·论　著·

基于指纹图谱、多指标定量及网络药理学的大黄质量标志物预测分析

李东辉[1,2]，吴红伟[1,2]，杨新荣[1,2]，李国峰[1,2]，李咸慰[1,2]，宋沁洁[1,2]，李越峰[1,2*](1.甘肃中医药大学，兰州 730000；2.甘肃省中药制药工艺工程研究中心，兰州 730000)

摘要：目的　建立大黄 HPLC 指纹图谱及多指标定量分析方法，结合网络药理学预测大黄潜在质量标志物。**方法**　采用 HPLC 对 20 批掌叶大黄样品中的没食子酸、儿茶素、表儿茶素等 13 种指标性成分进行含量测定，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行相似度分析，以 13 种指标成分含量进行主成分分析、正交偏最小二乘判别分析，采用网络药理学预测大黄相关成分的作用靶点和通路，构建成分-靶点-通路网络图并对核心靶点进行器官定位分析以预测大黄的潜在质量标志物。**结果**　指纹图谱相似度在 0.882~0.998，共确定了 15 个共有峰，大黄素甲醚、儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷是差异化合物，可用于鉴别和区分大黄质量。经筛选得到 15 个化合物，8 个核心靶点，包括 AKT1、TP53、JUN、HSP90AA1、CASP3、EGF、TNF、IL-6，涉及对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、内肽酶活性，涉及脂质和动脉硬化、MAPK 信号传导途径、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、非酒精性脂肪性肝病等通路，并构建成分-靶点-通路图，预测没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等为大黄潜在的质量标志物。**结论**　所建立的大黄指纹图谱特征性强，可用于控制其质量，特征谱和网络药理学分析预测了大黄的质量标志物，这为进一步研究大黄的作用机制提供参考。

关键词：大黄；指纹图谱；差异性成分；网络药理学；质量标志物；靶点；通路

中图分类号：R284.1；R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2023)01-0001-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.001

引用本文：李东辉，吴红伟，杨新荣，等. 基于指纹图谱、多指标定量及网络药理学的大黄质量标志物预测分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 1-9.

Predictive Analysis of Rhei Radix et Rhizoma Quality Markers Based on Fingerprint, Multi-indicator Quantification and Network Pharmacology

LI Donghui[1,2], WU Hongwei[1,2], YANG Xinrong[1,2], LI Guofeng[1,2], LI Xianwei[1,2], SONG Qinjie[1,2], LI Yuefeng[1,2*]
(*1.Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Gansu Province Chinese Medicine Pharmaceutical Process Engineering Research Center, Lanzhou 730000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To establish HPLC fingerprinting and multi-indicator quantitative analysis methods for Rhei Radix et Rhizoma and to predict potential quality markers of it in combination with network pharmacology. **METHODS**　The content of 13 index components, including gallic acid, catechin and epicatechin, was determined in 20 batches of *Rheum palmatum* L. samples by HPLC, and the similarity analysis was performed by using the Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System. The network pharmacology was used to predict the targets and pathways of Rhei Radix et Rhizoma-related components, construct a network diagram of components-targets-pathways and perform organ localization analysis on the core targets to predict the potential quality markers of Rhei Radix et Rhizoma. **RESULTS**　The similarity of fingerprint profiles ranged from 0.882 to 0.998, and a total of 15 common peaks were identified. Emodin-3-methyl ether, catechin, emodin-1-*O*-glucoside, physcion-8-*O*-glucoside and aloe-emodin-8-*O*-glucoside were the differential compounds, which could be used to identify and differentiate Rhei Radix et Rhizome quality. The screening yielded 15 compounds with 8 core targets including AKT1, TP53, JUN, HSP90AA1, CASP3, EGF, TNF, IL-6, involved in response to oxidative stress, response to lipopolysaccharide, endopeptidase activity, involved in lipid and atherosclerosis, MAPK signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications pathways. Non-alcoholic fatty liver disease, and the construction of a component-target-pathway map. Prediction of gallic acid, catechin, aloe-emodin, rhein acid and emodin as potential quality markers of Rhei Radix et Rhizoma. **CONCLUSION**　The established fingerprint profile of Rhei Radix et Rhizoma is highly

基金项目：国家自然科学基金项目(81960713，82160750)；甘肃省教育厅产业支撑计划项目(2021CYZC-21)；甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题(ZYGY202003)；甘肃省科学技术厅-科技计划(创新基地和人才计划)基础研究创新群体项目(21JR7RA569)

作者简介：李东辉，男，硕士生　E-mail: ldhjhy@163.com　*通信作者：李越峰，女，博士，教授　E-mail: 2271221734@qq.com

characterized and can be used to control its quality. The characterization profile and network pharmacological analysis predict the quality markers of Rhei Radix et Rhizoma, which provide a reference for further research on the mechanism of action of Rhei Radix et Rhizoma.
KEYWORDS: Rhei Radix et Rhizoma; fingerprint; differential components; network pharmacology; quality markers; targets; pathways

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum Maxim*. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill.的干燥根及根茎，为中国大宗中药材之一，主要含有蒽醌类衍生物、鞣质类、二苯乙烯苷类等成分，具有泻下、抑菌、止血等药理作用[1]。目前，中药及中药复方由于产地来源不一及化学成分多而复杂导致其质量难以控制。为解决以上问题，刘昌孝院士于 2016 年提出了中药质量标志物概念[2]。中药质量标志物后被归纳为有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍“五原则”[3]。网络药理学是基于系统生物学理论，借助统计学、复杂网络等数学手段，强调对生物系统的网络分析以及反映中药药效成分的理化和生物学性质，在分子水平上诠释中药多成分与机体的网络作用关系，为探索中药复杂作用模式提供了新的视角[4]。中药指纹图谱是指采用一定的分析手段得到能够具有标示其化学特征的色谱图或光谱图，因其具有专属性强、稳定性好、重现性好的特点被用于反映中草药的内在质量及区别其他药材，其主要包括紫外光谱法、红外光谱、核磁共振指纹图谱、高效液相色谱、指纹图谱等[5-6]。当前基于成分-靶点-通路-疾病的网络药理学是预测中药药效的一种重要手段[7]。

鉴于此，本研究首先采用 HPLC 建立 20 批大黄药材指纹图谱，建立大黄中没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 13 种成分的含量测定方法，结合主成分分析(principal component analysis，PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA)区分与比较不同产地的大黄药材。在此基础上，基于中药质量标志物理论，以指纹图谱及网络药理学为研究方法为大黄的质量标志物研究提供借鉴，同时也为全面控制大黄质量奠定一定基础。

1 材料与仪器

1.1 样品

20 批掌叶大黄药材来源于甘肃不同产地，采集于甘肃陇南、陇西、渭源、岷县、漳县、临洮，经甘肃中医药大学王明伟教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.的干燥根及根茎。信息见表 1。

表 1 大黄样品信息

Tab. 1 Rhei Radix et Rhizome sample information

编号	产地	收集时间	编号	产地	收集时间
S1	甘肃漳县	2021.11.23	S11	甘肃岷县	2021.11.25
S2	甘肃漳县	2021.11.23	S12	甘肃宕昌县	2021.11.28
S3	甘肃漳县	2021.11.23	S13	甘肃宕昌县	2021.11.28
S4	甘肃漳县	2021.11.23	S14	甘肃宕昌县	2021.11.28
S5	甘肃漳县	2021.11.23	S15	甘肃礼县	2021.11.28
S6	甘肃渭源县	2021.11.26	S16	甘肃礼县	2021.11.28
S7	甘肃渭源县	2021.11.26	S17	甘肃临洮县	2021.11.21
S8	甘肃岷县	2021.11.25	S18	甘肃临洮县	2021.11.21
S9	甘肃岷县	2021.11.25	S19	甘肃陇西县	2021.11.21
S10	甘肃岷县	2021.11.25	S20	甘肃陇西县	2021.11.21

1.2 试药

色谱级甲醇、色谱级乙腈、色谱级磷酸，购自天津市大茂化学试剂厂；儿茶素(批号：PS020094)、表儿茶素(批号：PS010585)、没食子酸(批号：PS000688)、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(批号：PS010709)、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷(批号：PSO011174)、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷(批号：PS011196)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷(批号：PS010712)、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷(批号：PS011865)、芦荟大黄素(批号：PS010375)、大黄酸(批号：PS010625)、大黄素(批号：PS000264)、大黄酚(批号：PS011322)、大黄素甲醚(批号：PS010626)均购自成都普思生物科技有限公司，对照品质量分数均>98%。

1.3 仪器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；BT125D 型十万分之一天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)；PL-S60 数码超声波清洗机(超声波频率 40 000 Hz，超声波功率 360 W，东莞康士洁

超声波科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)，梯度洗脱：0~15 min，2%→15%A；15~20 min，15%→20%A；20~30 min，20%A；30~60 min，20%→30%A；60~80 min，30%→55%A；80~90 min，55%→75%A；90~95 min，75%→80%A；95~100 min，80%→100%A。进样量 10 μL；检测波长 254 nm；柱温 30 ℃；体积流量 0.8 mL·min^{-1}。

2.2 混合对照品溶液的制备

称取各对照品适量加甲醇配制成含没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚各 0.25，0.90，0.40，0.50，1.50，0.24，0.20，0.66，0.37，0.80，0.35，1.50，0.71 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取各批次药材刮去外皮后粉碎(过 50 目筛)，取样品 1 g，加 25 mL 甲醇，称定质量，超声 40 min，取出冷却，补足减失质量，过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察　吸取“2.2”项下混合对照品溶液，按梯度稀释制成 6 个不同质量浓度的对照品溶液，按“2.1”项下条件测定并记录各色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(y)，对照品质量浓度为横坐标(x)，绘制标准曲线，并进行线性回归，得标准曲线方程见表 2。

2.4.2 仪器精密度试验　取同一供试品溶液，按“2.1”项下条件连续进样 6 次。以稳定性好、分离度高的大黄酚(图 1，25 号峰)为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD<0.9%，各共有峰相对峰面积的 RSD<1.6%。

2.4.3 重复性试验　取大黄粉末 6 份(S1)，每份 1 g，按“2.3”项下方法制备，按“2.1”项条件测定，以大黄酚为参照峰，计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别<2.5%，3%，表明重复性良好。

2.4.4 稳定性试验　取大黄粉末 1 g(S1)，按“2.3”项下方法制备，分别在 0，2，4，8，12，24 h 按“2.1”项下条件测定。以大黄酚为参照峰，结果各共有峰的相对保留时间 RSD<2.0%，相对峰面积 RSD<2.8%。

2.4.5 重复性试验　取样品(S1)粉末 6 份，每份 1 g，按“2.3”项下方法制备，按“2.1”项条件进样并记录峰面积。计算没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的 RSD 值分别为 1.625%，1.644%，1.243%，1.343%，1.212%，1.324%，0.986%，1.548%，1.954%，1.146%，1.015%，1.256%，1.875%。

表 2 线性回归方程

Tab. 2 Regression equation

化合物	回归方程	线性范围/mg·mL^{-1}	r
没食子酸	y=40 049x–283.93	0.015~0.25	0.999 8
儿茶素	y=3 931.7x–10.191	0.02~0.9	0.999 9
表儿茶素	y=5 322.4x+89.668	0.001 5~0.4	0.999 7
芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷	y=9 521x+131.01	0.019~0.5	0.999 7
大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷	y=7 379.4x–8.5262	0.03~1.5	0.999 8
大黄素-1-*O*-葡萄糖苷	y=19 210x–110.77	0.01~0.24	0.999 7
大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷	y=31 696x+9.374	0.008~0.2	0.999 8
大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷	y=7 040.8x+259.5	0.005~0.66	0.999 8
芦荟大黄素	y=40 276x–60.68	0.005~0.37	0.999 8
大黄酸	y=7 334.5x+736.68	0.005~0.8	0.999 6
大黄素	y=41 424x–195.77	0.02~0.355	0.999 8
大黄酚	y=11 929x–38.727	0.06~1.5	0.999 9
大黄素甲醚	y=9 244.4x+20.152	0.016~0.7	0.999 8

2.4.6 加样回收率试验　取已知含量的大黄样品(S1)粉末 0.5 g，平行 6 份分别加入 13 种对照品适量，按“2.3”项制备后进样并记录各成分峰面积。计算没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均加样回收率分别为 99.3%，101.1%，95.3%，97.7%，96.8%，102.8%，103.5%，98.3%，96.9%，104.6%，95.2%，103.6%，101.8%，RSD 值分别为 0.917%，1.65%，1.05%，2.11%，

0.86%，0.74%，0.94%，0.76%，1.26%，1.98%，2.11%，0.84%，2.01%。

2.4.7 样品测定　按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件进样，测定不同样品中没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚- 8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量，大黄样品和混合对照品色谱图见图 1。20 批大黄样品含量测定结果见表 3。

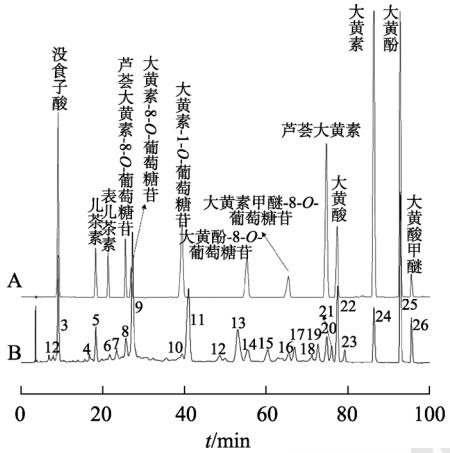

图 1　混合对照品(A)和大黄样品(B)的 HPLC 色谱图

1~26–峰号。

Fig. 1　HPLC chromatogram of mixed reference(A) and Rhei Radix et Rhizoma sample(B)

1-26–peak number.

2.5　指纹图谱的建立及相似度评价

将 20 批样品按“2.3”项下方法制备，按“2.1”项条件测定，将实验数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012A 版进行分析，设 S1 为参照指纹图谱，共 15 个共有峰。经过与对照品的比对，指认了 13 个色谱峰(图 1)，分别为没食子酸(3 号峰)、儿茶素(5 号峰)、表儿茶素(6 号峰)、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(8 号峰)、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷(9 号峰)、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷(10 号峰)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷(14 号峰)、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷(16 号峰)、芦荟大黄素(20 号峰)、大黄酸(22 号峰)、大黄素(24 号峰)、大黄酚(25 号峰)、大黄素甲醚(26 号峰)。大黄样品指纹图谱见图 2。结果各产地大黄样品指纹图谱相似度为 0.882~0.998，S1~S20 相似度依次为 0.975，0.91，0.949，0.987，0.989，0.943，0.991，0.976，0.978，0.911，0.943，0.992，0.994，0.922，0.882，0.985，0.898，0.985，0.912，0.998，表明 20 批样品的整体质量相对稳定，所建立的指纹图谱方法可用于大黄的鉴定和质量控制。

2.6　不同产地大黄样品的比较与区分

为了区分与比较不同产地的大黄样品成分差异，采用 Simca13 版软件以 13 种成分的含量为变量进行 PCA 及 OPLS-DA 分析。

2.6.1　PCA　以测定的 13 种成分含量进行 PCA 分析。根据特征值和贡献率选出主成分，以特征值>1，

表 3　20 批大黄样品 13 种成分含量质量分数(n=3)

Tab. 3　Mass fraction of 13 components in 20 batches of Rhei Radix et Rhizoma samples(n=3)　　mg·g^{-1}

编号	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷	大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷	大黄素-1-*O*-葡萄糖苷	大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷	大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
S1	2.841	5.764	1.491	2.502	15.871	2.343	2.445	4.582	0.781	3.951	1.411	8.253	4.265
S2	2.321	5.615	1.217	2.626	14.458	2.241	2.162	5.872	0.971	3.445	1.916	9.863	3.605
S3	2.779	5.175	1.530	2.519	16.306	3.052	3.713	5.448	1.003	2.143	2.273	7.589	2.836
S4	2.954	6.613	1.716	2.388	16.708	2.282	2.704	5.183	1.474	2.452	1.125	8.411	3.529
S5	3.205	5.234	1.029	2.729	15.393	2.349	2.844	5.205	1.180	3.828	1.649	9.012	3.568
S6	1.031	7.125	1.441	0.871	17.429	0.774	0.705	1.662	1.458	1.863	0.936	15.991	4.823
S7	1.704	8.129	1.065	0.655	15.649	0.679	0.776	2.066	1.579	1.544	1.147	14.026	3.225
S8	1.994	6.985	0.904	3.133	22.633	1.661	2.518	3.013	1.425	10.894	1.933	28.992	2.746
S9	2.399	7.269	0.824	3.380	24.183	2.357	2.849	3.141	1.369	11.199	2.471	29.461	3.312
S10	2.558	8.250	0.905	3.368	20.392	1.606	2.992	3.305	1.231	12.077	2.167	28.963	2.653
S11	2.837	7.316	0.788	2.956	19.618	1.412	2.445	3.214	1.421	11.529	2.032	27.114	3.564
S12	1.133	7.309	2.991	7.004	18.724	1.251	2.909	5.358	0.990	9.215	1.016	11.453	4.857
S13	1.595	4.965	2.823	7.712	20.691	0.951	3.186	4.280	2.395	9.934	1.337	12.504	3.653
S14	2.122	6.644	1.986	6.388	19.314	1.378	2.862	5.290	1.695	8.922	2.150	13.281	2. 922
S15	1.547	5.308	2.059	6.341	17.766	1.037	3.022	4.632	1.532	8.291	1.507	12.430	4.330
S16	1.321	6.696	2.776	6.858	19.667	1.209	2.972	5.068	1.603	8.367	0.982	13.425	3.437
S17	1.787	5.782	1.421	3.731	7.723	0.452	0.493	1.791	0.882	2.918	0.939	7.703	2.589
S18	1.648	5.424	1.469	3.794	7.421	0.675	0.576	1.517	0.598	3.214	1.035	5.697	2.533
S19	1.726	6.329	2.448	2.114	7.451	0.831	0.597	1.619	0.755	4.342	1.159	8.498	2.947
S20	1.807	4.369	1.771	3.047	7.607	0.741	0.685	1.646	0.777	4.032	1.703	6.447	3.745

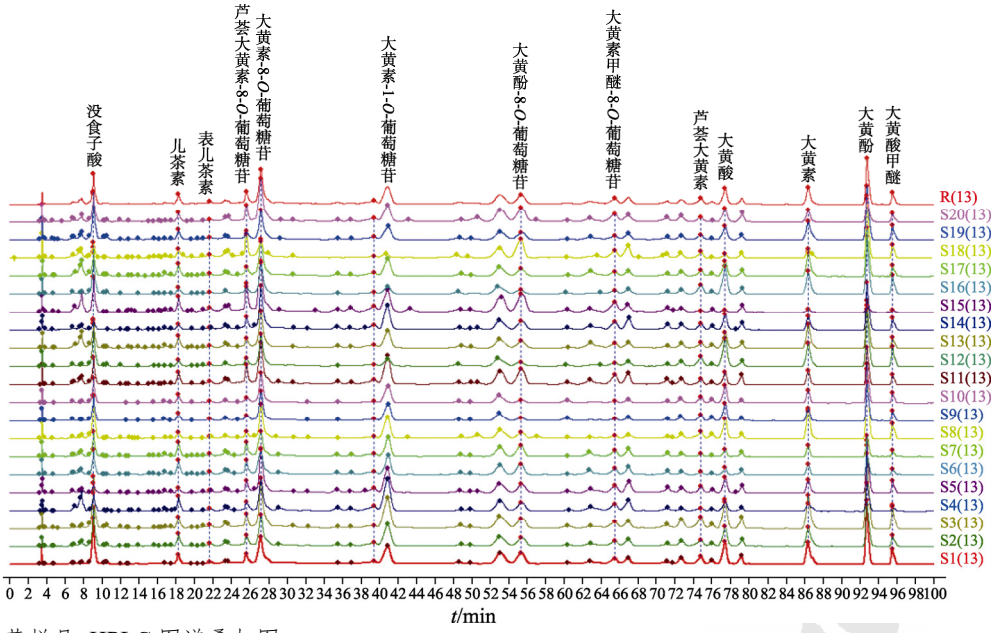

图 2 20 批大黄样品 HPLC 图谱叠加图

Fig. 2 Overlay of HPLC profiles of 20 batches of Rhei Radix et Rhizoma samples

提出的主成分有 3 个，其累积贡献率为 77.775%，其基本包含主要信息能够反映大黄的基本特征，结果见表 4。载荷的绝对值越大，对主成分的贡献越大，矩阵结果见表 5。大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚在第 1 主成分中有明显的载荷值，表儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷在第 2 主成分中有明显的载荷值，大黄素-1-*O*-葡萄糖苷在第 3 主成分中有明显的载荷值。实验结果表明影响大黄质量差异性的是多成分共同决定的结果。由图 3 可以得出，S1~S5 漳县产地大黄为一类，S6~S7 渭源县产地的大黄为一类，S8~S11 岷县产地为一类，S12~S16 宕昌县及礼县产地为一类，S17~S20 陇西县及临洮县产地为一类。

2.6.2 OPLS-DA 分析 OPLS 是一种多因变量对多自变量的回归建模方法，其最大的特点是可以去除自变量 *X* 中与分类变量 *Y* 无关的数据变异，

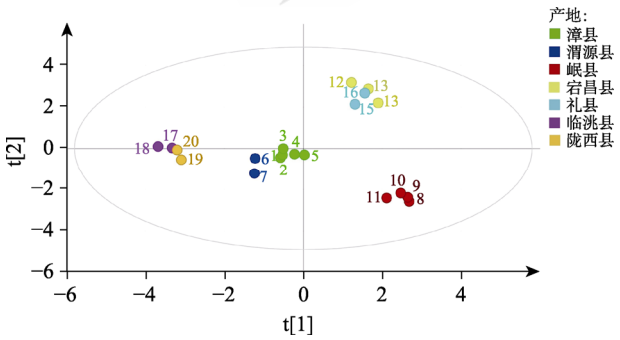

图 3 大黄样品 PCA

1~20–S1~S20。

Fig. 3 PCA of Rhei Radix et Rhizome sample

1–20–S1–S20.

表 4 特征值与方差贡献率

Tab. 4 Eigenvalues and variance contributions

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	4.478	34.447	34.447	4.478	34.447	34.447
2	3.182	24.477	58.924	3.182	24.477	58.924
3	2.451	18.851	77.775	2.451	18.851	77.775
4	1.423	10.948	88.923	1.423	10.948	88.723
5	0.629	4.842	93.565			
6	0.407	3.130	96.694			
7	0.168	1.292	97.986			
8	0.101	0.778	98.764			
9	0.066	0.509	99.273			
10	0.052	0.403	99.676			
11	0.022	0.169	99.845			
12	0.015	0.114	99.959			
13	0.050	0.041	100.000			

表 5 初始因子载荷矩阵

Tab. 5 Initial factor loading matrix

因子	主成分载荷		
	1	2	3
没食子酸	0.086	–0.655	0.666
儿茶素	0.440	–0.308	–0.588
表儿茶素	0.072	0.962	–0.004
芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷	0.462	0.776	–0.084
大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷	0.949	–0.220	–0.086
大黄素-1-*O*-葡萄糖苷	0.355	–0.205	0.856
大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷	0.812	0.277	0.443
大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷	0.545	0.509	0.629
芦荟大黄素	0.708	0.098	–0.396
大黄酸	0.829	–0.009	–0.228
大黄素	0.558	–0.611	0.093
大黄酚	0.736	–0.557	–0.346
大黄素甲醚	0.182	–0.244	–0.142

使分类信息主要集中在一个主成分中，从而模型变得简单和易于解释，其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显。OPLS-DA 得分图的横坐标表示正交信号过滤(orthogonal signal correction，OSC)过程中的主要成分的得分值(Tp)，所以从横坐标的方向可以看到组间的差异；纵坐标表示 OSC 过程中的正交成分的得分值(TO)；所以从纵坐标上看出组内的差异(组内样本间的差异)。

因此，本研究在 PCA 基础上采用 OPLS-DA 进一步区分不同产地大黄的差异成分，结果见图 4~5。在 OPLS-DA 模型中，累积解释能力参数 R^2X 和 R^2Y 分别为 0.869 和 0.583，预测能力参数 Q^2 为 0.785，R^2 和 Q^2 均>0.5，表明所建模型具有可靠性。结果表明 OPLS-DA 与 PCA 分析结果相似。按照模型中变量权重要性(VIP)排序预测值来筛选出具有统计学意义的差异标志物，即选出 VIP>1.0 的变量作为差异标志物，大黄素甲醚、儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷的 VIP 均>1.0，可以作为区分不同产地大黄的指标成分。

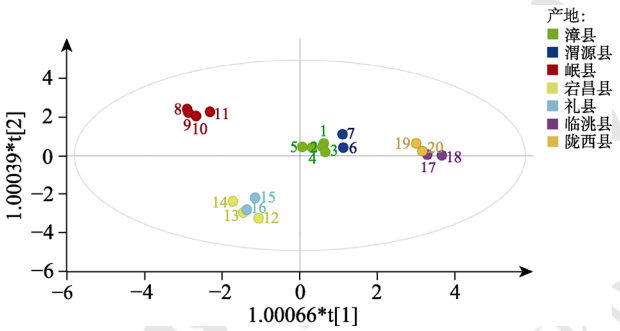

图 4 大黄 OPLS-DA 图

1~20–S1~S20。

Fig. 4 OPLS-DA diagram for Rhei Radix et Rhizoma

1–20–S1–S20.

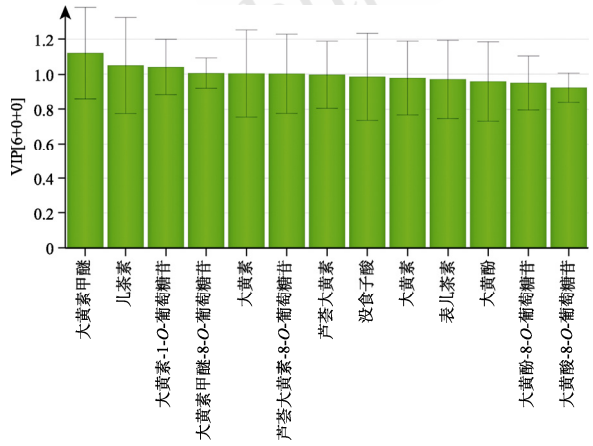

图 5 VIP 值

Fig. 5 VIP value

2.7 基于网络药理学的大黄功效关联物质预测分析

2.7.1 化合物靶点预测 大黄主要活性成分包括蒽醌类、蒽酮类、苯丁酮类、鞣质类等成分[1]，包含番泻苷 A、番泻苷 B、没食子酸、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等，具有泻下、抗菌、止血、降糖调脂、抗肿瘤等药理作用[8-12]。根据文献研究及特征指纹图谱，检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP，https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)、UNIPROT 数据库(https://www.uniprot.org)，PubChem Compound 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)，Swiss Target Prediction 数据库(http://new. swisstargetprediction.ch/)，以“Homo sapiens”及 Probability>0 为靶点筛选条件，获取番泻苷 A、番泻苷 B、没食子酸、儿茶素、表儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、丹叶大黄素、白皮杉醇 15 个化合物的靶点信息，筛去重复靶点得靶点 162 个。

2.7.2 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction networks，PPI)网络构建 将 15 个化合物的 162 个靶点输入在线 STRING 11.0 数据库软件 (https://string-db.org/cgi/input.pl)，以“Homo sapiens”、参数评分值>0.7 并隐藏网络中无联系的节点为条件进行 PPI 网络分析，结果共获得 149 个节点，426 条边，平均节点度 5.72，见图 6。利用 Cytoscape 3.7.1 软件中的“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑分析，以度值、介数中心性和接近中心性为参数筛选核心靶点，并对度值前 8 的核心靶点见表 6。

2.7.3 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 利用 R 软件，以物种“Homo sapiens”，阈值设置为 $P<0.05$ 为条件进行 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析。GO 分析结果见图 7，主要涉及对金属离子的反应、对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、膜筏、内肽酶活性、裂解酶活性及水解酶活性等。KEGG 分析前 20 条通路见图 8，主要包括脂质和动脉硬化、阿尔茨海默病、神经变性的途径-多种疾病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、病性大肠杆菌感染等通路。

2.7.4 “成分-靶点-通路”网络构建及分析 将核心靶点进行 KEGG 分析发现核心靶点涉及脂质和

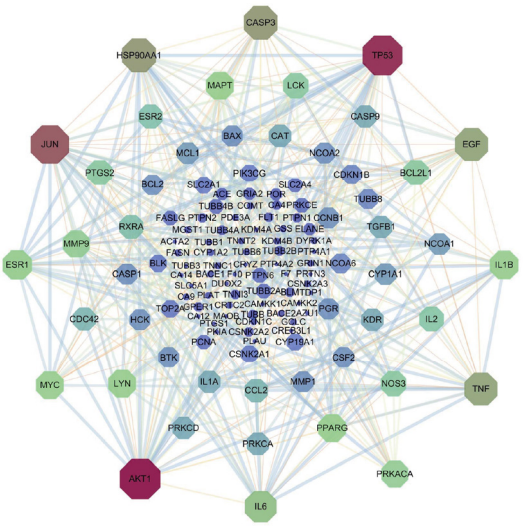

图 6　PPI 网络

Fig. 6　PPI network

表 6　部分核心靶点

Tab. 6　Selected core targets

序号	简称	度值	中介度	接近中心度
1	AKT1	34	0.184 829 17	0.523 364 49
2	TP53	33	0.185 849 16	0.506 787 33
3	JUN	31	0.127 324 22	0.489 082 97
4	HSP90AA1	25	0.062 334 57	0.478 632 48
5	CASP3	25	0.047 646 36	0.462 809 92
6	EGF	24	0.055 25 22	0.448
7	TNF	24	0.028 419 22	0.451 612 9
8	IL-6	22	0.022 130 18	0.440 944 88

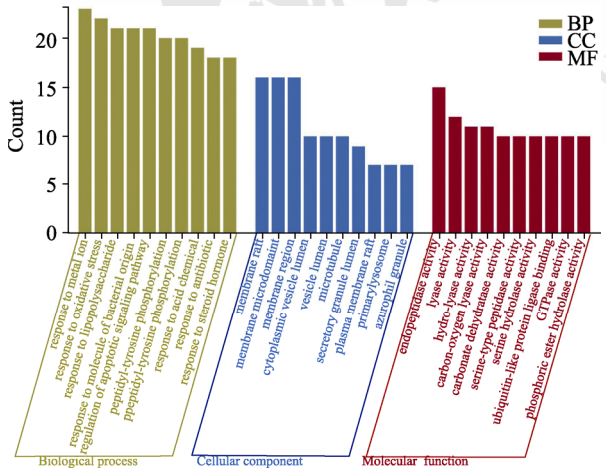

图 7　富集分析的生物过程

Fig. 7　Biological processes for enrichment analysis

动脉硬化、MAPK 信号传导途径、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、非酒精性脂肪性肝病、人类 T 细胞白血病病毒 1 感染及人类巨细胞病毒感染等关键通路。将筛选到的大黄 15 个

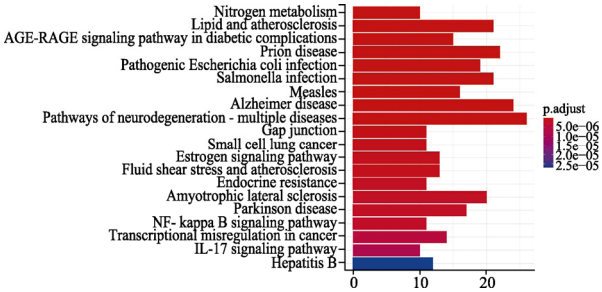

图 8　KEGG 分析

Fig. 8　KEGG analysis

活性成分及核心靶点以 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分-靶点-通路”网络，见图 9。由网络图可以看出 15 个活性成分通过作用于多靶点在不同的信号通路中共同发挥作用。

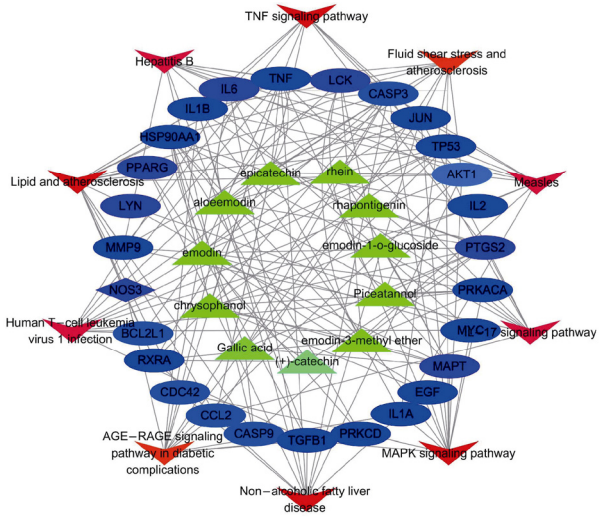

图 9　成分-靶点-通路网络

Fig. 9　Component-target-pathway network

2.7.5　核心靶点-器官定位　对核心靶点通过 GeneAtlas U133A，gcrma(http://biogps.org)数据集以种属为“human”获得每个靶基因在人体器官组织中的 mRNA 表达水平建立靶点-器官定位分析，见图 10。定位器官选择心、肝、肺、肾、全脑、全血，筛选出 mRNA 表达水平高于平均水平的器官或组织得靶基因所定位器官或组织。结果表明核心靶点主要富集在机体的肝、肾、心及肺组织中，这与大黄发挥改善肾功能不全、保肝、抗动脉粥样硬化相吻合[1]，表明基于网络药理学预测分析大黄功效关联物质具有可行性。

2.7.6　中药质量标志物的分析　中药质量标志物理论被归纳为有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍“五原则”[3]。有效性与质量控制密切关联，既反映了有效性和安全性的关联关系，又体

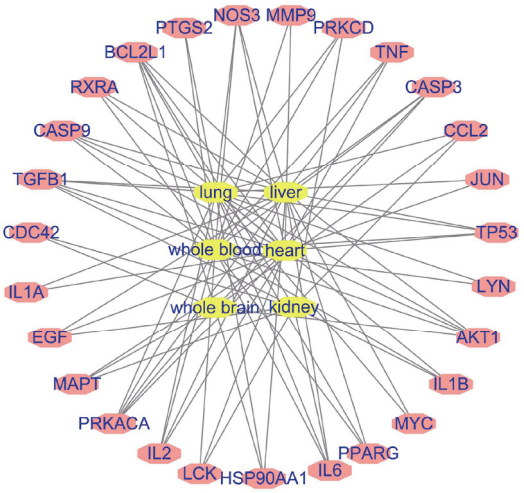

图 10 核心靶点-器官定位

Fig. 10 Core target-organ localisation

现中药成分的专属性、差异性特征。对 13 种指标成分进行含量测定，从而对大黄药材质量控制，体现了有效性。特有主要包括反映同一类药材的共有性(结构相似、相似的理化性质和药理活性)及同一类药材不同种的差异性(成分种类和含量、来源和转化)。大黄具有泻下、抗炎等药理活性，且不同产地的大黄其有效成分含量各不相同，如本研究表明，依据大黄素甲醚、儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷的含量差异可区分不同产地大黄，这体现了现代中药成分理论的特有性。传递与溯源主要包括药材的“原有成分”、饮片中的“转化成分”、入血的“效应成分”，大黄的质量标志物与蒽醌类成分息息相关，如本实验的游离蒽醌及蒽醌苷类成分。可测性包含多指标含量测定(专属性不强)，指示性成分适用于一测多评，成分反映整体功效，全息成分用于指纹图谱识别。本研究所建立的方法可更好地用于多指标含量测定，指标成分均能反映大黄的泻下、抗炎的药理功效，全息成分适用于指纹图谱识别。处方配伍是中药制剂回归中医理论及中医临床表现。

现代药理研究也表明番泻苷 A、番泻苷 B、大黄酚、大黄酸、大黄素等具有泻下、抗炎、抑菌、抗肿瘤、抗氧化、降血脂等功效[1]，多酚类化合物如没食子酸、儿茶素、表儿茶素具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、心血管系统疾病、神经系统疾病、糖尿病、肝纤维化等作用[8-12]。另外，白皮杉醇具有抗氧化、抗炎、抗衰老、抗侵袭、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、侵袭和迁移的作用[13-15]。综上，网络药理学的大黄功效关联物质预测分析发现，大黄的不同活性成分可能通过关键靶点 AKT1、TP53、JUN、HSP90AA1 等涉及脂质和动脉硬化、MAPK 信号传导途径、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、非酒精性脂肪性肝病等关键通路发挥作用。基于网络药理学预测结果与已有文献结果接近[1,15]，如调节脂质代谢、抗肿瘤、泻下、抗炎、抑菌，说明该方法具有一定的准确性，也符合中药整体观及系统性的理念。可见，大黄中关键效应成分可作用于多靶点，共同干预多个通路达到治疗疾病的目的，也进一步表明图谱所选指标成分的合理性。

3 讨论

本研究发现 20 批大黄药材指纹图谱相似度在 0.882~0.998，共确定了 15 个共有峰。利用 HPLC 及 OPLS-DA 分析发现，产地不同，大黄药材质量不同，如漳县大黄为一类，渭源县大黄为一类，岷县为一类，宕昌县及礼县为一类，陇西县及临洮县为一类，其中大黄素甲醚、儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷是差异化合物，可作为鉴别和区分大黄质量的依据。本研究结合特征图谱及文献研究筛选得到 15 个化合物，通过网络药理学分析得到 8 个核心靶点，包括 AKT1、TP53、JUN、HSP90AA1、CASP3、EGF、TNF 和 IL-6；生物过程涉及对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、内肽酶活性等；通路涉及脂质和动脉硬化、MAPK 信号传导途径、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、非酒精性脂肪性肝病等，并构建成分-靶点-通路图，得到没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等为大黄潜在的质量标志物。指纹图谱具有区别药材不同部位及成分，鉴别中药材真伪及跟踪中药成分，评价每一批药材的质量稳定性及传递性等特点，本研究借助 HPLC 建立的指纹图谱可用于大黄的鉴定与质量控制。从网络药理学有效性的角度对其进行分析，发现没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等成分均有传递性和溯源性，且与功能属性密切相关，可初步预测其为大黄的潜在质量标志物。

目前，有关质量标志物研究多建立在化学成分及药理作用的归纳总结之上，而本研究通过 HPLC 在多指标定量分析的基础上，建立特征指纹图谱确定了大黄的活性成分；其次，基于可测性、

可追溯性、有效性等特点，结合中药药理筛选具有生物活性的成分，及将核心靶点器官定位发现，核心靶点主要富集在机体的肝、肾、心及肺组织中，这与大黄改善肾功能不全、保肝、抗动脉粥样硬化等功能密切相关，整合开展大黄功效关联物质的系统辨识与确认，进一步表明基于网络药理学的大黄功效关联物质预测分析高度可信，具有一定的创新性。本研究从指标成分含量测定出发，从成分对应靶点，靶点对应器官，器官对应药效部位，药效部位对应药理作用等方面阐明了大黄的潜在质量标志物。这为大黄的质量控制提供了更全面的参考，也为后期深入研究大黄作用机制提供基础。

REFERENCES

[1] WANG Y, YANG X, XIA P F, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of Rhei Radix et Rhizoma and predictive analysis on quality markers[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(19): 4821-4837.

[2] LIU C X, CHEN S L, XIAO X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(9): 1443-1457.

[3] ZHANG T J, BAI G, CHEN C Q, et al. Research approaches of quality marker(Q-marker) of Chinese materia medica formula based on “five principles”[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(1): 1-13.

[4] XU Y, YANG H R, YANG Y S, et al. Research and prospect of fingerprint of traditional Chinese medicine[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2018, 18(76): 91-94.

[5] HAN L W, CHEN S J, DONG R, et al. Progress of network pharmacology applications in studying the complex mechanisms of action of traditional Chinese medicine[J]. Shandong Sci(山东科学), 2021, 34(6): 22-31.

[6] CAO Y Q, CHU Y J, LIU K F, et al. Visual analysis on fingerprint studies of Chinese materia medica in China[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22(9): 3073-3081.

[7] PENG M M, GUO S, CHEN Q, et al. Q-Marker prediction analysis of classical prescription Huanglian Decotion based on characteristic spectrums and network pharmacology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(18): 5514-5523.

[8] 孟姗姗. 中药大黄在临床应用中的功效以及对其药理作用研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(20): 81-82.

[9] ZHANG K X, YAO Q Y, WU F M, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacologicaleffects of medicinal plants in genus Rheum[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(6): 555-566.

[10] ZHENG X H, YANG J, YANG Y H. Research progress on pharmacological effects of gallic acid[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2017, 37(1): 94-98, 102.

[11] YAN J J, HUANG J W, JIN L F, et al. Application and research of catechins in cardiovascular diseases[J]. Sichuan J Physiol Sci(四川生理科学杂志), 2018, 40(4): 316-318.

[12] TONG G Z, FU X P, YANG Y, et al. Advances in research on the distribution and pharmacological activities of epicatechin[J]. J Yunnan Agric Univ Nat Sci(云南农业大学学报: 自然科学), 2018, 33(2): 343-349.

[13] WANG F X, CHEN H R, XIE W, et al. Research progress on anti-tumor effects of piceatannol[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32(5): 893-899.

[14] 刘芝兰, 曾春娇, 吴梅青, 等. 白藜芦醇与白皮杉醇及赤松素研究进展[J]. 医药导报, 2013, 32(8): 1043-1049.

[15] PENG R, LU T L, HU L H, et al. Progress on Q-marker research of traditional Chinese medicine decoction pieces[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(10): 2603-2610.

收稿日期：2022-02-21

(本文责编：沈倩)

http://www.chinapharm.com