

基于高效液相指纹图谱及网络药理学 预测分析山银花质量标志物

周新茹¹, 王志辉^{1,2}, 龙雨青¹,
曾梅¹, 杨敏¹, 童巧珍^{1,2,3}, 周日宝^{1,2,3*}, 刘湘丹^{1,2,3*}

¹湖南中医药大学药学院; ²湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点实验室;

³湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208

摘要: 山银花具清热解毒、疏散风热功效, 应用前景广阔。目前《中国药典》仅将绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙作为山银花质量评价指标, 不能全面评价山银花质量。本研究建立了山银花 HPLC 指纹图谱, 对 29 批山银花进行相似度评价, 应用聚类分析和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 初步筛选出山银花 8 个潜在 Q-Marker; 通过网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络图, 进一步分析验证山银花潜在 Q-Marker 的有效性。本研究发现绿原酸、异绿原酸 A、新绿原酸、獐芽菜苷、异绿原酸 B、灰毡毛忍冬皂苷乙、咖啡酸、川续断皂苷乙可作为山银花质量标志物, 其为较全面评价山银花药材质量提供了科学依据。

关键词: 山银花; HPLC 指纹图谱; 多元统计分析; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)2-0208-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.2.004

Prediction and analysis of the quality marker of Lonicerae Flos by HPLC fingerprint and network pharmacology

ZHOU Xin-ru¹, WANG Zhi-hui^{1,2}, LONG Yu-qing¹,
ZENG Mei¹, YANG Min¹, TONG Qiao-zhen^{1,2,3}, ZHOU Ri-bao^{1,2,3*}, LIU Xiang-dan^{1,2,3*}

¹School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine;

²Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan Bulk Genuine Medicinal Materials;

³Hunan Provincial Key Laboratory of Modernization of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Lonicerae Flos has the function of clear away heat and toxic material and treat the exopathogenic wind-heat, which has a broad application prospect. Only chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B were used as quality evaluation indexes of Lonicerae Flos in Chinese Pharmacopoeia at present, which can't comprehensively evaluate the quality of Lonicerae Flos. In this study, we have established the HPLC fingerprints of Lonicerae Flos, and evaluated the similarity of 29 batches of Lonicerae Flos. We screened the potential Q-marker of Lonicera Flos by orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). We analyze and verify the effectiveness of the potential Q-Marker of Lonicera Flos by constructing a "component-target-pathway" network diagram through network pharmacology. The research results showed that chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, neochlorogenic acid, sweroside, isochlorogenic acid B, macranthoidin B, caffeic acid, and dipsacoside B can be used as quality markers of Lonicera Flos, which can provide scientific basis for the quality control and evaluation of Lonicera Flos.

Key words: Lonicerae Flos; HPLC fingerprint; multivariate statistical analysis; network pharmacology; quality marker

收稿日期: 2022-05-30 接受日期: 2022-12-20

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2021JJ30497, 2021JJ30515); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2021CX80)

* 通信作者 Tel: 86-731-88458233; E-mail: 13973134355@139.com, paeonia_dd@126.com

山银花甘、寒、归肺、心、胃经, 具清热解毒, 疏散风热功效, 用于痈肿疮疖、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症^[1], 目前《中国药典》有山银花的中成药处方达 80 多个, 如感冒止咳片、口炎清

片、感冒止咳胶囊、清肝利胆颗粒、银屑灵颗粒等。山银花不仅为大宗常用中药材、成方制剂原材料,也是化工香料提取原料,同时还作为茶叶和护肤保健品开发,市场应用前景广阔。

现代研究表明,山银花化学成分数量多且复杂,包括有机酸类、三萜皂苷类、黄酮类、挥发油类及微量元素等^[2]。目前《中国药典》仅将绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙作为山银花质量评价指标,只对有机酸类与皂苷类共3种化学成分做了限量规定。大量研究表明木犀草苷等黄酮类成分也是山银花发挥药效的物质基础,中药化学成分复杂,发挥药效并不仅依靠某一化学成分,而是多个组分内部之间存在普遍的加合作用,因此仅以少数成分对药材进行品质评价不够全面。

为提升规范中药材及产品质量标准,刘昌孝院士^[3-7]在研究分析现有质量评价控制方法问题的基础上,于2016年提出了中药质量标志物(Q-Marker)的概念。中药质量标志物有传递与溯源、特有性、有效性、可测性及复方配伍五原则^[8-10],可作为较全面的中药材及产品质量评价控制指标。Q-Marker这一概念提出后,被广泛应用于解析中药材、饮片、制剂与有效性密切相关的中药内在化学质量属性,为中药材及其产品的全过程质量控制及质量溯源提供了新的思路。

隆回、溆浦为湖南灰毡毛忍冬来源山银花主产区,根据其花冠后期是否展开分五彩花(花冠展开)和湘蕾(花冠不展开)两大类,目前产地初加工方式主要有蒸汽杀青与低温干燥两种,从而市场形成了四种湘产山银花药材规格:蒸汽杀青湘蕾、低温干燥

湘蕾、蒸汽杀青五彩花、低温干燥五彩花。为评价不同规格湘产山银花质量,建立比较全面的质量评价指标,本文基于中药质量标志物的概念,结合HPLC指纹图谱、多元统计分析和网络药理学等研究方法预测并验证山银花Q-Marker,以期为山银花质量评价和质量控制提供思路和参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(包括G1312C二元泵、G1316A柱温箱、G7129A自动进样器、VIVID检测器,美国Agilent公司);色谱柱:Agilent ZORAB-AX SB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm);SK8200型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);Eco-S15型实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 试剂

新绿原酸(20 mg/支,批号:19081403);绿原酸(20 mg/支,批号:18071907);咖啡酸(20 mg/支,批号:20110501);獐芽菜苷(20 mg/支,批号:19090902);3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸(异绿原酸B,20 mg/支,批号:21022308);3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(异绿原酸A,20 mg/支,批号:21032304);灰毡毛忍冬皂苷乙(20 mg/支,批号:20072203);川续断皂苷(20 mg/支,批号:19120601)对照品均购自成都普菲德生物科技有限公司,质量分数均≥98%;甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。29批山银花样品采自湖南隆回和溆浦,具体信息见表1,经湖南中医药大学周日宝教授与刘湘丹副教授鉴定为忍冬科植物灰毡毛忍冬*L. macranthoides* Hand. -Mazz.的干燥花蕾及带初开的花。

表1 山银花样品来源信息表

Table 1 Information of the source of Lonicerae Flos samples

编号 No.	产地 Place of origin	品种 Variety	干燥方式 Drying method	编号 No.	产地 Place of origin	品种 Variety	干燥方式 Drying method
S1	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青	S16	湖南隆回	湘蕾	低温干燥
S2	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青	S17	湖南隆回	五彩花	低温干燥
S3	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青	S18	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青
S4	湖南隆回	湘蕾	低温干燥	S19	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青
S5	湖南怀化	湘蕾	低温干燥	S20	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青
S6	湖南怀化	五彩花	低温干燥	S21	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青
S7	湖南怀化	五彩花	低温干燥	S22	湖南隆回	湘蕾	低温干燥
S8	湖南怀化	五彩花	蒸汽杀青	S23	湖南隆回	湘蕾	低温干燥
S9	湖南怀化	湘蕾	蒸汽杀青	S24	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	产地 Place of origin	品种 Variety	干燥方式 Drying method	编号 No.	产地 Place of origin	品种 Variety	干燥方式 Drying method
S10	湖南怀化	湘蕾	蒸汽杀青	S25	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青
S11	湖南怀化	湘蕾	蒸汽杀青	S26	湖南隆回	湘蕾	低温干燥
S12	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青	S27	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青
S13	湖南隆回	湘蕾	蒸汽杀青	S28	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青
S14	湖南隆回	五彩花	蒸汽杀青	S29	湖南隆回	湘蕾	低温干燥
S15	湖南隆回	湘蕾	低温干燥				

1.3 数据库与软件

中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012年版); Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); STRING (<https://string-db.org/>) 数据库; Cytoscape 3.8.2 软件; Metascape (www.metascape.org/) 数据库; PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>); ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>); Schrödinger 软件。

2 方法与结果

2.1 山银花指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶(非亲水性)为填充剂(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.4% 磷酸水溶液为流动相 B, 按下表 2 进行梯度洗脱; 柱温 30 °C; 检测波长: 210 nm。

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0	10	90
15	10	90
17	12	88
20	15.4	84.6
22	21.4	78.6
34	21.8	78.2
40	30	70
60	30	70

2.1.2 对照品溶液制备

精密称取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐牙菜苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品适

量, 用 70% 甲醇溶解分别制得对照品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 密封, 低温避光保存, 备用。

2.1.3 供试品溶液制备

精密称取供试山银花样品粉末 1 g, 置于带塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇溶液 50 mL, 称重, 静置 12 h 后, 室温超声 30 min 后用 70% 甲醇补重, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 制得供试品溶液。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度试验

取 S20 号样品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图。以异绿原酸 A 为参照峰, 测得 22 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.003% ~ 2.07%, 相对峰面积的 RSD 在 1.00% ~ 2.99%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 重复性试验

取 S20 号样品 6 份, 每份精密称取 1 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样, 记录色谱图。以异绿原酸 A 为参照峰, 测得 22 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.01% ~ 2.78%, 相对峰面积的 RSD 在 0.52% ~ 2.67%, 表明该方法重复性良好。

2.1.4.3 稳定性试验

精密称取 S20 号样品 1 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样, 进行色谱分析, 记录色谱图。以异绿原酸 A 为参照峰, 测得 22 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.30% ~ 2.57%, 相对峰面积的 RSD 在 0.31% ~ 3.00%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 指纹图谱的建立

将 29 批山银花药材样品供试品溶液分别进样测定, 将图谱以 AIA 格式保存, 导入中药色谱指纹

图谱相似度评价系统(2012 年版)。以 S1 号图谱作为参照谱,采用中位数法,进行多点校正和色谱峰匹配,29 批山银花药材样品共得到了 22 个共有峰,其

指纹图谱叠加图见图 1,对照指纹图谱见图 2,混合对照品图谱见图 3。

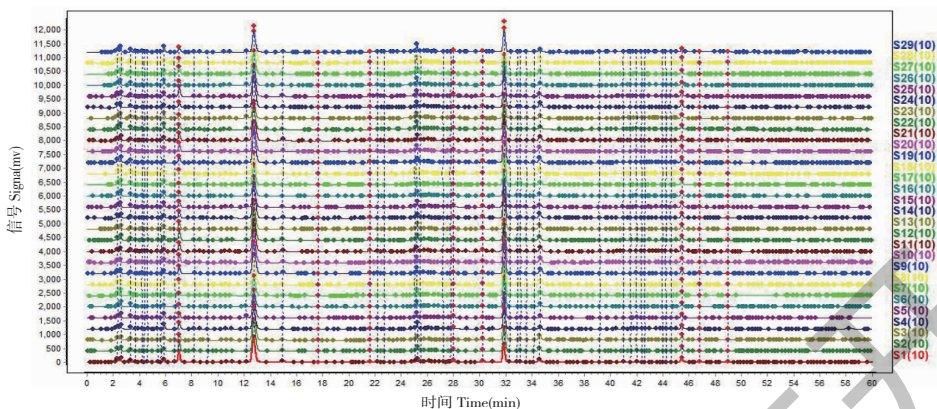


图 1 29 批山银花样品指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprint superposition of 29 batches of Lonicerae Flos

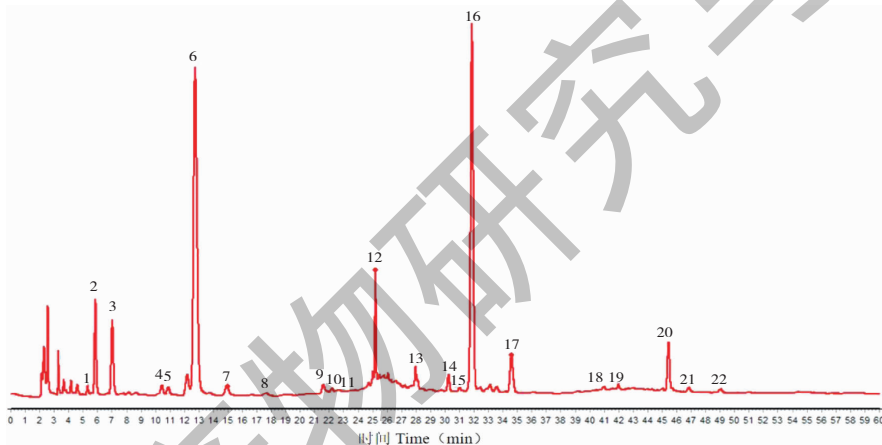


图 2 29 批山银花对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of Lonicerae Flos

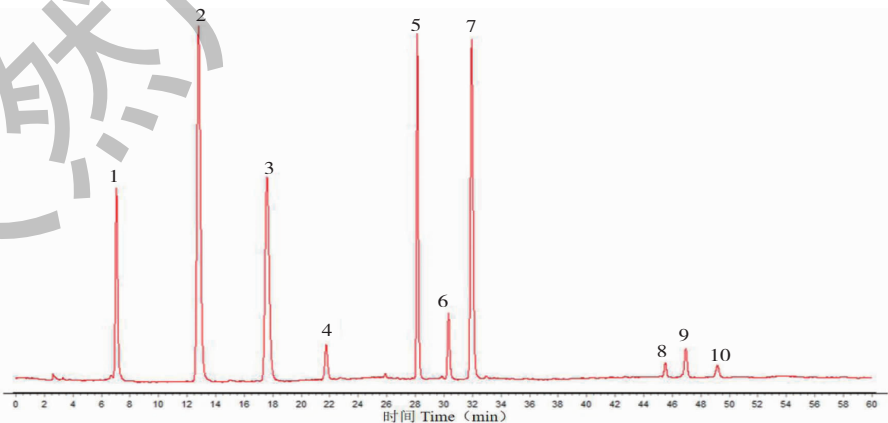


图 3 混合对照品图谱

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances

注:1-新绿原酸;2-绿原酸;3-咖啡酸;4-獐牙菜苷;5-木犀草苷;6-异绿原酸 B;7-异绿原酸 A;8-灰毡毛忍冬皂苷乙;9-灰毡毛忍冬皂苷甲;10-川续断皂苷乙。Note:1-Neochlorogenic acid;2-Chlorogenic acid;3-Caffeic acid;4-Swerside;5-Cynaroside;6-Isochlorogenic acid B;7-Isochlorogenic acid A;8-Macranthoidin B;9-Macranthoidin A;10-Dipsacoside B.

2.1.6 相似度分析

将 29 批山银花的图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版),计算相似度,结

果 29 批山银花的相似度见表 3。29 批山银花的指纹图谱相似度均 >0.95 ,表明所采集的山银花样品质量稳定均一。

表 3 山银花药材相似度结果

Table 3 Results of similarity evaluation of 29 batches of Lonicerae Flos

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.976	S11	0.992	S21	0.972
S2	0.981	S12	0.975	S22	0.990
S3	0.994	S13	0.997	S23	0.980
S4	0.994	S14	0.998	S24	0.994
S5	0.995	S15	0.997	S25	0.982
S6	0.958	S16	0.992	S26	0.993
S7	0.971	S17	0.979	S27	0.989
S8	0.990	S18	0.983	S28	0.996
S9	0.997	S19	0.997	S29	0.992
S10	0.996	S20	0.994		

2.1.7 层次聚类分析

运用 SPSS 26 数据统计软件,采用组间聚类方法,欧氏距离平方方法测量样品间距离进行系统聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA),结果见图 4。由图可知,在分类距离为 20 时,山银花样本被分为两大类, S1、S4、S5、S15、S16、S22、S23、S26、S27、S29、S6、S7、S17、S18 为一类, S3、S8、S13、S14、

S19、S24、S28、S2、S9、S10、S11、S12、S20、S21、S25 为一类。在距离为 6 时,样本被分为 4 类,山银花各批次间有明显的分类距离; S1、S4、S5、S15、S16、S22、S23、S26、S27、S29 被归为一类, S6、S7、S17、S18 被分为一类, S3、S8、S13、S14、S19、S24、S28 被分为一类, S2、S9、S10、S11、S12、S20、S21、S25 被归为一类。

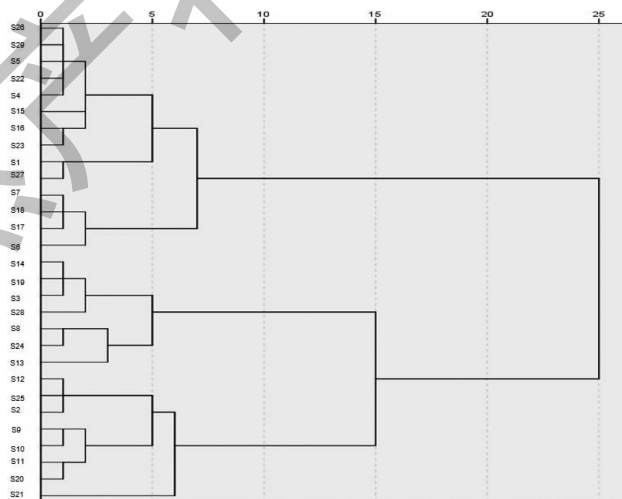


图 4 聚类分析结果

Fig. 4 Systematic tree map

2.1.8 正交偏最小二乘法判别分析

根据 HCA 聚类结果分为 2 组,采用有监督模式

的 OPLS-DA 进行 2 组间分析。模型拟合参数 $R_x^2 = 0.691$, $R_y^2 = 0.941$, 模型预测参数 $Q^2 = 0.789$, 均大

于 0.5, 表明所建立的模型稳定且预测能力较强。为了反映成分对山银花药材的共性表征的重要度, 各成分的 VIP 值见图 5。变量重要性投影 (VIP) 值是筛选差异性化合物的重要指标, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大。以 VIP 值 > 1 为阈值, 筛选成分, 按 VIP 值大小排序依次为 74 号峰 > 217 号峰 > 53 号峰 > 80 号峰 > 209 号峰 > 50 号峰 > 103 号峰 > 942 号峰 > 44 号峰 > 204 号峰 > 306 号峰 > 142 号峰 > 140 号峰 > 317 号峰 > 300 号峰 > 58 号峰 > 108 号峰 > 49 号峰 > 289 号峰 > 162 号峰 > 161 号峰 > 14 号峰

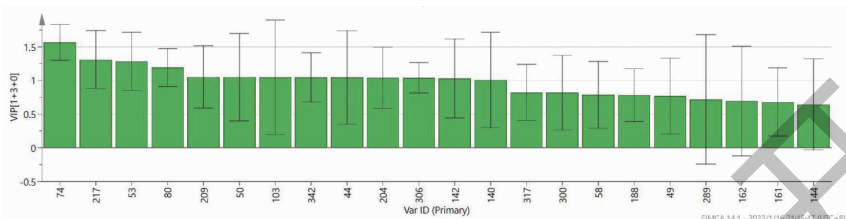


图 5 山银花成分 VIP 图

Fig. 5 OPLS-DA score scatter plot of 29 batches of Lonicerae Flos

2.2 基于成分-靶点-通路的有效性分析

对本研究图 5 中 VIP > 1 且通过对照品指认的八种化学成分(绿原酸、异绿原酸 A、新绿原酸、獐芽菜苷、异绿原酸 B、灰毡毛忍冬皂苷乙、咖啡酸、川续断皂苷乙)进行网络药理学研究, 验证分析山银花的潜在质量标志物的有效性, 相关活性化合物信息如表 4 所示。

表 4 活性化合物信息表

Table 4 Information of active compound

成分 Ingredient	PubChem 编号 PubChem CID
獐芽菜苷 Sweroside	161036
咖啡酸 Caffeic acid	689043
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	5281780
绿原酸 Chlorogenic acid	1794427
新绿原酸 Neochlorogenic acid	5280633
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	6474310
灰毡毛忍冬皂苷乙 Macranthoidin B	71307567
川续断皂苷乙 Dipsacoside B	21627940

2.2.1 靶标的预测筛选与蛋白质互作网络构建及分析

使用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库对以上 8 个活性化合物进行靶标预测, 选择其中可能性 (Probability) 大于 0 的靶点合并、删除重复项, 共获得 154 个人源靶标。将潜在靶标导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数

> 44 号峰 > 204 号峰 > 306 号峰 > 142 号峰 > 140 号峰 > 1。通过对照品 HPLC 对部分共有峰进行指认, 74 号峰为绿原酸, 209 号峰为异绿原酸 A, 50 号峰为新绿原酸, 103 号峰为獐芽菜苷, 204 号峰为异绿原酸 B, 306 号峰为灰毡毛忍冬皂苷乙, 142 号峰为咖啡酸, 140 号峰为川续断皂苷乙。

据库, 选择物种为人类, 设置 combined_score ≥ 0.9 的 97 个靶标作为相互作用关系数据, 通过 Cytoscape 3.8.2 软件绘制 PPI 网络, 并使用 Cytoscape 3.8.2 软件中的 Network Analyze 工具进行网络拓扑学分析, 计算度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 等参数, 见图 6。该网络由 97 个节点 (靶标) 组成, 以尺寸和颜色来表示拓扑学参数值大小, 颜色越深尺寸越大表示拓扑学参数越大。选取度值 ≥ 6 (二倍中位数)、介数中心性和接近中心性 2 个重要拓扑参数均大于中位数的靶点作为核心靶点^[11], 如图 6 所示, 核心靶标共有 16 个: STAT3、EGFR、MAPK1、APP、PIK3CA、ITGB1、CASP3、FYN、ESR1、LCK、CASP8、PRKCD、MAP2K1、ERBB2、SYK、JUN。

2.2.2 基因功能富集分析

通过 Metascape (www.metascape.org/) 在线基因功能富集分析工具对 16 个核心靶标进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和全基因组及代谢途径 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析, 设定分析的物种为“智人”, 其他选项设定默认, 选择 P 值 ≤ 0.01 进行个性化分析。根据数据信息, 选择按照 P 值升序排列的前 15 条基因功能, 以名称与富集因子使用微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 网站可视化作图得到分子生物学功能 (molecular function, MF)、生物学过程 (biological process, BP) 和细胞学组分 (cellular components, CC) 的柱状图, 选择按照 P 值升序排列前

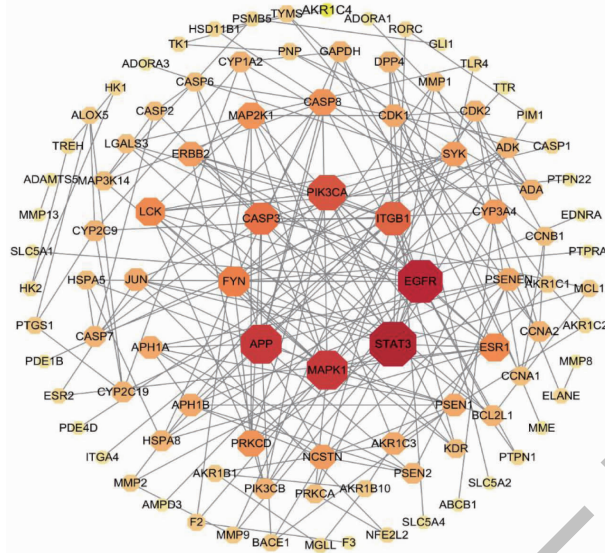


图 6 蛋白质互作图

Fig. 6 Protein-protein interaction network

15 条的基因通路制作 KEGG 通路气泡图。

2.2.2.1 靶标的 GO 功能注释

GO 功能注释结果见图 7, 包括 16 个核心靶标的 BP(332 条)、CC(29 条) 和 MF(35 条) 的富集结果。

柱状图纵坐标为 count, 以不同的颜色区分 GO 注释的三大功能。因条目数量过多, 每个功能注释仅展示 p 值最小前 15 的条目, 见图 7。主要涉及水解酶活性正向调节、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号

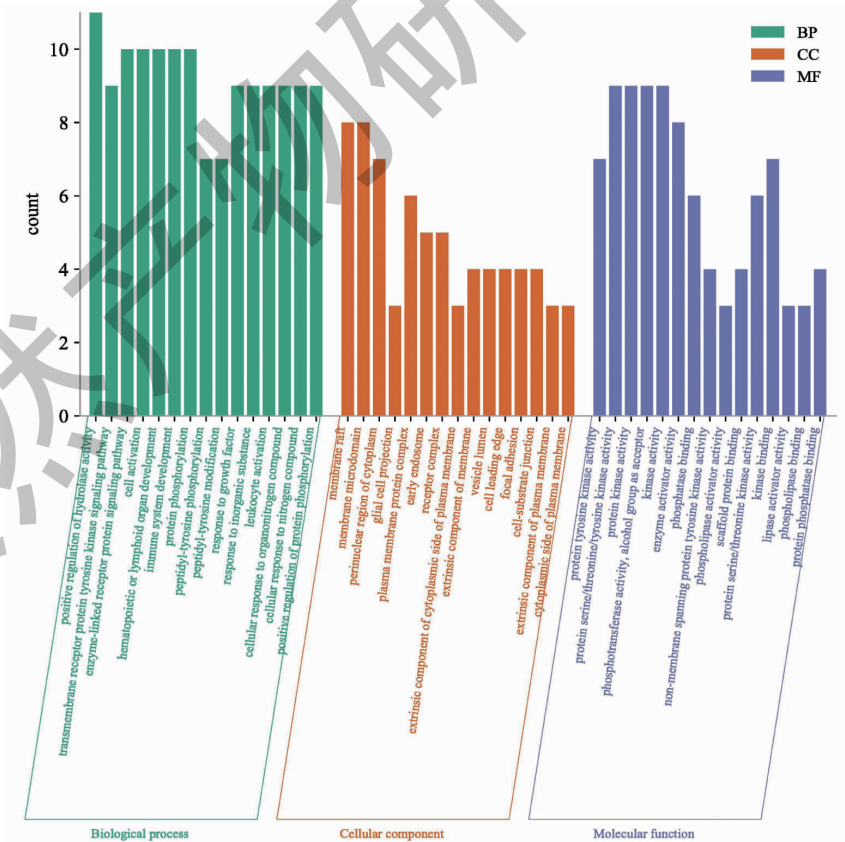


图 7 GO 功能注释柱状图

Fig. 7 The bar graph of GO function enrichment analysis

通路、酶联受体蛋白信号通路、细胞的激活、造血或淋巴器官的发育、免疫系统生长、蛋白质磷酸化、peptidyl-tyrosine 磷酸化、peptidyl-tyrosine 改变、对生长因子的响应、对无机物的反应、白细胞激活、细胞对有机氮化合物的反应、细胞对氮化合物的反应、蛋白质磷酸化的正向调节、膜筏、microdomain、细胞质的核周区、神经胶质细胞投影、质膜蛋白复合物、早期内体、复杂受体、质膜细胞质侧的外源性成分、膜的外部成分、囊腔、细胞前缘、粘着斑、细胞基质结、质膜外源成分、质膜的细胞质侧、蛋白质酪氨酸激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、醇基受体磷酸转移酶活性、激酶活性、酶激活活动、磷酸酶绑定、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、磷脂酶激活活动、链接蛋白结合、蛋白丝氨酸/苏

氨酸激酶活性、激酶绑定、脂肪酶催化剂活性、磷脂酶结合、蛋白磷酸酶绑定等生物活动。

2.2.2.2 靶标信号通路富集分析

对山银花的 16 个核心靶标的通路富集分析如图 8(仅展示 p 值最小的 15 条)所示,图中点的大小代表 count,颜色深浅代表 $-\log_{10}(P)$,横坐标代表 GeneRatio,结果表明主要涉及癌症通路、癌症蛋白聚糖通路、PD-L1 在癌症中的表达和 PD-1 检查点通路、卡波济肉瘤相关疱疹病毒感染、内分泌的阻力、粘着斑、破骨细胞分化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、雌激素信号通路、乳腺癌、丙型肝炎、非小细胞肺癌、乙型肝炎、胰腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等 115 条信号通路。

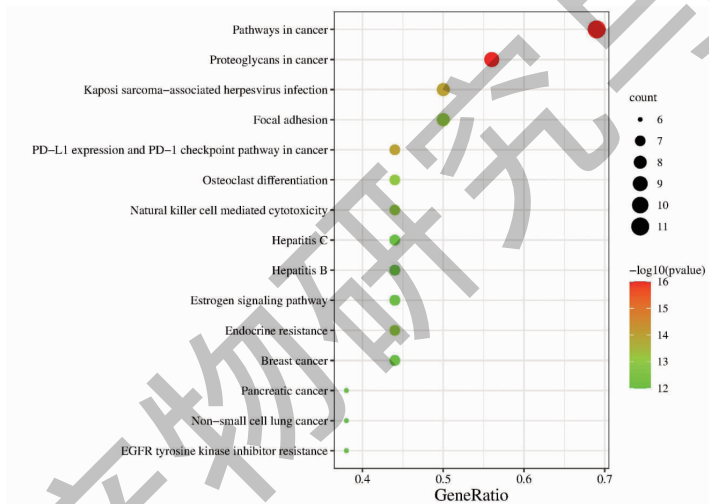


图 8 靶标信号通路富集分析气泡图

Fig. 8 The bubble chart of KEGG function enrichment analysis

2.2.3 化合物-靶标-通路网络构建与分析

将上述分析得到 115 个通路及 16 个关键靶标与对应的化合物数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建“化合物-靶标-通路”网络,如图 9 所示^[12]。图中外面两层蓝色圆点为 115 个通路,最内层红色圆点为 8 个潜在质量标志物,次内层绿色圆点为 16 个核心靶点。

2.2.4 分子对接验证

根据上述网络药理学结果结合考量山银花功效,选择 STAT3、EGFR、MAPK1 及 PIK3CA 作为分子对接验证的靶标蛋白,从 PDB 数据库中下载 STAT3 (ID: 5AX3 配体: 5ID)、EGFR (ID: 6JRK 配体: C6O)、MAPK1 (ID: TAUV 配体: RYW) 及 PIK3CA (ID: 3ZIM 配体: KKR) 结构,从 ZINC 数据库下载 8

个潜在质量标志物化合物的 mol2 格式,使用 Schrödinger 软件中的 Protein Preparation wizard 模块对蛋白质进行补足缺失残基以及中性化等操作,最后进行能量最小化并添加 OPLS4 力场,使用 Receptor Grid Generation 模块根据原有配体默认生成 Grid 文件,采用 Schrödinger 的 LigPrep 模块对各分子进行加氢、能量最小化、几何优化等处理,在 OPLS4 的力场下,将蛋白质与化合物对接,并将打分结果与原配体化合物进行对比^[13],对接结果见表 5,对接结合见图 10。8 个化合物与蛋白质对接后 docking score 均 <0 ,93.75%的化合物 docking score <-5 且与原活性化合物对接结果相近,证明 8 个成分与靶点对接效果良好。

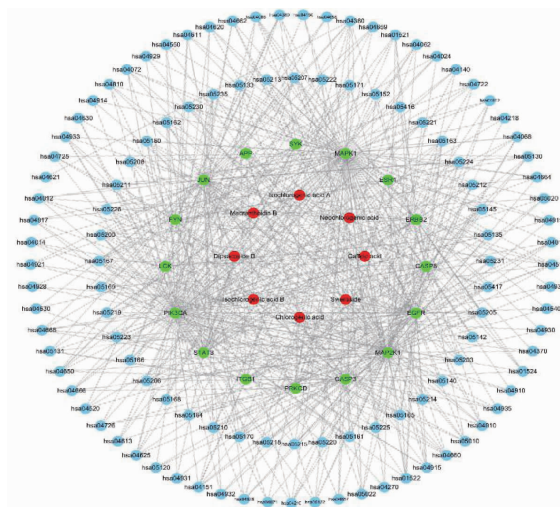


图9 化合物-靶标-通路网络图

Fig. 9 Compound-target-pathway network diagram

表5 成分与关键靶蛋白的分子对接结果

Table 5 Binding result of components with its key targets

化合物 Compound	蛋白质名称 Name of protein			
	STAT3	EGFR	MAPK1	PIK3CA
獐芽菜苷 Sweroside	-7.861	-7.500	-6.404	-5.984
咖啡酸 Caffeic acid	-5.124	-5.009	-4.820	-6.257
绿原酸 Chlorogenic acid	-7.840	-7.224	-7.503	-8.237
新绿原酸 Neochlorogenic acid	-7.840	-7.224	-7.503	-8.237
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	-4.727	-6.802	-6.898	-8.124
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	-7.826	-6.850	-7.398	-9.380
灰毡毛忍冬皂苷乙 Macranthoidin B	-7.570	-9.322	-7.352	-8.298
川续断皂苷乙 Dipsacoside B	-6.839	-8.156	-8.156	-8.138
原化合物 Primary compound	-8.750	-6.528	-14.422	-9.471

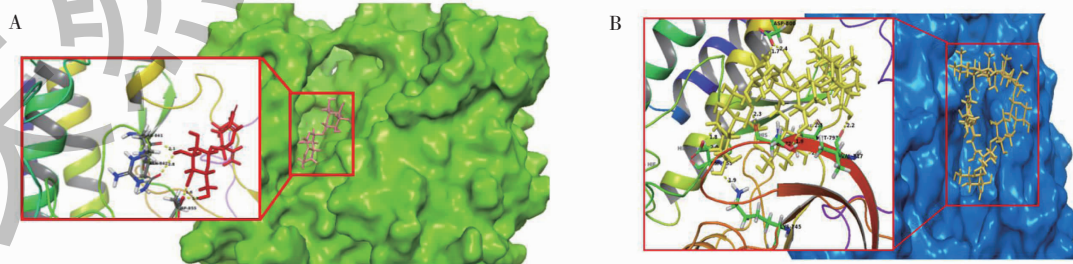


图10 EGFR 蛋白与獐芽菜苷(A)、灰毡毛忍冬皂苷乙(B)对接图

Fig. 10 Docking diagram of EGFR protein with sweroside (a) and macranthoidin B (b)

2.3 化学可测性分析

2.3.1 方法学考察

2.3.1.1 标准曲线的绘制

取对照品溶液,70% 甲醇等比稀释新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐芽菜苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙溶液,经 $0.45 \mu\text{m}$

微孔滤膜过滤,密封,低温避光保存,备用。精密吸取各浓度对照溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪,按“2.1.1”项色谱条件测定,以对照品浓度(mg/mL)

为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,8种化学成分线性回归方程见表6。

表6 山银花中8种化学成分线性回归方程

Table 6 Linear regression equations of eight chemical constituents of Lonicerae Flos

化学成分 Compound	标准曲线 Calibration curve	R^2	线性范围 Linearity range(mg/mL)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$y = 15\ 150\ 312.9704x + 15\ 909.8207$	0.999 7	0.012 ~ 0.48
绿原酸 Chlorogenic acid	$y = 15\ 692\ 496.4067x - 436\ 515.3333$	0.999 0	0.183 ~ 1.83
咖啡酸 Caffeic acid	$y = 42\ 563\ 201.7098x - 21\ 610.3691$	0.999 5	0.00096 ~ 0.12
獐芽菜苷 Sweroside	$y = 3\ 094\ 253.6595x + 4\ 638.8320$	0.999 9	0.0106 ~ 1.06
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	$y = 24\ 164\ 273.2260x - 36\ 173.0351$	0.999 3	0.0012 ~ 0.108
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	$y = 18\ 616\ 001.1209x - 26\ 551.8061$	0.999 8	0.0105 ~ 1.05
灰毡毛忍冬皂苷乙 Macranthoidin B	$y = 1\ 050\ 632.5285x + 13\ 852.7451$	0.999 0	0.01 ~ 0.3
川续断皂苷乙 Dipsacoside B	$y = 1\ 194\ 356.8011x - 43\ 322.0285$	0.999 6	0.1 ~ 1.9

从表6可知,新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐牙菜苷、异绿原酸B、异绿原酸A、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙线性关系良好。

2.3.1.2 精密度的实验

取S20号样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下连续进样6次,记录色谱图。测得新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐牙菜苷、异绿原酸B、异绿原酸A、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙峰面积的RSD分别为2.42%、0.32%、0.99%、1.18%、2.34%、0.24%、1.45%、0.93%,表明仪器精密度良好。

2.3.1.3 稳定性实验

精密称取S20号样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下,分别于0、4、8、12、18、24 h进样,进行色谱分析,记录色谱图。测得新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐牙菜苷、异绿原酸B、异绿原酸A、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙峰面积的RSD分别为2.99%、0.44%、2.20%、2.47%、2.65%、0.37%、1.83%、0.92%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.1.4 重复性实验

精密称取S20号样品6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下进样,记录色谱图。测得新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、獐牙菜苷、异

绿原酸B、异绿原酸A、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙峰面积的RSD分别为1.98%、1.86%、1.56%、2.26%、2.52%、1.47%、2.29%、1.22%,表明该方法重复性良好。

2.3.1.5 加样回收实验

精密称定已知含量的对应山银花样品6份,分别精密加入适量对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按照2.1.1项色谱条件下进样,记录色谱图,计算加样回收率。结果表明新绿原酸的平均回收率为102.84%(RSD=2.28%),绿原酸的平均回收率为96.44%(RSD=0.74%),咖啡酸的平均回收率为100.68%(RSD=2.53%),獐牙菜苷的平均回收率为100.28%(RSD=1.32%),异绿原酸B的平均回收率为101.97%(RSD=0.80%),异绿原酸A的平均回收率为99.79%(RSD=2.70%),灰毡毛忍冬皂苷乙的平均回收率为99.71%(RSD=1.14%),川续断皂苷乙的平均回收率为100.38%(RSD=2.30%),表明该方法的回收率良好。

2.3.2 含量测定

按“2.1.3”项下方法制备29批山银花样品供试品溶液,按“2.1.1”项色谱条件进样,记录色谱图,根据表6中标准曲线进行计算,其百分含量结果见表7。

表7 山银花样品中8种化学成分的含量

Table 7 Content of eight main components of Lonicerae Flos

编号 No.	含量 Content (%)							
	绿原酸 Chlorogenic acid	新绿原酸 Neochlorogenic acid	咖啡酸 Caffeic acid	川续断皂苷乙 Dipsacoside B	灰毡毛忍 冬皂苷乙 Macranthoidin B	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	獐牙菜苷 Sweroside
S1	5.137	13.883	0.139	1.456	8.431	2.230	0.152	0.434
S2	6.558	11.780	0.108	1.174	9.514	2.832	0.113	0.404
S3	7.285	7.003	0.081	1.631	10.678	5.273	0.163	0.348
S4	4.447	8.439	0.075	0.917	7.216	2.613	0.125	0.834
S5	4.476	6.308	0.041	0.987	8.129	3.009	0.119	0.697
S6	3.405	3.677	0.046	0.790	7.199	3.802	0.143	0.327
S7	4.001	4.342	0.036	1.009	7.779	4.043	0.132	0.460
S8	6.150	6.805	0.072	1.377	10.230	5.025	0.147	0.737
S9	6.656	10.070	0.130	1.125	9.211	4.015	0.189	0.884
S10	6.636	10.615	0.134	1.142	8.398	3.800	0.198	0.737
S11	6.495	10.839	0.111	1.156	9.157	3.310	0.151	0.939
S12	6.242	13.318	0.124	1.088	8.061	2.538	0.156	1.225
S13	6.097	9.960	0.124	1.451	10.049	4.365	0.181	0.838
S14	7.138	9.462	0.099	1.609	9.725	4.747	0.174	1.015
S15	4.824	8.085	0.072	0.987	9.221	3.343	0.150	0.867
S16	3.999	5.736	0.067	1.218	8.277	3.107	0.129	0.663
S17	4.157	2.971	0.043	1.561	11.365	3.744	0.135	0.755
S18	4.396	5.552	0.080	1.507	8.789	3.883	0.159	0.479
S19	7.203	8.624	0.100	1.407	9.382	4.957	0.182	1.077
S20	6.342	11.614	0.127	1.198	10.624	3.475	0.187	1.045
S21	7.638	10.971	0.157	1.113	7.014	2.931	0.159	1.469
S22	4.631	7.288	0.066	1.180	9.384	2.908	0.144	0.971
S23	3.561	4.799	0.053	0.827	6.835	2.983	0.141	0.821
S24	6.573	7.412	0.091	1.482	10.330	5.111	0.178	1.101
S25	6.201	13.806	0.121	1.324	8.753	2.807	0.160	1.081
S26	4.249	6.335	0.063	0.778	6.188	2.801	0.143	1.039
S27	4.903	10.042	0.121	1.086	7.698	2.518	0.178	1.145
S28	7.838	6.907	0.086	2.100	11.683	5.345	0.158	1.069
S29	4.267	6.350	0.059	0.768	6.431	2.921	0.136	0.893

2.4 基于植物亲缘性的质量标志物分析

2005版《中国药典》始将金银花和山银花分列,其中忍冬科忍冬干燥花蕾或带初开的花临床作金银花入药;灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬及黄褐毛忍冬干燥花蕾或带初开的花临床作山银花使用,建立同科同属不同种来源中药材(金银花和山银花)

的定性鉴别方法以确保入药来源的准确性十分必要。Wang等^[14]采用UPLC法测定新绿原酸、绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙等含量,用于定性鉴别区分金银花和山银花;金银花与山银花上述成分含量不同,金银花皂苷类成分极低不易检测,而山银花中皂苷类含量

高;Zhang 等^[15]利用测定金银花与灰毡毛忍冬中的新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 等成分的含量区分忍冬与灰毡毛忍冬。综上所述,金银花与山银花在酚酸类、黄酮类及皂苷类成分含量上存在显著差异,将新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙等作为山银花的质量标志物能够区别不同来源“银花”。

3 讨论与结论

3.1 基于化学成分可测性对质量标志物讨论

本文通过 HPLC 建立了山银花的指纹图谱,29 批山银花样品间相似度 >0.95,方法学考察结果证明 HPLC 指纹图谱稳定可靠。对山银花进行潜在质量标志物的含量测定,结果表明,所有样品以上 8 种成分均可检测,且所有样品绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙成分含量都远高于药典标准,表明湖南产不同规格山银花质量均良好。HCA 分析结果表明,在分类距离为 20 时,除 18 号样品外,其他样品按加工方式聚成两大类(蒸汽杀青、低温干燥);在分类距离为 6 时,除 1、27、13、18 外其他样品按照品种与加工方式的不同聚成 4 类(蒸汽杀青湘蕾、蒸汽杀青五彩花、低温干燥湘蕾、低温干燥五彩花)。其中,1、27 是蒸汽杀青湘蕾但与低温干燥湘蕾在 HCA 分析中分类距离更近,18 是蒸汽杀青的五彩花在分类学上与低温干燥五彩花分类更近,13 是蒸汽杀青湘蕾与蒸汽杀青五彩花分类更近,提示加工方法对药材品质有较大的影响。

3.2 基于有效性对质量标志物讨论

山银花入药时其味甘,寒,归肺、心、胃经,具清热解毒,疏散风热功效。现代研究表明,甘味^[16]与皂苷、维生素、蛋白质、甾醇及氨基酸等成分有关,清热解毒、疏散风热与现代研究中的抗炎抗菌增强免疫等反应有关。运用网络药理学从有效性角度分析发现,咖啡酸、獐芽菜苷等八种化合物通过调控 STAT3、EGFR、MAPK1、APP、PIK3CA、ITGB1、CASP3 等 16 个关键靶点,作用于能量代谢、神经递质传递、炎症反应等生理过程,与其清热解毒、疏散风热的传统功效相关。

深入分析相关靶点可以发现,炎症反应的靶点尤其多,以 STAT3 与 EGFR 靶点为例。STAT3 靶点全称 Signal Transducer And Activator Of Transcription 3,信号转换器与转录激活器^[18]。STAT 家族成员作为细胞因子和生长因子^[18],该蛋白可被各种细胞因子和生长因子磷酸化激活,包括 EGF、IL5、IL6、

HGF、LIF 和 BMP2^[18]。EGFR 靶点全称表皮生长因子受体,该蛋白是表皮生长因子家族成员的受体^[17]。EGFR 诱导受体二聚化和酪氨酸自磷酸化,导致细胞增殖^[18]。EGFR 是导致新冠病毒(COVID-19)由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)感染引起的严重形式的细胞因子风暴的组成部分^[18,19]。研究证实,上述靶点确为肺部相关感染中表现突出的靶点,与山银花的传统性味归经一致。

文献表明咖啡酸通过 NF- κ B 依赖性途径抑制 TNF- α 和 PGE2 的产生,提高巨噬细胞的细菌清除活性^[20],抑制 AGE 的形成,调节肠道炎症^[21],降低血清和肾脏中 ACE 和精氨酸酶活性、降低 MDA 和升高 NOx 水平来抗高血压^[21],阻断 STAT3 和抑制 MMP2 和 MMP-9,阻止 ROS 的产生以及减少肿瘤细胞血管生成来起抗肝癌作用^[22],激活 JNK/Bcl-2 介导的体外自噬降低 A53T α -突触核蛋白改善帕金森病行为并保护多巴胺能神经元^[23],降低氧化应激改善血脂水平,减少主动脉损伤抗动脉粥样硬化^[24]。獐芽菜苷能通过上调 miR-29a、抑制 col1 和 TIMP1 发挥抗肝纤维化作用^[25],抑制 NLRP3 炎症体的激活预防非酒精性脂肪性肝炎^[26,27],诱导肝癌细胞 Akt 磷酸化并抑制 Pck1 表达来抗癌^[28]。通过代谢组学分析,异绿原酸 A、异绿原酸 B、绿原酸、新绿原酸、川续断皂苷乙等均为山银花的入血成分^[29],因此文献研究结果与网络药理学研究证明以上 8 个潜在质量标志物确为山银花发挥药效的物质基础。

综上,本研究基于 HPLC 指纹图谱结合聚类分析可有效区分不同品种与加工方式的山银花;本研究基于 OPLS-DA 分析结果,结合网络药理学阐明了绿原酸、异绿原酸 A、新绿原酸、獐芽菜苷、异绿原酸 B、灰毡毛忍冬皂苷乙、咖啡酸、川续断皂苷乙 8 个化合物可作为山银花质量标志物,其为进一步提升山银花质量标准提供了参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 32-33, 230-232.
- 2 Yan RT, Ting Z, Han WY, et al. Lonicerae Flos; a review of chemical constituents and biological activities [J]. Dig Chin Med, 2018, 1: 173-188.
- 3 Liu CX. Five-year review on development of quality markers

- of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52:2511-2518.
- 4 Liu CX. Quality markers for Chinese medicines(Q-marker): improving Chinese medicine quality standards and quality control theory and promoting scientific development of Chinese medicine industry[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50:4517-4518.
- 5 Chen SL, Liu CX, Zhang TJ, et al. Ideas and suggestions on CMM decoction inheritance based on CMM quality markers and traditional usage[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50:4519-4528.
- 6 Liu CX. Construction of traceability system of Chinese materia medica product quality based on quality marker of Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:3669-3676.
- 7 Liu CX, Chen SL, Xiao XH, 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, 47:1443-1457.
- 8 Ju SS, Li YL, Lin ZJ, et al. Present situation analysis and thinking on quality control mode of Chinese materia medica[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2022, 28:269-274.
- 9 Cao YQ, Chu RJ, Liu KL, et al. Visualization and analysis of fingerprinting studies of Chinese traditional medicine in China[J]. *Mod Tradit Chin Med-Mater Materia World Sci Technol* (世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22:3073-3081.
- 10 Wang S, Bao YR, Li TJ, et al. Discussion on key problems for quality evaluation of traditional Chinese medicines and their analysis methods[J]. *J Instrum Ana* (分析测试学报), 2021, 40:132-138.
- 11 Zhang KY, Shen Y, Zhang L, et al. Rapid establishment of a database of potential quality markers(Q-Marker) of traditional Chinese medicine in *Curcuma Radix* based on UPLC-Triple-TOF-MS and network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53:2612-2622.
- 12 Chen JM, Hao EW, Du ZC, et al. Predictive analysis on quality marker of *Phyllanthus emblica* based on chemical composition, pharmacological effects and network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53:1570-1586.
- 13 Li CP, Chen NY, Li X, et al. Analysis of the potentiality of dehydroabietic acid as PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitor based on computational simulation[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:543-553.
- 14 Wang HB, Deng L, Ma YC, et al. Study on identification and determination of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* by UHPLC[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:2516-2521.
- 15 Zhang J, Huang Q, Zeng FJ, et al. Identification of *Jinyinhua* (*Lonicerae Japonicae Flos*) and *Shanyinhua* (*Lonicerae Flos*) based on characteristic UPLC and chemical pattern recognition methods[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2022, 24:49-53.
- 16 Zhang JY, Cao H, Gong SX, et al. Expression of salt-taste herbs and their applications in clinical compatibility[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47:2797-2802.
- 17 Bharadwaj U, Kasembeli MM, Robinson P, et al. Targeting janus kinases and signal transducer and activator of transcription 3 to treat inflammation, fibrosis, and cancer: rationale, progress, and caution[J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 72:486-526.
- 18 Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor(EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20:815-834.
- 19 Ren FJ, Ruan D, Xiong Y, et al. Expression of JAK2/STAT3 signaling pathway in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe pulmonary infection and its clinical significance[J]. *Chin J Nosocomiol* (中华医院感染学杂志), 2021, 31:3722-3726.
- 20 Zielińska D, Zieliński H, Laparra-Llopis JM, et al. Caffeic acid modulates processes associated with intestinal inflammation[J]. *Nutrients*, 2021, 13:554.
- 21 Obogh G, Ojueromi OO, Ademosun AO, et al. Effects of caffeine and caffeic acid on selected biochemical parameters in L-NAME-induced hypertensive rats[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45:e13384.
- 22 Espíndola KMM, Ferreira RG, Narvaez LEM, et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma[J]. *Front Oncol*, 2019, 9:541.
- 23 Zhang Y, Wu Q, Zhang L, et al. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy *in vitro* and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150:104538.
- 24 Wang Y, Kaur G, Kumar M, et al. Caffeic acid prevents vascular oxidative stress and atherosclerosis against atherosclerogenic diet in rats[J]. *Evid-based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:8913926.
- 25 Gong J, Yang F, Yang Q, et al. Sweroside ameliorated carbon tetrachloride(CCl₄)-induced liver fibrosis through FXR-miR-29a signaling pathway[J]. *J Nat Med*, 2020, 74:17-25.