

基于网络药理学及混合加权法优化凤仙透骨草提取工艺*

穆雪峰¹, 吴铭², 周朝梅², 施静², 游元元^{2**}

(1. 成都医学院第一附属中医医院针灸康复科, 成都 610500; 2. 成都医学院药学院, 成都 610500)

摘要 **目的:**通过网络药理学、混合加权法及响应面法优化凤仙透骨草治疗骨关节炎(OA)的提取工艺。**方法:**利用网络药理学及分子对接技术,对凤仙透骨草治疗骨关节炎的潜在活性成分及靶点进行筛选及验证,LC-MS 确定关键成分并以各指标成分含量为评价指标,利用层次分析法(AHP)-指标相关性的指标权重确定方法(CRITIC)混合加权法及 Box-Behnken 响应面设计优化提取工艺。**结果:**东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚为凤仙透骨草治疗骨关节炎的活性成分,三者混合提取的最佳工艺为加入 5 倍量 82% 乙醇,回流提取 2 次,每次 35 min。**结论:**凤仙透骨草通过多成分、多靶点、多通路发挥治疗骨关节炎的作用,AHP-CRITIC 混合加权法确定的权重系数客观合理,优选出的提取工艺稳定可行。**关键词:**凤仙透骨草;骨关节炎;网络药理学;分子对接;层次分析法(AHP);指标相关性的指标权重确定方法(CRITIC);响应面法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)11-1932-12
doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0717

Optimization of extraction process of *Impatiens Balsaminae* Caulis based on network pharmacology and mixture weighting methods*

MU Xue-feng¹, WU Ming², ZHOU Chao-mei², SHI Jing², YOU Yuan-yuan^{2**}

(1. Department of Acupuncture and Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Department of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

Abstract Objective: To optimize the extraction process of *Impatiens Balsaminae* Caulis in the treatment of degenerative osteoarthritis based on network pharmacology, mixture weighting and response surface method. **Methods:** Network pharmacology and LC-MS techniques were used to determine the active ingredients of *Impatiens Balsaminae* Caulis in the treatment of osteoarthritis, and they were taken as evaluation indexes. The extraction process of *Impatiens Balsaminae* Caulis was optimized by analytic hierarchy process(AHP)-criteria importance through intercriteria correlation(CRITIC) mixed weighting method and Box-Behnken response surface design. **Results:** Scopoletin, quercetin and kaempferol were the active ingredients in the treatment of osteoarthritis. The optimal extraction process was to add 5 times of 82% ethanol and reflux twice, 35 min each time. **Conclusion:** The treatment of osteoarthritis can be achieved by regulating target genes and related signaling pathways through various active components. The weight coefficient determined by AHP-CRITIC hybrid weighting method is objective and

* 成都医学院-成都医学院第一附属中医医院临床科学研究基金项目(2022LHZYYB-07);成都医学院应用开发与成果转化培育项目(CYCG19-01);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2019]41号)

** 通信作者 Tel:15308089262;E-mail:ym633@sina.com
第一作者 Tel:15776312786;E-mail:1306519221@qq.com

reasonable, and the optimized extraction process is stable and feasible.

Keywords: Impatiens Balsaminae Caulis; osteoarthritis; network pharmacology; molecular docking; analytic hierarchy process(AHP); criteria importance through intercriteria correlation(CRITIC); response surface method

骨关节炎是一种以关节软骨退行性病变和继发性骨质增生为特征的常见慢性关节疾病,在60岁以上的老人中致残率超过20%,临床主要表现为膝关节疼痛、肿胀及功能受限^[1-3],中医属于“骨痹”范畴,临床治疗常用熏洗之法,用药频次分析显示透骨草居于前列^[4-5]。

透骨草品种众多,凤仙透骨草为其主流品种。凤仙透骨草来源于凤仙花科植物凤仙花 *Impatiens balsamina* L. 的茎,具有祛风散寒、温经通络、活血止痛之效,主要含有的黄酮类、萜类、萘醌类等化学成分,具有抗炎镇痛、抗菌、抗氧化等作用^[6],但目前该药治疗骨关节炎的药效物质基础鲜有报道,使其提取工艺缺乏指导。

本研究采用网络药理学及分子对接技术,结合LC-MS筛选并预测凤仙透骨草治疗骨关节炎的主要有效成分、潜在作用靶点和信号通路;采用单因素试验和响应面法对凤仙透骨草提取工艺中的乙醇浓度、料液比、回流提取时间3个因素进行研究,以活性成分的含量为评价指标,借助层次分析法(AHP)-指标相关性的指标权重确定方法(CRITIC)混合加权法进行权重分配,Box-Behnken 响应面法优化凤仙透骨草的提取工艺。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent Technology 6545 LC/Q-TOF 超高效液相色谱串联质谱仪,Agilent 公司;Ultimate 3000 高效液相色谱仪,Thermo Fisher 公司;KH7200B 超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;CPA225D 十万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;HB 10 S096 旋转蒸发器,IKA 集团;L400 离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SL-100 移液器,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 试剂

凤仙透骨草,购买于成都荷花池中药市场,经成都医学院游元元教授鉴定为凤仙花 *Impatiens balsamina* L. 的茎;对照品东莨菪内酯(批号 MUST-21032415, HPLC 法测得纯度 $\geq 99.44\%$)、山柰酚(批

号 MUST-20082818, HPLC 法测得纯度 $\geq 99.30\%$)、槲皮素(批号 MUST-21001104, HPLC 法测得纯度 $\geq 99.12\%$),均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 凤仙透骨草网络药理学研究

2.1.1 活性成分及其作用靶点筛选 检索凤仙透骨草的所有中英文文献,整理其化学组分。在 TC-MSP 数据库(<http://tcmsp.com/tcmsp.php>)输入“凤仙透骨草”下载成分信息,将2处来源的化学成分信息合并去重。通过 pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)分别获得各成分二维结构 SDF 格式图片,导入 Swiss ADME 平台(<http://www.SwissADME.ch/>),以药代动力学胃肠吸收选择“High”,药物相似性前2个条件满足2个“YES”为筛选条件,得到凤仙透骨草潜在活性成分8个,见表1。将获取的活性成分 SDF 结构文件导入 Swiss target prediction 平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),预测活性成分潜在靶点。取评分大于“0.1”的靶点基因进行整合去重,得到化合物重要潜在靶点。

2.1.2 疾病靶点的收集 以“Osteoarthritis”为搜索词,在 GeneCard 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)中搜索已公布的人类骨关节炎的相关基因,合并去除重复项后,分别得到骨关节炎相关靶点将其导出,共导出2242个与骨关节炎相关的疾病靶点。

2.1.3 药物-疾病交集靶点基因数据库构建 使用在线微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>),将凤仙透骨草活性成分作用基因与骨关节炎基因取交集,得到71个成分-疾病重叠靶点信息,韦恩图见图1。

2.1.4 药物-疾病交集靶点蛋白互作网络的构建 在 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)中进行交集靶点蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分别使用 Cytoscape 的“Network analyzer”插件,通过拓扑学分析计算出 PPI 网络各靶点节点的度值,根据节点度值大小选定网络中关键靶点基因,

表 1 凤仙透骨草中 8 个活性化合物基本信息

Tab. 1 Basic information of 8 active compounds in *Impatiens Balsaminae* Caulis

CAS	化合物(compound)	分子式(chemical formula)	相对分子质量(relative molecular mass)
574-84-5	秦皮素(fraxetin)	C ₁₀ H ₈ O ₅	208.167
117-39-5	槲皮素(querctetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.236
92-61-5	东莨菪内酯(scopoletin)	C ₁₀ H ₈ O ₄	192.168
520-18-3	山柰酚(kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.236
305-01-1	秦皮乙素(esculetin)	C ₉ H ₆ O ₄	178.141
99-50-3	原儿茶酸(proto catechuic acid)	C ₇ H ₆ O ₄	154.120
83-72-7	2-羟基-1,4-萘醌(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)	C ₁₀ H ₆ O ₃	174.153
13306-05-3	矢车菊素(cyanidin)	C ₅ H ₁₁ O ₆	287.244

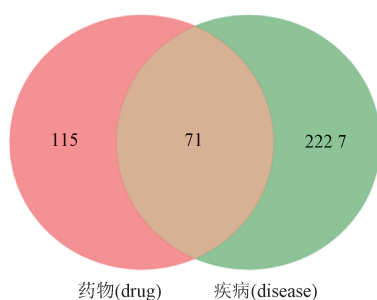


图 1 凤仙透骨草成分-疾病靶点交集 Venn 图

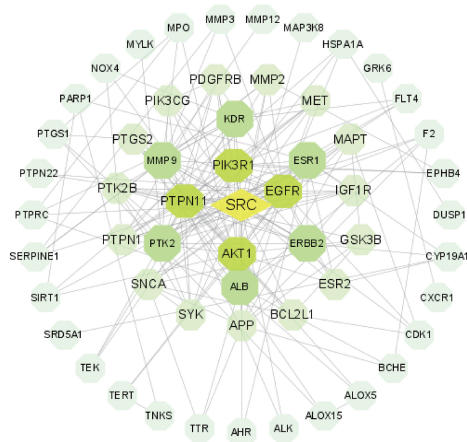
Fig. 1 Venn plot of the intersection of components and disease targets of *Impatiens Balsaminae* Caulis

图 2 药物-疾病靶点基因蛋白相互作用网络

Fig. 2 Drug-disease target gene-protein interaction network

度值越大,该基因在 PPI 网络中的作用越大。活性成分-疾病靶点网络见图 2,重合靶点见表 2。

2.1.5 富集分析 将 71 个交集靶点基因上传到 David 数据库进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析,得到具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 GO 条目,共 327 条,其中生物学进程 (biological process, BP)

225 条,细胞组分 (cellular component, CC) 39 条,分子功能 (molecular function, MF) 63 条,靶点基因主要参与凋亡过程负调控、参与血管生成、对氧化应激反应、正向调节 ERK1/2 级联反应等生物学进程等,主要在细胞质核周区、细胞外基质、线粒体、胞质等处发挥作用。参与的 MF 主要包括酶、蛋白质、蛋白质激酶、ATP 及胰岛素受体的结合等。结果见图 3,每个模块中 P 分值最小的前 10 个条目,其值越小越偏向红色,反之则偏蓝。气泡大小代表其富集基因数。

京都基因和基因组 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析结果显示,靶点基因富集于 73 条相关通路,图 4 中列出了 P 值排序最小的 20 个条目,靶点基因主要涉及到雌激素信号通路、RAS 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、血管内皮生长因子信号通路、趋化因子信号通路等,这些通路与细胞的炎症反应、氧化应激及转化、凋亡、增值及分化等生命过程密切相关。

2.1.6 “药物-活性成分-靶点-通路”拓扑网络构建 使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建凤仙透骨草与骨关节炎交集靶点的“药物-活性成分-靶点-通路”调控网络,采用“Network analyzer”插件进行网络拓扑参数分析得出上述网络中节点的度值,根据度值大小确定及靶点重要活性成分。如图 5 所示,图中按度值排名从高到低的化合物依次为槲皮素、矢车菊素、山柰酚、东莨菪内酯、秦皮乙素。

2.1.7 活性成分-靶点分子对接验证 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载分子的结构式,再从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载核心蛋白结构域的 pdb 格式,通过 Autodock Tools-1.5.7 对靶蛋白进行除水、加氢、电荷,以及对不完整的残基进行修饰,再将蛋白-配体

表 2 药物 - 疾病核心靶点基因
Tab. 2 Drug - disease core target genes

靶点(target)	名称(definition)	度值(degree)	中心度(centrality)
SRC	原癌基因酪氨酸蛋白激酶(proto - oncogene tyrosine - protein kinase Src)	23	0.427 830 212
PIK3R1	磷脂酰肌醇 3 - 激酶调节亚基 α (phosphoinositide - 3 - kinase regulatory subunit alpha)	17	0.115 595 741
PTPN11	酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 11 型(tyrosine - protein phosphatase non - receptor type 11)	15	0.073 224 353
ESR1	雌激素受体(estrogen receptor; nuclear hormone receptor)	13	0.227 951 022
AKT1	AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT serine/threonine kinase 1)	11	0.144 175 979
EGFR	表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor)	10	0.019 349 643
PTK2	粘着斑激酶 1(focal adhesion kinase 1)	10	0.051 542 837
PTPN1	酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 1 型(tyrosine - protein phosphatase non - receptor type 1)	8	0.048 275 949
PDGFRB	血小板衍生长因子受体 β (platelet - derived growth factor receptor beta)	7	0.004 424 645
ERBB2	受体酪氨酸蛋白激酶 erbB - 2 (receptor tyrosine - protein kinase erbB - 2)	7	0.086 726 065

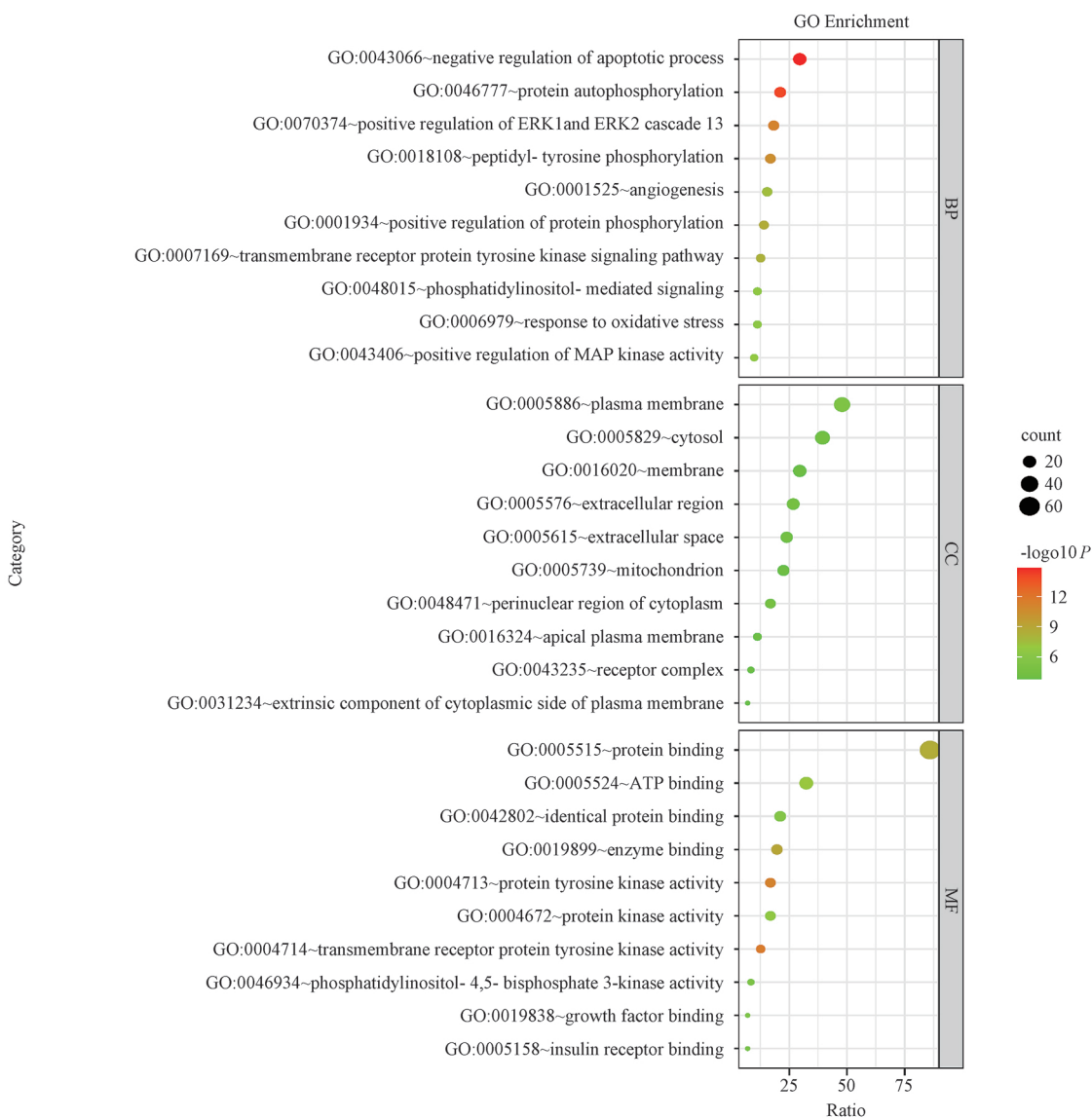


图 3 GO 富集分析气泡图

Fig. 3 Bubble chart of GO enrichment analysis

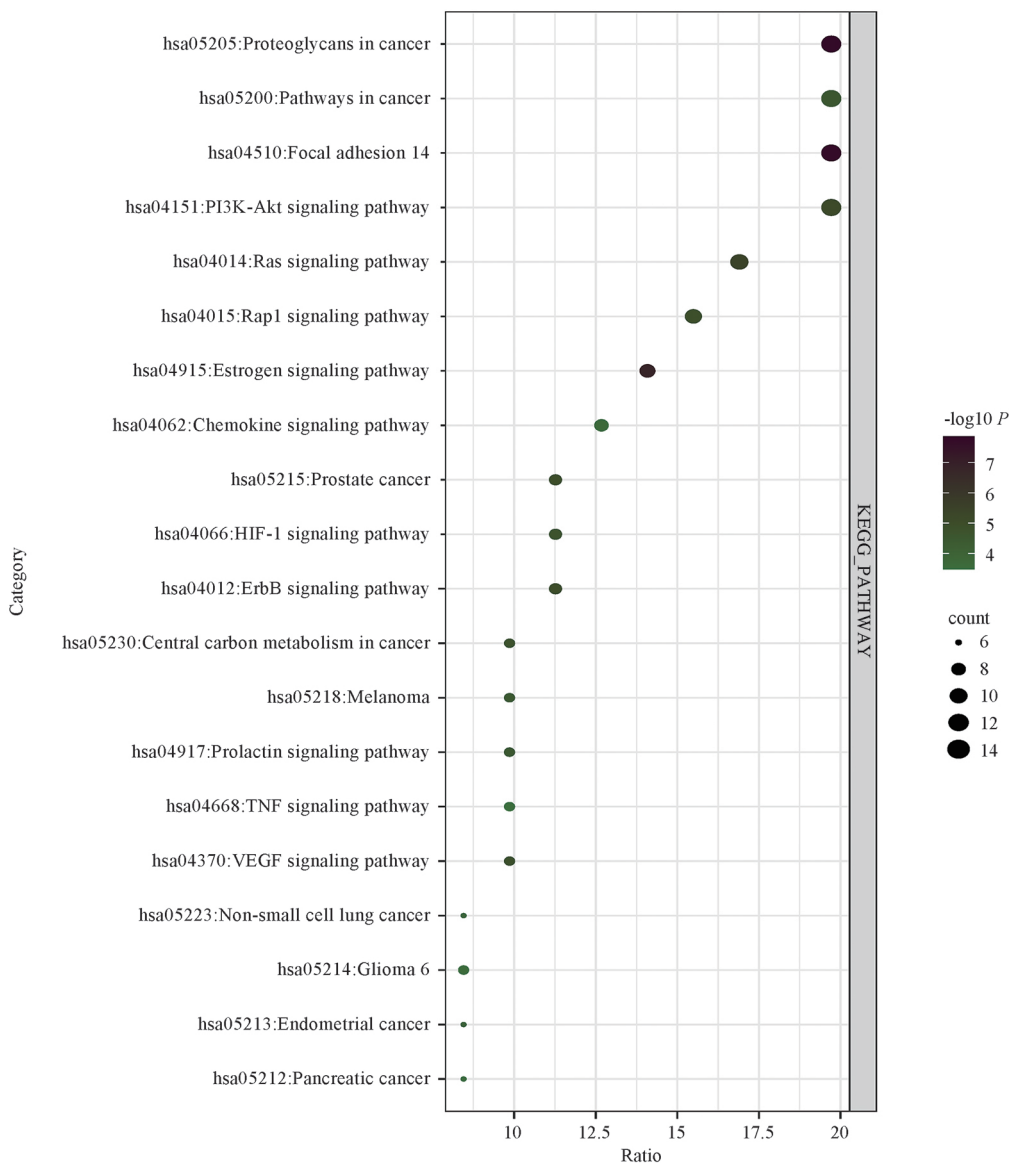


图 4 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 4 Bubble chart of KEGG enrichment analysis

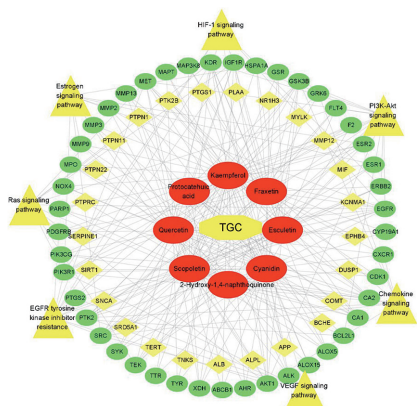


图 5 药物-活性成分-靶点-通路调控网络

Fig. 5 Drug-active ingredient-target-pathway regulatory network

复合物中相关分子的坐标置于 Grid Box, 然后运行 Vina 脚本进行分子结合能计算。将度值排名前六的潜在活性成分与核心靶点进行分子对接, 通常考虑结合能低于 $-4.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明受体与配体有相应的结合能力; 低于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明具有较好的结合活性; 小于 $-7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明有强烈的结合活性^[7-9]。由表 3 可知, 各活性成分与核心靶点均有较好的结合活性, 其中槲皮素、山柰酚和矢车菊素与 PTK2、PTPN11、PTPN1 等靶点有较强烈的结合活性。

2.2 风仙透骨草治疗骨关节炎的质量标志物筛选

2.2.1 供试品溶液的制备 称取透骨草粉末

表 3 活性成分与主要靶点的分子对接

Tab. 3 The active component is docked with the molecules of the main target

成分 (component)	结合能(binding energy)/(kcal · mol ⁻¹)									
	SRC	AKT1	EGFR	ERBB2	ESR1	PDGFRB	PIK3R1	PTK2	PTPN11	PTPN1
东莨菪内酯(scopoletin)	-6.3	-4.6	-4.0	-5.2	-5.5	-5.6	-5.4	-5.5	-6.3	-5.4
秦皮乙素(esculetin)	-6.7	-4.9	-4.7	-5.1	-5.3	-5.2	-5.6	-5.9	-6.2	-6.1
秦皮素(fraxetin)	-5.8	-4.7	-4.5	-5.1	-5.7	-4.4	-5.5	-5.3	-6.2	-6.3
山柰酚(kaempferol)	-6.1	-6.5	-5.7	-6.4	-7.1	-5.4	-6.9	-7.6	-7.4	-7.4
槲皮素(querceetin)	-6.2	-6.9	-5.4	-6.2	-6.4	-5.7	-6.4	-7.3	-7.1	-7.5
矢车菊素(cyanidin)	-7.8	-6.7	-5.6	-5.8	-7.0	-5.9	-6.2	-7.7	-7.0	-7.6

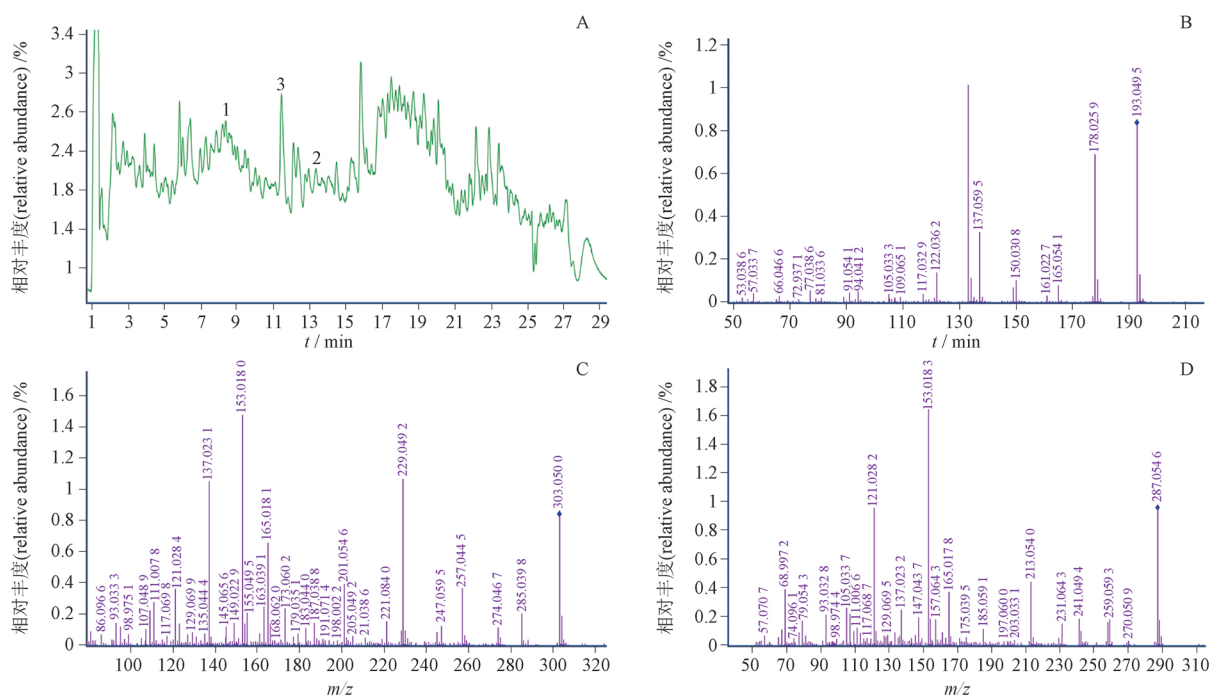
约 2.0 g, 甲醇浸泡过夜, 超声(功率 100 W, 频率 40 kHz)提取 30 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.2 LC-MS 法 质谱条件: 离子源为 ESI(电喷雾离子化)源, 以正离子模式采集; AutoMSe 模式采集一级、二级质谱解离碎片; 电喷雾电压 2 500 V, ESI 离子源温度 100 °C; 锥孔气流量 50 L · h⁻¹, 去溶剂气流量 500 L · h⁻¹; 一级碰撞能量 10 eV, 二级碰撞解离能量 20 ~ 35 eV; 数据采集范围为 m/z 50 ~ 1 250。

色谱条件: 采用 Waters C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 超高液相色谱柱, 流动相为超纯水(A) - 甲醇

(B), 梯度洗脱 (0 ~ 2.78 min, 5% B → 20% B; 2.78 ~ 4.17 min, 20% B → 28% B; 4.17 ~ 6.95 min, 28% B → 41% B; 6.95 ~ 9.73 min, 41% B → 45% B; 9.73 ~ 11.12 min, 45% B → 52% B; 11.12 ~ 13.89 min, 52% B → 62% B; 13.89 ~ 16.67 min, 62% B → 85% B; 16.67 ~ 19.45 min, 85% B → 90% B; 19.45 ~ 22.23 min, 90% B → 100% B; 22.23 ~ 25.01 min, 100% B), 流速 0.2 mL · min⁻¹, 进样体积 1 μL, 柱温 30 °C, 自动进样器温度 4 °C。

2.2.3 筛选结果 透骨草样品正离子模式下可筛选得到槲皮素、山柰酚及东莨菪内酯, 总离子流图及 3 个成分的二级质谱图见图 6。



1, B. 东莨菪内酯(scopolide) 2, C. 槲皮素(querceetin) 3, D. 山柰酚(kaempferol)

图 6 凤仙透骨草正离子模式模式下 TIC 图(A)及各成分二级质谱图(B~D)

Fig. 6 TIC chromatogram (A) and secondary mass spectra (B-D) of each component in Impatiensis Balsaminae Caulis under positive ion mode

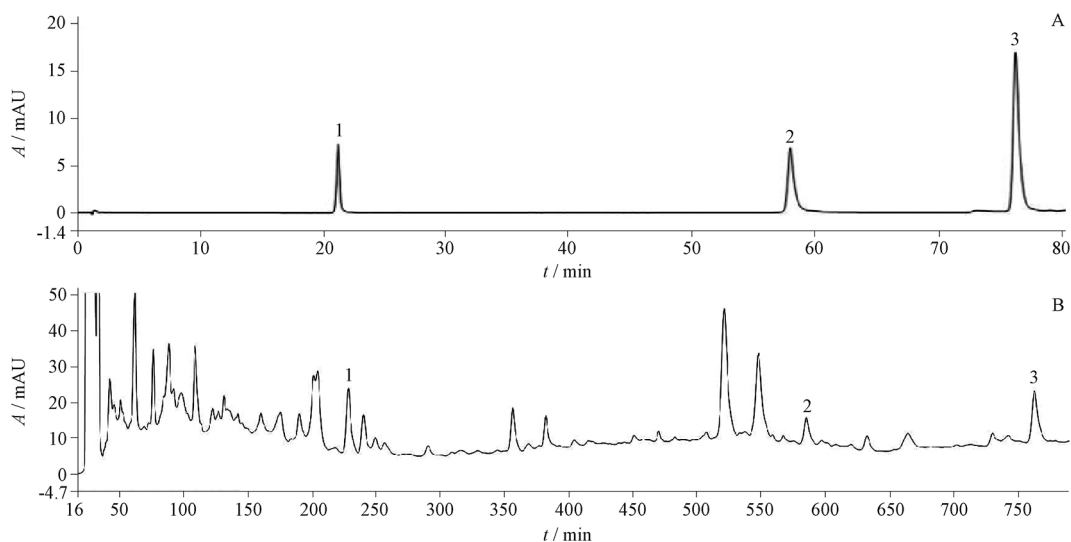
2.3 活性成分含量测定方法的建立

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别取东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的对照品适量,精密称定,加甲醇分别定容至 5 mL,配制成质量浓度为 1.02、1.00、1.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品储备液,精密量取槲皮素对照品储备液 1.25 mL,山柰酚对照品储备液 1.73 mL,东莨菪内酯对照品储备液 0.72 mL,用 75% 乙醇定容至 25 mL,制成每 1 mL 含槲皮素 0.05 mg、山柰酚 0.07 mg、东莨菪内酯 0.03 mg 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 称取凤仙透骨草粉末(过 4 号筛)约 5.0 g,加入 75% 乙醇 50 mL,超声(功率 100 W,频率 40 kHz)提取 30 min,旋蒸浓缩至约 5 mL,离心(4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.3 色谱条件 采用中谱科技 RD-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(B)-0.1% 醋酸(A)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 10%B \rightarrow 16%B; 10~20 min, 16%B; 20~25 min, 16%B \rightarrow 16.5%B; 25~50 min, 16.5%B \rightarrow 25%B; 50~60 min, 25%B \rightarrow 25.5%B; 60~80 min, 25.5%B \rightarrow 32%B; 80 min, 32%B \rightarrow 100%B; 80~90 min, 100%B; 90~95 min, 100%B \rightarrow 10%B),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 300 nm。

2.3.4 专属性试验 精密移取“2.3.1”项下混合对照品溶液、“2.3.2”项下供试品溶液各 20 μL ,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定。结果表明,供试品溶液在对照品相同保留时间的出峰位置处分别与对照品色谱峰对应一致。色谱图见图 7。



1. 东莨菪内酯(scopolide) 2. 槲皮素(querctin) 3. 山柰酚(kaempferol)

图 7 混合对照品(A)和凤仙透骨草样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of mixed references (A) and *Impatiensis Balsaminae Caulis* sample (B)

2.3.5 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量,用 75% 乙醇分别稀释 2、4、8、16 倍,得系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.3.3”项下条件测定,以质量浓度为横坐标,仪器测定峰面积为纵坐标进行线性回归,东莨菪碱、槲皮素、山柰酚的回归方程分别为

$$Y = 3.0 \times 10^7 X + 103 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.0 \times 10^7 X - 2.9 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 4.0 \times 10^7 X - 2.2 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明,东莨菪内酯质量浓度在 0.002 ~

0.030 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、槲皮素质量浓度在 0.003 ~ 0.050 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山柰酚在 0.004 ~ 0.070 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下的混合对照品溶液 20 μL ,按照“2.3.3”项下色谱条件连续进样 6 针。测定峰面积,计算东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 1.6%、2.5%、2.0%,表明仪器精密度良好,适用于透骨草中活性物质的测定。

2.3.7 重复性试验 精密称取透骨草粉末 6 份,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.3.3”项下

色谱条件连续进样6针。测得东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的平均百分含量分别为0.015 2%、0.005 1%、0.009 6%，RSD分别为2.3%、2.9%、2.4%，表明该方法重复性较好。

2.3.8 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液20 μL ，分别于制备后0、2、4、8、12、24 h，按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定，计算东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚峰面积的RSD分别为2.9%、2.0%、1.1%，表明供试品溶液中各物质在24 h内稳定。

2.3.9 加样回收试验 精密称取9份已知各指标成分含量的透骨草粉末，分成3组，每组平行3份，按照50%、100%、150%的比例加入东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚对照品溶液，按“2.3.2”项下方法制成供试溶

液，按“2.3.3”项下色谱条件进行测定，结果东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的加样回收率分别为102.5%、98.6%、100.2%，RSD分别为2.0%、1.8%、1.9%。结果表明，该方法加样回收率符合含量测定要求。

2.4 AHP-CRITIC混合加权法优化提取工艺

2.4.1 Box-Behnken响应面优化工艺试验设计 根据前期单因素试验结果，确定提取时间(A)(10、30、50 min)、乙醇浓度(B)(75%、85%、95%)、料液比(C)(5、17.5、30倍)为影响因素，提取次数固定为2次，利用Design-Expert 12软件，按-1、0、1的三水平编码，以各指标成分含量为响应值，进行Box-Behnken响应面试验设计。因素水平设计、试验安排及试验结果见表4。

表4 响应面试验设计与结果
Tab.4 Response surface test design and results

试验号 (compound)	A 提取时间 (extraction time)/min	B 乙醇浓度 (ethanol concentration)/%	C 料液比 (solid-liquid ratio)	质量分数(mass fraction)/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			综合得分 (composite score)
				东莨菪内酯 (scopolide)	槲皮素 (quercetin)	山柰酚 (kaempferol)	
1	30(0)	75(-1)	5(-1)	77.159	80.953	55.863	71.911
2	30(0)	85(0)	17.5(0)	38.592	58.903	41.456	50.291
3	10(-1)	85(0)	30(1)	45.851	65.501	46.697	56.514
4	30(0)	85(0)	17.5(0)	58.187	37.160	43.734	42.163
5	30(0)	85(0)	17.5(0)	76.118	38.011	44.578	45.258
6	50(1)	95(1)	17.5(0)	57.239	40.295	39.097	42.115
7	50(1)	85(0)	5(-1)	81.394	72.722	60.981	69.864
8	10(-1)	75(-1)	17.5(0)	48.554	56.936	26.868	45.596
9	30(0)	95(1)	30(1)	58.218	41.189	41.305	43.467
10	30(0)	85(0)	17.5(0)	41.051	59.095	43.062	51.263
11	30(0)	75(-1)	30(1)	66.945	32.567	4.330	27.473
12	30(0)	95(1)	5(-1)	55.419	52.206	48.559	51.387
13	50(1)	85(0)	30(1)	40.611	15.810	3.546	14.895
14	10(-1)	85(0)	5(-1)	45.110	66.401	50.490	58.184
15	50(1)	75(-1)	17.5(0)	43.209	13.924	3.595	14.258
16	30(0)	85(0)	17.5(0)	45.162	65.528	53.075	58.609
17	10(-1)	95(1)	17.5(0)	38.629	9.087	31.347	20.551

注(note):括号中是水平编码(horizontal encoding in parentheses)

2.4.2 AHP法计算权重系数 将透骨草中的东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚3个活性成分的优先顺序作为权重指标予以量化，通过确定各指标的优先顺序槲皮素、山柰酚、东莨菪内酯，构建成对比较矩阵，结果见表5。采用和积法求得东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的权重系数分别为0.125 3、0.490 6、0.384 1，最

大特征根(3.000)，本次针对3阶判断矩阵计算得到CI值为0.000，RI值查表为0.520，因此计算得到CR值为0.000(<0.1)，意味着本次研究判断矩阵满足一致性检验，计算所得权重具有一致性。

2.4.3 CRITIC法计算权重 将表4中的BBD试验结果进行标准化处理，[指标成分值=(实测值-最小

表5 各活性成分成对比较矩阵

Tab. 5 Pairwise comparison matrix of each active ingredient

成分 (component)	东莨菪内酯 (scopolide)	槲皮素 (quercetin)	山柰酚 (kaempferol)
东莨菪内酯 (scopolide)	1.000	0.250	0.333
槲皮素 (quercetin)	4.000	1.000	1.250
山柰酚 (kaempferol)	3.000	0.800	1.000

值)/(最大值 - 最小值)], 根据公式 $f_j = \sum_{i=1}^n (1 - r_{ij})$ 、 $c_j = \delta_j \sum_{i=1}^n (1 - r_{ij})$ 、 $\omega_j = c_j / \sum_{i=1}^m c_j$ 计算相应的对比强度 (δ_j)、冲突性 (f_j)、信息量 (c_j)、指标权重 (ω_j)，结果见表6，得到东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的权重系数分别为 0.348 4、0.357 3、0.294 3。

表6 CRITIC 权重计算结果

Tab. 6 CRITIC weight calculation results

考察指标 (inspection index)	ω_j		
	东莨菪内酯 (scopolide)	槲皮素 (quercetin)	山柰酚 (kaempferol)
对比强度 (contrast intensity)	0.003 0	0.004 0	0.004 0
冲突性 (conflict)	1.348 0	0.917 0	0.892 0
信息量 (amount of information)	0.004 0	0.004 0	0.003 0
指标权重 (Index weight)	0.348 4	0.357 3	0.294 3

2.4.4 AHP - CRITIC 混合加权法计算权重 通过 AHP 法和 CRITIC 法，分别计算出东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚的权重系数，按照复合权重， $\omega_{\text{复合}j} = \omega_{\text{AHP}j} \omega_{\text{CRITIC}j} / \sum \omega_{\text{AHP}j} \omega_{\text{CRITIC}j}$ ，计算得东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚 3 个成分的复合权重分别为 0.131 5、0.528 0、0.340 5。

2.4.5 综合评价结果的比较 采用 AHP 法、CRITIC 法和 AHP - CRITIC 混合加权法计算的权重系数，分别对实验结果进行综合评分，结果见表7。从综合得分分析，对 AHP 法与 CRITIC 法、AHP 法与 AHP - CRITIC 混合加权法、CRITIC 法与 AHP - CRITIC 混合加权法两两进行相关性分析，相关系数分别为 0.971、1.000、0.971，三者相关性显著 ($P < 0.01$)，说明通过 AHP 法、CRITIC 法和 AHP - CRITIC 混合加权法计算的综合得分具有一致性。从权重系数分析，AHP 法与 CRITIC 法计算的权重系数相关性为 0.105，二者相关性不显著 ($P = 0.933 > 0.05$)，说明

二者反映的信息不具有叠加性。综合考虑，选择 AHP - CRITIC 混合加权法。

表7 3种加权法综合评分结果

Tab. 7 Comprehensive scoring results of three weighted methods

试验号 (compound)	AHP	CRITIC	AHP - CRITIC
1	70.840	72.247	71.911
2	49.657	46.692	50.291
3	55.816	53.121	56.514
4	42.320	46.420	42.163
5	45.308	53.220	45.258
6	41.958	45.846	42.115
7	69.299	72.288	69.864
8	44.337	45.167	45.596
9	43.367	47.156	43.467
10	50.676	48.090	51.263
11	26.029	36.234	27.473
12	51.208	52.252	51.387
13	14.207	20.841	14.895
14	57.622	54.301	58.184
15	13.626	21.087	14.258
16	58.193	54.767	58.609
17	21.339	25.931	20.551

2.4.6 数据处理与分析 运用 Design - Expert 12 软件对表4中各因素水平设计与 AHP - CRITIC 法计算的综合得分进行拟合，得回归方程：

$$Y = -404.15 - 3.62A + 13.88B - 7.75C + 0.066AB - 0.053AC + 0.073BC - 0.022A^2 - 0.10B^2 + 0.058C^2$$

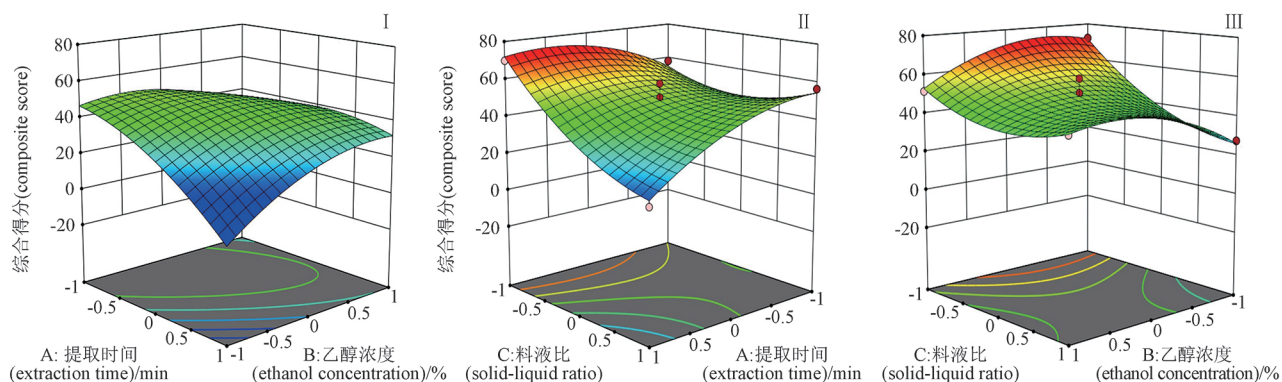
$$r = 0.976 6$$

其中 Y 表示综合得分， A 表示提取时间得分， B 表示乙醇浓度得分， C 表示料液比得分。校正系数为 0.945 6，说明该模型拟合度良好，试验误差小，可用此模型对综合评分进行分析和预测，对该模型进行方差分析，结果见表8。以综合得分为响应值， $P < 0.05$ ，说明该回归方程显著，而失拟值 $P = 0.700 3$ ，不显著，说明未知因素对试验的干扰小。利用 Design - Expert 12 软件得到方程等高线及响应面图，以确定最佳提取工艺参数，见图8。根据模型拟合结果，并结合实际操作情况，将优化后的透骨草提取工艺参数调整为加入 5 倍量 82% 乙醇，回流提取 2 次，每次 35 min。

2.4.7 工艺验证 根据优化后的最佳提取工艺，

表 8 方差分析结果
Tab. 8 Analysis of variance results

方差来源 (source of variance)	平均和 (mean sum)	自由度 (degree of freedom)	均方 (mean square)	F	P
模型(model)	4 499.02	9	499.89	16.02	0.000 7
A	197.13	1	197.13	6.32	0.040 2
B	0.368 5	1	0.368 5	0.011 8	0.916 5
C	1 485.01	1	1 485.01	47.60	0.000 2
AB	699.65	1	699.65	22.43	0.002 1
AC	710.20	1	710.20	22.76	0.002 0
BC	333.41	1	333.41	10.69	0.013 7
A ²	325.40	1	325.40	10.43	0.014 5
B ²	429.17	1	429.17	13.76	0.007 6
C ²	351.62	1	351.62	11.27	0.012 1
残差(residual error)	218.39	7	31.20	/	/
失拟项(missing fit)	59.85	3	19.95	0.5034	0.700 3
纯误差(pure error)	158.54	4	39.63	/	/
校正总和(corrected sum)	4717.41	16	/	/	/



I. 提取时间与乙醇浓度(extraction time & ethanol concentration) II. 乙醇浓度与料液比(ethanol concentration & solid-liquid ratio) III. 提取时间与料液比(extraction time & solid-liquid ratio)

图 8 各因素对综合得分影响的响应面

Fig. 8 Response surface of the influence of various factors on the comprehensive score

取透骨草药材 3 份, 制得供试品溶液, 测定并计算 后的提取工艺稳定可行, 可用于凤仙透骨草药材 各项指标得出综合评分, 结果见表 9。表明优化 的提取操作。

表 9 工艺验证结果
Tab. 9 Process verification results

成分 (component)	含量(content) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			均值(mean)	RSD/ %
	1	2	3		
东莨菪内酯(scopolide)	78.280	79.483	78.136	78.633	0.94
槲皮素(queretin)	81.648	82.326	81.605	81.860	0.49
山柰酚(kaempferol)	55.698	56.082	56.575	56.118	0.78
综合评分(composite score)	72.369	73.016	72.626	72.670	0.45

3 讨论

本研究采用网络药理学及分子对接技术对凤仙透骨草治疗骨关节炎的活性成分进行了预测,发现东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚等可能是其发挥作用的主要活性成分。这些活性成分作用于 EGFR、SRC、AKT1、ESR1、PIK3R1、MMP9 等关键靶点,进而通过参与雌激素信号通路、RAS 信号通路、PI3K - Akt 信号通路、HIF - 1 信号通路等发挥治疗骨关节炎的作用。

骨关节炎发病机制与基质金属蛋白酶(MMP)、细胞因子、基因、免疫反应及血液循环等多种因素密切相关^[10]。网络药理学预测结果显示凤仙透骨草中有多种治疗骨关节炎的潜在活性成分,但通过 LC - MS 技术分析后仅获得 3 个可测活性成分,故本研究选用东莨菪内酯、槲皮素、山柰酚 3 个物质进行考察。东莨菪内酯具有抗炎、镇痛的药理活性,是治疗骨关节炎的重要活性物质^[11]。WAN - OSMAN 等^[12]研究表明东莨菪内酯可抑制糖胺聚糖及 NO 从软骨外植体中释放白细胞介素 - 1 β (IL - 1 β),富含东莨菪素的海巴戟提取物可改善软骨结构并提高骨形成标志物 PINP 的水平。槲皮素具有抗炎、抑制破骨细胞吸收、抗细胞凋亡等活性作用,其体内外实验均表明槲皮素能显著降低炎性介质的形成,减少 IL - 1 β 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF - α)、白细胞介素 - 6(IL - 6)等细胞因子的表达与分泌^[13-14],具有治疗骨关节炎的潜在药用价值。山柰酚及其糖苷具有抗炎、镇痛、抗癌等生理活性^[15-17],研究表明山柰酚能以浓度依赖的方式导致 IL - 1 β 刺激的 PEG2 和 NO 形成减少,上调大鼠骨关节炎软骨细胞 iNOS 和 Cox - 2 的表达,抑制 I κ Ba 的降解和 NF - κ B 活化,具有显著的抗炎作用^[18]。

本研究基于 AHP - CRITIC 混合加权法和 Box - Behnken 响应面法,通过统计学和数学方法于一体,最终确定了凤仙透骨草的最优提取方案为加入 5 倍量 82% 乙醇,回流提取 2 次,每次 35 min。本实验中对凤仙透骨草提取工艺的优化其结果可作为开展实验研究的线索。采用多指标综合加权评分法时,各指标权重系数的赋予是综合评分是否科学合理的关键。层次分析法(AHP)是根据对一定客观现实的主观判断结构把专家意见和分析者的客观判断结果直接而有效地结合起来,将一层次

元素两两比较的重要性进行定量描述,但是此方法个人主观因素对整个过程的影响很大,而 CRITIC 法适用于确定指标客观权重,更能体现客观数据信息。本研究通过加权求和的方式,将 AHP 法和 CRITIC 法相结合,兼顾主客观因素,得到指标的综合评分,使得综合评价更具有科学性、客观性和准确性^[19-22]。

参考文献

- [1] 韦贵康,施祀. 实用中医骨伤科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006: 624
WEI GK, SHI S. Practical Osteomatology of Traditional Chinese Medicine[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2006: 624
- [2] ABRAMOFF B, CALDERA FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(2): 293
- [3] GLYN - JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991): 376
- [4] 邓凯峰,宁恒,陆惠玲,等. 基于现代数据挖掘技术分析中医外治法治疗膝骨关节炎的用药规律[J]. 中国中医基础医学杂志,2021, 27(5): 796
DENG KF, NING H, LU HL, et al. Based on modern data mining technology, this paper analyzes the drug use rules of external treatment of knee osteoarthritis[J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(5): 796
- [5] 周世博,郑永智,张小燕,等. 基于数据挖掘的膝骨关节炎中药外治用药规律研究[J]. 世界中医药,2021, 16(4): 626
ZHOU SB, ZHENG YZ, ZHANG XY, et al. Study on the rule of external treatment of knee osteoarthritis with traditional Chinese medicine based on data mining[J]. World Chin Med, 2021, 16(4): 626
- [6] 冯玉,王旋. 凤仙透骨草不同药用部位化学成分研究进展[J]. 山东中医杂志,2016, 35(8): 729
FENG Y, WANG X. Research progress on chemical constituents of different medicinal parts of *Bongxianensis*[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2016, 35(8): 729
- [7] WU N, YUAN T, YIN Z, et al. Network pharmacology and molecular docking study of the Chinese Miao medicine Sidaxue in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 435
- [8] ZHAO J, LIN F, LIANG G, et al. Exploration of the molecular mechanism of Polygonati Rhizoma in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 12: 815891
- [9] 于吉,苏娟,黄浩洲,等. 大建中方挥发活性成分预测及提取工艺优化[J]. 中药材,2022, 45(12): 2951
YU J, SU J, HUANG HZ, et al. Prediction of active components

- of volatile oil and optimization of extraction technology[J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(12): 2951
- [10] 许曼珊,姜婷,秦盈盈,等. 骨关节炎发病机制研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2020, 41(4): 229
XU MS, JIANG T, QIN YY, *et al.* Research progress on pathogenesis of osteoarthritis[J]. Int J Orthop, 2020, 41(4): 229
- [11] 褚子璇,卢敏,熊山. 东莨菪内酯的药理活性及药代动力学研究进展[J]. 化学研究,2019,30(4): 434
CHU ZX, LU M, XIONG S. Research progress on the pharmacological activity and pharmacokinetics of scopolide[J]. Chem Res, 2019, 30(4): 434
- [12] WAN - OSMAN WN, CHE - AHMAD - TANTOWI NA, LAU SF, *et al.* Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated osteoarthritis via anti - inflammatory, anti - oxidative, and anti - protease pathways[J]. J Food Biochem, 2019, 43(3): e12755
- [13] ZENG Y, LI S, WANG X, *et al.* Validated LC - MS/MS method for the determination of scopoletin in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. Molecules, 2015, 20(10): 18988
- [14] LEYVA - LOPEZ N, GUTIERREZ - GRIJALVA EP, AMBRIZ - PEREZ DL, *et al.* Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): E921
- [15] CALDERON - MONTANO J, BURGOS - MORON E, PEREZ - GUERRERO C, *et al.* A review on the dietary flavonoid kaempferol [J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11(4): 298
- [16] TEFFO LS, ADEROGBA MA, ELOFF JN. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts [J]. South African J Bot, 2010, 76(1): 25
- [17] PARVEEN Z, DENG Y, SAEED MK, *et al.* Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz. extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol - 3 - O - glucoside [J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(8): 1275
- [18] ZUANG ZL, YE GQ, HUANG B, *et al.* Kaempferol alleviates the interleukin - 1 induced inflammation in rat osteoarthritis chondrocytes via suppression of NF - κ B[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 3925
- [19] 李潮,于欢,温柔,等. 基于 AHP - CRITIC 混合加权法和响应面法的盐车前子炮制工艺优选及其利尿作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020, 26(20): 124
LI C, YU H, WEN R, *et al.* Study on processing process optimization and diuretic effect of salt psyllium based on AHP - CRITIC mixed weighted method and response surface method[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(20): 124
- [20] 祁玉芳,范星辰,汪思晨,等. 基于 AHP - CRITIC 复合加权法优选厚朴姜炙工艺及姜炙前后化学成分变化研究[J]. 中国中药杂志,2023, 48(14): 3806
QI YF, FAN XC, WANG SC, *et al.* Processing *Magnoliae Officinalis* Cortex with ginger juice: process optimization based on AHP - CRITIC weighting method and composition changes after processing[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(14): 3806
- [21] 刘小妹,王姗姗,施崇精,等. 基于 AHP - CRITIC 权重分析的 Box - Behnken 响应面法优化参膝口服液提取工艺研究[J]. 中药材,2019, 42(1): 150
LIU XM, WANG SS, SHI CJ, *et al.* Optimization of extraction process of Shenxi oral liquid by Box - Behnken response surface method based on AHP - CRITIC weight analysis[J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(1): 150
- [22] 张琳,周欣,闫丹,等. 基于 CRITIC - AHP 权重分析法结合 Box - Behnken 设计 - 响应面法优选陈皮饮片炮制工艺[J]. 中草药,2018, 49(16): 3829
ZHANG L, ZHOU X, YAN D, *et al.* The processing technology of orange peel slices was optimized based on critical - AHP weight analysis and Box - Behnken design - response surface method[J]. Chin Tradit Herb Drug, 2018, 49(16): 3829

(本文于2023年11月9日收到)