

# 基于谱效关系和网络药理学的苗药血人参抗炎活性成分研究

聂琴<sup>1</sup>, 吴静澜<sup>1,2,3</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 张均航<sup>1</sup>, 娄华勇<sup>4</sup>, 徐剑<sup>1,2,3</sup>,  
张永萍<sup>1,2,3\*</sup>, 傅建<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>贵州中医药大学药学院; <sup>2</sup>国家苗药工程技术研究中心; <sup>3</sup>贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵阳 550025; <sup>4</sup>贵州省天然产物研究中心, 贵阳 550014

**摘要:** 为明确苗药血人参的化学成分及抗炎活性物质, 本研究通过建立血人参 UPLC 指纹图谱方法, 利用化学计量法对其成分进行比较分析, 结合网络药理学-分子对接预测血人参抗炎的活性有效靶点, 并采取体外细胞实验对其抗炎药效进行验证。血人参指纹图谱结合化学计量法分析结果显示, 不同产地血人参共得到 28 个共有峰, 其中指认了 10 个共有峰, 并首次指认出血人参所含成分牡荆素、木犀草苷、金丝桃苷和汉黄芩素。聚类分析可将不同产地血人参聚为 3 类, 主成分分析与聚类分析结果一致, 可相互佐证。体外细胞实验表明, 不同产地的血人参对炎症细胞有不同程度的修复作用。网络药理学结果表明, 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) 是抗炎潜在的靶点, EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性被认为是抗炎的主要途径之一。本研究建立了血人参的谱-效关系, 并结合网络药理学阐明血人参抗炎的关键靶点及作用通路, 为血人参的质量控制和品质评价提供参考依据。

**关键词:** 苗药血人参; 超高效液相色谱; 谱效关联; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R932

文献标识码: A

## Study on the anti-inflammatory active substances of Miao medicine *Indigofera stachyodes* Lindl. based on spectrum-effect relationship and network pharmacology

NIE Qin<sup>1</sup>, WU Jing-lan<sup>1,2,3</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, ZHANG Jun-hang<sup>1</sup>, LOU Hua-yong<sup>4</sup>,  
XU Jian<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yong-ping<sup>1,2,3\*</sup>, FU Jian<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine; <sup>2</sup>National Miao Medicine Engineering Technology Research Centre; <sup>3</sup>Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Centre, Guiyang 550025, China; <sup>4</sup>Natural Products Research of Guizhou Province, Guiyang 550014, China

**Abstract:** To elucidate the chemical compositions and anti-inflammatory active substances of Miao medicine *Indigofera stachyodes* (*I. stachyodes*), an UPLC fingerprint method was established. Stoichiometry method was employed to analyze its components, then the effective anti-inflammatory targets of *I. stachyodes* was predicted via network pharmacology combined with molecular docking and its anti-inflammatory efficacy was further verified through *in vitro* cell experiments. The fingerprint spectrum of *I. stachyodes* integrated with chemical stoichiometry analysis displayed that a total of 28 common peaks were obtained, of which ten common peaks were identified. Vitexin, luteolin, hyperoside and baicalein were identified from *I. stachyodes* for the first time. Cluster analysis exhibited that *I. stachyodes* from different origins can be divided into three categories, and the results of principal component analysis is consistent with cluster analysis. Furthermore, *in vitro* cell assay exhibited that *I. stachyodes* from different origins with varying degrees of reparative effects. Network pharmacology studies demonstrated that the epidermal growth factor receptor (EGFR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) were potential targets, and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance was considered one of the primary pathways for anti-inflammatory. Collectively, this study successfully developed the spectrum-effect relationship of *I. stachyodes*, in addition, the signaling pathways and key targets of *I. stachyodes* anti-inflammatory were elucidated in conjunction with network pharmacology. These results will provide a substantial basis for quality control and evaluation of *I. stachyodes*.

**Key words:** Miao medicine *Indigofera stachyodes*; UPLC; spectrum-effect relationship; network pharmacology; molecular docking

血人参为豆科木蓝属植物茸毛木蓝 (*Indigofera stachyodes* Lindl.) 的干燥根, 为贵州少数民族习用药材<sup>[1]</sup>。具有活血、滋阴补肾、利湿、化痰等功效, 主要用于治疗伤风发热、妇女腹痛、淋浊、肝硬化、风湿痹痛等<sup>[2]</sup>。现代研究表明, 血人参中主要含有黄酮类<sup>[3]</sup>、鞣质类<sup>[4]</sup>、糖苷类、甾醇类、萜类、酚酸类以及挥发油类等化学成分<sup>[5]</sup>, 其药理作用有保肝<sup>[6]</sup>、抑菌<sup>[7]</sup>、抗肿瘤<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>、降血糖、降血脂及抗氧化等<sup>[1]</sup>。前期研究发现, 血人参具有优良的抗炎效果<sup>[5]</sup>, 但血人参的成分组成复杂, 诸多成分尚不明确。因此, 课题组进一步对血人参进行分离纯化, 探究不同极性部分抗炎差异效果, 结果显示, 血人参石油醚层、乙酸乙酯层的抗炎效果最佳<sup>[10]</sup>, 但并未指认其化学成分。目前, 市面上血人参药材质量参差不齐、质量控制体系不完善。因此, 建立可靠、稳定的血人参质量评价方法迫在眉睫。

指纹图谱可以较全面地反映中药的药效学物质特征而被广泛用于中药的质量控制领域, 基于此, 本研究采用 UPLC 建立不同产地血人参的指纹图谱, 利用化学计量学<sup>[11]</sup>分析其差异成分, 并对差异成分进行指认。

网络药理学是一种基于“药物-靶点-疾病”相互作用的网络，可用于探究药物治疗疾病的分子机制<sup>[12]</sup>，利用网络药理学研究主要潜在活性成分的作用靶点和作用通路<sup>[13]</sup>，将血人参的有效成分靶点和疾病靶点做交集，分析血人参的活性成分及抗炎作用靶点，构建 PPI 网络，拓扑分析筛选核心靶点，通过 GO 生物功能富集和 KEGG 通路富集分析构建血人参抗炎的信号通路，预测潜在作用机制。此外，采用体外细胞实验，探究不同产地血人参对脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导的 RAW 264.7 细胞损伤模型的修复作用差异，结合不同产地血人参化学成分，建立血人参“谱-效”关系，并对网络药理学结果进行验证。

本研究通过指纹图谱、网络药理学-分子对接及实验验证三个层面对血人参抗炎活性成分及作用机制进行研究，阐释血人参抗炎作用活性靶点及相关信号通路，以期对血人参药材质量控制和扩大其应用范围提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药材

16 批血人参药材（S1~S12、S16）均于 2022 年 9 月采集于贵州不同地区，S13~S15 购买自不同企业（见表 1），经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为豆科木蓝属植物茸毛木蓝（*Indigofera stachyodes* Lindl.）的干燥根。

表 1 血人参药材信息

Table 1 Information on *I. stachyodes* medicinal materials

编号	药材来源地	编号	药材来源地
Number	Origin of medicinal herbs	Number	Origin of medicinal herbs
S1	贵州省贵阳市花溪区高坡	S9	贵州省遵义市湄潭县
S2	贵州省贵阳市修文县	S10	贵州省都匀市独山
S3	贵州省贵阳市乌当区	S11	贵州省安顺市平坝
S4	贵州省铜仁市	S12	贵州省贵阳市开阳
S5	贵州省都匀市荔波区	S13	贵阳道生健康产业有限公司
S6	贵州省遵义市播州区	S14	德昌祥药业
S7	贵州省龙里县	S15	同济堂药业
S8	贵州省遵义市余庆县	S16	贵州省六盘水市六枝特区

### 1.2 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪（北京安捷伦科技（中国）有限公司）；CO<sub>2</sub> 恒温培养箱、

血球计数板、多功能酶标仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司）；高速冷冻离心机、十万分之一天平（日本岛津公司）；超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；HY-2 旋涡混匀仪（上海雷磁仪器有限公司）。

色谱乙腈（批号：23115140，纯度 $\geq$  99.9%，安徽天地高纯溶剂有限公司）；磷酸（批号：20231118，天津市科密欧化学试剂有限公司）；DMEM 培养基（批号：2310003，北京索莱宝科技有限公司）；0.25%胰蛋白酶-0.04% EDTA 消化液（批号：O09HR197121，上海源叶生物科技有限公司）；青霉素-链霉素溶液（批号：GA2212011，赛维尔生物科技有限公司）；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）（批号：J07HS174755，纯度 $\geq$  97.0%，上海源叶生物科技有限公司）；地塞米松（dexamethasone, DXMS）（批号：S12HS194411，纯度 $\geq$  98.8%，上海源叶生物科技有限公司）；CCK-8 试剂盒（批号：1231019003，北京索莱宝科技有限公司）；一氧化氮（NO）测定试剂盒（批号：20231228，南京建成生物工程研究所）；木犀草苷、木犀草素、儿茶素、漆黄素、牡荆素、甘草素、异甘草素、甘草酸、金丝桃苷和汉黄芩素（批号分别为 DSTDM001602、DSTDM003201、DSTDB003503、DSTDQ003701、DST220701-034、DSTDG001001、DSTDY001603、DSTDG000602、DST230905-023 和 DSTDH002501，纯度均 $\geq$  98%，成都德思特生物技术有限公司）。

### 1.3 细胞株

小鼠 RAW 264.7 细胞来源于贵州中医药大学制剂实验室。

### 1.4 血人参指纹图谱的建立

#### 1.4.1 血人参提取

称取 100.0 g 血人参药材粉末，置于 2 000 mL 圆底烧瓶中，加入 10 倍量 90%的乙醇回流提取 2 h 后，滤渣继续以 10 倍量 60%的乙醇回流提取 1 h，合并滤液。减压回收至无醇味后转移至蒸发皿中，恒温水浴（70 °C）挥去多余水分后，进行真空干燥，备用。

#### 1.4.2 供试品溶液制备

取 0.5 g 血人参提取物粉末于 10 mL 容量瓶中，用适量甲醇溶解后定容至刻度线，过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜，即得。

#### 1.4.3 对照品溶液制备

分别精密称取木犀草苷 0.005 0 g、木犀草素 0.004 8 g、儿茶素 0.004 9 g、漆黄素 0.005 0 g、牡荆素 0.004 8 g、甘草素 0.004 9 g、异甘草素 0.005 0 g、甘草酸 0.004 2 g、金丝桃苷 0.005 0 g、汉黄芩素 0.004 8 g 于 10 mL 容量瓶中，甲醇溶液溶解制得各浓度对照品，备用。

#### 1.4.4 混合对照品制备

取“1.4.3项”制备的各对照品各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，甲醇溶液定容至刻度线，混匀，即得。

#### 1.4.5 色谱条件

选择 Waters ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱；以乙腈为有机相 (C)，0.1%磷酸水溶液为水相 (A)；梯度洗脱 (0~5 min, 10%→20% C；5~25 min, 20%→25% C；25~31 min, 25%→30% C；31~46 min, 30%→50% C；46~50 min, 50%→62% C)；波长：235 nm；温度：30 °C；流速：0.2 mL/min；进样体积：2 μL。

#### 1.4.6 方法学考察

按“1.4.5”项下的色谱条件对混合对照品、S1 血人参溶液和不同时间点的 S1 血人参溶液 (0, 4, 8, 12, 24, 48 h) 分别连续测定 6 次，计算其相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

### 1.5 细胞实验

#### 1.5.1 细胞培养

RAW 264.7 细胞用含 15%胎牛血清(FBS)和 1%双抗的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。待细胞生长至对数期后用 0.25%胰蛋白酶-0.04% EDTA 消化、传代。待细胞传代至 3 代进行实验。

#### 1.5.2 细胞分组及给药浓度对细胞存活率影响

将 RAW 264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 浓度接种到 96 孔板中，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。弃去原培养液，分组给药，即调零组：未铺板无细胞而加入培养基溶液；对照组：铺板细胞而未加药物；处理组：血人参提取物 (浓度为 25、50、100、200、400、800、1 600 μg/mL)，每组五个复孔。每孔加入 100 μL 含有不同浓度血人参提取物-基础培养基溶液，继续培养 24 h 后，弃去含药基础培养基，每孔加入 100 μL 含有 CCK-8 的基础培养液 (1 : 10, V/V)，孵育 3 h，进行细胞存活率实验。

#### 1.5.3 不同批次血人参提取物对 RAW 264.7 细胞中 NO 水平的影响

为检测血人参对 LPS 诱导引起的细胞模型中促炎因子 NO 释放的影响，本实验选用对数生长期的 RAW 264.7 细胞，接种量  $1 \times 10^5$  个细胞/孔，培养过夜后分组给药。空白组 (Control group, Con) 加入完全培养基，模型组 (Model group, Mod) 加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS，DXMS 组以终浓度为 20 μg/mL 的比例加入，血人参药物组分别加入不同批次的血人参提取物 (终浓度为 20 μg/mL) 以及终浓度为 1 μg/mL 的 LPS，使每组的总体积为 100 μL，继续培养 24 h。吸取上清液测定 NO 的浓度。

## 1.6 网络药理学分析

### 1.6.1 血人参成分及靶点筛选

在 SwissADME 数据库（<http://www.swissadme.ch/>）中以 Pharmacokinetics 和 Druglikeness 为筛选指标，对血人参的成分进行筛选，将筛选得到的成分通过 SwissTargetPrediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）进行药物靶点预测。根据 possibility 值，取中位数对得到的药物靶点进行筛选。

### 1.6.2 疾病靶点筛选

使用 Gene Card 数据库，以“inflammation”为关键词得到关于炎症的疾病靶点，用中位数进行筛选。使用 OMIM 数据库、DisGeNET 数据库进行疾病靶点的补充，筛去重复值，得到最终炎症靶点。使用微生信 jvenn 将血人参的有效成分靶点和疾病靶点做交集，绘制韦恩图。

### 1.6.3 “药物-成分”靶点网络构建

使用 Cytoscape3.9.1 软件构建“药物-成分靶点”网络图分析血人参成分与其相关成分靶点的作用关系。

### 1.6.4 蛋白质相互作用网络构建

将血人参和炎症疾病的共同靶点导入 String 数据库（<https://string-db.org>）中分析，得到蛋白质的 PPI 网络，删去没有相互作用的蛋白。将得到的 PPI 网络文件导入 Cytoscape3.9.1 软件，利用 Network Analyzer 插件对 PPI 网络进行拓扑分析和网络构建。使用 CytoHubba 插件根据计算得到的 Degree 值，用中位数筛选关键靶点，得到最终的关键靶点。

### 1.6.5 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

使用 Metascape 数据库对共同靶点进行生物信息分析，得到 GO 条目数。根据富集结果筛选出各自  $LgP$  值前 10 个条目绘制柱状图，并获得 KEGG 富集通路，筛选 Gene Ratio 值前二十的通路绘制气泡图。

### 1.6.6 分子对接

利用 PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>）和 PDB 数据库（<https://www.rcsb.org/>）对关键靶点蛋白进行筛选，筛选条件为：分辨率在 0.2 ~ 0.25 nm；蛋白的 pH 值应符合人体的正常生理范围。用 Pymol 软件对靶点蛋白进行去水去配体处理。将血人参的关键成分与疾病靶点蛋白通过 Autodock 软件进行分子对接，Pymol 软件进行可视化处理。将得到的关键靶点与相关的有效成分进行分子对接，并对排名前五的可视化处理。

## 1.7 数据分析

使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,得到血人参的指纹图谱,并做相似度评价。采用化学计量学筛选差异成分,以16批不同产地血人参共有峰峰面积为变量,采用组间联接法及皮尔逊相关性作为分类依据行层次聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA),主成分分析(principal component analysis, PCA)。为了进一步分析不同产地血人参之间的抗炎活性差异性,以血人参共有峰的相对峰面积为自变量,抗炎药效为因变量,进行正交偏最小二乘判别(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)分析,并采用置换检验( $n = 200$ )对模型进行验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法学考察结果

混合对照品溶液连续测定6次,其相对保留时间的RSD为0.29%~1.2%,相对峰面积的RSD为0.56%~1.0%;S1血人参溶液连续测定6次,其相对保留时间的RSD为0.040%~0.68%,相对峰面积的RSD为0.26%~2.5%;对不同时间点的主要色谱共有峰进行分析,其相对保留时间的RSD为0.004 0%~0.030%,相对峰面积的RSD为0.20%~1.7%。结果表明仪器的精密度和重复性良好,该供试品溶液在48 h内稳定。

### 2.2 血人参指纹图谱建立

血人参指纹图谱见图1。如图2、图3所示,通过与对照品比对指认了其中10个色谱峰,1号峰为表儿茶素、6号峰为牡荆素、7号峰为木犀草苷、9号峰为金丝桃苷、14号峰为漆黄素、18号峰为木犀草素、23号峰为甘草酸、24号峰为汉黄芩素、26号峰为甘草素、27号峰为异甘草素。计算16批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,相似度在0.660~0.999(见图4A),表明不同产地血人参成分存在一定差异。

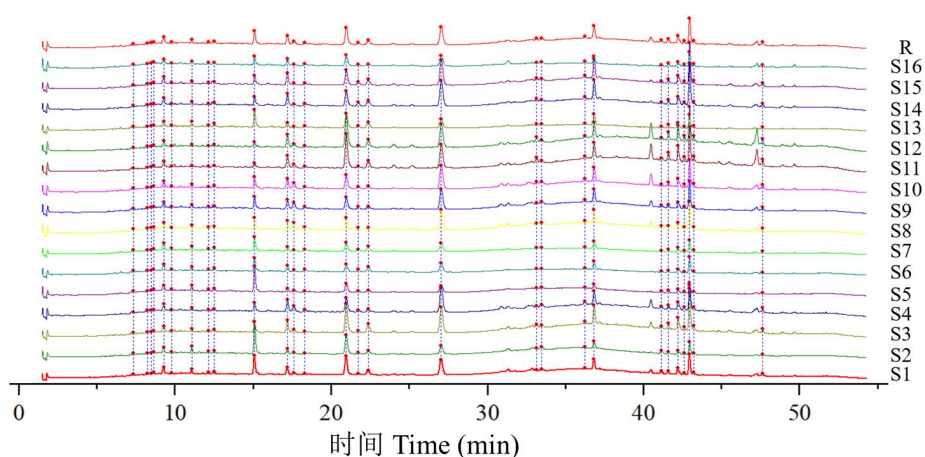


图1 血人参 UPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprint and control fingerprint (R) of *I. stachyodes*

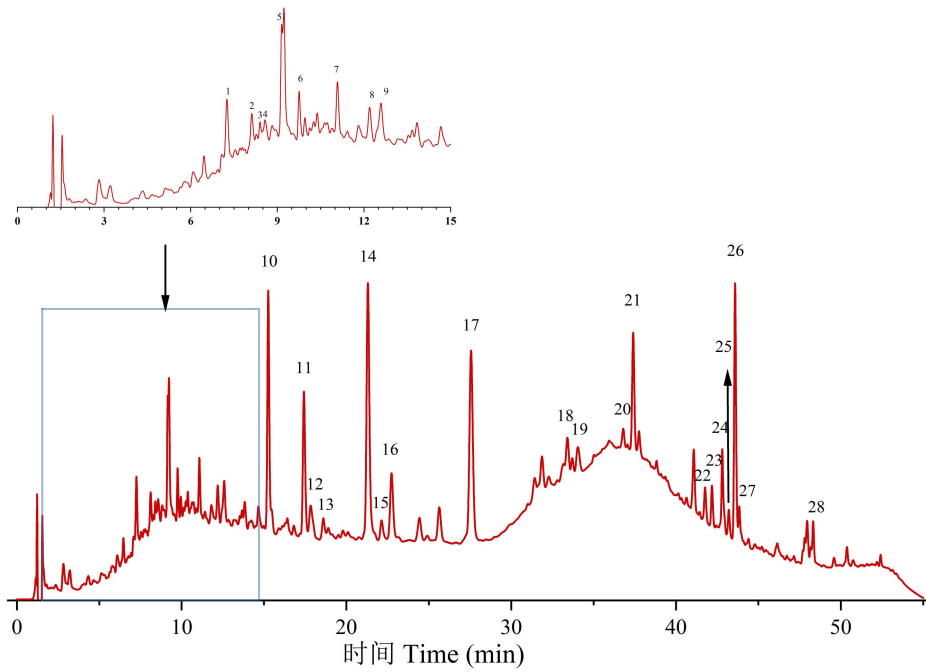


图2 血人参 (S1) 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of *I. stachyodes* (S1)

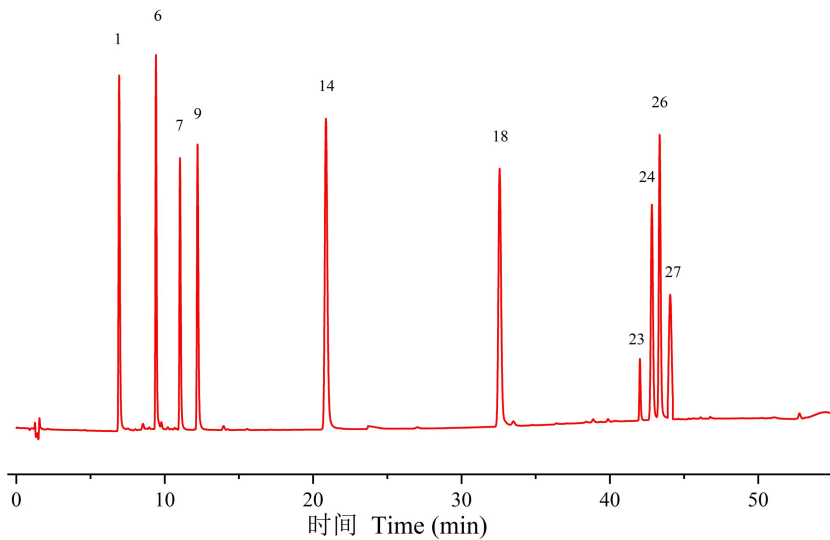


图3 混合对照品图谱

Fig. 3 Mixed reference substance spectrum

注: 1: 表儿茶素; 6: 牡荆素; 7: 木犀草苷; 9: 金丝桃苷; 14: 漆黄素; 18: 木犀草素; 23: 甘草酸; 24: 汉黄芩素; 26: 甘草素; 27: 异甘草素。Note: 1: Epicatechin; 6: Vitexin; 7: Luteolin-7-*O*-glycoside; 9: Hyperoside; 14: Fisetin; 18: Luteolin; 23: Glycyrrhizic acid; 24: Wogonin; 26: Liquiritigenin; 27: Isoliquiritigenin.



## 2.3 化学计量学研究

### 2.3.1 层次聚类分析

聚类分析结果见图 4B，不同产地血人参可分为三类，S1、S2、S5、S6、S7、S13、S16 为 A 类；S4、S8、S9、S10、S14、S15 为 B 类；S3、S11、S12 为 C 类。

### 2.3.2 主成分分析

如图 4C 所示，建立的模型参数  $R^2$  为 0.968， $Q^2$  为 0.576，均大于 0.500，表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。根据 PCA 得分图，16 批不同产地血人参各自聚集，可分为 3 类，该结果与聚类分析的结果一致。

根据变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 值大于 1 的原则，对 16 批血人参进行差异组分筛选，共得到 8 个差异成分见图 4D，VIP 值大小排序依次峰 14 (漆黄素) > 峰 17 > 峰 26 (甘草素) > 峰 21 > 峰 10 > 峰 11 > 峰 24 (汉黄芩素) > 峰 16，其中前 5 名的 VIP 值分别为 2.57、2.17、1.93、1.34、1.28。漆黄素可能是引起不同产地血人参质量差异的最大因素。

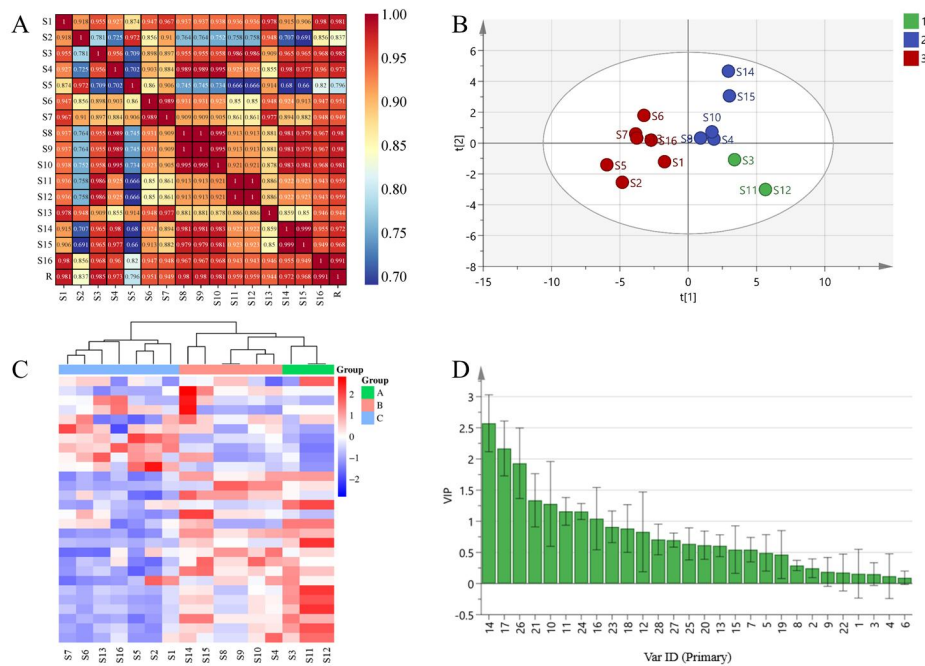


图 4 化学计量学分析

Fig. 4 Chemical stoichiometry analysis

注：(A) 16 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度；(B) 16 批血人参聚类热图；(C) PCA 得分图；(D)

PCA 结果的 VIP 图。Note: (A) The similarity between the fingerprint spectra of 16 batches of samples and the

control fingerprint spectra; (B) 16 batches of *I. stachyodes* clustering heatmap; (C) PCA score plot; (D) VIP plot of PCA results.

## 2.4 细胞实验结果

### 2.4.1 给药浓度对细胞存活率影响

结果如图 5A 所示，在浓度 25~1 600  $\mu\text{g/mL}$  时，与对照组相比，血人参对 RAW 264.7 细胞有细胞毒性作用，对细胞的存活率有明显影响，具有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。以 20  $\mu\text{g/mL}$  进行验证，如图 5B 所示，与对照组比较，细胞存活率无显著差异 ( $P > 0.05$ )。因此血人参提取物的安全浓度范围为 0~20  $\mu\text{g/mL}$ 。

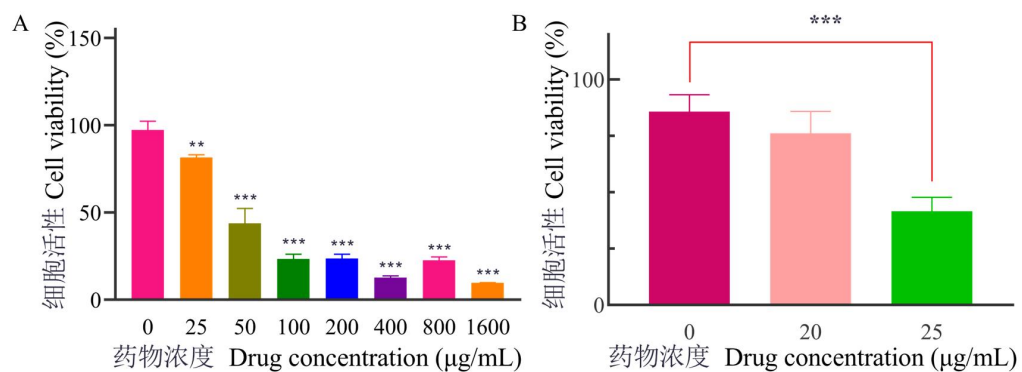


图 5 药物浓度对 RAW 264.7 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 Effect of drug concentration on RAW 264.7 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注：(A) 药物浓度筛选；(B) 药物浓度验证。Note: (A) Drug concentration screening; (B) Drug concentration verification.

### 2.4.2 不同批次血人参提取物对 RAW 264.7 细胞中 NO 水平的影响

结果表明，与 Con 组比较，Mod 组中 NO 的表达明显升高 ( $P < 0.01$ )；与 Mod 组比较，S8、S9、S13 组 LPS 诱导的 RAW 264.7 中 NO 的表达降低 ( $P < 0.05$ )，其中 S8 效果最佳，NO 释放量为  $15.0781 \pm 0.5589$ ，结果见图 6。

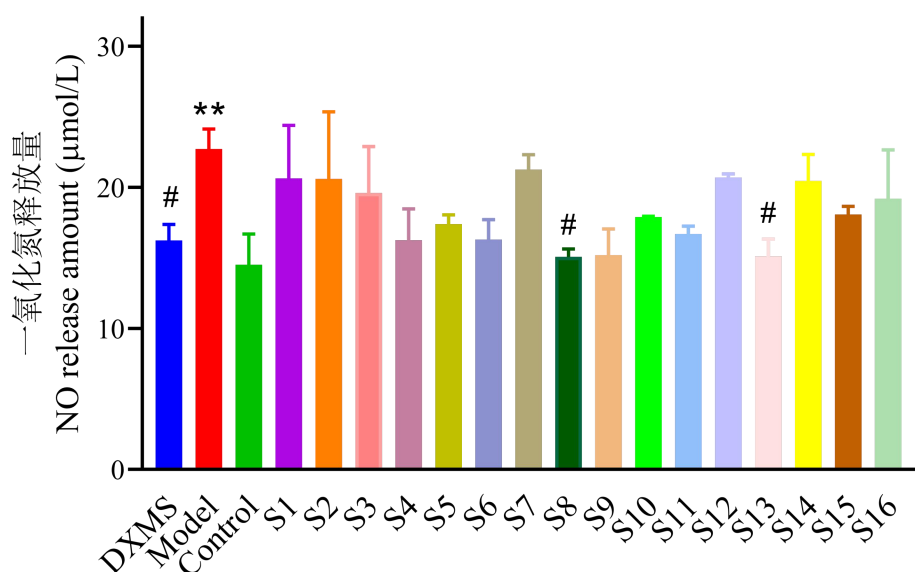


图 6 各组对 RAW 264.7 细胞中 NO 含量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Results of NO content determination in RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注：与 Con 组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与 Mod 组比较，# $P < 0.05$ 。Note: Compared with the Con group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the Mod group, # $P < 0.05$ .

### 2.4.3 正交偏最小二乘判别分析

结果显示，建立的模型参数  $R^2X$  为 0.833， $R^2Y$  为 0.887， $Q^2$  为 0.849，均大于 0.500，表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。样本得分矩阵见图 7A，由 OPLS-DA 得分图可知，不同产地血人参的抗炎药效存在一定的差异。采用置换检验 ( $n=200$ ) 对当前模型进行验证，验证参数  $R^2=0.236$ ， $Q^2=-0.751$ ， $Q^2$  点的回归线与垂直轴（左侧）相交于 0 以下，说明所建 OPLS-DA 模型拟合良好（见图 7B）。

根据变量重要性投影（VIP）值大于 1 的原则，筛选抗炎药效差异组分（见图 7C）。结果共找到了 8 个成分，VIP 值大小排序依次为峰 14（漆黄素）>峰 17>峰 26（甘草素）>峰 21>峰 10>峰 11>峰 24（汉黄芩素）>峰 16。其中漆黄素、甘草素、汉黄芩素的 VIP 分别为 2.54、1.90、1.14。

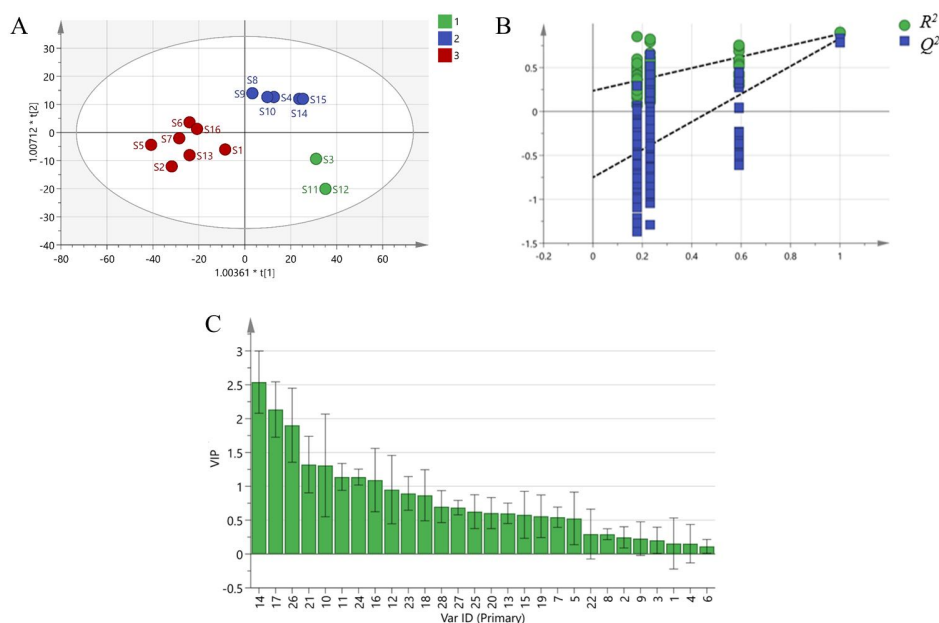


图 7 OPLS-DA 分析 ( $n = 200$ )

Fig. 7 OPLS-DA analysis ( $n = 200$ )

注：(A) OPLS-DA 得分图；(B) 置换检验；(C) OPLS-DA 结果的 VIP 图。Note: (A) OPLS-DA score plot; (B) Substitution test; (C) VIP plot of OPLS-DA results.

## 2.5 网络药理学分析

网络药理学结果显示，得到血人参有效成分 33 种（见表 2），有效成分靶点 2058 个，筛去重复值后，最终得到 200 个药物靶点，炎症靶点 1 490 个。使用微生信 jvenn 将血人参的有效成分靶点和疾病靶点做交集，最终得到 61 个交集靶点（见图 8A）。采用网络图分析血人参成分与其相关成分靶点的作用关系（见图 8B），网络包括了 33 种有效成分，200 个药物靶点。其中蓝色箭头代表有效成分，红色方块代表药物靶点。蛋白质相互作用网络构建，最终得到的关键靶点是 EGFR、PPARG、MMP9、SRC、AKT1、PTGS2、CASP3、ALB（见图 8C 和 8D）。GO 分析得到 GO 条目数 1 161 条，其中 CC 1 027 条、BP 49 条、MF 85 条。根据富集结果筛选出各自  $LgP$  值前 10 个条目绘制柱状图（见图 8E）。其中生物过程 (biological process, BP) 包括正向调控磷代谢过程、正向调节磷酸盐代谢过程、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等；细胞组成 (cell composition, CC) 包括囊腔、分泌颗粒管腔、细胞质囊腔等；分子功能 (molecular function, MF) 包括蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性醇基受体的磷酸转移酶活性等。共获得 133 条 KEGG 富集通路，主要包括癌症途径、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、松弛素信号通路等。筛选 Gene Ratio 值前二十的通路绘制气泡图（见图

8F)。将得到的关键靶点 EGFR、PPARG、MMP9、SRC、AKT1、PTGS2、CASP3、ALB 与相关的有效成分进行分子对接。由表 3 中数据可知对接能量排名前五的是 XRS3 与 PPARG、XRS4 与 EGFE、XRS7 与 EGFR、XRS6 与 EGFR、XRS13 与 EGFR，排名前五的可视化处理如图 9 所示。

表 2 血人参有效成分表

Table 2 List of active ingredients in *I. stachyodes*

编号 Number	化合物名称 Compound
XRS1	7,3',5'-三羟基二氢黄酮 7,3',5'-Trihydroxyflavanone
XRS2	7-羟基-4'-甲氧基黄酮 7-Hydroxyl-4'-methoxyflavanone
XRS3	甘草素 Liquiritigenin
XRS4	3'-甲氧基大豆昔元 3'-Methoxydaidzein
XRS5	毛蕊异黄酮 Calycosin
XRS6	芒柄花素 Formononetin
XRS7	大豆昔元 Daidzein
XRS8	儿茶素 Catechin
XRS9	Farnisin
XRS10	3,4',7-三羟基黄烷酮 3,4',7-Trihydroxyflavanone
XRS11	木犀草素 Luteolin

XRS12	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-7-ol
XRS13	染料木素 Genistein
XRS14	高丽槐素 Maackiain
XRS15	漆黄素 Fisetin
XRS16	(2Z)-6-Hydroxy-2-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methylidene]-1-benzofuran-3-one
XRS17	硫黄菊素 Sulfuretin
XRS18	7-羟基-4-苯并吡喃酮 7-Hydroxy-4-benzopyrone
XRS19	5,7-二羟基色原酮 5,7-Dihydroxychromone
XRS20	(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(Hydroxymethyl)-6-[(9-methoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromen-3-yl)oxy]oxane-3,4,5-triol
XRS21	Sativan
XRS22	9-Methoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromen-3-ol
XRS23	2',4'-二羟基查耳酮 2',4'-Dihydroxychalcone
XRS24	(+)-Stachyols A
XRS25	(-)-Stachyols B
XRS26	(-)-Stachyols A
XRS27	(+)-Stachyols B
XRS28	Stachyols C
XRS29	Stachyols D
XRS30	原儿茶酸 Protocatechuic acid
XRS31	没食子酸

XRS32 Gallic acid  
 龙胆酸  
 Gentisic acid  
 原儿茶醛

XRS33 Protocatechualdehyde

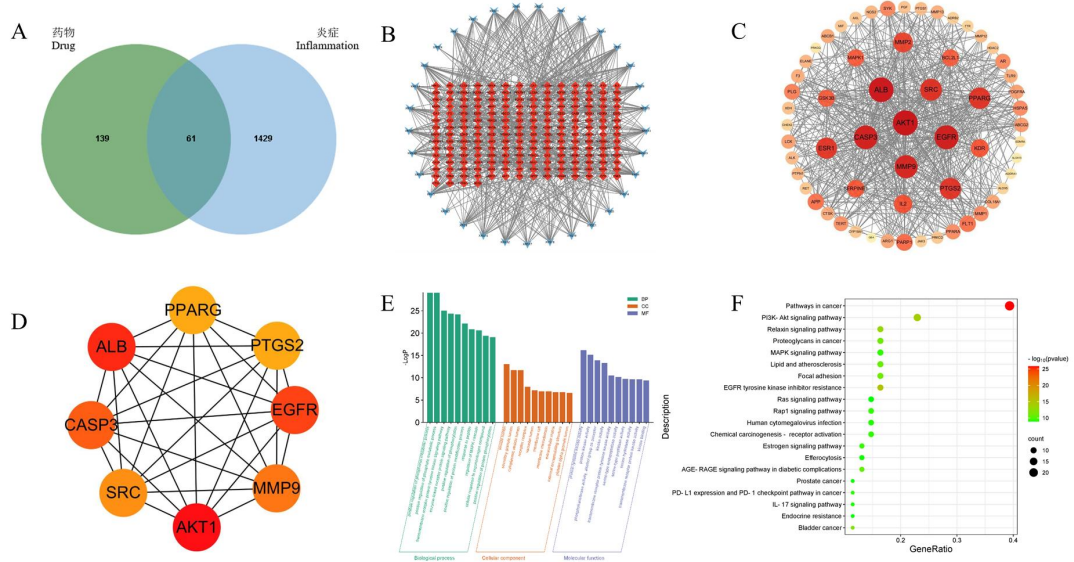


图 8 网络药理学分析

Fig. 8 Network pharmacology analysis

注：(A) 血人参有效成分与疾病的交集靶点图；(B) 血人参“药物—成分”靶点网络图；(C) PPI 网络图；(D) 关键靶点图；(E) GO 分析图；(F) KEGG 通路富集分析图。Note: (A) Intersection target map of active ingredients of *I. stachyodes* and diseases; (B) Network diagram of "Drug Component" target points in *I. stachyodes*; (C) PPI network diagram; (D) Key target map; (E) GO analysis chart; (F) KEGG pathway enrichment analysis chart

表 3 分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energy

成分	靶点蛋白	结合能
Component	Target protein	Binding energy (kcal/mol)
XRS2	PPARG	-5.58
XRS3	PPARG	-7.25

XRS4	EGFR	-6.86
XRS5	EGFR	-5.66
XRS6	EGFR	-5.84
XRS7	EGFR	-6.22
XRS8	MMP9	-5.09
XRS8	SRC	-4.25
XRS10	MMP9	-4.56
XRS12	AKT1	-4.20
XRS13	EGFR	-5.83
XRS16	MMP9	-3.94
XRS18	PTGS2	-3.86
XRS19	EGFR	-4.09
XRS19	PTGS2	-3.78
XRS20	CASP3	-3.73
XRS21	EGFR	-5.08
XRS23	CASP3	-4.60
XRS23	PTGS2	-4.75
XRS30	ALB	-3.33
XRS31	ALB	-3.78

---



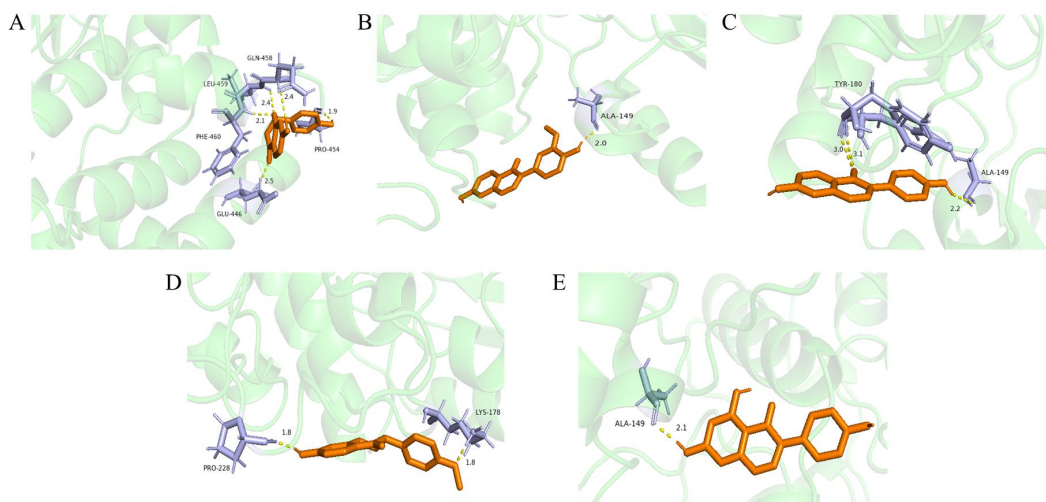


图 9 前五名关键靶点可视化处理

Fig. 9 Visualization processing of the top five key targets

注：(A) XRS3-PPARG；(B) XRS4-EGFR；(C) XRS7-EGFR；(D) XRS6-EGFR；(E) XRS13-EGFR。

### 3 讨论与总结

血人参是贵州区域内野生面广、质优量多的中药材之一，常作为贵州少数民族习用药材。Liu 等<sup>[4]</sup>采用高效液相色谱法对不同批次血人参乙酸乙酯层的化学成分绘制中药指纹图谱，为血人参成分研究提供参考，但未对其成分进行指认。为明确不同产地血人参化学成分和药效差异，本研究首次对血人参全成分进行提取，并采用 UPLC 对 16 批不同产地血人参进行全成分分析，共标定了 28 个共有峰，并指认出 10 个共有峰。首次在血人参中指认出牡荆素、木犀草苷、金丝桃苷和汉黄芩素，研究表明，牡荆素、木犀草苷、金丝桃苷、汉黄芩素均具有较好的抗炎活性<sup>[15-18]</sup>。体外细胞实验结果表明，较 Mod 组相比，不同产地血人参对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞损伤模型有不同程度的改善，RAW 264.7 中 NO 的表达降低，以 S8 为最佳，说明不同产地血人参的抗炎药效存在差异。利用 OPLS 回归分析建立不同批次血人参与其抗炎作用的谱效关系，构建的模型拟合度好。根据 VIP 值大于 1 筛选得到抗炎的关键成分，共找到了 8 个成分，分别是峰 14（漆黄素）、峰 17、峰 26（甘草素）、峰 21、峰 10、峰 11、峰 24（汉黄芩素）、峰 16。研究表明，漆黄素可以抑制 NO 产生和 TNF- $\alpha$ 分泌从而达到抗炎的效果<sup>[19]</sup>，此外，其他成分如表儿茶素<sup>[20]</sup>、甘草素、异甘草素、甘草酸<sup>[21]</sup>、木犀草素<sup>[22]</sup>也具有潜在的抗炎作用，而血人参具有良好的抗炎效果，可能与药物所含诸多活性成分共同发挥抗炎作用相关。

采用网络药理学对“药物-成分靶点”进行分析，得到 EGFR、PPARG、MMP9、SRC、

AKT1、PTGS2、CASP3、ALB 等 8 个关键靶点, 使用 GO 功能和 KEGG 通路富集对交集靶点进行分析, 共获得 133 条 KEGG 富集通路, 主要包括癌症途径、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、松弛素信号通路等。将所得关键靶点与相关的有效成分进行分子对接, 结果显示血人参活性成分与 PPARG 和 EGFR 靶点对接能力最好, XRS3 (甘草素) 作用于 PPARG, XRS4 (3'-甲氧基大豆苷元)、XRS6 (芒柄花素)、XRS7 (大豆苷元)、XRS13 (染料木素) 作用于 EGFR, PPARG 和 EGFR 是血人参发挥抗炎作用的主要靶点。PPARG 是受体酪氨酸激酶, 通过各种下游信号通路被激活以促进细胞增殖、运动和存活, 其介导的信号通路对炎症的发生发展具有重要作用<sup>[23]</sup>, 且 PPARG 可作用于癌症通路发挥治疗作用<sup>[24]</sup>, 故甘草素可能通过 PPARG 介导的癌症通路发挥抗炎作用; EGFR 是一类具有显著功能的核内受体转录因子超家族成员, 可通过阻止转录因子及其辅助因子与一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、诱导型环氧合酶 2 等炎症相关因子启动子上的相应位点结合, 进而抑制靶基因的表达<sup>[19]</sup>, XRS4 (3'-甲氧基大豆苷元)、XRS6 (芒柄花素)、XRS7 (大豆苷元)、XRS13 (染料木素) 与 EGFR 形成稳定连接, 推测三者可能通过调节 EGFR 这一核心靶点介导的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性通路产生抗炎作用。以上结果体现了血人参通过多成分、多靶点、多通路发挥治疗抗炎的药理作用。

综上所述, 苗药血人参的质量差异可能与其成分相关, 对其差异成分进行指认, 结果显示, 漆黄素、甘草素、汉黄芩素既是不同产地血人参的重要差异成分, 又是抗炎的重要活性成分, 可为苗药血人参的质量标准建立提供参考。网络药理学结果显示, EGFR、PPARG、MMP9、SRC、AKT1、PTGS2、CASP3、ALB 可能是血人参发挥抗炎的潜在靶点, 通过癌症途径、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、松弛素信号通路、PI3K-AKT 信号通路等关键信号通路发挥抗炎作用。本研究通过探究苗药血人参的抗炎成分及其作用机制, 为其抗炎药效物质基础及在功能药品开发利用提供理论依据。

#### 参考文献

- 1 Guizhou Provincial Drug Administration. Quality Standards for Ethnic Medicinal Materials in Guizhou Province(贵州省民族药材质量标准)[M]. Guizhou: China Medical Science and Technology Press, 2019.
- 2 Yang S, Wu JL, Fu J, et al. Optimization of purification process of total flavonoids from *Indigofera stachyodes* Lindl and its inhibitory effect on tyrosinase[J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2022, 24: 3384-3393.
- 3 Li J, Wang CM, Zhang YP, et al. Analysis of flavonoids from the roots of *Indigofera stachyoides*[J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2023, 21: 3079-3087.
- 4 Zhang YF, Zhu ZX, Wang WX, et al. Condensed tannins from roots of *Indigofera stachyodes*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46: 4131-4138.
- 5 Liao ZY, Fu J, Fu HX, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of

- Indigofera stachyoides* Lindl and predictive analysis of Q-marker[J].Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药),2023,32:37-47.
- 6 Yang YS,Shi JZ,Lei Z,et al.Protective effect of acetic ether extraction of the alcoholic extract of roots of *Indigofera stachyoides* on the acute liver injury induced by APAP in mice[J].Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2018,29:786-789.
  - 7 Fu J,Fu HX,Zhang YP,et al.Extraction,separation and antibacterial activity analysis of total flavonoids from Miao medicine *Indigofera stachyoides*[J].Guizhou Sci(贵州科学),2020,38:4-8.
  - 8 Duan L,Zhang YP,Miao YY,et al.*In vivo* and *in vitro* effects of Miao medicine *Indigofera stachyoides* extracts on breast cancer 4T1 cells[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2018,49:2902-2907.
  - 9 Qin S,Zhang YP,Chen X,et al.Study on screening anti-inflammatory ethnic medicine by zebrafish high-throughput platform[J].China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2020,35:4146-4148.
  - 10 Dan CL,Zhang YY,Zhang YP,et al.Study on anti-inflammatory activity of Radix *Indigofera* extract based on transgenic zebrafish mode-screening[J].Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2016,27:2617-2620.
  - 11 Zhou JJ,Zhou J,Zhang HW,et al.Multi-index composition analysis of different processed products of Astragali Radix based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition method[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:993-1003.
  - 12 Liu YL,Chen LR,Hou YX,et al.The mechanism of bufalin in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology and cellular experiments[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:1045-1055.
  - 13 Liu TH,Geng RY,Zhao Y,et al.Mechanism of *Cistanche tubulosa* water extract in the treatment of diabetic nephropathy based on UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS and network pharmacology[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,59:1257-1262.
  - 14 Liu MG,Xu H,Xu WF,et al.A study on HPLC fingerprint of the Miao medicine *Indigoferae stachyoidis*[J].J Guiyang Univ Tradit Chin Med(贵阳中医学院学报),2018,40:47-53.
  - 15 Hou FF,Li XB.Anti-inflammatory and neuroprotective effects of vitexin in MCAO rats through regulating NF- $\kappa$ B signaling pathway[J].Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志),2022,20:1779-1785.
  - 16 Jia JH,Chen XF,Li HB,et al.Quality evaluation of Lonicerae Japonicae Flos dispensing granules based on anti-inflammatory effect component index[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2024,55:2630-2640.
  - 17 Fan H,Li Y,Sun M,et al.Hyperoside reduces rotenone-induced neuronal injury by suppressing autophagy.Neurochem Res,2021,46:3149-3158.
  - 18 Ryu NH,Shin JM,Um JY,et al.Wogonin inhibits transforming growth factor  $\beta$ 1-induced extracellular matrix production via the p38/activator protein 1 signaling pathway in nasal polyp-derived fibroblasts[J].Am J Rhinol Allergy,2016,30:128-133.
  - 19 Chen XT,Liao J,Li C,et al.Study on pharmacodynamic material basis and mechanism of anti-inflammatory effect of *Duchesnea indica* based on serum pharmacology and network pharmacology[J].Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2024,44:1635-1644.
  - 20 Ying SH,Lu S,Chen ZZ,et al.Study on structure-function relationship of the anti-inflammatory and anti-cancer effects of catechins using cell models and network pharmacology[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:18-29.
  - 21 Xing YY,Wang ZY,Wang L,et al.Establishment of fingerprint profiles of Arctii Fructus-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma drug pair and study of their anti-inflammatory activity spectrum-effect relationship[J].Chin

Tradit Herb Drugs (中草药),2024,55:1237-1247.

- 22 Wang XF,Pan XZ,Cao N,et al.Molecular mechanism of luteolin against acute lung injury based on network pharmacology and molecular docking[J].Chin Pharm Bull(中国药理学通报),2024,40:1583-1591.
- 23 Sun SY,Cai WX,Liu X,et al.Relationship between PPARG rs2290449 and the efficacy of combination therapy in sepsis with MODS in Yanbian area[J].Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报),2024,59:1257-1262.
- 24 Li DH,Liu XK,Tian XT,et al.PPARG:A promising therapeutic target in breast cancer and regulation by natural drugs[J].PPAR Res,2023,2023:4481354.

收稿日期: 2024-08-01      接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 贵阳市高层次创新型青年科技人才(筑科合同[2021]43-10); 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2021]一般411); 国家苗药工程技术研究中心能力提升(黔科合中引地[2023]006); 贵州省高层次创新型人才(千层次及黔科合平台人才-GCC[2023]037)

\*通信作者 E-mail: zgygpg@126.com, fu\_jian2008@163.com