

基于 HPLC 指纹图谱及网络药理学的杜仲质量标志物预测分析

曾梅¹, 王朝晖^{1,2}, 王志辉^{1,2},
龙雨青¹, 曾娟¹, 周新茹¹, 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研究室;

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:通过建立杜仲不同部位 HPLC 指纹图谱分析方法, 结合网络药理学预测杜仲潜在质量标志物。基于中药质量标志物(Q-Marker)的理论依据, 结合指纹图谱和网络药理学对杜仲 Q-Marker 进行初步预测分析, 对 63 批杜仲不同部位样品进行相似度评价, 同时分别进行主成分分析(PCA)及偏最小二乘法判别分析(PLS-DA); 通过网络药理学筛选杜仲相关成分的靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测杜仲的 Q-Marker。本研究建立了 63 批杜仲不同部位的指纹图谱, 相似度均大于 0.900, 经筛选得到 8 个化合物, 173 个靶点, 包括 PIK3R1、HRAS、AKT1、EGFR、SRC 等 11 个核心靶点, 涉及氨代谢、癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症蛋白聚糖、PI3K-Akt 信号通路、卵巢类固醇生成等主要通路, 并构建成分-靶点-通路图。预测绿原酸、芦丁、京尼平苷为杜仲叶潜在 Q-Marker, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷为杜仲皮潜在 Q-Marker, 京尼平苷酸、京尼平苷、桃叶珊瑚苷为杜仲雄花潜在 Q-Marker, 将绿原酸、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷为杜仲果荚潜在 Q-Marker。

关键词:杜仲不同部位; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 靶点; 通路

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)8-1283-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.001

Predictive analysis of *Eucommia ulmoides* quality markers based on HPLC fingerprint and network pharmacology

ZENG Mei¹, WANG Zhao-hui^{1,2}, WANG Zhi-hui^{1,2},
LONG Yu-qin¹, ZENG Juan¹, ZHOU Xin-ru¹, ZHOU Ri-bao^{1,2,3*}, LIU Xiang-dan^{1,2,3*}

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

²Hunan Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Cultivation of Large and Authentic Medicinal Materials;

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

Abstract: The potential mass markers of *Eucommia ulmoides* were predicted by establishing an HPLC fingerprint analysis method for different parts of *E. ulmoides* combined with network pharmacology. Based on the theoretical basis of traditional Chinese medicine (TCM) quality markers (Q-Marker) combined with fingerprint mapping and network pharmacology for primary prediction analysis of Q-Marker of *E. ulmoides*, 63 batches of samples from different parts of *E. ulmoides* were evaluated for similarity, along with principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), respectively; Through network pharmacology to screen the targets and pathways of related ingredients in *E. ulmoides*, a ‘ingredient target pathway’ network diagram was constructed to predict Q-Marker in *E. ulmoides*. In this study, we established 63 batches of fingerprints from different parts of *E. ulmoides* with similarity scores greater than 0.900, which were screened to obtain eight compounds and 173 targets, including 11 core targets including PIK3R1, HRAS, AKT1, EGFR, SRC, and other major pathways involved in ammonia metabolism, cancer pathways, lipids and atherosclerosis, cancer proteoglycans, PI3K Akt signaling pathway, and ovarian steroidogenesis, and constructed component target pathway maps. Chlorogenic acid, rutin and geni-

收稿日期: 2023-02-01 接受日期: 2023-05-31

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21); 湖南省中医药管理局科研项目 D2022131(A2022005-9); 2020年湖南省一流专业建设点; 中药资源与开发(2020-248); 湖南中医药大学中药学一流学科项目(2018-3)

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

poside were predicted to be potential Q-Marker for *E. ulmoides* leaves, aucubin, geniposidic acid and pinosresinol diglucoside were predicted to be potential Q-Marker for *E. ulmoides* bark, geniposidic acid, geniposide and aucubin were predicted to be potential Q-Marker for *E. ulmoides* male flower, chlorogenic acid, geniposidic acid, aucubin were identified as potential Q-Marker for *E. ulmoides* pods.

Key words: different parts of *Eucommia ulmoides*; fingerprint pattern; network pharmacology; Q-Marker; targets; pathways

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv) 为杜仲科 (*Eucommiaceae*) 杜仲属 (*Eucommia*) 植物, 单属单种, 主产陕西省、四川省、河南省、湖南省、湖北省、重庆市、贵州省、山东省、甘肃省、江苏省和山西省等地, 其中湖南慈利为杜仲之乡, 杜仲资源丰富。杜仲传统以树皮入药, 在我国有两千多年的用药历史, 其味甘、性温, 有补肝肾、强筋骨、安胎等功效^[1]。杜仲叶于 2015 年新收录入《中华人民共和国药典》, 现为药食同源试点品种, 市场常见有杜仲茶等产品。杜仲雄花在杜仲产地也常作茶用; 杜仲果荚一般作为胶的提取原料。

市场杜仲产品质量参差不齐, 2020 年版《中华人民共和国药典》中杜仲皮、叶含量测定项下仅对松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸进行控制, 杜仲化学成分种类较为复杂, 制定合理的杜仲质量标准、保障杜仲质量, 是亟待解决的问题。

刘昌孝院士于 2016 年提出了中药质量标志物 (Q-Marker) 概念^[2], 后有专家将质量标志物归纳为“五原则”^[3], 为中药质量控制提供了科学依据。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]; 指纹图谱是目前较为成熟的发现不同批次产品共有成分的方法。

基于此, 本研究采用高效液相色谱 (HPLC) 法建立杜仲 (皮、叶、果荚、雄花) 的指纹图谱, 再利用

网络药理学方法对杜仲成分、靶点、通路进行整理分析方法预测杜仲不同部位潜在的 Q-Marker, 从而建立杜仲 (皮、叶、果荚、雄花) 的质量控制研究方法, 以期对杜仲 (皮、叶、果荚、雄花) 的质量控制以及作用机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (Agilent1260 二极管阵列检测器, 德国安捷伦公司); ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

1.2 材料

对照品桃叶珊瑚苷 (批号 19122404, 质量分数 ≥ 98%)、京尼平苷酸 (批号 19101402, 质量分数 ≥ 98%)、绿原酸 (批号 19101402, 质量分数 ≥ 98%)、京尼平苷 (批号 21092708, 质量分数 ≥ 98%)、松脂醇二葡萄糖苷 (批号 20011401, 质量分数 ≥ 98%)、芦丁 (批号 18071907, 质量分数 ≥ 98%)、紫云英苷 (批号 20121602, 质量分数 ≥ 98%)、槲皮素 (批号 21032401, 质量分数 ≥ 98%), 均购于成都普菲德生物科技有限公司; 磷酸 (天津市恒心化学试剂制造有限公司, 分析纯); 甲醇 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 乙腈 (色谱纯)。

28 批不同品种、不同产地杜仲叶样品、15 批不同产地及采收期杜仲皮样品、10 批不同产地杜仲果荚样品、10 批不同产地及采收时间杜仲雄花样品, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的不同部位。样品具体信息见表 1。

表 1 杜仲不同部位样品信息表

Table 1 Sample information of different parts of *E. ulmoides*

样品编号 Sample No.	产地 Place of origin	品种 Variety	采收部位 Harvesting site	采收时间 Harvest time	样品编号 Sample No.	产地 Place of origin	品种 Variety	采收部位 Harvesting site	采收时间 Harvest time
S1	湖南慈利	华仲 5 号	叶	2021.06.20	S33	湖南慈利江垭	地方种	树皮	2021.05
S2	湖南慈利	华仲 8 号	叶	2021.06.20	S34	湖南慈利零阳镇	地方种	树皮	2021.06
S3	湖南慈利	华仲 10 号	叶	2021.06.20	S35	湖南慈利三合镇	地方种	树皮	2021.05
S4	湖南慈利	华仲 12 号	叶	2021.06.20	S36	湖南慈利象市镇	地方种	树皮	2021.05
S5	湖南慈利	密叶杜仲	叶	2021.06.20	S37	湖南慈利溪口镇	地方种	树皮	2021.04

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品编号 Sample No.	产地 Place of origin	品种 Variety	采收部位 Harvesting site	采收时间 Harvest time	样品编号 Sample No.	产地 Place of origin	品种 Variety	采收部位 Harvesting site	采收时间 Harvest time
S6	湖南慈利	华仲 5 号	叶	2021.09.08	S38	湖南慈利龙潭河	地方种	树皮	2021.05
S7	湖南慈利	华仲 8 号	叶	2021.09.08	S39	湖南安化	地方种	树皮	2021.07
S8	湖南慈利	华仲 10 号	叶	2021.09.08	S40	福芝堂	地方种	树皮	2021.07
S9	湖南慈利	华仲 12 号	叶	2021.09.08	S41	中华药材行	地方种	树皮	2021.07
S10	湖南慈利	密叶杜仲	叶	2021.09.08	S42	湖南郴州桂东	地方种	树皮	2021.08
S11	湖南慈利	地方种	叶	2021.04.18	S43	湖南安化	地方种	树皮	2021.01
S12	湖南长沙芙蓉区	地方种	叶	2021.06.30	S44	湖南长沙芙蓉区	地方种	果荚	2021.06.30
S13	湖南怀化沅陵	地方种	叶	2021.07.18	S45	湖南怀化沅陵	地方种	果荚	2021.07.18
S14	湖南邵阳洞口	地方种	叶	2021.07.05	S46	湖南长沙岳麓区	地方种	果荚	2021.07.21
S15	湖南邵阳小沙江	地方种	叶	2021.07	S47	湖南郴州桂东	地方种	果荚	2021.08.13
S16	湖南郴州桂东	地方种	叶	2021.08.13	S48	湖南张家界	地方种	果荚	2021.09.22
S17	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.07.01	S49	湖南张家界	华仲 8 号	果荚	2022.08
S18	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.07.15	S50	湖南张家界	华仲 10 号	果荚	2022.08
S19	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.08.01	S51	湖南张家界	密叶杜仲	果荚	2022.08
S20	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.08.15	S52	湖南长沙岳麓区	地方种	果荚	2022.08
S21	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.09.01	S53	湖南张家界	地方种	果荚	2022.08
S22	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.09.15	S54	湖南慈利县	地方种 1	雄花	2021.06
S23	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.10.01	S55	湖南慈利县	地方种 1	雄花	2022.04
S24	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.10.15	S56	湖南慈利县	地方种 2	雄花	2022.04
S25	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.11.01	S57	湖南长沙岳麓区	地方种	雄花	2022.04
S26	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.12.01	S58	湖南慈利县	华仲 5 号	雄花	2022.04
S27	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.12.15	S59	湖南慈利县	华仲 12 号	雄花	2022.04
S28	湖南长沙岳麓区	地方种	叶	2021.12.30	S60	湖南慈利三合口乡	地方种	雄花	2022.04
S29	湖南宜冲桥乡	地方种	树皮	2021.06.01	S61	湖南慈利江垭	地方种	雄花	2022.04
S30	湖南慈利苗市	地方种	树皮	2021.06.20	S62	湖南慈利阳和乡	地方种	雄花	2022.04
S31	湖南慈利景龙桥	地方种	树皮	2021.06	S63	湖南慈利	地方种 3	雄花	2022.05
S32	湖南通津铺乡	地方种	树皮	2021.06					

1.3 杜仲不同部位指纹图谱研究

1.3.1 对照品溶液制备

精密称取对照品适量,用甲醇溶解分别制得浓度为 0.024 0 mg/mL 桃叶珊瑚苷溶液,0.075 0 mg/mL 京尼平苷酸溶液,0.205 0 mg/mL 绿原酸溶液,0.002 4 mg/mL 京尼平苷溶液,0.010 6 mg/mL 松脂醇二葡萄糖苷溶液,0.013 9 mg/mL 芦丁溶液,0.005 5 mg/mL 紫云英苷溶液,0.003 0 mg/mL 槲皮素溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,密封,低温避光保存,备用。

1.3.2 供试品溶液的制备

收集新鲜杜仲叶、皮、果荚、雄花样品,烘干,粉碎,精密称取样品粉末(过 80 目筛)0.5 g 置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 12 mL 后称重,超声提取

30 min 后取出,冷却、称重,损失的质量用甲醇补足后摇匀,滤过。取滤液在离心机中以 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜,密封,低温避光保存,备用

1.3.3 指纹图谱色谱条件

采用 Supersil ODS-B100A 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),采用梯度洗脱(0~12 min,5% A \rightarrow 8% A;12~17 min,8% A \rightarrow 11% A;17~25 min,11% A \rightarrow 13% A;25~28 min,13% A \rightarrow 14% A;28~40 min,14% A \rightarrow 14.5% A;40~41 min,85.5% A \rightarrow 14.5% A;41~56 min,20% A \rightarrow 30% A;56~65 min,30% A \rightarrow 24% A;65~66 min,76% A \rightarrow 95% A;66~67 min,5% A \rightarrow 5% A);体积流量为 1.0 mL/min;柱温

30 ℃;进样量 10 μL;检测波长(0~8 min,207 nm;9~30 min,237 nm;31~40 min,207 nm;41~57 min,320 nm;58~67 min,360 nm)。

1.4 基于网络药理学预测杜仲不同部位潜在 Q-Marker

1.4.1 杜仲不同部位潜在质量标志物来源定位

通过文献查阅,定位杜仲不同部位潜在质量标志物。

1.4.2 候选化合物靶点预测

通过数据库对 8 个目标化合物筛选,合并筛选出的靶点蛋白并去除重复靶点,得到与 8 个化合物相关的 173 个靶点蛋白。

1.4.3 靶点蛋白与蛋白互作(PPI)网络分析

将筛选出的靶点导入 STRING11.0 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 数据库后做 PPI 分析,设置物种为“Homo sapiens”,隐藏网络中无联系的节点,其余参数设置不变,获得核心靶点 PPI 网络图,并将得出的结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,然后用 Network Analyze 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)等参数对蛋白相互作用进行可视化处理。

1.4.4 功能富集分析与通路分析

基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析主要用于描述基因靶点的功能,包括分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)三个部分。京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析可以得到潜在靶点所富集的信号通路。将筛选得到的靶点导入 Metascape 数据库(<http://metascape.org/>)进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, $P < 0.01$ 表示具有统计学意义,按照 P 值大小对结果进行排序,并进行可视化。

1.4.5 分子对接验证

综合网络药理学结果及杜仲药效考虑,选择核心靶标作为分子对接验证的靶标蛋白,将筛选出的潜在质量标志物与选择的蛋白进行分子对接。

2 结果

2.1 杜仲不同部位指纹图谱研究

2.1.1 精密度考察

精密称 S12 样品 0.5 g,用“1.3.2”提取方法制备供试品溶液,在“1.3.3”液相色谱条件下进样,连

续 6 次,记录色谱图。以绿原酸为参照峰,测得 13 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.02%~0.08%,相对峰面积的 RSD 在 0.05%~2.29%,表明仪器精密度良好。

2.1.2 重复性试验

取 S12 样品 6 份,每份精密称取 0.5 g,用“1.3.2”提取方法制备供试品溶液,在“1.3.3”液相色谱条件下进样,记录色谱图。以绿原酸为参照峰,测得 13 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.02%~0.08%,相对峰面积的 RSD 在 0.68%~2.86%,表明该方法重复性良好。

2.1.3 稳定性试验

精密称取 S12 样品 0.5 g,用“1.3.2”提取方法制备供试品溶液,在“1.3.3”液相色谱条件下进样,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,进行色谱分析,记录色谱图。以绿原酸为参照峰,测得 13 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.02%~0.07%,相对峰面积的 RSD 在 0.54%~3.01%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.4 参照峰选择

在不同部位杜仲色谱图中绿原酸的峰分离良好,峰形稳定,峰面积较大且为所有样品共有,所以确定绿原酸的峰为参比峰(S)。

2.1.5 杜仲不同部位 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

取杜仲不同部位样品,用“1.3.2”提取方法制备供试品溶液,在“1.3.3”液相色谱条件下进样,记录 63 批样品的色谱图,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012 版)分别对杜仲不同部位样品 HPLC 色谱图进行多点校正,色谱峰匹配(时间宽度为 0.10),用中位数法生成对照图谱 R,计算相似度,建立杜仲不同部位的特征图谱,28 批杜仲叶样品标定了 13 个共有峰,15 批杜仲皮样品标定了 12 个共有峰,10 批杜仲雄花样品标定了 10 个共有峰,10 批杜仲果荚样品标定了 8 个共有峰。叶样品相似度 0.922~0.999,皮样品相似度 0.954~0.998,果荚样品相似度 0.928~0.998,雄花样品相似度 0.959~0.999,相似度均 > 0.9 ,说明不同部位杜仲样品之间相似度良好。杜仲不同部位色谱叠加见图 1,杜仲不同部位对照特征图谱见图 2(标出的峰为共有峰),不同部位样品相似度评价结果见表 2。

2.1.6 部分特征峰指认

进一步确认杜仲样品特征峰的化学信息,采用 HPLC 对杜仲叶样品对照特征图谱中共有峰中的 8

个色谱峰进行了指认,通过与对照品对照,分别鉴定为桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素,结果见图 3。

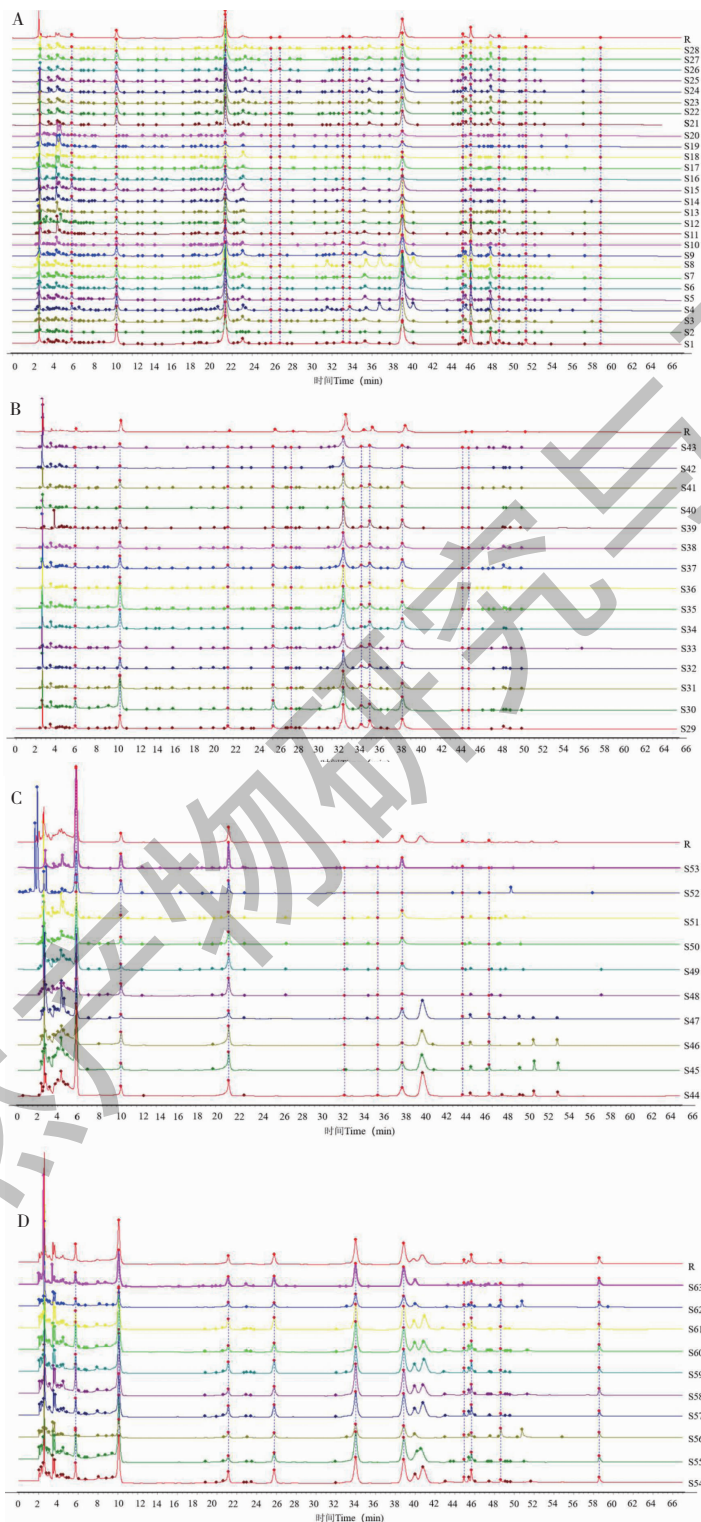


图 1 杜仲不同部位 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of different parts of *E. ulmoides*

注: A-叶; B-皮; C-果荚; D-雄花。Note: A-Leaf; B-Bark; C-Fruit pod; D-Male flower.

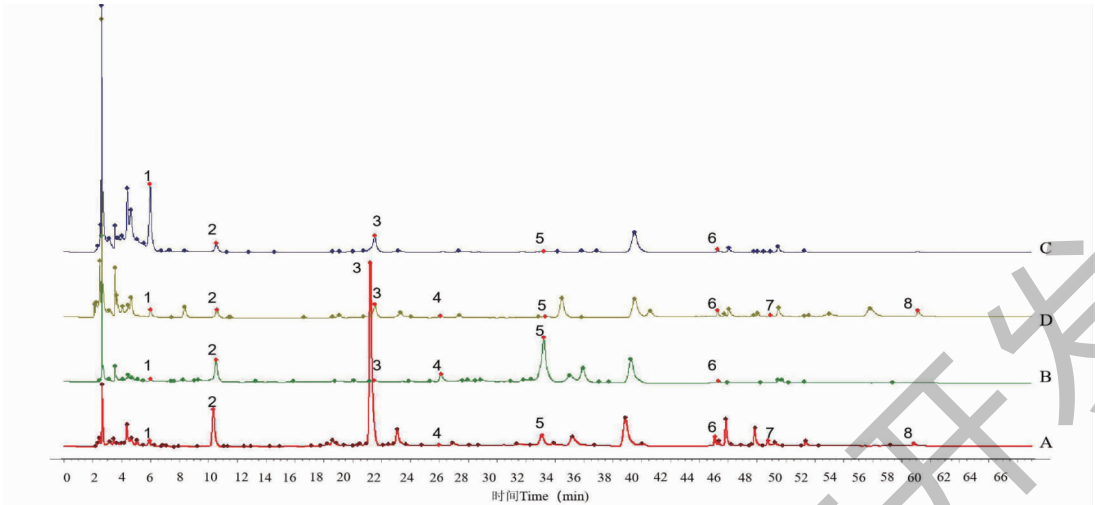


图2 杜仲不同部位对照特征图谱

Fig. 2 Control fingerprint of different parts of *E. ulmoides*

注: A-叶; B-皮; C-果荚; D-雄花。1-桃叶珊瑚苷; 2-京尼平苷酸; 3-绿原酸; 4-京尼平苷; 5-松脂醇二葡萄糖苷; 6-芦丁; 7-紫云英苷; 8-槲皮素 (图3同)。Note: A-Leaf; B-Bark; C-Fruit pod; D-Male flower. 1-Aucubin; 2-Geniposidic acid; 3-Chlorogenic acid; 4-Geniposide; 5-Pinoresinol diglucoside; 6-Rutin; 7-Astragalgin; 8-Quercetin (Same as Fig. 3).

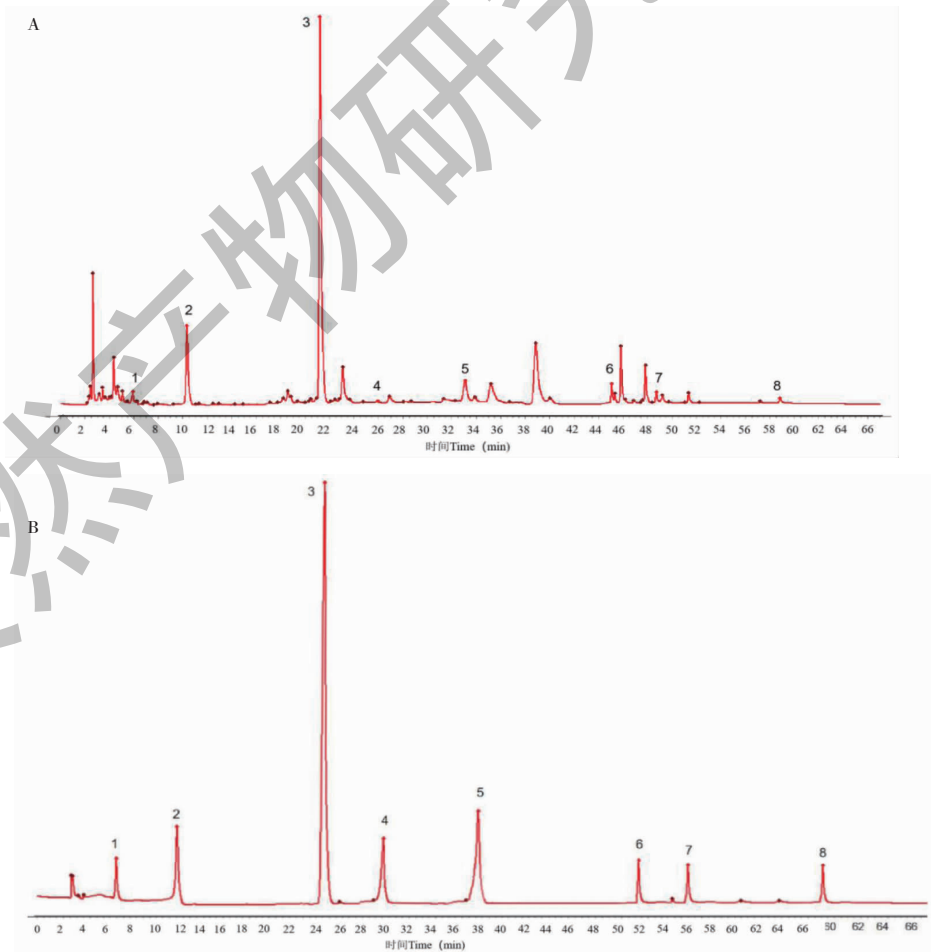


图3 杜仲叶 S12 样品(A)和混合对照品(B)的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of *E. ulmoides* leaf S12 sample (A) and the mixed control (B)

表 2 样品相似度评价结果

Table 2 Sample similarity evaluation results

样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity
S1	0.979	S22	0.991	S43	0.978
S2	0.988	S23	0.988	S44	0.999
S3	0.956	S24	0.992	S45	0.991
S4	0.985	S25	0.987	S46	0.979
S5	0.996	S26	0.994	S47	0.928
S6	0.999	S27	0.986	S48	0.982
S7	0.999	S28	0.987	S49	0.987
S8	0.921	S29	0.981	S50	0.998
S9	0.985	S30	0.923	S51	0.938
S10	0.988	S31	0.993	S52	0.958
S11	0.92	S32	0.994	S53	0.976
S12	0.922	S33	0.948	S54	0.994
S13	0.991	S34	0.997	S55	0.997
S14	0.961	S35	0.998	S56	0.959
S15	0.977	S36	0.984	S57	0.999
S16	0.924	S37	0.995	S58	0.988
S17	0.97	S38	0.946	S59	0.998
S18	0.922	S39	0.954	S60	0.992
S19	0.955	S40	0.98	S61	0.997
S20	0.958	S41	0.972	S62	0.959
S21	0.992	S42	0.998	S63	0.997

2.1.7 聚类分析(HCA)

以杜仲叶、皮、雄花、果荚共有峰峰面积为变量运用 SPSS 22 数据统计软件,采用组间聚类方法,欧氏距离平方法测量样品间距离进行系统聚类分析。结果表明,以距离小于 5 为标准,将 28 份杜仲叶样品分为 3 类,S4、S9 分别聚为一类,其余样品为一类;15 批杜仲皮样品聚为 4 类,S29、S31、S34、S35、S36、S41、S42、S43 聚为第一类,S30、S32、S39、S40 聚为第二类,S33、S38 聚为第三类,S37 单独聚为第四类;10 批杜仲果荚样品聚为 3 类,S45、S50 聚为第一类,S44、S46、S51 聚为第二类,S47、S48、S49、S52、S53 聚为第三类;10 批杜仲雄花样品聚为 2 类,S55、S57、S58、S60、S62、S63 聚为第一类,S59、S61、S54、S56 聚为第二类(结果如图 4)。不同品种杜仲叶、雄花、果荚不聚为一类,说明不同品种的杜仲样品质量有一定差异,不同产地杜仲叶、皮、雄花、果荚聚为

一类,说明不同产地的杜仲不同部位样品质量较为均一,没有明显地域性。

2.1.8 主成分分析和正交偏最小二乘判别分析

主成分分析法(principal component analysis, PCA)是一种通过降维技术把多个变量化为少数几个主成分(综合变量)的统计分析方法。

将杜仲不同共有峰峰面积导入 SPSS 22 数据统计软件,以特定的特征值与累计贡献率作为判定依据,对杜仲不同部位样品进行主成分分析。以特征值 >1 为提取标准,28 份杜仲叶样本有 3 个主成分,其特征值 $\lambda_1 = 6.999$, $\lambda_2 = 1.778$, $\lambda_3 = 1.344$,特征值 λ_1 的贡献率为 53.841%, λ_2 的贡献率为 13.678%, λ_3 的贡献率为 10.340%,累积贡献率为 77.859%;15 份杜仲皮样本有 4 个主成分,其特征值 $\lambda_1' = 6.275$, $\lambda_2' = 1.589$, $\lambda_3' = 1.366$, $\lambda_4' = 1.138$,特征值 λ_1' 的贡献率为 52.293%, λ_2' 的贡献

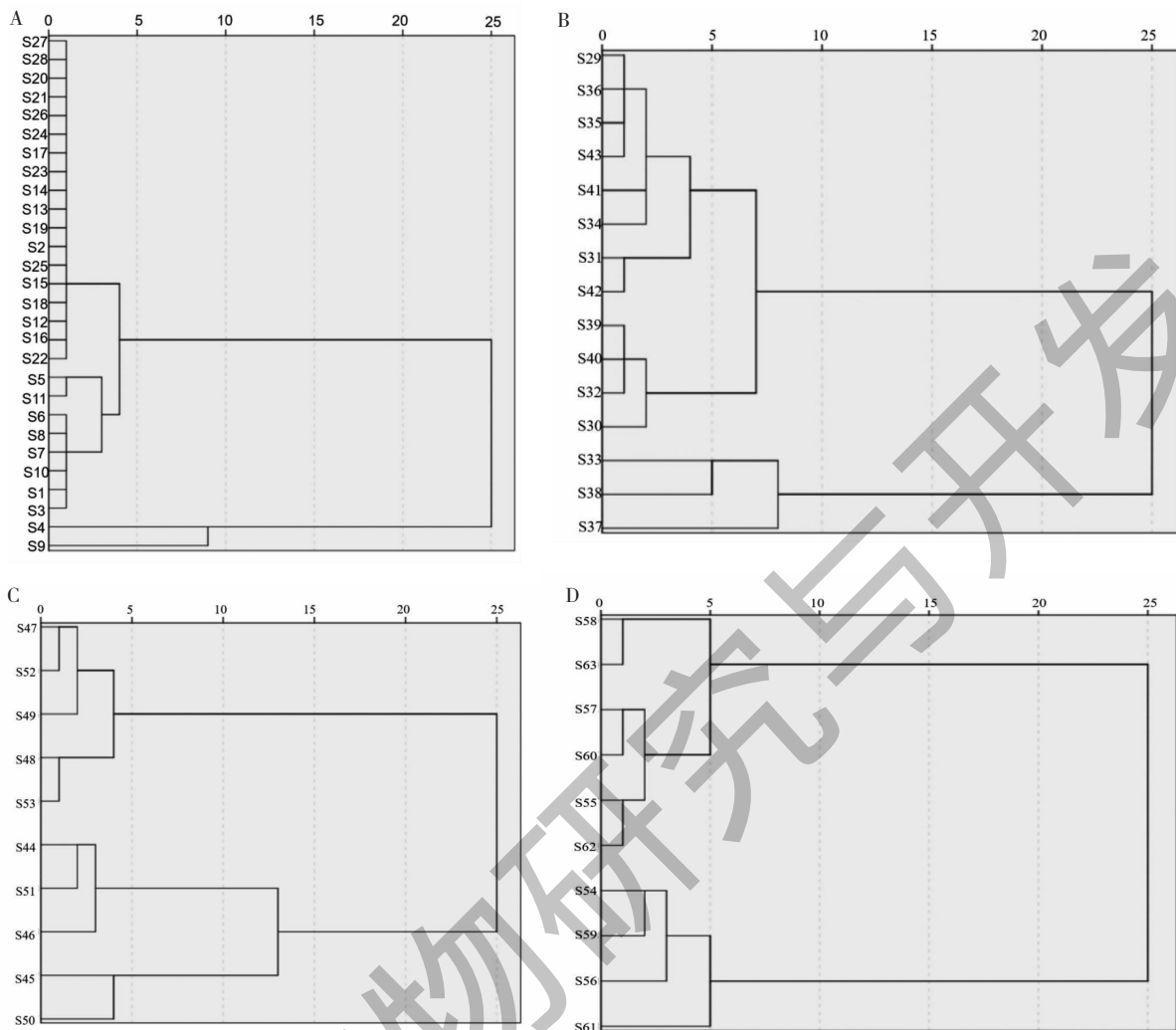


图4 杜仲不同部位聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis of different parts of *E. ulmoides*

注:叶;B-皮;C-果荚;D-雄花。Note: A-Leaf; B-Bark; C-Fruit pod; D-Male flower.

率为13.239%, λ_3' 的贡献率为11.383%, λ_4' 的贡献率为9.487%,累积贡献率为86.401%;10份杜仲果荚样本筛选出3个主成分,其特征值 $\lambda_1'' = 3.625$, $\lambda_2'' = 1.954$, $\lambda_3'' = 1.268$,特征值 λ_1'' 的贡献率为45.316%,特征值 λ_2'' 的贡献率为24.425%,特征值 λ_3'' 的贡献率为15.849%,累积贡献率为85.59%;10份杜仲雄花样本筛选出2个主成分,其特征值 $\lambda_1''' = 7.215$, $\lambda_2''' = 1.83$,特征值 λ_1''' 的贡献率为72.151%,特征值 λ_2''' 的贡献率为18.298%,累积贡献率90.449%。筛选出的杜仲不同部位的主成分具有良好代表性,可以反映出杜仲不同部位的综合质量。

以选取的主成分方差贡献率为权重系数,对杜仲不同部位样品主成分得分、综合得分进行分析,并

对得分结果进行排序。得分情况反映各批杜仲样本质量情况,质量越好,则分数越高。本研究中,湖南慈利华仲12号杜仲叶药材、慈利江垭杜仲皮药材、华仲10号杜仲果荚、华仲12号雄花样本分别在不同部位样品中得分最高,质量较好。

将杜仲不同部位样品中共有峰峰面积导入SIMCA多元变量统计软件,得到OPLS-DA得分图和VIP图,结果见图5。 R^2 代表模型的解释能力, Q^2 代表模型的预测能力,模型中 R^2 和 Q^2 均大于0.5。结果表明,采用PCA-X和OPLS-DA来观察不同部位杜仲样品的自然聚集,28份杜仲叶样品聚为3类,18份杜仲皮样品聚为4类,10份杜仲果荚样品聚为3类,10份杜仲雄花样品聚为两类,且分离更加显著,与HCA结果基本一致。

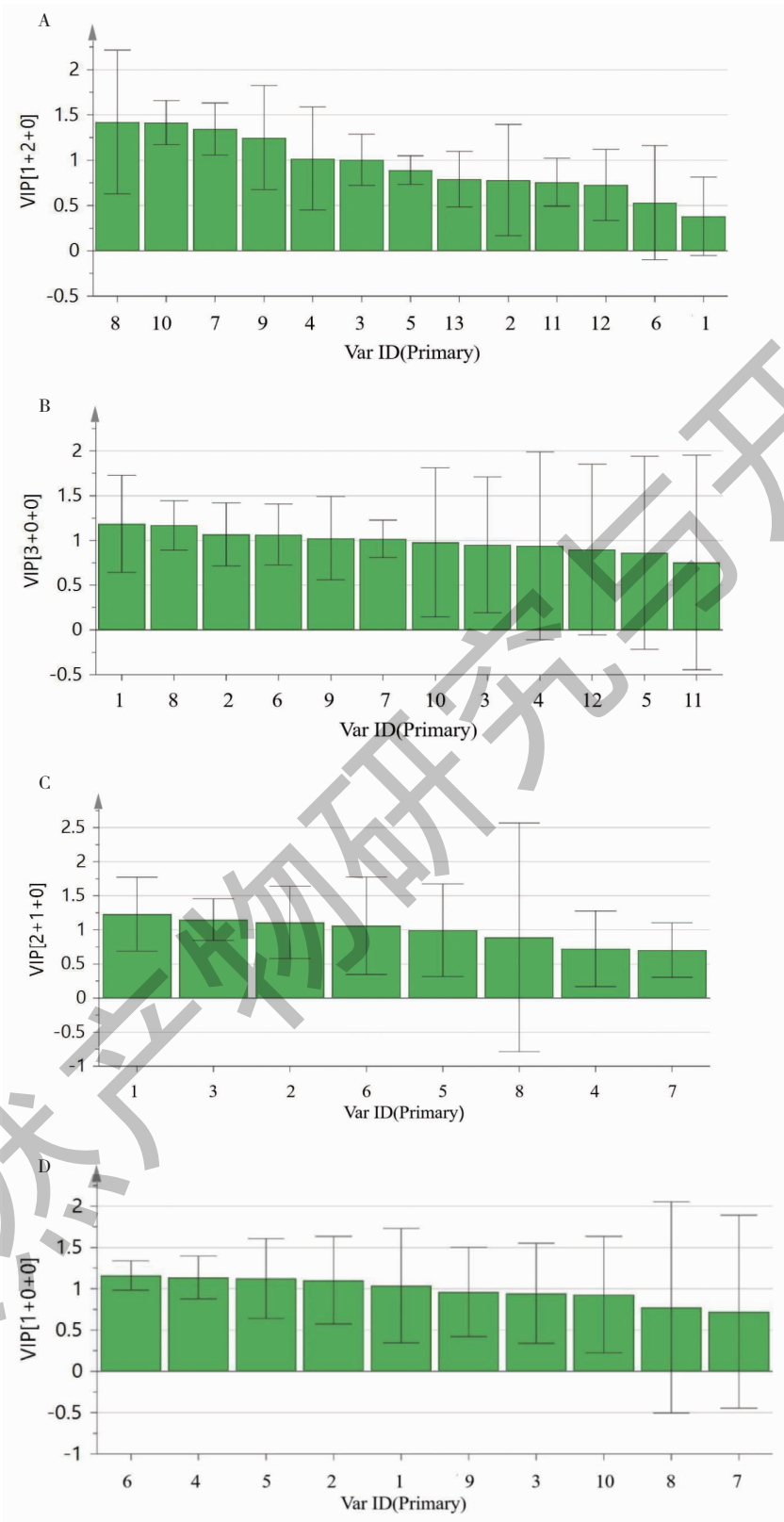


图5 杜仲不同部位的重要性变量

Fig. 5 Importance variables of different parts of *E. ulmoides*

注:叶;B-皮;C-果荚;D-雄花。Note: A-Leaf; B-Bark; C-Fruit pod; D-Male flower.

为明确不同部位杜仲样品质量差异的物质,结合变量重要性投影法,以VIP值大于1为标准,杜仲叶筛选出贡献较大的6个变量,杜仲皮筛选出贡献较大的6个变量,杜仲果荚筛选出贡献较大的4个变量,杜仲雄花筛选出贡献较大的5个变量。一般VIP值 >1 的变量为组间样本的主要差异变量,且VIP值越大,表明该成分对组间差异的贡献越大。根据对照品指认结果,杜仲叶样品中共有峰3、4、9号峰,分别对应绿原酸、京尼平苷、芦丁;杜仲皮样品中共有峰1、2、6号峰,分别对应桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷;杜仲果荚样品中共有峰3、2、1,分别对应绿原酸、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷;杜仲雄花样品中共有峰2、4、1号峰,分别对应京尼平苷酸、京尼平苷、桃叶珊瑚苷。其中杜仲叶7、8、10号峰,杜仲皮7、8、9号峰,杜仲雄花及果荚中5、6号峰VIP值均大于1,但由于未做液质实验,未能识别出,在接下来的实验中,将会进行该方面研究。说明这些成分在区分不同批次杜仲不同部位样品时起到重要作用,是杜仲的主要标志性成分。

2.2 基于网络药理学预测杜仲不同部位潜在 Q-Marker

2.2.1 杜仲不同部位潜在质量标志物来源定位

多项杜仲现代药理研究表明,杜仲中的化学成分主要包括木脂素类、黄酮类、环烯醚萜类、萜类和

甾体类、酚酸类、多糖类等。Ma等^[5]在研究中将京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷作为杜仲平压片质量评价标准;Liu等^[6]测定不同部位化学成分含量时提议将桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷作为杜仲雄花、皮的质量控制指标成分;Tu等^[7]在杜仲叶抗氧化活性研究中以紫云英苷等8种化学成分作为杜仲叶的加工方式筛选、质控标准。结合HPLC色谱分析结果,最终确定桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素8种成分作为杜仲不同部位质量标志物的潜在来源范围进行分析

2.2.2 候选化合物靶点预测

通过数据库对8个目标化合物筛选,合并筛选出的靶点蛋白并去除重复靶点,得到与8个化合物相关的173个靶点蛋白。

2.2.3 靶点蛋白与蛋白互作(PPI)网络分析

PPI可视化网络图结果见图6,将度值大于2倍中位数值且 $\text{degree} \geq 10$ 作为筛选条件,筛选得到11个重要核心靶点,具体包括SRC($\text{degree} = 21$)、HRAS($\text{degree} = 17$)、PIK3R1($\text{degree} = 16$)、CDK1($\text{degree} = 14$)、CASP3($\text{degree} = 13$)、CCNB1($\text{degree} = 12$)、AKT1($\text{degree} = 11$)、CCNA2($\text{degree} = 11$)、CCNB2($\text{degree} = 11$)、EGFR($\text{degree} = 11$)、PTK2($\text{degree} = 10$)。

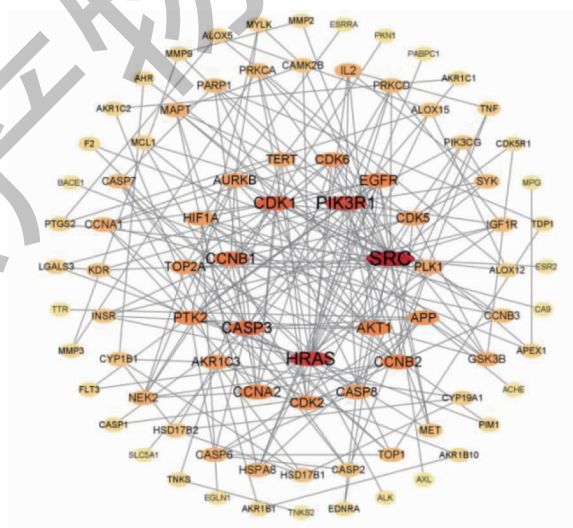


图6 蛋白-蛋白互作网络可视化图

Fig. 6 Visualization of protein-protein interaction network

2.2.4 功能富集分析与通路分析

GO功能分析中一共获得1767个条目,其中包括1487个生物过程(biological process, BP),186个

分子功能(molecular function, MF),93个细胞组成(cellular component, CC),GO分析结果提示BP主要集中在蛋白质磷酸化、激酶活性的调节、对无机物

的反应、正向调节转移酶活性等功能;MF 主要富集在碳酸脱水酶的活动、醇基为受体的磷酸转移酶活性、蛋白激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激

酶活性、激酶活性等功能;CC 主要涉及周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合体、蛋白激酶复合体等,分析结果见图 7。

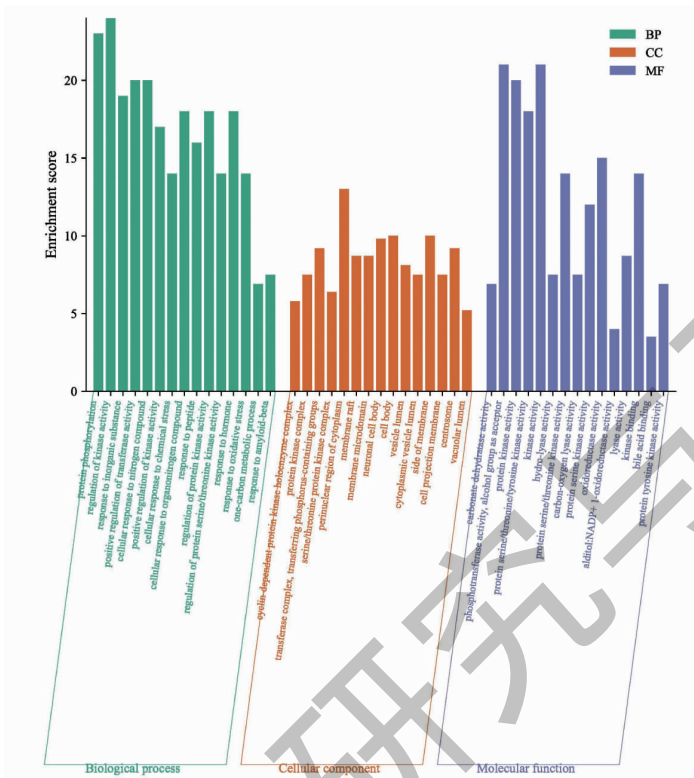


图 7 GO 功能注释柱状图

Fig. 7 Bar chart of GO function annotations

KEGG 富集分析得到 168 条通路,选择前 15 条主要的通路进行展示,主要涉及氮代谢、癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症蛋白聚糖、PI3K-Akt 信

号通路、卵巢类固醇生成等,表明这 173 个靶点可能主要通过调控这些通路来干预相关疾病,结果见图 8。

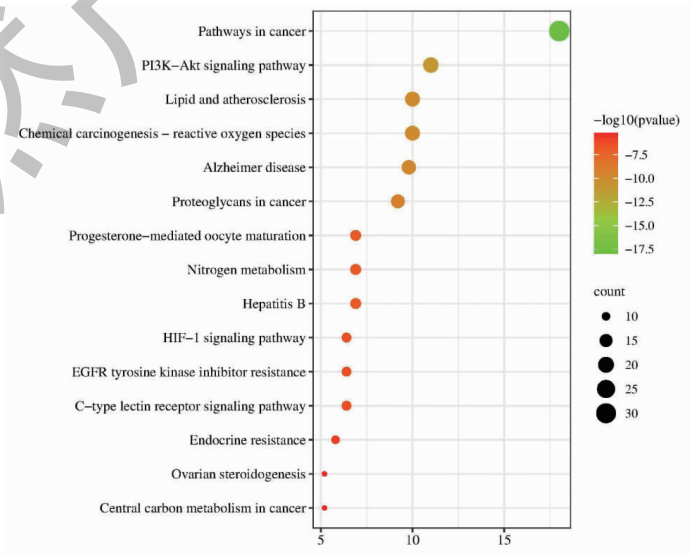


图 8 靶标信号通路富集分析气泡图

Fig. 8 Bubble map of target signal path enrichment analysis

2.2.5 “成分-靶点-通路”网络构建

将筛选得到的 8 个成分、173 个靶点和 15 条主要通路导入 Cytoscape3. 7. 1 软件, 建立杜仲“成分-靶点-网络”网络图, 结果见图 9, 由图可知, 杜仲作用于多个靶点、多条通路发挥作用。利用 Cytoscape 3. 9. 1 分析可知, 参考化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度 (degree), 发现槲皮素 (degree = 103)、芦丁 (degree = 79)、紫云英苷 (degree = 77)、桃叶珊瑚苷

(degree = 60)、京尼平苷 (degree = 57)、绿原酸 (degree = 56)、松脂醇二葡萄糖苷 (degree = 40)、京尼平苷酸 (degree = 37) 均有比较高的连接度, 可能是杜仲的活性成分, PIK3R1 (degree = 15)、HRAS (degree = 14)、AKT1 (degree = 14)、EGFR (degree = 13)、SRC (degree = 12) 这 5 个靶点的连接度高于其他靶点, 表明它们发挥了关键作用。

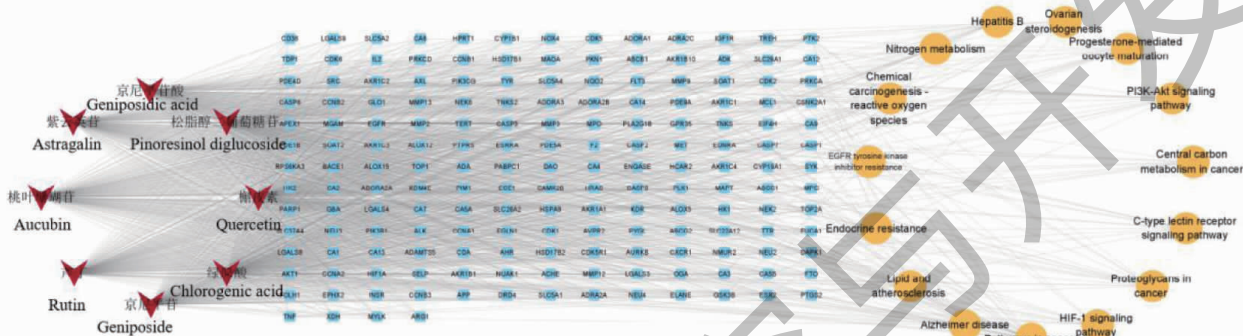


图 9 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 9 Network diagram of "component-target-pathway"

注: 红色 V 形节点代表化学成分; 蓝色方形节点代表靶点; 黄色圆形节点代表主要通路。Note: Red V-shaped nodes represent chemical components; Blue square nodes represent targets; Yellow circular nodes represent major pathway

2.2.6 分子对接

综合上述网络药理学结果及杜仲药效考虑, 选择核心靶标 AKT1、SRC、HRAS、ERFR 作为分子对接验证的靶标蛋白, 将筛选出的 8 个潜在质量标志物与选择的蛋白进行分子对接, 对接结果见表 3, 对接结合见图 10。由对接结果可知 8 个化合物与蛋白质对接后对接分数 (docking score) 均 < 0, 说明潜在的质量标志物与 AKT1、SRC、HRAS、ERFR 均表现出良好的结合作用。

2.2.7 Q-Marker 的分析

核心靶点 HRAS 为转化蛋白 p21/H-Ras-1, 是胃癌通路的靶点之一^[8], PIK3R1 是多个亚基组成的多聚体, 多个研究均证实 PIK3R1 基因表达与恶性肿瘤疾病存在显著关联^[9], AKT1 是 PI3K/Akt 通路的核心蛋白, 可促进成骨分化关键因子 Runx2、Osx 和 OPN 的表达, 促进骨形成^[10], 另有研究表明, AKT1 基因对海南黎族高血压性脑出血预警体系的构建具有重要价值^[11], RAGE 广泛存在于心肌细

表 3 成分与关键靶蛋白的分子对接结果

Table 3 Binding result of components with its key targets

化合物 Compound	蛋白质 Protein			
	AKT1(6HHG)	SRC(1Y57)	HRAS(2QUZ)	EGFR(1Z91)
桃叶珊瑚苷 Aucubin	-5.409	-6.678	-4.027	-4.629
京尼平苷酸 Geniposidic acid	-5.261	-5.446	-5.190	-5.832
绿原酸 Chlorogenic acid	-6.215	-6.746	-6.707	-7.219
京尼平苷 Geniposide	-5.514	-5.577	-4.281	-4.552
松脂醇二葡萄糖苷 Pinorensinol diglucoside	-9.069	-5.108	-3.988	-4.876
芦丁 Rutin	-7.764	-6.788	-4.331	-5.837
紫云英苷 Astragalinal	-5.572	-6.557	-3.602	-6.724
槲皮素 Quercetin	-8.531	-9.892	-5.173	-6.831

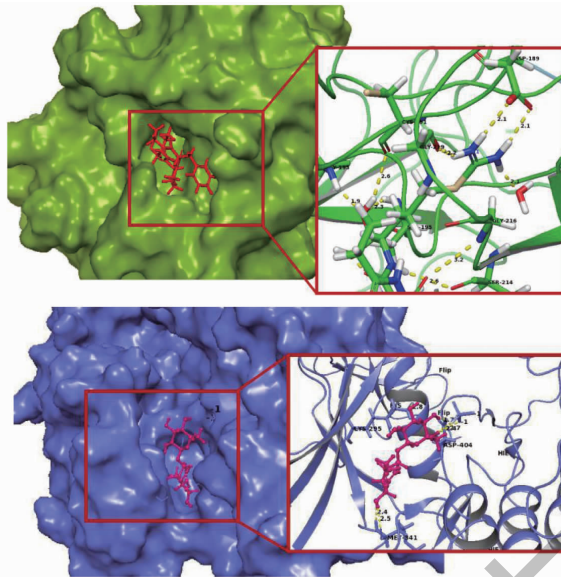


图 10 AKT1 蛋白与京尼平苷酸、SRC 蛋白与绿原酸的对接结果

Fig. 10 Docking results of AKT1 protein with geniposidic acid and SRC protein with chlorogenic acid

胞、内皮细胞中,可以促进血管的炎症因子释放,临床与冠心病等缺血性心脏疾病有关^[12],Wang^[13]研究证实了 SRC 在人肝癌组织中高表达,在肝癌的发生和发展中起到重要作用。核心靶点相应的作用,与杜仲不同部位 Q-Marker 降压、预防骨质疏松、护肝、调节血脂、抗肿瘤、抗炎、调节血脂等作用相关。

杜仲不同部位成分具有差异性,所对应的功效也有一定差异。例如木脂素类成分经过多年的实践研究证明是杜仲皮发挥降压作用的主要有效成分,杜仲叶中含量最高的绿原酸具有抗癌、消炎等作用,杜仲雄花中的主要成分黄酮类成分对冠心病、高血压等疾病有治疗作用等。结合 HPLC 结果,可将绿原酸、芦丁、京尼平苷作为杜仲叶潜在 Q-Marker,将桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷作为杜仲皮潜在 Q-Marker,将京尼平苷酸、京尼平苷、桃叶珊瑚苷作为杜仲雄花潜在 Q-Marker,将绿原酸、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷作为杜仲果菜潜在 Q-Marker。

3 讨论与结论

中药具有多成分、多靶点、整体性等特点,质量是保证其临床疗效的关键^[14],但质量标准和质量控制研究依然是制约中医药产业发展的瓶颈问题。本研究以刘昌孝提出的 Q-Marker 理念为基础,结合实验结论及文献研究筛选出杜仲不同部位可能存在的 Q-Marker 化合物,并对筛选出的化合物进行网络药理学分析,结果表明这 8 个化合物可通过 SRC、

HRAS、PIK3R1、CDK1、CASP3、CCNB1 等靶点作用于氮代谢、癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症蛋白聚糖、PI3K-Akt、卵巢类固醇生成等关键通路起作用,Huo 等^[15]研究发现杜仲叶中的总黄酮能显著降低高血脂大鼠血清中总胆固醇的含量,达到降低血脂的作用;同样有学者发现杜仲叶中的多糖能够明显降低动脉硬化指数和冠心指数及肝脏组织中总胆固醇、甘油三酯含量,从而发挥杜仲调节血脂作用^[16];杜仲皮通过抑制 PI3K/Akt 通路来抑制骨关节炎的进展^[17];Yuan 等^[18]发现杜仲叶总黄酮具有很强的体内抗肿瘤作用,与本研究结果一致。因此,所筛选出的桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、紫云英苷、槲皮素可作为杜仲不同部位的质量标志物。

杜仲皮作为临床常用的大宗中药材之一,在我国有两千多年的历史,具有较高的药用价值,杜仲化学成分较为复杂,药理作用广泛,且不同部位化学成分及药理作用具有差异性,现有相关研究大多局限于某一特定部位,割裂其整体性。杜仲的质量标准研究中缺少具有整体性成分的含量测定方法,有必要建立科学、全面的质量控制方法。本研究通过网络药理学和指纹图谱手段,预测杜仲中潜在的 Q-Marker,可为全面建立杜仲质量评价方法及质量溯源体系提供较为可靠的理论依据,同时也作为含有杜仲的复方 Q-Marker 的筛选手段。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science and Technology Press,2020:1088.
- 2 Liu CC Shi L, Xiao XH, et al. Q-Marker: a new concept of quality control of traditional Chinese medicine products[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2016,47:1443-1457.
- 3 Zhang TJ, Bai G Chen CQ, et al. Study on Q-marker of compound traditional Chinese medicine based on "Five Principles"[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2018,49:1-13.
- 4 Ye H. Drug repositioning through network pharmacology[J]. Curr Top Med Chem,2016,16:3646-3656.
- 5 Ma FX, He JJ, Li Q. Determination of geniposidic acid, chlorogenic acid and geniposide in Duzhong Pingya Tablet by RP-HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2008,25:86-89.
- 6 Liu K, Wang JY, Wei L, et al. Determination of 8 components in bark, leaf and male flower of *Eucommia ulmoides* by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2021,43:686-691.
- 7 Tu WQ, Li NZ, Liu J, et al. Study on the contents and antioxidant activities of eight chemical components in *Eucommia ulmoides* leaves produced by different processing methods[J]. Chin New Drug J(中国新药杂志),2020,29:1863-1867.
- 8 Wang Y. Erianin, the main active ingredient of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and in vitro experimental verification[J]. J Ethnopharmacol, 2021,279:114399-114399.
- 9 An A, Luo R, Ruan P. miR-495 promotes apoptosis and inhibits proliferation in endometrial cells via targeting PIK3R1[J]. Pathol Res Pract,2019,215:594-599.
- 10 Deng YL, Weng WY, Zhao ZH, et al. Effect of Huangqi Sanxian Decoction on postmenopausal osteoporosis[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学),2022,39:898-907.
- 11 Liu Y, Liu ZH, Zhou DF. Prediction value of AKT1 gene single nucleotide polymorphism in hypertensive intracerebral hemorrhage of Li nationality in Hainan Province[J]. Chin J Behav Med Brain Sci(中华行为医学与脑科学杂志),2002,31:724-729.
- 12 Uekita H, Ishibashi T, Shiomi M, et al. Integral role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in nondiabetic atherosclerosis[J]. Fukushima J Med Sci,2019,65:109-121.
- 13 Wang LP. CLDN6 promotes migration and invasion of hepatoma cells by activating Src/STAT3 signaling pathway[D]. Changchun:Jilin University(吉林大学),2022.
- 14 Jing FT, Feng S, Wang J, et al. Prediction analysis of quality markers of forsythia based on fingerprint and network pharmacology[J]. China Pharm(中国药房),2022,33:293-298.
- 15 Lei YN, Zhang XB. Effect of total flavonoids from *Eucommia ulmoides* leaves on reducing blood lipid[J]. J Northwest Univ:Nat Sci(西北大学学报:自科版),2015,45:777-780.
- 16 Lei YN, Zhang XB. Effect of Shangluo *Eucommia ulmoides* leaf polysaccharide on hyperlipidemia model mice[J]. J Shaanxi Normal Univ:Nat Sci(陕西师范大学学报:自科版),2018,46:120-124.
- 17 Xie GP, Jiang N, Wang SN, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv. bark aqueous extract inhibits osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis[J]. J Ethnopharmacol,2015,162:148-154.
- 18 Yuan DX, Shu LX, Huang R. Antitumor effect of total flavonoids from *Eucommia ulmoides* on tumor-bearing mice[J]. Chin J Clin Pharm Ther(中国临床药理学与治疗学),2014,19:1332-1336.