

基于网络药理学和动物实验探讨小续命汤治疗缺血性卒中的作用机制

王 飞¹, 徐莉莉², 张雅珍², 兰 瑞³, 向 军^{2,4,*}, 李祥婷^{2*}

(1. 复旦大学附属中山医院药剂科, 上海 200032; 2. 复旦大学附属中山医院中西医结合科, 上海 200032; 3. 河南中医药大学第一附属医院脑病科, 河南 郑州 450000; 4. 复旦大学中西医结合研究院内科研究所, 上海 200032)

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验探讨小续命汤治疗缺血性卒中的作用机制。**方法** 采用网络数据库获取小续命汤的成分及其对应的作用靶点、缺血性卒中的疾病靶点, Venny 2.1.0 软件获取成分-疾病靶点交集, STRING 数据库进行蛋白互作 (PPI) 分析获得核心靶点, Bioconductor 软件包进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。以脑缺血再灌注大鼠模型观察小续命汤对脑梗死面积、神经功能缺损评分、关键靶点的影响。**结果** 数据库检索获得 126 种活性成分和 57 个关键靶点, GO 富集分析得到细胞因子受体结合、细胞因子活性、磷酸酶结合等 74 个分子功能条目, KEGG 富集分析得到流体剪切应力和动脉粥样硬化、糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 等 124 条信号通路。动物实验表明, 小续命汤可减少大鼠脑梗死面积百分比, 减轻神经功能缺损, 下调 IL-6、VEGFA、TP53 表达。**结论** 小续命汤具有多种活性成分, 通过调控 IL-6、VEGFA、TP53 等多靶点, 减少脑梗死面积, 减轻神经功能缺损, 进而发挥治疗缺血性卒中的作用。

关键词: 小续命汤; 缺血性卒中; 网络药理学; IL-6; VEGF; P53

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)07-2398-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.07.051

祛风通络法及其代表方小续命汤治疗缺血性卒中中具有悠久的历史, 其临床疗效受到历代医家的推崇^[1-2]。现代临床和药理学研究进一步验证了小续命汤治疗缺血性卒中的确切药效^[3-4]。动物实验也证实小续命汤可减少脑梗死体积、改善神经功能, 机制研究发现小续命汤对神经元及其支持细胞和结构成分, 如胶质细胞、血管内皮细胞、血脑屏障等, 具有复合保护作用^[5-8]。但目前研究仍存在对小续命汤的多靶点涵盖不全面、协同效应网络不明晰等问题。

网络药理学是基于系统生物学的理论和方法, 强调对生物系统进行网络分析, 构建药物-靶点-疾病网络, 这与中药复方的多成分、生物过程的多环节、分子机制的多靶点相契合。因此, 本研究拟借助网络药理学解析小续命汤治疗缺血性卒中所涉及的有效成分、分子靶点、信号通路, 并通过动物实验验证进一步探讨其治疗缺血性卒中的机制。

1 网络药理学研究

1.1 小续命汤活性成分及靶点筛选 利用中药网络数据库 (TCMSP) 收集小续命汤 12 味药材的主要化学成分并进行

筛选, 标准包括①“类药五原则”, 即相对分子质量<500, 氢键供体数目<5, 氢键受体数目<10, 油水分分配系数<5, 可旋转键的数量≤10 个; ②药物代谢动力学参数, 其中药物口服生物利用度≥30%, 类药性≥0.18, 血脑屏障通透性≥-0.3。利用 TCMSP 数据库结合文献检索, 收集并筛选小续命汤 12 味药材成分的靶点。

1.2 缺血性卒中靶点预测 以“ischemic stroke”为关键词, 分别检索 GeneCard、TTD、DisGeNET、OMIM 数据库, 获得缺血性卒中的疾病靶点。

1.3 蛋白-蛋白相互作用网络 采用 Venny 2.1.0 软件获得小续命汤成分靶点与缺血性卒中疾病靶点的交集, 并将其导入 STRING 数据库进行蛋白互作分析。

1.4 药物-成分-靶点-疾病网络构建 将获得的小续命汤活性成分、靶点利用 Cytoscape 3.8.1 软件构建药物-成分-靶点-疾病网络。

1.5 靶点功能通路富集分析 利用 R3.6.3 软件使用 Bioconductor 生物信息软件包, 以 $P<0.05$ 为筛选标准, 进

收稿日期: 2022-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973618, 81973619); 上海市自然科学基金项目 (19ZR1409900); 上海市十三五临床重点专科-中医急诊项目 (shslczdzk04403)

作者简介: 王 飞 (1978—), 女, 副主任药师, 从事中西医结合临床药学研究。Tel: (021) 64041990, E-mail: wang.fei1@zs-hospital.sh.cn

***通信作者:** 向 军 (1982—), 男, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治缺血卒中的临床、基础研究。Tel: (021) 64041990, E-mail: xiang.jun@zs-hospital.sh.cn

李祥婷 (1987—), 女, 博士, 住院医师, 从事中医药防治缺血卒中的临床、基础研究。Tel: (021) 64041990, E-mail: rainy124@126.com

行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。

2 动物实验验证

2.1 材料

2.1.1 动物 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 230 ~ 280 g, 饲养于中山医院动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005, 实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2016-0006。研究经复旦大学附属中山医院动物伦理委员会批准。

2.1.2 试剂 TTC 染料 (美国 Sigma 公司); 兔抗 IL-6 抗体、 β -actin、HRP-山羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

2.1.3 仪器 BX51 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司); Power/PAC3000 型电泳和转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司); FluorChem FC2 型凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司)。

2.2 方法

2.2.1 小续命汤制备 参照文献 [8] 报道和《千金要方》, 加入 10 倍量水煎煮 1 h, 滤过, 重复 3 次, 合并滤液, 加入无水乙醇, 使其总体积分数为 75%, 磁力搅拌过夜, 25 000 $\times$ g 离心 20 min, 取上清, 恒温蒸发乙醇, 蒸馏水调节药物质量浓度至 1 g/mL, 高压灭菌, -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.2 分组和给药 参照文献 [8-9] 报道, 将大鼠随机分为假手术组、模型组和小续命汤低、中、高剂量组。造模前 3 d 开始每天连续给药, 小续命汤低、中、高剂量组大鼠灌胃给予 15、30、60 g/kg 小续命汤, 假手术组和模型组大鼠灌胃给予等量双蒸水。

2.2.3 脑缺血再灌注大鼠模型制备 参照文献 [8] 报道, 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉, 左侧颈部皮肤做切口, 依次分离左颈总动脉、左颈内动脉、左颈外动脉, 在颈外动脉远端作“V”切口, 将直径 3.0 mm 的尼龙线栓经左颈外动脉、左颈内动脉, 推送至左侧大脑中动脉起始端, 1.5 h 后拔除线栓, 进行再灌注 24 h。

2.2.4 神经功能缺损评分 参照 Zea Longa 评分标准对神经功能缺损进行评分, 即 0 分, 无神经功能缺损; 1 分, 对侧前爪不能完全伸展; 2 分, 向对侧自发性旋转; 3 分, 向对侧倾倒; 4 分, 意识丧失。

2.2.5 TTC 染色检测脑梗死面积 造模结束后大鼠深度麻醉, 断头处死, 取脑组织连续作 6 片冠状切片, 置于 1% TTC 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min, 4% 多聚甲酸溶液 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h, 拍照并计算脑梗死面积百分比。

2.2.6 Western blot 法检测脑组织 IL-6、VEGF、P53 蛋白表达 造模结束后大鼠深度麻醉, 断头取脑组织, 提取总蛋白, 在 -20 $^{\circ}$ C 下保存, BCA 法测定蛋白浓度, 经制胶、电泳、转膜后, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h, 加 IL-6、VEGF、P53、 β -actin (1 : 1 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过

夜, 加二抗室温孵育 2 h, ECL 显色, 凝胶成像系统拍照。

2.2.7 统计学分析 通过 SPSS 13.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 小续命汤活性成分及其靶点筛选 经数据库查询, 得到小续命汤中化学成分分别为麻黄 363 种、甘草 280 种、生姜 265 种、桂枝 220 种、人参 190 种、川芎 189 种、防风 173 种、黄芩 143 种、芍药 119 种、杏仁 113 种、附子 65 种、防己 50 种。根据要求筛选并去重, 最终获得 126 种活性成分及其对应的 174 个作用靶点。

3.1.2 小续命汤治疗缺血性卒中潜在靶点 通过 GeneCard、DisGeNET、TTD、OMIM 数据库检索缺血性卒中潜在靶点, 分别获得 3 350 (选取 $relevance \geq 10$ 的 422 个)、1 159 (选取相关度 $score \geq 0.1$ 的 126 个)、20、15 个, 通过筛选去重获得 499 个。采用 Venny 2.1 软件获得小续命汤与缺血性卒中的 57 个共同靶点 (图 1)。

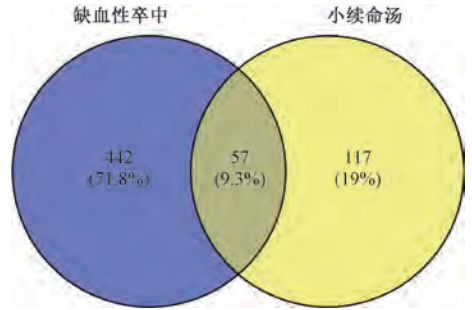


图 1 小续命汤治疗缺血性卒中靶点韦恩图

3.1.3 药物-成分-靶点-疾病网络 如图 2 所示, 药物-成分-靶点-疾病网络中红色节点代表疾病, 蓝色节点代表药物, 绿色节点代表小续命汤活性成分, 黄色节点代表靶点, 每条边代表成分和靶点的相互作用。1 种成分对应多个靶点, 1 个靶点也对应多种成分, 黄芩素、山柰酚、汉黄芩素、柚皮素、木犀草素、金雀异黄酮、刺芒柄花素、光果甘草宁等对应的靶点最多, 可能是小续命汤治疗缺血性卒中的核心成分。

3.1.4 潜在靶点的蛋白-蛋白互作网络 如图 3 所示, 蛋白互作网络中的节点大小、颜色深浅反映蛋白之间相互作用密度。其中, AKT1、IL-6、MAPK3、VEGFA、PTGS2、CCL2、CASP3、CAT、IL-10、TP53 等在蛋白互作网络中起着重要的联系作用, 可能是小续命汤治疗缺血性卒中最重要的潜在靶点。

3.1.5 GO 功能富集分析 如图 4 所示, GO 功能富集分析筛选出包括细胞因子受体结合、细胞因子活性、磷酸酶结合、血红素结合、核受体活性、转录因子活性、直接配体调节的序列特异性 DNA 结合、四吡咯结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、受体配体活性、生长因子受体结合等 155 个分子功能条目 ($P < 0.05$)。

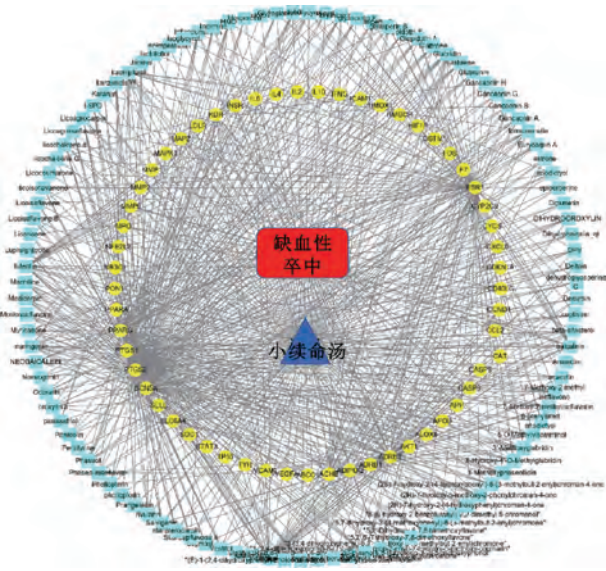


图 2 药物-成分-靶点-疾病网络

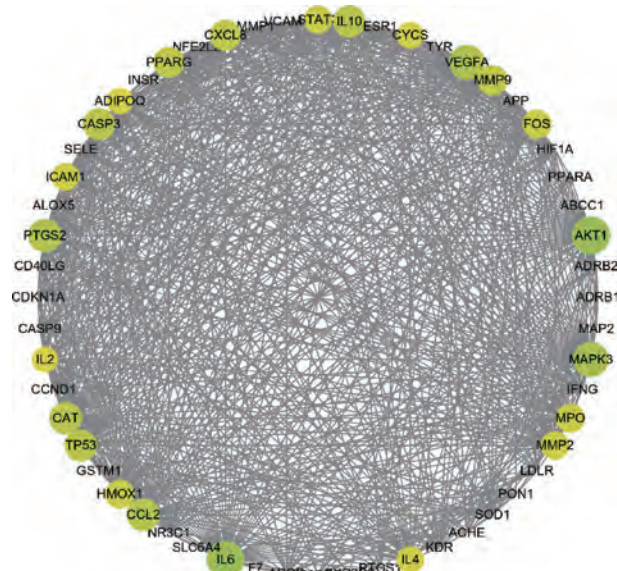


图 3 蛋白-蛋白相互作用网络

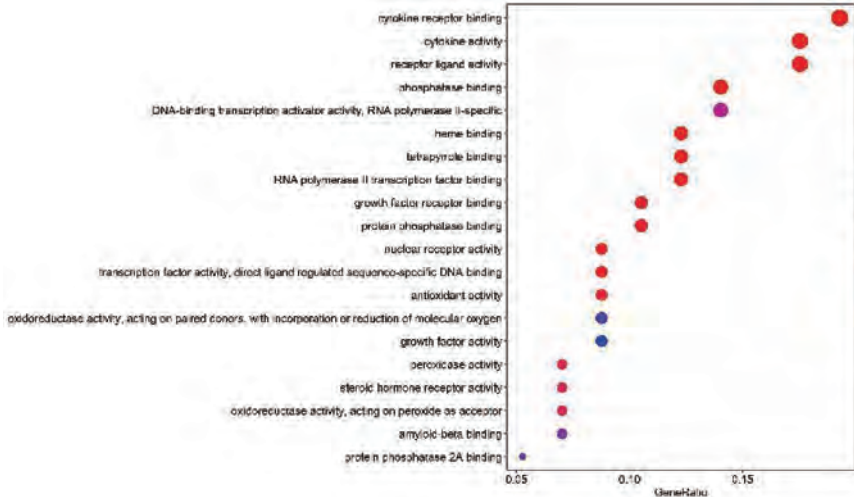


图 4 GO 功能富集分析气泡图

3.1.6 KEGG 通路富集分析 如图 5 所示，KEGG 通路富集分析筛选出包括流体剪切应力和动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路等 124 条信号通路 ($P<0.05$)。

3.2 动物实验

3.2.1 小续命汤对脑缺血大鼠神经功能缺损的影响 如表 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠神经功能缺损评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，小续命汤低剂量组大鼠神经功能缺损评分无明显变化 ($P>0.05$)，而中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且高剂量组作用更佳。

3.2.2 小续命汤对脑缺血大鼠脑梗死面积的影响 如表 1、图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠脑梗死面积百分比增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，小续命汤低剂量组大鼠脑梗死面积百分比无明显变化 ($P>0.05$)，而中、高剂量组大鼠脑梗死面积百分比减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并且

高剂量组作用更佳。

表 1 小续命汤对脑梗死面积和神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	神经功能缺损	脑梗死面积
	评分/分	百分比/%
对照组	0	0
模型组	3.4±0.22 ^{##}	26.13±1.34 ^{##}
小续命汤低剂量组	3.3±0.27	23.56±1.24
小续命汤中剂量组	2.9±0.42 [*]	19.65±1.10 [*]
小续命汤高剂量组	2.3±0.27 ^{**}	11.99±0.88 ^{**}

注：与对照组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.2.3 小续命汤对脑缺血大鼠脑组织 IL-6、VEGF、P53 蛋白表达的影响 如图 7 所示，与对照组比较，模型组大鼠脑组织 IL-6、VEGF、P53 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，小续命汤高剂量组大鼠脑组织 IL-6、VEGF、P53 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

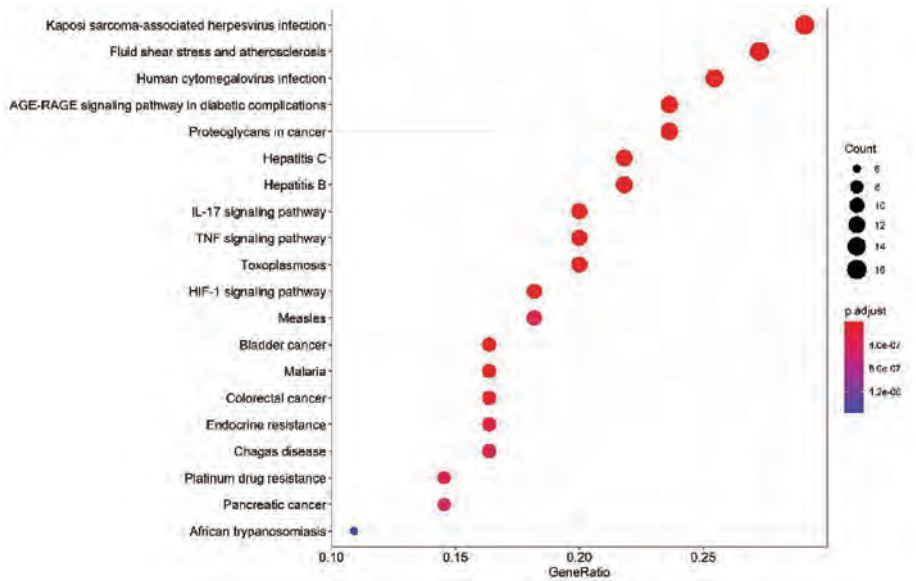


图 5 KEGG 通路富集分析气泡图

参与的相互作用最为广泛，可能是小续命汤治疗缺血性卒中核心靶点。通过核心靶点的功能和通路富集分析，发现其影响的生物学功能主要与细胞因子受体结合、细胞因子活性、转录因子活性等密切相关，发挥作用的信号通路主要有血流剪切应力与动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路等。

动物实验证明小续命汤可减少脑缺血大鼠脑梗死面积百分比，改善神经功能缺损，下调 IL-6、P53、VEGF 蛋白表达，与既往研究相符。有研究发现脑卒中后血清 VEGF 存在差异性升高，可作为卒中进展和远期不良结局的标志物^[13-16]。P53 是调节细胞存亡的明星分子，大量基础研究表明抑制 P53 表达有利于减轻脑缺血损伤，恢复神经功能^[17-19]。脑卒中后较高的血清 IL-6 水平与较大的梗死体积、较低的脑灌注水平和较高神经功能缺损评分相关^[20-21]，而抑制 IL-6 的表达可增强卒中后血管的自动调节功能，促进脑组织修复^[22-23]，是卒中治疗的潜在靶点。但上述靶点在缺血性卒中的研究多处于动物实验阶段，或由于调控手段有限，或由于副作用影响，限制其临床应用。但中药通过其多成分调控内源性靶点的表达，从而发挥药理学作用，具有独特的优势。

本研究通过网络药理学预测结合动物实验验证，显示小续命汤含有黄芩素、山柰酚、柚皮素等多种活性成分，通过调控 IL-6、VEGFA、TP53 等靶点，减少脑梗死、减轻神经功能缺损，进而发挥其治疗缺血性卒中的作用。但作为复方的小续命汤通常以水煎剂的形式服用，网络药理学预测的活性成分并不等同于其生物利用的活性成分。后续研究有必要借助指纹图谱、中药代谢指纹图谱等技术明确汤剂内的及其入血的有效成分，弥补单纯中药药理学预测的局限性，提供更可靠的依据。

参考文献:

[1] 陈党红, 颜 芳, 徐国峰, 等. 重新解读小续命汤的地位

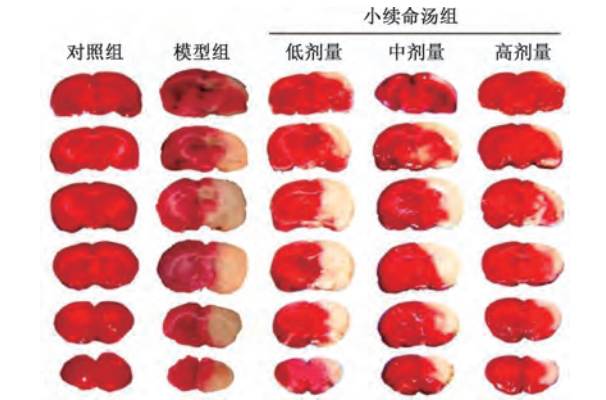
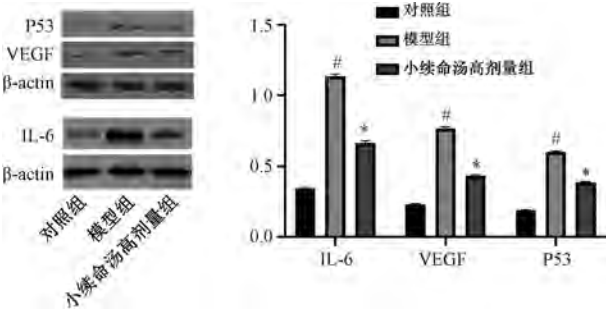


图 6 各组大鼠脑组织冠状切片 TTC 染色



注：与对照组比较, #*P*<0.05；与模型组比较, **P*<0.05。

图 7 各组大鼠脑组织 IL-6、VEGF、P53 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

4 讨论

本研究利用网络药理学方法筛选出小续命汤 126 种关键活性成分及其 172 个作用靶点、2 230 对成分-靶点的对应关系，其中黄芩素、山柰酚、柚皮素对应的靶点最多，且已有大量体内外研究证实其具有脑缺血保护作用^[10-12]，可能是小续命汤治疗缺血性卒中的关键成分。小续命汤治疗缺血性卒中的核心靶点相互作用网络中共有 57 个靶点和 714 条相互作用关系，以 AKT1、IL-6、MAPK3、VEGFA 等

[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2154-2157.

[2] 朱心红, 陈素云, 高天明. 小续命汤与脑卒中——小续命汤之文献研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 564-565; 557.

[3] 蔡定芳, 杨云柯, 顾喜喜, 等. 中医辨证结合西医分期治疗急性脑梗死临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 789-792.

[4] 叶晓红, 林乐乐, 傅海群, 等. 小续命汤药理及临床应用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(1): 97-100.

[5] Lan R, Xiang J, Zhang Y, *et al.* PI3K/Akt pathway contributes to neurovascular unit protection of Xiao-Xu-Ming decoction against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2013, 2013: 459467.

[6] Lan R, Xiang J, Wang G H, *et al.* Xiao-Xu-Ming decoction protects against blood-brain barrier disruption and neurological injury induced by cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2013, 2013: 629782.

[7] 路 畅, 杜 肖, 贺晓丽, 等. 小续命汤有效成分组对局灶性脑缺血/再灌注大鼠恢复早期的神经保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7): 938-944.

[8] Lan R, Zhang Y, Xiang J, *et al.* Xiao-Xu-Ming decoction preserves mitochondrial integrity and reduces apoptosis after focal cerebral ischemia and reperfusion *via* the mitochondrial p53 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 307-316.

[9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[10] Ran Y, Qie S, Gao F, *et al.* Baicalein ameliorates ischemic brain damage through suppressing proinflammatory microglia polarization *via* inhibiting the TLR4/NF-κB and STAT1 pathway [J]. *Brain Res*, 2021, 1770: 147626.

[11] 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.

[12] Wang K, Chen Z, Huang J, *et al.* Naringenin prevents ischaemic stroke damage *via* anti-apoptotic and anti-oxidant effects [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(8): 862-871.

[13] Matsuo R, Ago T, Kamouchi M, *et al.* Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke—research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS) study[J]. *BMC Neurol*, 2013, 13: 32.

[14] Åberg N D, Wall A, Anger O, *et al.* Circulating levels of vascular endothelial growth factor and post-stroke long-term functional outcome [J]. *Acta Neurol Scand*, 2020, 141(5): 405-414.

[15] Escudero C, Acurio J, López E, *et al.* Vascular endothelial growth factor and poor prognosis after ischaemic stroke[J]. *Eur J Neurol*, 2021, 28(5): 1759-1764.

[16] Kim E, Yang J, Park K W, *et al.* Inhibition of VEGF signaling reduces diabetes-exacerbated brain swelling, but not infarct size, in large cerebral infarction in mice[J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(5): 540-548.

[17] Hong L Z, Zhao X Y, Zhang H L. P53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2010, 26(3): 232-240.

[18] Wu K J, Yu S, Lee J Y, *et al.* Improving neurorepair in stroke brain through endogenous neurogenesis-enhancing drugs [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(9): 1596-1600.

[19] Almeida A, Sánchez-Morán I, Rodríguez C. Mitochondrial-nuclear p53 trafficking controls neuronal susceptibility in stroke [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(3): 582-591.

[20] Purroy F, Farré-Rodríguez J, Mauri-Capdevila G, *et al.* Basal IL-6 and S100b levels are associated with infarct volume [J]. *Acta Neurol Scand*, 2021, 144(5): 517-523.

[21] Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, *et al.* Association of interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy[J]. *Neurology*, 2021, 96(5): e752-e757.

[22] Lambertsen K L, Biber K, Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(9): 1677-1698.

[23] Armstead W M, Hekierski H, Pastor P, *et al.* Release of IL-6 after stroke contributes to impaired cerebral autoregulation and hippocampal neuronal necrosis through NMDA receptor activation and upregulation of ET-1 and JNK[J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(1): 104-111.