

基于活细胞固相色谱法联合高分辨质谱及网络药理学的丹参标准汤剂抗神经病理性疼痛作用成分及机制探讨

孙兴帅¹, 孙成艳^{2*}

1. 杭州胡庆余堂药业有限公司, 浙江 杭州 311100

2. 江苏省卫民药房连锁有限公司, 江苏 宿迁 223800

摘要:目的 采用活细胞固相色谱法联合高分辨质谱技术快速筛选鉴定丹参标准汤剂中潜在的抗神经病理性疼痛活性成分, 通过网络药理学技术分析其作用机制。方法 小鼠背根神经元细胞与丹参标准汤剂磷酸盐缓冲液(PBS)溶液共孵育, 吸附成分采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)鉴别; 鉴定得到的活性成分基于网络药理学分析其作用机制; 采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库联合Swiss数据库寻找成分作用靶点, 以“neuropathic pain”为关键词在Genecards数据库及OMIM数据库检索去重即得疾病靶点, 将成分靶点与神经病理性疼痛靶点交集筛选得到共同靶点; 将共同靶点导入STRING数据库进行检索, 得蛋白质相互作用(PPI)网络, 并导入Cytoscape 3.7.2绘图, 以度值(degree)为标准选取前10靶点作为关键靶点; 将共同靶点采用ClusterProfiler包进行基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。结果 共鉴定得到以酚酸类物质为主的潜在活性成分11个, 分别为香草酸、丹参素、咖啡酸、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、异丹酚酸B、丹酚酸E。网络药理学分析结果显示活性成分作用靶点174个, 与神经病理性疼痛靶点交集67个; PPI分析显示信号转导及转录激活蛋白3(STAT3)、白蛋白(ALB)、原癌基因c-Jun(JUN)、淀粉样前体蛋白(APP)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、胱天蛋白酶3(CASP3)、toll样受体4(TLR4)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、环加氧酶2(PTGS2)、转录因子p65(RELA)为关键靶点, “药味成分-靶点”网络拓扑分析显示各活性成分可能存在协同作用; GO富集分析显示与碳酸氢盐转运、对脂多糖反应、对细菌来源分析反应等生物过程, 膜筏、膜微区、膜区、分泌颗粒管腔等细胞组成以及碳酸脱水酶活性、水解酶活性、碳氧裂解酶活性等分子功能相关; KEGG富集显示与氮代谢、糖尿病并发症中的晚期糖基化产物(AGE)-晚期糖基化终末产物受体(RAGE)信号通路、脂质和动脉粥样硬化、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路等通路相关; 结合文献分析丹参抗神经病理性疼痛起效机制与炎症和免疫反应、神经元恢复及再生、代谢紊乱、病毒、疼痛递质传导、神经元超敏、疼痛阈等相关。结论 应用活细胞固相色谱与高分辨质谱联用技术筛选出丹参标准汤剂中抗神经病理性疼痛活性成分11个, 桥接网络药理学分析其作用机制可能与炎症和免疫反应、调节代谢紊乱、抑制超敏等相关。

关键词: 丹参; 标准汤剂; 神经病理性疼痛; 活细胞固相色谱法; 网络药理学; 炎症和免疫反应; 神经元恢复及再生; 代谢紊乱; 香草酸; 丹参素; 咖啡酸; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 阿魏酸; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸B; 异丹酚酸B; 丹酚酸E
中图分类号: R284.1, R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0311-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.011

Exploring components and mechanism of anti-neuropathic pain in *Salvia miltiorrhiza* standard decoction based on live cell immobilized chromatography coupled with high resolution mass spectrometry and network pharmacology

SUN Xingshuai¹, SUN Chengyan²

1. Hangzhou Huqing Yutang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311100, China

2. Jiangsu Weimin Pharmacy Chain Co., Ltd., Suqian 223800, China

Abstract: **Objective** To rapidly screen and identify the potential anti-neuropathic pain active components in *Salvia miltiorrhiza* standard decoction by live cell extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, and analyze the mechanism of action by

收稿日期: 2022-08-24

基金项目: 上海市科委科研计划项目(15DZ1900100)

第一作者: 孙兴帅, 研究方向为中药产品研发及大产品二次开发。E-mail: sunxingshuai@126.com

*通信作者: 孙成艳, 主管药师、执业药师。E-mail: m15579220582@163.com

network pharmacology. **Methods** Using mouse dorsal root neuron cells co-incubated with *Salvia miltiorrhiza* PBS solution, the adsorption components were identified by UPLC-Q-Orbitrap HRMS, and the components were analyzed based on network pharmacology and their mechanism of action. TCMSP database and Swiss database were used to search for the target of component action. The disease target was retrieved from Genecards database and OMIM database with the keyword "neuropathic pain". The common target was obtained by interscreening the component target and neuropathic pain target. The common targets were imported into the STRING database for retrieval to obtain protein interaction (PPI) network, and then imported into Cytoscape 3.7.2 for drawing. The top 10 targets were selected as key targets according to the degree value. Common targets were analyzed using the ClusterProfiler package for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment. **Results** A total of 11 potential active ingredients were identified, namely vanillic acid, danshensu, caffeic acid, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, ferulic acid, rosmarinic acid, shikonic acid, salvianolic acid B, isotope salvianolic acid B and salvianolic acid E, the network pharmacology analysis showed that there were 174 targets, and 67 intersected with the target set of neuropathic pain. Protein interaction network analysis showed that STAT3, ALB, JUN, APP, MMP9, CASP3, TLR4, MAPK1, PTGS2, RELA as core targets. The network topology analysis of "medicine components-target" showed that there may be synergistic effects of *S. miltiorrhiza* components. GO enrichment analysis showed that it was related to biological processes such as bicarbonate transport, response to lipopolysaccharide, and response to molecule of bacterial origin, membrane rafts, etc. raft, membrane microdomain, membrane region, secretory granule lumen and other cell composition and carbonate dehydratase activity, hydrolase activity, carbon-oxygen lyase activity and other molecular functions. KEGG enrichment shows that it was related to nitrogen metabolism, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, lipid and atherosclerosis HIF-1 signaling pathway and other pathways. Combined with literature analysis, its onset mechanism was related to inflammation and immune response, neuronal recovery and regeneration, metabolic disorder, virus, pain transmitter conduction, neuronal hypersensitivity, pain threshold, etc. **Conclusion** Eleven antineuropathic pain active ingredients in *S. miltiorrhiza* standard decoction were screened by live cell solid phase chromatography and high resolution mass spectrometry. Bridging network pharmacology was used to analyze the mechanism of action, which may be related to inflammation and immune response, regulation of metabolic disorders, and inhibition of hypersensitivity.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; standard decoction; neuropathic pain; live cell immobilized chromatography; network pharmacology; inflammation and immune response; neuron recovery and regeneration; metabolic disorder; vanillic acid; danshensu; caffeic acid; protocatechuic acid; protocatechuic aldehyde; ferulic acid; rosmarinic acid; shikonic acid; salvianolic acid B; isotope salvianolic acid B; salvianolic acid E

神经病理性疼痛是由神经系统(包括神经、脊髓和某些中枢神经系统区域)损伤导致的疼痛,为临床常见疼痛疾病^[1],发病原因呈现多样化,可由代谢、感染、创伤、炎症和神经毒性物质等引起的中枢神经或外周神经系统损伤导致^[1]。目前临床针对神经病理性疼痛一线治疗方案为抗惊厥药和三环类抗抑郁药,二线治疗方案为阿片类药物及利多卡因贴剂,而在临床治疗中发现药物治疗效果不佳,且伴随有恶心呕吐等不同程度的副作用以及药物依赖、成瘾性等风险。研究显示,病因多样、机制复杂难以阐明是现有药物疗效差、新药难以有效开发的原因。

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,始载于《神农本草经》,其味苦、性微寒,归心、肝经,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效^[2]。丹参主要化学成分可分为二萜类、三萜类、酚酸类、内酯类、生物碱类等,其中二萜如丹参酮I、丹参酮II_A、异丹参

酮I、异丹参酮II_A等,及酚酸如丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C等为其主要活性成分^[3]。药理学研究显示丹参具有抗氧化、改善微循环、防止血栓等作用。以“丹参”“疼痛”为主题词于中国知网数据库检索实验研究类文献,以Endnote格式导出至Vosviewer 1.6并以关键词共现为依据进行可视化,结果见图1,丹参与冠心病、心绞痛等疾病的相关性较大。丹参在神经系统疾病的应用引起学者关注,并试图将其用于治疗神经源性疼痛。以“丹参”“神经痛”为主题词于知网数据库检索实验研究类文献,以Endnote格式导出至Vosviewer 1.6并以关键词共现为依据进行可视化,结果见图2,丹参与带状疱疹后遗神经痛、坐骨神经痛、三叉神经痛、肋间神经痛、糖尿病源性神经痛等相关性较大。目前鲜有针对丹参治疗神经痛作用机制及药效物质基础的研究报道。本研究基于活细胞固相色谱法联合高分辨质谱及网络药理学分析丹参中镇痛成分及作用机制^[4],以期临床相关治疗提供借鉴。

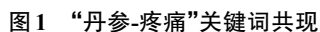


Fig. 1 Co-occurrence of keywords "*S. miltiorrhiza*-pain"

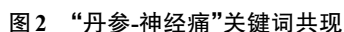


Fig. 2 Co-occurrence of keywords "*S. miltiorrhiza*-neuralgia"

1.1 主要仪器

1.2 细胞及主要试剂

1.3 数据库

2 方法

丹参标准汤剂制备方法参考《中药标准汤剂》：取丹参饮片 100 g，加 8 倍水，充分润湿并放置浸泡 30 min，加热煮沸后回流提取 30 min，趁热滤过，滤渣再加入 6 倍水回流提取 20 min，滤过，合并 2 次滤液，浓缩至 500 mL 即得。

2.2 色谱条件

2.3 质谱条件

离子源:可加热式电喷雾离子源(HESI);检测方式:正、负离子模式;喷雾电压+3 500/-3 800 V;辅助气温度300℃;毛细管温度350℃;鞘气流量

量 55 arb;辅助气体流量 15 arb。一级质谱采用全扫描,范围 m/z 100~1 200,质量分辨率为 70 000,二级质谱采用动态数据依赖性扫描。

2.4 细胞培养

小鼠背根神经元细胞培养在高糖 DMEM 培养基中(12%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 μg·mL⁻¹链霉素),在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,隔天换液。待细胞融合度达 90%时,细胞传代,先倒尽瓶中的培养基,加入适量的 0.25%胰蛋白酶消化后轻轻吹打,吹散成单细胞悬液,取对数生长期的细胞用于后续实验,按 1:2 比例传代培养。

2.5 小鼠背根神经细胞色谱筛选

2.5.1 亲和成分吸附 待细胞长满 T-75 培养皿后弃去培养基并用 PBS 冲洗 2 次,每次 5 mL,取 10 mL 丹参标准汤剂 PBS 溶液加入细胞培养皿中,空白组加入同体积的 PBS(后续操作与实验组同步),并于 37℃ 培养箱中孵育 1 h,使丹参标准汤剂 PBS 溶液充分与小鼠背根神经细胞孵育结合。

2.5.2 非结合成分的洗脱 弃丹参标准汤剂 PBS 溶液,并用 PBS 将细胞吹打下来收集离心,弃去洗脱液,用 PBS 重复清洗 5 次,每次 3 mL。

2.5.3 细胞亲和成分的解离 向小鼠背根神经细胞中加入 80%的乙腈溶液,超声解离,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液氮气吹干后用 80%乙腈溶液复溶至 150 μL。

2.5.4 解离液分析 细胞解离液按“2.2”“2.3”项色谱、质谱方法分析,确认与背根神经细胞有亲和吸附作用的丹参成分。

2.6 网络药理学研究

2.6.1 靶点收集和网络构建 基于质谱鉴定所得亲和吸附成分,采用 TCMSP 数据库检索联合 Swiss

数据库预测寻找对应药物作用靶点。以“neuropathic pain”为关键词在 Genecards 数据库及 OMIM 数据库检索去重即得疾病靶点,将丹参作用靶点与神经病理性疼痛的靶点交集筛选得到中药-疾病的共同靶点,绘制韦恩图。

2.6.2 蛋白质相互作用(PPI)及拓扑网络分析 将筛选所得交集靶点导入 STRING 数据库,设置物种为“Homo sapiens”进行检索,分析靶点蛋白之间的相互作用,设置置信度为“high confidence>0.7”,删除游离节点,得 PPI 网络,连线越密集,说明作用越大,同时保存为 TSV 格式文件并导入 Cytoscape 3.7.2 绘图,以度值(degree)为标准选取前 10 靶点作为关键靶点。整合药材-化合物、化合物-靶点信息,得到“丹参-化合物-靶点”关联网络图,分析成分与交集靶点间作用强弱。

2.6.3 基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析 将筛选的潜在靶点采用 ClusterProfiler 包进行 GO、KEGG 富集分析,采用 enrichplot、ggplot2 包对富集结果进行可视化,从细胞组分(CC)、分子功能(MF)、生物过程(BP)分析丹参标准汤剂抗神经病理性疼痛作用机制。

3 结果

3.1 丹参标准汤剂与小鼠背根神经元细胞结合成分分析

正、负离子模式下的质谱总离子流图见图 3。通过正、负离子质谱信息和离子丰度等方法确定色谱峰的准分子离子峰,进而利用 Xcalibur 3.0 Foundation 数据分析软件,根据精确相对分子质量及同位素分布情况得到分子式(误差值均小于 5×10^{-6}),结合文献检索及各中药化学成分数据库进行搜索匹配,初步鉴定化合物(表 1)。

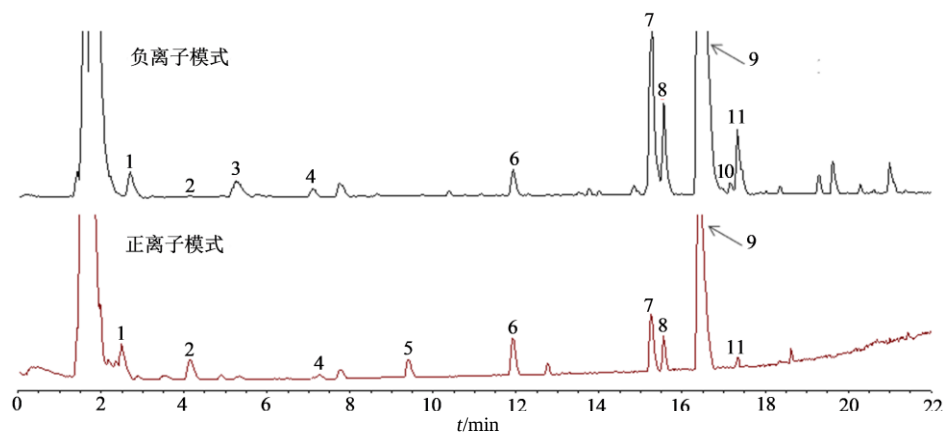


图3 细胞吸附丹参活性成分正、负总离子流图

Fig. 3 Positive and negative total ion currents of active components of *S. miltiorrhiza* absorbed by cells

表1 丹参标准汤剂与小鼠背根神经元细胞结合成分鉴定

Table 1 Identification of active components of *S. miltiorrhiza* standard decoction anti-neuropathic pain

峰号	成分	t_R/min	预测 m/z	实测 m/z	离子类型	分子式	误差/ ($\times 10^{-6}$)
1	香草酸	2.70	168.153 0	167.149 5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	0.1
2	丹参素	4.13	198.052 8	197.044 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	0.1
3	咖啡酸	5.24	180.040 0	179.033 8	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	-1.9
4	原儿茶酸	7.11	154.123 0	133.121 7	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	-0.1
5	原儿茶醛	9.41	138.123 0	137.119 3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	-2.2
6	阿魏酸	11.93	194.060 0	193.049 5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	-0.3
7	迷迭香酸	15.23	360.085 0	383.072 5	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	-3.4
8	紫草酸	15.57	538.111 0	537.102 5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	-0.4
9	丹酚酸B	16.45	718.153 0	717.144 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	-0.5
10	异丹酚酸B	17.19	718.153 0	717.145 0	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	0.1
11	丹酚酸E	17.33	718.153 0	717.144 7	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	-0.4

3.2 网络药理学研究

3.2.1 作用靶点预测 基于TCMSP数据库检索及SwissTargetPrediction预测,11个活性成分作用于靶点385个,去重后为174个,表明不同化合物可作用于同一靶点发挥作用。Genecards及OMIM数据库下载整理得神经病理性疼痛靶点1507个。活性成分作用靶点与神经病理性疼痛靶点交集显示共有靶点67个,为丹参潜在的干预神经病理性疼痛靶点。韦恩图见图4。

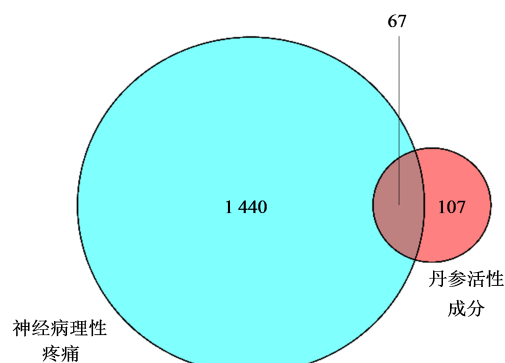
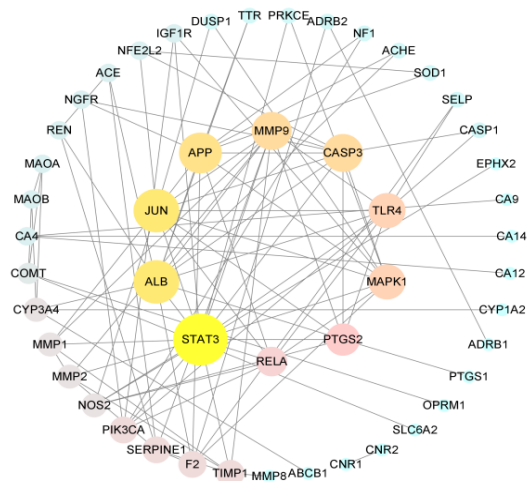


图4 丹参活性成分靶点与神经病理性疼痛靶点韦恩图

Fig. 4 Venny diagram of active ingredient from *S. miltiorrhiza* targets and neuropathic pain targets

3.2.2 PPI分析 将交集靶点导入STRING数据中分析靶点蛋白之间相互作用关系,物种为“Homo sapiens”进行检索,最低互作得分设置为“high confidence(0.7)”,隐藏网络中散点。分析显示共有节点数67个,边103条,平均节点度为3.07,PPI富集 $P < 1.0 \times 10^{-16}$ 。结果导入Cytoscape中进行可视化及分析核心作用靶点,结果见图5。信号转导及转录激活蛋白3(STAT3)、白蛋白(ALB)、原癌基因c-



图形大小代表degree值大小

Size of graphics represent degree of value

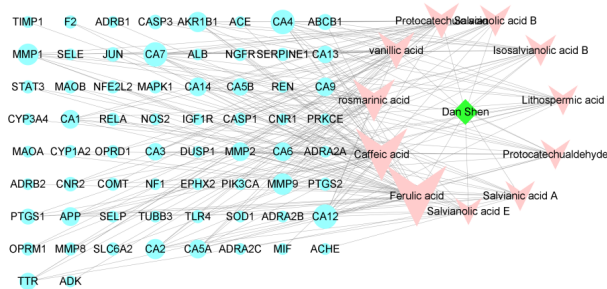
图5 交集靶点PPI网络

Fig. 5 PPI network diagram of intersection target

Jun(JUN)、淀粉样 β 前体蛋白(APP)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、胱天蛋白酶3(CASP3)、Toll样受体4(TLR4)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、环加氧酶2(PTGS2)、转录因子p65(RELA)为关键靶点(前10)。

3.2.3 丹参-活性成分-靶点拓扑网络分析 采用Cytoscape构建“丹参-活性成分-靶点”网络,节点为靶标或化合物,连线表示成分与靶标之间互作关系,结果见图6。丹参通过“多成分、多靶点”干预神经病理性疼痛,活细胞固相色谱所得成分均与神经病理性疼痛靶点相关联。

3.2.4 生物功能GO分析 采用“ClusterProfiler”软件包对交集靶点进行GO功能分析,选取BP/CC/MF



图形大小代表degree值大小

Size of graphics represent degree of value

图6 丹参-活性成分-靶点

Fig. 6 *S. multiorrhiza*-active ingredient-target

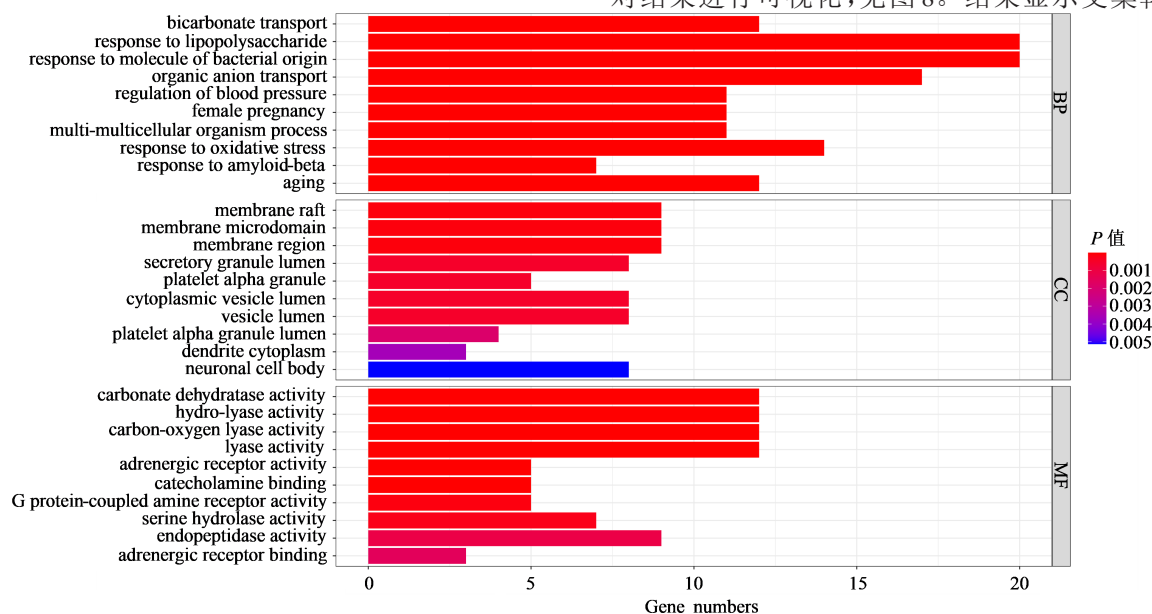


图7 GO富集分析

Fig. 7 GO enrichment analysis

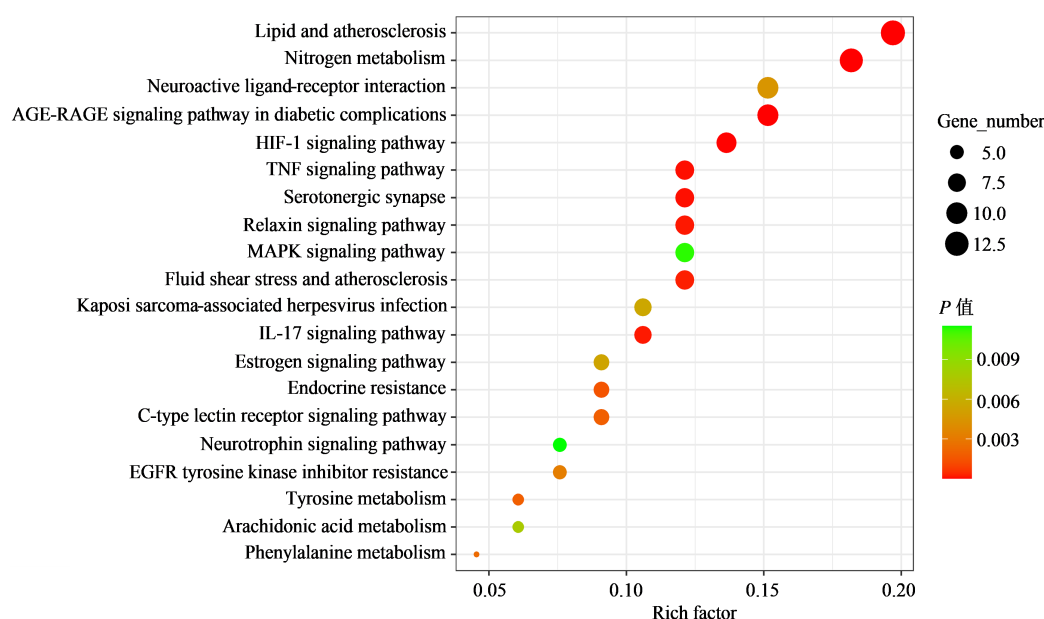


图8 KEGG富集分析

Fig. 8 KEGG enrichment analysis

前10条GO term绘制条形图(图7)。GO功能富集显示包括碳酸氢盐转运、对脂多糖反应、对细菌来源分析反应、有机阴离子转运、血压调节、对氧化应激的反应、对淀粉样蛋白反应等BP,膜筏、膜微区、膜区、分泌颗粒管腔等CC,以及碳酸脱水酶活性、水解酶活性、碳氧裂解酶活性、裂解酶活性、肾上腺素受体活性、儿茶酚胺结合、G蛋白偶联受体活性等MF。

3.2.5 KEGG富集分析 采用“ClusterProfiler”软件包对交集靶点进行KEGG富集分析,采用ggplot2包对结果进行可视化,见图8。结果显示交集靶点富

集于氮代谢、糖尿病并发症中的晚期糖基化产物(AGE)-晚期糖基化终末产物受体(RAGE)信号通路、脂质和动脉粥样硬化、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、5-羟色胺能突触、酪氨酸代谢、神经营养因子信号通路等通路,推测丹参活性成分可能通过调节糖脂及氨基酸代谢、控制炎症及免疫反应、调节细胞氧敏性、降低病毒及代谢废物毒性、调节递质转运及受体配体结合等生理过程干预神经病理性疼痛发生及进展。

4 讨论

神经病理性疼痛于1994年被国际疼痛研究学会(IASP)定义为“疼痛开始于或起源于外周或中枢神经系统的损伤或功能不良”,2001年将其简化为“损伤或疾病侵袭到中枢神经系统或躯体感觉系统所导致的疼痛”^[8]。物理、化学损伤到代谢性复合性神经病变均可能为诱因,常见病因包括糖尿病、带状疱疹、脊髓损伤、脑卒中、多发性硬化、癌症、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染,腰或颈神经根性神经病变和创伤或术后神经损害等^[9]。

本研究采用小鼠背根神经细胞固相色谱法筛选丹参标准汤剂中抗神经病理性疼痛的活性成分,并通过UPLC-Q-Orbitrap HRMS对筛选出的成分进行初步鉴定,结合文献及碎片信息初步确认香草酸、丹参素、咖啡酸、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、异丹酚酸B、丹酚酸E可能为其潜在发挥抗神经病理性疼痛的物质基础。香草酸为酚酸类化合物,有抗氧化、抗炎、抗菌、抗凋亡等作用,近期研究显示其有抗病毒、神经保护作用^[10]。丹参素^[11-14]可通过调节被根神经节炎症细胞因子表达改善糖尿病引起的神经痛,改善脑微血管循环障碍减轻血管性痴呆引起的神经损伤,保护缺氧-缺糖损伤的神经细胞及其线粒体功能。咖啡酸有抗炎、抗菌、抗病毒、升高白细胞及血小板等多种药理作用^[15],研究显示其可减轻小鼠坐骨神经慢性收缩后的神经性疼痛并改善功能恢复^[16],其衍生物咖啡酸苯乙酯通过p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核因子 κ B(NF- κ B)通路抑制小胶质细胞活化缓解神经病理性疼痛^[17]。原儿茶酸可通过抗氧化、促进神经干细胞体外增殖及诱导分化等发挥神经保护作用^[18-19]。原儿茶醛通过保护血脑屏障(BBB)、抗血小板聚集和抗神经炎症等发挥神经元保护作用,维持脑神经血管单元稳态^[20]。阿魏酸通过抑制海马、额叶和脊髓的单胺氧化酶A活性,增加海马、额叶和脊髓内5-羟色胺和去甲肾上腺素

水平,改善坐骨神经慢性压迫模型导致的神经病理性疼痛^[21-22]。迷迭香酸通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎性小体的活化、抑制活性氧(ROS)释放、阻止caspase-3异常激活等发挥保护多巴胺能神经元、促进海马区神经元再生、减少凋亡等作用,减少控制性皮层撞击损伤导致的神经元损伤^[23-24],其衍生物迷迭香酸甲酯也有相关报道^[25]。紫草酸通过抗炎及预防淀粉样 β 蛋白纤维化引起的神经毒性实现神经元保护作用^[26]。丹酚酸B抗氧化活性强,清除羟自由基并抑制 β -淀粉样蛋白的原纤维成形和聚集,减少A β 引起的细胞凋亡、抑制tau蛋白的过度磷酸化,调节脂质代谢,促进神经干细胞增殖分化,促进神经营养因子释放,保护和促进神经元再生^[27-30]。异丹酚酸B及丹酚酸E缺少相关报道,有待进一步研究。综上,活细胞固相色谱所得活性成分通过抗氧化、抗炎、保护和促进神经元再生等作用机制减少各种原因导致的神经损伤,进而干预神经病理性疼痛。

通过作用靶点富集分析显示,筛选出的活性化合物通过多条通路发挥作用。作用于氮代谢、脂质与动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路等可减少因糖脂代谢紊乱、代谢废物导致的神经损伤,如糖尿病周围神经病变导致的神经病理性疼痛^[31]。通过作用于肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素(IL)-17信号通路等,调节炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-17等表达,促进神经细胞的循环和代谢,抑制炎症及感觉神经损伤后神经病理性疼痛递质传导,抑制痛觉过敏和痛觉超敏形成^[32-34]。作用于酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、5-羟色胺等通路,氨基酸类神经递质在中枢神经系中与疼痛密切相关,调节氨基酸类神经递质的生成和转运避免中枢敏化,减少由苯丙氨酸代谢不良导致的脑损害、神经损伤^[35-36]。作用于HIF-1信号通路、MAPK信号通路、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药等通路,抑制促炎因子、疼痛介质分泌并增加抗炎因子分泌进而抑制神经源性炎症从而减缓疼痛,保护及修复神经元,调控神经细胞分化及再生^[37-40]。作用于神经营养因子信号通路,参与调节神经系统中神经元的发育、分化、再生、功能特性、突触定向生长以及可塑性方面的表达过程^[41]。作用于花生四烯酸代谢信号通路,调节前列腺素(致痛物质,可降低痛阈)尤其是脊髓部位的合成,改变神经病理性疼痛后中枢可塑性和敏感性^[42]。作用于卡波西肉瘤相关癌

疹病毒感染通路,抑制病毒活化和促细胞溶解的基因表达、病毒在感觉神经节内的扩散和在邻近细胞的复制过程,减少组织损伤(局部出血、脱髓鞘、轴突变性、感觉神经纤维和支持细胞的坏死等),避免外周和中枢痛相关神经元超敏化,从而缓解疼痛^[43]。

本研究基于小鼠背根神经元细胞固相色谱法筛选丹参标准汤剂中活性成分,分析丹参中潜在抗神经病理痛活性成分,共鉴定出11个结合的潜在活性成分,网络药理学技术分析其起效机制与炎症和免疫反应、调节代谢紊乱、抑制超敏等相关。但本研究存在一定局限性,如仅对丹参的水提部位进行垂钓、未进一步实验验证各成分活性及作用机制等。研究为丹参在神经病理性疼痛治疗方面提供参考,也可为中药药效物质及机制研究提供合理的方法学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 叶永贤,林洪,沙漠,等.神经病理性疼痛相关分子机制的研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2014,20(3): 177-180.
Ye Y X, Lin H, Sha M, et al. Research progress on molecular mechanisms related to neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2014, 20(3): 177-180.
- [2] 中国药典[S].一部.2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [3] 董凤彩.丹参成分及其药理作用[J].中国药物经济学, 2015, 10(3): 99-100.
Dong F C. Composition and pharmacological action of *Salvia miltiorrhizas* bge [J]. China J Pharm Econ, 2015, 10(3): 99-100.
- [4] 汤丹,肖伟,钱正明,等.活细胞固相色谱法联合高分辨质谱快速筛选龙血竭中镇痛活性成分[J].中草药, 2019, 50(11): 2539-2544.
Tang D, Xiao W, Qian Z M, et al. Rapid screening of potential analgesic ingredients from *Draconis Resina* by live cell immobilized chromatography coupled with HPLC-DAD-TOF-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(11): 2539-2544.
- [5] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.
- [6] Yu G C, Wang L G, Yan G R, et al. DOSE: An R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis [J]. Bioinformatics, 2015, 31(4): 608-609.
- [7] 董青,於化桃,代云桃,等.以标准汤剂为基准建立丹参的质量评价方法[J].中国中药杂志, 2017, 42(5): 817-822.
Dong Q, Yu H T, Dai Y T, et al. Establish quality evaluation method based on standard decoction of Danshen extract [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(5): 817-822.
- [8] 邢国刚,韩济生.神经病理性痛的新定义[J].中国疼痛医学杂志, 2011, 17(10): 595-596.
Xing G G, Han J S. A new definition of neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2011, 17(10): 595-596.
- [9] 郭云观,李君,冯艺.神经病理性疼痛的蛋白质组学研究进展[J].中国疼痛医学杂志, 2022, 28(6): 404-410.
Guo Y G, Li J, Feng Y. Advances in proteomics of neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(6): 404-410.
- [10] 王琳,杨微,姚强,等.香草酸对朊病毒感染细胞PrP^{Sc}沉积抑制和细胞保护作用研究[J].病毒学报, 2022, 38(4): 896-904.
Wang L, Yang W, Yao Q, et al. Inhibitory effect on PrP^{Sc} deposition and cell protection of vanillic acid in prion-infected cells [J]. Chin J Virol, 2022, 38(4): 896-904.
- [11] 吴秀芝.丹参素药理作用及成分含量分析[J].中医药导报, 2014, 20(7): 99-101.
Wu X Z. Pharmacological action and component content analysis of danshensu [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 20(7): 99-101.
- [12] 钱思远.丹参素通过改善脑微循环障碍减轻血管性痴呆小鼠的神经元损伤[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2018.
Qian S Y. Danshensu alleviates neuron damage in vascular dementia mice via improving cerebral microcirculation [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2018.
- [13] 张文生,朱陵群,牛福玲.丹参素对缺糖-缺氧损伤神经细胞的保护作用[J].中草药, 2004, 35(8): 921-924.
Zhang W S, Zhu L Q, Niu F L. Protective effect of danshensu on nerve cells injured by glucose deficiency and hypoxia [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2004, 35(8): 921-924.
- [14] 张文生,朱陵群,张丽慧,等.丹参素对缺氧/缺糖损伤神经细胞线粒体的保护作用[J].北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 53-56.
Zhang W S, Zhu L Q, Zhang L H, et al. Protective effects of danshensu on the mitochondria in the nerve cells injured by hypoxia/hypoglycemia [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2004, 27(3): 53-56.
- [15] 杨九凌,祝晓玲,李成文,等.咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J].中国药理学杂志, 2013, 48(8): 577-582.

- Yang J L, Zhu X L, Li C W, et al. Research progress on pharmacological effects of caffeic acid and its derivative phenylethyl caffeic acid [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(8): 577-582.
- [16] El Gabbas Z, Bezza K, Laadraoui J, et al. *Salvia officinalis*, rosmarinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1702378.
- [17] Cheng H, Zhang Y, Lu W P, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates neuropathic pain by suppressing the p38/NF- κ B signal pathway in microglia [J]. J Pain Res, 2018, 11: 2709-2719.
- [18] Shui G, Bao Y M, Bo J, et al. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 538(1/2/3): 73-79.
- [19] 关水, 刘天庆, 葛丹, 等. 原儿茶酸对体外培养的神经干/祖细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 448-452.
- Guan S, Liu T Q, Ge D, et al. Studies on the effects of protocatechuic acid on cell proliferation and apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2009, 25(4): 448-452.
- [20] 冯晋, 徐娅玲, 孟庆婷, 等. 原儿茶醛对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经血管单元稳态破坏的保护作用 [J]. 中国药房, 2021, 32(15): 1811-1817.
- Feng J, Xu Y L, Meng Q T, et al. Protective effect of protocatechuic aldehyde on neurovascular unit homeostasis damage in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. China Pharm, 2021, 32(15): 1811-1817.
- [21] Xu Y, Lin D, Yu X F, et al. The antinociceptive effects of ferulic acid on neuropathic pain: Involvement of descending monoaminergic system and opioid receptors [J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20455-20468.
- [22] 俞雪锋, 谢珣珮, 吴凡, 等. 阿魏酸对CCI诱导的小鼠神经病理性疼痛的改善作用及机制 [A]//第十六届全国神经精神药理学学术会议 [C]. 温州: 中国药理学会神经精神药理学专业委员会, 2014.
- Yu X F, Xie X P, Wu F, et al. Effect and mechanism of Ferulic acid on neuropathic pain induced by CCI in mice [A]// The 16th National Conference on Neuropsychopharmacology [C]. Wenzhou: Neuropsychopharmacology Committee of Chinese Pharmacological Society, 2014.
- [23] 罗飞, 张明辉, 陈立珂, 等. 迷迭香酸抑制NLRP3炎性小体的活化对创伤性颅脑损伤大鼠脑组织损伤和海马区神经元凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(7): 568-574.
- Luo F, Zhang M H, Chen L K, et al. Rosmarinic acid inhibits the activation of NLRP3 inflammasomes and alleviates brain tissue injury and hippocampal neuron apoptosis in rats with traumatic craniocerebral injury [J]. Immunol J, 2021, 37(7): 568-574.
- [24] 钟雯雯, 张志毕, 张兰春, 等. 迷迭香酸对MPTP诱导的多巴胺神经元损伤的保护作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(10): 1723-1727.
- Zhong W W, Zhang Z B, Zhang L C, et al. Protective effect of rosmarinic acid on MPTP induced dopaminergic neurons toxicity [J]. Nat Prod Res Dev, 2017, 29(10): 1723-1727.
- [25] 王小洪, 曹桂云, 王晴, 等. 迷迭香酸甲酯对帕金森病小鼠多巴胺神经元损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1156-1159.
- Wang X H, Cao G Y, Wang Q, et al. Protective effect of methyl rosmarinic acid on dopaminergic neuron injury in mice with Parkinson's disease [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(5): 1156-1159.
- [26] 彭宗根, 陈鸿珊. 紫草酸B的药理作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(10): 744-747.
- Peng Z G, Chen H S. Research progress on pharmacological effects of shikimic acid B [J]. Chin Pharm J, 2003, 38(10): 744-747.
- [27] 唐民科, 范悦, 刘长锁, 等. 丹酚酸B神经保护作用的机制与研究进展 [J]. 神经药理学报, 2014, 4(1): 1-10.
- Tang M K, Fan Y, Liu C S, et al. The mechanisms and research progress of neuroprotective effects of salvianolic acid B [J]. Acta Neuropharmacol, 2014, 4(1): 1-10.
- [28] 陈永红. 丹酚酸B保护线粒体和抗神经细胞凋亡作用及其作用机制研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2001.
- Chen Y H. Studies on the protective effect of salvianolic acid B on the mitochondrial injury & neuronal apoptosis and its action mechanisms [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2001.
- [29] 张一凡, 丁洁, 杜敏, 等. 丹酚酸B对小鼠动脉粥样硬化病变和巨噬细胞吞噬作用的影响及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2022, 48(3): 561-567.
- Zhang Y F, Ding J, Du M, et al. Effects of salvianolic acid B on atherosclerosis and efferocytosis of macrophages of mice and their mechanisms [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2022, 48(3): 561-567.
- [30] 马萌萌, 郭虹, 张晗, 等. 丹酚酸B对脑损伤神经细胞的保护作用 [J]. 天津中医药大学学报, 2015, 34(1): 55-58.
- Ma M M, Guo H, Zhang H, et al. Protective effect of Salvianolic acid B on nerve cells after cerebral injury [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2015, 34(1): 55-58.
- [31] 张雪利. MGO/NF- κ B/炎症信号通路在糖尿病痛性神经

- 病变中的作用 [D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- Zhang X L. The role of MGO/NF- κ B/inflammatory signaling pathways in painful diabetic neuropathy [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015.
- [32] 南兴东, 冯艺, 张利萍. TNF- α 在坐骨神经冷冻致神经病理性疼痛模型大鼠脊髓的表达 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18(1): 38-41, 45.
- Nan X D, Feng Y, Zhang L P. Expression of tumor necrosis factor- α in spinal cord in sciatic cryoneurolysis rats [J]. Chin J Pain Med, 2012, 18(1): 38-41, 45.
- [33] 钟敏, 曾因明, 柳垂亮, 等. 脊髓 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 在神经病理性疼痛过程中的表达变化 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2010, 16(1): 42-44.
- Zhong M, Zeng Y M, Liu C L, et al. Expression changes of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in spinal cord during neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2010, 16(1): 42-44.
- [34] 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3709-3712.
- Li Q Y, Xu H Y, Yang H J. Effect of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on neuropathic pain [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(19): 3709-3712.
- [35] 张美玉, 焦玥, 刘洋, 等. 川芎嗪对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用及对脑中枢敏化区氨基酸类神经递质含量的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(12): 921-929.
- Zhang M Y, Jiao Y, Liu Y, et al. Effect of ligustrazine on analgesic effect and amino acid transmitters in central sensitizations of brain regions in neuropathic pain model rats [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2018, 32(12): 921-929.
- [36] 张拥军, 张惠文, 顾学范, 等. 苯丙氨酸对神经元 rac1, cdc42 和 RhoA 表达及活性的影响 [A]// 中华医学会第十四次全国儿科学术会议论文汇编 [C]. 南宁: 中华医学会, 2006.
- Zhang Y J, Zhang H W, Gu X F, et al. Effects of phenylalanine on expression and activity of rac1, cdc42 and RhoA in neurons [A]// Proceedings of the 14th National Pediatric Academic Conference of Chinese Medical Association [C]. Nanning: Chinese Medical Association, 2006.
- [37] 苏洲, 田小军, 王玉梅, 等. 依达拉奉对急性缺血性脑卒中患者丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路蛋白表达的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(12): 1372-1375.
- Su Z, Tian X J, Wang Y M, et al. Effects of Edaravone on protein expression of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway in elderly patients with acute ischemic stroke [J]. Chin J Geriatr, 2018, 37(12): 1372-1375.
- [38] 张瑞, 夏志明, 孙小余, 等. ERK/CREB 信号通路在异菰皂苷元促进 A β 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 表达中的作用 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2016, 36(5): 642-647.
- Zhang R, Xia Z M, Sun X Y, et al. Role of ERK/CREB signal pathway in promotion of BDNF expression in A β intoxicated SH-SY5Y cells by smilagenin [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2016, 36(5): 642-647.
- [39] 刘志军, 彭从斌. siRNA-P300 鞘内注射对神经病理性疼痛大鼠模型 HIF-1 α /VEGF 和 ERK 通路的影响 [J]. 中国现代医生, 2019, 57(20): 37-42, 47.
- Liu Z J, Peng C B. Effect of intrathecal injection of siRNA-P300 on HIF-1 α /VEGF and ERK pathways in the rat model of neuropathic pain [J]. China Mod Dr, 2019, 57(20): 37-42, 47.
- [40] 吕翠岩, 张胜容, 赵文景, 等. 糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经 VEGF 和 HIF-1 α 调控机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 312-314.
- Lyu C Y, Zhang S R, Zhao W J, et al. Regulatory mechanism of tangbikang for diabetic rats sciatic nerve's VEGF and HIF-1 α [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(2): 312-314.
- [41] 于玲莉. 窖蛋白对神经营养因子信号通路的调控研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
- Yu L L. Modulation of NGF signaling by caveolin-1 and caveolin-2 [D]. Shanghai: East China Normal University, 2013.
- [42] 路志红, 梅其炳. 环氧合酶在神经病理性疼痛中作用的研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(5): 274-278.
- Lu Z H, Mei Q B. Research progress on the role of cyclooxygenase in neuropathic pain [J]. Foreign Med Sci Sect Pharm, 2004, 31(5): 274-278.
- [43] 赵志奇. 带状疱疹疼痛: 基础和临床概述 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(6): 369-375.
- Zhao Z Q. Herpes zoster pain: Basic and clinical overview [J]. Chin J Pain Med, 2014, 20(6): 369-375.

[责任编辑 兰新新]