

基于虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合的通关藤质量评价研究

李思雨¹, 王安鑫¹, 陈杰², 李娜¹, 张大川¹, 王添敏¹, 裴志东^{1*}, 张慧^{1*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 辽宁中医药大学中西医结合学院, 辽宁 沈阳 110847

摘要: **目的** 在考虑中药整体观点前提下, 采用虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合的新策略, 筛选通关藤潜在质量标志物 (quality marker, Q-Marker), 并建立以临床功效为导向的基于效应成分指数的通关藤质量评价新方法。**方法** 采用网络药理学, 虚拟筛选通关藤抗肿瘤潜在 Q-Marker; 通过成分敲除方法, 以 H₂₂ 荷瘤小鼠为模型, 验证潜在 Q-Marker 筛选的正确性; 采用高效液相色谱-紫外检测器-蒸发光散射检测器 (HPLC-VWD-ELSD) 技术, 测定 30 批药材中各潜在 Q-Marker 的含量, 并以人胃癌细胞 HGC-27、人肝癌细胞 SMMC-7721 为体外模型, 检测各 Q-Marker 对 22 种细胞的生长抑制率; 最后结合自定义权重系数分配法, 建立基于潜在 Q-Marker 含量和药效值的效应成分指数方法。**结果** 确定了通关藤抗肿瘤的潜在 Q-Marker 为通关藤苷 G、通关藤苷 H 和通关藤苷 I, 三者药效可达药材整体药效的 50% 以上; 建立的效应成分指数与 HGC-27、SMMC-7721 细胞抑制率呈显著正相关, r 分别为 0.757、0.884, 说明效应成分指数越大, 抗肿瘤药效越强。**结论** 采用虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合新策略, 构建了“以效论质、效从质变”的通关藤质量评价新模式, 兼顾了中药质量整体性和临床特异性的双重属性, 为中药质量评价提供新思路。

关键词: 虚拟筛选; 成分敲除; 效应成分指数; 通关藤; 通关藤苷 G; 通关藤苷 H; 通关藤苷 I; 质量评价

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)20-7540-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.023

Establishing quality evaluation of *Marsdenia tenacissima* based on combination of virtual screening-component knockout-efficacy component index

LI Siyu¹, WANG Anxin¹, CHEN Jie², LI Na¹, ZHANG Dachuan¹, WANG Tianmin¹, PEI Zhidong¹, ZHANG Hui¹

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. School of Integrative Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: **Objective** Considering the holistic characteristics of traditional Chinese medicine (TCM), a novel integrated strategy combining virtual screening, component knockout, and the efficacy component index (ECI) was employed to screen for potential quality markers (Q-Markers) of *Marsdenia tenacissima* and establish a novel clinical efficacy-oriented quality assessment method based on the ECI. **Methods** Network pharmacology was first used to virtually screen for anti-tumor potential Q-Markers of *M. tenacissima*. The accuracy of marker screening was then verified using the component knockout method in H₂₂ tumor-bearing mice. The contents of each identified marker in 30 batches of medicinal material were determined using HPLC-VWD-ELSD technology. The growth inhibition rates of these markers against 22 types of cells were assessed, with HGC-27 and SMMC-7721 cells as *in vitro* models. Finally, an ECI method based on potential Q-Marker content and efficacy value was established by integrating a custom weight coefficient assignment method. **Results** The results identified tenacissosides G, H, and I as the anti-tumor Q-Markers of *M. tenacissima*, collectively accounting for over 50% of the whole herb's efficacy. The established ECI showed significant positive correlations with the inhibition rates against HGC-27 and SMMC-7721 cells (correlation coefficients r of 0.747 and 0.884, respectively), indicating that a higher ECI corresponds to stronger anti-tumor efficacy. **Conclusion** The integrated “virtual screening-component knockout-ECI”

收稿日期: 2025-03-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173935); 辽宁省自然科学基金博士启动项目 (2024-BS-134); 辽宁省教育厅面上项目 (LJKMZ20221312); 辽宁省教育厅重点攻关项目 (JYTZD2023198); 国家中管局全国老药工 (康廷国) 传承工作室建设项目

作者简介: 李思雨, 博士, 主要从事中药品质评价研究。E-mail: lnzylsy@163.com

*通信作者: 张慧, 教授, 博士生导师。Tel: 13998541994 E-mail: syyyys@163.com

裴志东, 副教授。Tel: 13998437189 E-mail: pzd87586078@163.com

strategy established a novel quality assessment model for *M. tenacissima*, characterized as “quality assessment based on efficacy” and “efficacy changes with quality variation”. This model addresses the dual attributes of holistic quality and clinical specificity in TCM, providing a new approach for TCM quality evaluation.

Key words: virtual screening; component knockout; efficacy component index; *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.; tenacissosides G; tenacissosides H; tenacissosides I; quality assessment

通关藤为萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎，具有清热解毒、散结止痛作用，其抗肿瘤作用确切^[1-2]。由通关藤单味药材水提物制成的消癌平片剂、通关藤注射液等系列制剂生产企业已近百家，用于治疗胃癌、肝癌等，疗效公认良好^[3]。近年来，因其抗肿瘤临床显效，药材用量剧增，混淆品包括黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr.、夜来香 *Telosma cordata* (Burm. f.) Merr. 等多种^[4]，药材质量良莠不齐，目前《中国药典》2025 年版仅通过检测通关藤苷 H 含量来评价药材质量，不能客观评价药材的质量，为此亟需寻找药材质量标志物 (quality marker, Q-Marker)，建立兼顾中药整体性和临床导向性的具有中医特色的质量标准。

目前 Q-Marker 研究，文献多见“谱-效”关系、网络药理学、血清药物化学等方法^[5-7]；有关质量评价方法，多见指纹图谱、含量测定、生物活性评价等^[8-10]，这些方法为中药的质量控制提供了可借鉴的研究思路，但目前仍存在未兼顾中药整体性和临床导向性的 2 大瓶颈问题，为此亟需以此为突破口，建立“以效论质、效从质变”的质量评价体系，即一方面从

中药整体性出发，在保持药材“黄金比例”不变的情况下，寻找可代表整体药材药效的 1 组 Q-Marker；另一方面，以 Q-Marker 为指标，建立临床功效为核心的质量标准。效应成分指数 (effect-constituent index, ECI) 是将化学成分分析与生物效价检测加以整合为一个指数，以这一指数为指标，建立以临床功效为导向的质量评控新方法。该方法通过加权计算各功效成分的生物效价贡献度，构建多组分综合量化评价体系，实现了中药质量标准与药效密切相联，且兼顾中药整体性特点，显著提升了中药质量评价的客观性及全面性^[11-12]。

基于此，本研究采用虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合策略，采用网络药理学，虚拟筛选通关藤潜在 Q-Marker；采用成分敲除方法，从药材中敲除标志物和剩余部分，考察标志物抗肿瘤作用，以验证潜在 Q-Marker 的正确性；采用 HPLC-VWD-ELSD 和体外细胞模型，测定标志物含量药效值，建立基于潜在 Q-Marker 含量和药效值的 ECI 方法并加以验证。本研究以通关藤为例，为中药质量评价提供新思路、新策略。研究思路见图 1。



图 1 基于虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合的通关藤质量评价研究策略

Fig. 1 Research strategy for quality evaluation of *M. tenacissima* based on combination of virtual screening-component knockout-ECI

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent HPLC 1260 液相色谱仪（配备 VWD、ELSD 检测器）；Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；SANYO MCO175 二氧化碳培养箱（日本三洋公司）；步琦 C-850 全能型制备液相色谱仪（瑞士）；步琦 C₁₈ 制备型色谱柱（250×20 mm，10 μm）（瑞士）。

1.2 动物

SPF 级 KM 小鼠，体质量（20±2）g，雌性 10 只用于腹水传代，雄性 40 只用于模型建立，均购自辽宁省实验动物中心，合格证号 SYXK（辽）2021-0001。所有实验均在辽宁中医药大学伦理委员会的监督下进行，动物实验伦理批号 2025012。

1.3 试剂与药物

人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 HGC-27、小鼠肝癌细胞 H22（上海柏乾生物科技有限公司）；通关藤苷 I、通关藤苷 G、环磷酰胺（CTX）（上海源叶生物科技有限公司，质量分数≥98%，批号分别为 PM0529SB13、PM0529SA1、X22D8Y51136）；对照品通关藤苷 H（中国食品药品检定研究院，批号 111913-201202，质量分数≥98%）；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-2（interleukin-2，IL-2）、IL-6ELISA 检测试剂盒（上海科兴生物科技有限公司，批号为 21041430N、21041434N、21041435N）；30 批通关藤样品信息见表 1，均由辽宁中医药大学张慧教授鉴定为萝藦科植物通关藤 *M. tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎。

表 1 通关藤样品信息
Table 1 Sample information of *M. tenacissima*

编号	产地	来源	编号	产地	来源
S1	云南	亳州药材市场	S16	广西	亳州药材市场
S2	云南临沧	亳州药材市场	S17	广西玉林	亳州药材市场
S3	云南	亳州药材市场	S18	广西	亳州药材市场
S4	云南	亳州药材市场	S19	广西	亳州药材市场
S5	云南临沧	亳州药材市场	S20	贵州	安国药材市场
S6	云南	安国药材市场	S21	贵州	安国药材市场
S7	云南西双版纳	安国药材市场	S22	贵州	安国药材市场
S8	云南昆明	安国药材市场	S23	贵州	安国药材市场
S9	云南	安国药材市场	S24	贵州	安国药材市场
S10	云南临沧	安国药材市场	S25	贵州	安国药材市场
S11	云南昆明	安国药材市场	S26	贵州	安国药材市场
S12	广西	亳州药材市场	S27	广东	成都荷花池药材市场
S13	广西	亳州药材市场	S28	广东	成都荷花池药材市场
S14	广西玉林	亳州药材市场	S29	四川	成都荷花池药材市场
S15	广西	亳州药材市场	S30	四川	成都荷花池药材市场

2 方法与结果

2.1 网络药理学虚拟筛选潜在 Q-Marker

2.1.1 活性成分-疾病交集靶点的获取 基于本团队前期鉴定的通关藤 131 个化学成分，使用 SwissADME 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库进行活性成分筛选和潜在作用靶点预测。通过 OMIM、GeneCards、TTD、CTD 数据库，以“liver

cancer”及“gastric cancer”为关键词检索肝癌及胃癌相关靶点。对以上药物及活性成分靶点取交集。结果，共筛选出活性成分 160 个非重复靶点，肝癌、胃癌疾病靶点分别为 4 208 个、1 546 个，将药物靶点与疾病靶点结合分别获得交集靶点 93、56 个。结果见图 2。通过 degree 值分析，通关藤排名最高的 6 个活性化合物分别为通关藤皂苷 G（tenacissoside

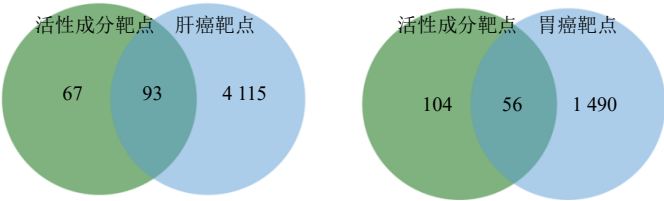


图 2 通关藤治疗肝癌、胃癌靶点的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagrams of targets for *M. tenacissima* in treating liver cancer and gastric cancer

G)、通关藤皂苷 H (tenacissoside H)、通关藤皂苷 I (tenacissoside I)、通关藤苦苷 B (tenacigenin B)、通关藤苦苷 C (tenacigenin C) 和 Marsdenin。

2.1.2 活性成分-靶点网络及 PPI 网络的构建 将所得 160 个非重复靶点与活性成分相关联, 通过 Cytoscape3.10.1 绘制活性成分-靶点关联网络图, 结果见图 3。将药物靶点和肝癌、胃癌靶点结合所

得的交集靶点 93 个及 56 个放入 String 数据库, 通过将物种设定为 *H. sapiens*, 置信度 >0.4 , 使用 CytoNCA 以度 (degree) 值进行排序, 选取排名前 8 的靶点构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 结果见图 4。选取排名前 3 的靶点作为关键靶点, 即为 IL-6、EGFR、STAT3。

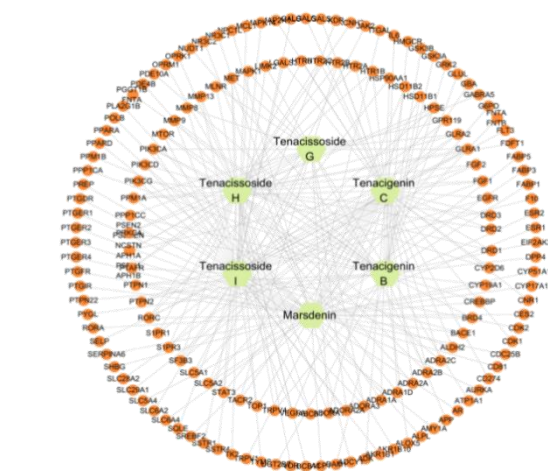


图 3 活性成分-靶点网络图

Fig. 3 Network diagram of active ingredient-target

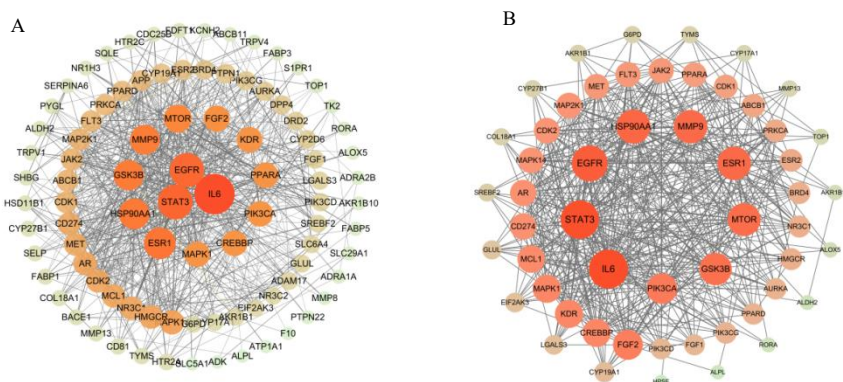


图 4 通关藤治疗肝癌 (A) 和胃癌 (B) 潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 4 PPI network of potential targets for *M. tenacissima* in treating liver cancer (A) and gastric cancer (B)

2.1.3 分子对接 基于网络药理学筛选得到的通关藤抗肝癌、胃癌的潜在 Q-Marker 为通关藤苷 G、通关藤苷 H、通关藤苷 I 及通关藤苦苷 B、通关藤苦苷 C、marsdenin, 二者的关键靶点均为 IL-6、EGFR、STAT3, 将候选 Q-Marker 与核心靶点蛋白 IL6、STAT3、EGFR 进行分子对接验证。首先通过 Chemdraw 23.1 绘制候选 Q-Marker 的 3D 结构式, 在 Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 获得关键靶点基因标准名称, 导入 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载对应 3D

结构式, 通过 AutoDockTools-1.5.7 进行分子对接, 所得对接结合能见表 2, 对接能 ≤ -5.0 kcal/mol (1 kcal/mol $= 4.182$ kJ/mol) 认定为结合活性较高^[13], 结果表明通关藤苷 G、通关藤苷 H、通关藤苷 I 与 3 个核心靶点的结合活性较高, 将其导入 Pymol 软件进行可视化, 结果见图 5。表明通关藤苷 G、通关藤苷 H、通关藤苷 I 为潜在 Q-Marker。

2.2 基于成分敲除的潜在 Q-Marker 验证

2.2.1 通关藤提取物的制备 取通关藤药材 (S1)

表 2 潜在 Q-Marker 与核心靶点的分子对接结合能
Table 2 Binding energy of molecular docking between potential Q-Markers and core targets

潜在Q-Marker	各关键靶点的结合自由能/(kcal·mol ⁻¹)		
	STAT3	IL-6	EGFR
通关藤苷G	-5.89	-6.56	-5.50
通关藤苷H	-5.05	-5.65	-5.00
通关藤苷I	-5.75	-7.69	-5.13
通关藤苦苷B	-2.93	-5.40	-4.85
通关藤苦苷C	-2.94	-5.22	-3.70
marsdenin	-2.97	-5.09	-4.87

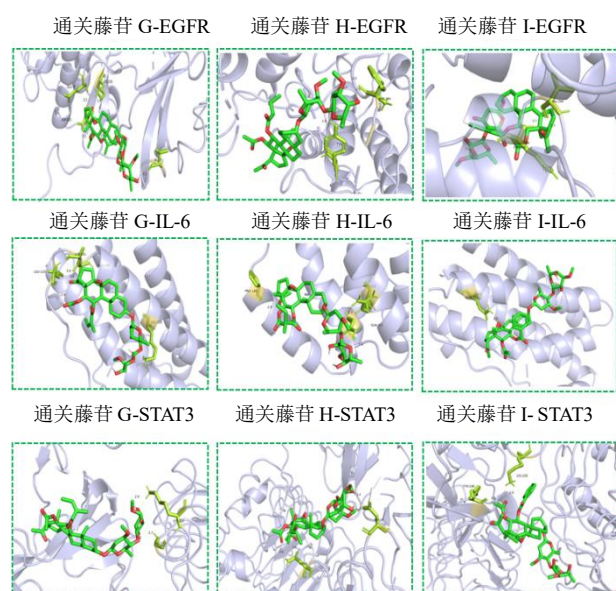


图 5 Q-Marker 与核心靶点对接可视化结果

Fig. 5 Visualization results of molecular docking between Q-Markers and core targets

50 g, 分别加 8 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过后, 冷冻干燥即得冻干粉。

2.2.2 敲除成分的制备 取 70%乙醇回流提取制备的供试品溶液, 按照《基于谱效关系的通关藤 Q-

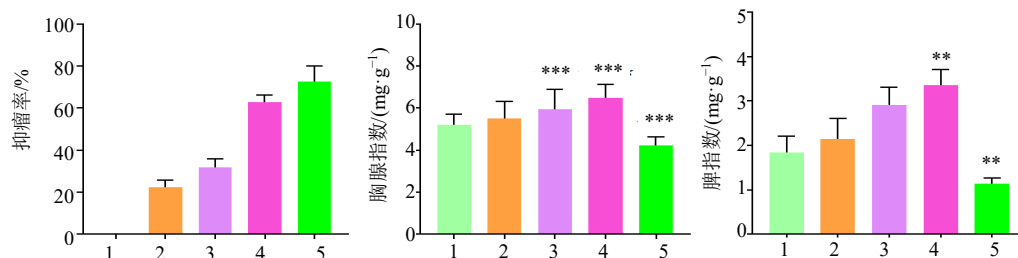
Marker 筛选》中通关藤指纹图谱的色谱条件^[14], 利用步琦 C-850 全能型制备液相色谱仪进行色谱峰收集, 捕获到潜在 Q-Marker 组 (包含通关藤苷 G ($t_R=41.92$ min)、通关藤苷 H ($t_R=51.83$ min)、通关藤苷 I ($t_R=54.02$ min) 及敲除了潜在 Q-Marker 的剩余组分, 出峰时间的两端不收集, 以避免其他物质混入影响收集组分的纯度。获得目标成分后冷冻干燥后备用。

2.2.3 H₂₂ 移植性肝癌小鼠的建立 取适宜浓度的对数生长期的 H₂₂ 细胞, 进行腹水传代, 收集第 3 代腹水, 1 500 r/min 离心 5 min, 后弃去液体, 加生理盐水稀释细胞浓度至 1×10^7 个/mL, 取 40 只小鼠, 左侧腋下用 75%乙醇消毒, 每只注射 0.2 mL 上述细胞悬液, 后进行常规饲养 20 d, 直至成瘤。

2.2.4 动物分组及给药 将接种后已成瘤的小鼠, 随机分为模型组、潜在 Q-Marker 组、剩余成分组、通关藤提取物组、阳性对照组, 每组 8 只, 潜在 Q-Marker 组每日 ig 相当于 45.00 g/kg 通关藤中所含的通关藤苷 I、通关藤苷 H、通关藤苷 G, 剩余成分组每日 ig 相当于 45.00 g/kg 通关藤中除潜在 Q-Marker 外的剩余组分, 通关藤提取物组每日 ig 45.00 g/kg 的通关藤提取物, 阳性对照组每日 ig 给予 CTX 20 mg/kg。模型组每日 ig 等体积的生理盐水, 每天给药 1 次, 连续给药 14 d。

2.2.5 对肿瘤抑制作用及脏器指数的影响 于末次给药后, 将各实验组小鼠安乐死, 并称定质量, 摘取各组小鼠的肿瘤组织及脾、胸腺, 生理盐水冲洗组织表面的血渍及脂肪组织, 滤纸擦干后称定质量, 按公式计算抑瘤率及胸腺、脾指数^[15-17], 结果见图 6。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}$$



1-模型组; 2-剩余成分组; 3-潜在 Q-Marker 组; 4-整体提取物组; 5-CTX 组。与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 图 7 同。
1-model group; 2-remaining components group; 3-potential Q-Marker group; 4-crude extract group; 5-CTX group. ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as Fig. 7.

图 6 各组小鼠的抑瘤率、胸腺指数、脾指数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 Tumor inhibition rate, thymus index and spleen index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

脾指数=每只小鼠脾质量/每只小鼠体质量

胸腺指数=每只小鼠胸腺质量/每只小鼠体质量

从图 6 可见, 剩余成分组、Q-Marker 组及通关藤提取物组均可提高荷瘤小鼠的胸腺指数及脾指数, 同时, 均对荷瘤小鼠肿瘤组织具有一定抑制作用。其中, 剩余成分组、Q-Marker 组及通关藤提取物组的抑瘤率分别为 22.18%、31.87%、62.92%, 说明 Q-Marker 对肿瘤组织的抑制作用可达通关藤提取物整体效应的 50.65%。

2.2.6 对血清中细胞因子的影响 各实验组于末次给药后, 取各小鼠血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书,

检测各实验组小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-6、TNF- α 的含量, 结果见图 7, 剩余成分组、潜在 Q-Marker 组、通关藤提取物组均能提高 H₂₂ 荷瘤小鼠中 IL-2、IL-6、TNF- α 的含量, 说明通关藤发挥抗肿瘤作用与免疫调节有关。剩余成分组、Q-Marker 组、通关藤提取物组提高 IL-6 含量的效应分别为 26.21%、61.70%、110.59%, 三者提高 IL-2 含量的效应分别为 45.43%、61.21%、121.50%, 三者提高 TNF- α 含量的效应分别为 64.71%、136.68%、245.18%。说明 Q-Marker 组提高 IL-2、IL-6、TNF- α 含量的效应值均可达到通关藤提取物整体药效的 50% 以上。

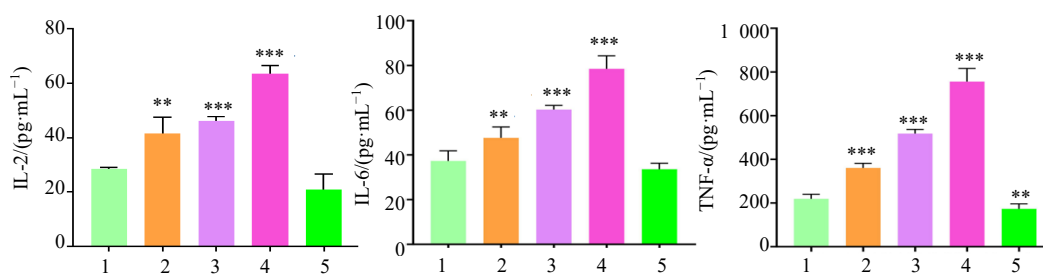


图 7 各组小鼠血清中 IL-2、IL-6、TNF- α 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Levels of IL-2, IL-6 and TNF- α in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 通关藤苷 I、H、G 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈 (A)-水 (B) 为流动相体系, 漂移管温度设置为 80 $^{\circ}$ C, 体积流量为 1 mL/min, 梯度洗脱条件: 0~15 min, 65%~61% B; 15~16 min, 61%~60% B; 16~33 min, 60%~58% B; 33~55 min, 58%~50% B; 55~60 min, 58%~50% B; 在 235 nm 波长下进行检测。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 30 批通关藤药材 50 g, 分别加 8 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过后, 冷冻干燥即得冻干粉。取冻干粉适量, 70%乙醇溶解稀释至生药质量浓度为 0.1 g/mL, 即得供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 分别精密称取通关藤苷 I、H、G 对照品适量至 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 即得通关藤苷 I、H、G 质量浓度分别为 1.536、2.134、1.154 mg/mL 的对照品储备液。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 除去通关藤药材, 按供试品溶液制备项下内容操作, 即得阴性对照溶液。

2.3.5 专属性考察 精密吸取供试品溶液、混合对

照品溶液、阴性对照溶液各 20 μ L, 分别按上述色谱条件进行分析, 结果显示, 阴性对照溶液色谱图中未见与对照品溶液色谱图中通关藤苷 I、G、H 相同保留时间的色谱峰, 证明阴性无干扰, 色谱图见图 8。

2.3.6 线性关系考察 分别精密吸取系列混合对照品储备液至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 按“2.3.1”项下进行测定。以进样量的自然对数为横坐标 (X), 以色谱峰面积的自然对数为纵坐标 (Y), 得通关藤苷 G、H、I 的线性回归方程分别为 $Y=776.85X+75.017$ ($r=0.9994$)、 $Y=1.3611X+5.1376$ ($r=0.9993$)、 $Y=341.43X-70.734$ ($r=0.9991$)。

2.3.7 稳定性试验 取 S1 号供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、8、12 h 后, 进样分析, 测得通关藤苷 I、H、G 的峰面积 RSD 值分别为 1.17%、1.82%、1.62%, 说明 3 个待测物在测试时间内化学性质稳定。

2.3.8 精密度试验 精密吸取 S1 号供试品, 连续进样 6 次, 记录通关藤苷 I、H、G 色谱峰面积, 计算 RSD 值分别为 1.91%、0.99%、1.74%, 结果表明仪器精密度良好。

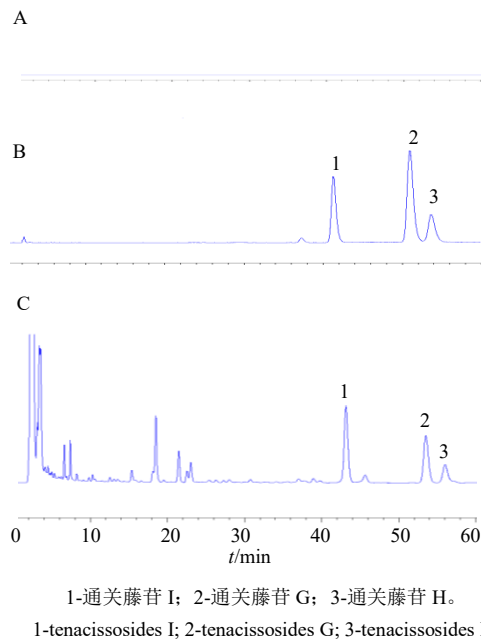


图 8 阴性对照 (A)、混合对照品 (B) 和供试品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC chromatograms of negative control (A), mixed reference substance (B) and test sample solutions (C)

2.3.9 重复性试验 精密称取 S1 号供试品 6 份, 按“2.3.1”项色谱条件项下进行测定, 测得通关藤苷 I、H、G 质量分数的 RSD 值分别为 1.54%、0.95%、0.82%, 说明所建立的方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 分别称取 6 份 S1 号样品 25 g, 精密加入混合对照品溶液 2 mL (含通关藤苷 I、G、H 的质量浓度分别为 0.625、0.371、0.801

mg/mL), 按照“2.3.2”项下制备供试品溶液, 进行测定, 计算通关藤苷 I、G、H 的加样回收率分别为 98.90%、101.36%、100.41%。

2.3.11 样品测定 30 批供试品, 按照“2.3.1”项色谱条件进行分析, 计算 30 批样品中通关藤苷 G、H、I 含量, 结果见表 3。

2.4 Q-Marker 对 SMMC-7721 和 HGC-27 细胞生长抑制作用

取通关藤苷 I、H、G 对照品适量, 分别用完全培养基制备成浓度分别为 100.2、150.23、180.56 $\mu\text{mol/L}$ 的供试品储备液。采用 MTT 法^[18]检测通关藤苷 I 浓度分别为 100.2、80.22、53.48、40.11、20.06 $\mu\text{mol/L}$, 通关藤苷 H 浓度分别为 150.23、120.1、80.12、60.09、30.05 $\mu\text{mol/L}$, 通关藤苷 G 浓度分别为 180.56、144.45、96.30、72.22、36.11 $\mu\text{mol/L}$ 。体外对 SMMC-7721 细胞及 HGC-27 细胞的抑制率, 并计算其半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值。阳性对照药为 CTX, 给药质量浓度为 4.5 mg/mL。结果显示, 通关藤苷 I、H、G 体外抑制 SMMC-7721 细胞的 IC_{50} 值分别为 60.36、95.9、118.46 $\mu\text{mol/L}$; 体外抑制 HGC-27 细胞的 IC_{50} 值分别为 52.91、75.97、98.46 $\mu\text{mol/L}$ 。阳性对照药对 HGC-27 细胞的抑制率为 71.20%, 对 SMMC-7721 细胞的抑制率为 61.00%。

2.5 ECI 的构建

采用自定义权重系数法, 根据通关藤苷 I、H、

表 3 30 批通关藤样品中通关藤苷 I、H、G 的含量

Table 3 Contents of tenacissoside I, H, and G in 30 batches of *M. tenacissima* samples

样品	质量分数/%			样品	质量分数/%		
	通关藤苷I	通关藤苷H	通关藤苷G		通关藤苷I	通关藤苷H	通关藤苷G
S1	1.16	1.31	0.61	S16	1.00	0.56	0.31
S2	2.92	2.08	1.42	S17	1.29	0.79	0.74
S3	1.30	0.89	0.52	S18	1.54	0.83	0.44
S4	2.59	1.95	1.35	S19	0.71	0.42	0.26
S5	1.66	1.32	0.93	S20	2.27	1.13	0.51
S6	0.89	0.48	0.27	S21	2.17	0.67	0.40
S7	2.77	2.72	0.50	S22	1.79	1.32	0.38
S8	2.85	2.86	0.96	S23	2.25	1.19	0.31
S9	0.81	0.55	0.26	S24	1.81	1.24	0.51
S10	1.19	0.73	0.62	S25	1.62	0.48	0.27
S11	1.88	1.57	0.71	S26	2.70	1.64	0.41
S12	2.97	1.52	0.22	S27	1.19	0.56	0.30
S13	3.58	0.89	0.54	S28	1.25	0.58	0.40
S14	2.85	0.86	0.52	S29	1.04	0.73	0.36
S15	1.68	1.05	0.45	S30	2.72	0.58	0.52

G 的 IC₅₀ 值, 按照下列公式计算权重系数。

$$W_i = \frac{PT}{\sum_{i=1}^n PT} \tag{1}$$

其中, W_i 为潜在 Q-Marker 的权重系数, PT 为潜在 Q-Marker 的 $1/IC_{50}$, n 为潜在 Q-Marker 个数, 通过公式计算得出通关藤苷 I、通关藤苷 H、通关藤苷 G 基于 HGC-27 抑制率的权重系数分别为 0.45、0.31、0.24; 基于 SMMC-7721 抑制率的权重系数分别为 0.53、0.24、0.23, ECI 通过综合指标评价法来反映, 见公式 (2)。

$$Z_m = 100 \times (WTI \times XTI + WTH \times XTH + WTG \times XTG) \tag{2}$$

Z_m 代表着不同产地通关藤的效应成分指数, XTI、XTH、XTG 分别代表通关藤苷 I、H、G 的含量

综上所述, 可得到基于 HGC-27 抑制率的通关藤效应成分指数见公式 (3): 基于 SMMC-7721 抑制率的通关藤 ECI 见公式 (4):

$$Z_m = 100 \times (0.45 \times XTI + 0.31 \times XTH + 0.24 \times XTG) \tag{3}$$

$$Z_m = 100 \times (0.53 \times XTI + 0.24 \times XTH + 0.23 \times XTG) \tag{4}$$

由得到的 2 个公式可以看出, 通关藤苷 I 的权重系数较大, 说明其抗肿瘤药效作用的贡献较大, 而目前现有的通关藤的质量标准仅为检测通关藤苷 H 的含量, 体现了目前质量标准与药效关联性的不足。

2.6 效应成分指数的验证

采用 MTT 法^[19-20]对 30 批通关藤样品对 HGC-27 及 SMMC-7721 细胞的体外增殖抑制率进行表征, 同时计算 30 批通关藤样品的 ECI, 结果见表 4。采用 SPSS 24.0 软件, 对得到的 30 批通关藤的 ECI 值及对 HGC-27 及 SMMC-7721 细胞的抑制率进行相关性分析, 结果显示, 不同产地通关藤对 HGC-27 及 SMMC-7721 细胞的抑制率与对应的 ECI, 均具有显著正相关 ($P < 0.001$); r 分别为 0.757、0.884。即 ECI 越大, 药效作用越强, 说明所建立的效应成分指数可以用于通关藤的质量一致性评价。

3 讨论

中药质量的整体评价一直是制约中药高质量发展的瓶颈问题, 其核心问题主要是如何寻找能代替药材整体药效的一组 Q-Marker^[21-22], 并基于所捕

表 4 30 批通关藤药材的抑制率及 ECI

Table 4 Inhibition rates and ECI of 30 batches of *M. tenacissima* medicinal materials

编号	抑制率/%		ECI	
	HGC-27	SMMC-7721	HGC-27	SMMC-7721
S1	65.87	66.48	1.07	2.23
S2	93.35	84.13	2.30	2.42
S3	64.28	47.85	0.99	0.62
S4	87.68	75.93	2.09	0.95
S5	68.71	66.21	1.38	1.54
S6	67.34	49.58	0.61	1.99
S7	91.28	77.76	2.21	2.23
S8	98.21	85.61	2.40	1.84
S9	69.33	36.04	0.60	1.24
S10	63.12	44.81	0.91	0.73
S11	71.33	37.29	1.50	1.04
S12	65.33	74.65	1.86	1.12
S13	85.69	79.87	2.01	0.54
S14	76.06	70.29	1.68	1.59
S15	66.58	52.56	1.19	1.40
S16	50.23	37.72	0.70	1.35
S17	84.33	48.85	1.00	1.55
S18	65.55	51.44	1.06	1.38
S19	40.23	42.38	0.51	1.04
S20	71.25	68.59	1.49	1.92
S21	67.25	62.21	1.28	0.83
S22	67.34	47.98	1.30	0.89
S23	45.62	67.34	1.45	0.81
S24	49.89	61.41	1.32	1.70
S25	59.88	60.83	0.94	2.23
S26	81.29	70.71	1.82	2.42
S27	51.28	34.17	0.78	0.62
S28	59.12	43.22	0.84	0.95
S29	56.89	40.97	0.78	1.54
S30	70.28	69.59	1.53	1.99

获的 Q-Marker 建立精准可量化、集成可重现、综合可操作、可实际应用的中药质量综合评价方法。目前对于中药 Q-Marker 的寻找及确定, 仍然遵循着“以一代全”的单功效研究模式, 其忽略了中药整体观特性; 对于质量评价体系的建立, 主要基于单一或少数的指标性成分的含量测定, 急需打破中药质量评价“量而不准、难关药效、难控难评”的困局^[23]。

为此, 本实验采用网络药理学方法, 筛选出通关藤潜在 Q-Marker (通关藤苷 G、通关藤苷 H、通关藤苷 I), 后在保持药材原有比例不变的前提下, 利用中药成分敲除系统, 捕获了与原药材等剂量的 Q-Marker、敲除 Q-Marker 的剩余成分, 验证了所确定的潜在 Q-Marker 基于抗肿瘤的体内药效对通关藤的整体药效贡献度。这一策略弥补了网络药理学缺少科学性试验验证的不足, 动态验证了可揭示多成分协同作用的通关藤 Q-Marker, 避免了因孤立研究成分导致的“以一代全”问题。

同时,本研究在所捕获的可代替通关藤整体药效的一组 Q-Marker 的基础上,建立了通过整合化学成分分析与生物活性评价的,基于 ECI 的通关藤质量评价体系。其是以“活性加权”为核心,结合自定义权重系数方法,以通关藤苷 G、H、I 体外对 HGC-27 及 SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 值为指标,计算通关藤苷 G、H、I 的权重系数,其中,通关藤苷 I 的药效贡献率最大,建立了 ECI 公式,结合各药材通关藤苷 G、H、I 的含量计算其 ECI,通过相关性分析,验证了 ECI 与体外抗肿瘤药效呈显著正相关,相关系数分别为 0.757、0.884,即 ECI 越大,抗肿瘤药效越好,说明所建立的效应成分指数可作为通关藤质量评价的有力补充。

综上,本研究采用虚拟筛选-成分敲除-效应成分指数联合新策略,从中药整体性出发,在保持药材原有比例不变的情况下,验证了可代表通关藤整体药效的一组 Q-Marker,并以此为基础建立了以临床功效为导向的,整合了化学成分分析与生物活性评价的,基于 ECI 的通关藤质量评价体系,其通过“化学检测-生物活性-数学建模”三位一体的策略,完成了中药质量评价从单一指标到整体关联、从碎片化到整合化的转变,本实验以通关藤为例,为中药质量评价体系的建立提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 贾祎萍, 吴子薇, 李晓波, 等. 通关藤化学成分及其细胞毒活性 [J]. 中成药, 2023, 45(9): 2910-2916.
- [2] Li X L, He S H, Liang W, et al. *Marsdenia tenacissima* injection induces the apoptosis of prostate cancer by regulating the AKT/GSK3 β /STAT3 signaling axis [J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21(2): 113-126.
- [3] 刘丽, 彭雨晴, 杨晨欣, 等. 消癌平抗肿瘤药理作用及机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(2): 526-538.
- [4] 冷彩云, 张慧, 乔佳, 等. 通关藤及其混淆品的鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 874-875.
- [5] 陈家仪, 叶伟霞, 侯惠婵, 等. 基于指纹图谱结合化学计量学的毛慈菇质量评价 [J]. 中药新药与临床药理, 2025, 36(6): 967-975.
- [6] 徐蓓蕾, 张东琦, 杨娜娜, 等. 基于指纹图谱与谱效关系的白头翁潜在抗氧化 Q-Marker (Q-Marker) 分析 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4427-4435.
- [7] 李娜, 王岩, 王长福, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的温胆汤质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6241-6252.
- [8] 兰卫. 基于指纹图谱结合化学模式识别法的欧芹子质量评价 [J]. 中药材, 2025, 48(5): 1206-1211.
- [9] 龚婕, 姚芙, 厉晓, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别的白薇质量评价 [J]. 中草药, 2025, 56(15): 5578-5585.
- [10] 吕昀, 程文倩, 牛可敬, 等. 基于多维整合策略的中药复方制剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7847-7856.
- [11] 张慧, 李思雨, 冯宏玲, 等. 基于效应成分指数的双黄连制剂质量控制研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(12): 2149-2154.
- [12] 肖小河, 张定堃, 王伽伯, 等. 中药品质综合量化评控体系: 标准评控力金字塔 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 7-12.
- [13] 李克亚, 肖金银, 罗雯鹏, 等. 黄芩苷调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡治疗溃疡性结肠炎的机制 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1667-1681.
- [14] 李思雨, 裴志东, 王嘉唯, 等. 基于谱效关系的通关藤 Q-Marker 筛选 [J]. 中成药, 2025, 47(7): 2327-2332.
- [15] Cai K X, Tse L Y, Leung C, et al. Suppression of lung tumor growth and metastasis in mice by adeno-associated virus-mediated expression of vasostatin [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(3): 939-949.
- [16] Shu G W, Zhao W H, Yue L, et al. Antitumor immunostimulatory activity of polysaccharides from *Salvia chinensis* Benth [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 237-247.
- [17] Wang L, Nie Z K, Zhou Q, et al. Antitumor efficacy in H22 tumor bearing mice and immunoregulatory activity on RAW 264.7 macrophages of polysaccharides from *Talinum triangulare* [J]. *Food Funct*, 2014, 5(9): 2183-2193.
- [18] 李一竹, 谭婧玉, 黄建华, 等. 竹节香附素 A 通过诱导细胞焦亡对口腔癌 SCC25 细胞生长的抑制作用 [J]. 中成药, 2025, 47(1): 278-282.
- [19] 张天旭, 熊晓妹, 邹雪, 等. 蛇葡萄素通过调控 Beclin-1/Bcl-2 靶点对人宫颈癌 SiHa 细胞噬与凋亡的影响 [J]. 中成药, 2024, 46(12): 3977-3985.
- [20] 李涵艺, 李杰, 陆荣欣, 等. 黄芩-黄连调控 β 细胞甜味受体通路对胰岛素分泌紊乱的改善作用 [J]. 中成药, 2024, 46(5): 1652-1657.
- [21] 蒋运斌, 杨荣平, 祝婧. 基于网络药理学和成分敲除/敲入的中药多维药效物质基础研究方法 [J]. 江西中医药大学学报, 2021, 33(1): 114-118.
- [22] 中华中医药学会《中药质量标志物研究技术指南》编写组. 中药质量标志物研究技术指南 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2249-2252.
- [23] 熊吟, 肖小河, 鄢丹, 等. 综合量化集成的中药品质评控策略: 中药效应成分指数 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 1-7.

[责任编辑 时圣明]