

【实验研究】

基于斑马鱼模型及网络药理学的晕痛定胶囊镇痛活性及作用机制探讨

陈 祺¹, 陈林珍¹, 陈美琳¹, 王亚峰^{2, 4}, 张 雪¹, 于 雪², 戴胜云³, 马志强^{1*}, 赵崇军^{1*}

1. 北京中医药大学 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102488

2. 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629

4. 世界中医药学会联合会, 北京 100101

摘要: **目的** 基于斑马鱼模型探究晕痛定胶囊的镇痛活性, 采用网络药理学方法预测晕痛定胶囊的镇痛作用机制。方法采用佛波酯构建斑马鱼疼痛模型, 以阿司匹林为阳性对照, 利用行为轨迹分析系统监测斑马鱼的运动轨迹, 以运动次数、运动时间、运动距离、运动速度等运动状态为指标评价晕痛定胶囊及其组方药材的镇痛活性; 同时运用网络药理学及分子对接技术预测晕痛定胶囊镇痛核心成分及潜在靶点; 选取网络药理学预测的核心成分法卡林二醇和金色酰胺醇酯为实验药物, 利用斑马鱼疼痛模型验证镇痛活性。**结果** 斑马鱼疼痛模型镇痛活性评价实验中, 晕痛定胶囊及其组方药材川芎、蜜环菌均能显著降低模型斑马鱼的快速运动和慢速运动 ($P < 0.01$), 且晕痛定胶囊作用强于川芎和蜜环菌。网络药理学筛选得到晕痛定胶囊镇痛活性成分87个及其作用靶点159个, 利用蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析得到法卡林二醇和金色酰胺醇酯等核心成分和MAPK1等核心靶点, 分子对接结果显示核心成分及核心靶点间具有较好的结合活性。法卡林二醇和金色酰胺醇酯镇痛活性实验结果表明单独给药法卡林二醇和金色酰胺醇酯可以达到良好的镇痛效果, 与网络药理学预测的核心成分结果相符。**结论** 晕痛定胶囊能够缓解暴露于佛波酯中斑马鱼的疼痛状态, 具有较明显的镇痛作用; 预测其作用机制可能与减少神经损伤及其炎症反应和促进细胞凋亡等过程有关; 且法卡林二醇和金色酰胺醇酯为其发挥镇痛作用的核心成分。

关键词: 晕痛定胶囊; 镇痛活性; 斑马鱼; 网络药理学; 分子对接; 法卡林二醇; 金色酰胺醇酯**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 02-0261-16**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.02.006

Analgesic activity and mechanism of Yuntongding Capsule based on zebrafish model and network pharmacology

CHEN Qi¹, CHEN Linzhen¹, CHEN Meilin¹, WANG Yafeng^{2, 4}, ZHANG Xue¹, YU Xue², DAI Shengyun³, MA Zhiqiang¹, ZHAO Chongjun¹

1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Evaluation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

4. World Federation of Chinese Medicine Societies, Beijing 100101, China

Abstract: **Objective** To explore the analgesic activity of Yuntongding Capsules (YTD) based on zebrafish model and analgesic mechanism of Yuntongding Capsules by network pharmacology. **Methods** Phorbol myristate acetate (PMA) was used to establish a zebrafish pain model, and aspirin was used as positive control. The movement trajectory of zebrafish was monitored with the behavior trajectory analysis system and the analgesic activity of YTD was evaluated by the movement states such as movement frequency,

收稿日期: 2023-08-14**基金项目:** 北京中医药大学新教师启动基金资助项目 (2020-JYB-XJSJJ-009)**第一作者:** 陈 祺, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: chen_qi0823@163.com***共同通信作者:** 马志强, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: mazq1968@sina.com

赵崇军, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。E-mail: 1014256537@qq.com

movement time, movement distance and movement speed. Network pharmacology and molecular docking techniques were used to predict the core components and potential analgesic mechanism of YTD. Selecting network pharmacology prediction components of faltarindiol (Fal) and aurantiamide acetate (Aur) as the experimental drugs to verify the network pharmacology prediction results.

Results By comparing the exercise intensity and trajectory of zebrafish in the model group and each administration groups, YTD has better analgesic activity, and it is better than the analgesic effect of *Ligusticum* or *Armillaria mellea* alone. 87 active components and 159 action targets of YTD analgesia were screened by network pharmacology. Core components such as Aur and core targets such as MAPK1 were obtained by protein-protein interaction network analysis and molecular docking was performed, showing that the core component targets had good binding activity. Data from the Fal and Aur groups suggest that favorable analgesia can be achieved by administering Fal or Aur alone. This is consistent with the results of network pharmacology. **Conclusion** YTD can alleviate the pain of zebrafish exposed to PMA and has obvious analgesic effect. Predicting its mechanism of action may be related to processes such as reducing nerve damage and inflammatory response, and promoting cell apoptosis. At the same time, Fal and Aur are the core components that exert analgesic effects, providing a foundation for the research and development of new analgesic drugs in the future.

Key words: Yuntongding Capsule; analgesia activity; zebrafish; network pharmacology; molecular docking; faltarindiol; aurantiamide acetate

晕痛定胶囊是由蜜环菌粉和川芎组成的中药复方制剂,具有镇静、止痛的功效,临床上常用于治疗偏头痛、神经症(神经官能症)引起的头痛,对于高血压、脑血管疾病引起的头痛、眩晕也有一定的治疗作用^[1]。目前采用动物模型对晕痛定胶囊镇痛活性进行评价的研究还未见报道。斑马鱼具有个体小、通体透明的优点,且体外发育繁殖能力强,药物暴露能够引起斑马鱼出现与哺乳动物类似的生理或病理反应^[2-3],且目前已有相关研究利用斑马鱼为模型来评价药物的抗炎镇痛活性^[4-5]。故本研究利用斑马鱼模型来评价晕痛定胶囊在体内的镇痛活性,同时结合网络药理学及分子对接技术预测晕痛定胶囊镇痛作用的核心成分和机制,为晕痛定胶囊的深入研究与应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

AB系野生型斑马鱼,购于中国科学院水生生物研究所,饲养于本实验室集中式斑马鱼养殖系统。养殖条件:水温(28 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, pH值7.0~7.4,保持14 h光照/10 h黑暗的光照周期,每日喂食3次活体丰年虾。排卵前日的斑马鱼成鱼以1:2的雌雄比放入产卵缸内,中间插入隔板分开雌雄以保证排孵时间一致,并于次日光周期前抽取隔板,光周期开始0.5 h后收集鱼卵,将其用培养水冲洗3遍放入新培养水中,于28.5 $^{\circ}\text{C}$ 相同光照条件下发育至第4天(4 dpf)。

1.2 药物及试剂

川芎干膏粉(批号210301)、晕痛定胶囊(批号210314)和蜜环菌粉(批号210315)由河南龙都药业

有限公司提供;法卡林二醇(批号200609)、金色酰胺醇酯(批号210514)、佛波酯(批号200918)由成都植标化纯生物技术有限公司提供;甲基纤维素(批号A15GS145385)由上海源叶生物科技有限公司提供;阿司匹林(批号CHB160302)由克洛玛生物科技有限公司提供。

1.3 仪器

ESEN-AW-SI斑马鱼养殖系统(北京爱生生物科技有限公司);LRH-250Z恒温生化培养箱(广州瑞明仪器有限公司);ZebraBox斑马鱼行为轨迹分析系统(ViewPoint众维公司);SCIENTZ-10ND冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼模型镇痛活性评价

2.1.1 “量-毒”曲线的建立 使用胚胎用水配制不同质量浓度的晕痛定胶囊、川芎和蜜环菌溶液。选取4 dpf的斑马鱼幼鱼于12孔板中,每孔20尾,使其暴露于各药物溶液中。设置胚胎用水为空白对照组,暴露过程于28.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中进行,每24小时移除死亡斑马鱼并更换药物,培养至72 h,统计各组斑马鱼存活率,绘制“量-毒”曲线,并确定最大非致死浓度(LC_0)。

2.1.2 镇痛活性评价 选取4 dpf的斑马鱼幼鱼于12孔板中,每孔20尾,根据各药物的 LC_0 设置低(L)、中(M)和高(H)浓度组,同时设置对照组(胚胎用水)、模型组和阳性对照组(阿司匹林),其中阳性对照组给药11.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿司匹林。给药3 d后,观察各组斑马鱼的状态,确保每组斑马鱼均存活。而后随机选取斑马鱼幼鱼于24孔板中,每孔1

只幼鱼,20尾斑马鱼为1组。除对照组外,各组斑马鱼适应性培养30 min后以 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 佛波酯构建疼痛模型,将各组的斑马鱼转移到含有 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 佛波酯的24孔板中(每孔1只幼鱼),利用斑马鱼行为轨迹系统监测斑马鱼10 min内的行为轨迹,以快速运动次数、快速运动距离、快速运动时间、慢速运动次数、慢速运动距离、慢速运动时间、快速运动速度、慢速运动速度和平均运动速度为指标定量评价晕痛定胶囊及各组方药物的镇痛作用,实验重复3次。

2.2 网络药理学分析和分子对接验证

2.2.1 晕痛定胶囊活性成分的收集 晕痛定胶囊是由蜜环菌粉、川芎组成的中成药,依托中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)及文献报道,以“川芎”和“蜜环菌”为检索词,检索晕痛定胶囊含有的化合物分子。TCMSP平台中检索到的化合物分子以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 为条件进行进一步筛选。其余化合物分子在PubChem数据库查找导出活性成分的二维化学结构数据,通过SwissADME平台预测化合物的药动学参数,以肠胃吸收(GI absorption)为“High”且类药性预测(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)结果中有2个及2个以上“Yes”作为筛选标准。整合筛选得到的化合物作为晕痛定胶囊活性成分数据库。

2.2.2 晕痛定胶囊活性成分靶点的预测 通过PubChem数据库查找导出活性成分的二维化学结构数据,获得活性成分的标准Smiles结构序列号,并将其Smiles结构序列号输入Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中分别进行不同活性成分的靶点基因预测,筛选阈值Probability >0 的所有靶点,得到晕痛定胶囊活性成分的靶点信息。

2.2.3 晕痛定胶囊镇痛靶点的预测 在GeneCards及DISGENET数据库以“pain”和“ache”为关键词进行检索,获得疼痛相关的靶点基因。将疼痛靶点基因与晕痛定胶囊活性成分靶点基因进行比对,取交集作为晕痛定胶囊镇痛的潜在靶点基因,并绘制Venn图表示。

2.2.4 晕痛定胶囊镇痛“活性成分-潜在靶点”网络的构建 整理归纳所得成分靶点及疾病靶点对应信息,利用软件Cytoscape 3.7.2及其“Merge”工具构建“活性成分-潜在靶点”网络,并对网络进行分析。

2.2.5 晕痛定胶囊镇痛潜在靶点基因的蛋白质-蛋

白质相互作用(PPI)网络的构建 将晕痛定胶囊镇痛活性的潜在靶点基因导入String数据库(<https://string-db.org/>)中,在设定物种为人的前提下,导出分值 >0.4 的置信度区间的互作关系数据,在Cytoscape 3.7.2中构建潜在靶点的PPI网络图。

2.2.6 潜在靶点的基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 分析晕痛定胶囊镇痛活性潜在靶点基因的功能及其在信号通路中的作用,从而进一步探讨晕痛定胶囊镇痛活性作用机制。通过来自信息网站Bioconductor(<http://www.bioconductor.org/>)的R语言数据包“ClusterProfile”“ggplot2”及“Pathview”,以GO数据库对靶点基因的生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)进行功能注释,并绘制每项排名前15的数据富集结果;以KEGG数据库对靶点基因主要参与的生化代谢途径进行富集与关联性分析,并绘制富集结果排名前20的通路,设定阈值为 $P<0.05$ 。

以KEGG分析结果中的显著通路数据信息,利用Cytoscape 3.7.2构建晕痛定胶囊镇痛活性的“活性成分-潜在靶点-核心通路”网络图,对该网络进行拓扑学性质分析,筛选聚焦晕痛定胶囊镇痛活性的核心成分及核心靶点。

2.2.7 分子对接 将“2.2.1”中从PubChem数据库下载的待对接成分(“2.2.6”项确定的核心成分)结构sdf格式文件通过软件Chem3D转化为pdb格式文件,采用AutoDock Tools 1.5.6软件设置其可旋转的键及活动键时需要移动的最少的原子数目,输出pdbqt格式文件作为分子对接中的配体。从PDB数据库(<http://www1.rcsb.org/>)下载待对接靶点(“2.2.6”项确定的核心靶点)的3D结构,首先对其结构进行预处理,去除水分子及磷酸根,然后采用AutoDock Tools 1.5.6软件对其进行计算Gasteiger电荷、添加氢原子离配体和受体、融合孤对电子等操作,输出pdbqt格式作为分子对接中的受体。

将受体与配体导入AutoDock Tools 1.5.6中获取相应活性口袋,设置Gridbox坐标及大小,运行Autodock Vina脚本进行分子对接,得到其结合情况评估参数Affinity值,并通过开源软件Pymol对其对接结果进行可视化。

2.3 网络药理学结果实验验证

对网络药理学和分子对接筛选出的关键成分法卡林二醇和金色酰胺醇酯进行镇痛活性实验验证

证。采用“2.1.1”项方法,建立法卡林二醇和金色酰胺醇酯的“量-毒”曲线;并以二者为实验药物,根据“2.1.2”项方法对2个成分的镇痛活性进行考察。

2.4 统计学方法

实验结果采用 GraphPad Prism 8 绘图并进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间显著性差异分析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 晕痛定胶囊及组方药物镇痛活性

3.1.1 “量-毒”曲线 采用 GraphPad Prism 8 软件,

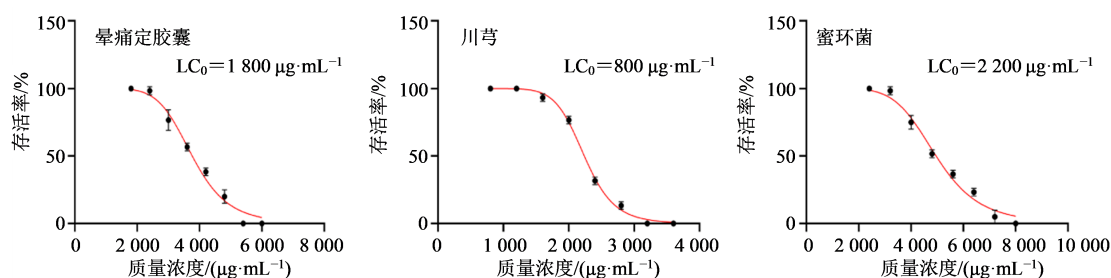


图1 “量-毒”曲线

Fig. 1 “Dose-toxicity” curve

表1 各药物给药质量浓度

Table 1 Dosage concentration of test material

药物	L/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	M/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	H/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
晕痛定胶囊	1 600	2 000	2 400
川芎	800	1 400	2 000
蜜环菌	2 000	2 400	2 800

模型组,晕痛定胶囊-L组斑马鱼快速运动次数、快速运动时间、慢速运动时间显著降低($P < 0.05$),慢速运动距离显著降低($P < 0.01$);晕痛定胶囊-M组斑马鱼快速运动距离、慢速运动次数、慢速运动时间显著降低($P < 0.05$),快速运动次数、快速运动时间、慢速运动距离显著降低($P < 0.01$);晕痛定胶囊-H组斑马鱼快速运动距离、慢速运动时间显著降低($P < 0.05$),快速运动次数、快速运动时间、慢速运动次数、慢速运动距离显著降低($P < 0.01$);表明晕痛定胶囊具有一定的镇痛作用。

川芎-M组斑马鱼快速运动次数显著降低($P < 0.05$);川芎-H组斑马鱼快速运动次数、快速运动时间显著降低($P < 0.05$)。蜜环菌-L组斑马鱼快速运动次数、慢速运动次数显著降低($P < 0.05$);蜜环菌-M组斑马鱼快速运动次数、慢速运动次数、慢速运动距离显著降低($P < 0.05$);蜜环菌-H组斑马鱼慢速运

以质量浓度为横坐标,存活率为纵坐标,绘制各药物作用72 h后斑马鱼的“量-毒”曲线,见图1。经计算得到晕痛定胶囊的 LC_{50} 为 $1\,800\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,川芎的 LC_{50} 为 $800\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,蜜环菌的 LC_{50} 为 $2\,200\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,并据此确定后续实验中的给药质量浓度,见表1。

3.1.2 晕痛定胶囊及组方药材镇痛作用 各组斑马鱼运动指标见图2~4,模型组各运动指标均与对照组有显著差异($P < 0.01$),表示造模成功;与模型组相比,各药物组斑马鱼快速运动速度、慢速运动速度、平均运动速度均显著降低($P < 0.01$),阿司匹林组各运动指标均显著降低($P < 0.01$)。相比于

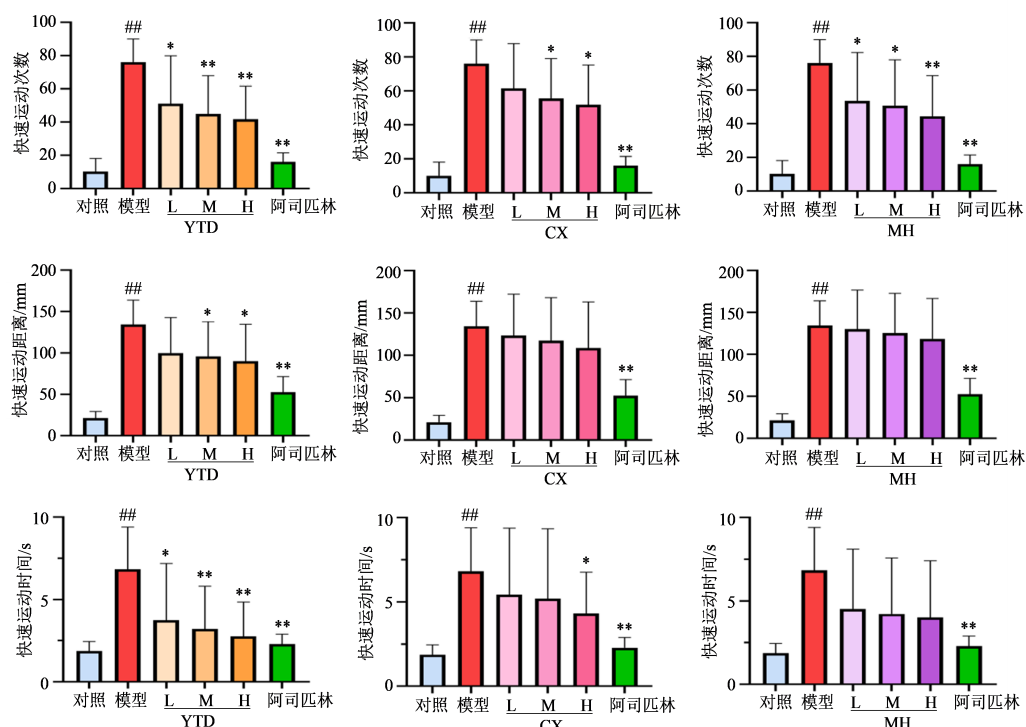
动次数、慢速运动距离、慢速运动时间、快速运动次数均显著降低($P < 0.05$)。对比晕痛定胶囊与川芎和蜜环菌各组数据可知,单独给药的镇痛效果不如药物配伍复方的镇痛效果。

3.2 网络药理学预测晕痛定胶囊镇痛作用机制

3.2.1 晕痛定胶囊活性成分的获取 经过TCMSP以及文献报道的检索,结合SwissADME平台和《中国药典》进行筛选和补充,共获得晕痛定胶囊组方药材川芎活性成分32种(表2)、蜜环菌活性成分55种(表3)。

3.2.2 晕痛定胶囊镇痛潜在靶点的获取 通过Swiss Target Prediction数据库进行筛选,获得川芎活性成分作用靶点2 160个、蜜环菌活性成分作用靶点2 851个。根据Uniport数据库查询靶点信息,将数据库中不包含的靶点和重复的靶点进行删除处理,共获得晕痛定胶囊活性成分靶点970个。通过以“pain”和“ache”为关键词在GeneCards及DISGENET数据库进行检索,获得了疼痛相关靶点511个。活性成分靶点与疼痛相关靶点取交集,并通过R语言绘制韦恩图,得到晕痛定胶囊活性成分-疼痛共同靶点159个,见图5。

3.2.3 晕痛定胶囊“活性成分-镇痛靶点”的网络构建 将87种化合物及159个交集靶点导入软件

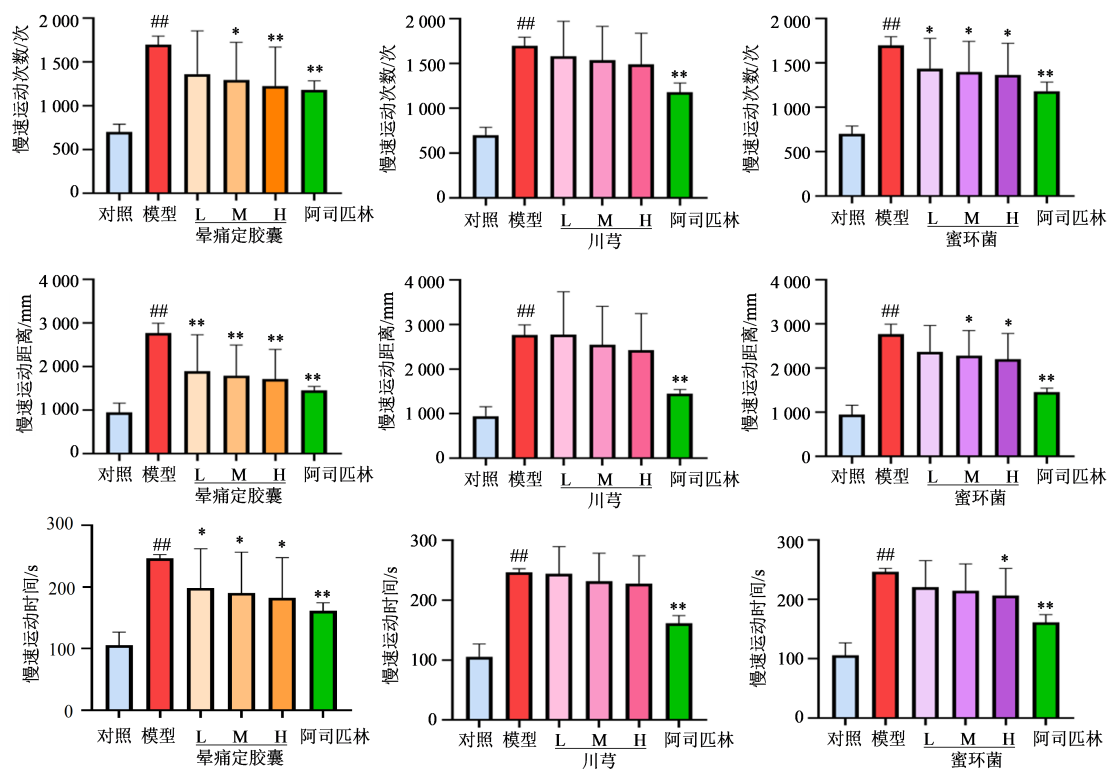


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图2 各组斑马鱼快运动强度 ($\bar{x} \pm s, n=60$)

Fig. 2 Fast exercise intensity of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s, n=60$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图3 各组斑马鱼慢运动强度 ($\bar{x} \pm s, n=60$)

Fig. 3 Slow exercise intensity of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s, n=60$)

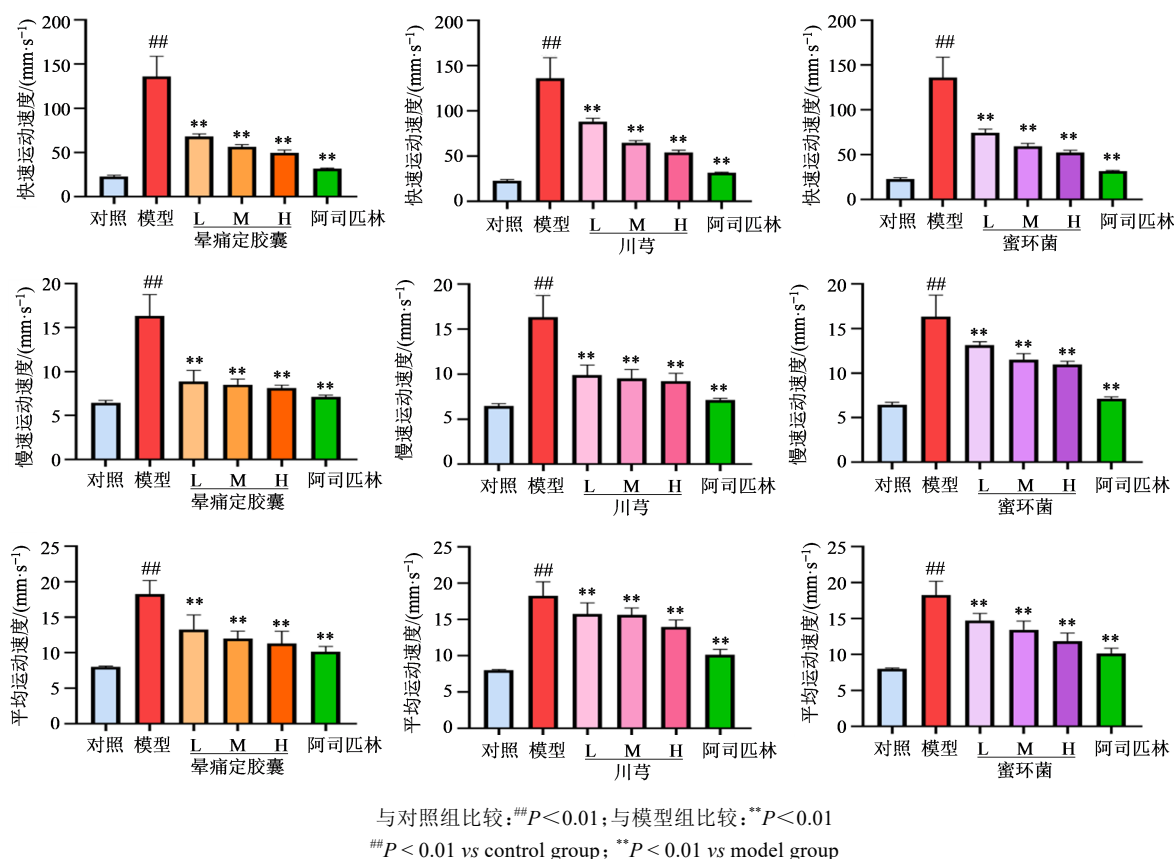


图4 各组斑马鱼运动速度 ($\bar{x} \pm s, n=60$)

Fig. 4 Movement speed of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s, n=60$)

表2 川芎主要活性成分

Table 2 Main active ingredients of *Chuanxiong Rhizoma*

编号	成分名称	编号	成分名称
CX1	亚油酸乙酯(mandenol)	CX17	(Z)-6,7-环氧藁本内酯[(Z)-6,7-epoxyligustilide]
CX2	杨梅酮(myricanone)	CX18	celephthalide A
CX3	川芎啉(perlolyrine)	CX19	洋川芎内酯O(senkyunolide O)
CX4	川芎酮(senkyunone)	CX20	洋川芎内酯P(senkyunolide P)
CX5	川芎萜呋内酯(wallichilide)	CX21	6'-双藁本内酯(tokinolide B)
CX6	豆甾醇(sitosterol)	CX22	ansapirolide
CX7	FA	CX23	3,8-dihydrodiligustilide
CX8	金色酰胺醇酯(aurantiamide acetate)	CX24	riligustilide
CX9	藁本内酯(Z-ligustilide)	CX25	新当归内酯(angelicide)
CX10	洋川芎内酯H(senkyunolide H)	CX26	L-valine-L-valine anhydride
CX11	洋川芎内酯K(senkyunolide K)	CX27	1-acetyl- β -carboline
CX12	洋川芎内酯N(senkyunolide N)	CX28	sedanonic acid
CX13	川芎内酯R(senkyunolide R)	CX29	3-methoxy-4-hydroxystyrene
CX14	丁苯酞(butylphthalide)	CX30	augustic acid
CX15	Z-亚丁基苯酞(Z-butylidenephthalide)	CX31	法卡林二醇3(R),8(S),9(Z)-falcariindiol
CX16	4,7-dihydroxy-3-butylphthalide	CX32	烟酸(nicotinic acid)

Cytoscape 3.7.2, 构建晕痛定胶囊镇痛活性“活性成分-潜在靶点”网络, 结果见图6。

3.2.4 潜在靶点基因 PPI 网络构建 将 159 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 网络分析,

表 3 蜜环菌主要活性成分

Table 3 Main active ingredients of *Armillaria mellea*

编号	成分名称	编号	成分名称
MH1	5'-methoxy-6'-chloroarmillane	MH29	melleolide M
MH2	melleolide C	MH30	armillyl orsellinate
MH3	melleolide D	MH31	armillyl everninate
MH4	蜜环菌甲素 (armillarin)	MH32	arnamiol
MH5	蜜环菌乙素 (armillaridin)	MH33	4-O-methylmelleolide
MH6	蜜环菌丙素 (armillaricin)	MH34	13-hydroxy-4-methoxymelleolide
MH7	蜜环菌丁素 (armillaribin)	MH35	14-hydroxydihydromelleolide
MH8	蜜环菌戊素 (melleolide)	MH36	4-dehydro-14-hydroxydihydromelleolide
MH9	蜜环菌己素 (armillarigin)	MH37	4-dehydrodihydromelleolide
MH10	蜜环菌庚素 (armillarikin)	MH38	arnamial
MH11	蜜环菌辛素 (armillarilin)	MH39	6,9-epoxy-ergosta-7,22,dien-3 β -ol
MH12	蜜环菌壬素 (armillarinin)	MH40	L-fucose
MH13	蜜环菌癸素 (armillaripin)	MH41	austocystin F
MH14	蜜环菌丑素 (armillaritin)	MH42	3-甲氧基-5-甲基苯酚 (3-methoxy-5-methylphenol)
MH15	蜜环菌寅素 (armillarivin)	MH43	扁枝衣二酸 (evernic acid)
MH16	蜜环菌卯素 (armillarizin)	MH44	棕榈酸 (pimaric acid)
MH17	蜜环菌酸 (armillaric acid)	MH45	7-氧代去氢松香酸 (7-oxodehydroabietic acid)
MH18	蜜环菌巴素 (armillasin)	MH46	15-羟基-7-氧代去氢松香酸 (7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid)
MH19	13-hydroxydihydromelleolide	MH47	N6,N6-二甲基腺苷 (N,N-dimethyladenosine)
MH20	4-O-methylarmillaridin	MH48	(R)-2-(2-(furan-2-yl)-oxoethyl)-octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione
MH21	judeol	MH49	armillariol A
MH22	melledonal C	MH50	armillariol B
MH23	10 α -hydroxymelleolide	MH51	armillariol C
MH24	melleolide F	MH52	异海松酸 (isopimaric acid)
MH25	melleolide G	MH53	山达海松酸 (sandaracopimaric acid)
MH26	melleolide H	A1	β -谷甾醇 (β -sitosterol)
MH27	melleolide K	A2	过氧麦角甾醇 (ergosterol peroxide)
MH28	melleolide L		

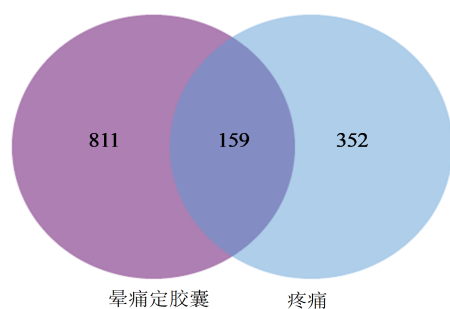


图 5 晕痛定胶囊活性成分靶点与疾病靶点韦恩图

Fig. 5 Venn diagrams of targets of active components of Yuntongding Capsule and targets of disease

将其物种设定为人,导出分值 >0.4 的置信度区间数据,而后在 Cytoscape 3.7.2 获得潜在靶点的 PPI 网络图,如图 7 所示,包括白细胞介素-6(IL6)、蛋白激酶

B1(AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、淀粉样前体蛋白(APP)等靶点。

3.2.5 潜在靶点基因 KEGG 通路分析和 GO 生物学过程分析 分析晕痛定胶囊镇痛活性潜在靶点基因的功能及其在信号通路中的作用,从而进一步探讨晕痛定胶囊镇痛活性作用机制。以 KEGG 数据库对靶点基因主要参与的生化代谢途径进行富集与关联性,并绘制富集结果排名前 20 的数据,其中有涉及癌症信号通路,如胰腺癌通路;涉及脂质代谢过程,如脂质和动脉粥样硬化;涉及信号传递过程,如神经活性配体-受体相互作用;涉及炎症反应调控通路,如松弛素信号通路和 IL-17 信号通路;涉及应激应答通路,如 HIF-1 信号通路,结果见图 8。

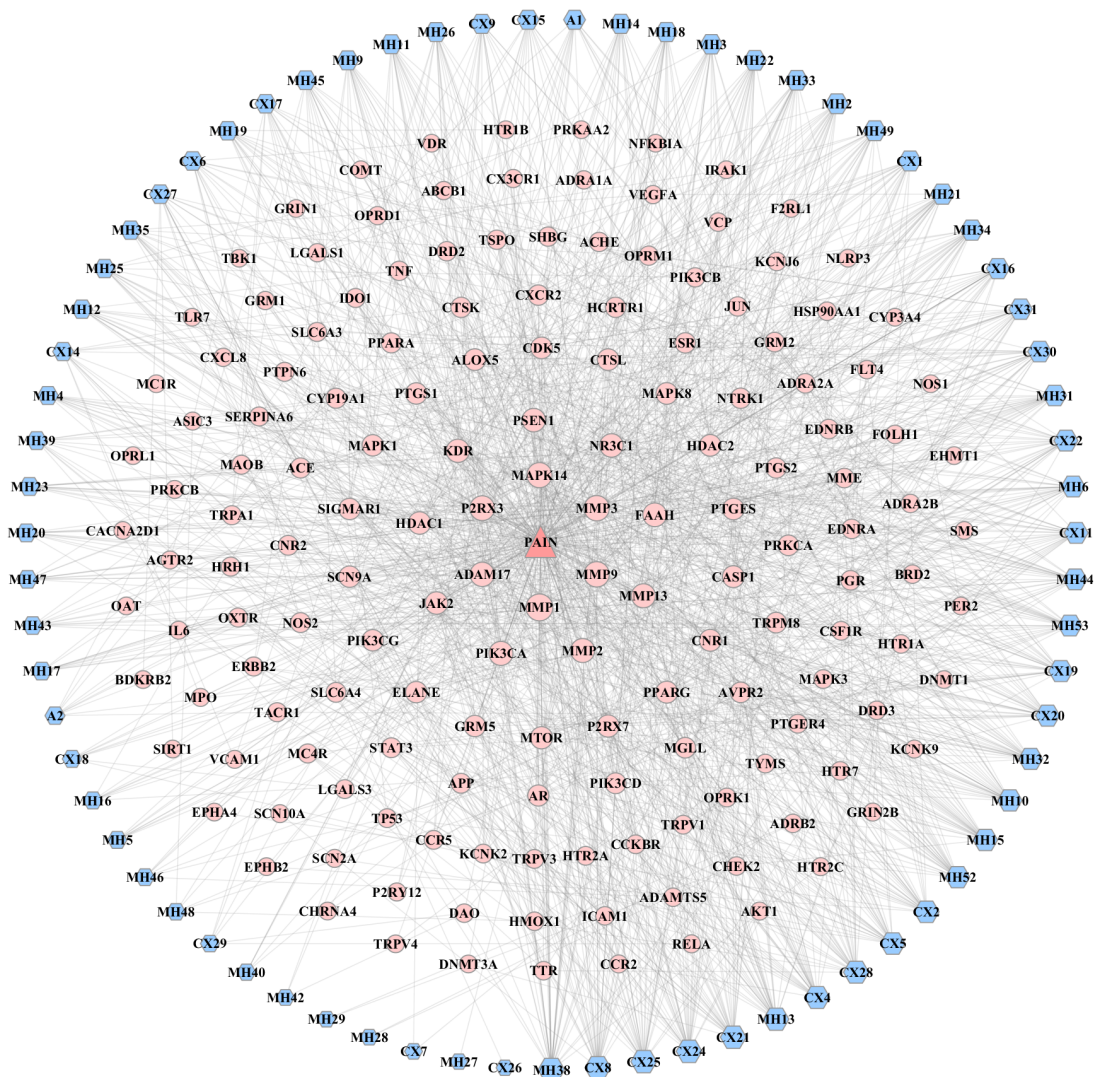


图6 活性成分-潜在靶点网络
Fig. 6 Network of active ingredient-potential targets

以GO数据库对靶点基因的BP、MF和CC进行功能注释,并绘制富集结果每项排名前15的数据显示,晕痛定胶囊所影响的BP包括有机物质反应、生物质量调节、细胞通信调控、多个代谢过程的正调控等;涉及CC包括质膜部分、神经元部分(主要有细胞体、树突和突触)等;影响的MF包括酶结合、相同蛋白结合、大分子转导活性和信号受体的活性等,结果见图9。

3.2.6 晕痛定胶囊镇痛“核心成分-核心靶点-核心通路”网络模型构建 以KEGG分析结果中的显著通路数据信息,利用Cytoscape 3.7.2构建晕痛定胶囊镇痛活性的“活性成分-潜在靶点-核心通路”网络图,见图10。对图中网络进行拓扑学性质分析,筛选度值>中位数且均>10的成分作为核心有效成分,分别为法卡林二醇(CX31)、arnamial (MH38)、

蜜环菌寅素(MH15)、6'-双藁本内酯(CX21)、蜜环菌庚素(MH10)、蜜环菌癸素(MH13)、川芎醌(CX4)、洋川芎内酯K(CX11)、金色酰胺醇酯(CX8)、sedanonic acid(CX28);选取度值>中位数且均>15的靶点作为核心靶点,分别为MMP9、MAPK14、MAPK8、PIK3CA、MMP2、MAPK1;筛选聚焦晕痛定胶囊镇痛活性的核心成分及核心靶点,如图11所示。

3.2.7 核心节点的分子对接 AutoDock Vina分析分别对“3.2.6”项得到的核心成分及核心靶点进行分子对接,结果见表4。当结合能<-17.782 kJ·mol⁻¹(-4.25 kcal·mol⁻¹),说明配体与受体具有一定的结合活性;当结合能<-20.92 kJ·mol⁻¹(-5.0 kcal·mol⁻¹)时结合活性较好,当结合能<-29.288 kJ·mol⁻¹(-7.0 kcal·mol⁻¹)时结

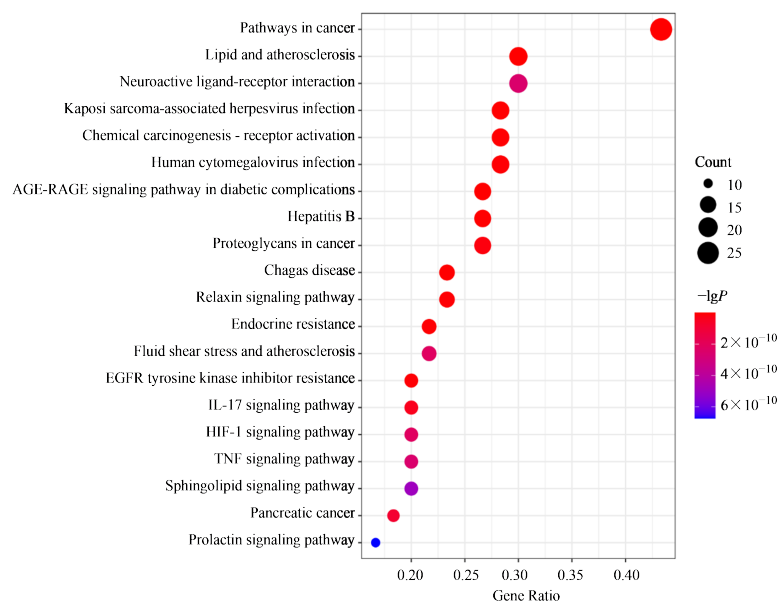


图 8 晕痛定胶囊镇痛作用潜在靶点基因的 KEGG 通路分析

Fig. 8 KEGG pathway analysis of potential target genes of Yuntongding Capsule for easing pain

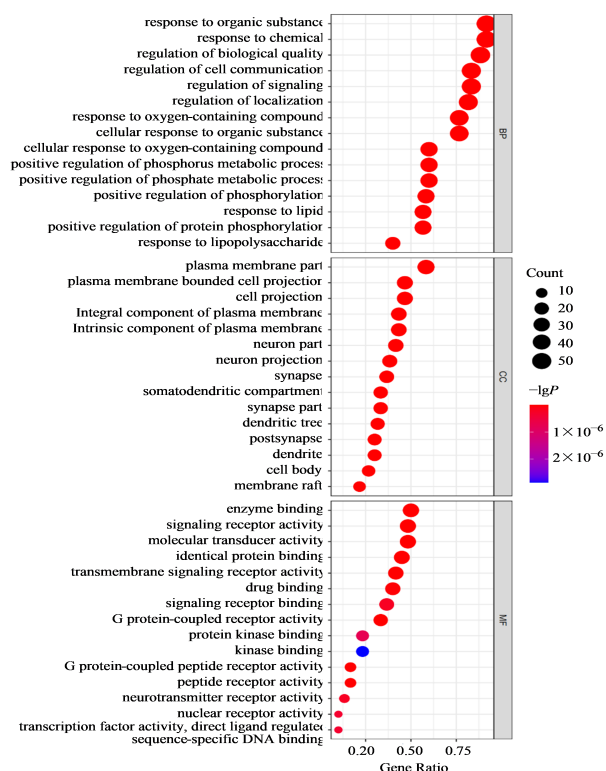


图 9 晕痛定胶囊镇痛作用潜在靶点基因的 GO 生物学过程分析

Fig. 9 GO biological process analysis of potential target genes of Yuntongding Capsule for easing pain

动次数、快速运动速度、快速运动次数平均运动速度均显著降低 ($P < 0.01$)。这表明单独给药法卡林二醇或金色酰胺醇酯能够达到良好的镇痛效果,与网络药理学结果相符。

4 讨论

晕痛定胶囊在临床上常用于治疗偏头痛,而偏头痛是一种复杂的神经血管性疾病,是影响健康的十大疾病之一,也是全球疾病负担的主要原因之一^[6]。但其发病机制尚不完全清楚,主流的偏头痛发病机制学说有血管源性学说、神经学说及三叉神经血管学说等^[7];中国偏头痛中西医结合防治指南显示偏头痛常见证型为风瘀阻络证、肝阳上亢证、风痰上扰证及瘀血阻络证,临床上也会出现常见证型的兼证^[8]。相关学者对晕痛定胶囊临床治疗偏头痛进行案例分析,发现晕痛定胶囊能够有效预防和治疗眩晕、偏头痛且无明显不良反应^[9-11]。

本实验采用佛波酯诱导斑马鱼产生神经炎症疼痛模型,从而探究晕痛定胶囊的镇痛活性。佛波酯作为一种中枢神经疼痛诱导剂,能够诱导小胶质细胞发生老化并使其分泌大量 TNF- α 及白细胞介素-1 β (IL-1 β),从而导致多巴胺能神经元死亡,使神经系统受到损伤^[12]。斑马鱼暴露在含有佛波酯的溶液中,神经受到损伤并产生疼痛,在感知疼痛后,其行为学发生改变,以各运动强度为指标来定量评价晕痛定胶囊的镇痛活性。实验结果显示,一定剂量下晕痛定胶囊具有明显的镇痛作用,且其比单独使用组方药材川芎或蜜环菌效果更佳。

本研究通过网络药理学筛选得到 MAPK1、MAPK8、MAPK14、MMP2、MMP9 和 PIK3CA 可能是晕痛定胶囊发挥镇痛作用的核心靶点,法卡林二醇为网络中度值最大的核心成分。对核心成分与

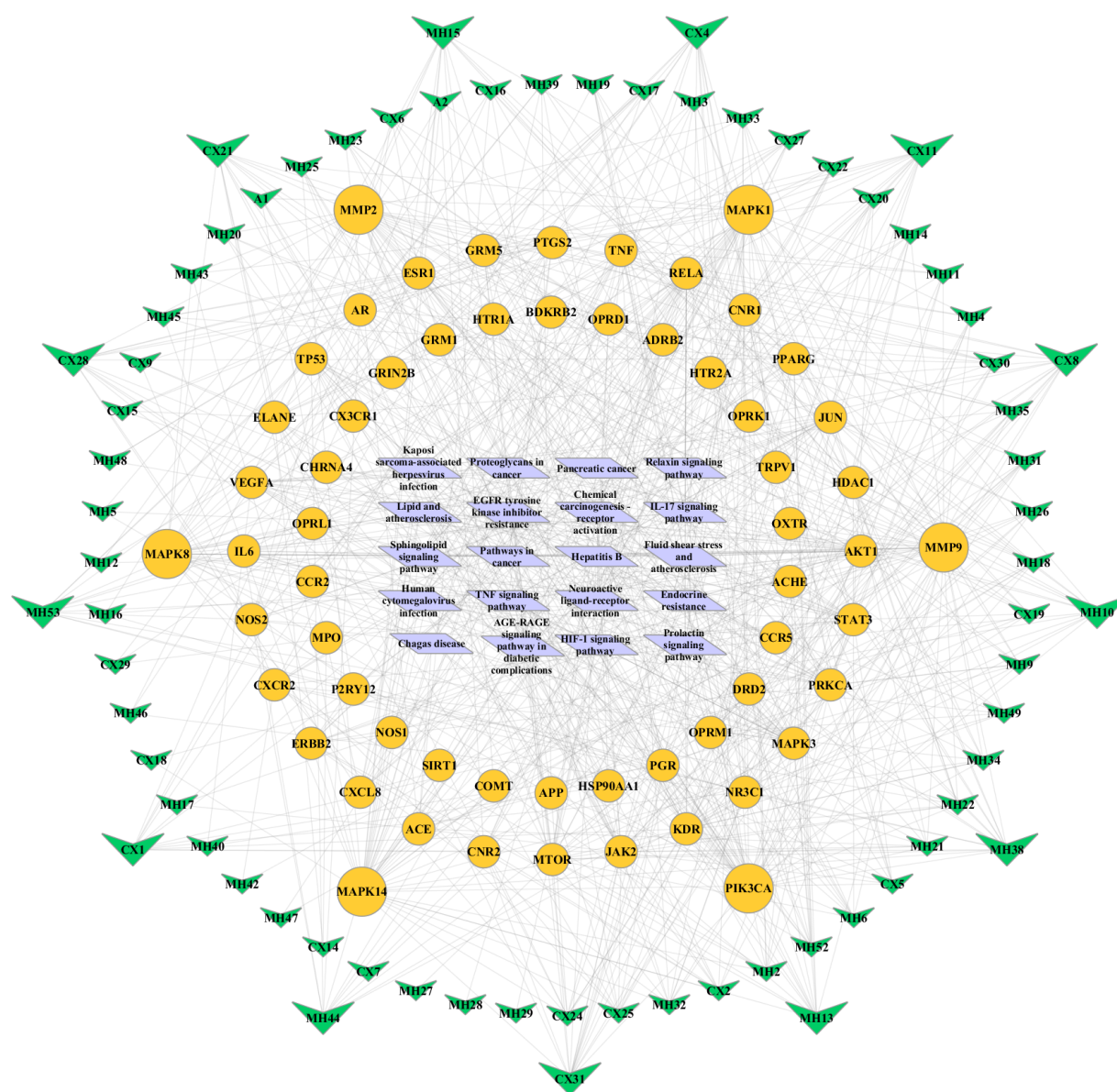


图10 晕痛定胶囊镇痛作用的“活性成分-潜在靶点-核心通路”网络

Fig. 10 Network of “active ingredient-potential target-core pathway” of Yuntongding Capsule for easing pain

靶点采用分子对接的方法进一步探究晕痛定胶囊镇痛作用的成分基础,成分与靶点的结合能越小代表结合越稳定,对接结果显示各核心成分与靶点结合的构象稳定时能量均较低,发挥镇痛作用的可能性大;其中金色酰胺醇酯与5个核心靶点结合活性均较突出,推测其在多个生物过程中发挥重要作用。选取核心成分中的法卡林二醇和金色酰胺醇酯进行斑马鱼镇痛活性验证,结果显示单独给药可以达到与晕痛定胶囊相同甚至更好的镇痛效果,进而验证网络药理学结果,这2个成分是晕痛定胶囊发挥镇痛活性的关键成分。

MAPK 通路是一种保守的3级激酶反应途径,3级激酶依次激活,共同调节细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理病理过程。MAPK 家族包含4种不同的信号通路:ERK1/2、P38MAPK、JNK 和 ERK5^[13],其与神经性疼痛和炎症性的调节密切相关^[14]。MAPK1 又称细胞外信号调节蛋白激酶2(ERK2),是ERK 家族重要成员,ERK 通路中上游蛋白和激酶的过度激活已被证明会诱发各种疾病,包括癌症、炎症、发育障碍和神经系统疾病^[15]。研究显示ERK1/2在小胶质细胞或星形胶质细胞中被激活的过程在脊髓背角疼痛致

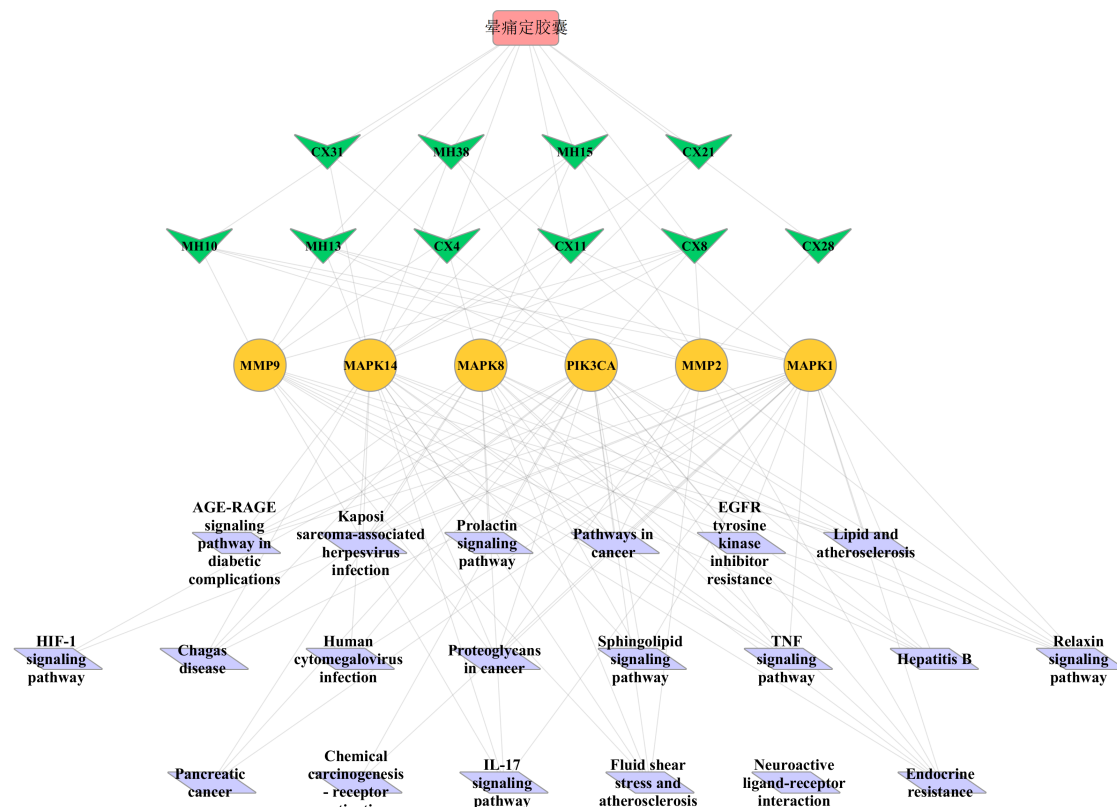


图 11 晕痛定胶囊镇痛作用的核心成分和核心靶点

Fig. 11 Network of core ingredient-core target-core pathway of of Yuntongding Capsule for easing pain

表 4 核心成分和核心靶点分子对接结合能

Table 4 Molecule docking binding energy of core component and core target

编号	靶点	PDB ID	成分	结合能/ (kJ·mol ⁻¹)	编号	靶点	PDB ID	成分	结合能/ (kJ·mol ⁻¹)
1	MAPK1	4IZ5	洋川芎内酯K	-24.267	4	MMP2	1EAK	金色酰胺醇酯	-36.401
			蜜环菌庚素	-40.166				sedanonic acid	-25.941
			蜜环菌癸素	-38.493				蜜环菌庚素	-37.656
			蜜环菌寅素	-37.238				蜜环菌癸素	-34.727
2	MAPK8	4YR8	川芎醌	-31.38				蜜环菌寅素	-35.564
			金色酰胺醇酯	-32.635				arnamial	-37.656
			洋川芎内酯K	-26.778	5	MMP9	1L6J	金色酰胺醇酯	-32.217
			6'-双藁本内酯	-33.054				蜜环菌庚素	-33.472
3	MAPK14	6QYX	蜜环菌寅素	-32.635				蜜环菌癸素	-33.472
			川芎醌	-32.217				蜜环菌寅素	-33.472
			金色酰胺醇酯	-34.309				arnamial	-32.217
			洋川芎内酯K	-30.543	6	PIK3CA	2V1Y	金色酰胺醇酯	-24.267
			6'-双藁本内酯	-32.635				法卡林二醇	-15.481
			法卡林二醇	-23.430				蜜环菌庚素	-30.543
			蜜环菌癸素	-33.054				蜜环菌癸素	-28.033
			蜜环菌寅素	-33.054				arnamial	-27.614
			arnamial	-33.890					

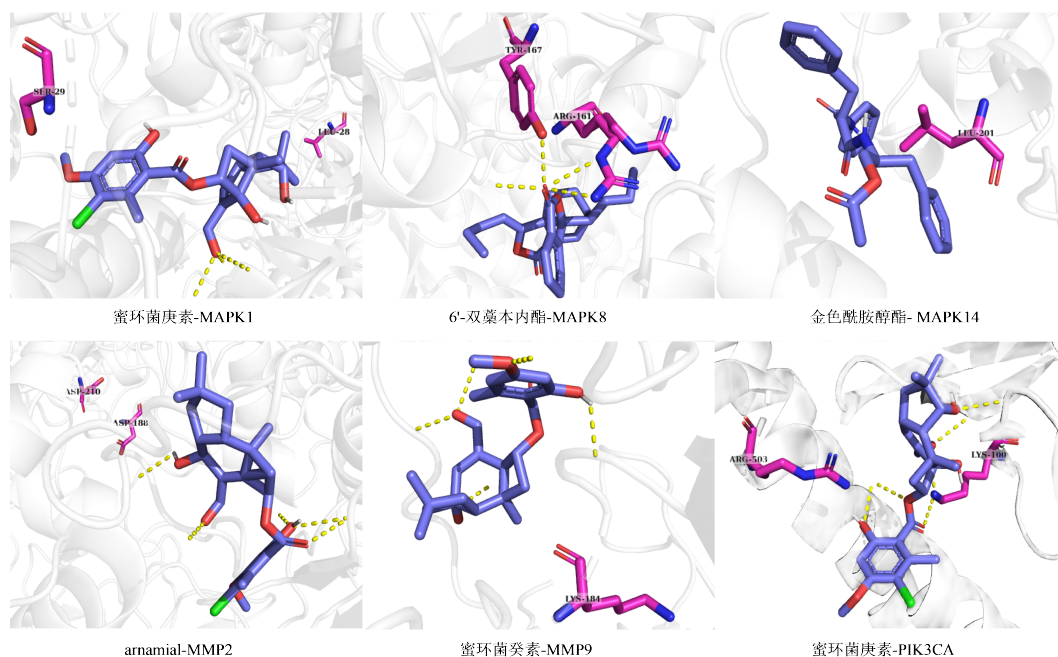


图 12 核心成分和核心靶点分子对接部分可视化结果

Fig. 12 Visualization results of docking between core components and core target molecules

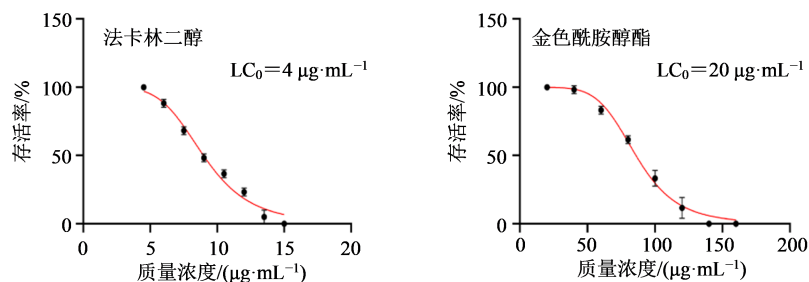
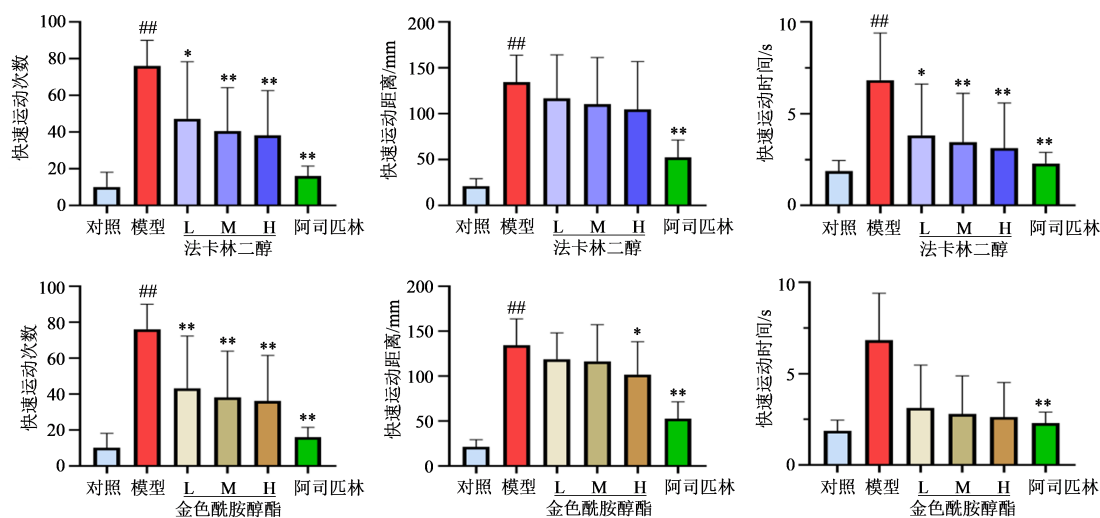
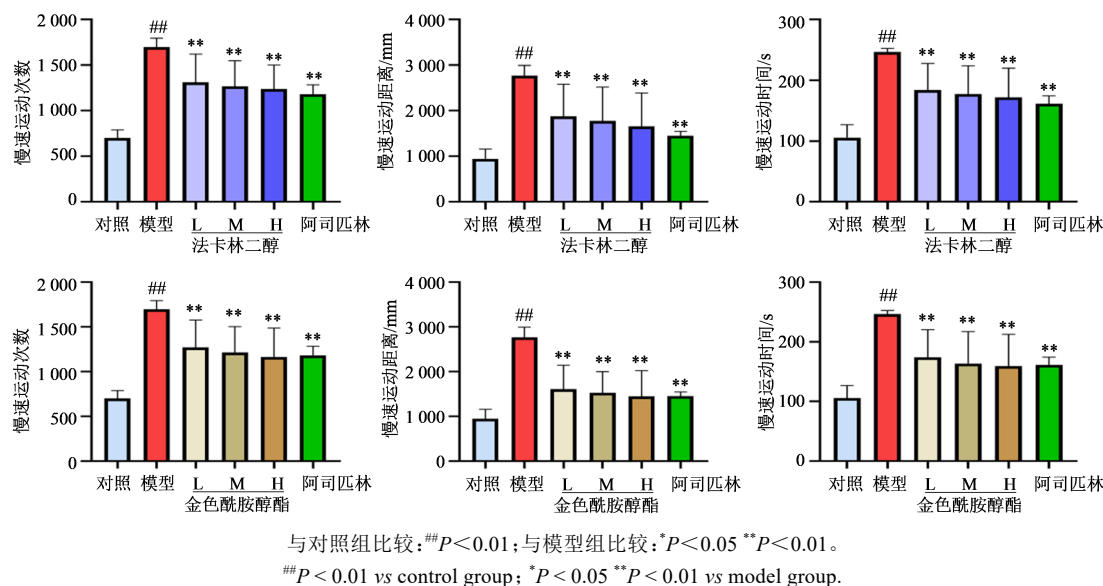
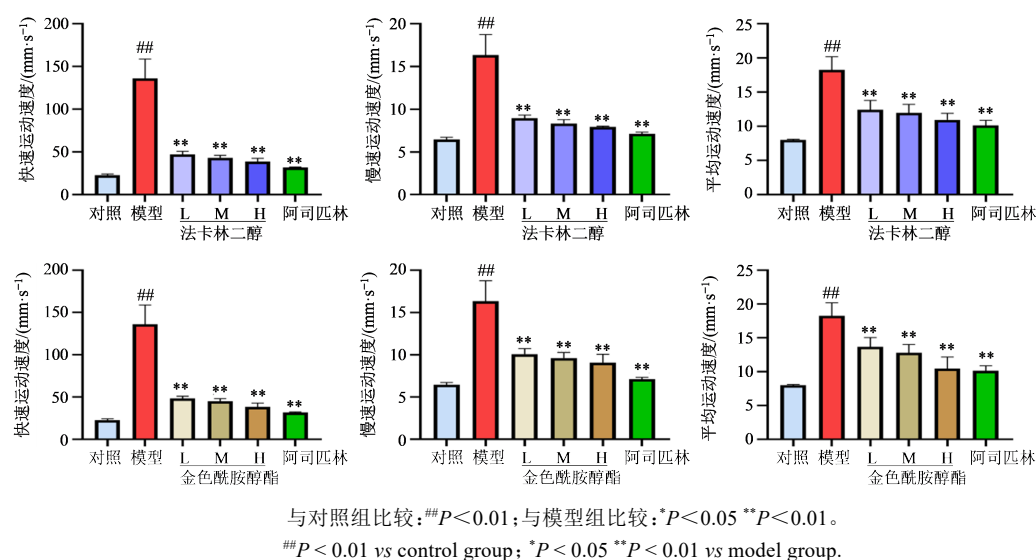


图 13 法卡林二醇和金色酰胺醇酯对斑马鱼的“量-毒”曲线

Fig. 13 “Dose-toxicity” curve of falcariindiol and aurantiamide acetate to zebrafish

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.图 14 法卡林二醇和金色酰胺醇酯对斑马鱼快运动强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=60$)Fig. 14 Effects of falcariindiol and aurantiamide acetate on fast exercise intensity of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=60$)

图15 法卡林二醇和金色酰胺醇酯对斑马鱼慢运动强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=60$)Fig. 15 Effects of falcariindiol and aurantiamide acetate on slow exercise intensity of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=60$)图16 法卡林二醇和金色酰胺醇酯对斑马鱼运动速度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=60$)Fig. 16 Effects of falcariindiol and aurantiamide acetate on movement speed of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=60$)

敏中起重要作用^[16]。ERK2也能参与疼痛信号的传递和调节,并在炎症性疼痛和神经性疼痛的发生和维持中发挥重要作用^[13]。MAPK8又称为c-Jun氨基末端激酶1(JNK1),当神经损伤导致炎症和感受介质形成时,可诱导DRG神经元产生从而快速激活JNK通路。实验表明鞘内注射JNK抑制剂可以缓解脊神经结扎(SNL)模型中的神经性疼痛^[17]。MAPK14属于P38 MAPK,主要参与成熟的神经系统炎症和痛觉过敏。P38 MAPK通路抑制剂可减少神经性疼痛下神经元的异常兴奋^[18]。在各种动物模型中,鞘内注射P38抑制剂可增加神经性疼痛的

疼痛阈值,提示P38通路的激活与神经性疼痛密切相关^[19]。相关研究显示金色酰胺醇酯能够通过抑制NF- κ B、JNK和p38通路对脂多糖刺激引起的炎症反应发挥抗炎作用^[20]。MMP9是由许多炎性细胞分泌而来,与神经炎症和细胞凋亡等生物过程相关^[21]。研究证实,MMP9在急性缺血性脑卒中患者中表达明显增强,其过度表达与神经兴奋性毒性、神经元损伤凋亡等过程有关^[22]。PIK3CA所编码的蛋白为PI3K酶的亚基,参与PI3K-AKT-mTOR途径,该途径是细胞生存和自噬调控的关键途径^[23]。且法卡林二醇经研究证实可促进癌细胞凋亡,其中

包括乳腺癌细胞^[24]、胃癌细胞^[25]和肺癌细胞^[26]等。

本研究基于斑马鱼模型评价了晕痛定胶囊的镇痛活性,通过网络药理学的方法预测晕痛定胶囊的镇痛机制,并采用斑马鱼实验验证核心成分的镇痛活性。结果显示晕痛定胶囊具有较好的镇痛活性,单独使用其核心成分法卡林二醇或金色酰胺醇酯能够达到较好的镇痛效果;预测其潜在机制可能是通过 MAPK1、MAPK8、MAPK14、MMP2、MMP9 和 PIK3CA 通路减少神经损伤及其炎症反应和促进细胞凋亡来达到良好的镇痛效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张晓峰. 晕痛定胶囊联合苯噻啉治疗偏头痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(4): 975-978.
Zhang X F. Clinical study on Yuntongding Capsules combined with pizotifen in treatment of migraine [J]. Drug Clin, 2019, 34(4): 975-978.
- [2] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 278-287.
Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(1): 278-287.
- [3] 李红燕, 谢倩, 王成, 等. 斑马鱼在药物毒理学评估中应用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 278-288.
Li H Y, Xie Q, Wang C, et al. Research progress on application and mechanism of zebrafish in drug toxicology assessment [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(1): 278-288.
- [4] 段秀英, 马瑞娇, 张云, 等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1573-1580.
Duan X Y, Ma R J, Zhang Y, et al. Zebrafish inflammation model and its application in anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1573-1580.
- [5] 杜婷婷, 王海苹, 徐懿乔, 等. 斑马鱼模型评价如意珍宝丸抗炎镇痛作用研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(4): 498-502.
Du T T, Wang H P, Xu Y Q, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Ruyi Zhenbao pill in zebrafish [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2017, 33(4): 498-502.
- [6] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(5): 459-480.
- [7] 范红珍, 姚文涛, 吕眯眯, 等. 偏头痛实验模型研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(11): 841-845.
Fan H Z, Yao W T, Lv M M, et al. Research progress of migraine experimental model [J]. Chin J Pain Med, 2017, 23(11): 841-845.
- [8] 张云云, 吴波水, 刘毅. 中国偏头痛中西医结合防治指南(2022年) [J/OL]. 中国中西医结合杂志, [2023-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.r.20230508.0915.004.html>.
Zhang Y Y, Wu B S, Liu Y. Chinese Guidelines for Integrating Chinese and Western Medicine in the Prevention and Treatment of Migraine Headache (2022) [J/OL]. Chin J Integr Tradit Western Med, [2023-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.r.20230508.0915.004.html>.
- [9] 张慧荣. 晕痛定胶囊治疗偏头痛的近期疗效观察 [J]. 中外医学研究, 2012, 10(9): 102-103.
Zhang H R. Observation on the short-term curative effect of Yuntongding capsule on migraine [J]. Chin Foreign Med Res, 2012, 10(9): 102-103.
- [10] 张光凤, 金梅. 晕痛定治疗偏头痛疗效观察 [J]. 中外医疗, 2009, 28(30): 83.
Zhang G F, Jin M. Observation on therapeutic effect of yuntongding on migraine [J]. China Foreign Med Treat, 2009, 28(30): 83.
- [11] 钱琪, 冉小飞, 田建娜. 晕痛定胶囊治疗偏头痛64例分析 [J]. 临床医药实践杂志, 2008, 1(14): 559-560.
Qian Q, Ran X F, Tian J N. Analysis of 64 cases of migraine treated by yuntongding capsule [J]. Proceeding Clin Med, 2008, 1(14): 559-560.
- [12] 刘琳, 罗晓光, 王新红, 等. 大鼠黑质反复佛波酯(PMA)注射诱导小胶质细胞老化及其与帕金森病关系的探讨 [A]// 中华医学峰会暨中华医学会神经病学分会第八届全国中青年神经病学学术会议论文集 [C]. 重庆: 中华医学会, 2015.
Liu L, Luo X G, Wang X H, et al. Repeated PMA injections in the rat substantia nigra induce microglia aging and its relationship with Parkinson's disease [A]// Chinese Medical Association, China Medical Summit and the 8th National Academic Conference on Young and Middle-aged Neurology of the Neurology Branch of the Chinese Medical Association [C]. Chongqing: Chinese Medical Association, 2015.
- [13] Li C L, Yang R, Sun Y, et al. N58A exerts analgesic effect on trigeminal neuralgia by regulating the MAPK pathway and tetrodotoxin-resistant sodium channel [J]. Toxins, 2021, 13(5): 357.
- [14] Gui Y L, Duan S Y, Xiao L H, et al. Bexarotent

- attenuated CCI-induced spinal neuroinflammation and neuropathic pain by targeting MKP-1 [J]. *Pain*, 2020, 21, 1149 – 1159.
- [15] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19 (3): 1997-2007.
- [16] Borges G, Berrocoso E, Mico J A, et al. ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders [J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 60: 77-92.
- [17] Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity [J]. *Life Sci*, 2004, 74 (21): 2643-2653.
- [18] Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, et al. p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases [J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011, 11 (1): 45-59.
- [19] Hains B C, Waxman S G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4308-4317.
- [20] Yoon C S, Kim D C, Lee D S, et al. Anti-neuroinflammatory effect of aurantiamide acetate from the marine fungus *Aspergillus* sp. SF-5921: Inhibition of NF- κ B and MAPK pathways in lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 568-574.
- [21] 黄伟东, 魏继鹏, 李健标. 血清MMP-9、Lp-PLA2、CRP水平对急性缺血性脑卒中介入治疗预后的影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2023, 15(4): 635-638, 642.
- Huang W D, Wei J P, Li J B. Effect of serum MMP-9, Lp-PLA2 and CRP levels on prognosis of interventional therapy for acute ischemic stroke [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2023, 15(4): 635-638, 642.
- [22] 常青, 杨宇英, 薛茜, 等. NLR、MMP-9对急性缺血性脑卒中静脉溶栓患者出血转化的诊断价值 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(9): 2077-2081.
- Chang Q, Yang Y Y, Xue Q, et al. Diagnostic value of NLR and MMP-9 in hemorrhagic transformation of patients with acute ischemic stroke undergoing intravenous thrombolysis [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42 (9): 2077-2081.
- [23] 尹丽梅, 袁建, 陈楷, 等. 解毒活血方调控PI3K/Akt/mTOR信号通路对ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12): 112-120.
- Yin L M, Yuan J, Chen K, et al. Jiedu Huoxue prescription affects plaque stability in ApoE^{-/-} atherosclerosis mice by modulating PI3K/akt/mTOR signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(12): 112-120.
- [24] 芦婷婷, 田欣, 王竞. 法卡林二醇单药及与其他药物联用对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58 (28): 56-58.
- Lu T T, Tian X, Wang J. Effects of faltarindiol alone and combination with other drugs on apoptosis of breast cancer cells [J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(28): 56-58.
- [25] 张宇. 法卡林二醇诱导胃癌细胞凋亡机制的研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2023.
- Zhang Y. The mechanism of facarinediol induced apoptosis in human gastric carcinoma cells [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2023.
- [26] 吴晓旭, 刘艳, 李琳, 等. 法卡林二醇通过线粒体途径和内质网应激途径诱导肺癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(12): 1325-1328, 1333.
- Wu X X, Liu Y, Li L, et al. Mechanism of fakarinediol inducing apoptosis in lung cancer cells through mitochondrial pathway and endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(12): 1325-1328, 1333.

[责任编辑 刘东博]