

硬尖神香草抗支气管哮喘气道重塑的质量标志物研究^Δ

蔡晓翠*, 郭君婷, 赵婷婷, 刘桂花[#](新疆维吾尔自治区药物研究院新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R562;R965;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)06-0733-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.06.07



摘要 **目的** 挖掘硬尖神香草抗支气管哮喘(简称“哮喘”)气道重塑的质量标志物(Q-Marker),为基于药效活性的硬尖神香草质量控制研究提供参考。**方法** 通过网络药理学方法筛选出硬尖神香草的潜在活性成分及作用靶点;以人气道平滑肌细胞(HASMCs)为对象,以血小板衍生生长因子BB(PDGF-BB)诱导构建气道重塑细胞模型,对硬尖神香草及潜在活性成分的抗哮喘作用进行验证;采用高效液相色谱法,建立14批硬尖神香草样品的指纹图谱并进行化学计量学分析;综合药效学实验和指纹图谱结果,确定硬尖神香草抗哮喘气道重塑的Q-Marker。**结果与结论** 网络药理学分析结果显示,硬尖神香草抗哮喘的潜在活性成分包括木犀草素、槲皮素、迷迭香酸等黄酮类和酚酸类化合物,抗哮喘的核心靶点为白细胞介素6、丝裂原活化蛋白激酶等。体外实验结果证实,25、50、100 μg/mL硬尖神香草及新绿原酸(80 μmol/L)、金合欢素(80 μmol/L)、丹酚酸B(40 μmol/L)、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸(80 μmol/L)均可显著降低PDGF-BB诱导的细胞存活率,抑制细胞增殖、迁移和细胞外信号调控蛋白激酶1/2的磷酸化,降低白细胞介素6、肿瘤坏死因子α、活性氧水平,使细胞普遍阻滞于G₀/G₁期($P<0.05$)。指纹图谱分析结果显示,14批硬尖神香草样品的指纹图谱共有27个共有峰,指认出新绿原酸等15个化合物,指纹图谱相似度均大于0.8;14批样品可分为3类,S1~S7为一类,S8~S13为一类,S14为一类;迷迭香酸、绿原酸、咖啡酸、三裂鼠尾草素、木犀草素、阿魏酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸及峰5、8对应成分的变量重要性投影大于1,为影响药材质量的潜在差异性标志物。综合网络药理学、体外实验验证、化学计量学分析可知,迷迭香酸、新绿原酸、咖啡酸、三裂鼠尾草素、木犀草素、阿魏酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、金合欢素、丹酚酸B、绿原酸可能是硬尖神香草抗哮喘气道重塑的Q-Marker。
关键词 硬尖神香草;质量标志物;支气管哮喘;气道重塑;网络药理学;指纹图谱

Study on quality markers of *Hyssopus cuspidatus* against airway remodeling in bronchial asthma

CAI Xiaocui, GUO Juntao, ZHAO Tingting, LIU Guihua (Xinjiang Key Laboratory of Uyghur Medicine, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To identify the quality markers (Q-Markers) of *Hyssopus cuspidatus* against airway remodeling in bronchial asthma (referred to as “asthma”), and to provide a reference for the quality control research of *H. cuspidatus* based on pharmacodynamic activity. **METHODS** Potential active components and action targets of *H. cuspidatus* were screened by network pharmacology method. Using human airway smooth muscle cells (HASMCs) as objects, airway remodeling cell model was induced by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB); validation test was then performed for anti-asthmatic effects of *H. cuspidatus* and the potential active components. HPLC method was employed to establish the fingerprints of 14 batches of *H. cuspidatus* samples, and chemometric analysis was also conducted. Combined with the results of pharmacodynamic experiments and fingerprint analysis, the Q-Markers of *H. cuspidatus* against airway remodeling in asthma were determined. **RESULTS & CONCLUSIONS** Network pharmacology analysis showed that the potential active components of *H. cuspidatus* against asthma might be flavonoids and phenolic acids such as luteolin, quercetin and rosmarinic acid, and the core anti-asthmatic targets were interleukin-6, mitogen-activated protein kinase, etc. *In vitro* experimental results confirmed that 25, 50, 100 μg/mL of *H. cuspidatus*, as well as neochlorogenic acid (80 μmol/L), acacetin (80 μmol/L), salvianolic acid B (40 μmol/L) and quercetin-3-O-β-D-glucuronide (80 μmol/L), significantly reduced the cell viability induced by PDGF-BB, inhibited cell proliferation, migration, and the phosphorylation level of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, decreased the levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-α and reactive oxygen species, and generally arrested cells in the G₀/G₁ phase ($P<0.05$). Fingerprint analysis showed that there were 27 common peaks in the fingerprints of the 14 batches of *H. cuspidatus* samples, with 15 compounds (including luteolin) identified, and the similarities of fingerprints were all greater than 0.8. The 14 batches of samples could be divided into three categories: S1-S7 as one category, S8-S13 as one category, and S14 as one category. The variable importance in the projection values of rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, salvigenin, luteolin, ferulic acid, quercetin-3-O-β-D-glucuronide, and the components corresponding to peaks 5 and 8 were greater than 1, indicating they were potential differential markers affecting quality. Integrating network

^Δ基金项目 中央医疗机构中药质量提升项目(No.2025);新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No. KY2024127);新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(No. 2022D01A132)

*第一作者 副研究员,硕士生导师。研究方向:天然药物及中药民族药新药研发和作用机制。E-mail:455815506@qq.com

[#]通信作者 研究员,硕士生导师。研究方向:中药民族药药效物质基础。E-mail:19426059@qq.com

pharmacology, *in vitro* experimental validation, and chemometric analysis, rosmarinic acid, neochlorogenic acid, caffeic acid, salvigenin, luteolin, ferulic acid, quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide, acacetin, salvianolic acid B and chlorogenic acid may be the Q-Markers of *H. cuspidatus* against asthma.

KEYWORDS *Hyssopus cuspidatus*; quality markers; bronchial asthma; airway remodeling; network pharmacology; fingerprint

支气管哮喘(以下简称“哮喘”)是一种以反复出现喘息、胸闷、咳嗽为特征的慢性呼吸系统疾病,全球约有3.39亿患者^[1],我国成人患病率达4.2%^[2]。哮喘难以治愈,不仅严重影响了患者的生活质量,而且加重了社会经济负担。气道重塑是慢性及重症哮喘的核心病理改变,其中气道平滑肌细胞异常增殖、迁移是导致支气管结构不可逆损伤的关键环节^[3]。然而,现有治疗药物存在疗效不足、易发生耐药等问题,因此开发针对哮喘尤其是气道重塑的新型药物尤为迫切。

唇形科植物硬尖神香草 *Hyssopus cuspidatus* Boriss 是维吾尔族抗哮喘药神香草的基源植物^[3],其地上部分主要含有黄酮类、挥发油和酚酸类等成分,具有抗炎、止咳及平喘等药理活性^[4-7]。目前,已有研究报道了硬尖神香草的药理作用,并对其质量控制方法进行了广泛探讨^[5,8-9]。然而,现有研究多聚焦于单一成分或少数几个成分的药效评价及质量控制,难以系统阐释硬尖神香草多成分协同抗哮喘的整体作用机制,亦缺乏将药效物质基础与整体质量控制相整合的研究策略。

网络药理学可通过构建“成分-靶点-通路-疾病”关联网络体系,科学预测活性成分所对应的疾病相关靶点与信号通路。鉴于中药成分复杂、质量控制难度大,寻找中药质量标志物(quality marker, Q-Marker)对于实现中药全流程质量控制与溯源具有重要意义^[10]。中药指纹图谱能全面反映药材的整体成分特征及质量差异,结合Q-Marker挖掘可精确定位核心活性成分,从而实现对药材质量的整体把控与精准评价。本研究基于网络药理学预测、细胞实验验证、指纹图谱分析,筛选具有药效相关性或化学可测性的成分作为硬尖神香草的Q-Marker,以期为基于药效活性的硬尖神香草质量控制研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

U3000型高效液相色谱(HPLC)仪、150i型CO₂培养箱均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Synergy L型酶标仪购自美国BioTek公司;BIO-099型真空转印仪、BIO-100型水平电泳仪均购自美国Bio-Rad公司;Amersham Imager 680型凝胶成像仪购自美国CTL公司;DSY2000X型显微镜购自重庆澳浦光电技术有限公司;FASCalibur型流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 主要药品与试剂

14批硬尖神香草药材(编号S1~S14)由本课题组采收,经新疆维吾尔自治区药物研究院何江研究员鉴定为唇形科植物硬尖神香草 *H. cuspidatus* Boriss. 的地上部分。药材信息可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表1。

DMEM培养基(批号SH30256.01)购自美国Hy-

clone公司;地塞米松、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸B、木犀草素、绿原酸、 β -谷甾醇对照品(批号分别为100129-201907、110885-201703、110773-201313、111871-202007、111562-202318、111520-200504、110753-202018、110851-201909,纯度均大于96%)均购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、三裂鼠尾草素对照品(批号分别为DSTD001504、DSTD005501、DSTD230801-362,纯度均大于98%)均购自成都德斯特生物技术有限公司;金合欢素、迷迭香酸甲酯、迷迭香酸乙酯、山柰素、芫花素对照品(批号分别为DJ0037、DM0079、DM0211、DS0056BD、DY0114,纯度均大于98%)均购自成都乐美天医药科技有限公司;MTS细胞活力测定试剂(货号G3582)购自美国Promega公司;PI/RNase 染液(货号550825)购自美国BD公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(货号CA1410)购自北京索莱宝科技有限公司;人白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(货号分别为88-7346、384284-001)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔抗细胞外信号调控蛋白激酶1/2(extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、兔抗磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2)单克隆抗体(货号分别为4695T、4370)均购自美国CST公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(货号分别为BL006A、ZB-2301)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;血小板衍化生长因子BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB;货号HY-P7055)购自美国MCE公司。

1.3 细胞来源

人气道平滑肌细胞(human airway smooth muscle cells, HASMCs)购自上海联迈生物工程有限公司。

2 方法与结果

2.1 网络药理学预测硬尖神香草抗哮喘的活性成分及靶点

2.1.1 活性成分筛选及靶点预测

以“硬尖神香草”为关键检索词,通过TCMSP数据库,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为标准^[11],筛选得硬尖神香草的活性成分257个,其中口服生物利用度排前8位的核心活性成分为木犀草素(luteolin)、槲皮素(quercetin)、金合欢素(acacetin)、丹酚酸B(salvianolic acid B)、三裂鼠尾草素(salvigenin)、芫花素(genkwanin)、 β -谷甾醇(β -sitosterol)、蒙花苷(linarin);以“bronchial asthma”为检索词,通过SwissTarget Prediction平台,筛选得硬尖神香草抗哮喘的潜在靶点135个。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将硬尖神香草抗哮喘的135个潜在靶点导入String 11.0数据库,物种设为“homo sapiens”,置信度设为“>0.7”,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。利用Cytoscape 3.8.0软件对“硬尖神香草-成分-靶点”进行可视化处理,并对PPI网络进行拓扑学分析,以度值大于3倍中位数为标准^[11],筛选出硬尖神香草抗哮喘的关键靶点。结果显示,所得PPI网络包括125个节点、983条边,按度值从高到低排序,前13位的关键靶点分别为IL-6、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、Jun原癌基因(Jun proto-oncogene, JUN)、TNF、IL-10、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、IL-1 β 、蛋白激酶B1(又称“AKT1”)、Fos原癌基因(Fos proto-oncogene, FOS)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、CXC趋化因子配体8(CXC chemokine ligand 8, CXCL8)、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)。

2.1.3 潜在靶点富集分析

采用R 4.2.3语言对硬尖神香草抗哮喘的13个关键靶点进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集以及京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。结果显示,共富集到1 677个GO功能条目($P<0.05$),其中生物过程1 606个、细胞组分9个、分子功能62个。共富集到110条KEGG信号通路($P<0.05$);以 P 值排序,前20位信号通路中与哮喘发生发展密切相关的有MAPK、晚期糖基化终末产物(advanced glycation end product, AGE)-晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)、IL-17、TNF信号通路等。GO功能富集和KEGG通路富集结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1。

2.1.4 分子对接

选取度值排名前4位的关键活性成分与PPI网络分析排名前5位的核心靶点进行分子对接。结果显示,木犀草素、槲皮素、金合欢素、丹酚酸B与IL-6、EGF、JUN、TNF、IL-10蛋白的结合能均小于-5.0 kcal/mol(1 kcal=4.184 kJ),表明结合性能较好^[12]。

2.2 体外实验验证硬尖神香草及活性成分对HASCs的作用

本研究结合网络药理学分析结果和前期预实验,以新绿原酸、金合欢素、丹酚酸B、槲皮素-3- O - β -D-吡喃葡萄糖苷酸和不同质量浓度的硬尖神香草提取物为干预药物,以地塞米松为阳性对照,以PDGF-BB诱导的HASCs为对象,进行体外实验验证。

2.2.1 硬尖神香草提取物的制备方法

取硬尖神香草药材(编号S8),切段(2~3 cm),加10倍量50%乙醇回流提取2次,每次1.5 h;收集提取液浓

缩至无醇味,经聚酰胺柱分别以水、20%乙醇、40%乙醇洗脱;收集40%乙醇洗脱部位,浓缩、干燥,即得硬尖神香草提取物。

2.2.2 细胞培养

取HASCs,接种于含10%胎牛血清的DMEM完全培养基中,于37℃、5%CO₂条件下培养。

2.2.3 造模、分组与给药

取对数生长期的HASCs,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中,培养24 h;将培养基更换为无血清培养基,饥饿24 h;加入PDGF-BB使其终浓度为20 ng/mL,培养24 h以构建气道重塑细胞模型^[13]。将细胞分为正常组(不含药物和PDGF-BB)、模型组、新绿原酸组(80 μ mol/L)、金合欢素组(80 μ mol/L)、丹酚酸B组(40 μ mol/L)、槲皮素-3- O - β -D-吡喃葡萄糖苷酸组(80 μ mol/L)、地塞米松组(阳性对照,20 μ mol/L),以及硬尖神香草低、中、高质量浓度组(25、50、100 μ g/mL),每组设置3个复孔。模型组和各药物组按前述方法造模后,各药物组(剂量依据前期预实验结果设置)再用相应药液继续培养24 h。

2.2.4 硬尖神香草及活性成分对HASCs增殖的影响

取对数生长期的HASCs,按“2.2.3”项下方法分组(同时设置不含细胞、不含药物和PDGF-BB的空白组)、干预、培养后,弃去各孔上清液,加入10%甲基三氯硅烷溶液100 μ L,培养2~4 h,使用酶标仪于490 nm波长下测定其光密度(OD)值,按下式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(正常组OD值-空白组OD值) $\times 100\%$ 。采用SPSS 29.0软件对数据进行统计分析;数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ (统计方法下同)。

结果(表1)显示,与正常组比较,模型组细胞的存活率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组细胞的存活率均显著降低($P<0.05$),且硬尖神香草低、中、高质量浓度组的变化呈浓度依赖趋势。

表1 各组细胞存活率、炎症因子、细胞迁移率、Transwell穿过率、ROS相对比值比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞存活率/ %	IL-6/ (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)	细胞迁移率/ %	Transwell 穿过率/%	ROS相对 比值
正常组	66.61 $\pm$ 1.28	11.21 $\pm$ 0.60	8.94 $\pm$ 0.33	34.35 $\pm$ 1.19	100	1
模型组	100.14 $\pm$ 2.67 ^a	110.21 $\pm$ 2.67 ^a	70.76 $\pm$ 4.38 ^a	39.00 $\pm$ 3.81 ^a	232.60 $\pm$ 13.15 ^a	4.11 $\pm$ 0.58 ^a
硬尖神香草低质量浓度组	45.54 $\pm$ 2.32 ^b	49.55 $\pm$ 2.55 ^b	29.69 $\pm$ 2.04 ^b	7.13 $\pm$ 0.44 ^b	63.27 $\pm$ 1.50 ^b	1.54 $\pm$ 0.16 ^b
硬尖神香草中质量浓度组	39.55 $\pm$ 2.31 ^b	20.14 $\pm$ 1.27 ^b	18.07 $\pm$ 1.77 ^b	6.98 $\pm$ 0.54 ^b	52.77 $\pm$ 0.86 ^b	1.40 $\pm$ 0.18 ^b
硬尖神香草高质量浓度组	20.73 $\pm$ 1.79 ^b	14.33 $\pm$ 1.79 ^b	12.27 $\pm$ 1.45 ^b	2.55 $\pm$ 0.41 ^b	43.50 $\pm$ 2.40 ^b	1.21 $\pm$ 0.11 ^b
新绿原酸组	27.71 $\pm$ 2.35 ^b	27.71 $\pm$ 2.53 ^b	12.70 $\pm$ 2.07 ^b	7.84 $\pm$ 0.71 ^b	80.90 $\pm$ 5.11 ^b	1.16 $\pm$ 0.17 ^b
金合欢素组	60.91 $\pm$ 2.22 ^b	33.31 $\pm$ 2.67 ^b	14.64 $\pm$ 1.08 ^b	10.47 $\pm$ 0.58 ^b	106.73 $\pm$ 3.87 ^b	1.36 $\pm$ 0.21 ^b
丹酚酸B组	20.62 $\pm$ 2.35 ^b	20.99 $\pm$ 2.73 ^b	14.31 $\pm$ 1.52 ^b	6.20 $\pm$ 0.37 ^b	108.97 $\pm$ 3.99 ^b	1.09 $\pm$ 0.01 ^b
槲皮素-3- O - β -D-吡喃葡萄糖苷酸组	30.91 $\pm$ 2.28 ^b	13.46 $\pm$ 0.24 ^b	16.25 $\pm$ 1.44 ^b	6.29 $\pm$ 0.71 ^b	68.55 $\pm$ 5.95 ^b	1.01 $\pm$ 0.03 ^b
地塞米松组	67.76 $\pm$ 2.31 ^b	20.31 $\pm$ 3.18 ^b	42.16 $\pm$ 1.40 ^b	3.59 $\pm$ 0.61 ^b	178.08 $\pm$ 3.96 ^b	1.80 $\pm$ 0.22 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2.5 硬尖神香草及活性成分对 HASMCs 上清液中 TNF- α 、IL-6 水平的影响

取对数生长期的 HASMCs,按“2.2.3”项下方法分组、干预、培养后,收集各组细胞上清液,按照试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测其 TNF- α 、IL-6 水平。结果(表1)显示,与正常组比较,模型组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$),且硬尖神香草低、中、高质量浓度组的变化呈浓度依赖趋势。

2.2.6 硬尖神香草及活性成分对 HASMCs 迁移的影响

(1)划痕实验:取对数生长期的 HASMCs,按“2.2.3”项下方法分组、干预。使用无菌枪头在孔板内垂直划痕,分别于培养 0、24 h 时使用显微镜观察,采用 Image J 软件计算划痕面积,并按下式计算细胞迁移率:迁移率(%)=(0 h 划痕面积-24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 $\times$ 100%。结果(表1)显示,随时间延长,正常组细胞的迁移速度加快、迁移细胞数量增多;与正常组比较,模型组细胞的划痕面积明显缩小,迁移率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组细胞的划痕面积明显增大,迁移率均显著降低($P<0.05$),且硬尖神香草低、中、高质量浓度组的变化呈浓度依赖趋势。各组细胞划痕实验的显微图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图2。

(2)Transwell 实验:将 HASMCs 接种于 Transwell 小室上层,将完全培养基加入小室下层。细胞按“2.2.3”项下方法分组、干预、培养后,取出小室,清洗;收集上层底部未穿膜的细胞,依次经 0.4% 中性甲醛固定、0.5% 结晶紫染色后,使用显微镜观察并计数,并按下式计算 Transwell 穿过率:穿过率(%)=给药组穿膜细胞数量/正常组穿膜细胞数量 $\times$ 100%。结果(表1)显示,与正常组比较,模型组的穿膜细胞数量增多,Transwell 穿过率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组的穿膜细胞数量明显减少,Transwell 穿过率均显著降低($P<0.05$),且硬尖神香草低、中、高质量浓度组的变化呈浓度依赖趋势。各组细胞 Transwell 实验的显微图可扫描本文首页

二维码查看“增强出版”板块中的附图3。

2.2.7 硬尖神香草及活性成分对 HASMCs 的 ROS 水平的影响

取对数生长期的 HASMCs,按“2.2.3”项下方法分组、干预、培养后,收集细胞,按照 ROS 检测试剂盒说明书操作,使用酶标仪测定并以正常组为参照计算 ROS 相对比值。结果(表1)显示,与正常组比较,模型组细胞中的 ROS 相对比值显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组细胞中的 ROS 相对比值均显著降低($P<0.05$),且硬尖神香草低、中、高质量浓度组的变化呈浓度依赖趋势。

2.2.8 硬尖神香草及活性成分对 HASMCs 形态的影响

取对数生长期的 HASMCs,按“2.2.3”项下方法分组、干预、培养后,收集细胞,使用显微镜观察其形态并拍照。结果(图1)显示,正常组细胞呈典型多角形或长梭形,胞质丰富,轮廓清晰,排列密集成束,具有明显的“峰谷”结构;与正常组比较,模型组细胞在形态上无明显差异;经不同质量浓度的硬尖神香草干预后,细胞收缩变圆,数量逐渐减少且呈浓度依赖性趋势;经新绿原酸、金合欢素、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷干预后,少数细胞变圆并伴有数量减少;经丹酚酸B干预后,细胞形态和数量改变较为明显,多数细胞变圆。

2.2.9 硬尖神香草及活性成分对 HASMCs 周期的影响

取对数生长期的 HASMCs,按“2.2.3”项下方法分组、干预、培养后,收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 1 500 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,逐滴加入预冷的 75% 乙醇,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜;以 1 500 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,加入 PI/RNase 染液,室温避光 15 min 后,使用流式细胞仪测定细胞周期并记录不同周期的细胞比例。结果(表2)显示,与正常组比较,模型组的 G₀/G₁ 期细胞比例显著降低, S、G₂/M 期细胞比例显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各药物组的 G₀/G₁ 期细胞比例均显著升高, S、G₂/M 期细胞比例大部分显著降低($P<0.05$)。值得注意的是,硬尖神香草中质量浓度组和丹酚酸B组的 S 期细胞比例显著升高($P<0.05$),表明硬尖神香草在不同质量浓度下表现出不同的阻滞位

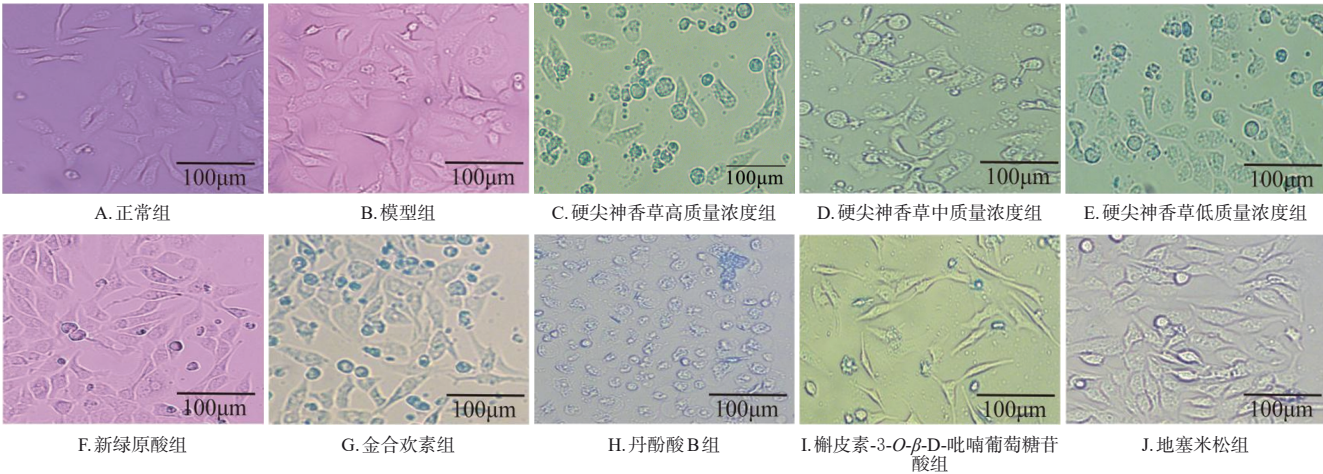


图1 各组细胞形态比较显微图

点(硬尖神香草中质量浓度阻滞于S期,高质量浓度阻滞于G₀/G₁期),可能与其含有多种活性成分、作用机制随剂量变化有关;丹酚酸B可将细胞阻滞于S期,这一作用可能与其特有靶点有关。

表2 各组不同分裂阶段细胞比例比较($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
正常组	84.5±1.0	3.9±0.3	11.6±0.6
模型组	54.2±1.6 ^a	14.4±1.3 ^a	31.8±2.1 ^a
硬尖神香草低质量浓度组	64.4±2.2 ^b	8.0±0.5 ^b	19.5±0.6 ^b
硬尖神香草中质量浓度组	65.1±2.3 ^b	24.9±1.3 ^b	2.4±0.0 ^b
硬尖神香草高质量浓度组	77.3±1.9 ^b	4.5±0.3 ^b	15.2±1.6 ^b
新绿原酸组	70.4±2.1 ^b	11.9±0.5 ^b	13.2±1.1 ^b
金合欢素组	80.4±1.3 ^b	9.4±0.7 ^b	4.6±0.2 ^b
丹酚酸B组	66.4±2.5 ^b	21.1±0.7 ^b	9.0±1.0 ^b
槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷组	84.4±2.3 ^b	11.4±0.2 ^b	4.2±1.4 ^b
地塞米松组	80.0±2.0 ^b	11.3±0.5 ^b	5.0±0.1 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2.10 硬尖神香草对HSMCs中ERK1/2蛋白磷酸化水平的影响

采用Western blot法检测。取对数生长期的HSMCs,按“2.2.3”项下方法分组(仅设正常组、模型组和硬尖神香草低、高质量浓度组)、干预、培养后,收集细胞,加入适量RIPA裂解液以提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度并进行变性处理。取变性蛋白适量,经电泳分离后以湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上,封闭;加入p-ERK1/2、ERK1/2、GAPDH一抗(稀释度分别为1:2 000、1:2 000、1:10 000),4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释度为1:10 000),室温下孵育;经显影、成像后,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以p-ERK1/2与ERK1/2的相对灰度比值表示ERK1/2的磷酸化水平。结果显示,与对照组(11.21 ± 0.60)比较,模型组细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平(110.21 ± 2.67)显著升高($P<0.05$);与模型组比较,硬尖神香草低、高质量浓度组细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平(49.55 ± 2.55 、 33.31 ± 2.67)均显著降低($P<0.05$)。各组细胞中p-ERK1/2、ERK1/2蛋白表达的电泳图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图4。

2.3 硬尖神香草指纹图谱分析

本研究进一步聚焦硬尖神香草的化学物质基础,采用HPLC法建立多批硬尖神香草样品的指纹图谱,通过相似度分析评价批次间的一致性,并结合化学计量学分析挖掘差异性标志物。

2.3.1 色谱条件

以Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~55 min, 5%A→11%A; 55~85 min, 11%A→23%A; 85~95 min, 23%A→25%A; 95~105 min, 25%A→30%A; 105~115 min, 30%A→80%A; 115~120 min, 80%A; 120~130 min, 30%A→5%A);流速为1.0 mL/min;柱温为30℃;检测波长为280 nm;进样量为20 μL。

2.3.2 溶液的制备

(1)混合对照品溶液:分别取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、迷迭香酸、金合欢素、丹酚酸B、木犀草素、迷迭香酸甲酯、迷迭香酸乙酯、β-谷甾醇、茺花素、山柰素、三裂鼠尾草素对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成上述成分质量浓度分别为0.60、1.24、0.74、1.08、0.84、1.49、0.15、1.27、0.60、0.52、0.33、0.38、0.49、0.56、0.42 mg/mL的混合对照品溶液。(2)供试品溶液:取硬尖神香草药材,粉碎,精密称取粉末约0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇溶液25 mL,称重,超声处理60 min,冷却至室温后再次称重,用50%乙醇补足失重,摇匀,即得供试品溶液。

2.3.3 指纹图谱方法学考察

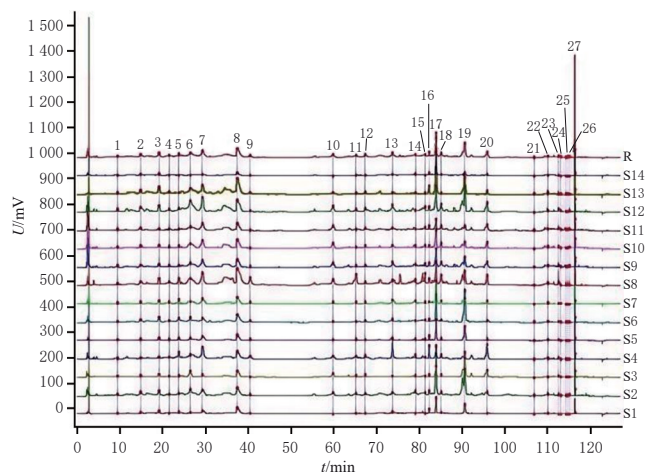
取硬尖神香草药材(编号S6)约0.5 g,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,以迷迭香酸色谱峰(峰17,保留时间适中、分离度好、稳定性强且峰面积较大)为参照,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD,以考察方法精密度(重复测定6次)、重复性(平行6份)和稳定性(室温下放置0、2、4、8、12、24 h)。结果显示,各项实验中,各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD分别不高于1.17%和2.98%($n=6$),表明方法精密度高、重复性好,且供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立与相似度分析

取14批硬尖神香草药材,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。将各样品色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价性系统(2012版)》,以S6图谱为参照,采用中位数法,设置时间窗宽度为0.1 min,经多点校正与自动峰匹配生成对照图谱(R)和叠加指纹图谱。结果(图2)显示,14批样品共有27个共有峰。通过与对照图谱比较,14批样品的相似度依次为0.836、0.888、0.932、0.936、0.933、0.975、0.941、0.941、0.950、0.909、0.965、0.979、0.970、0.836。通过与混合对照品比对,共鉴定出15个色谱峰,分别为:新绿原酸(峰2)、绿原酸(峰6)、咖啡酸(峰7)、阿魏酸(峰10)、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸(峰13)、迷迭香酸(峰17)、金合欢素(峰18)、丹酚酸B(峰19)、木犀草素(峰20)、迷迭香酸甲酯(峰21)、迷迭香酸乙酯(峰22)、β-谷甾醇(峰23)、茺花素(峰24)、山柰素(峰25)、三裂鼠尾草素(峰27)。

2.3.5 指纹图谱的聚类分析

以14批硬尖神香草指纹图谱中27个共有峰峰面积为变量,采用OriginPro 2025b软件进行聚类分析。结果显示,当平方欧氏距离为5时,14批药材可被分为三大类:S1~S7为一类,S8~S13为一类,S14为一类;27个共有峰可被分为3组:峰17为一组,峰6~8、27为一组,其余峰为一组;14批硬尖神香草和27个共有峰的分类之



2:新绿原酸;6:绿原酸;7:咖啡酸;10:阿魏酸;13:槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸;17:迷迭香酸;18:金合欢素;19:丹酚酸B;20:木犀草素;21:迷迭香酸甲酯;22:迷迭香酸乙酯;23: β -谷甾醇;24:芫花素;25:山柰素;27:三裂鼠尾草素。

图2 14批硬尖神香草的叠加指纹图谱和对照图谱(R)

间有一定的关联性,提示不同产地、不同采收时间、不同种植方式的药材质量存在一定差异。14批硬尖神香草样品的聚类分析热图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图5。

2.3.6 指纹图谱的相关性分析

为进一步探究硬尖神香草各成分间的关联程度,本研究基于14批硬尖神香草样品的27个共有峰峰面积,采用OriginPro 2025b软件进行Pearson相关性分析。结果显示,各成分之间存在较为复杂的相关性网络:在全部351组相关性数据中,正相关的有301组、负相关的有50组,其中150组相关性显著($P < 0.05$);大部分色谱峰之间呈显著正相关,如峰2(新绿原酸)、峰3、峰5、峰6(绿原酸)、峰7(咖啡酸)、峰17(迷迭香酸)、峰23(β -谷甾醇)、峰24(芫花素)、峰27(三裂鼠尾草素)($P < 0.05$)。14批硬尖神香草样品的相关性分析图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图6。

2.3.7 指纹图谱的主成分分析

使用SPSS 29.0软件对14批硬尖神香草指纹图谱中27个共有峰的峰面积进行标准化处理,并进行主成分分析。结果显示,以特征值 >1 为提取标准,共提取5个主成分,累计方差贡献率达91.0%。以载荷绝对值 >0.5 为筛选标准可知,第1主成分对应峰1、2、4~13、16、18、20、23、27,第2主成分对应峰1、3、10、17、18、21~23、25、27,第3主成分对应峰2、3、13、14、19、20、26,第4主成分对应峰19、26,第5主成分对应峰15。

2.3.8 指纹图谱的正交偏最小二乘-判别分析

以14批硬尖神香草指纹图谱中27个共有峰峰面积为变量,采用SIMCA-P 14.1软件进行正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)分析。结果显示,模型的解释能力参数(R^2X 、 R^2Y)为0.741、0.826,预测能力参数(Q^2)为

0.598,表明该模型的解释能力和预测能力均较好^[14]。由OPLS-DA的得分图(图3A)可知,S1~S8、S9~S13、S14分别处于不同象限。聚类分析和OPLS-DA这两种分析结果均表明,野生与人工栽培药材在化学成分方面存在显著差异,且S14号样本具有极为独特的化学轮廓。通过提取变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP) >1 ^[14]的色谱峰(图3B)发现,迷迭香酸(峰17)、绿原酸(峰6)、咖啡酸(峰7)、三裂鼠尾草素(峰27)、木犀草素(峰20)、阿魏酸(峰10)、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸(峰13)及峰8、5对应成分的VIP均大于1,可能是影响硬尖神香草质量的差异性标志物。

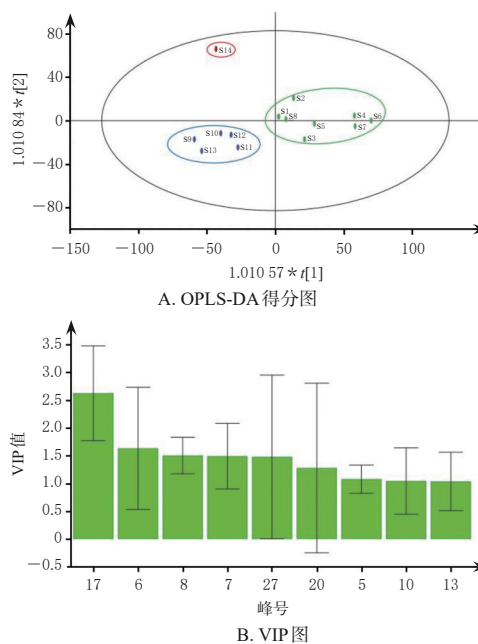


图3 14批硬尖神香草OPLS-DA统计图

2.4 硬尖神香草的Q-Marker筛选

综合网络药理学、体外实验验证、化学计量学分析可知,迷迭香酸、新绿原酸、咖啡酸、三裂鼠尾草素、木犀草素、阿魏酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、金合欢素、丹酚酸B、绿原酸可能是硬尖神香草抗哮喘气道重塑的Q-Marker。其中,槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸不仅是区分药材质量的差异性标志物,更是经细胞实验证实具有抗哮喘活性的核心药效成分,因此可将其作为硬尖神香草的关键Q-Marker。

3 讨论

Q-Marker是保障药材临床药效稳定可控的核心指标,其筛选需兼顾“理论关联性、药效有效性、化学可测性”三大原则。本研究围绕硬尖神香草Q-Marker的筛选与确证,通过网络药理学预测、细胞实验验证、指纹图谱分析3个层面,共同指向并确证其潜在Q-Marker,旨在为该药材质量控制与临床应用提供科学依据。

首先,本研究通过网络药理学构建“硬尖神香草-哮喘-成分-靶点”网络,结合分子对接技术预测了其抗哮喘的潜在Q-Marker活性成分及核心靶点。结果显示,木犀

草素、槲皮素、三裂鼠尾草素、新绿原酸、迷迭香酸等黄酮及酚酸类成分位于网络核心,可能通过调控MAPK、AGE-RAGE、IL-17等信号通路发挥抗炎、抗氧化作用。这些成分,尤其是已被证实具有抗哮喘相关活性的木犀草素、槲皮素等^[15-17],因其与药效的关联性较强,初步具备了成为Q-Marker的理论潜质,为后续药效验证与指纹图谱分析奠定了基础。

为验证上述网络药理学预测结果,本研究采用PDGF-BB诱导的HSMCs模型模拟哮喘气道重塑进行体外验证。结果证实,新绿原酸、金合欢素、丹酚酸B、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸和不同质量浓度的硬尖神香草均可显著抑制细胞增殖、迁移,减少炎症因子释放,抑制ERK1/2蛋白磷酸化。这一结果初步证实了新绿原酸等4种成分是硬尖神香草直接干预气道重塑的有效物质。上述结果从药效层面初步证实了网络药理学的预测结果。

确立Q-Marker不仅要“有效”,更要“可测”。药材质量的稳定是药效发挥的重要保障^[18],故本研究最后从药材质量控制的角度出发,通过HPLC指纹图谱对硬尖神香草进行了系统的化学表征。结果显示,14批硬尖神香草样品指纹图谱共有峰包含新绿原酸、绿原酸、咖啡酸等活性成分,确认了这些候选Q-Marker在实际药材中的可测性。进一步的化学计量学分析结果显示,不同产地、不同种植方式、不同采收时间的药材在化学成分上存在差异。迷迭香酸、绿原酸、咖啡酸、木犀草素、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸等9种成分被识别为造成样品质量差异的潜在标志物。在将已验证的有效成分(如新绿原酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸)作为Q-Marker的同时,还应纳入如迷迭香酸、三裂鼠尾草素等能有效区分药材来源、反映种植与储存条件稳定性的差异成分,从而构建一个既能关联药效,又能监控质量的多元化Q-Marker体系。其中,槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸既是药效成分又是区分不同药材的差异成分,可作为关键Q-Marker。

综上所述,本研究通过网络药理学完成理论筛选,细胞实验验证药效,指纹图谱分析确证可测性,三者共同明确硬尖神香草抗哮喘气道重塑的Q-Marker可能为迷迭香酸、新绿原酸、咖啡酸、三裂鼠尾草素、木犀草素、阿魏酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、金合欢素、丹酚酸B、绿原酸这10种成分,其中槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸为关键Q-Marker,为该药材的质量控制和资源可持续利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] HUANG K W, YANG T, XU J Y, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2019, 394 (10196): 407-418.
- [2] BENSON V S, SIDDALL J, HAQ A, et al. Disease burden, treatment patterns and asthma control in adult pa-

tients with asthma in China: a real-world study[J]. *J Asthma Allergy*, 2024, 17: 949-964.

- [3] YANG Q, SHI W. Rho/ROCK-MYOC in regulating airway smooth muscle growth and remodeling[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(1): L1-L5.
- [4] 张洪平,李茜,牛兴隆. 维吾尔药神香草的药理研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2015, 24(16): 33-34.
- [5] 毛艳,贺金华,铁偲,等. 维药神香草聚酰胺树脂柱40%乙醇洗脱物的成分分析及其对哮喘小鼠炎症的改善作用[J]. *中国药房*, 2017, 28(25): 3532-3535.
- [6] 袁凤娟,孙玉华,哈木拉提·哈斯木,等. 神香草不同洗脱物对豚鼠离体气管平滑肌收缩的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(13): 1790-1793.
- [7] 袁凤娟,胡梦颖,哈木拉提·哈斯木,等. 神香草提取物防治支气管哮喘的作用机制[J]. *中成药*, 2017, 39(4): 809-812.
- [8] 刁娟娟,古扎力努尔·艾尔肯,丁文欢. UPLC-MS/MS同时测定维药神香草中4种成分的含量[J]. *中国民族民间医药*, 2025, 34(19): 24-29.
- [9] 魏敏,孙璇. RP-HPLC同时测定硬尖神香草中4种成分含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(11): 77-79.
- [10] 王世聪,王华雨,时博,等. 仙茅的质量控制现状及质量标志物预测分析[J]. *中国药房*, 2025, 36(20): 2604-2608.
- [11] 郭春风,蒋鑫,程汝阳,等. 基于网络药理学和代谢组学的蟾宝痔疮栓抗痔疮的机制研究[J]. *中国药房*, 2025, 36(13): 1622-1628.
- [12] 吴沁航,朱丽文,陈子慧,等. 基于网络药理学及实验验证探析雷公藤治疗三阴性乳腺癌的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(6): 131-141.
- [13] CAI X C, MAO Y, SHEN X L, et al. The extract from *Hyssopus cuspidatus* Boriss. Prevents bronchial airway remodeling by inhibiting mouse bronchial wall thickening and hASMCM proliferation and migration[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 116047.
- [14] 庞会娜,范琳,肖凤琴,等. 指纹图谱结合化学计量法对葛根抗氧化活性部位的药效物质筛选[J]. *中国药房*, 2021, 32(7): 839-844.
- [15] MLCEK J, JURIKOVA T, SKROVANKOVA S, et al. Quercetin and its anti-allergic immune response[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 623.
- [16] LEE J Y, KIM J M, KIM C J. Flavones derived from nature attenuate the immediate and late-phase asthmatic responses to aerosolized-ovalbumin exposure in conscious guinea pigs[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(1): 53-60.
- [17] JANG T Y, JUNG A Y, KYUNG T S, et al. Anti-allergic effect of luteolin in mice with allergic asthma and rhinitis[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2017, 42(1): 24-29.
- [18] 刘梦云,车晓颖,刘秋怡,等. 基于质量标志物和抗氧化药效的盐巴戟天蒸制时间及特色质量标准研究[J]. *中国药房*, 2023, 34(9): 1048-1052.

(收稿日期:2025-11-06 修回日期:2026-02-28)

(编辑:舒安琴)