

海马补肾丸质量标志物研究

张铁军, 许 浚, 韩彦琪, 张洪兵, 岳 南, 刘昌孝*

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

摘 要: 海马补肾丸为中药大品种, 疗效确切, 但其基础研究薄弱, 质量控制方法简单, 不能科学评价和有效控制该药的质量。基于中药质量标志物的理念和确定原则, 对其化学物质组及口服血行成分进行了辨识与表征, 进而通过整体动物模型、蛋白组学、代谢组学、网络药理学以及受体结合及酶学检测等方法, 评价其有效性、阐释作用机制、确定药效物质基础、提炼质量标志物, 为充分发挥该药的临床价值、建立科学的质量评价体系提供了理论和实验依据。

关键词: 海马补肾丸; 化学物质组; 有效性; 作用机制; 药效物质基础; 质量标志物

中图分类号: R285; R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4613-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.013

Study on quality marker of Haima Bushen Pills

ZHANG Tie-jun, XU Jun, HAN Yan-qi, ZHANG Hong-bing, YUE Nan, LIU Chang-xiao

Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Haima Bushen Pills (HBP) is a kind of major Chinese materia medica varieties, which has been proven to be effective. However, due to its weak research foundation and simple quality control method, the quality of HBP cannot be evaluated scientifically and controlled effectively. In this paper, the chemical components of HBP and components ingested into the blood were identified and characterized based on the concept and determination principle of quality marker (Q-marker). Then, through the animal models, proteomics, metabolomics, network pharmacology, receptor binding and enzyme detection and other methods, its effectiveness was evaluated, the mechanism was explained, the effective components were determined, and the Q-marker was extracted. This paper provides theoretical and experimental evidence for giving full play to the clinical value and establishing a scientific quality evaluation system of HBP.

Key words: Haima Bushen Pills; chemical components; efficacy; mechanism; effective material basis; quality marker

海马补肾丸是天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂独家产品, 由海马、熟地黄、鲜雀肉、淫羊藿、人参等 36 味中药组成, 其中包含动物药 11 味, 植物药 25 味; 具有滋阴补肾、强身健脑之效, 用于身体衰弱、气血两亏、肾气不足、面黄肌瘦、心跳气短、腰酸腿疼、健忘虚喘。虽然已有药效及临床研究证实海马补肾丸疗效确切, 但其药效物质基础并不十分清楚, 质量控制方法简单, 不能科学评价和有效控制该药的质量。中药质量标志物 (Q-marker) 是刘昌孝院士^[1]提出的中药质量新概念, 因其具有与中药有效性密切关联、指标成分特异专属、可传递与溯源以及从中医药配伍环境出发等特

点, 极大地提高了中药质量评价科学性与完整性, 能更有效地提高中药质量控制水平和有利于建立中药质量溯源体系。本文对海马补肾丸制剂的化学物质组及口服血行成分进行了辨识与表征, 进而通过整体动物模型、蛋白质组学、代谢组学、网络药理学以及受体结合及酶学检测等方法, 评价其有效性、阐释作用机制、确定药效物质基础、提炼质量标志物, 以期为其提升其质量标准提供理论和实验证据。

1 海马补肾丸中化学物质组表征和辨识

1.1 制剂中原型物质组的辨识与表征

海马补肾丸为由 36 味中药组成的大复方, 化学物质组的辨识与表征是揭示该药科学内涵的前提和

收稿日期: 2019-09-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81430096); 国家自然科学基金重点项目 (81830111)

作者简介: 张铁军, 研究员。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

*通信作者 刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liuchangxiao@163.com

必要条件,也是确定质量标志物的基础。本课题组从海马补肾丸中共表征辨识出 320 个化合物,其中挥发性成分 105 个、非挥发性成分 215 个,另外还有 21 种无机矿物质元素。

采用 GC-MS 技术方法,优化色谱-质谱检测条件,对海马补肾丸挥发性成分进行分析研究。从海马补肾丸中共辨识得到 105 个挥发性化合物,主要为烯烃类、醇类、酮类、脂肪酸类及脂肪酸酯类成分,其中茴香脑、丁香酚、石竹烯、2',3',4'-三甲氧基苯乙酮、棕榈酸、十四酸乙酯、9-十六碳烯酸乙酯、软脂酸乙酯等含量较高。

运用 RP-LC-MS 和亲水作用色谱(HILIC)-LC-MS 的技术方法,分别对海马补肾丸非挥发性成分进行分析研究。在海马补肾丸中共鉴定得到 215 个非挥发性化合物,主要为磷脂类、有机酸类、生物碱类、苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮类、三萜皂苷类及氨基酸等成分。进一步结合文献进行成分的药材来源归属,其中来源于人参 10 个、熟地黄 8 个、山茱萸 5 个、补骨脂 14 个、附子 23 个、黄芪 5 个、当归 10 个、枸杞子 1 个、淫羊藿 34 个、肉苁蓉 17 个、狗脊 3 个、杜仲 10 个、党参 4 个、茯苓 1 个、覆盆子 15 个、五味子 14 个、肉桂 1 个、茴香 3 个、母丁香 1 个、牛膝 2 个、甘草 14 个,动物药海马、鹿茸、狗肾、驴肾、鲜雀肉、鹿筋、干海米、海蛆、蛤蚧主要为磷脂、氨基酸及核苷类等成分。

采用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)对海马补肾丸成品制剂中 21 种无机矿物质元素进行定量研究,通过分析各元素在全方中的比重,发现钙元素占全方无机矿物质元素总量的 40%以上,主要来源于龙骨、豹骨等动物药。钾、磷、钠元素质量分数也较高,均在 10%以上,其他各无机矿物质元素的含量相对较低。

1.2 入血成分及其代谢产物表征和辨识

中药复方制剂口服后,其有效物质首先吸收入血,再通过血液运输到达疾病治疗靶点发挥治疗作用,因此,只有被吸收入血的化学成分或相关代谢物,才有机会在靶器官维持一定的浓度,才有可能被看作是潜在的生物活性成分。本课题组进一步采用血清药物化学方法,运用 UPLC-Q/TOF-MS 技术,对口服给予海马补肾丸后大鼠血浆中吸收的原型成分及其代谢产物进行辨识研究,通过建立给药血浆的血行指纹谱,比对成品制剂、大鼠给药血浆及空白血浆样品的色谱图,筛选分析血中移行的原型药

物成分及代谢物,结果在大鼠血浆中共鉴定得到 30 个海马补肾丸相关的外源性化合物,包括 22 个原型药物成分和 8 个代谢产物,它们可能是复方潜在真正的活性成分。

2 基于“有效性”的质量标志物的发现与确定

2.1 基于整体动物模型药效学的“有效性”研究

“有效性”是质量标志物确定的重要条件。海马补肾丸具有滋阴补肾、强身健脑的功效,用于身体衰弱、气血两亏、肾气不足、面黄肌瘦、心跳气短、腰酸腿疼、健忘虚喘等临床证候。本课题组采用多种动物模型,从补肾填精、调节免疫、抗应激及益智健脑几个方面对海马补肾丸进行药效学评价,并研究其作用机制,为其有效性提供实验依据。

采用氢化可的松致小鼠肾阳虚模型,观察海马补肾丸抗阳虚作用和对勃起功能的影响;采用甲状腺素加利血平致小鼠肾阴虚模型,观察海马补肾丸抗阴虚作用;采用去势雄性大鼠及幼龄雄性大鼠模型,观察海马补肾丸雄性激素样作用^[2]。采用免疫功能低下小鼠模型,观察海马补肾丸免疫增强作用;采用小鼠负重游泳及常压缺氧模型,观察海马补肾丸抗应激作用;采用小鼠记忆获得性障碍及记忆巩固性障碍模型,观察海马补肾丸益智健脑作用^[3]。结果显示,给药 10 d,海马补肾丸 1.1、2.2 g/kg 均明显增加肾阳虚小鼠的自主活动次数,延长低温游泳时间,增加胸腺、脾脏的脏器系数;明显减少肾阴虚小鼠跳台错误次数、延长错误潜伏期,明显提高小鼠痛阈,增加小鼠胸腺、脾脏的脏器指数。给药 2 周,海马补肾丸 0.56、1.12 g/kg 均明显增加大鼠基础勃起率/海绵体静息率(bR/rR)值、海绵体内压,明显改善小鼠勃起功能,明显增加去势大鼠血清睾酮(T)浓度及前列腺、包皮腺、提肛肌的脏器指数,明显增加正常幼龄大鼠血清 T、卵泡生成素(FSH)浓度及精液囊的脏器指数,明显延长疲劳大鼠游泳时间;海马补肾丸 1.1、2.2 g/kg 均能明显增强免疫功能低下小鼠的非特异性免疫及体液免疫功能;海马补肾丸 2.2 g/kg 能明显改善小鼠的记忆获得及记忆巩固障碍。给药 5 d,海马补肾丸 1.1、2.2 g/kg 能明显延长小鼠常压缺氧存活时间。实验结果表明,海马补肾丸具有明显的滋阴补肾、强身健脑作用,与其功能主治基本相符。

2.2 基于系统生物学的“有效性”研究

在整体动物模型药效学研究的基础上,进一步对海马补肾丸进行代谢组学和蛋白组学研究,根据

实验结构进行整合分析,从代谢通路和关键蛋白的角度阐释其作用机制。

复制大鼠肾阳虚模型,给予海马补肾丸干预,结果表明海马补肾丸对氢化可的松所致的肾阳虚大鼠有治疗作用,对模型大鼠的一般状态、生理生化指标都有明显的调节和改善作用。进一步采用代谢组学的研究方法,借助 UPLC/Q-TOF MS 等技术,建立肾阳虚大鼠血清代谢指纹图谱;并结合主成分分析进行模式识别,寻找与肾阳虚相关的潜在生物标志物,探讨肾阳虚相关的内在代谢循环途径和信号通路。通过比较不同分组(正常、模型、治疗)的潜在生物标志物的种类及含量变化,探究海马补肾丸治疗肾阳虚的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

采用同位素相对标记与绝对定量(iTRAQ)技术筛选在接受氢化可的松刺激前后以及服用海马补肾丸前后的实验大鼠的下丘脑、垂体、肾上腺组织内的差异表达蛋白水平。这些由 iTRAQ 筛选出的差异表达蛋白以及针对这些蛋白的生物信息学分析将有助于全面了解肾阳虚的发病机制和海马补肾丸的作用机制。

结果发现,通路大多富集在亚油酸代谢、甘油磷脂代谢、甾体激素生物合成、磷酸肌醇代谢等 11 条靶标代谢通路。通过分析发现,代谢组学及蛋白组学存在 7 条共有通路,即甾体激素生物合成(steroid hormone biosynthesis)、甾体生物合成(steroid biosynthesis)、刺激神经组织的配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)、亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)、半乳糖代谢(galactose metabolism)、脂肪酸代谢(fatty acid metabolism)、不饱和脂肪酸生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)通路。据此推测,海马补肾丸通过作用于垂体组织的 Cyp21a1、Hsd3b1 等蛋白,肾上腺组织的 Cyp51a1、Dhcr7 等蛋白来调节甾体激素的生物合成通路以及甾体生物合成通路,进而调节 17 α -hydroxypregnenolone、11 β -hydroxyprogesterone、androstenedione、骨化三醇(calcitriol)4 个代谢标志物的血清含量,从而调节机体激素水平。有文献报道^[4],骨化三醇是活化的维生素 D,对于慢性肾功能衰竭患者有良好的治疗效果,能够改善炎症状态,提高肾功能,其可能的机制为骨化三醇与肾脏、甲状旁腺等器官直接作用,提高甲状腺对钙的敏感性,促进钙吸收,纠正

钙磷代谢紊乱。同时,骨化三醇还可以抑制甲状旁腺细胞,抑制甲状旁腺激素分泌,从而避免甲状旁腺功能亢进发生。

有研究^[5]表明,内源性大麻素系统在下丘脑-垂体-卵巢轴有广泛的分布,其特异性受体 CB1 可表达于子宫及输卵管,也可表达于卵巢的皮质和髓质,大麻素花生四烯酸乙醇胺(AEA)和 2-花生酰基甘油(2-AG)结合并活化内源性大麻素受体,脂肪酸酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)下调内源性大麻素的浓度,对生殖功能发挥重大调控作用。海马补肾丸还可以通过调节刺激神经组织的配体-受体相互作用通路中甘氨酸受体 β -亚单位基因(Glrb)蛋白的表达,以及 2-花生酰基甘油(2-arachidonylglycerol)代谢标志物的含量,从而刺激中枢神经兴奋,达到治疗目的。

海马补肾丸可通过调节垂体和肾上腺 Fads2 蛋白的表达来影响亚油酸代谢通路过程中的亚油酸的代谢;通过作用于垂体组织的 Pfkfb3、Akr1b7 蛋白来调节半乳糖代谢通路,进而影响其通路过程中的肌醇的含量,从而调节糖、脂等能量代谢。

海马补肾丸可通过调节垂体和肾上腺组织的 Fads2、Tecn、Cpt1a、Hacd3、Acs1l、Acadl 蛋白来调节脂肪酸代谢通路,进而调节代谢物左旋肉碱(L-carnitine)的水平。左旋肉碱是一种人体必需的营养素^[6],研究发现,左旋肉碱作为一种抗氧化剂能够增强细胞抗氧化能力,抑制细胞凋亡,从而保护肾小管上皮细胞。毛科稀等^[7]发现在给予左旋肉碱治疗后,老年慢性阻塞性肺疾病患者的免疫功能得到改善。在生殖系统疾病中,左旋肉碱能治疗男子不育症,参与精子能量代谢、稳定精子细胞膜^[8]。

海马补肾丸可通过作用于垂体组织的 Fads2、Tecn、Hacd3 和肾上腺组织的 Fads2,调节不饱和脂肪酸生物合成信号通路,进而调节二十二碳六烯酸(docosa-hexaenoic acid, DHA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)、二十二碳四烯酸(adrenic acid)、十八烯酸(oleic acid)、甘油二酯(diacylglycerol)、二十碳二烯酸(eicosadienoic acid)等代谢物的代谢,加快脂肪分解代谢速度,从而增加能量的产生、增强记忆力和免疫力。有研究^[6]表明,DHA 是一种高度不饱和脂肪酸,对人体的生长发育具有重要作用,DHA 在健脑明目、增强记忆力和免疫力、抗炎、抗癌等方面均有广泛的作用。有文献报道^[9],补充 DHA 对中老年改善认知障碍,特

别是对阿尔茨海默病（AD）的治疗具有重大意义。

综上所述,氢化可的松诱导肾阳虚大鼠模型下丘脑-垂体-肾上腺组织的蛋白表达以及相关通路调节发生紊乱,而海马补肾丸给药干预后,机体肾阳虚状态有所改善,通过蛋白组学及代谢组学研究结果推测,其治疗机制涉及调节糖、脂、氨基酸代谢等能量代谢过程,中枢神经系统、激素调节、免疫作用以及炎症反应等方面,通过改善机体能量供应,提高中枢神经系统的调节作用,促进激素合成,增强机体免疫力,缓解炎症反应等达到治疗肾阳虚的作用,显示了海马补肾丸的多靶点、多通路的作用特点。

2.3 基于网络药理学的质量标志物的预测

在化学物质组及药效作用机制研究的基础上，进一步采用网络药理学方法，建立海马补肾丸“化合物-靶点蛋白-信号通路-功效”网络，预测质量标志物。

选取海马补肾丸中包括甾体类、生物碱类、皂苷类、萜类、黄酮类、环烯醚萜及其苷类、酚酸类等类型在内的 64 个代表性化合物,并根据海马补肾丸的主要功效和适应症,选取与激素调节、免疫、炎症、能量代谢以及益智健脑相关的 16 个核心靶点蛋白,通过 TCMSP、CTD、ETCM、Super Target、UNIPROT、STRING 10、DAVID 和 KEGG 等相关数据库,预测分析了海马补肾丸中 64 个主要成分的作用靶点,借助 STRING 数据库获取相关通路信息并进行关联分析,从网络药理学角度,阐释海马补肾丸多成分、多靶点、多途径治疗肾阳虚的科学内涵,预测其可能的质量标志物。

实验结果提示,来源于海马、鹿茸、人参、淫羊藿等药材的胆固醇、人参皂苷 Rg_1 、淫羊藿苷等成分与孕酮受体 (PGR) 蛋白相互作用,参与孕酮调节的卵母细胞成熟通路 (progesterone-mediated oocyte maturation) 过程。已有研究表明,胆固醇为人体的肾上腺皮质和性腺所释放的各种激素,如皮质醇、醛固酮、睾丸酮、雌二醇以及维生素 D 的前体物质^[10]。人参皂苷 Rg_1 作用于下丘脑,产生激素调节作用,在外周可抑制皮质酮和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 的反应,发挥抑制下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴的作用,促进神经发育,调节神经递质、激素和酶的生成与释放,提高人体对周围环境的适应能力及应激能力,提高认知能力及性功能^[11]。淫羊藿苷具有雄激素、雌激素样作用,能

提高雄性激素和雌性激素水平,可明显促进性激素分泌,提高性机能,能促进一氧化氮和环磷酸腺苷的生成,导致阴茎海绵体平滑肌松弛,起到改善勃起功能的作用^[12]。

来源于狗肾、鹿筋、黄芪、甘草药材的睾酮、毛蕊异黄酮、异甘草素、槲皮素等成分可作用于雄激素受体 (AR) 蛋白发挥调节作用。有研究表明, 毛蕊异黄酮具有激活肾上腺、释放皮质激素的作用^[13]; 异甘草素属植物雌激素, 在机体缺乏雌激素时表现出雌激素样作用^[14]; 槲皮素可显著上调乳腺上皮细胞雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α) 及 ER β 的比值, 影响机体内整体的生殖内分泌水平^[15]。

来源于熟地黄、黄芪、山茱萸、牛膝、甘草等药材的齐墩果酸、甘草酸、槲皮素、毛蕊花糖苷等成分可作用于白细胞介素-6 (IL-6) 蛋白, 参与调节肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、辅助性 T 细胞 17 分化 (Th17 cell differentiation) 等通路过程。李雅玲等^[16]发现, 齐墩果酸可抑制组胺、花生四烯酸酯氧酶 (LTB4) 等炎症因子的合成和释放, 抑制炎症的发生, 其抗炎机制可能与垂体-肾上腺皮质系统有关。甘草酸可能通过对花生四烯酸水解所需的磷脂酶 A2 和脂加氧酶活性的抑制, 使前列腺素 (PGs) 合成释放受阻, 同时选择性地抑制补体系统的激活途径而发挥抗炎作用^[17]。孙涓等^[18]研究表明, 槲皮素能抑制组胺、白三烯、前列腺素 D 等炎症介质释放; 还能在 mRNA 水平和蛋白水平抑制诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 和 C 反应蛋白的产生, 发挥抗炎作用。毛蕊花糖苷能通过抑制转化生长因子 β 活化激酶 1-氨基端激酶 (TAK-1/JNK) 信号通路的活性而激活酪氨酸磷酸酶 1 (SHP-1) 信号通路起到抗炎作用^[19]。

来源于覆盆子、菟丝子、茯苓、山药、肉桂等药材的鞣花酸、金丝桃苷、茯苓酸、薯蓣皂苷、桂皮醛等成分可作用于核转录因子 κB p65 蛋白 (RELA) 靶点, 参与调节 B 细胞受体信号通路 (B cell receptor signaling pathway)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway)、辅助性 T 细胞 1 和 2 分化 (Th1 and Th2 cell differentiation)、花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism) 等与免疫、抗炎相关的过程。

来源于牛膝、山药、人参等药材的蜕皮甾酮、

薯蓣皂苷、人参皂苷 Rb₁、Re 等成分作用于蛋白激酶 (Akt1) 蛋白, 参与调节脂肪细胞内脂类分解调控 (regulation of lipolysis in adipocytes)、脂肪细胞因子信号通路 (adipocytokine signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-蛋白激酶 B 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、甲状腺激素信号通路 (thyroid hormone signaling pathway) 等通路过程。已有研究发现, 蜕皮甾酮可增加蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化水平, 同时抑制其下游 FoxO1 蛋白的表达水平, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 表达也有所下降^[20]。有文献报道^[21-22], 人参皂苷 Rb₁ 可通过调节氨基末端激酶 (JNK) 信号通路改善糖脂代谢异常。姚培培^[23]在研究人参皂苷 Re 改善脂质代谢的作用机制时发现, 人参皂苷 Re 能显著降低小鼠血清三酰甘油和胆固醇的含量; 能显著改善组织脂肪的沉积; 调控肝脏、皮下脂肪、内脏脂肪组织中脂肪酸氧化、脂肪生成代谢相关基因的表达水平, 并可能通过激活磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶信号通路 (P-AMPK), 改善机体脂代谢。

来源于蛤蚧、黄芪、杜仲、狗肾等药材的牛磺酸、槲皮素、鞣酐等成分作用于丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 蛋白, 参与调节缺氧诱导因子-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、叉形头转录因子信号通路 (FoxO signaling pathway)、哺乳动物雷帕霉素蛋白信号通路 (mTOR signaling pathway) 等通路。有文献报道^[24], 牛磺酸可促进胰岛素分泌, 改善胰岛素抵抗, 促进细胞摄取和利用葡萄糖, 降低血糖浓度。槲皮素能够降低糖尿病肥胖大鼠血糖和胆固醇、调节血脂紊乱^[25]。鞣酐能增加胰岛素的 mRNA 转录和表达, 并能促进胰岛素的分泌来改善糖代谢异常^[26]。

来源于五味子、覆盆子等药材的五味子醇甲、金丝桃苷等成分与乙酰胆碱酯酶 (AChE) 蛋白相互作用, 参与胆碱能的合成 (cholinergic synapse) 等通路过程。有学者发现, 五味子醇甲有神经保护作用, 其能增强 PC12 细胞对谷氨酸的摄取, 降低胞外谷氨酸的浓度, 并促进 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) PC12 细胞摄取谷氨酸^[27]。金丝桃苷可以降低海马活性氧 (ROS) 和丙二醛 (MDA) 含量以及血清促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、ACTH 和皮质酮 (CORT) 水平, 同时增加海马超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和糖皮质激素受体的表达^[28]。

来源于淫羊藿、人参、黄芪等药材的人参皂苷

Re、毛蕊异黄酮、淫羊藿苷等成分可作用于 NOS2 靶点。人参皂苷 Re 可以通过干预 AD 小鼠体内氨基酸、卵磷脂和鞘脂等代谢途径, 改善 AD 小鼠的学习记忆能力, 减少小鼠大脑中的 β -淀粉样蛋白 (A β), 引起 AD 的重要物质沉积, 从而发挥对 AD 的治疗作用^[29]。毛蕊异黄酮可能通过降低脑组织 AChE 活性来提高 D-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力^[30]。淫羊藿苷能够抑制脂多糖 (LPS) 诱导的 AD 炎症模型小鼠海马 iNOS 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 基因的表达, 改善小鼠的学习记忆能力^[31]。

基于以上网络药理学分析, 预测胆固醇、淫羊藿苷、鞣酐、毛蕊异黄酮、异甘草素、槲皮素、齐墩果酸、甘草酸、毛蕊花糖苷、鞣花酸、金丝桃苷、茯苓酸、薯蓣皂苷、桂皮醛、蜕皮甾酮、薯蓣皂苷、牛磺酸、五味子醇甲及人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re 等成分可能是海马补肾丸的药效物质基础, 也是潜在的质量标志物。

2.4 基于受体结合实验的质量标志物的预测

选取促性腺激素释放激素受体 (GNRHR)、中枢促肾上腺皮质激素释放因子 1 (CRF1) /促肾上腺皮质激素释放因子受体 1 (CRHR1)、雌激素受体 α (ER α)、磷酸二酯酶 5 (PDE5) 以及 AChE 为研究载体, 通过运用胞内钙离子荧光检测和酶抑制剂检测技术评价海马补肾丸全方及淫羊藿次苷 II、淫羊藿苷、毛蕊异黄酮、槲皮素、山柰酚、异甘草素、金丝桃苷、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rc、黄芪甲苷、齐墩果酸、雌二醇、鞣花酸、 β -蜕皮甾酮、五味子醇甲、五味子酚、五味子乙素、京尼平苷酸、马钱苷、毛蕊花糖苷、松果菊苷、补骨脂素、次乌头碱等主要单体成分给药后对 GNRHR、CRF1/CRHR1、ER α 的激动作用及对 PDE5 和 AChE 的抑制活性。通过研究可确定海马补肾丸的关键作用靶点, 揭示其药效分子机制, 并在分子层面阐释其药效物质基础, 确定其质量标志物。

结果表明, 源于淫羊藿、肉苁蓉、熟地黄、覆盆子药材的淫羊藿次苷 II、淫羊藿苷、毛蕊花糖苷、鞣花酸对 PDE5A1 具有显著抑制作用; 从而改善勃起功能障碍, 是壮阳作用的主要物质基础; 来源于补骨脂药材的补骨脂素对 AChE 有抑制活性, 是改善记忆作用的主要药效物质基础; 补骨脂素、毛蕊异黄酮、松果菊苷、人参皂苷 Rb₁、五味子乙素、淫羊藿苷、山柰酚、金丝桃苷、异甘草素 9 个化合

物均有植物雌激素样作用, 海马补肾丸治疗肾阳虚的机制之一为激活 ER α 雌激素受体, 从而调控促性腺激素的分泌, 影响生殖功能, 来源于附子药材的马钱苷对 CRHR1 具有激活作用, 上述化合物是治疗阳虚的药效物质基础。

3 结语

海马补肾丸为由 36 味药组成的中药大复方, 并含有多味动物药和矿物药。化学物质组的辨识与表征具有相当大的难度。本课题组从海马补肾丸中共表征辨识出 320 个化合物, 并从血中辨识 22 个吸收的原型成分和 8 个代谢产物, 明确了化学物质组, 为质量标志物的确定奠定了基础。

“有效性”是确定质量标志物的关键要素, 复方药物有效性是基于方(药)-证(病)的对应关系, 因此, 本课题组从全方和多种整体动物模型入手, 观察和评价其药效作用; 进一步在方法学上, 采用“系统-系统”的模式, 进行全方的蛋白组学和代谢组学研究; 采用“要素-要素”的模式, 进行化合物的受体结合实验和酶学检测; 并将网络预测与实验验证相结合, 层层破茧, 确定药效物质基础, 提炼和发现质量标志物。虽然“有效性”是确定质量标志物的最重要的条件, 但基于应用目的, “可测性”又是必要条件, 本课题组后续将针对“特有性”和“可测性”, 对海马补肾丸的质量标志物进行深入研究, 最终确定质量标志物, 并应用于该药质量评价和质量控制体系。

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] 只德广, 庞纪平, 金兆祥, 等. 海马补肾丸滋阴补肾作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2632-2638.
- [3] 庞纪平, 只德广, 金兆祥, 等. 海马补肾丸免疫调节及抗应激作用的实验研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1297-1303.
- [4] 胡诗德, 简 讯, 陈 慧, 等. 骨化三醇联合补气口服液对慢性肾功能衰竭患者血清瘦素及睾酮水平的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(3): 500-502.
- [5] 冯晓晔. 多囊卵巢综合征患者联合应用达英-35 及二甲双胍治疗前后内源性大麻素系统变化的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [6] 刘丽玮. 基于代谢组学的金匱肾气丸对 16 月龄小鼠增龄性改变的影响研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [7] 毛科稀, 熊金梦, 叶旭军. 左旋肉碱治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者效果 [J]. 安徽医学, 2016, 37(12): 1499-1501.
- [8] 龚东明, 白双勇, 李 铮. 左旋肉碱治疗男子不育症研究进展 [J]. 生殖与避孕, 2007(2): 141-144.
- [9] 李 瑾, 陈韵美, 朱 华, 等. 营养素与老年认知障碍的防治 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9): 1682-1685.
- [10] 关 欣, 王 帅, 李天娇, 等. 基于液质联用技术的慢性肾脏病不同阶段患者血浆代谢组学研究 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(4): 433-437.
- [11] 高 妍, 薛 薇, 李 敏, 等. 人参皂苷 Rg₁ 的中枢药理作用及多靶点机制研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(1): 107-111.
- [12] 王可可, 龚其海. 淫羊藿化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(19): 16-18.
- [13] 夏天爽, 薛黎明, 张巧艳, 等. 补肾阳与补肾阴中药抗骨质疏松作用的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37(2): 109-114.
- [14] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分对生殖系统药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(4): 367-374.
- [15] 闵佳玲, 许春莲, 舒 翔, 等. 长期槲皮素膳食暴露对小鼠乳腺发育的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(21): 116-121.
- [16] 李雅玲, 冯 威, 陈航宇, 等. 齐墩果酸药理作用研究 [J]. 生物技术世界, 2015(4): 125-127.
- [17] 王 兵, 王亚新, 赵红燕, 等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.
- [18] 孙 涓, 余世春. 槲皮素的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
- [19] 郑 帅, 杨 敏. 毛蕊花糖苷治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(16): 3232-3236.
- [20] 盛培培. 蜕皮甾酮对氧化应激诱导肝糖异生的影响 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2012.
- [21] 刘思明, 玛尔江·巴哈提别克. 浅析人参皂苷 Rb₁ 在改善糖尿病大鼠心脏损伤及代谢功能中的作用 [J]. 当代医药论丛, 2018, 16(13): 157-158.
- [22] 曹 萌. 人参皂苷 Rb₁ 通过抑制 JNK 信号通路改善糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢异常 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 531-536.
- [23] 姚培培. 人参皂苷 Re 改善脂代谢的作用机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [24] 赵玉星, 郭俊霞, 陈 文. 牛磺酸改善糖代谢的量效分

- 析 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 295-301.
- [25] 郭艳芳, 张 皓, 朱 玲, 等. 槲皮素改善糖尿病肥胖大鼠糖脂代谢紊乱及总胆固醇的作用 [J]. 解剖学研究, 2018, 40(6): 505-509.
- [26] 吴正财, 何宏星. 鞣酐对老年雄性糖尿病大鼠糖代谢的影响 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(2): 29-31.
- [27] 杨晓秋. 五味子健脑补益强壮作用的药理研究 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(23): 107-108.
- [28] 樊慧杰, 柴 智, 周 然. 金丝桃苷对神经系统保护作用的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4560-4562.
- [29] 李菁媛. 基于代谢组学的人参皂苷 Re 对阿尔茨海默病模型小鼠的作用及机制研究 [D]. 北京: 中国医科大学, 2018.
- [30] 于德红, 王 美, 陈金铭, 等. 毛蕊异黄酮对衰老小鼠学习记忆能力的改善作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 292-295.
- [31] 赵 霞, 都中蕊, 陈文芳. 淫羊藿苷对 AD 小鼠炎症反应和学习记忆能力影响 [J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(2): 127-129.