

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.011

西帕依固龈液成分鉴定及其治疗复发性阿弗他溃疡作用机制的网络药理学研究*

马璇^{1,2}, 范晨阳², 季志红², 李柯翔², 聂继红^{3△}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新奇康药业股份有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 鉴定西帕依固龈液的化学成分,探讨其治疗复发性阿弗他溃疡(RAU)的作用机制。方法 采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法分析西帕依固龈液的化学成分。利用文献挖掘及查询中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和比较药理学(CTD)数据库,筛选处方有效成分及各药物的作用靶点。通过 GEO, DisGeNET, Human Phenotype Ontology, DrugBank 数据库获取 RAU 疾病靶点。取药物-疾病交集靶点,使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建复方靶点网络,对核心靶点进行基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。结果 共获得没食子酸等 11 个化学成分的 914 个靶点,RAU 的 206 个疾病靶点,肿瘤坏死因子(TNF)、 γ 干扰素(IFN- γ)等 33 个交集靶点;GO 富集分析得到脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应等 920 项,其中生物过程 877 项,细胞成分 10 项,分子功能 33 项;KEGG 通路分析得到核因子(NF)- κ B、低氧诱导因子-1(HIF-1)、程序性坏死、细胞因子-细胞因子受体相互作用等 12 条信号通路。结论 西帕依固龈液所含没食子酸等核心成分能作用于 TNF 及 IFN- γ 等基因,继而调控 NF- κ B 及 HIF-1 等多条信号通路,从而发挥治疗 RAU 的作用。

关键词:网络药理学;超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法;复发性阿弗他溃疡;西帕依固龈液;作用机制

中图分类号:R965;R988.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)02-0041-05

Identification of Chemical Components of Xipayi Mouth Rinse Fluid and Its Mechanism in the Treatment of Recurrent Aphthous Ulcer Based on Network Pharmacology

MA Xuan^{1,2}, FAN Chenyang², JI Zhihong², LI Ke'ao², NIE Jihong³

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830011; 2. New Cicon Pharmaceutical Co., Ltd., Urumqi, Xinjiang, China 830011;

3. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830000)

Abstract: Objective To identify the chemical components of Xipayi Mouth Rinse Fluid, and to investigate its mechanism in the treatment of recurrent aphthous ulcer (RAU). **Methods** Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to analyze the chemical components of Xipayi Mouth Rinse Fluid. The literature was mined and the database of the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Comparative Toxicogenomics Database (CTD) was searched to screen the effective components of the prescription and the action targets of each Chinese herbal medicine. RAU disease targets were obtained from GEO, DisGeNET, Human Phenotype Ontology and DrugBank databases. The drug-disease intersection target was taken to construct the compound target network by the Cytoscape 3.7.2 software, Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were conducted on the core target. **Results** A total of 914 targets of 11 chemical components such as gallic acid, 206 disease targets of RAU, and 33 intersection targets such as tumor necrosis factor (TNF) and interferon γ (IFN- γ) were obtained. A total of 920 items such as response to lipopolysaccharide and response to molecule of bacterial origin were obtained by GO enrichment analysis, including 877 biological processes, 10 cellular components and 33 molecular functions. Twelve signal pathways such as nuclear factor (NF)- κ B, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), programmed necrosis and cytokine-cytokine receptor interaction were obtained by KEGG pathway analysis. **Conclusion** Core components such as gallic acid in Xipayi Mouth Rinse Fluid can act on TNF, IFN- γ and other genes, and then regulate NF- κ B, HIF-1 and other signaling pathways, so as to play a role in the treatment of RAU.

Key words: network pharmacology; UHPLC-Q-TOF-MS/MS; recurrent aphthous ulcer; Xipayi Mouth Rinse Fluid; mechanism

复发性阿弗他溃疡(RAU)为临床常见口腔黏膜疾病,常反复发作,病因尚不明确,主要与遗传及免疫、细菌因素、微量元素缺乏及食物抗原、精神因素、机械损

伤、系统疾病及激素紊乱、氧化应激等有关^[1-2]。目前多采用局部治疗与全身治疗相结合,以达到缩短溃疡发作期、延长间歇期、减轻疼痛和减少溃疡数量的目的^[3]。

*基金项目:新疆维吾尔自治区药学会科研基金[YXH201903]。

第一作者:马璇,女,在读博士研究生,高级工程师,研究方向为中药新药的作用机制,(电子信箱)mx646@163.com。

△通信作者:聂继红,女,主任药师,教授,研究方向为中药制剂,(电子信箱)xjnjh411@163.com。

西帕依固龈液以没食子为原料经现代工艺制成,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》^[4],有健齿固龈、清血止痛等功效,用于治疗口腔疾病。临床研究表明,西帕依固龈液可明显减少复发性口腔溃疡数,缩小溃疡直径,对口腔黏膜无刺激性^[5-6]。本研究中通过网络药理学手段分析西帕依固龈液中化合物可能的作用靶点及作用途径,预测其治疗 RAU 的机制。现报道如下。

1 化学成分鉴定

1.1 仪器与试剂

仪器: H-Class 型超高效液相色谱仪及 XEVO - G2XS QTOF 型质谱仪(美国 Waters 公司)。

试剂: 西帕依固龈液(新奇康药业股份有限公司,批号为 20190905)。

1.2 方法与结果

1.2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 1 min 时 1%B, 1 ~ 5 min 时 10%B, 5 ~ 50 min 时 25%B, 50 ~ 80 min 时 30%B, 80 ~ 90 min 时 50%B, 90 ~ 100 min 时 90%B); 流速为 0.8 mL/min。

质谱条件: 负电离(ES⁻)扫描模式, 毛细管电压 2.5 kV; 样品锥孔电压 40.0 kV, 源温度 100 °C, 去溶剂温度 250 °C, 锥孔气流量 50.0 L/h, 去溶剂气流 600.0 L/h。

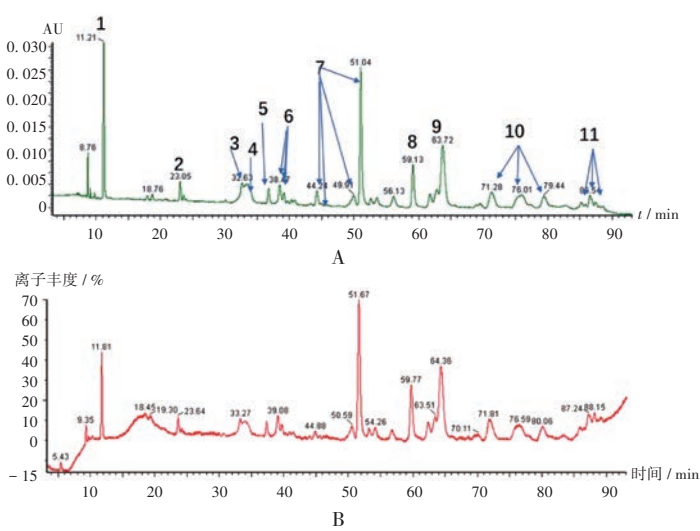
1.2.2 试验结果

采用液相色谱 - 质谱法分析, 结果见图 1。经过分子量比对, 查阅文献^[7-8], 鉴定出 8 种化学成分, 详见表 1。

2 网络药理学研究

2.1 活性成分及靶点收集

文献挖掘西帕依固龈液中 8 个化学成分, 质谱分析得 11 个化学成分, 去重后共获得 914 个靶点。



A. 高效液相色谱图 B. 总离子流图
图 1 西帕依固龈液高效液相色谱图与总离子流图

A. HPLC chromatograms B. Total ion chromatograms
Fig. 1 HPLC chromatograms and total ion chromatograms of Xipayi Mouth Rinse Fluid

2.2 RAU 疾病靶点收集

以“recurrent aphthous ulcer(stomatitis)”为关键词在 DisGeNET, Human Phenotype Ontology 和 DrugBank 数据库进行搜集, 分别获得 RAU 基因 27, 11, 117 个; 从 GEO 数据库(系列: GSE37265)获得 RAS 的差异表达基因, 利用 RStudio 进行分析, 共获得差异表达基因 80 个, 前 20 个见图 2 (红色代表基因上调, 黑色代表未发生差异表达, 绿色代表基因下调)。获得的差异表达基因作为 RAU 的相关靶点, 与 DisGeNET、Human Phenotype Ontology 和 DrugBank 数据库获得的靶点取交集, 共获得 206 个疾病靶点。

2.3 复方靶点网络构建、基因本体论(GO)富集及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析

将西帕依固龈液活性成分 914 个靶点与 RAU 疾病 206 个靶点取交集, 获得 33 个靶点。反向寻找, 获得 5 个

表 1 西帕依固龈液化学成分鉴定结果

Tab. 1 Identification of chemical components in Xipayi Mouth Rinse Fluid

峰号	中文名称	英文名称	CAS 编号	分子式	[M - H] ⁻
1	没食子酸	gallic acid	149-91-7	C ₇ H ₆ O ₅	169.0171
2	1,6-O-没食子酰基葡萄糖	1,6-di-O-galloyl-D-glucose	469-32-9	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.8664
3	1,2,6-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose	79886-49-0	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	636.7737
4	间/对双没食子酸	p/m-digallic acid	536-08-3	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	320.9137
5	1,3,6-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,3,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose	18483-17-5	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	636.7789
6	1,4,6-O-没食子酰基-β-D-吡喃葡萄糖	1,4,6-trigalloylglucose	94513-58-3	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.7822
7	1,2,3,6-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	tetragalloyl-glucoside	79886-50-3	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	786.6801
8	1,2,3,4,6-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose	14937-32-7	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.5850
9	1,2,3,4,6-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose	50678-27-8	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	940.5893
10	齐墩果酸甲酯	methyl oleanolate	1724-17-0	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	469.0516
11	3-O-咖啡酰基齐墩果酸	3-O-Caffeoyloleanic acid	97534-10-6	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	620.7631

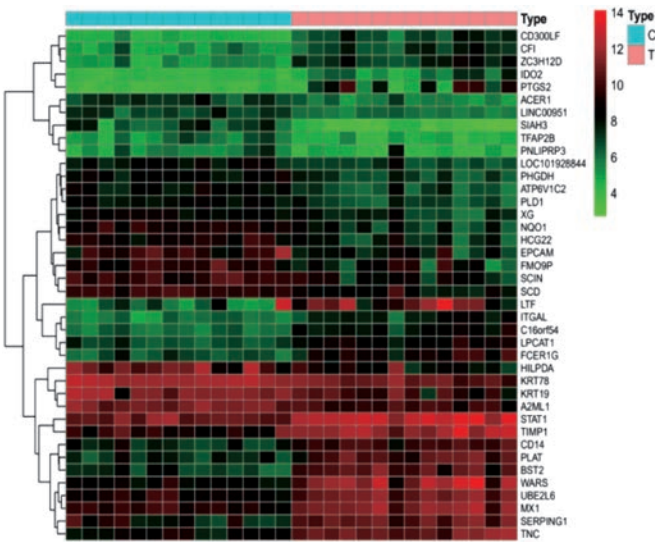


图 2 差异表达基因热图

Fig. 2 Heatmap of differentially expressed genes

对应的化学成分(见表 2),导入 Cytoscape 3. 7. 2 软件,构建复方靶点的网络图,结果见图 3(绿色代表活性成分,红色代表基因)。

表 2 西帕依固龈液治疗 RAU 靶点对应化学成分

Tab. 2 Chemical components corresponding to the target of Xipayi Mouth Rinse Fluid in the treatment of RAU

编号	中文名称	英文名称	CTD 编号	CAS 号
1	没食子酸	gallic acid	D005707	149 - 91 - 7
2	鞣花酸	ellagic acid	D004610	476 - 66 - 4
3	β -谷甾醇	β -sitosterol	C025473	64997 - 52 - 0
4	槲花双黄酮	amentoflavone	C011164	1617 - 53 - 4
5	棕榈酸	palmitic acid	D019308	57 - 10 - 3

对 33 个基因进行 GO 富集分析,共获得 920 项,其中生物过程(BP)877 项,细胞成分(CC)10 项,分子功能(MF)33 项($P < 0. 01$), P 值较小的前 10 项富集结果见图 4。前 3 个生物过程为对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、细胞因子产生的正调控,前 3 大细胞组成为膜筏、膜微区、膜区,前 3 项分子功能为细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性。

对 33 个潜在基因进行 KEGG 通路分析,共获得 12 条通路($P < 0. 01$),结果见图 5。前 4 条信号通路为 NF- κ B

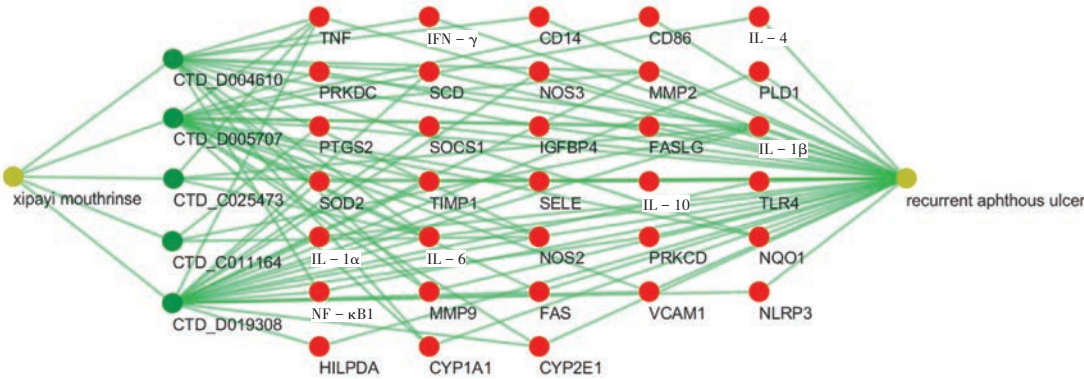


图 3 西帕依固龈液 RAU 靶点网络

Fig. 3 Network of Xipayi Mouth Rinse Fluid - RAU target

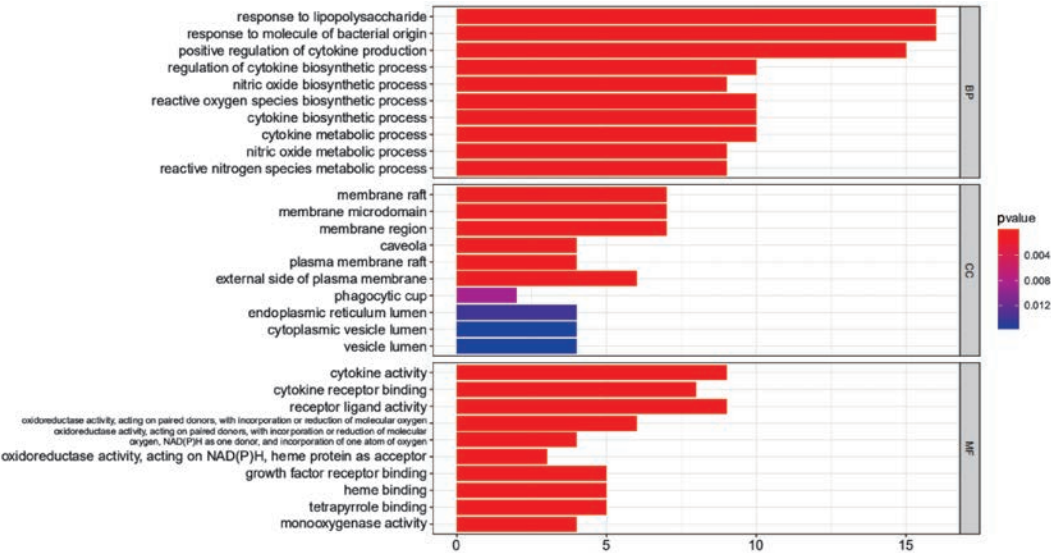


图 4 西帕依固龈液治疗 RAU 基因 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of Xipayi Mouth Rinse Fluid in the treatment of RAU gene

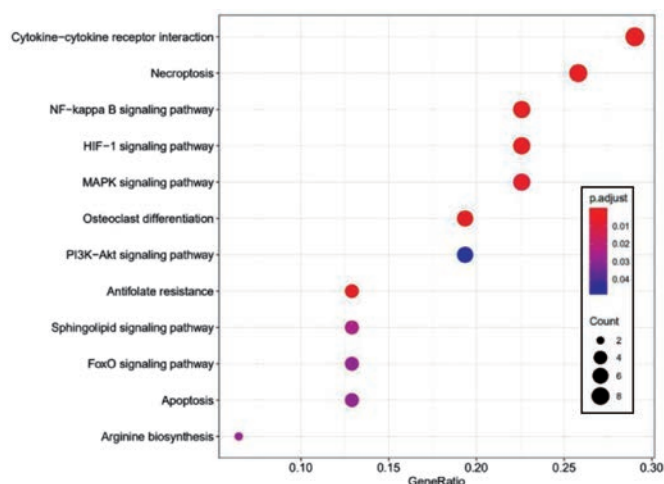


图5 西帕依固龈液治疗RAU基因KEGG通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis of Xipayi Mouth Rinse Fluid in the treatment of RAU gene

信号通路、HIF-1信号通路、程序性坏死、细胞因子-细胞因子受体相互作用。

3 讨论

本研究中利用液相色谱/质谱和网络药理学技术构建了西帕依固龈液治疗RAU的靶点网络。结果表明,西帕依固龈液中5个化学成分对多个靶点均有影响,如没食子酸、鞣花酸和棕榈酸分别作用于FAS和CYP2E1靶点。没食子酸类物质具有抗癌^[9]、抑菌^[10]、抗炎^[11]、抗病毒^[12]、促进细胞凋亡^[13]等多种药理活性。鞣花酸清除自由基的能力很强,具有抗氧化^[14]作用,还可通过影响NK细胞活性而起到一定的免疫调节作用^[15]。

目前的研究认为,RAU的发生、发展与细胞因子如白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)以及转化生长因子(TGF)有关,包括IL-6,IL-10,IL-4,IL-18,IFN- γ ,TNF- α ,TGF- β 等^[16-18]。网络药理学分析发现,西帕依固龈液治疗RAU最相关的通路为NF- κ B信号通路、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、程序性坏死与细胞因子-细胞因子受体相互作用,通路中涉及的抗炎、镇痛相关靶点包括IL-6,TNF,FAS等,与目前研究的RAU主要靶点相一致。临床研究表明,西帕依固龈液能降低慢性牙周炎患者龈沟液中的TNF- α ,IL-6,IL-8水平,升高超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平^[19]。西帕依固龈液能抑制模型大鼠牙龈炎牙龈组织中核因子(NF)- κ B-p65和环氧合酶(COX-2)的表达^[20];同时,西帕依固龈液可明显抑制前列腺素E₂(PGE₂)的合成与分泌^[21]。没食子提取物可抑制口腔细菌生物膜中葡萄糖转移酶的(GTF)活性,发挥防龋作用^[22]。

IL-6是炎性疼痛的重要参与因子,可通过增加TNF- α ,诱导产生前列腺素而引起疼痛反应^[15]。此外,

RAS的发生也有细菌因素,正常人群口腔内细菌的种类主要由9个细菌门组成,RAU患者口腔菌群发生了改变^[2,23]。酶促抗氧化系统在RAU的发病机制中起了关键作用,RAU患者血清中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、TNF- α 、髓过氧化物酶(MPO)、总氧化状态(TOS)水平和氧化应激指数(OSI)升高,一氧化氮(NO)、IL-10和抗氧化状态(TAS)水平降低^[24-25]。

综上所述,西帕依固龈液所含没食子酸等核心成分能作用于TNF,IFN- γ 等基因,继而调控NF- κ B,HIF-1等多条信号通路,从而发挥治疗RAU的作用。

参考文献

- [1] 吴艳,刘炳林.复发性阿弗他溃疡新药临床试验设计的考虑[J].中国临床药理学杂志,2020,36(8):1028-1031.
- [2] 蔡若林,毕玮,余优成.复发性阿弗他溃疡(RAS)发病因素的研究进展[J].复旦学报(医学版),2019,46(4):562-565.
- [3] 中华医学会.临床诊疗指南口腔医学分册[M].北京:人民卫生出版社,2016:71-73.
- [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:123-124.
- [5] 袁媛.西帕依固龈液在复发性口腔溃疡患者临床治疗中的应用效果[J].医疗装备,2021,34(2):84-85.
- [6] 李颖,孙江.西帕依固龈液联合牙周基础疗法治疗老年慢性牙周炎的临床观察[J].航空航天医学杂志,2021,32(2):175-177.
- [7] SHRESTHA S, KAUSHIK VS, ESHWARAPPA RSB, et al. Pharmacognostic studies of insect gall of Quercus infectoria Oliver (Fagaceae)[J]. Asian Pac J Trop Biomed,2014,4(1):35-39.
- [8] 刘延麟,邓旭明,王大成,等.土耳其椴子化学成分及抑菌活性的研究[J].林产化学与工业,2008,28(4):11-13.
- [9] JANG YG, KO EB, CHOI KC. Gallic acid, a phenolic acid, hinders the progression of prostate cancer by inhibition of histone deacetylase 1 and 2 expression[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry,2020,84:108444.
- [10] JEON MJ, HA JW. Bactericidal and synergistic effects of X-ray irradiation and gallic acid against foodborne pathogens on lettuce[J]. Food Microbiology,2020,92:103584.
- [11] NGUYEN-NGO C, SALOMON C, LAI A, et al. Anti-inflammatory effects of gallic acid in human gestational tissues in vitro[J]. Reproduction,2020,160(4):561-578.
- [12] 张文宁.没食子酸体外抗人四型腺病毒(HAdV-4)作用及机制研究[D].福州:福建中医药大学,2017.
- [13] 李万宏,乐祥鹏,李熙成,等.没食子酸对小鼠TM3细胞凋亡的影响[J].吉林农业大学学报,2020,42(5):581-586.
- [14] 王丹,王悦欣,汪熠,等.鞣花酸对皮肤基底细胞癌A431和HSC-2细胞增殖、凋亡、侵袭能力的影响[J].癌症进展,2020,18(4):356-358.
- [15] 姜成哲,张乾坤,金庆日,等.鞣花酸对脾淋巴细胞增殖、