

基于数据挖掘及网络药理学探讨中药灌肠治疗慢性盆腔炎的核心中药及机制

江佳琳¹, 何静玲², 黎小斌²

(1. 广州中医药大学第二临床医学院2017级研究生, 广东广州 510405;

2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东广州 510120)

摘要:【目的】分析和挖掘中药灌肠治疗慢性盆腔炎用药组方规律及潜在作用机制。【方法】收集筛选1988年3月至2019年7月中国知网(CNKI)、维普(VIP)、万方数据库收录的中药灌肠治疗慢性盆腔炎的临床研究文献,通过中医传承辅助平台(V2.5)软件分析中药灌肠处方的用药组方规律,通过中药分子机制在线生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)对高频核心中药进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,揭示高频核心中药治疗慢性盆腔炎的潜在作用信号通路。【结果】共筛选出295个有效处方,中药灌肠治疗慢性盆腔炎高频核心药物为蒲公英、败酱草、大血藤、三棱、莪术,其作用的潜在信号通路为瞬时受体电位(TRP)离子通道和长时增强(LTP)信号通路。【结论】运用数据挖掘及网络药理学分析,获得中药灌肠治疗慢性盆腔炎的高频核心中药,为临床治疗慢性盆腔炎提供统计学依据及参考方案,并为下一步的深入研究提供思路,也为慢性疼痛治疗提供策略。

关键词: 中药灌肠; 慢性盆腔炎; 网络药理学; 中医传承辅助平台; 用药规律

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0379-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtc.2021.02.028

Study on Core Chinese Herbal Medicines and Mechanism in Chinese Herbal Medicine Enema for Treatment of Chronic Pelvic Inflammation by Data Mining and Network Pharmacology

JIANG Jia-Lin¹, HE Jing-Ling², LI Xiao-Bin²

(1. 2017 Postgraduate Candidate, the Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese

Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: Objective To analyze and mine the prescription rules and potential mechanisms of Chinese herbal medicine enema for treatment of chronic pelvic inflammation. **Methods** The clinical research literatures on Chinese herbal medicine enema for chronic pelvic inflammation recorded in the databases of CNKI, VIP, Wanfang between March 1988 and July 2019 were collected and screened. The medication rules for the selected Chinese herbal medicine enema prescription were analyzed by traditional Chinese medicine Inheritance Platform System (V2.5) software, and then the high-frequency core herbs were given Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis by a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) to obtain the potential signaling pathways in high-frequency Chinese herbal medicines for treatment of chronic pelvic inflammation. **Results** There were 295 selected prescriptions. From which, the high-frequency core herbs for treatment of chronic pelvic inflammation were Herba Taraxaci, Herba Patriniae Cum Radice, Gaulis Sargentodoxae, Rhizoma Sparganii, Rhizoma Curcumae, and the potential signaling pathways were transient receptor potential (TRP) channels and long-term potentiation (LTP). **Conclusion** The high-frequency core herbs for treatment of chronic pelvic inflammation were achieved by data mining and network

收稿日期: 2019-09-25

作者简介: 江佳琳(1992-), 女, 硕士研究生; E-mail: 15011783483@163.com

通讯作者: 黎小斌, 女, 硕士, 主任医师, 教授; E-mail: hlxiaobin@126.com

基金项目: 2019年医疗卫生健康事业发展专项资金项目(传承发展中医药事业); 广东省中医药局中医药科研项目(编号: 20191167)

pharmacology, for offering a statistical basis and a reference for the clinical treatment of chronic pelvic inflammation, providing ideas for further research, and providing strategies for the treatment of chronic pain.

Keywords: Chinese herbal medicine enema; chronic pelvic inflammation; network pharmacology; traditional Chinese medicine Inheritance Platform; medication rules

慢性盆腔炎,即盆腔炎性疾病后遗症,是女性急性盆腔炎未得到及时正确、彻底的诊治而遗留的慢性炎症,表现为不同程度的慢性盆腔痛、不孕、异位妊娠等^[1],病情反复,对女性生理健康、心理健康及生活质量造成严重的影响。治疗上,西医常选择抗生素,但往往效果不理想。中医中药对于该病的治疗有明显的优势,其中,中医特色疗法——中药灌肠,疗效显著。本研究通过检索和查阅近30年的临床研究文献资料,筛选出治疗慢性盆腔炎显效的中药灌肠方共295首,利用中医传承辅助平台对其进行数据挖掘和规律总结,再通过中药分子机制在线生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)找出高频核心中药治疗慢性盆腔炎的潜在基因靶点及信号通路,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 文献来源 选择中国知网(CNKI)数据库、维普数据库、万方数据库,以“慢性盆腔炎”“盆腔炎性疾病后遗症”及“中药灌肠”作为检索关键词,检索1988年3月至2019年7月所涉及的以中药灌肠治疗慢性盆腔炎的临床研究文献。

1.2 处方筛选

1.2.1 纳入标准 ①明确诊断为慢性盆腔炎或盆腔炎性疾病后遗症;②有明确疗效标准且总有效率达90%以上的临床研究;③单纯中药灌肠或中药灌肠结合其他方法治疗;④方剂中药味具体完整。

1.2.2 排除标准 ①动物实验、名家经验介绍、理论探讨等非临床研究的文献;②中药灌肠方剂仅有方名或具体用药不完整的文献;③治疗方法不是中药灌肠,而是中药内服、中药外敷或西药抗生素灌肠等文献;④重复发表或处方相同的文献,仅选取其中1篇;⑤总有效率低于90%的文献。

1.2.3 筛选结果 根据上述纳入标准及排除标准,共纳入280篇文献,整理后得到295首方剂。

1.3 药名规范 参照《中华人民共和国药典》(2015年版)将文献处方涉及的中药进行药名规范。

1.4 处方录入与审核 将筛选出的处方录入到中医传承辅助平台系统(V2.5),由第2人对录入资料进行核对及补漏,保证录入信息的准确性。

1.5 数据分析 通过“中医传承辅助平台”中的“统计报表”“方剂数据分析”板块,分别进行药物频次、组方规律分析。

1.6 生物信息学分析 将得到的慢性盆腔炎灌肠方的高频核心中药录入BATMAN-TCM中,进行药物的靶点预测及信号通路分析。

2 结果

2.1 用药频次分析 录入系统的295首处方,共涉及161味中药,对其进行用药频次统计,提示中药灌肠方中频次>25次的药物有26味,其中,频次≥100次的依次为败酱草、蒲公英、大血藤、莪术、丹参、赤芍、三棱、延胡索。具体见表1。

表1 中药灌肠治疗慢性盆腔炎文献处方出现频次>25次的中药

Table 1 Herbs with frequency above 25 in prescriptions from literatures on Chinese herbal enema for chronic pelvic inflammation

序号	中药	频次(次)	序号	中药	频次(次)
1	败酱草	216	14	没药	58
2	蒲公英	176	15	乳香	58
3	大血藤	168	16	牡丹皮	56
4	莪术	165	17	香附	53
5	丹参	158	18	白花蛇舌草	50
6	赤芍	156	19	红花	47
7	三棱	143	20	皂角刺	41
8	延胡索	118	21	薏苡仁	40
9	桃仁	89	22	连翘	32
10	黄柏	84	23	桂枝	29
11	紫花地丁	86	24	茯苓	28
12	金银花	65	25	甘草	28
13	当归	64	26	鱼腥草	25

2.2 基于关联规则的组方规律分析 设置“支持度个数”(表示药物组合在所有方剂中出现的频次)为85,“置信度”为0.8,得到常用药对19个,见表2。按照药物组合出现频次由高到低,前3位分别为“蒲公英,败酱草”“大血藤,败酱草”“三棱,莪术”,用药规则分析9条,见表3。并以网络展示结果,见图1。

2.3 分子靶点及信号通路预测 应用BATMAN-TCM,将“Score cutoff”(截断分值)设置为80,将“Adjusted P-value”(校正P值)设置为0.01,得到蒲公英、败酱草、三棱、莪术、大血藤的47种结构明确的化学成分,325个潜在基因靶点。对这些靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)生物途径和治疗靶点数据库(TTD)疾病富集分析,富集得

表2 中药灌肠治疗慢性盆腔炎文献处方用药模式分析
Table 2 Analysis for medication modes in prescriptions from literatures on Chinese herbal enema for chronic pelvic inflammation

序号	中药组合模式	频次(次)	序号	中药组合模式	频次(次)
1	蒲公英,败酱草	142	11	赤芍,丹参	98
2	大血藤,败酱草	137	12	大血藤,丹参	96
3	三棱,莪术	136	13	三棱,大血藤	95
4	败酱草,丹参	126	14	蒲公英,莪术	95
5	败酱草,赤芍	121	15	蒲公英,大血藤,败酱草	92
6	败酱草,莪术	119	16	蒲公英,丹参	91
7	三棱,败酱草	109	17	丹参,莪术	89
8	蒲公英,大血藤	108	18	三棱,大血藤,莪术	89
9	三棱,败酱草,莪术	103	19	蒲公英,赤芍	88
10	大血藤,莪术	100			

表3 中药灌肠治疗慢性盆腔炎文献处方规则分析结果
Table 3 Analysis for prescription rules in literatures on Chinese herbal enema for chronic pelvic inflammation

序号	规则	置信度
1	三棱->莪术	0.951 048 951
2	三棱,败酱草->莪术	0.944 954 128
3	三棱,大血藤->莪术	0.936 842 105
4	大血藤,莪术->三棱	0.890 000 000
5	败酱草,莪术->三棱	0.865 546 218
6	蒲公英,大血藤->败酱草	0.851 851 852
7	莪术->三棱	0.824 242 424
8	大血藤->败酱草	0.815 476 190
9	蒲公英->败酱草	0.806 818 182

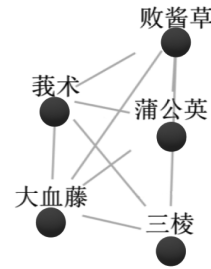


图1 中药灌肠治疗慢性盆腔炎文献处方高频药物网络展示图

Figure 1 Network of high-frequency herbs in prescriptions from literatures on Chinese herbal enema for chronic pelvic inflammation

到疾病9种,其中与慢性盆腔炎相关者主要为疼痛和刺激;19条细胞信号通路,其中与慢性盆腔炎相关的信号通路为瞬时受体电位(TRP)通道的炎症介质调节、钙信号通路、环鸟苷酸(cGMP)-蛋白激酶G(PKG)信号通路、长时增强信号通路、神经活性配体-受体相互作用等(详见表4~5)。潜在靶点、信号通路及疾病网络可视化见图2。

3 讨论

3.1 灌肠方主攻实,药多清热解毒化痰 现代中医学认为慢性盆腔炎的病因病机主要是经行产后,胞门未闭,风寒湿热之邪或虫毒乘虚内侵,与冲任气血相搏结,蕴积于胞宫,反复进退,耗伤气血,虚实错杂,缠绵难愈。往往是正气已虚而余邪未净,本虚标实。治疗上多采取内治与外治相结合,其中外治法中的中药灌肠,根据女性盆腔生理解剖特点——“胞宫,前邻膀胱,后邻直肠”,将中药汤剂通过直肠给药,使药物经黏膜静脉丛吸收,直达病灶,效果显著。

表4 治疗靶点数据库疾病富集分析结果
Table 4 TTD enrichment analysis

序号	疾病英文名称	疾病中文名称
1	pain	痛
2	irritation	刺激
3	brain injury	脑损伤
4	erectile dysfunction	勃起功能障碍
5	benign prostate hyperplasia	良性前列腺增生
6	chronic obstructive pulmonary disease	慢性阻塞性肺疾病
7	osteosarcoma	骨肉瘤
8	alopecia, unspecified	脱发,未指明
9	hypertension	高血压

表5 KEGG分子通路富集分析结果

Table 5 KEGG molecular pathway enrichment analysis

ID	KEGG通路英文名称	KEGG通路中文名称	校正P值
hsa04750	inflammatory mediator regulation of TRP channels	TRP通道的炎症介质调节	1.95e-005
hsa04020	calcium signaling pathway	钙信号通路	1.40e-008
hsa04720	long-term potentiation	长时增强	2.56e-003
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	cGMP-PKG 信号通路	5.29e-011
hsa04080	neuroactive ligand-receptor interaction	神经活性配体-受体相互作用	3.87e-004
hsa04070	phosphatidylinositol signaling system	磷脂酰肌醇信号通路	5.48e-003
hsa04912	GnRH signaling pathway	GnRH 信号通路	4.78e-004
hsa04915	estrogen signaling pathway	雌激素信号通路	3.59e-003
hsa04921	oxytocin signaling pathway	催产素信号通路	8.93e-003
hsa04744	phototransduction	光转换	4.78e-004
hsa00230	purine metabolism	嘌呤代谢	6.00e-016
hsa04270	vascular smooth muscle contraction	血管平滑肌收缩	1.70e-005
hsa04261	adrenergic signaling in cardiomyocytes	心肌细胞中的肾上腺素能信号	6.66e-003
hsa04114	oocyte meiosis	卵母细胞减数分裂	5.48e-003
hsa00071	fatty acid degradation	脂肪酸降解	3.87e-004
hsa00140	steroid hormone biosynthesis	类固醇激素生物合成	1.18e-003
hsa00564	glycerophospholipid metabolism	甘油磷脂代谢	8.93e-003
hsa00350	tyrosine metabolism	酪氨酸代谢	2.31e-004
hsa04970	salivary secretion	唾液分泌	1.08e-006
hsa04971	gastric acid secretion	胃酸分泌	7.54e-004

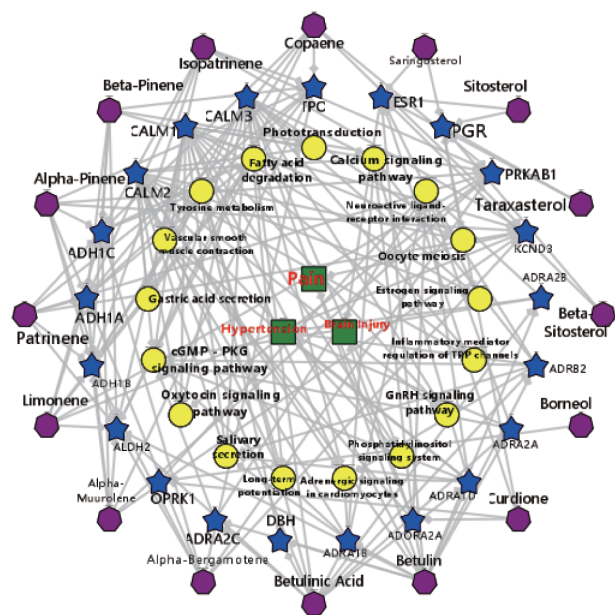


图2 中药灌肠方文献高频药物治疗慢性盆腔炎潜在靶点-信号通路-疾病网络图

Figure 2 Potential target-signal pathway-disease network for high-frequency herbs

本研究通过将纳入的总有效率达90%的中药灌肠处方,借助中医传承辅助平台系统,实现了

对药物之间关联性的定量描述、核心组合演化与提取。用药频次提示高频中药为败酱草、蒲公英、大血藤、莪术、丹参、赤芍、三棱、延胡索;中药组合及用药规则提示败酱草、蒲公英、大血藤、莪术、三棱处于核心地位,如网络图(见图1)所示。因此,我们认为,中药灌肠治疗慢性盆腔炎高频核心中药为败酱草、蒲公英、大血藤、莪术、三棱。从药物关联可以看出临床常用组合为药效功能相近的药味配合使用可增强疗效,或清热解毒药与祛瘀止痛、消肿散结药相结合,相互补充。虽慢性盆腔炎病机为本虚标实,但灌肠方均主攻标实,君药、臣药多选用清热解毒、利湿化瘀之品,佐以行气止痛药或虫类药消癥通络,而补虚之品鲜少。例如常用方红藤汤,以红藤为君药清热解毒利湿,臣以金银花、紫花地丁、连翘清热散瘀消痈,佐以牡丹皮、丹参、当归、乳香、延胡索凉血活血、行气止痛,使以甘草调和诸药。全方共奏清热利湿、祛瘀止痛之效。败酱草有消痈排脓、祛瘀止痛、清热解毒的作用,《本草纲目》中记载:“败酱,善排脓破

血,故仲景治痢及古方妇人科皆用之。”万新等^[2]研究发现,败酱浸提液对多种球菌、杆菌都呈不同程度的抑制作用。蒲公英最早载于《唐本草》,味苦、甘,性寒,归肝、胃经,具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋的功效。《本草纲目》云:“蒲公英生食治感染性疾病尤佳。”现代研究^[3]发现,蒲公英具有抗炎作用,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、螺旋体等多种病原微生物均有不同程度的抑制作用。大血藤,又称红藤,则有活血止痛、解毒消痈、祛风除湿的作用。黄淑凤等^[4]研究发现,大血藤可降低盆腔炎模型大鼠血清中血栓素A₂(TXA₂)含量及TXA₂/前列环素(PGI₂)比值,减轻模型大鼠子宫肿胀程度。三棱、莪术味辛、苦,三棱性温,莪术性平,均归肝、脾经,有破血行气止痛之效,常相须为用。李华等^[5]实验结果表明,以丹参、延胡索、三棱、莪术组成复方消炎丸水煎剂对前列腺素E₁所引起的毛细血管通透性增强有明显抑制作用,对结缔组织增生和渗出液有明显的抑制作用。刘明等^[6]实验证明,含有丹参、三棱、莪术、大血藤等6味的盆炎清灌肠剂能有效地改善慢性盆腔炎大鼠炎症细胞的浸润,减轻子宫充血、水肿、黏连状态,可以增加子宫组织中白细胞介素2(IL-2)含量、抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的过度分泌。

3.2 潜在信号通路 BATMAN-TCM是一个在线生物信息学分析工具,专门用于研究中药的分子机制,它基于中药成分进行目标预测和网络药理学分析。该工具通过成分-靶标-途径的模式,有助于理解中药的治疗机制,可为下一步的实验验证提供线索。本研究通过BATMAN-TCM的网络药理学分析得到的19条信号通路中,瞬时受体电位(TRP)离子通道及长时增强的信号通路在炎症、疼痛的发生和维持中发挥着重要地位,与慢性盆腔炎的发生发展密切相关。因此,我们认为所纳入文献的中药灌肠方可能通过调节TRP离子通道及长时增强的信号通路来治疗本病。

3.2.1 TRP TRP基因超家族是一组非选择性的阳离子通道,已经在人类身上发现的有6个亚组:TRPC(canonical)、TRPV(vanilloid)、TRPM(melastatin)、TRPML(mucolipins)、TRPP(polycystins)、TRPA(ankyrin),广泛分布在中枢神经系统、外周神经系统、感觉器官、心血管系统、泌尿生殖系统、免疫系统。由于缺乏特定拮抗体及激动剂,该通

道激活机制至今不明确。目前多倾向认为机体感受多种外界或内源性的物理、化学刺激激活磷脂酰醇肌醇信号通路产生三磷酸肌醇(IP₃),及通过1,2-二酰甘油(DAG),激活TRP通道来调节钙离子通道,介导神经递质的释放、痛觉、体液平衡、细胞生长死亡等多种生命活动^[7],也是目前分子生物学的研究热点。

炎症方面,TRPV1通过与T淋巴受体(TCR)结合引起钙内流而激活T细胞^[8]。TRPV2通过巨噬细胞FC γ R激活而上调并参与其吞噬及趋化作用^[9]且TRPV2在脂筏中的聚集对细菌吞噬作用至关重要^[10]。TRPM7在巨噬细胞活化中也具有关键作用^[11],并且是功能性B细胞和T细胞的生理发育所必需的。与T细胞中MagT1受体的作用相似,TRPM7对Mg²⁺浓度的变化做出反应和增强B淋巴受体(BCR)/TCR下游的磷脂酶活性^[12]。TRPC6通过增加细胞内的Ca²⁺浓度和促进基于肌动蛋白的细胞骨架重塑来增强巨噬细胞炎症蛋白2(MIP-2)和趋化因子受体2(CXCR2)相关的趋化反应,因此在中性粒细胞动员中起关键作用^[13-14]。同时,在白细胞跨内皮迁移期间,TRPC6通过介导血小板(PECAM)/内皮细胞黏附分子(D31)接合的下游作用而作用于内皮侧,从而调节内皮细胞容受性^[15]。TRPC6有助于急性炎症过程中松开内皮连接,增强细胞和体液免疫介质对靶组织的作用^[16-17]。

疼痛方面,主要集中于TRP的伤害感受器——TRPV1、TRPA1,二者表达在小型背根神经节(DRG)和三叉神经节神经元,其中,C纤维参与慢性疼痛,A δ 纤维参与快速有害机械刺激的传递,受多种理化因素的激活,除了机械、温度,也包括与炎症相关的pH、缺氧、前列腺素E₂、腺苷、ATP、缓激肽等。多项研究证明,TRPV1参与调节炎症中的痛觉过敏及神经性疼痛^[18-19],而敲除TRPA1基因或使用拮抗剂后的啮齿动物对冷刺激及机械疼痛的痛阈升高^[20-21]。这2个通道在偏头痛发病及治疗中的作用是目前的研究热点^[22-23]。

3.2.2 长时增强 对突触进行不同强度和不同频率的外界刺激可以引起突触兴奋性的改变,即突触可塑性,根据变化的性质不同,分为长时增强和长时抑制(LTD),前者可增强并激活神经元之间的强度。现代研究表明,长时增强参与慢性疼痛的形成,其中N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的激活是诱导长时增强所必备的^[24-26]。而蛋白激酶M ζ

(PKM ζ)是NMDA受体关键信号分子蛋白^[27],参与长时增强的维持^[28]。通过应用NMDA可以增强感觉背角神经元对有害和非有害刺激的反应,表明NMDA受体可能对痛觉过敏和异常性疼痛有贡献^[29],而NMDA受体拮抗剂全身或鞘内应用可显著降低不同类型持续性疼痛患者的疼痛感^[30]。抑制Ca²⁺可渗透的PKM ζ 降低了成年小鼠岛叶皮层中长时增强的表达^[31]。谌凌燕等^[32]相关实验证实,中药可通过抑制NMDA受体的磷酸化来治疗大鼠神经病理性疼痛。

3.2.3 其他通路 磷脂酰肌醇信号通路、钙离子信号通路、cGMP-PKG通路、血管平滑肌收缩通路可通过直接或间接作用调控血管平滑肌的收缩与舒张,改善局部组织缺血缺氧以缓解疼痛,也与高血压、脑损伤、勃起功能障碍相关。前列腺素属于脂肪酸类,其降解亦能抑制疼痛的发生。其他信号通路包括甾体激素信号通路、生物代谢,暂未发现与慢性盆腔炎相关,而可能与脑损伤、勃起功能障碍、良性前列腺增生、慢性阻塞性肺疾病、骨肉瘤、脱发、高血压等疾病相关。

综上所述,通过数据挖掘发现治疗慢性盆腔炎的中药灌肠方多以清热解毒祛瘀为法,其中,败酱草、蒲公英、大血藤、莪术、三棱是其高频核心药物,借助BATMAN-TCM分析发现,TRP离子通道及长时增强信号通路是其作用的潜在治疗靶点通路。那么,在下一步的研究可以提取高频核心中药的有效成分,通过检测其对潜在信号通路的作用以验证推测,或可发现TRP离子通道及长时增强信号通路相关激动剂或拮抗剂,为慢性盆腔炎及慢性疼痛的治疗提供新的策略。

参考文献:

- [1] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013, 264.
- [2] 万新, 石晋丽, 刘勇, 等. 败酱属植物化学成分与药理作用[J]. 国外医药(植物药分册), 2006, 21(2): 53-59.
- [3] 李海源, 范红艳. 蒲公英的药理作用研究进展[J]. 中国高新区, 2018(7): 189-191.
- [4] 黄淑凤, 孟建国, 孙鑫, 等. 大血藤对苯酚胶浆致盆腔炎模型大鼠血清PGL₂、TXA₂的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35(5): 69-70.
- [5] 李华, 王桂芝, 刘爱静, 等. 活血化瘀法治疗慢性盆腔炎的原理探讨[J]. 吉林医学, 1980, 1(3): 22-23.
- [6] 刘明, 梁建东, 张永萍, 等. 盆炎清灌肠剂治疗大鼠慢性盆腔炎的研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 130-132.
- [7] 史娟, 李继硕. TRP离子通道[J]. 神经解剖学杂志, 2004, 20(2): 197-204.
- [8] BERTIN S, AOKI-NONAKA Y, DE JONG P R, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+)T cells[J]. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1055-1063.
- [9] LINK T M, PARK U, VONAKIS B M, et al. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis [J]. Nat Immunol, 2010, 11(3): 232-239.
- [10] LEVEQUE M, PENNA A, LE TRIONNAIRE S, et al. Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipid rafts: alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4310.
- [11] SCHILLING T, MIRALLES F, EDER C. TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 21): 4561-4566.
- [12] JIN J, DESAI B N, NAVARRO B, et al. Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis[J]. Science, 2008, 322(5902): 756-760.
- [13] DAMANN N, OWSIANIK G, LI S, et al. The calcium-conducting ion channel transient receptor potential canonical 6 is involved in macrophage inflammatory protein-2-induced migration of mouse neutrophils [J]. Acta Physiol (Oxf), 2009, 195(1): 3-11.
- [14] LINDEMANN O, UMLAUF D, FRANK S, et al. TRPC6 regulates CXCR2-mediated chemotaxis of murine neutrophils [J]. J Immunol, 2013, 190(11): 5496-5505.
- [15] WEBER E W, HAN F, TAUSEEF M, et al. TRPC6 is the endothelial calcium channel that regulates leukocyte transendothelial migration during the inflammatory response [J]. J Exp Med, 2015, 212(11): 1883-1899.
- [16] SINGH I, KNEZEVIC N, AHMED G U, et al. Galphaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin [J]. J Biol Chem, 2007, 282(11): 7833-7843.
- [17] KINI V, CHAVEZ A, MEHTA D. A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca²⁺ entry, endothelial permeability, and angiogenesis [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33082-33091.
- [18] DAVIS J B, GRAY J, GUNTHORPE M J, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia [J]. Nature, 2000, 405(6783): 183-187.
- [19] CATERINA M J, LEFFLER A, MALMBERG A B, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor [J]. Science, 2000, 288(5464): 306-313.
- [20] BAUTISTA D M, JORDT S E, NIKAIT, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents [J]. Cell, 2006, 124(6): 1269-1282.
- [21] HORVATH A, TEKUS V, BOROS M, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic

- arthritis: *in vivo* study using TRPA1-deficient mice[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 6.
- [22] DEL F M, QUARTU M, BOI M, et al. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 86(4): 393-397.
- [23] MARONE I M, DE LOGU F, NASSINI R, et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice[J]. *Brain*, 2018, 141(8): 2312-2328.
- [24] YAN X, JIANG E, GAO M, et al. Endogenous activation of presynaptic NMDA receptors enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn in a rat model of neuropathic pain[J]. *J Physiol*, 2013, 591(7): 2001-2019.
- [25] QU X X, CAI J, LI M J, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain[J]. *Exp Neurol*, 2009, 215(2): 298-307.
- [26] FLYNN R, LABRIE-DION E, BERNIER N, et al. Activity-dependent subcellular cotrafficking of the small GTPase Rem2 and Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase IIalpha[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41185.
- [27] LI X Y, KO H G, CHEN T, et al. Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1400-1404.
- [28] KELLY M T, CRARY J F, SACKTOR T C. Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(13): 3439-3444.
- [29] WILLIS W D. Long-term potentiation in spinothalamic neurons[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 40(1-3): 202-214.
- [30] ROBINSON D A, ZHUO M. Glutamatergic synapses serve as potential targets for controlling persistent pain[J]. *Curr Anaesth Crit Care*, 2002, 13(6): 321-327.
- [31] YAMANAKA M, MATSUURA T, PAN H, et al. Calcium-stimulated adenylyl cyclase subtype 1 (AC1) contributes to LTP in the insular cortex of adult mice[J]. *Heliyon*, 2017, 3(7): e338.
- [32] 谌凌燕, 陈冬建, 吴智兵. 神经元调控因子NMDA受体与GABA受体在升降散治疗大鼠神经病理性疼痛中的作用[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(10): 2203-2206.

【责任编辑：侯丽颖】

应用DNA提取改良和二次聚合酶链反应技术检测乌头及其炮制品

朱高倩^{1,2,3}, 李双良^{1,2,3}, 马莉^{1,2,3}, 周培军^{1,2,3}, 蒲星宇^{1,2,3}, 王丽^{1,2,3}, 符德欢^{1,2,3}

(1. 云南省药物研究所, 云南昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 云南昆明 650111;

3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南昆明 650111)

摘要:【目的】筛选适用于9种乌头属植物根茎炮制前后DNA提取的方法。【方法】采用基于十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基硫酸钠(SDS)法的12种改良方法提取9种乌头属植物根茎炮制前后DNA, 考察提取缓冲液种类、聚乙烯吡咯酮(PVP)添加、水浴时间、DNA沉降方式对乌头属植物根茎炮制前后DNA提取的影响, 以及二次聚合酶链反应(PCR)技术对乌头炮制品ITS2片段浓度提高的影响。【结果】不同缓冲液与水浴时间互作提取DNA效应不同, 2×CTAB(含2.5 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头生品DNA的ITS2扩增效果最佳, 2×CTAB(含1.4 mol/L NaCl)水浴3 h提取的9种乌头炮制品DNA的ITS2扩增效果最佳。添加PVP或添加PVP+改变DNA沉降方式对生品DNA提取影响不大, 但对炮制品有明显的抑制

收稿日期: 2020-03-16

作者简介: 朱高倩(1988-), 女, 工程师; E-mail: zhugaoqian@163.com

通讯作者: 符德欢(1976-), 男, 正高级工程师; E-mail: fudehuan@126.com

基金项目: 云南省应用基础研究计划项目(编号: 2017FD234); 云南省重大科技专项(农业)(编号: 2017AB005)