

## 基于神经网络分析的疏风解毒胶囊抗炎作用谱效关系研究

韩彦琪<sup>1,2</sup>, 曹勇<sup>3#</sup>, 董亚楠<sup>4</sup>, 李翔宇<sup>4</sup>, 武琦<sup>5</sup>, 许浚<sup>1,2</sup>, 龚苏晓<sup>1,2</sup>, 张洪兵<sup>1,2</sup>, 翟永林<sup>3</sup>, 张铁军<sup>1,2\*</sup>, 刘昌孝<sup>2,6\*</sup>

1. 天津药物研究院, 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300193
2. 天津药物研究院, 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300193
3. 银川市中医医院, 宁夏 银川 750001
4. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800
5. 天津医科大学, 天津 300070
6. 天津药物研究院新药评价中心, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

**摘要:** **目的** 构建疏风解毒胶囊抗炎作用谱效关系网络模型, 探究其发挥抗炎作用的潜在物质基础。**方法** 在建立疏风解毒胶囊不同配比样品指纹图谱分析方法的基础上, 采用均匀设计法对疏风解毒胶囊中 8 味药材随机采样得到不同配比组, 测定各配比样品对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞释放肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL-6) 的抑制率, 将药效信息与各样品 MS 指纹图谱化学信息用 BP 人工神经网络分析得出各色谱峰对抗炎活性的影响程度, 建立谱效关系。**结果** 通过建立的最佳神经网络模型, 计算得到 14 个特征峰与疏风解毒胶囊抗炎活性显著相关。**结论** 通过谱效研究, 推测疏风解毒胶囊发挥抗炎作用的药效物质基础可能为包括大黄酸、大黄素、马鞭草苷、毛蕊花糖苷、松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷、连翘酯苷 A、虎杖苷等在内的 14 个化合物。

**关键词:** 疏风解毒胶囊; 谱效关系; 抗炎; 液相色谱-质谱联用; 神经网络分析; 大黄酸; 大黄素; 马鞭草苷; 毛蕊花糖苷; 松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 连翘酯苷 A; 虎杖苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3526-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.002

## Spectrum-effect relationship of anti-inflammatory activity of Shufeng Jiedu Capsule based on neural network analysis

HAN Yan-qi<sup>1,2</sup>, CAO Yong<sup>3</sup>, DONG Ya-nan<sup>4</sup>, LI Xiang-yu<sup>4</sup>, WU Qi<sup>5</sup>, XU Jun<sup>1,2</sup>, GONG Su-xiao<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-bing<sup>1,2</sup>, ZHAI Yong-lin<sup>3</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>1,2</sup>, LIU Chang-xiao<sup>2,6</sup>

1. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
3. Yinchuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750001, China
4. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China
5. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
6. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Center for New Drug Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To establish the spectrum-effect relationship network model of Shufeng Jiedu Capsule (SJC) for anti-inflammatory activity and explore potential effective compounds of its anti-inflammatory effects. **Methods** On the basis of the establishment of fingerprint analysis method for SJC, the uniform design method was used to divide eight herbs in SJC into groups

收稿日期: 2019-03-15

基金项目: 国家中药标准化专项资助项目 (ZYBZH-C-AH-02); 国家自然科学基金资助项目 (81430096); 国家自然科学基金资助项目 (81703802)

作者简介: 韩彦琪, 女, 助理研究员。Tel: (022)23003935 E-mail: hanyq@tjipr.com

\*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

刘昌孝 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjipr.com

#并列第一作者 曹勇, 男, 副研究员。E-mail: caoyong20021226@163.com

of different proportions to determine their inhibition ratios of TNF- $\alpha$  and IL-6 released by LPS-induced RAW264.7 cells. Pharmacodynamic data and chemical information of MS fingerprints of each group were analyzed with the BP artificial neural network to get the anti-inflammatory effect of each peak to establish the chromatography-efficacy relationship. **Results** According to the optimal neural network model, 14 characteristic peaks were calculated and found to be significantly correlated with the anti-inflammatory activity of SJC. **Conclusion** Through the spectrum-effect study, it is speculated that the anti-inflammatory components of SJC may be the 14 compounds including rhein, emodin, verbenaol, verbascoside, pinoselinol- $\beta$ -D-glucoside, forsythoside A, polydatin, etc., which provides a reference for the quality control and determination of effective components.

**Key words:** Shufeng Jiedu Capsule; spectrum-effect analysis; anti-inflammation; LC-MS; neural network analysis; rhein; emodin; verbenaol; verbascoside; pinoselinol- $\beta$ -D-glucoside; forsythoside A; polydatin

中药复方化学成分复杂, 这些复杂的化学成分之间相互配伍, 从而发挥中药复方的治疗效果, 因此研究中药复方的化学成分与药效之间的关系就显得尤为重要<sup>[1]</sup>。近年来, 中药谱效关系研究快速发展, 它将中药指纹图谱和药效学通过化学计量学模型进行关联, 建立了以化学分析与生物活性评价相结合的综合评价体系, 为揭示中药方剂中的药效物质基础和配伍规律提供了有效手段<sup>[2]</sup>。本实验在建立疏风解毒胶囊不同配比样品 LC-MS 分析方法的基础上, 通过均匀设计方法对疏风解毒胶囊中 8 味药材(虎杖、连翘、板蓝根、柴胡、败酱草、马鞭草、芦根、甘草)随机采样成不同比例组后提取, 并进行体外抗炎活性实验研究, 采用综合评分法对 2 个考察指标进一步数学处理, 使其更科学化, 最后利用 Matlab 编程, 采用人工神经网络算法对药效学信息与各组 MS 指纹谱化学信息进行相关性分析, 得出与抗炎活性密切相关的化学成分, 初步阐释疏风解毒胶囊的潜在抗炎药效物质基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

酶标仪(德国 Berthold 公司); Acquity UPLC、Premier 质谱仪(美国 Waters 公司); 超净工作台(苏州净化设备有限公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、倒置显微镜(日本 Olympus 公司); AB204-N 电子天平(德国 Mettler 公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海之信仪器有限公司); 离心机(德国 Hettich 公司)。

### 1.2 试剂与药材

小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、小鼠白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒(上海西塘生物科技有限公司); 地塞米松、脂多糖 (LPS)、DMSO (美国 Sigma 公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清、双抗(美国 Gibco 公司); 乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

虎杖、连翘、板蓝根、马鞭草、败酱草、柴胡、

芦根、甘草由安徽济人药业有限公司提供, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定, 各药材均符合《中国药典》2015 年版相关标准, 相关药材保存于天津药物研究院中药和健康产品研究中心药材库。

### 1.3 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 用 DMEM 高糖完全培养基(含 1% 双抗和 20% 胎牛血清)培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试样品制备

均匀设计法(uniform design, UD)是只考虑试验点在试验范围内均匀散布的一种试验设计方法, 不带有随机性且实验水平数较多, 能探索较大的剂量范围<sup>[3]</sup>。采用 DPS 软件对药材进行 8 因素 21 水平均匀设计, 各药材按处方最大量 2 倍设计: 虎杖 0~900 g, 板蓝根、连翘、柴胡、败酱草、马鞭草 0~720 g, 芦根 0~540 g, 甘草 0~360 g, N0 号按处方原配比设计, 结果见表 1。

根据均匀设计表的配比, 按照疏风解毒胶囊原制备工艺, 制得 22 个样品的冻干粉, 取双份精密称定后, 其中 1 份加入 70% 乙醇配制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 离心取上清, 即得 LC-MS 实验的供试品溶液。另 1 份加 DMSO 制备成 200 mg/mL 的储备液(于-20 °C 保存), 用于细胞实验。

### 2.2 样品 LC-MS 分析

色谱条件: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m), 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸超纯水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~2 min, 2% A; 2~6 min, 2%~12% A; 6~15 min, 12% A; 15~20 min, 12%~20% A; 20~37 min, 20%~50% A; 37~40 min, 50%~100% A; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 样品室温度 25 °C; 进样量 10  $\mu$ L。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); V 模式; 毛细管电

表 1 均匀设计结果

Table 1 Results of uniform design

样品	用量/g								样品	用量/g							
	虎杖	板蓝根	连翘	柴胡	败酱草	马鞭草	芦根	甘草		虎杖	板蓝根	连翘	柴胡	败酱草	马鞭草	芦根	甘草
N0	450	360	360	360	360	360	270	180	N11	180	216	0	252	648	288	81	198
N1	675	288	324	648	684	72	378	72	N12	315	720	432	288	612	504	297	0
N2	855	432	180	72	396	144	135	36	N13	630	612	360	180	36	612	108	270
N3	495	36	72	144	504	540	405	108	N14	45	108	612	108	324	108	324	252
N4	900	180	648	432	576	684	243	216	N15	450	648	576	576	468	36	54	162
N5	585	144	468	468	0	324	486	18	N16	90	576	216	396	540	180	513	288
N6	810	684	36	612	144	396	351	234	N17	360	324	288	0	216	720	540	180
N7	0	504	144	540	288	648	216	90	N18	765	540	720	216	252	252	459	126
N8	225	396	540	684	432	576	432	324	N19	720	72	252	504	360	468	0	306
N9	540	468	504	36	720	360	189	342	N20	135	360	684	360	108	432	27	54
N10	405	252	108	324	72	0	270	360	N21	270	0	396	720	180	216	162	144

压 3.0 kV (正离子模式) / 2.5 kV (负离子模式), 锥孔电压 30 V; 离子源温度 110 °C; 脱溶剂气温度 350 °C; 脱溶剂氮气体积流量 600 L/h; 锥孔气体积流量 50 L/h; 检测器电压 1 900 V (正离子模式) / 2 000 V (负离子模式); 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; 质量数检测范围  $m/z$  100~1 500; 内参校准液采用亮氨酸脑啡肽醋酸盐 ( $[M+H]^+ = 555.293$  1,  $[M-H]^- = 553.277$  5)。

为了获得良好的谱图效果, 本研究对 LC-MS 检测条件进行了优化, 包括进样量选择、流动相梯度考察等, 最终确定了以上实验条件。取 N0 样品进行了方法学考察, 结果表明, 精密度试验 ( $n=6$ )、稳定性试验 (24 h 内,  $n=6$ )、重复性试验 ( $n=6$ ) 均良好, RSD 均不超过 5%, 表明检测方法可行。

通过 UPLC-Q/TOF MS 分析, 得到了 N0~N21 号样品的正、负离子模式 BPI 图(图 1)。采用 Waters 公司的 MassLynx 4.1 软件中 Markerlynx 模块进行色谱峰自动识别和峰匹配, 将 22 个样品质谱信息导入 Markerlynx 进行主成分分析 (PCA) 得到 Score 图和 Loading 图 (图 2), 通过 Score 图可以看出 22 个样品的分散度较大, 说明样品间差异较大。分析 Loading 图和 Marker 数据表选取了贡献 (significance) 值较大的 44 个 marker 色谱峰进行整合, 建立 22 个样品的 LC-MS 谱库。

### 2.3 体外药效实验研究

取生长至 80%~90% 的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  个均匀接种于 96 孔板, 于 37.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜后吸去上清, 按实验分组, 每组设 6 个复孔, 对照组 (C) 每孔加

入 100 μL 含 2% 血清的 DMEM, 模型组 (M) 加入 100 μL 终质量浓度为 0.1 μg/mL 的 LPS, 阳性药组 (D) 加入 100 μL 终浓度为 0.1 mmol/L 地塞米松和 0.1 μg/mL 的 LPS 混合溶液, N0~N21 给药组中每孔加入 100 μL 终质量浓度为 500 μg/mL 的供试样品及 0.1 μg/mL 的 LPS 混合溶液。各组细胞处理后, 置于 37.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 收集细胞上清液, 用酶联免疫吸附试剂盒进行 TNF-α、IL-6 的含量测定 (结果见图 3、4)。从结果可以看出, 不同配比的疏风解毒样品对炎症因子的抑制效果有较明显的差异。

### 2.4 综合指标的计算

TNF-α、IL-6 是活化的单核、巨噬细胞产生的炎症细胞因子, 在众多炎症细胞因子中, 起主要作用。TNF-α 是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质, 能激活中性粒细胞和淋巴细胞, 使血管内皮细胞通透性增加, 调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放。IL-6 能诱导 B 细胞分化和产生抗体, 并诱导 T 细胞活化增殖、分化, 参与机体的免疫应答, 是炎性反应的促发剂。以 TNF-α、IL-6 抑制率为指标进行综合评价, 总分为 100 分, TNF-α、IL-6 抑制率各占 50 分。以各指标的最大值为最高分, 以此类推 (如 IL-6 抑制率最大值为 76.46%, 评分为 50 分, 其余各组的评分  $Y_{i,IL-6} = 50 \times X_{i,IL-6} / 76.46$ ,  $Y_{i,IL-6}$  指各样品 IL-6 指标的得分值,  $X_{i,IL-6}$  为各样品的 IL-6 抑制率), 结果见表 2。

### 2.5 BP 神经网络建模及预测

采用 BP (back propagation) 神经网络算法进行疏风解毒胶囊体外抗炎实验的谱效相关性分析, 采

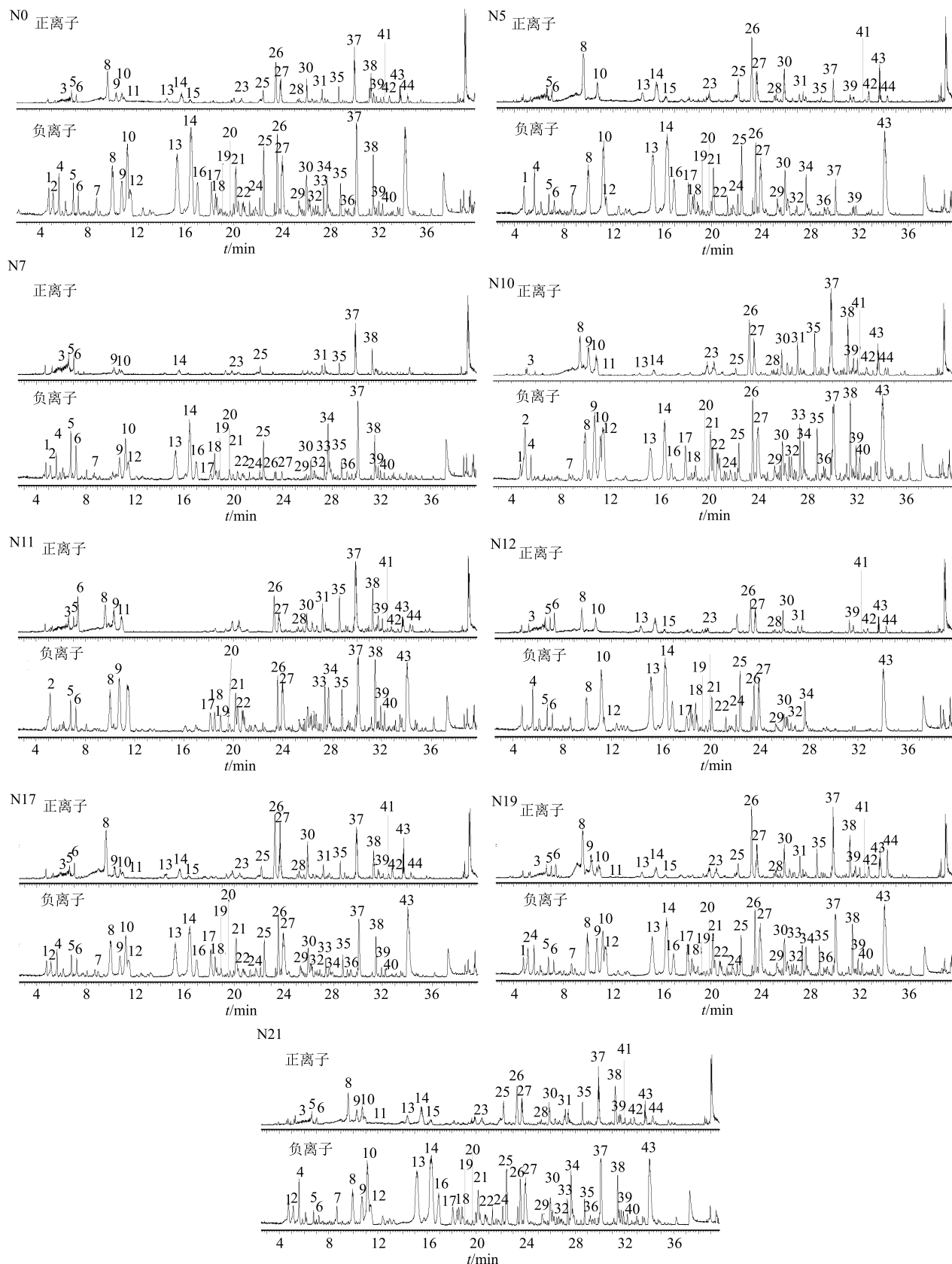


图 1 N0、N5、N7、N10、N11、N12、N17、N19、N21 样品正、负模式 BPI 图

Fig.1 BPI chromatograms in positive and negative ESI mode of N0, N5, N7, N10, N11, N12, N17, N19, and N21

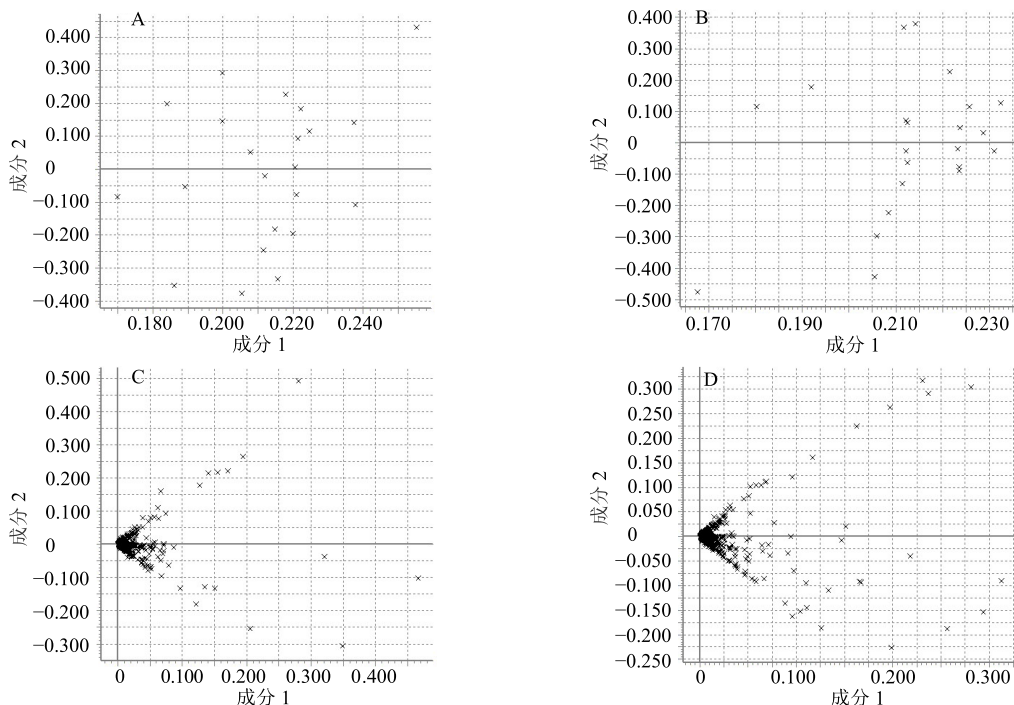
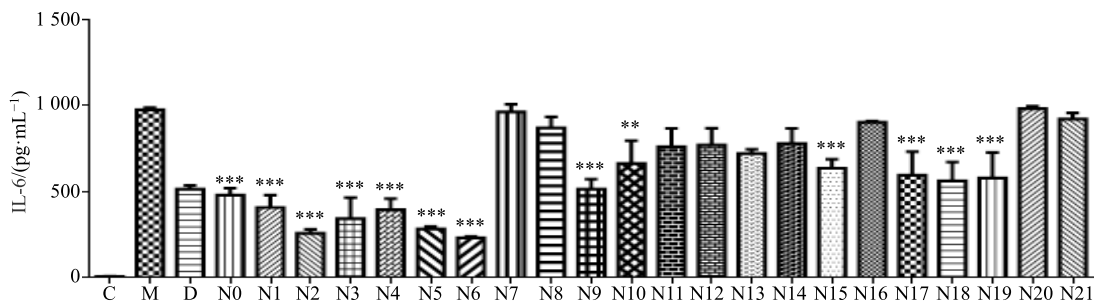


图 2 22 个样品 PCA 分析 Score 图 (A-正离子模式, B-负离子模式) 和 Loading 图 (C-正离子模式, D-负离子模式)  
 Fig. 2 PCA results of score plots (A-positive mode, B-negative mode) and loading plots (C-positive mode, D-negative mode) of 22 samples



C-对照 M-模型 D-地塞米松, 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图 4 同  
 C-control M-model D-Dexamethasone, \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as Fig. 4

图 3 N0~N21 样品与 LPS 共孵育 24 h 对 Raw264.7 细胞培养上清液中 IL-6 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
 Fig. 3 Effect of co-incubation of N0—N21 and LPS for 24 h on IL-6 in supernatant of Raw264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

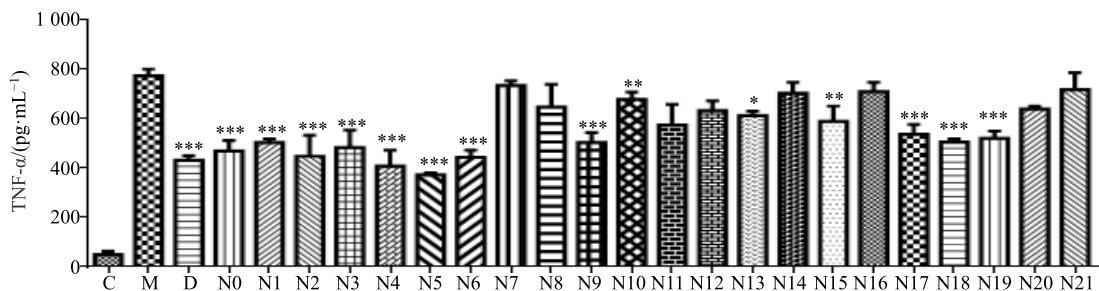


图 4 N0~N21 样品与 LPS 共孵育 24 h 对 Raw264.7 细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
 Fig. 4 Effect of co-incubation of N0—N21 and LPS for 24 h on TNF- $\alpha$  in supernatant of Raw264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 2 各样品综合评分结果

Table 2 Comprehensive scoring results of samples

样品	IL-6		TNF- $\alpha$		总分
	抑制率/%	得分	抑制率/%	得分	
N0	51.01	33.36	39.23	37.87	71.23
N1	58.36	38.16	34.92	33.72	71.88
N2	73.77	48.24	41.99	40.53	88.77
N3	65.15	42.60	37.56	36.26	78.86
N4	59.92	39.18	47.05	45.43	84.61
N5	71.28	46.61	51.79	50.00	96.61
N6	76.46	50.00	42.62	41.14	91.14
N7	1.25	0.82	5.00	4.83	5.65
N8	10.93	7.15	16.30	15.74	22.89
N9	47.41	31.00	34.98	33.77	64.77
N10	32.12	21.00	12.26	11.84	32.84
N11	22.07	14.43	25.87	24.98	39.41
N12	21.06	13.77	18.22	17.59	31.36
N13	26.27	17.18	20.63	19.92	37.10
N14	20.36	13.32	9.12	8.80	22.12
N15	35.07	22.93	23.73	22.91	45.84
N16	7.42	4.85	8.21	7.92	12.77
N17	39.23	25.65	30.58	29.52	55.17
N18	42.61	27.87	34.68	33.48	61.35
N19	40.93	26.76	32.64	31.51	58.27
N20	-0.51	-0.33	17.40	16.79	16.46
N21	5.65	3.69	7.32	7.06	10.75

用 MATLAB 编程, BP 网络参数如下<sup>[4]</sup>: ①网络层数为 1 个隐含层; ②输入层的节点数为 44, 即 22 个样品的 44 个特征峰; ③输出层的节点数为 1, 即抗炎综合药效; ④隐含层的节点数在公式  $n=\log_2 m$  ( $n$  为隐含层神经元个数,  $m$  为自变量个数) 的基础上, 通过反复试验优化, 最终确定为 6; ⑤传输函数: 隐含层传递函数选择双曲正切函数 (tansig), 输出层传递函数选择线性函数 (purelin); ⑥训练函数经反复试验选为 trainlm; ⑦训练次数为 1 000 次, 训练精确度为 0.01。为使网络更好地收敛, 实验数据在输入前应用规格化函数  $A_i=A_i/A_{\max}$  进行处理, 使所有输入、输出样本规范到 [0, 1] 的范围内。利用结合遗传算法 (genetic algorithm, GA) 确立的最优 GA-BP 模型计算 44 个特征峰与抗炎药效的关联关系。结果显示, 前 14 个正相关的色谱峰 (峰号为 43、6、35、32、30、26、16、15、42、23、8、14、11、4) MIV 值均大于 0.01, 与抗炎功效关系密切, 可能为疏风解毒胶囊发挥抗炎作用的潜在物质基础。经鉴定分别为大黄素、马鞭草苷、羟基甘草酸、甘草素、大黄酸、决明酮-8-*O*-葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、松脂素- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、柴胡皂苷 D、芹糖基-异甘草苷、反式-虎杖苷、连翘酯苷 A、异甘草苷、连翘酯苷 E, 具体信息见表 3。

表 3 潜在活性成分数据信息

Table 3 Detailed information of potential active ingredients

峰号	$t_R$ /min	[M-H] <sup>-</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS 特征碎片		化合物	分子式	MIV	来源
				ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>				
43 <sup>a</sup>	33.71	269.047 9	271.061 2	241, 225, 210		大黄素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0.047 2	H
6 <sup>a</sup>	7.20	387.138 0	411.126 4 <sup>#</sup>	387, 225	389, 227, 195, 177	马鞭草苷	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	0.044 5	M
35	28.60	837.398 3	839.404 4	837	839, 663, 469	羟基甘草酸	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	0.043 8	G
32	26.71	255.068 7	257.080 3	255, 135	137	甘草素	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	0.031 2	G
30 <sup>a</sup>	25.94	283.063 6	285.076 8	239, 211, 183		大黄酸	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	0.023 2	H
26 <sup>a</sup>	23.30	407.137 9	409.149 7	245, 215	247, 229	决明酮-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	0.020 4	H
16 <sup>a</sup>	16.97	623.202 6	647.234 6 <sup>#</sup>	623, 461, 161	625, 477, 325	毛蕊花糖苷	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	0.019 7	L、M
15 <sup>a</sup>	16.81	519.191 3	543.183 8 <sup>#</sup>	357, 342		松脂素- $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	0.020 1	L
42	32.80	779.477 7	781.341 7	765, 603, 457		柴胡皂苷 D	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	0.018 8	C
23	20.77	417.122 7	419.133 7	419, 257		芹糖基-异甘草苷	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	0.016 4	G
8 <sup>a</sup>	9.99	389.127 2	413.120 5 <sup>#</sup>	227, 185	391, 229	反式-虎杖苷	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	0.014 9	H
14 <sup>a</sup>	16.39	623.202 8	647.194 4 <sup>#</sup>	461, 179, 161	647, 325, 163	连翘酯苷 A	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	0.013 1	L
11	10.95	419.063 5		257, 303		异甘草苷	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	0.010 9	G
4	5.60	461.169 9	315, 135		连翘酯苷 E		C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	0.010 7	L

<sup>a</sup>与对照品比对确证, <sup>#</sup>[M+Na]<sup>+</sup>, H-虎杖, M-马鞭草, L-连翘, C-柴胡, G-甘草, B-败酱草

<sup>a</sup>confirmation by comparison with reference substance, <sup>#</sup>[M+Na]<sup>+</sup>, H-*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc., M-*Verbena officinalis* L., L-*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl, C-*Bulperum chinese* DC., G-*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., B-*Patrinia Scabiossefolia* Fisch., BLG-*Isatis indigotica* Fort.

### 3 讨论

炎症是许多不同类型疾病共同的病理基础。疏风解毒胶囊所治疗的病症“风热证”，多见于风热之邪侵袭卫表，导致肺卫不宣。其病因病机相当于现代医学的上呼吸道感染，上呼吸道感染通常是由病毒和细菌等病原体入侵导致炎症因子过度释放引起呼吸道黏膜急性炎症<sup>[5]</sup>，症见发热、恶风、咽痛、头痛、鼻塞、流浊涕、咳嗽等，其主要相关症状与风热证主要症状，即“风热上扰，咽喉不利，故咽喉肿痛；风热袭肺，肺失清肃，肺气上逆，故咳嗽；肺气失宣，鼻窍不利，津液为热邪所灼，故鼻塞流浊涕；风热袭表，卫气抗邪，阳气浮郁于表，故有发热。”一致，均属炎症症状。前期研究表明疏风解毒胶囊对大鼠肺炎模型具有抗炎作用<sup>[6]</sup>，本实验利用 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 体外炎症模型，通过测定细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量变化，评价疏风解毒不同配比样品的抗炎效果，进一步结合各样品 MS 指纹图谱化学信息利用 BP 神经网络分析得出各色谱峰对抗炎活性的影响程度，建立谱效关系，找到潜在的抗炎药效物质基础。

本实验计算出的 14 个关键化合物的主要结构类型为：环烯醚萜类（马鞭草苷）、蒽醌类（大黄素、大黄酸）、苯乙醇苷类（连翘酯苷 A、连翘酯苷 E、毛蕊花糖苷）、二苯乙烯类（反式-虎杖苷）、木脂素类（松脂素- $\beta$ -D-葡萄糖苷）、黄酮类（甘草素、异甘草苷、芹糖基-异甘草苷）、三萜皂苷类（羟基甘草酸、柴胡皂苷 A）及蒽醌类（决明酮-8-O-葡萄糖苷），大量研究已证明各类成分均有一定的抗炎特性。Vareed 等<sup>[7]</sup>发现，马鞭草苷可抑制花生四烯酸代谢途径中起关键作用的环加氧酶（COX-1 和 COX-2）的活性，发挥抗炎效果。杨文修等<sup>[8]</sup>揭示了大黄素、大黄酸和大黄酚等蒽醌类成分均可不同程度地抑制激活炎性介质释放的蛋白酪氨酸激酶（PTK）、蛋白激酶 C（PKC）、钙调素蛋白激酶（CaMPKs）等胞内激酶的活性，发挥抗炎作用。苯乙醇苷类化合物连翘酯苷 A 在 LPS 诱导的体外 BV2 小胶质细胞和原代小胶质细胞炎症模型中可抑制核转录因子- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）信号通路和提升核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）和血红素加氧酶 1（HO-1）的表达水平<sup>[9]</sup>，毛蕊花糖苷能减少超氧化物自由基的产生，从而降低诱导型一氧化氮合酶（iNOS）的活性<sup>[10]</sup>，二者都表现出抗炎活性。Huang 等<sup>[11]</sup>研究发现，虎杖苷可通过下调 Toll 样受体 4（TLR4）和

NF- $\kappa$ B 来抑制促炎性细胞因子（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6）的释放。体外实验表明，连翘中的木脂素类及其苷均可抑制 cAMP 磷酸二酯酶活性，升高炎症细胞 cAMP 水平从而发挥抗炎的作用<sup>[12]</sup>。另有文献表明<sup>[13]</sup>，甘草抗炎的主要成分包括黄酮类成分，其可通过抑制淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症介质释放从而减少中性粒细胞募集，有效的对抗炎症反应，其中甘草素可抑制卵白蛋白致哮喘小鼠免疫 IgE 抗体的产生<sup>[14]</sup>，异甘草苷可抑制炎症因子前列腺素 E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）和 NO 的生成<sup>[15]</sup>；同时，甘草中的三萜皂苷类成分亦能通过调节巨噬细胞产生 NO、TNF- $\alpha$  及 IL-1 等炎症因子并抑制磷脂酶 A2（PLA2）酶的活性及 COX-2 的表达而降低 PGE<sub>2</sub> 的合成来发挥抗炎作用<sup>[16]</sup>。综合以上研究报道，部分印证了本研究的谱效预测结果，因此推测，实验辨别出的 14 个化合物可能是疏风解毒胶囊发挥抗炎作用的有效成分，为疏风解毒胶囊质量控制标准的建立和进一步确定药效物质基础提供参考。

### 参考文献

- [1] 陈宇, 薛志远, 师志强, 等. 红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 160-166.
- [2] 刘淼, 黄莹莹, 林梦雅, 等. 黑玛咖不同提取物的抗疲劳作用与谱效关系研究 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2090-2096.
- [3] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [4] Jiang J, Su X, Ding H, et al. A novel approach to evaluate the quality and identify the active compounds of the essential oil from *Curcuma longa* L. [J]. *Anal Lett*, 2013, 46(8): 1213-1228.
- [5] Manoharan A, Winter J. Tackling upper respiratory tract infections [J]. *Practitioner*, 2010, 254(1734): 25-28.
- [6] 马莉, 黄妍, 侯衍豹, 等. 疏风解毒胶囊对大鼠肺炎模型的抗炎机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4591-4595.
- [7] Vareed S K, Schutzki R E, Nair M G. Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(10): 706-709.
- [8] 杨文修, 王新宇, 陈立君. 大黄蒽醌类衍生物抑癌、抗炎和抗病毒作用的分子机制 [A] // 天津市生物医学工程学会 2004 年年会论文集 [C]. 天津: 天津市生物医学工程学会, 2005.

- [9] Yue W, Zhao H, Lin C, *et al.* Forsythiaside a exhibits anti-inflammatory effects in LPS-stimulated BV2 microglia cells through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(4): 659-665.
- [10] Speranza L, Franceschelli S, Pesce M, *et al.* Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(9): 1398-1404.
- [11] Huang Q H, Xu L Q, Liu Y H, *et al.* Polydatin protects rat liver against ethanol-induced injury: Involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF- $\kappa$ B p65 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, doi: org/10.1155/2017/7953850.
- [12] Nikaido T, Ohmoto T, Kinoshita T, *et al.* Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by lignans [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(12): 3586-3592.
- [13] Xie Y C, Dong X W, Wu X M, *et al.* Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(2): 194-200.
- [14] Shin Y W, Bae E A, Lee B, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* and its components [J]. *Planta Med*, 2007, 73(3): 257-261.
- [15] Kwon H M, Choi Y J, Choi J S, *et al.* Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF- $\kappa$ B signal disruption [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(2): 235-245.
- [16] 李晓红, 齐云, 蔡润兰, 等. 甘草总皂苷抗炎作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 110-113.