

基于体外透皮成分分析的靶向网络药理学结合分子对接的儿泻康贴膜药效物质基础及作用机制研究

王甜¹, 宋紫腾^{2,3}, 罗春⁴, 郝艳琦^{2,3}, 朱加华⁴, 余彩霞⁴, 许浚^{2,3*}, 张铁军^{2,3*}, 刘昌孝²

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

3. 和光中药科技(天津)有限公司, 天津 300462

4. 上海儿童营养中心, 上海 201403

摘要: 目的 通过高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)分析儿泻康贴膜体外透皮接收液的化学成分, 结合网络药理学和分子对接技术初步预测其治疗小儿腹泻、腹痛的药效物质基础及作用机制。方法 采用HPLC-Q-TOF-MS/MS于正、负离子模式下扫描, 确认儿泻康贴膜透皮化学成分。选取19个主要活性成分为研究对象, 利用Swiss Target prediction数据库收集化合物潜在作用靶点; 通过GeneCards、OMIM、Drugbank数据库获取小儿腹泻、腹痛相关疾病靶点; 借助String 12.0网络分析平台, 获得活性成分与疾病交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 从而筛选出核心靶点; 利用Omicsbean在线分析平台对交集靶点进行基因本体(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 进一步通过Cytoscape3.9.1软件构建网络图; 运用Schrödinger2020 Maestro12.4软件将10个主要活性成分与15个核心靶点进行分子对接, 验证其结合能力。结果 儿泻康贴膜体外透皮接收液共鉴定出90个成分, 包括生物碱类、黄酮类、有机酸类、苯丙素类、三萜类、苦味素及其他类; 选取的19个活性成分治疗小儿腹泻、腹痛的潜在作用靶点共260个, 经PPI网络分析筛选出肿瘤蛋白p53(TP53)、信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)、表皮生长因子受体(EGFR)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)等15个核心靶点; KEGG通路富集共得到166条通路, 筛选出与疾病密切相关的通路共90条, 包括磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、神经营养素信号通路、白细胞介素17信号通路等重要信号通路。分子对接结果显示, 儿泻康贴膜中10个主要活性成分与15个核心靶点蛋白间结合能力较强, 能形成稳定的复合物。结论 通过HPLC-Q-TOF-MS/MS获得儿泻康贴膜体外透皮成分, 结合网络药理学和分子对接技术初步确定了儿泻康贴膜发挥多成分、多靶点、多途径治疗小儿腹泻、腹痛的潜在药效物质基础及作用机制。

关键词: 儿泻康贴膜; 体外透皮成分; 网络药理学; 分子对接; 桂皮醛; 丁香酚; 乙酸丁香酚酯; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 胡椒碱; 吴茱萸次碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)10-2261-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.006

Targeted network pharmacology based on analysis of transdermal constituents *in vitro* combined with molecular docking to study substance basis and mechanism of Erxiekang Emplastra

WANG Tian¹, SONG Ziteng^{2,3}, LUO Chun⁴, HAO Yanqi^{2,3}, ZHU Jiahua⁴, YU Caixia⁴, XU Jun^{2,3}, ZHANG Tiejun^{2,3}, LIU Changxiao²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 国家自然科学基金委员会重点项目(81830111)

第一作者: 王甜, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: wt20220222@163.com

*共同通信作者: 许浚, 研究员, 研究方向为中药质量和中药大品种二次开发。E-mail: xuj@tipr.com.cn

张铁军, 研究员, 研究方向为中药资源、中药质量和新产品开发。E-mail: zhangtj@tipr.com.cn

3. Heguang Chinese Medicine Technology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300462, China

4. Shanghai Children's Nutrition Center, Shanghai 201403, China

Abstract: Objective To analyze the chemical components of the transdermal receiving solution of Erxiekang Emplastra *in vitro* by HPLC-Q-TOF-MS/MS, and to preliminarily predict the pharmacodynamic material basis and mechanism of its efficacy in treating children's wind-cold diarrhea by network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** HPLC-Q-TOF-MS/MS was used to scan in positive and negative ion mode to confirm the transdermal chemical components of Erxiekang Emplastra. A total of 19 main active components were selected as the research objects, and the potential targets of the compounds were collected by Swiss Target prediction database. The targets of diseases related to wind-cold diarrhea in children were obtained through GeneCards, OMIM and Drugbank databases. STRING network analysis platform was used to obtain the protein-protein interaction (PPI) network of active ingredients and disease targets was obtained, so as to screen out the core targets. On-line analysis platform of Omicsbean was used to analyze the function of gene ontology (GO) and the pathway enrichment of Kyoto Gene and Genome Encyclopedia (KEGG), and then the network diagram was constructed by Cytoscape software. Schrodinger2020 Maestro12.4 software was used to perform molecular docking between 10 main active ingredients and 15 core targets to verify their binding ability. **Results** A total of 90 components were identified from the transdermal receiving solution of Erxiekang Emplastra *in vitro*, including alkaloids, flavonoids, organic acids, phenylpropanoids, triterpenoids, picrosins and others. There were 260 potential targets of 19 active ingredients in the treatment of wind-cold diarrhea in children, and 15 core targets, such as tumor protein p53 (TP53), signal transduction and transcription activating protein 3 (STAT3), epidermal growth factor receptor (EGFR) and serine/threonine protein kinase 1 (AKT1) were screened out by PPI network analysis. A total of 166 pathways were obtained by enrichment of KEGG pathway, and 90 pathways closely related to the disease were screened out, including phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B signaling pathway, mitogen-activated protein kinase signaling pathway, serotonin synapse, neurotrophic signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway. The results of molecular docking showed that the 10 main components in Erxiekang Emplastra had strong binding ability with 15 core target proteins and could form stable complexes. **Conclusion** All the transdermal components of Erxiekang Emplastra were obtained by HPLC-Q-TOF-MS/MS, and combined with network pharmacology and molecular docking technology, the potential material basis and mechanism of Erxiekang Emplastra in treating children's diarrhea with multi-components, multi-targets and multi-channels were preliminarily determined.

Key words: Erxiekang Emplastra; transdermal constituents *in vitro*; network pharmacology; molecular docking; cinnamaldehyde; eugenol; eugenol acetate; limonin; evodiamine; piperine; rutecarpine

小儿腹泻、腹痛是临床上较为常见的儿科病症,分别表现为大便形状改变、大便次数增多和脐周及耻骨以上部位出现的功能性腹痛,参与多种胃肠道疾病的发生发展^[1]。西医以对症治疗为主,复发率高且不良反应较多。中医药治疗该病症注重辨证论治,无论在中药内治,还是辅以拔罐、推拿以及穴位贴敷等外治法,对于缓解症状以及减少复发率有一定的优势,且安全性相对较高^[2-3]。

儿泻康贴膜由丁香、白胡椒、吴茱萸、肉桂组成,具有温中散寒止泻的功效。作为透皮贴剂,儿泻康贴膜采用穴位贴敷的方式使药物经皮直达病灶,避免肝脏首关效应、减少药物对胃肠道的刺激,可有效提高生物利用度,临床用于治疗小儿腹泻、腹痛,疗效确切^[4-5],但其发挥药效的物质基础及作用机制尚未见报道。本研究采用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术(HPLC-Q-TOF-MS/MS)对儿泻康贴膜体外透皮接收液的化学成分进行快速

辨识。在此基础上,利用网络药理学及分子对接技术,从复方、药材、活性成分、靶点、通路和药理作用间相互作用的整体性和系统性出发,探究儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛的药效物质基础及其作用机制,为后续研究及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,雄性,SPF级,体质量(200±20)g,购自维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证编号:SCXK(京)2021-0011,饲养于天津天诚新药评价有限公司实验动物屏障系统[合格证SYXK(津)2021-0008],温度维持在20~26℃,相对湿度维持在40%~70%,自由摄食饮水。实验动物的使用经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(IACUC:No.2023081102)。

1.2 药品与试剂

儿泻康贴膜(批号:2201406,山西晋新双鹤药

业有限责任公司);丁香酚、桂皮醛、胡椒碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱(批号:110725-201917、110710-202223、110775-202107、110802-201710、110801-202109;质量分数 $\geq 99.6\%$ 、 98.8% 、 98.2% 、 99.8% 、 99.3%)均购自中国食品药品检定研究院;柠檬苦素(批号: MUST-17030220;质量分数 $\geq 99.03\%$)购自成都曼斯特有限公司;乙酸丁香酚酯(批号: B11A8D41630,质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物有限公司。分析纯乙醇(95%)和甲醇、色谱纯甲醇,购自天津康科德科技有限公司。

1.3 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,美国 Agilent Technologies 公司;SCIEX X500R QTOF 型质谱仪,美国 SCIEX 公司;BCE 224I-ICCN 型电子分析天平及 SQP Secura 125-1CN 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TK-12B 型透皮扩散试验仪,上海锴凯科技贸易有限公司。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取桂皮醛、丁香酚、乙酸丁香酚酯、柠檬苦素、吴茱萸碱、胡椒碱、吴茱萸次碱对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加甲醇制成质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,置于冰箱 -20°C 保存。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 鼠皮的制备 SD 大鼠 ip 注射盐酸塞拉嗪+舒泰混合溶液,麻醉后,用电推剪将大鼠腹部小心推至皮肤无毛,剪下完整腹部皮肤,置于 4°C 预冷的 0.9% 氯化钠溶液中,剥离皮下脂肪及组织,用 0.9% 氯化钠溶液反复冲洗干净,置于冰箱 4°C 保存,24 h 内使用。

2.2.2 体外透皮接收液的制备 将儿泻康贴膜紧密贴于处理好的鼠皮表层,排除气泡,固定于透皮吸收扩散装置(贴剂背衬层朝向扩散室,鼠皮内层朝向接收室),接收室中注满 50% 乙醇 0.9% 氯化钠溶液,排除气泡,封口。水浴温度 $(37.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$, $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒速搅拌,28 h 后,从接收室中吸取接收液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB Eclipse- C_{18} ($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相: 甲醇(A)-水(B),梯度洗脱条件: $0\sim 10 \text{ min}$, $8\%\sim 25\% \text{ A}$; $10\sim 25 \text{ min}$, $25\%\sim 40\% \text{ A}$; $25\sim 50 \text{ min}$, $40\%\sim 65\%$

A ; $50\sim 80 \text{ min}$, $65\%\sim 85\% \text{ A}$; $80\sim 95 \text{ min}$, $85\%\sim 95\% \text{ A}$; $95\sim 105 \text{ min}$, $90\%\sim 95\% \text{ A}$; $105\sim 130 \text{ min}$, $95\%\sim 95\% \text{ A}$;体积流量: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温: 30°C ;进样量: $2 \mu\text{L}$ 。

2.4 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI),IDA 扫描,正、负离子检测模式;扫描范围 m/z $50\sim 1500$,离子源气体 1 和 2 保持在 413.7 kPa (60 psi),气帘压力保持在 35 ,离子源温度 600°C ;正、负离子模式喷雾电压:正离子模式为 5500 V ,负离子模式为 -4500 V ;碰撞能:正离子为 10 V ,负离子为 -10 V ;去簇电压:正离子为 50 V ,负离子为 -80 V 。采用 SCIEX OS 软件分析数据。

2.5 建立数据库

通过查阅中、英文文献,对儿泻康贴膜各单味药的化学成分质谱信息进行汇总,建立儿泻康贴膜成分数据库。将 HPLC-Q-TOF-MS/MS 采集的数据与对照品、数据库信息进行对比分析,鉴定已知化合物。

2.6 目标化合物的选取

首先基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定的儿泻康贴膜体外透皮接收液化学成分,优先选择《中国药典》规定的丁香、白胡椒、吴茱萸、肉桂的指标性成分;再依据课题组前期儿泻康贴膜透皮接收液的含量测定结果选择含量较大的成分;此外由于复方中含有大量挥发性成分,故结合文献选择挥发油中的有效成分;最后兼顾结构类型进行补充,确定后续研究的目标化合物。

2.7 化合物作用靶点及疾病靶点筛选

利用 Pubchem 数据库 (<https://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取目标化合物 sdf 文件,将其输入到 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),筛选“Probability >0 ”的选项为化合物潜在作用靶点。使用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>),限定物种为“human”,将化合物匹配到的靶点蛋白名称进行矫正。以“noninfectious diarrhea”“functional abdominal pain”为关键词,在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库中检索,将 3 个数据库靶点取交集,得疾病相关靶点。最后将化合物作用靶点与疾病相关靶点合并取交集,得到儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛的潜在靶点,并绘制韦恩图。

2.8 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

将交集靶点导入 String 12.0 数据库 (<http://string-db.org/>), 物种范围限定为“homo sapiens”, 获得 PPI 网络。将数据保存为 .TSV 格式文件, 导入到 Cytoscape 3.9.1 软件, 以度值调整节点大小和颜色深浅, 构建交集靶点的 PPI 网络, 经拓扑学分析, 筛选出核心靶点。

2.9 生物信息学分析

采用 Omicsbean 在线分析平台对交集靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 依据 *P* 值由小到大排序, 并对得到的通路进行分析, 取排名靠前的条目分别绘制柱状图和气泡图。

2.10 “复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络的构建

利用 Cytoscape 3.9.1 构建儿泻康贴膜的“复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络图, 并使用“Network Analyzer”对网络进行分析。

2.11 分子对接验证

通过分子对接验证核心靶点与关键活性成分之间的结合性能。在 Protein Data Bank 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载核心靶点的受体结

晶复合物; 将受体依次导入 Schrödinger2020 Maestro12.4 软件, 进行受体预处理并计算可能的活性空腔, 选择打分最高的空腔生成受体格点文件, 用于后续分子对接。在 Pubchem 数据库中下载核心成分的 sdf 文件, 导入 Schrödinger2020 Maestro12.4 软件对配体进行预处理, 在 Ligand Docking 中选择受体格点文件, 与处理后的配体进行分子对接并对结果进行可视化。

3 结果

3.1 儿泻康贴膜体外透皮接收液化学成分鉴定

采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对儿泻康贴膜体外透皮接收液的化学成分进行定性分析, 得到正、负离子流图, 见图 1。通过与对照品、自建数据库的信息进行匹配, 最终共鉴定出 90 个化合物, 包括生物碱类 46 个、黄酮类 8 个、有机酸类 6 个、苯丙素类 5 个、三萜类 4 个、苦味素 3 个、酚类 2 个、苯乙醇类 2 个、酚性芳香酸类 1 个、氨基酸类 1 个、香豆素类 1 个、酚醛类 1 个、鞣质类 1 个以及其他类 9 个。其中桂皮醛、丁香酚、乙酸丁香酚酯、柠檬苦素、吴茱萸碱、胡椒碱、吴茱萸次碱通过与对照品比对后确认。化合物信息见表 1。

表 1 儿泻康贴膜体外透皮接收液 HPLC-Q-TOF-MS/MS

Table 1 HPLC-Q-TOF-MS/MS data of Erxie kang Emplastra transdermal receiver *in vitro*

序号	t_R /min	离子模式	理论值	计算值	分子式	成分	结构类型
1	7.175	[M-H] ⁻	169.013 1	169.014 1	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸(gallic acid)	黄酮类
2	11.507	[M-H] ⁻	357.081 6	357.080 4	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	咖啡酰葡萄糖酸(caffeoylgluconic acid)	有机酸类
3	11.724	[M-H] ⁻	327.107 4	327.108 2	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	双羟基木犀草苷(dihydromelilotoside)	黄酮类
4	14.173	[M+H] ⁺	355.102 3	355.102 1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸(chlorogenic acid)	有机酸类
		[M-H] ⁻	353.086 7	353.087 7			
5	15.791	[M+H] ⁺	355.102 3	355.102 2	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	有机酸类
		[M-H] ⁻	353.086 7	353.087 8			
6	19.266	[M-H] ⁻	151.039 0	151.040 2	C ₈ H ₈ O ₃	异香草醛(isovanillin)	酚醛类
7	19.920	[M-H] ⁻	135.044 1	135.045 4	C ₈ H ₈ O ₂	对羟基苯乙酮(4'-hydroxyacetophenone)	苯乙醇类
8	20.927	[M+H] ⁺	358.201 3	358.201 5	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	甲基-二氢吴茱萸次碱(methyl-dihydroevoprenine)	其他类
9	22.514	[M+H] ⁺	137.059 7	137.059 3	C ₈ H ₈ O ₂	对羟基苯乙酮异构体(isomer of 4'-hydroxyacetophenone)	苯乙醇类
10	23.586	[M-H] ⁻	197.044 4	197.044 2	C ₉ H ₁₀ O ₅	丹参素(tanshinone)	酚性芳香酸类
11	24.583	[M+H] ⁺	277.103 0	277.105 0	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇	谷氨酸-谷氨酸(glutamyl-glutamic acid)	氨基酸
12	24.961	[M-H] ⁻	367.102 3	367.102 7	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	阿魏奎宁酸(avequinic acid)	有机酸类
13	26.180	[M-H] ⁻	177.054 6	177.055 8	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	松柏醛(coniferaldehyde)	苯丙素类
		[M+H] ⁺	179.070 3	179.070 4			
14	27.069	[M+H] ⁺	147.044 1	147.043 9	C ₉ H ₆ O ₂	香豆素(coumarin)	香豆素类

表1 (续)

序号	t_R /min	离子模式	理论值	计算值	分子式	成分	结构类型
15	31.670	$[M-H]^-$	463.088 2	463.088 9	$C_{21}H_{20}O_{12}$	异槲皮苷(isoquercitrin)	黄酮类
16	34.440	$[M+H]^+$	609.181 4	609.180 9	$C_{28}H_{32}O_{15}$	香叶木苷(diosmin)/斯皮诺(diosmin)	黄酮类
17	35.613	$[M+H]^+$	314.138 7	314.138 9	$C_{18}H_{19}NO_4$	去甲波尔定(norboldine)	生物碱类
18	35.635	$[M-H]^-$	477.102 8	477.105 3	$C_{22}H_{22}O_{12}$	鼠李素/异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷(rhamnetin/isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside)	黄酮类
19	36.119	$[M+H]^+$	133.064 8	133.064 7	C_9H_8O	桂皮醛(cinnamaldehyde)	苯丙素类
20	36.988	$[M-H]^-$	365.195 9	365.196 9	$C_{20}H_{30}O_6$	无水桂二萜醇(anhydrocinnzeylanol)	苯丙素类
21	37.176	$[M+H]^+$	352.129 2	352.129 9	$C_{19}H_{17}N_3O_4$	吴茱萸酰胺I(wuchuyamide I)	生物碱类
22	37.691	$[M-H]^-$	299.055 0	299.056 2	$C_{16}H_{12}O_6$	山柰甲黄素(kaempferide)	黄酮类
23	39.383	$[M+H]^+$	276.159 4	276.159 0	$C_{16}H_{21}NO_3$	二氢茛苳明宁碱(dihydropiperlonguminine)	生物碱类
24	41.106	$[M+H]^+$	471.201 3	471.201 5	$C_{26}H_{30}O_8$	柠檬苦素(limonin)	苦味素
		$[M-H]^-$	469.185 7	469.188 0			
25	42.832	$[M+H]^+$	274.143 8	274.144 1	$C_{16}H_{19}NO_3$	茛苳宁(piperlonguminine)	生物碱类
26	43.143	$[M-H]^-$	329.029 2	329.031 0	$C_{16}H_{10}O_8$	3,3'-O-二甲基鞣花酸(3,3'-O-dimethyllellagic acid)	鞣质类
27	44.030	$[M+H]^+$	485.180 6	485.178 9	$C_{26}H_{28}O_9$	吴茱萸内酯醇(evodol)	其他类
		$[M-H]^-$	483.164 9	483.166 4			
28	44.758	$[M+H]^+$	165.091 0	165.090 8	$C_{10}H_{12}O_2$	丁香酚(eugenol)	苯丙素类
		$[M-H]^-$	163.075 4	163.076 8			
29	46.641	$[M-H]^-$	527.191 1	527.192 4	$C_{28}H_{32}O_{10}$	6 β -乙酰氧-5-表柠檬苦素(6 β -acetoxy-5-epilimonin)	苦味素
30	47.258	$[M-H]^-$	332.139 4	332.141 3	$C_{20}H_{19}N_3O_2$	甲基-羟基吴茱萸碱(methyl-hydroxyevodiamine)	生物碱类
31	47.643	$[M+H]^+$	529.206 8	529.207 2	$C_{28}H_{32}O_{10}$	吴茱萸苦素乙酸酯(rutaevin 7-acetate)	苦味素
32	47.742	$[M-H]^-$	315.049 9	315.051 4	$C_{16}H_{12}O_7$	异鼠李素(isorhamnetin)	黄酮类
33	49.195	$[M-H]^-$	315.049 9	315.051 5	$C_{16}H_{12}O_7$	鼠李素(rhamnetin)	黄酮类
34	51.744	$[M+H]^+$	207.101 5	207.101 5	$C_{12}H_{14}O_3$	乙酸丁香酚酯(eugenyl acetate)	酚类
35	52.936	$[M+H]^+$	272.128 1	272.127 9	$C_{16}H_{17}NO_3$	胡椒林碱(piperlyne)	生物碱类
36	53.192	$[M-H]^-$	503.337 8	503.338 3	$C_{30}H_{48}O_6$	2 α ,3 β ,19 α ,23-四羟基乌苏-12-烯-28-酸(2 α ,3 β ,19 α ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid)	三萜类
37	54.142	$[M+H]^+$	308.175 7	308.175 6	$C_{19}H_{21}N_3O$	吴茱萸酰胺(evodiamide)	生物碱类
38	54.581	$[M+H]^+$	272.128 1	272.128 1	$C_{16}H_{17}NO_3$	去甲乌药碱(demethyl-coclaurine)	生物碱类
39	55.020	$[M+H]^+$	320.139 4	320.139 4	$C_{19}H_{17}N_3O_2$	羟基吴茱萸碱(hydroxyevodiamine)	生物碱类
40	56.025	$[M+H]^+$	304.144 4	304.144 3	$C_{19}H_{17}N_3O$	吴茱萸碱(evodiamine)	生物碱类
		$[M-H]^-$	302.128 8	302.130 6			
41	56.353	$[M+H]^+$	288.159 7	288.159 2	$C_{17}H_{21}NO_3$	胡椒新碱(piperanine)	生物碱类
42	57.804	$[M+H]^+$	286.143 7	286.143 4	$C_{17}H_{19}NO_3$	胡椒碱(piperine)	生物碱类
43	59.647	$[M+H]^+$	312.159 4	312.159 3	$C_{19}H_{21}NO_3$	N- β -苯乙基-3-(3,4-二甲氧基苯基)丙酰胺[N- β -phenethyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propenamide]	其他类
44	60.206	$[M+H]^+$	244.133 2	244.133 0	$C_{15}H_{17}NO_2$	阿塔宁I(atanine I)	生物碱类
45	60.681	$[M+H]^+$	219.174 3	219.174 1	$C_{15}H_{22}O$	2-甲基-6-(4-甲基苯基)-3-庚酮[2-methyl-6-(4-methylphenyl)-3-heptanone]	其他类

表 1 (续)

序号	t_R /min	离子模式	理论值	计算值	分子式	成分	结构类型
46	61.952	[M+H] ⁺	288.113 1	288.112 9	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	吴茱萸次碱(rutaecarpine)	生物碱类
		[M-H] ⁻	286.097 5	286.099 4			
47	62.383	[M+H] ⁺	306.160 1	306.160 1	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O	吴茱萸果酰胺I(goshuyuamide I)	生物碱类
48	62.828	[M+H] ⁺	302.175 0	302.174 8	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	胡椒内酰胺(piperolactam)/细叶青藤藤酰胺(futoamide)	生物碱类
49	64.867	[M+H] ⁺	356.258 4	356.258 7	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	1-甲基-2-[7-羟基-(E)-9-十三烯基]-4(1H)- 喹诺酮(1-methyl-2-[7-hydroxy-(E)-9- tridecenyl]-4(1H)-quinolone)	生物碱类
50	65.150	[M+H] ⁺	314.175 0	314.174 8	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	胡椒达定(piperdardine)	生物碱类
51	65.577	[M+H] ⁺	312.159 4	312.159 4	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	胡椒亭碱(piperattine)	生物碱类
52	66.972	[M-H] ⁻	487.342 9	487.343 3	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	2 α , 3 β , 23-三羟基齐墩果烷-12-烯-28-酸异 构体(isomer of 2 α , 3 β , 23-trihydroxyolean- 12-en-28-oic acid)	三萜类
53	68.013	[M+H] ⁺	316.190 7	316.190 5	C ₁₉ H ₂₅ NO ₃	胡椒油碱A(piperolein A)	生物碱类
54	69.256	[M+H] ⁺	328.190 7	328.190 6	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	假葎萘酰胺A(retroftactamide A)	生物碱类
55	70.311	[M+H] ⁺	179.070 3	179.069 7	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	松柏醛异构体(isomer of coniferaldehyde)	苯丙素类
56	71.577	[M+H] ⁺	330.206 4	330.206 4	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	假葎萘酰胺C(retrofractamide C)	生物碱类
57	72.036	[M+H] ⁺	286.216 5	286.216 2	C ₁₉ H ₂₇ NO	1-甲基-2-壬基-4-(1H)-喹诺酮(1-methyl-2- nonyl-4-(1H)-quinolones)	生物碱类
58	72.313	[M+H] ⁺	279.159 3	279.158 3	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	邻苯二甲酸二丁酯(dibutylphthalate)	其他类
59	72.933	[M+H] ⁺	340.190 7	340.190 6	C ₂₁ H ₂₅ NO ₃	葎萘壬三烯哌啶(dehydropiperonaline)	生物碱类
60	74.085	[M+H] ⁺	330.206 3	330.206 4	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	胡椒卡诺莎(pipercollosine)	生物碱类
61	75.682	[M+H] ⁺	312.232 1	312.231 8	C ₂₁ H ₂₉ NO	1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺 酮(1-methyl-2-[(Z)-5-undecenyl]-4- (1H)-quinolone)	生物碱类
62	76.541	[M+H] ⁺	342.206 3	342.205 3	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	葎萘环碱(piperonaline)	生物碱类
63	78.458	[M+H] ⁺	344.222 0	344.221 9	C ₂₁ H ₂₉ NO ₃	胡椒油碱B(piperolein B)	生物碱类
64	78.696	[M-H] ⁻	471.348 0	471.348 4	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	山楂酸(maslinic acid)	三萜类
65	78.723	[M+H] ⁺	300.113 1	300.113 2	C ₁₉ H ₁₃ N ₃ O	吴茱萸宁碱(evodiamine)	生物碱类
66	80.282	[M+H] ⁺	338.247 8	338.246 7	C ₂₃ H ₃₁ NO	1-甲基-2-(4Z, 7Z-十三碳二烯基)-4(1H)-喹诺 酮[1-methyl-2-(4Z, 7Z-tridecadienyl)- 4(1H)-quinolone]	生物碱类
67	80.282	[M+H] ⁺	314.247 8	314.248 0	C ₂₁ H ₃₁ NO	1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮[1- methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone]	生物碱类
68	82.875	[M-H] ⁻	471.348 0	471.349 2	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	山楂酸异构体(isomer of maslinic acid)	三萜类
69	83.515	[M+H] ⁺	364.263 4	364.263 6	C ₂₅ H ₃₃ NO	1-甲基-2-[(6Z, 9Z, 12E)-6, 9, 12-十五三烯 基]-4(1H)-喹诺酮(1-methyl-2-[(6Z, 9Z, 12E)-6, 9, 12-pentadecatrienyl]- 4(1H)-quinolone)	生物碱类
70	84.619	[M+H] ⁺	340.263 4	340.263 1	C ₂₃ H ₃₃ NO	吴茱萸卡品碱(evocarpine)	生物碱类
71	85.094	[M+H] ⁺	362.247 8	362.245 4	C ₂₅ H ₃₁ NO	1-甲基-2-[(3E, 6Z, 9Z, 12E)-3, 6, 9, 12-十 五四烯基]-4(1H)-喹诺酮(1-methyl-2- [(3E, 6Z, 9Z, 12E)-3, 6, 9, 12- pentadecatetraenyl]-4(1H)-quinolone)	生物碱类

表1 (续)

序号	t_R /min	离子模式	理论值	计算值	分子式	成分	结构类型
72	87.791	[M+H] ⁺	366.279 1	366.278 8	C ₂₅ H ₃₅ NO	1-甲基-2-[(6Z,9Z)-6,9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮(1-methyl-2-[(6Z,9Z)-6,9-pentadecadienyl]-4(1H)-quinolones)	生物碱类
73	88.919	[M-H] ⁻	323.221 7	323.221 2	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	8-姜辣醇(8-gingerdiol)	酚类
74	90.868	[M+H] ⁺	342.279 1	342.278 5	C ₂₃ H ₃₅ NO	二氢吴茱萸卡品碱(1-methyl-2-tridecylquinolin-4(1H)-one)	生物碱类
75	93.640	[M+H] ⁺	368.294 8	368.294 7	C ₂₅ H ₃₇ NO	1-甲基-2-[(Z)-10-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮(1-methyl-2-[(Z)-10-pentadecene]-4(1H)-quinolones)	生物碱类
76	98.869	[M-H] ⁻	332.295 9	332.295 8	C ₂₂ H ₃₉ NO	1-(十八碳-2E,4E,12/13Z-三烯)吡咯烷[1-(octadeca-2E,4E,12/13Z-trienyl)pyrrolidine]	生物碱类
77	98.942	[M+H] ⁺	334.310 4	334.310 3	C ₂₂ H ₃₉ NO	(2E,4E,12/13Z)-N-正异丁基十八碳-2,4,12/13-三烯酰胺[(2E,4E,12/13Z)-N-isobutyl-octadeca-2,4,12/13-trienamide]	生物碱类
78	99.141	[M+H] ⁺	334.310 4	334.310 3	C ₂₂ H ₃₉ NO	(2E,4E,12/13Z)-N-正异丁基十八碳-2,4,12/13-三烯酰胺[(2E,4E,12/13Z)-N-isobutyl-octadeca-2,4,12/13-trienamide]	生物碱类
79	99.749	[M-H] ⁻	279.231 9	279.233 6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸异构体(isomer of linoleic acid)	有机酸类
80	101.002	[M+H] ⁺	370.310 4	370.310 2	C ₂₅ H ₃₉ NO	1-甲基-2-十五烷基-4(1H)-喹诺酮[1-methyl-2-pentadecyl-4(1H)-quinolones]	生物碱类
81	101.518	[M+H] ⁺	346.310 4	346.310 2	C ₂₃ H ₃₉ NO	1-(2E,4E,12E)-十八碳三烯酰哌啶[1-(2E,4E,12E)-octadeca-trinoylpiperidine]	生物碱类
82	103.565	[M+H] ⁺	362.341 7	362.341 5	C ₂₄ H ₄₃ NO	(2E,4E,14/15Z)-N-异丁基-二十碳-2,4,14/15-三酰胺[(2E,4E,14/15Z)-N-isobutyl-eicosa-2,4,14/15-trienamide]	生物碱类
83	104.255	[M+H] ⁺	336.326 1	336.326 1	C ₂₂ H ₄₁ NO	N-异丁基-(2E,4E)-十八碳二烯酰胺[N-isobutyl-(2E,4E)-octadeca-dienamide]	生物碱类
84	105.189	[M+H] ⁺	362.341 7	362.341 6	C ₂₄ H ₄₃ NO	(2E,4E,14/15Z)-N-异丁基-二十碳-2,4,14/15-三酰胺[(2E,4E,14/15Z)-N-isobutyl-eicosa-2,4,14/15-trienamide]	生物碱类
85	109.057	[M+H] ⁺	348.326 1	348.326 3	C ₂₃ H ₄₁ NO	1-(哌啶基)-2,4-十八碳二烯-1-酮[1-(piperidinyl)-2,4-octadecadien-1-one]	其他类
86	109.282	[M-H] ⁻	339.326 9	339.327 5	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	山嵛酸(behenic acid)	有机酸类
87	109.600	[M+H] ⁺	374.341 7	374.342 0	C ₂₅ H ₄₃ NO	1-(哌啶基)-2,4,14-二十碳三烯-1-酮[1-(piperidinyl)-2,4,14-eicosatrien-1-one]	其他类
88	113.094	[M+H] ⁺	376.356 8	376.357 2	C ₂₅ H ₄₆ NO	1-(二十碳-2E,4E-二烯基)哌啶[1-(eicosa-2E,4E-dienyl) piperidine]	生物碱类
89	116.211	[M-H] ⁻	367.358 2	367.359 0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	姜黄素[curcumin (IS)]	其他类
90	117.965	[M+H] ⁺	376.357 3	376.357 1	C ₂₅ H ₄₅ NO	1-(二十碳-2E,4E-二烯基)哌啶异构体[isomer of 1-(eicosa-2E,4E-dienyl) piperidine]	其他类

3.2 儿泻康贴膜潜在活性成分

基于鉴定的透皮化学成分结合《中国药典》规定的指标性成分选取丁香酚、桂皮醛、胡椒碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素；依据含量测定结果增

加乙酸丁香酚酯；挥发油中的主要活性成分包括丁香烯、肉桂酸、 α -古巴烯、邻甲氧基肉桂醛、3-萜烯、D-柠檬烯；兼顾结构类型补充没食子酸、胡椒油碱A、胡椒醛、去氢吴茱萸碱、吴茱萸卡品碱、吴茱萸内

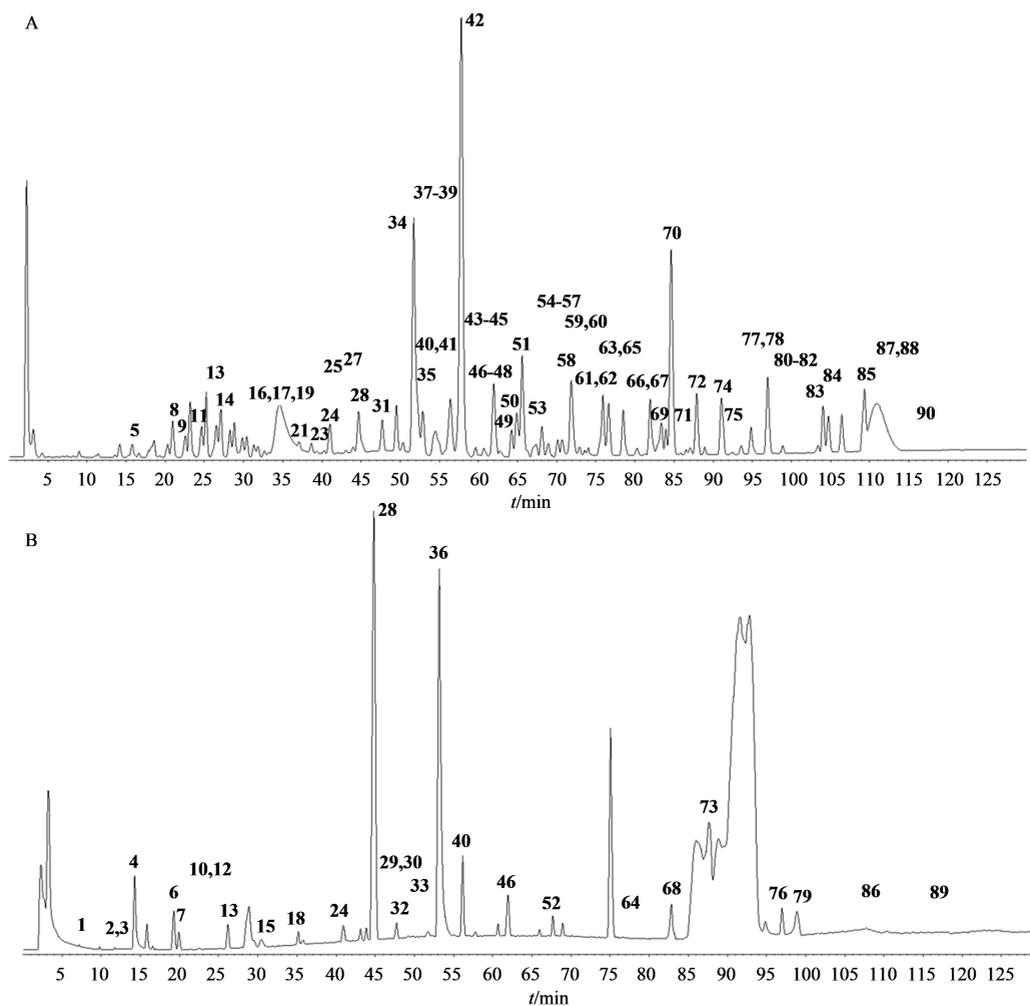


图1 儿泻康贴膜体外透皮接收液正(A)、负离子(B)流图

Fig. 1 BPC diagram of positive (A) and negative (B) ions in transdermal receiving solution of Erxiekang Emplastra *in vitro*

酯,共得到19个潜在活性成分(表2)。

3.3 化合物-疾病共有靶点

通过Swiss Target Prediction数据库筛选得到19个化合物共507个作用靶点。通过GeneCards数据库、OMIM数据库、DrugBank数据库得到去重后疾病靶点2337个。将活性成分作用靶点与疾病靶点取交集,得到260个交集靶点,作为儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛的潜在靶点(图2)。

3.4 PPI网络构建与分析

将260个交集靶点导入String 12.0数据库,获得TSV文件,导入Cytoscape 3.9.1软件,使用工具Analyze Network进行拓扑学分析,以度值调整节点大小和颜色深浅,构建PPI网络(图3)。图中共有240个节点,1407条边,节点越大、颜色越深表示该靶点与疾病之间相关性越强。按度值(degree)排序,筛选排名前15的靶点为核心靶点(表3)。

3.5 GO功能与KEGG通路富集分析

通过OmicsBean数据库,将交集靶点进行GO功能富集和KEGG通路富集分析。GO功能富集分析包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF),将 $P < 0.05$ 的前10个条目进行可视化(图4)。结果表明儿泻康贴膜中丁香酚、胡椒碱、吴茱萸碱、桂皮醛等19个潜在活性成分可能通过作用于TP53、SRC、STAT3、EGFR、AKT1、TNF、JUN、ESR1等靶点参与多细胞或单-多细胞过程的调控、化学反应、生物过程正向调节、对有机物质及化学刺激的反应等BP;定位细胞质、囊泡、膜区等CC;激活蛋白结合、酶结合、分子转化器活性、信号传导活性、相同蛋白质结合、蛋白质二聚化活性等MF来发挥作用。KEGG通路富集分析共获得 $P < 0.05$ 的通路166条,筛选与疾病相关的通路共90条进行网络图的构建,取前20条通路绘制气泡图(图5)。通路富集结果显示,儿泻康贴膜发挥药效主要涉及内分泌

表2 儿泻康贴膜19个潜在活性成分信息

Table 2 Information of 19 potential active components of Erxie Kang Emplastra

编号	结构类型	活性成分	分子式	来源
1(DX1)	苯丙素类	丁香酚(eugenol)	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	丁香
2(DX2)	酚类	乙酸丁香酚酯(eugenol acetate)	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	
3(DX3)	倍半萜类	丁香烯(caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	
4(DX4)	黄酮类	没食子酸(gallic acid)	C ₇ H ₆ O ₅	
5(RG1)	苯丙素类	桂皮醛(cinnamaldehyde)	C ₉ H ₈ O	肉桂
6(RG2)	苯丙素类	桂皮酸(cinnamic acid)	C ₉ H ₈ O ₂	
7(RG3)	苯丙素类	邻甲氧基肉桂醛[(E)-O-methoxycinnamaldehyde]	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	
8(RG4)	单萜类	α-古巴烯[(-)-α-copaene]	C ₁₅ H ₂₄	
9(BHJ1)	酰胺类生物碱	胡椒碱(piperine)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	白胡椒
10(BHJ2)		胡椒油碱A[(E)-piperolein A]	C ₁₉ H ₂₅ NO ₃	
11(BHJ3)	醛类	胡椒醛(piperonal)	C ₈ H ₆ O ₃	
12(BHJ4)	单萜烯类	3-萜烯(3-carene)	C ₁₀ H ₁₆	
13(BHJ5)	单萜类	D-柠檬烯[(+)-limonene]	C ₁₀ H ₁₆	
14(WZY1)	吲哚类生物碱	吴茱萸碱(evodiamine)	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	吴茱萸
15(WZY2)		吴茱萸次碱(rutaecarpine)	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	
16(WZY3)		去氢吴茱萸碱(dehydroevodiamine)	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	
17(WZY4)	喹诺酮类生物碱	吴茱萸卡品碱(evocarpine)	C ₂₃ H ₃₃ NO	
18(WZY5)	苦味素类	吴茱萸内酯(evodine)	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅	
19(WZY6)		柠檬苦素(limonin)	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	

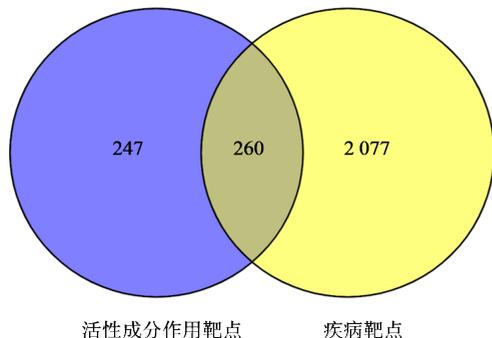


图2 活性成分作用靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of active ingredient target-disease target

抵抗(endocrine resistance)、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、钙信号通路(calcium signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)、炎症介质对TRP通道的调节(inflammatory mediator regulation of TRP channels)等信号通路。

3.6 “复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络的构建

根据对应关系在Cytoscape 3.9.1中构建“儿泻康贴膜-药材-成分-靶点-通路-药理作用”的网络关系图(图6),该网络图共386个节点,2288条边。将

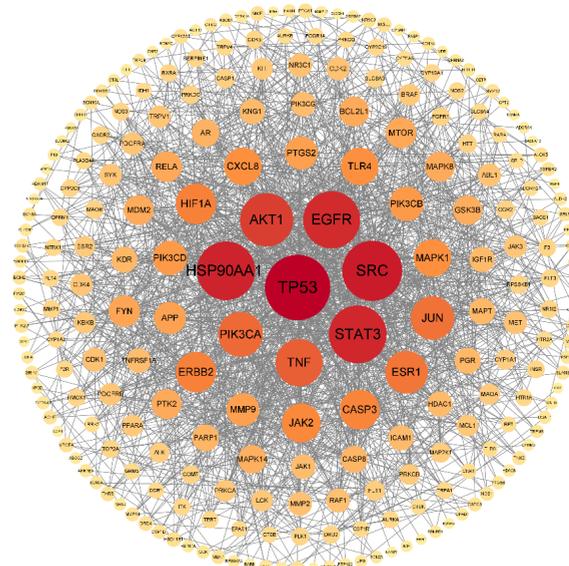


图3 成分-疾病交集靶点PPI网络

Fig. 3 PPI network of component-disease intersection target

经过Analyze Network的数据按度值进行排序,将度值≥中位数的成分作为核心活性成分,包括去氢吴茱萸碱、胡椒碱、胡椒油碱A、乙酸丁香酚酯、吴茱萸内酯、柠檬苦素、吴茱萸次碱、吴茱萸碱、邻甲氧基肉桂醛、丁香酚。该网络图表明儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛具有多成分、多靶点、多通路协同作用

表 3 15 个核心靶点信息

Table 3 Information of 15 core targets

编号	靶点名称	度值	介数中心性	紧密度中心性
1	肿瘤蛋白 p53(TP53)	73	0.086 159 718	0.508 510 638
2	原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)	66	0.128 714 056	0.524 122 807
3	热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)	64	0.084 360 425	0.492 783 505
4	信号传导及转录激活蛋白 3(STAT3)	63	0.048 803 715	0.496 881 497
5	表皮生长因子受体(EGFR)	62	0.051 647 816	0.497 916 667
6	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)	57	0.039 089 980	0.488 752 556
7	肿瘤坏死因子(TNF)	49	0.078 427 541	0.489 754 098
8	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA)	46	0.016 167 547	0.451 795 841
9	Jun 原癌基因, AP-1 转录因子亚单位(JUN)	44	0.022 281 809	0.478 957 916
10	雌激素受体(ESR1)	43	0.059 684 221	0.462 282 398
11	erb-b2 受体酪氨酸激酶 2(ERBB2)	40	0.023 160 512	0.450 943 396
12	缺氧诱导因子 1 α 亚单位(HIF1A)	40	0.024 025 795	0.462 282 398
13	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(CASP3)	39	0.015 950 363	0.452 651 515
14	胞内蛋白酪氨酸激酶(JAK2)	38	0.017 744 036	0.445 065 177
15	丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)	36	0.023 928 189	0.459 615 385

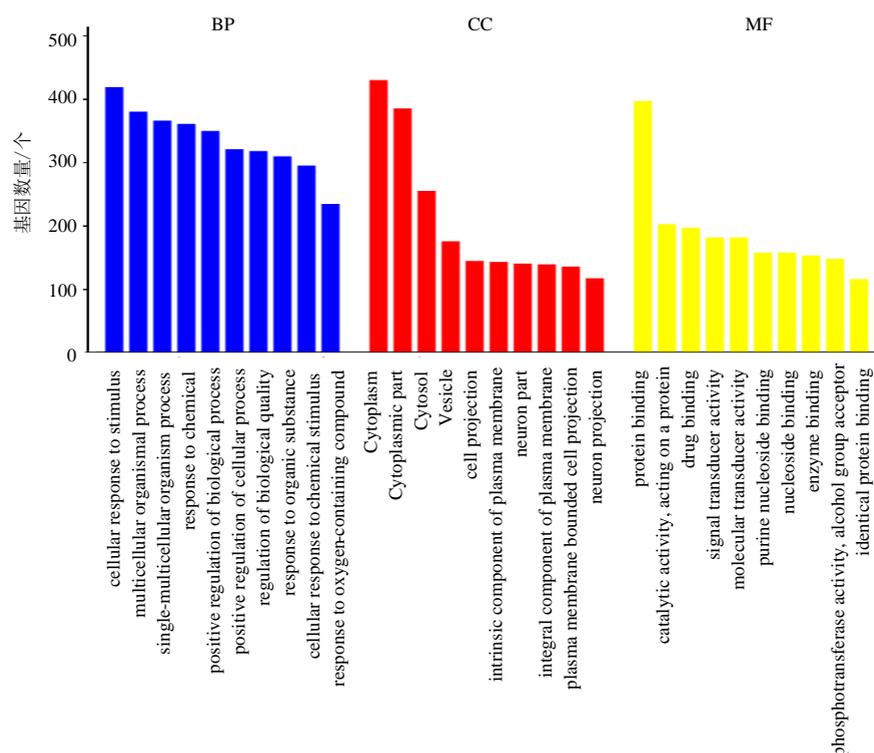


图 4 GO 功能分析

Fig. 4 GO functional analysis

的特点。

3.7 分子对接结果

儿泻康贴膜中 10 个核心活性成分与 15 个核心靶点对接结果见图 7。体系结合能降低小分子配体与蛋白受体才能结合。结合能的高低与结合位置的构象契合度、配体与受体之间的相互作用(如氢

键等)有关,体系能量降低越多,构象形状匹配度越高,对应的对接分数的绝对值越大。通常认为 Docking Score ≤ -20.9 kJ \cdot mol $^{-1}$ 小分子配体与蛋白受体对接较好。据图可知,除柠檬苦素外其余 9 个主要活性成分与 15 个核心靶点蛋白均呈现良好的对接结果,提示主要活性成分可能作用于核心靶点蛋

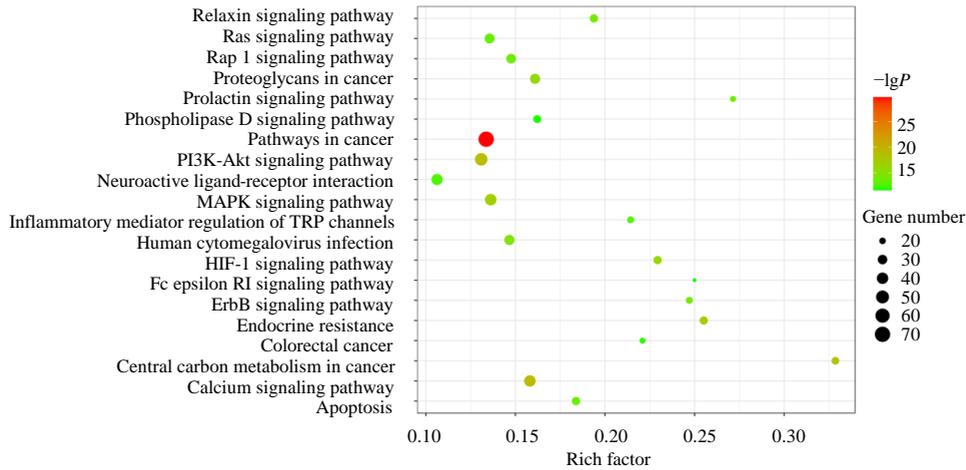


图 5 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

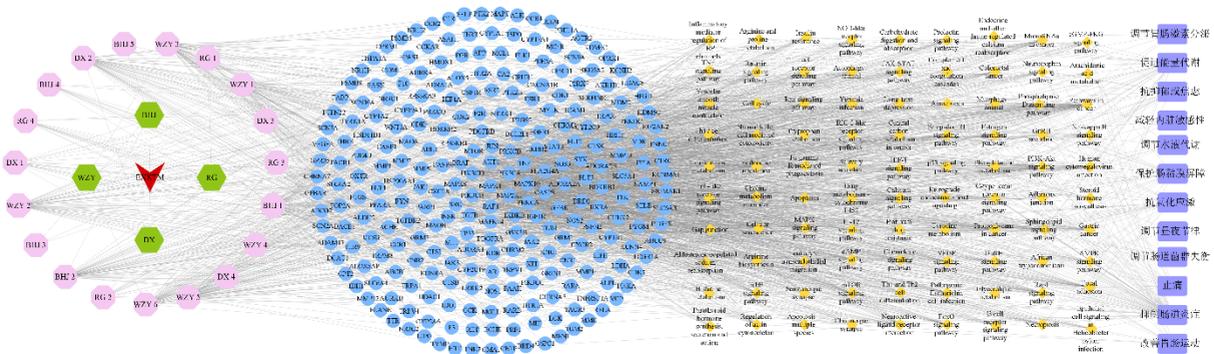


图 6 复方-药材-成分-靶点-通路网络

Fig. 6 Compound-medicinal materials-components-target-pathway network

白调控相关信号通路发挥药理作用,可能为儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛作用的药效物质基础。各药主要活性成分分子对接示意图,见图 8。

4 讨论

小儿腹泻、腹痛以较高发病率、病情迁延成为儿科常见疾病,影响婴幼儿生长发育、身体健康^[6]。小儿因其稚阴稚阳的生理特点,易因外感寒邪、饮食不当、脾胃虚弱、情志失调等引发泄泻,其中风寒泄泻较为常见^[7]。寒邪袭体可对免疫系统、消化系统、内分泌系统和神经系统等产生影响^[8-9]。无湿不成泻,外感风寒之邪入体需与湿邪相合方能致泻。通过矿场、糖水偏好、高架迷宫等实验发现湿证模型小鼠表现出抑郁样负面情绪^[10]。与正常小鼠相比,湿邪小鼠的肠道菌群的组成、结构、数目发生改变,同时伴有肠黏膜损伤、炎症浸润增加等^[11]。表明风寒湿邪可通过机体免疫抑制、肠黏膜屏障损害、胃肠道蠕动节律失常、炎症反应、情绪失调、能量代谢降低等导致小儿腹泻、腹痛。

本研究从儿泻康贴膜体外透皮接收液中共指出 90 个化合物,其中 16 个来源于丁香、10 个来源于肉桂、27 个来源于白胡椒、35 个来源于吴茱萸、鼠李素/异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷和异鼠李素 2 个成分属于丁香和吴茱萸共有成分。通过构建“复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络分析结合分子对接验证,预测儿泻康贴膜治疗小儿腹泻、腹痛的主要药效物质基础为去氢吴茱萸碱、胡椒碱、胡椒油碱 A、乙酸丁香酚酯、吴茱萸内酯、吴茱萸次碱、吴茱萸碱、邻甲氧基肉桂醛、丁香酚。结合网络药理学结果发现,儿泻康贴膜温中散寒止泻的功效可通过改善胃肠运动紊乱、调节内脏敏感性、减轻肠道炎症与免疫调节、缓解情绪失常等现代药理作用体现。

4.1 改善胃肠运动紊乱

Ca²⁺作为细胞内信号传导过程中重要的第二信使,是维持和调节神经、肌肉、血液、细胞膜及多种酶活性正常生理功能的必需元素。Ca²⁺是调节平滑

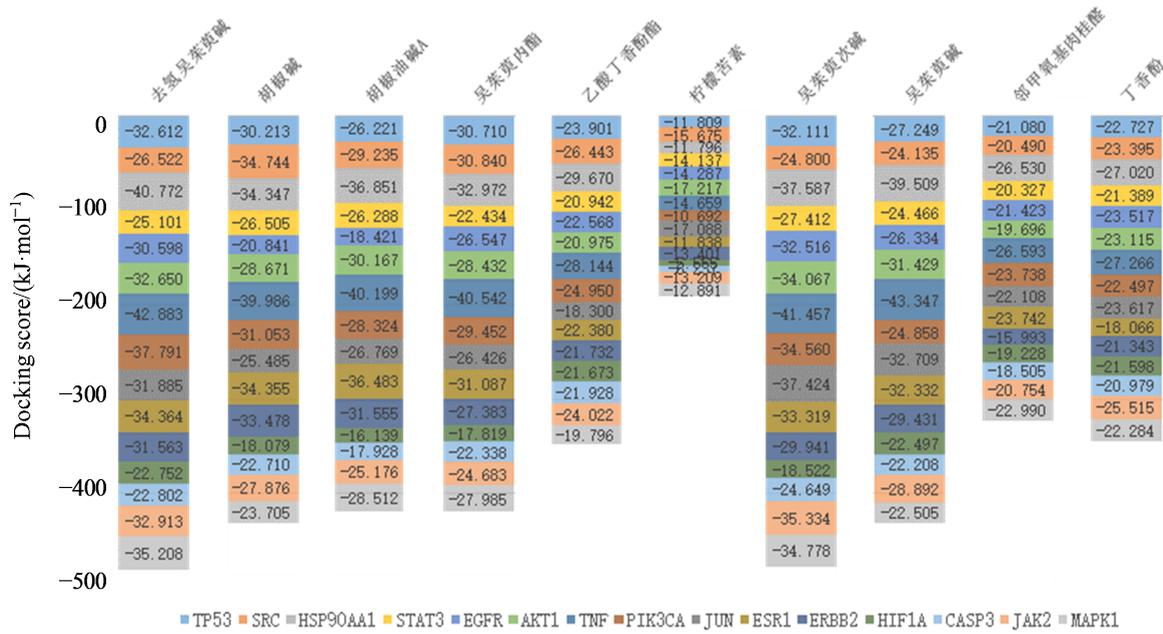


图 7 主要活性成分与核心靶点分子对接结果

Fig. 7 Docking results of main active components with core target molecules

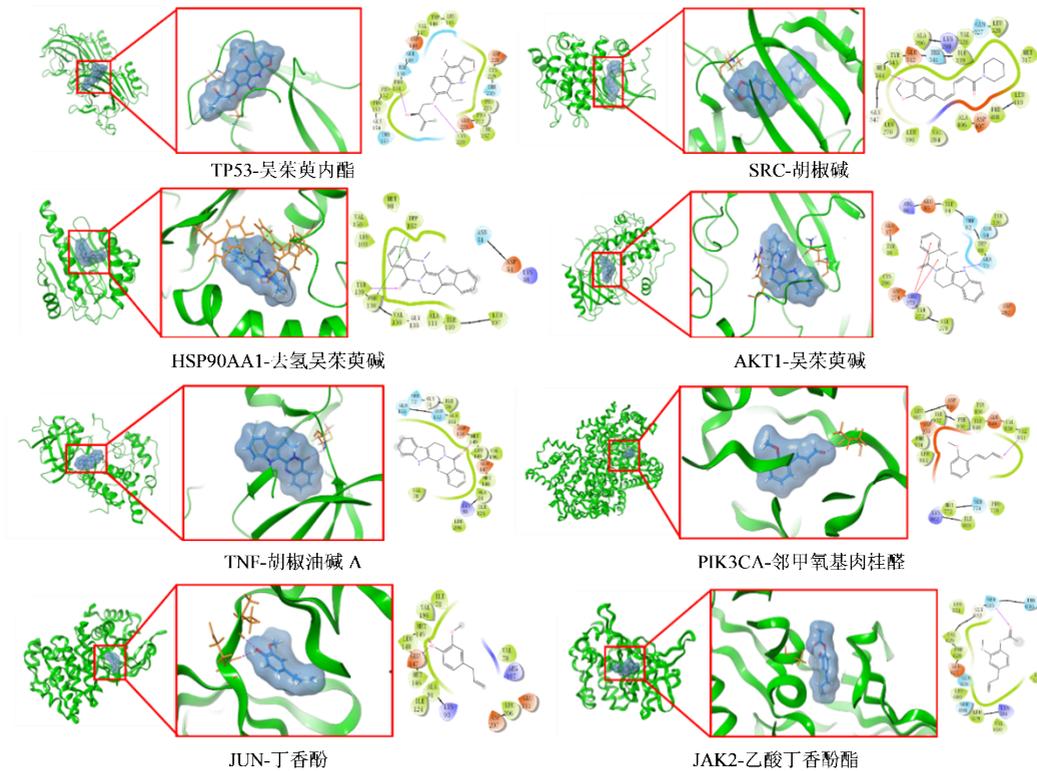


图 8 分子对接结果示意图

Fig. 8 Schematic diagram of molecular docking results

肌收缩和舒张的关键因素,当胞质中的 Ca^{2+} 浓度增加,与钙调蛋白结合,激活胃肠肌细胞中肌球蛋白轻链激酶,促进肌球蛋白产生三磷酸腺苷(ATP)酶,促进平滑肌收缩;反之,平滑肌舒张^[12]。腹痛相关模型大鼠胃肠组织钙离子信号通路相关蛋白的表

达和肌浆网钙离子摄入异常,提示腹痛模型大鼠胃肠平滑肌收缩紊乱与钙离子浓度增加有关。此外, Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} -钙调蛋白(CMD)通路和 Ca^{2+} -磷脂依赖蛋白激酶(PKC)通路调节细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,促进CI的分泌,导致腹泻。神经营养素是一类与神

经细胞分化和存活有关的营养因子,其中脑源性神经营养因子(BDNF)在调节神经突触传递方面与血清素(5-HT)密切相关,可通过影响5-HT等神经递质的传递调控胃肠蠕动^[13]。信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)被激活后可介导多种基因的表达并在细胞免疫抑制、肠道炎症反应、调节胃肠激素分泌增强胃肠运动等过程中发挥关键作用^[14]。

网络药理学结果表明,乙酸丁香酚酯、胡椒油碱A、吴茱萸次碱、柠檬苦素等化合物可作用于STAT3、原癌基因c-RAF(RAF1)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B-raf(BRAF)、EGFR、缓激肽受体B2(BDKRB2)、ERBB2、毒蕈碱型胆碱受体M2(CHRM2)等靶点,调控calcium signaling pathway、环磷酸腺苷信号通路(cAMP signaling pathway)、神经营养因子信号通路(neurotrophin signaling pathway)、肌动蛋白细胞骨架的调节(regulation of actin cytoskeleton)、Janus激酶-信号传导和转录激活蛋白信号通路(JAK-STAT signaling pathway)等信号通路进而改善胃肠运动功能紊乱、调节胃肠激素分泌及水液代谢、促进能量代谢,发挥止泻的作用。

4.2 调节内脏高敏感性

辣椒素受体1(TRPV1)是一种非选择性的阳离子通道,在胃肠道中主要存在于外源性感觉神经元、肠神经丛和黏膜组织中,作为高热、低pH值、辣椒素、炎症介质、神经营养因子等多种刺激的传感器和效应器,TRPV1被激活或敏化后调控内脏敏感性,介导胃肠道异常和慢性内脏疼痛。研究发现,结肠炎期间分泌的促炎因子通过激活或敏化G蛋白耦联受体等相关通路引发炎症性内脏高敏感。2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的结肠炎小鼠模型中,使用TRPV1拮抗剂(如JYL1421)可预防其背根神经节中TRPV1的表达增加导致的炎症后内脏疼痛^[15]。5-HT是一种单胺类神经递质,在学习记忆、情绪、睡眠、疼痛、运动和内分泌等生理功能以及异常情绪和认知等病理状态中发挥重要作用。5-HT从突触前轴突终末释放出来,与受体5-HT_{4R}结合,促进释放伤害性神经递质,影响胃肠运动及内脏痛觉敏感性^[16]。研究结果表明,腹痛模型大鼠结肠组织中5-HT的表达量显著增加,其失活转运体(SERT)表达减少,内脏敏感性升高;艾灸后,5-HT活性被抑制,SERT表达水平上升,内脏敏感性降低^[17]。表皮生长因子受体(EGFR)激活后刺激神经胶质细胞活化、中枢与外周敏化、炎症介质释放等,诱导并维持组织损伤后的痛敏反应^[18]。

网络药理学结果表明,吴茱萸碱、吴茱萸卡品碱、丁香烯、 α -古巴烯等化合物可作用于TRPV1、EGFR、人丝裂原激活蛋白激酶1(MAP2K1)、CASP3、AKT1、JUN、蛋白激酶C(PRKCB)、RAF1等靶点,调控神经活性配体-受体互作(Neuroactive ligand-receptor interaction)、Inflammatory mediator regulation of TRP channels、血清素突触(Serotonergic synapse)、雌激素信号通路(Estrogen signaling pathway)、逆行内源性大麻素信号(Retrograde endocannabinoid signaling)等信号通路降低内脏敏感性,发挥止痛作用。

4.3 减轻肠道炎症与免疫调节

磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B信号通路(PI3K-Akt信号通路)是一种重要的细胞内信号传导途径,被多种类型的细胞刺激或毒性损伤激活,调节基本细胞功能。磷酸化后的PI3K转变成磷脂酰肌醇三磷酸(PIP3),与Akt的PH结构域结合帮助激活Akt,活化的Akt(p-Akt)进一步激活下游转录因子NF- κ B,恢复NF- κ B的转录活性,促进炎症因子和介质的分泌,放大并持续炎症反应^[19]。此外,氧化应激促进PI3K-Akt通路活化,介导自噬相关信号通路,诱导细胞自噬,引起肠上皮细胞的凋亡或坏死,破坏肠黏膜屏障^[20]。MAPK信号通路参与多种细胞功能,可诱导产生细胞因子、激活巨噬细胞,释放炎症因子,损伤结肠黏膜,还可激活NF- κ B通路,加重氧化应激和免疫反应^[21]。IL-17家族在急性和慢性炎症反应中都起着至关重要的作用。IL-17作用于受体激活肠上皮细胞中的NF- κ B和MAPK激酶,介导肠道炎症反应^[22]。TP53能对各种细胞压力做出反应,参与昼夜节律、维持胃肠道黏膜完整性、胃气化等^[23]。

网络药理学结果表明,乙酸丁香酚酯、桂皮醛、桂皮酸、去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱等化合物可作用于TP53、TNF、Toll样受体4(TLR4)、前列腺素-过氧化物合酶2(PTGS2)、MAPK1、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)、蛋白激酶C(PRKCA)、缺氧诱导因子-1 α (HIF1A)等靶点,调控PI3K-Akt signaling pathway、MAPK signaling pathway、Rap1信号通路(Rap1 signaling pathway)、Ras信号通路(Ras signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、缺氧诱导因子1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等信号通路进一步保护肠黏膜屏障、抗氧化应激、调节肠道菌群失衡,发挥抗炎和免疫调节作用。

4.4 缓解情绪失常

脑-肠轴是由中枢神经系统(CNS)、肠神经系统(ENS)、自主神经系统(ANS)协调联系形成的复杂神经-内分泌系统,CNS与ENS通过传递5-HT、SP、胃动素等脑肠肽调控胃肠道功能。心理应激可促进下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)释放促肾上腺皮质激素释放激素(CRF),诱导肥大细胞释放炎症介质和5-HT,增加内脏敏感性,引起肠道分泌及动力异常,导致腹痛、腹泻。同时,这些不适症状也会促使ENS将异常信号传至CNS加重患者负面情绪,从而形成反馈环路^[24]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)可调节多种细胞功能,包括细胞增殖、存活、代谢和血管生成,是PI3K通路的重要下游底物,参与伤害性信息加工、焦虑和抑郁样行为^[25]。ESR1位于与认知功能和情绪相关的脑区,能够参与调节在脑系统中与认知和情绪相关的神经递质,与抑郁症和焦虑症的发生发展密切相关^[26]。

网络药理学结果表明,丁香酚、桂皮酸、吴茱萸卡品碱、吴茱萸内酯等化合物可作用于AKT1、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、MAPK1、雌激素受体(ESR1)、BRAF、JUN、SRC、核因子 κ B激酶亚基 β 抑制因子(IKB- κ B)等靶点,调控Rap1 signaling pathway、红细胞原癌基因B信号通路(ErbB signaling pathway)、neurotrophin signaling pathway、NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、长期抑郁症(long-term depression)等信号通路抗抑郁、抗焦虑、调节昼夜节律失衡,发挥缓解情绪失常的作用。

分子对接结果显示:柠檬苦素 Docking Score $> -20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。结合能的高低除了与结合位置的构象契合度有关,还与配体与受体之间的相互作用有关。配体与受体之间的相互作用不仅包括氢键、盐桥等极性作用还包括 π - π 堆积、疏水、范德华力等非极性作用。Schrödinger2020 Maestro12.4采用基于经验的回归参数的打分函数,由氢键、疏水相互作用、键的扭转罚分等物理参数评分组成。由于不同的打分函数对不同类型的相互作用有不同权重和偏好,若分子与打分函数不兼容,可能导致结合打分过低。

本研究基于儿泻康贴膜透皮成分利用网络药理学和分子对接技术,依次分析了复方中主要活性成分、关键靶点、信号通路,发现儿泻康贴膜可能是通过发挥改善胃肠功能紊乱、降低内脏高敏感性、抑制肠道过度炎症反应、保护肠黏膜屏障、抗抑郁/

焦虑等药理作用治疗小儿腹泻、腹痛,为进一步确定儿泻康贴膜的药效物质基础及作用机制提供了理论层面的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邵婷,侯园园,马文献.玉枢散辅助治疗小儿腹痛呕吐腹泻的疗效观察[J].中国药物滥用防治杂志,2023,29(5):877-880.
Shao T, Hou Y Y, Ma W X. Observation of curative effect of Yushu Powder in adjuvant treatment of abdominal pain, vomiting and diarrhea in children [J]. Chin J Drug Abuse Prev Treat, 2023, 29(5): 877-880.
- [2] 杨爱华,杨娟.腹痛方穴位贴敷联合小建中汤治疗小儿腹痛(腹部中寒证)的疗效评价[J].中华养生保健,2023(19):38-40.
Yang A H, Yang J. Efficacy evaluation of acupoint application of abdominal pain recipe combined with Xiaojianzhong Decoction in treating children's abdominal pain (abdominal cold syndrome) [J]. Chin Health Care, 2023(19): 38-40.
- [3] 马聪园.温中止痛散敷脐佐治小儿肠系膜淋巴结炎(腹部中寒证)的临床观察[D].长沙:湖南中医药大学,2023.
Ma C Y. Clinical observation on the treatment of paediatric mesenteric lymphadenitis (abdominal cold syndrome) by applying warm middle-health and pain-relieving powder to the umbilical cord [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2023.
- [4] 朱荣欣,胡思源,丛培荣,等.儿泻康贴膜敷脐治疗小儿寒性泄泻的多中心随机对照临床研究[J].中医儿科杂志,2023,19(6):45-49.
Zhu R X, Hu S Y, Cong P R, et al. A multi-centre randomised controlled clinical study of pediatric cold diarrhoea treated with Erxie kang (儿泻康) plaster applied to the navel [J]. J Pediatr Tradit Chin Med, 2023, 19(6): 45-49.
- [5] 聂晓伟,乔金梅.儿泻康贴膜联合蒙脱石散治疗小儿非感染性腹泻的临床观察[J].济宁医学院学报,2020,43(5):339-341.
Nie X W, Qiao J M. The value of erxie kang plaster combined with smectite powder in the treatment of non-infectious diarrhea in children [J]. J Jining Med Univ, 2020, 43(5): 339-341.
- [6] 韩新民,汪受传,虞舜,等.小儿泄泻中医诊疗指南[J].中医儿科杂志,2008,4(4):1-3.
Han X M, Wang S C, Yu S, et al. Guidelines on Chinese Medicine for Paediatric Diarrhoea [J]. J Pediatr Tradit

- Chin Med, 2008, 4(4): 1-3.
- [7] 陈兰青, 郑玉华, 王丽丝. 中医腹部按摩干预对小儿腹泻疗效的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(10): 1950-1953.
- Chen L Q, Zheng Y H, Wang L S. Analysis of curative effect of abdominal massage combined with routine nursing in children with diarrhea [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2022, 34(10): 1950-1953.
- [8] 王洪蓓. «伤寒杂病论»寒与寒证研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- Wang H B. A Study of Cold and Cold Evidence in the Treatise on Typhoid Miscellaneous Diseases. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2006.
- [9] 刘同亭, 吕倩, 韩玮, 等. 低温环境对胃肠功能的影响及改善措施 [J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2020, 10(5): 214-219.
- Liu T T, Lü Q, Han W, et al. Influence of low temperature on gastrointestinal function and improvement measures [J]. Chin J Dig Med Imageology Electron Ed, 2020, 10(5): 214-219.
- [10] 许华冲. 基于湿证流感小鼠"菌群-肠-脑轴"的变化探讨"湿性重浊"的病理机制 [D]. 广州: 暨南大学, 2020.
- Xu H C. Exploration on the pathogenesis of "dampness being heavy and turbid" based on the changes of the flora-intestinal-brain axis of influenza mice with damp syndrome. Guangzhou: Jinan University, 2020.
- [11] 吴先林. 基于不同饲养环境中流感小鼠免疫识别和免疫应答探讨湿邪致病特点和本质 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- Wu X L. Characteristics and nature of pathogenicity of dampness based on immune recognition and immune response in influenza mice in different rearing environments [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.
- [12] 贺雪云. 基于钙信号研究腹泄型肠易激综合征大鼠内脏高敏感和胃肠动力障碍的发生机制 [D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- He X Y. Based on calcium signaling to study the mechanism involved visceral hypersensitivity and gastrointestinal motility disorders in IBS-D rats [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.
- [13] Sharma V K, Yang X Y, Kim S K, et al. Novel interaction between neurotrophic factor- α 1/carboxypeptidase E and serotonin receptor, 5-HTR1E, protects human neurons against oxidative/neuroexcitotoxic stress via β -arrestin/ERK signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 79(1): 24.
- [14] Yu X, Li S G, Xu Y M, et al. Androgen maintains intestinal homeostasis by inhibiting BMP signaling via intestinal stromal cells [J]. Stem Cell Reports, 2020, 15(4): 912-925.
- [15] 查兰兰, 余晓云, 沈磊. TRP通道与炎症性肠病内脏高敏感相关研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2024, 33(1): 83-86, 90.
- Zha L L, Yu X Y, Shen L. Research advances related to TRP channels and visceral hypersensitivity in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2024, 33(1): 83-86, 90.
- [16] 李天津, 余保平. 5-羟色胺3、4受体与胃肠运动及临床意义 [J]. 国外医学(消化系疾病分册), 2004, 24(6): 354-357.
- Li T J, Yu B P. 5-Hydroxytryptamine 3 and 4 receptors and gastrointestinal motility and clinical implications [J]. Int J Dig Dis, 2004, 24(6): 354-357.
- [17] 廖路敏, 王娇娇, 储浩然, 等. 艾灸干预腹泄型肠易激综合征大鼠 miR-24/SERT/5-HT 通路改善内脏高敏感状态实验观察 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(5): 59-66.
- Liao L M, Wang J J, Chu H R, et al. Moxibustion improves visceral hypersensitivity in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by exerting an intervention effect on the microRNA-24/serotonin transporter/5-hydroxytryptamine pathway [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2022, 41(5): 59-66.
- [18] 李阔韬, 李顺堂, 蓝玲, 等. EGFR及其信号通路在神经病理性疼痛中的作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(6): 474-479.
- Li K T, Li S T, Lan L, et al. The role of epidermal growth factor receptor and its signaling pathway in neuropathic pain [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2020, 27(6): 474-479.
- [19] Dai X, Wang L J, Wu J, et al. Src kinase inhibitor PP2 regulates the biological characteristics of A549 cells via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 16(4): 5059-5065.
- [20] 夏利显, 周娇俐, 梅丽俊, 等. 痛泻要方通过PI3K-AKT通路诱导细胞自噬治疗腹泄型肠易激综合征的机制 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(3): 468-471, 504.
- XI L X, Zhou J L, Mei L J, et al. The mechanism of Tongxie Yaofang in the treatment of diarrheal irritable bowel syndrome by inducing autophagy through PI3K-AKT pathway [J]. World J Integr Tradit West Med, 2021, 16(3): 468-471, 504.
- [21] 张聪伟, 刘力, 杜晓泉, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨固肠止泻丸治疗溃疡性结肠炎的分子机制 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(4): 145-150, 223-224.
- Zhang C W, Liu L, Du X Q, et al. Mechanism of guchang Zhixie pill(固肠止泻丸) in treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology and molecular docking

- [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2023, 50(4): 145-150, 223-224.
- [22] 白婷婷, 杨欣, 孙宏文. 信号通路调控腹泻型肠易激综合征的研究进展 [J]. 广西医学, 2021, 43(12): 1505-1508.
- Bai T T, Yang X, Sun H W. Research progress of signaling pathway regulating diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Guangxi Med J, 2021, 43 (12): 1505-1508.
- [23] 吴洁. 沙棘干乳剂和运脾消滞法推拿治疗小儿功能性腹痛(食积气滞型)临床观察及药理研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- Wu J. Clinical observation and pharmacological study on dry emulsion of *Hippophae rhamnoides* and massage of invigorating spleen and eliminating stagnation in the treatment of functional abdominal pain in children. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [24] 俞帆. 腹泻型肠易激综合征常见证候与焦虑抑郁关系的探索研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- Yu F. Study on the Correlation between TCM Syndrome Types of Diarrheal Irritable Bowel Syndrome, Anxiety and Depression. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [25] Pan H T, Xi Z Q, Wei X Q, et al. A network pharmacology approach to predict potential targets and mechanisms of "*Ramulus Cinnamomi (cassiae)*-*Paeonia lactiflora*" herb pair in the treatment of chronic pain with comorbid anxiety and depression [J]. Ann Med, 2022, 54 (1): 413-425.
- [26] 布凡. 基于数据挖掘中医药治疗广泛性焦虑症的用药规律研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2023.
- Bu F. A Study on the Regularity of Traditional Chinese Medicine in Treating Generalized Anxiety Disorder based on data mining [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2023.

[责任编辑 齐静雯]