

基于指纹图谱和网络药理学对当归四逆汤中桂枝的 Q-marker 预测分析

夏金鑫, 梅 茜, 郭 爽, 严国俊, 王巧晗, 季 德, 赵晓莉, 陆兔林*, 毛春芹*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要:目的 基于指纹图谱和网络药理学分析预测当归四逆汤(DSD)中桂枝的质量标志物(Q-marker)。方法 建立桂枝水煎液和 DSD 的指纹图谱, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版)进行分析; 采用网络药理学筛选和分析桂枝相关成分的作用靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络, 预测 DSD 中桂枝潜在的 Q-marker。结果 建立了 15 批桂枝水煎液和 15 批 DSD 的指纹图谱, 相似度均>0.96, 并指出 7 个共有成分, 分别为原儿茶酸、香豆素、肉桂酸、桂皮醛、桂皮醇、2-甲氧基肉桂酸和 2-甲氧基桂皮醛; 通过网络药理学筛选出桂枝的 5 个活性成分、7 个核心靶点和 15 条关键通路; 基于 Q-marker “五原则”分析预测 2-甲氧基桂皮醛、桂皮醛、肉桂酸为其潜在的 Q-marker。结论 通过指纹图谱和网络药理学分析预测 DSD 中桂枝的 Q-marker, 为全面控制 DSD 的质量提供依据, 为进一步研究 DSD 的作用机制提供参考, 同时为经典方中复方及单味药的 Q-marker 的关联性研究提供示范。

关键词: 桂枝; 当归四逆汤; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 2-甲氧基桂皮醛; 桂皮醛; 肉桂酸

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2634-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.006

Q-marker prediction analysis of *Cinnamomi Ramulus* in Danggui Sini Decoction based on fingerprint and network pharmacology

XIA Jin-xin, MEI Xi, GUO Shuang, YAN Guo-jun, WANG Qiao-han, JI De, ZHAO Xiao-li, LU Tu-lin, MAO Chun-qin

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To analyze and predict the Q-marker of *Cinnamomi Ramulus* in Danggui Sini Decoction based on fingerprint and network pharmacology. **Methods** The fingerprints of *Cinnamomi Ramulus* Decoction and Danggui Sini Decoction were established, and analyzed by using the similarity evaluation system software for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 edition); The network pharmacology was used to screen and analyze the function target and pathway of related components of *Cinnamomi Ramulus*, and the “component-target-pathway” network was constructed to predict the potential Q-marker of *Cinnamomi Ramulus* in Danggui Sini Decoction. **Results** The fingerprints of 15 batches of *Cinnamomi Ramulus* Decoction and 15 batches of Danggui Sini Decoction were established. The similarity of fingerprints was more than 0.96, and seven common components were identified, including protocatechuic acid, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, 2-methoxy cinnamic acid, and 2-methoxy cinnamaldehyde. A total of five active components, seven core target sites and 15 key pathways of *Cinnamomi Ramulus* were screened out through network pharmacology system, and based on the “Five Principles” of quality markers, 2-methoxy cinnamaldehyde, cinnamaldehyde, and cinnamic acid were predicted as potential quality markers. **Conclusion** In this study, the quality markers of *Cinnamomi Ramulus* in Danggui Sini Decoction are analyzed by fingerprint and network pharmacology, which provides a basis for comprehensive control of the quality of Danggui Sini Decoction, reference for further study on the mechanism of Danggui Sini Decoction, and demonstration for the correlation study of quality markers of compound and single medicine in the classic prescription.

Key words: *Cinnamomi Ramulus*; Danggui Sini Decoction; fingerprint; network pharmacology; Q-marker; 2-methoxy cinnamaldehyde; cinnamaldehyde; cinnamic acid

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707000); 南京市栖霞区科技计划项目(高校院所产学研合作类, GC201802)

作者简介: 夏金鑫, 女, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 18801586201 E-mail: 371670943@qq.com

*通信作者 陆兔林, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: (025)85811835 E-mail: lutuling2005@126.com
毛春芹, 女, 正高级实验师, 主要从事中药新药研发及中药质量标准研究。E-mail: mcq63@163.com

当归四逆汤(DSD)是张仲景《伤寒论》中的经典名方之一。《伤寒论》第 351 条文:“手足厥寒,脉细欲绝者,当归四逆汤主之。”DSD 由当归、桂枝、白芍、细辛、甘草、木通、大枣 7 味药组成,具有温运血行、散寒通脉等功效,主治血虚寒厥证^[1-2]。现代临床在内科、外科、妇科等疾病上都有广泛的应用,主要用于治疗痛经、糖尿病周围神经病变、肿瘤、肾病、慢性肺源性心脏病、胃炎和荨麻疹等疾病^[3-10]。方中桂枝辛温,温经散寒以通脉,与当归共为君药;白芍、细辛共为臣药,助桂枝温通血脉。桂枝来源于樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥嫩枝,味辛、甘,性温,具有发汗解肌、温通经脉、助阳化气、平冲降气之功效,主要用于风寒感冒、脘腹冷痛、血寒经闭、关节痹痛、痰饮、水肿、心悸、奔豚等症^[11]。研究表明,桂枝在临床上一般用于治疗肿瘤、风湿性关节炎、痛经、糖尿病周围神经病变、心血管、痉挛等疾病^[12-14]。

中药质量标志物(Q-marker)是刘昌孝院士^[15-16]于 2016 年针对中药生物属性、制造过程及配伍理论等特点提出的新概念,是中药质量评价与控制的核心概念。Q-marker 具有有效性、特有性、传递与溯源性、可测性和处方配伍“五原则”的特点,能够反映中药的安全性和有效性,有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段,具有整体性和模糊性的特点,能够反映中药及其制剂内在质量的稳定性和均一性,是控制水煎液、复方制剂等失去中药外表特征的中药制剂的有效手段^[17-18]。中药和复方制剂成分复杂,具有多成分、多靶点及多通路的特点,使其作用机制研究困难。网络药理学具有系统性与整体性的特点,运用网络药理学对中药进行系统分析,有助于反映及阐释中药的活性成分与靶点之间的作用关系^[19-22]。本研究通过建立桂枝水煎液和 DSD 的指纹图谱,采用指纹图谱和网络药理学相结合的方法分析预测 DSD 中桂枝的 Q-marker,为全面控制 DSD 的质量提供依据,为进一步研究 DSD 的作用机制提供参考,同时为经典名方中复方与单味药的 Q-marker 的关联性研究提供示范。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waterse 2695 型高效液相色谱仪,包括四元泵、柱温箱、自动进样器、PDA 检测器和 Empower 工

作站(美国 Waters 公司);MS-105D 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);TD5001C 型电子天平(天津天马衡基仪器有限公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);H1650-W 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试药

桂皮醛(批号 SSELCLI,质量分数>98%)购自东京化成工业株式会社;肉桂酸(批号 AA0807DA14,质量分数≥98%)、桂皮醇(批号 Y04N7C23850,质量分数≥98%)、香豆素(批号 Y29M9C57109,质量分数≥98%)、原儿茶酸(批号 H21J9Z64031,质量分数≥98%)、2-甲氧基肉桂酸(批号 RA0424FA14,质量分数≥98%)、2-甲氧基桂皮醛(批号 S28D9G78359,质量分数≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他试剂均为分析纯。

DSD 由当归、桂枝、白芍、细辛、甘草、木通和大枣 7 味药组成,均购自于道地产区或主产区。每味药共收集不少于 3 个产地,总批次不少于 15 批。本实验前期已按照《中国药典》2015 年版项下各味药的检测方法和检测要求对药材进行检测,选出优质产地的药材,并按照《中国药典》2015 年版项下炮制方法将药材炮制成饮片。当归(甘肃岷县,批号 TA180074001);桂枝(广西东兴,批号 TA180185001~TA180199001);白芍(安徽亳州,批号 TA180099001);细辛(辽宁新宾,批号 TA180145001);甘草(甘肃陇西,批号 GC17111412);木通(河南洛阳,批号 MT2019030505);大枣(山西闻喜,批号 DZ1807162)。经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥嫩枝、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根和根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、木通科植物木通三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的干燥藤茎和鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。本实验共研究桂枝和 DSD 各 15 个批次。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Merck Purospher Star LP RP-18 endcapped (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~10% A; 8~15 min, 10%~13% A; 15~24 min, 13%~15% A; 24~28 min, 15%~17% A; 28~32 min, 17%~20% A; 32~40 min, 20%~30% A; 40~47 min, 30%~45% A; 47~60 min, 45%~70% A; 60~75 min, 70%~95% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取桂皮醛、肉桂酸、香豆素、原儿茶酸、桂皮醇、2-甲氧基桂皮醛、2-甲氧基肉桂酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释, 得到质量浓度分别为 0.300、2.525、2.250、0.613、0.325、1.473、0.316 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 样品的制备

DSD 出自于东汉·张仲景《伤寒论》, 原方组成: “当归三两, 桂枝三两(去皮), 芍药三两, 细辛三两, 甘草二两(炙), 通草二两, 大枣二十五枚(擘)”。用法用量: “上七味, 以水八升, 煮取三升, 去滓, 温服一升, 日三服”。经文献资料考证, 按一两等于 3 g, 大枣二十五枚为 8 枚(约 62.5 g), 一升等于 200 mL, 称取处方药味置陶瓷锅中, 加水 1 600 mL, 加盖, 武火煮沸并保持微沸煎至 600 mL, 以 80 目筛网滤过, 绞渣, 即得。按照煎煮方法, 煎煮得到 15 批 DSD (编号 D1~D15)、15 批桂枝水煎液(编号 S1~S15)和 1 批缺桂枝阴性水煎液(编号 YX)。

2.4 供试品溶液的制备

分别取桂枝水煎液、DSD 和缺桂枝阴性水煎液摇匀, 精密量取 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 参照峰选择 肉桂酸是桂枝的主要成分之一, 化学性质稳定, 峰面积较大, 色谱峰保留时间稳定, 故选择肉桂酸作为参照峰, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。

2.5.2 精密度试验 取 DSD (D1), 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算共有峰

的相对峰面积和相对保留时间。结果显示共有峰的相对峰面积 RSD<2.8%, 相对保留时间 RSD<0.14%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取 DSD (D1), 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示共有峰的相对峰面积 RSD<3.0%, 相对保留时间 RSD<0.54%, 表明 DSD 在 48 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取 DSD (D1), 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示共有峰的相对峰面积 RSD<3.0%, 相对保留时间 RSD<0.11%, 表明该方法重复性良好。

2.6 指纹图谱的建立与相关性分析

2.6.1 桂枝水煎液和 DSD 指纹图谱的建立 取 15 批桂枝水煎液和 15 批 DSD, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版), 分别以 S1 和 D1 为参照图谱, 采用中位数法, 得到 15 批桂枝水煎液和 15 批 DSD 的指纹图谱叠加图, 结果见图 1、2。

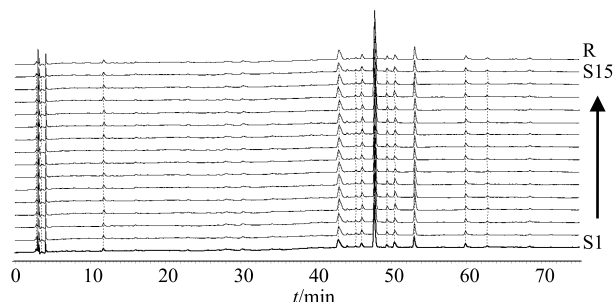


图1 15批桂枝水煎液指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 15 batches of *Cinnamomi Ramulus* Decoction

2.6.2 桂枝水煎液和 DSD 相似度分析 将 15 批桂枝水煎液和 15 批 DSD 的指纹图谱均导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版), 计算相似度, 结果见表 1。15 批桂枝水煎液和 15 批 DSD 的指纹图谱相似度均>0.96, 表明桂枝水煎液和 DSD 的质量稳定均一。

2.6.3 共有峰的指认及相关分析 根据指纹图谱分析结果, 将 DSD、桂枝水煎液、缺桂枝阴性水煎液和混合对照品的指纹图谱进行叠加, 结果见图 3。

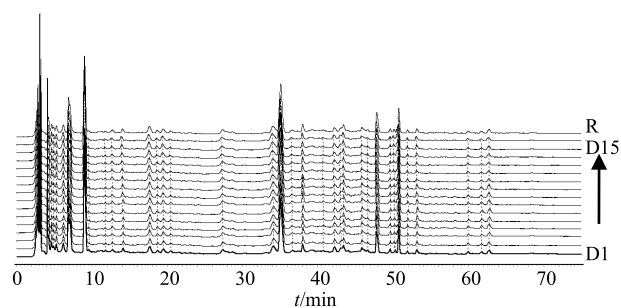


图 2 15 批 DSD 指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of 15 batches of DSD

表 1 桂枝水煎液和 DSD 指纹图谱相似度

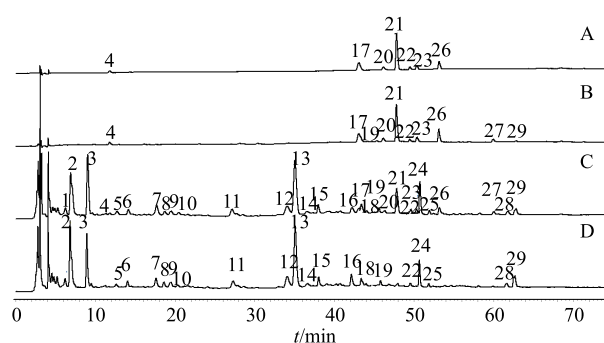
Table 1 Fingerprint similarities of *Cinnamomi Ramulus* Decoction and DSD

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.999	D1	0.974
S2	0.997	D2	0.973
S3	0.994	D3	0.973
S4	0.994	D4	0.970
S5	0.996	D5	0.972
S6	0.997	D6	0.969
S7	0.992	D7	0.978
S8	0.995	D8	0.978
S9	0.993	D9	0.978
S10	0.999	D10	0.969
S11	0.999	D11	0.968
S12	0.997	D12	0.968
S13	0.998	D13	0.985
S14	0.996	D14	0.985
S15	0.997	D15	0.986

由图可知,桂枝水煎液共确定 10 个共有峰,DSD 共确定 29 个共有峰,经对照品指认其中 7 个共有峰。7 个共有峰分别为 4 号峰(原儿茶酸)、17 号峰(香豆素)、20 号峰(桂皮醇)、21 号峰(肉桂酸)、22 号峰(2-甲氧基肉桂酸)、23 号峰(桂皮醛)和 26 号峰(2-甲氧基桂皮醛)。由于复方成分复杂,17 号峰(香豆素)未达基线分离,19 号峰和 22 号峰(2-甲氧基肉桂酸)在缺桂枝阴性水煎液中存在一定干扰。

2.7 基于“成分-靶点-通路”的网络药理学分析

2.7.1 中药靶点预测 通过检索中药系统药理数据库(TCMSP, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>)、PubChem Compound 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)



A-混合对照品色谱图 B-桂枝水煎液共有峰模式图 C-DSD 共有峰模式图 D-缺桂枝阴性水煎液色谱图 4-原儿茶酸 17-香豆素 20-桂皮醇 21-肉桂酸 22-2-甲氧基肉桂酸 23-桂皮醛 26-2-甲氧基桂皮醛

A-chromatogram of mixed reference substances B-common pattern of fingerprint of *Cinnamomi Ramulus* decoction C-common pattern of fingerprint of DSD D-chromatogram of negative *Cinnamomi Ramulus* decoction 4-3,4-dihydroxy benzoic acid 17-coumarin 20-cinnamyl alcohol 21-cinnamic acid 22-2-methoxy cinnamic acid 23-cinnamaldehyde 26-2-methoxy cinnamaldehyde

图 3 DSD、桂枝水煎液指纹图谱共有模式图和混合对照品、缺桂枝阴性水煎液色谱图

Fig. 3 Common pattern of DSD and *Cinnamomi Ramulus* Decoction, and chromatogram of mixed reference substances and negative *Cinnamomi Ramulus* Decoction

www.swisstargetprediction.ch/) 中香豆素、原儿茶酸、桂皮醇、肉桂酸、桂皮醛、2-甲氧基肉桂酸和 2-甲氧基桂皮醛 7 个候选化合物的作用靶点,共得到与 7 个化合物相关的 116 个靶点。

2.7.2 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络构建 将筛选出的 116 个靶点,导入在线 STRING 11.0 数据库软件(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)进行 PPI 网络分析,选择物种为“Homo sapiens”,蛋白交互参数评分值为“high confidence>0.7”,隐藏网络中无联系的节点,其余参数设置不变,获得核心靶点 PPI 网络图(图 4),结果共获得 116 个节点,199 条边。将 PPI 结果以 TSV 文本格式导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,并利用 Cytoscape 3.7.1 软件中的“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑属性分析,计算选取“度值”(degree)、“介数中心性”(betweenness centrality)和“接近中心性”(closeness centrality)3 个重要拓扑参数均大于中位数且 degree≥9 的靶点作为核心靶点。经筛选得到 12 个核心靶点,结果见表 2。经分析发现,这 12 个靶点与肉桂酸、2-甲氧基肉桂酸、2-甲氧基桂皮醛、桂皮醛、香豆素和原儿茶酸 6 个成分有关。

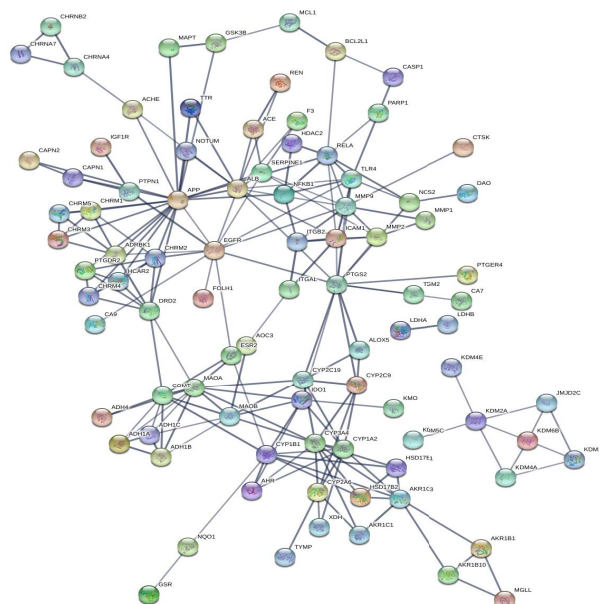


图 4 核心靶点 PPI 网络

Fig. 4 PPI network diagram of core targets

2.7.3 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 12 个潜在的核心靶点进行基因本体 (GO) 功能和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。GO 功能富集分析主要包括基因产物细胞功能、分子功能和生物功能分析, 对基因进行注释和分类; KEGG 通路富集分析可以得到 DSD 中桂枝核心靶点的信号通路。GO 和 KEGG 分析均根据 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

GO 富集分析共获取 24 个 GO 条目, 其中生物过程 (BP) 占 16 个、分子功能 (MF) 占 4 个、细胞组成 (CC) 占 4 个, 根据显著性程度 $P < 0.05$ 进行部分展示。BP 主要富集在白细胞介素-12 生物合成过程的正调控、神经递质分解代谢过程、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、炎症反应等; MF 主要富集在血红素结合、铁离子结合、氧化还原酶活性等; CC 主要富集在细胞质核周区。结果见表 3。

表 2 靶点网络的拓扑学性质

Table 2 Topological properties of target network

靶点	名称	介数中心性	接近中心性	度值
RELA	核因子 NF- κ B p65 亚单位 (nuclear factor NF-kappaB p65 subunit)	0.086 2	0.340 4	9
EGFR	表皮生长因子受体 erbB1 (epidermal growth factor receptor erbB1)	0.182 2	0.408 2	12
COMT	儿茶酚 O-甲基转移酶 (同源) [catechol O-methyltransferase (by homology)]	0.070 5	0.334 7	9
MAOA	单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A)	0.110 1	0.360 4	11
ALB	血清白蛋白 (serum albumin)	0.151 1	0.400 0	13
PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	0.302 5	0.421 1	14
CYP3A4	细胞色素 P450 家族成员 3A4 (cytochrome P450 3A4)	0.084 5	0.325 2	11
CYP1B1	细胞色素 P450 家族成员 1B1 (cytochrome P450 1B1)	0.125 1	0.334 7	9
APP	β 淀粉样 A4 蛋白 (β amyloid A4 protein)	0.276 5	0.402 0	21
MMP9	基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9)	0.067 2	0.373 8	11
CYP1A2	细胞色素 P450 家族成员 1A2 (cytochrome P450 1A2)	0.047 8	0.301 9	9
TLR4	Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4)	0.054 7	0.372 1	9

KEGG 富集分析共得到 26 条通路, 根据显著性程度 $P < 0.05$, 筛选得到 15 条相关通路, 主要包括类固醇激素生物合成、化学致癌、酪氨酸代谢、色氨酸代谢等。结果见表 4。

2.7.4 成分-靶点-通路网络构建 根据筛选得到的 6 个成分、12 个靶点和 15 条通路, 运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分-靶点-通路”网络图, 结果见图 5。根据 Cytoscape 3.7.1 软件对网络图进行分析, 以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度为参考, 发现肉桂酸、2-甲氧基肉桂酸、2-甲氧基桂皮醛、

桂皮醛、原儿茶酸的连接度相对较高, 均可能是桂枝发挥药效的活性物质; MAOA、MMP9、TLR4、CYP1A2、PTGS2、CYP1B1、RELA 的连接度较高, 可能是桂枝发挥作用的关键靶点; 15 条信号通路的连接度差异不大, 均可能是桂枝的关键信号通路。

3 整合分析

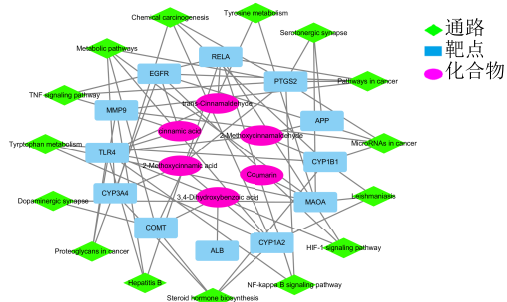
本研究通过建立桂枝水煎液和 DSD 的指纹图谱, 指认其共有峰, 对指认出的成分进行网络药理学分析, 筛选得到桂枝的关键靶点和信号通路, 运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分-靶点-通路”网

表 3 基因生物学过程
Table 3 Biological process of genes

类别	基因功能	数目/个	P 值
BP	白细胞介素-12 生物合成过程的正调控 (positive regulation of interleukin-12 biosynthetic process)	2	0.003 60
BP	神经递质分解代谢过程 (neurotransmitter catabolic process)	2	0.003 60
BP	RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	4	0.007 10
BP	炎症反应 (inflammatory response)	3	0.010 00
BP	一氧化氮生物合成过程的正调控 (positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)	2	0.013 00
MF	血红素结合 (heme binding)	4	0.000 12
MF	铁离子结合 (iron ion binding)	3	0.006 00
MF	氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)	2	0.015 00
MF	单加氧酶活性 (monooxygenase activity)	2	0.027 00
CC	细胞质核周区 (perinuclear region of cytoplasm)	3	0.027 00

表 4 核心靶点的 Pathway 富集分析
Table 4 Pathway enrichment analysis of core target

类别	代谢通路	数目/个	P 值
hsa00140	类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis)	4	9.26×10^{-7}
hsa05204	化学致癌 (chemical carcinogenesis)	4	1.19×10^{-4}
hsa00350	酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism)	2	1.46×10^{-3}
hsa00380	色氨酸代谢 (tryptophan metabolism)	3	1.93×10^{-3}
hsa05140	利什曼病 (Leishmaniasis)	3	4.54×10^{-3}
hsa05206	癌症中的 MicroRNAs (microRNAs in cancer)	4	4.75×10^{-3}
hsa04064	NF-κB 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway)	3	7.36×10^{-3}
hsa04066	HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)	3	8.17×10^{-3}
hsa04668	TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)	3	0.010 3
hsa04726	5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse)	3	0.011 8
hsa04728	多巴胺能突触 (dopaminergic synapse)	2	0.014 2
hsa05200	癌症通路 (pathways in cancer)	4	0.017 5
hsa05161	乙型肝炎 (hepatitis B)	3	0.018 7
hsa01100	代谢通路 (metabolic pathways)	6	0.022 6
hsa05205	癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)	3	0.033 7



桂枝挥发油含量较高, 主要成分为桂皮醛和 2-甲氧基桂皮醛, 其他有效成分为肉桂酸、2-甲氧基肉桂酸、桂皮醇、香豆素、 β -谷甾醇、多聚体糖苷及多种二萜类化合物等^[23]。经研究发现, 桂皮醛和 2-甲氧基桂皮醛, 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和抗癌等作用; 肉桂酸具有抗炎、抗菌、抗肿瘤和抗氧化能力等作用^[13,24]。Chao 等^[25]经过研究发现桂枝挥发油能够减轻炎症反应, 其作用于 NF- κ B 通路, 通过减轻炎症因子的产生来发挥作用。Ka 等^[26]经过研究发现桂皮醛能够抑制人类早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞, 诱导细胞凋亡。临床研究表明, 桂枝一般用于治疗肿瘤、类风湿关节炎、痛经、糖尿病周围神经病变、心血管、痉挛等疾病^[12-14]。利用 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 查找发现 DSD 可通过调控 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、5-羟色胺能突触、酪氨酸代谢、类固醇激素生物合成、癌症通路、色氨酸代谢、NF- κ B 信号通路、多巴胺能突触等信号通路进行疾病治疗。程邦^[27]经研究发现 DSD 通过调控 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、癌症通路等信号通路干预类风湿性关节炎; 程思宇^[28]经研究发现 DSD 通过调控 NF- κ B 信号通路治疗糖尿病周围神经病变; 刘泽宇等^[29]经研究发现 DSD 通过调控 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等信号通路治疗肝细胞癌。综上分析, 推测 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、癌症通路、5-羟色胺能突触、酪氨酸代谢、类固醇激素生物合成、色氨酸代谢、多巴胺能突触和 NF- κ B 信号通路均可能是桂枝在 DSD 中发挥作用的信号通路。

4 讨论

中药和复方制剂成分复杂, 具有多成分、多靶点、多通路的特点, 使其作用机制研究困难。中药指纹图谱是建立在中药化学成分系统研究的基础上, 分析中药和复方制剂的化学成分类型, 对中药进行整体质量控制; 网络药理学基于疾病、基因、靶点、中药相互作用网络的基础上, 进一步阐释中药的作用机制; 质量标志物是中药质量评价与控制的指标, 有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系。

本研究依据刘昌孝院士^[16]提出的“质量标志物”的理念, 采用指纹图谱和网络药理学相结合的方法分析预测 DSD 中桂枝的 Q-marker。通过建立桂枝水煎液和 DSD 的指纹图谱从传递和溯源性、

可测性的角度对桂枝进行分析, 指出原儿茶酸、香豆素、桂皮醇、肉桂酸、2-甲氧基肉桂酸、桂皮醛和 2-甲氧基桂皮醛 7 个成分, 其中桂皮醇未达基线分离, 2-甲氧基肉桂酸在缺桂枝阴性水煎液的指纹图谱中存在一定干扰; 运用网络药理学从有效性的角度对其进行分析, 发现肉桂酸、2-甲氧基肉桂酸、2-甲氧基桂皮醛、桂皮醛和原儿茶酸 5 个活性成分通过调控 MAOA、MMP9、TLR4、CYP1A2、PTGS2、CYP1B1、RELA 等关键靶点, 作用于 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、癌症通路、NF- κ B 信号通路、酪氨酸代谢等关键信号通路发挥桂枝治疗疾病的功效; 从质量标志物特有性的角度进行分析, 原儿茶酸是白芍和桂枝的共有成分, 桂皮醛、肉桂酸和 2-甲氧基桂皮醛是桂枝的特有成分。综上所述, 初步预测桂皮醛、肉桂酸和 2-甲氧基桂皮醛为 DSD 中桂枝潜在的 Q-marker。为后期深入研究桂枝和 DSD 的作用机制提供参考, 有助于建立全程质量控制体系, 提高中药产业质量控制水平。

参考文献

- [1] 南京中医学院伤寒教研组编著. 伤寒论译释 (下册) [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1980.
- [2] 李克绍. 伤寒论语释 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1982.
- [3] 李宝军, 刘志强. 当归四逆汤在妇科临床中的应用研究 [J]. 当代医学, 2015, 21(5): 11-12.
- [4] 戴 晖, 张丽芬, 蒙凤贞. 当归四逆汤治疗荨麻疹的疗效及对变态反应的调控作用观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(10): 110-111.
- [5] Kumar Y H, Bhaskar S, Shankar K. Comparative study of positive Ver-Sus negative autologous serum skin test in chronic spontaneous urticaria and its treatment outcome [J]. *N Am J Med Sci*, 2016, 8(1): 25-30.
- [6] 李志宏, 王建军. 当归四逆汤加减治疗血虚寒凝型糖尿病周围神经病变的临床观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(23): 3567-3570.
- [7] 陈安凤, 谈 勇. 加味当归四逆汤治疗慢性肺源性心脏病 30 例疗效观察 [J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(2): 35-37.
- [8] 尚福林. 当归四逆汤治疗慢性非萎缩性胃炎的临床观察 [J]. 光明中医, 2018, 33(13): 1843-1845.
- [9] 杨 成. 加味当归四逆汤治疗膝关节骨性关节炎疗效观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(16): 109-110.
- [10] 张春燕, 李 斌, 薛少奇, 等. 当归四逆汤的临床应用进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A2): 113-114.

- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 申睿, 赵林华, 邸莎, 等. 桂枝临床应用及其用量 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(1): 20-23.
- [13] 朱华, 秦丽, 杜沛霖, 等. 桂枝药理活性及其临床应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(22): 61-65.
- [14] 周三林. 麻黄、桂枝的临床应用与药理学研究 [J]. 中国民间疗法, 2018, 26(4): 108-109.
- [15] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-marker): 提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.
- [16] 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.
- [17] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655.
- [18] 张慧, 陈燕, 汪佳楠, 等. 指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3822-3827.
- [19] 周文霞, 程肖蕊, 张永祥. 网络药理学: 认识药物及发现药物的新理念 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1): 4-9.
- [20] 张华敏, 刘思鸿, 高宏杰, 等. 复方中药网络药理学方法研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(10): 1270-1273.
- [21] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学——中药复方作用机制研究新视角 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2873-2876.
- [22] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, *et al.* Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [23] 刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 等. 桂枝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 11-13.
- [24] 许源, 宿树兰, 王团结, 等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(4): 674-678.
- [25] Chao L K, Hua K F, Hsu H Y, *et al.* Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 220-231.
- [26] Ka H, Park H J, Jung H J, *et al.* Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. [J]. *Cancer Lett*, 2003, 196(2): 143-152.
- [27] 程邦. 基于代谢组学和网络药理学的当归四逆汤干预类风湿性关节炎疾病的机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- [28] 程思宇. 基于 NF- κ B 信号通路探究当归四逆汤对糖尿病大鼠周围神经病变保护作用机制 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.
- [29] 刘泽宇, 万宇翔, 黄金昶. 当归四逆汤治疗肝细胞癌作用机制的网络药理学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 185-192.