

基于网络药理学研究通窍活血汤治疗脑梗死后血管性痴呆的作用机制

鄢海良¹, 赵阳^{1#}, 方兴^{2*}, 卓晓贵¹, 郑景辉²

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 基于网络药理学研究通窍活血汤治疗脑梗死后血管性痴呆的作用机制。**方法** 预测通窍活血汤已知化学成分的作用靶点, 构建通窍活血汤化合物-靶点网络, 并对网络进行拓扑分析。对通窍活血汤作用靶点构建蛋白互作网络 (PPI)、GO 富集分析、KEGG 通路注释分析及通路靶点聚类分析, 将这些化合物与靶点进行分子对接以初步验证其作用机制。**结果** 通窍活血汤中 165 个主要化合物作用于 33 个靶点蛋白, PPI 网络中涉及关键蛋白排名前十的有 IL6、NOS3、SERPINE1、IL1B、CCL2、CRP、VEGFA、AKT1、MMP9、MMP2、PTGS2、ICAM1、VCAM1, GO 富集分析显示出 69 个生物过程、23 个分子功能、16 个细胞成分, KEGG 通路注释分析显示出 49 条通路, 51 组分子对接结果显示 44 组具有较好的结合活性。**结论** 通窍活血汤主要是通过抗炎、抗氧化、钙通道的调节、血脑屏障保护、调节脑血流、稳定斑块、抑制或促进神经递质释放、促进神经元再生等方面对血管性痴呆的病理进行调节。

关键词: 通窍活血汤; 血管性痴呆; 脑梗死; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)01-0255-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.01.051

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是一种因缺血性或出血性卒中而造成的认知、记忆和行为等认知功能障碍的临床综合征。属于中医痴呆、呆病范畴, 与风、火、痰、虚、瘀等因素相关^[1-2]。西医病因主要由脑血管病 (大小动静脉病变、栓塞、小血管病变、脑血管意外、局部和远处的缺血性功能改变等) 和危险因素 (脑血管病危险因素、卒中、缺血性白质病变等) 两个方面。根据流行病学统计^[3], 欧美等国家 VD 患者占痴呆总患者 10%~20%; 我国 VD 的患病率为 1.1%~3.0%, 年发病率为 5~9/1000 人; VD 患者日常生活能力和社会功能严重受损, 给家庭和社会带来了沉重的负担。血管性痴呆是可预防和有望治疗的一种痴呆, 起病缓慢, 持续进展, 可通过早期预防和治疗降低其残障率。西医主要从预防卒中、改善脑循环代谢、神经元保护等方面进行治疗, 短期内能改善患者的认知功能障碍, 但不能从根本上阻止神经细胞的继发性凋亡和坏死^[4]。从传统中医中药的整体辨证和治未病出发, 发挥中医中药的多成分多靶点的辨证施治、未病先防既病防变作用, 以期早期干预及延缓甚至阻止痴呆的发生。通窍活血汤出自清代著名医家王清任的《医林改错》, 具有活血祛瘀、通络止痛、开窍醒神的功效, 原文: 立通窍活血汤, 治头面, 四肢, 周身血管血瘀之证^[5]。现代研究表明通窍活血汤具有抗脑血栓形成、减轻脑水肿、抑制脂质过

氧化反应、减轻自由基对脑组织损伤、改善脑缺血后脑组织损伤、减少神经元丢失率, 改善神经可塑性和突触重构, 改善 VD 大鼠学习记忆能力^[6-7]。当前大多数研究主要是通过临床疗效观察和动物实验来探讨通窍活血汤作用于血管性痴呆的作用机制及疗效, 尚未阐述具体化合物靶点与疾病靶点的相互作用机制, 而网络药理学是通过构建“药物-靶点-疾病”网络来更系统综合地观察药物对疾病网络的干预机制, 利用中药复方为多成分、多靶点的协同作用机制, 在分子水平上阐明、成分和靶点药物靶点、疾病靶点及药物疾病共同靶点网络之间的协同效应和潜在机制。

1 方法

1.1 通窍活血汤化合物的收集筛选、靶点预测 通窍活血汤由 8 味药材组成, 分别是赤芍、川芎、桃仁、大枣、红花、葱白、生姜、麝香, 通过文献调研和中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 收集其所含化合物, 并以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为限定条件对所收集到的化合物进行筛选^[8], 将筛选出的有效化合物在 TCMSP 中自带的 Related Targets 完成有效化合物作用靶点预测。

利用生物信息学分析工具 (<http://bionet.ncpsb.org/>

收稿日期: 2019-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660776); 广西自然科学基金项目 (2016GXNSFAA380296)

作者简介: 鄢海良 (1993—), 女, 硕士生, 研究方向为脑血管疾病与神经变性疾病的中西医结合防治

#共同第一作者: 赵阳 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为中医药防治心血管疾病

*通信作者: 方兴 (1977—), 男, 硕士生导师, 研究方向为脑血管疾病与神经变性疾病的中西医结合防治。Tel: 18978989313,

E-mail: zkbfx@163.com

batman-tcm/, BATMAN-TCM), 以化合物相关度得分 (score cutoff) ≥ 100 、假定值 $P \geq 0.05$ 为限定条件对通窍活血汤有效化合物成分进行筛选及药物作用靶点预测。为了使数据格式的整体一致, 运用有机小分子生物活性数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>, PubChem) 对筛选出的两组有效化合物进行统一 ID 编码。

1.2 通窍活血汤作用靶点基因名的校正、筛选 将“1.1”项下通窍活血汤有效化合物靶点导入 STRING10.5 数据库 (<https://string-db.org>), 限定研究物种为人类, 同时剔除非人源靶点, 校正为其官方名称并摘录其标准基因名; BATMAN-TCM 筛选出的靶点即标准基因名, 无需校正。将 2 组通窍活血汤的靶点基因名导入 VENNY2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 剔除重复靶点后, 即为通窍活血汤有效化合物作用靶点的基因名。

1.3 血管性痴呆疾病相关靶点的检索、筛选 将“血管性痴呆”作为检索词, 文献查询其英文名为“Vascular dementia”, 通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) 检索血管性痴呆发病相关靶点。GeneCards 数据库通过 Gifts 算法, 能够计算靶点与疾病的相关度, 并按照相关度排序。按照靶点与血管性痴呆的相关程度, 为减少冗余, 选择相关度得分 ≥ 15 的靶点作为血管性痴呆靶点进行研究, 并摘录相应的靶点的标准基因名。最后将这两个数据库检索到的血管性痴呆疾病相关靶点导入 VENNY2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 得到两组数据的共同靶点, 即血管性痴呆疾病的靶点。

1.4 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的预测 将“1.2”项下预测的通窍活血汤化合物作用靶点与“1.3”项下筛选的血管性痴呆相关发病靶点导入 VENNY2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 得到 2 组靶点的共同靶点, 即为通窍活血汤作用于血管性痴呆的靶点。将每个靶点与每个对其有药理作用的化合物相对应, 采用 Cytoscape3.6.1 软件绘制化合物-靶点图。

1.5 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的 PPI 网络构建 将“1.4”项下预测的通窍活血汤作用血管性痴呆的靶点上传至 STRING10.5 数据库 (<https://string-db.org>), 选择研究物种为人类, 设置靶点之间最低联系分数为 0.4, 并隐藏不与其他靶点联系的靶点, 获得通窍活血汤对血管性痴呆靶点之间联系网络图, 导入 Cytoscape3.6.1 软件进行拓扑学分析, 并构建 PPI 网络。

1.6 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的富集分析和通路注释分析 把通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点导入 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), 选择生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function)、细胞成分 (cellular component) 对通窍活血汤作用于血管性痴呆的靶点进行基因本体 (GO) 富集分析, 通过 KEGG 进行靶点基

因通路注释分析。采用 GraphPad Prism 7 软件将 GO 富集分析满足假定值 $P < 0.05$ 的结果做成可视化条形图, OmicsShare (<http://www.omicsshare.com/>)、Heml 将得到的 KEGG 靶点基因通路注释分析满足假定值 $P < 0.05$ 的结果分别制成可视化气泡图、聚类图。

1.7 通窍活血汤主要有效化合物与其作用的血管性痴呆靶点分子对接 利用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查找通窍活血汤作用的血管性痴呆靶点的 PDB ID, 将 mol2 格式的化合物与 PDB ID 形式的靶点上传至 Systems Dock Web Site 数据库 (<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>) 进行分子对接, 通过所得的 Docking Score 值分析对接分子与靶点之间的结合活性。一般认为对接分数 (docking score) 值 > 4.25 表示对接分子与靶点之间有一定的结合活性, > 5.0 表明对接分子与靶点之间有较好的结合活性, > 7.0 则说明具有强烈的结合活性。

2 结果

2.1 通窍活血汤化合物的收集筛选、靶点预测 通窍活血汤有效化合物共 165 个, 其中赤芍 25 个, 川芎 25 个, 葱白 7 个, 红花 26 个, 大枣 35 个, 麝香 5 个, 桃仁 22 个, 生姜 20 个, 具体见表 1; 有效化合物作用靶点 2 203 个, 其中 TCMS 数据库收集到 1 389 个, BATMAN-TCM 收集到 814 个。

2.2 通窍活血汤作用靶点基因名的校正、筛选 通窍活血汤标准基因名共 2 170 个, 其中 TCMS 数据库 1 247 个, BATMAN-TCM 数据库 814 个, 删除重复靶点后得 493 个。

2.3 血管性痴呆发病靶点收集 GeneCards 数据库共检索出 2 966 个与血管性痴呆发病相关的靶点, 相关度最高的是 Vascular Endothelial Growth Factor A (95.7 分), 最低的是 Zinc Finger And AT-Hook Domain Containing 类靶点 (0.2 分), 其中相关度得分 ≥ 15 的靶点共 194 个, 而 OMIM 数据库共检索到 1 047 个血管性痴呆发病的靶点, 导入 VENNY2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 中后得到 2 个数据库的共同靶点 109 个, 即为血管性痴呆发病的靶点。

2.4 通窍活血汤作用血管性痴呆靶点的预测 分别将“2.2”“2.3”项下靶点、基因名导入 VENNY2.1 软件, 共得到 33 个共同靶点, 包括 AKT1、CCL2、CRP、F3、HIF1A、HMOX1、ICAM1、IFNG、IL1B、IL6、KDR、MAPK8、MMP2、MMP9、MPO、NOS3、PLAT、PLAU、PON1、PPARG、PTGS2、SELE、SERPINE1、SLC6A4、TGFB1、THBD、TP53、VCAM1、VEGFA、BCHE、NOS1、MTHFR、LPL, 即为通窍活血汤作用于血管性痴呆的靶点, 见图 1。将其与相对应的化合物进行联系分析, 共得到 123 对相关的联系, 通过 Cytoscape3.6.1 软件进行拓扑学分析, 得到作用靶点数排名前 6 的化合物为槲皮苷 (26 个)、木樨草素 (10 个)、山柰酚 (8 个)、黄芩素 (7 个)、 β -胡萝卜素 (6 个)、 β -谷甾醇 (4 个), 化合物-靶点联系图见图 2。

表1 通窍活血汤有效化合物

编号	药材	化合物	有机小分子生物活性 数据库化合物编号	编号	药名	化合物	有机小分子生物活性 数据库化合物编号
1	川芎	胆碱	305	85	红枣	光千金藤碱	830726
2	川芎	辛醇	957	86	桃仁	白杨苷	1548943
3	川芎	棕榈酸	985	87	红花	槲皮苷	5280343
4	川芎	十六醇	2682	88	红枣	槲皮苷	5280343
5	红枣	富马碱	4970	89	红花	木樨草素	5280445
6	红枣	原卟啉	4971	90	川芎	亚油酸	5280450
7	麝香	雄甾酮	5879	91	红花	β -胡萝卜素	5280489
8	*红花	CLR	5997	92	红枣	β -胡萝卜素	5280489
9	麝香	甾酮	6013	93	红枣	穆坪马兜铃酰胺	5280537
10	川芎	胎球蛋白A	6037	94	红花	八氢番茄红素	5280784
11	川芎	维生素B1	6042	95	赤芍	豆甾醇	5280794
12	桃仁	虫草素	6303	96	红花	豆甾醇	5280794
13	*桃仁	2,3-didehydro GA77	6466	97	红枣	豆甾醇	5280794
14	生姜	乙醛	6501	98	生姜	豆甾醇	5280794
15	川芎	邻乙基苯酚	6997	99	葱白	山柰酚	5280863
16	生姜	丙酸乙酯	7749	100	红花	山柰酚	5280863
17	生姜	壬酸	8158	101	红花	黄色色素	5281238
18	生姜	壬醇	8914	102	赤芍	菠菜固醇	5281331
19	赤芍	(+)儿茶素	9064	103	红花	除虫菊酯 II	5281555
20	葱白	(+)儿茶素	9064	104	赤芍	黄芩素	5281605
21	红枣	(+)儿茶素	9064	105	红花	黄芩素	5281605
22	红枣	(+)儿茶素	9064	106	红花	6-羟基山柰酚	5281638
23	桃仁	(+)儿茶素	9064	107	红花	槲皮素	5281680
24	生姜	雪花莲胺	9651	108	红枣	拟雌内酯	5281707
25	红枣	莲碱	10146	109	赤芍	鞣花酸	5281855
26	生姜	异缬草酸	10430	110	川芎	扁桃醇	5282184
27	红花	花生酸	10467	111	红花	赤桐甾醇	5283638
28	川芎	松油烯-4醇	11230	112	*赤芍	stigmast-7-en-3-ol	5283639
29	生姜	松油烯-4醇	11230	113	红枣	维生素B12	5311498
30	川芎	乙酸乙酯	12366	114	红枣	螺旋胺甲	5321444
31	生姜	壬基醇	12367	115	赤芍	油酸乙酯	5363269
32	川芎	十五烷醇	12397	116	*桃仁	4a-formyl-7 α -hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4 α ,4b β -gibbane-1 α ,10 β -dicarboxylic acid	5460209
33	川芎	戊酸	13849	117	桃仁	赤霉素17	5460657
34	川芎	十七烷醇	15076	118	*红枣	malkangunin	6325577
35	生姜	葑醇	15406	119	红花	六氢番茄红素	6436722
36	川芎	松油醇	17100	120	葱白	锌03860434	7057921
37	川芎	十五烷酸甲酯	23518	121	桃仁	谷甾醇 α 1	9548595
38	生姜	姜酮	31211	122	红花	4-[(戊)-4-(3,5-二甲氧基-4-氧代-1-环己基-2,5-二烯基)氨基-2-烯基-2,6-二甲氧基环己基-2,5-二烯-1-酮(3S,6R,8S,9S,10R,13R,14S,17R)]-17-[(1R,4R)-4-乙基-1,5-二甲基己基]-10,13-二甲基-2,3,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3,6-二醇	10237057
39	川芎	茨醇	64685	123	红枣	基-1,5-二甲基己基]-10,13-二甲基-2,3,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3,6-二醇	10550610
40	生姜	茨醇	64685	124	*川芎	wallichilide	10873344
41	红枣	桦木酸	64971	125	赤芍	芍药苷	11973336
42	红枣	丁子香酚	64971	126	赤芍	谷甾醇	12303645
43	赤芍	黄芩苷	64982	127	川芎	谷甾醇	12303645
44	红花	黄芩苷	64982	128	葱白	谷甾醇	12303645
45	葱白	蒜素	65036	129	*葱白	kaur-16-ene	12304784
46	*葱白	triflex OBP	66540	130	桃仁	菜油甾醇	12358798
47	麝香	α -雌二醇	68570	131	红枣	光千金藤定碱	12442999
48	红枣	桦木酸	72326	132	赤芍	1-O- β -D-吡喃葡萄糖基-8-O-苯甲酰牡丹酮	12962231
49	红枣	(-)-儿茶素	73160	133	*桃仁	GA60	13071237
50	红枣	黄连素	81531	134	*桃仁	GA63	14160552

续表 1

编号	药材	化合物	有机小分子生物活性 数据库化合物编号	编号	药名	化合物	有机小分子生物活性 数据库化合物编号
51	* 红枣	daechuine S7	81531	135	* 红枣	ziziphin_qt	15515703
52	桃仁	ga 121-异内酯	81531	136	* 桃仁	GA30	21596344
53	桃仁	β -谷甾醇	92782	137	红花	7,8-二甲基-1 <i>H</i> -嘧啶酮-[5,6- <i>g</i>] 啞啞啞-2,4-二酮	21786815
54	桃仁	赤霉素 7	92782	138	* 桃仁	GA120	25245018
55	生姜	二氢辣椒素	107982	139	红花	羽扇豆醇棕榈酸酯	56628822
56	川芎	13-甲基十五烷酸	146501	140	麝香	17- β -雌二醇	66795326
57	生姜	乙酸甲酯	147637	141	赤芍	芍药内酯苷	66997433
58	红枣	枣皂苷 V	152638	142	赤芍	芍药苷	70698143
59	红枣	长春胺	156951	143	赤芍	芍药苷	70698143
60	生姜	1,8-桉树脑	159051	144	红枣	枣苷 C	73110002
61	川芎	川芎啞	160179	145	赤芍	芍药新苷	73981645
62	红枣	(<i>S</i>)-乌药碱	160487	146	* 川芎	senkyunone	91726743
63	红枣	巴婆碱	160875	147	* 桃仁	GA119	91747859
64	* 红枣	21302-79-4	161352	148	红花	木酚素	92242026
65	川芎	杨梅酮	161748	149	* 红枣	daechuine S6	101063136
66	* 赤芍	campest-5-en-3 β -ol	173183	150	赤芍	棟叶吴萸素 B	101504852
67	红花	6-羟基柚皮素	188308	151	桃仁	2,3-二脱氢喹 70	101603111
68	红花	红花素	188308	152	* 桃仁	GA54	101603122
69	赤芍	β -谷甾醇	222284	153	* 桃仁	GA87	101663385
70	红花	β -谷甾醇	222284	154	赤芍	9-乙基-新芍药素 α	102015669
71	红枣	β -谷甾醇	222284	155	生姜	粉防己碱 A	102121497
72	生姜	β -谷甾醇	222284	156	红枣	黄夹次苷丙	121432025
73	桃仁	常春藤皂苷元	222284	157	赤芍	4-乙基芍药苷	124710902
74	麝香	3 β -羟基-5 α -雄甾烷-17-酮	441302	158	赤芍	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-反式-2-羟基-1,8-桉树脑- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	124899926
75	赤芍	芍药苷	442534	159	* 桃仁	GA77	131752128
76	桃仁	赤霉素 A44	443756	160	红花	红花醌苷	131833009
77	川芎	视黄醇	445354	161	赤芍	8-脱苯甲酰芍药苷	131885855
78	川芎	α -谷甾醇	457801	162	赤芍	异苯甲酰芍药苷	134380820
79	红花	α -谷甾醇	457801	163	赤芍	苯甲酰芍药苷	134380820
80	红花	吡啞 5-en-3 β -ol	457801	164	* 红枣	mauriline D	134431140
81	生姜	吡啞 5-en-3 β -ol	457801	165	赤芍	芍药内酯苷	134761887
82	红枣	核黄素	493570	166	红枣	酸枣仁皂苷 A	137324097
83	生姜	萹醇	536562	167	红枣	紫苏皂苷	137324097
84	生姜	<i>p</i> -薄荷糖-2en-7 ol	564463				

注：* 为找不出中文名称的有效化合物。

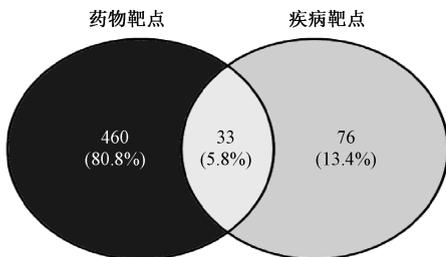
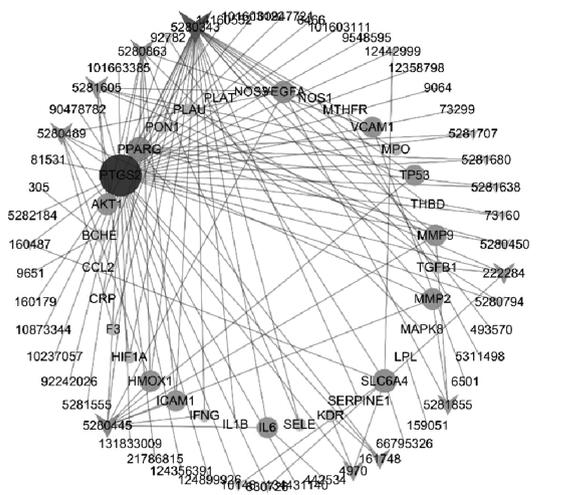


图 1 通窍活血汤作用血管性痴呆靶点的预测图

2.5 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的 PPI 网络 通过 STRING10.5 数据库分析得到 33 个靶点之间 340 条联系的网络图，导入 Cytoscape3.6.1 软件进行拓扑学分析，发现靶点之间联系个数排名前十的靶点为 IL6 (32 个)、NOS3 (30 个)、SERPINE1 (29 个)、IL1B (28 个)、CCL2 (28 个)、CRP (28 个)、VEGFA (27 个)、AKT1 (26 个)、

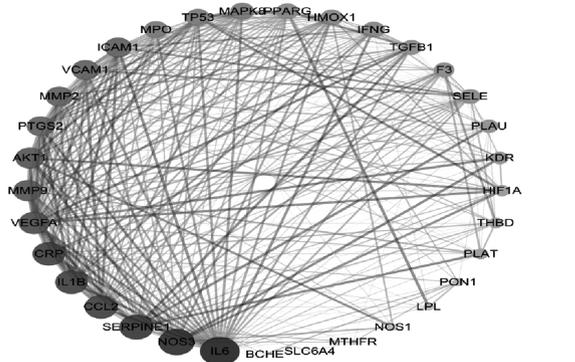
MMP9 (26 个)、MMP2 (25 个)、PTGS2 (25 个)、ICAM1 (25 个)、VCAM1 (25 个)，PPI 网络图见图 3。

2.6 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的 GO 富集分析和通路注释分析 GO 富集分析生物过程、分子功能、细胞成分分别得到 69、23、16 个条目，各取前 15 个条目绘制可视化条形图，见图 4。其中，生物过程与血管性痴呆相关的包括缺氧反应、基因表达的正调控、血管生成的正调控、一氧化氮生物合成过程的正向调控、细胞对缺氧的反应、内皮细胞增殖的正向调控、钙离子转运的负调控、蛋白质磷酸化的正调控、炎症反应，分子功能与血管性痴呆相关的包括血红素结合、细胞因子活性、一氧化氮合酶活性，细胞成分与血管性痴呆相关的包括血小板阿尔法颗粒腔、蛋白质的细胞外基质、血液微粒、蛋白质复合物。通路注释分析得到 $P \geq 0.05$ 的通路有 49 条，前 20 条通路中共涉及 26 个靶点，与血管性痴呆相关的包括肿瘤坏死因子信号



注：▽表示通窍活血汤化合物，符号越大，对应颜色越深，作用靶点越多；○表示血管性痴呆靶点，符号越大，对应颜色越深，被越多的化合物作用。

图2 通窍活血汤有效化合物作用血管性痴呆靶点网络图



注：靶点面积越大，颜色越深，该靶点与其他靶点的联系越多；连线宽度越宽，颜色越深，该线条连接的两个靶点之间相互联系程度越高。

图3 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的PPI网络图

通路、缺氧诱导因子-1信号通路、血管内皮生长因子信号通路、补体和凝血级联、核因子κB信号通路，可视化气泡图见图5，聚类热图见图6。

2.7 通窍活血汤主要有效化合物与其作用的血管性痴呆靶点分子对接 根据“2.4”项下拓扑学分析结果，选择排名前四的槲皮苷(5280343)、木樨草素(5280445)、山柰酚(5280863)、黄芩素(5281605)作为主要有效化合物，与通窍活血汤作用的33个血管性痴呆靶点进行分子对接。结果，51组对接中 Docking Score 值>7的有3组，>6的有34组，>5的有40组，>4.5的有44组，测不出的有7组，具体见表2。

3 讨论

血管性痴呆是以认知、记忆等诸多功能障碍为主，而且可能伴有语言、人格或情感障碍的一种获得性智能持续性损害疾病，而脑血管病变导致局部或全脑缺血、缺氧、细胞坏死，继而引起脑部与认知、记忆等相关的特定神经

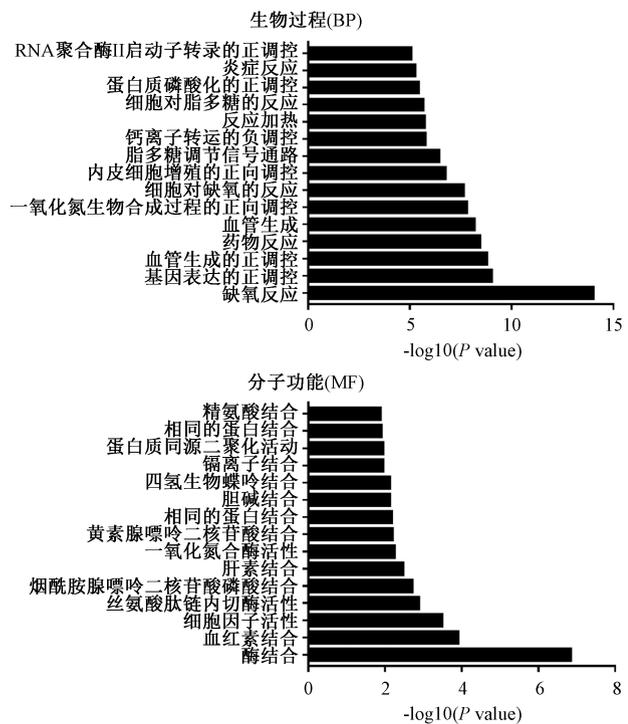


图4 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的GO富集分析

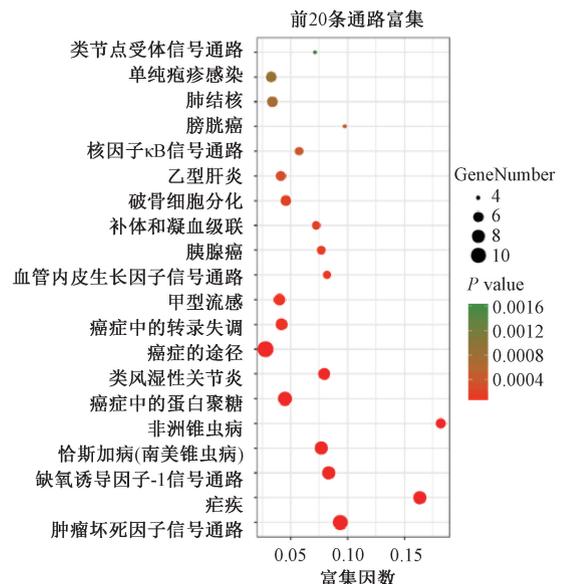
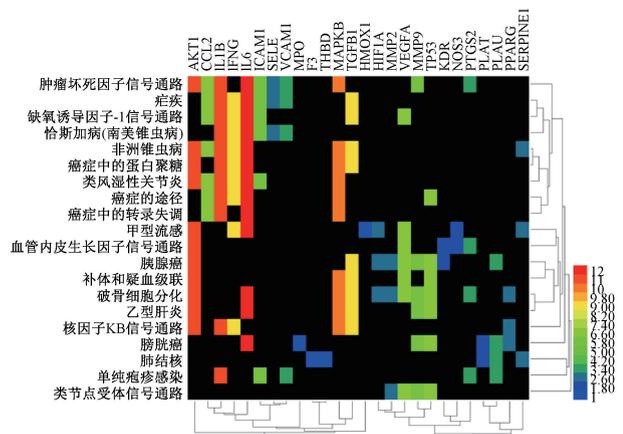


图5 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的KEGG通路注释分析

表2 通窍活血汤主要有效化合物与其作用的血管性痴呆靶点分子对接结果

编号	原始蛋白名	蛋白库编号	化合物	对接得分 (pKd/pKi)
1	HMOX1	6EHA	槲皮苷	7.157
2	HMOX1	6EHA	山柰酚	7.145
3	HMOX1	6EHA	木樨草素	7.141
4	VCAM1	4N5X	山柰酚	6.799
5	MMP9	5TH6	黄芩素	6.777
6	VCAM1	4N5X	槲皮苷	6.765
7	THRB	1DX5	槲皮苷	6.736
8	SELE	6EYJ	山柰酚	6.721
9	PLAT	5BRR	槲皮苷	6.686
10	HIF1A	1H2M	槲皮苷	6.675
11	SELE	6EYJ	槲皮苷	6.654
12	SERPINE1	4IC0	槲皮苷	6.642
13	MMP9	5TH6	木樨草素	6.640
14	MMP2	1RTG	槲皮苷	6.628
15	HIF1A	1H2M	黄芩素	6.619
16	AKT1	4EKL	黄芩素	6.615
17	MMP9	5TH6	槲皮苷	6.610
18	MMP2	1RTG	木樨草素	6.578
19	PON1	3SRE	槲皮苷	6.570
20	CRP	1B09	槲皮苷	6.557
21	AKT1	4EKL	槲皮苷	6.526
22	PERM	3F9P	黄芩素	6.514
23	PTGS2	5F19	黄芩素	6.450
24	PTGS2	5F19	木樨草素	6.437
25	TGFB1	5VQP	槲皮苷	6.434
26	PTGS2	5F19	槲皮苷	6.419
27	PERM	3F9P	槲皮苷	6.390
28	PTGS2	5F19	山柰酚	6.370
29	PPARG	6C5Q	槲皮素	6.276
30	AKT1	4EKL	山柰酚	6.268
31	MAPK8	3O17	山柰酚	6.172
32	NOS3	3NOS	槲皮苷	6.165
33	PPARG	6C5Q	木樨草素	6.131
34	PPARG	6C5Q	山柰酚	6.019
35	TIGAR	3DCY	黄芩素	5.950
36	TIGAR	3DCY	槲皮苷	5.881
37	TIGAR	3DCY	木樨草素	5.858
38	IFNG	3BES	槲皮苷	5.793
39	IFNG	3BES	木樨草素	5.731
40	CCL2	4ZK9	槲皮苷	5.387
41	ICAM1	5E6D	槲皮苷	4.951
42	PLAU	5E6A	槲皮苷	4.921
43	ICAM1	5E6D	山柰酚	4.902
44	ICAM1	5E6D	木樨草素	4.702



注：靶点颜色越亮，该靶点参与的通路越多。

图6 通窍活血汤对血管性痴呆作用靶点的 KEGG 分析聚类热图

思路。

结果，通窍活血汤中有 165 个有效化合物，33 个药物疾病共同靶点共有 198 对药理作用。现代研究表明，大枣具有增强免疫功能、抑制癌细胞增殖、降血压、降胆固醇、抗氧化作用^[9]，红花具有保护脑组织、抗血小板聚集、增强抗应激能力、降低血液黏度、降低血压、调节血脂平衡等作用^[10]，桃仁具有免疫调节、抗氧化、抗炎、心血管保护、抗肿瘤作用^[11]，赤芍具有抗血栓、抗氧化、抗内毒素、抗肿瘤、保护神经作用^[12]，生姜具有改善脑组织能量代谢、清除氧自由基、抑制钙超载、抑制神经细胞凋亡作用^[13]，葱白具有抑制炎症细胞因子^[14]；麝香具有抗炎、兴奋中枢、苏醒作用。Quercetin (槲皮苷) 为大枣、红花共有成分，经口服后在肠道细菌的作用下分解为槲皮素和糖类；槲皮素经肠上皮细胞吸收，发挥抗氧化、治疗心血管疾病、抗炎、抗脑损伤中药^[15-16]。beta-sitosterol (β-谷甾醇) 为桃仁、赤芍、大枣、红花、生姜共有成分，具有抗氧化、降低胆固醇、抗焦虑、抗惊厥、抑制炎症因子分泌^[17]。baicalein (黄芩素) 为红花、赤芍共有成分，是神经元细胞中的有效自噬诱导剂，通过抑制 mTOR 途径诱导神经元细胞自噬，促进 α-syn 在神经元细胞中的降解，并拮抗 α-syn 对神经细胞的毒性损伤以达到神经保护的目的^[18]；β-carotene (β-胡萝卜素) 是天然的抗氧化剂，可通过减轻 eNOS 脱偶联和硝化应激损伤，发挥抗缺血性脑损伤作用^[19]；luteolin (毛地黄黄酮) 为红花成分，能通过提高因脑缺血再灌注损伤引起的 SOD、GSH-Px、CAT 活性下降，降低升高的 MDA 水平，进而发挥抗脑缺血再灌注损伤作用^[20]。

对通窍活血汤作用于血管性痴呆的 33 个共同靶点进行拓扑、聚类分析，发现靶点之间作用与被作用的复杂关系，并重点分析靶点之间联系排名前十的靶点，初步揭示药物疾病共同靶点的作用机制。IL6、IL1β、ICAM1、VCAM1 是炎症因子，CRP 是炎症特异性反应，血管内皮细胞损伤引起血管病变继发脑缺血，缺血中心区神经元释放相关分子

组织损害是血管性痴呆发病的主要病理过程，其发病机制、生物学标志物、早期预防、后期治疗是血管性痴呆研究领域中的重点和热点。中药是一种具有多种生物活性的多组分复杂体系，在干预疾病过程中体现出复方制剂多成分、多靶点、多通路整合调节的作用特点，故采用网络药理学构建疾病与药物多通路、多靶点复杂的机制，系统研究药物疾病靶点作用机制及发现潜在靶点，既可系统阐述与疾病相关作用机制，又可为潜在靶点及机制的研究提供新

模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 激活免疫应答, 而后星形胶质细胞和小胶质细胞活化释放 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等一系列炎症因子, 使得血管内皮细胞 ICAM-1、血管内皮细胞黏附分子 VCAM1 表达上调, 引发细胞炎症反应, 使神经元发生不可逆死亡^[21]。NO 是一种血管、神经活性物质, 具有调节脑血流、抑制或促进神经递质释放、兴奋神经元、引发炎症、学习记忆功能。脑缺血缺氧以后, 兴奋性氨基酸增加激动 NMDA 受体, 灰质氧化和线粒体损伤、细胞内钙超载, 激活 NOS 释放大量对脑神经有害的 NO, 介导迟发性神经死亡, 谷氨酸过度释放, 引起海马区信号传递释放障碍, 继而引起学习障碍; 抑制神经胶质细胞 NOS3 的生成可以防止轴突线粒体分裂, 恢复线粒体活力, 维持 Miro-2 水平来保护轴突, 进而保护脑损害^[22-23]。CCL2 是人体内细胞趋化因子, 介导单核细胞迁移; 在脑缺血缺氧的情况下, 氧化应激、细胞因子或者生长因子的刺激等的介导, 其表达水平会显著升高, 然后损伤内皮细胞的紧密连接和破坏血脑屏障, 增加免疫细胞的募集以加重炎症反应, 活化小胶质细胞, 兴奋多巴胺神经元, 通过抑制 CCL2 的表达可以减轻脑缺血后的炎症反应及神经损害^[24]; 同时 CC 趋化因子受体 (CCR2) 是通过与 CC 趋化因子配体 (CCL2) 结合发挥作用的, CCR2 受体细胞在 CCL2 的诱导迁移至炎症部位, 分化巨噬细胞, 释放炎症因子, 发挥吞噬功能; CCR2 神经祖细胞在 CCL2 的介导下被吸引至神经损伤处并分化成神经元, 以发挥神经再生功能^[25]。VEGFA 是通过与 VEGFR2 结合激活两条信号通路而发挥作用: 第一, 激活 Src 信号通路后, 导致内皮细胞上 $\alpha 6\beta 1$ 整合素与其配体分离, 进一步激活金属基质蛋白酶 (MMPs, 主要是 MMP2、MMP9), 降解细胞外基质, 促进内皮细胞的迁移; 第二, 激活经典的 PI3/AKT 信号通路, 释放钙离子、PKC 等第二信使促进内皮细胞活化、分裂、增殖, 促进血管新生^[26]。PTGS2 是前列腺素内源性过氧化物合酶 PTGS 的 2 个异构酶, PTGS 及其产物参与血压调节、炎症反应、凝血平衡、肿瘤新生等多种生理病理过程^[27]。SERPINE1 基因多态性与 aSAH 后迟发性脑缺血和功能预后有关。这些关联可能来自纤溶酶原激活物抑制剂 1 水平的改变^[28]。

对通窍活血汤作用血管性痴呆的 33 个靶点进行 GO 富集分析以及上述重要靶点分析, 在生物过程方面, 排名前十五的条目中, angiogenesis (血管生成)、positive regulation of nitric oxide biosynthetic process (一氧化氮生物合成过程)、cellular response to hypoxia (细胞对缺氧的反应)、positive regulation of endothelial cell proliferation (血管内皮细胞增值的正向调控)、positive regulation of protein phosphorylation (蛋白质磷酸化的正调控)、inflammatory response (炎症反应)、negative regulation of calcium ion transport (钙离子转运的负调控)

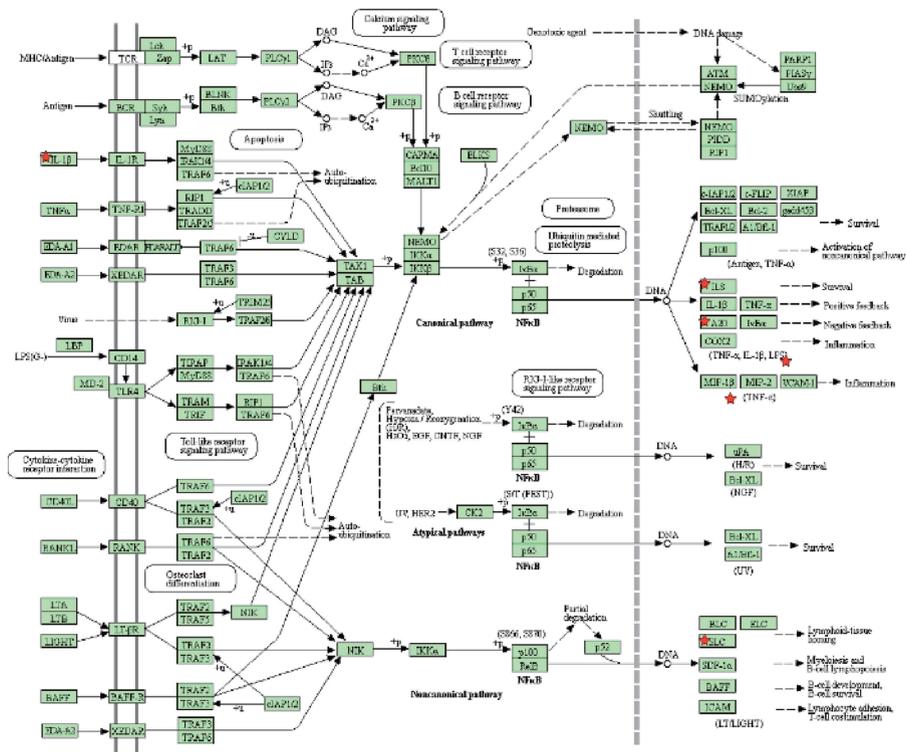
主要表现为脑损伤缺血缺氧后, 发生应激免疫反应, 一氧化氮合成、血管内皮再生、蛋白质受蛋白酶分解继发

内源性炎症反应的级联生物过程; 分子功能方面, 排名前 15 的条目中, heme binding (血红素结合) 功能使血液中多余的游离血红素与血红素结合蛋白相结合后清除, 防止游离血红素导致氧化应激反应对血管系统造成损伤并加重炎症反应^[29-30]; serine-type endopeptidase activity (细胞因子活性) 如 TNF- α 、IL-1 β , IL-6 等炎性细胞因子的表达, 是脑组织细胞损伤的表现也是进一步发展的加重机制。nitric-oxide synthase activity (一氧化氮合酶活性), 脑缺血缺氧, 兴奋性氨基酸增加激动 NMDA 受体, 细胞内钙超载, 激活 NOS 释放大量对脑神经有害的 NO, 最终造成血管内皮的损害, 缺血区域脑组织支配相应功能的缺失^[31]。细胞成分方面, 排名前 15 的条目中, platelet alpha granule lumen (血小板 alpha 颗粒腔), 血小板通过释放血小板 alpha 颗粒内容物促进血管内皮的修复, 而血管内皮的损伤能够引起血栓、血管炎、出血、动脉粥样硬化等; proteinaceous extracellular matrix (蛋白质性细胞外基质) 则与粥样斑块的稳定性密切相关; extracellular matrix (细胞外基质) 通过 MMP9 介导分解细胞外基质, 导致缺血再灌注后血脑屏障损伤, 通过抑制 MMP9 激活可改善血脑屏障通透性^[32]; blood microparticle (血液微粒) 如 IL-6、VEGFA、MMP9 等微粒直接或间接与脑组织损害相关。通过拓扑分析及 GO 富集分析表明通窍活血汤对脑梗后血管性痴呆的多通路、靶点的作用机制, 治疗机制及靶点的多样性。

经 KEGG 及聚类分析得出与血管性痴呆相关关系较为密切的 5 条通路, 分别为 TNF signaling pathway (肿瘤坏死因子信号通路): 由 VCAM1, AKT1, ICAM1, IL-6, CCL2, PTGS2, MMP9, IL-1 β 等主要靶点构成, 肿瘤坏死因子可以诱导白细胞介素等促炎细胞因子, 从而引起炎症反及损伤血管内皮细胞^[33]; HIF-1 signaling pathway (缺氧诱导因子-1 信号通路): 由 AKT1, IL-6, HIF1A, HMOX1, VEGFA, SERPINE1, IFNG, NOS3 靶点构成的通路; 缺氧时, 线粒体呼吸链电子传递及氧化磷酸化发生障碍, 进而导致电子传递链上酶活性抑制、氧化磷酸化水平降低, ATP 合成减少、自由基产生增多, 突触减少, 神经传导速度下降, 神经元坏死或凋亡而出现临床认知功能下降表现, HIF-1 能改善脑组织缺血, 减少组织再灌注损伤, 改善局部能量代谢障碍, 促进血流动力学恢复和新生血管生成, 维持神经细胞生存微环境的稳定^[34-35]; VEGF signaling pathway (血管内皮生长因子信号通路): 由 AKT1, PTGS2, VEGFA, NOS3 靶点构成, VEGF 及其受体能诱导血管新生及神经发生、促进神经功能的恢复^[36]; Complement and coagulation cascades (补体和凝血级联): 由 PLAT, THBD, F3, SERPINE1, PLAU 靶点构成; 与凝血关系密切; NF-kappa B signaling pathway (NF-kappa B 信号通路): NF-kB 通路由 VCAM1, ICAM1, PTGS2, IL-1 β 靶点构成; 通过诱导细胞增殖分化、介导细胞炎症免疫和诱导细胞凋亡从而发挥基因转录的生物学效应; 研究表明, 川芎、红花、赤芍、大枣、桃仁、生姜、葱白、麝香的有效化合物通过诱导 SER-

PINE1、VEGFA、PTGS2、COX-2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、AKT1等靶点,启动TNF signaling pathway、HIF-1 signaling pathway、VEGF signaling pathway、Complement and coagulation cascades、NF-kappa B signaling pathway等通路而发挥对血管性痴呆治疗机制及靶点的多样性,如抗炎、抗氧化、钙通道的调节、血脑屏障保护、调节脑血流、稳定斑块、抑制或促进神经递质释放、促进神经元再生等;本研究选取NF-kappa B signaling pathway阐述其通路机制,见图7,脑组织损伤后可出现不同程度的神经细胞损伤,而成人神经干细胞(NSCs)属于休眠状态,在病理及外因的刺激下可激活,表现出再生及修复能力,促进神经干细胞

再生,其中NF- κ B是诱导细胞增殖分化、免疫、凋亡的关键性转录因子;NF-kappa B信号通路由NF- κ B、NF- κ B抑制蛋白(I κ B)、I κ B激酶复合物(IKKs)和其上游激酶组成。脑缺血后,蛋白激酶级联反应被激活,I κ B磷酸化,随之被蛋白酶快速降解,NF- κ B被激活,进入细胞核,启动靶基因的转录,诱导与免疫、炎症反应和凋亡,激活局部内皮细胞和白细胞表面黏附分子的释放数量及功能的上调,造成局部血管的堵塞。研究表明通过干预使I κ B α 表达增加、p-NF κ B、p-p65的表达减少,从而达到抑制NF- κ B信号通路中炎症介质反应起到脑保护作用^[37]。



注:红色五角星为该通路所包含的通窍活血汤作用血管性痴呆的靶点。

图7 NF- κ B信号通路流程图

综上所述,本研究通过网络药理学对通窍活血汤作用于血管性痴呆的机制进行研究,分别从药物疾病靶点预测筛选、PPI分析、GO富集、KEGG通路、聚类进行分析,进而预测通窍活血汤通过如抗炎、抗氧化、钙通道的调节、血脑屏障保护、调节脑血流、稳定斑块、促进血管再生、抑制或促进神经递质释放、促进神经元再生等机制发挥脑保护作用,最后通过分子对接,验证了通窍活血汤有效化合物与其作用的靶点结合活性较好,建立在此基础上的靶点预测具有较高的可信度,进而证明本研究预测的真实性。

参考文献:

[1] 单永琳,刘国华.血管性痴呆的研究现状[J].医学综述,2017,23(8):1589-1594.
[2] 贾建平.《中国痴呆与认知障碍诊治指南》简介[C]//2009全国抗衰老与老年痴呆学术会议论文汇编.福州:

中国药理学学会,2009:8-9.
[3] 王枫,刘敬霞,顾玉宝,等.血管性痴呆的中医研究进展和治疗现状[J].辽宁中医杂志,2016,43(9):1997-2000.
[4] Erkinjuntti T, Román G, Gauthier S, et al. Emerging therapies for vascular dementia and vascular cognitive impairment[J]. Stroke, 2004, 35(4): 1010-1017.
[5] 相鲁闽.《医林改错》与活血化瘀三汤方[J].河南中医,2014,34(10):1891.
[6] 江颖,王凯华,方兴,等.中药通窍活血汤对脑缺血再灌注大鼠神经营养因子及氧自由基的影响[J].基因组学与应用生物学,2018,37(7):3085-3093.
[7] 韦冰心,卢昌均,刘国成,等.通窍活血汤对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马突触可塑性影响[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(7):28-31.
[8] Li J S, Zhao P, Li Y, et al. Systems pharmacology-based dis-

- section of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(15): 15290.
- [9] 董立军, 白冰瑶, 周 茜, 等. 红枣浓缩汁缓解小鼠体力疲劳及调节免疫功能的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(12): 314-318.
- [10] 刘 飞, 邓 云, 段春寒. 中药红花抗脑缺血损伤作用机制的研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2018, 16(1): 151-154.
- [11] 辛 静. 桃仁药理作用机临床应用研究新进展[J]. *健康之路*, 2016, 15(1): 20.
- [12] 吴修红, 孙晓兰, 胡妮娜, 等. 赤芍功效物质基础研究进展[J]. *中医药信息*, 2017, 34(2): 120-122.
- [13] 姜程曦, 林良义, 宋 娇, 等. 姜中姜酚和姜醇的研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(16): 2499-2504.
- [14] 郑琼莉, 戴 榕, 冷 沁, 等. 葱白提取物干预慢性心律失常纤维化的机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(12): 2829-2830.
- [15] Choi E M. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(3): 211-216.
- [16] Young-Min Ham W Y S P. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bel-xL[J]. *J Func Foods*, 2012, 4(1): 253-262.
- [17] 刘威良, 姬 昱, 黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展[J]. *农产品加工*, 2019, 20(1): 77-79; 82.
- [18] 谢利霞, 赵飞宇, 王 冕, 等. 黄芩素通过抑制 mTOR 通路激活自噬促进神经细胞过量表达的 α -突触核蛋白清除[J]. *河北医科大学学报*, 2017, 38(5): 585-589.
- [19] Mahmood Qaisar. 天然抗氧化物经由抗硝化应激机制介导缺血性脑损伤保护作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [20] 孙 波, 蔡鑫君, 吴婷婷, 等. 红花提取液对小鼠缺血再灌注脑损伤保护作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(2): 205-207.
- [21] 陈孝男, 杨爱琳, 赵亚楠, 等. 缺血性脑卒中的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 422-432.
- [22] Bastian C, Zaleski J, Stahon K, et al. NOS3 inhibition confers post-ischemic protection to young and aging white matter integrity by conserving mitochondrial dynamics and miro-2 levels[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(28): 6247-6266.
- [23] 黄伟强, 李 惠, 邹立华, 等. 血管性痴呆患者乙酰胆碱血浆一氧化氮水平及血液流变学指标的研究[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(14): 2076-2077.
- [24] 贺树成, 李运曼, 方伟蓉. CCR2/CCL2 对脑缺血再灌注损伤影响的研究进展[J]. *药学与临床研究*, 2018, 26(3): 196-201.
- [25] Hung Y W, Lai M T, Tseng Y J, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 affects migration of hippocampal neural progenitors following status epilepticus in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10(1): 777.
- [26] 狄云海. LncRNA MALAT1 与 microRNA181b 调控缺血性脑卒中后血管新生的初步研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
- [27] 杨 倩, 吕莉莉, 孙 蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析[J]. *中草药*, 2018, 49(11): 2606-2613.
- [28] Hendrix P, Foreman P M, Harrigan M R, et al. Association of plasminogen activator inhibitor 1 (SERPINE1) polymorphisms and aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2017, 105(9): 672-677.
- [29] Jung J Y, Kwak Y H, Kim K S, et al. Change of hemopexin level is associated with the severity of sepsis in endotoxemic rat model and the outcome of septic patients[J]. *J Crit Care*, 2015, 30(3): 525-530.
- [30] Mehta N U, Reddy S T. Role of hemoglobin/heme scavenger protein hemopexin in atherosclerosis and inflammatory diseases[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5): 384-387.
- [31] 张 东, 焦富英, 韩冰凌, 等. 针刺联合血塞通注射液对脑梗死患者神经功能缺损及细胞因子水平影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(1): 141-144.
- [32] 野战鹰, 邢邯英, 潘宝根, 等. 血脑屏障紧密连接在血管性认知障碍中作用的研究进展[J]. *现代预防医学*, 2018, 45(19): 3639-3642.
- [33] Huang Y, Qiu J P, Zhang D H, et al. Elevated soluble CD40 ligand in diabetic patients with painless myocardial infarction[J]. *Biofactors*, 2011, 37(2): 88-94.
- [34] 钱 来, 徐 运. 血清低氧诱导因子-1 α 与卒中后认知障碍相关性研究[C] //第十五次中国脑血管病大会 2015 论文汇编. 南京: 中华医学会, 2015: 649.
- [35] 吴 琼. 参知健脑方对缺氧致认知功能障碍大鼠线粒体损伤的保护机制的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [36] 龙建飞, 张秋霞, 王 蕾, 等. 血管内皮生长因子及其受体在缺氧缺血性脑损伤的作用研究[J]. *世界中医药*, 2015, 10(4): 637-639.
- [37] 王 玉, 杨洁红, 何 昱, 等. 养阴通脑颗粒对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF- κ B 信号通路的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3713-3717.