

## 基于网络药理学探讨川芎清脑颗粒改善偏头痛作用机制及验证研究

侯静怡<sup>1</sup>, 倪理琪<sup>1</sup>, 田良良<sup>2</sup>, 徐核<sup>2</sup>, 曹光昭<sup>2</sup>, 王坤<sup>1</sup>, 侯博文<sup>1</sup>,  
张晶晶<sup>2\*</sup>, 杨洪军<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 中医药防治重大疾病基础研究北京市重点实验室, 北京 100700;  
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 本研究采用网络药理学分析与动物实验验证相整合的研究策略, 探讨川芎清脑颗粒 (Chuanxiong Qingnao Granules, CXQN) 改善偏头痛 (migraine headache, MH) 的分子作用机制。动物实验过程均遵循中国中医科学院实验动物伦理委员会的规定。基于网络药理学, 获取 27 个 CXQN 的活性成分及对应的 940 个作用靶点, 交集得到 99 个 CXQN 治疗 MH 的共同靶点, 并筛选出肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、IL-1 $\beta$ 、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 等关键靶点, 富集分析表明 CXQN 治疗 MH 的靶点主要参与环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 等信号通路。进一步通过在硝酸甘油诱导的 MH 大鼠模型中验证发现, CXQN 给药组可显著改善模型大鼠的行为学症状及调节血管活性物质水平, 并显著降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$  和 BDNF 的基因和蛋白表达水平。本研究揭示了 CXQN 治疗 MH 的多成分、多靶点、多通路的作用特征, 且阐明 CXQN 治疗 MH 潜在的作用机制, 为其临床治疗 MH 疾病应用奠定理论基础和科学依据。

**关键词:** 川芎清脑颗粒; 偏头痛; 网络药理学; 作用机制; 分子对接

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3095-11

## Research of the mechanism of Chuanxiong Qingnao Granules in improving migraine based on network pharmacology and experimental validation

HOU Jing-yi<sup>1</sup>, NI Li-qi<sup>1</sup>, TIAN Liang-liang<sup>2</sup>, XU He<sup>2</sup>, CAO Guang-zhao<sup>2</sup>, WANG Kun<sup>1</sup>,  
HOU Bo-wen<sup>1</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>2\*</sup>, YANG Hong-jun<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment for Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** In this study, a research strategy integrating network pharmacology analysis and animal experimental validation was applied to explore the molecular mechanism of Chuanxiong Qingnao Granules (CXQN) in improving migraine headache (MH). All animal experiments were followed the regulation of the Laboratory Animal Ethics Committee of the China Academy of Chinese Medical Sciences. Based on the network pharmacology analysis, the 27 active ingredients and their corresponding 940 targets were obtained, and 99 common targets of CXQN in the treatment of MH were obtained by intersection, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, vascular

收稿日期: 2022-07-14; 修回日期: 2022-08-22.

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021B017-03).

\*通讯作者 Tel: 13910000292, E-mail: hjyang@icmm.ac.cn; zjj4785@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0860

endothelial growth factor A (VEGFA), IL-1 $\beta$ , brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were screened out as hub targets. Enrichment analysis showed that the targets of CXQN in the treatment of MH were mainly involved in cyclic adenosine monophosphate (cAMP), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathways. In addition, the experimental verification in the MH rat induced by nitroglycerin showed that the CXQN administrated groups could significantly improve the behavioral symptoms and regulate the level of vasoactive substances, and reduce the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGFA, IL-1 $\beta$ , and BDNF at gene and protein levels. This study revealed the multi-component, multi-target, and multi-pathway characteristics of CXQN in the treatment of MH, and elucidated the potential mechanism of CXQN in the treatment of MH, laying a theoretical foundation and scientific basis for its clinical application in the treatment of MH diseases.

**Key words:** Chuanxiong Qingnao Granules; migraine headache; network pharmacology; biological mechanism; docking stimulation

偏头痛 (migraine headache, MH) 是一种慢性且反复性发作的神经血管性头痛, 以单侧/双侧出现中度至重度搏动感为主要临床表现<sup>[1]</sup>, 我国 MH 患病率约为 9.3%, 且多见于青壮年<sup>[2]</sup>。MH 目前已严重影响到患者的生活和工作从而降低生活质量, 潜在性增加心血管疾病的患病风险, 如缺血性和出血性脑卒中及静脉血栓栓塞等疾病<sup>[3]</sup>。目前针对 MH 的药物均存在不同程度的不良反应及禁忌症<sup>[4]</sup>, 从而限制了本类药物的临床应用, 且给治疗带来诸多困扰。

MH 在祖国医学中属于“头风”“首风”范畴, 其病因多与瘀血内停、阻滞脑络有关, 治疗以活血化瘀、通络止痛为主<sup>[5]</sup>。川芎清脑颗粒 (Chuanxiong Qingnao Granules, CXQN) 是由《寿世保元》中记载的“清上蠲痛汤”加减而成<sup>[6]</sup>, 其中川芎为君药, 可活血行气、祛风止痛, 防风、当归、白芷可协同川芎加强活血止痛的疗效, 羌活、细辛、菊花也可祛风通络, 此外配伍使用麦冬滋阴生津, 防止温燥之邪伤阴。Chen 等<sup>[7]</sup>分析 CXQN 联合氟桂利嗪治疗 MH, 研究显示 MH 患者血清中的内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、5-羟色胺 (serotonin, 5-HT)、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 表达水平均显著降低, 且显著改善颅脑血流动力学, 抑制病情进展; Wu 等<sup>[8]</sup>观察 CXQN 治疗 MH 患者临床疗效, 结果显示 CXQN 可有效提高 MH 患者的治疗总有效率, 降低中医证候积分, 缓解临床症状, 且效果优于盐酸氟桂利嗪胶囊。CXQN 配伍精良, 疗效确切, 但目前仍然集中于临床研究, 其具体作用机制尚未阐明。

本研究基于网络药理学与动物实验验证相结合, 探索和验证 CXQN 治疗偏头痛的潜在作用靶点及作用通路, 以期阐明 CXQN 治疗偏头痛潜在的作用机制, 为其临床治疗偏头痛疾病应用奠定理论基础和科学依据。

## 材料与方法

**CXQN 活性成分的收集与筛选** CXQN 主要由川芎、当归、防风、菊花、黄芩、羌活、细辛、麦冬、独活、甘草、蔓荆子、细辛、白芷、生姜 14 味中药组成, 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <https://tcmspw.com/tcmsp.php>)<sup>[9]</sup> 查询其主要活性成分, 并根据药物的 ADME 参数, 设定口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ , 类药性 (DL)  $\geq 0.18$  及血脑屏障 (blood brain barrier, BBB)  $\geq 0.3$  作为筛选条件得到 CXQN 作用于中枢神经系统的活性成分<sup>[10]</sup>。

**CXQN 活性成分-预测靶点的获取** 通过 HIT 2.0 (<http://hit2.badd-cao.net>)<sup>[11]</sup> 和 ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>)<sup>[12]</sup> 数据库获取活性成分的靶点注释信息, 再应用三维相似方法, 通过 SEA Search Server (<http://sea.bsclab.org>)<sup>[13]</sup> 和 SwissTarget-Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)<sup>[14]</sup> 数据库预测查询活性成分的潜在靶点, 并将上述数据库中获得靶点合并后通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 规范化后得到活性成分的预测靶点。

**MH 潜在作用靶点的筛选** 本研究以“migraine”关键词进行检索, 在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)<sup>[15]</sup>、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <https://omim.org>)<sup>[16]</sup> 和 PubMed-Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)<sup>[17]</sup> 数据库中进行检索, 并将 2 个数据库获得的靶点合并后通过 UniProt 数据库规范化后得到 MH 疾病相关靶点。

**蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建及关键靶点的获取** 通过 VENN (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 在线工具整合 CXQN 治疗 MH 的作用靶点, 将得到的治疗作用靶点导入到 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>)<sup>[18]</sup> 中, 进行 PPI 分析, 以最低置信度 (confidence) 设置为 0.4 建立 PPI 网络。将该 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.0 平

台进行可视化分析, 并利用插件 cytoHubba 筛选 CXQN 治疗 MH 的关键作用靶点。

**基于 GO (gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 靶点富集分析** 将 CXQN 治疗 MH 的靶点导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)<sup>[19]</sup> 数据库分析靶点的功能和富集通路, 并利用 R 语言中的“ggplot”和“ggpubr”包绘制可视化图像, 获得 CXQN 治疗 MH 的信号通路及生物过程。

**分子对接验证** 为验证筛选出的 CXQN 治疗 MH 潜在关键靶点的准确性, 将“CXQN 活性成分的收集与筛选”项中活性成分与“蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建及关键靶点的获取”项中预测到的潜在作用靶点进行分子对接。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取活性成分的 2D 分子结构, 同时在 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得关键靶点的结构。采用 Schrodinger 软件预测活性分子与关键靶点的结合值, 并采用 PyMOL (version 0.99) 可视化对接结果<sup>[20]</sup>。

**试剂** 注射用硝酸甘油 (批号 H11020289, 北京益民药业有限公司); 西比灵胶囊 (批号 H10930003, 西安杨森制药有限公司); 川芎清脑颗粒 (批号 22010053B, 济川药业集团有限公司提供); 5-HT 酶联免疫试剂盒 (E-EL-0033c)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫试剂盒 (E-EL-R2856c)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫试剂盒 (E-EL-R0015c)、IL-1 $\beta$  酶联免疫试剂盒 (E-EL-R0012c) (Elabscience 科技公司); 4% 多聚甲醛固定液 (P1110, 北京索莱宝生物科技有限公司); FastPure RNA 提取试剂盒 (RC112, 南京诺唯赞生物科技有限公司); FastKing 一步法反转录-荧光定量 (SYBR Green) 试剂盒 [FP313, 天根生化科技 (北京) 有限公司]; TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 引物 (上海生工生物工程技术有限公司); 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI, C1005)、抗荧光淬灭剂 (P0126)、柠檬酸钠抗原修复液 (P0081)、蛋白浓度测定试剂盒 (P0009) (碧云天生物技术有限公司); BDNF 抗体 (GB11559, Servicebio 有限公司); VEGFA 抗体 (66828-1, Proteintech 公司); Rhodamine Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 抗体 (AS026)、Rhodamine Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 抗体 (AS040) (ABclonal 有限公司)。

**仪器** 全自动酶标仪 (型号 EDN, 基因有限公司); 时间分辨定量 PCR 系统 (型号 161006, 鲲鹏基因

RocGene 公司); Nanodrop2000 分光光度计 (美国 Thermo Scientific 科技有限公司); 正置荧光显微镜 (型号 Nikon Eclipse C1, 日本尼康公司)。

**实验动物** 雄性健康 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 体重 200~250 g, 购于斯贝福 (北京) 生物科技有限公司 [许可证号: SCXK (京) 2019-0010], 适应性饲养 5 天, 饲养条件为 12 h 光照/12 h 黑暗, 室温 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 自由饮水和进食。所有动物实验均按照中国中医科学院动物管理和使用委员会批准的方案进行。

**模型建立与给药** 将 60 只大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为空白组、MH 组、CXQN-L、CXQN-M、CXQN-H 组和西比灵 (flunarizine, Flu) 组。CXQN-L、-M、-H 组分别按照 0.90、2.70、8.10 g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$  灌胃 CXQN 溶液, Flu 组按照 1.25 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$  灌胃西比灵溶液, 上述药物均用生理盐水稀释, 空白组及 MH 组灌胃等体积的生理盐水溶液, 各组均连续给药 7 天。末次给药 30 min 后, 除空白组, 其余各组大鼠均给予按剂量体重比 10 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  颈部皮下注射硝酸甘油 (glycerol trinitrate, GTN), 建立 GTN 诱导的 MH 模型, 空白组颈部皮下注射等体积的生理盐水。

**行为学评价** 于大鼠注射硝酸甘油 10 min 后, 记录 1 h 内大鼠的前肢挠头次数, 并对各组大鼠耳红出现时间及消失时间进行观察记录。

**酶联免疫吸附测定 (ELISA) 分析** 造模 4 h 后, 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 常温静置 1 h, 4  $^{\circ}$ C、3 000 r $\cdot$ min $^{-1}$  离心 20 min 后分离血清, 按照试剂盒说明书检测 5-HT 含量; 同时, 取大鼠脑组织匀浆并收集上清液, 应用蛋白浓度测定试剂盒测定上清液中蛋白含量, 按照试剂盒说明书测定 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量。

**苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色** 取上述大鼠脑组织经固定液固定, 常规石蜡包埋切片, 进行 H&E 染色后, 在光学显微镜下观察脑组织病理变化。

**实时定量 PCR** 采用 FastPure RNA 提取试剂盒提取每组大鼠脑组织总 RNA, 测定浓度后, 分别取 1  $\mu$ g RNA, 进一步采用 FastKing 一步法反转录-荧光定量试剂盒进行逆转录与实时定量 PCR 反应, 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$ 、BDNF 的 mRNA 表达水平, 分别以  $\beta$ -actin 作为内参, 按  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的计算方法进行统计分析, 所用引物序列如表 1 所示。

**免疫荧光化学染色** 大鼠脑组织石蜡切片脱蜡复水, 柠檬酸钠抗原修复, 滴加 VEGFA 一抗 (1:100) 和 BDNF 一抗 (1:100) 于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日孵育对应二抗, DAPI 染核, 抗荧光淬灭封片剂避光封片, 荧光显微镜拍照。

**Table 1** Primers for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *IL*: Interleukin; *TNF- $\alpha$* : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; *VEGFA*: Vascular endothelial growth factor A; *BDNF*: Brain-derived neurotrophic factor

Gene	Sequence (5'-3')
<i>IL-6</i>	Forward: TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC Reverse: GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Forward: GACCTTCCAGGATGAGGACA Reverse: AGCTCATATGGGTCCGACAG
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Forward: TAGCCAGGAGGGAGAACAGA Reverse: TTTTCTGGAGGGAGATGTGG
<i>VEGFA</i>	Forward: GGAGGATGTCCTCACTTGGGA Reverse: CAAACAGACTTCGGCCTCTC
<i>BDNF</i>	Forward: GGGTGAAACAAAGTGGCTGT Reverse: ATGTTGTCAAACGGCACAAA
$\beta$ -Actin	Forward: TGTTACCAACTGGGACGACA Reverse: GGGGTGTTGAAGTCTCAAA

**统计学分析** 用 GraphPad Prism 软件 7.0 进行统计分析, 所有数据均表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。通过单向方差分析 (ANOVA) 及 Tukey 事后检验比较多组平均值。通过 Student's *t* 检验分析两组间差异。  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义, 每个实验重复 3 次。

**Table 2** Information of active compound of Chuanxiong Qingnao Granules (CXQN). OB: Oral bioavailability; DL: Drug-likeness; BBB: Blood Brain Barrier; CZ: Cangzhu; HQ: Huangqin; JH: Juhua; CX: Chuanxiong; BZ: Baizhi; MD: Maidong; FF: Fangfeng; XX: Xixin; QH: Qianghuo; DH: Duhuo; MJZ: Manjingzi; DG: Danggui; GC: Gancao; SJ: Shengjiang

No.	Compound	CAS	OB%	DL	BBB	Source
1	Alloisioimperatorin	35214-83-6	34.80	0.22	0.43	BZ, QH
2	Ammidin	482-44-0	34.55	0.22	0.92	BZ, DH, FF, QH
3	Bergaptin	7380-40-7	41.73	0.42	0.70	QH
4	Cnidilin	14348-22-2	32.69	0.28	0.52	BZ, DG, QH
5	Coptisine	3486-66-6	30.67	0.86	0.32	HQ
6	Cryptopin	482-74-6	78.74	0.72	0.41	XX
7	Dihydrocapsaicin	19408-84-5	47.07	0.19	0.47	SJ
8	Ethyl oleate	111-62-6	32.40	0.19	1.10	BZ
9	Glabranin	41983-91-9	52.90	0.31	0.31	GC
10	Glabridin	59870-68-7	53.25	0.47	0.36	GC
11	Isofucosterol	18472-36-1	43.78	0.76	0.97	JH
12	Isoimperatorin	482-45-1	45.46	0.23	0.66	BZ, DG, DH, FF, QH
13	Isoindigo	476-34-6	94.30	0.26	0.32	DH, QH
14	Mandenol	544-35-4	42.00	0.19	1.14	BZ, CX, FF
15	<i>O</i> -Acetylcolumbianetin	23180-65-6	60.04	0.26	0.34	DH
16	Ostruthin	148-83-4	30.65	0.23	0.79	DH, QH
17	Panicolin	41060-16-6	76.26	0.29	0.31	HQ
18	Phaseolinisoflavan	40323-57-7	32.01	0.45	0.46	GC
19	Phellopterin	2543-94-4	40.19	0.28	0.48	BZ, FF, QH
20	Phyllanthin	10351-88-9	33.31	0.42	0.57	DG
21	Prangenidin	642-05-7	36.31	0.22	0.50	FF
22	Shinpterocarpin	157414-04-5	80.30	0.73	0.68	GC
23	Stigmasterol	83-48-7	43.83	0.76	1.00	BZ, CZ, DG, MD, HQ, JH, MJZ
24	Supraene	111-02-4	35.55	0.42	1.73	BZ
25	Truflex	84-78-6	43.47	0.24	0.60	JH
26	Vestitol	20879-05-4	74.66	0.21	0.30	GC
27	$\beta$ -Sitosterol/sitosterol	83-46-5	36.91	0.75	0.99	CX, DG, DH, FF, GC, HQ, JH, MJZ, QH

## 结果

### 1 CXQN 活性成分-预测靶点的获取

基于 TCMSP 数据库搜索 CXQN 的活性成分, 并依据药物的 ADME 参数, 设定  $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$  和  $BBB \geq 0.30$  作为筛选条件, 共获取活性成分 27 个 (表 2), 其中川芎活性成分 2 个, 白芷活性成分 9 个, 麦冬活性成分 1 个, 防风活性成分 6 个, 黄芩活性成分 4 个, 菊花活性成分 4 个, 细辛活性成分 1 个, 羌活活性成分 9 个, 独活活性成分 6 个, 蔓荆子活性成分 2 个, 苍术活性成分 1 个, 当归活性成分 5 个, 甘草活性成分 6 个, 生姜活性成分 1 个。将筛选出的活性成分所对应的靶点进行汇总, 删除重复靶点后, 共得到成分靶点 940 个。

### 2 CXQN 治疗 MH 的 PPI 网络的构建、关键靶点的筛选与功能富集分析

通过检索 GeneCards、OMIM 和 PubMed-Gene 数据库, GeneCards 数据库共搜索到 113 个靶点, OMIM 数据库共搜索到 116 个靶点, PubMed-Gene 数据库共搜索到 287 个靶点, 将上述数据库获得的靶点合并去重, 并通过 UniProt 数据库规范化后获得 374 个 MH 靶点。将 CXQN 药物靶点与 MH 药物靶点导入 VENN 在线工

具, 取其交集, 得到重合靶点 99 个。将得到的 99 个共有靶点导入 STRING 数据库以获得 PPI 网络, 并将其导入 Cytoscape 平台进行可视化分析。如图 1 所示, 该 PPI 网络共包含 97 个节点 (node) 和 789 条相互作用边 (edge)。基于 Cytohubba 插件计算该网络中的拓扑参数以寻找 CXQN 治疗 MH 的关键靶点。根据网络拓扑分析中位数原则<sup>[21]</sup>, 以度值 (degree) > 中位数 (15), 介数中心性 (betweenness centrality) > 中位数 (119.3), 且中心接近度 (closeness centrality) 排名前 5 名作为筛选条件, 得到 CXQN 治疗 MH 的核心靶点: TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$ 、BDNF (表 3)。

**Table 3** Topological parameters of hub targets

Target	Degree	Betweenness centrality	Closeness centrality
TNF- $\alpha$	51	570.67	71.83
IL-6	49	457.15	71
VEGFA	46	686.32	68.66
IL-1 $\beta$	43	400.00	68.33
BDNF	44	1 038.04	69.66

将 99 个共有靶点导入 DAVID 数据库进行靶点的功能和富集通路, 如图 2A 所示, 通过 GO 分析可知 CXQN 治疗 MH 主要涉及类固醇结合、G-蛋白偶联血清素受体活性、转录共激活因子结合等生物过程 (biological process, BP); 细胞组分 (cellular components, CC) 主要涉及质膜、受体复合物、突触前膜的组成部分等过程; 分子功能 (molecular functions, MF) 主要涉及一氧化氮生物合成过程的正调控、细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular regulated protein kinase 1, ERK1) 和 ERK2 级联的正调控、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性的正调节等过程。如图 2B 所示, CXQN 治疗 MH 主要涉及环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 等信号通路, 表明 CXQN 的作用靶点参与不同类型的信号通路, 其“多成分-多靶点-多通路”相互协同调节是 CXQN 治疗 MH 的作用机制。

### 3 CXQN 活性成分与关键靶点分析对接验证

将 CXQN 活性成分分别与网络分析获取的 5 个核心靶点 TNF- $\alpha$  (PDB ID: 2AZ5)、IL-6 (PDB ID: 4CNI)、VEGFA (PDB ID: 1MKG)、IL-1 $\beta$  (PDB ID: 5R8Q)、BDNF (PDB ID: 1B8M) 进行分子对接。分子对接结果显示 (图 2A), CXQN 的活性成分与关键靶点均具有较好的结合活性。分别选择与关键靶点结合活性较高

的活性分子进行可视化分析, 如图 2B 所示, panicolin 与 TNF- $\alpha$  蛋白中的氨基酸残基 Tyr119 和 Tyr151 形成氢键相互作用, 与 Tyr59 上的苯环形成疏水性相互作用; glabranin 分别与 IL-6、IL-1 $\beta$ 、VEGFA 和 BDNF 蛋白中的氨基酸残基 Lys86/Leu64、Asn108/Met148、Leu32/Glu30 和 Ser15/Glu9 形成氢键相互作用。

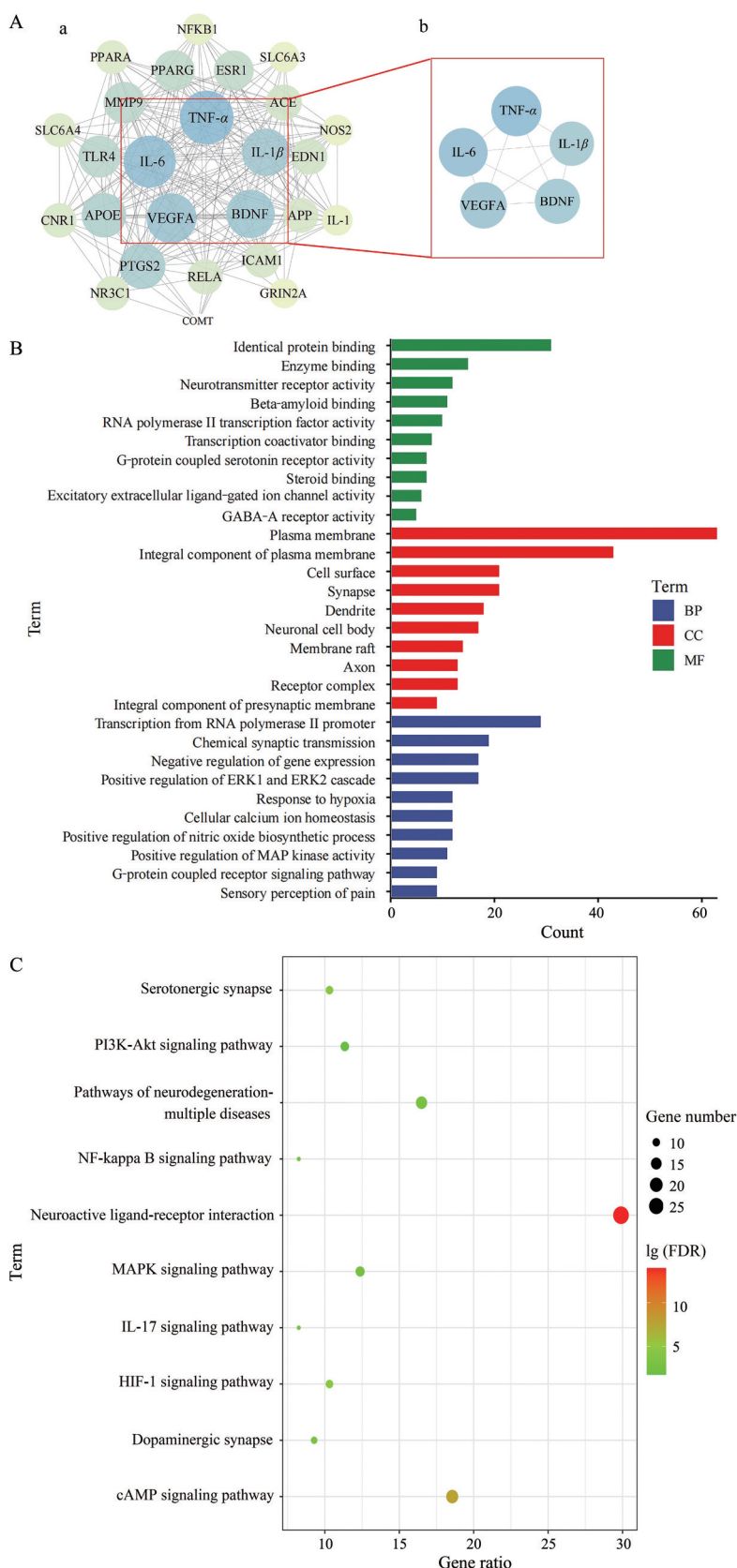
### 4 CXQN 显著改善大鼠 MH 症状

如图 3A 所示, 与空白组相比, MH 组大鼠在 1 h 内挠头次数及耳红持续时间显著增加 (空白组未出现耳红现象,  $P < 0.01$ ), 初步表明由 GTN 诱导的偏头痛模型复制成功; 与 MH 组相比, 阳性药-Flu 组和 CXQN 给药组 (CXQN-L、CXQN-M、CXQN-H) 的大鼠挠头次数和耳红持续时间均显著减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与空白组比较, MH 组血清中的 5-HT 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与 MH 组相比, Flu 组和 CXQN-M、CXQN-H 组血清中的 5-HT 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), CXQN-L 血清中的 5-HT 水平无明显差异。H&E 染色结果显示, 空白组神经元排列有序, 细胞边界清晰 (蓝色箭头); MH 组脑膜处大量的瘀血及血管扩张现象 (绿色箭头), 血管周围可见炎症细胞浸润 (红色箭头), 且神经元细胞皱缩, 排列紊乱; 而与 MH 组相比, CXQN-H 组 ( $8.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 中, 脑膜处瘀血、血管扩张损伤及炎症细胞浸润状况明显优于 MH 组, 且神经元细胞皱缩状态显著改善 (图 3B), 表明 CXQN 能改善 MH 大鼠的行为学症状及调节血管活性物质水平以发挥治疗 MH 作用。

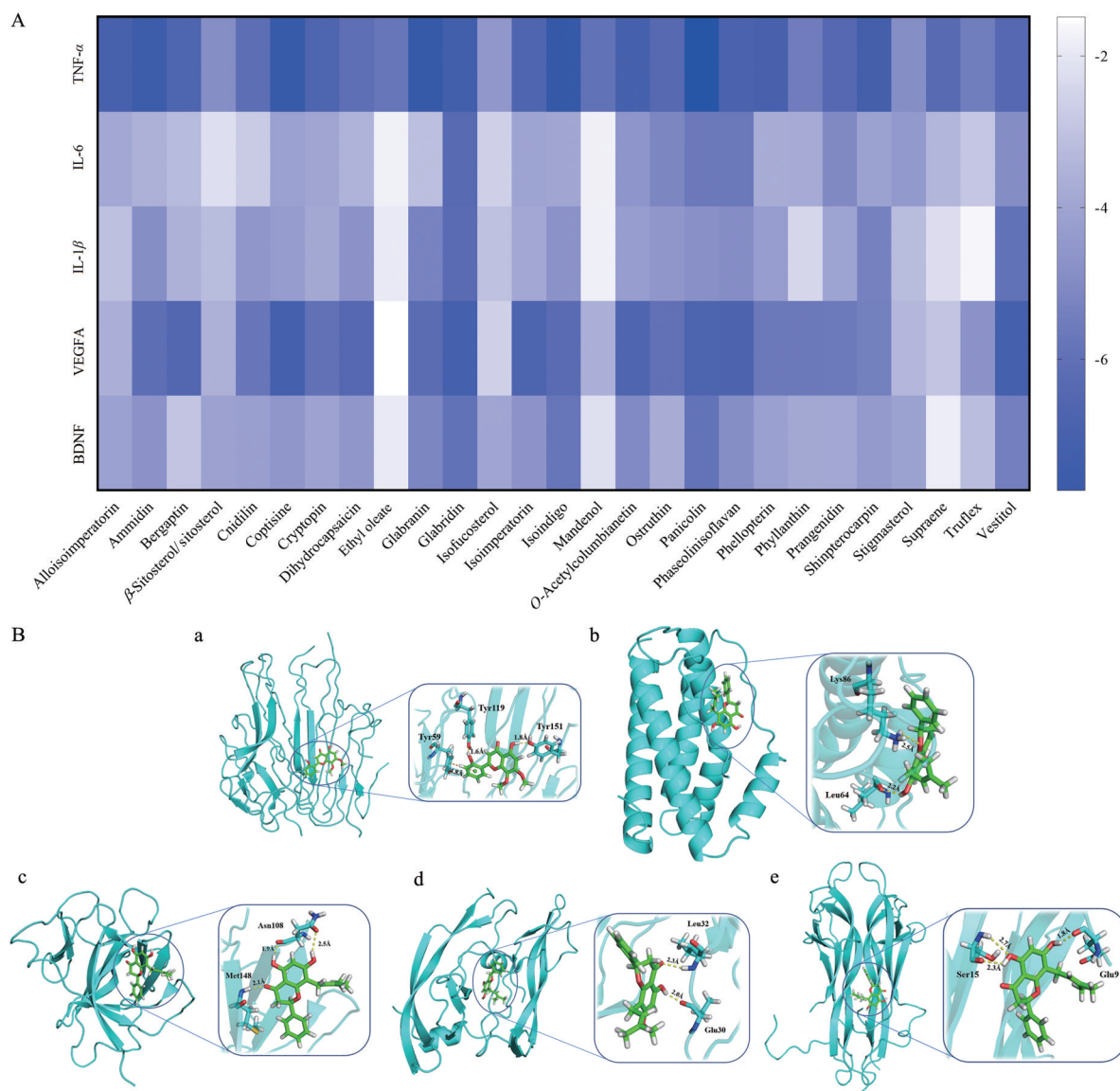
### 5 CXQN 调节 MH 核心靶点基因和蛋白的表达

如图 4 所示, 与空白组相比, MH 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$ 、BDNF mRNA 水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 与 MH 组相比, CXQN 给药组 (CXQN-L、CXQN-M、CXQN-H) 的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  mRNA 水平均显著性下调 ( $P < 0.01$ ), CXQN-M 和 CXQN-H 的 BDNF 和 VEGFA mRNA 水平显著下调 ( $P < 0.05$ ), 其他给药组仅有下降趋势但无显著性差异。

如图 5A~C 所示, 与空白组相比, MH 组的 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的蛋白表达量明显增加 ( $P < 0.05$ ); 而 CXQN 给药组的 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平均有所降低, 且 CXQN-H 组的蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 进一步结合免疫荧光观察 CXQN 调节 VEGFA 和 BDNF 核心靶点的蛋白表达, 如图 5D~G 所示, 与空白组相比, MH 组的 VEGFA 和 BDNF 的蛋白表达量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 MH 组相比, CXQN-H 组中的 VEGFA 和 BDNF 蛋白表达量显著性降低 ( $P < 0.01$ ), 表明 CXQN 通过 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGFA 和 BDNF 等关键靶点发挥治疗偏头痛的作用。



**Figure 1** Hub targets screening and functional enrichment. A: The process of the screening of hub targets. a: Protein-protein interaction (PPI) network with degree > 15 and betweenness centrality > 119.3; b: The PPI network with top 5 closeness centrality; B, C: Functional enrichment analysis of targets. Gene ontology (GO) enrichment analysis (B); Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis (C). BP: Biological process; CC: Cellular components; MF: Molecular functions; FDR: False discovery rate



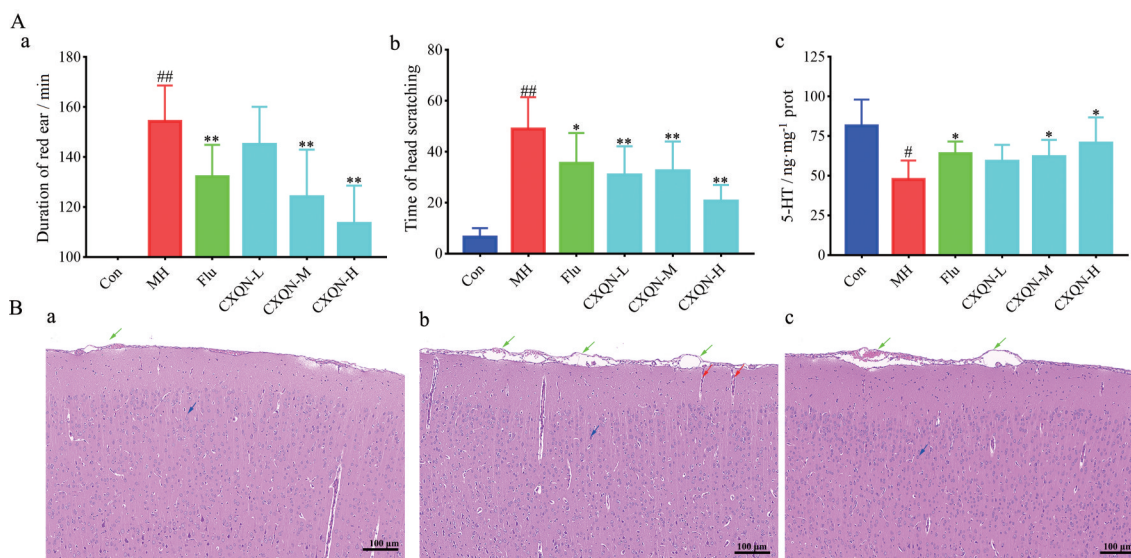
**Figure 2** Docking stimulation. A: Heatmap of the docking scores of hub targets combining with bioactive compounds in CXQN; B: Molecular docking stimulation of bioactive compound-hub target. a: Panicolin to TNF- $\alpha$  (docking score = -7.73); b: Glabranin to IL-6 (docking score = -5.246); c: Glabranin to IL-1 $\beta$  (docking score = -5.153); d: Glabranin to VEGFA (docking score = -5.892); e: Glabranin to BDNF (docking score = -4.885)

## 讨论

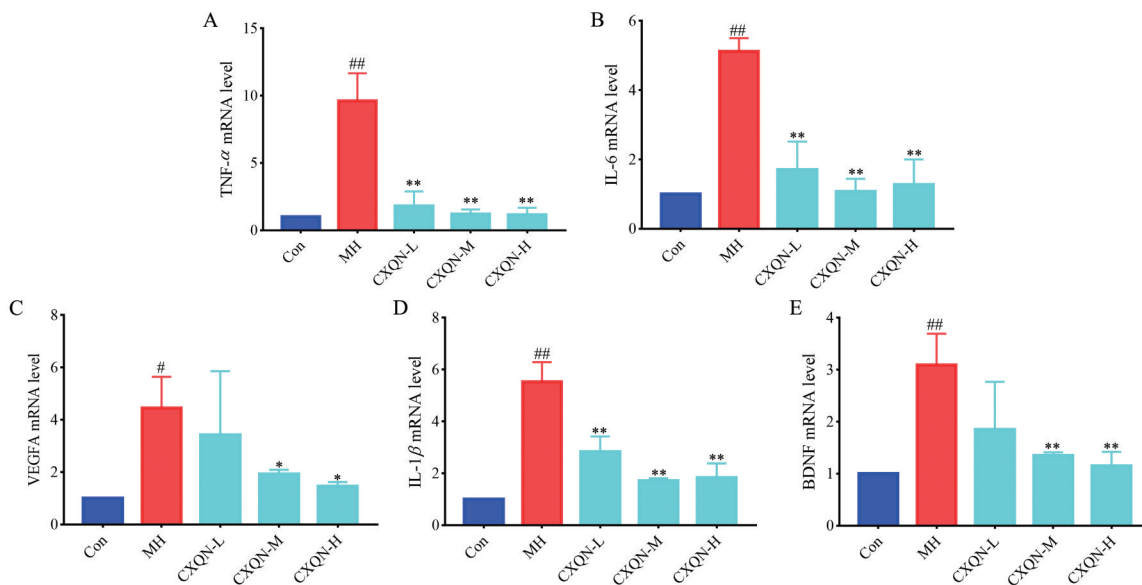
本研究利用网络药理学对 CXQN 防治偏头痛的作用靶点和相关通路进行挖掘, 探究其潜在分子机制, 主要通过 PPI 网络分析筛选出了 CXQN 治疗偏头痛的 5 个核心靶点, 并通过分子对接和动物实验对其药效和相关分子机制进行了初步验证。通过数据库比对筛选出 CXQN 的 27 个作用于中枢神经系统的活性成分。研究表明, 甘露醇具有快速脱水的作用, 有效减轻血管扩张并清除缺氧自由基, 从而达到缓解止痛的效果<sup>[22]</sup>;  $\beta$ -谷甾醇可通过作用于人体垂体-肾上腺素系统抑制炎症因子的产生, 同时抑制细胞外调节蛋白激酶 1/2 通路的

表达而降低细胞的凋亡, 从而起到抗炎镇痛的作用<sup>[23]</sup>。

网络药理学分析结果显示, CXQN 治疗偏头痛的潜在作用靶点共 139 个, 其核心靶点包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$ 、BDNF。PPI 网络及富集分析显示这些靶点基因间具有较强的相互作用, 并可能涉及神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 参与一氧化氮生物合成过程的正调控、化学突触传递、对缺氧的反应、炎症反应等生物学进程, 影响质膜、受体复合物、突触后膜等分子功能, 表明中药复方的“多成分-多靶点-多途径”的作用机制特征与中医药整体性观念不谋而合<sup>[10]</sup>。HIF-1



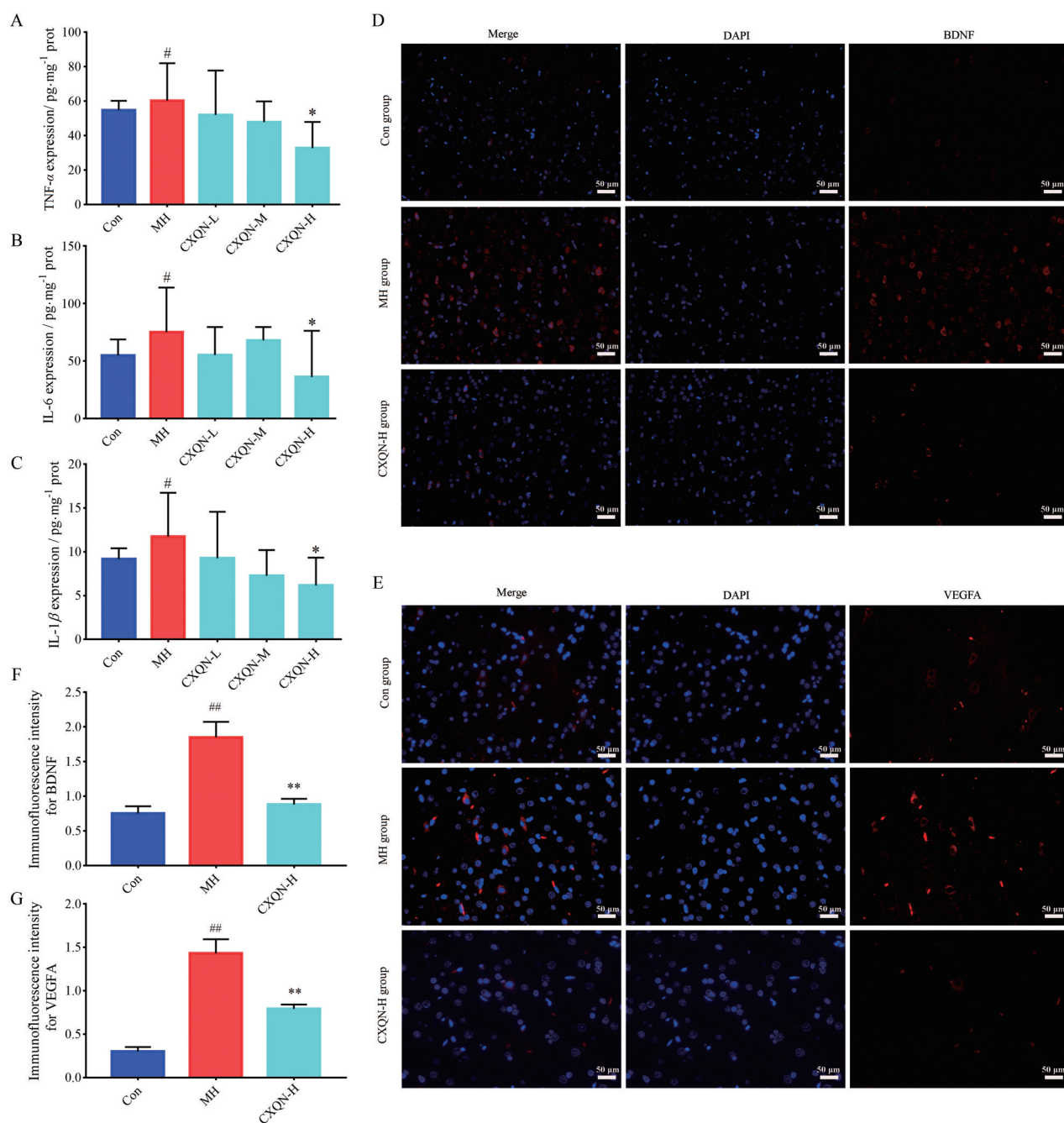
**Figure 3** CXQN improve migraine headache (MH) symptoms. A: Behavioral observations and pharmacological indexes. a: Comparative study on the duration of ear redness; b: Comparative study on the number of head scratching; c: 5-Hydroxytryptamine (5-HT) in the rat serum.  $n = 10, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs the control group (Con); <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the MH group. Flu: Flunarizine ( $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); CXQN-L, -M, -H: CXQN-low ( $0.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), -medium ( $2.70 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), -high ( $8.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) groups; B: Pathological changes of the CXQN ( $8.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) in rat brain tissue after glycerol trinitrate (GTN) induced migraine. a: Control group; b: MH group; c: CXQN-H group. Blue, red, and green arrows indicate the neuron, the inflammatory cell infiltration, and the hemangiectasis, respectively. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 4** Effect of the CXQN on the mRNA expression in GTN induced migraine. A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-6; C: VEGFA; D: IL-1 $\beta$ ; E: BDNF.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs the control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the MH group

是在缺氧环境下产生且对氧敏感的一类转录因子,其激活可减少脑损伤并促进功能恢复<sup>[24]</sup>,另有研究表明<sup>[25]</sup>, HIF-1 $\alpha$ 调控血管内皮生长因子,促进红细胞生成素的产生,并促进血管新生重建而降低血浆蛋白外渗发挥治疗偏头痛的作用;cAMP是参与细胞内多种生理和病理过程的重要物质,参与调控脑组织中神经营

养因子相关蛋白的表达而促进大脑中的神经再生<sup>[26]</sup>; PI3K-Akt信号通路是细胞内重要的生存信号转导通路,调节葡萄糖转运和细胞增殖、分化和凋亡,Liu等<sup>[27]</sup>研究证实该信号通路在偏头痛模型中被激活,对神经具有保护功能且可抑制氧化应激等神经元自噬。核心靶点中, TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 作为炎症因子促进神经源性



**Figure 5** Effect of the CXQN on the protein expression in GTN induced migraine. A-C: ELISA results for TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), and IL-1 $\beta$  (C) ( $n = 6$ ); D, E: Immunofluorescence for BDNF (D) and VEGFA (E); F, G: Immunofluorescence intensity for BDNF (F) and VEGFA (G) ( $n = 3$ ).  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs the control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the MH group. DAPI: 2-(4-Amidinophenyl)-6-indole-carbamidine dihydrochloride

炎症启动并维持外周敏化<sup>[28]</sup>。研究表明<sup>[29]</sup>, IL-6可增强脑膜传入系统的兴奋性, 促进疼痛信号传导; TNF- $\alpha$ 通过促进降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 等炎性因子的合成, 提高脑膜伤害感受器的敏感性并进一步促使神经元过度兴奋导致持续性头痛<sup>[30]</sup>; IL-1 $\beta$ 提高血管内皮细胞表达细胞间黏附因子, 进一步加重三叉神经炎症反应, 从而增加脑膜伤害

性感受器的敏感性<sup>[31]</sup>。VEGFA作为血管生长因子促进血管内皮细胞发生分裂与增生, 并提升其通透性导致血浆蛋白外渗<sup>[32]</sup>, 相关研究显示, 偏头痛患者的VEGFA水平异常增高, 血管通透性显著增加参与偏头痛的发生<sup>[33]</sup>。BDNF作为中枢和外周痛觉通路的重要调节因子, 为多巴胺和5-羟色胺能神经元提供营养物质, 有研究发现<sup>[34]</sup>, BDNF与CGRP共表达, 并通过对神经可塑

性的调节参与调控中枢敏化。

本研究采用硝酸甘油所诱导的偏头痛模型, 该模型能较好地模拟临床中偏头痛的症状和病理特点<sup>[35]</sup>, 并以耳红持续时间增加<sup>[36]</sup>、挠头次数增多<sup>[37]</sup>为主要行为学表现, 是目前运用较为广泛的动物偏头痛模型<sup>[38]</sup>。CXQN 给药组的大鼠挠头次数和耳红持续时间均显著减少且脑组织炎症浸润降低, 表明其可有效改善硝酸甘油所致的偏头痛症状; 通过 RT-PCR、ELISA 及免疫荧光实验进一步证实 CXQN 通过调节 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、VEGFA 和 BDNF mRNA 和蛋白的表达发挥治疗偏头痛的作用。

综上所述, CXQN 可能通过调节 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGFA、IL-1 $\beta$ 、BDNF 的表达及相关通路降低炎症因子的释放, 调控血管通透性及中枢敏化对偏头痛模型产生保护作用, 为 CXQN 临床治疗偏头痛提供实验依据。然而, 本研究仍有不足之处: 所获取的 CXQN 的化学成分和靶点均来源于数据库, 与实际研究结果会有一定差异, 后期有必要开展更多分子生物学实验对其进行验证。

**作者贡献:** 侯静怡负责研究设计、结果分析及文章撰写; 田良良和徐核参与实验操作与数据采集; 倪理琪、曹光昭、王坤和侯博文参与实验设计和实验技术的提供; 杨洪军和张晶晶负责实验监督及论文审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- Gerring ZF, Nyholt DR. Can we predict those at higher risk for migraine? [J]. *Per Med*, 2016, 13: 205-207.
- Yu S, Liu R, Zhao G, et al. The prevalence and burden of primary headaches in China: a population-based door-to-door survey [J]. *Headache*, 2012, 52: 582-591.
- Wood H. Migraine: migraine - a risk factor for cardiovascular disease? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 194-195.
- Feng JX. Efficacy and safety analysis of flunarizine in the treatment of migraine [J]. *Electron J Clin Med Lit (临床医药文献电子杂志)*, 2020, 7: 19-20.
- Liu Z, Du S, Gu JH, et al. Study on prescription medication rules of modern Chinese materia medica compound in treating chronic migraine based on data mining [J]. *China Med Her (中国医药导报)*, 2022, 19: 11-15.
- Li YH, Jiao YG, Li YM. A meta-analysis of comparison of the efficacy and safety of the Chuanxiong Qingnao Granules plus flunarizine versus flunarizine alone on migraine [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2020, 12: 142-146.
- Chen J, Tian HJ, Zhang W, et al. Effect of Chuanxiong Qingnao Granules combined with flunarizine on craniocerebral hemodynamics in patients with migraine and the effects of ET-1, 5-HT and CGRP levels [J]. *Guizhou Med J (贵州医药)*, 2022, 46: 302-303.
- Wu PR, Sun CM, Du YN, et al. Clinical effects of Chuanxiong Qingnao Granules on migraine patients [J]. *Med J Chin People's Health (中国民康医学)*, 2022, 34: 75-77, 84.
- 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.
- Zhu N, Hou J, Yang N. Network pharmacology integrated with experimental validation revealed the anti-inflammatory effects of *Andrographis paniculate* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 9752.
- Yan D, Zheng G, Wang C, et al. HIT 2.0: an enhanced platform for herbal ingredients' targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 7: 1238-1243.
- Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 976-982.
- Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 197-206.
- Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 32-38.
- Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards version 3: the human gene integrator [J]. *Database (Oxford)*, 2010, 2010: baq020.
- Amberger JS, Hamosh A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): a knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1.2.1-1.2.12.
- Zhou J, Rudd KE. EcoGene 3.0 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 613-624.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 605-612.
- Hou JY, Wu JR, Xu D, et al. Integration of transcriptomics and system pharmacology to reveal the therapeutic mechanism underlying Qingfei Xiaoyan Wan to treat allergic asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114302.
- Zhu N, Hou J. Exploring the mechanism of action Xianlingubao Prescription in the treatment of osteoporosis by network pharmacology [J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 85: 107240.
- Hou JY, Wu JR, Chen YB, et al. Systematic identification of the interventional mechanism of Qingfei Xiaoyan Wan (QFXYW) in treatment of the cytokine storm in acute lung injury using transcriptomics-based system pharmacological analyses [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60: 743-754.
- Fu CX. Clinical observation of 28 cases of migraine treated with mannitol [J]. *Heilongjiang Med J (黑龙江医学)*, 2005, 29: 959-

- 960.
- [23] Cicero AF, Allkanjari O, Busetto GM, et al. Nutraceutical treatment and prevention of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. *Arch Ital Urol Androl*, 2019, 91: 3.
- [24] Dadgostar E, Rahimi S, Nikmanzar S, et al. Aquaporin 4 in traumatic brain injury: from molecular pathways to therapeutic target [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47: 860-871.
- [25] Liu M, Fan G, Zhang D, et al. Study on mechanism of Jiawei Chaiqin Wendan Decoction in treatment of vestibular migraine based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5528403.
- [26] Koinuma S, Negishi R, Nomura R, et al. TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron-autonomous manner [J]. *J Neurochem*, 2021, 157: 1196-1206.
- [27] Liu YY, Jiao ZY, Li W, et al. PI3K/AKT signaling pathway activation in a rat model of migraine [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 4849-4854.
- [28] Vergne-Salle P, Bertin P. Chronic pain and neuroinflammation [J]. *Joint Bone Spine*, 2021, 88: 105222.
- [29] Liu M, Li Y, Zhong J, et al. The effect of IL-6/Piezo2 on the trigeminal neuropathic pain [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 13615-13625.
- [30] Bonner K, Pease JE, Corrigan CJ, et al. CCL17/thymus and activation-regulated chemokine induces calcitonin gene-related peptide in human airway epithelial cells through CCR4 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132: 942-950.
- [31] Takahashi K, Watanabe M, Suckawa Y, et al. IL-1 $\beta$  in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury [J]. *Eur J Pain*, 2011, 15: 467.
- [32] Sargent KM, Clopton DT, Lu N, et al. VEGFA splicing: divergent isoforms regulate spermatogonial stem cell maintenance [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 363: 31-45.
- [33] Mozafarihashjin M, Togha M, Ghorbani Z, et al. Assessment of peripheral biomarkers potentially involved in episodic and chronic migraine: a case-control study with a focus on NGF, BDNF, VEGF, and PGE2 [J]. *J Headache Pain*, 2022, 23: 3.
- [34] Lemos C, Mendonça D, Pereira-Monteiro J, et al. BDNF and CGRP interaction: implications in migraine susceptibility [J]. *Cephalalgia*, 2010, 30: 1375-1382.
- [35] Demartini C, Greco R, Zanaboni AM, et al. Nitroglycerin as a comparative experimental model of migraine pain: from animal to human and back [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 177: 15-32.
- [36] Urits I, Patel M, Putz ME, et al. Acupuncture and its role in the treatment of migraine headaches [J]. *Neurol Ther*, 2020, 9: 375-394.
- [37] Patel M, Urits I, Kaye AD, et al. The role of acupuncture in the treatment of chronic pain [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2020, 34: 603-616.
- [38] Moye LS, Pradhan AA. Animal model of chronic migraine-associated pain [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2017, 80: 9601-9609.