

应用系统生物学方法从次生代谢物作用蛋白受体角度探索吴茱萸的归经研究

滕杰¹, 梁怡红², 李毅², 王树青¹, 赵雅杰^{1#}, 谭丽楠^{1#}, 刘昌孝³

1. 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 日照市人民医院, 山东 日照 276800

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要:目的 以吴茱萸的归经研究为例, 构建基于系统生物学从次生代谢物作用蛋白受体角度研究中药归经的新方法。方法 建立吴茱萸的次生代谢物成分-作用受体的复杂网络, 以至少与 5 个化合物高度选择为条件选取蛋白受体, 并将受体组织器官分布、功能与吴茱萸归经脏腑循经器官与功效互相比对验证。结果 共获得吴茱萸的次生代谢物高度选择作用的 34 个受体, 其分布和功能与吴茱萸传统归经的循经解剖器官组织归位及功效高度一致。结论 应用本方法从成分作用受体角度说明中药归经的现代科学物质基础及机制, 将助推归经相关研究, 具有重要的参考价值。

关键词: 吴茱萸; 归经; 受体; 次生代谢物; 系统生物学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1841-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.016

Study on meridian tropism of *Evodiae Fructus* based on receptors of its secondary metabolites using system biological method

TENG Jie¹, LIANG Yi-hong², LI Yi², WANG Shu-qing¹, ZHAO Ya-jie¹, TAN Li-nan¹, LIU Chang-xiao³

1. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. People's Hospital of Rizhao, Rizhao 276800, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective Using meridian tropism of *Evodiae Fructus* as an example, a new method was built based on system biological method to study the tropism of Chinese herbal medicine from the view of secondary metabolites acting with protein receptors. **Methods** After establishing the complex secondary metabolites compounds-receptors network of *Evodiae Fructus*, the receptors connecting with at least five compounds were selected. These functions and tissue distribution of receptors were compared with the traditional efficacy and meridian viscera and organs of *Evodiae Fructus*. **Results** A total of 34 receptors of secondary metabolites of *Evodiae Fructus* were acquired. Their functions and distributions were consistent highly with the traditional efficacy and meridian tropism of *Evodiae Fructus* locating anatomical organs and tissues. **Conclusion** This original innovation method clearly elucidated the modern scientific material basis and mechanism of the meridian tropism of Chinese herbal medicine from the aspect of component action receptor. Also it will be of important reference value for the study of promoting meridian tropism.

Key words: *Evodiae Fructus*; meridian tropism; receptors; secondary metabolites; system biology

中药归经理论是中医理论对中药性能的一种认识, 是中药药性理论体系的核心内容之一, 它是中医以脏腑经络理论为基础, 在长期临床用药实践与疗效观察中对中药作用及其特性的总结, 也是解释中药作用机制和指导临床用药的重要依据。中药归

经的现代概念涵义至今仍没有统一的阐述, 主要因为归经的“经”的含义一直是有争议的问题, 《中国药典》和中药书籍多采用脏腑之名。目前大多数研究者形成共识之处: 归经理论反映了药物药效所在, 是指药物对某“经”的选择性作用, 是有关药物作

收稿日期: 2017-09-23

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (20110490793, 2013T60260)

作者简介: 滕杰 (1972—), 女, 副教授, 主要从事中药作用机制与药性相关研究。E-mail: tengjie@tmu.edu.cn

#天津医科大学药学院 2015 届本科实习生

用的归属、趋向、归趋、到达,即定向和/或定位;归经所指的脏腑经络是中医理论中的脏腑和经络,是整合功能和脏腑组织的综合系统,包含解剖实体在内,但不等同于现代解剖组织学中的内脏器官;中药的归经依据具有多样性,如按照临床疗效、五味和病因等^[1-5]。

中药成分对蛋白受体具有选择性作用,将作用受体与中药归经研究关联的初步想法虽获得众多学者的认同^[1-5],但实际应用一直鲜有报道。研究某味中药成分的作用受体是否能阐明该中药的归经,如何基于中药成分的作用受体研究中药的归经,这些问题的阐释既需要整体性研究观点/理念的创新,又需要研究方法的创新。

吴茱萸 *Evodiae Fructus* 为芸香目芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) huang 的干燥近成熟果实,其性味为辛、苦、热,小毒,归肝、肾、脾、胃经,可散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻;用于厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻^[6]。吴茱萸为历版《中国药典》所收录,是使用历史悠久的常用中药,其化学成分即次生代谢物的作用研究报道也较多^[7-8]。本研究拟以吴茱萸为例,从次生代谢物作用蛋白受体角度探索吴茱萸的归经研究,采用系统生物学方法为研究手段,为应用受体理论研究中药归经提供新的方法学示范。

1 材料与方法

1.1 吴茱萸中次生代谢产物及其体内代谢物的确定

查阅 Pubmed、CA 等数据库文献,检索吴茱萸中次生代谢物并绘制 3D 结构式。

1.2 受体结构信息与分子对接

蛋白三维结构来源于蛋白质数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)。采用 Autodock Vina 软件将吴茱萸中次生代谢化合物与蛋白进行分子对接筛选潜在作用受体。

1.3 选取多化合物高度选择的蛋白受体并查阅其功能和组织表达

应用 Cytoscape 软件生成化合物-蛋白受体网络,选取至少 5 个化合物与之作用的受体。文献检索受体功能并分析,并查阅文献及 Protein Atlas 中相关组织表达丰度的数据^[9],再构建多化合物作用受体-器

官组织网络,分析多受体高表达的器官组织。

1.4 系统生物学分析结果与传统归经比较

将系统生物学分析结果与吴茱萸传统归经的经络解剖器官组织归位及吴茱萸功效进行比较。

2 结果

2.1 吴茱萸次生代谢物及其代谢产物

查阅 Pubmed、CA 等数据库文献,检索吴茱萸中次生代谢产物及其在体内代谢产物共计 66 个化合物,具体名称见表 1。

2.2 化合物-受体可视化网络构建

将化合物-受体可视化成网络图,显示出有多个化合物高度选择作用的受体(至少 5 个化合物与之作用)共计 34 个(表 2)。选择度最高的是与能量代谢相关的丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) 和与钙离子释放相关的 FK506 结合蛋白 1A (FKBP1A)。检索得到这些受体主要的功能见表 3。吴茱萸中主要化合物如吴茱萸次碱、吴茱萸碱、柠檬苦素等不仅能与多个受体作用,且基本都作用于具有高选择度的受体。

2.3 多化合物作用的受体在组织表达丰度分析

查阅并记录多化合物作用的受体在组织的表达丰度。根据蛋白在组织器官中丰度不同,分别定义高、中、低、零表达程度为 3、2、1、0,而后按照等权重求和法计算排序。综合受体表达个数和表达丰度评价获得吴茱萸化合物作用的受体高度分布在生理解剖器官组织排序,并将这些受体-器官组织可视化成网络图,显示出有多个受体且丰度中、高程度表达的器官组织(图 1)。在 45 个组织器官中名次靠前排的依次是肾、胎盘、胆囊、膀胱、睾丸、十二指肠、盲肠、皮肤、附睾、胃、精睾、肝、扁桃腺、结肠、肾上腺和小肠,表明吴茱萸化合物作用的受体高度分布在生理解剖肝、肾和生殖器官中。

2.4 传统归经与现代解剖组织归位及功效比较

将吴茱萸传统归经的经络脏腑(功能脏腑)、经络解剖器官组织归位(现代解剖生理器官组织)及吴茱萸功效列表,并与网络分析结果比较,具体见表 3。

3 讨论

《中国药典》2015 年版中吴茱萸次碱、吴茱萸碱、柠檬苦素是吴茱萸中成分的定量测定标准物^[6],它们不仅含量高且是活性化合物。化合物-受体网络中可看出体内吸收含量高的活性化合物对具有高选择度的受体所起作用相叠加。而多化合物高度选择

表 1 吴茱萸次生代谢产物及其体内代谢产物名称

Table 1 Secondary metabolites of *Evodiae Fructus* and parts of their metabolites *in vivo*

编号	化合物名称	编号	化合物名称
1	12 α -羟基吴茱萸内酯醇	34	1-甲基-2-[7-羟基-(E)-9-十三碳烯]-4(1H)-喹诺酮
2	羟基吴茱萸碱	35	1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮
3	吴茱萸次碱	36	1-甲基-2-十四烷基-4(1H)-喹诺酮
4	3-萜烯	37	2-壬基-4(1H)-喹诺酮
5	海茵胺	38	2-十一碳烯-4(1H)-喹诺酮
6	fordimine	39	6 α -乙酰氧基-5-表柠檬苦素
7	3,3-二甲基丙烯基-p-丙烯基苯醚	40	6 β -乙酰氧基-5-表柠檬苦素
8	柠檬苦素	41	(R)-石虎柠檬苦素 A
9	吴茱萸胺 I	42	石虎柠檬苦素 A
10	吴茱萸胺 II	43	吴茱萸喹那唑林
11	棉花素	44	7,8-去氢吴茱萸次碱
12	四氢厚朴酚	45	7-羟基吴茱萸次碱
13	n,n-二甲基-5-甲氧基色胺	46	丙酮基吴茱萸碱
14	9,10-二羟基硬脂酸	47	羧基吴茱萸碱
15	1,3,4-三去氢防己诺林碱水合物	48	二吴茱萸碱
16	1-甲基-2-十五碳烷基-4(1H)-喹诺酮	49	二氢吴茱萸卡品碱
17	1-甲基-2-[(Z)-6-十一碳烯]-4(1H)-喹诺酮	50	吴茱萸卡品碱
18	黄皮树碱	51	evodiagenine
19	黄柏酮	52	evodirutin B
20	吴茱萸内酯醇	53	evodirutin A
21	吴茱萸酰胺	54	甲酸二氢吴茱萸碱
22	吴茱萸碱	55	臭辣树交酯 A
23	花生苷	56	异鼠李素- β -D-半乳糖
24	芸香碱	57	异鼠李素
25	去氢吴茱萸碱	58	罗旦梅交酯
26	1-甲基-2-[(Z)-10-十五碳烯]-4(1H)-喹诺酮	59	槲皮素
27	二氢吴茱萸次碱- α	60	雷特西宁
28	去甲基吴茱萸酰胺	61	吴茱萸苦素乙酸酯
29	1,2,3,4-四氢-1-O- β -卡波啉	62	茵芋碱
30	1-甲基-2-[(4Z,7Z)-4,7-十三碳二烯]-4(1H)-喹诺酮	63	吴茱萸果酰胺-IV
31	1-甲基-2-[(1E,5Z)-1,5-十一碳二烯]-4(1H)-喹诺酮	64	吴茱萸果酰胺-I
32	1-甲基-2-[(E)-1-十一碳烯]-4(1H)-喹诺酮	65	吴茱萸果酰胺-II
33	1-甲基-2-[(Z)-4-壬烯基]-4(1H)-喹诺酮	66	β -卡波啉

表 2 靶标蛋白网络中高选择度的受体蛋白

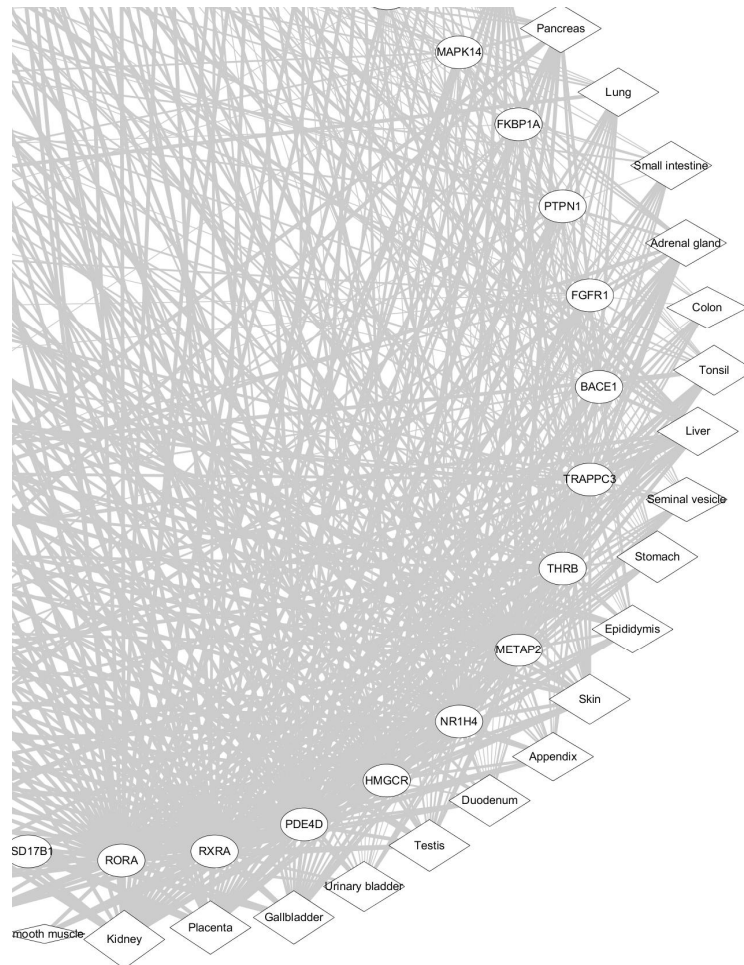
Table 2 Target receptor proteins with high selective degrees in compound-target protein network of *Evodiae Fructus*

编号	受体	度	编号	受体	度	编号	受体	度
1	MAPK14	20	13	CASP1	9	25	SRC	6
2	FKBP1A	20	14	FGFR1	8	26	RXRA	5
3	HSD11B1	14	15	TRAPPC3	7	27	RORA	5
4	PDE4D	13	16	KDR	7	28	CYP2C8	5
5	CRABP2	13	17	AR	7	29	NR1H4	5
6	F2	12	18	THRB	7	30	RBP4	5
7	BACE1	12	19	ALB	7	31	HCK	5
8	PTPN1	12	20	HSP90AA1	7	32	LCK	5
9	CDK2	10	21	METAP2	7	33	CA2	5
10	TTR	9	22	MME	6	34	TRPV1	5
11	HMGCR	9	23	HSD17B1	6			
12	SHBG	9	24	MMP3	6			

表 3 吴茱萸的归经与其主要作用受体分布功效综合分析

Table 3 Comprehensive list of *Evodiae Fructus*' meridian tropism compared with its main receptors' location and function

归经	功能 脏腑	经络对应症候	循经主要现代 解剖器官组织	吴茱萸对应主治功效	吴茱萸作用主要受体高表达 解剖器官组织	吴茱萸作用主要受体 的功能
足厥阴肝经	肝	男子疝气,女子小腹痛,喉咙干; 面色灰暗,呕逆腹泻遗尿,尿 滞留;肝阳上亢时头痛,眩晕 烦躁,中风不语	生殖器官、胃、 肝、胆、肺、 眼球后	散寒止痛、降逆止呕、助阳 止泻;用于厥阴头痛、寒 疝腹痛、经行腹痛、腕腹 胀痛、五更泄泻	胎盘、睾丸、膀胱、附睾、 胃、扁桃体、肝、附件、 肺、肾上腺、精囊	涉及到 MAP 激酶活 性,非跨膜蛋白酪 氨酸激酶活性,核 受体活性,甾体脱 氢酶活性,甾体激 素、雄性激素等结 合作用,尿核苷酸 结合、ATP 结合及 脂结合作用,温度 和疼痛敏感作用
足少阴肾经	肾	足底灼热而痛;面色发黑,嘈杂, 腹泻,心痛,气急气痛;肾虚 时阳萎,性欲减退	生殖器官、膀胱、 肾、肝、肺	助阳止泻、降逆、止痛;治 腕腹胀痛	肾、胎盘、睾丸、膀胱、附 睾、肝、精囊、附件、肺、 支气管、乳房、肾上腺	
足太阴脾经	脾	下肢肿胀发冷;噎气,腹胀,大 便塘泄,水肿,呕吐,胃痛	脾、胃、胰、心 肺、舌下	散寒止痛、降逆止呕;治寒 湿脚气、腕腹胀痛	十二指肠、胃、小肠、胰、 直肠	
足阳明胃经	胃	胸腹灼热或怕冷;消化不良,腹 胀满	胃、脾	散寒止痛、降逆止呕;治腕 腹胀痛、呕吐吞酸	十二指肠、胃、小肠、直肠	



部分网络图有多个受体且丰度中高强度表达的器官组织,圆形代表靶标受体蛋白,菱形代表器官组织
Tissue or organs located receptors with high numbers and with high abundance, circle shape represents target receptor protein, diamond shape represents tissue or organs

图 1 靶标受体蛋白-组织器官网络

Fig. 1 Target receptor protein-tissue or organs network

的受体(表 2、3)功能涉及能量代谢、钙离子释放、性激素与内分泌、尿核苷酸结合、脂结合、温度和疼痛敏感作用等方面,这与吴茱萸主治的散寒止痛助阳等功效有良好的对应关系。

归经所指的脏腑经络不等同于现代解剖组织学中的内脏器官,是整合功能和脏腑组织的综合系统,但又包含相应解剖实体在内,绝非完全脱离生理解剖基础。当代学者结合古籍与生理解剖学对经络分布解剖的科学研究已有很深厚的基础,本研究主要依据蔺云桂编著《经络图解》记录循经主要现代解剖器官组织及经络症候^[10]。《中国药典》中记载吴茱萸归脾、胃、肝、肾经。表 3 中显示吴茱萸的主治功效与脾、胃、肝、肾经主要对应疾病症候具有很好的对应关系,这表明吴茱萸归经历史形成依据主要源于其功效与靶向功能脏腑。中医经络理论里分布于生殖器的经脉中属于十二经主体干线的只有足厥阴肝经和足少阴肾经。大多数吴茱萸归经历史文献记载含有足厥阴肝经和足少阴肾经 2 种,其中各类记载必不可少的是足厥阴肝经。吴茱萸主治寒疝腹痛,经行腹痛,脘腹胀痛,助阳止泻,这些作用都与现代生殖系统功能、肾及膀胱功能高度相关。

现代植物化学与药理学研究表明吴茱萸中主要生物碱活性成分吴茱萸碱和吴茱萸次碱都作用于瞬时受体电位香草酸亚型 1 (TRPV1) 受体从而起到热刺激和镇痛的作用。TRPV1 受体属于低丰度表达的膜受体,主要分布在肾、十二指肠、小肠、子宫等脏器中^[11-13]。而这些脏器也主要分布在足厥阴肝经和足少阴肾经循经路线上。图 1 中能看到含有多个受体且丰度中、高程度表达的器官组织重点分布在肾、生殖系统器官、胃、膀胱、肝、十二指肠等器官上,这与吴茱萸归脾、胃、肝、肾经循经主要现代解剖器官组织高度一致。

本研究结果显示,吴茱萸中活性成分主要作用受体的功能不仅与吴茱萸功效有良好对应关系,并且这些受体分布也与吴茱萸归经循经主要解剖器官组织高度一致,也从分子、组织和系统层面解释了吴茱萸归经的科学内涵。本研究思路是“中药成分-作用受体-受体组织器官分布、功能-比较归经关联性”与中药归经脏腑循经器官及功效互相比对印证,应用系统生物学方法从成分作用受体角度说明中药归经的现代科学物质基础及机制。本研究方法的新颖之处主要有:1)应用系统网络显示并分析复杂作用关系;2)将新的蛋白质组学研究成果^[9]应用于中

药归经研究中;3)基于多角度比较阐述归经与受体在现代器官组织分布及功效的关联性。本方法的研究特点是多学科整合,工作量大,繁复细致。本研究通过对吴茱萸次生代谢产物作用潜在受体在人体内器官组织分布及其功能的分析探讨吴茱萸的归经研究,为实现受体理论用于中药归经研究提供了思路与创新方法学示范。

健全健康的人是一个功能完整的平衡系统,具有一定的鲁棒性。人体内的经与络是相互紧密联系并有各自特性的子系统。在中医理论中这些子系统的定位是特异的,尽管有些功能重叠但主要功能是不同的、各有侧重表述;但这些子系统在定位于现代解剖学器官组织及对应功能描述是交叉重叠的。简而言之,中药归经理论的重要基石为药物功效与定位(和/或定向),尤以药物功效与经络功能匹配方面为重。某味中药的化学成分所作用的主要受体也需从在人体内的分布(定位)与功能两个角度予以描述,而对于这些受体功能的注释分析可以获取病因和治疗功效这两方面紧密联系的信息。中药的归经依据虽然具有多样性,但多数中药的归经依据是按照临床疗效和病因等来归属的。从这个角度来看,某中药所归经络的功能和治疗描述(经络对应症候)与该中药的成分所作用受体涉及的病因和功效呈现出正相关。因此本研究明确了中药成分作用受体是阐明多数中药归经科学内涵的最重要研究基础之一的问题,并且提供应用系统生物学如何基于中药成分的作用受体研究中药归经的创新性方法与思路。

基于中医经络理论的中药归经在漫长历史形成过程中也正是源于系统性特点而不断发展完善。本研究思路和方法的最大特点就是开放式、包容性高、可补充更新从而更加完善。这也是系统研究方法所具有的共性特点。随着诸受体结构、功能以及各类疾病状态下受体表达分布的深入研究,以及研究手段的进步提高中药成分作用受体确认的准确性,必会促进采用系统生物学方法从中药成分的受体分布功效角度阐明中药归经的现代科学内涵;与此同时,也将丰富中药归经内容以及中医经络理论,促进中药临床合理用药及开发中药新的临床应用。秉承“继承不泥古,发扬不离宗”,这种原始创新性研究方法及思路必将为今后研究中药归经起到特有的重要助推作用,同时也对热爱中医药学的众多科研工作者致力于深入研究中药药性提供重要的参考价值。

参考文献

- [1] 贲长恩, 郭顺根. 中药归经理论研究述评 [J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(2): 2-7.
- [2] 李志勇, 李彦文, 荀丽英, 等. 中药归经研究的概述与设想 [J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(5): 404-406.
- [3] 张 杰, 李 滢. 利用蛋白质组学研究技术开展中药归经理论实质的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(1): 5-7.
- [4] 张铁军, 刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [5] 贺福元, 邓凯文, 杨岩涛, 等. 基于超分子化学的中药药性理论研究方法探讨(1)中药归经 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1624-1629.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] Yang X W, Teng J. Chemical constituents of the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2007, 16(1): 20-23.
- [8] Teng J, Yang X W. Two new indooquinazoline alkaloids from the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Heterocycles*, 2006, 68(8): 1691-1698.
- [9] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström M B, et al. Tissue-based map of the human proteome [J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419.
- [10] 蔺云桂. 经络图解 [M]. 第3版. 福州: 福建科学技术出版社, 2006.
- [11] Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, et al. Partial activation and inhibition of TRPV1 channels by evodiamine and rutaecarpine, two major components of the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(5): 1225-1230.
- [12] Ivanova B, Spiteller M. Evodiamine and rutaecarpine alkaloids as highly selective transient receptor potential vanilloid 1 agonists [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 65(5): 314-324.
- [13] 韩重阳, 王晓良. 瞬时受体电位通道研究进展 [J]. 生理科学进展, 2008, 39(1): 27-32.