

甘遂醋制前后萜类成分效应部位抗腹水、泻下作用及组成变化研究

刘东方¹, 郁红礼^{1,2,3}, 薛凡¹, 张元斌¹, 吴皓^{1,2,3}, 崔小兵¹, 王迅⁴, 靳荐凯¹

(1.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;2.江苏省中药炮制重点实验室,江苏南京 210023;3.国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏南京 210023;4.江苏省中医院/南京中医药大学附属医院,江苏南京 210029)

摘要:目的 探究甘遂醋制前后抗腹水、泻下作用及组成变化。方法 将甘遂用二氯甲烷和 95%乙醇依次提取,获得二氯甲烷部位及非二氯甲烷部位。采用癌性腹水小鼠模型,以腹水量、粪便含水量、尿量及肠道水通道蛋白(AQP)1、AQP3 的蛋白表达水平为指标,筛选甘遂效应部位,考察甘遂醋制前后效应部位二氯甲烷提取部位的抗腹水及泻下作用变化。同时对二氯甲烷部位及非二氯甲烷部位,以及醋制前后二氯甲烷部位各成分的相对含量变化进行质谱分析。结果 与模型组相比,生甘遂总提取物组、二氯甲烷提取部位高剂量组小鼠腹水量和十二指肠、空肠、回肠及结肠 AQP1、AQP3 蛋白的表达量均显著降低,粪便含水量显著增加,对尿量无影响;非二氯甲烷部位组无明显降低腹水及增加粪便含水量的作用,表明甘遂二氯甲烷部位是其主要效应部位;与模型组相比,醋品二氯甲烷部位高剂量组仍可显著降低癌性腹水小鼠的腹水量,增加粪便含水量,显著降低十二指肠、空肠、回肠中 AQP1、AQP3 蛋白表达,但对结肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量无显著影响。与生品二氯甲烷部位组相比,醋制后甘遂二氯甲烷部位组小鼠腹水量显著升高,粪便含水量显著降低。此外,甘遂对腹水中癌细胞存活率没有影响,不能促使其凋亡。质谱分析发现,甘遂中萜类成分主要富集于二氯甲烷部位中,且醋制后二氯甲烷部位 16 个萜类成分中 12 个成分相对含量减少,4 个成分含量增加。结论 甘遂醋制后仍保留“泻水逐饮”功效,但泻下作用缓和,效应的变化可能与所含萜类成分的组成变化有关。

关键词:甘遂;醋制;癌性腹水模型;AQP1;AQP3

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2020)05-0647-08

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0647

引文格式:刘东方,郁红礼,薛凡,等.甘遂醋制前后萜类成分效应部位抗腹水、泻下作用及组成变化研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(5):647-654.

Study on the Effects of Anti-Ascites and Anti-Diarrhea and Composition of the Effective Parts of Terpenoids from Kansui Radix Before and After Vinegar Processing

LIU Dong-fang¹, YU Hong-li^{1,2,3}, XUE Fan¹, ZHANG Yuan-bing¹, WU Hao^{1,2,3}, CUI Xiao-bing¹, WANG Xun⁴, JIN Jian-kai¹

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing in Jiangsu Province, Nanjing, 210023, China; 3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing, 210023, China; 4. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the anti-ascites and anti-diarrhea effects of Kansui Radix and vinegar-baked Kansui Radix. **METHODS** Dichloromethane and non-dichloromethane fractions were extracted from Kansui Radix with dichloromethane and 95% ethanol in turn. The ascites volume, fecal water content, urine volume, intestinal expressions of AQP1, and AQP3 proteins were measured as indexes to screen the effective fraction and investigate the anti-ascites and anti-diarrhea effects of dichloromethane fraction before and after vinegar-baked. At the same time, the relative content changes of dichloromethane frac-

收稿日期: 2020-08-08

基金项目: 国家自然科学基金(81873007);国家重点研发计划项目(2018YFC1707003);江苏省自然科学基金(BK20171493)

第一作者: 刘东方,男,硕士研究生,E-mail:ldf1512@163.com

通信作者: 吴皓,女,教授,博士生导师,主要从事中药炮制解毒科学内涵及质量控制研究,E-mail:whao59752@njucm.edu.cn;

郁红礼,女,副教授,主要从事中药炮制研究,E-mail:yuhongli76@126.com

tion before and after vinegar-baked were analyzed by mass spectrometry. **RESULTS** Compared with the model group, the number of ascites and the expressions of AQP1 and AQP3 in duodenum, jejunum, ileum, and colon of mice in the total-extract Kansui Radix group and high-dose dichloromethane fraction group were significantly decreased, while fecal water content was significantly increased, and urine volume was not changed. The non-dichloromethane fraction group did not notably influence the ascites and fecal water content, indicating that the dichloromethane fraction of Kansui Radix was the main effective fraction. Compared with the model group, the high-dose dichloromethane fraction of vinegar-baked Kansui Radix could significantly reduce the ascites volume, increase the fecal water content, and significantly reduce the expression of AQP1 and AQP3 protein in the duodenum, jejunum, and ileum, but had no significant effect on the expressions of AQP1 and AQP3 in the colon. Compared with the group of dichloromethane fraction of raw Kansui Radix, the ascites volume of the vinegar-baked dichloromethane fraction was significantly increased, and the fecal water content was significantly decreased. Besides, Kansui did not affect the survival rate or apoptosis of cancer cells in ascites. Mass spectrometry analysis showed that terpenoids mainly concentrated in dichloromethane fraction, 12 of the 16 terpenoids decreased, and 4 of 16 increased after vinegar processing. **CONCLUSION** The "removing water retention by purgation" effect of Kansui Radix was retained after vinegar processing. Vinegar-baked weakened the purgative effect, which may be related to the change of terpenoid composition.

KEYWORDS: Kansui Radix; stir-baking with vinegar; cancerous ascites model; AQP1; AQP3

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根,性味苦寒,有毒,属峻下逐水药,具有泻水逐饮、破积通便的功能,主治水肿胀满、胸腹积水、二便不利等症^[1-2]。甘遂始载于《神农本草经》^[2],因其有毒,被列为下品,其临床毒性主要表现为腹痛、腹泻以及对皮肤、口腔、胃肠黏膜的刺激性。炮制的主要目的是降低毒性、缓和药性,《中国药典》收录的甘遂炮制品为醋甘遂,采用醋炙法炮制,此法始于宋代沿用至今。

文献研究显示,甘遂含有大量萜类成分,包括二萜、三萜类成分^[3]。历代古籍中记载甘遂多丸、散入药^[1,4],提示其效应成分可能不易溶于水煎液中,这与其所含萜类成分的理化性质相符。课题组前期对甘遂的研究发现,甘遂的二氯甲烷提取部位含有大量萜类成分^[5-6],可引起肠组织肿胀、泄泻、肠道炎症等,醋制后泻下作用缓和^[7]。但甘遂逐饮之功与泻下作用是否有相关性,以及醋制对甘遂的功效产生何种影响,至今未见深入系统的研究。本文在课题组前期研究的基础上,进一步筛选甘遂抗腹水效应部位,探讨甘遂醋制前后抗腹水、泻下逐饮的功效变化,为甘遂醋制解毒存效炮制机制提供依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

H22 腹水癌细胞购自于中科院上海细胞库。ICR 小鼠,雄性,SPF 级,体质量 18~22 g,购自南京市青龙山动物繁殖场,许可证号:SCXK(苏)2017-0001,饲养于南京中医药大学实验动物中心,动物实

验通过伦理审查,动物伦理号:201902A007。

1.2 药材

甘遂购自安徽亳州药材市场,经江苏省食品药品监督管理局检验所胡皓彬主任药师鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根。

1.3 仪器

SHIMADZU LC-30AD 高效液相系统(日本岛津公司);Triple TOF5600 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);垂直凝胶电泳及电转印仪(美国 Bio-rad 公司);台式离心机(美国 Thermo 公司);SectraMax i3x 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);FA1104 电子天平(德国 Sartorius 公司);Tanon4200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.4 试剂

AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;牛血清白蛋白,翼飞雪生物科技, YB006-100; AQP1 Antibody, 恩晶生物, E1A5231; AQP3 Antibody, 恩晶生物, E1A5222; Anti- β -actin mab(Mouse), 翼飞雪生物科技, YF-MA0052; Goat Anti-Mouse IgG(H+L)HRP, 翼飞雪生物科技, YFSA01; Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP, 翼飞雪生物科技, YFSA02; RIPA 组织细胞高效裂解液, 翼飞雪生物科技, YWB001; PMSF (100 mmol/L), 翼飞雪生物科技, YP0100-1; 0.45 μ m PVDF Transfer Membranes, Merck Milli-

pore,IPVH00010;ECL 化学发光超敏显色试剂盒-A液,翊圣生物,36208-A;ECL 化学发光超敏显色试剂盒-B液,翊圣生物,36208-B;十二烷基硫酸钠(SDS),翼飞雪生物科技,YS0005-500;三羟甲基氨基烷(Tris Base),翼飞雪生物科技,YT0010-500;TEMED,Sigma-aldrich,T22500;1 mol/L Tis-HCl 缓冲液,博士德生物工程,AR1163;1.5 mol/L Tis-HCl 缓冲液,博士德生物工程,T1010;Tween-20,Biofroxx 公司,1247ML500;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×),碧云天生物技术研究所,P0015;30% Acr/Bis 制胶液,翼飞雪生物科技,YA1010;甘氨酸,翼飞雪生物科技,YG0001;过硫酸铵,阿拉丁,A112447;镇江香醋,江苏恒顺醋业;甲醇(分析纯),南京化学试剂;氯化钠(分析纯),南京化学试剂。

2 方法

2.1 H22 癌性腹水小鼠模型制备

将冻存的 H22 细胞株于 37 °C 水浴锅中复苏,1 000 r/min 离心 5 min,细胞沉淀用生理盐水悬浮至约含细胞数 1.0×10^7 mL⁻¹,给小鼠腹腔注射 0.2 mL 进行传代,于第 8 天选取腹水饱满的小鼠,在无菌条件下收集腹水,用生理盐水配制成 1.0×10^7 mL⁻¹ 的细胞混悬液,除空白组外,其余各组小鼠均腹腔注射 0.2 mL 细胞混悬液。

2.2 实验动物分组与给药

分组:ICR 小鼠禁食不禁水 24 h 后,按体质量随机分 11 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、阳性药物组(呋塞米)、生甘遂总提取物组(低、高剂量)、生甘遂二氯甲烷部位组(低、高剂量)、醋甘遂二氯甲烷部位组(低、高剂量)、生甘遂非二氯甲烷部位组(低、高剂量)。

给药:造模第 2 天开始灌胃给药,10 g 灌胃 0.2 mL;每日给药 1 次,连续给药 8 d。模型组和空白组给予 5% 羧甲基纤维素钠的生理盐水;阳性药物组给予 6 mg/kg 呋塞米;其他组给予相应的含 5% 羧甲基纤维素钠生理盐水的甘遂提取物。高、低剂量合生药量依次为 1.8、0.3 g/kg(按照 2015 年版《中国药典》临床等效剂量换算^[1])。

2.3 甘遂不同提取部位的制备

醋甘遂的制备:按照 2015 年版《中国药典》醋炙法炮制^[1]。

醋甘遂二氯甲烷提取部位制备:称取一定量甘遂粉末,采用二氯甲烷索氏提取至完全。醋甘遂非二氯甲烷提取部位制备:二氯甲烷索氏提取后的药

渣再用 95% 乙醇进行索氏提取。甘遂生品总提取物制备:称取一定量甘遂粉末,先用二氯甲烷索氏提取后,药渣再用 95% 乙醇索氏提取,提取液合并浓缩至干。

2.4 小鼠腹水量、粪便含水量及尿量测定

粪便含水量:造模后第 5 天禁食不禁水 12 h,给药后,单只小鼠进行单笼饲养,收集小鼠粪便,连续收集 5 h。在 80 °C 烘箱,将粪便烘干,计算各组小鼠粪便含水量。

尿量:造模后第 6 天,给药后,开始测量 5 h 内尿量。尿量测定采用滤纸片改良法。将小鼠放入 500 mL 的烧杯中,用致密的金属网封口,将烧杯倒扣于已称质量的高分子吸水树脂上,以高分子吸水树脂质量增加量作为小鼠的尿量。

腹水量:造模后第 8 天给药 3 h 后,颈椎脱臼处死,收集腹水,称取腹水量。

2.5 Western blot 分析

2.5.1 组织蛋白质提取及样品制备 小鼠解剖后,取每只小鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠各 1 段,剖开并用生理盐水清洗干净,立即放入液氮冷冻后存放在 -80 °C 冰箱备用。称取样品 60 mg 于 EP 管中,每个 EP 管中加入 4 颗研磨珠和 750 μL 裂解液(RIPA:PMSF=100:1),在组织研磨机中研碎(60 Hz,2 min),之后置 -20 °C 冰箱中裂解过夜。第 2 天将提取液转至新的 EP 管中,去除研磨珠。在 4 °C,10 000 × g 离心 10 min,离心后取上清 500 μL,之后加入 125 μL SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×),在沸水中煮 5 min。

2.5.2 Western blot 分析 每孔上样 30 μg 蛋白,用多功能电泳仪在电压 100 V 条件下运行,溴酚蓝跑至 SDS-PAGE 凝胶底部时停止运行,在 100 V 条件下用湿法转膜 1 h,用 5% BSA 封闭液在室温下封闭 2 h,孵一抗(β-actin、AQP1、AQP3)4 °C 过夜;次日用 TBST-Buffer 清洗 5 次,每次 5 min,再用对应的二抗在室温下孵育 2 h,TBST-Buffer 洗 5 次,每次 5 min。最后加入 ECL 曝光液(A:B=1:1,现配现用)进行化学发光成像,结果用灰度值表示。

2.6 甘遂不同提取部位质谱分析

2.6.1 供试品溶液的制备 取甘遂粉末约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,精密加入二氯甲烷 30 mL,提取 3 h。提取液蒸干,之后用甲醇溶解定容在 10 mL 容量瓶。取适量离心(12 000 r/min,10 min),取上清液即得。二氯甲烷提取后的药渣再

用 95%乙醇提取作为非二氯甲烷部位。

2.6.2 质谱分析条件 色谱条件:ZORBAX Extend-C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相 A 为 0.1%甲酸水,B 为乙腈;柱温 30 ℃;流速 0.3 mL/min;进样量 3 mL;洗脱程序:0~25 min,40%~80%B;25~35 min,80%~90%B;35~36 min,90%~100%B;38~40 min,100%B;40~43 min,40%B。

质谱条件:TOF-MS 扫描方式为 ESI⁺ 和 ESI⁻,质量扫描范围:50~1 500,气帘气(CUR)40 psi(1 psi=6.89 kPa),雾化气(GS1)55 psi,辅助气(GS2)55 psi,电喷雾电压(ISVF)5 500 eV,离子源温度 550 ℃;去簇电压 60 eV;TOF-MS 模式下设置碰撞电压 10 eV,IDA-MS/MS 条件下设置碰撞电压(CE)40 eV。

2.7 统计学方法

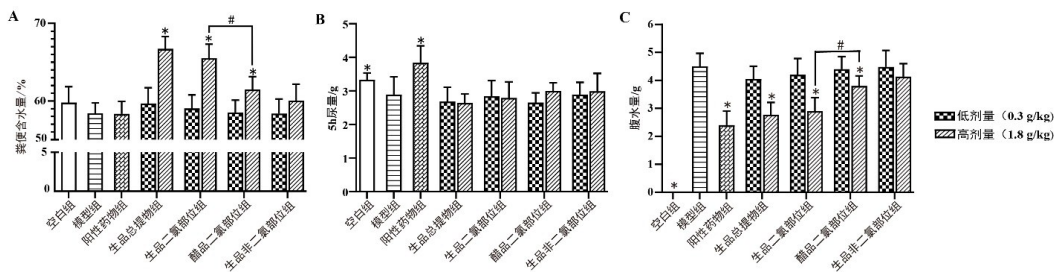
采用 SPSS 软件进行数据处理,方差齐采用 one-way ANOVA,方差不齐采用 Mann-Whitney 检

验。

3 结果

3.1 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠粪便含水量、尿量、腹水量的影响

图 1 结果可知,与空白组相比,模型组癌性腹水小鼠粪便含水量无显著性差异、尿量显著减少、腹水量显著增加。与模型组相比,生品总提物、生品二氯甲烷部位和醋品二氯甲烷部位的高剂量组小鼠粪便含水量显著增加、腹水量明显减少,而各低剂量组和非二氯甲烷部位高、低剂量组均无显著性差异,表明二氯甲烷部位是甘遂的抗腹水效应部位。与生品二氯甲烷组相比,醋制甘遂二氯甲烷部位高剂量组粪便含水量显著降低、腹水量显著增高,表明醋制后甘遂抗腹水及泻下作用仍然存在,但泻下作用明显缓和,抗腹水作用也明显减弱。甘遂各药物组对癌性腹水小鼠尿量均没有明显影响,表明甘遂主要通过泻下作用来排除小鼠体内水分。



注:与模型组比较,* P<0.05;相同剂量醋品与生品比较,# P<0.05。x̄±s,n=10。

图 1 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠粪便含水量、尿量、腹水量的影响

3.2 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对十二指肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

图 2 可知,与空白组相比,模型组十二指肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量显著上升。与模型组相比,生品总提物和生、醋品二氯甲烷部位的高剂量组 AQP1 蛋白的表达量显著降低,生品总提物和生、醋品二氯甲烷部位的高、低剂量组 AQP3 蛋白的表达量显著降低,而阳性药物组和非二氯甲烷部位高剂量组以及各低剂量组 AQP1 蛋白表达量没有显著差异,阳性药物组和非二氯甲烷部位的高、低剂量组 AQP3 蛋白表达量没有显著差异。与生品二氯甲烷部位组相比,醋品二氯甲烷部位组没有显著性差异,表明甘遂醋制后对十二指肠 AQP1、AQP3 蛋白水平的调节仍然存在。

量的影响

图 3 可知,各组对空肠 AQP1 和 AQP3 的影响与十二指肠一致。与空白组相比,模型组空肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量显著上升。与模型组相比,生品总提物和生、醋品二氯甲烷部位的高剂量组 AQP1 蛋白的表达量显著降低,生品总提物和生、醋品二氯甲烷部位的高、低剂量组 AQP3 蛋白的表达量显著降低,而阳性药物组和非二氯甲烷部位高剂量组以及各低剂量组 AQP1 蛋白表达量没有显著差异,阳性药物组和非二氯甲烷部位的高、低剂量组 AQP3 蛋白表达量没有显著差异。与生品二氯甲烷部位组相比,醋品二氯甲烷部位组没有显著性差异,表明甘遂醋制后对空肠 AQP1、AQP3 蛋白水平的调节仍然存在。

3.3 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠空肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达

3.4 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠回肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达

量的影响

图4可知,与空白组相比,模型组 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量没有显著变化。与模型组相比,生品总提物高、低剂量组和生、醋品二氯甲烷部位的高剂量组 AQP1 蛋白表达量显著下降,生品总提物和生、醋品二氯甲烷部位的高、低剂量组 AQP3 蛋白表达量显著下降,而阳性药物组和非二氯甲烷部位高、低剂量组和生、醋品二氯甲烷部位低剂量组 AQP1 蛋白表达量没有显著性差异,阳性药物组和非二氯甲烷部位高、低剂量组 AQP3 蛋白表达量没有显著性差异。与生品二氯甲烷部位组相比,醋品二氯甲烷部位高剂量组没有显著性差异,而低剂量组 AQP3 上升,表明甘遂醋制后对回肠 AQP3 表达的调节作用减弱。

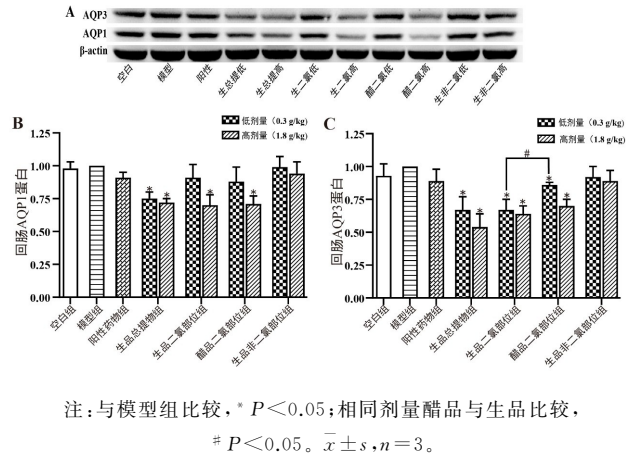


图4 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠回肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

3.5 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠结肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

图5可知,与空白组相比,模型组小鼠结肠 AQP1、AQP3 蛋白表达无显著性差异。与模型组相比,生品总提物组、生品二氯甲烷部位高剂量组小鼠结肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达显著降低,而阳性药物组、醋品二氯甲烷部位组和非二氯甲烷部位组 AQP1 和 AQP3 表达量均无显著性差异。与生品二氯甲烷高剂量组相比,醋品组结肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达显著增高,趋向于空白组和模型组。结肠是肠道吸收水分以及粪便形成的重要部位,故推测这可能是甘遂醋制缓和泻下作用的原因。

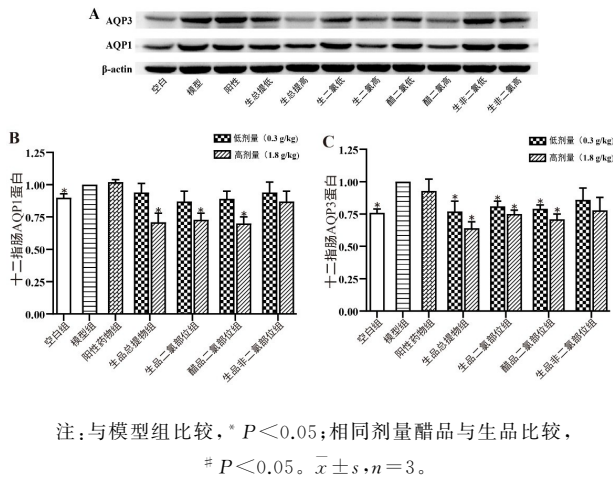


图2 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠十二指肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

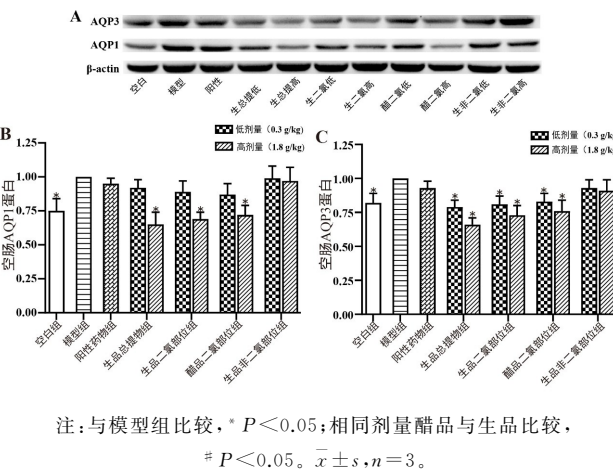


图3 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠空肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

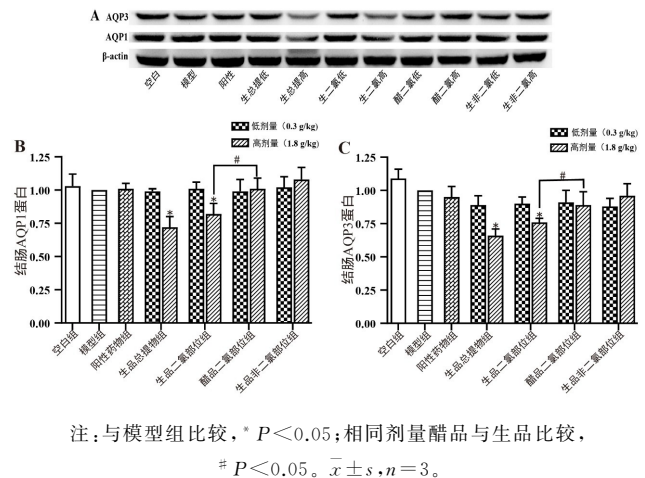


图5 甘遂不同提取部位以及醋制前后二氯甲烷部位对癌性腹水小鼠结肠 AQP1 和 AQP3 蛋白表达量的影响

3.6 生、醋甘遂二氯甲烷提取部位与非二氯甲烷提取部位液质鉴定

查阅文献建立甘遂化学成分库,采用 Peak View Software™ 质谱分析软件,结合保留时间和特征碎片等信息,从甘遂二氯甲烷提取部位中推测鉴定出 16 个萜类化合物,包含 9 个巨大戟烷型二萜、3

个假白榄烷型二萜以及 4 个三萜。非二氯甲烷部位中仅鉴定出 1 个巨大戟烷型二萜和 1 个假白榄烷型二萜。由此可见二氯甲烷可作为甘遂萜类成分富集溶剂,结果见表 1~2。此外,对生、醋甘遂这 16 个萜类化合物峰强度进一步分析,12 个萜类成分含量下降,4 个萜类成分上升,见表 1。

表 1 甘遂二氯甲烷部位萜类成分鉴定结果与醋制前后峰强度变化率

No.	tr/ min	分子式	分子量	加合 离子峰	理论值 m/z	实测值 m/z	偏差 ppm	MS/MS 特征碎片	化合物	醋制后峰 强度变化率	类型
1	8.52	C ₃₈ H ₄₂ O ₁₄	722.257 5	[M-H] ⁻	721.250 18	721.250 83	0.9	721,417,399, 301,295,121	Kansuinine C	+26.86%	B
2	10.94	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₅	793.294 6	[M+H] ⁺	794.301 85	794.301 51	-0.4	794,734,674,612, 572,491,432	Kansuinine D/Kansuinine D1	-31.52%	B
3	14.18	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₄	777.299 7	[M+H] ⁺	778.306 93	778.307 66	0.9	778,718,676, 658,598,311	Kansuinin E	-9.49%	B
4	16.46	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360 4	[M+H] ⁺	457.367 62	457.367 82	0.4	457,317,161, 135,121,107	Kansenol/Oleanolic acid/Ursolic acid	-6.87%	C
5	17.73	C ₂₉ H ₃₄ O ₆	478.235 5	[M+H] ⁺	479.242 82	479.242 93	0.2	479,419,357, 297,249	Kansuiphorin C/ Kansuiphorin D	-6.33%	A
6	19.58	C ₃₀ H ₄₂ O ₆	498.298 1	[M+H] ⁺	499.305 42	499.304 97	-0.9	499,313,285, 225,181	20-O-(2E,4Z-Decadienyl)ingenol/ 20-O-(2E,4Z-Decadienyl)ingenol/ 3-O-(2E,4Z-Decadienyl)ingenol/ 3-O-(2E,4Z-Decadienyl)ingenol/ 5-O-(2E,4Z-Decadienyl)ingenol	-7.56%	A
7	23.66	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	502.329 4	[M+H] ⁺	503.336 72	503.336 77	0.1	503,337,313, 207,193	20-O-Decannoylingenol	-12.44%	A
8	23.69	C ₃₂ H ₄₄ O ₇	540.308 7	[M+H] ⁺	541.315 98	541.315 45	-1	541,355,327, 313,285	3-O-(2E,4Z-Decadienyl)-5-O- acetylingenol/3-O-(2E,4Z-Decadienyl)- 20-O-acetylingenol/3-O-(2E,4E- Decadienyl)-20-deoxyingenol/	-7.25%	A
9	23.71	C ₃₁ H ₄₂ O ₇	526.293 1	[M-H] ⁻	525.285 78	525.285 7	-0.1	525,479,329, 311,283,267	5-O-(2E,4E)- Decadienyl-20-O-acetylingenol	+35.95%	A
10	24.24	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458.376 0	[M+H] ⁺	459.383 27	459.383 09	-0.4	459,423,301, 189,121	Kansuione	-9.19%	C
11	24.86	C ₃₀ H ₄₂ O ₅	482.303 2	[M+H] ⁺	483.310 5	483.310 24	-0.5	483,297,269, 255,231,217	3-O-(2E,4Z-Decadienyl)- 20-deoxyingenol	-27.66%	A
12	26.63	C ₃₀ H ₅₀ O	426.386 2	[M+H] ⁺	427.393 44	427.393 40	-0.1	427,409,313, 245,217,191	Euphol/Tirucalol/ α - Amyrin/ β -Amyrin	-2.84%	C
13	28.03	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	440.365 4	[M+H] ⁺	441.372 71	441.373 06	0.8	441,301,121,107	Kansenone/ Kansenol/ Epi-kansenone	+9.08%	C
14	28.3	C ₃₆ H ₅₆ O ₈	616.397 5	[M+H] ⁺	617.404 80	617.405 17	0.6	617,599,329, 265,253,223	3-O-(2,3-Dimethylbutanoyl)-13- O-decanoyingenol	+21.13%	A
15	33.33	C ₃₈ H ₆₀ O ₈	644.428 8	[M+H] ⁺	645.436 10	645.435 55	-0.8	645,511,427, 329,293,275	3-O-(2,3-Dimethylbutanoyl)-13-O- dodecanoyingenol/20-O-(2,3- Dimethylbutanoyl)-13-O-dodecanoyingenol/ 20-O-Hexanoyl-13-O-dodecanoyingenol	-31.67%	A
16	33.41	C ₃₉ H ₆₀ O ₉	672.423 7	[M-H] ⁻	671.416 46	671.416 77	0.5	671,509,309, 293,275	3-O-(2,3-Dimethylbutanoyl)-13-O- dodecanoyl-20-O-acetylingenol	-33.61%	A

注:A.假白榄烷型二萜;B.巨大戟烷型二萜;C.三萜

表2 甘遂非二氯甲烷部位萜类成分鉴定结果

No.	t _R /min	分子式	分子量	加合 离子峰	理论值 <i>m/z</i>	实测值 <i>m/z</i>	偏差 <i>ppm</i>	MS/MS 特征碎片	化合物	类型
1	14.12	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₄	777.299 7	[M+H] ⁺	778.306 9	778.306	-1.2	778, 718, 528, 293, 124	Kansuinin E	B
2	25.58	C ₃₀ H ₄₂ O ₅	482.303 22	[M+Na] ⁺	505.292 45	505.291 97	-1	505, 337, 319, 227	3-O-(2E,4'Z-Decadienyl)- 20-deoxyingenol	A

注:A.假白榄烷型二萜;B.巨大戟烷型二萜

4 讨论

甘遂是峻下逐水药,适用于腹水、胸胁积水等实证,临床上常用于肝硬化和癌性腹水的治疗。对比肝硬化腹水^[8]等其他腹水模型,恶性腹水模型^[9]造模方法简单、成模率高、周期短、死亡率低,故实验选用癌性腹水模型筛选甘遂抗腹水及泻下作用的效应部位。实验结果显示,甘遂二氯甲烷部位能够增加癌性腹水小鼠粪便含水量,降低小鼠腹水量,与总提物组相比没有显著性差异,而非二氯甲烷部位无明显作用,说明甘遂二氯甲烷部位是其主要的效应部位。进一步研究发现,甘遂醋制后其二氯甲烷部位仍然能增加癌性腹水小鼠粪便含水量,降低小鼠腹水量,表明了甘遂醋制后仍具有较强抗腹水及泻下作用,但与生品甘遂相比,甘遂醋制后泻下作用缓和,抗腹水作用减弱。此外,在实验设计时,发现有文献报道甘遂具有抗癌作用^[10-13],于是对模型组和生品高剂量组腹水中癌细胞的存活率和凋亡率进行了检测,癌细胞存活率分别为(81.20±10.60)%和(82.15±7.84)%,癌细胞凋亡率分别为(2.02±0.38)%和(1.95±0.33)%,两组之间互相比,存活率和凋亡率都没有显著性差异,表明甘遂减少腹水的效果与直接抑制肿瘤细胞生长无关。此结果与文献报道确有差异,然文献分析发现,甘遂抗癌作用的文章中多为提取部位或单体成分的体外实验,故可能的原因是体外实验与体内实验结果间存在差异,此外还可能与给药剂量相关。研究还发现甘遂对癌性腹水小鼠没有明显利尿作用,故推断甘遂的抗腹水作用主要与其泻下作用相关。

粪便成形与肠道水分的分泌和吸收密切相关,而肠道水通道蛋白在水分的吸收中发挥着重要作用。目前已发现大、小肠上均有表达的水通道蛋白主要是AQP1、AQP3、AQP4、AQP8^[14-18]。有研究表明,腹泻发生时,AQP1和AQP3蛋白表达量往往会降低^[19-23],而AQP4和AQP8对粪便含水量的影响不大^[15,24]。AQP1大量表达在毛细血管内皮和小血管,它在肠道黏膜与血流之间的水液转运中起着重要作用。AQP3大量表达在上皮细胞的基底外侧

膜上。故本文对肠各段(十二指肠、空肠、回肠、结肠)的AQP1和AQP3蛋白进行了测量,结果表明甘遂生品可以显著降低肠道各段AQP1和AQP3的表达量,此结果可能与甘遂致肠道水分吸收减少进而导致泻下作用相关。醋甘遂仍可显著降低小肠(十二指肠、空肠、回肠)AQP1、AQP3的表达,但对结肠AQP1和AQP3无明显影响。与生品组相比,醋品高、低剂量组对十二指肠AQP1和AQP3、空肠AQP1和AQP3、回肠AQP1的影响和醋品高剂量组对回肠AQP3的影响没有显著差异,醋品低剂量组对回肠AQP3的影响和醋品高、低剂量组对结肠AQP1和AQP3的影响减弱。推测甘遂醋制对回肠及结肠的AQPs水平调节的减弱,可能是甘遂醋制泻下作用缓和的原因。

此外,本文对甘遂二氯甲烷部位及非二氯甲烷部位进行了质谱解析,发现甘遂中萜类成分主要富集于二氯甲烷部位中,且醋制后二氯甲烷部位16个萜类成分中12个含量降低,4个含量上升,推测甘遂醋制后泻下作用缓和与其所含萜类成分变化相关。

本文研究了甘遂醋制前后抗腹水效应及泻下作用变化,发现甘遂醋制后仍然保留抗腹水作用,但醋制后泻下作用缓和。此结果可能与甘遂对肠道AQPs表达的影响有关。甘遂中含有大量的萜类成分,甘遂醋制后的效应变化与甘遂萜类成分在醋制过程中发生了结构转化相关,其转化机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 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,2015:286-287.
- [2] 孙星衍.神农本草经[M].北京:人民卫生出版,1982:110.
- [3] LEE JW, JIN QH, JANG H, et al. Jatrophone and ingenane-type diterpenoids from *Euphorbia kansui* inhibit the LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(14): 3351-3354.
- [4] 中医方剂数据库[DB/OL].http://www.zyfangji.com.
- [5] WANG KL, LIU L, HUANG JY, et al. Laxative effects of total diterpenoids extracted from the roots of *Euphorbia pekinensis* are attributable to alterations of aquaporins in the colon[J].

- Molecules, 2017, 22(3): 465.
- [6] YU HL, LIU L, WANG KL et al. Upregulation of aquaporin 3 expression by diterpenoids in *Euphorbia pekinensis* is associated with activation of the NF- κ B signaling pathway in the co-cultured system of HT-29 and RAW 264.7 cells[J]. *Biochimie*, 2018, 144:153-159.
- [7] 刘莲, 郁红礼, 王奎龙, 等. 狼毒醋制前后对小鼠肠道毒性及结肠水通道蛋白表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(12):2516-2521.
- [8] 戴瑶瑶, 范兴良, 祝峻峰. 四氯化碳制备肝硬化腹水模型方案的分析与比较[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(1):5-9.
- [9] 姚芳, 曹雨诞, 张楷承, 等. 癌性腹水模型制备方法及在中医药作用机制研究中的应用[J]. *中国药房*, 2018, 29(6):856-860.
- [10] 陈亮, 于志敏. 甘遂提取物对肿瘤瘤株 Hep,S180 的抑制作用观察[J]. *中国现代医药杂志*, 2008, 10(7):6-8.
- [11] 陈亮. 甘遂根提取物对大鼠上皮样肝癌 BEL-7402 的体外实验研究[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(9):1889-1892.
- [12] YASUKAWA K, AKIHISA T, YOSHIDA ZY, et al. Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(1): 119-124.
- [13] YU FR, LIAN XZ, GUO HY, et al. Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2005, 8(3):528-535.
- [14] MA TH, VERKMAN AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology[J]. *J Physiol*, 1999, 517(2): 317-326.
- [15] MATSUZAKI T, TAJIKA Y, ABLIMIT A, et al. Aquaporins in the digestive system[J]. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(2): 71-80.
- [16] LAFORENZA U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(5/6): 642-650.
- [17] ZHU S, RAN JH, YANG BX, et al. Aquaporins in digestive system[M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017: 123-130.
- [18] ZHU C, CHEN Z, JIANG ZY. Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1399.
- [19] 王杨, 彪雅宁, 张纳博, 等. 车前子对腹泻大鼠小肠黏膜 AQP1 表达的影响[J]. *河北中医药学报*, 2020, 35(2):5-8.
- [20] ZHANG D, ZHANG KQ, SU WH, et al. Aquaporin-3 is down-regulated in jejunum villi epithelial cells during enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in mice[J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 430-435.
- [21] IKARASHI N, KON R, SUGIYAMA K. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1172.
- [22] IKARASHI N, KON R, IIZASA T, et al. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6): 957-962.
- [23] IKARASHI N. The elucidation of the function and the expression control mechanism of aquaporin-3 in the colon[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2013, 133(9): 955-961.
- [24] YANG BX, SONG YL, ZHAO D, et al. Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(5): 1161-1170.

(编辑:董宇 董盈妹)