

基于化学模式识别和网络药理学的羊躑躅质量标志物预测分析

梅文亚¹, 于俊保¹, 邓婷¹, 刘湘丹^{1,2,3}, 童巧珍^{1,2,3}, 王志辉^{1,2}, 刘芙蓉^{1,2*}, 周日宝^{1,2,3*} (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室, 长沙 410208; 3. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208)

摘要:目的 基于高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)和网络药理学筛选羊躑躅质量标志物(Q-marker),比较羊躑躅不同部位、不同花期、不同产地 Q-marker 含量,挖掘羊躑躅潜在药用价值并推测其可能的作用机制。方法 采用 HPLC-ELSD 建立羊躑躅指纹图谱,进行聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),利用网络药理学方法构建“成分-靶点-通路-药理作用-功效”网络图,并进行疾病预测,筛选羊躑躅的 Q-marker 并进行定量分析。结果 本研究建立了 11 批羊躑躅药材的指纹图谱,共标定 10 个共有峰,经分析得到 4 个差异性成分,预测闹羊花毒素-III、闹羊花毒素-II、金丝桃苷、槲皮苷为羊躑躅的 Q-marker 候选成分并进行网络药理学分析,涉及 84 个靶点蛋白,包括 ATK1、TNF、INS 等,作用于 159 条信号通路,对肿瘤、自身免疫性疾病、心血管疾病等存在潜在治疗作用。成分含量测定结果显示羊躑躅以盛开花入药可能具有更好的疗效,并以 S10 产地最优。结论 通过化学模式识别、指纹图谱及网络药理学预测了羊躑躅的 Q-marker,证明羊躑躅可通过多靶点、多途径治疗疾病,为完善建立羊躑躅质量控制标准及其对疾病治疗机制的进一步探索提供参考。

关键词:羊躑躅;指纹图谱;质量标志物;化学模式识别;网络药理学

doi:10.11669/cpj.2024.21.006 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)21-2030-12

Prediction Analysis of Quality Markers of *Rhododendron molle* G. Don Based on Chemical Pattern Recognition and Network Pharmacology

MEI Wenyi¹, YU Junbao¹, DENG Ting¹, LIU Xiangdan^{1,2,3}, TONG Qiaozhen^{1,2,3}, WANG Zhihui^{1,2}, LIU Xiaorong^{1,2*}, ZHOU Ribao^{1,2,3*} (1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Key Research Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Genuine Regional Medicinal Materials Produced in Hunan Province, Changsha 410208, China; 3. Key Laboratory of Modern Research of Traditional Chinese Medicine, Education Department of Hunan Province, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen the quality markers (Q-marker) of *Rhododendron molle* based on HPLC-ELSD and network pharmacology, compare the contents of quality markers in different parts, different flowering periods and different producing areas of *R. molle*, and explore the potential medicinal value of *R. molle* and speculate its possible mechanism of action. **METHODS** HPLC-ELSD was used to establish the fingerprint of *R. molle*, and hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were carried out. The network diagram of 'component-target-pathway-pharmacological effect-efficacy' was constructed by network pharmacology method, and the disease prediction was carried out. The quality markers of *R. molle* were screened and quantitatively analyzed. **RESULTS** In this study, the fingerprints of 11 batches of *Rhododendron molle* were established, and total of 10 common peaks were calibrated. Four differential components were obtained after analysis. It was predicted that rhodojaponin-III, rhodojaponin-II, hyperoside and quercitrin were candidate components of quality markers of *R. molle* and network pharmacology analysis was performed. It involved 84 target proteins, including ATK1, TNF, INS, etc., acting on 159 signaling pathways, and had potential therapeutic effects on tumors, autoimmune diseases, and cardiovascular diseases. The results of component content determination showed that the flowering of *Rhododendron molle* might have better curative effect, and the S10 origin was the best. **CONCLUSION** The quality markers of *R. molle* are predicted by chemical pattern

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目资助(CARS-21);湖南省中医药管理局重点项目资助(A2024002);湖南中医药大学校级科研项目重点项目资助(2023-27);湖南省教育厅优秀青年项目资助(23B0385);湖南中医药大学科研创新项目资助(2023-102);湖南省自然科学基金项目资助(2022JJ80086);湖南省卫生健康委计划研究项目资助(D202302078705);湖南中医药大学重点学科中药学科项目资助(校行发规字[2023]2);2020年湖南省一流本科专业建设点项目资助(湘教通[2020]248号);2020年国家一流本科专业建设点项目资助(教高厅函[2021]7号)

作者简介:梅文亚,女,硕士研究生 研究方向:中药资源与品质评价 * 通讯作者:周日宝,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:中药资源与品质评价 Tel:(0731)88458233;刘芙蓉,女,硕士,副教授 研究方向:中药资源与药效物质分析 Tel:(0731)88458233

recognition, fingerprint and network pharmacology. It is proved that *R. molle* could treat diseases through multiple targets and multiple pathways, which provides a reference for improving the establishment of quality control standards of *R. molle* and further exploring the mechanism of disease treatment.

KEY WORDS: *Rhododendron molle* G. Don; finger print; quality marker; chemical pattern recognition method; network pharmacology

羊躑躅, 又称闹羊花, 为杜鹃花科植物羊躑躅 (*Rhododendron molle* G. Don) 的干燥花, 性辛、温, 有大毒^[1], 有散瘀定痛、祛风除湿之效。首载于《神农本草经》:“羊躑躅, 主贼风在皮肤中, 淫痛, 温疟, 恶毒, 诸痹。生川谷”^[2]。羊躑躅作为我国一种传统中药, 药用历史悠久, 民间常用其根、叶、花治疗类风湿性关节炎, 临床上可用于跌扑肿痛、偏正头疼、风湿痹痛等症^[1-3], 收录于《中国药典》2020年版^[4]。

羊躑躅来源广泛, 分布于安徽、江西、湖南等地。药材的生态环境适应性、产地初加工以及不同采收期等均会导致羊躑躅质量良莠不齐, 给其质量控制带来很大的困难, 并影响临床应用的安全性和有效性。现代研究表明, 羊躑躅根、茎、叶、花均可入药^[5], 具有抗炎、镇痛、免疫调节等药理作用^[6-7]。质量标志物 (quality markers, Q-marker) 是刘昌孝院士于 2016 年提出的新概念, 有利于更好地控制中药材质量, 通过网络药理学挖掘的大量数据及拓补网络分析, 预测中药材中有效化学成分及其作用靶点或机制途径, 并与化学模式识别结合分析, 更准确地预测中药材 Q-marker, 更全面地评价中药材的质量^[8]。《中国药典》并无其具体的含量测定方法, 关于羊躑躅差异性成分及其产生功效的作用机制的研究报道较少, 笔者尚未见羊躑躅指纹图谱及其 Q-marker 相关报道, 其基础研究较为薄弱^[9]。因此需要建立合理可行的研究方法对羊躑躅 Q-marker 进行分析与比较, 为提高羊躑躅质量控制标准提供一定参考依据。

基于此, 本研究采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD) 对不同产地羊躑躅样品进行分析比较, 建立羊躑躅指纹图谱, 结合化学模式识别进行分析比较, 寻找羊躑躅的差异性成分, 并从网络药理学的角度阐述其作为质量标志物的可行性及羊躑躅多成分、多靶点、多途径发挥药理功效的作用机制, 在此基础上进一步对不同采收部位、不同花期、不同产地羊躑躅进行多成分含量测定。通过以上研究, 以期对羊躑躅的质量控制标准提供分析方法和实验

基础, 并对羊躑躅药用资源的开发及机制研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200LC 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 科技有限公司), Alltech ELSD3300 检测器 (埃文森科技有限公司); ATY124R 电子天平 (岛津企业管理中国有限公司); 500A 多功能粉碎机 (永康市松青五金厂); RE 2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); XM-800VDE 三频超声波清洗机 (小美超声仪器有限公司); Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技中国有限公司)。

1.2 材料

闹羊花毒素-III (Rhodojaponin-III, RJ-III) (批号: B20895)、闹羊花毒素-II (Rhodojaponin-II, RJ-II) (批号: B20894), 购于上海源叶生物科技有限公司; 槲皮苷 (批号: MW9V-PF9F)、金丝桃苷 (批号: 18R5-YJ4C), 购于中国食品药品检定研究院, 以上对照品纯度均 $\geq 98\%$; 甲醇、无水乙醇 (分析纯); 甲醇 (色谱纯)。

不同产地 (S1 ~ S11)、不同采收部位 (S12 ~ S15)、不同花期 (S16 ~ S20) 羊躑躅药材, 共 20 批, 药材收集信息见表 1, 所有样品经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为杜鹃花科杜鹃属植物羊躑躅 (*Rhododendron molle* G. Don)。

1.3 网址与软件

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); SWISS 数据库 (<http://www.swisstarg-etprediction.ch/>); PharmMapper 数据库 (<http://www.lilabecust.cn/pharmmapper/>); UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); STRING 数据库 (<https://www.stringdb.org/>); Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>); Sanger Box 数据分析平台 (<http://sangerbox.com/login.html>); 微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>); CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) Cytoscape 3.7.1 软件。

表 1 羊躑躅药材样品信息表

Tab. 1 *Rhododendron molle* G. Don sample information table

No.	Origin (in Chinese)	Harvest site /period	Specimen	Harvest time	No.	Origin (in Chinese)	Harvest site /period	Specimen	Harvest time
S1	Huangshan, Anhui(安徽黄山)	Flower	Dry product	2023. 3	S12	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Root	Fresh product	2023. 4
S2	Guilin, Guangxi(广西桂林)	Flower	Dry product	2023. 3	S13	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Steam	Fresh product	2023. 4
S3	Enshi, Hubei(湖北恩施)	Flower	Dry product	2023. 3	S14	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Leaf	Fresh product	2023. 4
S4	Xiangtan, Hunan(湖南湘潭)	Flower	Dry product	2023. 3	S15	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Flower	Fresh product	2023. 4
S5	Nanchang, Jiangxi(江西南昌)	Flower	Dry product	2023. 3	S16	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Bud period	Fresh product	2023. 4
S6	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Flower	Dry product	2023. 3	S17	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Initial period	Fresh product	2023. 4
S7	Ji'an, Jiangxi(江西吉安)	Flower	Dry product	2023. 3	S18	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Half-open period	Fresh product	2023. 4
S8	Huanggang, Hubei(湖北黄冈)	Flower	Dry product	2023. 3	S19	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Blooming period	Fresh product	2023. 4
S9	Yongzhou, Hunan(湖南永州)	Flower	Dry product	2023. 3	S20	Luanchuan, Henan(河南栾川)	Wilting period	Fresh product	2023. 4
S10	Jingzhou, Hubei(湖北荆州)	Flower	Dry product	2023. 3					
S11	Xupu, Hunan(湖南溆浦)	Flower	Dry product	2023. 3					

2 方法

2.1 对照品溶液制备

取 RJ-III、RJ-II、槲皮苷、金丝桃苷对照品适量,精密称定,加体积分数 50% 甲醇制成质量浓度为 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,取单个对照品溶液各 0.25 mL 于 2 mL 量瓶中,加体积分数 50% 甲醇摇匀定容,配制成质量浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,密封,低温避光保存备用。

2.2 供试品溶液制备

称取羊躑躅样品粉末(过 80 目筛) 15 g,置于 200 mL 具塞锥形瓶中,加入体积分数 75% 乙醇 120 mL,称定质量,超声提取(频率 80 KHz) 2 h,提取 3 次,冷却至室温,再称定质量,用体积分数 75% 乙醇补足失重,合并滤液,旋转蒸发回收溶剂,得浸膏,加入体积分数 50% 甲醇超声溶解浸膏,全部转移至 25 mL 量瓶中定容,摇匀,静置 24 h,取上清液于离心管中, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min,取上清液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜 2 次,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱(ZORBAX SB-C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-水(B),洗脱梯度(0~30 min, 15% → 35% A; 30~50 min, 35% → 40% A; 50~55 min, 40% → 50% A; 55~60 min, 55% → 65% A; 60~61 min, 65% → 15% A; 61~65 min, 15% A)。柱温 30 °C,进样量 10 μL。蒸发光散射检测器参数设置为漂移管温度 85 °C,增益 2,气流 $2.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.4 羊躑躅潜在 Q-marker 来源定位

本实验定位羊躑躅潜在 Q-marker 的原则如下:基于 HPLC-ELSD 指纹图谱结合化学模式识别筛选羊躑躅中的差异性成分;查阅文献,基于药效作用选取羊躑躅中主要活性物质^[10-11]及入血成分^[9]。

2.5 潜在 Q-marker 的靶点预测

PubChem 数据库获得羊躑躅潜在 Q-marker 的 2D 结构、SMILES 号,利用 SWISS Target Prediction 和 Pharm Mapper 预测平台获得主要靶点,Uniprot 数据库查询靶点对应的基因,除去重复基因和非人类基因,将筛选后的靶点导入 STRING 数据库获得蛋白互作 tsv 信息文件,将文件导入 Cytoscape 软件绘制蛋白质相互作用网络(PPI)蛋白互作网络图。

2.6 基因本体(GO)分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

利用 Metascape 数据库对靶点进行生物信息学分析和通路分析,设置物种为(*Homo sapiens*),所得数据顺序按 P 值大小重新排列,将得到的靶点蛋白与通路进行可视化分析。

2.7 “化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络构建

建立“化合物-靶点-通路”“通路-药理作用-功效”的对应关系,导入 Cytoscape 3.7.1 软件,构建羊躑躅“化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络药理图。

2.8 疾病预测

将 KEGG 富集分析的前 15 条通路输入 CTD 数据库进行羊躑躅治疗疾病的预测分析。

3 结果

3.1 羊躑躅 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

3.1.1 精密度试验 取样品粉末(S9)适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,以 4 号峰(RJ-III)为参照峰,计算 10 个共有峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)均 < 1.7%,相对峰面积 RSD 均 < 2.4%,表明仪器精密度良好。

3.1.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(S9),分

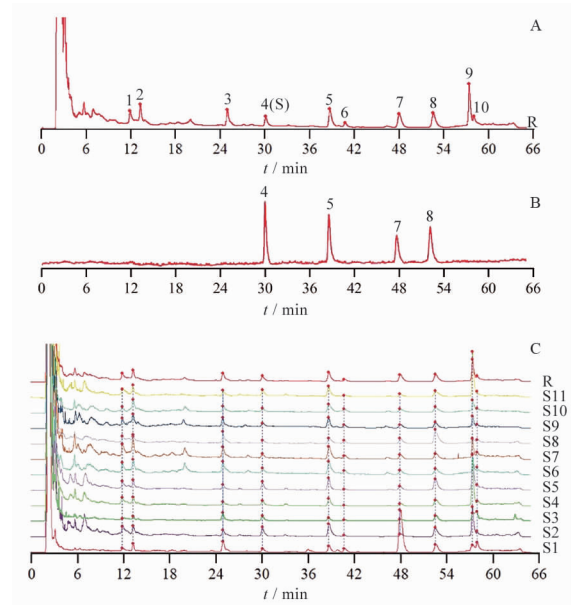
别于样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.3”项下色谱条件进样,以 4 号峰(RJ-Ⅲ)为参照峰,计算 10 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 2.6%,相对峰面积 RSD 均 < 2.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.1.3 重复性试验 取同一样品粉末(S9) 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样,以 4 号峰(RJ-Ⅲ)为参照峰,计算 10 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 2.7%,相对峰面积 RSD 均 < 2.5%,表明该方法重复性良好。

3.1.4 羊蹄躅 HPLC-ELSD 指纹图谱建立及相似度评价 取不同产地羊蹄躅药材样品 S1 ~ S11,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样,记录 11 批样品的色谱图,将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A) 进行处理分析,以 S1 图谱为参照图谱,时间窗为 0.2 min,采用中位数法,进行全谱峰匹配,生成对照指纹图谱(R),选取分离度较好且保留时间适中的 RJ-Ⅲ(峰 4)为参照峰,最终确定了 10 个共有峰。通过与标准品进行对比,指认了 4 个共有峰,分别为 RJ-Ⅲ(峰 4)、金丝桃苷(峰 5)、槲皮苷(峰 7)、RJ-Ⅱ(峰 8),建立羊蹄躅药材指纹图谱、混合对照品、指纹图谱共有模式,见图 1。结果显示,11 批不同产地羊蹄躅图谱与对照图谱之间的相似度为 0.784、0.982、0.953、0.980、0.992、0.915、0.979、0.858、0.988、0.203、0.743。其中 S1、S10、S11 号样品相似度较低(< 0.800),11 批羊蹄躅各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.55%,相对峰面积 RSD 为 63.92% ~ 179.76%,表明 S1、S10、S11 样品与各批次间这 10 个共有峰所代表的化合物含量存在较大差异,说明不同产地羊蹄躅质量存在一定差异。

3.2 多元统计分析

为研究不同产地羊蹄躅指纹图谱共有峰差异,以不同产地羊蹄躅共有峰峰面积为变量,运用 SPSS 25 数据统计软件进行无监督模式的识别分析,结合组间聚类方法,以欧式平方距离方法测量样品间的距离,进行系统聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA),以特定的特征值及累积贡献率为判定依据,对 11 批羊蹄躅样品进行主成分分析(principal component analysis, PCA),将不同产地羊蹄躅样品共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 多元变量统计软件,得到正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)得分图和变量重要性投影(VIP)图。



4 - RJ-Ⅲ; 5 - 金丝桃苷; 7 - 槲皮苷; 8 - RJ-Ⅱ; 其他为未知峰。

4 - RJ-Ⅲ; 5 - hyperin; 7 - quercitrin; 8 - RJ-Ⅱ; other peaks - unknown.

图 1 羊蹄躅指纹图谱共有模式(A)、混合对照品(B)、11 批羊蹄躅药材高效液相色谱(HPLC)叠加图谱(C)

Fig. 1 The fingerprint common mode (A), mixed reference substance (B), HPLC overlay map of 11 batches of *Rhododendron molle*(C)

3.2.1 HCA 以 11 批羊蹄躅样品 10 个共有峰峰面积为变量,运用 SPSS 25 软件对样品进行聚类分析,见图 2。结果表明,当欧式距离为 10 时,11 份羊蹄躅样品分为 4 类, S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9 聚为一类, S1 单独聚为第二类, S10 单独聚为第三类, S11 单独聚为第四类。从总体数据来看,不同产地羊蹄躅质量具有一定差异,安徽、湖北、湖南可能由于生长环境、产地初加工方法等原因导致与其他产地羊蹄躅存在明显差异。

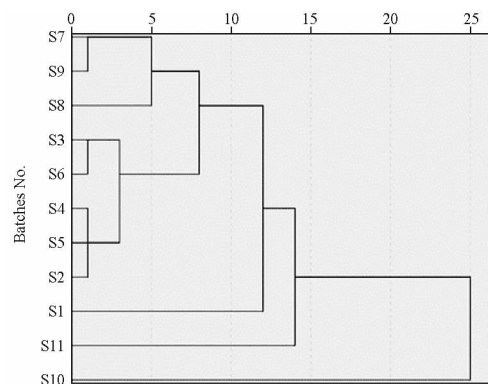


图 2 11 批羊蹄躅样品聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis tree diagram of 11 batches of *Rhododendron molle* G. Don samples

3.2.2 PCA 以 11 批羊躑躅样品 10 个共有峰峰面积为变量,运用 SPSS 25 软件对样品进行主成分分析。基于特征值 > 1 进行信息提取,结果显示 11 批羊躑躅样本有 4 个主成分,其特征值分别为 $\lambda_1 = 3.769$ 、 $\lambda_2 = 2.762$ 、 $\lambda_3 = 1.353$ 、 $\lambda_4 = 1.278$,贡献率分别为 37.687%、27.621%、13.527%、12.777%,累积贡献率可达到 91.613%,筛选出的 4 个主成分具有较好的代表性,可反映出不同产地闹羊花的综合质量。11 批羊躑躅样品的 PCA 得分散点图见图 3,与聚类分析结果基本一致,从图中可看出,S1、S10、S11 与其他批次样品相比差异较大,其原因可能是采收时羊躑躅处于不同的花期,且产地初加工方式有所不同,而其余产地差异较小,说明不同产地羊躑躅仍具有一定相似性。根据成分得分系数矩阵将主成分表示为各个峰面积的线性关系 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 以及综合得分线性表达式($Z_{\text{综}}$),以成分矩阵中每个变量对应的系数除以相应主成分特征值的开根值为权重系数,对不同产地羊躑躅主成分得分、综合得分(公

式 1) 进行分析,并对得分结果进行排序,结果见表 2。

$$Z_{\text{综}} = 0.411Z_1 + 0.301Z_2 + 0.148Z_3 + 0.139Z_4 \quad \text{公式(1)}$$

得分情况反映各批羊躑躅样本质量情况,得分越高,则质量越好。本研究中,湖北荆州样品得分最高,质量较好。

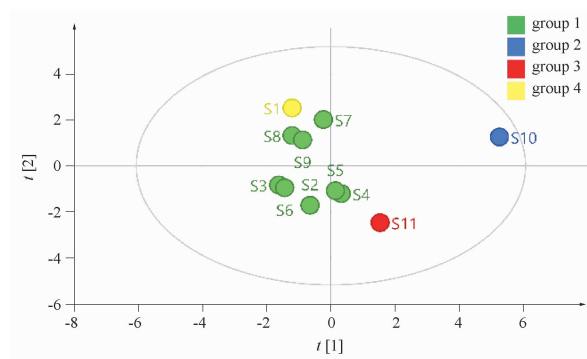


图 3 11 批羊躑躅样品主成分分析(PCA)得分图
Fig. 3 PCA score plot of 11 batches of *Rhododendron molle* G. Don samples

表 2 羊躑躅主成分得分、综合得分与排序

Tab. 2 Principal component score, comprehensive score and ranking of *Rhododendron molle* G. Don

No.	Principal component 1	Principal component 2	Principal component 3	Principal component 4	Comprehensive score	Ranking
S10	3.304	-0.350	1.127	0.842	1.536	1
S11	1.563	-0.098	5.269	0.230	1.424	2
S7	1.144	1.110	1.246	1.707	1.226	3
S8	0.656	1.580	2.851	0.323	1.212	4
S9	0.802	0.940	0.928	1.413	0.946	5
S5	1.080	0.029	2.059	0.699	0.854	6
S1	2.653	2.653	1.063	-4.614	0.719	7
S4	1.068	-0.496	1.526	0.550	0.592	8
S3	0.411	0.466	1.168	0.222	0.513	9
S2	0.773	-0.411	1.254	0.113	0.395	10
S6	0.405	0.164	0.176	0.148	0.263	11

3.2.3 OPLS-DA 将不同产地羊躑躅样品中共有峰峰面积导入 SIMCA 多元变量统计软件,得到 OPLS-DA 得分图和 VIP 图。分析显示自变量拟合指数($R^2 X$)为 0.913,因变量拟合指数($R^2 Y$)为 0.902,模型预测指数(Q^2)为 0.545,对不同产地羊躑躅样品的预测率为 54.5%,模型中 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 、 Q^2 均大于 0.5,说明成功构建拟合度和预测能力较好的数学模型,结果见图 4A。分析结果表明,采用 OPLS-DA 来观察不同产地羊躑躅样品的自然聚类,11 份羊躑躅样品聚为 4 类,与 HCA 结果基本一致。为明确不同产地羊躑躅样品质量差异物质,本研究结合变量重要性投影法,以 VIP 值大于 1 为标准,筛选出贡献较大的 6 个变量,VIP 值大于 1 说明该变量为组间样本的主要差异变量,VIP 值越大则该成

分对组间差异的贡献越大,见图 4B。羊躑躅样品共有峰 4、5、7、8 号峰根据对照品指认结果,分别对应 RJ-III、金丝桃苷、槲皮苷、RJ-II,其 VIP 值均大于 1,说明这些成分在区分不同批次羊躑躅样品时具有重要作用,是羊躑躅的潜在 Q-marker。通过 200 次置换检验,结果见图 4C,回归线与纵轴的相交点小于 0,说明模型不存在过拟合,模型验证有效。

3.3 基于网络药理学预测羊躑躅潜在 Q-marker

3.3.1 潜在 Q-marker 的选取 基于“2.4”项下的筛选原则,结合化学模式识别结果,选取 RJ-II、RJ-III、金丝桃苷、槲皮苷为羊躑躅的潜在 Q-marker 进行网络药理学分析。

3.3.2 靶点 PPI 网络分析 利用 SWISS Target Prediction 服务器、Pharm Mapper 数据库进行靶点

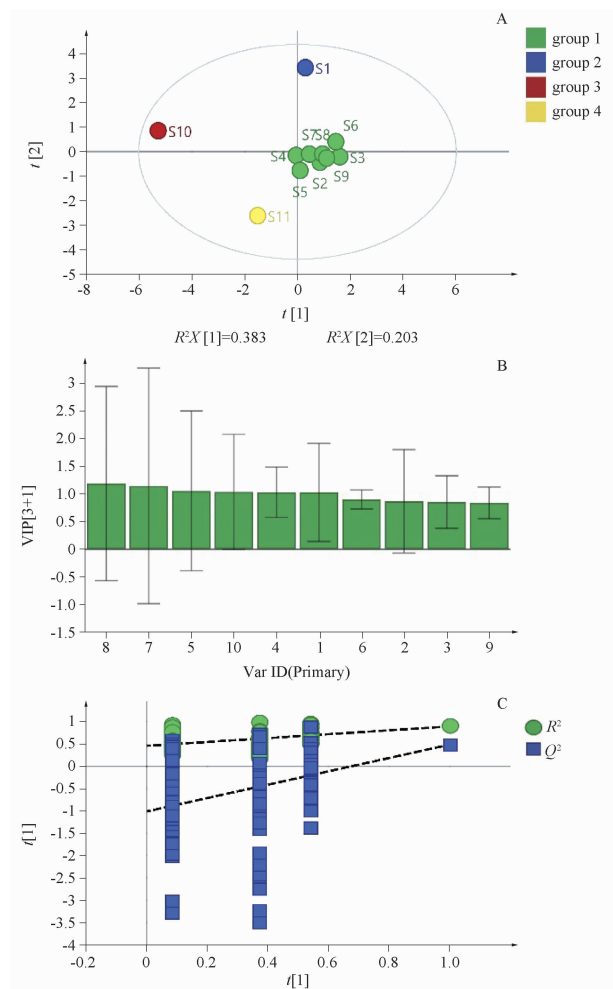


图4 11批羊躑躅样品正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)得分图(A)、变量重要性投影(VIP)图(B)和置换检验图(C)。n=6, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 OPLS-DA score plot (A), VIP plot (B) and permutation test plot (C) of 11 batches of *Rhododendron molle* G. Don. . n=6, $\bar{x} \pm s$

预测,最终得到4个化合物相关的84个相关靶点蛋白,导入STRING数据库得到靶点PPI tsv文件,利用Cytoscape软件构建PPI网络图,并进行网络拓扑分析,计算度值(degree),设置度值大于2倍中位数且 $\text{degree} \geq 10$ 为条件进行筛选。结果见图5,处于羊躑躅PPI网络中心的蛋白分别为AKT1(度值=112)、EGFR(度值=97)、TNF(度值=93)、SRC(度值=86)、INS(度值=83)、GSK3 β (度值=61),有较多的蛋白互作关系,为重要核心靶点。

3.3.3 GO功能富集分析与KEGG通路富集分析

利用Metascape数据库对84个靶点蛋白进行GO功能富集分析,得到915个生物过程(biological process)条目,63个细胞组成(cellular component)条目,85个分子功能(molecular function)条目。

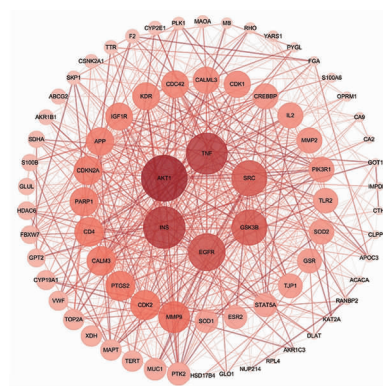


图5 羊躑躅相关蛋白靶蛋白质相互作用网络(PPI)网络
Fig. 5 PPI network of *Rhododendron molle* G. Don-related protein targets

GO富集结果显示这些蛋白主要参与了肽基络氨酸自磷酸化、UV-A反应、星型胶质细胞活化、正向调控超氧阴离子生成等生物过程;在细胞组成上参与了纺锤体中部、胞膜窖、轴突细胞质、血小板 α 颗粒管腔等过程;在分子功能上参与了胰岛素受体结合、Hsp90蛋白结合、氧气结合、细胞周期蛋白结合等功能,结果见图6。

KEGG通路富集得到159条通路,选取P值最小的前15条通路进行可视化分析,见图7,主要涉及癌症通路、内分泌失调通路、癌症中的蛋白聚糖通路、脂质和动脉粥样硬化通路、雌激素信号通路等,由此推测羊躑躅抗肿瘤、抗炎、抑制血管新生等药理作用可能与以上通路有关。

3.3.4 “化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络构建 利用Cytoscape软件构建“化合物-靶点-通路”及“通路-药理作用-功效”网络,见图8~9。表明羊躑躅Q-marker作用多靶点、多通路的特点,羊躑躅通过抗炎、免疫调节等药理作用,发挥祛风湿、散瘀定痛的功效。

3.3.5 疾病预测结果 将KEGG通路富集得到的前15条通路信息输入CTD数据库对羊躑躅潜在的治疗疾病预测分析,预测结果表示羊躑躅对肿瘤(前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、肝癌)、自身免疫性疾病(类风湿关节炎)、心血管疾病(高血压、动脉粥样硬化)、神经病理性疼痛(痛觉过敏)等具有潜在的治疗效果,预测结果与羊躑躅的传统应用(肿瘤、类风湿关节炎、高血压等)及药理作用具有较好的一致性。

3.4 多成分含量测定

为更全面地评价羊躑躅质量,故对11批不同产地、4批不同采收部位、5批不同花期羊躑躅中Q-marker进行定量比较分析。

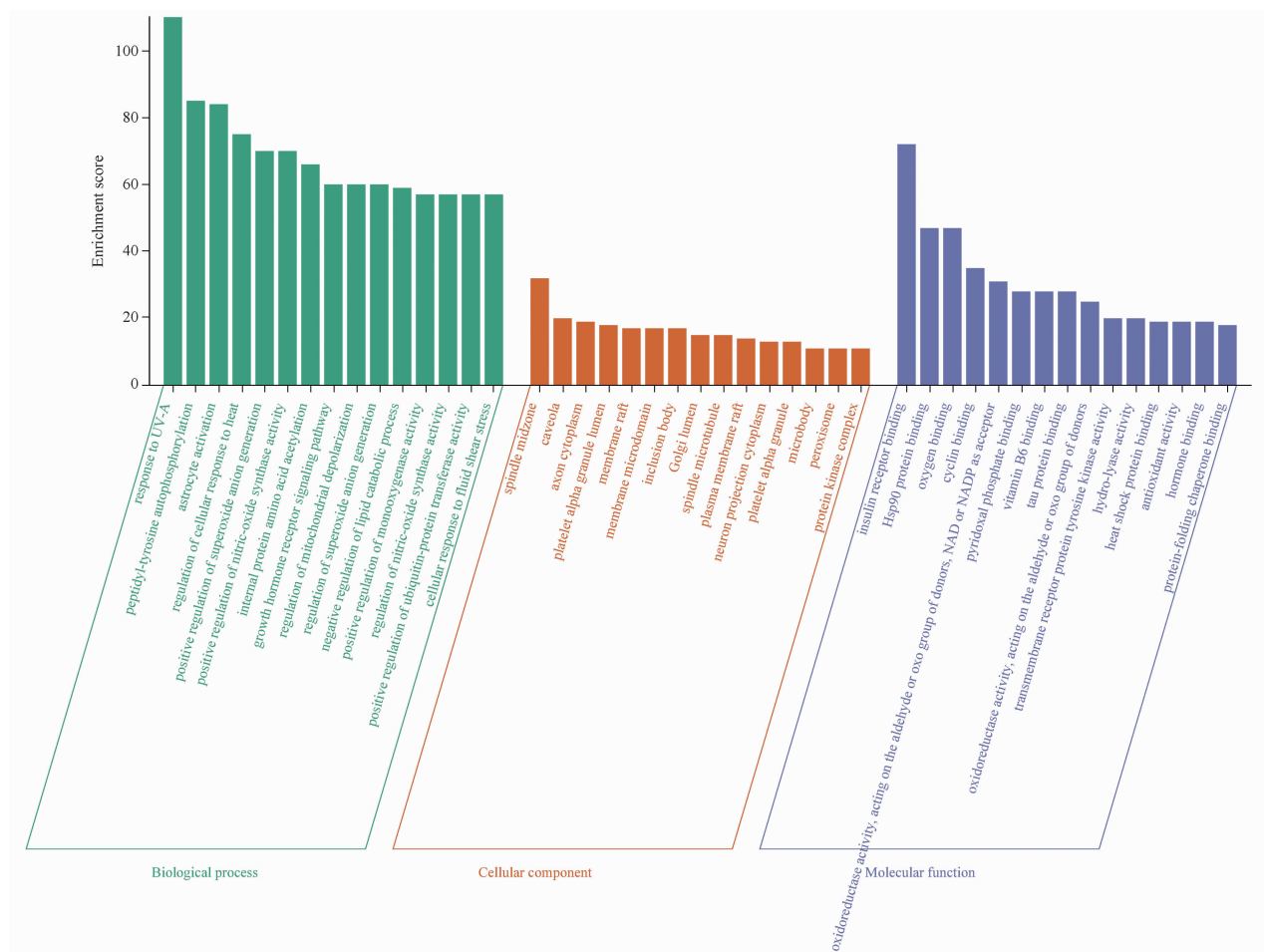


图6 羊蹄躅相关蛋白靶点基因本体(GO)富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of *Rhododendron molle* G. Don-related protein targets

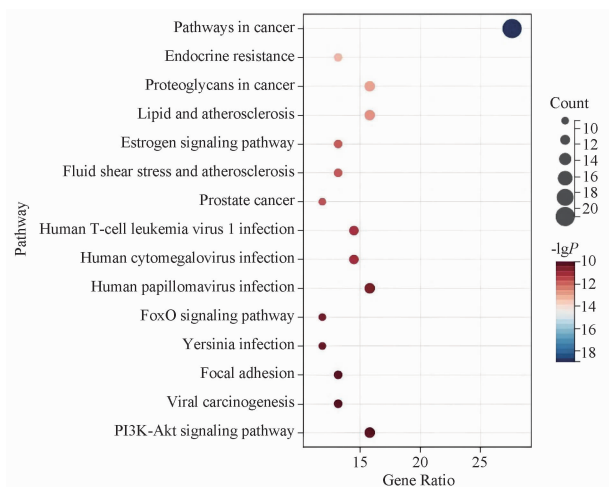


图7 羊蹄躅相关蛋白靶点京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析

Fig. 7 KEGG pathway analysis of *Rhododendron molle* G. Don-related protein targets

3.4.1 线性关系考察 精密称取 RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷对照品适量,加体积分数 50% 甲醇配制

成质量浓度分别为 1.100、1.000、1.000、1.333 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,将 RJ-III、RJ-II、金丝桃苷对照品溶液稀释 1.30、1.69、2.20、2.86、3.71 倍,槲皮苷对照品溶液稀释 1.50、2.25、3.38、5.06、7.59 倍,按“2.3”项下色谱条件进样,以峰面积对数为纵坐标,进样质量的对数为横坐标,得各成分的线性回归方程、相关系数、线性范围,结果见表 3。

3.4.2 精密度的试验 取同一供试品溶液(S9),按照“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,计算样品中 RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.328%、2.320%、0.992%、0.642%,表明仪器精密度的良好。

3.4.3 稳定性的试验 取同一供试品溶液(S9),分别于样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.3”项下色谱条件进样,计算样品中 RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.993%、1.486%、1.353%、0.743%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

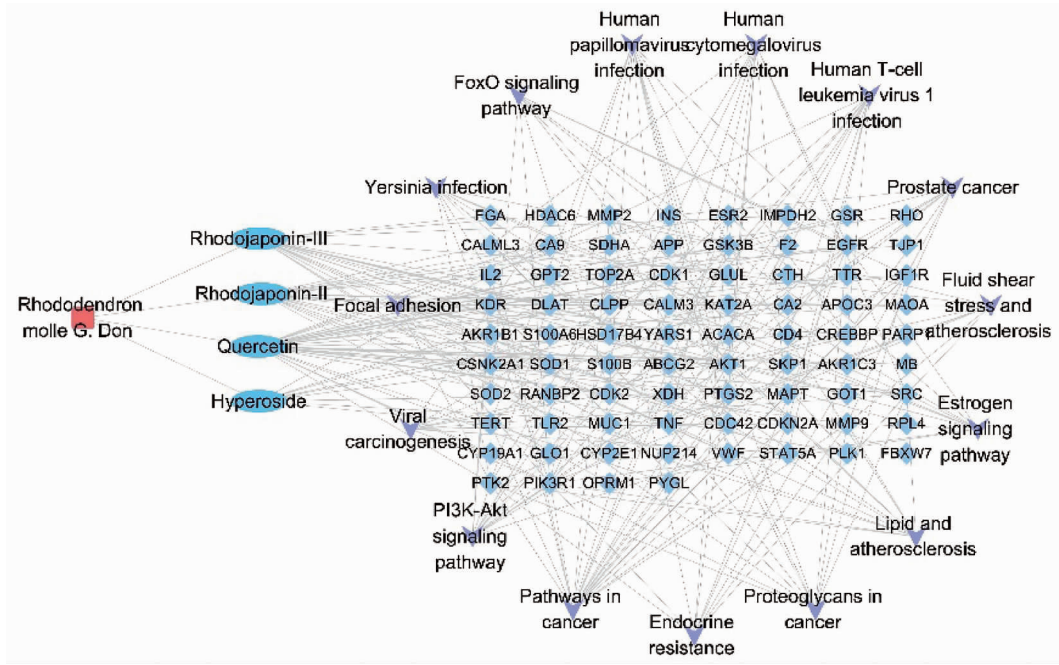


图 8 羊躑躅“成分-靶点-通路”网络关系图

Fig. 8 The “component-target-pathway” network plot of *Rhododendron molle* G. Don

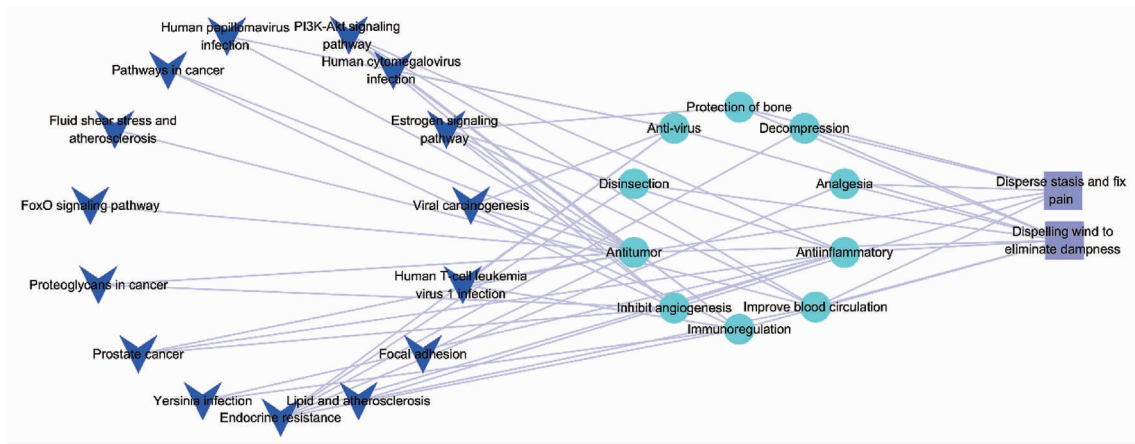


图 9 羊躑躅“通路-药理作用-功效”网络关系图

Fig. 9 The “pathway-pharmacological effects-efficacy” network diagram of *Rhododendron molle* G. Don

表 3 羊躑躅中 4 种化合物的回归方程、相关系数及线性范围

Tab. 3 Regression equation, correlation coefficient and linear range of four compounds in *Rhododendron mole* G. Don

Component	Regression equation	r^2	Range of linearity/mg · mL ⁻¹
RJ-III	$y = 1.792x + 1.680$	0.999 3	2.963 – 11.000
RJ-II	$y = 1.471x + 1.746$	0.999 2	4.882 – 10.000
Hyperin	$y = 2.882x + 0.764$	0.999 8	4.882 – 10.000
Quercitrin	$y = 1.364x + 1.761$	0.999 5	2.634 – 13.333

3.4.4 重复性试验 取羊躑躅样品粉末(S9)6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件依次进样,计算样品中RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷峰面积的RSD分别为0.992%、

1.012%、1.123%、0.410%,表明该方法的重复性良好。

3.4.5 加样回收率试验 取羊躑躅粉末(S9)适量,精密称定,共6份,分别加入等量对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件连续进样,记录峰面积,计算各成分加样回收率及RSD,结果见表4。RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷的平均回收率分别为96.28%、100.6%、98.65%、101.4%,RSD分别为0.60%、1.3%、1.5%、1.8%。

3.4.6 羊躑躅不同采收部位样品含量测定 羊躑躅不同采收部位(S12~S15) Q-marker 含量见表5

表4 羊躑躅加样回收率试验结果。n=6

Tab. 4 The results of recovery test of *Rhododendron mole* G. Don. n=6

Component	m(Known)/mg	m(Added)/mg	m(Measured)/mg	Recovery rate/%	Average recoveries/%	RSD/%
RJ-III	0.221 5	0.220 0	0.427 5	96.85	96.28	0.601 0
	0.220 9	0.220 0	0.419 6	95.19		
	0.221 1	0.220 0	0.426 2	96.62		
	0.221 6	0.220 0	0.425 9	96.45		
	0.221 6	0.220 0	0.424 9	96.24		
	0.222 2	0.220 0	0.426 1	96.36		
RJ- II	0.315 9	0.320 0	0.639 6	100.6	100.6	1.297
	0.329 8	0.320 0	0.644 1	99.12		
	0.320 2	0.320 0	0.651 1	101.7		
	0.320 4	0.320 0	0.634 4	99.06		
	0.319 9	0.320 0	0.654 3	102.3		
	0.319 0	0.320 0	0.643 9	100.8		
Hyperin	0.355 0	0.350 0	0.686 5	97.37	98.65	1.489
	0.352 8	0.350 0	0.705 2	100.3		
	0.354 7	0.350 0	0.702 8	99.73		
	0.355 0	0.350 0	0.684 0	97.02		
	0.353 2	0.350 0	0.701 9	99.82		
	0.353 2	0.350 0	0.691 2	97.60		
Quercitrin	0.258 7	0.260 0	0.537 8	103.7	101.4	1.826
	0.259 1	0.260 0	0.517 6	99.72		
	0.258 9	0.260 0	0.512 6	98.79		
	0.258 4	0.260 0	0.533 1	102.8		
	0.258 5	0.260 0	0.525 5	101.4		
	0.258 8	0.260 0	0.528 1	101.8		

(鲜品含量均扣除水分),羊躑躅不同部位均含有RJ-III,且花、叶中RJ-III质量分数较高,分别为0.386 8%、0.139 0%;RJ- II、金丝桃苷均在花中质量分数较高,分别为0.464 8%、0.463 2%;槲皮苷在叶中质量分数较高,为0.327 7%,在根、茎中均未检出RJ- II、金丝桃苷、槲皮苷。由此可推测花中二萜类、黄酮类含量高于其他部位,因此选择花入药可能具有更好的药理作用。

表5 羊躑躅不同部位Q-marker的含量测定

Tab5 Determination of Q-marker content in different parts of *Rhododendron molle* G. Don

No.	Site	Quality fraction/%			
		RJ- III	RJ- II	Hyperin	Quercitrin
S12	Root	0.058 0	-	-	-
S13	Stem	0.054 3	-	-	-
S14	Leaf	0.139 0	0.119 8	0.101 1	0.327 7
S15	Flower	0.386 8	0.464 8	0.463 2	0.172 0

注: - - 未检出。

Note: - - Not detected.

3.4.7 羊躑躅花不同花期样品含量测定 羊躑躅不同花期(S16~S20)Q-marker含量见图10(鲜品含量均扣除水分)。结果表明,不同花期羊躑躅

Q-marker含量存在差异,RJ- III、RJ- II、金丝桃苷均在盛花期含量最高,分别为0.386 8%、0.464 8%、0.463 2%,其次是初花期含量较高;槲皮苷仅在花蕾期具有较高含量,为0.172 0%。从整体含量来看,盛花期总质量分数较高,为1.315 0%。

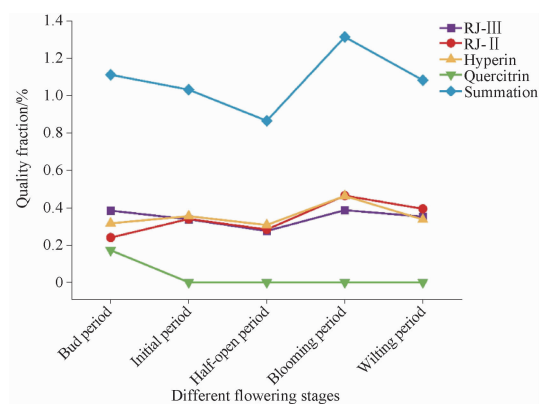


图10 不同花期羊躑躅Q-marker含量测定

Fig. 10 Determination of Q-marker content in *Rhododendron molle* G. Don at different flowering stages

3.4.8 不同产地羊躑躅样品含量测定 11批不同产地羊躑躅样品Q-marker含量测定结果见表6、图11。湖北荆州羊躑躅样品(S10)RJ- III、金丝桃苷质

量分数最高,分别为0.136 3%、0.179 6%;湖南溆浦羊躑躅样品(S11) RJ-II质量分数最高,为0.160 3%;安徽黄山羊躑躅样品(S1)槲皮苷质量分数最高,为

0.186 3%。其中S10样品中二萜类含量较高,而S1样品中黄酮类含量较高,总体来看,S10产地的质量更优。

表6 不同产地羊躑躅 Q-marker 的含量测定。n = 3

Tab. 6 Content determination of Q-marker in *Rhododendron molle* G. Don from different habitats. n = 3

No.	Quality fraction/%						
	RJ-III	RJ-II	Hyperin	Quercitrin	Diterpenes	Flavonoids	Summation
S1	0.083 1	0.124 8	0.113 3	0.186 3	0.207 9	0.299 6	0.507 5
S2	0.082 0	0.114 7	0.112 2	0.095 3	0.196 7	0.207 4	0.404 1
S3	0.089 6	0.113 7	0.097 9	0.085 1	0.203 3	0.183 0	0.386 4
S4	0.087 4	0.120 1	0.122 0	0.089 5	0.207 5	0.211 5	0.419 0
S5	0.096 1	0.137 0	0.124 4	0.093 5	0.233 1	0.227 9	0.461 0
S6	0.058 9	0.071 6	0.108 4	0.094 6	0.130 5	0.203 0	0.333 5
S7	0.086 8	0.111 9	0.146 3	0.097 0	0.198 7	0.243 2	0.441 9
S8	0.084 2	0.148 3	0.114 7	0.110 6	0.232 6	0.225 3	0.457 9
S9	0.083 5	0.123 4	0.135 1	0.104 9	0.206 9	0.240 0	0.446 9
S10	0.136 3	0.112 4	0.179 6	0.095 6	0.248 8	0.275 3	0.524 0
S11	0.110 2	0.160 3	0.110 3	0.079 6	0.270 5	0.189 9	0.460 4

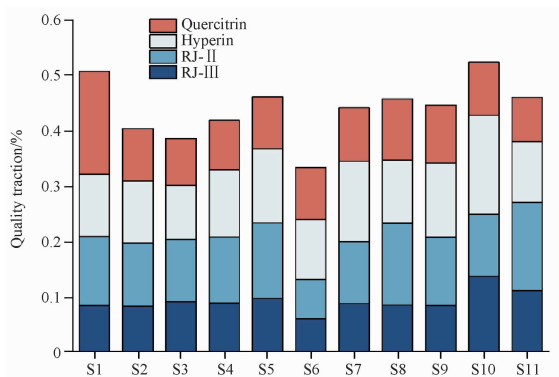


图11 不同产地羊躑躅 Q-marker 的含量

Fig. 11 Content of Q-marker in *Rhododendron molle* G. Don from different habitats

4 讨论

4.1 指纹图谱及化学识别模式分析

中药因多成分、多靶点、多通路的特点,单一指标难以全面反映药材质量。中药指纹图谱广泛应用于中药质量控制、真伪鉴别和谱效关系研究,并能系统地反映出各组分的信息情况^[12]。但中药指纹图谱无法反映出不同产地药材的共同差异性标志物,因此需要结合化学模式识别方法进行科学全面的分析,从而筛选 Q-marker^[13]。

本研究通过建立羊躑躅药材 HPLC-ELSD 指纹图谱,共确定 10 个共有峰,11 批羊躑躅药材相似度在 0.203 ~ 0.988,说明不同产地羊躑躅质量存在一定差异。HCA、PCA、OPLS-DA 结果均表明 11 批羊躑躅药材分为 4 类,通过 VIP 值排序发现 RJ-III、

RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷均大于 1,可作为羊躑躅的潜在 Q-marker。此外,峰 1、峰 10 亦可作为区分不同产地羊躑躅药材的差异成分,但由于未做质谱鉴定,无法指认,后续将加强该方面的研究。

4.2 羊躑躅潜在 Q-marker 预测分析

羊躑躅作为一种民间常用中药,具有抗炎、镇痛、免疫调节、抗肿瘤等药理作用^[14-15],常用于治疗风湿骨病顽疾,其二萜类、黄酮类为主要功能性物质^[16]。目前尚未见羊躑躅 Q-marker 相关研究,一定程度上限制了羊躑躅的质量评价及质量控制。XU 等^[17]指出“成分可测性”是建立适当的质量评价方法和质量标准的必要条件,本研究基于指纹图谱结合化学识别模式筛选了 RJ-II、RJ-III、金丝桃苷、槲皮苷为羊躑躅的差异性成分,结合羊躑躅中化学成分及主要活性成分来看,二萜类及黄酮类化合物是羊躑躅 Q-marker 的主要选择。Feng 等^[18]采用 HPLC 法测定了羊躑躅中 RJ-III、RJ-II 的含量;Guo 等^[19]建立了同时测定不同产地羊躑躅中 RJ-II、RJ-III、槲皮苷及金丝桃苷含量的 HPLC 方法,所建立的方法稳定可靠。本研究通过网络药理学挖掘,发现以上化合物对自身免疫性疾病、肿瘤等存在潜在的治疗作用,与其传统应用和药理研究结果基本相符,可作为羊躑躅的 Q-marker。

网络药理学研究表明羊躑躅活性成分可作用于 AKT1、TNF、EGFR 等多个靶点及 TNF-JNK 信号通路、Wnt 信号通路、TLR2/4-MAPK 等多条信号通路,而这些通路与靶点对机体产生重要调节作用^[20-21]。

已有研究表明 RJ-III 与 RJ-II 的生物利用度及生物转化远高于其他二萜类物质^[9], Liu 等^[22]证实 RJ-III 通过介导 Wnt 信号通路抑制 RA-FLS 细胞的炎症反应,降低促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量,具有较强的抗炎镇痛活性^[23]。Kong 等^[24]研究指出 RJ-II 可调控 Akt/NF- κ B 信号通路,抑制细胞炎症因子的分泌;金丝桃苷、槲皮苷可通过下调 NF- κ B 等信号通路降低 TNF- α 、IL-1 β 的含量^[25],此外还可靶向 AKT1 调节 Raf/MEK/ERK 信号通路防治小鼠肾病^[26]或其他相关通路抑制癌症的发展^[27]。研究表明,在肿瘤发生过程中 EGFR 大量表达或产生突变^[28],而槲皮苷、金丝桃苷可显著降低 EGFR 的基因表达,对结肠癌细胞增殖表现出显著的抑制作用^[29-30],以上药理研究结果表明,羊躑躅治疗疾病多靶点多通路的特点,为进一步阐明羊躑躅治疗自身免疫性疾病、肿瘤等作用机制提供新思路,也证实了本研究选择 RJ-II、RJ-III、槲皮苷、金丝桃苷为羊躑躅 Q-marker 的科学性及合理性。

4.3 多成分含量测定分析

本研究首次建立了羊躑躅指纹图谱,结合网络药理学挖掘,确定 RJ-II、RJ-III、金丝桃苷与槲皮苷为羊躑躅的 Q-marker,并探索不同部位、不同花期、不同产地羊躑躅 Q-marker 含量差异。从含量测定结果表明不同部位羊躑躅 Q-marker 含量存在一定差异,说明羊躑躅不同部位不可相互替代或混用,RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷总含量在花中含量最高,在茎中含量最低,表明羊躑躅花入药可能具有更好的疗效,此结果与《中国药典》2020 年版规定羊躑躅为花入药相符^[4],羊躑躅叶 Q-marker 含量仅次于花,说明其叶具有一定的药用价值。通过比较 S6 (河南栾川干品)与 S15 (河南栾川鲜品),发现鲜品中 Q-marker 含量明显高于干品,提示鲜品可能具有更好的临床疗效,也说明产地初加工方式及仓储方式会影响羊躑躅有效成分含量,为保证羊躑躅药材的质量,需要对羊躑躅药材的加工处理方式及保存进行严格控制,制定相应的质量评价标准。

目前,市场流通中羊躑躅药材花期采收混乱,不利于质量控制,本研究测定羊躑躅不同花期 Q-marker 含量,结果显示不同花期 RJ-III 含量先降后升再降,盛开期含量最高;不同花期 RJ-II、金丝桃苷含量呈先升后降,再升再降的趋势,均以盛开期含量最高,花蕾期含量最低;花蕾期槲皮苷含量最高,其余花期槲皮苷含量均低于检测限,无法检出。从 Q-marker 总含量来看,盛开期总含量最高,半开期含

量最低,提示羊躑躅以盛开期采收为宜。羊躑躅因毒性问题导致其开发利用受到桎梏,造成资源浪费。“毒效二重性”是中药的特点,在适量剂量之内为“效”,用之过度则为“毒”。毒性的本质是药效峻猛的一种表现形式,通过炮制、配伍等缓和羊躑躅的过度纠偏和调节,使羊躑躅“毒性”最大药效化。目前已有研究发现羊躑躅与栀子配伍可缓和其毒性^[31],或以蜂蜜、植物油赋形,可降低羊躑躅的毒性^[16],利用生物检测等手段对其进行质量评价,完善羊躑躅药材的质量控制标准,推动羊躑躅减毒增效工艺的高质量发展,实现“毒-效”的关系转化。利用大数据网络平台筛选出潜在的减毒成分,并基于传统中药理论探究配伍不同的减毒成分和炮制方法对羊躑躅毒性成分的影响及减毒增效的药效机制,加强羊躑躅毒性成分基础研究、毒理作用分子机制研究、机体风险因素研究。此外,构建羊躑躅基于易感人群辨识实现辨证用药科学避毒、易感物质质量控制实现安全性质量控制、临床精准用量控制等中药安全性风险“人-药-用”三维警戒体系,保障羊躑躅的临床安全合理应用,为羊躑躅新药开发及药品安全性评价提供一定参考依据。

5 结论

综上,本研究基于指纹图谱与网络药理学的综合预测分析和差异比较及质量标志物筛选原则,建议将 RJ-III、RJ-II、金丝桃苷、槲皮苷 4 种活性成分选定为羊躑躅药效物质基础的 Q-marker。目前,羊躑躅的基础研究相对较薄弱,质量检测标准较单一,不符合中药材质量控制的基本要求,严重限制了羊躑躅的开发与利用,药理学研究表明羊躑躅治疗疾病的作用机制仍需进行深入研究。后续课题组将研究不同储存年限以及不同炮制方法羊躑躅的指纹图谱以及有效成分含量的动态变化,筛选特征化学成分,区分不同来源的药材。羊躑躅主产于湖南、湖北、广西、安徽等地,故本研究所用样品均采自其主产地,具有足够的代表性,但药材批次较少,后续将增加样品批次,以期建立更为全面的羊躑躅质量评价体系,并在此基础上借助大数据网络挖掘羊躑躅的靶标蛋白与信号通路,紧扣羊躑躅已知的生物学信息,采用分子对接技术构建有效活性成分与分子机制相互作用网络。在中医药理论的指导下,加强对羊躑躅禁忌证、适应证的了解,结合动物模型实验验证,规范剂量-毒性关系,同时寻找有效的减毒增效策略,探索并结合现代科学方法对羊躑躅配伍和

炮制方法进行大胆创新,促进羊躑躅资源的开发与利用。

REFERENCES

- [1] GUO X H, FENG J W, YOU Q, *et al.* Research progress on poisonous Chinese medicine of *Rhododendri Mollis Flos* [J]. *Chin Pharm* (中国药业), 2020, 29(23): 96-104.
- [2] GUO X H, FENG J W, WANG Y D, *et al.* Herbal textual research and processing historical evolution of *Rhododendri Mollis Flos* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27(22): 172-180.
- [3] XUE Q W, LIANG S. Research progress on chemical constituents of *Rhododendron molle* and its pharmacological activities [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51(5): 1350-1360.
- [4] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部) [S]. 2020: 236.
- [5] Writing Group of National Compilation of Chinese Herbal Medicines. *National Compilation of Chinese Herbal Medicines* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975: 238.
- [6] LI C J, WANG L Q, CHEN S N, *et al.* Diterpenoids from the fruits of *Rhododendron molle* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(9): 1214-1217.
- [7] SONG Z F, ZHENG X W, XUE Q W, *et al.* The basic chemical substances of three medicinal parts from *Rhododendron molle* G. Don [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(17): 4498-4501.
- [8] CAO Z Y, LLU J T, HAN Y Q, *et al.* Identification of Q-markers for *Cistanches Herba* based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology [J]. *China J Chin Mate Med* (中国中药杂志), 2022, 47(7): 1790-1801.
- [9] GUO X H, HUANG M J, WANG L J, *et al.* Toxicity mechanism of *Rhododendri Mollis Flos*: based on serum metabolomics and network toxicology [J]. *China J Chin Mate Med* (中国中药杂志), 2022, 47(7): 1932-1941.
- [10] ZHANG J, LIU J, DAI L F, *et al.* Unlocking the potential antioxidant and anti-inflammatory activities of *Rhododendron molle* G. Don [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32(5): 2375-2383.
- [11] CAI Y Q, HU J H, QIN J, *et al.* *Rhododendron Molle* (Ericaceae): phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物 英文版), 2018, 16(6): 401-410.
- [12] FAN XINYU, JI TIAN, BI XUE YAN, *et al.* Overview of the classification and evaluation of fingerprints of traditional Chinese medicines [J]. *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2023, 36(6): 1254-1258.
- [13] ZHANG H P. Studies on the chemical constituents and pharmacological activities of the roots of *Rhododendron molle* [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2020.
- [14] YONG L, XUN Z Y, XIN Z Z, *et al.* Diterpenoids from the fruits of *Rhododendron molle*, potent analgesics for acute pain [J]. *Tetrahedron*, 2017, 74(7): 1214.
- [15] ZOU H Y, LUO J, XU D R, *et al.* Tandem solid-phase extraction followed by HPLC-ESI/QTOF/MS/MS for rapid screening and structural identification of trace diterpenoids in flowers of *Rhododendron molle* [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(3): 255.
- [16] MEI W Y, LIU X D, WANG Z H, *et al.* Research progress on *Rhododendron molle* in treatment of rheumatoid arthritis [J]. *China J Chin Mate Med* (中国中药杂志), 2023, 48(21): 5690-5700.
- [17] XUE R, ZHANG Q, CHEN P, *et al.* Research strategy on quality marker (Q-Marker) of traditional Chinese medicine decoction pieces [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(5): 1285-1293.
- [18] FENG J W, GUO X H, LI D, *et al.* Simultaneous determination of rhodjaponins II, III, V of *Rhododendri Mollis Flos* from different producing area and flowering phase by HPLC-CAD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52(24): 7624-7629.
- [19] GUO X H, LIU X, WU W H, *et al.* Simultaneous determination of four compounds in *Rhododendron molle* G. Don. by HPLC-ELSD method [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2021, 36(5): 2922-2925.
- [20] WU R, ZHANG Y, XU X, *et al.* Exosomal B7-H3 facilitates colorectal cancer angiogenesis and metastasis through AKT1/mTOR/VEGFA pathway [J]. *Cell Signal*, 2023, 109: 110737.
- [21] ZENG M, WANG Z H, WANG Z H, *et al.* Predictive analysis of *Eucommia ulmoides* quality markers based on HPLC fingerprint and network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35(8): 1283-1296.
- [22] LIU X R, LIU X D, WANG Z, *et al.* Rhodjaponin III affected fibroblast-like synovial cell proliferation and apoptosis by regulating Wnt1/Dvl1/ β -catenin pathway: an experimental research [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2022, 42(10): 1199-1206.
- [23] ZONG L, ZHANG J, DAI L, *et al.* The Anti-Inflammatory Properties of *Rhododendron molle* Leaf Extract in LPS-Induced RAW264.7 [J]. *Chem Biodivers*, 2020, 17(10): e2000477.
- [24] KONG L, WANG L, ZHAO Q, *et al.* Rhodjaponin II inhibits TNF- α induced inflammatory cytokine secretion in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(10): e22551.
- [25] WANG Z, SUN P, ZHAO T, *et al.* E Se tea extract ameliorates CCl4 induced liver fibrosis via regulating Nrf2/NF- κ B/TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154854.
- [26] YU F W, MING F L, NAN H, *et al.* Quercetin-targeted AKT1 regulates the Raf/MEK/ERK signaling pathway to protect against doxorubicin-induced nephropathy in mice [J]. *Tissue Cell*, 2023, 85: 102229.
- [27] NING Y, WU Y, ZHOU Q, *et al.* The effect of quercetin in the yishen tongluo jiedu recipe on the development of prostate cancer through the akt1-related CXCL12/CXCR4 pathway [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2024, 27: 863-876.
- [28] HALDER S, BASU S, LALL SP, *et al.* Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy: What's new in 2023 Expert Opin Ther Targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2023, 27(4-5): 305-324.
- [29] KESHAVERZ F, DORFAKI M, BARDANIA H, *et al.* Quercetin-loaded liposomes effectively induced apoptosis and decreased the epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer cells: an *in vitro* study [J]. *Iran J Med Sci*, 2023, 48(3): 321-328.
- [30] KERN M, TJADEN Z, NGIEWIH Y, *et al.* Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(4): 317-328.
- [31] YAO M, JIN L Y, DAI W Y. Animal experimental study on the detoxification effect of *Gardenia jasminoides* on the hepatotoxicity of *Rhododendron molle* G. Don [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2011, 22(9): 2183-2185.

(收稿日期:2024-05-13)