

基于 UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS 结合网络药理学及动物实验探讨益气活血汤对缺血性脑卒中的作用

刘平¹, 吴凯², 赵生文^{3*}

(1. 海南省司法医院, 海南海口 571100; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530000; 3. 海南医学院第一附属医院, 海南海口 570102)

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)、网络药理学和动物实验探讨益气活血汤对缺血性脑卒中 (IS) 的作用。方法 采用 UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS 技术分析益气活血汤潜在活性化合物, 并基于 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库对化合物靶点进行预测; 从 GeneCards 等数据库检索 IS 疾病相关靶点, 与化合物靶点取交集获得关键靶点, 建立潜在活性化合物-靶点调控网络和蛋白互作网络 (PPI), 并对关键靶点进行 GO 和 KEGG 分析。建立大脑中动脉栓塞 (MCAO) 大鼠模型, 观察大鼠神经功能缺损、血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF 和 MMP-9 水平及脑梗死率情况, 采用 HE 染色法观察大鼠脑组织病理变化, 并通过蛋白免疫印迹法分析大鼠脑组织中相关蛋白的表达。结果 共筛选出益气活血汤潜在活性化合物 37 个, 作用靶点 598 个, 与 8 953 个 IS 疾病靶点取交集后获得关键靶点 499 个。KEGG 分析表明, 关键靶点主要富集于 PI3K/Akt 等信号通路。动物实验表明, 益气活血汤可改善 MCAO 大鼠神经功能缺损症状, 减少脑梗死率, 抑制炎症反应, 改善脑组织病理形态, 同时上调 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的相对表达。结论 益气活血汤可通过多成分、多途径、多靶点抑制炎症反应, 调节 PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白表达发挥治疗 IS 的作用。

关键词: 益气活血汤; 缺血性脑卒中; UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS; 网络药理学; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)08-2785-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.08.049

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是常见的急性脑血管事件。据调查, 2019 年我国 IS 的患病率高达 1255.9/100 000, 并导致了 103 万人死亡^[1]。目前, 4.5 h 内接受重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓是 IS 治疗的首选方法^[2]。然而, 限于我国卒中诊治现状, 能到达上述治疗时间窗, 并接静脉溶栓治疗的患者仅 19.7%^[3]。由此可见, 采用多种手段加强对 IS 的防治显得十分重要。

根据 IS 疾病特点, 将其归属于中医学“中风”范畴, 其主要病机为“气虚”和“血瘀”, 临床治则当以益气活血化痰为主^[4]。益气活血汤具有补气活血祛瘀功效, 已广泛应用于心血管疾病的治疗。研究表明, 联合益气活血汤可明显提升西医治疗 IS 的效果, 改善患者预后^[5]。然而, 目前对益气活血汤治疗 IS 的机制尚不清楚。网络药理学基于整体观, 在预测中医药作用机制方面已经取得了重大成果。但目前网络药理学药效物质基础研究多来自于公共数据库, 导致研究结果出现“同质化”现象, 这与中医的整体观和辨证论治思想相违背^[6]。本研究通过 UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS 技术分析益气活血汤的药效物质基础, 在此基础上进行网络药理学分析和实验验证。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只, 体质量 180~200 g, 购自广西医科大学 [实验动物生产许可证号 SCXK (桂) 2020-0003], 大鼠饲养于广西中医药大学实验中心 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2022-0004], 环境温度 23 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~60%, 空气流通, 昼夜明暗交替各 12 h, 自由进食饮水, 适应性喂养 7 d。本研究动物实验在广西中医药大学实验中心进行, 并经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查通过 (伦理号 sd20220433)。

1.2 试剂与药物 4-羟基香豆素 (批号 S31511)、阿魏酸 (批号 B20007)、槲皮素 (批号 B20527)、绿原酸 (批号 B20782)、没食子酸 (批号 B20851)、芍药苷 (批号 B30371)、丹参素 (批号 B20254)、木犀草素 (批号 B20888)、毛蕊异黄酮 (批号 B21505)、新隐丹参酮 (批号 S17092)、芒柄花黄素 (批号 B20836) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均 \geq 95%; 素伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 2208145)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (批号 2153B)、IL-6 (批号 20213257)、IL-1 β (批

收稿日期: 2023-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82074034)

作者简介: 刘平, 副主任医师, 从事脑血管疾病的临床和基础研究。E-mail: liuping202212@126.com

* 通信作者: 赵生文, 副主任医师, 从事脑血管疾病的临床和基础研究。E-mail: zsw20111215@163.com

号 20212147)、TNF- α (批号 20214478)、VEGF (批号 20210987) 和 MMP-9 (批号 20200241) 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; PI3K (批号 2021335)、p-PI3K (批号 2021824)、Akt (批号 2021205) 和 p-Akt (批号 2021639) 抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司; β -actin 抗体(批号 20220114) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; RIPA 裂解液(批号 2201356)、Tricine-SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号 2112308) 均购自上海尚宝生物科技有限公司; 5% 脱脂奶粉(批号 21113052) 购自上海味庆生物科技有限公司; TTC 染色液(批号 C12145) 购自西安齐岳生物科技有限公司。质谱级甲醇、乙腈和甲酸均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 分析级甲醇购自南京化学试剂股份有限公司。中药饮片黄芪(批号 22033324)、丹参(批号 220157842)、党参(批号 22012417)、白术(批号 22053324)、茯苓(批号 22032216)、益母草(批号 22027891)、车前草(批号 22053328)、当归(批号 22032581)、川芎(批号 22013258) 和芍药(批号 22041176) 均购自广西中医药大学广西中医药大学第一附属医院, 并由李大为教授鉴定为正品。

1.3 仪器 Thermo LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪和 Xcalibur 2.1 工作站均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(1.8 μ m, 100 mm \times 2.1 mm) 购自沃特世科技(上海)有限公司; 蛋白质印迹分子成像系统购自美国 Azure Biosystems 公司; KH-LQ3500 型冰冻切片机购自湖北孝感阔海医疗科技有限公司; KH30RH 型高速冷冻离心机购自湖南凯达科学仪器有限公司; BX53 正置荧光显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司; DYY-16D 型电泳仪电源和 DYCP-38C 型电泳仪购自浙江明德仪器有限公司; 全波长酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司。

1.4 软件 R version 4.1.3 (<https://www.r-project.org/>)、Cytoscape version 3.9.0 (<https://cytoscape.org/>)、Chem3d version 14.0.0.117 (<https://www.chemdraw.com.cn/>)、AutoDockTools version 1.5.6 (<https://autodock.scripps.edu/>)、PyMOL version 2.5 (<https://pymol.org/2/>)、Image-Pro Plus version 6.0 (<https://www.mediacy.cn/>) 和 Vina version 1.2.2 (<https://vina.scripps.edu/>)。

2 方法

2.1 益气活血汤潜在活性化合物

2.1.1 益气活血汤供试品溶液制备 取黄芪、党参、益母草各 30 g, 当归 12 g, 川芎、白芍、白术各 10 g, 丹参、茯苓、车前子各 15 g, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 每次 2 h, 过滤, 浓缩至 1 g/mL。取 1 mL 浓缩液, 加入 70% 甲醇(20 mL) 摇匀, 4 000 r/min 离心 15 min, 离心后取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 即得益气活血汤供试品。

2.1.2 对照品溶液制备 取对照品 4-羟基香豆素、阿魏酸、槲皮素、绿原酸、没食子酸、芍药苷、丹参素、木犀

草素、毛蕊异黄酮、新隐丹参酮和芒柄花黄素各 1 mg 于 10 mL 容量瓶中, 使用甲醇定容, 即得对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(1.8 μ m, 100 mm \times 2.1 mm); 流动相 0.1% 甲酸乙腈(C) -0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 2%~5% C; 2~5.5 min, 5%~13% C; 2.5~16 min, 13%~36.5% C; 16~18 min, 36.5%~60% C; 18~27 min, 60%~80% C; 27~30 min, 80%~98% C; 30~35 min, 98% C); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样体积 5 μ L。

2.1.4 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正负离子扫描; 喷雾电压 2.5 kV、-3.5 kV; 毛细管加热温度 350 $^{\circ}$ C; 离子源温度 100 $^{\circ}$ C; 鞘气、辅助气 N₂, 体积流量 11 L/min; 扫描范围 m/z 100~1 200; 扫描分辨率 30 000。

2.1.5 数据分析和潜在活性化合物确定 采用 Thermo Xcalibur (Version 2.2) 软件对质谱数据进行分析, 并基于主要色谱峰、化合物相对分子量、离子碎片信息、对照品及相关文献报道鉴定供试品溶液中的化合物。于 TCMSP 数据库中进行检索, 筛选口服生物利用度(oral bioavailability, OB) \geq 30%, 且药物相似性(drug-likeness, DL) \geq 0.18 的化合物作为益气活血汤的潜在活性化合物。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 益气活血汤潜在活性化合物和缺血性脑卒中疾病相关靶点预测 将“2.1”项下获得的潜在活性化合物于 TCMSP 数据库中进行检索获取化合物作用靶点; 同时, 在 Pubchem 数据中下载上述益气活血汤潜在活性化合物的 2D 结构, 并导入 SwissTargetPrediction 数据库预测上述化合物的作用靶点(物种设置为“*Homo sapiens*”, 且 Probability > 0), 对 2 个数据库预测的作用靶点进行整合, 并通过 UniProt 数据库对靶点名称进行标准化处理。在 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 数据库中, 以“ischemic stroke”为检测词进行检索, 将 5 个数据获得靶点取交集, 作为 IS 疾病相关靶点。将潜在活性化合物的作用靶点与 IS 疾病相关靶点进行交集, 作为益气活血汤治疗 IS 的关键靶点。

2.2.2 潜在活性化合物-靶点调控网络及蛋白互作网络(PPI) 构建 基于益气活血汤潜在活性化合物和关键靶点信息, 建立益气活血汤治疗 IS 的潜在活性化合物-靶点调控网络。同时, 将关键靶点导入 STRING 数据库, 选择物种为“*Homo sapiens*”, 设置 minimum required interaction 值为 0.98, 并隐藏网络中断开连接的节点, 构建 PPI 网络, 以“tsv”文件输出。

2.2.3 益气活血汤治疗 IS 的核心靶点网络构建 将“2.2.2”项下 STRING 数据库输出的“tsv”文件导入 Cytoscape 软件, 通过 CytoNCA 插件计算各靶点 Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC 和 Network 这 6 个拓扑性质参数及其中心位值, 以 6 个拓扑性质参数均大于中位值作为筛选条件建立子网络, 再以相同的方法对子网络进行一次拓扑分析, 得到最终核心网络和核心靶点。

2.2.4 关键靶点的GO和KEGG富集分析 使用Metascape数据库对“2.2.1”项下获得的关键靶点进行GO和KEGG富集分析,并通过R软件“ggplot2”和“enrichplot”包对KEGG通路及GO中的生物学进程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)关键靶点的富集结果进行可视化处理。

2.2.5 分子对接 为验证药物作用的可能性,选择核心网络中感兴趣的靶点,并在益气活血汤潜在活化合物-靶点调控网络中找出相对应的化合物,分别于PDB和PubChem数据库获得蛋白和化合物的三维结构,通过Chem3d、AutoDockTools、PyMOL和Vina软件对二者进行分子对接模拟,评价候选成分与相关核心靶点之间的结合能力,并选取其中最佳对接模式。以结合能 <0 kcal/mol认为化合物配体与靶点蛋白间可进行自发结合,并以结合能 <-5 kcal/mol作为评选标准,结合能越小,代表化合物配体与靶点蛋白结合能力越强。

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物造模、分组和给药 90只大鼠适应性喂养7d后,按照体质量随机分为假手术组、模型组和益气活血汤

低、中、高剂量组,每组18只。除假手术组外,其余各组大鼠采用大脑中动脉线栓法建立大脑中动脉栓塞(MCAO)模型^[7],术后对大鼠进行Zea-longa评分,具体方法为无神经缺损症状记0分;不能完全伸展对侧前肢记1分;行走时向偏瘫侧转圈记2分;行走时向偏瘫侧倾斜记3分;不能自发行走或出现意识障碍记4分;死亡记5分。评分结果为1~3分的大鼠纳入研究,否则予以剔除。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余操作步骤同造模组。根据人与大鼠等效剂量换算^[8],益气活血汤低、中和高剂量组分别灌胃给予7.8、15.6、31.2 g/kg药液,假手术组和模型组均灌胃给予等体积生理盐水,每天1次,连续灌胃2周。

2.3.2 神经功能缺损程度评价 采用改良Garcia评分量表对各组大鼠给药前和末次给药60 min后神经功能缺损情况进行评价,改良Garcia评分主要从动物自主运动(观察大鼠笼内5 min活动)、体态对称性、前肢伸展运动、抓持和攀爬铁笼能力、两侧身体触觉反馈及两侧胡须触碰反应6个方面进行评分,分值3~18分,分值越低代表神经功能缺损越严重^[9],评分标准见表1。

表1 改良Garcia评分量表

评分/分	自主运动	体态对称性	前肢伸展运动	抓持和攀爬铁笼能力	两侧身体触觉反馈	两侧胡须触碰反应
0	无自主运动	—	偏瘫	—	—	—
1	很少活动,仅有位置变化	偏瘫	显著不对称	不能攀爬或转圈	一侧无反应	一侧无反应
2	有活动,接触笼子边缘少于3个	体态不对称	轻度不对称	一侧损害表现	一侧反应迟钝	不对称
3	有活动,接触笼子4个边缘	体态对称	对称	攀爬有力、抓持有力量	双侧反馈正常	对称

2.3.3 ELISA法检测血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF和MMP-9水平 所有大鼠末次给药60 min后,取腹主动脉血,3 000 r/min离心10 min,取上清液置于-80℃冰箱保存待测。按照ELISA试剂盒说明要求操作,检测各组大鼠血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF和MMP-9水平。

2.3.4 脑TTC染色法检测梗死率 随机选取5只大鼠测定脑梗死体积。大鼠处死后断头取脑,脑组织于-20℃下冷冻20 min,以冠状位6等分均匀切取脑片,脑片厚度约2 mm。将切取下的脑片立即置于0.4% TTC染液中,避光37℃恒温水浴染色30 min,期间每隔5 min翻面1次,确保染色均匀。染色完成后,倒出TTC染液,用4%多聚甲醛溶液固定,使用数码相机对每一脑片的尾面和头面进行拍照保存。使用Image-Pro Plus(version 6.0)软件对图像进行分析,计算每一脑片尾面和头面的梗死面积和总面积,并根据梯形法则计算脑梗死体积和脑总体积,并计算脑梗死率,公式为脑梗死率=脑梗死体积/脑总体积 $\times 100\%$ 。

2.3.5 HE染色观察脑组织病理学 从各组剩余的13只大鼠中随机抽取3只,对脑组织进行病理学观察。大鼠末次给药60 min后,取脑组织,经乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡和包埋后于4℃冰箱保存过夜,取包埋后的脑组织,切5 μ m片,苏木素染色5 min,1%水溶伊红染液染色2 min,具体染色步骤按照试剂盒说明书进行操作,封片后于显微

镜下观察脑组织病理形态。

2.3.6 Western blot法检测脑组织相关通路蛋白表达 完成脑梗死体积检测后,取各组剩余的10只大鼠脑组织,加入RIPA裂解液,使用匀浆器打碎进行裂解,匀浆液于低温离心机中,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法对蛋白质浓度进行定量检测。使用10% SDS-PAGE分离蛋白,以Tris缓冲液转移至PVDF膜上,使用5%脱脂奶粉溶液封闭2 h,洗膜后,根据说明书,孵育目的蛋白一抗和内参GAPDH一抗,4℃过夜,再次洗膜后,加入二抗37℃孵育1 h。通过ECL高敏发光液进行显影,胶片曝光,采用凝胶成像系统分析目的蛋白和内参GAPDH蛋白灰度值的比值,以该比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.4 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内给药前后比较采用配对样本 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 益气活血汤潜在活性化合物确定 通过UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS技术对益气活血汤供试品溶液及对照品溶液进行正、负离子扫描,共获得正、负离子模式下色谱峰233个(图1),通过色谱峰保留时间、精确相对分子量、离子碎片信息并与对照品进行比对,结合47篇文献报道,共鉴定正离子模式下化合物85个,负离子模式下化合物

148个。将化合物在TCMSP数据库检索,共筛选OB值 $\geq 30\%$,且DL ≥ 0.18 的37个成分作为益气活血汤潜在活性化合物,见表2。

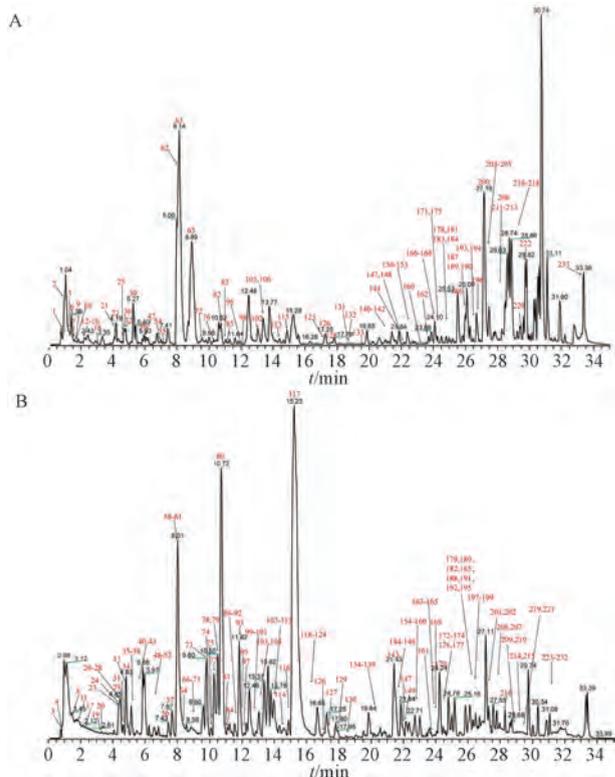


图1 正(A)、负(B)离子模式下益气活血汤总离子流图

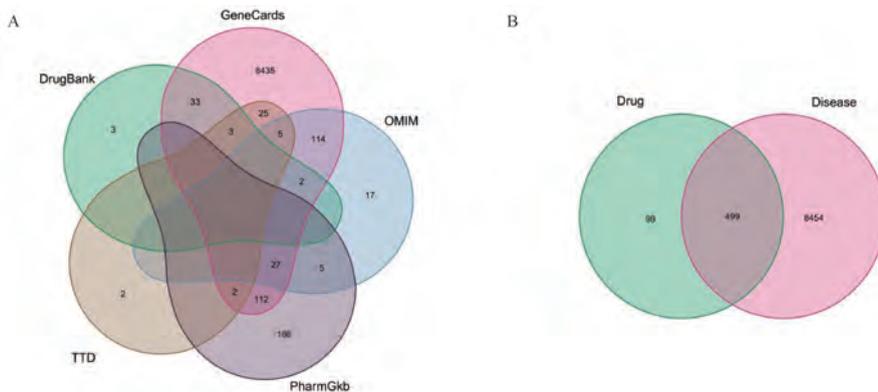


图2 IS疾病相关靶点(A)和益气活血汤治疗IS关键靶点(B)分析

3.5 益气活血汤治疗IS关键靶点的GO功能和KEGG通路分析 将499个关键靶点进行功能富集分析,GO分析结果显示,显著富集的BP、CC和MF分别有3 033、119和319个,主要包括氧化应激反应、脂多糖反应、内肽酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、膜筏和膜微区(图5A)。KEGG富集分析结果显示,关键靶点显著富集于179个信号通路,主要为脂质和动脉粥样硬化、PI3K/Akt和MAPK信号通路等(图5B)。

3.6 分子对接 取核心网络中Degree值排名前10位的靶点蛋白STAT3、EP300、JUN、HSP90AA1、Akt1、MYC、IL6、RELA、TNF和EGFR,并在潜在活性化合物-靶点调控网络找到上述靶点蛋白对应的化合物进行分子对接。结

3.2 益气活血汤治疗IS的关键靶点分析 基于TCMSP和SwissTargetPrediction数据库,剔除重复靶点后,共获得益气活血汤潜在活性化合物作用靶点598个。同时从GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD和DrugBank数据库检索IS疾病相关靶点8 953个,见图2A。益气活血汤潜在活性化合物作用靶点和IS疾病相关靶点取交集后获得关键靶点499个,见图2B。

3.3 益气活血汤治疗IS的潜在活性化合物-靶点调控网络构建 将499个交集靶点通过Cytoscape软件建立益气活血汤潜在活性化合物-靶点调控网络。由图3可知,益气活血汤中化学成分槲皮素作用的靶点最多,共计171个,其次为山柰酚和丹参酮II_A,分别有99、88个;而在作用靶点中,受到血府逐瘀汤中化学成分作用最多的靶点为PTGS2,共计有27个化学成分可作用于该靶点,其次为HSP90AA1和MMP9,分别有22和19个。

3.4 益气活血汤治疗IS的核心靶点网络 将499个关键靶点通过STRING数据库导出的tsv文件导入Cytoscape软件构建初始PPI网络(图4A),计算各靶点Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC和Network的中位值分别为94.65、0.06、6.00、0.01、1.82和2.29,得到所有参数值均大于中位值的靶点共计86个,建立子网络(图4B);再次计算子网络各靶点的上述拓扑性质参数中位值分别为26.54、0.44、16.00、0.06、8.65和9.63,得到所有参数值均大于中位值的靶点共计30个,以该30个靶点作为核心靶点并建立最终核心网络(图4C)。

表 2 益氣活血湯潛在活性化合物

编号	化合物	中文名称	t/min	分子式	离子类型	实际值 <i>m/z</i>	理论值 <i>m/z</i>	误差 ppm
1	catechol	儿茶酚	4.58	C ₆ H ₅ O ₂	[M-H] ⁻	109.030 55	109.028 40	1.554
2	albiflorin	白芍药苷	7.43	C ₂₄ H ₂₉ O ₁₃	[M+COOH] ⁻	525.160 58	525.160 26	0.313
3	paeoniflorin	芍药苷	8.01	C ₂₄ H ₂₉ O ₁₃	[M+COOH] ⁻	525.159 36	525.160 26	-0.907
4	melampyroside	山萝花苷	8.01	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₀	[M-H] ⁻	449.145 14	449.144 22	2.041
5	mutanpioside H	牡丹皮苷 H	8.38	C ₂₄ H ₂₉ O ₁₃	[M+COOH] ⁻	525.160 34	525.160 26	0.073
6	calycosin-7-O-beta-D-glucopyranoside	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	9.57	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.128 42	447.128 57	-0.153
7	morin	桑色素	10.36	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	[M+H] ⁺	303.049 71	303.049 92	-0.219
8	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside	黄芪异黄酮苷	11.43	C ₂₉ H ₃₇ O ₁₅	[M-H] ⁻	625.213 38	625.212 69	1.093
9	salvianolic acid G	丹酚酸 G	11.61	C ₁₈ H ₁₁ O ₇	[M-H] ⁻	339.051 94	339.050 51	0.581
10	salvianolic acid J	丹酚酸 J	11.62	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₂	[M-H] ⁻	537.103 52	537.102 75	0.768
11	maackiain-3-O-glucosyl-6'-O-malonate	马鞍烷-3-O-葡萄糖基-6'-O-丙二酸	11.99	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	[M+H] ⁺	533.128 42	533.128 96	-0.547
12	genkwanin	壳花素	12.02	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	[M+H] ⁺	285.075 78	285.075 75	-0.460
13	quercetin	槲皮素	12.17	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 23	447.092 18	1.042
14	cynarin	洋蓟素	13.15	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.119 20	515.118 40	1.548
15	neohesperidin	新橙皮苷	13.62	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	609.181 88	609.181 39	0.302
16	calycosin	毛蕊异黄酮	17.25	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 13	283.060 09	1.030
17	9,10-dimethoxypteroicarpin-3-O-beta-D-glucoside	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-beta-D-葡萄糖苷	18.69	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃ Na	[M+H] ⁺	571.142 27	571.142 21	0.102
18	isobenzoylpaconiflorin	异苯甲酰芍药苷	19.84	C ₃₁ H ₃₃ O ₁₄	[M+COOH] ⁻	629.186 10	629.186 48	-0.382
19	3,4',5-Trihydroxy-7-methoxyflavone	鼠李柠檬素	20.84	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	[M+H] ⁺	301.071 14	301.070 66	0.475
20	formononetin	刺芒柄花素	21.84	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	[M+H] ⁺	269.080 11	269.081 21	-0.025
21	kaempferol	山柰酚	22.14	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	[M-H] ⁻	299.055 63	299.055 01	2.058
22	wogonin	汉黄芩素	23.17	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	[M-H] ⁻	283.060 09	283.061 00	-0.460
23	iso preleoheterin	异前益母草灵素	24.18	C ₂₀ H ₃₁ O ₄	[M+H] ⁺	335.219 57	335.221 68	-2.116
24	tanshin醛dehyde	拟丹参醛	24.46	C ₁₉ H ₁₇ O ₄	[M+H] ⁺	309.112 58	309.112 13	0.444
25	tanshinone VI	丹参酮 VI	24.47	C ₁₈ H ₁₅ O ₄	[M-H] ⁻	295.097 47	295.096 48	0.985
26	przewaquinone B	紫丹参乙素	24.55	C ₁₈ H ₁₅ O ₄	[M-H] ⁻	295.097 44	295.096 48	0.955
27	trijuganone B	四氢丹参酮 I	26.01	C ₁₈ H ₁₇ O ₃	[M+H] ⁺	281.117 58	281.117 22	0.359
28	neocryptotanshinone	新隐丹参酮	26.04	C ₁₉ H ₂₁ O ₄	[M-H] ⁻	313.143 43	313.144 26	0.824
29	dihydrotanshinone I	二氢丹参酮 I	26.29	C ₁₈ H ₁₅ O ₃	[M+H] ⁺	279.101 99	279.101 57	0.419
30	protocic acid C	茯苓酸 C	26.89	C ₃₁ H ₄₅ O ₄	[M-H] ⁻	481.332 18	481.331 23	1.960
31	cryptotanshinone	隐丹参酮	27.18	C ₁₉ H ₂₁ O ₃	[M+H] ⁺	297.148 77	297.148 52	0.249
32	tumulolic acid	土莫酸	27.55	C ₃₁ H ₄₉ O ₄	[M-H] ⁻	485.363 68	485.362 53	2.356
33	tanshinone II _A	丹参酮 II _A	28.86	C ₁₉ H ₁₉ O ₃	[M+H] ⁺	295.133 12	295.132 87	0.249
34	isotanshinone II	异丹参酮 II	28.96	C ₁₉ H ₁₉ O ₃	[M+H] ⁺	295.133 12	295.132 87	0.249
35	dehydropachymic acid	去氢茯苓酸	29.83	C ₃₃ H ₄₉ O ₅	[M-H] ⁻	525.358 46	525.357 45	1.920
36	pachymic acid	茯苓酸	30.02	C ₃₃ H ₅₁ O ₅	[M-H] ⁻	527.374 08	527.373 10	1.856
37	marin	白桦脂酸	32.94	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	[M-H] ⁻	455.352 97	455.351 97	0.998

表3 部分核心靶点蛋白与益气活血汤潜在活性化合物的分子对接信息

关键靶点	PDB ID	化合物	中文名称	分子结合能/(kcal·mol ⁻¹)
STAT3	6tlc	cryptotanshinone	隐丹参酮	-9.0
EP300	2k8f	salvianolic acid G	丹酚酸 G	-7.0
JUN	1s9k	quercetin	槲皮素	-9.9
HSP90AA1	1byq	calycosin	毛蕊异黄酮	-7.3
Akt1	7nh5	kaempferol	山柰酚	-9.9
MYC	6e16	tanshinone II _A	丹参酮 II _A	-7.9
IL6	1alu	paeoniflorin	芍药苷	-6.7
RELA	3rc0	cryptotanshinone	隐丹参酮	-8.9
TNF	1a8m	formononetin	刺芒柄花素	-8.2
EGFR	1m14	quercetin	槲皮素	-7.9

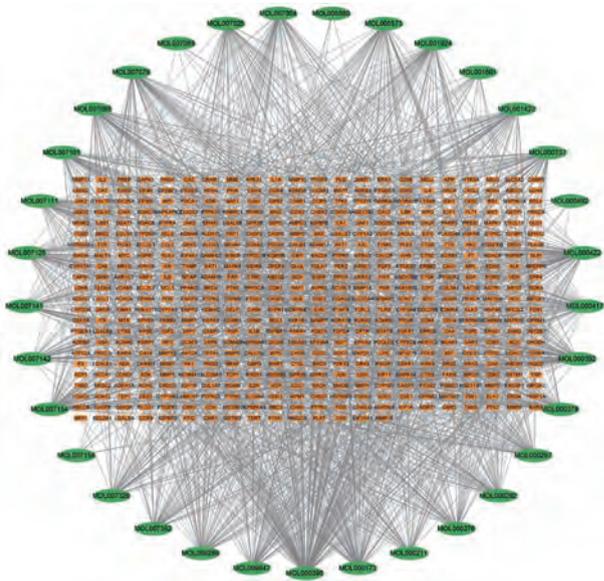


图3 益气温血汤治疗 IS 的潜在活性化合物-靶点调控网络

3.9 益气温血汤对 MCAO 大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF 和 MMP-9 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF 和 MMP-9 水平均升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,益气温血汤各剂量组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-9 水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而益气温血汤高、中剂量组大鼠血清 VEGF 水平均升高 ($P < 0.01$),见表 6。

表4 益气温血汤对 MCAO 大鼠改良 Garcia 评分的影响 (分, $\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	改良 Garcia 评分	
	给药前	给药后
假手术组	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00
模型组	10.40 \pm 1.50 ^{##}	9.87 \pm 2.07 ^{##}
益气温血汤低剂量组	10.33 \pm 1.63	11.33 \pm 1.23 [*]
益气温血汤中剂量组	9.87 \pm 1.36	13.67 \pm 1.35 ^{**}
益气温血汤高剂量组	10.27 \pm 1.75	14.87 \pm 1.19 ^{**}

注:与假手术组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

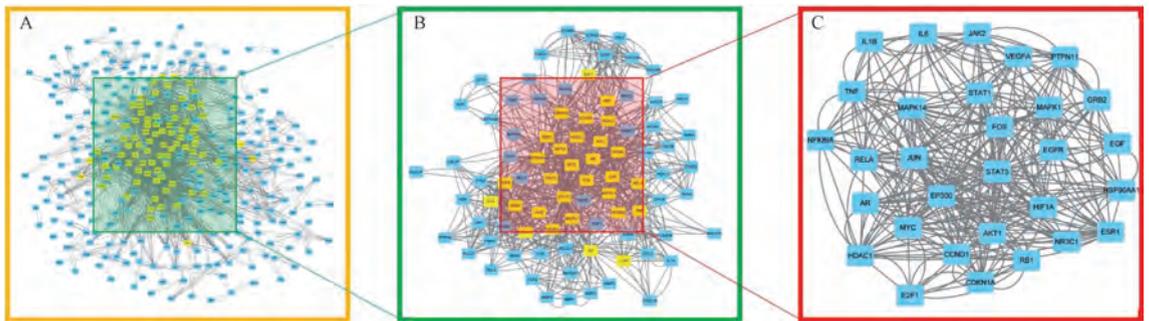


图4 益气温血汤治疗 IS 的核心靶点网络构建

表5 益气温血汤对 MCAO 大鼠脑梗死率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	脑梗死率
假手术组	0.00 \pm 0.00
模型组	47.41 \pm 1.46 ^{##}
益气温血汤低剂量组	42.19 \pm 1.30 ^{**}
益气温血汤中剂量组	18.26 \pm 1.67 ^{**}
益气温血汤高剂量组	13.44 \pm 2.34 ^{**}

注:与假手术组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

3.10 益气温血汤对 MCAO 大鼠脑组织病理形态的影响 假手术组大鼠神经元细胞排列整齐有序,结构完整,细胞

膜清晰,核仁位于细胞中央;与假手术组比较,模型组大鼠神经元细胞排列不规则,细胞核固缩,分离度增加,出现神经元细胞退行性变;与模型组比较,益气温血汤各剂量组脑组织病理形态改善,表现为神经元细胞重新排列整齐,细胞轮廓清晰,见图 8。

3.11 益气温血汤对 MCAO 大鼠脑组织 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益气温血汤各剂量组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值升高 ($P < 0.01$),见图 9。

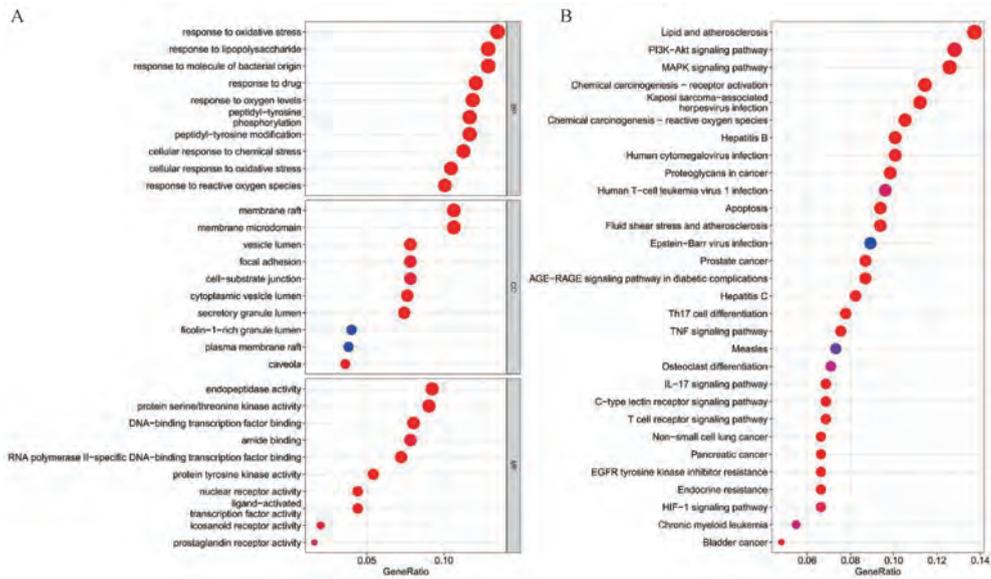


图5 益气活血汤治疗IS关键靶点的GO (A) 和KEGG (B) 分析

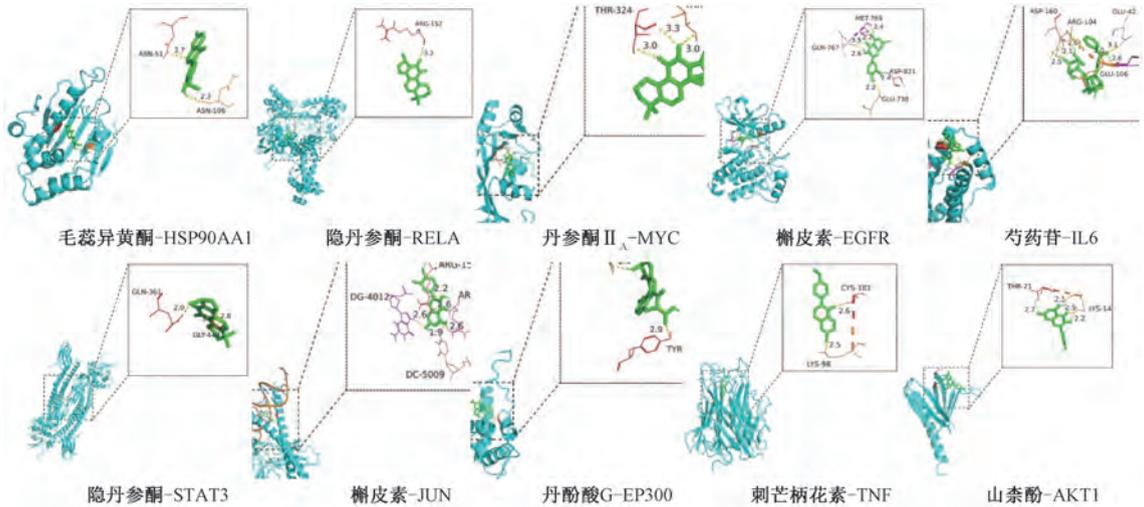


图6 部分核心靶点与益气活血汤潜在活性化合物分子对接模式示意图

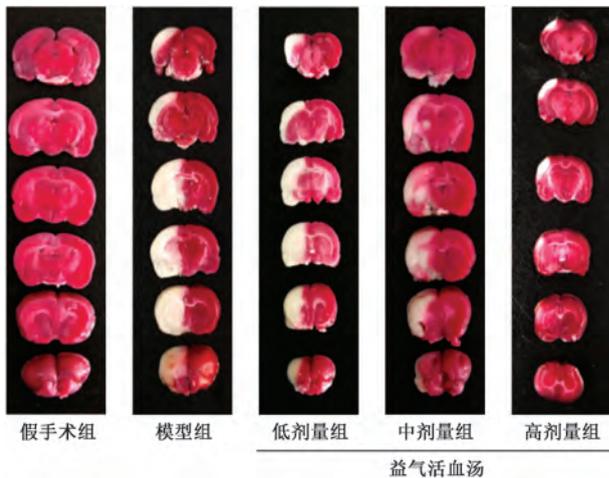


图7 各组大鼠脑组织TTC染色

4 讨论

中药复方成分复杂，解析复方的物质药理学基础，并阐明其作用机制一直是中医药研究的重点和难点领域。近几年，UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS技术为中药化学成分的快速、全面和准确鉴定提供了有力保障，为中药复方的物质药理学研究奠定了基础。本研究基于UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS技术平台，分析出益气活血汤中233个化合物，进一步根据OB和DL值共筛选获得37个潜在活性化合物。其中，芍药苷^[10]、毛蕊异黄酮^[11]、隐丹参酮^[12]、丹参酮II_A^[13]和刺芒柄花素^[14]等化合物均已证实具有改善IS神经功能缺损的作用。

基于靶点分析，本研究建立了益气活血汤潜在活性化合物-靶点调控网络。其中，作用靶点最多的潜在活性化合物为槲皮素，其次为山柰酚和丹参酮II_A。研究证实，槲皮

表6 益气活血汤对MCAO大鼠血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、VEGF和MMP-9水平的影响 (ng/L, $\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	IL-6	IL-1 β	TNF- α	VEGF	MMP-9
假手术组	9.23 \pm 4.33	63.53 \pm 7.71	159.91 \pm 2.74	70.63 \pm 5.16	103.15 \pm 25.62
模型组	30.70 \pm 3.85 ^{##}	115.93 \pm 6.85 ^{##}	273.47 \pm 8.99 ^{##}	75.53 \pm 6.73 ^{##}	241.73 \pm 31.03 ^{##}
益气活血汤低剂量组	27.04 \pm 4.05 [*]	109.78 \pm 8.60 [*]	259.80 \pm 21.27 [*]	78.99 \pm 13.66	215.27 \pm 23.82 [*]
益气活血汤中剂量组	20.29 \pm 3.50 ^{**}	87.94 \pm 6.23 ^{**}	210.38 \pm 12.07 ^{**}	97.55 \pm 9.62 ^{**}	176.09 \pm 21.97 ^{**}
益气活血汤高剂量组	17.49 \pm 2.90 ^{**}	71.42 \pm 6.58 ^{**}	174.30 \pm 15.41 ^{**}	115.92 \pm 9.24 ^{**}	125.96 \pm 25.88 ^{**}

注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

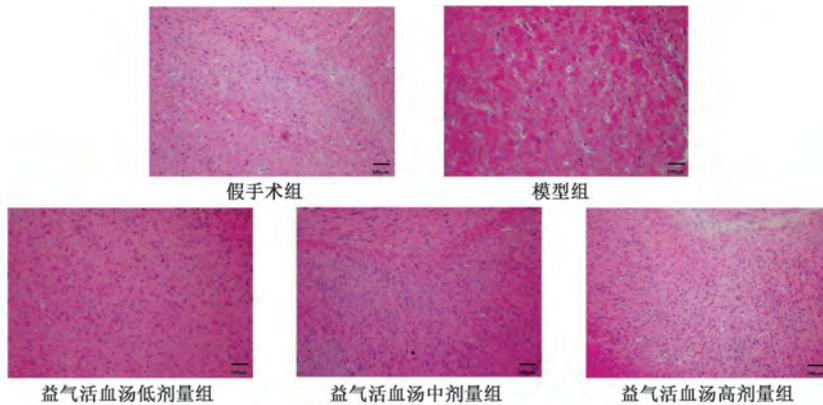
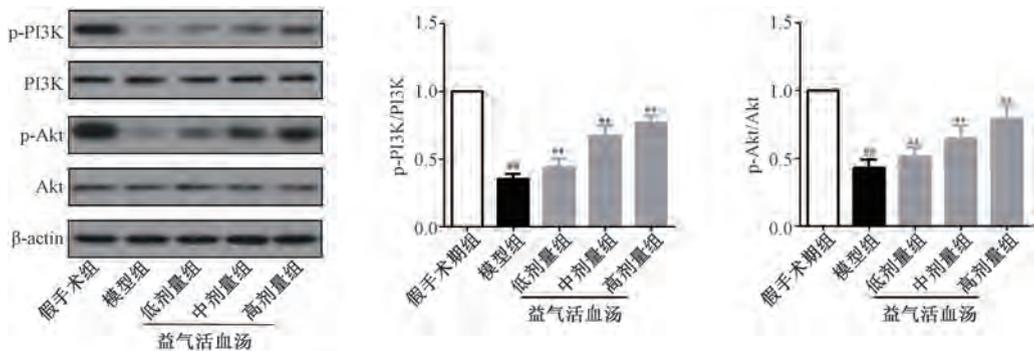


图8 各组大鼠脑组织HE染色($\times 100$)



注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

图9 益气活血汤对MCAO大鼠PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=10)

素可通过影响黑素皮质素受体-4的表达,改善中风小鼠模型的运动和感觉功能^[15]。Guo等^[16]一项系统评价结果发现,槲皮素在改善IS动物模型神经功能缺损症状、缩小梗死灶面积和减轻脑水肿等方面具有显著作用。目前研究认为,槲皮素对IS的治疗作用可能与抑制炎症反应,减轻氧化应激及抗血小板聚集等有关^[17]。此外,有研究发现,铁死亡在IS的发生和发展过程中具有重要作用,而抑制铁死亡则可减轻IS引起的神经元细胞损伤^[18-20]。Yuan等^[21]研究证实,山柰酚可通过影响Nr2/SLC7A11/GPX4信号通路抑制铁死亡,对神经元细胞具有保护作用。山柰酚血脑屏障穿透性良好,具有显著的清除氧自由基功能,既往研究证实其在延缓帕金森等神经系统退行性疾病进展方面作用显著^[22]。丹参酮II_A具有抗动脉粥样硬化、改善微循环及降低血浆粘等药理作用,已经是心肌梗死患者的常用治疗药物之一。Xu等^[23]研究发现,丹参酮II_A还可通过促进梗死灶周围新血管生成和抑制神经元凋亡,缓解MCAO模型

大鼠的神经功能缺损症状,减轻脑水肿,并改善脑组织缺血再灌注损伤引起的病理学改变。

本研究通过拓扑分析得到了包含30个靶点蛋白在内的最终核心网络。对该网络进行分析可知,靶点蛋白STAT3的Degree值最高。STAT3是一类DNA结合蛋白,可调控IL-6等多种细胞因子信号传递过程,对包括神经元细胞在内的多种细胞具有抗凋亡保护作用。Davis等^[24]研究表明,通过降低MCAO模型大鼠脑组织内STAT3表达可引起脑血管内皮功能减退,并导致梗死面积增加。本研究富集分析表明,关键靶点主要富集于PI3K/Akt等信号通路。PI3K/Akt信号通路可作用于NF- κ B、mTOR及GSK-3 β 等下游靶点,在神经元细胞存活/凋亡、自噬及突触的可塑性方面发挥重要的调控作用^[25]。目前,已有较多学者围绕PI3K/Akt信号通路对IS发病机制和治疗效果进行了研究^[26-28],这些研究均提示PI3K/Akt信号通路可延缓和阻碍IS的发生和进展,是未来IS靶向治疗药物研发的重点

方向。

在网络药理学分析基础上,本研究采用分子对接技术,根据作用靶点 Degrees 值,分析了排名前 10 位核心靶点与相应潜在活性成分结合的稳定性,结果表明,这些核心作用靶点可以与潜在活性成分形成较为稳定的构象。其中,山柰酚与 Akt1 (7nh5) 的自由能最低 (-9.9 kcal/mol)。7nh5 是一种 Akt1 及其抑制剂的结合构象, Kaixuan 等^[29]研究也同样发现山柰酚可作用于该类蛋白结构的相应位点而激活 Akt1, 增加其表达, 其主要机制可能是山柰酚与内源性抑制物竞争性结合 Akt1 蛋白, 使原 ATT1 由抑制状态转为激活状态有关。此外, 山柰酚增加 Akt1 表达还可能与激活其上游蛋白有关。Feng 等^[30]研究发现, 山柰酚可通过上调 G 蛋白偶联雌激素受体表达, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 使磷酸化 Akt 水平增加。以上研究结果进一步验证了益气活血汤对 IS 治疗作用的药效物质基础。

本研究进一步采用动物实验对网络药理学研究结果进行了验证。结果表明, 与模型组比较, 益气活血汤各剂量组大鼠组改良 Garcia 评分升高, 梗死率下降, 脑组织病理形态明显改善, 说明益气活血汤能改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损症状。IL-6^[31]、IL-1 β ^[32] 和 TNF- α ^[33] 是卒中后炎症反应的始动因子, 可对脑细胞产生毒性反应。VEGF 和 MMP-9 则具有促进梗死灶周围新生血管生成, 保持血流动力学稳定性及抗动脉粥样硬化等作用^[34-35]。本研究结果表明, 与模型组比较, 益气活血汤各剂量组大鼠血清 IL-6、IL-1、TNF- α 和 MMP-9 水平降低, VEGF 水平升高。结合网络药理学研究结果, IL-6、IL-1 β 、TNF 和 VEGF 均为 PPI 最终核心网络的靶点蛋白, 提示益气活血汤很可能通过影响上述靶点蛋白的表达发挥治疗 IS 作用。本研究结果还显示, 与模型组比较, 益气活血汤各剂量组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值升高。以上结果均提示, 益气活血很可能通过调控细胞炎症因子等分泌和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达而发挥治疗 IS 的作用, 这进一步验证了网络药理学研究结果。

综上所述, 益气活血能明显改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损症状, 减少脑梗死面积, 其主要机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路, 抑制细胞炎症因子释放和促进血管生成等机制有关。

参考文献:

[1] Wang Y J, Li Z X, Gu H Q, et al. China Stroke Statistics 2019: A Report From the National Center for Healthcare Quality Management in Neurological Diseases, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, the Chinese Stroke Association. National Center for Chronic and Non-communicable Disease Control and Prevention. Chinese Center for Disease Control and Prevention and Institute for Global Neuroscience and Stroke Collaborations [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2020, 5 (3): 211-239.

[2] Powers W J, Rabinstein A A, Ackerson T, et al. Guidelines

for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2019, 50 (12): e344-e418.

[3] Wang H Y, Gu H Q, Zhou Q, et al. Thrombolysis, time-to-treatment and in-hospital outcomes among young adults with ischaemic stroke in China: findings from a nationwide registry study in China [J]. *BMJ Open*, 2022, 12 (6): e055055-e055062.

[4] 王淑娟, 黄勇军, 李方玲, 等. 从气血辨析缺血性脑梗死的机制及治疗 [J]. *四川中医*, 2020, 38 (6): 48-50.

[5] Jiang C, Wang T, Xu Y C, et al. A retrospective study of Yiqi-Huoxue Decoction on blood pressure in patients with acute ischemic stroke [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (48): e23187-23190.

[6] 曾 鹏, 周 航. 网络药理学“异病-异方”关键成分筛选同质化现象思考 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (18): 177-191.

[7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.

[8] 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.

[9] Fu C, Wu Y, Liu S, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/Akt/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115021-115031.

[10] Tang H, Wu L, Chen X, et al. Paeoniflorin improves functional recovery through repressing neuroinflammation and facilitating neurogenesis in rat stroke model [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10921-e10938.

[11] Hsu C C, Kuo T W, Liu W P, et al. Calycosin preserves BDNF/TrkB signaling and reduces post-stroke neurological injury after cerebral ischemia by reducing accumulation of hypertrophic and TNF- α -containing microglia in rats [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15 (2): 326-339.

[12] Zhu F, Chen H, Xu M, et al. Cryptotanshinone possesses therapeutic effects on ischaemic stroke through regulating STAT5 in a rat model [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59 (1): 465-471.

[13] Kaiser E E, Waters E S, Yang X, et al. Tanshinone II A—Loaded nanoparticle and neural stem cell therapy enhances recovery in a pig ischemic stroke model [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11 (10): 1061-1071.

[14] Wu Q L, Cheng Y Q, Liu A J, et al. Formononetin recovered injured nerve functions by enhancing synaptic plasticity in ischemic stroke rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, S0006-291X (20): 30281-30283.

[15] Ulya T, Ardianto C, Anggreini P, et al. Quercetin promotes behavioral recovery and biomolecular changes of melanocortin-4

- receptor in mice with ischemic stroke[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2021, 32(4): 349-355.
- [16] Guo C, Wang W J, Liao Y C, et al. Effect and mechanisms of quercetin for experimental focal cerebral ischemia: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9749461-9749472.
- [17] Zhang L, Ma J, Yang F, et al. Neuroprotective effects of quercetin on ischemic stroke: A literature review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 854249-854262.
- [18] Wei Z, Xie Y, Wei M, et al. New insights in ferroptosis: Potential therapeutic targets for the treatment of ischemic stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1020918-1020939.
- [19] Fang Y, Chen X, Tan Q, et al. Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: A new mechanism of action[J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(6): 980-989.
- [20] Xu Y, Liu Y, Li K, et al. COX-2/PGE2 pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1619-1631.
- [21] Yuan Y, Zhai Y, Chen J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923-936.
- [22] Rahul, Siddique Y H. Neurodegenerative diseases and flavonoids: Special reference to kaempferol [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(4): 327-342.
- [23] Xu J, Zhang P, Chen Y, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate ameliorates cerebral ischemic injury through regulation of angiogenesis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1122-1133.
- [24] Davis C M, Lyon-Scott K, Varlamov E V, et al. Role of endothelial STAT3 in cerebrovascular function and protection from ischemic brain injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12167-12181.
- [25] Samakova A, Gazova A, Sabova N, et al. The PI3K/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia[J]. *Physiol Res*, 2019, 68(2): S131-S138.
- [26] Cui Y, Liu M, Zuo L, et al. Fraxetin protects rat brains from the cerebral stroke via promoting angiogenesis and activating PI3K/Akt pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(3): 400-409.
- [27] Yan Y, Liu Y, Yang Y, et al. Carnosol suppresses microglia cell inflammation and apoptosis through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(5): 656-662.
- [28] Liu X, Xiao X, Han X, et al. A new therapeutic trend: Natural medicine for ameliorating ischemic stroke via PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7963-7991.
- [29] Zhou K X, Zhang D, Bao H W, et al. Network pharmacology and molecular docking study on the effect of kaempferol in treatment of metabolic associated fatty liver disease[J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(5): 788-794.
- [30] Feng Z, Wang C, Jin Y, et al. Kaempferol-induced GPER upregulation attenuates atherosclerosis via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1106-1116.
- [31] Papadopoulos A, Palaiopoulos K, Björkbacka H, et al. Circulating interleukin-6 levels and incident ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of prospective studies [J]. *Neurology*, 2022, 98(10): e1002-e1012.
- [32] Lin S Y, Wang Y Y, Chang C Y, et al. TNF- α receptor inhibitor alleviates metabolic and inflammatory changes in a rat model of ischemic stroke[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 851-865.
- [33] Clausen B H, Wirenfeldt M, Høgedal S S, et al. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 81-97.
- [34] Moon S, Chang M S, Koh S H, et al. Repair mechanisms of the neurovascular unit after ischemic stroke with a focus on VEGF[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8543-8563.
- [35] Gao N, Guo T, Luo H, et al. Association of the MMP-9 polymorphism and ischemic stroke risk in southern Chinese Han population[J]. *BMC Neurol*, 2019, 19(1): 67-72.