

沉香的质量标志物预测与指纹图谱分析验证

杨慧珍, 和润莹, 李映, 葛喜珍* (北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要: 目的 寻找沉香药材的质量标志物。方法 通过网络药理学初步筛选出沉香的潜在质量标志物, 进一步采用 HPLC 建立 13 批不同产地沉香药材的指纹图谱。对 13 批沉香药材运用主成分分析(principal component analysis, PCA)进行自然聚类, 在此基础上, 运用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)筛选不同类别沉香药材的差异化成分, 进而验证并推测沉香药材的质量标志物。结果 网络药理学预测沉香中的 4 个活性成分可作为潜在质量标志物。在 HPLC 指纹图谱共有模式中标定了 10 个共有峰, 指认了沉香四醇峰、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮峰和 2-(2-苯乙基)色酮峰。PCA 与 OPLS-DA 分析结果表明不同批次沉香药材差异化成分是沉香四醇。同时, 结合网络药理学分析结果, 确认沉香四醇也是沉香发挥功效的主要活性成分, 可作为沉香潜在质量标志物。结论 沉香四醇可作为沉香潜在的质量标志物。

关键词: 沉香; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)03-0285-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.001

引用本文: 杨慧珍, 和润莹, 李映, 等. 沉香的质量标志物预测与指纹图谱分析验证[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 285-293.

Prediction of Quality Markers and Fingerprint Analysis of Aquilariae Lignum Resinatum

YANG Huizhen, HE Runying, LI Ying, GE Xizhen* (College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To find the quality marker(Q-marker) of Aquilariae Lignum Resinatum. **METHODS** Preliminary screening of potential Q-markers in Aquilariae Lignum Resinatum through network pharmacology, and establishing fingerprints of 13 batches of Aquilariae Lignum Resinatum by HPLC. Principal component analysis(PCA) was used for natural clustering of 13 batches of Aquilariae Lignum Resinatum materials. On this basis, orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) was used to screen the different components of different types of Aquilariae Lignum Resinatum materials to verify and speculate Q-marker of Aquilariae Lignum Resinatum. **RESULTS** Four active ingredients in Aquilariae Lignum Resinatum were predicted as potential Q-markers through network pharmacology. Then ten common peaks were calibrated with HPLC fingerprint. The agarotretrol peak, 6,7-dimethoxy-2-(2-phenylethyl)chromone peak and 2-(2-phenethyl)chromone peak were confirmed. The analysis results of PCA and OPLS-DA showed that the differential component of different batches of Aquilariae Lignum Resinatum was agarotretrol. Meanwhile, combined with the results of network pharmacological analysis, it was confirmed that agarotretrol was also the main active component of Aquilariae Lignum Resinatum to exert its efficacy and could be used as a potential Q-marker of Aquilariae Lignum Resinatum. **CONCLUSION** Agarotretrol can be used as a potential Q-marker of Aquilariae Lignum Resinatum. **KEYWORDS:** Aquilariae Lignum Resinatum; fingerprint; network pharmacology; quality marker

沉香为瑞香科植物白木香 *Aquilariae sinensis* (Lour.) Gilg 含树脂的木材, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘功能, 用于胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急^[1]。临床使用的沉香有国产沉香和进口沉香, 其中国产沉香主要来源于海南、广东、广西等地, 进口沉香主要来源于马来西亚、泰国、越南及缅甸等。含有沉香的中药复方常用于治疗心血管^[2]、消化系统^[3]、呼吸系统及

泌尿系统类^[4-5]疾病。现代药理学研究表明, 沉香具有抗氧化^[6]、抗炎与抗肿瘤等活性^[7-8]。然而, 沉香质量良莠不齐, 野生沉香资源缺乏^[9], 伪品、劣品流通于市场^[10]。确认沉香药材的质量标志物, 对评价沉香质量具有重要意义。

目前, 基于沉香质量分级的方法主要有化学成分分析法^[11]、色谱法和光谱法等^[10,12]。然而, 这些方法专一性差, 操作繁琐。中国药典 2020 年

基金项目: 国家重点研发计划项目(SQ2020YFF0400734)

作者简介: 杨慧珍, 女, 硕士生 E-mail: yanghuizhen0228@163.com

*通信作者: 葛喜珍, 女, 博士, 教授 E-mail: gexizhen@163.com

版以 HPLC 测定其中的沉香四醇, 要求其含量 > 0.1%。中药质量标志物两大重要特点是能反映中药的有效性和安全性^[13], 以此可以控制中药质量。沉香化学成分复杂, 与其疗效相关的质量标志物报道少。网络药理学可作为辅助分析方法挖掘和验证中药质量标志物, 以建立质量标准^[14-15]。本研究首先运用网络药理学分析出沉香潜在质量标志物, 然后建立了 13 批沉香 HPLC 指纹图谱, 在 PCA 分析的基础上运用正交偏最小二乘分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 初步筛选出不同批次沉香的差异成分, 进而确认沉香中质量标志物, 为沉香药材的规范生产和质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-16 高效液相色谱仪[岛津仪器(苏州)有限公司]; Purelab Flex2 超纯水系统(英国 ELGA); KH-250DB 数控超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器); JCWF-100A 骏程超微粉碎机(济南骏程机械设备有限公司); BSA224S-CW 型万分之一天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); HH-S26 恒温水浴锅(常州中捷实验仪器制造有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 麦克林公司); 无水乙醇(分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司); 沉香对照药材(批号: B26142)、沉香四醇(批号: B25829, 纯度 ≥ 98%)均购自上海源叶生物科技有限公司。6, 7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮(北京谨明生物科技有限公司, 批号: C21PA35620C; 纯度 ≥ 98%); 2-(2-苯乙基)色酮(上海拓青化工有限公司, 批号: ATK20210128-2; 纯度 ≥ 98%)。

1.3 试药

沉香药材 13 批, 按产地分为国产沉香 7 批(海南、广东), 进口沉香 6 批(马来西亚、泰国、马来西亚及缅甸), 经由北京联合大学张元副教授鉴定均为沉香正品, 样品保存于北京联合大学生物化学工程学院制药工程实验室, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 基于网络药理学进行沉香质量标志物预测

2.1.1 沉香活性成分及其潜在靶点筛选 利用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP 数据库, 据报道类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 时

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of sample

批号	描述	产地	来源
Y1015-200311-01	黄棕色, 气香	海南	河北安国中药材市场
Y1015-190613-02	黄棕色, 气香	海南	河北安国中药材市场
Y1015-190613-03	黄褐色, 气香	海南	安徽亳州中药材市场
Y1015-190521-04	土黄色, 气香	海南	安徽亳州中药材市场
Y1015-190521-05	黄褐色, 气香	海南	河北安国中药材市场
Y1015-190521-06	黄褐色, 气微香	海南	河北安国中药材市场
Y1015-190521-07	灰白色, 气微香	广东	河北安国中药材市场
Y1015-190521-08	灰白色, 气微香	马来西亚	河北安国中药材市场
Y1015-200920-09	黄褐色, 气微香	马来西亚	河南禹州中药材市场
Y1015-200920-10	土黄色, 气香	泰国	河南禹州中药材市场
Y1015-200920-11	土黄色, 气香	越南	河南禹州中药材市场
Y1015-190521-12	灰白色, 气微香	越南	河北安国中药材市场
Y1015-190521-13	黄褐色, 气微香	缅甸	河北安国中药材市场

具有良好的成药性, 而口服生物利用度(oral bioavailability, OB) ≥ 30% 的分子具有较好的成药可能性^[16-17], 故根据 OB ≥ 30% 且 DL ≥ 0.18 并结合文献查找沉香活性成分^[18-19], 共筛选出 11 个潜在活性化合物, 其化学结构见图 1。利用 TCMSP 及 SwissTargetPrediction 数据库查找上述化合物的潜在靶点^[20], 得到 395 个靶点蛋白。利用数据库 UniProt 查询每个蛋白靶点对应的基因名称, 规范基因信息, 获得 252 个预测靶点基因, 即沉香质量标志物的潜在靶点。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建和关键靶标筛选 将 11 个有效活性成分涉及的 252 个靶点基因导入 STRING 数据库, 将物种设为“homo sapiens”, 隐藏单独靶点, 置信度值设为 0.90, 构建 PPI 网络; 将得到的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 软件的 CytoNCA 插件进行网络可视化及拓扑分析筛选核心靶点, 以介数中心性、接近中心性、度值三者大于各自中位值为指标, 筛选 2 次, 得到网络核心靶点, 其中度值排名前 5 的是 JUN、EP300、CREBBP、TP53、RELA。制得 PPI 网络可视化图, 共统计到 185 个节点、946 条边, 见图 2。

2.1.3 信号通路生物过程富集分析 采用 DAVID 6.8 数据库对 252 个预测靶点基因进行基因本位(gene ontology, GO)功能富集分析。选择 GO 的 3 个条目, 点击 functional Annotation Chart, 设置 Benjaminin < 0.01 进行筛选, 共有 235 个条目, 依据 P < 0.05、富集倍数(false discovery rate, FDR) < 0.05, 筛选出前 20 条, 见图 3。其中分子功能 5 条, 生物过程有 12 条, 细胞组成 3 条, 可以

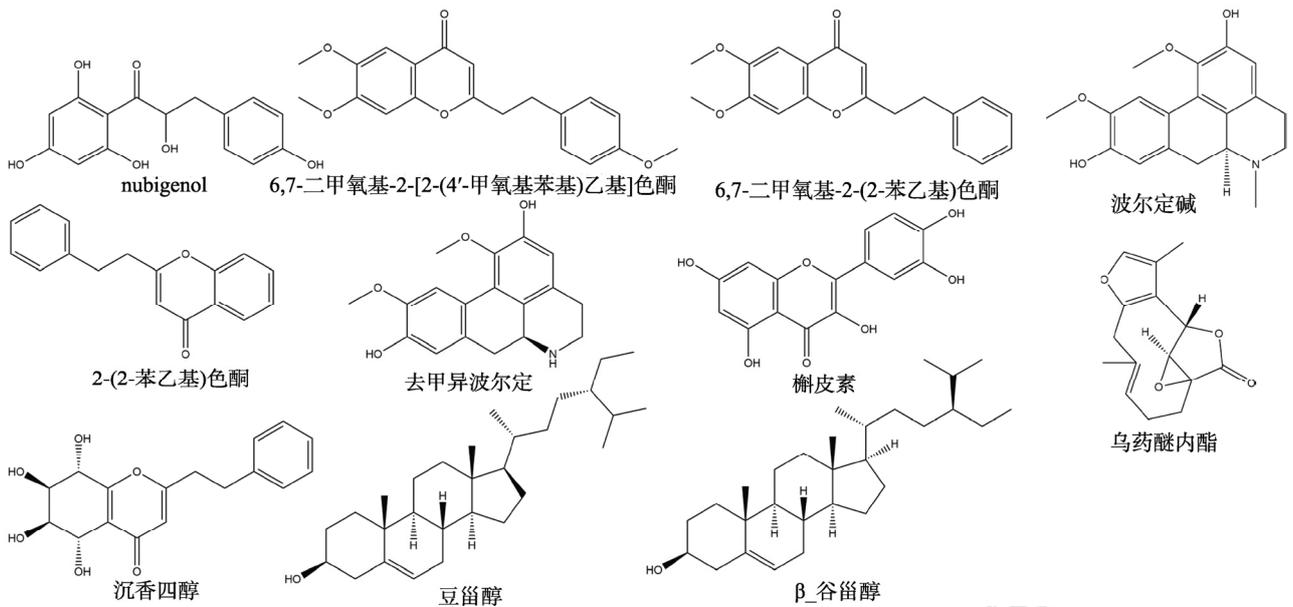


图 1 沉香活性成分
Fig. 1 Active ingredients of Aquilariae Lignum Resinatum

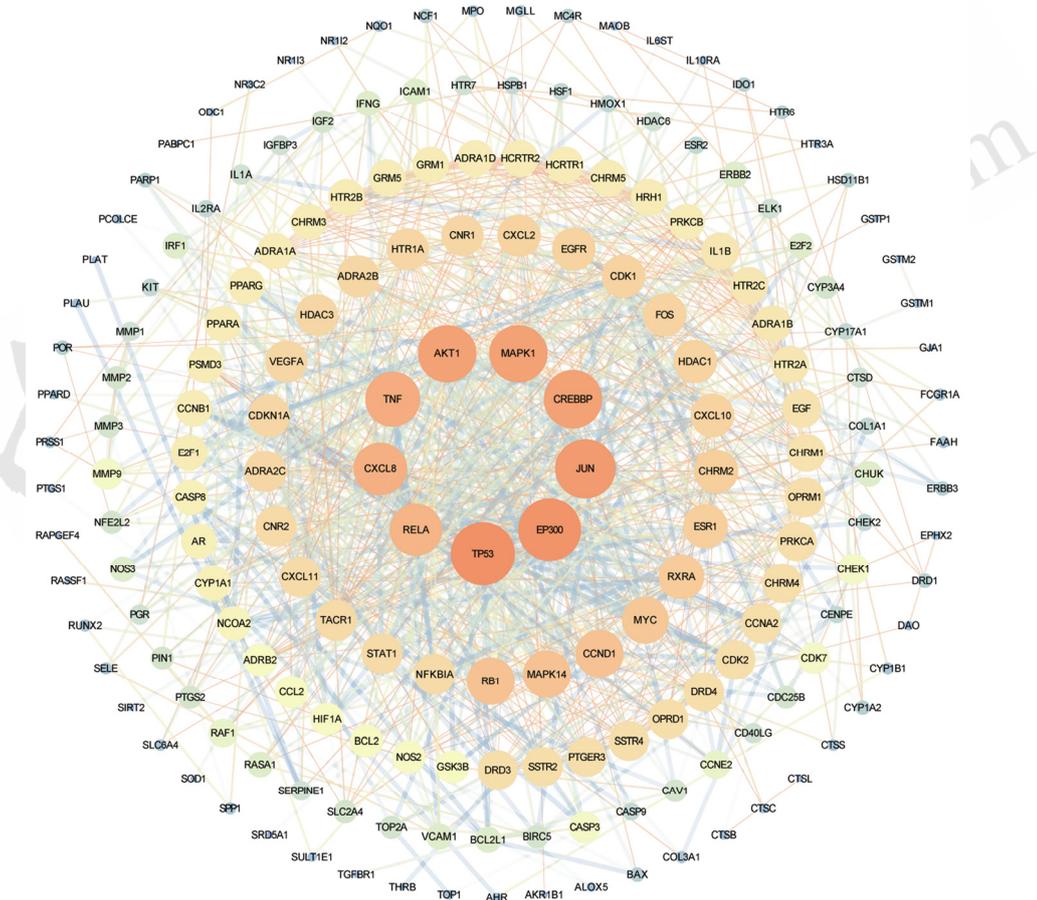


图 2 蛋白质-蛋白质相互作用
图中不同大小与颜色的节点代表靶点蛋白的度值大小，节点越大、颜色越深，该靶点蛋白在网络体系中的度值越大；节点间连线表示结合分数，线越粗，代表靶点蛋白间潜在的相互作用关系越密切。

Fig. 2 Protein-protein interaction network
Nodes of different sizes and colors in the figure represent the degree value of the target protein, the larger the node and the darker the color, the greater the degree value of the target protein in the network system; the connection between the nodes represents the binding score, the thicker the line, represents the closer the potential interaction relationship between the target protein.

看出靶基因明显富集于药物结合、酶结合、3', 5'-环核苷酸磷酸二酯酶活性及转录因子结合等分子功能, 药物反应、脂多糖反应、cAMP 分解代谢过程、缺氧反应、RNA 聚合酶 II 启动子对转录的正调控、信号转导、血管收缩、细胞缺氧反应、毒性反应、炎症反应、老化及凋亡过程的负调控等生物过程以及细胞外间隙等细胞组成。采用 DAVID 6.8 数据库对 252 个预测靶点基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 依据 Benjaminin<0.01, P<0.05, FDR<0.05 进行筛选, 对前 10 条相关的信号通路进行展示, 见图 3, 通路包括: 乙型肝炎(Hepatitis B)、癌症途径(Pathways in cancer)、神经活性配体-受体相互作用(Neuroactive ligand- receptor interaction)、钙信号通路(Calcium signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF

signaling pathway)等, 这表明 252 个靶点主要通过调控这些通路达到干预疾病的目的。

2.1.4 “化合物-靶点-通路”网络构建及分析 将上述筛选的沉香 11 个有效活性成分、252 个靶点和 10 条信号通路运用 Cytoscape 3.6.1 软件构建“成分-靶点-通路”网络可视化, 结果见图 4, 计算度值得到活性成分度值排序依次为槲皮素(querccetin)、2-(2-苯乙基)色酮[2-(2-phenethyl)chromone]、β-谷甾醇(β- sitosterol)、6, 7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮(6, 7- dimethoxy-2-(2-phenylethyl)chromone)、6, 7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮(DMPEC)、波尔定碱(Boldine)、去甲异波尔定(Norboldine)、沉香四醇(agarotetrol)、nubigenol、豆甾醇(sitosterol)及乌药醚内酯(C09495)。槲皮素、β-谷甾醇、去甲异波尔定、波尔定碱、豆甾醇、乌药醚内酯均普遍存在药材中, 不能作为特征性质量标志物。排名较前的 2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙

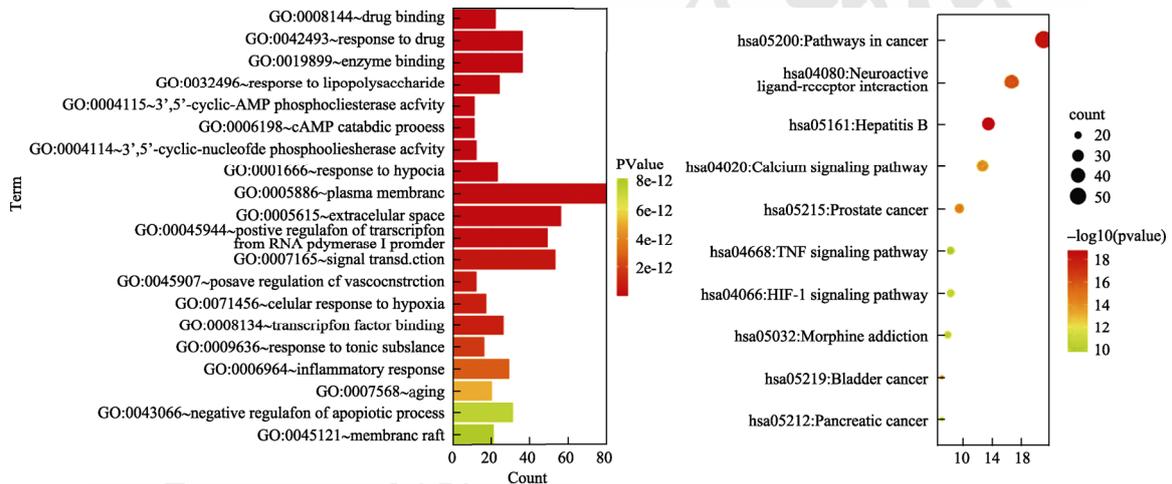


图 3 GO 富集分析(前 20 条)及 KEGG 富集分析
Fig. 3 GO enrichment analysis(the first 20 items) and KEGG enrichment analysis

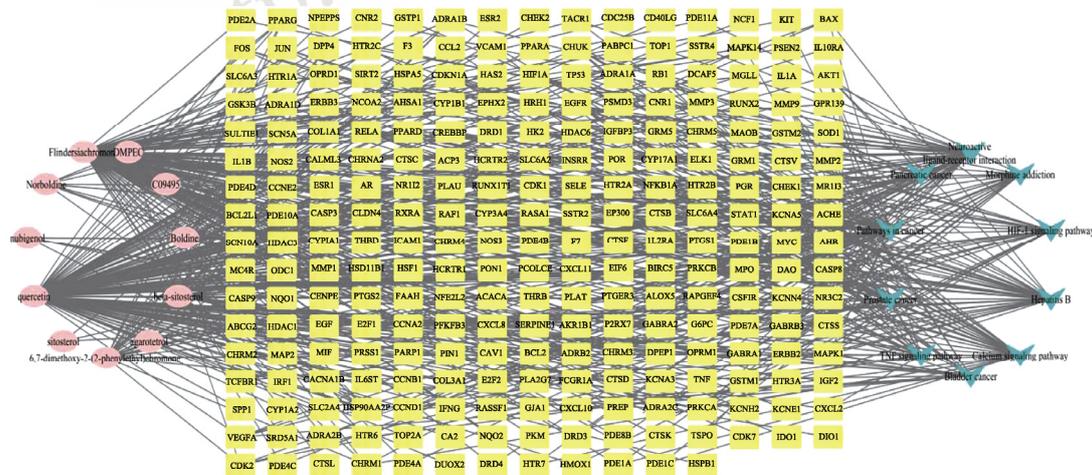


图 4 成分-靶点-通路图
Fig. 4 Composition-target-pathway diagram

基)色酮、6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮、沉香四醇为沉香具有代表性且具有较高连接度的活性成分, 猜测可能是沉香发挥药效的主要活性成分, 可作为潜在的质量标志物进行研究。结合靶标分析与通路分析可知, 上述沉香有效成分可能是通过干预乙型肝炎、癌症途径、神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路等途径, 作用于 JUN、EP300、CREBBP、TP53、RELA 等关键靶标, 从而达到治疗疾病的目的。

2.2 沉香指纹图谱研究

2.2.1 溶液的制备

2.2.1.1 供试品溶液的制备 取沉香粉末 1.000 g, 精密称定, 加 50 mL 95%乙醇于 100 mL 具塞锥形瓶, 称重, 静置 1 h 后回流 1 h。待冷却后, 进行补重并过滤。取 25 mL 滤液于旋转瓶, 旋转浓缩蒸干滤液, 冷却后, 用甲醇进行复溶, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得。

2.2.1.2 对照品溶液的制备 取沉香四醇对照品适量, 精密称定, 加入色谱级甲醇定容于 25 mL 的棕色量瓶, 制成质量浓度为 240 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用即得。

2.2.1.3 对照药材溶液制备 取沉香对照药材 0.200 0 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 10 mL, 浸泡 30 min, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)1 h, 冷却后, 称重, 再用乙醇补重, 摇匀, 静止, 取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Platisil ODS(C_{18}), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 100% \rightarrow 90% B; 5~10 min, 90% \rightarrow 85% B; 10~25 min, 85% \rightarrow 80% B; 25~35 min, 80% \rightarrow 70% B; 35~50 min, 70% \rightarrow 65% B; 50~60 min, 65% \rightarrow 55% B; 60~70 min, 55% \rightarrow 45% B; 70~80 min, 45% \rightarrow 35% B; 80~90 min, 35% \rightarrow 30% B; 90~100 min, 30% B。体积流量 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 252 nm, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 仪器精密度考察 取样品(批号: Y1015-200311-01)按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件连续进样 5 次, 每次进样 10 μL , 以沉香四醇峰为参照, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果显示各

项 RSD 均 $<2\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.3.2 重复性考察 取样品(批号: Y1015-200311-01)按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件连续进样 5 次, 每次进样 10 μL , 以沉香四醇峰为参照, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果显示各项 RSD 均 $<2\%$, 表明方法重复性良好。

2.2.3.3 稳定性考察 取样品(批号: Y1015-200311-01)按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 等不同时间进行检测, 以沉香四醇峰为参照, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果显示各项 RSD 均 $<2\%$, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 共有峰标定与指认 按“2.2.1”项下方法分别制备 13 批沉香药材的供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件进样, 分别记录其 HPLC 色谱图。将其以 CDF 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)”, 设定时间窗为 0.1, 按照中位数法以对照药材 S 为参照图谱, 经多点校正自动匹配后生成 HPLC 指纹图谱, 见图 5, 并生成沉香 HPLC 指纹图谱的共有模式, 见图 6, 共有模式中共标定 10 个共有峰, 指认了沉香四醇(峰 1)、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮(峰 6)及 2-(2-苯乙基)色酮(峰 8)。

2.2.5 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”计算 13 批沉香药材指纹图谱的相似度, 见表 2, 由于样品来源不同, 样品组间差异较大, 用全部样品生成的对照图谱计算相似度差异大, 故以对照药材 B26142 为参照, 即相似度为 1.000, 与国产沉香及进口沉香进行相似度分析。以对照药材为参照, 相似度值在 0.692~0.987, 其中沉香样品(批号: Y1015-190521-07)与对照药材相似度差异最大, 相似度 >0.800 的占 92.9%, 说明药材中化学成分相似度较高, 但还是存在一定差异。

2.2.6 基于化学计量学确定不同沉香药材的差异成分

2.2.6.1 主成分分析 (principal components analysis, PCA) 利用 SIMCA 14.1 软件对 13 批沉香药材样品共有峰的相对峰面积采用无监督模式的 PCA 分析, 归一化方法选择 Par 默认自动建模 (Autofit), 生成 1 个主成分, 此时, $\text{R}2\text{X}(\text{cum})=0.677$,

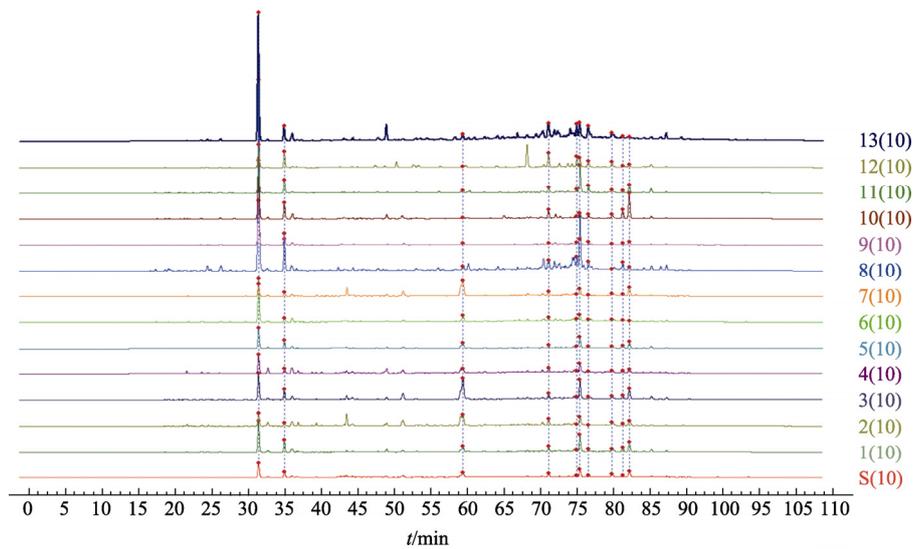


图5 对照药材与国产和进口沉香 HPLC 指纹图谱叠加

Fig. 5 Superposition of HPLC fingerprints of domestic, imported Aquilariae Lignum Resinatum and control medicinal material

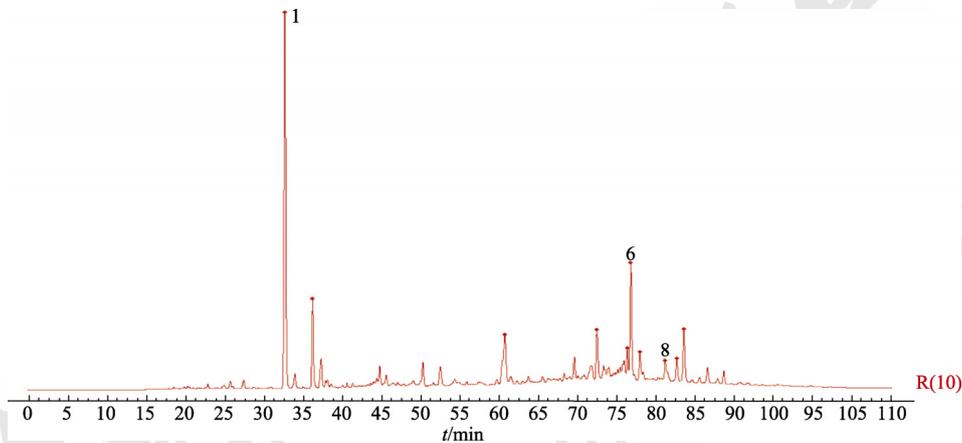


图6 国产和进口沉香 HPLC 指纹图谱共有模式

1-沉香四醇; 6-6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮; 8-2-(2-苯乙基)色酮。

Fig. 6 Common mode of HPLC fingerprint of domestic and imported Aquilariae Lignum Resinatum

1-agarotretol; 6-6, 7-dimethoxy-2-(2-phenylethyl)chromone; 8-2-(2-phenethyl)chromone.

表2 13批沉香药材 HPLC 指纹图谱相似度

Tab. 2 Similarity of HPLC fingerprints of 13 batches of Aquilariae Lignum Resinatum

批号	相似度	批号	相似度
B26142	1.000	Y1015-190521-07	0.692
Y1015-200311-01	0.987	Y1015-190521-08	0.822
Y1015-190613-02	0.917	Y1015-200920-09	0.807
Y1015-190613-03	0.922	Y1015-200920-10	0.863
4Y1015-190521-04	0.975	Y1015-200920-11	0.916
Y1015-190521-05	0.986	Y1015-190521-12	0.837
Y1015-190521-06	0.880	Y1015-190521-13	0.820

$Q2(\text{cum})=0.414$, 表明预测结果良好。并生成 3D PCA 得分图, 观察样品间自然聚集。编号为 8 和 13 样品聚为一类, 命名为 A 组, 其余编号样品聚为另一类, 命名为 B 组, 结果见图 7。

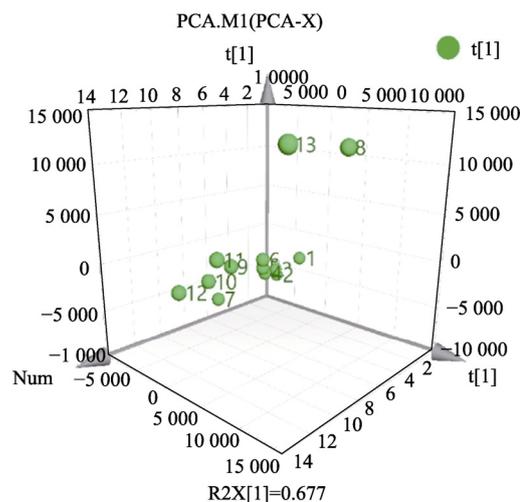


图7 13批沉香药材样品 PCA 得分图

Fig. 7 PCA score of 13 batches of Aquilariae Lignum Resinatum samples

2.2.6.2 OPLS-DA 在 PCA 分析基础上,进一步采用 OPLS-DA 分析上述 A 组、B 组的差异性成分。归一化方法选择 Par, 默认自动建模(Autofit), 生成 1 个主成分, 此时, $R2X(\text{cum}) \text{ progression}=0.902$, $Q2(\text{cum}) \text{ progression}=0.848$, 表明预测结果良好。并生成 S-plot 图, 找到差异性成分。差异性成分分布 S 型曲线的两角, 结果见图 8, 共有峰 1(沉香四醇)是 A、B 2 组的重要的差异性成分。最后, 采用置换检验(permutation test)验证 OPLS-DA 模型的可靠性, 并假设置换次数为 200。结果见图 9, A 组、B 组回归线在 Y 轴截距均 <0 , 表明 OPLS-DA 模型可靠。

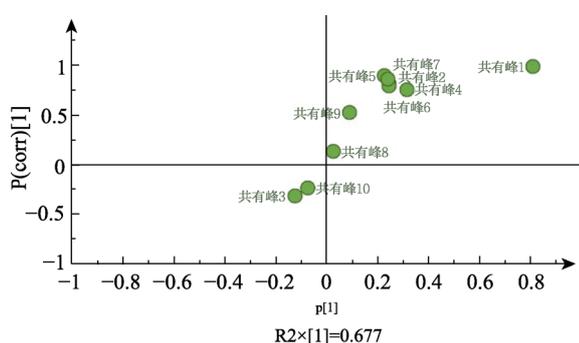


图 8 OPLS-DA 模型的 S-plot 图
Fig. 8 S-plot of OPLS-DA model

3 讨论

本研究通过网络药理学筛选出 4 个沉香特有的度值较高的有效活性成分, 分别是 2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮和沉香四醇, 他们通过神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、胰腺癌、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路等途径, 作用于 JUN、EP300、CREBBP、TP53、RELA 等关键靶标发挥药理作用。沉香作为一种名贵中药, 具有

温中止呕, 治疗胃溃疡、癌症, 改善心肌缺血及抗炎等作用。目前, 对沉香研究较多的是其醇提取物, 单体化合物研究较少, 其中沉香色酮类成分有明显抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用。研究发现沉香中 2-(2-苯乙基)色酮对人肝癌细胞(BEL-7402)、人胃癌细胞(SGC-7901)、人肺癌细胞(A549)、人髓系白血病细胞(K562)和人宫颈癌细胞(Hela)均表现出细胞毒性, 表明沉香 2-(2-苯乙基)色酮对癌症的治疗有效^[21]。此外, 2-(2-苯乙基)色酮显著影响多巴胺能突触、5-羟色胺能突触、gaba 能突触、长期抑郁和神经活性配体-受体相互作用等通路进而改善焦虑。还可上调神经活性配体与受体相互作用途径相关的 *Crhr2* 和 *Chrnd* 基因的表达^[22]。2-(2-苯乙基)色酮还对脂多糖刺激 RAW264.7 细胞产生的一氧化氮具有明显的抑制作用, 也表明了其具有抗炎活性^[23]。沉香甲醇提取物可通过抑制回肠段中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平来抑制氧化应激和改善炎性障碍的机制来改善肠黏膜炎, 其可能是一种有前途的治疗候选物, 用于预防癌症化疗期间的炎症^[24]。沉香甲醇提取物还可通过干预钙通道, 阻断 Ca^+ 内流以舒缓胃肠道痉挛^[25]。此外沉香乙醇提取物可通过抑制氧化和凋亡减轻异丙肾上腺素诱导的心肌缺血^[26]。血管内皮素 1 (endothelin-1, ET-1)不仅能参与血管收缩, 还能参与细胞缺氧性肺动脉高压的形成, 对细胞缺氧性肺动脉高压大鼠沉香给药治疗后发现血清 HIF-1 α 、ET-1 蛋白水平、ETA 受体水平表达均降低, 表明沉香可有效改善细胞缺氧性肺动脉高压的形成, 其机制可能与抑制 HIF-1 α 后间接引起 ET-1 水平下调有关^[27]。沉香精油具有较强的细胞

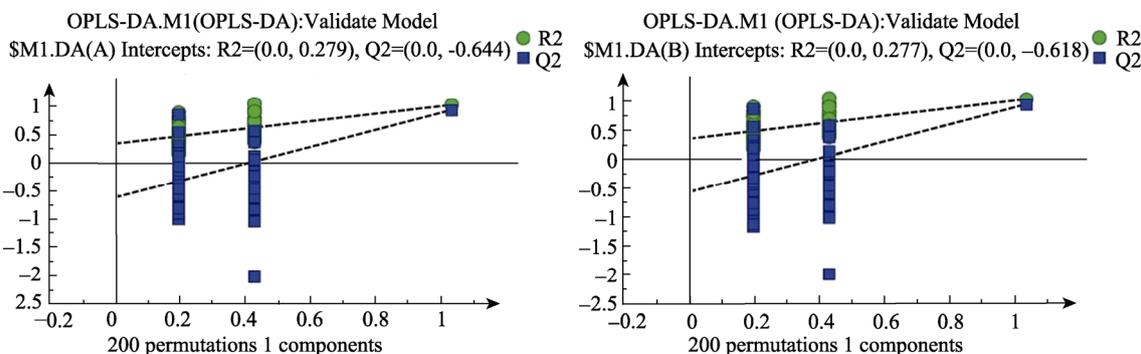


图 9 OPLS-DA 模型的验证
Fig. 9 Verification of OPLS-DA model

毒性,可有效抑制胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2)转移和诱导凋亡的作用^[28]。化合物 6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮和沉香四醇虽然在网络中处于重要地位,但是三者抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌等方面的动物及细胞药理学研究还未见报道,可以作为以后研究的方向。

为明确沉香的质量标志物,本研究采用 HPLC 对 13 批不同产地的沉香进行研究,建立了不同产地沉香的指纹图谱,确认了 10 个共有峰。相似度评价发现,13 批沉香相似度值在 0.692~0.987,其中 >0.800 的占 92.9%,表明不同产地沉香化学成分相似度较高,但存在一定差异。通过 PCA 与 OPLS-DA 分析发现共有峰 1(沉香四醇)是不同类别沉香药材的重要差异性成分,再结合网络药理学可知沉香四醇是沉香特有且发挥功效的活性成分。由此,可以确认沉香四醇是沉香潜在质量标志物。顾宇凡等^[29]建立了沉香中沉香四醇含量的 HPLC 测定方法,并建议将沉香四醇含量 >0.15% 作为沉香质量控制指标。国外有研究表明沉香四醇是药用级沉香的特征成分,可以作为沉香质量评价的指标^[30]。此外,有药动学结果表明沉香四醇在 70 mg·mL⁻¹ 时大鼠吸收更快,且在血浆中不易清除,发挥作用时间更长^[31]。基于化学成分有效性及指纹图谱及化学计量结果分析,沉香四醇可测性好,适合作为不同批次沉香药材的质量标志物成分。

本研究采用网络药理学研究与 HPCL 结合化学计量法从有效性、可测性角度预测,沉香四醇能作为沉香潜在的质量标志物,这为沉香质量控制的指标成分选择提供了参考。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 185-186
- [2] 高阿日古娜. 蒙药八味沉香散治疗冠心病心绞痛临床疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(20): 246, 254.
- [3] WANG Y Q, LIU F. Effects on the symptoms and intestinal hormones in the patients with habitual constipation treated with umbilicus plaster of Chenxiang Tongbian powder and moxibustion therapy[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2020, 15(2): 357-360.
- [4] 忽日查, 达日斯仁. 蒙药八味沉香散治疗支气管哮喘的临床疗效分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(13): 167.
- [5] ZHANG L L, DU X D, YANG F, et al. Clinical efficacy of using modified Liumo Chenxiang powder in the treatment of elderly patients with benign prostatic hyperplasia and its effect

- on PSAD and TGF- β 1[J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2019, 37(12): 123-126.
- [6] LI C G, PAN L, HAN Z Z, et al. Antioxidative 2-(2-phenylethyl)chromones in Chinese eaglewood from *Aquilaria sinensis*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22(7): 639-646.
- [7] YU Z X, WANG C H, CHEN D L, et al. Anti-inflammatory sesquiterpenes from agarwood produced via whole-tree agarwood-inducing technique of *Aquilaria sinensis*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(19): 4196-4202.
- [8] DAHHAM S S, HASSAN L E, AHAMED M B, et al. *In vivo* toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*)[J]. BMC Complement Altern Med, 2016(16): 236. Doi: 10.1186/s12906-016-1210-1.
- [9] PENG D Q, WANG C H, LIU Y Y, et al. Research progress on the chemical constituents of *Aquilariae Lignum Resinatum* and their pharmacological activities[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 358-365.
- [10] HUANG G K, CHEN Y T, LI J M, et al. Identification of agarwood and confusable varieties from circulation[J]. Pharm Today(今日药理学), 2019, 29(11): 769-772, 776.
- [11] FU Y J, TANG L N, CHEN Y, et al. Agarwood quality classification based on chemical composition analysis[J]. China Forest Products Industry(林产工业), 2020, 57(10): 26-30, 64.
- [12] LIU X L, CAI Y F, HE Z J. The preliminary study of artificial knot fragrant incense quality evaluation and edgeworthia mechanism[J]. J North Pharm(北方药理学), 2016, 13(4): 132-133.
- [13] 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.
- [14] YANG D, JIANG M H, LI C Z, et al. Investigation of active components and mechanism of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid based on network pharmacology[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(18): 4291-4298.
- [15] 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.
- [16] RU J L. Construction and utilization of traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015.
- [17] WANG C H, PENG D Q, LIU Y Y, et al. Anti-asthmatic effect of agarwood alcohol extract in mice and its mechanism[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(16): 4214-4221.
- [18] LI Y B, WANG L L, DENG X Y, et al. Investigating and exploring content of alcohol soluble extractives and agarotretol in agarwood and its quality classification method[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(15): 70-75.
- [19] LANCASTER C, ESPINOZA E. Evaluating agarwood products for 2-(2-phenylethyl)chromones using direct analysis in real time time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26(23): 2649-2656.
- [20] GFELLER D, GROSIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2014,

42(Web Server issue): W32-W38.

- [21] WANG Y Y, WANG H, MI C N, et al. Two new 2-(2-phenethyl)chromone derivatives from agarwood of *Aquilaria walla* and their cytotoxicity[J]. *Phytochem Lett*, 2021(42): 36-40.
- [22] KAO W Y, HSIANG C Y, HO S C, et al. Novel serotonin-boosting effect of incense smoke from Kynam agarwood in mice: The involvement of multiple neuroactive pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(275): 114069. Doi: 10.1016/j.jep.2021.114069.
- [23] HUO H X, GU Y F, ZHU Z X, et al. LC-MS-guided isolation of anti-inflammatory 2-(2-phenylethyl)chromone dimers from Chinese agarwood (*Aquilaria sinensis*)[J]. *Phytochemistry*, 2019(158): 46-55.
- [24] ZHENG H, GAO J, MAN S L, et al. The protective effects of *Aquilariae Lignum Resinatum* extract on 5-Fuorouracil-induced intestinal mucositis in mice[J]. *Phytomedicine*, 2019(54): 308-317.
- [25] LI H M, QU Y F, ZHANG J W, et al. Spasmolytic activity of *Aquilariae Lignum Resinatum* extract on gastrointestinal motility involves muscarinic receptors, calcium channels and NO release[J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 559-566.
- [26] WANG C H, PENG D Q, LIU Y Y, et al. Agarwood alcohol extract ameliorates isoproterenol-induced myocardial ischemia by inhibiting oxidation and apoptosis[J]. *Cardiol Res Pract*, 2020(2020): 3640815. Doi: 10.1155/2020/3640815.
- [27] JIN G E, YANG Q Y, CAO C Z, et al. Intervention of Tibetan medicine-twenty Wei Chenxiang pill on elevation of hypoxic pulmonary arterial pressure in rats[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2014, 37(9): 1640-1643.
- [28] DAHHAM S S, TABANA Y M, AHMED HASSAN L E, et al. *In vitro* antimetastatic activity of Agarwood (*Aquilaria crassna*) essential oils against pancreatic cancer cells[J]. *Alex J Med*, 2016, 52(2): 141-150.
- [29] GU Y F, ZHANG Q, HUO H X, et al. Quantitative determination of agarotretol in agarwood by HPLC-DAD[J]. *World Sci Technol-Modern Tradit Chin Med(世界科学技术-中医药现代化)*, 2014, 16(12): 2643-2646.
- [30] TAKAMATSU S, ITO M. Agarotretol in agarwood: Its use in evaluation of agarwood quality[J]. *J Nat Med*, 2020, 74(1): 98-105.
- [31] XIE B, LUO H T, HUANG X L, et al. Pharmacokinetic studies of six major 2-(2-phenylethyl) chromones in rat plasma using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry after oral administration of agarwood ethanol extract[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(12): 2418-2426.

收稿日期: 2021-06-29
(本文责编: 陈怡心)