

基于UPLC-Q-TOF-MS和GC-MS技术结合网络药理学探究 辣木叶治疗便秘的作用机制

张明晓¹, 李化^{1*}, 陈娜¹, 向俊洁^{1,2}, 林路洁¹, 李志勇¹, 杨滨^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 江西中医药大学 院士工作站, 南昌 330004)

[摘要] **目的和方法:**应用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)和气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)技术对4个品种辣木叶(传统印度种YD,印度种的改良种PKM1,PKM1的改良种PKM2,红河一号品种HH)中的化学成分进行定性分析,结合网络药理学手段探究辣木叶治疗便秘的潜在分子机制和物质基础。**结果:**UPLC-Q-TOF-MS法采用正负离子扫描模式,根据精确相对分子质量数据和一级、二级质谱碎片离子,结合对照品信息和文献数据从4种辣木叶中共鉴定20个非挥发性共有成分;采用GC-MS法将色谱峰信息与NIST Version 1.7谱库进行检索对比,4种辣木叶中共鉴定出19个挥发性共有成分。通过SwissTargetPrediction数据库和SEA数据库对辣木叶鉴定出的共有成分靶点进行预测,整合、去重后共得到674个化学成分靶点;利用GeneCards数据库检索便秘“constipation”关键词,得到1 086个便秘相关的靶点;通过Venny平台将化学成分靶点和便秘靶点映射后得到88个交集靶点,并绘制韦恩图。利用STRING数据库和Cytoscape软件绘制蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图;通过Metascape平台进行辣木叶治疗便秘进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,结果表明辣木叶治疗便秘可能与5-羟色胺能突触通路、晚期糖基化产物/糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路和癌症通路等通路有关;同时利用Cytoscape软件绘制“成分-靶点-通路”图,推测辣木叶治疗便秘的关键成分为腺苷、紫云英苷、香叶基丙酮、2-甲基-3-辛酮、棕榈酸和油酸酰胺;关键靶点可能为肿瘤坏死因子(TNF)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、白细胞介素-6(IL-6)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、肾上腺素能受体基因 α 2A(ADRA2A),进一步通过The Human Protein Atlas数据库推测这5个靶点在结肠、小肠、直肠等多组织中均有分布。**结论:**该研究较全面地阐明4个品种辣木叶中的挥发性和非挥发性成分,明确了辣木叶通过减轻炎症状态、促进肠道运动和分泌肠液等作用而治疗便秘,可为辣木叶的进一步质量评价与临床研究提供参考。

[关键词] 辣木叶; 网络药理学; 便秘; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱; 气相色谱-质谱联用仪

[中图分类号] R284.2;R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0182-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221213 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220711.1636.001.html>

[网络出版日期] 2022-07-12 12:02

Mechanism of Moringa Folium in Treatment of Constipation Based on UPLC-Q-TOF-MS and GC-MS and Network Pharmacology

ZHANG Mingxiao¹, LI Hua^{1*}, CHEN Na¹, XIANG Junjie^{1,2},
LIN Lujie¹, LI Zhiyong¹, YANG Bin^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China; 2. Academician Workstation of Jiangxi University of
Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[收稿日期] 2022-01-25

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1706106);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04511)

[第一作者] 张明晓,在读硕士,从事中药质量评价及其药效物质基础的研究,E-mail:1822315734@qq.com

[通信作者] *李化,博士,副研究员,从事中药质量评价及其药效物质基础的研究,E-mail:lihua621@hotmail.com;

*杨滨,博士,研究员,从事中药质量评价及其药效物质基础的研究,E-mail:ybinmm@126.com

[Abstract] Objective and Method: Chemical components in four varieties of *Moringa Folium* (MF); traditional Indian YD, modified species of Indian species PKM1, modified species of PKM1 species PKM2, and red river No.1 variety HH) were qualitatively analyzed by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), and potential mechanism and material basis of MF in the treatment of constipation were revealed based on network pharmacology. **Result:** Data of accurate relative molecular mass and fragment ions in primary and secondary mass spectra in both positive and negative ion modes were acquired by UPLC-Q-TOF-MS, and then 20 nonvolatile components were identified from the four varieties by comparison with references and consulting literature reports. Nineteen volatile components were identified by comparing mass spectrometry information and that in NIST (version 1.7) based on GC-MS, and 674 chemical component targets were predicted using SwissTargetPrediction and SEA after integration and duplicate elimination. A total of 1 086 constipation-related targets were predicted using GeneCards. With Venny, 88 intersection targets were obtained by mapping chemical component targets and disease targets and venny diagram was drawn. STRING and Cytoscape were used to plot protein-protein interaction(PPI) network diagram. Gene ontology(GO) function analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway analysis were completed through Metascape, which indicated that MF treated constipation mainly via thyroid hormone signaling pathway, advanced glycation end products/receptor for advanced glycation end products(AGE/RAGE) signaling pathway, and cancer signaling pathway. Additionally, the "component-target-pathway" map was plotted by Cytoscape, which predicted that the key components of MF in the treatment of constipation were adenosine, astragaloside, geranylacetone, 2-methyloctan-3-one, palmitic acid and oleamide. Also, we inferred that the core targets might be prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), tumor necrosis factor(TNF), mitogen-activated protein kinase 1(MAPK1), alpha 2A adrenergic receptor(ADRA2A), and interleukin(IL)-6, which distributed in multiple tissues such as colon, small intestine, and rectum. **Conclusion:** This study clarified the volatile and non-volatile divisions in four varieties of MF comprehensively, and explained that MF treated constipation by reducing inflammatory state and promoting intestinal movement and secretion of intestinal fluid, which provided reference for further quality evaluation and clinical research of MF.

[Keywords] *Moringa Folium*; network pharmacology; constipation; ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); gas chromatography mass spectrometry(GC-MS)

面对国内政策大力支持中医药“引进来”战略的时代背景下,抓住“互学互鉴、文明共享”的机遇和挑战,吸收更多的优质外来药材,丰富我国中药新资源^[1]。辣木原产于印度,现广泛种植于我国广东、云南、海南等地^[2],主要品种有传统印度种(YD)及其3个改良种PKM1、PKM2、红河一号品种(HH)^[3-5]。辣木叶在2012年被我国原卫生部批准为新资源食品^[6],其不仅具有蛋白质、维生素等多种营养成分^[7],且具有黄酮类、硫苷类、酚酸类等丰富的成分^[8],在改善便秘、降血脂、抗氧化、抗炎等方面发挥了显著功效^[8-9]。其中,便秘作为一种功能性疾病,在一般人群中患病率为1%~20%^[10],儿童、老年人的患病率较高,主要临床症状表现为排便困难或不尽、大便干硬等,这极大程度影响人们的生活质

量^[11]。目前治疗便秘的主要手段包括药物治疗和非药物治疗两大类,其中非药物治疗包括调整饮食结构、增加体育锻炼等,但治疗便秘的效果不佳^[12];药物治疗包括容积性泻药、刺激性泻药、促分泌药和微生态制剂等^[13],这些西药容易产生药物耐受、远期疗效不佳^[14]。现代药理学研究表明,辣木叶能通过促进胃排空、增加胃肠蠕动和修复小肠绒毛损伤等从而改善便秘^[9,15],属于润肠通便类药材^[9,16],具有缓和、便而不泄的特点,尤其适合孕妇、老年人等体虚人群的便秘治疗,具有极大的开发价值和研究意义。

网络药理学旨在从整体角度探索药物与疾病的关联性,该模式的整体性、系统性特点符合中药的多成分、多途径、多靶点协同作用的原理。沙子

珺等^[6]利用网络药理学手段研究辣木叶治疗高血脂症的机制,发现可能与脂质代谢、动脉粥样硬化相关信号通路的蛋白表达等有关。但辣木叶通便作用机制和物质基础尚不明确,有待于进一步深入研究。本文利用超高压液相色谱四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)和气相色谱质谱联用(GC-MS)技术定性挖掘不同品种辣木叶中的共有非挥发性成分和挥发性成分,结合网络药理学手段对辣木叶便秘功效的分子机制进行直观、系统的阐释,分析其核心靶点及相关通路;为进一步深入研究辣木叶治疗便秘的药理机制及其物质基础提供研究思路 and 方向。

1 材料

1.1 仪器 Xevo G2-XS型高分辨四极杆飞行时间串联液质联用仪,MassLynx 4.1质谱工作站(美国Waters公司),QP2010 Ultra型气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司),Milli-Q型超纯水制备仪(法国Millipore公司),BT125D型1/10万分电子天平(德国Sartorius公司),FW80型高速万能粉碎机、水浴锅、98-I-B型电子控温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),冷冻干燥机(德国Christ有限公司),40目药典筛(浙江省上虞市纱筛厂)。

1.2 试剂与药材 4-*O*-(α -*L*-鼠李糖基氧基)-苄基硫代葡萄糖苷对照品(北京倍仁康生物医药科技有限公司,批号P260-P262-P280,纯度 $\geq 98.0\%$),维采宁-2、牡荆素对照品(成都普思生物科技有限公司,批号分别为PS012054、PS010335,纯度均 $\geq 98.0\%$),异槲皮苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号HC10085,纯度 $\geq 98.0\%$),紫云英苷对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB-Z-050,纯度 $\geq 98.0\%$)。甲酸、乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20191216、20150427);无水硫酸钠(北京化学试剂公司,批号20060628);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

2019年至2020年收集辣木叶的4个品种,YD(云南昆佰堂生物科技有限公司),PKM1(云南天佑科技开发有限公司);PKM2(PKM1的改良种,云南杞道农业科技发展有限公司),HH(红河谷辣木产业有限公司)。经中国中医科学院中药研究所杨滨研究员鉴定为辣木科辣木 *Moringa oleifera* 的叶片。上述不同品种的辣木叶分别干燥后,自封袋密闭包装,于-4℃冰箱贮藏;临用前粉碎,过40目筛。

2 方法

2.1 UPLC-Q-TOF-MS 条件 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m),流动相 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.3% 甲酸水(B),梯度洗脱(0~3 min, 98%~97%B; 3~6 min, 97%B; 6~12 min, 97%~90%B; 12~18 min, 90%~82%B; 18~24 min, 82%~79%B; 24~28 min, 79%~98%B; 28~30 min, 98%B);柱温 40℃,流速 0.4 mL \cdot min⁻¹,进样量 1 μ L^[17]。

采用电喷雾离子源(ESI),正负离子检测模式,离子源工作参数为毛细管电压 3.0 V,锥孔电压 30 V,锥孔反吹气流量(N₂) 50 L \cdot h⁻¹,脱溶剂气流量 900 L \cdot h⁻¹,离子源温度 100℃,脱溶剂气温度 450℃;每 0.2 s 采集 1 次图谱,离子范围 *m/z* 100~1 000,低碰撞能量 6 V,高碰撞能量 15~50 V。

2.2 GC-MS 条件 WM-5MS 毛细管色谱柱(0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m);程序升温,初始温度 60℃,保持 3 min,以 5℃ \cdot min⁻¹升至 200℃;再以 4℃ \cdot min⁻¹升至 250℃,保持 10 min。进样口温度 250℃;载气为氦气;载气流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;进样 1 μ L,分流比 5:1。采用电子轰击离子源(EI),电离电压 70 eV;接口温度 250℃,离子源温度 200℃;离子范围 *m/z* 35~500。

2.3 供试品溶液的制备 取辣木叶粉末 0.1 g (PKM1 品种),精密称定,置于具塞刻度试管中,精密加入 70% 甲醇 4 mL,70℃水浴加热 30 min,每 10 min 涡旋混匀 10 s,取出,放冷,用 70% 甲醇补足失重,经 0.22 μ m 微孔滤头滤过,用于液质分析。

取辣木叶粉末 30.0 g (PKM1 品种),精密称定,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加水 300 mL,按照 2020 年版《中华人民共和国药典》四部附录 2204(挥发油测定法-甲法)提取挥发油 3 h,以乙酸乙酯为吸收溶剂;冷却分取油层,用少量无水硫酸钠脱水,以乙酸乙酯定容至 3 mL,摇匀,经 0.22 μ m 微孔滤头滤过,用于气质分析。

2.4 对照品溶液的制备 分别取 4-*O*-(α -*L*-鼠李糖基氧基)-苄基硫代葡萄糖苷、维采宁-2、牡荆素、异槲皮苷和紫云英苷适量,精密称定,加甲醇溶解,制备质量浓度为 1.104、0.020、0.007、0.139、0.041 g \cdot L⁻¹ 的混合对照品溶液,用于液质分析。

2.5 基于网络药理学对辣木叶便秘功效的分析

2.5.1 数据库及软件 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);

Similarity Ensemble Approach(SEA)数据库(<https://sea.bkslab.org/>) ; UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) ; GeneCards 5.10 数据库 (<https://www.genecards.org/>) ; STRING 11.5 数据库 (<https://string-db.org/>) ; Metascape 平台 (<https://metascape.org/>) ; Venny 2.1.0 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) ; 微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) ; The Human Protein Atlas 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) ; Cytoscape 3.8.2 软件。

2.5.2 辣木叶化学成分及便秘相关靶点的获取

基于辣木叶的 UPLC-Q-TOF-MS 和 GC-MS 鉴别得到的 35 个化学成分 (排除结构不能确定的 2 个咖啡酰奎宁酸异构体和 2 个对香豆酰奎宁酸异构体), 利用 PubChem 数据库获得辣木叶的 Isomeric SMILES (Simplified molecular input line entry system) 信息, 将其分别导入 SwissTargetPrediction 数据库 (物种设置为“Homo sapiens”, probability>0) 和 SEA 数据库 ($P<0.01$) 获取化学成分靶点, 将两个数据库中靶点导入 UniProt 后获取靶点的标准名称, 进一步进行靶点的整合。从 GeneCards 数据库中搜索便秘关键词“Constipation”, 筛选对相关相关性 Relevance 大于 2 倍中位数的靶点。最后利用 Venny 2.1 平台筛选辣木叶化学成分与便秘的共同靶点并且绘制韦恩图。

2.5.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图的构建及核心靶点的获取

将共同靶点导入 STRING 数据库后获得蛋白之间关系的 tsv 格式文件 (模式选择“multiple proteins”, Organism 选择“Homo sapiens”, minimum required interaction score 限定为 0.7, 去除无相互作用的单一蛋白), 将其导入 Cytoscape 软件。利用 Cyto NCA 插件计算度中心性 (DC)、介数中心性 (BC)、接近中心性 (CC)、特征向量中心性 (EC)、网络中心性 (NC)、基于局部平均连通度 (LAC) 的方法, 筛选指标大于中位数的靶点作为核心靶点, 同时利用 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络图。

2.5.4 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析

将 88 个交集靶点分别导入 Metascape 平台进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 物种选择“homo sapiens”, 设最小重叠度 (min overlap)=3, P 临界值 (P cutoff)=0.01, 最小富集度 (minienrichment)=1.5。利用微生信平台进行可视化分析。

2.5.5 成分-靶点-通路图的构建

利用 Cytoscape 软件构建成分-靶点-通路图并分析辣木叶治疗便秘

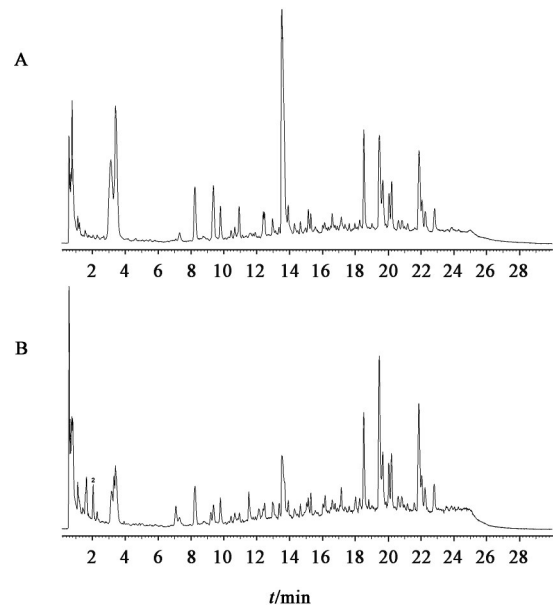
的核心靶点、关键成分和相关通路。以节点表示化学成分、核心靶点和通路, 以边来表示节点之间相互作用的关系。

3 结果

3.1 辣木叶化学成分的研究

3.1.1 UPLC-Q-TOF-MS 分析

辣木叶在正负离子模式下的总离子流见图 1, 利用 MassLynx 4.1 提取色谱峰的保留时间、实际分子质量、离子碎片等信息, 根据 EleComp Parameters 插件计算出 10 ppm 质量偏差范围内的分子式, 然后将一级、二级质谱信息与对照品信息和文献数据相比对, 初步鉴定出 4 个品种辣木叶中 20 个非挥发性共有成分, 见表 1。其中, 包括有机酸及其酯类 5 个, 生物碱类 1 个, 硫苷类 4 个, 黄酮及其衍生物类 10 个。



注: A. 正离子; B. 负离子

图 1 辣木叶 (PKM1 品种) UPLC-Q-TOF-MS 的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of Moringa Folium (PKM1)

3.1.2 GC-MS 分析

利用 GC-MS 联用仪对辣木叶总离子图中的各峰质谱扫描后获得相应的质谱图, 采用 NIST Version 1.7 谱库进行检索对比; 按照目标物与标准物的相似度达 80%, 初步鉴定出 4 种辣木叶挥发油中 19 个共有挥发性成分, 见图 2 和表 2, 包含醛类化合物 7 个、酮类化合物 4 个、烷烃类化合物 3 个、有机酸类化合物 2 个、萜类化合物 1 个、腈类化合物 1 个、生物碱类化合物 1 个。

3.2 基于网络药理学对辣木叶便秘功效的分析

3.2.1 辣木叶及便秘相关靶点的获取

基于鉴定的辣木叶化学成分通过 SwissTargetPrediction 和 SEA 数据库获取分别获得 377 和 341 个潜在相关靶

表1 4种辣木叶的共有非挥发性成分

Table 1 Common non-volatile components in four varieties of Moringa Folium

No.	t_R /min	名称	分子式	相对 分子 质量	δ /ppm	MS	MS/MS
1	1.11	苹果酸	$C_4H_6O_5$	134.09	-9.8	133.012 4	115.001 4
2	2.04	腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24	1.1	268.104 9	136.061 9、119.034 8
3	3.41	4-O-(α -L-鼠李糖基氧基)-苄基硫代葡萄糖苷 ¹⁾	$C_{20}H_{29}NO_{14}S_2$	571.57	8.9	570.100 2	328.084 5、259.010 4
4	8.23	咖啡酰奎宁酸异构体	$C_{16}H_{18}O_9$	354.31	7.9	353.090 1	191.054 3、179.032 8
5	9.35	4-O-(α -L-乙酰鼠李糖基吡喃基氧基)-硫代葡萄糖苷异构体 I	$C_{22}H_{31}NO_{15}S_2$	613.61	9.6	612.111 6	370.095 5、259.011 0
6	10.44	香豆酰奎宁酸异构体	$C_{16}H_{18}O_8$	338.31	-3.0	337.091 3	191.053 8、163.037 6
7	10.67	香豆酰奎宁酸异构体	$C_{16}H_{18}O_8$	338.31	-2.7	337.091 4	191.053 6、163.037 7
8	10.93	4-O-(α -L-乙酰鼠李糖基吡喃基氧基)-硫代葡萄糖苷异构体 II	$C_{22}H_{31}NO_{15}S_2$	613.61	4.6	612.108 5	370.095 2、259.010 9
9	12.39	咖啡酰奎宁酸异构体	$C_{16}H_{18}O_9$	354.31	0.0	353.087 3	191.054 2、179.033 1、173.043 6
10	13.53	4-O-(α -L-乙酰鼠李糖基吡喃基氧基)-硫代葡萄糖苷异构体 III	$C_{22}H_{31}NO_{15}S_2$	613.61	8.8	612.111 1	370.095 4、259.010 9
11	15.29	维采宁-2 ¹⁾	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.52	2.2	593.151 9	473.108 1、353.065 1
12	17.97	牡荆素 ¹⁾	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.38	0.7	431.098 1	311.054 7、283.059 7
13	18.52	异槲皮苷 ¹⁾	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.38	9.1	463.091 9	300.026 7、271.023 5、255.027 8
14	19.46	槲皮素丙二酰己糖	$C_{24}H_{22}O_{15}$	550.42	5.8	549.091 2	505.105 7、300.029 6、271.025 0
15	19.68	槲皮素-羟基-甲基戊二酰糖苷	$C_{27}H_{28}O_{16}$	608.50	5.3	607.133 1	505.099 0、300.026 7
16	20.05	槲皮素乙酰糖苷	$C_{23}H_{22}O_{13}$	506.41	6.9	505.101 7	300.026 9、271.023 3、255.027 7
17	20.22	紫云英苷 ¹⁾	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.38	6.9	447.095 8	284.031 4、255.028 2、227.032 8
18	21.88	山柰酚丙二酰己糖	$C_{24}H_{22}O_{14}$	534.42	3.9	533.095 2	285.040 1、255.019 4、227.033 5
19	22.06	山柰酚-羟基-甲基戊二酰糖苷	$C_{27}H_{28}O_{15}$	592.50	4.4	591.137 6	489.104 9、447.093 8、285.039 1
20	22.25	山柰酚乙酰糖苷	$C_{23}H_{22}O_{12}$	490.41	1.8	489.104 2	284.030 9、255.027 6、227.032 4

注:¹⁾经与对照品比对所得;腺苷为正离子模式,其他为负离子模式

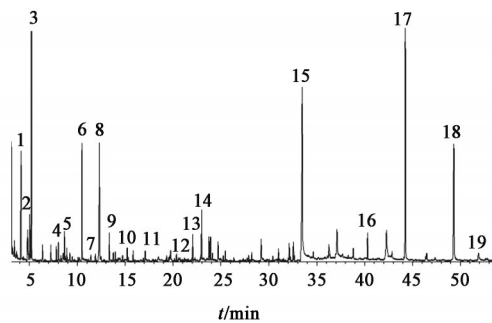


图2 辣木叶(PKM1品种)的GC-MS总离子流

Fig. 2 Total ion chromatogram of Moringa Folium (PKM1) by GC-MS

点,经过整合、删除44个重复项后,共获得674个靶点。以“constipation”为检索词,从GeneCards数据库中搜索并筛选后获得便秘靶点1 086个。对辣木叶与便秘取交集后共获得共同靶点88个,利用Venny 2.1平台绘制韦恩图,见增强出版附加材料。

3.2.2 PPI网络的构建及核心靶点的获取 利用Cytoscape软件进行对88个共同靶点进行DC、BC、

CC、EC、LAC和NC指标筛选后,筛选出24个核心靶点,边数为134条包括蛋白激酶B1(Akt1)、肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、白细胞介素(IL)-6等,PPI网络图见增强出版附加材料。

3.2.3 GO富集分析和KEGG通路分析 利用Metascape平台对88个交集靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析($P < 0.01$),GO富集主要包括生物过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)]3部分,分别对前10个条目进行可视化分析,见增强出版附加材料。BP主要与细胞对有机环化化合物的反应、对无机物的反应、蛋白质磷酸化的正调控等功能有关;CC主要与膜筏、突触后膜、谷氨酸能突触等有关;MF主要与转录因子结合、蛋白激酶活性等有关。KEGG通路主要涉及5-羟色胺能突触通路、糖尿病并发症晚期糖基化产物/糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路、癌症通路等。

3.2.4 成分-靶点-通路图的构建 利用Cytoscape

表2 4种辣木叶的共有挥发性成分

Table 2 Common volatile components in four varieties of *Moringa Folium*

No.	t_R /min	名称	分子式	相对分子质量	相似度/%
1	4.12	正己醛	C ₆ H ₁₂ O	100.16	88
2	4.80	糠醛	C ₅ H ₄ O ₂	94.09	94
3	5.23	2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	98.15	81
4	8.03	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	106.12	91
5	8.67	2-甲基-3-辛酮	C ₉ H ₁₈ O	142.24	92
6	10.48	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	120.15	95
7	11.42	氧化芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.25	92
8	12.31	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	142.24	94
9	13.34	苯乙腈	C ₈ H ₇ N	117.15	93
10	15.21	2,3-二氢-2,2,6-三甲基苯甲醛	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	88
11	17.11	壬酸	C ₉ H ₁₈ O ₂	158.24	94
12	20.37	大马酮	C ₁₃ H ₂₂ O	194.32	92
13	22.06	香叶基丙酮	C ₁₃ H ₁₈ O	190.29	93
14	22.97	β -紫罗酮	C ₁₃ H ₂₀ O	192.30	90
15	33.49	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43	91
16	40.32	正二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	296.58	95
17	46.50	正二十烷	C ₂₀ H ₄₂	282.56	94
18	49.32	正二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	352.69	94
19	51.90	油酸酰胺	C ₁₈ H ₃₅ NO	281.48	90

软件绘制成分-靶点-通路图,见增强出版附加材料。共包含83个节点、208条边。度值代表与该节点存在直接关系节点的数目,反映该节点的枢纽性的重要性,一般认为度值越大其在网络中的调控作用就越重要。成分-靶点-通路图表明,连接度较高的化学成分有香叶基丙酮(LMY32)、2-甲基-3-辛酮(LMY25)、腺苷(LMY2)、油酸酰胺(LMY39)、紫云英苷(LMY17)、棕榈酸(LMY35),预测其为辣木叶治疗便秘的主要成分。连接度较高得靶点有列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、TNF、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、 α 2A-肾上腺素能受体基因(α 2A-AR)、IL-6,预测其为辣木叶治疗便秘的主要靶点。这反映辣木叶治疗便秘具有多成分、多靶点、多通路的特点。

3.2.5 核心蛋白组织分布 利用 The Human Protein Atlas 数据库查找5个关键靶点PTGS2、TNF、ADRA2A、IL-6和MAPK1,下载tsv格式的文件,对数据中表达量NX>10的组织筛选后得到55条数据。应用Cytoscape软件构建靶点-组织分布网

络图,见增强出版附加材料。结果表明靶点在结肠(colon)、直肠(rectum)、小肠(small intestine)等多组织中均有表达。

4 讨论

本研究利用UPLC-Q-TOF-MS和GC-MS技术分别从4个品种辣木叶的甲醇提取物和挥发油中鉴别出了20个非挥发性化合物和19个挥发性化合物,涉及硫苷类、黄酮类、生物碱类等,并结合网络药理学研究方法对其治疗便秘的分子机制进行了初步探讨。结果显示,辣木叶治疗便秘的潜在活性成分有腺苷、紫云英苷、香叶基丙酮、2-甲基-3-辛酮、棕榈酸和油酸酰胺。其中腺苷作为合成环磷酸腺苷(cAMP)的前体,可通过调节cAMP/AMP/水通道蛋白3(AQP3)通路改善胃肠动力和对水分的吸收,进而改善便秘^[18];紫云英苷可以调节IL-4、IL-5等因子从而发挥抗炎作用^[19];棕榈酸可通过抑制NO的生成促进胃肠运动^[20-21],而目前未见有关香叶基丙酮、2-甲基-3-辛酮和油酸酰胺治疗便秘得有关报道。从成分-靶点-网络图可推测辣木叶治疗便秘的主要靶点为PTGS2、TNF、ADRA2A、IL-6和MAPK1蛋白。其中PTGS2通过影响前列腺素E₂的表达,引起结肠收缩,从而促进排便^[22];ADRA2A是肾上腺素能受体信号通路的重要调节因子,该通路可以促进胃肠道运动和肠液的分泌^[23-24];IL-6和TNF属于促炎症因子,过度表达将会加重胃肠道炎症状态,影响胃肠稳态;或引起肠道体液的异常分泌及对水分的异常吸收,从而引起便秘的发生^[25-26]。KEGG通路富集结果表明辣木叶治疗便秘可能与5-羟色胺能通路、ARG/RAGE通路、癌症通路等有关。5-羟色胺是一种神经递质,可引起平滑肌的收缩与舒张,它能调控治疗肠神经递质(5-HT7R)的表达来治疗便秘^[27]。AGE/RAGE是调控炎症信号的主要通路之一,可激活核转录因子(NF)- κ B,引起黏附分子、生长因子、促炎细胞因子(如IL-6、IL-8、TNF- α)等的表达和释放,进而引起慢性细胞活化和组织损伤;同时还可刺激VEGF,增加血管的通透性^[28]。LI等^[29]研究发现,AGE/RAGE可激活MAPK通路引起便秘。

综上,辣木叶成分复杂,治疗便秘的机制多样化,本研究仅对其化学成分进行定性鉴别,通过网络药理学数据平台对其治疗便秘潜在靶点的预测。对于辣木叶中多成分的定量研究、药物活性评价及其毒理分析尚需后续开展代谢组学等的研究,通过体内外实验验证其作用靶点及通路机制,阐明其治

疗便秘的作用,为辣木叶更广泛的临床应用提供科学的实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 朱晓玲. 一带一路背景下我国中医药国际化进程推进及可持续发展探讨[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(20): 172-174.
- [2] 肖伟, 于凡, 许利嘉, 等. 海上丝绸之路上的重要资源——辣木叶茶[J]. 中国现代中药, 2019, 21(7): 851-854, 919.
- [3] 董竹平, 李超, 扶雄. 不同品种辣木叶多糖的理化性质和抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 38-44.
- [4] 王思良, 楚永兴. 辣木优良家系选择初报[J]. 绿色科技, 2017(5): 13-14.
- [5] 盛军, 田洋, 赵一鹤, 等. 辣木产业关键技术创新与应用[D]. 昆明: 云南农业大学, 2019.
- [6] 沙子珺, 黎彩凤, 唐仕欢, 等. 新资源药材辣木叶抗高血脂血症的药效与作用机制探析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3465-3477.
- [7] MEIRELES D, GOMES J, LOPES L, et al. A review of properties, nutritional and pharmaceutical applications of *Moringa oleifera*: Integrative approach on conventional and traditional Asian medicine [J]. *Orient Pharm Exp Med*, 2020, 20: 495-515.
- [8] 高启霞, 沙子珺, 唐仕欢, 等. 辣木化学成分及其药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2020, 39(3): 350-359.
- [9] 党玥, 田梦媛, 王承潇, 等. 辣木叶提取物对便秘小鼠润肠通便的作用及机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4241-4247.
- [10] 刘宝华, 刘沂. 国内外便秘诊治指南比较分析[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(19): 1845-1850.
- [11] CHU H, ZHONG L, LI H, et al. Epidemiology characteristics of constipation for general population, pediatric population, and elderly population in China [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 2014: 532734.
- [12] 马继征, 刘绍能, 吴秦相, 等. 中药治疗慢性功能性便秘效果的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(10): 1213-1221.
- [13] 王冬冬, 吴相柏. 功能性便秘的诊治进展[J]. 中国全科医学, 2019, 22(24): 3016-3022.
- [14] JOHANSON J F. Review of the treatment options for chronic constipation[J]. *MedGenMed*, 2007, 9(2): 25.
- [15] 李梦薇, 刘洋, 顾文宏, 等. 辣木叶及其复方对便秘大鼠的通便作用和胃肠激素水平的影响[J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1291-1296.
- [16] 田梦媛. 辣木叶产地加工及润肠通便效果研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [17] 张明晓, 李化, 陈娜, 等. 一测多评法同时测定辣木叶中硫苷及黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2022, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20211214.203.
- [18] 王璐, 隋楠. 基于大肠主津理论助阳通便膏对便秘模型小鼠结肠组织VIP-CAMP-PKA-AQP3通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 147-151, 277-278.
- [19] 马小斐, 刘函晔, 王丹丹, 等. 紫云英苷通过NOX2/ROS/NF- κ B信号通路抑制哮喘气道炎症[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(6): 797-802.
- [20] 罗明楚, 石小翠, 孙朋, 等. 拔毒散的化学成分及其抗炎活性研究[J]. 广西植物, 2022, doi: 45.1134.q.20210617.1025.006.
- [21] 鲁光宝, 黄敬文, 王景. 膻穴埋线法对慢性传输性便秘大鼠肠神经递质类递质NO、NOS的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(S1): 196-197.
- [22] HANSEN M B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility [J]. *Physiol Res*, 2003, 52(1): 1-30.
- [23] 王文学. 昼夜节律钟通过激素和线粒体呼吸链调节结肠癌干细胞增殖[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [24] 高启霞. 辣木叶对慢性便秘的治疗作用及蛋白质组学研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2020.
- [25] YAO J, ZHAO L, ZHAO Q, et al. NF- κ B and Nrf2 signaling pathways contribute to wogonin-mediated inhibition of inflammation-associated colorectal carcinogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1283.
- [26] IMRAN M, RAUF A, SHAH Z A, et al. Chemopreventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(2): 263-275.
- [27] 樊俊阳. 枳术丸对STC模型小鼠结肠组织AchE、5-HT7R及水通道蛋白表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [28] 杨超茅, 杨志新, 马晓玲. AGEs-RAGE信号通路在糖尿病肾病中的作用机制及中医药研究进展[J]. 中医学报, 2019, 34(9): 1864-1868.
- [29] LI J H, HUANG X R, ZHU H J, et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: Implications for diabetic renal and vascular disease [J]. *FASEB J*, 2004, 18(1): 176-178.

[责任编辑 顾雪竹]