

基于 HPLC 指纹图谱和网络药理学的消炎退热颗粒质量标志物(Q-Marker)预测

李成成, 苑楠楠, 白桦芳, 王 媛, 魏 岚, 孙立新*

沈阳药科大学药学院, 辽宁 本溪 117004

摘 要: 目的 基于指纹图谱和网络药理学方法, 分析预测消炎退热颗粒质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 采用 HPLC 法, 以秦皮乙素为参照, 建立 20 批消炎退热颗粒的指纹图谱。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版) 对 20 批样品进行相似度评价, 确定共有峰。通过与单味药材溶液和混合对照品溶液色谱峰进行对比, 对共有峰进行药味归属, 并指认化学成分。采用聚类分析进行分类评价, 运用有监督模式偏最小二乘法-判别分析筛选出造成组间差异的主要标志性成分。采用网络药理学筛选和分析消炎退热颗粒相关的作用靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测消炎退热颗粒的 Q-Marker。结果 成功建立 21 个共有峰的指纹图谱, 筛选出 4 个差异成分可作为消炎退热颗粒差异标志物, 分别为秦皮乙素、新绿原酸、菊苣酸和咖啡酸, 作为网络药理学研究对象。网络药理学结果显示筛选出 4 种差异成分均可作为潜在 Q-Marker。结论 建立的 HPLC 指纹图谱分析方法准确度高、稳定性好, 较全面、直观地反映了消炎退热颗粒整体化学成分信息, 筛选出 4 个可作为消炎退热颗粒潜在 Q-Marker 的化学成分, 为消炎退热颗粒质量的全面控制提供参考, 同时也为消炎退热颗粒药效关联物质基础的研究及作用机制的探索奠定基础。

关键词: 消炎退热颗粒; HPLC; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 偏最小二乘法-判别分析; 网络药理学; 质量标志物; 秦皮乙素; 新绿原酸; 菊苣酸; 咖啡酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)13-3885-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.012

Prediction of quality markers for Xiaoyan Tuire Granules based on HPLC fingerprint and network pharmacology

LI Cheng-cheng, YUAN Nan-nan, BAI Hua-fang, WANG Yuan, WEI Lan, SUN Li-xin

College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China

Abstract: Objective To analyze and predict the potential Q-markers of Xiaoyan Tuire Granules (消炎退热颗粒, XTG) based on fingerprints and network pharmacology methods. **Methods** The fingerprints of 20 batches of XTG were established by using HPLC method with esculetin as a reference. Using “Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System” (2012A version), 20 batches of samples were evaluated for similarity and common peaks were determined. By comparing with the chromatographic peaks of the single medicinal solution and the mixed reference solution, the common peaks were assigned, and the medicinal taste and the chemical components were assigned. Cluster analysis was used for classification, and the supervised model partial least squares method-discriminant analysis (PLS-DA) was used to screen out the main marker components that cause differences between groups. Using network pharmacology to screen and analyze the relevant targets and pathways of XTG, construct a “compound-target- pathway” network to predict the potential quality markers (Q-Marker) in XTG. **Results** The fingerprints of 21 common peaks were successfully established, and four different components were screened out as differential markers of XTG, namely esculetin, neochlorogenic acid, cichoric acid and caffeic acid, which were used as the research object of network pharmacology. The results of network pharmacology showed that the four different components were selected as potential quality markers. **Conclusion** The established HPLC fingerprint analysis method has high accuracy and good stability, and reflects the overall chemical composition information of XTG more comprehensively and intuitively. Four chemical components that can be

收稿日期: 2021-02-26

基金项目: 辽宁省教育厅“辽宁特聘教授滚动支持项目”(辽教函[2018]35 号)

作者简介: 李成成 (1994—), 女, 硕士, 研究方向为药物分析。Tel: (024)43520599 E-mail: lcc151886@163.com

*通信作者: 孙立新 (1967—), 女, 博士, 教授, 研究方向为药物分析。Tel: (024)43520599 E-mail: slx04@163.com

used as potential quality markers of XTG were screened out. It provides a reference for the comprehensive control of the quality of XTG, and also lays a foundation for the study of the substance basis of the drug efficacy of XTG and the exploration of the mechanism of action.

Key words: Xiaoyan Tuire Granules; HPLC; fingerprints; similarity analysis; cluster analysis; partial least square-discriminant analysis; network pharmacology; quality marker; esculetin; neochlorogenic acid; cichoric acid; caffeic acid

消炎退热颗粒 (Xiaoyan Tuire Granules, XTG) 由大青叶、蒲公英、紫花地丁、甘草 4 味中药组成, 具有清热解毒、凉血消肿的功效^[1]。此方大青叶、蒲公英为君药, 二药性味苦寒, 合用有清热解毒、消肿散结、凉血消斑之效。紫花地丁为臣药, 味苦辛, 性寒, 助君药清热解毒、凉血消肿。甘草为佐使, 以其甘平之性补脾益气、扶正驱邪, 助君臣清热解毒, 且能调和诸药。四药合用, 发挥清泻肝胃热毒、疏散心肺火热、凉血消肿功效。

中药及其复方制剂系统庞大, 成分复杂, 市面上的产品质量参差不齐。基于此背景, 2016 年刘昌孝院士^[2]提出中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 概念, Q-Marker 与中药功能属性密切相关, 是可以定性定量的特有化学成分, 可作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制。中药指纹图谱是一种综合的可量化的鉴定手段, 它是建立在中药化学成分系统研究的基础上, 主要用于评价中药材以及中药制剂半成品质量的真实性、优良性和稳定性, 为中药及中药制剂质量控制提供有效手段^[3-11]。网络药理学预测可以快速发现中药主要作用通路及作用靶点, 对于预测中药成分的潜在作用靶点具有重要意义^[12-15]。基于中药和复方制剂具有多成分、多靶点及多通路的特点, 两者结合既能评估制剂质量的优劣, 又能说明药效的强弱, 更具说服力^[16-22]。

本研究通过建立 XTG 的 HPLC 指纹图谱, 结合多元统计学方法, 初步筛选出差异标志物。并以其为研究对象, 结合网络药理学寻找潜在作用靶点和作用通路, 进而预测 Q-Marker。旨在为全面控制 XTG 的质量提供依据, 为 XTG 作用机制的研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-20A 型 HPLC 仪, 包括 SPD-M20A 型二极管阵列检测器 (DAD)、LC-20AT 型二元泵、Lab Solution 工作站, 日本岛津公司; RPL-D2000 型柱温箱, 大连日普利科技仪器有限公司; TG332A 型微量分析天平, 湘仪天平仪器设备有限公司;

KQ5200B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE2000A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; PB-10 标准型 pH 计, 德国 Sartorius 公司。

1.2 数据库和软件

Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Genecard 数据库 (<https://www.genecards.org>)、String 网站 (<https://string-db.org/>)、Cytoscape 软件 (版本号: 3.7.1)、David 6.7 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、微生物信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)。

1.3 药品与试剂

XTG 购自 2 个厂家, 各 10 批, 批号 190806、190807、190407、200224、200304、191012、191106、200310、200313、190904 样品购自陕西步长制药有限公司 (厂家 A), 规格 10 g/袋, 分别编号为 SA1~SA10; 批号 ZFA1802、ZGA1801、ZGA1902、ZBA2001、ZEA2001、ZHA1901、ZBA2002、ZCA1901、ZEA2003、ZGA1901 样品购自云南白药集团股份有限公司 (厂家 B), 规格 10 g/袋, 分别编号为 SB1~SB10; 鸟苷对照品, 批号 1028B021, 质量分数 ≥ 98.0%, 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 新绿原酸对照品, 批号 X-014-180410, 质量分数 ≥ 98.0%, 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 对照品秦皮甲素 (批号 KA0422CA14)、秦皮乙素 (批号 C25J7Y18390)、咖啡酸 (批号 W16O10B021)、菊苣酸 (批号 Y24J11Y119342)、靛玉红 (批号 J19A10T95563), 质量分数均 ≥ 98.0%, 均购自上海源叶生物科技有限公司; 甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水, 购自杭州娃哈哈集团有限公司。

大青叶和紫花地丁药材, 购自九洲恒源 (安国) 药业有限公司; 甘草购自亳州市永刚饮片厂有限公司; 蒲公英购自安国路路通中药饮片有限公司, 经沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院贾英教授鉴定, 大青叶为十字花科菘蓝属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶, 蒲公英为菊科蒲公英属植

物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草, 紫花地丁为堇菜科堇菜属植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草, 甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-25% 甲醇乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 8%~10% B; 30~44 min, 10%~12% B; 44~58 min, 12%~13.5% B; 58~95 min, 13.5% B; 95~125 min, 13.5%~35% B; 125~135 min, 35%~65% B; 135~150 min, 65% B; 柱温 30 ℃; 检测波长 290 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液 取各对照品适量, 精密称定, 加 75% 甲醇配制含鸟苷 11.0 μg/mL、新绿原酸 10.2 μg/mL、秦皮甲素 10.1 μg/mL、秦皮乙素 10.6 μg/mL、咖啡酸 13.9 μg/mL、菊苣酸 10.4 μg/mL、靛玉红 20.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品约 1.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 超声 (250 W, 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。

2.2.3 单味药材溶液 按照 XTG 的制备工艺, 将大青叶、蒲公英、紫花地丁和甘草分别加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 煎液滤过, 滤液合并, 浓缩至相对密度为 1.25~1.30 (80 ℃), 加 3 倍量乙醇, 搅拌, 静置 24 h, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.20 (80 ℃), 加蔗糖粉及淀粉适量, 干燥得单味药材粉末。根据处方比例称取, 按“2.2.2”项下方法处理, 即得单味药材溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 参照峰的选择 《中国药典》2020 年版将秦皮乙素作为评价 XTG 质量的指标性成分, 其含量较高, 色谱峰较稳定, 故选择秦皮乙素作为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.3.2 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (编号为 S5), 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 进行测定。结果表明, 21 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均不大于 1.3%, 相对峰面积的 RSD 均不大

于 3.0%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取样品 (编号为 S5) 1.5 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果表明, 21 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均不大于 1.7%, 相对峰面积的 RSD 均不大于 3.0%, 结果表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (编号为 S5), 室温下放置, 分别于 0、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果表明, 21 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均不大于 2.0%, 相对峰面积的 RSD 均不大于 2.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

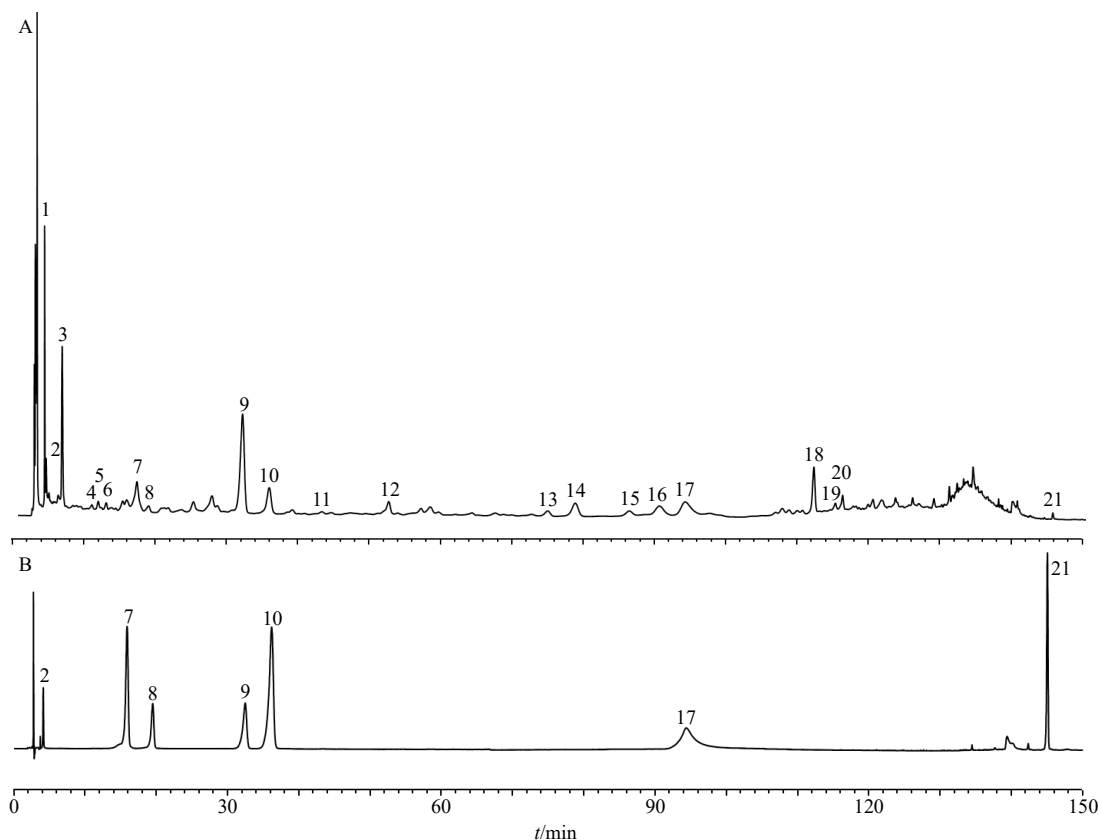
2.4 指纹图谱的建立与相关性评价

2.4.1 共有峰的指认 取按“2.2”项下方法制备的供试品溶液和混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 通过对比样品色谱峰和对照品色谱峰的保留时间, 鉴定 7 个化合物, 分别为鸟苷、新绿原酸、秦皮甲素、秦皮乙素、咖啡酸、菊苣酸、靛玉红, 见图 1。

2.4.2 聚类分析 以秦皮乙素为内参照峰, 计算 20 批 XTG 的 HPLC 指纹图谱各色谱峰相对内参照峰的面积之比, 应用 SPSS 21.0 软件对样品进行聚类分析, 采用离差平方和法 (Ward's method), 将欧式距离的平方 (squared Euclidean distance) 作为样品的测量尺度, 结果见图 2。由图 2 可知, 20 批样品可聚为 2 大类: SA1~SA10、SB1~SB3、SB6、SB10 为第 I 类; SB4、SB5、SB7~SB9 为第 II 类。第 II 类全部为厂家 B 产品; 第 I 类为厂家 A 和部分厂家 B 产品, 说明不能以生产厂家为分类方式。

2.4.3 指纹图谱的建立与对照指纹图谱的生成 将质量较均一的 15 批 XTG 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年 A 版)”, 得到 15 批 XTG 指纹图谱, 见图 3-A。以秦皮乙素为参照, 标定 21 个共有峰, 生成对照指纹图谱, 见图 3-B。

2.4.4 相似度的计算 将 20 批样品指纹图谱与采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年 A 版)”生成的对照指纹图谱进行比较, 计算相似度。结果显示, 第一类 15 批样品 SA1~SA10、SB1~SB3、SB6、SB10 的相似度分别为 0.998、0.996、0.998、0.986、0.995、0.979、0.996、0.989、0.984、0.995、0.967、0.985、0.986、0.993、0.998, 得到各个指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.96;



2-鸟苷 7-新绿原酸 8-秦皮甲素 9-秦皮乙素 10-咖啡酸 17-菊苣酸 21-靛玉红
2-guanosine 7-neochlorogenic acid 8-esculin 9-esculetin 10-caffeic acid 17-cichoric acid 21-indirubin

图 1 供试品溶液 (A) 和混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of sample solution (A) and standard of seven components (B)

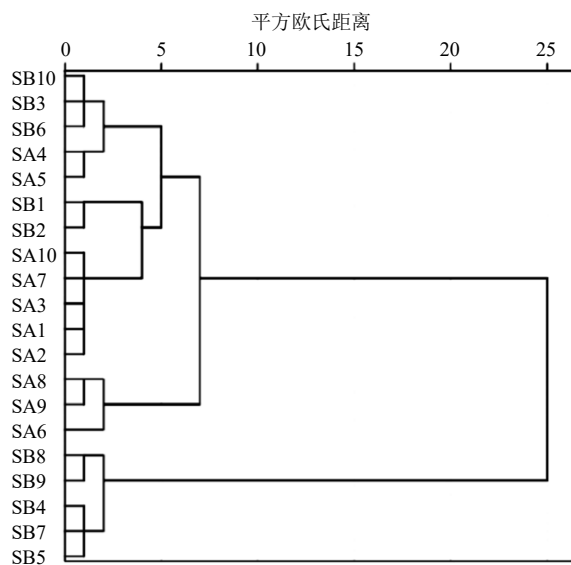


图 2 XTG 聚类分析树状图

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis figure of XTG

第 2 类 5 批样品 SB4、SB5、SB7~SB9 的相似度分别为 0.970、0.963、0.974、0.944、0.949，得到各个指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.94。由

上面的数据可知，根据聚类分成的 2 类在相似度上存在差异。但总的来说 20 批的相似度均大于 0.94，表明 XTG 质量均一稳定。

2.4.5 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 为了更好地观察不同厂家样品间的组内差异，本研究进行有监督的 PLS-DA，获得相应模型，PLS-DA 得分图见图 4。从模型验证的参数图可知，模型的稳定性和交叉验证的预测力都较高 ($Q^2=0.843$ 、 $R^2_X=0.903$)，说明所建立的 PLS-DA 模型可以很好地用于不同厂家制剂的分析。由图 4 可知，2 个生产厂家的 20 批样品均分布在 95% 置信区间内，且依据生产厂家不同分别分布在不同的区域，区分较为明显，表明在有监督的 PLS-DA 判别模型中，2 组复方制剂中的化学成分存在差异。

为进一步确定引起 XTG 分组的差异标志物，采用变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 对数据矩阵分析，VIP 图见图 5。PLS-DA 模型中 VIP 值可直观体现 2 个生产厂家的

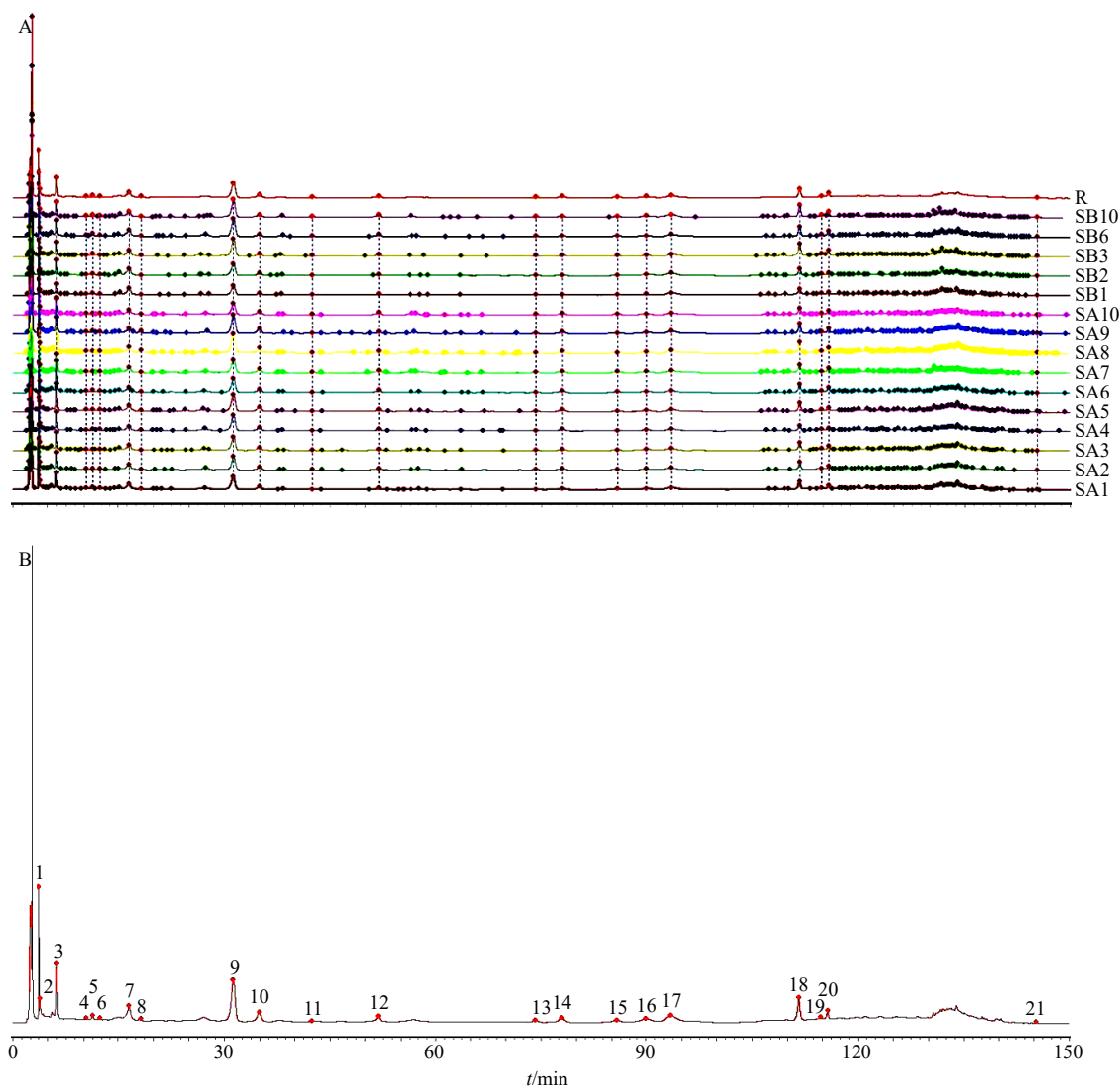


图 3 15 批 XTG 样品的 HPLC 指纹图谱 (A) 及其对照指纹图谱 (B)

Fig. 3 Fingerprint chromatograms of 15 batches of XTG (A) and its referential fingerprint (B)

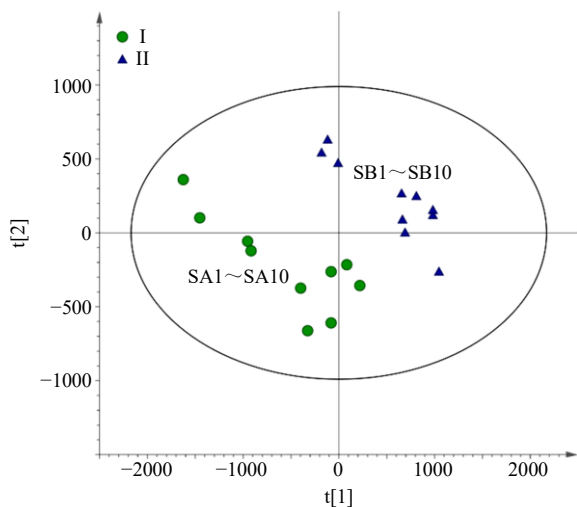


图 4 PLS-DA 得分图

Fig. 4 Score plot of PLS-DA

差异性成分, VIP 值大于 1 的化合物对分类概括解释率大于 50%, 对分类结果具有统计学意义, 即为差异标志物。由图 5 可知, 9 (秦皮乙素)、7 (新绿原酸)、3、18、17 (菊苣酸)、14、10 (咖啡酸) 号峰的 VIP 值均大于 1, 为 XTG 的差异标志物, 可控制该制剂的质量。

2.4.6 共有峰归属 分别取“2.2.3”项下药材溶液各 20 μ L, 进样分析, 结果见图 6。通过比对单味药材溶液和样品溶液色谱峰的保留时间和最大吸收波长, 将 21 个共有峰进行药味归属。由图 6 可得, 1、2 (鸟苷)、3 号峰为 4 味药材的共有成分; 5、11、12、13、14、15、21 (靛玉红) 号峰是君药大青叶的特有成分; 6、7 (新绿原酸) 号峰为君药蒲公英的特有成分; 8 (秦皮甲素)、9 (秦皮乙素) 号峰是

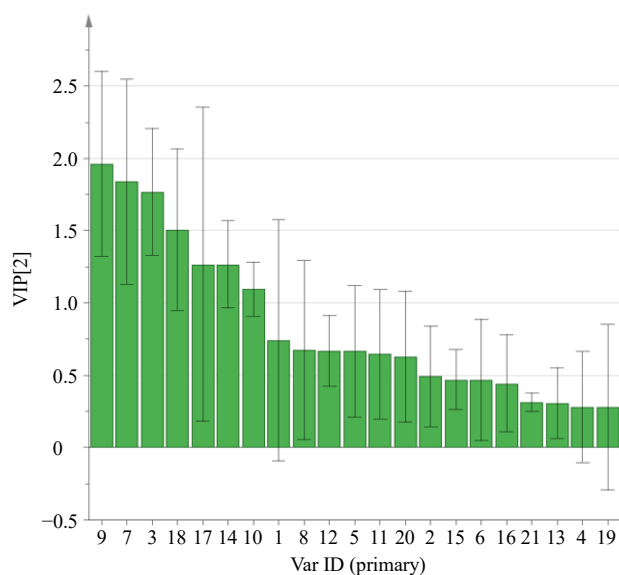


图 5 PLS-DA VIP 值图

Fig. 5 VIP plot of PLS-DA

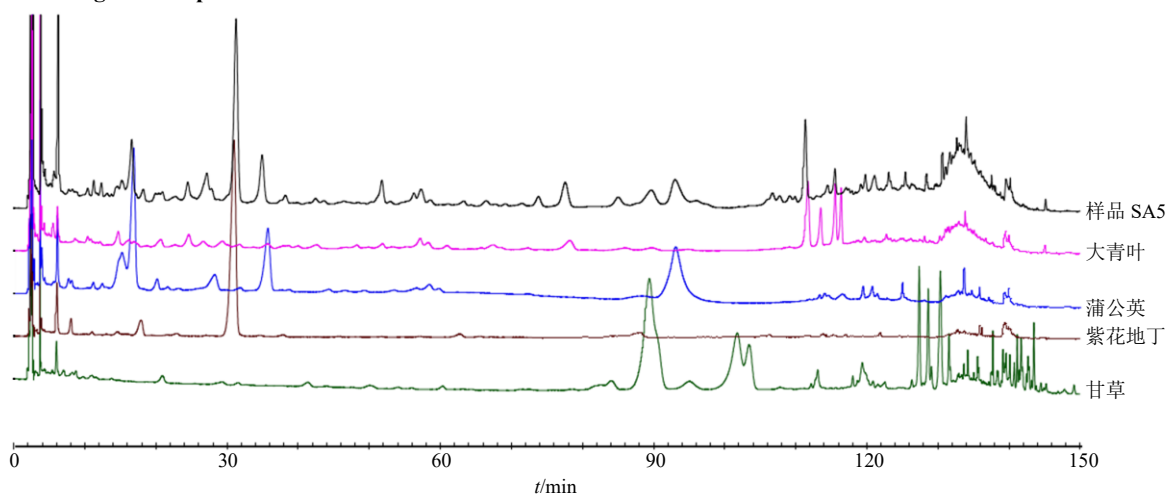


图 6 药材归属 HPLC 图

Fig. 6 Chromatograms of medicinal materials

量标准与中药有效性的关联性, 本实验基于中药指纹图谱研究和多元统计学方法进行初筛, 寻找引起组间差异的差异标志物, 并以此为基础利用网络药理学进一步的寻找 Q-Maker, 做到量效合一。

2.5.1 活性成分靶点信息的收集 通过 TCMSP、PubChem、Swiss Target Predict 等中药系统药理学数据库及分析平台, 共得到秦皮乙素、咖啡酸、新绿原酸和菊苣酸 4 个候选化合物的 121 个作用靶点。

2.5.2 疾病靶点数据集的建立 以 “Inflammation” 和 “Fever” 为关键词搜索 Genecard 数据库 (<https://www.genecards.org>) 获得 3404 个疾病相关基因。

2.5.3 蛋白相互作用网络的构建与核心基因筛选结果分析 将活性成分靶点和疾病靶点取交集并去

重, 得到 81 个交集靶点。将交集靶点导入 String 11.0 数据库获取蛋白互作数据信息 (图 7), 构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。

2.5 网络药理学研究

现代药理学研究显示, 大青叶、蒲公英、紫花地丁和甘草具有显著的解热、抗炎、体内外抗内毒素活性。其中, 君药大青叶特征成分为靛苷类 (靛蓝、靛玉红); 君药蒲公英特征成分为菊苣酸、咖啡酸, 菊苣酸是咖啡酸衍生物; 臣药紫花地丁特征成分为秦皮乙素、秦皮甲素, 均属于香豆素类化合物; 甘草为方中佐使, 具有调和诸药的功效。有研究发现, 靛苷类化合物^[23-24]、咖啡酸及菊苣酸^[25-26]、香豆素类化合物^[27]及中药甘草^[28]均具抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等生物活性。因此, 指纹图谱指认的 7 个化合物除鸟苷外, 均具有显著的抗炎活性。

为增强中药质量控制手段、质量评价指标及质

量标准与中药有效性的关联性, 本实验基于中药指纹图谱研究和多元统计学方法进行初筛, 寻找引起组间差异的差异标志物, 并以此为基础利用网络药理学进一步的寻找 Q-Maker, 做到量效合一。

将 String 结果导入 Cytoscape 软件, 并通过 CytoHubba 插件中的 Degree 算法筛选得到交互作用评分在前 10 的基因, 提示这些基因在 PPI 中发挥了关键作用。如图 8, 前 10 的基因分别为 *AKT1*、*CASP3*、*MAPK1*、*EGFR*、*STAT3*、*SRC*、*MMP9*、*ESR1*、*PIK3CA*、*CCND1*。

2.5.4 基因本体生物学过程 (gene-ontology biology process, GO) 功能富集分析 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 10 个核心靶点蛋白进行 GO 功能富集分析, 以 $P < 0.01$ 表示具有统计

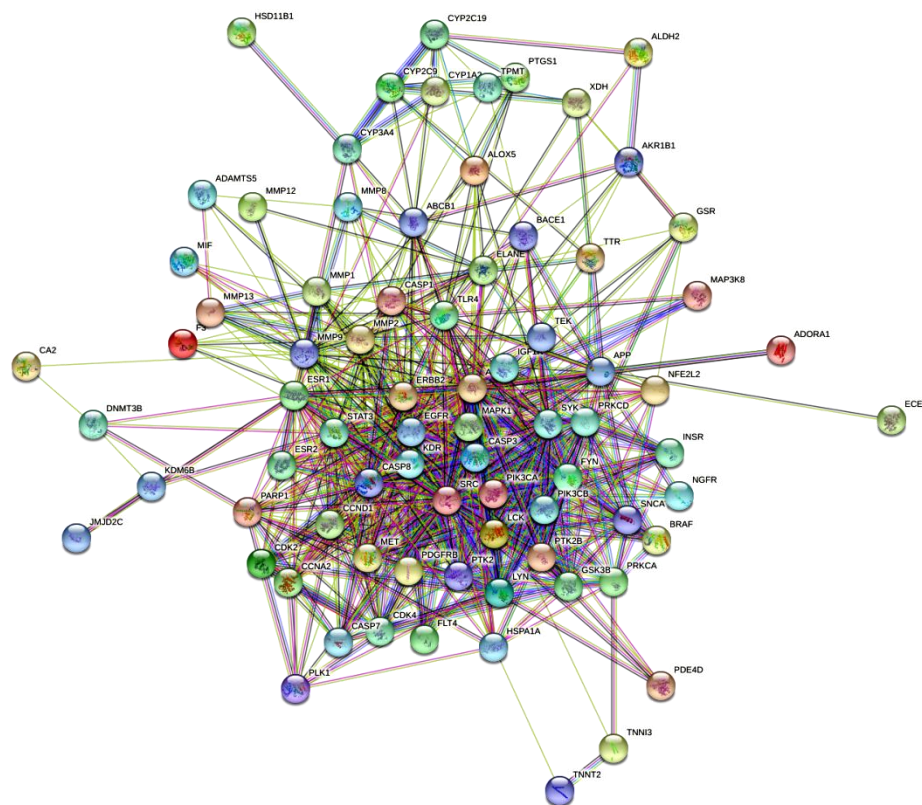


图 7 PPI 网络

Fig. 7 PPI network

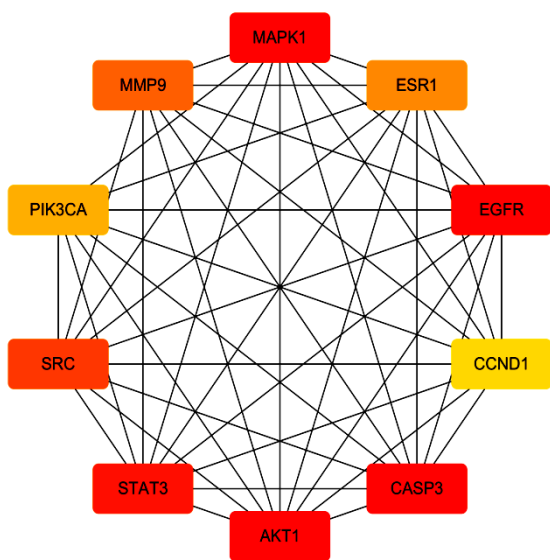


图 8 10 个核心基因交互网络图

Fig. 8 Interaction network diagram of 10 core genes

学意义。GO 富集分析根据 $P < 0.01$ 的条件筛选出 51 条条目，生物过程、细胞组成、分子功能分别为 38、5、8 条，导入微生信网站作图，如图 9 所示。其中，生物过程条目 38 个，主要涉及机体对 UV-A (Ultraviolet Rays-A) 的反应、ERBB2 信号通路、调

亡过程的负调控、磷脂酰肌醇 3-激酶信号转导的调控、对雌二醇的反应等生物过程。分子功能条目 8 个，主要涉及一氧化氮合酶调节剂的活性、酶结合、相同的蛋白质结合、激酶活性、转录因子结合、蛋白激酶活性、蛋白质结合、ATP 结合等分子功能。细胞成分条目 5 个，主要涉及细胞溶质、细胞质、细胞核、质膜、核质等细胞成分。

2.5.5 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 10 个核心靶点蛋白进行 KEGG 通路富集分析，以 $P < 0.01$ 表示具有统计学意义。KEGG 通路富集分析根据 $P < 0.01$ 的条件筛选出 57 个 KEGG 富集条目，对 57 条通路进行整合发现，主要涉及癌症相关的信号通路、消炎清热相关的信号通路及内分泌相关的信号通路。如癌症中的蛋白聚糖合成分解途径、癌症相关途径、胰腺癌、前列腺癌等癌症相关通路；磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase, PI3K-Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶

(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、Janus 激酶-信号转导与转录激活子 (the Janus kinase-signal transducer and activator of tran-ions, JAK-STAT) 信号通路、乙型肝炎、幽门螺杆菌感染

中的上皮细胞信号传导、丙型肝炎、Toll 样受体信号通路等消炎清热相关通路。本实验仅对与消炎清热相关的信号通路及相对靶点进行作表展示, 结果见表 1。

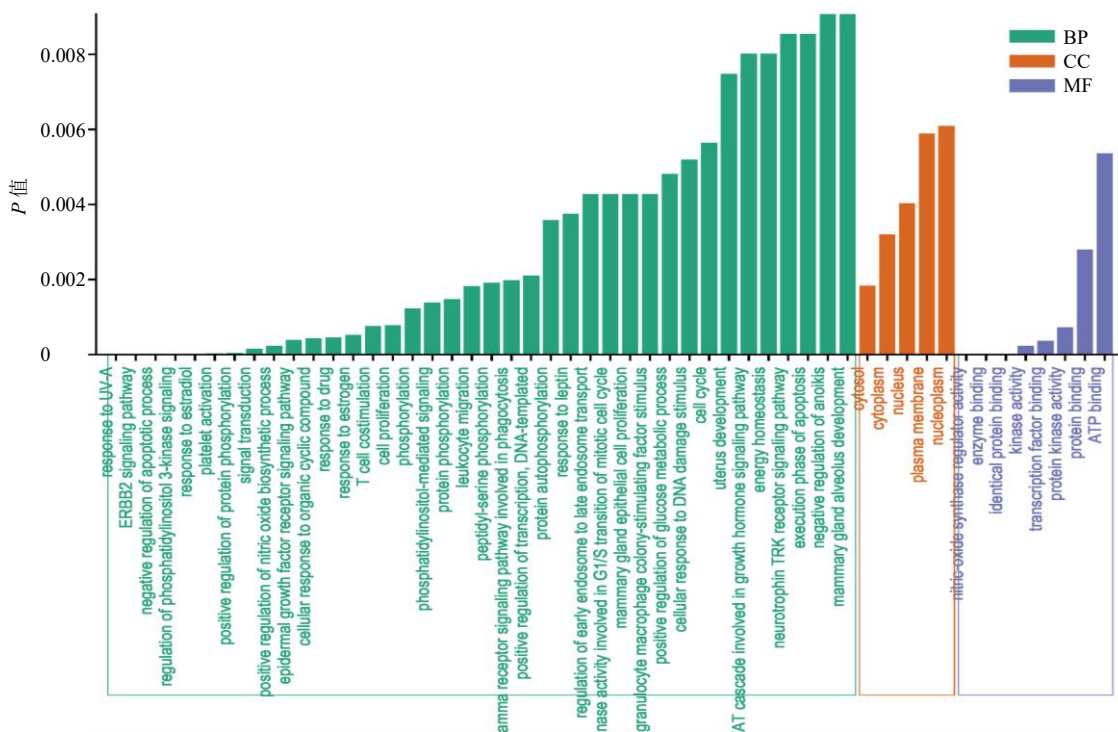


图 9 GO 分析富集图

Fig. 9 Histogram of GO enrichment analysis

表 1 KEGG 富集分析信息

Table 1 KEGG enrichment analysis information

编号	基因功能	靶点蛋白	P 值
hsa05161 hepatitis B		CCND1、PIK3CA、SRC、CASP3、STAT3、MAPK1、AKT1、MMP9	5.56×10^{-11}
hsa04068 FoxO signaling pathway		CCND1、PIK3CA、STAT3、MAPK1、AKT1、EGFR	3.08×10^{-7}
hsa04668 TNF signaling pathway		PIK3CA、CASP3、MAPK1、AKT1、MMP9	6.57×10^{-6}
hsa05160 hepatitis C		PIK3CA、STAT3、MAPK1、AKT1、EGFR	1.56×10^{-5}
hsa04151 PI3K-Akt signaling pathway		CCND1、PIK3CA、MAPK1、AKT1、EGFR	6.41×10^{-4}
hsa04630 Jak-STAT signaling pathway		CCND1、PIK3CA、STAT3、AKT1	7.02×10^{-4}
hsa04210 apoptosis		PIK3CA、CASP3、AKT1	0.002 763
hsa05120 epithelial cell signaling in helicobacter pylori infection		SRC、CASP3、EGFR	0.003 219
hsa04010 MAPK signaling pathway		CASP3、MAPK1、AKT1、EGFR	0.003 502
hsa04620 Toll-like receptor signaling pathway		PIK3CA、MAPK1、AKT1	0.007 891

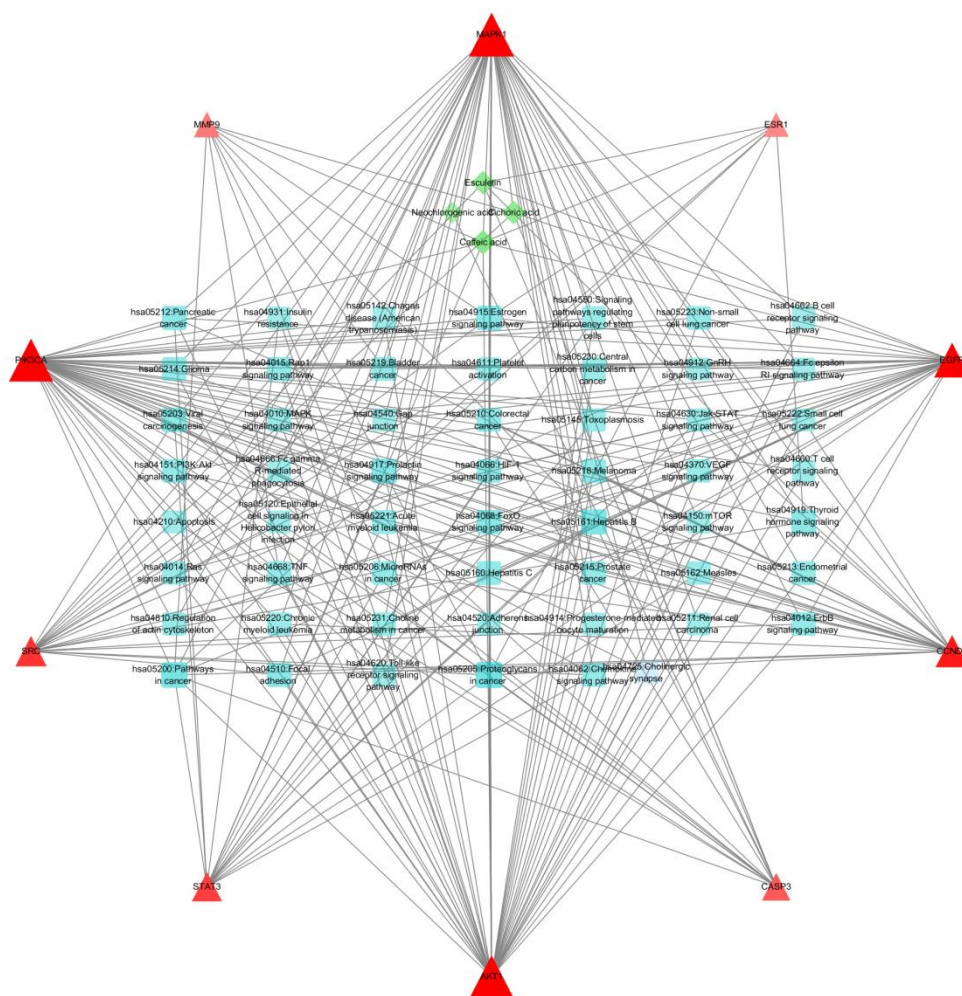
2.5.6 构建成分-靶点-通路网络 将 10 个靶点蛋白、4 个化合物及 57 条信号通路导入 Cytoscape 3.7.1 软件绘制成分-靶点-通路网络 (图 10)。以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度为参考, 发现 4 个化合物连接度差异不大, 均可能是 XTG 的活性成分: MAPK1、PIK3CA、AKT1、EGFR、CCND1、SRC

的连接度高于其他靶点, 可能是 XTG 发挥药效的关键靶点; 57 条信号通路差异性不大, 均可能是 XTG 的关键信号通路。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方式和色谱条件的优化

本研究分别考察了不同的提取方式、提取时间、



菱形代表活性成分，方形代表通路，三角形代表基因靶点
heatin diamonds represent active ingredients, squares represent pathways and triangles represent gene targets

图 10 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 10 “Compounds-targets-pathways” network

提取溶剂、色谱柱品牌、流动相体系及水相的添加剂、检测波长、柱温对色谱峰数量及分离情况的影响,最终确定以 75%甲醇超声提取 30 min 作为供试品制备方法。色谱柱选用 Diamonsil C₁₈(2) 柱,以 0.1%甲酸水溶液-25%甲醇乙腈梯度洗脱,检测波长为 290 nm 且柱温为 30 ℃时,色谱图峰较多分离度良好。

3.2 HPLC 指纹图谱结果分析

本研究建立 20 批 XTG HPLC 指纹图谱, 共确认 21 个共有峰, 指认了 7 个化合物, 并将 21 个共有峰进行药味归属。采用相似性分析、聚类分析、PLS-DA 3 种分析方法, 对图谱结果进行分析。聚类分析将 20 批样品可粗分为 2 大类; 根据聚类分成的 2 类在相似度上存在差异, 但总的来说 20 批的相似

度均大于 0.94, 表明 XTG 质量均一稳定; 通过 PLS-DA 分析指出 7 个差异化合物, 采用对照品指出其中 4 个化合物, 分别为新绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸和菊苣酸。结果提示, 这 7 个化合物影响样品组间差异, 可用来控制产品的质量。

3.3 网络药理学结果分析

3.3.1 活性成分的筛选 网络药理学结果显示, 咖啡酸、秦皮乙素、菊苣酸及新绿原酸联接受度差异不大, 均可能是 XTG 的活性成分, 建议作为 XTG Q-Marker。现代药理学研究表明, 咖啡酸、秦皮乙素、菊苣酸及新绿原酸均有不同程度抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒的生物活性^[25-27]。

3.3.2 关键靶点蛋白的筛选

MAPK1、PIK3CA、AKT1、EGFR、CCND1、SRC 这 6 个靶点可能是

发挥药效的关键作用靶点。MAPK 基因编码 MAP 激酶家族相关蛋白, MAPK1、MAPK3、MAPK8 属于丝裂原活化蛋白激酶通路家族, 主要涉及细胞的存活、增殖、分化和凋亡等多种功能, 可以促进炎症因子表达, 导致内毒性急性肺损伤等相关炎症疾病的发生^[29]。

AKT1 在细胞内信号通路中起重要作用, 作为 PI3K-Akt 信号转导途径的重要中间分子, 参与调控细胞增殖、存活和凋亡等^[30]。EGFR 基因编码的蛋白质是一种跨膜糖蛋白, 该蛋白在肝细胞中作为丙型肝炎病毒的受体, 并促进相关细胞进入, 与丙型肝炎的发生有关。

3.3.3 作用通路的筛选 57 条信号通路(dgree: 3~10)中前 27 条信号通路联接度相对较高(dgree>5) 主要涉及癌症相关的信号通路和消炎清热相关的通路, 包括乙型肝炎、丙型肝炎、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、JAK-STAT 信号通路、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导等。其中, TNF 是致炎因子, 不但参与急性呼吸窘迫综合征的发病过程, 而且损害肺泡表面活性物质系统^[31]。

MAPK 信号通路可调控炎症基因表达, 活化的 MAPK 能够使细胞核、细胞质中的转录因子发生磷酸化而激活, 从而调控目标基因的表达, 产生不同的生理反应^[32]; 研究表明, JAK-STAT 在多种炎症因子刺激下激活, 进而发挥信号转导和转录调控功能, 影响巨噬细胞的分化和炎症^[33]。可通过调控 JAK-STAT 信号通路活性, 调控癌细胞的迁移、侵袭和炎症因子的分泌, 并促进细胞凋亡。另外, Foxo 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、JAK-STAT 信号通路和细胞凋亡可调节能量代谢, 从而达到清热的作用。其中, Foxo 信号通路参与许多细胞生理事件, 例如细胞凋亡、细胞周期控制、葡萄糖代谢、抗氧化应激等, 能够调节细胞能量代谢状态。由此可推测, XTG 可能通过作用于这些信号通路达到消炎清热的作用。

3.4 整合分析

本研究依据刘昌孝院士提出的“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 XTG Q-Marker。通过建立 XTG 的指纹图谱, 从溯源性和可测性的角度对 XTG 进行分析, 指出乌苷、新绿原酸、秦皮甲素、秦皮乙素、咖啡酸、菊苣酸和靛玉红 7 个成分。运用网络药理学

从有效性的角度对其进行分析, 发现咖啡酸、秦皮乙素、菊苣酸和新绿原酸 4 个活性成分通过调控 MAPK1、PI3KCA、AKT1、EGFR、CCND1、SRC 等关键靶点, 作用于乙型肝炎、丙型肝炎、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、JAK-STAT 信号通路、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导等关键信号通路发挥药效作用。

XTG 由大青叶、蒲公英、紫花地丁、甘草 4 味中药组成, 具有清热解毒, 凉血消肿的功效。本论文基于指纹图谱和网络药理学方法预测和筛选出 4 个差异成分秦皮乙素、新绿原酸、菊苣酸和咖啡酸, 建议作为 XTG Q-Marker。

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. 2020: 1531-1532.
- [2] 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.
- [3] 吴建雄, 秦建平, 刘峰, 等. 坤宁颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 447-449.
- [4] 林源, 陈敏. 小儿柴桂退热颗粒的 UPLC 指纹图谱及聚类、主成分分析 [J]. 中国药房, 2018, 29(4): 474-477.
- [5] 李正坤, 王铭爽, 刘传鑫, 等. 基于 UPLC 指纹图谱考察云贵产地白及药材大小与化学成分含量的关系 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 504-511.
- [6] 林秀莲, 宋粉云, 李华, 等. 补肾强身片 UPLC 指纹图谱 [J]. 中成药, 2017, 39(3): 551-555.
- [7] 严慕贤, 廖娟, 柯汉女, 等. 参芪降糖片多糖成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(5): 574-577.
- [8] 袁慕荣, 王汝上. 小儿热速清颗粒 UPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定研究 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(12): 1517-1522.
- [9] 吴娟萍, 薛涛, 郭璐, 等. 华蟾素胶囊 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1977-1985.
- [10] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [11] 李明月. 心脉通胶囊的 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1104-1112.
- [12] 吴静洁, 梅应兵, 姚雪婷, 等. 基于网络药理学及分子对接研究柚皮素抗胃癌机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(2): 124-131.

- [13] 郑慧丽, 曹程, 王颖异, 等. 基于“成分-靶点-通路”的枸杞子调控年龄相关性黄斑变性作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1039-1048.
- [14] 吴朗杰, 赵春燕, 战丽彬. 基于网络药理学和分子对接研究白花蛇舌草和半枝莲药对治疗宫颈癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1049-1058.
- [15] 崔琳琳, 苗明三. 基于数据挖掘和网络药理学的中药抗血栓用药规律分析 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1063-1072.
- [16] 倪术仁, 连云岚, 赵思俊, 等. 强力脑清素片 HPLC 指纹图谱的建立及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1011-1019.
- [17] 李春霞, 何巧玉, 刘静, 等. 基于网络药理学和多元统计分析的黄连质量标志物预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2718-2727.
- [18] 牛江涛, 曹瑞, 司昕蕾, 等. 基于网络药理学的化学标志物与生物标志物对接研究模式概述 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(5): 80-84.
- [19] 刘博文, 戴静, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1634-1644.
- [20] 杨子博, 李冬冬. 逍遥散治疗糖尿病的网络药理学分析 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1733-1744.
- [21] Yao Y X, Liu T, Liu B W, *et al.* Identification and verification of effective components of Huanghuai for dysfunctional uterine bleeding based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(2): 177-188.
- [22] 段姗姗, 王永恒, 彭书旺, 等. 基于网络药理学探讨加味逍遥散治疗气滞痰阻型桥本氏甲状腺炎的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(9): 1771-1779.
- [23] 林琳, 刁勇, 周心怡, 等. 靛蓝的生物活性研究进展 [J]. 染料与染色, 2019, 56(4): 16-18.
- [24] 刘丽娟, 王允亮, 许树青, 等. 靛玉红、色胺酮对 LPS 诱导 RAW_{264.7} 炎症细胞模型的抗炎作用研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(8): 1069-1072.
- [25] 岑丽航, 肖瑞琳, 李苗, 等. 蒲公英的抗癌抗炎机制研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(11): 954-961.
- [26] 王玉真, 高爽, 李凌军, 等. 菊苣酸生物活性及其药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(15): 1729-1733.
- [27] 聂安政, 林志健, 张冰. 秦皮化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3332-3341.
- [28] 邓桃妹, 彭灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨 [J/OL]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [29] 崔琳, 张燕丽, 文泽馨, 等. 丝裂原活化蛋白激酶在治疗肿瘤中的研究进展 [J]. 西藏医药, 2019, 40(6): 19-21.
- [30] 黄宁宁, 吴恩辉, 童春南. 桑枝提取物抑制 miR-369 对 SK-N-SH 细胞损伤的影响 [J]. 新中医, 2020, 52(23): 1-6.
- [31] 周盈, 曹磊, 平芬. 慢性阻塞性肺疾病相关炎性细胞因子的研究进展 [J]. 临床荟萃, 2020, 35(3): 273-276.
- [32] 王利敏, 朱滢润, 唐映红. 基于 ERK/p38 MAPK 信号通路探讨复方玄参利咽合剂对慢性咽炎模型兔抗炎机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 179-183.
- [33] 赵九洲, 姜晓旭, 李宏伟, 等. JAK-STAT 信号通路与巨噬细胞炎症调控的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(5): 402-404.

[责任编辑 郑礼胜]