

基于网络药理学和实验验证探讨养血清脑丸治疗偏头痛的作用机制

宁耀钧, 沈芬, 谢军, 解达帅, 石萍*

山西医科大学附属运城市中心医院, 山西 运城 044000

摘要: 目的 利用网络药理学及分子对接的方法探究养血清脑丸治疗偏头痛的潜在作用机制并对其进行实验验证。方法 利用 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库筛选养血清脑丸的活性成分和作用靶点, 从 NCBI GENE、OMIM、CTD、DisGeNET 数据库获取与偏头痛密切相关的靶点, 将其与养血清脑丸靶点取交集后获得养血清脑丸治疗偏头痛的潜在作用靶点; 利用 STRING 数据库进行蛋白互作网络 (PPI) 分析, 结合 Cytoscape 3.6.0 软件筛选关键靶点; 采用 DAVID 数据库对养血清脑丸治疗偏头痛的潜在作用靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并采用 Cytoscape 3.6.0 软件构建“养血清脑丸-组方中药-活性成分-偏头痛-靶点-通路”网络和筛选关键成分, 使用 AutoDock 软件对关键成分与关键靶点进行分子对接。采用硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠模型, 对网络药理学研究结果中的部分关键靶点进行实验验证。**结果** 筛选获得养血清脑丸活性成分 140 个、作用靶点 279 个, 其中与偏头痛治疗相关的靶点 53 个; 通过网络分析, 筛选获得白细胞介素-6 (IL-6)、溶质载体家族 6 成员 4 (SLC6A4)、肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、内皮型一氧化氮合酶 (NOS3) 等靶点、异紫堇杷明碱、槲皮素、斯氏紫堇碱、球紫堇碱、山柰酚等成分可能是养血清脑丸治疗偏头痛的关键靶点和关键成分, 分子对接结果表明关键成分和关键靶点间具有较好的结合活性; KEGG 通路富集结果表明养血清脑丸可能通过神经活性配体受体相互作用、5-羟色胺能突触、钙信号通路、cAMP 信号通路及肿瘤坏死因子信号通路等途径发挥治疗偏头痛的作用。动物实验结果表明, 养血清脑丸能抑制偏头痛大鼠血清中一氧化氮 (NO)、IL-6、TNF- α 及脑组织中 VEGF 表达的升高, 促进脑组织 5-羟色胺 (5-HT) 水平的升高和 5-羟色胺受体 1B (5-HT1B) 蛋白的表达, 抑制 SLC6A4 和 CGRP 的表达, 对硝酸甘油型大鼠偏头痛症状有明显的改善作用。**结论** 明确了养血清脑丸治疗偏头痛的潜在成分、靶点和通路, 其作用机制可能与升高 5-HT 水平和 5-HT1B 蛋白表达、抑制 SLC6A4 和降钙素基因相关肽 (CGRP) 表达有关, 为深入开展其作用机制的研究提供了科学依据和参考。

关键词: 养血清脑丸; 偏头痛; 网络药理学; 分子对接; 异紫堇杷明碱; 槲皮素; 斯氏紫堇碱; 5-羟色胺

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)12-2693-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.004

Mechanism of Yangxue Qingnao Pills in treatment of migraine based on network pharmacology and experimental verification

NING Yao-jun, SHEN Fen, XIE Jun, XIE Da-shuai, SHI Ping

Yuncheng Central Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Yuncheng 044000, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of Yangxue Qingnao Pills in treatment of migraine based on network pharmacology and molecular docking and to conduct its experimental verification. **Methods** TCMSP and Swiss Target Prediction databases were used to screen the active components and targets of Yangxue Qingnao Pills. Genes related to the occurrence and development of migraine were searched through databases of NCBI GENE, OMIM, CTD, and DisGeNET. The potential targets of treatment were obtained by taking the intersection of the two above. STRING database was used for establishing protein-protein interaction (PPI) networks and key targets were selected by Cytoscape 3.6.0. GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by DAVID database. “Yangxue Qingnao Pills - herbs - active components - migraine - targets - pathways” network was constructed and key components were screened by Cytoscape 3.6.0, AutoDock software was used to dock the molecules of the key components with the key targets. The migraine rat model induced by nitroglycerin was used to verify key nodes in the results of network

收稿日期: 2022-06-28

基金项目: 山西省教育厅高校科技创新计划项目 (2020L0227); 山西省运城市中心医院院级项目 (YJ2022107)

作者简介: 宁耀钧, 男, 硕士, 研究方向为中药物质基础及其作用机制研究。E-mail: ningyaojun@163.com

*通信作者: 石萍, 研究方向为药物不良反应监测。E-mail: ycszxy_sp@163.com

pharmacology. **Results** 140 active components and 279 targets of Yangxue Qingnao Pills were screened. 53 targets were identified for the intersection between Yangxue Qingnao Pills and migraine. The key targets of Yangxue Qingnao Pills in treatment of migraine were IL-6, SLC6A4, TNF, VEGFA, NOS3, etc. The key components were isocorypalmine, quercetin, (*S*)-scoulerine, bulbocapnine, kaempferol, etc. Molecular docking showed a good binding ability of key components and key target. The enrichment analysis of KEGG pathway showed that Yangxue Qingnao Pills treatment for migraine involved multiple pathways, including neuroactive ligand-receptor interaction, serotonergic synapse, calcium signaling pathway, cAMP signaling pathway, TNF signaling pathway, etc. The results of animal experiments showed that Yangxue Qingnao Pills could inhibit NO, IL-6, TNF- α , VEGF, SLC6A4, and CGRP in serum or brain tissue of migraine rats and increase of 5-HT and 5-HT1B level in brain tissue, significantly improve the symptoms of migraine rats. **Conclusion** This study reveals the potential active components, key targets and related pathways of Yangxue Qingnao Pills in treatment of migraine, the mechanism maybe related to increase of the level of 5-HT and the 5-HT1B protein expression, inhibition of SLC6A4 and CGRP expression, which provides a basis for further experiments.

Key words: Yangxue Qingnao Pills; migraine; network pharmacology; molecular docking; 5-HT; isocorypalmine; quercetin; (*S*)-scoulerine

偏头痛是一种以单侧或双侧搏动性头痛为特征并伴有恶心、呕吐、畏光等不同症状的常见的神经血管性疾病^[1]。偏头痛的发病机制尚不完全清楚,目前以血管源学说、皮层扩散抑制学说、三叉神经血管学说较为流行^[2],此外还受 5-羟色胺(5-HT)、降钙素基因相关肽等生化因素、机体氧化应激、基因变化及炎症免疫反应等的影响^[3-6]。偏头痛在全世界范围内发病率高达 14.4%,成为人类致残的主要疾病之一,世界卫生组织已将其列为紧急公共卫生优先事项^[7-8]。研究表明,偏头痛患者人群并发外周动脉闭塞性疾病、心肌梗死等血管性疾病及抑郁症等病的风险系数显著高于无偏头痛人群,是导致人类生活质量下降的第 7 大原因,严重影响患者身体健康,已成为一个重大的医疗和社会问题^[9-11]。

偏头痛归属于中医学“头风”“头痛”范畴,肝阳上亢、瘀血、痰浊等为其主要中医证候,因而治疗多以平肝、活血等为主要治疗方法^[12-13]。养血清脑丸由当归、川芎、白芍、熟地黄、钩藤、鸡血藤、夏枯草、决明子、延胡索、细辛、珍珠母等组成,具有养血平肝、活血通络的功效,临床研究表明其治疗偏头痛疗效显著,能有效减少偏头痛发作次数和缩短发作时间^[14]。目前,针对养血清脑丸的文献报道仅限于临床研究,对其治疗偏头痛药效物质基础及其作用机制的研究还未见报道。

针对养血清脑丸组方中药较多、成分复杂的特点,本研究采用基于整体性和系统性的网络药理学研究方法,建立以养血清脑丸组方中药为起点的、通过关联活性成分、偏头痛、靶点及其参与信号通路的复杂网络,筛选网络中的潜在关键成分和靶点,并采用分子对接及动物实验的方法进行初步验

证,明确养血清脑丸治疗偏头痛的药效物质基础与作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,8~10 周龄,体重 220~250 g,均购自维通利华实验动物技术有限公司[合格证号 SCXK(京)2016-0011],饲养于独立换气动物房,环境温度(24±1)℃,湿度(55±5)%,12 h 明暗交替光照,期间自由饮食。动物实验经运城市中心医院伦理委员会批准(审批号 YXKT2022017)。

1.2 药物及主要试剂

养血清脑丸购自天士力医药集团股份有限公司(批号 210643);琥珀酸舒马普坦购自天津华精制药有限公司(批号 20210105);硝酸甘油注射剂购自北京益民药业有限公司(批号 20200812);大鼠白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、5-HT、大鼠血管内皮细胞生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司(批号 CSB-E04640r、CSB-E11987r、CSB-E08364r、CSB-E04757r);大鼠一氧化氮(NO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司(批号为 A013-2-1);5-羟色胺受体 1B(5-HT1B)多克隆抗体和降钙素基因相关肽(CGRP)多克隆抗体均购自 Abcam 公司(批号 ab13896、ab231722);溶质载体家族 6 成员 4(SLC6A4)多克隆抗体和 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(批号 bs-1893R、bsm-33036M)。

1.3 主要仪器

Sorvall ST8 冷冻离心机(美国 Thermo 公司);CYT5MFV 多功能酶标仪(美国伯腾公司);Taton-

4200 自动凝胶成像分析系统 (美国 Tanon 公司); 1658002 垂直电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 养血清脑丸活性成分筛选

采用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 搜索养血清脑丸组方药材当归、川芎、白芍、熟地黄、钩藤、鸡血藤、夏枯草、决明子、延胡索、细辛化学成分, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件, 筛选养血清脑丸活性成分^[15]。养血清脑丸组方药材珍珠母为贝壳类中药, 因其所含成分多为无机盐、微量元素等不符合筛选条件而被剔除^[16]。

2.2 活性成分与偏头痛靶点检索及共有靶点筛选

采用 TCMSP 平台检索养血清脑丸活性成分对应的作用靶点, 同时采用 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 对活性成分靶点进行进一步补充, 具体方法为基于 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对养血清脑丸的活性成分进行检索, 获得各成分的 SMILES 化学式, 并将各成分的 SMILES 信息输入 Swiss Target Prediction 数据库, 基于各成分的二维和三维结构的相似性, 获得其对应的 probability > 0.3 的靶点, 与上述 TCMSP 平台获得的靶点进行整合、去重, 最终靶点作为养血清脑丸活性成分的作用靶点^[17]。

在 NCBI GENE 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>)、DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) 中通过检索 “migraine”, 获得与偏头痛相关的靶点, 合并 4 个数据库并删除重复信息, 所得结果即为与偏头痛相关的靶点。

利用 OmicShare 平台 (<https://www.omicshare.com/>) 绘制养血清脑丸活性成分靶点与偏头痛相关靶点的韦恩图, 所得交集靶点即为养血清脑丸治疗偏头痛的作用靶点。

2.3 共有靶点蛋白互作网络 (PPI) 构建及关键靶点筛选

采用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 通过导入养血清脑丸与偏头痛共有靶点, 物种设置为 “Homo sapiens”, 绘制共有靶点的 PPI 网络, 导出数据文件并采用 Cytoscape 3.6.0 软

件对 PPI 网络进一步可视化分析, 采用 CytoHubba 插件计算 PPI 网络中各靶点的拓扑参数, 获得基于度 (degree) 值、中心度 (betweenness)、紧密中心度 (closeness) 3 个参数中排名前 10 的靶点, 筛选共有靶点即为养血清脑丸治疗偏头痛的关键靶点。

2.4 共有靶点基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将养血清脑丸与偏头痛共有靶点导入 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 设定阈值 $P < 0.05$, 对共有靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 获得共有靶点所参与的生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 及通路, 分别对 GO 和 KEGG 分析各条目排名前 10 的信息及共有靶点所参与的功能和通路信息绘制柱状图和气泡图进行数据结果的可视化展示。

2.5 “养血清脑丸 - 组方中药 - 活性成分 - 偏头痛 - 靶点 - 通路” 网络构建

将养血清脑丸、组方中药、活性成分、偏头痛、相关靶点、通路的对应关系导入 Cytoscape 3.6.0 软件, 获得养血清脑丸治疗偏头痛的 “养血清脑丸 - 组方中药 - 活性成分 - 偏头痛 - 靶点 - 通路” 网络模型图。此外, 运用 network analyzer 工具对网络中的各节点进行拓扑学分析, 以各成分节点的 degree 值为指标, 明确养血清脑丸治疗偏头痛的关键活性成分。

2.6 关键成分 - 关键靶点的分子对接验证

对筛选的活性成分和关键靶点进行分子对接验证, 具体操作为从 PubChem 数据库下载关键成分的 MOL2 文件, 并采用 ChemBioDraw 软件进行能量最小化等前处理; 从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载关键靶点的 PDB 文件, 运用 Pymol 软件对靶点蛋白进行原始配体分离、水分子去除等前处理; 将经前处理后的小分子和靶点蛋白分子分别导入 AutoDockTools 1.5.6 软件, 经加氢、电荷分配等处理后均保存为 PDBQT 格式并进行分子对接, 获得关键成分与关键靶点间的结合能 (affinity, kcal/mol)、结合位置等信息, 导出对接结果的 PDBQT 格式文件, 并采用 Pymol 软件进行可视化展示。

2.7 实验验证

2.7.1 实验动物分组、给药及造模 实验动物适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、舒马普坦组和养血清脑丸 1.5、0.75 g/kg 组, 每组动物 8 只。

舒马普坦组 ig 琥珀酸舒马普坦 10 mg/kg, 养血清脑丸组分别 ig 养血清脑丸 1.5、0.75 g/kg^[18], ig 体积 10 mL/kg, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 对照组和模型组 ig 等剂量生理盐水。末次给药 30 min 后, 除对照组外, 其余各组大鼠颈部 ih 硝酸甘油注射剂 10 mg/kg, 对照组大鼠注射等剂量的生理盐水。造模后大鼠出现双耳发红、前肢频繁挠头、爬笼次数增多、烦躁不安等现象, 持续一段时间, 继而出现蜷卧、活动减少等状态, 说明造模成功^[19]。造模 4 h 后各组大鼠 ip 10%水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉, 腹主动脉采血于真空促凝管中, 室温静置 2 h 后 3 500 r/min 离心 10 min, 收集血清, 置于-20 °C 冰箱保存备用; 取血后, 断头处死, 取脑组织, 将其置于-80 °C 冰箱保存。

2.7.2 行为学观察 观察大鼠给药期间的行为学变化, 并于造模后统计大鼠 120 min 内抓头次数。

2.7.3 ELISA 检测大鼠血清 NO、IL-6、TNF- α 水平和脑组织中 5-HT、VEGF 的含量 参照大鼠 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 NO、IL-6、TNF- α 水平; 准确称取大鼠脑组织 100 mg, 加入预冷的生理盐水于冰上匀浆, 1 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 参照大鼠 ELISA 试剂盒说明书检测脑组织中 5-HT 和 VEGF 的含量。

2.7.4 Western blotting 法检测大鼠脑组织中 5-HT1B、SLC6A4、CGRP 蛋白表达情况 准确称取

大鼠脑组织约 200 mg, 4 °C 解冻后加入预冷的组织裂解液匀浆提取组织蛋白, 于 4 °C 条件下离心 20 min, 10 000 r/min, 取上清经 BCA 试剂盒蛋白定量后, 取 30 μ g 蛋白进行电泳、PVDF 膜转膜, 分别加入一抗 SLC6A4、5-HT1B 和 CGRP (稀释倍数 1:3 000)、 β -actin (稀释倍数 1:5 000), 4 °C 孵育过夜后加入羊抗兔二抗 (稀释倍数 1:3 000) 室温孵育 4 h 后, 用 ECL 化学发光液显色, 经自动凝胶成像分析系统拍照后以 Image J 软件分析各组蛋白相对表达水平。

2.7.5 统计学方法 采用 GraphPad Prism7.0 软件进行数据分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态性和方差齐性时, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 养血清脑丸活性成分的筛选结果

最终获得活性成分 140 个, 其中白芍 13 个、川芎 7 个、当归 2 个、钩藤 32 个、鸡血藤 24 个、决明子 14 个、熟地黄 2 个、细辛 8 个、夏枯草 11 个、延胡索 49 个, 见表 1。其中, 谷甾醇 (sitosterol)、 β 谷甾醇 (beta-sitosterol)、豆甾醇 (stigmasterol)、槲皮素 (quercetin)、儿茶素 (catechin)、芦荟大黄素 (aloe-emodin)、山柰酚 (kaempferol)、隐品碱 (cryptopin)、木犀草素 (luteolin) 9 个成分为组方中药间的共有成分。

表 1 养血清脑丸中的有效成分

Table 1 Active ingredients in Yangxueqingnao Pills

MOL ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL001921	lactiflorin	49.12	0.80	白芍
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍
MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	白芍
MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	白芍
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	白芍
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12beta-olide	64.77	0.38	白芍
MOL001918	paeoniflorigenone	87.59	0.37	白芍
MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33	白芍
MOL002157	wallichilide	42.31	0.71	川芎
MOL000433	FA	68.96	0.71	川芎
MOL002135	myricanone	40.60	0.51	川芎
MOL002140	perlolyrine	65.95	0.27	川芎
MOL002151	senkyunone	47.66	0.24	川芎
MOL001494	mandenol	42.00	0.19	川芎
MOL008484	vincoside lactam	50.81	0.82	钩藤
MOL008457	tetrahydroalstonine	32.42	0.81	钩藤
MOL008488	yohimbine	46.42	0.81	钩藤

续表 1

MOL ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL008472	hirsutasideA	70.34	0.81	钩藤
MOL008476	hirsutasideB	40.21	0.80	钩藤
MOL008485	hirsutasideC	34.27	0.75	钩藤
MOL008463	SMR000232338	56.74	0.75	钩藤
MOL008470	SMR000232333	78.38	0.75	钩藤
MOL008481	(1'R,3S,4a'S,5a'S,10a'R)-1'-methyl-2-oxo-1',4a',5',7',8',10',10a'-octahydrospiro [indoline-3,6'-pyrano[3,4-f]indolizine]-4'-carboxylic acid	105.22	0.70	钩藤
MOL008475	mitraphyllic acid	31.70	0.70	钩藤
MOL008467	rhynchophylline A	68.68	0.69	钩藤
MOL008455	3-oxo-22 α -hydroxyurs-12-en-27,28-dioic acid	32.33	0.68	钩藤
MOL008458	angustidine	51.85	0.66	钩藤
MOL008456	(3E,4R)-4-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylidene] oxolan-2-one	51.78	0.65	钩藤
MOL008478	methyl(E)-2-[(2S,3R,12bS)-3-vinyl-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydroindolo[3,2-h] quinolizin-2-yl]-3-methoxy-prop-2-enoate	31.94	0.64	钩藤
MOL008489	delta(sup 18)-Hirsutine	41.64	0.64	钩藤
MOL008468	methyl(E)-2-[(2S,3Z,12bS)-3-ethylidene-2,4,6,7,12,12b-hexahydro-1H-indolo [3,2-h]quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate	56.83	0.64	钩藤
MOL008465	(E)-16,17-didehydro-17-methoxy-17,18-seco-3-beta-yohimban-16-carboxylic acid methyl ester	32.75	0.64	钩藤
MOL008482	(2S,12bR)-methyl-2-[(E)-1-oxobut-2-en-2-yl]-1,2,6,7,12,12b-hexahydroindolo[2,3-a] quinolizine-3-carboxylate	42.07	0.60	钩藤
MOL008490	isocorynantheic acid	72.36	0.60	钩藤
MOL008460	geissoschizine acid	49.92	0.60	钩藤
MOL008477	corynoxine	57.13	0.57	钩藤
MOL008473	(E)-2-[(3S,6'S,7'S,8'aS)-6'-ethyl-2-keto-spiro[indoline-3,1'-indolizidine]-7'-yl]-3-methoxy-acrylic acid methyl ester	57.85	0.57	钩藤
MOL008474	(E)-2-[(3R,6'S,7'S,8'aS)-6'-ethyl-2-keto-spiro[indoline-3,1'-indolizidine]-7'-yl]-3-methoxy-acrylic acid methyl ester	54.47	0.57	钩藤
MOL008471	isorhynchophylline	47.31	0.57	钩藤
MOL008469	rhynchophylline	41.82	0.57	钩藤
MOL008487	hirsutine	34.44	0.43	钩藤
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	钩藤
MOL000469	3-hydroxystigmast-5-en-7-one	40.93	0.78	鸡血藤
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a] phenanthren-3-ol	36.23	0.78	鸡血藤
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	鸡血藤
MOL000493	campesterol	37.58	0.71	鸡血藤
MOL000470	8-C- α -L-arabinosylluteolin	35.54	0.66	鸡血藤
MOL000491	augelicin	37.50	0.66	鸡血藤
MOL000503	medicagol	57.49	0.60	鸡血藤
MOL000507	psi-baptigenin	70.12	0.31	鸡血藤
MOL000490	petunidin	30.05	0.31	鸡血藤
MOL000497	licochalcone a	40.79	0.29	鸡血藤
MOL000502	cajinin	68.80	0.27	鸡血藤
MOL000501	consume close grain	68.12	0.27	鸡血藤
MOL000468	8-O-methylreyusi	70.32	0.27	鸡血藤
MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] acrylamide	118.35	0.26	鸡血藤
MOL000461	3,7-dihydroxy-6-methoxy-dihydroflavonol	43.80	0.26	鸡血藤
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	鸡血藤
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	鸡血藤
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	鸡血藤
MOL000500	vestitol	74.66	0.21	鸡血藤
MOL000506	lupinidine	61.89	0.21	鸡血藤

续表 1

MOL ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL006481	gluco-obtusifolin	42.41	0.81	决明子
MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	决明子
MOL000953	CLR	37.87	0.68	决明子
MOL006465	rubrofusarin-6-beta-gentiobioside	40.12	0.67	决明子
MOL006475	obtusin	81.43	0.40	决明子
MOL006486	raffinose	31.24	0.40	决明子
MOL006472	aurantio-obtusin	31.55	0.37	决明子
MOL002268	rhein	47.07	0.28	决明子
MOL006482	9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methylene-4 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]isochromen-1-one	63.25	0.24	决明子
MOL002281	toralactone	46.46	0.24	决明子
MOL006466	rubrofusarin	45.55	0.24	决明子
MOL006489	quinizarin	47.34	0.19	决明子
MOL009849	ZINC05223929	31.57	0.83	细辛
MOL001558	sesamin	56.55	0.83	细辛
MOL012141	caribine	37.06	0.83	细辛
MOL002962	(3 <i>S</i>)-7-hydroxy-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)chroman-4-one	48.23	0.33	细辛
MOL002501	[(1 <i>S</i>)-3-[(<i>E</i>)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl](1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-[(<i>E</i>)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31	细辛
MOL012140	4,9-dimethoxy-1-vinyl-5 <i>b</i> -carboline	65.30	0.19	细辛
MOL006772	poriferasterol monoglucoside	43.83	0.76	夏枯草
MOL004355	spinasterol	42.98	0.76	夏枯草
MOL006774	stigmast-7-enol	37.42	0.75	夏枯草
MOL004798	delphinidin	40.63	0.28	夏枯草
MOL000737	morin	46.23	0.27	夏枯草
MOL006767	vulgaxanthin-I	56.14	0.26	夏枯草
MOL000791	bicuculline	69.67	0.88	延胡索
MOL001463	dihydrosanguinarine	59.31	0.86	延胡索
MOL001474	sanguinarine	37.81	0.86	延胡索
MOL004231	tetrahydrocorysamine	34.17	0.86	延胡索
MOL004225	pseudocoptisine	38.97	0.86	延胡索
MOL001458	coptisine	30.67	0.86	延胡索
MOL004230	stylopine	48.25	0.85	延胡索
MOL004198	18797-79-0	46.06	0.85	延胡索
MOL004226	24240-05-9	53.75	0.83	延胡索
MOL000787	fumarine	59.26	0.83	延胡索
MOL001461	dihydrochelerythrine	32.73	0.81	延胡索
MOL004202	dehydrocavidine	38.99	0.81	延胡索
MOL002670	cavidine	35.64	0.81	延胡索
MOL004190	(-)-alpha- <i>N</i> -methylcanadine	45.06	0.80	延胡索
MOL004228	saulatine	42.74	0.79	延胡索
MOL001454	berberine	36.86	0.78	延胡索
MOL002903	(<i>R</i>)-canadine	55.37	0.77	延胡索
MOL004234	2,3,9,10-tetramethoxy-13-methyl-5,6-dihydroisoquinolino[2,1- <i>b</i>]isoquinolin-8-one	76.77	0.73	延胡索
MOL004210	(1 <i>S</i> ,8' <i>R</i>)-6,7-dimethoxy-2-methylspiro[3,4-dihydroisoquinoline-1,7'-6,8-dihydrocyclopenta[<i>g</i>][1,3]benzodioxole]-8'-ol	43.95	0.72	延胡索
MOL004224	pontevedrine	30.28	0.71	延胡索
MOL000793	C09367	47.54	0.69	延胡索
MOL004191	capaurine	62.91	0.69	延胡索
MOL004204	dehydrocorydaline	41.98	0.68	延胡索
MOL004195	corydaline	65.84	0.68	延胡索
MOL004214	isocorybulbine	40.18	0.66	延胡索
MOL000785	palmatine	64.60	0.65	延胡索
MOL004071	hyndarin	73.94	0.64	延胡索
MOL004216	13-methylpalmatrubine	40.97	0.63	延胡索

续表 1

MOL ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL004209	13-methyldehydrocorydalmine	35.94	0.63	延胡索
MOL004203	dehydrocorybulbine	46.97	0.63	延胡索
MOL004199	corynoloxine	38.12	0.60	延胡索
MOL004205	dehydrocorydalmine	43.90	0.59	延胡索
MOL000790	isocorypalmine	35.77	0.59	延胡索
MOL004196	corydalmine	52.50	0.59	延胡索
MOL004221	norglaucing	30.35	0.56	延胡索
MOL004233	ST057701	31.87	0.56	延胡索
MOL004220	N-methylaurotetanine	41.62	0.56	延胡索
MOL004197	corydine	37.16	0.55	延胡索
MOL000217	(S)-scoulerine	32.28	0.54	延胡索
MOL004208	demethylcorydalmatine	38.99	0.54	延胡索
MOL004193	clarkeanidine	86.65	0.54	延胡索
MOL004763	izoteolin	39.53	0.51	延胡索
MOL004200	methyl-[2-(3,4,6,7-tetramethoxy-1-phenanthryl)ethyl]amine	61.15	0.44	延胡索
MOL004232	tetrahydroprotopapaverine	57.28	0.33	延胡索
MOL004215	leonticine	45.79	0.26	延胡索
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	白芍、川芎、钩藤、熟地黄、延胡索
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	白芍、当归、钩藤、鸡血藤、夏枯草
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍、钩藤、夏枯草
MOL000492	catechin	54.83	0.24	白芍、鸡血藤
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	当归、鸡血藤、决明子、熟地黄、夏枯草、延胡索
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	钩藤、夏枯草、延胡索
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24	鸡血藤、决明子
MOL001460	cryptopin	78.74	0.72	细辛、延胡索

3.2 养血清脑丸与偏头痛共有靶点的筛选结果

通过 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库检索养血清脑丸活性成分作用靶点进行合并去重后共获得靶点 279 个,对应 88 个活性成分。从 NCBI GENE、OMIM、CTD、DisGeNET 数据库中分别检索到与偏头痛相关的靶点 304、63、23、72 个,合并 4 个数据库并删除重复靶点,共获得 325 个偏头痛相关的靶点。将养血清脑丸靶点与偏头痛相关靶点进行交集,共获得交集靶点 53 个,见图 1。

3.3 共有靶点 PPI 网络及关键靶点的筛选结果

养血清脑丸与偏头痛共有靶点的 PPI 网络如图 2 所示,网络共包含靶点节点 53 个,靶点间相互作用的边共 336 条。

采用 Cytoscape 3.6.0 的 CytoHubba 插件对 PPI 网络靶点拓扑参数进行分析,degree、betweenness、closeness 3 个参数排名前 10 的靶点信息及其相互作用见表 2。由上述信息可知,IL-6 和 SLC6A4 这 2 个靶点在 3 个参数中排名均为前 2 名,表明这 2 个靶点可能是养血清脑丸治疗偏头痛的关键靶点。



图 1 养血清脑丸与偏头痛靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the target of Yangxueqingnao Pills and migraine related target

3.4 共有靶点的 GO 注释和 KEGG 通路富集分析

共有靶点的 GO 富集分析中,BP、CC、MF 排名前 10 的条目信息,见图 3。BP 包含 1 074 条,靶点主要参与对药物的反应(response to drug)、血液循环(blood circulation)、对氮化合物的反应(response to nitrogen compound)、循环系统过程(circulatory system process)等;CC 包含 44 条,包括质膜的组成成分(integral component of plasma

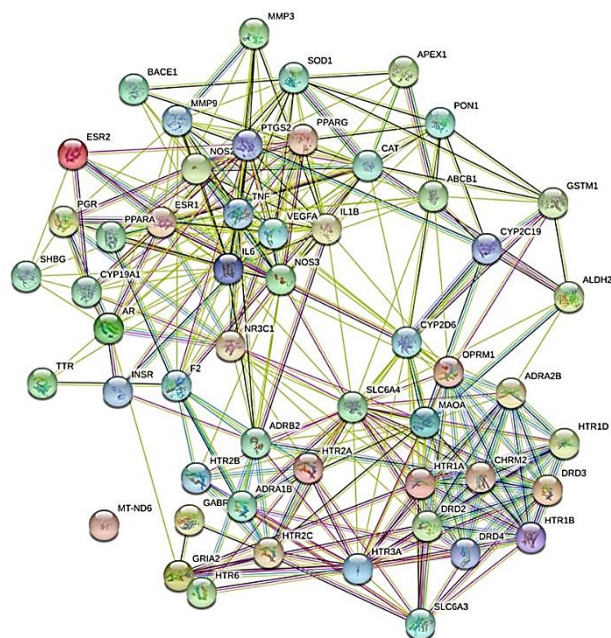


图 2 养血清脑丸与偏头痛共有靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of targets between Yangxueqingnao Pills and migraine

表 2 PPI 网络排名前 10 的靶点信息

Table 2 Top 10 target information of PPI network

靶点	degree	靶点	closeness	靶点	betweenness
IL-6	27	IL-6	38.83	SLC6A4	272.19
SLC6A4	26	SLC6A4	38.50	IL-6	220.89
TNF	23	TNF	36.83	OPRM1	199.76
VEGFA	22	VEGFA	36.17	NOS3	151.83
PTGS2	22	NOS3	35.67	ADRB2	125.08
MAOA	21	MAOA	35.33	TNF	106.48
NOS3	21	OPRM1	35.33	CAT	105.97
OPRM1	20	PTGS2	35.00	MAOA	103.28
CAT	19	CAT	34.33	NR3C1	102.82
HTR3A	19	IL1B	34.17	VEGFA	99.76

membrane)、质膜固有成分 (intrinsic component of plasma membrane)、质膜部分 (plasma membrane part) 等; MF 包含 92 条, 共有靶点主要发挥神经递质受体活性 (neurotransmitter receptor activity)、G 蛋白偶联胺受体活性 (G-protein coupled amine receptor activity)、药物结合 (drug binding)、信号受体活性 (signaling receptor activity) 等。

KEGG 通路富集分析结果如图 3 所示, 共有靶点的涉及的通路共 28 条, 提示养血清脑丸通过多通路而发挥偏头痛的治疗作用。根据 P 值大小, 排名前 5 的通路包括神经活性配体受体相互作用

(neuroactive ligand-receptor interaction)、5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse)、钙信号通路 (calcium signaling pathway)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway) 及肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)。

3.5 “养血清脑丸-组方中药-活性成分-偏头痛-靶点-通路”网络构建及关键成分筛选结果

养血清脑丸治疗偏头痛的“养血清脑丸-组方中药-活性成分-偏头痛-靶点-通路”网络如图 4 所示, 网络包含 161 个节点 (10 个组方中药、78 个活性成分、43 个靶点、28 条通路) 和 639 条边, 网络间各节点的复杂关系进一步表明养血清脑丸以多成分、多靶点、多途径治疗偏头痛的作用特点。

3.6 关键成分-关键靶点的分子对接结果

通过对“养血清脑丸-组方中药-活性成分-偏头痛-靶点-通路”网络中活性成分节点的 degree 值进行分析, 结果表明, degree 排名前 10 的活性成分信息见表 3, 提示这 10 个活性成分可能是养血清脑丸治疗偏头痛的潜在关键活性成分。采用分子对接的方法对 10 个潜在关键活性成分与关键靶点 IL-6 (PDB ID: 4cni) 和 SLC6A4 (PDB ID: 6awo) 间的结合活性进行验证。各成分与靶点间的结合能如表 3 所示, 一般认为结合能小于 -4.25 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$) 表明二者间有一定结合活性, 结合能小于 -5.0 kcal/mol 表明有较好结合活性, 结合能小于 -7.0 kcal/mol 则表示二者有强烈的结合活性^[20]。分子对接结果显示, 除原阿片碱与 IL-6 外, 其余成分与关键靶点间均有一定的结合活性, 且大部分成分与靶点间的结合活性较好, IL-6 与槲皮素和山柰酚、SLC6A4 与 β -谷甾醇和隐品碱间有强烈结合活性。对结合能小于 -5.0 kcal/mol, 即具有较好结合活性的成分与靶点间的对接结果进行可视化展示如图 5 所示。

3.7 动物实验验证结果

3.7.1 养血清脑丸对偏头痛大鼠行为学的影响 经硝酸甘油造模后, 模型组大鼠出现双耳发红、烦躁不安现象, 且前肢挠头次数较对照组显著增多 ($P < 0.01$), 而舒马普坦组和养血清脑丸 1.50、0.75 g/kg 组大鼠出现异常反应的频率显著低于模型组 ($P < 0.01$), 见图 6。

3.7.2 养血清脑丸对偏头痛大鼠血清 NO、IL-6、TNF- α 水平和脑组织 5-HT、VEGF 含量的影响 如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 NO、



图 3 GO 富集分析 (top 10) 和 KEGG 通路分析

Fig. 3 GO enrichment (top 10) and KEGG pathway enrichment analysis

IL-6、TNF- α 水及脑组织 VEGF 含量显著升高 ($P < 0.01$), 而脑组织 5-HT 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 舒马普坦组和养血清脑丸 1.5、0.75 g/kg 组大鼠血清中 NO、IL-6、TNF- α 水平及脑组织中 VEGF 水平含量降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 而脑组

织 5-HT 含量显著升高 ($P < 0.01$)。

3.7.3 养血清脑丸对偏头痛大鼠脑组织 SLC6A4、5-HT1B、CGRP 表达的影响 与对照组相比, 模型组大鼠脑组织中 5-HT1B 的表达显著降低, 而 SLC6A4 和 CGRP 的表达显著升高 ($P < 0.01$); 与

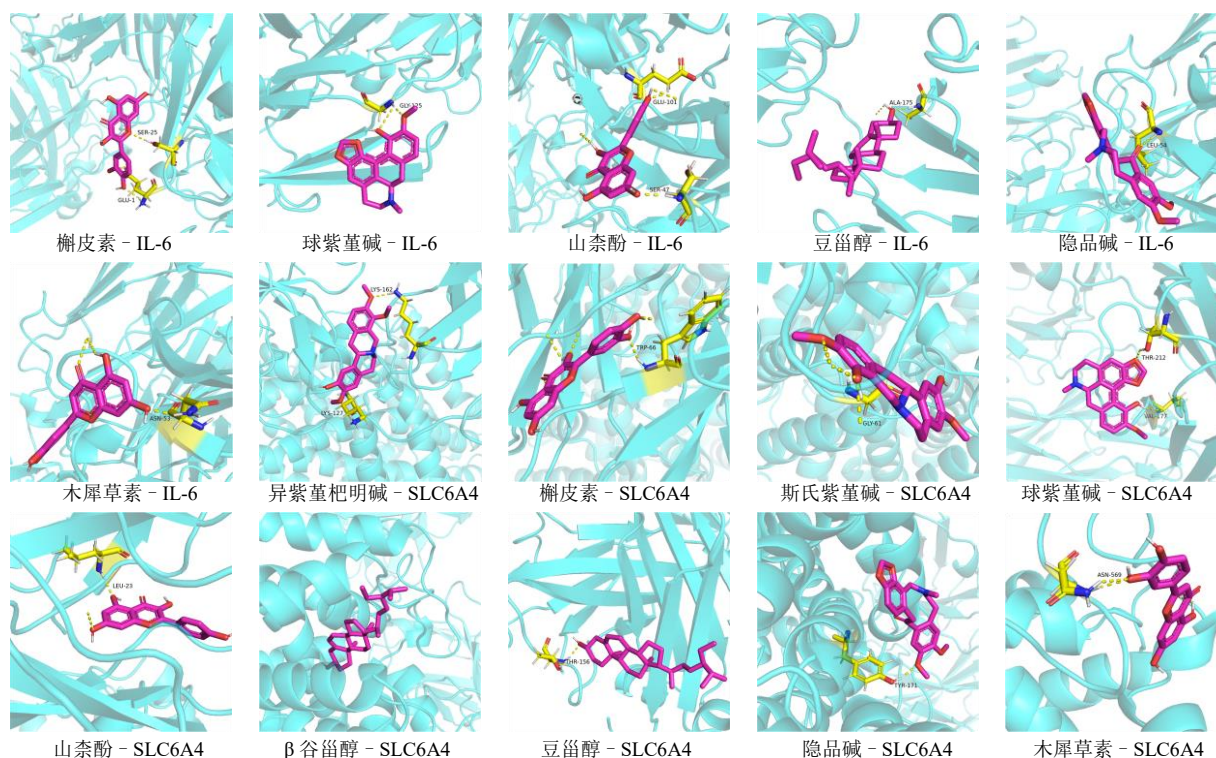
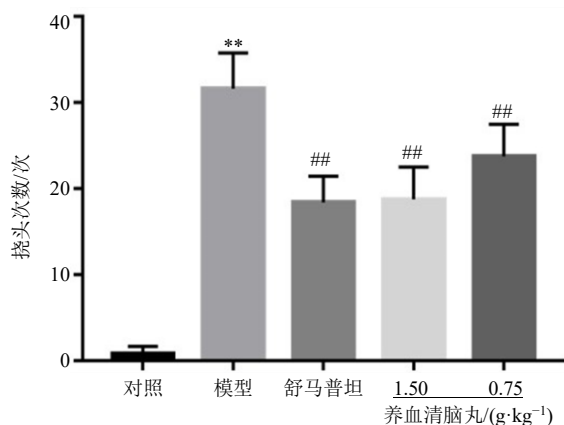


图 5 关键成分与关键靶点间分子对接模式图

Fig. 5 Molecular docking mode of target proteins and active ingredients

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group图 6 养血清脑丸对偏头痛大鼠挠头次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig. 6 Effect of Yangxueqingnao Pills on the number of head scratching in migraine rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组成药物之一[22-24]。研究表明,黄酮类成分槲皮素、山柰酚、木犀草素均具有显著的抗氧化、抗炎及免疫调节活性[25-27],其中槲皮素为钩藤、夏枯草、延胡索的共有成分,山柰酚为白芍、钩藤、细辛、夏枯草共有成分,木犀草素为鸡血藤和夏枯草共有成分,进一步说明了养血清脑丸组方中药间协同治疗

偏头痛的作用特点。

通过对养血清脑丸治疗偏头痛靶点的 PPI 网络进行筛选,筛选 degree、betweenness、closeness 3 个参数中排名前 10 名的靶点,结果表明 IL-6 和 SLC6A4 均排在前 2 名。IL-6 于 1973 年被鉴定为由 T 细胞分泌的可溶性因子,其由 α 链和 β 链组成,是介导多种细胞间通讯的枢纽,具有广泛的生物学功能,其受体 IL-6R 在机体表达广泛,可介导感染、应激和创伤等引起炎症反应,已成为机体免疫调节和多种疾病发生发展的重要途径,被广泛用于靶向治疗的重要靶点[26-30]。

虽然偏头痛的病理生理机制尚不完全清楚,但临床上以非甾体抗炎药进行偏头痛治疗时患者颅内炎症介质水平升高,因而常认为偏头痛是一种炎症性疾病[31-32]。偏头痛患者发病期间疼痛的原因可能与脑膜伤害感受器的激活和致敏有关,此外有研究显示偏头痛患者颅内 IL-6 水平在疾病发作时升高,提示 IL-6 可能促进脑膜发出疼痛信号,并促进头痛的发展[33]。有关 IL-6 在这一过程中的作用及其机制,Yan 等[34]研究表明 IL-6 可能通过细胞外调节蛋白激酶(ERK)而介导 Nav1.7 调节增强硬脊膜传入的兴奋性,进而调控与偏头痛相关的疼痛行为。

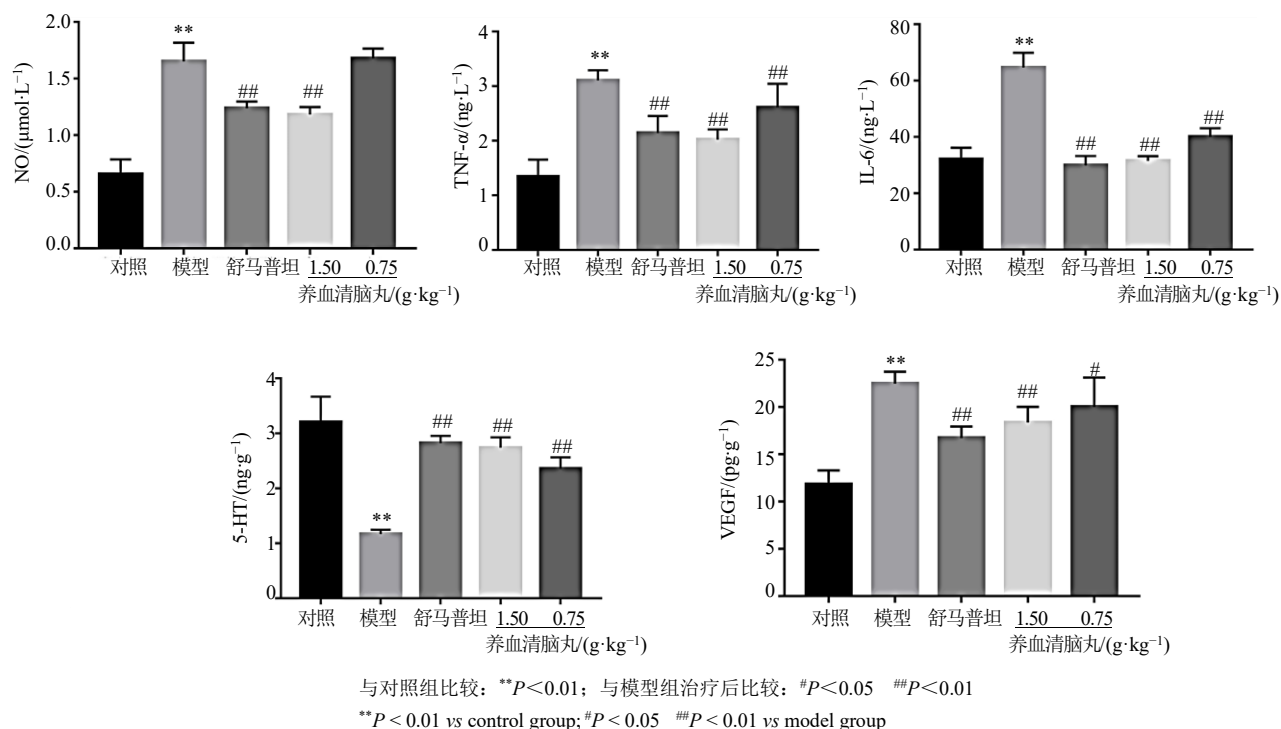


图 7 养血清脑丸对偏头痛大鼠血清 NO、TNF-α、IL-6 水平和脑组织 5-HT、VEGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
 Fig. 7 Effect of Yangxueqingnao Pills on NO, TNF-α, IL-6 in serum and the content of 5-HT and VEGF in brain tissue of migraine rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

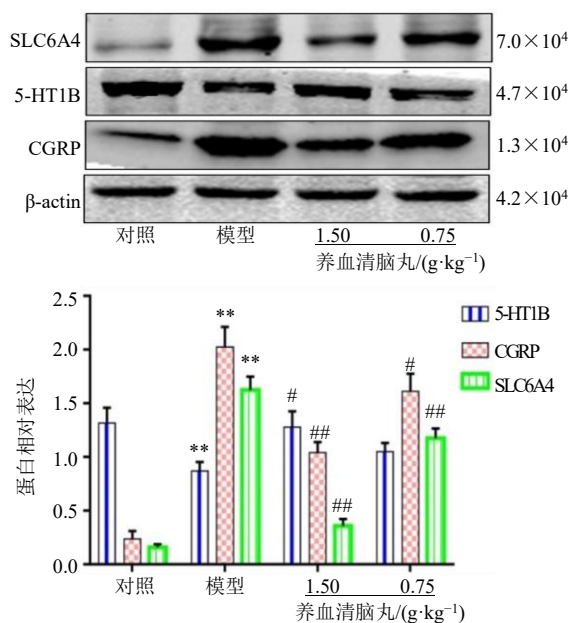


图 8 养血清脑丸对偏头痛大鼠脑组织 5-HT1B、CGRP、SLC6A4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
 Fig. 8 Effect of Yangxueqingnao Pills on protein expression of 5-HT1B, CGRP and SLC6A4 in brain tissue of migraine rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

精神障碍、抑郁症等是偏头痛常见的共病，其共病机制尚不完全清楚，可能与单胺类神经传递功能失调有关^[35-36]。大量研究表明 5-HT 系统在偏头痛病理生理学过程中发挥重要作用，偏头痛发作期间，血浆中 5-HT 浓度显著升高，其代谢物 5-羟基吲哚乙酸明显降低，而 5-HT、下视黄醇、去甲肾上腺素等神经递质可介导偏头痛痛觉^[36-37]。研究发现 SLC6A4 插入/缺失多态性的短等位基因降低了转录活性，导致 5-HT 再摄取减少，进而使 5-HT 水平失调。此外，在关键靶点的筛选中，内皮型一氧化氮合酶（NOS3）亦排名靠前。NO 是一种有效的血管舒张剂，其释放受损可导致血管/凝血功能障碍，进而影响脑血流变化，激活皮层扩散抑制和三叉神经血管系统，从而介导疼痛^[38-39]。在内皮细胞中，NOS3 作为 NOS（NO 合成酶）亚型之一，可介导 L-精氨酸合成 NO 的过程^[40]。

养血清脑丸治疗偏头痛靶点的通路分析结果表明，养血清脑丸可能通过 5-羟色胺能突触、钙信号通路、cAMP 信号通路及 TNF 信号通路等途径发挥治疗偏头痛的作用。在偏头痛的病理生理研究中，三叉神经学说起着至关重要的作用，其认为偏头痛主要依赖于颅内血管的异常扩张，因而收缩扩张的脑血管可以阻止偏头痛发作^[41]。偏头痛与内源

性 5-HT 间关联性研究最早始于 20 世纪 50 年代^[42], 作为一种单胺类神经递质, 其在学习记忆、情绪、睡眠、疼痛等生理功能以及情绪、认知异常等病理状态中发挥重要作用, 5-HT 一旦从突触前轴突终末释放, 就与其受体结合, 其中突触前定位的 5-HT_{1B} 受体被认为是抑制 5-HT 过量释放的受体, 因而基于血管收缩的作用机制的 5-HT_{1B} 激动剂曲普坦常被用于中重度偏头痛发作患者的治疗^[43], 其可有效地中止急性偏头痛发作, 并在人体和动物模型中抑制降钙素基因相关肽 (CGRP) 的体内释放。钙离子信号可从膜电位、离子转运蛋白到激酶、转录因子等多层次调节机体生理功能, 其中钙离子信号通路中电压依赖性钙通道 Cav2.1 在大脑皮层、三叉神经节、参与中枢痛觉控制的脑干核等所有与偏头痛相关的脑区域均有表达^[44], 在启动中枢神经系统突触的动作电位诱发的神经递质释放中起着重要作用, 而编码其成孔 $\alpha 1$ 亚单位的基因 CACNA1A 的错义突变导致一种罕见的先兆偏头痛^[45]。

基于网络药理学研究结果结合文献分析, 本研究亦采用动物实验对网络药理学中的部分关键节点进行了验证, 结果表明, 养血清脑丸可抑制硝酸甘油所诱导的偏头痛大鼠前肢挠头次数等异常情况的发生, 对偏头痛大鼠有确切的治疗作用, 该作用与其抑制偏头痛大鼠血清中 NO、IL-6、TNF- α 和脑组织中 VEGF、SLC6A4、CGRP 含量的升高, 促进脑组织 5-HT 水平及 5-HT_{1B} 的表达有关, 动物实验结果进一步验证了网络药理学研究的准确性。

综上, 本研究采用网络药理学的方法阐释了养血清脑丸多成分、多靶点、多通路治疗偏头痛的作用特点, 明确其治疗偏头痛的关键成分和关键靶点, 并采用分子对接的方法验证了关键成分和关键靶点间具有较好的结合活性, 进一步确证了研究结果的可靠性, 研究结果为养血清脑丸的实验研究及临床应用提供一定的理论基础和参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李琴瑶, 杨红军. 偏头痛相关炎症因子的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(6): 456-459.
- [2] 周霞, 孙中武. 偏头痛的发病机制及诊治进展 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(5): 714-715.
- [3] 王飞, 高丽, 王永刚. 5-羟色胺参与偏头痛的作用机制概述及展望 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 258-261.
- [4] Zeller J, Poulsen K T, Sutton J E, et al. CGRP function-blocking antibodies inhibit neurogenic vasodilatation without affecting heart rate or arterial blood pressure in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(7): 1093-1103.
- [5] Dini E, Mazzucchi S, De Luca C, et al. Plasma levels of oxidative stress markers, before and after BoNT/A treatment, in chronic migraine [J]. *Toxins*, 2019, 11(10): 608.
- [6] Cavestro C, Ferrero M, Mandrino S, et al. Novelty in inflammation and immunomodulation in migraine [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(27): 2919-2936.
- [7] Kim S, Bae D W, Park S G, et al. The impact of pain-related emotions on migraine [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 577.
- [8] Lars J S, Emma N, Timothy J S, et al. Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990-2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(11): 954-976.
- [9] Kuo F H, Lee C Y, Li J P, et al. Migraine as a risk factor for peripheral artery occlusive disease: A population-based cohort study [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(22): 8549.
- [10] Gill K, Chia V M, Hernandez R K, et al. Rates of vascular events in patients with migraine: A MarketScan® database retrospective cohort study [J]. *Headache*, 2020, 60(10): 2265-2280.
- [11] Vos T, Flaxman A D, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [12] 徐榛敏, 贾敏, 梁晓, 等. 偏头痛中医临床实践指南专题·偏头痛中医临床实践指南(征求意见稿) [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5057-5067.
- [13] 李柱, 倪文璐, 赵艳敏, 等. 300 例偏头痛患者中医体质分布及与中医证候关系临床研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(10): 13-14.
- [14] 任怀山, 杨荣. 养血清脑丸治疗偏头痛的疗效观察 [J]. 中国现代药物应用, 2008(18): 45-46.
- [15] 白子兴, 曹旭含, 孙承颐, 等. 基于网络药理学探讨桃红四物汤延缓股骨头坏死病变进程作用机制 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 65-70.
- [16] 杨丽, 刘友平, 韦正, 等. 贝壳类药材牡蛎石决明珍珠母的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2990-2992.
- [17] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [18] 张锐, 杨晓玉, 贾明璐, 等. 养血清脑丸联合利扎曲普坦治疗偏头痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 316-320.

- [19] 许永崧, 仇峰, 吴莎, 等. UPLC-MS/MS 测定吴茱萸汤活性组分在硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆和脑组织的药代动力学 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 645-654.
- [20] 裴超, 邵霖霖, 刘晶, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨红花治疗视网膜静脉阻塞的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1844-1851.
- [21] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [22] 赵丽沙, 董宇, 寿旦. 延胡索生物碱类化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 299-302.
- [23] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [24] Wang P, Zhang T L, Yu G H, *et al.* Poly-pharmacokinetic strategy-delineated metabolic fate of bioactive compounds in a traditional Chinese medicine formula, Yuanhu Zhitong tablets, using parallel reaction monitoring mode [J]. *Phytomedicine*, 2019, 53: 53-61.
- [25] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [26] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
- [27] Manzoor M F, Ahmad N, Ahmed Z, *et al.* Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(9): e12974.
- [28] Zhang Z, La Placa D, Nguyen T, *et al.* CEACAM1 regulates the IL-6 mediated fever response to LPS through the RP105 receptor in murine monocytes [J]. *BMC Immunol*, 2019, 20(1): 7.
- [29] Kaur S, Bansal Y, Kumar R, *et al.* A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(5): 115327.
- [30] Aden K, Breuer A, Rehman A, *et al.* Classic IL-6R signalling is dispensable for intestinal epithelial proliferation and repair [J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(11): e270.
- [31] Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, *et al.* Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally [J]. *Headache*, 2006, 46(2): 200-207.
- [32] Waeber C, Moskowitz M A. Migraine as an inflammatory disorder [J]. *Neurology*, 2005, 64(10 Suppl 2): S9-S15.
- [33] Fidan I, Yüksel S, Ymir T, *et al.* The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine [J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 171(1-2): 184-188.
- [34] Yan J, Melemedjian O K, Price T J, *et al.* Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6) [J]. *Mol Pain*, 2012, 8: 6.
- [35] 解苒萱, 许梅花. 偏头痛共发疾病的研究进展 [J]. 临床神经病学杂志, 2019, 32(4): 313-315.
- [36] Gasparini C F, Smith R A, Griffiths L R. Genetic and biochemical changes of the serotonergic system in migraine pathobiology [J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 20.
- [37] Deen M, Christensen C E, Hougaard A, *et al.* Serotonergic mechanisms in the migraine brain - A systematic review [J]. *Cephalalgia*, 2017, 37(3): 251-264.
- [38] Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, *et al.* Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: Role in essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(12): 2310-2320.
- [39] Chen M, Tang W, Hou L, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)-308G>A, nitric oxide synthase 3 (NOS3) +894G>T polymorphisms and migraine risk: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129372.
- [40] García-Martín E, Navarro-Muñoz S, Rodríguez C, *et al.* Association between endothelial nitric oxide synthase (NOS3) rs2070744 and the risk for migraine [J]. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20(3): 426-432.
- [41] Pietrobon D, Moskowitz M A. Pathophysiology of migraine [J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75: 365-391.
- [42] Izzati-Zade K F. The role of serotonin in the pathogenesis and clinical presentations of migraine attacks [J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2008, 38(5): 501-505.
- [43] Negro A, Koverech A, Martelletti P. Serotonin receptor agonists in the acute treatment of migraine: A review on their therapeutic potential [J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 515-526.
- [44] Pietrobon D. Calcium channels and migraine [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(7): 1655-1665.
- [45] Pietrobon D. Function and dysfunction of synaptic calcium channels: Insights from mouse models [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15(3): 257-265.

[责任编辑 高源]