

基于网络药理学和指纹图谱的安宫牛黄丸质量标志物预测与分析

黄祖顺^{1, 2}, 郭磊^{1, 2}, 张爱荣³, 秦雪梅^{1, 2*}, 高晓霞^{1, 2*}

1. 山西大学 中医现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 山西广誉远国药有限公司, 山西 晋中 030800

摘要: **目的** 通过网络药理学与指纹图谱预测安宫牛黄丸中的潜在质量标志物(Q-Marker)。**方法** 应用网络药理学筛选和分析安宫牛黄丸活性成分及临床适应证(卒中、高热昏迷、脑炎、脑出血及癫痫)的作用靶点和通路,并寻找关键活性成分;应用超高效液相色谱(UPLC)构建安宫牛黄丸的指纹图谱,结合网络药理学预测其潜在的Q-Marker,并使用Auto Dock Vina软件对潜在的Q-Marker与关键靶点进行分子对接验证。**结果** 收集得到安宫牛黄丸活性成分128个,经过筛选得到10个核心靶点(STAT3、AKT1、MAPK1等)和7个关键活性成分(小檗碱、槲皮素、汉黄芩素、黄芩素、熊果酸、黄芩苷及麝香酮),涉及炎症反应、细胞免疫、脂质代谢等相关机制。安宫牛黄丸的UPLC指纹图谱,标定22个共有峰,并指出15个色谱峰,结合网络药理学筛选出的关键活性成分初步预测4个成分为其潜在的Q-Marker,分别是小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素,涉及的关键生物通路包括AGEs-RAGE通路、PI3K-Akt通路以及MAPK通路等。**结论** 借助网络药理学结合UPLC指纹图谱分析预测得到安宫牛黄丸潜在的Q-Marker分别为小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素,为其全面质量控制提供依据。

关键词: 安宫牛黄丸; 网络药理学; 指纹图谱; 分子对接; 质量标志物; UPLC; 小檗碱; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)10-2083-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.004

Prediction and analysis of quality markers of Angong Niu Huang Pill based on network pharmacology and fingerprint

HUANG Zushun^{1, 2}, GUO Lei^{1, 2}, ZHANG Airong³, QIN Xuemei^{1, 2}, GAO Xiaoxia^{1, 2}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Guangyuyuan Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Jinzhong 030800, China

Abstract: Objective To predict the quality markers (Q-Marker) of Angong Niu Huang Pill based on network pharmacology and fingerprint. **Methods** The related targets and pathways of the active components and clinical indications including stroke, hyperthermic coma, encephalitis, cerebral hemorrhage and epilepsy of Angong Niu Huang Pill were retrieved through the related database by network pharmacology and predict the key components. The fingerprint of the prescription were established by using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), and to predict the potential Q-Marker of the prescription with network pharmacology. The molecular docking was used to verify the results of potential quality markers and key targets with Auto Dock

收稿日期: 2023-05-15

基金项目: 山西中医药大学科技创新团队(2022TD2007); 山西省重点研发计划项目(201903D311012); 山西传统名优及大品种中成药提质增效关键技术研究; 中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2021C033); 名优晋药再开发山西省重点实验室项目(202104010910001); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目(201605D111004)

第一作者: 黄祖顺(1994—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药药理学。E-mail: mrhdaemon789@163.com

*共同通信作者: 秦雪梅, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质控、评价与代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

高晓霞, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中医药代谢组学与龟龄集、定坤丹等山西传统名方二次开发等方面研究。

E-mail: gaoxiaoxia@sxu.edu.cn

Vina. **Results** A total of 128 active components of Angong Niu Huang Pill were collected and 10 core targets which were STAT3, AKT1, MAPK1, etc., and seven key components, namely berberine, quercetin, wogonin, baicalin, ursolic acid, baicalin and muskone were screened out, which were involved in inflammatory response, cellular immunity, lipid metabolism and other related mechanisms. A total of 22 common peaks were obtained in the UPLC fingerprint of the prescription, and 15 chromatographic peaks were identified. It was preliminarily predicted that the four components of berberine, baicalin, baicalein, wogonin were the potential Q-Markers of the prescription with the key active ingredients screened out by network pharmacology. The key biological pathways were identified, including AGEs-RAGE pathway, PI3K-Akt Pathway, and MAPK pathways. **Conclusion** The Q-Marker of Angong Niu Huang Pill were analyzed by network pharmacology and fingerprint, which provided reference for quality control of the prescription, and for further study on the mechanism of Angong Niu Huang Pill.

Key words: Angong Niu Huang Pill; network pharmacology; fingerprint; molecular docking; quality markers; UPLC; berberine; baicalin; baicalein; wogonin

安宫牛黄丸为我国传统复方中药中享有盛名的急症用药^[1],是临床中治疗高热症的“温病三宝”之一,于清代温病学家吴鞠通的温病条辨中首次被记载,功效解毒清热、芳香醒神、豁痰开窍,主治邪热内陷、高热不退及神昏谵语等热证。卒中、高热昏迷、脑炎、脑出血及癫痫为其典型临床适应证^[2]。

安宫牛黄丸为《中国药典》2020年版收录方剂,其质量控制采用高效液相色谱法限定胆红素、黄芩苷及盐酸小檗碱的含量^[3]。但该方由多味药组成,药味配伍关系和成分较为复杂,饮片质量也参差不齐,且现有的质量控制标准不高;因此,建立能够全面阐述复方质量特点的方法具有重大意义。中药质量标志物(Q-Marker)于2016年由刘昌孝院士提出,此概念是指将中药药效-活性成分-质量控制标志物成分相关联,为中药质量控制标准的整体性建立开拓新思想^[4]。本研究通过网络药理学方法筛选安宫牛黄丸关键活性成分,并结合超高效液相色谱(UPLC)建立指纹图谱,预测其潜在Q-Marker。旨在为安宫牛黄丸的全面质控提供依据,为其作用机制研究提供参考,也为其他中药复方预测Q-Marker提供新的思路。

1 材料

1.1 数据库及软件

中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/>); SwissTargetPrediction 资料库 (<https://www.swissadme.ch/>); Genecard (<https://www.genecards.org/>); PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>); UniProt (<http://www.uniprot.org/>); DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>); STRING (<https://string-db.org/>); R×64 4.2.0 软件 (<https://www.r-project.org/>); Cytoscape 软件(3.8.0版); PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>); Auto Dock vina 软件。

1.2 仪器

Agilent1290超高效液相色谱仪(Agilent公司); KQ2200DB 数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CPA225D 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 超纯水系统(Milli-QIntegral Water PurificationSystem); SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.3 药品与试剂

安宫牛黄丸(批号:3792005003、812011001、3792008004、3792011007、3792009006、3792008005、3842104002、3782011002、3772009004、3842104001,对应编号为S1~S10,山西广誉远国药集团有限公司); 复方中冰片等11味单味药材均由山西广誉远国药集团有限公司提供,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为牛黄、水牛角、人工麝香、珍珠、朱砂、雄黄、黄连、黄芩、栀子、郁金、冰片,均符合《中国药典》2020年版要求,留样于山西大学中医药现代研究中心;超纯水(自制);甲醇(分析纯,天津大茂化学试剂厂);乙腈、甲酸(质谱级,美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 基于网络药理学的安宫牛黄丸关键活性成分筛选

2.1.1 安宫牛黄丸活性成分及靶点的收集 利用TCMSP检索并收集冰片、黄连、黄芩、牛黄、郁金、栀子6味中药活性成分,得到活性成分后筛选,以口服生物利用度(OB)≥30%与类药性指数(DL)≥0.18标准^[5-6]进行成分筛选。安宫牛黄丸中矿物药及动物药如珍珠、水牛角、雄黄、朱砂、麝香在TCMSP数据库中无相关资料,经查阅文献报道^[7-10],收集活性成分及相应的CAS号,检索PubChem数据库,得到相关成分的sfd格式的2维结构图,将信息导入SwissADME数据库,以胃肠道吸收结果为High、5

类药性结果至少2个是Yes为标准,筛选出易成药、易于人体吸收的活性成分。将得到的活性成分导入SwissTargetPrediction数据库收集对应的靶点,应用UniProt数据库,注释与校正得到的靶点基因,物种选择为“human”。

2.1.2 安宫牛黄丸临床适应证疾病共有靶点的收集 查询GeneCards数据库,并收集热证疾病靶点,本研究选择卒中、高热昏迷、脑炎、脑出血及癫痫等临床适应证以关键词“stroke”“hyperthermic coma”“encephalitis”“cerebral hemorrhage”“epilepsy”进行检索并筛选,筛选标准为相关分数(relevance score) ≥ 10.00 。运用R $\times 64$ 4.2.0软件将上述查询到的疾病靶点取交集后,再与候选活性成分所对应的靶点取交集,以获取安宫牛黄丸发挥疗效的潜在作用靶点。应用UniProt数据库,注释与校正得到的潜在作用靶点,物种选择为“human”,并删除重复值。

2.1.3 “药材-活性成分-共有靶点”网络构建与分析 利用Cytoscape软件(3.8.0版)构建“药材-活性成分-共有靶点”网络,并应用Analyzer工具计算网络拓扑参数,以度(degree) ≥ 10 倍中位数为筛选条件,数值越大,成为安宫牛黄丸发挥药效的关键活性成分可能性越大。

2.1.4 关键靶点及关键活性成分的确定 将“2.1.2”项获得的交集靶点导入STRING数据库,去除离散或无关联的基因节点,筛选标准为置信值(medium confidence)=0.9,得到蛋白质相互作用(PPI)网络。利用Cytoscape 3.8.0软件分析得到的PPI网络,以度值、介数和接近中心性参数为条件筛选排名靠前的关键靶点。根据“2.1.3”项获得的活性成分与关键靶点的连接度值,筛选密切程度高的关键活性成分。

2.1.5 交集靶点的基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用DAVID数据库对交集靶点进行KEGG通路分析和GO分析,选择智人(Homo Sapiens)为条件。

2.2 安宫牛黄丸指纹图谱建立与相关性分析

2.2.1 供试品溶液制备 取不同批次安宫牛黄丸大蜜丸,剪碎,研磨混合,精密称定0.5 g,转移至锥形瓶中精密加入75%甲醇25 mL,30℃超声提取30 min,提取液滤过,旋转蒸发器蒸干溶剂后,加入甲醇定容至10 mL,静置,补重,摇匀,取上清液滤过(0.22 μm 微孔滤膜),取续滤液,即得。

2.2.2 各药材供试品溶液制备 取复方组方药材各0.1 g(过40目筛),分别置于50 mL具塞锥形瓶

中,精密加入75%甲醇50 mL,密塞,30℃超声处理30 min,放至室温,摇匀,静置,用75%甲醇补重,取上清液滤过(0.22 μm 微孔滤膜),取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 Water Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm,1.8 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸甲醇溶液(B),梯度洗脱:0~6 min,10%~25%B;6~22 min,25%~46%B;22~27 min,46%~60%B;27~33 min,60%~95%B;33~35 min,95%~10%B;进样量:1 μL ;检测波长:254 nm(样本检测后首先得到全波长3D指纹图谱,经过色谱峰对比以及峰个数、响应值的分析,发现图谱在254 nm处基线稳定,峰个数较多,因此将254 nm选为指纹图谱的检测波长);体积流量:0.4 mL \cdot min⁻¹;柱温:30℃。

2.2.4 方法学考察

(1)精密度考察:取安宫牛黄丸(批号:3792005003)1份,按照“2.2.1”项下方法制得供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件在UPLC色谱仪中连续进样6次,记录色谱图,计算共有峰的峰面积和保留时间的RSD值。

(2)重复性考察:取安宫牛黄丸(批号:3792005003)1份,按照“2.2.1”项下的方法平行制备供试品溶液6份,按照“2.2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图,计算共有峰的峰面积和保留时间的RSD值。

(3)稳定性考察:取安宫牛黄丸(批号:3792005003)1份,按照“2.2.1”项下的方法制得供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h按照“2.2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图,计算共有峰的峰面积和保留时间的RSD值。

2.2.5 安宫牛黄丸指纹图谱共有峰的归属及指认 取10批安宫牛黄丸各1份,并取安宫牛黄丸中11种单味药材,分别按照“2.2.1”和“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液和各单味药材供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进样,得到10批安宫牛黄丸指纹图谱叠加图。选择图谱中含量较大且分离度较好的色谱峰作为共有峰。收集安宫牛黄丸和各单味药材指纹图谱,通过比较色谱峰的色谱保留行为对共有峰的药材来源进行归属。根据文献报道^[11-12],对指纹图谱中共有峰进行指认。

2.2.6 安宫牛黄丸指纹图谱相似度评价 分别取10批次安宫牛黄丸样品,按照“2.2.1”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进样,记录色谱图。将色谱图数据导入中药色谱指纹图谱

相似度评价系统(2012.130723版)并分析,其中S6批次的色谱图的色谱峰峰形和分离度较好,且基线平稳,故选择该批次色谱图作为对照图谱。相似度评价方法选择平均数法,避免极端数据对结果的影响^[13]。对色谱峰的全谱峰分析采用多点校正法。

2.3 潜在 Q-Marker 成分与关键靶点分子对接验证

将网络药理学筛选得到的关键活性成分及指纹图谱确定的关键成分的交集成分初步确定为潜在 Q-Marker,利用 Auto Dock Vina 软件对相关成分与关键核心靶点进行分子对接,验证其相互作用活性。从 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载 Q-Marker(配体)结构的 mol2 格式, PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取关键靶点(受体)对应的蛋白三维结构 pdb 格式。使用 AutoDock 软件对配体进行判断 root 等,对受体设定原子类型等,并分别将配体及受体格式转换为 pdbqt 格式,再进行对接并获取结合能计算结果,使用 PyMOL 软件对成分-蛋白对接结果进行可视化分析。

3 结果

3.1 安宫牛黄丸网络药理学筛选结果

3.1.1 安宫牛黄丸活性成分及临床适应证疾病靶点 经 TCMSP 检索并筛选后,得到活性成分 88 个,其中冰片 3 个、黄连 14 个、黄芩 36 个、牛黄 5 个、郁金 15 个和栀子 15 个。经查阅相关文献收集水牛角、麝香、雄黄、朱砂、珍珠化学成分,并导入 SWISS ADME 数据库,以类药性和胃肠道吸收为条件筛选,得到可以成药、可以被人体吸收的化学成分共 40 个,其中水牛角 7 个、麝香 22 个、珍珠 11 个。综合共得到 128 个候选活性成分。将 128 个候选活性成分导入数据库中检索对应靶点,去重后共得到 613 个成分相关靶点。

通过 GeneCards 数据库共得到适应证疾病交集靶点 938 个,见图 1-A。取上述靶点与候选活性成分靶点取交集,得到安宫牛黄丸治疗卒中、高热昏迷、脑炎、脑出血及癫痫的共有疾病靶点 131 个,包含 AKT1、VEGFA、BCL2 等靶点,见图 1-B。

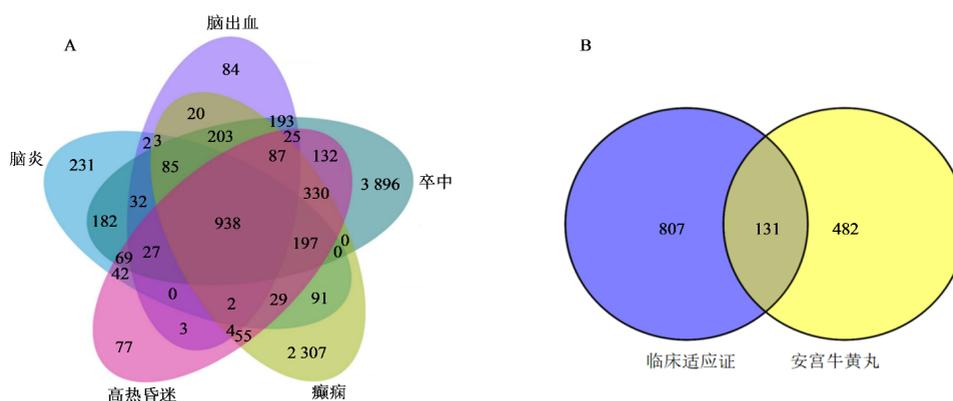


图1 安宫牛黄丸临床适应证疾病靶点(A)与安宫牛黄丸成分和临床适应证相关的共同靶点(B)韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets related to clinical indications of Angong Niuhuang Pills(A) and common targets related to components of Angong Niuhuang Pills and its clinical indications(B)

3.1.2 “药材-活性成分-共有靶点”网络分析 利用 Cytoscape 软件(3.8.0版)构建“药材-活性成分-共有靶点”网络,得到安宫牛黄丸治疗卒中、高热昏迷、脑炎、脑出血、肝性脑病及癫痫的“药材-活性成分-共有靶点”网络图,见图 2。结果显示,槲皮素(degree=32)、 β -谷甾醇(degree=18)、麝香酮(degree=16)、黄芩素(degree=14)、小檗碱(degree=14)、熊果酸(degree=12)、异亮氨酸(degree=10)及汉黄芩素(degree=10)等成分与各靶点连接度较高。

3.1.3 关键靶点及关键活性成分确定 将获得的交集靶点 131 个导入 STRING 数据库,得到 PPI 网

络,见图 3。以度值、介数和接近中心性参数为条件筛选排名靠前的关键靶点。得到排名前 10 的靶点,分别是 STAT3、AKT1、MAPK1 等(按照相关拓扑学参数由高至低排名)。依据与核心靶点相关联的程度搜寻到安宫牛黄丸中 7 个关键活性成分,分别为小檗碱(MOL001454)、槲皮素(MOL000098)、汉黄芩素(MOL000173)、黄芩素(MOL002714)、熊果酸(MOL000511)、黄芩苷(MOL002776)及麝香酮(CAS 号:541-91-3),来自于安宫牛黄丸中黄连、黄芩、栀子及麝香。

3.1.4 安宫牛黄丸靶点通路分析 利用 DAVID 数据库对 131 个交集靶点进行 KEGG 通路分析和 GO

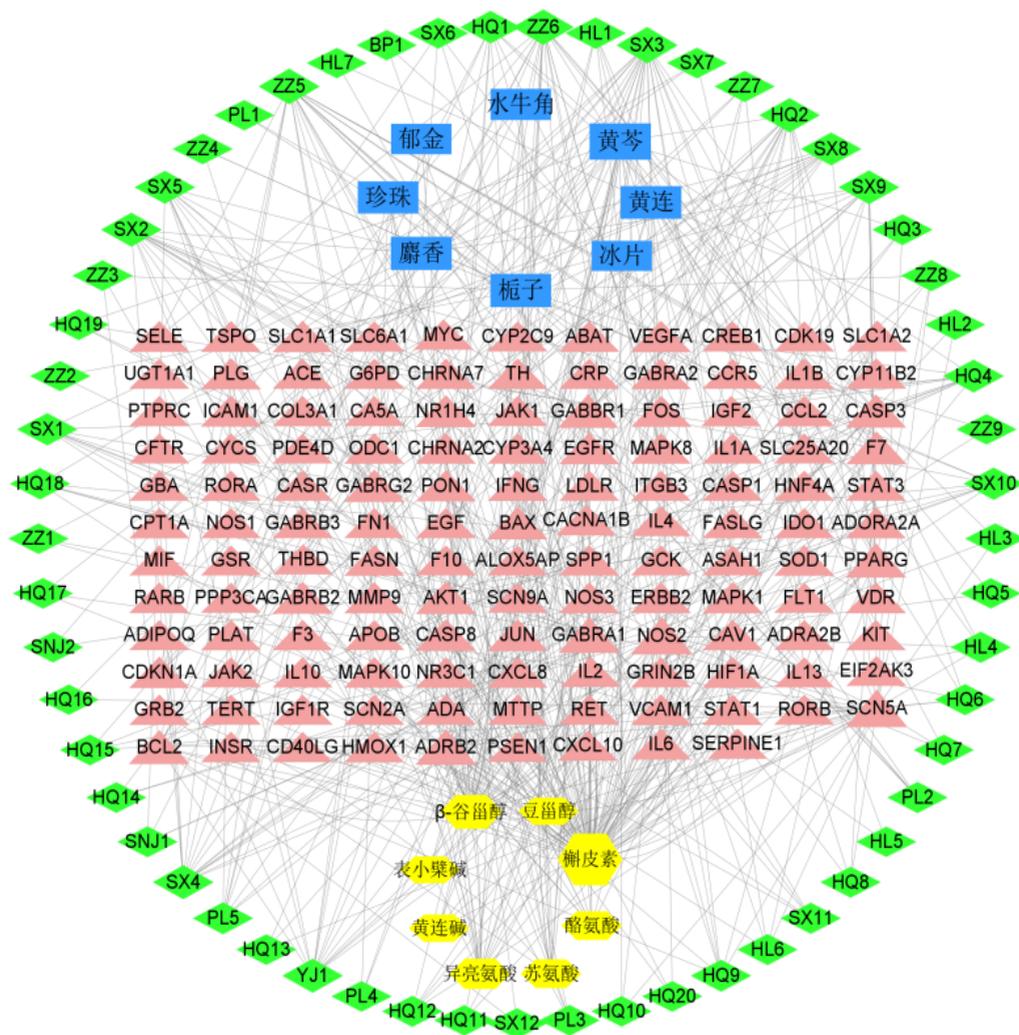


图2 安宫牛黄丸“药材-活性成分-共有靶点”网络

Fig. 2 "herbal medicine-active components-potential targets" network of Angong Niu Huang Pills

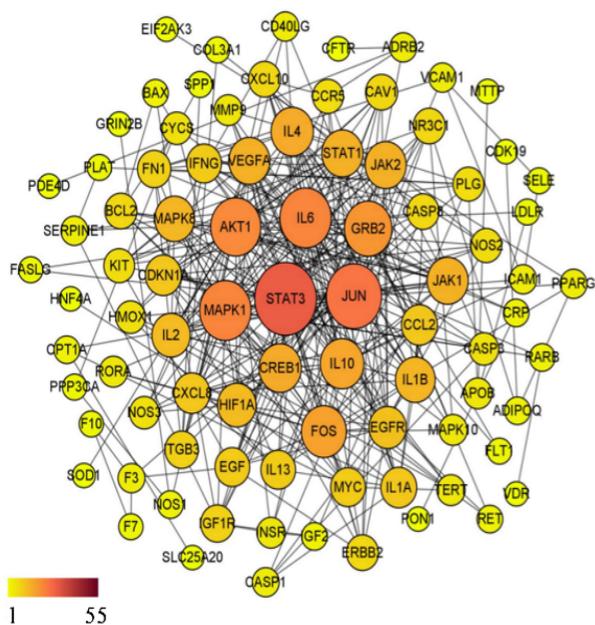


图3 安宫牛黄丸靶点PPI网络

Fig. 3 PPI network of targets of Angong Niu Huang Pills

分析,经KEGG分析,选择排名靠前的通路进行可视化分析,见图4。关键信号通路涉及糖尿病并发症中的AGE- RAGE信号通路、PI3K-Akt信号通路及MAPK信号通路等。根据GO富集结果发现,安宫牛黄丸起治疗作用时,在生物过程(BP)中,对脂多糖、缺氧反馈以及基因表达正向调控通路等的影响较大;而安宫牛黄丸对同蛋白结合、内肽酶活性以及蛋白酶结合等的分子功能(MF)影响较大;最后对质膜的组成部分、细胞外区域以及细胞表面的细胞组分(CC)具有较大作用,见图5。

3.2 安宫牛黄丸指纹图谱结果分析

3.2.1 方法学考察结果

(1)精密度考察:结果测得22个共有峰的峰面积的RSD值均<3.93%,保留时间的RSD均<0.07%,表明仪器精密度良好。

(2)重复性考察:结果测得22个共有峰峰面积的RSD值均<3.81%,保留时间的RSD均<0.14%,

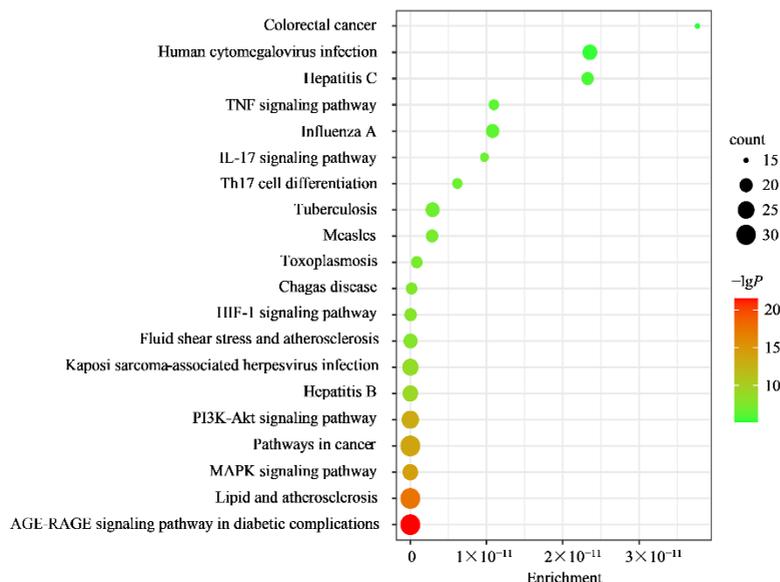


图4 安宫牛黄丸治疗疾病交集靶点的KEGG富集分析

Fig. 4 KEGG pathways of anti-diseases targets of Angong Niu Huang Pills

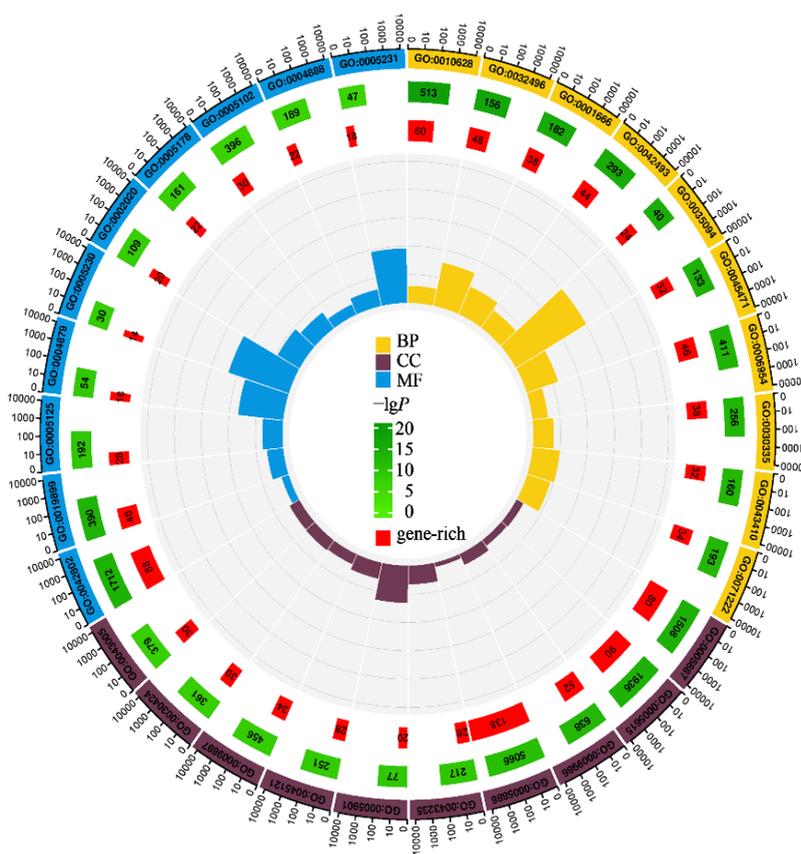


图5 安宫牛黄丸治疗疾病交集靶点的GO富集分析

Fig. 5 GO terms of the anti-diseases targets of Angong Niu Huang Pills

表明该方法的重复性良好。

(3)稳定性考察:结果测得22个共有峰峰面积的RSD值均<3.87%,保留时间的RSD均<0.08%,表明供试品溶液在室温下24 h内稳定。

3.2.2 安宫牛黄丸指纹图谱共有峰的归属及指认得到供试品指纹图谱和供试品及单味药材叠加图谱,见图6.7。安宫牛黄丸指纹图谱中共有含量较大且分离度较好的22个共有峰,9、12~19号峰来自

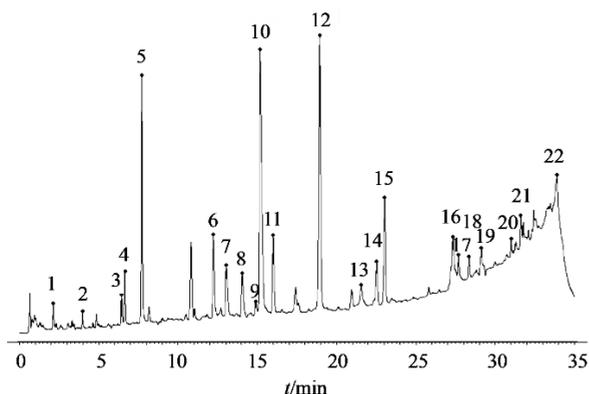


图6 安宫牛黄丸供试品(S6)指纹图谱

Fig. 6 Fingerprint of test sample of Angong Niu Huang Pills (S6)

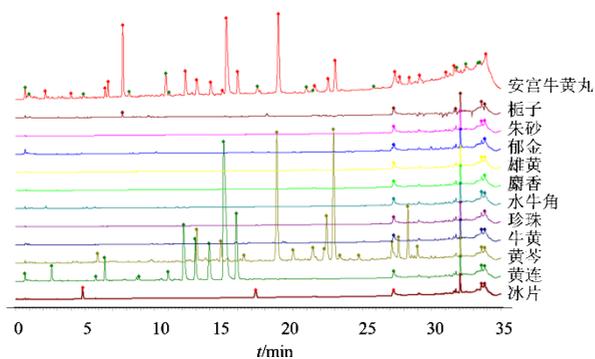


图7 安宫牛黄丸(S6)及单味药材色谱图

Fig. 7 Specific chromatogram of Angong Niu Huang Pills (S6) and single materia medica

黄芩;1、4、6、8、10、11号峰来自黄连;2号峰来自冰片;5号峰来自栀子;21号峰来自栀子;7号峰在黄连、黄芩中均存在;3、20号峰未归属到具体药材,有待进一步确证。

指纹图谱中22个共有峰,共指出15个共有峰:2号峰味对羟基苯甲酸,4号峰味京尼平龙胆双糖苷,5号峰味京尼平苷,6号峰味黄连碱,7号峰为表小檗碱,8号峰为药根碱,10号峰为小檗碱,11号峰为巴马汀,12号峰为黄芩苷,13号峰为白杨素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,14号峰为千层纸素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,15号峰为汉黄芩苷,16号峰为黄芩素,18号峰为汉黄芩素,19号峰为千层纸素A。

根据网络药理学预测结果,安宫牛黄丸中关键活性成分小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素分别对应指纹图谱中10号峰、12号峰、16号峰及18号峰;麝香酮、槲皮素及熊果酸未找到对应峰,考虑可能与色谱条件与检测方法有关。

3.2.3 安宫牛黄丸指纹图谱相似度分析 生成的10批样品的叠加图谱,见图8。相似度分析结果表

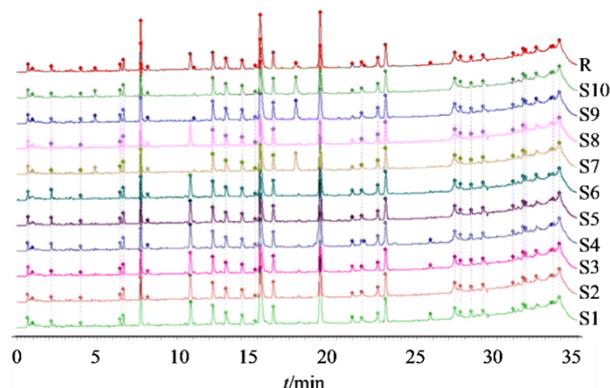


图8 10批安宫牛黄丸样品的UPLC指纹图谱

Fig. 8 UPLC fingerprints of 10 batches of Angong Niu Huang Pills

明10批安宫牛黄丸样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在0.9以上(表1),表明这10批安宫牛黄丸质量较为均一稳定,且指纹图谱中10号峰、12号峰、16号峰及18号峰出峰时间及峰形稳定,初步预测关键活性成分小檗碱、黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素可能是安宫牛黄丸的潜在Q-Marker^[4]。

表1 10批安宫牛黄丸样品UPLC指纹图谱相似度

Table 1 Similarity of UPLC fingerprints of 10 batches of samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.995	S6	0.996
S2	0.995	S7	0.981
S3	0.996	S8	0.995
S4	0.982	S9	0.979
S5	0.980	S10	0.980

3.3 Q-Marker成分与关键靶点分子对接验证

根据网络药理学分析结果,从PDB数据库中提取前4位靶点(AKT1、VEGFA、STAT3、MAPK3)的蛋白三维结构,将其分别与配体小檗碱(A)、黄芩苷(B)、黄芩素(C)及汉黄芩素(D)进行分子对接,结合能见表2,结合能小于0,表明配体与受体可以自发结合,结合能小于-20.92 kJ·mol⁻¹表示可以形成稳定的对接结构。其中汉黄芩素与STAT3、黄芩苷与MAPK1均可以产生较强的结合。将4种成分与靶点的对接结果利用PyMOL软件进行可视化分析,见图9。

4 讨论

中药以及中药制剂质量是中药及相关产业的生命线,但因其成分复杂,增大了质量评价与控制的难度。中药Q-Marker的确立可以促进中药质量

表2 活性成分与靶点受体蛋白间的结合能

Table 2 Binding energy of target and active compounds

化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
	AKT1(PDB ID:3OCB)	VEGFA(PDB ID:5HHC)	STAT3(PDB ID:2XA4)	MPAK1(PDB ID:6SLG)
小檗碱	-31.38	-31.12	-37.24	-34.73
黄芩苷	-36.40	-32.64	-36.40	-39.75
黄芩素	-30.12	-28.03	-35.56	-33.47
汉黄芩素	-31.38	-26.36	-36.66	-33.47

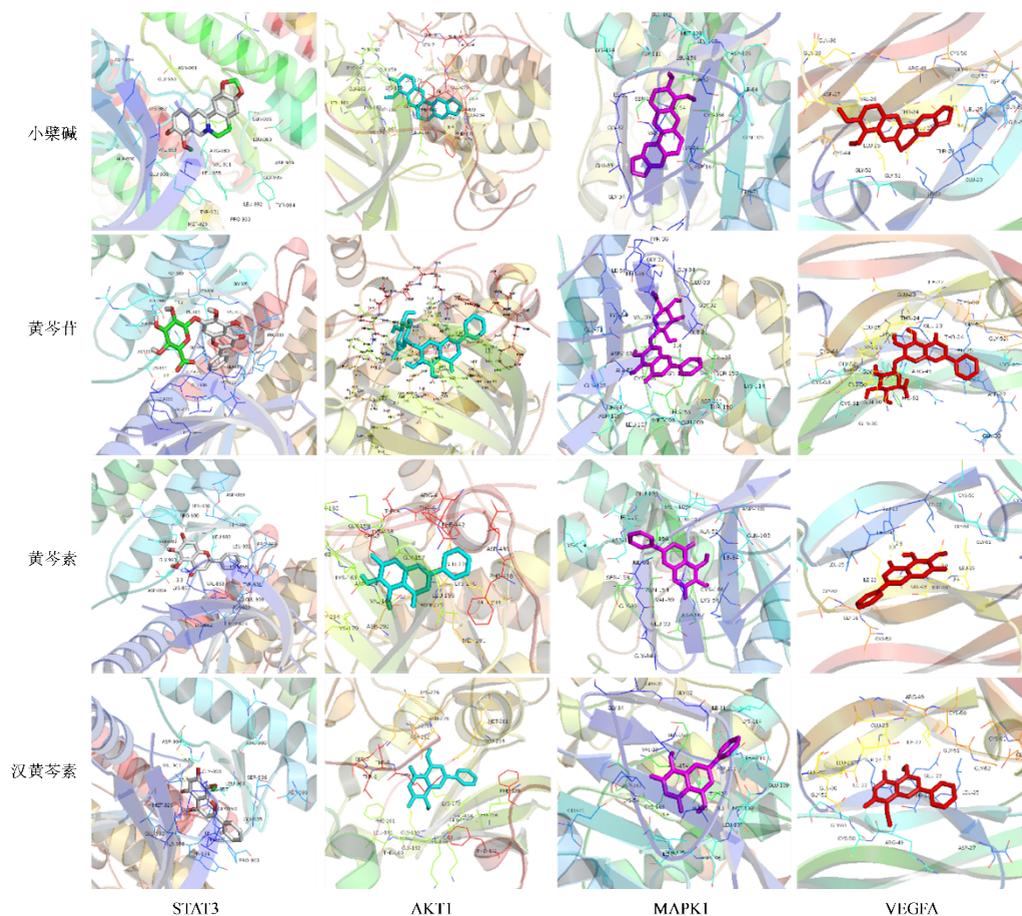


图9 潜在Q-marker成分与关键靶蛋白分子对接模式图

Fig. 9 Molecular docking pattern of Q-marker components with its key targets

控制全面性的研究,为建立中药质量系统化控制体系开拓了新思路^[14]。李晴等^[15-16]运用网络药理学方法对白术指纹图谱指认的化学成分进行药效活性的验证,此方法简便,重复性高。但由于安宫牛黄丸组方复杂,包含动物药、矿物药与植物药,应用上述方法有一定的局限。本研究采用查阅文献与数据库相结合的方法共发掘出128种化学成分,再通过筛选获得7个关键活性成分,分别是小檗碱、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、熊果酸、槲皮素及麝香酮,将得到的活性成分结合指纹图谱分析预测Q-Marker,

并进行分子对接验证以期获得全面准确的Q-Marker。

4.1 网络药理学结果分析与评价

采用网络药理学对安宫牛黄丸进行活性成分筛选与靶点预测。得到STAT3、VEGFA及AKT1等10个关键核心靶点,主要涉及脂质代谢、炎症反应、细胞免疫等相关机制。STAT3已经被多项研究证实,在脑出血后血肿周围脑组织中表达增加,并且使用该靶点的抑制剂显著改善脑出血大鼠的神经功能^[17-18];VEGFA可促进血管内皮细胞迁移、增殖和

血管形成,所诱导的血管通透性增强是其在炎症和其他病理环境中发挥重要作用的基础^[19]。GO富集分析显示,安宫牛黄丸对缺氧反馈过程、蛋白酶结合过程、细胞表面等途径具有广泛调节的作用。分析结果说明,安宫牛黄丸主要是通过调节 AGE-RAGE 信号通路、PI3K-Akt 信号通路以及 MAPK/ERK 信号通路等通路发挥治疗作用。研究表明,蛋白激酶 C 和 MAPKs 等多个细胞内信号途径的激活与 AGE-RAGE 信号通路密切相关,从而引发 NF- κ B 的活化,促进促炎症细胞因子参与神经病变发生发展,与癫痫发病机制密切相关^[20]。实验证实 PI3K/Akt 通路的激活可以对保护脑缺血起到一定的作用^[21],而降低 MAPK/ERK 信号通路蛋白表达水平对防治缺血性卒中具有良好的效果^[22]。

上述文献研究表明,网络药理学预测的结果与现有相关文献较为接近,说明该研究方法具有一定的准确性和可靠性,同时也与中药整体性的观念相契合,安宫牛黄丸中多个关键性成分可作用于多个靶点,起到治疗或干预疾病的作用。

根据安宫牛黄丸的方解,中药牛黄及犀角(水牛角)为组方君药,且现代药理研究发现,水牛角具有抗炎镇痛镇静、维持脑血循环通畅、保护脑组织的药理活性^[23]。胆红素是牛黄主要指标成分,具有清除氧自由基与抗氧化作用^[24],且在多种疾病中通过抗炎和抗氧化作用修复组织损伤^[25],但在网络药理学筛选过程中,胆红素 OB 值为 16.53%,未达到 30% 而被筛除。其他君药成分也未通过网络药理学的筛选,不被纳入 Q-Marker 范围做质控成分,考虑是相关文献报道及数据库资料较少。组方中佐药包含珍珠、雄黄及朱砂矿物药,珍珠具有抗衰老的药理活性^[26]。而朱砂(主含硫化汞, HgS)和雄黄(主含二硫化二砷, As₂S₂)对急性缺血性卒中和脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,对逆转卒中所致的皮层单胺类神经递质改变有一定的作用^[27],并且发挥抑制钙超载作用、起到减轻脑水肿、具有脑缺血的保护及抗细胞凋亡的作用,上述成分可能是该复方发挥芳香开窍作用的物质基础^[28]。但朱砂和雄黄作为毒性中药,不被网络药理学数据库收纳。说明网络药理学有其局限性,需要完善和发展^[29]。

4.2 指纹图谱作为中药质控重要方法的评价

刘昌孝院士^[4]提出的 Q-Marker 概念,是需要可以定性定量的特有化学成分,可作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制。而我国传统中药大多数都是天然植物药、动物药及矿物药

等。以往中药鉴定方法包括基原鉴定法、性状鉴定法等具有较大的主观性,而中药内在活性成分才是决定药效与质量的根本,且鉴于中药复方中,药材组方复杂,成分多样。任何单一成分无法代表复方的整体特点,而指纹图谱能全面地反映中药所包含的化学信息,是中药质量控制的有效手段^[30]。基于此,本研究通过建立安宫牛黄丸的指纹图谱,对共有峰进行指认和归属,表征安宫牛黄丸中化学成分。

本研究采用 UPLC 构建安宫牛黄丸指纹图谱,并结合网络药理学得到的关键活性成分,共筛选出 4 种成分作为潜在的 Q-Marker,且研究发现指认出 4 种成分的 10 号峰、12 号峰、16 号峰及 18 号峰,在指纹图谱中出峰时间及峰形稳定,在组方制剂中稳定存在,可以定性定量研究。而 Taviano 等^[31]研究显示 ig 熊果酸可以抑制癫痫小鼠的中枢神经系统,减少小鼠自动症和癫痫的发作次数。研究表明,槲皮素具有包括抗过敏、抗病毒、抗炎^[32]、预防癌变、延缓衰老、保护心血管和神经系统等作用^[33]。Zhou 等^[34]报道,麝香酮可通过诱导神经干细胞增殖和分化,激活 PI3K/Akt 信号通路发挥在脑缺血卒中的保护作用,说明麝香酮在组方治疗卒中等脑部疾病发挥重要作用。但本研究筛选的 Q-Marker 中没有包含文献报道中对安宫牛黄丸治疗疾病作用较多的及网络药理学筛选得到的熊果酸、槲皮素和麝香酮,可能的原因是槲皮素、熊果酸在复方中含量较低,而麝香酮挥发性强,测定多采用气相色谱法^[35]。针对无法测定的活性成分,后期可以采用多谱联用如 NMR、GC-MS、ICP-MS 和 LC-MS 等分析手段。

综上,本研究根据网络药理学预测结果及指纹图谱结果综合分析,初步预测安宫牛黄丸潜在的 4 种 Q-Marker 分别是黄芩苷、小檗碱、汉黄芩素及黄芩素。而胆红素、麝香酮、槲皮素、HgS 及 As₂S₂ 等多种成分可能为潜在的 Q-Marker,仍需进一步研究确证。本研究进一步完善了安宫牛黄丸的质量控制体系,为其作用机制提供了参考。Q-Marker 的预测是一种复杂的过程,尤其是对于组方多样、成分复杂的复方,本研究仍存在一定局限性,但可以为安宫牛黄丸临床二次开发提供思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王玉昆,丁人杰,段丽娟,等.安宫牛黄丸的临床应用研

- 究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(10): 2146-2153.
- Wang Y K, Ding R J, Duan L J, et al. Research progress on clinical application study of Angong Niu Huang Pill [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(10): 2146-2153.
- [2] 黄坡, 郭玉红, 赵京霞, 等. 安宫牛黄丸的临床研究进展 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(2): 361-364, 376.
- Huang P, Guo Y H, Zhao J X, et al. Clinical research progress of Angong Niu Huang pill [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2018, 27(2): 361-364, 376.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- Liu C X, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [5] Xu X, Zhang W X, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [6] Tao W Y, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix* formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 1-10.
- [7] 柳温曦, 程显隆, 郭晓晗, 等. 牛黄及代用品化学成分、质量控制方法的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(8): 597-602.
- Liu W X, Cheng X L, Guo X H, et al. Progress in research on chemical constituents and quality control methods of *Calculus bovis* and its substitutes [J]. Chin Pharm J, 2019, 54(8): 597-602.
- [8] 吴晓莹. 羚羊角和水牛角的解热作用及其成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- Wu X Y. Study on antipyretic effect and chemical constituents of *Antelope* horn and buffalo horn [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2019.
- [9] 王春来. 水牛角粉不宜入煎剂分析 [J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(7): 502.
- Wang C L. Analysis of buffalo horn powder unsuitable for decoction [J]. J Pract Tradit Chin Med, 2010, 26(7): 502.
- [10] 王存, 曾勇, 罗卢洋, 等. 对20种海水珍珠和淡水珍珠的化学成分的初步对比研究 [J]. 农业研究与应用, 2021, 34(2): 5-13.
- Wang C, Zeng Y, Luo L Y, et al. Comparative study on chemical compositions of 20 species of sea water pearls and fresh water pearls [J]. Agric Res Appl, 2021, 34(2): 5-13.
- [11] 徐彤, 黄萌萌, 刘丽芳, 等. 安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式分析 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2448-2454.
- Xu T, Huang M M, Liu L F, et al. HPLC fingerprint and multi-components determination combined with chemical pattern recognition of Angong Niu Huang Pills [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(12): 2448-2454.
- [12] 柴玉爽, 曾珊瑚, 何源峰, 等. 安宫牛黄丸的 UPLC 特征指纹图谱与化学模式识别 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 565-571.
- Chai Y S, Zeng H H, He Y F, et al. UPLC characteristic fingerprint and chemical pattern recognition of Angong Niu Huang Pills [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(3): 565-571.
- [13] 王静. 晋产北柴胡质量评价研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- Wang J. Study on the quality evaluation of *Bupleurum chinense* produced in Shanxi [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [14] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的5年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- Liu C X. Five-year review on development of quality markers of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [15] 李晴, 朱香梅, 石雨荷, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的白术质量标志物预测分析 [J]. 中国药事, 2022, 36(4): 404-416.
- Li Q, Zhu X M, Shi Y H, et al. Prediction and analysis of quality markers of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* based on fingerprints, and network pharmacology [J]. Chin Pharm Aff, 2022, 36(4): 404-416.
- [16] 徐瑞杰, 薛蓉, 梅茜, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的枳实薤白桂枝汤质量标志物预测 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 372-381.
- Xu R J, Xue R, Mei X, et al. Q-Markers prediction of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction based on fingerprint and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(2): 372-381.
- [17] Li H T, Zhou H J. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling attenuates neurogenesis in intracerebral hemorrhage rat model [J]. Turk Neurosurg, 2018, doi: 10.5137/1019-5149.JTN.23665-18.1.
- [18] Ji N, Wu L R, Shi H, et al. VSIG4 attenuates NLRP3 and ameliorates neuroinflammation via JAK2-STAT3-A20 pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Neurotox Res, 2022, 40(1): 78-88.

- [19] Zhou Z W, Gao S, Li Y D, et al. VEGI improves outcomes in the early phase of experimental traumatic brain injury [J]. *Neuroscience*, 2020, 438: 60-69.
- [20] Suchal K, Malik S, Khan S I, et al. Protective effect of mangiferin on myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of AGE-RAGE/ MAPK pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42027.
- [21] Tu L, Wang Y, Chen D, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 via regulation of the PI3K-akt-mTOR/JNK pathway in neonatal cerebral hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(6): 1210-1226.
- [22] 彭张辉, 胡发云, 刘君, 等. 血管介入治疗联合脉血康胶囊对缺血性卒中病人 MAPK/ERK 信号通路及促动脉硬化指数的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(5): 927-930.
- Peng Z H, Hu F Y, Liu J, et al. Effects of interventional therapy combined with Maixuekang capsule on MAPK/ERK signaling pathway and plasma arteriosclerotic index in patients with ischemic stroke [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2022, 20(5): 927-930.
- [23] 蔡之幸, 王重卿. 水牛角治头痛作用初探 [J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(9): 69-71.
- Cai Z X, Wang C Q. Preliminary exploration on the therapeutic effect of *Cornu bubali* on headache [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2016, 50(9): 69-71.
- [24] Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A F, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance [J]. *Science*, 1987, 235(4792): 1043-1046.
- [25] Yao Q, Jiang X, Zhai Y Y, et al. Protective effects and mechanisms of bilirubin nanomedicine against acute pancreatitis [J]. *J Control Release*, 2020, 322: 312-325.
- [26] 李笑萍, 王君. 水溶性珍珠钙抗小鼠亚急性衰老的药理作用及其机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(9): 834-836.
- Li X P, Wang J. Pharmacologic effect and mechanism of water-soluble calcium from pearl [J]. *Chin J Gerontol*, 2004, 24(9): 834-836.
- [27] 朱坤杰, 孙建宁, 马长华, 等. 安宫牛黄丸及重金属组分对内毒素脑损伤大鼠大脑皮层单胺类递质的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(10): 949-953.
- Zhu K J, Sun J N, Ma C H, et al. Effect of Angong Niu Huang pill and heavy metal constituents on EcoG of brain damage caused by LPS in rats [J]. *China J Chin Mater Med*, 2007, 32(10): 949-953.
- [28] 冯淑怡. 含与不含朱砂雄黄的安宫牛黄丸对大鼠出血性脑损伤的保护作用及机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- Feng S Y. Protective effect and mechanism of Angong Niu Huang pill with or without cinnabar realgar on hemorrhagic brain injury in rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2007.
- [29] 马焱彬, 贾利军, 李玉婷, 等. 网络药理学研究中"槲皮素类现象"与对策的探讨 [J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2021, 40(3): 223-230.
- Ma H B, Jia L J, Li Y T, et al. Reflection and countermeasures on "quercetin phenomenon" in network pharmacology research [J]. *J Chengdu Univ Nat Sci Ed*, 2021, 40(3): 223-230.
- [30] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(1): 82-86.
- Zhao J, Xie S J, Zhao X H, et al. Research progress on quality control methods of fingerprint of traditional Chinese medicine [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2020, 41(1): 82-86.
- [31] Taviano M F, Miceli N, Monforte M T, et al. Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS depressing effects [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(4): 382-385.
- [32] Anand David A V, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid [J]. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10(20): 84-89.
- [33] Li Y, Yao J Y, Han C Y, et al. Quercetin, inflammation and immunity [J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
- [34] Zhou Z Y, Dun L L, Wei B X, et al. Musk ketone induces neural stem cell proliferation and differentiation in cerebral ischemia via activation of the PI3K/akt signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2020, 435: 1-9.
- [35] 郑程莉, 蒋桂梅, 吴杰, 等. 圈养林麝产麝香中麝香酮含量测定分析 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(12): 2021-2025, 2052.
- Zheng C L, Jiang G M, Wu J, et al. Determination and analysis of muscone content in musk produced by captive forest musk Deer [J]. *Mod Chin Med*, 2020, 22(12): 2021-2025, 2052.

[责任编辑 刘东博]