

羌活抗炎质量标志物的挖掘及资源评价

张英秀^{1,3,4}, 张剑光^{1,2,3,4}, 哈马莫支阿木^{1,3,4}, 李 丽^{1,3,4}, 杨子江¹, 张志锋^{1,3,4*}

1. 西南民族大学青藏高原研究院药学院, 四川 成都 610041

2. 钦州市卫生学校, 广西 钦州 535000

3. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225

4. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225

摘要: **目的** 基于生物合成途径及网络药理学理念, 从“化学成分-靶点”角度对羌活具有抗炎作用的质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 进行预测, 建立基于 Q-Marker 的羌活药材质量评价方法。**方法** 首先通过生物合成途径筛选可能的 Q-Marker; 其次采用中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology, TCMSP) 预测和筛选羌活的化学成分及潜在作用靶点, 然后在人类基因数据库 Genecards 及 OMIM 中检索抗炎相关靶基因, 利用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点”网络模型, 筛选出羌活抗炎作用的 Q-Marker; 再次采用分子对接技术对筛选出的化合物与靶点 (PTGS2) 进行对接; 最后采用 UHPLC 同时测定来自不同基原和不同产地的羌活的 Q-Marker 以评价其资源品质;**结果** 紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等化合物是羌活抗炎作用的主要活性物质, 可作为 Q-Marker 的主要选择。分子对接结果证实紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等 Q-Marker 与 PTGS2 水解酶的结合能低, 构象稳定。建立了基于 UHPLC-DAD 测定羌活 Q-Marker 的方法, 15 批不同基原和产地的样品, 紫花前胡苷质量分数为 0.05~14.84 mg/g, 香叶木苷质量分数 0.04~3.88 mg/g, 佛手柑内酯质量分数为 0.07~0.32 mg/g, 羌活醇质量分数为 0.10~16.76 mg/g, 异欧前胡素质量分数为 0.20~7.99 mg/g。**结论** 基于生物合成途径、网络药理、分子对接和 UHPLC 预测并分析羌活抗炎 Q-Marker 的方法科学、可行, 为羌活的质量标准提升和资源品质评价提供新思路。

关键词: 羌活; 生物合成途径; 网络药理学; 质量标志物; 分子对接; 质量评价; 紫花前胡苷; 香叶木苷; 佛手柑内酯; 羌活醇; 异欧前胡素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0652-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.033

Excavation and resource evaluation of anti-inflammatory quality markers of *Notopterygii Rhizoma et Radix*

ZHANG Ying-xiu^{1,3,4}, ZHANG Jian-guang^{1,2,3,4}, HAMAMAZHI Amu^{1,3,4}, LI Li^{1,3,4}, YANG Zi-jiang¹, ZHANG Zhi-feng^{1,3,4}

1. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Qinzhou Health School, Qinzhou 535000, China

3. Key Laboratory of Protection and Utilization of Ethnic Medicinal Resources in Qinghai-Tibet Plateau, State Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610225, China

4. Sichuan Qiang and Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

Abstract: **Objective** A component-target method was developed to predict anti-inflammatory quality markers (Q-Marker) and evaluate the quality of Qianghuo (*Notopterygii Rhizoma et Radix*) based on the concept of biosynthetic pathway and network pharmacology. **Methods** The biosynthetic pathway was used to predicting potential Q-Markers. The component and potential targets of *Notopterygii Rhizoma et Radix* were predicted and screened by traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP). Then, the Genecards and OMIM databases were used to search anti-inflammatory target genes. The component-target network was built with Cytoscape software to screen the anti-inflammatory Q-Markers. Then, molecular docking technology was

收稿日期: 2022-05-03

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2019YFC1712503); 四川省科技厅区域创新合作项目 (20QYCX0106); 西南民族大学中央高校基本科研业务专项基金项目 (2021HQZZ01); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金优秀学生培养工程项目 (2021NYYXS15)

作者简介: 张英秀, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源品质评价。E-mail: 1831307957@qq.com

*通信作者: 张志锋, 研究员, 研究方向为药用植物资源品质评价。E-mail: zhangzhf99@gmail.com

used to dock the selected compounds with the target (PTGS2). Finally, Q-Markers of *Notopterygii Rhizoma et Radix* from different base sources and producing areas were simultaneously determined by UHPLC to evaluate their resource quality. **Results** Nodakenin, diosmin, bergapten, notopterol and isoimperatorin were the main active compounds with anti-inflammatory action of *Notopterygii Rhizoma et Radix* was established, which can be used as the main selection of Q-Markers. The results of molecular docking showed that the binding energy between Q-Markers and PTGS2 was low and conformation was stable. Fifteen batches of samples from different base sources and producing areas were investigated. The content respectively was 0.05—14.84 mg/g in nodakenin, 0.04—3.88 mg/g in diosmin, 0.07—0.32 mg/g in bergapten, 0.10—16.76 mg/g in notopterol and 0.20—7.99 mg/g in isoimperatorin. **Conclusion** It was scientific and reasonable to predict the anti-inflammatory Q-Markers of *Notopterygii Rhizoma et Radix* based on biosynthetic pathway, network pharmacological and molecular docking. The study provides new method for improving of quality standard and the quality evaluation of *Notopterygii Rhizoma et Radix*.

Key words: *Notopterygii Rhizoma et Radix*; biosynthetic pathway; network pharmacological; quality marker (Q-Marker); molecular docking; quality evaluation; nodakenin; diosmin; bergapten; notopterol; isoimperatorin

中药的化学成分复杂,受不同基原、不同产地、生态环境等多种因素影响,中药材的质量控制一直受到巨大挑战^[1-2]。2016 年刘昌孝院士^[3]提出的质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 是中药质量控制的新概念,对中药质量控制具有重要意义^[4-5]。Q-Marker 是以疗效为核心的质量控制体系,从中药疗效的有效性寻找物质基础并筛选出质量控制标志成分,然而如何筛选和确定 Q-Marker 是关键。

随着现代生物学技术的发展,通过挖掘中药活性成分生物合成途径及关键酶,并利用合成生物学技术构建模式植物中新的代谢途径,是一种崭新的、极具潜力的获取药用化合物的方法^[6-9]。因此,利用合成生物学策略筛选活性成分及潜在 Q-Marker,为进一步药材质量控制奠定良好基础。近年来基于靶点、蛋白、疾病、药物小分子为研究对象开展生物系统网络分析,构建药物-靶点-疾病网络系统,系统地阐明成分-靶点-疾病之间的潜在机制与联系,进而了解他们之间的相互作用关系^[10],为中药作用靶点预测、活性成分筛选、药物新的适应症的理論开发挖掘提供新的思路^[11-13]。分子对接“锁和钥匙模型”理论由 Fisher. E 提出^[14],是基于计算机辅助设计寻找已知结构的大分子(受体)与小分子(配体)活性位点的低能结合模式的过程,并筛选出活性成分的重要技术^[15-16]。本研究借助网络药理学探寻联系化学成分与相应疾病靶点的桥梁,推测与疾病作用靶点相关的核心化学成分,通过分子对接从繁多的化合物筛选出活性小分子作为药材的 Q-Marker。

羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 和宽叶羌活 *N. franchetii* H. de Boiss. 的干燥根及根茎^[17]。羌活主要分布于我国青

海、甘肃、四川和云南等地,临床上主要用于治疗外感风寒、寒湿痹、痈疽疮毒、上肢风湿疼痛等症状。羌活含有香豆素、有机酸、黄酮、挥发油等化合物^[18-19],药理研究表明,羌活具有抗炎镇痛、抗心肌缺血、抗休克、抗血栓、抗氧化的药理作用^[20-22],尤其抗炎作用疗效较为显著,但其抗炎活性物质及 Q-Marker 尚不清楚。本实验利用系统生物学的策略对 Q-Marker 及药材质量控制进行探索,通过整合生物合成途径、网络药理学和分子对接等技术,筛选出具有羌活抗炎作用相关潜在 Q-Marker,采用 UHPLC-DAD 建立基于 Q-Marker 的含量测定方法,评价其资源品质,为中药质量标准的提升与资源品质评价提供新思路。

1 材料与设备

1.1 仪器

Waters Acquity®H-Class UHPLC 型超高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器及 Empower3 工作站(美国 Waters 公司);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司);METTLER AE240 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品紫花前胡苷(批号 17051905)、香叶木苷(批号 17010603)、补骨酯素(批号 17010603)、佛手柑内酯(批号 17061201)、欧前胡素(批号 17041207)均购自成都康邦生物科技有限公司;羌活醇对照品(批号 Q-010-170426)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;异欧前胡素对照品(批号 wkq6032205)购自四川省维克奇生物科技有限公司;以上对照品质量分数均>98%;乙腈(Fischer 公司);水为超纯水。15 批次药材(S1~S7 为羌活,

S8~S15 为宽叶羌活)经西南民族大学张志锋教授鉴定为伞形科植物羌活 *N. incisum* Ting ex H. T. Chang 和宽叶羌活 *N. franchetii* H. de Boiss. 的干燥根及根茎, 标本保存于西南民族大学, 样品来源见表 1。

表 1 样品收集信息

Table 1 Information of sample collection

编号	基原	收集地点	采集时间
S1	羌活	四川小金	2017-10
S2	羌活	四川汶川	2017-10
S3	羌活	四川壤塘	2017-10
S4	羌活	四川壤塘	2017-12
S5	羌活	青海西宁	2017-10
S6	羌活	四川九寨沟	2017-11
S7	羌活	四川九寨沟	2017-10
S8	宽叶羌活	四川壤塘	2017-10
S9	宽叶羌活	四川阿坝	2017-10
S10	宽叶羌活	甘肃宕昌	2017-10
S11	宽叶羌活	四川甘孜	2017-10
S12	宽叶羌活	四川金川	2017-10
S13	宽叶羌活	四川九寨沟	2017-10
S14	宽叶羌活	四川九寨沟	2017-10
S15	宽叶羌活	四川九寨沟	2017-11

2 方法与结果

2.1 基于生物合成途径的羌活潜在 O-Marker 预测

中药药理作用与其所含的次生代谢物质有关,药材质量及有效性取决于次生代谢物质积累^[23],通过分析羌活植物体内次生代谢产物的来源及生物合成途

径,寻找羌活可能的潜在 Q-Marker。羌活根及根茎主要含有羌活醇、紫花前胡苷、佛手柑内酯、异欧前胡素、欧前胡素、佛手柑亭、羌活酚、珊瑚菜素等香豆素类化合物,其中活性成分多以补骨脂素为基本母核的线型呋喃香豆素为主,它们来源于苯丙基途径。研究表明^[24-26],羌活香豆素类成分在生物合成中,补骨脂素是由苯丙氨酸通过苯丙氨酸解氨酶、肉桂-4-羟化酶、4-香豆酸辅酶 A、伞形酮二甲基烯丙基转移酶、异紫花前胡内酯合酶、补骨脂素合酶等各种酶的作用生物合成得到,见图 1。由图 1 中的生物合成代谢途径,补骨脂素通过花椒毒酚合酶作用合成中间体花椒毒酚,花椒毒酚在酶的作用下进一步合成欧前胡素;补骨脂素通过佛手酚酶作用合成佛手酚,佛手酚通过佛手酚-O-基转移酶作用下进一步合成佛手柑内酯,此外通过其他相关酶及生物合成过程,生成一系列呋喃型香豆素类活性成分。由此可见,羌活呋喃香豆素类化合物可能通过补骨脂素生物合成得到衍生物,补骨脂素可能是呋喃型香豆素类化合物生物合成最为关键的化合物。因此,羌活质量控制体系不仅包括补骨脂素,而且还应该包括羌活醇、紫花前胡苷、佛手柑内酯、异欧前胡素、佛手柑亭、羌活酚、欧前胡素等其他香豆素化合物,这些化合物都可能是羌活的潜在 Q-Marker。

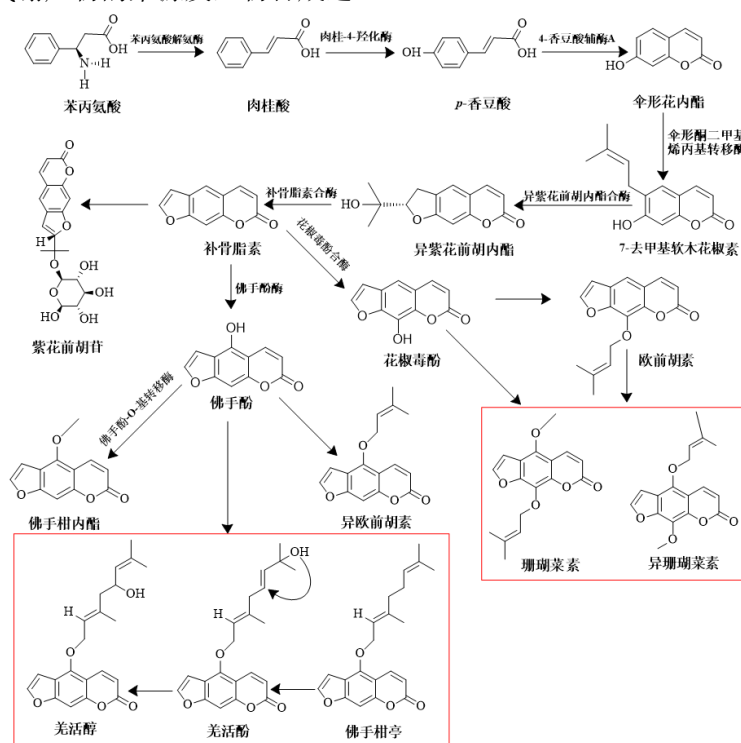


图 1 羌活呋喃香豆素的生物合成关系

Fig. 1 Biosynthesis relationship of furocoumarines in *Notopterygii Rhizoma et Radix*

2.2 基于网络药理学的羌活抗炎作用的潜在 Q-Marker 预测

2.2.1 羌活有效成分的收集及筛选 通过在中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology, TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmsspsearch.php>) 中输入关键词“羌活”, 获得活性化学成分信息。依据化合物

的药动学参数口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-like, DL) ≥ 0.18 进行筛选^[27], 并补充因其筛选条件被删除但在生物合成途径潜在的 Q-Marker, 而且文献已报道有明确药理作用的活性成分, 如羌活醇、补骨脂素、佛手柑内酯等, 共筛选出 18 个候选有效成分见表 2。

表 2 羌活的活性成分信息

Table 2 Information on active ingredients in *Notopterygii Rhizoma et Radix*

Mol ID	化合物	OB/%	DL	靶点
MOL011975	羌活酚	62.97	0.48	KCNH2
MOL004792	紫花前胡苷	57.12	0.69	ESR1、PTGS2、ACHE
MOL001942	异欧前胡素	45.46	0.23	PTGS2
MOL001951	佛手柑亭	41.73	0.42	KCNH2、PTGS2
MOL011969	去甲呋喃羽叶云香素	41.31	0.21	AR
MOL002644	珊瑚菜素	40.19	0.28	CHRM1、PTGS2、RXRA、ADRB2、DPP4
MOL0119638	香叶基-5-甲氧基补骨脂素	40.97	0.50	KCNH2、PTGS2、DPP4、NCOA1
MOL000358 β	谷甾醇	36.91	0.75	PGR、NCOA2、PTGS1、PTGS2、KCNH2、CHRM3、CHRM1、PDE3A、HTR2A、ADRA1A、CHRM2、ADRB2、SLC6A4、OPRM1、CHRNA7、BCL2、BAX、CASP9、CASP3、CASP8、PRKCA、TGFB1、PON1、MAP2
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	PGR、NCOA2、NR3C2
MOL001941	欧前胡素	34.55	0.22	CHRM1、PTGS2、DPP4、PIK3CG、MAOB
MOL001956	异珊瑚菜素	32.69	0.28	CHRM1、PTGS2、RXRA、ADRB2、DPP4
MOL002811	香叶木素	31.14	0.27	NOS2、PTGS1、PTGS2、DPP4、PRSS1、NCOA2、NCOA1
MOL011971	diversoside_qt	67.57	0.31	ADRB2
MOL011968	coumarin	33.07	0.78	/
MOL0119626	-feruloylnodakenin	32.02	0.67	/
MOL011974	羌活醇	8.71	0.46	KCNH2、PTGS2
MOL001950	补骨脂素	33.60	0.10	ACHE、CRH
MOL001945	佛手柑内酯	42.21	0.13	CBR1、KCNK3、CA9、CA1、ALOX5、ACHE

2.2.2 羌活有效成分靶点筛选 通过 TCMSP 数据库输入羌活为关键词搜索作用靶点, 收集其靶点名称、化合物名称等信息, 保存为 txt 文件格式。利用 perl 软件对有效成分 txt 文件及作用靶点 txt 文件进行分析, 得到包含有效成分 ID、有效成分名字、靶点全名等相关信息的中药羌活有效成分靶点文件并保存, 筛选出羌活有效成分靶点 109 个, 去除重复后总共得到 53 个靶点, 并通过 perl 软件, 利用 Uniprot^[28]数据库对羌活有效成分靶点进行注释并换成对应基因的名称, 得到羌活活性成分的基因靶点。

2.2.3 抗炎作用靶点筛选 羌活临床上主要用于风寒感冒、头痛等症状的治疗, 其药理主要表现为抗炎作用。在人类基因数据库 Genecards^[29] (<https://www.genecards.org>) 及 OMIM^[30]数据库 (<https://omim.org>) 输入“anti-inflammatory”关键词, 搜索得到抗炎相关靶点, 去掉重复靶点, 经

与 Uniprot 数据库校正整合, 分别收集得到抗炎疾病靶点 3238 及 505 个。运用 Venny 平台 (版本 2.1, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将羌活有效成分靶蛋白与抗炎疾病靶点进行映射 (图 2), 得到羌活具有抗炎作用相关联的潜在作用靶点 41 个。

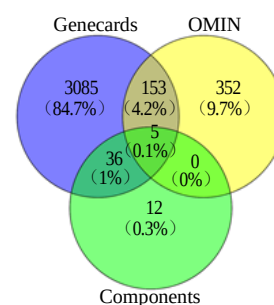


图 2 羌活活性成分-抗炎作用靶点韦恩图

Fig. 2 Venny diagram of active ingredient-anti-inflammation target in *Notopterygii Rhizoma et Radix*

2.2.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将羌活有效成分靶点与抗炎作用的共同靶点导入 String^[31] 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行 PPI 网络构建, 并将限定物种为 “Homo sapiens” 进行筛选, 获取交互作用。结果以 tsv 文件保存, 保留文件中 node1 和 node2 信息并导入到 Cytoscape3.6.1 软件, 构建 PPI 网络见图 3。共涉及 36 个节点, 108 条边。结果表明, 羌活抗炎作用的靶点之间相互作用、协同起效。节点大小及颜色表示 degree 的大小, 节点越大对应的 degree 越大, 颜色由浅蓝色到红色, 对应的 degree 越大。对其进行网络中节点的拓扑特征分析, 整个 PPI 网络的 degree 的中位数为 5.8, 一般认为 $\text{degree} \geq 2$ 倍中位数时, 该靶点比较重要, 为网络的核心靶点。因此, 靶点 CASP3 ($\text{degree} = 16$)、JUN ($\text{degree} = 12$)、PTGS2 ($\text{degree} = 12$) 为 PPI 网络的核心靶点。

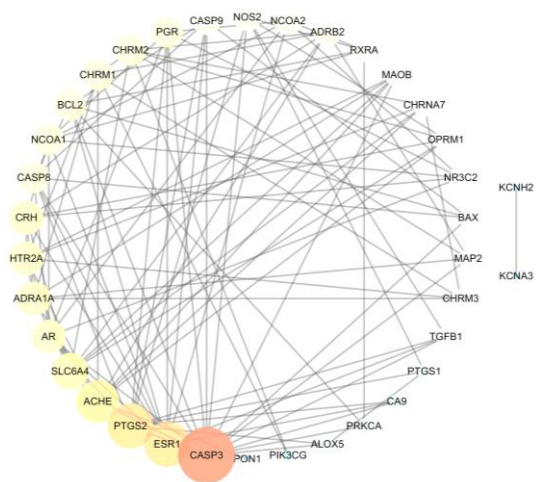


图 3 蛋白互作网络图

Fig. 3 Protein interactions network

2.2.5 抗炎成分-靶点网络的构建及关键靶点筛选 将数据库中挖掘到羌活活性成分候选化合物与作用靶点数据, 导入 Cytoscape3.6.1 软件, 构建羌活“成分-靶点”网络见图 4。不同靶点和活性成分间有相互联系, 表明羌活中同一个活性成分可作用于不同的靶点, 不同活性成分也可作用于同一个靶点, 体现其多成分、多靶点的抗炎过程中具有协同作用, 进一步分析得活性成分与靶点之间相互作用关系的总边数为 72 条。归纳总结得到 41 个羌活抗炎作用相关联的潜在作用靶点 (蓝色椭圆形为羌活抗炎作用靶点) 和 16 个具有抗炎作用的羌活有效成分节点 (绿色菱形为羌活抗炎作用的化学成分)。

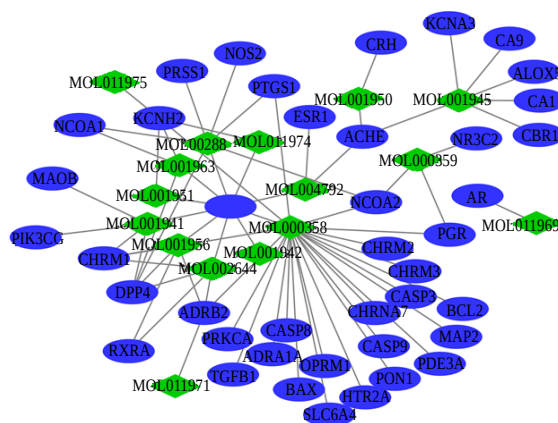


图 4 活性成分-靶点网络

Fig. 4 Ingredient-target network

在网络中, 基因靶点与化合物节点相互相连的条数越多, 意味着该节点在整个网络中发挥越为重要的作用, 点的大小用 degree 来表示, degree 值越大, 靶点与化合物的作用关系越密切, 也可能是化合物的关键靶点^[32]。化合物及靶点 degree 值排名前 23 见表 3, 排名前 3 的靶点分别为 PTGS2、DPP4、KCNH2, 其 degree 值分别为 10、5、5。与 PTGS2 相关联化合物分别是紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、佛手柑亭、欧前胡素、异珊瑚菜素、 β -谷甾醇、珊瑚菜素、香叶木素、8-香叶基-5-甲氧基补骨脂素等 10 个化合物。整合抗炎靶点蛋白互作网络及羌活抗炎成分-靶点网络分析, PTGS2 为羌活抗炎的关键靶点。

2.2.6 成分-靶点分子对接 PTGS2 是抗炎作用的靶点之一^[33-34], 亦是网络药理学筛选出羌活具有抗炎作用的关键靶点, 故本实验选择其为对接蛋白。PTGS2 前列腺素 G/H 合成酶 2 (ID: 5JVV) 受体, 利用 Auto Dock Tools 1.5.6 软件删除 PTGS2 蛋白复合物中水分子, 分离配体和受体, 添加非极性氢, 设定靶蛋白的活性中心, 活性中心三维坐标为 $\text{center}_x = 23.939$, $\text{center}_y = 36.049$, $\text{center}_z = 1.603$; 大小设置为 $\text{size}_x = 15$, $\text{size}_y = 15$, $\text{size}_z = 15$; 搜索精度 ($\text{exhaustiveness} = 32$), 其他参数设定为默认值, 保存为 pdbqt 文件。配体从 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载小分子 3D SDF 文件, 利用 pymol 软件确认空间结构无误后转换为 pdb 文件。将结构文件载入 Auto Dock Tools1.5.6, 添加氢, 保存为 pdbqt 文件。采用 Auto Dock Vina (<http://vina.scripps.edu/>) 进行分子对接, 选取结合能低的构象作为对接构象, 利用 pymol 对接构象进行可视化分析, 分子对接结果见表 4。

表 3 度值排名前 23 的信息

Table 3 Degree information of top 23

名称	度值	介值中心度	紧密度	类型
MOL000358	24	0.638 954 79	0.465 517 24	化合物
PTGS2	10	0.494 559 30	0.461 538 46	靶点
MOL002881	7	0.125 811 58	0.350 649 35	化合物
MOL001945	6	0.178 197 06	0.234 782 61	化合物
MOL002644	5	0.038 446 14	0.337 500 00	化合物
MOL001956	5	0.038 446 14	0.337 500 00	化合物
KCNH2	5	0.066 525 84	0.343 949 04	靶点
DPP4	5	0.023 177 59	0.295 081 97	靶点
MOL001941	5	0.081 048 72	0.333 333 33	化合物
ADRB2	4	0.054 975 00	0.339 622 64	靶点
MOL011963	4	0.029 981 39	0.333 333 33	化合物
CHRM1	4	0.045 685 03	0.348 387 10	靶点
ACHE	3	0.265 548 57	0.288 770 05	靶点
MOL004792	3	0.313 766 60	0.360 000 00	化合物
NCOA2	3	0.063 144 09	0.348 387 10	靶点
MOL000359	3	0.038 076 94	0.264 705 88	化合物
MOL001950	2	0.037 037 04	0.226 890 76	化合物
PTGS1	2	0.018 257 06	0.339 622 64	靶点
PGR	2	0.027 082 29	0.327 272 73	靶点
RXRA	2	0.000 140 00	0.255 924 17	靶点
MOL001951	2	0.006 364 18	0.325 301 20	化合物
MOL011974	2	0.006 364 18	0.325 301 20	化合物
NCOA1	2	0.001 702 11	0.268 656 72	靶点

表 4 分子对接结合能

Table 4 Binding energy value of molecular docking

编号	化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
1	紫花前胡苷	-39.30
2	8-香叶基-5-甲氧基补骨脂素	-38.46
3	羌活酚	-40.73
4	香叶木素	-35.12
5	羌活醇	-40.12
6	佛手柑亭	-37.20
7	β-谷甾醇	-43.05
8	谷甾醇	-43.05
9	珊瑚菜素	-34.70
10	欧前胡素	-33.86
11	异珊瑚菜素	-35.20
12	异欧前胡素	-34.28
13	去甲呋喃羽叶云香素	-35.95
14	佛手柑内酯	-31.84
15	香叶木苷	-44.31
16	补骨脂素	-30.26

蛋白受体与药物小分子配体形成构象结合能越低，结构越稳定。一般认为结合能数值小于-29.3 kJ/mol，说明受体和配体间具有较好的亲和力。从表 4 的结果表明，所有小分子配体与蛋白受体形成构象能量均小于-29.3 kJ/mol，亲和力较好，形成的结构稳定，结合活性较高，部分小分子化合物与 PTGS2 蛋白对接结果见图 5。分子对接结果证实筛选出的小分子是羌活具有抗炎作用的物质基础。

2.2.7 整合分析预测 Q-Marker 与羌活抗炎靶点有关联的 16 个活性成分中，与核心蛋白靶点 PTGS2 相关联的紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡

素、佛手柑亭、欧前胡素、异珊瑚菜素、香叶木素、8-香叶基-5-甲氧基补骨脂素等化合物在羌活抗炎的作用的更大，为潜在 Q-Marker。刘卫根等^[35-37]对羌活不同部位化学成分的含量测定研究发现，补骨脂素在羌活叶及叶柄含有丰富补骨脂素，在根部及茎低于定量限及检测限而无法测定；欧前胡素在根、茎、叶、叶柄中均低于检测限无法进行其含量测定分析；此外根、茎、叶、叶柄不同部位均含有丰富的紫花前胡苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等化合物。结合图 1 中次生代谢产物的生物合成途径，补骨脂素在根部含量低的原因可能是大量补骨脂素在叶及茎中生物合成紫花前胡苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等补骨脂素衍生物化合物而消耗殆尽造成的；欧前胡素含量低可能是其取代基母核 B 环 C₈ 位不易合成以及其在体内生物合成珊瑚菜素及异珊瑚菜素而消耗造成。中药化学成分复杂，成分的可测性是 Q-Marker 应用于质量控制的必要条件之一，以达到质量控制的目的。整合生物合成途径、网络药理学是中药 Q-Marker 指标选择核心理论^[38-39]，初步确定紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等 5 种化合物是羌活具有抗炎作用的主要活性物质，拟可以作为羌活抗炎作用 Q-Marker 的主要可测的指示性成分，并采用 UHPLC-DAD 对不同基原羌活样品进行 Q-Marker 含量测定研究并加以验证 Q-Marker 筛选方法的可行性。

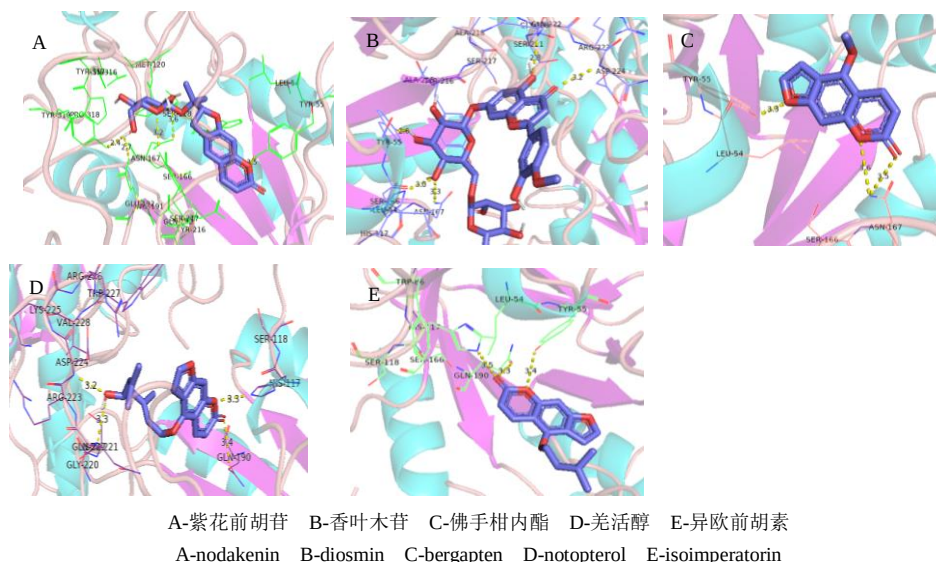


图5 PTGS2与化合物分子对接图

Fig. 5 Molecular docking of PTGS2 and compounds

2.3 基于UHPLC-DAD对羌活Q-Marker的定量分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UHPLC HSS C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱: 0~4 min, 20%~77% A; 4~8 min, 77%~80% A; 8~9 min, 80%~87% A; 9~10 min, 87%~90%A; 体积流量为 0.15 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 270 nm; 进样量 2 μL。羌活色谱图见图 6。

2.3.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛) 0.4 g, 精密称定, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 精密加甲醇至刻度线, 称定质量, 超声处理 (200 W, 40 kHz) 30 min, 冷却, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取紫花前胡苷 4.72 mg、香叶木苷 0.80 mg、佛手柑内酯 1.40 mg、羌活醇 2.34 mg、异欧前胡素 2.32 mg 置入 10 mL 量瓶中加入甲醇超声使溶解再定容至刻度线, 摇匀备用, 分别得到质量浓度分别为 0.472、0.080、0.140、0.234、0.232 mg/mL 对照品储备液。

2.3.4 线性关系考察 分别将紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素混合对照品溶液稀释 0、2、20、100、200、400 倍, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样 2 μL, 记录各对照品峰面积。以待测成分色谱峰

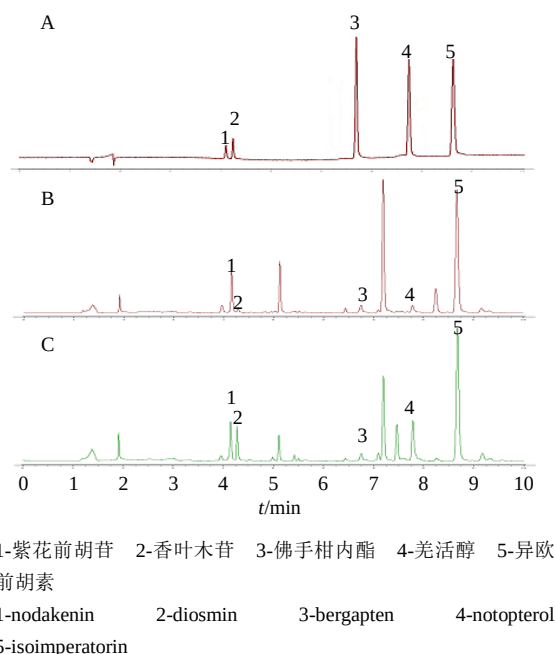


图6 混合对照品(A)、羌活(B)和宽叶羌活(C)的UHPLC色谱图

Fig. 6 UHPLC chromatogram of mixed references (A), *N. incisum* (B) and *N. franchetii* (C)

峰面积为纵坐标(Y), 待测成分的质量浓度为横坐标(X)进行线性回归, 5种成分的线性回归方程和线性范围结果如下: 紫花前胡苷线性回归方程 $Y=2\,950\,129X-1127$, $R^2=0.999\,8$, 线性范围为 0.078~40.000 μg/mL; 香叶木苷线性回归方程: $Y=14\,231\,402X+6764$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围为 0.027~29.000 μg/mL; 佛手柑内酯线性回归方

程: $Y=54\ 783\ 139\ X+873$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围: $0.028\sim33.000\ \mu\text{g/mL}$; 羌活醇线性回归方程: $Y=29\ 676\ 924\ X+240$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围: $0.058\sim35.000\ \mu\text{g/mL}$; 异欧前胡素线性回归方程: $Y=36\ 233\ 163\ X+999$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围: $0.039\sim42.000\ \mu\text{g/mL}$ 。表明线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 分别取高、中、低质量浓度的对照品混合溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件在 1 d 之内连续进样 3 次进行日内精密度试验, 连续进样 3 d 进行日间精密度试验, 分别测定计算紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素的峰面积, 分别计算日内及日间精密度 RSD。结果显示, 各对照品日内及日间 RSD 均小于 3.0%, 表明本实验条件下各成分的日内及日间仪器精密性良好, 符合分析测定要求。

2.3.6 重复性试验 取同一批次羌活药材 (S6), 按“2.3.2”项下供试品溶液的配制进行前处理, 制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 测定样品中紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素的含量, 计算其 RSD。结果显示各 RSD 分别为 1.17%、1.08%、1.33%、1.12%、1.06%, 表明此方法的重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取羌活样品 (S6), 按“2.3.2”项下供试品溶液的配制进行前处理, 制备供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 分别在 0、2、4、8、12、24、48 h 进样, 测定样品中紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素的含量, 计算其 RSD。结果显示各 RSD 分别 1.01%、0.78%、1.23%、1.32%、0.88%, 表明供试品在 48 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取羌活样品 (S6), 称取 9 份, 每份 0.2 g, 分成 3 组, 每组 3 份, 各组分别加入对照品溶液适量 (分别相当于药材中各个对照品含量的 80%、100%、120%), 按“2.3.2”项下供试品溶液的配制进行前处理制备供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 测定样品中紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素的含量, 计算各被测成分的平均加样回收率和 RSD。结果其平均回收率分别为 99.85%、99.78%、98.77%、98.76%、101.11%; RSD 分别为 2.56%、0.99%、0.74%、1.43%、1.93%, 该实验条件下各成分的加样回收率良好。

2.3.9 样品测定 分别称取各羌活样品粉末 0.4 g, 按“2.3.2”项下制备供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件分析, 根据线性回归方程计算样品中各成分的含量。结果见表 5。结果表明所有羌活样品中均可以测出紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等 5 种成分的含量, 而补骨脂素、欧前胡素含量非常低, 均低于检测限而未被检出。实验结果证实 Q-Marker 筛选过程的合理性和可行性, 最后确定紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素 5 个化合物为羌活发挥抗炎作用的 Q-Marker。

表 5 羌活含量测定结果 ($n=3$)

Table 5 Determination of components in *Notopterygii Rhizoma et Radix* samples ($n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	紫花前胡苷	香叶木苷	佛手柑内酯	羌活醇	异欧前胡素
S1	1.23	0.18	0.26	2.77	0.71
S2	0.38	0.04	0.07	3.81	0.41
S3	8.15	3.88	0.13	15.47	4.88
S4	0.05	0.24	0.18	12.06	4.26
S5	2.67	0.18	0.22	16.76	5.13
S6	2.42	0.83	0.18	11.33	5.02
S7	1.45	0.15	0.13	1.78	0.84
S8	4.15	0.23	0.32	11.66	5.15
S9	1.42	0.16	0.14	4.89	1.88
S10	14.84	1.01	0.26	0.10	7.99
S11	2.11	0.18	0.08	14.79	6.02
S12	12.12	1.83	0.27	1.82	4.99
S13	1.16	0.88	0.10	0.27	0.78
S14	1.11	0.26	0.24	5.73	3.94
S15	7.06	0.96	0.27	0.91	0.20

2.4 基于 Q-Marker 的羌活药材资源品质评价

为了更直接评价 5 个 Q-Marker 对样品的分辨能力, 采用 SPSS20.0 软件中的因子分析对原始数据进行标准化处理, 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 以主成分的特征值及贡献率为作为确定主成分依据, 结果见表 6。由表 6 可知, 主成分的提取原则为其对应的特征值 > 1, 因此选取前 2 个主成分 (PC1 和 PC2), 累计贡献率为 80.403%, 表明这 2 个主成分的信息量大, 基本可以客观反应羌活样本的信息。其中, PC1 特征值为 2.266, 方差贡献率为 45.327%, 异欧前胡素、羌活醇和佛手柑内酯在 PC1 有较高载荷, 呈高度正相关; PC2 特征值为 1.754, 方差贡献率为 35.076%, 紫花前胡苷和香木叶苷在 PC2 有较高载荷, 呈高度正相关, 初始因子载荷矩阵见表 7。

为了对样品品质的优劣进行评价, 对 15 个羌活样品进行综合评价, 利用评价函数计算出各样品

表 6 特征值和方差贡献率

Table 6 Eigenvalue and variance contribution rate

主成分	初始特征峰			被提取的载荷平方和		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
PC1	2.266	45.327	45.327	2.266	45.327	45.327
PC2	1.754	35.076	80.403	1.754	35.076	80.403
PC3	0.669	13.384	93.788			
PC4	0.282	5.646	99.433			
PC5	0.028	0.567	100.000			

表 7 因子载荷矩阵

Table 7 Factor load matrix

成分	主成分	
	PC1	PC2
紫花前胡苷	0.370	0.888
香叶木苷	0.517	0.662
佛手柑内酯	0.775	-0.478
羌活醇	0.786	-0.570
异欧前胡素	0.803	0.223

的综合主成分 F 值^[40]，总得分越高表明该样品的综合品质越好。根据 PCA 结果可知，PC1 和 PC2 累积方差贡献率为 80.403%，说明这 2 个主成分代表原指纹图谱数据的主要信息，取前 2 个特征值，并计算相应的特征向量，2 个主成分得分模型分别为 $PC1 = 0.163\ XZ_1 + 0.228\ XZ_2 + 0.342\ XZ_3 + 0.347\ XZ_4 + 0.354\ XZ_5$ ； $PC2 = 0.506\ XZ_1 + 0.343\ XZ_2 - 0.272\ XZ_3 - 0.325\ XZ_4 + 0.127\ XZ_5$ 。根据主成分综合模型公式： $F = 0.507\ 5PC1 + 0.492\ 4PC2$ 计算综合得分值，并对其值进行排序（表 8）。结果表明，以具有抗炎作用的 Q-Marker 作为评价指标评价不同的羌活样品，S3 的得分最高，即品质最优，综合排名前 5 分布为 S3（羌活）、S5（羌活）、S11（宽叶羌活）、S8（宽叶羌活）、S6（羌活）；综合得分最后 5 位分别是样品 S1（羌活）、S15（宽叶羌活）、S2（羌活）、S7（羌活）、S13（宽叶羌活），品质较差。不同基原羌活在品质上有明显的差异，这可能与羌活的种质、生长环境、土壤等因素有关。

3 讨论

中药成分复杂，Q-Marker 成分的可测性要求其具有一定的含量且较大、能满足定量测定方法专属性的活性物质。通过植物体内生物合成途径，筛选出紫花前胡苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡等化合物为潜在的 Q-Marker。这些潜在的化合物与网络药理筛选出抗炎的活性成分相符，进一步证实本研究通过网络药理学筛选潜在 Q-Marker 的合理性。与关键靶点 PTGS2 的分子对接显示，这 5 个成分的结合能均小于 -29.3 kJ/mol，亲和力较好，

表 8 羌活样品的主成分得分

Table 8 PCA scores of *Notopterygii Rhizoma* et *Radix* samples

编号	PC1	PC2	综合得分 (F)	排名
S3	2.020 117	1.930 984	1.978 207	1
S5	1.614 614	1.956 063	1.761 132	2
S11	0.690 649	0.752 411	0.716 553	3
S8	0.417 741	0.425 983	0.420 710	4
S6	0.337 564	0.369 256	0.350 882	5
S4	0.271 319	0.406 886	0.330 046	6
S10	0.484 056	-0.010 390	0.267 651	7
S12	0.250 498	-0.111 340	0.092 290	8
S14	-0.103 850	-0.021 160	-0.067 630	9
S9	-0.706 440	-0.637 570	-0.675 340	10
S1	-1.073 840	-0.206 070	-0.693 710	11
S15	-0.797 450	-0.870 970	-0.828 320	12
S2	-1.088 680	-0.964 400	-1.032 840	13
S7	-1.089 550	-1.028 810	-1.061 420	14
S13	-1.226 750	-1.196 360	-1.211 660	15

形成的结构稳定，结合活性较高。因此，通过网络药理学结合 Q-Marker 核心理论筛选出紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素等 5 种活性成分作为是羌活抗炎作用的 Q-Marker，与 Q-Marker 的“有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍”五原则的核心内容一致^[38]。

本实验建立了 UHPLC-DAD 法同时测定羌活中 Q-Marker 含量的方法，各成分专属性强；各待测成分日内及日间精密度良好，回归方程曲线、稳定性、重现性均良好，符合含量测定条件要求。本实验还对色谱条件进行优化，考察不同组成的流动相（乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.05%乙酸），不同体积流量（0.15、0.30、0.40 mL/min），不同柱温（25、30、40 ℃）等条件，最终确定色谱条件为乙腈-水为流动相，体积流量为 0.15 mL/min，柱温 30 ℃；检测波长 270 nm；在该条件下基线平稳，分离度好。

本研究通过次生代谢产物的生物合成途径、网络药理学与 UHPLC-DAD 对羌活抗炎作用的 Q-Marker 进行预测及分析。结合 Q-Marker 核心理论最终筛选出紫花前胡苷、香叶木苷、佛手柑内酯、羌活醇、异欧前胡素为羌活具有抗炎作用潜在的 Q-Marker；最后通过 UHPLC-DAD 对羌活 2 种

基原 15 批次样品的含量测定分析进行验证, 结果验证了此次 Q-Marker 筛选过程的合理性和可行性。因此, 本研究提供了一种实用的挖掘中药 Q-Marker 的研究方法, 对其他中药的质量控制及资源品质评价研究也具有借鉴意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Drasar P, Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 812(1/2): 3-21.
- [2] Yang W Z, Zhang Y B, Wu W Y, et al. Approaches to establish Q-Markers for the quality standards of traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(4): 439-446.
- [3] 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.
- [4] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [5] 马小兵, 吕露阳, 王甜甜, 等. 多基原藏药材“美多罗米”中质量标志物的初步预测及分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 310-314.
- [6] 赵莹, 杨欣宇, 赵晓丹, 等. 植物类黄酮化合物生物合成调控研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 454-463.
- [7] 黄璐琦, 高伟, 周雍进. 合成生物学在中药资源可持续利用研究中的应用 [J]. 药学报, 2014, 49(1): 37-43.
- [8] 周明, 沈勇根, 朱丽琴, 等. 植物黄酮化合物生物合成、积累及调控的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(18): 216-221.
- [9] 徐德宏, 崔培梧, 罗怀浩, 等. 天麻素生物合成的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5877-5883.
- [10] 胡晓茹, 郑海荣, 党海霞, 等. 基于网络药理学的红花注射液用红花药材质量控制方法研究 [J]. 药学报, 2019, 54(11): 2074-2082.
- [11] Li H Y, Zhao L H, Zhang B, et al. A network pharmacology approach to determine active compounds and action mechanisms of Ge-Gen-Qin-Lian Decoction for treatment of type 2 diabetes [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 495840.
- [12] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [13] Dai X M, Cui D N, Wang J, et al. Systems pharmacology based strategy for Q-Markers discovery of HuangQin Decoction to attenuate intestinal damage [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 236.
- [14] van Alphen R J, Wiemer E A C, Burger H, et al. The spliceosome as target for anticancer treatment [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2): 228-232.
- [15] 李婧, 马小兵, 沈杰, 等. 基于文献挖掘与分子对接技术的抗新型冠状病毒中药活性成分筛选 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 845-850.
- [16] 刘钱, 贺桢翔, 杨慧, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索肺毒清治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在活性成分 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1713-1722.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 190.
- [18] 张艳侠, 蒋舜媛, 徐凯节, 等. 宽叶羌活种子的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 941-945.
- [19] 罗鑫, 王雪晶, 赵祎武, 等. 羌活化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1492-1495.
- [20] 张明发, 沈雅琴, 朱自平, 等. 羌活的镇痛抗炎抗血栓形成作用研究 [J]. 中医药研究, 1996(6): 51-53.
- [21] 陈虹宇, 尹显梅, 陈玲, 等. 不同商品规格等级羌活的镇痛抗炎作用对比研究 [J]. 中药与临床, 2016, 7(2): 15-17.
- [22] 巩子汉, 段永强, 付晓艳, 等. 羌活的药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(5): 192-194.
- [23] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1415-1418.
- [24] 王熹鹏. 香豆素的结构生物合成及其功能分析 [J]. 农产品加工: 学刊, 2011(8): 128-131.
- [25] 张娟, 刘林德, 王蕾, 等. 天然香豆素类物质的利用和研究进展 [J]. 鲁东大学学报: 自然科学版, 2013, 29(3): 223-228.
- [26] 王凯顺, 袁慕华, 刘璇, 等. 大孔树脂富集多舌飞蓬总咖啡酸酯的工艺 [J]. 精细化工, 2017, 34(2): 186-190.
- [27] 杨释岑, 刘志强, 刘和波, 等. 利用网络药理学方法研究交泰丸治疗糖尿病的作用机制 [J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2656-2661.
- [28] Apweiler R, Bairoch A, Wu C H, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(suppl_1): D115-D119.
- [29] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *CurrProtoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [30] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [31] von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, et al. STRING: A

- database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [32] 陈启洪, 李晓飞, 段灿灿, 等. 网络药理学探讨杜仲主要活性成分及药理作用机制 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 419-426.
- [33] 王梦婷. 小白菊内酯抗炎效果及其机制研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
- [34] 杜叶青, 段治康, 董舒卉, 等. 基于网络药理学的金银花活性成分抗炎作用机制的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2019, 29(2): 96-102.
- [35] 刘卫根, 王亮生, 周国英, 等. 羌活不同部位有机酸和香豆素类化合物含量的比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 1950-1956.
- [36] 刘卫根, 王亮生, 周国英, 等. 宽叶羌活不同部位有效成分的分布特征 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1589-1595.
- [37] 刘卫根, 周国英, 郑金顺, 等. 栽培宽叶羌活中有机酸和香豆素含量的季节动态变化研究 [J]. 化学研究与应用, 2018, 30(1): 28-33.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 张文霖. 主成分分析在 SPSS 中的操作应用 [J]. 市场研究, 2005(12): 31-34.

[责任编辑 时圣明]