

基于指纹图谱和网络药理学预测三七参蜂口服液的质量标志物



冯莉萍^{1,2}, 夏伟军^{1,2}, 李晋玉^{1,2}, 张丁倩³, 任 萍^{1,2}, 陆礼和^{1,2}

1. 云南省药物研究所 (昆明 650111)
2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室 (昆明 650111)
3. 云南白药集团股份有限公司 (昆明 650111)

【摘要】目的 基于指纹图谱和网络药理学研究方法, 建立三七参蜂口服液的指纹图谱并预测分析质量标志物。**方法** 采用 HPLC 法建立 12 批三七参蜂口服液的指纹图谱, 并对色谱峰进行指认和归属, 结合中药色谱指纹图谱相似度评价、聚类分析、主成分分析及偏最小二乘法判别 (OPLS-DA) 等多元统计分析方法筛选出候选成分; 通过网络药理学构建三七参蜂口服液“成分-靶点-通路”的网络, 预测其质量标志物。**结果** 建立的 HPLC 指纹图谱确定 13 个共有峰, 与参照物比对指认 3 (二苯乙烯苷)、5 (苯甲酸钠)、6 (党参炔苷)、7 (三七皂苷 R₁)、9 (人参皂苷 R_{g1})、10 (人参皂苷 Re)、12 (10-羟基-2 癸烯酸)、13 (人参皂苷 Rb₁) 8 个共有色谱峰; 12 批三七参蜂口服液样品相似度均在 0.997 以上, 聚类为 2 类, OPLS-DA 分析得出 2、3、4、7、9、10、11、12 号色谱峰是影响三七参蜂口服液质量的主要标志性成分。网络药理学预测党参炔苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、10-羟基-2 癸烯酸为三七参蜂口服液潜在的质量标志物, 通过信号转导及转录激活蛋白 3-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1-动力相关蛋白 1 信号通路、缺氧诱导因子 1 信号通路和磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B 信号通路等发挥传统功效。**结论** 所建立的指纹图谱重复性好, 稳定可行; 6 个标志性成分对三七参蜂口服液质量影响较大、具有传递性和追溯性, 且与功效密切相关, 可作为潜在质量标志物为三七参蜂口服液质量控制与评价提供科学基础。

【关键词】 三七参蜂口服液; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物

【中图分类号】 R 284.1, R 285.5 **【文献标识码】** A

Q-marker prediction analysis of Sanqi Shenfeng oral liquid based on fingerprint and network pharmacology

FENG Liping^{1,2}, XIA Weijun^{1,2}, LI Jinyu^{1,2}, ZHANG Dingqian³, REN Ping^{1,2}, LU Lihe^{1,2}

1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China

2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China

3. Yunnan Baiyao Group Co., Ltd., Kunming 650111, China

Corresponding author: LU Lihe, Email: lulihe@126.com

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202410109

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目 (202104AR040002)

通信作者: 陆礼和, 硕士, 高级工程师, Email: lulihe@126.com

<https://ywlbx.whuzhmedj.com/>

【Abstract】Objective To establish the fingerprints and predict the quality markers of Sanqi Shenfeng oral liquid based on fingerprint and network pharmacology. **Methods** The fingerprints of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid were established by using HPLC, and their peaks were identified and assigned. The candidate components were selected by multiple statistical analysis methods such as similarity evaluation, hierarchical cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA). The “component-target-pathway” network diagram was constructed by network pharmacology, and the quality markers of Sanqi Shenfeng oral liquid were predicted. **Results** The 13 common peaks were identified from the established fingerprint. Compared with the reference material, eight common peaks were identified as 3 (tetrahydroxystilbene glucoside), 5 (sodium benzoate), 6 (lobetyolin), 7 (notoginsenoside R₁), 9 (ginsenoside Rg₁), 10 (ginsenoside Re), 12 (10-hydroxy-2-decenoic acid), 13 (ginsenoside Rb₁). The similarity of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid samples was higher than 0.997, and 12 batches of samples were grouped into two categories. OPLS-DA analysis showed that peaks 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 were the main signature components affecting the quality of Sanqi Shenfeng oral liquid. Network pharmacology predicted that lobetyolin, notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Re and 10-hydroxy-2-decenoic acid were potential Q-markers of Sanqi Shenfeng oral liquid. The traditional functions are performed through STAT3/AKT1-Drp1, HIF-1 and PI3K-AKT signaling pathway. **Conclusion** The established fingerprint has good reproducibility, stability and feasibility. The six components have great influence on the quality of Sanqi Shenfeng oral liquid, which are transferable and traceable, and are closely related to the efficacy. They can be used as potential quality markers to provide a scientific basis for the quality control and evaluation of Sanqi Shenfeng oral liquid.

【Keywords】 Sanqi Shenfeng oral liquid; Fingerprints; Network pharmacology; Quality marker

三七参蜂口服液是由三七、党参、蜂王浆、枸杞、何首乌 5 个药味制备而成的中药制剂，其质量标准为国家药品标准 WS-5834(B-0834)-2014Z，具有补中益气、养血生津、滋补肝肾的功效，用于病后及老年体虚属气血不足、肝肾亏损证，症见头昏耳鸣、头痛失眠、食欲不振、神疲乏力等^[1]。中药质量是对中药有效性和安全性的反映和表征，是中成药有效性控制的重要依据。2016 年刘昌孝院士^[2]基于中药质量控制指标与中药有效性的关联性、专属性差的现状，提出了中药质量标志物（Q-marker）的概念，阐述中药由于化学成分复杂导致物质-功效之间呈现多元、非线性关系，其质量评价不但需要以某些成分的含量作为指标，还需要对中药整体的“化学轮廓”及其相应的“生物学模式”进行关联性研究。指纹图谱技术是常用的基于“化学轮廓”模式识别方法，可有效地表达中药制剂中各药味的存在，全面反映中药制剂的质量信息，结合聚类分析与主成分分析技术可对指纹图谱所呈现的质量信息进行初步分析，更加系统、全面地评价中药材的质量^[3-4]。网络药理学作为谱-效相关分析方法的一种，可分析提炼成分-靶点-通路-功效

的关联进而探索成分与药效的关联关系，为建立中药活性指纹图谱提供了研究手段^[5]。本研究采用相似度评价和主成分分析（principal component analysis, PCA）等方法分析三七参蜂口服液的指纹图谱，探索影响其质量控制的成分，并与网络药理学相结合，预测发挥药效的潜在成分，分析质量控制指标是否合理，以期建立三七参蜂口服液的活性指纹图谱，为从整体的化学轮廓角度评价其质量提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（配备四元梯度泵 G1311C、自动进样器 G1329B、柱温箱 G1316A、紫外检测器 G1315D），美国 Agilent 公司；XSE 205 型电子分析天平，瑞士 Mettler-Toledo 公司；Milli-Q POD 超纯水仪，德国 Merck 公司；N-1100D-W 型旋转蒸发仪，东京理化有限公司。

1.2 试剂与材料

三七皂苷 R₁ 对照品（批号：110745-201921，含量以 90.4% 计）、人参皂苷 Rg₁ 对照

品(批号: 110703-202034, 含量以 94.0% 计)、人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号: 110704-202129, 含量以 94.3% 计)、人参皂苷 R_e 对照品(批号: 110754-202129, 含量以 96.0% 计)、党参炔苷对照品(批号: 111732-201607, 鉴别用)、二苯乙烯苷对照品(批号: 110844-202116, 含量

以 94.8% 计)、10-羟基-2-癸烯酸对照品(批号: 110812-201808, 含量以 97.5% 计)均购自中国食品药品检定研究院; 苯甲酸钠(批号: F2012004)、蜂蜜(批号: Y2201001)、三七参蜂口服液样品及处方饮片均由云南白药集团有限公司提供, 样品编号及批号见表 1。

表 1 三七参蜂口服液样品和处方饮片的批号信息

Table 1. Sample information of Sanqi Shenfeng oral liquid and herbal medicines pieces

样品编号	批号	样品编号	批号	饮片名称	批号
S1	HJ220501	S7	ZDB2106	三七	WSSYN20210310
S2	HJ220502	S8	ZDB2109	党参	YP20210702M
S3	HJ220503	S9	ZDB2110	蜂王浆	Y2201001
S4	ZAB2204	S10	ZEB2203	枸杞	YP20211101M
S5	ZBB2201	S11	ZEB2204	何首乌	201201
S6	ZDB2105	S12	ZEB2205	蜂蜜(辅料)	Y2201001

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~60 min, 5%~25% 乙腈; 60~85 min, 25%~70% 乙腈; 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 203 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液制备

分别取人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_e、二苯乙烯苷、10-羟基-2-癸烯酸、党参炔苷对照品及苯甲酸钠各适量, 精密称定, 加甲醇溶解并定量稀释, 制成每 1 mL 中含各对照品约 0.1 mg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备

精密量取三七参蜂口服液样品 10 mL, 用水饱和和正丁醇液振荡提取 3 次, 每次 10 mL, 合并水饱和和正丁醇液, 减压回收至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取三七参蜂口服液(编号: S1)供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 12 号峰 10-羟基-2-癸烯酸为参照峰, 计算各色谱峰相对保留时间 $RSD < 2.0%$, 相对峰面积 $RSD < 3.0%$ ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取三七参蜂口服液样品(编号: S1), 按“2.3”

项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以 12 号峰 10-羟基-2-癸烯酸为参照峰, 计算各色谱峰相对保留时间 $RSD < 1.0%$, 相对峰面积 $RSD < 3.0%$ ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取三七参蜂口服液(编号: S1)供试品溶液, 分别于 0、3.5、7.5、18、40、75 h 按“2.1”项下色谱条件测定, 以 12 号峰 10-羟基-2-癸烯酸为参照峰, 计算各色谱峰相对保留时间 $RSD < 1.0%$, 相对峰面积 RSD 均 $< 3.0%$ ($n=6$), 表明供试品溶液在 75 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立与相似度评价

取 12 批三七参蜂口服液供试品溶液按“2.1”项下色谱条件测定, 记录指纹图谱。运用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件进行分析, 以 S1 为参照图谱, 以中位数法生成三七参蜂口服液指纹图谱共有模式, 结果见图 1。以共有模式为对照图谱, 计算 12 批样品的指纹图谱相似度。结果(表 2)显示 12 批样品指纹图谱的相似度均大于 0.95, 表明建立的指纹图谱可稳定的表征三七参蜂口服液指纹特征。

2.6 共有峰归属

通过比对参照物溶液、三七参蜂口服液、阴性样品及药味供试品溶液的色谱峰保留时间及紫外吸收谱, 对 13 个共有峰进行归属, 见图 2。结果显示: 2 号峰来自蜂蜜, 3 号峰(二苯乙烯

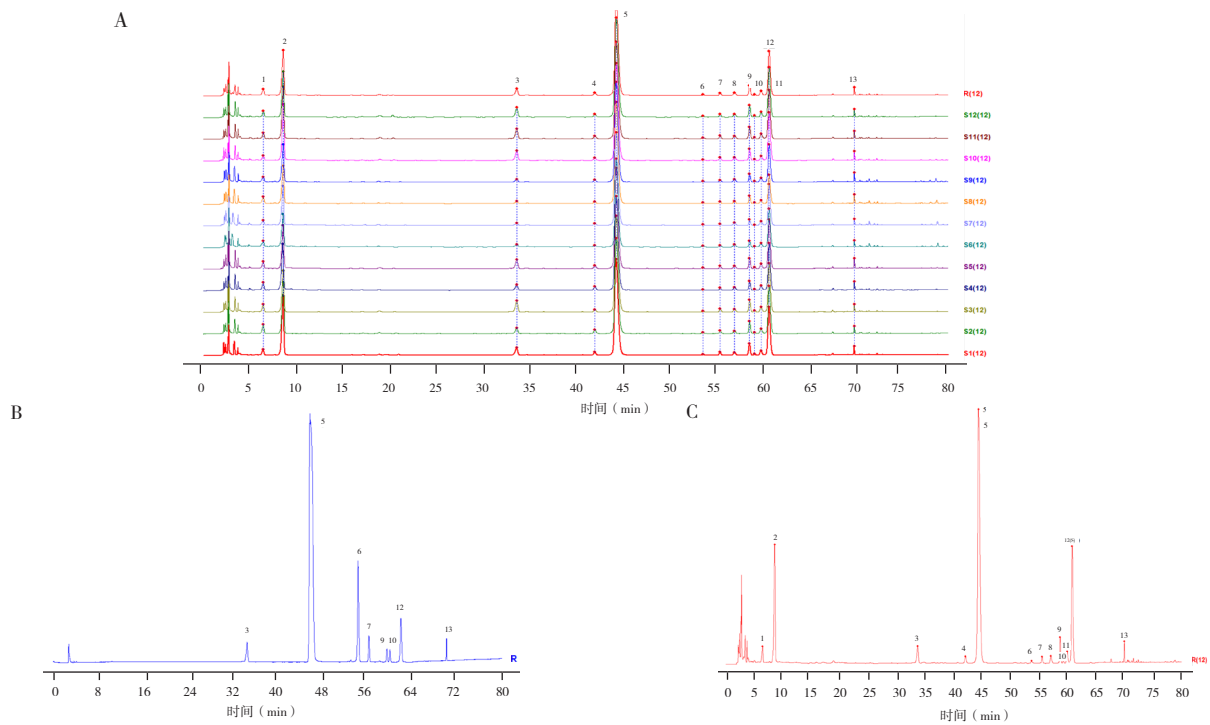


图1 12批次三七参蜂口服液样品HPLC指纹图谱 (A)、混合对照品图谱 (B) 及对照指纹图谱 (C)

Figure 1. HPLC fingerprint of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid samples (A), HPLC diagram of mixed control (B) and control fingerprint (C)

注: 3. 二苯乙烯苷; 5. 苯甲酸钠; 6. 党参炔苷; 7. 三七皂苷R₁; 9. 人参皂苷R_{g1}; 10. 人参皂苷R_e; 12. 10-羟基-2癸烯酸; 13. 人参皂苷R_{b1}。

表2 12批三七参蜂口服液样品相似度评价

Table 2. Similarity evaluation of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S5	0.999	S9	0.997
S2	0.999	S6	0.999	S10	0.998
S3	0.999	S7	0.999	S11	0.999
S4	1.000	S8	0.993	S12	0.999

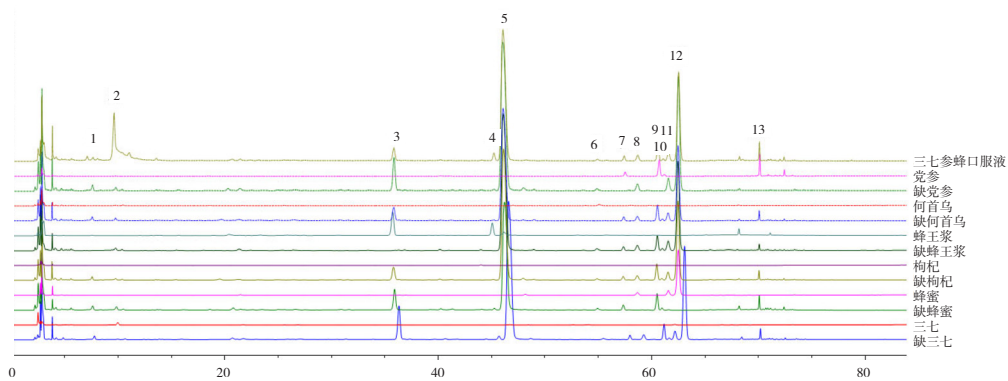


图2 三七参蜂口服液样品物质基准特征峰归属

Figure 2. Attribution of reference characteristic peaks of Sanqi Shenfeng oral liquid samples

苷)、4号峰来自何首乌, 5号峰为辅料苯甲酸钠, 6号峰(党参炔苷)来自党参, 7号峰(三七皂苷R₁)、9号峰(人参皂苷R_{g1})、10号峰(人参皂苷R_e)、13号峰(人参皂苷R_{b1})来自三七, 8号峰、11号峰、12号峰(10-羟基-2

癸烯酸)来自蜂王浆, 枸杞的色谱峰未在指纹图谱中体现。

2.7 聚类分析和主成分分析

将12批次三七参蜂口服液指纹图谱的13个共有峰峰面积数据导入SPSS 26.0软件, 采用组

间连接聚类方法，测量区间选择欧式距离开展聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)，结果见图 3。当欧式距离为 20 时，12 批次三七参蜂口服液聚类为 2 类，S6~S9 号样品聚为一类，S1~S5、S10~S12 号样品聚为一类。基于相关性进行 PCA，主成分特征值及方差贡献率分析见表 3，以特征值 > 1 为标准，提取得到 4 个主成分，其方差累积贡献率为 88.276% > 80%，可解释总方差的 88.276% 的信息，具有很好的代表性，可用以评价三七参蜂口服液的质量。

2.8 偏最小二乘法判别分析

将 12 批次三七参蜂口服液的 13 个共有峰峰面积数据导入 SIMCAP 14.1 软件进行偏最小二乘法判别 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 分析^[6]，PCA 分析得分见图 4A，12 批样品分为 2 类，与 HCA 和 PCA 分析结果一致。OPLS-DA 分析中自变量拟合指数 (R^2_x) 为 0.868，因变量拟合指数 (R^2_y) 为 0.994，模型预测指数 (Q^2) 为 0.911， R^2 和 Q^2 超过 0.5 表示模型拟合结果可接受^[7]，OPLS-DA 得分图见图 4B。通过变量投影重要度 (variable importance for the projection, VIP) 值筛选出影响三七参蜂口服液样品分类的标志性成分，结果见图 4C，以 $VIP > 1$ 为筛选标准，确定 2、3 (二苯乙烯苷)、4、7 (三七皂苷 R_1)、9 (人参皂苷 R_{g1})、10 (人参皂苷 R_e)、11、12 (10-羟基-2-癸烯酸) 号色谱峰是影响三七参蜂口服液样品成分差异的主要标志性成分。

2.9 网络药理学分析

2.9.1 候选化合物靶点预测

基于共有峰归属和 OPLS-DA 分析，二苯乙烯苷 (HSW)、党参炔苷 (DS1)、三七皂苷 R_1 (SQ1)、人参皂苷 R_{g1} (SQ2)、人参皂苷 R_{b1} (SQ3)、人参皂苷 R_e (SQ4)、10-羟基-2-癸烯酸 (FWJ1) 共 7 个化学成分能够实现饮片到制剂的传递，且

为影响三七参蜂口服液质量的主要标志性成分，作为候选化合物进行靶点预测。采用 PubChem 查找 7 个候选化合物的规范的简化分子线性输入规范 (canonical simplified molecular input line entry specification, canonical SMILES)，分别输入 Swiss Target Prediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 开展对应靶蛋白的预测，除去重复值，得到 75 个相关靶点。将化合物与靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件，构建饮片-化合物-靶点网络图，见图 5^[7-10]。其中化合物 10-羟基-2-癸烯酸 (FWJ1)、三七皂苷 R_1 (SQ1)、人参皂苷 R_{g1} (SQ2) 的度值分别为 30、24、12，表明这 3 个化合物对应的靶点较多，影响较大。

2.9.2 蛋白质相互作用网络构建

将预测得到的 75 个靶点导入 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库进行蛋白质相互作用 (protein-protein interaction network, PPI) 网络的构建，限定物种为“人”，蛋白交互评分值 > 0.9，结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建 PPI 网络^[8-11]，见图 6。对分析结果进行拓扑属性分析，选取度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 3 个拓扑参数均大于中位数且度值 ≥ 10 的靶点作

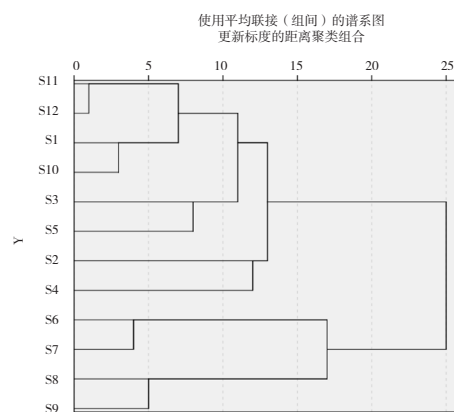


图3 12批三七参蜂口服液样品聚类分析结果
Figure 3. Cluster analysis results of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid samples

表3 特征值和方差贡献率

Table 3. Characteristic value and variance contribution rates

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差百分比 (%)	累积百分比 (%)	总计	方差百分比 (%)	累积百分比 (%)
1	6.663	51.256	51.256	6.663	51.256	51.256
2	2.071	15.932	67.188	2.071	15.932	67.188
3	1.500	11.537	78.725	1.500	11.537	78.725
4	1.242	9.551	88.276	1.242	9.551	88.276

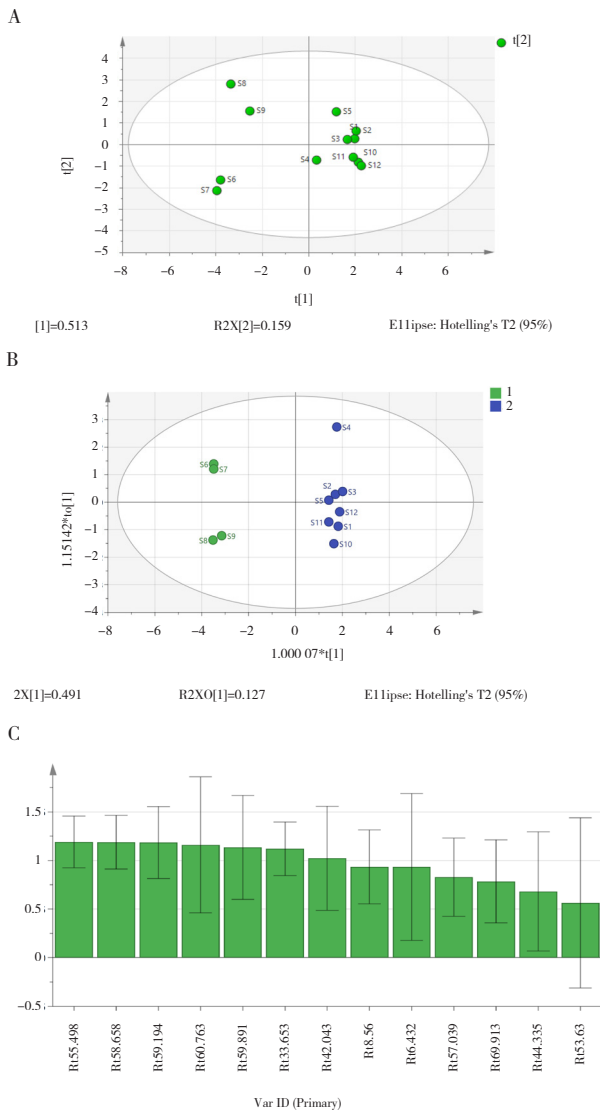


图4 12批三七参蜂口服液样品PCA得分图 (A)、OPLS-DA得分图 (B) 及VIP图 (C)
Figure 4. PCA score plot (A), OPLS-DA score plot (B) and VIP value (C) of 12 batches of Sanqi Shenfeng oral liquid samples

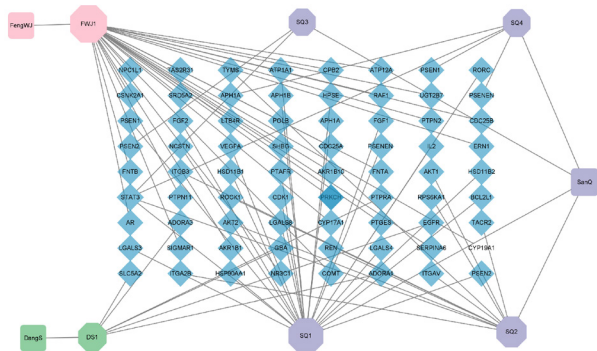


图5 饮片-成分-靶点图
Figure 5. Drug-component-target network
注：正方形节点代表药味，八边形节点为化学成分，菱形节点代表靶点。

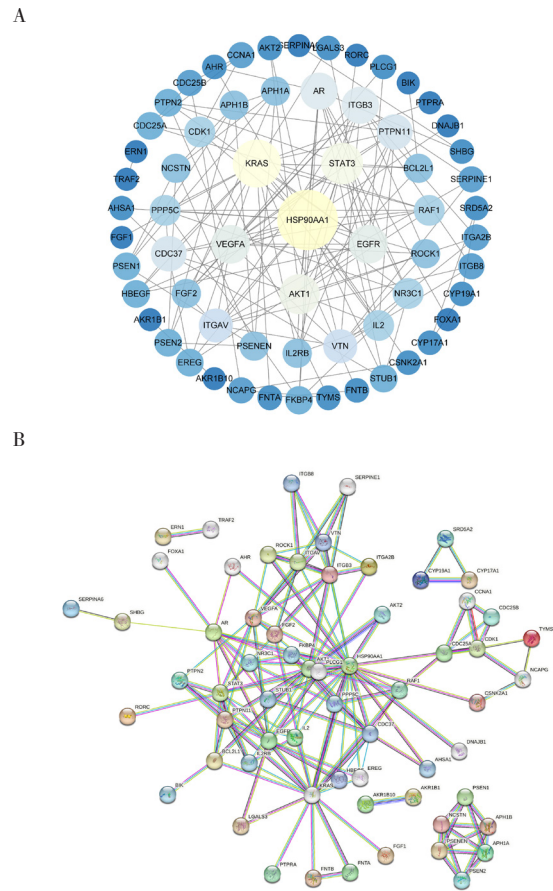


图6 经可视化分析的PPI网络图 (A)、原始PPI网络图 (B)
Figure 6. The PPI network analyzed by visualization (A), original PPI network (B)

为关键靶点，获得 8 个关键靶点，见表 4。
2.9.3 基因本体功能富集分析和京都基因与基因组百科全书通路富集分析

采用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对 8 个关键靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析，包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cell composition, CC) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。以 $P < 0.05$ 和伪发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 对 GO 分析获得条目进行筛选，共得到 26 个条目，其中 BP 占 21 条，MF 占 4 条，CC 占 1 条，见图 7。BP 主要包括蛋白质磷酸化的正向调节、基因表达的正向调控、肽基丝氨酸磷酸化的正向调节、细胞增殖正向调节、磷酸化的正向调节、内皮细胞迁移的正向调节等，MF 主要涉及相同蛋

白结合、氧化氮合酶活性调节、酶结合、蛋白二聚化活性，CC 为大分子复合物。KEGG 分析共获得 68 条通路，以 $P < 0.01$ 筛选得到 43 条通路，其中排名前 20 名的通路见图 8，三七参蜂口服液中 7 个候选化合物富集的通路主要包括癌症、病毒感染、能量代谢、雌激素等信号通路，结果见表 5。

2.9.4 成分-靶点-通路构建

将 7 个候选化合物、8 个关键靶点、43 条通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建成分-靶点-通路网络图，见图 9。以化合物、靶点蛋

白、信号路的连接度为参考，化合物中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的连接度较高，可能是三七参蜂口服液发挥药效的主要化学物质，靶点蛋白中血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase, AKT1)、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源蛋白 (KRAS)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、信号转导和转录激活因子-3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的连接度较高，其中 STAT3 与人参

表4 靶点网络的拓扑学性质

Table 4. Topological properties of target network

靶点	名称	度值	介数中心性	接近中心性
HSP90AA1	热休克蛋白90α家族A类成员1 (heat shock protein HSP 90-α)	25	0.491 0	0.653 3
KRAS	Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源蛋白 (GTPase KRas)	17	0.222 1	0.526 9
STAT3	信号转导和转录激活因子-3 (signal transducer and activator of transcription 3)	13	0.093 6	0.505 2
AKT1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1 (serine/threonine-protein kinase)	12	0.083 6	0.505 2
EGFR	表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)	11	0.072 6	0.505 2
VEGFA	血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor A)	11	0.045 5	0.485 1
AR	雄激素受体 (androgen receptor)	10	0.133 0	0.490 0
ITGB3	整合素亚基β 3 (integrin beta-3)	10	0.047 9	0.471 2

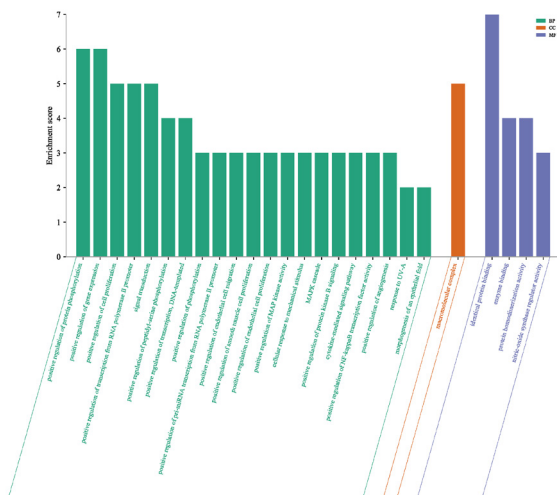


图7 GO富集分析结果

Figure 7. GO enrichment analysis result

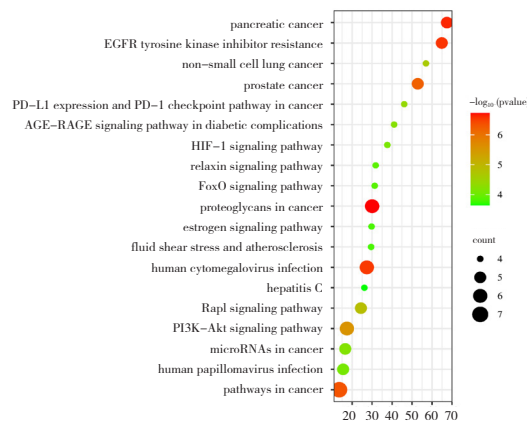


图8 KEGG富集分析结果

Figure 8. KEGG enrichment analysis result

表5 核心靶点的通路富集分析

Table 5. Topological properties of target network

类别	代谢通路	数目	P
hsa05207	化学致癌-受体激活通路 (chemical carcinogenesis - receptor activation)	7	1.90×10^{-9}
hsa05205	肿瘤相关蛋白多糖信号通路 (proteoglycans in cancer)	6	1.87×10^{-7}
hsa05212	胰腺癌 (pancreatic cancer)	5	2.33×10^{-7}
hsa01521	表皮生长因子-酪氨酸激酶抑制剂抵抗 (tyrosine kinase inhibitor resistance EGFR)	5	2.73×10^{-7}
hsa05163	人类巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection)	6	2.98×10^{-7}
hsa05200	肿瘤相关通路 (pathways in cancer)	7	4.73×10^{-7}

续表5

类别	代谢通路	数目	P
hsa05215	前列腺癌 (prostate cancer)	5	6.25×10^{-7}
hsa04151	磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)	6	2.84×10^{-6}
hsa04015	大鼠肉瘤相关蛋白1信号通路 (Rap1 signaling pathway)	5	1.37×10^{-5}
hsa05223	非小细胞性肺癌 (non-small cell lung cancer)	4	2.21×10^{-5}
hsa05235	肿瘤中程序性凋亡受体配体-1表达和细胞程序性死亡蛋白-1检查点通路 (PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer)	4	4.18×10^{-5}
hsa04933	糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)	4	5.93×10^{-5}
hsa05206	癌症相关微小核糖核酸 (microRNAs in cancer)	5	6.39×10^{-5}
hsa04066	缺氧诱导因子-1信号通路 (HIF-1 signaling pathway)	4	7.68×10^{-5}
hsa05165	人乳头瘤病毒感染 (human papillomavirus infection)	5	8.27×10^{-5}
hsa04926	松弛素信号通路 (relaxin signaling pathway)	4	1.27×10^{-4}
hsa04068	叉头转录因子O亚族O信号通路 (FoxO signaling pathway)	4	1.33×10^{-4}
hsa04915	雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)	4	1.55×10^{-4}
hsa05418	流体剪切力和动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis)	4	1.58×10^{-4}
hsa05160	丙型肝炎 (hepatitis C)	4	2.27×10^{-4}

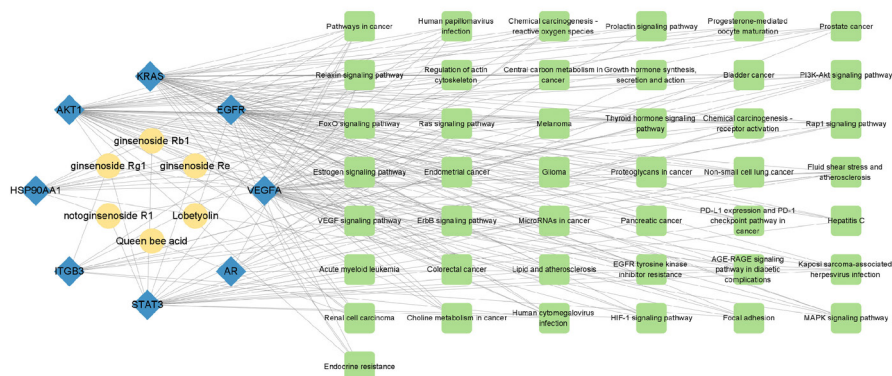


图9 成分-靶点-通路网络图

Figure 9. Network of component-target-pathway

注：黄色圆形节点代表化学成分，蓝色菱形节点代表靶点，绿色方形节点代表通路。

皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 均有连接，可能是三七参蜂口服液的主要关键靶点，43 条信号通路的连接度差异不大，均可能是三七参蜂口服液的关键信号通路。

3 讨论

3.1 质量标志物分析

三七参蜂口服液由三七、党参、蜂王浆、枸杞、何首乌 5 个药味制备而成，其功效为补中益气、养血生津、滋补肝肾。《本草纲目拾遗》中论述三七的功效为人参补气第一，三七补血第一，味同而功亦等，故称人参三七，为中药之最珍贵者。三七与人参同为五加科人参属植物，人

参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 等皂苷类物质是该属植物最主要的次生代谢产物，是人参属“特有性”成分，也是发挥扩张血管、抑制血小板凝集、抗炎、抗癌、免疫调节等药理活性的物质基础^[12-13]。《本草正义》中论述党参力能补脾养胃、润肺生津、健运中气，与人参不甚相远。党参主要含聚炔、多糖、黄酮类等成分，其中党参炔苷作为其标志性成分，也是发挥抗溃疡、免疫调节、抗癌、抗菌、抗病毒等药理活性的物质基础^[14]。蜂王浆广泛用于改善各种慢性健康问题，其主要化学成分 10-羟基-2-癸烯酸被称为王浆酸，约占蜂王浆干物质成分的 3.5%，被认为是评价蜂王浆质量的重要指标，也是蜂王浆抗菌、抗

炎、调节癌症、促进免疫和抵御皮肤损伤等生物学活性的物质基础之一^[15]。何首乌始载于《开宝本草》，炮制后具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨的功效，现代药理学研究^[16]表明，二苯乙烯苷具有抗炎、抗氧化、抗衰老作用与传统药效补肝肾和益精血相对应，是何首乌的主要药效物质基础之一。枸杞始载于《神农本草经》，具有滋补肝肾、养阴润肺等功效，其富含糖类、生物碱类、黄酮类及酚酸类成分，具有调节免疫、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等作用，其中枸杞多糖与枸杞子的传统功效相对应，是枸杞子传统功效的主要物质基础^[17]，而甜菜碱亦是枸杞中重要的化合物，在我国药典中用于枸杞药材及其制剂的质量控制，可为机体提供甲基和维持细胞渗透压。

中医学认为“气”是人体内运行不息的极精微物质，是构成和维持人体生命活动的基础物质之一，这与现代医学的能量极为相似，所以中医的“气”与现代生物学的“能量”在理论与概念上具有相通性^[18]。三七参蜂口服液具有补中益气之功，从现代药理学角度分析，其可能调控了人体的能量代谢过程，这与本研究网络药理学结果基本一致。从网络药理学分析结果可知，三七参蜂口服液的主要成分可能作用于 AKT1、STAT3、VEGFA、EGFR 等靶点，通过信号转导及转录激活蛋白 3-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1-动力相关蛋白 1 信号通路 (signal transducer and activator of transcription 3-serine/threonine kinase 1-dynamin-related protein 1, STAT3/AKT1-Drp1)、单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway, PI3K-AKT)、缺氧诱导因子 1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway, HIF-1) 对细胞的能量代谢和血液供应起调节作用。

PPI 网络分析结果显示，STAT3 和 AKT1 是三七参蜂口服液的两个关键靶点，已有相关研究^[19]证实 STAT3 和 AKT1 均可通过促进下游分子 Drp1 在 Ser637 位点的磷酸化从而促进线粒体分裂，而线粒体作为细胞制造能量的结构，通过自身“分裂”与“融合”的形态变化在细胞能量调节过程中发挥重要作用。因此结合本研究结果，推测三七参蜂口服液可能通过调控线粒体功能发

挥调节机体能量代谢的作用。

KEGG 分析结果显示，在排名前 20 的通路中，除癌症相关通路占比较高外，三七参蜂口服液还主要富集在能量代谢相关通路上，包括 HIF-1 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路，其中 HIF-1 为葡萄糖代谢经典通路，而 PI3K-AKT 信号通路则有研究证明其与葡萄糖代谢、脂质合成和代谢均相关，这与三七参蜂口服液的传统功效是一致的。HIF-1 信号通路是人体应答缺氧应激的关键，可调控细胞产生的一系列缺氧代偿反应，一方面，HIF-1 介导缺氧条件下的糖酵解路径供能，另一方面，HIF-1 的下游 PDK 蛋白可以抑制乙酰辅酶 A 的合成，阻断三羧酸循环，降低氧消耗^[20]。PI3K-AKT 信号通路在机体多器官/组织中调控脂代谢相关基因的表达，并且其参与机体包括脂质的合成、转运、摄取与分解等在内的一系列调控^[21]。PI3K-AKT 信号通路与葡萄糖代谢途径也密切相关，其介导缺氧环境下细胞的糖酵解途径^[22]。

此外，本研究结果显示三七参蜂口服液调控了 AMPK 激酶，AMPK 作为一个重要的蛋白激酶，被称为“细胞能量调节器”，是生物能量代谢调节的关键分子。一方面，AMPK 作为磷酸腺苷激活的蛋白激酶/沉默信息调节因子 2 相关酶 1/基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅活化因子 1 α 信号通路上的关键分子，在调控线粒体数量和功能方面发挥着不可替代的作用^[23-24]；另一方面，AMPK 可启动产生三磷酸腺苷的分解代谢途径；再者，AMPK 激酶还可通过磷酸化激活内皮型一氧化氮合酶，产生一氧化氮，调节血管张力，舒张血管平滑肌，增加血流，以改善缺血缺氧组织的血氧供应^[25]。

综上所述，7 个候选化合物为相应饮片的特征性化学成分，可实现从饮片-制剂的传递和追溯，阴性无干扰专属性强，为三七参蜂口服液发挥补中益气，养血生津，滋补肝肾传统功效的主要物质基础，网络药理学预测 7 个候选化合物中 6 个化合物可作用于多个靶点，干预不同通路发挥药效作用，说明指纹图谱所选的指标成分具有合理性，故可初步预测党参炔苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 Re、10-羟基-2 癸烯酸为三七参蜂口服液潜在的质量标志物。

3.2 研究局限性

枸杞多糖和甜菜碱理应是三七参蜂口服液的质量标志物，但建立的三七参蜂口服液指纹图谱中无色谱峰归属于枸杞多糖成分或甜菜碱。分析枸杞多糖未出现色谱峰的原因，一是因为多糖类属大极性成分，在通过十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱时难以保留而形成有效分离，会跟随流动相直接流出色谱柱，且多糖中几乎无共轭双键，紫外吸收较弱且为末端吸收，在二极管阵列检测器检测中不具优势。二是三七参蜂口服液供试品制备时采用正丁醇萃取，样品中多糖类成分留于水层被弃去；同时本研究对于甜菜碱未出现色谱峰的原因进行一定探索研究，将指纹图谱采用的 C_{18} 色谱柱替换为更适宜甜菜碱检测的氨基键合硅胶色谱柱后，在枸杞饮片及三七参蜂口服液渗漉液的检测色谱图中出现甜菜碱色谱峰，但依照制备工艺在渗漉液中加入蜂蜜后，甜菜碱色谱峰消失不见，推测造成此现象的原因为甜菜碱为季铵碱类生物碱， $pK_a=2.38$ ，具有弱碱性，蜂蜜则富含酸性的有机酸（葡萄糖酸、柠檬酸、乙酸等）和多酚类物质（咖啡酸、没食子酸等），当甜菜碱在水溶液中结合蜂蜜中的酸性物质生成盐时，在 C_{18} 色谱柱和氨基色谱柱上均无保留，造成三七参蜂口服液指纹图谱中无甜菜碱色谱峰的现象。

利益冲突声明：作者声明本研究不存在任何经济或非经济利益冲突。

参考文献

- 1 国家食品药品监督管理总局国家药品标准. 三七参蜂口服液 [S]. 2014.
- 2 张铁军, 白钢, 刘昌孝, 等. 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. [Zhang TJ, Bai G, Liu CX, et al. The concept, core theory and research methods of Chinese medicine quality markers[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(2): 187-196.] DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0912.
- 3 张涛, 张青, 易海燕, 等. 基于指纹图谱结合化学计量法对何首乌不同炮制品多指标成分分析 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4653-4662. [Zhang T, Zhang Q, Yi HY, et al. Analysis on multi-index components of *Polygoni Multiflori* Radix and its processed products based on fingerprints and chemometrics[J]. Chinese Traditional and

Herbal Drugs, 2022, 53(15): 4653-4662.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.008.

- 4 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345. [Sun LL, Wang M, Ren XL. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(20): 4339-4345.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.031.
- 5 许金国, 夏金鑫, 梅茜, 等. 经典名方当归四逆汤指纹图谱及功效关联物质预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4507-4518. [Xu JG, Xia JX, Mei Q, et al. Fingerprints of classical prescription Dangui Sini Decoction and predictive analysis of its efficacy related substance[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(15): 4507-4518.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.008.
- 6 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843. [Liu TL, Yang LL, Dong CM, et al. Study on HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica* Flos from different areas based on chemical pattern recognition[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(15): 4833-4843.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.027.
- 7 邵淑贤, 金珊, 叶乃兴. 基于电子鼻与 HS-SPME-GC-MS 技术对不同产地黄观音乌龙茶香气的差异分析 [J]. 食品科学, 2023, 44(4): 232-239. [Shao SX, Jin S, Ye NX. Differential analysis of aroma components of Huangguanyin Oolong tea from different geographical origins using electronic nose and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2023, 44(4): 232-239.] DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20220413-160.
- 8 帅丽霞, 陈旺, 袁袁, 等. 基于指纹图谱和网络药理学对经典名方二冬汤质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5682-5691. [Shuai LX, Chen W, Yuan Y, et al. Predictive analysis of quality markers of Erdong decoction based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(18): 5682-5691.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.011.
- 9 温捷, 薛蓉, 季德, 等. 指纹图谱结合网络药理学的瓜

- 蒺藜片质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2687–2695. [Wen J, Xue R, Ji D, et al. Predictive analysis of quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(9): 2687–2695.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.019](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.019).
- 10 涂慧, 陈林, 周代俊, 等. 基于指纹图谱和网络药理学对经典名方五味消毒饮质量标志物的预测分析[J]. 中国药师, 2024, 27(4): 557–569. [Tu H, Chen L, Zhou DJ, et al. Quality marker prediction analysis of Wuwei disinfection decoction based on fingerprint and network pharmacology[J]. China Pharmacist, 2024, 27(4): 557–569.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202401123](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202401123).
- 11 田永强, 邹骞, 张义生, 等. 基于网络药理学和指纹图谱的温经止痛合剂质量标准研究[J]. 中国药师, 2023, 26(10): 22–34. [Tian YQ, Zou J, Zhang YS, et al. Quality standards of Wenjing Zhitong mixture based on network pharmacology and fingerprint[J]. China Pharmacist, 2023, 26(10): 22–34.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202211076](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202211076).
- 12 石礼平, 张国壮, 刘丛盛, 等. 三七化学成分和药理作用研究概况及质量标志物的预测[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2059–2067. [Shi LP, Zhang GZ, Liu CS, et al. Research summary of chemical constituents and pharmacological effects of *Panax notoginseng* and predictive analysis on its Q-markers[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(8): 2059–2067.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjmm.20230213.201](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjmm.20230213.201).
- 13 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733–2745. [Liu YC, Zhang TJ, Guo HB, et al. Research progress on *Notoginseng Radix et Rhizoma* and predictive analysis on its Q-Marker[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(9): 2733–2745.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.023](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.023).
- 14 边惠琴, 武晓玉, 夏鹏飞, 等. 党参的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(3): 337–344. [Bian HQ, Wu XY, Xia PF, et al. Research progress of *Codonopsis Radix* and predictive analysis on quality markers[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 37(3): 337–344.] DOI: [10.13375/j.cnki.wcjps.2022.03.023](https://doi.org/10.13375/j.cnki.wcjps.2022.03.023).
- 15 孙奕良, 李海燕, 马志敏, 等. 蜂王浆在提高人体免疫力及解决围绝经期女性症状方面的研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38(35): 119–124. [Sun YL, Li HY, Ma ZM, et al. Research progress of royal jelly in improving human immunity and symptomatic treatment of perimenopausal women[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(35): 119–124.] DOI: [10.11924/j.issn.1000-6850.casb2022-0464](https://doi.org/10.11924/j.issn.1000-6850.casb2022-0464).
- 16 王卓, 钟凌云, 解杨, 等. 基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(3): 882–897. [Wang Z, Zhong LY, Xie Y, et al. Research progress on *Polygoni Multiflori Radix* based on "raw and cooked with different uses" and prediction analysis on quality marker (Q-Marker)[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(3): 882–897.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.029](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.029).
- 17 宋艳梅, 张启立, 崔治家, 等. 枸杞子化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(2): 206–213. [Song YM, Zhang QL, Cui ZJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycii fructus* and its quality marker prediction and analysis[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 37(2): 206–213.] DOI: [10.13375/j.cnki.wcjps.2022.02.021](https://doi.org/10.13375/j.cnki.wcjps.2022.02.021).
- 18 王茹, 王培利, 王承龙. 基于网络药理学研究人参调节能量代谢的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(10): 90–93. [Wang R, Wang PL, Wang CL. Mechanism of *Renshen (Ginseng Radix Et Rhizoma)* on energy metabolism based on network pharmacology[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(10): 90–93.] DOI: [10.13193/j.issn.1673-7717.2021.10.020](https://doi.org/10.13193/j.issn.1673-7717.2021.10.020).
- 19 Zhou K, Chen J, Wu J, et al. Atractylenolide III ameliorates cerebral ischemic injury and neuroinflammation associated with inhibiting JAK2/STAT3/Drp1-dependent mitochondrial fission in microglia[J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152922. DOI: [10.1016/j.phymed.2019.152922](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152922).
- 20 王莘莘, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的 HIF-1 信号通路[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(5): 560–566. [Wang PP, Kong FP, Chen XQ, et al. HIF-1 signal pathway in cellular response to hypoxia[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2011, 40(5): 560–566.] DOI: [10.3785/j.issn.1008-9292.2011.05.017](https://doi.org/10.3785/j.issn.1008-9292.2011.05.017).
- 21 闫晗, 杨吉春, 迟毓婧, 等. PI3K-Akt 信号转导通路对脂代谢的调控作用[J]. 生理科学进展, 2021,

- 52(6): 425–430. [Yan H, Yang JC, Chi YJ, et al. The regulation of PI3K–Akt signal transduction pathway on lipid metabolism[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2021, 52(6): 425–430.] DOI: [10.3969/j.issn.0559-7765.2021.06.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.0559-7765.2021.06.005).
- 22 Xie Y, Shi X, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 783–791. DOI: [10.3892/mmr.2018.9713](https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9713).
- 23 Yu Y, Zhao Y, Teng F, et al. Berberine improves cognitive deficiency and muscular dysfunction via activation of the AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway in skeletal muscle from naturally aging rats[J]. *J Nutr Health Aging*, 2018, 22(6): 710–717. DOI: [10.1007/s12603-018-1015-7](https://doi.org/10.1007/s12603-018-1015-7).
- 24 Jia D, Hou L, Lyu Y, et al. Postinfarction exercise training alleviates cardiac dysfunction and adverse remodeling via mitochondrial biogenesis and SIRT1/PGC-1 α /PI3K/Akt signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23705–23718. DOI: [10.1002/jcp.28939](https://doi.org/10.1002/jcp.28939).
- 25 符庆璞, 高钰琪. 蛋白激酶 AMPK 的研究进展 [J]. *生命科学*, 2005, 17(2): 147–152. [Fu QY, Gao YQ. Advances in the studies of AMP-activated protein kinase[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005, 17(2): 147–152.] DOI: [10.3969/j.issn.1004-0374.2005.02.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-0374.2005.02.009).

收稿日期: 2024 年 04 月 15 日 修回日期: 2024 年 11 月 09 日
本文编辑: 周璐敏 杨 燕