

· 论著 ·

基于网络药理学的青蒿治疗肾阴虚型糖皮质激素性骨质疏松机制研究

赖立勇^{1a,1b}, 夏天爽^{1a}, 岳小强², 辛海量^{1a} (1. 海军军医大学: a. 药学院生药学教研室; b. 中医系, 上海 200433; 2. 海军军医大学第二附属医院中医科, 上海 200003)

[摘要] **目的** 通过网络药理学和体外实验, 对青蒿治疗肾阴虚型糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)的潜在作用靶点及相关信号通路进行预测和初步验证。**方法** 通过 TCMSp 数据库和 Uniprot 数据库获取青蒿药物靶点并确定目标靶点基因名; 通过 GeneCards 数据库、OMIM 数据库和 Drugbank 数据库获取肾阴虚型 GIOP 的靶点基因, 与药物靶点基因交叉分析获得共同作用靶点基因; 利用 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 并利用 Cytoscape 软件进行可视化分析和核心靶点筛选; 通过 Metascape 数据库对所有共同靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 最后通过体外实验对预测结果进行验证。**结果** 筛选出 98 个青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 的作用靶点, 其中核心基因 17 个。GO 和 KEGG 功能富集分析结果表明, 青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 与激素应答、细胞死亡的正向调节和细胞外刺激应答等生物过程, 以及 PI3K/AKT、AGE/RAGE、MAPK 和 IL-17 等信号通路有关, 其中 PI3K/AKT 信号通路上富集的基因数最多。体外实验结果显示, 青蒿可以促进地塞米松(DEX)损伤的成骨细胞的增殖, 提高碱性磷酸酶(ALP)活性, 激活 PI3K/AKT 通路, 促进 AKT 的磷酸化。**结论** 青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 具有多靶点 - 多通路的特点, 可以通过多条途径促进成骨细胞的增殖、分化, 其中 PI3K/AKT 信号通路是一条重要的通路, 青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 可能与其能够促进 PI3K/AKT 信号通路, 促进 AKT 的磷酸化有关。

[关键词] 青蒿; 肾阴虚; 糖皮质激素性骨质疏松; 地塞米松; 成骨细胞

[文章编号] 2097-2024(2023)11-0672-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202204115

Mechanism of *Artemisia annua* L. in GIOP with kidney-yin deficiency based on network pharmacology

LAI Liyong^{1a,1b}, XIA Tianshuang^{1a}, YUE Xiaoqiang², XIN Hailiang^{1a} (1a. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy; 1b. School of Traditional Chinese Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To predict and preliminarily verify the potential targets and related signaling pathways of *Artemisia annua* L. in treating glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) with kidney-yin deficiency by network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** The pharmacological targets of *Artemisia annua* L. were obtained from TCMSp database and were converted to gene names through Uniprot database. The target genes of GIOP with kidney-yin deficiency were obtained from GeneCards database, OMIM database and Drugbank database, and the common target genes were obtained by cross analysis with drug target gene. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by String database, and visualization analysis and core targets screening were performed by Cytoscape 3.9.0. All common targets were analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional enrichment analysis through Metascape database. Finally, the prediction results were verified by *in vitro* experiments. **Results** Ninety-eight targets of *Artemisia annua* L. to GIOP with kidney-yin deficiency were screened, including 17 core genes. The results of GO and KEGG functional enrichment analysis indicated that *Artemisia annua* L. treating GIOP with kidney-yin deficiency was related to biological processes such as hormonal response, positive regulation of cell death and extracellular stimulation response, *et al*, as well as signaling pathways such as PI3K/AKT, AGE/RAGE, MAPK and IL-17 *et al*. The number of genes enriched in PI3K/AKT signaling pathway was the largest. *In vitro* experiment results showed that *Artemisia annua* L. promoted the proliferation of osteoblasts damaged by dexamethasone (DEX), increased alkaline phosphatase activity, activated PI3K/AKT pathway, and promoted the phosphorylation of AKT. **Conclusion** *Artemisia annua* L. treating GIOP with kidney-yin deficiency has the characteristics of multi-targets and multi-pathway, which could promote

[作者简介] 赖立勇, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合基础与临床, Tel: 17301785074, Email: 17301785074@163.com

[通信作者] 岳小强, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医临床医疗、科研, Tel: (021)35360178, Email: yuexiaoqiang@163.com; 辛海量, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药资源、品质评价、药理学研究, Tel: (021)81871309, Email: hailiangxin@163.com

the proliferation and differentiation of osteoblasts through multiple pathways. The PI3K/AKT signaling pathway is an important pathway. *Artemisia annua* L. treating GIOP with kidney-yin deficiency might be related to its ability to promote the PI3K/AKT signaling pathway and promote the phosphorylation of AKT.

[Key words] *Artemisia annua* L.; kidney-yin deficiency; glucocorticoid-induced osteoporosis; dexamethasone; osteoblast

作者通过网络药理学和体外实验,对青蒿治疗肾阴虚型糖皮质激素性骨质疏松(GIOP)的潜在作用靶点及相关信号通路进行预测和初步验证。研究表明,青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 具有多靶点-多通路的特点,可以通过多条途径促进成骨细胞的增殖、分化,其中 PI3K/AKT 信号通路是一条重要的通路,青蒿治疗肾阴虚型骨质疏松可能与其能够促进 PI3K/AKT 信号通路,促进 AKT 的磷酸化有关。

前言

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨密度(bone mineral density, BMD)降低、骨量丢失、骨微结构破坏为主要特点的全身代谢性骨病,以脆性增加、易发生骨折为主要特征^[1]。随着老龄化的加剧,OP 的发生率越来越高,在我国 50 岁以上的人群中,OP 的发生率为 19.2%,其中女性为 32.1%,男性为 6.0%^[2]。OP 可分为原发性 OP 和继发性 OP,在继发性 OP 中,糖皮质激素性 OP(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP)的发生率排在第一位^[3],目前骨质疏松症(OP)是一种以骨密度(BMD)降低、骨量丢失、骨微结构破坏为主要特点的全身代谢性骨病,以脆性增加、易发生骨折为主要特征^[1]。随着老龄化的加剧,OP 的发生率越来越高,在我国 50 岁以上的人群中,OP 的发生率为 19.2%,其中女性为 32.1%,男性为 6.0%^[2]。OP 可分为原发性 OP 和继发性 OP,在继发性 OP 中,GIOP 的发生率排在第一位^[3],GIOP 治疗上西医使用的药物有钙制剂、活性维生素 D、双磷酸盐类以及雌激素等,这些药物不仅忽略了糖皮质激素这个罪魁祸首,还有可能产生一系列的副作用^[4],寻找安全有效且有针对性的药物显得尤为重要。

中医认为糖皮质激素是“纯阳”之品^[5],使用过量易伤阴津;肾主骨,肾虚是导致骨质疏松的关键病机,因此,肾阴虚证是 GIOP 的一个主要证型,临床研究也证明,肾阴虚证是 GIOP 患者的一个易患证型^[6]。青蒿为菊科蒿属植物黄花蒿植物 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分,分布遍及全国,味苦、辛,性寒,归肝、胆经,具有清虚热、除骨蒸的作用^[7],对于过量使用糖皮质激素造成的阴虚火旺、烦躁不

安,有一定的疗效,临床上也常用青蒿加减处方治疗糖皮质激素使用过度,造成阴虚火旺、虚火上炎的病症^[8-9],同时,体内实验发现,青蒿在多种骨丢失模型动物上,可以促进骨组织的再生,提高骨密度^[10],青蒿在治疗骨质疏松方面具有广阔的应用前景。然而,目前关于青蒿治疗 OP,特别是在 GIOP 方面的研究尚有限,为此,本研究应用网络药理学和体外实验,结合中医基础理论知识,研究青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 的关键靶点和信号通路,以期明确中药青蒿抗肾阴虚型 GIOP 的作用及机制,为骨质疏松的临床治疗提供新思路和方法。

1 材料与方法

1.1 GIOP 相关靶点筛选

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库(<https://omim.org>)和 DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com>)中,以“glucocorticoid induced osteoporosis”作为关键词进行检索,获得 GIOP 的靶点基因,去除两个数据库的重复结果,获得 GIOP 疾病靶点基因。

1.2 肾阴虚相关靶点筛选

根据全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会^[11]1986 年对虚证辨证标准的修订,阴虚证诊断标准:主证:①五心烦热(palms and soles);②咽燥口干(dry throat and thirst);③舌红或少苔、无苔(red tongue or less fur or without fur);④脉细数(thin and rapid pulse)。次证:①午后升火(tidal fever);②便结而尿短赤(constipation and scanty dark urine);③盗汗(night sweating)。诊断条件:具备主证 3 项,次证 1 项。在 GeneCards 数据库中,对各症状关键词进行检索,筛选出 4 个主证检索结果中至少出现 3 次的靶点,与次证检索结果交叉分析后得到阴虚靶点。肾虚证诊断标准为:①腰脊酸痛(soreness and weakness of waist);②胫酸膝软或足跟痛(soreness and weakness of knees or heel pain);③耳鸣或耳聋(tinnitus or deaf);④发脱或齿摇(alopecia or toothmobility);⑤尿后有余沥或失禁(urinary incontinence or poor urination);⑥性功能减退、不育、不孕(sexual dysfunction and infertility or sterility)。诊断条件:具备 3 项。在 GeneCards 数据库中,对各症状关键词进行检索,筛选出至少出

现 3 次的靶点为肾虚靶点。将肾虚靶点与肾虚靶点交叉分析后获得肾阴虚靶点。将 GIOP 疾病靶点与肾阴虚靶点交叉分析后获得肾阴虚型 GIOP 靶点。

1.3 青蒿化学成分筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP: <http://tcmsp.com/tcmssp.php>) 上, 以 Herb: 青蒿、OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 为条件进行检索, 确定青蒿的活性成分。

1.4 预测靶点并添加基因名

利用 TCMSP 的靶点预测模型, 进一步预测青蒿活性成分的相关靶点, 通过 UniProt 数据库 (<http://www.Uniprot.org/>) 对预测靶点添加基因名。最后利用微生信在线软件 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将肾阴虚型 GIOP 靶点基因与青蒿靶点基因进行交集分析, 并绘制出韦恩图。

1.5 构建基因蛋白互作 (PPI) 网络及拓扑分析

将“青蒿-肾阴虚型 GIOP”共同靶点基因数据导入 String 在线软件 (<https://string-db.org/>), 选择种属为“Homo sapiens”, 设置最小互作得分为 0.4, 构建出 PPI 网络, 将数据导入 Cytoscape 软件中进行可视化分析, 并利用 CytoNCA 插件进行拓扑分析, 以度中心度 (DC) 和介度中心度 (BC) 均大于上四分位数的靶点作为核心靶点, 进一步分析。

1.6 GO 和 KEGG 功能富集分析

为进一步阐述青蒿对肾阴虚型 GIOP 的作用机制, 将“青蒿-肾阴虚型 GIOP”共同靶点基因数据导入 metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 功能富集分析, 并通过微生信在线软件绘制相关柱状图和气泡图。

1.7 实验材料与仪器

青蒿购于河北安国市场, 经海军军医大学药理学系药学教研室辛海量副教授鉴定, 密封存放于干燥阴凉处。称取青蒿粉末 1g, 加入 60% 乙醇 50 ml, 室温冷浸 7 d, 过滤得滤液, 55 $^{\circ}$ C 旋蒸浓缩后, 55 $^{\circ}$ C 烘干备用^[12-13]。

其他试剂及生产厂家: 地塞米松 (大连美仑); 胎牛血清 (Gibco, 美国); DMEM 培养基等细胞培养试剂 (天津灏洋); 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (南京建成); BCA 蛋白检测试剂盒、MTT (上海碧云天生物技术有限公司); PI3K、AKT、p-AKT、GADPH 抗体 (CST 公司)。

1.8 原代成骨细胞的分离

以二次消化法从新生大鼠颅骨盖中分离获得

原代成骨细胞^[14]。

1.9 细胞培养和传代

以含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基培养成骨细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养, 待细胞铺满 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养。

1.10 成骨细胞增殖及 ALP 检测

取 3-8 代的成骨细胞计算其数目, 配制成细胞浓度为 1×10^4 个/ml 细胞悬液接种于 96 孔板。24 h 后分别更换为含药培养液 (DEX: 10 μ mol/L; AE: 100、50、25 μ g/ml)。给药 48 h 后采用 MTT 法检测成骨细胞的增殖情况。

取 3-8 代的成骨细胞计算其数目, 配制成细胞浓度为 5×10^4 个/ml 细胞悬液接种于 24 孔板。24 h 后分别更换为含药培养液 (给药浓度同上)。培养过程中每 3 d 更换 1 次含药培养液。第 8d 裂解细胞, 收集细胞裂解液, 于 4 $^{\circ}$ C、13800 $\times$ g 离心 5 min。用对硝基苯磷酸二钠法测定细胞 ALP 活性。

1.11 Western blot 法检测 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白的表达

将 3-8 代的成骨细胞裂解, 提取细胞总蛋白, 根据 BCA 试剂盒进行蛋白定量。采用 Western blot 技术对 PI3K、AKT 和 p-AKT 水平进行检测。

1.12 统计学分析

实验结果以“均值 $\pm$ 标准差” ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 选用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行组间变量的比较分析。

2 结果

2.1 肾阴虚型 GIOP 相关靶点筛选

通过 Genecards 数据库共检索到 GIOP 相关靶点基因 1741 个, 通过 OMIM 数据库共检索到 GIOP 相关靶点基因 311 个, 通过 Drugbank 数据库共检索到 GIOP 相关靶点基因 30 个, 将 3 个数据库检索结果合并后去除重复基因后, 最终获得 2039 个。通过 Genecards 数据库检索获得阴虚靶点基因 876 个, 肾虚靶点基因 4603 个, 交叉分析后获得肾阴虚靶点基因 836 个。将肾阴虚靶点基因和 GIOP 靶点基因交叉分析后获得 522 个肾阴虚型 GIOP 靶点基因 (图 1)。

2.2 青蒿活性成分筛选

通过 TCMSP 平台共检索到青蒿中 OB $\geq$ 30%, DL $\geq$ 0.18 的活性成分 22 个, 见表 1。

2.3 靶点预测和基因名添加

通过 TCMSP 和 UniProt 数据库获得 214 个青

表 1 青蒿主要活性成分

分子名称	生物利用度(%)	药物相似度(DL)
新西兰牡荆苷_qt	59.85	0.21
醋酸酯	58.02	0.52
脱氧青蒿素	54.47	0.26
青蒿烯	54.36	0.31
万寿菊素	53.11	0.34
牡荆黄素_qt	52.18	0.21
泽兰黄醇素	50.8	0.41
双氢青蒿素	50.75	0.3
青蒿素	49.88	0.31
异鼠李素	49.6	0.31
青蒿亭	49.55	0.48
茵陈黄酮	48.96	0.41
槲皮素	46.43	0.28
维采宁-2_qt	45.84	0.21
豆甾醇	43.83	0.76
线菊素	43.46	0.34
六氟磷酸钠	42.6	0.37
山奈酚	41.88	0.24
谷甾醇	36.91	0.75
木犀草素	36.16	0.25
怪柳黄素	32.86	0.31
玄参黄酮	30.35	0.3

蒿活性成分靶点基因。将其与肾阴虚型 GIOP 疾病靶点基因交叉分析(图 1)，“青蒿-肾阴虚型 GIOP”交集靶点基因共有 98 个。

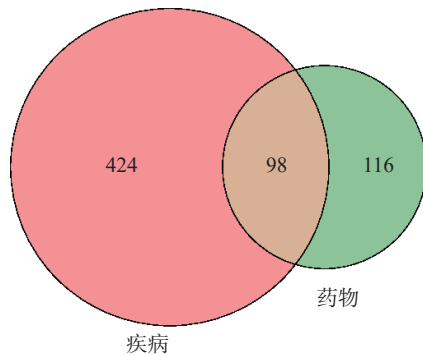


图 1 “青蒿-肾阴虚型 GIOP”交集靶点基因

2.4 靶点基因蛋白互作 (PPI) 网络及拓扑分析

运用 String 在线软件构建出“青蒿-肾阴虚型 GIOP”共同靶点 PPI 网络(图 2), 共有 98 个节点, 1935 条相互关系, 见图 2。利用 CytoNCA 插件计算网络节点的 DC, BC 上四分位数为 59、101.49248, 故以 $DC \geq 59$ 、 $BC \geq 101.49248$ 为筛选条件, 筛选青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 的核心靶点, 共得到 17 个核心靶点, 如表 2。

表 2 “青蒿-肾阴虚型 GIOP”核心靶点信息

靶点信息	简称	度中心度 (DC)	介度中心度 (BC)
RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	AKT1	84	495.8247
肿瘤坏死因子	TNF	83	336.63745
白细胞介素-6	IL6	81	281.4354
细胞肿瘤抗原p53	TP53	79	273.47903
血管内皮生长因子A	VEGFA	78	200.2001
白细胞介素-1 β	IL1B	76	199.86818
基质金属蛋白酶-9	MMP9	73	146.52397
转录因子AP-1	JUN	71	167.16982
前列腺素G/H合成酶-2	PTGS2	71	140.30101
半胱氨酸蛋白酶-3	CASP3	71	120.33017
表皮生长因子受体	EGFR	68	294.5016
表皮生长因子	EGF	67	107.6285
白细胞介素-8	CXCL8	67	127.67476
雌激素受体	ESR1	65	251.7144
C-C基序趋化因子配体	CCL2	65	101.49248
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ	PPARG	63	118.61439
血红素氧合酶-1	HMOX1	59	156.89531

2.5 GO 和 KEGG 功能富集分析

GO 富集分析获得 5612 个细胞生物学过程, 其中 BP 分析获得 4649 个条目, MF 分析获得 585 个条目, CC 分析获得 378 个条目, 根据富集的基因数进行降序排列, 分别选取前 10 个条目建立 BP、MF、CC 三合一柱状图(图 3)。生物学过程 (BP) 主要涉及激素应答、性腺发育、细胞死亡的正向调节等, 细胞成分 (CC) 包括细胞外基质、转录调节复合物、膜筏等, 分子功能 (MF) 包括信号受体调节活性、蛋白结构域特异性结合、激酶结合等。

KEGG 富集分析获得 225 个信号过程, 根据富集的基因数进行降序排列, 选取前 20 个条目建立气泡图(图 4), KEGG 富集分析主要涉及的信号通路有 PI3K/AKT 信号通路, IL-17 信号通路, AGE/RAGE 信号通路, MAPK 信号通路等, 说明青蒿治疗肾阴虚型 GIOP 可能是从多条信号通路联合发挥作用的, 其中 PI3K/AKT 信号通路上富集的共同靶点最多。

2.6 细胞实验

2.6.1 青蒿显著提高 DEX 损伤的成骨细胞的增殖及分化

DEX 损伤成骨细胞后, 其增殖能力及 ALP 活性显著降低。药物治疗后, 青蒿提取物可显著促进 DEX 损伤的成骨细胞的增殖, 提高 ALP 活性, 促进 DEX 损伤的成骨细胞的增殖(图 5)。

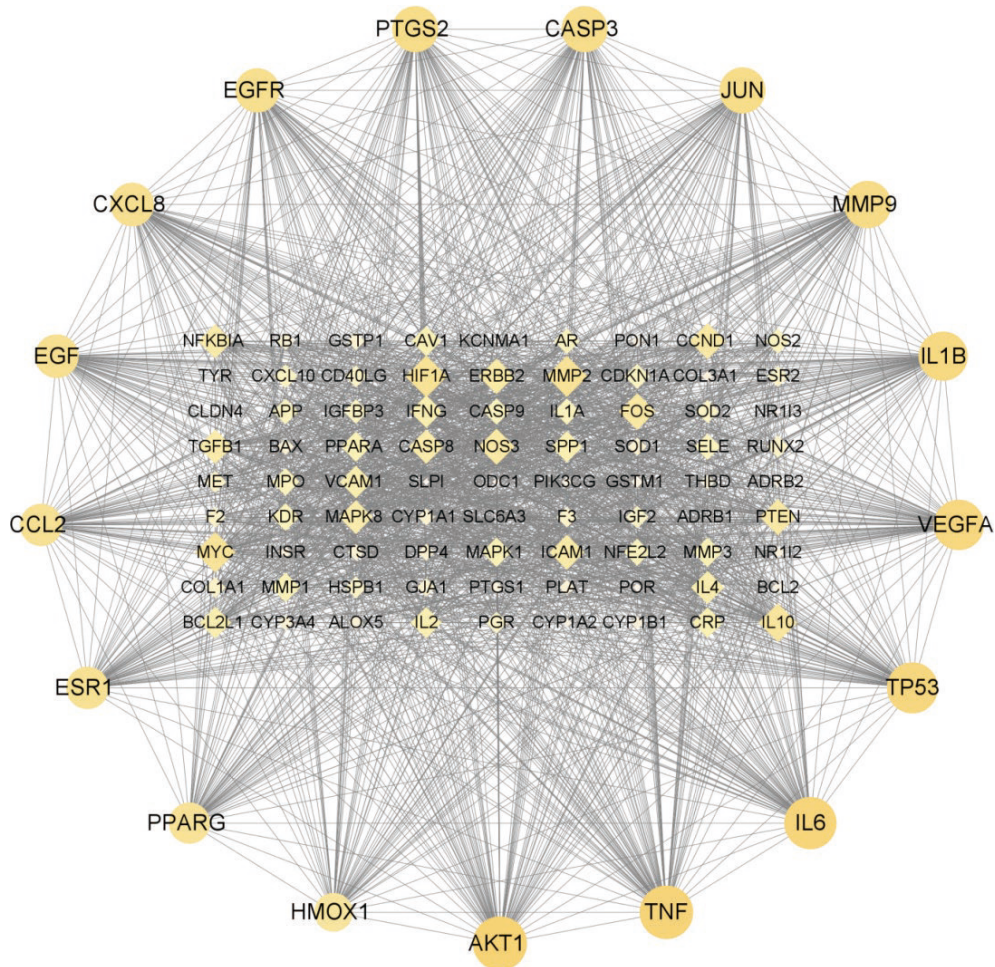


图 2 “青蒿-肾阴虚型 GIOP”共同靶点网络

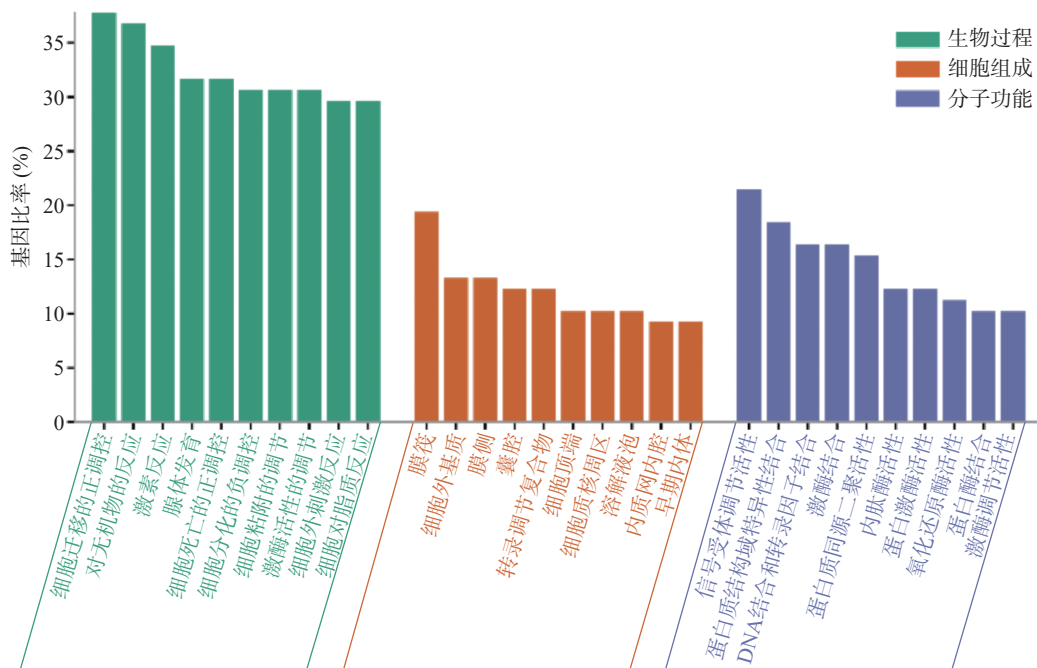


图 3 BP、MF、CC 三合一柱状图

2.6.2 青蒿对 DEX 损伤的成骨细胞 PI3K/AKT 通路蛋白的影响

药物处理 DEX 损伤的成骨细胞 48 h 后，

Western blot 结果显示，与空白组比较，模型组 p-AKT/AKT 比值、PI3K 蛋白表达水平明显下降，给予青蒿提取物治疗后，p-AKT/AKT 比值、PI3K 蛋

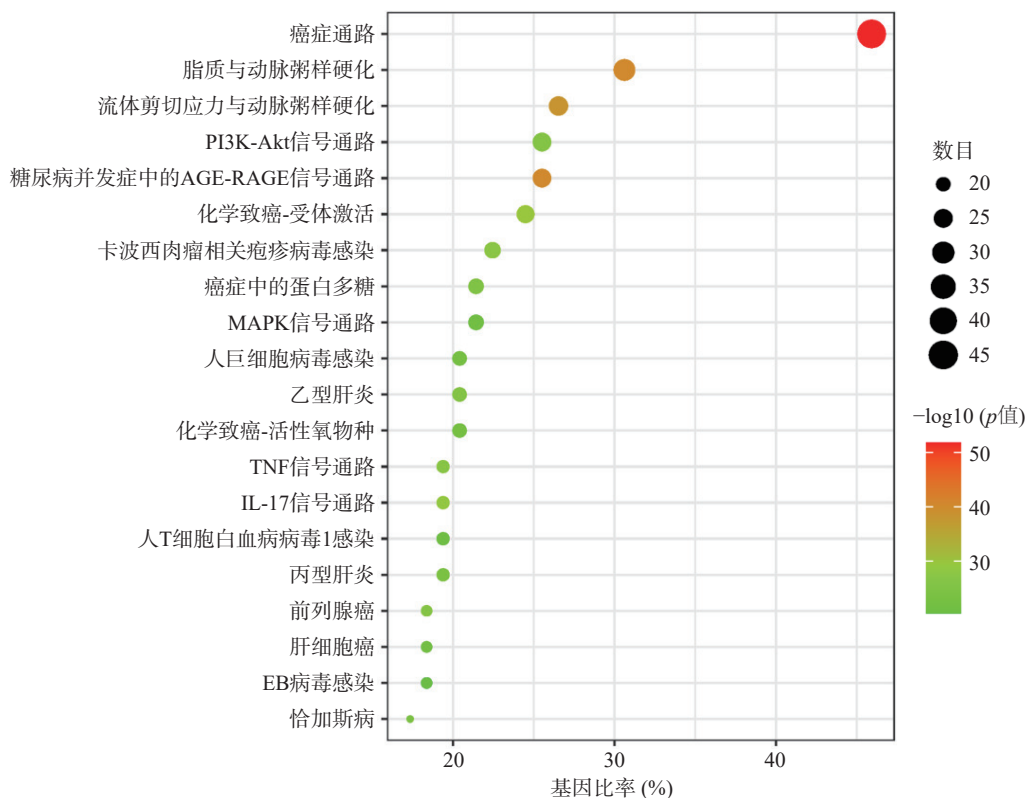


图 4 KEGG 气泡图

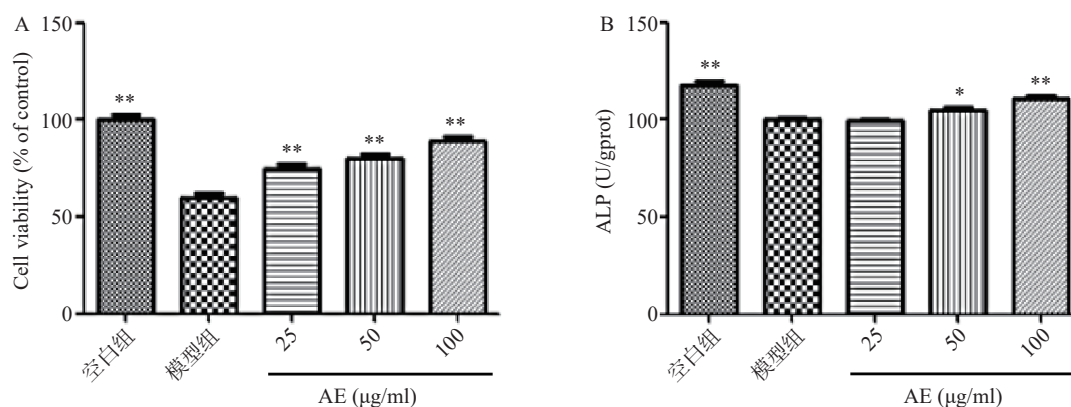


图 5 青蒿对 DEX 损伤的成骨细胞的增殖 (A) 及分化 (B) 影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较。

白表达水平明显提高(图 6)。

3 讨论

研究发现, PI3K/AKT 通路与氧化应激有密切的联系, 一方面, 过量的活性氧 (ROS) 可抑制 AKT 的磷酸化^[15], 另一方面, 磷酸化的 AKT 也可以通过 Nrf2/HO-1 通路抑制氧化应激^[16]。在 OP 的治疗药物探索过程中, 抗氧化是一条重要的线索, 如啤酒花中的黄腐酚, 杜仲中的绿原酸, 黄连中的小檗碱, 其抗骨质疏松的机制均与抗氧化有关^[17-19], 现代药理研究已经证明青蒿具有抗氧化, 抗炎, 调节免疫等作用^[20-21], 但青蒿中化学成分众多, 虽然

目前多以倍半萜类成分青蒿素含量作为其质量评价标准^[22]。然而, 除了倍半萜类成分外, 青蒿中还存在黄酮类成分、有机酸类成分等等^[23], 青蒿的抗肾阴虚型 GIOP 的机制可能与抗氧化有关。研究发现, 倍半萜类成分、黄酮类成分、有机酸类成分均存在一定的抗氧化效果^[24-27], 青蒿的抗肾阴虚型 GIOP 的机制可能与抗氧化有关。因此, 研究青蒿是否在抗 OP 方面存在作用, 青蒿中哪种单体成分在其抗 OP 的过程中起主要作用值得进一步探究。

本研究以网络药理学为基础, 初步筛选出了青蒿抗肾阴虚型 GIOP 的 98 个共同靶点, 通过拓扑分析, 筛选出了 17 个核心靶点。GO 分析和 KEGG

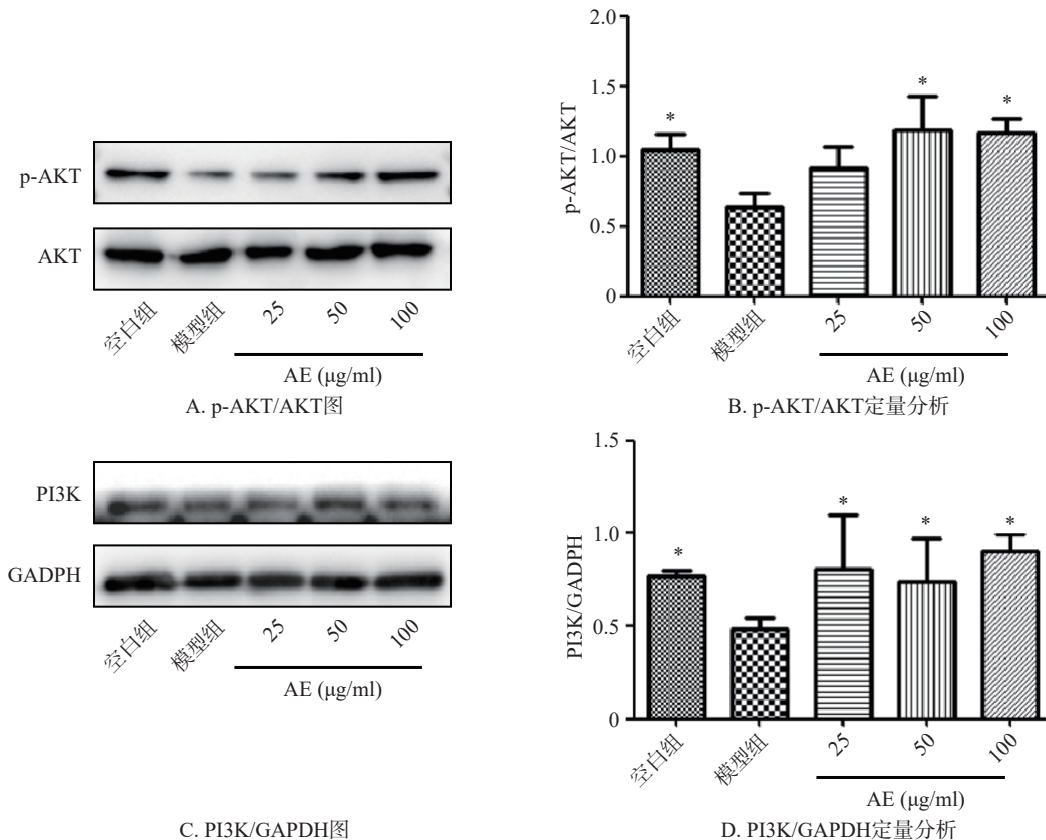


图6 青蒿对 DEX 损伤的成骨细胞 PI3K/AKT 通路蛋白的影响 (p-AKT/AKT:A-B, PI3K/GAPDH:C-D)($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

* $P<0.05$, 与模型组比较。

富集分析发现这些共同靶点参与了多个生物学过程,且参与 PI3K/AKT, IL-17, AGE/AGE, MAPK 等多个信号通路,其中 PI3K/AKT 信号通路上富集的共同靶点最多。研究表明,PI3K/AKT 信号通路可通过影响成骨细胞的增殖和分化,抑制 OP 的发生^[28]。本研究体外实验亦证实青蒿可以促进 DEX 损伤的成骨细胞的增殖和分化,激活 PI3K/AKT 信号通路,促进 AKT 的磷酸化,验证了网络药理学的预测结果,为后续青蒿抗 GIOP 研究提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] KANIS J A, COOPER C, RIZZOLI R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(1): 3-44.
- [2] 中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会. 骨质疏松症中国白皮书 [J]. 中华健康管理学杂志, 2009, 3(3): 148-154.
- [3] 邓微. 骨质疏松为何偏爱女性 [J]. 江苏卫生保健, 2021, 23(11): 10.
- [4] 叶丹. 骨质疏松药物治疗的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(1): 148-151.
- [5] 姚曼, 林玩福, 程彬彬. 糖皮质激素性骨质疏松症的中西医结合研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(7): 1606-1609.
- [6] 赖丽钧. 糖皮质激素性骨质疏松症的中医证型分布特点 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(12): 123-124, 126.
- [7] 张兴. 认识身边的中药: 青蒿 [J]. 中医健康养生, 2021, 7(4): 26-27.
- [8] 马玉超. 青蒿汤加减联合糖皮质激素治疗轻中型系统性红斑狼疮的疗效观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2022, 22(2): 43-45.
- [9] 张蕾, 易春艳, 唐明秀, 等. 浅谈青蒿在激素依赖性皮炎中的运用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(34): 161, 163.
- [10] ZHANG J. The osteoprotective effects of artemisinin compounds and the possible mechanisms associated with intracellular iron: a review of in vivo and in vitro studies[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 76: 103358.
- [11] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准 [J]. 中西医结合杂志, 1986, 6(10): 598.
- [12] 谭余庆, 赵一, 林启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 166-171.
- [13] 张静修, 戴克逊, 赵一. 青蒿浸膏抗疟实验研究 [J]. 广西中医药, 1978, 1(4): 57-60.
- [14] GU G, HENTUNEN T A, NARS M, et al. Estrogen protects primary osteocytes against glucocorticoid-induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(3): 583-595.
- [15] DENG S, DAI G, CHEN S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 602-608.
- [16] HAN D D, CHEN W, GU X L, et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 14680-14692.
- [17] SUN X L, XIA T S, ZHANG S Y, et al. Hops extract and xanthohumol ameliorate bone loss induced by iron overload via

- activating Akt/GSK3 β /Nrf2 pathway[J]. *J Bone Miner Metab*, 2022, 40(3): 375-388.
- [18] HAN D D, GU X L, GAO J, et al. Chlorogenic acid promotes the Nrf2/HO-1 anti-oxidative pathway by activating p21Waf1/Cip1 to resist dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137: 1-12.
- [19] SHAO J J, LIU S B, ZHENG X, et al. Berberine promotes peri-implant osteogenesis in diabetic rats by ROS-mediated IRS-1 pathway[J]. *Biofactors*, 2021, 47(1): 80-92.
- [20] 徐明霞. 青蒿素及其衍生物在动物生产中的应用研究 [J]. 饲料研究, 2021, 44(4): 147-149.
- [21] SKOWYRA M, GALLEGO M G, SEGOVIA F, et al. Antioxidant properties of Artemisia annua extracts in model food emulsions[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2014, 3(1): 116-128.
- [22] 张秋红, 朱子微, 李晋, 等. 中药青蒿化学成分与种植研究现状 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(19): 10-12.
- [23] 赵祎武, 倪付勇, 宋亚玲, 等. 青蒿化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4816-4821.
- [24] FAROMBI E O, ADEDARA I A, ABOLAJI A O, et al. Sperm characteristics, antioxidant status and hormonal profile in rats treated with artemisinin[J]. *Andrologia*, 2014, 46(8): 893-901.
- [25] 王伟, 何平, 江小明. 木犀草素及其黄酮苷的抗炎、抗氧化作用 [J]. 食品科学, 2020, 41(17): 208-215.
- [26] 周惠祯, 汤良杰, 龚宇, 等. 瑞香狼毒花化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2395-2401.
- [27] CAO Z Y, DING Y, CAO L, et al. Isochlorogenic acid C prevents Enterovirus 71 infection via modulating redox homeostasis of glutathione[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16278.
- [28] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路与骨破坏: 问题与机制 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(23): 3716-3722.
- [收稿日期] 2022-04-27 [修回日期] 2022-11-01
[本文编辑] 李睿曼

(上接第 665 页)

果用水提取, 膏体就会吸水膨胀变粘, 因此, 本文选择甲醇作为供试品前处理提取溶剂。另外, 为了富集特征化学成分, 一些极性不大的化学成分可以采用萃取的方法, 一些极性较大的化学成分可以采用大孔树脂柱层析的方法。本实验中笔者发现, 10% 乙醇^[6]、30% 乙醇^[7]、60% 乙醇^[8]、90% 乙醇大孔树脂洗脱液中分别含有红花、车前子、桃仁、预知子的特征成分, 但是利用薄层色谱法进行鉴别时, 红花的分离效果较差, 桃仁阴性有干扰, 故本文未将红花及桃仁列入质量标准。

虽然蒸发光散射检测器在那些弱或者无紫外吸收的中药成分分析中具有独特而不可替代的作用(例如黄芪甲苷的测定), 但是蒸发光散射检测器在分析中药成分时还有许多不尽人意的地方^[9]。课题组前期实验时也试过蒸发光散射检测器, 为了使黄芪甲苷分离效果好, 其保留时间需达到 44 min 左右, 而且重现性差。而采用 UPLC-MS 的方法, 黄芪甲苷在 10 min 内即可测定完, 且分离效果好, 故 UPLC-MS 在不影响分离效果的情况下大大提高了样品中各成分的分析速度^[10-11]。另外, 在色谱和质谱条件的优化中, 本实验考察了不同比例流动相(0.1% 甲酸的乙腈-0.1% 甲酸溶液)的分离效果, 最终确定梯度洗脱的方式。因此, 本研究采用 UPLC-MS 的方法测定实脾消水凝胶贴膏中黄芪甲苷的含量, 为实脾消水凝胶贴膏的质量控制提供了一种快速、灵敏、稳定、可靠的方法。

实脾消水浸膏为传统浸膏剂, 处方有十二味药, 其质量标准除了常规检查项外, 主要是【鉴别】项, 要求对黄芪、牵牛子、车前子、桂枝和冰片

进行薄层色谱鉴别。本文建立了实脾消水凝胶贴膏的质量控制方法, 在原标准的基础上增加了【含量测定】项, 并在【鉴别】项下增加了莪术、猪苓、预知子的薄层色谱鉴别, 为实脾消水浸膏的二次开发奠定了一定的基础。

【参考文献】

- [1] 李佩文, 谭煌英, 万冬桂, 等. 中药消水膏外敷治疗癌性腹水 120 例临床及实验研究 [J]. 中医杂志, 2000, 41(6): 358-359.
- [2] 谭煌英, 李佩文. 中药外敷治疗癌性腹水的临床及细胞学研究 [J]. 中医杂志, 1997, 38(3): 165-166.
- [3] 程志强. 中药消水 II 号外敷治疗恶性胸水的临床与实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2002.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 版)(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59-60.
- [5] 李洋, 王秀丽. 清热养阴除湿丸质量标准研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5636-5639.
- [6] 李茹冰, 崔强, 李雅姝, 等. 大孔树脂法制备红花中羟基红花黄色素 A[J]. 医学信息, 2014, 27(25): 90-91.
- [7] 商锋, 尹胜, 肖潇, 等. 大孔吸附树脂纯化制备京尼平苷酸的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 93-97.
- [8] 郭先帅, 刘冬云, 朱婉婷, 等. AB-8 型大孔吸附树脂纯化复方桂枝茯苓丸中桃仁、赤芍提取物工艺 [J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 167-170.
- [9] 霍秦秦, 孙立丽, 秦丽娜, 等. 蒸发光散射检测器在中药成分分析中的应用研究 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(9): 205-206.
- [10] 卢森华, 黎强, 梁爽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定强力枇杷露中 5 种罂粟壳生物碱含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(12): 62-66.
- [11] 张群, 陈瑜, 支晓伟, 等. UPLC-MS/MS 法测定五倍子洗剂中 5 种指标性成分的含量 [J]. 药学实践杂志, 2021, 39(5): 437-441.

[收稿日期] 2022-05-16 [修回日期] 2023-05-16
[本文编辑] 陈盛新