

基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合整合网络药理学的藤黄健骨胶囊化学成分识别及作用机制初步研究

曹 辉¹, 周 霖^{2*}, 孙 志², 李 震¹, 李卓伦², 王肖辉³, 师莹莹², 薛连平², 左莉华², 金建文⁴, 武 婧⁴, 赵 杰^{2*}

1. 郑州大学第一附属医院 腔内血管外科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院 超声科, 河南 郑州 450052

4. 陕西丽彩药业有限公司, 陕西 咸阳 712000

摘 要: **目的** 系统研究藤黄健骨胶囊的主要化学成分, 并探讨其发挥药效的主要作用机制, 为其药效物质研究提供一定的参考依据。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 对藤黄健骨胶囊的主要化学成分进行全面分析, 根据化合物的一级、二级质谱信息, 并与对照品或参考文献进行比对, 实现对药物的化学信息进行快速识别。在此基础上, 采用 BAT-MAN-TCM 数据库对鉴定得到的化学成分进行靶点预测, 进一步通过 DAVID 数据库进行 KEGG 通路注释分析和 GO 富集分析, 初步筛选出药物的主要药效物质, 并探讨其作用机制。**结果** 从藤黄健骨胶囊中共鉴定出 34 种化学成分, “成分-靶点”网络分析表明药物中的重要成分山柰酚、大豆苷元、熊果酸、刺芒柄花素和豆甾醇等可作用于 Bcl-2、BAX、AKt、PPARG、PTGS1、PTGS2、TNF、IL6、F7 及 IL1B 等关键靶点, 结果分析表明破骨细胞分化信号通路、NF- κ B 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、肾细胞信号通路以及血小板激活等可能是其发挥壮骨健骨、补肾活血和解痉止痛治疗作用的主要途径。**结论** 采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 高分辨质谱分析结合网络药理学的方法, 初步明确了藤黄健骨胶囊的化学组成及潜在作用机制, 为筛选其药效成分及深入阐明作用机制提供了科学的理论依据。

关键词: 藤黄健骨胶囊; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 网络药理学; 山柰酚; 大豆苷元; 熊果酸; 刺芒柄花素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)09-2408-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.016

Chemical composition identification and mechanism study of Tenghuang Jiangu Capsule based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and network pharmacology

CAO Hui¹, ZHOU Lin², SUN Zhi², LI Zhen¹, LI Zhuo-lun², WANG Xiao-hui³, SHI Ying-ying², XUE Lian-ping², ZUO Li-hua², JIN Jian-wen⁴, WU Jing⁴, ZHAO Jie²

1. Department of Endovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. Department of Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

4. Shaanxi Licai Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To systematically study the chemical components of Tenghuang Jiangu Capsule, explore the main mechanism of action, and provide some evidences for the research of its pharmacodynamic substances. **Methods** In this study, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to comprehensively analyze the main chemical components of Tenghuang Jiangu Capsule. According to the MS/MS spectrometry information of compounds, the chemical information of this herbal formula can be quickly and accurately identified by comparison with standards or references. Next, the BAT-MAN-TCM database was used to predict the targets of the identified chemical

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81600377); 河南省高等学校重点科研项目基础研究计划 (19A320070)

作者简介: 曹 辉, 男, 主治医师, 研究方向为中药成分分析及中药药理。Tel: (0371)66862570 E-mail: cxhemail@sina.com

*通信作者 周 霖, 男, 主管药师, 研究方向为中药成分分析。Tel: (0371)66862570 E-mail: fcczhoul@zzu.edu.cn

赵 杰, 男, 主任药师, 研究方向为医院药学。Tel: (0371)66862570 E-mail: zhaojie@zzu.edu.cn

components. The KEGG pathway annotation analysis and GO enrichment analysis were further carried out through the DAVID database to screen out the main pharmacodynamic substances of Tenghuang Jiangu Capsule and explore the potential mechanisms. **Results** A total of 34 chemical components were identified in Tenghuang Jiangu Capsule. The “component-target” network analysis indicated that the major components including kaempferol, isoflavones aglycone, ursolic acid, formononetin, and stigmasterol might act on some key targets such as Bcl-2, BAX, AKt, PPARG, PTGS1, PTGS2, TNF, IL6, F7, IL1B, etc. The results indicated that osteoclast differentiation, NF- κ B, PI3K-Akt, renal cell, and platelet activation might be the main action pathways of exerting the therapeutic effect of bone protection, nourishing kidney, promoting blood circulation and relieving pain of Tenghuang Jiangu Capsule. **Conclusion** In this study, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with network pharmacology was used to preliminarily clarify the chemical composition and reveal potential mechanism of Tenghuang Jiangu Capsule. The results provided scientific theoretical basis for screening the effective ingredients and further clarifying the mechanism of action of Tenghuang Jiangu Capsule.

Key words: Tenghuang Jiangu Capsule; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; network pharmacology; kaempferol; isoflavones aglycone; ursolic acid; formononetin

藤黄健骨胶囊是骨科和风湿类疾病常用药物,由熟地黄、淫羊藿、鹿衔草、骨碎补、鸡血藤、肉苁蓉、莱菔子 7 种药材组成^[1],为 2019 年版医保乙类(药品分类编号:ZG03,补肾壮骨剂,编号 1195)中药复方制剂。临床上主要用于多种骨质性疾病的治疗,具有健骨止痛和补肾活血等功效,疗效确切,应用广泛^[2]。

中药化学成分复杂,其主要是通过多成分、多靶点及多层次的方式发挥作用,各成分之间相互配合、相互影响,并由此表现出高效低毒的治疗效果^[3]。查阅文献发现,目前对藤黄健骨胶囊的质量研究仅关注该药的单个成分^[1-2],中药及其制剂均为多组分的配伍体系,仅鉴定出某个成分的含量并不能对药物进行精准质量控制,难以确保患者的安全、有效用药。有研究报道,藤黄健骨胶囊具有治疗骨质疏松、膝关节炎及腰椎间盘突出等疾病的作用,其作用机制可能为抑制骨质吸收、促进成骨细胞形成和骨的重建,降低破骨细胞的活性,提高血钙水平,此外还可以降低血液黏稠度,抑制血小板聚集,从而提高骨密度等^[4-6]。然而,这些研究都是仅从药效评价或宏观药理层面上对药物的作用进行解释,并未从分子机制或通路层面对这些机制进行深入研究,且相对比较片面,存在一定的局限性。网络药理学可多方位地阐释药物治疗疾病的作用机制,筛选中药药效成分,对应潜在靶点,构建“药物-成分-疾病-靶点”网络,明确具体分子作用机制及重要的信号通路,能够更加全面、系统地体现中药复杂的治疗作用^[7-9]。

本研究采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术建立一种快速、科学的分析方法以实现藤黄健骨

胶囊中主要化学成分进行定性研究。同时,基于质谱识别的药物所含活性成分,采用网络数据库对其靶点进行预测及功能分析,深入探讨其主要作用机制。结果发现,藤黄健骨胶囊的主要活性成分山柰酚、大豆苷元、熊果酸、刺芒柄花素和豆甾醇等可作用于 Bcl-2、BAX、AKt、PPARG、PTGS1、PTGS2、TNF、IL6、F7 及 IL1B 等关键靶点,调节破骨细胞分化信号通路、NF- κ B 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、肾细胞信号通路以及血小板激活等重要通路,可能是其发挥壮骨健骨、补肾活血和解痉止痛治疗作用的主要途径。

1 材料

1.1 仪器与软件

UHPLC-Q-Orbitrap 液质联用系统:Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司)串联 Thermo Q Exactive 型高分辨质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);New Classic MS 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司);MDS-6G 型多通量微波消解/萃取系统(上海新仪微波化学科技有限公司);Xcalibur 3.0 工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CD (Compound discovery, 2.1) 化合物分析鉴定软件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 试剂

色谱纯级甲醇、乙腈、甲酸均购自美国 Fisher 公司;娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司;藤黄健骨胶囊(甘肃省西峰制药有限公司,批号 20181202)。

对照品琥珀酸(MUST-17030502)、没食子酸(批号 MUST-15042910)、原儿茶酸(批号 MUST-16032112)、金丝桃苷(批号 MUST-16032113)、山

柞酚(批号 MUST-16032801)、刺芒柄花素(批号 MUST-17031005)、阿魏酸(批号 MUST-15091605)、熊果酸(批号 MUST-15082905)、甾甾醇(MUST-17062802)、淫羊藿苷(MUST-19082301)、松果菊苷(MUST-19030701)、毛蕊花糖苷(MUST-19032725)、大豆苷元(MUST-19101107)、柚皮素(MUST-16032406)、柚皮苷(MUST-18050808)均购于成都曼思特生物科技有限公司;以上对照品经 HPLC 峰面积归一化,质量分数均大于 99%。

2 方法

2.1 供试品和对照品溶液的制备

取藤黄健骨胶囊内容物约 1.0 g,精密称定后,置于具塞锥形瓶中。精密量取并加入甲醇 50 mL,密塞,微波萃取(功率 600 W)17 min,摇匀后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

取各对照品约 1.0 mg,精密称定并置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇并稀释至刻度,摇匀制备成 0.1 mg/mL 的单一对照品储备液;分别量取上述储备液适量,混合后加入纯甲醇稀释,最终制备成各对照品质量浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱:0~5.0 min, 5% A; 5.0~10.0 min, 5%~10% A; 10.0~28.0 min, 10%~15% A; 28.0~43.0 min, 15%~25% A; 43.0~50.0 min, 25%~32% A; 50.0~62.0 min, 32%~50% A; 62.0~68.0 min, 50%~70% A; 68.0~75.0 min, 70%~100% A; 体积流量为 0.2 mL/min; 进样量 5 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 质谱条件 采用加热电喷雾离子源(heated ESI),正、负离子同时扫描的 Full MS/dd-MS² 模式。正离子模式下:喷雾电压 3.50 kV,鞘气(氮气)体积流量 40 $\mu\text{L/min}$; 负离子模式下:喷雾电压 2.80 kV,鞘气(氮气)体积流量 38 $\mu\text{L/min}$ 。辅助气(氮气)体积流量为 10 $\mu\text{L/min}$,辅助气(氮气)和离子传输管温度分别为 300 $^{\circ}\text{C}$ 和 320 $^{\circ}\text{C}$ 。一级全扫质量扫描范围为 m/z 80~1 200,分辨率 70 000 FWHM; 二级质谱采用数据依赖性扫描,在一级质谱的基础上选择其响应值较高的进行诱导碰撞解离(CID),以获取二级质谱数据,碰撞能梯度为 20、50、100 eV,质荷比窗口宽度设置为 2。

2.3 化合物鉴定

按照上述色谱、质谱条件进样,根据高分辨质谱提供的准分子离子及加合离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量,经 Xcalibur 2.0 软件拟合计算相应的分子式,并与 CD(Compound discovery 2.1)化合物分析鉴定软件和本地数据库相匹配,初步对在高分辨质谱下捕捉到的各种成分进行前期推测,再依据对照品、参考文献、Mass Bank 或 Chemical Book 等数据库提供的相对保留时间及高能碰撞下产生的碎片离子信息进一步确认,最终达到实现快速定性未知化学成分的目的。

2.4 药物成分潜在靶标预测预测

本研究采用 BAT-MAN-TCM(<http://bionet.Ncpsb.org/bat-man-tcm/>)数据库对基于质谱鉴定的化学成分进行靶点预测。由于药物成分对应的靶点可能存在命名不规范或不统一的问题,因而首先通过 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/uploadlists/>)转换候选成分对应的靶点基因名。

2.5 靶标功能及相关疾病富集分析

基于以上过程筛选的关键核心靶点,本研究采用人类基因组注释数据库 DAVID6.8(<http://david.ncifcrf.gov/>)对其进行 KEGG 通路注释分析和 GO 富集分析,以 $P<0.05$ 进行筛选;同时将核心靶点在数据库中进行相关疾病富集分析,即得到藤黄健骨胶囊的主要治疗疾病,极大地促进临床合理用药。通过分析后,关键靶点(基因)可直接映射到通路上。这些富集得到的通路即是药物发挥治疗疾病并起调节作用的关键途径,通过该方法可得到藤黄健骨胶囊发挥作用的代谢通路及相关生物学过程等相关信息。

3 结果与讨论

3.1 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 平台的藤黄健骨胶囊化学成分识别

基于以上优化后的色谱、质谱分析条件,对藤黄健骨胶囊进行分析。在正、负离子同时扫描的模式下从藤黄健骨胶囊中共鉴定出 34 种主要活性成分,结果见表 1,总离子流图见图 1。

3.2 核心靶标、活性成分筛选

基于“3.1”项下的鉴定结果,本研究采用 BAT-MAN-TCM 数据库平台对鉴定的 34 种化学成分进行靶点预测,共得到 875 个作用靶点,去除重复靶点后,共得到藤黄健骨胶囊主要化学成分潜在靶标 209 个。

表1 藤黄健骨胶囊化学成分的鉴定

Table 1 Identified chemical ingredients of Tenghuang Jiangu Capsule

编号	化合物名称	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	模式	碎片	归属
1	琥珀酸*	2.06	$C_4H_6O_4$	117.019 33	117.019 13	-1.726	N	117.019 18 $[M-H]^-$, 99.008 64 $[M-H-H_2O]^-$, 73.029 41 $[M-H-CO_2]^-$, 55.018 47 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$	鸡血藤、肉苁蓉、熟地黄
2	没食子酸*	2.34	$C_7H_6O_5$	169.014 24	169.014 07	-1.045	N	169.014 16 $[M-H]^-$, 125.024 25 $[M-H-CO_2]^-$, 107.013 72 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 97.029 37 $[M-H-CO_2-CO]^-$	鹿衔草
3	麦芽酚	3.40	$C_6H_6O_3$	127.038 97	127.038 69	-2.209	P	127.038 97 $[M+H]^+$, 109.028 33 $[M+H-H_2O]^+$, 99.043 85 $[M+H-CO]^+$, 81.033 47 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 71.049 14 $[M+H-CO-CO]^+$, 67.054 08 $[M+H-CO-CO]^+$, 53.038 89 $[M+H-CO-H_2O-CO]^+$	骨碎补、淫羊藿
4	香草酸	3.59	$C_8H_8O_4$	167.034 98	167.034 77	-1.269	N	167.034 85 $[M-H]^-$, 152.011 15 $[M-H-CH_3]^-$, 139.040 01 $[M-H-CO]^-$, 123.045 14 $[M-H-CO_2]^-$	鹿衔草
5	原儿茶酸*	4.25	$C_7H_6O_4$	153.019 33	153.019 13	-1.320	N	153.019 21 $[M-H]^-$, 109.029 34 $[M-H-CO_2]^-$, 91.018 76 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 81.034 50 $[M-H-CO_2-CO]^-$	骨碎补、鸡血藤、鹿衔草
6	松柏醛	6.14	$C_{10}H_{10}O_3$	179.070 27	179.069 87	-2.238	P	179.070 18 $[M+H]^+$, 161.059 68 $[M+H-H_2O]^+$, 151.075 33 $[M+H-CO]^+$, 133.064 79 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 105.069 86 $[M+H-CO-H_2O-CO]^+$, 81.069 89 $[M+H-CO-H_2O-CO-2C]^+$	鹿衔草
7	水杨酸	6.79	$C_7H_6O_3$	137.024 41	137.024 15	-1.951	N	137.024 29 $[M-H]^-$, 119.013 56 $[M-H-H_2O]^-$, 93.034 42 $[M-H-CO_2]^-$	鹿衔草
8	桃叶珊瑚苷	7.52	$C_{15}H_{22}O_9$	345.119 10	345.118 84	-0.769	N	345.118 38 $[M-H]^-$, 299.113 53 $[M-H-CO-H_2O]^-$, 183.065 57 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 179.056 46 $[M-H-C_9H_{10}O_3]^-$, 161.045 01 $[M-H-C_9H_{10}O_3-H_2O]^-$, 143.034 47 $[M-H-C_9H_{10}O_3-H_2O-H_2O]^-$, 119.049 94 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO-H_2O-H_2O]^-$, 101.024 22 $[M-H-C_9H_{10}O_3-H_2O-H_2O-CH_2-CO]^-$, 89.024 31 $[M-H-C_9H_{10}O_3-H_2O-H_2O-C_2H_2-CO]^-$	熟地黄
9	肉苁蓉苷 F	8.25	$C_{21}H_{28}O_{13}$	487.145 71	487.145 39	-0.665	N	487.145 39 $[M-H]^-$, 179.034 88 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9]^-$, 161.024 26 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9-H_2O]^-$, 135.045 06 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9-CO_2]^-$	熟地黄、肉苁蓉
10	松果菊苷*	21.33	$C_{35}H_{46}O_{20}$	785.250 96	785.250 31	-0.836	N	785.251 04 $[M-H]^-$, 623.218 51 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$, 477.163 64 $[M-H-C_9H_6O_3-C_6H_{10}O_4]^-$, 315.108 61 $[M-H-C_9H_6O_3-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^-$, 179.035 17 $[M-H-C_{26}H_{38}O_{16}]^-$, 161.024 37 $[M-H-C_{26}H_{40}O_{17}]^-$, 153.055 73 $[M-H-C_9H_6O_3-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$, 133.029 39 $[M-H-C_{26}H_{40}O_{17}-CO]^-$	肉苁蓉
11	金丝桃苷*	22.69	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.088 19	463.088 23	0.067	N	463.088 23 $[M-H]^-$, 343.045 41 $[M-H-C_6H_6O_4]^-$, 300.027 62 $[M-H-C_6H_{11}O_5]^-$, 271.024 87 $[M-H-C_6H_{11}O_5-CHO]^-$, 255.030 03 $[M-H-C_6H_{11}O_5-CHO_2]^-$, 243.029 80 $[M-H-C_6H_{11}O_5-CHO-CO]^-$, 151.003 59 $[M-H-C_6H_{11}O_5-C_6H_5O_3]^-$, 107.013 78 $[M-H-C_6H_{11}O_5-C_6H_5O_3-CO_2]^-$	淫羊藿
12	新北美圣草苷	25.87	$C_{27}H_{32}O_{15}$	595.166 84	595.166 69	-0.258	N	595.166 69 $[M-H]^-$, 459.114 62 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$, 287.056 21 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9]^-$, 151.003 51 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9-C_8H_8O_2]^-$, 135.045 06 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9-C_7H_4O_4]^-$, 107.013 71 $[M-H-C_{12}H_{20}O_9-C_8H_8O_2-CO_2]^-$	骨碎补
13	香橙素	25.88	$C_{15}H_{12}O_6$	289.070 66	289.069 79	-3.026	P	289.070 40 $[M+H]^+$, 179.033 86 $[M+H-C_6H_6O_2]^+$, 163.038 88 $[M+H-C_6H_6O_3]^+$, 153.018 19 $[M+H-C_8H_8O_2]^+$, 145.028 32 $[M+H-C_6H_6O_3-H_2O]^+$, 135.044 02 $[M+H-C_7H_6O_4]^+$, 125.023 16 $[M+H-C_9H_8O_3]^+$, 117.033 36 $[M+H-C_7H_6O_4-H_2O]^+$	鸡血藤

续表 1

编号	化合物名称	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	模式	碎片	归属
14	毛蕊花糖苷*	32.12	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	623.198 14	623.197 57	-0.920	N	623.198 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 461.166 90 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^-$, 315.108 49 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 179.034 81 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{11}]^-$, 161.024 32 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3]^-$, 153.055 31 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, 133.029 36 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3-\text{CO}]^-$	熟地黄、肉苁蓉
15	柚皮苷*	32.23	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	579.171 92	579.171 75	-0.309	N	579.172 30 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 271.061 34 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9]^-$, 177.019 38 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}]^-$, 151.003 60 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^-$, 119.050 08 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^-$, 107.013 80 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}-\text{CO}_2]^-$, 93.034 51 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4]^-$	骨碎补
16	柚皮素*	32.26	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	273.075 75	273.074 98	-2.820	P	273.075 50 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 179.034 10 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}]^+$, 153.018 20 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^+$, 147.044 04 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3]^+$, 119.049 14 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4]^+$	骨碎补、鸡血藤
17	阿福豆苷	35.82	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.098 37	431.098 08	-0.673	N	431.099 03 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 285.040 37 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 255.029 94 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{CH}_2\text{O}]^-$, 227.034 99 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}]^-$, 151.004 61 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^-$, 93.034 12 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_9\text{H}_4\text{O}_5]^-$	骨碎补
18	大豆苷元*	36.69	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	253.050 63	253.050 48	-0.601	N	253.050 72 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 135.008 50 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]^-$, 91.018 65 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}-\text{CO}_2]^-$	鸡血藤
19	山柰酚*	36.86	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	287.055 014 5	287.054 08	-3.256	P	287.054 66 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 165.019 38 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 153.017 70 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 121.028 15 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4]^+$	骨碎补、淫羊藿、鹿衔草
20	二氢榧皮素	37.32	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$	303.051 02	303.050 81	-0.713	N	303.050 78 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 153.019 55 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3]^-$, 151.039 99 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^-$, 125.023 70 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4]^-$, 123.045 15 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4-\text{CO}]^-$	鸡血藤
21	阿魏酸*	43.92	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	195.065 18	195.064 79	-2.027	P	177.054 67 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 163.039 12 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$, 149.059 28 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, 145.028 55 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 117.033 45 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$	熟地黄、莱菔子
22	染料木素	45.77	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.045 54	269.045 38	-0.619	N	269.045 53 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 151.003 49 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]^-$, 117.034 41 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^-$, 107.014 16 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}-\text{CO}_2]^-$	鸡血藤
23	甘草素	50.81	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	257.080 83	257.080 05	-3.005	P	257.080 38 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 147.044 11 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 137.023 38 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^+$, 119.049 16 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3]^+$	淫羊藿、鸡血藤
24	刺芒柄花素*	51.76	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	269.080 83	269.080 2	-2.361	P	269.080 72 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 254.057 08 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 137.023 36 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}]^+$, 137.023 36 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3]^+$	鸡血藤
25	宝藿苷 II	54.49	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$	499.160 97	499.160 89	-0.161	N	499.161 35 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 353.103 00 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 161.024 05 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3]^-$, 132.021 12 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3-\text{CHO}]^-$, 93.034 55 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5]^-$	淫羊藿
26	美迪紫檀素	55.61	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.096 48	271.095 73	-2.787	P	271.096 19 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 161.059 77 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 147.044 08 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2]^+$, 137.059 77 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 123.044 01 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2]^+$, 109.064 78 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2-\text{CO}]^+$, 94.041 44 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3]^+$	鸡血藤
27	淫羊藿苷*	57.29	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$	675.229 44	675.228 94	-0.746	N	675.229 80 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 367.118 74 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9]^-$, 352.095 31 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{CH}_3]^-$, 217.050 46 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2]^-$, 149.059 97 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 133.028 67 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{CH}_3-\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4]^-$, 93.033 96 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9-\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5]^-$	淫羊藿
28	樱黄素	57.76	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	285.075 75	285.074 95	-2.806	P	285.075 59 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 270.053 13 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 167.033 92 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]^+$, 124.015 59 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2]^+$	鸡血藤

续表 1

编号	化合物名称	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	模式	碎片	归属
29	宝藿苣 I	59.87	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$	513.176 62	513.176 27	-0.683	N	513.176 82 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 367.118 38 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 366.110 81 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4]^-$, 351.087 43 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{CH}_3]^-$, 323.092 99 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{CH}_3-\text{CO}]^-$, 217.050 43 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2]^-$, 149.060 58 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$, 133.029 40 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{CH}_3]^-$, 93.034 24 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5]^-$	淫羊藿
30	淫羊藿素	68.18	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	367.118 71	367.118 47	-0.821	N	367.118 99 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 352.095 67 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, 297.040 71 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_4\text{H}_7]^-$, 281.045 50 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_4\text{H}_7]^-$, 175.003 66 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_4\text{H}_7-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^-$, 163.003 63 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_4\text{H}_7-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^-$, 133.029 34 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{C}_4\text{H}_7-\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4]^-$, 93.034 41 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5]^-$	淫羊藿
31	亚油酸	68.87	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	281.247 5	281.246 58	-3.295	P	281.248 47 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 263.236 69 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 245.226 50 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 175.147 43 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{10}]^+$, 133.101 04 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$, 107.085 39 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_2]^+$, 69.070 01 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{20}]^+$, 55.054 58 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{20}-\text{CH}_2]^+$	熟地黄
32	熊果酸*	73.17	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	457.367 62	457.366 49	-2.475	P	457.364 93 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 439.356 75 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$, 411.361 60 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$, 393.350 43 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}]^-$, 297.257 17 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}]^-$, 231.210 51 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6]^-$, 203.179 32 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4]^-$, 189.163 85 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2]^-$, 163.148 24 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_2]^-$, 135.116 85 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_4]^-$, 107.085 47 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_4]^-$, 95.085 51 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{12}-\text{C}_5\text{H}_6-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_3\text{H}_4]^-$	鹿衔草
33	7-酮基- β -谷甾醇	81.56	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$	429.372 70	429.371 64	-2.486	P	429.372 65 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 411.359 62 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 317.246 37 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{16}]^+$, 275.201 05 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{22}]^+$, 165.091 02 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{16}-\text{C}_{11}\text{H}_{20}]^+$, 149.096 05 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{19}\text{H}_{34}]^+$	鸡血藤
34	豆甾醇*	82.98	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$	413.377 79	413.376 65	-2.764	P	413.378 88 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 123.080 21 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{21}\text{H}_{38}]^+$, 109.064 79 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{21}\text{H}_{38}-\text{CH}_2]^+$, 97.064 76 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{21}\text{H}_{38}-\text{C}_2\text{H}_2]^+$, 81.069 85 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{21}\text{H}_{38}-\text{CH}_2-\text{CO}]^+$, 69.069 95 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{21}\text{H}_{38}-\text{C}_2\text{H}_2-\text{CO}]^+$	骨碎补、 鸡血藤、 熟地黄

*表示经对照品比对鉴定; N-负离子模式; P-正离子模式

*identified by comparison with standard reference substance; N-negative mode; P-positive mode

3.3 靶标功能富集分析及中药-成分-靶点网络的构建

本研究采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建藤黄健骨胶囊的主要活性成分-靶点网络图,如图 2 所示。分析网络图可知,药物组成药材中靶点频数最高的药材是鸡血藤和熟地黄;其中 19 个药物成分作用靶点频率大于 20,频率较高的药物成分为山柰酚(鹿衔草、淫羊藿、骨碎补)、大豆苷元(鸡血藤)、熊果酸(鹿衔草)、刺芒柄花素(鸡血藤)和豆甾醇(鸡血藤、熟地黄、骨碎补)等;频率较高的靶点分别

是 PTGS2、PTGS1、PPARG、IL1B、IL6、TGFB1、F7 和 TNF 等,这些靶点与疼痛、肾病、免疫炎症以及骨性疾病等密切相关。

3.4 核心靶点的 KEGG 信号通路及 GO 生物过程富集分析

3.4.1 KEGG 通路富集分析 将筛选到的核心靶点导入 DAVID 数据库进行 KEGG 富集分析,条件设置为 $P < 0.05$ 且错误发现率(FDR) < 0.05 ,剔除不相关通路后,共得到排名靠前的重要通路 10

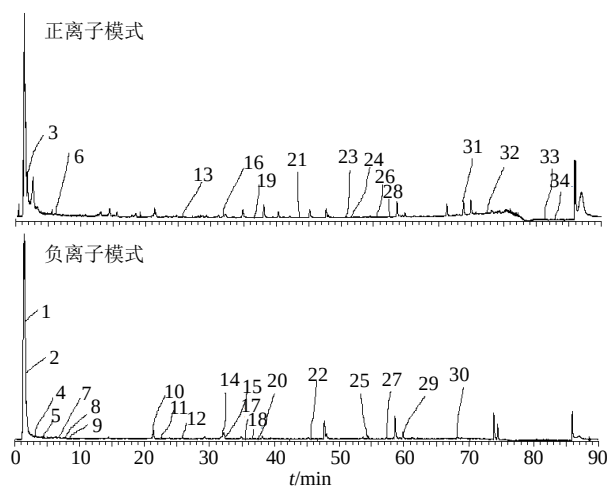


图 1 藤黄健骨胶囊的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Tenghuang Jiangu Capsule

条, 分别为破骨细胞分化信号通路、NF- κ B 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、肾细胞信号通路、钙信号通路、血小板激活信号通路、VEGF 信号通路、TNF 炎症信号通路以及 MAPK 信号通路等, 见表 2。由此可见, 在药物成分对应的靶点下, 富集的信号通路主要集中在对骨细胞、肾细胞、血管内皮、血小板以及疼痛物质等方面, 其与藤黄健骨胶囊的主要功效补肾活血及止痛等功效高度吻合, 表明了本研究的科学性和合理性。

针对藤黄健骨胶囊的主要壮骨、健骨作用机制, 本研究对富集得到的相关信号通路进行深入分析, 结果发现破骨细胞分化信号通路与上下游 NF- κ B、PI3K-Akt 等信号通路之间高度相关。NF- κ B 经典信号通路中的 NF- κ B 进入细胞核后, 通过启动或调控基因的转录来调节破骨细胞分化成熟或者凋亡,

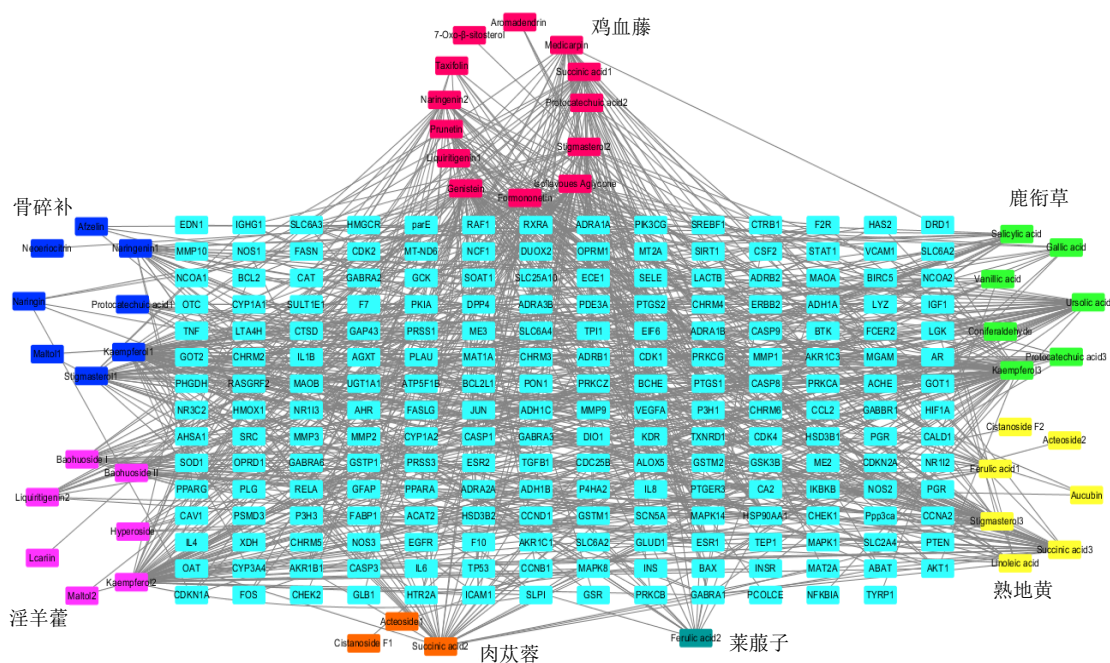


图 2 藤黄健骨胶囊主要活性成分-靶点网络

Fig. 2 Active ingredient-target network of Tenghuang Jiangu capsule

同时还能刺激产生大量的炎症因子如 TNF、IL1B 及 IL6 等, 加速疾病进程^[10]。分析靶点结果发现, 熊果酸可作用于 NF- κ B 及 IL6, 山奈酚及大豆苷元可作用于 TNF 及 IL1B 等靶点, 其潜在治疗机制可能为抑制靶点活性, 从而抑制破骨细胞分化, 最终起到保护骨质的作用。同时, 研究发现 PI3-K/Akt 信号通路主要参与人破骨细胞凋亡调节, Moon 等^[11]证明活化的 Akt 诱导破骨细胞分化是通过活化

GSK3B 级联信号实现的, 而本研究筛选的活性成分刺芒柄花素可作用于 GSK3B 关键靶点, 以降低破骨细胞的生成, 可能成为骨质疏松治疗的一个新的靶点。此外, 研究表明线粒体是细胞凋亡调节的关键部位, 能够合成释放一系列的抗凋亡及促凋亡因子, 其中 Bcl-2 家族蛋白是抗细胞凋亡的关键因子, Bax 是促进细胞凋亡的关键因子^[12]。藤黄健骨胶囊中的山奈酚可全面作用于 Bcl-2、BAX、CASP3

表 2 经 KEGG 富集分析后的主要通路

Table 2 Main pathways in KEGG enrichment analysis

通路	计数	P 值	FDR
osteoclast differentiation	18	3.21×10^{-8}	4.13×10^{-5}
PI3K-Akt signaling pathway	31	2.70×10^{-9}	3.46×10^{-6}
NF-kappa B signaling pathway	12	1.23×10^{-5}	1.58×10^{-2}
renal cell carcinoma	8	1.44×10^{-5}	1.83×10^{-3}
calcium signaling pathway	20	1.31×10^{-7}	1.68×10^{-5}
platelet activation	10	6.16×10^{-4}	7.63×10^{-3}
VEGF signaling pathway	15	2.62×10^{-10}	3.36×10^{-7}
TNF signaling pathway	24	1.46×10^{-15}	1.85×10^{-12}
arginine and proline metabolism	9	3.50×10^{-6}	4.49×10^{-4}
MAPK signaling pathway	22	1.77×10^{-6}	2.28×10^{-3}

表 3 GO 富集分析的生物过程结果

Table 3 Bioprocess results of GO enrichment analysis

通路	计数	P 值	FDR
sensory perception of pain	5	3.21×10^{-12}	5.50×10^{-10}
positive regulation of osteoclast differentiation	3	2.05×10^{-10}	3.64×10^{-7}
platelet degranulation	5	3.31×10^{-9}	4.48×10^{-7}
kidney development	4	8.04×10^{-7}	7.72×10^{-5}
regulation of smooth muscle cell proliferation	12	9.09×10^{-11}	1.60×10^{-7}
positive regulation of vasoconstriction	9	2.57×10^{-9}	4.54×10^{-6}

表 4 GO 富集分析的细胞组分结果

Table 4 Results of cell components in GO enrichment analysis

通路	计数	P 值	FDR
cytosol	90	2.08×10^{-18}	2.78×10^{-15}
cytoplasm	84	4.10×10^{-12}	5.48×10^{-10}
plasma membrane	79	7.43×10^{-11}	9.94×10^{-9}
nucleus	79	2.16×10^{-10}	2.85×10^{-7}
extracellular exosome	57	2.63×10^{-8}	3.52×10^{-5}
nucleoplasm	50	3.24×10^{-6}	4.32×10^{-4}

表 5 GO 富集分析的分子功能结果

Table 5 Molecular functional results of GO enrichment analysis

通路	计数	P 值	FDR
protein binding	141	5.68×10^{-8}	8.39×10^{-6}
enzyme binding	39	8.87×10^{-27}	1.31×10^{-23}
ATP binding	30	4.87×10^{-7}	6.97×10^{-4}
protein kinase activity	21	8.81×10^{-9}	1.30×10^{-5}
transcription factor binding	15	6.79×10^{-6}	0.01×10^{-3}
oxidoreductase activity	14	6.96×10^{-7}	1.03×10^{-4}

板激活过程等；这些靶点在细胞组分中与胞质、胞合、蛋白激酶活化、ATP 结合、氧化还原酶激活等膜以及胞核等相关性最大；在分子功能中与蛋白结

及 AKT 靶点，其机制可能是促进 BCL2 表达，同时抑制 BAX 的表达、AKT 的活性及 Caspase3 的降解，从而达到壮骨健骨的功效。

3.4.2 GO 生物过程富集分析 将筛选得到的核心靶蛋白导入 DAVID 数据库进行 GO 生物学过程富集分析，即分别从生物过程、细胞组分及分子功能 3 个层面对基因功能进行注释。GO 富集分析结果显示，藤黄健骨胶囊治疗疾病的靶基因主要富集在 606 个生物学过程，79 种细胞组分和 148 种分子功能。主要生物学过程富集结果见表 3，细胞组分及分子功能富集分别见表 4 和表 5。由表中 GO 分析结果可见，藤黄健骨胶囊治疗疾病的生物过程主要涉及痛觉调节、骨分化正向调节、肾脏调节、血小

高度相关。

4 讨论

中药复方制剂是以多成分、多靶点及多通路的作用特点发挥高效低毒治疗作用的，单一成分并不能从整体上表征药物的主要物质基础。中药质量控制应该“围绕药效、锁定成分”，选择药物中能够代表药效的化学成分作为质量标志物，构建以药效物质基础为导向的中药质量控制体系。本实验以藤黄健骨胶囊为研究对象，基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术平台，快速分析、定性了 34 种化学成分，为其质量标志物的进一步筛选奠定了重要的前期基础；为探索药物化学成分与临床疗效之间的相关性，本研究采用网络药理学方法对鉴定的化合物进行综合分析，并找到药物中的重要关键成分如山柰酚、大豆苷元、熊果酸、刺芒柄花素和豆甾醇等，以及药物的专属性成分如淫羊藿苷、油皮苷和松果菊苷等。

其中山柰酚具有明显的抗生育、抗骨质疏松、促进成骨细胞增殖和分化以及抗血小板的作用，是该药补肾壮骨、活血功效的重要活性成分之一^[13-14]；

大豆苷元具有明显的促进骨代谢、抑制骨转化及骨质疏松作用^[15]；熊果酸具有促进骨、肌肉生长、抗炎镇痛调节免疫功能、调节血管及抗骨质疏松等药理作用^[16]；刺芒柄花素可抑制骨组织 MMP-9 的合成和分泌、破骨细胞的骨吸收，同时降低 TNF 及 IL-6 水平，具有明显的健骨作用^[17-18]，同时具有解痉镇痛的效果；豆甾醇能够抑制多种炎症介质和基质降解，从而起到抗骨关节炎引起的软骨退化作用，对骨关节炎具有积极的治疗作用^[19]。此外，除本研究分析筛选到的以上 5 种成分，其他类成分如淫羊藿苷、柚皮苷和松果菊苷等都属于藤黄健骨胶囊的专属性质量标志物成分。淫羊藿中的淫羊藿苷可以全面作用于雌激素受体 α -分泌型糖蛋白 (Wnt) / β -链蛋白 (β -catenin)，核转录因子- κ B (NF- κ B)，细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等多个信号通路，具有显著的成骨作用，使其成为治疗骨质疏松症的首选先导化合物^[20]。骨碎补中的柚皮苷可抑制 RANKL 介导的 I κ B- α 降解来抑制 RANKL 诱导的 NF- κ B 活化，抑制 RANKL 诱导的 ERK 磷酸化，抑制破骨细胞关键标记基因的表达，通过抑制破骨细胞形成，防止骨量减少及增加骨强度，是治疗骨性疾病的重要活性成分^[21]。肉苁蓉中的松果菊苷可增加碱性磷酸酶 (ALP)、骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)、骨桥蛋白 (OPN) 的 mRNA 表达和骨的矿化，是治疗骨质疏松的骨形成因子^[22]。

同时，本研究还对药物成分所对应的靶点进行筛选，并构建“药材-成分-靶点”网络，然后将这些靶点进行 KEGG 通路分析及 GO 分析，初步明确藤黄健骨胶囊治疗疾病的主要分子机制通路、调节的生物学过程、作用的细胞组分以及潜在的分子功能。经过富集分析结果可知，藤黄健骨胶囊可能主要作用于 Bcl-2、BAX、AKT、PPARG、NF- κ B、PTGS1、PTGS2、TNF、IL6、F7 及 IL1B 等靶点，并通过破骨细胞分化信号通路、肾细胞信号通路、凝血因子等从而起到补肾活血和止痛等功效，具体为山柰酚作用于 Bcl-2、BAX、CASP3、AKT、PPARG、PTGS1、PTGS2、TNF、IL1B 及 F7 等靶点，大豆苷元作用于 PPARG、PTGS1、PTGS2、TNF 及 IL6 等靶点，熊果酸作用于 NF- κ B、PTGS1、PTGS2、TNF、IL6 及 IL1B 等靶点，刺芒柄花素作用于 GSK3B、PPARG、PTGS1、PTGS2 等靶点，豆甾醇作用于 PTGS1、PTGS2 等靶点。其中 Bcl-2、

BAX、CASP3、AKT、GSK3B、PPARG 和 IL1B 与骨病及肾病高度相关，PTGS1 和 PTGS2 靶点与疼痛和凝血高度相关，TNF 及 IL6 与炎症和疼痛高度相关。

传统中医药理论认为，目前常见的骨性疾病经以肾虚血瘀型骨质疏松为主，属“骨痿”“骨痹”“腰背痛”等范畴，因此补肾健脾、活血化瘀是防治该类疾病的主要手段和有效途径^[4]。藤黄健骨胶囊中的熟地黄可益精填髓，活血化瘀；淫羊藿可祛风除湿，补益肝肾；骨碎补可续伤止痛，补肾健骨；鹿衔草可补肾强骨、祛风除湿；鸡血藤可活血行气，滋阴养肾；肉苁蓉可温补肾阳，通经络，强筋骨；莱菔子可理气健骨，兼防滋腻太过之弊。该药的主要功效与骨质疏松等骨性疾病的病机高度吻合，可明显减轻四肢疼痛，促进骨的形成和重建，抑制骨质吸收，降低破骨细胞活性，提升血钙水平等，对于治疗骨性疾病具有很好的疗效。上述已有药理研究与本研究结果一致，都表明藤黄健骨胶囊的健骨止痛和补肾活血功效，而本研究则从更深层次的药效成分-作用靶点-网络通路水平来阐释藤黄健骨胶囊的作用机制，更具科学性和合理性。

本研究基于 UHPLC-Q-Orbitrap 技术的分析方法可高效、快速、全面地对藤黄健骨胶囊中的活性化学成分进行系统识别。不仅能够从整体上系统地阐明藤黄健骨胶囊的化学成分组成，为深入挖掘分析其药效物质奠定了坚实的基础，同时采用网络药理学方法深入挖掘其潜在药物治疗机制、靶点及药物可能治疗的疾病，为今后藤黄健骨胶囊质量控制标准的提升和临床应用提供更加科学的理论指导依据。

参考文献

- [1] 赵子剑. HPLC 测定藤黄健骨胶囊中淫羊藿苷的含量 [J]. 光明中医, 2009, 24(4): 646-647.
- [2] 于曼娜, 张 青. 高效液相色谱法测定藤黄健骨胶囊中淫羊藿苷的含量 [J]. 海峡药学, 2006(4): 98-100.
- [3] 周 霖, 周珮珮, 王肖辉, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的丹灯通脑软胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4311-4318.
- [4] 张 林, 王启孟. 藤黄健骨胶囊治疗肾虚血瘀型骨质疏松症的效果及对骨密度和骨代谢的影响 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(34): 144-145.
- [5] 胡新阳. 藤黄健骨胶囊治疗膝关节骨关节炎疗效观察 [J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(2): 225-226.
- [6] 刘 鹏, 徐冬冬, 黄文虎, 等. 藤黄健骨胶囊治疗腰椎间盘突出症疗效观察 [J]. 新中医, 2016, 48(10): 103-104.

- [7] Wang Y Y, Yu W D, Shi C L, *et al.* Network pharmacology of Yougui Pill combined with Buzhong Yiqi Decoction for the treatment of sexual dysfunction [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 1243743.
- [8] Sun W J, Chen Y F, Li H C, *et al.* Material basis and molecular mechanisms of Dachengqi decoction in the treatment of acute pancreatitis based on network pharmacology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109656.
- [9] Ge L N, Cheng K, Han J X. A network pharmacology approach for uncovering the osteogenic mechanisms of *Psoralea corylifolia* Linn [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 2160175.
- [10] 王链链, 郭晓英. 破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(6): 742-748.
- [11] Moon J B, Kim J H, Kim K, *et al.* Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3beta/ NFATc1 signaling cascade [J]. *J Immunol*, 2012, 188(1): 163-169.
- [12] 于冬冬, 赵丹阳, 姚啸生. 中药复方鹿角胶丸通过 PI3-K/AKT 信号通路调节破骨细胞凋亡 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 874-878.
- [13] 雷晓青, 陈 鳌, 刘 毅, 等. 山柰酚药理作用的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 61-62.
- [14] Wong S K, Chin K Y, Ima-Nirwana S. The osteoprotective effects of kaempferol: The evidence from *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3497-3514.
- [15] 孙 强, 刘 建. 大豆苷元对糖皮质激素性骨质疏松大鼠骨量及骨微结构的影响 [J]. 海南医学院学报, 2013, 19(6): 731-734.
- [16] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的血管药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1510-1519.
- [17] 喻琴云, 詹晓峰, 黄 彦. 刺芒柄花素对去势骨质疏松大鼠 P38MAPK/MMP-9 信号通路的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(12): 1371-1376.
- [18] Cos, De Takatsuka T, Apen S, *et al.* Phytoestrogens: Recent developments [J]. *Planta Med*, 2013, 69(7): 589-599.
- [19] 周志远, 卢 群, 刘 洋, 等. 豆甾醇的研究及开发进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(24): 15-17.
- [20] 路宇仁, 陈映冰, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 209-220.
- [21] 申意伟, 徐西林, 张晓峰, 等. 骨碎补中柚皮苷治疗股骨头坏死研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(7): 128-131.
- [22] Li T M, Huang H C, Su C M, *et al.* Cistanche deserticola extract increases bone formation in osteoblasts [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(6): 897-907.