

基于网络药理学复方龙脉宁方治疗脑卒中的分子机制研究

沈霞¹, 任丹¹, 高静^{1*}, 张岗¹, 王永华^{2*}, 彭亮¹, 裴丽珊¹

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 西北大学, 陕西 西安 710069)

摘要: 脑卒中作为一种常见的疾病, 其临床表现复杂多样。复方龙脉宁方治疗脑卒中有着特别明显的疗效, 但其治疗脑卒中的分子机制尚不明确。本研究旨在运用网络药理学方法, 研究复方龙脉宁方治疗脑卒中的活性成分、作用靶点和分子通路, 揭示复方龙脉宁方治疗缺血性脑卒中的分子机制。通过查询TCMSP数据库获取复方龙脉宁方治疗脑卒中的潜在活性成分, 利用CNKI数据库来进行文献的验证, 通过PharmMapper、UniProt数据库来进行靶点的预测和筛选, 利用收集结果通过TTD数据库来进行靶蛋白群的收集, 运用Cytoscape软件分别构建“成分-靶点”网络图、“成分-靶点-疾病”网络图、“靶蛋白相互作用”网络图。利用EAGLE算法进行聚类分析, KEGG数据库进行通路分析、SYBYL软件进行分子对接。最终收集得到与脑卒中相关的39个潜在活性成分与17个潜在有效靶点, 其代表性活性成分分别是川芎嗪、薯蓣皂苷、葛根异黄酮类等, 与之相关的靶点分别是MMP9、NOS3、NOS2、KDR、ALB、IL2、TGFB2、CPB等。研究发现碳代谢和HIF-1信号通路为复方龙脉宁方治疗脑卒中的主要分子通路。阐明复方龙脉宁方治疗缺血性脑卒中可能是通过减少炎症反应、增强血管通透性、抑制脑缺血-再灌注损伤的作用途径, 为临床用药提供理论依据。

关键词: 网络药理学; 复方龙脉宁方; 脑卒中; 缺血性脑卒中; 靶点

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1588-09

The molecular mechanism of stroke treatment by Fufang Longmai Ningfang based on network pharmacology

SHEN Xia¹, REN Dan¹, GAO Jing^{1*}, ZHANG Gang¹, WANG Yong-hua^{2*}, PENG Liang¹, PEI Li-shan¹

(1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Stroke is a common disease with complex and diverse clinical manifestations. Fufang Longmai Ningfang has been found to exhibit therapeutic effect on stroke, but its molecular mechanism for treating stroke remains unclear. The aim of this study was to investigate the molecular mechanism of Fufang Longmai Ningfang in the treatment of ischemic stroke by using the method of network pharmacology to define the active ingredients, target and molecular pathway of Fufang Longmai Ningfang. The TCMSP database was used to obtain the potential active components of Fufang Longmai Ningfang in the treatment of stroke. The CNKI database was used to verify the literature. The target was predicted and screened by PharmMapper and UniProt database. The target protein group was collected by TTD database. The Cytoscape software was used to construct a "component-target" network map, "component-target-disease" network map, and "target protein interaction" network map. The EAGLE algorithm was used for cluster analysis, the KEGG database was used for pathway analysis, and the SYBYL software was used for molecular docking for bioactivity verification. We found 39 potential active ingredients and 17 potential effective targets related to stroke. The representative active ingredients were ligustrazine, dioscin, and

收稿日期: 2019-01-09; 修回日期: 2019-02-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31600320); 陕西省自然科学基金资助项目 (2017JM8030); 陕西省普通高校青年杰出人才项目.

*通讯作者 Tel: 86-29-38185165, E-mail: jxrain@163.com; depwyh@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0031

puerarin, and the related targets were MMP9, NOS3, NOS2, KDR, ALB, IL2, TGFB2, and CPB among others. The study found that carbon metabolism and HIF-1 signaling pathway are the main molecular pathways for treatment of stroke by Fufang Longmai Ningfang. The treatment of ischemic stroke by Fufang Longmai Ningfang may involve reduction of inflammatory response, enhancement of vascular permeability and inhibition of cerebral ischemia-reperfusion injury, providing a theoretical basis for their clinical use.

Key words: network pharmacology; Fufang Longmai Ningfang; stroke; ischemic stroke; target

脑卒中最早记载于《神农本草经》, 主要是以卒然昏仆、不省人事为主要病证, 并伴有半身不遂, 口眼喎斜、语言不利为兼证的病证^[1], 在西医上被称之为脑卒中, 通常表现为脑血栓、脑缺血、动脉粥样硬化等心血管疾病^[2]。传统中医学根据发病机制的不同, 将脑卒中分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两种。其中缺血性脑卒中最为常见, 临床实验表明所有脑卒中患者中缺血性脑卒中患者达到 80%^[3]。而历代医家认为, 瘀血是造成脑卒中的关键因素及重要病机^[4], 气血虚者, 其经络多瘀滞, 则易导致脑卒中的发生, 中医诊断为气虚血瘀型脑卒中^[5-7]。现代医学表明, 缺血性脑卒中发病机制非常复杂, 主要与脑组织能量衰竭、炎症反应、细胞凋亡、免疫调节异常等机制有一定的关系^[8], 其临床表现复杂多样, 多是由病理性的代谢异常或形态改变而引起的。此外, 有研究发现, 糖尿病、高血压、心脏病也可导致脑卒中加重^[3]。

中药复方是复杂体系, 具有多成分、多靶点、多作用途径的特点, 在传统医学治疗疾病的过程中, 常常配伍多种中药, 以达到增效减毒的目的^[9]。复方的临床效果是机体体内复杂生物过程的一个综合结果, 有效成分组与相关药物靶点群研究是中药复方作用机制研究目前面临的两个重要难题^[10]。复方龙脉宁方由葛根、穿山龙、川芎、蜂胶 4 味中药所组成, 具有活血通脉的功效, 主要用于缺血性心脑血管类疾病, 如动脉粥样硬化、脑血栓、脑缺血和心绞痛等^[11]。在临床上对于治疗缺血性脑卒中所导致的肢体麻木、半身不遂、口眼歪斜和胸痹所导致的胸闷气短、心悸、失眠等症^[12], 具有很好的疗效, 但其药效物质基础的研究尚不明确。网络药理学是一种基于系统生物学与生物信息学结合方法理论, 它是通过生物系统进行网络分析, 从而来设计多靶点药物的学科, 它主要强调的是药物对多个靶点同时起作用, 调节多条信号通路, 最后达到增效减毒的目的, 为从分子角度研究中药复方的分子作用机制提供理论和方法, 并被广泛应用于中医药分子机制的研究^[13-15]。

本研究采用网络药理学研究方法, 从复方龙脉宁化学物质组入手, 通过 OB 值、DL 值分析遴选该复方中的潜在活性成分, 运用反向对接法筛选其对应的作用靶点。构建“成分-靶点”网络模型图, 靶蛋白之间

的关系图, 以期阐明复方龙脉宁方治疗缺血性脑卒中的分子机制, 为其临床用药奠定理论基础, 为中药复方的质量控制奠定物质基础。

材料与方

潜在活性成分的收集 复方龙脉宁方由葛根、穿山龙、川芎、蜂胶 4 味中药所组成。利用 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>) 数据库和查阅 CNKI (<http://www.cnki.net/>) 数据库中已报道的关于葛根、穿山龙、川芎、蜂胶这 4 味药的相关文献, 收集复方龙脉宁方组方中各单味药的主要化学成分进行 ADME 分析, 根据条件参数 (OB \geq 30%, DL \geq 0.18)^[16]初步筛选出该复方潜在的活性成分。

作用靶点的预测与筛选 将收集到的各单味药的化学成分信息, 保存为 mol2 的格式, 输入到 Phrammapper (<http://59.78.96.61/phrammapper>) 数据库中, 将参数 Select Targets Set 设置为 Human Protein Targets Only (v2010, 2241), 其余参数均为默认设置。将所得到的所有靶点分别导入到 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中, 得到所有蛋白和 Gene ID, 记录与活性成分相关的靶点信息。

将上述所得到的靶点信息与 TTD (Therapeutic Target Database, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>) 数据库、CNKI 数据库中关于脑卒中的靶点进行比对分析, 最终筛选归纳出关于脑卒中的作用靶点。经文献查询, 发现糖尿病、高血压、心脏病也与脑卒中有一定的关系, 因此, 在这里同时对这 3 类疾病与该复方的各活性成分也进行了靶点的收集。

“成分-靶点”网络模型的构建 为了明确复方龙脉宁方治疗脑卒中的分子机制与相关靶点之间的对应关系, 本研究采用网络药理学模型的方法对其进行分析, 得到治疗脑卒中的主要成分以及关键靶点。首先将复方龙脉宁方中的中药与由上述得到的潜在活性成分制作成中药-成分对应关系表, 并将其保存为 H-C.xlsx 备用, 然后将复方龙脉宁方中所有化学成分与对应的靶点制作成相应的关系表, 保存为 C-T.xlsx 备用。最后, 将上述的两个表格依次导入 Cytoscape3.5.0 软件中, 构建“成分-靶点” (component-target, C-T) 网络图。

分别用不同的颜色和不同的形状的节点来代表所对应的成分和作用靶点。

复方龙脉宁方靶蛋白群网络模型构建与分析 将上述所得的关于疾病脑卒中的潜在靶点,与活性成分分别汇总成表,保存为.xlsx表格,然后将其输入String (<https://string-db.org/>) 数据库中,得到复方龙脉宁方的靶蛋白互作模型图。将上述所得的复方龙脉宁方的“成分-靶点”网络模型进行拓扑分析与模块分析。首先,将复方龙脉宁中的所建立的C-T.xlsx表与Table.xlsx表导入Cytoscape3.5.0软件中,利用Network Analyzer工具分析靶点的连接度与中介中心度这2个网络拓扑参数。模块分析采用ClusterViz插件进行EAGLE聚类分析。EAGLE算法对建成PPI网络分析,利用Cytoscape 3.5.0软件进行绘图,参数设为默认值。将上述所得的潜在靶点输入KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 数据库中,通过输入靶基因名称列表,限定物种为人,其他均为默认设置,最后对通路进行分析。

分子对接 为验证炎症靶点蛋白与其所对应的活性成分之间的结合活性,利用软件SYBYL-X2.0,将上述得到的靶点蛋白与其对应成分进行对接,对其结果进行分析。

结果

1 复方龙脉宁方的活性分子

本研究运用中药网络药理学数据库TCMSP、CNKI数据库最终收集到复方龙脉宁方中这4味药所含的化学成分共220个,其中葛根(GG)18个,蜂胶(FJ)13个,川芎(CX)189个,穿山龙(CSL)9个。通过标准参数 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 对其所有化学成分进行筛选,最终遴选复方龙脉宁活性成分39个(表1)。

39个活性成分中有9个来自葛根,13个来自川芎,4个来自穿山龙,13个来自蜂胶。在传统的中医药理论中,常常通过配伍应用来达到增效减毒的目的。在复方龙脉宁方中,葛根、川芎、穿山龙、蜂胶配伍使用,具有活血通络、解毒化淤的功效。本方中葛根代表性成分为异黄酮类成分如葛根素、大豆皂醇等,具有解热、镇痛、舒张血管、降血压、改善微循环障碍和心肌缺血的药理作用^[17-20];川芎代表性成分为川芎嗪、藁本内酯和丁基苯酞,具有扩张血管,降低血压、抗心肌缺血、抗脑缺血、抑制血小板凝集和抗血栓形成的药理作用^[21,22];穿山龙代表性成分为薯蓣皂苷、土茯苓素,具有抗炎、扩张冠状动脉和调节代谢的药理作用^[23];蜂胶代表性成分为芦丁、槲皮素、咖啡酸苯乙酯,具有抗菌消炎、降低血压和抗氧化的药理作用^[24-26]。研究表明,复方龙脉宁方治疗缺血性脑卒中是通过多成分-多靶

Table 1 Major ingredients table of Fufang Longmai Ningfang

No.	Ingredient	Molecular formula
GG1	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
GG2	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
GG3	3'-Methoxydaidzein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
GG4	Beta-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
GG5	Daidzein-4,7-diglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄
GG6	Soyasapogenol A (P)	C ₃₀ H ₅₀ O ₄
GG7	Soyasapogenol B (P)	C ₃₀ H ₅₀ O ₃
GG8	Puerarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
GG9	Allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃
FJ10	Acetylsalicylic acid C	C ₉ H ₈ O ₄
FJ11	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
FJ12	Pinobanksin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
FJ13	Galangin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
FJ14	Quercetin dihydrate	C ₁₅ H ₁₄ O ₉
FJ15	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
FJ16	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄
FJ17	Phenethyl caffeate	C ₁₇ H ₁₆ O ₄
FJ18	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
FJ19	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
FJ20	Rhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
FJ21	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
FJ22	7,4'-Di-O-methylapigenin	C ₁₇ H ₁₆ O ₅
CSL23	Dioscin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆
CSL24	7-Epitaol	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄
CSL25	Diosgenin palmitate	C ₄₃ H ₇₂ O ₄
CSL26	Smitilbin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
CX27	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
CX28	Tetramethylpyrazine	C ₈ H ₁₂ N ₂
CX29	Rhein	C ₁₅ H ₈ O ₆
CX30	Butylphthalide	C ₁₂ H ₁₄ O ₂
CX31	Ligustilide	C ₁₂ H ₁₄ O ₂
CX32	Neocnidilide	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
CX33	3-Butylidenephthalide	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
CX34	Perlolyrine	C ₁₆ H ₁₂ N ₁₂ O ₂
GX35	Wallichilide	C ₂₀ H ₁₆ O ₇
CX36	Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
CX37	Mandenol	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
CX38	Free ammonia	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
CX39	Myricanone	C ₁₅ H ₁₀ O ₈

点协同作用的结果。

2 复方龙脉宁方“成分-靶点”网络模型构建

为了解释复方龙脉宁方治疗脑卒中的作用机制,将上述39个活性分子通过PharmMapper服务器所获取的靶点与TTD数据库中的靶点进行对比校正,最终得到复方龙脉宁方中总靶点数1705个,其中川芎451个,葛根437个,蜂胶392个,穿山龙425个,其中与脑卒中相关的靶点数为17个。复方龙脉宁方中39个潜在活性成分和治疗脑卒中17个靶点通过Cytoscape软件构建“成分-靶点”网络关系图,发掘复方龙脉宁方治疗脑卒中的关键成分和关键靶点及其之间的相互关系,如图1所示。

在图1中用成分名以及Uniprot数据库中的靶点

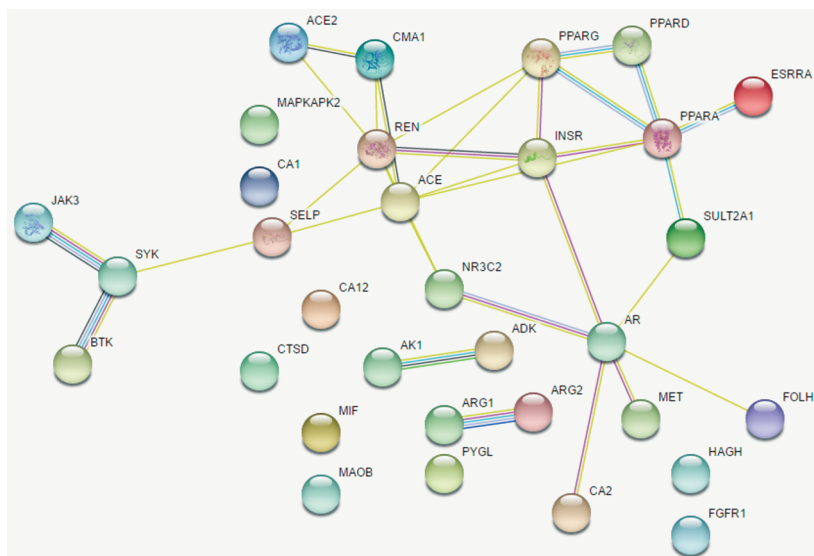


Figure 3 "Protein-protein" network diagram of Fufang Longmai Ningfang

互作用的关系, 结合成分-靶点对应关系可知, 与靶点蛋白血管紧张素转换酶存在相互作用的成分为穿山龙中的土茯苓素, 与靶点蛋白肾素存在相互作用的为蜂胶中的短叶松素, 与靶点蛋白P-选择素存在相互作用的是川芎中的3H-川芎哞。这也更好地验证了复方龙脉宁各成分间存在着相互协同的作用, 共同参与疾病的治疗过程, 与传统中医理论协同增效的理论相统一。

5 网络的拓扑分析和模块分析

为了确定复方龙脉宁方的关键成分和关键靶点, 本研究对复方龙脉宁方中所含的各有效成分及其对应靶点进行拓扑分析。采用Cytoscape软件3.5.0中的Network Analysis工具来分析不同网络的拓扑参数, 根据中介中心度与连接度来衡量节点在网络中的中心度, 1个节点度代表网络中和节点相连的路线的条数。化合物和靶点之间的节点越多, 则这些成分与靶点就可能是其中的关键成分和关键靶点。表2为复方龙脉宁方中的各成分与靶点拓扑分析结果, MMP3、KDR、ALB可能为该复方治疗脑卒中的关键靶点蛋白。除此之外, 本研究采用EAGLE算法进行模块分析, 进一步展现各成分与其对应靶点及疾病之间的关系, 根据节点的不同, 将靶点分为3个模块, 不同的模块参数如表3所示。

6 分子对接验证

为了更好地说明炎症靶点蛋白与相对应的活性成分之间的结合活性, 阐明复方龙脉宁方可能是通过抑制炎症反应治疗缺血性脑卒中, 本研究选取由“作用靶点的预测与筛选”得到的炎症因子与其对应的活性化合物进行分子对接分析。利用SYBYL-X 2.0软件^[28]进行分子对接和阳性验证实验, 对接得分结果见表4、5。

Table 2 Analysis of topological properties of stroke targets of Fufang Longmai Ningfang

Number	Gene	Degree	Betweenness centrality
1	MMP3	36	0.199 3
2	KDR	33	0.179 1
3	ALB	33	0.126 9
4	TGFB2	24	0.065 6
5	MMP9	23	0.106 6
6	NOS3	21	0.041 5
7	SOD2	19	0.032 8
8	IL2	18	0.031 4
9	PARP1	16	0.022 4
10	NOS2	9	0.005 8
11	CPB	4	0.009 3
12	PLAU	4	0.002 9
13	TEK	3	0.000 0
14	PGF	3	0.000 0
15	PLAT	1	0.000 0
16	ANG	1	0.000 0
17	PLG	1	0.000 0

Table 3 Modular analysis of stroke targets of Fufang Longmai Ningfang

Module number	No.1	No.2	No.3
Network			
Rank	1	2	3
Nodes	13	7	4
Edges	47	16	6
Modularity	3.615	0.64	0.222
Indeg	47	16	6
Outdeg	13	25	27

将表4中的小分子与其所对应的靶点蛋白的对接得分和表5的靶点蛋白与相应的配体得分(阳性对照)

Table 4 Docking results of the partial active compound with inflammation targets

Target	Compound	Total score	Target	Compound	Total score
NOS2	CSL26	6.197 3	MMP3	GG4	5.694 9
NOS2	CX34	5.280 6	MMP3	GG5	5.244
NOS2	GX35	6.040 2	MMP3	FJ11	5.435 5
NOS2	CX38	5.476 2	MMP3	FJ13	5.182 3
NOS3	FJ17	5.389 5	MMP3	FJ14	5.523 1
NOS3	FJ21	6.114 5	MMP3	FJ17	6.085 8
NOS3	CSL23	7.162 9	MMP3	FJ19	5.836 3
NOS3	CSL24	6.934 6	MMP3	FJ20	6.360 2
NOS3	CSL25	7.423 3	MMP3	FJ21	6.315 4
NOS3	CX33	5.018 1	MMP3	CSL25	6.472 1
NOS3	GX35	5.376 5	MMP3	CX33	5.547 4
NOS3	CX36	6.828 3	MMP3	GX35	7.055 5
NOS3	CX37	8.146 5	MMP3	CX36	6.420 8
NOS3	CX38	6.935	MMP3	CX37	6.931 8
NOS3	CX39	5.248 7	MMP3	CX38	7.962 3
MMP9	GG3	6.038 4	PARP1	GG3	5.644 1
MMP9	GG4	7.215 5	PARP1	GG4	6.630 3
MMP9	GG5	6.257 9	PARP1	GG5	6.296 6
MMP9	FJ15	6.384 2	PARP1	FJ17	8.120 3
MMP9	FJ17	7.113 9	PARP1	CSL25	7.28
MMP9	CSL26	6.372 1	PARP1	CSL26	8.227 1
MMP9	CX33	5.469 2	PARP1	CX30	5.503 6
MMP9	CX34	5.800 8	PARP1	CX31	5.337 4
MMP9	GX35	7.132 8	PARP1	CX33	6.871 6
MMP9	CX37	7.836 5	PARP1	CX36	7.631 5
MMP9	CX38	7.522 6	PARP1	CX39	5.555 9
IL2	FJ21	5.389 5	IL2	CSL26	5.148 1
IL2	CSL25	4.727 1	IL2	GX35	4.300 3

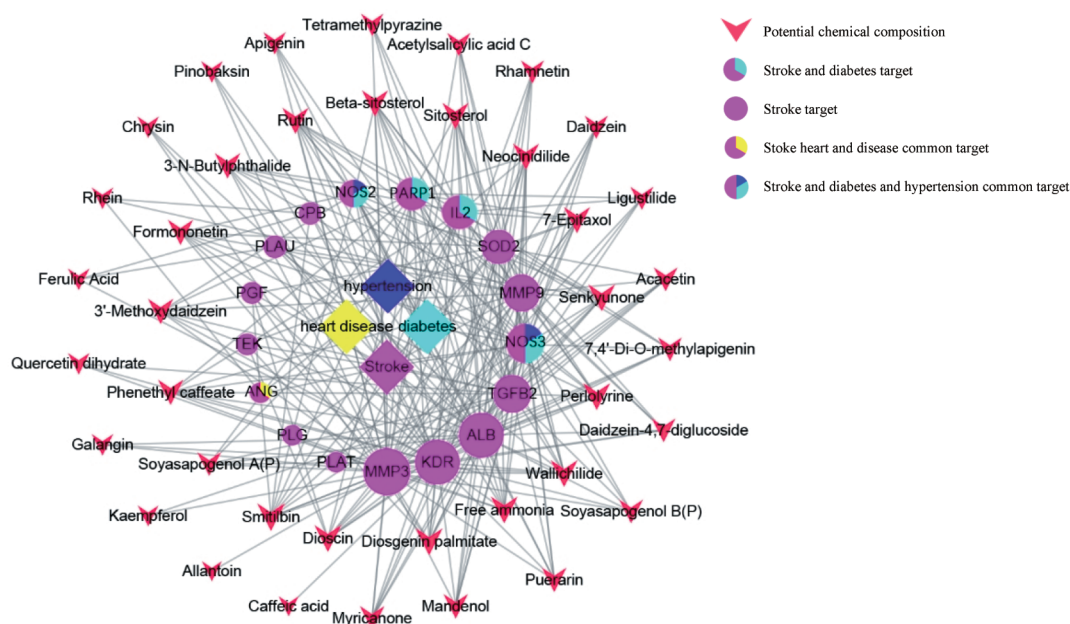
相比较,可以看出,炎症靶点蛋白与所对应的活性分子具有一定的结合活性。文献表明^[29],对接得分 ≥ 4.25 ,说明分子与靶点有一定的结合活性;对接得分 >5.0 ,说明

Table 5 Target protein docking results with ligands

Target name	Ligand	Total score
NOS2	SO4	4.288 2
NOS3	ZN	0.689 6
MMP3	ZN	0.459 7
MMP9	ZN	0.516 9
PARP1	SO4	3.629 5
IL2	GOL	3.551 4

有较好的结合活性;对接得分 >7.0 ,说明分子与靶点具有强烈的结合活性。并且,阳性对照的对接得分不高于小分子与靶点蛋白的对接得分。由此可以得知,复方龙脉宁方可能是通过特定成分作用于炎症靶点蛋白来抑制炎症反应的发生,由此来达到治疗脑卒中的目的。

此外文献记载,糖尿病、高血压、心脏病是发生缺血性脑卒中的危险因素,这3种疾病会使本身患有脑卒中的患者病情加重^[3]。因此,本研究在复方龙脉宁方用于治疗缺血性脑卒中的基础上对这3种疾病与缺血性脑卒中之间的关系进行了研究。本研究采用上述同种研究方法对复方龙脉宁方进行潜在靶标的预测,筛选出关于糖尿病、高血压、心脏病的靶点,其中糖尿病的靶点数为31个,高血压为20个,心脏病为1个,糖尿病与脑卒中的共有靶点数为4个,高血压与脑卒中的共有靶点数为2个,心脏病与脑卒中的共有靶点数为1个。最后根据不同成分对应不同的靶点,各靶点对应不同的疾病进行“成分-靶点-疾病”网络模型的构建。图4是对复方龙脉宁方中的4味中药中的有效成分化学群进行这3种疾病与脑卒中的潜在活性成分靶点进行预测、筛选所得到的“成分-靶点-疾病”网络图。

**Figure 4** "Ingredient-target-disease" network diagram of Fufang Longmai Ningfang

研究发现, NOS2和NOS3为治疗脑卒中、高血压、糖尿病的共有靶点; 靶点IL-2、PARP1为脑卒中与糖尿病的共有靶点; 血管生成素(ANG)为脑卒中与心脏病共有靶点。其中糖尿病与脑卒中的关系更为密切(靶点数为4个)。已有文献记载, 高血糖除了是糖尿病的主要症状外, 还可导致氧化应激和炎症反应而损伤血管, 使蛋白激酶C(PKC)和Rho激酶激活、内皮素系统及基质金属蛋白酶(MMP9)上调等^[30], 从而促进脑卒中的发展。除此之外, 又有研究发现, NOS在辅助因子四氢生物蝶呤参与下, 通过氧化L-精氨酸及还原氧生成NO^[31]。在生理条件下, 由NOS生成的NO是内源性血管保护分子, 有舒张血管、抑制血小板聚集、改善缺血区血流量、抑制白细胞黏附于内皮细胞而清除氧自由基、抗炎等作用^[32], 从而对于缺血性脑卒中有很好的治疗作用。ANG具有非常强的促进血管再生的能力, 能够使血管稳定、抑制内皮细胞的凋亡, 是一种能够促进血管修复的细胞因子, ANG治疗缺血性脑卒中的作用机制有两方面, 其一可能是通过维持血管内皮细胞的结构形态完整; 其二可能是可能通过减轻脑血管炎症反应过程来实现保护作用^[33]。

讨论

实验研究表明, 葛根异黄酮类成分具有扩张血管、抗血栓和降脂降压的药理作用^[20]。其中葛根素通过诱导缺血心肌血管的再生来治疗心肌缺血, 其机制可能是激活HIF-VEGF-eNOS信号转导通路中1个或几个分子, 从而促进NO分子的形成, NO和其他分子一起促进内皮细胞的增殖、迁移和血管生成。除此之外, 还能提高PGI₂/TXA₂水平, 降低儿茶酚胺生成, 从而降低血黏度、抑制血栓形成^[34,35], 达到治疗缺血性脑卒中的目的。已有文献报道, NOS3与NOS2对于缺血性脑卒中具有很好的治疗效果。川芎中的川芎嗪治疗缺血性脑卒中主要通过两方面。其一, 能有效抑制脑缺血-再灌注时白介素的合成^[36]; 其二, 抑制脑缺血-再灌注后TNF- α 的表达, 使白介素的表达提前, 从而对抗脑缺血-再灌注损伤, 治疗缺血性脑卒中^[37]。穿山龙中的薯蓣皂苷的中心度也相对较高(薯蓣皂苷的中心度为10)。研究发现, 薯蓣皂苷不仅可以增加小鼠心肌营养性血流量, 同时, 还可以降低 β/α 脂蛋白的比率, 改善冠脉循环, 这对于治疗缺血性脑卒中有非常重要的作用^[38], 同时它也对IL-2起到一定的作用, 可以抑制炎症的发生和细胞凋亡。蜂胶水提液具有明显的抗炎作用, 主要通过抑制5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)的活性来发挥抗炎作用, 并能有效地抑制血小板凝集、抑制前列腺素E₂(PEG₂)合成, 具有神经保护和免疫调节的

作用^[39,40]。

血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)的靶点具有很高的中心度(VEGFR-2中心度为25)。VEGFR-2是VEGF的受体, 与VEGF-A结合后能增强内皮细胞有丝分裂、改善内皮细胞的抗凋亡作用, 增强血管通透性以及血管新生^[41,42]。在缺血性脑卒中发生早期, VEGF及VEGFR-2水平升高可以保护血管内皮, 改善微循环, 促进侧支循环建立, 改善缺血区域再灌注以及减轻炎症反应, 从而达到神经保护作用^[43,44]。已有文献报道, VEGFR-2为治疗脑卒中的关键靶点^[45]。近年来, 基质金属蛋白酶(MMPs)被视为治疗缺血性脑卒中的新靶点^[46]。MMP9在周围脑血管的基底中起着非常重要的作用, 它可以通过调节亲和抗血管生成因子之间的平衡, 介导VEGF的蛋白活化, 促使神经血管重塑^[47-49]。据文献记载, 脑卒中患者的神经功能损伤程度与机体所含血清白蛋白呈负相关^[50], 引发重症脑卒中的危险因素之一可能就是低蛋白血症^[51]。并且, 脑卒中患者低蛋白血症对神经功能的远期预后, 也会产生不良影响^[52]。因此, 对于白蛋白的调控至关重要。

研究发现, 复方龙脉宁方中的4味中药具有明显的抗血栓、抑制炎症反应、增加心血管形成的作用, 对于治疗缺血性脑卒中有很好效果。除此之外, 不同的成分对应多个靶点, 而不同的靶点又对应多个的成分, 从分子水平揭示中药复方多成分多靶点协同作用的特点。

从靶点群相关性分析发现, 脑卒中与高血压、心脏病、糖尿病这三类疾病均有共同的蛋白质靶点群。因此, 复方龙脉宁方不仅可以用来治疗缺血性脑卒中, 还可对患有糖尿病、心脏病、高血压的患者进行一定的治疗, 在临床上也有过类似的用法。综上所述, 本研究从分子角度初步揭示中药复方异病同治的分子机制, 为中药复方老药新用奠定理论基础。

通过利用网络药理学的分析方法, 其中包括靶点预测、构建网络模型、KEGG通路分析, 阐述了复方龙脉宁方组方中治疗脑卒中的39个活性分子, 分别以葛根素等异黄酮类、川芎嗪类生物碱、薯蓣皂苷类等为代表的有效物质群; 通过靶点预测得到了17个与治疗脑卒中有关的作用靶点, 其中NOS2、NOS3、ANG、MMP3、MMP9、SOD2在治疗脑卒中方面起着非常重要的作用。对经典复方“复方龙脉宁方”治疗缺血性脑卒中的分子机制进行初步的阐述, 并对其通路分析, 发现复方龙脉宁方在治疗脑卒中时可能有以下3种途径: ①可能是通过激活HIF-VEGF-eNOS信号转导通路中的几个分子, 从而促进内皮细胞的增殖、迁移

和血管的生成、增强血管通透性; ② 可能与抑制炎症相关的通路 TLR4/NF- κ B 信号通路有关, 供血不足导致缺氧, 而低氧与炎症关系密切, HIF-1 α 可以降低炎症因子 IL-6、IL-2 和 TNF- α 的增加, 从而减轻心肌缺血再灌注引起的炎性损伤; ③ 可能与其抑制 5-LOX 的活性来发挥抗炎作用, 从而有效抑制血小板凝集、保护神经和增强免疫调节来达到治疗脑卒中的效果。此外, 复方龙脉宁方在治疗脑卒中的同时对于糖尿病、高血压、心脏病也有一定的治疗作用。本研究初步阐明了复方龙脉宁方的分子作用机制, 为传统复方的临床应用提供理论基础。

References

- [1] Huang KC, Peng YF. Progress in imaging studies of ischemic stroke dialectic and post-stroke cross-cate function [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2017, 15: 360-363.
- [2] Zeng QY. A Comparative Study of The Effects of Comprehensive Rehabilitation Programs of Chinese and Western Medicine on Early Hemiplegia in Ischemic Stroke (中、西医综合康复方案对缺血性脑卒中早期偏瘫的影响的对比研究) [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2006.
- [3] Wu YM, Tao RY, Meng XB, et al. Research progress on the mechanism of ischemic stroke injury [J]. *Jilin J Tradit Chin Med* (吉林中医药), 2018, 38: 368-372.
- [4] Cheng N, Li TF, Zhan J, et al. Huoxue and blood stasis treatment of early ischemic stroke [J/OL]. *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2018, 38: 1682-1685.
- [5] Gao LX. Clinical observation on 46 cases of ischemic stroke with Qi deficiency and blood stasis treated by Yiqi Quyu Pill [J]. *Chin J Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2015, 33: 483-485.
- [6] Chen W. Clinical manifestations of Xuefu Zhuyu Decoction in the treatment of ischemic stroke [J]. *China Naturopathy* (中国民间疗法), 2018, 26: 27-28.
- [7] Xiao L, Zhang ZL, Han LM. A review of ancient literature and modern medical research on stroke [J]. *Gannan Hosp J* (赣南医学院学报), 2011, 31: 160-161.
- [8] Chen SP. Current status and progress of antiplatelet therapy for ischemic cerebrovascular disease [J]. *Chin J Integr Tradit West Cardioangiopathy* (中西医结合心血管病杂志), 2018, 6: 39-40.
- [9] Zhang WN, Li AP, Li K, et al. Progress in the research method of medicinal substances of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharmacol J* (中国药理学杂志), 2018, 53: 761-764.
- [10] Su Z, Wang CL, Sun J. Experimental study on anti-thrombosis and microcirculation of Fufang Longmaining Dropping Pills [J]. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2010, 33: 55-57.
- [11] Wang S, Wang CL, Shi YJ, et al. Experimental study of Compound Long Ningning on cold coagulation sputum rats [J]. *J Chin Med Pharm* (中医学报), 2014, 42: 48-51.
- [12] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 682-690.
- [13] Wei S, Niu M, Wang J, et al. A network pharmacology approach to discover active compounds and action mechanisms of San-Cao Granule for treatment of liver fibrosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 733-743.
- [14] Li S. Exploring traditional Chinese medicine by a novel therapeutic concept of network target [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22: 647-652.
- [15] Xue JT, Huang N, Kong WY, et al. Study on active components and mechanism of Gegen's sugar reduction based on network pharmacology [J]. *Chin Pharmacol J* (中国药理学杂志), 2018, 53: 1748-1754.
- [16] Ru JL. Construction and Utilization of Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015.
- [17] Wang ZL. Study on The Mechanism of Action of ICA69 and Gegen Qinlian Decoction in The Occurrence and Treatment of Pain (ICA69 与葛根芩连汤在疼痛发生与治疗中的作用机制研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016.
- [18] Zhang JX. Analysis of the effect of puerarin on cerebral infarction [J]. *J Contemporary Med* (当代医药论丛), 2017, 15: 143-144.
- [19] Zhang D, Li YY, Wang YF, et al. Effect of astragalus and puerarin on renal endoplasmic reticulum stress-related PERK pathway in KKAY mice [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2017, 26: 166-173.
- [20] Geng LX. Advances in pharmacological effects and comprehensive utilization of *Pueraria lobata* [J]. *Asia Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2010, 6: 161-162.
- [21] Jin YQ, Hong YL, Li JR, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of Chuanxiong [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2013, 4: 45-47.
- [22] Chi XJ, Sun R. Research progress of pharmacological effects of Chuanxiong on cerebral ischemic effects based on efficacious substance basis [J]. *Chin Pharmacovigilance* (中国药物警戒), 2013, 10: 355-357, 361.
- [23] Yu H, Du JL. Research status of pharmacological action and mechanism of saponin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42: 4694-4699.
- [24] Zhang JL, Wang K, Hu FL. Research progress on antioxidant activity and molecular mechanism of propolis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 2645-2652.
- [25] Huang WC. Research progress in bioactivity and pharmacological action of propolis (I) [J]. *Bee J* (蜜蜂杂志), 2006, 28: 10-12.

- [26] Li Y, Yang JF. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of propolis [J]. Heilongjiang Med (黑龙江医药), 2005, 18: 333-334.
- [27] Wang WX, Zhang NN, Zeng XY, et al. HIF-1 α anti-inflammatory effects on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2018, 34: 1201-1205.
- [28] Lin ZF, Huang XA, Xu PP, et al. Study on the inhibitor of reduning injection on the HRV 3C protease based on virtual screening [J]. Pharmacol Clin Chin Med (中药药理与临床), 2017, 33: 142-146.
- [29] Li J, Gao L, Gao Y, et al. Exploration in targets action of antitussive and expectorant bioactive components from *Farfarae flos* based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2018, 49: 179-187.
- [30] Zhang SY. Therapeutic effect of integrated traditional Chinese and Western medicine on type 2 diabetes mellitus complicated with cerebral infarction [J]. Hebei J Tradit Chin Med (河北中医), 2009, 31: 724, 789.
- [31] Li Y, Yu F, Dai DJ, et al. Possible mechanisms of diabetes aggravating stroke and targets of related drugs [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2010, 34: 433-438.
- [32] Liu CH, Zhang YB, Liu WX, et al. Study on vascular protection target after acute ischemic stroke [J]. J Chengde Med Coll (承德医学院学报), 2007, 9: 95-97.
- [33] Zhuang Y, Jin WX. Protective effect and mechanism of angiotensin II on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Nerv Ment Dis (中国神经精神疾病杂志), 2014, 40: 305-308.
- [34] Cheng SQ, Chen X, Yu XY, et al. Advances in pharmacological effects of *Pueraria lobata* [J]. J Jilin Coll Med (吉林医药学院学报), 2013, 34: 46-49.
- [35] Huang Y, Zhou W, Zhao FM, et al. Effects of Liangxue Tongyu Recipe on TNF- α , HSP70, NO and NOS in peripheral blood of patients with hemorrhagic apoplexy [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2013, 30: 18-20.
- [36] Han JX, Sun XH, Gong LL, et al. Advances in pharmacological research of Chuanxiong in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. Med J Qilu (齐鲁医学杂志), 2005, 20: 375-376.
- [37] Li DC, Liu QY, Liu CY. Research progress in chemical composition and pharmacological action of Chuanshanlong [J]. J Shanxi Univ Tradit Chin Med (山西中医药学院学报), 2016, 17: 69.
- [38] Massaro FC, Brooks PR, Wallace HM, et al. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties [J]. Naturwissenschaften, 2011, 98: 329-337.
- [39] Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions [J]. Life Sci, 2007, 80: 370-377.
- [40] Wang K. The Effect of Propolis on Inflammatory Diseases and Inflammatory Microenvironment and Its Mechanism (蜂胶对炎症性疾病和炎症微环境的影响及其作用机制) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [41] Li LF, Liu HY, Deng MY, et al. Vascular endothelial growth factor regulates proliferation and migration of endothelial progenitor cells *via* gap junction protein 43 [J]. Acta Acad Med Militaris Tertiae (第三军医大学学报), 2016, 38: 136-140.
- [42] Wang YK, Yan XL. Research progress on the relationship between brain-derived neurotrophic factor, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 and cerebral infarction [J]. Chin J Pract Diagn Ther (中华实用诊断与治疗杂志), 2017, 31: 95-97.
- [43] Wang CL. Dynamic Changes of Serum VEGF and bFGF Levels in Patients with Acute Cerebral Infarction (急性脑梗死患者血清VEGF与bFGF水平动态变化的研究) [D]. Tangshan: Hebei United College, 2014.
- [44] Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2011, 20: 47-54.
- [45] Shen X. Correlation between VEGFR-2 Gene Promoter Region Polymorphism and Susceptibility to Atherosclerotic Ischemic Stroke (VEGFR-2 基因启动子区多态性与动脉粥样硬化型缺血性脑卒中易感相关性) [D]. Suzhou: Soochow University, 2014.
- [46] Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290: H232-H239.
- [47] Zhao BQ, Wang S, Kim HY, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke [J]. Nat Med, 2006, 12: 441-445.
- [48] Gu YH, You XX, Yan J. Matrix metalloproteinases: a therapeutic target for acute ischemic stroke [J]. Inter Natl J Neurol Neuro Surg (国际神经病学神经外科杂志), 2013, 40: 266-238.
- [49] Bu YZ, Lu GP, Zhang DW, et al. Clinical significance of hyper-sensitive creatine kinase and matrix metalloproteinase-9 in acute myocardial infarction [J]. J Clin Res (医学临床研究), 2008, (05): 817-819.
- [50] Feng XY, Li MY, Tan WL. Research progress of matrix metalloproteinase-2 signal regulation and its inhibitors [J]. Chin J Cardiol (中华心血管病研究), 2008, 36: 623-626.
- [51] Peng B, Sun J, Ni J, et al. Relationship between serum albumin level and severity of ischemic stroke [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol (中国神经免疫学和神经病学杂志), 2010, 17: 311-313.
- [52] Ozawa M, Yoshida D, Hata J, et al. Effects of protein intake on stroke risk [J]. Chin Rehabilitation, 2017, 32: 361.