

基于液质联用结合网络药理学的复方伤痛胶囊中 5 种药效成分定量及作用机制研究

高渐联¹, 周霖^{2*}, 王肖辉^{2*}, 聂兴国³, 朱超男¹

1. 新乡医学院第一附属医院 药学部, 河南 卫辉 453100

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

3. 新乡医学院第一附属医院 骨科, 河南 卫辉 453100

摘要: **目的** 对复方伤痛胶囊中的 5 种药效成分进行定量, 提升药物质量标准, 并对药效成分在药物治疗中的作用机制进行研究。**方法** 采用 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 进行成分初步分离, 乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱; 采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 仪器, 使用 Full mass/dd MS2 模式对药物中的关键成分进行快速、准确含量测定; 基于网络药理学构建关键成分-重要靶点网络, 并进一步进行京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和基因本体 (gene ontology, GO) 分析, 找到关键信号通路和作用靶点。**结果** 建立的分析方法学较为稳定, 能够满足分析的标准需要; 5 种药效成分 (没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和延胡索乙素) 线性关系均良好, $r \geq 0.999 0$; 网络药理学结果显示, 药物中的药效成分可能是通过基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo protein 9, MMP9)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、MMP2、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等炎症、疼痛关键靶点, 从而发挥缓解疼痛及炎症等作用。实验验证结果发现, 没食子酸能够明显降低脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞白血病 RAW264.7 细胞中的 IL-2 水平, 大黄素能够明显降低 RAW264.7 细胞中的 PTGS2 水平, 大黄酸能够明显降低 RAW264.7 细胞中的 MMP9 水平, 大黄素甲醚能够明显降低 RAW264.7 细胞中的 EGFR 水平, 延胡索乙素能够明显降低 RAW264.7 细胞中的 MMP2 水平。**结论** 对复方伤痛胶囊的质量提升提供了重要的参考依据, 同时为中医药相关药效成分研究提供了一种借鉴思路。

关键词: 网络药理学; 复方伤痛胶囊; 没食子酸; 大黄素; 大黄酸; 大黄素甲醚; 延胡索乙素; 基质金属蛋白酶 9; 前列腺素内过氧化物合酶 2; 白细胞介素-2; 表皮生长因子受体; 核因子-κB; 转化生长因子-β; 肿瘤坏死因子

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1793-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.011

Quantitative analysis and mechanism research of five pharmacodynamic components in Fufang Shangtong Capsule based on liquid mass spectrometry combined with network pharmacology

GAO Jian-lian¹, ZHOU Lin², WANG Xiao-hui², NIE Xing-guo³, ZHU Chao-nan¹

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, China

2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, China

Abstract: Objective To accurately quantify the five pharmacodynamic components in Fufang Shangtong Capsule (复方伤痛胶囊, FSC), improve drug quality standards, and analyze the important role of pharmacodynamic components in drug therapy. **Methods** An Acquity UPLC® BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used to separate the components. Acetonitrile-0.1% formic acid water was used as mobile phase gradient elution. UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and Full Mass/dd MS2 model were used for rapid and accurate content determination of key ingredients in the drug. Key components-important target network was constructed based on

收稿日期: 2022-08-06

基金项目: 北京卫生健康公益基金会 (TM19004); 河南省医学攻关计划 (LHGJ20200524); 河南省科技攻关计划 (21210231107)

作者简介: 高渐联, 男, 主管药师, 研究方向为临床药学、药物分析。E-mail: gaolian2007@163.com

*通信作者: 周霖, 男, 主管药师, 研究方向为药物分析、中药药理学。E-mail: 524734490@qq.com

王肖辉, 女, 主治医师, 研究方向为药理学。E-mail: xhhykl@126.com

network pharmacology, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and gene ontology (GO) analysis was further conducted to find key signaling pathways and action targets. **Results** The analytical methodology established in this study was robust and could meet the standard requirements of analysis. All the five pharmacodynamic components had good linearity in the range of mass concentration, $r \geq 0.999$. Network pharmacology results showed that the pharmacodynamic components in drugs may be key targets of inflammation and vascular factors such as matrix metallo protein 9 (MMP9), prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), MMP2, interleukin-2 (IL-2), epidermal growth factor receptor (EGFR). As a result, it maps to nuclear factor- κ B (NF- κ B), transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway inflammatory pathways, which has important reference value in drug quality and efficacy. The experimental results showed that gallic acid could significantly reduce the level of IL-2 in LPS induced RAW264.7 cells, emodin could significantly reduce the level of PTGS2 in cells, rhein could significantly reduce the level of MMP9 in cells, emodin methyl ether could significantly reduce the level of EGFR in cells, and fumarine ethyl rhizoma could significantly reduce the level of MMP2 in cells. **Conclusion** This study provides an important reference for the quality improvement of FSC, and also provides a reference for the study of relevant TCM pharmacodynamic components.

Key words: network pharmacology; Fufang Shangtong Capsule; gallic acid; emodin; rhein; emodin methyl ether; tetrahydropalmatine; matrix metallo protein 9; prostaglandin endoperoxide synthase 2; interleukin-2; epidermal growth factor receptor; nuclear factor- κ B; transforming growth factor- β ; tumor necrosis factor

复方伤痛胶囊(Fufang Shangtong Capsule, FSC)是由大黄(酒制)、当归、柴胡、天花粉、桃仁(去皮)、红花、醋延胡索、甘草等中药材,在中医药理论的指导下,经现代工艺提取加工而成的中药复方制剂^[1],具有化瘀、行气、止痛的功效,临床上常用于急性胸壁扭挫伤之瘀滞证等,疗效确切,应用广泛^[2-4]。药效成分是药物中的关键物质,也是药物发挥治疗疾病作用的根本基础。本研究查阅文献并采用网络药理学方法对 FSC 中的成分进行筛选,发现其中的没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和延胡索乙素在疼痛以及炎症性疾病治疗中发挥着关键作用,是 FSC 的潜在重要药效成分^[5-7]。由于药物中的有效成分含量较低,且目前尚未有对该药物中此类成分定量研究的相关报道。因此,本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 高分辨液质联用系统,建立了快速、科学、准确的一级 Full mass 全扫描同时定性、定量分析方法对 FSC 中的 5 种药效成分进行含量测定。该方法具有分析时间短、选择性强、灵敏度高优点,可用于 FSC 中复杂活性成分的快速定性及定量分析。同时,本研究基于网络药理学及实验药理学对以上成分的关键作用靶点进行系统分析,深入挖掘其在药物治疗疾病中的作用。

1 仪器与材料

Q-Exactive 型液相色谱-质谱联用系统,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m),美国 Waters 公司; New Classic MS 型十万分之一分析天平,瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司; BX7200HP 型台式超声波清洗器,上海新苗医疗器械制造有限公司。

对照品没食子酸(批号 MUST-18032801)、延胡索乙素(批号 MUST-17022720),购于成都曼思特生物科技有限公司;对照品大黄酸(批号 wkq16062204)、大黄素(批号 wkq16071004)、大黄素甲醚(批号 wkq16070403),购于四川维克奇生物科技有限公司;质量分数均大于 99%。甲酸、乙腈、甲醇为色谱级纯,美国 Fisher 公司;水为哇哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;其他试剂均为分析纯。

RAW264.7 细胞(批号 CL0173)购自普诺赛生物科技有限公司;胎牛血清(批号 BL205C)、DMEM 培养基(批号 A8190R)、SDS-PAGE(批号 BL502B)、ECL 试剂盒(批号 GK10008)购自河南天驰生物技术有限公司;基质金属蛋白酶 9(matrix metallo protein 9, MMP9, 批号 ab100610)、MMP2(批号 ab100606)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2, 批号 ab221834)、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2, 批号 ab278922)及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR, 批号 ab269558)ELISA 试剂盒购自 Abcam 生物科技有限公司。

一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 GB15002)、MMP9(批号 GB11132)、IL-2(批号 GB11114)、PTGS2(批号 GB11077-2)、MMP2(批号 GB111507)、EGFR(批号 GB111504);二抗辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-山羊抗小鼠(批号 GB23301)、HRP-山羊抗兔(批号 GB23303)试剂盒均购自 Servicebio 生物科技有限公司。

FSC 编号为 S1~S20, 批次分别为 805031、806038、805076、810002、805074、808031、806053、809031、807073、803022、811003、805038、805019、809020、807018、806064、803038、808020、807067、807070, 均购自甘肃省西峰制药有限公司, 密封保存于阴凉干燥处。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的配制

精密称定适量的没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和延胡索乙素的对照品, 加入纯甲醇制备成混合对照品储备液, 各成分质量浓度分别为 19.52、278.68、1.61、39.41、1.46 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 供试品溶液的制备

取 FSC 内容物, 置于锥形瓶中加入纯甲醇 50 mL, 密封, 称定总质量, 超声辅助溶解 20 min (参数设置为 200 W、50 kHz), 放冷, 再次称定质量, 用纯甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

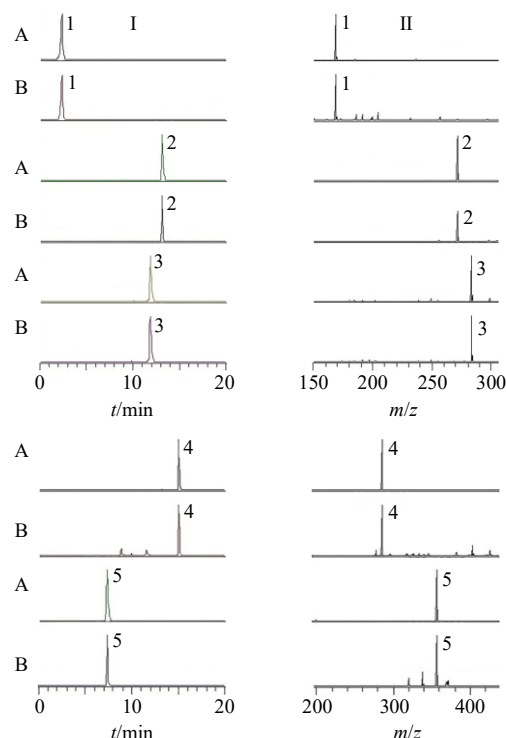
Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱程序为 0~1.0 min, 5%乙腈; 1.0~3.0 min, 5%~20%乙腈; 3.0~6.0 min, 20%~30%乙腈; 6.0~9.0 min, 30~50%乙腈; 9.0~12.0 min, 50%~30%乙腈; 12.0~18.0 min, 30%~0 乙腈; 18.0~20.0 min, 0~5%乙腈。体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μL ; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 质谱条件

离子源为 HESI (heated ESI) 源, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气体积流量为 10 $\mu\text{L/min}$; 正离子模式下: 鞘气体积流量为 40 $\mu\text{L/min}$, 喷雾电压为 3.50 kV; 负离子模式下: 鞘气体积流量为 38 $\mu\text{L/min}$, 喷雾电压为 2.80 kV, m/z 扫描范围为 80~1200, 一级扫描分辨率为 70 000。在优化的色谱质谱条件下 5 种待测成分的提取离子流图及质谱图见图 1, 目标分析物参数见表 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取“2.1”项下混合对照品溶液、“2.2”项下供试品溶液和空白对照溶液 (甲醇), 按“2.3”及“2.4”项下色谱及质谱条件进样测定。结果显示, 空白溶液对所测成分无干扰, 且供试品溶液中 5 种待测成分的出峰时间与对照品溶液中的基本一致, 说明方法专属性较好。



1-没食子酸 2-大黄素 3-大黄酸 4-大黄素甲醚 5-延胡索乙素
1-gallic acid 2-emodin 3-rhein 4-emodin methyl ether 5-tetrahydropalmatine

图 1 5 种对照品 (A) 和样品 (B) 中 5 种待测成分的提取离子图 (I) 和一级质谱图 (II)

Fig. 1 Extracting ion chromatograms and MS of five components

表 1 5 种待测成分的质谱分析参数

Table 1 MS/MS parameters of five components

成分	分子式	t/min	相对分子质量 (m/z)		误差
			理论值	实际测定值 ($\times 10^{-6}$)	
没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	4.05	169.014 24	169.014 01	-1.400
大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	15.24	271.060 10	271.059 81	-1.070
大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆	14.07	283.024 81	283.024 51	-1.064
大黄素甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	16.99	285.075 75	285.075 23	-1.824
延胡索乙素	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	9.18	356.185 63	356.184 97	-1.866

2.5.2 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液适量, 纯甲醇稀释并定容, 依次配制成 6 个质量浓度的系列梯度溶液, 其中没食子酸 0.61、1.22、2.44、4.88、9.76、19.52 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素 8.71、17.42、34.83、69.67、139.34、278.68 $\mu\text{g/mL}$; 大黄酸 0.05、0.10、0.20、0.40、0.81、1.61 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素甲醚 1.23、2.46、4.93、9.85、19.71、39.41 $\mu\text{g/mL}$; 延胡索乙素 0.05、0.09、0.18、0.36、0.73、1.46 $\mu\text{g/mL}$ 在“2.3”和“2.4”项下 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 色谱、质谱条件进样分析, 记录峰面积。以各待测物的质量

浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程、相关系数 (r) 及线性范围; 以信噪比为 10 计算定量限, 结果分别为没食子酸 $Y=4.25 \times 10^8 X+8.00 \times 10^7$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 $0.61 \sim 19.52\ \mu\text{g/mL}$, 定量限 $0.130\ \text{ng/mL}$; 大黄素 $Y=2.40 \times 10^7 X-1.20 \times 10^6$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 $8.71 \sim 278.68\ \mu\text{g/mL}$, 定量限 $1.505\ \text{ng/mL}$; 大黄酸 $Y=2.04 \times 10^9 X+3.49 \times 10^7$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 $0.05 \sim 1.61\ \mu\text{g/mL}$, 定量限 $0.020\ \text{ng/mL}$; 大黄素甲醚 $Y=3.68 \times 10^6 X-2.78 \times 10^6$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 $1.23 \sim 39.41\ \mu\text{g/mL}$, 定量限 $1.945\ \text{ng/mL}$; 延胡索乙素 $Y=4.82 \times 10^9 X+1.27 \times 10^8$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 $0.05 \sim 1.46\ \mu\text{g/mL}$, 定量限 $0.033\ \text{ng/mL}$ 。结果表明, 5 种待测化合物在质量浓度范围内线性关系均良好, $r \geq 0.999\ 0$ 。

2.5.3 精密度考察 精密吸取供试品溶液 (批号 806038) $5\ \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 结果显示没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、延胡索乙素的峰面积的 RSD 分别为 1.40%、1.32%、2.22%、4.15%、1.64%, 结果表明该方法精密度良好。

2.5.4 重复性考察 取同一批样品 (批号 806038), 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样测定并计算含量, 测得没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、延胡索乙素的平均质量分数分别为 237.72、4128.27、10.74、886.53、8.85 $\mu\text{g/g}$, RSD 分别为 0.68%、1.40%、0.87%、1.28%、0.66%, 结果表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 806038), 分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析,

测得没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、延胡索乙素的峰面积的 RSD 分别为 1.08%、1.86%、1.26%、0.83%、0.68%, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.6 加样回收率试验 称取样品粉末 (批号 806038) 共 9 等份, 每 3 份为 1 组, 精密称定, 分别加入没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、延胡索乙素的对照品适量, 使加入各成分含量分别为 FSC 中相应成分含量的 50%、100%、150%。按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 处理后分别进样测定。计算各待测物的平均回收率及 RSD, 结果显示没食子酸、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、延胡索乙素的平均回收率分别为 99.75%、98.84%、100.12%、99.56%、99.16%, RSD 分别 1.81%、0.62%、1.46%、0.62%、0.57%, 结果表明该方法下 5 种待测成分的测定准确度较好。

2.5.7 样品含量测定 取 20 个不同批次的 FSC, 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液各 3 份, 在“2.3”和“2.4”项下色谱、质谱条件进样分析, 记录峰面积并计算 5 种待测物在 FSC 中的含量, 结果见表 2。

2.6 关键药效成分的网络药理学分析及分子对接实验

2.6.1 作用靶点获取 结合 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>, 数据库靶点筛选物种为人, Fit 值 > 2)、Swiss Target Prediction 数据库 [<http://www.swisstargetprediction.ch/>, 数据库选择物种为人, 靶点选择概率 (probability) > 0] 和 Similarity Ensemble Approach (SEA) 数据库

表 2 FSC 中 5 种待测成分的测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 2 Determination of five components ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

批次	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$					批次	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$				
	没食子酸	大黄素	大黄酸	大黄素甲醚	延胡索乙素		没食子酸	大黄素	大黄酸	大黄素甲醚	延胡索乙素
S1	77.33 $\pm$ 1.20	4 333.29 $\pm$ 2.21	3.43 $\pm$ 0.42	169.27 $\pm$ 1.48	2.85 $\pm$ 0.15	S11	253.28 $\pm$ 0.94	4 683.80 $\pm$ 1.57	33.02 $\pm$ 0.96	571.27 $\pm$ 1.54	13.47 $\pm$ 0.33
S2	225.03 $\pm$ 1.46	3 701.48 $\pm$ 14.52	8.72 $\pm$ 0.27	863.46 $\pm$ 1.51	8.41 $\pm$ 0.46	S12	156.76 $\pm$ 2.49	4 981.14 $\pm$ 1.40	5.74 $\pm$ 0.23	488.39 $\pm$ 2.05	7.55 $\pm$ 0.39
S3	917.24 $\pm$ 2.96	3 904.46 $\pm$ 2.66	42.64 $\pm$ 2.04	1 937.53 $\pm$ 10.68	66.47 $\pm$ 2.43	S13	304.19 $\pm$ 1.55	4 781.06 $\pm$ 1.88	16.76 $\pm$ 0.27	248.04 $\pm$ 1.59	12.48 $\pm$ 0.40
S4	325.88 $\pm$ 2.38	4 713.87 $\pm$ 3.47	43.09 $\pm$ 1.91	575.29 $\pm$ 3.23	18.88 $\pm$ 0.88	S14	142.04 $\pm$ 1.49	4 721.43 $\pm$ 1.42	7.44 $\pm$ 0.28	222.25 $\pm$ 1.81	7.35 $\pm$ 0.35
S5	174.71 $\pm$ 3.53	3 923.74 $\pm$ 11.43	5.57 $\pm$ 0.42	1 422.90 $\pm$ 2.05	10.41 $\pm$ 0.25	S15	359.48 $\pm$ 1.66	4 515.41 $\pm$ 1.89	21.14 $\pm$ 1.04	581.78 $\pm$ 1.29	10.40 $\pm$ 0.22
S6	783.65 $\pm$ 4.54	5 321.59 $\pm$ 1.72	41.58 $\pm$ 1.56	829.70 $\pm$ 2.88	49.42 $\pm$ 1.92	S16	281.96 $\pm$ 1.14	4 864.16 $\pm$ 2.90	13.68 $\pm$ 0.57	682.85 $\pm$ 2.44	12.20 $\pm$ 1.41
S7	506.00 $\pm$ 1.75	3 514.01 $\pm$ 2.83	21.37 $\pm$ 1.34	974.18 $\pm$ 1.37	27.92 $\pm$ 1.72	S17	149.66 $\pm$ 1.68	3 563.62 $\pm$ 1.90	6.65 $\pm$ 0.40	232.33 $\pm$ 2.17	6.51 $\pm$ 0.25
S8	368.12 $\pm$ 1.82	4 286.01 $\pm$ 1.23	38.28 $\pm$ 1.97	669.23 $\pm$ 2.02	23.88 $\pm$ 1.44	S18	424.13 $\pm$ 2.90	4 344.57 $\pm$ 2.14	27.83 $\pm$ 1.08	842.50 $\pm$ 1.67	20.52 $\pm$ 0.87
S9	656.30 $\pm$ 1.87	4 076.03 $\pm$ 2.35	42.96 $\pm$ 2.62	1 319.38 $\pm$ 1.24	33.07 $\pm$ 1.06	S19	816.12 $\pm$ 1.79	2 870.48 $\pm$ 1.96	56.97 $\pm$ 1.46	1 075.36 $\pm$ 2.04	28.16 $\pm$ 1.23
S10	327.45 $\pm$ 2.65	3 623.60 $\pm$ 0.83	11.53 $\pm$ 0.59	303.53 $\pm$ 1.76	20.21 $\pm$ 0.55	S20	762.06 $\pm$ 1.21	3 132.67 $\pm$ 2.35	55.12 $\pm$ 0.90	1 017.29 $\pm$ 1.39	32.83 $\pm$ 1.42

(<https://sea.bkslab.org/>, 数据库靶点筛选物种为人) 3 个权威网站预测 5 种定量成分的作用靶点, 共获得 593 个作用靶点。

2.6.2 成分-靶点网络的构建 基于 Cytoscape 3.9.1 软件构建以上关键药效成分的成分-靶点相互作用网络图, 该网络包含 433 个节点和 593 条边, 如图 2 所示。分析网络图, 以度 (degree) 值为中位数 2 倍为筛选条件, 获得 73 个关键作用靶点; 频率较高

的靶点基因分别是 MMP9、PTGS2、MMP2、IL-2、EGFR、丝裂原激活蛋白激酶 8 (mitogen activated protein kinase 8, MAPK8)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin dependent kinase 1, CDK1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 等, 这些基因与免疫炎症、疼痛以及血管调节等密切相关。

2.6.3 KEGG 信号通路及 GO 生物过程富集分析 将

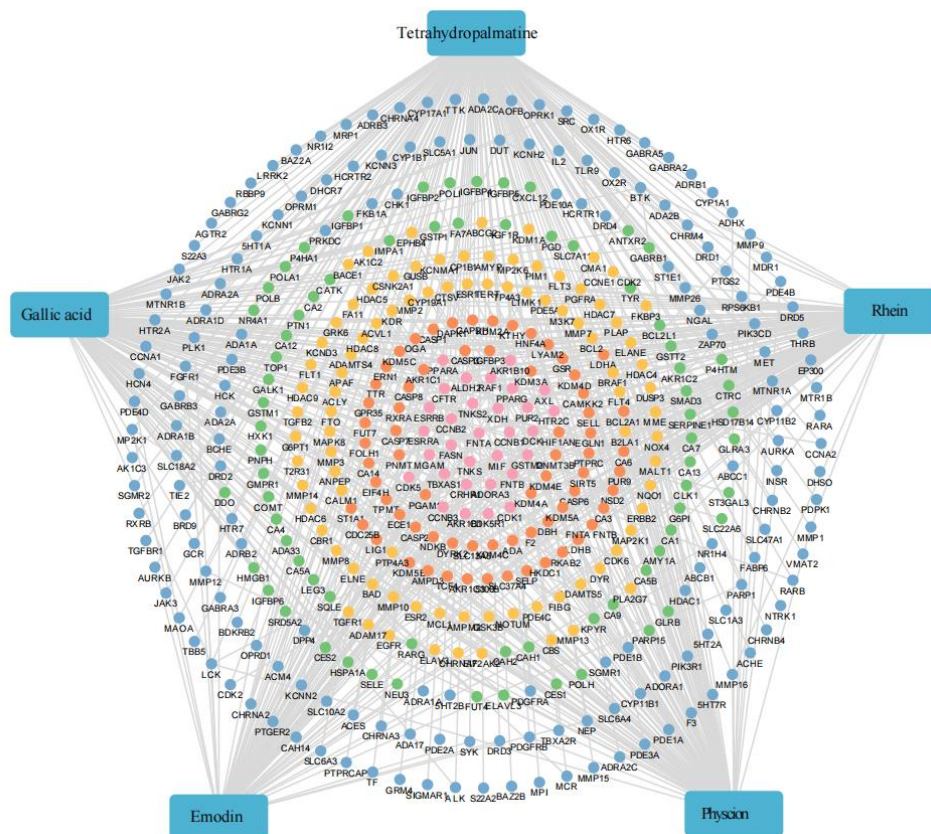


图 2 5 种主要成分-靶点网络图

Fig. 2 Components-target network diagram of five main components

筛选到的 73 个关键作用靶点导入 DAVID 数据库进行 KEGG 富集分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 共得到 44 条通路, 排名靠前的 20 条重要通路, 分别为核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、IL-17、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、Toll 样受体 (Toll-like receptor) 和 MAPK 信号通路等, 结果见图 3。由此可见, 在药物成分对应的靶基因下, 富集的信号通路主要集中在对炎症性信号通路等方面, 这些炎症信号与疼痛疾病密切相关, 与 FSC 的主治疾病契合度较高, 表明了本研究对这些药效成分定量的科学性和合理性。

基于 DAVID 数据库对筛选出来的 73 个关键作用靶点分别从生物过程、细胞组分及分子功能 3 个层面进行注释, 即 GO 生物学过程富集分析。GO 富集分析结果显示, 这些关键作用靶点主要富集在 264 个生物学过程, 69 种细胞组分和 60 种分子功能。主要生物过程富集结果见图 4, 分子功能及细胞组分富集分别见图 5 和图 6。由图中 GO 分析结果可见, 以上药效成分的生物过程主要涉及炎症反应、细胞分化以及免疫应答等; 在分子功能中与生长因子活性、凝血酶活性以及能量活性等高度相关; 这些靶点在细胞组分中与胞质、胞膜以及胞核等相关性较大。

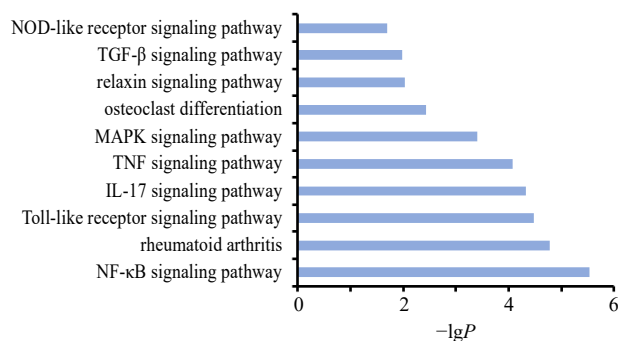


图 3 经 KEGG 富集分析后的主要通路

Fig. 3 Main pathways based on KEGG enrichment analysis

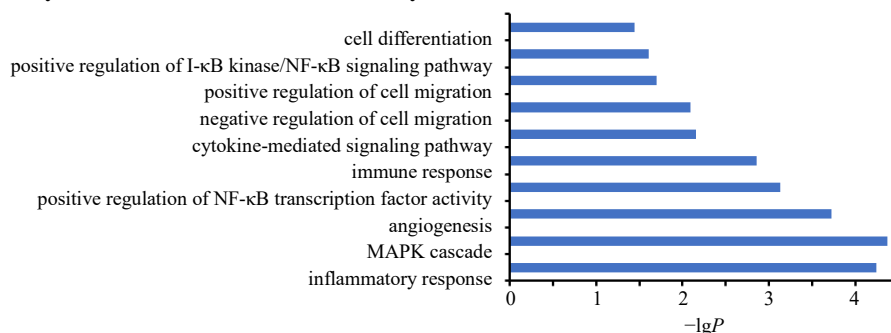


图 4 关键作用靶点的生物过程 GO 分析 (生物过程)

Fig. 4 GO analysis of biological processes of key action targets (biological process)

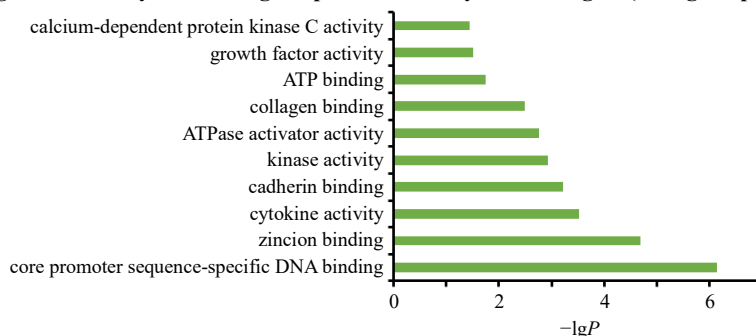


图 5 关键作用靶点的分子功能 GO 分析 (分子功能)

Fig. 5 Molecular function GO analysis of key action targets (molecular function)

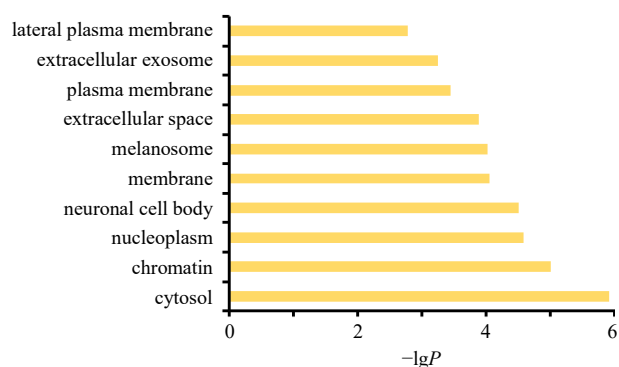


图 6 关键作用靶点的细胞组成 GO 分析 (细胞组分)

Fig. 6 GO analysis of key targets (cell components)

换为“pdbqt”格式; 运行 AutoDock4 (设置对接 Box、对接参数、运算方法等) 进行分子对接, 对接结果在

2.6.4 分子对接实验 首先, 从 RCSB PDB 在线平台 (<http://www.rcsb.org/>) 导出与关键靶点相关的 3D 蛋白结构并导出为 PDB 格式。然后, 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性化合物的 3D 结构, 以 SDF 格式存储。随后导入 OpenBabel 3.1.1 软件转化为 AutoDock 可以识别的格式。使用 Pymol 对活性化合物和蛋白结构进行去水, 去除小分子的操作, 并导入 AutoDockTools-1.5.7 软件将活性化合物设置为配体 (加全氢、检测设置扭转键), 蛋白结构设置为受体 (加全氢), 同时转

Pymol 上进行可视化。最后, 利用对接结合能来评估化合物小分子与疾病靶蛋白结合的能力。

分子对接结果 (图 7) 显示, 大黄酸对接 MMP9、没食子酸对接 IL-2、大黄素对接 PTGS2、延胡索乙素对接 MMP2、大黄素甲醚对接 EGFR 的结合能较低, 分子对蛋白质之间至少形成 2 个氢键, 对接结果较为稳定。

2.7 实验验证

2.7.1 细胞培养 将小鼠单核巨噬细胞 (RAW 264.7) 采用含 10% 胎牛血清 (FBS)、80 U/mL 青霉素以及 0.08 mg/mL 链霉素的 DMEM 完全培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养, 用细胞刮刀刮取细胞进行传代。

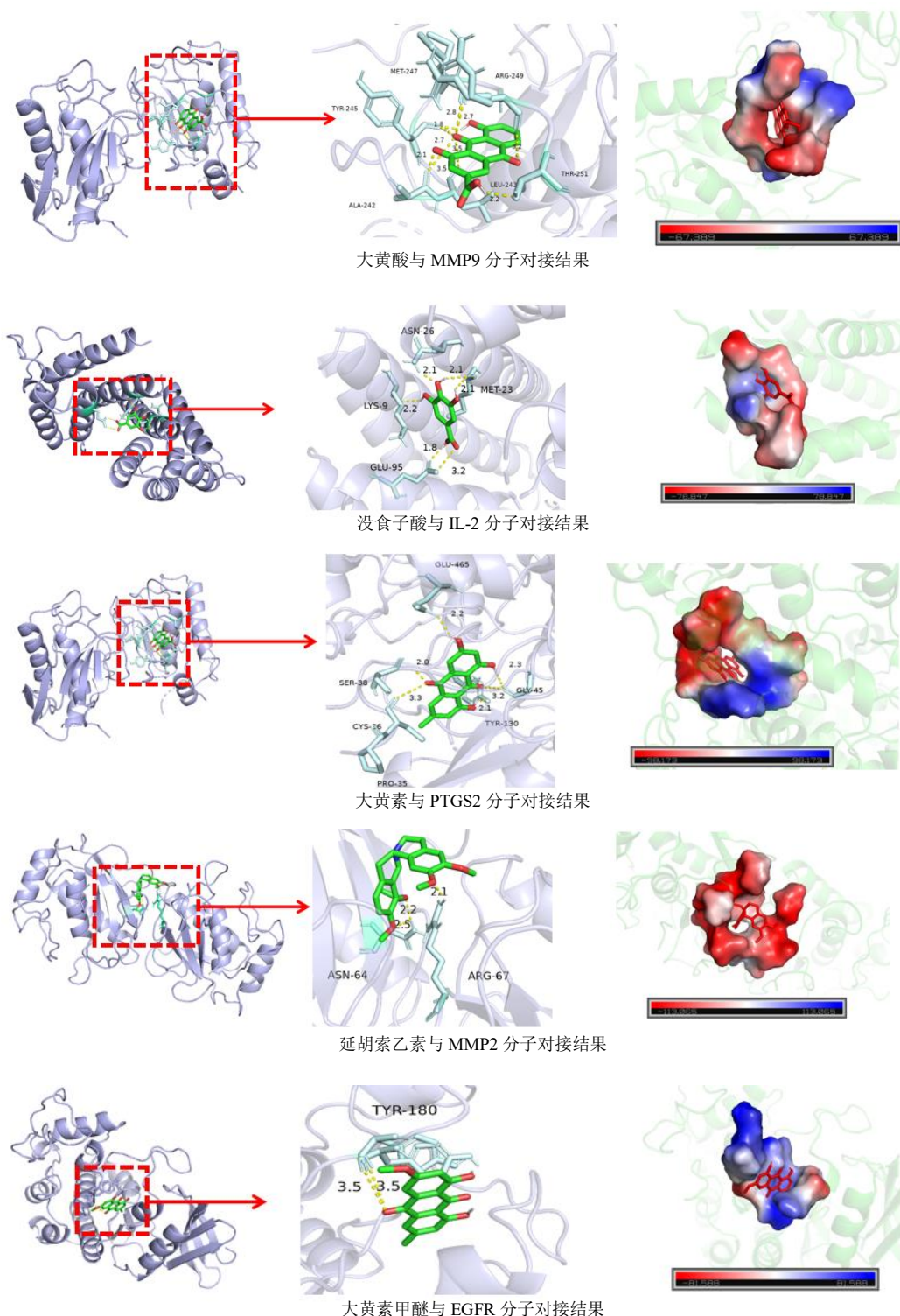


图 7 药效成分与关键靶点的分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results of pharmacodynamic components and key targets

2.7.2 ELISA 法检测细胞上清液中 MMP-9、IL-2、PTGS2、MMP2 及 EGFR 水平 本研究依据相关参考文献^[8-12]并采用 MTT 法确定了各成分作用于细胞的最佳剂量, 进一步进行实验验证。取对数生长期细胞, 按照每孔 2×10^5 的密度接种于 6 孔板, 培

养 24 h 后, 弃上清液, 分别进行大黄酸 (设置对照组、模型组和大黄酸 6、12、24 $\mu\text{mol/L}$)、没食子酸 (设置对照组、模型组和没食子酸 5、10、25 $\mu\text{g/mL}$)、大黄素 (设置对照组、模型组和大黄素 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)、延胡索乙素 (设置对照组、模型组和延胡

索乙素 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ）、大黄素甲醚（设置对照组、模型组和大黄素甲醚 2、4、6 $\mu\text{mol/L}$ ）的药效实验。其中对照组仅给予培养基，模型组给予 1 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖（lipopolysaccharides, LPS），各成分低、中、高剂量组在给予 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的基础上，同时添加相应浓度的药物。药物干预 24 h 后，取细胞上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组的 MMP9、IL-2、PTGS2、MMP2 及 EGFR 水平。检测结果（表 3~7）显示，大黄素能够明显降低细胞上清中的 MMP9 水平（ $P<0.05$ ），没食子酸能够明显降低细胞上清中的 IL-2 水平（ $P<0.05$ ），大黄素能

表 3 大黄素对细胞上清液中 MMP9 水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Table 3 Effect of rhein on MMP9 level in cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MMP9/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	1.34 $\pm$ 0.25
模型	—	5.64 $\pm$ 0.93*
大黄素	6	3.62 $\pm$ 0.67 [#]
	12	3.06 $\pm$ 0.94 [#]
	24	2.24 $\pm$ 0.46 [#]

与对照组比较：* $P<0.05$ ；与模型组比较：[#] $P<0.05$ ，下表同

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group, same as below tables

表 4 没食子酸对细胞上清液中 IL-2 水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Table 4 Effect of gallic acid on IL-2 level in cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-2/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	3.86 $\pm$ 0.64
模型	—	9.35 $\pm$ 0.92*
没食子酸	5	6.31 $\pm$ 0.37 [#]
	10	4.93 $\pm$ 0.45 [#]
	25	4.64 $\pm$ 0.35 [#]

表 5 大黄素对细胞上清液中 PTGS2 水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Table 5 Effect of emodin on PTGS2 level in cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	PTGS2/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	16.39 $\pm$ 1.78
模型	—	26.16 $\pm$ 2.67*
大黄素	40	20.34 $\pm$ 1.93 [#]
	80	18.68 $\pm$ 1.46 [#]
	160	17.36 $\pm$ 1.86 [#]

表 6 延胡索乙素对细胞上清液中 MMP2 水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Table 6 Effect of tetrahydropalmatine on MMP2 level in cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MMP2/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	9.39 $\pm$ 1.53
模型	—	18.93 $\pm$ 2.76*
延胡索乙素	5	12.63 $\pm$ 1.93 [#]
	10	11.36 $\pm$ 1.67 [#]
	20	10.64 $\pm$ 1.38 [#]

表 7 大黄素甲醚对细胞上清液中 EGFR 水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Table 7 Effect of physcion on EGFR level in cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	EGFR/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	21.82 $\pm$ 3.28
模型	—	32.95 $\pm$ 1.85*
大黄素甲醚	2	25.34 $\pm$ 2.64 [#]
	4	24.35 $\pm$ 1.39 [#]
	6	22.38 $\pm$ 2.34 [#]

够明显降低细胞上清中的 PTGS2 水平（ $P<0.05$ ），延胡索乙素能够明显降低细胞上清中的 MMP2 水平（ $P<0.05$ ），大黄素甲醚能够明显降低细胞上清中的 EGFR 水平（ $P<0.05$ ）。

2.7.3 蛋白印迹法（Western blotting）检测细胞中 MMP9、IL-2、PTGS2、MMP2 及 EGFR 蛋白表达水平 按照“2.7.2”项下方法处理并收集细胞，加入裂解液，冰上裂解 30 min 后，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心（半径 8.5 cm）30 min，二喹啉甲酸（bicinchoninic acid, BCA）法测定蛋白浓度，加入适量上样缓冲液，沸水浴中处理 8 min 进行变性。蛋白（上样量为 30 μg ）经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）凝胶电泳分离，转移至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜上，5%脱脂牛奶封闭 2 h，一抗（稀释比 1：2000）4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，用添加聚山梨酯-20 的 Tris-缓冲盐（tris-buffered saline tween, TBST）洗膜 4 次，孵育二抗（稀释比 1：5000），增强化学发光（enhanced chemiluminescence, ECL）化学发光法进行显色，GAPDH 作为内参。检测结果（图 8 和表 8~12）显示，大黄素能够明显降低细胞中的 MMP9 蛋白表达水平，没食子酸能够明显降低细胞中的 IL-2 蛋白表

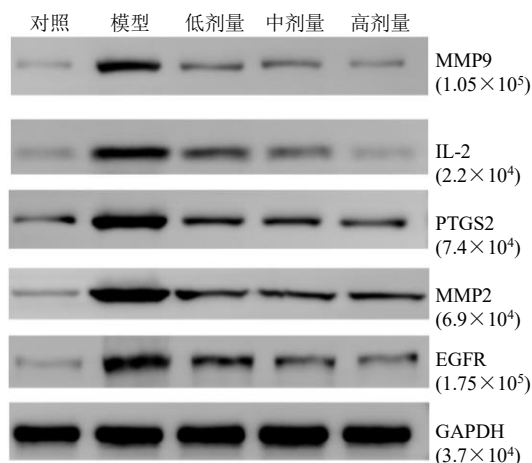


图 8 各组细胞中 MMP9、IL-2、PTGS2、MMP2 及 EGFR 蛋白表达检测

Fig. 8 Expression levels of MMP9, IL-2, PTGS2, MMP2 and EGFR proteins in cells

表 8 大黄酸对细胞中 MMP9 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 8 Effect of rhein on MMP9 protein expression level in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MMP9/GAPDH
对照	—	0.08 $\pm$ 0.02
模型	—	0.53 $\pm$ 0.13*
大黄酸	6	0.19 $\pm$ 0.06 [#]
	12	0.14 $\pm$ 0.02 [#]
	24	0.12 $\pm$ 0.01 [#]

表 9 没食子酸对细胞中 IL-2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 9 Effect of gallic acid on IL-2 protein expression level in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-2/GAPDH
对照	—	0.15 $\pm$ 0.02
模型	—	0.73 $\pm$ 0.12*
没食子酸	5	0.34 $\pm$ 0.09 [#]
	10	0.25 $\pm$ 0.07 [#]
	25	0.17 $\pm$ 0.02 [#]

达水平 ($P < 0.05$), 大黄素能够明显降低细胞中的 PTGS2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 延胡索乙素能够明显降低细胞中的 MMP2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 大黄素甲醚能够明显降低细胞中的 EGFR 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 提取方法优化

本实验考察了不同的提取溶剂 (乙醇、甲醇、

表 10 大黄素对细胞中 PTGS2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 10 Effect of emodin on PTGS2 protein expression level in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	PTGS2/GAPDH
对照	—	0.21 $\pm$ 0.03
模型	—	0.73 $\pm$ 0.15*
大黄素	40	0.37 $\pm$ 0.05 [#]
	80	0.29 $\pm$ 0.16 [#]
	160	0.24 $\pm$ 0.06 [#]

表 11 延胡索乙素对细胞中 MMP2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 11 Effect of tetrahydropalmatine on MMP2 protein expression level in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MMP2/GAPDH
对照	—	0.18 $\pm$ 0.05
模型	—	0.82 $\pm$ 0.17*
延胡索乙素	5	0.38 $\pm$ 0.08 [#]
	10	0.35 $\pm$ 0.03 [#]
	20	0.31 $\pm$ 0.04 [#]

表 12 大黄素甲醚对细胞中 EGFR 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 12 Effect of physcion on EGFR protein expression level in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	EGFR/GAPDH
对照	—	0.15 $\pm$ 0.03
模型	—	0.72 $\pm$ 0.18*
大黄素甲醚	2	0.47 $\pm$ 0.08 [#]
	4	0.33 $\pm$ 0.07 [#]
	6	0.24 $\pm$ 0.05 [#]

80%乙醇、80%甲醇、40%乙醇、40%甲醇、水) 及提取时间 (10、20、30 min) 对提取效果的影响。结果发现, 乙醇、甲醇均具有最好的提取效果, 但使用甲醇提取后各成分的出峰效果最好, 因此采用纯甲醇作为提取溶剂; 提取时间设置为 10 min 时, 待测成分提取不够完全, 影响分析效果, 提取时间设置为 30 min 时的提取效率与 20 min 大体相同, 表明 20 min 时药物中的待测目标成分已经提取完全, 因此本实验采用的提取时间为 20 min; 本实验分别使用纯甲醇 30、50、70 mL 提取 20 min, 结果发现待测成分在 30 mL 溶剂中提取不够完全, 50 mL 和 70 mL 的提取效率较为接近, 表明待测成分在 50 mL 溶剂中可以提取完全, 故本实验使用纯甲醇 50 mL

超声提取 20 min。

3.2 流动相的选择

本实验分别考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液流动相系统的分离能力,结果发现乙腈的洗脱能力相对甲醇较强,各化合物的分离效果较好;而加入 0.1%甲酸水可以使各成分响应更高,能够更好地满足分析要求。因此,本实验最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相进行洗脱,达到有效分离的目的。

3.3 实验药理学研究分析

本研究基于 FSC 中关键药效成分进行了网络药理学分析及实验药理学验证,以期能够更加深刻理解该药物药效成分对药物治疗疾病的关键作用。研究结果显示药物中的 5 种药效成分能够有效干预 MMP9、PTGS2、MMP2、IL2、EGFR 等炎症、血管因子关键靶点,表明本研究筛选到的药效成分在药物的治疗过程中起到了重要作用。在以上筛选的关键靶点及通路中,MMP2 及 MMP9 可作用于各种胶原、明胶、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白等,可能是发挥斑块溶解进而发挥祛瘀作用的主要靶点^[13]。PTGS2 是非甾体抗炎药物靶标,可控制前列腺素合成,有效控制炎症反应,进而减轻疼痛^[14]。IL-2 在中枢和外周有镇痛作用,可能是药物发挥镇痛作用的关键靶点^[15]。EGFR 可以诱导并维持不同条件下的痛敏反应,其介导的信号通路对神经病理性疼痛的发生发展具有重要作用^[16]。

有研究发现,通过抑制 NF- κ B 信号通路,可以抑制炎症因子释放,从而缓解炎症性疼痛^[17]; TGF- β 信号在造血的发生和发育中起着关键作用,可能是活血化瘀的重要信号通路之一^[18]; TNF- α 通过调控 NF- κ B 等相关信号通路,导致了进行性加重的疼痛,并进一步作用于神经元,通过 P 物质等在神经元间产生痛觉敏化,最终传入脊髓中枢导致剧烈的癌痛,因此, TNF 信号通路也是缓解疼痛的重要通路之一^[19]。

此外,有研究表明,没食子酸对小鼠促炎因子(TNF- α 、IL-6)以及过敏介质组胺具有显著的抑制作用,能抑制炎症过敏反应的发生,对于疼痛疾病具有较好的缓解作用^[20-21];大黄酸可减少 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等促炎细胞因子的生成,同时抑制 NF- κ B 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症因子途径,显著减少免疫细胞迁移

而发挥强大的抗炎作用,还能抑制 MMP2 及磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, pAkt) / Akt 比值的增加而减轻炎症反应,与调节疼痛等疾病密切相关^[22-23]; 大黄素可通过调节鞘脂代谢及精氨酸生物合成发挥镇痛作用^[24-25]; 大黄素甲醚可通过调节沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)-腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 信号通路来缓解机体炎症水平^[26]; 延胡索乙素具有显著的镇痛作用,是 FSC 缓解疼痛的主要药效物质之一^[27-28]。以上药效成分在药物治疗疼痛性疾病的过程中从不同角度发挥着抗炎、缓解疼痛等治疗作用。

本研究采用先进的液质联用技术对药物中的关键药效成分进行了快速、准确、科学的定量,为药物质量标准的制定和提升奠定了扎实的前期基础;同时,基于网络药理学和实验药理学全面、系统地揭示了药效成分在药物质量和治疗方面的科学内涵,有助于更加直观地认识药效成分在药物中扮演的重要角色。本研究将为 FSC 质量水平的提升提供参考依据,同时为中医药今后相关药物药效成分研究方法提供了一种新的借鉴思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱立国,李盛华,赵晓平,等. 复方伤湿止痛膏治疗急性胸壁扭挫伤临床应用专家共识 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(5): 252-258.
- [2] 王寿强,雍娟. 复方伤湿止痛膏在急性胸壁扭挫伤中的应用及对神经肽的影响 [J]. 中国医师杂志, 2020, 22(2): 306-308.
- [3] 朱鹏飞,杨莹莹,郭艳波. 复方伤湿止痛膏治疗肋骨骨折合并血胸的疗效观察 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(6): 915-918.
- [4] 卫杰,林吉良. 从“筋骨同治”理论探讨复方伤湿止痛膏对桡骨骨折术后肿痛及骨折恢复的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(12): 93-95.
- [5] 高雅,李骅,王四旺,等. 没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(4): 435-438.
- [6] 韩思琪,哈伟,师彦平. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 303-316.
- [7] 唐逸丰. 延胡索化学成分与药理作用研究概况 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(23): 144-146.
- [8] 钟先锋,罗婷,邓泽元,等. 大黄酸对正常和氧化损伤内皮细胞的增殖和氧化保护作用 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 257-261.

- [9] 方国平, 周荟慧, 方颖, 等. 没食子酸诱导 ROS 积蓄介导黑色素瘤 B16-F10 细胞内源性凋亡及周期阻滞 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(21): 3835-3841.
- [10] 熊思敏, 张金晓, 康玮, 等. 大黄素诱导人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡作用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 773-779.
- [11] 蹇明辉, 陈文明, 张怡. 延胡索乙素对高糖诱导 H9c2 细胞凋亡和氧化应激的抑制作用 [J]. 遵义医科大学学报, 2022, 45(3): 317-321.
- [12] 陶正娣, 吴勤研, 蓝晓红, 等. 大黄素甲醚对人肝癌细胞增殖及糖酵解的调控作用及机制研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2022, 27(9): 769-775.
- [13] 张莉, 白林英, 母凯茜, 等. 灯盏乙素对小型猪动脉粥样硬化模型颈总动脉斑块组织中基质金属蛋白酶-1、2、9 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 91-97.
- [14] Gray R T, Cantwell M M, Coleman H G, *et al.* Evaluation of PTGS2 expression, PIK3CA mutation, aspirin use and colon cancer survival in a population-based cohort study [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(4): e91.
- [15] 刘珊, 史霖, 王军阳, 等. 白介素 2 在小鼠分支选择损伤神经源性疼痛模型中的镇痛作用 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(8): 1180-1182.
- [16] 李阔韬, 李顺堂, 蓝玲, 等. EGFR 及其信号通路在神经病理性疼痛中的作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(6): 474-479.
- [17] 洪嘉琪, 史家欣, 敖欢, 等. 芍药苷通过抑制脊髓 Akt-NF- κ B 信号通路及小胶质细胞激活缓解炎症性疼痛 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(3): 325-333.
- [18] 兰雨, 杨晓. TGF- β 信号在造血发育中的作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(6): 1253-1257.
- [19] 吴艺舟, 林子晨, 孙杰. 基于肿瘤坏死因子 TNF- α 的癌
- 症疼痛机制及临床治疗策略 [J]. 医学理论与实践, 2018, 31(18): 2716-2719.
- [20] Yang R N, Li Z J, Zou Y T, *et al.* Gallic acid alleviates neuropathic pain behaviors in rats by inhibiting P2X7 receptor-mediated NF- κ B/STAT3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 680139.
- [21] 郑雪花, 杨君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98, 102.
- [22] 郑舟琴, 杜宏. 大黄酸药理作用的新进展 [J]. 重庆医学, 2019, 48(22): 3897-3901.
- [23] Zhou Y Y, Gao C F, Vong C T, *et al.* Rhein regulates redox-mediated activation of NLRP3 inflammasomes in intestinal inflammation through macrophage-activated crosstalk [J]. *British J Pharmacol*, 2022, 179(9): 1978-1997.
- [24] Chen P, Lin D S, Wang C, *et al.* Proteomic analysis of emodin treatment in neuropathic pain reveals dysfunction of the calcium signaling pathway [J]. *J Pain Res*, 2021, 14: 613-622.
- [25] 陈鹏, 王琛, 罗瑞熙, 等. 大黄素通过调节血清代谢改善神经病理性疼痛的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2187-2194.
- [26] 王瑞婕, 杨勇, 白婷. 大黄素甲醚对酒精性肝损伤中 SIRT1-AMPK 通路的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1557-1562.
- [27] Liu B B, Luo M, Meng D Y, *et al.* Tetrahydropalmatine exerts analgesic effects by promoting apoptosis and inhibiting the activation of glial cells in rats with inflammatory pain [J]. *Mol Pain*, 2021, 17: 174480692110421.
- [28] 王安铸, 马晓昌. 延胡索乙素的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1927-1929.

[责任编辑 郑礼胜]