

经典名方当归四逆汤指纹图谱及功效关联物质预测分析

许金国¹, 夏金鑫¹, 梅 茜¹, 赵晓莉¹, 张科卫¹, 毛 靖¹, 高红宁¹, 李 鹏², 毛春芹^{1*}, 陆兔林^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 基于指纹图谱及网络药理学对当归四逆汤(Danggui Sini Decoction, DSD)进行全过程质量控制和温经散寒、养血通脉功效关联物质预测分析。方法 建立 DSD 物质基准对应实物的指纹图谱, 匹配共有峰, 进行共有峰的归属分析; 基于可测性和可追溯性进行 DSD 活性成分的筛选, 采用网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络, 预测 DSD 温经散寒、养血通脉功效关联物质。结果 建立了 DSD 物质基准对应实物的指纹图谱, 标定 25 个共有峰, 指认了芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸、邻甲氧基桂皮醛、甘草酸、藁本内酯、细辛脂素 9 个色谱峰, 相似度均>0.90。根据各共有峰的归属分析, 主要药效物质群可以从饮片到物质基准对应实物较为完整的传递, 归属关系清晰明确; 采用网络药理学对筛选出的 9 个活性成分进行“成分-靶点-通路”网络构建与分析, 富集的通路中包括癌症信号通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道的炎性介质调节等, DSD 的 9 个活性成分可能通过调节这些信号通路达到温经散寒、养血通脉的作用。结论 建立了经典名方 DSD 的指纹图谱并对其进行归属分析, 明确 DSD 的色谱峰归属, 对经典名方 DSD 进行整体化、过程化的质量控制; 并结合网络药理学发现 DSD 的 9 个活性成分具有传递性和溯源性, 且与 DSD 温经散寒、养血通脉功效属性密切相关, 可作为其潜在的关联物质, 为 DSD 的进一步研究提供依据。

关键词: 经典名方; 当归四逆汤; 指纹图谱; 网络药理学; 功效关联物质; 质量控制; 成分-靶点-通路; 温经散寒; 养血通脉; 芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸、邻甲氧基桂皮醛、甘草酸、藁本内酯、细辛脂素; 癌症信号通路; PI3K-Akt 信号通路; MAPK 信号通路; TRP 通道的炎性介质调节; 传递性; 溯源性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4507-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.008

Fingerprints of classical prescription Danggui Sini Decoction and predictive analysis of its efficacy related substance

XU Jin-guo¹, XIA Jin-xin¹, MEI Xi¹, ZHAO Xiao-li¹, ZHANG Ke-wei¹, MAO Jing¹, GAO Hong-ning¹, LI Peng², MAO Chun-qin¹, LU Tu-lin¹

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

2. Nanjing Hailing of Chinese Medicine Pharmaceutical Technology Research Co., Ltd., Nanjing 210023, China

Abstract: Objective Based on fingerprint and network pharmacology research, the whole process quality control of Danggui Sini Decoction (DSD, 当归四逆汤) was carried out, and the efficacy related substances of warming meridian and dispelling cold, nourishing blood and promoting pulse were predicted and analyzed. **Methods** The fingerprint of DSD substance standard corresponding substance was established, the common peaks were matched and the attribution of the common peaks were analyzed; The active components of DSD were screened based on the testability and traceability, and used network pharmacology to construct the “component-target- pathway” network to predict the efficacy related substances of DSD for warming meridian and dispelling cold, nourishing blood and promoting pulse. **Results** The fingerprint of DSD was established, 25 common peaks were identified,

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707000)

作者简介: 许金国, 高级实验师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: 300024@njucm.edu.cn

*通信作者: 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。Tel: (025)85811835 E-mail: 300555@njucm.edu.cn

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。E-mail: ltl2021@njucm.edu.cn

and nine peaks were identified, including albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid, liquiritin, cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, glycyrrhizic acid, ligustilide, asaridin, the similarity was all greater than 0.90. According to the attribution analysis of each common peak, the main pharmacodynamic substance groups can be completely transferred from the decoction pieces to the substance standard, and the attribution relationship was cleared; The network pharmacology was used to construct and analyze the “component-target-pathway” network of the nine active ingredients, and the enriched pathways include pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, inflammatory mediator regulation of TRP and other signaling pathways, the nine active components of DSD may regulate these signaling pathways to achieve the functions of warming meridians, dispersing cold, nourishing blood and promoting pulse. **Conclusion** In this study, the fingerprint of classical prescription DSD was established and its attribution analysis was carried out to clarify the chromatographic peak attribution of DSD. and the quality control of classical prescription DSD was carried out in an integrated and procedural way. Combined with network pharmacology, it was found that the nine active components of DSD had transmissibility and traceability, and were closely related to the efficacy of DSD in warming meridians and dispelling cold, nourishing blood and promoting pulse, which could be used as potential efficacy related substances to provide basis for the further study of DSD.

Key words: classical prescription; Danggui Sini Decoction; fingerprint; network pharmacology; efficacy related substances; quality control; component-target-pathway; warming meridians and dispelling cold; nourishing blood and promoting pulse; albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid, liquiritin, cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, glycyrrhizic acid, ligustilide, asaridin; pathways in cancer; PI3K-Akt signaling pathway; MAPK signaling pathway; inflammatory mediator regulation of TRP; transmissibility; traceability

经典名方来源于古代医疗记载,是历代医药学家的经验总结,是我国医学宝库的重要组成部分。为了推动经典名方的开发研究,国家药品监督管理局于 2019 年 3 月发布了《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》(以下简称《申报资料要求》)^[1],加强对经典名方的质量管理。

当归四逆汤(Danggui Sini Decoction, DSD)出自东汉张仲景《伤寒论》^[2],原方由当归、桂枝、白芍、细辛、甘草、木通、大枣 7 味药组成,具有温经散寒、养血通脉等功效,主治血虚寒厥证。现代临床主要用于治疗痛经、糖尿病周围神经病变、类风湿性关节炎等疾病^[3-6]。DSD 的相关研究主要集中于临床应用方面,对质量控制方面的研究相对较少。本课题按照《申报资料要求》对经典名方 DSD 进行指纹图谱研究,并借助网络药理学构建 DSD “成分-靶点-通路”网络,综合预测分析其潜在的功效关联物质。为全面控制和评价经典名方 DSD 的质量提供依据,为经典名方复方制剂的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e 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; ZYX0071 型超纯水系统,南京汉隆实验器材有限公司; MS-105DU 型十万分

之一电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司; MG-H21S011 多功能电陶炉,广东美的生活电器制造有限公司; TD5001C 型电子天平,天津天马衡基仪器有限公司; 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; KQ-500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; 砂锅,江西舒雅陶瓷有限公司。

1.2 试药

对照品阿魏酸(批号 110773-201915,质量分数 99.4%)、桂皮醛(批号 110710-201217,质量分数 99.5%)、肉桂酸(批号 110786-201604,质量分数 98.8%)、芍药苷(批号 110736-201943,质量分数 95.1%)、细辛脂素(批号 111889-201705,质量分数 100.0%)、甘草苷(批号 111610-201908,质量分数 95.0%)、甘草酸铵(批号 110731-202021,质量分数 96.2%),中国食品药品检定研究院;对照品藁本内酯, CAS: 4431-01-0,质量分数 >98%,南京森贝伽生物科技有限公司;对照品芍药内酯苷,批号 4644,质量分数 100%,上海诗丹德标准技术服务有限公司;对照品邻甲氧基桂皮醛,批号 S28D9G711659,质量分数 ≥98%,上海源叶生物科技有限公司。乙腈,色谱纯,默克股份两合公司;甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技有限公司;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。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。本实验前期已按照《中国药典》2020 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: 当归(甘肃岷县)、桂枝(广东肇庆)、白芍(安徽亳州)、细辛(辽宁新宾)、甘草(甘肃民勤)、三叶木通(陕西西安)、大枣(山东新泰)。按照《中国药典》2020 年版及全国饮片炮制规范项下相关要

求将药材炮制成 15 批饮片。经检测饮片均符合《中国药典》2020 年版项下相关规定。利用 Excel 中 RANDBETWEEN 函数生成随机数, 将当归、桂枝、白芍、细辛、木通、炒甘草、大枣 7 味饮片的不同批次随机组合, DSD 批次组合具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~3 min, 5%乙腈; 3~10 min, 5%~10%乙腈; 10~15 min, 10%~12%乙腈; 15~30 min, 12%~14%乙腈; 30~35 min, 14%~17%乙腈; 35~40 min, 17%~19%乙腈; 40~50 min, 19%~25%乙腈; 50~75 min, 25%~45%乙腈; 75~90 min, 45%~70%乙腈; 90~92 min, 70%~95%乙腈; 92~95 min, 95%~5%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 245 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。

表 1 DSD 组合信息

Table 1 Combination information of DSD

编号	当归	桂枝	白芍	细辛	炒甘草	木通	大枣
S1	ypTA180071003	TA180101001	ypTA180100002	ypTA180173007	ypXELHQG-GC-22	yp20042014-3	ypDZ18071631
S2	ypTA180075002	TA180102001	ypBS201810-2	ypTA180173009	ypXELHQG-GC-42	yp20042014-3	ypDZ18071651
S3	ypTA180072003	TA180105001	ypBS201810-1	ypTA180144001	ypXELHQG-GC-23	yp20042012-2	ypDZ18071621
S4	ypTA180074003	TA180109001	ypTA180100001	ypTA180173004	ypXELHQG-GC-33	yp20042012-2	ypDZ18071642
S5	ypTA180073003	TA180107001	ypTA180099001	ypTA180145001	ypXELHQG-GC-53	yp20042014-3	ypDZ18071651
S6	ypTA180073001	TA180103001	ypBS201810-3	ypTA180173005	ypXELHQG-GC-33	yp20042013-1	ypDZ18071642
S7	ypTA180074001	TA180103001	ypTA180100002	ypTA180173001	ypXELHQG-GC-33	yp20042014-2	ypDZ18071643
S8	ypTA180074003	TA180105001	ypTA180100002	ypTA180173008	ypXELHQG-GC-31	yp20042012-3	ypDZ18071631
S9	ypTA180071002	TA180107001	ypTA180097001	ypTA180173003	ypXELHQG-GC-41	yp20042012-3	ypDZ18071623
S10	ypTA180073003	TA180103001	ypBS201810-5	ypTA180173009	ypXELHQG-GC-41	yp20042013-3	ypDZ18071612
S11	ypTA180071002	TA180101001	ypTA180099002	ypTA180173003	ypXELHQG-GC-13	yp20042012-2	ypDZ18071632
S12	ypTA180072003	TA180103001	ypBS201810-1	ypTA180173001	ypXELHQG-GC-43	yp20042015-3	ypDZ18071612
S13	ypTA180072001	TA180110001	ypTA180099001	ypTA180173007	ypXELHQG-GC-43	yp20042015-1	ypDZ18071652
S14	ypTA180074001	TA180108001	ypTA180096001	ypTA180173004	ypXELHQG-GC-22	yp20042012-1	ypDZ18071611
S15	ypTA180074001	TA180110001	ypTA180099002	ypTA180143001	ypXELHQG-GC-23	yp20042013-1	ypDZ18071611
S16	ypTA180075001	TA180106001	ypBS201810-1	ypTA180142001	ypXELHQG-GC-21	yp20042015-2	ypDZ18071611
S17	ypTA180075001	TA180106001	ypBS201810-1	ypTA180142001	ypXELHQG-GC-21	yp20042015-2	ypDZ18071611
S18	ypTA180075001	TA180106001	ypBS201810-1	ypTA180142001	ypXELHQG-GC-21	yp20042015-2	ypDZ18071611
S19	ypTA180072001	TA180108001	ypTA180097002	ypTA180146001	ypXELHQG-GC-41	yp20042014-2	ypDZ18071642
S20	ypTA180072001	TA180108001	ypTA180097002	ypTA180146001	ypXELHQG-GC-41	yp20042014-2	ypDZ18071642
S21	ypTA180072001	TA180108001	ypTA180097002	ypTA180146001	ypXELHQG-GC-41	yp20042014-2	ypDZ18071642
S22	ypTA180072001	TA180108001	ypTA180097002	ypTA180146001	ypXELHQG-GC-41	yp20042014-2	ypDZ18071642
S23	ypTA180072001	TA180108001	ypTA180097002	ypTA180146001	ypXELHQG-GC-41	yp20042014-2	ypDZ18071642

2.2 对照品溶液的制备

取各对照品适量,精密称定,加甲醇配制成含阿魏酸 3.34 $\mu\text{g/mL}$ 、藁本内酯 2.20 $\mu\text{g/mL}$ 、肉桂酸 2.22 $\mu\text{g/mL}$ 、邻甲氧基桂皮醛 2.50 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 104.20 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药内酯苷 13.90 $\mu\text{g/mL}$ 、细辛脂素 3.77 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 17.61 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 34.16 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

按照处方比例称取 7 味饮片量:当归 9 g,桂枝 9 g,白芍 9 g,细辛 9 g,炒甘草 6 g,木通 6 g,大枣 24 g。置砂锅中,加水 1600 mL,浸泡 45 min,以武火(2200 W)煮沸后,调节火力至 1000 W,开盖,保持微沸并煮至 600 mL,趁热用 100 目筛滤过,即得 DSD 物质基准对应实物。

取 DSD 物质基准对应实物 3 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取 DSD 物质基准对应实物 1 份,按照“2.3”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。以 18 号峰(甘草酸)为参照峰,计算各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明各共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.18%,相对峰面积 RSD 值均小于 3.30%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取 DSD 物质基准对应实物 1

份,按照“2.3”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。以 18 号峰(甘草酸)为参照峰,计算各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各个共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.91%,相对峰面积 RSD 值均小于 3.82%,表明该方法的重复性良好,可用于 DSD 指纹图谱的检测。

2.4.3 稳定性考察 取 DSD 物质基准对应实物 1 份,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。以 18 号峰(甘草酸)为参照峰,计算各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各个共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.90%,相对峰面积 RSD 值均小于 2.08%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 DSD 物质基准对应实物指纹图谱的建立及相似度评价

取 23 批 DSD 物质基准对应实物供试品溶液与对照品溶液按色谱条件进行测定,记录色谱图。通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A)软件,以 S1 为参照峰,采用平均数法,进行多点校正和色谱峰匹配,得到 23 批 DSD 物质基准对应实物指纹图谱叠加图、共有模式图和混合对照品图,共确认 25 个色谱峰,指认 9 个色谱峰。结果见图 1、2。与对照指纹图谱相比,23 批 DSD 物质基准对应实物指纹图谱的相似度均 >0.90 ,表明 DSD 物质基准对应实物的相似度良好,主要物质群差异性小,

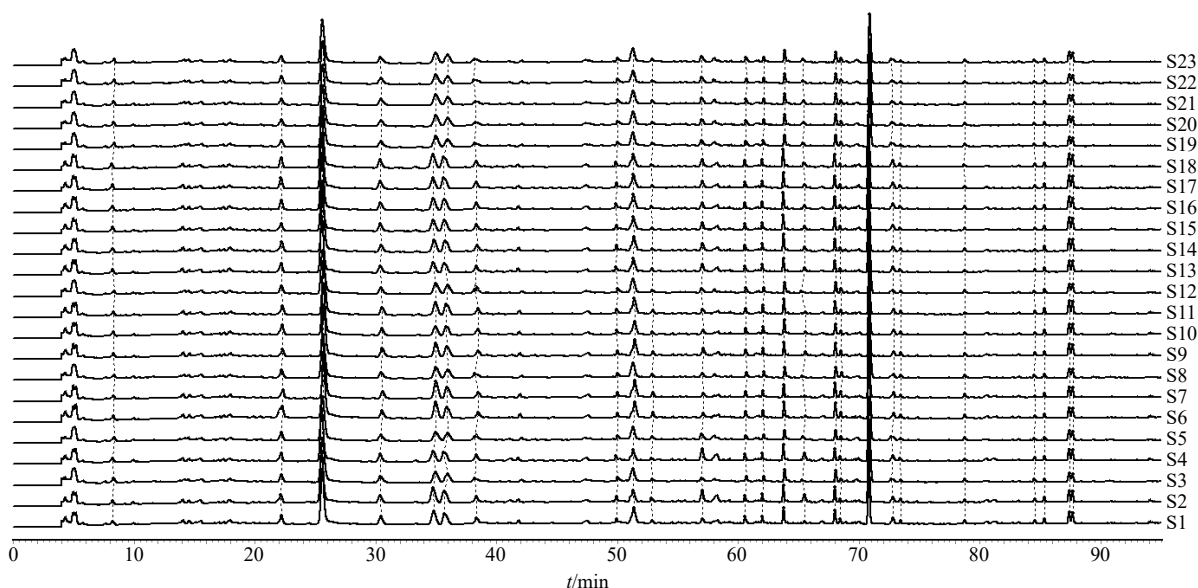


图 1 23 批 DSD 物质基准对应实物 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 HPLC fingerprint of 23 batches of DSD substance standard corresponding substance

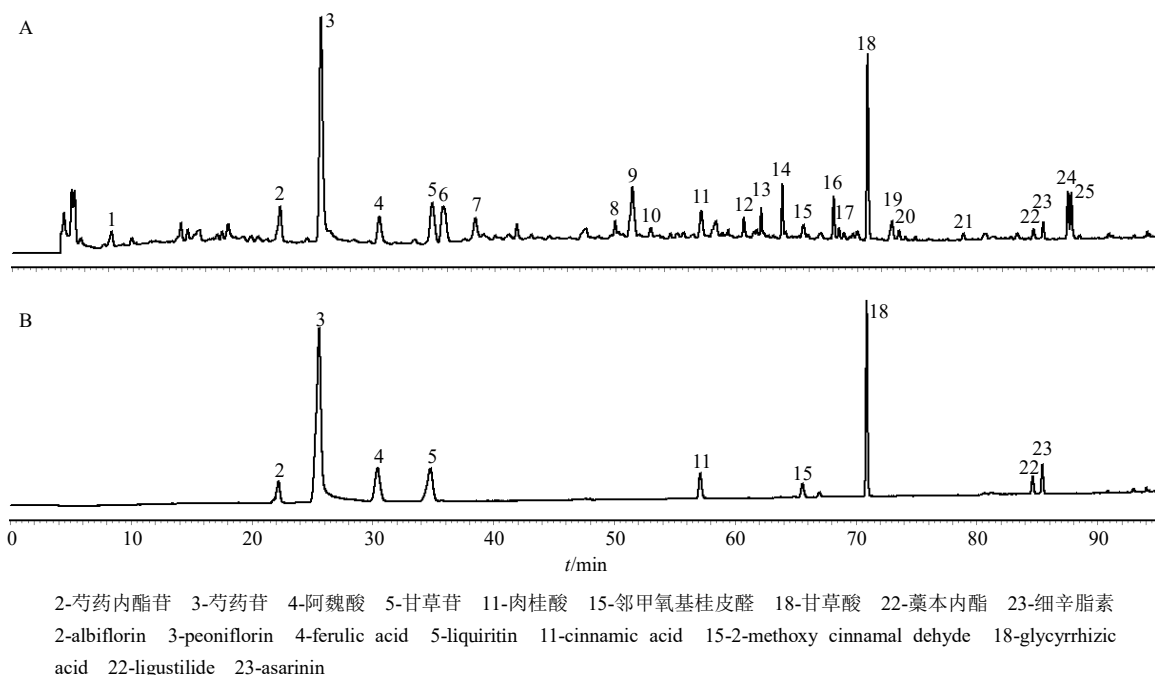


图 2 DSD 物质基准对应实物 HPLC 共有模式图 (A) 和混合对照品 HPLC 图 (B)

Fig. 2 Common pattern of HPLC fingerprint of DSD substance standard corresponding substance (A) and HPLC of mixed reference substances (B)

制备工艺较为科学合理，形成的物质基准对应实物对照图谱能够作为衡量 DSD 物质基准对应实物的标准参照物，结果见表 2。

2.6 DSD 物质基准对应实物指纹图谱共有峰的归属

按供试品制备方法分别制备单味饮片供试品溶液、缺单味饮片供试品溶液、和 DSD 物质基准对应实物供试品溶液。取 DSD 物质基准对应实物、单味饮片、缺单味饮片供试品溶液按上述色谱条件进行测定，记录色谱图。分别将 DSD 物质基准对应实物、单味饮片、缺单味饮片供试品溶液的色谱图进行叠加比较，对 DSD 物质基准对应实物指纹图谱的色谱峰进行归属分析，结果见图 3 和表 3。

根据图 3 和表 3 对 DSD 物质基准对应实物指纹图谱中各共有峰进行归属分析，DSD 物质基准对应表 2 23 批 DSD 物质基准对应实物 HPLC 指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of HPLC fingerprints of 23 batches of DSD substance standard corresponding substance

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.998	S7	0.992	S13	0.994	S19	0.994
S2	0.992	S8	0.997	S14	0.998	S20	0.994
S3	0.997	S9	0.998	S15	0.998	S21	0.994
S4	0.992	S10	0.994	S16	0.999	S22	0.995
S5	0.993	S11	0.997	S17	0.997	S23	0.996
S6	0.995	S12	0.997	S18	0.997		

应实物指纹图谱共确认 25 个色谱峰，均可以在原料饮片中找到明确归属。具体归属情况为 4、22 号峰归属于当归饮片；9、11、15 号峰归属于桂枝饮片；2、3、7 号峰归属于白芍饮片；1、4、19、20、23~25 号峰归属于细辛饮片；5、6、8~10、12~14、16~18、21 号峰归属于甘草；其中 4 号峰为当归、细辛所共有，9 号峰为桂枝、甘草所共有。经对照品指认 9 个色谱峰，分别为 2 号峰芍药内酯苷、3 号峰芍药苷、4 号峰阿魏酸、5 号峰甘草苷、11 号峰肉桂酸、15 号峰邻甲氧基桂皮醛、18 号峰甘草酸、22 号峰藜本内酯和 23 号峰细辛脂素，主要药效成分的指认率为 36.0%。综上可知，DSD 物质基准对应实物的物质群可清晰的追溯到饮片，且色谱峰归属明确，指认率较高。

从色谱峰个数与峰强度看，甘草对指纹图谱的贡献最大，当归、桂枝、白芍和细辛对指纹图谱的贡献度相对较大，木通、大枣对指纹图谱的贡献较低。木通主要含三萜及其苷类，其指标性成分木通苯乙醇苷 B 在饮片炮制过程中损失严重，导致含量大幅度下降，在 DSD 煎煮过程中由饮片转移至水煎液的量极少，在此色谱条件下未检测出色谱峰。大枣主要成分为多糖和氨基酸类物质，水溶性大，含量较低，且大枣中指标性成分齐墩果酸、白桦脂酸等物质极性较小，由饮片转移至水煎液的量极少，

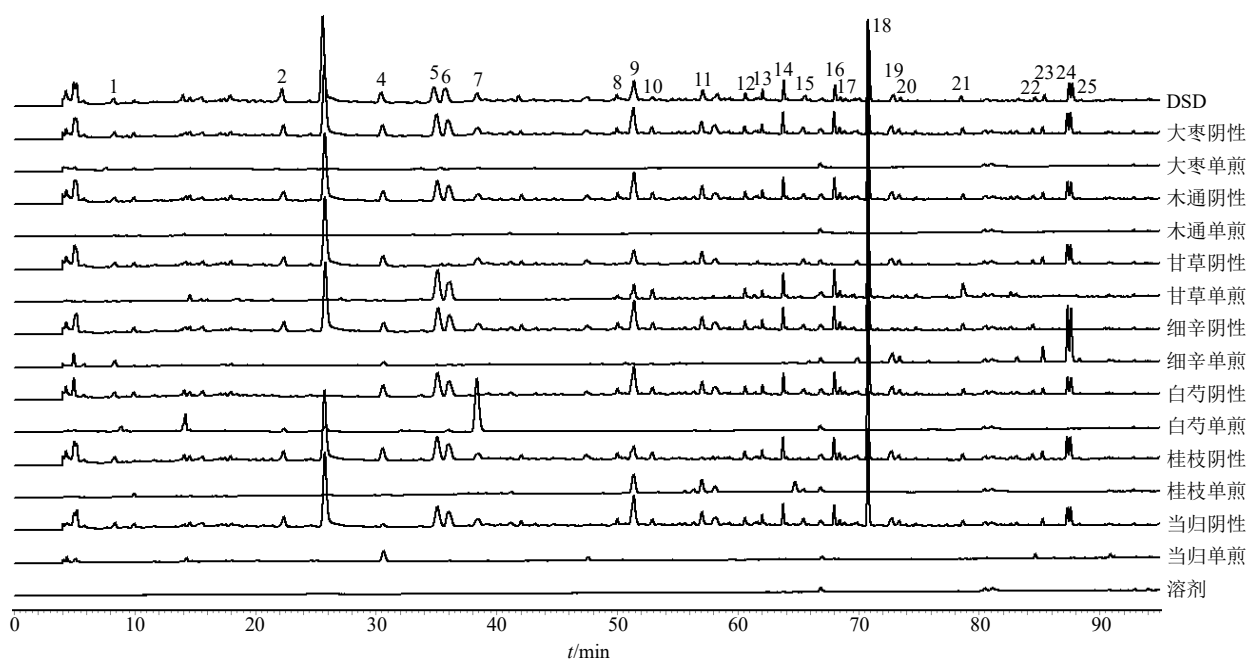


图3 DSD物质基准对应实物色谱峰归属

Fig. 3 Attribution of chromatographic peaks of DSD substance standard corresponding substance

表3 DSD物质基准对应实物共有峰归属情况

Table 3 Attribution of common peaks of DSD substance standard corresponding substance

峰号	来源	化合物	峰号	来源	化合物
1	细辛	未指认	14	甘草	未指认
2	白芍	芍药内酯苷	15	桂枝	邻甲氧基桂皮醛
3	白芍	芍药苷	16	甘草	未指认
4	当归、细辛	阿魏酸	17	甘草	未指认
5	甘草	甘草苷	18	甘草	甘草酸
6	甘草	未指认	19	细辛	未指认
7	白芍	未指认	20	细辛	未指认
8	甘草	未指认	21	甘草	未指认
9	桂枝、甘草	未指认	22	当归	藁本内酯
10	甘草	未指认	23	细辛	细辛脂素
11	桂枝	肉桂酸	24	细辛	未指认
12	甘草	未指认	25	细辛	未指认
13	甘草	未指认			

在此色谱条件下不能检出色谱峰。因此，木通、大枣2味饮片，在本实验色谱条件下难以获得指纹图谱信息。

2.7 基于网络药理学的DSD功效物质预测分析

2.7.1 基于可测性和可追溯性的活性成分筛选

根据文献研究，当归、桂枝共为DSD的君药，其中阿魏酸为药典项下当归的质量控制指标，藁本内酯为其挥发油主要成分；邻甲氧基桂皮醛是桂枝挥发

油主成分之一，肉桂酸为非挥发油成分，受热较稳定，具有抗菌、利胆、抗突变、抗肿瘤、抗疲劳等药理作用^[7]。白芍、细辛均为臣药，其中芍药苷为白芍的质量控制指标，具有镇痛、解除痉挛、保护脑血管等作用，芍药苷、芍药内酯苷等统称为芍药总苷，具有补血、抗抑郁等作用^[8]；细辛主要活性成分为挥发油和木脂素类，细辛脂素为药典项下细辛的质量控制指标，具有镇痛、抗炎等作用^[9-10]。甘草为佐药，其活性成分为黄酮类、三萜类，甘草苷具有抗炎、抗菌、抗氧化等作用，甘草酸具有抗炎镇咳、免疫调节等作用，均为药典项下甘草含量测定的质量控制指标^[11-12]。木通的主要成分为三萜、苷类成分，大枣的有效成分为多糖类。文献研究结合DSD的指纹图谱研究，以上类别中9个活性成分均能得到指认，且能够从饮片到物质基准对应实物进行传递。基于可测性和可追溯性，将这9个活性成分做为候选化合物。利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找9个候选化合物的Canonical SMILES，为后续DSD“成分-靶点-通路”网络的构建做准备。

2.7.2 DSD主要成分成分的靶点预测

将9个活性成分的Canonical SMILES编号分别导入Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测分析其对应的靶蛋白，去除重复靶点，共得到与9个活性化合物相关的271个作

用靶点。

2.7.3 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将筛选得到的 271 个作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 选择物种为 “Homo sapiens”, 蛋白交互参数评分值为 “high confidence>0.9”, 网络显示选项为 “hide disconnected nodes in the network”, 其余参数设置均保持不变, 得到 271 个靶蛋白的 PPI 网络图 (图 4)。将分析结果以 TSV 文本格式导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 并利用 Cytoscape 3.7.1 软件中的 “Network Analyzer” 功能

对分析结果进行网络拓扑分析, 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度值 ≥ 10 的靶点作为关键靶点。经筛选得到 48 个关键靶点, 结果见表 4。

2.7.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将 PPI 网络构建筛选得到的 48 个关键靶点利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对其进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富

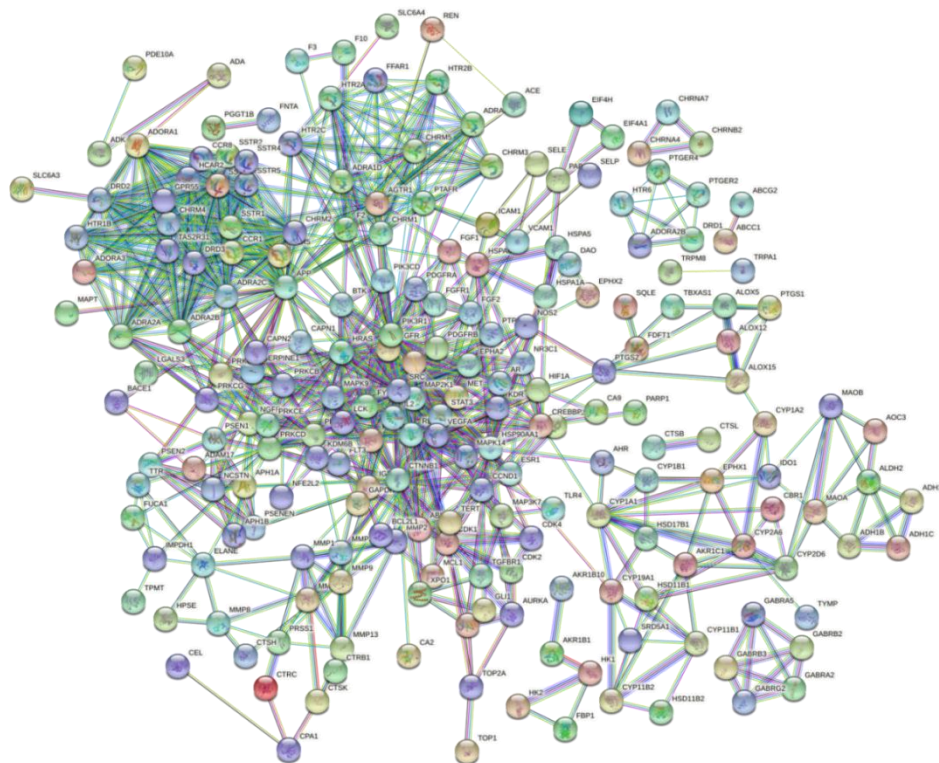


图 4 271 个靶蛋白的 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of 271 target proteins

表 4 靶点网络的拓扑学性质

Table 4 Topological properties of target network

靶点	名称	介数中心性	接近中心性	度值
ABL1	酪氨酸受体激酶 ABL (tyrosine-protein kinase ABL)	0.003 9	0.326 4	11
CCND1	周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1)	0.022 8	0.375 5	13
MAPK14	MAP 激酶 p38 α (MAP kinase p38 α)	0.010 1	0.377 8	17
PDGFRB	血小板源性生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor)	0.001 3	0.355 5	13
LCK	酪氨酸蛋白激酶 LCK (tyrosine-protein kinase LCK)	0.004 8	0.368 8	19
CTNNB1	β -连环蛋白 (axin1/ β -catenin)	0.088 5	0.402 2	29
FYN	酪氨酸蛋白激酶 FYN (tyrosine-protein kinase FYN)	0.007 3	0.378 5	19
SRC	酪氨酸蛋白激酶 SRC (tyrosine-protein kinase SRC)	0.091 9	0.420 2	41

续表 4

靶点	名称	介数中心性	接近中心性	度值
AGTR1	1 型血管紧张素 II 受体 (type-1 angiotensin II receptor)	0.036 4	0.370 3	23
NGFR	低亲和力神经营养因子受体 p75NTR (low affinity neurotrophin receptor p75NTR)	0.009 9	0.354 2	12
PRKCB	蛋白激酶 C β (protein kinase C β)	0.008 1	0.363 8	16
PRKCA	蛋白激酶 C α (protein kinase C α)	0.023 2	0.376 3	17
ADRA2A	α -2a 肾上腺素能受体 (α -2a adrenergic receptor)	0.011 2	0.342 5	27
APP	β 淀粉样 A4 蛋白 (β amyloid A4 protein)	0.138 5	0.414 6	49
CCR5	C-C 趋化因子受体 5 型 (C-C chemokine receptor type 5)	0.036 1	0.380 1	26
CCR1	C-C 趋化因子受体 1 型 (C-C chemokine receptor type 1)	0.019 1	0.364 5	22
CHRM2	毒蕈碱乙酰胆碱受体 M2 (muscarinic acetylcholine receptor M2)	0.021 4	0.362 4	24
ADRA2B	α -2b 肾上腺素能受体 (α -2b adrenergic receptor)	0.011 2	0.342 5	27
ADRA2C	α -2 肾上腺素能受体 (α -2 adrenergic receptor)	0.011 2	0.342 5	27
CHRM1	毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1 (muscarinic acetylcholine receptor M1)	0.005 7	0.373 3	16
F2	凝血酶 (thrombin)	0.026 3	0.358 2	19
PTAFR	血小板活化因子受体 (platelet activating factor receptor)	0.012 7	0.374 7	16
PIK3R1	磷脂酰肌醇 3-激酶 (p85- α)	0.108 6	0.431 9	45
HTR2A	血清素 2a 受体 [serotonin 2a (5-HT2a) receptor]	0.010 7	0.337 5	14
PRKCG	蛋白激酶 C γ (protein kinase C γ)	0.001 0	0.336 9	10
PRKCH	蛋白激酶 C η (protein kinase C η)	0.001 0	0.336 9	10
PRKCE	蛋白激酶 C ϵ (protein kinase C ϵ)	0.008 9	0.344 4	13
PRKCD	蛋白激酶 C δ (protein kinase C δ)	0.050 3	0.384 0	21
EGFR	表皮生长因子受体 erbB1 (epidermal growth factor receptor erbB1)	0.036 9	0.410 1	23
HSPA8	热休克同源蛋白 71 000 (heat shock cognate 71 000 protein)	0.040 6	0.361 7	10
HSP90AA1	热休克蛋白 HSP90- α (heat shock protein HSP 90- α)	0.073 2	0.398 7	25
CYP1A1	细胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 1A1)	0.149 7	0.308 1	12
RELA	核因子 NF- κ B p65 亚基 (nuclear factor NF- κ B p65 subunit)	0.054 2	0.412 8	19
VEGFA	血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	0.063 2	0.426 0	21
MAPK9	c-Jun N-末端激酶 2 (c-Jun N-terminal kinase 2)	0.005 5	0.366 7	10
AR	雄激素受体 (同源性) [androgen receptor (by homology)]	0.008 0	0.374 7	11
NR3C1	糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor)	0.005 7	0.362 4	12
CREBBP	CREB 结合蛋白/p53 (CREB-binding protein/p53)	0.181 9	0.394 5	17
HRAS	转化蛋白 p21/H-Ras-1 (transforming protein p21/H-Ras-1)	0.030 6	0.378 5	30
CDK1	细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1)	0.022 6	0.338 2	11
STAT3	信号转换器和转录激活器 3 (signal transducer and activator of transcription 3)	0.160 2	0.437 9	34
JUN	原癌基因 c-JUN (proto-oncogene c-JUN)	0.040 7	0.411 9	19
ESR1	雌激素受体 α (estrogen receptor α)	0.058 6	0.377 0	14
MAP2K1	双特异性丝裂原活化蛋白激酶 1 (dual specificity mitogen-activated protein kinase 1)	0.006 2	0.363 1	11
MMP3	基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3)	0.031 8	0.353 5	11
MMP9	基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9)	0.045 6	0.348 2	12
FGF2	碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor)	0.001 8	0.348 9	10
IL2	白细胞介素-2 (interleukin-2)	0.004 2	0.365 2	15

集分析和 KEGG 通路富集分析均根据“ $P \leq 0.01$ ”和“Benjamini ≤ 0.01 ”进行筛选。

GO 功能富集分析共获取 97 个 GO 条目。其中生物过程 (biological process, BP) 占 62 条, 细胞组成 (cell composition, CC) 占 9 条, 分子功能 (molecular function, MF) 占 26 条。根据显著性程度进行部分展示, 结果见图 5。BP 主要包括血小板活化、细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular regulated

protein kinases 1, ERK1) 和 ERK2 级联的正调控、药物反应、MAP 激酶活性的正调控等方面; CC 主要涉及质膜、胞质溶胶等过程; MF 主要涉及酶结合、蛋白激酶活性等过程。KEGG 通路富集分析共富集到 78 条通路, 根据显著性程度进行部分展示, 结果见图 6。根据图表可知, DSD 9 个活性成分富集的通路主要包括癌症、磷脂酰肌醇-3-羟激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein

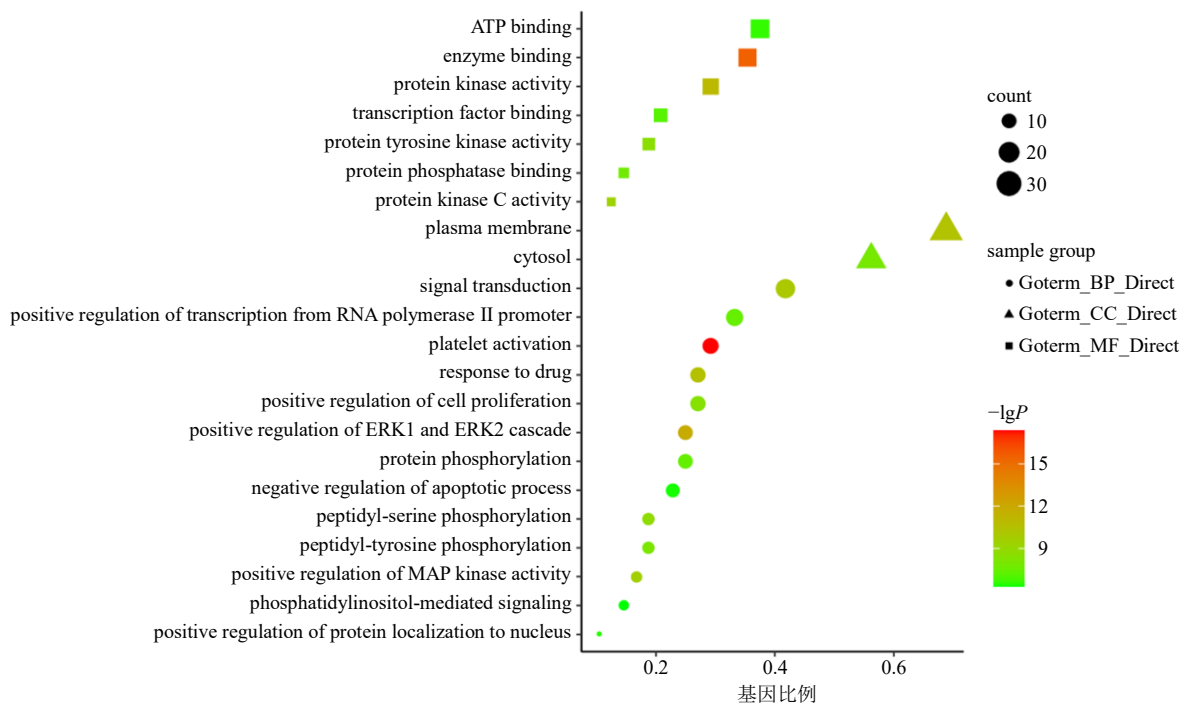


图 5 DSD GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of DSD

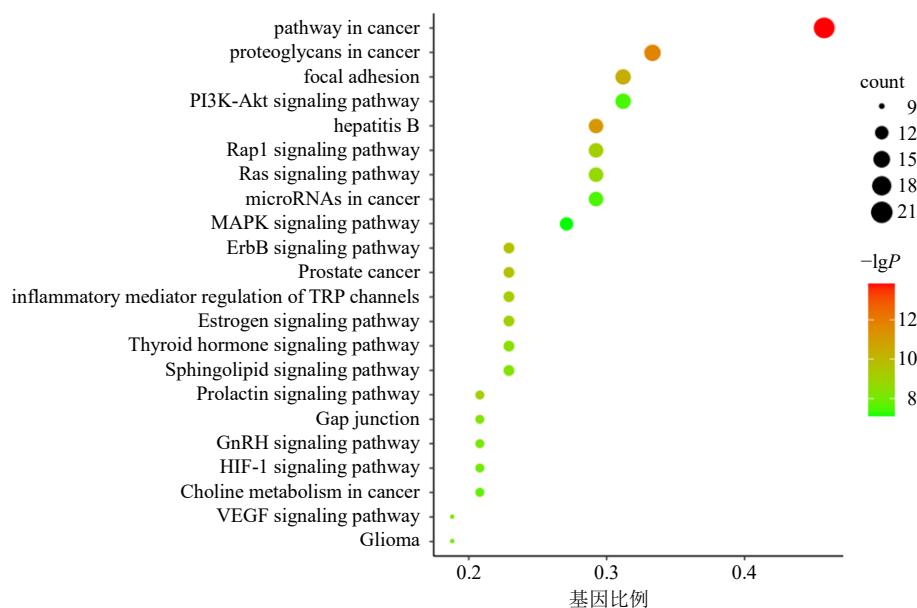


图 6 DSD KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of DSD

kinase B, PI3K-Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道的炎性介质调节等信号通路。

2.7.5 “成分-靶点-通路”网络的构建 根据筛选

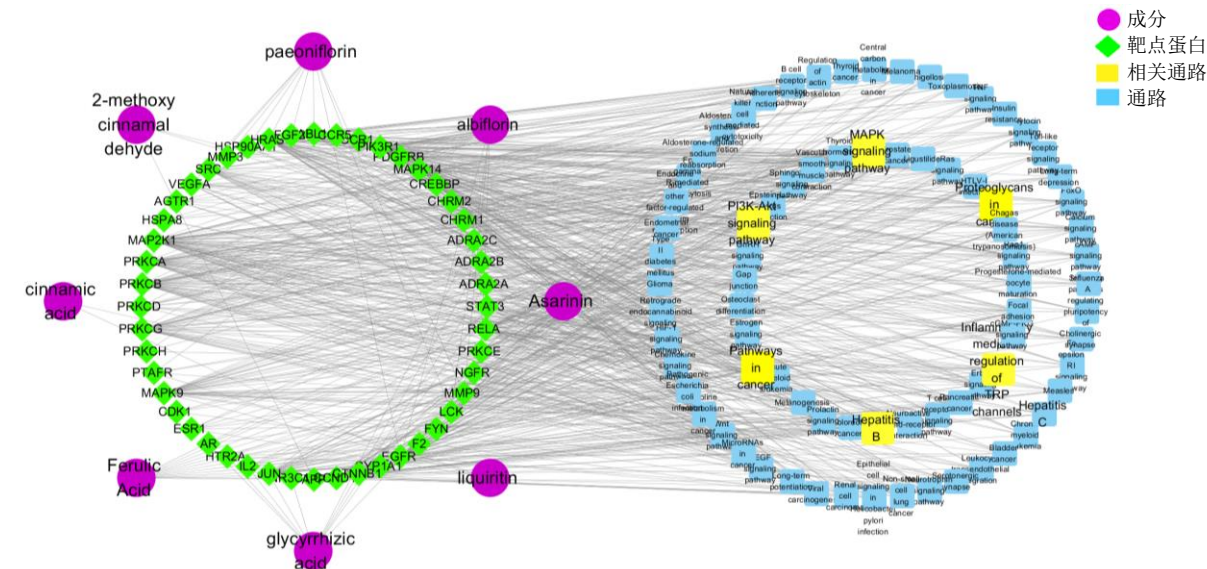


图 7 DSD “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 7 “Ingredient-target-pathway” network diagram of DSD

2.7.6 整合分析 DSD 具有温经散寒、养血通脉等功效,主治血虚寒厥症,临床主要用于治疗痛经、糖尿病周围神经病变、类风湿性关节炎、肿瘤等疾病。本研究通过文献研究和指纹图谱研究基于可测性和可追溯性对 DSD 相关活性成分进行网络药理学分析,并对其作用机制进行探讨分析。研究显示, DSD 筛选得到 9 个活性化合物,共获得 271 个靶点,通过构建 PPI 网络图并选用度值、接近中心性、介数中心性 3 个拓扑参数进行分析,筛选得到 48 个关键靶点。

经分析, DSD 9 个活性成分可能通过作用于去甲肾上腺素受体(norepinephrine receptor, ADR)发挥镇痛作用,作用于乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, CHRM)影响神经信号传导^[13];蛋白激酶 C (protein kinase C, RKC)是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物,通过抑制 PKC 的激活,改善皮肤微血管血流紊乱和微血管功能障碍^[14]; IL-2 属于炎症因子,可用于调控炎症反应, VEGFA 能够引起血管新生,诱导细胞凋亡,抑制 VEGFA、IL-2 的表达可减轻疼痛和炎症反应^[15-16]; ESR1 对生殖功能、性发育有重要作用,同时与痛觉传递有关,可用于调节阴阳,稳定生理功能^[17-18];基质金属蛋白酶

得到的 9 个活性成分、48 个关键靶点和 78 条信号通路,运用 Cytoscape 3.7.1 软件,建立 DSD “成分-靶点-通路”网络图,结果见图 7。由图可知, DSD 相关活性成分通过调控不同的蛋白靶点,作用于多条通路发挥治疗作用。

(matrix metalloproteinases, MMP)能够抑制癌细胞的侵袭与迁移,达到治疗癌症的作用^[19-20]。

GO 功能富集分析显示,共获取 97 个 GO 条目,主要包括血小板活化、MAPK 级联的正调节、MAP 激酶活性的正调控等生物过程,质膜、胞质溶胶等细胞组成和酶结合、蛋白激酶活性等分子功能,主要以生物过程为主,涉及神经-激素分泌调节、细胞生长增殖、能量代谢等生物学过程。

KEGG 通路富集分析显示, DSD 9 个活性成分主要涉及癌症、PI3K-Akt、MAPK、TRP 通道的炎性介质调节等信号通路。经研究, MAPK 信号通路参与细胞多种生理过程,是重要的信号转导系统之一,与炎症、肿瘤等多种疾病有关^[16]; PI3K-Akt、MAPK 信号通路与细胞增殖、凋亡有关,通过调控 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路能够抑制癌细胞增殖并诱导其凋亡,促进造血和血小板生成,有可能是发挥补血、活血作用的重要通路^[21-22]; TRP 通路是一类离子通道,与炎症和疼痛的发生密切相关,通过调控 TRP 通路,拮抗 TRPV1 等 TRP 通道家族成员,缓解关节炎疼痛,常用于治疗类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风等疾病^[23-24];叉头型转录因子的 O 亚型(forkhead transcription factor of the O class,

FOXO)、低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)等信号通路与造血功能有关,通过调控以上通路能够促进O₂、营养物质的转运,使细胞免受缺氧损伤,促进血管和红细胞生成^[25]。同时,郇丹华等^[16]研究发现,DSD可通过调控MAPK、花生四烯酸等信号通路治疗痛经;李文婷等^[26]、张伏芝^[27]研究发现通过调控MAPK、PI3K-Akt、HIF-1、晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)等信号通路能够治疗糖尿病周围神经病变;程邦^[28]经研究发现DSD通过调控TNF、HIF-1、癌症通路、雌激素、VEGF等信号通路干预类风湿性关节炎。由此推测,DSD中关键效应成分可通过作用于多个靶点,干预多条通路达到温经散寒、养血通脉的作用。

基于指纹图谱和网络药理学研究,阿魏酸、肉桂酸、芍药苷等9个成分具有传递性和溯源性,且与DSD的功能属性密切相关,可预测其为影响DSD品质的潜在功效关联物质。

3 讨论

DSD由当归、桂枝等7味药组成,成分复杂,为了尽可能全面的分析其所含的化学成分,本研究对色谱条件和供试品提取条件进行考察。通过考察不同的检测波长(237、245、280、290、316 nm)、流动相系统(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%甲酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液)、色谱柱(Waters XBridge C₁₈色谱柱、Merck Purospher Star LP RP₁₈ endcapped 色谱柱、Hanbon Hedera ODS-2 色谱柱)、体积流量(0.6、0.8、1.0 mL/min)、柱温(25、30、35 ℃)等项目,确立了DSD指纹图谱分析方法中色谱条件的关键要素:色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长 245 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液;梯度洗脱;结合DSD组成药味的药典提取方法对供试品溶液的提取溶剂种类(甲醇、乙醇)和提取溶剂体积分数(0、30%、50%、70%醇溶液)进行考察,发现以70%甲醇为提取溶剂时色谱峰基线平稳,提取情况较佳,因此,选择70%甲醇超声提取。通过以上研究,确立DSD指纹图谱的分析方法。

经典名方由多味药组成,成分复杂,具有多成分、多靶点、多通路的特点,同时经典名方的组方配伍又注重君臣佐使的配伍关系,通过组方配伍对相关疾病进行治疗,使其作用机制研究困难。本实

验以指纹图谱为指标,全面考察DSD原料饮片-物质基准对应实物的关键质量属性的传递性。结果显示,DSD物质基准对应实物共确认25个峰,指认9个色谱峰,均能在原料饮片中找到明确归属。从色谱峰个数与峰强度看,甘草对指纹图谱的贡献最大,当归、桂枝、白芍和细辛对指纹图谱的贡献度相对较大,木通、大枣对指纹图谱的贡献较低。木通指标性成分木通苯乙醇苷B在饮片炮制过程中损失严重,导致含量大幅度下降,在DSD煎煮过程中由饮片转移至水煎液的量极少,在此色谱条件下未检测出色谱峰;大枣主要成分为多糖和氨基酸类物质,水溶性大,含量较低,在此色谱条件下未检测出色谱峰。因此,木通、大枣2味饮片,在本实验条件下难以获得指纹图谱信息,后期可结合其他质量控制方法对其进行全面的质量控制。

网络药理学主要是基于系统生物学的理论,对生物系统的网络分析,选取特定信号节点进行多靶点药物分子设计的新学科,具有系统性与整体性的特点,可用于阐释及分析中药复方制剂配伍之间的作用关系及作用机制^[29-31]。本实验将指纹图谱与网络药理学相结合,通过对经典名方DSD进行指纹图谱研究,并采用网络药理学识别技术,构建DSD的“成分-靶点-通路”网络,预测分析与DSD的功能主治密切相关的核心靶点、信号通路及功效关联物质,进一步推进对经典名方复方制剂作用机制的研究。

本研究基于指纹图谱及网络药理学研究,分析预测DSD温经散寒、养血通脉功效关联物质,为后期DSD复方制剂全方位的质量控制及作用机制研究奠定基础,有助于建立全过程的质量控制体系,提高中药产业质量控制水平。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局.《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》[EB/OL]. [2019-03-27]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20190327150101694.html>.
- [2] 湖北中医学院. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 11.
- [3] 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.
- [4] 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): 3568-3570.

- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [9] 刘杰, 刘广学, 尚明英, 等. 华细辛和北细辛 HPLC 特征图谱识别与抗炎靶点及抗炎成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1374-1383.
- [10] 余娟娟. 细辛调节 TRPV1 离子通道镇痛机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [11] 杨豆, 张卫波. 甘草化学成分及药理作用研究 [J]. 湖南饲料, 2017(3): 21-23.
- [12] 刘仁俊. 浅谈甘草化学成分及药理作用 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(19): 74.
- [13] 邢琪昌, 陈佳, 刘征, 等. 当归四逆汤治疗糖尿病周围神经病变靶点预测和机制探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 101-105.
- [14] Casellini C M, Barlow P M, Rice A L, *et al.* A 6-month, randomized, double-masked, placebo-controlled study evaluating the effects of the protein kinase C-beta inhibitor ruboxistaurin on skin microvascular blood flow and other measures of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4): 896-902.
- [15] 赵乐. VEGF 网络调控在黄芪桂枝五物汤治疗膝骨关节炎模型大鼠中的作用研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [16] 卻丹华, 陈王焕, 姜飞鹏, 等. 基于网络药理学和分子对接研究当归四逆汤治疗原发性痛经的机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 855-864.
- [17] Pecchi E, Priam S, Gosset M, *et al.* Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: Possible involvement in osteoarthritis pain [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(1): R16.
- [18] Lu H, Ozawa H, Nishi M, *et al.* Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor β [J]. *J Neuroendocrinol*, 2010, 13(10): 839-845.
- [19] 王晓燕, 张允历, 张恒, 等. 槲皮素对人胃癌细胞侵袭和 MMP-2 表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(3): 215-218.
- [20] 王鹏, 姜战武, 孙玉国, 等. 木犀草素对人胃癌 HGC-27 细胞迁移的影响及机制 [J]. 山东医药, 2012, 52(38): 8-10.
- [21] Kashafi E, Moradzadeh M, Mohamadkhani A, *et al.* Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 573-577.
- [22] 孙玉成, 刘晓巍, 片光哲. β -谷甾醇诱导人胃癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究 [J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 866-871.
- [23] Galindo T, Reyna J, Weyer A. Evidence for transient receptor potential (TRP) channel contribution to arthritis pain and pathogenesis [J]. *Pharmaceuticals*, 2018, 11(4): 105.
- [24] 杨欣, 李亚辉, 李来来, 等. 广金钱草挥发油基于 TRP 通道的抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 134-141.
- [25] 史旭芹. 基于多组学的当归补血汤补血功效物质基础及作用机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [26] 李文婷, 郑舒宁, 张琪, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-川芎药对对糖尿病周围神经病变作用机制的研究 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(1): 6-12, 34.
- [27] 张伏芝. 基于网络药理学的糖尿病周围神经病变气虚血瘀证组方筛选与优化 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 姚运秀, 潘春晖, 王晨, 等. 网络药理学在中药复方的研究进展与应用策略 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3): 257-263.
- [31] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 156-160.

[责任编辑 郑礼胜]