

基于特征图谱-网络药理学的牛膝干预膝骨关节炎质量标志物 (Q-Marker) 研究

赵萌^{1,2}, 王胜超^{1,2,3,4,5*}, 张红伟^{2*}, 曾梦楠¹, 郭彭莉¹, 张贝贝¹, 张振凌^{1,2,3,4,5}, 郑晓珂¹, 冯卫生¹

1. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046

2. 河南省药品医疗器械检验院 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 河南 郑州 450008

3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

4. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

5. 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 基于特征图谱探究牛膝盐炙、酒炙前后的差异性特征成分, 结合网络药理学预测及分子对接验证, 筛选牛膝干预膝骨关节炎 (KOA) 的潜在质量标志物 (Q-Marker)。方法 采用 HPLC 技术建立牛膝、盐牛膝及酒牛膝的特征图谱, 结合主成分分析 (PCA) 与正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 筛选炮制前后的主要差异成分; 通过网络药理学预测特征成分治疗 KOA 的核心靶点与关键通路, 绘制“药物-成分-靶点-疾病-通路”网络以筛选抗 KOA 差异活性成分; 结合 Q-Marker 五原则及分子对接验证结果, 筛选潜在 Q-Marker。结果 15 批牛膝、盐牛膝及酒牛膝的特征图谱分别标定 27、28、34 个共有峰, 经对照品比对, 3 种牛膝共指认 14 种共有化学成分; 化学计量学分析显示, 牛膝盐炙前后的主要差异成分为人参皂苷 Ro、姜状三七皂苷 R₁、齐墩果酸、金盏花皂苷 E、竹节参皂苷 I、竹节参皂苷 IVa 及竹节参皂苷 IVa 甲酯, 酒炙前后的主要差异成分为人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 I、姜状三七皂苷 R₁、金盏花皂苷 E、 β -蜕皮甾酮、齐墩果酸及竹节参皂苷 IVa。网络药理学预测表明, 核心成分 β -蜕皮甾酮、旌节花甾酮 D、竹节参皂苷 IVa 甲酯、齐墩果酸、人参皂苷 Ro, 可能通过调控白蛋白 (ALB)、原癌基因 (JUN)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、雌激素受体 α 基因 (ESR1)、抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤因子-2 (BCL2) 6 个核心靶标, 参与癌症通路、白细胞介素 (IL)-17 信号通路、前列腺癌等关键信号通路发挥抗 KOA 作用; 分子对接验证进一步证实, 上述 5 个核心成分与 JUN、BCL2 靶标均具有良好结合活性。结合 Q-Marker 五原则, 最终筛选出 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、齐墩果酸为牛膝治疗 KOA 的潜在 Q-Marker。结论 建立的 HPLC 特征图谱可有效区分牛膝及其盐炙、酒炙品; 经网络药理学预测、分子对接验证及 Q-Marker 五原则筛选出的差异活性成分, 可作为牛膝治疗 KOA 的潜在 Q-Marker。

关键词: 牛膝; 炮制; 特征图谱; 膝骨关节炎; 网络药理学; 质量标志物; β -蜕皮甾酮; 人参皂苷 Ro; 齐墩果酸

中图分类号: R284; R684.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)02-0552-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.02.015

Research on quality markers of *Achyranthes bidentata* for intervention in knee osteoarthritis based on characteristic chromatographic fingerprint and network pharmacology

ZHAO Meng^{1,2}, WANG Shengchao^{1,2,3,4,5}, ZHANG Hongwei², ZENG Mengnan¹, GUO Pengli¹, ZHANG Beibei¹, ZHANG Zhenling^{1,2,3,4,5}, ZHENG Xiaoke¹, FENG Weisheng¹

1. College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Key Laboratory of Quality Control of Chinese Materia Medica and Drinking Tablets of State Drug Administration, Henan Food and Drug Inspection Institute, Zhengzhou 450008, China

收稿日期: 2025-09-04

基金项目: 2023 年郑州市协同创新专项 (2023XTCX041); 豫财教[2023]47 号-达 2023 年第三批“双一流”创建资金-中医学青年骨干人才引进培养-青年 B 类资助项目 (00104311-2023-71); 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室开放课题资助项目 (KF202201); 基于单细胞转录组技术关联大分子多糖变化解析牛膝盐炙影响肝-肠细胞动态异质性的炮制机制研究 (252300421621)

作者简介: 赵萌 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事中药炮制机制及饮片标准化研究。E-mail: zm18834193101@163.com

*通信作者: 王胜超 (1991—), 男, 讲师, 从事中药炮制机制及饮片标准化研究。E-mail: wangsc1204@163.com

张红伟 (1983—), 男, 中药师, 从事药品检验分析工作。E-mail: 526356277@qq.com

3. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P.R., Zhengzhou 450046, China
4. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
5. Henan Provincial Key Laboratory of TCM Decoction Processing, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To explore the differential characteristic components of raw *Achyranthes bidentata*, salt-processed *A. bidentata*, and wine-processed *A. bidentata* through feature fingerprinting, combined with network pharmacology prediction and molecular docking verification, to screen potential quality Markers (Q-Markers) for the intervention of *A. bidentata* in knee osteoarthritis (KOA).

Methods The characteristic fingerprints of raw *A. bidentata*, salt-processed *A. bidentata*, and wine-processed *A. bidentata* were established by HPLC. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen the main differential components before and after processing; Network pharmacology was used to predict the core targets and key pathways of the characteristic components in treating KOA, and a “drug-component-target-disease-pathway” network was drawn to screen the differential active components against KOA; Based on the Q-Marker five principles and the results of molecular docking verification, potential differential Q-Markers were screened. **Results** The characteristic fingerprints of 15 batches of raw *A. bidentata*, salt-processed *A. bidentata*, and wine-processed *A. bidentata* respectively identified 27, 28, and 34 common peaks. After comparison with reference substances, 14 common chemical components were identified for three *A. bidentata*. Chemometric analysis showed that the main differential components before and after salt processing of raw *A. bidentata* were ginsenoside Ro, zingibroside R₁, oleanolic acid, calenduloside E, chikusetsusaponin IVa, chikusetsusaponin IVa methyl, while the important differential components before and after alcohol processing were ginsenoside Ro, chikusetsusaponin I, zingibroside R₁, calenduloside E, β -ecdysone, oleanolic acid, chikusetsusaponin IVa. Network pharmacology prediction indicated that β -ecdysone, cyasterone, chikusetsusaponin IVa, oleanolic acid, ginsenoside Ro in *A. bidentata*, might participate in anti-KOA by regulating 6 core targets including albumin (ALB), proto-oncogene (JUN), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG), cysteine aspartate protease 3 (CASP3), estrogen receptor α gene (ESR1), and anti-apoptotic protein B-cell lymphoma factor-2 (BCL2) in cancer pathways, interleukin (IL)-17 signaling pathway, and prostate cancer and other key signaling pathways; Molecular docking verification further confirmed that the above 5 core components had good binding activity with JUN and BCL2 targets. Based on the Q-Marker five principles, β -ecdysone, ginsenoside Ro, oleanolic acid were finally selected as potential Q-Markers for the treatment of KOA with *A. bidentata*. **Conclusion** The established HPLC characteristic fingerprints can effectively distinguish raw *A. bidentata* and its salt-processed and wine-processed products; The differential active components screened by network pharmacology prediction, molecular docking verification, and the Q-Marker five principles can be used as potential Q-Marker for the treatment of KOA with *A. bidentata*.

Key words: *Achyranthes bidentata* Bl.; processing; characteristic chromatogram; knee osteoarthritis; network pharmacology; Q-Marker; β -ecdysone; ginsenoside Ro; oleanolic acid

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根，具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨、利尿通淋、引血下行之功效。临床常用于经闭癥瘕、腰膝酸痛、筋骨无力、淋证涩痛、水肿、小便不利等证^[1]。南北朝《神农本草经集注》记载：“牛膝，主治寒湿痿痹，四肢拘挛，膝痛不可屈伸……”；清代《本草便读》提及：“生者破血行瘀，盐炒酒蒸熟则强筋健骨，补肝肾”。现代研究亦证实，牛膝酒炙可增强活血通络作用，盐炙能引药下行，发挥补肾益精、强健筋骨之效^[2-3]；且牛膝自古用于治疗寒湿痿痹，这与现代临床膝骨关节病症相吻合^[4-5]。膝骨关节炎 (KOA) 是骨科临床高发疾病，中医将其归属于“膝痹”“痹证”“骨痹”范畴，多由肝肾不

足、风寒湿邪外侵所致，以肝肾亏虚、气滞血瘀为主要证型^[6-7]，其中肾虚为病程进展的核心病机，治宜补肾益精、活血化瘀。现代研究表明，牛膝是治疗 KOA 的高频高效中药^[8]，且酒炙、盐炙可提升其药效成分含量，但有效成分尚不十分明确。基于此，本研究通过对牛膝炮制（酒炙、盐炙）前后的差异成分，并借助网络药理学方法，预测牛膝干预 KOA 的药效物质基础及质量标志物 (Q-Marker)。

中药具有化学成分复杂、作用靶点多、有效成分含量低且质量评价指标不统一等特点^[9]。传统提取分离技术虽具备准确性和可靠性，却无法简便、快速、直观地从整体上评价不同炮制品的

主要成分差异^[10]。中药特征图谱技术是当前中药质量评价、制剂控制及药效部位筛选中广泛应用的分析技术, 可便捷、客观、多指标且宏观地反映中药内在化学成分的特征差异^[11-12]。同时, 结合刘昌孝院士提出的 Q-Marker 理念^[13], 可为中药材质量控制提供新路径。二者联合应用可有效提升中药质量评估的科学性, 为完善质量评价体系提供参考。因此, 本研究立足系统生物学理论, 借助网络药理学技术, 可可视化“药物-成分-靶点-疾病-通路”网络, 从整体层面构建网络拓扑结构, 进而明确药物治疗疾病的有效成分、阐明药物与机体的相互作用机制; 同时联合特征图谱、网络药理学、分子对接及 Q-Marker 分析策略开展系统性研究,

既为牛膝的质量评价提供科学依据, 也初步阐明牛膝治疗 KOA 的药效机制, 明确其物质基础及潜在作用靶点, 为后续相关研究提供支撑。

1 材料

1.1 药品

牛膝、盐牛膝、酒牛膝饮片药店零售, 经河南中医药大学张振凌教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根切制的饮片、以及盐炙法和酒炙法炮制的饮片。购买市售牛膝饮片共 15 批 (N1~N15)、酒牛膝饮片 4 批 (J12~J15)、盐牛膝饮片 4 批 (Y12~Y15), 实验室自制盐牛膝 (Y1~Y11)、酒牛膝 (J1~J11) 饮片各 11 批。详细信息见表 1。

表 1 牛膝、盐牛膝、酒牛膝饮片信息

Table 1 Information of *A. bidentata*, salt and wine processing *A. bidentata*

编号	批号	厂家/炮制前编号	编号	批号	厂家/炮制前编号
N1	200401	保和堂(焦作)制药有限公司	J6	—	N6
N2	200413		J7	—	N7
N3	200408		J10、11	—	N15
N4	200500341	康美药业股份有限公司	J12	20171202	保和堂(焦作)制药有限公司
N5	190901401		J13	230523	安徽广和中药饮片有限公司
N6	1811200291	河南郑州东升大药房	J14	140410	郑州瑞龙制药股份有限公司
N7	191204871		J15	1702103	安徽亳药千草国药股份有限公司
N8	200337	河南张仲景大药房	Y1	—	N1
N9	190220		Y2	—	N1
N10	20190401	河南本草国药馆	Y3	—	N2
N11	20190601		Y4、5	—	N4
N12	181101CP0103	河北光明饮片有限公司	Y6、7	—	N11
N13	18010103	安徽广和中药饮片有限公司	Y8	—	N13
N14	20190401	广东汇群药业有限公司	Y9	—	N14
N15	1807054	安徽亳药千草国药股份有限公司	Y10、11	—	N15
J1、8、9	—	N1	Y12	210515	保和堂(焦作)制药有限公司
J2	—	N2	Y13	200522	安徽广和中药饮片有限公司
J3	—	N3	Y14	200604	广东汇群药业有限公司
J4	—	N4	Y15	200516	康美药业股份有限公司
J5	—	N5			

1.2 试剂

牛膝甾酮 A、竹节参皂苷 IVa 甲酯、竹节参皂苷 IVa 丁酯、竹节参皂苷-I 均为实验室自制 (质量分数均 $\geq 98.0\%$); 对照品 β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、水龙骨素 B、齐墩果酸、杯苋甾酮 (批号分别为 PS0109-0020、PS00094、PS180709-17、PS010731、PS0001146、PS200525-02、PS012022、PS0707-0020,

质量分数均 $\geq 98.0\%$), 成都普思生物科技有限公司; 旌节花甾酮 D、姜状三七皂苷 R₁ (批号 AF20042212、AF20042103, 质量分数均 $\geq 98.0\%$), 成都埃法生物科技有限公司; 金盏花皂苷 E (批号 CFS201902, 质量分数均 $\geq 98.0\%$), 武汉天植生物技术有限公司; 竹节参皂苷 IV (批号 P23N10L103974, 质量分数均 $\geq 98.0\%$), 上海源叶生物科技有限公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯 (货号

分别为 Ms1922-801、As1122-801)，美国天地试剂公司；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Waters e2695 型 HPLC (美国 Waters 公司)；Advantage A10 型超纯水仪、BT25S 十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司)；微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)；KQ-500DV 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)；BSA224S-CW 型万分之一天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司)；DZF-6050B 型真空干燥箱 (北京恒泰丰科试验设备有限公司，中国)；BCD-206TAS 型低温冰箱 (中国海尔集团公司)。

2 方法与结果

2.1 药物制备

2.1.1 盐牛膝制备 参照《中国药典》2020 年版四部通则盐炙法^[1]。取牛膝饮片 500 g、1 g·mL⁻¹ 的氯化钠水溶液 10 mL 拌匀，闷 1 h 至盐水吸尽。将拌匀闷透后的牛膝饮片置于预热好的热锅中，文火炒干，取出，晾凉。

2.1.2 酒牛膝制备 参照《中国药典》2020 年版四部通则酒炙法。取牛膝饮片 500 g，黄酒 50 g，拌匀，闷 1 h 至黄酒被吸尽。将拌匀闷透后的牛膝饮片置于预热好的热锅中，文火炒干，取出，晾凉。

2.2 特征图谱的研究

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称定样品粉末 (过三号筛) 1.0 g，置 50 mL 锥形瓶内，加水饱和正丁醇 30 mL，密塞，浸泡 12 h，超声 (250 W、40 kHz) 30 min，滤过，甲醇 10 mL 分次洗涤残渣，合并滤液和洗液，水浴蒸干，残渣加甲醇溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液制备 精密称定对照品牛膝甾酮 A、β-蜕皮甾酮、水龙骨素 B、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、杯苋甾酮、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa、竹节参皂苷 IVa 甲酯、姜状三七皂苷 R₁、金盏花皂苷 E、竹节参皂苷 IVa 丁酯、竹节参皂苷 I、旌节花甾酮 D、齐墩果酸适量，置 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度线，即得各供试品母液。精密量取各对照品母液 1.00 mL，置 20 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度线，配制成质量浓度分别为 27.05、19.50、13.30、2.40、1.65、1.60、15.15、8.10、13.35、2.50、3.70、16.75、1.35、6.70、2.30、4.20 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Waters Symmetry C₁₈ 型

(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸水 (B)，梯度洗脱 0~10 min, 2%→10% A；10~21 min, 10%→15% A；21~36 min, 15%→20% A；36~51 min, 20%→30% A；51~61 min, 30%→35% A；61~76 min, 35%→40% A；76~91 min, 40%→60% A；91~106 min, 60%→80% A；106~115 min, 80% A；115~120 min, 80%→2% A，体积流量 0.8 mL·min⁻¹，柱温 30 °C，检测波长 210 nm，进样量 15 μL。

2.2.4 精密度考察 取牛膝 (N1)，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次，以 2 号峰 (β-蜕皮甾酮) 为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示，各共有峰的相对保留时间 RSD<0.3%，各共有峰的相对峰面积 RSD<3.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 取牛膝 (N1)，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2.3”项下色谱条件测定，以 2 号峰 (β-蜕皮甾酮) 为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示，各共有峰的相对保留时间 RSD<2.0%，各共有峰的相对峰面积 RSD<3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性考察 取牛膝 (N1)，按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件测定，以 2 号峰 (β-蜕皮甾酮) 为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示，各共有峰的相对保留时间 RSD<1.0%，各共有峰的相对峰面积 RSD<3.0%，表明方法稳定性良好。

2.2.7 特征图谱的建立及相似度分析 取不同批次的牛膝、盐牛膝、酒牛膝各 15 批，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件测定。将各样品的 HPLC 图谱以 cdf 格式分别导入“中药色谱特征图谱相似度评价系统 (2012.130732 版)”，取 6~120 min 的色谱图，进行色谱峰匹配，设牛膝 (N1)、盐牛膝 (Y1)、酒牛膝 (J1) 的特征图谱为参照图谱，采用平均数法，时间窗宽度为 0.50 min，进行多点校正和色谱峰匹配，分别获得叠加特征图谱和对照图谱 (R)。见图 1-A、B、C。其中牛膝共标识 27 个共有峰，盐牛膝共标识 28 个共有峰，酒牛膝共标识 34 个共有峰。相似度分析显示 (表 2)，牛膝相似度为 0.71~0.97，盐牛膝相似度为 0.41~0.93，酒牛膝相似度为 0.65~0.88。将牛膝、盐牛膝、酒牛膝的 R 进行相似度评价。牛膝与盐牛

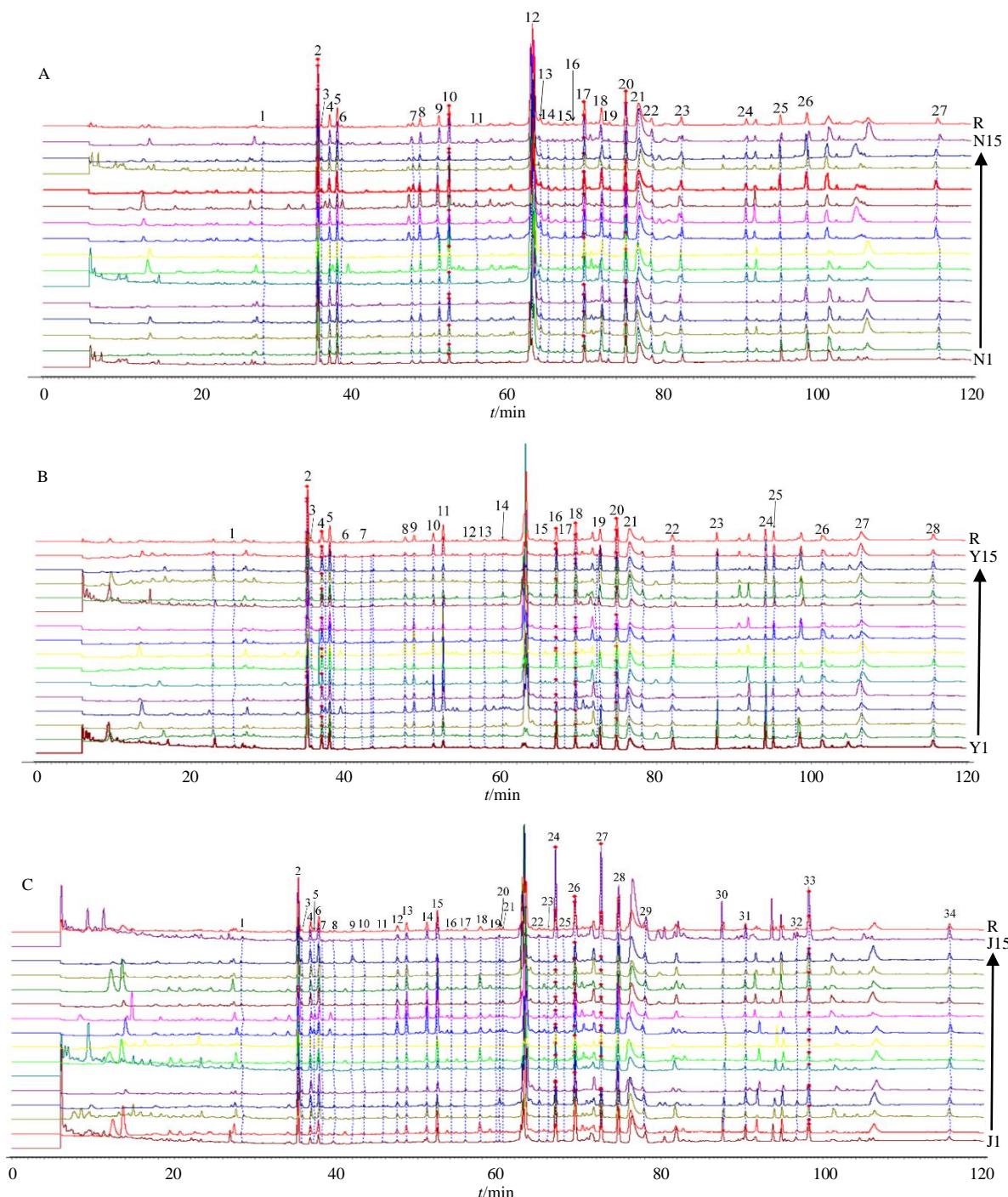


图 1 牛膝 (A)、盐牛膝 (B)、酒牛膝 (C) 的 HPLC 特征图谱及对照图谱 (R)

Fig. 1 HPLC Characteristic chromatograms of *A. bidentata* (A), salted *A. bidentata* (B), wine processed *A. bidentata* (C) and reference chromatogram (R)

膝相似度为 0.65, 牛膝与酒牛膝相似度为 0.85, 盐牛膝与酒牛膝相似度 0.68, 提示牛膝盐炙、酒炙前后内在物质成分发生较大的变化。

通过与对照品色谱峰比对, 共指认出 14 种共有化学成分, 分别为牛膝甾酮 A (峰 1)、 β -蜕皮甾酮 (峰 2)、水龙骨素 B (峰 3)、25R-牛膝甾酮 (峰

4)、25S-牛膝甾酮 (峰 5)、人参皂苷 Ro (峰 7)、竹节参皂苷 IV (峰 8)、竹节参皂苷 Iva (峰 9)、竹节参皂苷 IVa 甲酯 (峰 10)、姜状三七皂苷 R₁ (峰 11)、金盏花皂苷 E (峰 12)、竹节参皂苷 IVa 丁酯 (峰 13)、竹节参皂苷 I (峰 14)、齐墩果酸 (峰 16)。对照品溶液、供试品溶液的 HPLC 色谱图见图 2。

表2 牛膝、盐牛膝、酒牛膝相似度

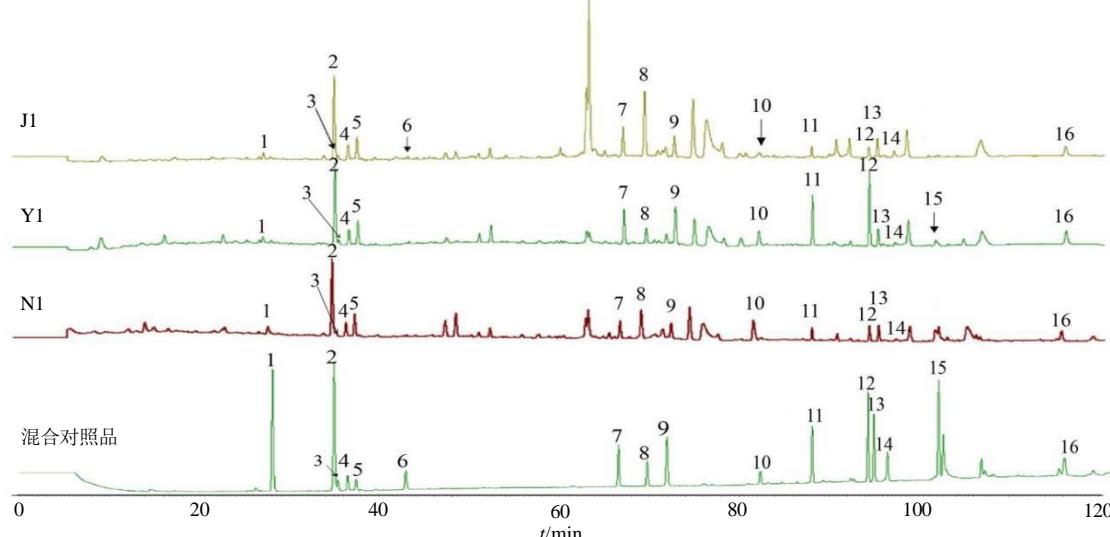
Table 2 Similarity of *A. bidentata*, salt and wine processing*A. bidentata*

牛膝	相似度	盐牛膝	相似度	酒牛膝	相似度
N1	1.00	Y1	1.00	J1	1.00
N2	0.73	Y2	0.79	J2	0.76
N3	0.94	Y3	0.83	J3	0.82
N4	0.97	Y4	0.60	J4	0.84
N5	0.97	Y5	0.79	J5	0.86
N6	0.71	Y6	0.63	J6	0.68
N7	0.83	Y7	0.41	J7	0.80
N8	0.84	Y8	0.94	J8	0.86
N9	0.92	Y9	0.79	J9	0.69
N10	0.85	Y10	0.88	J10	0.86
N11	0.78	Y11	0.61	J11	0.65
N12	0.97	Y12	0.64	J12	0.79
N13	0.76	Y13	0.85	J13	0.88
N14	0.91	Y14	0.89	J14	0.80
N15	0.80	Y15	0.89	J15	0.86

2.2.8 主成分分析 (PCA) 以牛膝、盐牛膝、酒牛膝各15批样本中14个共有峰面积为变量, 使用SPSS 20.0进行因子分析, 凯泽-梅耶-奥金抽样充分性度量 (KOM) 值为0.674, 大于0.6, 说明适合进行因子分析, 且巴特利球形检验统计量为0.000, 表

明各变量相关性好。由表3可知, 以特征值 >1 为提取标准, 得到4个主成分, 其累积方差贡献率为65.75%, 可以代表特征图谱中14个共有峰的大部分信息, 碎石图见图3。由表4因子载荷矩阵可知, 共有峰8~13对主成分1影响较大, 共有峰5对主成分2影响较大, 共有峰1和7对主成分3影响较大, 共有峰14对主成分4影响较大。采用SIMCA 14.1软件对15批牛膝及其炮制品各色谱峰的峰面积数据进行PCA, PCA得分3D图见图4, 所有样品均在95%置信区间内, 且15批样品在主成分空间的分布上可明显分为3大类, 牛膝、盐牛膝、酒牛膝各分为一类, 表明牛膝、酒牛膝、盐牛膝图谱各成分差异较大。

2.2.9 偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 将牛膝、盐牛膝、酒牛膝各15批样本中14个共有化学成分峰面积导入SIMCA 14.1软件, 进行OPLS-DA, 结果见图5-A、B, 牛膝、酒牛膝、盐牛膝可被较好地区分, 与PCA结果一致。采用置换检验($n=200$)对模型进行验证, 表明该模型不存在过拟合, 见图6-A、B。以变量投影重要性 (VIP) 值 >1 筛选差异化合物, 结果见图7-A、B, VIP值越大, 表明该变量对样本分类贡献越大, 其中, 牛膝盐炙前后的重



1-牛膝甾酮 A; 2- β -蜕皮甾酮; 3-水龙骨素 B; 4-25R-牛膝甾酮; 5-25S-牛膝甾酮; 6-杯苋甾酮; 7-人参皂苷 Ro; 8-竹节参皂苷 IV; 9-竹节参皂苷 IVa; 10-竹节参皂苷 IVa 甲酯; 11-姜状三七皂苷 R₁; 12-金盏花皂苷 E; 13-竹节参皂苷 IVa 丁酯; 14-竹节参皂苷 I; 15-旌节花甾酮 D; 16-齐墩果酸。

1-inokosterone A; 2- β -yeecdysone; 3-polypodine B; 4-25R-inokosterone; 5-25S-inokosterone; 6-cyasterone; 7-ginsenoside Ro; 8-chikusetsusaponin IV; 9-chikusetsusaponin IVa; 10-chikusetsusaponin IVa methyl; 11-zingibroside R₁; 12-calenduloside E; 13-chikusetsusaponin IVa butyl ester; 14-chikusetsusaponin I; 15-cyasterone D; 16-oleanolic acid.

图2 供试品溶液、混合对照品溶液的HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatograms of test solution and mixed reference substance solution

表 3 特征值及方差贡献率

Table 3 Characteristic values and variance contribution

成分因子	特征值	rate	
		方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.460	31.856	31.856
2	2.193	15.663	47.519
3	1.376	9.827	57.346
4	1.177	8.404	65.750

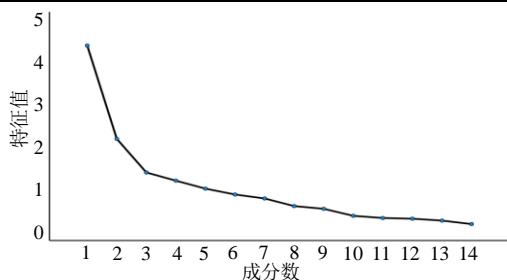


图 3 碎石图

Fig. 3 Gravel diagram

表 4 因子载荷矩阵

Table 4 Factor load matrix

峰号	载荷			
	1	2	3	4
1	-0.438	0.488	0.611	0.143
2	-0.363	0.355	-0.323	0.269
3	-0.460	0.481	-0.115	0.119
4	-0.444	0.582	-0.153	-0.143
5	-0.424	0.721	0.235	-0.138
6	0.516	0.150	0.587	0.274
7	0.351	-0.188	0.617	-0.151
8	0.654	-0.214	-0.066	0.410
9	0.612	0.268	-0.041	0.328
10	0.774	0.186	-0.024	-0.270
11	0.690	0.418	-0.091	0.256
12	0.797	0.388	-0.119	-0.122
13	0.656	0.420	-0.227	-0.010
14	0.463	0.162	0.004	-0.709

要差异成分为人参皂苷 Ro、姜状三七皂苷 R₁、齐墩果酸、金盏花皂苷 E、竹节参皂苷 I、竹节参皂苷 IVa 及竹节参皂苷 IVa 甲酯；牛膝酒炙前后的重要差异成分为人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 I、姜状三七皂苷 R₁、金盏花皂苷 E、 β -蜕皮甾酮、齐墩果酸及竹节参皂苷 IVa。上述差异成分满足可测性和溯源性原则，可作为牛膝潜在的 Q-Marker，用于饮片的质量控制。

2.3 网络药理学研究

2.3.1 牛膝“成分-靶点”和“疾病-靶点”预测 基

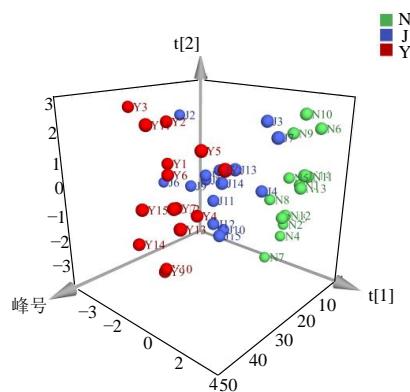


图 4 PCA 得分 3D 图

Fig. 4 3D map of PCA scores

于特征图谱指认的 14 个共有成分，及通过文献研究筛选出的杯苋甾酮^[14]、旌节花甾酮 D^[15]，共 16 种化学成分。首先通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库检索各成分对应的 SMILES 编号，将其导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库中进行潜在靶点信息匹配；针对在该数据库中未获取到靶点信息的成分，进一步借助中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP，<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 及 PharmMapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>) 数据库开展补充分析，获取对应的靶点蛋白及基因名称。最终，从 16 种成分中累计获得 131 个靶点蛋白，并构建“药物-成分-靶点”关系图 (图 8)。

以“knee osteoarthritis”为关键词在 Genecards (<https://genealacart.genecards.org/>) 数据库和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库搜索疾病相关基因靶点，获得的疾病靶点 417 个，采用“Venny 2.1 网站”绘制 Venn 图，得出共同的交集靶点基因 61 个，见图 9。将度 (degree) 值排名前 5 的 β -蜕皮甾酮、旌节花甾酮 D、竹节参皂苷 IVa 甲酯、齐墩果酸、人参皂苷 Ro 作为核心成分。

2.3.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建与核心靶点的筛选 将 23 个交集靶点删除重复值后导入到 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库中，设置 Organism 为“*homo sapiens*”后进行搜索，将基因数据取置信度 (score ≥ 0.4)，处理好的数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件中，利用软件自带的 Network Analysis 插件进行网络拓扑分析，见图 10。牛膝治疗 KOA 的靶标中度值前 6 的靶点为白蛋白 (ALB)、原癌基因 (JUN)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

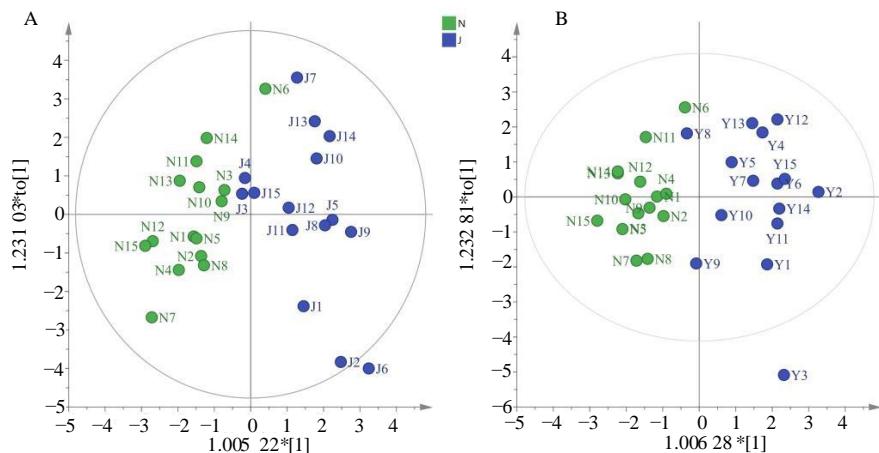


图5 牛膝与酒牛膝(A)、牛膝与盐牛膝(B) 对比 OPLS-DA 图

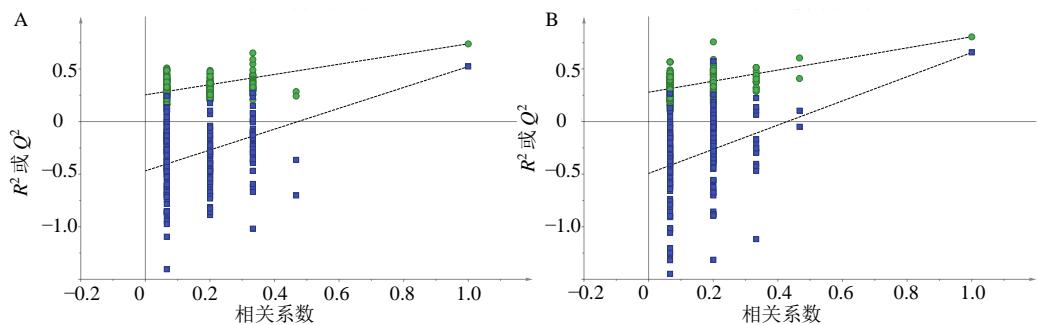
Fig. 5 Comparison of OPLS-DA diagrams of *A. bidentata* and wine processed *A. bidentata* (A), *A. bidentata* and salt processed *A. bidentata* (B)

图6 牛膝与酒牛膝(A)、牛膝与盐牛膝(B) OPLS-DA 模型的200次置换检验验证

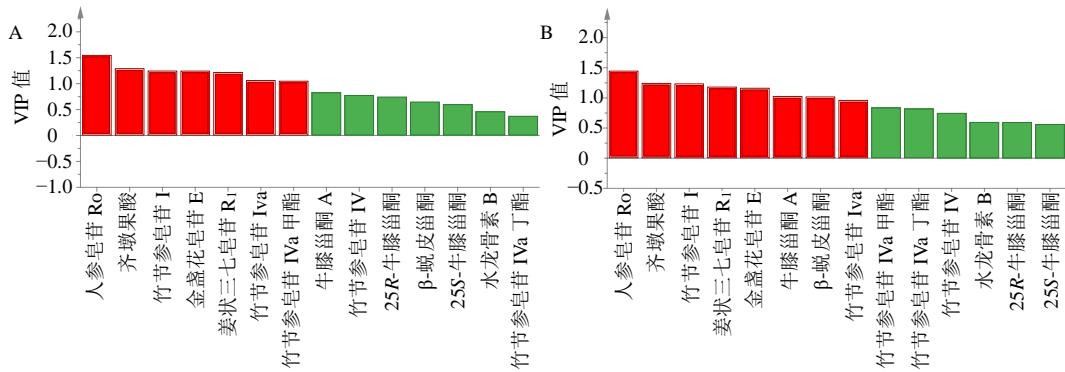
Fig. 6 Verification of OPLS-DA model by 200 permutation tests of *A. bidentata* and wine processed *A. bidentata* (A), *A. bidentata* and salt processed *A. bidentata* (B)

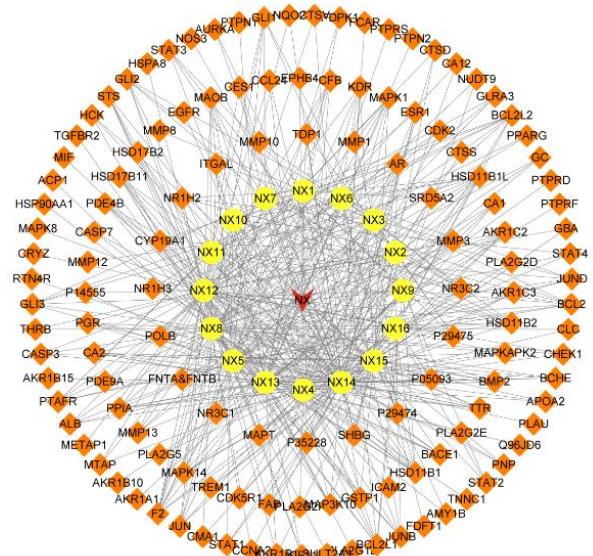
图7 牛膝与酒牛膝(A)、牛膝与盐牛膝(B) 共有峰的VIP图

Fig. 7 VIP chart of common peak of *A. bidentata* and wine processed *A. bidentata* (A), *A. bidentata* and salt processed *A. bidentata* (B)

(PPARG)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3 (CASP3)、雌激素受体 α 基因 (ESR1)、抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤因子-2 (BCL2) 为关键靶点。

2.3.3 基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百

科全书 (KEGG) 通路富集分析 使用 Metascape 网站 (<https://metascape.org>) 对核心靶点进行 GO 及 KEGG 通路富集分析, 设定物种和背景为人, 设定 $P \leq 0.05$, 结果显示, GO 分子功能, 一共得到 2570



NX1-牛膝甾酮 A; NX2-金盏花皂苷 E; NX3-水龙骨素 B; NX4-25R-牛膝甾酮; NX5-齐墩果酸; NX6-25S-牛膝甾酮; NX7-杯苋甾酮; NX8-旌节花甾酮 D; NX9-竹节参皂苷 IV; NX10-竹节参皂苷 Iva; NX11-姜状三七皂苷 R₁; NX12- β -蜕皮甾酮; NX13-人参皂苷 Ro; NX14-竹节参皂苷 IVa 甲酯; NX15-竹节参皂苷 IVa 丁酯; NX16-竹节参皂苷 I。

NX1-inokosterone A; NX2-calenduloside E; NX3-polypodine B; NX4-25R-inokosterone; NX5-oleanolic acid; NX6-25S-inokosterone; NX7-officinalis kuan; NX8- stachysterone D; NX9-chikusetsusaponin IV; NX10-chikusetsusaponin IVa methyl; NX11-zingibroside R₁; NX12- β -yecdysone; NX13-ginsenoside Ro; NX14-chikusetsusaponin IVa; NX15-chikusetsusaponin IVa butyl ester; NX16-chikusetsusaponin I.

图 8 “药物-成分-靶点” 网络

Fig. 8 “Drug-component-target” network

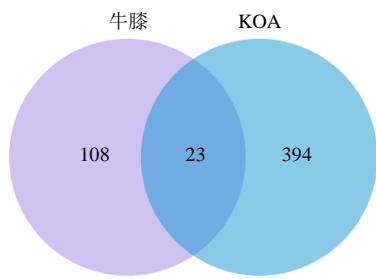


图9 “成分-疾病”靶点韦恩图

Fig. 9 Venn diagram of “component-disease” target

个富集分析结果，在 $P < 0.05$ 基础上选取生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 富集基因数目前 10，利用微生信平台进行数据可视化处理得到柱状图，见图 11。KEGG 通路富集分析，得到 185 条通路，筛选 $P < 0.01$ ，取显著性最大的 10 条通路，绘制气泡图，见图 11。其中关键靶点主要富集在癌症通路 (Pathways in cancer)、IL-17 信号通路 (IL-

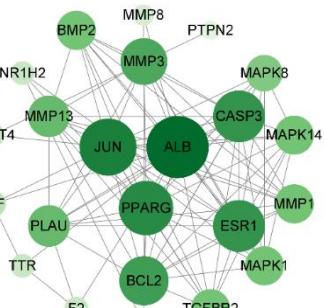


图 10 PPI 网络

Fig. 10 PPI network

17 signaling pathway)、前列腺癌 (Prostate cancer) 等通路。

2.3.4 药物-有效成分-靶点-疾病-通路网络构建
基于特征图谱分析与文献研究确定的 16 个成分，结合 23 个药物-疾病交集靶点及 KEGG 富集分析得到的前 10 条通路，导入 Cytoscape 3.8.2 软件中，构建牛膝及其炮制品主要差异成分的“药物-成分-靶点-疾病-通路”可视化网络（图 12）。可视化分析结果显示，基于特征图谱分析与文献研究确定的 16 个成分可通过协同调控不同靶点蛋白，作用于多条信号通路，发挥治疗 KOA 的作用。

2.3.5 核心活性成分与关键靶点的分子对接 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 获得 2D 结构, 使用 ChemDraw 20.0 软件转化为 mol2 格式的 3D 结构, 从 PDB 数据库 (<https://www.pdb.org/>) 获得配体蛋白, 运用 PyMOL、AutoDock 1.5.6 进行分子对接, 最终使用 Pymol 进行可视化。根据“活性成分-靶点-疾病”网络分析获得核心活性成分 β -蜕皮甾酮、旌节花甾酮 D、竹节参皂苷 IVa 甲酯、齐墩果酸、人参皂苷 Ro 与核心靶点 ALB、JUN、PPARG、CASP3、ESR1、BCL2 进行分子对接, 见表 5。分子对接结果显示, β -蜕皮甾酮、旌节花甾酮 D 分别与 JUN、PPARG、CASP3 对接, 齐墩果酸与 JUN 对接结合能均小于 $-29.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 显示有强烈的结合活性^[16]。用 Pymol 软件进行可视化分析, 见图 13。从分子对接的结果来看, 这些具有强烈结合活性的成分与靶点的相互作用为深入理解牛膝治疗 KOA 的作用机制提供了重要线索。 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro 等核心活性成分与 JUN、PPARG、CASP3 等关键靶点的紧密结合, 可能在调节细胞的增殖、凋亡、炎症反应等多个生物学过程中发挥关键作用。

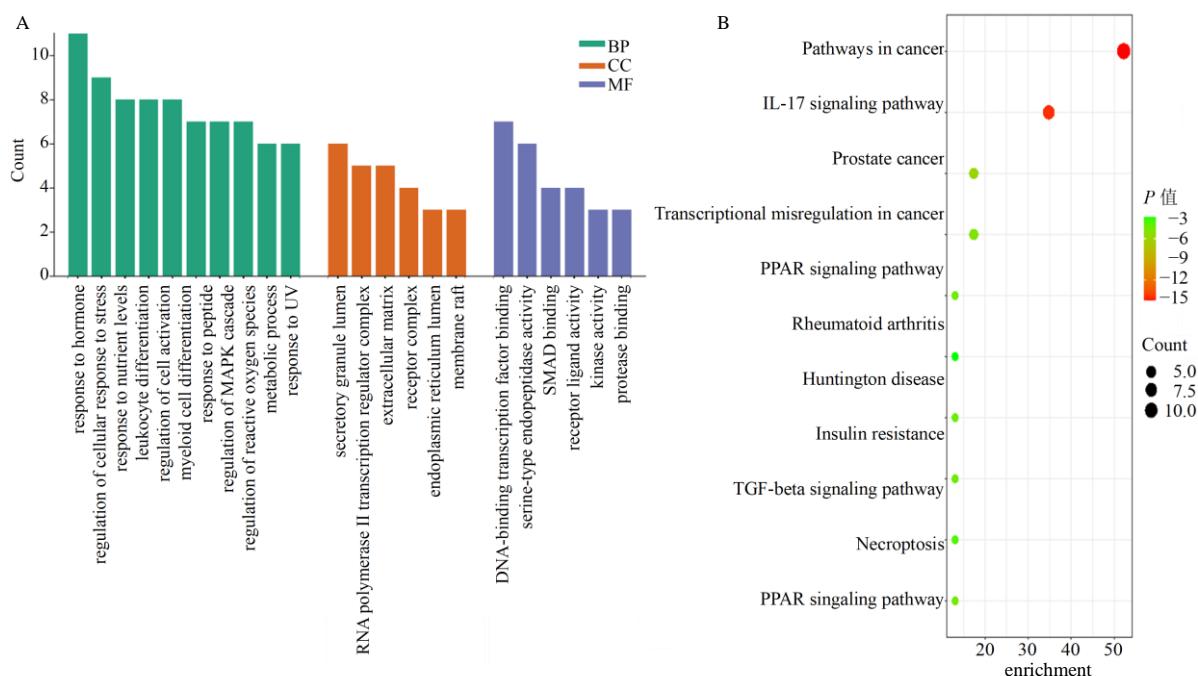
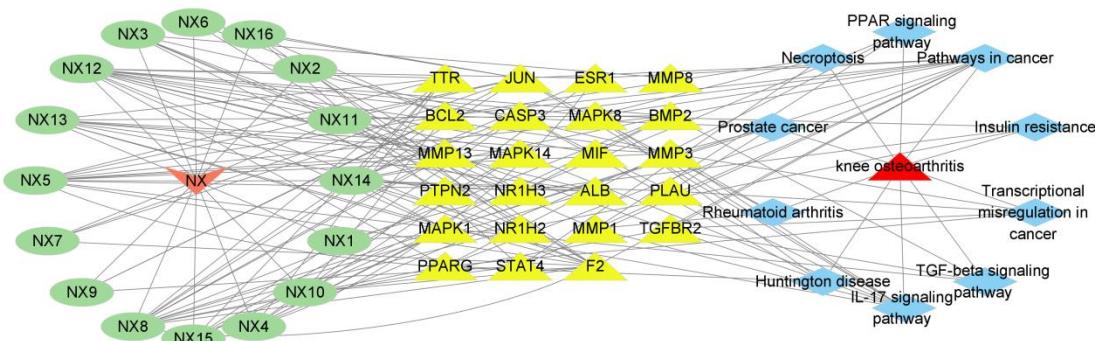


图 11 GO (A) 和 KEGG (B) 信号通路富集分析

Fig. 11 GO (A) and KEGG (B) signaling pathway enrichment analysis



NX1-牛膝甾酮 A; NX2-金盏花皂苷 E; NX3-水龙骨素 B; NX4-25R-牛膝甾酮; NX5-齐墩果酸; NX6-25S-牛膝甾酮; NX7-杯苋甾酮; NX8-旌节花甾酮 D; NX9-竹节参皂苷 IV; NX10-竹节参皂苷 Iva; NX11-姜状三七皂苷 R₁; NX12-β-蜕皮甾酮; NX13-人参皂苷 Ro; NX14-竹节参皂苷 IVa 甲酯; NX15-竹节参皂苷 IVa 丁酯; NX16-竹节参皂苷 I。

NX1-inokosterone A; NX2-calenduloside E; NX3-polypodine B; NX4-25R-inokosterone; NX5-oleanolic acid; NX6-25S-inokosterone; NX7-officinalis kuan; NX8- stachysterone D; NX9-chikusetsusaponin IV; NX10-chikusetsusaponin IVa methyl; NX11-zingibroside R₁; NX12-β-ecdysone; NX13-ginsenoside Ro; NX14-chikusetsusaponin IVa; NX15-chikusetsusaponin IVa butyl ester; NX16-chikusetsusaponin I.

图 12 药物-成分-靶点-疾病-通路图

Fig. 12 Drug-component-target-disease-pathway diagram

基于有效性分析结果, β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、齐墩果酸、旌节花甾酮 D、竹节参皂苷 IVa 甲酯可作为与牛膝抗 KOA 药效直接关联的潜在 Q-Marker。但旌节花甾酮 D 并非“2.2”项下指认的共有成分, 且对应峰面积极低, 不易检测。而竹节参皂苷 IVa 甲酯是竹节参皂苷的衍生物, 具体为竹节参皂苷 IVa 的甲基化修饰产物, 其结构对高温较敏感, 在炮制过程中可能发生水解或转化, 且前期预

测含量低于千分之一, 准确定量难度增加。两者虽然具有一定的生物活性, 但由于检测困难和不稳定性, 不符合 Q-Marker 筛选的可测性原则, 因此不被确定为潜在的 Q-Marker。

2.4 基于化学成分可测性的牛膝 Q-Marker 预测分析

牛膝提取物中含有多种有效成分, 张留记等^[17]采用 HPLC 法对 21 个产地怀牛膝中 β -蜕皮甾酮的

表 5 核心成分与靶点分子对接验证

Table 5 Verification of molecular docking between core components and target molecules

靶点名称	PDBID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
		β-蜕皮甾酮	旌节花甾酮 D	竹节参皂苷 IVa 甲酯	齐墩果酸	人参皂苷 Ro
ALB	2vuf(FUA)	-20.08	-23.43	-17.15	-20.92	-3.35
JUN	3u88(CHD)	-31.08	-32.22	-28.03	-30.54	-28.03
PPARG	5F9B(5VN)	-29.71	-34.73	-9.20	-26.36	-23.85
CASP3	7xN4(NAD)	-32.22	-38.49	-34.31	-24.69	-67.78
ESR1	7uj7(nyU)	-20.08	-22.18	-18.83	-21.34	-18.41
BCL2	4x86(CPS)	-23.01	-27.20	-24.27	-27.20	-18.83

JUN-β-蜕皮甾酮

JUN-旌节花甾酮 D

PPARG-β-蜕皮甾酮

PPARG-旌节花甾酮 D

CASP3-β-蜕皮甾酮

CASP3-旌节花甾酮 D

JUN-齐墩果酸

图 13 分子对接可视化结果

Fig. 13 Visualization results of molecular docking

含量进行测定,结果显示道地产区怀牛膝的 β -蜕皮甾酮含量显著高于非道地产区,综合品质更优;同时发现该成分在牛膝种子和根部均有分布,表明其在牛膝中分布广泛且具有代表性。屠万倩等^[18]建立牛膝中甾酮类和三萜皂苷类成分的含量测定方法,比较牛膝及其炮制品牛膝段和酒牛膝中甾酮类和皂苷类成分含量的变化,发现酒炙后, β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮的含量略有增加,竹节参皂苷 IVa 和人参皂苷 Ro 的含量则明显增加,此研究方法可准确测定这几种甾酮和皂苷的含量。李建鹏等^[19]基于超高效液相色谱-三重四极杆线性离子阱串联质谱 (UHPLC-Q-Trap-MS/MS) 对怀牛膝中 β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、齐墩果酸-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷等 8 种成分进行了含量测定。李金洋

等^[20]通过紫外分光光度计和 HPLC 测量不同规格牛膝在不同储藏包装条件下的色度值和指标性成分 β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、齐墩果酸及水分的含量,借助灰色关联分析色度与各指标性成分之间的相关性,探究牛膝药材储藏的最优条件。付国辉等^[21]采用 HPLC 法对牛膝中齐墩果酸含量进行测定,来评价牛膝药材的质量。综上所述,文献调研已证实, β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro 及齐墩果酸可实现准确定量,佐证了上述成分的可测定性。同时,本研究构建的特征图谱显示,上述成分均达到基线分离。为进一步明确牛膝的 Q-Marker,后续研究将聚焦于构建更高效的多成分同步测定方法,通过分析不同产地牛膝药材及不同炮制规格样品,明确可测定成分的含量波动规律,从而为牛膝 Q-Marker 的筛选提供更全面的数据支撑。此外,

还将结合细胞实验、动物实验等生物活性评价手段,深入探究可测定成分与牛膝药效的内在关联,从药效学层面验证其作为 Q-Marker 的科学性与合理性。以期通过上述研究,逐步完善基于化学成分可测性的牛膝 Q-Marker 预测分析体系,为牛膝药材的质量控制与评价提供科学可靠的方法学依据。

3 讨论

基于刘昌孝院士提出 Q-Marker 理论^[22],本研究通过 HPLC 特征图谱可有效、多层次地反映牛膝盐炙、酒炙前后的化学成分变化差异,结合网络药理学关联“药物-成分-靶标-疾病-通路”明确成分与药理之间的互动关系,进一步采用分子对接和文献研究可测性对其关联性进行可视化和成分变化分析。

基于 Q-Marker “五原则”要求,首先围绕溯源性与可测性核心原则,系统构建牛膝、酒牛膝、盐牛膝各 15 批样品的特征图谱。经与对照品比对分析,成功指认 14 个共有峰;后续借助化学计量学方法筛选获得 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、姜状三七皂苷 R₁、齐墩果酸、金盏花皂苷 E、竹节参皂苷 I、竹节参皂苷 IVa 及竹节参皂苷 IVa 甲酯 8 种差异化合物,可作为区分牛膝不同炮制品的候选差异活性成分。网络药理学分析结果进一步证实, β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、齐墩果酸可作为与牛膝抗 KOA 药效直接关联的潜在 Q-Marker;且该 3 种成分均已被证实可在血清或血浆中检测到原型或代谢产物^[23-24],符合 Q-Marker 的传递性与溯源性原则。

通过检索 TCMSP 发现, β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、齐墩果酸分别存在于 6、8、94 种中药中。除齐墩果酸外,其余 2 种成分在其他中药中的分布较为稀少,符合 Q-Marker 的特有性原则;但网络药理学分析结果表明,齐墩果酸可通过多途径、多靶点协同发挥抗 KOA 作用,且其在不同牛膝炮制品中是存在显著差异,综合权衡溯源性、可测性、传递性及有效性等核心要素,仍将其纳入差异活性成分的辨识范畴。

本研究以抗 KOA 作用为核心导向,联合网络药理学与文献调研分析证实,该 3 种成分涵盖甾体类、皂苷类 2 类核心活性化合物,可通过协同作用调控多条靶点通路,契合中药多成分协同增效的配伍精髓,进而满足 Q-Marker 的配伍合理性原则要求。

中药炮制导致药效改变的核心内涵,在于其物质基础的改变^[25]。中药化学成分是阐明药效物质、

药理作用、炮制机制及临床疗效的重要基础^[26]。对牛膝、盐牛膝及酒牛膝的特征图谱研究及化学计量学分析筛选出的差异性成分可能与炮制温度、时间及辅料密切相关^[27]。中药炮制常伴随高温加热过程,高温虽可能导致部分成分损失与转化,却也可能增强药效。牛膝在临幊上素有“生熟异用”之说,自明代《本草纲目》至清代《本草便读》等多部本草古籍,均明确记载其“生者破血行瘀,盐炒酒蒸后则强筋健骨”,可用于治疗“寒湿痿痹”“筋骨痿软”;现代药理学研究亦证实,酒炙牛膝可增强活血化瘀功效^[28],盐炙牛膝则能强化补肝肾、强筋骨作用^[29-30],而这种功效差异与其内在化学成分的转化密切相关。本研究结果显示,从特征图谱共有峰指认、相似度评价、化学计量学分析和 VIP 值筛选的系统分析中,充分证明 β -蜕皮甾酮与人参皂苷 Ro 在不同炮制规格牛膝中的差异显著,推测二者可能是牛膝不同炮制品功效差异的关键物质基础。

已有研究表明,牛膝总皂苷可调控 KOA 软骨细胞的增殖与凋亡,并干预炎症因子白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的表达;且不同浓度的牛膝总皂苷在调控细胞增殖与凋亡过程中起到重要作用^[31]。其中,代表性成分人参皂苷 Ro 具有抗炎、抗病毒及免疫调节等药理活性^[32];牛膝中的甾酮类物质同样具有抗炎镇痛功效^[33],如蜕皮甾酮可通过上调 Ras (Ras 蛋白)-Raf (Raf 激酶)-ERK (细胞外信号调节激酶) 信号通路,加速辐射诱导的口腔黏膜炎大鼠模型的愈合^[34],进而发挥抗炎镇痛作用。此外,齐墩果酸可通过减少氧化应激,缓解骨关节炎引发的肌肉功能障碍^[35]。结合牛膝补肝肾、强筋骨的传统功效可见,上述 2 类有效成分与其药理作用存在密切关联。

通过 PPI 网络拓扑图的分析,筛选出 ALB、JUN、PPARG、CASP3、ESR1、BCL2 共 6 个牛膝治疗 KOA 的关键靶点;进一步分子对接结果显示, JUN、PPARG、CASP3 靶点具有较强的结合活性,其作用机制主要涉及免疫调节、炎症反应及细胞凋亡等相关通路^[36]。其中, JUN 可与其他转录因子 B 细胞转录激活因子 (BATF) 形成复合体,对软骨细胞基质形成起负向调控作用,同时正向调控软骨细胞基质降解相关酶的表达,加速软骨降解并加重 KOA 病程^[37]。研究证实^[38], PPARG 可通过阻滞肿瘤凋亡、侵袭及迁移等通路,在抗肿瘤过程中发挥重要作用。CASP3 作为调控凋亡进程的核心因子,

可调节内、外源性凋亡通路，在疾病防治中通常需抑制其表达以减少软骨细胞凋亡^[39]。KEGG 富集分析显示，有效成分对应的靶点主要富集于癌症通路、IL-17 信号通路、前列腺癌转录失调等通路，这些通路贯穿 KOA 炎症反应及软骨细胞凋亡的全过程。IL-17 通路作为关键信号通路，可通过加剧炎症反应促进软骨细胞降解，导致骨关节炎患者血清及滑液中 IL-17 水平升高，且该水平与病变 X 线影像所示严重程度呈正相关^[40-42]；同时，IL-17 可抑制软骨细胞合成蛋白多糖，进而诱导基质金属蛋白酶（MMPs）家族酶的产生。此外，IL-17 还可通过影响其他细胞因子及化合物的分泌，调控骨关节炎病程进展^[43]。

综上，牛膝中的 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro、齐墩果酸 3 种有效成分，既与网络药理学预测的疾病靶点通路密切相关，也与其强筋健骨的传统功效高度契合；进一步分子对接结果亦证实，这 3 种有效成分具有较强的靶点结合活性，可作为牛膝治疗 KOA 的潜在 Q-Marker，为牛膝的质量评价研究提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [S]. Volume I. 2020
- [2] 李思懿, 张凤玲, 王晓倩. 牛膝炮制方法的历史沿革与现代研究 [J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(3): 19-22. Li S Y, Zhang F L, Wang X Q. Historical evolution and modern research on processing methods of *Achyranthes bidentata* [J]. *J Tradit Chin Med Manag*, 2022, 30(3): 19-22.
- [3] 刘萌, 王胜超, 曾梦楠, 等. 网络药理学辅助探究牛膝及其不同炮制品对肾病综合征大鼠的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(4): 492-502. Liu M, Wang S C, Zeng M N, et al. *Achyranthes bidentata* different processed products on rats with nephrotic syndrome [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, 33(4): 492-502.
- [4] 张慧芳, 王勤俭. 筋骨消痛丸外敷联合膝关节脉冲射频治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎 50 例 [J]. 河南中医, 2025, 45(5): 744-748. Zhang H F, Wang Q J. Fifty cases of liver and kidney deficiency type knee osteoarthritis treated with jinggu Xiaotong Pills combined with knee joint pulsed
- [5] LE Thi Quynh, 蔡永刚, 任花梅, 等. 基于血管再生机制探讨中西医治疗膝骨关节炎 [J]. 河南中医, 2025, 45(5): 788-795. Quynh L T, Cai Y G, Ren H M, et al. Exploring the mechanisms of angiogenesis in integrated traditional Chinese and western medicine treatment for knee osteoarthritis [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2025, 45(5): 788-795.
- [6] 刘春红, 吴斌. 中医治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(9): 73-76. Liu C H, Wu B. Research progress of Chinese medicine in the treatment of knee osteoarthritis [J]. *Rheum Arthritis*, 2021, 10(9): 73-76.
- [7] 马勇. 膝骨关节炎的辨证分型和中草药治疗:《膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)》解读 [J]. 中医正骨, 2021, 33(9): 1-2, 14. Ma Y. Syndrome differentiation classification and Chinese herbal medicine therapies of knee osteoarthritis [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2021, 33(9): 1-2, 14.
- [8] 潘建科, 洪坤豪, 刘军, 等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类的膝骨关节炎用药规律研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 201-204. Pan J K, Hong K H, Liu J, et al. Analysis on medication rule in herbal prescriptions for knee osteoarthritis based on apriori and clustering algorithm [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2015, 21(12): 201-204.
- [9] 王蕾, 曹雪晓, 栗焕焕, 等. 中药化学成分的分子识别与自组装在中药研究中的应用 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 516-521. Wang L, Cao X X, Li H H, et al. Application of molecular recognition and self-assembly of chemical components in study of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(2): 516-521.
- [10] 李丹, 李爱平, 李科, 等. 液质联用技术在中药化学成分定性分析中的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 2112-2119. Li D, Li A P, Li K, et al. Research progress on qualitative analysis of chemical composition of traditional Chinese medicine by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(10): 2112-2119.
- [11] 朱岩, 戚进, 余伯阳. “谱效整合指纹图谱技术”在中药物质基础方面的研究进展及思考 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(8): 1702-1708. Zhu Y, Qi J, Yu B Y. Research progress and thinking of “effect-spectrum integrated fingerprint technology” in the material basis of traditional Chinese medicine [J]. *Mod*

- Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(8): 1702-1708.
- [12] 韩晴雯, 周斌, 李玉平, 等. HPLC 指纹图谱技术结合模式识别分析评价参莲胶囊的质量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1300-1308.
- Han Q W, Zhou B, Li Y P, et al. Quality evaluation of Shenlian Capsules by HPLC fingerprint and pattern recognition [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(7): 1300-1308.
- [13] 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.
- [14] Liu J, Xu J, Zhao X J, et al. A new heterocyclic compound from *Cyathula officinalis* Kuan [J]. Chin Chem Lett, 2010, 21(1): 70-72.
- [15] 孟大利, 侯柏玲, 汪毅, 等. 中药牛膝中的植物甾酮类成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(9): 562-564, 576.
- Meng D L, Hou B L, Wang Y, et al. Phytosterone constituents from *Achyranthese bidentata* Bl. [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2006, 23(9): 562-564, 576.
- [16] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83922.
- [17] 张留记, 孙丹丹, 屠万倩, 等. 不同产地怀牛膝 β -蜕皮甾酮含量测定及指纹图谱研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4): 500-505, 510.
- Zhang L J, Sun D D, Tu W Q, et al. Study on determination of β -ecdysterone and fingerprints of *Achyranthes bidentata* bl. from different areas [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(4): 500-505, 510.
- [18] 屠万倩, 张留记, 刘晓苗, 等. 牛膝及其炮制品中甾酮类和皂苷类成分的含量比较 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 89-93.
- Tu W Q, Zhang L J, Liu X M, et al. Comparative study of sterones and triterpenoid glycosides contents in raw and processed *Achyranthis bidentatae Radix* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(1): 89-93.
- [19] 李建朋, 王彦志, 李曼倩, 等. 基于 UHPLC-Q-Trap-MS/MS 对牛膝 8 种成分的定量研究 [J]. 中药材, 2021, 44(6): 1435-1440.
- Li J P, Wang Y Z, Li M Q, et al. Quantitative study on eight components of *Achyranthes bidentata* based on UHPLC-Q-Trap-MS/MS [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(6): 1435-1440.
- [20] 李金洋, 胡婷婷, 李静, 等. 基于颜色-成分关联分析不同规格牛膝储藏过程中质量变化的规律研究 [J]. 山西中医药大学学报, 2024, 25(9): 992-1004.
- Li J Y, Hu T T, Li J, et al. Research of regularity on the quality change of different specifications of Niuxi during storage based on color-component correlation analysis [J]. J Shanxi Univ Chin Med, 2024, 25(9): 992-1004.
- [21] 付国辉, 黄丽杰. 不同商品等级牛膝中齐墩果酸的含量测定 [J]. 河南医学高等专科学校学报, 2018, 30(5): 510-513.
- Fu G H, Huang L J. Content determination on oleanolic acid in different grade of *Achyranthes bidentata* Bl [J]. J Henan Med Coll Staff Work, 2018, 30(5): 510-513.
- [22] 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 Drugs, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [23] 谢耀慧, 李昕蓉, 何军刚, 等. 四妙丸的化学成分、药理作用和临床应用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(5): 109-118, I0027.
- Xie Y H, Li X R, He J G, et al. Research progress on chemical composition, pharmacological action and clinical application of Simiao pill (四妙丸) and predictive analysis of quality Marker [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025, 43(5): 109-118, I0027.
- [24] 王佳. 人参中齐墩果酸型人参皂苷 Ro 的制备及大鼠体内代谢研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- Wang J. Preparation and metabolism in rats of ginsenosides Ro of oleanolic acid type in ginseng [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015.
- [25] 杨冰, 祝丹丹, 于欣茗, 等. 新世纪 20 年: 守正创新背景下创新炮制技术探索与实践 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 357-365.
- Yang B, Zhu D D, Yu X M, et al. Twenty years of new century: Exploration and practice of innovative processing technology under background of uphold fundamental principles and break new ground [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(2): 357-365.
- [26] 屠鹏飞, 史社坡, 姜勇. 中药物质基础研究思路与方法 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 209-215.
- Tu P F, Shi S P, Jiang Y. Strategies and approaches on exploring material basis of Chinese materia Medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(2): 209-215.
- [27] 施崇精, 宋英, 石征蓉, 等. 基于“火力火候”探讨川牛

- 膝工业化酒炙工艺量变关系及标准化研究 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4839-4848.
- Shi C J, Song Y, Shi Z R, et al. Exploring quantitative relationship and standardization research of wine stir-fry industrial technology of *Cyathulae Radix* based on “fire heat” [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 4839-4848.
- [28] 李军鸽, 王永春, 赵莹, 等. 温经汤中牛膝的酒炙工艺及炮制前后药效学对比研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 18-24.
- Li J G, Wang Y C, Zhao Y, et al. Comparative study of stir-frying with wine process and pharmacodynamics before and after processing of *Achyranthis bidentatae Radix* in Wenjing decoction [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(1): 18-24.
- [29] 陶益, 杜映姗, 黄苏润, 等. 牛膝不同炮制品中化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 1-5.
- Tao Y, Du Y S, Huang S R, et al. Analysis of chemical constituents in different processed products of *Achyranthis bidentatae Radix* by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form 2017, 23(12): 1-5.
- [30] 田瀚举, 杨颜溶, 贾豪, 等. 基于红外光谱结合机器学习方法的牛膝不同炮制品及炮制程度的判别分析 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7387-7401.
- Tian H J, Yang Y R, Jia H, et al. Discrimination analysis of different processed products and processing degree of *Achyranthis bidentatae Radix* based on infrared spectroscopy combined with machine learning methods [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7387-7401.
- [31] 陈浩雄, 徐启良, 黄竞杰, 等. 牛膝总皂苷体外干预膝关节炎软骨细胞增殖与凋亡的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(22): 2400-2404.
- Chen H X, Xu Q L, Huang J J, et al. Effects of total saponins of *Achyranthes bidentata* on proliferation and apoptosis of chondrocytes in vitro [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(22): 2400-2404.
- [32] 周晓伟, 张铭予, 董斌, 等. 基于正交试验的人参抗小鼠 Lewis 肺癌细胞增殖作用的研究 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(7): 563-570.
- Zhou X W, Zhang M Y, Dong B, et al. Inhibitory effect of *Panax ginseng* on proliferation of lewis lung cancer cells with chemical fingerprints and orthogonal experimental design [J]. Chin Pharm J, 2019, 54(7): 563-570.
- [33] 罗懿钒, 欧阳文, 唐代凤, 等. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2122-2136.
- Luo Y F, Ouyang W, Tang D F, et al. Research progress of material basis and pharmacological effects of saponins and sterones in *Achyranthes* [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(12): 2122-2136.
- [34] Yang L, Hui A L, Pan J. Ecdysterone accelerates healing of radiation-induced oral mucositis in rats by increasing matrix cell proliferation [J]. Radiat Res, 2019, 191(3): 237-244.
- [35] 马天文, 吕良钰, 于跃, 等. 齐墩果酸抑制骨关节炎大鼠肌肉氧化损伤及软骨下骨异常骨重建 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(11): 4081-4088.
- Ma T W, Lü L Y, Yu Y, et al. Oleanolic acid inhibits muscle oxidative damage and abnormal subchondral bone remodeling in osteoarthritis rats [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2022, 53(11): 4081-4088.
- [36] Li L L, Huang H L. Potential targets and molecular mechanism of quercetin against knee osteoarthritis [J]. Chin Med Nat Prod, 2022, 2(1): 32-43.
- [37] Chen H T, Ni Q B, Li B, et al. Identification of differentially expressed genes in synovial tissue of osteoarthritis based on a more robust integrative analysis method [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(9): 3745-3754.
- [38] Elix C, Pal S K, Jones J O. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in prostate cancer [J]. Asian J Androl, 2018, 20(3): 238-243.
- [39] Hua L, Wang F Q, Du H W, et al. Upregulation of caspase-3 by high glucose in chondrocyte involves the cytoskeleton aggregation [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 5925-5932.
- [40] Chen B, Deng Y, Tan Y, et al. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations [J]. J Int Med Res, 2014, 42(1): 138-144.
- [41] 姚力僕, 唐洁, 郑洁, 等. 血清相关炎症因子表达水平与老年膝关节骨性关节炎病情严重程度的相关性 [J]. 西部医学, 2021, 33(1): 144-147.
- Yao L Y, Tang J, Zheng J, et al. Analysis of correlation between expression levels of serum IL-17, TNF- α , TGF- β 1 and TIMP-1 and disease severity of elderly knee osteoarthritis [J]. Med J West China, 2021, 33(1): 144-147.
- [42] Han L, Lee H S, Yoon J H, et al. Association of IL-17A and IL-17F single nucleotide polymorphisms with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population [J]. Gene, 2014, 533(1): 119-122.
- [43] Wang K, Xu J H, Cai J Y, et al. Serum levels of resistin and interleukin-17 are associated with increased cartilage defects and bone marrow lesions in patients with knee osteoarthritis [J]. Mod Rheumatol, 2017, 27(2): 339-344.