

当归六黄汤质量标志物的发现及其作用机制解析研究

陈兰茹, 马天宇, 毛宏宇, 黄家豪, 孟永海*, 翟春梅* (黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150006)

摘要 目的: 基于中药质量标志物(Q-marker)“五原则”和网络药理学, 为当归六黄汤的质量控制研究提供参考, 并为其临床应用提供科学依据。方法: 根据Q-marker“五原则”对当归六黄汤的质量标志物进行筛选, 再利用中药系统药理学数据库(TCMSP)、ChEMBL与Swiss Target Prediction平台获取功效标志物的潜在作用靶点, 构建当归六黄汤质量标志物的蛋白互作网络。利用拓扑、GO、KEGG富集分析构建“关键靶点-信号通路-生物过程”网络, 进而阐释当归六黄汤质量标志物的作用机制。结果: 根据“五原则”和网络药理学综合分析, 筛选阿魏酸、黄芪甲苷、梓醇、汉黄芩素、地黄苷D、黄芩苷、黄柏碱、汉黄芩苷、小檗碱作为当归六黄汤的质量标志物, 这些标志物可能通过作用于MAPK、雌激素、PI3K-Akt等通路从而调节MAPK级联、基因表达、一氧化氮生物合成过程抑制炎症。结论: 本研究初步探究当归六黄汤的质量标志物及其作用机制, 为当归六黄汤的机制研究和临床应用提供更有利的科学依据与理论基础。

关键词: 当归六黄汤; 质量标志物; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R932; R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)11-1296-14
doi:10.16153/j.1002-7777.2023.11.010

Study on Discovery of Quality Markers for Danggui Liuhuang Decoction and Its Action Mechanism

Chen Lanru, Ma Tianyu, Mao Hongyu, Huang Jiahao, Meng Yonghai*, Zhai Chunmei* [Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine (Ministry of Education), Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China]

Abstract Objective: Based on the "five principles" of traditional Chinese medicine quality markers (Q-marker) and network pharmacology, to provide reference for the quality control of Danggui Liuhuang Decoction, and to provide scientific basis for its clinical application. **Methods:** The quality markers of Danggui Liuhuang Decoction were screened according to the "five principles" of Q-markers, and the potential targets of the efficacy markers were obtained by using the TCM System Pharmacology Database (TCMSP), ChEMBL and Swiss Target Prediction platform. And the Protein-protein Interaction network of quality markers of Danggui Liuhuang Decoction was constructed. Topology, GO and KEGG enrichment analyses were used to construct the "key

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(编号 2017RAQXJ125); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(编号 2022yjscx055); 黑龙江省博士后科研启动金资助项目(编号 LBH-Q15137)

作者简介: 陈兰茹 Tel: 13623598824; E-mail: 466530351@qq.com

通信作者: 孟永海 Tel: 18846183892; E-mail: 124391407@qq.com

翟春梅 Tel: 13945086892; E-mail: zhaiem163@163.com

target-signal pathway-biological process" network, and then the mechanism of the quality markers of Danggui Liuhuang Decoction was explained. **Results:** According to the "five principles" and network pharmacological analysis, ferulic acid, astragaloside, catalpol, wogonin, rehmannioside D, baicalin, phellodendrine, wogonoside and berberine were selected as quality markers for Danggui Liuhuang Decoction. These markers may regulate inflammation by acting on MAPK, estrogen, PI3K-Akt and other pathways, thereby regulating the MAPK cascade, gene expression and nitric oxide biosynthesis. **Conclusion:** This study preliminarily explore the quality markers of Danggui Liuhuang Decoction and its mechanism of action. It provides more favorable scientific basis and theoretical basis for the mechanism research and clinical application of Danggui Liuhuang Decoction.

Keywords: Danggui Liuhuang Decoction; Q-markers; action mechanism; network pharmacology

1 引言

当归六黄汤由金代医家李东恒所创制，记载于《兰室秘藏》中^[1]，被后世称为“治盗汗之圣药”，现又被国家中医药管理局收录于《古代经典名方目录（第一批）》^[2]。该复方由当归、黄柏、熟地黄、黄芩、生地黄、黄连等比例，黄芪加倍组成，具有固表止汗、滋阴降火之功效，常常被用于阴虚火旺盗汗证，且治疗效果显著，还具有抗菌、抗炎、降血糖、免疫调节等作用^[3-4]，此方经过其深化和发展，现在常被用于内分泌科、妇科、儿科、外科等，基本病机总属“阴虚有火”^[5]。

有学者提出，当归六黄汤发挥抗炎作用的途径包括抑制炎症因子（肿瘤坏死因子、白细胞介素等）的产生和激活相关通路等^[6]。有研究表明当归六黄汤可通过抑制前列腺素E（Phenyl Glycidyl Ether 2, PGE2）、白细胞介素6（Inter Leukin-6, IL-6）和一氧化氮（Nitric Oxide, NO）的产生，抑制诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和环氧化酶-2（COX-2）的表达，从而对RAW246.7细胞产生抗

炎作用，此外当归六黄汤还可抑制局部皮肤中白细胞介素22（Inter Leukin-22, IL-22）的产生而发挥抗炎作用^[7]。在当归六黄汤与机体免疫反应和炎症因子的相关研究中，有国外学者发现当归六黄汤在体内对非肥胖型糖尿病（Non-obese Diabetes, NOD）小鼠的胰岛炎能够产生显著的抑制作用，延缓糖尿病的发作和发展，促进胰岛素分泌和敏感性，并平衡部分正常化的Th1和Th2细胞因子^[8]。

在此基础上，笔者基于Q-marker五原则^[9]（刘昌孝课题组提出）对当归六黄汤抗炎药效相关的质量标志物进行预测，并运用网络药理学构建当归六黄汤质量标志物的“关键靶点-信号通路-生物过程”网络，对其作用机制进行分析^[10]，希望能为当归六黄汤的机制研究和临床应用提供更有利的科学依据与理论基础。

2 方法

2.1 当归六黄汤质量标志物的预测

基于五原则的当归六黄汤质量标志物发现路径见图1。

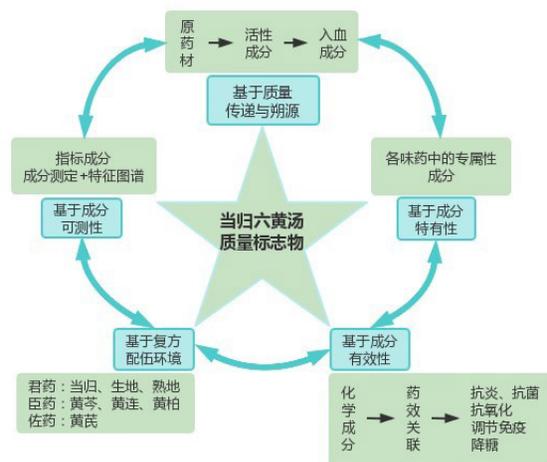


图1 基于“五原则”的当归六黄汤质量标志物发现路径

2.1.1 基于质量传递与溯源的质量标志物的预测

中药与化学药不同,体内代谢时经历了多环节的传递与变化,导致最终体内的效应成分与原料中原有成分的构成已大有不同^[11]。药物进入体内后会经历一系列的生物转化(入血、分布、代谢等)而发挥疗效并产生特异性的生物效应,即入血成分及其代谢产物是最终“效应成分”^[12]。从质量传递与溯源的角度,血液中的效应成分是质量传递体系的最终环节,也是质量标志物确定的重要依据^[13-14]。陈林霖等^[15]对当归芍药散的入血成分及药代动力学进行研究,结果表明当归的入血成分有阿魏酸等有机酸类;李伟霞等^[16]对当归质量标志物进行预测,结合文献发现当归的入血成分有洋川芎内酯、藁本内酯等挥发油类化合物;张德辉^[17]通过检测生/熟地黄含药血清共发现了8个药物原型被吸收入血,包括桃叶珊瑚苷、地黄苷A、梓醇、蜜力特苷、二氢梓醇、地黄苷D、益母草苷、毛蕊花糖苷;崔晓娟等^[18]考察黄连解毒汤对小鼠溃疡性结肠炎的作用并对其入血成分进行测定,研究结果表明小檗碱、巴马汀、木兰碱、黄柏内酯和黄柏碱是黄连和黄柏的入血成分,此外黄柏的入血成分还有二氢小檗碱,黄芩的入血成分有黄芩苷、汉黄芩苷和汉黄芩素;刘傲雪^[19]采用液质联用色谱技术对当归补血汤中的31个可入血化合物的原型成分进行鉴别,发现黄芪甲苷IV可以原型成分吸收入血进入体循环。

2.1.2 基于成分特有性的功效标志物预测

当归为伞形科植物当归的干燥根,既能补血又能活血,被誉为“妇科圣药”^[20]。有机酸类、挥发油、多糖类等是当归的主要化学成分,具有多种药理活性^[21]。有机酸是当归的主要成分之一,目前对该类成分的研究主要集中在阿魏酸、咖啡酸和绿原酸^[22]。挥发油在当归中的含量约为1%,其中以藁本内酯最为典型且含量最高^[23],但结构不稳定,容易异构化^[24]。水溶性多糖类成分也是当归中的主要活性成分之一,其含量可达15%^[25]。此外,当归还有黄酮、维生素、香豆素类、氨基酸、核苷类等成分^[26]。

地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,是著名的“四大怀药”之一,将地黄缓缓烘焙至约八成干,称为生地黄,熟地黄为生地黄的加工炮制品^[20]。地黄化学成分主要有环烯醚萜及其苷类、苯乙醇苷类、糖类等,具有多种药理活性^[27]。其中

环烯醚萜类成分在地黄中含量最高而且数量最多,梓醇是地黄中该类成分的典型代表^[28]。但地黄在炮制后某些含量有所变化,像梓醇、毛蕊花糖苷等在熟地黄中的含量要比在鲜地黄和生地黄中低^[29]。研究发现梓醇在生地黄炮制过程中,会随时间增长含量逐渐降低,降低率高达40%~80%^[30];毛蕊花糖苷在蒸制过程中,pH呈酸性会发生可逆的酯化反应,也会导致含量降低^[31-32]。但地黄苷A和地黄苷D比较稳定,在生/熟地黄中含量均较高,可作为地黄类药材,特别是熟地黄质量控制的指标性成分^[33-34]。此外地黄还包括黄酮类、三萜类、酚酸类、木脂素类等其他类化合物^[35]。

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根,可泻火解毒、燥湿清热^[20]。其主要成分是黄酮类化合物,具有多种药理活性。有研究表明汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等对炎症反应具有抑制作用,主要是通过体内对多种炎症通路进行调节和阻断而产生的^[36]。黄芩素虽然是黄芩中含量最高的化合物,但进入血液后会迅速转化为黄芩苷等代谢物^[37],而黄芩苷成分来源比较稳定,在正品黄芩中的含量可达6.2%,具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,且质量可控、高效低毒,在临床得到广泛应用^[38]。此外黄芩还含有多糖、萜类、挥发油、 β -谷甾醇等化合物^[39]。

黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎,可泻火解毒、燥湿清热^[20]。黄连含有多种化学成分,如生物碱、香豆素、有机酸、甾体、黄酮以及挥发油等,具有多种药理活性^[40-41]。小檗碱是黄连中含量最高的生物碱类成分,可达10%,其次为黄连碱、药根碱等^[42]。

黄柏为芸香科植物黄皮树的干燥树皮,习称川黄柏,具有泻火初蒸、燥湿清热、解毒疗疮的功效^[20,43],主要含有生物碱类、黄酮类和酚酸类等成分,具有多种药理活性^[44]。小檗碱是黄柏中含量最高的生物碱类成分,可达1.4%~5.8%,另外药根碱、黄柏碱等活性成分也占有一定比重^[45]。盐酸小檗碱是黄柏的多种化学成分中比较典型的成分,其含量高达3%以上,这也是黄柏区别于关黄柏的特征之一^[46]。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,为补气圣药,可脱毒排脓、固表止汗、行滞通痹、敛疮生肌、利水消肿、补气升阳、生津养

血^[20]。黄芪主要含黄酮类、皂苷类和多糖类成分，具有多种药理活性^[47]。黄芪甲苷是目前研究较多的活性成分之一，有研究表明黄芪药渣仍含有大量黄芪甲苷，含量能达到72.8%^[48-49]。《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2020年版将黄芪甲苷作为黄芪药材及饮片的质控指标，规定黄芪甲苷的含量不得少于0.080%^[20]。黄芪多糖在黄芪所含的多种化学成分中占比最多，活性最强，但目前对黄芪多糖的探讨还处于较低水平，且目前已知作用的成果转化率也相对较低^[50]。黄芪中还含有氨基酸、叶酸、维生素、微量元素、甾醇类物质等化合物^[51]。

2.1.3 基于成分与功效关联的功效标志物预测

中药有效性的控制是质量控制的根本目的，因此“有效”是Q-Marker的核心要素^[52]。当归六黄汤为治盗汗之圣药，可滋阴降火、清热、固表止汗，临床常用于治疗各种汗证，具有抗炎、降血糖、抗菌、抗胰岛素抵抗、免疫调节等作用^[5]。有研究发现，小檗碱可通过抑制花生四烯酸或脂多糖诱导人单核细胞中TNF- α 、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1、IL-6和环氧合酶-2等因子水平，抑制核因子 κ B（Nuclear Factor- κ B，NF- κ B）转位进入细胞核而显著减弱炎症反应^[53-54]。黄芩苷可以通过抑制NF- κ B核转位、调节肠道菌群、抑制自噬、增加相关microRNA的表达、调节Treg/Th17平衡等产生抗炎效果^[55]。

2.1.4 基于复方配伍环境的功效标志物预测

复方是中药临床运用的主要形式，“系统质”的“非加和性”是复方中药的一大特点^[52]。药材所发挥的疗效以及药效物质基础会根据配伍环境的不同而发生变化，同种中药治疗不同疾病时的用药目的和治疗原则也会发生变化，因此，想要确定中药的质量标志物，就必须联合疾病的具体病因病机，以处方配伍环境为出发点，与中药临床研究相结合，基于中药临床运用时最终效应成分及其功效的临床表达形式，确定质量标志物^[56]。刘炎^[57]对黄芪和当归以不同比例配伍后的化学成分的含量进行研究，结果表明二者配伍可提高当归药材中阿魏酸和黄芪药材中黄芪甲苷的溶出。王文萍等^[58]对不同配伍的当归补血汤的药动学进行研究，发现当归能使黄芪中黄芪甲苷发挥功效的进程提前，增加其在

体内的活力。闫妍^[59]对当归六黄汤的合煎和单煎质量表征进行研究，结果表明，合煎汤剂会产生大量絮状沉淀，出膏率也高于当归六黄汤单煎样品。有研究表明中药复方合煎产生沉淀具有减毒作用。杜青青等^[60]对黄芩苷和盐酸小檗碱配伍前后的药动学进行研究，发现这2种成分在大鼠小肠内相互作用时，黄芩苷会使盐酸小檗碱的吸收增加，但盐酸小檗碱会使黄芩苷的吸收减少。张红杰等^[61]对黄芩-黄连防治神经炎症的配伍优势进行探索，研究结果表明黄芩与黄连相须配伍后的抗神经炎症作用明显优于单味黄芩或黄连。王晓强等^[62]将不同比例的黄连与生地黄及小檗碱进行配伍，并对其在大鼠体内的变化规律进行研究，发现生地黄对黄连中的小檗碱的吸收速度影响不大，但会增加其吸收程度，而且增加生地黄的剂量还可使小檗碱的生物利用度提高。

2.1.5 基于成分可测性的功效标志物预测

根据2020年版《中国药典》规定的当归、黄柏、熟地黄、黄芩、生地黄、黄连、黄芪含量测定的成分有阿魏酸、梓醇、地黄苷D、小檗碱、黄柏碱、黄芩苷、黄连碱、表小檗碱、巴马汀、黄芪甲苷^[20]。黄明军等^[63]运用LC-MS法对当归六黄汤汤剂中主要成分进行分析，指认汤剂中主要的19个特征色谱峰，分别为白羊素、绿原酸、去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷、Senkyunolide、汉黄芩苷、黄柏碱、黄芩素、木兰花碱、千层纸素A苷、格陵兰黄连碱、Calycosin、药根碱、巴马汀、非洲防己碱、表小檗碱、汉黄芩素、黄连碱、黄芩苷、小檗碱。曾杉等^[64]建立当归六黄汤UPLC指纹图谱及黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和阿魏酸4种成分的质量分数测定方法，建立了15批当归六黄汤的指纹图谱，标定了20个共有峰，分别归属于处方中的六味药材，并指认了阿魏酸、盐酸黄柏碱、千层纸素A苷、表小檗碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、木兰花碱、汉黄芩苷等8个成分。

2.2 当归六黄汤质量标志物作用机制解析研究

2.2.1 当归六黄汤质量标志物作用靶点收集

本研究利用TCMSP、ChEMBL^[65]（<https://ebl.ac.uk/chembl/>）与Swiss Target Prediction^[66]（<http://swisstargetprediction.ch/>）获取当归六黄汤质量标志物的潜在作用靶点。

2.2.2 当归六黄汤质量标志物蛋白互作 (Protein-protein Interaction, PPI) 网络的构建

基于STRING 11.5数据库 (<http://string-db.org/>), 选择置信度大于0.4, 获取当归六黄汤质量标志物潜在作用靶标的PPI网络, 并在Cytoscape3.9.1中进行可视化。

2.2.3 节点拓扑参数、基因功能富集 (Gene Ontology, GO) 与KEGG通路富集分析

研究运用Cytoscape中的CentiScaPe2.2插件, 计算PPI网络中节点的节点度 (Degree unDir)、紧密度 (Closeness unDir)、介质性 (Betweenness unDir), 将这3个代表节点中心性和重要性的参数值分别进行标准化, 取Closeness unDir > 0.0027、Betweenness unDir > 216.0127为明确当归六黄汤作用靶点参与的生物过程及在信号通路中的作用, 本研究将上述关键靶点导入DAVID数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 以 $P < 0.05$ 作为筛选条件, 进行GO与KEGG通路富集分析, 获得当归六黄汤质量标志物参与的生物过程与信号通路。为进一步明确其作用机制, 研究将关键靶点、信号通路、生

物过程进行联合分析, 以共同阐释当归六黄汤质量标志物的作用机制。

3 结果

3.1 当归六黄汤质量标志物预测分析

3.1.1 基于质量传递与溯源的功效标志物预测分析

从质量传递与溯源角度分析, 当归有机酸类和挥发油类、生/熟地黄的环烯醚萜苷类、黄连和黄柏生物碱类、黄芩黄酮类、黄芪皂苷类成分为当归六黄汤的关键入血成分。

3.1.2 基于成分特有性的功效标志物预测分析

从成分特有性角度分析, 有机酸类、环烯醚萜苷类、生物碱类、黄酮类等成分在中药中含量相对较大且药理活性强, 可作为当归六黄汤的潜在质量标志物。但当归中的藁本内酯结构不稳定, 容易异构化; 黄芩中的黄芩素入血会迅速转化为黄芩苷等代谢物, 因此不适合作为质量标志物。

3.1.3 基于成分与功效关联的功效标志物预测分析

从成分与功效关联角度分析, 当归六黄汤中可能的主要效应物质见表1。

表1 当归六黄汤潜在效应物质

药理作用	当归	生地黄	熟地黄	黄芩	黄连	黄柏	黄芪
抗炎	阿魏酸、藁本内酯	梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷	地黄苷 D、毛蕊花糖苷	黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷	黄连碱、小檗碱	小檗碱、黄柏碱	黄芪甲苷、多糖
抗菌	阿魏酸、藁本内酯	梓醇、毛蕊花糖苷	毛蕊花糖苷	黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷	小檗碱、黄连碱、药根碱	小檗碱、药根碱	黄芪甲苷、多糖
抗氧化	阿魏酸、绿原酸、多糖	梓醇、毛蕊花糖苷、多糖	毛蕊花糖苷、多糖	黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷	小檗碱、多糖	黄柏碱、盐、酸小檗碱	黄芪甲苷、多糖
调节免疫	阿魏酸、多糖	梓醇、多糖、毛蕊花糖苷	多糖、毛蕊花糖苷	黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素	小檗碱	黄柏碱、木兰花碱、小檗碱	黄芪甲苷、多糖
降糖	多糖	梓醇、寡糖、地黄苷 D、	寡糖、地黄苷 D、	黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素	黄连碱、小檗碱、药根碱	小檗碱	黄芪甲苷、多糖
抗肝纤维化	阿魏酸			黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素	黄连碱、小檗碱	小檗碱	黄芪甲苷

综合分析可知,阿魏酸、黄芩苷、藁本内酯、木兰花碱、黄芩素、梓醇、汉黄芩苷、盐酸小檗碱、绿原酸、汉黄芩素、地黄苷D、小檗碱、黄芪甲苷、毛蕊毛糖苷、黄连碱、药根碱、黄柏碱等为当归六黄汤的主要药效物质,为其质量标志物分析提供参考。

3.1.4 基于复方配伍环境的功效标志物预测分析

从复方配伍环境角度分析,阿魏酸、黄芪甲苷、盐酸小檗碱、小檗碱、黄芩苷等可能为当归六黄汤的主要药效成分。

3.1.5 基于成分可测性的功效标志物预测分析

从成分可测性角度分析汉黄芩素、梓醇、黄

柏碱、地黄苷D、小檗碱、黄芩苷、黄连碱、表小檗碱、巴马汀、阿魏酸、黄芪甲苷、非洲防己碱、绿原酸、Calycosin、木兰花碱、格陵兰黄连碱、盐酸小檗碱、Senkyunolide、药根碱、汉黄芩苷、黄芩素、白羊素、盐酸黄柏碱、汉黄芩素可能为当归六黄汤的主要有效成分。

综上所述,基于质量标志物“五原则”分析可知,当归六黄汤中的汉黄芩苷、阿魏酸、黄芪甲苷、小檗碱、地黄苷D、黄柏碱、汉黄芩素、梓醇、黄芩苷等化合物可测性强、专属性高,便于质量控制,可作为当归六黄汤的质量标志物。当归六黄汤质量标志物信息见表2。

表2 当归六黄汤质量标志物信息

质量标志物	分子式	CAS号	相对分子质量	来源	君臣佐使
梓醇	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	2415-24-9	362.329	生地、熟地、当归	君
地黄苷D	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	81720-08-3	686.610	生地、熟地	君
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	21967-41-9	446.361	黄芩	臣
汉黄芩苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	51059-44-0	460.388	黄芩	臣
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	632-85-9	284.263	黄芩	臣
小檗碱	C ₁₇ H ₁₇ N	131-10-2	235.324	黄芩、黄连、黄柏	臣
黄柏碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	6873-13-8	377.862	黄柏	臣
黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	84687-43-4	784.970	黄芪	佐

3.2 当归六黄汤质量标志物PPI网络的构建

本研究利用TCMSP、ChEMBL与Swiss Target Prediction收集当归六黄汤质量标志物潜在作用靶点,去重后,最终获得489个靶点。将上述靶点上

传至STRING平台,设置Confidence>0.4,获得各靶点之间的互作关系,导入Cytoscape进行可视化,见图2。

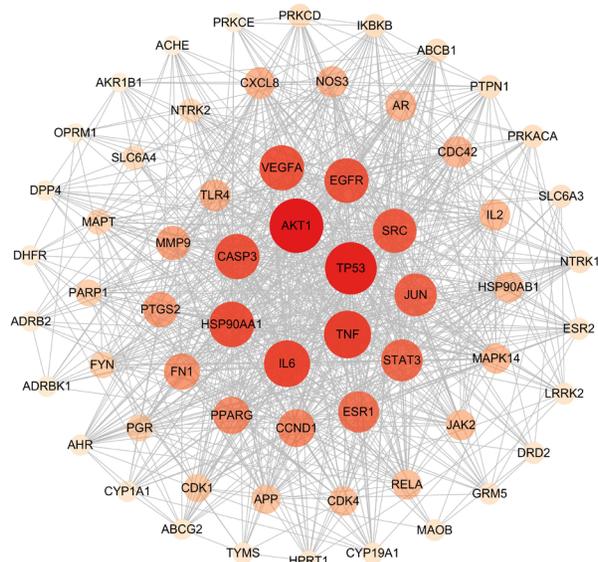


图2 当归六黄汤质量标志物的蛋白互作网络

3.3 节点拓扑参数、基因功能富集 (GO) 与 KEGG通路富集

节点度是评价网络局部中心性的重要参数, 节点的度值越大, 对网络的影响力越高, 发挥的生物学功能越关键; 紧密度越高, 反映信号从一个节点传递到其他节点的速度越快; 介质性越大, 表

明经过一个节点的最短路径数越多^[67]。研究使用 CentiScaPe2.2 插件计算当归六黄汤质量标志物 PPI 网络中各节点的节点度、紧密度与介质性, 条件为 $Closeness\ unDir > 0.0027$ 、 $Betweenness\ unDir > 216.0127$ 以及 $Degree\ unDir > 15.8089$, 共获得 62 个关键靶点, 部分关键靶点拓扑参数信息见表 3。

表3 当归六黄汤质量标志物关键靶点拓扑参数

靶点	Betweenness unDir	Closeness unDir	Degree unDir
AKT1	9051.489289	0.001930502	144
TP53	5757.817298	0.001851852	137
TNF	4079.716286	0.001805054	121
IL6	3882.007248	0.001824818	118
HSP90AA1	4779.342627	0.001757469	114
CASP3	2934.804729	0.001792115	113
VEGFA	2793.057295	0.001769912	113
EGFR	3131.741505	0.001776199	111
SRC	3345.632846	0.001766784	109
JUN	2457.184909	0.001730104	105
STAT3	1433.775483	0.00170068	102
ESR1	4222.151693	0.001727116	100

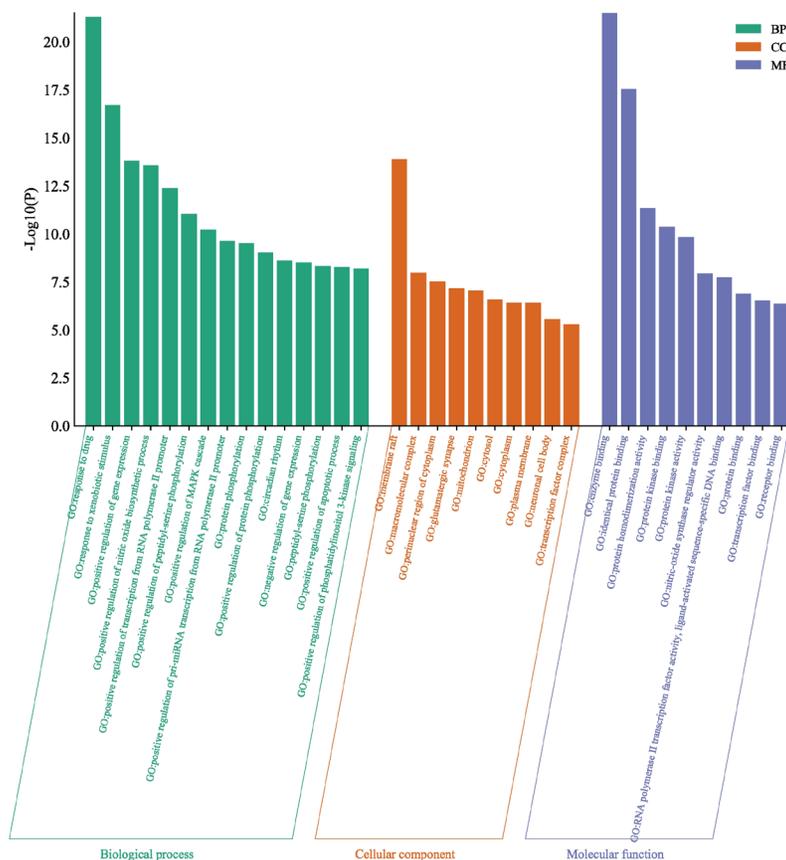
续表 3

靶点	Betweenness unDir	Closeness unDir	Degree unDir
CCND1	1698.927571	0.001626016	88
PPARG	4091.578077	0.001669449	86
FN1	1406.768407	0.001631321	83
PTGS2	1828.85582	0.001639344	79
MMP9	1302.738818	0.001615509	76
CXCL8	703.8611747	0.001587302	67
TLR4	489.6851524	0.001552795	67

为明确当归六黄汤质量标志物关键靶点参与的生物过程与信号通路，本研究对其进行GO富集分析。功能富集分析包括生物学过程（Biological Process, BP）、分子功能（Molecular Function, MF）以及细胞组分（Cellular Component, CC）3个部分。以 $P < 0.05$ 为筛选条件分别获得BP、MF、CC富集条目459、109、71条，其中选取 P 值

（ P -value）较高的GO功能过程如图3所示。

结果显示当归六黄汤质量标志物作用靶点参与的生物学过程为一氧化氮生物合成过程的积极调节、RNA聚合酶 II 启动子转录的正向调节、MAPK 级联的积极调节等；膜筏、大分子复合物等细胞组分所占比例较大；分子功能主要为酶结合、受体结合、蛋白质结合、一氧化氮合酶调节活性等。



绿色为生物过程条目，橙色为细胞组分条目，蓝色为分子功能条目。

图 3 GO 功能富集分析

借助DAVID进行KEGG信号通路富集分析, 设置 $P < 0.05$, 获得当归六黄汤质量标志物所参与的140条信号通路, 对 P 值排序靠前的20条KEGG信号通路进行可视化处理, 见图4。提示当归六黄汤功

效标志物参与的主要信号通路为糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、化学致癌-受体激活、癌症通路、PI3K-Akt信号通路、脂质与动脉粥样硬化、人巨细胞病毒感染等。



图4 KEGG信号通路富集分析(top20)

3.4 关键靶点-关键通路-关键生物过程综合分析作用机制

将关键靶点、信号通路、生物过程进行联合分析，构建当归六黄汤质量标志物“关键靶点-信号通路-生物过程”网络，见图5。研究发现当归六黄汤质量标志物可能通过作用于JUN、TLR4、

TNF、TP53、PARP1、AR、MMP9、CYP1A1、AKT1、JAK2等靶点，影响MAPK、IL-17、C-凝集素受体、糖尿病并发症中的AGE-RAGE、雌激素、PI3K-Akt等通路，从而调节MAPK级联、一氧化氮生物合成过程、基因表达、细胞凋亡过程、RNA聚合酶II启动子转录等生物过程。

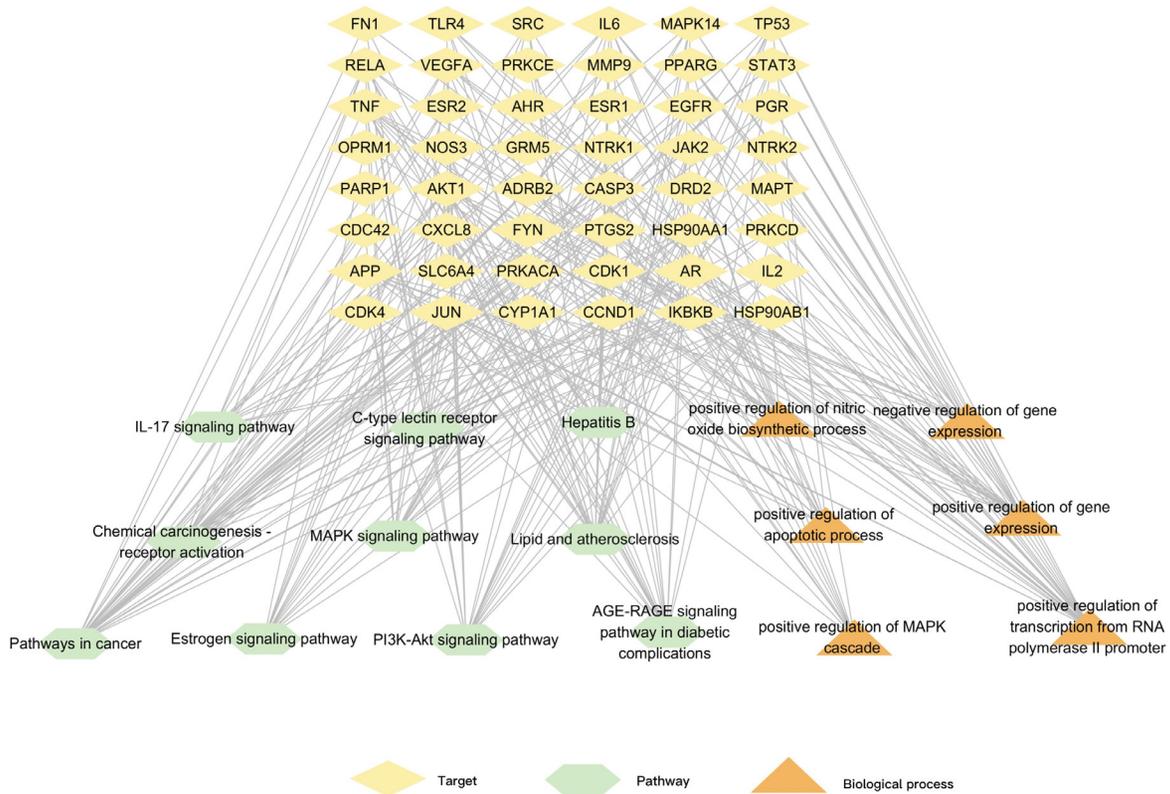


图5 “关键靶点 - 关键信号通路 - 关键生物过程”网络

丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK）信号通路可参与多种生理及病理过程（细胞的生长、发育、分裂和分化等），在生物体内的信号传导中具有重要作用^[68]。MAPK家族的信号通路主要包括4条途径，其中P38MAPK是重要成员之一，在炎症反应中起重要作用^[69]。雌激素可以与雌激素核受体（nER）结合形成同源二聚体和/或异二聚体并易位到细胞核，将DNA结合雌激素反应元件（Estrogen Response Element, EREs）并激活ERE依赖基因的表达^[70]。PI3K/Akt信号通路成分在人类癌症中经常改变^[71]。PI3K-Akt通路的组成型激活是由于编码PI3K或Akt

基因的PIK3C基因扩增，或由于通路成分的突变，例如PTEN（10号染色体上删除的磷酸酶和张力素同系物），其抑制Akt的活化^[72]。IL-17通路在抗真菌宿主防御中具有保护作用^[73]。AGE-RAGE信号通路与炎症密切相关，AGEs可与细胞表面的RAGE受体结合，通过激活NF-κB来干预免疫和氧化应激反应^[74]。C型凝集素受体（C-type Lectin Receptor, CLR）在识别真菌和协调对这些病原体的先天性和适应性免疫反应方面起着重要作用^[75]。在病原体结合后，CLR触发不同的信号通路，诱导决定T细胞极化命运的特定细胞因子的表达，一些CLR可以诱导直接激活NF-κB的信号通路，而其他CLR则影

响Toll样受体的信号传导^[76]。

4 讨论

炎症之火与气虚关系密切，而且气虚之火属于阴火^[77]。阴火可存在于西医学的免疫异常、应激状态、慢性炎症等病理状态^[78]。阴火与炎症反应来源相同，证素相通、机制相符、性质相合^[79]。气虚无法祛邪外出，则导致免疫功能减弱，造成低度炎症长期存在^[80]。当归六黄汤目前临床常被应用于甲状腺疾病、糖尿病并发症、围绝经期综合征等，这些临床疗效与它的抗炎分子机制也有密切关系。甲状腺炎在中医中属于“瘰疬”范畴，发病因素为阴虚火旺，而现代研究认为其很大部分是由促炎和抗炎失衡引起的^[81]，而当归六黄汤中的熟地、黄柏、黄芩等均可通过抗炎、提高免疫等改善甲状腺患者的临床症状^[82]，比如黄芩中的黄芩苷可通过阻断PI3K/Akt等信号通路，增加IL-10的水平，减少TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的释放，控制炎症并减轻氧化应激损伤^[83]。糖尿病并发症多发生微血管病变，在中医中归于“消渴”范畴，病机为血中不足，血中伏火^[78]。质量标志物中的黄芪甲苷、小檗碱、梓醇等是防治糖尿病微血管病变的高频中药活性成分^[84]，其中小檗碱抑制高糖会导致NF- κ B的核移位，降低多种促炎因子的表达^[85]。由此，可认为当归六黄汤治疗这些疾病与炎症及其相关通路、靶点具有密切联系。

在当归六黄汤与炎症相关的药理作用、复方配伍、化学成分等研究的基础上，结合Q-marker五原则和网络药理学对其进行筛选分析，可考虑将阿魏酸、黄芪甲苷、梓醇、汉黄芩素、地黄苷D、黄芩苷、黄柏碱、汉黄芩苷、小檗碱作为当归六黄汤的质量标志物，进一步建立当归六黄汤的质量评价体系，但此方法也存在局限性。文献分析是建立在目前存在的相关研究基础上，但是相关研究还在不断进行丰富中，因此目前分析结果并不能完全作为最终结论。另外，应用的数据收集分析网站是在文献分析的基础上进行数据分析的，因此由单个成分分析的作用机制不能等同于全方的作用机制。所以本文中所得到的预测结果，后期应当加以实验进行验证，以提高临床用药的科学性。

参考文献：

[1] 李杲（东垣）. 兰室秘藏 [M]. 北京：人民卫生出版

社，2005：8.

- [2] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知[EB/OL]. (2018-04-13) [2019-05-20]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.
- [3] 武亚楠, 李付平, 徐英, 等. 经典名方当归六黄汤的历史源流与现代临床应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 8-17.
- [4] 崔渺, 魏岩, 姜立娟, 等. 当归六黄汤异病同治临床应用现状及实验研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(4): 467-472.
- [5] 薛倍倍, 王晓丽, 刘虹, 等. 当归六黄汤的研究进展[J]. 中医药导报, 2020, 26(13): 162-167.
- [6] 杨玲, 彭江丽, 李娟, 等. 当归六黄汤的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 233-241.
- [7] Kim SB, Kang OH, Keum JH, et al. Anti-inflammatory Effects of Danggui Liu Huang Decoction in RAW 264.7 Cells[J]. Chin J Integr Med, 2012, 12: 1237.
- [8] Liu T, Cao H, Ji Y, et al. Interaction of Dendritic Cells and T Lymphocytes for the Therapeutic Effect of Danggui Liu Huang Decoction to Autoimmune[J]. Sci Rep, 2015, doi:10.1038/srep13982.
- [9] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [10] 刘亚楠, 吕恬仪, 任越, 等. 大柴胡汤功效标志物的发现及其作用机制解析研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2200-2210.
- [11] 赵鸿鹏, 许浚, 张洪兵, 等. 基于质量传递与溯源的中药质量标志物(Q-Marker)的发现策略及应用[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2557-2565.
- [12] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 葛根苓连汤的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(18): 1675-1679.
- [13] 王彩虹. 中药多成分药代动力学的新方法和策略研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [14] 中药四逆汤化学物质组和代谢组学研究[D]. 重庆: 第二军医大学, 2012.
- [15] 陈林霖, 王艳慧, 戚进, 等. 当归芍药散入血成分的分析及药代动力学研究(英文)[J]. 中国天然药物, 2011, 9(5): 363-368.

- [16] 李伟霞, 泥文娟, 王晓艳, 刘等. 当归化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 40-47, 274.
- [17] 张德辉. 生/熟地黄提取工艺考察及血清药物化学初步研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
- [18] 崔晓娟, 卢卓, 肖思萌, 等. 黄连解毒汤对UC小鼠的抗炎作用、入血成分测定及其作用靶点的虚拟筛选[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 206-213.
- [19] 刘傲雪. 基于序贯代谢的当归补血汤质控成分遴选研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020.
- [21] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.
- [22] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [23] 伍鹏程, 赵盼, 罗兴平, 等. 化学转化法间接测定当归药材中药效标志物藁本内酯含量的方法研究及应用[J]. 药学学报, 2021, 56(3): 841-848.
- [24] 陈振鹤, 吴国泰, 孙敏, 等. 当归中藁本内酯研究概况[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(2): 102-105.
- [25] 张新国, 王强林, 李春雷, 等. 当归多糖的酶法提取新工艺研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(3): 96-100.
- [26] 曹颜冬. 当归化学成分及药理作用的分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 93, 95.
- [27] 张西强. 近年来地黄的研究概况[J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(16): 136-137.
- [28] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [29] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [30] 杨培民, 曹广尚. HPLC法测定地黄不同炮制品中梓醇的含量[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10): 598-600.
- [31] 王宏洁, 金亚红, 李鹏跃, 等. 鲜、生、熟地黄药材中3种活性成分含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2008(15): 1923-1925.
- [32] 郭阿莉. 不同炮制方法对地黄化学成分及药理作用的影响[J]. 中国民间疗法, 2019, 27(4): 86-88, 108.
- [33] 李更生, 刘明, 王慧森, 等. 生地黄与熟地黄中地黄苷A、D的比较分析[J]. 中成药, 2008(1): 93-96.
- [34] 周倩. 地黄标准物质及熟地黄质量评价标准的研究[D]. 郑州: 河南大学, 2014.
- [35] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.
- [36] 王沛明, 陈文, 孟宪丽. 黄芩有效成分在炎症通路中的作用靶点研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 193-197.
- [37] 李静荣, 梁冰宜, 彭维, 等. 基于生物信息学和分子对接技术研究当归六黄汤治疗溃疡性结肠炎潜在活性成分及分子机制[J]. 药学研究, 2022, 41(9): 561-569.
- [38] 金敏. 黄芩中黄酮类化学成分研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2008(9): 55-56.
- [39] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [40] 黄玲. 黄连化学成分及有效成分药理活性的研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(17): 136-137.
- [41] 孙洁, 严广华. 黄连化学成分及有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(8): 140-143.
- [42] 田智勇, 李振国. 黄连的研究新进展[J]. 时珍国医国药, 2004(10): 704-706.
- [43] 宿莹. 当归六黄汤物质基准的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [44] 董阳阳, 钟泓玲, 钱成, 等. 川黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(5): 710-712.
- [45] 陈阳峰, 钟晓红. 黄柏的药理作用及其活性成分提取[J]. 作物研究, 2015, 29(5): 564-568.
- [46] 周松, 刘永刚, 张国祥, 等. 黄柏化学成分及质量控制研究进展[J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3740-3742.
- [47] 向璐, 张巧艳, 赵琦明, 等. 黄芩-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2196-2213.
- [48] 黄英, 杜正彩, 侯小涛, 等. 黄芩药渣化学成分、药理及应用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(6): 140-144.
- [49] 黄亚非, 刘杰, 黄际薇, 等. HPLC测定黄芩药渣中

- 黄芪甲苷含量[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2009, 48(2): 146-148.
- [50] 李博, 耿刚. 黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2022, 14(4): 262-264.
- [51] 胡妮娜, 张晓娟. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(1): 76-82.
- [52] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学报, 2019, 54(2): 187-196, 186.
- [53] 陈美琳, 李芝奇, 范琦琦, 等. 小檗碱药理作用及其相关作用机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5861-5872.
- [54] 任弟娟. 小檗碱抗幽门螺杆菌持留菌机制的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [55] 周颖, 张珂, 庄煜, 等. 黄芩苷抗炎作用机制的研究进展[J]. 激光生物学报, 2021, 30(5): 400-405.
- [56] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [57] 刘炎. 中药黄芪炮制及复方配伍的化学研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2007.
- [58] 王文萍, 曹琦琛, 王华伟, 等. 当归补血汤不同配伍的药动学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(6): 659-663.
- [59] 闫妍. 当归六黄汤合煎与单煎质量表征及其抗阴虚甲亢作用研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [60] 杜青青, 王战国, 刘芳, 等. 黄芩苷与盐酸小檗碱在大鼠小肠吸收的相互作用研究[J]. 中国药房, 2010, 21(11): 965-967.
- [61] 张红杰, 苏丹, 朱根华, 等. 黄芩-黄连抗神经炎症的配伍优势及其调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的潜在靶点[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(22): 58-67.
- [62] 王晓强, 杨明炜, 刘芳芳, 等. 黄连与生地黄不同比例配伍对小檗碱在大鼠体内药动学的影响[J]. 中国中药杂志, 2007(17): 1795-1797.
- [63] 黄明军, 孙耀志, 高松, 等. LC-MS分析当归六黄汤中主要成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 63-67.
- [64] 曾杉, 史紫娟, 陈伟彦, 等. 当归六黄汤UPLC指纹图谱的建立及4种成分的含量测定[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(2): 13-18.
- [65] Anna G, Bellis LJ, Patricia BA, et al. ChEMBL: A Large-scale Bioactivity Database for Drug Discovery[J]. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkr777.
- [66] Daina A, Michielin O, Zoete V. Swiss Target Prediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357.
- [67] 贡巴加, 任越, 马婧, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨藏族药佐木阿汤治疗高血压病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5383.
- [68] Eun Kyung Kim, Eui-Ju Choi. Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [69] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK信号通路研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34.
- [70] Guo Y, Wu G, Yi J, et al. Anti-hepatocellular Carcinoma Effect and Molecular Mechanism of the Estrogen Signaling Pathway[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 11: 763539.
- [71] Vara J Á F, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt Signalling Pathway and Cancer[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2004, 30(2): 193-204.
- [72] Franke TF. PI3K/Akt: Getting it Right Matters[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6473-6488.
- [73] van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Verschueren IC, et al. Differential Effects of IL-17 Pathway in Disseminated Candidiasis and Zymosan-induced Multiple Organ Failure[J]. *Shock*, 2010, 34(4): 407-411.
- [74] Chen J, Chen Y, Shu A, et al. Radix Rehmanniae and Corni Fructus Against Diabetic Nephropathy via AGE-RAGE Signaling Pathway[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2020, 12: 8358102.
- [75] Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity[J]. *Cellular Microbiology*, 2014, 16(2): 185-194.
- [76] Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling Through C-type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(7): 465-479.
- [77] 王新东, 祁晓霞. 从阴火认识血管稳态失衡综合征炎症机制的中医内涵[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(2): 156-158, 204.

- [78] 崔翰博, 关恽, 魏青, 等. 结合临证再探“阴火”[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(12): 1763-1764, 1822.
- [79] 孙超凡, 王暴魁. 从阴火理论探析糖尿病肾病炎症反应[J]. 中医学报, 2023, 38(6): 1186-1190.
- [80] 廖思琴, 郑文丽, 王颖, 李东垣“阴火论”在现代糖尿病辨治中的用药规律研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2023, 47(3): 252-259.
- [81] 田晓玲, 华川, 赵勇, 等. 基于炎症反应探讨中药治疗桥本甲状腺炎作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(6): 188-193.
- [82] 张仪斐, 叶涛, 杨雪, 等. 中药治疗阴虚火旺甲亢作用研究进展[J]. 贵州中医药大学学报, 2022, 44(4): 70-73.
- [83] 孟欢, 侯晓婷, 张华敏, 等. 中药天然产物治疗炎症性肠病的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(10): 3349-3369.
- [84] 李家劼, 罗启明, 郭锦晨, 等. 基于文献挖掘分析中医药防治糖尿病微血管病变的组方用药规律[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(18): 1-13.
- [85] 张雅晨, 孙建国. 小檗碱预防性治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 药学进展, 2023, 47(3): 217-226.

(收稿日期 2023年4月14日 编辑 肖妍)