

杨黎宇, 李家伟, 李燕玲, 等. 基于谱效关系和网络药理学的穿心莲抗氧化物质基础研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 55-62.

YANG L Y, LI J W, LI Y L, et al. Fundamental study of antioxidant substances in *Andrographis paniculata* based on spectral efficacy relationship and network pharmacology [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 55-62.

## 基于谱效关系和网络药理学的穿心莲抗氧化物质基础研究

杨黎宇, 李家伟, 李燕玲, 胡诗雨, 李健\*

(福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 为研究穿心莲 HPLC 指纹图谱及体外抗氧化作用的谱效关系, 构建穿心莲抗氧化作用网络, 整合谱效关系和网络药理学数据, 预测穿心莲抗氧化作用的物质基础。采用 HPLC 法建立 10 批次穿心莲的指纹图谱; 测定穿心莲对大鼠肝细胞 (BRL-3A) 中活性氧 (ROS) 及丙二醛 (MDA) 含量的影响; 采用灰色关联分析法进行谱效关联分析, 初步确定抗氧化成分; 结合网络药理学, 预测抗氧化候选成分; 根据分析结果, 探究穿心莲抗氧化成分。结果: 本研究建立了穿心莲指纹图谱, 共标定 11 个共有峰; 根据灰色关联度大小排序, 9、7、10、5、1、6、8、3 号共有峰与 BRL-3A 细胞 ROS 含量有较高关联度; 9、7、10、5、1、6、8、3 号共有峰与 BRL-3A 细胞 MDA 含量有较高关联度; 网络药理学推测穿心莲抗氧化成分主要包括 14-脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲苷 A 等 25 个; 整合分析确定穿心莲抗氧化成分为共有峰 9、7、10、5、1、6、8、3 代表的成分及 14-脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯等。综上, 穿心莲抗氧化药效是多种成分共同作用的结果, 穿心莲的活性成分可能主要通过细胞凋亡途径, 作用于丝/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1)、内皮生长因子受体 (EGFR)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3) 等靶点发挥其药理作用。本研究可对穿心莲抗氧化的物质基础研究提供参考。

**关键词:** 穿心莲; 抗氧化; HPLC 指纹图谱; 谱效关系; 网络药理学; BRL-3A 细胞

**中图分类号:** S853. 7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)06-0055-08

## Fundamental study of antioxidant substances in *Andrographis paniculata* based on spectral efficacy relationship and network pharmacology

YANG Liyu, LI Jiawei, LI Yanling, HU Shiyu, LI Jian\*

(College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** This study was to explore the HPLC fingerprint of *Andrographis paniculata* and the relationship between its spectrum and efficacy *in vitro*, to construct a network of the antioxidant effect of *Andrographis paniculata*, and to integrate the spectrum and the network pharmacology information, for purpose of predicting the material basis of oxidation resistance of *Andrographis paniculata*. The fingerprints of 10 batches of *Andrographis paniculata* were established by HPLC, and the contents of ROS and MDA in BRL-3A cells treated with *Andrographis paniculata* were determined using a microplate reader, and the antioxidant ingredients were preliminarily determined by grey correlation analysis. The candidate components of antioxidants were predicted in combination of network pharmacology in order to analyze the antioxidant components of *Andrographis paniculata*. The results were that the fingerprint of *Andrographis paniculata* was established and 11 common peaks were calibrated. The grey correlation analysis showed that the common peaks of 9, 7, 10, 5, 1, 6, 8 and 3 had a higher relevance with the ROS content of BRL-3A cells, and that the common peaks of 9, 10, 5, 7, 6, 8, 1 and 3 had a higher relevance with the MDA content of BRL-3A cells. According to the network pharmacology, 25 components, including 14-deoxyandrographolide, neo-andrographolide, and rographidine A, were speculated to be the antioxidant components of *Andrographis paniculata*. The integrated analysis suggested that the antioxidant components of *Andrographis paniculata* were 9, 7, 10, 5, 1, 6, 8 and 3 common peaks, and 14-deoxyandrographolide, neo-andrographolide, and so on. Taken together, the antioxidant effect of *Andrographis paniculata* was believed to be attributed to the interaction of various components. The active ingredients of *Andrographis paniculata* might exert their pharmacological effects mainly through the apoptotic pathway, acting on AKT1, EGFR, CASP3 and other targets. The results provided reference for future research on the material basis of the

收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2024-03-21

基金项目: 福建省科技重大专项资助项目 (2021NZ029023); 福建农林大学科技创新专项基金 (CXZX2016013)

第一作者: 杨黎宇, 男, 硕士

\* 通信作者: 李健, 副教授, 主要从事兽医中药药理学研究, E-mail: lijian@fafu.edu.cn。

antioxidant effect of *Andrographis paniculata*.

**Keywords:** *Andrographis paniculata*; oxidation resistance; HPLC fingerprint; spectral efficacy relationship; network pharmacology; BRL-3A cells

穿心莲 (*Andrographis paniculata*) 为爵床科穿心莲属植物, 在我国主产于广西、广东、福建和海南等地, 干燥的地上部分入药, 味苦, 性寒, 归心、肺、大肠、膀胱经, 具有清热解毒、凉血、消肿等功效<sup>[1]</sup>。现代研究显示穿心莲的活性成分主要是二萜内酯类和黄酮类<sup>[2]</sup>。研究表明穿心莲内酯对 MN 大鼠肾纤维化具有抑制作用, 通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路和 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路, 进而抑制炎症反应和细胞外基质生成<sup>[3]</sup>。穿心莲内酯抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖活性, 对 HepG2 肝癌细胞的凋亡有促进作用; 能抑制 HepG2 肝癌细胞的迁移<sup>[4]</sup>。但穿心莲抗氧化物质基础尚待深入研究。

本研究开展基于 10 个批次的穿心莲指纹图谱研究及其对大鼠肝脏 BRL-3A 细胞的抗氧化作用研究, 将指纹图谱和抗氧化指标进行谱效相关的灰色关联分析, 初步确定抗氧化的物质基础; 然后利用 TCMSP、PharmMapper、SwissTargetPrediction 等数据库获取穿心莲抗氧化的相关靶点, 构建穿心莲“成分-靶点-通路-功能”网络, 推测其发挥抗氧化作用的主要活性成分及其可能的分子机制。将研究结果进行整合分析, 预测穿心莲抗氧化的潜在物质基础, 旨在建立一种相对快捷、准确的中药活性物质基础研究策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

穿心莲样品共 10 份, 购自全国不同产地, 分别命名为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10, 样品信息见表 1。基原经鉴定为爵床科植物穿心莲 (*Andrographis paniculata* [Burm. f.] Nees), 按 2020 年版《中国药典》中的穿心莲进行项下检查, 符合各项规定。将 40 °C 干燥至恒重的穿心莲碎后过筛, 备用。穿心莲内酯对照品 (批号: 5508-58-7, 品牌: 源叶, 含量: 98%), 脱水穿心莲内酯对照品 (批号: 134418-28-3, 品牌: 源叶, 含量: 98%), 新穿心莲内酯对照品 (批号: 27215-14-1, 品牌: 源叶, 含量: 98%) 购自中国药品生物制品检验所, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。DMEM (High Glucose) 培养液和 0.25% 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司, 胎牛血清和 DCFH-DA 均购自 Gibco 公司, 硫代乙酰胺 (TAA) 购自 Sigma 公司, 二甲基亚砜 (DMSO) 及 4-四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 均购自 Solarbio 公司, 丙二醛 (MDA) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。BRL-3A 细胞购自中科院上海生命科学研究细胞资源中心 (目录号: GNR 10)。

表 1 穿心莲样品信息

样品编号	来源	样品编号	来源
S1	广东省广州市白云山制药有限公司	S6	山西省大同市广盛原中医药有限公司
S2	河北省保定市保定中药制药股份有限公司	S7	浙江省宁波市宁波药材股份有限公司
S3	辽宁省大连市大连药材集团有限公司	S8	宁夏回族自治区同心县宁夏仁德堂医药药材有限公司
S4	甘肃省平凉县平凉药业有限责任公司	S9	陕西省西安市陕西地道中药材种植有限公司
S5	海南省海口市海南康农堂中药有限公司	S10	福建省福州市福建省药材有限责任公司

### 1.2 穿心莲 HPLC 指纹图谱的建立

色谱条件: 色谱柱 Inertsil ODS-SP (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱程序见表 2; 检测波长 215 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 20  $\mu$ L, 在 60 min 内被洗脱完毕。

对照品溶液: 分别精密称取穿心莲内酯 6.81 mg、脱水穿心莲内酯 5.42 mg 以及新穿心莲内酯 4.81 mg 至 10 mL 容量瓶中, 甲醇超声溶解, 定容至刻度线并摇匀。

供试品溶液: 精密称取穿心莲 0.5 g, 置于 25 mL

容量瓶中, 加 20 mL 甲醇, 超声提取 20 min, 放置至室温, 甲醇定容并摇匀, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜即得。

方法学考察: 脱水穿心莲内酯是穿心莲的主要成分之一, 该色谱峰峰面积较大且比较稳定, 选其作为参照物峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。精密吸取同一供试品溶液 (01#样品) 各 20  $\mu$ L, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 以考察稳定性; 分别连续 6 次进样测定, 以考察精密密度; 按上述方法分别制备供试品溶液 6 份, 进样测定, 以考察重复性。

表2 穿心莲 HPLC 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	22	78
5	25	75
30	30	70
60	45	55

样品测定：取不同批次穿心莲 10 批，分别制成供试品溶液，按照上述色谱条件测定。

相似度评价：将 10 批穿心莲指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）软件。以 S1 号样品色谱图为参照图谱，以中位数法生成对照指纹图谱。

### 1.3 10 批次穿心莲水提物对 BRL-3A 细胞存活率及抗氧化功能的影响

称取穿心莲 0.5 g，加入蒸馏水 25 mL，浸泡 5 min，4 000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜过滤，得到质量浓度为 20 mg/mL 的穿心莲水提物。

BRL-3A 细胞于 96 孔板培养 24 h 后，按照前期建立的 BRL-3A 细胞氧化应激模型处理细胞<sup>[5]</sup>，加入 10 μL 10 个批次穿心莲水提物，对照组加 10 μL DMEM 培养液，每个批次设 5 个平行孔，37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h，MTT 法检测细胞存活率。

BRL-3A 细胞于 6 孔板培养 24 h 后，进行氧化应激处理，加入 500 μL 不同批次穿心莲水提物，对照组加 500 μL DMEM 培养液，每个批次设 3 个平行孔，37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h，加入冰冷的无菌 PBS 溶液 800 μL 洗涤 2 次，再加入 10 μmol/L 的 2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯溶液 1 mL，37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 20 min，无菌 PBS 溶液洗涤 3 次，加 0.25% 胰酶 500 μL 消化，收集细胞，1 000 r/min、5 min 离心 2 次，加 500 μL PBS 溶液重悬。一部分迅速加入黑色 96 孔板中，100 μL/孔，以空白对照组（NC）的荧光强度调零，用荧光酶标仪检测各组的二氯荧光素相对荧光强度，激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm<sup>[6]</sup>；另一部分冰水浴中超声破碎，按照试剂盒说明书测定 MDA 含量。

### 1.4 谱效相关性研究

以 BRL-3A 细胞的活性氧（ROS）和 MDA 值为确定的参考序列，指纹图谱共有峰的峰面积为比较序列，采用 SPSSAU 在线分析软件（<https://spssau.com>）的“灰色关联法”模块进行数据均值化及结果分析，分辨系数取 0.5，根据灰色关联度大小确定各共有峰

对各指标的贡献度大小。

### 1.5 化学成分库的构建及靶点预测

检索中药系统药理学数据库和分析平台（TCMSP 数据库），再结合文献报道<sup>[7-12]</sup> 收集穿心莲中共计 59 个化合物，构建化学成分库。在 PharmMapper 数据库依次以化学成分名称进行检索，得到相应的靶点信息；无靶点成分再利用 PubChem 数据库查询 3D 结构，上传至 SwissTargetPrediction 数据库基于配体结构特征预测靶点。选择高匹配度的靶基因，通过 Uniprot 数据库校正这些靶点的名称，合并去重得到 624 个靶点。

### 1.6 核心靶点筛选和网络模型构建

把整合后的靶点导入 STRING 平台并设置可信度 >0.9，构建蛋白相互作用网络；然后，以连接度（Degree）≥2 倍中位数为条件初步筛选出 147 个核心靶点；再将上述靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体富集（gene ontology, GO）和信号通路分析，提取出  $P < 0.05$  且与氧化应激相关的条目，得到核心靶点。

数据文件导入 Cytoscape 3.7.2，建立核心靶点蛋白相互作用网络和穿心莲“成分-靶点-通路-功能”网络，根据靶点预测结果，筛选出成分库中作用于核心靶点的化学成分，即穿心莲发挥抗氧化作用的可能成分。

### 1.7 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，采用  $t$  检验进行显著性分析，试验数据用“平均值±标准差”表示， $P < 0.01$  表示差异极显著， $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 穿心莲 HPLC 指纹图谱

10 批次穿心莲，分别按照 1.3 的方法制成供试品溶液并测定，得到图 1 色谱。根据 10 批样品测定结果，各批样品指纹图谱的色谱峰均在 60 min 内，综合 10 批样品的色谱图，有 11 个共有峰，其中 4 号峰为穿心莲内酯峰，9 号峰为新穿心莲内酯峰，11 号峰为脱水穿心莲内酯峰，各批样品的 11 个峰总面积占总峰面积的 90% 以上，因此确定这 11 个峰为共有指纹峰，见图 2。应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统，评价 10 批样品的指纹图谱，设定时间窗宽度为 0.2 min，以中位数法生成对照指纹图谱，得到样品与对照指纹图谱之间的相似度，见表 3。

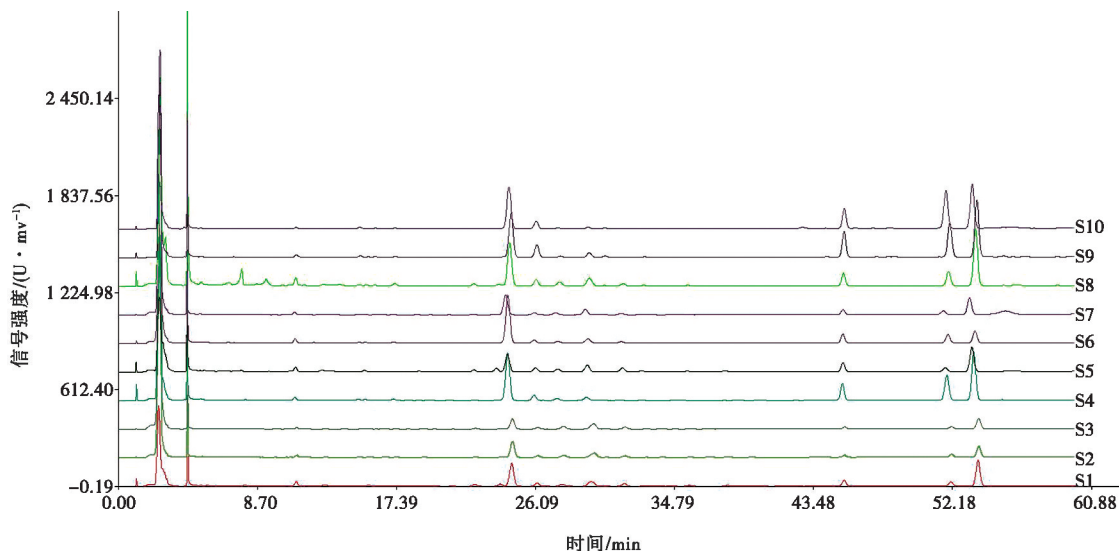
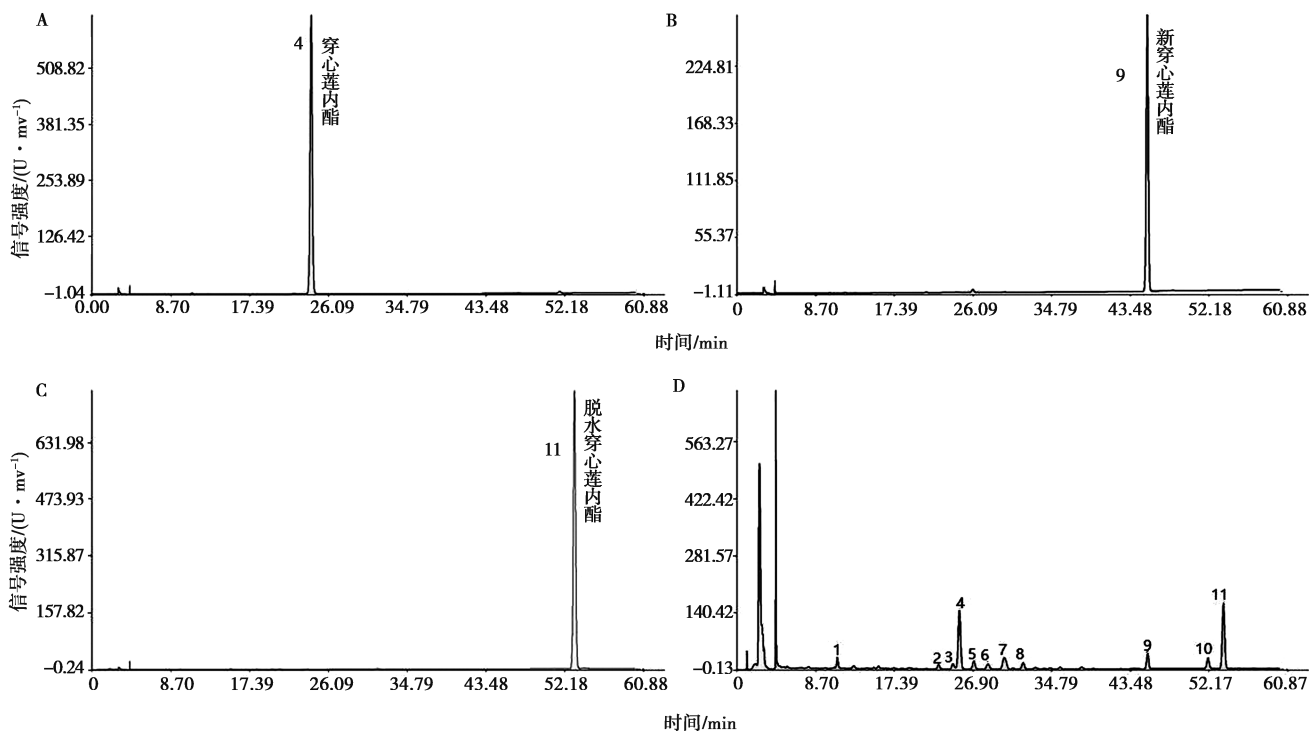


图 1 10 批次穿心莲指纹图谱



A. 穿心莲内酯峰；B. 新穿心莲内酯峰；C. 脱水穿心莲内酯峰；D. 共有指纹峰。数字代表峰号。

图 2 穿心莲指纹图谱

表 3 指纹图谱相似度结果

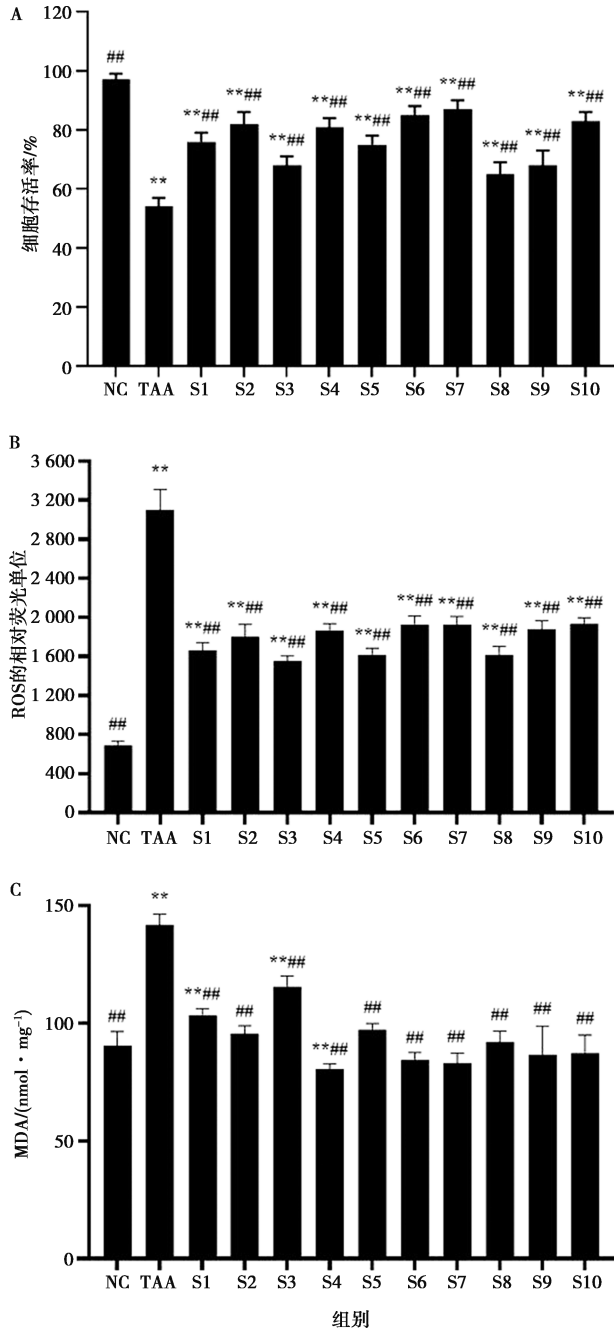
样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.919	0.988	0.990	0.918	0.830	0.975	0.986	0.857	0.867	0.898

## 2.2 穿心莲水提取物对 BRL-3A 细胞存活率及抗氧化功能的影响

MTT 结果显示，不同批次的穿心莲水提取物（20 mg/mL），作用于正常生长的 BRL-3A 细胞，细胞存

活率均  $\geq 90\%$ ，即上述样品溶液对 BRL-3A 细胞均没有毒性或毒性极小。细胞经 TAA 处理后，细胞存活率降至 54%，而不同批次穿心莲水提取物均能使细胞存活率极显著提高（图 3a）。TAA 处理使 BRL-3A

细胞 ROS 的释放和 MDA 的产生显著升高, 细胞呈现明显的氧化应激状态, 而不同批次穿心莲水提取物均能使 ROS 和 MDA 显著下降, 具有显著的抗氧化效果 (图 3a、图 3b)。



\* 与空白组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 与空白组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ); #与模型组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), ##与模型组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 3 穿心莲水提取物对 BRL-3A 细胞存活率及抗氧化功能的影响

### 2.3 谱效相关性

灰色关联分析结果见表 4, 对于 BRL-3A 细胞 ROS 生成量与指纹图谱关联分析结果显示的 9、7、

10、5、1、6、8、3 号共有峰高度相关, 关联度均大于 0.54; MDA 生成量与指纹图谱关联分析结果显示的 9、10、5、7、6、8、1、3 号共有峰高度相关, 关联度均大于 0.59。ROS 和 MDA 的谱效分析结果呈现较高的一致性, 说明共有峰 9、7、10、5、1、6、8、3 对应发挥抗氧化作用的主要成分可能是穿心莲水提取物。

表 4 穿心莲水提取物谱效灰色关联分析结果

排名	ROS		MDA	
	峰号	相关度	峰号	相关度
1	9	0.909	9	1
2	7	0.78	10	0.968
3	10	0.729	5	0.725
4	5	0.651	7	0.71
5	1	0.626	6	0.642
6	6	0.579	8	0.612
7	8	0.574	1	0.597
8	3	0.544	3	0.586
9	11	0.375	11	0.377
10	4	0.344	4	0.365

### 2.4 核心靶点的生物功能与通路富集分析

对初筛靶点进行 GO-BP 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析, 选出与氧化应激密切相关的 10 种功能和 1 条通路 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。其中, 一氧化氮代谢过程涉及的靶点基因最多。筛选出穿心莲中 Degree  $\geq 2$  倍中位数且与氧化应激相关的核心靶点 46 个。核心靶点富集结果见图 4。

表 5 核心靶点的 GO 富集和 KEGG 通路分析

类别	条目	基因数	P 值
GO_BP	氧化应激反应	8	$4.90 \times 10^{-5}$
GO_BP	氧化应激反应的内在性凋亡信号通路	3	$7.32 \times 10^{-3}$
GO_BP	细胞的氧化应激反应	4	$1.82 \times 10^{-2}$
GO_BP	细胞凋亡执行阶段	3	$8.32 \times 10^{-3}$
GO_BP	氧化还原过程	10	$7.36 \times 10^{-3}$
GO_BP	h 负调控的细胞死亡	3	$8.27 \times 10^{-3}$
GO_BP	一氧化氮生物合成过程的正向调控	15	$4.65 \times 10^{-19}$
GO_BP	一氧化氮生物合成过程	4	$1.73 \times 10^{-4}$
GO_BP	细胞对一氧化氮的反应	3	$6.38 \times 10^{-3}$
GO_BP	线粒体去极化的正向调节	2	$8.36 \times 10^{-4}$
KEGG	细胞凋亡	11	$4.12 \times 10^{-7}$

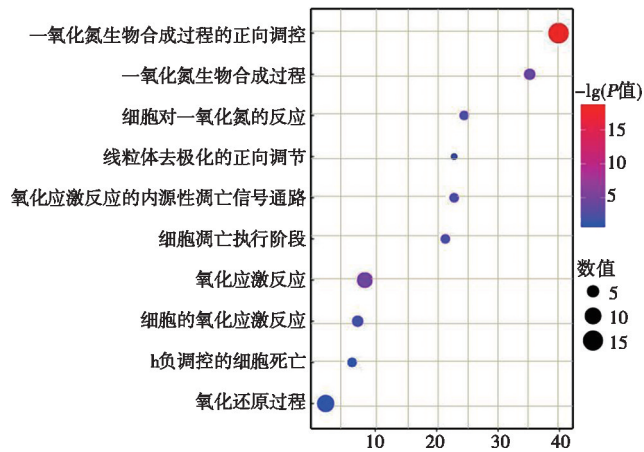


图 4 核心靶点富集气泡图

### 2.5 主要活性成分及网络图

将核心靶点导入 Cytoscape 3.7.2 作蛋白相互作用网络 (PPI), 如图 5 所示, 共 46 个节点, 466 条边, 网络平均自由度为 20.261, 没有游离蛋白。图中节点越大代表 Degree 值越高, 连线越粗代表相互作用越强, 分析显示 Degree 值排序最前的蛋白依次为丝/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1)、内皮生长因子受体 (EGFR)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、核磷蛋白 C (MYC)、白介素 - 6 (IL - 6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、雌激素 1 (ESR1)、雷帕霉素靶蛋白 (MTOR) 等, 以上皆是靶点蛋白互作网络 (PPI) 中的关键蛋白。

通过整合的靶点预测信息, 推测得到穿心莲成 BADIAN 分库中抗氧化的主要活性成分 25 个, 见表 6。用 Cytoscape 3.7.2 构建“成分-靶点-通路-功能”网络 (图 6), 包含 82 个节点、430 条边, 网络平均自由度为 10.463。节点越大、颜色越深表示 Degree 值越高。结果显示 EGFR、一氧化氮合酶 2 (NOS2)、I 型醌氧化还原酶 (NQO1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、聚 (ADP-核糖) 聚合酶 1 (PARP1) 等靶点的网络节点度靠前, 可能是穿心莲成分发挥药理作用的主要靶点。

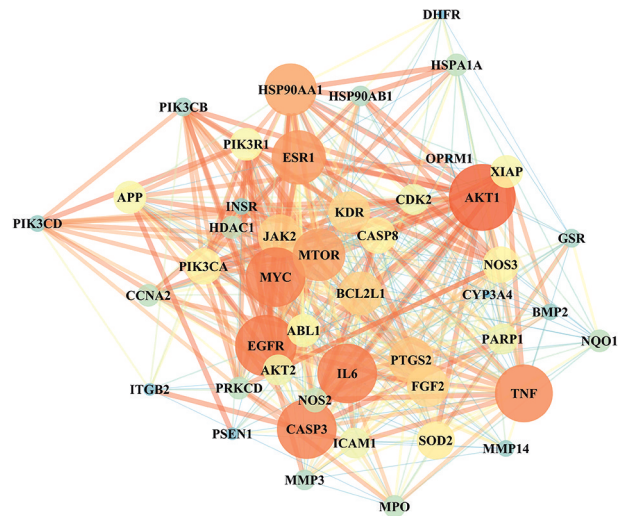


图 5 靶点蛋白互作网络

表 6 穿心莲主要抗氧化活性成分预测结果

序号	化合物中文名称	化合物英文名称
1	14-脱氧穿心莲内酯	14-deoxyandrographolide
2	14-脱氧-12-甲氧基穿心莲内酯	14-deoxy-12-methoxyandrographolide
3	1-油酸单甘油酯	1-Monoolein
4	3-[2-[(1S,4aR,5S,8aR)-5,8a-二甲基-2-亚甲基-5-羟甲基十氢化萘-1-基]乙基]-5H-呋喃-2-酮	3-[2-[(1S,4aR,5S,8aR)-5,8a-dimethyl-2-methylene-5-methylol-decalin-1-yl]ethyl]-5H-furan-2-one
5	穿心莲苷 A	andrographidine A
6	穿心莲苷 C	andrographidine C
7	穿心莲苷 E	andrographidine E
8	穿心莲苷 B <sub>qt</sub>	andrographidine B <sub>qt</sub>
9	穿心莲苷 F <sub>qt</sub>	andrographidine F <sub>qt</sub>
10	穿心莲素	andrographin
11	穿心莲素 F	andrographin F
12	穿心莲内酯	andrographolide
13	穿心莲内酯 19-β-D-葡萄糖苷 <sub>qt</sub>	andrographolide-19-β-D-glucoside <sub>qt</sub>
14	脱氧喜树碱	deoxycamptothecine
15	去氧地胆草内酯	deoxyelephantopin

续表6

序号	化合物中文名称	化合物英文名称
16	单甲基二羟基三甲氧基黄酮	mono-O-methylwightin
17	复方黄酮	moslosooflavone
18	新穿心莲内酯	neo-andrographolide
19	千层纸素 A	oroxylin A
20	潘尼可林	panicolin
21	潘尼卡丁	paniculatin
22	潘尼西利 B	paniculide B
23	潘尼西利 C	paniculide C
24	潘尼枯甙元	paniculogenin
25	槲皮素四甲基(3,4,5,7)醚	quercetin tetramethyl(3,4,5,7) ether

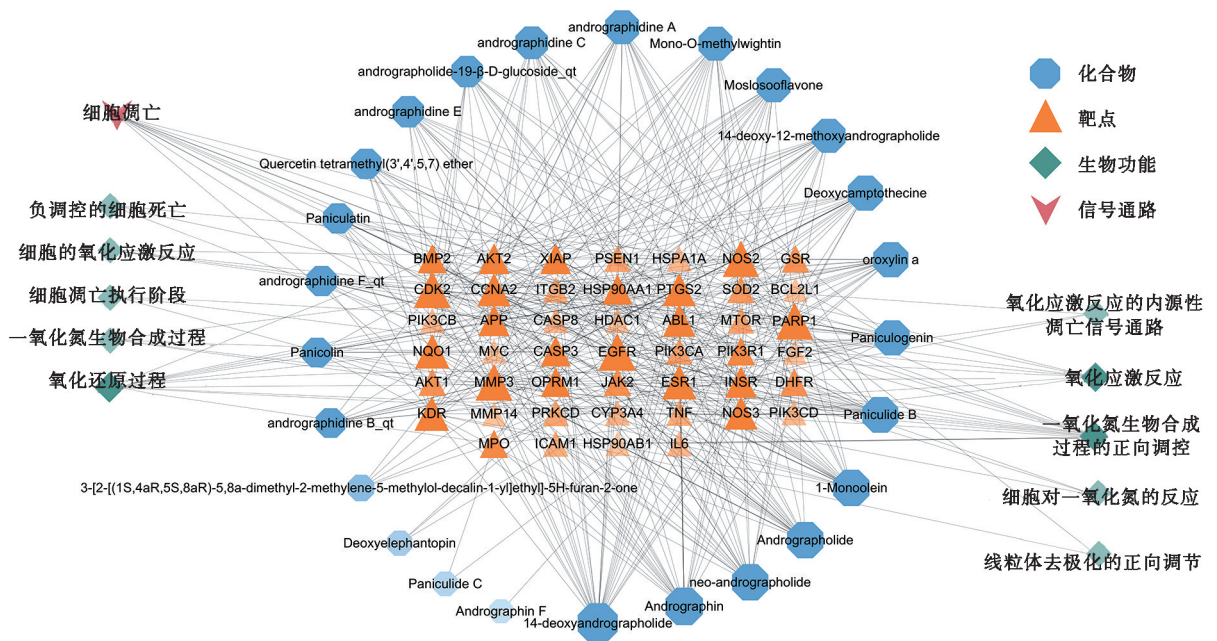


图 6 成分-靶点-通路-功能网络

## 2.6 整合分析

通过 HPLC 法建立穿心莲的指纹图谱标定了 11 个共有峰，并分析和 ROS、MDA 之间的谱效关系，ROS 和 MDA 的谱效分析结果呈现较高的一致性，说明共有峰 9、7、10、5、1、6、8、3 对应的成分可能是穿心莲水提取物中主要的抗氧化成分。网络药理学筛选出 14-脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲苷 A、穿心莲内酯、千层纸素 A 和复方黄酮等 25 个活性成分，与穿心莲发挥抗氧化功效密切相关。

穿心莲指纹图谱标定 8 个共有峰对应的成分，与网络药理学筛选出的 25 个成分，可能有部分重合，具体成分的鉴定，值得进一步深入研究。

## 3 讨论

穿心莲药理作用广泛，有研究报道穿心莲具有护肝利胆、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗心肌缺血再灌注损伤等作用。本文结合谱效关系和网络药理学，研究发现穿心莲中多个成分都能发挥抗氧化功效，基于整体探索其潜在的作用机制，体现出中药多成分、多靶点、多通路的特点<sup>[13-15]</sup>。

本研究从数据库及文献报道中共收集穿心莲有效成分 59 个，推测出 14-脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲苷 A 等 25 个抗氧化的主要活性化合物，主要是二萜内酯类和苷类物质。其中，穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等成分已被研究证实能抗机体氧化<sup>[16-17]</sup>，本研究结果对其药理活性也做出进一步探

究。网络药理学预测得到穿心莲抗氧化的核心靶点共 46 个，由此得到 PPI 网络中的核心节点，也是发挥相关活性的关键靶点。在这些关键靶点中，AKT1 参与细胞凋亡、葡萄糖代谢和蛋白质合成过程<sup>[18]</sup>，是 MTOR 的上游分子，能将其激活从而调节细胞的存活和增殖<sup>[19]</sup>。EGFR 是酪氨酸激酶受体家族的成员，相关试验<sup>[20]</sup>表明枸杞多糖可以下调 EGFR 蛋白来改善氧化应激诱导的内皮功能障碍。CASP3 活化后是细胞凋亡途径最主要的介导蛋白<sup>[21]</sup>，过氧化物合酶 2 (Ptgs2) 和 MYC 都是凋亡相关基因，有研究证实 Ptgs2 还能下调 CASP3 的表达来调控多种组织细胞的凋亡<sup>[22]</sup>。氧化应激会诱导促炎介质和自由基产物升高，而最常见的核心促炎介质就有 IL-6，锰超氧化物歧化酶则是线粒体中清除超氧阴离子抗氧化的关键酶<sup>[23]</sup>。此外，一氧化氮合酶 2 和一氧化氮合酶 3 通过调节一氧化氮的合成来决定其介导的生理过程能否完成<sup>[24]</sup>。分析结果表明穿心莲抗氧化作用主要影响细胞凋亡通路，涉及氧化应激反应、氧化应激引发的凋亡信号通路、凋亡执行阶段、一氧化氮代谢等生物学过程。

氧化应激发生在机体内氧化和抗氧化两大系统之间平衡失调的情况下，整合两类试验结果，穿心莲抗氧化更侧重于清除活性氧族，较少涉及对内源性抗氧化系统的调控。另外，鉴于网络药理学的局限性，不能反映出基因表达和信号通路之间的正负调节关系，也并非所有化合物都有收录靶点基因，穿心莲的剂量和用药途径等因素也没有纳入考虑，这些都可以作为今后进一步研究的内容。

综上所述，结合指纹图谱和谱效关系与网络药理学，在证实穿心莲抗氧化功效的基础上，穿心莲的活性成分可能主要通过细胞凋亡途径，作用于 AKT1、EGFR、CASP3 等靶点发挥其药理作用。具体成分的鉴定，值得进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 68-269.
- [2] 张晓, 唐力英, 吴宏伟, 等. 穿心莲现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志 2018, 24 (18): 222-234.
- [3] 周靖, 郭洋洋, 陆春红, 等. 穿心莲内酯对膜性肾病大鼠肾纤维化的影响及其机制研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22 (9): 1075-1080.
- [4] 徐辉, 焦响乐, 郑玉宽, 等. 穿心莲内酯对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡和迁移的影响 [J]. 中医研究, 2022, 35 (8): 65-69.
- [5] LI J, LIN X, MA Y F, et al. Protective effect of calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside against oxidative stress of BRL-3A cells induced by thioacetamide [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11 (43): 524-532.
- [6] 李健, 韩林, 马玉芳, 等. 黄芪 3 种成分对 ChangLiver 细胞氧化应激的抑制作用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (2): 31-36.
- [7] 韩婧, 刘惠文, 吴娟, 等. 临泉产穿心莲地上部分黄酮类化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22 (3): 358-362.
- [8] 邵军, 陈伟康, 郑东昆, 等. 17- $\beta$ -羟基-9-去氢穿心莲内酯体外代谢速率及代谢产物研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (5): 971-977.
- [9] 邢世华, 李晓波. 清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30 (4): 464-468.
- [10] 林青, 匡艳辉, 黄琳, 等. 一测多评测定穿心莲及其制剂中内酯类成分 [J]. 中草药, 2012, 43 (12): 2406-2411.
- [11] 朱涛, 管弦, 张维, 等. 脱氢穿心莲内酯琥珀酸半酯通过抑制 iNOS 减轻 LPS 诱导的急性肺损伤导致的氧化应激 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32 (9): 1238-1241.
- [12] 邵艳华, 王建刚, 赖小平, 等. 穿心莲二萜内酯类成分的高效薄层色谱指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2014, 37 (2): 219-223.
- [13] 李景华, 许笑笑, 赵炎葱, 等. 穿心莲二萜内酯有效部位化学成分液质联用法鉴定及其初步药效学研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (23): 4642-4646.
- [14] 彭宇然, 孙亦诚, 王德才, 等. 穿心莲内酯抗肿瘤作用衍生物的合成研究进展 [J]. 有机化学, 2015, 35 (7): 1451-1468.
- [15] GUPTA S, MISHRA K P, GANJU L. Broad-spectrum antiviral properties of andrographolide [J]. Arch Virol, 2017, 162 (3): 611-623.
- [16] 曹衡玉, 欧阳征仁, 尹海辉, 等. 穿心莲内酯激活 Nrf2 抑制乙醇诱导肝细胞氧化应激损伤 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35 (11): 2897-2902.
- [17] 韩敏. 脱水穿心莲内酯对糖尿病大鼠急性心肌梗死的保护作用及其机制分析 [D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [18] NUMATA T, ARAYA J, FUJII S, et al. Insulin-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK signaling pathways inhibit TLR3-mediated human bronchial epithelial cell apoptosis [J]. J Immunol, 2011, 187 (1): 510-519.
- [19] 梁木林, 党红星, 鲁雪, 等. 抑制 mTOR 信号通路对幼鼠肺损伤时 p-AKT1 分子的影响及意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35 (3): 506-514.
- [20] 张文娟. EGFR/ErbB2 及 PI3K/AKT/e-NOS 在枸杞多糖改善氧化应激所致内皮功能障碍中的作用研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2019.
- [21] HAITAO Y, JUAN Z, BO P, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16 (5): 344-454.
- [22] 王永照. CRISPR/Cas9 敲除 Ptgs2 对肝星状细胞凋亡的影响 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
- [23] 蔡玉, 邓明田, 刘孜斐, 等. 干扰 EZH2 的表达对奶山羊精原干细胞抗氧化能力的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2021, 44 (4): 726-732.
- [24] 安红梅, 史云峰, 胡兵, 等. 熟地黄对 D-半乳糖衰老模型大鼠脑衰老的作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2008 (3): 59-60.