

益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的网络药理学机制研究

苏丞^{1,2}, 李国铭², 刘文琛², 程晓², 孙景波^{2,3}, 黄燕^{2,3} (1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120; 2. 广东省中医院脑病中心, 广东 广州 510120; 3. 广东省中医急症研究重点实验室, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 运用网络药理学方法探究益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中(Cerebral ischemic stroke, CIS)的潜在效应机制。**方法** 从中药系统药理学分析平台(TCMSP)及网络药理学分析平台(BATMAN-TCM)数据库中获取益脑康胶囊的化学成分和靶点, 通过人类基因数据库(GeneCards)获取缺血性脑卒中的治疗靶点, 并利用 R 语言筛选共同靶点; 使用 Cytoscape 软件构建“药物有效活性成分-疾病靶点”可视化调控网络图, 利用 STRING 数据库构建蛋白互作网络图(PPI), 然后运行 R 语言对 PPI 进行核心蛋白的筛选; 最后, 通过 R 语言对共同靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果** 共筛选出益脑康胶囊 36 种类药成分及 541 个潜在靶点, 缺血性脑卒中相关靶点 1 826 个, 药物-疾病共同靶点 245 个, GO 功能富集分析涉及 3 052 条生物过程, 影响对氧化应激的反应、活性氧代谢过程、循环系统血管功能、对细菌源分子的反应、对脂多糖的反应等过程; KEGG 通路富集分析得出 170 条通路, 涵盖了 PI3K-Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路等重要通路。**结论** 益脑康胶囊可能主要通过调节氧化应激、调控细胞功能、改善血管内皮功能来发挥对缺血性脑卒中的治疗作用。

关键词: 益脑康胶囊; 缺血性脑卒中; 网络药理学; 靶点; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0675-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.012

A Network Pharmacology Approach to Explore Mechanisms of Yinaokang Capsule for Treatment of Ischemic Stroke

SU Cheng^{1,2}, LI Guoming², LIU Wenchen², CHENG Xiao², SUN Jingbo^{2,3}, HUANG Yan^{2,3} (1. The Second School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 2. Encephalopathy Center of Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research on Emergency in TCM, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the potential mechanism of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke using a network pharmacology approach. **Methods** Based on the TCMSP database and network pharmacology analysis platform(BATMAN-TCM), the effective active components and targets of Yinaokang capsule were extracted, and the targets of cerebral ischemic stroke were obtained through the human gene database (GeneCards), and then the common targets were screened by R language. Cytoscape software was engaged to construct a visual regulatory network map of “drug- active ingredient- disease- target”, and a protein- protein interaction

收稿日期: 2020-09-10

作者简介: 苏丞, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 脑病的中医临床研究。Email: sucheng0119@163.com。通信作者: 黄燕, 女, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治脑病的临床与基础研究工作。Email: gdszyhy@163.com。

基金项目: 十三五国家重点研发计划资助项目(2018YFC1705002); 广东省中医院中医药科学技术研究专项课题(YN2018ZD04); 广东省中医药局科研项目(20202069); 国家重点研发计划“中医药现代化研究”专项: 益气活血类方治疗脑梗死的临床辨证循证优化研究(2019YFC1708601)。

network map(PPI) was constructed by using the STRING database. Then the R language was used to screen the core protein of the PPI. Finally, the R language was used to conduct functional gene ontology(GO) enrichment analysis and common enrichment analysis of the Kyoto Gene and Genomic Encyclopedia(KEGG) pathways for common targets. By using network analysis, 36 potential bioactive compounds and 541 targets in *Yinaokang* capsule and 1 826 cerebral ischemic stroke related targets were identified, resulted in 245 common targets of *Yinaokang* capsule and ischemic stroke. GO terms were distributed as to 3 052 biological processes. The potential mechanism of biological processes and molecular function was related to response to oxidative stress, response to molecule of bacterial origin, response to lipopolysaccharide, reactive oxygen species metabolic process, vascular process in circulatory system and so on. 170 signaling pathways were obtained by KEGG enrichment analysis. The core pathways of key targets involved in PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, Fluid shear stress and atherosclerosis and so on. **Conclusion** The results of bioinformatics analysis of big data showed that *Yinaokang* capsule could play an important role in the treatment of ischemic stroke mainly through regulating oxidative stress, cell function, and improving vascular endothelial function.

Keywords: *Yinaokang* capsule; cerebral ischemic stroke; network pharmacology; targets; mechanism

脑梗死又称缺血性脑卒中,是导致世界范围内死亡和残疾的主要原因,属于中医中风范畴,其发病常与风、火、痰、虚、瘀等因素相关,约占全部脑卒中的 60%~80%^[1]。现代医学认为脑梗死是由脑部血液供应障碍和缺血缺氧引起的,缺血缺氧会导致脑组织坏死、软化、炎症发生^[2],进而引发局灶或完全神经功能缺损。脑梗死具有发病急骤,致死、致残率高等特点,治疗及中风后护理的经济成本非常巨大,中风的负担仍然很高^[3]。

益脑康胶囊是广东省中医院刘茂才教授在中医辨证论治理论的指导下,结合自身治疗中风病多年的基础上总结的经验方,主要成分为天麻、川芎、制南星、黄芪、半夏、水蛭等,可补脾益气、平肝息风、活血化瘀、燥湿化痰祛风。药物选择切中缺血性中风阴类证辨证,具有益气醒神、破瘀涤痰的功效,是国家科技部十五攻关课题“急性缺血中风辨证规范与疗效评价的示范研究”中医综合方案中所选用的广东省中医院脑病中心常用的中成药。临床研究^[4]表明,含有脑脉一号(益脑康胶囊的商品名)的中西医结合综合治疗方案可改善神经功能缺损,有提高患者生存质量的趋势,在改善急性缺血性中风患者症状和体征等不适方面,也显示了中医药的优势。

中药复方具有多成分、多靶点、多通路和较高的整体性和系统性的作用特性,在干预具有多细胞、多因子共同参与调控的复杂病理生理过程方面具有独特的优势^[5]。虽然前期研究^[4]已经证实益脑康胶囊

对治疗缺血性脑卒中具有良好的疗效,但仍缺乏全面系统的挖掘和探讨。网络药理学通过计算机技术,比较系统全面地观察药物与疾病之间潜在的关系并进行可视化分析,有助于揭示中药复方的科学内涵,发现药物靶标,传承和发展中医药理论^[6];通过运用系统生物学的思维方法,多层次的研究构建,适合对中药复方的特点进行研究^[7-8]。综上,本研究运用网络药理学方法,进一步系统地阐述益脑康胶囊的作用机制,以期临床及基础研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 成分靶点信息的查询 在 TCMSP 数据库(<https://tcmispw.com/tcmisp.php>)中检索半夏、川芎、黄芪、制南星的成分和靶点,成分的筛选条件设置为口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18。水蛭和天麻由于 TCMSP 数据库未收录,二者的化学成分从 Batman 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)获得,将这两味中药的化学成分返回 TCMSP 数据库检索其 ADME 参数,按照成分筛选条件进行纳入,并进一步通过 Batman 数据库和 Swisstargets 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)获得其成分靶点。其中 Batman 选取分值大于 20 分的靶点纳入,Swisstargets 数据库选取 Probability 大于 0 的靶点纳入。

1.2 疾病靶点的查找并筛选共同靶点 以“Ischemic stroke”为关键词,在 GeneCards (<https://www.geneCards.com/>)

genecards.org/), NCBI 基因数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行人类基因检索。其中 GeneCards 的数据将 Relevance score 进行中位数的筛选,大于中位数的靶点被纳入,以获得更具有相关性的疾病靶点。将筛选出的药物靶点与疾病靶点输入韦恩图制作软件 Venny 2.1,筛选共同靶点。

1.3 蛋白互作网络(PPI)的构建与分析 将上述共有靶点输入 String 数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)来创建 PPI 网络,选择“Homo sapiens”为生物种类,选择“highest confidence”(> 0.9)为最小互相作用阈值,其余设置均为默认设置,制作 PPI 网络。将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.6.0 中,根据 NetworkAnalyzer 的专用工具进行拓扑分析,并将度、中间中心性、平均最短路径长度和紧密中心性这 4 个主要参数用作参考规格。根据程度排列,选择得分超过平均值的基因作为重要目标。

1.4 构建可视化调控网络图 通过 MCODE 分析进行关键基因的筛选。将已经构建好的 PPI 网络导入 Cytoscape 3.6.0 中,在 Cytoscape 3.6.0 中,打开 MCODE 控制模块以分析基因簇并选择其主要靶标。然后使用 Cytoscape 3.6.0 软件建立“药物-活性成分-靶点-疾病”的数据可视化控制网络图。根据度值(Degree 值)分析,得出作用靶点最多的有效活性成分。

1.5 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析 将上述共有靶点的 GO 的生物过程(BP),分子功能(MF)和细胞成分(CC)的富集结果进行汇总,然后将其引入 String 数据库中进行查询,并选择校正 P 值 ≤ 0.05 ,选择安装并引入了 clusterProfiler, richplot 和 ggplot2 软件包的 R 3.6.3 软件,进行柱形图绘制。对现有药物疾病目标进行 KEGG 通道聚集分析,引入 String 数据库查询,选择校正 P 值 ≤ 0.05 的新项目,应用 R 3.6.3,安装并引入 clusterProfiler 软件包,绘制柱状图。

2 结果

2.1 益脑康胶囊有效活性成分及作用靶点的筛选

对益脑康胶囊中 4 味中药进行 TCMSP 数据库的检索,选择 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 筛选有效成分,获得(含重复)有效活性成分:半夏 13 个、川芎 7 个、黄芪 20 个、制南星 7 个。通过 BATMAN-TCM 数据库,以“Score cutoff”值 ≥ 20 为参数,获取水蛭和天麻的化学成分及作用靶标信息,结果为天麻 3 个、水蛭 1 个。删除重复的数据信息后,总共获得了 36 个有效的活性成分,并且有效的活性部分对应 541 个靶点。

2.2 缺血性脑卒中的疾病靶点及共同靶点的筛选 通过检索,在 GeneCards 数据库得到 1 674 条相关基因,在 NCBI 数据库得到 598 个基因,之后把 2 个数据库的基因合并和去除重复后,得到 1 826 个缺血性脑卒中的相关基因。利用韦恩图软件 Venny 2.1 将药物靶点与疾病靶点融合,得到 245 个共有靶点,作为药物作用于疾病的预测靶点进行下面的通路富集分析,见图 1。

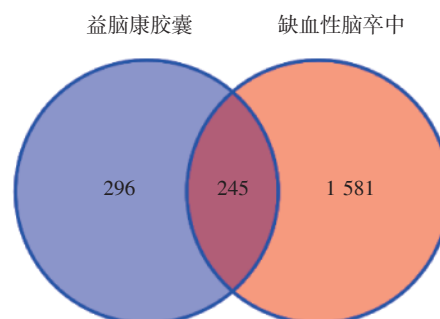


图 1 缺血性脑卒中与益脑康胶囊的靶点韦恩图

Figure 1 Venn's diagram of ischemic stroke targets and Yinao-kang capsule target

2.3 PPI 的构建及核心蛋白的筛选 将药物和疾病的共同靶点导入到 STRING 数据库中进行 PPI 构建,如图 2 所示。网络图中的最小互助得分为 > 0.9,网络具有 245 个节点,1 011 个边,平均度为 8.25。其中节点表示蛋白质,而边表示每种蛋白质之间的相互影响。使用 R 语言解析下载的 tsv 文件,共获得 ITGB3、ITGB1、ESR1、FOS、BDKRB2、MAPK8、EGF、IL-6、CXCL8、HSP90AA1 等核心蛋白。

2.4 拓扑分析及 MCODE 聚类分析 将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.6.0 中,根据 NetworkAnalyzer 的专用工具进行拓扑分析,并将度、中间中心性、平均最短路径长度和紧密中心性这 4 个主要参数用作参考规格。根据程度排列,选择得分超过平均值的基因作为重要目标。使用 R 3.6.3 绘制总共筛选出 85 个关键靶点的前 20 个靶点,横坐标为每个靶点的度值,见图 3。STAT3、PIK3CA、AKT1、MAPK1 及 MAPK3 等均是益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的关键靶点。本研究通过 MCODE 分析进行关键基因的筛选。将已经构建的 PPI 网络导入 Cytoscape 3.6.0,然后打开 MCODE 控制模块以分析基因簇并选择其关键靶点(图 4)。总共获得了 9 个基因簇和 7 个关键基因(PLAU、IL-13、PDGFRA、PTGS1、TRPM8、CHRM2、TAAR1)。

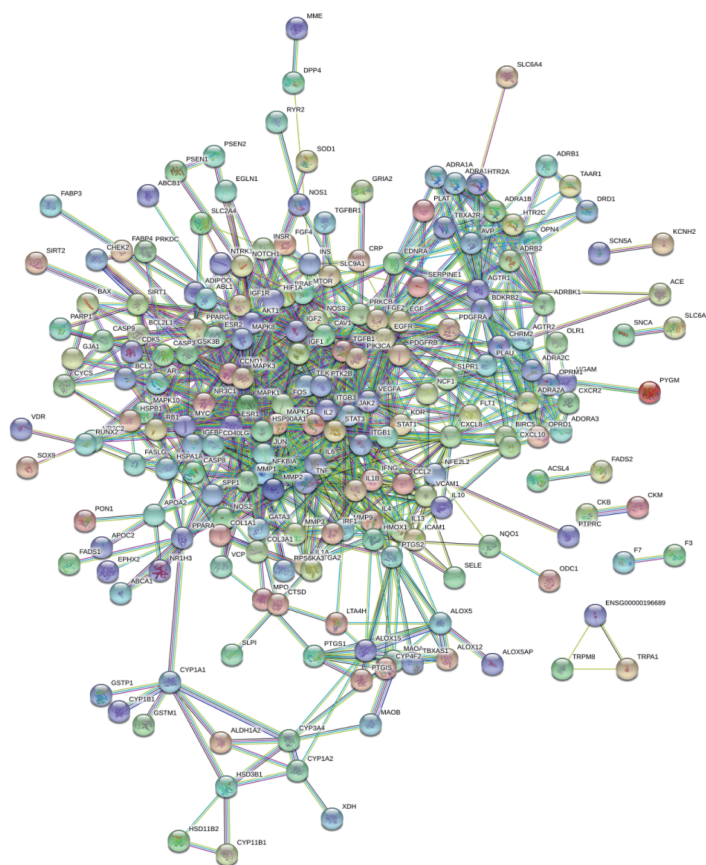


图2 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的蛋白互作网络(PPI)图
Figure 2 PPI network of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke

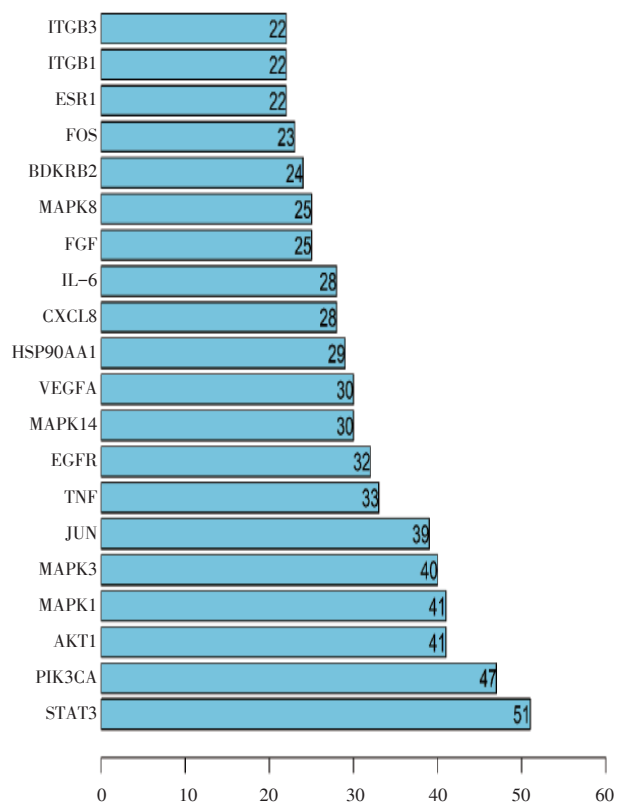
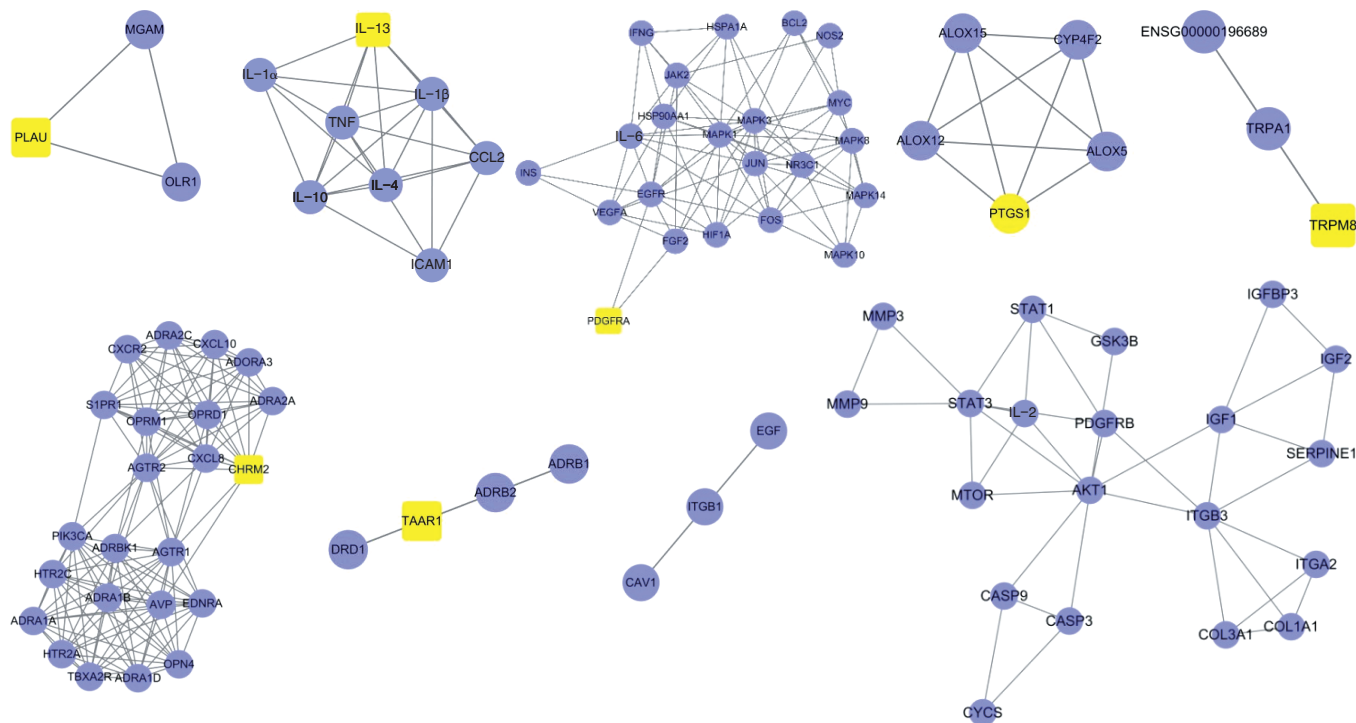


图3 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中中度值(Degree)排名前20位的靶点柱状图
Figure 3 Bar chart of top 20 targets of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke



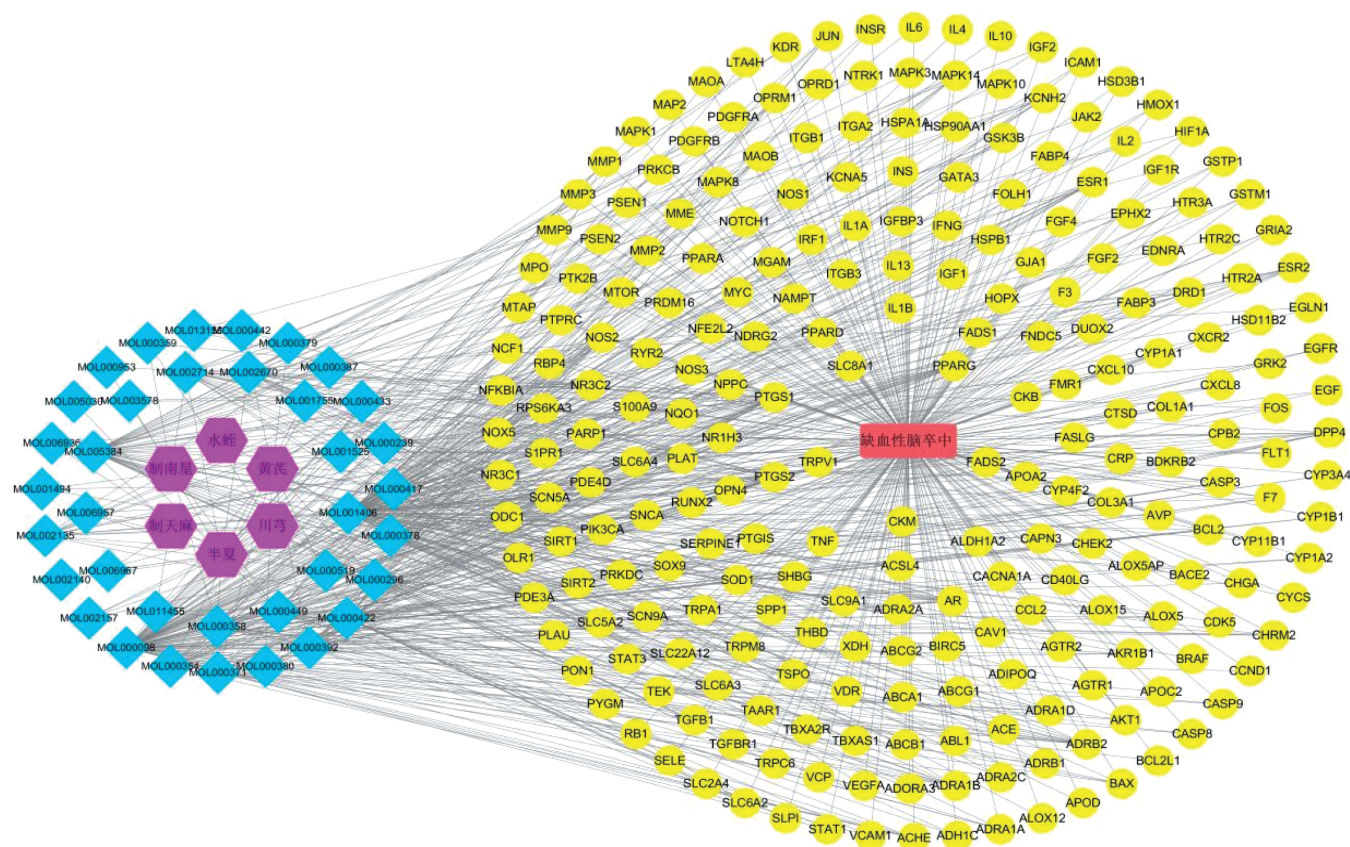
注: 蓝色为主要成分, 黄色为7个关键基因

图4 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的核心团簇网络

Figure 4 Network of core cluster of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke

2.5 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络的构建 为了更好、更深入地了解中药材、成分、疾病及其相对靶标之间的复杂相互作用，本课题组基于列出的匹配中药材、成分、疾病的治疗及其功效靶标建立了相关数据导入到 Cytoscape 3.6.0 中，绘制了“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图。将成分进行度值

排序，度值越大说明成分越重要，见图 5。活性成分度值最高的活性成分是西红花酸(MOL001406)、槲皮素(MOL000098)、苏齐内酯(MOL005384)、山奈酚(MOL000422)、7-O-甲基异丁香酚(7-O-methylisomucronulatol)(MOL000378)等。



注：网络中紫色为中药，蓝色为主要成分，红色为疾病即缺血性脑卒中，黄色为药物作用于疾病的靶点

图 5 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的“药物-活性成分-靶点-疾病”可视化调控网络图

Figure 5 Visual regulatory network of active ingredient-target interaction of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke

2.6 GO 功能富集分析 现有的药物疾病靶点用于执行 GO 的生物过程、分子功能和细胞功能，并存储到 String 数据库信息数据库中，选择标定 P 值 ≤ 0.05 的新项目，共有 3 052 生物过程，221 个与分子功能有关，而 118 个与细胞功能有关。使用 R 3.6.3 软件，安装和导入 clusterProfiler、richplot、ggplot2 软件包及开始的条形图，如图 6 所示。图中的横坐标轴表示富集数，颜色表示显著性。 P 值越小，色调越红。相反， P 值越大，色调越蓝。重要靶标的基因功能聚集数据表明，重要靶标在生物作用的整个过程中明显聚集，包括对氧化应激的反应、活性氧代谢过程、循环系统血管功能、对细菌源分子的反应、对脂多糖的反应、细胞对化学应激的反应、对氧水平

的反应、管径直径调节、血管直径调节、管径大小调节。在分子功能方面，包括受体配体活性、信号受体激活器活性、细胞因子活性、血红素结合、四吡咯结合、类固醇结合、氧化还原酶活性作用于成对的供体上并结合或还原分子氧、蛋白酶结合、G 蛋白偶联胺受体活性等。在细胞组分层面，则包括膜筏、膜微结构域、膜区、神经元细胞体、膜小凹、质膜筏、细胞的焦点黏连、细胞基质结、突触前膜整体成分、肌纤维膜等。

2.7 KEGG 通路富集分析 对现有的药物疾病靶点进行 KEGG 富集分析，引入 String 数据库查询，选择校正 P 值 ≤ 0.05 的项目，共收集到 170 条通路。使用 R 3.6.3，安装并引用 clusterProfiler 包后，进行柱状

图绘制, 见图 7。益脑康胶囊治疗脑梗死的机制主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE

信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、在癌症中的蛋白聚糖、乙型肝炎、人巨细胞病毒感染、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染等。

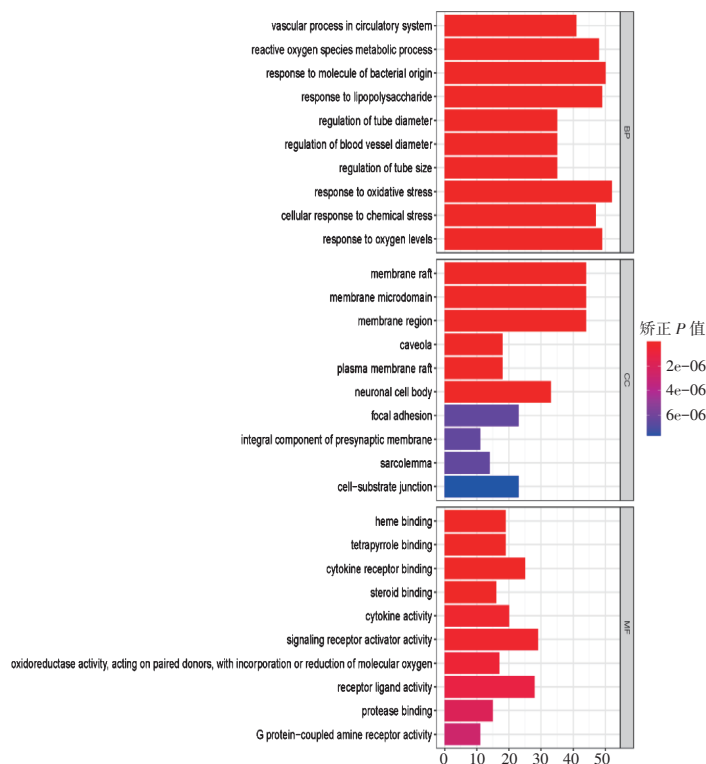


图 6 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的药物-疾病共同靶点的 GO 功能富集分析

Figure 6 GO function enrichment analysis of common targets of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke

3 讨论

中药对疾病的治疗具有多靶点、多方位的优势^[9]。本课题组前期相关试验及临床研究^[10-15]表明, 益脑康有上调急性缺血性中风大鼠脑组织 VEGF 的表达, 促进缺血区及缺血半暗带毛细血管的再生和侧枝循环建立的功能, 可提高血清 NO 含量, 降低 VEGF、PDGF-BB 含量, 以修复损伤的内皮细胞, 纠正内皮功能紊乱, 抑制新生血管生成和炎性浸润, 缓解或逆转动脉粥样硬化; 并减轻脑组织缺血缺氧性损害, 缩小梗死面积和改善脑水肿; 其具有降脂作用以外的血管内皮保护、抗动脉粥样硬化、抑制血栓形成作用; 同时可上调 ZO-1 蛋白的表达, 减轻溶栓后血脑屏障破坏。本实验筛选了益脑康胶囊的成分、药物疾病的共同靶标和 PPI 上的重要靶标, 并对它们进行了基因功能注释和通路分析。几个集成了外部数据库查询和电子计算机物理模型的大数据平台被用来分析获得的结果, 并解释分离的核心团

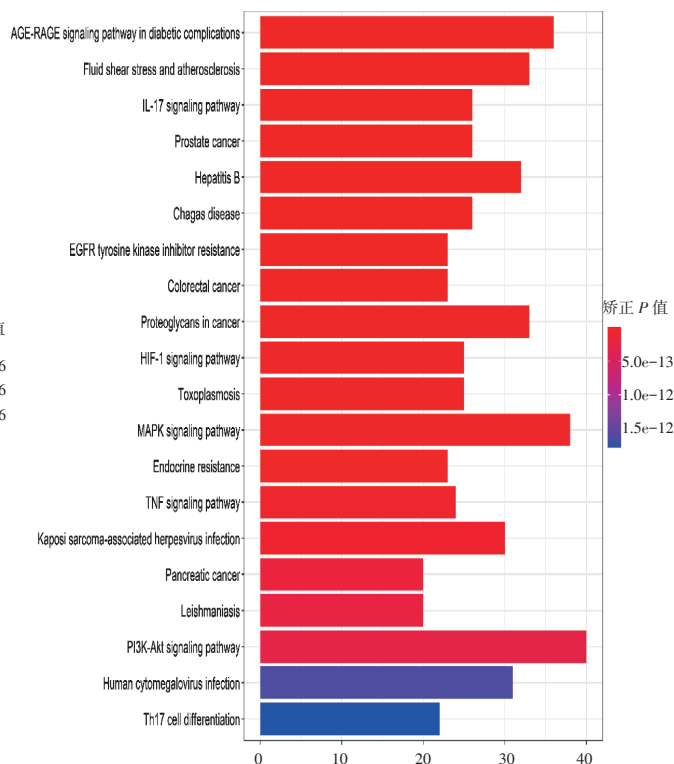


图 7 益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的 KEGG 通路富集分析图

Figure 7 KEGG pathway enrichment analysis of Yinaokang capsule in the treatment of cerebral ischemic stroke

簇。数据分析是从总体目标靶点和团簇的两个层次上进行的, 进一步解释了益脑康胶囊治疗脑缺血性中风的机制。

Cytoscape 度值分析可知, 活性成分度值最高的活性成分是西红花酸、槲皮素、苏齐内酯、山柰酚、7-O-甲基异丁香酚(7-O-methylisomucronulatol)等。文献报道西红花酸可以降低大鼠脑缺血再灌注脑梗死体积, 改善神经功能, 减少脑组织中 MDA 和 NO 的含量, 增强脑组织 SOD 活性^[16-19], 对脑缺血再灌注损伤有保护作用^[20]。此外, 西红花酸可促进肝细胞损伤的自噬、减少肝细胞进一步损伤^[21], 降低血中炎症因子水平, 抑制肝组织 caspase-8、caspase-9、caspase-12 活性及 iNOS、NF-κB 基因表达^[22]。槲皮素能够抑制全脑缺血缺氧损伤后的氧化应激反应^[23], 降低梗死面积、炎症反应、氧化应激及凋亡细胞数量, 改善神经功能损伤^[24], 减轻血脑屏障损伤和脑水肿, 抑制 IL-1β、TNF-α、IL-6、IFN-γ 的表达, 减

少神经元细胞凋亡,减轻组织损伤^[25-27]。许多研究^[28-29]已经表明,山柰酚具有抗癌、抗糖尿病以及抗脑缺血等多种药理活性,这与针对岭南特点脑病运用调肝、补血、祛瘀等治疗脑卒中有相似之处。

拓扑分析和 PPI 网络图表明, STAT3、PIK3CA、AKT1、MAPK1 及 MAPK3 等均是益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的关键靶点。多项研究表明,脑部缺血性改变发生后,受损伤的脑组织释放大量的细胞因子及各种化学因子,它们通过共同的受体 gp130 激活 STAT3, STAT3 对缺血再灌注脑损伤后的血管再生至关重要,特别是在恢复过程中^[30-32]。在缺血缺氧致大脑小胶质细胞激活的过程中, JAK2/STAT3 信号通路起到了重要的作用;脑缺血程度、脑缺血 p-STAT3 表达所在的位置、蛋白激活的程度、脑缺血损伤再灌注阶段都与 STAT3 有关; STAT3 可以通过调节相关信号通路,使之表达,从而达到抑制神经细胞凋亡、保护脑组织的目的,对脑缺血再灌注患者的康复与预后具有重要的意义^[33-36]。

生物学过程、分子功能、细胞组分富集结果分析表明,益脑康胶囊治疗缺血性脑血管病可能与氧化应激的反应、活性氧代谢过程等有关。研究^[37]表明这些生物过程与神经系统的功能密切相关,参与了脑缺血的病理生理过程。脑缺血缺氧是脑梗死后造成神经功能障碍的主要原因之一,会导致局部组织坏死和神经元死亡。此外,KEGG 富集结果提示与益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中相关的有 PI3K-Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路,这些通路被显著性富集。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是一种胞内磷脂酰肌醇激酶。蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)又称 AKT,是一种胞内丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶。PI3K/AKT 通路激活能激活/抑制胞内各种蛋白磷酸化,调控神经细胞细胞存活/凋亡、自噬、神经发生及神经细胞增殖以及突触可塑性^[38]。目前许多相关研究表明,PI3K-Akt 信号通路的激活与抑制与神经系统疾病中脑梗死^[39]、阿尔茨海默症、神经系统肿瘤、帕金森等都有密切联系^[40-42],特别是对脑缺血再灌注后氧化应激、细胞凋亡、血管生成等多个生理病理过程^[43]及改善脑缺血再灌注损伤有积极意义^[44-45]。MAPK 通路是细胞增殖、应激、炎症、分化、功能同步化、转化、凋亡等信号转导通路的共同交汇通路之一,在真核生物机体内的信号传递网

络中扮演着“传递员”的角色^[46],此通路的级联反应对脑缺血后神经系统具有保护作用^[47-49]。岭南地区为多湿之地,久则伤脾,糖尿病患者居多,而 AGEs 多由于大分子物质(蛋白质、脂质或核酸等)在非酶催化条件下与还原性单糖反应所生成的一种稳定的终末产物,是糖尿病微血管病变的主要原因,其中 RAGE 信号通路扮演着重要角色^[50]。RAGE 广泛存在于人体各类细胞中,属于多配体受体,不仅参与内体炎症反应,还与糖尿病慢性并发症的发生、发展有关。AGE-RAGE(AGE 受体)相互作用对血管壁具有治疗作用以及内皮祖细胞在糖尿病性血管病变中具有修复作用^[51]。RAGE 与 AGE 结合后,激活相关信号反应,诱导发生氧化应激,产生自由基,导致氧化损伤、血管收缩和促凝血状态。AGE 增加促进白细胞与内皮细胞的黏附,阻塞毛细血管,并释放自由基及蛋白酶,损伤内皮细胞,提高血管的通透性,血液浓缩,同时也促进血小板聚集和纤维蛋白形成^[52]。以上研究初步体现了益脑康胶囊的氧化应激、细胞调节、血管内皮调节的相关性,但还需更加深入的研究。

综上所述,本研究基于网络药理学技术与方法分析了益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中的分子机制,筛选出益脑康胶囊的活性成分及潜在靶点,药物-疾病的共同靶点等。通过对这些靶点进行 GO 生物过程及 KEGG 信号通路的富集分析,初步预测到益脑康胶囊可通过调节 STAT3、PIK3CA、AKT1、MAPK1 及 MAPK3 等靶点,调控 PI3K-Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路等通路,以治疗缺血性脑卒中。本研究显示,益脑康胶囊对缺血性脑卒中不但具有既往研究中所表明的纠正内皮功能紊乱,减轻脑组织缺血缺氧性损害,改善脑水肿,减轻溶栓后血脑屏障破坏等作用,还可能具有调节氧化应激、调控细胞功能、改善血管内皮等作用,为进一步研究益脑康胶囊治疗缺血性脑卒中提供了思路。

参考文献:

- [1] WU S M, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18: 394-405.
- [2] SHI K, TIAN D C, LI Z G, et al. Global brain inflammation in stroke[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(11): 1058-1066.
- [3] GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national

- burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18: 439–458.
- [4] GUO J W, CHEN C, HUANG Y, et al. Combinatorial effects of naomai yihao capsules and vascular endothelial growth factor gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells on angiogenesis in cerebral ischemic tissues in rats[J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32: 87–92.
- [5] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2938–2942.
- [6] 陈娟, 顾俊菲, 汪春飞, 等. 组分结构中药与网络药理学: 病理机制网络的系统整体调控[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(4): 758–764.
- [7] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学—中药复方作用机制研究新视角[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(7): 2873–2876.
- [8] 潘家祐. 基于网络药理学的药物研发新模式[J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, 28(10): 721–726.
- [9] 蔡业峰, 付于, 郭建文, 等. 中医药治疗急性缺血性中风的多中心随机对照研究[J]. *中药材*, 2007, 30(9): 1192–1195.
- [10] 秦秀德, 朱磊, 黄燕, 等. 益脑康对动脉粥样硬化基础急性缺血性中风大鼠脑组织病理及脑组织血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国试验方剂学杂志*, 2010, 16(16): 166–169.
- [11] 朱磊, 张彦红, 时光, 等. 益脑康对动脉粥样硬化性急性缺血性大鼠血清NO、VEGF及PDGF-BB含量的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 8(27): 2048–2051.
- [12] 朱磊, 陈杰, 秦秀德, 等. 益脑康胶囊对AS性AIS大鼠血清中内皮损伤相关因子的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(4): 418–421.
- [13] 朱磊, 潘华峰, 张彦红, 等. 益脑康对动脉粥样硬化性急性缺血性大鼠组织中vWF、TM影响的研究[J]. *新中医*, 2012, 44(8): 156–158.
- [14] 李跃, 孙景波, 黄燕. 益脑康胶囊对脑梗死大鼠溶栓后血脑屏障的保护作用及对ZO-1蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11): 268–271.
- [15] 陈杰, 朱磊, 周喜燕, 等. 益脑康对动脉粥样硬化性缺血性中风大鼠脑组织MMP-9、TIMP-1活性的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 11(22): 2681–2682.
- [16] 何新康, 叶夷露, 潘蓓蓓, 等. 西红花素对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及神经行为学影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(3): 282–286.
- [17] OCHIAI T, OHNO S, SOEDA S, et al. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362(1): 61–64.
- [18] 谭安雄, 李小云. 西红花酸对大鼠脑缺血再灌注Caspase-3 mRNA和NF- κ B表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(1): 8–11.
- [19] 皋聪, 彭飞城, 钱之玉. 西红花酸对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14(4): 421–425.
- [20] 谭安雄, 朱耀斌, 王玉银. 西红花酸对大鼠脑缺血-再灌注氧自由基及一氧化氮的影响[J]. *医药导报*, 2011, 30(7): 846–848.
- [21] 郭宏兴, 高珂, 邹杏坚, 等. 西红花酸促进脂多糖和D-氨基半乳糖胺诱导的大鼠肝细胞损伤的自噬[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(9): 1121–1125.
- [22] 高珂, 郭宏兴, 刘亮明, 等. 西红花酸对百草枯中毒大鼠的肝保护效应[J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 10(5): 876–880.
- [23] DAI Y, ZHANG H, ZHANG J, et al. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF- κ B pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 284: 32–40.
- [24] GHOSH S, SARKAR S, CHOUDHURY S T, et al. Triphenyl phosphonium coated nano-quercetin for oral delivery: Neuroprotective effects in attenuating age related global moderate cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(8): 2439–2450.
- [25] WANG C P, SHI Y W, TANG M, et al. Isoquercetin ameliorates cerebral impairment in focal ischemia through anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects in primary culture of rat hippocampal neurons and hippocampal CA1 region of rats[J]. *MolNeurobiol*, 2017, 54(3): 2126–2142.
- [26] HAGHNEJAD A A, ORYAN S, BOHLOOLI S, et al. Alpha-tocopherol reduces brain edema and protects blood-brain barrier integrity following focal cerebral ischemia in rats[J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26(1): 17–22.
- [27] LI H Z, CHEN J F, LIU M, et al. Effect of hyperbaric oxygen on the permeability of the blood-brain barrier in rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1725–1730.
- [28] 张君, 程笑, 杨欢, 等. 山奈酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1): 39.
- [29] 向丽, 董志, 李然然, 等. 山奈酚对脑缺血再灌注大鼠神经元超微结构及TLR4/NF- κ B的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(10): 869.
- [30] TANG Y, TONG X, LI Y, et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the protective effects of epidermal growth factor receptor activation against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 662: 219–226.
- [31] CHEN D, WEI L, LIU Z R, et al. Pyruvate kinase M2 increases angiogenesis, neurogenesis, and functional recovery mediated by upregulation of STAT3 and focal adhesion kinase activities after ischemic stroke in adult mice[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 770–784.
- [32] ZHANG Y, LIU J, YANG B, et al. Ginkgo biloba extract inhibits astrocytic lipocalin-2 expression and alleviates neuroinflammatory injury via the JAK2/STAT3 pathway after ischemic brain stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 518.
- [33] TIAN Y S, ZHONG D, LIU Q Q, et al. Upregulation of miR-216a exerts neuroprotective effects against ischemic injury through negatively regulating JAK2/STAT3-involved apoptosis and inflammatory pathways[J]. *J Neurosurg*, 2018, 130(3): 977–988.
- [34] DING Y, QIAN J, LI H, et al. Effects of SC99 on cerebral ischemia-perfusion injury in rats: selective modulation of microglia

- polarization to M2 phenotype via inhibiting JAK2-STAT3 pathway[J]. *Neurosci Res*, 2019, 142 : 58-68.
- [35] WANG B, GUO H, LI X, et al. Adiponectin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial oxidative injury and apoptosis in hippocampal HT22 cells via the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(12): 1731-1743.
- [36] HOFFMANN C J, HARMS U, REX A, et al. Vascular signal transducer and activator of transcription-3 promotes angiogenesis and neuroplasticity long-term after stroke[J]. *Circulation*, 2015, 131(20) : 1772-1782.
- [37] LI P, ANNE R S, LEAK R K, et al. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: potential therapeutic targets to preserve the genome and improve stroke recovery[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 134: 208-207.
- [38] 吴登艳, 邓娅, 郝进, 等. PI3K-Akt/mTOR 信号通路介导黄芩苷抑制增生性瘢痕组织成纤维细胞的增殖[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(1): 60-67.
- [39] XU Z P, GAN G S, LIU Y M, et al. Adiponectin attenuates streptozotocin-induced Tau hyperphosphorylation and cognitive deficits by rescuing PI3K/Akt/GSK-3 β pathway[J]. *Neurochem Res*, 2017, 43 (2): 1-8.
- [40] ZOTT B, SIMON M M, HONG W, et al. A vicious cycle of beta amyloid-dependent neuronal hyperactivation[J]. *Science*, 2019, 365 (6453): 559-565.
- [41] PENG W, MINAKAKI G, NGUYEN M, et al. Preserving lysosomal function in the aging brain: insights from neurodegeneration[J]. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(3): 611-634.
- [42] MECCA C, GIAMBANCOI, DONATO R, et al. Targeting mTOR in glioblastoma: rationale and preclinical/clinical evidence[J]. *Dis Markers*, 2018, 2018: 9230479.
- [43] OU B, TAO W, YANG S, et al. The antiapoptosis effect of Geum japonicum Thunb. var. chinese extracts on cerebral ischemia reperfusion injury via PI3K/Akt pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 7290170.
- [44] YU X, PENG Y, LIANG H, et al. TSLP/TSLPR promote angiogenesis following ischemic stroke via activation of the PI3K/AKT pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3411-3417.
- [45] ZHANG Q, AN R, TIAN X, et al. β -Caryophyllene pre-treatment alleviates focal cerebral ischemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (5) : 1459-1469.
- [46] SHEN S W, DUAN C L, CHEN X H, et al. Neurogenic effect of VEGF is related to increase of astrocytes transdifferentiation into new mature neurons in rat brains after stroke[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 108: 451-461.
- [47] KOVALSKA M, KOVALSKA L, PAVLIKOVA M, et al. Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochemical research*, 2012, 37(7): 1568-1577.
- [48] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update[J]. *Physiological reviews*, 2012, 92(2): 689-737.
- [49] 杨忠华, 许能贵, 易玮, 等. 针刺调节 MAPK/ERK 通路对脑缺血模型大鼠的干预作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2010, 27(1): 23-26, 30, 99-100.
- [50] GIACCO F, BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [51] KUNZ J. Update on diabetic macroangiopathy[J]. *Pathologie*, 2012, 33: 192-204.
- [52] SINGH V P, BALI A, SINGH N, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18: 1-14.

(编辑: 修春)