

基于方证代谢组学联合靶向蛋白分析策略的痹痛宁胶囊质量标志物 (Q-Marker) 研究

刘绍博^{1,2}, 姚龙宇^{1,2}, 查鑫^{1,2}, 陈妍^{1,2}, 陶玲^{1,2}, 闫广利³, 孔玲³, 沈祥春^{1,2}, 王喜军^{3*}

1. 贵州医科大学 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 贵州 贵阳 550014

2. 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550014

3. 黑龙江中医药大学, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 采用方证代谢组学联合靶向蛋白分析策略, 进行痹痛宁胶囊 (Bitongning Capsules, BC) 质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 的深入挖掘, 为 BC 质量标准的提升奠定基础。方法 以 BC 的临床主治病症为核心, 建立风寒湿痹证下的骨关节病大鼠模型, 进行非靶向代谢组学分析, 提取病症成立下的血液代谢标记物, 在药物有效性的前提下, 确定 BC 治疗风寒湿痹证下骨关节病的关键代谢轮廓, 并联合生物信息学方法, 提取关键代谢轮廓中的核心蛋白靶点, 进行与 BC 体内直接作用物质的分子对接分析, 确定药效物质基础, 并联合 Q-Marker “五原则” 体系, 最终完成 BC Q-Marker 的深入挖掘。结果 代谢组学分析中共发现以 1-甲基烟酰胺、D-谷氨酰胺、亚麻酸等为主的 30 个小分子代谢产物, 并确定 α -亚麻酸代谢为 BC 治疗风寒湿痹证下骨关节病的关键调控代谢通路, 进一步进行该通路所涉基因的提取, 最终得到 PLA2G2A、PLA2G2F、PLA2G2D 等 6 个关键蛋白靶点。同时, 共筛选所得 BC 体内直接作用物质 22 种, 在分子对接分析的基础上, 确定了异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮 3 种体内直接作用物质, 符合 Q-Marker 的“五原则”要求。结论 异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮成分在满足有效性的前提下, 同时还满足可测性、溯源性、功效关联性、特异性等原则, 确定为 BC Q-Marker。

关键词: 痹痛宁胶囊; 质量标志物; 方证代谢组学; 骨关节病; 药效物质基础; 风寒湿痹证; 生物信息学; 分子对接; α -亚麻酸; 可测性; 溯源性; 功效关联性; 特异性; 异甘草苷; 香橙素; 5,3',4'-三羟基黄酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)08-2662-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.004

Research on improvement of quality markers for Bitongning Capsules based on strategy with “chinmedomics - targeted protein analysis”

LIU Shaobo^{1,2}, YAO Longyu^{1,2}, ZHA Xin^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}, TAO Ling^{1,2}, YAN Guangli³, KONG Ling³, SHEN Xiangchun^{1,2}, WANG Xijun³

1. Guizhou Medical University, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

2. Guizhou Provincial Engineering Research Center for Efficient Utilization of Characteristic Natural Medicinal Resources, Guizhou Provincial Characteristic Key Laboratory of Natural Medicinal Pharmacology and Pharmaceutical Property Evaluation in Higher Education Institutions, Joint Key Laboratory of Guizhou Medical University and Guiyang City, Key Laboratory of Effective Utilization of Natural Medicinal Resources, Guiyang 550014, China

3. Heilongjiang University of traditional Chinese medicine, National Key Laboratory for the integration and innovation of classical prescriptions and modern Chinese medicine, Harbin 150040, China

收稿日期: 2024-12-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2503003); 国家自然科学基金青年基金项目 (82405036); 中央引导地方科技发展资金项目 (黔科合中引地[2023]003); 贵州省高层次人才百层次人才 (黔科合平台人才-GCC[2023]048); 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室揭榜挂帅项目 (JBGS-FAMP202304); 贵州省教育厅省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室开放基金课题资助项目 (黔教技[2023]112 号); 贵州省卫健委科学技术 (gzwkj2024-516); 贵州医科大学高层次人才启动 (校博合 J 字 [2022]008 号)

作者简介: 刘绍博, 男, 博士, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: liushaobo@gmc.edu.cn

***通信作者:** 王喜军, 男, 二级教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: xijunw@sina.com

Abstract: Objective To conduct an in-depth exploration of quality markers for Bitongning Capsules (BC, 痹痛宁胶囊) using a strategy integrating formula-pattern metabolomics and targeted protein analysis, thereby laying the foundation for enhancing its quality standards. **Methods** Centered on the clinical indications of BC, a rat model of bone and joint disease with wind-cold-dampness arthralgia syndrome was established. Non-targeted metabolomics analysis was performed to identify blood metabolic markers associated with disease progression. Under the premise of drug efficacy, key metabolic profiles regulated by BC in treating bone and joint diseases under this syndrome were determined. Bioinformatics methods were employed to extract core protein targets within these metabolic profiles. Molecular docking analysis was conducted between these targets and the direct bioactive components of BC *in vivo* to identify pharmacodynamic material bases. Combined with the “five-principle” system for quality markers (effectiveness, measurability, traceability, efficacy correlation, and specificity), the quality markers were comprehensively identified. **Results** Metabolomics analysis revealed 30 small-molecule metabolites, including 1-methylnicotinamide, *D*-glutamine, and linolenic acid. The α -linolenic acid metabolism pathway was identified as the key regulatory pathway for BC in treating bone and joint diseases under wind-cold-dampness arthralgia syndrome. Six core protein targets (PLA2G2A, PLA2G2F, PLA2G2D, etc.) were extracted from this pathway. Additionally, 22 direct bioactive components of BC *in vivo* were screened. Molecular docking analysis confirmed that isoliquiritin, dihydrokaempferol, and 5,3',4'-trihydroxyflavone met the “five-principle” criteria for quality markers. **Conclusion** The components isoliquiritin, dihydrokaempferol, and 5,3',4'-trihydroxyflavone fulfill the principles of effectiveness, measurability, traceability, efficacy correlation, and specificity, demonstrating potential as quality markers for BC.

Key words: Bitongning Capsules; quality marker; chinmedomics; osteoarthropathy; pharmacodynamic material basis; wind-cold-dampness arthralgia syndrome; bioinformatics; molecular docking; α -linolenic acid; testability; traceability; efficacy relevance; specificity; isoliquiritin; dihydrokaempferol; 5,3',4'-trihydroxyflavone

质量问题是决定中药产业发展的关键问题，而质量标准体系的建立，是解决其质量问题的核心途径^[1]。但是，由于中药材及其制剂组方工艺复杂性的存在，致使中药质量标准体系的建立成为国际性难题^[2]。作为中药质量标准体系建立的核心要素，刘昌孝院士^[3]依据药品原料、制品及处方中物质所具有的五项基本准则，包括：“物质存在性”“物质特有性”“物质可测性”“中药功效关联性”和产品生产过程中的“物质溯源与传递性”等，提出了质量标志物（quality markers, Q-Marker）这一质量功能性概念^[4-6]。Q-Marker 研究既能反映药物有效性与安全性的相关性，又能满足成分专属性与差异性的特征要求；还能基于方证对应的原则下，体现针对疾病显效方式与物质基础的客观存在，其理念与方证代谢组学这一复杂体系下的中药成分探索策略不谋而合^[7-9]。

方证代谢组学（chinmedomics）是一种结合了中药血清药物化学及代谢组学的研究方法^[10-11]。通过运用代谢组学方法来寻找体内的小分子代谢产物作为生物标志物以达到精确检测的目的，并以此为基础搭建出方剂总体效果的准确评估系统。同时，采用中药血清药物化学的方法探究方剂内部有效成分的存在情况，并把这 2 种方式相互关联起来，从而找寻那些与实际治疗效果密切相关的药效物质，这种研究模式得到了国内外学者的广泛认同和

推广^[12-15]。方证代谢组学对中药行业全过程质量追溯体系的建立和发展具有较大的推动作用。

痹痛宁胶囊（Bitongning Capsules, BC）是贵州恒霸药业有限责任公司的独家专利品种（国药准字 Z20054248），具有良好的祛风除湿、消肿定痛之功效，临床上对由风寒湿痹所致的骨关节病有显著疗效。但作为衡量、控制及保证质量依据的主要技术手段，BC 质量标准体系的建设并不完善。当前，BC 的质量控制多以《中国药典》2020 年版中组分中药的相关要求为指导，配合部分地方标准为基础，采用 HPLC 法定量检测马钱子碱等毒性成分的含量，同时严格监控重金属（铅、砷等）、微生物限度和生产工艺关键参数。当前的质控体系，虽能保障基本用药安全，但仍存在批间成分差异较大、多成分同步检测覆盖率低等问题，究其原因其药效物质基础研究长期薄弱，Q-Marker 研究尚属空白，致使其药品执行标准在质量标准体系建设上存在指标成分专属性较差、病理机制关联性不强、与中药理论缺乏基本联系的重要问题。本研究以 BC 为例，从其核心证候出发，建立风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型，以方证代谢组学为研究策略，结合靶向蛋白分析，探寻风寒湿痹证下骨关节病的生物学本质，发现 BC 治疗骨关节病的药效物质基础，并在“五原则”体系下，确定 BC 的 Q-Marker，解决制约药物质量建设的主要瓶颈，提高产品功效，提

升产品的核心竞争能力与可持续发展能力。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Q-Exactive HFX 型质谱仪、UHPLC vanquish 型超高效液相色谱仪, 德国 Thermo Fisher Scientific 公司; AB Triple TOF 6600 型质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; Agilent 1290 Infinity LC 型超高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Eppendorf Centrifuge 5430 R 型低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; ME104 型电子天平, 中国 Mettler Toledo 公司; QT-1 型涡旋仪, 中国 Xiexu Medical 公司; FD-1C-80 型冷冻干燥机, 中国 Shanghai Bilon 公司; SB-4200D 型超声波清洗机, 中国 Scientz Biotechnology 公司。

1.2 药品与试剂

BC, 批号 20230403, 由贵州恒霸药业有限责任公司提供; II 型胶原蛋白 (CII, 批号 190306) 与不完全弗氏佐剂 (IFA, 批号 376035) 购自德国默克公司; 醋酸, 购自科密欧试剂公司; ELISA 试剂盒, 批号 202411, 购自上海泛音生物科技有限公司; 甲酸等化学试剂均为质谱级, 购自赛默飞化学试剂公司。

2 方法

2.1 给药样品的制备

2.1.1 BC 混悬液的制备 称取 BC 9.7 g 置于 100 mL 量瓶内, 配制成 0.097 g/mL 的供试品混悬液。

2.1.2 BC 体外成分分析样本制备 精确称取 20 mg BC 样品, 加入 300 μ L 的 40% 甲醇水溶液, 充分涡旋 30 s, 离心 15 min, 取上清, 即得。

2.1.3 BC 体内成分分析样本制备 取大鼠空白血清及给药血清各 0.5 mL, 加入甲醇, 涡旋混合 60 s, -20°C 静置 30 min, 16 000 r/min、 4°C 下离心 20 min, 取上清液真空干燥, 残渣加入 40% 甲醇水溶液 100 μ L, 涡旋, 16 000 r/min、 4°C 下离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.1.4 BC 成分分析对照组样本制备 取大鼠空白血清 0.5 mL, 加入 BC 体外供试品提取液, 加入甲醇, 涡旋混合 60 s, -20°C 静置 30 min, 16 000 r/min、 4°C 下离心 20 min, 取上清真空干燥, 残渣加入 100 μ L 的 40% 甲醇水溶液, 涡旋, 16 000 r/min、 4°C 下离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.2 动物分组与给药

SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 体质量约 220 g, 许可证号为 SCXK (湘) 2019-0014。动物实验经贵州医科大学

动物实验伦理委员会批准 (批准文号 NO.2303411)。在常温 25°C 左右、相对湿度 65% 且 12 h 避光与光照交替进行的情况下, 自由摄食饮水 7 d。随后, 采用随机法进行分组, 在大鼠造模期间, 随机分为对照组 (12 只) 与模型组 (18 只) 2 组, 将 CII 溶解在 0.01 mol/L 的醋酸里 (CII 的最终质量浓度为 4 mg/mL), 并彻底搅拌, 然后放置在 4°C 的环境下过夜。之后, 在冷的 IFA 中加入适量的 CII 溶液, 使其达到相等的体积, 并且确保它们完全融合在一起。接下来, 用针头从大鼠的尾巴底部和脊柱两侧多个地方向皮肤深处注入含有 CII 200 μ g 的 CII 乳剂, 直到第 7 天后再重复这个过程, 对照组则使用 0.01 mol/L 的醋酸和 IFA 的乳化液处理。造模期间, 除对照组外, 模型组于第 1~30 天进行人工风寒湿邪环境的加持, 每天给予人工风寒湿邪刺激 1 次。每次持续约 1 h, 刺激条件为风速 18 m/s。相对湿度为 100%, 温度为 $7\sim 10^{\circ}\text{C}$, 共刺激 30 d^[16-18]。造模结束后, 对照组与模型组各取 6 只大鼠进行代谢组学分析, 其余模型大鼠进一步随机分组, 即模型组 (6 只)、BC 治疗组 (6 只)。对 BC 组大鼠给予 BC 治疗 (68.58 mg/kg), 连续 14 d, 模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.3 生物样本收集

造模结束后, 肝门静脉采集血样, 收集对照组与模型组随机各取的 6 只大鼠血清进行代谢组学分析。药物治疗结束后, 肝门静脉采集血样, 收集包括对照组与模型组剩余大鼠在内的各组大鼠血清, 进行代谢组学与中药血清药物化学分析。

2.4 行为学指标检测

记录各组大鼠体质量变化, 各组大鼠于实验第 30 天及第 44 天, 进行双后肢足垫温度及足爪容积情况检测, 并观察记录实验大鼠四肢关节部位的病变情况, 根据每个关节的病变情况累计积分, 进行大鼠关节炎指数评定。同时, 在第 30、44 天进行 6 min 自主活动测试, 为保证实验的一致性, 各组检测同时进行。

2.5 临床化学指标检测

取大鼠血清样本, 按照 ELISA 试剂盒说明书依次进行操作, 检测血清中的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、抗环瓜氨酸肽抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide, CCP-Ab)、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的含量。

2.6 代谢组学数据采集

2.6.1 样品处理 血清在常温环境下缓慢解冻, 取适量血清, 加入预冷过后的甲醇-乙腈-水溶液 (甲醇-乙腈-水 22:1:1) 中, 采用涡旋仪充分混合, 低温超声 30 min, -20 °C 静置 10 min, 14 000 r/min、4 °C 下离心 20 min, 取上清液真空干燥, 质谱分析时加入 100 μ L 乙腈-水溶液 (乙腈-水 1:1) 复溶, 涡旋, 14 000 r/min、4 °C 下离心 15 min, 取上清液进样分析。

2.6.2 色谱条件 样品采用 Vanquish LC 超高效液相色谱系统 (UHPLC) HILIC 色谱柱进行分离; 柱温 25 °C; 体积流量 0.5 mL/min; 进样量 2 μ L; 流动相为含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水的水溶液-乙腈; 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 95%乙腈; 0.5~7.0 min, 95%~65%乙腈; 7.0~8.0 min, 65%~40%乙腈; 8.0~9.0 min, 40%乙腈; 9.0~9.1 min, 40%~95%乙腈; 9.1~12.0 min, 95%乙腈; 整个分析过程中样品置于 4 °C 自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响, 采用随机顺序进行样本的连续分析。样本队列中插入对照样品, 用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。

2.6.3 质谱条件 ESI 源及质谱设置参数如下: 雾化气辅助加热气 1 (Gas 1) 50 μ L, 辅助加热气 2 (Gas 2) 2 μ L, 离子源温度 350 °C, 喷雾电压 (ISVF) 正离子模式 3 500 V, 负离子模式-2 800 V; 一级质荷比检测范围 m/z 70~1 200, 分辨率 60 000 dpi, 扫描累积时间 100 ms, 二级采用分段式采集方法, 扫描范围 m/z 70~1 200, 二级分辨率 60 000 dpi, 扫描累积时间 100 ms, 动态排除时间 4 s。

2.7 BC 化学成分数据采集

将空白血清、BC 体外样本供试品溶液、BC 体内成分分析样本溶液、对照组+体外供试品对照样本溶液, 按照如下条件进行样本数据分析。

2.7.1 色谱条件 样品采用 Vanquish UHPLC (美国 Thermo Scientific 公司) 超高效液相色谱系统结合 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱进行分离; 柱温 35 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-0.1%甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~17.0 min, 95% A; 17.0~17.2 min, 95%~2% A; 17.2~20.0 min, 2%~95% A。

2.7.2 质谱条件 采用 Q-Exactive HFX 质谱仪进行样本一级、二级谱图的采集。Q-Exactive HFX 质谱仪样品与 UHPLC 系统联用, 电喷雾电离 (ESI)

正、负 2 种离子模式分别进行质谱采集。喷雾电压 3 800 V (ESI⁺)、-3 500 V (ESI⁻), 鞘气压力 45 arb, 辅助气压力 20 arb, 离子传输管温度 320 °C, 雾化温度 350 °C; 检测方式为全扫描/数据依赖二级扫描 (Full-MS/dd-MS²) 模式, 一级分辨率为 60 000, 二级分辨率为 15 000, 排名前 10 的 MS1 离子获得 MS/MS 谱图, 碰撞能量 (CEs) 采用阶梯归一化能级 20、40、60 eV; 一级质荷比扫描范围 m/z 90~1 300。

2.8 数据处理

2.8.1 统计学分析 采用 Graphpad Prism 9.0 软件包进行独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示两样本之间的差异在统计学上具有显著意义。

2.8.2 生物标记物的数据分析流程 原始数据经 ProteoWizard 转换成.mzXML 格式, 然后采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。对 XCMS 提取得到的数据首先进行代谢物结构鉴定、数据预处理 (空值过滤: 删除缺失值>50%的离子峰; 空值填充: KNN 填充; 数据过滤: 过滤 RSD>50%的 feature), 然后进行实验数据质量评价, 最后再进行数据分析。数据分析内容包括单变量统计分析、多维统计分析、差异代谢物筛选、差异代谢物生物信息学分析等。

2.8.3 体内直接作用物质数据分析流程 采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和色谱峰提取, 一级质量误差小于 2.5×10^{-5} , 二级碎裂谱图匹配度分数大于 0.7, 其中得分越高, 谱图相似度越高, 目前, 一般普遍认为 0.7 以上, 初步鉴定结果为可靠^[19]。

2.8.4 相关性分析 采用分子对接的分析方法, 对 BC 体内直接作用物质与效应标记物关键通路下的靶向蛋白进行关联分析, 从 PubChem 下载体内直接作用物质的化学结构式, 从 PDB 数据库 (www.rcsb.org) 下载蛋白结构, 部分没有结构的使用 AlphaFold2 进行结构建模, 通过 RDKit 调用 MMFF94 立场优化小分子结构与能量, 选择 smina 作为对接软件进行对接, 对接的盒子大小均为 12.6 nm, 其中对接的逼近度为 20, 每次生成 20 个构象。以关键作用靶点、核心作用靶点结合势能均为 0.8 以上, 且体内入血含量显著作为药效物质基础筛选标准, 获得治疗风寒湿痹证下骨关节病的药效物质基础^[20]。

3 结果

3.1 模型组大鼠的复制与评价

造模结束后, 行为学指标结果如表 1 所示。与对照组相比, 模型组大鼠体质量呈显著降低, 呈明

表 1 风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型的行为学与生理生化指标检测分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Behavioral and physiological biochemical indicators detection and analysis of a rat model of osteoarthritis under wind-cold-dampness arthralgia syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 6$)											
组别	体质量/g	自主活动 次数	足爪温度/ ℃	足爪容积 (左)	足爪容积 (右)	关节指数 (左)	关节指数 (右)	IL-1β/ (pg·mL ⁻¹)	TNF-α/ (pg·mL ⁻¹)	CCCP-Ab/ (μg·mL ⁻¹)	MMP-3/ (ng·mL ⁻¹)
对照	263.90±15.62	39.17±5.17	36.13±0.55	1.43±0.04	1.41±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	140.40±6.54	227.50±26.61	28.34±2.30	40.51±2.98
模型	248.10±18.50*	21.67±3.99**	33.24±0.64**	2.02±0.29**	2.04±0.22**	3.89±0.68**	3.83±0.86**	152.60±9.75*	296.20±35.59**	25.21±1.87*	46.48±5.47*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

显变化 ($P<0.05$), 在自主活动检测中, 活动次数出现极显著性降低 ($P<0.01$), 而在双后肢足垫温度及足爪容积上, 模型组大鼠进一步表现出足爪肿胀, 足垫温度降低的现象, 呈极显著性差异 ($P<0.01$), 并且在关节炎炎症积分的表现中, 关节指数也呈极显著性差异 ($P<0.01$)。

在生理生化指标的分析中, 造模结束后, 结果如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α、MMP-3、CCCP-Ab 水平, 均呈现出显著性或极显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01), 即大鼠血液中 IL-1β、TNF-α、MMP-3 含量升高, CCCP-Ab 含量降低, 表现出模型大鼠体内炎症活动正在发生, 组织损伤正在出现, 自身免疫活动正在激活。

同时, 组织病理学研究也证实了这一结果表现, 如图 1-a 所示, 对照组大鼠关节组织结构清晰, 染色均匀, 软骨表面光滑 (红色箭头), 软骨细胞形态结构正常, 未见明显骨侵蚀, 两侧滑膜 (蓝色箭头) 未见明显增生, 未见明显的炎性细胞浸润, 黑色方框表示该处放大视野位置。而与对照组相比, 如图 1-b 所示, 模型组关节组织可见滑膜轻度增生、变厚, 结缔组织轻度增生 (绿色箭头), 并可见少量以粒细胞、淋巴细胞与巨噬细胞为主的炎性细胞浸润 (紫色箭头), 但软骨细胞形态结构正常, 未见明显骨侵蚀, 黑色方框表示放大视野位置。

3.2 给药组大鼠的药效学分析

治疗结束后, 各组行为学指标结果如表 2 所示,

表 2 风寒湿痹证下骨关节病大鼠治疗期间的行为学与生理生化指标检测分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Analysis of behavioral, physiological, and biochemical index detection during the treatment of osteoarthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 6$)											
组别	体质量/g	自主活动 次数	足爪温度/ ℃	足爪容积 (左)	足爪容积 (右)	关节指数 (左)	关节指数 (右)	IL-1β/ (pg·mL ⁻¹)	TNF-α/ (pg·mL ⁻¹)	CCCP-Ab/ (μg·mL ⁻¹)	MMP-3/ (ng·mL ⁻¹)
对照	290.20±34.32	38.67±5.39	34.55±0.65	1.20±0.07	1.10±0.15	0.00±0.00	0.00±0.00	165.60±5.56	348.10±39.40	22.98±2.16	44.93±3.42
模型	248.00±31.16	14.50±1.52 ^{##}	33.83±1.04	1.84±0.19 ^{##}	1.88±0.72 ^{##}	3.83±0.98 ^{##}	3.67±1.21 ^{##}	189.90±10.58 ^{##}	438.30±69.13 ^{##}	24.61±1.05	50.04±3.84
BC	252.60±31.34	32.67±2.66**	35.13±0.44	1.23±0.23**	1.11±0.12**	1.83±0.98**	1.50±0.84**	164.80±8.95**	342.20±43.03**	24.59±3.10	44.37±6.34

与对照组比较: ^{##} $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 表 4 同。
^{##} $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; same as table 4.

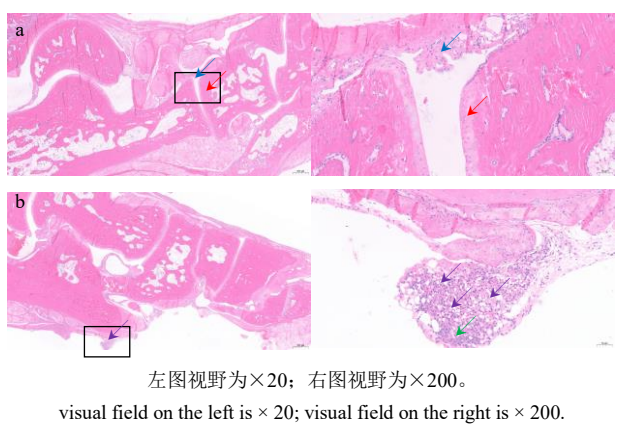
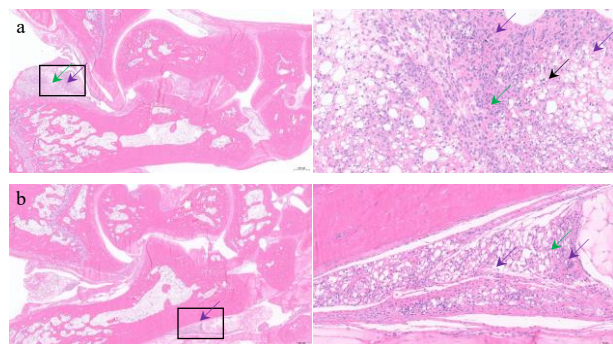


图 1 对照组 (a) 和模型组 (b) 大鼠的组织病理学检测
Fig. 1 Histopathological examination of rats in control group (a) and model group (b)

与对照组相比, 除体质量和足爪温度外, 其余各项指标, 模型组大鼠均未见好转, 仍有极显著性差异 ($P<0.01$)。

而在治疗组中, 与模型组相比, 除体质量和足爪温度外, 其余各项指标均出现极显著性好转 ($P<0.01$), 且在足爪容积检测中, 已与对照组相比已无显著性差异 ($P>0.05$), 大鼠足爪肿胀已见好转, 足垫温度上升。而在治疗后, 各组生理生化指标分析结果如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠在炎症因子 IL-1β、TNF-α 的表现上仍然持续, 均呈极显著性差异 ($P<0.01$), 但经治疗后, 治疗组并无此差异出现, 且与模型组相比, 治疗组呈极显著性差异 ($P<0.01$)。

在组织病理学检测当中，模型组大鼠病理性加重（图 2-a），关节组织可见滑膜中度增生、变厚，结缔组织中度增生（绿色箭头），少见结缔组织点状坏死（黑色箭头），胞核固缩、碎裂，并可见较多以淋巴细胞与巨噬细胞为主的炎性细胞浸润（紫色箭头）；软骨细胞形态结构正常，未见明显骨侵蚀。黑色方框表示放大视野位置。而治疗组大鼠（图 2-b），关节组织滑膜轻度增生、变厚，结缔组织轻度增生（绿色箭头），仅少量以淋巴细胞与巨噬细胞为主的炎性细胞浸润（紫色箭头）；软骨细胞形态结构正常，未见明显骨侵蚀。黑色方框表示放大视野位置。



左图视野为 $\times 20$ ；右图视野为 $\times 200$ 。
visual field on the left is $\times 20$; visual field on the right is $\times 200$.

图 2 模型组 (a) 和治疗组 (b) 大鼠的组织病理学检测
Fig. 2 Histopathological examination of rats in model group (a) and treatment group (b)

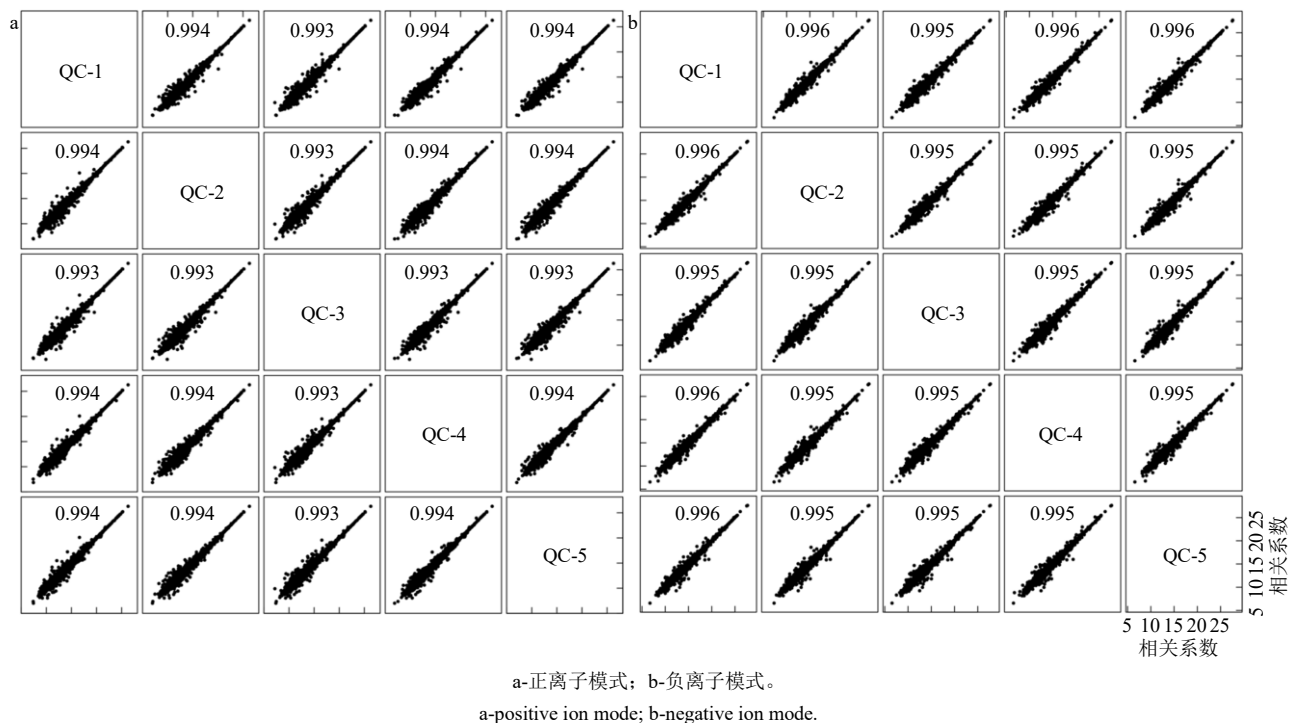
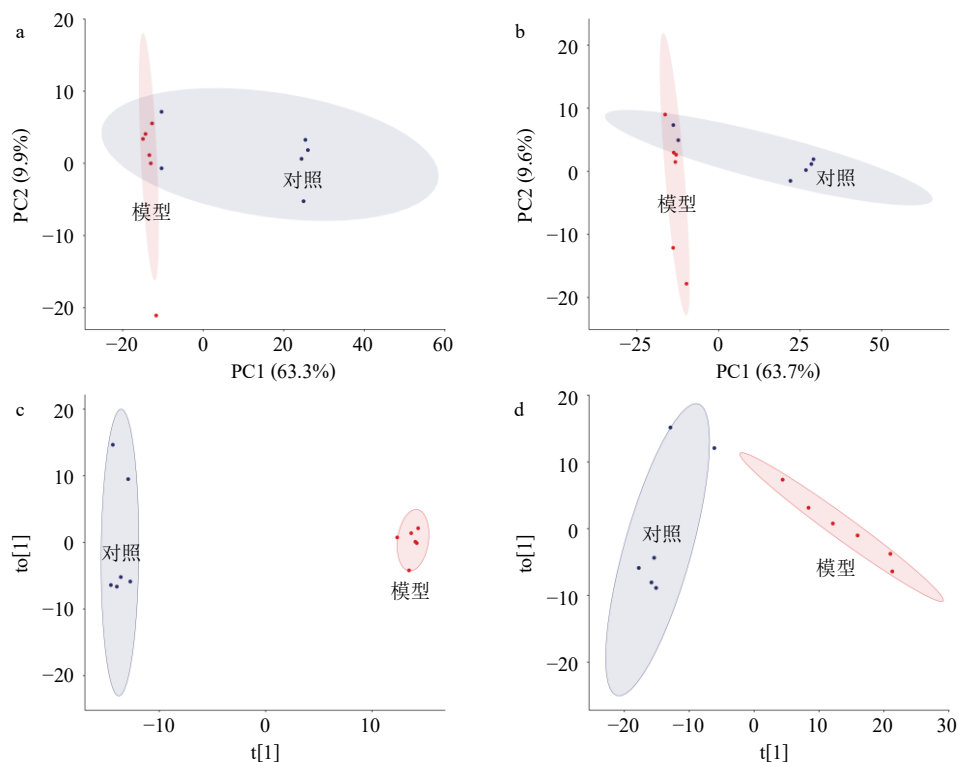


图 3 正、负离子模式下 QC 样本的 Pearson 相关性分析

Fig. 3 Pearson correlation analysis of QC samples in positive and negative ion mode

3.3 大鼠的代谢组学研究

造模结束后，随机所取各组大鼠进行代谢组学分析，对 QC 样品（由待测样本等量混合制成）进行相关性分析，采用 Pearson 相关性分析方法，如图 3-a、b 所示。相关性系数大于 0.9 表明相关性较好，正、负离子模式下，本实验结果表明 QC 样本间的相关性系数都在 0.9 以上，说明实验重复性与仪器稳定性较好。经 7 次循环交互验证，得到的主成分分析（principal component analysis, PCA）模型，如图 4-a、b 所示，参数 R^2_x 大于 0.7 以上，表明样本组内聚集度高，组间分离明显，说明模型可靠，组间有明显差异，经诱导后，模型组大鼠的生理机能受到影响，大鼠血液代谢轮廓发生改变，病理变化正在发生。正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA）过程中为避免有监督模型在建模过程中发生过拟合，采用置换检验（permutation test）对模型进行检验，以保证模型的有效性^[21-22]。如图 4-c、d 所示，随着置换保留度逐渐降低，随机模型的 R^2 和 Q^2 均逐渐下降，说明原模型不存在过拟合现象，模型稳健性良好^[23]，如图 5-a、b。为此，结合单变量统计分析结果（ $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$ 且 $P < 0.05$ ）以 $VIP > 1$ 为基准，进行风寒湿痹证下骨关节病大鼠生物标记物的筛选。所得离子经 Metlin、

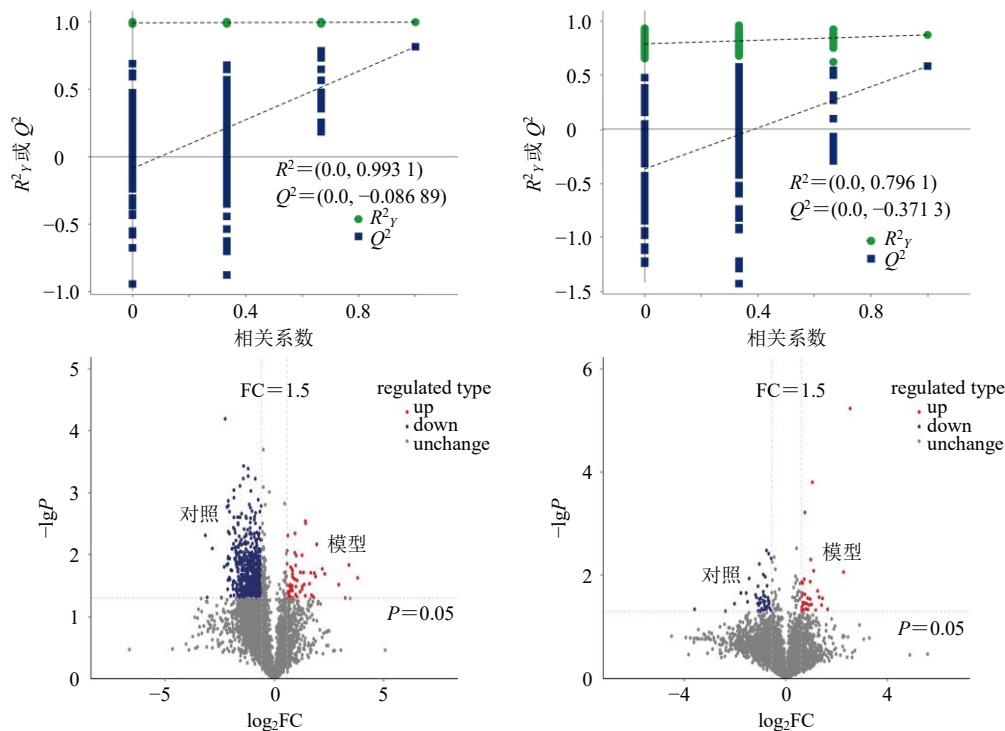


a、b 为正、负离子模式下的 PCA；c、d 为正、负离子模式下的 OPLS-DA。

a, b represent PCA in positive and negative ion modes; c, d is OPLS-DA in positive and negative ion modes.

图 4 风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型代谢生物标记物的寻找

Fig. 4 Search for metabolic biomarkers in a rat model of osteoarthritis with wind-cold-dampness arthralgia syndrome



a、b 为正、负离子模式下 OPLS-DA 分析下的置换检验；c、d 为正、负离子模式下代谢生物标记物确定的火山图。

a and b represent the displacement test under OPLS-DA analysis in positive and negative ion modes; c and d are volcano maps determined by metabolic biomarkers in positive and negative ion modes.

图 5 风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型代谢生物标记物的确定

Fig. 5 Identify for metabolic biomarkers in a rat model of osteoarthritis with wind-cold-dampness arthralgia syndrome

HMDB 和 KEGG 等网络检索数据库进行检索和匹配, 结合 MS/MS 二级质谱数据进行化学结构鉴定, 共鉴定出 30 个风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型的代谢生物标记物, 结果见表 3, 如图 5-c、d 所示。

3.4 关键治疗通路的确定与核心治疗靶点的提取

将所得生物标记物, 经 MetPA 拓扑分析, 确定

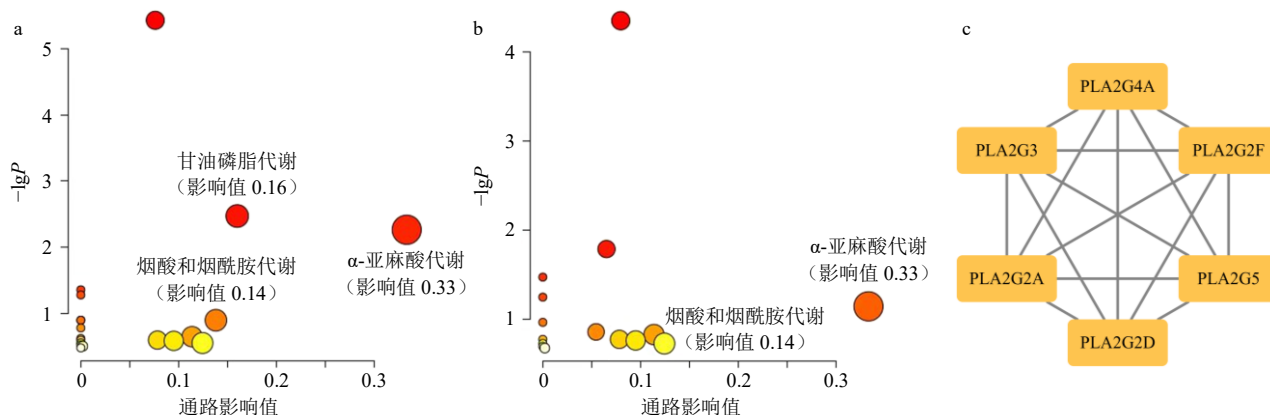
病证所涉代谢通路包括: α -亚麻酸代谢、甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢等 20 个代谢通路, 且以通路影响值 >0.3 为筛选标准, 确定 α -亚麻酸代谢为风寒湿痹证下骨关节病的关键代谢通路 (图 6-a)。

随后, 进一步在药物有效性的基础上发现经 BC 治疗后, 治疗组回调了其中 14 个代谢生物标记物,

表 3 风寒湿痹证下骨关节病大鼠小分子代谢生物标记物的提取

Table 3 Extraction of metabolic small molecule biomarkers in rats with osteoarthritis under wind-cold-dampness arthralgia syndrome

ID	m/z	t _R /s	成分	离子模式	得分	误差 ($\times 10^{-6}$)
M204T300_2	204.123 06	300.355 0	乙酰肉碱 (acetylcarnitine)	[M+H] ⁺	0.999 5	1.004 8
M171T258_2	171.112 49	258.182 0	N- α -乙酰基-L-赖氨酸 (N- α -acetyl-L-lysine)	[M+H-H ₂ O] ⁺	0.997 4	0.474 8
M137T299	137.069 80	298.871 5	环草隆 (siduron)	[M+H-C ₇ H ₁₂] ⁺	0.888 0	7.632 4
M302T64	302.305 16	63.630 0	脯氨酸-色氨酸 (Pro-Trp)	[M+H] ⁺	0.983 3	1.500 6
M137T331	137.069 77	330.618 5	N-甲基烟酰胺 (1-methylnicotinamide)	[M+H] ⁺	0.848 7	1.091 5
M191T248	191.084 34	248.334 0	L-丙氨酰-L-苏氨酸 (L-Thr-L-Ala)	[M+H] ⁺	0.701 2	2.908 7
M130T412_2	130.048 96	411.826 5	谷氨酰胺 (D-glutamine)	[M+H-NH ₃] ⁺	0.989 9	4.626 9
M313T37_2	313.272 68	37.132 0	1-棕榈酰甘油 (1-palmitoylglycerol)	[M+H-H ₂ O] ⁺	0.947 9	0.052 4
M317T491	317.216 61	491.246 5	亮氨酸-甘氨酸-赖氨酸 (Leu-Gly-Lys)	[M+H] ⁺	0.850 0	4.579 0
M279T39	279.230 66	39.385 0	亚麻酸 (linolenic acid)	[M+H] ⁺	0.923 9	1.445 9
M160T381_2	160.131 94	380.613 0	5-氨基戊酸 (5-aminovaleic acid betaine)	[M+H] ⁺	0.947 4	3.229 9
M61T102_2	61.039 09	102.150 0	尿素 (urea)	[M+H] ⁺	0.999 5	8.592 7
M138T304	138.051 77	304.447 5	邻氨基苯甲酸 (anthranilic acid, vitamin L1)	[M+H] ⁺	0.604 1	3.953 3
M301T39	301.214 67	39.164 0	4-氧基蒯醇 (4-oxoretinol)	[M+H] ⁺	0.690 2	7.279 5
M175T382	175.070 38	382.235 0	L-硫西曲啉 (L-thiocitrulline)	[M+H-NH ₃] ⁺	0.982 6	2.845 6
M496T190_2	496.339 22	189.685 0	1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	[M+H] ⁺	0.965 9	2.983 5
M524T185_2	524.370 49	184.842 0	1-硬脂酰-sn-甘油 3-磷酸胆碱 [LPC(18:0)] {1-stearoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine [LPC(18:0)]}	[M+H] ⁺	0.981 6	2.453 1
M524T151	524.370 11	150.796 5	1-硬脂酰-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine)	[M+H] ⁺	0.987 4	2.885 5
M787T141	786.599 68	141.289 0	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)	[M+H] ⁺	0.986 7	0.846 6
M188T339	188.102 02	339.106 0	L-谷氨酰胺 (L-glutamine)	[M+CH ₃ CN+H] ⁺	0.995 3	4.701 8
M835T136	834.599 21	136.430 0	1-二十二碳六烯酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1-docosahexaenoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	[M+H] ⁺	0.973 6	1.106 9
M157T289_2	157.096 94	288.582 0	N- α -乙酰基-L-鸟氨酸 (N- α -acetyl-L-ornithine)	[M+H-H ₂ O] ⁺	0.996 5	3.933 1
M510T187	510.353 02	187.247 5	1-庚癸酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	[M+H] ⁺	0.990 1	4.158 8
M162T346	162.111 65	345.652 0	左旋肉碱 (L-carnitine)	[M+H] ⁺	0.988 7	7.243 9
M280T379	280.092 48	379.046 0	甘油磷酸胆碱 (glycerophosphocholine)	[M+Na] ⁺	0.968 1	7.922 4
M175T469	175.118 31	469.421 0	精氨酸 (arginine)	[M+H] ⁺	0.993 8	3.378 0
M162T373	162.111 37	372.950 0	肉碱 (carnitine)	[M+H] ⁺	0.943 1	2.651 7
M131T302_2	131.080 77	301.897 0	肌氨酸 (sarcosine)	[M+CH ₃ CN+H] ⁺	0.810 6	4.778 7
M337T44	337.309 36	43.666 0	芥酸 (erucic acid)	[M-H] ⁻	0.997 3	3.618 8
M269T47	269.247 23	46.516 0	十七烷酸 (heptadecanoic acid)	[M-H] ⁻	0.982 4	1.741 6



a 为风寒湿痹证下骨关节病的关键代谢通路分析; b 为 BC 对风寒湿痹证下骨关节病的最主要调控代谢通路; c 为关键代谢途径 (α-亚麻酸代谢) 下的关键蛋白靶点。
a is the key metabolic pathway analysis of osteoarthritis under wind-cold-dampness arthralgia syndrome; b is the most important metabolic pathway for BC to regulate osteoarthritis under wind-cold-dampness arthralgia syndrome; c is the key protein target under the key metabolic pathway (α-linolenic acid metabolism).

图 6 BC 关键通路下关键靶点的确定与体内直接作用物质分析

Fig.6 Determination of key targets under key pathways and analysis of substances directly acting *in vivo*

其相对丰度结果如表 4 所示。对回调代谢生物标记物再次进行 MetPA 拓扑分析,发现 BC 在进行风寒湿痹证下骨关节病治疗时,尤以 α-亚麻酸代谢,烟酸和烟酰胺代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等为主,并且以通路影响值>0.3 为筛选标准,发现 α-亚麻酸代谢为 BC 最主要的调控代谢通路,如图 6-b 所示。

综合前后结论,围绕 α-亚麻酸代谢这一风寒湿痹证下骨关节病的关键代谢通路与 BC 最主要的调控代谢通路,基于 GEO 数据库,联合 GSEA 针对

α-亚麻酸代谢通路,进行该通路下所涉差异基因的提取分析,进行 PPI 蛋白互做网络的构建。使用 cytoHubba 软件,确定蛋白质相互作用网络中的核心蛋白质靶点,如图 6-c 所示。

3.5 BC 的体内直接作用物质分析

分别对对照组样品、给药组样品、BC 体外样品组的混合对照样品、BC 体外样品进行数据采集,并对其正负离子 BPC 图进行比对,如图 7-a、b 所示,从谱图上可以直观看到体外样品与生物样品有较大差异,且给药组与对照组之间谱图也存在一定

表 4 BC 对风寒湿痹证下骨关节病大鼠模型代谢生物标记物的相对丰度值调控分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Regulatory analysis of BC on metabolic biomarkers in a rat model of osteoarthropathy with wind-cold-dampness arthralgia syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	相对丰度				
	乙酰肉碱	亚麻酸	LPC(18:0)	尿素	精氨酸
对照	4 350 697±3 292 098	115 707±98 400	85 365 144±36 255 460	602 586±351 835	909 536±455 753
模型	11 711 637±4 609 065 ^{###}	425 491±178 301 ^{###}	290 166 667±108 530 948 ^{###}	1 268 345±184 995 ^{##}	297 817±144 057 [#]
BC	6 340 182±3 368 195 [*]	144 066±179 022 [*]	153 538 336±46 634 477 [*]	915 845±165 687 [*]	968 835±579 134 [*]

组别	相对丰度				
	邻氨基苯甲酸	L-谷氨酰胺	芥酸	1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	左旋肉碱
对照	80 562±39 382	1 317 707±992 613	83 958±12 461	85 965 597±93 355 982	13 978 544±9 827 584
模型	262 473±142 878 ^{###}	59 916±31 805 ^{###}	816 989±338 713 ^{###}	207 840 342±26 242 735 [#]	1 875 810±3 712 852 ^{##}
BC	95 969±23 281 ^{**}	1 039 422±551 723 [*]	58 027±17 485 ^{**}	86 118 324±76 995 240	10 826 354±1 831 929 [*]

组别	相对丰度			
	肌氨酸	4-氧基蒺藜醇	甘油磷酸胆碱	脯氨酸-色氨酸
对照	3 290 642±1 149 324	65 213±66 606	35 397 133±20 452 985	4 454 522±2 003 288
模型	2 038 390±408 092 [#]	278 132±178 257 ^{###}	3 773 204±680 229 ^{###}	9 889 439±2 509 469 ^{##}
BC	3 182 453±604 991 [*]	118 018±41 235 [*]	46 051 209±13 756 853 ^{**}	6 723 046±444 059 [*]

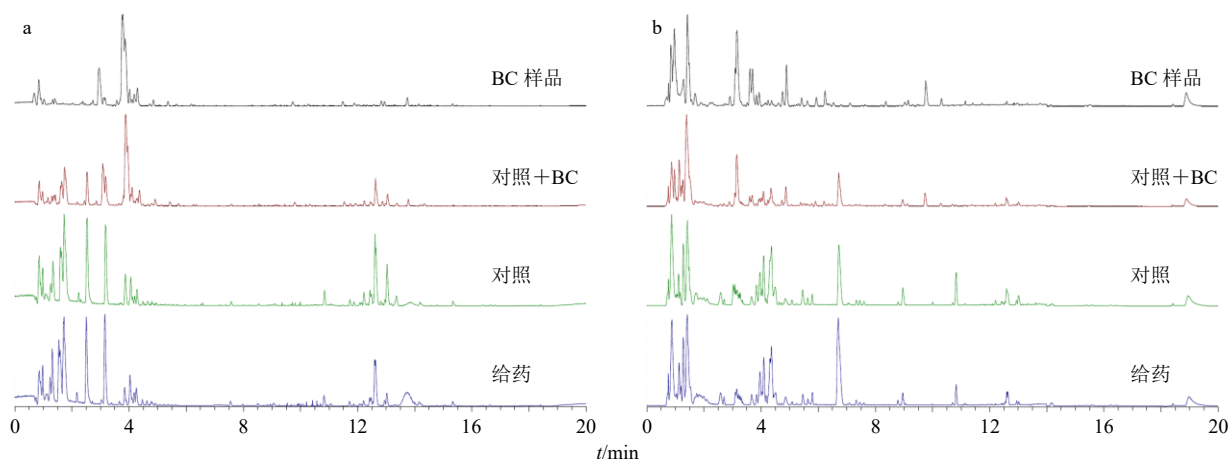


图 7 正 (a)、负 (b) 离子模式下体内直接作用物质分析的 BPI 色谱图

Fig. 7 BPI chromatograms of direct interaction substances in the body under positive (a) and negative (b) ion modes

差异。通过检索本地中药高分辨质谱数据库进行化合物鉴定,依据一级质量误差小于 2.5×10^{-5} , 二级碎裂谱图匹配度分数值大于 0.7 进行初次筛选,分析鉴定中药及其给药组样本中化学成分。随后,依据对照组样品与 BC 体外样品组的分析鉴定结果,同时结合体外样品分析结果,对给药组分析结果采用化学计量模块进行质谱背景扣除,确定给药组的

血中移行成分。随后,进一步依据 PubChem、Zinc、MolAid、ChemSpider 等公共数据库,进行交叉比对分析,以一级质量误差小于 $\pm 5 \times 10^{-6}$, 二级碎裂谱图匹配度大于 0.8 进行二次筛选。最终,确定所得结果,即发现 BC 的体内直接作用物质 21 种,中药及其给药组样品鉴定获得的具体化学成分相关信息见表 5。

表 5 风寒湿痹证下骨关节病大鼠体内直接作用物质的信息

Table 5 Information of direct acting substances from bone and joint disease rats with wind-cold-dampness arthralgia syndrome

ID	m/z	tr/ min	成分名称	离子模式	得分	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子碎片 (m/z)
M341T66	341.108 7	1.10	α,β -海藻糖 (α,β -trehalose)	$[M-H]^-$	0.884 1	0.5	341.11, 179.06, 101.02, 113.02, 119.03
M301T546	301.070 5	9.09	鸢尾素 (tectorigenin)	$[M+H]^+$	0.961 4	0.3	301.07, 286.05, 285.04, 301.22, 258.05
M144T81	144.101 8	1.35	水苏碱 (stachydrine)	$[M+H]^+$	0.999 6	1.0	144.1, 145.11, 151.33
M285T372	285.112 0	6.19	大叶茜草素 (mollugin)	$[M+H]^+$	0.876 9	0.3	253.09, 285.11, 225.09, 221.06, 285.08
M375T189_4	375.129 3	3.16	马钱酸 (loganic acid)	$[M-H]^-$	0.951 0	1.8	213.08, 375.13, 113.02, 169.09, 95.05
M419T373_2	419.133 3	6.22	异甘草苷 (isoliquiritin)	$[M+H]^+$	0.991 8	0.8	257.08, 137.02, 147.04, 258.08, 119.05
M271T506	271.059 9	8.44	染料木素 (genistein)	$[M+H]^+$	0.996 1	0.4	271.06, 153.02, 272.06, 215.07, 243.06
M437T610	437.341 3	10.16	刺囊酸 (echinocystic acid)	$[M+H-2H_2O]^+$	0.880 1	0.2	437.34, 437.25, 95.09, 119.09, 109.1
M271T500	271.096 3	8.33	刺甘草查耳酮 (echinatin)	$[M+H]^+$	0.959 0	0.4	121.03, 271.1, 229.09, 107.05, 177.05
M287T372	287.055 9	6.21	香橙素 (dihydrokaempferol)	$[M-H]^-$	0.955 3	0.6	125.02, 259.06, 287.06, 177.05, 243.07
M417T856	417.226 7	14.27	五味子甲素 (deoxyschizandrin)	$[M+H]^+$	0.978 7	0.5	417.23, 316.13, 301.11, 347.15, 285.11
M521T337	521.310 7	5.61	杯菟甾酮 (cyasterone)	$[M+H]^+$	0.961 0	0.1	303.2, 109.07, 485.29, 173.1, 183.1
M285T441	285.075 6	7.35	毛蕊异黄酮 (calycosin)	$[M+H]^+$	0.994 5	0.3	285.08, 270.05, 225.05, 253.05, 137.02
M271T340	271.060 0	5.67	5,3',4'-三羟基黄酮 (5,3',4'-trihydroxyflavone)	$[M+H]^+$	0.994 7	0.0	271.06, 137.02, 272.06, 271.09, 161.02
M269T341	269.045 5	5.68	5,3',4'-三羟基黄酮 (5,3',4'-trihydroxyflavone)	$[M-H]^-$	0.961 6	0.1	269.05, 133.03, 135.01, 269.14, 91.02
M282T134	282.119 5	2.24	1-甲基腺苷 (1-methyladenosine)	$[M+H]^+$	0.997 6	0.2	150.08, 282.12, 283.14, 151.08, 150.09
M307T134	307.064 7	2.24	黄尿环核苷 (xanthosine)	$[M+Na]^+$	0.976 1	1.1	175.02, 307.06, 308.07, 176.03, 307.03
M314T409	314.138 5	6.82	N-反式-阿魏酰胺 (moupinamide)	$[M+H]^+$	0.950 5	1.7	177.05, 314.14, 121.06, 145.03, 117.03
M309T277	309.196 1	4.61	ignazin	$[M+H-H_2O]^+$	0.878 5	0.3	309.2, 291.19, 152.11, 135.1, 134.1
M174T219	174.054 9	3.65	3-奎尼酸 (3-isoquinaldic acid)	$[M+H]^+$	0.978 4	0.7	146.06, 174.05, 128.05, 147.06, 175.06
M132T141	132.076 8	2.36	肌酸 (creatine)	$[M+H]^+$	0.946 9	0.1	90.06, 132.08, 90.9, 97.03, 132.04
M160T226	160.075 6	3.77	蟾毒色胺 (bufotenine)	$[M+H-C_2H_7N]^+$	0.996 5	0.6	160.08, 132.08, 115.05, 118.07, 117.06

除此之外,对 BC 体外高含量成分进行正、负离子模式下的基峰色谱图(base peak chromatogram, BPC)分析,分别对体外丰度最高的色谱峰进行峰形确认、二级谱图检查,然后正、负离子图依次如

图 8-a、b 所示,共标记 44 个 BC 体外高含量成分,具体信息如表 6 所示。其中有 2 个成分,即成分马钱子酸与异甘草苷,体外含量较高并且体内入血,为 BC 的体内直接作用物质。

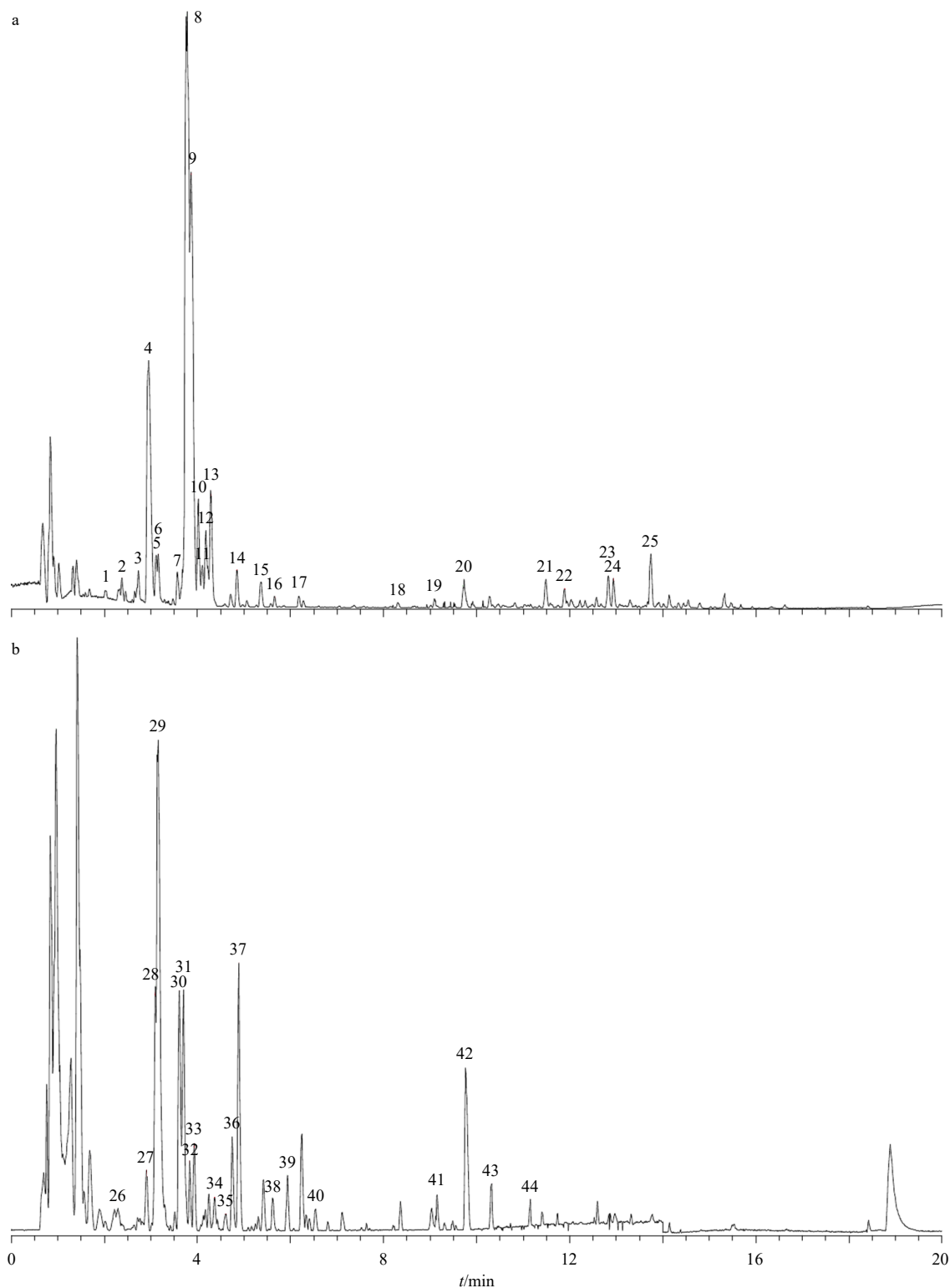


图 8 正 (a)、负 (b) 离子模式下 BC 的基峰色谱图

Fig. 8 Peak chromatograms of BC in positive (a) and negative (b) ion modes

表 6 BPC 图标峰化学成分鉴定结果

Table 6 Chemical composition identification results of BPC icon peak

峰号	t_R / min	母离子质 荷比(m/z)	成分名称	离子模式	一级质量偏 差($\times 10^{-6}$)	二级质谱 匹配得分
1	2.10	150.091 2	辛弗林 (synephrine)	$[M+H-H_2O]^+$	0.4	0.998 3
2	2.38	145.049 5	反式-2-丁烯-1,4-二甲酸 [(3E)-3-hexenedioic acid]	$[M+H]^+$	0.0	0.974 0
3	2.79	134.096 5	cathine (NA)	$[M+H-H_2O]^+$	0.0	0.992 9
4	3.06	166.122 6	麻黄碱 (DL-ephedrine)	$[M+H]^+$	0.5	0.997 5
5	3.17	197.080 7	4',6'-二甲基-2'-羟基苯乙酮 (4',6'-dimethoxy-2'-hydroxyacetophenone)	$[M+H]^+$	0.5	0.774 9
6	3.21	180.138 0	N-methylephedrine (NA)	$[M+H]^+$	0.8	0.982 0
7	3.62	355.102 1	4-O-咖啡酰基奎宁酸 (4-O-caffeoylquinic acid)	$[M+H]^+$	0.8	0.998 0
8	3.82	335.174 7	7-甲基腺嘌呤 (7-strychnine)	$[M+H]^+$	2.2	0.998 9
9	3.92	395.195 8	氟唑磺隆 (brucin)	$[M+H]^+$	16.0	0.995 7
10	4.07	351.169 9	strychninenoxide	$[M+H]^+$	3.3	0.986 9
11	4.14	220.060 7	4-keto-8-methoxy-1H-quinoline-2-carboxylic acid	$[M+H]^+$	0.3	0.899 3
12	4.23	365.185 6	(2E,4E)-12-hydroxy-3,5,7-trimethyl-13-methyloltetradeca-2,4-dienedioic acid	$[M+Na]^+$	21.6	0.985 2
13	4.34	381.180 4	法尼基硫代水杨酸 (farnesylthiosalicylic acid)	$[M+Na]^+$	14.6	0.998 3
14	4.89	257.080 6	甘草素 (liquiritigenin)	$[M+H]^+$	0.3	0.998 8
15	5.40	223.059 9	异嗪皮啶 (isofraxidin)	$[M+H]^+$	0.5	0.997 8
16	5.70	194.117 5	2-amino-2-methyl-4-phenylbutyric acid	$[M+H]^+$	0.5	0.971 6
17	6.22	419.133 3	异甘草苷 (isoliquiritin)	$[M+H]^+$	0.8	0.991 8
18	8.36	469.331 1	光甘草内酯 (glabrolide)	$[M+H]^+$	0.0	0.977 5
19	9.16	469.330 9	6-O-hexopyranosylhexopyranose	$[M+H-C_{18}H_{32}O_{15}]^+$	0.5	0.965 5
20	9.78	453.335 8	甘草次酸 (beta-glycyrrhetic acid)	$[M+H-H_2O]^+$	1.3	0.987 8
21	11.51	321.242 2	奇壬醇 (kirenol)	$[M+H-H_2O]^+$	0.7	0.831 8
22	11.92	305.247 2	14(15)-EpEDE	$[M+H-H_2O]^+$	0.9	0.890 9
23	12.86	323.257 7	incensol oxide	$[M+H]^+$	0.9	0.876 3
24	12.97	283.205 4	boscartol F	$[M+H-H_2O]^+$	1.1	0.940 1
25	13.77	323.257 7	前列腺素 E ₁ 醇 (prostaglandin E ₁ alcohol)	$[M+H-H_2O]^+$	1.3	0.947 2
26	2.24	129.018 2	中康酸 (mesaconic acid)	$[M-H]^-$	8.0	0.912 6
27	2.89	315.072 0	benzoic acid	$[M-H]^-$	6.5	0.934 3
28	3.09	353.087 5	洋蓟素 (cynarin)	$[M-H-C_9H_6O_3]^-$	0.8	0.980 3
29	3.16	375.129 3	马钱苷酸 (loganic acid)	$[M-H]^-$	1.8	0.951 0
30	3.60	191.055 2	右旋奎宁酸 (quinic acid)	$[M-H]^-$	4.2	0.998 7
31	3.66	165.054 9	对羟基苯丙酸 (benzenepropanoic acid)	$[M-H]^-$	5.4	0.976 1
32	3.83	152.034 3	2-羟基-6-甲基吡啶-4-羧酸 (hydroxy-6-methylpyridine-4-carboxylic acid)	$[M-H]^-$	6.7	0.968 7
33	3.92	435.150 5	马钱子苷 (loganin)	$[M+HCOO]^-$	0.2	0.928 9
34	4.35	153.018 3	2,5-二羟基苯甲酸 (gentisic acid)	$[M-H]^-$	6.6	0.998 1
35	4.60	121.028 4	对羟基苯甲醛 (4-formylphenol)	$[M-H]^-$	7.7	0.999 2
36	4.76	549.161 2	liquiritigenin-7-O-β-D-apiosyl-4-O-β-D-glucosid	$[M-H]^-$	0.8	0.986 6
37	4.88	417.118 8	甘草苷 (liquiritin)	$[M-H]^-$	0.3	0.992 9
38	5.60	565.301 5	杯菟甾酮 (cyasterone)	$[M+HCO_2]^-$	0.7	0.996 1
39	5.93	187.096 7	壬二酸 (azelaic acid)	$[M-H]^-$	4.1	0.998 6
40	6.52	137.023 4	薄荷醇水杨酸酯 (menthyl salicylate)	$[M-H-C_{10}H_{18}]^-$	7.8	0.999 1
41	9.13	837.390 7	甘草皂苷 G2 (licoricesaponin G2)	$[M-H]^-$	0.8	0.941 6
42	9.75	821.395 9	甘草皂苷 H2 (licoricesaponin H2)	$[M-H]^-$	0.4	0.986 7
43	10.30	821.396 0	甘草酸 (glycyrrhizic acid)	$[M-H]^-$	0.5	0.945 9
44	11.13	367.118 4	甘草香豆素 (glycy coumarin)	$[M-H]^-$	1.3	0.987 3

3.6 BC 体内直接作用物质的分子对接分析

进行 BC 体内直接作用物质的分子对接分析，选择 BC 风寒湿痹证下骨关节病治疗的关键代谢通路（ α -亚麻酸代谢）上的核心蛋白靶点，包括：PLA2G3、PLA2G4A、PLA2G2F、PLA2G5、PLA2G2D 与 PLA2G2A，它们参与 α -亚麻酸代谢的关键调节，连同 BC 的 21 种体内直接作用物质进行分子对接分析。

首先，要求候选物质的所有靶蛋白结合势能小

于 0，确认化合物可以自发结合关键和核心蛋白靶点。同时，基于低于 -8.0 kJ/mol 的平均结合能对化合物进行了进一步的筛选。分子对接表明，BC 中的一些化合物与核心蛋白靶点具有优异的结合活性，最佳结合模式由最短结合距离决定，使用 PyMol 绘制药物主要有效成分与靶蛋白的对接模式。最终结果表明，异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮 3 种化学成分具有最佳的结合性能，结果如表 7 和图 9~11 所示。

表 7 BC 体内直接作用物质分子对接的结合势能 (1 kcal = 4.184 kJ)

化合物名称	结合势能/(kcal·mol ⁻¹)						
	PLA2G2A	PLA2G2F	PLA2G2D	PLA2G3	PLA2G4A	PLA2G5	均值
异甘草苷 (isoliquiritin)	-8.4	-7.1	-8.9	-7.3	-9.0	-8.4	-8.18
香橙素 (dihydrokaempferol)	-8.0	-7.7	-8.0	-7.4	-8.5	-8.7	-8.05
5,3',4'-三羟基黄酮 (5,3',4'-trihydroxyflavone)	-8.2	-8.0	-6.8	-8.0	-8.8	-8.3	-8.02
杯苊甾酮 (cyasterone)	-8.8	-7.5	-6.7	-7.6	-9.6	-6.9	-7.85
染料木素 (genistein)	-8.2	-7.5	-6.4	-7.1	-8.0	-8.4	-7.60
ignazin	-8.3	-7.2	-6.2	-7.9	-8.6	-6.7	-7.48
毛蕊异黄酮 (calycosin)	-7.8	-7.4	-6.3	-7.5	-7.9	-7.8	-7.45
鸢尾黄素 (tectorigenin)	-8.4	-7.2	-5.8	-7.1	-7.9	-7.8	-7.37
刺甘草查耳酮 (echinatin)	-7.7	-7.2	-6.7	-6.9	-7.6	-7.8	-7.32
N-反式-阿魏酰酰胺 (moupinamide)	-7.8	-6.7	-6.5	-7.1	-8.0	-7.5	-7.27
刺囊酸 (echinocystic acid)	-6.5	-7.3	-7.0	-8.1	-7.7	-6.6	-7.20
3-奎尼酸 (3-isoquinaldic acid)	-7.2	-7.1	-8.0	-6.6	-6.7	-7.0	-7.10
大叶茜草素 (mollugin)	-8.2	-7.2	-6.3	-6.9	-7.1	-6.8	-7.08
马钱苷酸 (loganin acid)	-7.7	-6.2	-5.9	-6.7	-8.2	-6.8	-6.92
1-甲基腺苷 (1-methyladenosine)	-6.9	-5.9	-6.4	-6.7	-7.3	-7.3	-6.75
α,β -海藻糖 (α,β -trehalose)	-6.8	-6.7	-5.4	-6.5	-7.1	-7.0	-6.58
黄尿环核苷 (xanthosine)	-7.5	-5.9	-5.3	-5.8	-7.3	-6.3	-6.35
五味子甲素 (deoxyschizandrin)	-6.6	-8.1	-5.5	-5.6	-6.3	-5.8	-6.32
蟾毒色胺 (bufotenine)	-5.9	-6.3	-6.5	-6.0	-6.3	-6.0	-6.17
水苏碱 (stachydrine)	-4.6	-4.8	-5.3	-4.6	-5.3	-4.7	-4.88
肌酸 (creatine)	-4.6	-4.4	-5.0	-4.9	-4.7	-4.8	-4.73

4 讨论

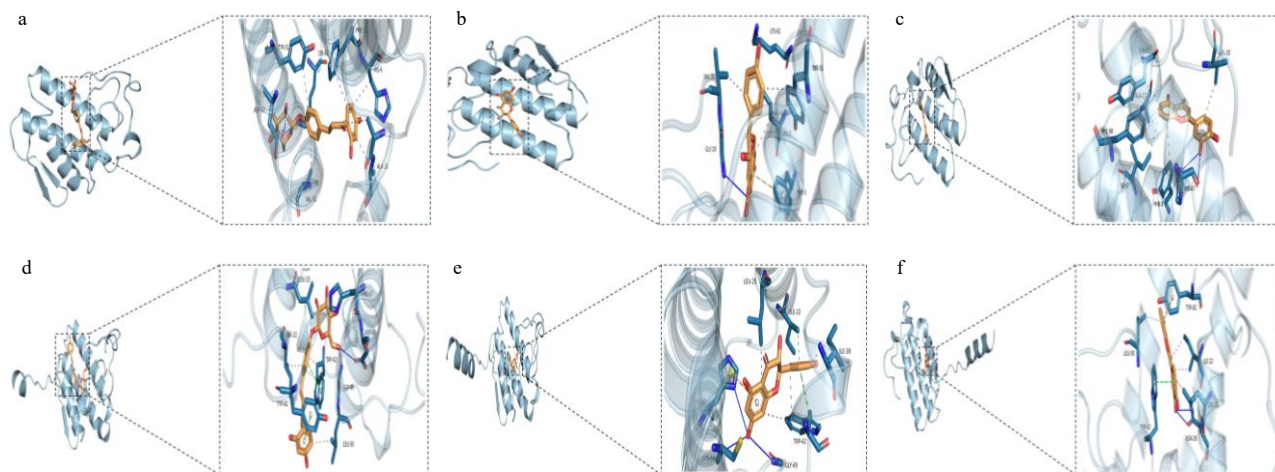
PLA2G3、PLA2G4A、PLA2G2F 等是磷脂酶 A2 (phospholipase A2) 家族的主要成员，它们在炎症和免疫类疾病中起着重要作用，而免疫与炎症反应是骨关节病最重要的病理特点^[24-26]。

磷脂酶 A2 酶是一类参与脂质代谢的酶，可促进炎症反应和细胞膜破坏^[27]。在骨关节病的发病机制和发展过程中，研究表明磷脂酶 A2 家族可能密切参与其中^[28-30]。具体来说，PLA2G3 属于低分子量的分泌型磷脂酶 A2，与组织炎症和修复过程有关，PLA2G4A 属于胞浆型磷脂酶 A2，其活性调节

与细胞信号传递中的脂质介质生成密切相关，特别是在产生前列腺素和白三烯等炎症介质中发挥重要作用^[30-33]。

PLA2G2F 生理作用研究尚少，但应与炎症和免疫调节相关。PLA2G5 与 PLA2G4A 相似，在炎症介质的生成中具有重要作用，且与另一种广泛研究的分泌型磷脂酶 A2 即 PLA2G2A 关联密切，与许多疾病的炎症反应有关，其重要性体现在，参与调控产生的各种炎症介质^[34-36]。

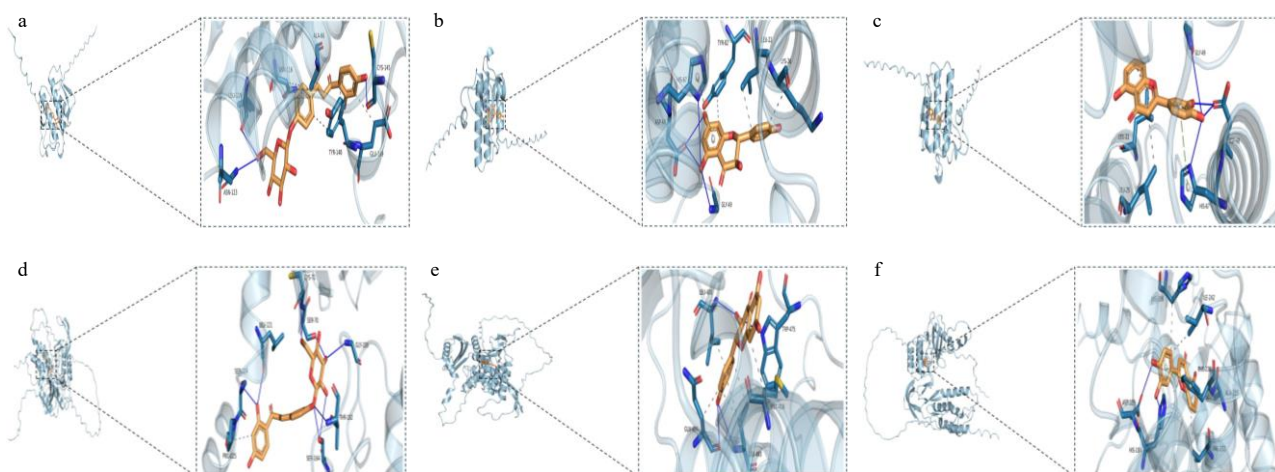
异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮 3 种物质作为 BC 的体内直接作用物质，与风寒湿痹证骨



a 为异甘草苷与 PLA2G2A 的 3D 结合构象；b 为香橙素与 PLA2G2A 的 3D 结合构象；c 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G2A 的 3D 结合构象；d 为异甘草苷与 PLA2G2D 的 3D 结合构象；e 为香橙素与 PLA2G2D 的 3D 结合构象；f 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G2D 的 3D 结合构象。
a is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G2A; b is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G2A; c is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G2A; d is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G2D; e is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G2D; f is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G2D.

图 9 核心靶点 PLA2G2A、PLA2G2D 与核心成分异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮之间的对接图

Fig. 9 Docking diagram between core targets PLA2G2A, PLA2G2D and core components isoliquiritin, dihydrokaempferol, 5,3',4'-trihydroxyflavone



a 为异甘草苷与 PLA2G2F 的 3D 结合构象；b 为香橙素与 PLA2G2F 的 3D 结合构象；c 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G2F 的 3D 结合构象；d 为异甘草苷与 PLA2G3 的 3D 结合构象；e 为香橙素与 PLA2G3 的 3D 结合构象；f 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G3 的 3D 结合构象。
a is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G2F; b is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G2F; c is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G2F; d is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G3; e is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G3; f is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G3.

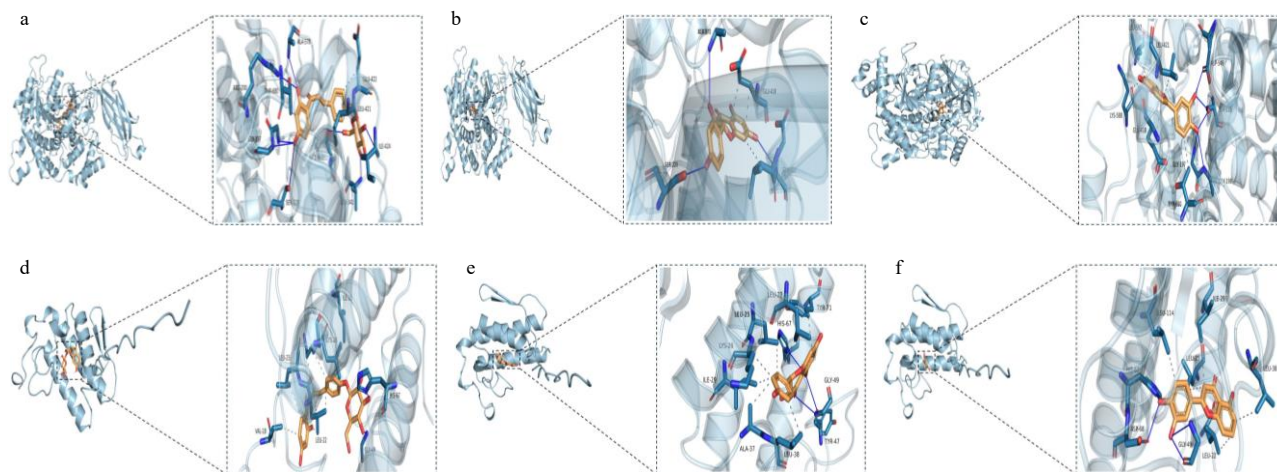
图 10 核心靶点 PLA2G2F、PLA2G3 与核心成分异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮之间的对接图

Fig. 10 Docking diagram between core targets PLA2G2F, PLA2G3 and core components isoliquiritin, dihydrokaempferol, 5,3',4'-trihydroxyflavone

关节病关键代谢通路的核心蛋白靶点均有低于 -8.0 kJ/mol 的低势能结合，在 BC 药物有效性的大前提下，三者均符合有效性原则。同时，依据超高效液质联用技术快速、高效、高灵敏度和选择性好的特点，本实验所得成分均可进行定量与半定量分析，异甘草素、二氢山柰酚、5,3',4'-三羟基黄酮 3 种物

质符合可测性原则的相关要求。

最后，通过数据库的交叉匹配，本研究发现异甘草苷主要来源于甘草，而香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮 2 种物质则来源于苍术与麻黄，3 种物质均来自佐使药物（甘草）、臣药（麻黄）以及君药（苍术），符合功效关联性，遵循具有组方配伍特点的要求^[37]，



a 为异甘草苷与 PLA2G4A 的 3D 结合构象；b 为香橙素与 PLA2G4A 的 3D 结合构象；c 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G4A 的 3D 结合构象；d 为异甘草苷与 PLA2G5 的 3D 结合构象；e 为香橙素与 PLA2G5 的 3D 结合构象；f 为 5,3',4'-三羟基黄酮与 PLA2G5 的 3D 结合构象。
a is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G4A; b is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G4A; c is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G4A; d is the 3D binding conformation of isoliquiritin and PLA2G5; e is the 3D binding conformation of dihydrokaempferol and PLA2G5; f is the 3D binding conformation of 5,3',4'-trihydroxyflavone and PLA2G5.

图 11 核心靶点 PLA2G4A、PLA2G5 与核心成分异甘草苷、香橙素、5,3',4'-三羟基黄酮之间的对接图

Fig. 11 Docking diagram between core targets PLA2G4A, PLA2G5 and core components isoliquiritin, dihydrokaempferol, 5,3',4'-trihydroxyflavone

且 3 种物质均为体内外含量较高的体内直接作用物质，符合特异性原则要求^[2,38]。综上所述，异甘草苷、香草素、5,3',4'-三羟基黄酮符合 Q-Marker“五原则”的相关要求，可作为 BC 的 Q-Marker。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙会敏, 杨锐, 张朝阳, 等. 2015 年版《中国药典》提升药用辅料科学标准体系强化我国药品质量 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(15): 1353-1358.
- [2] 屠鹏飞, 姜勇, 何轶, 等. 中药材和饮片质量控制与质量标准体系的构建 [J]. 中国食品药品监管, 2022(10): 34-45.
- [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] 贺木兰, 王玺, 何成峙, 等. 基于化学成分、药理作用及网络药理学的血府逐瘀胶囊质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3886-3897.
- [5] 张磊, 林梅, 陈雪艳, 等. 基于数据驱动的中药制药过程质量标志物 (Q-Marker) 监测方法研究及实践 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2452-2462.
- [6] Zhang T J, Bai G, Liu C X. Innovation theory, technical methods and industrial application of quality marker of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(1): 84-86.
- [7] Kang T G, Dou D Q, Xu L. Establishment of a quality marker (Q-marker) system for Chinese herbal medicines using burdock as an example [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 339-346.
- [8] 朱婷, 黄菲, 陈琴, 等. 基于“五原则”的泽泻汤质量标志物 (Q-marker) 预测分析 [J]. 海峡药学, 2024, 36(8): 39-44.
- [9] 王七龙, 井亚江, 黄建萍, 等. 基于指纹图谱、网络药理学预测黄芪“补气升阳”功效的质量标志物 [J]. 中南药学, 2024, 22(6): 1550-1557.
- [10] Wang X J, Zhang A H, Sun H, *et al.* Chinmedomics: Newer Theory and Application [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 299-307.
- [11] 刘鸿达, 孔玲, 孙晖, 等. 方证代谢组学理论及方法的形成和发展 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2629-2637.
- [12] 闫广利, 孙晖, 张爱华, 等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.
- [13] 王喜军, 张爱华, 孙晖, 等. 基于中医方证代谢组学的中医证候精准诊断及方剂疗效精准评价 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(1): 30-34.
- [14] 苏红娜, 张爱华, 孙晖, 等. 中医方证代谢组学研究进展及其应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(8): 1279-1286.
- [15] Han Y, Sun H, Zhang A H, *et al.* Chinmedomics, a new strategy for evaluating the therapeutic efficacy of herbal medicines [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 216: 107680.
- [16] 余晓愉, 熊辉, 齐新宇, 等. 基于以方测证的膝骨关节

- 炎风寒湿痹证模型大鼠构建研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(7): 1091-1095.
- [17] 马腾茂, 强宇靖, 罗奎元, 等. 秦艽不同配伍药对对风寒湿痹类风湿关节炎模型大鼠血清炎症因子及踝关节病理学改变的影响 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(15): 1878-1883.
- [18] 林也, 戴宗顺, 张婷, 等. 基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 668-672.
- [19] Wang M M, Yin F T, Kong L, *et al.* Chinmedomics: A potent tool for the evaluation of traditional Chinese medicine efficacy and identification of its active components [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 47.
- [20] 郭思凡, 蔡莹, 张爱华. 基于代谢组学的中药药效评价、药效物质发现及作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2338-2346.
- [21] 刘绍博, 孙晖, 卢盛文, 等. 基于中医方证代谢组学策略研究知柏地黄丸质量标志物 [J]. 中医药学报, 2021, 49(10): 14-22.
- [22] 钟森杰, 熊霞军, 张倩, 等. 基于“方证对应”理论探讨主动脉弓缩窄致心力衰竭大鼠模型的中医证型与代谢标志物 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 130-139.
- [23] Kong L, Sun Y, Sun H, *et al.* Chinmedomics strategy for elucidating the pharmacological effects and discovering bioactive compounds from keluoxin against diabetic retinopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 728256.
- [24] 万锦平, 肖海, 覃星悦, 等. 脑小血管病患者对氧磷脂酶 1、载脂蛋白 A1、脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与脑白质高信号及认知功能的关系探讨 [J]. 微循环学杂志, 2024, 34(4): 62-67.
- [25] 黄道桂, 刘颖. 白细胞介素-32、脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与阿尔茨海默病患者认知功能损害的相关性分析 [J]. 大医生, 2024, 9(21): 26-28.
- [26] 黄宇, 付美珍, 戴淑惠, 等. 膜性肾病患者抗磷脂酶 A2 受体抗体定量水平与肾损伤标志物的相关性 [J]. 检验医学与临床, 2024, 21(20): 2990-2993.
- [27] 王振坤, 李鹏. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与高密度脂蛋白抗炎功能的关系 [J]. 岭南心血管病杂志, 2018, 24(1): 37-39.
- [28] 邢红宇, 郑才玲, 梁宁, 等. 类风湿关节炎患者血清中淀粉样蛋白 A 和分泌型磷脂酶 A2 的水平及意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16): 2071-2073.
- [29] 颜平. 老年类风湿关节炎合并动脉粥样硬化患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(13): 3175-3176.
- [30] 包卓玛, 侯孜明, 江露, 等. 杨枫总黄酮调控类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、迁移及凋亡的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025: 1-8.
- [31] 陈晓梅. 逍遥散对慢性应激损伤大鼠海马区 MAPK 信号通路 FGFR1、PLA2G3 及 PLA2G5 基因表达的影响 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2019.
- [32] 张旭. 基于 PLA2G4A 基因和 IL-6/JAK2/STAT3 通路的“止痒平肤液”治疗 EGFRIs 相关皮疹的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [33] 柴春泉, 姜逸, 梁尚华, 等. 丹参川芎嗪注射液通过 miR-145-5p/PLA₂G₄A 抑制糖氧剥夺诱导的星形胶质细胞活化和炎症反应 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 101-106.
- [34] 崔继志, 徐烨华, 李华杰, 等. 瑞舒伐他汀对慢性心衰大鼠心功能及心肌胞浆型磷脂酶 A2 的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(9): 1006-1010.
- [35] 陈晓梅, 郭维, 孙琪, 等. 逍遥散对慢性应激损伤模型大鼠海马区 PLA2G5 的影响 [J]. 山西中医, 2019, 35(3): 52-55.
- [36] 梁宇, 吴丹. 西洋参对卵巢早衰大鼠卵巢 HPGDS PLA₂G₄A、PTGS₁ 基因表达的影响 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(2): 166-167.
- [37] 彭潇, 郑丽云, 方世记, 等. 丹酚酸 A 对大鼠脑缺血再灌注损伤后胞浆型磷脂酶 A2 表达的影响及机制研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(2): 195-198.
- [38] 钱挺照, 胡春, 胡赛峰. 用“结构-过程-结果”三维理论构建泌尿外科中医药质量评价体系 [J]. 中医药管理杂志, 2024, 32(20): 109-111.

[责任编辑 郑礼胜]