

指纹图谱结合网络药理学的瓜蒌饮片质量标志物预测分析

温 捷, 薛 蓉, 季 德, 苏联麟, 王巧晗, 严国俊, 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 基于中药质量标志物(Q-Marker)的理论依据, 结合指纹图谱和网络药理学对瓜蒌饮片 Q-Marker 进行初步预测分析。方法 建立瓜蒌饮片的指纹图谱, 对 15 批瓜蒌饮片进行相似度评价, 同时进行主成分分析(PCA)及偏最小二乘法判别分析(PLS-DA); 通过网络药理学筛选瓜蒌饮片相关成分的靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测瓜蒌饮片的 Q-Marker。结果 建立了 15 批瓜蒌饮片的指纹图谱, 相似度均大于 0.900, 经 PCA 和 PLS-DA 显示同一产地的瓜蒌饮片各自聚为一类, 指认的 16、9、12 号峰在区分不同产地瓜蒌饮片中起重要作用。网络药理学分析表明, 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇等成分是瓜蒌饮片发挥活性作用的有效成分, 结合 Q-Marker 理念, 进一步明确 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇可作为瓜蒌饮片潜在的 Q-Marker。结论 通过指纹图谱和网络药理学分析预测了瓜蒌饮片的 Q-Marker, 为全面控制和评价瓜蒌饮片质量提供了科学依据, 为瓜蒌饮片的进一步开发应用提供理论参考。

关键词: 瓜蒌饮片; 质量标志物; 指纹图谱; 网络药理学; 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)09-2687-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.019

Predictive analysis of quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces based on fingerprint and network pharmacology

WEN Jie, XUE Rong, JI De, SU Lian-lin, WANG Qiao-han, YAN Guo-jun, LU Tu-lin, MAO Chun-qin

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

Abstract: Objective Based on the theoretical basis of quality marker (Q-Marker) of traditional Chinese medicine, combined with fingerprints and network pharmacology, the preliminary prediction analysis of the quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces was carried out. **Methods** The similarity evaluation of 15 batches of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces was carried out using the similarity evaluation system software (2012A) of Chinese medicine chromatographic fingerprints; The principal component analysis and partial least squares discriminant analysis were performed at the same time. The targets and pathways of the relevant components of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces were screened by network pharmacology, and the “component-target-pathway” network diagram was constructed to predict the quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces. **Results** The fingerprints of 15 batches of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces were established, and their similarities were all greater than 0.900. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showed that the *Trichosanthis Fructus* decoction pieces from the same place of origin were grouped together. The designated peak 16, peak 9 and peak 12 played an important role in distinguishing the *Trichosanthis Fructus* decoction pieces from different origins. Network pharmacological analysis showed that 3,29-dibenzoyl rarounitriol and other ingredients were the active ingredients of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces, combined with the core of the quality marker, it was further clarified 3,29-dibenzoyl rarounitriol can be used as a potential quality marker for *Trichosanthis Fructus* decoction pieces. **Conclusion** The study predicts the quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces through fingerprint and network pharmacological analysis, provides a scientific basis for comprehensive control and evaluation of the quality of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces, and provides a theoretical reference for the further development and application of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces.

Key words: *Trichosanthis Fructus* decoction pieces; quality marker (Q-Marker); fingerprint; network pharmacology; 3,29-dibenzoyl rarounitriol

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707000)

作者简介: 温 捷, 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: 19805186486 E-mail: 1206264275@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, 主要从事新药研发及药物制剂研究。E-mail: mcq63@163.com

瓜蒌为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟果实。秋季果实成熟时, 连果梗剪下, 置通风处阴干。瓜蒌作为一味常用中药在我国大部分均有种植, 主要分布在山东、安徽、山西、河北等地。瓜蒌性味甘、微苦, 寒, 归肺、胃、大肠经; 具有清热涤痰、宽胸散结、润燥滑肠的作用, 主要用于肺热咳嗽、痰浊黄稠、胸痹心痛、结胸痞满、乳痈、肺痈、肠痈、大便秘结^[1]。现代研究表明, 瓜蒌主要含三萜类、油脂、黄酮类、有机酸、氨基酸、甾醇类等生物活性成分, 具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、扩张冠状动脉、增加冠状血流量、抑制血小板聚集、降低胆固醇等药理活性^[2-3], 是临床配伍的常用中药。

目前, 瓜蒌的质量控制多以外观性状和薄层鉴别为指标, 但仅靠性状和薄层鉴别不能真正控制中药的质量, 反映其所体现的整体疗效。指纹图谱在尚不清楚中药整体化学成分的情况下, 能从整体上全面、准确地描述中药材及其制剂的内在质量, 可以提高中药质量评价的技术水平和科技含量^[4-5]。中药具有多成分、多靶点及多途径协同作用的特点, 是中药现代化研究难点和关键, 网络药理学的出现为中药走向现代化提供了新的前景。同时, 网络药理学整体性、系统性的特点与中医药整体观和辨证论治的思想精髓不谋而合^[6-7]。2016 年, 刘昌孝院士^[8]提出了“中药质量标志物(Q-Marker)”, 即在中医药理论的指导下, 整合相关植物学科理论和现代化学生物学技术, 最终实现建立全程质量控制体系。本研究建立瓜蒌饮片 HPLC 指纹图谱, 运用相似度评价分析、主成分分析(PCA)与偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)方法对收集的 3 个产地样品进行了综合评价, 结合网络药理学预测瓜蒌的 Q-Marker, 为全面控制和评价瓜蒌饮片质量提供了科学依据, 为瓜蒌饮片的进一步开发应用提供理论参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, 日本 SHIMADZU 公司; 色谱柱 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); MS-105D 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; KQ-500E 数控超声波清洗器, 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;

FA1104N 型电子天平, 上海菁海仪器有限公司。

1.2 试药

对照品 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇(批号 111931-201804)、木犀草素(批号 111520-201605)、芦丁(批号 YM0313SA14)、5-羟甲基糠醛(批号 H1906143)均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%。乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 甲酸(色谱纯, 美国 ACS 恩科公司), 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯(山东禹王实业有限公司化工分公司)。共收集来源于安徽省(S1~S5)、河北省(S6~S10)、山东省(S11~S15)3 个产地 15 批瓜蒌饮片, 由雷允上药业集团有限公司提供, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为葫芦科植物双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱色谱条件

岛津 LC-20AD HPLC Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.05%甲酸(B), 梯度洗脱: 0~45 min, 1%~10%A; 45~75 min, 10%~20%A; 75~100 min, 20%~35%A; 100~123 min, 35%~55%A; 123~125 min, 55%~64%A; 125~155 min, 64%A; 体积流量 0.8 mL/min 检测波长 277 nm; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取各对照品适量, 加纯甲醇配制成含 5-羟甲基糠 29.1 μg/mL、芦丁 25.5 μg/mL、木犀草素 38.6 μg/mL、3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇 35.7 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失去质量, 摇匀, 离心, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取瓜蒌饮片样品(S7) 2.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录其指纹图谱, 以 5-羟甲基糠醛作为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD<2.47%, 相对峰面积 RSD<2.69%, 表明该仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取瓜蒌饮片样品(S7) 2.0 g 各

6 份,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录其色谱图,以 5-羟甲基糠醛作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积,结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD<1.15%,相对峰面积的 RSD<3.00%,表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0、6、12、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件进样,记录其色谱图,以 5-羟甲基糠醛作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果显示共有峰相对保留时间的 RSD<1.46%,相对峰面积的

RSD<3.00%,表明样品在该条件下 24 h 内稳定。

2.5 瓜蒌指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.5.1 瓜蒌指纹图谱的建立 取 15 批瓜蒌饮片,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件依次进样测定,并记录色谱图。将 15 批瓜蒌饮片的 HPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)软件。以 S1 号样品的指纹图谱作为参照谱,采用平均数法,时间窗为 0.3,确定了 18 个共有峰,得到瓜蒌饮片指纹图谱叠加图,见图 1。

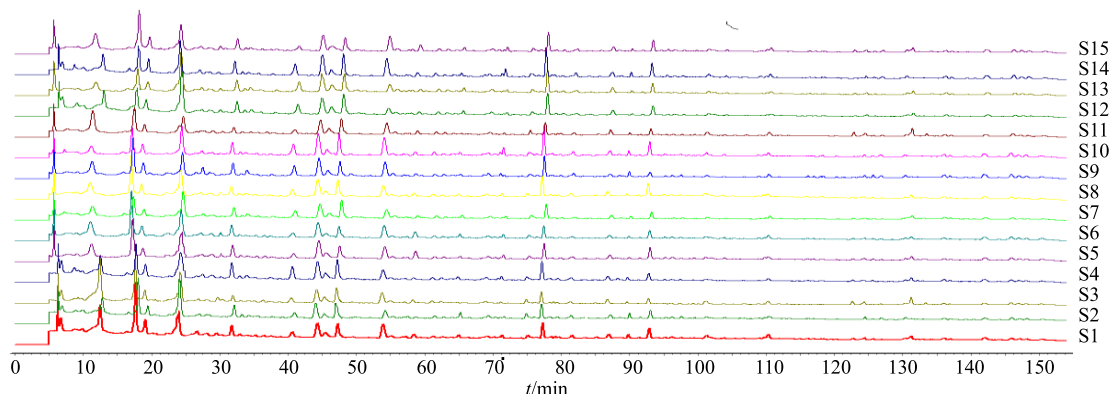


图 1 15 批瓜蒌饮片指纹图谱

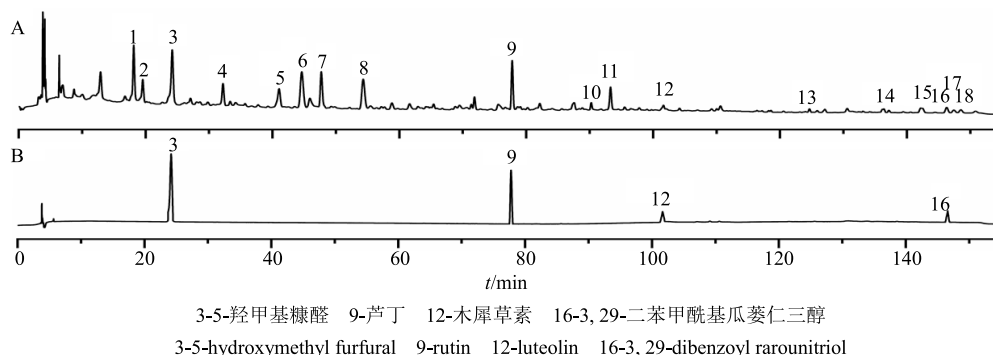
Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces

2.5.2 指纹图谱共有峰的标定和相似度评价 通过对照品比对的方式,指认了其中 4 个共有峰,分别为 5-羟甲基糠醛(3 号峰)、芦丁(9 号峰)、木犀草素(12 号峰)、3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇(16 号峰)。瓜蒌指纹图谱共有模式图及混合对照液的对照色谱图见图 2。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)软件对 15 批瓜蒌饮片样品指纹图谱的相似度进行计算,瓜蒌饮片指纹图谱相似度的范围在 0.910~0.997,分别是 0.959、0.941、

0.958、0.991、0.994、0.982、0.993、0.996、0.995、0.997、0.910、0.992、0.995、0.998、0.990,样品相似度均大于 0.900。

2.6 PCA

将 15 批瓜蒌饮片共有峰的相对峰面积作为变量,并导入 SIMCA-P+14.1 软件进行分析处理。采用非监督识别方法进行 PCA,观察样品间自然聚集,结果见图 3。PCA 显示不同产地的瓜蒌饮片沿 PCI 轴被明显分为 3 部分,在主成分空间的分布



3-5-羟甲基糠醛 9-芦丁 12-木犀草素 16-3, 29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇
3-5-hydroxymethyl furfural 9-rutin 12-luteolin 16-3, 29-dibenzoyl rarounitriol

图 2 瓜蒌饮片指纹图谱共有模式图 (A) 及混合对照色谱图 (B)

Fig. 2 Chromatogram of reference fingerprint of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces (A) and chromatogram of reference substances (B)

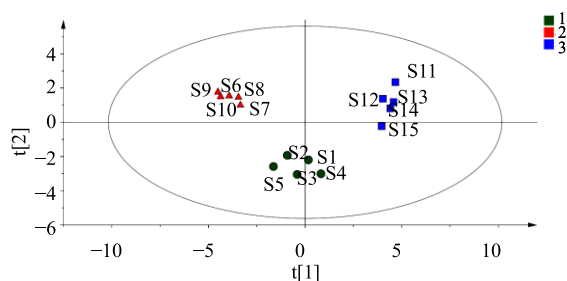


图3 PCA得分图

Fig. 3 PCA score plot

上有特定区域,说明不同产地的瓜蒌饮片化学成分存在着差异。

2.7 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)

在PCA的基础上,采用有监督模式的PLS-DA进一步分析不同产地瓜蒌饮片的差异性,样本得分矩阵见图4。模型解释率参数 R^2Y 为0.959,预测能力参数 Q^2 为0.922,均高于0.5,表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。由图4可知,PLS-DA结果与PCA分析一致,3个产地各自聚为一类。安徽产地分布在第1、2象限,河北产地的分布在第4象限,山东产地的聚在第3、4象限,即3个产地的瓜蒌饮片明显归为3类,进一步说明不同产地的瓜蒌饮片在成分上存在着差异。

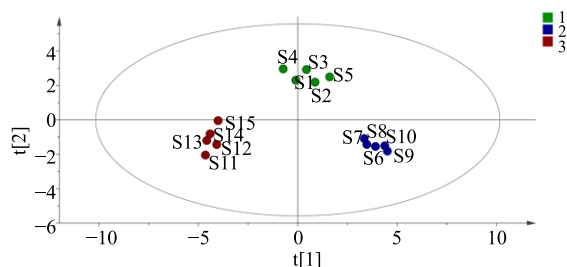


图4 PLS-DA得分图

Fig. 4 PLS-DA score plot

为更好明确不同产地瓜蒌饮片差异的物质,通过对PLS-DA模型中的变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)参数进行分析,得到差异性标记物的VIP得分图,见图5。筛选出贡献较大的9个变量($VIP > 1$),VIP值由大到小依次为16号峰(3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇)、6号峰、11号峰、14号峰、9号峰(木犀草素)、7号峰、1号峰、8号峰、12号峰(芦丁)。这些成分在区分不同产地瓜蒌饮片中起重要作用,是引起3个产地差异的主要标志性成分。

2.8 成分-靶点-通路网络药理学分析

2.8.1 数据库与软件 中药系统药理学数据库与分

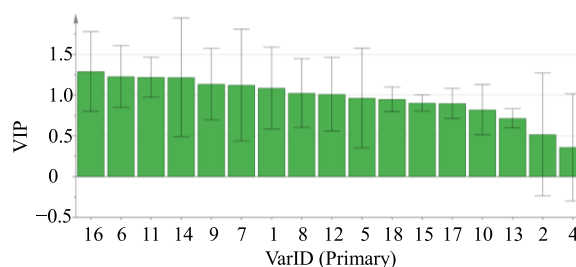


图5 瓜蒌饮片的重要性变量图

Fig. 5 VIP plot of PLS-DA of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces

析平台(TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcmssp.php>), PubChem Compound 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Swiss Target Prediction 服务器(<http://new.swisstargetprediction.ch/>), David 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>), 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>), Cytoscape3.6.1 软件。

2.8.2 中药靶点预测 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://lsp.nwu.edu.cn/tcmssp.php>), 对5-羟甲基糠醛、芦丁、木犀草素、3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇进行化合物检索, 获取其靶点信息; 通过 PubChem Compound 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)进行搜索, 将得到的化合物 SMILES 结结构输入 Swiss Target Prediction 服务器(<http://new.swisstargetprediction.ch/>)进行靶点预测, 得到上述4个化合物的作用靶点, 筛去重复靶点, 最终得到与其有关的作用靶点共125个。

2.8.3 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析 GO生物功能分析包括从生物功能上对基因产物进行标准化描述和注释, 通过GO富集分析可以获得不同基因在哪些生物学功能上富集并发挥药效作用。利用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)对获得的125个作用靶点进行GO富集分析。选取智人(Homo sapiens)物种的“Gene_Ontology”项, 得到GO条目, 包含106个生物过程(biological process, BP)条目, 29个细胞组成(cellular component, CC)条目, 以及30个分子功能(molecular function, MF)条目, 分别占64.2%, 17.6%, 18.2%。设置P-value值 < 0.05 , FDR < 0.05 , 选取组分排名前20的条目, 得到图6。

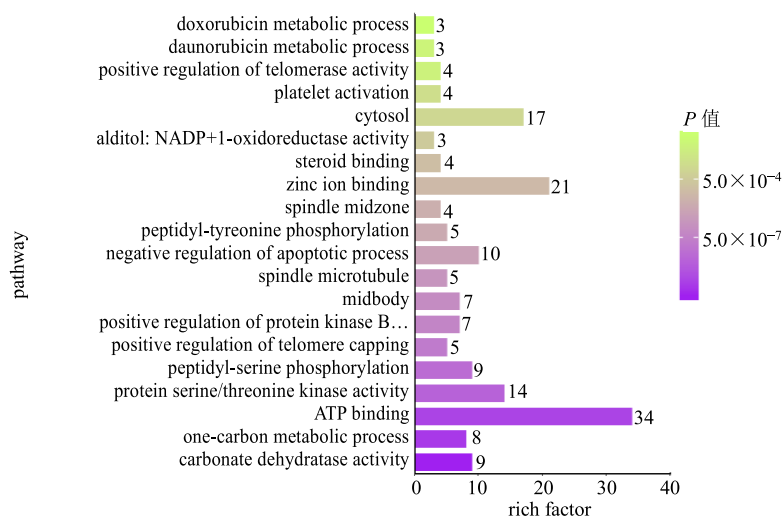


图 6 GO 富集分析 (前 20 条)

Fig. 6 GO enrichment analysis results (Top 20)

结果显示以上靶点参与的生物过程包括一碳代谢过程、肽基丝氨酸磷酸化、端粒封端的正调控、蛋白激酶 B 信号转导的正调控、凋亡过程的负调控、肽基苏氨酸磷酸化、血小板活化、端粒酶活性的正调控、柔红霉素代谢过程、阿霉素代谢等过程, 涉及纺锤体微管、中体、纺锤中区、胞质溶胶等细胞, 具有碳酸

盐脱水酶活性、三磷酸腺苷结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、锌离子结合、类固醇结合、醛糖醇、NADP+1-氧化还原酶活性等分子功能。结果见表 1。

利用 DAVID 数据库进行 KEGG_PATHWAY 富集分析, 富集到 KEGG 信号通路 58 条, 通过设定 $P\text{-value} < 0.01$, 其中排名前 20 的通路如图 7 所示

表 1 基因生物学过程

Table 1 Biological process of genes

类别	基因功能	数目/个	P 值
BP	一碳代谢过程 (carbonate dehydratase activity)	8	4.40×10^{-10}
BP	肽基丝氨酸磷酸化 (carbonate dehydratase activity)	9	1.90×10^{-6}
BP	端粒封端的正调控 (carbonate dehydratase activity)	5	2.80×10^{-6}
BP	蛋白激酶 B 信号转导的正调控 (positive regulation of protein kinase B signaling)	7	1.20×10^{-5}
BP	凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process)	10	7.00×10^{-5}
BP	肽基苏氨酸磷酸化 (peptidyl-threonine phosphorylation)	5	8.60×10^{-5}
BP	血小板活化 (platelet activation)	4	6.30×10^{-4}
BP	端粒酶活性的正调控 (positive regulation of telomerase activity)	4	9.50×10^{-4}
BP	柔红霉素代谢过程 (daunorubicin metabolic process)	3	9.70×10^{-4}
BP	阿霉素代谢过程 (doxorubicin metabolic process)	3	9.70×10^{-4}
CC	中体 (midbody)	7	4.00×10^{-5}
CC	纺锤体微管 (spindle microtubule)	5	6.90×10^{-5}
CC	纺锤中区 (spindle midzone)	4	2.70×10^{-4}
CC	胞质溶胶 (cytosol)	21	3.40×10^{-4}
MF	碳酸盐脱水酶活性 (carbonate dehydratase activity)	9	5.30×10^{-15}
MF	三磷酸腺苷结合 (ATP binding)	34	1.30×10^{-9}
MF	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity)	14	7.30×10^{-8}
MF	锌离子结合 (zinc ion binding)	21	3.40×10^{-4}
MF	类固醇结合 (steroid binding)	4	3.60×10^{-4}
MF	醛糖醇: NADP + 1-氧化还原酶活性 (alditol:NADP + 1-oxidoreductase activity)	3	4.70×10^{-4}

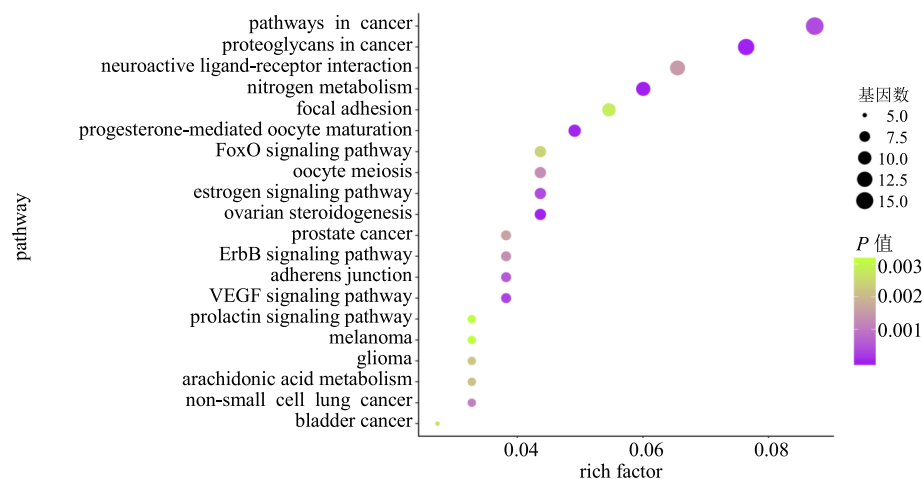


图 7 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG Enrichment analysis results

2.8.4 KEGG 通路富集分析 这些通路主要包括氮代谢、肺癌蛋白多糖、卵巢类固醇生成、孕激素介导的卵母细胞成熟、血管内皮生长因子、雌激素信号通路、肿瘤通路、血管内皮细胞粘附蛋白、非小细胞肺癌、卵母细胞减数分裂、酪氨酸激酶受体信号通路、神经活性配体-受体相互作用、前列腺癌、花生四烯酸代谢、胶质瘤、叉形头转录因子、

膀胱癌、局灶性粘连、黑色素瘤、通路黑色素瘤、催乳素信号通路等。结果见表 2。

2.8.5 “成分-靶点-通路”网络构建及分析 网络药理学通过将现有数据导入可视化网络软件，并且进行多种运算规则，在现有的相关数据库中进行综合筛选得到分析结果^[9-10]。本研究将化合物成分、靶点、信号通路相互作用数据导入 Cytoscape

表 2 核心靶点的 Pathway 富集分析

Table 2 Pathway enrichment analysis of core targets

类别	代谢通路	数目/个	P 值
ptr00910	氮代谢 (nitrogen metabolism)	11	3.90×10^{-15}
ptr05205	肺癌蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)	14	5.00×10^{-6}
ptr04913	卵巢类固醇生成 (ovarian steroidogenesis)	8	8.70×10^{-6}
ptr04914	孕酮介导的卵母细胞成熟 (progesterone-mediated oocyte maturation)	9	2.50×10^{-5}
ptr04370	血管内皮生长因子信号通路 (VEGF signaling pathway)	7	3.00×10^{-4}
ptr04915	雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)	8	3.80×10^{-4}
ptr05200	肿瘤通路 (pathways in cancer)	16	3.90×10^{-4}
ptr04520	血管内皮细胞粘附蛋白 (adherens junction)	7	5.70×10^{-4}
ptr05223	非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer)	6	1.10×10^{-3}
ptr04114	卵母细胞减数分裂 (oocyte meiosis)	8	1.30×10^{-3}
ptr04012	酪氨酸激酶受体信号通路 (ErbB signaling pathway)	7	1.30×10^{-3}
ptr04080	神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)	12	1.50×10^{-3}
ptr05215	前列腺癌 (prostate cancer)	7	1.60×10^{-3}
ptr00590	花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)	6	2.10×10^{-3}
ptr05214	胶质瘤 (glioma)	6	2.20×10^{-3}
ptr04068	叉形头转录因子 (FoxO signaling pathway)	8	2.40×10^{-3}
ptr05219	膀胱癌 (bladder cancer)	5	2.60×10^{-3}
ptr04510	黏着斑 (focal adhesion)	10	2.80×10^{-3}
ptr05218	黑色素瘤 (melanoma)	6	3.10×10^{-3}
ptr04917	催乳素信号通路 (prolactin signaling pathway)	6	3.10×10^{-3}

3.7.1 软件, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 结果见图8。根据 Cytoscape3.7.1 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 (Degree) 为参考, 发现 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇、木犀草素、芦丁的连接度相对较高, 提示这些成分可能是瓜蒌饮片发挥药效的活性物质; 靶点 AKT1、PIK3R1、EGFR、IGF1R、PRKCA 的连接度较高, 可能是瓜蒌饮片发挥作用的关键靶点; 肿瘤通路 (pathways in cancer)、肺癌蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、氮代谢 (nitrogen metabolism)、黏着斑 (focal adhesion) 信号通路的连接度较大, 均可能是瓜蒌饮片发挥作用的关键信号通路。文献研究表明 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇、木犀

草素、芦丁具有抗肿瘤、抗癌、抗炎及抗菌等作用^[2,11-12]; AKT1、PIK3R1、EGFR、IGF1R、PRKCA 在肿瘤的发生、发展中起着重要作用, 体现在肿瘤基因的不稳定性和肿瘤细胞的增殖、抗凋亡、分化、侵袭、药物抵抗^[13-17]等方面; 肿瘤通路 (pathways in cancer)、肺癌蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、氮代谢 (nitrogen metabolism)、黏着斑 (focal adhesion) 信号通路是发挥治疗癌症、神经系统疾病、心脑血管疾病关键的生物通路^[18-22]。通过构建“成分-靶点-通路”网络图, 说明了瓜蒌不同成分对应的不同靶点在不同的信号通路中发挥不同的作用, 恰好符合中药多成分、多靶点和多途径协同作用的特点。

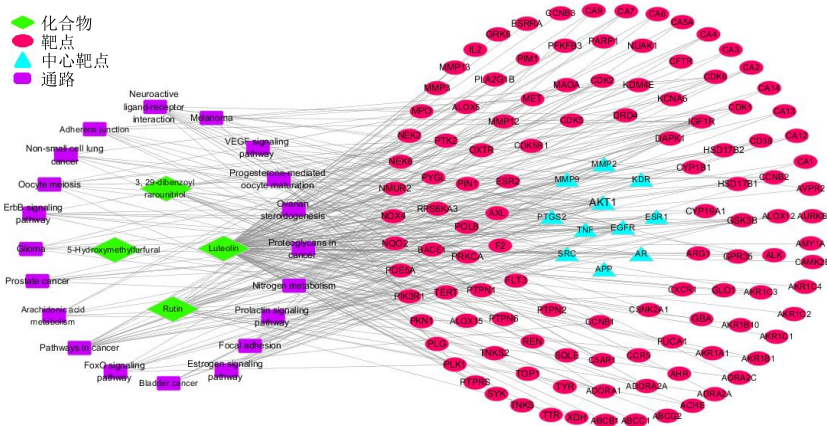


图8 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 8 “Compound-target-pathway” network diagram

3 Q-Marker 预测分析

本研究通过建立不同产地瓜蒌饮片的指纹图谱, 指认其共有峰, 对指认出的成分进行网络药理学分析, 建立“成分-靶点-通路”的网络图。根据度值大小分析得到, 木犀草素、芦丁、3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇3个成分可能是瓜蒌发挥作用的物质基础。基于刘昌孝院士^[23-24]提出的中药 Q-Marker 的“五原则”, 对上述3个化合物进行分析。3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇是瓜蒌的特异性成分, 而木犀草素和芦丁在自然界广泛存在^[25], 不属于瓜蒌的特异性成分。结合指纹图谱和网络药理学, 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇作为瓜蒌的特异性三萜类物质, 可预测为瓜蒌的潜在 Q-Marker^[26], 后期可利用分子对接技术对该化合物与核心靶点进行进一步分析。

从生源途径看, 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇属

于三萜类化合物, 是由焦磷酸金合欢脂 (FPP) 尾尾缩合生成的鲨烯通过不同的环化方式转变而来, 处于生源途径的下游位置, 具有较强的特异性^[27]。木犀草素和芦丁属于黄酮类化合物, 集中分布于被子植物中, 其生物合成途径是由莽草酸途径和乙酸-丙二酸复合而成, 在植物界分布较为广泛, 不符合质量标志物的“特有性”^[23]。从传统药性来看, 瓜蒌性寒, 味甘、苦, 归肺、胃、大肠经。文献研究表明, 三萜类化合物是寒性中药发挥药效的主要物质基础^[28]。从传统功效来看, 瓜蒌具有清热涤痰、散结、润燥等作用, 主要用于肺热咳嗽、痰浊黄稠、结胸痞满、乳痈、肺痈、肠痈等。结合现有研究, 瓜蒌所含有的三萜类化合物具有抗肿瘤、抗菌、抗炎的功效^[29], 这与瓜蒌的传统功效不谋而合。从成分可测性来看, Zhao 等^[30]通过 LC-MS/

MS 研究了 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇在大鼠血浆中的药代动力学过程；冯果等^[31]采用 UPLC-MS/MS 技术发现 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇在大鼠体内不同脏器均有分布；刘金娜等^[32]使用 HPLC 测定了瓜蒌中 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇的含量。因此，瓜蒌功效的物质基础与三萜类成分具有密切的相关性，很有可能是瓜蒌发挥主要药效作用的物质基础，且能采用 HPLC/UPLC 等技术进行定量定性分析，所以，3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇可作为瓜蒌质量标志物的选择。

4 讨论

中药质量控制体系的不完善是影响中医药产业走向国际化的主要问题之一，随着国内外科学技术的发展，更多的检测技术登上中医药的大舞台，更加标准的、科学的、具有中医药理论指导的中药质量标准体系也逐渐提上日程。秉着“传承不泥古，创新不离宗，论证以求真”的精神，刘昌孝院士提出了中药产品质量控制的新概念——中药质量标志物（Q-Marker）。

瓜蒌作为一味临床常用中药，其清热涤痰，宽胸散结等作用与瓜蒌的化学成分密不可分，网络药理学分析表明指纹图谱指认的芦丁、木犀草素和 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇通过控制肿瘤通路、肺癌蛋白多糖、神经活性配体-受体相互作用、氮代谢、黏着斑信号通路参与瓜蒌抗菌、抗肿瘤、抗炎、扩张冠状动脉、增加冠状血流量、抑制血小板聚集、降低胆固醇等药效活性，从而发挥治疗癌症、神经系统疾病、心脑血管疾病的作用，与瓜蒌的现代研究一致^[33-36]。瓜蒌性寒、微苦，归肺经，经指纹图谱指认的芦丁、木犀草素和 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇分别是黄酮类与三萜类化合物，多味苦，常见于寒性中药，通路中的肺癌蛋白多糖、非小细胞肺癌等信号通路等均与肺相关，体现了中医药理论指导下四气五味归经的统一。同时，通过对指纹图谱指认的多个成分进行网络药理学分析，得到的瓜蒌不同成分对应的不同靶点在不同的信号通路中发挥不同的作用，这恰好符合中药多成分、多靶点和多途径协同作用的特点，也体现了中医药理念的整体观^[24, 37]。

本研究以指纹图谱和网络药理学分析为基础，在刘昌孝院士 Q-Marker 理论的指导下，进行瓜蒌质量标志物的预测分析。通过对 15 批瓜蒌饮片指纹图谱进行 PCA 和 PLS-DA，发现不同产地的瓜蒌

饮片各自聚为一类，指认的 16 号峰（3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇）、12 号峰（木犀草素）和 9 号峰（芦丁）在区分不同产地瓜蒌饮片中起重要作用。通过网络药理学分析筛选核心靶点和主要通路，得出木犀草素、芦丁、3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇 3 个成分可能是瓜蒌发挥药效作用的物质基础。基于质量标志物的核心，从生源途径、传统药性、传统功效以及成分可测性方面，进一步明确 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇可作为瓜蒌饮片潜在的 Q-Marker。

中药饮片是中药配方颗粒、中药汤剂、中成药的物质基础，其质量直接影响中药产品的质量与中医临床疗^[38]。瓜蒌饮片药用价值高，被广泛用于临床。所以，建立全面的、有效的、科学的质量评价方法具有重大意义。本研究初步预测 3,29-二苯甲酰基瓜蒌仁三醇为瓜蒌的潜在 Q-Marker，为后期深入研究瓜蒌饮片药效机制提供参考，有助于建立和完善瓜蒌饮片的质量控制体系，提高质量控制水平。此外，通过对网络药理学涉及的靶点和通路进行分析，可为后续开展药效研究、药理机制研究提供新的思路，在中医药理论的指导下结合临床，从整体推进瓜蒌更深层次的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 173.
- [2] 万丽娟, 卢金清, 许俊洁, 等. 瓜蒌子化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4440-4443.
- [3] 刘明, 李慧, 李陈跟, 等. 瓜蒌化学成分及药用价值的研究综述 [J]. 阜阳师范学院学报: 自然科学版, 2018, 35(1): 23-26.
- [4] 刘明, 李慧, 李陈跟, 等. 瓜蒌化学成分及药用价值的研究综述 [J]. 阜阳师范学院学报: 自然科学版, 2018, 35(1): 23-26.
- [5] 黄萌萌, 王琪, 李晓琦, 等. 基于全-精细指纹图谱与多元统计分析的栀子炒制前后差异评价 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2460-2466.
- [6] 高寒, 徐伟, 张定航, 等. 基于网络药理学的刺五加总皂苷抗疲劳作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 413-421.
- [7] 王升启. 中药作用分子机制研究新策略 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 647.
- [8] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10):

- 2257-2265.
- [9] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [10] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [11] 郑罗棋, 惠慧, 田港, 等. 基于网络药理学吴茱萸致肝毒性机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 419-425.
- [12] 徐建国. 木犀草素对创伤性脑损伤的作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京大学, 2016.
- [13] 刘琳, 程伟. 槐花化学成分及现代药理研究新进展 [J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 125-128.
- [14] Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: A comprehensive review [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 154.
- [15] Yin K, Cui Y, Sun T, *et al.* Antagonistic effect of selenium on lead-induced neutrophil apoptosis in chickens via miR-16-5p targeting of PIK3R1 and IGF1R [J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125794.
- [16] Snell K I E, Ward D G, Gordon N S, *et al.* Exploring the roles of urinary HAI-1, EpCAM & EGFR in bladder cancer prognosis & risk stratification [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(38): 25244-25253.
- [17] Kang J H, Toita R, Kim C W, *et al.* Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1662-1672.
- [18] 吴静, 杨睿, 刘树业. 蛋白激酶C抑制剂的研究新进展 [J]. 天津医药, 2016, 44(1): 114-117.
- [19] Liu F, Chang L, Hu J L. Activating transcription factor 6 regulated cell growth, migration and inhibited cell apoptosis and autophagy via MAPK pathway in cervical cancer [J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 139: 103120.
- [20] 文恩, 黄思思, 彭杰, 等. 前列腺癌和非小细胞肺癌发生脑转移差异的机制初步研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(12): 2065-2069.
- [21] Espinoza-Sánchez N A, Götte M. Role of cell surface proteoglycans in cancer immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 62: 48-67.
- [22] 潘玲珍, 闫智勇, 左长英, 等. 长期使用地西洋对神经活性配体受体相互作用信号通路的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(5): 443-446.
- [23] Kurmi K, Haigis M C. Nitrogen metabolism in cancer and immunity [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(5): 408-424.
- [24] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [25] 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.
- [26] Jeong D, Yi Y S, Sung G H, *et al.* Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(3): 487-496.
- [27] 孙雨, 杨钰涵, 王珺, 蒋海强, 崔宁, 苏本正, 于宗渊. 交泰丸的化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J/OL]. 中国中药杂志:1-10[2020-05-26]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20200328.201>.
- [28] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [29] 陈慧, 孙慧, 杨秀艳, 等. 中药寒热平性质与其化学成分类别相关性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(7): 103-106.
- [30] 刘金娜, 温春秀, 刘铭, 等. 瓜蒌的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 843-848.
- [31] Zhao C L, Zhang N, Chen B, *et al.* A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of 3, 29-dibenzoyl rarounitriol in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(8): 1229-1234.
- [32] 冯果, 吴增光, 何新, 等. UPLC-MS/MS 分析瓜蒌子中 3, 29-二苯甲酰基栝楼仁三醇在大鼠体内的组织分布情况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 86-92.
- [33] 刘金娜, 谢晓亮, 杨太新, 等. 果实熟度及加工方式对瓜蒌子中 3, 29-二苯甲酰基栝楼仁三醇的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 581-583.
- [34] Minh C V, Nhiem N X, Yen H T, *et al.* Chemical constituents of *Trichosanthes kirilowii* and their cytotoxic activities [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(8): 1443-1448.
- [35] Moon S S, Rahman A A, Kim J Y, *et al.* Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(15): 7264-7269.
- [36] Lee E O, Lee J R, Kim K H, *et al.* The methylene chloride fraction of *Trichosanthis Fructus* induces apoptosis in U937 cells through the mitochondrial pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(1): 21-25.
- [37] Ni L L, Zhu X W, Gong C Y, *et al.* *Trichosanthes kirilowii* fruits inhibit non-small cell lung cancer cell growth through mitotic cell-cycle arrest [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(2): 349-364.
- [38] 陈春宇, 董汉玉, 纪瑞锋, 等. 基于中医药理论的芳香类中药防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3051-3061.
- [39] 董玲, 孙裕, 裴纹萱, 等. 基于全程质量控制理念的中药标准化体系研究思路探讨 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4481-4487.