

基于网络药理学及动物实验探究安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的作用

王砺寒, 侯静怡*, 李雪丽*

(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)

摘要: **目的** 基于网络药理学及动物实验探究安宫牛黄丸对缺血性脑卒中的治疗作用。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台、中医药综合数据库、中国天然产物化学成分库及文献检索获取活性成分, SwissTargetPrediction 数据库预测药物的作用靶点, GeneCards、PubMed-Gene 数据库获取缺血性卒中相关靶点。药物与疾病靶点相交集后, 导入 STRING 数据库进行蛋白互作关系分析, 筛选关键作用靶点, DAVID 数据库进行 GO 功能富集、KEGG 通路富集分析, Schrodinger 软件对活性分子与潜在关键靶点进行分子对接。采用大鼠动脉阻塞 (MCAO) 法构建大鼠脑缺血/再灌注损伤模型, 给予安宫牛黄丸干预 5 d, 对神经功能、脑梗死率和脑组织病理学改变进行评估, RT-qPCR、Western blot 法验证安宫牛黄丸对脑组织中部分关键靶点的调控作用。**结果** 筛选出 16 种活性成分及 940 个与缺血性卒中相关的靶点, 并得到交集靶点 318 个。富集分析表明, 安宫牛黄丸主要与 MAPK、cAMP、PI3K/Akt、细胞凋亡等信号通路的调控相关。分子对接显示, 安宫牛黄丸活性成分与核心靶点 CDC42、SIRT1、PARP1 和 MAPK3 均有较好的结合活性。动物实验显示, 安宫牛黄丸能够降低 MCAO 大鼠脑梗死率, 改善神经功能缺损和脑组织病理损伤状态, 上调 MAPK3、SIRT1 表达, 下调 CDC42、PARP1 表达。**结论** 安宫牛黄丸对缺血性卒中的改善作用具有多成分、多靶点的特征, 本研究为其临床应用提供了科学的实验依据。

关键词: 安宫牛黄丸; 缺血性脑卒中; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)10-3468-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.048

缺血性脑卒中 (acute ischaemic stroke, AIS) 占我国脑卒中的 69.6%~70.8%^[1], 其临床表现为突发性的脑血液循环障碍及神经功能缺损, 是高致残率、高致死率、高复发率的重大疾病^[2]。因此, 积极寻找预防、治疗和延缓 AIS 的有效措施对于挽救患者生命和减轻社会负担具有重要意义。

安宫牛黄丸是中药清热开窍方“温病三宝”之首, 出自清代温病学家吴鞠通的《温病条辨》, 由牛黄、水牛角、麝香 (或人工麝香)、珍珠、朱砂、雄黄、黄连、黄芩、栀子、郁金、冰片组成^[3], 是中医治疗高热烦躁、神昏谵语、中风昏迷等急危重症的传统抢救药物, 临床应用广泛。现代研究表明, 安宫牛黄丸可明显改善 AIS 患者昏迷程度, 具有促觉醒^[4]、促进神经功能恢复^[5]、减轻炎症反应^[6-7]、改善凝血功能^[8]的作用, 疗效确切, 安全性好, 但其药效途径及作用机制尚待深入挖掘和系统阐述。

网络药理学是基于系统生物学、生物信息学和网络分析等方法, 系统、全面地探究中药治疗复杂疾病作用机制的新兴交叉学科, 其理论与中医治疗观和辨证论治的特

点相吻合。因此, 本研究利用网络药理学与动物实验深入探讨安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的潜在靶点及作用机制, 以期为其临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 活性成分筛选 利用中药系统药理学 (TCMSP) 数据库与分析平台 (<https://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)^[9]、中医药综合数据库 (TCMID) (<http://www.megabionet.org/tcmid/>)^[10]、中国天然产物化学成分库及已发表的文章查询活性成分, 并根据吸收、分布、代谢、消除 (absorption, distribution, metabolism and elimination, ADME) 参数, 设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-like properties, DL) ≥ 0.18 及血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) ≥ 0.3 ^[11] 作为筛选条件, 得到安宫牛黄丸作用于中枢神经系统的物质基础。

1.1.2 活性成分靶点预测 通过 HIT 2.0 (<http://hit2.badd-cao.net>)^[12]、ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>)^[13] 数据库获取活性成分靶点注释信息,

收稿日期: 2024-07-08

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82204670, 82305055); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JJPY2022004, ZZ13-YQ-081-2022T); 中国博士后科学基金资助项目 (2023M743919)

作者简介: 王砺寒 (1993—), 女, 博士, 研究方向为中药复杂作用机制。Tel: 18202719576, E-mail: lhwang29@163.com

* **通信作者:** 侯静怡 (1989—), 女, 博士, 研究方向为中药信息学。Tel: 17710266480, E-mail: hjy_2016@126.com

李雪丽 (1982—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药心脑血管药理。Tel: (010) 64089520, E-mail: lixuli1801@163.com

SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)^[14]数据库预测查询活性成分的潜在靶点。将上述靶点合并后通过 UniProt 数据库规范化,得到预测靶点。

1.1.3 缺血性脑卒中潜在作用靶点筛选 以“ischemic stroke”为关键词,在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、PubMed-Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[9]数据库中进行检索。将上述靶点合并后通过 UniProt 数据库规范化,得到缺血性脑卒中疾病相关靶点。

1.1.4 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建及关键靶点获取 通过 Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 在线工具整合安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的作用靶点,导入到 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>)^[15]进行 PPI 分析,最低置信度 (confidence) 设置为 0.7,建立 PPI 网络,导入 Cytoscape 3.7.0 平台进行可视化分析,并利用插件 cytoHubba 筛选关键作用靶点^[16]。

1.1.5 GO、KEGG 富集分析 将安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的靶点导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库,限定物种为“*Homo Sapiens*”,对靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析,选取 GO 的生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 条目中排名靠前的 10 条及 KEGG 条目中排名靠前的 20 条,通过 R 语言中的“ggplot”“ggpubr”包绘制可视化图像,获得信号通路及生物学过程。

1.1.6 分子对接 将“1.1.1”项下活性成分与“1.1.4”项下潜在作用靶点进行分子对接,在 PubChem 数据库中获取前者二维分子结构,RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取后者结构。采用 Schrodinger 软件预测活性分子与关键靶点的结合值,PyMOL 将对接结果可视化^[11]。

1.2 动物实验

1.2.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 45 只,雄性,体质量 260~280 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008],饲养于中国中医科学院医学实验中心,标准光照周期 (12 h 光照、12 h 黑暗),室内温度 (22±2)℃,相对湿度 (45±5)%,全程予以标准饲料,自由进食饮水。动物实验经中国中医科学院医学实验中心实验动物福利伦理委员会批准 (伦理批准号 ERCCACMS21-2303-07)。

1.2.2 药物、试剂与仪器 安宫牛黄丸 (批号 48915-230401-0002,龙晖药业有限公司);金纳多 (批号 5080622,德国威玛舒培博士药厂)。异氟烷 (批号 20220905,青岛欧博方医药科技有限公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) (批号 T8877,美国 Sigma 公司);10% 中性福尔马林固定液 (批号 PH0996,飞净生物科技有限公司);线栓 (批号 2838-A4,北京西浓科技有限公司);Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (批号 RC112、Q711,南

京诺唯赞生物科技股份有限公司);M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover (批号 MF166,北京聚合美生物科技有限公司);BCA 试剂盒 (批号 P0012,上海碧云天生物技术有限公司);CDC42 抗体 (批号 10155-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);PARP1、MAPK3 抗体 (批号 CY5347、CY5084,上海泊湾生物技术有限公司);SIRT1 (批号 8469,美国 Cell Signaling Technology 公司)。蛋白电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司);Real-Time PCR System、Nanodrop 微量 UV-Vis 分光光度计 (型号 QuanStudio™ 1 Plus、840-317400,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2.3 大脑中动脉栓塞 (MCAO) 脑缺血模型制备 采用经典的线栓法制备,并于缺血 90 min 后拔栓形成缺血/再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R)。健康大鼠以 3%~5% 异氟烷诱导麻醉,1.5%~3% 异氟烷维持麻醉,监测并实时维持体温为 37℃,备皮后开始手术,经颈正中切口,暴露并小心分离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,用手术线将颈总动脉近心端和颈外动脉远心端结扎,微血管夹将颈内动脉近心端靠近动脉分叉处夹闭,在颈总动脉距分叉处约 4 mm 的位置穿手术线打一松结,显微剪在颈总动脉剪一小口,插入直径为 0.28 mm 的线栓,将备用松结稍扎紧后使线栓缓慢向颈内方向行进,松开颈内动脉上的微动脉夹,继续前进至中动脉起始端,遇微阻力即停止插栓,深度为 18~20 mm,固定线栓并观察无异常后缝合伤口,90 min 后再次麻醉大鼠,轻轻拔出线栓恢复血供;假手术组不插入线栓,其他操作步骤相同。

1.2.4 分组及给药 大鼠随机分为假手术组、模型组、金纳多组 (0.021 6 g/kg) 和安宫牛黄丸低、高剂量组 (0.27、0.54 g/kg),每组 9 只。于 I/R 术后 1 h 开始给药,假手术组和模型组灌胃予以蒸馏水,各给药组灌胃予以相应剂量药物,每天 1 次,连续 5 d。

1.2.5 神经行为评分 根据大鼠神经功能损伤程度不同,通过 Longa 5 评分法划分为 6 个等级,即提起鼠尾,大鼠能向地面伸展双上肢,无明显神经功能缺损,计 0 分;大鼠不能完全伸展病灶对侧前肢,出现蜷缩,轻度局灶性神经功能缺损,计 1 分;行走时,大鼠向病灶对侧转圈,中度局灶性神经功能缺损,计 2 分;行走时,大鼠向病灶对侧旋转、倾倒或翻滚,重度局灶性神经功能缺损,计 3 分;不能自行行走或有意识丧失,极重度神经功能缺损,计 4 分;死亡,计 5 分。

1.2.6 TTC 染色评估脑梗死率 大鼠异氟烷吸入麻醉后断头取脑,生理盐水冲洗后放入脑模具内,以视交叉为基准,远心端切 2 片,近心端切 4 片,每片 2 mm,加入 1% TTC 染色液,于 37℃ 下避光孵育 10~15 min,正常脑组织为玫瑰红色,缺血区为白色,10% 中性福尔马林固定脑片,采用 Canon IJ Scan Utility 扫描摄像,Image J 图像分析软件计算白色区和全脑面积,以白色区域总面积与全脑总面积比值为脑梗死率。

1.2.7 HE 染色观察脑组织病理形态 取大鼠脑组织,行

常规 10% 福尔马林固定、脱水、石蜡包埋和冠状切片，近经典海马区收片并进行 HE 染色，采用数字切片系统全景扫描仪观察脑组织病理形态特征，拍照后 Image J 软件计算神经细胞密度，进行半定量分析。

1.2.8 RT-qPCR 法检测脑组织 *CDC42*、*PARP1*、*MAPK3*、*SIRT1* mRNA 表达 收集各组大鼠缺血半侧脑组织，置于 -80 ℃ 冰箱中保存，称取 0.1 g，按照组织总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA，使用 Nanodrop 微量 UV-Vis 分光光度计测定 RNA 浓度。取 RNA 1 μg，按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA，以 *β-actin* 为内参，利用 RT-qPCR 试剂盒检测基因表达。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，序列见表 1。检测完成后，使用 2^{-ΔΔCT} 法计算基因相对表达量。

1.2.9 Western blot 法检测脑组织 *CDC42*、*PARP1*、*MAPK3*、*SIRT1* 蛋白表达 收集各组大鼠缺血半侧脑组织，称取 0.1 g 放在液氮中研磨，加入细胞组织快速裂解液混匀，超声破碎仪上超声处理 15 s，离心后取上清液，使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白，与 loading buffer 混合后加热变性，蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，使用湿转法将其转至聚偏二氟乙烯膜上，5% 脱脂奶粉溶液室温孵育 1 h，加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，次日 TBST 溶液洗膜，加入二抗室温孵育 1.5 h；TBST 溶液洗膜，使用 ECL 化学

表 1 引物序列

基因	序列
<i>CDC42</i>	正向 5'-ATGATTGGTGGAGAGCCATAC-3'
	反向 5'-GATGGAGAGACCACTGAGAAAC-3'
<i>MAPK3</i>	正向 5'-CTGGACCGGATGTTAACCTTTA-3'
	反向 5'-CTGGTTCATCTGTCGGATCATAG-3'
<i>PARP1</i>	正向 5'-GCTGAGGTCATCAGGAAGTATG-3'
	反向 5'-CTCTCCCTCTCGCTCTATCTT-3'
<i>SIRT1</i>	正向 5'-GATGACGCCTTATCCTCTAGTTC-3'
	反向 5'-CGGTCTGTCAGCATCATCTT-3'
<i>β-actin</i>	正向 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'
	反向 5'-GGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'

发光试剂盒显色，并于化学发光成像仪上捕获图像。

1.2.10 统计学分析 通过 Origin 2021 pro 软件进行处理，符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐时多组间比较采用单因素方差分析，否则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 活性成分及靶点 共获取活性成分 16 种，详见表 2，其中牛黄 1 种，麝香 1 种，黄芩 7 种，栀子 7 种，黄连 5 种，郁金 1 种，冰片 1 种。将上述活性成分所对应的靶点进行汇总，删除重复后共得到 940 个。

表 2 安宫牛黄丸活性成分

序号	活性成分	CAS 号	OB/%	DL	BBB	来源
1	cholesterol	80356-14-5	37. 87	0. 68	1. 13	水牛角、牛黄、麝香
2	panicolin	41060-16-6	76. 26	0. 29	0. 31	黄芩
3	beta-sitosterol/sitosterol	83-46-5	36. 91	0. 75	0. 99	黄芩、栀子、郁金
4	stigmasterol	83-48-7	43. 83	0. 76	1. 00	黄芩、栀子
5	coptisine	3486-66-6	30. 67	0. 86	0. 32	黄芩、黄连
6	supraene	111-02-4	33. 55	0. 42	1. 73	黄芩、栀子
7	epiberberine	6873-09-2	43. 09	0. 78	0. 40	黄芩、黄连
8	moslosooflavone	3570-62-5	44. 09	0. 25	0. 54	黄芩
9	berberine	633-66-9	36. 86	0. 78	0. 57	黄连
10	(<i>R</i>)-canadine	2086-96-6	55. 37	0. 77	0. 57	黄连
11	palmatine	3486-67-7	64. 60	0. 65	0. 37	黄连
12	ammidin	482-44-0	34. 55	0. 22	0. 92	栀子
13	mandenol	544-35-4	42. 00	0. 19	1. 14	栀子
14	isoimperatorin	482-45-1	45. 46	0. 23	0. 66	栀子
15	ethyl oleate(NF)	111-62-6	32. 40	0. 19	1. 10	栀子
16	dipterocarpol	471-69-2	41. 71	0. 76	0. 42	冰片

2.2 PPI 网络、关键靶点与功能富集分析 GeneCards 数据库中共检索到 5 417 个靶点，PubMed-Gene 数据库中共检索到 201 个靶点，将上述靶点合并去重，通过 Uniprot 数据库规范化后共获得 3 279 个疾病靶点。将安宫牛黄丸靶点与疾病靶点取交集，得到重合靶点 318 个，见图 1A，再将其导入 STRING 数据库构建 PPI 网络，以及 Cytoscape 数据平台进行可视化分析，如图 1B 所示，该 PPI 网络共包含 299 个节点 (node) 和 1 397 条相互作用边 (interaction edge)。应用 Cytohubba 插件计算分析该网络中的拓扑参数，并以度 (Degree) > 中位数 (6)、介数中心性 (Betweenness

3470

Centrality) > 中位数 (197.60)、中心接近度 (Closeness Centrality) > 中位数 (101.97)、度 (Degree) 排名前 5 位为筛选条件，得到核心靶点为 *CDC42*、*SIRT1*、*PARP1* 和 *MAPK3*，见表 3。

表 3 关键靶点信息

序号	靶点	Degree	Betweenness Centrality	Closeness Centrality
1	<i>CDC42</i>	22	669. 82	126. 90
2	<i>SIRT1</i>	24	2 826. 90	130. 96
3	<i>PARP1</i>	21	2 526. 95	124. 91
4	<i>MAPK3</i>	35	2 699. 62	143. 67

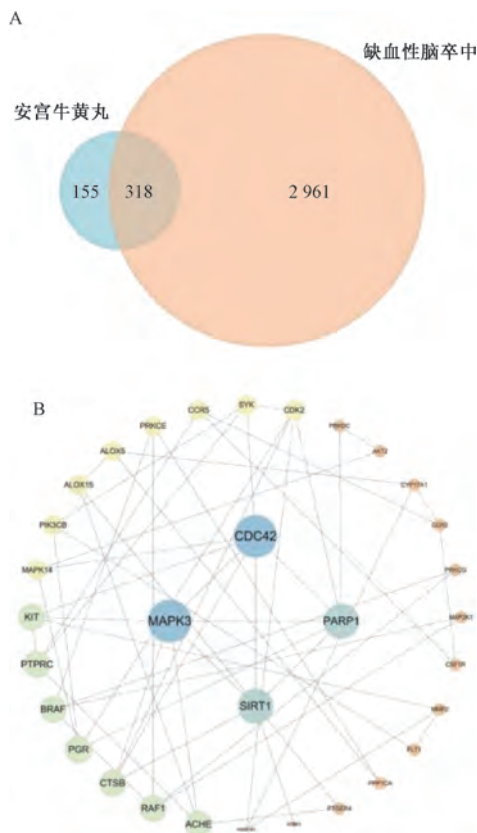


图 1 安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的交集靶点韦恩图 (A) 和 PPI 网络 (B)

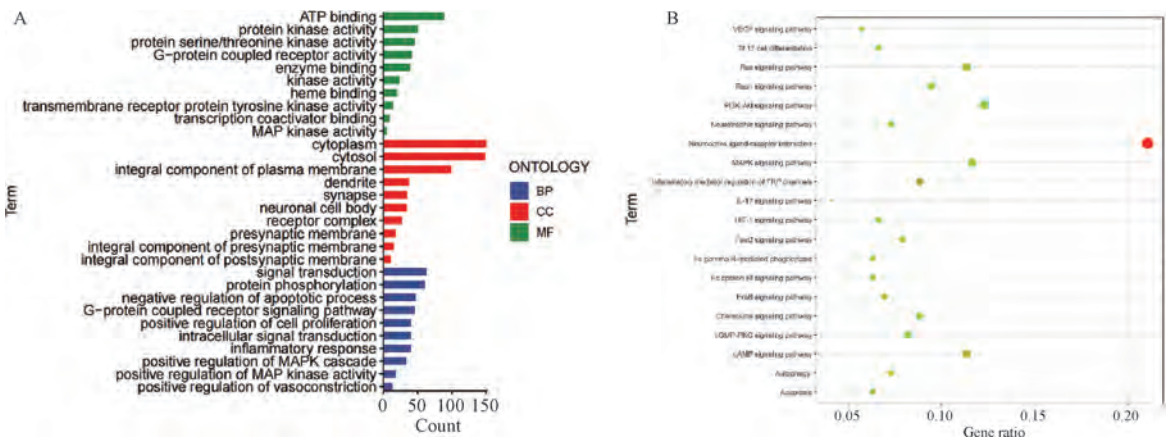


图 2 GO 功能 (A)、KEGG 通路 (B) 富集分析图

量组神经功能评分降低 ($P<0.01$), 表明金纳多和安宫牛黄丸均可改善大鼠神经功能损伤, 见图 4。

2.5 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑梗死率的影响 假手术组无白色区, 脑组织正常无梗死; 与假手术组比较, 模型组可见梗死区; 与模型组比较, 金纳多组和安宫牛黄丸各剂量组大鼠脑梗死率降低 ($P<0.01$), 见图 5。

2.6 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织病理损伤的影响 如图 6A 所示, 假手术组大鼠脑组织结构完整, 神经细胞排列整齐, 数目丰富, 未见变性、坏死等病变; 模型组大鼠脑组织梗死区和缺血周边区组织疏松水肿, 出现大片筛网状结

如图 2A 所示, 安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中生物过程主要涉及 G-蛋白偶联受体信号通路、MAPK 通道正向调节等, 细胞组分主要涉及受体复合体、细胞质、胞浆等, 分子功能主要涉及蛋白酶激活性、ATP 结合、G 蛋白偶联受体活性、MAP 激酶活性等。如图 2B 所示, 安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中主要通过调控 MAPK 信号通路、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、细胞凋亡等信号通路。以上结果表明, 安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中时通过“多成分-多靶点-多通路”进行调控。

2.3 分子对接 将活性成分分别与 CDC42 (PDB ID: 5UPK)、SIRT1 (PDB ID: 5BTR)、PARP1 (PDB ID: 6BHV)、MAPK3 (PDB ID: 4QTB) 4 个核心靶点进行分子对接, 如图 3A 所示, 活性成分均与关键靶点有较好的结合活性。进一步通过 PyMol 对结合结果最低的组合进行相互作用模式分析, 发现氢键、静电、氧氢键相互作用和 π - π 共轭相互作用共同维持配体与受体蛋白的结合稳定性, 如图 3B 所示, Coptisine 与 CDC42 蛋白和 MAPK3 蛋白中的氨基酸残基 Leu398、Met125 和 Lys71 形成氧氢键相互作用, Moslosooflavone 与 SIRT1 蛋白和 PARP1 蛋白中的氨基酸残基 Leu228、Tyr907、Ser904、Gly863 形成氧氢键与 π - π 共轭相互作用。

2.4 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠神经功能缺损的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠 Longa 5 分神经功能评分升高 ($P<0.01$), 表明急性脑缺血后大鼠已经出现中度及稍重度的神经功能损伤; 与模型组比较, 金纳多组和安宫牛黄丸各剂

构为液化性坏死 (软化灶), 同时嗜碱性粒细胞增多并伴随弥漫性小胶质细胞活化, 神经细胞排列紊乱、稀疏, 神经元呈空泡变性, 或者胞体呈三角形固缩, 核仁皱缩变小甚至丢失; 与模型组比较, 金纳多组和安宫牛黄丸各剂量组大鼠脑组织皮层 (Cortex) 神经细胞空泡性变化减轻, 细胞排列紧密, 粒细胞浸润和小胶质细胞活化减轻。半定量分析结果如图 6B~6D 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织皮层、海马 CA1 和 CA3 区神经细胞密度降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 金纳多组和安宫牛黄丸高剂量组大鼠脑组织皮层、海马 CA1 和 CA3 区神经细胞密度升高 ($P<$

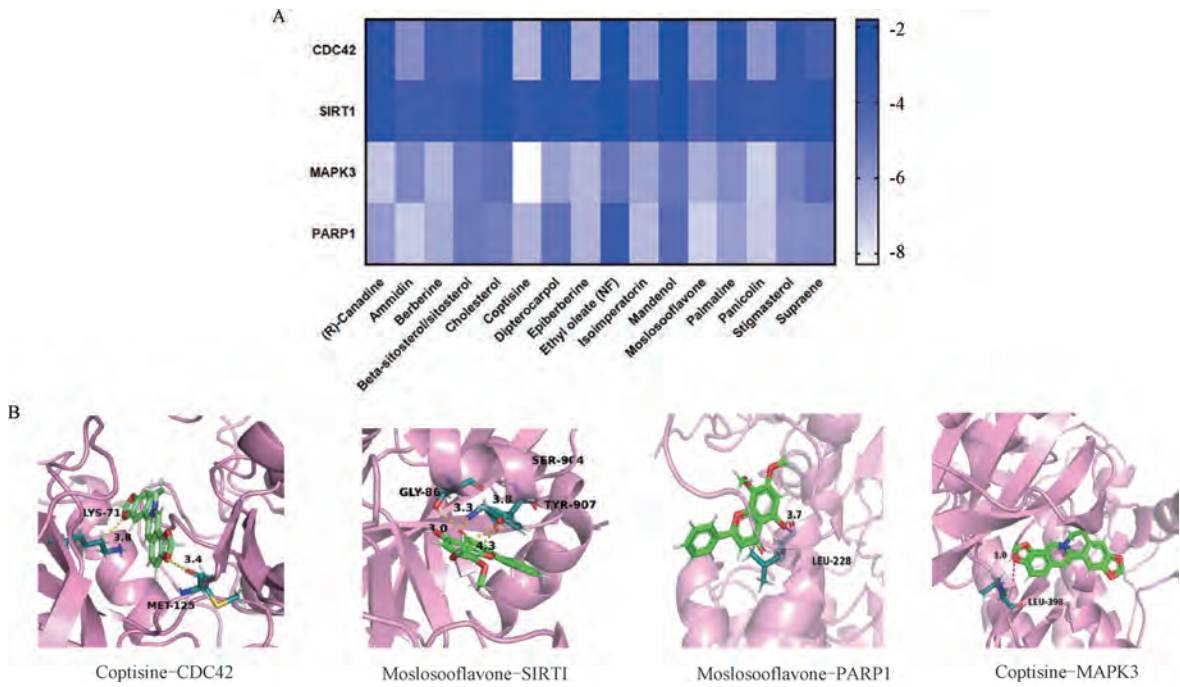
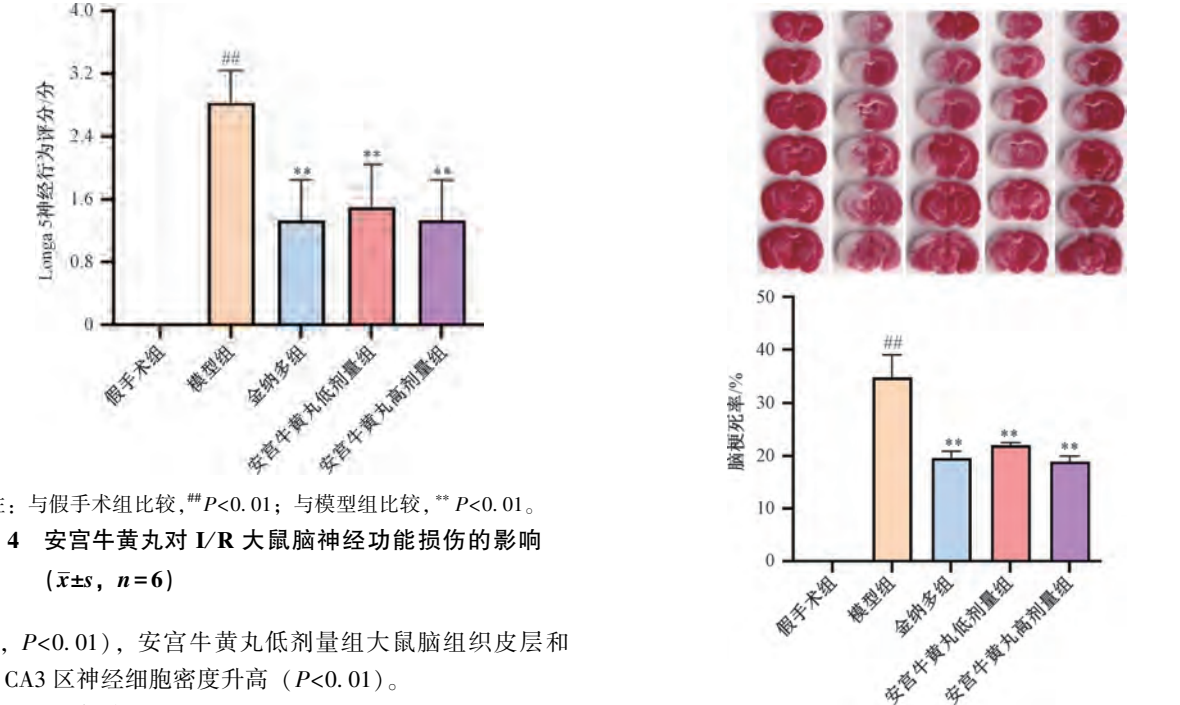


图 3 活性成分与关键靶点结合热图 (A) 和对接示意图 (B)



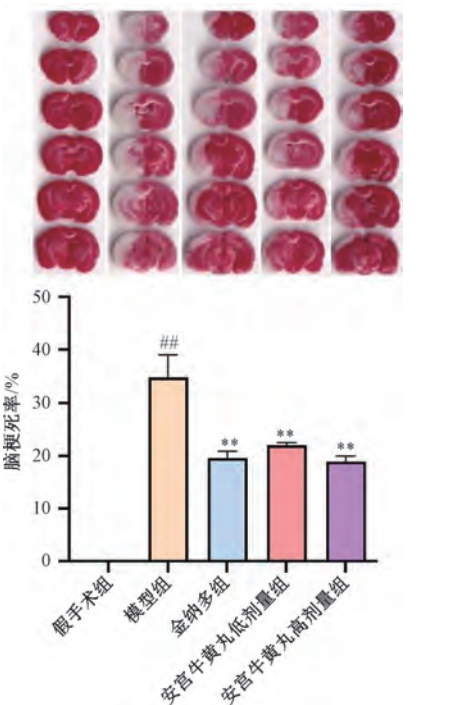
注：与假手术组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 4 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑神经功能损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

0.05, $P<0.01$), 安宫牛黄丸低剂量组大鼠脑组织皮层和海马 CA3 区神经细胞密度升高 ($P<0.01$)。

2.7 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织 CDC42、PARP1、MAPK3、SIRT1 mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 CDC42、PARP1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), MAPK3、SIRT1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 安宫牛黄丸各剂量组大鼠脑组织 CDC42 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), MAPK3、SIRT1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), 安宫牛黄丸高剂量组 PARP1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), 见图 7。

2.8 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织 CDC42、PARP1、MAPK3、SIRT1 蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 CDC42、PARP1 蛋白表达升高 ($P<0.01$),



注：与假手术组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 5 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑梗死率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

MAPK3、SIRT1 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 安宫牛黄丸各剂量组大鼠脑组织 CDC42 蛋白表达降低 ($P<0.01$), MAPK3、SIRT1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 安宫牛黄丸高剂量组大鼠脑组织 PARP1 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 见图 8。

3 讨论

缺血性卒中由突发性血供障碍引起, 形成缺血核心和

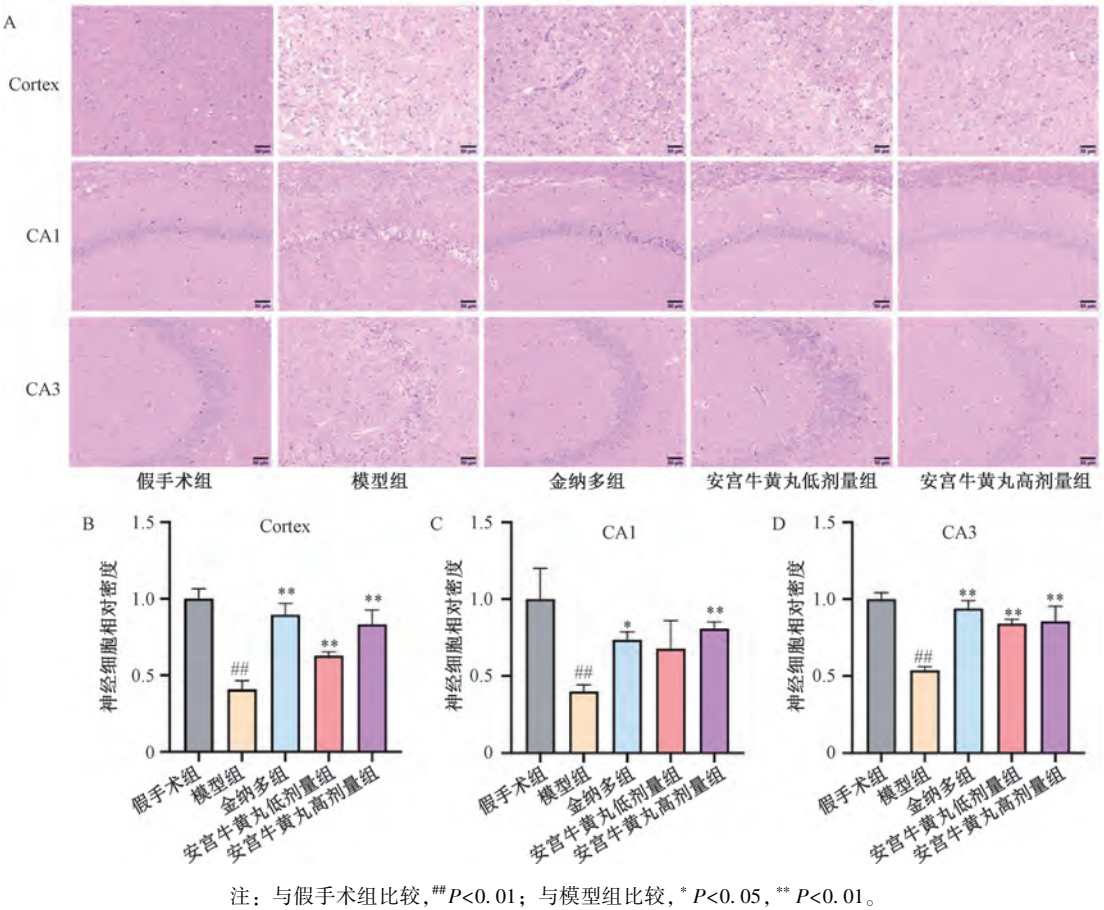


图 6 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织病理变化的影响 (×200, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

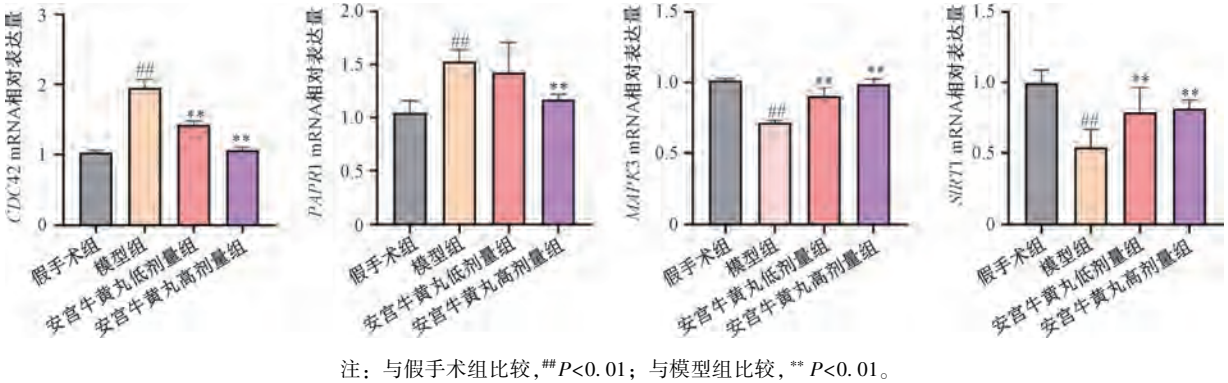
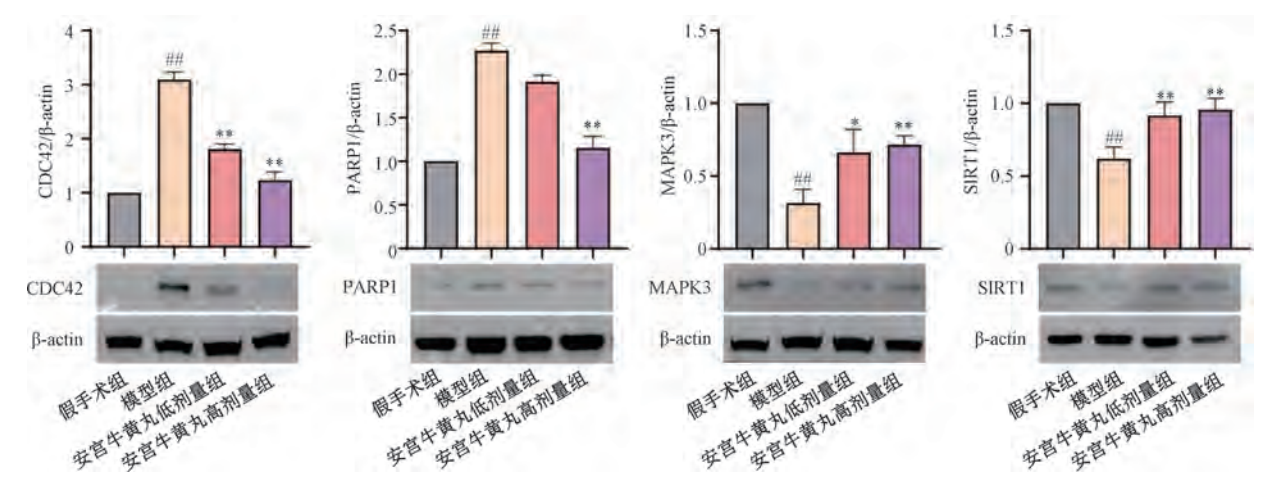


图 7 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织 *CDC42*、*PARP1*、*MAPK3*、*SIRT1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

周围缺血半暗带，这种原发性损伤进而引发一系列继发事件，包括兴奋性毒性物质释放、氧化应激、离子稳态失衡、线粒体功能紊乱及炎症反应等，以上因素错综复杂共同诱导继发性脑损伤，并持续几周甚至更长时间，最终导致细胞凋亡或坏死。中医自古重视机体的整体调节，中药多成分、多环节和多靶点的作用优势与现代医学背景下的系统生物学，以及基于网络药理学和组合靶标思路的临床组合用药研究策略不谋而合。

安宫牛黄丸是中医治疗缺血性中风要药，临床疗效独特，本研究基于网络药理学结合分子对接技术对该制剂治疗缺血性脑卒中的作用靶点和相关通路进行挖掘，探究其

潜在的分子机制。通过 PPI 网络分析筛选出安宫牛黄丸治疗缺血性脑卒中的 4 个核心结合靶点，分别是 *CDC42*、*PARP1*、*MAPK3* 和 *SIRT1*，并对以上靶点进行了分子对接的初步验证。其中，*CDC42* 是 Rho 家族 GTP 酶，参与调控细胞骨架和微管动力学、转录、细胞周期进程、细胞极性、凋亡、吞噬、囊泡运输和细胞粘附等重要的生理进程^[17]，在脑缺血再灌注过程中可激活 *MLK3/MKK7/JNK3* 信号通路而调控细胞凋亡^[18]；*PARP1* 是多聚 ADP 核糖聚合酶超家族成员，可影响 *NF-κB*^[19]、*TNF-α*^[20]、*IL-6*^[21] 等炎症相关基因的表达，敲除后在脑缺血再灌注中具有明显的保护作用^[22-23]；*MAPK3* 是丝裂原活化蛋白激酶（*MAPK*）通路重



注：与假手术组比较，##*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

图 8 安宫牛黄丸对 I/R 大鼠脑组织 CDC42、PARP1、MAPK3、SIRT1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

要的组成部分，在细胞信号转导过程中起重要的连接作用，参与神经元重塑和细胞迁移等过程^[24]，并且在氧化应激诱导的细胞凋亡过程中发挥关键作用^[25]，在脑缺血再灌注过程中激活后可以减轻细胞凋亡和炎症反应，具有明显的神经保护作用^[26-27]；SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的去乙酰化酶，介导组蛋白和非组蛋白的去乙酰化调节，参与氧化应激、能量代谢和细胞凋亡过程^[28-30]，在脑缺血再灌注过程中调控下游靶标 NF-κB、FoxO3、p53、PGC-1α 等介导细胞凋亡、炎症和氧化应激过程，增加其表达或激活后可明显减轻脑缺血再灌注损伤^[31-34]。

动物实验结果显示，安宫牛黄丸可降低 I/R 大鼠脑梗死率，并且明显改善神经行为功能和脑组织病理损伤。进一步研究发现，安宫牛黄丸可抑制 CDC42、PARP1 表达，上调 MAPK3、SIRT1 的表达，可能通过调节 CDC42、PARP1、MAPK3、SIRT1 等核心分子参与调控炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等生物学过程，发挥抗大鼠脑 I/R 损伤的作用。

综上所述，本研究运用网络药理学预测安宫牛黄丸治疗缺血性卒中的关键成分和核心靶点，并结合动物实验推测该制剂可能通过调节 CDC42、PARP1、MAPK3、SIRT1 表达来参与调控炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等相关通路，从而发挥抗缺血性脑损伤的作用，为其临床治疗缺血性脑卒中提供了一定科学依据。

参考文献：

[1] 中华医学会神经病学分会，中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志，2018，51(9)：666-682.

[2] Feigin V L, Owolabi M O. Pragmatic solutions to reduce the global burden of stroke: a World Stroke Organization-Lancet Neurology Commission [J]. *Lancet Neurol*, 2023，22 (12) : 1160-1206.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

[4] 林萃才，陈润华，陈锦亮. 不同剂量安宫牛黄丸对急性脑梗死伴中、重度意识障碍痰热内闭证促觉醒作用观察[J]. *中医药临床杂志*，2020，32(5)：925-930.

[5] 许秀峰. 安宫牛黄丸治疗脑卒中急性期患者的临床疗效及其对神经功能的影响[J]. *临床合理用药杂志*，2022，15(12)：46-49.

[6] 朱婷婷. 安宫牛黄丸对急性脑梗死静脉溶栓患者炎症因子、血管内皮功能及神经功能的影响[J]. *新中医*，2022，54(18)：20-24.

[7] 李春河，刘 南，陈 静，等. 安宫牛黄丸治疗急性缺血性卒中痰热内闭证的疗效及对炎症反应、儿茶酚胺水平的影响[J]. *新中医*，2023，40(1)：35-42.

[8] 刘志雄，蔡道修. 安宫牛黄丸对急性脑梗死神经、凝血功能影响[J]. *长春中医药大学学报*，2020，36(5)：930-933.

[9] 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.

[10] Huang L, Xie D, Yu Y, *et al*. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018，46 (D1) : D1117-D1120.

[11] 侯静怡，倪理琪，田良良，等. 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[J]. *药学报*，2022，57(10)：3095-3105.

[12] Yan D, Zheng G, Wang C, *et al*. HIT 2.0: an enhanced platform for herbal ingredients' targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022，7(50)：D1238-D1243.

[13] Xu H, Zhang Y, Liu Z, *et al*. ETCM: an encyclopedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019，8(47)：D976-D982.

[14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019，2 (47) : W357-W364.

[15] 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.

[16] Zhu N, Hou J, Yang N. Network pharmacology integrated with experimental validation revealed the anti-inflammatory effects of *Andrographis paniculata*[J]. *Sci Rep*, 2021, 7(10): 9752.

[17] Farhan H, Hsu V W. Cdc42 and cellular polarity: emerging roles at the golgi[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(4): 241-248.

[18] Zhao J, Pei D, Zhang Q, *et al.* Down-regulation Cdc42 attenuates neuronal apoptosis through inhibiting MLK3/JNK3 cascade during ischemic reperfusion in rat hippocampus[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(4): 831-843.

[19] Kim J, Long K E, Tang K, *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(2): 193-203.

[20] Chiarugi A, Moskowitz M A. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-κB-driven transcription and microglial activation; implication for neurodegenerative disorders [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(2): 306-317.

[21] Liaudet L, Pacher P, Mabley J G, *et al.* Activation of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(3): 372-377.

[22] Eliasson M J, Sampei K, Mandir A S, *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia[J]. *Nat Med*, 1997, 3(10): 1089-1095.

[23] Endres M, Wang Z, Namura S, *et al.* Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly (ADP-ribose) polymerase[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(11): 1143-1151.

[24] Drosten M, Dhawahir A, Sum E Y M, *et al.* Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival[J]. *EMBO J*, 2010, 29(6): 1091-1104.

[25] Tuo Q, Wang C, Yan F, *et al.* MAPK pathway mediates the protective effects of onychin on oxidative stress-induced apoptosis in ECV304 endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2004, 76 (5) : 487-497.

[26] Li X, Xie Z, Zhou Q, *et al.* TGN-020 alleviate inflammation and apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion injury in mice through glymphatic and ERK1/2 signaling pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(2): 1175-1186.

[27] Zhao J, Zhao X, Tian J, *et al.* Theanine attenuates hippocampus damage of rat cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting HO-1 expression and activating ERK1/2 pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117160.

[28] Kumari S, Chaurasia S N, Nayak M K, *et al.* Sirtuin inhibition induces apoptosis-like changes in platelets and thrombocytopenia [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (19) : 12290-12299.

[29] Boutant M, Cantó C. SIRT1 metabolic actions; Integrating recent advances from mouse models [J]. *Mol Metab*, 2013, 3(1): W357-W364.

[30] Tsai K, Cheng Y, Leu H, *et al.* Investigating the role of Sirt1-modulated oxidative stress in relation to benign paroxysmal positional vertigo and Parkinson’s disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(9): 2607-2616.

[31] Hernández-Jiménez M, Hurtado O, Cuartero M I, *et al.* Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage[J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2333-2337.

[32] Zhu H, Wang Z, Zhu X, *et al.* Icaritin protects against brain injury by enhancing SIRT1-dependent PGC-1α expression in experimental stroke[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 59(1-2): 70-76.

[33] Wang T, Gu J, Fei P, *et al.* Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1, and NF-κB pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(3): 229-240.

[34] Lu H, Wang B. SIRT1 exerts neuroprotective effects by attenuating cerebral ischemia/reperfusion-induced injury *via* targeting p53/microRNA-22[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1): 208-216.