

“利咽”功效关联的金果榄质量标志物分析

卢丽洁¹, 吴清华^{1*}, 朱兴龙¹, 黄旭龙¹, 饶华楠¹, 鲜彬¹,
文飞燕¹, 周涛¹, 魏民², 刘三波³, 裴瑾^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;

2. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110;

3. 华润三九(黄石)药业有限公司, 湖北 黄石 435003)

[摘要] 目的: 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术、多元统计分析和网络药理学技术研究金果榄的“利咽”质量标志物(Q-Marker)。方法: 首先采用UPLC-Q-TOF-MS技术辨识18批金果榄中的主要化学成分。在此基础上, 一方面采用主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析筛选出造成组间差异的主要标志性成分; 另一方面利用网络药理学技术预测潜在“利咽”成分, 并对多元统计分析和网络分析所得化合物交集与核心靶点进行分子对接, 验证质量标志物准确性。结果: UPLC-Q-TOF-MS共鉴定出金果榄中17个化合物, 包括生物碱类、二萜内酯类、甾醇类等类型化合物。基于多元统计分析方法寻找到5个主要差异性成分, 分别为非洲防己碱、药根碱、巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾。基于网络分析筛选出四氢巴马汀、巴马汀、蝙蝠葛任碱、去氧黄藤素、neoechinulin A、古伦宾共6个化合物为金果榄的潜在“利咽”成分; 通过白细胞介素-6、表皮生长因子受体、前列腺素G/H合成酶2、基质金属蛋白酶-9和原癌基因酪氨酸蛋白激酶等关键靶点, 以及乙型肝炎、甲型流感、人类嗜T细胞病毒感染、人巨细胞病毒感和新型冠状病毒肺炎等通路发挥“利咽”功效。多元统计分析和网络分析共同预测所得金果榄中的潜在活性成分包括巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾, 与6个核心靶点分子对接活性较好, 可作为金果榄的“利咽”Q-Marker。结论: 该研究初步预测了金果榄的“利咽”质量标志物, 有利于建立关联药效的金果榄质量标准, 为完善该药材的质量评价体系提供参考。

[关键词] 金果榄; 利咽; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS); 多元统计分析; 网络药理学; 质量标志物

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)13-0140-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230117 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221219.1155.001.html>

[网络出版日期] 2022-12-20 11:23:01

Quality Marker (Q-marker) of Tinosporae Radix Associated with Efficacy of "Relieving Sore Throat"

LU Lijie¹, WU Qinghua^{1*}, ZHU Xinglong¹, HUANG Xulong¹, RAO Huanan¹, XIAN Bin¹,
WEN Feiyan¹, ZHOU Tao¹, WEI Min², LIU Sanbo³, PEI Jin^{1*}

(1. School of Pharmacy, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resource, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China;

3. China Resources Sanjiu (Huangshi) Pharmaceutical Co. Ltd., Huangshi 435003, China)

[收稿日期] 2022-06-28

[基金项目] 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人函[2019]41号); 四川省科技计划重点研发项目(2020YFN0152, 2021YFYZ0012-5, 2022YFS0582); 四川省中医药发展服务中心-中医药产业发展重大项目(第九包)(510201202109711)

[第一作者] 卢丽洁, 在读硕士, 从事药用资源评价与综合利用研究, Tel: 028-61800235, E-mail: lulijie6_6@163.com

[通信作者] *裴瑾, 教授, 博士生导师, 从事中药资源品种、品质研究, E-mail: peixin@163.com;

*吴清华, 讲师, 从事道地药材品种、品质研究, Tel: 028-61800235, E-mail: 20122051@cdutcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To study the potential quality marker (Q-marker) of *Tinosporae Radix* associated with efficacy of "relieving sore throat" based on ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), multivariate statistical analysis (MSA), and network pharmacology. **Method:** UPLC-Q-TOF-MS was used to identify the main chemical components in 18 batches of *Tinosporae Radix*. On this basis, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to screen out the main marker components that caused differences between groups. Moreover, network pharmacology technology was applied to predict the potential "sore throat-relieving" components, and the molecular docking between the common components resulting from MSA and network pharmacology and the core targets was carried out to verify the marker components. **Result:** A total of 17 compounds, including alkaloids, diterpenoid lactones, and sterols, were identified by UPLC-Q-TOF-MS. Five main differential components were found by MSA: Columbamine, jatrorrhizine, palmatine, menisperine, and columbin. Network pharmacology analysis yielded six compounds: tetrahydropalmatine, palmatine, menisperine, fibleucin, neoechinulin A, and columbin which were selected as potential "sore throat-relieving" components of *Tinosporae Radix*. They may relieve sore throat by acting on interleukin-6, epidermal growth factor receptor, prostaglandin G/H synthase 2, matrix metalloproteinase-9, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src and other targets, and regulating Hepatitis B, influenza A, human T-cell virus infection, human cytomegalovirus infection, coronavirus disease-2019, and other signaling pathways. The common active components in *Tinosporae Radix* resulting from MSA and network pharmacology analysis were palmatine, menisperine, and columbin, which had high binding affinity with six core targets and can be used as the Q-marker components of *Tinosporae Radix* in "relieving sore throat". **Conclusion:** This study predicts the "sore throat-relieving" Q-marker of *Tinosporae Radix*, which lays a basis for developing the quality standard of *Tinosporae Radix* based on the efficacy and improving the quality evaluation system of the medicinal.

[Keywords] *Tinosporae Radix*; relieving sore throat; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); multivariate statistical analysis; network pharmacology; quality marker

金果榄系防己科植物青牛胆或金果榄的干燥块根,具有清热解暑、利咽止痛的功效^[1]。本草考证、现代药理学及临床研究均表明金果榄“利咽”疗效显著。《本草纲目拾遗》^[2]记载“咽喉一切症,煎服一二钱即效……而咽喉等症,有起死回生之功……双单蛾及齿痛,切薄片含之,极神效”;金果榄水煎液^[3]、地苦胆胶囊^[4]等多种炎症模型均有明显的抑制作用;该药材在治疗急慢性咽炎、急性扁桃体炎等方面^[5-7]疗效显著,并且其临床制剂小儿咽扁颗粒^[1]具有清热解暑、利咽止痛的作用,用于小儿肺卫热盛所致的喉痹、乳蛾等。此外,金果榄还是清咽润喉丸^[8]和羚羊清肺丸^[1]等中成药的原料药,皆具有清利咽喉的作用。

金果榄的利咽功效主要表现为对中医所言喉痹和乳蛾的治疗作用,即对应西医所说的咽炎和扁桃体炎等。喉痹和乳蛾是流行病学领域的临床常见病证,发病率高,存在顽固性、季节性、反复性、多发性等特点,影响人类的健康状况和正常的生活工

作等^[9]。现代医学大多采用抗生素类药物或辅以地塞米松等激素类制剂,以及抗病毒药物进行治疗^[10-11]。存在治疗谱窄、易反复发作、耐受性差、不良反应大、常见的致病微生物对药物产生耐药性、合并用药容易发生相互交叉作用等问题,影响患者依从性及药物的疗效性。中药具有不良反应小,作用持久,辨证论治,标本兼治等特点^[12],在治疗以上病证方面具有一定优势^[13]。金果榄利咽疗效显著,可作为喉痹和乳蛾治疗的候选药物。然而,目前金果榄利咽物质基础不明确,严重阻碍该疗效的应用,故亟待寻找金果榄的利咽质量标志物。

目前金果榄质量多通过化学分析方法进行评价,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)含量测定项下仅规定单一指标古伦宾作为评价标准^[1],难以准确反映药材品质,与临床疗效关联度低。本研究以金果榄的利咽作用为研究目标,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术辨析18批金果榄药材中

的主要成分,结合多元统计分析方法和网络药理学技术筛选金果榄的潜在利咽质量标志物,最后通过分子对接验证筛选结果合理性,为优化金果榄的质量评价方法奠定基础,为后续建立以质量标志物为核心的金果榄药材质量评价体系提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters Synapt XS型电喷雾四极杆飞行时间液质联用仪(美国Waters公司),KQ-600DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),Reference型纯水机(四川优普超纯科技有限公司),SQP型万分之一电子天平、BT125D型十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),YE3K024438型移液枪(Dragonlab)。

1.2 药物与试剂 金果榄药材为课题组前期进行资源调查时所采集,包括来自7省的共18批样品,样品产地信息及编号见表1,经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为防己科植物青牛胆 *Tinospora sagittata* 的干燥根,均符合2020年版《中国药典》^[1]药材性状项下规定。

表1 金果榄药材样品信息

Table 1 Sample information of *Tinosporae Radix*

编号	产地
S1	四川省乐山市马边县
S2	四川省宜宾市屏山县
S3	四川省雅安市芦山县
S4	四川省巴中市恩阳区
S5	四川省成都市彭州市
S6	四川省德阳市什邡市
S7	陕西省汉中市宁强县
S8	陕西省安康市岚皋县
S9	湖北省恩施州利川市
S10	湖北省宜昌市远安县
S11	贵州省黔东南州榕江县
S12	贵州省黔东南州天柱县
S13	湖南省吉首市凤凰县
S14	湖南省怀化市中方县
S15	云南省楚雄州禄丰县
S16	云南省文山州西畴县
S17	广西省南宁市隆安县
S18	广西省来宾市金秀县

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,美国Thermo Fisher公司),乙酰胺(成都市科隆化学品有限公司,批号

2020113001,纯度≥98%),对照品盐酸巴马汀、盐酸药根碱、非洲防己碱、古伦宾、20-羟基蜕皮素、四氢巴马汀、木兰花碱(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DST210421-031、DST201109-069、DST191028-009、DST210206-016、DST210810-027、DSTDY010101,纯度均≥98%)。

1.3 数据库及软件 MassLynx V4.2软件;Swiss ADME数据库(<http://www.swissadme.ch/>),SwissTargetPrediction服务器(<http://new.swisstargetprediction.ch/>),中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),Venny 2.1.0在线网站(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>),STRING 10数据库(<http://string-db.org/>),Cytoscape 3.9.0软件,DAVID 6.8数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),R语言R-4.0.3软件,蛋白结构数据库(PDB, <http://www.rcsb.org/>),PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) Open Babel 2.4.0软件,Discovery Studio 2016软件,AutoDock Tools 1.5.6软件和AutoDock-vina 1.1.2软件。

网络药理学分析的数据检索时间为2022年4月,将UPLC-Q-TOF-MS鉴定所得的金果榄中主要成分作为网络药理学预测的目标化合物,满足Swiss ADME数据库中Druglikeness项下5种药物类药性规则中的3种和GI adsorption=High的成分为活性成分^[14],以SwissTargetPrediction数据库中Probability值>0的靶点和TCMSP平台上所有靶点的交集为相关靶点^[15]。在GeneCards数据库中以“pharyngitis”和“tonsillitis”为关键词选择Relevance score>1的疾病靶点。在Venny 2.1.0在线网站中获得成分与疾病交集靶点。将交集靶点导入STRING数据库中,设置生物属性为“Homosapiens”,蛋白互作最小分数阈值为0.4,其余设置保持系统默认,并删除游离的靶点,获取“利咽”靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,保存TSV格式文件至Cytoscape 3.9.0软件中进行拓扑分析。在DAVID数据库^[16]中,以 $P<0.05$ 、富集倍数FDR<0.05为筛选条件,对交集靶点进行基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。在Cytoscape 3.9.0软件中导入利咽成分、靶点和通路,进行拓扑分析筛选活性成分。在PubChem数据库^[17]下载化合物3D结构sdf格式文件,Open Babel 2.4.0软件转换化合物格式;在RSCBPDB数据库^[18]

中下载物种为“人”、分辨率高的核心靶点pdb格式文件。采用Discovery Studio 2016软件对受体和配体进行预处理,AutoDock Tools 1.5.6软件获得最佳活性位点,在AutoDock-vina 1.1.2软件中进行分子对接计算,Discovery Studio 2016软件进行分子对接可视化处理。

2 方法

2.1 供试品和对照品溶液的制备 取本品粉末约0.5 g,过三号筛,精密称定,精密加入70%甲醇10 mL,称定质量,超声处理(功率200 W,频率59 kHz)20 min,放冷后,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 mL,置10 mL量瓶中,加70%甲醇至刻度,摇匀,即得。

取各对照品适量,精密称定,分别置于10 mL棕色量瓶中,加入甲醇溶液并定容至刻度,经过稀释得到7个对照品溶液,盐酸巴马汀、盐酸药根碱、非洲防己碱、古伦宾、20-羟基蜕皮素、四氢巴马汀和木兰花碱的质量浓度分别为50.0、54.5、70.0、284.0、52.5、53.5、59.0 mg·L⁻¹。

所有供试品和对照品溶液均在4℃条件下贮藏。

2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相A(0.2%甲酸水溶液,20 mmol·L⁻¹乙酸铵)-B(甲醇-乙腈1:1);洗脱梯度(0~18 min,20%~38%B;18~20 min,38%~75%B;20~25 min,75%~90%B;25~31 min,90%~20%B;31~35 min,20%B)^[19];柱温30℃;进样量2 μL;流速0.2 mL·min⁻¹。

2.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);在正离子模式下获得ESI-MS光谱;扫描范围 m/z 100~1 500^[20];干燥气体N₂,干燥气流速800 L·h⁻¹,干燥气温度450℃,离子源温度100℃,喷雾器压力6 bar(1 bar=0.1 mPa,毛细管电压3 kV,锥孔电压40 V;碰撞气体为氦气,低能量扫描时碰撞能量4 eV,高能量扫描时碰撞能量30~50 eV;准确质量数用亮氨酸脑啡肽作校正液。

2.4 化学成分鉴定 将各批次药材UPLC-Q-TOF-MS数据导入UNIFI软件,与系统自带金果榄化学成分库、自建金果榄化合物库及对照品进行比对;根据相对分子质量,并结合二级质谱碎片信息、保留时间、参考文献报道等最终确定化合物信息。

2.5 多元统计分析 采用SPSS和SIMCA 14.1软件,以UPLC-Q-TOF-MS检测所得18批金果榄药材中主要成分响应值为原始数据,应用主成分分析

(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),寻找18批药材间的差异化学成分,从化学层面筛选质量标志物。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 靶点预测与筛选 将UPLC-Q-TOF-MS辨析所得的金果榄中主要成分作为网络药理学预测的目标化合物,通过PubChem数据库对鉴定的化合物检索查询Canonical SMILES号,未检索到的化合物利用ChemDraw将化合物结构式保存为MOL格式,在SwissADME平台中输入Canonical SMILES号或者上传化合物结构式,根据Druglikeness Yes数≥3和ADME参数GI adsorption=High等标准筛选活性成分,Druglikeness项下内容包括Lipinski规则(类药五原则)、Ghose规则、Veber规则、Egan规则和Muegge规则5种考察药物类药性的规则,认为满足以上5种规则中的3种并且GI adsorption胃肠道吸收度高则药物具有类药性。在SwissTargetPrediction数据库中进行活性成分靶点预测分析,选择Probability值>0的靶点为相关靶点,同时在TCMSP平台上得到活性化合物所有靶点蛋白并整合,构建分子-靶点网络。以“pharyngitis”和“tonsillitis”为关键词在GeneCards数据库中搜索,以Relevance score>1获取疾病相关靶点。在Venny 2.1.0在线网站中绘制成分与疾病靶点重合的韦恩图,得到金果榄“利咽”的相关靶点。

2.6.2 构建金果榄PPI网络 将交集靶点导入STRING数据库中,生物属性设置为“Homo sapiens”,并删除游离的靶点,PPI最小分数阈值设置为0.4,其余设置保持系统默认,获取金果榄“利咽”相关靶点的PPI,相应结果保存至Cytoscape 3.9.0软件中(文件保存为TSV格式),借助图形化手段对交集靶点进行可视化呈现并进行拓扑分析。

2.6.3 GO富集分析和KEGG富集分析 在DAVID数据库中,以 $P<0.05$ 、富集倍数FDR<0.05为筛选条件,对交集靶点进行GO分析和KEGG通路富集分析。获取与金果榄“利咽”的生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)及主要通路等。

2.6.4 构建“成分-靶点-通路”综合网络 结合2.6.2项下的拓扑分析结果及2.6.3项下的KEGG通路富集分析结果,在Cytoscape 3.9.0软件中导入相对应的成分、靶点和通路,最终构建金果榄的“成分-靶点-通路”网络,在信息网络中,线条表示成分、靶点与通路的相互关系,节点的大小代表关联度等级,

从而筛选活性成分。

2.6.5 分子对接验证

2.6.5.1 受体与配体结构获取 将多元统计分析和“成分-靶点-通路”网络分析所得化合物取交集,得到金果榄中具有代表性的“利咽”成分,依次与核心靶点对接。在 PubChem 数据库下载化合物 3D 结构 sdf 格式文件,Open Babel 2.4.0 软件转换化合物格式;在 RSCBPDB 数据库中物种选择“人”,选择分辨率高的 3D 结构,下载核心靶点 pdb 格式文件。

2.6.5.2 分子对接与可视化 采用 Discovery Studio 2016 软件对受体和配体进行去水、加氢和力场优化等预处理,AutoDock Tools 1.5.6 软件获得最佳活性位点,在 AutoDock-vina 1.1.2 软件中输入命令符进行分子对接计算,小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$) 表示有较好的结合活性, $< -7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示有强烈的结合活性。Discovery Studio 2016 软件进行分子对接可视化处理。

3 结果

3.1 化学成分识别 将 18 批药材和 6 个对照品按照 2.1 项下制备方法制备样品溶液和对照品溶液,按 2.2 和 2.3 项下检测条件获得 18 批次金果榄药材总离子流图,见图 1。与各数据库以及对照品对比匹配后,得到金果榄中 17 个主要成分,见图 2,各成分的保留时间、化学名、化学式、离子碎片和质谱信息见表 2,平均百分含量为 18 批药材各共有成分峰面积百分含量的平均值。以上成分峰面积百分含量总和达 91.89%,表明这 17 个成分在金果榄中有代表性,可作为金果榄质量标志物的候选成分。

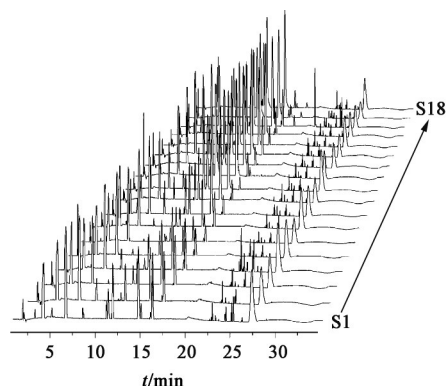


图1 18批金果榄药材的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatography of 18 batches of Tinosporae Radix

3.2 多元统计分析

3.2.1 PCA 为了预测金果榄的质量标志物,本研究以 UPLC-Q-TOF-MS 测定所得 18 批不同产地金

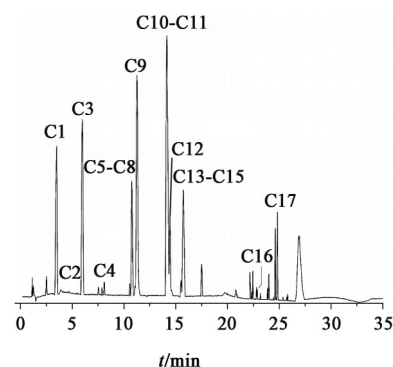


图2 金果榄中17个主要成分

Fig. 2 17 major compounds in Tinosporae Radix

果榄中 17 个主要成分响应值为原始数据,应用 SPSS 20.0 统计软件对数据标准化处理后,进行主成分分析。计算相关矩阵的特征值及方差贡献率,以变量重要性投影 (VIP) 值 > 1 作为提取标准,结果显示,共得到 5 个主成分因子,其累计方差贡献率 $> 80\%$,说明这 5 个主成分反映了金果榄药材中 17 个成分 82.964% 的信息量,可以作为不同产地金果榄的评价指标,见表 3。此外,本研究得到各主成分因子载荷矩阵,其中 C7、C9、C10、C15、C5 号色谱峰与主成分因子 1 相关性最强;C3、C4、C14、C16、C17 号色谱峰对主成分因子 2 影响较大;C6、C8、C13 号色谱峰主要影响主成分因子 3,综上所述主成分 1、2、3 对应的化学成分,包括非洲防己碱、巴马汀、药根碱、neoechinulin A、2-去氧-20 β -羟基蜕皮素、20-羟基蜕皮素、蝙蝠葛任碱、硬脂酸、古伦宾、棕榈酸、金果榄苷、四氢巴马汀、2-去氧-20 β -羟基蜕皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷,共计 13 个化合物为反映金果榄质量的代表性化合物,可作为金果榄的质量标志物,见图 3。

3.2.2 OPLS-DA 为了更好地预测金果榄药材的质量标志物,将 3.2.1 项所用原始数据导入 SIMCA 14.1 软件,采用监督模式的 OPLS-DA 进一步对不同产地金果榄所含化合物进行差异性分析。模拟拟合参数结果为 $R^2X=0.948$, $R^2Y=0.954$,模型预测参数 $Q^2=0.798$,表明建立模型的预测能力与解释能力均较好。金果榄中 17 个成分的 VIP 正态分布图,结果表明其中 5 个成分的贡献度较大 ($VIP>1.0$),C10(巴马汀) $>$ C9(药根碱) $>$ C7(非洲防己碱) $>$ C3(蝙蝠葛任碱) $>$ C11(tinophyllolside)。此外 C1(木兰花碱)和 C14(古伦宾)的 VIP 值也相对较大,也应该作为引起金果榄质量差异的化合物。并且课题组前期实验发现,古伦宾的含量远高于其他成分含量,同时古伦宾是金果榄药材的特有

表2 金果榄中主要化合物特征
Table 2 Characteristics of main components in Tinosporae Radix

峰号	t_R /min	分子式	准分子 理论值 (m/z)	准分子 检测值 (m/z)	准分子离子检测值 (m/z)	δ /ppm	碎片离子	化合物	平均 百分 含量 /%
C1	3.48	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	341.162 7	341.162 0	342.169 3[M+H] ⁺	-2.1	282.088 6[M+H-C ₂ H ₇ N-CH ₃] ⁺ 、265.085 9[M+H-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH] ⁺ 、297.112 1[M+H-C ₂ H ₇ N] ⁺	木兰花碱	9.88
C2	4.32	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	329.162 7	329.161 8	330.169 1[M+H] ⁺	-2.8	192.100 1[M-C ₈ H ₉ O ₂] ⁺ 、1480.074 7[M-C ₈ H ₉ O ₂ -CH ₃ -OCH ₃] ⁺	牛心果碱	0.88
C3	5.96	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	355.178 3	355.177 7	356.184 9[M+H] ⁺	-1.9	264.078 1[M+H-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH-CH ₃] ⁺ 、279.101 5[M+H-C ₂ H ₇ N-CH ₃ OH] ⁺	蝙蝠葛任碱	15.22
C4	7.86	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	480.308 7	480.308 9	481.316 2[M+H] ⁺	0.4	301.179 8[M-H ₂ O-C ₈ H ₁₇ O ₃] ⁺ 、427.284 2[M+H-3H ₂ O] ⁺	20-羟基蜕皮素	1.48
C5	10.08	C ₂₇ H ₄₄ O ₆	464.313 7	464.313 6	465.320 8[M+H] ⁺	0.5	411.289 8[M+H-3H ₂ O] ⁺ 、447.310 6[M+H-H ₂ O] ⁺	2-去氧-20 β -羟基蜕皮素	0.46
C6	10.56	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₁	626.366 6	626.366 3	627.374 3[M+H] ⁺	0.6	429.300 0[M+H-2H ₂ O] ⁺	2-去氧-20 β -羟基蜕皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷	0.40
C7	10.75	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	337.131 4	337.130 3	338.137 6[M+H] ⁺	-3.2	322.107 3[M-CH ₃] ⁺ 、294.112 4[M+H-CH ₃ -CO] ⁺	非洲防己碱	10.80
C8	10.80	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	355.178 3	355.177 2	356.184 5[M+H] ⁺	-3.3	192.1007[M-C ₁₀ H ₁₁ O ₂] ⁺ 、281.0802[M-C ₃ H ₉ N-CH ₃] ⁺	四氢巴马汀	0.52
C9	11.24	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	337.131 4	337.130 3	338.137 5[M+H] ⁺	-3.4	322.107 3[M-CH ₃] ⁺ 、294.112 4[M+H-CH ₃ -CO] ⁺	药根碱	17.35
C10	14.13	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	351.147 0	351.146 0	352.153 3[M+H] ⁺	-2.9	336.123 04[M+H-CH ₃] ⁺ 、308.128 1[M+H-CH ₃ -CO] ⁺	巴马汀	21.75
C11	14.41	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	536.225 7	536.225 8	554.259 7[M+NH ₄] ⁺	0.1	279.137 2[M-C ₆ H ₁₂ O ₆ -CH ₃ OH-COOH] ⁺ 、297.147 8[M-C ₆ H ₁₂ O ₆ -C ₂ H ₄ O ₂ -COOH] ⁺ 、357.169 1[M-C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁺	tinophyllolside	2.71
C12	15.47	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356.125 9	356.125 5	395.088 7[M+K] ⁺	-1.2	133.064 2[M-C ₆ H ₇ O ₂ -C ₃ H ₄ O ₃] ⁺ 、227.068 9[M-C ₆ H ₇ O ₂ -H ₂ O] ⁺	去氧黄藤苦素	0.18
C13	15.54	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	520.194 4	520.194 4	559.157 6[M+H] ⁺	0	359.147 7[M-C ₆ H ₉ O ₅] ⁺	金果榄苷	0.80
C14	15.70	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358.141 6	358.141 0	359.148 3[M+H] ⁺	-1.8	341.138 3[M-OH] ⁺ 、295.132 8[M+H-H ₂ CO ₂] ⁺ 、121.0639[M-C ₁₁ H ₁₁ O ₃ -H ₂ CO ₂] ⁺	古伦宾	7.62
C15	16.20	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	323.163 3	323.163 9	346.153 1[M+Na] ⁺	1.5	241.121 1[M-C ₂ H ₂ -C ₃ H ₄ O] ⁺ 、221.083 3[M-CH ₃ -C ₃ H ₇ N ₂ O] ⁺	neoechinulin A	0.23
C16	22.45	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240 2	256.239 1	274.272 9[M+NH ₄] ⁺	-4.1	125.095 2[M-OH-C ₈ H ₁₈] ⁺ 、274.272 9[M-OH-C ₉ H ₂₀] ⁺	棕榈酸	1.38
C17	24.00	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271 5	284.270 4	302.304 2[M+NH ₄] ⁺	-3.7	153.114 3[M-OH-C ₈ H ₁₈] ⁺	硬脂酸	0.22

成分,且是2020年版《中国药典》中唯一质量控制指标,为古伦宾作为金果榄质量标志物提供了合理依据。见图4。

PCA筛选出反映金果榄质量的13个代表性化合物,OPLS-DA发现引起金果榄质量差异的7个化合物,对PCA和OPLS-DA的分析结果取交集,寻找18批次金果榄药材的代表性成分,分别为非洲防己碱、药根碱、巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾,以上化合物可作为金果榄的候选质量标志物。

3.3 网络药理学分析

3.3.1 “利咽”相关靶点预测与筛选 以UPLC-Q-TOF-MS辨析所得主要成分作为候选成分,根据类药性筛选发现,除2-去氧-20 β -羟基蜕皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷不满足Lipinski规则(类药五原则)、Ghose规则、Veber规则、Egan规则和Muegge规则等5种考察药物类药性的规则中的任何一种,并且GI adsorption为low,不具药物活性外;木兰花碱、牛心果碱、蝙蝠葛任碱、20-羟基蜕皮素、2-去氧-20 β -羟基

表3 主成分信息和方差贡献率

Table 3 Principal component information and variance contribution rate

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积/%	总计	方差百分比	累积/%
1	5.407	31.809	31.809	5.407	31.809	31.809
2	3.500	20.590	52.399	3.500	20.590	52.399
3	2.112	12.424	64.823	2.112	12.424	64.823
4	1.587	9.333	74.156	1.587	9.333	74.156
5	1.497	8.808	82.964	1.497	8.808	82.964
6	0.945	5.558	88.522			
7	0.621	3.655	92.177			
8	0.399	2.350	94.527			
9	0.301	1.771	96.298			
10	0.192	1.128	97.426			
11	0.168	0.986	98.412			
12	0.112	0.659	99.071			
13	0.092	0.538	99.609			
14	0.049	0.287	99.896			
15	0.015	0.090	99.986			
16	0.002	0.014	99.999			
17	0.000	0.001	100.000			

	主成分因子1	主成分因子2	主成分因子3	主成分因子4	主成分因子5
C1	-0.213	0.496	-0.116	0.320	-0.618
C2	-0.245	0.440	0.333	-0.048	-0.687
C3	-0.452	0.714	-0.220	0.059	0.129
C4	0.105	0.842	-0.315	0.078	0.077
C5	0.651	0.463	-0.447	0.005	-0.189
C6	0.494	0.429	0.592	-0.227	-0.031
C7	0.927	0.095	-0.138	0.169	-0.126
C8	0.141	0.187	0.653	0.560	0.357
C9	0.921	0.108	-0.160	0.144	0.164
C10	0.889	0.184	-0.059	0.302	0.126
C11	-0.799	-0.038	-0.019	0.248	0.312
C12	-0.750	0.434	0.048	0.006	-0.141
C13	0.194	0.264	0.867	0.036	-0.018
C14	-0.390	0.600	-0.138	0.540	0.294
C15	0.702	0.200	0.035	-0.205	0.015
C16	-0.094	0.537	-0.129	-0.526	0.358
C17	-0.087	0.637	0.160	-0.542	0.256

图3 主要因子载荷矩阵

Fig. 3 load matrix of main factor

蜕皮素、非洲防己碱、四氢巴马汀、药根碱、巴马汀、tinophyllolloside、去氧黄藤苦素、金果榄苷、古伦宾、neoechinulin A、棕榈酸和硬脂酸等其他化学成分满足5种类药性规则中的3种,并且GI adsorption为high,可作为活性成分。在TCMSP和SwissTargetPrediction权威平台上提取各化合物对

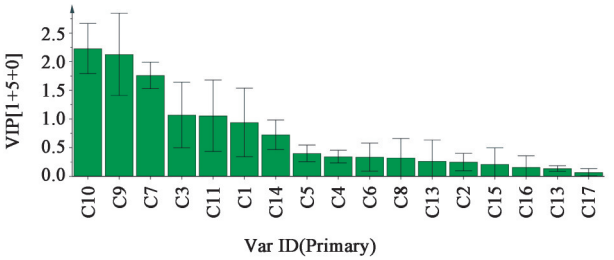


图4 金果榄中17个成分的VIP

Fig. 4 VIP value diagram of 17 major compounds in Tinosporae Radix

应的靶点基因,合并去除重复基因后得到金果榄潜在靶点基因506个。在GeneCards数据库中,以“pharyngitis”和“tonsillitis”为关键词得到疾病相关靶点,选取相关性>1.0的靶点,最终得到523个候选疾病靶点基因。将金果榄中主要化学成分靶点和疾病靶点分别导入在线网站Venny 2.1.0进行维恩分析,最终得到金果榄“利咽”相关靶点有41个。

3.3.2 PPI网络的建立 将3.3.1项下获得的41个交集靶点导入STRING数据库中,获取PPI网络,见图5,将最终结果以TSV格式保存并上传至Cytoscape 3.9.0软件中并对其进行拓扑分析,结果见图6,依据Closeness Centrality值和Betweenness Centrality值>2倍中位数,Degree值大于中位数,筛选到拥有较多相互作用关系的8个蛋白作为核心作用靶点,分别为白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、信号转导及转录激活蛋白3(STAT3)、表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺素G/H合成酶-2(PTGS2/COX-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC),提示这些靶点可能与金果榄的利咽作用相关。IL-6是由活化的单核-巨噬细胞及淋巴细胞等产生的一类细胞因子,参与炎症反应的部分或者全过程,主要刺激免疫细胞的增殖和分化,参与机体的免疫应答,进而增加炎症反应^[21]。TNF- α 参与多种炎症的信号通路,而且可以调节其他细胞因子的合成和释放。研究发现MMP家族参与类风湿性关节炎^[22]和骨性关节炎^[23]等炎症反应。PTGS2是炎症中催化前列腺素合成的一种关键诱导酶,在炎症刺激、组织损伤等情况下表达增强并参与炎症反应。与Caspase-3密切相关的核转录因子(NF)- κ B信号通路在免疫应答中起到关键性作用。Caspase-3是Caspase家族成员之一,在凋亡过程中处于有序级联反应下游,为多种凋亡刺激信号传输的汇聚点。黄芩苷通过抑制Caspase-3蛋白的裂解,进而抑制乳腺炎小鼠乳腺组织细胞凋亡^[24]。此外,研究发

现喉、口咽和下咽鳞状细胞癌与EGFR上调相关^[25],而鼻咽癌的发生与鼻咽部非可控性炎症密切相关^[26]。

3.3.3 GO功能分析和KEGG通路分析 GO功能分析结果表明,共有1 635个GO条目显著富集($P<0.05$),1 420个在BP中富集,79个在CC中富集,136个在MF中富集,BP、CC、MF各10个显著富集条目见增强出版附加材料。BP包括对细菌起源分子的反应、药物反应、对脂多糖的反应和炎症反应的调节等;CC涉及膜筏、内吞囊泡、基底质膜和吞噬泡等;MF主要包括细胞因子受体结合、丝氨酸水解酶活性以及蛋白酪氨酸激酶活性等,进而发挥金果榄的利咽作用。

KEGG通路分析筛选得到112条通路,按照P值大小进行排序,选取(P值)最小的30条进行作图呈现,见增强出版附加材料。结果显示,与金果榄“利咽”相关通路主要包括乙型肝炎(hsa05161)、甲型流感(hsa05164)、人类嗜T细胞病毒感染(hsa05166)、人巨细胞病毒感染(hsa05163)、新型冠状病毒肺炎(hsa05171)、IL-17信号通路(hsa04657)以及TNF信号通路(hsa04668)等,金果榄可能通过上述通路发挥利咽作用。

3.3.4 化合物-靶点-通路网络构建 为进一步明确

金果榄各成分的有效性,将成分、关键靶点、信号通路进行联合分析,运用Cytoscape 3.9.0软件中,构建化合物-靶点-通路的网络关系图,见增强出版附加材料,信息网络中共包含66个节点与401条边,红色正三角节点代表金果榄中的化合物成分(16个),紫色圆形节点代表靶点(41个),绿色菱形节点代表金果榄发挥的信号通路(9个)。结果Degree值、Closeness Centrality值和Betweenness Centrality值均大于中位数的成分共计6个,包括四氢巴马汀、巴马汀、蝙蝠葛任碱、去氧黄藤苦素、neoechinulin A、古伦宾,以上可能是金果榄药材利咽的重要成分。

3.3.5 分子对接验证 多元统计分析结果表明,非洲防己碱、药根碱、巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾可作为金果榄的候选质量标志物;成分-靶点-通路网络分析发现,四氢巴马汀、巴马汀、蝙蝠葛任碱、去氧黄藤苦素、neoechinulin A和古伦宾可能是金果榄药材利咽的重要成分;对两种分析方法所得结果取交集认为,金果榄中具有代表性的利咽成分包括巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾,依次与8个核心靶点进行分子对接,对接得分见表4。结果表明,3种化合物与EGFR、SRC、PTGS2、MMP-9、IL-6及Caspase-3等核心靶点均具有较好结合活性,进一步验证3种化合物可以作为金果榄的利咽质量标志物。

表4 金果榄活性成分与核心靶点蛋白的对接结合能

Table 4 Binding energy for molecular docking of key targets with active components in *Tinosporae Radix*

化合物	核心靶点结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$							
	EGFR(4LRM)	SRC(3GEQ)	PTGS2(1PXX)	MMP9(6ESM)	IL6(1ALU)	Caspase-3(1NME)	STAT3(6NUQ)	TNF(5UUI)
古伦宾	-7.8	-7.6	-5.6	-7.8	-6.3	-7.0	-5.7	-4.3
巴马汀	-8.3	-8.8	-7.4	-7.2	-6.5	-6.1	-5.4	-4.3
蝙蝠葛任碱	-9.1	-8.7	-7.6	-6.5	-5.7	-6.2	-5.4	-4.1

注:括号内为核心靶点的PDB编号

6个核心靶点对应结合能最高的分子对接,见增强出版附加材料。蝙蝠葛任碱与EGFR上THR793氨基酸残基形成氢键,键长(重原子距离)为2.79,还存在C-H键、sigma- π 键和烷基- π 键等其他结合方式;与PTGS2主要以范德华力和氢键结合,结合能为 $-7.6\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,对接活性较好,其苯环上的羟基等与氨基酸残基ARG120和TYR355形成氢键。巴马汀和SRC的结合方式主要为范德华力和C-H键等,以 $-8.8\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的结合能稳定结合。巴马汀和IL-6结合能为 $-6.5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,主要以范德华力和氢键等方式结合,与ARG120残基相互作用形成氢键。古伦宾结构中酯基和五元环上的氧与

MMP-9上ALA189、HIS226和GLN227等氨基酸残基形成氢键,结合能为 $-6.5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,键长分别为3.03、3.00和2.81;与Caspase-3上ASN208、SER209、TRP214、SER251和PHE252等氨基酸残基形成氢键,结合能为 $-7.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,键长平均在3左右。

4 讨论

金果榄主产于四川、湖南、湖北、贵州、广西等地,分布较广。课题组前期调研发现不同产地金果榄在药材性状、化学成分含量等方面差异较大,其质量受多种因素影响,药材质量是临床疗效的保障,然而目前金果榄的质量评价仅以古伦宾为单一评价指标,不利于其临床应用及产业的发展,其

质量评价标准亟待完善。中药质量标志物具有特有性、有效性、可测性、与中医药理论相关性等基本特征,既反映了与有效性(和安全性)的关联关系,又体现中药成分的专属性、差异性特征^[27],为中药质量评价提供新思路,具有较高指导意义。

物质-功能关联是质量标志物研究的核心内容,物质-功能关联也就是指中药的化学物质实体与机体生命活动之间交互作用。近年来多采用高效液相色谱和高分辨质谱等化学分析方法明确中药的物质,PCA、OPLS-DA等多元统计分析方法能在一定程度不损失信息的情况下,通过变换和构造模型,剔除指标间相互制约的成分,寻找一个简单综合指标,使复杂数据简单化^[28],筛选主要,剔除次要,对引起中药质量差异的物质进行综合分析和评价,以实现对中药质量更准确,更全面地控制。中药物质-功能间存在复杂网络关系,网络药理学从药物和疾病之间相互作用的整体性和系统性出发,体外虚拟筛选出潜在的药效物质、作用靶点及通路,构建药物-靶标-疾病多层次网络联系^[29],是发现中药质量标志物的途径之一。

本研究使用UPLC-Q-TOF-MS技术辨析得到金果榄中17个主要化学成分,综合多元统计分析和网络药理学网络分析筛选出金果榄中潜在利咽成分巴马汀、蝙蝠葛任碱和古伦宾,最后分子对接结果表明以上化合物与关键靶点结合活性较好,理论上证实了质量标志物较好的生物活性。另外根据质量标志物的“五要素”,并结合文献佐证以上3种成分作为金果榄的质量标志物的可靠性。首先基于成分特有性认为,金果榄中古伦宾含量较高,为金果榄中特有成分;此外,以巴马汀为代表的异喹啉类生物碱也是该药材中的主要化学成分,为防己科植物的特征性成分,以上两类成分可以作为金果榄的质量标志物。基于成分有效性发现,巴马汀作为小檗碱类生物碱,通过多种途径缓解炎症^[30-34],从而治疗咽喉肿痛等症,古伦宾^[35]和蝙蝠葛任碱^[36-37]也具有较好抗炎作用,3种成分可作为金果榄质量标志物的选择对象。基于中药药性理论认为,金果榄味苦,“苦味”的物质基础应具有苦味的味觉特征,并且具有苦味的功能属性,与苦味药相关的化学成分大多包括生物碱、挥发油及苦味素等^[38]。巴马汀和蝙蝠葛任碱属于生物碱类化合物,古伦宾属于苦味素类化学成分,因此均可被认为是其质量标志物。基于成分可测性发现,2000年版《中国药典》^[39]开始以盐酸巴马汀作为金果榄质量评价指

标,通过薄层色谱法进行定量测定。2010年版《中国药典》^[40]至今规定其主要成分古伦宾的测定方法和限度要求。现多项研究发现可采用反相高效液相色谱法同时对金果榄中多种生物碱和二萜类成分进行定量测定^[19,41-42]。因此以上质量标志物具备可测性条件,作为金果榄质量评价指标可行性较高。然而巴马汀和古伦宾不仅具有多种药理活性,还具有肝毒性,巴马汀的“效-毒”关系存在剂量依赖性、时间依赖性和服用方式相关性^[43],细胞色素P450 3A4酶介导的呋喃环生物活性可能是古伦宾诱导肝损伤的潜在机制^[44],两种成分的“效-毒-时”关联机制仍需更一步的研究与探讨,为金果榄利咽质量标志物的确定提供可靠依据。

综上所述,和其他中药一样,金果榄也以多成分、多靶点、多途径的方式发挥治疗作用。目前学者们仅对其抗炎机制做过相关研究,而对利咽的作用机制研究较为薄弱。查阅其他药物治疗喉痹和乳蛾的机制^[45-48],结果表明其他药物也主要通过抑制炎症因子如IL-6、IL-1 β 、PGE₂及TNF- α 等的释放,下调COX-2和NF- κ B p65等表达发挥治疗作用。本文采用UPLC-Q-TOF-MS技术、多元统计分析和网络药理学技术获取金果榄的利咽质量标志物,具有全面、快速和准确等优势,预测所得金果榄潜在利咽靶点及通路与研究较吻合,可为后续机制研究提供参考,巴马汀、古伦宾和蝙蝠葛任碱可以作为金果榄利咽的质量标志物。然而本研究所得金果榄的潜在利咽质量标志物,虽然关联药效,但各化学成分对整体药效的贡献度未知,量效关系不清楚,有待进一步研究,为建立一个更完善的既关联药效、又明确贡献度,以质量标志物为核心的金果榄药材质量评价体系提供科学依据。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:227,568,1648.
- [2] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:人民卫生出版社,1963.
- [3] 王刚,涂自良,陈黎,等. 金果榄抗炎作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1232-1233.
- [4] 殷崎,宋勤,杨永东. 民族药地苦胆胶囊的药理学研究[J]. 中国民族民间医药杂志,1998(4):30-34,46.
- [5] 殷崎,闻兴培,金礼钟. 民族药地苦胆胶囊治疗急、慢性咽炎临床观察[J]. 中国民族民间医药杂志,1998(1):9-11.

- [6] 张国峰,王芳,郭亦男,等.金果术甘汤治疗小儿急性扁桃体炎64例[J].长春中医药大学学报,2008,24(1):93.
- [7] 辛梅霞,刘英.金果榄粉治疗急性扁桃体炎38例[J].世界今日医学杂志,2004,5(4):290.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:1679.
- [9] 梁璐.复方利咽口服液对实验性急、慢性咽炎的疗效与作用机制研究[D].太原:山西大学,2012.
- [10] 李岩,陶荆华,汪婧怡,等.中医外治法治疗急性咽炎的研究进展[J].中国中医急症,2021,30(11):2065-2068.
- [11] 杨艾,何旭东,张耀武,等.慢性咽炎的发病机制及药物治疗进展[J].中国药事,2021,35(7):808-813.
- [12] 张霞,谢雁鸣,李光熙,等.中医药治疗急性咽炎的优势与问题探讨[J].中国中药杂志,2017,42(19):3819-3825.
- [13] 程媛媛.中医辨证论治慢性咽炎的治疗进展[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2015,23(1):79-80,73.
- [14] 桂文琪,方媛,聊晓玉,等.基于网络药理学和体内实验验证霍山石斛治疗胃溃疡的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(7):151-161.
- [15] 连文静,胡骏,傅梦薇,等.基于网络药理学与分子对接技术探究冬虫夏草治疗支气管哮喘和慢性肾衰竭"异病同治"作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(11):184-191.
- [16] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009,4(1):44-57.
- [17] KIM S, SHOEMAKER B A, BOLTON E E, et al. Finding potential multitarget ligands using PubChem [J]. Methods Mol Biol, 2018,1825:63-91.
- [18] NURMINEN A, FARNUM G A, KAGUNI L S. Pathogenicity in POLG syndromes: DNA polymerase gamma pathogenicity prediction server and database [J]. BBA Clin, 2017,7:147-156.
- [19] XIANG Q, HASHI Y, CHEN Z. Simultaneous detection of eight active components in Radix Tinosporae by ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2016,39(11):2036-2042.
- [20] 张玉峰.基于液质联用技术的中药化学成分鉴定方法学研究[D].杭州:浙江大学,2008.
- [21] 朱锐灵,沈悦,马飞鸿,等.分子对接技术在中药抗炎活性成分筛选和作用机制研究中的应用[J].中国药理学与毒理学杂志,2018,32(6):497-506.
- [22] MANN S, SHARMA A, BISWAS S, et al. Identification and molecular docking analysis of active ingredients with medicinal properties from edible *Baccaurea sapida* [J]. Bioinformation, 2015, 11(9):437-443.
- [23] CHEN W P, TANG J L, BAO J P, et al. Anti-arthritis effects of chlorogenic acid in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model [J]. Int Immunopharmacol, 2011,11(1):23-28.
- [24] 尹德恩,李讨讨,蒋海涛,等.湖羊CASP3基因的序列分析及其在临床型乳腺炎乳腺组织中的表达特征[J].基因组学与应用生物学,2022,41(1):12-19.
- [25] FUJII S, URYU H, AKASHI K, et al. Clinical significance of KRAS gene mutation and epidermal growth factor receptor expression in Japanese patients with squamous cell carcinoma of the larynx, oropharynx and hypopharynx [J]. Int J Clin Oncol, 2013,18(3):454-463.
- [26] 陈攀. SPLUNC1在LPS诱导炎症反应中的作用机制研究[D].长沙:中南大学,2013.
- [27] 许海玉,侯文彬,李珂,等.基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(6):1-8.
- [28] 刘娜,李军,李宝国.多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考[J].中国中药杂志,2014,39(21):4268-4271.
- [29] 刘志华,孙晓波.网络药理学:中医药现代化的新机遇[J].药学报,2012,47(6):696-703.
- [30] KÜPELI E, KOŞAR M, YEŞİLADA E, et al. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species [J]. Life Sci, 2002,72(6):645-657.
- [31] KUMATIA E K, ANNAN K, DICKSON R A, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Annickia Polycarpa* stem bark and its constituents [J]. Der Pharmacia Lettre, 2016,8(13):42-52.
- [32] CHEN G, XU Y, JING J, et al. The anti-sepsis activity of the components of Huanglian Jiedu decoction with high lipid A-binding affinity [J]. Int Immunopharmacol, 2017,46:87-96.
- [33] YAN B, WANG D, DONG S, et al. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- κ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2017,45:194-200.
- [34] QI F, SUN Y, LV M, et al. Effects of palmatine hydrochloride mediated photodynamic therapy on oral

- squamous cell carcinoma [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2019, 18(6):1596-1605.
- [35] IBRAHIM ABDELWAHAB S, SYAED KOKO W, MOHAMED ELHASSAN TAHA M, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of columbin through the inhibition of cyclooxygenase-2 and nitric oxide but not the suppression of NF- κ B translocation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 678(1/3):61-70.
- [36] SUN D, HAN Y, WANG W, et al. Screening and identification of *Caulis Sinomenii* bioactive ingredients with dual-target NF- κ B inhibition and β_2 -AR agonizing activities [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(11):1843-1853.
- [37] ZHANG A, PAN W, LV J, et al. Protective effect of amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(3):745-751.
- [38] 和焕香, 郭庆梅. 瓜蒌化学成分和药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19):4808-4820.
- [39] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2000:174-175.
- [40] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:202.
- [41] LIU Y, ZHOU W, MAO Z, et al. Analysis of six active components in *Radix Tinosporae* by nonaqueous capillary electrophoresis with mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(23):4628-4635.
- [42] 严赞, 张赞赞. HPLC-ESI-MS/MS同时测定金果榄中5种成分含量 [J]. *中药材*, 2017, 40(2):395-398.
- [43] LO S N, CHANG Y P, TSAI K C, et al. Inhibition of CYP1 by berberine, palmatine, and jatrorrhizine: Selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3):671-680.
- [44] PEI J, XIAO W, ZHU D, et al. Cytochrome P450 enzyme-mediated bioactivation as an underlying mechanism of columbin-induced hepatotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(4):940-947.
- [45] 吴飞虎, 宋任洁, 钱雅琴, 等. 疏风解毒胶囊对急性咽炎大鼠干预作用及机制探讨 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(9):923-925, 935.
- [46] 孔庆新, 东方, 李思阳, 等. 荔枝草提取物治疗慢性咽炎的作用及机制研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(1):109-113.
- [47] 徐金红. 基于TLR4/NF- κ B信号通路探讨紫正地黄汤治疗急性咽炎的机制研究 [D]. 合肥:安徽中医药大学, 2020.
- [48] 梁璐, 朴晋华, 高天红, 等. 注射用炎琥宁对实验性急性咽炎动物模型的疗效与作用机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(3):165-168.
- [责任编辑 顾雪竹]