

·数字中医药·

本文引用:赵冯岩,杨浩澜,朱炎贞,林美好,刘芳. 基于网络药理学从铁死亡途径研究补阳还五汤调控缺血性脑卒中的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2021,41(7):1065-1072.

基于网络药理学从铁死亡途径研究补阳还五汤调控缺血性脑卒中的作用机制

赵冯岩^{1,2},杨浩澜¹,朱炎贞³,林美好^{1,2},刘芳^{1,2*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心,湖南长沙410208;
3.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 利用网络药理学方法探究补阳还五汤经由铁死亡途径调控缺血性脑卒中的作用机制。**方法** 通过TCMSP、PharmMapper数据库完成补阳还五汤处方中各药物的化学成分、靶点基因及其相应对接得分的收集,采用KEGG、GeneCards数据库获取疾病相关靶点;采用Cytoscape 3.6.1获取补阳还五汤调控缺血性脑卒中中铁死亡途径的作用候选靶点网络图,并对该图进行模块分析和二次筛选;KOBAS 3.0对候选靶点与模块基因进行KEGG通路富集;采用Western blot技术检测PC12细胞氧化应激模型p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR蛋白表达。**结果** 共得到补阳还五汤主要活性成分10个,综合文献分析得缺血性脑卒中中铁死亡途径关键靶点3个,主要KEGG通路7条。验证实验结果提示补阳还五汤通过PI3K-Akt-mTOR信号通路对氧化应激损伤的PC12细胞发挥保护作用。**结论** 补阳还五汤调控缺血性脑卒中中铁死亡途径可能与HSP90AA1、EGFR、GRB2等靶点及MAPK、PI3K-Akt等信号通路有关,其中HSP90AA1靶点和PI3K-Akt信号通路可能是关键机制之一。

[关键词] 铁死亡;补阳还五汤;缺血性脑卒中;网络药理学

[中图分类号]R255.2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.016

Exploring the Mechanism of Buyang Huanwu Decoction Regulating on Cerebral Ischemic Stroke Through Ferroptosis Based on Network Pharmacology

ZHAO Fengyan^{1,2}, YANG Haolan¹, ZHU Yanzhen³, LIN Meiyu^{1,2}, LIU Fang^{1,2*}

(1. Pharmacy School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Center for Standardization and Functional Engineering of Traditional Chinese Medicine in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To use network pharmacology to explore the mechanism of Buyang Huanwu Decoction regulating ischemic stroke through ferroptosis. **Methods** The chemical components, target genes of Buyang Huanwu Decoction and their corresponding docking scores were collected by TCMSP database or PharmMapper database, and the disease-related targets were obtained through KEGG and GeneCards database; the Cytoscape 3.6.1 software was used to get the network map of candidate targets of Buyang Huanwu Decoction effect on cerebral ischemic stroke by ferroptosis pathway, and the network map of candidate targets was screened twice and MCODE analysis subsequently; the candidate targets and module genes were enriched by KEGG pathway in KOBAS 3.0. Western blot were used to detect the expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR and mTOR protein

[收稿日期]2021-03-23

[基金项目]国家自然科学基金项目(81704064);湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(20B434);湖南省中医药管理局科研项目(202177);湖南中医药大学大学生创新创业计划项目(2020-112);2018年湖南省青年教师培养对象资助项目;湖南省中药学一流学科资助项目(校行科学[2018]3号)。

[作者简介]赵冯岩,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学。

[通信作者]*刘芳,女,博士,硕士研究生导师,副教授,E-mail: fliu0825@126.com。

in PC12 cells model with oxidative stress injury. **Results** There were 10 potential active ingredients in Buyang Huanwu Decoction, and 3 key targets and 7 main KEGG pathways in cerebral ischemic stroke by ferroptosis based on the literature analysis. And the validation experiment confirmed that Buyang Huanwu Decoction can protect oxidative stress induced PC12 cells injure via PI3K-Akt-mTOR signal pathway. **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction in regulating cerebral ischemic stroke by ferroptosis may be related to HSP90AA1, EGFR, GRB2 and other signal pathways such as MAPK and PI3K-Akt. Among which the HSP90AA1 and PI3K-Akt signaling pathway may be one of the most crucial mechanisms.

[**Keywords**] ferroptosis; Buyang Huanwu Decoction; cerebral ischemic stroke; network pharmacology

缺血性脑卒中是一类中枢神经系统疾病,指突发的脑组织局部供血不足或血流完全中断,使该局部脑组织崩解破坏,进而产生局部或全脑神经功能障碍的一种脑血管疾病。补阳还五汤出自《医林改错》^[1],以气虚血瘀立论,由黄芪、当归、赤芍、地龙、桃仁、川芎、红花组合成方,是治疗缺血性脑卒中的经典名方,现代临床应用也颇为广泛^[2]。现代药理研究^[3-4]表明,补阳还五汤具有扩张血管、增加脑血流量、抗炎、抗缺氧、改善微循环以及抗血栓等作用,可通过增加血管内皮生长因子阳性细胞数量、抑制神经细胞凋亡、抗感染、抑制基质金属蛋白酶等多种途径来防治缺血性脑卒中。但由于中药复方多成分、多靶点的特点,补阳还五汤防治缺血性脑卒中的机制尚不完善。

铁死亡是一种具有铁依赖性的新型细胞程序性死亡方式,由细胞内异常铁代谢导致的脂质过氧化物和活性氧堆积引起的调节性的细胞死亡^[5]。缺血性脑卒中发生时,神经元内铁离子聚集导致铁超载,铁离子通过 Fenton 反应造成 ROS 聚集,并且在小鼠缺血性中风动物模型中谷胱甘肽(GSH)水平显著降低,脂质过氧化增加^[6],表明铁死亡亦为缺血性脑卒中病理生理进程中神经元死亡的一种方式。铁死亡抑制剂和铁螯合剂能够有效减轻缺血性脑卒发生时神经元的损伤,提示铁死亡途径中存在调控缺血性脑卒中的潜在靶点^[7-9]。然补阳还五汤能否通过调控铁死亡途径进而发挥药效尚无研究报道,在已有的中药复方经铁死亡调控脑缺血的研究报道中,仅葛金文团队^[10-11]发现脑泰方(黄芪、川芎、地龙、僵蚕)及其提取物能通过影响铁死亡的发生,从而发挥抗缺血性脑卒中的作用,本课题组在预实验中亦发现补阳还五汤对大鼠中动脉栓塞模型大鼠海马中谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)这一铁死亡关键生物标志物具有调控作用,为保证后续从铁死亡途径开展补阳还五汤调控缺血性脑卒中实验研究设计方案合理可行,本文基于网络药理学方法,全面系统挖掘补阳还五汤经由铁死亡途径调控缺血性脑卒中的作用机制并为阐明补阳还五汤调控脑缺血的作用机制

和药效物质基础提供指导。

1 材料

1.1 药物

参照前期研究^[12]将补阳还五汤原方(黄芪 120 g, 当归 6 g, 赤芍 4.5 g, 川芎 3 g, 红花 3 g, 桃仁 3 g, 地龙 3 g)和精方(黄芪 30 g, 川芎 9 g, 地龙 6 g)提取制备成干浸膏,使用时用无菌 PBS 稀释至适当浓度,经 0.25 μm 滤膜过滤除菌。

1.2 主要试剂

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系(PC12 细胞)购自长沙科文生物科技有限公司。HRP 标记山羊抗兔(货号:GB23303)、HRP 标记驴抗山羊(货号:GB23404)、HRP 标记山羊抗小鼠(货号:GB23301)、HRP 标记山羊抗大鼠(货号:GB23302)、 β -actin(鼠源,货号:GB12001)、Akt(兔源,货号:GB11689)、p-Akt(兔源,货号:GB13459)、p-PI3K(兔源,货号:GB13471)、p-mTOR(兔源,货号:GB13460)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;mTOR(兔源,货号:2983)购自美国 CST 公司;PI3K(鼠源,货号:BSM-33219M)购自北京博奥森生物技术有限公司;PI3K(货号:ab151549)、mTOR(货号:ab2732)均购自英国 Abcam 公司;Akt(货号:4691s)购自美国 Sigma 公司;Akt 抑制剂(货号:HY-10249a)购自 MedChemExpress 公司。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:3111);化学发光成像仪(美国 Cytiva 公司,型号:GEAI600)。

2 方法

2.1 补阳还五汤化学成分及成分靶点的收集

在 TCMSp 中药系统药理学技术平台(<https://tcmsp-e.com/>)分别以“黄芪”“红花”“当归”“川芎”“赤芍”“地龙”“桃仁”为关键词搜索化学成分,以口服利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug like, DL) ≥ 0.18 为筛选条件,筛得主要活性化合物并下载其 mol2 文件,将其代入 PharmMapper

反向药效团匹配数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)进行预测。整合所有化合物靶点后利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将靶点的 UniProtKB AC/ID 转换为 Gene name。

2.2 缺血性脑卒中疾病及铁死亡靶点的收集

分别以 cerebral ischemic stroke、cerebral infarction 和 Ferroptosis 为关键词在基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)(<https://www.kegg.jp/>)以及人类基因注释数据库(GeneCards)(www.genecards.org)中进行检索,获取缺血性脑卒中疾病及铁死亡相关靶点。

2.3 药材-成分-靶点网络图构建及模块分析

采用 Cytoscape 3.6.1 软件分别构建成靶点相互作用网络、疾病靶点相互作用网络、成分靶点与疾病靶点相互作用网络,同时,选择 Bisogenet 插件,将方法设置为“Input nodes and its neighbors”,参数为 1,输出方式为基因,在构建成成分靶点与疾病靶点相互作用网络时,将方法改为“Input nodes only”,其余不变。通过 Merge 功能将以上 3 个网络合并,取交集部分,分别获得补阳还五汤调控缺血性脑卒中及铁死亡的两个候选靶点网络图。再将这两个网络图合并,得到补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选靶点网络图,通过 MCODE 插件对合并所得候选靶点进行模块分析,得到药材-模块基因网络图,并导入药材及其成分信息构建药材-成分-候选靶点网络图,对药材-模块基因网络图和药材-成分-候选靶点网络图进行点度中心性(degree centrality, DC)分析以评估药材对各模块基因的作用强度,并筛选出 DC 前 10 位的活性成分。

2.4 关键靶点的筛选

采用 Cytoscape 3.6.1 软件中的 CentiScaPe2.2 插件对补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选靶点进行再次筛选,以获取其关键靶点,以 DC、接近中心性(closeness centrality, CC)和中介中心性(betweenness centrality, BC)作为度量节点重要性的指标,去除孤立靶点后,最终获得 DC、CC、BC 均位于前 10 位的靶点作为补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的核心靶点。

2.5 通路整合与分析

采用 DAVID 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)将所有候选靶点及模块的 Gene name 转换为 Entrez

Gene ID,分别导入 KOBAS 3.0(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)进行 KEGG 通路注释分析,将分析结果导入 OmicShare tools(<http://www.omicshare.com/tools>)生成 KEGG 动态富集气泡图。

2.6 Western blot 法检测 PC12 细胞中 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白的表达

参照前期结果^[13],以 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 处理 PC12 细胞 2 h 制备氧化应激损伤模型, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的补阳还五汤原方和精方提取物均具有一定程度保护作用,采用 20 nmol Akt 抑制剂与细胞共同培育 10 h 制备通路干预模型组,初步验证网络药理学研究结果。将 PC12 细胞分成 7 组,分别为正常组、氧化应激损伤模型组、Akt 抑制剂组、补阳还五汤原方(BYYF)组、补阳还五汤精方(BYJF)组、Akt 抑制剂+BYYF 组、Akt 抑制剂+BYJF 组,检测细胞中 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白的表达水平。将 PC12 细胞以 1×10^7 的密度接种于 6 孔板中,细胞分组处理后,加入 RIPA 裂解液收集细胞离心,收集上清混合于 SDS 上样缓冲液中, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。取蛋白样品 $25 \text{ } \mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE 电泳分离,恒压 60 V 转 30 min ,然后 120 V 转 90 min ,转至 PVDF 膜上恒压 100 V 转膜,封闭后分别与一抗(p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 的稀释比例均为 $1:1\ 000$, β -actin 的稀释比例为 $1:1\ 500$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,HRP 标记的二抗($1:1\ 000$) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。滴加 ECL 显影液暗反应后用发光成像仪拍照。采用 Image J 测定蛋白条带的灰密度值,以 β -actin 为内参照,以目的条带 IOD 值与 β -actin 条带 IOD 值的比值作为该蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。数据均经过方差齐性检验和正态性检验,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤中主要化学成分及其靶点收集

由 TCMSp 数据库收集得到补阳还五汤主要活性成分 106 个,其中黄芪 20 个、当归 4 个、赤芍 29 个、川芎 8 个、桃仁 23 个、红花 22 个。该平台未收录“地龙”相关化合物,且黄芪甲苷、赤芍苷等化合物也并不满足 OB 值与 DL 值的筛选条件,经文献查找^[14-17],

黄芪甲苷、赤芍苷等化合物均为补阳还五汤中的有效成分,故补充地龙及其他药材的有效化合物共 20 个。将这 126 个化学成分导入 PharmMapper 数据库进行靶点预测,去除无靶点者共得 2 802 个靶点,其中黄芪 452 个、当归 225 个、赤芍 458 个、川芎 445 个、桃仁 451 个、红花 462 个、地龙 308 个。

3.2 疾病靶点收集

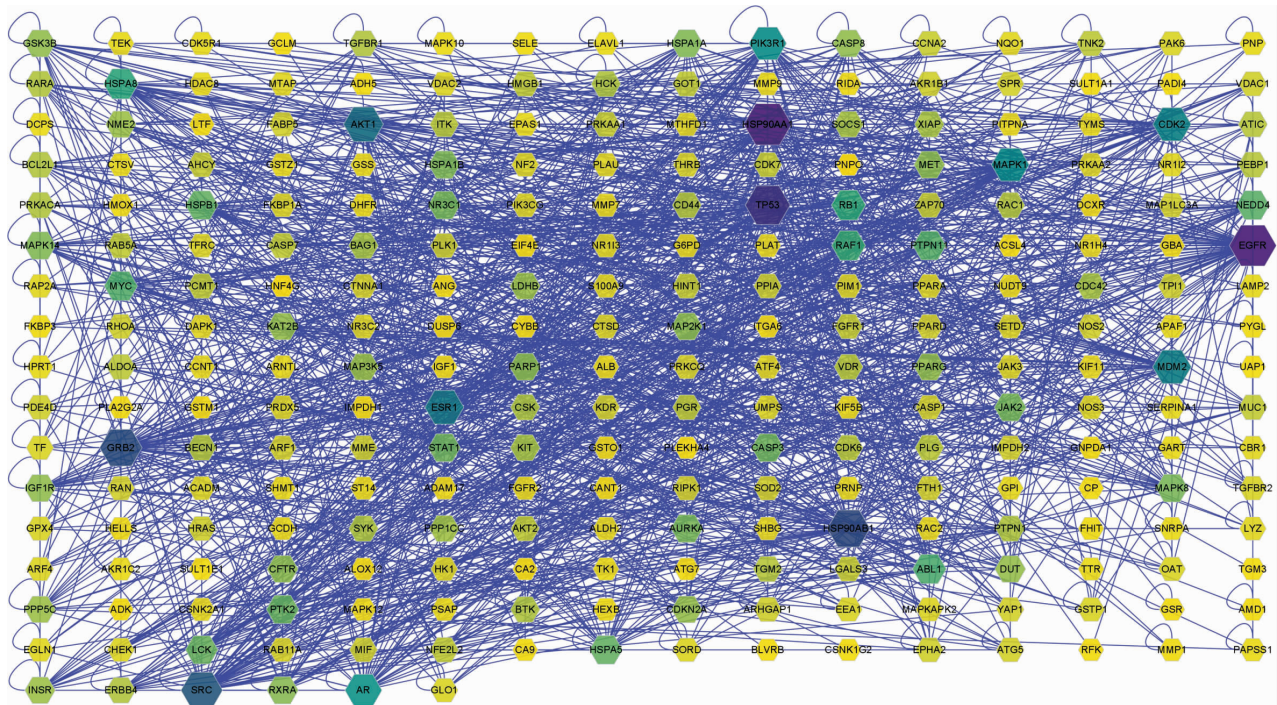
以“cerebral ischemic stroke”等关键词在 KEGG 数据库及 GeneCards 数据库中进行检索,获得缺血性脑卒中直接靶点 2 681 个,铁死亡直接靶点 105 个。通过 Bisogenet 插件扩展缺血性脑卒中相关靶点至 14 920 个,铁死亡相关靶点 4 614 个。

3.3 药材-成分-靶点网络构建结果及模块分析

合并补阳还五汤调控缺血性脑卒中及铁死亡的两个候选靶点网络图,共得节点 262 个,即补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选蛋白共

262 个,得到补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选靶点网络图(见图 1),该过程中各个网络图的拓扑学参数见表 1,药材-成分-靶点网络图的 DC 分析所得主要活性成分见表 2。补阳还五汤调控缺血性脑卒中时呈现出较为丰富的靶点,而其在调控铁死亡途径时仅 284 个候选靶点,合并两个靶点网络图后节点数为 262 个,在该方作用于铁死亡途径的靶点中占比高达 92.25%,在补阳还五汤调控缺血性脑卒中的所有候选靶点(2 424 个)中占比达到 10.8%,证实铁死亡途径对补阳还五汤调控缺血性脑卒中具有重要作用。

基于补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中候选靶点进行的模块分析结果见表 3,得到各个模块的基因均为直接或间接作用与铁死亡及缺血性脑卒中的相关靶点。其中,模块 1 中各个药材的 DC 之和为 2 376,明显高于其他 5 个模块,提示模块 1



注:图中颜色深度和体积大小均与 DC 成正比

图 1 补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选靶点图

表 1 各靶点网络体系的拓扑学参数

靶点网络体系	节点数	边数
补阳还五汤成分靶点	7 921	181 792
缺血性脑卒中相关靶点	14 920	253 033
铁死亡相关靶点	4 614	119 756
补阳还五汤调控缺血性脑卒中候选靶点	2 424	31 880
补阳还五汤调控铁死亡的候选靶点	284	1 748
补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的候选靶点	262	1 603

表 2 补阳还五汤活性成分信息表

编号	化合物	MOL ID	度值	药材归属
1	Kaempferol	MOL000422	846	黄芪,红花
2	β -sitosterol	MOL000358	811	桃仁,当归,红花,赤芍
3	Stigmasterol	MOL000449	604	当归,红花,赤芍
4	Paeoniflorin	MOL001925	571	赤芍
5	Jaranole	MOL000239	560	黄芪
6	Baicalin	MOL002776	558	赤芍,红花
7	Quercetin	MOL000098	558	红花,黄芪
8	Hederagenin	MOL000296	415	桃仁,黄芪
9	Sitosterol	MOL000359	397	赤芍,川芎
10	10(+)-catechin	MOL000492	285	赤芍

表 3 药材-模块基因网络图分析结果

药材	模块 1	模块 2	模块 3	模块 4	模块 5	模块 6
赤芍	630	240	355	156	17	44
当归	39	18	21	10	0	4
川芎	184	74	100	50	8	14
红花	500	195	271	127	26	37
黄芪	497	195	296	147	31	33
桃仁	504	206	285	150	23	39
地龙	22	9	13	7	1	2
共计	2 376	941	1341	647	106	173

受到各味药材的作用可能最为显著。从补阳还五汤配伍特点与其临床药理作用相结合的角度出发,进一步研究补阳还五汤中的药材对不同信号通路模块的调控作用。见图 2。

3.4 关键靶点获取

将 DC、CC、BC 均位于前 10 位的 7 个靶点作为

补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的核心靶点,它们依次是热休克蛋白 90 α 编码基因(HSP90AA1)、表皮生长因子受体(EGFR)、肿瘤蛋白 P53(TP53)、生长因子受体结合蛋白 2(GRB2)、类固醇受体共激活子(SRC)、雌激素受体 1(ESR1)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶蛋白 1(AKT1)。整理基 F PharmMapper 数据库的匹配结果,可得七味药分别作用于核心靶点的化合物数目及其化合物在进行反向药效团预测时最高的对接得分。见表 4。

3.5 关键通路获取

KEGG 富集结果中,MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、FoxO 信号通路、Estrogen 信号通路、VEGF 信号通路和 HIF-1 信号通路被显著富集,其中铁死亡的 Rich Factor 得分高达 0.4,明显高于其他通路,证明筛选所得候选靶点与铁死亡途径有着密切联系,结果见图 3。

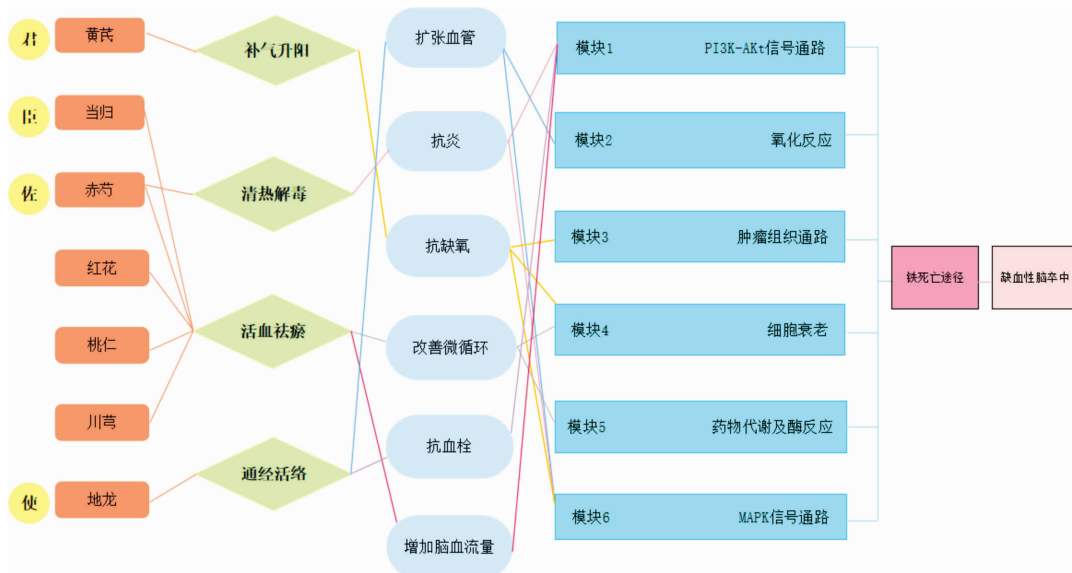


图 2 补阳还五汤中各味药材协同作用分析图

表 4 补阳还五汤作用于核心靶点的化合物数及分子对接得分

核心靶点	黄芪		桃仁		当归		赤芍		地龙		红花		川芎	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
HSP90AA1	20	3.345	26	3.844	2	2.943	30	4.361	5	2.969	24	3.497	10	3.936
EGFR	25	3.841	23	3.599	2	2.980	30	4.000	5	3.051	24	3.145	9	3.954
TP53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
GRB2	6	4.181	19	4.459	2	4.080	19	5.074	5	4.453	14	4.352	9	4.451
SRC	25	3.879	26	4.464	2	2.995	30	4.394	5	3.481	24	4.402	8	4.508
ESR1	24	3.909	24	3.589	2	3.484	28	4.183	5	2.934	24	3.940	9	4.000
AKT1	20	2.938	16	3.404	—	—	22	3.838	5	2.931	13	2.940	6	2.985

注:A:对接化合物数;B:化合物对接最高得分;“—”表示无直接作用

3.6 补阳还五汤对 PC12 细胞氧化应激损伤模型 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白的影响

PC12 细胞中 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白的定量分析结果见图 4。相较于正常组,氧化应激损伤模型细胞中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白的比值显著降低($P<0.05$),提示细胞在氧化应激损伤过程中 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化程度降低,该通路被抑制,Akt 抑制剂组亦下调了 PC12 中 3 种蛋白的磷酸化($P<0.05$);相较模型组,BYYF 或 BYJF 干预后,PI3K-Akt-mTOR 信号通路被显著激活,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白的比值显著上调($P<0.05$),而 Akt 抑制剂+BYYF 或 BYJF 干预处理的 P12 细胞中 3 种蛋白的磷酸化程度被明显抑制($P<0.05$),证实补阳还

五汤可能通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路对氧化应激损伤的 PC12 细胞发挥保护作用。

4 讨论

目前,缺血性脑卒中有效治疗方法十分有限,且现有治疗方法都有严格的适应症和一定的风险,迫切需要开发新的治疗方法。中医药“多成分、多途径、多靶点”协同作用的特点用于缺血性脑卒中的防治独具优势,如脑泰方、补阳还五汤等中药方剂均对缺血性脑卒中的防治具有确切疗效。为阐明补阳还五汤调控缺血性脑卒中的具体机制,故本研究应用网络药理学方法对补阳还五汤有效成分和作用机制进行了综合分析。而现有网络药理学研究中,大都集中在药物治疗疾病方面,如韩根利等^[18]

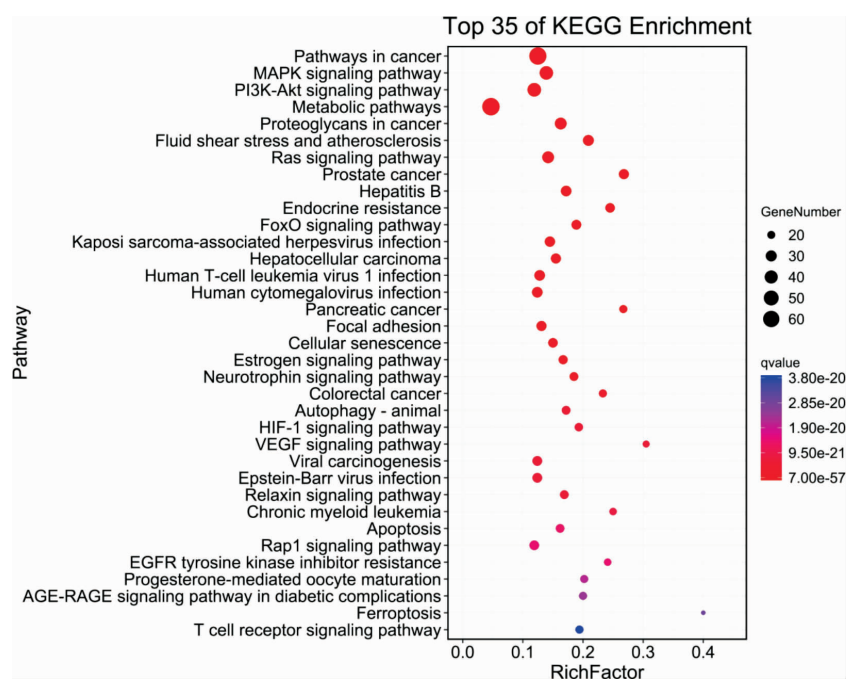
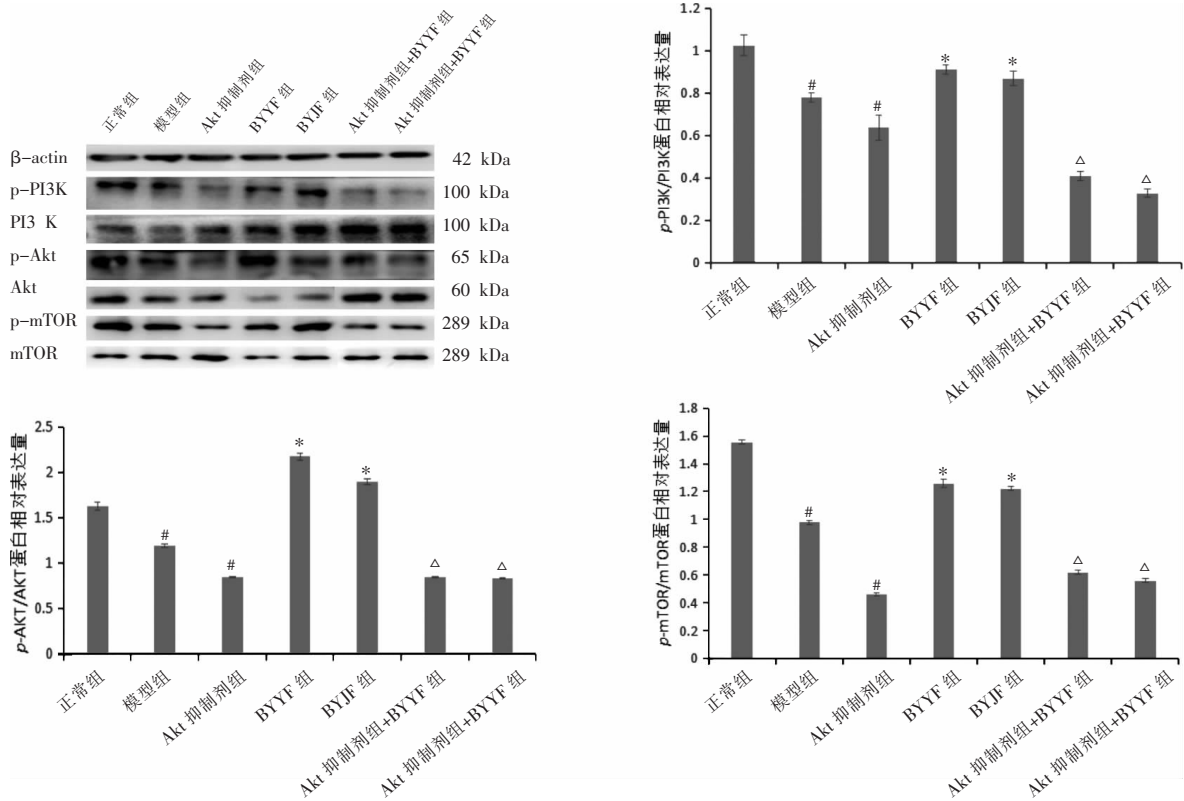


图 3 补阳还五汤候选靶点的部分 KEGG 通路分析



注:与对照组比较, # $P<0.05$,与模型组比较, * $P<0.05$,与原方、精方干预组比较, $\Delta P<0.05$

图4 PC12细胞中PI3K、Akt和mTOR蛋白的表达情况

利用网络药理学方法探讨三七合剂干预肝缺血再灌注损伤机制,陈纪焯等^[19]运用网络药理学方法进行了五苓散治疗慢性心力衰竭的机制研究,这些研究均是直接将药物靶点与疾病靶点相结合以得到结果。针对这一现状,本研究瞄准一条细胞死亡途径,将药物成分靶点分别与疾病靶点、细胞死亡途径相结合,取二者交集,以新的思路利用网络药理学方法探讨药物的作用机制,结合分子对接相关技术进一步确认目标成分与靶点,以获得更为精准的结果,同时从中医理论角度验证了补阳还五汤中各味药材可分别作用于多个通路,并协同影响铁死亡途径,最终调控缺血性脑卒中,进一步证实本研究结果的科学性。

本研究通过将补阳还五汤组方中的七味药与核心靶点进行对接,发现黄芪、红花、桃仁、赤芍与核心靶点的对接化合物数目和最高得分表现突出,提示补阳还五汤调控关键靶点的成分较多的来源于此4味药。现有报道中,薛志远^[20]通过测定氧化应激模型小鼠血清、肝脏及大脑组织中T-SOD、GSH-Px的活力和MDA水平,表明黄芪水提液在体外体内均具有良好的抗氧化能力。马勤等^[21]研究发现红花中红花黄色素能提高脑组织抗氧化

能力。刘琳等^[22]研究显示,桃仁中多糖对于OH⁻和O²等均具有明显的抑制作用。张海燕等^[23]发现赤芍总苷可加速自由基清除和抑制炎症因子的释放。上述研究均从实验角度证实了各个药物的抗铁死亡潜在作用,提示补阳还五汤可能通过多种药物协同发挥作用,进而调控铁死亡以达到治疗缺血性脑卒中的目的。此外,赤芍虽为佐药,但其对接化合物数和最高得分均高于其他药物,在药材-模块基因网络图分析结果中,发现赤芍对各模块均具有较强的作用,提示赤芍经铁死亡途径在缺血性脑卒中的治疗中贡献可能最大,提示后续实验研究时,可以此为参考对补阳还五汤进行合理的拆减方。结合DC、CC、BC均位于前10位的核心靶点和对接化合物及得分表,将HSP90AA1、EGFR、GRB2 3个靶点作为补阳还五汤发挥疗效的关键靶点。

KEGG富集和模块分析结果显示,补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中可能与MAPK、PI3K-Akt等信号通路有关。PI3K-Akt和MAPK信号通路经下游多种靶点可促进脑缺血后神经细胞的存活,在缺血性脑损伤中发挥重要的作用^[24]。其中PI3K-Akt信号通路是调节细胞各种生理活动的经典通路,具有诱导自噬,减轻氧化应激,抗脂质过

氧化等作用^[25-26],更有研究^[27-28]表明,激活 PI3K-Akt 信号通路可以减轻机体中铁死亡的发生。在模块分析中 PI3K-Akt 所受到的调节作用也最为显著。由此推测 PI3K-Akt 信号通路是补阳还五汤经铁死亡途径调控缺血性脑卒中的关键机制之一。

综上,本研究提示补阳还五汤经由铁死亡途径调控缺血性脑卒中,其可能作用机制与 HSP90AA1、EGFR、GRB2 等靶点及 MAPK、PI3K-Akt、Ras 等信号通路有关,其中,HSP90AA1 靶点以及 PI3K-Akt 信号通路可能为关键机制。采用 Akt 抑制剂处理 PC12 细胞,结果表明补阳还五汤通过 PI3K-Akt 信号通路对氧化应激损伤的 PC12 模型细胞发挥保护作用,从实验角度一定程度证实本研究结果的准确度,为后续探索补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的作用机制提供了新的思路和方向。由于该研究是基于生物信息学及大量数据库的计算得出的结果,本课题组后续将基于本文结果深入开展实验验证研究。

参考文献

- [1] 王清任.医林改错[M].新1版.上海:上海科学技术出版社,1966.
- [2] 罗银河,葛金文,刘林.补阳还五汤治疗缺血性中风临床应用进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(3):278-281.
- [3] 韦珊瑶,张永全,张艺,等.补阳还五汤研究进展[J].大众科技,2019,21(7):50-53.
- [4] 李军,王朝阳.补阳还五汤对急性脑缺血大鼠血管新生影响的实验研究[J].中国中医急症,2011,20(2):273-274.
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [6] 廖君,葛金文,余清平,等.铁死亡研究现状[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(10):2151-2158.
- [7] ZILLE M, KARUPPAGOUNDER S S, CHEN Y X, et al. Neuronal death after hemorrhagic stroke in vitro and in vivo shares features of ferroptosis and necroptosis[J]. Stroke, 2017, 48(4): 1033-1043.
- [8] AHMAD S, ELSHERBINY N M, HAQUE R, et al. Sesamin attenuates neurotoxicity in mouse model of ischemic brain stroke[J]. NeuroToxicology, 2014, 45: 100-110.
- [9] TUO Q Z, LEI P, JACKMAN K A, et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke[J]. Molecular Psychiatry, 2017, 22(11): 1520-1530.
- [10] 贺超,廖君,兰斌,等.脑泰方对脑梗死后铁死亡-脂质代谢通路蛋白表达的影响[J].中华中医药杂志,2020,35(11):5491-5494.
- [11] LAN B, GE J W, CHENG S W, et al. Extract of Naotaiyang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. Journal of Integrative Medicine, 2020, 18(4): 344-350.
- [12] 刘芳,王宇红,邵乐,等.补阳还五汤精简方对大鼠中动脉阻塞模型大鼠海马组织 Cdk5 的调控[J].中国药理学通报,2017,33(8):1176-1181.
- [13] 刘芳,朱炎贞,赵冯岩,等.补阳还五汤类方提取物对 PC12 细胞氧化应激损伤模型凋亡与自噬的调控[J].中草药,2020,51(20): 5228-5236.
- [14] 孙政华,邵晶,郭玫.黄芪化学成分及药理作用研究进展[J].中医临床研究,2015,7(25):22-25.
- [15] 张石凯,曹永兵.赤芍的药理作用研究进展[J].药学实践杂志,2021,39(2):97-101.
- [16] 刘亚明,郭继龙,刘必旺,等.中药地龙的活性成分及药理作用研究进展[J].山西中医,2011,27(3):44-45.
- [17] 许筱凤,李婷,王一涛,等.桃仁的研究进展[J].中草药,2015,46(17):2649-2655.
- [18] 韩根利,刘宏胜.三七合剂干预肝缺血再灌注损伤机制的网络药理学探讨[J].中草药,2020,51(20):5260-5269.
- [19] 陈纪焯,张永健,姜萍,等.基于网络药理学的五苓散治疗慢性心力衰竭的机制研究[J].中草药,2020,51(20):5220-5227.
- [20] 薛志远.红芪和黄芪抗骨质疏松、抗氧化及抗肝损伤作用比较研究[D].兰州:兰州大学,2018.
- [21] 马勤,徐慧,阮影影,等.红花黄色素对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的痴呆大鼠学习记忆能力的影响[J].中药药理与临床,2014,30(5):64-66.
- [22] 刘琳,刘洋洋,占颖,等.芡实的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中华中医药杂志,2015,30(2):477-479.
- [23] 张海燕,刘忠锦,陈志伟.赤芍总苷对 D-半乳糖诱导衰老大鼠脑组织 TOLL 受体和 IL-33 的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(6):830-833.
- [24] 郁迪,莫绪明.PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在缺血性脑损伤中的保护作用[J].医学综述,2015,21(2):210-213.
- [25] 耿男,庞燕,张静雯,等.PI3K/Akt 信号通路在肾缺血再灌注损伤中的研究进展[J].医学综述,2021,27(8):1480-1486.
- [26] 刘文东,李悦山.氯沙坦对过氧化氢诱导乳鼠心肌细胞凋亡的保护作用机制研究[J].广东医学院学报,2011,29(6):591-595.
- [27] LIU L, YANG S Q, WANG H. A-Lipoic acid alleviates ferroptosis in the MPP⁺-induced PC12 cells via activating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. Cell Biology International, 2021, 45(2): 422-431.
- [28] YI J M, ZHU J J, WU J, et al. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(49): 31189-31197.