

- of the FasL/Fas system? [J]. *Biol Reprod*, 2019, 101(1): 235-247.
- [21] Chen J, Chen Y P, Shu A M, et al. *Radix rehmanniae* and *Corni fructus* against diabetic nephropathy via AGE-RAGE signaling pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 8358102.
- [22] Davidson S M, Adameová A, Barile L, et al. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 3795-3806.
- [23] Wu Z Y, Fan Q Q, Miao Y S, et al. Baicalin inhibits inflammation caused by coinfection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* involving IL-17 signaling pathway [J]. *Poult Sci*, 2020, 99(11): 5472-5480.
- [24] Liu Q, Si T L, Xu X Y, et al. Electromagnetic radiation at 900 MHz induces sperm apoptosis through bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in rats[J]. *Reprod Health*, 2015, 12(1): 1-9.
- [25] Roufayel R. Regulation of stressed-induced cell death by the Bel-2 family of apoptotic proteins[J]. *Mol Membr Biol*, 2016, 33(6-8): 89-99.
- [26] Vardiyan R, Ezati D, Anvari M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47(3): 155-160.
- [27] Veeravarmal V, Austin R D, Siddavaram N, et al. Caspase-3 expression in normal oral epithelium, oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2016, 20(3): 445-452.
- [28] Sims E K, Lakhter A J, Anderson-Baucum E, et al. MicroRNA 21 targets BCL2 mRNA to increase apoptosis in rat and human beta cells [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(6): 1057-1065.
- [29] Salama R M, Abd-Elwahab A H, Abd-Elgalil M M, et al. LCZ696 (sacubitril/valsartan) protects against cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats: role of neprilysin inhibition and lncRNA TUG1 in ameliorating apoptosis [J]. *Toxicology*, 2020, 437: 152439.
- [30] Gianzo M, Muñoz-Hoyos I, Urizar-Arenaza I, et al. Angiotensin II type 2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(3): 608-616.

基于网络药理学和动物实验探讨脑泰方治疗脑缺血的作用机制

贺旭^{1,2}, 宋祯彦¹, 王珊珊¹, 刘晓丹¹, 葛金文^{1*}

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208; 2. 益阳医学高等专科学校解剖教研室, 湖南益阳 413000)

摘要:目的 采用网络药理学和动物实验探讨脑泰方治疗脑缺血的潜在作用机制。方法 从TCMSP、TCMID、BATMAN-TCM及文献资料中寻找与脑泰方中4味中药(黄芪、川芎、地龙和僵蚕)相关的所有成分和作用靶点,并构建药物活性成分-靶点网络。通过TTD、DrugBank、DisgeNET数据库筛选与脑缺血相关的作用靶点,利用STRING平台构建药物-疾病靶点交互网络,对核心靶点进行网络拓扑分析,利用DAVID 6.8数据库对核心靶点蛋白进行GO和KEGG富集分析。再考察脑泰方对脑缺血大鼠神经功能的影响。结果 脑泰方有39种活性成分,预测靶点有629个,其中80个与脑缺血相关。脑泰方活性成分主要为槲皮苷、山柰酚、异鼠李素、十八烯酸、亚油酸,并且棕榈酸等能发挥抗脑缺血的作用,涉及到的重要效应蛋白有VEGFA、TNF、CREB1、IL6、CASP3、BDNF、MAPK1等。富集分析主要涉及MAPK信号通路、Neurotrophin信号通路、VEGF信号通路等。脑泰方可改善脑缺血大鼠神经功能缺损体征,对MAPK信号通路关键节点蛋白表达起调控作用。结论 脑泰方抗脑缺血是多成分、多靶点、多途径相互作用的结果。

关键词: 脑泰方; 脑缺血; 作用机制; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2356-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.053

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1704904); 湖南省中医药管理局科研项目(201932); 湖南省教育厅优秀青年课题(19B441); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2019ZXYJH07)

作者简介: 贺旭(1984—),男,博士,副教授,研究方向为中药在治疗心脑血管疾病神经发生与神经再生中的作用。Tel: 13787196994, E-mail: Hexu0628@163.com

*通信作者: 葛金文(1965—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为脑血管病发病机制及中西医结合防治研究和中西医结合方法学。Tel: (0731) 88458761, E-mail: 40831556@qq.com

网络出版日期: 2021-09-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210920.0158.010.html>

脑卒中是一种急性脑血管疾病,其中缺血性脑卒中占到60%~70%。缺血性中风属中医“中风”范畴,其病机非常复杂,气血两虚是缺血性中风的主要病机^[1]。《医林改错》记载,“亏损元气,是其本源”“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,提出“气虚血瘀”学说^[2]。因此,缺血性中风的主要病机为“气虚血瘀”,其主要治则便是益气活血。

王清任根据益气活血的治则创立补阳还五汤,并以该法确立得到中药复方脑泰方,由黄芪、川芎、地龙和僵蚕(8:2:3:3)构成,主要功效补气活血、化瘀通络,现已用于脑缺血急性期的治疗,且取得了较好的临床效果。课题组前期研究表明,脑泰方的作用机制可能是通过抗血小板活化^[3]、抗血栓^[4]、抑制神经元的凋亡^[5]、抗炎性作用^[6]及上调膜铁转运辅助蛋白,减少脑铁沉积^[7]起神经保护作用,但其在脑缺血疾病中的药理作用尚未完全阐明。本研究通过多个数据库联用检索和文献挖掘,筛选脑泰方的主要活性成分并进行成分靶点预测,分析活性成分-作用靶点-疾病之间的作用关系,并对靶点基因功能及信号通路进行分析,构建脑泰方治疗缺血性脑中风的成分-靶点-通路网络,进行网络拓扑学分析,从而揭示其作用的分子机制,为脑泰方在脑缺血疾病中的临床应用和进一步研究提供理论支撑。

1 材料与方

1.1 脑泰方活性成分的收集和分析 脑泰方由黄芪、川芎、地龙、僵蚕组成,临床水煎服用,该方剂化合物信息分析依托于中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)、中药信息数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid>)。设置口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18,对上述4味中药所含的每个化合物进行筛选,无药物动力学参数的化合物通过查阅文献进行筛选。最后通过Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询筛选出的化合物结构式,并获得化合物的SMILES表达式。

1.2 脑泰方活性成分的靶点获取 采用TCMS、SEA (<http://sea.bkslab.org>)、SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库,根据化合物结构相似性和分子对接特性进行预测,并结合相关文献进行补充。脑泰方活性成分的靶点预测分数阈值设置≥0.6^[8],使用UniProt (<http://www.uniprot.org/>)进行除重及标准化命名。

1.3 “脑缺血”靶点获取 在Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)、TTD (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)数据库中输入关键词“cerebral ischemia”,获取脑缺血疾病的相关靶点,然后将脑泰方的预测靶点映射到脑缺血疾病相关靶点中,以获取脑泰方治疗脑缺血的潜在作用靶点。

1.4 可视化网络构建 利用Cytoscape v3.6.1软件构建活

性成分-靶点-脑缺血疾病可视化网络图,使用在线蛋白相互作用的检索和预测数据库STRING (<https://string-db.org/>)构建脑泰方抗脑缺血潜在靶点的蛋白与蛋白相互作用(PPI)网络,选择系统默认分值score≥0.4,并使用Cytoscape v3.6.1软件绘制靶蛋白PPI网络图。

1.5 GO、KEGG富集分析 将“1.4”项下脑泰方治疗脑缺血的蛋白-蛋白相互作用重要拓扑模块中的靶点导入在线基因功能富集工具DAVID 6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>),以人类基因为背景, $P<0.05$ 、FDR(错误发现率) <0.05 为标准,对主要活性成分和脑缺血的共同基因进行GO富集分析。同时,将这些靶点导入KEGG数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)查看对应的通路图并分类,利用Omicshare (www.omicshare.com/tools),以 $P<0.05$ 、FDR <0.05 为标准对通路进行富集分析,找出脑泰方发挥抗脑缺血作用的关键通路。

1.6 实验验证

1.6.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,8周龄,体质量250~290g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2019-0004。动物房温度保持(23±1)℃,相对湿度55%,通风良好,饲养于光照/黑暗为12h/12h的环境,每笼4只,自由饮水,给予标准饮食。

1.6.2 试剂与仪器 兔抗p-ERK1/2、p-CREB抗体(美国CST公司);兔抗BDNF抗体(美国Affinity Biosciences公司);兔抗GAPDH抗体(武汉博士德生物工程有限公司);Kopf脑立体定位仪(美国David KOPF Instruments公司);线栓(北京西农科技有限公司)。

1.6.3 脑泰方制备 黄芪、川芎、地龙、僵蚕均购自湖南中医药大学第一附属医院药房,25g川芎加80%乙醇浸泡45min,提取2次,加醇量分别为8、6倍,提取时间为2、1.5h,滤过,合并滤液,60℃真空浓缩;另取黄芪100g、地龙37.5g、僵蚕37.5g、川芎醇提后的药渣适量,加水浸泡30min,提取2次,每次加10倍量水,提取时间分别为2、1h,滤过,合并滤液,真空浓缩,干燥成干浸膏,临用时生理盐水稀释。前期课题组发现,1.8、0.9g/mL脑泰方能显著改善脑缺血大鼠的神经功能缺损体征,故本实验选择0.9g/mL进行考察。

1.6.4 模型建立 采用大鼠中动脉栓塞法制备局灶性脑缺血模型,大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3.5mL/kg)麻醉,仰卧位固定做手术切口,钝性分离颈总动脉和迷走神经,微动脉夹夹闭颈总动脉的近心端,找到颈总动脉分叉处并分离颈外动脉和颈内动脉,在分叉处结扎(活结)颈外动脉,在附近剪一小口,将线栓插入到颈内动脉,深度为(18±0.5)mm,右侧大脑中动脉栓塞30min后拔出线栓,将分叉处结扎(活结)的颈外动脉手术线松开,去除近心端的微动脉夹,用签压住出血处止血,缝合切口;假手术组除不插入线栓外,其余步骤同模型组。

1.6.5 分组及给药 大鼠随机分为假手术组、模型组、脑

泰方组, 脑泰方组于脑缺血第1天灌胃给予9 g/kg 脑泰方(0.9 g/mL), 每天1次; 模型组在脑缺血第1天灌胃给予等体积0.9%生理盐水, 每天1次; 假手术组不干预。当大鼠恢复意识能进行活动后, 在第1、7、15天采用Longa 5级4分法进行神经功能评分^[9], 在第15天后取海马, 检测p-ERK1/2、p-CREB、BDNF蛋白表达。

1.6.6 免疫印迹实验 大鼠断头处死, 取脑并分离海马, 组织与蛋白提取剂按1:10比例稀释, 裂解组织, 4℃、12 000 r/min离心20 min, 收集上清液后测定蛋白浓度, SDS-PAGE凝胶电泳, 每个泳道上样20 μg总蛋白, 电泳分离蛋白后转移至PVDF膜上, p-ERK1/2、p-CREB转膜约90 min, BDNF转膜约45 min。一抗孵育(1:1 000)在

4℃下过夜, 1×TBST溶液漂洗, 稀释偶联HRP标记羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育2 h, 漂洗后采用ECL化学发光法显影, 以GAPDH为内参, 使用Image J软件分析目的条带灰度值, 并计算目的蛋白相对表达。

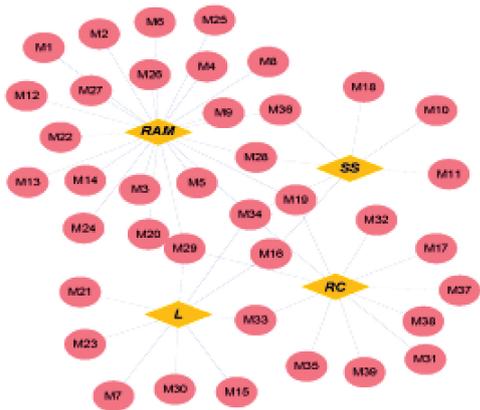
1.6.7 统计学分析 通过GraphPad Prism 5.0软件进行处理, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑泰方活性成分筛选 共筛选出29种活性成分, 另外有10种虽不符合筛选条件, 但文献[10-21]报道它们也具有相应活性, 故予以补充, 见表1。其中, 黄芪占22种, 川芎占11种, 地龙占8种, 僵蚕占6种, 见图1。

表1 脑泰方活性成分信息

编号	药材来源	成分	OB/%	DL
M1	黄芪	(3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮	67.67	0.26
M2	黄芪	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙-2-环内酯-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3-醇	36.23	0.78
M3	黄芪	3,9-二-O-甲基尼索林	53.74	0.48
M4	黄芪	5'-羟基异丁香酚-2',5'-二-O-葡萄糖苷	41.72	0.69
M5	黄芪	7-O-甲基异戊烯醇	74.69	0.30
M6	黄芪	ACINSUME	39.05	0.48
M7	地龙	花生四烯酸	45.57	0.20
M8	黄芪	黄芪紫檀烷苷	64.26	0.42
M9	黄芪	黄芪甲苷	36.74	0.92
M10	僵蚕	白僵菌素	—	—
M11	僵蚕	植物甾醇	36.91	0.75
M12	黄芪	白桦脂酸	55.38	0.78
M13	黄芪	联苯双酯	31.10	0.67
M14	黄芪	毛蕊异黄酮	47.75	0.24
M15	地龙	苯丁酸氮芥	—	—
M16	地龙、僵蚕	胆固醇	37.87	0.68
M17	川芎	蒿本内酯	51.30	0.07
M18	僵蚕	胡萝卜苷	20.63	0.62
M19	黄芪、川芎	叶酸	68.96	0.71
M20	黄芪	芒柄花黄素	69.67	0.21
M21	地龙	蓝萜亭	—	—
M22	黄芪	常春藤皂苷元	36.91	0.75
M23	地龙	次黄嘌呤	52.29	0.04
M24	黄芪	二氢异黄酮	109.90	0.30
M25	黄芪	异木糖醇-7,2'-二-O-葡萄糖	49.28	0.62
M26	黄芪	异鼠李素	49.60	0.31
M27	黄芪	jaranol	50.83	0.29
M28	黄芪、僵蚕	山柰酚	41.88	0.24
M29	川芎、黄芪、地龙	亚油酸	41.90	0.14
M30	地龙	苯苄醇	—	—
M31	川芎	十八碳二烯	42.00	0.19
M32	川芎	杨梅酮	40.60	0.51
M33	川芎、地龙	十八烯酸	33.13	0.14
M34	川芎、黄芪、地龙、僵蚕	棕榈酸	19.30	0.10
M35	川芎	川芎咪	65.95	0.27
M36	黄芪、僵蚕	槲皮苷	46.43	0.28
M37	川芎	senkyunone	47.66	0.24
M38	川芎	谷甾醇	36.91	0.75
M39	川芎	wallichilide	42.31	0.71



注：RAM为黄芪，SS为僵蚕，L为地龙，RC为川芎。

图1 脑泰方活性成分药材来源

2.2 脑泰方活性成分抗脑缺血的靶点预测和可视化网络构建 脑泰方39种活性成分共有629个作用靶点，存在1819个相互作用关系，其中每种活性成分都有2个以上的作用靶点，平均46.6个。从TTD、Drugbank、DisGeNET数据库中共获得脑缺血疾病靶点312个，本实验将预测靶点与其相互映射，共获取80个潜在作用靶点，见图2。

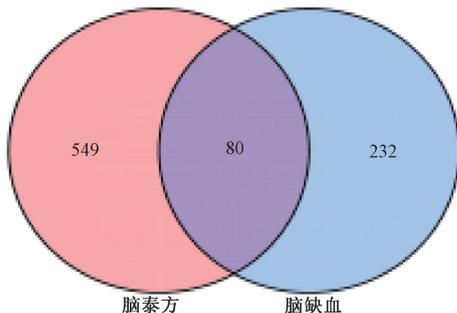
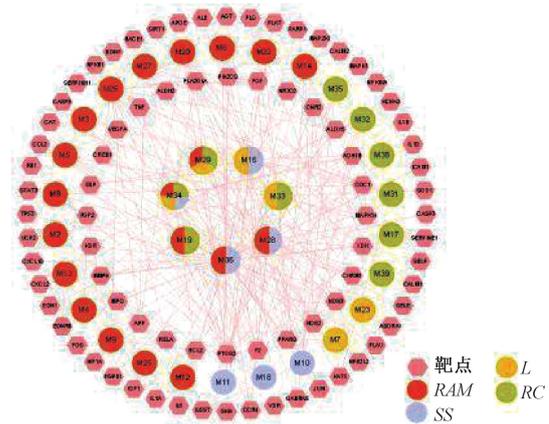


图2 脑泰方活性成分靶点预测

将脑泰方39种活性成分与80个抗脑缺血的潜在靶点构建成成分-靶点-疾病网络，网络中化合物与靶点相连的连线称之为度(Degree)，连线越多，自由度越高，表明该节点(化合物或靶点)存在的相互作用关系越多^[22]，见图3。由此可知，具有较高自由度的靶点包括PTGS2(Degree=24)、PPARG(Degree=12)、NOS2(Degree=9)、VEGFA(Degree=6)、TNF(Degree=5)，具有较多预测靶点的有槲皮素(M36, Degree=47)、山柰酚(M28, Degree=26)、异鼠李素(M26, Degree=17)、十八烯酸(M33, Degree=14)等，可能是脑泰方抗脑缺血的重要药效成分。

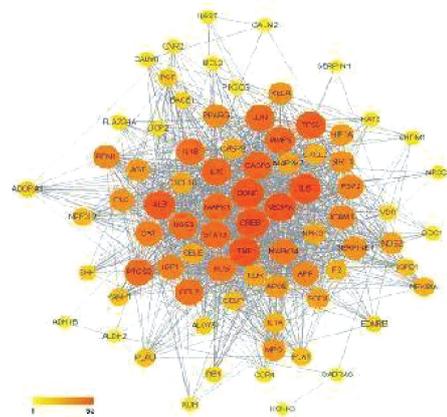
将80个潜在靶点构建了PPI网络，发现包含1190种相互作用关系，其中处于PPI网络中心拥有较多蛋白相互作用的靶点有VEGFA(Degree=60)、TNF(Degree=59)、CREB1(Degree=57)、IL6(Degree=56)、CASP3(Degree=55)、BDNF(Degree=53)、MAPK1(Degree=43)等，提示这些蛋白可能是抗脑缺血的重要效应蛋白，见图4。

2.3 GO、KEGG富集分析 采用DAVID 6.8数据库对80个与脑缺血相关的靶点进行GO、KEGG富集分析，筛选排



注：与3种以上成分存在关联的靶点放置于内圈，代表它们可能参与更多的生物学过程，是重要的药效靶点。RAM为黄芪，SS为僵蚕，L为地龙，RC为川芎。

图3 活性成分-靶点-脑缺血疾病网络



注：圆形节点代表蛋白靶点，圆圈大小和颜色深浅代表靶点蛋白相互作用的密切程度。

图4 脑缺血相关性蛋白靶点PPI网络

名前20个GO生物学过程分析条目，见图5。GO富集分析结果表明，脑泰方核心作用靶点主要通过衰老、凋亡过程、炎症反应、细胞增殖、血管生成、正调控磷脂酰肌醇3-激酶信号转导、血管内皮生长因子受体信号通路、MAPK激活、ERK1和ERK2级联正调控等生物学过程来发挥抗脑缺血的作用；KEGG富集分析结果表明，脑泰方发挥抗脑缺血作用可能与MAPK、Neurotrophin、VEGF、PI3K-Akt、癌症、cAMP、Ras等信号通路相关。

2.4 脑泰方对脑缺血大鼠神经功能评分的影响 脑缺血第7、15天，脑泰方组大鼠神经功能评分低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见表2。

表2 各组大鼠神经功能评分($\bar{x} \pm s$)

组别	神经功能评分/分		
	脑缺血第1天	脑缺血第7天	脑缺血第15天
假手术组	0	0	0
模型组	2.71±0.45	2.29±0.45	1.57±0.49
脑泰方组	2.57±0.49	1.43±0.49*	0.86±0.35**

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

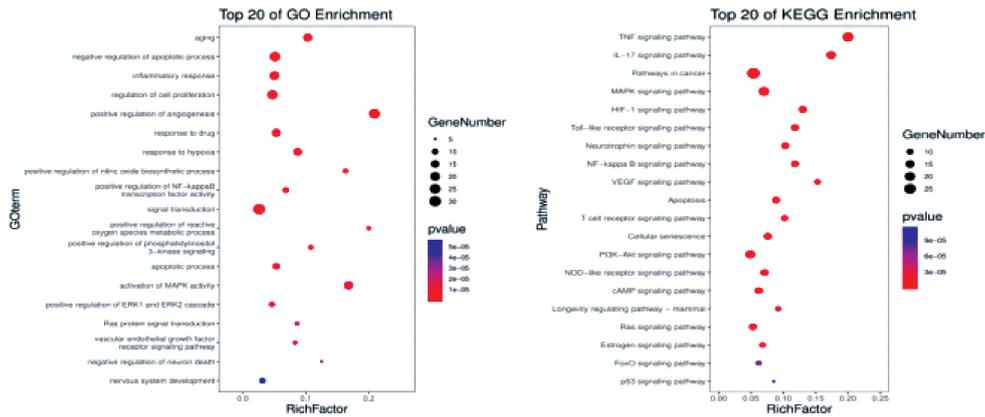
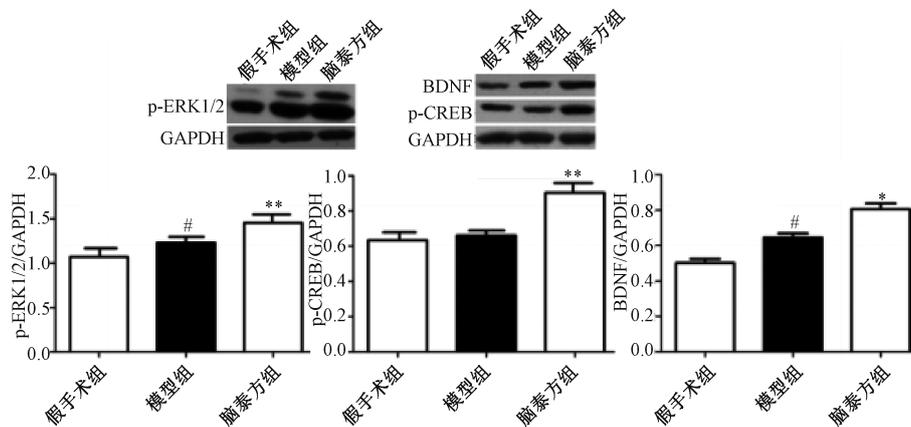


图5 GO、KEGG 富集分析

2.5 脑泰方对脑缺血大鼠海马 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马 p-ERK1/2、BDNF 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,

脑泰方干预后大鼠海马 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图6。



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

图6 各组大鼠海马 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达

3 讨论

中药网络药理学构建“药物活性成分-靶点以及疾病-靶点”多层次网络结构图,体现了中医的整体性和辩证论治原则^[23-24],目前被广泛应用于探讨中药或中药复方在治疗复杂疾病的作用机制^[25-27]。因此本研究拟基于网络药理学分析方法对脑泰方活性成分进行筛选,靶点预测和疾病相关性分析,构建了成分-靶点-疾病网络和脑泰方-脑缺血相关性靶点的 PPI 网络分析脑泰方治疗脑缺血的作用机制,共获得了 39 种活性成分的 629 个预测靶点,平均一种活性成分对应约 46.6 个靶点,这充分显示了脑泰方的多靶点作用。通过脑缺血疾病靶点映射筛选出 80 个预测靶点与脑缺血相关,发现脑泰方的主要活性成分中槲皮苷、山柰酚、异鼠李素等拥有较多的预测靶点,这可能是脑泰方抗脑缺血的重要药效成分。其中槲皮苷能提高免疫功能^[28],山柰酚和异鼠李素有神经保护作用^[29-30]。为了更好地了解脑泰方治疗脑缺血的生物学过程和可能的信号途径,将获得的脑泰方与脑缺血相关的基因进行 GO 分析和通路分析,结果显示脑泰方治疗脑缺血的作用途径主要与衰老、凋亡过

程、炎症反应、细胞增殖、血管生成、正调控磷脂酰肌醇 3-激酶信号转导、血管内皮生长因子受体信号通路、MAPK 的激活和 ERK1 和 ERK2 级联的正调控有关。PTGS2、PPARG、NOS2、VEGFA、TNF 是参与较多生物学过程富集的关键基因。细胞内的生物学功能是由蛋白与蛋白之间的相互作用实现,这种相互作用包括蛋白之间的直接物理作用和间接的生物学功能相关性,因此 PPI 网络中某一蛋白尤其是核心蛋白的异常会引起级联反应,从而产生疾病。本研究构建了脑泰方与脑缺血相关的靶点 PPI 网络,通过拓扑分析找出核心靶点,结果显示,VEGFA、TNF、CREB1、IL6、CASP3、BDNF、MAPK1 拥有最多的蛋白相互作用,可能是脑泰方主要通过调控炎症、血管生成、G 蛋白偶联受体信号通路、类固醇代谢和腺苷酸环化酶活性、脑源性神经营养因子和重组人有丝分裂原激活蛋白激酶 1 的表达而发挥药效作用。KEGG 富集结果进一步发现 MAPK signaling pathway, Neurotrophin signaling pathway 等属于前 20 条信号通路。

为了验证网络药理学的预测结果,首先从行为学结果

进行了探讨,神经功能评分结果显示给予脑泰方干预后,脑缺血大鼠在神经功能评分降低 ($P < 0.05$),这说明脑泰方能显著改善脑缺血后大鼠的神经功能缺损体征,接着对其作用机制进行探讨。作为 MAPK 家族中关键组成部分,细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 是一类丝/苏氨酸残基的蛋白激酶。ERK 表达广泛,涉及细胞内包括细胞存活、细胞周期进入、细胞增殖和分化等一系列生命活动过程的调节。正常情况下 ERK 在胞浆中表达,而激活后转移至胞核,通过磷酸化 (p-ERK1/2) 可以调节核内转录调控因子 CREB 的表达而产生细胞效应。本实验结果显示,脑缺血增强了大鼠海马部位 ERK 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.05$),而给予脑泰方干预后 p-ERK1/2 的蛋白表达增加 ($P < 0.05$),这提示脑缺血后本身的应激可能增强了上游 ERK 信号分子的表达,而通过脑泰方的治疗可增加大鼠海马部位的 ERK1/2 磷酸化水平。CREB 可在不同信号通路的激酶作用下实现 ser133 磷酸化而活化,在学习记忆过程中发挥重要作用,且受到理化因素刺激后发生磷酸化 (p-CREB) 而被激活,促进其下游效应蛋白脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达。BDNF 作为神经营养因子,可改善神经再生的微环境。脑缺血后 BDNF 的表达上调能促进脑梗死周围部位的神经再生^[31]。p-CREB 和 BDNF 在大脑皮层和海马的过表达可发挥神经保护作用^[32]。本实验结果显示,与脑缺血模型组比较,脑泰方组大鼠海马的 p-CREB 和 BDNF 蛋白表达均升高,这说明脑泰方通过促进脑缺血大鼠海马 p-CREB 和 BDNF 蛋白的表达而发挥神经保护作用。

综上所述,本研究通过网路药理学确定脑泰方的抗脑缺血的化学活性成分、作用靶点及信号通路,且基于行为学和蛋白免疫印迹技术初步验证了脑泰方可通过 MAPK/ERK 信号通路发挥抗脑缺血的作用。

参考文献:

[1] 陈可冀. 急性缺血性脑血管病的治疗[J]. 中西医结合杂志, 1990, 10(6): 327.
[2] 黄德弘, 刘孟渊, 王清任气血理论和调气活血组方思想特色探析及运用体会[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(5): 26-29.
[3] 刘林, 易亚乔, 王国佐, 等. 脑泰方抗血小板活化作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(5): 1049-1050.
[4] 刘林, 刘羽, 王国佐, 等. 脑泰方抗血栓作用的实验研究[J]. 中医药导报, 2015, 21(2): 29-31.
[5] 秦莉花, 刘林, 成绍武, 等. 加味脑泰方对去势脑缺血大鼠海马 ATF4/CHOP/Puma 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2): 365-369.
[6] 易亚乔, 刘检, 刘林, 等. 加味脑泰方对大鼠缺氧/复氧损伤海马神经元炎症通路 SIRT1/NF- κ B 的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(3): 45-50.
[7] 黄娟, 廖君, 彭熙炜, 等. 脑泰方对脑缺血/再灌注大鼠海马区 Nr2、HO-1 和膜铁转运辅助蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10): 1467-1472.

[8] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
[9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
[10] Kitahiro Y, Koike A, Sonoki A, et al. Anti-inflammatory activities of *Ophiopogon Radix* on hydrogen peroxide-induced cellular senescence of normal human dermal fibroblasts[J]. *J Nat Med*, 2018, 72(4): 905-914.
[11] Lu Z L, Wang H, Zhu M X, et al. Ophiopogonin D', a natural product from *Radix Ophiopogonis*, induces *in vitro* and *in vivo* RIPK1-dependent and caspase-independent apoptotic death in androgen-independent human prostate cancer cells[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 432.
[12] Zhu Y, Zhang Y J, Huang X, et al. Z-ligustilide protects vascular endothelial cells from oxidative stress and rescues high fat diet-induced atherosclerosis by activating multiple NRF2 downstream genes[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 110-120.
[13] 程杏安, 蒋旭红, 刘展眉, 等. 僵蚕七种化学成分抗肿瘤活性的初步研究[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2015, 28(4): 35-39.
[14] 段冷昕, 高杨, 吴欣芳, 等. 蚯蚓活性组分对内质网应激所致肝细胞凋亡的保护作用研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2973-2978.
[15] Wang Q, Duan L X, Xu Z S, et al. The protective effect of the earthworm active ingredients on hepatocellular injury induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 304-311.
[16] 孔凤利, 岳显可, 朱涛, 等. HPLC 指纹图谱结合主成分分析研究僵蚕不同溶剂提取物的化学组分[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(4): 445-449.
[17] 程锁明, 王航宇, 李国玉, 等. 白僵蚕中甾体类化学成分的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(6): 724-728.
[18] 徐冲, 高思阳, 刘梅, 等. 僵蚕化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3732-3734.
[19] 黄居敏, 苏明声, 张亚梅, 等. 僵蚕化学成分研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 87-89.
[20] 彭延古, 许光明, 赵建国, 等. 僵蚕抗凝活性部位中化学成分的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(5): 41-43.
[21] 颜新培, 蔡光先, 李顺祥, 等. 桑蚕及相关产物的化学成分与药理研究现状[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(5): 78-80.
[22] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
[23] 张雨, 李恒, 李克宁, 等. 复方中药网络药理学研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(7): 1584-1588.
[24] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇[J]. 药学报, 2012, 47(6): 696-703.

- [25] 姜云耀, 刘楠, 刘建勋. 基于入脑成分的网络药理学方法探讨益气通络颗粒保护脑缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 740.
- [26] 刘艳飞, 孙明月, 赵莹科, 等. 网络药理学在中药药物重定位研究中的应用现状与思考[J]. 中国循证医学杂志, 2017, 17(11): 1344-1349.
- [27] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(1): 171-178.
- [28] 陈龙云, 周艳艳, 徐安莉, 等. 槲皮苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(19): 2343-2349.
- [29] 郑红丽, 李广生. 山柰酚对缺血性脑损伤大鼠的神经保护作用研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(10): 919-922.
- [30] Li W H, Cheng X, Yang Y L, et al. Kaempferol attenuates neuroinflammation and blood brain barrier dysfunction to improve neurological deficits in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Brain Res*, 2019, 1722: 146361.
- [31] Wang Y, Yang J H, Du H X, et al. Yangyin Tongnao granules enhance neurogenesis in the peri-infarct area and upregulate brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor after focal cerebral ischemic infarction in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(4): 3817-3826.
- [32] Mohamed S K, Ahmed A A E, El Morsy E M, et al. The protective effect of zeranol in cerebral ischemia reperfusion via p-CREB overexpression [J]. *Life Sci*, 2019, 217: 212-221.

基于网络药理学、分子对接和细胞实验探讨枸杞子防治老年性痴呆的作用机制

曾永长^{1,2}, 梁少瑜^{1,2*}, 姜倩倩^{1,2}, 吴俊洪^{1,2}, 刘常青³, 宋力飞³, 吴正治^{1,2*}

(1. 深圳大学第一附属医院转化医学院, 广东 深圳 518035; 2. 深圳市老年医学研究所, 广东 深圳 518020; 3. 广州泽力医药科技有限公司, 广东 广州 510663)

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接和细胞实验探讨枸杞子防治老年性痴呆的作用机制。**方法** 通过化学成分数据库联合检索, 结合药动力学参数筛选枸杞子的候选活性成分, 采用 PharmMapper 反向药效团匹配的靶标识别平台预测其靶点, TTD 等数据库筛选与老年性痴呆相关的潜在靶点, DAVID 数据库对靶点基因进行 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析, String 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用 (PPI) 网络和“成分-靶点-通路”网络, SYBYL 软件对关键活性成分与靶点进行分子对接, RT-qPCR 检测枸杞子水提取物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞 *GSK3B*、*MAPK14*、*ESR1*、*NOS2*、*CASP3* mRNA 表达的影响, Western blot 检测枸杞子水提取物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞 *CASP3* 蛋白表达的影响。**结果** 枸杞子中 50 种活性成分通过调控 *HSD11B1*、*RARB*、*NR3C1*、*RARA*、*IGF1*、*MAPK14*、*CASP3*、*ESR2*、*GSK3B* 等 31 个潜在靶点, 参与多种癌症通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经营养因子信号通路、多巴胺能突触等信号通路, 起到防治老年性痴呆作用。新黄质、花色苷、胡萝卜素、隐黄素、玉米黄质等成分与关键靶点 *HSD11B1*、*INSR*、*NR3C1*、*RARA*、*CASP3*、*MAPK14*、*GSK3B*、*NOS2* 具有良好的结合能力。枸杞子水提取物可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞 *GSK3B*、*MAPK14*、*NOS2*、*CASP3* mRNA 表达, 上调 *ESR1* mRNA 表达, 下调 *CASP3* 蛋白表达。**结论** 本研究揭示了枸杞子防治老年性痴呆“活性成分-靶点-通路”的关系, 可为该药材临床应用提供依据。

关键词: 枸杞子; 老年性痴呆; 作用机制; 网络药理学; 分子对接; 细胞实验

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2362-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.054

老年性痴呆也叫阿尔茨海默病, 是一种典型的慢性中枢神经系统退行性疾病, 其发病机制复杂, 病因不明, 临床一线用药以乙酰胆碱酯酶抑制剂和 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸

受体拮抗剂为主, 两者只能控制症状, 不能终止病程发展, 且具有严重的不良反应。以传统中药延缓轻度认知障碍向老年性痴呆的转化、终止甚至逆转老年性痴呆的发展进程

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603669); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515010978, 2021A1515012474); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20180227175929767); 岭南中医药现代化专项 (2020B1111120003)

作者简介: 曾永长 (1979—), 男, 博士, 高级工程师, 从事复方药效物质基础与药物新制剂开发研究。E-mail: zyc1199@126.com

* 通信作者: 梁少瑜 (1983—), 女, 博士, 高级工程师, 从事老年性疾病的中医药防治研究。E-mail: lsy1199@126.com

吴正治 (1964—), 男, 教授, 从事中西医结合老年病研究。E-mail: szwz001@163.com

网络出版日期: 2021-09-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.r.20210920.0034.006.html>