

基于指纹图谱和网络药理学的茯苓质量标志物预测分析



黄广伟^{1, 2, 3}, 侯 俐², 吴信华^{1, 2, 3}

1. 上海绿谷生命园医药有限公司 (上海 201707)
2. 上海沪东医院 (上海 200129)
3. 上海复方中药 (绿谷) 工程技术研究中心 (上海 201707)

【摘要】目的 基于指纹图谱、化学模式识别、网络药理学和分子对接分析茯苓的潜在质量标志物。**方法** 采用 HPLC 法建立 20 批茯苓药材的指纹图谱, 结合正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 筛选组间主要差异成分; 运用网络药理学方法确认与药效相关的成分, 将差异成分与药效成分进行关联, 预测潜在质量标志物, 并通过分子对接进行验证。**结果** 建立了 20 批茯苓的 HPLC 指纹图谱, 标定 21 个共有峰, 并指认其中 6 个成分; OPLS-DA 分析筛选出 11 个差异成分, 并成功指认其中 5 个; 网络药理学分析共获得 15 个活性成分、33 个核心靶点及 57 条 KEGG 通路。综合指纹图谱与网络药理学结果, 筛选出猪苓酸 C、去氢土莫酸、松苓新酸和 16 α -羟基松苓新酸作为茯苓的潜在质量标志物。**结论** 通过指纹图谱结合化学模式识别和网络药理学方法, 成功识别了茯苓潜在的质量标志物, 为全面控制和评价茯苓质量提供科学依据。

【关键词】 茯苓; 指纹图谱; 化学模式识别; 网络药理学; 分子对接; 质量标志物

【中图分类号】 R285.5

【文献标识码】 A

Predictive analysis of quality markers of *Poria cocos* based on fingerprint and network pharmacology

HUANG Guangwei^{1,2,3}, HOU Li², WU Xinhua^{1,2,3}

1. Shanghai Green-Valley Shengmingyuan Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201707, China

2. Shanghai Hudong Hospital, Shanghai 200129, China

3. Shanghai Compound Traditional Chinese Medicine (Green Valley) Engineering Technology Research Center, Shanghai 201707, China

Corresponding author: HUANG Guangwei, Email: hgw77@163.com

【Abstract】Objective To analyze the potential quality marker (Q-Marker) of *Poria cocos* based on fingerprint analysis, chemical pattern recognition, network pharmacology, and molecular docking. **Methods** The fingerprint of 20 batches of *Poria cocos* was established by high performance liquid chromatography (HPLC), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was used to screen the main differential components of common peaks between groups. Network pharmacology methods were used to identify the efficacy-related components. The differential components were correlated with the efficacy-related components to predict Q-Marker, which were then

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202503071

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (18401930400); 浦东新区卫健委科技项目面上项目 (PW2024A-94)

通信作者: 黄广伟, 高级工程师, Email: hgw77@163.com

validated by molecular docking. **Results** The fingerprints of 20 batches of *Poria cocos* were established, 21 common peaks were calibrated, and 6 components were identified. OPLS-DA was used to screen 11 differential components, among which 5 were identified. Network pharmacology analysis identified 15 active components, 33 core targets, and 57 KEGG pathways. By integrating the results of fingerprint and network pharmacology, polyporenic acid C, dehydrotumulosic acid, 3-dehydrotrametenolic acid, and 16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid were selected as Q-Marker. **Conclusion** The potential quality markers of *Poria cocos* were successfully identified by fingerprinting combined with chemical pattern recognition and network pharmacology methods, providing scientific basis for comprehensive control and evaluation of *Poria cocos* quality.

【Keywords】 *Poria cocos*; Fingerprint; Chemical pattern recognition; Network pharmacology; Molecular docking; Quality marker

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核, 味甘淡, 性平, 归心、肺经, 具有利水渗湿、健脾、宁心等功效, 常用于水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、心神不安、惊悸失眠等症^[1]。现代研究表明, 茯苓具有利尿^[2-3]、保肝^[4-5]、抗肿瘤^[6]、抗氧化^[7]、抗衰老^[8]、抗炎^[9]及免疫调节^[10]等多种药理作用, 其主要药效物质基础为茯苓多糖和三萜类化合物^[11-12]。上海沪东医院临床应用的胃脾方, 通过益气健脾、清胃消痞之功效, 在治疗慢性萎缩性胃炎方面疗效显著。目前市场上以云南、安徽大别山区及湖北九资河所产茯苓品质较优, 此外福建、湖南、广西、河南等地也有种植^[13]。

目前, 《中国药典(2020年版)》^[1]仅从性状、鉴别、检查及浸出物等方面对茯苓药材的质量进行控制, 尚未明确其含量测定指标, 导致难以真正控制茯苓质量并对其品质作出客观综合评价。中药质量标志物(quality markers, Q-Marker)的提出为中药质量评价与质量控制提供了重要思路, 其基于处方配伍、特有性、可测性、有效性及溯源性5项原则, 将药效与药性纳入质量评价体系, 从而更完整地反映中药质量^[14]。中药指纹图谱作为一种较为成熟的共有成分分析方法, 结合化学模式识别可揭示中药的整体性与差异性, 而网络药理学则通过构建生物网络有效预测活性成分、作用靶点及相关通路, 三者有机结合对深入挖掘茯苓 Q-Marker 具有重要意义^[15]。

本研究基于 HPLC 指纹图谱与化学模式识别方法, 对不同产地茯苓的质量进行评价, 筛选导致质量差异的主要成分; 同时借助网络药理学预测茯苓的潜在药效标志物, 综合两方面结果确定其潜在 Q-Marker, 并进一步通过分子对接验证

Q-Marker 与相关靶点之间的相互作用, 从而为茯苓的整体质量控制研究提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

1260 型高效液相色谱仪, 包括 G7111A 四元泵、G7129A 柱温箱和 G7115A DAD 检测器(美国安捷伦科技有限公司); SK250H 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司); MSA125P 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 主要药品与试剂

对照品松苓新酸(批号: MUST-24032020)、猪苓酸 C(批号: MUST-24011011)、去氢茯苓酸(批号: MUST-24110724)、去氢土莫酸(批号: MUST-24121414)、茯苓新酸 A(批号: MUST-24080810)、茯苓新酸 B(批号: MUST-24042305)均购自成都曼思特生物科技有限公司, 纯度均大于 98%; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析级纯, 水为超纯水。

茯苓 S1~S5 产自安徽岳西, 购自安徽新盛中药饮片有限公司; S6~S10 产自贵州黎平, 购自山东金银藤中药材有限公司; S11~S15 产自湖北黄冈, 购自安徽敬道药业有限公司; S16~S20 产自云南玉溪, 购自安徽新盛中药饮片有限公司; 茯苓样品批号信息见表 1。茯苓药材均为茯苓块, 经上海绿谷生命园张媛媛经理鉴定为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核。

2 方法与结果

2.1 茯苓指纹图谱定性分析

2.1.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：0.1% 磷酸溶液 (A) – 乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~15 min, 50%~65% B；15~25 min, 65% B；25~45 min, 65%~95% B)；柱温：30℃；流速：1.0 mL/min；检测波长：244 nm；进样量：10 μL^[16-17]。

表1 茯苓样品批号信息

Table 1. Batch number information of Poria cocos samples

编号	批号	编号	批号
S1	170030212-YR181001	S11	170030213-YR190106
S2	170030212-YR181002	S12	170030213-YR190107
S3	170030212-YR181003	S13	170030213-YR190108
S4	170030212-YR181004	S14	170030213-YR190109
S5	170030212-YR181005	S15	170030213-YR1901010
S6	170030221-YR190101	S16	170030225-YR181006
S7	170030221-YR190102	S17	170030225-YR181007
S8	170030221-YR190103	S18	170030225-YR181008
S9	170030221-YR190104	S19	170030225-YR181009
S10	170030221-YR190105	S20	170030225-YR1810010

2.1.2 供试品溶液的制备

取茯苓药材粉碎后过三号筛，精密称定约 2 g，置于具塞锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，经超声（功率：250 W，频率：50 kHz）处理 30 min，冷却至室温后过滤，滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.1.3 混合对照品溶液的制备

精密称取茯苓新酸 B、去氢土莫酸、茯苓新酸 A、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和松苓新酸对照品适量，加甲醇溶解制成浓度分别为 9.20、15.96、29.60、12.32、14.60、5.12 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.4 参照峰的选择

在对照色谱分析中，去氢茯苓酸表现出良好的色谱峰形，分离度符合试验要求。基于该化合

物稳定的保留行为，本研究选择其作为参照峰，并通过系统计算获得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.1.5 精密度试验

精密称定茯苓药材（编号：S13），按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，计算得各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.2%，相对峰面积 *RSD* 均小于 0.4% (*n*=6)。

2.1.6 稳定性试验

取同一供试品溶液（编号：S13），室温放置，按“2.1.1”项下色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定，记录色谱图，计算得各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.1%，相对峰面积 *RSD* 均小于 0.5% (*n*=6)。

2.1.7 重复性试验

精密称定茯苓药材（编号：S13）共 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件依次进样测定，记录色谱图，计算得各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.1%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.0% (*n*=6)。

2.1.8 指纹图谱的建立及共有峰指认

采用上述方法测定 20 批不同产地茯苓药材的指纹图谱，并运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）软件导入相应 HPLC 图谱数据，共识别出 21 个共有峰。以 S1 样品色谱图为参照图谱，采用中位数法进行多点校正和全谱峰匹配，生成对照指纹图谱（图 1）。以该对照指纹图谱为参照，计算各批次共有峰相似度，结果（表 2）显示所有产地茯苓的相似度均大于 0.95，

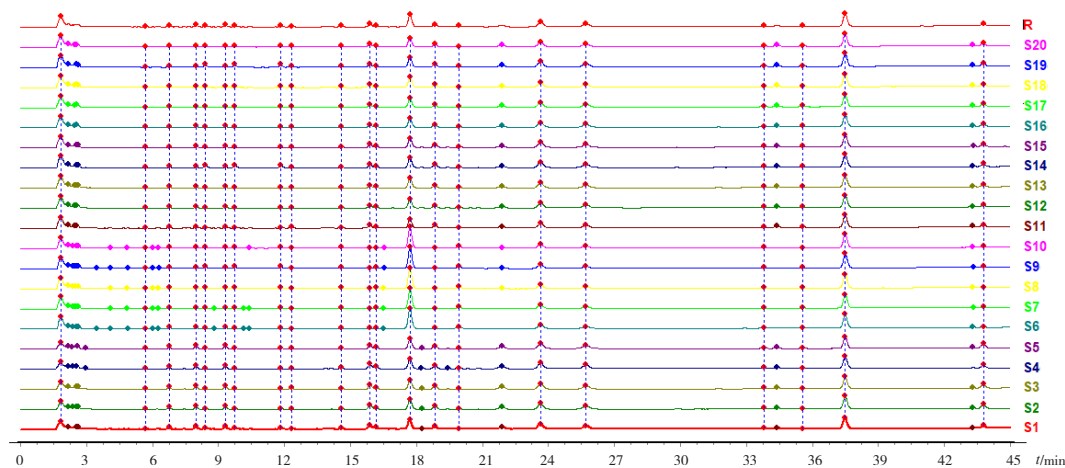


图1 20批样品的HPLC图

Figure 1. HPLC chromatograms of 20 batches of samples

表明不同批次间化学成分组成具有良好的一致性。进一步通过与对照品图谱比对,成功指认6个共有峰,分别为:茯苓新酸B(11号峰)、去氢土莫酸(13号峰)、茯苓新酸A(14号峰)、猪苓酸C(16号峰)、去氢茯苓酸(20号峰)和松苓新酸(21号峰),结果见图2。

表2 茯苓样品相似度评价

Table 2. Results of similarity evaluation of Poria cocos			
编号	相似度	编号	相似度
S1	0.986	S11	0.984
S2	0.982	S12	0.984
S3	0.976	S13	0.981
S4	0.983	S14	0.986
S5	0.983	S15	0.983
S6	0.960	S16	0.983
S7	0.957	S17	0.983
S8	0.958	S18	0.988
S9	0.958	S19	0.983
S10	0.956	S20	0.983

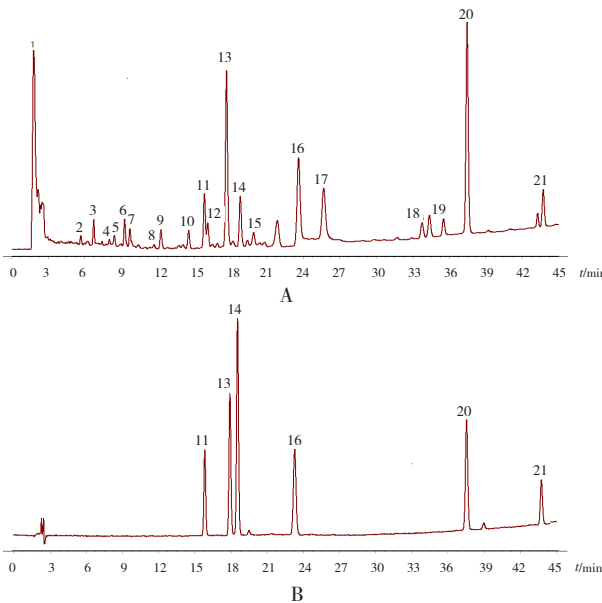


图2 茯苓药材与混合对照品溶液的HPLC色谱图
Figure 2. HPLC of Poria cocos and mixed reference solution

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; 11. 茯苓新酸B; 13. 去氢土莫酸; 14. 茯苓新酸A; 16. 猪苓酸C; 20. 去氢茯苓酸; 21. 松苓新酸。

2.2 正交偏最小二乘法-判别分析

采用正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对20批茯苓药材进行分组分析,并结合自变量投影重要性指标(variable importance in the projection, VIP)进一步考察各共有峰的情况,得分图和VIP结果图分别见图3和图4。得分图显示,20批样品被分为两类:第一类包括S1~S5

和S11~S20,均产自安徽、湖北和云南;第二类为S6~S10,均产自贵州。以VIP值大于1.0为标准,共筛选出11个对组间差异贡献较大的成分,对应峰号为2、4、9、11~17和21。其中,已指认的峰11(茯苓新酸B)、峰13(去氢土莫酸)、峰14(茯苓新酸A)、峰16(猪苓酸C)和峰21(松苓新酸)可作为茯苓潜在的Q-Marker,用于茯苓饮片的质量控制。

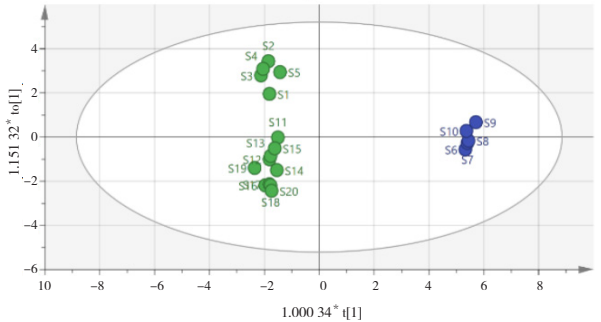


图3 OPLS-DA分析得分图
Figure 3. Score plot of OPLS-DA

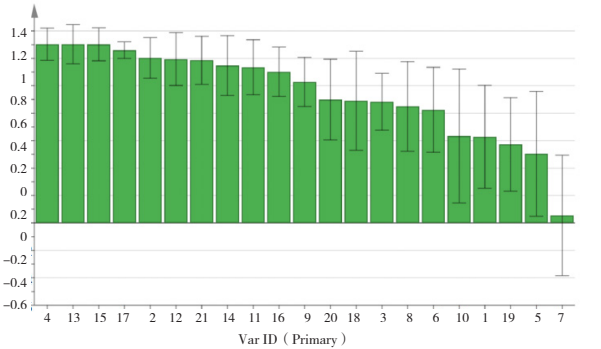


图4 OPLS-DA分析VIP图
Figure 4. VIP plot of OPLS-DA

2.3 基于网络药理学预测茯苓Q-Marker

2.3.1 成分及靶点的收集

以“茯苓”为关键词,在中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)中检索并设定口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%及类药性(drug-likeness, DL)≥0.18的条件,初步筛选获得15个活性成分(表3),并从中获取其相关靶点。同时,通过PubChem数据库收集这些活性成分的Smiles化学式,分别提交至超级增强子数据库(Super Enhancer Archive, SEA, <http://sea.bkslab.org/>)和瑞士生物信息学研究所(Swiss Institute of Bioinformatics, SIB, <http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库进行靶点

预测。将所有预测及检索获得的靶点导入 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化命名,

合并去重后最终得到 342 个与茯苓活性成分相关的靶点蛋白。

表3 茯苓活性成分基本信息

Table 3. Basic information on active ingredients in Poria cocos

成分ID	成分名称	OB (%)	DL
MOL.000273	16α-羟基松苓新酸 (16α-hydroxydehydrotrametenolic acid)	30.93	0.81
MOL.000275	氢化松苓新酸 (trametenolic acid)	38.71	0.80
MOL.000276	去氢茯苓酸 (dehydropachymic acid)	35.11	0.81
MOL.000279	啤酒甾醇 (cerevisterol)	37.96	0.77
MOL.000280	去氢土莫酸 (dehydrotumulosic acid)	31.07	0.82
MOL.000282	星鱼甾醇 (ergosta-7,22E-dien-3β-ol)	43.51	0.72
MOL.000283	过氧麦角甾醇 (ergosterol peroxide)	40.36	0.81
MOL.000285	猪苓酸C (polyporenic acid C)	38.26	0.82
MOL.000287	齿孔菌酸 (eburicoic acid)	38.70	0.81
MOL.000289	茯苓酸 (pachymic acid)	33.63	0.81
MOL.000290	茯苓新酸A (poricoic acid A)	30.61	0.76
MOL.000291	茯苓新酸B (poricoic acid B)	30.52	0.75
MOL.000292	茯苓新酸C (poricoic acid C)	38.15	0.75
MOL.000296	常春藤皂苷元 (hederagenin)	36.91	0.75
MOL.000300	去氢齿孔酸 (dehydroeburicoic acid)	44.17	0.83

2.3.2 蛋白质互作网络分析

将获得的 342 个靶点蛋白上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) , 设定物种为 “Homo sapiens” , 筛选出 263 个互作得分 (score) > 0.900 的靶点。随后, 将这些靶点导入 Cytoscape 3.2.1 软件进行拓扑特征分析, 最终筛选出 33 个度值、介度中心性和接近中心性均高于平均值的靶点作为核心靶点, 其中包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 、磷脂酰肌醇 3- 激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA) 、90 kDa 热休克蛋白 αA1 (hHeat shock protein HSP 90-α, HSP90AA1) 、MAPK8、MAPK14 等, 并构建了核心靶点蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络图 (图 5) 。

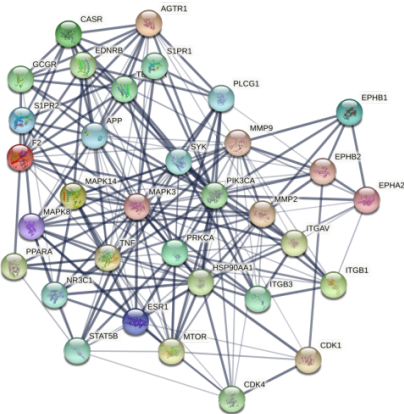


图5 核心靶点PPI
Figure 5. PPI of core targets

2.3.3 功能富集分析与通路分析

利用 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 对 33 个核心靶点进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。GO 分析涵盖生物过程 (biological process, BP) 、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个类别, KEGG 分析则用于识别核心靶点所显著富集的信号通路。分析过程中物种及背景均设置为 “Homo sapiens” , 以 $P<0.01$ 为显著性阈值, 并按照 P 由小到大的顺序对富集结果进行排序。

GO 富集分析共获得 218 个 GO 条目, 根据 $P<0.01$ 筛选出 92 个显著条目, 其中包括 55 个 BP 条目, 主要涉及血管生成、白细胞迁移和蛋白质磷酸化的正调控等; 21 个 MF 条目, 主要涉及蛋白质结合、腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 结合、激酶活性及蛋白酪氨酸激酶活性等; 以及 16 个 CC 条目, 主要涉及质膜、荷叶边膜和膜筏等, 具体结果见图 6。KEGG 富集分析共得到 57 条显著通路 ($P<0.01$) , 其中前 20 条包括癌症通路、磷酸肌醇 3- 激酶 (phosphoinositide 3-Kinase, PI3K) – 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、雌激素信号通路、T 细胞受体信号通路和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路等 (表 4) , 表明这 33 个核心靶点可能通过上述信号通路参与疾病进程的调控。进一步利用 OmicShare 平台 (<https://www.omicshare.com/>)

表4 前20条信号通路信息表
Table 4. Information on the top 20 signaling pathways

编号	通路名称	基因数目	P
hsa05205	癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)	13	2.30×10^{-11}
hsa05200	癌症的途径 (pathways in cancer)	15	3.40×10^{-10}
hsa04664	Fc epsilon RI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway)	8	1.50×10^{-8}
hsa04919	甲状腺激素信号通路 (thyroid hormone signaling pathway)	8	5.70×10^{-7}
hsa04071	鞘脂信号通路 (sphingolipid signaling pathway)	8	7.70×10^{-7}
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)	11	1.50×10^{-6}
hsa04012	ErbB信号通路 (ErbB signaling pathway)	7	2.00×10^{-6}
hsa05161	乙型肝炎 (hepatitis B)	8	2.80×10^{-6}
hsa05214	胶质瘤 (glioma)	6	9.10×10^{-6}
hsa04670	白细胞跨内皮迁移 (leukocyte transendothelial migration)	7	1.00×10^{-5}
hsa04917	催乳素信号通路 (prolactin signaling pathway)	6	1.40×10^{-5}
hsa04611	血小板活化 (platelet activation)	7	2.00×10^{-5}
hsa04380	破骨细胞分化 (osteoclast differentiation)	7	2.10×10^{-5}
hsa04015	Rap1信号通路 (Rap1 signaling pathway)	8	3.10×10^{-5}
hsa04914	孕酮介导的卵母细胞成熟 (progesterone-mediated oocyte maturation)	6	3.80×10^{-5}
hsa04930	II型糖尿病 (type II diabetes mellitus)	5	5.70×10^{-5}
hsa04915	雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)	6	7.00×10^{-5}
hsa04660	T细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)	6	7.40×10^{-5}
hsa05231	癌症中的胆碱代谢 (choline metabolism in cancer)	6	7.80×10^{-5}
hsa04668	TNF信号通路 (TNF signaling pathway)	6	1.00×10^{-4}

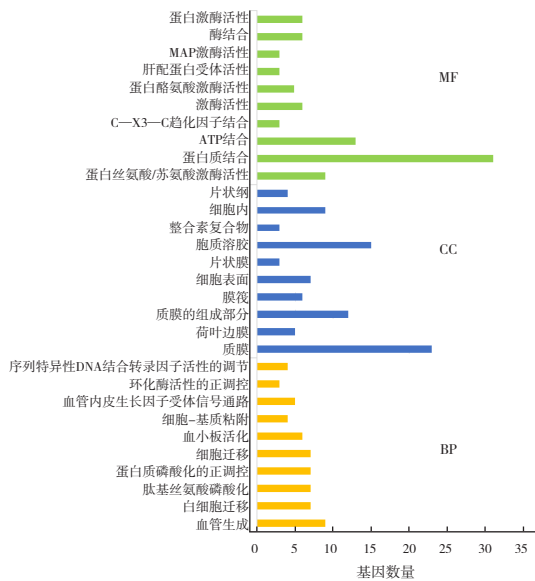


图6 GO富集分析可视化结果
Figure 6. Visualization results of GO enrichment analysis

[omicshare.com/tools/](https://www.omicshare.com/tools/)) 对 KEGG 富集分析结果进行可视化, 结果见图 7。

2.3.4 “成分-靶点-通路”网络构建

将核心靶点、相关活性成分及前 20 条信号通路导入 Cytoscape 3.2.1 软件, 经 Merge 整合构建“成分-靶点-通路”网络 (图 8)。该网络共包含 68 个节点, 涵盖 15 个活性成分、33 个靶点和 20 条通路。节点的度值反映其连接数量,

度值越高, 表明该节点在网络中越关键, 越可能为核心化合物或重要靶点蛋白。分析显示, 去氢茯苓酸、猪苓酸 C、16 α -羟基松苓新酸、啤酒甾醇和去氢土莫酸的度值较高, 提示其可能是茯苓发挥药效的主要成分, 并具备作为茯苓药效关联的潜在 Q-Marker 的潜力。靶点中 MAPK3、PIK3CA、TNF 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 节点较大, 表明茯苓对这些靶点具有较高调控作用, 可视为关键靶点。通路节点中, “癌症中的蛋白多糖”“癌症通路”和“PI3K-Akt 信号通路”等节点较大, 说明这些通路富集的靶点较多, 进一步提示茯苓活性成分可能通过调控这些信号通路实现治疗疾病的目的。

2.4 分子对接验证

通过指纹图谱结合化学模式识别分析, 确定 11 号峰 (茯苓新酸 B)、13 号峰 (去氢土莫酸)、14 号峰 (茯苓新酸 A)、16 号峰 (猪苓酸 C) 和 21 号峰 (松苓新酸) 为不同产地茯苓的共有峰, 这些成分具有良好的代表性和组间差异性, 符合 Q-Marker 的可测性与溯源性要求; 网络药理学研究结果显示, 去氢茯苓酸、猪苓酸 C、16 α -羟基松苓新酸、啤酒甾醇和去氢土莫酸与茯苓的药效密切相关, 体现出良好的有效性特征。

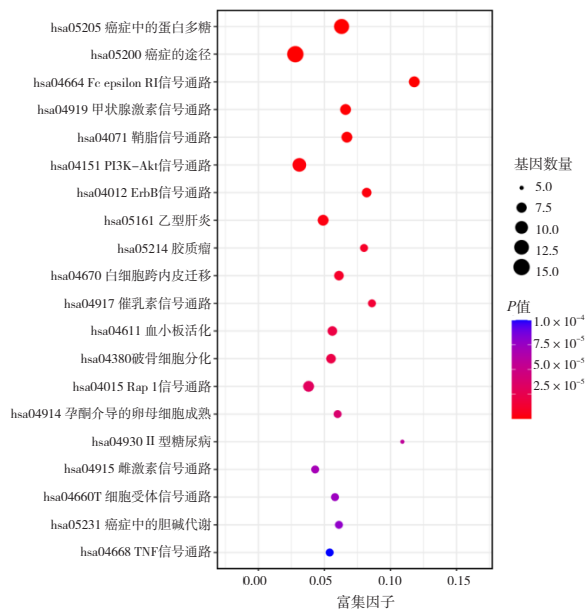


图7 KEGG信号通路可视化结果
Figure 7. Visualization results of the KEGG signaling pathway

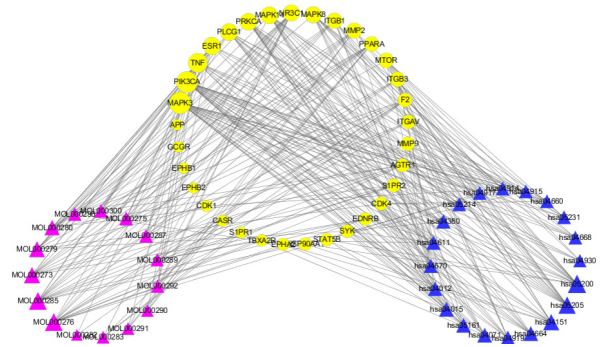


图8 茯苓成分-靶点-通路网络
Figure 8. Component-target-pathway network of Poria cocos
注：红色三角形代表活性成分；黄色圆形代表靶点；蓝色三角形代表通路；边代表相互作用关系。

通过网络药理学结合指纹图谱与 OPLS-DA 分析,发现猪苓酸 C 和去氢土莫酸为共有成分,同时考虑到 16 α -羟基松苓新酸作为松苓新酸的羟基化衍生物,在结构和性质上具有高度相似性,最终将猪苓酸 C、去氢土莫酸、松苓新酸及 16 α -羟基松苓新酸确定为茯苓的潜在 Q-Marker。为验证其可靠性,进一步开展分子对接验证:首先从 TCMSP 数据库下载潜在 Q-Marker 的分子结构 (mol2 格式),并从 PDB 数据库 (<https://www1.rcsb.org/>) 获取关键靶点的配体结构;随后使用 PyMol 2.3.4 对成分和配体进行加氢、去除水分子和电荷等预处理,再借助 AutoDock 4.2 软件将各成分与靶点进行分子对接,计算结合能。结合能低于 -5 kcal/mol 表明该化合物与靶点之间具有良好的结合活性,且结合能越低,结合活性越强。

分子对接结果 (表 5) 显示,4 个潜在 Q-Marker 与关键靶点均表现出良好的亲和力,其结合能均低于 -6 kcal/mol。其中,松苓新酸与各靶点的结合能整体最低,表明其潜在作用活性最强;而 PIK3CA 与各 Q-Marker 的结合能均低于 -8.5 kcal/mol,提示该靶标可能是茯苓多种成分共同发挥药效的关键作用位点。利用 PyMol 软件对分子对接结果进行可视化,结果见图 9。

表5 分子对接结合能测定结果 (kcal/mol)

成分名称	MAPK3	PIK3CA	TNF	ESR1
猪苓酸C	-7.92	-8.60	-7.71	-9.02
松苓新酸	-9.66	-9.99	-7.00	-8.96
16 α -羟基松苓新酸	-9.12	-8.73	-6.94	-8.30
去氢土莫酸	-8.32	-9.02	-6.25	-8.67

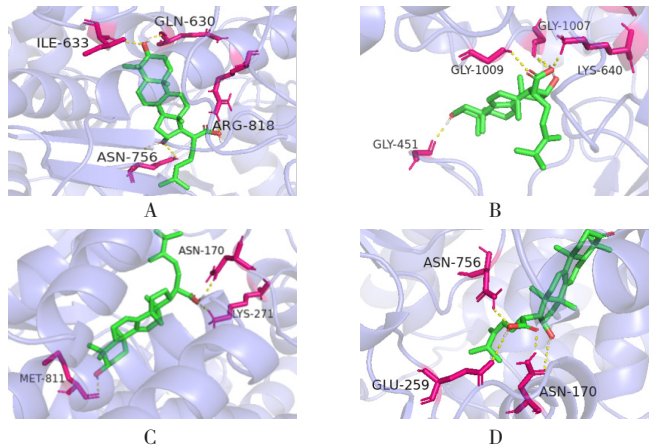


图9 关键靶点PIK3CA与活性成分的分子对接模式图
Figure 9. Molecular docking model diagram of the core target PIK3CA and its ligands
注：A. PIK3CA与16 α -羟基松苓新酸；B. PIK3CA与去氢土莫酸；C. PIK3CA与松苓新酸；D. PIK3CA与猪苓酸C。

3 讨论

近年来,中药指纹图谱结合化学模式识别与网络药理学方法在中药 Q-Marker 的预测与分析中已得到广泛应用。本研究在建立 HPLC 指纹图谱过程中发现,在 244 nm 波长下色谱峰数量较多、特征性显著,因此选定该波长,并对流动相和洗脱程序进行了系统优化,最终确定的色谱条件出峰时间适宜、峰形良好。此外,通过比较不同比例甲醇溶液(50%、70%及纯甲醇)及不同提取时间(15、30、45 min)的效果,结果表明采用甲醇提取 30 min 时,色谱峰数量较多、峰面积较大且基线稳定。基于所建立的指纹图谱对茯苓化学信息进行整体表征,其相似度均大于 0.95,显示不同批次样品间化学成分组成具有较高一致性。结合 OPLS-DA 分析可将 20 批茯苓样品分为两类:安徽、湖北和云南产地的样品聚为一类,贵州产样品单独聚为一类,说明不同产地茯苓存在一定质量差异。进一步通过 VIP 分析发现,茯苓新酸 B、去氢土莫酸、茯苓新酸 A、猪苓酸 C 和松苓新酸可能是导致产地差异的标志性成分,这些成分符合 Q-Marker 的可测性与溯源性要求,可作为茯苓潜在的 Q-Marker,为其饮片的质量控制提供依据。

网络药理学筛选结果显示,去氢茯苓酸、猪苓酸 C、16 α -羟基松苓新酸、啤酒甾醇和去氢土莫酸等度值较高的成分可能是茯苓发挥临床疗效的主要物质基础,符合 Q-Marker 的有效性原则。茯苓的利尿作用主要与其三萜类成分相关,田婷等^[18]研究发现,茯苓皮乙醇提取物具有显著利尿效果,其机制可能与茯苓酸、猪苓酸 C、去氢土莫酸和齿孔酸等四环三萜类成分拮抗醛固酮、抑制肾小管对 Na⁺ 的重吸收和 K⁺ 的排泄有关。在抗炎方面,茯苓活性成分通过多途径发挥作用: Cai 等^[19]指出 29-羟基猪苓酸 C 和猪苓酸 C 可通过减少诱导型一氧化氮合酶表达、抑制一氧化氮释放并阻断激活蛋白-1 信号通路实现抗炎;啤酒甾醇在脂多糖诱导的巨噬细胞中通过下调 MAPK 信号、减少促炎细胞因子、失活核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和激活蛋白 1 转录因子,并上调核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2, Nrf2) 介导的血红素加氧酶 1 表达以发挥抗炎作用^[20];去

氢土莫酸和茯苓酸则在急慢性炎症模型中表现出剂量依赖性抗炎效果,其机制为抑制磷脂酶 A2 活性从而减少组胺、血清素等炎症介质释放,且去氢土莫酸因无糖皮质激素样副作用可能更具安全性优势^[21]。此外,茯苓三萜酸类成分还具有抗癫痫和镇静作用,可能与上调抑制性神经递质 γ -氨基丁酸水平及下调兴奋性神经递质谷氨酸水平相关^[22]。倪付勇等^[23]发现包括齐墩果酸、猪苓酸 C、茯苓酸、去氢茯苓酸、松苓新酸和土莫酸在内的多种茯苓三萜酸类化合物对经典补体激活途径具有不同程度抑制作用。去氢茯苓酸还可通过调节辅助性 T 细胞 (T helper cell, Th) 1/Th2 平衡影响机体免疫功能,并剂量依赖性地减轻湿疹相关病变^[24]。16 α -羟基松苓新酸能够通过糖皮质激素受体介导的 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路改善肠道屏障功能^[25]。在抗肿瘤方面,猪苓酸 C 可通过诱导细胞凋亡有效抑制肺癌细胞增殖:一方面通过激活死亡受体介导的外源性凋亡途径直接诱导程序性细胞死亡;另一方面显著抑制 PI3K/Akt 信号通路活性,同时增强肿瘤抑制因子 p53 的磷酸化水平及转录活性, Akt 抑制与 p53 功能协同可能共同参与其凋亡诱导过程^[26]。

依据 Q-Marker 的可测性、溯源性、有效性及特异性筛选原则,本研究整合 HPLC 指纹图谱、OPLS-DA 分析与网络药理学方法,最终确定猪苓酸 C、去氢土莫酸、松苓新酸和 16 α -羟基松苓新酸作为茯苓的潜在 Q-Marker。这些成分可能通过作用于 MAPK3、PIK3CA、TNF 和 ESR1 等关键靶点,调控癌症通路、PI3K-Akt 等信号通路,从而在治疗癌症、利尿、保肝、抗氧化、抗炎及免疫调节等方面发挥药效。MAPK3 (又称 ERK1) 作为 MAPK 家族成员,在细胞增殖、凋亡和侵袭等多种基本过程中起核心调控作用,其信号通路异常与多种疾病发生相关。ERK1/2 参与先天性和适应性免疫系统中的多个信号传导过程,是免疫细胞功能的关键调节因子;直接抑制 ERK1/2 或其上游调节因子可用于治疗炎症和自身免疫性疾病^[27]。此外,ERK 信号传导还与阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病密切相关^[28]。MAPK/ERK 通路还可通过抑制凝血酶敏感蛋白-1 的表达影响血管生成,进而促进肿瘤生长、侵袭和转移^[29]。PIK3CA 是调控细胞生长、转化、黏附、凋亡、存活和运动的关键因子,在约 15% 的

人类癌症中发生突变,尤其在肝癌、结肠癌和乳腺癌中突变频率较高^[30]。该基因还参与肌肉、肝脏和脂肪组织中的胰岛素响应调节^[31]。TNF作为一种多效细胞因子,广泛参与机体的炎症与免疫过程,对多种肿瘤细胞具有细胞毒性,并可诱导胰岛β细胞凋亡^[32]。目前已有3种TNF抑制剂被批准用于类风湿关节炎的临床治疗^[33]。ESR1是乳腺上皮中雌激素作用的主要介质,雌激素暴露是其驱动乳腺癌发展的核心机制之一^[34]。同时,ESR1也被认为是骨质疏松的易感基因^[35]。

为进一步验证所筛选Q-Marker的有效性,本研究进行了分子对接验证。结果显示,各成分与关键靶点的结合能均低于-6 kcal/mol,表明茯苓潜在Q-Marker与核心靶点之间具有良好的亲和力。结合前述文献药理研究及分子对接结果,可有力证明基于网络药理学与指纹图谱方法筛选出的茯苓Q-Marker具有合理性和可靠性。然而,分子对接作为一种计算机模拟技术,仍存在一定的局限性,后续需通过分子实验或体内实验进行多维度验证,以进一步增强其生物学可信度。

综上所述,猪苓酸C、去氢土莫酸、16α-羟基松苓新酸和松苓新酸这4种成分可作为茯苓的Q-Marker,为其在中药复方制剂研发及药用价值的深入开发提供科学依据。

参考文献

- 1 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 251.
- 2 赵宇辉,唐丹丹,陈丹倩,等.利尿药茯苓、茯苓皮、猪苓和泽泻的化学成分及其利尿作用机制研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(4): 594-599. [Zhao YH, Tang DD, Chen DQ, et al. Progress on chemical components and diuretic mechanisms of traditional Chinese diuretic medicines Poria cocos, Cortex poriae, Polyporus umbellatus and Alisma orientalis[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2014, 28(4): 594-599.] DOI: [10.3867/j.issn.1000-3002.2014.04.019](https://doi.org/10.3867/j.issn.1000-3002.2014.04.019).
- 3 Feng YL, Lei P, Tian T, et al. Diuretic activity of some fractions of the epidermis of Poria cocos[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3): 1114-1118. DOI: [10.1016/j.jep.2013.10.043](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.043).
- 4 Wu K, Fan JL, Huang XY, et al. Hepatoprotective effects exerted by Poria cocos polysaccharides against acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 114: 137-142. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.03.107](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.107).
- 5 Kim JH, Sim HA, Jung DY, et al. Poria cocos wolf extract ameliorates hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism, inhibition of ER stress, and activation of autophagy via AMPK activation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4801. DOI: [10.3390/ijms20194801](https://doi.org/10.3390/ijms20194801).
- 6 Jiang Y, Fan LP. Evaluation of anticancer activities of Poria cocos ethanol extract in breast cancer: *in vivo* and *in vitro*, identification and mechanism[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 257: 112851. DOI: [10.1016/j.jep.2020.112851](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112851).
- 7 黄聪亮,郑佳俐,李凤林,等.茯苓多糖对2型糖尿病小鼠肾组织抗氧化能力及Bax、Bcl-2蛋白表达影响[J].食品与生物技术学报,2016,35(1): 82-88. [Huang CL, Zheng JL, Li FL, et al. Effect of pachymaran on the antioxidant capacity and Bax, Bcl-2 Protein expression of renal tissue in mice with type II diabetes[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(1): 82-88.] DOI: [10.3969/j.issn.1673-1689.2016.01.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-1689.2016.01.013).
- 8 Fang CL, Paul CR, Day CH, et al. Poria cocos (Fuling) targets TGFβ/Smad7 associated collagen accumulation and enhances Nrf2-antioxidant mechanism to exert anti-skin aging effects in human dermal fibroblasts[J]. Environ Toxicol, 2020, 36(5): 729-736. DOI: [10.1002/tox.23075](https://doi.org/10.1002/tox.23075).
- 9 Jeong JW, Lee H, Han M, et al. Ethanol extract of Poria cocos reduces the production of inflammatory mediators by suppressing the NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 101. DOI: [10.1186/1472-6882-14-101](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-101).
- 10 Tu YJ, Luo XY, Liu D, et al. Extracts of Poria cocos improve functional dyspepsia via regulating brain-gut peptides, immunity and repairing of gastrointestinal mucosa[J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153875. DOI: [10.1016/j.phymed.2021.153875](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153875).
- 11 路平,史汶龙,杨思雨,等.茯苓化学成分及药理作用研究进展[J].中成药,2024,46(4): 1246-1254. [Lu P, Shi WL, Yang SY, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of Poria Cocos[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(4): 1246-1254.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2024.04.028](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2024.04.028).
- 12 邓桃妹,彭代银,俞年军,等.茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2020,51(10): 2703-2717. [Deng TM, Peng DY, Yu NJ, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of Poria cocos and predictive analysis on quality markers[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(10): 2703-2717.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.013](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.013).
- 13 孙雪,章登停,王慧,等.基于高光谱成像技术的茯苓产地识别[J].中国中药杂志,2023,48(16): 4337-4346. [Sun X, Zhang DT, Wang H, et al. Origin identification of Poria cocos based on hyperspectral imaging technology[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(16): 4337-4346.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjcm.20230512.102](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20230512.102).
- 14 刘昌孝.中药质量标志物(Q-marker):提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展[J].中草药,2019,50(19): 4517-4518. [Liu CX. Q-marker: improving the quality standards and quality control theory of traditional Chinese medicine and promoting the scientific development of the traditional Chinese medicine industry[J]. Chinese

- Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(19): 4517–4518.] DOI: [CNKI:SUN:ZCYO.0.2019-19-001](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.004).
- 15 徐蓓蕾, 孙文斌, 王昊, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的秦皮质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(15): 5019–5032. [Xu BL, Sun WB, Wang H, et al. Predictive analysis of quality markers of Fraxini Cortex based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(15): 5019–5032.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.027](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.027).
- 16 陈素娥, 孙红, 朱琳, 等. 茯苓药材高效液相色谱指纹图谱及多指标成分定量研究[J]. 中南药学, 2020, 18(9): 1507–1512. [Chen SE, Sun H, Zhu L, et al. HPLC fingerprint and determination of quantitative multi-components of Poria[J]. Central South Pharmacy, 2020, 18(9): 1507–1512.] DOI: [10.7539/j.issn.1672-2981.2020.09.013](https://doi.org/10.7539/j.issn.1672-2981.2020.09.013).
- 17 万鸣, 黄超, 杨玉莹, 等. 不同产地茯苓中 7 种三萜类成分含量的测定及聚类分析[J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2101–2106. [Wang M, Huang C, Yang YY, et al. Content determination and cluster analysis of 7 kinds of triterpenes in Poria cocos from different habitats[J]. China Pharmacy, 2020, 31(17): 2101–2106.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.10](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.10).
- 18 田婷, 陈华, 殷璐, 等. 茯苓和茯苓皮水和乙醇提取物的利尿作用及其活性成分的分离鉴定[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(1): 57–62. [Tian T, Chen H, Yin L, et al. Diuretic effects of water and ethanol extracts from Poria cocos and Poria cocos skin, and isolation and identification of their active ingredients[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2014, 28(1): 57–62.] DOI: [10.3867/j.issn.1000-3002.2014.01.009](https://doi.org/10.3867/j.issn.1000-3002.2014.01.009).
- 19 Cai TG, Cai Y. Triterpenes from the fungus Poria cocos and their inhibitory activity on nitric oxide production in mouse macrophages via blockade of activating protein-1 pathway[J]. Chemistry & Biodiversity, 2011, 8(11): 2135–2143. DOI: [10.1002/cbdv.201100013](https://doi.org/10.1002/cbdv.201100013).
- 20 Alam MB, Chowdhury NS, Sohrab MH, et al. Cerevisterol alleviates inflammation via suppression of MAPK/NF- κ B/AP-1 activation of the Nrf2/HO-1 signaling cascade[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 199. DOI: [10.3390/biom10020199](https://doi.org/10.3390/biom10020199).
- 21 Giner EM, Máñez S, Recio MC, et al. *In vivo* studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids[J]. Planta Medica, 2000, 66(3): 221–227. DOI: [10.1055/s-2000-8563](https://doi.org/10.1055/s-2000-8563).
- 22 Gao Y, Yan H, Jin R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from Poria cocos is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain[J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2528–2535. DOI: [10.3109/13880209.2016.1168853](https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1168853).
- 23 倪付勇, 谢雪, 温建辉, 等. 茯苓非多糖类化学成分抗补体活性[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2529–2533. [Ni FY, Xie X, Wen JH, et al. Non-polysaccharide chemical constituents of Poria cocos and their anti-complementary activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(11): 2529–2533.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.004](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.004).
- 24 何红梅, 程雁, 马如龙, 等. 去氢茯苓酸对湿疹大鼠的治疗作用及对免疫反应的影响[J]. 现代免疫学, 2024, 44(2): 104–111. [He HM, Cheng Y, Ma RL, et al. The therapeutic effect of dehydroferulic acid on eczema rats and its impact on immune response[J]. Current Immunology, 2024, 44(2): 104–111.] <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotat-SHMY202402003.htm>.
- 25 Xu H, Wang Y, Jurutka PW, et al. 16 α -hydroxytrametenolic acid from Poria cocos improves intestinal barrier function through the glucocorticoid receptor-mediated PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(39): 10871–10879. DOI: [10.1021/acs.jafc.9b04613](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04613).
- 26 Ling H, Zhou L, Jia X, et al. Polyporenic acid C induces caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer A549 cells[J]. Mol Carcinog, 2009, 48(6): 498–507. DOI: [10.1002/mc.20487](https://doi.org/10.1002/mc.20487).
- 27 Lucas RM, Luo L, Stow JL. ERK1/2 in immune signalling[J]. Biochemical Society Transactions, 2022, 50(5): 1341–1352. DOI: [10.1042/BST20220271](https://doi.org/10.1042/BST20220271).
- 28 Medina JH, Viola H. ERK1/2: a key cellular component for the formation, retrieval, reconsolidation and persistence of memory[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2018, 11: 361. DOI: [10.3389/fnmol.2018.00361](https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00361).
- 29 Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997–2007. DOI: [10.3892/etm.2020.8454](https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454).
- 30 Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers[J]. Brit J Cancer, 2006, 94(4): 455–459. DOI: [10.1038/sj.bjc.6602970](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602970).
- 31 Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. Cell, 2017, 170(4): 605–635. DOI: [10.1016/j.cell.2017.07.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029).
- 32 梁旗, 李彩萍, 兰珍. TNF- α 与糖尿病肾病关系的研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(3): 178–182. [Liang Q, Li CP, Lan Z. Study of the relationship between serum tumor necrosis factor alpha and diabetic nephropathy[J]. Journal of Inner Mongolia Medical University, 2008, 30(3): 178–182.] DOI: [10.3969/j.issn.1004-2113.2008.03.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-2113.2008.03.007).
- 33 Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis[J]. New Engl J Med, 2006, 355(7): 704–712. DOI: [10.1056/NEJMe055183](https://doi.org/10.1056/NEJMe055183).
- 34 Einarsdóttir K, Darabi H, Li Y, et al. ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(1): R15. DOI: [10.1186/bcr1861](https://doi.org/10.1186/bcr1861).
- 35 Ioannidis JPA, Ralston SH, Bennett ST, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes[J]. J Am Med Assoc, 2004, 292(17): 2105–2114. DOI: [10.1001/jama.292.17.2105](https://doi.org/10.1001/jama.292.17.2105).

收稿日期: 2025 年 03 月 19 日 修回日期: 2025 年 08 月 08 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳