

- [30] Yang W B, Wu Z J, Yang K, et al. BMI1 promotes cardiac fibrosis in ischemia-induced heart failure via the PTEN-PI3K/Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(1): H61-H69.
- [31] Li L, Hao J H, Jiang X, et al. Cardioprotective effects of ulinastatin against isoproterenol-induced chronic heart failure through the PI3K-Akt, p38 MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1354-1360.
- [32] Cao Y, Ruan Y, Shen T, et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 674219.
- [33] MacLean J, Pasumarthi K B S. Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenoconversion and fibrosis in the heart [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2014, 51(6): 476-482.

基于网络药理学研究脑血疏口服液治疗脑出血的作用机制

张友刚^{1,2}, 李昊楠², 史永平^{1,2}, 张姗姗², 李晓彬², 曾英姿³, 韩利文^{2,4*}, 田青平^{1*}, 刘可春²

[1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103; 3. 山东沃华医药科技股份有限公司, 山东 潍坊 261205; 4. 山东第一医科大学药学与制药科学学院, 山东 济南 250001]

摘要: 目的 基于网络药理学研究脑血疏口服液治疗脑出血的作用机制。方法 利用TCMSP数据库, 筛选出脑血疏口服液的活性成分。通过DisGeNET、Genecards数据库, 筛选出脑出血疾病相关的靶点, 两者取交集得到相同的靶点。将交集基因用David软件进行GO注释分析和KEGG通路分析。采用Cytoscape3.7.1软件, 建立单味药-成分-靶点网络模型、交集基因蛋白质相互作用网络模型、活性成分-靶点-通路网络模型; 利用Ledorck分子对接软件, 验证预测结果。**结果** 脑血疏口服液治疗脑出血的活性成分共56种, 其中黄芪紫檀烷苷、槲皮素、汉黄芩素、川芎嗪、桉脂素等可能是重要物质基础。脑血疏口服液治疗脑出血的机制涉及靶标40个、相关信号通路20条, 可能与PI3K-Akt、肿瘤坏死因子、细胞凋亡等信号通路有关, 而且ESR1、AKT1、PIK3CA、AKT3、EGFR、PTGS2、MMP2、MMP3等靶点可能在治疗脑出血过程中起着关键性的作用。**结论** 本研究基于整体观角度, 通过网络药理学构建了脑血疏口服液治疗脑出血的成分-靶点-信号通路的相互关联网络, 系统揭示了该制剂治疗脑出血的主要药效物质以及作用机制, 可为临床科学使用提供依据。

关键词: 脑血疏口服液; 脑出血; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)01-0234-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.01.048

脑出血(cerebral hemorrhage, CH)是一种常见的脑血管疾病, 其通常是由脑内血管发生病变、坏死、破损引起, 大多数患者不是由于脑出血导致原有病情加重, 而是由于脑出血引起的一系列生理病理变化致残致死^[1-2]。脑出血一般发病较为突然, 若不及时治疗, 轻则使患者留下后遗症, 重则导致患者死亡^[3]。脑出血在临幊上病死率极高, 受到了医药部门的高度重视, 临幊上对于脑出血的治疗包括西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗, 其中以

中西医结合治疗的效果最佳。脑出血是影响我国国民健康的重大公共卫生问题, 防治脑出血的发生、发展十分重要。

中医认为, 脑出血为“瘀血阻滞, 脉道不利”, 治疗上多采用活血化瘀的方法^[4]。脑血疏口服液是我国国家中药保护品种, 具有益气、活血、化瘀, 通腑的功效^[5]。脑血疏口服液由黄芪、大黄、牛膝、牡丹皮、石菖蒲、川芎、水蛭7味中药制成, 是唯一一个治疗脑出血的中成药。临

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707300); 山东省重点研发计划(2017YYSP032); 山东省农业科技园区产业提升工程项目(2017YQ001)

作者简介: 张友刚(1994—), 男, 硕士生, 从事中药制剂分析研究。Tel: 15706804667, E-mail: 1628942675@qq.com

*通信作者: 韩利文(1980—), 男, 博士, 副研究员, 从事中药质量生物评价研究。Tel: (0531) 82605331, E-mail: hanliwen08@126.com

田青平(1966—), 女, 博士, 教授, 从事药物制剂研究。Tel: (0351) 3985245, E-mail: tianqp123456@163.com

床实验表明脑血疏口服液可以显著加快血肿吸收、具有显著改善神经功能受损和临床综合症状的作用，对于脑出血患者的急性期和康复期具有良好的疗效。中药复方成分复杂，这种复杂性使得中药复方的药效物质基础和作用机制不明确^[6]。网络药理学是基于网络生物学和系统生物学开发的一门新兴学科，随着与网络药理学相关的多学科的快速发展，国内外越来越多的学者运用网络药理学来探索疾病与药物更深层次的关联^[7]。本研究利用网络药理学技术发掘脑血疏口服液治疗脑出血的机理，通过建立“药效成分-靶标-通路”网络模型，深入探讨脑血疏口服液治疗脑出血的药效物质、作用机制，为中药现代化研究提供参考。

1 方法

1.1 脑血疏口服液化学成分信息的收集 通过TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/index.php>) 及文献收集脑血疏口服液7味中药（黄芪、大黄、牛膝、牡丹皮、石菖蒲、川芎、水蛭）的全部化学成分，并通过TCMSP、Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 以及查阅相关文献获得这些成分的化学结构，并保存Smiles格式。

1.2 活性成分的筛选 口服吸收利用度(OB%)和药物相似性(DL)是药物筛选过程中两个重要的ADME参数，常用于评价化合物的成药性^[8]。本研究选取同时满足OB≥30%、DL≥0.18的化合物作为潜在活性成分，结合相关文献报道，对水蛭中不满足以上2个条件的活性成分也进行收录^[9]。

1.3 成分靶点的筛选、疾病靶标的收集 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 服务器是基于分子的二维和三维结构与已知蛋白分子的作用程度来预测化合物的潜在靶标，从而精准的得到未知化合物的作用靶标^[10]。将筛选得到的潜在活性分子的Smiles结构导入该数据库，并选定研究物种为人类(homo sapiens)，导出潜在化学成分的靶标。以“cerebral hemorrhage”为关键词，检索GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/search>) 数据库中脑出血相关基因，并去除重复基因。

1.4 “单味药-活性成分-作用靶点”网络的构建 根据以上预测结果，采用Cytoscape3.7.1软件构建“单味药-活性成分-作用靶点”关系网络模型，节点(node)代表单味药、潜在活性成分与潜在作用靶点，边(edge)用来连接单味药与活性成分、活性成分与作用靶点，展现单味药-活性成分-作用靶点之间的联系。

1.5 交集基因的获取及其蛋白质相互作用网络的构建 将脑血疏口服液作用靶点基因和脑出血的相关基因分别输入在线韦恩图绘制网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 获取交集基因，交集基因即为脑血疏口服液治疗脑出血的潜在靶点。将获取的交集基因导入String数据库 (<https://string-db.org/>)，然后将获取的交集基因信息导入Cytoscape 3.7.1绘制交集基因蛋白质相互

作用网络。

1.6 交集基因的生物分子功能注释 将获取的交集基因靶点信息采用David6.8数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行GO注释分析和KEGG通路分析。其中GO注释分析分为3个部分，分别为生物过程分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)和生物过程(biological process, BP)。利用David6.8数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行通路富集分析，将通路富集分析的结果通过Omicshare (<http://www.omicshare.com/tools/index.php>) 对富集分析结果进行可视化处理。

1.7 主要活性成分-靶点分子对接 LeDock是苏黎世大学赵洪桃在博士期间开发的一款跨平台分子对接软件，在速度和准确度上均呈现出强劲的优势^[11]，它采用遗传算法和模拟退火算法相结合的方法对配体的构象进行取样^[12]，其蛋白处理过程十分方便，可实现水分子、杂原子、离子的去除，同时氢原子也可以自动加上。将“1.6”项下的主要活性成分通过Chem3D Pro 14.0得到其MOL2格式，通过Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)、RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库获取主要活性成分作用于疾病靶点的PDB蛋白晶体，并保存为PDB格式，为分子对接做好前期准备。将靶点蛋白晶体及对应的配体先后导入LeDock进行分子对接，保存对接后产生的DOK文件用于展示对接结果。

2 结果

2.1 脑血疏口服液7味中药潜在活性成分及脑出血相关靶点 在TCMSP数据库中筛选出潜在活性成分，分别为黄芪20种，石菖蒲4种，牛膝20种，牡丹皮11种，大黄16种，川芎7种，合并去重后得到70种，再查阅文献发现水蛭45种潜在活性成分，最终得到115种，具体见表1。通过DisGeNET数据库搜集到疾病靶标66个，在Genecards数据库以Relevance score的中位数的2倍为卡值，获得647个疾病靶标，将2个数据库的疾病靶标去重，最终得到656个。

2.2 “单味药-活性成分-作用靶点”网络 将单味药-活性成分信息、活性成分作用靶点信息导入Cytoscape 3.7.1，采用Merge工具绘制“单味药-活性成分-作用靶点”图，见图1，一共有561个节点、1833条边。通过Network Analyzer计算网络拓扑参数，发现潜在成分作用靶点Degree值(网络模型中每个节点与其相连节点的数目)>20的有15个，排名前5的是TDP1、MAPT、CYP19A、MBNL、CA1，分别有69、57、26、26、24个化合物与其发生相互作用。

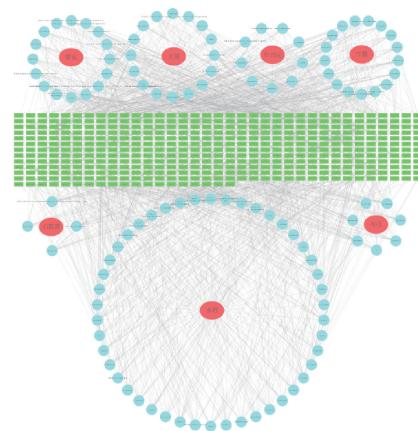
2.3 交集基因及蛋白质相互作用网络 通过在线韦恩图，得到脑血疏口服液潜在活性成分作用靶点与脑出血疾病作用靶点的交集基因有66个，见图2。将其导入String数据库，经Cytoscape 3.7.1处理后得到蛋白质相互作用图，见图3，包括66个节点、和595条边，平均节点度值为18.03。

表1 脑血疏口服液中7味中药潜在活性成分

编号	潜在活性成分	OB/%	DL	药材
1	mairin(丁子香萜)	55.38	0.78	黄芪/牡丹皮
2	jaranol(梔子醇)	50.83	0.29	黄芪
3	Hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75	黄芪
4	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl]octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol[(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇]	36.23	0.78	黄芪
5	isorhamnetin(异鼠李亭)	49.60	0.31	黄芪
6	3,9-di-O-methylnissolisin(3,9,10-三甲氧基紫檀烷)	53.74	0.48	黄芪
7	5'-hydroxyiso-mucronulatol-2',5'-di-O-glucoside(7-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-2',5'-二葡萄糖苷)	41.72	0.69	黄芪
8	7-O-methylisomucronulatol(7,2'-二羟基-3',4'-二甲基异黄烷)	74.69	0.30	黄芪
9	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside(9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷)	36.74	0.92	黄芪
10	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol(黄芪紫檀烷苷)	64.26	0.42	黄芪
11	bifendate(联苯双酯)	31.10	0.67	黄芪
12	formononetin(芒柄花黄素)	69.67	0.21	黄芪
13	isoflavanone(二氢异黄酮)	110.00	0.30	黄芪
14	calycosin(毛蕊异黄酮)	47.75	0.24	黄芪
15	kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	黄芪/石菖蒲/牛膝/牡丹皮
16	FA(叶酸)	68.96	0.71	黄芪/川芎
17	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol[(3R)-7,2'二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷]	67.67	0.26	黄芪
18	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside(3',4'-二甲氧基异黄烷-7,2'-二葡萄糖苷)	49.28	0.62	黄芪
19	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpane(1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯)	39.05	0.48	黄芪
20	quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	黄芪/牛膝/牡丹皮
21	8-isopentenyl-kaempferol(8-异戊烯基山柰酚)	38.04	0.39	石菖蒲
22	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan(桉脂素)	52.35	0.62	石菖蒲
23	cycloartenol(环阿屯醇)	38.69	0.78	石菖蒲
24	poriferasta-7E,22E-dien-3beta-ol(软骨甾醇)	42.98	0.76	牛膝
25	28-norolean-17-en-3-ol(28-去甲齐墩果-17-烯-3-醇)	35.93	0.78	牛膝
26	bidentatoside, II _qt(二齿皂苷元Ⅱ)	31.76	0.59	牛膝
27	spinoside A(菠萝昔 A)	41.75	0.40	牛膝
28	β-ecdysterone(β-蜕皮甾酮)	44.23	0.82	牛膝
29	berberine(小檗碱)	36.86	0.78	牛膝
30	coptisine(黄连碱)	30.67	0.86	牛膝
31	wogonin(汉黄芩素)	30.68	0.23	牛膝
32	8-7-stigmastenol(8-7-豆甾醇)	37.42	0.75	牛膝
33	baicalein(黄芩素)	33.52	0.21	牛膝
34	baicalin(黄芩苷)	40.12	0.75	牛膝
35	epiberberine(表小檗碱)	43.09	0.78	牛膝
36	β-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	牛膝/大黄
37	inophyllum E(海棠果素 E)	38.81	0.85	牛膝
38	spinasterol(菠菜甾醇)	42.98	0.76	牛膝
39	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	牛膝
40	palmatine(巴马亭)	64.60	0.65	牛膝
41	β-daucosterol _qt(β-胡萝卜苷元)	36.91	0.75	牛膝
42	paeoniflorin _qt(芍药苷元)	68.18	0.4	牡丹皮
43	(+)-catechin[(+)-儿茶素]	54.83	0.24	牡丹皮
44	benzoyl paeoniflorin(苯甲酰芍药苷)	31.14	0.54	牡丹皮
45	4-O-methylpaeoniflorin _qt(4-甲氧基芍药苷元)	67.24	0.43	牡丹皮
46	5-[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene barbituric acid(5- {[5-(4-甲氧基苯基)-呋喃基]亚甲基}巴比妥酸)	43.44	0.30	牡丹皮
47	mudanpioside H _qt 2(牡丹皮苷元 H)	42.36	0.37	牡丹皮
48	paeonidinan _qt(去葡萄糖甲基花青素)	65.31	0.35	牡丹皮
49	eupatin(泽兰黄醇素)	50.80	0.41	大黄
50	mutatochrome(柠黄质)	48.64	0.61	大黄
51	physcion diglucoside(大黄素)	41.65	0.63	大黄
52	procyanidin B-5,3'-O-gallate(原花青素 B-5,3'-O-没食子酸酯)	31.99	0.32	大黄
53	rhein(大黄酸)	47.07	0.28	大黄

续表 1

编号	潜在活性成分	OB/%	DL	药材
54	sennoside E_qt(番泻苷元E)	50.69	0.61	大黄
55	torachrysone-8-O-β-D-(6'-oxayl)-glucoside[决明酮-8-O-β-D-(6'-草酰基)-葡萄糖苷]	43.02	0.74	大黄
56	toralactone(决明内酯)	46.46	0.24	大黄
57	emodin-1-O-β-D-glucopyranoside(大黄素-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷)	44.81	0.80	大黄
58	sennoside D_qt(番泻苷元D)	61.06	0.61	大黄
59	daucosterol_qt(胡萝卜苷元)	35.89	0.70	大黄
60	palmidin A(棕榈素A)	32.45	0.65	大黄
61	aloe-emodin(芦荟大黄素)	83.38	0.24	大黄
62	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside[没食子酸-3-O-(6'-O-没食子酸酯)-葡萄糖苷]	30.25	0.67	大黄
63	(-) -catechin[(-)-儿茶素]	49.68	0.24	大黄
64	mandenol(亚油酸乙酯)	42.00	0.19	川芎
65	myricanone(杨梅酮)	40.60	0.51	川芎
66	perlolyrine(川芎嗪)	65.95	0.27	川芎
67	senkyunone(洋川芎酮)	47.66	0.24	川芎
68	wallachilide(川芎哚哚内酯)	42.31	0.71	川芎
69	sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	牡丹皮/川芎
70	butanedioic acid(丁二酸)	29.62	0.01	水蛭
71	phenylalanine(苯丙氨酸)	41.62	0.04	水蛭
72	L-alanine(L-丙氨酸)	87.69	0.01	水蛭
73	L-methionine(L-蛋氨酸)	70.87	0.01	水蛭
74	L-arginine(L-精氨酸)	47.64	0.03	水蛭
75	L-lysine(L-赖氨酸)	29.33	0.02	水蛭
76	L-tyrosine(L-酪氨酸)	57.55	0.05	水蛭
77	L-leucine(L-亮氨酸)	72.92	0.01	水蛭
78	taurine(牛磺酸)	24.37	0.01	水蛭
79	proline(脯氨酸)	77.57	0.01	水蛭
80	L-tryptophan(L-色氨酸)	75.93	0.08	水蛭
81	L-serine(L-丝氨酸)	98.47	0.01	水蛭
82	L-threonine(L-苏氨酸)	73.52	0.01	水蛭
83	L-aspartic acid(L-天冬氨酸)	79.74	0.02	水蛭
84	valine(缬氨酸)	53.33	0.01	水蛭
85	L-isoleucine(L-异亮氨酸)	59.05	0.02	水蛭
86	L-histidine(L-组氨酸)	53.18	0.03	水蛭
87	cystine(胱氨酸)	39.58	0.05	水蛭
88	methyl 14-methylpentadecanoate(14-甲基十五酸甲酯)	9.42	0.11	水蛭
89	methyl heptadecanoate(十七酸甲酯)	17.41	0.14	水蛭
90	methyl stearate(硬脂酸甲酯)	16.80	0.16	水蛭
91	hypoxanthine(次黄嘌呤)	52.29	0.04	水蛭
92	canthine(黄嘌呤)	46.17	0.04	水蛭
93	uracil(尿嘧啶)	42.53	0.02	水蛭
94	uridine(尿苷)	10.49	0.11	水蛭
95	inosine(肌苷)	11.17	0.18	水蛭
96	adenosine(腺苷)	19.85	0.16	水蛭
97	campesterol(菜油甾醇)	37.58	0.71	水蛭
98	cholesterol(胆甾醇)	37.87	0.68	水蛭
99	hexanal(己醛)	55.74	0.01	水蛭
100	nicotinic acid(烟酸)	47.65	0.02	水蛭
101	glycerol(甘油)	72.87	0.01	水蛭
102	hexadecyl ethers of glycerol(甘油十六烷基醚)	-	-	水蛭
103	methyl (Z)-11-hexadecenoate[(11Z)-甲基十六碳烯酸]	-	-	水蛭
104	13-docosenoic acid methyl ester(13-二十二酸甲酯)	-	-	水蛭
105	13-octadecenoic acid methyl ester(13-十八烯酸甲酯)	-	-	水蛭
106	methyl 14-methylhexadecanoate(14-甲基十六酸甲酯)	-	-	水蛭
107	methyl 4-methyltetradecanoate(4-甲基十四酸甲酯)	-	-	水蛭
108	methyl 10-nonenadecenoate(10-甲基十九碳烯酸)	-	-	水蛭
109	methyl 11-methylhexadecanoate(11-甲基十六酸甲酯)	-	-	水蛭
110	methyl 12-methyltetradecanoate(12-甲基十四酸甲酯)	-	-	水蛭
111	hirudinoidine a [1,3-二甲基-6-(甲基亚磺酰基)噻吩并[3,2-g]蝶啶-2,4(1H,3H)-二酮]	-	-	水蛭
112	hirudinoidine b [1-甲基-6-(甲基亚磺酰基)噻吩并[3,2-g]蝶啶-2,4(1H,3H)-二酮]	-	-	水蛭
113	hirudinoidine c [6-(甲基亚磺酰基)噻吩并[3,2-g]蝶啶-2,4(1H,3H)-二酮]	-	-	水蛭
114	cholesta-5,7-dien-3-one(胆甾-5,7-二烯-3-酮)	-	-	水蛭
115	hirudin(水蛭素)	-	-	水蛭



注：红色表示单味药，蓝色表示活性成分，绿色表示作用靶点。

图1 脑血疏口服液成分靶点网络

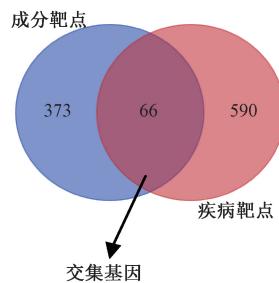
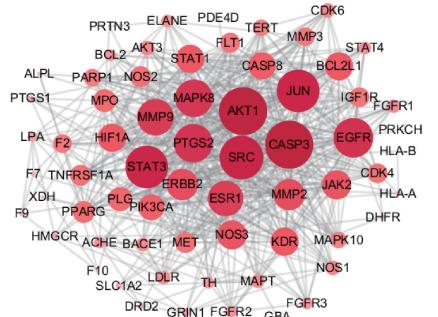


图2 脑血疏口服液成分靶点韦恩图

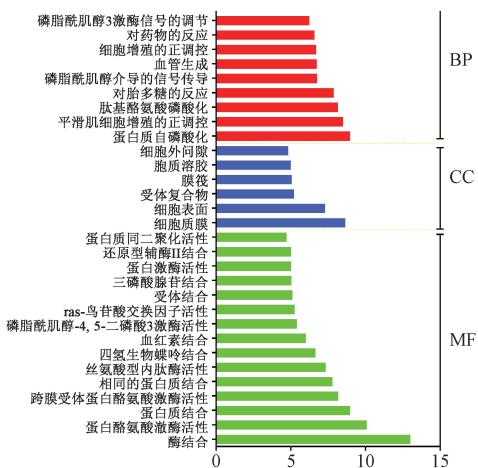


注：每个节点表示蛋白，每条边表示不同蛋白之间的相互作用。圆越大，颜色越深，表示该靶点在整个蛋白相互作用网络中起的作用越大。

图3 交集基因蛋白质相互作用

2.4 生物功能通路分析 将 66 个基因导入 David 数据库进行 GO 分析，以 $P < 0.01$ 、错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 为标准进行筛选，结果见图 4。由此可知，从生物过程层面上看，脑血疏口服液对蛋白质自磷酸化、平滑肌细胞增殖的正调控、肽基酪氨酸磷酸化、对脂多糖的反应、磷脂酰肌醇介导的信号传导、血管生成、细胞增殖的正调控等影响较大；从细胞组分层面上看，脑血疏口服液对质膜、细胞表面、受体复合物、膜筏、胞质溶胶、细胞外间隙等影响较大；从分子功能层面上看，脑血疏口服液对酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白质结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、相同的蛋白质结合、丝氨

酸型内肽酶活性、四氢生物蝶呤结合、血红素结合等影响较大。前 20 条通路见图 5。



注：BP 表示生物过程，CC 表示细胞组分，MF 表示分子功能。

图4 脑血疏口服液治疗脑出血候选靶点的 GO 富集分析

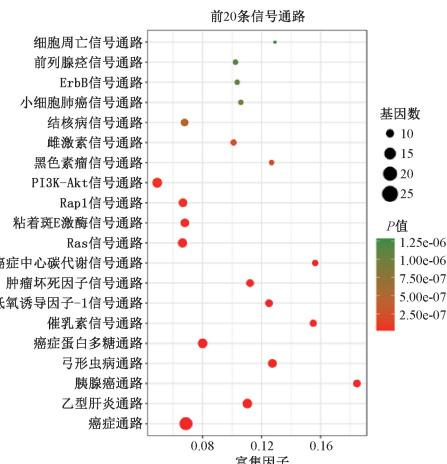
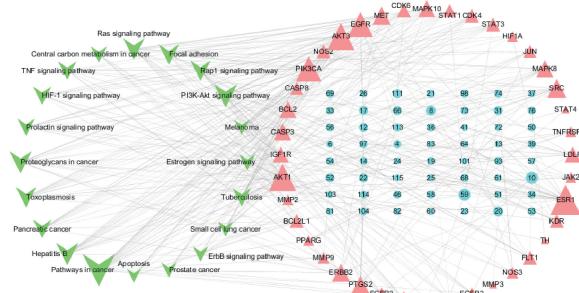


图5 KEGG 分析

2.5 脑血疏口服液活性成分-靶点-通路网络模型 将富集分析排名前 20 的通路所对应的脑血疏口服液潜在活性成分和作用靶点构建“活性成分-靶点-通路”网络模型，见图 6，包括 116 个节点、366 条边。由此可知，ESR1、AKT1、AKT3、EGFR、PIK3CA 节点度值排名靠前，可能是脑血疏口服液治疗脑出血的核心靶点。

2.6 分子对接 将活性成分-靶点-通路网络中排名前五的化合物与其作用于脑出血的靶点进行分子对接，结果见表 2，可知槲皮素与基质金属蛋白酶 3 (MMP3) 具有较好的结合活性，大部分活性成分与其作用的治疗脑出血的靶点具有良好的结合性能。再将已知的能特定作用于 MMP3 的抑制剂伊洛马司他 (Ilomastat, PubChem CID: 132519) 与 1HY7 进行分子对接，其结合能为 -10.39 kcal/mol 。另外，槲皮素、伊洛马司他都是通过疏水相互作用、氢键、配位键与 1HY7 相互作用，以 PyMol V1.8 和 Ligplot⁺ V2.1 展示对接结果，见图 7。



注：蓝色圆形表示活性成分，红色三角表示作用靶点，绿色凹四边形表示可能的调控通路，边代表三者相互作用。节点越大，表明其对脑出血的影响越大。

图 6 脑血疏口服液治疗脑出血活性成分-靶点-通路网络

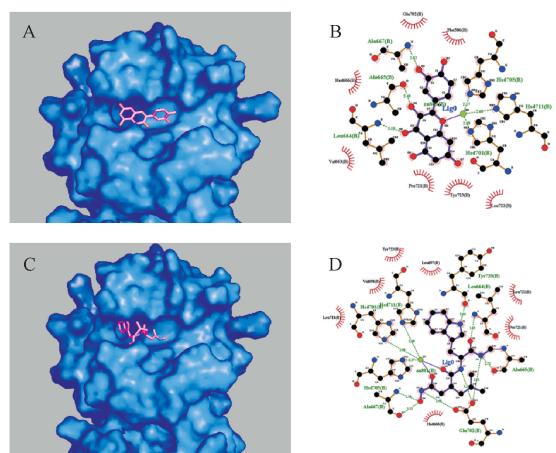
表 2 脑血疏口服液主要活性成分-作用靶点分子对接结果

配体	基因简称	Uniprot ID	PDB ID	分子对接得分/
				(kcal·mol ⁻¹)
66(川芎嗪)	EGFR	P00533	2ITN	-5.94
	ESR1	P03372	5UFX	-5.65
	ERBB2	P04626	5MY6	-5.03
	PTGS2	P35354	5IKT	-6.42
31(汉黄芩素)	NOS3	P29474	4D1P	-5.57
	NOS2	P35228	3E7G	-4.96
	PTGS2	P35354	5IKT	-5.07
22(桉脂素)	MAPK8	P45983	2XRW	-4.42
	MAPK10	P53779	3OY1	-4.26
	MMP3	P08254	1HY7	-7.13
20(槲皮素)	EGFR	P00533	2ITN	-6.81
	ERBB2	P04626	5MY6	-6.61
	MMP2	P08253	1CK7	-4.06
	KDR	P35968	2XIR	-6.23
10(黄芪紫檀烷苷)	MET	P08581	4R1V	-6.09
	FGFR2	P21802	3B2T	-6.02
	FGFR3	P22607	4K33	-6.01
	FLT1	P17948	3HNG	-5.91
	FGFR1	P11362	5EW8	-5.69

3 讨论

脑出血是指非外伤性脑内实质出血，脑出血后脑组织会发生一系列病理生理变化，分为原发性损伤和继发性损伤，前者包括血肿增大、血肿机械压迫，后者包括血红蛋白毒性作用、炎性反应、凝血酶释放、局部脑组织血流量减少等^[13]。脑出血治疗早期以消除血肿为主要治疗目的，后期以继发性损伤中的炎症损伤为主^[14-15]。

本研究系统分析了脑血疏口服液的有效成分，构建了化合物-靶点-通路网络，在该网络中起关键作用的是黄芪紫檀烷苷、槲皮素、汉黄芩素、川芎嗪、桉脂素等。在脑部血管的修复过程中，血管内皮祖细胞起着关键的作用。血管内皮祖细胞源于骨髓，被释放至外周血液后根据需要可以分化成各种细胞，当分化成内皮细胞可以促进血管的新生以及内皮破损的修复在各种病理和组织工程学领域有广泛应用^[16-17]。孙军^[18]等研究表明，槲皮素能够刺激血管内皮祖细胞的增殖与分化，从而促进损伤血管的修复。川



注：A、B 表示槲皮素与 1HY7 的对接，C、D 表示伊洛马司他与 1HY7 的对接。C、D 中的眼睛表示疏水相互作用，绿色表示氢键，蓝色表示配位键。

图 7 1HY7 与槲皮素、伊洛马司他的分子对接

芎嗪能够保护受损的血管内皮细胞，且在一定浓度范围内呈现出剂量依赖^[19]。除此之外，川芎嗪具有较强的抗血小板作用，和一定的抗血栓作用^[20]。川芎嗪可能通过抑制血小板聚集、降低血液黏滞度、改善脑部血管循环，从而达到避免脑部组织缺血缺氧的目的。脑出血后，缺血中心区将发生不可逆性的神经损伤，而缺血半暗带发生的神经元细胞凋亡是可逆的^[21]。汉黄芩素通过抑制小胶质细胞的炎症激活来保护神经元细胞，而不直接作用于神经元细胞^[22]。上述文献报道与本研究通过网络药理学预测的槲皮素、川芎嗪、汉黄芩素可能的活性作用一致。除此之外，存在一些未被报道的活性成分，将成为未来研究脑出血治疗脑出血的潜在方向，如黄芪紫檀烷苷、桉脂素等。

脑血疏口服液治疗脑出血涉及多个靶点，成分-靶点-通路网络提示，ESR1、AKT1、PIK3CA、AKT3、EGFR、PTGS2、MMP2、MMP3 等靶点在治疗脑出血的过程中发挥着重要的作用。苏氨酸蛋白激酶 AKT1 和 AKT3 能够激活 PI3K-Akt 信号通路，从而促进脑出血后局部脑组织缺血造成的损伤神经干细胞的增殖^[23]。MMP2 和 MMP3 同属 MMPs，二者的激活能够诱发脑出血后炎症反应的发生，炎症反应导致血脑屏障的破坏以及脑部神经功能的损伤，抑制 MMPs 的过表达能够起到保护血脑屏障及脑部神经的作用^[24]。除此之外，成分-靶点-通路网络揭示了诸如 PTGS2、NOS2、NOS3 等炎症相关的靶点在治疗脑出血时的重要性。在分子对接验证过程中发现，槲皮素和伊洛马司他与 1HY7 具有较好的结合能力，两者结合位点相同，而且都能够与 MMP3 中的锌形成配位键，抑制 MMP3 的表达，从而验证了靶点预测的可靠性。

本研究将所得到的靶点进行 KEGG 通路分析得到与脑出血可能相关的通路，如 PI3K-Akt、肿瘤坏死因子 (TNF)、低氧诱导因子-1 (HIF-1)、细胞凋亡 (apoptosis)、ErbB、Rap1 信号通路等，与炎症、代谢、血脑屏障功能、神经元保护及细胞凋亡密切相关。脑出血后，由于血肿等

原因致使局部组织血流量减少，缺血部位组织细胞就会处于低氧状态。HIF-1信号通路的激活在缺血后细胞代谢中的作用发挥着重要的作用，参与重建细胞代谢途径来实现对脑组织的保护^[25]。脑出血患者发病几天后血肿程度与TNF-α水平呈正相关^[26]，其高表达是血脑屏障破损、炎症反应、神经细胞凋亡等继发性损伤的重要原因^[15]。脑血疏口服液活性成分可能通过作用于TNF信号通路相关靶点，抑制TNF-α的过表达，从而达到保护血脑屏障、减少神经细胞的凋亡等目的。

综上所述，脑血疏口服液通过多成分作用于多靶点，从而协同调控多种通路，从整体网络层面发挥抗脑出血作用，展现了传统中药有别于小分子化药的作用特点。关于脑血疏的关键活性化合物、作用靶点和通路还需要深入的验证研究，为今后临床治疗提供理论依据。

参考文献：

- [1] 周忠焱，徐佳琪，赵外荣，等. 斑马鱼脑出血模型的建立及丹参在该模型上改善脑出血的研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1121-1125.
- [2] 张丽杰. 脑出血的中西医结合治疗现状与进展[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2018, 3(45): 198.
- [3] An S J, Kim T J, Yoon B W. Epidemiology, risk factors, and clinical features of intracerebral hemorrhage: an update [J]. *J Stroke*, 2017, 19(1): 3-10.
- [4] 张营, 刘涛, 于荣, 等. 活血化瘀治疗脑出血探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(16): 2427-2428.
- [5] 艾鑫, 刘翠. 脑血疏口服液对脑出血大鼠血肿体积的影响及神经功能的保护作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(7): 859-861.
- [6] 张晓囡, 张军平, 徐士欣, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗高血压潜在机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(24): 5865-5875.
- [7] Liu C X, Liu R, Fan H R, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.
- [8] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.
- [9] 欧阳罗丹, 胡小松, 牛明, 等. 基于网络药理学的水蛭活血化瘀的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1901-1906.
- [10] Gfeller I D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTarget Prediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (W1): W32-W38.
- [11] Wang Z, Sun H Y, Yao X J, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power[J]. *Physical Chem Chem Phys*, 2016, 18(18): 12964-12975.
- [12] Shen C, Wang Z, Yao X J, et al. Comprehensive assessment of nine docking programs on type II kinase inhibitors: prediction accuracy of sampling power, scoring power and screening power [J]. *Brief Bioinform*, 2018. doi: 10.1093/bib/bby103.
- [13] 刘宝华. CD163/HO-1信号通路与人脑出血后血肿周围组织炎症反应的相关性[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [14] Xi G H, Keep R F, Hoff J T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage [J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(1): 53-63.
- [15] Babu R, Bagley J H, Di C H, et al. Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention[J]. *Neurosurg Focus*, 2012, 32(4): E8.
- [16] 夏鑫, 吴明华. 血管相关内皮祖细胞标志物研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2018, 26(1): 65-67.
- [17] 戴备军, 翁剑枫, 胡志斌. 基质金属蛋白酶-9 和内皮祖细胞在心脏移植术患者中表达的相关性及临床意义[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(3): 296-300.
- [18] 孙军, 温昌明, 张保朝, 等. 槲皮素通过调控PI3K/Akt信号通路对血管内皮祖细胞发挥保护作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(1): 85-90.
- [19] 刘新泳, 赵全芹, 李朝武, 等. 川芎嗪碱的合成及其对血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2003, 41(5): 485-487.
- [20] 唐刚华, 姜国辉, 王世真, 等. 川芎嗪及其类似物的抗血小板与抗血栓作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 317-319.
- [21] 陈孝男, 杨爱琳, 赵亚楠, 等. 缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 422-432.
- [22] Cho J S, Lee H K. Wogonin inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(10): 1561-1564.
- [23] 崔晓萍, 陈建梅, 穆军山, 等. PI3K-AKT通路对脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(2): 154-159.
- [24] 江珊, 俞晓飞. 脑出血后炎症损伤相关信号通路的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(9): 845-848.
- [25] 王苹苹, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的HIF-1信号通路[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(5): 559-566.
- [26] Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabín J, et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage [J]. *Neurology*, 2002, 58(4): 624-629.