

基于整体观中药质量标志物的发现及研究进展

叶 霁, 李睿旻, 曾华武, 柳润辉, 张卫东*

中国人民解放军海军军医大学 药理学系, 上海 200433

摘要: 中药质量是中医药应用、发展和传承的重要因素, 是中药发挥临床疗效的保障。长期以来, 具有复杂性和多样性特征的中药, 特别是由多种中药组成的复方中药药效物质基础尚不明确, 限制了其质量标准的制定, 影响了中医药国际化的进程。质量标志物主要依据中药属性、制造过程及配伍理论等特点提出, 是中药及中药复方质量评价的指标性成分。近些年来关于质量标志物的解析和应用研究得到了迅猛的发展, 为质量标准的制定提供更加科学、明确的方向。从中药方剂整体观研究体系出发, 围绕中药复方的药理活性以及相关化学物质基础、整合系统生物学和网络药理学的前沿技术, 对质量标志物的发现进行综述, 介绍相关经验方法和研究进展, 以期发现与临床疗效相关的药效成分即质量标志物提供丰富有益的方法指导。

关键词: 质量标志物; 中药; 整体观; 药效物质基础; 系统生物学; 网络药理学

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4529-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.002

Discovery and research advances in quality markers of Chinese materia medica based on holistic characteristics

YE Ji, LI Rui-min, ZENG Hua-wu, LIU Run-hui, ZHANG Wei-dong

School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: The quality of Chinese material medica (CMM) is an important factor in the application, development, and inheritance of traditional Chinese medicine (TCM). It is also the guarantee of the clinical efficacy of CMM. For a long time, the pharmacodynamics material basis of CMM with the characteristics of complexity and diversity, especially CMM formula composed of many kinds of Chinese materia medica, is still unclear. It limits the scientific formulation of quality standards and affects the process of internationalization of TCM. Quality markers are proposed based on the properties, manufacturing process, and compatibility theory of TCM, which are the indicators of quality evaluation of CMM and its formula. In recent years, the research and application of quality markers has developed rapidly, which provides a more scientific and clear direction for the formulation of quality standards. This paper reviews the discovery of quality markers based on the holistic research system of CMM formula, focusing on its pharmacological activity and related chemical substance basis, integrating the frontier technologies of system biology and network pharmacology, and introduces the relevant experience, methods, and research progress, with a view to discovering the correlation with clinical efficacy. The quality markers of CMM could provide abundant and useful methodological guidance.

Key words: quality marker; Chinese materia medica; holistic characteristics; pharmacodynamic material basis; systems biology; network pharmacology

中药质量是中药有效性、安全性的关键因素, 是中医临床用药的安全保障。针对中药及其复方开展稳定可控的质量评价研究, 不仅有助于反映中药材的品质, 也有助于中医药在国际上的推广和应用。由于分析技术的迅速发展以及各学科的交叉加速融

合, 中药质量评价研究方面有了全方位的进步, 从单个指标成分的测定到基于指纹图谱的多指标成分测定, 从基于对照品的含量测定到一测多评等方法, 积极有效地提升了整体中药质量评价水平, 有效促进了中医药现代化的发展。

收稿日期: 2019-08-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81520108030); 国家自然科学基金资助项目 (21472238)

作者简介: 叶 霁, 高级实验师, 主要从事中药质量控制研究和药动学研究。Tel/Fax: (021)81871248 E-mail: catheline620@163.com

*通信作者 张卫东 Tel/Fax: (021)81871244 E-mail: wdzhangy@hotmail.com

中药质量标志物 (quality marker, Q-marker) 是 2016 年由刘昌孝院士为提升中药及其产品质量标准、健全国家药品标准体系、促进中医药产业健康发展而提出的概念^[1]。近几年来,以研究质量标志物为核心目标,中药及其复方在基础研究、药理学研究等方面实现了蓬勃发展,极大地推进了中医药的国际化 and 标准化进程。本文以传统中医理论为依据,借鉴前期中药方剂麝香保心丸整体观研究思路,结合近年来关于中药和复方中药的现代药理学及其药效物质基础的研究进展,并整合系统生物学和网络药理学等前沿技术,深刻地阐述质量标志物的发现过程、发现方法和研究进展,明确了中药及其复方的有效性、物质基础、质量标志物之间的关联性,健全中药及中药复方质量控制研究体系,有效促进中药国际化和标准化的健康发展。

1 中药方剂的整体观研究体系

“整体观”源于《易经》的原始系统观念,成于《内经》“天人合一”的自然整体论与元体-阴阳-五行学说的有机自然观^[2]。中药质量标准的研究与制定,必须是基于“药效组分”的整体观的基础来进行^[3],即具有明确的化学结构和生物活性。为了开发“药效组分”,将现有的中药方剂学研究方法与传统中医药理论和现代科学技术集合,并遵循系统论和还原论相结合、宏观与微观研究相结合、体内研究和体外研究相结合的原则,以高分辨质谱仪、核磁共振仪等仪器为技术平台、多元统计学方法为技术手段、系统生物学和网络生物学等先进技术为支撑,围绕中药复方的药理活性以及相关化学物质基础,提出一种包括化学物质基础研究、现代药理研究、系统生物学以及网络生物学研究的现代中药方剂研究体系^[4],该体系既体现了中药的整体观,又强调辨证分析方法,有助于开发“有用的分子”,即中药质量标志物,为中药质量标准的制定提供科学依据。课题组以该研究体系为指导,基于整体观思路,对麝香保心丸 (SBP) 的药理作用及其药效物质基础开展了系统剖析,基本上阐明了 SBP 与治疗心肌梗死相关的有效成分和作用机制,发现其质量标志物,使 SBP 成为一个质量可控、疗效明确的经典中药名方。

化学物质基础的解析是开展中药质量控制的的前提。为了了解 SBP 的化学物质基础,采用 HPLC-DAD-MS 鉴定了包括人参皂苷类、蟾蜍甾烯类、胆酸类等不同类型共 47 个化学成分^[5],GC-MS

分析结果经 NIST05 数据库的比对,共鉴定了 SBP 中 49 个挥发性化学成分^[6]。化学物质基础的明确为血清药物化学和药动学研究奠定了基础。经过进一步开展大鼠口服 SBP 后血清药物化学分析,共发现了 35 个入血成分,其中有 27 个原型成分和 8 个代谢产物^[7-8]。在已鉴定的入血移行成分中,有许多成分与心血管系统疾病的预防和治疗息息相关,如肉桂中的肉桂醛能够抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的细胞黏附因子的产生,可以减少血小板聚集和血栓形成,有利于对抗动脉粥样硬化^[9];蟾蜍中的蟾毒灵能抑制心肌细胞膜上的 Na^+ , K^+ -ATP 酶,从而使心肌细胞内 Na^+ 浓度增高, Ca^{2+} 则通过 Na^+ - Ca^{2+} 交换进入心肌细胞,使心肌收缩力加大,对于心衰有积极的治疗作用^[10]。随后考察酯蟾毒配基、蟾毒灵、日蟾毒它灵、沙蟾蜍精及蟾毒它灵在心、肝、脾、肺、肾和小肠的组织分布情况,结果显示,蟾蜍甾二烯类化合物主要分布在血量充足的组织中如肺、肝及肾等,然而在其靶器官心脏中的含量却不高,这可能与该类化合物发挥强心作用的机制相关^[11]。另外,开展各活性成分之间透膜吸收的相互作用实验发现,2 个挥发性成分冰片和麝香酮对人参皂苷均有促进吸收的作用^[12],说明冰片和麝香 2 味药材在 SBP 中发挥着“药引”的作用。

安全性和有效性是质量控制的基础,基于药理活性的质量标志物的发现,对于中药或中药复方研究具有重要意义。以 SBP 中促血管新生的主要活性成分的发现为例,采用原代人脐静脉内皮细胞模型评价入血成分对内皮细胞增殖活性的影响。对 SBP 及其 26 个入血成分进行促血管新生活性研究,结果发现 SBP、肉桂醛及人参皂苷 Rg_3 、 Rh_2 具有显著的诱导内皮细胞增殖活性^[4]。

随着研究的深入,将现代技术进一步运用到 SBP 研究中,有助于更深刻、系统地了解其作用机制,挖掘其真正发挥作用的有效成分。采用代谢组学技术结合现代药理研究,揭示 SBP 组分配伍对急性心肌梗死大鼠预保护作用及多成分协同作用机制。其中,SBP 组分为前期入血成分筛选的有效活性成分肉桂酸、麝香酮、蟾毒灵、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Re 、胆酸和冰片,结果显示,SBP 组分配伍的作用机制主要包括抑制与急性心肌梗死相关的血小板代谢异常、氧化损伤和炎症。而 SBP 组分配伍 7 种单体成分对急性心肌梗死大鼠的预保护作用均不如 SBP 组分配伍的疗效好,进一步说明了 SBP

是通过来源于多味药材的多个成分通过协同作用而发挥疗效^[13]。由此,这 7 个成分可以作为 SBP 的质量标志物。随后利用网络药理学技术和现代药理研究,对 SBP 治疗心血管疾病的作用机制进行了系统研究^[14]。通过计算药物对疾病的网络作用得分,说明 SBP 治疗心血管疾病的有效性。利用药物靶点或疾病基因对网络全基因进行打分,再计算疾病或药物对信号通路的影响得分,通过分析显著作用的信号通路的生物学过程来揭示 SBP 对心血管疾病的作用。利用基因芯片数据对使用的方法进行了验证。结果显示,入血成分在 SBP 全方治疗心血管疾病过程中发挥重要作用。药物通过网络的形式对基因进行调控,从而达到治疗疾病的目的。网络药理学研究进一步验证其入血成分为 SBP 的有效成分。

2 基于化学物质基础中药质量标志物的发现

化学物质基础研究是中药质量标志物的发现过程中必不可少的基础和前提,在中药复方整体研究体系中占据重要地位。它是以中医药理论为指导,运用现代分离分析技术,先确定中药化学成分,再结合药效评价和中药血清药物化学研究确定中药的有效成分。近年来,关于中药质量标志物的发现,集中在对血清药物化学和药动学研究方向。

2.1 中药血清药物化学研究

中药血清药物化学是王喜军教授在日本学者田代真一的研究基础上提出的研究方法,即通过研究血清中的外源性物质,观测吸收入血的中药活性物质及其代谢规律,以研究中药在体内药效物质基础和作用规律^[15]。血清药物化学这一概念自提出以来,便得到了广泛的关注和认可,从中药众多复杂成分中找到真正进入体内的入血成分,便于确定潜在的发挥作用的有效成分,即是中药质量标志物。以中药给药后的血清作为研究对象,通过多种现代分离分析技术,从血清中分离、鉴定移行成分,研究血清中移行成分与传统药效的相关性,为中药质量控制的开展提供依据。

高分辨质谱仪常用于中药血清药物化学成分解析,由于其灵敏度高、检测限低,在中药的分析发展过程中起着举足轻重的作用。近几年来,随着仪器灵敏度和精密度的不断提高,物质基础的研究得到进一步深入,为质量标志物的发现和确认提供更准确的数据支持。复方丹蛭片具有益气通络、活血化瘀的功效,临床上用于缺血性脑卒中经络之气虚血瘀证的治疗。课题组首先通过超高压液相色谱-

行波离子迁移飞行时间质谱仪 (UPLC-TWIMS-QTOF/MS) 分析仪器结合多维数据采集和处理系统,对复方全成分进行解析^[16],随后以血清药物化学理论为指导,结合 UNIFI 平台和多元统计分析软件,对大鼠口服复方丹蛭片后的入血原型成分及代谢产物进行全面表征,并建立一种快速高灵敏度检测脑脊液微量成分的方法,对其透过血脑屏障的原型成分及代谢产物进行鉴定^[17],结果显示,在脑脊液中可检测到 7 个黄酮类、9 个丹参酮类、7 个苯酚内酯类和源于地龙的 6 个呋喃磺酸类成分,发现来源于君药黄芪中的毛蕊异黄酮 7-O-β-D-葡萄糖苷、臣药丹参中的丹参酮 II_A、佐药地龙中的 5-乙基-2-己基呋喃-3-磺酸以及使药川芎中的川芎内酯 I 与改善神经功能缺损、抗凝血、保护脑组织免受缺血和缺氧损伤作用相关^[18-20],因此,可将这些成分作为复方丹蛭片临床上治疗缺血性脑卒中的质量标志物。

2.2 药动学研究

中药化学成分在体内的暴露程度及动力学变化规律是反映中药有效物质的客观基础和依据。基于原型成分和入血成分及代谢产物的结果,体内过程研究包括吸收、分布、代谢、排泄的经时过程 (ADME/T) 及其动力学规律,称为药动学研究^[21]。大部分情况下,中药经口服后可以在体内进行吸收代谢,所以原型成分和代谢后的产物均可以作为发挥治疗作用的物质基础,药动学研究在阐明中药的药效物质基础和质量标志物的鉴定中发挥重要作用^[22]。药物是否有效,最终是通过药物的药理效应来表现。药动学/药效学 (pharmacokinetic/pharmacodynamic, PK-PD) 技术的发展,可体现化合物通过量-效和体内过程的变化规律,反映给药后中药的物质暴露和影响因素,为药动学标志物的确认提供帮助。与药动学标志物的不同点在于,质量标志物不考虑代谢产物及在体内产生的活性作用机制,而是更关注中药的内在化学成分。如果药动学标志物和质量标志物均指向同样的内在成分,那么这些成分将会作为对中药质量控制的最重要目标成分。

Gao 等^[23]建立了一种灵敏度高、选择性好的 UPLC-MS/MS 方法,并将其应用于雷公藤苷片的定量和药动学研究。对佐剂关节炎大鼠和正常大鼠口服不同剂量雷公藤苷片后不同时间点的 PK-PD 进行研究。用 DAS 1.0 测定和计算药动学特性。采用单因素方差分析法,通过足肿胀的变化来评价雷公藤苷片的药效学。药动学研究结果表明,雷公藤次

苷的峰浓度和曲线下峰面积显示剂量依赖性和时间依赖性。但对于雷公藤吉碱来说,没有发生体内蓄积的现象,其血浆浓度显示低暴露。因此,其很难成为雷公藤苷片的药动学标志物,雷公藤次苷被认为是雷公藤苷片的生物活性和毒性成分,可以同时作为质量标志物和药动学标志物。最终得出结论,雷公藤苷片的质量、临床安全性和疗效通过雷公藤次苷的含量来评价。Zhang 等^[24]以质量标志物理论为基础,结合抑制活性肾素-血管紧张素-醛固酮系统的 PK-PD 研究芪苈强心胶囊的质量标志物。将体外含量较高、体内暴露较好的生物活性成分作为其治疗慢性心力衰竭的标志物,与活性肾素-血管紧张素-醛固酮系统的抑制作用密切相关。结果表明,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮-7-葡萄糖苷、芥子碱和人参皂苷 Rg_1 可作为芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭的质量标志物。Chen 等^[25]成功评价并筛选了银兰胶囊中具有脂质调节作用的质量标志物。经过药动学研究,证明羽扇豆醇和人参皂苷 Rb_3 2 个化合物具有良好的生物利用度,它们通过靶向肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) mRNA 及其相关途径发挥脂质调节作用,证实其也是银兰胶囊中的质量标志物。这些研究成果不仅能推进中药及其复方的临床用药有效性和安全性,而且还能为中药质量标志物的预测提供一条创新的思路。

3 基于现代药理中药质量标志物的发现

3.1 以药理活性为导向筛选质量标志物

中药治疗疾病的作用是中药有效与否的关键依据和核心内容,是确定临床用药的重要指标,反映了中药的本质特征。有效是质量标志物的核心要素,是中药质量控制的主要依据和根本目的^[21]。建立一套新颖、具体的中药质量评价体系,不仅需要涉及成分,而且涉及生物活性。Zhong 等^[26]将三七总皂苷的化学成分与药理活性相结合,筛选了三七总皂苷的质量标志物,并采用建模方法考察了质量标志物与关键工艺的关系,优化工艺,提升效率,结果表明,三七总皂苷最佳萃取过程和柱色谱过程,对质量标志物的含量高低影响最大。在 97 个已鉴定的化合物中,三七皂苷 R_1 及人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 和 Rd 是三七总皂苷的质量标志物。Dai 等^[27]基于系统药理学发现黄芩汤中减轻肠道损伤的质量标志物包括芍药苷、黄芩苷、野黄芩素、甘草酸、去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A。依据 8 个化合物在黄芩汤中的相应浓度,将它们重新组合

作为有效组分群,通过伤口愈合试验和炎症因子测定实验,验证了有效组分群与黄芩汤的生物活性等效性。综合结果表明,有效组分群与黄芩汤生物活性相接近,它们可作为其质量标志物。

3.2 与生物标志物相关联的质量标志物筛选

生物标志物 (biomarker) 是标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生改变生物学或生物化学指标。基于药物临床适应症的质量生物标志物 (Q-biomarker) 可评价中药与生物体作用时的效价,从临床药理作用和质量控制角度直接反映药物的有效性和安全性,完善质量控制的评价体系^[28]。基于生物活性将生物效价和生物标志物相结合,为中药的质量控制提供一种新的策略^[29]。Zhang 等^[30]以五味子药材为例,采用了多种分析方法和数据处理方法,探索具有抗抑郁作用的质量标志物。采用高分辨率质谱仪鉴定和半定量了大鼠脑组织样本中 6 种木脂素类成分,生物信息学分析显示该活性成分均能调节与去甲肾上腺素能、多巴胺能和血清素能途径相关的各种生物标志物。利用高效液相色谱-质谱/质谱联用 (HPLC-MS/MS) 方法,选择这 3 种途径中所含的单胺类代谢产物,基于靶标代谢组学筛选五味子治疗抑郁症的潜在生物标志物,并利用 6 种成分与潜在生物标志物的相关性分析,揭示了五味子醇甲、五味子甲素、五味子丙素和戈米辛 N 可以作为五味子的质量标志物。这些研究结果有助于同时实现复杂成分与临床疗效的统一性,对中药发展意义深远。

3.3 以多元统计分析法为手段的质量标志物筛选

多元统计分析法是从中药复杂体系中筛选有效成分的强大、有效的手段。以现代药理学为基础的质量标志物的筛选,多元统计分析方法发挥了重要的作用。以市售蟾蜍药材的质量评价为例,He 等^[31]先采用预分离色谱法和高分辨质谱法对蟾蜍的小分子和肽类成分进行了鉴定。通过数据库检索发现,毒素是由相对分子质量范围在 400~2 000 的游离/共轭型蟾蜍甾烯和多肽组成。然后,采用偏最小二乘法 (PLS) 多元统计分析法筛选出蟾蜍甾烯 (VIP>1.5) 是蟾蜍发挥抗肿瘤细胞活性标志物,包括 21 个已鉴定的蟾蜍甾烯类成分和 7 个未知化合物。基于权重系数校正 9 个蟾蜍甾烯类成分的总含量作为质量评价指标,且与蟾蜍对肿瘤细胞的抑制作用有良好的相关性。相关系数从 0.4 增加到 0.6。因此,该策略比传统的图谱-效应关系方法在质量标

志物的鉴定上有了显著的进步。

3.4 以多维变量为基础质量标志物的筛选

中药成分复杂,不同成分的生物活性各异,各成分之间在疾病生命系统中表现出复杂的关联规律,体现“多重药理功效”特点^[32]。寻找“多重药理作用”的来源及所对应的质量标志物,可以通过合理地制定多种考察指标,建立多维变量构建模型的研究策略来实现。Jiang 等^[33]开发了一种基于识别和鉴定质量标志物的方法,对中药进行质量控制,主要以含量、稳定性、药动学和药理学 4 个维度的 7 个变量为基础,采用“蜘蛛网”模型,以待测分析物的回归面积(A)和变异系数(CV)为指标,对中药候选化合物的性质进行评价,以获得质量标志物。重要性指数(IMI)参考方程为 $IMI = A \times 1/CV$ 。以回归面积较大、变异系数较小的化合物作为质量标志物,它具有较好的含量、稳定性、药动学和药理活性。相反,化合物的性质不理想、回归面积较小、变异系数较大,则不能代表中药的质量,排除这些化合物。“蜘蛛网”模型可以过滤掉多余的成分,把重点放在质量控制的关键指标——质量标志物上,筛选出的质量标志物在众多复杂的中药成分中具有含量、稳定性、药动学和药理学的最佳综合特性,能够全面表征中药的内在质量。Li 等^[34]采用整合药理学方法,结合化学和生物合成分析、药物代谢和网络药理学,对元胡止痛片的活性成分进行鉴定,并阐明其分子机制。采用灰色关联分析(GRA)和最小二乘支持向量机(LS-SVM)回归技术等数据挖掘方法,建立了成分与疗效、多维度剂量效应之间的相关性。基于响应度、单味药的特有成分及代谢产物、对活性具有重要贡献等因素,确认了延胡索乙素、别隐品碱、原阿片碱、延胡索碱、欧前胡素、异欧前胡素、白当归素 7 种成分为元胡止痛片的质量标志物。通过进一步数据挖掘发现,其中 3 个质量标志物原阿片碱、别隐品碱和延胡索碱,与元胡止痛片的多种生物活性高度相关。最终选择了延胡索乙素、延胡索碱和欧前胡素 3 种成分作为必要成分组合,可区分药品真伪,并可提升元胡止痛片的质量控制标准。基于多维变量的质量标志物筛选,有利于体现传统中医理论,兼顾“君-臣-佐-使”药材的有效成分,实现对中药复方更加全面的质量控制。

4 基于系统生物学技术中药质量标志物的发现

系统生物学的概念和研究体系最早由美国的

Leory Hood 教授提出^[35],它是以整体性和系统性研究为特征的一种科学,与中医药的整体性作用规律相一致,是在细胞、组织、器官和生物体整体水平上研究结构和功能各异的生物分子以及在特定条件下,如遗传、环境因素变化时,分析这些组分间相互关系的学科,并通过生物信息学来定量阐明和预测生物功能、表型和行为。系统生物学的目标就是要得到一个理想的模型,使其理论预测能够反映出生物系统的真实性,且可以用来预测系统受到干扰后的行为,包括代谢组学、基因组学等内容。

中医方证代谢组学是整合了中药血清药物化学与代谢组学的一项新策略,在方证对应并显效的情况下,发现与临床疗效相关、体现方剂配伍、可追溯体内代谢和制备过程的中药药效物质基础的研究策略,是发现中药质量标志物的有效方法^[36]。一方面,利用代谢组学技术从内源性小分子代谢层面表征证候代谢轮廓及发现生物标记物,实现证候的精准诊断,并以代谢轮廓和生物标记物为参数精准评价方剂整体效应;另一方面,采用一体化研究,利用血清药物化学方法阐明有效状态下方剂体内显效成分,将内源性证候的生物标记物与体内的外源性方剂成分相关联,阐明方剂药效物质基础及作用机制^[37]。当前,中医方证代谢组学已在多个疾病证候及多个相关方剂中成功开展实践应用。

Sun 等^[38]基于高通量中医方证代谢组学策略,对临床主要用于治疗肝胆系统疾病引起的湿热黄疸中药方剂茵陈蒿汤进行分析。采用高灵敏度 UPLC-MS 技术,共鉴定出茵陈蒿汤中 69 个化学成分,其中 41 个成分被吸收入血;随后鉴定了湿热黄疸综合证的 34 个尿液生物标志物。利用高通量中医方证代谢组学对尿液生物标志物和入血成分进行相关性分析,最终确定 9 种主要化合物作为茵陈蒿汤发挥疗效的质量标志物。Wang 等^[39]探讨了开心散治疗 APP/PS1 阿尔茨海默病转基因小鼠的作用及潜在的质量标志物。基于新的目标识别、经典的 Morris 水迷宫实验、 β -淀粉样蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 的免疫组化检测、HE 染色、血浆代谢谱分析,并采用中医方证代谢组学策略,应用 Pcms 软件分析了生物标志物和入血成分之间的相关性,最终确定了开心散治疗阿尔茨海默病的 5 个质量标志物为人参皂苷 Rf、人参皂苷 F₁、20-O-吡喃葡萄糖基人参皂苷 Rf、去氢茯苓酸和 E-3、4、5-三甲氧基肉桂酸。基于该研究策略、模型和方法,Zhang 等^[40]同时对治疗阿

尔茨海默病的另一中药复方生脉散进行了分析。结果证明了五味子甲素、异五味子甲素、当归酰戈米辛 Q、戈米辛 D、当归酰戈米辛 H、戈米辛 M2、人参皂苷 F₁、20(R)-人参皂苷 Rg₃ 8 个成分与药效紧密相关,可作为生脉散治疗该病的质量标志物。Ma 等^[41]选择具有抗肿瘤活性的蟾蜍毒液作为模型,开发了基于代谢组学的筛选和质量一致性控制 (MSQCC) 方法,用来应对天然药物化学变异性存在较大不一致的问题。依据代谢组学和生物学图谱共筛选 9 个天然蟾蜍样本,鉴定了 24 个蟾蜍甾烯类成分是其发挥抗癌作用的质量控制指标。随后对不同批次蟾蜍样本包含脂蟾毒配基、日蟾蜍他灵等 9 个蟾蜍甾烯类成分进行定量分析后,并有效应用于解决厂家对天然药物制剂批次之间的差异大的问题。因此,中医方证代谢组学的发展,不仅能够直接发现和预测中药有效成分和潜在靶点,还可作为发现中药质量标志物的重要途径,最终为质量控制提供新思路。

5 基于网络药理学技术中药质量标志物的发现

通过网络来描述现实世界中大量复杂的系统,用顶点和连线来表示个体间的联系,又称网络模型。通过建立网络模型,可以将复杂生物系统的相互作用抽象表达成网络,通过分析复杂网络的成分关系和特点,对生物实现系统认知。从分子水平上看,中药复方的作用具有多组分、多靶点的特点,中药方剂发挥作用的效应是其中的众多有效分子组合对机体生物分子网络(包括 DNA、RNA、蛋白质、小分子代谢物等)进行广泛调节的综合结果^[4]。网络药理学技术以高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索为基础,基于系统生物学的理论,对生物系统进行网络分析,从改善或恢复生物网络平衡的整体观角度来认识药物与机体的相互作用。

质量生物标志物网络^[28]是采用生物信息学技术,结合药物主要成分,利用 Phrammapper 数据库反向找靶及分子对接技术,预测所搜集中药成分的直接作用靶点,通过功能注释筛选与药物关键功能相关的直接作用靶点。将直接靶蛋白映射到京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG), 取其所在通路中下游的靶点作为中药成分的间接作用靶蛋白。筛选出与生物效应作用相关的关键靶蛋白并进行蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 分析,构建可视化网络,将所得到的网

络作为候选质量生物标志物网络,网络中的中药成分即为中药质量标志物。

为了了解中药分子作用机制,研究人员提出一种包含转录组分析、数据收集、统计分析、网络算法、生物信息学分析和药理学验证在内的基于计算的系统药理学新方法。利用网络算法随机漫步重启法 (signed random walk with restart, SRWR) 模拟药物对网络的影响,可以识别在人体信号网络上被药物正或负调节(激活或抑制)的蛋白质。以具有治疗缺血性脑卒中作用但作用机制尚不明确的灯盏细辛注射液 (DZXXI) 为例,证明新方法的工作原理^[42], DZXXI 的入血活性成分的高置信度预测 83 个靶标,其处理的 MCF7 细胞中鉴定出 87 个差异表达基因。这些靶基因进一步被发现与缺血性脑卒中的神经细胞凋亡有关,如核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号和磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号。DZXXI 假定靶点与缺血性脑卒中相关基因的交叉分析后,确定了与 3 个 DZXXI 入血活性成分相对应的 2 个重要靶点 [前列腺素 G/H 合酶 1 (PTGS1)、PTGS2], 这些靶点通过生物模拟实验和体内外模型实验得到进一步验证。SRWR 算法识别的被药物副调控的靶基因与缺血性脑卒中和血小板激活密切相关,其编码蛋白富集在脑、血管内皮和血小板中。结果表明, DZXXI 具有抗炎和抗血小板的双重药理作用, 3 个入血活性成分芹菜素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸和咖啡酸可作为其重要的质量标志物。

利用网络生物学技术可寻找影响中药制剂质量相关的活性化合物,并能同时了解其分子靶标和作用机制,可以更高效安全地对其进行质量控制。Xiang 等^[43]采用了网络药理学的方法,并结合化学成分的含量,对具有抗心律失常的参仙生脉口服液 (SSOL) 进行了研究。首先,采用 UPLC-QTOF-MS/MS 方法分析了 SSOL 的主要成分,共鉴定出 64 个化合物,其中 32 个化合物通过对照品比对确认。其次,根据已鉴定的化合物构建网络,预测与心律失常相关的有效化合物。在现有数据库和拓扑操作方法的的基础上,提出了一种双网络分析方法,从中筛选出心律失常通路中的 10 个重要靶点,26 个化合物具有良好的抗心律失常活性。根据网络药理学的预测结果,结合该中药制剂的化学成分的含量,选择 10 个具有代表性的化合物作为 SSOL 的质量标志物。其中的 5 个化合物丹参素、迷迭香酸、丹酚酸

A、朝藿定 A 和淫羊藿苷具有抗心律失常活性。

Guo 等^[44]以抗心律失常药心速宁胶囊(XSNC)为例,探讨了基于整合药理学寻找质量标志物的方法。采用超高压液相色谱-线性离子阱-轨道串联质谱法(UHPLC-LTQ-Orbitrap)快速、高效地鉴定了 XSNC 的主要成分。依据吸收-分布-代谢-排泄(ADME)预测模型,筛选出具有药物相似性特征的 41 个候选活性化合物,可能对 XSNC 在体内抗心律失常的治疗作用有贡献。此外,构建了药物靶向疾病基因相互作用网络,确定了 XSNC 抗心律失常的关键候选靶点和潜在的质量标志物。依据 921 个 XSNC 假定靶点的预测和 XSNC 假定已知治疗心律失常靶点交互网络的构建,选择了 315 个具有高连通性的中枢节点。这些中枢节点参与心脏交感神经-迷走神经平衡的调节、能量产生和代谢的调节,同时也参与心律失常发展过程中的血管生成和血管循环。此外,选择 63 个具有网络拓扑重要性的主要枢纽作为抗心律失常的 XSNC 候选靶点。筛选出小檗碱、帕尔马亭、东莨菪素、甘草素、柚皮素、刺芒柄花素、川陈皮素、橘皮素、5-去甲川陈皮素、苦参醇 E 和苦参酮等与相应的 XSNC 候选靶点相关,可作为 XSNC 抗心律失常的质量标志物。

Wang 等^[45]对具有抗糖尿病作用的翻白草(PDB)成分、靶点和作用机制进行了解析,对潜在的蛋白靶标进行了鉴定。基于网络药理学的方法进行生物信息学分析。对这些靶蛋白的富集、蛋白-蛋白相互作用、途径和相关疾病进行了分析。用 Cytoscape 软件分析 PDB 中这些成分的潜在蛋白质靶点,表明 PDB 中 21 个化合物在 28 条信号途径中调节 33 种糖尿病相关蛋白。在网络分析预测的 21 个潜在的具有抗糖尿病作用的成分中,在分子和细胞水平上对三粒小麦黄酮进行了实验验证,结果证明,该活性小分子化合物对改善葡萄糖的吸收有一定的作用,可作为翻白草的质量标志物。

6 结语

质量标志物是中药质量控制的关键,是中药走向国际化和现代化需要迈出的重要一步。以整体观为指导的质量标志物的探索,有利于对中药发挥重要作用的药效成分开展层层剖析,对其药理作用 and 作用机制进行逐步阐明,最终的目标是使中药变得更加安全有效、质量可控且机制明确。虽然现阶段已经基本实现多种技术手段和方法应用于中药质量标志物的寻找,然而发现中药的关键药效成分后,

后期依然需要兼顾中药复方“君-臣-佐-使”药材所对应多成分的协同作用,并对组分配伍机制开展深入研究,这也是体现复方配伍属性的有效途径之一。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 姜华,高原,杨景明,等. 源于“整体观”思想的中药质量评价方法研究概述 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1027-1031.
- [3] 张贵君,张春晖,刘炎. 中药质量标准与中药的科学发展 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(11): 15-16.
- [4] 张卫东. 系统生物学与中药方剂现代研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [5] Jiang P, Dou S S, Liu L, *et al.* Identification of multiple constituents in the TCM-formula Shexiang Baoxin Pill by LC coupled with DAD-ESI-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(1): 133-142.
- [6] Yan S, Yang Y, Wu Y, *et al.* Chemical fingerprinting and quantitative analysis of volatiles in Shexiang Baoxin Pill by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection [J]. *J Anal Chem*, 2009, 64(2): 149-155.
- [7] Jiang P, Liu R H, Dou S S, *et al.* Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin Pill by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(12): 1333-1343.
- [8] 郭黎安,王淑萍,向丽,等. 气相色谱-质谱法定性分析麝香保心丸挥发性入血成分的研究 [J]. 药学实践杂志, 2012, 30(3): 207-209.
- [9] Liao B C, Hsieh C W, Liu Y C, *et al.* Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 229(2): 161-171.
- [10] 巩丽丽,李景香,张会敏. 蟾酥药理作用及制剂工艺的研究进展 [J]. 食品与药品, 2007, 9(10A): 51-53.
- [11] Huang H M, Yang Y G, Lv C, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of five bufadienolides from the Shexiang Baoxin Pill following oral administration to mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 161: 175-185.
- [12] Jiang P, Fu P, Xiang L, *et al.* The effectiveness of borneol on pharmacokinetics changes of four ginsenosides in Shexiang Baoxin Pill *in vivo* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(3): 419-427.
- [13] Xiang L, Han L, Jiang P, *et al.* Metabolomics study of protective effects of Shexiang Baoxin Pill and its

- bioactive constitutes combination in treating the early period of acute myocardial infarction in rats [J]. *Altern Integ Med*, 2013, 2(6): 125-127.
- [14] Zhao J, Jiang P, Zhang W. Molecular networks for the study of TCM pharmacology [J]. *Brief Bioinform*, 2010, 11(4): 417-430.
- [15] Wang X J. *Serum Pharmacochimistry of Traditional Chinese Medicine* [M]. San Diego: Academic Press, 2017.
- [16] Chen T F, Ye J, Li H L, *et al.* Hybrid multidimensional data acquisition and data processing strategy for comprehensive characterization of known, unknown and isomeric compounds from the compound Dan Zhi Tablet by UPLC-TWIMS-QTOFMS [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 8714-8727.
- [17] Mi N, Chen T F, Li H L, *et al.* Metabolite profiling of traditional Chinese medicine formula Dan Zhi Tablet: An integrated strategy based on UPLC-QTOF/MS combined with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 70-85.
- [18] Jia X, Chen J, Lin H, *et al.* Disposition of flavonoids via enteric recycling: Enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310(3): 1103-1113.
- [19] Li P, Wang G J, Li J, *et al.* Characterization of metabolites of tanshinone II_A in rats by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2006, 41(5): 670-684.
- [20] Bundy J G, Lenz E M, Bailey N J, *et al.* Metabonomic assessment of toxicity of 4-fluoroaniline, 3,5-difluoroaniline and 2-fluoro-4-methylaniline to the earthworm *Eisenia veneta* (rosa): Identification of new endogenous biomarkers [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2010, 21(9): 1966-1972.
- [21] 张铁军, 白 钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. *药学学报*, 2019, 54(2): 187-196.
- [22] He J, Feng X C, Wang K, *et al.* Discovery and identification of quality markers of Chinese medicine based on pharmacokinetic analysis [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 182-186.
- [23] Gao X, Du X, An L J, *et al.* Wilforine, the Q-marker and PK-maker of Tripterygium glycosides tablet: Based on preparation quantitative analysis and PK-PD study [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 357-364.
- [24] Zhang F, Zhang Y, Li X, *et al.* Research on Q-markers of Qiliqiangxin capsule for chronic heart failure treatment based on pharmacokinetics and pharmacodynamics association [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 220-230.
- [25] Chen Z, Sun D, Bi X, *et al.* Selection and evaluation of quality markers from Yinlan Capsule and its LXR α -mediated therapy for hyperlipidemia [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152896.
- [26] Zhong Y, Zhu J, Yang Z, *et al.* Q-marker based strategy for CMC research of Chinese medicine: A case study of *Panax notoginseng* saponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 129-137.
- [27] Dai X M, Cui D N, Wang J, *et al.* Systems pharmacology based strategy for Q-markers discovery of Huangqin Decoction to attenuate intestinal damage [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 236.
- [28] 李小锦, 黄莹莹, 杨 珍, 等. 基于效应基准的中药质量生物标志物研究策略 [J]. *药学学报*, 2019, 54(2): 204-210.
- [29] Wu X, Zhang H B, Fan S S, *et al.* Quality markers based on biological activity: A new strategy for the quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 212-219.
- [30] Zhang Y, Lv X, Liu R, *et al.* An integrated strategy for ascertaining quality marker of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill based on correlation analysis between depression-related monoaminergic metabolites and chemical components profiling [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1598: 122-131.
- [31] He R, Ma H, Zhou J, *et al.* High resolution mass profile of bufadienolides and peptides combining with anti-tumor cell screening and multivariate analysis for the quality evaluation of *Bufo venenum* [J]. *Molecules*, 2019, doi:10.3390/molecules24101943.
- [32] 张铁军, 许 浚, 韩彦琪, 等. 中药大品种质量标准提升研究的思路与实践 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(1): 4-11.
- [33] Jiang Z, Yang J, Wang Y. Discrimination and identification of Q-markers based on ‘Spider-web’ mode for quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 98-102.
- [34] Li K, Li J, Su J, *et al.* Identification of quality markers of Yuanhu Zhitong tablets based on integrative pharmacology and data mining [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 212-219.
- [35] Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: Systems biology [J]. *Ann Rev Genomics Human Genet*, 2001, 2: 343-372.
- [36] Wang X J, Zhang A, Sun H, *et al.* Discovery and development of innovative drug from traditional medicine by integrated chinmedomics strategies in the post-genomic era [J]. *Trends Anal Chem*, 2016, 76: 86-94.

- [37] 闫广利, 孙 晖, 张爱华, 等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.
- [38] Sun H, Zhang A H, Yang L, *et al.* High-throughput chinmedomics strategy for discovering the quality-markers and potential targets for Yinchenhao Decoction [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 328-338.
- [39] Wang X J, Zhang A H, Kong L, *et al.* Rapid discovery of quality-markers from Kaixin San using chinmedomics analysis approach [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 371-381.
- [40] Zhang A H, Yu J B, Sun H, *et al.* Identifying quality-markers from Shengmai San protects against transgenic mouse model of Alzheimer's disease using chinmedomics approach [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 84-92.
- [41] Ma H, Zhou J, Guo H, *et al.* A strategy for the metabolomics-based screening of active constituents and quality consistency control for natural medicinal substance toad venom [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1031: 108-118.
- [42] Zhao J, Lv C, Wu Q L, *et al.* Computational systems pharmacology reveals an antiplatelet and neuroprotective mechanism of Deng-ZhanXi-Xin Injection in the treatment of ischemic stroke [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104365.
- [43] Xiang W, Suo T C, Yu H, *et al.* A new strategy for choosing "Q-markers" via network pharmacology, application to the quality control of a Chinese medical preparation [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 858-868.
- [44] Guo R, Zhang X, Su J, *et al.* Identifying potential quality markers of Xin-Su-Ning capsules acting on arrhythmia by integrating UHPLC-LTQ-Orbitrap, ADME prediction and network target analysis [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 117-128.
- [45] Wang N N, Zhu F F, Shen M X, *et al.* Network pharmacology-based analysis on bioactive anti-diabetic compounds in *Potentilla discolor* Bunge [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111905.