

基于指纹图谱、化学模式识别及网络药理学预测银花泌炎灵片质量标志物

王振洲^{1,2,3}, 刘芮¹, 李生², 朱继忠², 李平亚^{3*} (1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林华康药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700; 3. 吉林大学, 长春 130117)

摘要: 目的 基于指纹图谱和网络药理学方法分析预测银花泌炎灵片中潜在的质量标志物 (quality marker, Q-Marker)。方法 建立 13 批银花泌炎灵片的 HPLC 指纹图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行相似度分析, 指认共有峰并对其进行归属。运用化学计量学方法, 结合 SPSS 26.0 和 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析、主成分分析以及正交偏最小二乘判别分析对银花泌炎灵片指纹图谱进行研究, 筛选出造成差异的主要标志性成分。运用网络药理学筛选并分析银花泌炎灵片的作用靶点和通路, 构建“药物-成分-靶点-通路”网络图, 预测银花泌炎灵片 Q-Marker 及核心靶点。结果 建立了银花泌炎灵片的 HPLC 指纹图谱, 确定了绿原酸、芒果苷、野黄芩素、木犀草素、槲皮素等 27 个共有峰, 化学模式识别分析筛选出 5 个成分作为银花泌炎灵片的差异性标志物。通过网络药理学筛选出 5 个活性成分、20 个核心靶点和 20 条关键通路, 结果显示 5 个活性成分均可作为潜在 Q-Marker。结论 该方法稳定、准确可行, 筛选出 5 个可作为银花泌炎灵片潜在 Q-Marker 的化学成分, 为全方位控制银花泌炎灵片质量提供参考, 同时也为进一步研究银花泌炎灵片的作用机制奠定基础。

关键词: 银花泌炎灵片; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量评价; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2024)01-0097-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230140

引用本文: 王振洲, 刘芮, 李生, 等. 基于指纹图谱、化学模式识别及网络药理学预测银花泌炎灵片质量标志物[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 97-105.

Prediction of Quality Markers of Yinhua Miyanling Tablets Based on Fingerprinting, Chemical Pattern Recognition and Network Pharmacology

WANG Zhenzhou^{1,2,3}, LIU Rui¹, LI Sheng², ZHU Jizhong², LI Pingya^{3*} (1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China; 3. Jilin University, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To predict potential quality markers (Q-markers) in Yinhua Miyanling tablets based on fingerprinting and network pharmacology methods. **METHODS** HPLC fingerprints of 13 batches of Yinhua Miyanling tablets were established, and the similarity analysis was carried out using the "Chromatographic Fingerprint Evaluation System for Traditional Chinese Medicine" to identify the common peaks and attribute them. The fingerprints of Yinhua Miyanling tablets were investigated using chemometrics, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis in combination with SPSS 26.0 and SIMCA 14.1 software to identify the major signature components responsible for the differences. The network pharmacology was used to screen and analyze the targets and pathways of Yinhua Miyanling tablets, construct a "drug-component-target-pathway" network diagram, and predict the Q-Marker and core targets of Yinhua Miyanling tablets. **RESULTS** HPLC fingerprint of Yinhua Miyanling tablets was established, and 27 common peaks including chlorogenic acid, mangostin, wild baicalin, lignocerin and quercetin were identified. Chemical pattern recognition analysis screened five components as differential markers for Yinhua Miyanling tablets. Five active ingredients, 20 core targets and 20 key pathways were screened by network pharmacology, showing that all five active ingredients could be used as potential Q-Markers. **CONCLUSION** The method is stable, accurate and feasible for screening five chemical components as potential Q-Markers for Yinhua Miyanling tablets. It provides a reference for the overall control of the quality of Yinhua Miyanling tablets, and also lays the foundation for further research on the mechanism of action of Yinhua Miyanling tablets.

KEYWORDS: Yinhua Miyanling tablets; fingerprints; chemical pattern recognition; quality evaluation; network pharmacology; quality marker

基金项目: 吉林省科技厅发展计划资助项目 (20210204149YY)

作者简介: 王振洲, 男, 博士, 讲师 E-mail: 32726915@qq.com

*通信作者: 李平亚, 男, 博士, 教授 E-mail: lipy@mails.jlu.edu.cn

银花泌炎灵片由古方《八正散》演化而来,由金银花、半枝莲、篇蓄、瞿麦、石韦、川木通、车前子、淡竹叶、桑寄生、灯心草 10 味药材组成^[1-2], 主治清热解暑、化瘀止痛、利湿通淋。其中金银花具有抑菌、清热解毒的作用^[3]; 半枝莲可以利尿消肿、化瘀止痛^[4], 两者共为君药。石韦利尿通淋; 瞿麦清热利尿; 篇蓄利尿通淋、清热解毒; 车前子清热利尿; 川木通利尿、抗菌; 六者共为臣药, 助金银花和半枝莲清热、利尿。灯心草抗炎、抑菌; 淡竹叶杀菌消炎、清热泻火; 两者为佐药。桑寄生为使药, 具有通经络、补肝肾、强筋骨之功。诸药合用达到抗菌、清热、利湿止痛的功效。现代药理研究表明, 银花泌炎灵片可以影响受体中炎症基因的表达, 抑制炎症因子的分泌, 治疗泌尿系统疾病^[5-7]; 银花泌炎灵片联合常用的抗菌药物左氧氟沙星, 能够缓解单纯性急性尿路感染症状、明显降低耐药性^[8-9]; 银花泌炎灵片在单独使用或与氨曲南等药物联合使用时, 在尿路感染等病症的治疗中均具有良好的临床效果^[10-11]。

中药复方制剂具有多成分、多靶点等特点, 各味药在相互配伍时可以达到减毒增效的作用, 但由于其成分复杂, 质量难以得到控制, 基于此, 刘昌孝院士根据中医理论及配伍关系等提出中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 这一概念, 对中药的质量研究具有深远意义^[12-14]。中药指纹图谱是在多方面研究中药化学成分基础上的一种综合的色谱鉴定手段, 具有专属性强、稳定性好和重现性好等优点, 通过共有峰及相似度等有效地评价不同厂家、不同批次药物的质量^[15-16]。化学模式识别是借用计算机的一种多元分析技术, 在中药的质量控制中具有广泛的应用, 能够有效评价中药质量; 且化学模式识别对指纹图谱的数据可以客观地进行分析, 也是预测 Q-Marker 的重要数学方法^[17]。中药和疾病之间的桥梁是基因, 网络药理学能够筛选出中药复方的活性成分、核心靶点及关键通路, 构建“药物-成分-靶点-疾病”调控网络, 预测潜在靶点^[18]。

因此, 本研究建立银花泌炎灵片的 HPLC 指纹图谱, 并结合聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、以及正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 等统

计学方法筛选标志性成分, 结合网络药理学分析预测质量标志物^[19-22], 为银花泌炎灵片建立更系统、全面的质量评价系统提供参考。

1 仪器与试剂

LC-2030 高效液相色谱仪、紫外检测器 (日本岛津公司); XS105DU 型十万分之一电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-600DE 型超声波清洗仪 (昆山超声仪器有限公司)。

野黄芩苷 (批号: 110842-202010; 纯度: 98%)、芒果苷 (批号: 111607-201704; 纯度: 98.1%)、木犀草素 (批号: 111520-202107; 纯度: 96.3%)、槲皮素 (批号: 100081-201610; 纯度: 99.1%)、绿原酸 (批号: 100081-201610; 纯度: 96%) 均购自中国食品药品检定研究院; 娃哈哈纯净水; 甲醇、乙腈 (色谱级, 美国 Fisher 试剂公司); 其他试剂均为分析纯。13 批银花泌炎灵片 [吉林华康药业股份有限公司, 规格: 每片 0.5 g; 批号分别为 061203(S1), 061212(S3), 061225(S4), 061228(S5), 061229(S11), 071002(S2), 071004(S6), 071008(S7), 071009(S8), 071022(S9), 071212(S10), 071213(S12), 071215(S13)]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Apollo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 的甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~18 min, 7%→8%A; 18~30 min, 8%→12%A; 30~50 min, 12%→15%A; 50~60 min, 15%→18%A; 60~65 min, 18%→23%A; 65~70 min, 23%→25%A; 70~90 min, 25%→30%A; 90~100 min, 30%→7%A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL; 柱温为 35 °C; 检测波长: 340 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取野黄芩苷、芒果苷、木犀草素、槲皮素、绿原酸对照品适量, 精密称定, 置于同一 5 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解, 定容, 制成每 1 mL 各含 10~100 μg 对照品的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 13 批银花泌炎灵片, 研细, 分别取本品粉末约 3 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇溶液 30 mL, 超声 (100 W, 40 kHz) 45 min, 滤过, 滤液蒸干, 加 80% 甲醇使溶解, 定容至 5 mL, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次并记录色谱图。以峰形较好的 4 号峰绿原酸峰为参照峰 S，经过统计方法计算得到各特征峰相对保留时间 RSD<0.96%，证明方法仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 精密称取同一供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以峰形较好的 4 号峰绿原酸峰为参照峰 S，经过统计方法计算得到各特征峰相对保留时间 RSD<0.90%，表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 精密称取同一供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于 0，2，4，8，12，24 h 进样测定，记录色谱图。以峰形较好的 4 号峰绿原酸峰为参照峰 S，统计方法计算结果显示，各特征峰相对保留时间 RSD<2.03%，相对峰面积 RSD<2.46%，表明此方法在 24 h 内稳定性良好。

2.4 银花泌炎灵片指纹图谱构建及相似度评价

取 13 批银花泌炎灵片供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样并记录色谱图。将所得的 13 批银花泌炎灵片 HPLC 色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”，格式为 AIA，进行指纹图谱分析，采用多点校正及谱峰自动匹配，提取峰形明显的 27 个共有色谱峰生成对照图谱 R，见图 1。然后根据指纹图谱分别输入相似度价系统，分析各个批次指纹图谱与生成的对

比图谱的相似性系数，13 批次银花泌炎灵片样品与形成的对比图谱的相似程度结果见表 1。13 批样本的相似度良好，各批次样品与对照图谱间相似度均>0.93，表明银花泌炎灵片样品批间质量较稳定。

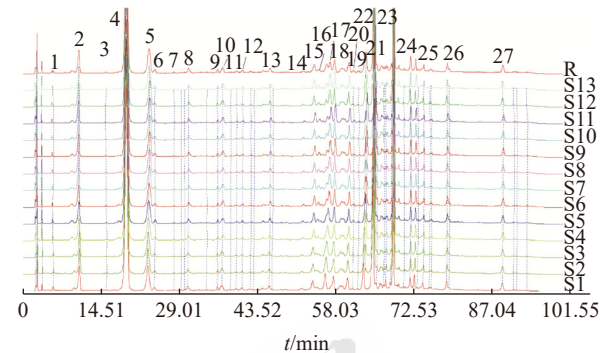


图 1 银花泌炎灵片样品 (S1~S13)HPLC 叠加图谱及对照图谱 (R)

Fig. 1 HPLC overlay spectrum and control spectrum(R) of Yinhuo Miyanling tablets sample(S1-S13)

2.5 共有峰的归属和指认

取混合对照品溶液、供试品溶液，按“2.1”项分别进样检测，记录的色谱见图 2。进行信息比对后最终指定 4，8，22，23 和 26 号色谱峰依次为绿原酸、芒果苷、野黄芩苷、木犀草素、槲皮素。以 4 号峰的保留时间和峰面积为 1，经过统计学计算，其他各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.00%~1.69%，相对峰面积的 RSD 为 6.09%~9.99%，说明 13 批银花泌炎灵片样品总体质量稳

表 1 银花泌炎灵片供试品与对照指纹图谱的相似度

Tab. 1 Similarity between the fingerprint spectra of the test sample and the control of Yinhuo Miyanling tablets

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	对照
S1	1.000	0.992	0.999	0.982	0.982	0.845	0.808	0.821	0.805	0.807	0.860	0.955	0.834	0.947
S2	0.992	1.000	0.992	0.972	0.971	0.846	0.819	0.833	0.818	0.819	0.842	0.978	0.843	0.949
S3	0.999	0.992	1.000	0.984	0.984	0.846	0.807	0.821	0.805	0.807	0.860	0.956	0.833	0.947
S4	0.982	0.972	0.984	1.000	1.000	0.852	0.812	0.824	0.813	0.812	0.873	0.956	0.837	0.949
S5	0.982	0.971	0.984	1.000	1.000	0.851	0.811	0.822	0.812	0.810	0.874	0.954	0.836	0.949
S6	0.845	0.846	0.846	0.852	0.851	1.000	0.991	0.994	0.989	0.990	0.985	0.833	0.997	0.969
S7	0.808	0.819	0.807	0.812	0.811	0.991	1.000	0.997	0.998	0.999	0.961	0.821	0.995	0.951
S8	0.821	0.833	0.821	0.824	0.822	0.994	0.997	1.000	0.996	0.996	0.964	0.832	0.999	0.958
S9	0.805	0.818	0.805	0.813	0.812	0.989	0.998	0.996	1.000	0.999	0.962	0.821	0.994	0.951
S10	0.807	0.819	0.807	0.812	0.810	0.990	0.999	0.996	0.999	1.000	0.961	0.822	0.994	0.951
S11	0.860	0.842	0.860	0.873	0.874	0.985	0.961	0.964	0.962	0.961	1.000	0.813	0.970	0.962
S12	0.955	0.978	0.956	0.956	0.954	0.833	0.821	0.832	0.821	0.822	0.813	1.000	0.839	0.936
S13	0.834	0.843	0.833	0.837	0.836	0.997	0.995	0.999	0.994	0.994	0.970	0.839	1.000	0.964
对照	0.947	0.949	0.947	0.949	0.949	0.969	0.951	0.958	0.951	0.951	0.962	0.936	0.964	1.000

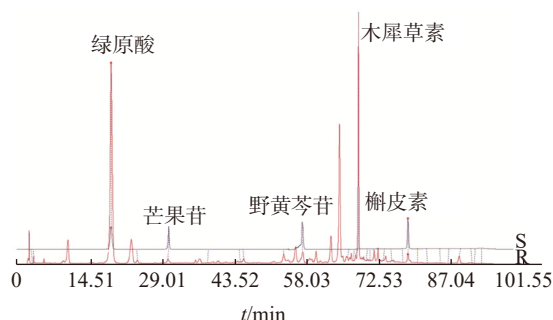


图2 混合对照品溶液(R)和样品(S)的HPLC色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference solution(R) and sample(S)

定,在化学成分种类上具有一致性。绿原酸归属于金银花、扁蓄等,是抗菌的主要物质基础,文献报道绿原酸能够抑制炎症通路,减轻细胞炎症损伤^[23];芒果苷归属于石韦,能够抗病毒^[24];槲皮素归属于半枝莲、石韦、桑寄生等,具有消肿利尿、清热解毒的功效^[25];木犀草素归属于金银花、半枝莲、扁蓄、石韦、车前子、淡竹叶、灯心草;野黄芩苷归属于半枝莲。

2.6 化学模式识别

2.6.1 CA 将13批银花泌炎灵片样品的27个共有峰峰面积输入到SPSS 26.0软件中,采用组间连接方法绘图,选择欧式平方距离作为度量标准,SPSS导出的树状图结果见图3。欧氏距离>10时,13批银花泌炎灵片可按生产年份聚为2类,S1、S3~5、S11号样品聚为第Ⅰ类,S2、S6~10、S12~13号样品则聚为第Ⅱ类。

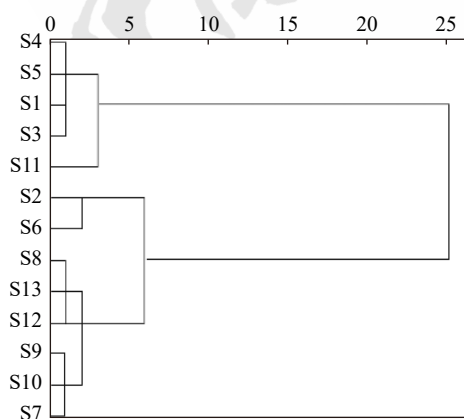


图3 银花泌炎灵片样品聚类分析图
Fig. 3 Cluster analysis of samples from Yin Hua Mi Yan Ling tablets

2.6.2 PCA 因子分析:将13批银花泌炎灵片样品的27个共有峰峰面积输入到SPSS 26.0软件中,提取主成分(级别变量特征值均>1为主成

分)。由表2可知,提取到5个主成分,累计方差贡献率达到了91.294%,其中成分1和2的特征值明显大于其他成分,样品中各成分的绝大部分信息可以被反映,达到了降维的作用。

表2 银花泌炎灵片主成分特征值及方差贡献率
Tab. 2 Principal component characteristic values and variance contribution rate of Yin Hua Mi Yan Ling tablets

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	13.931	51.597	51.697
2	5.431	20.114	71.712
3	1.895	7.018	78.729
4	1.880	6.964	85.693
5	1.512	5.601	91.294

图4为碎石图,可以明显观测出特征值的变化情况,前2个点倾斜率较大可认为是主要因素;曲线在第3个主成分存在1个明显的拐点,说明前2个主成分占数据中变异的大部分,与表2中前2个主成分特征值明显较高的分析结果一致,可以基本显示出不同批次银花泌炎灵片之间的相似度和差异性,可以代表银花泌炎灵片的质量。

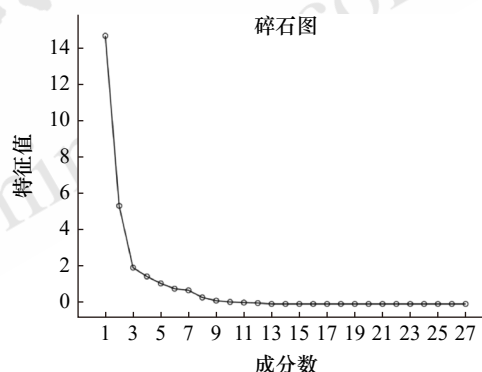


图4 银花泌炎灵片样品PCA碎石图
Fig. 4 PCA fragment chart of Yin Hua Mi Yan Ling tablet sample

主成分方差分析旋转后的因子载荷矩阵见表3。第1主成分的信息主要来自4(绿原酸),5~7,8(芒果苷),9~13,15,19~21号色谱峰;第2主成分的信息主要来自1,22(野黄芩苷),24,26(槲皮素)号色谱峰;第3主成分的信息主要来自2,4(绿原酸),16,25号色谱峰;17,25号色谱峰对第4主成分贡献率较大;3号色谱峰对第5主成分贡献率较大。这5个主成分对于区分不同批次的银花泌炎灵片指纹图谱起决定性作用。

采用SIMCA 14.1软件绘制PCA得分图,见

表 3 银花泌炎灵片主成分因子旋转载荷矩阵

Tab. 3 Principal component factor rotation load matrix of Yinhuo Miyanling tablets

编号	成分1	成分2	成分3	成分4	成分5
S1	0.125	-0.910	-0.216	0.113	0.109
S2	0.376	0.598	0.543	0.298	-0.096
S3	0.553	-0.506	-0.276	-0.252	0.423
S4	0.738	0.108	0.549	-0.016	-0.119
S5	0.914	0.051	0.310	0.033	-0.082
S6	0.953	-0.075	0.027	0.105	-0.003
S7	0.962	0.122	0.117	0.057	-0.014
S8	0.972	0.093	0.158	0.056	0.005
S9	0.902	-0.191	-0.002	-0.081	-0.088
S10	0.974	0.126	0.111	0.076	0.068
S11	0.815	0.520	0.107	0.074	-0.036
S12	0.982	0.042	0.130	0.062	0.088
S13	0.970	0.170	0.092	0.052	0.094
S14	-0.119	-0.337	0.016	-0.753	-0.289
S15	0.918	0.153	0.195	0.043	0.199
S16	0.683	-0.085	0.566	0.080	0.084
S17	0.083	-0.181	-0.074	0.872	0.047
S18	-0.037	-0.223	-0.112	-0.371	-0.812
S19	0.961	0.079	0.023	0.028	0.126
S20	0.963	0.044	-0.006	0.012	0.121
S21	0.961	0.053	-0.023	0.022	0.127
S22	0.170	0.898	-0.104	0.098	-0.176
S23	0.513	-0.714	0.052	-0.044	-0.179
S24	0.158	0.893	-0.161	0.005	0.323
S25	-0.239	0.319	-0.742	0.417	-0.154
S26	0.352	0.842	-0.125	0.081	0.310
S27	0.613	0.656	-0.092	-0.068	0.370

图 5。由图可知，13 批银花泌炎灵片聚为 2 类，与 CA 结果一致。

2.6.3 OPLS-DA 将 13 批银花泌炎灵片样品的

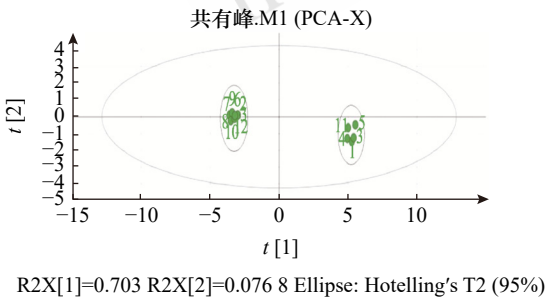


图 5 13 批银花泌炎灵片样品主成分分析得分图
1~13 为 13 批银花泌炎灵片样品。

Fig. 5 Principal component analysis score of 13 batches of Yinhuo Miyanling tablets samples
1~13 were 13 batches of samples of Yinhuo Miyanling tablets.

27 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，进行 OPLS-DA，得分图见图 6，由图可知，样本聚为 2 类，与 CA、PCA 结果一致。变量投影重要性 (variable importance in the projection, VIP) 值能够筛选出影响银花泌炎灵片分类的标志性成分，以 VIP 值>1 作为潜在化学标记物，结果见图 7。得到 4(绿原酸)，23(木犀草素)，24，20，21，8(芒果苷)，22(野黄芩苷)，3，1，26(槲皮素)，13，6 号色谱峰是影响银花泌炎灵片分类的主要原因，具有标志性作用。对这些主要标志性成分进行测试，使银花泌炎灵片生产质量更加稳定可控。

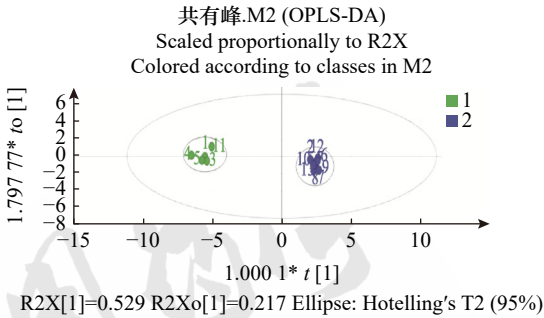


图 6 13 批银花泌炎灵片样品正交偏最小二乘判别分析得分图
1~13 为 13 批银花泌炎灵片样品。

Fig. 6 Orthogonal partial least squares discriminant analysis score chart of 13 batches of Yinhuo Miyanling tablets samples
1~13 were 13 batches of samples of Yinhuo Miyanling tablets.

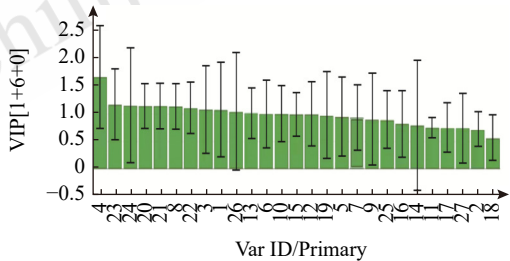


图 7 银花泌炎灵片样品正交偏最小二乘判别分析 VIP 值图

Fig. 7 VIP value graph of partial least squares discriminant analysis for samples of Yinhuo Miyanling tablets

2.7 网络药理学研究

据已有文献报道，绿原酸、芒果苷、木犀草素具有抗菌、抗炎、调节免疫、解热的作用^[26-28]，槲皮素能够清热解毒、消肿利水^[29]，野黄芩苷抗炎、抗氧化^[30]，对于银花泌炎灵片发挥疗效具有重要意义。

2.7.1 活性成分靶点的预测 通过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/>) 等, 并将靶点基因名利用 UnitProt 数据库规范后得到靶点共 196 个。

2.7.2 疾病靶点数据集的建立 以 “urinary tract infection” 为关键词搜索 Genecard 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org>)、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>), 将 3 个数据库得到的结果取并集, 获得 8 561 个疾病相关基因。

2.7.3 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将活性成分靶点和疾病靶点取交集并去重, 得到 188 个交集靶点。将交集靶点导入 String 11.0(<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 数据库获取蛋白互作数据信息, 物种选为 “Homo sapiens”, 并隐藏网络中游离节点, 蛋白交互参数评分值为 “medium confidence>0.9” 构建 PPI 网络, 见图 8, 共获得 188 个节点及 707 条边, 平均节点度为 7.52。将 PPI 结果以 TSV 文本格式下载, 导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中并利用插件对 PPI 网络进行分析, 计算选取度 (degree)、

介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 重要拓扑参数, 筛选得到排名前 20 的基因为银花泌炎灵片起效的关键靶点, 分别为 AKT1、TP53、TNF、JUN、IL6、VEGFA、CASP3、MYC、CTNNB1、IL1B、PTGS2、HIF1A、EGFR、ESR1、EGF、MMP9、EGF、FOS、CCND1、CXCL8、PPARG。结果见表 4。

2.7.4 基因本体生物学过程 (gene-ontology biology process, GO) 功能富集分析 利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对核心靶点蛋白进行 GO 功能富集分析, 具有统计学意义的条件是 $P<0.01$ 。GO 富集分析共获得 174 个条目, 其中生物过程 (biological process, BP)137 个, 细胞组分 (cellular component, CC)10 个, 分子功能 (molecular function, MF)27 个, BP 主要富集在 DNA 诱导的转录正调控、对 RNA 聚合酶 II 启动子的 pri-miRNA 转录的正调控、基因表达的正调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、凋亡过程的正向调节、细胞对缺氧的反应、对药物的反应、基因表达的负调控、对序列特异性 DNA 结合转录因子活性的正向调节、对异物刺激的反应

表 4 关键靶点的度、介数中心性、接近中心性值
Tab. 4 Degree, betweenness centrality, and closeness centrality values of key targets

靶点	度	介数中心性	接近中心性
AKT1	127	3 229.06	0.74
TP53	114	1 377.11	0.68
JUN	109	1 130.45	0.68
TNF	109	1 407.32	0.69
IL6	108	1 466.58	0.69
VEGFA	105	656.48	0.66
MYC	101	1 088.65	0.67
CASP3	101	797.73	0.66
CTNNB1	100	1 486.62	0.67
PTGS2	98	632.52	0.65
IL1B	98	705.72	0.66
HIF1A	96	526.16	0.64
ESR1	95	947.24	0.65
EGFR	95	714.37	0.65
MMP9	91	582.26	0.63
EGF	91	473.85	0.63
FOS	88	908.84	0.64
CCND1	86	356.28	0.62
CXCL8	83	271.28	0.61
PPARG	82	467.11	0.62

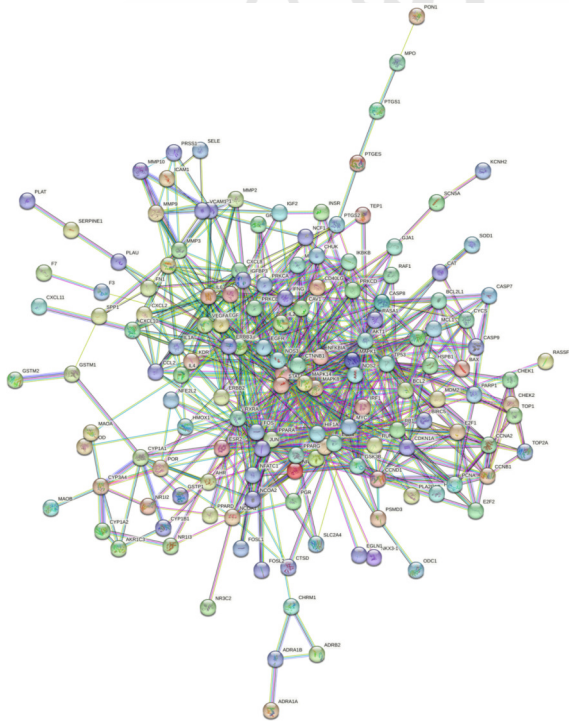


图 8 PPI 网络图
Fig. 8 PPI network diagram

等；CC 包括大分子复合物、转录因子复合体、染色质、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物、核质、细胞外间隙、转录抑制因子复合物、细胞核、转录因子 AP-1 复合体等；MF 包括转录因子结合、酶结合、转录辅助因子结合、RNA 聚合酶 II 序列特异性 DNA 结合转录因子结合、染色质结合、蛋白激酶结合、序列特异性 DNA 结合、蛋白结合、转录调控区序列特异性 DNA 结合等。结果见图 9。

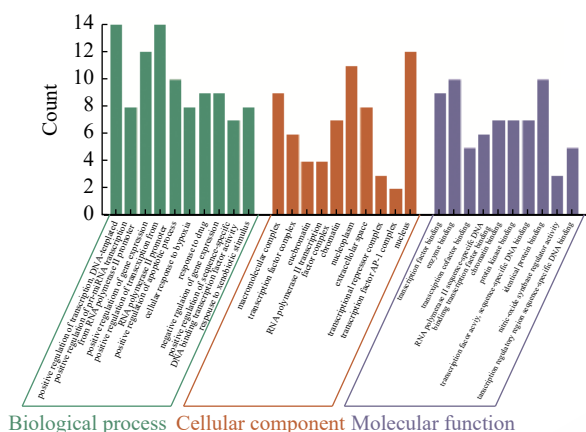


图 9 核心靶点的 GO 分析富集图
Fig. 9 GO analysis enrichment map of core targets

2.7.5 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对核心靶点蛋白进行 KEGG 功能富集分析, 具有统计学意义的条件是 $P < 0.01$, 筛选出富集条目共 89 条, 前 20 条通路见图 10。主要富集到癌症的途径、膀胱癌、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒感染、巨噬细胞感染、结直肠癌、癌症中的蛋白多糖、脂质和动脉硬化、乳腺癌、宫颈癌、IL-17 信号传导途径、糖尿病并发症中的 AGE-

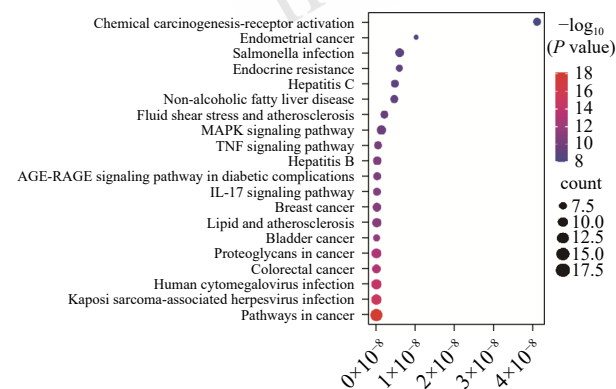


图 10 核心靶点的 KEGG 富集通路分析图
Fig. 10 KEGG enrichment pathway analysis of core targets

RAGE 信号通路、TNF 信号传导途径、MAPK 信号传导途径、非酒精性脂肪肝、内分泌抵抗、乙型肝炎、丙型肝炎等通路。

2.7.6 “药物-成分-靶点-通路”网络构建及分析 将 20 个核心靶点、5 个化合物 (绿原酸、木犀草素、槲皮素、野黄芩苷、芒果苷) 及 20 条信号通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 绘制成分-靶点-通路网络, 见图 11。图中发现 5 个化合物连接度差异不大, 作用于 20 个核心靶点和 20 条关键信号通路共同发挥作用, 均可能是银花泌炎灵片的活性成分。

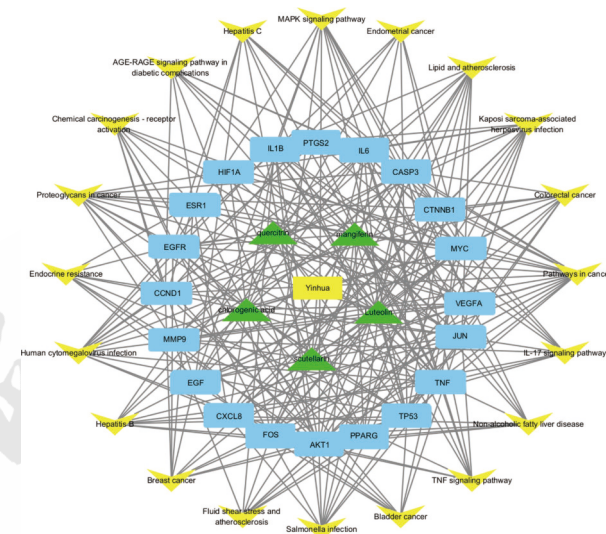


图 11 “药物-成分-靶点-通路”网络图
Fig. 11 "Drug-component-target-pathway" network diagram

3 讨论

本实验考察了 50% 甲醇、60% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇和 90% 甲醇提取, 超声 30, 45, 60 min 制备的供试品溶液, 结果显示 80% 甲醇提取液色谱峰形更好, 超声提取 45 min 基本提取完成; 确定采用 80% 甲醇, 超声 45 min 进行提取。还考察了不同流动相系统 (甲醇-水、甲醇-0.05% 甲酸溶液、甲醇-0.1% 甲酸溶液、甲醇-0.25% 醋酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.05% 甲酸溶液、乙腈-0.25% 醋酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液) 对色谱峰形和分离度的影响, 结果发现效果最好的是乙腈-0.1% 甲酸水溶液。190~400 nm 紫外-可见光全波长扫描结果发现在 340 nm 处色谱峰基线很平稳, 且分离度及峰形更好。

本实验建立了银花泌炎灵片的 HPLC 指纹图谱, 确定了绿原酸、芒果苷、野黄芩素、木犀草

素、槲皮素等 27 个共有峰, 相似度均>0.936。CA 结果显示 13 批银花泌炎灵片可聚为 2 类, 第 I 类为 2006 年生产的产品, 第 II 类为 2007 年生产的产品, 说明不同生产年份的样品之间存在差异, 同一年份生产的样品较一致, 可能与每一年的原材料采集时间和产地、生产工艺有关, 因此加强原料药材的质量控制、优化生产工艺能够为银花泌炎灵片提供更加稳定的质量^[31-32]。PCA 提取到 5 个与处方药材对应的成分, 累计方差贡献率达 91.294%, 影响前 2 个主成分的色谱峰主要为绿原酸、芒果苷、野黄芩苷和槲皮素等, 用以表征药物质量, 提示厂家在生产时应注意主成分对应的色谱峰。现代药理学研究表明, 银花泌炎灵片中的金银花、篇蓄等具有显著的清热解毒、抗菌消炎的作用, 金银花的成分包括有机酸类、黄酮类、挥发油类和三萜皂苷类等, 其中绿原酸和木犀草素为其特征成分; 半枝莲的特征成分为野黄芩苷; 篇蓄的特征成分为槲皮素和绿原酸; 石韦的成分包括槲皮素、绿原酸和芒果苷。OPLS-DA 的 VIP 值得到 4(绿原酸), 23(木犀草素), 24, 20, 21, 8(芒果苷), 22(野黄芩苷), 3, 1, 26(槲皮素), 13, 6 号色谱峰是影响银花泌炎灵片分类差异的主要标志性成分, 可以较为全面地反映药物的内在质量, 生产时可多加注意这些成分, 且分类结果与 CA、PCA 结果一致^[33-34]。

Q-marker 是 2016 年刘昌孝院士提出的新概念, 旨在为中药的质量控制提供参考, 本研究基于 Q-marker 的五原则: 有效性、特有性、可测性、溯源性及具有中医药理论的关联性; 应用指纹图谱指认出的共有峰确定银花泌炎灵片的活性成分, 结合化学模式识别预测其质量标志物, 体现出五原则的可测性, 应用网络药理学预测靶点及通路体现出五原则的有效性。网络药理学分析结果显示, 绿原酸、木犀草素、芒果苷、野黄芩苷、槲皮素 5 个活性成分通过调控 AKT1、TP53、TNF、JUN、IL6、VEGFA、CASP3 等核心靶点, 作用于癌症的途径、巨噬细胞感染、TNF 信号传导途径、MAPK 信号传导途径、内分泌抵抗、乙型肝炎、丙型肝炎、膀胱癌等通路发挥药效, 核心靶点与关键通路均证实了银花泌炎灵片治疗尿路感染、抗炎的作用, 5 个化合物均可作为银花泌炎灵片的 Q-marker^[35-36]。

银花泌炎灵片是由金银花等 10 味药材配伍而

成的历史悠久的中成药, 其活性物质成分复杂, 通过多靶点、多途径发挥药效, 故不能选择单一指标性成分来控制质量, 而中药指纹图谱信息量大, 能从传统的单一成分转变至整体特征, 为银花泌炎灵片的质量稳定可控提供了有效保障。综上所述, 本研究建立了银花泌炎灵片指纹图谱的质量评价系统, 指认出绿原酸、木犀草素、芒果苷、野黄芩苷、槲皮素 5 个共有峰; 并结合 CA、PCA、OPLS-DA 技术研究不同批次银花泌炎灵片之间的质量及稳定性, 分析出指纹图谱指认的 5 个化学成分为标志性成分; 通过网络药理学预测出以上 5 个活性成分可作为银花泌炎灵片的 Q-marker。该方法简便可行、准确, 为银花泌炎灵片生产过程中的质量和稳定性控制提供了基础和借鉴, 保障临床用药质量均一、安全可靠。

REFERENCES

- [1] ZHANG W T, MIAO R P, ZHAO Q H, et al. Clinical and fundamental research Yinhuo Miyanling Tablets in treating urinary tract infection [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(11): 2403-2410.
- [2] SUN J, XIE Y M, LIU H, et al. Clinical characteristics of Yinhuo Miyanling Pian users based on real world study [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(16): 3391-3396.
- [3] WU J, WANG C, YU H C. Chemical constituents and pharmacological effect of *Lonicerae Japonicae* Flos [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(4): 225-234.
- [4] LI N, WANG P, SUN T F, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological action and quality control of *Scutellaria barbata* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(21): 5117-5128.
- [5] YUAN J C, ZHANG S R, QIU J H, et al. Clinical effect of Yinhuo Miyanling tablets in treatment of cystitis glandularis [J]. China Med Her(中国医药导报), 2022, 19(21): 74-77.
- [6] PAN L, ZHANG L D, ZHAO F Y, et al. Clinical and medication characteristics of Yinhuo Miyanling tablets in the treatment of urinary calculi in real-world [J]. J Basic Chin Med(中国中医基础医学杂志), 2022, 28(1): 132-137.
- [7] SAI J Y. Research on the anti-inflammatory effects and preliminary mechanism of the Yinhuo Miyanling tablet[D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [8] ZHONG T B. Effectiveness analysis of levofloxacin capsules combined with Yinhuo Biyanling Tablets in the treatment of acute cystitis [J]. J North Pharm(北方药学), 2021, 18(3): 45-46.
- [9] ZHANG L, LIU X M. Clinical observation of Yinhuo Biyanling combined with levofloxacin in the treatment of 35 cases of simple acute lower urinary tract infection [J]. J Med Forum(医药论坛杂志), 2021, 42(16): 138-140.
- [10] ZHANG Y Z. Clinical study on Yinhuo Miyanling Tablets

- p>combined with aztreonam in treatment of acute urinary tract infection [J].
- Drugs Clin(现代药物与临床)*
- , 2022, 37(3): 597-600.
- [11] LI D D, ZHANG Y L, XIE Y M, et al. Analysis of the characteristics of real-world Yinhuo Miyanling tablets combined with antibiotics in the treatment of urinary tract infections [J]. *World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志)*, 2020, 15(6): 1084-1088.
 - [12] GAO M Y, LANG Y X, ZHANG Y Y, et al. Research progress on quality markers of Chinese materia medica [J]. *Special Wild Econ Animal Plant Res(特产研究)*, 2022, 44(6): 149-153,160.
 - [13] XUE R, ZHANG Q, CHEN P, et al. Research strategy on quality marker(Q-Marker) of traditional Chinese medicine decoction pieces [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2022, 53(5): 1285-1293.
 - [14] YUAN Y, ZHANG L L, LIU J T, et al. Analysis and prediction of quality markers of *Lonicerae Japonicae Flos* [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47(7): 1730-1738.
 - [15] CHEN Y, CHEN J Y, ZHANG W J, et al. Study on the fingerprints and chemical characteristics of *Baphicacanthus cusia* leaves in different habitats and growing periods based on chemometrics [J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2022, 39(10): 1226-1235.
 - [16] LIU T L, YANG L L, DONG C M, et al. Study on HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica Flos* from different areas based on chemical pattern recognition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2022, 53(15): 4833-4843.
 - [17] MEI J, HUANG Y, CROMMEN J, et al. Quality evaluation of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry and chemical pattern recognition[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022(221): 115029.
 - [18] HUANG Q, LIU Q, ZHANG F Y, et al. Active ingredient analysis of *Eucommia ulmoides* Oliv. in treating diabetic nephropathy by using UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2021, 40(6): 460-469.
 - [19] WANG F Y, JIANG F, FAN X L, et al. Prediction and analysis of quality markers of *Smilax China* based on pharmacological action of chemical components and network pharmacology [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2022, 33(11): 2805-2809.
 - [20] NIU B, XIE X, XIONG X, et al. Network pharmacology-based analysis of the anti-hyperglycemic active ingredients of Roselle and experimental validation[J]. *Comput Biol Med*, 2022(141): 104636.
 - [21] LI S, ZHU J, WANG Z, et al. HPLC fingerprint spectrum construction and detection method of Yin Hua Mi Yan Ling Pian: CN113189248B[P]. 2022-09-30.
 - [22] DONG Y, ZHAO Q, WANG Y. Network pharmacology-based investigation of potential targets of *Astragalus membranaceus* - *Angelica sinensis* compound acting on diabetic nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19496.
 - [23] DUAN S T, LU W, YU W, et al. Chlorogenic acid reducing LPS-induced neuroinflammatory injury in microglia by inhibiting NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *China Pharm(中国药师)*, 2022, 25(5): 758-764.
 - [24] GUAN L, YANG C Q, LI R J, et al. Research progress of mangiferin [J]. *Contemp Chem Ind(当代化工)*, 2021, 50(2): 478-481,486.
 - [25] MA N, LI Y J, FAN J P. Research progress on pharmacological action of quercetin [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*, 2018, 20(8): 221-224.
 - [26] WANG Y, LU H, ZOU X J, et al. Research progress on extraction, separation and purification of chlorogenic acid in *Jinyinhua(Lonicerae Japonicae Flos)* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2022, 40(8): 186-189.
 - [27] MA Y L, LI X N, QIAN D M, et al. Extraction of mangiferin and its antioxidant activity [J]. *Shandong Chem Ind(山东化工)*, 2020, 49(24): 24-26.
 - [28] WANG Q, LI K W, ZHOU C Z. Progress in pharmacological effect and preparation of luteolin [J]. *J Beijing Union Univ(北京联合大学学报)*, 2022, 36(1): 59-63.
 - [29] HE Y J, ZHANG P Z, TIAN H Y, et al. Quercetin protects H9C2 cells against hypoxia injury through MAPK/ERK1/2 signal pathway [J]. *J Third Mil Med Univ(第三军医大学学报)*, 2021, 43(20): 2220-2225.
 - [30] LIU X Y, LI C. Research progress on therapeutic mechanism of scutellarin on ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2021, 44(5): 1284-1288.
 - [31] CHEN L N, CHENG X M, WANG L, et al. Evaluation of batch consistency of Fengshigutong capsules by HPLC fingerprint combined with pattern recognition analysis [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2021, 43(12): 3446-3449.
 - [32] CHEN S L, SUN Y, WEI C X, et al. Establishment of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition analysis and content determination of three components in Huoxue Zhitong Capsules [J]. *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2022, 42(3): 242-247.
 - [33] WANG Q, SU R, WANG H H. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Xingpi Yang'er Granules [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2021, 41(6): 1083-1090.
 - [34] LIU H, XIAO J C, ZHANG Q J, et al. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Jingulian Capsules [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021, 52(14): 4185-4192.
 - [35] ZHONG L J, YANG F, WU J X, et al. Predictive analysis of quality markers of anticoagulant activity of Kunming granules based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and spectral efficacy [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2023, 29(7): 168-176.
 - [36] LI X, WEI S, NIU S, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis[J]. *Comput Biol Med*, 2022(144): 105389.

收稿日期: 2023-01-18

(本文责编: 李艳芳)