

[文章编号] 1007-7669(2024)11-0866-07

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.11.12

## 基于网络药理学及实验验证探究石南藤镇痛活性成分的作用机制

唐婷婷<sup>1,2</sup>, 石德志<sup>1,2</sup>, 曹杰<sup>1,2</sup>, 肖莲莲<sup>1,2</sup>, 房雨彤<sup>1,2</sup>, 李秋桐<sup>1,2</sup>, 郑云枫<sup>1,2</sup>,  
嵇晶<sup>1,3</sup>, 程建明<sup>1,2</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省经典名方工程研究中心, 江苏 南京 210023; 3. 中药学类国家级实验教学示范中心, 江苏 南京 210023)

[关键词] 石南藤; 墙草碱; 镇痛; 网络药理学; 胆碱能神经元

[摘要] 目的 探究石南藤镇痛活性成分的作用机制。方法 采用网络药理学方法筛选石南藤镇痛相关的核心靶点, 利用 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。经硅胶柱采用石油醚-乙酸乙酯分离系统体系梯度 (95:5~50:50) 洗脱石南藤阳离子洗脱液部位分离得墙草碱, 用 HPLC 测定纯度。选择 ICR 小鼠随机分为空白组, 阳性对照 (阿司匹林 120 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 模型组和墙草碱低、中、高剂量 (150、300、600 mg·kg<sup>-1</sup>) 值 (均 n=8), 连续给药 7 d, 末次给药后, 除空白组, 各组按每 10 g 体重腹腔注射 0.7% 醋酸 0.1 mL, 考察各组小鼠扭体反应次数及潜伏期; ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$  的含量, 检测脑组织中胆碱乙酰转移酶 (ChAT)、乙酰胆碱 (ACh)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的浓度。结果 网络药理学结果显示, 石南藤筛选出墙草碱、风藤酰胺等核心成分; 富集到关键通路有神经信号传导通路、胆碱能突触通路等。分离墙草碱纯度为 90.42%。动物实验显示, 与模型组比较, 墙草碱低、中、高剂量组扭体次数显著减少 ( $P<0.05$ ), 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量显著降低 ( $P<0.01$ ); 墙草碱三个剂量组脑组织中 ChAT 显著升高 ( $P<0.01$ ), 中、高剂量组 ACh 浓度显著增加 ( $P<0.01$ ), 低、中、高剂量组 AChE 浓度显著降低 ( $P<0.05$ )。结论 石南藤镇痛发挥镇痛的关键活性成分是墙草碱, 通过上调 ChAT、ACh 活性和下调 AChE 参与胆碱能突触通路, 减少疼痛。

[中图分类号] R966

[文献标志码] A

## Study on mechanism of analgesic active constituents from *Piper wallichii* based on network pharmacology and experimental verification

TANG Ting-ting<sup>1,2</sup>, SHI De-zhi<sup>1,2</sup>, CAO Jie<sup>1,2</sup>, XIAO Lian-lian<sup>1,2</sup>, FANG Yu-tong<sup>1,2</sup>, LI Qiu-tong<sup>1,2</sup>, ZHENG Yun-feng<sup>1,2</sup>, JI Jing<sup>1,3</sup>, CHENG Jian-ming<sup>1,2</sup>

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing JIANGSU 210023, China; 2. Jiangsu Province Engineering Research Center of Classical Prescription, Nanjing JIANGSU 210023, China; 3. National Experiment Teaching Center of Chinese Pharmacy, Nanjing JIANGSU 210023, China)

[KEY WORDS] *Piper wallichii*; pellitorine; analgesia; network pharmacology; cholinergic neurons

[收稿日期] 2022-04-22

[接受日期] 2024-02-26

[基金项目] 江苏省科技厅科技项目 (BK20181424)

[作者简介] 唐婷婷, 女, 博士在读, 主要从事中药新药创制与转化应用的研究, E-mail: Tingting9608@163.com。嵇晶, 女, 高级实验师, 博士, 主要从事中药质量研究, E-mail: jier4522@163.com。程建明, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药新剂型、新技术研究及其产品开发, E-mail: cjm7895@163.com

[责任作者] 嵇晶, 程建明

[ **ABSTRACT** ] **AIM** To investigate the analgesic mechanism of the active constituents of *Piper wallichii*. **METHODS** The core targets related to analgesia of *Piper wallichii* were screened by network pharmacology, and GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analyses were carried out by DAVID database. The cationic elution site of Shinan vine was eluted by a silica gel column with a gradient (95:5-50:50) of petroleum ether-ethyl acetate separation system system to isolate the wallwort alkaloids, and the purity was determined by HPLC. Selected ICR mice were randomly divided into a blank group, positive control (aspirin 120 mg · kg<sup>-1</sup>) group, a model group, and low, medium, and high dose (150, 300, and 600 mg · kg<sup>-1</sup>) pellitorine groups (all n=8), and were administered continuously for 7 d. After the last administration, each group was injected intraperitoneally with 0.1 mL of 0.7% acetic acid for every 10 g of body weight except the blank group. The number of twisting responses and latency period in each group were examined. Serum levels of tumour necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , interleukin (IL) -6 and IL-1 $\beta$  were detected by ELISA, and the concentrations of choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholine (ACh), and acetylcholinesterase (AChE) were examined in brain tissues. **RESULTS** The network pharmacological results showed that *Piper wallichii* screened out the core components such as pellitorine and futoamide, and the key pathways such as nerve signalling pathway and cholinergic synaptic pathway. The purity of isolated pellitorine was 90.42%. Animal experiments showed that, compared with the model group, the number of twisting in the low, medium and high dose pellitorine groups was significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the content of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum was significantly reduced ( $P<0.01$ ). ChAT in the brain tissues of the three dose pellitorine groups were significantly higher ( $P<0.01$ ), and the concentration of ACh in the medium and high dose pellitorine groups were significantly higher ( $P<0.01$ ), and the AChE concentration of low, middle and high dose pellitorine groups were significantly decreased ( $P<0.05$ ). **CONCLUSION** The key active constituent in the analgesic effect of *Piper wallichii* is pellitorine, which is involved in the cholinergic synaptic pathway by up-regulating the activities of ChAT and ACh, and down-regulating AChE, thus reducing pain.

疼痛是一种与实际或潜在的组织损伤相关联的、不愉快的感觉和情绪情感复杂体验<sup>[1]</sup>。药物治疗是控制疼痛的常用方法, 但会带来一定的不良反应<sup>[2]</sup>。中药在治疗疼痛方面的应用逐渐增多<sup>[3,4]</sup>, 其可从多靶点、多层面来治疗疼痛, 并有价格低廉、毒副作用小等特点, 备受医学界的关注。石南藤 [*Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz.] 为胡椒科属植物, 有祛风湿、强腰膝、活血止痛功效<sup>[5]</sup>, 研究报道生物碱是胡椒科属的主要化学成分<sup>[6]</sup>。课题组前期研究表明石南藤阳离子洗脱液是发挥镇痛的有效部位, 但镇痛作用是单一活性成分还是有效成分群尚未确定。目前, 笔者尚未见石南藤镇痛的活性成分及其作用机制的报道。本研究结合网络药理学探讨石南藤镇痛的作用机制, 通过硅胶柱层析系统分离石南藤阳离子镇痛活性部位, 得纯度较高的墙草碱, 结合动物模型对其机制进行验证, 为临床应用及后续深入研发提供指导与依据。

## 材料和方法

### 网络药理学分析

1 石南藤有效成分及作用靶点的筛选 石南藤基原较广泛, 本研究石南藤是胡椒科植物石南藤或毛茛

[*Piper puberulum* (Benth.) Maxim.] 的茎、叶或全株。利用中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/index.php/>) 数据库<sup>[7]</sup>和欧洲生物信息研究所 (EBI) 开发的一个靶点与生物活性药物 ChEMBL 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/chembl>) 全面检索石南藤有效成分及其相应靶点, 根据口服利用度 (OB)  $\geq 30\%$  及类药性 (DL)  $\geq 0.18$  进行筛选<sup>[8]</sup>。同时, 通过文献检索补充石南藤的其他有效成分。一些有效成分如墙草碱 (OB 值 23.81%、DL 值 0.06) 不满足上述筛选条件, 但通过前期课题组研究基础和文献检索发现上述成分有明显的抗炎作用<sup>[9]</sup>, 因此本类成分也作为本研究的候选有效成分。通过 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、TTD 数据库检索出与镇痛相关基因。使用 Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny 软件将药物靶点与疾病靶点取交集, 并以韦恩图呈现, 初步获得石南藤与镇痛交集靶点, 即石南藤镇痛潜在作用靶点<sup>[10]</sup>。

2 石南藤“药物-成分-靶点”构建 将石南藤治疗疼痛的潜在作用靶点上传至 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>), 得到蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络中关键节点基因。所得有效成分与镇痛交集靶点的数据输入 Cytoscape 3.8.2 软件 (

bioinformatics.com.cn/) 中, 构建“药物 - 成分 - 靶点”图。其中, 节点代表石南藤有效成分、药物、靶点; 边代表药物与药物、药物与成分、成分与靶点之间的相互关系。使用软件的“Network analyzer”插件对上述网络的节点度值进行分析, 值越大, 表示在网络中越重要<sup>[11]</sup>。

3 GO 和 KEGG 通路富集 将潜在作用靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、Metascape (<https://metascape.org/>) 和微生物网址 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>), “Select Identifier” 设置为 “Official Gene Symbol”, “Select Species” 设置为 “Homo Sapiens”, 设定  $P < 0.05$ , 实现 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析<sup>[12]</sup>。

### 实验验证

1 药品、试剂与仪器 石南藤 (江苏金氏丹科技有限公司, 产地广西, 批号 20190826), 经南京中医药大学刘训红教授鉴定为胡椒科植物石南藤或毛茛的茎、叶或全株。阿司匹林 (拜耳医药保健有限公司); 冰乙酸 (99.5% 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 用蒸馏水配置成 0.7% 备用; 小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$ 、胆碱乙酰转移酶 (ChAT)、乙酰胆碱 (ACh)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) ELISA 测试试剂盒 (南京翼飞雪生物科技有限公司); D001 大孔强酸性苯乙烯系阳离子树脂 (北京索莱宝科技有限公司); 墙草碱 (上海源叶生物科技有限公司, 纯度 98%, 批号 X06N11L130119)。

酶标仪 (德国 PerkinElmer 公司), 暗箱式紫外分析仪 (上海宝山顾村光电仪器厂), Waters e2695 高效液相色谱系统 (含四元泵溶剂系统、在线脱气机和自动进样器)、Waters 2998 型紫外检测器 (PDA) (美国 Waters 公司), Tissuelyer-48 组织研磨机 (上海净信科技有限公司), 大龙 D3024R 高速冷冻离心机 (上海怡赛科学仪器有限公司)。

2 石南藤阳离子洗脱液经硅胶柱分离 石南藤经醇提后再浓缩至  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  生药备用。有效部位制备工艺是取 2 个柱体积 (BV)  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  生药的上样液, 以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流过滤过阳离子吸附树脂, 用 5 BV 的 70% 乙醇溶液洗脱, 洗脱流速为  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 收集洗脱液, 备用。取活化后的 20 g 硅胶, 加入  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  洗脱液 100 mL, 充分搅拌均匀, 蒸干。取活化后的空白硅胶 200 g 装柱, 加样后用空白硅胶 10 g 封口, 石油醚 - 乙酸乙酯分离系统梯度洗脱 (95:5~50:50), 每 50 mL 接一个流分, 一个梯度接 20 个流分<sup>[13]</sup>。收集流分, 浓缩后加甲醇, 进 HPLC 分析, 合并相同的

流分。

3 剂量设计 石南藤粉末日服量均为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。按女性人体平均体重  $60 \text{ kg}$  计, 剂量为  $0.0083 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 按体表面积系数换算成小鼠剂量为  $0.075 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。墙草碱为石南藤指标性成分之一, 低、中和高剂量组分别给予墙草碱 150、300、600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 阳性对照选用阿司匹林 ( $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。

4 分组给药与造模 ICR 小鼠 18~22 g 48 只, 雌雄各半, SPF 级。许可证号为 (沪) 2017-0005, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证编号: 20170005061044。取健康 ICR 小鼠 48 只, 雌雄各半, 在实验室适应 7 d 后, 随机分为 6 组, 每组 8 只, 即空白组, 模型组, 阳性对照 (阿司匹林  $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组和墙草碱低、中、高剂量 ( $150$ 、 $300$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组, 空白组、模型组灌胃给予等量生理盐水 ( $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 其余各组小鼠按每 10 g 体重  $0.1 \text{ mL}$  灌胃给予相应药物, 每日 1 次, 连续 7 d。末次给药后 1 h, 除空白组, 各组按每 10 g 体重腹腔注射 0.7% 醋酸  $0.1 \text{ mL}$ 。

5 统计扭体次数和镇痛率 观察并记录各鼠扭体反应的潜伏期和 30 min 扭体反应的次数 (以腹部凹陷、臀部歪扭、身体扭曲或抽胯为扭体指标)。计算小鼠的镇痛率。镇痛率 (%) = (模型组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 模型组扭体次数  $\times 100\%$

6 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量 采用 ELISA 法。给药第 7 日后, 麻醉小鼠后收集所有小鼠眼底静脉血液,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $3\ 500 \times g$  离心 10 min, 收集上清液。用 ELISA 试剂盒检测小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量。

7 脑组织 ChAT、ACh、AChE 浓度 采用 ELISA 法。给药第 7 日后, 收集所有小鼠脑组织, 称重后匀浆,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12\ 000 \times g$  离心 10 min, 收集上清液。用 ELISA 试剂盒检测脑组织中 ChAT、ACh、AChE 浓度<sup>[14]</sup>。

统计学分析 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。运用 GraphPad Prism 8.3.0 统计软件对实验数据进行分析。组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有显著差异。

## 结 果

### 网络药理学分析

1 有效成分及作用靶点的筛选 文献报道石南藤黄酮类成分均不是胡椒科石南藤的有效成分, 利用数据库筛选胡椒科石南藤 5 个活性成分见表 1, 化学成分作用靶点 28 个, 疾病相关靶点 1 069 个。将药物与疾病靶点绘制韦恩图, 见图 1。药物与疾病相关靶点交集于 13 个靶基因, 即为石南藤镇痛的潜在作用靶点, 部分预测靶点见表 2。

表 1 石南藤有效成分信息表

| 编号 | 化合物名称   | 英文名称                     | OB/%  | DL   |
|----|---------|--------------------------|-------|------|
| 1  | 墙草碱     | pellitorine              | 23.81 | 0.06 |
| 2  | 风藤酰胺    | futoamide                | 28.75 | 0.25 |
| 3  | 荜茇明宁碱   | piperlonguminine         | 30.71 | 0.18 |
| 4  | 几内亚胡椒酰胺 | guineensine              | 26.66 | 0.18 |
| 5  | 二氢荜茇明宁碱 | di-hydropiperlonguminine | 28.86 | 0.46 |

OB: 口服利用率, DL: 类药性

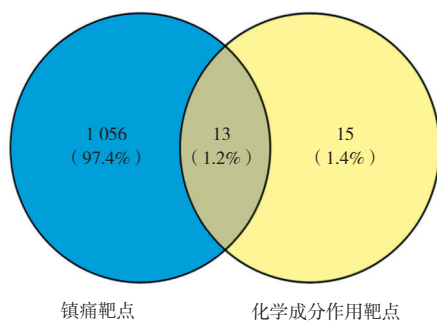


图 1 石南藤与镇痛靶点的韦恩图

2 石南藤“药物-成分-靶点”分析 PPI 网络图中共有 13 个节点, 其中节点度值大于 0.8 的靶点包括 ADRB2、ADRB1、CHRND、CHRNA1、CHRNA4, 表明其可能是石南藤发挥镇痛作用的主要靶点, 在治疗镇痛发挥主要作用, 见图 2。PPI 生成网络包含节点 33 个, 有效成分节点 4 个, 交集靶点 28 个; 含边 43 条。网络中较为重要的成分为风藤酰胺、荜茇明宁碱、几内亚胡椒酰胺、墙草碱, 节点度值分别为 15、12、10、8。风藤酰胺与 ADRB1 等关联, 荜茇明宁碱与 NOS3 等关联, 几内亚胡椒酰胺与 ROS 等关联, 墙草碱与 CHRNA4 等关联, 见图 3。

3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 基于 DAVID 数据库, GO 富集获得生物过程 (BP) 条目 39 条、细胞组成 (CC) 条目 10 条、分子功能 (MF) 条目 14 条, 根据 Count 值 ( $P < 0.05$ ) 分别筛选前 10 个条目, 见图 4。BP 主要包括胆碱能突触传递、神经肌突触传递、褐色脂肪细胞分化等条目, CC 主要包括细胞质膜、细

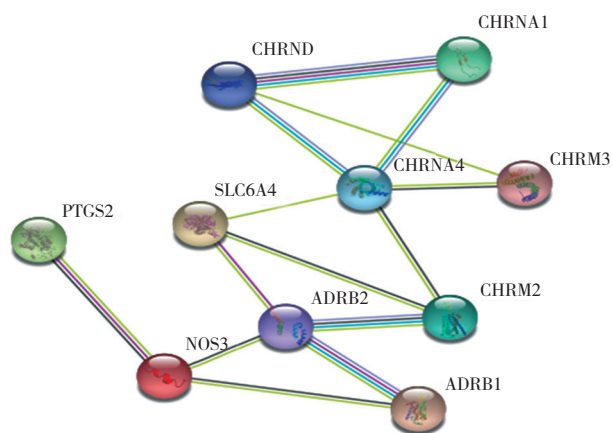


图 2 石南藤蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图

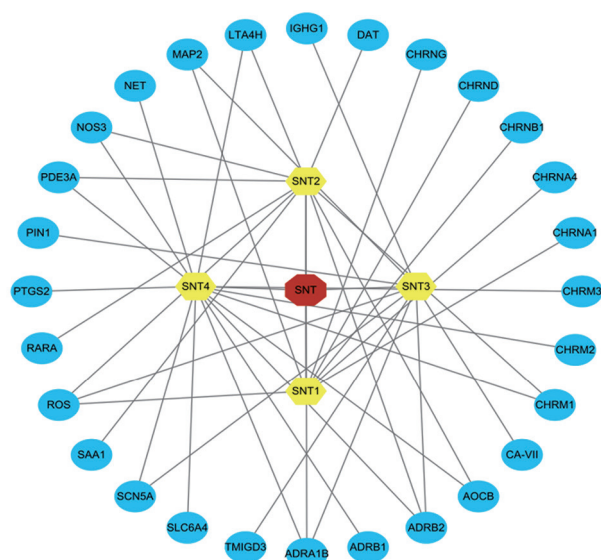


图 3 药物-成分-靶点网络图 红色代表药物, 黄色代表成分, 蓝色代表靶点。SNT: 石南藤, SNT1: 墙草碱, SNT2: 荜茇明宁碱, SNT3: 几内亚胡椒酰胺, SNT4: 风藤酰胺

胞连接、ACh 门控通道复合体等条目, MF 主要包括 ACh 结合、ACh 激活的阳离子选择性通道活性、ACh 受体活性等条目。KEGG 富集分析结果共得到 9 条富集通路, 见图 5。按富集基因顺序排序取前 3 信号通路为神经信号传递通路、钙离子信号通路和 cAMP 信

表 2 石南藤潜在的部分作用靶点预测表

| 编号 | 成分    | 靶点名称   | 基因名称   | Uniport ID |
|----|-------|--|--------|------------|
| 1  | 墙草碱   | neuronal acetylcholine receptor; alpha4/beta4    | CHRNA4 | P30926     |
| 2  | 风藤酰胺  | muscarinic acetylcholine receptor M3             | CHRM3  | P20309     |
| 3  | 风藤酰胺  | prostaglandin G/H synthase 2                     | PTGS2  | P35354     |
| 4  | 风藤酰胺  | sodium-dependent serotonin transporter           | SLC6A4 | P31645     |
| 5  | 风藤酰胺  | beta-2 adrenergic receptor                       | ADRB2  | P07550     |
| 6  | 风藤酰胺  | alpha-1B adrenergic receptor                     | ADRB1  | P08172     |
| 7  | 风藤酰胺  | sodium channel protein type 5 subunit alpha      | SCN5A  | Q14524     |
| 8  | 荜茇明宁碱 | cGMP-inhibited 3', 5'-cyclic phosphodiesterase A | PDE3A  | Q14432     |
| 9  | 墙草碱   | acetylcholine receptor; delta                    | CHRND  | Q07001     |
| 10 | 荜茇明宁碱 | nitric-oxide synthase, endothelial               | NOS3   | P29474     |

号通路, 与墙草碱有关的作用通路为钙离子信号通路和胆碱能突触通路。

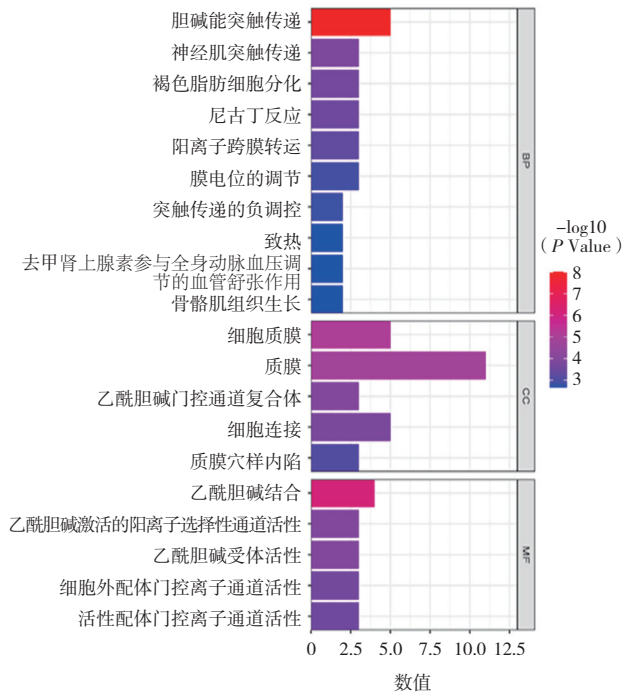


图 4 GO 通路富集结果 BP: 生物过程, CC: 细胞组成, MF: 分子功能

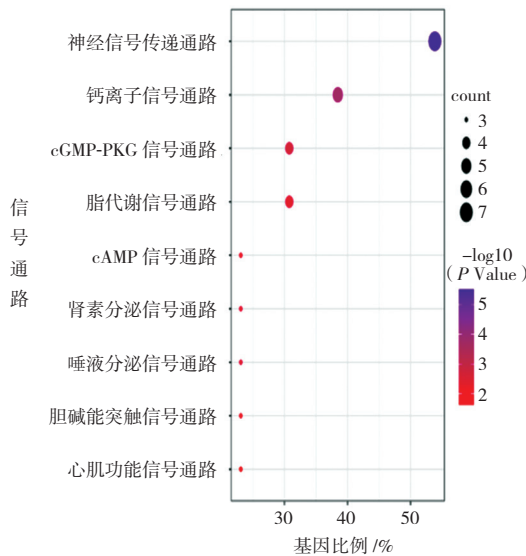


图 5 KEGG 通路富集结果

实验验证

1 石南藤阳离子洗脱液分离 梯度为石油醚 - 乙酸乙酯体系 (75:25), 经过 HPLC 分析第 5~20 流分得墙草碱单个成分, 其中第 20 流分, 见图 6。墙草碱纯度约 90.42%, 合并相同流分, 用于后续药效实验的样品。

2 扭体反应 与模型组相比, 墙草碱低、中、高剂量组小鼠扭体次数显著减少 ( $P < 0.05$ ), 呈量效趋势; 墙草碱高剂量组扭体潜伏期显著延长 ( $P < 0.05$ )。墙草碱高剂量组扭体次数显著少于阳性对照组 ( $P < 0.05$ ),

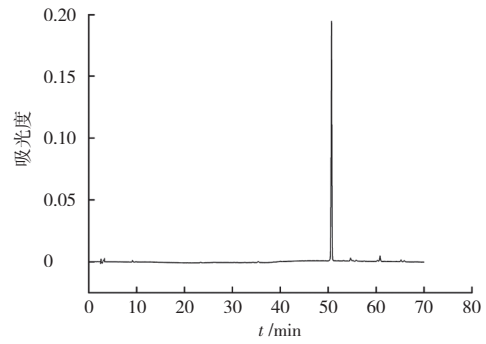


图 6 石油醚 - 乙酸乙酯 (75:25) 第 20 流分 HPLC 图

扭体潜伏期长于阳性对照组但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。见表 3。墙草碱低、中、高剂量组和阳性对照组的镇痛率分别为 37.91%、39.53%、53.95% 和 30.70%。

表 3 各组扭体次数及潜伏期比较  $n=8, \bar{x} \pm s$

| 组别     | 扭体次数                       | 潜伏期 /s                       |
|--------|----------------------------|------------------------------|
| 模型     | 43.00 ± 3.85               | 375.10 ± 21.64               |
| 阳性对照   | 29.80 ± 1.03 <sup>b</sup>  | 480.10 ± 89.10 <sup>a</sup>  |
| 墙草碱低剂量 | 26.70 ± 5.67 <sup>bd</sup> | 441.10 ± 55.78 <sup>ad</sup> |
| 墙草碱中剂量 | 26.00 ± 6.71 <sup>bd</sup> | 441.60 ± 32.84 <sup>ad</sup> |
| 墙草碱高剂量 | 19.80 ± 2.82 <sup>ce</sup> | 559.60 ± 69.24 <sup>bd</sup> |

经  $t$  检验: 与模型组比较, <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与阳性对照组比较, <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$

3 血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量 与模型组相比, 墙草碱低、中、高剂量组和阳性对照组血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 各组脑组织炎症因子和 ACh、ChAT、AChE 水平比较

$n=8, \bar{x} \pm s$

| 组别     | IL-1 $\beta$ /ng · L <sup>-1</sup> | TNF- $\alpha$ /ng · L <sup>-1</sup> | IL-6/pg · L <sup>-1</sup>  |
|--------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 空白     | 72.69 ± 8.99                       | 349.65 ± 27.51                      | 85.38 ± 2.80               |
| 模型     | 109.10 ± 9.34                      | 540.90 ± 11.42                      | 129.05 ± 6.98              |
| 阳性对照   | 64.32 ± 6.14 <sup>c</sup>          | 423.61 ± 45.41 <sup>c</sup>         | 74.63 ± 2.54 <sup>c</sup>  |
| 墙草碱低剂量 | 67.35 ± 2.63 <sup>c</sup>          | 474.56 ± 21.95 <sup>c</sup>         | 74.74 ± 3.67 <sup>c</sup>  |
| 墙草碱中剂量 | 65.99 ± 2.99 <sup>cd</sup>         | 471.13 ± 17.35 <sup>cd</sup>        | 70.71 ± 8.37 <sup>cd</sup> |
| 墙草碱高剂量 | 60.41 ± 3.63 <sup>cd</sup>         | 363.74 ± 27.39 <sup>cd</sup>        | 59.85 ± 5.10 <sup>ce</sup> |

$n=8, \bar{x} \pm s$

| 组别     | ACh/pmol · L <sup>-1</sup>   | ChAT/pmol · L <sup>-1</sup>  | AChE/pg · mL <sup>-1</sup>  |
|--------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 空白     | 210.17 ± 15.05               | 158.70 ± 14.44               | 102.62 ± 7.86               |
| 模型     | 144.45 ± 7.09                | 141.75 ± 5.20                | 182.41 ± 4.70               |
| 阳性对照   | 186.02 ± 21.19 <sup>b</sup>  | 179.75 ± 16.14 <sup>b</sup>  | 106.57 ± 6.05 <sup>b</sup>  |
| 墙草碱低剂量 | 141.75 ± 5.20 <sup>ac</sup>  | 193.28 ± 7.47 <sup>cd</sup>  | 93.89 ± 10.18 <sup>bd</sup> |
| 墙草碱中剂量 | 193.28 ± 7.47 <sup>cd</sup>  | 210.15 ± 5.39 <sup>ce</sup>  | 87.31 ± 10.57 <sup>be</sup> |
| 墙草碱高剂量 | 208.48 ± 13.18 <sup>cd</sup> | 225.17 ± 16.71 <sup>ce</sup> | 91.38 ± 13.79 <sup>be</sup> |

IL: 白细胞介素, TNF: 肿瘤坏死因子, ACh: 乙酰胆碱, ChAT: 胆碱乙酰转移酶, AChE: 乙酰胆碱酯酶。经  $t$  检验: 与模型组比较, <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与阳性对照组比较, <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$

4 脑组织 ACh、ChAT、AChE 浓度 与模型组比较, 墙草碱中、高剂量组和阳性对照组 ACh、ChAT 浓度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 墙草碱低、中、高剂量组和阳

性对照组 AChE 浓度均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

## 讨 论

前期研究表明石南藤阳离子洗脱液部位是发挥镇痛的有效部位<sup>[14]</sup>, 墙草碱作为石南藤阳离子洗脱液部位的指标性成分, 含量高且占活性部位生物碱的 9.18%, 探究石南藤发挥镇痛的有效成分群或者单一成分及其作用机制, 具有较大的研究意义。因此, 结合网络药理学和实验验证的方法, 选取石南藤中墙草碱进行初步的作用机制研究。

网络药理学研究表现, 墙草碱是石南藤发挥镇痛的成分之一, 由于其他活性成分的鉴定及分离纯化工工艺研究较少, 且难以购买对照品, 研究困难, 本研究重点验证了墙草碱的活性。与墙草碱有关的作用通路是钙离子信号通路、胆碱能突触通路<sup>[15,16]</sup>。田甜等<sup>[17]</sup>认为墙草碱是离子通道 TRPV1 的拮抗剂, 对外界引起的各种疼痛都有抑制作用。胆碱能突触通路中胆碱能抗炎通路目前研究较多。胆碱能抗炎通路存在于中枢神经系统与免疫系统之间, 通过迷走神经及其递质 ACh 与免疫系统相互作用<sup>[18]</sup>, 机体在受到强烈应激刺激时, 通过神经及其递质抑制炎症, 达到减少疼痛的作用<sup>[19]</sup>。

本研究中动物炎症实验采用了醋酸致痛模型, 结果显示墙草碱所有剂量组均能显著减少醋酸诱导小鼠扭体次数, 具有镇痛作用。与石南藤阳离子有效部位实验结果比较, 在相同给药剂量下 ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 墙草碱低剂量组镇痛率是 37.91%, 提示墙草碱是石南藤中发挥镇痛的主要活性成分。ELISA 检测结果表明, 与模型组相比, 墙草碱低、中、高剂量组血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均显著降低, 促炎性细胞因子水平显著降低。ACh 作为胆碱能突触的中枢介质<sup>[20,21]</sup>, 在胆碱能突触通路中起着重要作用。与模型组比较, 墙草碱中、高剂量组 ChAT、ACh 浓度显著升高, 这说明墙草碱不同剂量对醋酸致小鼠的 ChAT 蛋白和 ACh 蛋白表达均有促进作用; 墙草碱不同剂量组对 AChE 均有抑制作用。

综上所述, 墙草碱是石南藤发挥镇痛物质基础的关键活性成分, 通过促进 ACh 释放, 增加 ChAT 的活性, 降低 AChE 的活性来影响脑组织胆碱能突触通路, 从而抑制血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量, 达到减少疼痛的作用。

## [ 参考文献 ]

[1] 宋学军, 樊碧发, 万 有, 等. 国际疼痛学会新版疼痛定义

修订简析 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9): 641-644. SONG XJ, FAN BF, WAN Y, *et al.* A brief analysis of the revised definition of pain by the international society for pain [J]. Chin J Pain Med, 2020, 26(9): 641-644.

- [2] 赵丽辉, 李佳响, 宿树兰, 等. 中药外用透皮吸收制剂用于炎症性疼痛的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7339-7347. ZHAO LH, LI JX, SU SL, *et al.* Research progress on transdermal absorption preparations of traditional Chinese medicine for external use in inflammatory pain [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(23): 7339-7347.
- [3] 熊礼燕, 姬国玺, 林 励, 等. 沉香镇痛有效部位及其物质基础研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1842-1844. XIONG LY, JI GX, LIN L, *et al.* A study on the effective analgesic parts and material basis of Agarwood [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(8): 1842-1844.
- [4] 赵玮璿. 中药止痛散脐敷治疗癌性疼痛的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [5] 段书涛. 石南藤化学成分的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [6] 赵国伟. 石南藤的化学成分研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [7] 韦 琳, 宗 伟, 曾庆鸿, 等. 花椒抗炎镇痛网络药理学分析及实验验证研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 3034-3042. WEI L, ZONG W, ZENG QH, *et al.* Pharmacological analysis and experimental verification of the anti-inflammatory and analgesic network of Sichuan pepper [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(12): 3034-3042.
- [8] 丁 杰, 倪喆鑫, 程 雯, 等. 基于网络药理学探讨活血化痰药治疗子宫内膜异位症的作用机制 [J]. 药学实践杂志, 2020, 38(6): 516-522. DING J, NI ZX, CHENG W, *et al.* Exploring the mechanism of action of blood activating and stasis removing drugs in the treatment of endometriosis based on network pharmacology [J]. J Pharm Pract, 2020, 38(6): 516-522.
- [9] 杨一博, 徐 颖, 王 璐, 等. 基于网络药理学探索青盐方治疗围绝经期综合症的配伍合理性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 749-757. YANG YB, XU Y, WANG L, *et al.* Exploring the compatibility rationality of qingyan formula in the treatment of perimenopausal syndrome based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(3): 749-757.
- [10] 张 倩, 任鑫睿, 郭 欢, 等. 基于网络药理学探讨白芷抗惊厥作用的潜在有效成分及作用机制 [J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(2): 11-13. ZHANG Q, REN RX, GUO H, *et al.* Exploring the potential effective ingredients and mechanisms of Bai Zhi's anticonvulsant effect based on network pharmacology [J]. Clin Res Pract, 2021, 6(2): 11-13.
- [11] 盛韦菖, 梁学振, 许 波, 等. 基于网络药理学探讨补虚与活血配伍治疗股骨头坏死的作用机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(7): 152-156. SHENG WC, LIANG XZ, XU B, *et al.* Exploring the mechanism of the combination of tonifying deficiency

- and promoting blood circulation in the treatment of femoral head necrosis based on network pharmacology [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2021, 48(7): 152–156.
- [12] 吴文正, 郑晓辉, 高怡加, 等. 基于网络药理学探讨三七对骨愈合的作用机制 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(8): 1561–1567. WU WZ, ZHENG XH, GAO YJ, *et al.* Exploring the mechanism of sanqi on bone healing based on network pharmacology [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(8): 1561–1567.
- [13] 李虹霖, 高伟, 夏昆鹏, 等. 头穴丛刺对阿尔茨海默病大鼠海马区 ChAT、AChE 表达的影响 [J]. 中国针灸, 2019, 39(4): 403–408. LI HL, GAO W, XIA KP, *et al.* The effect of scalp acupuncture on the expression of ChAT and AchE in the hippocampus of Alzheimer's disease rats [J]. Chin Acup Moxib, 2019, 39(4): 403–408.
- [14] 唐婷婷, 曹杰, 房雨彤, 等. 石南藤镇痛活性部位筛选及其纯化 [J]. 中成药, 2023, 45(3): 1007–1011. TANG TT, CAO J, FANG YT, *et al.* Screening and purification of analgesic active sites from Shinanteng [J]. Chin Tradit Pate Med, 2023, 45(3): 1007–1011.
- [15] OLAH Z, REDEI D, PECZE L, *et al.* Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1 [J]. Phytomedicine, 2017, 34: 44–49.
- [16] KUMAR S, ARYA P, MUKHERJEE C, *et al.* Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells [J]. Biochemistry, 2005, 44(48): 15944–15952.
- [17] 田甜, 何君艺, 樊素雄, 等.  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体对缺血再灌注损伤影响的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(18): 2914–2917. TIAN T, HE JY, FAN SX, *et al.* Current research status on the effect of nicotinic acetylcholine receptors on ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Pharm, 2020, 36(18): 2914–2917.
- [18] 张霄旦, 赵擎宇. 胆碱能抗炎通路的机制及其在脓毒症的应用 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(6): 539–543. ZHANG XD, ZHAO QY. The mechanism of cholinergic anti-inflammatory pathway and its application in sepsis [J]. Int J Pathol Clin Med, 2011, 31(6): 539–543.
- [19] 许玉珉, 沈晓明, 兰瑞, 等. 开心散对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力和突触功能的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 15–22. XU YM, SHEN XM, LAN R, *et al.* The mechanism of kaixinsan on learning and memory ability and synaptic function in APP/PS1 mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2021, 27(20): 15–22.
- [20] 袁美. 海马区乙酰胆碱受体激活在丰富环境改善大鼠卒中后认知障碍中的作用机制研究 [D]. 上海: 上海体育学院, 2021.
- [21] 龚普阳, 潘烨华, 郭瑜婕, 等. 基于气相色谱-质谱联用结合网络药理学探究竹叶椒挥发油抗炎镇痛的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3296–3305. GONG PY, PAN YH, GUO YJ, *et al.* Exploring the anti-inflammatory and analgesic mechanisms of volatile oil from *Sichuan pepper* based on gas chromatography-mass spectrometry combined with network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(11): 3296–3305.