

基于UPLC-Q-TOF-MS技术和整合药理学方法探索 吴茱萸经皮成分及其治疗腹泻的分子机制

周建新^{1,2}, 沈硕^{2,3}, 杜茂波², 李玉洁^{2,3}, 孙奕², 何爱萍², 姚瑶²,
王明硕², 刘淑芝^{2*}, 尹永芹^{1*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 中国中医科学院 青蒿素研究中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)鉴定吴茱萸的透皮成分,并运用整合药理学方法揭示吴茱萸经皮治疗腹泻的分子机制。方法:综合对照品比对,UNIFI系统解析和质谱裂解规律研究等方法,实现对吴茱萸透皮成分的快速鉴定。在此基础上,借助中医药整合药理学研究平台v2.0(TCMIP v2.0),SymMap,DisGeNET及相关文献,获取吴茱萸透皮成分的潜在作用靶标和腹泻相关疾病靶标。对疾病和药物靶标集进行拓扑分析以获得核心靶标,利用基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库获得核心靶标的富集功能和通路,构建“透皮成分-核心靶标-关键通路”网络图。结果:从吴茱萸70%乙醇提取稠膏的透皮接受液中鉴定出包括喹诺酮类生物碱、柠檬苦素类、吲哚类生物碱、有机酸类和甾醇在内的19个化学成分。对药物和疾病靶标集进行拓扑分析获得174个吴茱萸经皮治疗腹泻的核心靶标,通过KEGG富集获得炎症反应、细胞增殖、信号转导、细菌感染、营养物质调节和能量代谢等信号通路。结论:吴茱萸的透皮成分通过作用于Rac家族蛋白、磷脂酰肌醇3-激酶、细胞色素P450酶和醛酮还原酶来参与肠道炎症调节,维护肠道黏膜的完整性,并通过修复和调整机体代谢发挥止泻作用,初步阐明了吴茱萸经皮治疗腹泻的分子机制。

[关键词] 吴茱萸;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS);整合药理学;腹泻;分子机制

[中图分类号] R22;R857.3;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0112-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210348

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210106.0943.003.html>

[网络出版日期] 2021-1-6 13:56

Investigation of Transdermal Constituents and Molecular Mechanism of Euodiae Fructus in Treatment of Diarrhea by Transdermal Drug Delivery Based on Integrated Pharmacology and UPLC-Q-TOF-MS

ZHOU Jian-xin^{1,2}, SHEN Shuo^{2,3}, DU Mao-bo², LI Yu-jie^{2,3}, SUN Yi², HE Ai-ping²,
YAO Yao², WANG Ming-shuo², LIU Shu-zhi^{2*}, YIN Yong-qin^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the transdermal constituents of Euodiae Fructus and predict its molecular mechanism in treating diarrhea by transdermal drug delivery. **Method:** Ultra performance liquid

[收稿日期] 20200925(005)

[基金项目] 国家级非物质文化遗产代表性项目-中医传统制剂方法[IX-4(1)]

[第一作者] 周建新,在读硕士,从事中药制剂及外用新剂型研究,E-mail:guangyaozjx@163.com

[通信作者] *尹永芹,教授,从事中药制剂及外用新剂型研究,E-mail:yongqinyin@126.com;

*刘淑芝,研究员,博士生导师,从事中药制剂及外用新剂型研究,E-mail:liushuzhi2004@sina.com

chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and integrated pharmacology methods were used. The rapid identification of transdermal constituents of *Euodiae Fructus* was realized by the means of comparison of reference substances, analysis of UNIFI system and mass spectrometry. On this basis, Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine (TCMIP) v2.0, SymMap, DisGeNET databases and literature were used to collect potential targets of transdermal constituents of *Euodiae Fructus* and targets for diarrhea-related diseases. The disease targets and drug targets were topologically analyzed to obtain the core targets, which were used for the Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Finally, Cytoscape 3.6.0 was used to build up a network of transdermal constituents-core targets-key pathways. **Result:** A total of 19 chemical constituents were speculatively identified from *Euodiae Fructus* extract, including quinolone alkaloids, limonins, indole alkaloids, organic acids and sterols. A total of 174 core targets of *Euodiae Fructus* for treating diarrhea were obtained by a topology analysis, signaling pathways of inflammatory response, cell proliferation, nutrient regulation and energy metabolism, signal transduction, bacterial infection were obtained through the analysis of KEGG enrichment. **Conclusion:** In this study, the transdermal constituents of *Euodiae Fructus* are identified for the first time, they can participate in the regulation of intestinal inflammation, maintain the integrity of intestinal mucosa, repair and adjust the metabolism of the body by acting on Rac protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, cytochrome P450 enzymes and aldo-keto reductase, respectively. In general, the molecular mechanism of *Euodiae Fructus* in the treatment of diarrhea is preliminarily elucidated.

[Key words] *Euodiae Fructus*; ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); integrated pharmacology; diarrhea; molecular mechanism

中药经皮给药属于中医外治范畴,可追溯到公元前1300年^[1]。临床上很多中药被广泛外用于皮肤科、骨科和消化科等疾病的治疗,但中药成分复杂,透皮后如何系统阐明药物的物质基础和药效机制,是一个困扰着相关研究人员的问题。目前,相关研究多以组方中的单一透皮成分作为对象^[2-3],并没有将中医整体治疗的观念贯穿其中。因此,建立一种中药透皮成分起效机制的新型研究模式具有重要意义。

超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对复杂样品具有很强的定性分析能力;采用该技术手段可以对中药透皮成分进行快速鉴定,并为后续经皮药效机制的研究提供物质基础信息。整合药理学是研究药物与机体相互作用及其整合规律、作用原理的一门学科,强调“整体与局部”“体内与体外”“体内过程与活性评价”等多层次、多环节的整合研究^[4]。将UPLC-Q-TOF-MS技术和整合药理学研究手段相结合,利用透皮成分群与药效靶点群的交互分析,可立体化地阐释中药经皮给药的物质基础和药效机制。

据2020年版《中华人民共和国药典》记载^[5],吴茱萸具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效。神阙穴给药治疗疾病历史悠久^[6],将吴茱萸贴敷神

阙穴是中医经皮给药治疗腹泻的传统方法之一。大量临床数据显示,腹泻患者经吴茱萸贴敷神阙穴给药后疗效显著^[7-8];但目前关于吴茱萸经皮给药治疗腹泻的药效物质和分子机制研究较少。因此,在本课题组前期研究基础上^[9-10],本研究以整合药理学理念为指导,通过UPLC-Q-TOF-MS和体外透皮试验获得吴茱萸的透皮成分,借助网络药理学手段探索吴茱萸治疗腹泻可能的分子作用机制。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相系统和Vion IMS QToF型高分辨质谱仪(美国Waters公司),TK-24BL型透皮扩散试验仪(上海楷凯科技贸易有限公司),JJ-500型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),ME155DU型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]

吴茱萸饮片(大庆同舟中药饮片有限公司,批号4374170601,产地江西,经中国中医科学院中药研究所陈敏研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸*Euodia rutaecarpa*的干燥近成熟果实),吴茱萸70%乙醇提取稠膏[自制,批号20200807,称取吴茱萸饮片100.04 g,加70%乙醇600 mL提取2次,每次2 h,用九号筛滤过,合并药液,于温度50℃减压浓缩至无醇味,转移至常压水浴浓缩,得到稠膏20.85 g],

吴茱萸碱、吴茱萸次碱、绿原酸、柠檬苦素、槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110802-201710, 110801-201608, 110753-201716, 110800-201707, 100081-201610, 纯度依次为99.6%, 99.7%, 99.3%, 97.9%, 99.1%), 去氢吴茱萸碱、金丝桃苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为P11N7F24697, P14A11F121347, 纯度依次为99.9%, 98%), 水为娃哈哈纯净水, 乙腈、甲酸为质谱纯, 其余试剂为分析纯。

SPF级昆明种雄性小鼠, 体质量16~18 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号SCXK(京)2016-0011。本研究所涉及动物实验经中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准, 批准号2020B142。

使用的数据库和软件有中医药整合药理学研究平台v2.0^[11](TCMIP v2.0), 疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET), 中医药证候关联数据库(SymMap), STRING 11.0, DAVID 6.8, Venny 2.1.0, Cytoscape 3.6.0及UNIFI™ 1.9.4.053。

2 方法和结果

2.1 吴茱萸透皮成分的鉴定

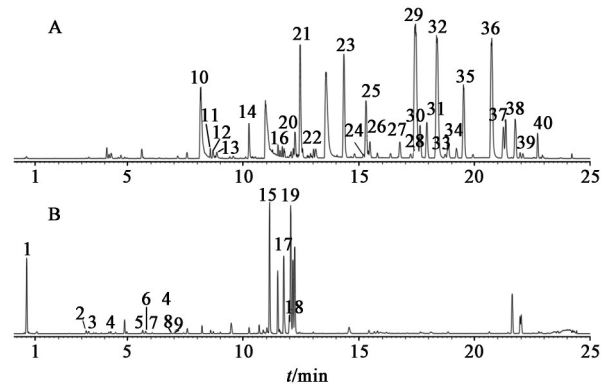
2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1.5 min, 5%~10%B; 1.5~2.5 min, 10%~15%B; 2.5~6 min, 15%~20%B; 6~9 min, 20%~35%B; 9~10.5 min, 35%~50%B; 10.5~17.5 min, 50%~65%B; 17.5~20.5 min, 65%~80%B; 20.5~21.5 min, 80%~100%B; 21.5~23 min, 100%B), 流速0.4 mL·min⁻¹, 柱温设定35 °C, 稠膏样品进样量1 μL, 透皮液样品进样量2 μL, 检测波长245 nm。

2.1.2 质谱条件 使用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式全扫描; 离子源工作参数为脱溶剂气流量1 000 L·h⁻¹, 脱溶剂气温度450 °C, 锥孔气流量设定50 L·h⁻¹, 毛细管电压3.0 kV, 锥孔电压30 V, 离子源温度120 °C, 每0.2 s采集1次图谱, 扫描范围m/z 50~1 000。

2.1.3 供试品溶液的制备 取吴茱萸70%乙醇提取稠膏0.15 g于具塞锥形瓶, 加入70%乙醇25 mL, 称定质量, 超声(功率300 W, 频率40 kHz)5 min, 放冷, 称定质量, 用70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 用0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得吴茱萸稠膏样品溶液。采用改良Franz扩散池法, 取小鼠完整腹部皮肤, 固定于扩散池和接受池之间, 扩散池中

加入吴茱萸70%乙醇提取稠膏0.50 g, 扩散面积3.14 cm², 接受液为95%乙醇-水(3:7), 磁力搅拌转速320 r·min⁻¹, 控制温度(32±0.2) °C, 搅拌24 h后取接受液, 用0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得吴茱萸透皮样品溶液。

2.1.4 透皮成分分析 通过分析各成分的保留时间、相对分子质量及相关质谱信息, 并与相应对照品和参考文献进行比对, 结果从吴茱萸70%乙醇提取稠膏中鉴定了40个化学成分, 其中有7个成分经过对照品确认, 其基峰色谱图(BPI)见图1。在此基础上, 进行了透皮成分的鉴定, 共鉴定出19个成分透过皮肤, 见图2。鉴定出的成分及其相关信息见表1。结果发现透过最多的成分是喹诺酮类生物碱, 如吴茱萸卡品碱、二氢吴茱萸卡品碱等; 其次是柠檬苦素类, 如柠檬苦素、吴茱萸苦素等; 另外, 透过皮肤的还有吲哚类生物碱(如吴茱萸碱和吴茱萸次碱), 有机酸(柠檬酸和绿原酸)和甾醇类(β-谷甾醇), 但在吴茱萸透皮样品溶液中未能检测到黄酮类成分。



A. 正离子模式; B. 负离子模式(图2同)

图1 吴茱萸提取稠膏 UPLC-Q-TOF-MS 分析的 BPI

Fig. 1 BPI chromatograms of Euodiae Fructus extract by UPLC-Q-TOF-MS

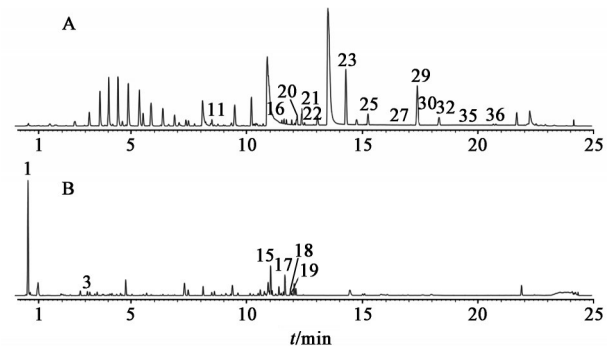


图2 吴茱萸提取稠膏透皮样品 UPLC-Q-TOF-MS 分析的 BPI

Fig. 2 BPI chromatograms of transdermal sample of Euodiae Fructus extract by UPLC-Q-TOF-MS

表1 吴茱萸提取稠膏及其透皮样品中化学成分的UPLC-Q-TOF-MS鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents in Euodiae Fructus extract and its transdermal sample by UPLC-Q-TOF-MS

化合物	t_R /min	名称	分子式	m/z			加荷 方式	特征碎片 离子	透过 皮肤
				理论值	实测值	δ /ppm			
1	0.62	柠檬酸 ^[12]	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 2	191.019 0	-1.0	[M-H] ⁻	155, 111	是
2	3.20	咖啡酰葡萄糖酸 ^[13]	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.082 2	357.082 2	0	[M-H] ⁻	195	否
3	3.30	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 3	353.086 7	-1.7	[M-H] ⁻	191	是
4	4.25	阿魏酰葡萄糖酸 ^[12]	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.097 8	371.096 8	-2.7	[M-H] ⁻	195	否
5	5.63	异槲皮苷 ^[14]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 7	463.087 8	0.2	[M-H] ⁻	301, 271, 255	否
6	5.82	金丝桃苷 ^[15]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 7	463.087 6	-0.2	[M-H] ⁻	301, 271	否
7	6.03	异鼠李素-3-O-桑布双糖苷 ^[16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 6	609.145 8	0.3	[M-H] ⁻	315	否
8	6.88	异鼠李素-3-O-芸香糖苷 ^[12]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.161 2	623.161 0	-0.3	[M-H] ⁻	315	否
9	6.99	异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷 ^[16]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.103 3	477.103 2	-0.2	[M-H] ⁻	315	否
10	8.19	去氢吴茱萸碱	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	302.129 3	302.132 3	9.9	[M+H] ⁺	286	否
11	8.56	β-谷甾醇 ^[17]	C ₂₉ H ₅₀ O	453.349 9	453.349 8	-0.2	[M+K] ⁺	304, 288, 270	是
12	8.81	吴茱萸宁碱 ^[18]	C ₁₉ H ₁₃ N ₃ O	300.113 7	300.115 9	7.3	[M+H] ⁺	285	否
13	9.16	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.050 5	303.051 2	2.3	[M+H] ⁺	287, 285	否
14	10.24	吴茱萸酰胺 ^[19]	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	346.132 2	346.135 5	9.5	[M+K] ⁺	286	否
15	11.12	吴茱萸苦素 ^[20]	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	485.181 2	485.180 2	-2.1	[M-H] ⁻	423	是
16	11.49	柠檬苦素	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 9	471.202 2	0.6	[M+H] ⁺	427, 425	是
17	11.74	吴茱萸内酯醇 ^[20]	C ₂₆ H ₂₈ O ₉	483.165 5	483.165 7	0.4	[M-H] ⁻	421, 395, 161	是
18	11.97	吴茱萸苦素乙酸酯 ^[20]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	527.191 7	527.191 2	-0.9	[M-H] ⁻	485, 467	是
19	12.04	6β-乙酰氧基-5-表柠檬苦素 ^[20]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	527.191 7	527.191 2	-0.9	[M-H] ⁻	485, 467	是
20	12.22	吴茱萸碱	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	304.145 0	304.143 3	-5.6	[M+H] ⁺	171	是
21	12.44	吴茱萸次碱	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	288.113 7	288.112 1	-5.6	[M+H] ⁺	273	是
22	12.55	1-甲基-2-[7-羟基-(E)-9-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[21]	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	356.259 0	356.257 8	-3.4	[M+H] ⁺	338, 186, 173	是
23	14.34	1-甲基-2-正壬基-4(1H)-喹诺酮 ^[22]	C ₁₉ H ₂₇ NO	286.217 1	286.216 9	-0.7	[M+H] ⁺	173	是
24	15.18	1-甲基-2-[(4Z,7Z,10E)-4,7,10-十三三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[23]	C ₂₃ H ₂₉ NO	336.232 7	336.232 6	-0.3	[M+H] ⁺	173, 186	否
25	15.29	1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₁ H ₂₉ NO	312.232 7	312.231 8	-2.9	[M+H] ⁺	186	是
26	15.47	1-甲基-2-癸基-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₀ H ₂₉ NO	300.232 7	300.232 6	-0.3	[M+H] ⁺	186	否
27	16.76	1-甲基-2-[(4Z,7Z)-4,7-十三二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₃ H ₃₁ NO	338.248 4	338.247 7	-2.1	[M+H] ⁺	186, 173	是
28	17.22	1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮异构体 ^[12]	C ₂₁ H ₂₉ NO	312.232 7	312.232 6	-0.3	[M+H] ⁺	186, 173	否
29	17.40	1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₁ H ₃₁ NO	314.248 4	314.248 5	0.3	[M+H] ⁺	186, 173	是
30	17.64	1-甲基-2-[(3E,6Z,9Z)-3,6,9-十五三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₃ NO	364.264 0	364.264 0	0	[M+H] ⁺	186	是
31	17.92	1-甲基-2-[(6Z,9Z,12E)-6,9,12-十五三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₃ NO	364.264 0	364.263 1	-2.5	[M+H] ⁺	186	否
32	18.37	吴茱萸卡品碱 ^[10]	C ₂₃ H ₃₃ NO	340.264 0	340.263 1	-2.6	[M+H] ⁺	186, 173	是
33	18.72	2-十三烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₂ H ₃₃ NO	328.264 0	328.264 6	1.8	[M+H] ⁺	186, 173	否
34	18.84	1-甲基-2-[(Z)-7-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₃ H ₃₃ NO	340.264 0	340.261 4	-7.6	[M+H] ⁺	186	否
35	19.51	1-甲基-2-[(6Z,9Z)-6,9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₅ NO	366.279 7	366.280 4	1.9	[M+H] ⁺	186	是
36	20.72	二氢吴茱萸卡品碱 ^[12]	C ₂₃ H ₃₅ NO	342.279 7	342.278 6	-3.2	[M+H] ⁺	186, 173	是
37	21.24	1-甲基-2-[(Z)-10-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₇ NO	368.295 3	368.295 4	0.3	[M+H] ⁺	256	否
38	21.34	1-甲基-2-[(Z)-9-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₇ NO	368.295 3	368.296 3	2.7	[M+H] ⁺	256	否
39	21.96	1-甲基-2-十四烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₄ H ₃₇ NO	356.295 3	356.293 1	-6.2	[M+H] ⁺	186, 173	否
40	22.72	1-甲基-2-十五烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[12]	C ₂₅ H ₃₉ NO	370.311 0	370.310 9	-0.3	[M+H] ⁺	186, 173	否

2.2 核心靶标的筛选及分析 基于上述对吴茱萸透皮成分的鉴定,进一步运用网络药理学方法研究透皮成分的作用机制。借助 TCMIP v2.0 和 SymMap 及相关文献,检索 2.1 项下透皮化合物的相关靶标,合并去重后共获得 255 个药物潜在作用靶标。通过 TCMIP v2.0 和 DisGeNET,以“腹泻(diarrhea)”为关键词进行检索,合并去重后共获得 350 个疾病靶标。将药物潜在作用靶标集和疾病靶标集导入 STRING 获得蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)关联,导入 Cytoscape 软件进行拓扑分析,设定同时满足大于节点连接度(degree),节点紧密度(closeness)和节点介度(betweenness)的中位数为卡值,选取同时满足 3 个卡值的节点为核心靶标,得到 174 个核心靶标,其中核心靶标大部分为疾病靶标,如胰岛素(INS),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1),白细胞介素-6(IL-6),表皮生长因子受体(EGFR)等;药物潜在作用靶标有白蛋白(ALB),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(CASP3),促分裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)等;药物与疾病共有 11 个靶标,即肿瘤坏死因子(TNF),前列腺素 G/H 合成酶 2(PTGS2),磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1(PIK3R1),信号转导和转录激活因子 1(STAT1),阿片类受体 μ_1 (OPRM1),细胞色素 P450 3A4 酶(CYP3A4),5-羟色胺(5-HT)转运体(SLC6A4),阿片类受体 κ_1 (OPRK1),细胞色素 P450 2B6 酶(CYP2B6),细胞色素 P450 1A2 酶(CYP1A2),糖皮质激素受体(NR3C2)。

有研究表明^[24],腹泻的发生发展与血清炎症因子水平存在一定联系。TNF- α 可刺激单核巨噬细胞释放 IL-6 和 IL-8 等促炎因子,这些因子可作用于肠壁细胞而改变肠壁的通透性;过度激活 TNF,IL-6 和 IL-8 等炎症因子的表达会导致肠黏膜损伤,抑制肠黏膜对电解质和水的吸收、促进肠分泌和蠕动,进而引起消化功能紊乱,导致腹泻。PTGS2 是调节前列腺素(PG)合成的关键酶,同时也参与调控炎症反应。据研究发现,腹泻和 PG 的分泌关联密切,PGE 和 PGF 具有促进肠上皮细胞分泌、抑制钠和水吸收的作用^[25-26];PG 也可以刺激肠平滑肌收缩,促进肠内容物向前推进,使电解质吸收减少,通过调控 PTGS2 的活性可减少 PG 释放引起的动力性腹泻。此外,腹泻常伴随腹痛,PGE₂被认为是参与痛觉过敏的主要炎症介质之一,能够参与炎性疼痛的产生或调制^[27-28]。临床研究显示,肠易激综合征(IBS)腹痛发生的机制为外周伤害性刺激激活肥大细胞分

泌 PG,5-HT 和缓激肽等多种炎症介质,通过作用于中枢神经系统从而产生痛觉^[29-30]。人类肠道受中枢神经系统和肠神经系统的双重支配,肠道不同部位有不同亚型的阿片类受体分布,内源性阿片肽可作用于 OPRM1 和 OPRK1,抑制神经递质的释放,减轻炎性疼痛,阻止肠道在炎症状态的异常运动和分泌^[31]。共有靶标中的 STAT1 在对病毒、真菌的免疫应答中起着非常重要的作用,病毒侵入细胞会通过诱导 STAT1 的降解而阻止 I 型干扰素的免疫应答,从而造成机体病毒性腹泻^[32]。在腹泻型 IBS 患者肠黏膜,SLC6A4 会大量表达^[33]。

2.3 核心靶标的功能和通路富集 将 2.2 项下核心靶标导入 DAVID 数据库,参数设置为“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”,Species 选择 homo sapiens,选择 functional annotation tool 对吴茱萸经皮治疗腹泻的核心靶标进行基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集^[34]。设置参数 $P \leq 0.05$,根据 count 值显示前十的条目,见图 3。生物过程(BP)富集结果显示核心靶标主要参与炎症反应、免疫调节及三磷酸腺苷(ATP)合成等;细胞组分(CC)主要富集到细胞膜、细胞质、细胞间隙及胞外区;分子功能(MF)主要富集到蛋白、酶及甾醇连接、蛋白激酶、生长因子、一氧化氮合酶及 ATP 酶活性调控。

KEGG 富集到的通路主要有 toll 样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway),TNF 信号通路,核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,趋化因子(chemokine)信号通路,粘着斑(focal adhesion)和 T 细胞受体(T cell receptor)信号通路等相关炎症反应通路;缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、叉头框 O(FoxO)信号通路、肾素-血管紧张素(Ras)相关蛋白 1(Rap1)信号通路和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路等细胞增殖调控通路;调节机体营养物质吸收代谢和能量代谢,维持机体内环境平衡的 Ras 信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等;机体内关键信号传导 MAPK 信号通路;以及沙门氏菌感染(Salmonella infection)。见图 4。

2.4 “透皮成分-核心靶标-关键通路”多维网络图的构建及分析 构建透皮成分、核心靶标和关键通路之间相互作用关系表,导入 Cytoscape 软件,进一步挖掘吴茱萸治疗腹泻的分子机制,见图 5。结果发现喹诺酮类生物碱直接作用的靶标有 Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1(RAC1),RAC2,MAPK14,STAT1,

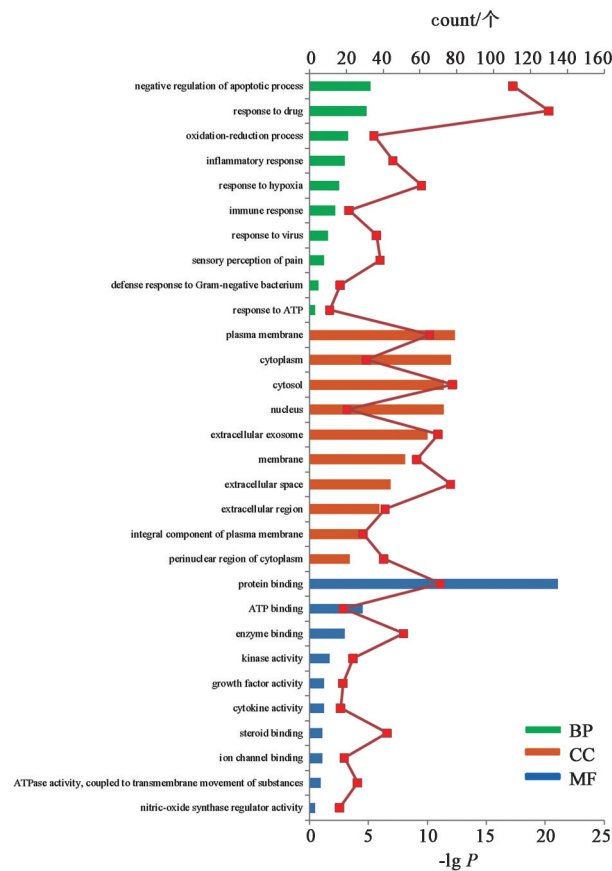


图3 吴茱萸治疗腹泻的核心靶标GO功能富集
Fig. 3 GO function enrichment of core targets from *Euodia Fructus* for treating diarrhea

PTGS2, CASP3等靶点,通过cAMP, VEGF, Rap1等信号通路发挥作用。其中富集到参与cAMP信号通路调控的喹诺酮类化合物靶点有RAC1, RAC2, 肾上腺素受体 β_1 亚型(ADRB1), 钙调蛋白3(CALM3), 5-羟色胺1A受体(HTR1A), ADRB2, 毒蕈碱型乙酰胆碱 M_1 型受体(CHRM1);参与沙门氏菌感染通路调节有RAC1, CASP1, MAPK14; Rap1信号通路富集到RAC1, RAC2, MAPK14, CALM3和酪氨酸蛋白激酶(SRC)5个靶点,每条通路均有RAC1参与。RAC1属于Ras超家族的小三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白,通过GTP结合的有活性形式和二磷酸鸟苷(GDP)结合的无活性形式循环调节多种信号转导途径,在肌动蛋白细胞骨架重组、控制细胞生长、蛋白质激酶的激活和细胞迁移中发挥重要作用。Rac作为肌动蛋白调节因子可定位于紧密连接,调节不同的信号通路。致病性大肠埃希氏菌可以通过Ⅲ型分泌系统将细菌效应蛋白传递到宿主肠道上皮细胞,破坏肠道上皮细胞紧密连接,导致肠道上皮细胞屏障和门控功能改变,从而引发腹泻^[35-36]。cAMP信号通路参与调节cAMP介导和

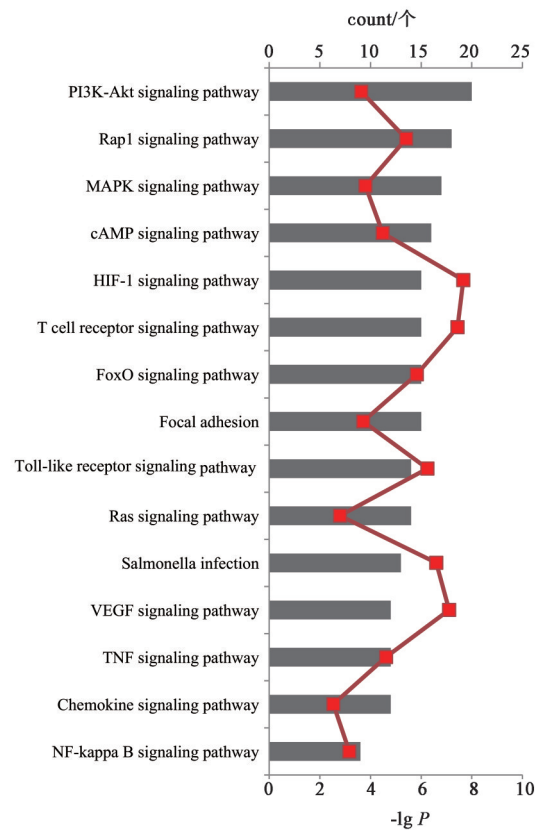
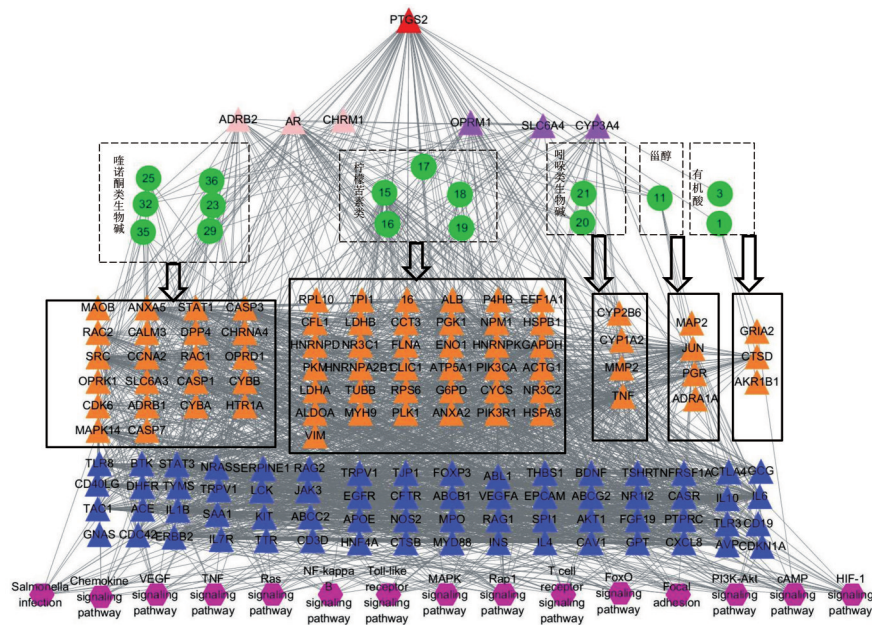


图4 吴茱萸治疗腹泻的核心靶标KEGG通路富集
Fig. 4 Enrichment of KEGG pathways of core targets from *Euodia Fructus* for treating diarrhea

RAC1依赖的内皮细胞屏障功能的稳定性,体内外实验证实不同介质刺激引起的炎症使得RAC1活化,活化的RAC1可以保护内皮细胞屏障功能^[37-38]。由PPI网络图可知,喹诺酮类化合物主要通过作用于Rac家族蛋白,参与内皮细胞屏障功能的保护与修复。

柠檬苦素类化合物直接作用的靶标有PI3K催化亚单位 α (PIK3CA), PIK3R1,核糖体S6激酶(RPS6)和细丝蛋白A(FLNA)等。关键的调控通路为HIF-1信号通路、粘着斑,其中参与调控HIF-1信号通路的药物靶点均为柠檬苦素类化合物靶点,分别为RPS6, α -烯醇化酶(ENO1), PIK3R1, PIK3CA和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。其中PIK3R1和PIK3CA作为柠檬苦素类关键靶点,参与多条通路的调节。有研究表明,缺氧环境可使NF- κ B表达增加,激活PI3K/Akt/NF- κ B通路上的信号分子,增加HIF-1 α 的活性和含量,从而介导HIF-1 α 下游靶基因环氧合酶-2(COX-2)的表达,最终引起肠道炎症反应的发生^[39-40]。而柠檬苦素类化合物可直接作用于PI3K,可能通过此途径参与肠道炎症的调节。

吡啶类生物碱直接作用的靶标主要有



圆形代表透皮成分;三角形代表靶标;六边形代表通路;橙色三角形代表直接作用靶标;蓝色三角形代表间接作用靶标;红色三角形代表四类化合物共同作用靶标;粉色三角形代表三类化合物共同作用靶标;紫色三角形代表两类化合物共同作用靶标

图5 吴茱萸治疗腹泻的“透皮成分-核心靶标-关键通路”网络分析

Fig. 5 Network analysis of transdermal ingredients-core targets-key pathways of Euodiae Fructus for treating diarrhea

CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, ADRB2, 雄激素受体 (AR)等。细胞色素 P450 酶是肝脏重要的药物代谢酶,参与人体内多种药物的催化代谢,同时还作为代谢外源性物质的重要氧化酶之一,介导许多前致癌物或前毒性物质在体内的激活及某些有害物质的解毒性代谢清除^[41]。肠黏膜上皮细胞含丰富的代谢酶,其解毒代谢维持着肠黏膜屏障的完整性^[42]。当机体发生炎症时会抑制肠黏膜细胞脱毒相关基因的表达,破坏肠黏膜屏障的完整性,损伤肠黏膜上皮屏障^[43-44]。有研究表明,吴茱萸次碱通过同时竞争性地与孕烷 X 受体(PXR)及组成型雄甾烷受体(CAR)2 条核受体通路结合,从而下调 CYP3A11 的基因表达及酶功能活性^[45];柠檬苦素对 CYP1A2 mRNA 和蛋白的表达均有诱导作用^[46]。

有机酸直接作用的靶标有 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (AMPA) 离子能谷氨酸受体 2 (GRIA2), 组织蛋白酶 D (CTSD), 醛酮还原酶家族 1 成员 B1 (AKR1B1) 等。机体发生糖原性腹泻时,肠道内糖消化和吸收功能受到损害,造成糖质积滞^[47]。肠道内的高糖条件会激活醛酮还原酶,产生大量的极性物质山梨醇,从而引起细胞渗透性水肿^[48]。由 PPI 网络可知,吴茱萸中的有机酸类成分能够直接作用于 AKR1B1 参与糖代谢,调节肠道内糖吸收与消化的平衡,从而达到治疗腹泻的目的。

3 讨论

中药具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,系统研究中药的分子作用机制十分复杂。本文以吴茱萸为研究对象,尝试将 UPLC-Q-TOF-MS 技术和整合药理学相结合,旨在建立一种立体化阐释吴茱萸经皮治疗腹泻的物质基础和作用机制的研究策略。

确定物质基础是研究药物作用机制需要面对的首要问题。对于经皮给药而言,透皮成分即为中药经皮起效的物质基础。由于皮肤屏障导致部分成分无法被透皮吸收,因此,本研究首先采用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定了吴茱萸提取物的透皮接受液中 19 个透皮成分,即潜在活性成分;然后通过数据库及文献检索获得潜在活性成分相关的作用靶标和疾病靶标,拓扑分析获得核心靶标,并对吴茱萸治疗腹泻的核心靶标进行 GO 和 KEGG 分析。此外,还构建了“透皮成分-核心靶标-关键通路”多维网络图。分析获得吴茱萸中喹诺酮类生物碱主要作用于 Rac 家族蛋白,通过参与内皮细胞屏障功能的保护与修复发挥止泻作用;柠檬苦素类化合物主要作用于 PI3K,参与肠道炎症的调节;吡咯类生物碱主要作用于细胞色素 P450 酶,维护肠黏膜屏障的完整性;有机酸主要作用于醛酮还原酶调整机体糖代谢发挥止泻作用,初步阐明了吴茱萸经皮治疗腹泻的物质基础和可能的分子机制。上述研究方法

为中药经皮起效的物质基础和分子机制研究提供了新思路,且贴合中药多成分、多靶点、多通路的作用特点,但本文研究结果尚需相应的体内外实验加以验证,从而能更加全面地解析吴茱萸通过经皮给药治疗腹泻的作用机制。

[参考文献]

- [1] 朱庆文,梁秉文. 中药经皮给药的历史发展探讨[C]//中华中医药学会. 第七届中华中医药学会中医外治学学术年会论文汇编:2011年卷. 北京:出版社不详,2011:8.
- [2] 季新燕,刘亚明,杜红,等. 红花利多卡因微乳研制及其药效学初步研究[C]//中国中西医结合学会诊断专业委员会. 中国中西医结合学会第六届全国诊断学术会议论文集:2012年卷. 北京:出版社不详,2012:2.
- [3] 惠先,徐坤,豆婧婧,等. 青藤碱传递体经皮给药的药动学和药效学研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(5):374-377.
- [4] 许海玉,侯文彬,李珂,等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(6):1-8.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:179.
- [6] 刘佳,管咏梅,陈丽华,等. 中药脐部给药系统的研究进展[J]. 世界中医药,2019,14(7):1629-1634.
- [7] 焦露露,沈丽,郎卿,等. 吴茱萸敷脐在小儿腹泻中的临床应用[J]. 世界临床医学,2016,10(7):113-115.
- [8] 王威岩,刘军,孔令丽,等. 温针灸配合吴茱萸贴敷神阙穴治疗慢性腹泻的临床观察[J]. 中国中医药科技,2020,27(1):108-109.
- [9] 殷文光,李曼玲,刘淑芝,等. SPE-HPLC测定复方吴茱萸巴布膏中吴茱萸碱和吴茱萸次碱血药浓度及药动学研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(22):2946-2949.
- [10] 杜茂波,刘淑芝,李曼玲,等. 黄连巴布剂体外释放和透皮行为的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):969-972.
- [11] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D976-D982.
- [12] 赵晓梅,程宇欣,梁彩霞,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的吴茱萸化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20202051.
- [13] WANG L, WANG D J, GUO W, et al. Four new caffeoylgluconic acid positional isomers from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2019, 21(11):1104-1111.
- [14] 刘珊珊. 吴茱萸水溶性成分及其品质评价研究[D]. 北京:首都医科大学,2016.
- [15] 刘珊珊,周兴清,梁彩霞,等. 吴茱萸水提取物化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):58-64.
- [16] LIU S S, DAI Y T, SUI F, et al. Flavonol glycosides from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2018, 20(9):867-874.
- [17] GRECA M D, MONACO P, PREVITERA L. Stigmasterols from *Typha latifolia* [J]. J Nat Prod, 1990, 53(6):1430-1435.
- [18] 黄小龙,沈冰冰,梁雪娟,等. HPLC-Q-TOF-MS/MS快速鉴别吴茱萸中的生物碱类组分[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(19):102-108.
- [19] 饶高雄,胡之璧,宋纯清. 小粒吴茱萸的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(1):28-30.
- [20] 赵楠,李达翎,李占林,等. 吴茱萸化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2016,33(2):103-109.
- [21] HUANG X, LI W, YANG X W. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4):709-714.
- [22] 尹元元,刘珊珊,韩利文,等. 吴茱萸生物碱类化学成分及其抗血管生成活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):45-53.
- [23] LING Y, HU P, ZHANG L F, et al. Identification and structural characterization of acylgluconic acids, flavonol glycosides, limonoids and alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa* by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54(9):1593-1604.
- [24] 殷跃文. 感染性腹泻患儿炎症因子水平的变化、病原学特点及相关危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(6):716-720.
- [25] 程晓华,张秋丽,巩小琳,等. 四神丸联合美沙拉秦治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 现代药物与临床,2018,33(5):1085-1088.
- [26] 王魁. 前列腺素与腹泻[J]. 中国兽医杂志,1990(12):45-46
- [27] VIEIRA A S, ARALDI D, DIAS E V, et al. Janus kinase 2 activation participates in prostaglandin E₂-induced hyperalgesia [J]. Life Sci, 2016, 166:8-12.
- [28] 黄冰晴,王兵丽. 前列腺素E₂及其受体对炎性痛调制的研究进展[J]. 闽南师范大学学报:自然科学版,2017,30(2):65-70.
- [29] 俞星,王承党. 肠易激综合征腹痛的发生机制和治疗[J]. 胃肠病学,2012,17(11):689-691.
- [30] 王静,徐萍,诸琦. 5-羟色胺转运体在肠易激综合征

- 腹痛机制中的研究[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(6): 398-401.
- [31] 董凤良, 杜方民, 董小芳, 等. 阿片类药物导致便秘的机制及治疗[J]. 医学综述, 2014, 20(2): 288-291.
- [32] GUO L J, LUO X L, LI R, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infection inhibits interferon signaling by targeted degradation of STAT1 [J]. J Virol, 2016, 90(18): 8281-8292.
- [33] KATSUMATA R, SHIOTANI A, MURAO T, et al. Gender differences in serotonin signaling in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Intern Med, 2017, 56(9): 993-999.
- [34] 曼琼, 王婷婷, 唐纯玉, 等. 基于整合药理学策略分析小儿扶脾颗粒对功能性消化不良的精准应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 173-179.
- [35] MCNAMARA B P, KOUTSOURIS A, O'CONNELL C B, et al. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function [J]. J Clin Invest, 2001, 107(5): 621-629.
- [36] DEAN P, KENNY B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein [J]. Mol Microbiol, 2004, 54(3): 665-675.
- [37] SCHNOOR M, LAI F P L, ZARBOCK A, et al. Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability *in vivo* [J]. J Exp Med, 2011, 208(8): 1721-1735.
- [38] 潘舟, 张桓铭, 周青山. 炎症状态下内皮屏障功能的变化及其机制[J]. 职业与健康, 2018, 34(22): 3162-3168.
- [39] ZHANG B L, XU R L, QIN Y W, et al. Potential candidate genes for alveolar hypoxia identified by transcriptome network analysis [J]. Medicina (Kaunas), 2012, 48(11): 572-580.
- [40] 胡璐璐, 赫玉宝, 张方信. 急进高原缺氧环境下TLR4、HIF-1 α 对肠黏膜屏障的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(10): 1212-1218.
- [41] 余奇. 吴茱萸次碱对细胞色素P450酶活性的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2006.
- [42] 李思荃, 许研, 于长志, 等. 别旁茶苷对LPS诱导CRL-1790细胞释放炎症因子的影响及作用机制[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(4): 474-479.
- [43] YANG Q F, CHEN B L, ZHANG Q S, et al. Contribution of MDR1 gene polymorphisms on IBD predisposition and response to glucocorticoids in IBD in a Chinese population [J]. J Dig Dis, 2015, 16(1): 22-30.
- [44] KUANG X Z, LI W, KANNO Y, et al. Cycloartane-type triterpenes from *Euphorbia fischeriana* stimulate human CYP3A4 promoter activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(23): 5423-5427.
- [45] 黄凌, 邝少轶, 张丽. 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经PXR、CAR核受体通路影响CYP3A4表达的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(35): 3274-3279.
- [46] 董飞, 张小平, 聂丽云, 等. 丁香酸和柠檬苦素对小鼠肝脏CYP450酶的影响[J]. 药学研究, 2017, 36(11): 638-642.
- [47] 成焕文, 谢孝榕, 余玉君. 胰岛素治疗小儿“顽固性”腹泻[J]. 贵州医药, 1991(5): 282-283.
- [48] 何敏慧. 醛糖还原酶与糖尿病微血管并发症[J]. 杭州医学高等专科学校学报, 2002(3): 95-97.

[责任编辑 刘德文]