

基于指纹图谱和网络药理学对经典名方竹茹汤中葛根的质量标志物 (Q-Marker) 预测分析

王璐¹, 张礼欣¹, 贾奥蒙¹, 毛春芹¹, 李林¹, 侯金才², 郭勇², 陆兔林^{1*}, 申屠银洪^{3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023
2. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430
3. 浙江桐君堂中药饮片有限公司, 浙江 桐庐 311500

摘要: **目的** 基于指纹图谱和网络药理学分析预测经典名方竹茹汤 (Zhuru Decoction, ZRD) 中葛根的质量标志物 (Q-Marker)。 **方法** 建立葛根药材和饮片的水煎液及竹茹汤的指纹图谱, 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竹茹汤中葛根相关成分的作用靶点和通路, 构建成分-靶点-通路网络, 预测竹茹汤中葛根发挥治疗胃热呕吐功效潜在的 Q-Marker。 **结果** 分别建立了 15 批葛根药材水煎液、葛根饮片水煎液和 18 批竹茹汤的指纹图谱, 相似度均 > 0.95, 并指出 6 个共有成分, 分别为 4 号峰 3'-羟基葛根素、6 号峰葛根素、7 号峰 3'-甲氧基葛根素、9 号峰葛根芹菜糖苷、11 号峰大豆苷、23 号峰大豆苷元; 从网络药理学数据库中筛选分析得到 6 个化合物的 14 个核心靶点, 包括转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、信号转导和转录激活因子 1- α/β (signal transducer and activator of transcription 1- α/β , STAT1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、STAT3、转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53) 等和 20 条关键通路, 包括 IL-6、TNF 信号通路、NOD 样受体 (NOD-like receptor) 信号通路、Toll 样受体 (Toll-like receptor) 信号通路等构建成分-靶点-通路图; 基于“Q-Marker 五原则”分析预测大豆苷元、葛根素、大豆苷为竹茹汤中葛根潜在的 Q-Marker。 **结论** 通过指纹图谱和网络药理学分析预测竹茹汤中葛根的 Q-Marker, 为全面控制竹茹汤的质量提供依据, 为进一步研究竹茹汤的作用机制提供参考, 同时为经典名方中复方及单味药的 Q-Marker 的关联性研究提供示范。

关键词: 葛根; 经典名方; 竹茹汤; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 靶点; 通路; 胃热; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 葛根芹菜糖苷; 大豆苷; 大豆苷元

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6197-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.009

Q-Marker prediction analysis of *Puerariae Lobatae Radix* in Zhuru Decoction based on fingerprint and network pharmacology

WANG Lu¹, ZHANG Li-xin¹, JIA Ao-meng¹, MAO Chun-qin¹, LI lin¹, HOU Jin-cai², GUO Yong², LU Tu-lin¹, SHENTU Yin-hong³

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China
3. Zhejiang Tongjuntang Chinese Herbal Pieces Co., Ltd., Tonglu 311500, China

Abstract: Objective To analyze and predict the Q-Marker of Gegen (*Puerariae Lobatae Radix*, PLR) in Zhuru Decoction (竹茹汤, ZRD) based on fingerprint and network pharmacology. **Methods** The fingerprints of PLR decoction, PLR pieces decoction and ZRD were collected, and analyzed by using the similarity evaluation system software for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 edition); The function target and pathway of related components of PLR were screened and analyzed, and the

收稿日期: 2021-03-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707000); 江苏省研究生科研与实践创新训练计划项目 (KYCX21_1773)

作者简介: 王璐, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。E-mail: wangluann@foxmail.com

*通信作者: 申屠银洪, 执业中药师, 主要从事中药及饮片质量标准研究管理。E-mail: st.yh@163.com

陆兔林, 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

“component-target-pathway” network was constructed to predict the potential Q-marker of PLR in therapeutic effect of ZRD on vomiting caused by stomach heat. **Results** The fingerprint libraries of 15 batches of PLR decoction, 15 batches of PLR pieces decoction, and 18 batches of ZRD were established, with the similarity more than 0.95. Six common components of peaks 4, 6, 7, 9, 11, 23 were identified, respectively, named 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, apioside, daidzin and daidzein. A total of 14 core target sites related to six components including transcription factor p65 (RELA), RAC- α serine/threonine-protein kinase (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), signal transducer and activator of transcription 1- α/β (STAT1), interleukin-6 (IL-6), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), transcription factor AP-1 (JUN), cellular tumor antigen p53 (TP53) and etc, and 20 key pathways including Interleukin-6, TNF signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and others of PLR were screened out from network pharmacology system in the component-target-pathway network. Based on the analysis and prediction guided by the “Five Principles” of Q-Marker, daidzein, puerarin, daidzin were identified as the potential Q-Marker in ZRD. **Conclusion** In this study, the Q-Markers of PLR in ZRD are analyzed by fingerprint and network pharmacology, which provides a basis for comprehensive quality control of ZRD, and offers a reference for further study on the mechanism of ZRD. Meanwhile, it also could serve as an example for the correlation study of Q-Marker of compound and single medicine in the classic prescription.

Key words: *Puerariae Lobatae Radix*; classic prescription; Zhuru Decoction; fingerprint; network pharmacology; Q-Marker; target; pathway; stomach heat; 3'-hydroxy puerarin, puerarin; puerarin; 3'-methoxy puerarin; apioside; daidzin; daidzein

竹茹汤 (Zhuru Decoction, ZRD) 出自宋朝许叔微的《普济本事方》卷第四·翻胃呕吐霍乱·竹茹汤, 原方由葛根、甘草、半夏、竹茹、生姜、大枣 6 味药组成, 主治胃热呕吐, 其后经历药味组成、剂量和功效主治等方面的改变, 还可用于治疗酒呕。方中重用葛根, 清胃生津, 是为君药; 半夏、竹茹、生姜和胃止呕; 甘草、大枣健脾益气, 调和诸药^[1-2]。

葛根 *Puerariae Lobatae Radix* (PLR) 来源于豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根^[3], 味甘、辛, 凉, 能解肌退热、生津止渴、解酒毒。用于外感发热头痛、口渴、酒毒伤中。据报道^[4], 葛根水提物能缩短小鼠醉后睡眠时间, 加速酒精在肝脏中代谢速度, 降低肝损伤的风险, 另有研究^[5]证明葛根中黄酮和葛根素等成分可通过调节酒精和脂质代谢减轻斑马鱼酒精性肝损伤。葛根除胃热、解酒的作用与竹茹汤和胃止呕、治疗酒呕的功效相一致, 此外, 葛根被广泛应用于心脑血管疾病和免疫系统疾病的临床治疗^[6]。

为提升中药及产品质量标准, 对现有质量评价与控制方法及存在问题进行研究分析后, 刘昌孝院士^[7]于 2016 年提出了中药质量标志物 (Q-Marker) 的概念, 后经张铁军等^[8]总结归纳得出中药质量标志物应符合有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍的“五原则”, 现如今预测中药 Q-Marker 多遵循此五原则。

中药及其复方制剂成分复杂, 质量难以控制, Q-Marker 的建立有利于中药全程质量控制及质量溯源, 是中药质量评价与控制的指标。中药指纹图

谱能充分反应中药化学成分的传递和溯源, 网络药理学则是近几年兴起的基于成分-靶点-通路-疾病科学地对中药药效进行预测的一种手段, 也能从理论上阐明中药的有效性, 指纹图谱结合网络药理学适用于中药多成分、多靶点、多通路的特点。本课题组基于 Q-Marker 理论, 通过指纹图谱和网络药理学研究方法, 以“Q-Marker 五原则”为核心, 预测经典名方竹茹汤中葛根的 Q-Marker, 以期为经典名方中单味药的 Q-Marker 研究提供借鉴, 同时为全面控制经典名方竹茹汤奠定基础, 为进一步研制竹茹汤相关制剂及其质量控制提供思路^[9-12]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, DAD 紫外检测器, Chem Station 色谱工作站, 安捷伦科技有限公司; KQ-500B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FA1104N 电子天平, $d=0.1$ mg, 上海菁海仪器有限公司; MS-105D 电子天平, $d=0.01$ mg, 瑞士梅特勒-托利多集团; H1650-W 台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; ZYX0071 超纯水系统, 南京汉隆实验器材有限公司; MG-H21S011 红外炉, 广东美的生活电器制造有限公司。

1.2 试剂

对照品葛根素, 批号 110752-201615, 质量分数 95.4%, 购自中国食品药品检定研究院; 对照品 3'-羟基葛根素 (批号 180102, 质量分数 $\geq 98\%$)、3'-甲氧基葛根素 (批号 171204, 质量分数 $\geq 98\%$)、葛根素芹菜糖苷 (批号 171216, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购

自南京森贝伽生物科技有限公司；对照品大豆苷（批号 20111016，质量分数≥98%）、大豆苷元（批号 YY20101110，质量分数≥98%）均购自上海源叶生物技术有限公司。甲醇，分析纯，山东禹王实业有限公司化工分公司；乙腈，色谱纯，默克股份两合公司；甲酸，色谱纯，美国恩科公司；水为娃哈哈纯净水。

竹茹汤由葛根、甘草、半夏、竹茹、生姜和大枣 6 味药组成，均购自道地产区或主产区，经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定。每味药共收集多个产地，总批次不少于 15 批，均明确了各药材基原、药用部位、产地及其采收加工方法。本课题组前期已按照《中国药典》2020 年版项下各味药的检测方法和要求对药材进行检测，合格的优质药材按照《中国药典》2020 年版项下炮制方法及经典名方申报资料要求拟定的饮片草案，将药材炮制成合格饮片。

本实验共研究 15 批葛根药材水煎液、15 批葛根饮片水煎液以及 15 批不同批次饮片及 3 批同批次饮片制备的共 18 批竹茹汤，其中葛根来自陕西、安徽、河南 3 个产地共 15 批，为豆科葛属植物野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根；半夏来自江苏泰州、甘肃天水、贵州 3 个产地共 15 批，为天南星科

半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎；甘草来自新疆阿勒泰、内蒙鄂尔多斯、甘肃陇西 3 个产地共 15 批，为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎；竹茹来自江西、四川 2 个产地共 15 批，为禾本科刚竹属植物淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层；生姜来自山东、云南 2 个产地共 15 批，为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎；大枣来自山东新泰、河北沧州、山西闻喜 3 个产地共 15 批，为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。药材及对应饮片来源与批号见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈；梯度洗脱：0~4 min，0.5%~8%乙腈；4~25 min，8%~10%乙腈；25~36 min，10%乙腈；36~38 min，10%~14%乙腈；38~55 min，14%~16%乙腈；55~60 min，16%~23%乙腈；60~70 min，23%~30%乙腈；70~85 min，30%~75%乙腈；85~89 min，75%~100%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 25 °C；进样量 10 μL。

表 1 药材及对应饮片来源与批号

Table 1 Source and batch number of medicinal materials and decoction pieces

药材	产地	批号	饮片炮制标准
葛根	陕西	17102011~17102015	《中国药典》2020 年版一部“葛根”
	安徽	111708011~111708015	
	河南	20170331~20170335	
甘草	新疆阿勒泰	yp180311~yp180315	《水炙甘草炮制及质量标准研究》(草案)
	内蒙鄂尔多斯	yp180321~yp180325	
	甘肃陇西	yp1804191~yp1804195	
半夏	江苏泰州	20180111~20180115	《姜汁浆水制半夏工艺及质量标准研究》(草案)
	甘肃天水	171211~171215	
	贵州	171201~171205	
竹茹	江西	111707221~111707227	《中国药典》2020 年版一部“竹茹”
	四川	111707261~111707268	
生姜	山东	201802211~201802215	《中国药典》2020 年版一部“生姜”
	山东	201803131~201803135	
	云南	201802271~201802275	
大枣	山西闻喜	1807261~1807265	《中国药典》2020 年版一部“大枣”
	山东新泰	1807161~1807165	
	河北安国	1709061~1709065	

2.2 对照品溶液的制备

取各对照品适量,加50%甲醇配制成含3'-羟基葛根素 88.11 $\mu\text{g/mL}$ 、葛根素 285.14 $\mu\text{g/mL}$ 、3'-甲氧基葛根素 92.57 $\mu\text{g/mL}$ 、葛根芹菜糖苷 114.97 $\mu\text{g/mL}$ 、大豆苷 86.74 $\mu\text{g/mL}$ 、大豆苷元 57.49 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

本课题组前期已对竹茹汤基准样品的制备方法、工艺参数进行了考察,按照经典名方申报资料要求随机组合多批次,采用确定的煎煮方法得到15批葛根药材水煎液(编号YC1~YC15)、15批葛根饮片水煎液(编号YP1~YP15)和18批竹茹汤(编号ZRD1~ZRD18)和1批缺葛根阴性水煎液(编号YX)。分别取上述液体30 mL于蒸发皿水浴挥干,50%甲醇复溶,定容至10 mL量瓶中,离心,过0.22 μm 微孔滤膜即得。

2.4 葛根药材、饮片水煎液及竹茹汤指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取ZRD供试品溶液,重复进样6次,记录指纹色谱图。选择保留时间稳定、面积大的葛根素色谱峰作为参照峰,各个共有峰的相对保留时间RSD值均小于0.13%,相对峰面积RSD值均小于4.42%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取平行制备的ZRD供试品溶液6份,在上述色谱条件下进样,记录指纹色谱图。以葛根素为参照峰,各个共有峰的相对保留时间RSD值均小于0.12%,相对峰面积RSD值均小于4.97%,表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取ZRD供试品溶液,分别室温放置0、2、4、8、12、24 h后,在上述色谱条件下进样,记录指纹色谱图。以葛根素为参照峰,各个共有峰的相对保留时间RSD值均小于0.12%,相对峰面积RSD值均小于4.82%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.4 指纹图谱的建立 将15批葛根药材水煎液、15批葛根饮片水煎液及18批竹茹汤基准样品供试品溶液分别进样测定,将图谱以AIA格式保存,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)。以S1图谱作为参照谱,采用中位数法,进行多点校正和色谱峰匹配,15批葛根药材水煎液、葛根饮片水煎液均分别得到了21个共有峰,18批竹茹汤基准样品得到了25个共有峰,15批葛根药材水煎液、葛根饮片水煎液以及18批竹茹汤基准样品的指纹图谱叠加图分别见图1~3。

2.4.5 相似度分析 将15批葛根药材、饮片水煎液和18批竹茹汤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15批葛根药材水煎液(编号YC1~YC15)的相似度分别为0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000;15批葛根饮片水煎液(编号YP1~YP15)的相似度分别为0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000;18批竹茹汤(编号ZRD1~ZRD18)的相似度分别为0.999、0.999、

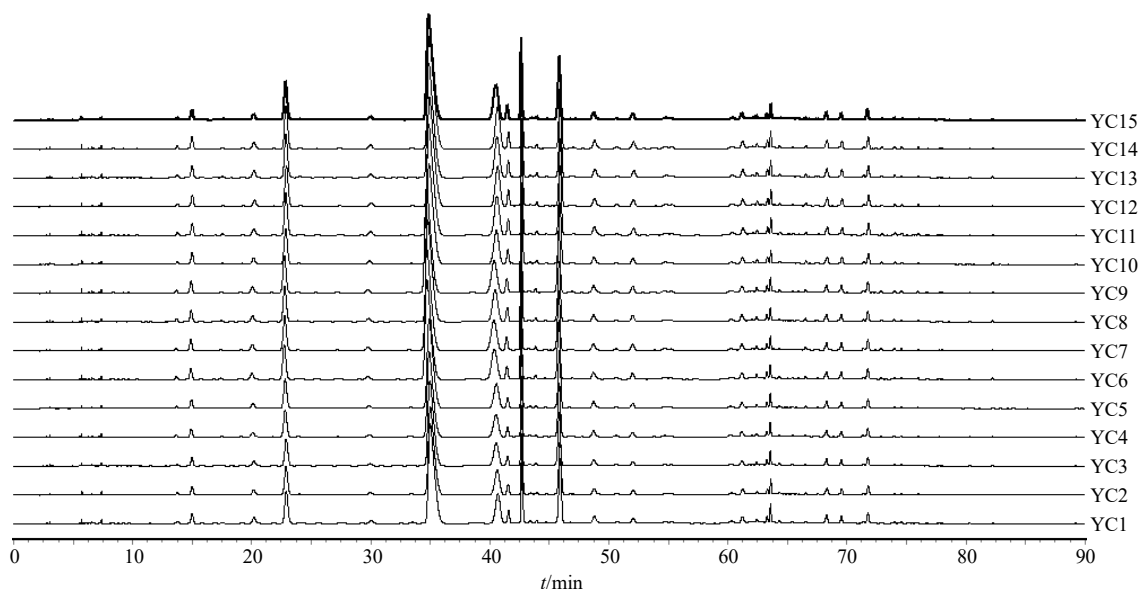


图1 15批葛根药材水煎液指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of PLR decoction

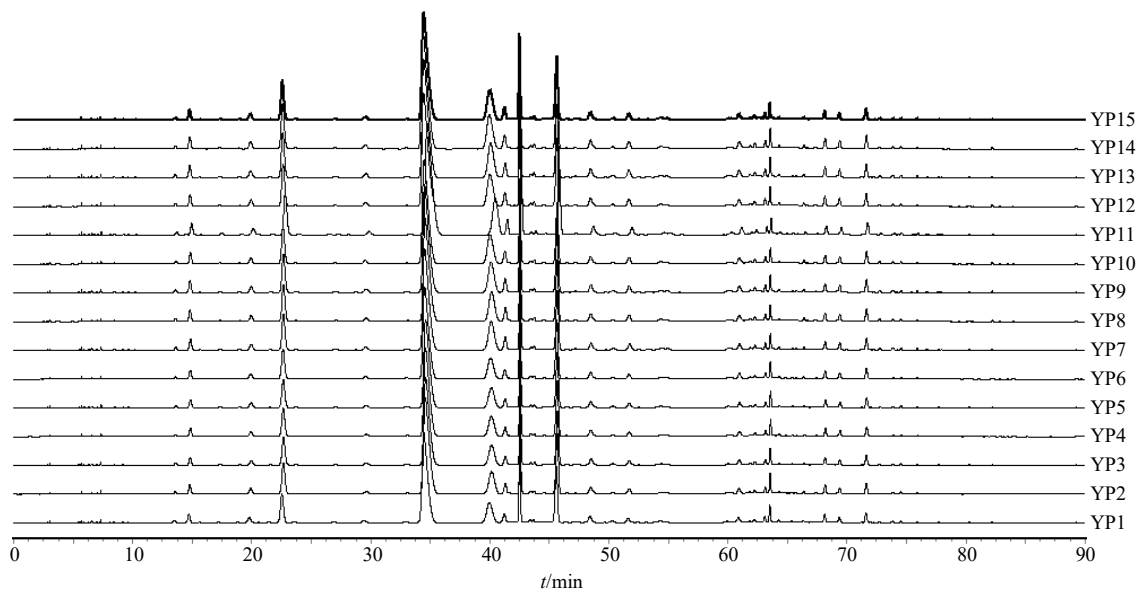


图2 15批葛根饮片水煎液指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of PLR pieces decoction

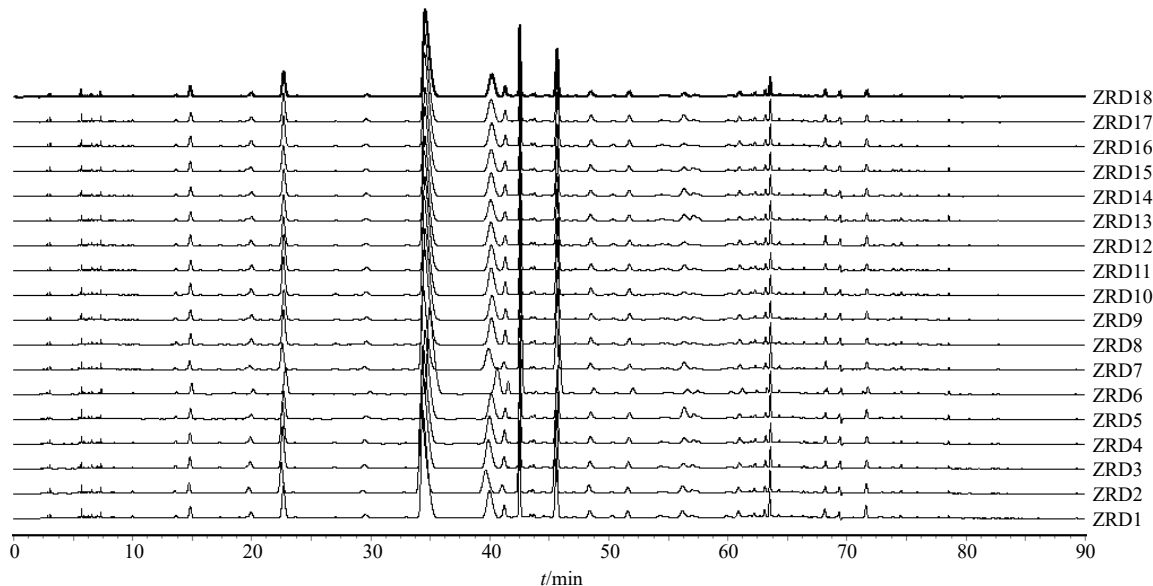


图3 18批竹茹汤指纹图谱

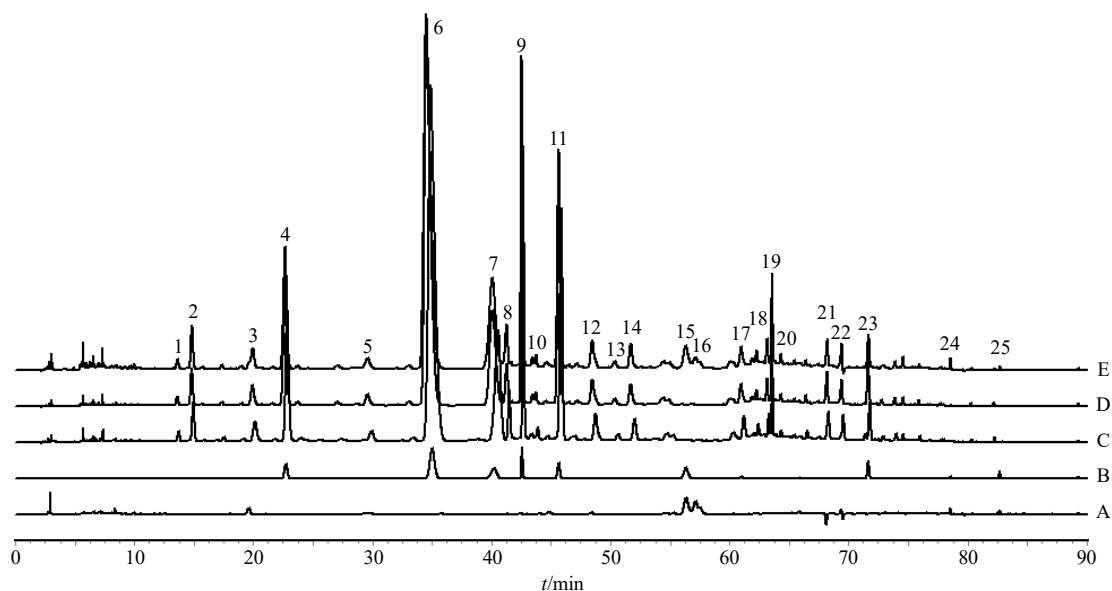
Fig. 3 HPLC fingerprints of 18 batches of ZRD

0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、1.000、1.000、0.999、1.000、0.999、0.999、1.000、1.000、1.000、0.999、0.999；可见，15批葛根药材、15批葛根饮片水煎液和18批竹茹汤的指纹图谱相似度均>0.95，表明葛根药材、饮片水煎液和竹茹汤的质量稳定均一。

2.4.6 共有峰的指认及相关分析 根据指纹图谱分析结果，将多批次葛根药材水煎液、葛根饮片水煎液、竹茹汤指纹图谱共有模式、缺葛根阴性水煎液和混合对照品的指纹图谱进行叠加。采用对照品比对的方式，指认了葛根药材、饮片水煎液及竹茹

汤指纹图谱共有模式中的6个共有峰，分别为3'-羟基葛根素（4号峰）、葛根素（6号峰）、3'-甲氧基葛根素（7号峰）、葛根芹菜糖苷（9号峰）、大豆苷（11号峰）、大豆苷元（23号峰），且这6个峰在竹茹汤中无阴性干扰，见图4。

对15批葛根药材水煎液、饮片水煎液指纹图谱相似度计算，各产地葛根指纹图谱相似度均大于0.95，说明不同产地间葛根药材及饮片的整体化学组分类似，且与复方共有6个特征性成分，由此看出葛根中这6个成分实现了“药材-饮片-复方”的传递，具有良好的传递与溯源性，且在配伍处方中



A-缺葛根阴性水煎液色谱图 B-混合对照品色谱图 C-葛根药材水煎液共有峰模式图 D-葛根饮片水煎液共有峰模式图 E-竹茹汤共有峰模式图 4-3'-羟基葛根素 6-葛根素 7-3'-甲氧基葛根素 9-葛根芹菜糖苷 11-大豆苷 23-大豆苷元
A-chromatogram of water decoction of negative PLR B-chromatogram of mixed control substance C-common peak pattern of PLR decoction D-common peak pattern of PLR pieces decoction E-common peak pattern of ZRD 4-3'-hydroxypuerarin 6-puerarin 7-3'-methoxypuerarin 9-apioside 11-daidzin 23-daidzein

图4 竹茹汤、葛根药材、葛根饮片水煎液指纹图谱共有模式图和混合对照品、缺葛根阴性水煎液色谱图

Fig. 4 Fingerprints of ZRD, PLR decoction, PLR pieces decoction and chromatograms of mixed control substance and negative decoction of PLR pieces

也能得到较好的指认，以此为基础将筛选出的竹茹汤中葛根的6个活性成分进一步进行网络药理学研究，选取的这6个成分均在指纹图谱中响应值前10，且根据前期文献研究推测可能与竹茹汤治疗胃热呕吐、解酒呕的功效关联性更为密切。

2.5 基于成分-靶点-通路的网络药理学分析

2.5.1 候选化合物靶点预测

检索中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), 获取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元 6 个化合物的靶点信息；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 结构输入 Swiss Target Prediction 服务器 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测，并结合 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库，得到上述 6 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 159 个。

2.5.2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络构建

PPI 能够体现蛋白靶点彼此之间的相互作用，这些作用包括参与传递生物信号、调节基因表达、调控能量和物质代

谢及细胞周期等。对 6 个化合物的靶点相互作用进行分析筛选，能够辨识与竹茹汤功效关联更加密切的成分，进一步确证复方中葛根的 Q-Marker。将筛选出的 159 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>0.9”，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 5)，结果共获得 159 个节点，421 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度值 ≥ 15 的靶点作为核心靶点。经筛选得到 14 个核心靶点，结果见表 2。经分析发现，这 14 个靶点 9 个与大豆苷元相关、7 个与葛根素相关、3 个与大豆苷相关。

2.5.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和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 (

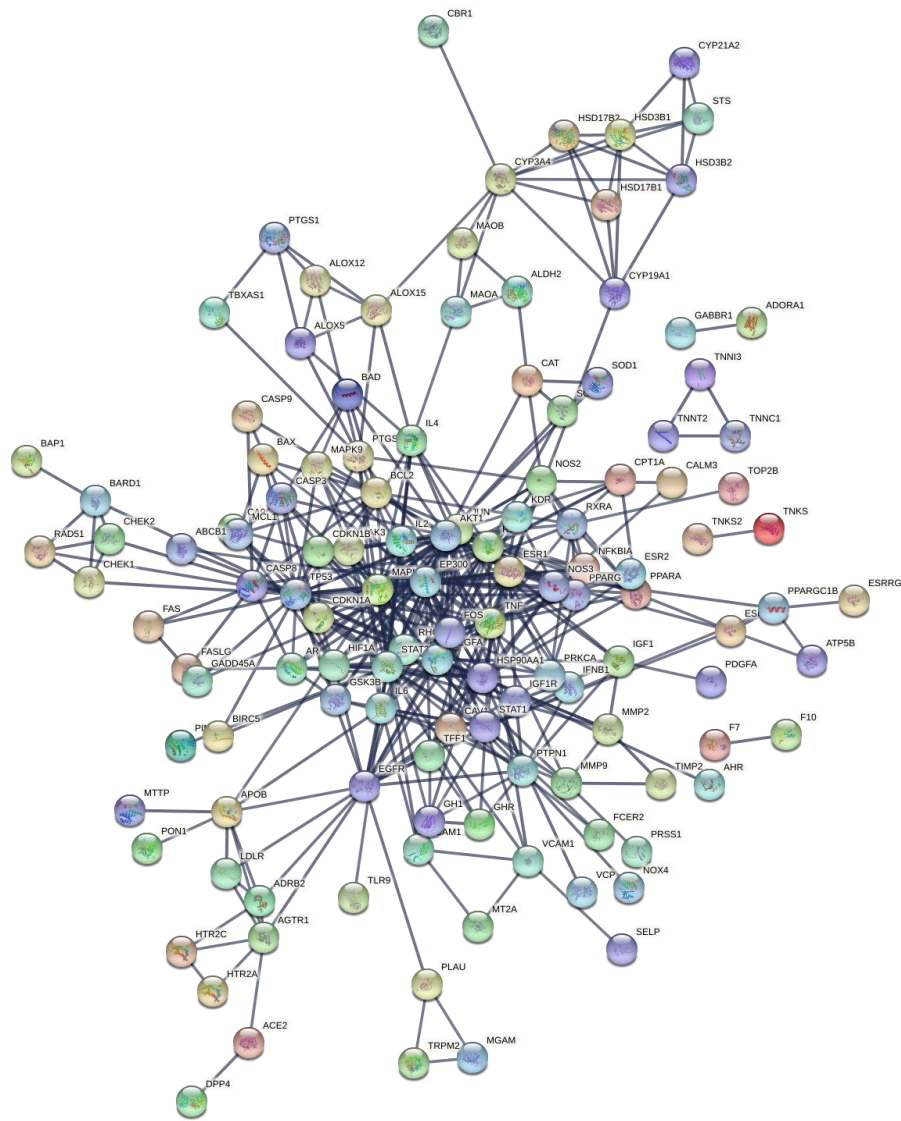


图5 作用靶点 PPI 网络图

Fig. 5 PPI network diagram of targets

表2 核心靶点网络的拓扑学性质

Table 2 Topological properties of core targets network

靶点	名称	介数 中心性	接近 中心性	度值	靶点	名称	介数 中心性	接近 中心性	度值
EP300	histone acetyltransferase p300	0.058	0.447	28	JUN	transcription factor AP-1	0.034	0.450	24
TP53	cellular tumor antigen p53	0.169	0.479	32	ESR1	estrogen receptor	0.153	0.457	18
EGFR	epidermal growth factor receptor erbB1	0.173	0.455	19	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	0.041	0.448	18
AKT1	RAC- α serine/threonine- protein kinase	0.104	0.455	29	IL6	interleukin-6	0.093	0.432	18
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	0.042	0.453	19	RELA	transcription factor p65	0.022	0.405	18
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	0.132	0.483	30	TNF	tumor necrosis factor	0.045	0.435	22
					STAT1	signal transducer and activator of transcription 1- α/β	0.052	0.430	17
					HSP90AA1	heat shock protein HSP 90- α	0.065	0.453	22

gov/) 对 14 个潜在的核心靶点进行 GO 功能分析和 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竹茹汤中葛根核心靶点的信号通路。GO 和 KEGG 分析均选取 $P < 0.05$, 具有统计学意义。

GO 富集分析共获取 78 个条目,其中生物过程 (biological process, BP) 占 54 个,分子功能 (molecular function, MF) 占 20 个,细胞组成 (cellular component, CC) 占 4 个,设置 $P < 0.05$, 错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 , 选取显著性程度前 20 的条目进行展示,结果见图 6。结果显示,以上靶点参与的生物过程包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正负调控、一氧化氮生物合成过程的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控、转录正调控、核染色质、相同蛋白质结合、酶结合、转录因子结合、染色质结合等分子功能,推测竹茹汤中葛根通过这些功能调控机体,解热止呕。

KEGG 富集分析共得到 75 条通路,根据显著性程度 $P < 0.01$, 筛选得到 43 条相关通路,其中排名前 20 的通路如图 7 所示,主要包括乙型肝炎、癌症通路、HIF-1 信号通路、炎症性肠病、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路等。

2.5.4 成分-靶点-通路网络构建 根据筛选得到的 6 个成分、159 个靶点和 20 条关键通路,运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建成分-靶点-通路网络图,结果见图 8。根据 Cytoscape 3.7.1 软件对网络图进行

分析,以成分、靶点、信号通路的度值为参考,发现大豆苷元、葛根素、大豆苷的连接度相对较高,可能是竹茹汤中葛根发挥治疗胃热呕吐、酒呕功效

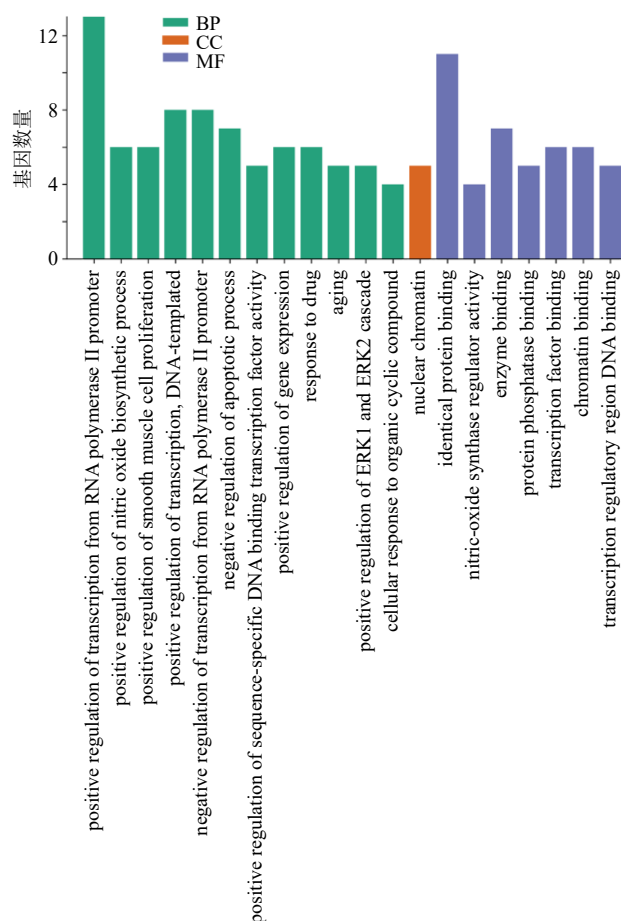


图 6 GO 富集分析 (前 20 条)
Fig. 6 GO analysis of number of genes (top 20)

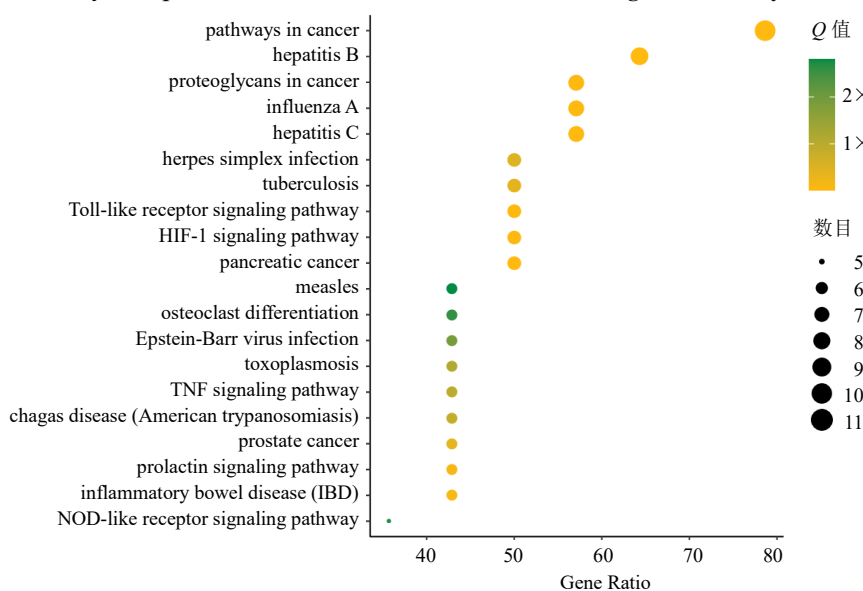


图 7 KEGG 富集分析
Fig. 7 Enrichment analysis results of KEGG

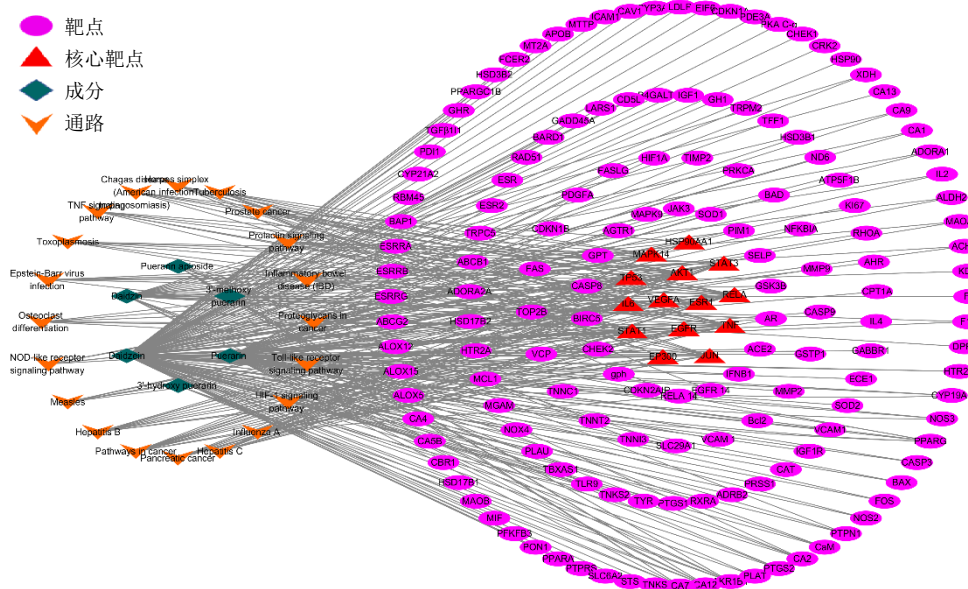


图8 “成分-靶点-通路”网络图

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

的活性物质；转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT1)、TNF、信号转导和转录激活因子 1- α/β (signal transducer and activator of transcription 1- α/β , STAT1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、STAT3、转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53) 9 个靶点的连接度较高 (度值 ≥ 10)，可能是竹茹汤中葛根发挥作用的关键靶点；20 条信号通路中除 Pathways in cancer (度值 = 11)、Hepatitis B (度值 = 9) 略高，NOD-like receptor signaling pathway (度值 = 5) 略低外，其余差异不大，因此，20 条信号通路均可能是竹茹汤中葛根的关键信号通路。

2.6 整合分析

本研究通过建立葛根药材、饮片水煎液和竹茹汤的指纹图谱，指认其共有峰，并对指认出的成分进行网络药理学分析，筛选得到竹茹汤中葛根的核心靶点和信号通路，运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建成分-靶点-通路网络图，根据度值分析得出结论：大豆苷元、葛根素、大豆苷 3 个成分可能是竹茹汤中葛根发挥治疗胃热呕吐、酒呕功效的活性成分。朱卫丰等^[13]基于 Q-Marker 的新概念从成分特有性、传统功效、传统药性、成分可测性、中药配伍环境 (药对配伍、复方配伍、经典方配伍)、成分有效性

等多个方面对单味药葛根的 Q-Marker 进行了深入的全面的探讨分析，大豆苷元、葛根素、大豆苷在传统功效、成分可测性、成分有效性这 3 个方面均有显著的 Q-Marker 特性。基于 Q-Marker 的五原则进行分析，这 3 个成分在竹茹汤中从药材-饮片-复方均能实现良好的传递与溯源，且在复方中无阴性干扰，为葛根所特有，网络药理学从理论上证明了其有效性，综上结合指纹图谱和网络药理学对竹茹汤中葛根的 Q-Marker 进行预测分析，大豆苷元、葛根素、大豆苷这 3 个成分基本符合 Q-Marker 五原则，故预测其为竹茹汤中葛根潜在的 Q-Marker。

3 讨论

本研究依据刘昌孝院士^[7]提出的 Q-Marker 理念，采用指纹图谱和网络药理学相结合的方法分析预测竹茹汤中葛根发挥治疗胃热呕吐功效的 Q-Marker。通过建立葛根药材、饮片水煎液和竹茹汤的指纹图谱从传递和溯源性、可测性的角度对葛根进行分析，指认出 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元 6 个成分，从 Q-Marker 特有性的角度进行分析，这 6 个成分均是竹茹汤中葛根的特有成分，方中无其他药味干扰。

运用网络药理学从有效性的角度对其进行分析，发现大豆苷元、葛根素、大豆苷 3 个活性成分通过调控 RELA、AKT1、TNF、STAT1、IL-6、MAPK14、STAT3、JUN、TP53、组蛋白乙酰转移酶

p300 (histone acetyltransferase p300, EP300)、表皮生长因子受体 erbB1 (epidermal growth factor receptor erbB1, EGFR) 等关键靶点, 作用于 Interleukin-6、TNF 信号通路、NOD 样受体 (NOD-like receptor) 信号通路、Toll 样受体 (Toll-like receptor) 信号通路等关键信号通路发挥竹茹汤治疗胃热呕吐、酒呕的功效。

葛根主要含有异黄酮类、三萜类、皂苷类和多糖类, 含量最多的成分为异黄酮类物质, 主要包括大豆苷、大豆苷元与葛根素等, 其中葛根素含量占比最大^[14]。葛根素能够显著改善高脂诱导的糖尿病小鼠抑郁症状、对心血管、脑部、肝脏损伤均具有保护作用^[15], 大豆苷作为中药中天然的抗酒精成瘾剂, 有研究以此为线索改进了编码线粒体醛脱氢酶 (ALDH2) 的设计, 而 ALDH2 非活性变异形式的 ALDH2*2 基因几乎保护了该基因的所有载体免受酒精中毒的侵害^[16]。大豆苷元是一种从植物中提取的次生代谢物, 具有类黄酮结构, 以其对胃肠道疾病的保护作用而闻名, 研究表明大豆苷元对动物模型中食管反流引起的食道黏膜损伤具有预防作用^[17]。

14 个核心靶点中 EGFR 是一种跨膜糖蛋白, 属蛋白激酶家族的成员, 具有诱导受体二聚和酪氨酸自磷酸化并导致细胞增殖。这个基因的突变与原发性和继发性乳腺癌发生、生长及转移有关^[18], 有文献报道 EGFR 可能在葛根解热功效中发挥重要作用^[19]。IL-6 是一种有效的急性反应诱导剂, 在感染和组织损伤期间, IL-6 的快速生成有助于宿主防御, TNF 主要由巨噬细胞分泌, 是引起发热的有效热原, 在一定条件下可刺激细胞增殖和诱导细胞分化, 最新研究发现, IL-6 与 TNF 在众多中药抗酒精性胃损伤机制中起到关键作用^[20]。

由此可推测, 竹茹汤中葛根的活性成分可能通过作用于这些蛋白靶点起到治疗胃热呕吐、酒呕的疗效。葛根可能通过调控 HIF-1 信号等 7 条代谢通路起到解热的作用^[19]。高思佳等^[21]研究发现 IL-6、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路等 10 条通路参与葛根解肌退热, 部分通路与炎症反应相关, 因此推测竹茹汤中葛根治疗胃热呕吐的机制, 可能是通过相关靶点作用于这些信号通路。

综上所述, 初步预测大豆苷元、葛根素、大豆苷为竹茹汤中葛根潜在的 Q-Marker。竹茹汤具有多成分、多靶点、多途径协同作用的特点, 本研究采

用现代网络药理学方法, 预测竹茹汤中君药葛根与复方功能主治密切相关的关键靶点及信号通路, 为进一步实验验证、潜在药理学机制及临床拓展应用提供参考依据。本研究基于中药化学与中药药理学, 整合多学科技术方法, 基于可测性、可追溯性、有效性开展竹茹汤中葛根 Q-Marker 的系统辨识与确认, 为后期深入研究葛根及其相关复方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^[22]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋·许叔微. 普济本事方 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 58.
- [2] 童坚, 赵宇平, 田莎莎, 等. 经典名方竹茹汤小考 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23): 5262-5268.
- [3] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 347.
- [4] 梁婕, 凌敏, 张薇, 等. 葛根提取物对小鼠酒精性肝损伤的辅助保护效果 [J]. 江苏预防医学, 2020, 31(3): 280-282.
- [5] Liu Y S, Yuan M H, Zhang C Y, et al. Puerariae Lobatae Radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111121.
- [6] 曹毅. 中药葛根的相关药理药效研究综述 [J]. 中国处方药, 2018, 16(2): 27-28.
- [7] 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.
- [8] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [9] 孙媛, 王璐, 彭梅梅, 等. 甘草不同炮制品的指纹图谱研究及质量标志物预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5209-5218.
- [10] 李欢欢, 林丽, 郭爽, 等. 基于网络药理学及定性定量研究的甘草质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2680-2688.
- [11] 夏金鑫, 梅茜, 郭爽, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2634-2641.
- [12] 梅茜, 夏金鑫, 郭爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [13] 朱卫丰, 邹斌, 管咏梅, 等. 葛根质量标志物(Q-marker)探讨分析 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4):

- 775-777.
- [14] 李树欣. 葛根的化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 辽宁化工, 2020, 49(11): 1412-1413.
- [15] 胡子奇, 廖雁君, 刘玉民等. 葛根素对高脂诱导糖尿病小鼠抑郁症状的改善作用及机制研究[J]. 药学学报, 2021, 56(5): 1391-1399.
- [16] Lowe E D, Gao G Y, Johnson L N, *et al.* Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(15): 4482-4487.
- [17] Deng T, Zhang N, Liu Y, *et al.* Daidzein ameliorates experimental acute reflux esophagitis in rats via regulation of cytokines [J]. *Pharmazie*, 2021, 76(2): 84-91.
- [18] Wendt M K, Williams W K, Pascuzzi P E, *et al.* The antitumorigenic function of EGFR in metastatic breast cancer is regulated by expression of Mig6 [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(1): 124-133.
- [19] 李冰涛, 翟兴英, 李佳, 等. 基于网络药理学葛根解热作用机制研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(8): 1409-1416.
- [20] 王雪雪, 尹爱武, 陶柱萍, 等. 中草药抗酒精性胃损伤活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4836-4845.
- [21] 高思佳, 王丹, 王莹莹, 等. 基于网络药理学预测葛根解肌退热的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(12): 1585-1587.
- [22] 许金国, 黄紫炎, 沈钱能, 等. 经典名方竹茹汤的指纹图谱及功效关联物质预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5599-5606.

[责任编辑 郑礼胜]