

基于指纹图谱、网络药理学和定量分析的南五味子 治疗药源性肝损伤的质量标志物研究

林路洁¹, 张明晓¹, 李化^{1*}, 兰雪梅^{1,2}, 魏晓露¹, 郭丛¹, 杨滨^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 西南大学, 重庆 400715)

摘要 根据中药质量标志物(Q-marker)的理念,采用超高效液相色谱法(UPLC)建立指纹图谱和多指标定量的方法,结合网络药理学研究,筛选南五味子保肝功效的潜在质量标志物。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件对15批不同产地的南五味子指纹图谱进行相似度分析,相似度在0.981~0.998。确定了18个共有成分,由聚类分析和主成分分析确定了3个差异性成分;构建“成分-靶点-通路”网络图,预测南五味子保肝的核心成分,筛选出14个与南五味子治疗药源性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)作用相关的核心成分,通过作用于AKT1、CCND1、CYP1A1、CYP3A4、MAPK1、MAPK3、NOS2、NQO1、PTGS2等靶点,调控脂质和动脉粥样硬化、乙型肝炎、白细胞介素-17、肿瘤坏死因子等信号通路发挥保肝作用。结合成分的可测性、特有性、有效性,预测五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素是南五味子治疗DILI的质量标志物。15批样品中五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素的质量分数分别为0.20%~0.57%、0.13%~0.33%、0.42%~0.70%。综上,该研究综合利用指纹图谱、网络药理学、含量测定等多技术的融合策略,科学合理地推测了南五味子治疗DILI的质量标志物,可为提升南五味子的质量评价标准、探索南五味子治疗DILI的作用机制提供依据。

关键词 南五味子; 药源性肝损伤; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物

Identification of Q-markers for Schisandrae Sphenantherae Fructus in treating drug-induced liver injury based on network pharmacology, fingerprint and quantitative analysis

LIN Lu-jie¹, ZHANG Ming-xiao¹, LI Hua^{1*}, LAN Xue-mei^{1,2}, WEI Xiao-lu¹, GUO Cong¹, YANG Bin^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Southwestern University, Chongqing 400715, China)

[Abstract] This study aims to establish the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint and multi-indicator quantitative analysis method for Schisandrae Sphenantherae Fructus (SSF) and to screen out the potential quality markers (Q-markers) of hepatoprotection based on network pharmacology. The similarity analysis was performed using the *Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System*, which showed that the similarity of the fingerprints of 15 samples from different regions ranged from 0.981 to 0.998. Eighteen common components were identified, from which 3 differential components were selected by cluster analysis and principal component analysis. The "component-target-pathway" network was built to predict the core components related to the hepatoprotective effects. Fourteen core components were screened by network pharmacology. They acted on the targets such as AKT1, CCND1, CYP1A1, CYP3A4, MAPK1, MAPK3, NOS2, NQO1, and PTGS2 to regulate the signaling pathways of lipid metabolism and atherosclerosis, hepatitis B, interleukin-17, and tumor necrosis factor. Considering the chemical measurability, characteristics, and validity, schisantherin A, anwulignan, and schisandrin A were identified as the Q-markers. The content of schisantherin A, anwulignan, and schisandrin A in the test samples were 0.20%-0.57%, 0.13%-0.33%, and 0.42%-0.70%.

收稿日期 2023-03-26

基金项目 国家自然科学基金项目(82173964); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT20021, ZXKT17065)

通信作者 * 李化, 博士, 副研究员, 主要从事中药质量评价及其药效物质基础研究, E-mail: lihua621@hotmail.com; * 杨滨, 博士, 研究员, 主要从事中药质量评价及其药效物质基础研究, E-mail: ybinmm@126.com

作者简介 林路洁, 硕士研究生, E-mail: lin5674qq@126.com

respectively. Combining the fingerprint, network pharmacology, and content determination, this study predicted that schisantherin A, anwulignan, and schisandrin A were the Q-markers for the hepatoprotective effect of SSF. The results can provide reference for improving the quality evaluation standard and exploring the hepatoprotective mechanism of SSF.

[Key words] Schisandrae Sphenantherae Fructus; drug-induced liver injury; fingerprint; network pharmacology; quality markers

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230627.201

药源性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指在用药过程中由药物本身或其代谢产物, 或由特殊体质对药物的超敏感性或耐受性降低所导致的肝损伤^[1]。随着新药开发, 临床用药种类的增加, 药源性肝损伤逐渐引起人们的重视。目前治疗药源性肝损伤的西药种类局限, 难以广泛应用于不同类型的药源性肝损伤^[2]。在中医上, 药源性肝损伤的治疗侧重于补益肝肾, 疏泄肝毒, 益气养阴^[3]。南五味子是木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实, 具有收敛固涩, 益气生津, 补肾宁心的功效^[4]。南五味子醇提物可有效降低 DILI 患者血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶和总胆红素的水平^[5-7], 它主要通过调节 CYP450 酶活性, 调控核转录因子 Nrf2 的表达, 调控核受体 PXR 的表达, 起着减少毒性代谢物的产生^[8]、抗氧化^[9-11]、抗炎^[12] 和调节胆汁转运功能^[13] 等作用。

南五味子在黄河流域以南的地区均有分布, 地理位置的分散, 导致南五味子的质量参差不齐^[13-17]。2020 年版《中国药典》收载含有南五味子的单方制剂和成方制剂达 14 种, 但在南五味子药材项下仅对五味子酯甲进行含量限定。中药成分多样、作用机制复杂, 单一指标难以全面反映药材质量, 南五味子质量评价标准亟待完善。南五味子中含木脂素类、挥发油类、三萜类、多糖类等成分, 其中木脂素类成分为主要保肝活性成分^[18]。南五味子质量的评价指标主要集中在木脂素类成分, 评价指标种类多样化, 不同学者选择的评价指标并不一致。WEI H 等^[19] 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立了测定南五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素共 8 个成分含量的方法, 用于评价不同产地的南五味子的质量。LIU H 等^[20] 采用 HPLC 指纹图谱法结合层次聚类分析和主成分分析法, 筛选并确定五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素是评价南五味子质量的关键指标。杨洁等^[13] 运用 UPLC-TQ-

MS 技术分析测定了不同产地南五味子药材中 7 种木脂素类成分的含量, 结合主成分分析探讨了南五味子木脂素在不同产地间的含量差异。还有学者选择五味子酯乙^[21]、五味子酯丙^[22]、五味子酮^[13]、D-表加巴辛^[13] 作为指标成分, 研究它们在南五味子与同属植物中的含量特征。马新飞等^[23] 建立了南五味子药材的 HPLC 指纹图谱研究以及 7 个木脂素类成分 (五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素) 含量测定的方法, 评价了 12 批不同产地南五味子的质量。综上所述, 这些评价指标的选择, 缺乏与临床疗效关联分析, 难以科学合理地评价南五味子的质量。

刘昌孝院士于 2016 年提出的中药质量标志物 (Q-marker) 概念, 主要从成分的有效性、可测性、特有性等方面对中药质量进行有效评价, 对中药在临床安全有效的应用具有重要意义^[24]。中药指纹图谱专属性强、稳定性好, 已被广泛用于评价中药材品质。戚华文等^[25-26] 通过分别建立枳实、吴茱萸的高效液相色谱指纹图谱, 结合化学计量学分析, 筛选出 3 个枳实的质量标志物、4 个吴茱萸的质量标志物用以质量控制。张淑娟等^[27] 通过建立 15 批黄芪药材的指纹图谱, 运用化学计量学分析, 筛选出 2 个黄芪的质量标志物。网络药理学具有系统性和整体性的特点, 是挖掘中药复杂成分的作用靶点、预测多成分的药效机制等的重要工具, 曲中原等^[28]、李媚等^[29] 采用指纹图谱的成分分析和网络药理学相结合的方法, 预测南柴胡和广藿香与功效相关联的质量标志物。姜海慧等^[30] 通过构建“成分-靶点”网络, 富集分析基因本体中生物过程与通路信息, 探讨了南五味子的保肝作用机制。目前南五味子的质量研究集中于药材性状与化学成分的联系^[31], 尚缺乏与药效相结合来探寻反映南五味子质量的质量标志物。为此, 本研究建立能体现南五味子整体化学特征性的超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 运用化学计量学方法筛选不同产地南五味子的差异性成分, 结合网络药理学分析从有效性上确认保肝活性成分, 确

定潜在的质量标志物,并测定不同产地南五味子中质量标志物的含量,为完善并提升南五味子药材的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity H-Class UPLC™ 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);2998 型超高效液相色谱仪和 Xevo G2-S-Q-TOF 型高分辨率飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司);BT125D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ5200DB 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DH-101-0 型电热恒温鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司);W80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂

在 2019 年 12 月至 2023 年 1 月从河北安国、安徽亳州、四川荷花池等地中药材市场和线上药材经销商处收集南五味子 15 批,其中陕西 8 批(编号 SG-SAX1~SG-SAX8)、山西 3 批(编号 SG-SX1~SG-SX3)、河南 2 批(编号 SG-HN1~SG-HN2)、云南 1 批(编号 SG-YN1)、安徽 1 批(编号 SG-AH1)。15 批南五味子经中国中医科学院中药研究所李化副研究员鉴定均为木兰科植物华中五味子 *S. sphenanthera* 的干燥果实。药材粉碎过 3 号筛,于电子防潮柜中保存。

对照品五味子醇乙(批号 MUST-14010312)、五味子甲素(批号 MUST-13080205)、五味子乙素(批号 MUST-13091606)、五味子丙素(批号 MUST-14052408)、五味子酯甲(批号 MUST-13110606)、五味子酯乙(批号 MUST-14101907)、五味子酯丙(批号 MUST-22082204)、五味子酚(批号 MUST-14020101)、戈米辛 D(批号 MUST-17120902)、戈米辛 G(批号 MUST-18102804)、当归酰戈米辛 H(批号 MUST-17092612)、戈米辛 J(批号 MUST-17102802)、花柏烯酸(批号 MUST-18120710)、戈米辛 L1(批号 MUST-19061720)、戈米辛 M2(批号 MUST-19070422)、戈米辛 N(批号 MUST-19050815)、五味子酚乙(批号 MUST-18010601)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;五味子醇甲(批号 W-002-171129)购自成都瑞芬斯生物科技有限公司;五味子酯戊(批号 ST16830105)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;南五味子素(批号

DST220829-100)购自成都德思特生物技术有限公司;安五脂素(批号 20220102)购自重庆美赛生物科技有限公司,所有对照品质量分数均大于 98%。水为屈臣氏蒸馏水;甲酸为质谱纯、甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);乙腈为色谱纯(美国 Supelco 公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别取五味子醇甲、戈米辛 D、戈米辛 J、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、戈米辛 G、五味子酯丙、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,甲醇溶解,得到质量浓度分别为 0.062、0.023、0.026、0.054、0.063、0.016、0.019、0.052、0.050、0.055、0.055 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液;分别精密吸取上述对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶,甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液 1。同法制得混合对照品溶液 2,含五味子酯戊、花柏烯酸、五味子酚乙、戈米辛 M2、南五味子素、戈米辛 L1、安五脂素、戈米辛 N 为 1.6、2.8、1.2、4.2、2.8、1.1、2.6、6.1 μg·mL⁻¹,用于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的定性分析。

取安五脂素、五味子酯甲、五味子甲素对照品适量,精密称定,分别加甲醇制得每 1 mL 含五味子酯甲 0.328 mg、安五脂素 0.263 6 mg、五味子甲素 0.559 mg 的单一对照品溶液,用于 UPLC 的定量分析。

2.2 供试品溶液的制备

取南五味子粉末约 0.25 g,精密称定,置 20 mL 具塞锥形瓶中,加无水乙醇 10 mL,超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz)10 min,取出,放冷,加无水乙醇补重,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.3 色谱条件

Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,95%~58% A;5~13 min,58%~55% A;13~15 min,55%~43% A;15~17 min,43% A;17~19 min,43%~30% A;19~21 min,30%~5% A;21~22 min,5% A;22~22.5 min,5%~95% A;22.5~25 min,95% A);流速 0.4 mL·min⁻¹;柱温 40 ℃;进样量 1 μL;检测波长 254 nm(五味子酯甲、五味子甲素)、280 nm(安五脂素)。

2.4 质谱条件

电喷雾电离(ESI)离子源,正离子扫描模式;毛

细管电压 3.0 kV; 干燥气温度 450 °C; 干燥气体流量 800 L·h⁻¹; 离子源温度 120 °C; 锥孔气体流量 50 L·h⁻¹; 锥孔电压 40 V; 补偿电压 80 V; 质量扫描范围 m/z 100~1 500, 以 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 亮氨酸-脑啡肽的 50% 乙腈水溶液作为外标进行质量实时校正。

2.5 南五味子中化学成分的鉴定

根据文献报道^[3]和预实验,选择在正离子模式

下进行检测,总离子流图见图 1。根据对照品保留时间、一级和二级质谱数据,结合文献报道^[33-34]和 UNIFI 软件化学数据库中成分的精确相对分子质量对其进行鉴定,以误差 $\pm 5\times 10^{-6}$ 匹配,从南五味子中共鉴定出 31 个联苯环辛烯型木脂素、5 个四氢呋喃型木脂素、2 个二芳基丁烷型木脂素、2 个环阿屯型三萜,见表 1。

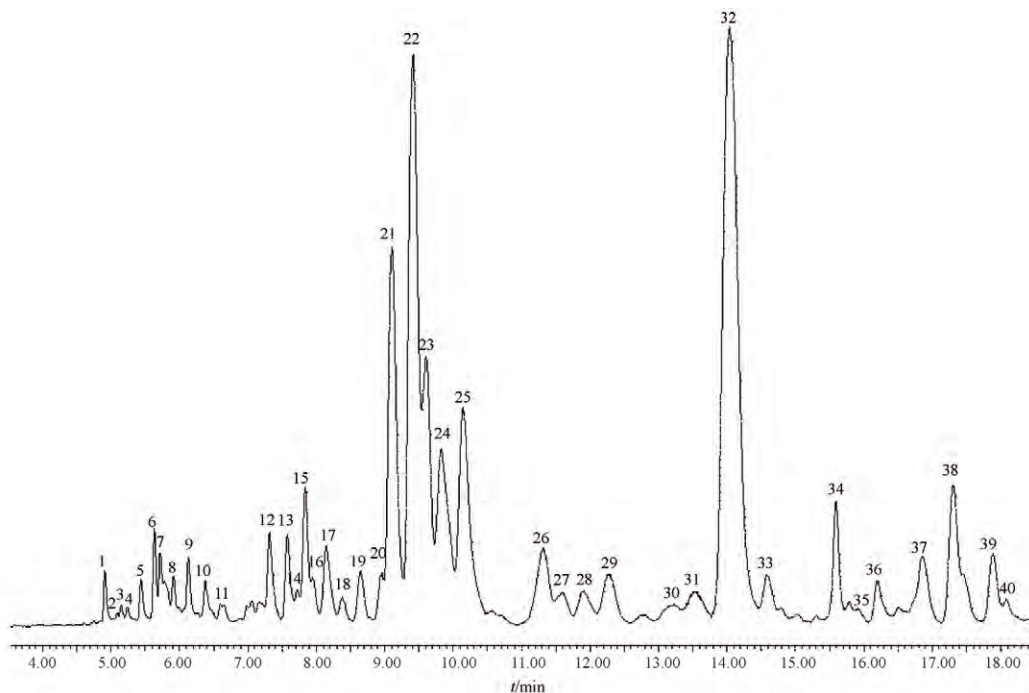


图 1 南五味子乙醇提取物在正离子模式下的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of the ethanol extract of Schisandrae Sphenantherae Fructus at the positive ion mode

2.6 UPLC 指纹图谱研究

2.6.1 方法学考察

2.6.1.1 精密度试验 取样品粉末(SG-SAX8)适量,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,连续进样 6 次,记录色谱图。以五味子酯甲为参照,记录主要特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.40%,相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%,表明该仪器精密度良好。

2.6.1.2 重复性试验 取样品粉末(SG-SAX8)适量,精密称定 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录色谱图。以五味子酯甲为参照,记录主要特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.40%,相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%,表明该方法重复性良好。

2.6.1.3 稳定性试验 取样品粉末(SG-SAX8)适量,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录主要特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.40%,相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.2 UPLC 指纹图谱的建立与相似度评价

将 15 批不同产地南五味子样品的 UPLC 色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版),得到 18 个共有峰,对数据文件进行剪切处理,选择陕西产地样品(SG-SAX8)的图谱作为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设为 0.1 min,经多点校正和 Mark 峰匹配后,生成 15 批南五

表 1 UPLC-Q-TOF-MS 分析南五味子乙醇提取物中化学成分

Table 1 Chemical components of the ethanol extract of Schisandrae Sphenantherae Fructus analyzed by UPLC-Q-TOF-MS

No.	t_R / min	分子式	实测值(m/z)	理论值(m/z)	二级碎片离子	化合物	误差 / $\times 10^{-6}$
1	4.91	$C_{20}H_{22}O_5$	343.153 3 $[M+H]^+$	343.154 5	219.100 7, 204.076 8, 189.054 4, 161.059 4	chicanine	3.50
2	5.09	$C_{20}H_{22}O_5$	343.153 3 $[M+H]^+$	343.154 5	219.100 7, 204.076 8, 189.054 4, 161.056 9	chicanine 同分异构体	3.50
3	5.15	$C_{22}H_{26}O_6$	387.179 2 $[M+H]^+$	387.180 7	345.132 5, 314.112 7, 299.091 8, 241.087 7	neglschisandrin E	3.87
4	5.24	$C_{22}H_{26}O_7$	403.174 2 $[M+H]^+$	403.175 7	343.117 0, 330.111 0	schisphenlignan G	3.72
5	5.43	$C_{23}H_{30}O_7$	457.160 8 $[M+K]^+$	457.162 9	401.193 3, 369.167 4, 323.127 7	戈米辛 S	4.59
6	5.63	$C_{23}H_{30}O_7$	457.160 8 $[M+K]^+$	457.162 9	401.193 3, 369.167 4, 323.127 7	戈米辛 T	4.59
7	5.72	$C_{21}H_{24}O_5$	357.169 1 $[M+H]^+$	357.170 2	233.118 5, 218.093 6, 203.069 8, 175.074 3	zuihonin C	3.08
8	5.91	$C_{24}H_{32}O_7$	471.179 4 $[M+K]^+$	471.178 5	415.211 5, 400.186 0, 384.193 5, 369.167 4, 338.146 2	五味子醇甲 ¹⁾	-1.91
9	6.13	$C_{30}H_{34}O_9$	577.186 5 $[M+K]^+$	577.184 0	417.189 6, 399.180 0, 357.130 4, 353.140 6, 342.145 2	五味子酯戊 ¹⁾	-4.33
10	6.38	$C_{22}H_{28}O_6$	389.197 5 $[M+H]^+$	389.196 4	374.175 8, 357.165 2, 342.149 0, 287.091 1, 227.068 5	戈米辛 J ¹⁾	-2.83
11	6.60	$C_{22}H_{24}O_7$	401.159 1 $[M+H]^+$	401.160 0	371.148 6, 341.135 7, 312.098 9	schisphenlignan I	2.24
12	7.32	$C_{22}H_{30}O_6$	390.203 0 $[M]^+$	390.204 2	237.146 5, 327.070 4, 167.069 7	pregomisin	3.08
13	7.57	$C_{23}H_{28}O_7$	417.189 7 $[M+H]^+$	417.191 3	399.180 0, 368.162 0, 338.150 0	epigomisin O	3.84
14	7.72	$C_{28}H_{34}O_9$	553.183 7 $[M+K]^+$	553.184 0	385.160 4, 371.147 0, 340.130 9, 325.108 9	戈米辛 E	0.54
15	7.84	$C_{23}H_{28}O_7$	455.146 3 $[M+K]^+$	455.147 2	399.180 0, 384.157 4, 368.16 2	五味子醇乙同分异构体	1.98
16	7.94	$C_{31}H_{36}O_9$	591.198 0 $[M+K]^+$	591.199 6	431.206 0, 399.180 0, 356.160 8	苯甲酰基戈米辛 Q	2.71
17	8.15	$C_{30}H_{32}O_9$	575.168 5 $[M+K]^+$	575.168 4	415.174 0, 397.167 7, 371.147 0, 325.105 3	戈米辛 G 同分异构体	-0.17
18	8.38	$C_{30}H_{32}O_9$	575.168 5 $[M+K]^+$	575.168 4	415.174 0, 397.167 7, 384.153 4, 371.147 0, 325.105 3	戈米辛 G ¹⁾	-0.17
19	8.65	$C_{30}H_{40}O_5$	481.294 7 $[M+H]^+$	481.295 4	445.277 0, 427.260 4, 381.108 4	longipedlactone B	1.45
20	8.95	$C_{23}H_{30}O_6$	403.211 7 $[M+H]^+$	403.212 0	388.188 1, 371.185 3, 340.165 4	戈米辛 K1/K2	0.74
21	9.11	$C_{28}H_{34}O_9$	553.183 8 $[M+K]^+$	553.184 0	415.174 0, 371.147 0, 356.126 0, 343.114 5, 325.105 3	五味子酯丙 ¹⁾	0.36
22	9.42	$C_{30}H_{32}O_9$	575.168 5 $[M+K]^+$	575.168 4	415.174 0, 371.147 0, 356.126 0, 343.114 5, 325.105 3	五味子酯甲 ¹⁾	-0.17
23	9.61	$C_{28}H_{34}O_9$	553.183 8 $[M+K]^+$	553.184 0	415.174 0, 371.147 0, 356.126 0, 343.114 5, 325.105 3	五味子酯乙 ¹⁾	0.36
24	9.83	$C_{29}H_{28}O_9$	559.136 7 $[M+K]^+$	559.137 0	399.143 2, 381.128 4, 355.115 4	五味子酯丁	0.54
25	10.15	$C_{23}H_{30}O_6$	403.211 7 $[M+H]^+$	403.212 1	388.185 2, 371.182 5, 340.165 4, 325.142 1, 302.113 5	五味子酚 ¹⁾	0.99
26	11.31	$C_{28}H_{34}O_9$	515.229 4 $[M+H]^+$	515.228 1	415.178 2, 385.164 4, 343.118 3	顺芷酰戈米辛 P	-2.52
27	11.61	$C_{30}H_{34}O_8$	561.189 1 $[M+K]^+$	561.189 1	401.193 3, 383.147 7, 369.171 4	苯甲酰戈米辛 U	0
28	11.91	$C_{25}H_{30}O_8$	497.157 0 $[M+K]^+$	497.157 8	399.180 0, 368.162 0, 353.136 8, 337.142 6, 330.107 2	南五味子素同分异构体	1.61
29	12.27	$C_{29}H_{40}O_{12}$	581.257 9 $[M+H]^+$	581.259 8	383.147 7, 352.129 5	schisandroside B	3.27
30	13.21	$C_{29}H_{30}O_8$	545.159 2 $[M+K]^+$	545.157 8	385.164 4, 355.153 9, 323.127 7	schisphenins G	-2.57
31	13.55	$C_{20}H_{24}O_4$	328.166 3 $[M]^+$	328.167 5	295.132 2, 236.982 7, 192.995 5, 176.963 2, 137.061 1	安五脂素 ¹⁾	3.66
32	14.05	$C_{24}H_{32}O_6$	455.181 6 $[M+K]^+$	455.183 6	417.227 2, 402.201 9, 386.208 9, 370.178 2, 316.131 7	五味子甲素 ¹⁾	4.39

续表1

No.	t_R / min	分子式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	二级碎片离子	化合物	误差 / $\times 10^{-6}$
33	14.59	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$	523.173 4 $[\text{M}+\text{K}]^+$	523.173 4	385.160 4, 370.182 2	schinlignans D	0.00
34	15.59	$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_4$	503.255 4 $[\text{M}+\text{K}]^+$	503.256 4	447.290 7, 429.279 7, 419.289 6, 213.125 6	schisanlactone A	1.99
35	15.92	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$	415.210 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$	415.212 0	384.193 5, 369.167 4, 338.150 0	甲基戈米辛 O	3.61
36	16.20	$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_8$	557.155 3 $[\text{M}+\text{K}]^+$	557.157 8	397.163 6, 367.154 0, 351.121 6	schisanchinin A	4.49
37	16.86	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_8$	537.188 6 $[\text{M}+\text{K}]^+$	537.189 1	399.180 0, 368.162 0, 384.157 4	当归酰异戈米辛 O	0.93
38	17.31	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_8$	543.198 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	543.199 5	399.180 0, 368.162 0, 353.136 8, 337.142 6	6-O-苯甲酰戈米辛 O	2.76
39	17.88	$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_8$	543.140 8 $[\text{M}+\text{K}]^+$	543.142 1	383.147 7, 353.136 8, 314.080 1, 283.060 5	interiotherin A	2.39
40	18.08	$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$	539.204 2 $[\text{M}+\text{K}]^+$	539.204 7	383.147 7, 368.162 0	micrantherin A	0.93

注: ¹⁾ 经对照品鉴定确认。

味子的UPLC叠加图谱和对照指纹图谱,见图 2。15 批南五味子样品与对照指纹图谱的相似度介于 0.981~0.998,表明不同产地南五味子样品中化学成分组成基本一致。

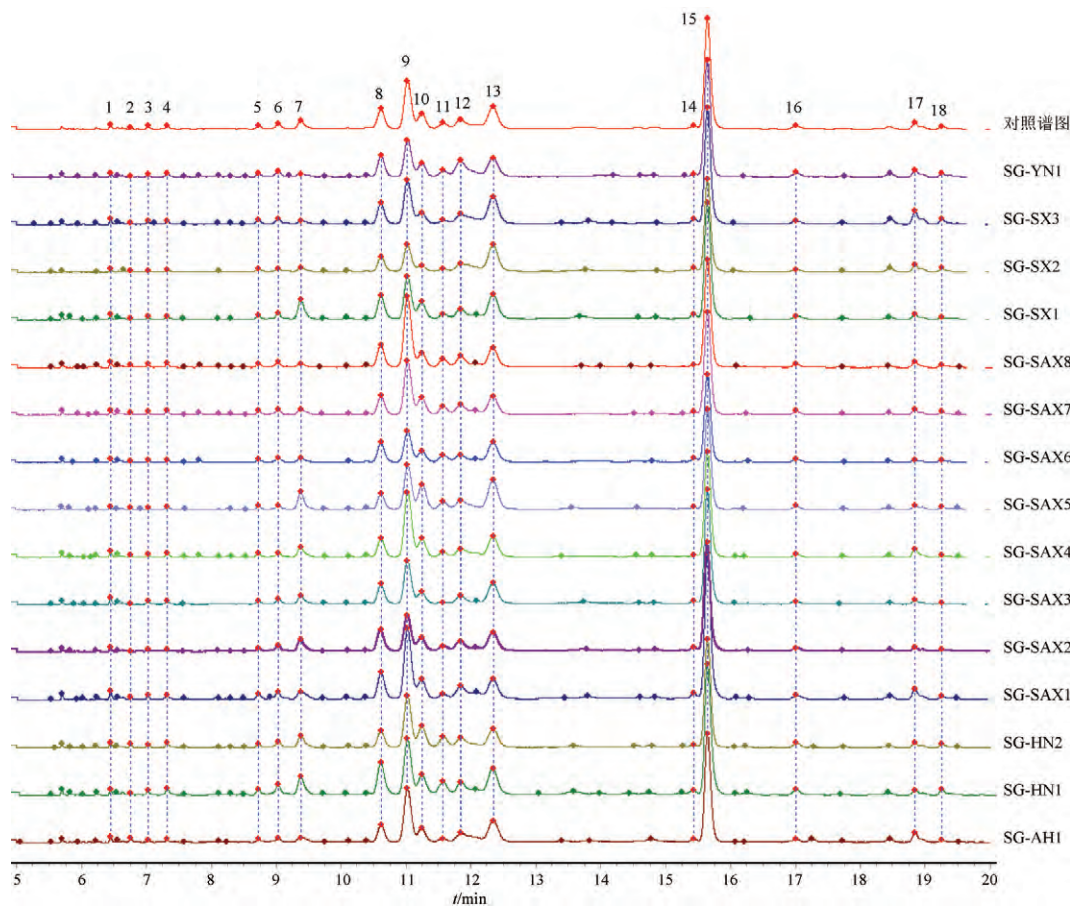


图 2 15 批南五味子样品 UPLC-UV(254 nm) 指纹图谱叠加图
Fig.2 Overlay of UPLC-UV fingerprints (254 nm) of 15 batches of Schisandrae Sphenantherae Fructus samples

2. 6. 3 指纹图谱共有峰的指认与归属
根据对照品、各峰的质谱数据对 18 个共有峰进行指认,明确了 18 个共有峰可能代表的化合物: 峰 1 为戈米辛 S,峰 2 为五味子醇甲,峰 3 为五味子酯

戊,峰 4 为戈米辛 J,峰 5 为 pregomisin,峰 6 为五味子醇乙同分异构体,峰 7 为戈米辛 G 同分异构体,峰 8 为五味子酯丙,峰 9 为五味子酯甲,峰 10 为五味子酯乙,峰 11 为五味子酯丁,峰 12 为五味子酚,峰 13 为顺芷酰戈米辛 P,峰 14 为安五脂素,峰 15 为五味子甲素,峰 16 为 schisanlactone A,峰 17 为 6-*O*-苯甲酰戈米辛 O,峰 18 为 interiotherin A。

2.7 多元统计学分析

2.7.1 聚类分析

聚类分析是一种计算类间相似系数矩阵,在无监督情况下将相对同质的群组进行归类的数理统计方法。以 15 批南五味子的 18 个共有峰面积为变量,将数据中心化预处理后导入分析网站(<https://www.omicstudio.cn/index>),采用离差平方和法以欧

氏距离为区间进行系统聚类,纵向聚类样品,横向聚类成分。聚类分析将不同产地的南五味子分为 3 类,第 1 类有 2 个样品,产地涉及陕西和河南;第 2 类有 5 个样品,产地涉及陕西、安徽和河南;第 3 类有 9 个样品,产地涉及陕西、山西和云南。热图能直接显示组间的含量差异,见图 3,图中颜色代表每种化合物的信号强度,通过热图可知 15 批次南五味子的主要差异性成分为五味子甲素、安五脂素和五味子酯甲。第 1 类南五味子中五味子甲素、安五脂素、五味子酯甲和五味子酯丙的峰面积均高于第 2、3 类,第 2 类中五味子酯甲的峰面积高于第 3 类,第 3 类中五味子甲素、安五脂素、顺芷酰戈米辛 P、戈米辛 G 同分异构体的峰面积高于第 2 类。

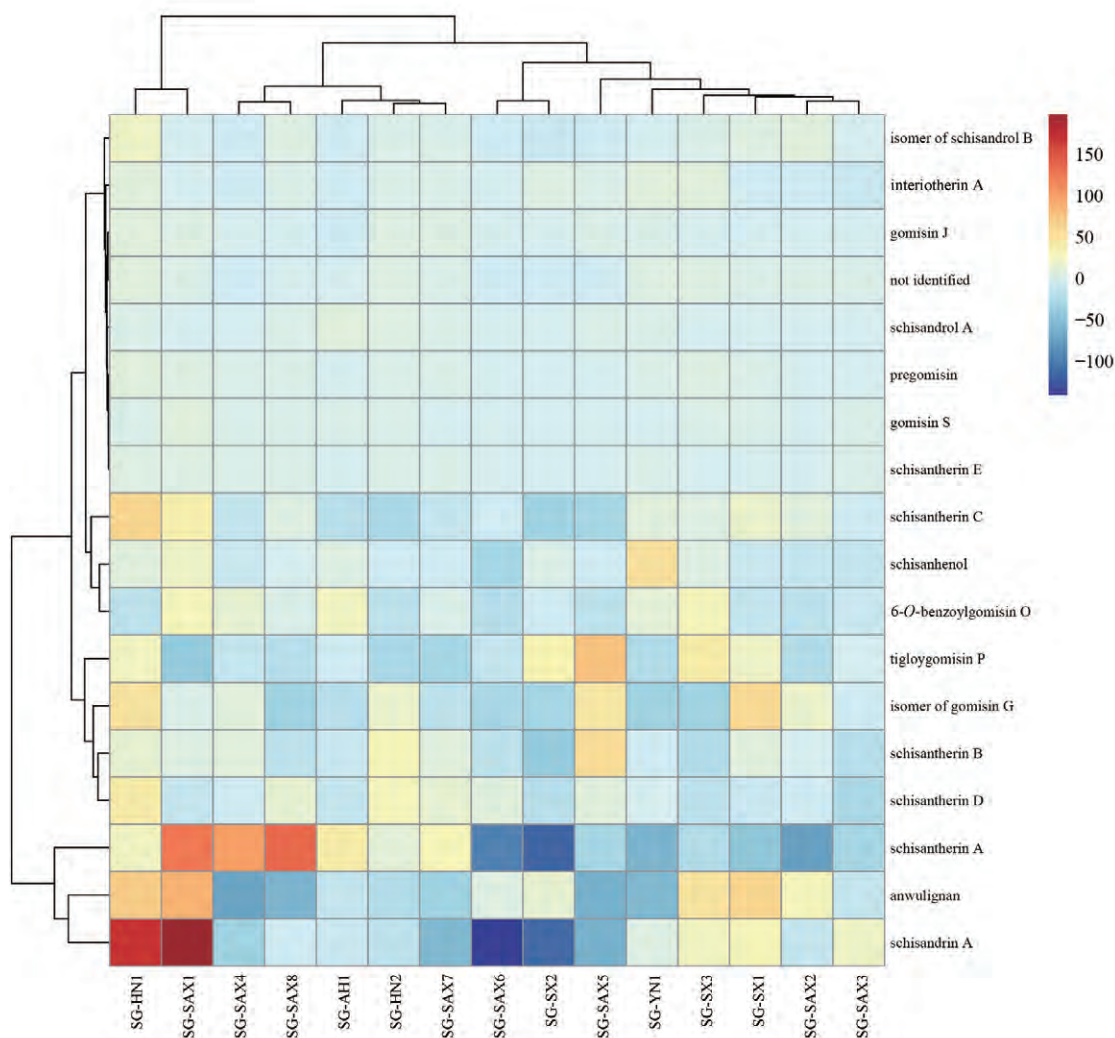


图 3 15 批南五味子样品的热图及聚类分析

Fig.3 Heat map and cluster analysis of 15 batches of Schisandrae Sphenantherae Fructus samples

2.7.2 主成分分析

主成分分析属于无监督分析,通过正交基向量构建数学模型来对复杂数据进行降维处理,以较少个数的主成分来反映原始数据的主要信息,有助于筛选对南五味子药材有价值信息的主要指标。将以中心化方式预处理的 18 个共有峰面积数据导入 SIMCA 14.1 进行主成分分析,选择特征值大于 1,贡献率较大的 3 个主成分,其中主成分 1 的特征值为 8.41,贡献率为 56.0%,主成分 2 的特征值为 3.70,累计贡献率达 80.7%,主成分 3 的特征值为 1.21,累计贡献率达 88.8%。在三维得分图中不同产地南五味子大致可分为 3 类,见图 4。第 1 类有 5 个样品,产地涉及陕西、安徽和河南;第 2 类有 2 个样品,产地涉及陕西和河南;第 3 类有 9 个样品,产地涉及陕西、山西和云南,与聚类分析结果一致。载荷值表示各化学成分对反映药材整体质量的主成分的贡献大小,其绝对值越大,说明该化学成分对药材整体质量影响较大。通过载荷权重值进一步分析影响南五味子质量的化学成分,从载荷矩阵表中可知,五味子甲素(0.793 8)、五味子酯甲(0.505 6)对第一主成分的贡献较大,五味子酯甲(0.732 0)、安五脂素(-0.545 8)对第二主成分的贡献较大,戈米辛 G 同分异构体(0.634 9)对第三主成分影响较大(其余成分的载荷值信息见中国知网增强出版附件表 S1)。结合各成分峰面积结果发现,在第 1 类南五味子中,五味子酯甲峰面积高于第 3 类;在第 2 类南五味子中,五味子酯甲、五味子甲素、安五脂素峰面积均高于第 1、3 类南五味子;在第 3 类南五味子中,安五脂素、五味子甲素和戈米辛 G 同分异构体的峰面积高于第 1 类。将主成分分析结果结合聚类热图可知,五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素是反映南五味子质量的代表性化合物。

2.8 网络药理学研究

2.8.1 南五味子活性成分及其潜在靶点筛选

由 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定了南五味子中 37 个化学成分,导入 SwissADME 平台(<http://www.swissadme.ch/>)以筛选活性成分,筛选标准:①胃肠道吸收为高;②在 Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge 类药性规则评价中,至少有 2 项符合评价规则。将筛选后的成分通过 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和 Similarity Ensemble Approach 数据库(<https://sea.bkslab.org/>)查找作用

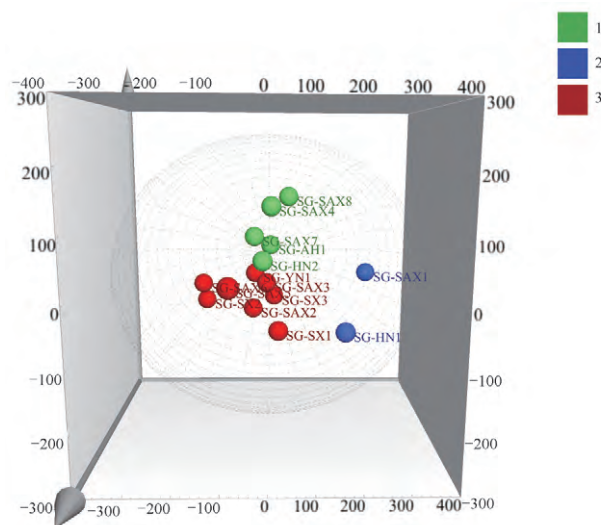


图 4 不同产地南五味子的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of Schisandrae Sphenantherae Fructus Samples from different regions

靶点^[3]。其中有 3 个成分没有对应靶点,故舍去。其余戈米辛 S、五味子酯戊等 34 个成分得到相关靶点 3 762 个,去除重复后得 720 个成分作用靶点。以“chemical and drug induced liver injury”为关键词,在比较毒理基因组数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>)中检索得到药源性肝损伤疾病靶点 92 078 个,筛选相关性得分大于中位数的靶点后得到 42 个疾病靶点。利用 Venny 2.1.0 平台(<https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)筛选二者的共同靶点,得到 18 个可能与南五味子治疗 DILI 的潜在作用相关的靶点。用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)规范靶点基因名,得到 UniProt ID 及对应靶蛋白名称,见表 2。

2.8.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络图的构建

将南五味子的 18 个治疗 DILI 的靶点导入 STRING 11.5 数据库(<https://cn.string-db.org/>),预测蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,设定物种为“Homo sapiens”,最小互作分数为 0.700,隐藏网络中没有相互作用的单一靶点,见图 5。图中节点代表作用靶点,边代表靶点之间的关联,边越粗,关联越大;共有 18 个节点,61 条边,平均节点度为 6.78,平均局部聚类系数为 0.664。

2.8.3 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

将共同靶点导入 DAVID 数据库(<https://>

表 2 与南五味子治疗药源性肝损伤作用有关的靶点信息

Table 2 Targets information related to the treatment of drug-induced liver injury of Schisandrae Sphenantherae Fructus

No.	UniProt 号	靶蛋白	靶基因	靶点分类
1	P31749	serine/threonine-protein kinase AKT	AKT1	激酶
2	P10415	apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	其他离子通道
3	P42574	caspase-3	CASP3	蛋白酶
4	Q14790	caspase-8	CASP8	蛋白酶
5	P24385	cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1	CCND1	激酶
6	P10145	interleukin-8	CXCL8	分泌蛋白
7	P04798	cytochrome P450 1A1	CYP1A1	细胞色素 P450
8	P08684	cytochrome P450 3A4	CYP3A4	细胞色素 P450
9	P01100	proto-oncogene c-Fos	FOS	转录因子
10	P05412	transcription factor Jun	JUN	转录因子
11	P28482	MAP kinase ERK2	MAPK1	激酶
12	P27361	MAP kinase ERK1	MAPK3	激酶
13	Q16236	nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NFE2L2	转录因子
14	P35228	nitric oxide synthase, inducible	NOS2	酶
15	P15559	quinone reductase 1	NQO1	酶
16	P37231	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	核受体
17	P35354	cyclooxygenase-2	PTGS2	氧化还原酶
18	P01375	TNF-alpha	TNF	分泌蛋白

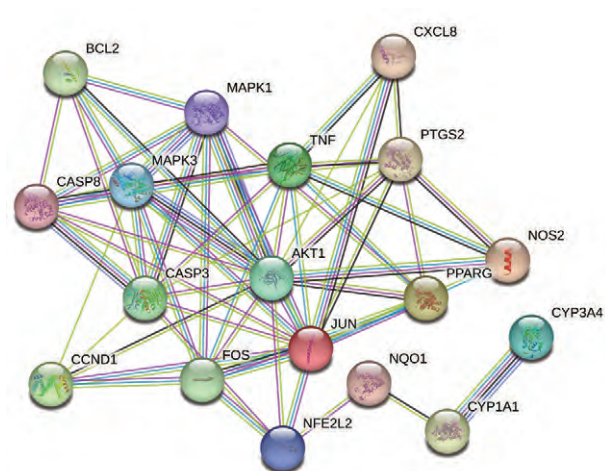


图 5 南五味子保肝作用靶点的 PPI 图

Fig.5 PPI network of Schisandrae Sphenantherae Fructus

david.ncicrf.gov/home.jsp) 进行 GO 和 KEGG 通路分析,选择物种为“*Homo sapiens*”,利用微生信平台进行可视化分析。从生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF) 3 个方面进行 GO 功能分析,以 $P<0.05$ 筛选结果。结果表明,BP 条目有 167 个,主要涉及老化、对药物的反应、对脂多糖的反应、对凋亡过程的正向调节、对活性氧的细胞应答、对外源性物质刺激的反应等; CC 条目有 17 个,主要涉及

大分子复合物、核质、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物、细胞液、细胞质基质、小窝、转录因子 AP-1 复合物等; MF 条目有 34 个,主要为酶结合、相同蛋白结合、血红素结合、大分子结合、转录因子结合等。对排名靠前的各 10 个 BP、CC、MF 条目绘制条形图(条形图见中国知网增强出版附件图 S1)。KEGG 通路富集分析共有 123 条通路,将排名前 20 条通路以气泡图展示(气泡图见中国知网增强出版附件图 S2)。这些通路涉及脂质和动脉粥样硬化、癌症通路、乙型肝炎、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子(TNF) 信号通路、细胞凋亡、Toll 样受体信号通路等。

2.8.4 “成分-靶点-通路”网络构建

为进一步明确南五味子各成分的有效性,将成分、关键靶点、信号通路进行联合分析,运用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“成分-靶点-通路”的网络关系图。信息网络中共包含 72 个节点和 348 条边。矩形代表南五味子中的化学成分(34 个),菱形代表靶点(18 个),V 形代表南五味子治疗药源性肝损伤的信号通路(20 个)。使用 Network Analyser 插件计算度值(degree)、介数中心性(betweenness centrality)、接近中心性(closeness centrality) 指标,选择 3 个指标值均大于中位

数以上的成分作为核心成分(具体数值见中国知网增强出版附件表 S2)。南五味子主要作用于 AKT1、MAPK1、MAPK3、CYP1A1、CYP3A4、PTGS2、NQO1 等 18 个作用靶点,以上靶点涉及的酶有激酶、细胞色素酶、氧化还原酶等,通过 IL-17、TNF、Toll 样受体信号通路等发挥保肝作

用,见图 6。拓扑分析获得安五脂素、五味子酯丙、顺芷酰戈米辛 P、戈米辛 S、longipedlactone B、戈米辛 G、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、戈米辛 E、五味子酯丁、epigomisin O、戈米辛 K1/K2、pregomisin 共 14 个是南五味子治疗药源性肝损伤的核心成分。

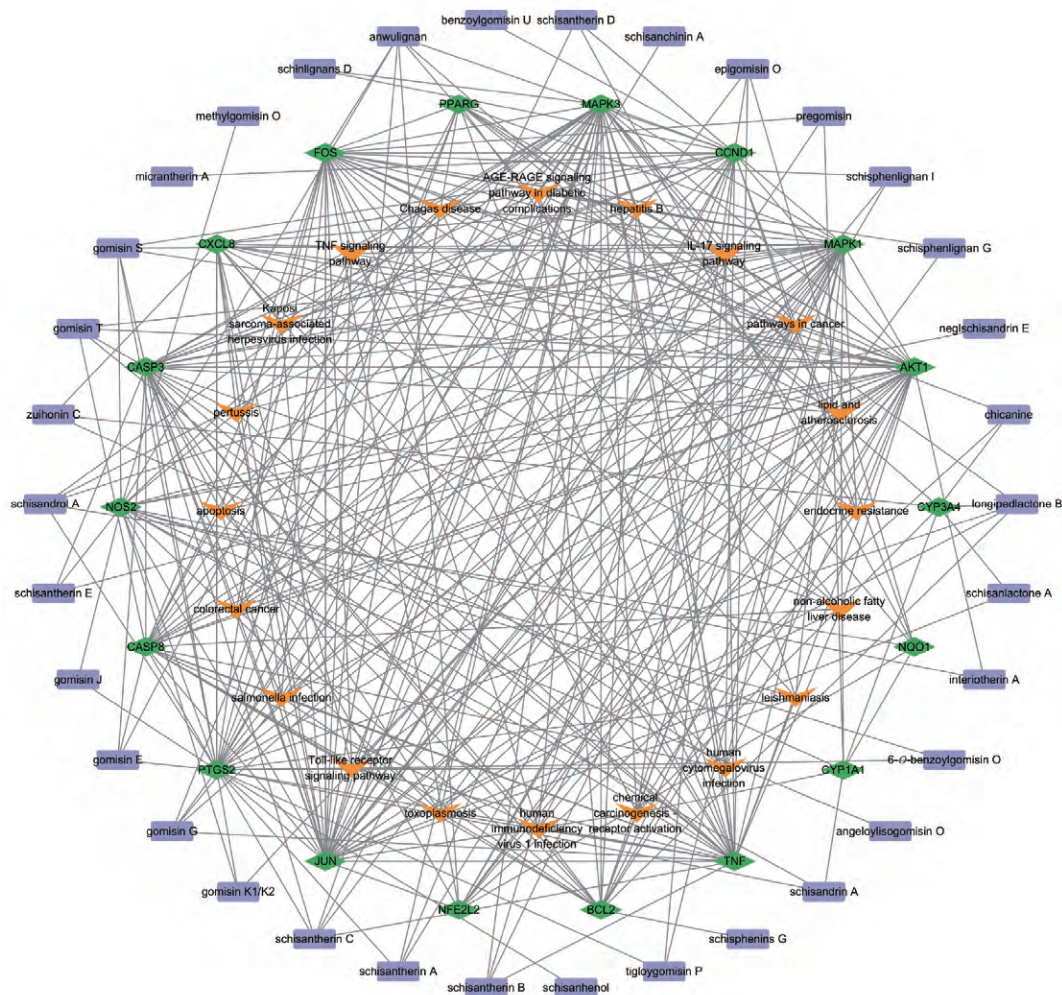


图 6 “成分-靶点-通路”网络可视化

Fig.6 Visualization of "compound-target-pathway" network

2.9 质量标志物的确定

聚类分析和主成分分析筛选出能反映南五味子质量差异的 3 个代表性化合物,为五味子甲素、安五脂素、五味子酯甲,与 LIU H 等^[2]通过多元统计学分析筛选出的五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素是南五味子化学成分标志物的研究结果一致。网络药理学筛选出能代表南五味子保肝作用的 14 个化

合物,依次为安五脂素、五味子酯丙、顺芷酰戈米辛 P、戈米辛 S、longipedlactone B、戈米辛 G、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、戈米辛 E、五味子酯丁、epigomisin O、戈米辛 K1/K2、pregomisin。综上所述,确定南五味子治疗药源性肝损伤的质量标志物为安五脂素、五味子酯甲和五味子甲素。以下开展了这 3 个成分的含量测定研究。

2.9.1 含量测定的方法学考察

2.9.1.1 线性关系 取五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素的单一对照品储备液,依次稀释 2、5、10、20、50、100 倍,按 2.3 项下色谱条件进样测定。以

对照品进样量(μg) 为横坐标,对应的待测成分平均峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。以信噪比为 3 : 1 得到检测限(LOD),信噪比为 10 : 1 得到定量限(LOQ),见表 3。

表 3 3 种成分的线性方程、相关系数、线性范围、检测限(LOD) 和定量限(LOQ)

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, linear range, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of the three components

成分	线性方程	R^2	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
五味子酯甲 ¹⁾	$y=3\,000\,992x+505.814$	1.000	1.33~129.6	0.66	1.33
安五脂素 ²⁾	$y=2\,827\,941x+272.064$	0.999 9	2.5~125.0	1.23	2.46
五味子甲素 ¹⁾	$y=4\,971\,203x+5\,506.098$	1.000	1.6~512.0	0.41	0.82

注: ¹⁾ 254 nm 下检测; ²⁾ 280 nm 下检测。

2.9.1.2 精密度试验 取南五味子样品(SG-SX2),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,记录待测成分峰面积,计算供试品溶液中五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素峰面积的 RSD 分别为 0.78%、0.84%、0.70%,表明该仪器精密度良好。

2.9.1.3 稳定性试验 取南五味子样品(SG-SX2),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录对照品峰面积,计算供试品溶液中五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素峰面积的 RSD 分别为 0.74%、0.99%、0.72%,表明南五味子供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9.1.4 重复性试验 取南五味子样品(SG-SX2) 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定。供试品溶液中五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素含量的 RSD 分别为 1.1%、2.5%、1.4%,表明该方法的重复性良好。

2.9.1.5 加样回收率试验 取已知含量的南五味子溶液 9 份,分成 3 组,每组 3 份,根据五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素含量按 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1 的量添加五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录峰面积。供试品溶液中五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素的加样回收率分别为 94.20% ~ 100.3%、98.50% ~ 105.6%、97.10% ~ 101.4%,RSD 分别为 2.2%、2.4%、1.3%,表明该方法准确度良好。

2.9.2 含量测定

取 15 批南五味子药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,外标一点法计算五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素的含量,见表 4。15 批南五味子药材中的五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素的质量分数分别为 0.20%~0.57%、0.13%~0.33%、0.42%~0.70%,符合 2020 年版《中国药典》规定。在地理分布上,陕西和山西大致划为秦岭以北地区,安徽、河南、云南划为秦岭以南地区,秦岭以北地区的五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素平均质量分数分别为 0.326 5% ± 0.116 7%、0.226 7% ± 0.066 8%、0.532 3% ± 0.067%,秦岭以南地区的五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素平均质量分数分别为 0.364 8% ± 0.057 4%、0.225 3% ± 0.074 2%、0.586 4% ± 0.076 9%。秦岭以南地区的南五味子中五味子酯甲和五味子甲素的含量高于秦岭以北地区,安五脂素含量在这 2 个区域没有明显差异,这与高建平、宋小妹等研究报道相符^[13-14]。

3 讨论

本研究建立了 15 批南五味子药材的 UPLC 指纹图谱,指纹图谱间相似度均大于 0.9,18 个共有峰面积占总峰面积 90% 以上,利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定结果确认 18 个共有峰;以上述各共有峰的峰面积为变量,运用聚类分析和主成分分析筛选出 3 个反映南五味子药材质量的代表性成分。进一步结合网络药理学研究,以 SwissADME 数据库筛选活性成分,SwissTargetPrediction 数据库预测成分靶点,

表 4 不同产地南五味子中 3 种木脂素类成分的含量

Table 4 The content of three kinds of lignans in Schisandrae Sphenantherae Fructus samples from different regions %

样品编号	五味子酯甲	安五脂素	五味子甲素
SG-AH1	0.410 5±0.001 1	0.212 2±0.000 4	0.541 6±0.002 0
SG-HN1	0.390 9±0.000 7	0.330 7±0.000 1	0.700 7±0.001 6
SG-HN2	0.376 4±0.005 0	0.200 9±0.002 2	0.540 5±0.005 9
SG-SAX1	0.467 0±0.004 1	0.334 0±0.004 2	0.684 2±0.009 3
SG-SAX2	0.252 4±0.004 3	0.260 5±0.003 0	0.531 0±0.006 0
SG-SAX3	0.301 5±0.004 1	0.200 4±0.002 4	0.541 6±0.006 5
SG-SAX4	0.495 8±0.005 2	0.132 5±0.001 7	0.525 0±0.004 1
SG-SAX5	0.318 4±0.004 0	0.147 0±0.001 6	0.505 8±0.006 3
SG-SAX6	0.223 4±0.002 0	0.236 9±0.001 2	0.424 0±0.003 4
SG-SAX7	0.397 3±0.006 6	0.184 2±0.004 2	0.503 3±0.009 7
SG-SAX8	0.567 4±0.040 2	0.163 8±0.019 5	0.558 1±0.012 4
SG-SX1	0.289 8±0.004 8	0.309 1±0.004 8	0.562 2±0.008 1
SG-SX2	0.201 3±0.002 0	0.242 0±0.001 0	0.455 8±0.003 0
SG-SX3	0.334 9±0.031 1	0.282 8±0.011 6	0.564 8±0.016 0
SG-YN1	0.281 3±0.002 6	0.157 3±0.001 7	0.562 9±0.005 8

CTD 数据库收集疾病靶点, DAVID 数据库预测靶点作用通路, Cytoscape 3.9.1 软件建立“成分-靶点-通路”网络; 对“成分-靶点-通路”网络进行拓扑分析筛选出 13 个成分与南五味子保肝功效相关。将质量差异性成分与功效相关成分关联, 最终确认五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素为南五味子治疗药源性肝损伤的潜在质量标志物。

本研究分别考察了不同提取方式(超声法、冷浸法、回流法)、不同提取溶剂(水; 纯甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇、40% 甲醇、20% 甲醇; 无水乙醇、80% 乙醇、60% 乙醇、40% 乙醇、20% 乙醇)、不同提取时间(10、20、30、40、50、60 min) 和不同料液比(g:mL)(1:20、1:40、1:100、1:200、1:400) 对南五味子中木脂素类成分含量的影响, 结果表明南五味子的最优提取条件是以无水乙醇作为提取溶剂, 料液比是 1:40, 超声提取时间是 10 min。

在网络药理学研究中, 分别比较了 DrugBank(<https://go.drugbank.com/>)、TTD(<https://db.idr-blab.net/ttd/>)、OMIM(<https://www.omim.org/>) 及 GeneCards(<https://www.genecards.org/>) 等疾病数据库获取南五味子治疗 DILI 作用靶点。发现选择的数据库不同, 获得的疾病靶点也不相同。在 Drug-Bank 与 TTD 数据库中均未检索到药源性肝损伤的疾病靶点。在 CTD、GeneCards、OMIM 中检索药源

性肝损伤, 分别获得 92 078、3 494、355 个疾病靶点; 在 CTD 数据库筛选出南五味子治疗 DILI 的质量标志物为安五脂素、五味子酯甲、五味子甲素, 在 GeneCards 数据库筛选出的质量标志物为安五脂素, 在 OMIM 数据库中未筛选得到质量标志物。CTD 数据库主要收集化学药物作用于人体后, 与药物产生关联的基因、表型、分子、疾病等信息^[8-3], 在致病物质的网络药理学研究中, 学者们多选择 CTD 数据库开展研究。DAVIS A P 等^[3] 运用并分析 CTD 数据库中暴露于砷类化合物时受影响的基因数据, 揭示了砷类化合物致病的分子机制。黄洪等^[4] 通过 CTD 数据库预测了何首乌肝毒性成分的作用靶点。王志强等^[4] 通过 CTD 数据库预测了雷公藤致卵巢毒性的候选靶点。鉴于此, 本论文选择 CTD 数据库作为获取药源性肝损伤的疾病靶点数据库。

联苯环辛烯类木脂素为五味子属药用植物 Q-marker 的重要候选成分^[4]。WANG H 等^[4] 研究发现五味子酯甲能抑制转录生长因子 β 激活激酶 1 (TAK1) 激活, 下调肝组织和肝星状细胞中 TAK1/MAPK 和 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达, 显著降低血清和肝组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的水平, 减少血清转氨酶、羟脯氨酸水平, 降低肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白和胶原蛋白 1A1 的表达, 减轻硫代乙酰胺诱导的小鼠肝损伤。安五脂素是南五味子区别于五味子的特征性成分^[4], 它能减少肝内 caspase-3 含量, 增加受损细胞的存活率, 上调肝组织中 p38 MAPK、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 和过氧化氢酶 (HO-1) 的表达, 增加外周血和肝组织中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性, 恢复抗氧化作用, 减轻 D-半乳糖诱导的肝损伤^[4]。邱宏涛等^[4] 的实验结果表明, 五味子甲素能抑制脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、前列腺素 (PGE2) 的分泌, 同时减少诱导型一氧化氮合酶 (NOS2) 与环氧酶 2 (PTGS2) 蛋白的表达, 具有较强的抗炎活性。这些药理研究结果证明了本研究选择五味子酯甲、安五脂素、五味子甲素作为南五味子治疗药源性肝损伤质量标志物的科学性和合理性。

网络药理学研究表明, 南五味子治疗药源性肝损伤的主要通路涉及有脂质和动脉粥样硬化、癌症通路、乙型肝炎、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、

肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、细胞凋亡、Toll样受体信号通路等。肝损伤常伴有炎症反应,细胞因子参与了DILI发展过程中的炎症诱导及免疫反应,在DILI早期临床诊断、预防和治疗等方面具有重要意义。DILI患者血清中的炎症细胞因子TNF- α 、IL-17和IL-6水平显著升高^[47],提示TNF、IL-17信号通路在DILI的发展中起着关键作用。肝纤维化、肝硬化、肝衰竭及癌变是最常见的肝病进展形式^[48],而且抗肿瘤药、心血管药分别占药源性肝损伤病因的8.34%、2.98%^[49],因此在通路富集结果中存在脂质和动脉粥样硬化通路和癌症通路。癌症通路也为姜海慧等^[50]富集得到的南五味子发挥保肝作用的机制通路之一。富集到癌症通路上的关键靶点有EGFR、MAPK1、MAPK3、NQO1、NOS2、PTGS2、STAT3、MMP9等。FAN X等^[10]报道五酯片(即南五味子醇提物)可通过增加Nrf2、HO-1和NQO1等靶基因的蛋白表达来保护对乙酰氨基酚诱导肝损伤的小鼠肝组织。据报道^[11],南五味子醇提物(五酯胶囊)还可预防和治疗利福平、异烟肼、5-氟尿嘧啶、顺铂、他克莫司、他汀类等药物引起的肝损伤。从“成分-靶点-通路”网络图中可见,南五味子中安五脂素、五味子酯丙、顺芷酰戈米辛P、戈米辛G、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素等成分作用于MAPK1、MAPK3、CYP1A1、CYP3A4、AKT1、PTGS2、NQO1等靶点,通过IL-17通路、TNF通路、癌症通路和乙肝病毒等通路,以多靶点、多通路的方式发挥对药源性肝损伤的治疗作用。

综上,本研究采用指纹图谱结合多元统计学分析筛选了南五味子药材的质量差异性成分,在此基础上又采用UPLC-Q-TOF-MS结合网络药理学预测了南五味子保肝的增效成分,最终确认南五味子潜在的治疗DILI的质量标志物为五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素。但由于网络药理学是一种通过体外计算模拟中药成分作用于体内生物系统的技术,无法提供作用成分的量效关系,因此预测所得的五味子酯甲、安五脂素和五味子甲素对南五味子治疗药源性肝损伤的贡献程度仍有待进一步通过动物实验和细胞实验加以验证。

参考文献

- [1] BJÖRNSSON E S. Epidemiology, predisposing factors, and outcomes of drug-induced liver injury [J]. Clin Liver Dis, 2020, 24(1): 1.
- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: drug-induced liver injury [J]. J Hepatol, 2019, 70(6): 1222.
- [3] 匡子禹. 中医药治疗药物性肝损伤的系统评价及用药规律分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [4] 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: 255.
- [5] 张震, 边吉来, 张斌. 五酯胶囊治疗化疗所致药物性肝损伤的临床研究 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(2): 141.
- [6] 朱红欣. 五酯片治疗轻度药物性肝损伤的效果观察 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(28): 85.
- [7] 陈永芳, 王志刚, 任鹏飞, 等. 五酯滴丸联合双环醇片治疗抗结核药所致肝功能损伤的临床疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(28): 10.
- [8] JIANG Y, FAN X, WANG Y, et al. Hepato-protective effects of six schisandra lignans on acetaminophen-induced liver injury are partially associated with the inhibition of CYP-mediated bioactivation [J]. Chem Biol Interact, 2015, 231: 83.
- [9] FAN X, JIANG Y, WANG Y, et al. Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of NRF2-ARE and p53/p21 pathways [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42(12): 1982.
- [10] FAN X, CHEN P, JIANG Y, et al. Therapeutic efficacy of Wuzhi Tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on acetaminophen-induced hepatotoxicity through a mechanism distinct from *N*-acetylcysteine [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(3): 317.
- [11] ZHU P, LI J, FU X, et al. Schisandra fruits for the management of drug-induced liver injury in China: a review [J]. Phytomedicine, 2019, 59: 1.
- [12] ZENG H, LI D, QIN X, et al. Hepatoprotective effects of *Schisandra sphenanthera* extract against lithocholic acid-induced cholestasis in male mice are associated with activation of the pregnane X receptor pathway and promotion of liver regeneration [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(3): 337.
- [13] 高建平, 王彦涵, 郁韵秋, 等. 南五味子木脂素成分的HPLC含量测定及其变异规律 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 28.
- [14] 宋小妹, 考玉萍. 不同产区南五味子中木脂素含量测定 [J]. 陕西中医, 2004, 25(7): 645.
- [15] 杨洁, 段金彪, 李国龙, 等. 不同产地南五味子中木脂素分析研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4647.
- [16] 王金叶, 刘恒, 黄德福, 等. LC-MS/MS法测定不同产地南五味子3种木脂素含量 [J]. 海峡药学, 2018, 30(8): 38.
- [17] 杨燕云, 陈靓, 许亮, 等. 木脂素类成分测定法鉴别南北五味子 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(10): 69.
- [18] YANG K, QIU J, HUANG Z, et al. A comprehensive review of ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils [J]. J Ethnopharmacol,

- 2022, 284: 1.
- [19] WEI H, SUN L, TAI Z, et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera* [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(1): 97.
- [20] LIU H, ZHANG J, LI X, et al. Chemical analysis of twelve lignans in the fruit of *Schisandra sphenanthera* by HPLC-PAD-MS [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(13): 1234.
- [21] 邓力,王浩兵,严书超,等.超高效液相色谱法同时测定南、北五味子中的7种木脂素含量 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(12): 1158.
- [22] WANG J, CHEN Y, LIN M, et al. Development of a quality evaluation method for Fructus Schisandrae by pressurized capillary electrochromatography [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(3): 381.
- [23] 马新飞,郭盛,朱邵晴,等.基于 HPLC 指纹图谱及多元功效成分定量分析的南五味子药材质量标准提升研究 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(3): 293.
- [24] 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.
- [25] 戚华文,徐鑫,温柔,等.基于化学模式识别技术的枳实 HPLC 定量指纹图谱研究 [J]. *分析测试学报*, 2021, 40(1): 72.
- [26] 戚华文,徐鑫,高德嵩,等.吴茱萸 HPLC 指纹图谱的建立及基原鉴别研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4341.
- [27] 张淑娟,张贵贵,李东辉,等.基于网络药理学及指纹图谱的黄芪质量标志物预测 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2691.
- [28] 曲中原,吴双,郑岩,等.基于指纹图谱和网络药理学的南柴胡质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2678.
- [29] 李媚,陈盛君,王协和,等.广藿香 UPLC 指纹图谱研究及基于网络药理学的广藿香潜在质量标志物预测 [J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2665.
- [30] 姜海慧,唐凯,张化为,等.基于网络药理学研究南五味子对肝损伤的保护作用机制分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(5): 759.
- [31] 黄得栋.南五味子药材商品规格等级与其内在质量的相关性研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [32] 李伟,刘亚丽,宋永贵,等. UPLC-Q-TOF-MS^E 结合 OPLS-DA 模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2212.
- [33] 袁军,付平,王野.南五味子种子中木脂素类成分的高效液相色谱-电喷雾电离-质谱分析 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(5): 565.
- [34] HUANG X, SONG F R, LIU Z Q, et al. Comprehensive quality evaluation of Fructus Schisandrae using electrospray ionization ion trap multiple-stage tandem mass spectrometry coupled with chemical pattern recognition techniques [J]. *Analyst*, 2011, 136(20): 4308.
- [35] ZHOU Y, HUANG S X, PU J X, et al. Ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometric procedure for qualitative and quantitative analyses of nortriterpenoids and lignans in the genus *Schisandra* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 916.
- [36] 阮振靓,邓欣祺,陈倩,等.基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS 和分子网络技术快速鉴定五味子中联苯环辛二烯型木脂素类化学成分 [J]. *中南药学*, 2022, 20(3): 499.
- [37] 赵文燕,向茜,王蟬,等. UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学和实验验证分析黄连水炒吴茱萸治疗慢性结肠炎的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(19): 5316.
- [38] DAVIS A P, WIEGERS T C, JOHNSON R J, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): update 2023 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D1257.
- [39] 闫小妮,田国祥,贺海蓉,等. CTD 数据库架构及数据获取查询与提取方法 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(8): 905.
- [40] 黄洪,熊万娜,汤小军,等.基于网络毒理学和分子对接筛选何首乌致肝毒性成分和 CYP450 抑制剂 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z2): 2863.
- [41] 王志强,宫彩霞,李振彬.基于网络药理学和分子对接技术探讨雷公藤卵巢毒性的机制 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(1): 62.
- [42] 任伟光,张翠英.五味子的研究进展及质量标志物(Q-marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(11): 3110.
- [43] WANG H, CHE J, CUI K, et al. Schisantherin A ameliorates liver fibrosis through TGF- β 1 mediated activation of TAK1/ MAPK and NF- κ B pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2021, 88: 1.
- [44] 姜泽静.南五味子质量标准与鱼腥草中黄酮类成分的含量测定研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [45] GAO J, YU Z, JING S, et al. Protective effect of anwulignan against D-galactose-induced hepatic injury through activating p38 MAPK-Nrf2-HO-1 pathway in mice [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 1859.
- [46] 邱宏涛,赵筱萍,李正,等.基于网络药理学的五味子木脂素类主要药效作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(3): 522.
- [47] 刘海涛,张雷鸣,李经纬.药物性肝损伤患者临床与病理学特征分析 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2022, 25(4): 508.
- [48] 王宇明,于乐成.肝脏炎症及其防治专家共识 [J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(2): 152.
- [49] WANG J, SONG H, GE F, et al. Landscape of DILI-related adverse drug reaction in China Mainland [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(12): 4424.

责任编辑 张宁宁