

基于指纹图谱和网络药理学的枳实薤白桂枝汤质量标志物预测

徐瑞杰, 薛 蓉, 梅 茜, 宫静雯, 张 倩, 赵晓莉, 严国俊, 毛春芹, 许金国*, 陆兔林*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 建立枳实薤白桂枝汤 (Zhishi Xiebai Guizhi Decoction, ZXGD) HPLC 指纹图谱, 并结合网络药理学, 预测 ZXGD 潜在的质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 首先建立 ZXGD 的 HPLC 指纹图谱的检测方法, 并对共有峰进行指认和归属, 应用网络药理学方法构建 ZXGD 的“成分-靶点-通路”网络关系, 对其潜在的 Q-Marker 进行预测。结果 ZXGD 的 HPLC 指纹图谱共标定 17 个共有峰, 并指认出 7 个色谱峰; 采用网络药理学方法, 筛选出 34 个核心靶点、8 条代谢通路, 根据化合物、靶点以及信号通路之间的连接度, 初步预测厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林、邻甲氧基肉桂醛 4 个成分为 ZXGD 潜在的 Q-Marker。结论 通过 HPLC 指纹图谱结合网络药理学分析预测 ZXGD 治疗疾病潜在的 Q-Marker, 所建立的方法操作简便, 重复性好, 可用于 ZXGD 的质量控制, 也为深入研究 ZXGD 的质量标准和作用机制提供支撑和参考。

关键词: 枳实薤白桂枝汤; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 经典名方; 厚朴酚; 和厚朴酚; 辛弗林; 邻甲氧基肉桂醛
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0372-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.007

Q-Markers prediction of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction based on fingerprint and network pharmacology

XU Rui-jie, XUE Rong, MEI Xi, GONG Jing-wen, ZHANG Qian, ZHAO Xiao-li, YAN Guo-jun, MAO Chun-qin, XU Jin-guo, LU Tu-lin

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

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction (ZXGD, 枳实薤白桂枝汤) and combine with network pharmacology to predict the potential quality markers (Q-Marker) of ZXGD. **Methods** First, the HPLC fingerprint detection method of ZXGD was established and optimized, and the common peaks were identified and attributed. The network pharmacology was used to construct the “components-targets-pathways” network relationship, and its potential Q-Marker makes were predicted. **Results** A total of 17 common peaks were obtained in the HPLC fingerprint of ZXGD, and seven chromatographic peaks were identified. Using network pharmacology, 34 core targets and eight metabolic pathways were screened out. According to the compounds, targets, and the degree of connectivity between signal pathways, it was preliminarily predicted that the four components of magnolol, honokiol, synephrine, and 2-methoxycinnamaldehyde were the potential Q-Markers of ZXGD. **Conclusion** The combination of HPLC fingerprint and network pharmacology analysis predicts the potential Q-Marker in ZXGD, the established method is easy to operate and has good reproducibility, and can be used for the quality control of ZXGD, which provides support and reference for in-depth study of the quality standard and action mechanism of ZXGD.

Key words: Zhishi Xiebai Guizhi Decoction; fingerprint; network pharmacology; quality markers; classic prescription; magnolol; honokiol; synephrine; 2-methoxycinnamaldehyde

枳实薤白桂枝汤 (Zhishi Xiebai Guizhi Decoction, ZXGD) 收录于国家中医药管理局公布的第一批《古代经典名方目录》, 最早记载于东汉·

张仲景《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治第九》^[1], 处方由枳实、薤白、桂枝、厚朴、瓜蒌组成, 具有通阳散结、祛痰下气之功效, 主治胸痹。现代临床

收稿日期: 2021-07-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707000)

作者简介: 徐瑞杰 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: xuruijie@126.com

*通信作者: 陆兔林 (1963—), 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

许金国 (1971—), 男, 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

研究表明, ZXGD 应用广泛, 可用于治疗心脏类疾病, 如心肌梗死、冠心病等, 消化系统疾病, 呼吸道疾病和代谢疾病等^[2-6]。

由于 ZXGD 由多味药组成, 药味配伍关系和成分较为复杂, 饮片质量也参差不齐, 对于 ZXGD 整体性质量控制方面的研究较少, 因此, 建立能够全面阐述 ZXGD 复方特点的方法具有重大意义。2016 年刘昌孝院士^[7]提出中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 的新思路, 并明确了 Q-Marker 的五大原则分别是特有性、有效性、传递与溯源、可测性和配伍环境。Q-Marker 是特有的可定性、定量的化学成分, 贯穿中药到制剂的全过程, 为中药质量标准的整体性建立提供新思路。中药指纹图谱是以中药化学成分为研究基础, 对含有复杂成分的物质采用特定的分析技术, 可用于药材、饮片以及中药制剂产品质量的整体性评价^[8]。网络药理学可从整体性、系统性出发, 将中药的研究模式从传统的“单药物、单靶点”转变为“多组分、多靶点、多途径”, 同时还可揭示“药物-基因-靶点”之间的相互作用关系^[9]。通过构建网络药理学的网络拓扑学关系图, 能形象地反映中药发挥药效的特点, 更加直观地阐明药物配伍的作用机制, 增加中药复方临床应用的科学性, 对揭示中药和中药复方的内在作用机制有着巨大贡献, 也为经典名方的研究方向提供更多的选择^[10]。目前基于网络药理学的方法, 已对清络饮和六味地黄丸的作用机制的有效性进行了证实^[11]。本研究从 Q-Marker 的五原则出发, 以 ZXGD 为研究对象建立指纹图谱, 结合网络药理学, 预测分析 ZXGD 发挥药效作用的潜在 Q-Marker, 为后续 ZXGD 的质量控制和机制研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AD 型岛津高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司, 包括 LC-20ADXR 低压梯度泵 (四元)、CTO-20AC 柱温箱、DGU-20A5R 在线脱气装置、SIL-20AXR 自动进样器、SPD-M20A PDA 检测器、CBM-20A 色谱工作站; MS105DU 型电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; KQ-500B 型数控超声波清洗器, 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; TD1002C 型电子天平, 天津天马衡基仪器有限公司; 冷冻干燥机, 上海利润科学仪器有限公司。

1.2 试药

对照品邻甲氧基肉桂醛 (批号 S28D9G711659, 质量分数 98.0%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品辛弗林 (批号 110727-201809, 质量分数 99.5%)、橙皮苷 (批号 110721-201818, 质量分数 96.2%)、肉桂酸 (批号 110786-201604, 质量分数 98.8%)、桂皮醛 (批号 110710-201821, 质量分数 99.6%)、和厚朴酚 (批号 110730-201614, 质量分数 99.3%)、厚朴酚 (批号 110729-201714, 质量分数 100.0%), 均购自中国食品药品检定研究院。

ZXGD 由枳实、厚朴、薤白、桂枝、瓜蒌 5 味中药组成, 研究所用药材均来自道地产区或主产区。本实验前期已完成药材检测, 并依据《中国药典》2020 年版各味药项下标准将药材炮制成对应饮片。枳实 (江西省樟树市新干县, 批号 ZS-M1811001~ZS-M1811005), 厚朴 (湖北省恩施州鹤峰县, 批号 HP180608~HP180612), 薤白 (吉林省四平市梨树县, 批号 XB180320~XB180324), 桂枝 (广东省肇庆市德庆县, 批号 GZ-181011~GZ-181015), 瓜蒌 (山东省济南市长清县, 批号 GL181015~GL181019), 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定, 5 味药的基原分别为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果、木兰科木兰属植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、百合科葱属植物小根蒜 *Allium macrostemon* Bge. 的干燥鳞茎、樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实。本实验共研究由各批次饮片随机组合的 20 批 ZXGD。

1.3 试剂

乙腈, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 甲醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~5 min, 1%~5%乙腈; 5~10 min, 5%~8%乙腈; 10~25 min, 8%~10%乙腈; 25~30 min, 10%~15%乙腈; 30~45 min, 15%~18%乙腈; 45~50 min, 18%乙腈; 50~55 min, 18%~20%乙腈; 55~57 min, 20%~23%乙腈; 57~77 min, 23%~25%乙腈; 77~82 min, 25%~30%乙腈; 82~93 min, 30%~45%

乙腈; 93~96 min, 45%乙腈; 96~103 min, 45%~65%乙腈; 103~121 min, 65%~95%乙腈; 121~126 min, 95%~1%乙腈; 126~136 min, 1%乙腈; 检测波长 290 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别取各对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成含肉桂酸 2.02 μ g/mL、桂皮醛 7.82 μ g/mL、和厚朴酚 1.43 μ g/mL、厚朴酚 0.80 μ g/mL、邻甲氧基肉桂醛 98.20 μ g/mL、辛弗林 56.52 μ g/mL、橙皮苷 306.00 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 样品制备

《金匱要略》中 ZXGD 的原方组成:“枳实四枚, 厚朴四两, 薤白半斤, 桂枝一两, 栝蒌实一枚(捣)”, 用法用量为“上五味, 以水五升, 煮取六升, 先煮枳实厚朴取二升, 去滓, 内诸药, 分温三服”^[1]。经文献考证, 按照 1 两等于 3 g, 1 升等于 200 mL 进行换算, 枳实 4 枚约为 9 g, 瓜蒌实为 15 g。称取处方中枳实和厚朴置于陶瓷锅中, 加水 1000 mL 浸泡 1 h, 半开盖, 武火煎煮至沸腾, 转文火并保持微沸继续煎煮至 400 mL, 以 2 层纱布趁热滤过, 并收集滤液。再称取薤白、桂枝和瓜蒌加入上述滤液中, 浸泡 1 h, 半开盖, 武火煎煮至沸腾, 转文火并保持微沸继续煎煮至 100 mL, 2 层纱布滤过, 滤液放冷至室温。取滤液至-80 ℃冰箱预冻 12 h, 转移至冷冻干燥机, 于-54 ℃、0.74 Pa 真空度冷冻干燥为冻干粉, 即得。根据上述制备方法, 共得到 20 批 ZXGD (编号 S1~S20) 冻干粉以及 5 味药的单煎和阴性水煎液的冻干粉各 1 批。

2.4 供试品溶液的制备

取“2.3”项下 10 mL 煎煮液所对应的冻干粉, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 35 mL, 加蒸馏水至刻度, 称定质量, 超声处理(功率 500 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 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 在本研究所建立的指纹图谱中, 橙皮苷化学性质稳定, 峰面积稳定、峰形较佳、分离度较好、保留时间适中, 因此选择橙皮苷为参照峰, 以计算其余峰的相对峰面积和相对保留时间。

2.5.2 精密度试验 取 ZXGD 1 份(S1), 按照“2.4”项下确定的方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算共有峰相对保留时间

和相对峰面积。结果显示, 共有峰的相对保留时间 RSD<1.3%, 相对峰面积 RSD<4.0%, 表明仪器精密密度良好, 可用于 ZXGD 指纹图谱的测定。

2.5.3 稳定性试验 取 ZXGD 1 份(S1), 按照“2.4”项下确定的方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1”项下色谱条件进样, 计算共有峰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 RSD<1.4%, 相对峰面积 RSD<4.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取 ZXGD(S1) 1 份, 按照“2.4”项下确定的方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算共有峰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 RSD<1.9%, 相对峰面积 RSD<4.7%, 表明该方法重复性良好, 可用于 ZXGD 指纹图谱的测定。

2.6 指纹图谱的建立和相关性分析

2.6.1 ZXGD 指纹图谱建立 取 ZXGD 20 批(S1~S20), 按照“2.4”项下确定的方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定。将所得图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012A 版), 选择 S1 号图谱为参照图谱, 采用平均数法, 进行全峰匹配, 得到 20 批 ZXGD 的指纹图谱叠加图, 见图 1。

2.6.2 ZXGD 相似度分析 将 20 批 ZXGD 样品的指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012A 版), 计算相似度。结果 S1~S20 样品的相似度分别为 0.952、0.976、0.973、0.961、0.983、0.990、0.982、0.976、0.958、0.983、0.981、0.982、0.991、0.976、0.966、0.965、0.978、0.968、0.965、0.985。20 批 ZXGD 的指纹图谱相似度均>0.95, 表明 ZXGD 的质量稳定均一。

2.6.3 ZXGD 共有峰的归属及指认 根据指纹图谱的分析结果, 分别将单味药供试品溶液、相应缺单味药的阴性供试品溶液和 ZXGD 供试品溶液的指纹图谱进行叠加, 对共有峰进行归属, 结果见图 2。ZXGD 中共有 17 个共有峰, 其中 1、8、9、11、15 号峰来自枳实; 12~14 号峰来自桂枝; 5、6、10、16、17 号峰来自厚朴; 4 号峰来自瓜蒌; 2、3 号峰在枳实、薤白、瓜蒌中均存在; 7 号峰在枳实、厚朴中均存在。

将混合对照品溶液和 ZXGD 供试品溶液的指纹图谱进行叠加, 对共有峰进行指认, 结果见图 3。

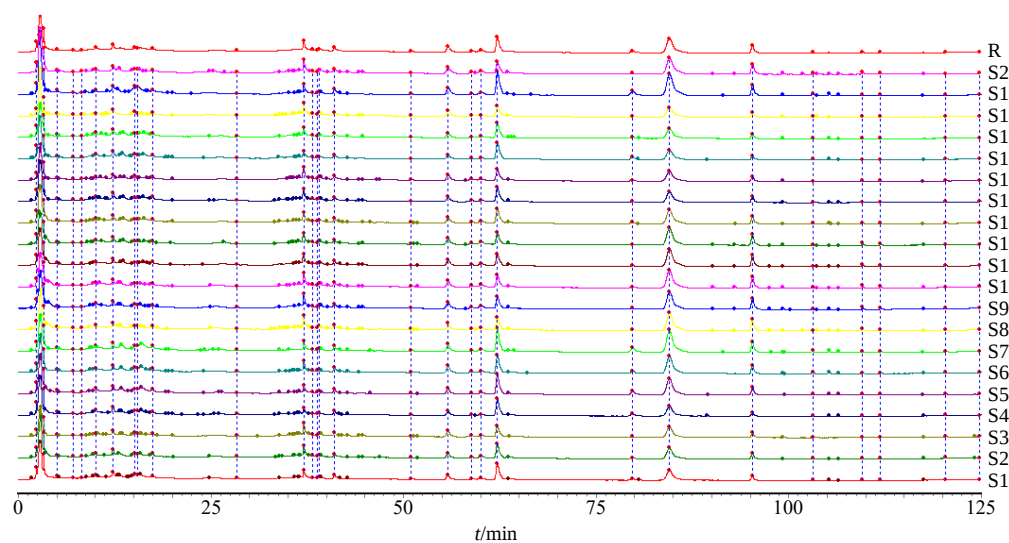


图1 20批ZXGD的指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprints of 20 batches of ZXGD

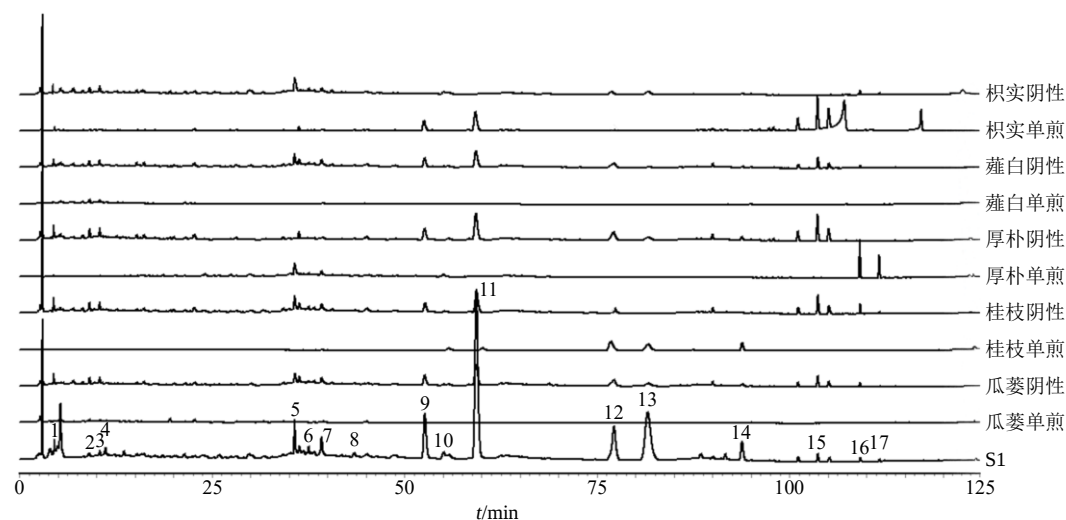


图2 ZXGD 专属性色谱图

Fig. 2 ZXGD specific chromatogram

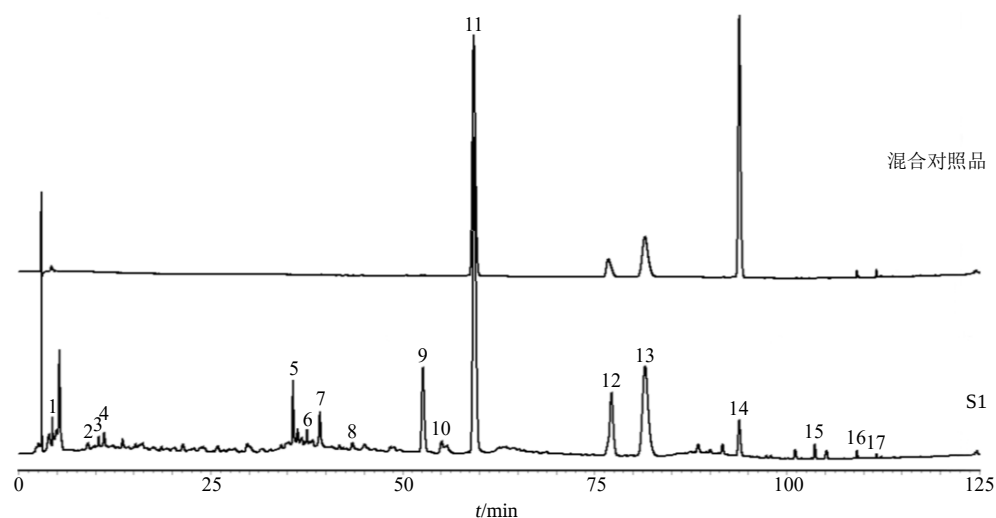


图3 混合对照品及ZXGD 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed reference substance and ZXGD

对照品指纹图谱共指认出 7 个共有峰, 分别是 1 号峰辛弗林、11 号峰橙皮苷、12 号峰肉桂酸、13 号峰桂皮醛、14 号峰邻甲氧基肉桂醛、16 号峰和厚朴酚、17 号峰厚朴酚。因此得到 ZXGD 共有峰的归属和指认结果见表 1。

2.7 网络药理学预测分析

2.7.1 化合物-靶点的预测

通过检索 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中辛弗林、橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛、和厚

表 1 ZXGD 共有峰归属

Table 1 ZXGD common peak attribution

峰号	来源	化合物	峰号	来源	化合物
1	枳实	辛弗林	10	厚朴	未指认
2	枳实、薤白、瓜蒌	未指认	11	枳实	橙皮苷
3	枳实、薤白、瓜蒌	未指认	12	桂枝	肉桂酸
4	瓜蒌	未指认	13	桂枝	桂皮醛
5	厚朴	未指认	14	桂枝	邻甲氧基肉桂醛
6	厚朴	未指认	15	枳实	未指认
7	枳实、厚朴	未指认	16	厚朴	和厚朴酚
8	枳实	未指认	17	厚朴	厚朴酚
9	枳实	未指认			

朴酚、厚朴酚 7 个化合物的 SMILES, 并将 SMILES 分别导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测分析相对应的靶点, 去除重复靶点, 共得到与 7 个化合物相关的 231 个作用靶点。

2.7.2 蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

将筛选出的 231 个作用靶点, 导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/cgi/input.pl>) 构建蛋白 PPI 网络, 选择物种为 “Homo sapiens”, 选择隐藏网络中无联系节点, 最小交互值 (minimum required interaction score) 为最高置信度 (highest confidence) >0.9, 获得 PPI 的网络图, 见图 4, 共获得 231 个节点, 6788 条边。将上述分析结果以 TSV 格式导入 Cytoscape 3.7.2 软件中, 并利用此软件筛选出度 (degree) 参数 ≥10, 介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 均大于中位数的靶点共 34 个作为核心靶点, 结果见表 2。

2.7.3 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) 通路分

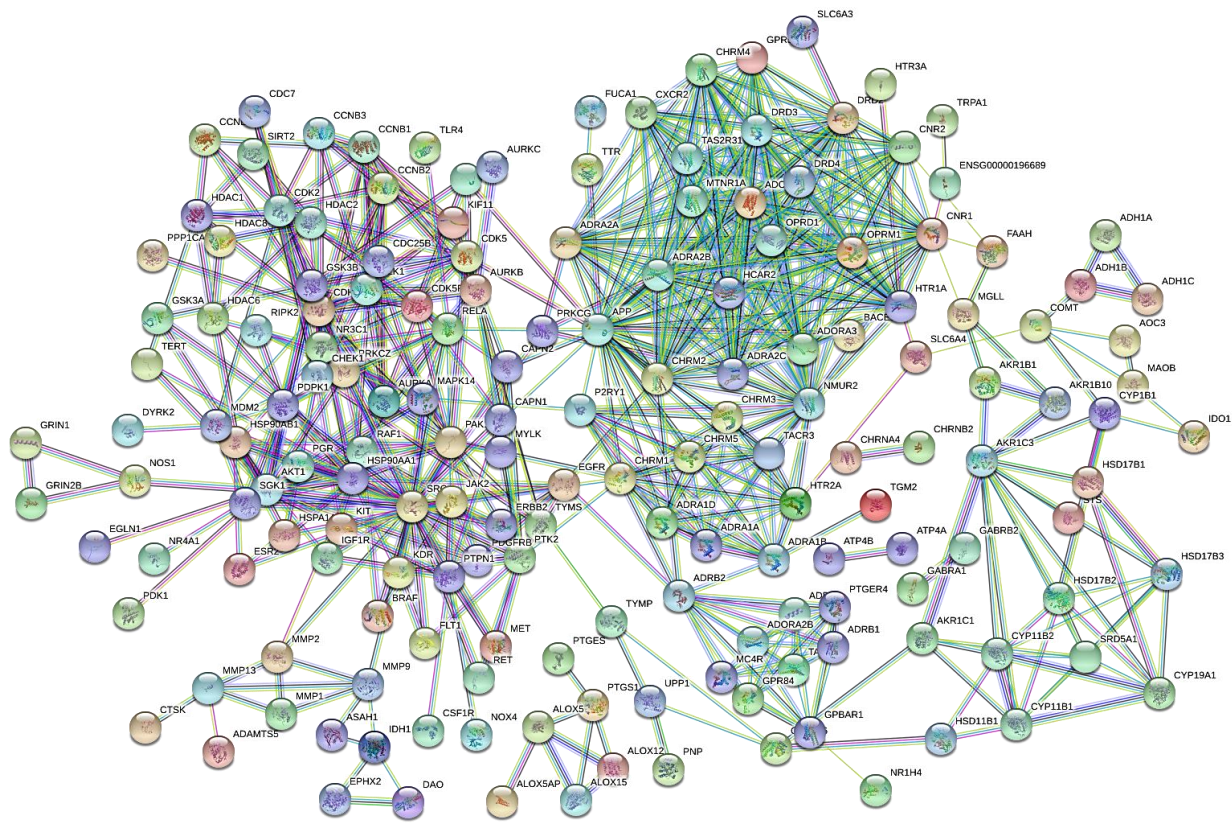


图 4 靶点 PPI 网络图

Fig. 4 Target PPI network

表 2 核心靶点性质
Table 2 Core target properties

靶点	名称	度值	介数中心性	接近中心性
NMUR2	neuromedin U receptor 2	30	0.024 8	0.329 8
ADRA2A	alpha-2a adrenergic receptor	22	0.006 9	0.319 1
APP	beta amyloid A4 protein	37	0.235 4	0.364 3
HTR1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A	23	0.049 7	0.307 2
DRD2	dopamine receptor D2	22	0.012 7	0.300 8
CHRM2	muscarinic acetylcholine receptor M2	23	0.070 5	0.336 2
CNR2	cannabinoid receptor 2	22	0.005 5	0.300 8
ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B	22	0.006 9	0.319 1
CNR1	cannabinoid receptor 1	24	0.114 9	0.310 9
ADRA2C	adrenoceptor alpha 2C	22	0.006 9	0.319 1
ADRB2	adrenoceptor alpha 2B	12	0.109 7	0.301 9
P2RY1	purinergic receptor P2Y1	11	0.014 7	0.315 3
CHRM1	muscarinic acetylcholine receptor M1	14	0.126 7	0.360 1
ADRA1B	adrenoceptor alpha 1B	12	0.021 6	0.312 1
HTR2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	11	0.069 7	0.317 2
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	19	0.092 5	0.308 4
AURKA	aurora kinase A	13	0.039 3	0.301 3
RAF1	serine/threonine-protein kinase RAF	10	0.004 7	0.306 0
PAK1	serine/threonine-protein kinase PAK 1	14	0.037 6	0.339 1
HSP90AA1	heat shock protein HSP 90-alpha	21	0.066 3	0.334 8
PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	10	0.010 6	0.307 2
PTPN1	protein-tyrosine phosphatase 1B	10	0.031 3	0.308 4
SRC	tyrosine-protein kinase SRC	32	0.256 6	0.372 0
CDK5	cyclin dependent kinase 5	13	0.085 6	0.339 8
RELA	nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit	10	0.071 7	0.342 0
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	12	0.011 2	0.292 4
CDC25B	dual specificity phosphatase Cdc25B	10	0.005 6	0.289 1
CCNB1	cyclin B1	12	0.008 4	0.288 6
PLK1	Polo like kinase 1	10	0.005 7	0.284 9
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	19	0.116 1	0.334 0
CCNB2	cyclin B2	11	0.006 5	0.288 1
JAK2	Janus kinase 2	11	0.015 8	0.306 0
PTK2	focal adhesion kinase 1	15	0.022 0	0.323 0
NR3C1	glucocorticoid receptor	11	0.011 4	0.296 8

析 将筛选得到的 34 个核心靶点利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 对其进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 见图 5、6。GO 功能富集分析可以用于描述基因靶点在生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function,

MF) 3 大层面的功能。KEGG 通路富集分析除了可以对基因本身功能进行注释, 也可以得到与基因靶点相关的信号通路。富集分析均以 $P < 0.01$ 具有统计学意义。

在 GO 富集分析中, 共得到 40 个 GO 条目, 其中 BP 占 20 个, CC 占 9 个, MF 占 11 个。生物过

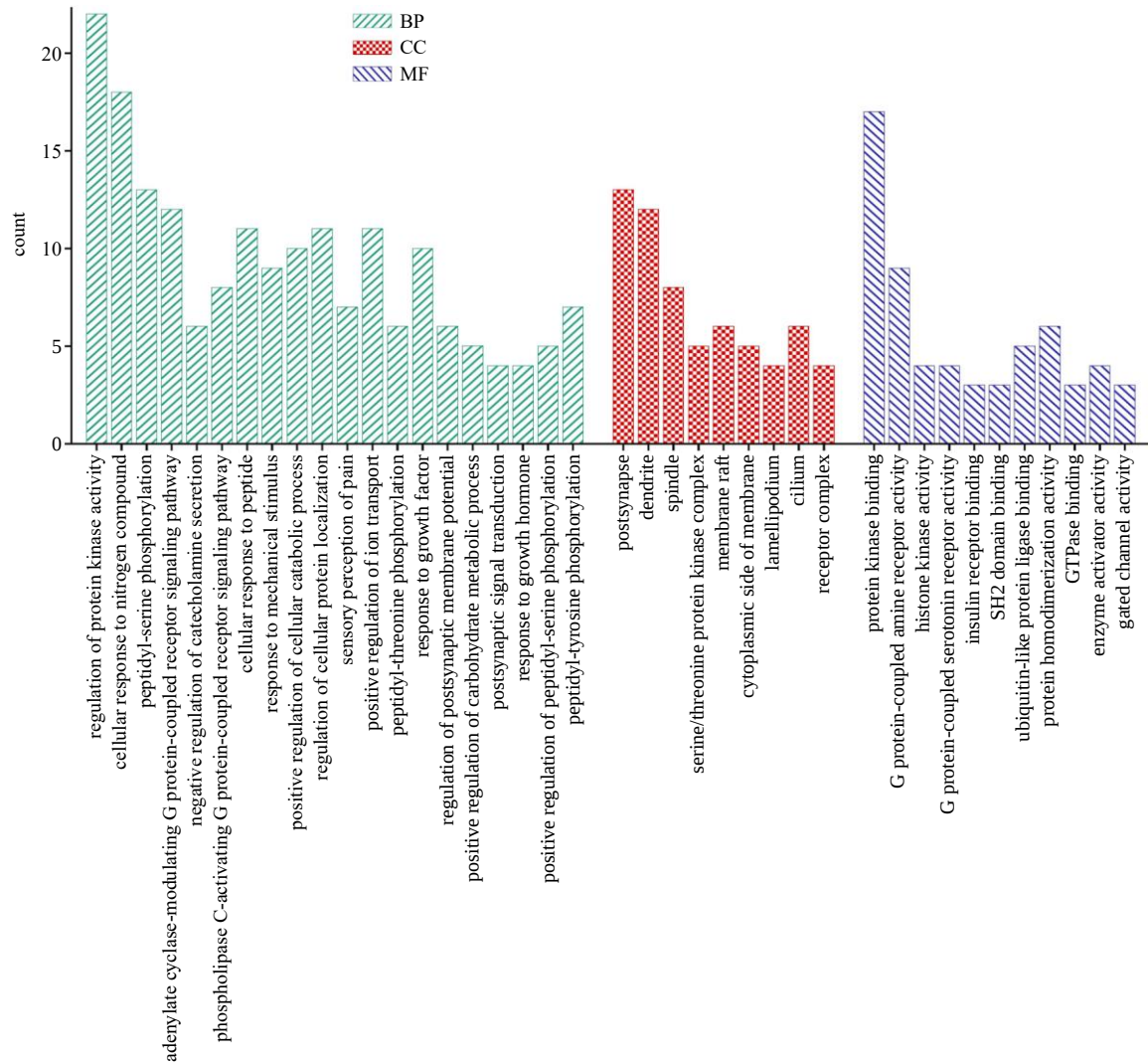


图 5 ZXGD 核心靶点 GO 功能富集分析

Fig. 5 Analysis of GO function enrichment of ZXGD core targets

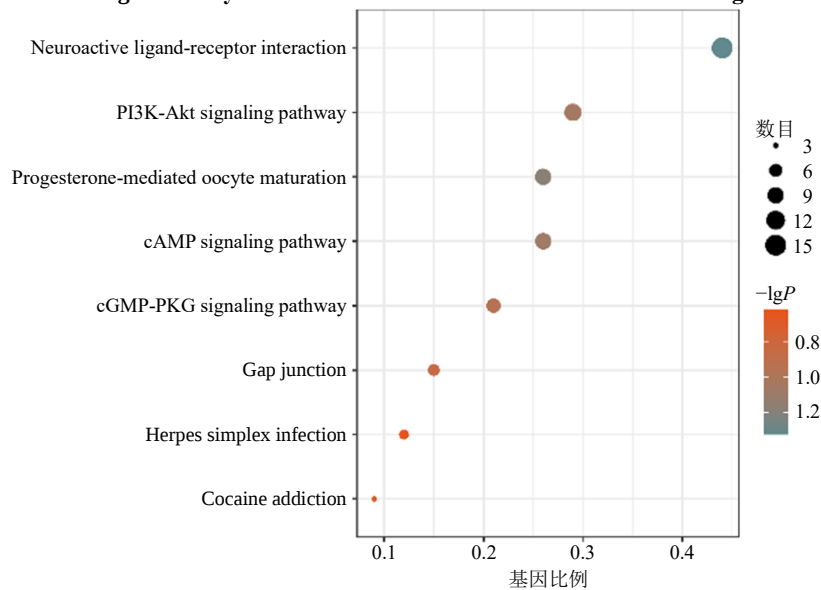


图 6 KEGG 富集通路分析结果

Fig. 6 KEGG enrichment pathway analysis result

程显著富集在蛋白激酶活性调节、细胞对氮化合物的反应、肽基丝氨酸磷酸化和腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路等过程；细胞组成显著富集在突触后膜、树突等区域；分子功能显著富集在蛋白激酶结合、G 蛋白偶联受体活性和蛋白质同源二聚活性等功能。

在 KEGG 富集分析中，共得到 8 条主要通路。富集到的通路主要涉及神经活性配体-受体相互作用（neuroactive ligand-receptor interaction）、环腺苷酸信号通路（cAMP signaling pathway）、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶通路（PI3K-Akt signaling pathway）等，表明 34 个核心靶点可能是主要通过调节这些通路来起到治疗或干预疾病的作用。

2.7.4 成分-靶点-通路网络构建 根据筛选得到的 ZXGD 中 7 个化合物、34 个核心靶点和 8 条代谢通路，使用 Cytoscape 3.7.2 软件，并根据化合物、靶点以及信号通路之间的连接度，构建 ZXGD 中的“成分-靶点-通路”可视化网络图，见图 7。由图可知，ZXGD 是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用达到发挥治疗作用的目的。在 7 个化合物中，厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林、邻甲氧基肉桂醛 4 个成分有较高的连接度；在 34 个核心靶点中，RAF1、DRD2、RELA、CHRM2、ADRB2、CHRM1 的连接度也高于其他靶点；在 8 条代谢通路中，神经活性配体-受体相互作用、孕酮介导的卵母细胞成熟、环腺苷酸信号通路、PI3K-Akt 通路、cGMP-PKG 信

号通路、缝隙连接的连接度相对较高。

2.7.5 整合分析 ZXGD 主治胸痹，现代临床治疗较为广泛。对治疗心脏相关疾病^[12-15]、消化系统疾病^[16-17]、呼吸系统疾病^[18-19]及代谢性慢性疾病^[20]均有显著疗效。GO 富集分析中显示，ZXGD 对蛋白激酶活性调节过程、细胞对氮化合物的反应过程、突触后膜区域等途径具有广泛调节的作用。在 KEGG 富集分析中显示，ZXGD 主要调节神经活性配体-受体相互作用、环腺苷酸信号通路、缝隙连接等相关信号通路。

研究发现，神经活性配体-受体相互作用通路与胃癌患者的肿瘤突变负荷（tumor mutation burden, TMB）关系密切^[21]，还可参与非小细胞肺癌的病因学，使得其在肿瘤的 IA、IIA、IIIB 和 IV 阶段被激活。而孕酮介导的卵母细胞成熟可在肺腺癌的所有阶段（IA、IB、IIA、IIB、IIIA、IIIB 和 IV）都可被激活^[22]。环腺苷酸信号通路在促进细胞的生存、分化等方面发挥了关键的作用，同时还可以修复神经元的损伤，起到改善衰老、提高记忆能力和认知能力的作用^[23]。Wang 等^[24]实验研究已经证明还可以通过激活环腺苷酸信号通路，抑制炎症因子的释放，从而预防小鼠急性肺损伤和慢性阻塞性肺疾病。通过激活 PI3K-Akt 通路可以促进胰岛素的分泌和减少肝细胞的脂质积累，产生抗糖尿病的活性^[25]。心肌缺血再灌注损伤的主要调控机制是细胞的凋亡和自噬，而 PI3K-Akt 通路是可以破坏心肌缺血再灌注损伤疾病的自噬和凋亡，从而起到治疗作用^[26]。PI3K 通路还可以调节抗氧化酶来抵抗氧化应激，从而发挥心血管保护作用。cGMP-PKG 信号通路可能是调节不同的生物学功能来参与心力衰竭的发病机制。在心肌缺血再灌注损伤中，缝隙连接可以增强细胞的通透性，促进离子在细胞之间的传递，从而导致钙超载，而 ZXGD 可以对缝隙连接产生保护作用，干预钙超载传递和扩散过程，对心肌产生明显的保护作用，最终产生抗心肌缺血再灌注损伤的作用^[27]。另有研究表明，环腺苷酸信号通路、PI3K-Akt 通路和 cGMP-PKG 信号通路均是慢性心力衰竭疾病相关作用通路^[28]，而且神经活性配体-受体相互作用通路和 PI3K-Akt 通路可以修复神经血管平滑肌坏死、脂质代谢、炎症等途径从而发挥抗冠心病的潜力^[29]。

上述文献研究表明，网络药理学预测的结果与现有相关文献较为接近，说明该研究方法具有一定

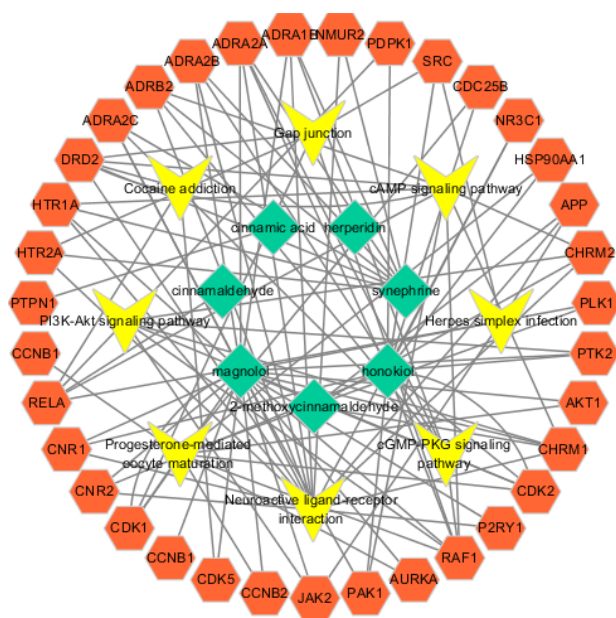


图 7 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 7 Network diagram of “component-target-pathway”

的准确性和可靠性,同时也与中药整体性的观念相契合,为进一步阐述 ZXGD 的物质基础提供了参考。ZXGD 中多个关键性成分可作用于多个核心靶点,从而干预多个作用通路,起到治疗或干预疾病的作用。结合 Q-Marker 的基本要求、指纹图谱和上述网络药理学分析,故可初步预测厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林、邻甲氧基肉桂醛是 ZXGD 潜在的 Q-Marker。

3 讨论

中药质量是中药及相关产业的生命线,质量的优劣可制约和影响中药产业的健康和发展。提高中药质量,就是做好顶层设计。中药 Q-Marker 的建立可以促进中药标准的质量控制研究,加强中药质量评价体系的建立。

本实验在优化供试品溶液提取条件时,分别考察了不同比例甲醇(60%、70%、80%)对提取率的影响,最后结果表明,以 70%甲醇作为提取溶剂时,各色谱峰峰面积较高,提取率较好,故而选择 70%甲醇作为提取溶剂。本实验在优化色谱条件时,考察了不同的检测波长(214、254、290 nm),不同厂家的色谱柱(Kromasil C₁₈、Hanbon Heder ODS-2、Waters XBridge C₁₈),不同的流动相系统(甲醇-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-水),不同柱温(25、30、35 ℃)对色谱峰的影响。考察结果表明,选取波长 290 nm、Kromasil C₁₈ 色谱柱、乙腈-水流动相、温度为 30 ℃时,色谱峰峰形良好、分离度佳、基线平稳。

在进行色谱峰归属分析时发现,2、3 号峰在枳实饮片、薤白饮片、瓜蒌饮片中均存在,7 号峰在枳实饮片和厚朴饮片中均存在,可能是由于枳实、薤白和瓜蒌,枳实和厚朴中存在结构、性质相类似的成分,目前选择的色谱条件未能将其分开,或者不同药味中存在同一种化学成分,因此对这 3 个峰的归属产生困难。后期将采用双阴性实验等对这 3 个峰的归属进行进一步的研究和探讨。

本实验通过建立 ZXGD 的指纹图谱,结合网络药理学研究,ZXGD 中厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林、邻甲氧基肉桂醛 4 个成分均具有传递性和溯源性,可初步预测厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林、邻甲氧基肉桂醛为 ZXGD 的潜在 Q-Marker。为后期对 ZXGD 的质量控制提供依据和参考,也为深入研究 ZXGD 的作用机制提供理论的支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 东汉·张仲景. 金匱要略 [M]. 何任, 何若苹整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 31-32.
- [2] 陈建维, 刘圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [3] 周宏园. 枳实薤白桂枝汤加味治疗冠心病不稳定型心绞痛的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [4] 胡欣妍. 血府逐瘀汤合枳实薤白桂枝汤对不稳定型心绞痛患者颈动脉斑块的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(4): 333-334.
- [5] 奚肇庆, 曹世宏, 韩树人, 等. 枳实薤白桂枝汤合人参汤治疗慢性支气管炎 30 例临床观察 [J]. 南京中医药大学学报, 1996, 12(4): 20-21.
- [6] 谢芳萍. 枳实薤白桂枝汤对 ET-1 诱发家兔急性心肌缺血的保护作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [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] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [9] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [10] 李秀云, 章新友, 吴地尧, 等. 中药复方网络药理学研究的文献分析 [J]. 中国药房, 2021, 32(2): 182-189.
- [11] Zhang B, Wang X, Li S. An integrative platform of TCM network pharmacology and its application on a herbal formula, Qing-Luo-Yin [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 456747.
- [12] 张杰. 枳实薤白桂枝汤加减治疗痰浊内阻冠心病不稳定型心绞痛 68 例 [J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(12): 890.
- [13] 马春亚, 陆曙. 经方在心血管疾病中的应用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(1): 98-100.
- [14] 陈伟, 覃仕化. 保元汤合枳实薤白桂枝汤加减治疗中-重度气虚血瘀型慢性心衰的临床疗效观察 [J]. 心血管病防治知识: 学术版, 2019, 9(32): 39-40.
- [15] 潘扬, 张超, 陆文, 等. 心肌炎从肺论治验案 3 则 [J]. 中医药导报, 2016, 22(18): 102-103.
- [16] 肖梦丽, 赵迎盼, 姚梦丹, 等. 中医药治疗功能性消化不良的临床文献研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10): 1175-1181.
- [17] 吴宗山. 枳实薤白桂枝汤临床新用 [J]. 甘肃中医, 2009, 22(8): 44.
- [18] 奚肇庆, 曹世宏, 韩树人, 等. 枳实薤白桂枝汤合人参汤治疗慢性支气管炎 30 例临床观察 [J]. 南京中医药大学学报, 1996, 12(4): 20-21.

- [19] 贾臻, 任小清, 任杰. 枳实薤白桂枝汤联合低分子肝素治疗肺栓塞临床研究 [J]. 河南中医, 2017, 37(2): 210-212.
- [20] 夏寒星. 枳实薤白桂枝汤对高脂血症调脂疗效的临床观察 [J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(6): 50-51.
- [21] Yu J, Zhang Q Y, Wang M C, *et al.* Comprehensive analysis of tumor mutation burden and immune microenvironment in gastric cancer [J]. *Biosci Rep*, 2021, doi: 10.1042/bsr 20203336.
- [22] Yu B, Li T, Chen J, *et al.* Identification of activated pathways in lung adenocarcinoma based on network strategy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2020, 16(4): 793-799.
- [23] 王继凤, 刘晓冉, 隋欣, 等. 基于 cAMP/PKA/CREB 信号通路独参汤对衰老模型大鼠认知功能障碍的影响 [J/OL]. 吉林大学学报: 医学版, 2021-07-03. <https://cc0eb1c56d2d940cf2d0186445b0c858.casb.njucm.edu.cn/kcms/detail/22.1342.R.20210525.0920.004.html>.
- [24] Wang X F, Song S D, Li Y J, *et al.* Protective effect of quercetin in LPS-induced murine acute lung injury mediated by cAMP-EPAC pathway [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 1093-1103.
- [25] Zhang Y Y, Gao S, Liang K N, *et al.* Exendin-4 gene modification and microscaffold encapsulation promote self-persistence and antidiabetic activity of MSCs [J]. *Sci Adv*, 2021, doi: 10.1126/sciadv.abi4379.
- [26] Hou J Y, Zeng C T, Zheng G H, *et al.* LncRNAs participate in post-resuscitation myocardial dysfunction through the PI3K/Akt signaling pathway in a rat model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 689531.
- [27] 张恒, 李媛媛, 王笑, 等. 枳实薤白桂枝汤通过保护缝隙连接干预心肌缺血再灌注钙超载的研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 2-7.
- [28] 马颖, 王博龙, 王亮, 等. UHPLC-Q-TOF-MS 整合网络药理学研究升陷汤有效成分及其治疗慢性心力衰竭的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2489-2500.
- [29] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

[责任编辑 郑礼胜]