

在体吸收谱效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛活性成分

南楠^{1,2}, 许永崧^{3,4}, 李美景^{1,2}, 龚慕辛^{1,2*}, 郭中原^{5,6}, 徐睿^{1,2}, 骆思源^{1,2}, 王智民⁵

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

3. 首都医科大学附属北京潞河医院内分泌代谢与免疫性疾病中心, 北京 101149

4. 糖尿病防治研究北京市重点实验室, 北京 101149

5. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

6. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 阐明治疗偏头痛的传统方剂吴茱萸汤 (Wuzhuyu Decoction) 的有效成分和作用机制。 **方法** 利用单向在体肠灌注方法获得 10 种 WZYD 在体吸收成分谱, 同时建立利血平致偏头痛小鼠模型, 检测血清与脑组织中一氧化氮及其合成酶水平及脑组织内 5-羟色胺、去甲肾上腺素、多巴胺的含量, 将吸收谱与药效指标进行谱效相关分析, 确定影响药效的主要成分。结合网络药理学方法对吴茱萸汤治疗偏头痛的有效活性成分和潜在作用靶点进行分析, 获得潜在治疗靶点以及生物学过程等, 并对网络中的关键靶点和成分进行分子对接。 **结果** 吴茱萸汤中 9 种在体吸收成分对药效指标具有不同的作用, 综合药效趋势中, 吸收含量越高作用越好的前 3 位成分为吴茱萸苦素 (rutaevine, Rv)、柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 (limocitrin-3-O-β-D-glucoside, Lcs)、吴茱萸次碱 (rutaecarpine, Ru), 吸收含量越低作用越好的前 3 位成分为 6-姜辣素 (6-gingerol, 6-Gi)、吴茱萸碱 (evodiamine, Ev)、人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁, Rg₁)。网络药理学分析, 吴茱萸汤作用于前列腺素内过氧化物合成酶 2、5-羟色胺转运体、瞬时受体电位香草酸亚型 1 等受体蛋白, 涉及 118 个生物学过程、21 个细胞组分、21 个分子功能和 24 条信号通路。 **结论** 吴茱萸汤中活性成分的吸收量与药效存在相关关系, 可能是通过抑制神经源性炎症、影响 5-羟色胺能信号通路的传导发挥治疗作用。

关键词: 偏头痛; 吴茱萸汤; 单向在体肠灌注; 谱效相关; 网络药理学; 吴茱萸苦素; 柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷; 吴茱萸次碱; 6-姜辣素; 吴茱萸碱; 人参皂苷 Rg₁

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5956-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.019

Study on pharmacological ingredients of Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine by correlating *in vivo* absorption spectrum-effect relationship

NAN Nan^{1,2}, XU Yong-song^{3,4}, LI Mei-jing^{1,2}, GONG Mu-xin^{1,2}, GUO Zhong-yuan^{5,6}, XU Rui^{1,2}, LUO Si-yuan^{1,2}, WANG Zhi-min⁵

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

3. Center for Endocrine Metabolism and Immune Diseases, Beijing Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

4. Beijing Key Laboratory of Diabetes Research and Care, Beijing 101149, China

5. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

6. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To clarify the effective composition and mechanism of a traditional formula Wuzhuyu Decoction (WZYD, 吴茱萸汤) in treatment of migraine. **Methods** In this study, the spectrum-effect relationships between 10 kinds of WZYD absorption

收稿日期: 2021-02-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473360)

作者简介: 南楠, 博士研究生, 主要从事中药复方药效物质基础研究。E-mail: kkwp263@163.com

*通信作者: 龚慕辛, 教授, 博士生导师, 主要从事中药复方药效物质基础研究。Tel: (010)83911624 E-mail: gongmuxin@ccmu.edu.cn

component spectrum using the single pass intestinal perfusion and migraine related efficacy were analyzed to determine the main components that affect the efficacy, such as NO and NO Synthetase in serum and brain, 5-hydroxytryptamine, dopamine, norepinephrine in brain tissue. And the components and mechanism of WZYD were explored in the treatment of migraine by network pharmacology. Then the active ingredients and potential targets were analyzed to obtain therapeutic targets and biological processes through network pharmacology, and carry out molecular docking of key targets and components in the network. **Results** The results indicated that nine components absorbed of WZYD had different effects to pharmacodynamics index. In the comprehensive efficacy trend, the effects of some ingredients were positively correlated with absorption, such as rutaevine, limocitrin-3-*O*- β -*D*-glucoside and rutaecarpine; while the effects of others were negatively correlated with absorption, such as 6-gingerol, evodiamine and ginsenoside Rg₁. WZYD acted on PTGS2, SLC6A4, and TRPV1 and 118 biological processes, 21 cellular components, 21 molecular functions and 24 signaling pathways were involved. **Conclusion** There is a correlation between the absorption of active components in WZYD and its efficacy. WZYD may play a therapeutic role by inhibiting neurogenic inflammation and the conduction of 5-HT signaling pathway.

Key words: migraine; Wuzhuyu Decoction; single pass intestinal perfusion; spectrum-effect relationship; network pharmacology; rutaevine; limocitrin-3-*O*- β -*D*-glucoside; rutaecarpine; 6-gingerol; evodiamine; ginsenoside Rg₁

偏头痛 (migraine) 作为反复或周期性发作的一侧或两侧搏动性头痛, 常伴有恶心、呕吐、畏光等自主神经症状, 是一种高致残和高负担的神经系统疾病, 现有的治疗方法对症状的改善有一定的作用, 但存在有效率低、副作用大、复发率高等问题, 因此, 需要寻找更有效、更经济、耐受性更好的治疗方法。吴茱萸汤 (Wuzhuyu Decoction) 首载于汉代张仲景《伤寒论》, 以吴茱萸、人参、生姜、大枣 4 味药组成, 主治“干呕吐涎沫, 头痛者”, 是后世医家治疗肝胃虚寒、浊阴上逆型偏头痛的代表方剂。既往临床研究发现吴茱萸汤可以有效减少头痛发作次数和持续时间且安全性好^[1-2], 但其有效成分和作用机制尚不完全清楚。

本课题组前期对吴茱萸汤中改善偏头痛的有效成分^[3]和吴茱萸汤外翻肠囊吸收的可检测原型成分与药效间的相关性^[4]进行了研究, 结果发现柠檬黄素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (limocitrin-3-*O*- β -*D*-glucoside, Lcs)、人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁, Rg₁)、人参皂苷 Re (ginsenoside Re, Re)、人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁, Rb₁)、吴茱萸苦素 (rutaevin, Rv)、柠檬苦素 (limonin, Li)、吴茱萸碱 (evodiamine, Ev)、6-姜辣素 (6-gingerol, 6-Gi) 和吴茱萸次碱 (rutaecarpine, Ru) 对偏头痛药效指标具有不同程度的影响, 但 2 种谱效相关实验得到的部分成分的作用趋向相反, 如 Rb₁ 在吴茱萸汤中含量越高对药效越好, 但在外翻肠囊吸收谱效相关研究中却显示 Rb₁ 进入肠囊越少对药效越有利。考虑外翻肠囊吸收属于离体实验, 可能导致结果与实际情况不同, 因此, 本研究进一步采用单向在体肠灌流方法, 对吴茱萸汤中上述成分肠吸收量与药效间的相关性进行探究。

除上述成分外, 吴茱萸汤作为水煎剂仍含有其他复杂成分, 成分间可能在体内过程中存在协同或拮抗作用, 并影响疗效。这些成分治疗偏头痛的作用机制和成分间的相互影响尚未明确, 因此, 本实验采用网络药理学方法对吴茱萸汤中包括上述成分在内的活性成分和作用靶点等进行推测, 为明确吴茱萸汤治疗偏头痛的药效成分和机制研究提供新的思路和视角。

1 材料

1.1 仪器与材料

BT100-1L 蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); Agilent 1100 系列高效液相色谱系统 (Agilent 公司); MG-2200 氮吹仪 (EYELA 公司); ALPHA 1-2 PLUS 冷冻干燥机 (Christ 公司, 德国)。

1.2 药品与试剂

利血平注射液 (规格 1 mg : 1 mL, 批号 1509071, 广东邦民药业有限公司), 琥珀酸舒马曲坦片 (以琥珀酸舒马曲坦计 100 mg/片, 批号 4G6919T, 天津华金药业有限公司), 一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 和考马斯亮蓝试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。Ev (批号 110801-200908, 质量分数 99.7%)、Ru (批号 110801-201207, 质量分数 99.4%)、Li (批号 110801-201205, 质量分数 88.5%)、Rg₁ (批号 110703-201128, 质量分数 93.4%)、Re (批号 110754-201123, 质量分数 89.1%)、Rb₁ (批号 110704-201223, 质量分数 95.9%)、6-Gi (批号 111833-201102, 质量分数 98.6%), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院; Lcs (自制, 质量分数 $\geq 95\%$); 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)

(批号 BCBP2642V, 质量分数 $\geq 98\%$)、5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA, 批号 BCBP2642V, 质量分数 $\geq 98\%$)、多巴胺 (dopamine, DA, 批号 H8502-5G, 质量分数 $\geq 98\%$)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE, 批号 H7752-250MG, 质量分数 $\geq 97\%$)、内标物 3,4-二羟基苄胺 (3,4-dihydroxy-benzylamine, 3,4-DHBA, 批号 16290-26-9, 质量分数 98%), 以上对照品及内标物均购自 Sigma 公司; 乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯) 均购自 ThermoFisher 公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 7~8 周龄, 体质量 280~320 g, 合格证号为 SCXK (京) 2016-0011; SPF 级 ICR 小鼠, 雌雄各半, 7~8 周龄, 体质量 28~32 g, 合格证号为 SCXK (京) 2012-0001, 均购自维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养在室温 (25±2) °C、湿度 (50±10) %、自由摄食和饮水并暴露于 12 h 的光/暗交替环境中。动物实验经首都医科大学动物伦理委员会批准 (伦理编号 AEEI-2014-128), 实验结束采用颈椎脱臼法处死动物。

1.4 吴茱萸汤的制备

吴茱萸、人参、生姜、大枣饮片收集自不同产地 (表 1), 均由首都医科大学中医药学院中药资源教研室罗容教授鉴定为芸香科植物 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实, 符合《中国药典》2020 年版规定。各药材按照文献方法^[3]加水煎煮, 共获得 10 种吴茱萸汤, 质控指标见表 2, 药液减压干燥成干膏, 使用前复溶。

2 方法

2.1 大鼠单向在体肠灌流实验

2.1.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 洗脱梯度如表 3 所示, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 体积流量 1 mL/min。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取适量各对照品, 以甲醇配制成不同质量浓度的混合对照品溶液, 取混合对照品溶液 100 μL, 加入 K 氏缓冲液 (Kreb-Ringer, KR) 100 μL, 混匀后氮气吹干, 100 μL 甲醇复溶, 离心取上清, 20 μL 进样分析。

2.1.3 供试品溶液的制备 取相当于生药量 3.5 g 吴

表 1 10 种吴茱萸汤饮片组成

Table 1 Medicinal slices in 10 kinds of Wuzhuyu Decoction

编号	生药量/ (g·mL ⁻¹)	饮片来源			
		吴茱萸	生姜	人参	大枣
1	2.205	广西	河北	吉林万良	新疆-1
2	1.470	湖南	山东-2	吉林抚松-2	陕西
3	0.735	广西+浙江-1 各半	河北	吉林抚松-3	新疆-2
4	0.735	广西	山东-3	不详	河北
5	2.205	江西-1	山东-2	吉林抚松-1	陕西
6	1.470	浙江-1	山东-4	吉林-3	新疆-2
7	0.735	湖南	山东-3	吉林万良-2	河北
8	2.205	广西	山东-4	吉林-2	北京
9	1.470	江西-2	山东-1	吉林-4	北京
10	1.470	浙江-2	山东-1	吉林-1	新疆-1

表 2 10 种吴茱萸汤中 9 种成分含量

Table 2 Contents of nine ingredients in 10 kinds of Wuzhuyu Decoction

汤号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)								
	Lcs	Rg _I	Re	Rb _I	Rv	Li	6-Gi	Ev	Ru
WZYD-1	0.427	1.234	0.705	1.639	0.857	0.346	0.099	0.105	0.071
WZYD-2	0.070	0.353	0.195	0.534	2.636	1.115	0.088	0.162	0.027
WZYD-3	0.066	0.220	0.091	0.122	0.135	0.530	0.022	0.027	0.008
WZYD-4	0.044	0.252	0.100	0.240	1.321	0.764	0.032	0.029	0.007
WZYD-5	0.283	0.798	0.347	0.860	7.928	2.523	0.156	0.313	0.065
WZYD-6	0.341	0.476	0.221	0.521	0.456	0.223	0.057	0.095	0.043
WZYD-7	0.042	0.209	0.130	0.152	0.994	0.455	0.047	0.085	0.012
WZYD-8	0.384	0.885	0.549	1.636	8.232	5.149	0.299	0.179	0.042
WZYD-9	0.109	0.347	0.243	0.691	2.579	1.658	0.048	0.061	0.015
WZYD-10	0.122	0.399	0.265	0.468	2.078	0.673	0.068	0.154	0.049

表 3 HPLC 含量测定梯度洗脱程序

Table 3 HPLC gradient elution procedure for content determination

时间/min	甲醇/%	乙腈/%	水/%
0	1	16	83
5	1	16	83
10	1	19	80
45	4	19	77
55	4	25	71
65	4	34	62
110	4	34	62

茱萸汤干膏, 加入 20 mL 甲醇超声 30 min, 滤过蒸干, 色谱甲醇复溶并定容至 5 mL, 10 μL 进样分析。

2.1.4 标准曲线的制备及线性关系考察 取各对照品溶液,以甲醇配制成不同质量浓度的混合对照品溶液,用 0.45 μm 滤膜滤过,按照“2.1.1”项下色谱条件进样 20 μL 。线性关系考察同文献结果^[3]。

2.1.5 准确度、精密度、稳定性及回收率考察 参考文献方法^[4]对 HPLC 测定方法的准确度与精密度及样品的稳定性、提取回收率进行考察。准确度 RSD 均小于 15%,日内精密度及日间精密度 RSD 均小于 10%,稳定性试验结果偏差在 $\pm 5\%$ 以内,结果均符合生物样品分析要求。

2.1.6 在体肠灌流样品的制备 参照文献方法^[5]配制 KR 缓冲液。称取“1.4”项中吴茱萸汤煎液的干燥粉末,用 KR 缓冲液配制相应生药浓度的在体肠灌流吸收实验样品溶液,为防止沉淀堵塞肠管,预先进行离心(3000 r/min 离心 10 min),取上清液进行灌流。

2.1.7 单向在体肠灌流模型的制备及吸收样品处理 参考文献方法^[4]制备大鼠在体肠灌流模型并进行灌流液样品的取样。吸收样品溶液的制备:将各样品冷冻干燥后,每 200 μL 样品加甲醇 500 μL ,涡旋混合 30 s,超声 30 min,3000 r/min 离心 5 min,取上层清液。上清液用氮气吹干,每 200 μL 样品残渣加甲醇 100 μL ,涡旋混合 30 s,超声 5 min。样品用针头过滤器滤过,吸取 10 μL 注入 HPLC 仪,按照“2.1.1”项色谱条件进行分析。单向在体肠灌流单位面积累积吸收量(M)计算方法公式如下。

$$M = V \times [C_{\text{in}} - C_{\text{out}} \times (V_{\text{out}}/V_{\text{in}})] \times 15 / (a \times b)$$

M 为药物的累积吸收量, C_{in} 为供试液浓度, C_{out} 为收集液样品浓度, V_{out} 为收集液体积, V_{in} 为供试液体积, a 和 b 为肠段长度 (cm) 和周长 (cm)

实验中检测的是药液中的原型成分,计算出的是经过肠道后药液中消失成分的量,将其看作被吸收的量,实际上不仅包含被吸收的成分,也可能包含经肠道代谢的成分。为了简便描述,本研究均称作吸收量。

2.2 小鼠偏头痛实验

2.2.1 小鼠偏头痛模型的制备、分组及给药 将小鼠分为 14 组,每组 12 只,包括对照组、假手术组、模型组、阳性药(舒马曲坦, 5.83 mg/kg)组及 10 组吴茱萸汤治疗组。给药体积均为 20 mL/kg。吴茱萸汤组采取预防加治疗的给药模式,实验开始第 1 天按 0.2 mL/10 g 体质量 ig 给予相应吴茱萸汤 1 次/d,对照组、假手术组、模型组每天 ig 给予等剂

量蒸馏水,阳性药组仅进行治疗给药,从第 6 天起 ig 舒马普坦。参考文献方法^[3]制备小鼠偏头痛模型:第 6~13 天,各给药组小鼠 sc 0.172 mg/kg 利血平 1 次/d,假手术组和对照组 sc 等量生理盐水;第 14 天小鼠用 3%水合氯醛(450 mg/kg)麻醉,剪开头部皮肤,在前囟下 2 mm、矢状缝右侧 2 mm 处钻一孔,剪尾取自体血液,自钻孔处注射 2 μL 自体血液于大脑皮层,深度 1 mm,手术结束后用骨蜡止血,青霉素抗炎,缝合创面,假手术组只钻孔不埋血块,对照组不做处理。第 15~21 天各组继续 ig 给药。第 21 天,各组小鼠麻醉、处死,取心脏混合血液及全脑。

2.2.2 单胺类神经递质及 NO 含量、NOS 活力的测定方法 参考文献方法^[3]将脑组织匀浆、离心,测定单胺类神经递质;按照试剂盒说明书进行脑组织及血清中 NO 含量、NOS 活力的测定。

2.3 统计方法

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.4 在体肠灌流吸收量与药效指标相关分析方法

采用 Minitab 17.0 (17.1.0.0) 中的偏最小二乘回归方法 (partial least squares regression, PLSR),将各成分总吸收量分别与药效指标进行相关分析,根据回归系数大小辨识在体肠灌流吸收成分中影响药效指标的主要成分。使用 Matlab 12.0 R2012b (8.0.0.783) 编写的程序计算熵值,作为各药效指标在综合药效中的权重。对同一成分与各药效指标的回归系数、各药效指标熵值权重的乘积求和,作为该成分对综合药效的作用趋势。

2.5 网络药理学研究

2.5.1 吴茱萸汤活性成分的筛选 由于中药成分复杂,吴茱萸汤中除上述已测定成分外,尚有大量未测定成分,故本研究利用 TCMSP (<https://tcmssp.com/tcmssp.php>) 数据库^[6]和 TCMIP (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/>) 数据库^[7]对吴茱萸汤 4 种中药的化学成分进行收集汇总和筛选,去除重复成分。

2.5.2 潜在活性成分作用靶点的预测 为了获得吴茱萸汤潜在活性成分的作用靶点,除利用 TCMSP、TCMIP 数据库检索外,还采用 SwissTargetPrediction^[8] (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>) 和 Similarity Ensemble Approach (SEA)^[9] (

bkslab.org/) 对上述成分的作用靶点进行预测, 建立吴茱萸汤潜在活性成分作用靶点数据库。

2.5.3 偏头痛疾病治疗相关靶点的收集 在 TTD^[10] (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中, 检索获得偏头痛疾病治疗相关靶点信息。利用 UniProt 数据库将获得的所有靶点标准化, 绘制吴茱萸汤潜在活性成分作用靶点与偏头痛疾病治疗靶点的韦恩图, 获得交集靶点用于后续分析。

2.5.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-protein interactions, PPI) 网络的构建 利用 Stringv11.0^[11] (<https://string-db.org/>) 构建吴茱萸汤和偏头痛交集靶点的 PPI 关系网络, 并对网络进行拓扑学分析, 按照拓扑参数平均最短路径 (average shortest path length)、接近中心性 (closeness centrality)、度 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 的平均值为标准, 筛选获得关键靶点。

2.5.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析 利用 DAVID 对获得的交集靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析, 其中以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 认为结果具有显著性。通过上述分析, 以深入了解吴茱萸汤治疗偏头痛涉及的生物过程和信号通路。

2.5.6 网络构建 根据药物 (drug)、成分 (ingredient)、靶点基因名称 (gene name) 之间以及靶点与信号通路之间的相互作用, 建立信息网络, 利用 Cytoscapev 3.8.0 (www.cytoscape.org) 对此网络进行可视化分析, 同时, 构建靶点-信号通路网络图, 明确信号通路与靶点之间的相关关系。

2.5.7 成分-靶点分子对接验证 选择“中药-成分-靶点”网络中的关键靶点和成分, 利用 Discovery Studio 2020 软件进行分子对接, 验证关键靶点与成分之间的结合活性。从 Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载活性成分的 3D 结构的 SDF 文件, PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载靶点蛋白的 3D 结构的 PDB 文件。通过虚拟筛选中的精准分子对接程序 CDocker 模块进行计算, 将原配体对接到各自的活性口袋中, 计算初始复合物中原配体的分子构象与对接后的分子构象的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD), 以 $RMSD \leq 2.0$ 证明对接所得分子构象可以在一定程度上还原配体与受体的结合模式。将吴

茱萸汤活性成分对接进入先前定义好的活性口袋中, 以对接能作为对接分值的打分指标, 对接能的负值越大, 说明受体与活性成分的对接亲和力越大, 活性也越高^[12], 按照原配体与受体对接分值的 80% 作为阈值, 对活性成分和原配体与靶点的结合能力大小进行预测和排序, 选择对接打分值高于阈值且作用模式与原配体-受体作用模式近似的化合物作为靶标的潜在抑制剂^[13]。

3 结果

3.1 单向在体肠灌流吸收谱效相关结果

3.1.1 单向在体肠灌流吸收谱 实验结果显示不同吴茱萸汤中 9 种成分在肠灌流过程中均可被吸收, 结果见表 4。各组吴茱萸汤中由于成分配比不同, 导致同一种成分的吸收量相差较大, 这也使中药复方的研究更加的复杂化。

3.1.2 单胺类神经递质及 NO、NOS 的测定结果 利血平耗竭偏头痛小鼠模型药效结果如表 5 所示, 与对照组和假手术组相比, 造模后小鼠 5-HT、5-HIAA、NE、多巴胺的水平显著降低 ($P < 0.01$), 脑中 NO、NOS (NO-b、NOS-b) 和血清中 NOS (NOS-p) 的水平显著升高 ($P < 0.01$); 血清中 NO (NO-p) 的水平显著降低 ($P < 0.01$)。吴茱萸汤组或阳性药组小鼠除 DA 外, 各指标均得到一定改善。

3.1.3 谱效相关分析结果 各药效指标与在体肠灌流吸收量的 PLSR 结果见表 6。其中正数表示各成分在体吸收量与药效指标呈正相关关系, 负数反之。其中药物成分在 5-HT、5-HIAA、NE、DA 及血清 NO 指标中的回归系数为正, 表示该成分对偏头痛改善具有正向作用, 为负表示呈负向作用; 药物成分在脑组织 NO 及血清与脑组织 NOS 指标中, 回归系数为正表示该成分在体吸收量对偏头痛改善具有正向作用, 为负表示具有正向作用。综合趋势可见, 在各药效指标中, 成分在体吸收越多, 疗效越好的前 3 位成分为 Rv、Lcs、Ru, 成分在体吸收越少, 疗效越好的前 3 位成分为 6-Gi、Ev、Rg₁。

通过上述结果发现, 各成分对不同药效指标存在不同的作用趋势, 表明这些成分对偏头痛的治疗均具有一定的疗效, 然而中药水煎液成分复杂, 除上述成分外仍有大量未进行研究的成分, 并且这些成分的作用靶点尚不明确, 若对所有靶点逐一验证可行性较低, 因此, 本研究采用网络药理学的方法, 利用数据库和软件检索、计算、分析的方法, 快速有效的筛选出药物的有效成分和作用靶点。

表 4 10 种吴茱萸汤 9 种成分单向肠灌注单位面积吸收量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Absorption per unit area of nine kinds of ingredients in 10 kinds of Wuzhuyu Decoction by single pass intestinal perfusion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

吴茱萸汤	Lcs/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Rg1/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Re/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Rb1/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Rv/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
WZYD-1	4.289±2.472	2.944±1.376	1.587±1.042	2.104±2.297	3.798±0.932
WZYD-2	7.752±3.357	1.632±0.845	0.582±0.402	2.104±0.454	2.101±0.320
WZYD-3	4.815±1.851	3.177±1.290	2.113±0.375	0.902±0.560	2.101±0.593
WZYD-4	1.898±0.782	0.558±0.193	0.727±0.243	0.296±0.213	0.048±0.017
WZYD-5	10.160±2.952	3.545±1.347	1.592±0.921	1.501±0.811	1.447±0.387
WZYD-6	0.388±0.219	3.173±0.808	2.098±0.572	2.341±1.185	4.211±0.943
WZYD-7	3.323±1.303	3.170±0.531	1.120±0.152	0.740±0.207	0.657±0.184
WZYD-8	5.201±3.875	2.501±1.079	0.378±0.351	2.123±1.343	2.722±1.418
WZYD-9	18.205±9.476	16.929±7.117	10.812±4.030	5.772±3.699	4.214±2.987
WZYD-10	1.386±0.445	1.824±0.241	0.457±0.061	1.023±0.374	0.489±0.057
吴茱萸汤	Li/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	6-Gi/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Ev/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Ru/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	
WZYD-1	2.792±0.803	0.814±0.204	0.473±0.122	0.292±0.063	
WZYD-2	2.672±0.570	0.950±0.092	0.188±0.104	0.050±0.013	
WZYD-3	0.900±0.256	0.452±0.080	0.095±0.035	0.045±0.007	
WZYD-4	0.533±0.202	0.587±0.167	0.081±0.096	0.034±0.011	
WZYD-5	2.392±0.404	0.620±0.124	0.080±0.020	0.069±0.029	
WZYD-6	3.036±0.533	0.540±0.095	0.524±0.151	0.114±0.024	
WZYD-7	0.285±0.076	0.402±0.046	0.056±0.014	0.038±0.005	
WZYD-8	1.122±0.956	0.265±0.151	0.091±0.066	0.097±0.036	
WZYD-9	6.610±4.814	0.894±0.526	0.338±0.267	0.135±0.140	
WZYD-10	0.409±0.249	0.431±0.105	0.087±0.010	0.029±0.004	

3.2 网络药理学结果

3.2.1 吴茱萸汤中抗偏头痛潜在活性成分 共获得 112 种活性成分, 其中吴茱萸中独有成分 39 种、人参独有成分 27 种、大枣独有成分 26 种、生姜独有成分 14 种、大枣和人参共有成分 2 种、大枣和吴茱萸共有成分 2 种、大枣、人参、生姜共有成分 1 种, 4 味药物共有成分 1 种, 即 β -谷甾醇 (β -sitosterol)。在多项体内外研究中已证明, β -谷甾醇具有镇痛、抗炎、镇静、抗焦虑等作用^[14]。含有该成分的杜鹃花科植物 *Arbutus andrachne* L. 叶甲醇提取物也对小鼠疼痛模型表现出明显的镇痛作用^[15]。

3.2.2 吴茱萸汤治疗偏头痛的靶点 共得到了 1517 个潜在活性成分作用靶点和 278 个偏头痛治疗靶点。绘制韦恩图共获得 112 个吴茱萸汤治疗偏头痛的作用靶点 (图 1)。

3.2.3 PPI 网络的构建及拓扑分析 通过 STRING 数据库, 构建吴茱萸汤治疗偏头痛靶点的 PPI 网络,

其中靶点碳酸酐酶 14 (Carbonic anhydrase 14, CA14)、蛋白酶体组装伴侣 1 (Proteasome assembly chaperone 1, PSMG1) 与其他 110 个靶点之间未获得相互作用的证据, 结果如图 2-A 所示。将 PPI 数据导入 Cytosape 软件中, 其中节点 (nodes) 110 个, 边 (edges) 882 条。按照平均最短路径 ≤ 2.28 , 接近中心性 ≥ 0.45 , 度 ≥ 15.02 , 介数中心性 ≥ 0.012 , 筛选出 31 个关键靶点, 如图 2-B 所示。如血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 可能与其他 46 个靶点相关, 淀粉样 β 蛋白 A4 蛋白 (amyloid-beta A4 protein, APP) 可能与其他 45 个靶点相关, 这些与其他靶点关系密切, 在整个调节网络中起到枢纽的作用, 可能是吴茱萸汤治疗偏头痛的关键靶点。

3.2.4 GO 及 KEGG 富集分析 为了确定 112 个交集靶点抗偏头痛的作用机制, 利用 DAVID 数据库对这些靶点进行了 GO 富集分析, 以阐明相关的生

表 5 各小鼠单胺类神经递质和血管活性物质的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 5 Contents of monoamine neurotransmitters and vasoactive substances in mice of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	5-HT/(ng·g ⁻¹)	5-HIAA/(ng·g ⁻¹)	DA/(ng·g ⁻¹)	NE/(ng·g ⁻¹)
假手术	643.110±107.014 ^{▲▲}	377.310±89.668 [▲]	386.223±128.718 ^{▲▲}	439.004±57.942 ^{▲▲}
对照	664.526±63.861	401.609±81.283 ^{▲▲}	391.039±94.181	442.259±46.713
模型	337.785±84.504 ^{△△}	301.904±54.414 ^{△△}	242.075±158.621 ^{△△}	171.173±65.172 ^{△△}
阳性药	417.810±92.491 ^{▲▲}	386.022±115.267 [▲]	259.308±104.721	188.654±25.649
WZYD-1	427.344±86.341 [▲]	424.598±62.161 ^{▲▲}	238.002±83.673	222.491±37.219 ^{▲▲}
WZYD-2	526.862±95.044 ^{▲▲}	488.519±107.66 ^{▲▲△△}	282.070±115.021	225.873±40.351 ^{▲▲}
WZYD-3	443.495±96.816 [▲]	392.581±65.142 ^{▲▲}	234.888±83.549	177.888±35.760
WZYD-4	443.097±63.413 [▲]	393.811±60.828 ^{▲▲}	244.404±126.079	196.890±43.600
WZYD-5	496.664±152.423 ^{▲▲}	504.176±77.892 ^{▲▲△△}	267.604±132.124	224.429±47.589 ^{▲▲}
WZYD-6	492.962±78.320 [▲]	432.545±71.805 ^{▲▲}	256.052±84.982	195.196±46.363
WZYD-7	433.650±107.179 [▲]	398.836±108.244 ^{▲▲}	338.159±141.715	191.963±33.028
WZYD-8	502.575±133.067 ^{▲▲}	459.894±54.514 ^{▲▲△}	301.118±129.806	240.470±55.478 ^{▲▲}
WZYD-9	486.512±72.174 ^{▲▲}	491.213±85.024 ^{▲▲△△}	298.839±104.626	239.249±53.514 ^{▲▲}
WZYD-10	496.519±123.627 ^{▲▲}	442.538±67.939 ^{▲▲}	305.776±107.064	215.693±82.047 [▲]
组别	NO-b/(μmol·g ⁻¹)	NOS-b/(μmol·g ⁻¹)	NO-p/(μmol·L ⁻¹)	NOS-p/(μmol·L ⁻¹)
假手术	0.204±0.090 ^{▲▲}	0.274±0.176 ^{▲▲}	6.541±3.020	41.382±3.429 ^{▲▲}
对照	0.206±0.094	0.257±0.220	8.992±5.197	39.895±4.912
模型	0.425±0.184 ^{△△}	0.719±0.477 ^{△△}	3.705±3.098 ^{△△}	50.688±8.132 ^{△△}
阳性药	0.252±0.137 [▲]	0.442±0.215 ^{▲▲}	3.770±3.163	42.934±5.046 ^{▲▲}
WZYD-1	0.264±0.111 ^{▲▲}	0.301±0.216 ^{▲▲}	47.712±28.203 ^{▲▲}	41.957±6.928 [▲]
WZYD-2	0.252±0.087 ^{▲▲}	0.357±0.237 ^{▲▲}	48.057±25.602 ^{▲▲}	43.453±5.200 [▲]
WZYD-3	0.334±0.218	0.301±0.212 ^{▲▲}	8.146±6.227	42.906±4.442 ^{▲▲}
WZYD-4	0.233±0.117 ^{▲▲}	0.295±0.194 ^{▲▲}	4.750±4.414	47.639±10.730
WZYD-5	0.264±0.082 ^{▲▲}	0.416±0.244 ^{▲▲}	17.935±6.520 [▲]	40.065±6.370 ^{▲▲}
WZYD-6	0.242±0.102 ^{▲▲}	0.255±0.181 ^{▲▲}	16.952±12.444 [▲]	39.848±2.443 ^{▲▲}
WZYD-7	0.343±0.159	0.320±0.218 ^{▲▲}	13.106±10.452	44.307±6.753 [▲]
WZYD-8	0.279±0.137 ^{▲▲}	0.361±0.436 ^{▲▲}	25.621±16.644 ^{▲▲}	45.440±7.591 [▲]
WZYD-9	0.215±0.103 ^{▲▲}	0.408±0.275 ^{▲▲}	20.727±16.112 ^{▲▲}	46.103±5.701
WZYD-10	0.274±0.169 ^{▲▲}	0.322±0.301 ^{▲▲}	16.545±11.290 [▲]	42.852±6.026 ^{▲▲}

与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; NO-b、NOS-b 代表脑中 NO、NOS 含量 NO-p、NOS-p 代表血清中 NO、NOS 含量

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group; NO-b and NOS-b represent NO and NOS content in brain NO-p and NOS-p represent NO and NOS content in serum

表 6 药效指标与在体肠灌注吸收量的 PLSR 分析结果

Table 6 Partial least-squares regression analysis of pharmacodynamic indexes and intestinal perfusion absorption *in vivo*

药效指标	熵值权重	Lcs	Rg ₁	Re	Rb ₁	Rv	Li	6-Gi	Ev	Ru
5-HT	0.135 4	0.651	-0.007	-1.312	0.032	0.298	0.351	-0.639	-0.943	0.640
5-HIAA	0.159 4	2.370	-1.097	-0.168	1.285	1.551	0.233	-1.557	-1.385	0.710
DA	0.131 1	-0.459	0.002	-0.086	-0.089	0.195	0.809	-0.945	0.244	-0.226
NE	0.116 5	2.528	-1.943	0.262	1.582	0.550	0.985	-1.273	-1.56	0.991
NO-b	0.104 9	-0.424	1.159	-0.881	-0.256	-1.156	0.960	-0.236	0.515	0.260
NOS-b	0.109 9	3.138	-1.129	-0.425	1.893	1.103	1.075	-1.696	-1.486	1.103
NO-p	0.136 4	-0.062	-0.208	0.212	-0.282	0.141	-0.152	-0.190	-0.039	0.616
NOS-p	0.106 4	-1.363	-0.903	1.193	-0.481	-1.034	0.839	1.198	0.292	-0.530
综合趋势		0.537	-0.332	-0.144	0.213	0.507	-0.023	-0.549	-0.425	0.278

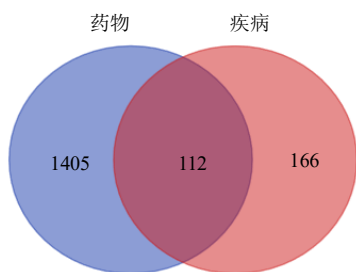


图 1 吴茱萸汤潜在活性成分作用靶点与偏头痛治疗靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of potential targets of active ingredient in Wuzhuyu Decoction and targets of migraine therapy

生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (Molecular function, MF)。结果 3 者分别富集到 118、21、21 个条目, 利用 bioinformatics 在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 将各部分的前 10 个条目绘制气泡图 (图 3), 气泡越大, 富集的靶点越多; 气泡颜色越红, 校正后 P 值越小, 表示更高的可信度和重要性。其中 BP 中富集最显著的包括化学突触传递、对药物的反应、磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体信号通路、促进钙离子释放入胞浆、血管收缩等。CC 富集最显著的包括细胞膜的整体部分、细胞质膜、神经树突、膜筏、神经突起等。MF 富集最显

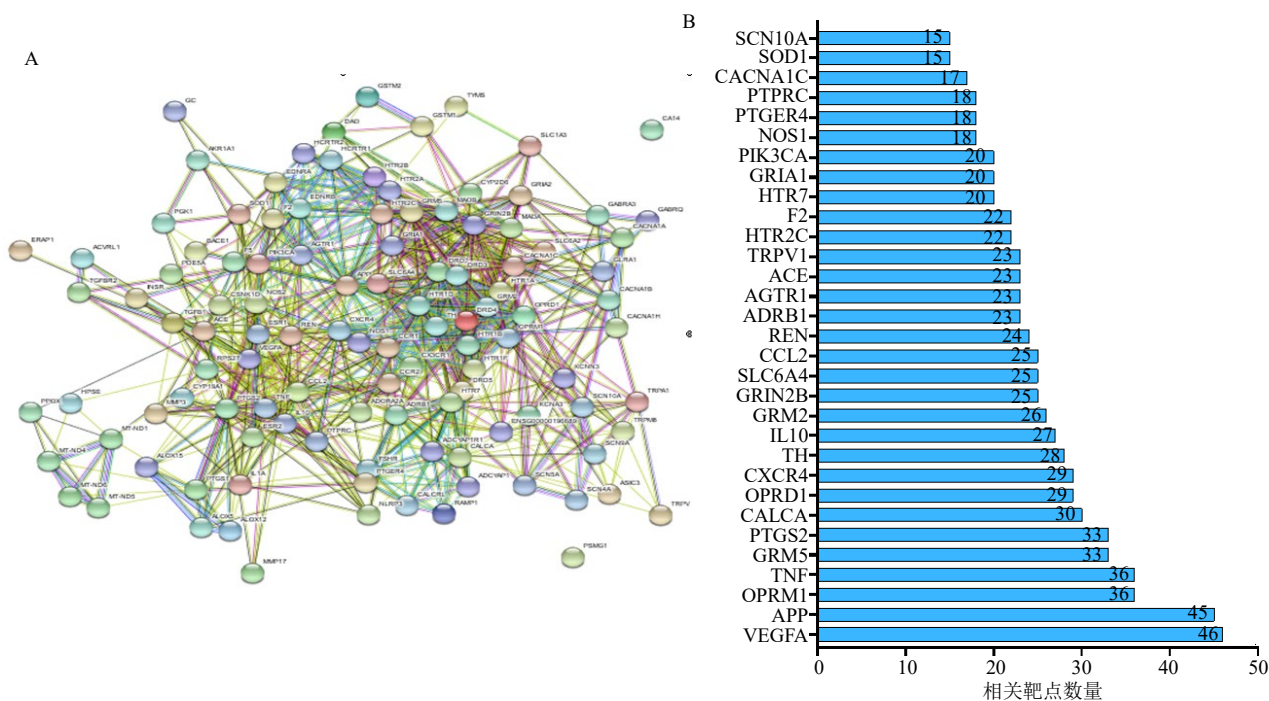


图 2 吴茱萸汤治疗偏头痛作用靶点的 PPI 网络图 (A) 及关键靶点 (B)

Fig. 2 PPI network map (A) and key targets (B) of Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine

著的包括血清素结合、神经递质受体活性、G 蛋白偶联血清素受体活性、药物结合、多巴胺结合等。结果显示, 吴茱萸汤治疗偏头痛主要涉及神经元膜蛋白相关的配体-受体结合, 从而影响神经信号传导, 发挥有效的治疗作用。

利用 DAVID 数据库, 对吴茱萸汤治疗偏头痛的靶点进行 KEGG 通路富集, 共富集到 24 条信号通路, 见图 4。图中圆形代表靶点, 箭头代表信号通路, 面积越大、颜色越深, 代表该靶点参与的通路或通路涉及的靶点均越多, 说明其在网络中越重要。其中校正 $P < 0.01$ 的有 14 条, 如图 5 所示, 条

形越长, 代表该信号通路越重要, 排名前 3 的信号通路分别是神经活性配体受体相互作用、5-HT 能突触信号通路、钙信号通路, 均涉及神经递质和突触信号传导, 提示吴茱萸汤治疗偏头痛的作用机制可能是通过调节神经信号的传导而发挥作用的。

3.2.5 中药-成分-靶点网络构建及分析 采用 Cytoscape 构建中药-成分-靶点网络图, 共有 220 个节点, 1444 条边, 如图 6-A 所示。同时, 根据筛选获得的关键靶点, 反向寻找其活性成分, 从而构建吴茱萸汤治疗偏头痛的关键靶点和成分网络图, 如图 6-B 所示, 其中 81 种成分作用于 2 个及以上靶点,

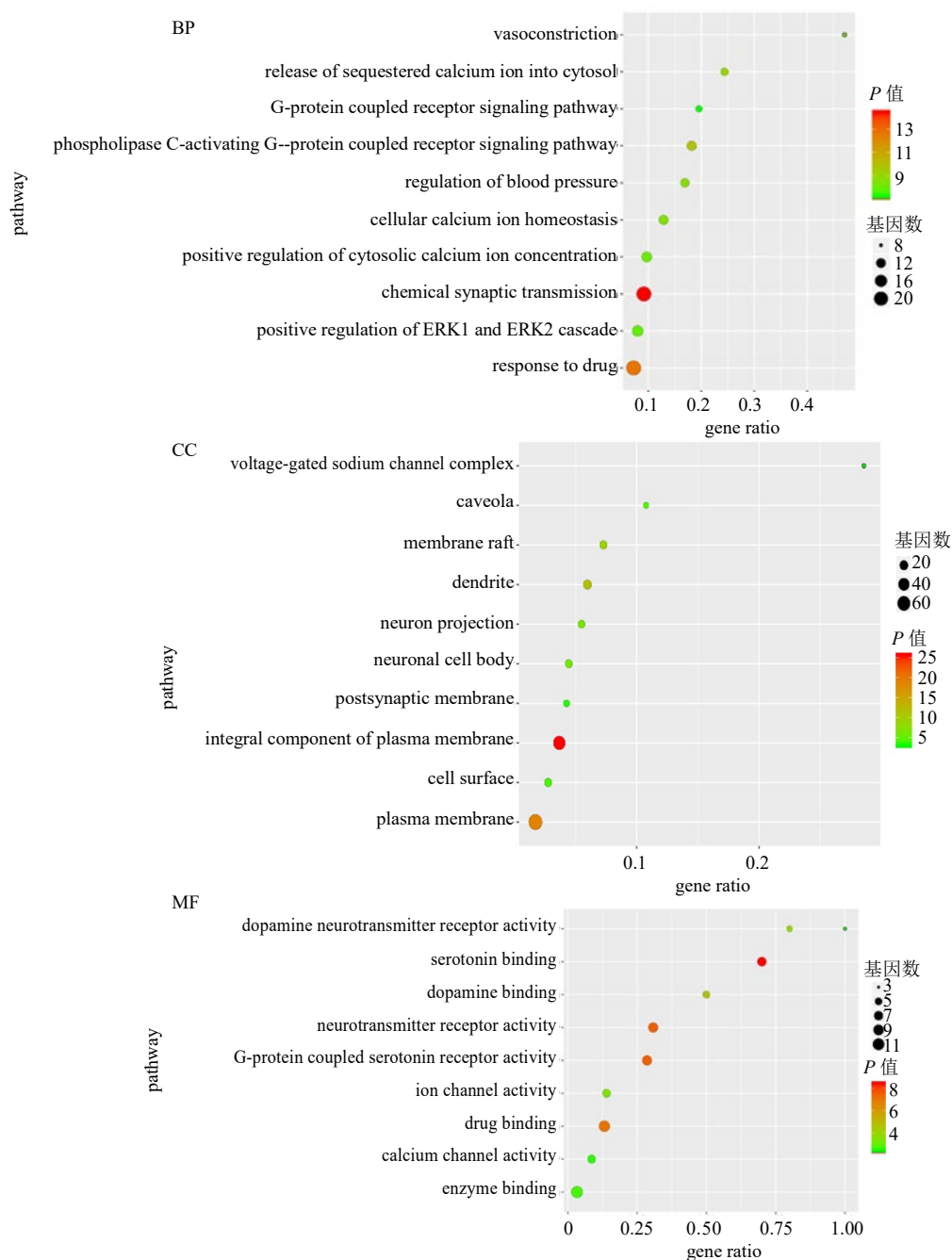


图3 吴茱萸汤治疗偏头痛靶点 GO 富集分析气泡图

Fig. 3 Bubble chart of GO enrichment analysis on potential target of Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine

提示这些成分的变化对偏头痛的治疗效果产生重要的影响。吴茱萸中的去甲吴茱萸酰胺、evodione、羟基吴茱萸碱和大枣中的左旋千金藤啶碱作用的靶点均有 9 个，这些度值较高的成分有可能在吴茱萸汤缓解偏头痛症状中发挥着相对重要的作用。

上述节点中度值较高的靶点是多种成分共同作用的部分，被刺激产生作用的可能性大，在偏头痛治疗过程中具有重要意义。吴茱萸汤中有 52 种成分

共同作用于前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 靶点，且 33 个靶点与该靶点相互作用，这个靶点是参与前列腺素合成、促进炎症反应的关键酶，抑制该酶活性可以有效抑制神经源性炎症反应。5-羟色胺转运体 (solute carrier family 6 member 4, SLC6A4)，可将 5-HT 从突触间隙运回突触前，从而终止 5-HT 的作用，有 40 种成分和 25 个靶点作用于该靶点，

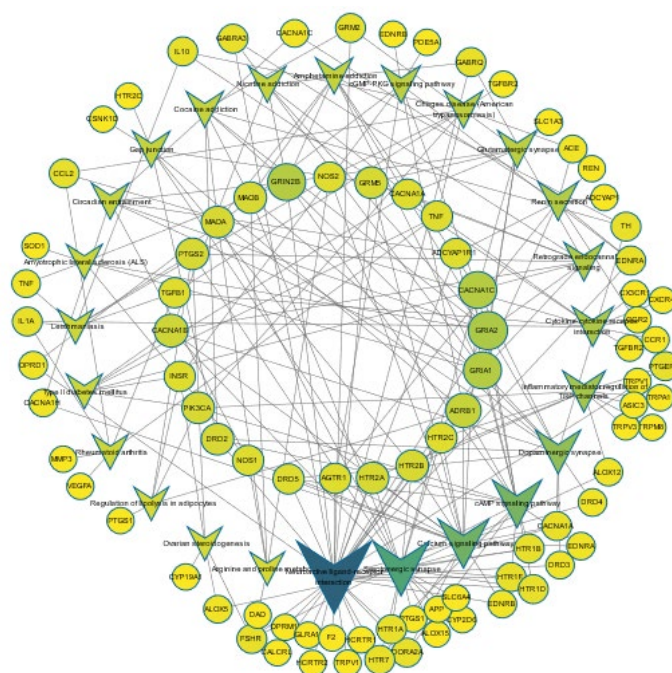


图 4 吴茱萸汤治疗偏头痛靶点与信号通路网络图

Fig. 4 Network diagram of targets and signal pathways in Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine

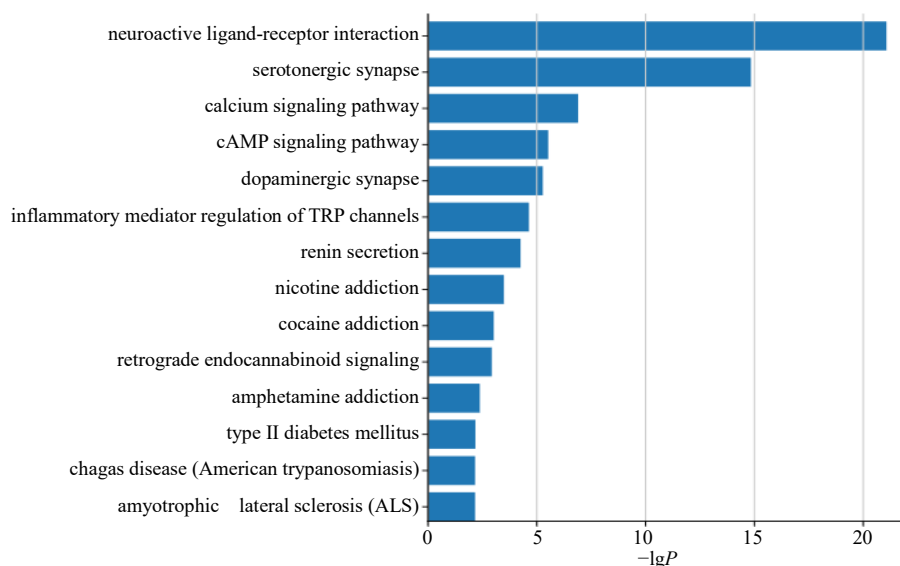
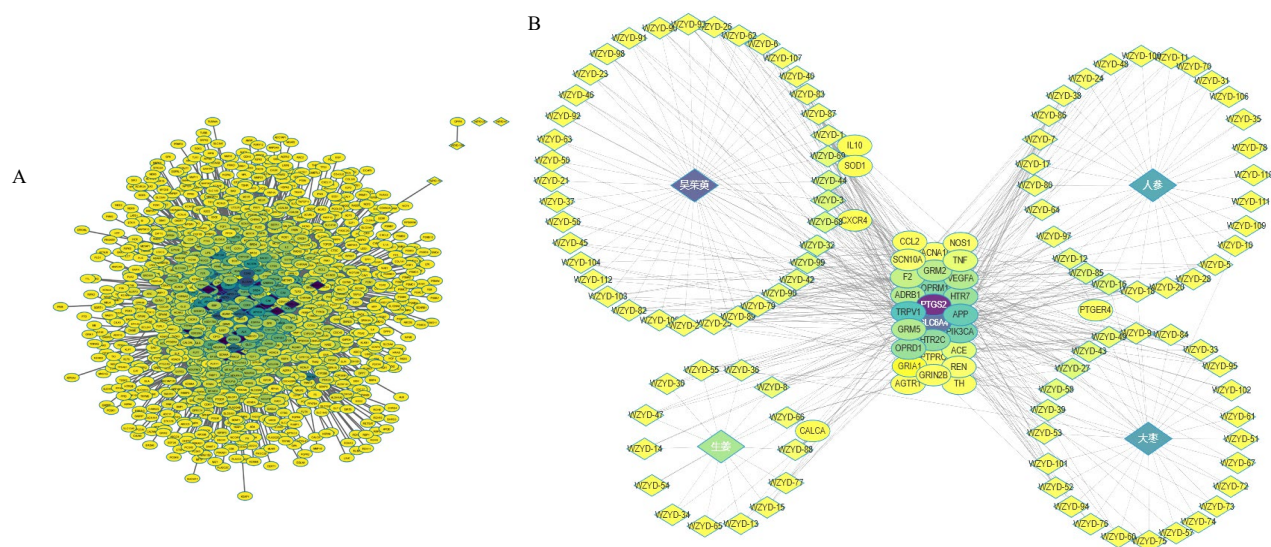


图 5 吴茱萸汤治疗偏头痛信号通路

Fig. 5 Signal pathways of Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine

抑制该靶点的作用可以有效预防偏头痛的发作，这可能是吴茱萸汤治疗和预防偏头痛的另一机制，上述实验研究结果也证实吴茱萸汤治疗后脑中 5-HT 的含量明显升高。瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)，该靶点参与炎症疼痛和痛觉敏化的调节，具有诱导降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 释放的作用，而 CGRP 是促进血管扩张和

三叉神经痛觉敏化的关键神经递质，是诱发偏头痛发作的重要因素^[16]。研究发现，山柰酚、 β -谷甾醇、槲皮素等成分可抑制 TRPV1 表达而升高热痛伤害阈值，这可能也是吴茱萸汤治疗偏头痛小鼠模型疗效显著的原因之一^[17]。从上述分析结果中可看出中药、成分、靶点之间构成了复杂网络，1 种化合物可对应多个靶点，而 1 个靶点可被多种成分影响，体现了吴茱萸汤多成分、多靶点的治疗特色。



A-中药-成分-靶点网络图 B-中药-关键靶点-关键成分网络图

A-network diagram of TCM-component-target B-network diagram of TCM-key component- key target

图 6 吴茱萸汤治疗偏头痛的中药-成分-靶点网络图

Fig. 6 Network diagram of TCM-component-target of Wuzhuyu Decoction in treatment of migraine

3.2.6 分子对接 选取关键靶点和成分网络中度值前 3 的靶点, 分别是 PTGS2 (PDBID: 1PXX)、SLC6A4 (PDBID: 5I6X)、TRPV1 (PDBID: 3SUI), 以及这些靶点对应的吴茱萸汤活性成分 52、40、26 个, 将这些成分对接到 3 个靶点的活性口袋中, 选择 CDOCKER 进行对接, 其中 3SUI 是 TRPV1 与钙调蛋白的复合物, 没有小分子化合物作为原配体, 将其对接阈值设为 0。3 个靶点获得 9、11、7 个打分值高于阈值的化合物 (表 5), 打分值最高的结合模式图见图 7。

4 讨论

临床和基础研究均证实吴茱萸汤治疗偏头痛疗效确切, 复方中不同成分及含量对药效指标具有不同程度的影响, 表明中药中多种成分之间相互作用, 协同或拮抗起效, 本研究利用单向在体肠灌流法模拟吴茱萸汤在体内吸收过程, 利用 PLSR 法对成分的吸收量和药效指标之间进行回归分析, 结果表明不同成分对药效指标有不同程度的影响, 但这些成分的作用机制并不仅限于对上述药效指标的影响, 而且吴茱萸汤中的成分也远远多于上述成分。因此, 在此基础上, 本研究又采用网络药理学的方法^[18], 从整体的角度探索药物与疾病的关联性, 强调从药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发, 这与中医整体观念、辨证论治的理论不谋而合, 从

而分析和预测吴茱萸汤抗偏头痛治疗的成分和作用机制, 为中医药治疗疾病的机制研究提供参考。

偏头痛的发作机制主要与三叉神经系统痛觉敏化有关, 同时伴有神经源性炎症、硬脑膜血管扩张。临床上常用治疗药物一类是非甾体类抗炎药, 另一类是抑制血管扩张药物, 包括 5-HT 受体激动剂和与 CGRP 相关药物。然而, 上述药物治疗偏头痛存在胃肠道溃疡出血和发生心脑血管事件的风险, 因此, 众多学者也将偏头痛的治疗药物转向传统医学, 中医药具有辨证论治和用药安全性、耐受性好等特点, 其在治疗偏头痛方面具有独特的优势^[19]。临床^[1]和基础^[20]研究均证明吴茱萸汤治疗偏头痛具有明显的疗效和安全性, 药效实验结果也表明吴茱萸汤可以有效增加脑 5-HT 和 5-HIAA 的含量, 并降低脑中 NO 水平和 NOS 活性的作用, 从而发挥治疗偏头痛的作用。结合网络药理学分析, 提示吴茱萸汤可能是通过抑制脑中 5-羟色胺转运体 (serotonin transporter, SERT) 的作用, 从而增加 5-HT 和 5-HIAA 含量, 抑制 NOS1 靶点的作用降低 NO 的含量。5-HT、5-HIAA 与血管收缩、神经突触传导关系密切, NO、NOS 与神经源性炎症、血管收缩关系密切^[21]。综上, 吴茱萸汤可能是通过抑制神经源性炎症、调节血管收缩和影响神经突触传导发挥治疗偏头痛的作用。

表 5 筛选得到的 3 个靶点的潜在活性成分信息

Table 5 Potential active ingredients of screened three targets

活性成分名称	打分值		
	PTGS2	SLC6A4	TRPV1
6-羟基木犀草素 (6-OH-luteolin)	37.703 6	—	—
棉花素 (gossypetin)	36.070 7	—	—
槲皮素 (quercetin)	33.940 4	—	—
石竹胺 (dianthramine)	31.749 8	—	—
儿茶素 [(+)-catechin]	30.212 9	—	—
山柰酚 (kaempferol)	29.648 6	—	—
灌木远志酮 A (frutinone A)	28.890 6	—	—
异鼠李素 (isorhamnetin)	28.475 1	—	—
乌药碱 (coclaurine)	28.042 0	33.132 6	—
二氢辣椒素 (dihydrocapsaicin)	—	47.545 7	—
6-姜酮酚 (6-paradol)	—	45.428 2	—
1-甲基-2-十一碳烯-4-喹诺酮 (1-methyl-2-undecyl-4-quinolone)	—	35.826 9	—
1-甲基-2-壬基-4 喹诺酮 (1-methyl-2-nonyl-4-quinolone)	—	33.266 7	—
苯代南蛇碱/南蛇藤苯甲酰胺碱 (celabenzine)	—	30.712 9	—
吴茱萸酰胺乙 (goshuyamide II)	—	30.555 3	—
吴茱萸酰胺 (evodiamide)	—	26.556 7	—
5-甲氧基- <i>N,N</i> -二甲基色胺 (<i>N,N</i> -dimethyl-5-methoxy tryptamine)	—	25.877 2	10.928 5
左旋千金藤啶碱 (stepholidine)	—	22.545 7	—
吴茱萸卡品碱 (evocarpine)	—	21.143 9	—
<i>N</i> -反式-阿魏酰酪胺 (moupinamide)	—	—	22.852 5
4-姜酚 (4-gingerol)	—	—	19.266 4
姜酮 (zingerone)	—	—	18.632 2
吴茱萸碱 (evodiamine)	—	—	4.832 3
2,5-二甲基-7-羟基色酮 (2,5-dimethyl-7-hydroxy chromone)	—	—	4.253 3
二氢吴茱萸次碱 (dihydrorutaecarpine)	—	—	3.203 7

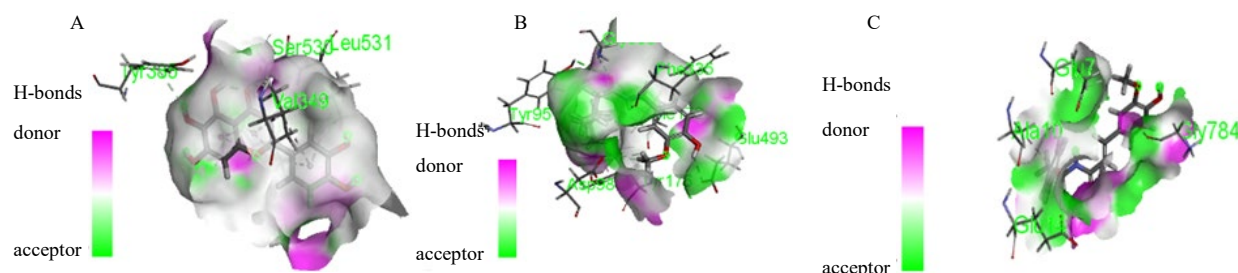
A-6-羟基木犀草素与 PTGS2 B-二氢辣椒素与 SLC6A C-*N*-反式-阿魏酰酪胺与 TRPV1A-6-hydroxyluteolin and PTGS2 B-dihydrocapsaicin and SLC6A C-*N*-trans-feruloyl tyramine and TRPV1

图 7 潜在活性成分与靶点的相互作用及药效团模型匹配图

Fig. 7 Interaction between potential active ingredients and target and pharmacophore model matching diagram

神经源性炎症是偏头痛发作的关键环节，也是其病理生理基础，除了 NO 外，前列腺素参与各种炎症反应过程，PTGS2 [也称环氧化酶-2

(cyclooxygenase 2, COX-2)] 是前列腺素合成的关键酶，其表达与炎症的严重性密切相关^[22]，研究发现偏头痛动物模型大脑中 COX-2 高表达^[23]，同样

偏头痛患者在发作期血浆 COX-2 的表达也明显高于发作间期和健康对照组^[21]。非甾体类抗炎药是广泛用于治疗偏头痛的一类物质，其作用机制就是通过改变 COX-2 活性，抑制花生四烯酸合成前列腺素，从而抑制神经源性炎症和逆转中枢敏化^[24]。通过网络药理学分析结果发现，PTGS2 与吴茱萸汤中的 52 种活性成分相关联，并影响 5-HT 能突触信号通路、逆行内源性大麻素信号通路、利什曼病、卵巢类固醇生成信号通路、脂肪细胞脂解调节这 5 条信号通路，PTGS2 在吴茱萸汤治疗偏头痛的过程中占据了重要的地位，实验研究证实吴茱萸含量较高的 2 种主要成分吴茱萸次碱、吴茱萸碱均可以有效抑制前列腺素的合成^[25-26]，这 2 种成分均对治疗偏头痛有效，吴茱萸碱在改善药效学指标方面起了重要作用^[3]。提示吴茱萸汤治疗偏头痛的关键机制之一是抑制神经源性炎症。另外，成年后女性的偏头痛的发病率是男性的 2~3 倍^[27]，表明雌孕激素与偏头痛的发作也有密切的关系，吴茱萸汤也可调节卵巢类固醇生成信号通路、脂肪细胞脂解，它们与偏头痛的病理机制相关。

另一方面，偏头痛与血管舒缩密切相关，5-HT 能信号通路和肾素分泌相关信号通路均涉及血管舒缩功能。5-HT_{1B/1D} 受体 (HTR1B/1D) 激动剂是偏头痛治疗的常用药物，具有促进血管收缩和抑制 CGRP 等神经递质释放的双重作用^[28]。吴茱萸酰胺乙、去甲吴茱萸酰胺、吴茱萸酰胺、巴婆碱、荷叶碱、aponorhyscine、5-甲氧基-*N,N*-二甲基色胺、无刺枣因 S7 可同时作用于 HTR1B 和 HTR1D 这 2 个靶点，在促进血管收缩的同时抑制三叉神经系统中行疼痛传导通路，从而阻断痛觉敏化。同时，5-HT 能信号通路涉及中枢神经突触信号传导，偏头痛患者脑中 5-HT 能神经元功能受到抑制，使 5-HT 分泌减少，导致下行痛觉易化/抑制功能失调，使三叉神经系统持续活化。通过 GO 和 KEGG 通路富集分析发现，吴茱萸汤治疗偏头痛的分子功能涉及血清素结合活性、神经递质受体活性、G 蛋白耦联的血清素受体活性，并且通过调节神经配体受体相互作用信号通路、5-HT 能神经突触信号通路、钙离子信号通路发挥作用，表明吴茱萸汤治疗偏头痛的作用机制可能是通过调节 5-HT 含量发挥作用的。其中 5-HT 转运体基因 *SLC6A4* 受到 40 种成分的共同作用，该基因的表达产物 SERT 位于突触前膜上，具有将 5-HT 转运到胞质内的作用，抑制该蛋白的活

性，可以有效增加突触间 5-HT 的浓度，发挥下行痛觉调节作用。阿米替林是三环类抗抑郁药，是最早发现具有预防偏头痛作用的药物之一，其作用机制主要是通过抑制 SERT 而发挥治疗作用的，是目前临床中具有 B 级证据的推荐预防偏头痛用药^[29]。吴茱萸汤中多种成分共同作用于该靶点，本课题组前期研究也证实吴茱萸汤治疗后脑中 5-HT 的浓度会明显升高^[3]，推测其可能通过抑制 5-HT 重摄取而发挥治疗作用。值得注意的是，KEGG 通路富集分析得到肾素分泌通路与偏头痛的治疗相关，肾素可催化血管紧张素合成，从而产生收缩血管的作用。实验显示肾素-血管紧张素系统参与与偏头痛发病有关的神经源性炎症、内皮功能障碍和伤害性传导的神经调节，使用肾素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂等有助于治疗偏头痛，临床中可用来预防偏头痛的发作^[30-31]。

在交集靶点的 PPI 网络中，VEGFA 与 15 种成分、46 个靶点相互作用，是偏头痛治疗的一个核心枢纽靶点。研究发现，偏头痛患者发作期循环血中 VEGFA 的含量较对照组明显降低^[32]，VEGFA 对内皮细胞具有保护作用，涉及血管生成、血管通透性改变等因素，其在偏头痛发作过程中会导致内皮功能障碍和心血管疾病风险的增加，同时血管通透性的改变也会引起血浆外渗，激活三叉神经等感觉神经元细胞，从而产生疼痛和痛觉敏化。

利用分子对接对 3 个关键靶点和吴茱萸汤活性成分进行分子对接，结果发现 3 个靶点与多个成分之间结合良好，说明吴茱萸汤中成分作用于这些靶点发挥治疗偏头痛的作用。研究发现，与 PTGS2 结合较好的多个成分如 6-羟基木犀草素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素等均属于黄酮类化合物，大量研究发现，黄酮类成分可通过 COX 途径，抑制 COX-2 的表达^[33]。与 SLC6A4 结合较好的成分包括喹诺酮碱和吲哚类生物碱，虽然网络药理学分析未发现吴茱萸碱与 SLC6A4 的关系，本课题组发现升高吴茱萸汤中吴茱萸碱的含量能有效增加脑中 5-HT 含量并改善偏头痛^[34]，推测其发挥治疗作用的成分有可能与其代谢产物有关。与 TRPV1 结合的成分主要是吲哚类生物碱，其中吴茱萸碱能有效抑制 TRPV1 的激活^[35]，具有明显的抑制神经病理性疼痛的作用^[36]。

网络药理学的分析中，人参中含量较大的皂苷类成分与关键靶点的作用较少，吴茱萸汤临床应用中人参用量比例较大 (10~15 g)^[37]，表明人参在

吴茱萸汤治疗疾病过程中发挥了重要的作用,大量研究发现,人参皂苷具有抑制 COX-2 等炎症因子表达的作用^[38],但是皂苷类成分具有肠道内难以吸收、生物利用度低、肠内滞留时间较长的特点,经肠道菌群代谢后可产生大量的去糖基化代谢产物^[39],这些代谢物具有多种药理作用,如抗炎、抗糖尿病、抗过敏以及神经保护等^[40]。本课题组研究发现吴茱萸汤中人参皂苷 Rb₁ 的含量与治疗偏头痛疗效呈正相关,与脑干中的分布呈负相关,因此推测人参中原型成分的作用靶点可能在脑外及肠道。这也提示网络药理学研究基于可吸收成分进行,对分析中药难吸收的成分可能发挥的作用存在一定的局限性。

综上所述,通过动物实验和网络药理学研究分析,发现吴茱萸汤治疗偏头痛可能是通过多种成分,作用于 PTGS2、SLC6A4、TRPV1 等靶点,抑制神经源性炎症并调节 5-HT 能信号通路实现的,表明网络药理学能较好地体现中药治疗疾病的特色,也为未来中医药研究提供了方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu H W, Zou Y H, Cao K G, *et al.* Efficacy of modified Wuzhuyu decoction granule for migraine patients with cold and stasis obstructing meridian syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(6): 409-414.
- [2] 刘红燕, 刘春艳. 吴茱萸汤治疗偏头痛 32 例临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2006, 15(6): 608.
- [3] Pan X Q, Wang M Y, Wu Y C, *et al.* Identification of active ingredients in Wuzhuyu decoction improving migraine in mice by spectral efficiency association [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1524-1534.
- [4] 潘学强, 吴燕川, 龚慕辛, 等. 外翻肠囊吸收成分与药效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛的药效物质 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(1): 126-133.
- [5] 吴燕川, 许永崧, 贺蕊, 等. 吴茱萸汤各成分在正常和偏头痛模型大鼠肠吸收差异的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(8): 1682-1691.
- [6] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [7] Yu Y, Zhang G, Han T, *et al.* Analysis of the pharmacological mechanism of Banxia Xiexin decoction in treating depression and ulcerative colitis based on a biological network module [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 199.
- [8] 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.
- [9] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, *et al.* Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
- [10] Wang Y X, Zhang S, Li F C, *et al.* Therapeutic target database 2020: Enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [11] Hsia C W, Ho M Y, Shui H A, *et al.* Analysis of dermal papilla cell interactome using STRING database to profile the *ex vivo* hair growth inhibition effect of a *Vinca alkaloid* drug, colchicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3579-3598.
- [12] 何堃, 燕波, 孙梦盛, 等. 基于网络药理学和分子对接法预测赭实子防治阿尔茨海默病的分子机制 [J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(7): 549-557.
- [13] 于雅楠, 陈锡欣, 刘怡, 等. 基于分子对接技术的豆科喹诺里西啶类生物碱抑制血管新生的活性成分虚拟筛选 [J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1640-1646.
- [14] Babu S, Jayaraman S. An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110702.
- [15] Jaffal S M, Oran S A, Alsalem M. Anti-nociceptive effect of *Arbutus andrachne* L. methanolic leaf extract mediated by CB1, TRPV₁ and PPARs in mouse pain models [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(6): 1567-1577.
- [16] Shibata M, Tang C H. Implications of transient receptor potential cation channels in migraine pathophysiology [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(1): 103-116.
- [17] 杜力军, 孙虹, 李敏, 等. 精制吴茱萸胶囊对偏头痛小鼠的作用 [J]. *中药药理与临床*, 1999, 15(3): 4-6.
- [18] Musa A, Ghorai L S, Zhang S D, *et al.* A review of connectivity map and computational approaches in pharmacogenomics [J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(3): 506-523.
- [19] Li T. Treatment of migraine from the view of disease diagnosis and syndrome differentiation in combination [J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(4): 251-253.
- [20] Wu Y C, Pan X Q, Xu Y S, *et al.* Optimization of combinations of ginsenoside-Rg1, ginsenoside-Rb1, evodiamine and rutaecarpine for effective therapy of mouse migraine [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(2): 207-216.
- [21] 王贺波, 于生元. 偏头痛与一氧化氮 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2001, 7(3): 169-172.
- [22] Li C, Zhu Q S, He Q, *et al.* Plasma levels of

- cyclooxygenase-2 (COX-2) and visfatin during different stages and different subtypes of migraine headaches [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 24-28.
- [23] Tassorelli C, Greco R, Armentero M T, *et al.* A role for brain cyclooxygenase-2 and prostaglandin-E2 in migraine: Effects of nitroglycerin [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2007, 82: 373-382.
- [24] Tepper D E. Non-steroidal anti-inflammatories for the acute treatment of migraine [J]. *Headache*, 2013, 53(1): 225-226.
- [25] Woo H G, Lee C H, Noh M S, *et al.* Rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, inhibits prostaglandin production in RAW264.7 macrophages [J]. *Planta Med*, 2001, 67(6): 505-509.
- [26] Liu Y N, Pan S L, Liao C H, *et al.* Evodiamine represses hypoxia-induced inflammatory proteins expression and hypoxia-inducible factor 1 α accumulation in RAW264.7 [J]. *Shock*, 2009, 32(3): 263-269.
- [27] Vetvik K G, MacGregor E A. Sex differences in the epidemiology, clinical features, and pathophysiology of migraine [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(1): 76-87.
- [28] Amrutkar D V, Ploug K B, Hay-Schmidt A, *et al.* mRNA expression of 5-hydroxytryptamine 1B, 1D, and 1F receptors and their role in controlling the release of calcitonin gene-related peptide in the rat trigeminovascular system [J]. *Pain*, 2012, 153(4): 830-838.
- [29] Burch R. Antidepressants for preventive treatment of migraine [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2019, 21(4): 18.
- [30] Bali A, Singh N, Jaggi A S. Renin-angiotensin system in pain: Existing in a double life? [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2014, 15(4): 329-340.
- [31] Ripa P, Ornello R, Pistoia F, *et al.* The renin-angiotensin system: A possible contributor to migraine pathogenesis and prophylaxis [J]. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14(9): 1043-1055.
- [32] Michalak S, Kalinowska-Lyszczarz A, Wegrzyn D, *et al.* The levels of circulating proangiogenic factors in migraineurs [J]. *Neuromolecular Med*, 2017, 19(4): 510-517.
- [33] 魏江存, 欧和生, 滕红丽, 等. 黄酮类成分抗炎活性及其作用机制的研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2021-09-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20200817.1418.276.html>.
- [34] Xu Y, Wu S, Wu Y, *et al.* Recognition and optimization of ingredients treating nitroglycerin-induced migraine rats from Wuzhuyu decoction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 6156754.
- [35] 刘珍洪. 基于热敏通道 TRPV1、TRPA1 探讨吴茱萸汤的散寒止痛机理 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [36] Zhang W D, Chen X Y, Wu C, *et al.* Evodiamine reduced peripheral hypersensitivity on the mouse with nerve injury or inflammation [J]. *Mol Pain*, 2020, 16: 1744806920902563.
- [37] 龚慕辛, 王雅璐, 邹志东, 等. 吴茱萸汤现代临床应用证药规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 84-87.
- [38] Im D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of *Panax ginseng* [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): E444.
- [39] Dong W W, Zhao J H, Zhong F L, *et al.* Biotransformation of *Panax ginseng* extract by rat intestinal microflora: Identification and quantification of metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(4): 540-547.
- [40] Kim D H. Gut microbiota-mediated pharmacokinetics of ginseng saponins [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(3): 255-263.

[责任编辑 潘明佳]