

# 基于机器学习与网络药理学探究补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的物质基础

王 丰<sup>1</sup>, 孟庆琦<sup>1</sup>, 刘 晴<sup>2</sup>, 刘 影<sup>3</sup>, 孙 璐<sup>3</sup>, 米 妍<sup>1</sup>, 穆丹阳<sup>1</sup>,  
何大阔<sup>2\*</sup>, 侯 悦<sup>1\*</sup>

(1. 东北大学生命科学与健康学院, 辽宁省生物资源开发利用重点实验室, 工业智能与系统优化国家级前沿科学中心, 辽宁 沈阳 110170; 2. 东北大学信息科学与工程学院, 流程工业综合自动化国家重点实验室, 辽宁 沈阳 110004; 3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 本溪 117004)

**摘要:** 为了探究补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 抗缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 药效作用及机制, 本研究建立了大脑中动脉缺血再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 大鼠模型, 初步评价了BHD在MCAO/R动物模型中的抗IS药效作用, 然后将补阳还五汤的活性成分与FDA批准临床治疗IS的药物进行无监督聚类, 并结合网络药理学预测活性成分的作用机制, 最后建立脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的BV-2细胞模型, 采用Griess法和MTT法对BHD成分的抗炎活性及对细胞存活率的影响进行分析。结果显示, BHD能显著改善MCAO/R大鼠的神经功能评分, 延长转棒停留时间, 降低脑梗死体积及脑含水量, 无监督聚类算法筛选得到BHD发挥药效的活性成分共7个, 结合网络药理学预测分析活性成分的作用机制可能与炎症相关, 使用LPS诱导BV-2细胞模型验证BHD活性成分的抗炎药效, 并通过建立液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 考察不同活性成分在BHD中的含量。综上所述, 本研究明确了补阳还五汤治疗IS的关键活性成分及其潜在的药效机制, 对传统中药的现代化研究具有重要意义。所有动物实验均通过东北大学生物与医学伦理委员会审核批准 (批准号: NEU-EC-2023A052S)。

**关键词:** 脑卒中; 机器学习; 网络药理学; 补阳还五汤; 无监督聚类

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0627-10

## Integrated machine learning and network pharmacology approach for exploring the material basis of Buyang Huanwu Decoction for ischemic stroke

WANG Feng<sup>1</sup>, MENG Qing-qi<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>2</sup>, LIU Ying<sup>3</sup>, SUN Lu<sup>3</sup>, MI Yan<sup>1</sup>, MU Dan-yang<sup>1</sup>,  
HE Da-kuo<sup>2\*</sup>, HOU Yue<sup>1\*</sup>

(1. College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Key Laboratory of Bioresource Research and Development of Liaoning Province, National Frontiers Science Center for Industrial Intelligence and Systems Optimization, Shenyang 110170, China; 2. College of Information Science and Engineering, State Key Laboratory of Synthetical Automation for Process Industries, Shenyang 110004, China; 3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China)

**Abstract:** The study investigates the therapeutic effects and mechanisms of Buyang Huanwu Decoction (BHD) in treating ischemic stroke (IS). Using a middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) rat model,

收稿日期: 2024-10-09; 修回日期: 2025-01-19.

基金项目: 辽宁省重点实验室 (2022JH13/10200026); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (N2220002).

\*通讯作者 E-mail: houyue@mail.neu.edu.cn; hedakuo@mail.neu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0971

we evaluated the neuroprotective effects of BHD, demonstrating significant improvements in neurological function scores, prolonged rotarod retention time, and reductions in both infarct volume and brain water content. An unsupervised clustering algorithm was employed to identify active components of BHD by clustering them with FDA-approved drugs for ischemic stroke treatment. Combined with network pharmacology analysis, the mechanisms of these active components were predicted to be associated with anti-inflammatory pathways. Further validation using a lipopolysaccharide (LPS)-induced BV-2 cell model demonstrated the anti-inflammatory efficacy of seven key active components, with their effects on anti-inflammatory activity and cell viability assessed *via* the Griess and MTT assays. Additionally, the content of these active components in BHD was quantified using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). In conclusion, this study elucidates the critical active components of BHD and their potential pharmacological mechanisms, providing valuable insights for the modernization of traditional Chinese medicine and its application in ischemic stroke therapy. All animal experiments were approved by the Animal and Medical Ethics Committee of Northeastern University (approval No.: NEU-EC-2023A052S).

**Key words:** stroke; machine learning; network pharmacology; Buyang Huanwu Decoction; unsupervised clustering

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 在全球范围内是导致死亡和残疾的主要因素之一,其发病机制复杂,涉及脑血流减少、能量代谢障碍、炎症反应等多个因素<sup>[1]</sup>。尽管目前已存在多种治疗手段,包括溶栓、抗凝等,但疗效有限,且存在较高的不良反应风险。因此,探索更加安全有效的治疗策略是当前脑卒中研究的重点方向之一。

中医药治疗注重整体观念,中药具有多途径、多靶点的作用特点,对 IS 等多种心脑血管疾病的治疗具有重要临床意义<sup>[2]</sup>。中药复方补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 因其在促进脑血流、减轻脑损伤方面的显著效果,成为 IS 治疗领域的重要研究对象<sup>[3-5]</sup>。然而, BHD 发挥疗效的物质基础及其作用机制尚未被充分阐明,限制了其在临床中的更广泛应用。

机器学习以其强大的数据处理能力,在处理大规模、多维度的数据时,展现出传统分析方法无法比拟的优势,能够从复杂的药物成分中挖掘出潜在的关键活性成分<sup>[6,7]</sup>。为了探究 BHD 抗 IS 的物质基础,本研究引入了机器学习的无监督聚类方法,通过对 BHD 的活性成分进行系统筛选和分析,揭示其与临床批准的用于治疗 IS 药物的结构相似性。通过无监督聚类,能够将药物活性成分与已知的 IS 药物进行分类比较,从而筛选出与补阳还五汤疗效密切相关的成分<sup>[8]</sup>。针对筛选出的活性成分,采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV-2 细胞对成分的抗炎活性进行评估,并结合液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 测定活性成分的含量。这种基于机器学习的跨学科创新方法,不仅提高了研究的效率,也为后续的网络药理学和实验验证奠定了坚实基础。

本研究建立大脑中动脉缺血再灌注 (middle

cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 大鼠模型考察 BHD 对神经功能评分、转棒停留时间、脑梗死体积及脑含水量的改善作用,结合机器学习和网络药理学分析探究 BHD 发挥抗 IS 药效的关键活性成分,并建立 LPS 诱导的 BV-2 细胞模型检测筛选成分对 NO 释放率和细胞存活率的影响,结合 LC-MS 测定活性成分的含量,以期 BHD 的临床应用提供理论基础和科学依据。

## 材料与方法

**药品、试剂与细胞系** 三溴乙醇 [1420, 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司] 溶解于叔戊醇 (A800284, 上海麦克林生化科技有限公司)。氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, 批号: T8170) 购自北京索莱宝科技有限公司。丁苯酞 (DL-NBP, 批号: 11110651, 石药集团), 溶解于植物油, 临用前配制。本实验所用 BHD 由黄芪 120 g、当归 3 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g 组成,所有药材购自北京同仁堂药店。将上述中药材加入水中浸泡充分后,进行两次煎煮,每次 40 min。煎液过滤后合并,并浓缩至原药材 4 g·mL<sup>-1</sup> 备用,制备得率为 82.73%。黄芩素 (货号: A0018)、木犀草素 (货号: A0108)、芒柄花黄素 (货号: A0232)、槲皮素 (货号: A0083)、山柰酚 (货号: A0129)、异鼠李素 (货号: A0190) 和毛蕊异黄酮 (货号: A0514) 购自成都曼斯特生物科技有限公司。BV-2 细胞由南开大学药学院赠送。DMEM 高糖培养基 (货号: 11965092) 和 0.25% trypsin-EDTA (货号: 25200-072) 购自 Gibco 公司; fetal bovine serum (货号: 164210) 购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

Waters Xevo™ G2 Q-TOF/MS 质谱仪购自美国 Waters 科技有限公司; 多功能微孔板检测仪 (BioTek Synergy H1) 购自安捷伦科技有限公司; 二氧化碳培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

**实验动物** 健康雄性 SD 大鼠, 体重 200~220 g, SPF 级, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号为 SCXK (辽) 2015-0001。以上动物均在东北大学生命医学实验室饲养, 室温 20~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 采用标准方式饲养, 明暗环境各交替 12 h。所有动物实验已通过东北大学生物与医学伦理委员会审核批准 (批准号: NEU-EC-2023A052S)。

**MCAO/R 模型制备及动物分组** 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照药丁苯酞组。

所有大鼠均采用 2.5% 三溴乙醇麻醉, 麻醉后进行常规消毒, 暴露右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、外颈动脉 (external carotid artery, ECA) 和内颈动脉 (internal carotid artery, ICA)。使用硅胶包覆的尼龙单丝插入外颈动脉, 并将单丝推进至中大脑动脉 (middle cerebral artery, MCA), 实现局部缺血。缺血持续 1 h 后, 迅速移除单丝以启动再灌注, 再灌注持续 2 h。假手术组大鼠仅暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和外颈动脉操作, 不做其他干预。术后 2 h 开始干预, 补阳还五汤低、中、高剂量组分别以 14.5、29、58 g·kg<sup>-1</sup> 进行灌胃给药, 给药体积约为 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 阳性对照药丁苯酞组以 80 mg·kg<sup>-1</sup> 进行灌胃给药, 假手术组和模型组大鼠则给予等体积蒸馏水灌胃<sup>[9,10]</sup>。

本研究共纳入 60 只大鼠, 其中 52 只用于后续实验, 8 只大鼠因死亡被排除, MCAO/R 大鼠的总死亡率为 13.3%。根据文献和之前的研究, 成功的 MCAO 模型应满足以下 3 个标准: ① 术后 24 h 神经功能评分 (五分制) 大于 2; ② 缺血侧大脑血流 (CBF) 在动脉阻塞后减少 20%~30%; ③ 术后再灌注 24 h 后, 缺血侧 CBF 减少 40%~60%。所有不能满足这 3 个标准或死亡的 MCAO 大鼠均被排除。5 只大鼠因未符合纳入标准而被排除, 剩余 47 只大鼠用于后续实验。

**行为学评分** 改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 分别于缺血再灌注后、术后 14 天评估大鼠神经功能。包括运动实验、感觉实验和平衡木测试等方面, 最高分 18 分, 最低分 0 分。评分越高代表神经功能损伤程度越重。

**转棒实验** 转棒实验分别于术前、术后 14 天评估大脑损伤后大鼠的运动功能。所有大鼠在 MCAO/R 手术前接受了为期 3 天的训练, 每天进行 3 次训练, 间隔 120 min。训练期间, 转棒速度设定为 10 r·min<sup>-1</sup>, 持

续 5 min。在正式测试中, 转棒速度从 4 r·min<sup>-1</sup> 逐渐增加至 40 r·min<sup>-1</sup>, 持续 300 s, 记录每只大鼠掉落的时间、速度及距离<sup>[11]</sup>。

**脑梗死体积测定** 断头处死大鼠后, 迅速取出脑组织, 弃去小脑、嗅球, 脑组织按冠状位切成 5 片, 每片厚度 2 mm, 切片置于 2% TTC 染液中, 37 °C 恒温避光孵育 30 min, 染色完毕拍照后采用 Image J 软件测量脑梗死面积百分比。脑梗死面积百分比 (%) = [(左侧半球体积 - 右侧半球未梗死区体积) / 左侧半球体积] × 100%<sup>[12,13]</sup>。

**脑水肿检测** 断头处死大鼠后, 迅速取出脑组织, 称湿重, 然后将脑组织置于 100 °C 恒温干燥箱中, 烘干 24 h 至恒重即为干重。脑水肿百分比 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

**BHD 活性成分收集与无监督聚类** 将 BHD 组方中的黄芪、当归、红花、桃仁、赤芍、地龙和川芎七味药材, 使用中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据库和 SymMap (<http://www.symmap.org/>) 数据库进行检索, 活性成分通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库的 “canonical SMILES” 进行标准化, 并使用 RDKit 计算活性成分分类药性, 共得到 80 个化学成分。利用 RDKit 指纹计算化合物的化学结构相似性, 设置参数为 NumBits = 1 024, MinPathLength = 1, MaxPathLength = 7, 计算 Tanimoto 相似性。Tanimoto 相似性用于衡量两分子结构相似性, 通过在 Python 中使用 RDKit 库, 结合 4 种无监督聚类算法 (K-means、Affinity propagation、Agglomerative clustering 和 Butina), 对 BHD 化合物与 FDA 批准药物进行聚类分析。

**BHD 活性成分靶点和 IS 靶点收集** BHD 的活性成分靶点信息来自 TCMSP 和 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 与 IS 相关的靶点信息则来源于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://disgenet.cn/>) 及 Therapeutic Target Databases (TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库。通过在这些数据库中搜索关键词 “ischemic stroke”, 筛选出与 IS 密切相关的潜在治疗靶点。同时整合转录组数据作为 IS 的潜在治疗靶点, 转录组数据来自 Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库, 具体包含数据集 GSE16561 和 GSE58294。前者包含 39 例 IS 患者样本和 24 例正常样本, 后者包含 69 例 IS 患者样本和 23 例正常样本。下载原始数据后, 使用 R 包 “Limma” 进行数据归一化处理, 并通过基因差异表达分析对这些数据进行比较,

筛选出与 IS 相关的差异基因。分析的阈值设置为  $P < 0.05$  和  $|\log_2 \text{fold change}| > 0$ 。

**药物与疾病交集靶点的筛选** 运用 Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将 BHD 中主要活性成分的靶点与 IS 相关的疾病靶点取交集, 制作韦恩图。

**KEGG 富集分析** 利用生物信息学工具“微生信” (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 研究了 BHD 活性成分在治疗 IS 靶点中的生物学作用及其信号转导途径。途径分类数据来自 KEGG (<http://www.genome.jp/KEGG/>)。

**构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络** 将筛选出的共同靶点导入 STRING 11.0 (<https://cn.string-db.org/>) 进行 PPI 网络的拓扑分析, 综合评分大于 0.9 作为优先级筛选标准。随后, 利用 Cytoscape 3.8.2 构建了包含潜在关键靶点的 PPI 网络, 并对网络参数进行了全面评估。在此基础上, 应用 MCODE 算法对 PPI 网络进行模块化分析, 选择最低  $P$  值的最高评分项进行模块的功能注释, 从而识别并解释网络中的重要功能特征。

**分子对接** 在 PDB 数据库中下载关键作用靶点蛋白的“PDB”格式晶体结构, 在 PubChem 数据库中下载核心活性成分的“SDF”格式结构。通过 Schrödinger 软件中的“Maestro”模块对蛋白质进行去水、加氢等操作, 对配体进行预处理。通过 docking score 评价受体-配体相互作用情况, 并展示 3D 效果图。

**细胞培养** BV-2 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中生长。

**Griess 法检测一氧化氮释放率** 将 BV-2 细胞接种于 96 孔板, 每孔  $2 \times 10^4$  个细胞, 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 24 h。弃去培养基, 实验组加入不同浓度的活性成分, LPS 组和空白对照组分别加入相应的培养基, LPS 终浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup>。继续孵育 24 h 后, 取上清液 100 μL, 加入等体积的 Griess 试剂 (1% 磺胺酰胺和 0.1% *N*-1-萘基乙二胺, 均溶于 2.5% 磷酸溶液), 室温反应 10 min。通过酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光度, 计算 NO 的释放量。所有实验重复 3 次, 并根据标准曲线计算 NO 的浓度<sup>[14]</sup>。

**MTT 法检测细胞存活率** 将 BV-2 细胞接种于 96 孔板, 每孔  $2 \times 10^4$  个细胞, 常规培养条件下 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 培养 24 h, 确保细胞生长良好。根据实验设计, 选择 7 种活性成分, 包括芒柄花黄素、木犀草素等, 每个活性成分设置对应的 6 个实验组: 对照组 (仅加入相应培养基)、模型组 (加入 LPS, 终浓度 100 ng·mL<sup>-1</sup>)、不同药物浓度组 (含有终浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS)<sup>[15-20]</sup>。所有

实验组在培养 24 h 后, 分别进行处理, 并继续培养 24 h。孵育结束后, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 溶液, 在 37 °C 孵育 4 h。吸去上清, 加入 150 μL DMSO 溶解生成的紫色结晶, 震荡 10 min 至完全溶解, 使用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值。通过 OD 值计算各组细胞存活率, 并以对照组的存活率为 100% 进行相对计算<sup>[21]</sup>。

**采用 LC-MS 进行定量分析** 供试品溶液补阳还五汤合煎液浓度为 4 g·mL<sup>-1</sup> (以生药材计), 用 70% 甲醇稀释至 50 μg·mL<sup>-1</sup>。

**对照品溶液** 取槲皮素、山柰酚、异鼠李素、芒柄花黄素、木犀草素、黄芩素、毛蕊异黄酮、芍药苷、黄芪甲苷、阿魏酸、苦杏仁苷 11 种对照品适量, 精密称定, 置于 11 个离心管中, 加入甲醇制备成质量浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 单独对照品母液。

分别取上述单独对照品母液 10 μL, 共计 110 μL, 然后加入 1 890 μL 70% 甲醇稀释, 制得 5 μg·mL<sup>-1</sup> 混合对照品溶液。

**色谱条件** 采用 Waters ACQUITY UHPLC™ 系统, 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 乙腈, B: 0.1% 甲酸水; 流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 梯度洗脱, 梯度洗脱程序见下表, 柱温: 40 °C; 自动进样器温度: 10 °C; 进样量: 5 μL。梯度条件如下: 0~1 min, 5% A; 1~6 min, 5%~40% A; 6~10 min, 40%~99% A; 10~12 min, 99% A; 12~15 min, 5% A。

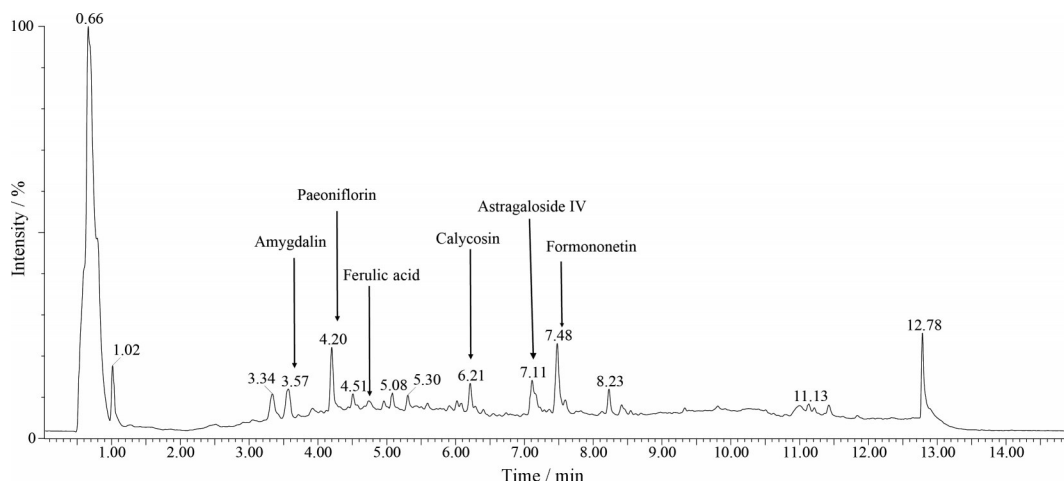
**质谱条件** 采用 Xevo™ G2 Q-TOF/MS 系统, 离子源为 ESI 源, 负离子模式检测, 毛细管电压 1.0 kV, 锥孔电压 40 V, 二级锥孔电压 1 V, 离子源温度 110 °C, 去溶剂气温度 500 °C, 去溶剂气流量 700 L·h<sup>-1</sup>, 扫描质量范围:  $m/z$  50~1 200, 扫描时间 0.2 s, 以 centroid 模式进行数据采集, 采用亮氨酸-脑啡肽 ([M-H]<sup>-</sup>, 554.261 5) 作为 Lock Spray 校正标准液, 流速为 10 μL·min<sup>-1</sup>。

**统计学分析** 数据表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 。统计分析采用 SPSS 22.0 软件进行。用  $t$  检验确定两组间的统计学显著性。为了比较多组, 使用单因素方差分析, 通过 Tukey's 检验或 Dunnett's T3 检验确定显著性差异。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 BHD 对 MCAO/R 模型大鼠脑梗死体积和行为学评分的影响

采用 LC-MS 分析 BHD 的化学成分, 获得每种化合物的保留时间和质谱数据, 共鉴定出 6 种化学成分, 包括芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、芍药苷、黄芪甲苷、阿魏酸和苦杏仁苷, 结果如图 1 所示。

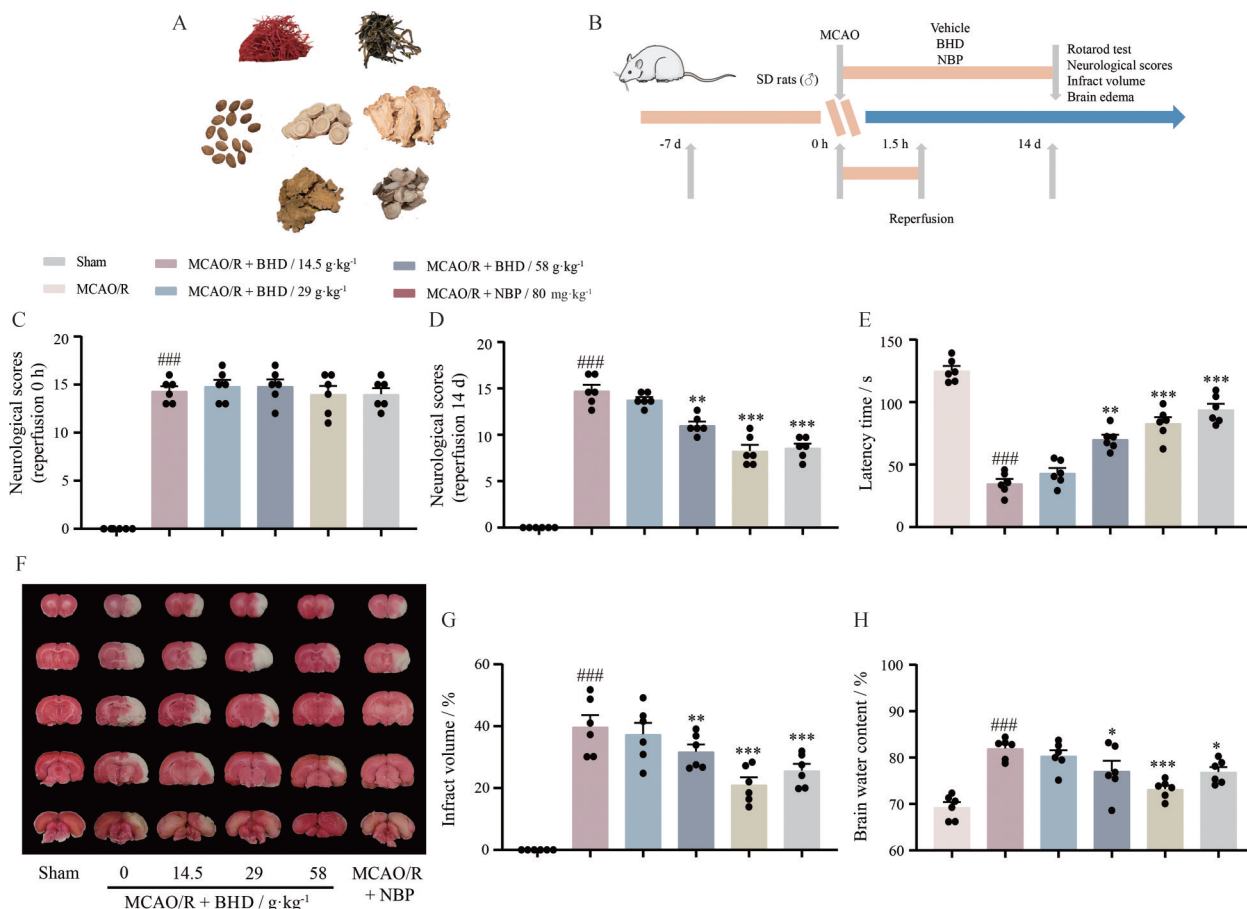


**Figure 1** The total ions current of BHD in negative ion mode. BHD: Buyang Huanwu Decoction

研究系统评估了BHD对大鼠MCAO/R模型所致缺血再灌注损伤的缓解作用。BHD的组成药物如图2A所示,实验流程如图2B所示。

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、转棒测试的停留时间、脑梗死体积及脑水含量显著升高

( $P < 0.05$ ),灌胃给予BHD ( $14.5、29、58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )能够显著降低神经功能评分,并延长旋转杆测试中的潜伏期(图2C~E)。此外,BHD ( $14.5、29$ 和 $58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )还显著减少了脑梗死体积及脑水含量(图2F~H)。这些结果表明,BHD能够有效减轻MCAO/R大鼠的缺血性损伤。



**Figure 2** BHD alleviated ischemia-reperfusion injury after MCAO/R. A: Seven herbal medicines in BHD; B: Flow chart of the experiment; C, D: Neurological scores were evaluated at 0 h (C) and 14 d (D) after reperfusion; E-H: Rotarod test (E), infarct volume (F, G), and cerebral edema (H) were evaluated at 14 d after reperfusion.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . ### $P < 0.001$  vs sham group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs MCAO/R group. MCAO/R: Middle cerebral artery occlusion/reperfusion

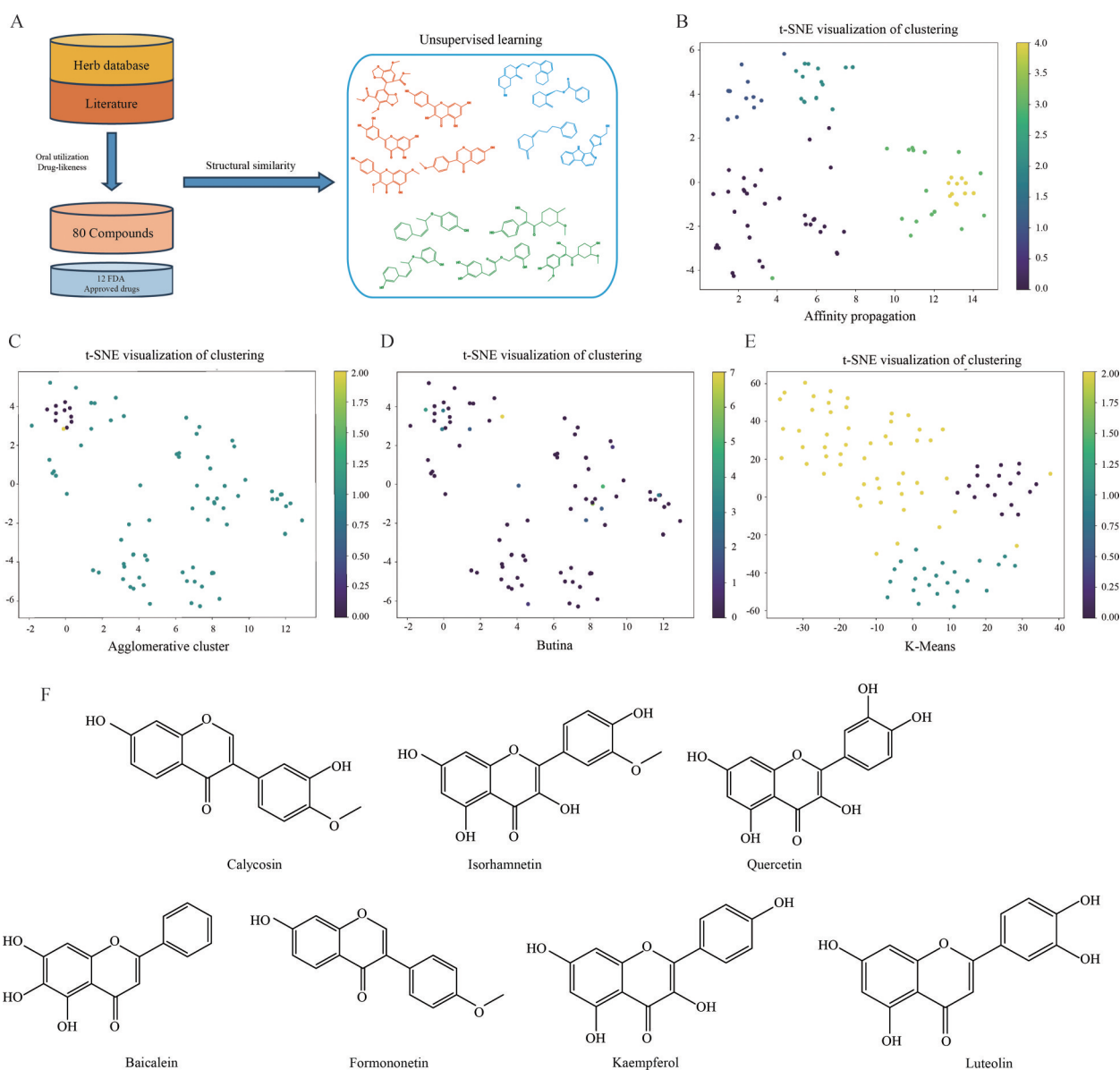
## 2 机器学习筛选BHD潜在抗IS活性成分

通过整合 TCMSP 和 SYMMAP 数据库, 初步收集了与 7 种单味药相关的 775 种活性成分。基于 RDKit 计算活性成分分类药性, 最终筛选出 80 种 BHD 的活性成分, 作为进一步研究的候选化合物 (图 3A)。为了探讨这些化合物与 FDA 批准的用于治疗 IS 药物之间的潜在联系, 采用无监督聚类分析, 对 BHD 的活性成分进行进一步研究。聚类算法包括 Affinity propagation (图 3B)、Agglomerative clustering (图 3C)、Butina (图 3D) 和 K-Means (图 3E)。基于化学结构相似性, 确定了 BHD 中 41 种与 FDA 批准的 IS 药物具有较高结构相似

性的候选化合物。随后, 结合化合物的可获取性和成本效益分析, 进一步筛选出 7 种成本低于 200 美元的化合物作为最终的候选物 (图 3F), 进入后续的深入研究。

## 3 BHD 活性成分治疗 IS 的网络药理学分析

为了进一步探讨这些候选化合物在治疗 IS 中的潜在作用机制, 进行了网络药理学分析。首先, 通过 GEO 数据库的差异表达分析, 结合 GeneCards、DisGeNET 等数据库的整合, 最终收集到 6 444 个与 IS 相关的靶点。经过去除重复靶点后, 最终筛选出 143 个与 BHD 活性成分相关的潜在靶蛋白。对这 143 个靶点进行了 KEGG 通路富集分析, 结果显示, IL-17 信号



**Figure 3** Machine learning approach to mining BHD active ingredients. A: Unsupervised hierarchical clustering of BHD compounds and approved drugs based on similarity of chemical structure, unsupervised cluster analysis study of BHD components and FDA therapeutic IS drugs; B-E: Affinity propagation (B), Agglomerative cluster (C), Butina (D) and K-Means (E) clustering algorithms were used for the study; F: Seven compounds were taken into account in following analysis. IS: Ischemic stroke

通路、TNF 信号通路等炎症相关通路在 IS 病理过程中具有重要作用 (图 4A)。为了更好地理解这些靶点的相互作用, 利用 STRING 数据库构建了 PPI 网络, 并通过 MCODE 算法进行聚类分析, 得到重要的功能模块。对该模块进行了进一步的 KEGG 通路富集分析, 结果显示, IL-17A 信号通路等炎症相关通路可能是 BHD 活性成分在抗 IS 中发挥作用的关键机制 (图 4B)。

#### 4 BHD 活性成分分子对接结果

通过机器学习筛选, 发现 BHD 中的 7 种关键活性成分为黄芩素、木犀草素、芒柄花黄素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素和毛蕊异黄酮, 其中黄芩素来源于赤芍、红花, 山柰酚和槲皮素来源于黄芪、红花, 木犀草素来源于红花, 异鼠李素、芒柄花黄素和毛蕊异黄酮来源于黄芪。网络药理学分析显示, BHD 活性成分治疗 IS 的关键靶点为 JUN、IL-6、CCL2、IL-1 $\beta$ 、CXCL8 和 RELA, IL-6 和 IL-1 $\beta$  是经典的促炎性细胞因子, 其编码蛋白在炎症相关信号通路中具有关键调控作用; CCL2 和 CXCL8 作为趋化因子, 能够通过其编码蛋白在免疫细胞募集中发挥重要作用。此外, JUN 和 RELA 分别编码 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 转录因子, 它们不仅是基因表达调控的关键分子, 也在炎症反应的信号转导中发挥重要作用。将这些活性成分与关键靶点进行分子对接, 配体和蛋白之间的结合情况用 docking score 表示 (图 5A、

B)。分子对接结果揭示了黄芩素、木犀草素、芒柄花黄素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素和毛蕊异黄酮可能为 BHD 通过调控炎症发挥抗 IS 的重要活性成分。

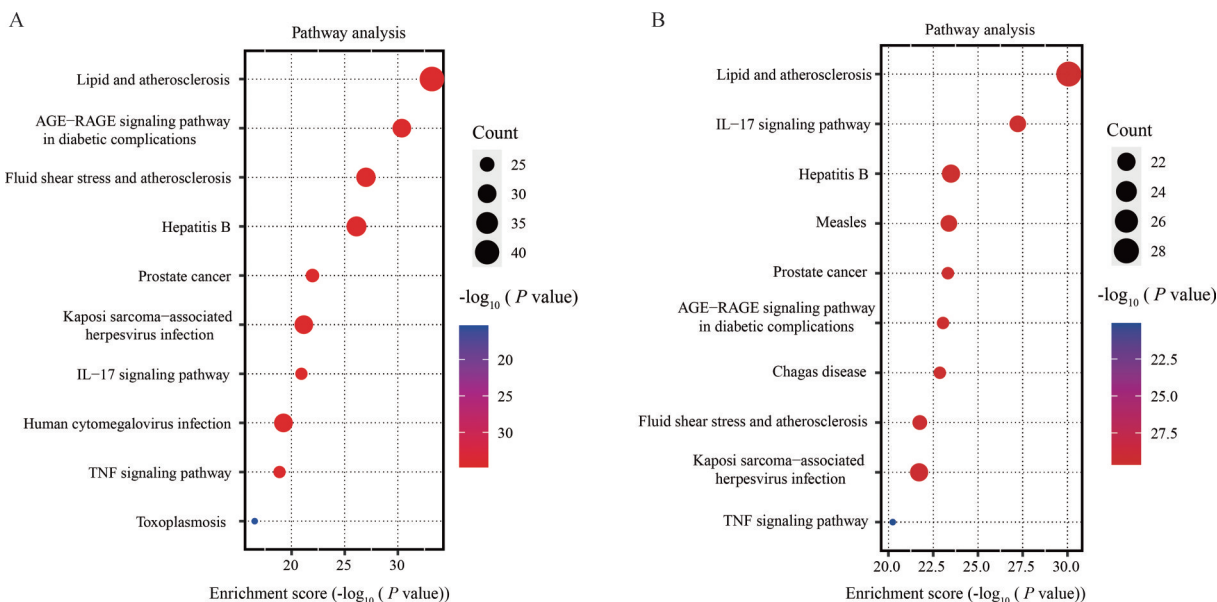
#### 5 BHD 关键成分活性研究与含量测定

结合机器学习和网络药理学分析, 从补阳还五汤中筛选得到发挥药效的 7 种关键活性成分, 并采用 LPS 诱导的 BV-2 细胞对成分的抗炎活性进行评估。结果显示, 黄芩素、木犀草素和芒柄花黄素在不影响细胞活性的情况下, 能够以浓度依赖性方式显著抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞中的 NO 释放 ( $P < 0.05$ , 图 6A~F)。相反, 槲皮素、山柰酚、异鼠李素和毛蕊异黄酮的抗炎活性较差, 并表现出较为明显的细胞毒性。

采用 LC-MS 测定以上化合物在补阳还五汤中的含量, 结果如表 1 所示, 在 7 个活性成分中只检测到芒柄花黄素在生药中的成分含量为  $2.51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 毛蕊异黄酮的含量为  $6.26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 结合抗炎活性实验结果分析得出芒柄花黄素可能具有潜在的抗 IS 药效。

#### 讨论

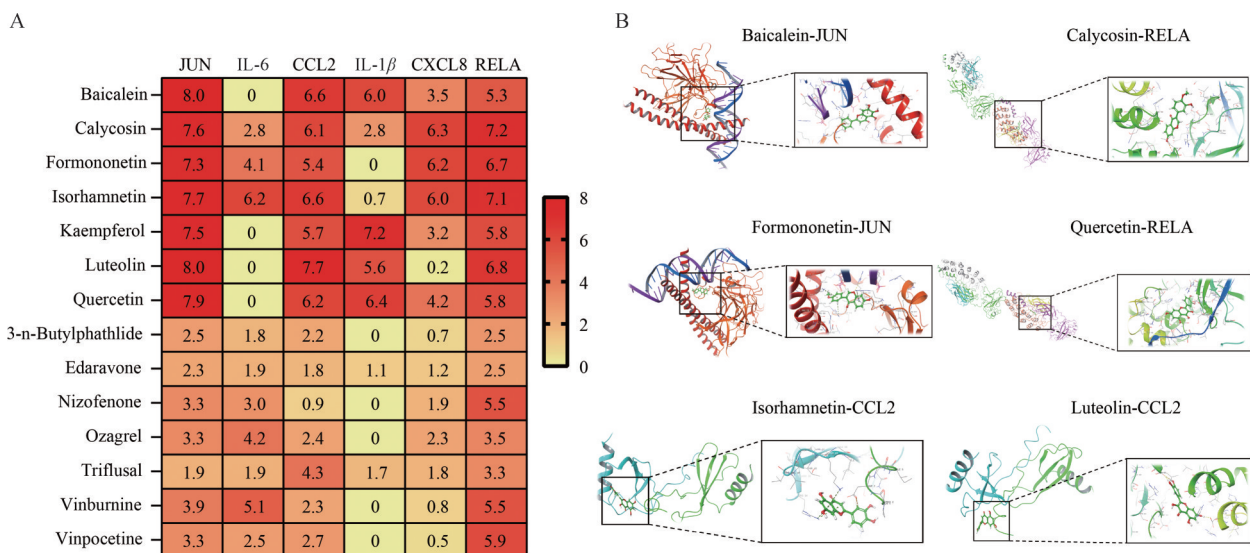
IS 作为全球范围内致死率和致残率较高的疾病, 长期以来引起了广泛的关注。尽管现代医学在卒中急性期治疗方面取得了一定进展, 但由于神经系统的复杂性和个体差异, 治疗效果仍然有限<sup>[22-24]</sup>。特别是缺



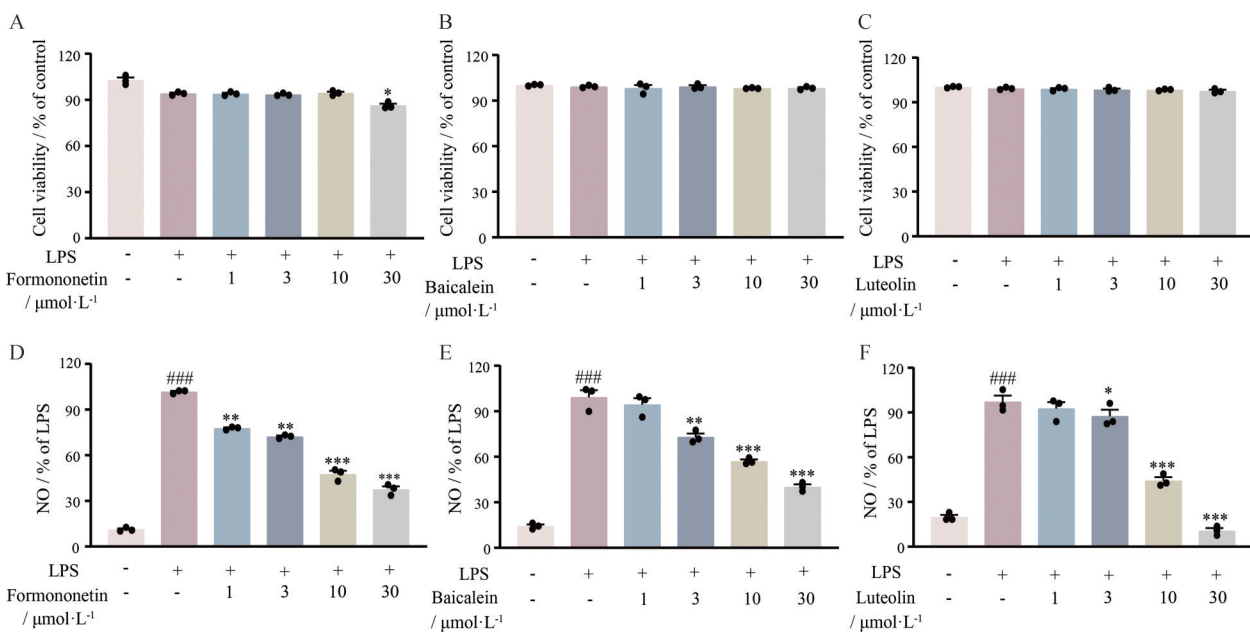
**Figure 4** Network pharmacology analysis by BHD compounds for the treatment of cerebral IS. A: The top 10 significantly enriched terms of the hub genes in KEGG pathways; B: The top 10 significantly enriched terms of MCODE cluster1 in KEGG pathways

**Table 1** The contents of the components in BHD

Component	Peak area of chemical reference substances ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Peak area of BHD ( $50 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentration of the substance/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Ingredient content in herbal medicine/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Formononetin	30 387	1 527	0.13	2.51
Calycosin	14 929	1 869	0.31	6.26



**Figure 5** Molecular docking analysis by BHD compounds and FDA approved drugs for the treatment of IS. A: Molecular docking score heatmap of BHD compounds and FDA-approved drugs with core targets; B: Molecular docking diagram of BHD compounds and core targets



**Figure 6** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of predicted active ingredients. The effect of compound formononetin (A, D), baicalein (B, E) and luteolin (C, F) on the rate of cell viability and NO release in the LPS-induced BV-2 cell model was measured.  $n = 3, \bar{x} \pm SEM$ .  $###P < 0.001$  vs control group;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs LPS group. LPS: Lipopolysaccharide

血后再灌注损伤以及炎症反应的调控仍是当前研究的热点<sup>[25,26]</sup>。随着神经保护机制的深入探讨,探索新的治疗靶点和药物组合成为亟待解决的问题<sup>[27]</sup>。

补阳还五汤是中医治疗IS的著名方剂,其药效在临床上已得到广泛应用和验证。本研究通过MCAO/R大鼠模型验证了其在改善神经功能、减少脑梗死体积及脑含水量方面的效果,实验结果表明其能够显著提高神经功能评分、延长转棒停留时间,并呈现良好的剂量依赖性。然而,补阳还五汤的成分复杂,其发挥药效

的物质基础尚不完全清楚。本研究采用了多种无监督聚类算法,结合网络药理学分析,筛选出BHD中抗IS的关键活性成分。通过对多种数据进行整合,最终确定了黄芩素、芒柄花黄素等7种成分为可能的活性成分,并进一步验证了其在调控神经炎症中的重要作用。通过LC-MS对BHD的这7种成分进行定量分析,测定芒柄花黄素和毛蕊异黄酮的含量,表明这两种化合物可能是发挥抗IS的主要成分。然而,未能测定其余5种成分的含量,这一现象可能与多种因素相关,如不同

批次的BHD制备可能导致成分浓度的波动,或者某些成分在LC-MS分析中可能未达到可检测的浓度阈值。此外,已有文献<sup>[28-30]</sup>报道了这些未检测到的成分在BHD中的存在,进一步验证了它们的潜在活性与药理作用。因此,尽管在本实验中未能完全检测到所有活性成分,但根据现有的文献和对BHD成分的深入了解,仍然可以推测这些成分在BHD的抗IS效果中起到关键作用。进一步研究可以在优化样品提取和分析方法的基础上,验证这些成分的含量及其药理作用<sup>[8,31-35]</sup>。

机器学习作为一种强大的数据分析工具,已逐渐在药物研究领域展现出跨学科的优势<sup>[36,37]</sup>。首先,机器学习在药物活性成分的筛选和优化中发挥着重要作用<sup>[38,39]</sup>。通过无监督学习算法,研究者能够从海量的中药化学成分数据库中识别出潜在的活性分子。如通过聚类分析和网络药理学的方法,可以从复杂的中药配方中筛选出对特定疾病有治疗潜力的有效成分。其次,机器学习在中药靶点预测方面也取得了显著进展。通过构建中药-成分-靶点的多层异构网络,并利用深度神经网络分析中药成分与靶点之间的相互作用,研究者能够更准确地预测中药的药理作用机制,这种方法有助于发现新的药物作用途径和治疗靶点。此外,机器学习在中药的剂量预测和个体化治疗中也展现出巨大潜力,通过分析患者的遗传信息、生理参数和药物反应数据,机器学习模型能够为每个患者提供定制化的药物剂量方案,从而提高治疗效果并减少不良反应<sup>[40]</sup>。

本研究采用无监督聚类算法,并结合网络药理学手段,初步从补阳还五汤中筛选出黄芩素、芒柄花黄素等7种潜在的抗IS活性成分。为了实证这些预测,建立了LPS诱导BV-2细胞模型,对这些成分的抗炎活性和含量进行评估,从而在实验层面验证分析结果。这一研究方法为揭示中药复方的药效物质基础提供了新的工具和思路,展现了机器学习技术在复杂药物成分解析中的独特价值。

**作者贡献:** 王丰和孟庆琦负责实验实施、数据分析和撰写论文;刘晴负责实验研究、数据分析;孙璐、刘影负责LC-MS检测;米妍和穆丹阳负责动物实验;侯悦和何大阔负责实验设计与论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Marto JP, Strambo D, Livio F, et al. Drugs associated with ischemic stroke a review for clinicians [J]. *Stroke*, 2021, 52: E646-E659.
- [2] Li XH, Yin FT, Zhou XH, et al. The signaling pathways and targets of natural compounds from traditional Chinese medicine in treating ischemic stroke [J]. *Molecules*, 2022, 27: 3099.
- [3] Mo JY, Liao WG, Du JY, et al. Buyang Huanwu Decoction improves synaptic plasticity of ischemic stroke by regulating the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118636.
- [4] She Y, Shao L, Jiao KY, et al. Glycosides of Buyang Huanwu Decoction inhibits pyroptosis associated with cerebral ischemia-reperfusion through Nrf2-mediated antioxidant signaling pathway both *in vivo* and *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155001.
- [5] Wang RQ, Ren JH, Li SY, et al. Efficacy evaluation of Buyang Huanwu Decoction in the treatment of ischemic stroke in the recovery period: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 975816.
- [6] Chen HY, He Y. Machine learning approaches in traditional Chinese medicine: a systematic review [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50: 91-131.
- [7] Pan DP, Guo YL, Fan YF, et al. Development and application of traditional Chinese medicine using AI machine learning and deep learning strategies [J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52: 605-623.
- [8] Eckhardt CM, Madjarova SJ, Williams RJ, et al. Unsupervised machine learning methods and emerging applications in healthcare [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2023, 31: 376-381.
- [9] Zhang Y, Yan H, Liang Y. Effects of Buyang Huanwu Decoction on cognitive function in rats with ischemic stroke [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2023, 45: 1309-1314.
- [10] Li MC, Li MZ, Lin ZY, et al. Buyang Huanwu Decoction promotes neurovascular remodeling by modulating astrocyte and microglia polarization in ischemic stroke rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323: 117620.
- [11] Xiao J, Cai T, Fang YJ, et al. Activation of GPR40 attenuates neuroinflammation and improves neurological function *via* PAK4/CREB/KDM6B pathway in an experimental GMH rat model [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18: 160.
- [12] Chen XR, Pan ZG, Fang ZN, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis by inducing autophagy through the upregulation of SIRT1-mediated deacetylation of Beclin-1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15: 310.
- [13] Guo Y, Mao MJ, Li QY, et al. Extracts of Ginkgo flavonoids and ginkgolides improve cerebral ischaemia-reperfusion injury through the PI3K/Akt/Nrf2 signalling pathway and multicomponent *in vivo* processes [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154028.
- [14] Wakulik K, Wiatrak B, Szczukowski L, et al. Effect of novel pyrrolo 3, 4-*d* pyridazinone derivatives on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2575.
- [15] Xu J, Zhang Y, Xiao Y, et al. Inhibition of 12/15-lipoxygenase by baicalein induces microglia PPAR $\beta/\delta$ : a potential therapeutic role for CNS autoimmune disease [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e569.

- [16] Kim SY, Jin CY, Kim CH, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- $\kappa$ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43: 682-692.
- [17] Cho N, Choi JH, Yang H, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1940-1945.
- [18] Yan JJ, Du GH, Qin XM, et al. Baicalein attenuates the neuroinflammation in LPS-activated BV-2 microglial cells through suppression of pro-inflammatory cytokines, COX2/NF- $\kappa$ B expressions and regulation of metabolic abnormality [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106092.
- [19] Kim JS, Lee HJ, Lee MH, et al. Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells [J]. *Planta Med*, 2006, 72: 65-68.
- [20] Park SE, Sapkota K, Kim S, et al. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164: 1008-1025.
- [21] Yu YX, Li YP, Gao F, et al. Vitamin K2 suppresses rotenone-induced microglial activation *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37: 1178-1189.
- [22] Mosneag IE, Flaherty SM, Wykes RC, et al. Stroke and translational research-review of experimental models with a focus on awake ischaemic induction and anaesthesia [J]. *Neuroscience*, 2024, 550: 89-101.
- [23] Viven D. New opportunities for diagnosis and prognosis of stroke: the benefits of across border approaches [J]. *Hamostaseologie*, 2021, 41: 22-24.
- [24] Zhang MZ, Wang K, Xue CR, et al. Preclinical studies on neural stem/progenitor cell therapy for ischemic stroke: a systematic review [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2023, 18: 380-390.
- [25] Gao J, Liu JF, Li YH, et al. Targeting p53 for neuroinflammation: new therapeutic strategies in ischemic stroke [J]. *J Neurosci Res*, 2023, 101: 1393-1408.
- [26] Wang HQ, Zhang SY, Xie LL, et al. Neuroinflammation and peripheral immunity: focus on ischemic stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110332.
- [27] Cheng CC, Liang YJ, Li X, et al. New advances in stroke therapy targeting the CREB signaling pathway and the potential for herbal interventions [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 1538-1545.
- [28] Zhang GY, Han Xin, Xu T, et al. Buyang Huanwu Decoction suppresses cardiac inflammation and fibrosis in mice after myocardial infarction through inhibition of the TLR4 signalling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 320: 117388.
- [29] Cao Y, Yao WM, Yang T, et al. Elucidating the mechanisms of Buyang Huanwu Decoction in treating chronic cerebral ischemia: a combined approach using network pharmacology, molecular docking, and *in vivo* validation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155820.
- [30] Zhen LY, Wang HF, Lu YH, et al. Rapid identification and quantitative determination of chemical compositions in Buyang Huanwu Decoction based on HPLC-Q-exactive mass spectrometry [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci) (浙江大学学报(医学版))*, 2022, 51: 534-543.
- [31] Zhang SS, Liu M, Liu DN, et al. Network pharmacology analysis and experimental validation of kaempferol in the treatment of ischemic stroke by inhibiting apoptosis and regulating neuroinflammation involving neutrophils [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 12694.
- [32] Zhao JJ, Song JQ, Pan SY, et al. Treatment with isorhamnetin protects the brain against ischemic injury in mice [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41: 1939-1948.
- [33] Luo J, Cai YD, Wei DL, et al. Formononetin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by targeting the PARP-1/PARG/Iduna signaling pathway [J]. *Brain Res*, 2024, 1829: 148845.
- [34] Li M, Meng ZL, Yu SC, et al. Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis *via* regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110137.
- [35] Liu H, Zhao ZB, Yan MY, et al. Calycosin decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing ACSL4-dependent ferroptosis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 734: 109488.
- [36] Gaudelot T, Day B, Jamasb AR, et al. Utilizing graph machine learning within drug discovery and development [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: bbab159.
- [37] Yang F, Zhang Q, Ji XK, et al. Machine learning applications in drug repurposing [J]. *Interdiscip Sci*, 2022, 14: 15-21.
- [38] Li W, Yang JC, Huang N. Deep learning in drug design and discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 761-767.
- [39] Li ZY, Cong KY, Wu SQ, et al. Advances of artificial intelligence technology in the discovery and optimization of lead compounds [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2443-2453.
- [40] Tang YQ, Li ZC, Yang DD, et al. Research of insomnia on traditional Chinese medicine diagnosis and treatment based on machine learning [J]. *Chin Med*, 2021, 16: 2.