

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)23-0060-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.23.013



基于指纹图谱和网络药理学的筋骨痛消液质量标志物预测*

王艳平^{1,2}, 陈菲^{1,2}, 王小龙^{1,2}, 黄丽^{1,2}, 王鹏飞^{1,2}, 田杰^{1,2△}

(1. 宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏回族自治区中药制剂创新工程技术研究中心, 宁夏银川 750021)

摘要:目的 基于指纹图谱和网络药理学预测筋骨痛消液中的质量标志物(Q-Marker)。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法建立17批筋骨痛消液的指纹图谱,使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)进行相似度评价和共有成分指认;采用网络药理学筛选共有成分的相关靶点和关键通路,并建立成分-靶点-通路网络,预测发挥活血化瘀通络、祛寒散结止痛作用潜在的Q-Marker。结果 共标定29个共有峰,并指认出6个色谱峰,分别为龙血素B、11-羧基- β -乙酰乳香酸、川续断皂苷VI、羟基红花黄色素A、大黄酸、苦杏仁苷。筛选出50个核心靶点、90条富集通路,根据化合物、靶点及信号通路间的连接度,初步预测11-羧基- β -乙酰乳香酸、川续断皂苷VI、羟基红花黄色素A、大黄酸、苦杏仁苷5种Q-Marker。根据蛋白-蛋白相互作用网络计算得白蛋白(ALB)、JUN、酪氨酸激酶(SRC蛋白)、环加氧酶2(PTGS2)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)5个关键靶点;基因本体论(GO)功能富集分析涉及生物过程197条,细胞组分35条,分子功能64条;京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析得到相关度高的信号通路有脂质和动脉粥样硬化、松弛素、白细胞介素17(IL-17)、破骨细胞分化、凋亡、C型凝集素受体、Th17细胞分化等。结论 所建立方法操作简便、重复性好,初步预测了筋骨痛消液中5种Q-Marker,可为其质量控制和作用机制研究提供参考。

关键词: 筋骨痛消液;质量标志物;高效液相色谱法;指纹图谱;网络药理学;骨关节炎

Prediction of Quality Markers of Jinggu Tongxiao Tincture Based on Fingerprint and Network Pharmacology

WANG Yanping^{1,2}, CHEN Fei^{1,2}, WANG Xiaolong^{1,2}, HUANG Li^{1,2}, WANG Pengfei^{1,2}, TIAN Jie^{1,2}

(1. Ningxia Hui Autonomous Region Traditional Chinese Medicine Hospital and Chinese Medicine Research Institute, Yinchuan, Ningxia, China 750021; 2. Ningxia Hui Autonomous Region Traditional Chinese Medicine Preparation Innovation Engineering Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia, China 750021)

Abstract: Objective To predict the quality marker (Q-Marker) of Jinggu Tongxiao Tincture based on fingerprint and network pharmacology. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to establish the fingerprints of 17 batches of Jinggu Tongxiao Tincture, and the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012A) was used for similarity evaluation and identification of common components. The network pharmacology was used to screen related targets and key pathways of common components, to establish a "component-target-pathway" network, and to predict potential Q-Markers that play a role in promoting blood circulation, resolving blood stasis, unblocking collaterals, dispelling cold, dispersing nodules, and relieving pain. **Results** A total of 29 common peaks were calibrated and six chromatographic peaks were identified, namely loureirin B, acetyl-11-keto- β -boswellic acid, asperosaponin VI, hydroxysafflor yellow A, rhein, and amygdalin. A total of 50 key targets and 90 enrichment pathways were screened out, and based on the connectivity among compounds, targets, and signaling pathways, five Q-Markers of acetyl-11-keto- β -boswellic acid, asperosaponin VI, hydroxysafflor yellow A, rhein, and amygdalin were preliminarily predicted. Five key targets of albumin (ALB), JUN, tyrosine kinase (SRC protein), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and mitogen-activated protein kinase (MAPK) were calculated based on the protein-protein interaction (PPI) network. Gene Ontology (GO) enrichment analysis involved 197 biological processes (BP), 35 cell components (CC), and 64 molecular functions (MF). The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis obtained highly correlated signaling pathways, including lipid and atherosclerosis, relaxin, interleukin-17 (IL-17), osteoclast differentiation, apoptosis, C-type lectin receptor, Th17 cell differentiation and autophagy. **Conclusion** The established method is easy to operate and has good repeatability. It preliminarily predicts five Q-Markers of Jinggu Tongxiao Tincture, which can provide a reference for its quality standards and mechanism of action.

Key words: Jinggu Tongxiao Tincture; quality markers; HPLC; fingerprint; network pharmacology; osteoarthritis

* 基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划一般项目[2019BEG03068]; 宁夏回族自治区科学技术厅自治区人才项目[KJT2019001]。

第一作者: 王艳平, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为中药制剂和炮制, (电子信箱)13895013806@163.com。

△通信作者: 田杰, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为中药鉴定和临床药学, (电子信箱)13995080812@163.com。

筋骨痛消液由续断、乳香、生桃仁、红花、大黄、杏仁、天葵子、龙血竭、山楂、薄荷、冰片11味中药材组方,具有活血化瘀通络、祛寒散结止痛功效。适用于血瘀证,气滞血瘀,肝、肾不足引起的各种脊柱退行性疾病,以及肩周炎、膝骨性关节炎等各部位骨性关节炎,临床疗效显著。筋骨痛消液由多药味组方,其药味配伍关系和成分较复杂,检测其中任何一种成分均不能代表其整体药效,中药复方制剂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。刘昌孝院士于2016年首次提出质量标志物(Q-Marker)概念,旨在更好地控制中药材和中成药产品的质量^[1]。中药指纹图谱作为综合、量化的色谱鉴定手段,能较客观地反映全方位的物质基础和化学成分群的整体信息,较好地体现成分的复杂性和相关性,广泛用于整体评价药材和制剂的质量^[2-3]。网络药理学是基于大数据分析平台,通过筛选中药材中有效化合物成分,结合相关数据库中疾病的相关信息,筛选出药物作用于疾病的靶点及机制网络,行挖掘药物作用及机制的相关数据,能直观反映药物与疾病的关联程度^[4-5],揭示成分-靶点-通路网络拓扑学关系图可直观反映药物发挥药效的特点。本研究中应用中药指纹图谱并结合网络药理学的方法,对筋骨痛消液进行质量控制,并预测筋骨痛消液中潜在的Q-Marker,为后期深入研究其作用机制和质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配有G1311B型四元泵,G4212B型二极管阵列(DAD)检测器,G1316A型柱温箱;Quintix224-1CN型电子分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为万分之一);DV215CD型电子分析天平(美国Ohaus公司,精度为万分之一);KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品(批号为111760-201502,纯度 $\geq 99.3\%$),川续断皂苷VI对照品(批号为111685-201707,纯度 $\geq 90.9\%$),苦杏仁苷对照品(批号为110820-201808,纯度 $\geq 88.2\%$),羟基红花黄色素A对照品(批号为111637-201609,纯度 $\geq 91.9\%$),大黄酸对照品(批号为110757-201607,纯度 $\geq 99.3\%$),龙血素B对照品(批号为111558-201407,纯度 $\geq 99.9\%$),均购自中国食品药品检定研究院;筋骨痛消液(中试样品,宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院制剂室提供,批号分别为20211230,

20211231, 20211232, 20220101, 20220102, 20220103, 20220104, 20220105, 20220206, 20220207, 20220208, 20220309, 20220310, 20220311, 20220312, 20220313, 20220414, 编号为S1-S17);乙腈、甲醇均为色谱纯,购于美国Thermo Scientific公司;磷酸(色谱纯,上海易恩化学技术有限公司);甲酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:WondaSil™ C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时8%A~11%A,10~30 min时11%A~15%A,30~70 min时15%A~42%A,70~100 min时42%A~57%A,100~110 min时57%A~85%A,110~125 min时85%A~90%A,125~130 min时90%A~8%A;流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;记录时间:130 min;柱温:30 °C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

分别取各对照品适量,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声(功率为250 W,频率为40 kHz)使溶解,加甲醇定容,摇匀,作为对照品贮备液。取对照品贮备液适量,制成质量浓度分别为11-羰基- β -乙酰乳香酸0.118 mg/mL、川续断皂苷VI 0.331 mg/mL、苦杏仁苷0.396 mg/mL、羟基红花黄色素A 0.153 mg/mL、大黄酸对照品0.785 mg/mL、龙血素B 0.153 mg/mL的混合对照品溶液。

精密量取中试样品10 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,超声(功率为250 W,频率为40 kHz)30 min,0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

参照峰选择:龙血竭中主要有效成分为龙血素B,其含量较高,化学性质、峰面积稳定,峰形较佳,分离度较好,保留时间适中,故选择龙血素B为参照峰,以计算其余峰的相对峰面积和相对保留时间。

精密度试验:取同批样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图,以峰27(龙血素B)作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.13%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.32%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同批样品6份,按2.2项下方法分别制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以峰27(龙血素B)作为参照峰,计算各共有

峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.19%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.62%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,4,8,12,24,36,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以27号峰(龙血素B)作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.79%($n=7$),相对峰面积的RSD均小于2.60%($n=7$),表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.4 指纹图谱建立

指纹图谱建立:取17批(编号为S1-S17)样品,适量依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,将所得图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版),选择供试品溶液(编号为S6号)图谱为参照图谱,采用平均数法,时间窗设为0.1,进行全峰匹配,得到17批样品的高效液相色谱叠加指纹图谱。详见图1。

相似度分析:将17批(编号为S1-S17)样品的指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版),计算相似度。结果相似度分别为0.988,0.995,0.995,0.997,0.998,0.998,0.997,0.989,0.996,0.999,0.995,0.998,0.981,0.993,0.987,0.989,0.992,均大于0.980,表明各批次样品的相似度良好,共有成分基本一致,制剂质量稳定、均一。

共有峰指认及归属:按2.2项下方法制备混合对照品溶液和供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。经Mark峰匹配后,共标定29个共有峰(图2),通过对比供试品溶液色谱峰和混合对照品溶液色谱峰的保留时间及DAD光谱图(图3至图4),对供试品溶液

色谱图中的共有峰进行归属,确认6个指纹峰。其中,2号峰为苦杏仁苷,5号峰为羟基红花黄色素A,18号峰为川续断皂苷VI,24号峰为大黄酸,27号峰为龙血素B,29号峰为11-羧基- β -乙酰乳香酸。

2.5 网络药理学预测分析

2.5.1 基于可测性和可溯性的候选化合物的活性成分靶点收集

11-羧基- β -乙酰乳香酸能活血、行气、生肌、解毒、消肿、止痛,具有良好的抗炎镇痛效果^[6-7];川续断皂苷VI可明显减轻骨关节炎软骨损伤及骨关节炎软骨的炎性反应,作用机制可能与上调miR-19a的表达进而激活人性别决定区Y框蛋白(SOX9) mRNA及蛋白、抑制核因子 κ B(NF- κ B) mRNA及蛋白有关,且能诱导小鼠骨髓间充质干细胞定向分化为成骨细胞^[8-9];羟基红花黄色素A可促进人骨髓间充质干细胞的成骨分化,有利于坏死股骨头骨组织的修复,对激素性股骨头缺血性坏死有较好的治疗效果,还具有一定镇痛作用^[10-13];大黄酸能抑制骨关节炎滑膜中炎性细胞的增生,减少软骨II型胶原蛋白细胞的丢失,抑制和延缓软骨细胞凋亡,并能激活骨骼肌组织中相关通路,显著延长肥胖小鼠的力竭运动距离和时间,增加其抗疲劳性,改善运动耐力^[14-16];苦杏仁苷能有效抑制关节炎模型大鼠外周血中炎性因子及滑膜蛋白的表达,干扰对关节滑膜的损伤,起到抗炎镇痛和保护软骨作用^[17-18]。结合筋骨痛消液的组方及功能主治,上述成分均可得到指认和测定,且具有可溯性,通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、PubChem、Swiss Target Predict等,共得到苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、川续断皂苷VI、大黄酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸5个候选化合物相关的146个作用靶点。龙血竭为方中佐药,其主要成分龙血

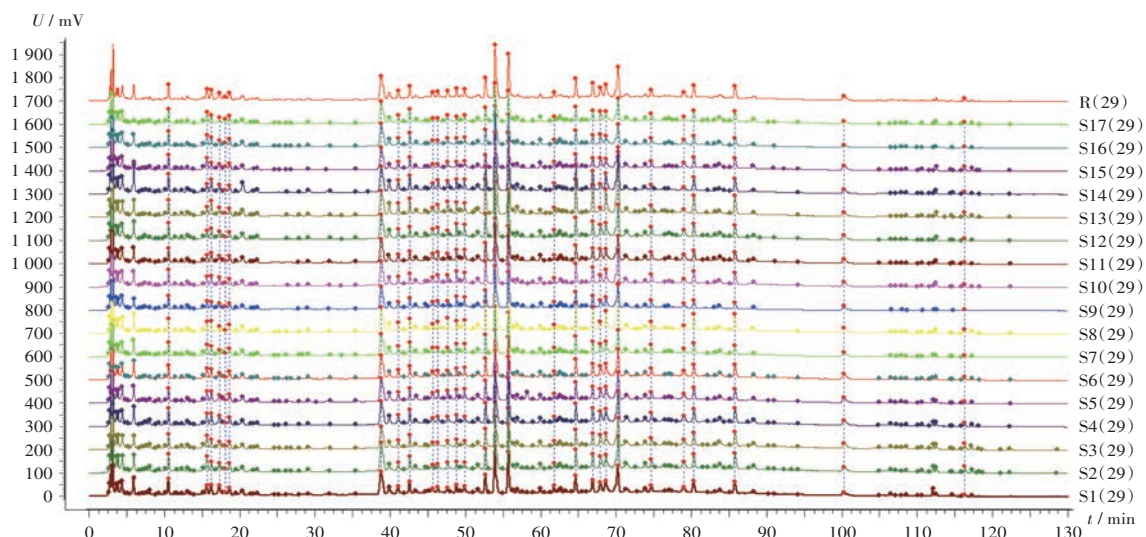


图1 17批筋骨痛消液高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 17 batches of Jingu Tongxiao Tincture

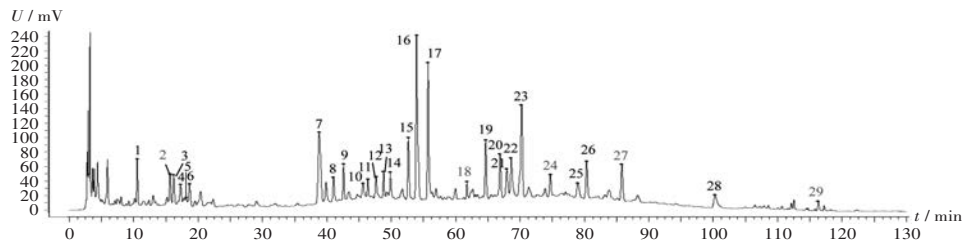


图 2 17 批筋骨痛消液高效液相色谱图共有模式

Fig. 2 Common patterns of HPLC chromatograms of 17 batches of Jing Tongxiao Tincture

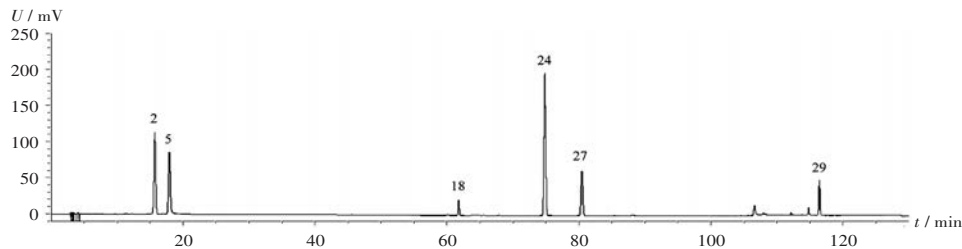
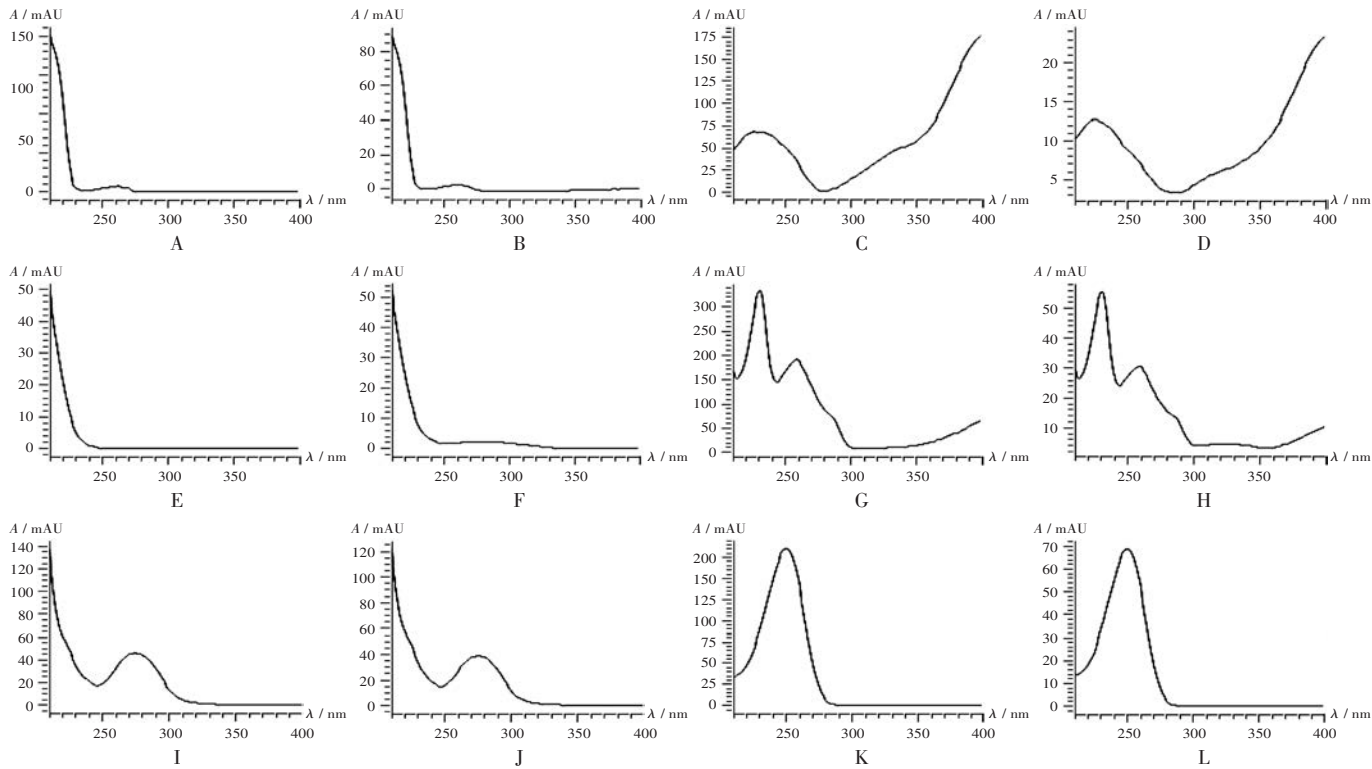


图 3 混合对照品溶液高效液相色谱图

2. 苦杏仁苷 5. 羟基红花黄色素 A 18. 川续断皂苷 VI 24. 大黄酸 27. 龙血素 B 29. 11 - 羧基 - β - 乙酰乳香酸
2. Amygdalin 5. Hydroxysafflor yellow A 18. Asperosaponin VI 24. Rhein 27. Loureirin B 29. Acetyl - 11 - keto - β - boswellic acid

Fig. 3 HPLC chromatogram of the mixed reference solution



A, C, E, G, I, K. 对照品溶液 (苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、川续断皂苷 VI、大黄酸、龙血素 B、11 - 羧基 - β - 乙酰乳香酸)
B, D, F, H, J, L. 供试品溶液 (苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、川续断皂苷 VI、大黄酸、龙血素 B、11 - 羧基 - β - 乙酰乳香酸)

图 4 共有峰 DAD 光谱图

A, C, E, G, I, K. Reference solution (amygdalin, hydroxysafflor yellow A, asperosaponin VI, rhein, loureirin B, acetyl - 11 - keto - β - boswellic acid)
B, D, F, H, J, L. Test solution (amygdalin, hydroxysafflor yellow A, asperosaponin VI, rhein, loureirin B, acetyl - 11 - keto - β - boswellic acid)

Fig. 4 DAD spectograms of common peaks

素 B 未纳入候选化合物。

2.5.2 疾病靶点数据集建立

以“osteoarthritis”为关键词,检索 OMIM, TTD, Gene-

Cards 数据库自建库起至 2022 年 5 月 9 日的相关信息,去重后共获得疾病靶点 1 512 个。利用 Venny 2.1 在线作图工具平台,输入 146 个药物靶点、1 512 个疾病靶

点,绘制维恩图,取交集后获得药物 - 疾病共有靶点 50 个,详见图 5。

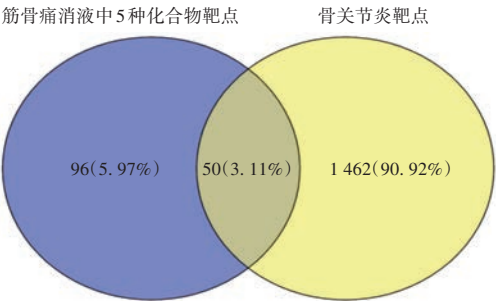


图 5 5 种化合物 - 骨关节炎靶点维恩图

Fig. 5 Venn diagram of five compound - osteoarthritis targets
2. 5. 3 蛋白 - 蛋白相互作用(PPI)网络构建

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)构建 PPI 网络,导入筛选的 50 个共有靶点,选择物种为“Homosapiens”,最低相互作用阈值为 0. 4,详见图 6。将得到的数据用 . tsv 格式导入 Cytoscap 3. 8. 2 软件中,通过 NetworkAnalyzer 工具进行拓扑分析,根据度值大小排序,选取度值大于平均分的基因作为核心靶点进行排序,使用 R 4. 0. 5 软件绘制条形图,详见图 7。结果显示,筋骨痛消液治疗骨关节炎的核心靶点包有白蛋白 (ALB)、JUN、酪氨酸激酶 (SRC 蛋白)、环加氧酶 2 (PTGS2)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等有关。

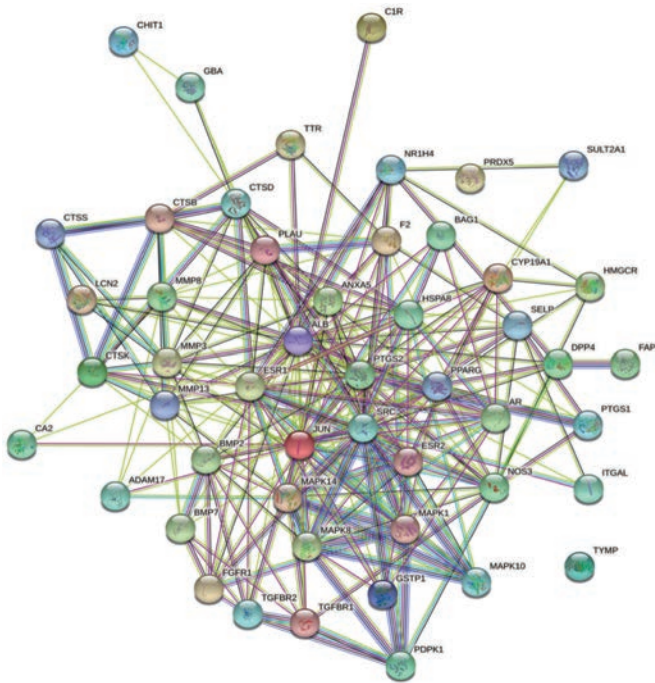


图 6 筋骨消液治疗骨关节炎的 PPI 网络

Fig. 6 PPI network of Jingu Tongxiao Tincture in the treatment of osteoarthritis

2. 5. 4 基因本体论(GO)功能富集分析

利用 David 数据库对上述获得的共有靶点进行 GO 功能富集分析,包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分

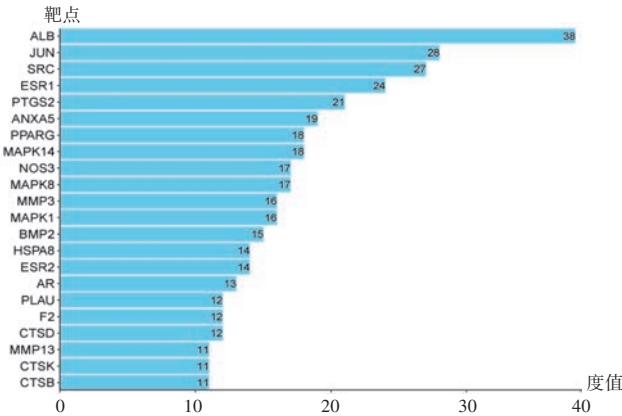


图 7 基于 PPI 拓扑分析的核心靶点排序

Fig. 7 Sorting of key targets based on PPI topology analysis

子功能(MF),各筛选前 10 条重要通路,并使用 R 语言对富集结果进行可视化,选取每部分 P 值排名前 10 的通路绘制气泡图,详见图 8。结果显示,交集基因富集至 197 条 BP、35 条 CC、64 条 MF 相关的过程中。其中,BP 包括蛋白质水解 (proteolysis)、胶原分解代谢过程 (collagen catabolic process)、MAPK 活性负调控 (negative regulation of MAP kinase activity) 等;CC 包括细胞外区 (extracellular region)、细胞外间隙 (extracellular space)、ficolin - 1 - rich 颗粒腔 (ficolin - 1 - rich granule lumen) 等;MF 包括丝氨酸型内肽酶活性 (serine - type endopeptidase activity)、酶结合 (enzyme binding)、MAPK 活性 (MAP kinase activity) 等。

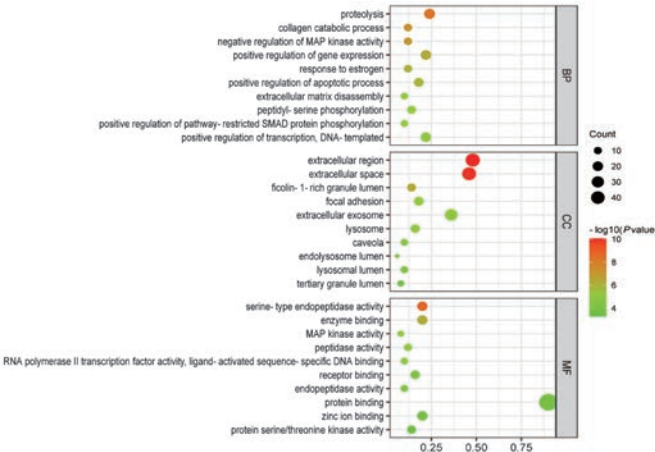


图 8 筋骨痛消液治疗骨关节炎的 GO 富集分析 P 值排名前 10 的通路气泡图

Fig. 8 Bubble chart of the pathway with the top 10 P - value ranking in GO enrichment analysis for Jingu Tongxiao Tincture in the treatment of osteoarthritis

2. 5. 5 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

利用 David 数据库进行 KEGG 通路富集分析,设置 $P < 0. 01$,选取 P 值排名前 20 的通路绘制 KEGG 通路富集的气泡图 (图 9),各通路富集靶点见表 1。将 50 个共

表 1 KEGG 通路富集分析筋骨痛消液治疗骨关节炎 P 值排名前 20 的通路富集靶点

Tab.1 Target genes of the pathway with the top 20 P - value ranking in KEGG pathway enrichment analysis for Jinggu Tongxiao Tincture in the treatment of osteoarthritis

信号通路	富集靶点
Lipid and atherosclerosis	MAPK10, SELP, HSPA8, JUN, MAPK8, PDPK1, SRC, NOS3, MMP3, MAPK1, PPARG, MAPK14
Relaxin signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, MMP13, SRC, NOS3, MAPK1, MAPK14, TGFBR1, TGFB2
IL - 17 signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, MMP13, MMP3, LCN2, MAPK1, MAPK14, PTGS2
Osteoclast differentiation	MAPK10, JUN, MAPK8, CTSK, MAPK1, PPARG, MAPK14, TGFBR1, TGFB2
Apoptosis	MAPK10, JUN, MAPK8, PDPK1, CTSK, MAPK1, CTSD, CTSS, CTSB
Endocrine resistance	MAPK10, JUN, MAPK8, SRC, MAPK1, MAPK14, ESR1, ESR2
C - type lectin receptor signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, SRC, MAPK1, MAPK14, PTGS2
Th17 cell differentiation	MAPK10, JUN, MAPK8, MAPK1, MAPK14, TGFBR1, TGFBR2
FoxO signaling pathway	MAPK10, MAPK8, PDPK1, MAPK1, MAPK14, TGFBR1, TGFBR2
Fluid shear stress and atherosclerosis	MAPK10, JUN, MAPK8, SRC, NOS3, GSTP1, MAPK14
MAPK signaling pathway	MAPK10, HSPA8, JUN, MAPK8, MAPK1, MAPK14, TGFBR1, FGFR1, TGFBR2
Toll - like receptor signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, CTSK, MAPK1, MAPK14
T cell receptor signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, PDPK1, MAPK1, MAPK14
VEGF signaling pathway	SRC, NOS3, MAPK1, MAPK14, PTGS2
Fc epsilon RI signaling pathway	MAPK10, MAPK8, PDPK1, MAPK1, MAPK14
Platelet activation	SRC, NOS3, MAPK1, F2, MAPK14, PTGS1
Adherens junction	SRC, MAPK1, TGFBR1, FGFR1, TGFBR2
Autophagy - animal	MAPK10, MAPK8, PDPK1, MAPK1, CTSD, CTSB
TGF - beta signaling pathway	BMP2, MAPK1, BMP7, TGFBR1, TGFBR2
NOD - like receptor signaling pathway	MAPK10, JUN, MAPK8, MAPK1, MAPK14, CTSS

有靶点经 David 数据库 KEGG 通路富集分析后,共得到 90 条 KEGG 通路。 $-\log_{10}(P - \text{value})$ 代表富集的显著性,颜色越红,显著性越高。结果显示,筋骨痛消液治疗骨关节炎与脂质和动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、松弛素(Relaxin signaling pathway)、白细胞介素 17(IL - 17 signaling pathway)、破骨细胞分化(Osteoclast differentiation)、凋亡(Apoptosis)、C 型凝集素受体信号通路(C - type lectin receptor signaling pathway)、Th17 细胞分化(Th17 cell differentiation)等信号通路相关。

2. 5. 6 成分 - 靶点 - 通路网络构建及 Q - Marker 分析

将筋骨痛消液中 5 个化合物、对应的核心靶点和通路导入 Cystoscap 3. 8. 2 软件,构建成分 - 靶点 - 通路网络(图 10)。结果显示,11 - 羧基 - β - 乙酰乳香酸(度值 25)、川续断皂苷 VI(度值 21)、羟基红花黄色素 A(度

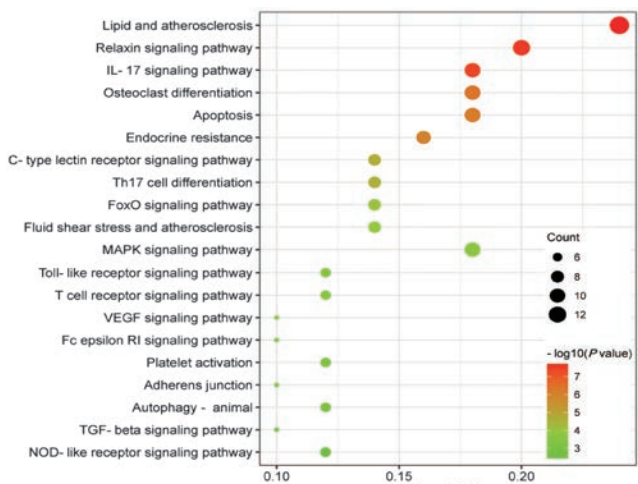


图 9 筋骨痛消液治疗骨关节炎的 KEGG 通路富集分析 P 值排名前 20 的通路

Fig. 9 Bubble chart of the pathway with the top 20 P - value ranking in KEGG pathway enrichment analysis for Jinggu Tongxiao Tincture in the treatment of osteoarthritis

值 19)、大黄酸(度值 19)、苦杏仁苷(度值 21)与各靶点连接度较高,表明上述 5 种成分可能为筋骨痛消液主要活性成分潜在的 Q - Marker。ALB(度值 38)、JUN(度值 28)、SRC(度值 27)、雌激素受体 1(ESR1,度值 24)、PTGS2(度值 21)、膜联蛋白 A5(ANXA5,度值 19)、MAPK14(度值 18)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG,度值 18)、MAPK8(度值 17)、一氧化氮合酶(NOS3,度值 17)等核心靶点,通过作用于脂质和动脉粥样硬化、松弛素、IL - 17、破骨细胞分化、细胞凋亡、C 型凝集素受体、Th17 细胞分化、MAPK、Toll 样受体、T 淋巴细胞受体、转化生长因子 - β (TGF - β)、NOD 样受体等信号通路,共同影响膝骨关节炎及骨质疏松的

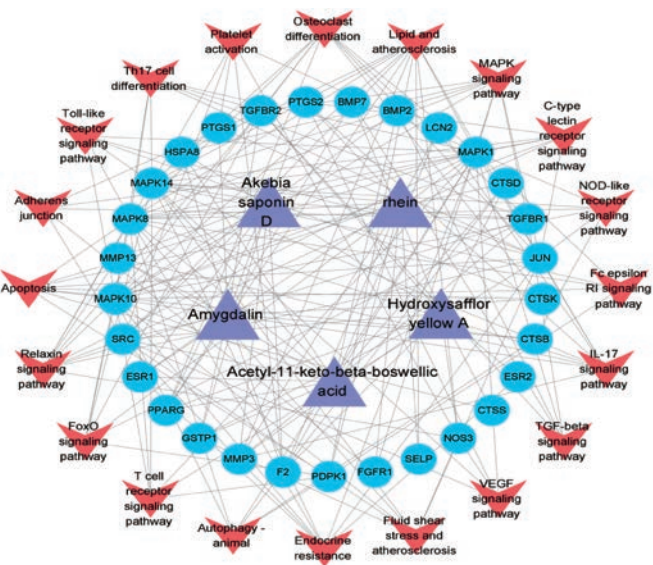


图 10 筋骨痛消液治疗骨关节炎的成分 - 靶点 - 通路网络
Fig. 10 Component - target - pathway network of Jinggu Tongxiao Tincture in the treatment of osteoarthritis

发生与发展。

3 讨论

本研究中分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液及乙腈-0.1%甲酸水溶液4种不同流动相下色谱峰的分离情况。结果发现,甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相时指纹图谱色谱峰的峰形较差,分离度不好;乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相时色谱峰分离效果较乙腈-水好,且基线较平稳,故选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。分别于210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 nm波长处进行测定,发现210 nm和220 nm波长处指纹图谱的色谱峰多,但220 nm波长处出峰更稳定,分离度好,基线平稳,故选择检测波长为220 nm。考察了柱温(25, 30, 35℃),流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min),以及不同类型色谱柱[WondaSil™ C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Luna® C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent Eclipse-Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]对色谱行为的影响。最终确定2.1项下色谱条件。

通过建立筋骨痛消液指纹图谱色谱条件,对17批筋骨痛消液高效液相色谱指纹图谱相似度进行评价,共标定了29个共有峰,并对6个峰的成分进行指认和归属,并运用网络药理学预测了11-羧基-β-乙酰乳香酸、川续断皂苷VI、羟基红花黄色素A、大黄酸、苦杏仁苷5个Q-Marker。本研究中利用网络药理学的方法阐述了筋骨痛消液治疗骨关节炎的潜在作用机制。PPI网络结果显示,不同靶点间存在密切的相互作用,更易产生级联效应。上述靶点对应于筋骨痛消液中的多个组成部分,这一点充分体现了中药多靶点、多组分的特点。通过度值筛选发现,ALB, JUN, SRC, ESR1, PTGS2, ANXA5, MAPK14, PPARC, MAPK8, NOS3等具有较高度值,位于靶点间相互作用网络的核心位置,可能是骨关节炎的易感基因。指纹图谱作为质量控制的手段,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的质量进行全方位控制。

综上所述,本研究中建立的筋骨痛消液高效液相色谱指纹图谱对制剂的整体质量进行把控,为全面控制其质量提供了科学依据;结合网络药理学研究结果,筋骨痛消液能作用于软骨细胞、滑膜细胞等与骨关节炎的发生、发展密切相关的细胞;同时,筋骨痛消液具有多靶点、多通道的特点,对骨性关节炎有较好的治疗作用;其中,11-羧基-β-乙酰乳香酸、川续断皂苷VI、羟基红花黄色素A、大黄酸、苦杏仁苷5个成分均具有传递性和溯源性,初步预测可作为筋骨痛消液的潜在Q-Marker。未来研究中需开展基础研究进行验证,进一步明确筋骨痛消液Q-Marker的准确性。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 刘静,元超凡,绪扩,等. 指纹图谱技术在食品质量与安全中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2022,13(10):3189-3197.
- [3] 符海郊,张倩睿,吴方建. 现代分析技术用于中药质量控制研究进展[J]. 中国药业,2019,28(22):96-99.
- [4] 韩利文,陈善军,董榕,等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展[J]. 山东科学,2021,34(6):22-31.
- [5] 翁家俊,谢奕霖,张轩硕,等. 基于数据挖掘和网络药理学技术的《中医方剂大辞典》含连翘组方规律及其抗炎机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(22):181-193.
- [6] 张一恺. 乳香药效物质基于“解毒,生肌”的胃保护及促愈合作用及机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2016.
- [7] HAROYAN A, MUKUCHYAN V, MKRTCHYAN N, et al. Efficacy and safety of curcumin and its combination with boswellic acid in osteoarthritis: a comparative, randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. BMC Complement Altern Med,2018,18(1):7-23.
- [8] 陈伟达,石玮,杨继国,等. 川续断总皂苷调节miR-19a对大鼠骨关节炎软骨细胞SOX9/NF-κB信号通路的影响[J]. 中国药师,2020,23(5):824-829.
- [9] 刘开飞. 川续断皂苷VI通过抑制骨细胞生成来保护胶原诱导型关节炎引起的骨破坏[D]. 广州:南方医科大学,2019.
- [10] 杨宇,史昌乾,佟杰. 羟基红花黄色素A镇痛作用及机制初步研究[J]. 中南药学,2019,17(1):53-56.
- [11] 姚弘毅,程凯,王琳. 羟基红花黄色素A对骨性关节炎模型大鼠炎症因子水平及Notch信号通路的影响[J]. 中国医药,2020,15(6):927-931.
- [12] 吴敏瑞. 羟基红花黄色素A促进兔缺血性股骨头缺血性坏死修复机制的研究[D]. 福州:福建中医药大学,2014.
- [13] 齐振熙,万甜,吴敏瑞,等. 羟基红花黄色素A不同给药方式对兔缺血性股骨头缺血坏死模型ERK1/2、JNK和p38蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(9):2927-2930.
- [14] 孙先润,吕龙宝,唐涛,等. 大黄酸对猕猴骨关节炎IL-1β、NO/iNOS表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2018,26(15):1413-1417.
- [15] 郭青玉. 大黄酸通过上调AMPK-Sirt1信号通路改善肥胖小鼠的运动耐力[D]. 南京:南京大学,2020.
- [16] 窦鹏程. 四种药物对骨关节炎滑膜成纤维细胞分泌IL-1β、MMP-13、PGE2的影响[D]. 长沙:中南大学,2012.
- [17] 罗德梅,刘青,董旭南,等. 苦杏仁苷对II型胶原诱导关节炎大鼠关节滑膜ASIC3表达的影响[J]. 中华全科医学,2017,15(11):1839-1842.
- [18] HWANG HJ, LEE HJ, KIM CJ, et al. Inhibitory effect of amygdalin on lipopolysaccharide-induced TNF-α and IL-1β mRNA expression and carrageenan-induced rat arthritis[J]. J Microbiol Biotechnol,2008,18(10):1641-1647.

(收稿日期:2023-02-28;修回日期:2023-07-01)