

基于网络药理学和分子对接技术的生姜挥发油 治疗头风病作用机制研究

晏菲, 高佳蓉, 张小飞, 邹俊波, 贾妍卓, 王雯翡, 史亚军*

陕西中医药大学药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 咸阳 712046

摘要:通过网络药理学和分子对接的方法探讨生姜挥发油治疗头风病的作用机制。采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术测定生姜挥发油的化学成分,通过TCMSP和Swiss Target Prediction在线分析工具对生姜挥发油的靶点进行预测,通过Drugbank、OMIM和DisGeNET数据库对头风病疾病的靶点进行预测,绘制维恩图获得两者交集。应用String数据库构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,采用Cytoscape 3.7.2软件对交集靶点进行可视化分析。使用R语言ClusterProfiler包进行基因本体(GO)富集分析与KEGG富集分析。最后利用Discovery Studio 4.0软件对与头风病相关的核心靶点进行分子对接。检测得到生姜挥发油化学成分53种,预测治疗头风病相关的靶点130个。GO富集分析与KEGG富集分析分别得到1361个可能与生姜挥发油治疗头风病作用机制有关的富集项以及77个可能是生姜挥发油治疗头风病通路的富集项。分子对接结果显示,核心靶点与金合欢醛、可巴烯、橙花叔醇有较强的亲和力。生姜挥发油治疗头风病可能是通过APP、OPRM1、ADRA2A等关键靶点发挥作用,同时通过调控神经活性配体-受体相互作用通路、Ca²⁺信号通路、含血清素的神经突触等多种信号通路发挥作用。生姜挥发油治疗头风病是多成分、多靶点、多通路的作用结果,这为生姜挥发油治疗头风病的进一步研究提供了一定的理论基础。

关键词:生姜挥发油;头风病;网络药理学;分子对接;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)6-1032-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.6.018

Study on the mechanism of ginger volatile oil in treating head wind disease based on network pharmacology and molecular docking technology

YAN Fei, GAO Jia-rong, ZHANG Xiao-fei, ZOU Jun-bo, JIA Yan-zhuo, WANG Wen-fei, SHI Ya-jun*

Shaanxi Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China

Abstract: To explore the mechanism of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease by the method of network pharmacology and molecular docking. The chemical composition of ginger volatile oil was determined by GC-MS. The targets of ginger volatile oil were predicted by TCMSP and Swiss Target Prediction on-line analysis tools, and the targets of head wind disease were predicted by Drugbank, OMIM and DisGeNET database. Venn diagram was drawn to obtain the intersection of the two. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using String database, and the intersection targets were visually analyzed by Cytoscape 3.7.2. The R language ClusterProfiler package was used for GO and KEGG enrichment analyses. Finally, the molecular docking of the core targets related to head wind disease was carried out by using Discovery Studio 4.0. 53 chemical constituents of ginger volatile oil were detected and 130 targets related to the treatment of head wind disease were predicted. 1361 enrichment items which may be related to the mechanism and 77 enrichment items which may be the pathway of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease were obtained by GO and KEGG enrichment analyses respectively. The results of molecular docking showed that the core targets had strong affinity with 2,6,10-dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-, copaene and nerolidol. Ginger volatile oil may play a role in the treatment of head wind disease

through APP, OPRM1, ADRA2A and other key targets, and through the regulation of Neuroactive ligand-receptor interaction, Ca^{2+} signaling pathway, Serotonergic synapse and other signal pathways. The treatment of head wind disease with ginger volatile oil is the result of multi-component, multi-target and multi-pathway, which provides a theoretical basis for further research on the treatment of head wind disease with ginger volatile oil.

Key words: ginger volatile oil; head wind disease; network pharmacology; molecular docking; action mechanism

“头风”最早记载于《神农本草经》,“白鲜,味苦,寒。主治头风”。《症治准绳·头痛》云:“医书多分头痛头风为二门,然一病也,但有新久去留之分耳。浅而近者名头痛,其痛卒然而至,易于解散速安也。深而远者为头风,其病作止不常,愈后迁触复发也。”现代医学认为,头风病是一种慢性阵发性头痛为主要表现的疾病,相当于西医的偏头痛、紧张性头痛和丛集性头痛等原发性头痛。发病间歇期间状如常人,一旦受到诱因刺激,便头痛剧烈,每次发作性质相似,病程较长,容易反复发作。仅偏头痛一项在全球的发病率为 8.4%~28%,终生发病率约为 14.0%,大约 18.2%的女性和 6.5%的男性患有偏头痛^[1]。偏头痛在全球的伤残调整生命年数(disability-adjusted life-years, DALYs)从 1990 年到 2015 年增加了 49.5%,为仅次于卒中的第二大 DALYs^[2]。西医治疗以应用非甾体类抗炎药、曲普坦类药物、阿片类药物、麦角类制剂为主,但有较大的副作用,且易反复。传统口服中药服药时间长,且不能立即缓解症状。针灸治疗可疏通经络,改善患者血管内皮细胞功能,但仅能减轻疼痛强度,减少发作次数、缩短持续时间,需与药物结合才能起到更好的效果。

生姜是姜科多年生草本植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。味辛,性微温。具有解表散寒,温中止呕等功效^[3]。我国传统医学使用生姜治疗头风病早有记载,《名医类案》曰:“以生姜自然汁少许,灌入鼻中,其痛立止”治疗顽固性头痛。现代研究表明,生姜挥发油具有镇痛、兴奋与镇静,抗氧化和对缺血性脑损伤的保护作用,对中枢神经系统有兴奋和抑制的双向调节作用^[4]。生姜挥发油脂溶性强,极性较小,而鼻黏膜为脂质膜,极性小、脂溶性强的物质易于通过,本研究拟将生姜挥发油制成鼻腔给药制剂,可经“鼻-脑”通路向脑区高效递药而呈现显著的脑靶向作用^[5],应用网络药理学的方法分析生姜挥发油、头风病、靶点之间作用的关系,构建“化合物—靶点—通路—疾病”间的多层次网络关系,对生姜挥发油治疗头风病的作用机制进行探讨,为后期制剂研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

BT-25S 型十万分之一电子天平(赛多利斯上海贸易有限公司);Agilent 7890B/5977B 气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪(美国安捷伦公司)。

生姜(购于陕西西安市农贸市场,经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎)。乙酸乙酯、无水硫酸钠为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 生姜挥发油化学成分的测定

照《中国药典》2020 版一部生姜项下挥发油提取方法提取挥发油,生姜破碎成小块,加 10 倍量水,浸泡 30 min,水蒸气蒸馏法提取 6 h,收集挥发油,以适量乙醚溶解,无水硫酸钠脱水干燥后备用^[6]。

采用 GC-MS 技术测定生姜挥发油的化学成分。气相色谱条件:Agilent HP-5 ms(30 m × 250 μm × 0.25 μm)毛细管色谱柱,载气为氦气,进样量 1 μL,分流比 5:1,分流流量 5 mL/min,程序升温初始温度 70 °C(10 min),10 °C/min 至 95 °C,5 °C/min 至 125 °C,6 °C/min 至 240 °C,1 °C/min 至 260 °C。质谱条件:EI 离子源,离子源温度 250 °C,四极杆温度 150 °C,扫描质量范围(m/z)20~450 amu,溶剂延迟 3 min,采用 DataAnalysis 将阈值调为 21,筛选化学成分^[7]。

1.2.2 生姜挥发油作用靶点的预测

利用 GC-MS 测定的生姜挥发油化学成分借助 TCMSIP 和 Swiss Target Prediction 在线分析工具对生姜挥发油的靶点进行预测。

1.2.3 头风病疾病相关靶点的预测

头风病相当于现代医学的偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛等原发性头痛。为了较完全的预测头风病疾病的靶点,以头风病(head wind disease)、偏头痛(migraine)、紧张性头痛(tension headache)、丛集性头痛(cluster headache)作为关键词,在 Drugbank、OMIM 和 DisGeNET 数据库对头风病疾病相关靶点进行检索。

1.2.4 生姜挥发油化学成分—头风病疾病靶点的交集

将生姜挥发油化学成分的靶点与头风病疾病的靶点分别导入在线网站 Venny 2. 1. 0 中绘制维恩图,重叠部分为两者的交集,即生姜挥发油化学成分直接作用于头风病的靶点。

1.2.5 “成分—靶点”网络的构建

将生姜挥发油化学成分与 1.2.4 中的交集靶点分别导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,构建生姜挥发油化学成分—交集靶点信息网络。在信息网络中,边表示蛋白与蛋白的相互关系,线条的粗细代表关联度等级。

1.2.6 蛋白—蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将 1.2.4 中获得的交集导入 String 中获取 PPI 网络功能富集分析,将结果以 TSV 文件保存并上传至 Cytoscape 3.7.2 软件对靶点进行可视化分析,得到生姜挥发油治疗头风病靶点的 PPI 网络并对其进行拓扑分析。

1.2.7 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

R 语言 ClusterProfiler 包^[8]可以对基因集合进

行统计分析和可视化。利用 ClusterProfiler 包对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,得到与生姜挥发油治疗头风病生物过程、细胞组分、分子功能及主要通路等有关的富集项。

1.2.8 分子对接

利用 Discovery Studio 4.0 软件进行分子对接。在生姜挥发油治疗头风病靶点的 PPI 网络图中选取核心靶点,借助 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)找出靶点 score 值排序靠前的靶点蛋白结构,配体为该靶点所对应的化合物,利用 Drugbank 在线平台找出核心靶点对应的阳性药物并在 Pub Chem 中下载阳性药物和所对应化合物的 2D 结构。将整理好的靶点蛋白 3D 结构和对应化合物及阳性药物的 2D 结构导入 Discovery Studio,使用 DOCK ligand (libDock)进行分子对接,得到核心靶点蛋白和对应化合物及阳性药物的相互作用关系图。

2 结果

2.1 生姜挥发油的化学成分

通过 GC-MS 测定出生姜挥发油的化学成分有 53 种(见表 1),成分总离子谱图见图 1。

表 1 生姜挥发油化学成分

Table 1 Chemical constituents of ginger volatile oil

序号 No.	CAS	化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	相对含量 Relative content(%)
1	000111-84-2	壬烷 Nonane	4.212 4	1.087
2	000080-56-8	α -蒎烯 2-Pinene	5.164 4	3.023
3	000079-92-5	莰烯 Camphene	5.635 6	9.662
4	000127-91-3	β -蒎烯 β -Pinene	6.597 3	0.653
5	000123-35-3	月桂烯 β -Myrcene	7.116 6	2.319
6	000099-83-2	水芹烯 α -Phellandrene	7.751 3	0.751
7	003387-41-5	桉烯 4(10)-Thujene	9.059 1	9.745
8	000470-82-6	桉叶油醇 Eucalyptol	9.145 6	3.310
9	029050-33-7	(+)-4-萜烯 (+)-4-Carene	12.107 5	0.913
10	003102-70-3	2,4,6-三甲基-1,3-苯二胺 2,4,6-Trimethyl-1,3-benzenediamine	12.463 4	0.316
11	000078-70-6	芳樟醇 Linalool	12.549 9	0.614
12	004443-51-0	2-甲氧基-1,7,7-三甲基双环[2.2.1]庚烷 2-Methoxy-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane	13.001 9	0.181
13	000106-23-0	香茅醛 Citronellal	14.405 9	0.678
14	000507-70-0	合成右旋龙脑 <i>endo</i> -Borneol	14.780 9	1.049
15	055722-59-3	3,7-二甲基-3,6-辛二烯醛 3,7-Dimethyl-3,6-octadienal	15.386 8	0.490
16	000098-55-5	α -松油醇 α -Terpineol	15.608 0	0.271
17	000106-22-9	香茅醇 Citronellol	16.800 4	0.648
18	000106-26-3	橙花醛 Neral	17.213 9	4.391

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	CAS	化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	相对含量 Relative content (%)
19	000106-25-2	橙花醇 Nerol	17.589 0	0.729
20	005392-40-5	柠檬醛 Citral	18.117 9	6.184
21	000076-49-3	乙酸龙脑酯 Bornylacetate	18.541 0	0.553
22	000112-12-9	甲基壬基甲酮 Undecanone	18.742 9	0.294
23	024717-85-9	惕各酸香茅酯 Citronellyl tiglate	20.348 9	0.282
24	022469-52-9	(+)-环苜蓿烯 (+)-Cyclosativene	20.714 3	0.132
25	003856-25-5	可巴烯 Copaene	20.983 6	0.483
26	000123-35-3	月桂烯 β -Myrcene	21.127 8	0.983
27	000515-13-9	β -榄香烯 1-Methyl-1-ethenyl-2,4-bis(1'-methylene)cyclohexane	21.387 5	1.210
28	013474-59-4	反式- α -香柠檬烯 <i>trans</i> - α -Bergamotene	21.695 2	0.224
29	000087-44-5	反式石竹烯 Caryophyllene	22.060 6	0.202
30	015423-57-1	大根香叶烯 B 1,5-Cyclodecadiene,1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (<i>E,E</i>)-	22.378 0	0.542
31	997220-51-3	倍半萜烯 B SesquisabineneB	22.887 6	0.654
32	025246-27-9	香树烯 Alloaromadendrene	23.041 5	0.417
33	028624-28-4	Eudesma-4,6-二烯 Eudesma-4,6-diene	23.368 5	1.292
34	000644-30-4	α -姜黄烯 Benzene,1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	23.512 7	6.570
35	095910-36-4	(-)-异喇叭烯 Isoledene	23.580 0	0.203
36	017066-67-0	β -瑟林烯 β -Selinene	23.628 1	0.249
37	000495-60-3	α -姜烯 1,3-Cyclohexadiene,5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(<i>R</i> *, <i>S</i> *)]-	23.830 1	11.567
38	000483-76-1	δ -杜松烯 δ -Cadinene	23.887 8	2.424
39	000470-40-6	罗汉柏烯 <i>cis</i> -Thujopsene	24.060 8	7.117
40	000469-61-4	α -柏木烯 α -Cedrene	24.147 4	1.323
41	013744-15-5	毕澄茄烯 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropano[1,2]benzene,2,3,3a.alpha.,3b.alpha.,4,5,6,7-octahydro-4.alpha.-isopropyl-7.beta.-methyl-3-methylene-	24.205 1	0.515
42	056633-28-4	α -松香油 (-)- α -Panasinene	24.339 7	0.408
43	020307-83-9	β -倍半水芹烯 β -Sesquiphellandrene	24.435 9	6.599
44	053585-13-0	(4 <i>E</i>)-1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-亚烷基)环己烯 (<i>E</i>)-1-Methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-ylidene)cyclohex-1-ene	24.580 2	0.356
45	000639-99-6	榄香醇 Cyclohexanemethanol,4-ethenyl-.alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-,[1 <i>R</i> -(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]-	24.955 2	0.694
46	000142-50-7	橙花叔醇 Nerolidol	25.205 2	1.209
47	001461-03-6	β -雪松烯 β -Himachalene	25.772 6	0.482
48	997284-06-5	7-表-顺-倍半萜烯水合物 7- <i>epi-cis</i> -Sesquisabinene hydrate	26.253 4	2.353
49	001209-71-8	γ -桉叶醇 2-Naphthalenemethanol,1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, (2 <i>R-cis</i>)-	26.647 7	0.280
50	000473-15-4	β -桉叶醇 β -Eudesmol	27.042 0	0.589
51	000515-17-3	γ -芹子烯 γ -Selinene	27.099 7	0.538
52	997220-96-6	γ -姜黄烯 γ -Curcumene	27.359 3	0.372
53	000502-67-0	金合欢醛 2,6,10-Dodecatrienal,3,7,11-trimethyl-, (<i>E,E</i>)-	28.676 8	0.168

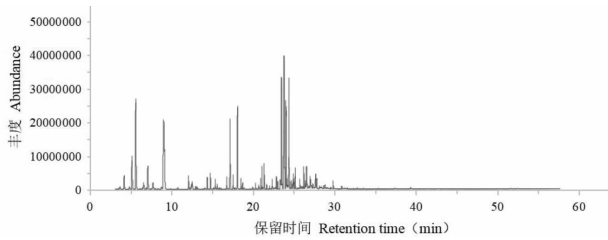


图1 生姜挥发油成分总离子谱图

Fig. 1 Total ion spectrum of ginger volatile oil

2.2 生姜挥发油化学成分作用靶点的收集

将生姜挥发油的化学成分在 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库进行作用靶点预测,共获得

作用靶点 3 816 个,删除重复项,获取生姜挥发油化学成分靶点 509 个。

2.3 头风病基因靶点的收集

通过 Drugbank、OMIM 和 DisGeNET 数据库收集头风病疾病的基因靶点共 1 507 个,删除重复项,得到靶点 915 个。

2.4 生姜挥发油化学成分—头风病疾病靶点的交集结果

利用检索得到的生姜挥发油的 509 个靶点与头风病的 915 个疾病靶点绘制维恩图,得到交集基因 130 个(见图 2)。说明生姜挥发油治疗头风病可能是通过这 130 个靶点发挥作用。

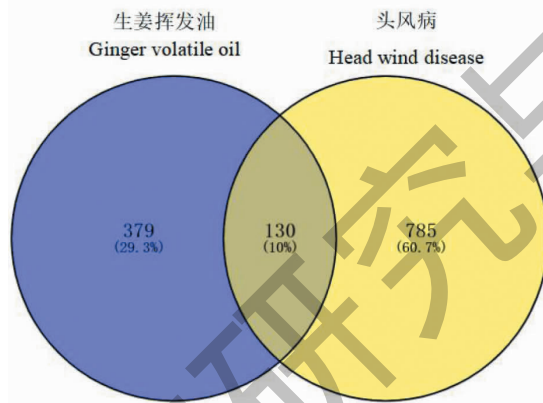


图2 生姜挥发油化学成分靶点与头风病疾病靶点维恩图

Fig. 2 Venn diagram of chemical component target of ginger volatile oil and head wind disease target

2.5 “成分—靶点”网络模型的构建

将 2.4 得到的交集靶点,导入 Cytoscape 3.7.2 软件中建立“生姜化学成分—交集靶点”网络,网络由 178 个节点组成 1 400 条边,其中最大自由度值

为 86,平均自由度为 14.034(见图 3)。图中左边浅蓝色三角代表生姜挥发油的化学成分,右边红色圆圈代表药物—疾病的交集靶点,大小根据自由度排序,展示成分与各交集靶点之间的关系。

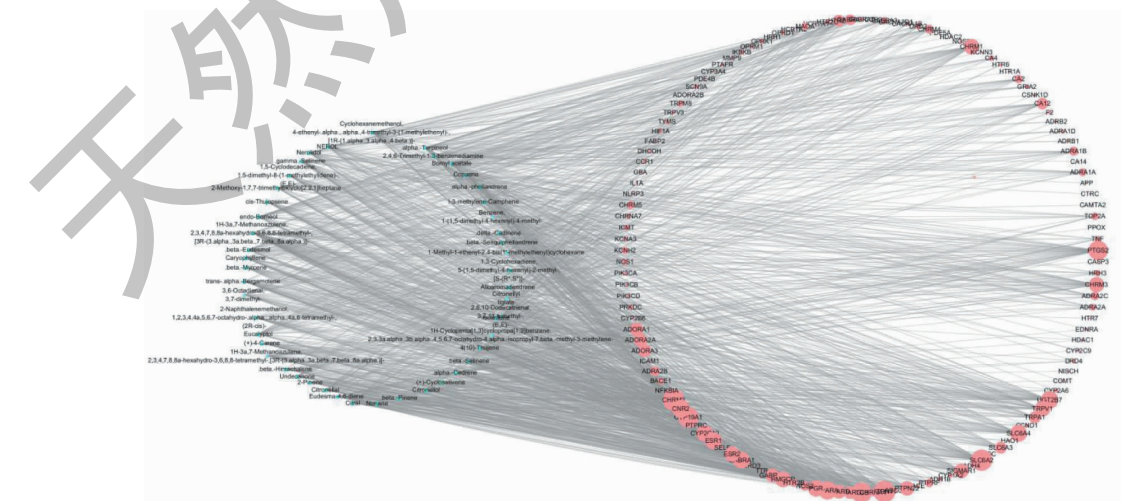


图3 “生姜挥发油化学成分—交集靶点”网络图

Fig. 3 Network diagram of "chemical component of ginger volatile oil-intersection target"

2.6 PPI 网络构建

利用 String 网站对 130 个交集基因进行分析,通过 Cytoscape 3.7.2 软件对分析得到的数据进行可视化分析,得到生姜挥发油治疗头风病靶点的 PPI 网络并进行拓扑分析。根据度的大小得到 62 个主要节点,642 条边,平均自由度为 16.726(见图 4)。即 62 个头风病相关的关键靶点和 642 条与头风

病靶点蛋白质相互作用关系,图中每个圆圈代表每个交集靶点,大小及颜色深浅显示其自由度的大小。

在生姜挥发油治疗头风病作用 PPI 网络中,APP、OPRM1、ADRA2A、ADRA2C、HTR1A、DRD2、DRD4、DRD3、ADRA2B、OPRK1 是度值最大的 10 个节点,即生姜挥发油治疗头风病的关键靶点,可能在生姜挥发油治疗头风病的过程中具有重要作用。

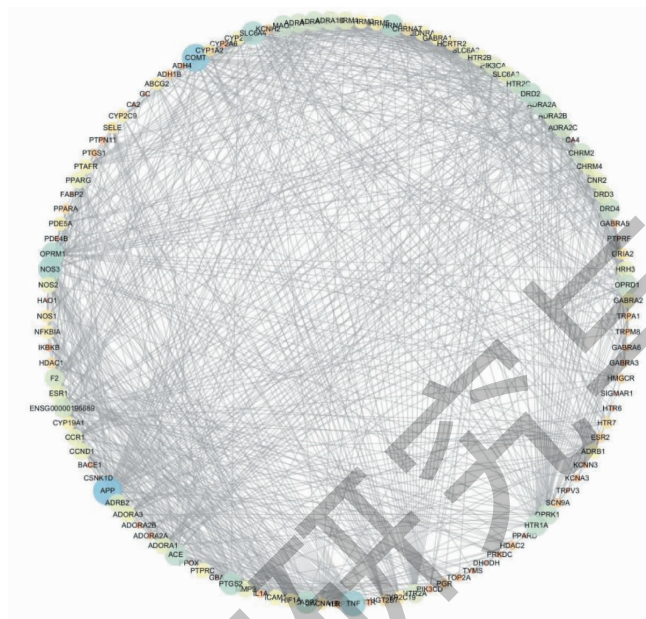


图 4 生姜挥发油治疗头风病的靶点 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease target

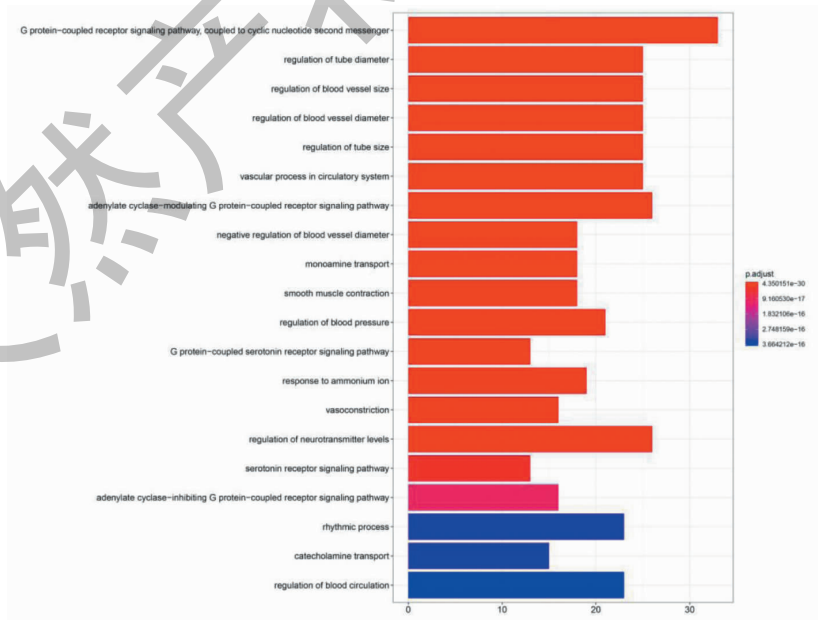


图 5 生姜挥发油治疗头风病潜在靶点 GO 富集分析(BP)

Fig. 5 GO enrichment analysis of potential targets of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease(BP)

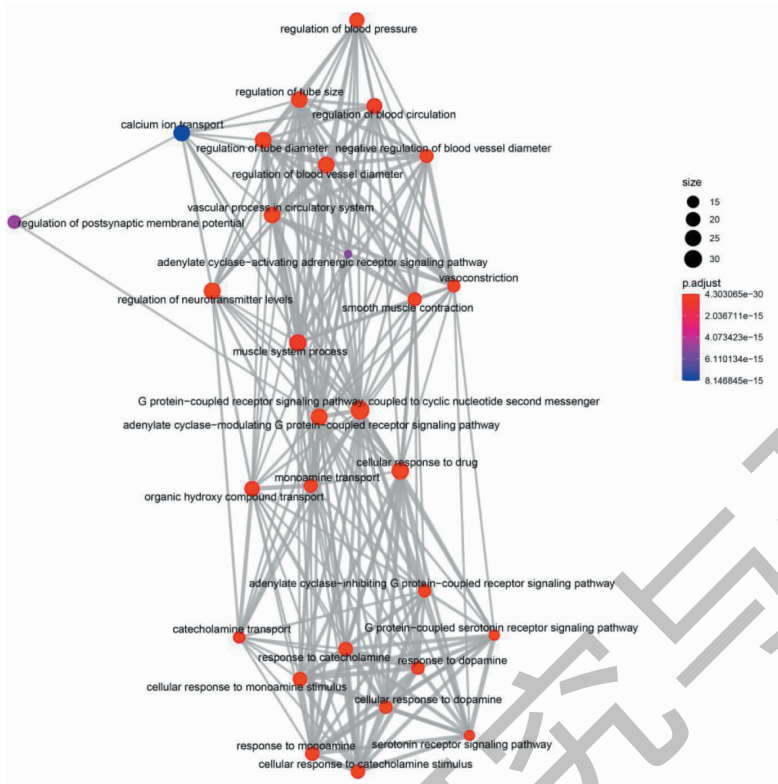


图6 生物过程(BP)重点通路图

Fig. 6 Key pathway map of biological process

2.7 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

2.7.1 生物过程(BP)分析

对生姜挥发油治疗头风病的潜在靶点进行 GO 分析, BP 分析得到 1 148 个富集项, 按照显著性大小排序, 前 20 项最具显著性的 BP 见图 5, 生姜挥发油治疗头风病和与环核苷酸第二信使偶联的 G 蛋白偶联受体信号通路、血管管径调节、循环系统中的血管突起、腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、血管内径负调控等生物过程密切相关。通过 Clusterprofiler 包构建 BP 分析 GO 交互网络(见图 6), 图中大红色节点代表着更显著的路径。

2.7.2 细胞组分(CC)分析

CC 分析得到 72 个富集项, 前 20 项最具显著性的 CC 见图 7, 生姜挥发油治疗头风病与突触后膜、突触膜、突触后膜的组成部分、突触后膜的固有成分以及突触膜的整体成分等细胞组分密切相关。CC 分析 GO 交互网络见图 8。

2.7.3 分子功能(MF)分析

MF 分析得到 141 个富集项, 前 20 项最具显著性的 MF 见图 9, 生姜挥发油治疗头风与 G 蛋白偶

联胺受体活性、神经递质受体活性、G 蛋白偶联神经递质受体活性、5-羟色胺受体活性等分子功能密切相关。MF 分析 GO 交互网络见图 10。

2.7.4 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集结果见图 11, 共得到 77 个富集项, 前 20 项最具显著性的通路见图 8。结果显示, 神经活性配体—受体相互作用通路是最显著的代谢通路, 可能是生姜挥发油治疗头风病最重要的通路, Ca^{2+} 信号通路、含血清素的神经突触、cAMP 信号通路、cGMP-PKG 信号通路等可能是较重要的通路。血清素 5-羟色胺(5-HT) 是含血清素的神经突触通路中发挥重要作用的重要物质, 作用过程见图 12。

2.8 分子对接分析

为了进一步说明靶点蛋白与对应化合物之间的结合活性, 本研究选择生姜挥发油治疗头风病作用蛋白交互网络中度值较高的 3 个核心靶点 OPRM1、ADRA2A 和 DRD2, 与其对应的化合物进行分子对接, 结合活性越高, 得分越高(见表 2)。其中橙花叔醇与 OPRM1, 可巴烯与 ADRA2A, 金合欢醛与 DRD2 的结合活性最高。利用 Discovery Studio 4.0 软件进

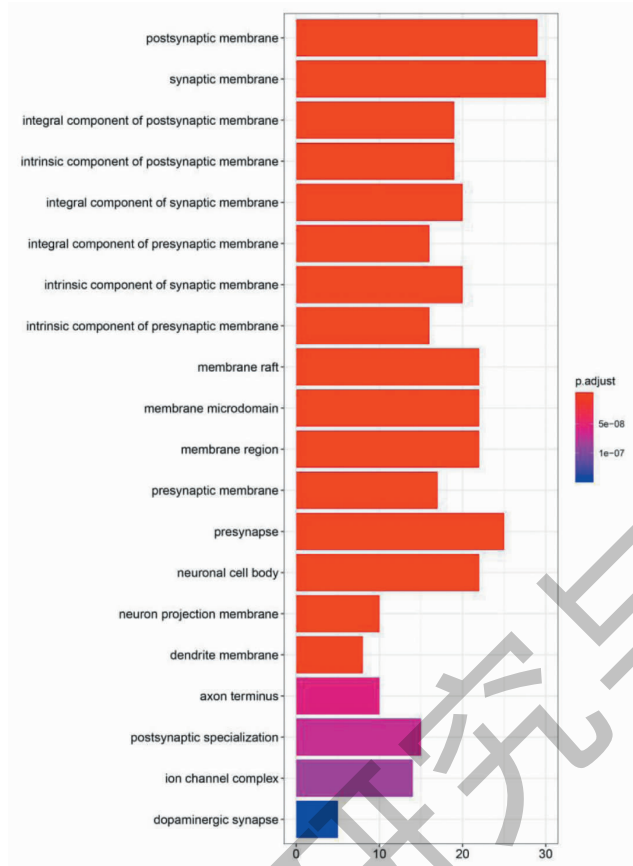


图7 生姜挥发油治疗头风病潜在靶点 GO 富集分析(CC)

Fig. 7 GO enrichment analysis of potential targets of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease(CC)

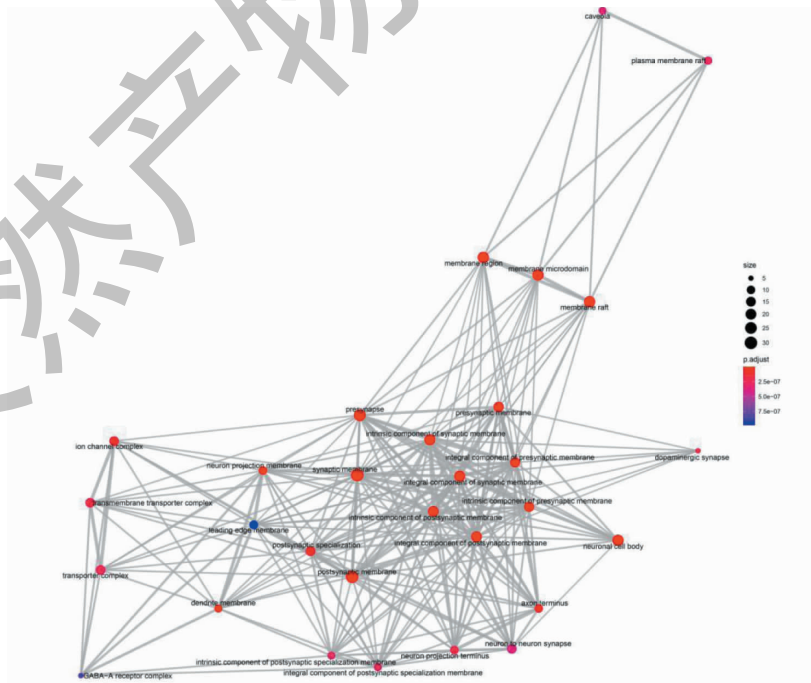


图8 细胞组分重点通路图

Fig. 8 Key pathway map of cellular component

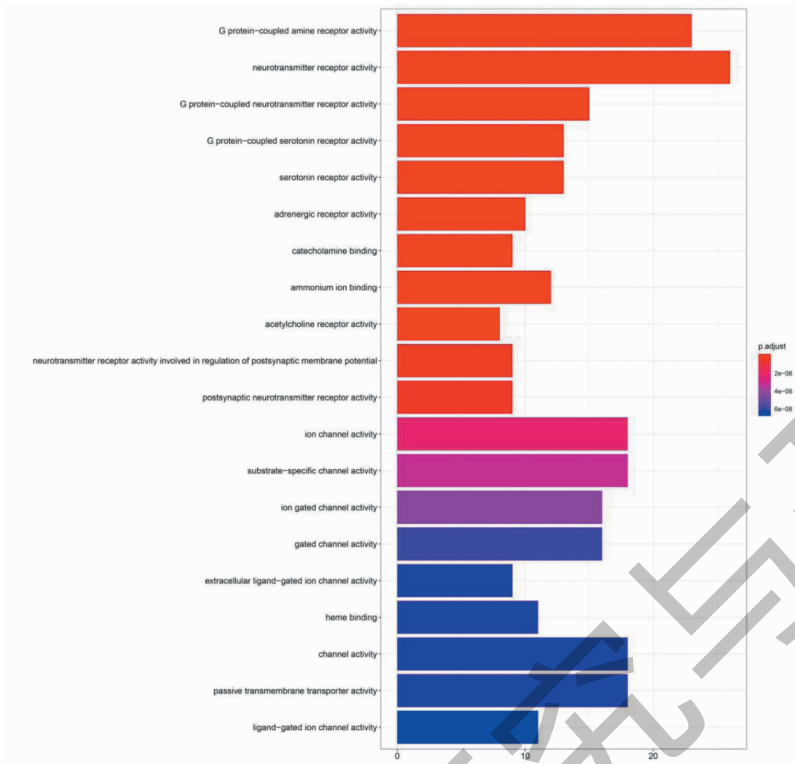


图9 生姜挥发油治疗头风病潜在靶点 GO 富集分析 (MF)

Fig.9 GO enrichment analysis of potential targets of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease(MF)

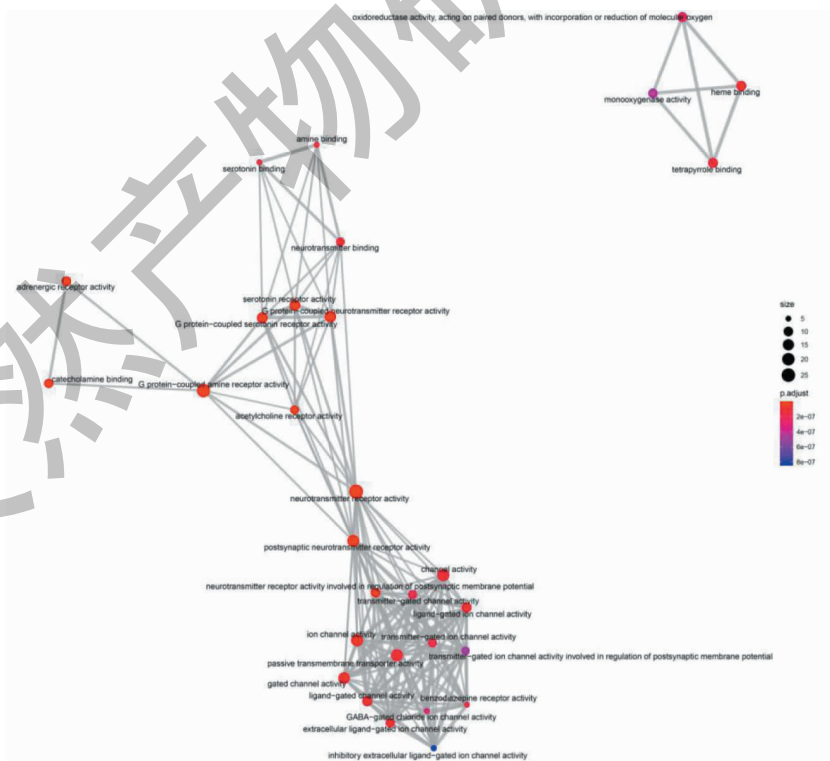


图10 分子功能重点通路图

Fig.10 Key pathway map of molecular function

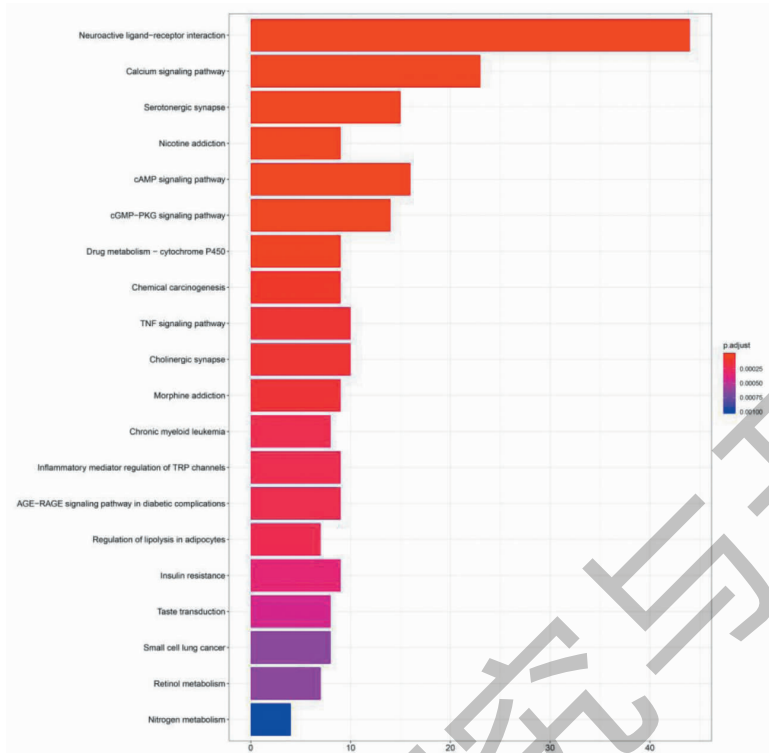


图 11 生姜挥发油治疗头风病潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 11 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease

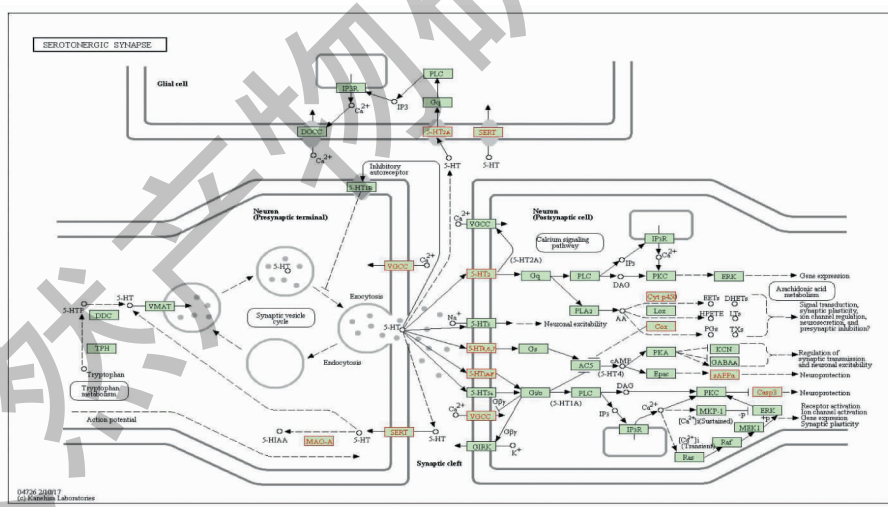


图 12 生姜挥发油治疗头风病的重要通路-含血清素的神经突触

Fig. 12 An important pathway of ginger volatile oil in the treatment of head wind disease-serotonergic synapse

行阳性药物验证实验和分子对接,并选择与表 2 中对接得分最高的化合物即核心成分进行比较,对比情况见表 3。核心靶点与核心成分、阳性药物的对接结果见图 13。结果表明,3 个核心靶点与核心成分的对接得分均高于与阳性药物的对接得分。

3 讨论

中医学认为,头风病其病因为内感和外伤两端,临证时难以用单一病机概括,为风、瘀、寒、痰、虚杂合致病。《诸病源候论》谓“头面风者,是体虚,诸阳经脉为风所乘”。风邪为最主要的致病因素,与头

表 2 核心靶点与对应化合物结合活性得分表

Table 2 Score table of binding activity between core targets and corresponding compounds

关键靶点 Core target	化合物 Compound	得分 Score
OPRM1	桉叶油醇 Eucalyptol	60.599 7
OPRM1	合成右旋龙脑 endo-Borneol	60.752 5
OPRM1	α -松油醇 α -Terpineol	66.821 1
OPRM1	橙花叔醇 Nerolidol	91.432 6
ADRA2A	2-甲氧基-1,7,7-三甲基双环[2.2.1]庚烷 2-Methoxy-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane	79.095 0
ADRA2A	乙酸龙脑酯 Bornylacetate	87.803 6
ADRA2A	可巴烯 Copaene	92.583 0
ADRA2A	α -柏木烯 α -Cedrene	87.509 9
ADRA2A	桉叶油醇 Eucalyptol	69.107 6
ADRA2A	2,4,6-三甲基-1,3-苯二胺 2,4,6-Trimethyl-1,3-benzenediamine	73.289 9
DRD2	香茅醛 Citronellal	72.350 7
DRD2	合成右旋龙脑 endo-Borneol	56.369 6
DRD2	3,7-二甲基-3,6-辛二烯醛 3,7-Dimethyl-3,6-octadienal	70.782 8
DRD2	α -松油醇 α -Terpineol	59.723 1
DRD2	橙花醇 Nerol	74.442 7
DRD2	柠檬醛 Citral	75.223 3
DRD2	甲基壬基甲酮 Undecanone	79.790 5
DRD2	金合欢醛 2,6,10-Dodecatrienal,3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	97.667 9

表 3 核心靶点与核心成分、阳性药物的结合活性得分对比

Table 3 Comparison of activity scores of core targets combined with core components and positive drugs

核心靶点 Core target	核心成分 Core component	得分 Score	阳性药物 Positive drug	得分 Score
OPRM1	橙花叔醇 Nerolidol	91.432 6	吗啡 Morphine	87.666 6
ADRA2A	可巴烯 Copaene	92.583 0	溴莫尼定 Brimonidine	86.611 1
DRD2	金合欢醛 2,6,10-Dodecatrienal,3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	97.667 9	阿朴吗啡 Apomorphine	83.920 8

风病的发作与反复有密切关系。Wu 等^[9]整理了秦汉至晚清 1911 年现存的治疗头痛的古代医学论著及文献资料,解表药及辛味药物使用频次为最高,以解表药祛除外感风寒或风热,其中生姜在所有药物中的使用频次占第 5 位。

本研究运用网络药理学对生姜挥发油的主要活性成分、作用靶点进行筛选并与头风病的靶点进行交集,建立生姜挥发油化学成分—交集靶点信息网络进行生姜挥发油治疗头风病的研究。研究表明,生姜挥发油治疗头风病的主要活性物质是乙酸龙脑酯、合成右旋龙脑、 α -松油醇、eudesma-4,6-二烯、橙

花叔醇、柠檬醛、可巴烯以及 β -桉叶醇等。通过 PPI 网络分析筛选出 APP、OPRM1、ADRA2A、ADRA2C、HTR1A、DRD2、DRD4、DRD3、ADRA2B、OPRK1 等 62 个可能在生姜挥发油治疗头风病过程中发挥重要作用的关键靶点以及 642 条头风病靶点蛋白质相互作用关系。

为进一步探讨生姜挥发油治疗头风病的潜在机制,利用生姜挥发油活性成分和头风病疾病的交集靶点进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析共得到 1 361 个富集项,包括生物过程中与环核苷酸第二信使偶联的 G 蛋白偶联受体信号通路、血管

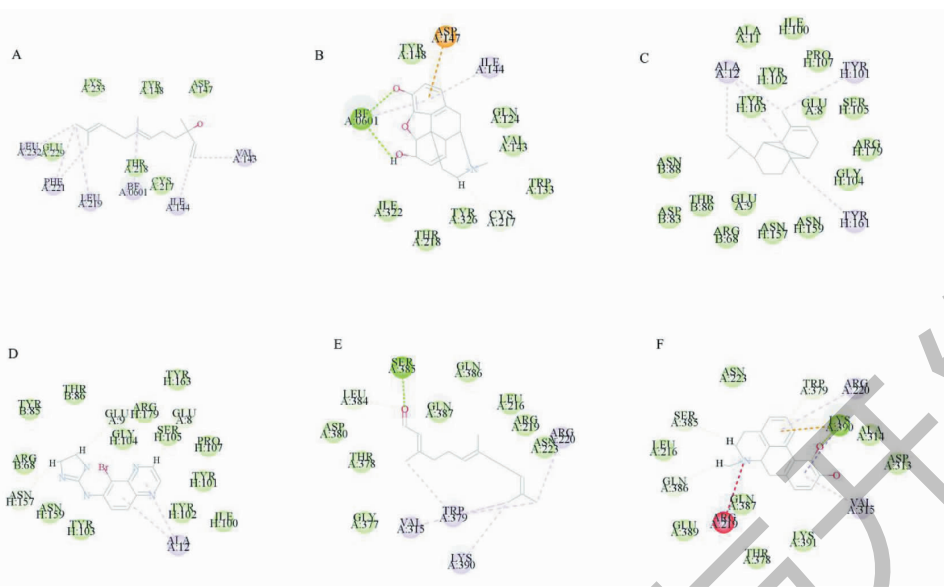


图 13 核心靶点与核心成分、阳性药物分子对接图

Fig. 13 Molecular docking results of core targets combined with core components and positive drugs

注: A. OPRM1-橙花叔醇; B. OPRM1-吗啡; C. ADRA2A-可巴烯; D. ADRA2A-溴莫尼定; E. DRD2-金合欢醛; F. DRD2-阿朴吗啡。Note: A. OPRM1-Nerolidol; B. OPRM1-Morphine; C. ADRA2A-Copaene; D. ADRA2A-Brimonidine; E. DRD2-2,6,10-Dodecatrienal,3,7,11-trimethyl-, (E, E)-; F. DRD2-Apomorphine.

管径调节、循环系统中的血管突起等;细胞组分中的突触后膜、突触膜、突触后膜的组成部分等;分子功能中的 G 蛋白偶联胺受体活性、神经递质受体活性、G 蛋白偶联神经递质受体活性、5-羟色胺受体活性等。KEGG 富集分析得到了 77 个富集项,包括神经活性配体—受体相互作用通路、Ca²⁺ 信号通路、含血清素的神经突触通路等。头风病的发生与多种神经递质及受体有关,其为阵发性神经系统疾病,可通过调节神经活性配体—受体相互作用通路发挥镇痛作用^[10]。文献研究表明,偏头痛与 Ca²⁺ 信号通路密切相关,抑制性突触在调节疼痛信号传导和偏头痛产生的调制电路中起着关键作用,P/Q 型 Ca²⁺ 通道通常对许多中枢突触的突触前 Ca²⁺ 进入和神经递质释放至关重要,能够抑制或兴奋神经传递^[11]。含血清素的神经突触又称 5-HT 神经通路,其与控制进食行为,体温调节和睡眠等有关。偏头痛患者 5-HT 受体结合率降低,脑内 5-HT 水平升高,许多抗偏头痛药物与 5-HT 及其受体相互作用从而发挥治疗作用^[12,13]。富集分析结果显示,生姜挥发油可能通过调节关键靶蛋白,参与神经活性配体—受体相互作用, Ca²⁺ 信号通路以及含血清素的神经突触等相关通路发挥镇痛治疗作用。

为进一步说明蛋白与相应配体化合物的结合活

性,结合文献报道,在生姜挥发油治疗头风病作用 PPI 网络度值较大的靶点中选取 3 个核心靶点 OPRM1、ADRA2A、DRD2,在 Drugbank 里找出与蛋白有关的 3 个阳性药吗啡、溴莫尼定、阿朴吗啡,配体即为该蛋白所对应的成分化合物。利用 Discovery Studio 4.0 对该蛋白和配体及阳性药进行分子对接,结果表明,该蛋白与配体的结合活性分数高于与阳性药的结合活性分数,即蛋白与配体的结合活性较高。在核心靶点中,OPRM1 基因是 μ 阿片受体的编码基因, μ 阿片受体在机体的痛觉敏感性和内源性镇痛等功能中发挥重要调节作用,尤其在调控神经系统产生镇痛效应方面有非常重要的作用^[14]。ADRA2A 属于 G 蛋白偶联受体,存在于去甲肾上腺素神经元中,刺激和抑制突触后中枢神经系统信号通路^[15,16]。ADRA2A 受体的激活会产生选择性的颅脑血管收缩作用^[17]。DRD2 主要位于脑部,是黑质纹状体多巴胺能神经元的主要靶点^[18]。偏头痛患者发作期内源性多巴胺释放减少和波动^[19]。DRD2 基因多态性与中国汉族女性偏头痛的发病风险显著相关,偏头痛患者血浆 DRD2 水平较高,女性偏头痛患者的 DRD2 水平明显高于男性偏头痛患者^[20]。

本研究应用网络药理学的方法证实了生姜挥发

油治疗头风病的作用,预测了生姜挥发油治疗头风病的潜在靶点以及治疗头风病作用相关的信号通路和生物过程,揭示了生姜挥发油治疗头风病是多成分、多靶点、多通路的作用结果。本研究对生姜挥发油治疗头风病的作用机制及实验验证提供了理论依据,以期对后期的制剂研究、药物开发和临床应用提供参考。

参考文献

- Chen YQ, Liu BY, Gong WN, et al. Auricular acupuncture for migraine: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99: e23036.
- GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16: 877-897.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 104.
- Sun JW, Wang J. Research progress of ginger volatile oil [J]. *Tradit Chin Med Res (中医研究)*, 2016, 29(2): 75-77.
- Ahmad N, Ahmad R, Naqvi AA, et al. Intranasal delivery of quercetin-loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischaemia [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2018, 46(4): 717.
- Zhong LY, Zhang SJ, Gong QF, et al. Comparative analysis of volatile compositions in *Zingeris Rhizoma Recens*, *Zingiberis Rhizoma* and processed *Magnoliae Officinalis Cortex* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21(20): 49-54.
- Liu QL, Liu YH, Zhao CX, et al. Comparative analysis of main active constituents in ginger samples collected from different origins [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 27: 1016-1021.
- Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16: 284-287.
- Wu YB. Theoretical studies on the treatment of headache of wind [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学), 2014.
- Shu Y, Xu Y, Xiao W, et al. A conjoint analysis of epilepsy and migraine through network-and-pathway-based method [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9: 2642-2653.
- Cao YQ, Tsien RW. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca²⁺ channel activity and inhibitory synaptic transmission [J]. *P Nat Acad Sci USA*, 2005, 102: 2590-2595.
- Silberstein SD. Serotonin (5-HT) and migraine [J]. *Headache*, 1994, 34: 408-417.
- Deen M, Hougaard A, Hansen HD, et al. Migraine is associated with high brain 5-HT levels as indexed by 5-HT receptor binding [J]. *Cephalalgia*, 2019, 39: 526-532.
- Yu ZC, Zhang Q, Wang XW, et al. Research progress of OPRM1 gene methylation in the application of pain and opioid analgesics [J]. *Chin J Pain Med (中国疼痛医学杂志)*, 2019, 25(1): 57-61.
- Yuan DP, Liu ZM, Kaindl J, et al. Activation of the α adrenoceptor by the sedative sympatholytic dexmedetomidine [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 507-512.
- Qian XS, Zhang XF, Tu ZM, et al. Observation on the efficacy of milnacipran in the treatment of depression according to ADRA2A and MDGA2 gene polymorphism [J]. *Chin J Pharmacoevidemiol (药物流行病学杂志)*, 2020, 29: 675-679.
- Willems EW, Valdivia LF, Villalón CM, et al. Possible role of alpha-adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy [J]. *Cephalalgia*, 2003, 23: 245-57.
- Karjalainen T, Karlsson HK, Lahnakoski JM, et al. Dissociable roles of cerebral μ -opioid and type 2 dopamine receptors in vicarious pain: a combined PET-fMRI study [J]. *Cereb Cortex*, 2017, 27: 4257-4266.
- DaSilva AF, Nascimento TD, Jassar H, et al. Dopamine D2/D3 imbalance during migraine attack and allodynia *in vivo* [J]. *Neurology*, 2017, 88: 1634-1641.
- Deng Y, Huang J, Zhang H, et al. Association of expression of DRD2 rs1800497 polymorphism with migraine risk in Han Chinese individuals [J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 763-769.