

# 基于网络药理学和化学计量学方法预测桔梗的质量标志物

杨亦柳<sup>1</sup>, 于倩<sup>1</sup>, 肖凤琴<sup>1</sup>, 刘晖<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 严铭铭<sup>1,2\*</sup>, 李光哲<sup>1\*</sup> (1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林省中药保健食品科技创新中心, 长春 130117)

**摘要:** 目的 基于中药质量标志物(quality marker, Q-marker)理论的有效性和可测性对桔梗饮片 Q-marker 进行初步预测分析。方法 建立 20 批桔梗样品的指纹图谱, 进行相似度评价, 同时通过网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测桔梗药材的潜在活性成分。运用主成分分析法、正交偏最小二乘判别分析等数理分析方法筛选差异性成分, 并对候选成分进行含量测定。结果 建立的指纹图谱有 19 个共有峰, 指认了 8 个共有成分作为候选活性成分, 进行网络药理学分析。网络药理学筛选出 6 个联接度较高的化合物, 基于 Q-marker 溯源及传递性、特异性、有效性、可测性等方面综合考虑, 初步预测了木犀草素、紫丁香苷、绿原酸、桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub> 和桔梗皂苷 E 作为桔梗潜在 Q-marker。结论 桔梗 Q-marker 预测分析为桔梗药材质量的全面控制提供参考, 同时也为桔梗药效关联物质基础及作用机制的研究和探索奠定基础。

**关键词:** 桔梗; 网络药理学; 指纹图谱; 含量测定; 质量标志物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)13-1785-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222301

引用本文: 杨亦柳, 于倩, 肖凤琴, 等. 基于网络药理学和化学计量学方法预测桔梗的质量标志物[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(13): 1785-1794.

## Prediction of Platycodonis Radix Quality Marker Based on Network Pharmacology and Chemometrics Methods

YANG Yiliu<sup>1</sup>, YU Qian<sup>1</sup>, XIAO Fengqin<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, YAN Mingming<sup>1,2\*</sup>, LI Guangzhe<sup>1\*</sup> (1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Jilin Provincial Science & Technology Innovation Center of Health Food of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To preliminary predict and analyze the quality marker(Q-markers)of Platycodonis Radix decoction based on the validity and measurability of traditional Chinese medicine Q-marker. **METHODS** The fingerprints of 20 batches of Platycodonis Radix samples were established, and the similarity was evaluated. At the same time, a “component-target-pathway” network diagram was constructed through network pharmacology to predict the potential active components of Platycodonis Radix. Mathematical analysis methods such as principal component analysis and orthogonal partial least-squares discrimination analysis were used to screen differential components; the content of candidate components were determined. **RESULTS** There were 19 common peaks in the established fingerprint, and 8 common components were identified as candidate active components for network pharmacology analysis. Network pharmacology indicated that 6 compounds were screened out with a high degree of connectivity. Based on the comprehensive consideration of Q-marker principle: traceability and transmissibility, specificity, efficacy, and measurability, luteolin, syringin, chlorogen acid, platycoside D, platycoside D<sub>3</sub> and platycoside E were preliminarily predicted as potential Q-markers of platycodon. **CONCLUSION** The prediction analysis of Platycodonis Radix Q-marker provides a reference for the comprehensive control of the quality of Platycodonis Radix medicinal materials, and also lays a foundation for the research and exploration of the substance basis and mechanism of action of Platycodonis Radix.

**KEYWORDS:** Platycodonis Radix; network pharmacology; fingerprint; content determination; quality markers

桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC. 为桔梗科多年生草本植物, 俗称铃铛花、僧帽花。桔梗为药食两用品, 根部入药, 最早追溯至《神农本草经》, 性平, 味辛、苦, 具有宣肺、利咽、祛痰、排脓之功效, 临床常用于咳嗽痰多, 咽痛

音哑, 肺痈吐脓等证<sup>[1]</sup>。桔梗中含有皂苷、酚类<sup>[2]</sup>、黄酮类等成分, 其中皂苷类已分离出七十多种, 且药理研究表明桔梗皂苷为镇咳作用的主要成分<sup>[3]</sup>。目前, 市售桔梗药材质量参差不齐, 产地、气候、海拔高度、采收年限及采收期的差异都会

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20210401096YY); 长春市重点研发计划项目(21ZGY15)

作者简介: 杨亦柳, 女, 硕士生 E-mail: 1525515951@qq.com \*通信作者: 严铭铭, 女, 博士, 教授, 博导 E-mail: Yanmm595@yahoo.com.cn 李光哲, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: ligz@nenu.edu.cn

影响桔梗中皂苷的含量<sup>[4-8]</sup>, 中国药典 2020 年版中收录的桔梗药材, 作为桔梗质量控制的主要项目, 其含量测定项下仅以桔梗皂苷 D 单一成分作为测定指标, 缺乏针对多种药效成分系统性评价其质量的方法。

中药药材及方剂具有多成分、多靶点、多途径作用于人体的特点, 为了从中药成分的角度更好地控制中药质量, 刘昌孝院士提出质量标志物 (quality marker, Q-marker) 的五原则<sup>[9]</sup> (有效性、特有性、可测性、溯源性和处方配伍的关联性), 以期建立对药材或复方具有参考价值的质量控制标准。中药指纹图谱技术能从整体上全面、准确地反映中药药材及其制剂的成分及含量, 常用于揭示中药成分的整体性、复杂性和批间一致性。网络药理学是通过现有生物系统研究数据库对信号通路的多途径调节进行预测, 对后续药理研究起到一定的指导作用, 这与中药的多通路治疗途径相契合。目前对桔梗进行质量控制研究缺少采用网络药理学的有效性研究与 HPLC 的可测性研究相结合的方法, 因此, 本研究以质量标志物理论为依托, 从生物信息学和化学角度对来自 2 个产地的 20 批桔梗药材进行分析, 并预测桔梗潜在的质量标志物, 为完善其质量控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器及试剂

LC-2010A HT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); ELSD6000 蒸发光散射检测器 [美国奥泰科技 (中国) 有限公司]; ALB-224 分析天平、AB265-S 分析天平均购自赛多利斯科学仪器有限公司; KQ-250 型超声波清洗器 (昆山市仪器有限公司); HX-400A 型高速中药粉碎机 (浙江省永康市溪岸五金药具厂)。

桔梗药材饮片购于内蒙古赤峰和河南南阳 (分别为桔梗主产区与副产区), 经长春中医药大学吉林省人参科学研究院姜大成教授鉴定为桔梗科桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 样品信息见表 1。对照品: 桔梗皂苷 D (批号: Y02A10Y17264, 供含量测定用)、熊果苷 (批号: KM0530CA14, 供含量测定用) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 桔梗皂苷 D<sub>3</sub> (武汉天植生物技术有限公司, 批号: CFS201803, 供含量测定用); 桔梗皂苷 E (批号: 111852-200101)、紫丁香苷 (批号: 111574-200201)、绿原酸 (批号: 110753-

200413)、黄芩苷 (批号: 110715-200514)、木犀草素 (批号: 111520-200504) 由中国药品生物制品检定所提供, 均为供含量测定用; 乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯) 均购自美国 J.T.Baker 公司; 甲酸 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 纯净水来自娃哈哈食品有限公司。

表 1 20 批桔梗样品信息

Tab. 1 Twenty batches of *Platycodonis Radix* sample information

| 编号  | 药材批号        | 产地  | 来源          |
|-----|-------------|-----|-------------|
| S1  | C359180401b | 河南  | 长春市朝阳区宏检大药房 |
| S2  | C359180403b | 河南  | 长春市朝阳区宏检大药房 |
| S3  | 2004058     | 河南  | 长春市百草大药房    |
| S4  | C359180407b | 河南  | 长春市朝阳区宏检大药房 |
| S5  | 180408      | 河南  | 长春市宽城区仙草大药房 |
| S6  | 180601      | 河南  | 长春市宽城区仙草大药房 |
| S7  | 180604      | 河南  | 长春市宽城区仙草大药房 |
| S8  | 180606      | 河南  | 长春市宽城区仙草大药房 |
| S9  | 180701      | 河南  | 长春市朝阳区宏检大药房 |
| S10 | 180705      | 河南  | 长春市朝阳区宏检大药房 |
| S11 | 19005       | 内蒙古 | 长春市南关区吉林大药房 |
| S12 | 19009       | 内蒙古 | 长春市南关区吉林大药房 |
| S13 | 38619015    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S14 | 38619016    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S15 | 38620006    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S16 | 38620008    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S17 | 38620009    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S18 | 38620002    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S19 | 38620007    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |
| S20 | 38620005    | 内蒙古 | 长春市南关区同仁堂药房 |

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Apollo-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测器: ELSD6000 蒸发光检测器; 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱 (0~12 min, 5%A; 12~15 min, 5%→15%A; 15~45 min, 15%→35%A; 45~50 min, 35%→50%A; 50~60 min, 50%A); 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; ELSD 初始温度 105 °C, 气体流量 2.8 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 对照品各 10, 20 μL; 供试品 20 μL。

### 1.3 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品桔梗皂苷 D 2 mg、桔梗皂苷 E 2 mg、桔梗皂苷 D<sub>3</sub> 1.5 mg、紫丁香苷 1 mg、绿原酸 2.5 mg、黄芩苷 2.5 mg、木犀草素 2.5 mg、熊果苷 4 mg, 用甲醇溶解并定容至同一 5 mL 量瓶中, 摇匀, 制成含 0.424 mg·L<sup>-1</sup> 桔梗皂苷 D、0.388 mg·L<sup>-1</sup> 桔梗皂苷 E、0.414 mg·L<sup>-1</sup> 桔梗皂苷

D<sub>3</sub>、0.284 mg·L<sup>-1</sup>紫丁香苷、0.528 mg·L<sup>-1</sup>绿原酸、0.494 mg·L<sup>-1</sup>黄芩苷、0.502 mg·L<sup>-1</sup>木犀草素、0.74 mg·L<sup>-1</sup>熊果苷的混合对照品溶液。

#### 1.4 质量标志物对照品溶液的制备

精密称取对照品紫丁香苷 1 mg、桔梗皂苷 D 2 mg、桔梗皂苷 D<sub>3</sub> 1.5 mg、桔梗皂苷 E 2 mg、木犀草素 2.5 mg、绿原酸 2.5 mg, 分别置 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解, 定容, 摇匀, 即得对照品储备液。

#### 1.5 供试品溶液的制备

精密称取桔梗药材样品 1.0 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容后称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 冷却, 再次称定质量, 用甲醇补足损失质量, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

#### 1.6 定性和定量分析方法学考察

**1.6.1 仪器精密度试验** 取同一批桔梗样品(S7), 精密称定, 按“1.5”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2”项下色谱条件重复进样 6 次。以 8 号峰为参照峰, 计算相对保留时间及相对峰面积。

**1.6.2 重复性试验** 取同一批桔梗样品(S7), 精密称定, 按“1.5”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“1.2”项下色谱条件进样检测, 以 8 号峰为参照峰, 计算相对保留时间及相对峰面积。

**1.6.3 稳定性试验** 取同一批桔梗样品(S7), 精密称定, 按“1.5”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2”项下色谱条件分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样检测, 以 8 号峰为参照峰, 计算相对保留时间及相对峰面积。

**1.6.4 线性关系考察** 精密称取“1.3”项下的混合对照品溶液, 分别逐级稀释一定倍数后, 按“1.2”项下的色谱条件进样测定, 以质量浓度为横坐标(X), 对照品峰高的自然对数值(ln)为纵坐标(Y), 计算回归方程, 考察线性关系。

**1.6.5 加样回收率考察** 精密称定已知含量的桔梗样品(S7)粉末, 平行 6 份, 按一定比例加入桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E、木犀草素、绿原酸、紫丁香苷对照品, 按“1.5”项下的方法制备供试品溶液, 按“1.2”项下的色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算每个对照品的平均回收率。

#### 1.7 HPLC 指纹图谱的生成及相似度分析

分别取 20 批桔梗样品, 精密称定, 按“1.5”

项下方法制备供试品溶液, 按“1.2”项下色谱条件进样检测, 记录色谱。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本), 以桔梗样品 HPLC 对照图谱 R 为参照, 进行整体相似度评价。

#### 1.8 网络药理学研究

**1.8.1 候选化合物靶点预测** 在中药系统药理学数据库 TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)和 Pubmed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>)中搜索桔梗所含化学成分基本信息, 在 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)与 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中检索潜在质量标志物, 根据 probability 值>0 筛选化合物作用的靶点, 将靶点蛋白名称通过 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)转换为相应的基因名后, 去除重复靶点, 得到相关靶点蛋白。

**1.8.2 蛋白与蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络分析** 将获得的靶点蛋白以 gene symbol 形式导入 String 11.5 数据库(<https://string-db.org/>), 物种选择为人 (Homo sapiens [9606]), 隐藏网络中无联系的节点, 最高置信度蛋白交互评分值>0.9, 其他参数设置不变, 构建 PPI 网络图。

**1.8.3 功能富集分析与通路分析** 利用 DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对靶点蛋白进行基因本体论(gene ontology, GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes & genomes, KEGG)通路富集分析。GO 功能分析主要用于描述基因靶点的功能, 主要包括分子功能(molecular function, MF)、细胞组成(cellular component, CC)和生物过程(biological process, BP)三大方面。KEGG 功能分析主要用于得到潜在靶点所富集的信号通路。

**1.8.4 成分-靶点-通路网络构建** 根据检索的潜在质量标志化合物、“1.8.1”项下查找的靶点和“1.8.3”项下富集的通路相互关系, 运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建桔梗“成分-靶点-通路”图。

#### 1.9 化学模式识别分析

**1.9.1 聚类分析** 以 19 个共有峰的峰面积为原始数据, 运用 SPSS 20.0 软件对 20 批桔梗样品进行聚类分析, 采用最远邻距离法, 以 Pearson 相关性为度量标准<sup>[10]</sup>。

**1.9.2 主成分分析** 以 20 批桔梗样品中的 19 个共有峰的峰面积为原始数据, 用 SIMCA 14.1 软件

对其进行主成分分析,选出贡献率主成分反映出桔梗药材的基本特征。

**1.9.3 正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)** 以20批桔梗样品19个共有峰峰面积为原始数据,导入SIMCA 14.1软件进行有监督模式的OPLS-DA,主成分回归系数 $Q^2(\text{cum})$ 反应模型的预测性,矩阵结实程度 $R^2X(\text{cum})$ 概括X矩阵结实率,型区分参数 $R^2Y(\text{cum})$ 反应模型的稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 定性研究方法学考察

**2.1.1 色谱条件的优化** 为了最大化色谱峰信息、以稳定的提取方法和最高的提取效率获得桔梗的指纹图谱,本实验前期对不同料液比、提取溶剂、提取方式、提取时间以及色谱条件中的色谱柱、ELSD检测器初始温度、ELSD检测器气体流量、流动相体系及流速进行考察,最终确定1 g : 25 mL为料液比,100%甲醇为提取溶剂,超声提取30 min为样品的制备方法,ELSD初始温度105℃、气体流量2.8 mL·min<sup>-1</sup>、乙腈-0.1%甲酸水为流动相、流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>的色谱条件。

**2.1.2 参照峰的选择** 桔梗皂苷D<sub>3</sub>峰面积较大,分离度及对称因子均符合要求,且为所有桔梗样品共有,故设定其所在8号峰为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

**2.1.3 仪器精密度考察** 19个共有峰相对保留时间的RSD在0.05%~0.12% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD在0.96%~1.23% ( $n=6$ ),表明检测仪器的精密

度良好。

**2.1.4 重复性考察** 19个共有峰相对保留时间的RSD在0.05%~0.17% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD在1.46%~3.07% ( $n=6$ ),表明该方法的重复性良好。

**2.1.5 稳定性考察** 19个共有峰相对保留时间的RSD在0.08%~0.1% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD在1.31%~1.66% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.2 指纹图谱及相似度分析

将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版本)中,以S1号色谱图为参照图谱,采用多点校正法进行色谱峰匹配,选择中位数法生成对照图谱R。对照指纹图谱R见图1,20批桔梗样品HPLC叠加指纹图谱见图2。确定共有峰19个,通过与对照品溶液色谱峰对比,确定1,3,4,6,8,12,14,18号共有峰分别为熊果苷、紫丁香苷、绿原酸、桔梗皂苷E、桔梗皂苷D<sub>3</sub>、黄芩苷、桔梗皂苷D、木犀草素。混合对照品溶液的色谱图见图3。相似度分析结果显示,20批桔梗样品相似度在0.924~0.998,表明不同批次桔梗样品间差异较小。

### 2.3 网络药理学分析

**2.3.1 潜在质量标志物的溯源定位** 从生源途径看,桔梗皂苷D、桔梗皂苷D<sub>3</sub>、桔梗皂苷E均属于齐墩果烷型五环三萜皂苷,齐墩果烷型三萜皂苷为桔梗中的一类重要皂苷,是由前体物质3-异戊烯焦磷酸酯、 $\gamma,\gamma$ -二甲基烯丙焦磷酸酯经甲羟戊酸途径、异戊二烯途径合成的<sup>[11]</sup>,桔梗皂苷处

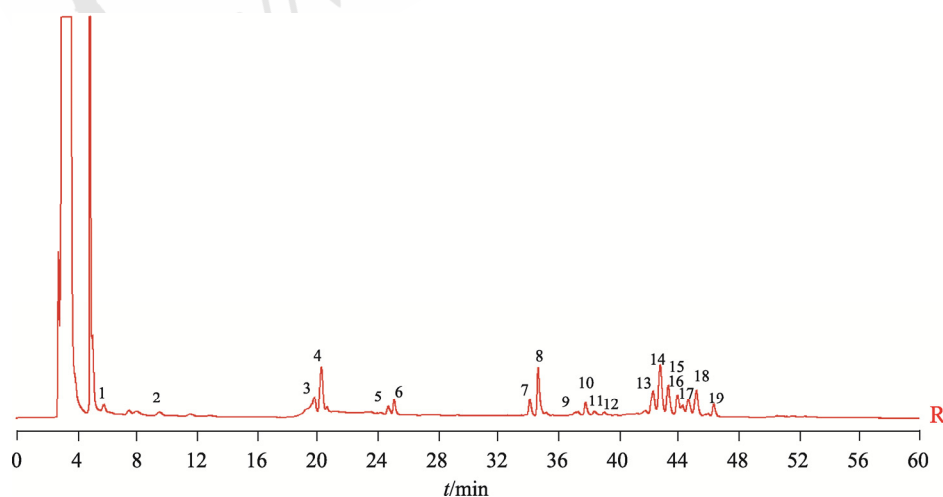


图1 对照指纹图谱R

1~19为共有峰。

Fig. 1 Reference fingerprint R

Number 1-19 were common peaks.

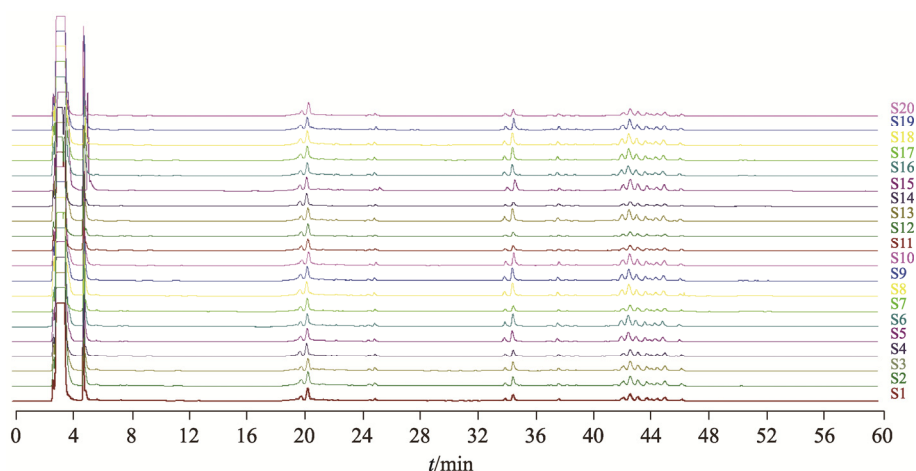


图2 20批桔梗样品 HPLC 叠加指纹图谱  
1~19 为共有峰。

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprint of 20 batches of samples from *Platycodonis Radix*  
Number 1–19 were common peaks.

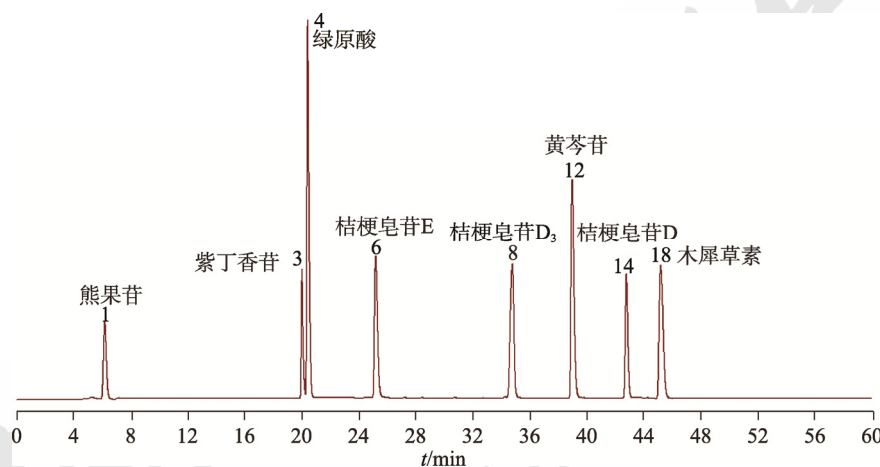


图3 混合对照品色谱峰

Fig. 3 Chromatography peaks of mixed reference substance

于上述合成途径下游区域，具有较高特异性；绿原酸、紫丁香苷属于苯丙素类化合物，绿原酸在菊科、忍冬科植物中广泛存在且含量丰富，是经莽草酸途径合成的次生代谢物<sup>[12]</sup>，紫丁香苷也是苯丙氨酸经由莽草酸途径合成的次生代谢产物，是在苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)、4-香豆酸-辅酶A连接酶(4CL)、咖啡酸-O-甲基转移酶、肉桂酰辅酶A还原酶、肉桂酰乙醇脱氢酶、松柏醇酯酰转移酶等酶的依次作用下生成松柏脂<sup>[13]</sup>，随后经丁香酚合成酶、丁香酚-O-甲基转移酶的作用下进行甲基化反应，生成甲基丁香酚<sup>[14]</sup>，最后脱水缩合生成糖苷键而合成的，具有较高的特异性；木犀草素属于黄酮类化合物，是由苯丙烷途径和类黄酮途径合成的<sup>[15]</sup>：首先，苯丙氨酸经由PAL、C4H、4CL转化为 $p$ -香豆酰辅酶A，它是各种重要次生代谢物的前体；查尔酮合成酶和查

尔酮异构酶将 $p$ -香豆酰辅酶A转化为柚皮素，这是木犀草素生物合成的关键分叉点；柚皮素分别通过类黄酮3'-羟基化酶(F3'H)和黄酮合成酶(FNS)转化为芥子醇或芹菜素，它们再分别通过F3'H和FNS转化为木犀草素，从植物亲缘学看，木犀草素的合成处于偏下游位置，具有一定的特异性。

从传统药性来看，桔梗性平，味苦、辛，归肺经。文献研究表明，三萜类、黄酮类、酚类化合物均为平性药发挥功效的主要物质基础<sup>[16]</sup>，且桔梗的苦味也与其所含桔梗皂苷类、黄酮类物质有关<sup>[17]</sup>；从传统功效来看，桔梗能镇咳祛痰，《备急千金要方》中便有记载，“桔梗二两，水三升，煮取一升，顿服之”可治疗喉痹，梁仲远等<sup>[18]</sup>研究表明桔梗水煎液对浓氨水引咳小鼠的咳嗽有明显的潜伏期延长、次数减少的效果，并且增加小鼠的酚红排泌量，起到良好的镇咳与祛痰作用。

**2.3.2 候选化合物靶点预测** 将“2.2”项下指认的熊果苷、黄芩苷、木犀草素、紫丁香苷、桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E 和绿原酸 8 个化合物作为潜在的质量标志物候选成分, 进行数据库检索和筛选, 结果得到 8 个化合物相关的 178 个靶点蛋白。

**2.3.3 PPI 网络分析** 将获得的 178 个靶点蛋白以 gene symbol 形式导入 String 11.5 数据库, 设置参数后筛选出 116 个蛋白的 PPI 网络, 见图 4, 数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行拓扑特性分析, 根据度值(degree)、介度中心性(between centrality)、接近中心性(closeness centrality)均大于中位数, 且度值从大到小地排序筛选靶点, 发现 SRC 非受体酪氨酸激酶(SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, SRC)、RAS 家族小 GTP 结合蛋白 H-RAS(ras family small gtp binding protein H-Ras, HRAS)、信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 3-激酶催化亚单位  $\alpha$ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)分别与 54, 40, 38, 37, 34 个靶点蛋白有相互作用, 可能是发挥药效作用的关键靶点。

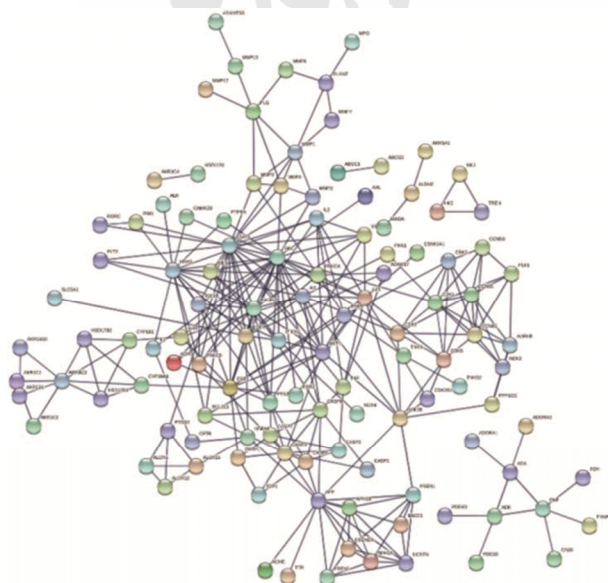


图 4 蛋白-蛋白相互作用网络  
Fig. 4 Protein-protein interaction network

**2.3.4 GO 富集分析和 KEGG 富集分析** GO 功能分析共得到 528 条结果, 其中 360 条与 BP 有关,

59 条与 CC 有关, 109 条与 MF 有关。按 *P*-value 从小到大排列选取前 30 条, 共选出 19 条 BP 结果, 2 条 CC 结果, 9 条 MF 结果。进行可视化分析, 结果见图 5, 可以看出 BP 主要与氧化还原过程、对凋亡过程的负调控、对于药物的反应、碳酸氢盐运输、一碳代谢过程, 以及蛋白质磷酸化等生物过程有关; CC 主要富集在质膜、胞液等细胞组成部分; MF 主要与蛋白激酶活性、酶结合、ATP 结合、蛋白激酶结合及蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等分子功能有关。KEGG 分析共富集到 94 条通路, 以 *P* 值 < 0.05 为筛选条件, 共得到 70 条通路, 按照 *P* 值选取前 30 条, 进行可视化分析, 见图 6, 桔梗可能通过 PI3K-Akt 信号通路、Rap1 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路以及 cAMP 信号通路发挥作用。从功效主治上看, 桔梗可能是通过调控支气管平滑肌与肺部的 HIF(缺氧诱导因子)重构细胞内氧稳态, 提高肺部的氧利用率<sup>[19]</sup>, 实现宣肺镇咳功能; 桔梗利咽作用可能是由于调控呼吸道上皮细胞中枢调节因子 FoxO(叉头盒转录因子家族 O)的免疫应答, 进而影响下游因子的表达, 阻止了炎症在咽部扩散<sup>[20]</sup>; 桔梗祛痰排脓可能与介导 Rap1 信号通路修复肺内皮细胞的损伤<sup>[21]</sup>, 或参与 cAMP 信号通路中蛋白的表达, 影响肺循环中血管细胞通透性, 从而降低炎症反应有关<sup>[22]</sup>。现代药理学研究证实, 桔梗可通过下调 PI3K-Akt 信号通路实现抗肺癌作用<sup>[23]</sup>。

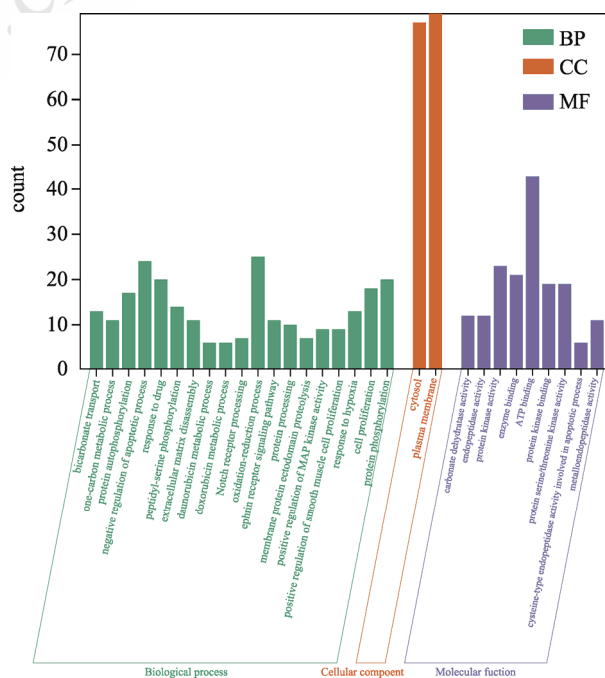


图 5 GO 富集分析  
Fig. 5 GO function enrichment analysis

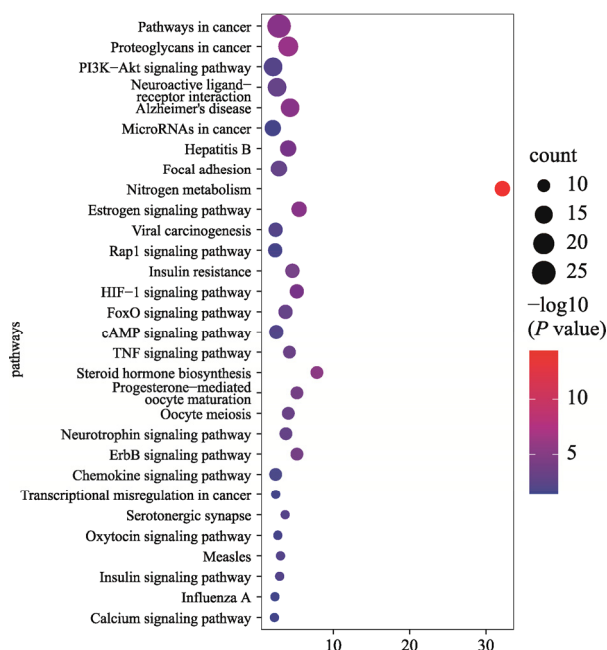


图6 KEGG 富集分析

圆圈越大, 富集的基因数越多; 颜色越红,  $P$ -value 值越小, 颜色越蓝,  $P$ -value 越大。

Fig. 6 KEGG enrichment analysis

The larger the circle, the more genes were enriched; the redder the color, the smaller the  $P$ -value, the bluer the color, the larger the  $P$ -value.

**2.3.5 “成分-靶点-通路”网络的构建** 根据“2.2”项下指认的 8 个化合物、查找的 178 个核心靶点和 65 条通路相互关系, 运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建桔梗“成分-靶点-通路”图, 见图 7。以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度为参考, 发现木犀草素、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E、绿原酸、紫丁香苷、桔梗皂苷 D 连接度较高, 推测可能是桔梗的活性成分之一; AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶

(AKT Serine/threonine kinase, AKT1)、磷脂酰肌醇-3-激酶调控亚单位 1(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit1, PIK3R1)、HRAS、Jun 原癌基因(AP-1 转录因子亚基, Jun Proto-Oncogene, AP-1transcription factor subunit, JUN)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、SRC、STAT3、细胞凋亡蛋白酶 3(Caspase3, CASP3)可能是桔梗发挥药效的关键靶点; 癌症相关通路、PI3K-Akt 信号通路、神经活性配体-受体相互作用通路以及乙型肝炎通路连接度较高, 可能是桔梗的关键信号通路。

## 2.4 桔梗质量标志物的定性鉴别研究

以 19 个共有峰的峰面积为原始数据, 运用 SPSS 20.0 软件对 20 批桔梗样品进行聚类分析, 结果见图 8, 显示 20 批桔梗样品可聚为两大类: 批次为 S1~S10 的聚为一类, 即河南产桔梗药材提取的桔梗样品为一批, 批次为 S11~S20 的聚为另一类, 即河北产桔梗药材提取的桔梗样品为另一批。说明同一地区的药材提取的桔梗样品之间的差异较小, 质量较稳定; 两大类中的小类表明, 来源于同一产地、不同供货渠道的桔梗药材也会有质量差异。

运用 SIMCA14.0 软件计算 20 批桔梗样品的主成分得分, 选出贡献率最大的前 2 个主成分, 总贡献率为 95%, 即前 2 个主成分能反映出桔梗活性部位样品的基本特征。20 批桔梗样品可以分为 2 类, S1~S10 为一类, S11~S20 可以分为一类, 见图 9。结果表明主成分分析结果与聚类分析结果一致。同一地区的桔梗药材, 质量稳定并无太大差异。

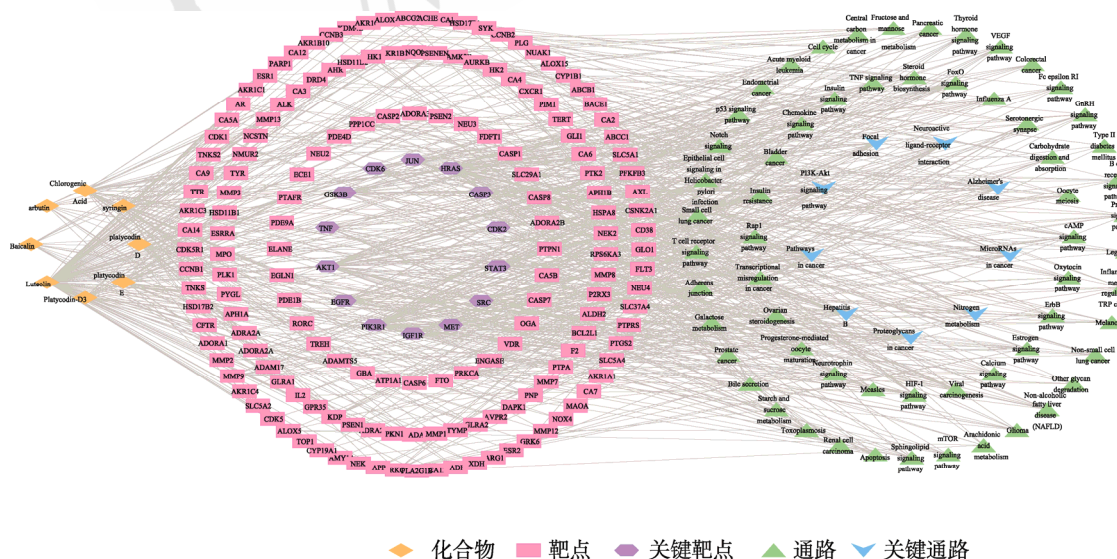


图7 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 7 Compound-target-pathway network

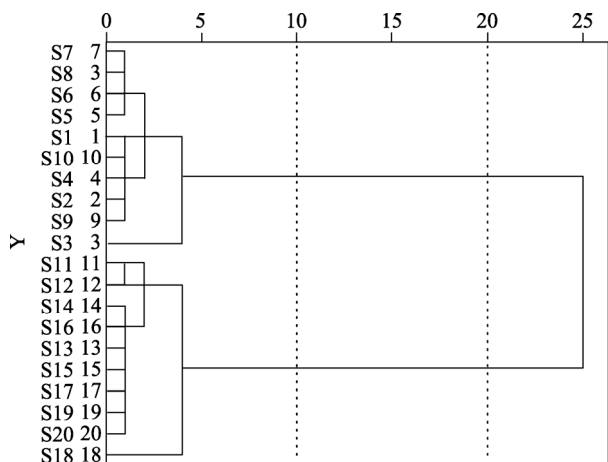


图 8 20 批桔梗样品 HPLC 指纹图谱的聚类树状关系图  
Fig. 8 Dendrogram of HPLC fingerprints of 20 batches of samples from Platycodonis Radix

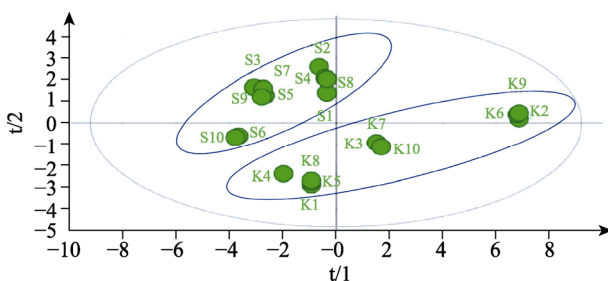


图 9 20 批样品色谱峰 PCA 图  
Fig. 9 PCA diagram of 20 batches of samples

为确定色谱峰对应化学成分的贡献程度,以 20 批桔梗样品 19 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行有监督模式的 OPLS-DA,主成分回归系数  $Q^2_{cum}$  反应模型的预测性,矩阵结实程度  $R^2X_{cum}$  概括 X 矩阵结实率,型区分参数  $R^2Y_{cum}$  反应模型的稳定性。结果见图 10,20 批样品可以明显地分为 2 类,  $Q^2_{cum}=0.559$ ,  $R^2X_{cum}=0.947$ ,  $R^2Y_{cum}=0.964$ , 均  $>0.5$ , 表明该模型对样品的区分程度和预测能力较强。

计算变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP),当 VIP 值  $>1$  时为有意义变量,选取  $VIP \geq 1.0$  为标准,筛选得到 4 个影响较大的峰,从大到小依次为 14,18,4,3 号峰。从 OPLS-DA 模型的载荷图中也能看出这 4 个峰离原点较远,表明这 4 个峰的差异对分类引起的影响较大,通过对照品比对确认,14 号峰鉴定为桔梗皂苷 D、18 号峰鉴定为木犀草素、4 号峰鉴定为绿原酸、3 号峰鉴定为紫丁香苷,见图 10。数理分析表明这 4 个化合物的含量变化可以反映桔梗药材的差异性,可作为桔梗的潜在质量标志物进一步研究。同时,桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E 可通过去糖基化

反应转化为桔梗皂苷 D<sup>[24-25]</sup>,考虑到含量的全面性,上述二者也应作为桔梗含量测定指标。鉴于此,本研究对桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E、木犀草素、紫丁香苷、绿原酸 6 个标志性成分进行定量分析。

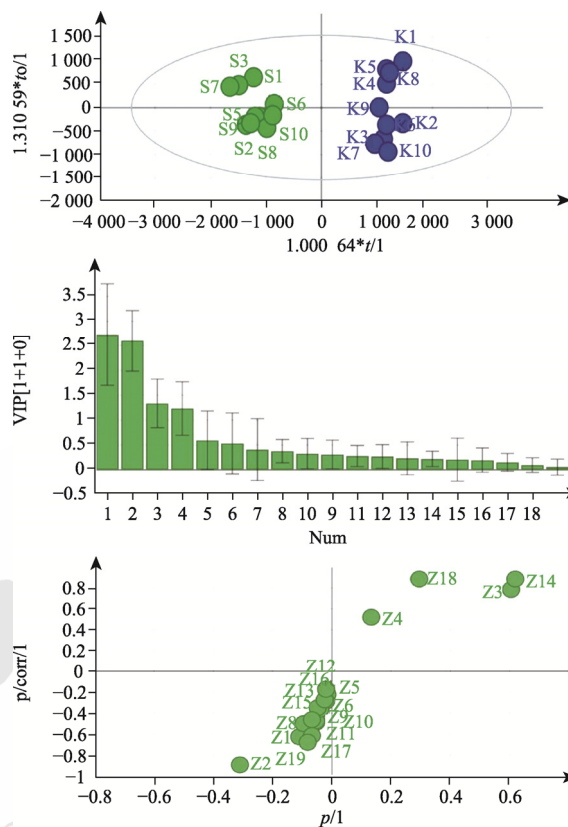


图 10 20 批样品色谱峰 OPLS-DA 图  
Fig. 10 OPLS-DA diagram of 20 batches of samples

## 2.5 桔梗质量标志物含量测定

### 2.5.1 方法学考察

2.5.1.1 线性关系考察 经过测定,线性关系及相关系数见表 2。

表 2 20 批桔梗样品的 6 个主要成分线性相关结果  
Tab. 2 Results of linear correlation of 6 main components in 20 batches of Platycodonis Radix sample

| 名称                  | 线性范围/ $\mu\text{g}$ | 回归方程                 | $R^2$   |
|---------------------|---------------------|----------------------|---------|
| 绿原酸                 | 0.007~0.07          | $y=0.841\ 7x+14.794$ | 0.999 3 |
| 紫丁香苷                | 0.02~0.40           | $y=0.704\ 9x+14.194$ | 0.999 6 |
| 桔梗皂苷 E              | 0.035~0.35          | $y=0.880\ 2x+14.897$ | 0.999 8 |
| 桔梗皂苷 D <sub>3</sub> | 0.3~3.0             | $y=0.832\ 3x+14.699$ | 0.999 0 |
| 桔梗皂苷 D              | 0.4~4.0             | $y=0.729\ 5x+14.578$ | 0.999 4 |
| 木犀草素                | 0.5~5.0             | $y=0.852\ 4x+14.778$ | 0.999 7 |

2.5.1.2 仪器精密度考察 测得 6 个主要成分的相对保留时间 RSD 均在 0.96%~2.45%,结果表明仪器精密度良好。

**2.5.1.3 重复性考察** 测得 6 个主要成分的含量 RSD 均在 1.31%~3.66%，结果表明所用方法重复性良好。

**2.5.1.4 稳定性考察** 测得 6 个主要成分的峰面积 RSD 均在 1.46%~2.08%，结果表明所用方法稳定性良好。

**2.5.1.5 回收率考察** 计算得到 6 个主要成分的平均回收率均在 99.35%~100.72%，RSD 均在 1.82%~2.69%，表明所建立的含量测定方法回收率良好。

**2.5.2 含量测定结果** 20 批桔梗样品所含的成分种类差异不明显，然而含量具有一定差异，各批次桔梗样品中桔梗皂苷 D 含量均>0.10%，符合药典的含量要求，结果见表 3。

**表 3** 20 批桔梗样品的 6 个主要成分含量结果  
**Tab. 3** Results of 6 main components in 20 batches of *Platycodonis Radix* samples

| 样品 | 绿原酸  | 紫丁香苷 | 桔梗皂苷 D <sub>3</sub> | 桔梗皂苷 E | 桔梗皂苷 D | 木犀草素 |
|----|------|------|---------------------|--------|--------|------|
| 1  | 0.04 | 0.43 | 1.45                | 0.32   | 2.84   | 1.20 |
| 2  | 0.02 | 0.19 | 1.27                | 0.28   | 2.46   | 1.07 |
| 3  | 0.02 | 0.14 | 1.11                | 0.26   | 2.15   | 0.91 |
| 4  | 0.02 | 0.14 | 0.87                | 0.21   | 1.64   | 0.71 |
| 5  | 0.02 | 0.20 | 0.82                | 0.19   | 1.50   | 0.65 |
| 6  | 0.02 | 0.17 | 0.70                | 0.17   | 1.28   | 0.75 |
| 7  | 0.08 | 0.48 | 0.68                | 0.26   | 1.14   | 0.81 |
| 8  | 0.01 | 0.08 | 0.47                | 0.13   | 1.88   | 0.76 |
| 9  | 0.01 | 0.07 | 0.52                | 0.13   | 1.93   | 0.92 |
| 10 | 0.01 | 0.11 | 0.49                | 0.13   | 1.88   | 0.74 |
| 11 | 0.03 | 0.49 | 2.33                | 0.35   | 4.02   | 0.68 |
| 12 | 0.03 | 0.33 | 2.36                | 0.37   | 3.97   | 1.38 |
| 13 | 0.02 | 0.27 | 2.25                | 0.35   | 3.90   | 1.36 |
| 14 | 0.05 | 0.46 | 2.35                | 0.36   | 4.10   | 1.36 |
| 15 | 0.03 | 0.29 | 2.39                | 0.36   | 4.10   | 1.44 |
| 16 | 0.03 | 0.27 | 2.40                | 0.37   | 4.13   | 1.46 |
| 17 | 0.02 | 0.26 | 2.38                | 0.36   | 4.06   | 1.46 |
| 18 | 0.02 | 0.26 | 2.37                | 0.35   | 4.04   | 1.48 |
| 19 | 0.05 | 0.47 | 2.71                | 0.43   | 4.63   | 1.47 |
| 20 | 0.03 | 0.32 | 2.30                | 0.35   | 3.95   | 1.07 |

### 3 讨论

本研究依据刘昌孝院士的质量标志物的理念，根据特有性、有效性和可测性原则对 20 批桔梗样品进行定性、定量分析，并预测桔梗的质量标志物。通过文献查阅和指纹图谱分析初步确定桔梗潜在的质量标志物成分种类为三萜类、黄酮类与酚酸类，网络药理学有效性分析结果显示，桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E、木犀草素、紫丁香苷、绿原酸 6 种活性成分可能通过 AKT1、PIK3R1、HRAS、JUN、EGFR、SRC、STAT3 等关

键靶点作用于 PI3K-Akt 通路、FoxO 信号通路、cAMP 信号通路、HIF-1 信号通路等 11 条通路发挥作用。现代药理学研究表明，木犀草素、紫丁香苷和绿原酸均有不同程度的抗氧化、抗炎、抗肿瘤作用<sup>[26-28]</sup>，并且有一定的免疫调节作用<sup>[29-30]</sup>。桔梗皂苷 D 也具有上述药理作用<sup>[31]</sup>，同时，桔梗皂苷 D 还具有保肝的作用<sup>[32]</sup>。

为了进一步确定桔梗的质量标志物，采用 OPLS-DA 方法分析影响桔梗药材质量的主要成分，并对数理分析筛选出的成分进行 HPLC 含量测定。结合网络药理学结果，桔梗皂苷 D、绿原酸、木犀草素、紫丁香苷等 6 个成分既是桔梗潜在的药效物质基础，又是反映桔梗药材质量差异的标志物，建议作为桔梗药材的质量标志物，此结果涵盖了文献对桔梗 Q-marker 的预测。许伟辰等<sup>[33]</sup>预测的桔梗 Q-marker 为皂苷和多糖类，多糖由于结构复杂，无法针对单一成分进行定量分析；韦金玉等<sup>[34]</sup>将皂苷、多糖、黄酮类、苦味氨基酸、聚乙炔类等列入桔梗候选质量标志物，比照质量标志物五原则发现苦味氨基酸与聚乙炔类的有效性尚未明确。本研究基于桔梗中固有成分<sup>[2]</sup>，采用网络药理学、HPLC 和化学计量学结合的多元手段进行分析，发现皂苷、黄酮与酚类均具有有效性、可测性，因此与文献相比，本研究所选质量标志物准确、可靠，更能从桔梗功效方面全面控制桔梗药材质量。

综上所述，本实验建立了一种桔梗 HPLC-ELSD 指纹图谱，该方法灵敏度高、分离度好、特征性强，并通过网络药理学研究和含量测定分析，基于溯源及传递性、特有性、有效性和可测性等原则确定了桔梗的 6 种潜在标志物体系质量标志物：桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D<sub>3</sub>、桔梗皂苷 E、绿原酸、木犀草素、紫丁香苷。该体系能全面、系统地反映其质量，为今后对桔梗质量标准的深入研究与药材开发提供参考依据。

### REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 289.
- [2] LI W, YANG H J. Phenolic constituents from *Platycodon grandiflorum* root and their anti-inflammatory activity[J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4530.
- [3] XIE X X, ZHANG C, ZENG J X, et al. Antitussive and expectorant activities and saponin components of Various extract Fractions from *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2019, 28(13): 1647-1653.

- [4] LI X F, DU Y F, XIE X N, et al. HPLC fingerprints of *Platycodon grandiflorum* from different habitats and the determination of platycodin-D[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(4): 529-532.
- [5] ZHAO X Y, LIU R, FENG H, et al. Quality control of *Platycodon grandiflorum* based on chemometrics method and HPLC fingerprint[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32(9): 1491-1498.
- [6] HUANG J. Quality evaluation of *Platycodon grandiflorum* from different altitude by PCA and fingerprint[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2015, 36(13): 309-313, 320.
- [7] GE D, WANG J T, GUI S Y, et al. A research about comparison between different harvest period of *Platycodonis Radix* chemical composition by fingerprint of traditional Chinese medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2017, 28(1): 217-219.
- [8] LI X F, HAO Z, LIU S M, et al. HPLC fingerprint of *Platycodon grandiflorum* in different picking times[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(3): 353-356.
- [9] LIU C X. Five-year review on development of quality markers of traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(9): 2511-2518.
- [10] LI M Y. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Xinmaitong capsules[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(6): 1104-1112.
- [11] XU Y Y, CHEN Z, JIA L M, et al. Advances in understanding of the biosynthetic pathway and regulatory mechanism of triterpenoid saponins in plants[J]. Sci Sin Vitae(中国科学: 生命科学), 2021, 51(5): 525-555.
- [12] CHEN Z X. Studies on the characterization of chlorogenic acids biosynthetic pathways and regulation of CGA content in *Lonicera macranthoides* hand.-mazz[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.
- [13] KOEDUKA T, FRIDMAN E, GANG D R, et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester[J]. PNAS, 2006, 103(26): 10128-10133.
- [14] LIN M Y, NIU H, LIU J J, et al. Identification of genes related to biosynthesis of methyleugenol in *Asarum sieboldii* by transcriptome sequence analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(15): 3160-3167.
- [15] LI L, LIU Q, LIU T Y, et al. Expression of putative luteolin biosynthesis genes and WRKY transcription factors in *Taraxacum antungense* Kitag[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2021, 145(3): 649-665.
- [16] ZHANG Y C, LI M L, GUO Y Z, et al. Study on the correlation between the active ingredients of the mild traditional Chinese medicine and their properties[J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2010, 22(1): 67-72.
- [17] ZHANG L, GUO X X, ZHU L L. Distribution and dynamic changes of bitterness constituents of *Platycodon grandiflorum*[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2019, 30(5): 586-591.
- [18] LIANG Z Y. Study on antitussive and expectorant effect of water extract of *Platycodon grandiflorum*[J]. China Pharm(中国药房), 2011, 22(35): 3291-3292.
- [19] LEI W, HE Y, SHUI X, et al. Expression and analyses of the HIF-1 pathway in the lungs of humans with pulmonary arterial hypertension[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4383-4390.
- [20] SEILER F, HELLBERG J, LEPPER P M, et al. FOXO transcription factors regulate innate immune mechanisms in respiratory epithelial cells[J]. J Immunol, 2013, 190(4): 1603-1613.
- [21] KE Y B, KARKI P, ZHANG C O, et al. Mechanosensitive Rap1 activation promotes barrier function of lung vascular endothelium under cyclic stretch[J]. Mol Biol Cell, 2019, 30(8): 959-974.
- [22] MOORE T M, CHETHAM P M, KELLY J J, et al. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP[J]. Am J Physiol, 1998, 275(2): L203-L222.
- [23] LI Y, WU Y Y, XIA Q, et al. *Platycodon grandiflorus* enhances the effect of DDP against lung cancer by down regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2019(120): 109496.
- [24] SU X L, LIU Y Y, HAN L, et al. A candidate gene identified in converting platycoside E to platycodin D from *Platycodon grandiflorus* by transcriptome and main metabolites analysis[J]. Sci Rep, 2021(11): 9810.
- [25] SHIN K C, KIM D W, WOO H S, et al. Conversion of glycosylated platycoside E to deapiose-xylosylated platycodin D by cytolase PCL5[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): E1207.
- [26] TARASIUK A, BULAK K, TALAR M, et al. Chlorogenic acid reduces inflammation in murine model of acute pancreatitis[J]. Pharmacol Rep, 2021, 73(5): 1448-1456.
- [27] YU Q, WU G Z. Research progress of anti-inflammatory properties of luteolin[J]. J Pharm Res(药学研究), 2019, 38(2): 108-111, 119.
- [28] QIN Q H, ZHU A H. Study on the screening and mechanism of syringin anticancer activity[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2018, 46(14): 107-108, 112.
- [29] ZHANG Z T, ZHANG D Y, XIE K, et al. Luteolin activates Tregs to promote IL-10 expression and alleviating caspase-11-dependent pyroptosis in sepsis-induced lung injury[J]. Int Immunopharmacol, 2021(99): 107914.
- [30] TAN J Y, LUO J, MENG C C, et al. Syringin exerts neuroprotective effects in a rat model of cerebral ischemia through the FOXO3a/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2021(90): 107268.
- [31] 邹霞霜, 单进军, 谢彤, 等. 桔梗皂苷 D 的研究进展[J]. 中成药, 2014, 36(4): 823-827.
- [32] KIM T W, LEE H K, SONG I B, et al. Platycodin D attenuates bile duct ligation-induced hepatic injury and fibrosis in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2013(51): 364-369.
- [33] XU W C, LUO Z C, XIE T, et al. Advance in research on *Platycodonis Radix* and preliminary analysis of its quality marker prediction[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2021, 37(2): 294-302.
- [34] WEI J Y, LIANG J, HUANG D F, et al. Quality control status and prediction analysis of quality markers of Jiegeng (*Platycodonis Radix*)[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2021, 39(7): 247-253.

收稿日期: 2022-06-28  
(本文责编: 陈怡心)