

基于网络药理学和代谢组学与分子对接技术预测鱼腥草破壁饮片抗辐射质量标志物

何文秀^{1,2}, 王吉文², 杨联林², 胡倩倩², 赵雨^{1,2}, 马宏亮^{1,2*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 中山市中智药业集团有限公司, 广东 中山 528437)

摘要: **目的** 基于代谢组学分析结合网络药理学方法与分子对接技术预测鱼腥草破壁饮片抗辐射质量标志物(Q-Marker)。**方法** 建立UPLC-Q-TOF-MS法解析鱼腥草破壁饮片化学成分,采用主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析筛选关键代谢物;构建“成分-靶点-通路”网络预测抗辐射Q-Marker,进行GO、KEGG富集分析,并利用分子对接验证其生物活性。**结果** 预测的Q-Marker(5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚)皆为黄酮类成分,其通过核心靶点(Akt1、BCL2、EGFR)及核心通路(癌症通路、PI3K/Akt信号通路、脂质与动脉粥样硬化通路)协同发挥抗辐射作用,5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮与受体有更强的结合能力(抗病毒、抗肿瘤等生物活性)。**结论** 本实验初步预测5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚是鱼腥草破壁饮片抗辐射Q-Marker,不仅为鱼腥草破壁饮片质量控制提供理论依据,亦为其他天然抗辐射药物的开发提供方向。

关键词: 鱼腥草破壁饮片;代谢组学;抗辐射;网络药理学;Q-Marker;分子对接;主成分分析;正交偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-1014-10

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.049

辐射损伤是一种近现代突显的疾病,无相关记载和防治措施。随着生产、科研、医疗的迅猛发展,人们接触放射性辐射的可能性越来越大,导致基因突变^[1-2]、细胞损伤^[3]、强氧化性自由基生成^[4]等一系列系统功能性障碍病变^[5]。加之日本核爆炸、核泄漏、核污水排放等事件的发生,“辐射防护剂”一词迅速成为热议的焦点^[6]。然而,目前市场上的辐射防护剂大多为化学合成物质,成本高、不良反应多,故寻找高效低毒、安全性高的天然抗辐射剂越来越受到重视。

鱼腥草始载于《名医别录》^[7],味辛、性微寒,具有清热解暑、消痈排脓、利尿通淋之功效^[8]。鱼腥草破壁饮片是将符合法定标准且具有细胞结构的鱼腥草传统饮片,经现代破壁粉碎技术加工为粒径 $D_{90}<45\mu\text{m}$ 的粉末中间体,后通过无添加成型专利技术制成30~100目的干燥颗粒^[9],该破壁技术仅改变传统饮片的物理状态,保留原药物全成分。研究表明,中药破壁饮片相比于传统饮片有着“等量增效”的优势^[10-12],如鱼腥草破壁饮片抗细菌内毒素作用强于传统饮片等。被誉为“天然抗生素”的鱼腥草体内水溶性多糖和总黄酮具有抗辐射作用^[13-15],表明鱼腥草有作为天然抗辐射药物开发的潜能,但目前关于鱼腥草破壁饮片抗辐射的作用机理及物质基础仍是空白。因此,本实验以鱼腥草破壁饮片为研究对象,开展其抗辐射质量标志物

(Q-Marker)的筛选及其作用机理的研究,同时比较破壁饮片和传统饮片Q-Marker的相对含量,研究两者质量差异。

近年来,代谢组学^[16]、网络药理学^[17]、分子对接^[18]等新兴学科的发展为预测Q-Marker提供了有力支持,然而在寻找具有抗辐射作用Q-Marker中药的应用却仅限于人参^[19]。因此,本实验建立UPLC-Q-TOF-MS法对鱼腥草破壁饮片的物质基础进行全面解析,并结合网络药理学与分子对接技术对其成分、靶点、通路进行系统性分析,预测其抗辐射Q-Marker,为鱼腥草破壁饮片质量控制及后续利用提供科学依据,亦为其他天然抗辐射药物的开发提供崭新的研究思路和技术。

1 材料

1.1 试剂与药物 鱼腥草原药材采自广西桂林药材种植基地,经中山市中智药业集团有限公司贾世清中药师鉴定为三白草科蕺菜属植物鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb 的干燥地上部分,经净制、除杂、干燥,制成鱼腥草传统饮片。将鱼腥草传统饮片通过气流粉碎技术制备成破壁粉体(中间体)、再经“无添加成型”技术进一步制备成鱼腥草破壁饮片,样品编号见表1。甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国默克公司);亮氨酸-脑啡肽校准液(色谱纯,美国Waters公司);蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2019M663357)

作者简介: 何文秀(1999—),女,硕士生,从事中药学研究。E-mail: hwx1454551230@163.com

*通信作者: 马宏亮(1979—),男,博士,高级工程师,从事中药GAP研究。E-mail: mhl008@126.com

表1 鱼腥草样品信息

样品批次	破壁饮片编号	传统饮片编号
第1批	P1	C1
	P2	C2
	P3	C3
	P4	C4
第2批	P5	C5
	P6	C6
	P7	C7
第3批	P8	C8
	P9	C9

1.2 仪器 KQ-700 DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ME 204 型万分之一电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱串联 Xevo G2-XS QTOF 型质谱仪 (美国 Waters 公司)。

1.3 数据库及软件 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); 中药系统数据库及分析平台 TCMS 2.3 (<https://www.tcmsp-e.com/>); Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html>); GeneCards 人类基因数据库 (<https://www.genecards.org/>); RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>); Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>); Swiss Target Prediction 数据库 2021 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); STRING 在线分析平台 11.5 (<https://cn.string-db.org/>); SIMCA 14.1 软件 (瑞典 Umetrics 公司); 微生信分析平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>); TBtools 软件 (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>); Openbabel 3.1.1 软件 (<https://openbabel.org/>); Cytoscape 3.8.2 软件 (Cytoscape Consortium; <https://cytoscape.org/>); PyMol 2.4.0 软件 (<https://github.com/schrodinger/pymol-open-source>); AutoDock 4.2.6 软件 (<https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/>)。

2 方法与结果

2.1 色谱、质谱条件

2.1.1 色谱 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相 [乙腈-甲醇 (1:1)] (A) - 水 (含 0.1% 甲酸) (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 0~12% A; 5~13 min, 12%~19% A; 13~15 min, 19%~24% A; 15~27 min, 24%~38% A; 27~36 min, 38%~52% A; 36~38 min, 52%~0A; 38~40 min, 0A); 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL。

2.1.2 质谱 电喷雾离子源; 负离子模式扫描; 扫描范围 m/z 50~1 200; 毛细管电压 2.0 kV; 离子源温度 100 °C; 锥气孔体积流量 50 L/h; 锥孔电压 40 V; 脱溶剂气温度 250 °C, 体积流量 600 L/h; 低能量通道碰撞电压 6 eV; 高能量通道碰撞电压 40~50 eV。亮氨酸-脑啡肽校准液精确质量校正 (554.262 0 [M-H]⁻, 556.276 6 [M+H]⁺)。

2.2 供试品溶液制备 精密称取 3 批鱼腥草饮片各 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 80% 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声提取 30 min (80 KHz、560 W), 放冷, 称定质量, 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 放置 30 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。取等体积的所有供试品溶液混合, 制成质控样品 (QC), 用以考察整个检测和分析过程中的稳定性和重复性。

2.3 定性及半定量分析 通过 CNKI、SCI-Hub (<https://tool.yovisun.com/scihub/>)、PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等数据库检索鱼腥草化学成分相关文献, 登录 ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)、Chemical Book (<https://www.chemicalbook.com/>) 数据库, 将鱼腥草化学成分的分子式、化学名、CAS 号、保留时间及 mol 格式结构式导入 UNIFI 分析软件, 将其作为自建鱼腥草成分数据库。

在“2.1”项条件下进样测定, 得到质谱数据, 将其与自建鱼腥草成分数据库进行比对, 设置鉴定参数为响应值 ≥5 000, 误差 ≤5, 进一步通过文献报道数据精确比对分子质量、特征碎片离子、保留时间等信息进行成分分析与鉴定。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析结果

2.4.1 样品提取溶剂考察 依次考察 40%、60%、80% 甲醇及甲醇的 UPLC-Q-TOF-MS 谱图分离效果, 见图 1。由此可知, 40% 甲醇所得各成分峰的峰形较差, 无法辨别是否为成分峰, 且基线不平稳; 其余 3 种体积分数甲醇提取的供试品总离子流图的主峰种类一致, 出峰数目基本无差异, 但 80% 甲醇所得各成分峰的分离度略高, 拖尾影响较小, 故最终选择 80% 甲醇。

2.4.2 化学成分解析 共鉴定出 54 种成分, 见图 2, 以 P1 样品为例记录总离子流图。筛选得到 35 种共有成分, 见表 2, 包括黄酮类 17 种、有机酸类 7 种、生物碱类 5 种、酯类 4 种、醇类 1 种、苷类 1 种, 并用 TBtools 工具进行数据标准化及其热图绘制 (颜色由蓝到红表示响应值由低到高), 结果显示, 3 批鱼腥草破壁饮片中 P1~P3、P4~P6、P7~P8 在热图矩阵中各自聚为一簇, 且平行样间的聚拢趋势能较好地凸显破壁饮片质量稳定的特性, 同时验证取样及检测的可靠性, 见图 3。

2.4.3 主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 采用 SIMCA 14.1 软件对鱼腥草药材中 35 种共有成分的响应值进行 PCA, 结果见图 4。由此可知, 3 批鱼腥草破壁饮片 (P1~P3、P4~P6、P7~P9) 各自占据一象限, 出现较好的组间分离效果。在负离子检测模式下, 主成分 PC1、PC2 的贡献率分别为 42.70%、19.90%; 同时质控样 (QC1~QC4) 紧密聚焦于中心轴附近, 表明仪器稳定性良好, 方法可靠。

采用 OPLS-DA 模型精确找出 3 批鱼腥草破壁饮片的关键代谢成分, 见图 5。为了验证该模型拟合效果的可行性, 对其进行 200 次置换检验, 其中 R^2Y 为 0.828 9, 说明模型

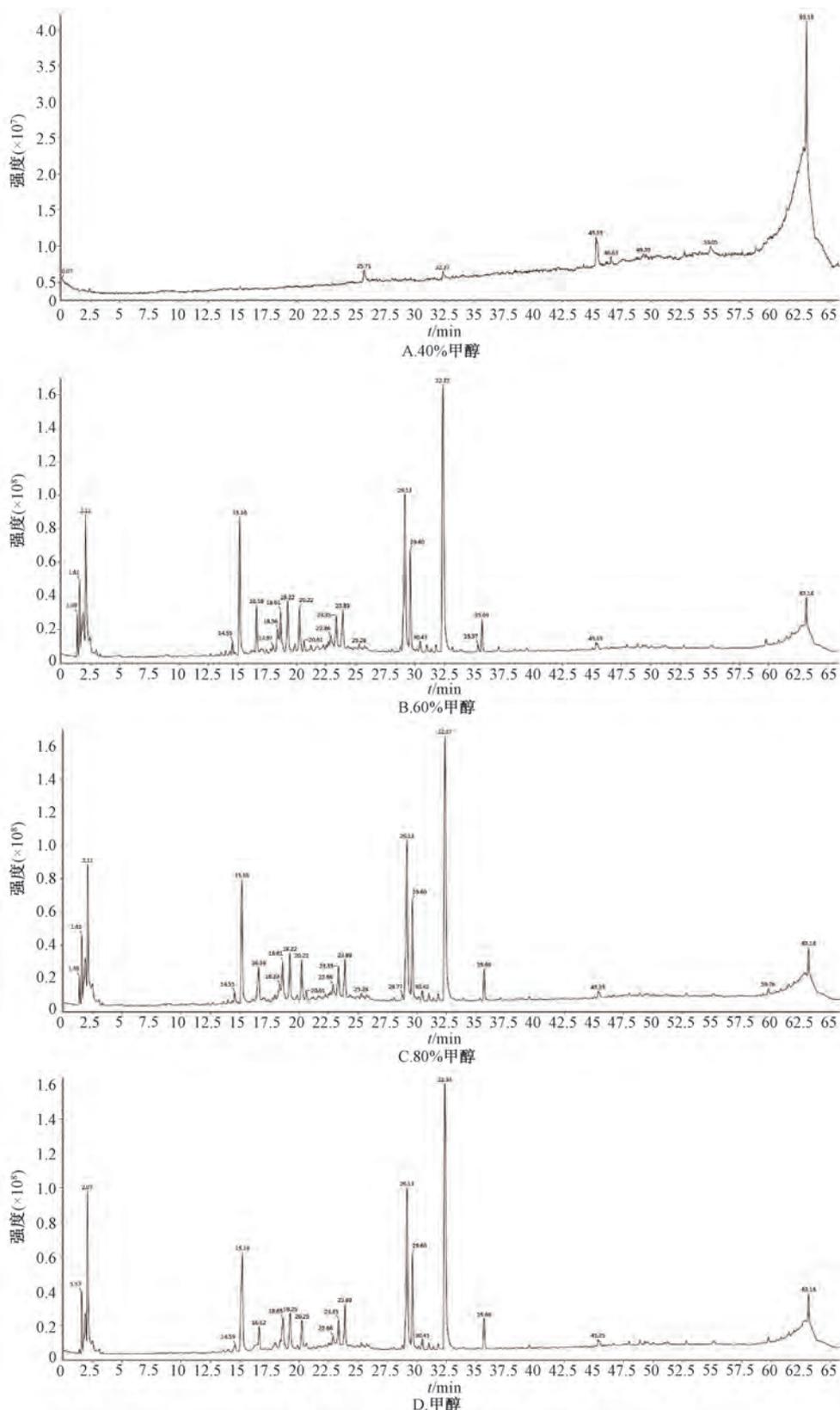


图 1 4种提取溶剂总离子流图

对因变量的贡献率为 82.89%，拟合度较好； Q^2Y 为 0.6624，表明该模型的预测能力强，且图中左端任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于右端的原始值， Q^2 回归线的截距为负值，均显示 OPLS-DA 模型不存在过拟合现象，可有效

进行后续关键代谢物筛选^[20-21]，见图 6。

本实验关键代谢物的筛选条件设定为变量重要性投影值 (VIP) >1 且 $P < 0.05$ ，共筛选出 19 个关键代谢物，见图 7，其中 VIP 值大于 1 有异槲皮苷 (1.449 2)、5, 3'-二

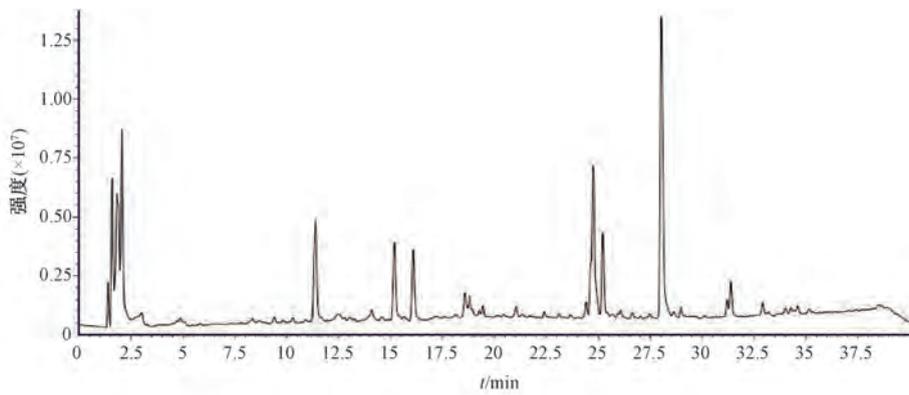


图2 鱼腥草 P1 样品总离子流图

表2 鱼腥草破壁饮片共有成分信息

序号	名称	t_R /min	CAS号	理论值 m/z	实测值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	加和离子	响应值
1	丁二酸二甲酯	2.10	106-65-0	191.054 7	191.055 4	-3.6	+HCOO	1 485 048
2	右旋奎宁酸	2.12	77-95-2	192.068 5	192.069 2	-3.7	-H、+HCOO	1 476 554
3	柠檬酸	4.73	77-92-9	191.018 1	191.018 9	-4.1	-H	192 135
4	隐绿原酸	11.34	905-99-7	353.087 4	353.087 6	-0.6	-H	2 045 093
5	新绿原酸	11.43	906-33-2	354.129 7	354.129 8	-0.3	-H	56 306
6	新绿原酸甲酯	15.72	123410-65-1	367.101 8	367.102 6	-2.2	-H	58 643
7	3-咖啡酰奎尼酸甲酯	15.73	123483-19-2	359.216 8	359.217 7	-2.5	-H	53 985
8	奎尼酸甲酯	15.86	123483-19-2	369.114 9	369.115 4	-1.3	-H	53 211
9	去甲异波尔多定	16.35	5890-18-6	312.123 1	312.123 6	-1.7	-H	13 058
10	巴婆碱	16.43	6871-21-2	357.420 4	357.421 0	-1.7	+HCOO	19 854
11	laetanine	17.09	72361-67-2	300.982 7	300.983 2	-1.7	-H	10 909
12	N-反式-阿魏酰酪胺	17.48	66648-43-9	311.369 8	311.370 3	-1.7	-H	18 764
13	长寿花糖苷	18.51	54835-70-0	431.191 4	431.191 8	-1.0	+HCOO、-H	573 662
14	5-O-咖啡酰莽草酸	19.38	73263-62-4	335.075 8	335.076 5	-2.1	-H	218 246
15	儿茶素	20.39	7295-85-4	347.421 4	347.422 1	-2.1	+HCOO	251 112
16	对羟基肉桂酸	21.28	7400-08-0	209.043 6	209.044 6	-4.6	+HCOO	71 908
17	芦丁	24.54	153-18-4	609.146 1	609.146 8	1.2	-H、+HCOO	1 692 439
18	金丝桃苷	24.67	482-36-0	463.088 3	463.088 4	0.3	-H、+HCOO	2 787 138
19	异槲皮苷	24.86	21637-25-2	452.119 7	452.119 8	0.3	-H、+HCOO	2 098 764
20	槲皮素-3-D-木糖苷	25.98	549-32-6	433.077 0	433.077 3	-0.8	-H	135 388
21	异荭草素	26.99	4261-42-1	447.093 3	447.093 7	1.0	-H、+HCOO	6 005 208
22	荭草苷	27.94	28608-75-5	439.022 1	439.022 1	0	-H、+HCOO	6 976 432
23	槲皮苷	27.95	522-12-3	446.998 9	446.999 3	1.0	-H、+HCOO	6 086 424
24	马兜铃内酰胺 I	28.86	13395-02-3	292.059 8	292.060 7	-3.0	-H	76 175
25	马兜铃内酰胺 FI	29.00	112501-42-5	264.065 2	264.065 9	-2.8	-H	53 360
26	阿福豆苷	31.28	482-39-3	431.097 3	431.097 8	-1.2	-H、+HCOO	826 651
27	异牡荆素	32.66	29702-25-8	439.751 6	439.752 1	-1.2	-H、+HCOO	804 322
28	牡荆素	32.70	3681-93-4	440.981 7	440.982 2	-1.2	-H、+HCOO	799 994
29	槲皮素	33.88	117-39-5	301.034 0	301.034 7	-2.3	-H	48 744
30	木犀草素	34.39	491-70-3	285.039 5	285.040 0	-1.7	-H	23 029
31	山柰酚	34.40	520-18-3	290.861 6	290.862 1	-1.7	-H	240 001
32	5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	34.59	32174-62-2	313.070 7	313.071 2	-1.6	-H	10 882
33	野黄芩素	35.41	529-53-3	609.146 1	609.146 8	1.2	-H、+HCOO	23 029
34	吐叶醇	38.35	23526-45-6	269.137 8	269.138 6	-3.1	+HCOO	7 483
35	三羟基十八二烯酸	39.27	-	329.232 3	329.232 8	-1.6	-H	268 588

羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮(1.336 7)、隐绿原酸(1.321 5)、新绿原酸(1.321 5)、laetanine(1.304 7)、去甲异波尔多定(1.304 7)为, 山柰酚(1.293 6)、木犀草素(1.293 6)、野黄芩素(1.293 6)、槲皮素-3-D-木糖苷(1.200 7)、阿

福豆苷(1.175 2)、芦丁(1.173 8)、吐叶醇(1.175 2)、5-O-咖啡酰莽草酸(1.127 8)、儿茶素(1.127 8)、绿原酸甲酯(1.095 5)、新绿原酸甲酯(1.095 5)、异荭草素(1.050 2)、长寿花糖苷(1.003 1), 包括10个黄酮、3

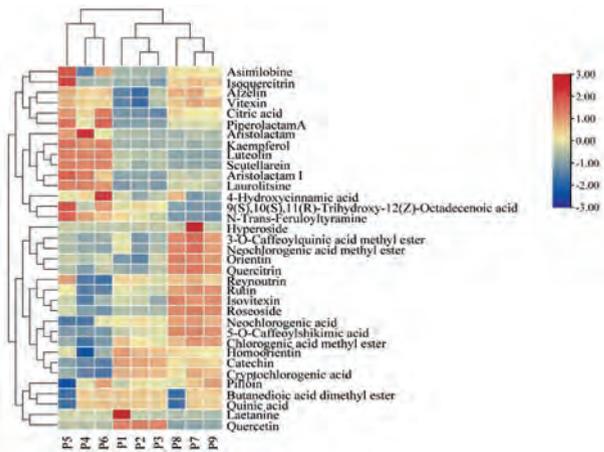


图3 鱼腥草破壁饮片中35种共有成分热图

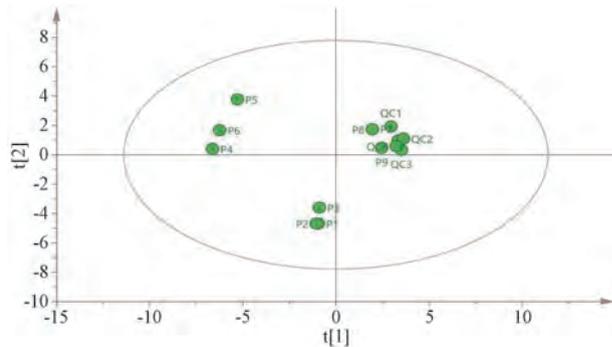


图4 鱼腥草破壁饮片PCA得分图

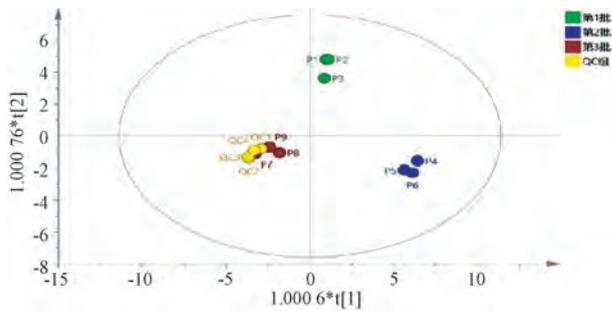


图5 鱼腥草破壁饮片OPLS-DA得分图

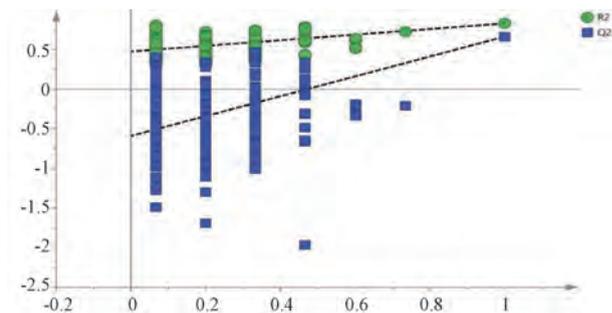


图6 OPLS-DA模型200次置换检验

个有机酸、2个生物碱、2个酯、1个醇及1个苷，结合热图发现关键代谢物种类没有发生变化，而是发生了含量转移。

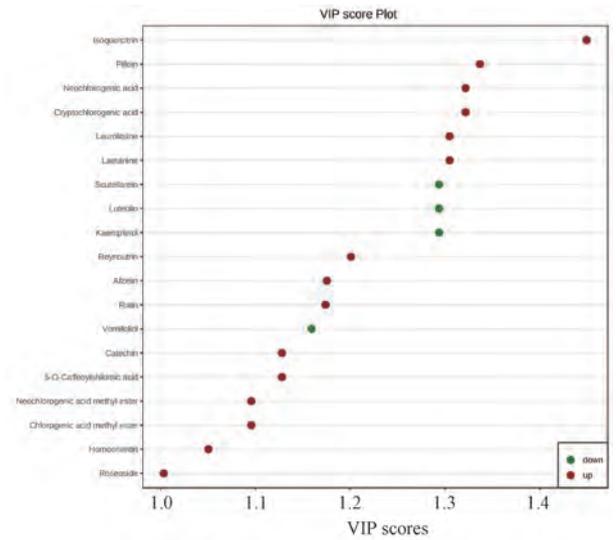


图7 VIP值差异倍数条形图

2.5 网络药理学研究

2.5.1 潜在活性成分筛选及靶点预测 利用 PubChem、Swiss ADME、Swiss Target Prediction 数据库对上述鱼腥草 19 个关键代谢物候选成分进行 SMILES 号信息、靶点查询。其中，Swiss ADME 数据库中以胃肠道吸收显示为“High”，同时根据药物设计的类药五原则（Lipinski 规则），选取 Druglikeness 项下的 5 个参数至少满足 2 个“Yes”作为筛选条件，共选取了 10 个潜在活性成分，见表 3；其次，Swiss Target Prediction 数据库中设置物种为“Homo sapiens”，选择 Probability>0 的靶点。除吐叶醇和儿茶素无靶点外，其余 8 种活性成分均有靶点，去除重复靶点，得到 214 个潜在作用靶点。

表3 鱼腥草破壁饮片抗辐射的潜在活性成分

序号	成分	CAS 号	类型	Pubchem CID
1	5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	32174-62-2	黄酮	5320496
2	laetanine	72361-67-2	生物碱	129371873
3	去甲异波尔多定	5890-18-6	生物碱	22179
4	山奈酚	520-18-3	黄酮	5280863
5	木犀草素	491-70-3	黄酮	5280445
6	野黄芩素	529-53-3	黄酮	5281697
7	阿福豆苷	482-39-3	黄酮	5316673
8	芦丁	153-18-4	黄酮	5280805
9	吐叶醇	23526-45-6	醇	5280462
10	儿茶素	7295-85-4	黄酮	9064

2.5.2 抗辐射靶点收集 在 GeneCards、TCMSP 2.3 疾病数据库中以关键词“resistance radiation”“radio-resistance”“anti-radiation”进行靶点搜索，共搜集到 9 557 个抗辐射相关靶点信息，靶点合并去重，并以 Relerance score 大于等于所有靶点的平均值（3.255 2）为阈值，最终筛选出 3 111 个潜在疾病靶点。

2.5.3 蛋白相互作用网络构建 “成分-疾病”交集靶点可视化，将潜在活性成分靶点（214 个）与抗辐射靶点（3 111 个）取交集，绘制韦恩图，见图 8。由此可知，两者交集靶点有 116 个，将交集靶点导入 STRING 数据库，物种设

置为“*Homo sapiens*”，其他参数不变，去除单一节点，获得蛋白相互作用网络图，下载 tsv. 格式文件，导入 Cytoscape 3. 8. 2 软件进行可视化及拓扑属性分析，介数中心性值越大，节点越大，颜色越深，见图9。

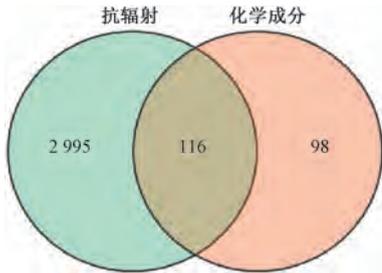


图8 潜在活性成分与抗辐射共有靶点韦恩图



图9 蛋白相互作用网络图

选取同时 ≥ 2 倍数度值 (DC) 阈值、2 倍介数中心性值 (BC) 阈值的靶点作为候选活性靶点。因为选取同时 ≥ 1 倍 DC 阈值、1 倍 BC 阈值的靶点数目 (41 个，多靶点药物) 是选取同时 ≥ 2 倍 DC 阈值、2 倍 BC 阈值靶点数目的 2 倍 (少/单靶点药物)，基于“少/单靶点药物”比“多靶点药物”的作用针对性更强，治疗抗辐射损伤的效果更佳，故将此作为筛选鱼腥草抗辐射候选活性靶点的依据。

如图9所示，网络图包含 114 个节点和 2 482 条相互作用连线，为进一步筛选候选活性靶点，下载拓扑参数信息表使用 Excel 计算靶点信息的 DC 值和 BC 值，按照候选活性靶点筛选依据选取同时 ≥ 2 倍 DC 阈值 (68)、2 倍 BC 阈值 (58.82) 的靶点作为候选活性靶点，获得 20 个候选靶点，靶点信息详见表 4。

2.5.4 KEGG 信号通路、GO 功能富集分析 通过 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 对候选活性靶点进行 KEGG 信号通路富集分析和 GO 功能富集分析。上传 20 个候选活性靶点基因名，物种设置为“*Homo sapiens*”，依次点击个性化分析“custom analysis”及富集分析“enrichment analysis”，根据注释结果借助微生信

表4 蛋白相互作用候选活性靶点基因

编号	靶点名称	靶点全称	度值	介数中心性值
1	Akt1	Akt 丝氨酸/苏氨酸激酶 1	152	1 208
2	TNF	肿瘤坏死因子	144	817
3	BCL2	BCL2 细胞凋亡调节因子	142	756
4	EGFR	表皮生长因子受体	144	1 135
5	ESR1	雌激素受体 1	132	1 151
6	SRC	SRC 原癌基因,非受体酪氨酸激酶	130	874
7	PTGS2	前列腺素内过氧化物合成酶 2	104	401
8	MMP9	基质金属肽酶 9	106	212
9	SIRT1	Sirtuin 蛋白 1	92	219
10	GSK3B	糖原合酶激酶 3 β	90	225
11	PARP1	聚(ADP 核糖)聚合酶 1	84	199
12	BCL2L1	BCL2L1 编码蛋白	84	118
13	KDR	插入域受体激酶	82	146
14	MCL1	MCL1 凋亡调节因子,BCL2 家族	78	126
15	JAK2	Janus 激酶 2	80	82
16	CDK2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2	74	232
17	CCL2	C-C 基序趋化因子配体 2	78	132
18	KIT	KIT 原癌基因,受体酪氨酸激酶	72	62
19	IL2	白细胞介素 2	72	83
20	MMP2	基质金属肽酶 2	70	60

平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制 KEGG 气泡图及 GO 富集条形图。

KEGG 富集结果显示，候选靶点基因富集了 88 条相关通路，主要涉及白介素-4 和白介素-13 信号传导、急性病毒性心肌炎、胸膜间皮瘤、CKAP4 信号通路、前列腺癌等通路，对其 *P* 值从小到大排序，选取前 20 条通路进行 KEGG 富集通路气泡图绘制，见图 10。

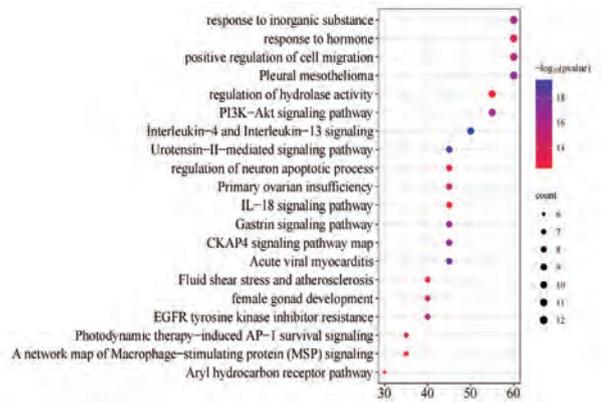


图10 KEGG 通路富集分析气泡图

GO 功能富集分析包括细胞组成、生物过程及分子功能。根据 $P < 0.05$ 对富集结果进行筛选，共获 675 个 GO 条目，其中细胞组成 25 个、生物过程 608 个、分子功能 42 个，将各自的前 10 个条目进行 GO 富集条形图绘制，见图 11。从图中富集基因 Count 数得出，细胞组成主要涉及核被膜、膜筏、常染色质、质膜外侧、中心体、膜微区等区域；生物过程主要涉及尿紧张素 II 介导的信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、胃泌素信号通路、PI3K/Akt 信号通路、白介素-4 和白介素-13 信号传导等通路；分子功能主

要涉及蛋白激酶活性、激酶结合、蛋白质结构域特异性结合、BH3 结构域结合、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酶结合，表明鱼腥草破壁饮片中的活性成分是通过多靶点多蛋白调控多条通路，协同发挥抗辐射的作用。

木犀草素、山柰酚等活性成分通过激活上述 20 个候选活性靶点作用于癌症、信号调节等通路，协同发挥抗辐射关键作用。

鱼腥草具有清热解毒的功效，常用于治疗实热、热毒、湿邪等病症，为治疗肺病之要药。刘霞龄等^[28-29]验证了鱼腥草具有防治放射性损伤和抗肿瘤作用，但机理尚不清楚。放射性损伤多为射线辐射损伤，射线直接作用于骨髓造血干细胞，倘若该系统受损，轻者导致机体产生内源性自由基，造成脂质过氧化损伤或细胞凋亡，重者致使骨髓造血干细胞的增殖分化功能受阻，自我更新能力丧失，引发一系列病变、癌变及并发症^[30]。正如该网络节点所示，5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚通过作用 PARP1、EGFR、PTGS2、Akt1、SIRT1、MCL1、BCL2、BCL2L1、SRC、KDR 等多个靶点对皮肤病、前列腺癌、病毒感染、肺癌、乙型肝炎等恶性疾病产生抑制作用，从而发挥鱼腥草清热解毒、抗辐射的作用。

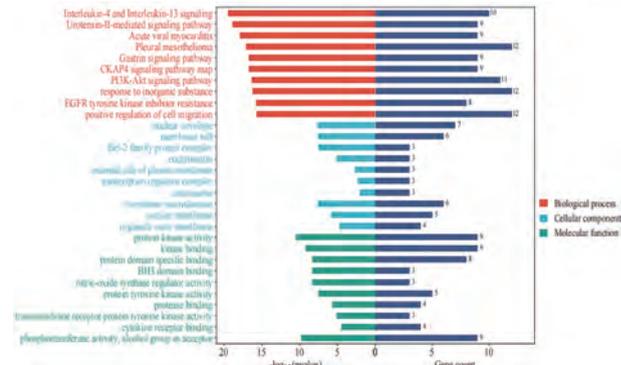


图 11 GO 功能富集分析

2.5.5 “活性成分-潜在靶点-通路”网络构建 将富集潜在靶点蛋白较多的前 20 条 KEGG 信号通路及活性成分导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制鱼腥草破壁饮片活性成分-潜在靶点-通路网络图，见图 12。其中橙色 V 形代表活性成分（8 种）、紫色方块代表候选活性靶点（20 个）、蓝色菱形代表信号通路（20 条）；使用拓扑属性分析插件进行拓扑参数计算，产生 48 个节点、209 条边，可见鱼腥草破壁饮片抗辐射作用具有多成分、多靶点、多通路的特点。

2.6 分子对接验证

2.6.1 配体与受体结构获取 将 5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚 3 个 Q-Marker 作为配体，从 PubChem 数据库下载其 3D 结构的 sdf 格式文件，在 Openbabel 3.1.1 软件中转换为 pdb 格式；将 Degree 值排名前 3 的核心靶点 Akt1、BCL2、EGFR 作为受体导入 RCSB PDB 数据库，物种选择“Homo sapiens”进行搜索，下载分辨率（resolution）≤3 的晶体结构 pdb 格式文件。

2.6.2 分子对接与可视化 采用 AutoDock 4.2.6 软件对受体进行去水、加全氢处理；对配体进行加全氢、电荷分布设置、检测扭转键、选择扭转键等处理，各自导出 PDBQT 格式文件。将受体、配体进行 BOX 对接，设置对接参数和运算方法，进行分子对接获得最佳活性位点，将结果导出为 Result PDBQT 格式文件，对比配体和受体的结合能，见表 5。结合能越小，对接效果越好，即配体越容易和受体结合。将 Result PDBQT 文件格式转换为 Result pdb 格式，导入 PyMol 2.4.0 软件进行分子对接结果可视化展示，见图 13。由此可知，3 个 Q-Marker 与各个靶蛋白均有较好的结合，其中与 BCL2 的结合能最小，即结合能力比 Akt1 和 EGFR 强。结合能小于 -4.0 kcal/mol 时，配体有较强的生物活性^[31]，结果表明筛选出的鱼腥草 Q-Marker 均有较好的生物活性；其次，只比较 3 个 Q-Marker 与单个受体 BCL2 的结合能力时，发现 5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮的生物活性最强。

2.6.3 分子对接结果有效性佐证 通过分子对接技术和文献验证 Q-Marker 的生物活性，同时从文献中归纳鱼腥草破壁饮片 Q-Marker 的药效组织、部位、作用及应用，见表 6。由此可知，5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚在卵巢、前列腺、免疫细胞、平滑肌和动脉内膜、线粒体、皮肤表面发挥抗肿瘤等作用，与预测的组织分布（膜筏、细胞器内膜、线粒体膜、肺部、前列腺、卵巢）基本一致，从心脑血管、呼吸、生殖、造血系统发挥药效。

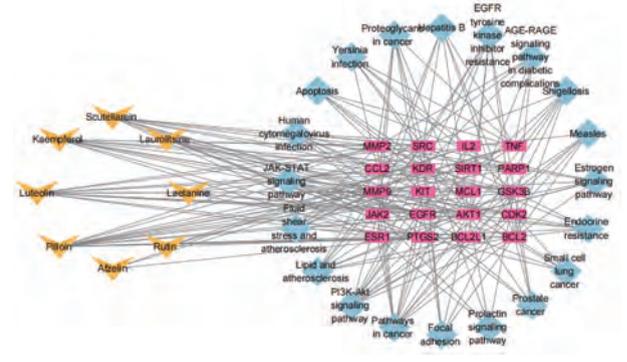


图 12 鱼腥草破壁饮片“活性成分-潜在靶点-通路”网络图

以成分、靶点、通路三者之间的连接度度值为参考值，得出有较高连接度的是 5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮（度值 15）、木犀草素（度值 11）、山柰酚（度值 11）。5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮具有抗炎^[22]、抗病毒作用；木犀草素具有抗肿瘤、保护肝损伤、抗糖尿病等作用^[23-26]；山柰酚具有抗病毒、抗肿瘤作用^[27]，与本实验富集的通路有较高的相关性，因此，将上述 3 个成分作为鱼腥草破壁饮片抗辐射的 Q-Marker；20 个候选活性靶点中 Akt1（度值 26）、EGFR（度值 17）、BCL2（度值 17）的度值均大于 16，可将其指定为核心靶点；20 条 KEGG 富集通路中连接度较高的有癌症通路（度值 13）、PI3K/Akt 信号通路（度值 11）、脂质与动脉粥样硬化（度值 9）等通路，进一步表明鱼腥草破壁饮片中 5, 3'-二羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、

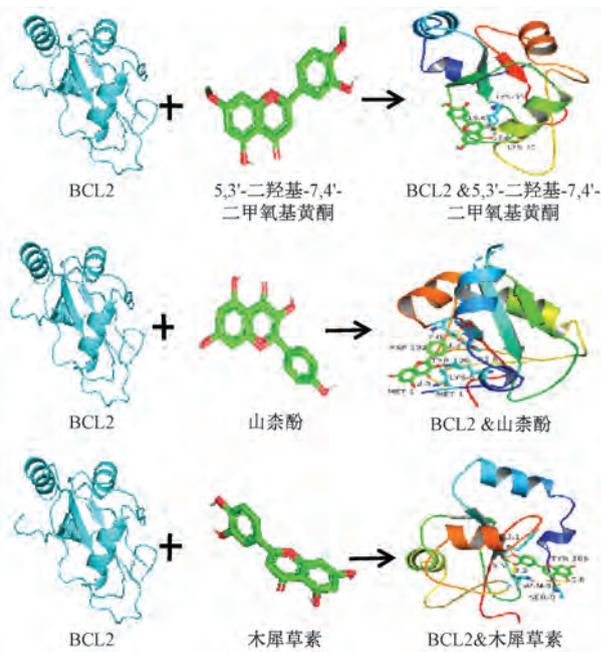


图 13 Q-Marker 与核心靶点 (BCL2) 分子对接图

表 5 Q-Marker 与核心靶点对接结果

化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)		
	Akt1	BCL2	EGFR
5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	-5.31	-6.14	-4.99
山柰酚	-3.88	-5.76	-5.05
木犀草素	-4.15	-5.33	-3.66

核心靶点 Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,同时也是细胞存活途径的中枢转导子,调节细胞过程中的关键信号通路,包括增殖、分化、转录、凋亡^[32-34]; BCL2 调控途径的破坏会造成脑缺血损伤^[35]、缺血性中风^[36]等疾病,对机体伤害性极强,因此保障 BCL2 在细胞凋亡过程中发挥正向调节作用,有利于改善缺血、供血不足、供血障碍等特殊症状,此症状与辐射损伤的病理特征一致;此外,EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一,广泛分布于哺乳动物细胞表面,在细胞生长发育、增殖分化、突变等生物学过程紧密相关^[37]。

鱼腥草破壁饮片抗辐射作用中发挥至关重要的前 3 条靶向通路依次是癌症通路、PI3K/Akt 信号通路与脂质动脉

表 6 Q-Marker 文献佐证信息

Q-Marker	组织/部位	作用	适应症	文献
5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	巨噬细胞	诱导抗炎活性,抑制 NF-κB 活性	脓毒症	[22]
	卵巢、肾脏	抗病毒、抗菌、抗肿瘤增殖	卵巢肿瘤	[40]
	细胞膜	清除 DPPH ⁻ 、ABTS ⁺ 自由基,抑制细胞毒性	U87-MG 癌症细胞	[41]
木犀草素	前列腺	抑制肿瘤细胞增殖	前列腺癌	[42]
	表皮、免疫细胞	抵御紫外线辐射;抑制 IL-1β 活性	皮炎、皮肤癌	[43]
山柰酚	脑神经	神经保护作用	缺血性中风	[44]
	脑神经	抗肿瘤作用、心脏保护及神经保护	放疗	[45]
	平滑肌细胞、动脉内膜	抑制促炎细胞因子,改善慢性炎症	动脉粥样硬化	[46]
	线粒体	减少活性氧 ROS 产生,刺激细胞凋亡发挥抗肿瘤作用	化疗	[47]

粥样硬化通路。癌症的发生主要是由原癌基因被激活,抑癌基因失活两大因素所致,长期演变为染色体变异、分子突变和免疫缺陷,外界环境和基因本体致癌过程都需要细胞表面受体或胞内受体参与,通过激活 PI3K/Akt 信号通路及其他信号转导途径,导致包括基因在内的生化反应^[38]。脂质动脉粥样硬化通路的改变影响着多数心血管疾病及并发症的发生,如脑梗死、中风、神经元退行性疾病,此外,脂质是细胞膜的基本结构成分以及免疫应答的关键,在体内多种信号转导和代谢途径中起着不可替代的作用,辐射损伤可能是最初通过改变生物膜脂质水平,影响细胞增殖分化,造成机体脂质代谢稳态受损^[39]进而产生一系列疾病反应。上述研究结果与文献报道相符,证明了本实验数据及分析的可靠性。

2.7 基于抗辐射 Q-Marker 的鱼腥草破壁饮片与传统饮片的质量评价 选取鱼腥草样品中 3 个抗辐射 Q-Marker 质谱响应值进行比较,见表 7。鱼腥草破壁饮片中 5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚响应值均高于鱼腥草传统饮片,加上前者全成分服用的优点,意味着鱼腥草破壁饮片在抗辐射方面具有更丰富的物质基础及其更强的

生物活性,这与方碧烟等^[48]的研究结果相吻合。此外,本实验体现了破壁饮片在促进有效成分更好释放和溶出方面的优势。

3 讨论

质谱技术与植物代谢组学方法可以高效准确地实现中药复杂体系成分分析,为多组物质鉴定研究提供更先进、更可靠的技术支撑。本实验通过 UPLC-Q-TOF-MS 方法全面解析鱼腥草破壁饮片物质基础,结合多元统计分析得出其代谢成分主要以黄酮类为主,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗辐射等作用。

近年来, Q-Marker 的提出为中药质量标准和质量控制提供了新的科研思路。通过网络药理学构建活性成分-核心靶点-通路网络图,确定了鱼腥草破壁饮片抗辐射质量标志物 5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、木犀草素、山柰酚,其在免疫系统、生殖系统、细胞器内外膜、造血系统等部位发挥抗肿瘤、抗炎、抗肿瘤、调节细胞凋亡、增强免疫等作用;核心靶点 Akt1、BCL2、EGFR 主要作用于癌症通路、PI3K/Akt 信号通路、脂质与动脉粥样硬化通路发挥抗肿瘤、造血、供血等功能,靶向作用于辐射损伤,发挥抗辐射作用。本实验思路与大部分中药网络药理学不同,首

表7 鱼腥草破壁饮片与传统饮片 Q-Marker 响应值比较

编号	5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮		山柰酚		木犀草素	
	破壁饮片	传统饮片	破壁饮片	传统饮片	破壁饮片	传统饮片
P1,C1	301 738	127 429	366 785	250 766	135 097	78 695
P2,C2	370 329	127 171	363 751	250 034	135 193	76 854
P3,C3	357 684	129 225	358 888	249 338	129 959	77 695
P4,C4	225 539	125 786	304 544	251 406	115 540	75 696
P5,C5	221 390	125 340	408 183	251 467	121 191	76 982
P6,C6	242 127	127 635	387 955	254 642	114 387	74 526
P7,C7	298 185	129 658	492 611	350 379	139 291	74 365
P8,C8	251 074	128 564	473 771	352 991	137 033	74 259
P9,C9	292 439	125 355	473 662	351 029	135 388	73 698
平均值	284 501	127 351	403 350	284 672	130 236	75 863

先,本实验是基于液质仪实际检出的化学成分寻找靶点,而非只依赖中药成分数据库官网;其次,运用植物代谢组学综合全面分析具有海量数据的鱼腥草破壁饮片成分,整体反映中药体内所有代谢物信息并准确筛选关键代谢物;另外,常规网络药理学仅以度值确定 Q-Marker,本实验在此基础上添加介数中心性值,同时满足 2 个指标阈值筛选抗辐射 Q-Marker,使成分与疾病具有更高的准确性和相关性,并耦合分子对接及文献检索检验上述 Q-Marker 的生物效应,后期可在此基础上开展动物实验,通过建模从细胞生物学水平加以验证 Q-Marker、核心靶点、通路三者之间的关联性。

本实验首次结合网络药理学、植物代谢组学及分子对接技术预测鱼腥草破壁饮片抗辐射 Q-Marker,对辐射损伤的作用靶点和作用机制进行了深入研究,为后期开发利用安全、稳定、有效的鱼腥草抗辐射药物、食品、保健品提供理论依据,同时也为其他天然抗辐射药物的发现拓展新的思路和研究方向。

参考文献:

[1] 蒲晓璐,陈厚荣.具有抗辐射作用的食物及其研究现状[J].农产品加工(创新版),2011(6):60-65.

[2] 殷雪.PARP-1抑制剂联合电离辐射对BRCA基因突变乳腺癌细胞DNA损伤及凋亡的影响[D].南宁:广西医科大学,2015.

[3] Karbownik M, Reiter R J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 225(1): 9-22.

[4] 孙桂玲,江悦华,赖声礼,等.毫米波辐射联合阿霉素对K562细胞株氧化自由基及抗氧化酶系的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(12):1358-1363.

[5] 李宗生,王洪生,洪佳璇,等.鱼腥草总黄酮与利血生抗辐射功效的对比研究[J].航空航天医学杂志,2016,27(6):669-673.

[6] 王庆宾,韩婷,孙连娜,等.抗辐射的天然药物研究进展[J].药学实践杂志,2012,30(3):171-174;177.

[7] 赵强,杨洁,赵三虎,等.鱼腥草总黄酮提取及其药理作用研究进展[J].分子植物育种,2019,17(23):7918-7923.

[8] 石跃桂.鱼腥草研究文献综述[J].北京农业,2011(9):121-122.

[9] 张家乐,靳贵英,梁媛,等.鱼腥草破壁饮片冲泡前后重金属含量测定[J].广东化工,2023,50(3):196-198.

[10] 代耀兰,李韶青,杨若聪,等.鱼腥草破壁饮片抗细菌内毒素作用研究[J].中草药,2019,50(17):4225-4231.

[11] 宋叶.沉香破壁饮片与传统饮片含量及药效学对比研究[D].广州:广州中医药大学,2020.

[12] 王洋洋.铁皮石斛破壁饮片制备工艺及质量标准研究[D].杭州:浙江大学,2019.

[13] 王洪生,洪佳璇,冯丙江,等.鲜鱼腥草多糖与总黄酮抗辐射作用机制的对比[J].绍兴文理学院学报(自然科学),2015,35(10):29-32.

[14] 包俊,龙正海.鱼腥草总黄酮的抗辐射效应研究[J].中华中医药学刊,2010,28(8):1747-1748.

[15] 袁雪芬,王晓丹,杨鸿武,等.复方鱼腥草制剂对小鼠辐射损伤保护作用的实验研究[J].中国比较医学杂志,2007,17(8):555.

[16] 田淑云,廖朝华,周紫薇,等.植物代谢组学在药材质量评价中的研究进展与展望[J].药学报,2022,57(6):1734-1749.

[17] 余石群.基于网络药理学和代谢组学探讨大豆苷元抑制非小细胞肺癌的分子机制[D].南昌:南昌大学,2023.

[18] 郭伟强,吴天惠,陈子明,等.甘草酸抑制肿瘤的网络药理和分子对接分析[J].苏州科技大学学报(自然科学版),2023,40(3):46-53.

[19] 付佳琪.基于代谢组学的人参三醇组皂苷对电离辐射损伤的防护作用及机制研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2021.

[20] 巴小翠,孙俊英,陈玉洁,等.基于HPLC多指标成分定量联合OPLS-DA、EW-TOPSIS法的天丹通络胶囊质量评价研究[J].现代药物与临床,2023,38(5):1094-1101.

[21] 张雨馨,陈碧莹,王丽明,等.代谢组学在中药作用机制研究中的应用[J].中草药,2023,21(7):1712-1719.

[22] Tsai Y C, Wang S L, Wu M Y, et al. Pilloin, a flavonoid isolated from *Aquilaria sinensis*, exhibits anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Molecules*, 2018, 23(12):3177.

[23] 解举民,段卓,刘欣.木犀草素抗肿瘤作用的研究进

- 展[J]. 肿瘤药学, 2024, 14(2): 173-178.
- [24] 符方芳, 姜靖雯, 陈霁莹, 等. 木犀草素通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路抑制结肠癌细胞生长[J]. 医学研究杂志, 2023, 52(6): 100-107.
- [25] 张治杰, 潘阳阳, 姚亚乐, 等. 木犀草素对乙酰氨基酚诱导肝损伤的保护作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2024, 52(2): 12-21; 31.
- [26] 林 焯, 柳 丽, 孙 静, 等. 木犀草素防治糖尿病的作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(7): 112-118.
- [27] 陆主航, 刘祖浩, 王雪莲, 等. 载山柰酚长循环靶向脂质体的处方筛选及抗卵巢癌疗效评估[J]. 中国医院药学杂志: 2023, 43(21): 2411-2418.
- [28] 刘霞龄, 蔡长青, 吴丹进, 等. 三黄复方煎在食管癌放疗中增敏作用的临床研究[J]. 新中医, 1997, 37(9): 36-37.
- [29] 石小枫. 常用清热解毒类抗癌中草药抗肿瘤作用概况[J]. 四川生理科学杂志, 1991, 13(Z1): 71.
- [30] 胡梦佳. SRC-3 在造血干细胞稳态调控与骨髓放射损伤中的作用与机制研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2021.
- [31] 柳小莉, 黄小英, 张小飞, 等. 基于 GC-MS 成分分析结合网络药理学预测当归挥发油质量标志物(Q-Marker)[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2696-2706.
- [32] Tian X L, Wang R, Gu T X, et al. Costunolide is a dual inhibitor of MEK1 and Akt1/2 that overcomes osimertinib resistance in lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 193.
- [33] Ha J M, Jin S Y, Lee H S, et al. Akt1-dependent expression of angiopoietin 1 and 2 in vascular smooth muscle cells leads to vascular stabilization[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(8): 1133-1145.
- [34] Qian Z Y, Ye J W, Li J T, et al. Decrotonylation of Akt1 promotes Akt1 phosphorylation and activation during myogenic differentiation[J]. *J Adv Res*, 2022, 50: 117-133.
- [35] 钟 森, 陈文超, 徐永强, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞相关调节因子及脑细胞凋亡的影响[J]. 中国中医急症, 2010, 19(2): 279-282.
- [36] 滕 尧. 基于细胞凋亡调节因子 Bax、Bcl-2 芪蛭胶囊防治缺血性中风的机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [37] 高春峰. 非吸烟女性非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体突变状态及其短期预后因素分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2022.
- [38] 陈 超, 缪艳燕, 李慧君, 等. 基于 UPLC-MS/MS 成分分析结合网络药理学预测新会陈皮黄酮类成分质量标志物[J]. 环球中医药, 2022, 15(3): 417-426.
- [39] 戴迎初, 裴海龙, 周光明. 辐射诱导表达的短肽 ATMLP 通过调控脂质代谢调节肺癌辐射敏感性的机制研究[C]//中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集. 珠海: 中国毒理学会, 2023: 1.
- [40] Oliveira J A, Bernardi D I, Balbinot R B, et al. New cadinenes-sesquiterpene from *Chromolaena laevigata* (lam.) R. M. King & H. Rob (Asteraceae) aerial parts and biological activities[J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(21): 3880-3887.
- [41] Frezza C, Venditti A, de Vita D, et al. Phytochemical analysis and biological activities of the ethanolic extract of *Daphne sericea* Vahl flowering aerial parts collected in central Italy[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 379.
- [42] Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108612.
- [43] Gendrisch F, Esser P R, Schempp C M, et al. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation[J]. *Biofactors*, 2020, 47(2): 170-180.
- [44] Dong R, Huang R X, Shi X H, et al. Exploration of the mechanism of luteolin against ischemic stroke based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12274-12293.
- [45] Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2277.
- [46] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, et al. Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 1-10.
- [47] Nejabati H R, Roshangar L. Kaempferol: a potential agent in the prevention of colorectal cancer[J]. *Physiol Rep*, 2022, 10(20): 15488.
- [48] 方碧烟. 当归补血汤传统饮片与破壁饮片不同应用方式的物质基础比较研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.