

基于指纹图谱和网络药理学对曼地亚红豆杉 质量标志物的分析研究*

李雅静^{1,2}, 张振凌^{1,2,3,4**}, 王胜超^{1,2**}, 朱建光^{1,2},
王瑞生^{1,2}, 李宝卿⁵, 赵永琪^{1,2}, 孙梦梅^{1,2}

(1. 河南中医药大学 药学院, 郑州 450046; 2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 郑州 450046;
3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046; 4. 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室, 郑州 450046;
5. 河南省景春堂药业有限公司, 许昌 461000)

摘要 目的: 基于指纹图谱和网络药理学方法, 对曼地亚红豆杉质量标志物(Q - Marker)进行预测, 建立基于Q - Marker的曼地亚红豆杉药材评价方法。方法: 采用Waters SymmetryShield™ RP 18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈-0.1%三氟乙酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速1 mL · min⁻¹, 柱温30 ℃, 检测波长254 nm, 进样体积10 μL, 建立8个年限24批曼地亚红豆杉药材指纹图谱并标定共有峰, 采用层次聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)进行分类评价, 借助正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least square - discriminant analysis, OPLS - DA)筛选不同年限曼地亚红豆杉的主要差异性标志物; 结合网络药理学, 通过相应数据库筛选差异性标志物的核心靶点和关键通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 以此预测曼地亚红豆杉的Q - Marker; 采用HCA及主成分分析(principal component analysis, PCA)进一步验证曼地亚红豆杉的Q - Marker, 综合评价其质量。结果: 建立了24批曼地亚红豆杉药材指纹图谱, 标定了25个共有峰, 指出18个化合物, 包括紫杉烷类、黄酮类、生物碱类、甾体类、酚类, 相似度均>0.900; HCA的结果显示不同年限曼地亚红豆杉存在一定的差异性; 经OPLS - DA筛选出11个差异性标志物, 分别为紫杉醇、10 - 脱乙酰基巴卡亭Ⅲ(10 - DAB)、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10 - 去乙酰紫杉醇(10 - DAT)、阿魏酸、山柰素、芦丁、金松双黄酮、穗花杉双黄酮、对羟基苯甲醛; 基于差异性标志物, 运用网络药理学从有效性角度对其进行分析, 初步预测紫杉醇、10 - DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10 - DAT为曼地亚红豆杉的Q - Marker, 主要通过作用于PIK3R1、AKT1、EGFR、HRAS、MAPK1等14个核心靶点, 调控癌症通路、AGE - RAGE信号在糖尿病并发症中的作用等信号通路, 发挥消肿散结、通经利尿的功效; HCA结果验证了预测的Q - Marker的合理性, PCA综合评价结果表明十年生春季采收的曼地亚红豆杉质量较佳。结论: 基于指纹图谱和网络药理学方法筛选出紫杉醇、10 - DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10 - DAT为曼地亚红豆杉的Q - Marker, 结合化学识别模式方法对不同年限曼地亚红豆杉的质量进行综合排序, 其中十年生春季采收的得分最高, 质量较好, 为曼地亚红豆杉的质量标准的研究及资源评价提供了新思路。

关键词: 曼地亚红豆杉; 指纹图谱; 网络药理学; 化学识别模式; 紫杉醇; 10 - 脱乙酰基巴卡亭Ⅲ; 巴卡亭Ⅲ; 三尖杉宁碱; 10 - 去乙酰紫杉醇; 质量标志物; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)01 - 0035 - 16

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.01.04

* 河南省药品监督管理局科技计划项目(2020DB224); 河南中医药大学2021年度科技协同创新专项项目(2023XTCX041); 河南中医药大学2022年度研究生科研创新项目(2022KYCX006); 公益性行业专项—中药炮制技术传承基地建设(00104296)

** 通信作者 张振凌 Tel: (0371)65680970; E - mail: zhangz6758@163.com

王胜超 Tel: 13783495211; E - mail: wangsc1204@163.com

第一作者 Tel: 15639059683; E - mail: 985268643@qq.com

Analysis of quality markers of *Taxus media* based on fingerprint and network pharmacology*

LI Ya-jing^{1,2}, ZHANG Zhen-ling^{1,2,3,4**}, WANG Sheng-chao^{1,2**},
ZHU Jian-guang^{1,2}, WANG Rui-sheng^{1,2}, LI Bao-qing⁵,
ZHAO Yong-qi^{1,2}, SUN Meng-mei^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R, Zhengzhou 450046, China; 4. Henan Provincial Key Laboratory of TCM Decoction Processing, Zhengzhou 450046, China; 5. Henan Jing Chun-Tang Pharmaceutical Industry Company Limited, Xuchang 461000, China)

Abstract Objective: To predict potential quality markers (Q-Marker) of *Taxus media* Rehd. based on fingerprint and network pharmacology methods, and establish an evaluation method of *Taxus media* Rehd. based on Q-Marker, as so to provide basis for the establishment of quality standard and quality evaluation system of *Taxus media* Rehd. . **Methods:** Waters SymmetryShield™RP18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used for separation, and the wavelength was 254 nm. The mobile phase was acetonitrile - 0.01% trifluoroacetic acid aqueous solution for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the column temperature was 30 °C. The injection volume was 10 μL. The fingerprints of 24 batches of *Taxus media* Rehd. with 8 kinds of cultivation years were established and the common peaks were identified. Hierarchical clustering analysis (HCA) was used for classification, orthogonal partial least square - discriminant analysis (OPLS - DA) was used to screen out the main marker components that cause differences between different years. Combined with network pharmacology, the core targets and key pathways were constructed a "component - target - pathway" network map through corresponding databases. Q-Markers were further verified and quality of *Taxus media* Rehd. comprehensively evaluated by HCA and PCA. **Results:** A total of 25 common peaks were obtained in the HPLC fingerprint of *Taxus media* Rehd. , 18 compounds were identified, and their similarities were all above 0.900, including taxanes, flavonoids, alkaloids, steroids and phenols. The results of HCA showed that there were some differences among samples with different cultivation years. Eleven different markers were screened by OPLS - DA, and they were paclitaxel, 10 - deacetylbaaccatin III (10 - DAB), baaccatin III, cephalomannine, deacetyltaxol (10 - DAT), ferulic acid, kaempferide, rutin, amentoflavone - 4', 4", 7 - trimethyl ether, skyrin, 4 - hydroxybenzaldehyde. Based on the difference markers, network pharmacology was applied to analyze them from the perspective of effectiveness. Paclitaxel, 10 - DAB, bakatine III, cephalomannine and 10 - DAT were preliminarily predicted as Q - Markers of *Taxus media* Rehd. . They could regulate cancer pathway, AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complications and other signaling pathways by PIK3R1, AKT1, EGFR, HRAS and MAPK1 targets, and play the role of reducing swelling and menstruation diuresis clearing. The results of HCA verified the rationality of Q - Marker, and the comprehensive evaluation results of PCA showed that sample which was cultivated for ten years and harvested in spring bore the best quality. **Conclusion:** Paclitaxel, 10 - DAB, bakatine III, cephalomannine and 10 - DAT are selected as Q - Markers based on fingerprint and network pharmacological methods. The quality of *Taxus media* Rehd. in different cultivation years is sorted comprehensively by combining with chemical recognition pattern method. The 10 - year - old sample harvested in spring gets the highest score and the quality is good. The study provides new method for establishing of quality standard and the quality evaluation of *Taxus media* Rehd. .

Keywords: *Taxus media* Rehd. ; fingerprint; network pharmacology; chemical recognition pattern; paclitaxel; 10 - DAB; bakatine III; cephalomannine; 10 - DAT; quality marker; quality evaluation

曼地亚红豆杉(*Taxus media* Rehd.)属于红豆杉科红豆杉属植物,由欧洲红豆杉(*T. baccata* L.)与东北红豆杉(*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)天然杂交而成,紫杉醇含量相对较高,是提取紫杉醇的最佳药用植物资源^[1]。现代研究表明,曼地亚红豆杉主要成分包括紫杉烷类^[2]、黄酮类^[3]、挥发油类^[4]、酚类和甾体类^[5]等,具有抗肿瘤^[6]、降血糖^[7]、抑菌^[8]、抗氧化^[9]等方面的药理作用。我国的红豆杉储量占全球储量的一半以上^[10],主要分布在长江以南流域,以及东北、华中、华南等地区,资源优势品种主要以曼地亚红豆杉和南方红豆杉(*T. mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu)为主,研究重点依然是在其抗肿瘤的紫杉烷类化合物,但大多以南方红豆杉为主^[11-12]。目前有关红豆杉的质量标准研究较少,地方药材标准可见紫杉^[13]、喜马拉雅红豆杉^[14]、南方红豆杉^[15-17]收录,其采收加工炮制方法、质量控制标准尚不完善且不统一,多以10-DAB为单一质量评价指标,标准收录的红豆杉来源多以本地资源优势品种为主,存在地域性差异,阻碍了红豆杉优势药用资源的开发及临床的广泛应用,其质量评价体系亟待完善。

刘昌孝^[18]在2016年提出了“中药质量标志物(Q-Marker)”的概念和研究理念,与中药有效性-物质基础-质量控制-标志性成分相关联^[19],为中药质量控制研究指明了新的思路。中药指纹图谱对于更加客观地从整体上评价中药的内在质量具有重要的意义^[20],可用于药材、饮片以及中药制剂产品质量的整体性评价。网络药理学研究契合中药多成分、多靶点的复杂药效学特点,可以揭示中药对机体的系统药理学作用^[21],是发现中药Q-Marker的有效途径。因此,本研究建立不同采收年限曼地亚红豆杉药材指纹图谱,明确曼地亚红豆杉中的特征性成分,结合化学识别模式方法,初步筛选差异性标志物,并结合网络药理学预测曼地亚红豆杉的Q-Marker,采用主成分分析和聚类分析校验预测曼地亚红豆杉Q-Marker能否评价不同采收年限曼地亚红豆杉的质量,从而指导建立科学的曼地亚红豆杉药材质量标准,为提高曼地亚红豆杉药材和饮片质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2424型高效液相色谱仪(上海沃特世科

技有限公司);KQ-500DV型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UPT-II-10T型超纯水器(成都现超纯科技有限公司);BSA224S-CW型万分之一电子天平、BT25S型十万分之一电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 试剂

对照品对羟基苯甲醛(批号Y02J7C15574)、阿魏酸(批号G13S11L124423)、芦丁(批号M09HB177693)、10-DAB(批号H11S9X70008)、巴卡亭Ⅲ(批号H19J10X93344)、槲皮素(批号C28J11Y116820)、芹菜素(批号M29GB150104)、10-DAT(批号H22M10X88906)、三尖杉宁碱(批号J09J12T136339)、紫杉醇(批号J04S11H123510)、山柰素(批号F11A11X108412)、7-表紫杉醇(批号H07A8D41177)、银杏双黄酮(批号AF22032002)、金松双黄酮(批号P20N10F103774)、穗花杉双黄酮(批号G01D11L132895)、紫杉碱M(批号J106HB187406)均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98.0\%$;儿茶素(批号F1960049)和 β -蜕皮甾酮(批号2S000094)购自成都普思生物科技股份有限公司,纯度均 $\geq 98.0\%$ 。甲醇、乙腈购自安徽天地高纯溶剂有限公司,均为色谱纯;其余试剂均为分析纯;三氟乙酸(上海市麦克林生化科技有限公司,纯度 $\geq 99.5\%$)、甲酸(天津市大茂化学试剂厂,纯度 $\geq 88.0\%$)、乙酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,纯度 $\geq 99.8\%$)和磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,纯度 $\geq 99.8\%$)、水为超纯水。

1.3 药材

曼地亚红豆杉药材购自平顶山市致元生物科技有限公司,经河南中医药大学张振凌教授鉴定为红豆杉科红豆杉属植物曼地亚红豆杉(*T. media* Rehd.)的干燥细枝及叶,见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Waters SymmetryShield™ RP18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈(A)-0.1%三氟乙酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~20 min, 5%A→12%A;20~40 min, 12%A→22%A;40~55 min, 22%A→30%A;55~70 min, 30%A→52%A;70~85 min, 52%A→56%A;85~95 min, 56%A→70%A;95~105 min, 70%A→100%A;105~110 min, 100%A→5%A),流速1 mL min⁻¹,柱温30℃,检测波长254 nm,进样量10 μL 。

表 1 24 批曼地亚红豆杉不同年限的信息
Tab. 1 Information of 24 batches of *T. media*
Rehd. in different years

样品编号 (sample No.)	年限 (year)	采集时间 (harvest period)
S1 ~ S3	三年生 (triennial)	2022 - 03 - 18
S4 ~ S6	五年生 (five - year plant)	2022 - 09 - 19
S7 ~ S9	六年生 (six - year plant)	2022 - 03 - 18
S10 ~ S12	七年生 (seven - year plant)	2022 - 09 - 19
S13 ~ S15	八年生 (eight - year plant)	2022 - 09 - 19
S16 ~ S18	十五年生 (fifteen - year plant)	2022 - 09 - 19
S19 ~ S21	十八年生 (eighteen - year plant)	2022 - 03 - 18
S22 ~ S24	十年生 (decennial)	2022 - 03 - 18

2.2 供试品溶液的制备

取曼地亚红豆杉粉末 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 50 mL 超声 (功率 500 W, 频率 50 kHz) 处理 2 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

分别精密称取儿茶素、对羟基苯甲醛、 β -蜕皮甾酮、阿魏酸、芦丁、10-DAB、巴卡亭 III、槲皮素、芹菜素、10-DAT、三尖杉宁碱、紫杉醇、山柰素、7-表紫杉醇、银杏双黄酮、金松双黄酮、穗花杉双黄酮、紫杉碱 M 的对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.27、0.33、0.60、0.30、0.22、0.24、0.21、0.23、0.49、0.27、0.18、0.21、0.55、0.26、0.40、0.20、0.27、0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 参照峰的选择

在供试品溶液色谱峰中, 以 24 号色谱峰 (金松双黄酮), 峰形较佳, 分离度较好, 峰面积稳定, 因此选为参照峰, 以计算其余峰的相对峰面积和相对保留时间。

2.4.2 精密度试验

取 S24 号曼地亚红豆杉药材, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.32%, 相对峰面积的 RSD < 2.9%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验

取 S24 号曼地亚红豆杉药材, 按照“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进行测定, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD <

0.12%, 相对峰面积的 RSD < 2.7%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同 1 份曼地亚红豆杉药材 (S24 号), 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h, 在“2.1”项色谱条件下进行测定, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.28%, 相对峰面积的 RSD < 2.7%, 表明曼地亚红豆杉供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱建立

取 24 批曼地亚红豆杉药材, 分别按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件下依次进样测定, 并记录色谱图。将 24 批曼地亚红豆杉药材的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”以 S24 号样品色谱图为参照图谱, 时间窗宽度 0.10 min, 采用中位数法, 进行多点校正和色谱峰匹配, 得到 25 个共有峰, 生成 24 批曼地亚红豆杉药材叠加 HPLC 色谱图 (图 1) 和曼地亚红豆杉药材对照图谱 R (图 2)。

2.6 指纹图谱共有峰的指认和相似度评价

通过对照品的保留时间, 对曼地亚红豆杉样品的指纹图谱共有峰进行指认 (图 3), 初步确认了 18 个化合物, 其中 6 个紫杉烷类 [10-DAB (峰 9)、巴卡亭 III (峰 10)、10-DAT (峰 13)、三尖杉宁碱 (峰 15)、7-表紫杉醇 (峰 21)、紫杉醇 (峰 16)], 7 个黄酮类 [芦丁 (峰 6)、槲皮素 (峰 11)、芹菜素 (峰 12)、穗花杉双黄酮 (峰 14)、山柰素 (峰 20)、银杏双黄酮 (峰 22)、金松双黄酮 (峰 24)], 3 个酚类 [儿茶素 (峰 2)、对羟基苯甲醛 (峰 3)、阿魏酸 (峰 5)], 1 个生物碱类 [紫杉碱 M (峰 23)], 1 个甾体类 [β -蜕皮甾酮 (峰 4)]。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件对 24 批曼地亚红豆杉药材样品的指纹图谱相似度进行计算, 结果曼地亚红豆杉的相似度在 0.927 ~ 0.987 范围内。

2.7 化学识别模式

2.7.1 HPLC 共有峰的层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)

运用 SPSS 21.0 统计分析软件, 采用组间联接法, 以平方欧氏距离为度量标准进行系统 HCA, 见图 4。结果表明, 当平方欧氏距离为 5 时, 24 批曼地亚红豆杉药材聚为 8 类, 其中 S1 ~ S3 (三年春) 一类, S4 ~ S6 (五年秋) 和 S10 (七年秋) 一类, S7 ~ S9 (六年春) 一类, S11 ~ S12 (七年秋) 一类, S13 ~ S15 (八年秋)

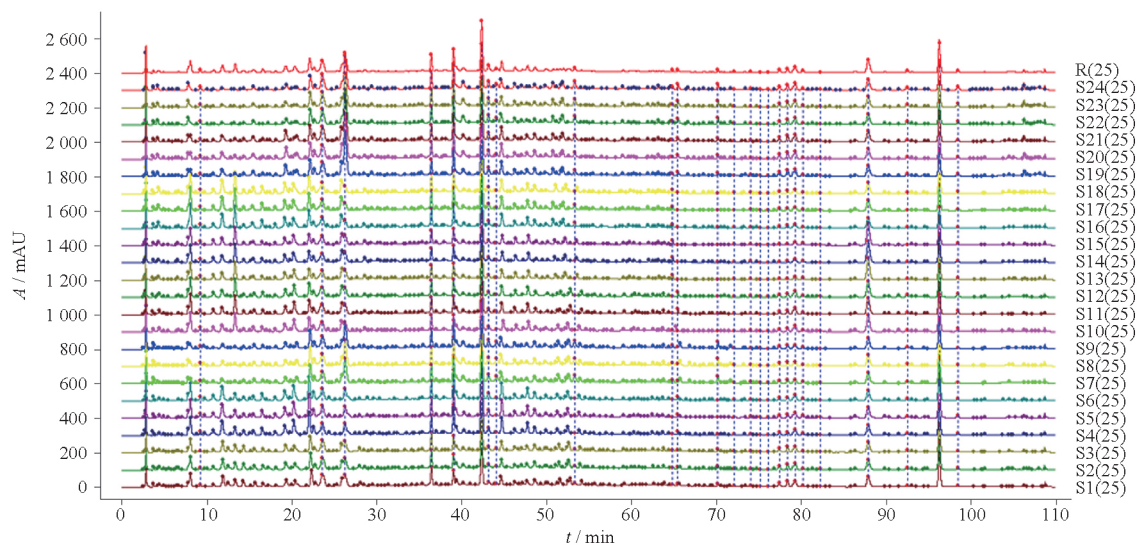


图1 24批曼地亚红豆杉样品指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprints of 24 batches of *T. media* Rehd.

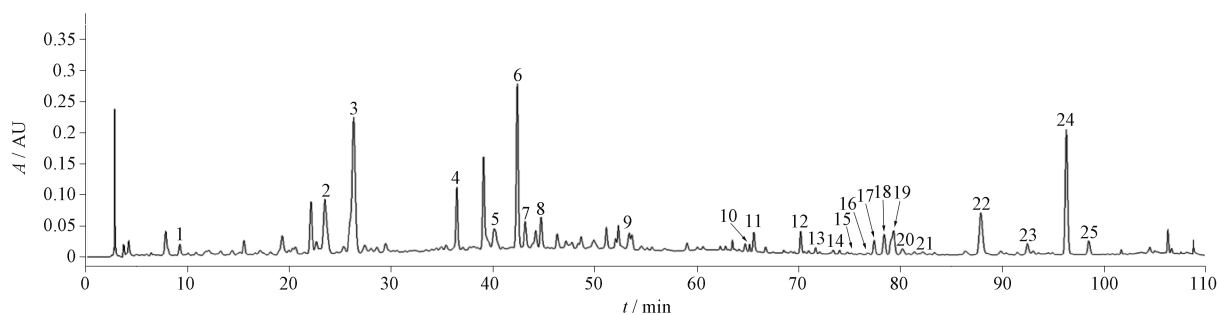


图2 曼地亚红豆杉药材对照图谱 R

Fig. 2 Control fingerprint R of *T. media* Rehd.

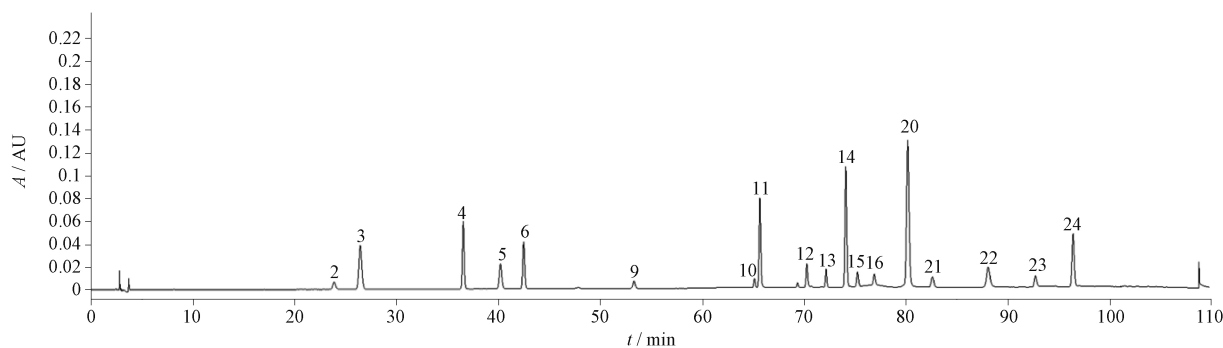


图3 曼地亚红豆杉混合对照品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed reference of *T. media* Rehd.

一类、S16 ~ S18(十五年秋)一类、S19 ~ S21(十八年春)、S24(十年春)为一类、S22 ~ S23(十年春)一类。结果表明,不同采收年限的曼地亚红豆杉具有一定的差异性。

2.7.2 HPLC 共有峰的 OPLS - DA

为了更好地观察不同年限间的差异性,本研究采用有监督模式的 OPLS - DA 进行组间分析,运用 SIMCA 14.1 软件,进行分析处理,结果见图 5。模型

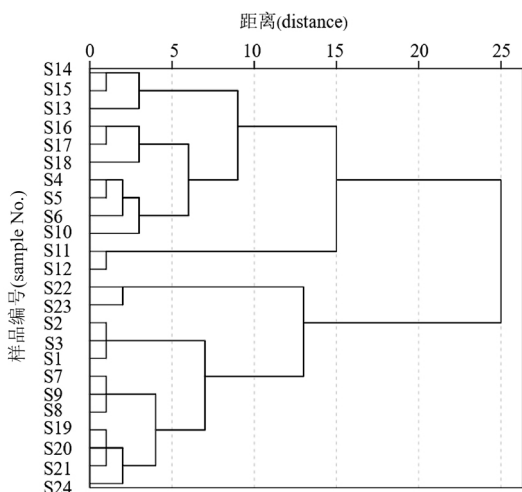


图4 24批曼地亚红豆杉物质基准的HCA树状图
Fig.4 HCA tree view of 24 batches of *T. media* Rehd. material benchmark

解释参数 R_x^2 为 0.953, R_y^2 为 0.915, Q^2 为 0.816, 均 > 0.5, 说明建模稳定且预测能力强。

为了进一步确定引起不同采收年限曼地亚红豆杉的差异性标志物, 采用变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 对数据矩阵分析, 结果见图6, VIP > 1 的变量为组间样本的主要差异变量, 且 VIP 值越大, 表明该成分对组间差异的贡献越大, VIP > 1 的色谱峰依次为 14 号峰 (穗花杉双黄酮)、10 号峰 (巴卡亭 III)、25 号峰 (未知化合物)、20 号峰 (山柰素)、6 号峰 (芦丁)、9 号峰 (10 - DAB)、24 号峰 (金松双黄酮)、13 号峰 (10 - DAT)、4 号峰 (对羟基苯甲醛)、1 号峰 (未知化合物)、16 号峰 (紫杉醇)、15 号峰 (三尖杉宁碱)、5 号峰 (阿魏酸)。上述化合物在区分不同年限曼地亚红豆杉药材中起重要作用, 是引起 8 个年限差异的主要标志性化合物。

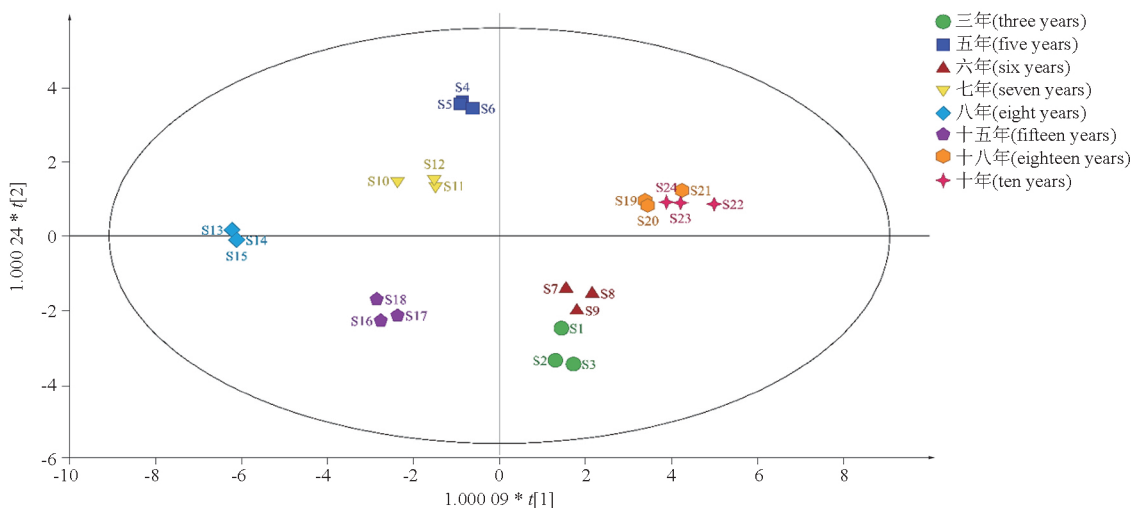


图5 曼地亚红豆杉的 OPLS-DA 得分图
Fig.5 OPLS-DA score plot of *T. media* Rehd.

2.8 网络药理学预测分析

2.8.1 数据与软件

通过 Pub Chem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>)、Pharm Mapper 数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>) 及 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), 检索得到紫杉醇、巴卡亭 III、10 - DAB、10 - DAT、三尖杉宁碱、穗花杉双黄酮、山柰素、芦丁、金松双黄酮、对羟基苯甲醛和阿魏酸 11 个候选差异性标志物的靶点, 剔除重复靶点, 共得到 544 个靶点。

2.8.2 蛋白互作网络的构建

将上述筛选得到的 544 个靶点导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/cgi/input.pl>) 进行蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建。PPI 网络中有 105 个节点, 918 条边, 平均节点度为 8.61, 结果见图 7。将 PPI 的分析结果以 TSV 文本格式导入“Cytoscape 3.9.0”软件中, 并利用其中的“Network Analyzer”功能对分析结果进行拓扑属性分析, 选取度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 3 个拓扑参数均大于中位数的关键靶点, 经筛选后共得到 14 个核心靶点, 结果见表 2。

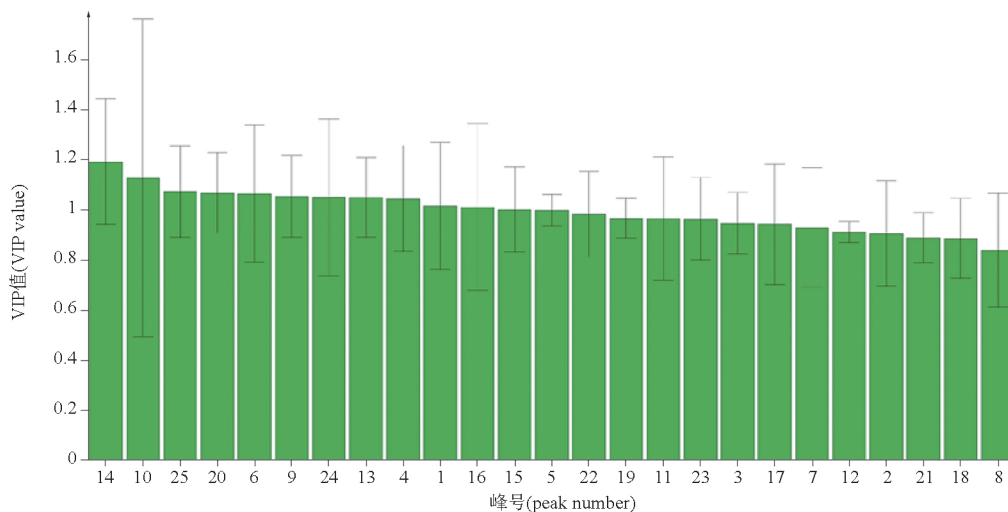


图 6 曼地亚红豆杉药材的 VIP 值预测图 (VIP > 1)

Fig. 6 VIP predicted values plot of *T. media* Rehd.

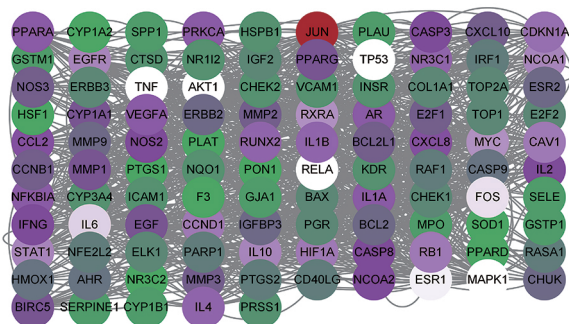


图 7 PPI 网络

Fig. 7 PPI network

2.8.3 基因本体功能富集分析与基因组百科全书通路富集分析

2.8.3.1 基因本体功能富集分析 利用 David 6.8 数据库 ([https://David - d.ncicrf. gov/home. jsp](https://David-d.ncicrf.gov/home.jsp)) 对获得的 544 个作用靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析。选取智人 (*Homo sapiens*) 物种项, 得到 637 个 GO 条目, 其中 439 个生物过程 (biological process, BP), 显著富集在药物反应、对外来生物刺激反应、蛋白磷酸化等过程; 67 个细胞组成 (cellular component, CC) 显著富集在细胞溶质、质膜、核质等

表 2 靶点网络的拓扑学性质

Tab. 2 Topological properties of target network

靶点 (target)	名称 (definition)	度值 (degree)	介数中心性 (betweenness centrality)	接近中心性 (closeness centrality)
SRC	酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine - protein kinase SRC)	17	0.055 6	0.518 1
MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinases 1)	20	0.063 5	0.573 3
TP53	肿瘤抗原 p53 (tumor antigen p53)	10	0.016 8	0.452 6
PIK3R1	磷酸肌苷 - 3 - 激酶调控亚基 1 (phosphoinositide - 3 - kinase regulatory subunit 1)	27	0.162 3	0.704 9
HSP90AA1	热休克蛋白 hsp90 - α (heat shock protein HSP 90 - alpha)	11	0.016 6	0.452 6
HRAS	原癌基因 (HRAS proto - oncogene)	20	0.062 9	0.573 3
AKT1	蛋白激酶 B (protein kinase B)	21	0.085 4	0.589 0
GRB2	生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor binding protein 2)	15	0.028 0	0.494 3
STAT3	信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3)	12	0.026 7	0.472 5
EGFR	表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)	20	0.083 1	0.573 3
FYN	酪氨酸激酶 (anti - phospho - FYN)	2	0.000 9	0.361 3
CTNNB1	钙黏蛋白相关蛋白 (cadherin - associated protein beta 1)	5	0.004 8	0.401 9
RELA	转录因子 p65 (transcription factor p65)	14	0.039 1	0.494 3
RXRA	视黄酸受体 (retinoic acid receptor RXR - alpha)	8	0.006 5	0.417 5

过程;131 个分子功能(molecular function, MF)显著富集在蛋白质结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性等过程。分别设置 $P < 0.05$, 错误发现率(false discov-

ery rate, FDR) < 0.05 , 选取组分排名前 10 的 BP、CC、MF 条目, 结果见图 8。

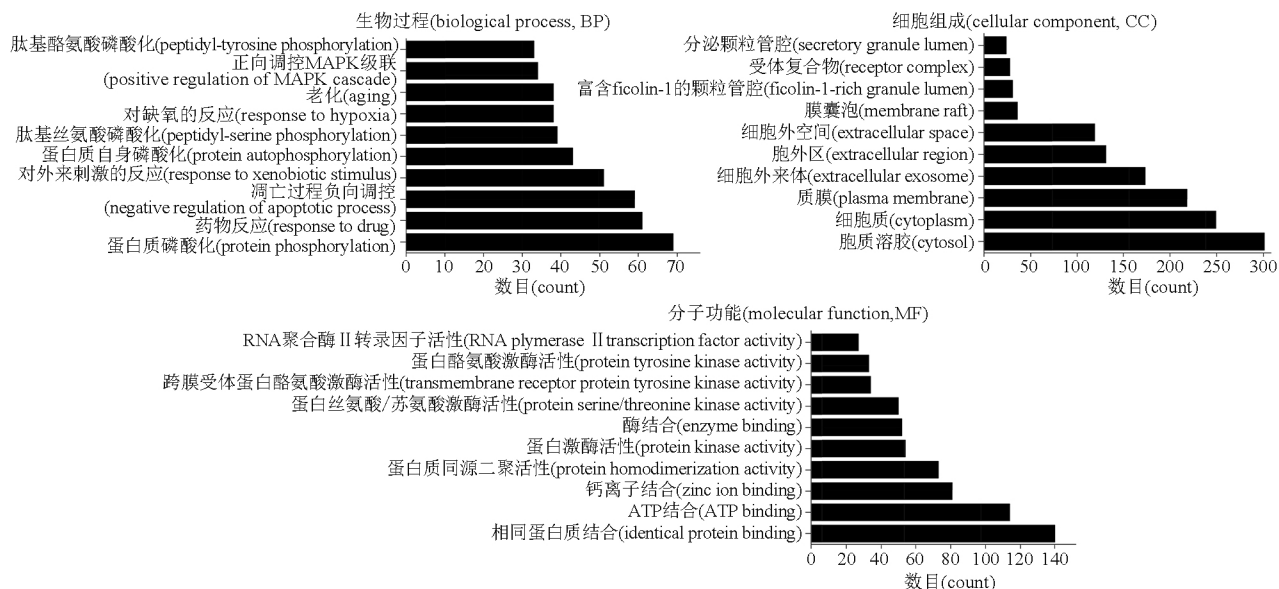


图 8 GO 功能富集分析柱状图

Fig. 8 Bar chart of GO functional enrichment analysis

2.8.3.2 基因组百科全书通路富集分析 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 以 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ 为筛选条件对获得的 544 个作用靶点进行基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。结果共得到 187 个条目, 主要涉及癌症通路(pathways in cancer), AGE - RAGE 信号在糖尿病并发症中的作用(AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complications), 脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis) 等通路, 结果见表 3。选取排名前 20 的通路进行 KEGG 富集分析绘制气泡图, 结果见图 9。

2.8.4 “成分 - 靶点 - 通路”网络图的构建

根据筛选得到 11 个差异性标志物, 14 个核心靶点, 20 条关键通路。运用“Cytoscape 3.9.0”软件构建“成分 - 靶点 - 通路”网络图, 进行可视化分析, 结果见图 10。以成分、靶点、信号通路的连接度(Degree)为参考, 连接度较多的成分有紫杉醇(Degree = 9)、10 - DAB (Degree = 9)、巴卡亭 III (Degree = 9)、三尖杉宁碱 (Degree = 9)、10 - DAT (Degree = 7), 提示这些成分可能是曼地亚红豆杉发挥药效的活性物质; 靶点 PIK3R1 (磷脂酰肌醇 3 - 激

酶调节亚基 α , Degree = 27)、AKT1 (蛋白激酶 B, Degree = 21)、EGFR (表皮生长因子受体, Degree = 20)、HRAS (原癌基因, Degree = 20)、MAPK1 (丝裂原活化蛋白激酶 1, Degree = 20)、SRC (Degree = 17)、GRB2 (生长因子受体结合蛋白, Degree = 15) 的连接度较高, 可能是曼地亚红豆杉发挥作用的关键靶点; 癌症通路 (Degree = 11)、PI3K - Akt 信号通路 (Degree = 10)、脂质与动脉粥样硬化 (Degree = 10)、前列腺癌 (Degree = 10)、癌症中的蛋白多糖 (Degree = 10)、非小细胞性肺癌 (Degree = 9)、乙型肝炎 (Degree = 9) 信号通路的连接度较大, 均可能是曼地亚红豆杉发挥作用的关键信号通路。

2.8.5 整合分析

基于刘昌孝^[18]提出的中药 Q - Marker 的“五原则”, 对筛选出的 11 个差异性标志物进行分析。紫杉醇、10 - DAB、巴卡亭 III、三尖杉宁碱, 10 - DAT 度值较高, 且为特异性成分, 可作为曼地亚红豆杉潜在的 Q - Marker; 而金松双黄酮、穗花杉双黄酮、阿魏酸、芦丁、山柰素、对羟基苯甲醛在自然界中普遍存在, 针对曼地亚红豆杉而言特异性不强, 且度值低于平均值, 故不能作为辨别药材质量的标志性成分。

表 3 主要核心靶点的通路富集分析
Tab. 3 Pathway enrichment analysis of core targets

类别 (category)	代谢通路 (metabolic pathway)	数目(number)/ 个(count)	P	FDR
hsa01100	代谢通路(metabolic pathways)	171	1.31×10^{-20}	1.97×10^{-18}
hsa05200	癌症通路(pathways in cancer)	85	9.2×10^{-19}	6.9×10^{-17}
hsa04933	AGE - RAGE 信号在糖尿病并发症中的作用(AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complications)	33	1.95×10^{-16}	9.74×10^{-15}
hsa05417	脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)	47	2.07×10^{-15}	7.75×10^{-14}
hsa05215	前列腺癌(prostate cancer)	30	4.34×10^{-14}	1.3×10^{-12}
hsa05418	流体剪切应力和动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)	35	1.85×10^{-13}	4.63×10^{-12}
hsa05207	化学致癌 - 受体激活(chemical carcinogenesis - receptor activation)	42	2.55×10^{-12}	5.47×10^{-11}
hsa05208	化学致癌 - 活性氧(chemical carcinogenesis - reactive oxygen species)	43	3.41×10^{-12}	6.4×10^{-11}
hsa05205	癌症中的蛋白多糖(proteoglycans in cancer)	40	1.53×10^{-11}	2.55×10^{-10}
hsa01521	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)	24	3.61×10^{-11}	5.41×10^{-10}
hsa00910	氮代谢(nitrogen metabolism)	12	1.69×10^{-10}	2.31×10^{-9}
hsa04066	HIF - 1 信号通路(HIF - 1 signaling pathway)	27	2.54×10^{-10}	3.18×10^{-9}
hsa04071	鞘脂信号通路(sphingolipid signaling pathway)	28	3.86×10^{-10}	4.45×10^{-9}
hsa04151	PI3K - Akt 信号通路(PI3K - Akt signaling pathway)	52	5.01×10^{-10}	5.37×10^{-9}
hsa04931	胰岛素耐受性(insulin resistance)	26	1.12×10^{-9}	1.12×10^{-8}
hsa04014	Ras 信号通路(ras signaling pathway)	40	1.21×10^{-9}	1.13×10^{-8}
hsa05161	乙型肝炎(hepatitis B)	32	1.74×10^{-9}	1.47×10^{-8}
hsa05223	非小细胞性肺癌(non - small cell lung cancer)	21	1.76×10^{-9}	1.47×10^{-8}
hsa04370	VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway)	19	2.19×10^{-9}	1.73×10^{-8}
hsa04068	FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)	28	3.72×10^{-9}	2.79×10^{-8}

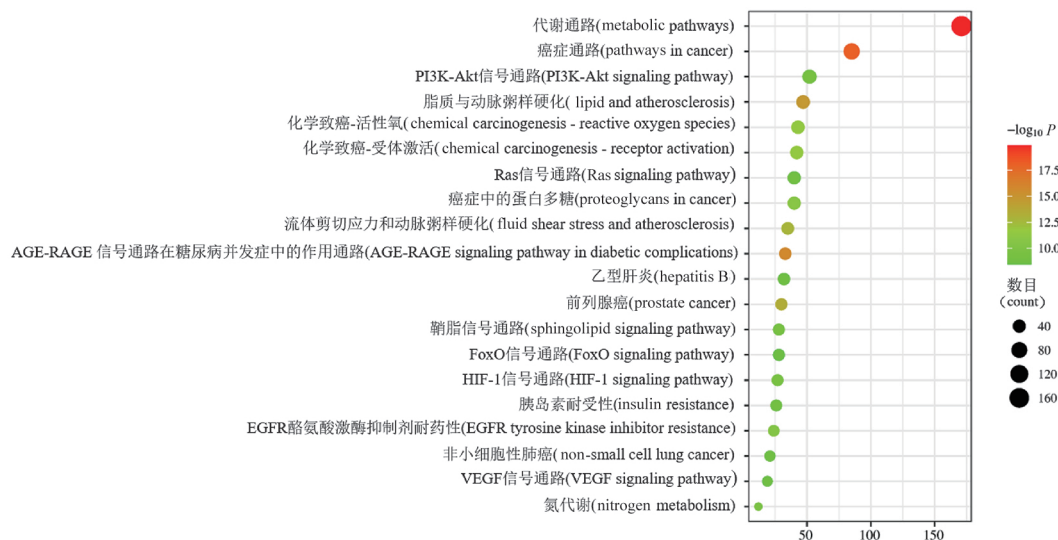


图 9 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 9 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

曼地亚红豆杉含有紫杉烷类、黄酮类、挥发油类、酚类和甾体类等成分,具有消肿散结、通经利尿

的功效,临床上主要用于抗肿瘤、降血糖等疾病的治疗。运用网络药理学从有效性角度分析发现 11 个

收的分为春季,9月份采收的分为秋季,将春季和秋季各12批曼地亚红豆杉药材5个Q-Marker的峰面积经过标准化处理后作为变量,导入SPSS 21.0软件,进一步验证紫杉醇、10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10-DAT为曼地亚红豆杉Q-Marker的合理性,结果见图11。当平方欧式距离为5时,春季分为4类:S1~S3号样品(三年春)一类,S7~S9号样品(六年春)一类,S19~S21号样品(十八年春),S24号

样品(十年春)一类,S22~S23号样品(十年春)一类;秋季分为4类:S4~S6号样品(五年秋),S10号样品(七年秋)一类,S11~S12号样品(七年秋)一类,S13~S15号样品(八年秋)一类,S16~S18号样品(十五年秋)一类。经5个Q-Marker结果筛选出的数据进行聚类分析和“2.7.1”项HCA结果一致。进一步证明了5个Q-Marker可代表曼地亚红豆杉的质量用于区分不同的采收年限。

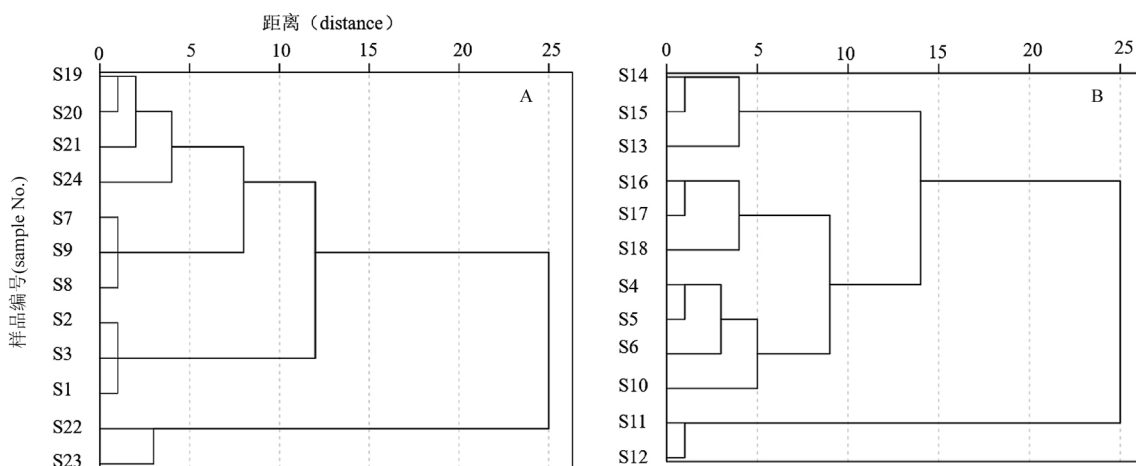


图11 春季(A)和秋季(B)各12批样品预测Q-Marker后的HCA树状图

Fig 11 HCA tree view of 12 batches of samples each after Q-Markers prediction in spring (A) and in autumn (B)

2.8.6.2 PCA综合评价不同年限曼地亚红豆杉的质量 按照每个年限的均值将5个Q-Marker的峰面积经过标准化处理后作为变量,导入SPSS 21.0软件,评价不同年限曼地亚红豆杉的质量。运用PCA,以特征值>1为提取标准,设置“显示因子得分系数矩阵FAC”。结果共提取3个主成分,分别为FAC 1、FAC 2和FAC 3,其累计方差贡献

率>80%,说明这3个主成分预测了5个Q-Marker合计83.147%的信息量,可以作为不同年限曼地亚红豆杉的评价指标,具体特征值和方差贡献率见表4。以3个主成分的特征值占累加特征值的百分比为权重进行线性组合,计算每个年限的3个主成分因子得分及综合得分,对8个年限的曼地亚红豆杉进行综合评价。

表4 特征值和方差贡献率

Tab. 4 Characteristic value and variance contribution rate

成分 (component)	初始特征值(initial eigenvalue)			提取平方和载入(extract sum of squares loading)		
	特征值 (characteristic value)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累积方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%	特征值 (characteristic value)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累积方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%
FAC1	1.76	35.201	35.201	1.76	35.201	35.201
FAC2	1.288	25.764	60.965	1.288	25.764	60.965
FAC3	1.109	22.181	83.147	1.109	22.181	83.147
FAC4	0.571	11.423	94.57			
FAC5	0.272	5.43	100			

$F_i = \sum W_i \times X_i$ (i 为 1、2、3、4、5), W_i 为各个因子所占的权重: $F_1 = 0.432X_1 - 0.505X_2 - 0.410X_3 + 0.623X_4 - 0.005X_5$ 、 $F_2 = 0.357X_1 - 0.414X_2 + 0.329X_3 - 0.360X_4 - 0.580X_5$ 、 $F_3 = 0.554X_1 + 0.081X_2 + 0.651X_3 + 0.105X_4 - 0.501X_5$, $F = 0.352F_1 + 0.258F_2 + 0.222F_3$, 综合主成分评价结果见表 5。 F 值越大说明曼地亚红豆杉的综合质量较好, 8 个年限曼地亚红豆杉的综合得分由大到小的顺序为十年春 (S22 ~ S24 号样品)、六年春 (S7 ~ S9 号样品)、十八年春 (S19 ~ S21 号样品)、三年春 (S1 ~ S3 号样品)、十五年秋 (S16 ~ S18 号样品)、八年秋

(S13 ~ S15 号样品)、七年秋 (S7 ~ S9 号样品)、五年秋 (S4 ~ S6 号样品)。结果表明, 以筛选的 5 个 Q - Marker 作为评价指标, 6 年以上春季采收的得分较高, 即品质较优。为进一步分析不同年限曼地亚红豆杉中的质量, 将 5 个 Q - Marker 的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件绘制 PCA 得分图, 见图 12。8 个年限的曼地亚红豆杉被分为 7 类, 其中 6 年以上春季采收的曼地亚红豆杉综合得分整体较好, 说明采收期及年限在质量上均存在一定的差异, 可能与代谢及枝叶的生长发育特性有关^[37], 提示季节与年限对化学成分蓄积程度的相关性。

表 5 不同年限曼地亚红豆杉主成分综合得分及排序

Tab. 5 Comprehensive score and ranking of PCA of *T. media* Rehd. in different years

采收期 (harvesting time)	采收季节 (harvesting season)	F_1	F_2	F_3	F	排名 (ranking)
十年 (ten years)	春 (spring)	1.003	1.605	2.151	1.244	1
六年 (six years)	春 (spring)	0.612	1.173	2.330	1.035	2
十八年 (eighteen years)	春 (spring)	0.522	1.246	2.101	0.971	3
三年 (three years)	春 (spring)	0.222	1.159	1.964	0.812	4
十五年 (fifteen years)	秋 (autumn)	0.019	1.038	2.007	0.719	5
八年 (eight years)	秋 (autumn)	0.032	0.887	2.112	0.708	6
七年 (seven years)	秋 (autumn)	0.190	1.015	1.710	0.708	7
五年 (five years)	秋 (autumn)	0.066	0.721	1.718	0.590	8

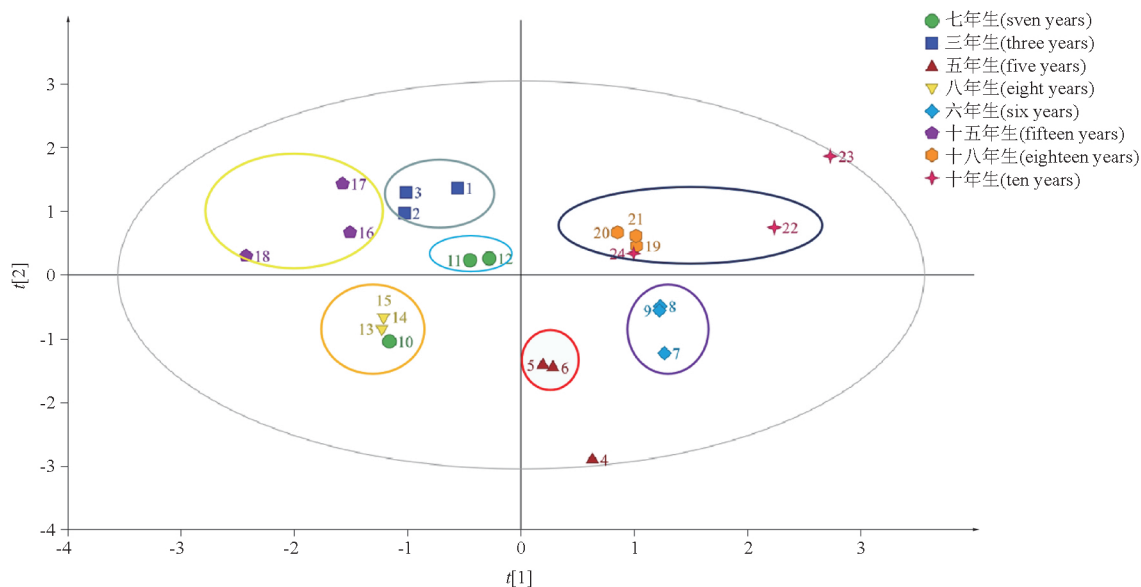


图 12 5 个 Q - Marker 的 PCA 得分图

Fig. 12 PCA score plot of five Q - Markers

3 讨论

红豆杉, 又称紫杉, 是珍稀天然抗癌植物。中医

古籍早有记载, 见于《本草纲目》^[38]、《本草推陈》^[39] 等。中医临床常将红豆杉的枝和叶作为饮片配伍其

他中药使用,多用于肿瘤的治疗,效果显著。当前红豆杉的药用来源主要有3种,南方红豆杉(*T. mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu.)、东北红豆杉(*T. cuspidate* Sieb. et Zucc.)、喜马拉雅红豆杉(*T. walli-chiana* Zucc.),近年来,红豆杉中紫杉醇抗癌效果奇特,广州、安徽、江苏、上海等地方标准陆续收录南方红豆杉药用。但南方红豆杉、东北红豆杉,喜马拉雅红豆杉野生资源稀少、生长缓慢,资源有限,且属于濒危品种,其药材来源阻碍了红豆杉的发展。曼地亚红豆杉紫杉醇含量高,适应性强,已有规模化的种植,保守估计,其资源蕴藏量居首,但缺乏标准收录,其质量评价标准亟待完善。

曼地亚红豆杉的栽培变种较多^[40],化学成分类型多样,化学性质差异性大,而中药指纹图谱是目前全面反映中药及中药复方内在质量的有效手段^[41]。因此本研究建立曼地亚红豆杉药材指纹图谱的方法,结合网络药理学筛选其潜在的Q-Marker,基于Q-Marker对不同年限曼地亚红豆杉的质量整体评价。前期主要考察了不同提取溶剂、不同流动相、不同温度、不同流速、不同色谱柱,此外还采用DAD检测器进行了全波长扫描,结果显示在254 nm检测波长下,基线平稳,色谱峰数量较多;最终确定采取甲醇超声提取2次,每次30 min的提取方式,Waters SymmetryShield™ RP18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)在乙腈-0.1%三氟乙酸水系统下梯度洗脱,温度30 °C、进样体积1.0 mL · min⁻¹,在254 nm下采集色谱峰多,分离度好,24批不同采收年限曼地亚红豆杉HPLC色谱图相似度在0.927~0.987,表明曼地亚红豆杉的质量一致性好。药理活性研究和临床实践已证明紫杉醇、10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱,10-DAT等紫杉烷类化合物是抗肿瘤的主要活性成分,其中10-DAB和巴卡亭Ⅲ是紫杉醇的同系物,三尖杉宁碱的成分结构与紫杉醇的差异仅在C13位侧链上NH-的连接,且某些红豆杉中的三尖杉宁碱醇含量可能高于紫杉醇,当提取分离得到紫杉醇的同时,会得到比紫杉醇产量更大的主含三尖杉宁碱的副产物基因^[42],由于这些成分与紫杉醇的结构相似,都可作为紫杉烷类药物的半合成原料,通过结构修饰改造成紫杉醇^[43],从而解决紫杉醇资源稀缺、产量低等问题。红豆杉的Q-Marker与紫杉烷类化合物息息相关,根据指纹图谱与网络药理学的结果,结合化学识别模式方法可较好地地区分不同年限、不同季节的

曼地亚红豆杉,验证了Q-Marker的合理性,因此可将紫杉醇、10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱,10-DAT作为红豆杉的Q-Marker。本课题前期研究结果表明,曼地亚红豆杉的成分种类与当前标准收录的南方红豆杉一致,儿茶素、对羟基苯甲醛、β-蜕皮甾酮、阿魏酸、芦丁、10-DAB、槲皮素、芹菜素、7-表紫杉醇、银杏双黄酮、金松双黄酮是曼地亚红豆杉的优势成分,可见曼地亚红豆杉具有较好的药用价值。

中药具有多成分、多靶点、整体性的特点,刘昌孝院士提出的“Q-Marker”概念,有利于阐明中药有效物质基础,且对中药总体质量的控制具有重要作用^[44]。网络药理学方法是一种基于成分与药效相关联的质量标志物研究方法,可深入发现中药多成分、多靶点的治疗机制^[45],现已成为快速准确地找到Q-Marker的主要手段之一。因此,为进一步表征曼地亚红豆杉中的特征、有效物质基础,本实验基于Q-Marker可测、特有、有效、传递及配伍“五原则”,首先采用HPLC法建立曼地亚红豆杉药材的指纹图谱,标定25个共有峰,指认18个化合物,经OPLS-DA筛选紫杉醇、巴卡亭Ⅲ、10-DAB、10-DAT、三尖杉宁碱、穗花杉双黄酮、山柰素、芦丁、金松双黄酮、对羟基苯甲醛和阿魏酸11个差异性标志物,随后结合网络药理学方法从有效性角度对11个差异性标志物进行靶点预测及相关通路富集分析,结果表明它们主要调控PIK3R1、AKT1、EGFR、HRAS、MAPK1、SRC、GRB2等14个核心靶点,均与干预癌症等密切相关。KEGG通路富集分析中,关于癌症的通路较多,表明交集靶点与抗肿瘤密切相关。PI3K-Akt信号通路参与细胞增殖、分化和凋亡及癌细胞存活等过程,引起胶质母细胞瘤、卵巢癌和结肠癌等多种癌症^[44],大多数PI3K-Akt通路的致癌突变发生于核心蛋白PI3K激酶催化亚基或调节亚基,如本研究预测得到的紫杉醇靶标PIK3R1能够通过调节PI3K催化亚基p110稳定性,并帮助其定位结合到细胞质膜,进而PIP2磷酸化为PIP3发挥抑癌或致癌的作用^[46]。网络药理学研究结果表明,10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10-DAT等成分可以作用于该通路发挥治疗抗肿瘤的作用,这与红豆杉临床应用相同,提示曼地亚红豆杉作为红豆杉药用来源,具备可行性,也为曼地亚红豆杉的药效作用机制提供了参考依据。本研究除了紫杉醇、10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖

杉宁碱、10-DAT 特征性成分外,发现主要成分金松双黄酮和银杏双黄酮含量较高,可能与改善糖尿病并发症相关,后期可做深入研究。

为进一步明确预测的 Q-Marker 能否用于评价曼地亚红豆杉的质量,本研究采用 HCA 和 PCA 的化学识别方法进行验证。HCA 的结果表明以 5 个 Q-Marker 标准化的峰面积为变量指标,春季采收 4 个年限可以分为 4 类,较好区分出三年、六年、十年、十八年采收的红豆杉;秋季采收的 4 个年限也分为 4 类,较好区分出五年、七年、八年、十五年采收的红豆杉,提示预测的 Q-Marker 可作为鉴别和区分曼地亚红豆杉质量的重要依据。PCA 分布结果表明 8 个年限的曼地亚红豆杉被分为 7 类,其中六年以上春季采收的曼地亚红豆杉综合得分整体分布集中,与 HCA 的结果一致。此外,为深入验证 Q-Marker 的质量评价作用,本研究同时采用 PCA 方法进行综合评分排序,结果表明,得分由大到小的顺序为十年春、六年春、十八年春、三年春、十五年秋、八年秋、七年秋、五年秋,提示以 6 年以上春季采收质量较优且稳定。由以上结果可知,不同年限曼地亚红豆杉化学成分相似,但质量存在一定差异,这可能与采收季节、年限、生长环境等有关^[47],提示采收时应该重点关注 5 个 Q-Marker 的含量,从而提升曼地亚红豆杉的整体稳定性。

综上所述,本研究基于指纹图谱和网络药理学方法,对曼地亚红豆杉的 Q-Marker 进行预测与分析,结合 Q-Marker 核心理论最终筛选出紫杉醇、10-DAB、巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、10-DAT 为曼地亚红豆杉的 Q-Marker,最后基于化学识别模式方法综合评价不同年限曼地亚红豆杉的质量,结果验证了 Q-Marker 筛选过程的合理性和可行性。此方法具有较好、可靠的质量评价作用,为曼地亚红豆杉质量标准的建立及后续研究提供参考。

参考文献

- [1] 马生军, 刘建慧, 马留纯, 等. 不同产地及生长年限曼地亚红豆杉中 10-脱乙酰基巴卡亭Ⅲ、三尖杉宁碱、紫杉醇量的比较分析[J]. 中草药, 2017, 48(23): 4979
MA SJ, LIU JH, MA LC, et al. Comparative analysis on contents of 10-deacetyl-baccatin III, cephalomannine, taxol of *Taxus media* from different habitats and growth years[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(23): 4979
- [2] 吴长桥, 蒋路园, 杨艳芳, 等. 红豆杉属植物中紫杉烷化合物含量比较与分析[J]. 中草药, 2021, 52(2): 538
WU CQ, JIANG LY, YANG YF, et al. Comparison and analysis of taxane compounds in *Taxus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(2): 538
- [3] 刘向前, 张晓丹, 朱育林, 等. 曼地亚红豆杉双黄酮结构表征和 Taxol 定量[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1498
LIU XQ, ZHANG XD, ZHU YL, et al. Structure identification of biflavones and determination of taxol from *Taxus media*[J]. J Chin Med Mater, 2008, 31(10): 1498
- [4] 徐蕊, 吴泰宗, 范杰平. 曼地亚红豆杉枝叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 南昌大学学报(工科版), 2013, 35(1): 22
XU R, WU TZ, FAN JP. GC-MS analysis of the chemical constituents of the essential oil from *Taxus media* by different extraction methods [J]. J Nanchang Univ (Eng Technol), 2013, 35(1): 22
- [5] 李振麟, 吕旭辉, 王新婕, 等. 曼地亚红豆杉枝叶化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3226
LI ZL, LÜ XH, WANG XJ, et al. Chemical constituents from twig and leaves of *Taxus media*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(14): 3226
- [6] 戴淑颖, 张郜晨茜, 刘怿, 等. 南方红豆杉水提物通过激活自噬下调 PD-L1 增强 IFN- γ 抗肿瘤作用的体外研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5114
DAI SY, ZHANG GCQ, LIU Y, et al. Study on the antitumor effect of IFN- γ *in vitro* promoting by aqueous extract of *Taxus mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu via the modulation autophagy and down-regulating PD-L1 expression [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(9): 5114
- [7] 汤彬. 南方红豆杉枝叶降血糖的物质基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014
TANG B. Study on Material Basis of Hypoglycemic Effect of *Taxus chinensis* Branches and Leaves[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2014
- [8] 徐迪, 苏超, 张洋. 曼地亚红豆杉精油组分及其抑菌活性研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2021, 40(5): 75
XU D, SU C, ZHANG Y. Study on components and antibacterial activity of essential oil from *Taxus media* [J]. J Mianyang Norm Univ, 2021, 40(5): 75
- [9] 吕旭辉. 曼地亚红豆杉和亮叶杨桐化学成分研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018
LÜ XH. Study on the Chemical Constituents of *Taxus media* and *Adinandra nitida* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018
- [10] 王希清, 寇萍, 李弘琨, 等. 红豆杉资源加工利用产业发展现状[J]. 生物质化学工程, 2020, 54(6): 13
WANG XQ, KOU P, LI HK, et al. Industrialization development status of *Taxus* resources[J]. Biomass Chem Eng, 2020, 54(6): 13
- [11] 薛雪, 朱龙平, 杨得坡, 等. 红豆杉活性成分筛选的一种新方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1178

- XU X, ZHU LP, YANG DP, *et al.* New screening method for active constituents in *Taxus chinensis* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(7):1178
- [12] 王亚坤, 裴静波, 谢长生, 等. 南方红豆杉水提物对 HER2 阳性人 NCI-N87 胃癌移植瘤生长及凋亡作用[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(8): 1949
- WANG YK, PEI JB, XIE CS, *et al.* *Taxus chinensis* var *mairiei* (AETC) inhibiting HER2 positive human gastric cancer cells NCI-N87 transplantation tumor and inducing apoptosis[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2016, 34(8): 1949
- [13] 黑龙江省中药材标准 2001 年版[S]. 2001: 232
- Heilongjiang Provincial Standard for Traditional Chinese Medicine Materials 2001[S]. 2001: 232
- [14] 中华人民共和国卫生部药品标准 维吾尔族药分册[S]. 1999: 32
- The Fascicle of Uyghur Medicine of Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China[S]. 1999: 32
- [15] 浙江省中药材标准. 第一册[S]. 2016: 24
- Zhejiang Provincial Standard for Traditional Chinese Medicine Materials. Vol I [S]. 2016: 24
- [16] 广东省中药材标准. 第一册[S]. 2018: 346
- Guodong Provincial Standard for Traditional Chinese Medicine Materials. Vol I [S]. 2018: 346
- [17] 湖北省中药材标准 2018 年版[S]. 2018: 161
- Hubei Provincial Standard for Traditional Chinese Medicine Materials 2018[S]. 2018:161
- [18] 陈莉, 王盛, 刘柳珊, 等. 基于质量标志物有效性、特异性及可测性理念的天葵子 Q-marker 成分预测[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(10):1672
- CHEN L, WANG S, LIU LS, *et al.* Q-marker component prediction of *Semiaquilegiae Radix* based on the concept of effectiveness, specificity and testability of quality markers [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(10):1672
- [19] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. *药学报*, 2019, 54(2): 187
- ZHANG TJ, BAI G, LIU CX. The concept, core theory and research methods of Chinese medicine quality markers [J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54(2):187
- [20] 童欢, 张明伟, 张炳武, 等. 基于指纹图谱、含量测定和化学模式识别的五子衍宗丸质量评价研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(1):103
- TONG H, ZHANG MW, ZHANG BW, *et al.* Study on quality evaluation of Wuziyanzong pills based on HPLC fingerprint, assay and chemical pattern recognition[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(1):103
- [21] 朱雪亚, 李泽运, 张潇, 等. 清热解毒口服液 6 个药物成分的定量分析与网络药理学研究[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(9):1537
- ZHU XY, LI ZY, ZHANG X, *et al.* Quantitative analysis and network pharmacology research based on 6 components in Qingre Jiedu oral liquid[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(9):1537
- [22] 匡雪君, 王彩霞, 邹丽秋, 等. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(22): 4144
- KUANG XJ, WANG CX, ZHOU LQ, *et al.* Recent advances in biosynthetic pathway and synthetic biology of taxol[J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, 41(22): 4144
- [23] 卫强, 孙涛. 红豆杉的抗肿瘤活性成分及其衍生物研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(10): 1664
- WEI Q, SUN T. Review on anti-tumor components from *Taxus* and their derivatives [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2016, 28(10): 1664
- [24] 张应龙, 刘维, 江洪. 紫杉醇对鼻咽癌细胞株 CNE2 的增殖抑制作用及对 PI3K/AKT/p53 信号通路的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(14): 1652
- ZHANG YL, LIU W, JIANG H. Effect of paclitaxel on proliferation inhibitory of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 and its intervention on PI3K/AKT/p53 signal pathway [J]. *Chin J Chin Pharmacol*, 2018, 34(14): 1652
- [25] 陶红芳, 方建林, 刘元生, 等. 紫杉醇下调死亡结构域沉默子表达促进白血病细胞凋亡新机制研究[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(11): 862
- TAO HF, FANG JL, LIU YS, *et al.* Increase of leukemia cell apoptosis through the down-regulation of silencer of death domains by paclitaxel[J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2014, 29(11): 862
- [26] 冯锦, 吴建红, 熊响莲, 等. 紫杉醇通过调控 JAK2/STAT3 通路对肝纤维化模型大鼠 Th17/Treg 影响的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(13): 1564
- FENG J, WU JH, XIONG XL, *et al.* Paclitaxel regulates effect of JAK2/STAT3 pathway on Th17/Treg in hepatic fibrosis model rats [J]. *Chin J Immunol*, 2022, 38(13): 1564
- [27] 向雷, 黄智, 张帅, 等. 磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基 1 过表达对肝细胞癌进展的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28(10): 962
- XIANG L, HUANG Z, ZHANG S, *et al.* The effect of overexpression of PIK3R1 on the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *J Interv Radiol*, 2019, 28(10): 962
- [28] ANDRADE VP, MORROGH M, QIN LX, *et al.* Gene expression profiling of lobular carcinoma in situ reveals candidate precursor genes for invasion[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(4): 772
- [29] WONG H, LEVINGA J, LAPLANTE L, *et al.* Akt ineffective behavior, spatial memory, and extinction related to psychiatric disorders[J]. *Elife*, 2020, 16(9): e56630
- [30] RAI SN, DILNASHIN H, *et al.* The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders[J]. *Neurotox Res*, 2019, 35(3): 775
- [31] MACK PC, BANKS KC, ESPENSCHIED CR, *et al.* Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung-cancer: analysis of over 8000 cases [J]. *Cancer*, 2020, 126(14): 3219
- [32] CHEN SJ, LI FY, XU D, *et al.* The function of RAS mutation in

- cancer and advance sinits drug research[J]. *Curr Pharm Design*, 2019, 25(10): 1105
- [33] 张倩楠, 贾琴琴, 杨婷婷, 等. MAPK1 基因沉默对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2022, 44(4): 373
ZHANG QN, JIA QQ, YANG TT, *et al.* Effect of MAPK1 gene silencing on proliferation, apoptosis, migration and invasion of lung cancer A549 cells[J]. *J Ningxia Med Univ*, 2022, 44(4): 373
- [34] 王信, 李莉, 张瑞, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的白花蛇舌草质量标志物预测分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(16): 1633
WANG X, LI L, ZHANG R, *et al.* Predictive analysis of quality markers of *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb based on fingerprint and network pharmacology[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2022, 42(16): 1633
- [35] 白雪, 刘霞, 崔英, 等. 生长因子受体结合蛋白 2rs238419 遗传多态性与非小细胞肺癌患者铂类药物化疗疗效的相关性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(20): 2387
BAI X, LIU X, CUI Y, *et al.* Correlation between genetic polymorphisms of growth factor receptor binding protein 2 and the efficacy of platinum - based chemotherapy in non - small cell lung cancer patients in Yanbian region[J]. *Chin J Chin Pharmacol*, 2022, 38(20): 2387
- [36] 王雅楠, 马庆久, 徐建庆, 等. EphA2 通过调控 Grb2 表达参与肝癌细胞侵袭的机制探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(1): 32
WANG YN, MA QJ, XU JQ, *et al.* The mechanisms of erythropoietin - producing hepatocellular A2 protein participating in the invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulating the expression of growth factor receptor bound protein 2[J]. *J Mod Oncol*, 2021, 29(1): 32
- [37] 史小娟, 徐志明, 付顺华, 等. 采收季节与年龄对曼地亚红豆杉主要活性成分的影响[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(19): 2538
SHI XJ, XU ZM, FU SH, *et al.* Effects of gathering season and three age affect on main active components of *Taxus media*[J]. *China J Chin Mater Med*, 2010, 35(19): 2538
- [38] 李时珍. 本草纲目[M]. 武汉: 崇文书局, 2008: 347
LI SZ. *Compendium of Materia Medica*[M]. Wuhan: Chongwen Publishing House, 2008: 347
- [39] 叶觉途. 本草推陈[M]. 南京: 江苏人民出版社, 1963: 247
YE JQ. *Materia Medica Promoting Aging*[M]. Nanjing: Jiangsu People's Publishing House, 1963: 247
- [40] 冯巍, 谈锋, 谢峻. 曼地亚红豆杉研究进展[J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1589
FENG W, TAN F, XIE J. *Advances in studies on Taxus media*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2007, 38(10): 1589
- [41] 景奉堂, 冯帅, 王静, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的连翘质量标志物预测分析[J]. *中国药房*, 2022, 33(3): 293
JING FT, FENG S, WANG J, *et al.* Predictive analysis of quality markers of *Forsythia suspensa* based on fingerprint and network pharmacology[J]. *China Pharm*, 2022, 33(3): 293
- [42] 李健, 赖平安. 通过侧链结构修饰将三尖杉宁碱转化为紫杉醇的工艺研究[J]. *生物化工*, 2020, 6(6): 15
LI J, LAI PA. Study on conversion of cephalomannine into paclitaxel by modification of side chain structure[J]. *Biol Chem Eng*, 2020, 6(6): 15
- [43] 崔海超, 郑文艺, 张智慧, 等. 不同红豆杉属植物中 7 种紫杉烷类化合物的 HPLC 检测与分析[J]. *森林工程*, 2022, 38(4): 118
CUI HC, ZHENG WY, ZHANG ZH, *et al.* Determination and analysis of seven taxanes in different *Taxus* species by HPLC method[J]. *Forest Eng*, 2022, 38(4): 118
- [44] 王倩, 姜俊, 许霞, 等. 指纹图谱及网络药理学联合分析芪胶升白胶囊的药效成分及机制[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(6): 1526
WANG Q, JIANG J, XU X, *et al.* Effective components and mechanism of Qijiao Shengbai capsules based on fingerprinting and network pharmacology[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(6): 1526
- [45] 黄露, 徐顶巧, 乐世俊, 等. 基于层次分析—熵权法和网络药理学的野马追质量标志物研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(21): 5545
HUANG L, XU DQ, LE SJ, *et al.* Research on Q - markers of *Eupatorium lindleyanum* based on analytic hierarchy process - entropy weight method and network pharmacology[J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(21): 5545
- [46] TANIGUCHI CM, WINNAY J, KONDO T, *et al.* The phosphoinositide 3 - kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5305
- [47] 吴杰, 汤欢, 黄林芳, 等. 红豆杉属植物全球生态适宜性分析研究[J]. *药学报*, 2017, 52(7): 1186
WU J, TANG H, HUANG LF, *et al.* Research and analysis of globally ecological suitability for *Taxus* plants[J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(7): 1186

(本文于 2023 年 2 月 22 日收到)