

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0173-06

基于老药新用的气滞胃痛颗粒治疗慢性反流性胃炎作用机制研究

韩凌¹, 辛明媛², 包永睿^{3,4,5}, 王帅^{3,4,5}, 李天娇^{3,4,5}, 杨欣欣^{3,4,5}, 孟宪生^{3,4,5*}

¹辽宁华润本溪三药有限公司,本溪 117004; ²东北国际医院,沈阳 110623; ³辽宁中医药大学药学院;

⁴辽宁省组分中药工程技术研究中心; ⁵辽宁省现代中药研究工程实验室,大连 116600

摘要:探讨气滞胃痛颗粒治疗慢性反流性胃炎的作用机制,为其临床新适应症的研究开发奠定基础。采用代谢组学的研究方法,对慢性反流性胃炎大鼠及气滞胃痛颗粒各给药组血清内源性物质进行分析,Agilent MPP 12.1 软件对数据进行倍数检验、主成分分析,寻找各组中血清差异化合物,并对差异化合物进行结构鉴定与代谢通路分析。倍数检验结果显示,空白组与模型组在内源性化合物水平存在显著差异;主成分分析结果说明各组与模型组均得到较好分离;气滞胃痛颗粒治疗组血清中鉴定出 22 个差异化合物,涉及氨基酸代谢、鞘磷脂代谢、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢等代谢通路。本研究从内源性化合物变化角度揭示气滞胃痛颗粒治疗慢性反流性胃炎的作用机制,为该方在治疗反流性胃炎方面的临床应用提供数据支持。

关键词:气滞胃痛颗粒;老药新用;慢性反流性胃炎;代谢组学;作用机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.026

Study on the Mechanism of Qizhiweitong Granules Treating Chronic Reflux Gastritis Based on the New Use of Old Medicine

HAN Ling¹, XIN Ming-yuan², BAO Yong-rui^{3,4,5}, WANG Shuai^{3,4,5}, LI Tian-jiao^{3,4,5},
YANG Xin-xin^{3,4,5}, MENG Xian-sheng^{3,4,5*}

¹China Resources in Liaoning Benxi Third Pharmaceutical Co., Ltd., Benxi Liaoning 117004, China;

²Northeast International Hospital, Shenyang 110623, China;

³School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine;

⁴Province Multi-Component Chinese Medicine Engineering Technology Research Center of Liaoning;

⁵Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory of Liaoning, Dalian Liaoning 116600, China

Abstract: In order to explore the mechanism of Qizhiweitong Granules treating chronic reflux gastritis, lay a foundation for the research and development of new indications. Using the method of metabolomics to study the serum endogenous substance of rats with chronic reflux gastritis and administrated with Qizhiweitong Granules. Agilent MPP 12.1 software was used to perform multiple tests and principal component analysis of the data, to find the serum difference compounds in each group, and to conduct structural identification and metabolic pathway analysis of the difference compounds. Multiple testing results showed that there were significant differences in endogenous compound levels between the blank group and the model group. Principal component analysis results showed that each group was well separated from the model group. There were 22 different compounds identified in the serum of the treatment group of Qizhiweitong Granules, referring amino acid metabolism, phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, purine metabolism and other metabolic pathways. This study from the perspective of endogenous compounds changes to reveal the mechanism of Qizhiweitong Granules treating chronic reflux gastritis, which provide data support for the clinical application.

Key words: Qizhiweitong Granules; Older drugs new use; Chronic reflux gastritis; Metabolomics; Mechanism of action

气滞胃痛颗粒为临床治疗肝郁气滞,胸痞胀满,

胃脘疼痛的常用有效方剂。经 30 多年的临床应用,疗效确切显著、无毒副作用,为临床治疗胃脘疼痛的一线用药。近年药理与临床研究发现,其对反流性胃炎具有较好的治疗作用^[1,2]。在现有临床应用有

收稿日期:2018-04-19 接受日期:2018-05-03

基金项目:辽宁省特聘教授项目(辽教发[2014]187 号);辽宁省高等学校创新团队支持计划项目(辽教函[2018]39 号)

*通信作者 Tel:86-411-85890185; Email:mxsvvv@126.com

效方剂基础上,开发药物新适应症,可大大减少研发周期与成本,尤其在保障药物安全性方面具有独特优势^[3,4]。本研究在前期针对气滞胃痛颗粒治疗反流性胃炎药效研究的基础上,进一步采用代谢组学的研究方法^[5],对其治疗慢性反流性胃炎的作用机制进行深入研究,为气滞胃痛颗粒老药新用、临床新适应症的增加提供参考。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级健康 Wistar 大鼠,雄性,体重 200 ± 20 g,辽宁长生生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(辽)2010-0001。

1.2 仪器设备

Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间(Q-TOF)LC/MS 系统(美国安捷伦公司); Agilent 1290 Infinity 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

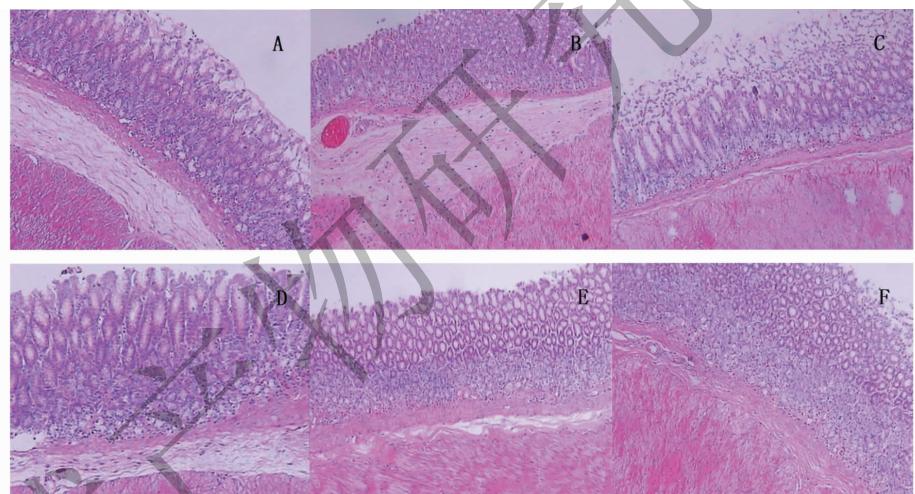


图 1 各组病理切片图(100×)

Fig. 1 Histopathological sections of each group(100×)

注:A. 空白组,B. 模型组,C. 气滞胃痛低剂量组,D. 气滞胃痛中剂量组,E. 气滞胃痛高剂量组,F. 柚橼酸莫沙必利组。

Note: A. Blank group, B. Model group, C. Low dose of Qizhiweitong Granules, D. Middle dose of Qizhiweitong Granules, E. High dose of Qizhiweitong Granules, F. Citric acid moxapride.

可见模型组大鼠胃黏膜表层有坏死碎片,黏膜变薄伴有少量充血,黏膜肌层水肿增厚,结缔组织出现充血,严重者可见腺体肠化生,同时有炎性因子窜到黏膜层内。气滞胃痛颗粒低、中、高剂量组血管充血渐渐消失,肌层有恢复现象,炎性细胞减少,高剂量组效果最好,且接近阳性对照药枸橼酸莫沙必利组,证明气滞胃痛颗粒具有缓解及治疗反流性胃炎的药理作用。

1.3 药物与试剂

气滞胃痛颗粒(辽宁华润本溪三药有限公司,批号:20130910);枸橼酸莫沙必利片(亚宝药业,批号:130705)。

2 方法与结果

2.1 气滞胃痛颗粒治疗慢性反流性胃炎药效研究

健康 Wistar 大鼠 48 只,除空白对照组外,其余大鼠按(15 mL/kg)空腹灌胃自制反流液(牛磺胆酸钠 2.5 g,卵磷脂 0.25 g,胰酶 1.5 g,纯水定容至 100 mL),一日 2 次,造模 4 周后,将其随机分为模型组、气滞胃痛颗粒高(4.5 g/kg/d)、中(1.5 g/kg/d)、低(0.5 g/kg/d)剂量组和枸橼酸莫沙必利组(0.03 g/kg/d),每组 8 只;连续给药 2 周。末次给药后,禁食不禁水 24 h,眼眶取血,分离血清留作代谢组学分析;另取大鼠胃窦部组织作病理学观察^[1]。

2.2 气滞胃痛颗粒治疗慢性反流性胃炎作用机制研究

2.2.1 色谱质谱分析条件

色谱分析条件:Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:A-0.1% 甲酸水溶液,B-乙腈;梯度洗脱(0~5 min, B:5~55%;5~20 min, B:55~100%);流速:1.0 mL/min,分流比 3:1;柱温:45 °C。

一级质谱分析条件:电喷雾离子源(Dual ESI),正离子模式检测,干燥气温度350℃,干燥气流速9L/min,雾化器压力45 psig,毛细管电压4 000 V,碎裂电压175 V,Skimmer 65 V,OCT 1RF Vpp 250 V。采集速率1.1 Spectra/s,质量扫描范围 m/z 100~1 700。

二级质谱分析条件:电喷雾离子源(Dual ESI),

正离子模式检测,干燥气体温度325℃,干燥气体流速6 L/min,雾化器压力45 psig,鞘气温度350℃,鞘气流速12 L/min,毛细管电压4 000V,碎裂电压175 V,Skimmer 65 V,OCT 1RF Vpp 750 V,碰撞能量为10eV、20eV,质量扫描范围 m/z 100~1 700。

2.2.2 代谢轮廓分析

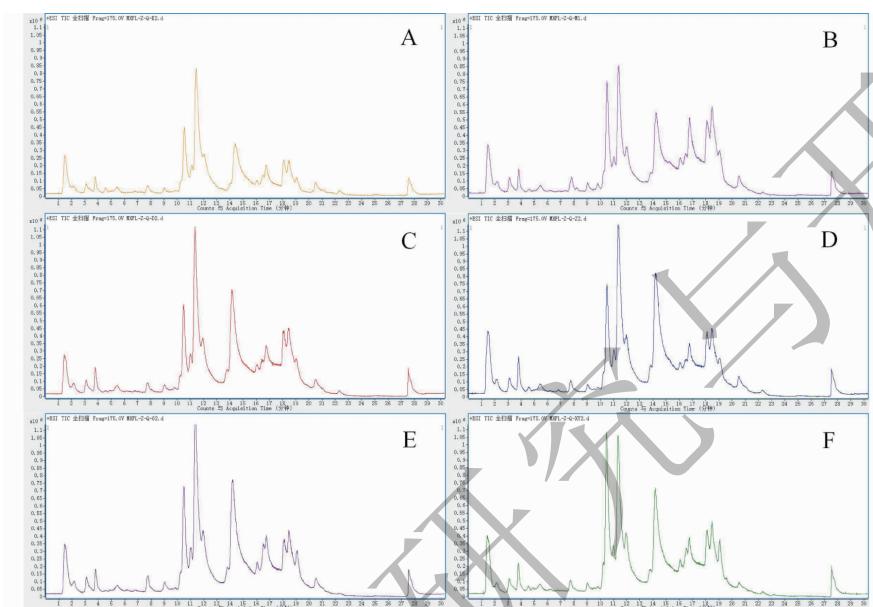


图2 各组总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagram of each group

注:A. 空白组,B.. 模型组,C. 气滞胃痛低剂量组,D. 气滞胃痛中剂量组,E. 气滞胃痛高剂量组,F. 柚橼酸莫沙必利组。

Note: A. Blank group, B. Model group, C. Low dose of Qizhiweitong Granules, D. Middle dose of Qizhiweitong Granules, E. High dose of Qizhiweitong Granules, F. Citric acid moxapride.

2.2.3 数据统计学处理及分析

2.2.3.1 倍数检验分析

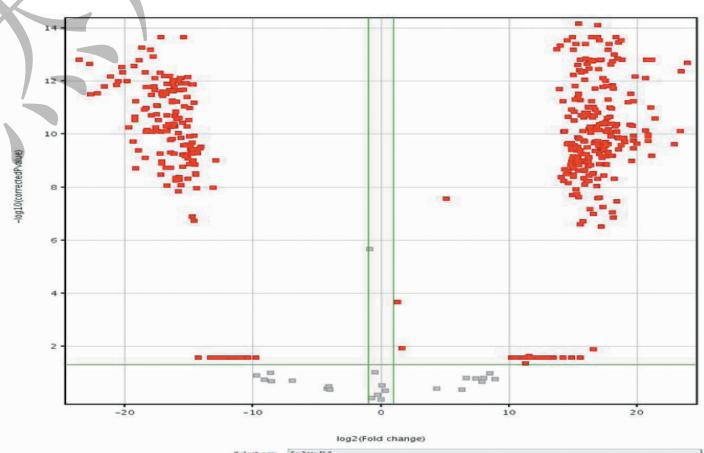


图3 空白组与模型组 Log2 Fold change 图

Fig. 3 The Log2 Fold change graph between blank group and the model group

结果可知空白组与模型组得到较好的分离

(Fold change > 2), 说明此模型建立的合理。

2.2.3.2 主成分分析(PCA)

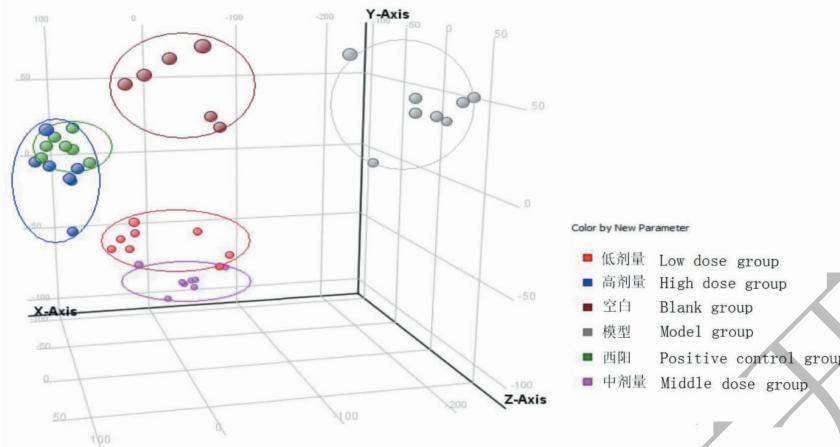


图4 各给药组三维PCA图

Fig. 4 Three-dimensional PCA diagram of each drug group

通过PCA的三维散点分布图,以X、Y、Z轴为第一、第二和第三主成分,其中第一主成分贡献率为68.13%,第二主成分贡献率为5.52%,第三主成分贡献率为2.6%,累积贡献率为76.25%,说明此三

维图可更好更真实的反映组数据的分类情况^[6,7]。且给药组与模型组得到较好分离。

2.2.3.3 聚类分析

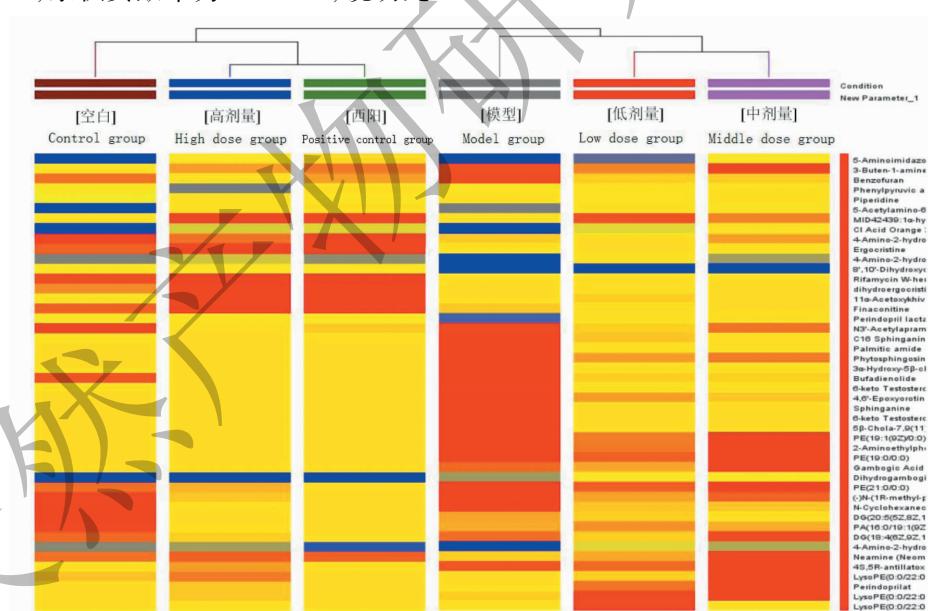


Fig. 5 Serum hierarchical clustering diagram of different groups

可见气滞胃痛颗粒高剂量组与空白组、阳性对照药莫沙必利组聚为一类,气滞胃痛颗粒中、低剂量组与模型组聚为一类,说明气滞胃痛颗粒高剂量组对内源性代谢物的影响接近空白组。

2.2.4 内源性差异代谢物的鉴定

通过查阅代谢物信息数据库,MPP12.6软件分析发生显著变化($P < 0.05$)的代谢物小分子,再通过KEGG、HMDB、METLIN等代谢物数据库进行辅助检索及比对^[8],最终得到代谢物的鉴定结果,见表1。

表 1 气滞胃痛颗粒组所调控内源性代谢物初步鉴定结果(与模型组比较)

Table 1 Preliminary identification results of endogenous metabolites controlled by Qizhiweitong Granules(compared with model group)

序号 No.	RT (min)	选择离子 Ion mode	精确质量 Da	分子式 Molecular formula	碎片离子分子量 <i>m/z</i>	鉴定化合物 Identified compound
1	1.393	[M + H] ⁺	295.0547	C ₈ H ₁₄ N ₃ O ₇ P	10eV:59. 548 6、140. 069 2、236. 120 2、281. 059 2	5-Aminoimidazole ribonucleotide
2	1.554	[M + H] ⁺	71.0738	C ₄ H ₉ N	10eV:55. 055 0、57. 058 3	3-Buten-1-amine
3	1.973	[M + H] ⁺	165.0789	C ₉ H ₁₁ NO ₂	10eV:103. 053 7、120. 080 6、131. 049 7、149. 059 1	Phenylalanine
4	2.177	[M + H] ⁺	85.0891	C ₅ H ₁₁ N	10eV:57. 057 9、86. 096 9	Piperidine
5	3.808	[M + H] ⁺	204.0900	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	10eV:118. 064 7、144. 079 5、146. 060 0、188. 070 7	D-Tryptophan
6	4.572	[M + H] ⁺	581.2915	C ₂₃ H ₄₃ N ₅ O ₁₂	10eV:86. 097 2、203. 138 3、472. 222 2、528. 765 3	N3'-Acetylaramycin
7	4.903	[M + H] ⁺	474.3164	C ₃₂ H ₄₂ O ₃	10eV:133. 087 6、232. 092 4、327. 169 4、459. 273 7	MID42439: 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl) phenyl] -
8	7.728	[M + H] ⁺	273.2674	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	10eV: 137. 058 8、172. 085 6、216. 060 9、256. 261 8	C16 Sphinganine
9	7.780	[M + H] ⁺	255.2560	C ₁₆ H ₃₃ NO	20eV:43. 054 3、57. 069 9、88. 075 3、102. 091 4	Palmitic amide
10	7.789	[M + H] ⁺	317.2931	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	10eV:146. 117 4、212. 246 8、256. 262 7	Phytosphingosine
11	7.856	[M + H] ⁺	354.2568	C ₂₄ H ₃₄ O ₂	10eV:161. 132 8、221. 150 5、275. 197 7	Bufadienolide
12	8.657	[M + H] ⁺	414.2759	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	10eV:119. 085 3、201. 209 8、281. 137 9、329. 166 9	Eplerenone
13	9.051	[M + H] ⁺	436.1861	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	10eV:133. 086 7、239. 148 9、303. 112 1、352. 414 4	4, 6'-Epoxyorotiniflavan-4-ol
14	9.809	[M + H] ⁺	356.2709	C ₂₄ H ₃₆ O ₂	10eV:135. 119 0、247. 171 1	5 β -Chola-7, 9 (11)-dien-24-oic Acid
15	9.870	[M + H] ⁺	515.2980	C ₂₆ H ₄₆ NO ₇ P	10eV:184. 071 4、355. 276 6、457. 223 0	2-Aminoethylphosphocholate
16	9.871	[M + H] ⁺	493.3148	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	10eV:184. 072 4、283. 176 2、417. 246 6	PE(19:1(9Z)/0:0)
17	11.414	[M + H] ⁺	183.0653	C ₇ H ₉ N ₃ O ₃	10eV:125. 000 2、137. 068 6、154. 289 4	4-Amino-2-hydroxylamino-6-nitrotoluene
18	12.237	[M + H] ⁺	644.2900	C ₃₁ H ₄₉ O ₁₂ P	10eV:263. 819 6、398. 056 6、565. 116 5	PI(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
19	12.566	[M + H] ⁺	503.3337	C ₂₈ H ₄₅ N ₃ O ₅	10eV:261. 811 5、371. 146 5、461. 272 1	4S,5R-Antillatoxin A
20	14.273	[M + H] ⁺	630.3204	C ₃₈ H ₄₆ O ₈	10eV:290. 175 6、415. 236 3、522. 757 1	Dihydrogambogic acid
21	14.279	[M + H] ⁺	630.3194	C ₃₃ H ₄₆ N ₂ O ₁₀	10eV:388. 210 8、518. 690 5、594. 327 0	Finaconitine
22	15.474	[M + H] ⁺	537.3793	C ₂₇ H ₅₆ NO ₇ P	10eV:184. 074 8、283. 160 4、327. 199 4、437. 312 5	LysoPE(0:0/22:0)

3 讨论

色氨酸是5-羟色胺的前体。其在色氨酸羟化酶作用下转化生成5-羟色氨酸,最终合成于中枢神经元及消化道的肠嗜铬细胞,参与肠蠕动的调节^[9],胃肠道平滑肌5-HT₂受体或肠壁内神经节细

胞5-HT₄受体激动均可以引起胃肠道平滑肌收缩,使胃肠道张力增加,肠蠕动加快,影响胃肠代谢。气滞胃痛颗粒通过升高色氨酸含量,使5-羟色胺释放增加,发挥5-羟色胺激动剂的作用,缓解反流性胃炎的症状。

鞘氨醇参与了体内鞘脂的代谢,影响体内生物

活性,Cer/Sph 和 S1P 之间构成了一个重要的代谢平衡体,它们之间的动态平衡与细胞生存、死亡以及一些细胞的炎症反应密切相关。给予模型组大鼠气滞胃痛颗粒后,通过调节大鼠体内内源性代谢物 Sphinganine、Phytosphingosine、Bufadienolide、2-Aminooethylphosphocholate 等的变化影响磷脂代谢,进而影响胃黏膜炎症。

在体内,苯丙氨酸可以合成酪氨酸,仅有少量苯丙氨酸会合成苯丙酮酸。所以当苯丙酮酸含量增高时,酪氨酸的含量就会减少,进而影响多巴胺、促甲状腺素及肾上腺素的合成。此外,苯丙酮酸含量过高可导致四氢生物喋呤(BH_4)缺乏,可能会导致色氨酸转化为 5-HT 的含量减少,而 5-HT 可以激动胃肠道平滑肌 5-HT₂ 受体或肠壁内神经节细胞 5-HT₄ 受体引起胃肠道平滑肌收缩,使胃肠道张力增加,肠蠕动加快,反流性胃炎有胃肠动力障碍反应,故苯丙氨酸代谢紊乱会导致反流性胃炎。给予气滞胃痛组通过调节体内苯丙氨酸代谢,调控胃肠动力生理机能,进而抑制反流性胃炎。

花生四烯酸在脂过氧化酶作用下生成丙三烯,引起炎症和启动凝血系统^[10]。给药组大鼠血清中 PGE₂ 升高,内源性代谢物包括(-) N-(1R-methylpropyl) arachidonoyl amine 相应上调,促进胃黏液的形成和释放,改善胃黏膜血流,清除对上皮屏障具有损伤作用的物质,修复损坏的上皮,调节炎症免疫,减轻炎症反应。

5-氨基咪唑核糖核苷酸经嘌呤代谢通路合成,经硫胺素代谢通路合成 1-(5'-磷酸核糖基)-5-氨基咪唑,进而合成硫胺素(维生素 B1)。维生素 B1 可抑制胆碱酯酶活性,缺乏维生素 B1 时此酶活性过高,乙酰胆碱大量破坏使神经传导受到影响,可造成胃肠蠕动缓慢,消化液分泌减少,食欲不振、消化不良等障碍。气滞胃痛组可调控嘌呤代谢,缓解胃肠蠕动障碍症状。

综上,气滞胃痛颗粒是通过调节 D-Tryptophan、Phytosphingosine 等内源性物质,氨基酸代谢、鞘磷脂代谢、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢等代谢通路多靶点、多途径调节发挥治疗慢性反流性胃炎作用的,为该成药治疗反流性胃炎临床新适应症的开发奠定实验基础。

参考文献

- 1 Zhang YF(张跃飞), Yu T(于婷), Wang S(王帅), et al. The preliminary pharmacodynamic study of qizhiweitong granule in treating reflux gastritis[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2015, 42:1570-1572.
- 2 Zhang YB(张亚兵), Deng AL(邓阿黎), Peng YF(彭艳芳), et al. Observation of bile reflux gastritis with incoordination between the liver and stomach treated by Qizhiweitong Granule[J]. *J Hebei Tradit Chin Med*(河北中医), 2009, 31:1301-1303.
- 3 Guo ZR(郭宗儒). Concise analysis for innovation of pioneering and follow-on drugs[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2016, 51:1179-1184.
- 4 Ren YS(任岩松), Shen SY(沈舜义). New indication of existing drugs and its significance in drug discovery[J]. *World Clinic Drugs*(世界临床药物), 2013, 34:687-692.
- 5 Liu JH(刘建华), Wang YM(王玉美), Yang XT(杨雪婷), et al. Current application of metabolomics in the study of material basis of medicinal effectiveness and action mechanism of traditional chinese medicine formula[J]. *J Liaoning Univ TCM*(辽宁中医药大学学报), 2017, 19(11):22-25.
- 6 Zhao DP(赵丹萍), Zhang JJ(张建军), He C(贺成), et al. Study on mechanism of nourishing blood and smoothing liver effects of paeoniae radix alba based on metabolomics information[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48: 3412-3418.
- 7 Zhang C(张川), Mao JY(毛静远), Hou YZ(侯雅竹), et al. Advances in data collection and analysis in metabolomics [J]. *Chin J Integr Tradit Chin Western Med*(中国中西医结合杂志), 2009, 29:949-952.
- 8 Bao YR, Wang S, Yang XX, et al. Metabolomic study of the intervention effects of shuihonghuazi formula, a traditional chinese medicinal formulae, on hepatocellular carcinoma (HCC) rats using performance HPLC/ESI-TOF-MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198:468-478.
- 9 Wang Y, Wang S, Bao YR, et al. Multi-pathway integrated adjustment mechanism of glycyrrhiza triterpenes curing gastric ulcer in rats[J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13:209-215.
- 10 Yang Y, Wang S, Bao YR, et al. Anti-ulcer effect and potential mechanism of licoflavone by regulating inflammation mediators and amino acid metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199:175-182.