

基于指纹图谱和网络药理学对经典名方二冬汤质量标志物 (Q-Marker) 预测分析

帅丽霞^{1,2}, 陈旺^{1,2}, 袁袁^{1,2}, 阮佳², 詹雁², 徐超群^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611100

2. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 基于指纹图谱和网络药理学方法, 分析预测二冬汤潜在的质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。 **方法** 采用 HPLC 建立 15 批二冬汤指纹图谱, 并对其峰进行指认和归属, 同时采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版), 并结合层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 对结果进行分析、评价不同批次样品质量差异; 基于可测性和可溯源性筛选出 6 个 Q-Marker 候选成分, 通过网络药理学构建二冬汤“成分-靶点-通路”的网络, 分析二冬汤的潜在 Q-Marker。 **结果** 建立了 26 个共有峰的指纹图谱, 指认了新芒果苷、芒果苷、金丝桃苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵、千层纸素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 7 个共有色谱峰, 15 批指纹图谱与对照图谱相似度均大于 0.97, 15 批样品聚为 2 类; 采用网络药理学的方法分析得出新芒果苷、芒果苷、金丝桃苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵 6 个成分可能为二冬汤潜在的 Q-Marker, 其可能通过调节胰岛素、Ras 相关蛋白 1 (Ras-associated protein 1, Rap1)、肝炎等信号通路发挥养阴清热、生津止渴的功效。 **结论** 建立的指纹图谱分析方法灵敏度高、稳定性强、数据准确可靠; 并结合网络药理学研究发现 6 个成分具有传递性和溯源性, 且与二冬汤功效有关, 可作为其潜在的 Q-Marker, 为二冬汤进一步研究提供参考。

关键词: 经典名方; 二冬汤; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 新芒果苷; 芒果苷; 金丝桃苷; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 甘草酸铵; 千层纸素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 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(2022)18-5682-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.011

Predictive analysis of quality markers of Erdong Decoction based on fingerprint and network pharmacology

SHUAI Li-xia^{1,2}, CHEN Wang^{1,2}, YUAN Yuan^{1,2}, RUAN Jia², ZHAN Yan², XU Chao-qun²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611100, China

2. Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To analyze and predict the quality markers of Erdong Decoction (二冬汤) based on fingerprint and network pharmacology methods. Analyzing the potential quality markers (Q-Marker) in Erdong decoction by constructing the the network of “compound-target pathway” through network pharmacology. **Methods** The fingerprints of 15 batches of Erdong Decoction were established by using HPLC method, and their peaks were identified and assigned. At the same time, the results were analyzed and evaluated by using the similarity evaluation software of chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine (2012 Edition) and hierarchical cluster analysis (HCA). **Results** The fingerprints of 26 common peaks were established and 7 common peaks of neomangiferin, mangiferin, hyperoside, baicalin, wogonside, ammonium and melaleuca-3-O-β-D-glucuronide were identified. The similarity between 15 batches of fingerprints and the control was greater than 0.97, and 15 batches of medicinal materials were grouped into two categories. Using the method of network pharmacology, it is concluded that neomangiferin, mangiferin, hyperoside, baicalin, wogonside and ammonium glycyrrhizinate may be the potential Q-Marker of Erdong decoction, which may play the effects of nourishing yin and clearing heat, promoting fluid production to quench thirst by regulating insulin, Rap1 (Ras-associated protein

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 四川省科技计划 (2020JDZH0021)

作者简介: 帅丽霞 (1997—), 女 (汉族), 四川眉山人, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新工艺、新技术研究。

Tel: 15244825492 E-mail: 1342477457@qq.com

*通信作者: 徐超群 (1964—), 女, 博士, 研究员, 从事中药新药与新型给药系统研究。Tel: (028)85213973 E-mail: chaoqun_xu@sina.com

1) signal pathway, hepatitis and other signal pathways. **Conclusion** The established fingerprint analysis method has high sensitivity, strong stability and accurate and reliable data. Combined with network pharmacology, it is found that the six components have transmissibility and traceability, and are related to the efficacy of Erdong decoction. It can be used as its potential Q-Marker to provide reference for the further study of Erdong Decoction.

Key words: classical prescription; Erdong Decoction; fingerprint; network pharmacology; quality marker; neomangiferin; mangiferin; hyperoside; baicalin; wogonin; ammonium; melaleuca-3-O- β -D-glucuronide; transmissibility; traceability

经典名方是中医发展和历代医家临床实践的结晶,凝结着各代医家的智慧,开发与研究经典名方既有利于传承中医文化,有利于现代中医药的发展。2018年,国家中医药管理局公布了《古代经典名方目录(第一批)》^[1],二冬汤被收录于其中。二冬汤出自清代程国彭所著的《医学心悟》卷三^[2],全方由天冬、麦冬、天花粉、黄芩、知母、甘草、人参、荷叶组成,主治上消,具有养阴清热、生津止渴之功效,临床上常被用于治疗糖尿病、百日咳、肺结核、慢性支气管炎、阴虚咳嗽等^[3-8]。

因中药具有多成分、多靶点的特点,检测其任何一种成分均不能代表其整体药效,且由于中药的复杂性导致中药质量控制指标与其有效性关联度低且专属性差等问题,因此刘昌孝院士^[9]于2016年首次提出了质量标志物(quality markers, Q-Marker)的概念,旨在更好地控制中药材的质量^[10]。而中药指纹图谱能全面、定量地分析中药所包含的化学信息,是中药质量控制的重要手段,同时在经典名方物质基准的研究中也成为重要手段^[11]。网络药理学具有整体性、系统性的特点与中医药整体观、辨证论治原则一致,其通过建立“成分-靶点-通路”网络拓扑学关系图可以直观反映药物发挥药效的特点,增加复方临床应用的科学性^[12]。本研究将指纹图谱与网络药理学相结合,并应用相似度评价软件和聚类分析,可以更加系统、全面地对其质量进行控制,预测其发挥药效的潜在 Q-Marker,并同时分析指纹图谱的质量控制指标是否合理,可为二冬汤后续研究提供可行性参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; Sigma TGL-16G 型高速冷冻离心机, Sigma 公司; SB-XS205 型电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司; 2L 液体加热器,康雅顺公司。

1.2 材料

芒果苷、金丝桃苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵对照品,中国食品药品检定研究院,批号分别

为 110607-201704、111521-201809、110715-202122、112002-2-1702、110731-201910,质量分数依次为 98.1%、94.9%、94.2%、98.0%、98.0%; 新芒果苷、千层纸素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷对照品,四川德思特乐美天有限公司,批号分别为 DST201128-017、DST200802-040,质量分数均为 98.0%。

药材购置于不同产地,15批药材来源见表1,均由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定,天冬为百合科天冬属植物天冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根,麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根,天花粉为葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥根,黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,知母为百合科知母属植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎,荷叶为睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶,人参为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎,甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎,经实验室阮佳研究员按《中国药典》2020年版检测炮制后符合要求。采用随机数字表法将不同批次饮片进行组合,结果见表2。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

MS Technologies Target-Core C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~5 min, 2%乙腈; 5~15 min, 2%~6%乙腈; 15~30 min, 6%~9%乙腈; 30~65 min, 9%乙腈; 65~70 min, 9%~14%乙腈; 70~85 min, 14%~16%乙腈; 85~95 min, 16%~17%乙腈; 95~105 min, 17%乙腈; 105~115 min, 17%~20%乙腈; 115~120 min, 20%~27%乙腈; 120~140 min, 27%~33%乙腈; 140~141 min, 33%~90%乙腈; 141~142 min, 90%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 254 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

表1 二冬汤药材来源

Table 1 Source of Chinese medicinal materials of Erdong Decoction

药材	产地(批号)
天冬	云南永胜(120201011~120201015)、贵州石阡(120201021~120201025)、四川绵阳(120201031~120201035)
麦冬	四川三台(220210511~220210515)、浙江慈溪(2202010721~2202010725)、浙江杭州(2202010731~2202010735)
天花粉	江苏泗阳(320201111~320201115)、河北安国(320201121~320201125)、河南濮阳(320201131~320201135)
黄芩	河北围场(420201111~420201115)、山西绛县(420201121~420201125)、陕西商洛(420201131~420201135)
知母	河北易县(520201111~520201115)、安徽亳州(520201121~520201125)、山西绛县(520201131~520201135)
荷叶	江西石城(620210811~620210815)、山东曹县(620210821~620210825)、湖南湘潭(620210831~620210835)
人参	吉林抚松(720201011~720201015)、黑龙江鹤岗(720201021~720201025)、吉林长春(720201031~720201035)
甘草	甘肃酒泉(820201111~820201115)、内蒙古赤峰(820201121~820201125)、宁夏吴忠(820201131~820201135)

表2 15批二冬汤样品饮片批号

Table 2 15 batches of Erdong Decoction sample pieces

批号	天冬	麦冬	天花粉	黄芩	知母	荷叶	人参	甘草
S1	120201015	2202010731	320201111	420201125	520201123	620210812	720201022	820201134
S2	120201012	2202010123	320201135	420201121	520201113	620210822	720201034	820201131
S3	120201011	220210512	320201123	420201135	520201121	620210831	720201013	820201115
S4	120201031	220210511	320201125	420201123	520201134	620210835	720201012	820201122
S5	120201033	2202010731	320201124	420201113	520201121	620210815	720201014	820201133
S6	120201034	2202010122	320201133	420201122	520201133	620210811	720201015	820201112
S7	120201023	2202010733	320201115	320201114	520201135	620210821	720201031	820201123
S8	120201035	220210515	320201132	420201134	520201125	620210834	720201011	820201111
S9	120201013	2202010121	320201114	420201124	520201112	620210823	720201025	820201135
S10	120201014	2202010735	320201131	320201115	520201132	620210832	720201033	820201125
S11	120201024	220210513	320201122	420201133	520201114	620210825	720201032	820201124
S12	120201022	2202010125	320201121	320201111	520201115	620210813	720201035	820201114
S13	120201021	2202010732	320201134	320201112	520201131	620210824	720201023	820201123
S14	120201032	220210514	320201113	420201131	520201111	620210814	720201021	820201113
S15	120201025	2202010124	320201112	420201132	520201124	620210833	720201024	820201132

2.2 溶液的制备

2.2.1 水煎液的制备 二冬汤始载于清代程国彭所著的《医学心悟》卷三,文中记载:“大法,治上消者,宜润其肺,兼清其胃,二冬汤主之…治上消,天冬(二钱,去心),麦冬(三钱,去心),花粉(一钱),黄芩(一钱),知母(一钱),甘草(五分),人参(五分),荷叶一钱,水煎服。”根据中医药管理局颁布的古代经典方关键信息表(7首方剂)^[13]并查阅相关文献确定,清代一钱等于现今3.73 g,一钱等于十分。因方中煎服方法仅有“水煎服”,故参照2009年国家中医药管理局关于印发的《医疗机构中药煎药室管理规范》和有关文献并结合实验室前期实验,确定二冬汤标准汤剂的制备方法:称取天冬11.19 g,麦冬16.78 g,天花粉5.60 g,黄芩5.60

g,知母5.60 g,甘草2.81 g,人参2.81 g,荷叶5.60 g,共55.60 g,加纯净水650 mL,加盖浸泡30 min,武火煮沸后转文火煎煮30 min,药渣再加550 mL水加热煮沸30 min,趁热用100目滤布滤过,合并2次滤液,放冷加自来水定容至1000 mL量瓶中,即得。

2.2.2 混合对照品的制备 精密称取新芒果苷、芒果苷、金丝桃苷、黄芩苷、千层纸素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、甘草酸铵适量于25 mL量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为0.128、0.048、0.040、0.072、0.052、0.048、1.960 g/L的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.2.1”项下制备得到的二冬汤水煎液5 mL,10 000 r/min离心(离心半径5 cm)10 min,取上清液过0.24 μm水相微孔

滤膜，即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验 取同一水煎液 (S1) 供试品溶液，分别在制样后 0、2、4、8、12、24 h 后测定，以 23 号色谱峰为参照峰 (S)，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%，相对峰面积的 RSD 均小于 4%，各图谱相似度均大于 0.96，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.2 精密度试验 取同一份水煎液 (S1) 供试品溶液，按上述色谱条件连续进样 6 次，以 23 号色谱峰为参照峰 (S)，计算各峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.4%，相对峰面积的 RSD 均小于 3%，各图谱相似度均大于 0.96，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一水煎液 (S1)，按照“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，以 23 号峰为参照峰 (S)，结果各峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.4%，相对峰面积的 RSD 均小于 5%，各图谱相似度均大于

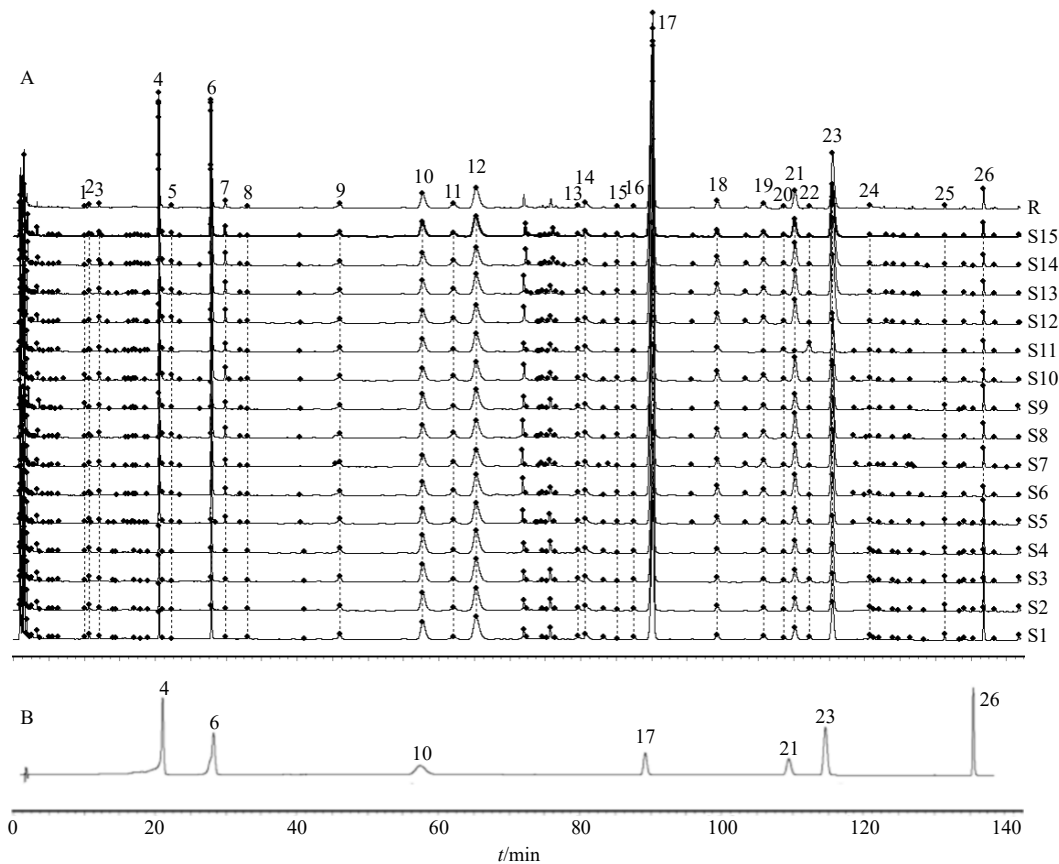
0.95，表明该方法重复性良好。

2.4 二冬汤指纹图谱的建立

取 15 批二冬汤供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行进样检测，记录色谱图。采用“中药色谱指纹谱图相似度评价系统 (2012 版)”进行数据分析，以 S1 为参照图谱，时间窗宽度设定为 0.1 min，采用中位数法，进行多点校正和 Mark 峰匹配，生成二冬汤指纹图谱及其对照指纹图谱 (共有模式，R)，结果见图 1。共标定 26 个共有峰，其中指认 7 个共有峰，分别为 4 号峰新芒果苷、6 号峰芒果苷、10 号峰金丝桃苷、17 号峰黄芩苷、21 号峰千层纸素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、23 号峰汉黄芩苷、26 号峰甘草酸铵。

2.5 共有峰归属

取二冬汤物质基准样品 S1 以及缺天冬、缺麦冬、缺天花粉、缺黄芩、缺知母、缺甘草、缺人参、缺荷叶的阴性样品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图。



4-新芒果苷 6-芒果苷 10-金丝桃苷 17-黄芩苷 21-千层纸素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 23-汉黄芩苷 26-甘草酸铵
4-neomangiferin 6-mangiferin 10-hypericin 17-baicalin 21-laminin-3-O-β-D-glucuronide 23-baicalin 26-ammonium glycyrrhizinate

图 1 15 批二冬汤物质基准 (S1~S15) 的 HPLC 指纹图谱 (A) 和混合对照品的 HPLC 图 (B) 及对照指纹图谱 (R)
Fig. 1 HPLC fingerprint (A) of 15 batches of Erdong Decoction substance reference (S1—S15), its common mode (R), and HPLC diagram of mixed reference substances (B)

结合色谱峰的保留时间及紫外吸收图, 通过对比分析, 对 26 个共有峰进行归属, 见图 2。结果发现 4~7 号峰来自知母, 11、15~24 号峰来自黄芩, 1、9、10~14 号峰来自荷叶, 25、26 号峰来自甘草, 2、3 号峰为知母荷叶共有峰, 黄芩在该条件下出峰较多,

因天冬、麦冬、天花粉成分大多为多糖类, 本身药典也无紫外检测, 故在本指纹图谱下无贡献。

2.6 相似度分析

以对照指纹图谱为参照, 计算 15 批二冬汤样品图谱相似度分别为 0.976、0.976、0.976、0.976、0.999、

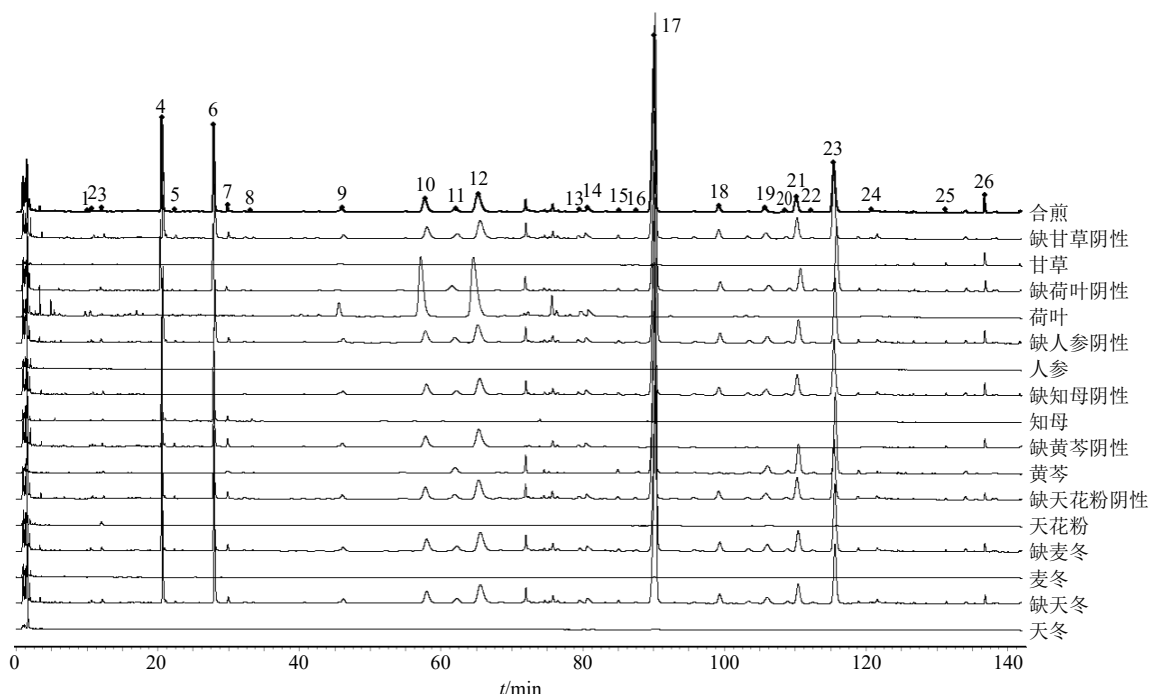


图 2 二冬汤物质基准特征峰归属

Fig. 2 Attribution of reference characteristic peaks of Erdong Decoction

0.997、0.994、0.997、0.999、0.993、0.981、0.994、0.998、0.995、0.995, 相似度良好, 均在 0.90 以上, 表明所建立的指纹图谱稳定, 可以反应其指纹特征, 样品 S1~S4、S11 相似度小于 0.99, 表明不同产地、批次之间物质基准存在质量差异。

2.7 HCA

HCA 常用于数据的初步探索性分析, 具有直观、结论形式简明的特点^[14]。采用 SPSS 21.0 数据分析软件, 对 15 批样品的共有峰的峰面积进行系统聚类分析, 采用组间连接法, 测量区间为平方欧氏距离, 聚类结果见图 3, 结果发现当欧氏距离为 10 时, 将 15 批二冬汤物质基准可分为 2 类, 样品 S1、S5、S9、S11、S15 为第 1 类, 样品 S2~S4、S6~S8、S10、S12~S15 为第 2 类, 表明不同产地间药材质量存在一定的差异性。

2.8 基于成分-靶点-通路的网络药理学分析

2.8.1 基于可测性和可溯性的候选化合物筛选 根据相关文献研究, 黄芩主要成分为多糖和黄酮类, 黄芩的质量控制指标黄芩苷在控制高血糖中发挥重

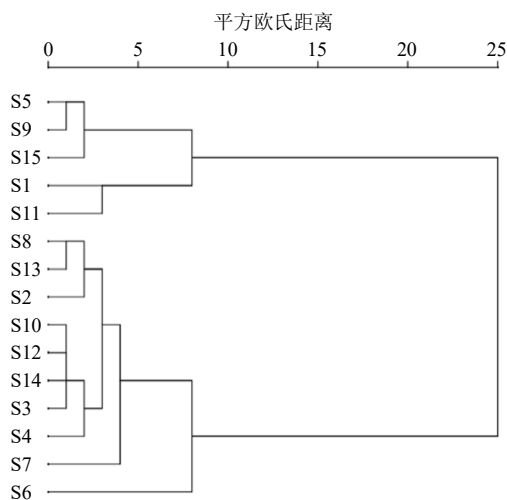


图 3 15 批二冬汤物质基准的 HCA 树状图

Fig. 3 HCA tree view of 15 batches of Erdong Decoction material benchmark

要作用, 其可以通过增加人体谷胱甘肽过氧化酶 (glutathione peroxidase, Gpx) 活性, 降低三酰甘油与总胆固醇水平, 从而改善人体血糖, 汉黄芩苷也为其黄酮类成分, 具有抗炎、保护心脑血管等作用^[15]。

知母的主要成分为皂苷、双苯吡酮类、生物碱类，知母的质量控制指标芒果苷和其他成分如新芒果苷具有良好的降血糖作用^[16]。甘草主要成分为三萜类、黄酮类、多糖类等其它成分，甘草的控制指标甘草酸具有较好的降血糖、调节免疫和抗动脉粥样化作用^[17]。荷叶的主要活性成分为生物碱和黄酮类，金丝桃苷具有调脂作用^[18]。天冬、麦冬、人参主要活性成分为皂苷和多糖类，天花粉的活性成分为多糖类。结合文献研究和指纹图谱研究，以上6个成分均可以得到指认和测定，且能够实现饮片到物质基准对应实物的传递。基于可测性和可溯性，将以上6个化合物作为候选化合物。利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找这6个候选化合物的 Canonical SMILES，为后续研究做准备。

2.8.2 二冬汤主要化学成分的靶蛋白预测 将6个活性成分的 Canonical SMILES 分别输入 Swiss Target Prediction 数据库 ([\[prediction.ch/\]\(https://www.swisstargetprediction.ch/\)\) 进行其对应靶蛋白的预测，将相关靶蛋白进行整理，去除重复靶点，共得到6个活性成分作用的252个靶点。](https://www.swisstarget</p>
</div>
<div data-bbox=)

2.8.3 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将通过筛选得到的252个靶点导入在线数据库 STRING (<http://string-db.org>) 进行 PPI 网络构建，选择物种为“Homo sapiens”，蛋白交互评分值“high confidence>0.9”，并隐藏无联系的节点，其余参数设置保持不变，得到242个靶蛋白的PPI网络图(图4)。将PPI的分析结果以 TSV 文本格式导入 Cytoscape 3.7.1 软件中，并利用其中的“Network Analyzer”功能对分析结果进行拓扑属性分析，选取计算选取度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 3个拓扑参数均大于中位数且度值≥10的靶点作为关键靶点。经过筛选共得到21个关键靶点，结果见表3。

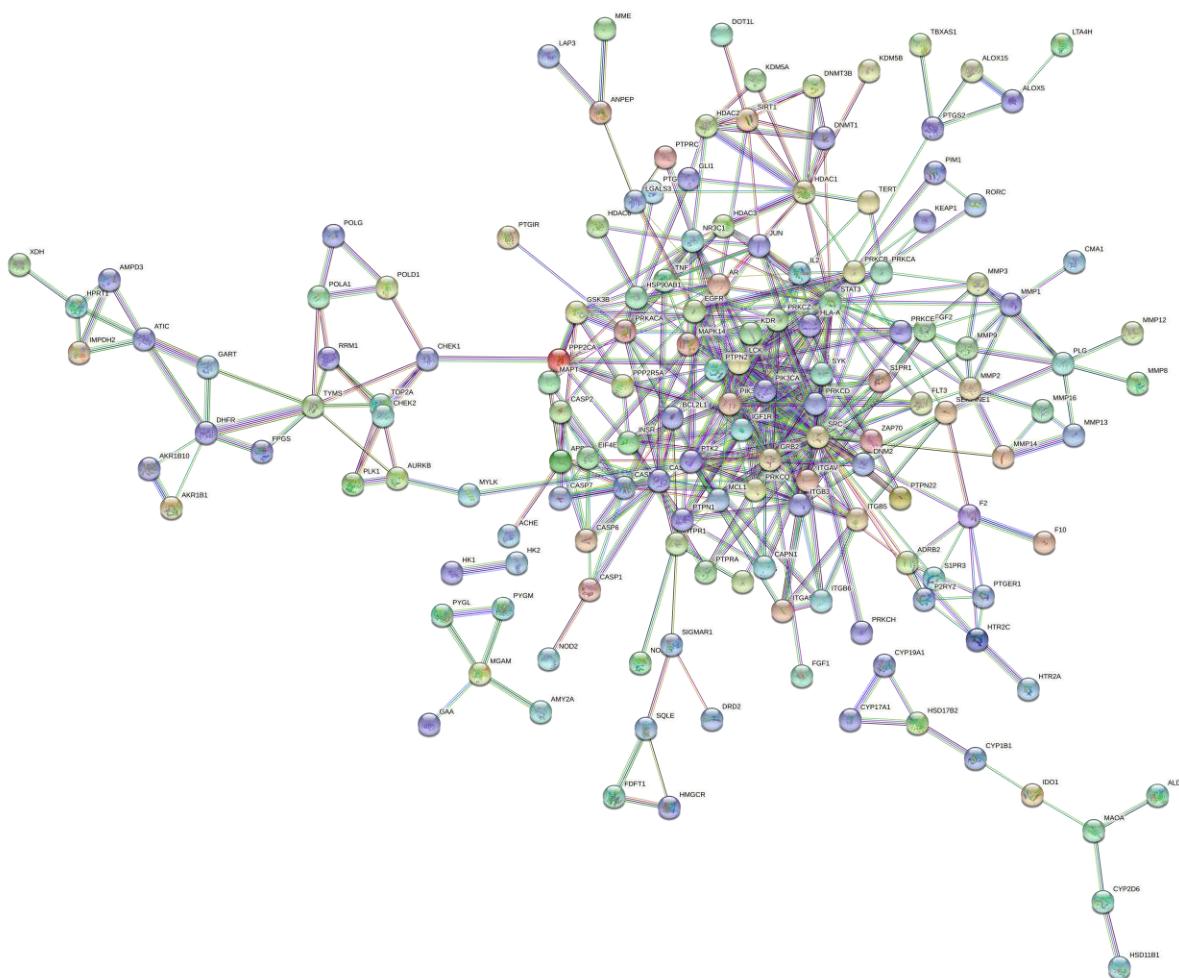


图4 242个靶蛋白的PPI网络图
Fig. 4 PPI network diagram of 242 target proteins

表 3 靶点网络的拓扑学性质
Table 3 Topological properties of target network

靶点	名称	介数中心性	接近中心性	度值
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	0.015 5	0.329 3	10
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	0.022 0	0.354 3	13
SYK	spleen associated tyrosine kinase	0.003 5	0.352 5	13
HDAC1	histone deacetylase 1	0.062 9	0.321 4	15
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	0.308 0	0.438 3	43
ITGB3	integrin subunit beta 3	0.014 1	0.351 6	15
INSR	insulin receptor	0.008 6	0.324 5	10
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	0.219 7	0.402 9	32
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	0.014 5	0.355 3	12
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	0.026 0	0.341 8	13
PRKCZ	protein kinase C zeta	0.006 4	0.332 5	12
EGFR	epidermal growth factor receptor	0.064 8	0.384 6	16
IL2	interleukin 2	0.011 7	0.340 1	14
AR	androgen receptor	0.035 7	0.036 9	14
CASP8	caspase 8	0.037 8	0.348 8	13
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	0.026 6	0.380 3	24
LCK	LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	0.062 2	0.385 7	24
CASP3	caspase 3	0.026 9	0.319 1	14
KDR	kinase insert domain receptor	0.033 9	0.356 2	13
GRB2	growth factor receptor bound protein 2	0.047 4	0.369 9	23
PRKACA	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha	0.063 0	0.384 6	12

2.8.4 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 利用 David6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对筛选得到的 22 个关键靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析和 KEGG 通路分析均选取 “ $P \leq 0.01$ ” 和 “Eenjamini ≤ 0.01 ”, 具有统计学意义。

GO 功能分析共得到 49 个条目, 其中生物过程 (biological process, BP) 占 28 条, 细胞组成 (cell composition, CC) 占 3 条, 分子功能 (molecular function, MF) 占 18 条。选取部分显著性强的进行展示, 见图 5, BP 主要包括蛋白质生成、RNA 多聚酶促转录因子的转录调节 (egulation of transcription from RNA polyerase promoter) 和酶结合等方面; CC 主要涉及质膜、ATP 结合等过程; MF 主要涉及胞浆、凋亡过程的负调控等方面。KEGG 富集分析共得到条 56 通路。选取部分显著性强的进行展示, 见图 6。根据显示结果可知, 二冬汤的活性成分富集的通路主要包括癌症、Ras 相关蛋白 1

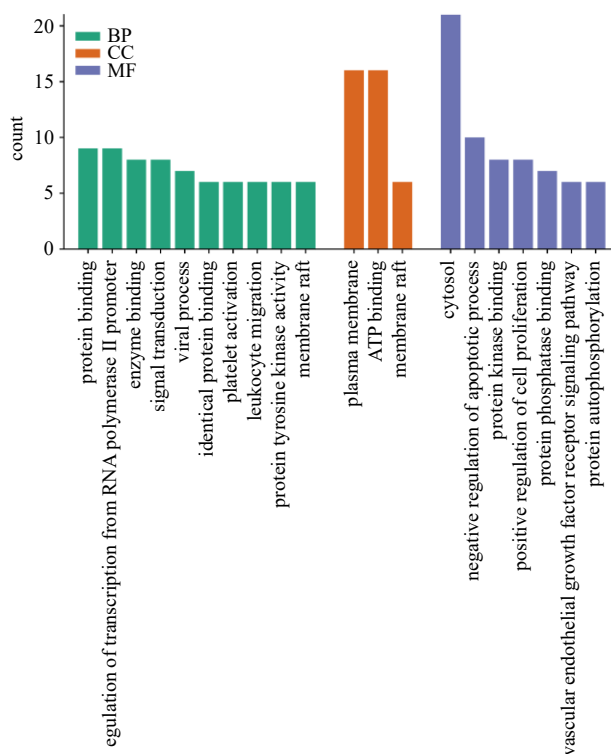


图 5 二冬汤 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of Erdong decoction

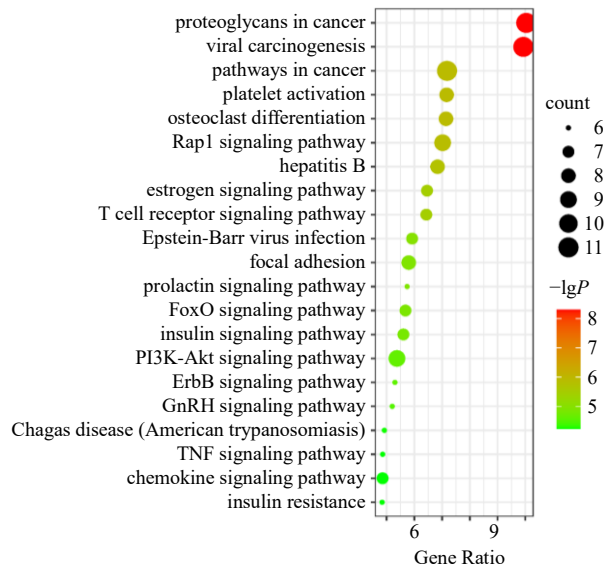


图6 二冬汤 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of Erdong Decoction

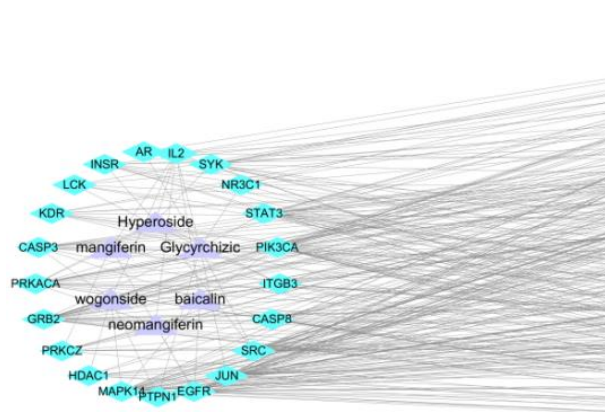


图7 二冬汤“成分-靶点-通路”网络图

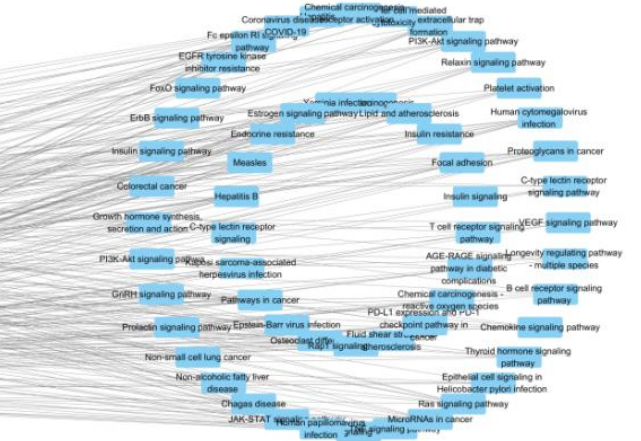
Fig. 7 “Ingredient-target-pathway” network diagram of Erdong Decoction

酸残基,进而影响胰岛素信号传导^[23];白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 是炎症因子,在炎症调控中起作用;胰岛素受体 (insulin receptor, INSR) 分泌胰岛素促进组织、细胞对葡萄糖的摄取与利用,调节血糖水平;表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是表皮生长因子和转化生长因子- α (transforming factor α , TGF- α) 的受体,活性成分与该通路相互作用阻断促炎因子和 EGFR 的结合发挥抗炎作用,增加机体免疫功能^[24]。生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor binding protein 2, GRB2) 通过被促红细胞生成素肝细胞受体 A2 (erythropoietin hepatocyte receptor A2, EphA2) 调控参与肝细胞侵袭^[25]。在 GO 功能富集分析显示,二冬汤对蛋白质生成、RNA 多聚酶促转

(Ras-associated protein 1, Rap1) 信号通路、肝炎等信号通路。

2.8.5 成分-靶点-网络的构建 根据筛选得到的 6 个成分、21 个关键靶点和 56 条通路导入 Cytoscape 3.7.1 软件,建立二冬汤“成分-靶点-网络”网络图,结果见图 7,由图可知,二冬汤作用于多个靶点、多条通路发挥作用。

2.8.6 Q-Marker 的分析 二冬汤在临床上应用较为广泛,可被用于治疗糖尿病、百日咳、肺结核、慢性支气管炎、阴虚咳嗽等,尤其在治疗糖尿病相关症状中具有显著疗效^[19-22]。网络药理学分析结果可知,二冬汤中 6 个成分可能作用于蛋白酪氨酸酶 N1 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1, PTPN1) 而影响蛋白酪氨酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP1B) 编码,而 PTP1B 是去磷酸化胰岛素信号传导途径中信号分子磷酸化的酪氨



录因子的转录,酶结合等途径具有广泛的调节作用。在 KEGG 富集的通路中,二冬汤主要调节癌症、炎症、免疫等信号通路。叉头框蛋白 O (forkhead box protein O, FoxO) 通路能够通过调节细胞增殖、凋亡、自噬以及氧化应激等反应发挥生物作用,从而影响靶基因葡萄糖 6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6ase) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCCK) 表达,进而抑制肝脏糖异生,改善 2 型糖尿病大鼠血糖异常^[26]。磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路是细胞中一个典型的信号通路,该条通路与磷脂酰肌醇和 PKC 介导衍生信号通路有关,其能刺激胰岛素对葡萄糖的摄取与储存^[27],Rap1 是一种能够

调控细胞黏附、细胞极性和细胞-细胞连接形成等多种生物过程的小三磷酸鸟苷环水解酶 (guanosine triphosphate cyclic hydrolase, GTPase), 可以通过调控下游 Akt、PI3K 因子改善血糖水平^[28]。

由此可知, 网络药理学的预测结果与已有文献报道较为一致, 说明该研究方法具有一定的准确性和可取性。同时, 这 6 个有效成分可通过作用于多靶点, 干预多条通路发挥药效作用, 进一步说明指纹图谱所选的指标成分具有合理性。这 6 个成分可以从饮片-煎液实现良好的传递和溯源, 且无阴性干扰, 基于 Q-Marker 的五原则, 新芒果苷、芒果苷、金丝桃苷、汉黄芩苷、黄芩苷、甘草酸铵都基本符合, 故可初步预测其为二冬汤潜在的 Q-Marker。

3 讨论

中药复方成分复杂, 为对其质量进行全面控制, 本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液 5 种不同的流动相下色谱峰的分离情况, 结果发现流动相为乙腈-水、甲醇-水时, 峰较少, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液时, 峰数量接近, 但乙腈-0.1%甲酸水溶液系统各峰分离效果好, 故选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。同时, 对 203、230、254、270、290 nm 等不同检测波长进行了考察, 通过比较发现 203 nm 和 230 nm 基线漂移严重, 270 nm 和 290 nm 与 254 nm 相比较, 254 nm 中指标性成分甘草酸铵峰面积更高, 故选择 254 nm。另外, 考察了色谱柱温度(25、30、35 °C), 体积流量(0.8、1.0、1.2 mL/min) 及不同类型色谱柱, 最终确定上述色谱条件。

本研究采用 HPLC 法建立二冬汤的指纹图谱, 筛选出 26 个共有峰, 并对 7 个峰进行了指认, 经与各单味药阴性色谱图对照, 得到知母、荷叶、黄芩、荷叶 4 味饮片的特征峰, 其中来源于黄芩的色谱峰较多, 天冬、麦冬、天花粉主要成分为多糖和皂苷类, 不具备紫外检测的特点, 通过课题组前期实验, 这 4 味药可通过薄层或分光光度法进行鉴别。采用相似度评价软件结合聚类分析, 将 15 批药材分为 2 类, 说明不同产地的药材因气候、海拔等原因会造成一定的差异。指纹图谱作为质量控制的手段之一, 还需结合多指标成分的含量测定、出膏率、大类成分含量测定等方法对经典名方质量进行全方位控制。

中药质量是影响中药事业发展的关键因素, Q-Marker 基于中药化学成分与中药安全性、有效性, 选择中药中一些可测性成分作为质量控制指标, 提高中药可控性和溯源性, 促进中药质量的控制研究。本实验基于 Q-Marker 可测、特有、有效、传递及配伍“五原则”, 首先采用高效液相色谱法建立标准汤剂的指纹图谱, 并指认出相关峰, 预测出二冬汤可能的质量标志物, 体现中药质量的可测性。随后采用网络药理学的方法从有效性方面对 6 个可能的标志物成分进行靶点预测及相关通路的富集, 其主要涉及蛋白酪氨酸酶 N1、INSR、EGFR 等 21 个靶点, 富集的通路包括 FoxO 通路、PI-3K-AKT 等 56 条信号通路, 且涉及的靶点和通路大多与治疗糖尿病相关症状相关^[29-30], 这与古方记载“治疗上消”一致, 因为糖尿病属于上消范畴。但网络药理学仍存在一些局限性, 后续仍需要通过一些药理实验进行验证以促进二冬汤质量标准的建立。

综上所述, 本实验基于指纹图谱和网络药理学研究表明新芒果苷、芒果苷、金丝桃苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵这 6 个成分可能为二冬汤的潜在 Q-Marker, 为二冬汤质量控制及后续研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录(第一批)[EB/OL]. (2018-04-16) [2020-02-02]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 程国彭. 医学心悟 [M]. 清乾隆 56 年辛亥聚金堂刻本. 北京: 人民卫生出版社, 1971: 105-107.
- [3] 袁新国, 谢梦洲, 杨英, 等. 二冬汤和有氧运动对 2 型糖尿病大鼠糖代谢和脂代谢的影响 [J]. 重庆医学, 2018, 47(28): 3610-3613.
- [4] 王雅晴, 何泽云. 何泽云自拟二冬汤治疗慢性肾脏病验案 2 则 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7): 133.
- [5] 赵益, 罗蓉, 尚广彬, 等. 二冬汤含药血清对肺癌细胞 A549 的作用研究 [J]. 新中医, 2012, 44(9): 113-115.
- [6] 王成章. 加味二冬汤治疗百日咳痉咳期 104 例 [J]. 辽宁中医杂志, 1990, 17(3): 35.
- [7] 房佳乐. 二冬汤加减方治疗青年人特发性室性期前收缩的临床观察 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [8] 王帅. 二冬汤加减联合吉非替尼治疗晚期阴虚痰热型非小细胞肺癌的临床疗效观察 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [9] 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.
- [10] 彭梅梅, 郭爽, 陈琪, 等. 基于特征图谱和网络药理学的经典名方黄连汤质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5514-5523.
- [11] 张琴, 王佳丽, 高喜梅, 等. 经典名方温胆汤水煎液 HPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 930-937.
- [12] 刘青松, 郝彦伟, 张怡, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨加味附子理中汤治疗阳虚型溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2022, 10(3): 1-18.
- [13] 国家中医药管理局, 国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》的通知 [EB/OL]. [2020-11-10] (2020-11-16). <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.
- [14] 管咏梅, 万鑫浩, 吴文婷, 等. 经典名方桂枝加葛根汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5535-5542.
- [15] 龚发萍, 郑鸣. 黄芩的化学成分及药理作用 [J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(34): 176-178.
- [16] 翁丽丽, 陈丽, 宿莹, 等. 知母化学成分和药理作用 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(1): 90-92.
- [17] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7680-7692.
- [18] 刘淑萍, 樊淑彦, 侯海妮, 等. 荷叶化学成分及药理作用研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2004, 25(4): 254-256.
- [19] 师美凤. 二冬汤对糖尿病前期患者胰腺 β 细胞功能的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(5): 39-40.
- [20] 田锦鹰, 马祖等, 陈国姿. 二冬汤对糖尿病前期胰岛素敏感性的影响 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(3): 386-387.
- [21] 胡成玉, 张红霞. 二冬汤对糖尿病前期胰岛素敏感性影响随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(17): 14-15.
- [22] 谢振东. 二冬汤加减方对阴虚质糖耐量异常糖脂代谢指标的影响 [J]. 新中医, 2014, 46(1): 117-119.
- [23] 丁岩军, 彭惠民. PTPN1 基因单核苷酸多态性与 2 型糖尿病的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(23): 2310-2313.
- [24] 刘静, 李春霞, 何巧玉, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的黄芩质量标志物预测研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(8): 1041-1046.
- [25] 王雅楠, 马庆久, 徐建庆, 等. EphA2 通过调控 Grb2 表达参与肝癌细胞侵袭的机制探讨 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(1): 32-37.
- [26] 李慧, 刘军彤, 杨宇峰, 等. 基于 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路研究中药益糖康对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢异常的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(9): 28-32.
- [27] Bass-Stringer S, Tai C M K, McMullen J R. IGF1-PI3K-induced physiological cardiac hypertrophy: Implications for new heart failure therapies, biomarkers, and predicting cardiotoxicity [J]. *J Sport Health Sci*, 2021, 10(6): 637-647.
- [28] 席啸虎. 基于网络药理学的麦冬治疗糖尿病成分和机制及其配伍后作用通路改变研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(4): 638-644.
- [29] 黄芳, 徐丽华, 郭建明, 等. 知母提取物的降血糖作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 25(6): 332-335.
- [30] 龚发萍, 郑鸣. 黄芩的化学成分及药理作用 [J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(34): 176-178.

[责任编辑 郑礼胜]