

经典名方芍药甘草汤解痉功效的关键质量属性研究

续艳丽^{1,2}, 李少泓³, 李坚², 李晓春², 朱仁愿², 张启立¹, 武晓玉^{1,4,5}, 段文达^{1,4,5}, 夏鹏飞^{1,4,5}, 赵磊^{1,4,5*} (1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730099; 2.兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730050; 3.无锡市第二人民医院, 江苏 无锡 214000; 4.甘肃中医药大学甘肃省高校中藏药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; 5.甘肃省道地药材质量标准化技术研究与推广工程实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 基于血清药物化学、网络药理学和体外实验验证, 阐明芍药甘草汤(Shaoyao-Gancao decoction, SGD)治疗痉挛性疾病的关键质量属性。方法 采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对 SGD 体内入血移行成分进行分析鉴定; 利用 Cytoscape 构建“入血成分-解痉靶点-通路”网络图, 筛选 SGD 解痉核心功效成分; 通过离体肠平滑肌实验对核心成分进行验证, 明确 SGD 解痉功效的关键质量属性。结果 据高分辨质谱提供的精确分子量和碎片离子信息, 结合对照品比对和相关文献报道, 共鉴定出 17 个 SGD 入血原型成分, 分别为氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、异甘草苷、甘草苷、甘草酸、苯甲酰芍药苷、甘草查尔酮 B、芒柄花苷、异甘草素、甘草素、甘草查尔酮 A、甘草查尔酮 C、光甘草定、甘草次酸、没食子酸。网络药理学预测 SGD 中光甘草定、甘草素、芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷度值较高, 可能通过 GRIN2A、VCP、ABCB1、CYP2C9、CYP3A4、CHRNA2、SNCA 等靶点, 作用于药物代谢-细胞色素 P450、神经活性配体-受体相互作用、cAMP、钙信号通路等发挥解痉作用。生物活性测定结果表明, 芍药苷、甘草素、芍药内酯苷、光甘草定和苯甲酰芍药苷均可降低乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)引起的离体肠平滑肌收缩张力, 是 SGD 解痉功效的关键质量属性, 其中芍药苷和甘草素解痉效果较强, 与 Ach 模型组比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 本实验构建经典名方芍药甘草汤关键质量属性筛选方法, 明确 SGD 解痉功效的关键质量属性, 为 SGD 的精准质量控制及其产品二次开发提供实验依据。

关键词: 芍药甘草汤; 经典名方; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 血清药物化学; 网络药理学; 痉挛; 关键质量属性

中图分类号: R961

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)06-0721-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222666

引用本文: 续艳丽, 李少泓, 李坚, 等. 经典名方芍药甘草汤解痉功效的关键质量属性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 721-729.

Research on Key Quality Attributes of Spasmolysis Effect of the Famous Classical Formula Shaoyao Gancao Decoction

XU Yanli^{1,2}, LI Shaohong³, LI Jian², LI Xiaochun², ZHU Renyuan², ZHANG Qili¹, WU Xiaoyu^{1,4,5}, DUAN Wenda^{1,4,5}, XIA Pengfei^{1,4,5}, ZHAO Lei^{1,4,5*} (1.College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730099, China; 2.Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China; 3.Wuxi No.2 People's Hospital, Wuxi 214000, China; 4.Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines, College of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 5.Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate the critical quality attributes of Shaoyao Gancao decoction(SGD) in the treatment of spasmodic diseases based on serum pharmacochemistry, network pharmacology and isolated intestinal smooth muscle contraction experiments. **METHODS** The blood migration components in SGD were analyzed and identified by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. Cytoscape software was used to construct the network diagram of “blood components-spasmolytic target-pathway” and screen the core functional components of SGD in spasmolytic. The core components were verified by isolated intestinal smooth muscle test, and the critical quality attributes of SGD spasmolytic efficacy were clarified. **RESULTS** According to the accurate molecular weight and fragment ion information provided by high resolution mass

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160457); 兰州市科技计划项目(2021-1-185); 甘肃省药品监督管理局科研项目(2020GSMPA027); 甘肃省自然科学基金项目(21JR7RA564); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金(zzy-2022-07)

作者简介: 续艳丽, 女, 博士生, 高级工程师 E-mail: 864093439@qq.com *通信作者: 赵磊, 女, 博士, 教授 E-mail: 549089096@qq.com

spectrometry, combined with standard substance comparison and relevant literature reports, a total of 17 SGD prototype components were identified, included oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, isoliquiritin, liquiritin, glycyrrhizic acid, benzoylpaeoniflorin, licochalcone B, ononin, liquiritigenin, iso liquiritigenin, licochalcone A, licochalcone C, glabridin, glycyrrhetic acid, gallic acid. Network pharmacology predicted that the key SGD antispasmodic active ingredients of glabridin, liquiritigenin, albiflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin may exert antispasmodic effects through GRIN2A, VCP, ABCB1, CYP2C9, CYP3A4, CHRN2, SNCA and other targets, acting on drug metabolism-cytochrome P450, neuroactive ligand-receptor interactions, cAMP, calcium signaling pathway, etc. Verification tests showed that the glabridin, liquiritigenin, albiflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin could reduce the maximum contractile evoked by acetylcholine, and albiflorin and paeoniflorin exerted significant spasmolytic effects with the inhibitory response for acetylcholine evoked contraction ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** The critical quality attributes of SGD antispasmodic efficacy are determined by establishing the screening method of the classic decoction standard, which provide experimental basis for the accurate quality control of SGD and the secondary development of SGD products.

KEYWORDS: Shaoyao Gancao decoction; classic prescription; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; serum pharmacochrometry; network pharmacology; spasticity; critical quality attributes.

芍药甘草汤(Shaoyao Gancao decoction, SGD)最早记载于医圣张仲景的《伤寒论》,由芍药、甘草 2 味药等比例组成,组方精简,临床疗效确切,主治经筋挛急、脘腹疼痛等症^[1]。后世医家将此方视为治疗脚挛急的基础方,并不断拓展其临床应用,将此方用于治疗其他痉挛性疾病,如胃肠痉挛、面肌痉挛、脑卒中后痉挛等^[2]。现代药理和临床研究证实^[3-5],芍药甘草汤具有显著的解痉、抗炎、镇痛等作用,对多种痉挛性疾病、疼痛性疾病、炎症性疾病以及支气管哮喘、帕金森病、便秘等都有显著的治疗作用,现收载于《古代经典名方目录(第一批)》^[6]。经典名方是指目前仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医籍所记载的方剂。国家近年对经典名方的研发提出“免药效、免临床”等利好政策^[7-8]。

质量是一切产品的生命线,药品关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)^[9]系指影响药品安全性、有效性或一致性的,保持在一定的限度、范围或分布的物理、化学或生物活性特征。目前,经典名方质量概貌研究主要以出膏率、含量测定、指纹或特征图谱等为指标确定关键质量属性^[9-12],但与有效性之间无明确关联。血清药物化学^[13]认为中药所含成分复杂,但只有被吸收入血的成分才能发挥作用。网络药理学^[14]基于系统生物学的理论,能够整体性、系统性地反映中药复方潜在有效成分与多靶点的作用关系及作用机制。借助现代检测技术手段和方法,辨识基于有效性的关键质量属性,是中药复方开发利用的关键。因此,本研究基于入血成分,通过网络药理学从微观角度挖掘 SGD 解痉功效的关键质量属性,并通过客观、便捷的生物活性测定方法进行确认,可用于经典名方芍药甘草汤的质量控制及其产品开发,也可为中药复方及经典名方关键

质量属性研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Vanquish UPHLC 超高效液相色谱仪(美国赛默飞公司); Q-Exactive 高分辨质谱仪(美国赛默飞公司),带加热电喷雾电离(heated electrospray ionization, HESI)探针的 API 离子源、Xcalibur 和 Mass Frontier 8.0 软件; MS205DU 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q IQ7000 超纯水系统(德国默克密理博公司); X1R 高速冷冻离心机(美国赛默飞公司); PowerLab 肌肉张力换能器、ML870 生物信号处理系统均购自澳大利亚 ADInstruments 公司。

1.2 试药

白芍(批号: 21022301; 产地: 安徽)和炙甘草(批号: 20092201; 产地: 安徽)饮片均购自甘肃陇峰药业有限公司,经兰州市食品药品监督管理局朱仁愿高级工程师鉴定均为正品。各饮片均符合中国药典 2020 年版项下性状要求,其白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根切片,炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的甘草根和根茎切片的加工炮制品。SGD 水煎液制备方法: 取白芍、炙甘草各 55.2 g, 加 10 倍量的水煎煮 1 h 过滤,滤渣再加 10 倍量的水煎煮 1 h,合并滤液,浓缩制成 1 g·mL⁻¹ 生药的水煎液,即得。

对照品异甘草素(纯度: 99.04%; 批号: 20112401)、光甘草定(纯度: 99.08%; 批号: 18083001)、甘草查尔酮 A(纯度: 98.89%; 批号: 19102406)、甘草查尔酮 B(纯度: 93%; 批号: 20121501)、甘草素(纯度: 99.86%; 批号: 17112302)、异甘草苷(纯度: 99.95%; 批号: 20042301)、氧化芍药苷(纯度: 99.67%; 批号: 19120604)、芍药内

酯苷(纯度: 98.75%; 批号: 19122302)、芒柄花苷(纯度: 98%; 批号: 19071501)、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖(纯度: 98%; 批号: 19010904)、苯甲酰芍药苷(纯度: 99.43%; 批号: 19103002)均由成都格利普生物科技有限公司提供。甘草酸铵(纯度: 94.4%; 批号: 110731-202021)、甘草次酸(纯度: 99.06%; 批号: 110723-201715)、芍药苷(纯度: 94.6%; 批号: 110736-202044)、没食子酸(纯度: 91.5%; 批号: 110831-201906)、甘草苷(纯度: 95.0%; 批号: 111610-201908)由中国食品药品检定研究院提供。氯化乙酰胆碱(acetylcholine, Ach, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C13127991)。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 水为 Milli-Q 超纯水, 其他化学试剂为分析纯。

台氏液(NaCl 120.6 mmol·L⁻¹、KCl 5.9 mmol·L⁻¹、CaCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹、NaH₂PO₄ 1.2 mmol·L⁻¹、NaHCO₃ 15.4 mmol·L⁻¹、葡萄糖 11.5 mmol·L⁻¹、MgCl₂ 1.2 mmol·L⁻¹, pH=7.4)^[7]每次实验时需新鲜配制。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量(220±20)g, 由中国农业科学研究院兰州兽医研究所提供, 生产许可证号: SCXK(甘)2020-0002。动物饲养于适宜的温度、湿度环境中, 自由进食饮水。

2 方法与结果

2.1 SGD 血清药物化学研究

2.1.1 含药血浆的制备 SD 雄性大鼠适应性饲养 3 d 后, 将其随机分为空白组和给药组, 每组 6 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。给药组按 24 g·kg⁻¹ 生药量灌胃给予 SGD 水煎液, 空白组灌胃相应量的双蒸水。灌胃 1 h 后腹动脉取血于预先涂有 1% 肝素钠生理盐水的 EP 管中, 离心 10 min(3 500 r·min⁻¹), 取上清液, 得到血浆样品, -80 °C 冷冻保存。

2.1.2 血浆样品预处理 首先将 6 只大鼠的空白血浆和含药血浆分别涡旋混合, 取混合后的空白及含药血浆各 200 μL 加入 600 μL 甲醇, 涡旋 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液于 37 °C 水浴中通 N₂ 吹干, 残渣用 100 μL 甲醇溶解, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液供分析使用。

2.1.3 对照品溶液制备 分别精密称取异甘草素、光甘草定、甘草查尔酮 A、甘草查尔酮 B、甘草素、异甘草苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芒柄花苷、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷、甘草酸铵、甘草次酸、芍药苷、没食子酸、

甘草苷对照品适量, 加甲醇制成适宜质量浓度的对照品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 色谱条件 Thermo Scientific Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 5%A; 2~42 min, 5%→95%A; 42~47 min, 95%A; 47~47.1 min, 95%→5%A; 47.1~50 min, 5%A); 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C; 进样量 4 μL。

2.1.5 质谱条件 正离子模式检测条件: 离子源 HESI-II; 毛细管电压 3.5 kV; 源内温度 350 °C; 毛细管温度 320 °C; 扫描范围 *m/z* 100~1 500; S-lens 为 60; 鞘气流速 35 arb; 辅助气流速 10 arb; 扫描模式 Full MS/dd-MS²; 分辨率 Full MS 模式 70 000; 分辨率 dd-MS² 模式 17 500。

负离子模式检测条件: 离子源 HESI-II; 毛细管电压 3.2 kV; 源内温度 350 °C; 毛细管温度 320 °C; 扫描范围 *m/z* 100~1 500; S-lens 为 60; 鞘气流速 35 arb; 辅助气流速 10 arb; 扫描模式 Full MS/dd-MS²; 分辨率 Full MS 模式 70 000; 分辨率 dd-MS² 模式 17 500。

2.1.6 SGD 入血原型成分的确定 采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 在“2.1.4”和“2.1.5”色谱和质谱条件下对空白溶液、含药血浆样品溶液、对照品溶液分别进样分析, 得正、负离子模式下的总离子流图, 见图 1。据高分辨质谱提供的精确分子量和碎片离子信息, 结合对照品比对和相关文献报道对灌服 SGD 后的大鼠血浆进行入血成分分析, 共鉴定出 17 个入血成分, 各化学成分保留时间、准分子离子峰的质荷比的理论值和实测值、碎片离子等数据见表 1^[15-21]。

2.2 SGD 解痉关键功效成分的网络药理学研究

2.2.1 入血成分解痉候选靶点筛选 在 SwissTarget Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), ChEMBL(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 3 个数据库筛选 SGD 入血成分的潜在作用靶点。将各数据库筛选出的靶点合并, 除去重复靶点, 共得到 494 个 SGD 入血成分靶点。

2.2.2 痉挛疾病靶点的获取 以“Spasm”“Spasms”“Muscular spasm”“Muscle spasms”为关键词, 通过 TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)、DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>)、GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)和 OMIM(<https://omim.org/>)

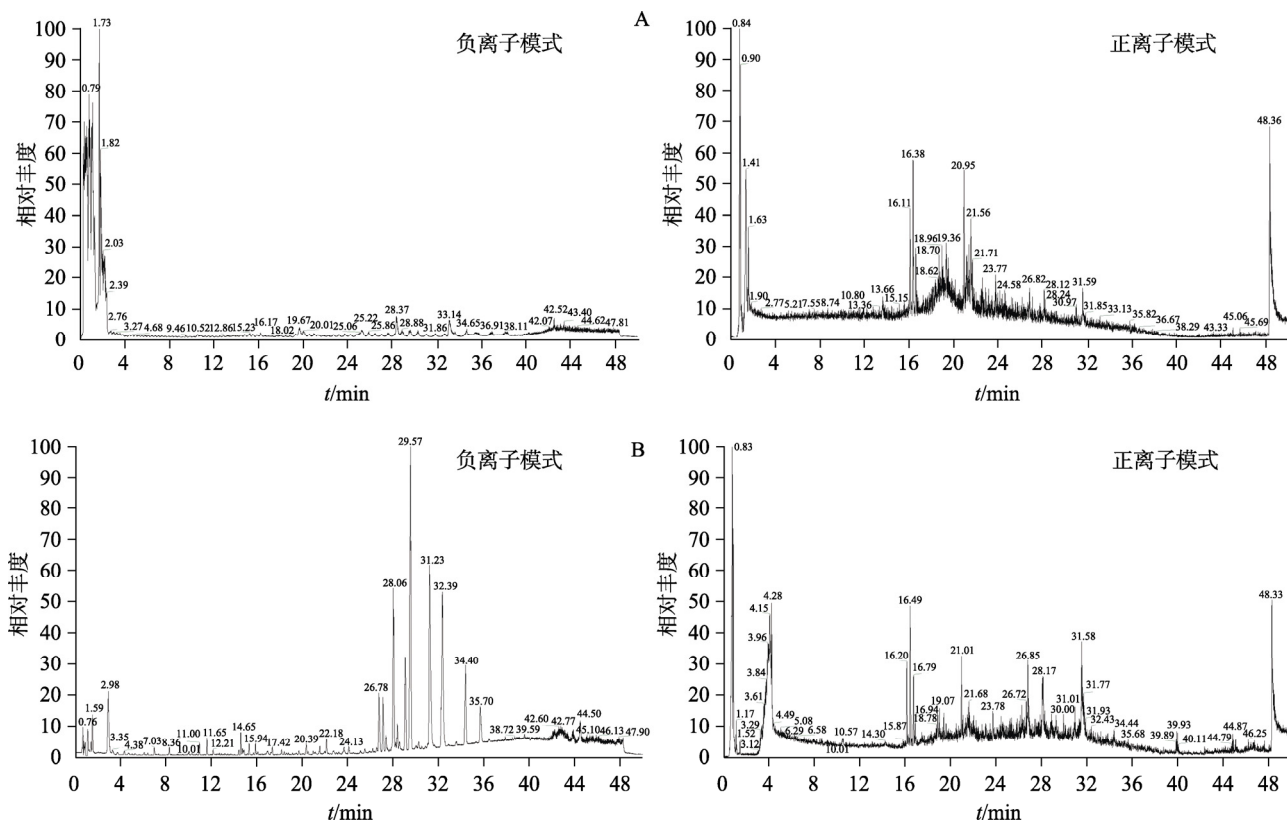


图1 大鼠空白血浆(A)和含药血浆(B)在正、负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of rat blank serum (A) and serum (B) after administration in positive and negative ion modes

org/)药物靶标数据库检索获取疾病靶点,整合查找结果并删除重复的靶点,获得痉挛疾病相关靶点376个。

2.2.3 SGD解痉潜在靶点 运用 Venny 2.1.0 平台将 SGD 入血成分作用靶点与痉挛疾病靶点进行映射取交集,得到 28 个 SGD 活性成分治疗痉挛性疾病的潜在靶点。

2.2.4 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络 为进一步获得候选靶点的相互作用,采

用 Cytoscape3.7.0 软件中的 BiosGenet 和 CytoNCA 插件,于 DIP、BIOGRID、HPRD、INTACT、MINT 和 BIND 数据库中建立 SGD 入血成分解痉 28 个潜在靶点的 PPI 网络,并对网络节点的拓扑属性进行了分析筛选。筛选策略见图 2。结果显示 GRIN2A、VCP、ABCB1、CYP2C9、CYP3A4、CHRNA2 和 SNCA 的 Dgree 值较高,可能在 SGD 治疗痉挛疾病中起主要作用。

图 2 黑色矩形边框的 PPI 网络设置 DC744 得

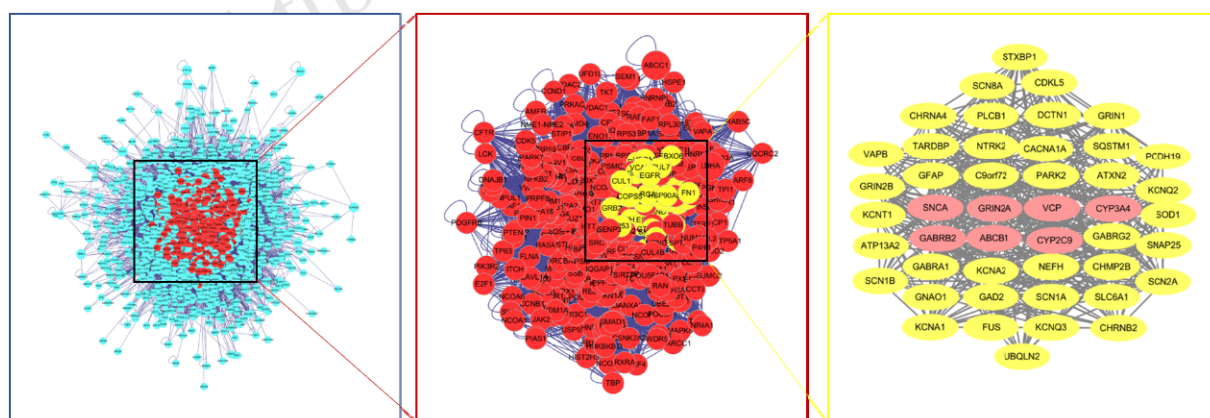


图2 PPI网络拓扑分析结果

Fig. 2 Network topology analysis of PPI

表 1 正、负离子模式下的 SGD 入血成分化合物的质谱信息

Tab. 1 Characterization of absorbed components of SGD at positive and negative mode

序号	保留时间/min	分子式	鉴定结果	理论值 m/z	测量值 m/z	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	来源
1	5.30	$C_{23}H_{28}O_{12}$	氧化芍药苷*	495.150 80	495.150 51	M-H	-0.59	465.138 92[M-H-CH ₂ O] ⁻ , 165.054 66[M-H-CH ₂ O-HA-Glc] ⁻ , 137.022 78[HA-H] ⁻	白芍 ^[15-16]
2	7.59	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药内酯苷*	479.155 88	479.155 27	M-H	-1.27	449.144 65[M-H-CH ₂ O] ⁻ , 327.108 70[M-H-CH ₂ O-BA] ⁻ , 165.054 32[M-H-CH ₂ O-BA-Glc] ⁻	白芍 ^[15-16]
3	7.61	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药苷*	479.155 88	479.155 33	M-H	-1.15	449.144 41[M-H-CH ₂ O] ⁻ , 327.108 75[M-H-CH ₂ O-C ₆ H ₅ COOH] ⁻ , 165.054 76[M-H-CH ₂ O-BA-Glc] ⁻ , 121.027 92[BA-H] ⁻	白芍 ^[16]
4	8.17	$C_{21}H_{22}O_9$	异甘草苷*	417.119 11	417.118 80	M-H	-0.74	255.065 96[M-H-Glu] ⁻ , 135.007 20[M-H-Glu-C ₈ H ₈ O] ⁻ , 119.048 66[C ₈ H ₈ O-H] ⁻	甘草 ^[17]
5	8.28	$C_{21}H_{22}O_9$	甘草苷*	417.119 11	417.119 81	M-H	1.68	255.065 73[M-H-Glu] ⁻ , 135.007 29[M-H-Glu-C ₈ H ₈ O] ⁻ , 119.048 79[C ₈ H ₈ O-H] ⁻	甘草 ^[17]
6	9.13	$C_{41}H_{32}O_{26}$	1,2,3,4,6- <i>O</i> -五没食子酰葡萄糖*	939.110 90	939.110 17	M-H	-0.78	787.099 00[M-H-C ₇ H ₅ O ₄] ⁻ , 617.078 43[M-H-2C ₇ H ₅ O ₄] ⁻ , 465.067 26[M-H-3C ₇ H ₅ O ₄] ⁻ , 447.056 30[M-H-4C ₇ H ₅ O ₄] ⁻	白芍 ^[17]
7	12.10	$C_{42}H_{62}O_{16}$	甘草酸*	821.396 51	821.396 97	M-H	0.56	803.390 08[M-H-H ₂ O] ⁻ , 759.396 48[M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 469.331 60[M-H-2GlcA] ⁻	甘草 ^[18]
8	15.07	$C_{30}H_{32}O_{12}$	苯甲酰芍药苷*	583.182 10	583.181 34	M-H	-1.30	283.045 84[M-H-Bz-Glc] ⁻ , 165.054 76[M-H-2Bz-Glc] ⁻ , 121.027 94[Bz-H] ⁻	白芍 ^[17]
9	16.09	$C_{16}H_{14}O_5$	甘草查尔酮 B*	287.091 40	287.090 85	M+H	-1.92	269.080 14[M-H-OH] ⁻ , 193.049 48[M-H-C ₆ H ₅ O] ⁻ , 121.028 54[BA-H] ⁻	甘草 ^[19]
10	16.14	$C_{22}H_{22}O_9$	芒柄花苷*	431.133 66	431.133 36	M+H	-0.70	269.080 56[M+H-C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁻ , 254.057 10[M+H-C ₆ H ₁₁ O ₅ -O] ⁻	甘草 ^[19]
11	16.29	$C_{15}H_{12}O_4$	异甘草素*	255.066 28	255.066 19	M-H	-0.35	135.007 17[M-H-C ₈ H ₈ O] ⁻ , 119.048 56[C ₈ H ₈ O-H] ⁻	甘草 ^[19]
12	17.46	$C_{15}H_{12}O_4$	甘草素*	255.066 28	255.066 21	M-H	-0.27	135.007 37[M-H-C ₈ H ₈ O] ⁻ , 119.048 77[C ₈ H ₈ O-H] ⁻	甘草 ^[19]
13	22.04	$C_{21}H_{22}O_4$	甘草查尔酮 A*	337.144 53	337.144 78	M-H	0.74	321.113 25[M-H-OH] ⁻ , 305.118 38[M-H-2OH] ⁻ , 229.086 67[M-H-2OH-C ₆ H ₅] ⁻	甘草 ^[20]
14	22.04	$C_{21}H_{22}O_4$	甘草查尔酮 C	337.144 53	337.144 62	M-H	0.27	305.118 38[M-H-2OH] ⁻ , 229.086 79[M-H-2OH-C ₆ H ₅] ⁻ , 161.059 91[M-H-2OH-C ₆ H ₅ -C ₅ H ₉] ⁻	甘草 ^[17]
15	23.28	$C_{20}H_{20}O_4$	光甘草定*	323.128 57	323.128 72	M-H	0.46	213.091 20[M-H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁻ , 201.091 08[M-H-C ₆ H ₆ O ₂ -C] ⁻ , 135.043 56[M-H-C ₆ H ₆ O ₂ -C-C ₅ H ₉] ⁻	甘草 ^[20]
16	27.72	$C_{30}H_{46}O_4$	甘草次酸*	471.346 89	471.345 89	M+H	-2.12	407.328 74[M+H-HCOOH-H ₂ O] ⁺ , 235.168 52[M+H-C ₁₅ H ₂₄ O ₂] ⁺ , 189.163 67[M+H-C ₁₅ H ₂₄ O ₂ -HCOOH] ⁺	甘草 ^[17]
17	48.28	$C_7H_6O_5$	食子酸*	169.014 25	169.014 68	M-H	2.54	125.022 90[M-H-CH ₂ O] ⁻ , 107.012 76[M-H-CH ₂ O-OH] ⁻	白芍/甘草 ^[21]

注: *通过对照品比对确认。

Note: *Confirmed by comparison of reference materials.

到红色边框内的网络,再按照 DC>148, BC>164, CC>0.534, Eigenvector>0.40, LAC>17.03, Network>18.82 获得黄色矩形边框内的核心 PPI 网络。

2.2.5 功能富集和通路分析 将 SGD 入血成分解痉候选靶点导入 David 6.8 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>), Select identifier 设置为 official gene symbol, List type 设置为 gene list, 限定物种为

homo sapiens, 阈值 $P<0.05$, 进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。选 P 值较小的前 10 个通路进行可视化, 结果见图 3。SGD 治疗痉挛性疾病潜在基因靶点主要富集的相关通路为药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对异生物质的代谢、神经活性配体-受体相互作用、化学致癌、亚油酸代谢、cAMP 信号通路、钙信号通路等。根据 KEGG 分析结果并

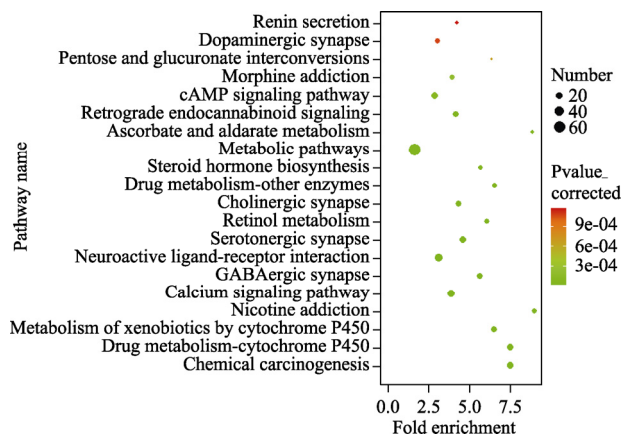


图3 KEGG分析
Fig. 3 KEGG analysis

结合既往痉挛发病机制相关研究报道,认为SGD可能主要通过药物代谢-细胞色素P450、神经活性配体-受体相互作用、cAMP信号通路和钙信号通路等多途径、多通路的调节过程,发挥解痉作用。

2.2.6 “入血成分-解痉靶点-通路”网络图的构建与分析 将SGD解痉候选靶点及对应的入血成分、前10条通路导入Cytoscape 3.7.0软件,构建“入血成分-解痉靶点-通路”网络图,见图4。图4中菱形为入血成分,圆形为靶点,箭头为通路,黄色菱形光甘草定(Degree=161)、甘草素(Degree=142)、芍药内酯苷(Degree=106)、芍药苷(Degree=93)和苯甲酰芍药苷(Degree=83)分度值较高,可能是SGD解痉关键活性成分。

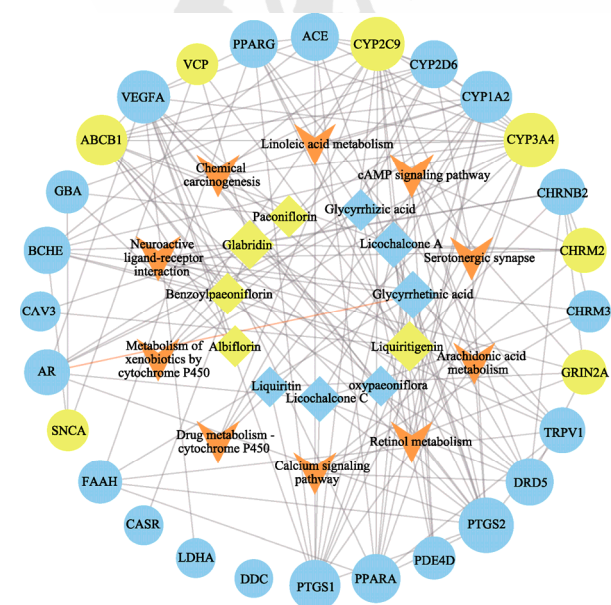


图4 SGD解痉“入血成分-解痉靶点-通路”网络图
Fig. 4 “Absorbed components-spasmolytic target-pathway” network diagram of SGD

2.3 体外试验验证

2.3.1 大鼠离体肠段制备 实验前大鼠禁食24 h,自由饮水。实验时用颈椎脱臼法处死实验大鼠,迅速剖开腹腔取出小肠段,用台氏液将其冲洗干净。剪取小肠肠段(1.5 cm),上端与肌肉张力换能器连接,下端固定在肌槽底部的弯钩上,置于盛有台氏液的肌槽中,赋值1.0 g,恒温(37±0.5)℃,以每秒1~2个气泡的速度持续通入新鲜氧气,小肠平滑肌收缩活动及变化信号经张力换能器连至BL-420生物机能实验多道生理信号采集处理系统。

2.3.2 对Ach致大鼠离体小肠平滑肌痉挛作用的影响 取“2.3.1”项下制备的肠段放入恒温平滑肌槽温育1 h后,记录正常曲线。采用1 mmol·L⁻¹ Ach建立大鼠小肠平滑肌收缩模型,致小肠收缩达到最大,2 min后以累积加药的方式,分别比较实验前期筛选的光甘草定、甘草素、芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷5种成分,以及不同浓度SGD对Ach致大鼠离体小肠平滑肌痉挛模型的影响。另设对照组给予空白溶剂。每组实验重复6次。结果见图5~6。以平均张力为指标观察,应用GraphPad Prism 8.0.2统计软件处理数据,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

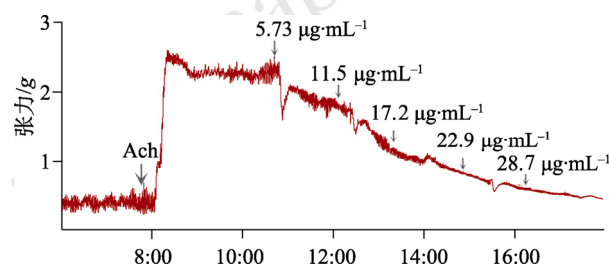


图5 不同浓度甘草素对Ach引起的离体小肠平滑肌张力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Effects of different concentration groups of licorice on the contractile amplitude of isolated small intestinal strip induced by Ach($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

结果显示,芍药苷(图6A)、甘草素(图5,图6B)累积给药后,平均张力均减小,与Ach模型组比较,芍药苷(11.7~29.3 μg·mL⁻¹)和甘草素(17.2~28.7 μg·mL⁻¹)可显著降低Ach致离体肠平滑肌最大收缩力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并具有浓度依赖性。SGD浓度在30.0~50.0 mg·mL⁻¹对Ach致大鼠离体小肠平滑肌痉挛模型具有显著的舒张作用,其发挥解痉作用的主要物质为芍药苷和甘草素,芍药内酯苷、光甘草定和苯甲酰芍药苷也协同发挥解痉作用。结果见图6。

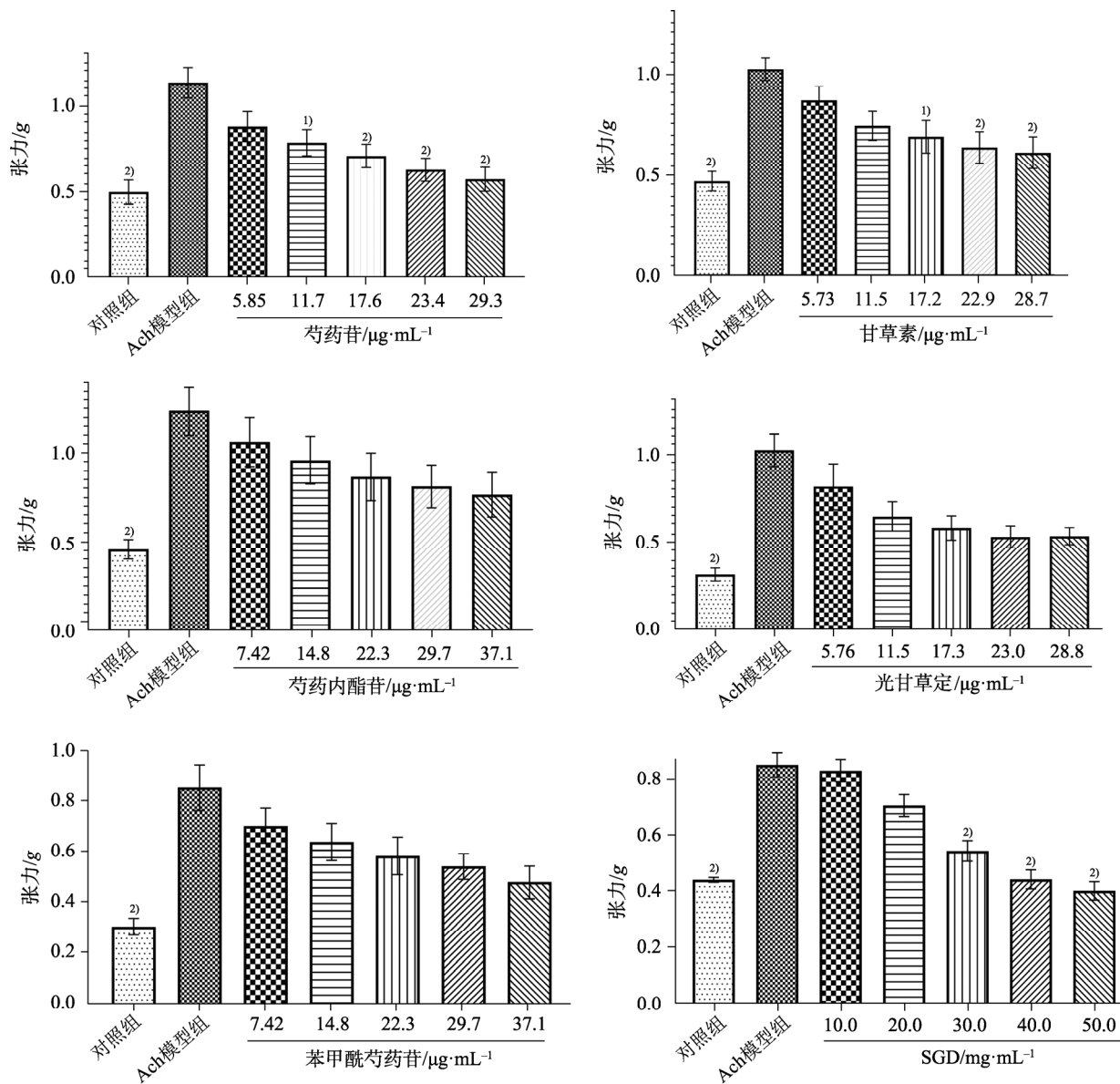


图6 不同药物浓度对ACh引起的离体小肠平滑肌痉挛模型的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
与ACh模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effects of different concentration groups on the contractile amplitude of isolated small intestinal strip induced by ACh ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with the ACh model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3 讨论

本研究基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术获得光甘草定、异甘草素、甘草查尔酮A、甘草查尔酮B、甘草素、异甘草苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芒柄花苷、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷、甘草酸铵、甘草次酸、芍药苷、没食子酸、甘草苷等17个SGD入血原型成分。借助网络药理学方法,初步预测光甘草定、甘草素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷等5个成分对治疗痉挛性疾病起主要作用。生物活性测定结果表明,芍药苷、甘草素、芍药内酯苷、

光甘草定和苯甲酰芍药苷均可降低ACh引起的离体肠平滑肌收缩张力,其中芍药苷和甘草素解痉效果较强,与ACh模型组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),进一步印证了入血成分和网络药理学的预测分析。有研究表明,光甘草定是一种多酚类黄酮,可通过激活大电导钙激活钾通道(BKCa通道)和抑制磷酸二酯酶而松弛血管平滑肌,也可通过p38/MAPK通路抑制动脉粥样硬化模型兔动脉MLCK表达而减平滑肌细胞的收缩程度^[22-23]。甘草素和异甘草素互为同分异构体,有研究^[24-25]发现异甘草素和甘草素对KCl、乙酰胆

碱或磷酸组胺引起离体肠平滑肌收缩有抑制作用,并呈一定的量效关系。芍药苷具有显著的镇痛、镇静、抗惊厥作用,已有研究证实芍药苷对大鼠输精管附睾部和前列腺部平滑肌的强直性收缩具有抑制作用;对豚鼠、大鼠的离体肠管和在体胃运动以及大鼠子宫平滑肌具有抑制作用,并能拮抗催产素对子宫引起的收缩^[26-28]。因此,芍药苷、甘草素、芍药内酯苷、光甘草定和苯甲酰芍药苷可作为SGD解痉功效的关键质量属性,通过多靶点、多通路作用于痉挛疾病,从而发挥中药协同作用的优势。其潜在分子机制可能与药物代谢-细胞色素P450、神经活性配体-受体相互作用、cAMP信号通路、钙信号通路有关,涉及平滑肌收缩、药物分解、氧化还原等多个生物学过程。

总之,经典名方SGD临床疗效确切,深受广大患者欢迎,但存在药效物质基础不明确、质量控制标准不完善、药物疗效缺乏稳定性等弊端,难以满足现代临床用药要求。整合血清药物化学、网络药理学和生物学方法阐明SGD解痉关键质量属性,可用于经典名方的质量控制,还可促进SGD传统产品的二次开发与新药研发,满足以“精品传承经典、以价值带动市场”的经典名方研究核心理念。

REFERENCES

- [1] 熊曼琪. 伤寒论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 80-81.
- [2] QU Y Z, MA S J, ZHU G W, et al. Historical evolution and modern research on Shaoyao Gancaotang[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(6): 216-225.
- [3] WU L F, LI Y T, TANG Y Z, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Shaoyao Gancan decoction[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2021, 44(6): 1354-1360.
- [4] HUI C Y, LI X D, LI H F, et al. Analysis of Shaoyao Gancan decoction based on ancient literatures[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis(中西医结合肝病杂志), 2022, 32(5): 432-435.
- [5] 陈平, 曾瑾, 杨安东, 等. 古代经典名方芍药甘草汤的处方及关键信息考证[J/OL]. 中药药理与临床, 2020-05-24. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20210524.001>.
- [6] 国家中医药管理局. 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知》[EB/OL]. (2018-04-13) [2021-11-04]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [7] JIANG Y Q, FANG Y T, LI Q T, et al. Discussion on the rationality of the clinical research and the immune efficacy of the ancient classical prescription[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(5): 710-714.
- [8] ZHAO Y X, CHEN X Q, WANG J W, et al. Exploration and research on the efficacy evaluation model of classic famous prescriptions under the integrated medical system[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2022, 33(4): 933-936.
- [9] GUAN Y G, LUO G, GAO X Y, et al. Study on critical quality attributes of classical prescription substance benchmarks of Taohe Chengqi Decoction[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(8): 2267-2275.
- [10] ZHAO Z F, ZOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription Huanglian Decoction and determination of the contents of 6 components[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.
- [11] SHANG B X, ZHAO Z X, CENG Q, et al. Research on key quality attributes of substance benchmark of the famous classical formula Kai-Xin-San[J/OL]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022-05-24. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20220520.301>.
- [12] LIU J T, ZHAO H P, ZHU Q, et al. Study on critical quality attributes of Qingjin Huatan Decoction based on serum pharmacochemistry[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(5): 1392-1402.
- [13] WU X W, HAO Y Y, NIE C X, et al. An overview of methodology and research progress on application of serum pharmacochemistry of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(3): 173-179.
- [14] ZHUANG Y S, CAI B C, ZHANG Z L. Application progress of network pharmacology in traditional Chinese medicine research[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2021, 37(1): 156-160.
- [15] HE J, GAO X X, TIAN J S, et al. Analysis on chemical constituents in Bupleuri Radix and Paeoniae Radix Alba by UPLC-MS and their contribution to Xiaoyao powder[J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2018, 49(4): 375-382.
- [16] WANG Q, LI L T, MA Y B, et al. Comparative study on chemical composition and pharmacological action of Radix Paeoniae Alba and Radix Paeoniae Rubra and predictive analysis of quality markers[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(12): 1093-1098.
- [17] ZHANG L, WANG Y, ZHANG C, et al. Analysis of chemical constituents in daishenning by HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(13): 137-145.
- [18] XU L L, LIU B, WANG F, et al. Rapid characterization of chemical constituents and rat metabolites of Fufang Gancan tablets by UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(22): 4534-4540.
- [19] JI W L, ZHOU Z H, WANG T T, et al. Identification of chemical constituents in Banxia Xiexin decoction based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(10): 1736-1750.
- [20] CUI Y Y, ZHOU Y F, MA Y Q, et al. Differences analysis of

- chemical composition of raw and fried *Glycyrrhiza uralensis* based on UPLC-QTOF-MS[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31(9): 1049-1053.
- [21] XU W T, HUO Z P, LEI L, et al. Chemical constituent cluster of decoction of Sanguisorbae Radix by HPLC-IT-TOF/MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(6): 1277-1288.
- [22] GÜVEN C, PARLAR A. Glabridin relaxes vascular smooth muscles by activating BKCa channels and inhibiting phosphodiesterase in human saphenous vein[J]. Curr Med Sci, 2021, 41(2): 381-389.
- [23] WANG G X, WANG Y, DING J L, et al. Regulation of glabridin on the expression of MLCK in endothelial cells through the pathway of p38/MAPK in the artery wall of atherosclerotic rabbits[J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2017, 52(3): 309-313.
- [24] LI H D, LI K, WU S H, et al. Analysis of spasmolytic compositions in Huoxiang Zhengqi liquid[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2012, 23(6): 652-654.
- [25] 陈晓玲. 甘草根中的抗痉挛成分之一: 异甘草素及其作用部位[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(6): 270-271.
- [26] ZHANG Y F, ZHANG Y G, BIAN T T, et al. New progress in pharmacological action of paeoniflorin[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(15): 3735-3740.
- [27] 朱峰, 李永民, 张春晖, 等. 芍药总苷对家兔小肠平滑肌张力的影响[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2011, 27(2): 91-92.
- [28] LUO J R, WANG C M, FU L, et al. Effects of paeoniflorin on contractile activity of rabbit sphincter of oddi muscle rings *in vitro*[J]. J Dalian Med Univ(大连医科大学学报), 2009, 31(6): 668-671.
- 收稿日期: 2022-07-27
(本文责编: 曹粤锋)