

基于“五原则”的脑震宁颗粒质量标志物(Q-marker)的辨识分析

曹建华^{1,2}, 刘艳之³, 刘海霞³, 卫春红³, 王 将³, 秦雪梅¹, 王旭文^{3*}, 李震宇^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西振东安特生物制药有限公司, 山西 晋中 030600

摘要: 脑震宁颗粒为经典的中药复方制剂, 具有凉血活血、化瘀通络、益血安神、宁心定智、除烦止呕等功效, 现代临床常用于治疗脑外伤引起的头痛、头晕、烦躁失眠、健忘、恶心呕吐等。通过梳理现代研究文献, 基于中药质量标志物(Q-marker)“五原则”对脑震宁颗粒的Q-marker进行预测分析, 进一步对已选定的Q-marker进行现代药理文献综述, 构建“Q-marker-靶点-通路-疾病”的网络关联图, 以期脑震宁颗粒的质量控制研究提供参考。

关键词: 脑震宁颗粒; 质量标志物; 质量控制; 五原则; 网络构建

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4654-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.018

Analysis of quality marker in Naozhenning Granule based on “five principles”

CAO Jian-hua^{1,2}, LIU Yan-zhi³, LIU Hai-xia³, WEI Chun-hong³, WANG Jiang³, QIN Xue-mei¹, WANG Xu-wen³, LI Zhen-yu¹

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

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Zhendong Ante Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

Abstract: Naozhenning Granule (NG) is a traditional Chinese medicine prescription, which can cool and activate blood, resolve stasis and dredge collaterals, enrich blood and tranquilize mind, calm nerves and arrest vomiting. The clinical studies have also confirmed that NG was effective for the treatment of headache, dizziness, irritability, insomnia, forgetfulness, nausea, and vomiting caused by cerebral trauma. The quality markers (Q-markers) of NG are predicted and analyzed based on the “five principles” of Q-markers of Chinese materia medica and the research literatures in the recent years. The modern pharmacological research of the selected Q-markers was reviewed and analyzed. Then the network of “Q-marker, targets, pathway, and disease” was constructed, in order to provide the scientific basis for the quality control study of NG.

Key words: Naozhenning Granule; quality marker (Q-marker); quality control; five principles; network construction

中药质量是对中药有效性和安全性的反映和表征, 而质量控制和评价是中药现代化发展的关键科学问题^[1-2]。但现行质量标准仍存在诸多问题, 难以客观评价和有效控制中药质量^[3], 针对这个问题, 刘昌孝院士在研究现有质量评价与控制方法及存在的问题上, 提出中药质量标志物(Q-marker)的新概念^[4], 而中药的有效性及安全性在临床上主要是

通过方剂表达, 只有在方剂配伍的环境下, 筛选出能够发挥疗效的显效成分, 由此建立的质量标准才具有临床的有效性和安全性。在此基础上有学者提出复方中药Q-marker的“五原则”研究路径, 目前已经应用于疏风解毒胶囊、桂枝茯苓胶囊等复方中药制剂Q-marker的预测分析^[5-6]。

脑震宁颗粒(Naozhenning Granule, NG)是一

收稿日期: 2019-05-28

基金项目: 山西省重点研发计划(201603D3113003); 山西省中药现代化振东专项基金(2106ZD0404); 山西省研究生联合培养基地人才培养项目(2018JD05)

作者简介: 曹建华(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药物质基础研究。Tel: 17836205385 E-mail: caojhsxu@163.com

*通信作者 李震宇, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制及活性成分研究。Tel: 15834101402 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

王旭文, 男, 高级工程师, 研究方向为制药工程。Tel: 1779992004 E-mail: wangxuwen@zajt.com

种纯中药复方制剂,由当归、地黄、牡丹皮、川芎、地龙、丹参、茯苓、陈皮、酸枣仁、竹茹、柏子仁 11 味药材组成。其中以当归养血和血为君药;以生地黄、牡丹皮凉血散瘀,丹参、川芎活血化瘀共为臣药;以地龙清热活络、利尿止痉,竹茹清热涤痰、解郁止呕,陈皮理气化痰、健脾燥湿,茯苓健脾利湿、宁心安神,柏子仁、酸枣仁养心安神共为佐使药^[7]。临床上用于治疗颅脑损伤后遗症、血管神经性头痛、改善轻中型颅脑外伤症状、促进功能恢复和纠正神经功能紊乱等疾病^[8]。

NG 组方复杂,目前现有的质量控制主要集中在有效成分的测定。卫生部颁布标准中对其阿魏酸和原儿茶醛进行了薄层色谱鉴别;李献玉等^[9]采用 HPLC 法同时测定 NG 中丹酚酸 B 和橙皮苷的含量,结果两者在线性范围内均有良好的线性关系,精密度分别为 1.26%、1.08%,符合精密度要求,方法简便、精密度高、可靠性强、操作简便,可用于 NG 的质量控制;李军等^[10]采用 HPLC 法测定 NG 中阿魏酸和橙皮苷的含量,结果两者在线性范围内均有良好的线性关系,精密度与重复性 RSD 均小于 1.5%,方法灵敏、重复性高、样品处理简单,可用于 NG 的质量控制。尽管对 NG 中有效成分的测定能够为其质量控制提供依据,但是复方中药药效发挥是由多个有效成分共同作用的结果,仅对任何单一成分进行质量控制还无法达到质量控制的全面性和准确性的目的,基于 Q-marker 的检测分析已经成为中药质量控制的发展方向^[11-12]。因此,需要将 NG 中的有效成分进行多维度的分析,进而找到能够从整体上表征其质量的 Q-marker,从而建立以 Q-marker 为核心的质控指标,用于 NG 的质量控制^[13]。

本文主要依据“五原则”对 NG 的 Q-marker 进行预测分析,并结合网络药理学对筛选出的 Q-marker 进行“Q-marker-靶点-通路-疾病”的网络构建,以期对 NG 的质量控制研究提供依据。

1 Q-marker 的预测

1.1 基于质量“传递”和“溯源”的 Q-marker 的辨识

1.1.1 原料药材中化学物质的辨识 通过液相质谱法对 NG 组方药材中含有的成分进行表征和辨识,从 11 味原料药材中共辨识出 550 个化合物。其中 Wu 等^[14]从当归药材中辨识出 24 个化合物,包括 11 个酚类成分、12 个苯酞类成分和 1 个氨基酸成分;赵文军等^[15]从牡丹皮药材中辨识出 48 个化合物,

包括 11 个没食子酸类成分、17 个单萜及其苷类成分、8 个酚酸类成分、1 个三萜类成分、7 个苯乙醇类成分和 4 个黄酮类成分;高昕等^[16]从川芎药材中辨识出 30 个化合物,包括 20 个苯酞类成分、2 个黄酮类成分、1 个生物碱成分和 7 个酚酸类成分;张玉等^[17]从地龙药材中辨识出 84 个化合物,包括 11 个游离的氨基酸成分、26 个有机酸类成分、11 个核苷类成分、5 个二肽及环二肽类成分、21 个含氮类成分和 10 个其他类成分;张弛等^[18]从丹参药材中辨识出 70 个化合物,包括 50 个二萜类成分和 20 个酚酸类成分;康安等^[19]从茯苓药材中辨识出 42 个化合物,包括 35 个三萜类成分和 7 个其他类成分;张波泳等^[20]从地黄药材中辨识出 26 个化合物,包括 12 个环烯醚萜苷类成分、8 个苯乙醇苷类成分、3 个核苷类成分、2 个有机酸类成分和 1 个紫罗兰酮;马琳等^[21]从陈皮药材中辨识出 32 个化合物;从柏子仁药材中辨识出 49 个化合物^[22-23];从酸枣仁药材中辨识出 131 个化合物,包括 20 个达玛烷型三萜皂苷类成分、14 个五环三萜类成分、34 个黄酮类成分、18 个生物碱类成分、41 个脂肪酸类成分和 4 个酚类成分^[24-27];从竹茹药材的乙醇提取物中辨识出 14 个化合物,包括 1 个三萜类成分、6 个甾体类成分、1 个黄酮类成分、1 个木脂素类成分和 5 个其他类成分^[28-29]。

1.1.2 制剂中原型成分的基础表征和辨识研究 采用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱的方法^[30],对 NG 中的化学成分进行表征和辨识,从 NG 中共辨识出 161 个化合物,包括 26 个黄酮及黄酮苷类成分、9 个环烯醚萜苷类成分、9 个生物碱类成分、8 个丁基苯酞类成分、8 个酚酸类成分、8 个单萜苷类成分,以及有机酸、糖类、氨基酸等中药材共有成分。对所辨识的化合物进行归属,其中 64 个来源于酸枣仁、62 个来源于陈皮、58 个来源于川芎、54 个来源于当归、50 个来源于丹参、49 个来源于牡丹皮、42 个来源于地黄、36 个来源于竹茹、37 个来源于柏子仁、32 个来源于地龙、28 个来源于茯苓。上述归属包括多种药材中的共有成分,如糖类、氨基酸类以及小分子的有机酸类。

1.1.3 入血成分及其代谢产物的辨识 采用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱的方法,优化色谱、质谱分离检测,快速地分析和鉴定了通过口服给予 NG 后大鼠的血清中的吸收原型成分及其代谢产物^[27]。口服给予 NG 后大鼠血清中共鉴定出 60

个与 NG 相关的外源性化学成分,其中包括 30 个原型成分和 30 个代谢产物,分别为 5 个环烯醚萜类成分、11 个丁基苯酞类成分、4 个丹酚酸类成分、4 个黄酮苷类成分、2 个酸枣仁皂苷类成分、4 个生物碱类成分、3 个咖啡酰奎尼酸类成分和 27 个其他类成分。进一步归属可知,7 个化合物来源于所有药材、17 个化合物来源于当归、9 个化合物来源于地黄、9 个化合物来源于丹参、9 个化合物来源于陈皮、1 个化合物来源于地龙、12 个化合物来源于牡丹皮、18 个化合物来源于酸枣仁、18 个化合物来源于川芎、1 个化合物来源于竹茹、1 个化合物来源于柏子仁、1 个化合物来源于茯苓。

1.1.4 NG 药材原有成分-制剂原型成分-血中效应成分的传递和变化 通过对药材、制剂与血中移行成分的整体辨识,进一步将其制剂中的成分和入血

后的效应成分进行对比归属,阐明了质量“传递”和“溯源”的过程(表 1),明确其变化规律(图 1)。现代研究表明在血清中能够检测到的原型成分和代谢产物,可能为复方制剂潜在的真正的活性成分,并与 NG 的药理活性直接相关,应作为 Q-marker 的重要选择^[5]。

1.2 基于成分特有性对 NG Q-marker 的辨识

在 NG 中当归为君药,地黄、牡丹皮、丹参、川芎为辅药,陈皮、酸枣仁为佐使药。而以上 7 味药材也是 NG 入血成分的主要来源,故对其成分的特有性进行分析,进而选定各单味药中的特有成分作为 NG Q-marker 确定的重要依据和可行路径。

1.2.1 当归、川芎成分的特有性 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的

表 1 NG 原型成分及入血成分与各味药材的归属分析

Table 1 Analysis on compositions in NG and its blood components and attribution of various herbs

药材来源	制剂中原型成分数 (特有成分)	成分类型	入血成分数 (特有成分)	成分类型
酸枣仁	64 (21)	生物碱类、三萜苷类、黄酮类	25 (9)	皂苷类、生物碱类、黄酮类
陈皮	62 (22)	黄酮及其苷类、三萜类	16 (2)	黄酮类
川芎	58 (2)	苯酞类、生物碱类、有机酸类、多糖类	25 (0)	苯酞类
当归	54 (0)	苯酞类、有机酸、黄酮类、多糖类	24 (0)	苯酞类
丹参	50 (13)	酚酸类、二萜类、氨基酸类	16 (4)	酚酸类、二萜类
牡丹皮	49 (14)	酚及其酚苷类、三萜及其苷类、单萜及其苷类	19 (6)	酚及其酚苷类
地黄	42 (18)	环烯醚萜类、多糖类、氨基酸类	16 (6)	环烯醚萜类
竹茹	36 (1)	木脂素类、三萜类	8 (0)	小分子有机酸
柏子仁	37 (0)	脂肪油、三萜类	8 (0)	小分子有机酸
地龙	32 (0)	氨基酸类、有机酸	8 (0)	小分子有机酸
茯苓	28 (0)	三萜类	8 (0)	小分子有机酸

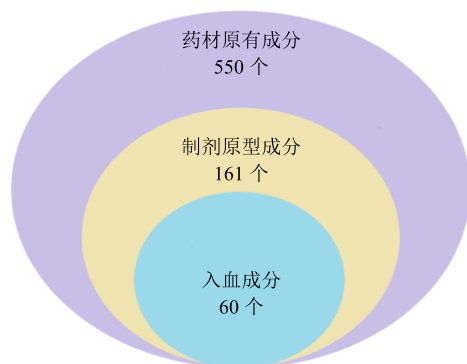


图 1 NG 中物质变化示意图

Fig. 1 Schematic diagram of material change in formation of NG

干燥根茎。根据文献分析和本课题组的研究表明,二者同属一科,有相似的化学成分和药理作用,主要含有挥发油类、有机酸类、多糖类和黄酮类等成分。二者均以苯酞类为主的挥发油类成分为主要活性成分,具有多种药理作用^[31],可作为二者在 NG 中区别于其他药材的特征成分。

1.2.2 地黄成分的特有性 地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根,根据文献分析和本课题组的研究表明,地黄中主要含有环烯醚萜苷类、多糖类、氨基酸类和其他类等成分,其中以梓醇、地黄苷 A/D/E 等为主的环烯醚萜苷类为地黄中的特征成分,药理作用广泛,主要

表现在对免疫系统、中枢神经系统、血液系统等方面^[32]。

1.2.3 牡丹皮成分的特有性 牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 根据文献分析和本课题组的研究表明, 牡丹皮中主要含有三萜及其苷类、单萜及其苷类、酚及酚苷类和其他类等成分, 其中以丹皮酚为主的酚及酚苷类成分和以芍药苷为主的单萜及其苷类为牡丹皮的特征成分, 含量高, 同时具有调节免疫、抑制中枢反应、镇痛等作用^[6]。

1.2.4 丹参成分的特有性 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 根据文献分析和本课题组的研究表明, 丹参中主要含有二萜类、酚酸类、挥发油类、无机元素类和其他类等成分, 其中以丹参酮类为主的二萜类成分和以丹酚酸为主的酚酸类成分为丹参的特征成分, 药理作用主要表现在保护心脑血管系统、抗肿瘤、抗菌、抗炎、保护器官等方面^[33]。

1.2.5 陈皮成分的特有性 陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 根据文献分析和本课题组的研究表明陈皮中主要含有黄酮类、挥发油类、三萜类、微量元素类和其他类等成分, 其中以橙皮苷、柚皮苷等为主的黄酮类化合物为陈皮的特征成分, 药理作用主要表现在清除自由基、抗氧化、调节心血管系统等方面^[34]。

1.2.6 酸枣仁成分的特有性 酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子, 根据文献分析和本课题组的研究表明, 酸枣仁中主要含有皂苷类、黄酮类、三萜类、生物碱类、脂肪油类和其他类等成分, 其中以酸枣仁皂苷为主的皂苷类、斯皮诺素等为主的黄酮类和以木兰花碱为主的生物碱类为酸枣仁的特征成分, 含量高, 对中枢神经系统特别是镇静催眠、抗惊厥、抗焦虑、抗抑郁等具有一定的作用^[24,35]。

1.3 基于“性(味)”物质基础的界定对 Q-marker 的研究

中药的药性理论体系是中医药学理论体系中的重要组成部分, 而中药药性主要包括归经、升降浮沉、四气、五味、十八反和十九畏等理论, 其中四气、五味和归经为中药药性理论的纲领部分^[36]。临床上主要以遣药组方为主, 但是中药药性具有多样性和复杂性, 故表现出“效同性异”“性同效异”和“效性相同”等特点, 在临床应用时应注意药性理论

具有主次之分, 何者在方剂中起主导作用, 其对应的功效就会更突出地体现这方面的特性^[37], 因此也应作为 Q-marker 确定的依据之一。结合上述对入血成分和方剂君臣佐使原则的分析, 总结 NG 中 7 味药材(当归、川芎、地黄、牡丹皮、酸枣仁、丹参、陈皮)的药性、归经、功效、主治和主要物质基础(表 2)。

1.4 基于网络药理学对 NG 复方配伍的 Q-marker 研究^[27,43]

基于 NG 入血成分研究结果, 并结合相关文献报道, 按照图 2 标示的路径对相关数据分析最终筛选出主要的有效成分。以 40 个入血原型成分和代谢物进行靶点、通路进行预测, 研究结果发现选定的 40 个成分均能够作用于与脑外伤、脑震荡和神经保护等疾病相关的靶点及 18 条通路, 主要通过调控氧化应激、降低炎症因子水平缓解脑外伤后引发的炎症反应、调节脑内硫化氢生成改善认知功能及脑外伤后抑郁、抑制细胞凋亡等, 体现了 NG 治疗脑外伤的多成分多靶点多通路的作用机制。研究结果提示, NG 处方配伍中有效成分可能为芍药苷、隐丹参酮、丹参酮 II_A 和丹参酮 I、酸枣仁皂苷 A、Z-藁本内酯、梓醇、茯苓酸 B、川芎内酯 A、川芎内酯 H/I 等。

1.5 基于成分可测性对 NG Q-marker 的辨识分析

从 Q-marker 应用的角度, “成分的可测性”又是确定 Q-marker 的重要依据。文献研究表明, 目前对于中药化学成分的分析 and 测定主要是通过色谱手段, NG 的 Q-marker 需要能够在色谱条件下进行定性、定量的测定, 力求科学地指导质量控制和质量评价^[5,44-45]。故应聚焦于既有专属性又具有活性, 且能够通过简单的前处理方式便于用色谱方法测定的成分, 将其作为 Q-marker。

根据以上分析可知, 以藁本内酯、川芎内酯为代表的苯酞类成分, 以梓醇、地黄苷为代表的环烯醚萜类成分, 以丹皮酚、丹酚酸为代表的酚及酚酸类成分, 以丹参酮为代表的二萜类成分, 以斯皮诺素、橙皮苷、芍药苷为代表的黄酮类成分, 以酸枣仁皂苷为代表的皂苷类成分和以木兰花碱为代表的生物碱类为 NG Q-marker 的重要选择。采用 HPLC 可以同时测定 NG 中丹酚酸 B、橙皮苷和阿魏酸的含量^[9-10]; 《中国药典》2015 年版规定了梓醇、丹皮酚、丹参酮类、丹酚酸、橙皮苷、酸枣仁皂苷和斯皮诺素的测定方法和限度要求; 李更生等^[46]采用

表 2 各味药材五味药性和主要物质基础总结

Table 2 Characterization of five flavors and major material basis with seven herbs

药名	性味	归经	功效	主治	主要物质基础
当归	温, 甘、 辛	归肝、心、 脾经	补血活血、 调经止痛、 润肠通便	血虚诸证、月经不调、经闭、痛经、 症瘕结聚、崩漏、虚寒腹痛、痿 痹、肌肤麻木、肠燥便难、赤痢 后重、痈疽疮疡、跌扑损伤	当归多糖、苯丙素类(阿魏酸)、苯 酞类(蒿本内酯) [38]
川芎	温, 辛	归肝、胆、 心包经	活血行气、 祛风止痛	月经不调、痛经、经闭、胸痹心痛、 胁肋作痛、肢体麻木、跌打损伤、 风湿痹痛	生物碱类(川芎嗪)、苯酞类(丁基 苯酞、蒿本内酯)、酚酸类(阿魏 酸、咖啡酸) [38]
地黄	寒, 甘	归心、肝、 肾经	清热凉血、 养阴生津	热入营血、温毒发斑、吐血衄血、 热病伤阴、舌绛烦渴、津伤便秘、 阴虚发热、骨蒸劳热、内热消渴	环烯醚萜苷类(梓醇、地黄苷) [39]
牡丹皮	微寒, 苦、辛	归心、肝经	清热凉血、 活血化瘀	热入营血、温毒发斑、吐血衄血、 夜热早凉、无汗骨蒸、闭经痛经、 跌扑损伤、痈肿疮毒	酚及其酚酸类(丹皮酚)、单萜类(芍 药苷、氧化芍药苷) [40-41]
酸枣仁	平, 甘、 酸	归肝、胆、 心经	养心补肝、 宁心安神、 敛汗、生津	虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、 津伤口渴	黄酮类(斯皮诺素、酸枣黄素)、皂 苷类(酸枣仁皂苷)、生物碱(酸 枣仁碱、木兰花碱) [39,42]
丹参	微寒, 苦	归心、肝经	活血祛瘀、 通经止痛、 清心除烦、 凉血消痈	月经不调、血滞经闭、产后瘀滞腹 痛、胸痹心痛、脘腹疼痛、癥瘕 积聚、肝脾肿大、热痹肿痛、热 病高热烦躁、心悸怔忡、失眠等	酚酸类(丹参素、丹酚酸)、二萜醌 类(丹参酮) [38]
陈皮	温, 苦、 辛	归肺、脾经	理气健脾、 燥湿化痰	脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多	黄酮类(橙皮苷、柚皮苷、新橙皮 苷) [40-41]

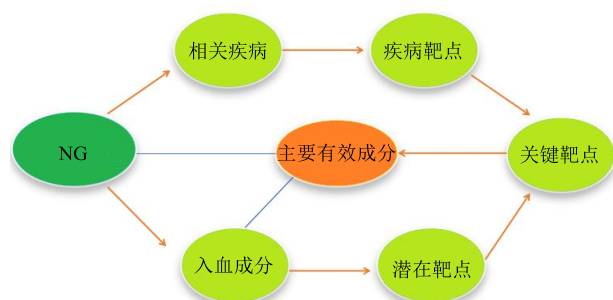


图 2 基于网络药理学对 NG 中主要有效成分研究路径

Fig. 2 Main active components in NG based on network pharmacology

HPLC 法测定地黄中地黄苷 D 的含量; 李盈等^[47]采用 HPLC 法测定牡丹皮中芍药苷的含量; 李冰洁等^[48]采用 HPLC-DAD 法同时测定酸枣仁中木兰花碱和斯皮诺素的含量。

根据 Q-marker 的定义和复方中药的“五原则”路径, 找到存在于 NG 中与其临床疗效密切相关的化学物质, 初步选定蒿本内酯、川芎内酯、梓醇、

地黄苷、丹皮酚、丹酚酸、丹参酮、斯皮诺素、芍药苷、橙皮苷、酸枣仁皂苷、木兰花碱这 12 个化合物作为 NG 的 Q-marker。

2 Q-markers 的现代药理研究

现代药理研究表明, 酸枣仁中的皂苷类成分酸枣仁皂苷、酸枣仁总黄酮类成分和总生物碱均对中枢神经系统有一定作用, 包括镇静催眠作用^[49-50]、抗惊厥^[51]、抗焦虑^[52]、抗抑郁^[53]、抗应激性溃疡^[54]、改善学习记忆能力等作用^[55-56]; 丹参中的酚酸类成分丹酚酸 B 和二萜类成分丹参酮具有抗炎作用, 丹参酮 II_A 能够有效降低放射性脑损伤小鼠的脑细胞凋亡, 减轻对脑细胞的损伤, 改善脑损伤小鼠的学习记忆功能, 丹酚酸 B 可以保护脑组织、脑内神经细胞、缓解缺血引起的脑水肿进而改善脑内微循环^[57-58]; 牡丹皮中的酚酸类成分丹皮酚和单萜苷类成分芍药苷具有抗肿瘤、抗菌消炎、抗氧化、调节免疫功能等作用^[59-60]; 陈皮中的黄酮类成分橙皮苷具有一定的保肝^[61]、抗炎镇痛^[62]、清除自由基、抗

氧化、免疫调节等作用^[63]；地黄中的环烯醚萜苷类成分梓醇对神经系统有一定的作用，包括在脑缺血损伤、老年痴呆症、帕金森病和衰老神经疾病中的作用，其作用机制可能为抗氧化作用、抗炎作用和提高神经可塑性，此外研究发现梓醇对于神经性疼痛有明显的抑制作用，可以显著减少抑郁症模型大鼠的血清皮质醇水平，表现出一定的抗抑郁作用，并且能够提高认知记忆的能力^[64]，地黄苷 A 则具有较好的免疫活性^[65]；苯酞类成分藁本内酯是当归和川芎中共有的活性成分，具有镇痛、抗炎的作用，通过增加内源性抗氧化防御能力来发挥对老年痴呆的治疗作用，通过减少氧化应激反应和抗凋亡作用对脑缺血再灌注模型小鼠发挥神经保护作用，改善小鼠认知功能^[66]；川芎中的苯酞类成分川芎内酯 A 对于体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有保护作用，抑制环氧合酶-2 (COX-2) 的表达，表现出一定的抗炎镇痛作用，具有抗血小板聚集和抗凝作用^[67]。

3 NG 的“Q-marker-靶点-通路-疾病”网络构建

3.1 Q-marker 靶点预测结果分析

将 Q-marker 成分输入 DRAR-CPI 得到所对应的 chemical-protein 打分值，以 Z-score<-1 为阈值筛选后共得到 261 个靶点的 PDB ID。在 Uniprot 网站输入这些靶点的 PDB ID，共得到 245 个靶点。

3.2 Q-marker 疾病富集及潜在作用信号通路分析

运用 CooLGeN 数据库搜索文献报道中与脑震荡、脑外伤、神经保护、神经再生的相关的靶点，与上述 245 个靶点进行对比分析，得到 15 个可能与 NG 治疗脑外伤相关的潜在作用靶点。将筛选得到的上述潜在靶点导入 DAVID 数据库，输入靶点名称列表限定物种为人，经数据库检索、转化，设定阈值 $P<0.05$ ，进行 KEGG 代谢通路富集分析，将潜在的作用靶点直接映射到通路上，药物成分靶点

富集的通路被认为是药物调控的通路。对作用靶点进行关联分析，Q-markers 在诸多脑部疾病的相关通路上发挥着重要的作用，共富集通路 12 条，如 mTOR 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路等。用 GraphPad Prism 5 绘图，得到 Q-markers 潜在活性靶点的 KEGG 代谢通路图 (图 3)。

3.3 Q-marker-靶点-通路-疾病网络构建

根据 Q-marker 潜在的作用靶点的预测结果，采用 Cytoscape 3.7.1 软件的关联功能构建“Q-marker-靶点-通路-疾病关联网络图”(图 4)。

经 Q-marker 的体内靶点预测，得到与靶点相关的通路，选取与脑外伤、脑震荡、神经保护等疾病相关的通路的构建，得到以藁本内酯、川芎内酯、梓醇、地黄苷、丹皮酚、丹酚酸、丹参酮、斯皮诺素、芍药苷、橙皮苷、酸枣仁皂苷、木兰花碱为代表的 NG Q-marker，可以作用于 8 个关键靶点和 12 条信号通路。基于“Q-marker-靶点-通路-疾病”网络构建结果发现，所得到的靶点、通路多数与脑外伤、脑震荡、神经保护等方面有关，因此进一步可以确定这 12 个化合物作为 NG 的质量控制的 Q-marker。

4 结语

传统中药复方的临床疗效与多个活性成分的相互作用有关，并不是某一个成分的单独作用^[6]。NG 为中药复方制剂，临床上用于治疗脑损伤症状，促进功能恢复。本研究通过参考大量相关文献筛选出 NG 的 Q-marker，基于 NG 的临床疗效、现代药理研究及潜在的作用信号通路，分析得出藁本内酯、川芎内酯、梓醇、地黄苷、丹皮酚、丹酚酸、丹参酮、斯皮诺素、芍药苷、橙皮苷、酸枣仁皂苷、木兰花碱这 12 个化合物为质控的核心指标，其作用的潜在信号靶点与氧化应激、免疫应答、炎症反应等通路密切相关，也是决定 NG 临床疗效的关键。

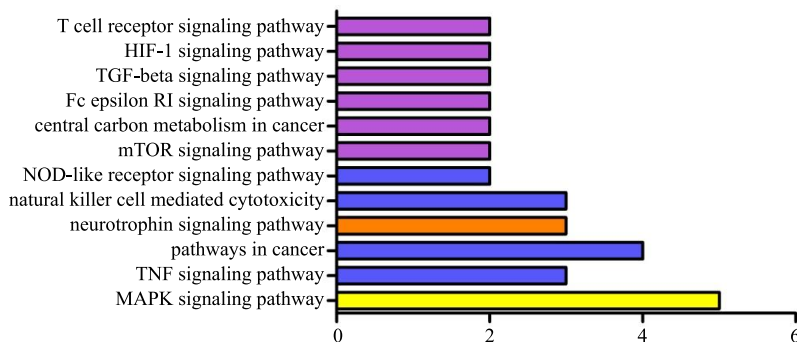


图 3 Q-markers 潜在活性靶点的 KEGG 代谢通路图

Fig. 3 Enriched KEGG pathways analysis of potential targets of Q-marker

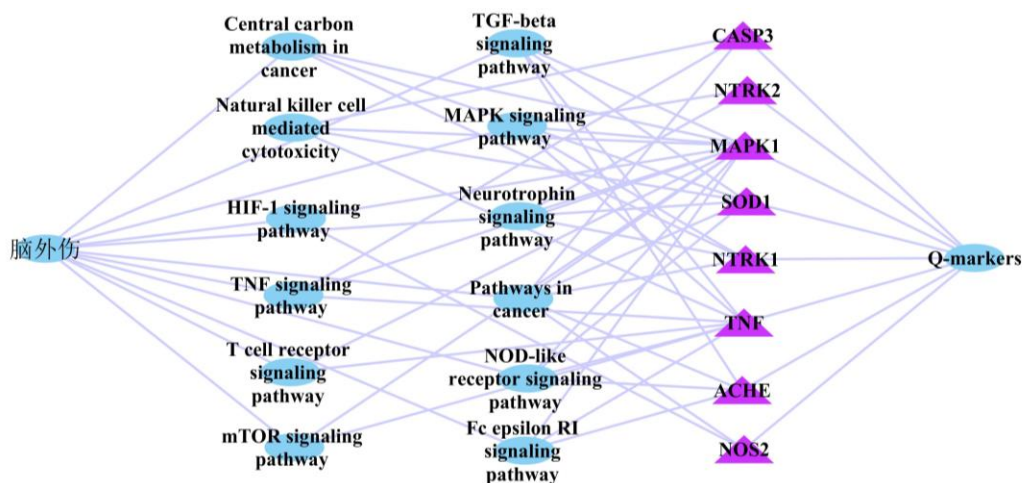


图 4 NG “Q-marker-靶点-通路-疾病” 关联网络图

Fig. 4 Q-marker target-pathway-disease association network for NG

综上所述,本研究在基于“五原则”对 NG 进行系统分析,结合网络药理学的方法对 Q-marker 进行相关网络构建,为 NG 的 Q-markers 的筛选提供了参考,以期 NG 的质量控制研究提供依据。

参考文献

- [1] 季 申, 王 柯, 胡 青, 等. 基于有效性和安全性相关的中药质量控制方法的建立 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 502-505.
- [2] 姜东京, 杜伟锋, 蔡宝昌. 中药谱效关系在中药质量控制方面的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3811-3814.
- [3] 张铁军, 王 杰, 陈常青, 等. 基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价路径 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1051-1060.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [5] 张铁军, 白 钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [6] 张莉野, 田成旺, 刘素香, 等. 桂枝茯苓方的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 265-272.
- [7] 肖 穗, 吴芬培, 黄栋堂, 等. 脑震宁治疗颅脑外伤 98 例疗效分析 [J]. 现代医药卫生, 2005, 21(13): 1711.
- [8] 石东付, 张 弛. 脑震宁颗粒治疗脑外伤后头痛 66 例 [J]. 河北中医, 2006, 28(5): 358.
- [9] 李献玉, 郝少君, 王希东, 等. 高效液相色谱法同时测定脑震宁颗粒中丹酚酸 B 和橙皮苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(17): 1508-1510.
- [10] 李 军, 李献玉. HPLC 法测定脑震宁颗粒中阿魏酸和橙皮苷的含量 [J]. 解放军药学学报, 2009, 25(3): 264-265.
- [11] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 多元统计及“成分-靶点-疾病”在线关联分析脑心通胶囊中质量标志物 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2775-2785.
- [12] Zhang L, Zhu L, Wang Y, *et al.* Characterization and quantification of major constituents of Xue Fu Zhu Yu by UPLC-DAD-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62(25): 203-209.
- [13] 江振作, 王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标准物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4127-4133.
- [14] Wu Y Y, Wang L, Liu G X, *et al.* Characterization of principal compositions in the roots of *Angelica sinensis* by HPLC-ESI-MSⁿ and chemical comparison of its different parts [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 393-402.
- [15] 赵文军, 林 阳, 李鹏飞, 等. 牡丹皮化学成分的 HPLC-QTOFMS 分析 [J]. 药学实践杂志, 2014, 32(4): 261-265.
- [16] 高 昕, 孙文军, 岐 琳, 等. 基于超高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱的川芎化学成分的快速分析 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(6): 711-715.
- [17] 张 玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- [18] 张 弛, 张彩娟, 邱敏懿, 等. 丹参多化学成分的 UPLC-LTQ Orbitrap MS 快速表征解析 [J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 14-21.
- [19] 康 安, 郭锦瑞, 谢 彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [20] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法

- 分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [21] 马琳, 黄小方, 欧阳辉, 等. UHPLC/Q-TOF-MS/MS 快速鉴定陈皮化学成分 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(19): 33-37.
- [22] 卢军, 芦霜. 柏子仁研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(3): 247-250.
- [23] 李淑芝, 王秀萍. 柏子仁油的化学成分研究 [J]. 中成药, 1999, 21(2): 37-38.
- [24] 闫艳, 张敏, 崔小芳, 等. 酸枣仁化学成分体内过程及其质量标志物研究思路探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 299-309.
- [25] 耿欣, 李廷利. 酸枣仁主要化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医学报, 2016, 44(5): 84-86.
- [26] 马进杰, 刘萍, 马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3): 206-211.
- [27] Yu S, Liu H, Li K, *et al.* Rapid characterization of the absorbed constituents in rat serum after oral administration and action mechanism of Naozhenning granule using LC-MS and network pharmacology [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 166(20): 281-290.
- [28] 朱梅, 熊亮, 王亚男, 等. 慈竹茹中木脂素类化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1968-1972.
- [29] 杨欣, 金晓飞, 李红, 等. 不同种类竹沥化学成分 GC-MS 比较分析 [J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(2): 53-55.
- [30] 于舒婷, 刘海霞, 李昆, 等. 采用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱快速识别脑震宁颗粒的化学成分 [J]. 药学学报, 2018, 53(4): 609-620.
- [31] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [32] 付国辉, 杜鑫. 地黄化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(15): 39-41.
- [33] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 丹参化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 特产研究, 2018, 40(1): 48-53.
- [34] 白燕, 李晓玉, 吴兆宇, 等. 陈皮的化学成分及药理作用研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, 20(1): 47-48.
- [35] 谭云龙, 孙晖, 孙文军, 等. 酸枣仁化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 186-188.
- [36] 盛良. 中药四气五味和化学成分的关系 [J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(21): 2804-2806.
- [37] 张铁军, 刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [38] 刘昌孝, 张铁军, 何新, 等. 活血化瘀中药五味药性功效的化学及生物学基础研究的思考 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 615-624.
- [39] 张静雅, 曹煌, 龚苏晓, 等. 中药甘味的药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 533-539.
- [40] 张静雅, 曹煌, 许浚, 等. 中药苦味药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 187-193.
- [41] 孙玉平, 张铁军, 曹煌, 等. 中药辛味药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 785-790.
- [42] 曹煌, 张静雅, 龚苏晓, 等. 中药酸味的药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3617-3622.
- [43] 卢紫娟, 刘海霞, 李昆, 等. 基于网络药理学的脑震宁颗粒治疗脑外伤的机制分析 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3531-3540.
- [44] 李冲冲, 龚苏晓, 许浚, 等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1233-1245.
- [45] 史永平, 孔浩天, 李昊楠, 等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 281-289.
- [46] 李更生, 王慧森. HPLC 法测定地黄中地黄苷 D 含量 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 752-754.
- [47] 李盈, 王举涛, 刘金旗, 等. HPLC 法同时测定牡丹皮中芍药苷和氧化芍药苷含量 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(21): 25-27.
- [48] 李冰洁, 宋伟, 宋芳芹, 等. HPLC-DAD 同时测定酸枣仁提取物中生物碱与黄酮类成分 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2376-2379.
- [49] 吴玉兰, 许惠琴, 陈洗. 酸枣仁不同炮制品及炒酸枣仁中总黄酮与总皂苷的镇静催眠作用比较 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 868-869.
- [50] 符敬伟, 乔卫, 陈朝晖. 酸枣仁总生物碱镇静催眠作用的实验研究 [J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(1): 52-54.
- [51] 赵连红, 乔卫, 许岚. 酸枣仁中生物碱抗惊厥作用的实验研究 [J]. 天津药学, 2007, 19(1): 4-5.
- [52] 王守勇, 谢鸣, 王欣. 酸枣仁汤组分与抗焦虑效用的相关性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 104-108.
- [53] 朱铁梁, 胡占嵩, 李璐, 等. 酸枣仁总生物碱抗抑郁作用的实验研究 [J]. 武警医学院学报, 2009, 18(5): 420-422.
- [54] 李立华, 郑书国. 酸枣仁对应激性溃疡的影响 [J]. 安徽中医临床杂志, 2003, 15(5): 387-388.
- [55] 侯建平, 张恩户, 胡悦, 等. 酸枣仁对小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 广西中医学院学报, 2002, 5(3): 11-13.
- [56] 王丽娟, 张彦青, 王勇, 等. 酸枣仁黄酮对记忆障碍

- 小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(5): 53-55.
- [57] Li S, Dang Y, Zhou X, *et al.* Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-17.
- [58] Adesso S, Russo R, Quaroni A, *et al.* *Astragalus membranaceus* extract attenuates inflammation and oxidative stress in intestinal epithelial cells via NF- κ B activation and Nrf2 response [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 1-14.
- [59] 蒋丽丽, 张彦龙, 王春杰, 等. 牡丹皮中有效成分丹皮酚的药理活性研究进展 [J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(22): 4223-4224.
- [60] 龙世林, 陈 雅. 牡丹皮药理作用及临床研究进展 [J]. 中国药业, 2007, 16(3): 63-64.
- [61] 谭 辉. 中药枳壳的化学成分及药理作用探析 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(27): 14-15.
- [62] 谢仁峰, 文双娥, 李 洋, 等. 柚皮苷抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2011, 8(4): 5-8.
- [63] 张志海, 王彩云, 杨天鸣, 等. 陈皮的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2005, 20(1): 47-48.
- [64] 蔡其燕, 姚忠祥. 梓醇在神经系统作用的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(18): 3589-3591.
- [65] 卫 冰, 杨 云. 地黄环烯醚萜苷类化学成分的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(24): 130-133.
- [66] 李 静, 汪 宁, 汪光云, 等. 藁本内酯神经保护药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(4): 55-57.
- [67] 张丽娟, 刘继勇, 姚 翀, 等. 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(13): 1081-1084.