将活性化合物及其治疗NAFLD潜在靶点导入Cytoscape 3.9.0软件，构建“活性化合物-潜在治疗靶点”相互作用网络。

②潜在治疗靶点GO功能和KEGG通路富集分析。采用注释、可视化和集成发现数据库（The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID）对HHQG潜在治疗NAFLD靶点进行GO功能与KEGG通路富集分析，并借助R 2.4.1语言包对富集结果进行可视化分析。

③蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及核心靶点筛选。将获得的潜在治疗靶点导入STRING数据库，物种项选择“homo sapiens”，设定“minimum required interaction score”为0.992，去除孤立节点，生成蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络图；下载PPI网络的TSV格式文件，导入Cytoscape软件，利用CytoNCA计算交集PPI的网络拓扑学特征属性值并对结果进行筛选，两次打分后获得核心靶点。

④分子对接验证HHQG中的关键成分与

核心靶点的结合能力。在蛋白质结构数据库（protein data bank, PDB）及AlphaFold数据库中查找核心靶点蛋白，利用PyMOL 1.8.7移除所有配体、水分子和共晶体分子，添加氢原子，随后设置对接活性口袋包裹整个蛋白结构；下载关键小分子化合物三维结构，使用AutoDock Tools 1.5.7将小分子以及核心靶点蛋白转换为PDBQT格式；利用AutoDock Vina 1.2.0进行分子对接分析并计算结合能，结合能小于 $-5$  kcal/mol认为化合物与靶蛋白结合稳定，选择结合能最低且符合生物学意义的构象使用Discovery Studio进行可视化展示。

## 2 结果

### 2.1 基于HPLC-Q-Exactive MS的HHQG成分鉴定结果

共鉴定出75个化学成分，包括黄酮类31个，有机酸类17个，鞣质类9个，环烯醚萜类8个，木质素类3个，其他类7个，其中有12个化学成分通过与对照品比对得到进一步的确认，结果见表1和图1A-C；共筛选出HHQG潜在活性成分13个，具体见图1D。

### 2.2 网络药理学结果

#### 2.2.1 治疗靶点获取及“活性化合物-潜在治疗靶点”网络构建

将13个候选活性化合物导入PharmMapper在线网站，共获得329个作用靶点；利用关键词“non-alcoholic fatty liver disease”在5个在线数据库进行疾病靶点搜索，GeneCards数据库获得4158个靶点、OMIM数据库获得82个靶点、PharmGKB数据库获得46个靶点、CTD数据库获得87个靶点、DrugBank数据库获得5个靶点，将各数据库的靶点数据绘制韦恩图（图2A），汇总去重后获得40207个疾病靶点；将活性化合物靶点与疾病靶点取交集，获得207个潜在治疗靶点（图2B）；使用Cytoscape 3.9.0软件，构建13个活性化学成分与207个交集靶点的网络图（图3），每个化合物连接的靶点数量作为权重，度数越高，代表化合物的形状越大。

#### 2.2.2 潜在治疗靶点GO功能和KEGG通路富集分析

使用DAVID 6.8.0数据库对获得的207个交集靶点进行GO和KEGG通路富集分析，设

表1 HHQG化学成分鉴定  
Table 1. Identification of chemical components of HHQG

序号	化学成分名称	保留时间 (min)	分子式	离子模式	分子离子峰		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片	类型
					理论值	实测值			
1	没食子酸-3-O-β-D-葡萄糖苷 (gallic acid 3-O-β-D-glucoside) [17,13]	1.08	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331.06 597	331.06 866	8.116	331.06 866, 313.05 704, 169.01 385, 125.02 371	鞣质类
2	奎宁酸 (quinic acid) [5,9]	1.10	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	191.05 501	191.05 600	5.158	191.05 600, 173.04 526, 147.02 893, 111.00 784	有机酸类
3	精氨酸 (L-arginine) [5]	1.12	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	175.11 895	175.11 819	-4.353	175.11 819, 116.07 027	氨基酸类
4	延胡索酸 (fumaric acid) [14]	1.12	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	115.00 258	115.00 278	1.695	115.00 278	有机酸类
5	苹果酸 (malic acid) [6-7]	1.13	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	133.01 314	133.01 357	3.159	133.01 357, 115.00 278	有机酸类
6	缬氨酸 (valine) [8]	1.20	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	118.08 625	118.08 584	-3.516	118.08 584	氨基酸类
7	莽草酸 (shikimic acid) [8-9]	1.42	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	173.04 444	173.04 512	3.873	173.04 512, 93.03 354, 155.03 433, 137.02 376, 111.04 421	有机酸类
8	诃子次酸 (chebulic acid) [8]	1.79	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	355.02 958	355.02 908	-1.430	355.02 908, 337.02 136, 311.04 163, 293.03 165, 275.01 892, 249.04 120, 205.05 069, 193.01 428	鞣质类
9	柠檬酸 (citric acid) [5-6]	1.81	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	191.01 862	191.01 974	5.816	191.01 974, 111.00 789, 173.00 874, 147.02 927	有机酸类
10	琥珀酸 (butanedioic acid) [6-7]	2.22	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	117.01 823	117.01 842	1.580	117.01 842	有机酸类
11	没食子酸 (gallic acid) [4, 7, 9]	3.19	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	169.01 314	169.01 378	3.729	169.01 378, 125.02 362	有机酸类
12	原儿茶酸 (protocatechuic acid) [5, 8]*	6.70	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	153.01 823	153.01 878	3.561	153.01 878, 109.02 861	有机酸类
13	没食子酸丙酯 (propyl gallate) [7]	9.78	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	211.06 009	211.06 151	6.681	211.06 151, 169.01 402	鞣质类
14	对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid) [7]	10.09	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	137.02 332	137.02 379	3.426	137.02 379	有机酸类
15	山柰苷 (shanziside) [7]	10.79	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	391.12 348	391.12 659	7.931	391.12 659, 229.07 233, 211.06 136, 185.08 192, 167.07 094, 149.06 026	环烯醚萜
16	去乙酰车叶草苷酸甲酯 (methyl deacetylasperulosidate) [7]	11.85	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	[M+C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>+</sup>	449.12 896	403.12 640	7.224	403.12 640	环烯醚萜
17	没食子酸甲酯 (methyl gallate) [6, 13]	12.25	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	183.02 879	183.02 988	5.902	183.02 988, 168.00 606	鞣质类
18	去乙酰车叶草苷酸 (Scandoside) [7]	12.46	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	389.10 783	389.10 904	3.090	389.10 904	环烯醚萜

续表1

序号	化学成分名称	保留时间 (min)	分子式	离子模式	分子离子峰		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片	类型
					理论值	实测值			
19	表儿茶素 (epicatechin) [7]	12.80	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	289.07 066	289.07 269	7.007	289.07 269、245.08 281、 151.03 935、137.02 385	黄酮类
20	绿原酸 (chlorogenic acid) [4, 6]*	13.62	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.08 670	353.08 945	7.764	353.08 945、191.05 611、 179.03 529、173.04 524、 135.04 395	有机酸类
21	诃子素 (chebulin) [7]	14.04	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	311.03 975	311.04 242	8.557	311.04 242	鞣质类
22	咖啡酸 (caffeic acid) [6, 9]	14.17	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	179.03 388	179.03 485	5.389	179.03 485、135.04 454	有机酸类
23	羟基红花黄色素A (hydroxysafflor yellow A) [11]	14.39	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	611.16 066	611.16 443	6.167	611.16 443、491.12 189	黄酮类
24	柯里拉京 (corilagin) [4, 6]*	14.92	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	633.07 224	633.07 666	6.982	633.07 666、463.05 399、 301.00 031、169.01 385	鞣质类
25	京尼平苷酸 (geniposidic acid) [7]	15.44	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373.11 292	373.11 606	8.407	373.11 606、355.06 870	环烯醚萜
26	1,3,6-三-O-没食子酰葡萄糖 (1,3,6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose) [6-7, 13]	15.46	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	635.08 789	635.09 216	6.723	635.09 216、169.01 379、 125.02 369	鞣质类
27	表没食子儿茶素 ((-)-epigallocatechin) [6-7]	15.64	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	305.06 557	305.06 802	8.001	305.06 802、261.07 776	鞣质类
28	梔子苷 (gardenoside) [4]*	15.73	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	411.12 616	411.12 427	-4.623	411.12 427	环烯醚萜
29	丁香酸 (syringic acid) [10]	16.06	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	197.04 444	197.04 570	6.344	197.04 570、169.01 390、 140.01 096、125.02 383、 111.00 792	有机酸类
30	京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷 (geniposide-1-β-D-gentiobioside) [13]	16.08	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	549.18 139	549.18 079	-1.105	549.18 079、225.07 713、 207.06 642	环烯醚萜
31	1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖 (1,2,3,6-tetra-O-galloylglucose) [10]	17.25	C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> O <sub>22</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	787.09 884	787.10 327	5.617	787.10 327、635.09 106、 617.08 173、295.04 736、 169.01 384	鞣质类
32	花旗松素 (taxifolin) [7]	17.41	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	303.04 992	303.05 255	8.648	303.05 255、285.04 181、 151.00 323	黄酮类
33	夏佛塔苷 (schafostside) [5]	17.96	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	563.13 953	563.14 307	6.283	563.14 307、473.11 227、 443.10 040、353.06 839	黄酮类
34	杨梅素-3-O-鼠李葡萄糖苷 (myricetin-3-O-rhamnoside) [7]	17.97	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	625.13 992	625.14 410	6.677	625.14 410、463.09 000、 301.03 625	黄酮类
35	槲皮素-3-O-槐糖-7-O-鼠李糖苷 (quercetin-3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside) [6]	18.05	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	771.19 783	771.20 306	6.776	771.20 306、609.14 948、 463.08 972、301.03 659	黄酮类

续表1

序号	化学成分名称	保留时间 (min)	分子式	离子模式	分子离子峰		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片	类型
					理论值	实测值			
36	儿茶素 (catechin) [6]	18.23	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	289.07 066	289.07 172	3.651	289.07 172、271.06 235、 245.10 371、151.03 973、 137.02 382	黄酮类
37	阿魏酸 (ferulic acid) [5-6]*	18.69	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	193.04 953	193.05 070	6.033	193.05 070	有机酸类
38	金丝桃苷 (hyperoside) [6]	18.88	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	463.08 710	463.09 052	7.380	463.09 052、301.03 604	黄酮类
39	山柰酚-3-O-芸香糖-7-O-鼠李糖苷 ( quercetin-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside ) [6,12]	19.08	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	739.20 800	739.21 338	7.271	739.21 338、285.04 016	黄酮类
40	川楝素 (toosendanin) [4]*	19.30	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	597.23 063	597.23 022	-0.692	597.23 022	三萜类
41	木犀草苷 (cynaroside) [4]	19.38	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	447.09 218	447.09 543	7.252	447.09 543、285.04 150、 151.00 314	黄酮类
42	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (miquelianin) [6]	19.62	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	477.06 636	477.06 989	7.385	477.06 989、301.03 659、 151.00 316	黄酮类
43	芦丁 (rutin) [4,6]*	19.85	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	609.14 501	609.14 929	7.024	609.14 929、301.03 583、 300.02 893、271.02 631、 151.00 299	黄酮类
44	异鼠李素-3-7-O-己糖苷 ( quercetin-3,7-O-hexoside ) [12]	19.92	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	639.15 557	639.16 064	7.923	639.16 064、315.01 590	黄酮类
45	鞣花酸 (ellagic acid) [5-6]	20.17	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	300.99 789	301.00 040	8.327	301.0 004	黄酮类
46	柚皮苷 (naringenin) [12]	20.25	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	579.17 083	579.17 255	2.966	579.17 255	黄酮类
47	芹菜素 (apigenin) [6]*	20.39	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	271.06 009	271.05 905	-3.873	271.05 905	黄酮类
48	牡荆素 (vitexin) [5-6]	20.66	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	431.09 727	431.10 065	7.833	431.10 065、413.12 680、 311.09 384	黄酮类
49	美迪紫檀素 (medicarpin) [12]	20.72	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	269.08 083	269.08 307	8.305	269.08 307、251.02 072	黄酮类
50	山奈酚-3-O-芸香糖苷 (nicotiflorin) [15]	21.17	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593.15 009	593.15 479	7.913	593.15 479、285.04 156	黄酮类
51	水仙苷 (narcissin) [5]	21.32	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	623.16 066	623.16 449	6.144	623.16 449、315.05 225、 300.02 881	黄酮类
52	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 ( isorhamnetin-3-O-glucoside ) [6,12]	21.35	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	477.10 275	477.10 577	6.325	477.10 577、315.05 045、 285.04 193、151.00 336	黄酮类
53	山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷 ( quercetin-3-O-β-D-glucoside ) [16]	21.73	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	461.07 145	461.07 138	-0.157	461.07 138、300.99 634	黄酮类

续表1

序号	化学成分名称	保留时间 (min)	分子式	离子模式	分子离子峰		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片	类型
					理论值	实测值			
54	京尼平 (genipin) [13]	22.02	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	225.07 575	225.07 758	8.131	225.07 758、207.06 602	环烯醚萜
55	金合欢素 (acacetin) [10,12]	22.77	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	283.06 119	283.06 259	8.797	283.06 259	黄酮类
56	槲皮素 (quercetin) [5-6]*	22.78	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	301.03 427	301.03 680	8.374	301.03 680、273.04 123、 178.99 855、151.00 322	黄酮类
57	毛蕊异黄酮 (calycosin) [12]	22.86	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	283.06 009	283.06 259	8.797	283.06 259、268.03 900	黄酮类
58	柚皮素 (naringenin) [6]	23.50	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	271.06 009	271.06 271	9.629	271.06 271	黄酮类
59	丁香酚 (eugenol) [11]	24.12	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.09 100	165.09 029	-4.338	165.09 029、133.06 442、 105.06 980	木脂素类
60	木犀草素 (luteolin) [4,6]*	24.53	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.03 936	285.04 187	8.790	285.04 187、151.00 327	黄酮类
61	羟基去氢木香内酯 (hydroxydihydrocostunolide) [6]	24.67	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	247.13 287	247.13 171	-4.698	247.13 171、229.12 129	倍半萜类
62	异鼠李素 (isorhamnetin) [5-6,12]*	24.96	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	315.04 992	315.05 270	8.795	315.05 270、300.02 908	黄酮类
63	刺芒柄花素 (formononetin) [5-6]	25.73	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	269.08 083	269.07 980	-3.848	269.07 980	黄酮类
64	异土木香内酯 (isolanolactone) [6]	28.61	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	233.15 360	233.15 240	-5.174	233.15 240、215.14 188、 187.14 754	倍半萜类
65	芝麻素 (sesamin) [7]	29.06	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.10 196	353.10 495	8.454	353.10 495	黄酮类
66	去氢木香内酯 (dehydrocostus lactone) [6]*	29.14	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	231.13 795	231.13 681	-4.960	231.13 681、213.12 630、 195.11 617、185.13 187	倍半萜类
67	二氢- $\alpha$ -环木香烯内酯 (dihydro- $\alpha$ -costunolide) [6]	30.07	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	235.16 925	235.16 925	-5.088	235.16 925、217.15 569	倍半萜类
68	去氢二异丁香酚 (dehydrodiisoeugenol) [11]	30.79	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	327.15 908	327.15 659	-7.628	327.15 659	木脂素类
69	槲子花酸B (gardenoside B) [7]	31.86	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	485.32 615	485.32 996	7.858	485.32 996、469.33 554	环烯醚萜
70	石竹素 (caryophyllene oxide) [17]	32.31	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	221.18 999	221.18 892	-4.846	221.18 892	黄酮类
71	甲基丁香酚 (methyl eugenol) [11]	32.41	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	179.10 665	179.10 588	-4.334	179.10 588、131.08 510	木脂素类
72	$\alpha$ -亚麻酸 ( $\alpha$ -linolenic acid) [5]	35.23	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	277.21 620	277.21 863	8.742	277.21 863、259.20 743	有机酸类
73	亚油酸 (linoleic acid) [5-6]	36.45	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	279.23 185	279.23 428	8.678	279.23 428	有机酸类
74	棕榈酸 (palmitic acid) [5-6]	37.73	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	255.23 185	255.23 398	8.319	255.23 398	有机酸类
75	油酸 (oleic acid) [5-6]	38.42	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	281.24 750	281.24 994	8.651	281.24 994	有机酸类

注: \*为与对照品比对。

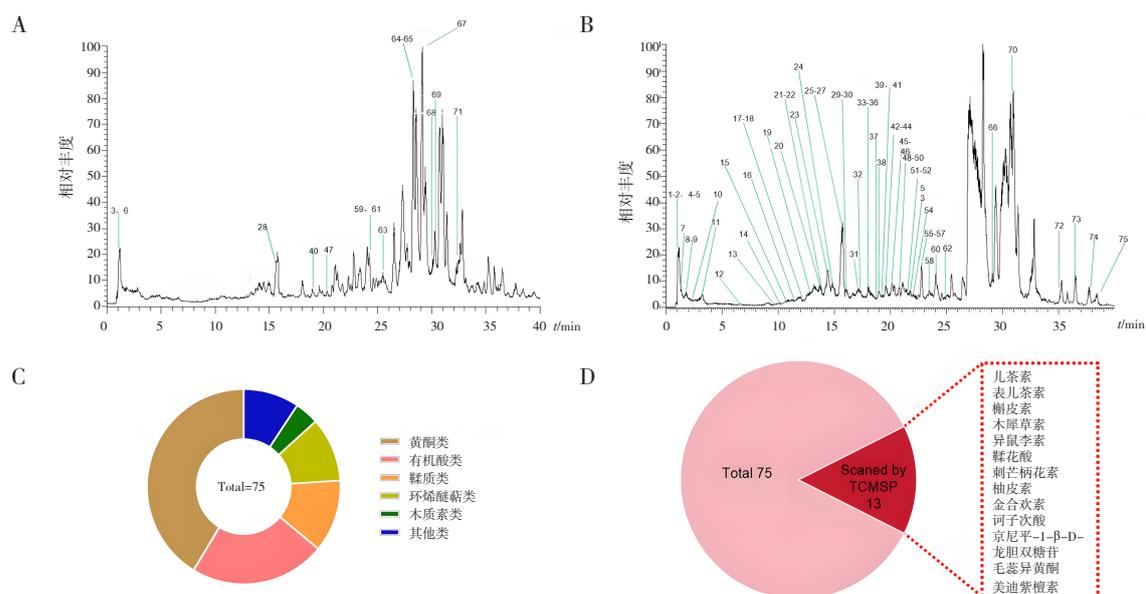


图1 HHQG化学成分鉴定与活性化合物筛选

Figure 1. Chemical component identification and active compound screening of HHQG

注：A. 正离子模式；B. 负离子模式；C. 化合物分类；D. TCMSP活性化合物筛选。

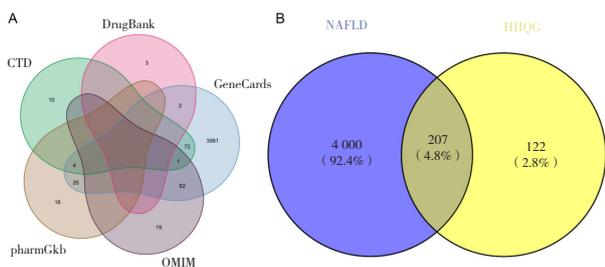


图2 潜在治疗靶点获取

Figure 2. Acquisition of potential therapeutic targets

注：A. NAFLD疾病靶点；B. HHQG治疗NAFLD潜在靶点。

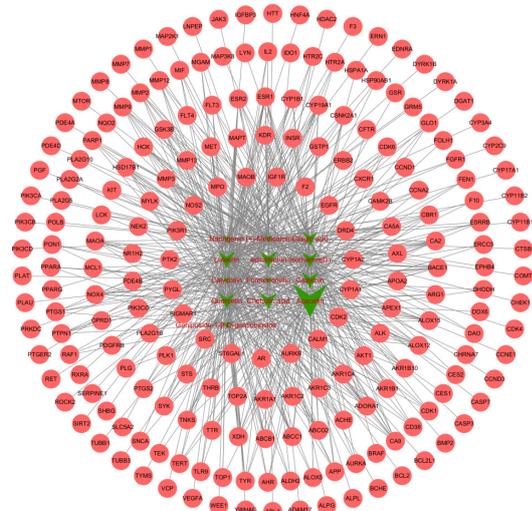


图3 “活性化合物-潜在治疗靶点”网络图

Figure 3. Network diagram of "active compounds-potential therapeutic targets"

置过滤条件  $P < 0.05$ 。GO 功能富集得到生物过程 (biological process, BP) 条目 2 305 个, 细胞组成 (cellular component, CC) 条目 109 个, 分子功能 (molecular function, MF) 条目 245 个, 分别选取 BP、CC、MF 前 10 条通路进行可视化处理 (图 4A)。BP 主要涉及激酶活性的调控、酪氨酸磷酸化修饰、对异种生物刺激的反应等; 交集基因编码的蛋白大多定位于膜筏、膜微区、丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶复合物等位置; MF 主要涉及调节跨膜激酶及受体活性、调节丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶活性、调节类固醇羟化酶活性等。KEGG 结果根据  $P$  值与 Count 值排序后选取排名前 30 位的条目绘制柱状图 (图 4B), 结果明显富集到磷酸肌醇 3 激酶-丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 (phosphoinositide 3-kinases-serine/threonine kinase, PI3K-AKT)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂抵抗与酪氨酸激酶受体 (human epidermal growth factor receptor, ERBB) 等重要的信号通路。结果表明 HHQG 中的潜在活性化学成分可能通过调节细胞膜上的 EGFR 与 ERBB 等酪氨酸激酶受体活性, 影响下游 PI3K-AKT 等信号通路, 调节细胞周期、细胞代谢和氧化应激等, 从而发挥抗 NAFLD 的作用。

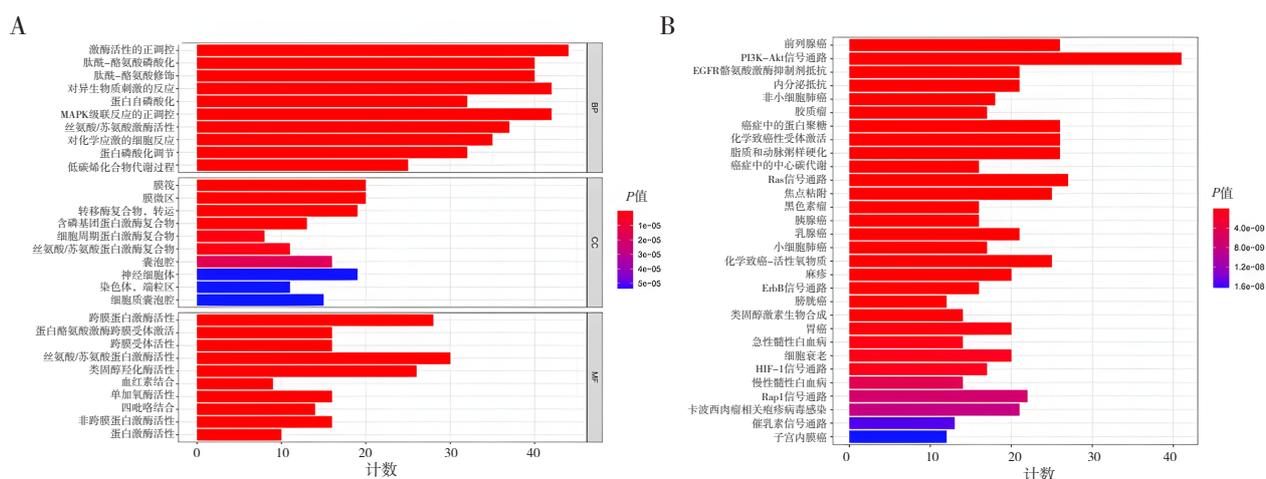


图4 潜在治疗靶点GO与KEGG富集分析结果

Figure 4. GO and KEGG enrichment analysis results of potential therapeutic targets

注：A. GO分析；B. KEGG富集分析。

### 2.2.3 核心靶点筛选

将交集靶点上传至 STRING 数据库，绘制 PPI 网络图，结果包括 207 个节点，125 条相互作用连线，去除孤立节点后，导出 PPI 网络图（图 5）。

使用 Cytoscape 软件以连接度、介度、紧密度 3 项经两次评分后筛选出 5 个核心靶点：AKT1、EGFR、ERBB2/人表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）、PI3K 调节亚基 1（PI3K regulatory subunit 1，PIK3R1）以及非受体酪氨酸激酶 Src（图 6）。提示这些靶点可能是 HHQG 治疗 NAFLD 的潜在关键靶点。

### 2.4 活性化学成分与核心靶点的分子对接可视化分析

将 5 个核心靶点与相应的活性小分子化合物进行分子对接（表 2）。结合能小说明成分与靶点结合越容易。在本次研究中，所有活性化学成分与核心靶点的结合能均低于  $-5$  kcal/mol，表明配体与受体蛋白结合稳定，方剂中多个活

性化合物与核心靶点具有良好的亲和力以及潜在的药效活性。为进一步可视化展示对接结果，筛选 HHQG 中关键化合物，基于表 2 绘制网络图，采用力引导布局（图 7）。木犀草素

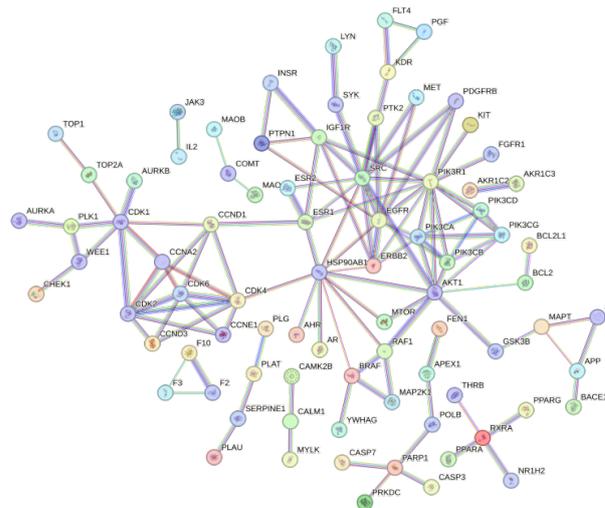


图5 PPI网络图

Figure 5. PPI network diagram

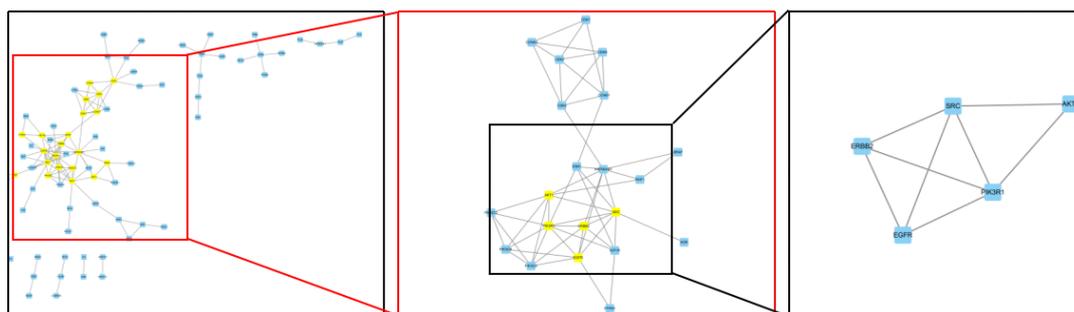


图6 核心靶点筛选

Figure 6. Core targets screening

表2 分子对接结合能数据  
Table 2. Molecular docking binding energy

MOL ID	活性化合物	核心靶点	PDB编号	结合能 (kcal/mol)
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	AKT1	6BUU	-6.3
MOL000006	木犀草素 (luteolin)			-6.1
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)			-5.7
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)			-5.5
MOL000006	木犀草素 (luteolin)	EGFR	2GS6	-6.6
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)			-6.4
MOL001689	金合欢素 (acacetin)			-6.4
MOL000098	槲皮素 (quercetin)			-6.3
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)			-6.3
MOL000417	毛蕊异黄酮 (calycosin)			-6.1
MOL000392	刺芒柄花素 (formononetin)			-5.8
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)	ERBB2	7PCD	-8.7
MOL001689	金合欢素 (acacetin)	PI3KR1	2R4B	-7.2
MOL000006	木犀草素 (luteolin)			-7.2
MOL000098	槲皮素 (quercetin)			-7.1
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)			-7.0
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	Src	4K11	-7.6
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)			-7.6
MOL002565	美迪紫檀素 (medicarpin)			-7.4
MOL000006	木犀草素 (luteolin)			-7.4
MOL006826	诃子次酸 (chebulic acid)			-7.3
MOL000771	柚皮素 (naringenin)			-6.9
MOL001689	金合欢素 (acacetin)			-6.7
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)			-6.7

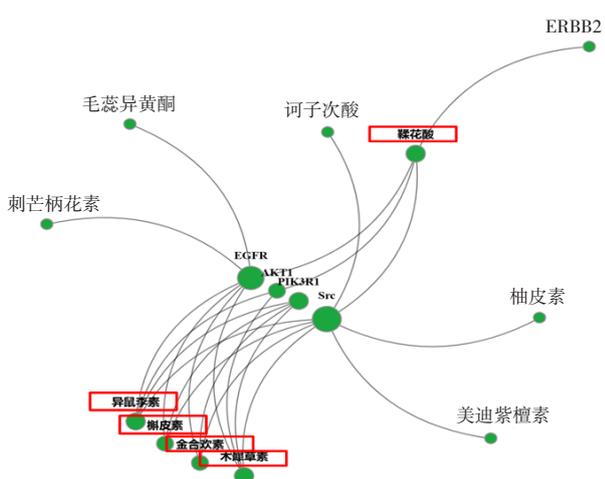


图7 核心靶点与对应活性化合物网络图

Figure 7. Network diagram of core targets and corresponding active compounds

(OB 为 36.16%, DL 为 0.25)、异鼠李素 (OB 为 49.60%, DL 为 0.31)、金合欢素 (OB 为 34.97%, DL 为 0.24)、槲皮素 (OB 为 46.43%, DL 为 0.28)、鞣花酸 (OB 为 43.06%, DL 为 0.43)

为 HHQG 治疗 NAFLD 的关键化合物。由于部分靶点能与多种小分子化合物结合，本研究筛选了与每个核心靶点结合能最低的关键小分子进行可视化展示，具体见图 8。

图 8 展示了化合物与核心蛋白的结合模式，包括三维结构、结合位点和相互作用分析。左侧分别为核心蛋白的三维结构（红色代表  $\alpha$  螺旋，蓝色代表  $\beta$  折叠，绿色代表无规则卷曲），其对应的活性化合物以黑色线条形式展示并嵌入蛋白质的结合位点；中间图为化合物与蛋白结合位点的放大图；右侧图展示了化合物与核心蛋白的 2D 相互作用图，其中氢键作为强相互作用力参与维持蛋白质的二级结构和三级结构，增强配体与受体的结合亲和力，从而影响信号传导和生物活性：槲皮素与 AKT1 蛋白的 ASP-190、LYS-297、GLU-298、THR-197 形成氢键；木犀草素与 EGFR 蛋白的 ARG-803、LYS-879 形成氢键；鞣花酸与 ERBB2 蛋白的 GLU-770 形成氢键；金合欢素与 PI3KR1 蛋白的 GLN-988 形成氢键，

与 THR-315、PRO-943 形成碳氢键；木犀草素与 PI3KR1 蛋白的 ASP-813、LYS-812、THR-915 形成氢键；鞣花酸与 Src 蛋白的 GLN-528、LYS-203 形成氢键；槲皮素与 Src 蛋白的 GLN-528、LYS-203、ARG-155、SER-177、GLU-178

形成氢键。分子对接结果显示，鞣花酸、槲皮素等关键化合物能够与多个核心靶点形成较为稳定的结合，具有多靶点作用的潜力，HHQG 在治疗 NAFLD 时，可能通过同时调控多个信号通路发挥协同效应。

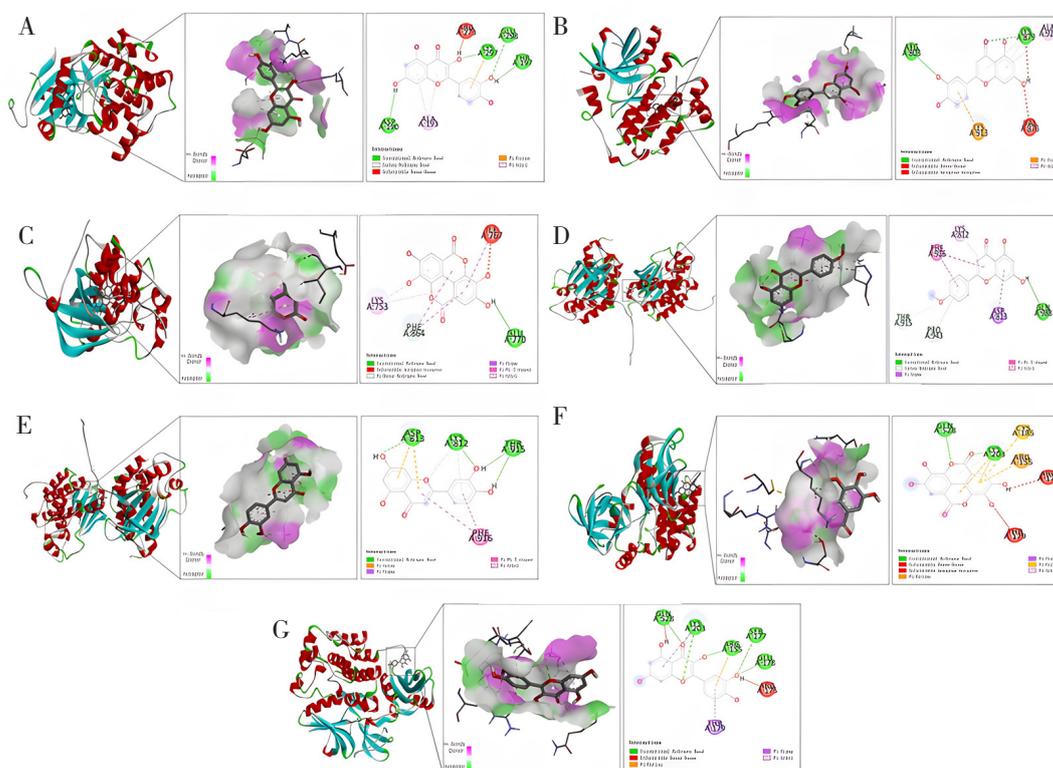


图8 活性化学成分与核心靶点分子对接可视化

Figure 8. Visualization of molecular docking between active chemical constituents and core targets

注：A. AKT1-槲皮素；B. EGFR-木犀草素；C. ERBB2-鞣花酸；D. PI3KR1-金合欢素；E. PI3KR1-木犀草素；F. Src-鞣花酸；G. Src-槲皮素。

### 3 讨论

HHQG 是传统蒙药，该方经历代蒙医发展与完善，最终确定由红花、丁香、莲子、麦冬、木香、诃子、川楝子、栀子、紫檀香、人工麝香、水牛角浓缩粉、人工牛黄、银朱 13 味药材组成，具有清肝、解毒、调理肝脏等功效。现代研究表明，HHQG 在治疗 NAFLD 方面具有显著疗效，研究选取 NAFLD 患者 100 例，给予 HHQG 后发现治疗组可明显改善 NAFLD 与肝纤维化症状<sup>[21-22]</sup>。但由于其成分复杂，对于其物质基础及作用机制研究较少。本文基于高分辨液质技术高效的分离能力和强大的结构辨识能力，通过部分对照品对比、参考文献及二级质谱碎片信息共鉴定和推测出 HHQG 中的 75 个化合物<sup>[23]</sup>，其中黄酮类化合物 31 个，有机酸类化合物 17 个，鞣质类化合

物 9 个，环烯醚萜类化合物 8 个，木质素类化合物 3 个及其他类化合物 7 个，为后续药效研究提供物质基础数据；之后以  $DL \geq 0.18$  和  $OB \geq 30\%$  为标准筛选出 13 个具有潜在药效活性的小分子化合物，进行网络药理学分析<sup>[24]</sup>，进一步筛选 HHQG 治疗 NAFLD 的 5 个核心作用靶点（AKT1、EGFR、ERBB2、PI3KR1、Src）、5 个关键化合物（木犀草素、异鼠李素、金合欢素、槲皮素、鞣花酸）及 3 条重要信号通路（PI3K-AKT 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、ERBB 信号通路），以探讨其治疗 NAFLD 可能的作用机制。

现代药理学常使用“二次打击”学说来揭示 NAFLD 的发病机制，而其中“一次打击”的核心问题是胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）<sup>[25]</sup>。IR 是指细胞对胰岛素的敏感性降低，导致葡萄糖

摄取减少和血糖升高, 机体游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 增多。FFA 在转运蛋白的协助下进入到肝脏, 通过线粒体的  $\beta$  氧化、 $\alpha$  氧化以及内质网的  $\omega$  氧化等途径进行分解, 当肝脏中 FFA 的输入持续增加时, 这些 FFA 不再被运输到线粒体中进行分解, 而在肝细胞内累积, 进而导致肝细胞的脂肪变性<sup>[26]</sup>。此外, FFA 的分解过程中还会产生大量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 成为“二次打击”即氧化应激的关键物质, ROS 可以通过激活 FAS 系统进而促进细胞凋亡, 而死亡的细胞又会吸引炎症细胞, 释放炎症因子, 进一步加剧肝脏的炎症和损伤<sup>[27]</sup>, 在脂肪肝发展为脂肪肝炎及纤维化过程中发挥重要作用。

本研究网络药理学所筛选出的 5 个核心蛋白中, EGFR 与 ERBB2 (HER2) 均属于 ERBB 受体家族的酪氨酸激酶受体, 当这些受体被小分子配体激活后, 会发生二聚化和自磷酸化, 启动下游包括 PI3K-AKT 在内的多条信号通路<sup>[28]</sup>; Src 为非受体型酪氨酸激酶, 可通过磷酸化并激活 PI3K, PI3K 激活后, 生成磷脂酰肌醇-3,4,5 三磷酸, 进一步招募并激活 AKT。AKT 是位于糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3) 上游的一个重要调控靶点, 肝细胞内磷酸化的 AKT 可促使 GSK-3 磷酸化, 进而合成肝糖原。有研究发现, 与正常小鼠相比, AKT2 基因敲除小鼠的肝脏表现出了对胰岛素的敏感性减弱的现象, 进一步证实了 AKT 是维持正常糖代谢的重要蛋白激酶<sup>[29]</sup>。同时, 活化的 AKT 可以抑制多种促凋亡蛋白 [如 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关细胞死亡因子 (Bcl-2 associated death promoter, Bad) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)] 的功能, 激活抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2 和 Bcl-XL), 从而促进细胞存活。有研究发现, 木犀草素能够通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 从而促进细胞存活和减轻炎症反应<sup>[30]</sup>; 槲皮素与异鼠李素可以通激活 PI3K/AKT 通路改善胰岛素信号传导, 减少胰岛素抵抗, 降低肝脏脂肪积累<sup>[31]</sup>。HHQG 现有质量控制化合物为梔子中梔子苷、红花中羟基红花黄色素 A、丁香中丁香酚<sup>[32]</sup>。本研究分析发现, HHQG 中木犀草素、异鼠李素等黄酮类化合物应为日后该药质量控制的重要的化合物。综上, HHQG 可能通过调控 PI3K-AKT 信号传导通路, 激活下游与

葡萄糖代谢相关酶活性, 增强胰岛素介导的葡萄糖摄取和代谢, 进而改善胰岛素的敏感性, 降低 IR<sup>[33]</sup>, 影响脂肪酸的合成和氧化, 抑制肝脏脂肪积聚, 同时减少肝脏炎症反应并促进肝细胞生存, 减轻由长期炎症可能引起的肝纤维化<sup>[34]</sup>。

HHQG 作为多成分的蒙药方剂, 其多靶点、多途径的作用机制, 使其在复杂的病理环境中具备独特的治疗优势。包旭等<sup>[35]</sup>发现 HHQG 可显著降低小鼠肝损伤区域肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达量, 减轻肝损伤后发生的炎症; 卢任玲等<sup>[36]</sup>研究发现 HHQG 可能通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶 /c-Jun 信号通路的活化, 调节下游凋亡基因和蛋白的表达来抑制肝细胞的凋亡。本研究综合 HHQG “活性化学成分-潜在治疗靶点”网络与“二次打击”学说, 揭示其在降低 IR 与缓解氧化应激的潜在机制, 为 NAFLD 的临床治疗提供了新的思路和潜在的药物靶点, 同时也为 HHQG 的质量控制提供了科学依据。未来进一步深入研究 HHQG 中关键化合物与靶点的作用方式, 将为 NAFLD 的临床治疗提供更为有效的干预策略和药物开发方向。

## 参考文献

- 王海坤, 吴毓婷, 吴娜, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨保和丸“异病同治”非酒精性脂肪肝和功能性消化不良的分子机制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(10): 1726-1731. [Wang HK, Wu YT, Wu N, et al. Exploration on molecular mechanism of Baohe pill in treating non-alcoholic fatty liver and functional dyspepsia with concept of “treating different diseases with same method” based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2023, 29(10): 1726-1731.] DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2023.10.031.
- 乌吉木. 蒙药古日古木-13 味丸治疗非酒精性脂肪肝疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(3): 4-6. DOI: 10.16041/j.cnki.cn15-1175.2019.03.003.
- 锡林通嘎拉嘎, 杨宏昕, 白田龙, 等. 基于数据挖掘的蒙药红花清肝十三味丸文献计量分析 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(8): 181-183. [Xi LTGL, Yang HX, Bai TL, et al. Bibliometric analysis of mongolian medicine Honghua Qinggan Shisanwei pills based on data mining[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2021, 17(8): 181-183.]

- DOI: [10.11954/ytetyy.202108049](https://doi.org/10.11954/ytetyy.202108049).
- 胡玉霞, 李君, 王跃武, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定土茯苓七味散中 12 种成分的含量 [J/OL]. 中成药, 2023-11-24. [Hu YX, Li J, Wang YW, et al. Simultaneous content determination of twelve constituents in Tufuling Wei powder by HPLC-MS/MS[J/OL]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023-11-24.] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20231123.1659.008.html>.
  - 李君, 王跃武, 张谦, 等. 基于 HPLC-Q-Exactive-MS 和 HPLC-MS/MS 技术的小儿解感颗粒定性定量分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(8): 868-876. [Li J, Wang YW, Zhang Q, et al. Qualitative and quantitative analysis of Xiao'er Jiegan granules by HPLC-Q-Exactive MS and HPLC-MS/MS technology[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2023, 43(8): 868-876.] DOI: [10.13286/j.1001-5213.2023.08.07](https://doi.org/10.13286/j.1001-5213.2023.08.07).
  - 杨琳, 张谦, 李君. HPLC-Q-Exactive-MS 法鉴定巴特日七味丸中化学成分 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(11): 2714-2722. [Yang L, Zhang Q, Li J. Identification of chemical components in Bateria Qiwei pills by HPLC-Q-Exactive-MS[J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(11): 2714-2722.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.009](https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.009).
  - 李胜男, 李君, 解红娟, 等. HPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 法鉴定森登-4 味涂剂中化学成分 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 811-819. [Li SN, Li J, Xie HJ, et al. Identification of chemical components in Sendeng-4 pigmentum by HPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS[J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(4): 811-819.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.009](https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.009).
  - 李君, 顾艳丽, 张谦, 等. 基于 HPLC-Q-Exactive MS 的蒙药那如-3 醇提取物成分分析 [J]. 中药材, 2022, 45(10): 2403-2410. DOI: [10.13863/j.issn1001-4454.2022.10.022](https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2022.10.022).
  - 李君, 胡玉, 张梦迪, 等. 蒙药三子散醇提取物化学成分的 HPLC-Q-Exactive-MS 快速分析与鉴定 [J]. 中国药房, 2022, 33(11): 1348-1354. [Li J, Hu YX, Zhang MD, et al. Rapid analysis and identification of chemical components of ethanol extract from Mongolian medicine Sanzi san by HPLC-Q-Exactive-MS[J]. China Pharmacy, 2022, 33(11): 1348-1354.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.12](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.12).
  - 曲中原, 王淇漩, 周游, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学方法探讨短梗五加改善失眠的潜在药效成分及作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(24): 2629-2637. [Qu ZY, Wang QX, Zhou Y, et al. Study on the potential pharmacodynamic components and mechanism of Eleutherococcus sessiliflorus in improving insomnia based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2022, 42(24): 2629-2637.] DOI: [10.13286/j.1001-5213.2022.24.10](https://doi.org/10.13286/j.1001-5213.2022.24.10).
  - 布仁, 张彭鹏, 王跃武, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定朱日亨滴丸中 15 种成分 [J]. 中成药, 2023, 45(12): 3890-3894. [Bu R, Zhang PP, Wang YW, et al. Simultaneous determination of fifteen constituents in Zhuriheng Dropping pills by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(12): 3890-3894.] DOI: [10.3969/j.issn.1001.1528.2023.12.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001.1528.2023.12.005).
  - 侯冰燕, 张志, 刘颖, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析胀果甘草地上部分的黄酮类化合物 [J]. 西北药学杂志, 2023, 38(6): 1-14. [Hou BY, Zhang Z, Liu Y, et al. Analysis of flavonoid constituents in the aerial parts of Glycyrrhiza inflata Batalin. by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2023, 38(6): 1-14.] DOI: [10.3969/j.issn.1004-2407.2023.06.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-2407.2023.06.001).
  - 夏慧敏, 张慧文, 刘宏, 等. HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定蒙药三子散化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 3005-3014. [Xia HM, Zhang HW, Liu H, et al. Rapid identification of the chemical components of mongolian medicine Sanzi powder by HPLC-Q-Exactive-MS/MS[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(21): 3005-3014.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20210426](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20210426).
  - Elapavalore A, Kondić T, Singh RR, et al. Adding open spectral data to MassBank and PubChem using open source tools to support non-targeted exposomics of mixtures[J]. Environ Sci Process Impacts, 2023, 25(11): 1788-1801. DOI: [10.1039/d3em00181d](https://doi.org/10.1039/d3em00181d).
  - 谢雨宸, 邹雪梅, 李红颖, 等. 基于 UPLC-Q-Executive Orbitrap MS 技术的藏药细叶亚菊的化学成分分析 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(20): 22-28. [Xie YC, Zhou XM, Li HY, et al. Analysis of chemical constituents of Tibetan medicine Ajania tenuifolia based on UPLC-Q-Executive Orbitrap MS[J]. Chinese Journal of Ethnopharmacology and Ethnopharmacy, 2022, 31(20): 22-28.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-8517.2022.20.zgmzmjyzz202220007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-8517.2022.20.zgmzmjyzz202220007).

- 16 周思倩, 方艳, 谭金桃, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析百蕊草醇提物的化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(10): 1633-1646. [Zhou SQ, Fang Y, Tan JT, et al. Analysis on chemical components of Thesium chinense Turcz. alcohol extract based on UPC-Q-TOF-MS/MS[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(10): 1633-1646.] DOI: [10.16333/j.1001-6880.2022.10.001](https://doi.org/10.16333/j.1001-6880.2022.10.001).
- 17 甄丹丹, 黄耀斌, 卢显兴, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨丝穗金粟兰水提物抗炎镇痛药效物质及作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3903-3910. [Zhen DD, Huang YB, Lu XX, et al. Anti-inflammatory and analgesic substances and mechanisms of aqueous extracts of Chloranthus fortune based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(12): 3903-3910.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.017](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.017).
- 18 孙若岚, 梁研, 赵凡, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨芪术抗癌方治疗结直肠癌的作用机制 [J]. 中医杂志, 2024, 65(4): 404-413. [Sun RL, Liang Y, Zhao F, et al. Exploring the mechanism of action of Astragalus anticancer formula in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2024, 65(4): 404-413.] DOI: [10.13288/j.11-2166/r.2024.04.012](https://doi.org/10.13288/j.11-2166/r.2024.04.012).
- 19 Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution[J]. Drug Discov Today Technol, 1(4): 337-341. DOI: [10.1016/j.ddtec.2004.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007).
- 20 李琳, 丁顺, 徐正扬, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨附子治疗变应性鼻炎的作用机制研究 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(15): 1162-1172. [Li L, Ding S, Xu ZY, et al. A study to explore the mechanism of action of epiphyllum in the treatment of allergic rhinitis based on network pharmacology and experimental validation[J]. Journal of Hainan Medical University, 2023, 29(15): 1162-1172.] DOI: [10.13210/j.cnki.jhmu.20230616.003](https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20230616.003).
- 21 徐靖宣, 时浩洋, 王栋, 等. 基于情志致病理论探讨从肝论治炎症性肠病的研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(12): 990-996. [Xu JX, Shi HY, Wang D, et al. Research progress in the treatment of inflammatory bowel disease from the liver based on the theory of emotional pathogenesis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2023, 31(12): 990-996.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-038X.2023.12.15](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-038X.2023.12.15).
- 22 唐莉. 蒙药红花清肝十三味丸治疗病毒性乙型肝炎的临床效果 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(2): 14-15. DOI: [10.16041/j.cnki.cn15-1175.2022.02.028](https://doi.org/10.16041/j.cnki.cn15-1175.2022.02.028).
- 23 张皓, 张谦, 李君. 基于 HPLC-Q-Exactive-MS 技术的蒙药壮西六味散化学成分解析 [J]. 中国药师, 2024, 27(2): 181-191. [Zhang H, Zhang Q, Li J. Chemical constituent identification of Zhuangxi-6 powders based on HPLCQ-Exactive-MS[J]. China Pharmacist, 2024, 27(2): 181-191.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202401128](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202401128).
- 24 买买提·司马义, 艾则孜江·艾尔肯, 胡岩, 等. 基于网络药理学研究孜亚比提片对 2 型糖尿病的潜在分子机制 [J]. 中国药师, 2024, 27(2): 192-198. [Maimaiti S, Aizezijiang A, Hu Y, et al. Study on the potential molecular mechanism of Ziyabiti tablets on type 2 diabetes based on network pharmacology[J]. China Pharmacist, 2024, 27(2): 192-198.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202310060](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202310060).
- 25 Wolfs MG, Gruben N, Rensen SS, et al. Determining the association between adipokine expression in multiple tissues and phenotypic features of non-alcoholic fatty liver disease in obesity[J]. Nutr Diabetes, 2015, 5(2): e146. DOI: [10.1038/nutd.2014.43](https://doi.org/10.1038/nutd.2014.43).
- 26 Rong L, Zou J, Ran W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 13: 1087260. DOI: [10.3389/fendo.2022.1087260](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1087260).
- 27 Bhushan B, Michalopoulos GK. Role of epidermal growth factor receptor in liver injury and lipid metabolism: emerging new roles for an old receptor[J]. Chem Biol Interact, 2020, 324: 109090. DOI: [10.1016/j.cbi.2020.109090](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109090).
- 28 Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Med (Lond), 2018, 18(3): 245-250. DOI: [10.7861/clinmedicine.18-3-245](https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245).
- 29 Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)[J]. Science, 2001, 292(5522): 1728-1731. DOI: [10.1126/science.292.5522.1728](https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728).
- 30 Yin X, Guo X, Liu Z, et al. Advances in the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2844. DOI: [10.3390/ijms24032844](https://doi.org/10.3390/ijms24032844).
- 31 Zhu S, Wu Z, Wang W, et al. A revisit of drugs and potential therapeutic targets against non-alcoholic fatty liver disease: learning from clinical trials[J]. J Endocrinol Invest, 2024, 47(4): 761-776. DOI: [10.1007/s40618-023-02216-y](https://doi.org/10.1007/s40618-023-02216-y).

- 32 刘颖, 胡琴, 史文. 红花清肝十三味丸质量标准研究 [J]. 中成药, 2013, 35(6): 1230–1235. [Liu Y, Hu Q, Shi WF. Study on the quality standard of HHQG pills[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(6): 1230–1235.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2013.06.028](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2013.06.028).
- 33 Xu X, Poulsen KL, Wu L, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH)[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 287. DOI: [10.1038/s41392-022-01119-3](https://doi.org/10.1038/s41392-022-01119-3).
- 34 Liu B, Deng X, Jiang Q, et al. Scoparone improves hepatic inflammation and autophagy in mice with nonalcoholic steatohepatitis by regulating the ROS/P38/Nrf2 axis and PI3K/AKT/mTOR pathway in macrophages[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109895. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.109895](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109895).
- 35 包旭, 卞康坤, 肖海军, 等. 红花清肝十三味丸通过抑制炎症细胞浸润改善小鼠肝损伤的研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2024, 45(1): 1–10. [Bao X, Bian KK, Xiao HJ, et al. Honghua Qinggan 13 flavor pill alleviates liver injury in mice through inhibiting inflammatory cell infiltration[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2024, 45(1): 1–10.] DOI: [10.12160/j.issn.1672-5190.2024.01.001](https://doi.org/10.12160/j.issn.1672-5190.2024.01.001).
- 36 卢任玲, 金蓉, 张子英, 等. 红花清肝十三味丸通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路减轻大鼠急性肝损伤的研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 21–26. [Lu RL, Jin R, Zhang ZY, et al. Honghua Qinggan 13 Flavor Pill attenuates acute liver injury in rats by inhibiting the JNK/c-Jun signalling pathway[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 37(3): 21–26.] DOI: [10.13412/j.cnki.zyyl.2021.03.005](https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.2021.03.005).

收稿日期: 2024 年 03 月 20 日 修回日期: 2024 年 07 月 14 日  
本文编辑: 钟巧妮 李 阳