

• 数据挖掘与循证医学 •

基于“干法+湿法实验”和“配位化学”探讨石膏解热配伍规律及物质基础

皮雯敏, 韩娜娜, 袁枝花, 王志家, 林晓钰, 雷海民, 王鹏龙*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 整理分析含有石膏的古方, 挖掘石膏在治疗热证时的配伍用药规律, 并结合“有机小分子活性成分与无机金属离子”间的配位化学探究其解热的物质基础。方法 收集《中医方剂大辞典》中含有石膏且具有解热作用的方剂, 构建方药数据库, 利用 Microsoft Excel 2019 统计各中药出现频次, 通过 SPSS Modeler 18.0 对方剂中的药物进行关联规则分析, 得到核心药物组合。运用网络药理学分析核心药物组合, 得到核心靶点, 并进行蛋白互作分析以及基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析; 用等温滴定量热仪滴定核心药物组合, 验证其是否发生反应; 梳理中药有机活性成分-金属配合物研究进展, 探究石膏解热物质基础。结果 共纳入方剂 1440 首, 以汤剂、散剂为主; 涉及中药 770 味, 其中与石膏配伍的高频中药 29 味 (频次 ≥ 100), 以清热药、补虚药、解表药为主。关联规则分析得到二项关联 16 条, 其中核心药物组合“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”的有效成分分别为 43、99 个, 与发热的交集靶点有 51、94 个。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 2 个核心药物组合很可能以调控核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路为主, 同时调控白细胞介素 (inter leukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 等细胞因子及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 信号通路、TNF 信号通路等, 协同发挥作用。以核心药物组合“石膏-黄芩”为例, 等温滴定量热实验结果显示黄芩和石膏互作强烈, 而其主要有效成分黄芩苷和钙离子也发生了配位反应, 证明黄芩中的活性成分和石膏中的金属离子可发生相互作用。通过梳理中药有机活性成分-金属配合物研究进展, 推测石膏药效的发挥与其中金属元素和配伍中药有机活性成分形成配合物密切相关。结论 利用“干法+湿法实验”结合“配位化学”理念, 探究石膏解热配伍规律及物质基础, 石膏在自身发挥解热作用的同时, 其中丰富的元素可与配伍中药中的黄酮类、蒽醌类、多糖类等有机活性成分形成配合物, 从而增强生物活性, 发挥协同作用, 以期为石膏解热物质基础及机制的探究提供新的方向。

关键词: 石膏; 数据挖掘; 网络药理学; 配位化学; 解热; 配伍规律; 石膏-黄芩; 石膏-甘草

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1471-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.023

Analysis of antipyretic compatibility law and material basis of *Gypsum Fibrosum* based on “dry-method + wet-method” and “coordination chemistry”

PI Wen-min, HAN Na-na, YUAN Zhi-hua, WANG Zhi-jia, LIN Xiao-yu, LEI Hai-min, WANG Peng-long

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To sort out and analyze the ancient prescriptions containing Shigao (*Gypsum Fibrosum*), to explore the rule of compatibility of *Gypsum Fibrosum* in the treatment of fever, and its antipyretic material basis combined with coordination chemistry between the active components of organic small molecules and inorganic metal ions. **Methods** The prescriptions containing *Gypsum Fibrosum* and antipyretic effect in the *Dictionary of Traditional Chinese Medicine Prescriptions* were collected, and the prescription database was constructed. The occurrence frequency of each traditional Chinese medicine (TCM) was counted by Microsoft Excel 2019, and the core drug combinations were obtained by analyzing the association rules of the drugs in the prescription by SPSS Modeler 18.0.

收稿日期: 2021-10-20

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7202116); 国家自然科学基金项目 (82073974); 北京市科技新星计划 (Z201100006820026); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2018-QNRC2-B08); 北京中医药大学重点攻关项目 (2020-JYB-ZDGG-044); 中央高校基金科研业务项目 (杰出青年基金 BUCM-2019-JCRC002, 岐黄团队 2019-JYB-TD005); 北京市中药基础与新药研究重点实验室

作者简介: 皮雯敏, 女, 硕士研究生在读, 研究方向为中药复方活性物质基础表征研究。Tel: 18810973813 E-mail: wenminpi@163.com

***通信作者:** 王鹏龙, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为基于弱键化学探究中药复方物质基础及其配伍机制。

Tel: (010)53912100 E-mail: wpl581@126.com

The core drug combinations were analyzed by network pharmacology, and the core targets were obtained. Protein interaction analysis and gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were carried out. The core drug combination was titrated by isothermal titration calorimeter to verify whether it reacted or not. The research progress of organic components of TCM-metal complex was summarized, and the material basis of antipyretic substance of *Gypsum Fibrosum* was explored. **Results** Through screening 1440 prescriptions were included, mainly decoctions and powders. A total of 770 TCMs were involved, including 29 high-frequency drugs compatible with *Gypsum Fibrosum* (frequency ≥ 100), which were mainly heat-clearing TCMs, deficiency-tonifying TCMs and exterior-releasing TCMs. Sixteen two-item associations were obtained by association rule analysis, in which the active components of the core drug combinations “*Gypsum Fibrosum*-Huangqin (*Scutellariae Radix*)” and “*Gypsum Fibrosum*-Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)” were 43 and 99 respectively, and 51 and 94 targets were intersected with fever. The results of GO and KEGG enrichment analysis showed that the combinations of the two core drugs probably regulated nuclear factor- κ B (NF- κ B) signal pathway mainly, cytokines such as inter leukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), nitric oxide (NO), mitogen activated protein kinases (MAPK) signal pathway, TNF signal pathway were played a synergistic role. Taking the core drug combination “*Gypsum Fibrosum*-*Scutellariae Radix*” as an example, the results of isothermal titration calorimetry test showed that there was a strong interaction between *Scutellariae Radix* and *Gypsum Fibrosum*, and the coordination reaction between baicalin and calcium ion also occurred. It was proved that the active components of *Scutellariae Radix* can interact with the metal ions in *Gypsum Fibrosum*. Through combing the research progress of organic active components of TCM-metal complexes, it was inferred that the efficacy of *Gypsum Fibrosum* was closely related to the formation of complexes between metal elements and organic components of TCM. **Conclusion** The “dry-method + wet-method” combined with the concept of “coordination chemistry” were used to explore the antipyretic compatibility law and material basis of *Gypsum Fibrosum*. It was considered that while *Gypsum Fibrosum* played an antipyretic role, rich elements could be partitioned with flavonoids, anthraquinones and polysaccharides in TCM to form complexes, so as to enhance biological activity and play a synergistic effect, with view to providing a new direction for the study of antipyretic material basis of *Gypsum Fibrosum*.

Key words: *Gypsum Fibrosum*; data mining; network pharmacology; coordination chemistry; antipyretic effect; compatibility law; *Gypsum Fibrosum*-*Scutellariae Radix*; *Gypsum Fibrosum*-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

矿物药作为中药的三大来源之一，资源丰富，功效明确，在中医药领域具有不可或缺的作用^[1]。自本次新型冠状病毒疫情爆发以来，中医药治疗取得了明显的疗效^[2]。在各省市公布的预防新型冠状病毒肺炎处方中，矿物药石膏的使用频率最高，占比为 33.93%^[3]。石膏作为清热药，口服具有清热泻火、除烦止渴的功效，主要用于外感热病的高热烦渴、肺热喘咳、胃火亢盛等症^[4]，临床应用历史悠久。其炮制品煅石膏具有收湿、生肌、敛疮、止血的功效，外用治疗溃疡不敛、湿疹瘙痒等症。由于石膏等矿物药的主要成分为金属元素，使其研究难度加大，尤其是其物质基础和作用机制，仍为目前矿物药研究的瓶颈，制约其发展^[5]。

矿物药石膏药效物质基础是中药尚未充分揭示的关键问题之一，我国学者曹治权^[6-7]很早便提出了中药配位化学学说，认为中药中的有机成分和微量元素形成的配合物是中药有效物质基础之一，其存在形态与生物活性密切相关。配位化学主要是研究金属原子或离子与含孤对电子的分子或离子通过配位键形成的化合物^[8]。金属离子和有机配体之间的配位组装由于同时具有无机和有机化合物的双重优

点，在药物递送、催化、核磁共振成像等方面具有独特的优势^[9-10]，引起了各国学者的广泛关注，其研究成果也为中医药揭示矿物药的物质基础和作用机制提供了参考和思路。为充分揭示石膏药效物质基础，本研究采用“配位化学”和“干法+湿法实验”相结合的研究模式，其中干法实验是指运用数据挖掘、网络药理学、分子模拟等技术手段收集信息加以分析的方法^[11]，区别于常规的实验室实验，即湿法实验。本研究旨在运用干法实验即数据挖掘和网络药理学的方法，结合湿法实验即等温滴定量热实验，再梳理目前金属离子与有机配体的研究成果，克服现有干法实验只能对单体成分进行分析而缺少对 2 个或多个成分自组装形成的配合物预测分析的现状，通过总结现有中药成分与金属配合物研究进展，演绎推导矿物药石膏的药效物质基础。总结分析石膏解热配伍规律的同时，探讨其解热的物质基础，以期对石膏的作用机制提供依据。

1 干法实验

1.1 资料与方法

1.1.1 数据采集 含石膏的方剂信息均来自于《中医方剂大辞典》^[12]，采用 Excel 2019 软件对数据进

行处理, 构建石膏方药数据库。

1.1.2 数据筛选 纳入标准: (1) 组成中含有石膏的方剂; (2) 方剂的方源、组成、主治完整; (3) 功效或主治中涉及到“大热”“泻火”“积热”等关键词; (4) 内服方剂。排除标准: (1) 方源、组成或主治不完整; (2) 外用方剂; (3) 重复方剂, 如方名不同但组成相同^[13]。

1.1.3 数据规范 由于中药中存在“同名异物”“同物异名”的现象, 因此, 依据《中国药典》^[4]和《中华本草》^[14], 将药材名称进行统一规范。

1.1.4 数据挖掘方法 用 Excel 2019 对石膏方药数据库进行频数分析, 得到石膏的常用配伍用药。通过 SPSS Modeler 18.0 进行关联规则分析, 得到核心药物组合, 结果用 Cytoscape 3.8.2 进行可视化。

1.1.5 网络药理学分析 通过 TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 数据库以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件进行筛选, 同时查找文献补充得到黄芩和甘草的活性成分及靶点信息^[15-16]。通过对石膏进行电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 分析^[17], 发现石膏中除含 Ca 以外, 含量较高的元素还有 Al、Mg、Fe、K、Na 等, 因此选择 Ca、Al、Mg、Fe、K、Na 为石膏的主要成分, 在 STITCH (<http://stitch.embl.de/>) 数据库中, 以 homo sapiens 为限定条件,

以 combined score ≥ 0.5 为筛选条件, 获得石膏的靶点信息。通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库以“fever”为关键词进行检索, 使用中位数对 relevance score 进行筛选, 获得疾病靶点信息。使用 Uniprot (<http://www.Uniprot.org>) 数据库统一规范靶点名称。将核心药物组合靶点和疾病靶点导入 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 二者取交集后获得潜在作用靶点, 绘制韦恩图。将活性成分和潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 绘制“中药-成分-靶点-疾病”网络图。再将潜在作用靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 限定物种为 homo sapiens, 选择置信度高于 0.9 的基因, 并根据中介中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC)、度 (degree) 筛选核心靶点。利用 DAVID 网站 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 限定物种为 homo sapiens, 结果以 $P < 0.05$ 进行筛选。

1.2 结果

1.2.1 数据筛选结果 从《中医方剂大辞典》中共收集符合标准的方剂 1440 首, 涉及 770 味中药, 总频数为 13 417, 其中与石膏配伍的高频中药 (频次 ≥ 100) 29 味, 统计结果见表 1。

表 1 与石膏配伍的高频中药 (频次 ≥ 100)

Table 1 High frequency traditional Chinese medicines compatible with *Gypsum Fibrosum* (frequency ≥ 100)

中药	频次	频率/%	方剂占比/%	中药	频次	频率/%	方剂占比/%
黄芩	525	3.91	36.46	黄连	154	1.15	10.69
甘草	521	3.88	36.18	犀牛角	140	1.04	9.72
炙甘草	429	3.20	29.79	白术	128	0.95	8.89
芍药	344	2.56	23.89	茯苓	126	0.94	8.75
知母	338	2.52	23.47	薄荷	125	0.93	8.68
栀子	292	2.18	20.28	生姜	119	0.89	8.26
人参	286	2.13	19.86	大黄	118	0.88	8.19
升麻	270	2.01	18.75	玄参	118	0.88	8.19
麻黄	261	1.95	18.13	桔梗	116	0.86	8.06
葛根	260	1.94	18.01	连翘	113	0.84	7.85
麦门冬	235	1.75	16.32	当归	111	0.83	7.71
防风	231	1.72	16.04	前胡	111	0.83	7.71
柴胡	224	1.67	15.56	肉桂	107	0.80	7.43
川芎	175	1.30	12.15	地骨皮	101	0.75	7.01
生地黄	161	1.20	11.18				

1.2.2 纳入方剂剂型分布 对符合标准的 1440 首方剂进行剂型分析, 涉及汤、散、丸、丹、膏、片 6 种剂型。其中汤剂占比最高, 其次为散剂, 而在散剂中煮散占绝大部分, 这符合石膏作为矿物药需先煎、久煎的用法, 统计结果见表 2。

表 2 石膏纳入方剂剂型分布

Table 2 Formulation distribution of *Gypsum Fibrosum* into prescriptions

剂型	频次	频率/%
汤剂	799	55.49
散剂	485	33.68
丸剂	100	6.94
丹剂	34	2.36
膏剂	18	1.25
片剂	4	0.28

1.2.3 高频中药功效分布 分析高频中药的功效, 结果显示, 与石膏配伍的中药以清热药、补虚药和解表药为主, 统计结果见表 3。

1.2.4 高频中药关联规则分析 将与石膏配伍的高频中药通过 SPSS Modeler 18.0 的 Apriori 算法进行关联分析, 设置参数支持度为 10%, 置信度为 90%, 最大前项数为 1, 挖掘出 16 个二项关联组合, 药物组合的提升度均大于 1, 说明其具有统计学意义^[18]。二项关联支持度最高的组合是“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”药对, 结果见表 4。此外, 通过 Cytoscape 3.8.2 构建高频中药的关联网络图, 清晰直观地反映了药物之间的关联程度, 见图 1。

1.3 “石膏-黄芩”和“石膏-甘草”核心配伍机制探讨

1.3.1 “中药-成分-靶点-疾病”网络构建 通过 TCMSP、STITCH 数据库和文献补充检索到“石

表 3 石膏配伍中药的功效分布

Table 3 Efficacy distribution of traditional Chinese medicine compatible with *Gypsum Fibrosum*

功效类型	味数	频次	频率/%	中药名称
清热药	9	1942	14.47	黄芩、知母、栀子、生地黄、黄连、犀牛角、玄参、连翘、地骨皮
补虚药	6	1710	12.75	甘草、炙甘草、人参、麦门冬、白术、当归
解表药	7	1490	11.11	升麻、麻黄、葛根、防风、柴胡、薄荷、生姜

表 4 石膏与配伍高频中药间的二项关联规则分析

Table 4 Binomial association rule analysis between *Gypsum Fibrosum* and compatible high frequency traditional Chinese medicines

前项	后项	支持度/%	置信度/%	提升度
黄芩	石膏	36.37	100	1.000 7
甘草	石膏	36.16	100	1.000 7
炙甘草	石膏	29.77	100	1.000 7
芍药	石膏	23.80	100	1.000 7
知母	石膏	23.46	100	1.000 7
栀子	石膏	20.26	100	1.000 7
人参	石膏	19.85	100	1.000 7
升麻	石膏	18.74	100	1.000 7
麻黄	石膏	18.11	100	1.000 7
葛根	石膏	18.08	100	1.000 7
麦门冬	石膏	16.31	100	1.000 7
防风	石膏	16.03	100	1.000 7
柴胡	石膏	15.54	100	1.000 7
川芎	石膏	12.14	100	1.000 7
生地黄	石膏	11.10	100	1.000 7
黄连	石膏	10.68	100	1.000 7

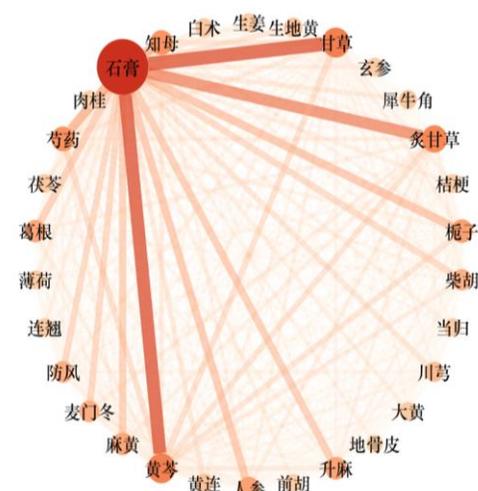


图 1 高频中药关联网络

Fig. 1 Association networks among high frequency traditional Chinese medicines

膏-黄芩”药对共涉及 43 个活性成分, 264 个靶点; “石膏-甘草”药对共涉及 99 个活性成分, 369 个靶点。以“fever”为关键词, 在 GeneCards 数据库检索到 943 个疾病靶点, 导入 Venny 2.1, 与“石膏-黄

芩”和“石膏-甘草”药对分别得到 51 和 94 个交集靶点，如图 2、3 所示。将活性成分和潜在作用靶点

导入 Cytoscape 3.8.2 软件，绘制“中药-成分-靶点-疾病”网络图，如图 4、5 所示。

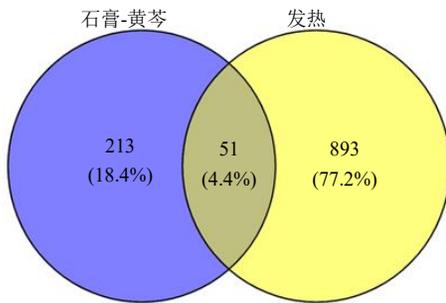


图 2 “石膏-黄芩”解热靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of antipyretic target of “Gypsum Fibrosus-Scutellariae Radix”

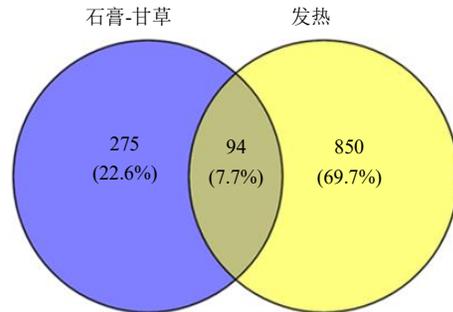


图 3 “石膏-甘草”解热靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of antipyretic target of “Gypsum Fibrosus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma”

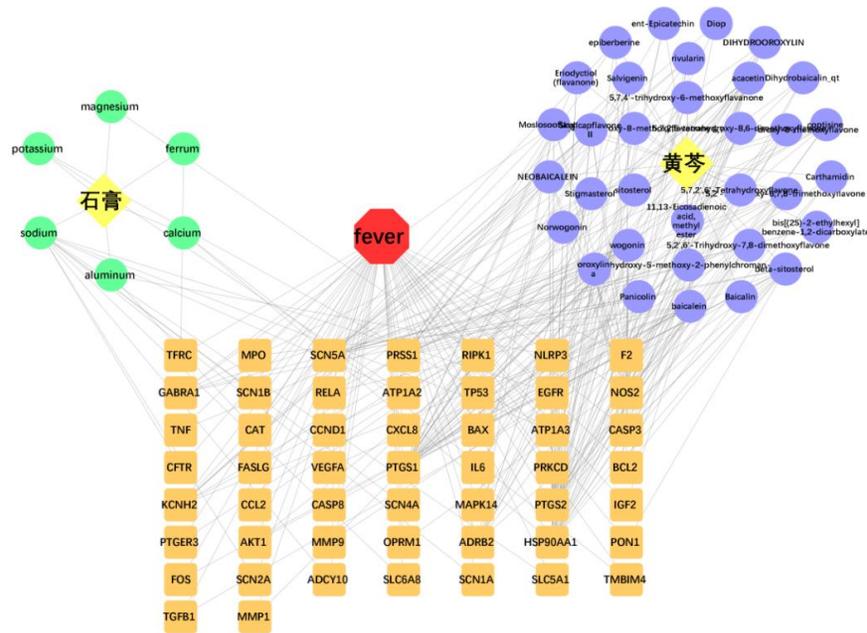


图 4 “石膏-黄芩”的中药-成分-靶点-疾病网络图

Fig. 4 Traditional Chinese medicine-ingredient-target-disease network of “Gypsum Fibrosus-Scutellariae Radix”

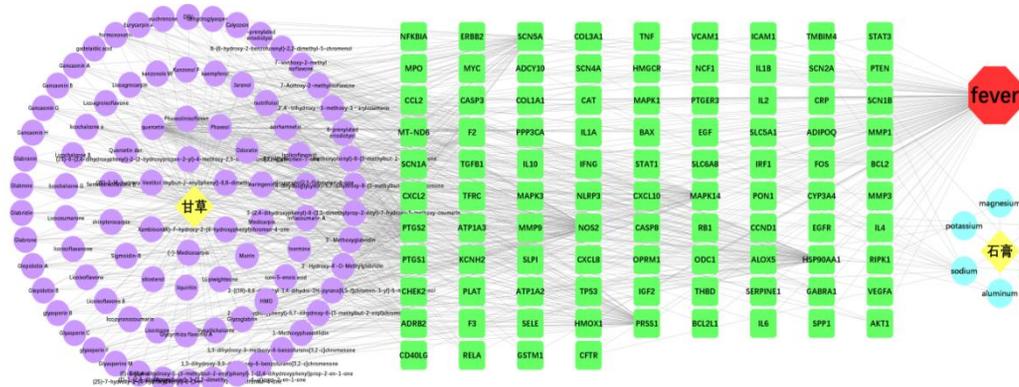


图 5 “石膏-甘草”药材-成分-靶点-疾病网络图

Fig. 5 Traditional Chinese medicine-ingredient-target-disease network of “Gypsum Fibrosus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma”

1.3.2 核心靶点筛选及 GO 和 KEGG 富集分析 将“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”的潜在作用靶点导入 STRING 数据库,分别筛选出 16 和 28 个核心靶点,如表 5 所示。二者网络拓扑值排名均靠前的靶点包括:肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、血管内皮生成因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 1(RAC-alpha serine/

threonine-protein kinase, AKT1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL6)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)。将核心靶点导入 DAVID 网站,进行 GO 和 KEGG 富集分析。以 $P < 0.05$ 为条件对 GO 分析结果进行筛选,得到“石膏-黄芩”药对生物过程 149 条,细胞组成 15 条,分子功能 24 条;“石膏-甘草”药对生物过程 263 条,细胞组成 21 条,分子功能 34 条。均选择 P 值排前的 15 条做条形图,如图 6、7 所示。

表 5 核心靶点

Table 5 Core targets

核心配伍	靶点个数	核心靶点
石膏-黄芩	16	TP53、RELA、VEGFA、TNF、CXCL8、EGFR、AKT1、IL6、FOS、MAPK14、CASP8、RIPK1、HSP90AA1、CCND1、TGFB1、SCN1B
石膏-甘草	28	STAT3、MAPK1、MAPK3、IL6、TNF、RELA、TP53、VEGFA、MAPK14、AKT1、FOS、EGFR、STAT1、CXCL8、HSP90AA1、IL1B、IL2、MYC、IL4、TGFB1、CCND1、PTGS2、EGF、CASP8、BCL2L1、MMP9、NOS2、ICAM1

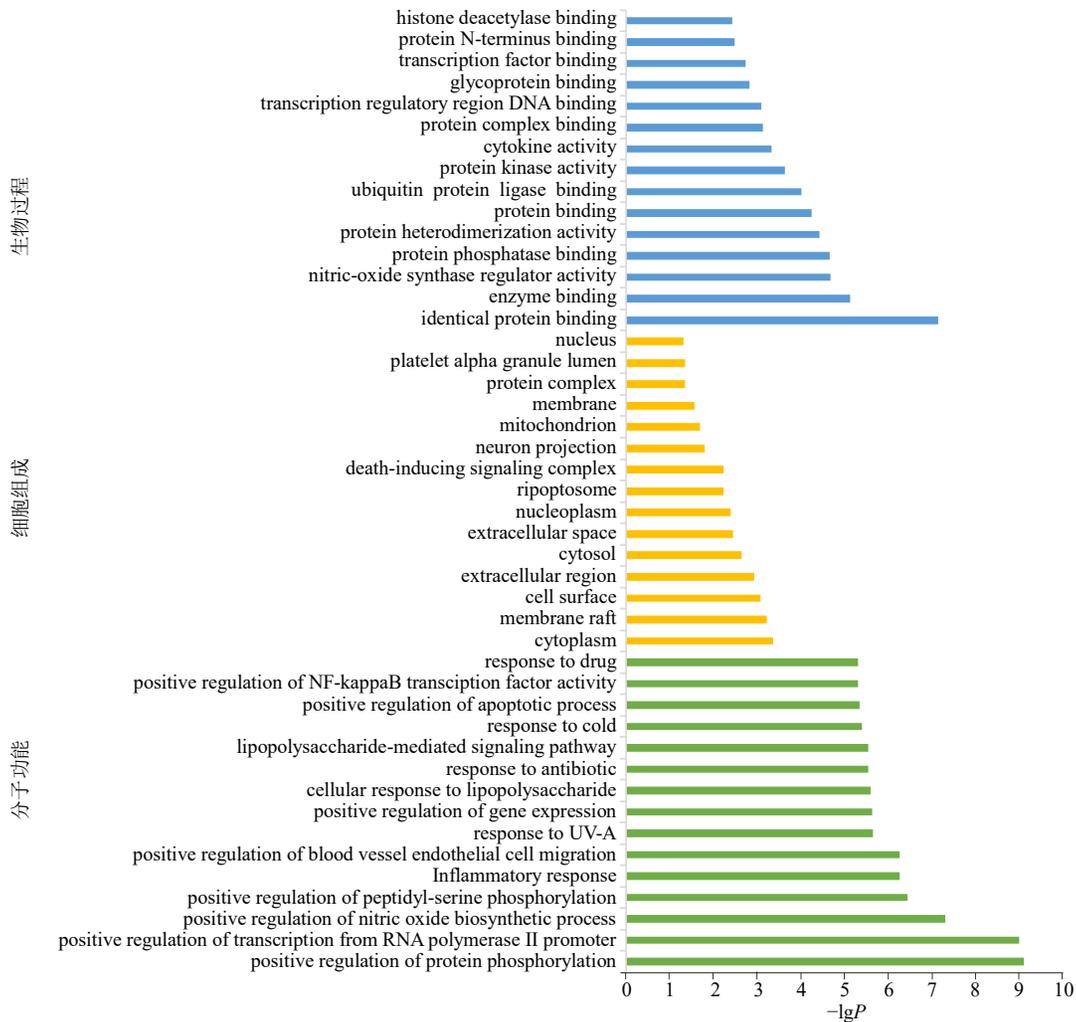


图 6 “石膏-黄芩”药对 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of “Gypsum Fibrosum-Scutellariae Radix”

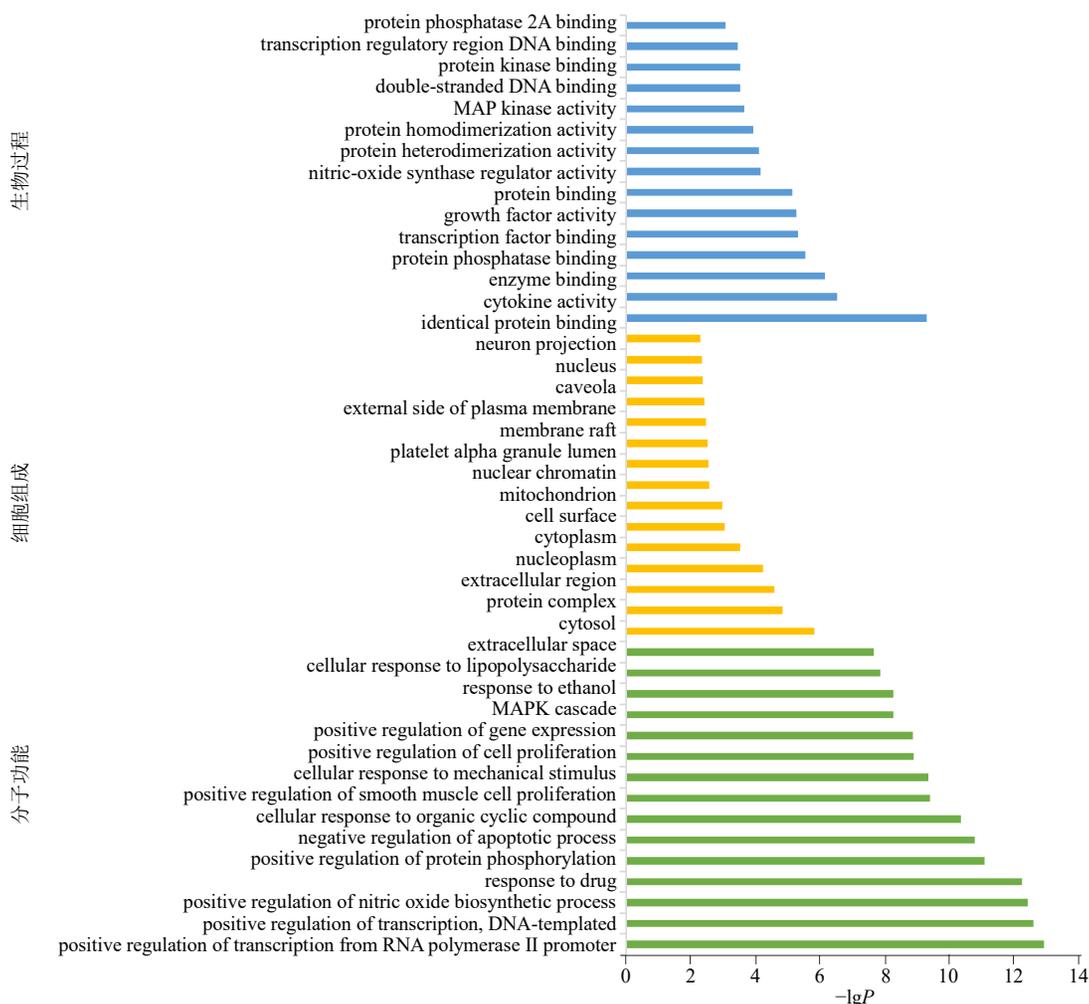


图7 “石膏-甘草”药对GO富集分析图

Fig. 7 GO enrichment analysis of “Gypsum Fibrosum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma”

结果显示,“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”药对均可通过对蛋白磷酸化、RNA聚合酶II启动子转录、一氧化氮合成等过程的正调控及调节炎症反应、细胞对脂多糖的应答反应来综合发挥作用。以 $P < 0.05$ 为条件对KEGG分析结果进行筛选,分别得到76和102条信号通路,选择P值排前的15条做气泡图,如图8、9所示。结果显示,“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”药对涉及的通路主要包括乙型肝炎、Toll样受体信号通路、癌症通路、NOD样受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等。

2 湿法实验

2.1 材料

2.1.1 药材与试剂 石膏为硫酸盐类矿物硬石膏族石膏,黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,均购自北京同仁堂,经北京中医

药大学雷海民教授鉴定,符合《中国药典》2020年版规定。无水氯化钙(质量分数 $\geq 96\%$,批号20200406)购自天津市大茂化学试剂厂,黄芩苷(质量分数 $\geq 98\%$,批号110715-200514)购自中国食品药品检定研究院。

2.1.2 仪器 NANO ITC等温滴定量热仪和脱气站 Degassing Station(美国TA公司); YP3002电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司)。

2.2 方法

2.2.1 样品溶液的制备 石膏和黄芩各称取12g,加8倍量水冷凝回流煎煮1h后,滤过得到药材水煎液。称取无水氯化钙4.44mg,溶于4mL去离子水,得到10mmol/L氯化钙溶液;称取黄芩苷3.57mg,调碱后溶于4mL去离子水,得到2mmol/L黄芩苷溶液。

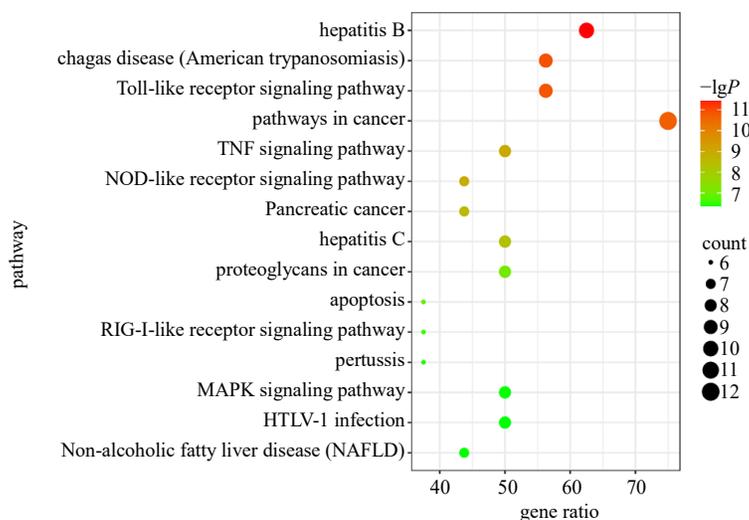


图8 “石膏-黄芩”药对 KEGG 富集分析图

Fig. 8 KEGG enrichment analysis of "Gypsum Fibrosum-Scutellariae Radix"

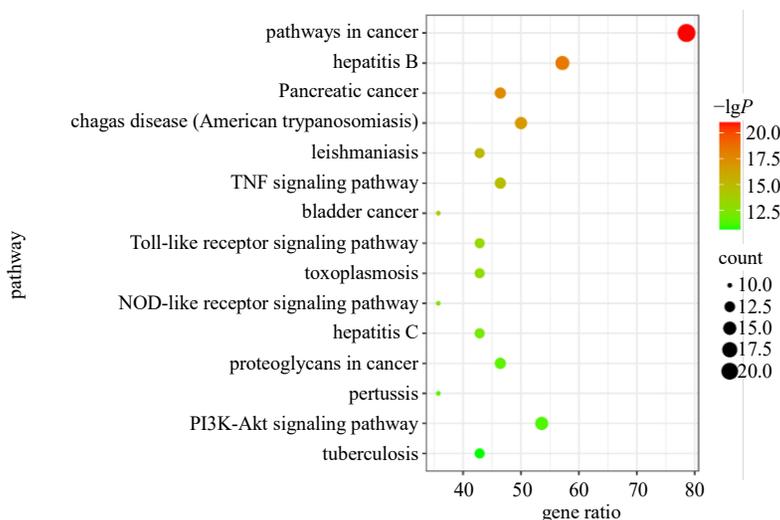


图9 “石膏-甘草”药对 KEGG 富集分析图

Fig. 9 KEGG enrichment analysis of "Gypsum Fibrosum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma"

2.2.2 等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 测定 将石膏和黄芩水煎液、氯化钙和黄芩苷溶液放入脱气站, 于 25 °C 条件下恒温脱气 20 min。将被滴定液于样品池中注入 300 μL, 滴定液于进样针中吸入 50 μL。搅拌速率为 200 r/min, 在 25 °C 条件下连续滴定 20 滴, 每滴 2.5 μL, 间隔时间为 240 s。

2.2.3 数据处理 在滴定过程中, ITC Run 软件会自动采集每次滴定的能量变化, 能量变化值曲线峰朝上代表该滴定过程为放热反应, 焓变 (dH) 为负值; 朝下则为吸热反应, dH 为正值。样品互滴结束后, 再扣除滴定液滴定空白去离子水的能量, 计算得到趋势线。

2.3 结果

黄芩水煎液滴定石膏水煎液结果如图 10 所示, 黄芩和石膏为放热反应, dH 为-1999 kJ/mol, 反应程度较强。为进一步探究“石膏-黄芩”药对中活性成分之间的相互作用, 以石膏和黄芩的主要有效成分钙离子和黄芩苷为例, 进行 ITC 滴定, 结果如图 11 所示, 黄芩苷和钙离子也为放热反应, dH 为-65.54 kJ/mol。由于药材水煎液中成分复杂多样, 所以与单体成分滴定相比, 反应程度更强。

3 中药有机成分-金属配合物

“干法实验”只能以中药中的单体成分为单位进行药效学机制分析, 但中药中的活性成分多以黄酮

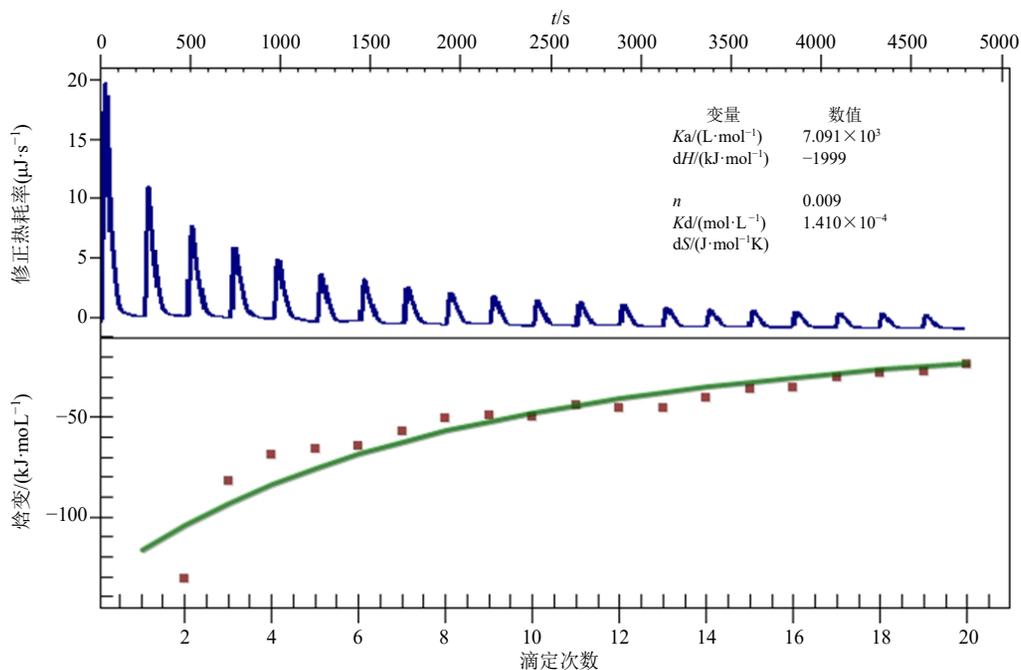


图 10 黄芩滴定石膏热量变化图

Fig. 10 Calorimetric titrations of *Scutellariae Radix* to *Gypsum Fibrosum*

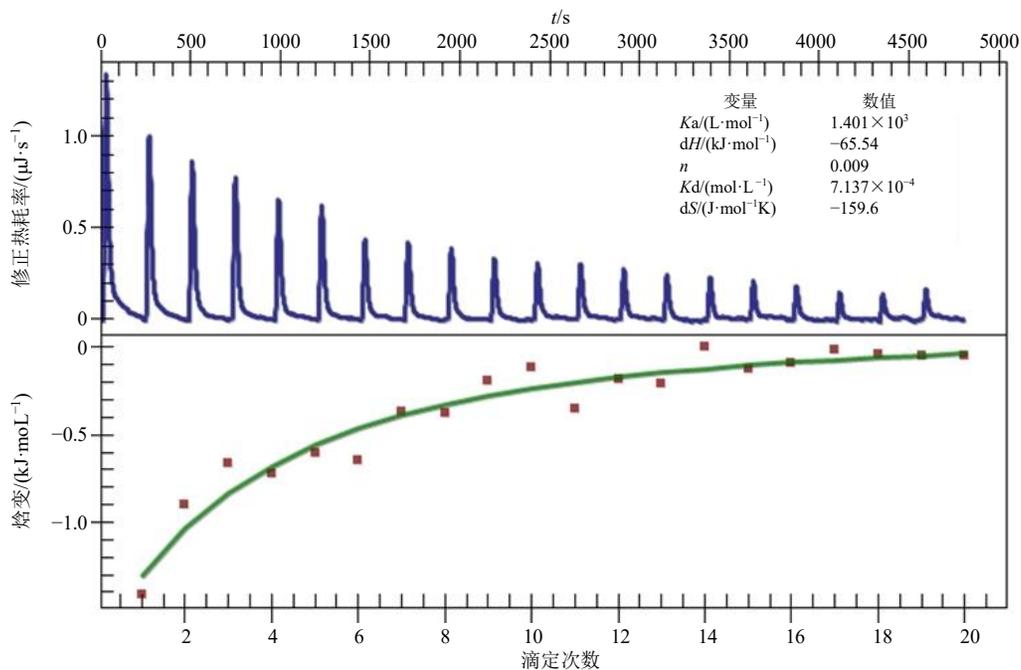


图 11 氯化钙滴定黄芩苷热量变化图

Fig. 11 Calorimetric titrations of calcium chloride to baicalin

类、蒽醌类、萜类等小分子化合物和多糖等大分子物质为主，这些有机成分因具有酚羟基、醛基、羧基等基团，对金属离子具有较强的配位能力，可与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 等人体所必须的大量

或微量金属元素形成配合物，在药理活性上产生双重功能或协同作用^[19]。因此，要深入揭示以石膏为代表的矿物药的药效物质基础，仅以单体成分为单位进行分析是不准确的，需借助中药有机成分-金属

配合物的研究现状,最终演绎推导石膏的药效机制。

3.1 黄酮类金属配合物

黄酮类化合物存在于大部分中药中,具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤等药理活性^[20],其结构多具有 3-羟基-4-羰基和 5-羟基-4-羰基而易与金属离子络合。Li 等^[21]研究发现黄芩苷与金属离子形成的配合物,其药效明显强于黄芩苷单体,如黄芩苷-铜可通过抑制细胞增殖进而抑制 HepG2 细胞移植瘤的生长,提示铜偶联增强了黄芩苷的抗肿瘤细胞增殖作用。研究表明,槲皮素与钒、铜、镁、铁、钆、钴、镉、钙等金属络合后,表现出比槲皮素单体更优异的抗氧化活性^[22]。

3.2 蒽醌类金属配合物

蒽醌类化合物具有抗菌、抗病毒等广泛的药理活性^[23],具有 α 酚羟基或邻二酚羟基的蒽醌类较易与金属离子反应。向晖^[24]研究发现,大黄酸分别与 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 以 2 : 1 的比例形成配合物,在抗菌、抗氧化和抗癌中显示其优异活性。Yang 等^[25]发现,大黄素和 Mn^{2+} 通过 9-C=O 和 1-OH 2 个位点配位络合,形成的配合物对人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7、小鼠黑色素瘤细胞 B16、人乳腺癌细胞 MDA-MB-

231、人宫颈癌细胞 HeLa 5 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值比大黄素提高了近 3 倍,可诱导细胞形态改变,降低细胞存活率,诱导癌细胞 G_0/G_1 期阻滞和凋亡。

3.3 萜类金属配合物

萜类化合物在自然界中分布广泛,结构多样,具有抗肿瘤、抗菌等活性^[26]。孙仪萌^[27]将甘草酸与 Cu^{2+} 组装络合,发现组装体可以保持稳定的螺旋纤维结构,并作为催化骨架,既能降低反应成本,又极大地提高了 Diels-Alder 反应的速率,可广泛应用于医药等领域。

3.4 多糖类金属配合物

多糖是中药中很常见的一类有机物,具有抗癌、抗病毒、降血糖等多种药理活性^[28]。Tan 等^[29]制备了麦冬多糖- Fe^{3+} 络合物,从化学组成上看,多糖-铁络合物是一种含有高分子碳水化合物和金属离子的超分子结构,不仅具有适当的配位稳定性,而且更有利于人体吸收。

通过对中药有机成分-金属配合物的梳理发现,有机配体多与 Cu、Fe、Mn、Zn 等过渡金属元素通过自组装的方式形成配合物,活性研究多集中在抗氧化、抗肿瘤和抗菌等方面,归纳总结见表 6。

表 6 中药有机成分-金属配合物及药效学评价

Table 6 Organic components of traditional Chinese medicine-metal complexes and their pharmacodynamic evaluation

有机配体	金属离子	体外药效评价		体内药效评价		文献
		细胞/细菌模型	药效	动物模型	药效	
黄芩苷	Cu^{2+}	HepG2	下调磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路诱导 HepG2 细胞凋亡	皮下肿瘤 BALB/c 裸鼠	小鼠实体瘤质量显著减少	21
	Cu^{2+}	SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞	抑制 β 淀粉样蛋白 1-42 (amyloid beta peptide 1-42, A β 1-42) 聚集,减少 H_2O_2 的产生来保护 SH-SY5Y 细胞免受 A β 1-42 聚集所致的氧化损伤	—	—	30
	Cu^{2+} 、 Al^{3+}	革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌	广谱抗菌	—	—	31
野黄芩苷	Mg^{2+}	—	—	脑缺血再灌注 SD 大鼠	在大鼠体内具有线性动力学特征,在脑组织内可维持更长时间	32
槲皮素	Mg^{2+}	DPPH 法	Mg 和槲皮素 C 环的 3、4 位和 B 环的 3'、4'位配位络合,清除自由基	—	—	33
			大肠杆菌、肺炎链球菌	抑菌圈直径分别为 21.6、23.7 mm	—	—
大黄酸	Cr^{3+}	DPPH 法	对 $\cdot\text{OH}$ 的半数有效浓度 (EC_{50}) 为 $0.343 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	—	—	24
	Fe^{2+}	HepG2	IC_{50} 为 $17.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	—	—	24
	Fe^{3+}	HepG2、HeLa、MCF-7、B16、MDA-MB-231	对 5 种癌细胞的 IC_{50} 值比大黄素提高了近 3 倍	—	—	25

“—”表示文献未提及

“—” represent not mentioned in the literature

4 讨论

石膏作为矿物药,含有丰富的元素,其中Ca元素含量最多,此外还含有Zn、Fe、Mn、Mg、Na、Al、K、Cu、Si、Pb、As、Cd、Hg、Cu、Be等微量元素^[34]。石膏的解热机制目前尚无统一观点,调研后认为可从两方面理解。首先,石膏本身便具有解热作用,所含丰富的元素是石膏解热的物质基础。如Na⁺和Ca²⁺与下丘脑的体温调定点有关,Ca²⁺可作用于下丘脑,调控发热细胞的信号传导,降低Na⁺/Ca²⁺值,从而发挥降温作用^[17];Zn、Cd、Co、Pb等微量元素与退热作用关系密切;Fe、Cu、Se等微量元素可以调节免疫系统,与清热作用也有间接的关系^[35]。其次,石膏作为一个“元素库”,常与黄芩、甘草、麻黄等清热药、补虚药、解表药配伍使用,这些中药中含有大量的黄酮类、蒽醌类、萜类等小分子化合物和蛋白质、多糖等大分子物质^[36-38],这些有机化合物很可能与石膏中丰富的金属离子及其他微量元素形成配合物,且由于其具有一定的稳定性,因此也可看作是一个“新化学实体”,从而改变原有机配体的理化性质或与病灶靶点的结合途径,增强生物活性,发挥协同作用^[39]。

本研究首先通过对《中医方剂大辞典》进行数据挖掘,得到了解热方剂中的石膏常用配伍中药。发现与石膏配伍频次较高的有黄芩、甘草、炙甘草,其中,炙甘草作为甘草的炮制品,二者所含化学成分的含量稍有差异但种类几乎不变,炙甘草中甘草苷、甘草酸、芹糖甘草苷含量下降,醇溶性浸出物、甘草素含量增加^[40]。因此,选取“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”2个核心配伍药对运用网络药理学做进一步的机制探讨。发现其涉及到蛋白磷酸化、Toll样受体等信号通路,而Toll样受体是一种跨膜蛋白,能介导炎症和免疫反应,与配体结合后可激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路,且激活NF- κ B信号通路最关键的步骤就是核因子 κ B抑制剂 α (nuclear factor- κ B inhibitor, I κ B α) 的磷酸化和降解^[41]。因此核心配伍药对很可能主要通过调控NF- κ B信号通路,同时调控IL6、TNF、NO等细胞因子及MAPK信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等多靶点、多途径地发挥解热作用。再以核心药物组合“石膏-黄芩”为例,进行等温滴定量热实验,证明石膏和黄芩及其主要活性成分确实可以发生相互作用。通过干法实验发现“石膏-黄芩”和“石膏-甘草”药效机制与“黄芩”和“甘草”明显不同,

再结合配位化学理念,提出对石膏解热作用的理解:石膏中富含的金属元素不仅具有直接的生理功能,在水煎煮过程中更可以与中药多种有机活性成分发生分子互作,形成配合物发挥药理作用,本研究为石膏解热机制的探究提供新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊金璐,于迪,宋来辉,等.基于CiteSpace的矿物药研究现状可视化分析[J].中草药,2021,52(4):1105-1116.
- [2] 杨丰文,黄明.张伯礼.谈弘扬抗疫精神,坚定文化自信[J].当代中国与世界,2021(1):58-61.
- [3] 李衍达,赵振宇,孙嘉惠.基于数据挖掘的新型冠状病毒肺炎用药规律研究[J].中国现代中药,2020,22(5):690-696.
- [4] 中国药典[S].一部.2020:99.
- [5] 马瑜璐,房方,刘圣金,等.金属组学研究概况及其在矿物药研究中的应用前景[J].中国中药杂志,2021,46(9):2142-2148.
- [6] 曹治权.中药药效的物质基础和作用机理研究新思路(一):中药中化学物种形态和生物活性关系的研究[J].上海中医药大学学报,2000,14(1):36-40.
- [7] 曹治权.中药药效的物质基础和作用机理研究新思路(二):中药中化学物种形态和生物活性关系的研究[J].上海中医药大学学报,2000,14(2):55-57.
- [8] 韩冬月,宋玲玲,关君.应用量子化学计算方法研究大黄素与金属离子的配位作用[J].世界科学技术—中医药现代化,2020,22(3):829-835.
- [9] Zhang H, Kang L, Zou Q L, et al. Coordination-assembled supramolecular nanoplateforms: Structural modulation and theranostic applications[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 58: 45-52.
- [10] Guo J L, Ping Y, Ejima H, et al. Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal-phenolic networks[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(22): 5546-5551.
- [11] 亓金钗,陈静,李文,等.基于“干法+湿法”联用技术探究西藏沙棘抗氧化质量标志物[J].中国中药杂志,2021,46(11):2699-2709.
- [12] 彭怀仁.中医方剂大辞典(第九册)[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2019.
- [13] 段海萍,刘海蝶,赵玉荣,等.《中医方剂大辞典》关于温病的用药与新型冠状病毒肺炎相关方药分析[J].亚太传统医药,2021,17(3):153-158.
- [14] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草-9[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [15] 连赞芳.基于HPLC指纹图谱与多元化统计法的黄芩质量评价研究[J].福建中医药,2021,52(10):23-26.

- [16] 樊建, 沈莹, 邓代千, 等. 三种基原甘草主要化学成分的差异及应用探讨 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2021-11-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20211104.1455.052.html>.
- [17] 叶鸿博. 石膏及其配伍解热作用的物质基础及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [18] 武晏屹, 苗明三. 基于临床应用的杏仁配伍规律分析 [J]. 中医学报, 2020, 35(07): 1505-1508.
- [19] Chen Z F, Liang H. Progresses in TCM metal-based antitumour agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(5): 412-423.
- [20] 张洪, 张惟郁, 朱伟嵘. 黄酮类化合物调控肿瘤细胞自噬的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5252-5262.
- [21] Li X L, Zou K L, Gou J, *et al.* Effect of baicalin-copper on the induction of apoptosis in human hepatoblastoma cancer HepG2 cells [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 72.
- [22] Xu D, Hu M J, Wang Y Q, *et al.* Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): E1123.
- [23] 邓丽红, 谢臻, 麦蓝尹, 等. 蒽醌类化合物抗菌活性及其机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21): 2450-2455.
- [24] 向晖. 大黄酸金属配合物的结构及药理作用研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [25] Yang L, Tan J, Wang B C, *et al.* Synthesis, characterization, and anti-cancer activity of emodin-Mn(II) metal complex [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(12): 937-942.
- [26] 赵媛, 王旭斌, 郑宁. 天然萜类化合物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(98): 48-49.
- [27] 孙仪萌. 甘草酸的自组装螺旋纳米结构作为催化不对称 Diels-Alder 反应的骨架 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [28] 王晓晖, 白海泉, 乌兰格日乐. 多糖金属配合物的研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2014, 29(5): 516-519.
- [29] Tan C X, Wang Y L. Self-assembly of Ophiopogonis polysaccharide-iron (III) complex in aqueous solution and solid state [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2019, 28(9): 665-672.
- [30] Yin F, Liu J H, Ji X H, *et al.* Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by A β aggregation in SH-SY₅Y cells [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 492(2): 76-79.
- [31] 刘衍季, 何小燕, 刘晓华, 等. 黄芩苷铜和铝配合物的合成及其生物活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1296-1302.
- [32] 张清璇. 野黄芩苷镁盐的药动学和组织分布研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2020.
- [33] Ghosh N, Chakraborty T, Mallick S, *et al.* Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 151: 807-813.
- [34] 王薇, 周才新, 张义生, 等. 不同产地石膏中微量元素的比较分析 [J]. 中国药师, 2014, 17(6): 972-974.
- [35] 杨柳, 张义生, 徐惠芳, 等. 矿物类中药石膏清热作用研究进展 [J]. 中国药师, 2016, 19(10): 1943-1945.
- [36] 吴攸, 杨熠文, 杨柏灿. 黄芩清热功效的临床合理应用 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(9): 38-41.
- [37] 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.
- [38] 任海波, 王迎春, 麻景梅, 等. 麻黄的活性成分与临床应用进展 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(4): 396-399.
- [39] Xu C, Cai Y B, Ren C H, *et al.* Zinc-triggered hydrogelation of self-assembled small molecules to inhibit bacterial growth [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7753.
- [40] 陈佳, 张权, 杨蕊, 等. 甘草药材及其炮制品炙甘草化学模式识别分析 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1963-1976.
- [41] Heidi E, Carolyn W, Stefan E, *et al.* The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy [J]. *Eur J Heart Fail*, 2011, 1(15): 602-610.

[责任编辑 潘明佳]