

# 基于网络药理学的柴胡镇痛作用机制初探

谈英<sup>1,2</sup>, 杨晓娟<sup>3</sup>, 韩晓妮<sup>2</sup>, 张跃飞<sup>1,2</sup>, 代春美<sup>4</sup>, 牛明<sup>3\*</sup> (1. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110; 2. 国家中成药工程技术研究中心, 辽宁 本溪 117004; 3. 解放军第302医院全军中医药研究所, 北京 100039; 4. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:目的** 通过采用网络药理学方法,系统分析柴胡镇痛的主要作用机制及作用靶标,并初步阐明口服和注射两种给药方式下作用靶标差异,筛选可用于其质量评价的生物靶标并进行验证。**方法** 基于数据库和文献检索收集柴胡的化学成分及其可能的作用靶标,以文献报道结合口服生物利用度和类药性作为区分口服制剂和注射用药药效成分的原则,从 GeneCards 数据库中检索疼痛相关靶标,利用 DIP 蛋白质相互作用建立成分靶标与疼痛靶标的关联关系,构建柴胡镇痛的“药物成分-靶标-疾病”网络,通过网络分析筛选关键作用靶标并阐释其可能的机制。**结果** 根据网络分析结果,共筛选出 13 个柴胡镇痛作用的主要靶标,包括胰蛋白酶原 1、凝血酶原、二肽基肽酶 4、乙酰胆碱酯酶、环氧化酶 2、激素受体、雌激素受体、核受体辅助激活子 1、一氧化氮合酶 3 等,主要影响细胞增殖、精氨酸分解代谢、血小板活化等过程。针对口服和注射两种不同给药方式下,主要作用靶点差异的分析结果表明,胰蛋白酶原 1、环氧化酶 2 以及一氧化氮合酶 3 均为两种方式的主要作用靶标,可作为其生物评价的重要靶标;同时,注射剂成分对凝血酶原的过多作用可能与其不良反应有关。本研究选择环氧化酶 2 对柴胡的药效作用进行验证,体外试剂盒检测结果表明,柴胡质量浓度为  $3.125 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时可对环氧化酶 2 活性产生显著直接抑制作用。**结论** 网络药理学可有效预测不同给药方式下柴胡镇痛的作用靶标及机制,亦可为构建基于镇痛作用的柴胡质量生物评价方法提供参考。

**关键词:** 柴胡;镇痛作用;网络药理学

doi:10.11669/cpj.2019.02.004 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)02-0098-07

## Investigation of Analgesic Mechanisms of Bupleuri Radix with Network Pharmacology

TAN Ying<sup>1,2</sup>, YANG Xiao-juan<sup>3</sup>, HAN Xiao-ni<sup>2</sup>, ZHANG Yue-fei<sup>1,2</sup>, DAI Chun-mei<sup>4</sup>, NIU Ming<sup>3\*</sup> (1. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China; 2. NERC for the Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Benxi 117004, China; 3. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 4. Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze the major analgesic mechanism and target of Bupleuri Radix with a network pharmacology method, clarify the difference targets between oral administration and injection administration, and validate the possible biological target for its quality evaluation. **METHODS** The chemical components and potential targets of Bupleuri Radix were collected based on the database and literature searching and the analgesic associated targets were searched from Genecards database. All of the targets combined with interactional proteins from DIP database were used to construct a “compound-target-disease” network and the major analgesic mechanism of Bupleuri Radix were then predicted by the key function targets screened from it. **RESULTS** According to the results of network analysis, 13 key targets were screened out, including trypsin-1, prothrombin, dipeptidyl peptidase 4, acetylcholinesterase, COX-2, androgen receptor, estrogen receptor, GABA receptor  $\alpha 1$  and NOS-3, which might affect the process of cell proliferation, arginine catabolic process, platelet activation and so on. Trypsinogen-1, cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-3 were the main targets for both of them, and could be used as the targets for biological evaluation of Bupleuri Radix. At the same time, there were some differences between oral administration and injection of Bupleuri Radix, the excessive effects of injection components on prothrombin may be associated with the adverse reactions of injection. Otherwise, inhibition of COX-2 enzyme activity by *in vitro* testing showed that Bupleuri Radix has good activity at the concentration of  $3.125 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . **CONCLUSION** Network pharmacology provides the potential to predict the analgesic mechanism and to establish new quality evaluation methods of Bupleuri Radix.

**KEY WORDS:** Bupleuri Radix; analgesic effect; network pharmacology

**基金项目:**国家公益性行业专项课题资助(201507002);国家中药标准化项目资助(ZYBZH-Y-TJ-43, ZYBZH-Y-BJ-07, ZYBZH-C-HUN-21);全军医学科技“十二五”科研项目资助(BWS11J049);全军医学科技青年培育项目资助(16QNP151)

**作者简介:**谈英,男,博士,高级工程师 研究方向:中药学 \* **通讯作者:**牛明,男,工程师 研究方向:生物信息学 Tel: (010) 66933325 E-mail: nmbright@163.com

柴胡 (*Bupleuri Radix*) 为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonifolium* Willd.) 的干燥根,具有疏散退热、舒肝解郁、升举阳气等功效<sup>[1]</sup>。柴胡在临床上应用广泛,其口服和注射制剂均有显著的抗炎、镇痛效果,临床疗效确切,如中药复方气滞胃痛颗粒中柴胡为其主要药味,主要治疗慢性胃炎、胃脘胀痛等<sup>[2]</sup>,柴胡注射液可用于感冒引起的全身酸痛。然而,由于柴胡所含成分复杂多样,其镇痛的药效物质和作用机制目前尚不明确,有研究表明,柴胡镇痛可能与挥发油<sup>[3]</sup>、皂苷<sup>[4]</sup>和多糖<sup>[5]</sup>等成分有关,其药效作用可能主要是对炎性因子表达的影响<sup>[6]</sup>、抑制疼痛的神经传导<sup>[7]</sup>以及对病原体的抑制或杀灭<sup>[8]</sup>,是多种途径药理作用的综合体现。

鉴于中药本身的复杂性,传统的研究方法缺少对药效成分和作用机制的整体分析,导致其结果无法全面阐释中药药效作用的内涵。近年来,网络药理学的兴起为中药药效物质及作用机制研究带来了新的思路<sup>[9-11]</sup>,成为中药研究领域的一个热门学科。网络药理学可以将药物作用网络与生物网络整合在一起,从整体上预测药物成分和疾病靶标的关系,通过网络特征分析,快速、高效锁定药物主要作用的疾病靶标,并利用生物信息学方法探讨药物可能的生物学功能及作用机制<sup>[12-13]</sup>。因此,本研究拟采用网络药理学方法对柴胡的镇痛作用机制进行分析,初步阐明口服和注射两种给药方式下可能的药效物质和作用靶标差异,并针对筛选可用于其质量评价的主要作用靶标,并进行体外实验验证,以期对指导柴胡临床合理用药和新药开发以及建立关联临床功效的质量评价方法等提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库及软件

中药系统药理学分析数据库 TCMSP<sup>[14]</sup> (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), 中医药基础数据库 TC-MID<sup>[15]</sup> (<http://www.megabionet.org/tcmid/>), 传统中药数据库 TCM Database @ Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw>), 蛋白质相互作用信息数据库 DIP<sup>[16]</sup> (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>), 蛋白质数据库 UniProt (<http://www.uniprot.org/>), 人类孟德尔遗传数据库 OMIM (<http://www.omim.org/>), 人类基因数据库 GeneCards (<http://www.genecards.org>), 网络可视化及分析软件 Cytoscape (Version 3.6.0)。

### 1.2 仪器与材料

SynergyH2 多功能微孔板检测仪 (美国 BioTek 公司); 万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 台式高速离心机 (美国 Thermo 公司); 微量移液器、多道移液器 (德国 Eppendorf 公司); DK-600S 三用恒温水箱 (上海精宏实验设备有限公司); Vortex-Genie<sup>®</sup> 2 涡旋仪 (深圳市安必胜科技有限公司); 离心管 (美国康宁公司); 电子天平 (美国 Mettler Toledo 公司, 型号: XS-205); 真空冷冻干燥机 (Biosafer 公司)。

### 1.3 药物与试剂

二甲基亚砜 (DMSO, 美国 AMRESCO 公司, 批号 3304C252); 环氧化酶 2 (COX-2) 抑制剂筛选试剂盒 (上海碧云天有限公司, 批号 180227); 柴胡 (华润三九医药股份有限公司, 产地山西)。

### 1.4 药材样品制备

取药材适量, 加入去离子水回流提取 2 次, 将提取液加入体积分数 50% 的乙醇搅拌醇沉, 静置一夜, 抽滤, 减压浓缩, 冷冻干燥。精密称取冻干粉末适量, 加 DMSO 溶解配成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的母液, 超声处理 30 min,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清备用, 使用时将一定量母液加入 DMSO 制成所需浓度的药材供试品溶液。

### 1.5 柴胡镇痛的网络药理学分析

基于 TCMSP、TCMID 和 TCM Database@ Taiwan 数据库收集柴胡的化学成分, 采用文献<sup>[17]</sup>方法预测成分的口服利用度 (oral bioavailability, OB) 和类药性 (drug-likeness, DL), 其中以  $\text{OB} > 30\%$  且  $\text{DL} > 0.18$  的成分作为口服制剂发挥药效作用的主要成分, 以挥发油类成分作为注射剂发挥药效作用的主要成分, 并通过文献检索和软件<sup>[18]</sup>预测获取成分可能的作用靶点信息。基于 MeSH 数据库检索疼痛 (pain) 相关疾病, 并通过 OMIM 和 Genecards 数据库搜集疾病相关的靶标, 所有靶标均通过 UniProt 数据库获取其 UniProt ID 信息。根据柴胡所含化学成分与其作用靶标的对应关系以及 DIP 数据库中的蛋白质相互作用信息, 将搜集到的柴胡化合物成分、药物作用靶标和疾病靶标进行关联, 构建柴胡镇痛的“成分-靶点-疾病”网络, 通过 Cytoscape 软件进行可视化, 并采用 Cytoscape 自带的 Network Analyzer 模块进行网络分析, 获取网络节点的特征参数, 针对柴胡可能作用的疾病靶标, 对其网络节点的度 (degree, D)、中介中心度 (betweenness centrality, BC) 以及邻近中心度 (closeness centrality, CC) 等特征参数

进行分析,筛选柴胡主要作用的疾病靶标,分析不同给药方式下疾病靶标的差异,并利用 DAVID 数据库阐明其作用机制。

1.6 体外生物活性验证

基于网络药理学分析结果,以 Degree 作为主要观察指标,选择不同给药方式下 Degree 均比较高的柴胡直接作用的疾病靶标作为候选指标,并采用体外试剂盒方法验证其药效活性。

2 结果与讨论

2.1 柴胡镇痛的“成分-靶点-疾病”网络构建

基于 TCMSP、TCMID 和 TCM Database@ Taiwan 数据库以及文献检索共收集柴胡中的化学成分 253 个,包括挥发油类成分 203 个、黄酮类成分 20 个、香豆素类成分 9 个、皂苷类成分 10 个、其他成分 11 个;通过文献检索、数据库查询以及软件预测,共收集成分作用的靶点蛋白 367 个;通过 Genecards 数据库收集柴胡可作用到的疼痛相关靶点 1 274 个,其中能够直接作用的疼痛相关靶标 295 个,所构建的网络见图 1A。其中,三角形代表柴胡中的化学成分。从图 1A 中提取柴胡直接作用的疼痛靶标网络见图 1B。

2.2 网络分析及作用靶标筛选

针对图 1A 中的网络,采用 Cytoscape 自带的 Network Analyzer 模块进行网络分析,计算网络中各个蛋白节点的 D、BC 以及 CC 等特征参数。针对 D 大于全部节点 D 值中位数 2 倍的关键节点蛋白,筛选 BC 和 CC 分别大于其全部节点中位数的疾病靶标作为柴胡镇痛作用的主要作用靶标。根据网络分析结果,筛选参数确定为 Degree  $\geq 48$ , BC  $\geq 0.008$ ,

CC  $\geq 0.228$ ,最终筛选出满足条件的靶点 13 个,见表 1。从表 1 中可以看出,根据不同成分作用于上述靶标的数目来讲,口服利用度较高的化合物与挥发油类成分的靶标存在一定差异,挥发油对其中 12 个靶标均有作用,而口服利用度高的化合物可能主要作用于 COX-2、一氧化氮合酶 3 (NOS-3) 以及胰蛋白酶原 1 (trypsin-1)。

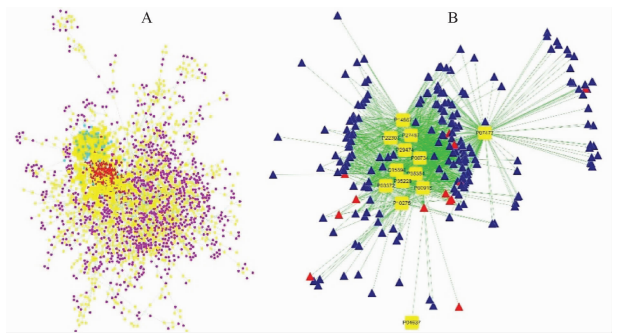


图 1 柴胡镇痛的“成分-靶点-疾病”网络

A - 红色三角形-柴胡中的化学成分,蓝色圆点 - 柴胡成分直接作用的靶点;黄色方形 - 柴胡直接作用的疼痛相关靶点;黄色圆点 - 柴胡间接作用的疼痛相关靶点;紫色圆点 - 与靶点蛋白存在相互作用的蛋白。B - 红色三角形为 OB > 30% 且 DL > 0.18 的成分(14 个),蓝色三角形为挥发油类成分,黄色方形为柴胡直接作用的疼痛相关靶点

Fig. 1 The “compound-target-disease” network for the analgesic effect of Bupleuri Radix

A - the triangle nodes represent the components of Bupleuri Radix, the blue circle nodes represent the targets of the components, the yellow square nodes represent the directed pain targets of the components, the yellow circle nodes represent the undirected pain targets of the components and the purple circle nodes represent the interaction proteins. B - the red triangle nodes represent 14 components of Bupleuri Radix with OB > 30% and DL > 0.18, the blue triangle nodes represent the essential oils of Bupleuri Radix and the yellow square nodes represent the directed pain targets of the components

表 1 柴胡镇痛的主要作用靶点及其相关拓扑参数

Tab. 1 Major targets and their topological parameters for the analgesic effect of Bupleuri Radix

Uniprot ID	Protein name	Degree	Closeness centrality	Betweenness centrality	Essential oils	Components with high OB and DL values
P07477	Trypsin-1	146	0.023	0.245	127	6
P00734	Prothrombin	125	0.013	0.231	102	3
P27487	Dipeptidyl peptidase 4	121	0.01	0.232	100	2
P22303	Acetylcholinesterase	114	0.031	0.245	105	1
P35354	Prostaglandin G/H synthase 2 (COX-2)	99	0.018	0.245	73	12
P14867	GABA Receptor $\alpha 1$	94	0.009	0.241	84	1
P10275	Androgen receptor	87	0.129	0.261	28	1
P03372	Estrogen receptor	86	0.029	0.248	49	1
P29474	Nitric oxide synthase, endothelial (NOS-3)	85	0.016	0.245	70	10
P00918	Carbonic anhydrase 2	73	0.008	0.242	48	1
Q15596	Nuclear receptor coactivator 2	63	0.011	0.241	48	2
P04637	Cellular tumor antigen p53	61	0.15	0.273	0	1
P35228	Nitric oxide synthase, inducible (NOS-2)	58	0.058	0.259	33	2

针对表 1 中的靶标进行分析,柴胡镇痛的主要靶标大致分为 2 类。

第一类是蛋白酶,主要包括胰蛋白酶原 1、凝血酶原、COX-2、NOS2/3、二肽基肽酶 4、乙酰胆碱酯酶以及碳酸酐酶 2。

胰蛋白酶原 1 (trypsin-1) 是胰腺分泌的一种主要胰蛋白酶原亚型, trypsin-1 可以激活蛋白酶活化受体-2 (protease-activated receptor, PAR-2), 引起肥大细胞组胺释放, 导致疼痛<sup>[19]</sup>, 临床上胰蛋白酶的升高与胰腺炎、胰腺癌疼痛密切相关<sup>[20]</sup>, 柴胡在临床上可用于治疗急性胰腺炎, 改善疼痛症状, 其作用机制可能与其对胰蛋白酶的抑制作用有关<sup>[21]</sup>。二肽基肽酶 4 抑制剂常可造成骨关节疼痛<sup>[22]</sup>, 柴胡复方对于骨关节炎和类风湿性关节炎等具有一定治疗作用<sup>[23]</sup>。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase) 是疼痛神经传导中的重要蛋白酶, 对疼痛的发生、发展具有调控作用, 柴胡和醋柴胡可通过作用于胆碱酯酶发挥疏肝止痛的作用<sup>[24]</sup>。机体部分凝血因子 (如 FVII 和 FIX) 缺乏时, 关节和肌肉内出血 (如血友病) 产生的压力和/或局部炎症可引起急、慢性疼痛<sup>[25]</sup>, 凝血酶可有效改善血液凝血障碍<sup>[26]</sup>, 而柴胡可能通过作用于凝血酶原 (prothrombin) 调节机体的凝血过程达到镇痛的效果<sup>[27]</sup>。值得注意的是, prothrombin 也是补体途径中的重要蛋白, 可通过影响 complement component 3 (C3) 和 complement component 5 (C5) 诱导类过敏反应<sup>[28-29]</sup>, 这也可能是柴胡注射液发生不良反应的诱因之一。

炎症反应也是诱发疼痛的一个主要方面, 受细菌、病毒等病原体侵袭或机体自身组织损伤的影响, 体内产生的肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )、白介素 1 (IL-1) 及白介素 6 (IL-6) 等炎症细胞因子<sup>[30]</sup>, 能够促进环氧化酶 (COX-1/2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达量的增加<sup>[31]</sup>, COX-2 是花生四烯酸代谢成前列腺素类物质 (PGs) 的限速酶, 其表达量增加可加速 PGs 的产生, 进而导致水肿、疼痛、发热等炎症反应, 有研究表明, 以 COX-2 抑制剂为代表的非甾体类抗炎药可减轻发热疼痛<sup>[32]</sup>或类风湿性关节炎所引起的疼痛<sup>[33]</sup>, 同时柴胡中皂苷类物质可通过 HIF-1 $\alpha$ /COX-2 信号通路阻断或抑制 COX-2 的激活及其活性<sup>[34-35]</sup>。此外, COX-2、iNOS 等也是浅表性胃炎<sup>[36]</sup>、慢性萎缩性胃炎<sup>[37]</sup>等疾病的重要靶标, 而临床上含柴胡复方如气滞胃痛颗粒、柴胡疏肝散等也主要用于慢性胃炎的治疗。

第二类是受体蛋白, 包括雌激素受体 (ER)、雄激素受体 (AR) 以及  $\gamma$ -氨基丁酸受体 (GABA receptor  $\alpha 1$ )。

雌激素受体 (ER)<sup>[38]</sup> 和  $\gamma$ -氨基丁酸受体 (GABA receptor)<sup>[39]</sup> 广泛分布于神经系统中, 参与痛觉的传递和调制, 雄激素受体 (AR) 可以调节神经对痛觉的适应性反应<sup>[40]</sup>, 而柴胡对机体性激素<sup>[41]</sup> 和 GABA<sup>[42]</sup> 水平的调节作用亦可能是其镇痛药效作用的体现。AR、ER 以及 GABA receptor  $\alpha 1$  是柴胡挥发油的主要作用靶标, 而口服柴胡的入血成分对这些靶标的作用较弱, 因此柴胡注射液可能对于神经性疼痛具有一定疗效<sup>[43]</sup>。

### 2.3 柴胡镇痛直接作用靶标的 GO 富集分析

采用 DAVID 软件对柴胡镇痛的作用靶标进行 GO 富集分析, 包括生物过程 (biological process), 分子功能 (molecular function) 和细胞组成 (cellular component) 3 个部分, 其中显著富集 (Count  $\geq 2$ ,  $P$ -Value  $\leq 0.01$ , FDR  $\leq 0.1$ ) 的结果表 2 ~ 4。结果表明, 从生物过程的富集结果来讲, 柴胡镇痛的靶标主要与细胞增殖、血小板活化、精氨酸代谢、鸟苷酸环化、一氧化氮合成等过程的调节有关; 从分子功能富集结果来说, 柴胡镇痛作用主要与转录因子结合作用、酶的结合作用等方面有关; 从细胞组成的富集结果来说, 柴胡镇痛的靶标主要集中于细胞核染色质、质膜等区域。

表 2 柴胡镇痛靶标的生物过程富集分析

Tab. 2 Biological process enrichment analysis for the analgesic targets of Bupleuri Radix

GOTERM_BP_DIRECT	Count	P
Negative regulation of cell proliferation	4	$2.44 \times 10^{-3}$
Arginine catabolic process	2	$5.70 \times 10^{-3}$
Negative regulation of platelet activation	2	$5.70 \times 10^{-3}$
Positive regulation of guanylate cyclase activity	2	$7.84 \times 10^{-3}$
Cellular response to fluid shear stress	2	$8.54 \times 10^{-3}$
Negative regulation of calcium ion transport	2	$9.25 \times 10^{-3}$
Nitric oxide biosynthetic process	2	$9.25 \times 10^{-3}$

表 3 柴胡镇痛靶标的分子功能富集分析结果

Tab. 3 Molecular function enrichment analysis for the analgesic targets of Bupleuri Radix

GOTERM_MF_DIRECT	Count	P
Transcription factor binding	4	$9.26 \times 10^{-4}$
Enzyme binding	4	$1.47 \times 10^{-3}$
Receptor binding	4	$1.73 \times 10^{-3}$
Nitric-oxide synthase activity	2	$2.13 \times 10^{-3}$
Chromatin binding	4	$2.32 \times 10^{-3}$
Tetrahydrobiopterin binding	2	$2.84 \times 10^{-3}$
Heme binding	3	$4.09 \times 10^{-3}$
Arginine binding	2	$4.97 \times 10^{-3}$

2.4 柴胡镇痛直接作用靶标的通路富集分析

采用 DAVID 软件对柴胡镇痛的直接作用靶标进行通路富集分析,选择 KEGG 数据库作为分类依据,显著富集( $P \leq 0.01$ )的信号通路结果见表 5,主要包括对非小细胞肺癌通路、甲状腺激素信号通路、癌症相关通路、精氨酸生物合成通路等过程的干预作用。目前,临床上含柴胡的复方也常用于非小细胞肺癌、甲状腺炎的治疗<sup>[44-45]</sup>,且对精氨酸诱导的胰腺炎具有较好的疗效<sup>[46]</sup>。

2.5 柴胡镇痛主要作用靶标的体外实验验证

针对上述构建的“药物-靶点-疾病”网络进行简化,提取柴胡中药物与其镇痛主要作用靶点的相互作用关系见图 1B,共有 216 个柴胡成分可作用于表 1 中筛选的直接作用靶标,其中,无论是柴胡口服主要入血成分,还是柴胡注射剂的主要成分,其主要的靶标均包括 P07477 (Trypsin-1)、P35354 (COX-2) 和 P29474 (NOS-3),该结果提示上述靶标或可作为评价柴胡镇痛生物活性的重要候选指标。

为了验证柴胡对上述靶标的作用,本研究选取 COX-2 为研究示例,采用 COX-2 抑制剂筛选试剂盒对柴胡的镇痛作用进行体外实验验证,设置空白对照孔、100% 酶活性对照孔、阳性药样品孔和受试样品孔,每组不少于 3 个复孔,阳性药样品孔和受试样品孔分别加入柴胡样品和阳性药塞来昔布后混匀于 37 °C 孵育 10 min 后,使用酶标仪进行荧光检测,激发波长为 560 nm,发射波长 590 nm。计算样品孔和空白对照孔的平均相对荧光值 (relative fluorescence unit, RFU),分别记录为 RFU<sub>空白对照</sub>、RFU<sub>100% 酶活性对照</sub>和 RFU<sub>样品</sub>,并计算每个样品的抑制率,计算公式:

表 4 柴胡镇痛靶标的细胞组成富集分析结果

Tab.4 Cellular component enrichment analysis for the analgesic targets of Bupleuri Radix

GOTERM_CC_DIRECT	Count	P
Nuclear chromatin	3	$6.87 \times 10^{-3}$
Plasma membrane	8	$8.01 \times 10^{-3}$

表 5 柴胡镇痛直接作用靶标的通路富集分析

Tab.5 Pathway enrichment analysis for the directed analgesic targets of Bupleuri Radix

KEGG_PATHWAY	Count	P
Small cell lung cancer	3	$9.11 \times 10^{-3}$
Thyroid hormone signaling pathway	3	$1.60 \times 10^{-2}$
Pathways in cancer	4	$2.73 \times 10^{-2}$
Arginine biosynthesis	2	$3.42 \times 10^{-2}$

抑制率 (%) = (RFU<sub>100% 酶活性对照</sub> - RFU<sub>样品</sub>) / (RFU<sub>100% 酶活性对照</sub> - RFU<sub>空白对照</sub>) × 100%。

柴胡对 COX-2 抑制效果的剂量-效应曲线见图 2。该结果表明,柴胡可对 COX-2 酶活性产生显著抑制作用,且浓度在 3.125 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间具有明显剂量依赖关系,其剂量-效应曲线与阳性药塞来昔布相似,柴胡对 COX-2 酶活性抑制作用的 IC<sub>50</sub> 约为 6.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 结论

本研究运用网络药理学方法对柴胡镇痛的作用机制进行分析,结果表明,trypsin-1、prothrombin、dipeptidyl peptidase 4、acetylcholinesterase、COX-2、GABA receptor  $\alpha 1$ 、NOS-3 等 13 个蛋白质可能是其主要的靶标,其药效作用主要表现为与酶及转录因子的结合作用,影响细胞增殖、血小板活化、精氨酸代谢、鸟苷酸环化、一氧化氮合成等过程,从多个途径发挥镇痛效果,而柴胡注射剂的不良反应可能与其通过凝血酶原影响补体途径有关。针对柴胡镇痛主要作用靶标 COX-2 的体外实验验证结果表明,柴胡对 COX-2 有较为显著抑制作用,且在质量浓度为 3.125 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时呈现明显的剂量关系,IC<sub>50</sub> 约为 6.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,该结果亦可为构建基于镇痛作用的柴胡质量生物评价方法提供参考。

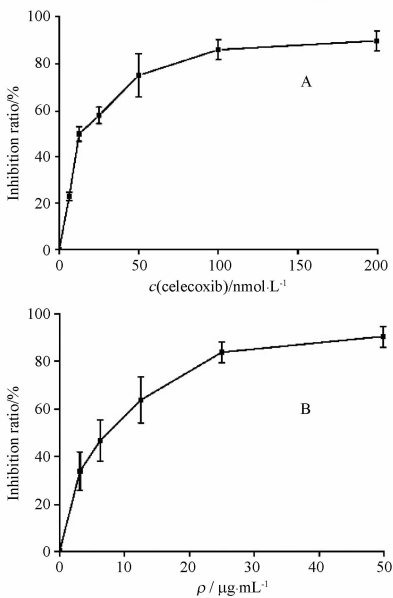


图 2 塞来昔布(A)与柴胡(B)抑制 COX-2 活性的剂量-效应曲线.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig.2 Dose-response curves for the COX-2 enzyme activity inhibition of Bupleuri Radix(A) and celebrex (B).  $n=3, \bar{x} \pm s$

## REFERENCES

- [1] Ch. P 2015. Vol I (中国药典 2015 年版. 一部) [S]. 2015: 280.
- [2] CHEN C X, LI T L, WANG S R. *Pharmacology of Traditional Chinese Medicine* (中药药理学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006: 39.
- [3] XIE H D, JIA X B, CAI B C, *et al.* Experimental study on anti-inflammatory and analgesic effects of volatile oil of *Bupleurum chinense* and *B. scorzonrifolium* [J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2007, 15(2): 108-110.
- [4] YANG L, WANG X Y, LIU C, *et al.* Advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Bupleurum chinense* [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2012, 29(3): 143-144.
- [5] WANG S, BAO Y R, MENG X S, *et al.* Extraction and purification procedure of analgesic effective substances in *Bupleurum chinense* [J]. *Asia Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2012, 8(11): 43-45.
- [6] YANG H, YANG L, JIANG L. Study on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Bupleurum chinense* and *B. marginatum* [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2012, 23(47): 4442-4444.
- [7] HU J L, ZHI L, ZHANG L F, *et al.* Effect of Chaihu Shugan powder on rats with migraine NF-kappa B, C-fos and 5-HT [J]. *Sci Technol Engineer* (科学技术与工程), 2016, 16(12): 205-210.
- [8] LIU Y H, CHEN Y S, XIE W, *et al.* Studies on antiendotoxin action of total saponins from *Radix Bupleuri* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2003, 26(6): 423-425.
- [9] ENGIN H B, GURSOY A, NUSSINOV R, *et al.* Network-based strategies can help mono-and poly-pharmacology drug discovery: a systems biology view [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(8): 1201-1207.
- [10] WANG J, CUI H, WANG R, *et al.* A systems pharmacology-oriented discovery of a new therapeutic use of the TCM formula Li-wei-wuling for liver failure [J]. *Sci Reports*, 2018, 8(1): 5645.
- [11] LI S. Network target: a starting point for traditional Chinese medical network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(15): 2017-2020.
- [12] NIU M, ZHANG C E, WU S N, *et al.* Evaluation of the "multi-efficacy of one drug" of traditional Chinese medicines based on the biological target network: towards precision medicine [J]. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19(1): 44-49.
- [13] CHAI X, MENG Y K, BAI Z F, *et al.* Mechanism of anti-hepatitis B virus activity of *Tonkinensis* based on biological targets network [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2018, 53(3): 396-402.
- [14] RU J L, LI P, WANG J, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13. doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [15] HUANG L, XIE D, YU Y, *et al.* TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 1117-1120.
- [16] XENARIOS I, RICE D W, SALWINSKI L, *et al.* DIP: the database of interacting proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 32(1): 289-291.
- [17] XU X, ZHANG W, HUANG C, *et al.* A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [18] YU H, CHEN J, XU X, *et al.* A systematic prediction of multiple drug-target interactions from chemical, genomic, pharmacological data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37608.
- [19] VERGNOLLE N, BUNNETT N W, SHARKEY K A, *et al.* Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway [J]. *Nat Med*, 2001, 7: 821-826.
- [20] HOOGERWERF W A, SHENOY M, WINSTON J H, *et al.* Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(1): 883-891.
- [21] SHI Q, NIE S Q, HUANG L Q. New progression of chemical component and pharmacological studies of *Radix Bupleuri* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2002, 8(5): 53-56.
- [22] HUANG W H, ZHANG Y K, HOU X Y, *et al.* Risk of arthralgia due to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a Meta-analysis [J]. *Adv Drug React J* (药物不良反应杂志), 2016, 18(4): 261-272.
- [23] ZHANG Y, ZHOU X L, SHAO Q, *et al.* Anti-inflammatory effect of Xiaochaihutang in rats with collagen-induced arthritis and the mechanism [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 2015, 31(9): 781-785.
- [24] CAO F, TANG A M. Effect of Xiaochaihu decoction with different dosages of *Bupleurum chinense* on the content of MTL, ACHE, NO in gastric antrum in normal rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 36(3): 617-619.
- [25] WU R H, ZHANG J S, WU X Y. The pain and control in children hemophilia [J]. *Chin J Thromb Hemost* (血栓与止血学), 2009, 15(5): 236-240.
- [26] WANG Y Z, YIN L J. Effect of local application of hemocoagulase on articular cavity hematocoele after arthroscopic surgery [J]. *Lab Med Clin* (检验医学与临床), 2015, 12(13): 1842-1844.
- [27] HAN L, WANG X W, SHAN H Y, *et al.* Research of modified major bupleurum decoctions effect on liver function and blood coagulation mechanism [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2016, 11(6): 1063-1065.
- [28] SZE BENI J. Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. [J]. *Mol Immunol*, 2014, 61(2): 163-173.
- [29] KRISINGER M J, GOEBELER V, LU Z, *et al.* Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway [J]. *Blood*, 2012, 120(8): 1717-1725.
- [30] LEON L R. Molecular biology of thermoregulation-invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(6): 2648-2655.
- [31] NANTEL F. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 128: 853-859.
- [32] PAN X C, ZHANG X Z. Studies on preparation of nimesulide suppository and its quality control [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39(3): 230-230.
- [33] GONG X M, WANG S, CHEN S, *et al.* Anti-inflammatory action and mechanism on the adjuvant arthritis mouse model of

- petroleum ether extract from *Citrullus lanatus* Vine[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2017, 52(19):1680-1684.
- [34] HOU H L, HE S X, ZHU Z F, *et al.* The role of saikosaponind in regulating HIF-1 $\alpha$ /COX-2 signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)* (西安交通大学学报:医学版), 2011, 32(1):80-84.
- [35] HE S X, LUO J Y, ZHAO G, *et al.* Effect of saikosaponins-d on cyclooxygenase-2 expression of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝脏病杂志), 2006, 14(9):712-714.
- [36] LUO Y Q, WU K C, SUN A H, *et al.* Significance of COX-1, COX-2 and iNOS expression in superficial gastritis, gastric mucosal atypical hyperplasia and gastric carcinoma [J]. *Chin J Digest* (中华消化杂志), 2000, 20(4):223-226.
- [37] KANG J Y, WANG H Y, HUANG B, *et al.* Effects of weiwei granules on COX-2 and p53 in chronic atrophic gastritis rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Digest* (中国中西医结合消化杂志), 2017, 25(8):595-599.
- [38] LI S F, ZHOU W, XING Y, *et al.* Progress on the role of estrogen receptors in pain modulation [J]. *Progr Physiol Sci* (生理科学进展), 2010, 41(2):121-124.
- [39] LI N, CUI K M, LI W M, *et al.* Role of  $\gamma$ -aminobutyric acid and its receptors in pain modulation [J]. *Int J Anesthesiol Resuscit* (国际麻醉学与复苏杂志), 2007, 28(4):342-345.
- [40] CRAFT R M, MOGIL J S, ALOISI A M. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones[J]. *Eur J Pain*, 2004, 8(5):397-411.
- [41] WANG L N, WANG W, JIA T Z. Regulative effect of bupleurum and vinegar-processed bupleurum on the estrogen levels of rats [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2014, 42(1):56-58.
- [42] XIE W, BAO Y, YU L J. Effect of saikosaponin on GABA of hippocampus of chronic kindling induced by pentylenetetrazol in rats[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)* (西安交通大学学报:医学版), 2007, 28(1):21-24.
- [43] REN H. Acupoint Injection Therapy's Clinical Observation of 456 Cases of the Oculomotor Nerve[D]. Wuhan: Hebei Medical University, 2012.
- [44] FAN D Y. Effects of the chaihui longmu decoction on advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2017, 9(24):133-135.
- [45] DENG C, LI J, TANG X Z. Observation of the short-term effects and long-term recurrence rate of Chaihu Shugansan in the treatment of hyperthyroidism thyroid function[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2017, 19(6):107-110.
- [46] ZHU J L. The preventive and therapeutic effect of regulating the IL-6/STAT3 signaling pathway with entrapment scattered dachaihu on CP pancreatic fibrosis induced by L-arginine[D]. Xi'an: Shaanxi University of Chinese Medicine, 2016.

(收稿日期:2018-05-13)