

·数字中医药·

本文引用:朱秋燕,曾鑫冰,杨筱倩,谢若曦,李笑,黄小平,邓常清. 益气活血开窍组方中药对脑缺血后白质保护的网路药理学研究及药效学验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 941-949.

益气活血开窍组方中药对脑缺血后白质保护的网路药理学研究及药效学验证

朱秋燕^{1,2}, 曾鑫冰^{1,2}, 杨筱倩¹, 谢若曦^{1,2}, 李笑³, 黄小平^{2*}, 邓常清^{2*}

(1.湖南中医药大学血管生物学实验室,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学中西医结合心脑血管病防治湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学医学院,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的 采用网路药理学方法,以髓鞘再生的主要功能细胞少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)为靶点,预测益气活血开窍组方中药有效成分对脑缺血后白质损伤的促修复作用。方法 从TCMSP、PubChem、SwissTargetPrediction数据库中预测组方中药主要有效成分促进脑卒中后OPCs修复脑白质的作用靶点;整合GEO、GeneCards和CTD数据库获得的脑卒中疾病靶基因,通过STRING绘制“中药组方-疾病”靶点PPI网络图;并进行GO及KEGG富集分析。同时,采用大鼠脑缺血再灌注模型,从神经功能和形态学评价益气活血开窍组方中药对脑缺血再灌注后脑白质损伤的促修复作用。结果 网路药理学共获取33个疾病-药物共同潜在靶点。PPI网络及拓扑分析结果显示VEGFA、PTGS2、NTRK1、ESR2和MET等可能为核心作用靶点,富集分析主要涉及钙离子、PI3K-Akt、VEGF、Rap1、Ras、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抗性和MAPK信号通路,KEGG富集分析GEO数据集差异基因结果显示,卒中5d和15d均涉及PI3K-Akt信号通路。药理学实验结果显示,益气活血开窍组方中药可改善脑缺血再灌注后大鼠神经功能障碍,减轻脑白质损伤和大鼠胼胝体、纹状体髓鞘脱失。结论 益气活血开窍组方中药可改善脑缺血再灌注后白质损伤,机制可能与各有效成分通过多靶点、多途径促进髓鞘再生和白质修复有关。

[关键词] 网路药理学;益气活血开窍组方中药;脑缺血再灌注;髓鞘再生

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.06.012

Network pharmacology research and pharmacodynamic validation of the ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation on white matter protection after cerebral ischemia

ZHU Qiuyan^{1,2}, ZENG Xinbing^{1,2}, YANG Xiaolian¹, XIE Ruoxi^{1,2}, LI Xiao³, HUANG Xiaoping^{2*}, DENG Changqing^{2*}

(1. Laboratory of Vascular Biology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Cerebrovascular Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** Through network pharmacology, to predict the promoting and repairing effect of effective components of the ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation on white matter injury after cerebral

[收稿日期]2021-12-07

[基金项目]湖南省教育厅重点项目(19A381);长沙市自然科学基金项目(kq2014084);2022年湖南省中医药管理局重点项目(E2022001);2022年湖南省国内一流培育学科中西医结合学科项目(2021ZXYJH06);2021年湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ027);2020年湖南省大学生创新创业训练计划项目(2598);2021年国家级大学生创新创业训练计划项目(202110541053);湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目(06);湖南省研究生优秀教学团队(基础医学研究生教学团队)项目([2019]370-118);2022年湖南省自然科学基金项目(631)。

[第一作者]朱秋燕,女,硕士研究生,研究方向:心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。

[通信作者]*黄小平,女,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:569229858@qq.com;邓常清,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:dchangq@sohu.com。

ischemia with oligodendrocyte precursor cells (OPCs), the main functional cells of myelin regeneration. **Methods** TC MSP, PubChem and SwissTargetPrediction databases were used to predict the targets of the effective components of ingredient Chinese medicine in promoting white matter repair of OPCs after stroke; GEO, GeneCards and CTD databases were used to search the stroke targets; PPI network diagram of "ingredient Chinese medicine-disease" targets was drawn through STRING, and performed for GO and KEGG enrichment analysis. Meanwhile, using the rat cerebral ischemia-reperfusion model, the promoting and repairing effect of effective components of the ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation on white matter injury after cerebral ischemia was evaluated from neurological function and morphology. **Results** A total of 33 drug-disease common potential targets were identified in network pharmacology. PPI network and topology analysis revealed that VEGFA, PTGS2, NTRK, ESR2 and MET, etc. may be important targets, enrichment analysis mainly involved Calcium, PI3K-Akt, VEGF, Rap1, Ras, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and MAPK signaling pathways. KEGG enrichment analysis of differential genes in GEO data sets showed, PI3K-Akt signaling pathway was involved in both 5 and 15 days of stroke. Pharmacological experiments showed that the ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation can improve neurological function and mitigate white matter injury after cerebral ischemia-reperfusion, reduce white matter injury and demyelination of corpus callosum and striatum in rats. **Conclusion** The ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation can effectively improve white matter injury after cerebral ischemia-reperfusion and the effect may be closely related to the multi-target and multi-pathway promotion of myelin regeneration and white matter repair by each active ingredient.

[**Keywords**] network pharmacology; ingredient Chinese medicine with Qi-benefiting, blood-activating and resuscitation; cerebral ischemia-reperfusion; remyelination

脑梗死是严重危害人类健康的疾病,具有高致死率和致残率的特点^[1-3]。脑缺血可导致严重脑损伤、神经细胞迅速损伤和死亡^[4]。长期以来,脑缺血后的神经修复研究侧重对神经元或灰质损伤的保护,而近年来,研究证明脑白质完整性对于脑卒中后长时程神经修复具有重要意义^[5-6]。脑白质是大脑内神经纤维聚集区域,约占人脑体积 50%,也是关键损伤部位,它可破坏神经元之间、皮质和皮质下中枢之间的信号传递,也可造成神经纤维投射区的灰质损伤,对神经元造成二次伤害,是脑缺血后神经功能难以恢复的重要原因^[7-9]。

脑白质主要位于脑胼胝体、纹状体等区域,由少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs),OLs 突起形成的髓鞘及髓鞘包裹的神经元轴突三部分组成。脑白质的主体是 OLs,OLs 来源于脑白质原位的少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)以及室管膜下区(subventricular zone, SVZ)的多潜能神经干细胞^[10]。脑缺血后,白质中的 OLs 损伤导致神经轴突髓鞘脱落,而成熟的 OLs 缺乏增殖能力,必须依赖新生成的 OPCs 增殖分化为成熟 OLs,形成新的髓鞘,此即“髓鞘再生”^[11-12]。OPCs 是白质修复的关键细胞,因缺血等因素诱导的脑内源性白质修复作用十分有限,局部炎症、氧化应激、兴奋毒性等因素导致脑内环境的改变也不利于 OPCs 的存活和修复^[13]。由于白质修复涉及 OPCs 增殖、分化与成

熟等复杂过程,因此,单一措施的促白质修复作用往往有限,应该从多环节、多途径寻找促进其修复的措施。

中医药研究表明,脑梗死的基本病机是气虚血瘀,治疗应益气活血。黄芪和三七是治疗心脑血管疾病的常用中药,可有效减轻脑损害,改善脑梗死患者神经功能缺损症状。黄芪甲苷(Astragaloside IV, AST IV)是黄芪抗缺血性脑卒中的主要活性成分^[14],三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)是三七的主要药效组分,主要含人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd、三七皂苷 R1^[15]。冰片有开窍醒神之功,多用于中风、痰热、神昏窍闭等证,其主要有效成分为左旋龙脑^[16]。前期研究发现,以冰片配伍 AST IV 与 PNS 的益气活血开窍组中药可促进脑缺血再灌注后药物成分入脑,且可促进脑缺血后神经元增殖和内源性神经发生,减轻脑微血管损伤,具有促神经修复的作用^[17-18]。由于脑缺血后的炎症反应、氧化应激、能量代谢与细胞凋亡等同样可影响 OPCs 的增殖、分化,从而影响脑白质修复。因此,推测该组分中药也可能具有通过促进髓鞘再生发挥对脑缺血后白质损伤的修复作用。为了验证这一推测,本研究首先用网络药理学方法预测了该组分中药中的主要有效成分对脑缺血后 OPCs 髓鞘再生的作用及可能的靶点,然后采用体内实验初步探讨了其促进脑缺血再灌注后白质损伤的修复作用,

以期为后继研究奠定基础。

1 方法

1.1 益气活血开窍组中药作用脑卒中后 OPCs 髓鞘再生的潜在靶点预测

1.1.1 AST IV、冰片和 PNS 主要有效成分潜在靶点的预测 在中医药数据库与分析平台(TCMSP)^[19]及 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得 AST IV、冰片主要活性成分(左旋龙脑)、PNS 5 个主要活性成分(人参皂苷 Re、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd)的 CAS 号,输入 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中获取 SMILES 号,将 AST IV、冰片主要成分、PNS 中 5 个主要活性成分(人参皂苷 Re、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rd)的 SMILE 号输入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)中,获得 AST IV、冰片和 PNS 中活性成分的作用靶点。

1.1.2 脑卒中后 OPCs 髓鞘再生靶标基因获取 在 Gene Expression Omnibus (GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中,以“white matter”AND “stroke”AND “oligodendrocyte precursor cells”为检索式,获取芯片编号为 GSE53737 的高通量测序数据集。该数据集由 25 个样本的基因表达数据组成,包括 10 个对照样本(非卒中)、8 个卒中 5 d 样本和 7 个卒中 15 d 样本。本研究比较了卒中 5 d 与卒中 15 d 的差异表达基因(differentially expression genes, DEGs),以 $P < 0.05$, $|\log_2(FC)| \geq 1.5$ 作为 DEGs 的筛选标准。为了使上述各芯片数据集筛选出来的 DEGs 更具有脑卒中的基因属性,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 Comparative Toxicogenomics Database (CTD)数据库(<http://ctdbase.org/>)中,以“stroke”为关键词检索靶基因,与 GEO 数据库中获得的 DEGs 取交集。

1.1.3 中药组分-疾病靶点的蛋白互作网络(PPI)构建 将药物有效成分潜在靶点与疾病潜在靶点取交集,获得药物-疾病共同靶基因,并将共同靶基因导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)中,选择“multiple proteins”“Homo sapiens”,靶点间的最低联系分数调整为“0.400”,勾选“隐藏网络中断开连接的节点”,构建 PPI 网络。在“Exports”处下载整个 PPI 网络的“TSV”格式,在 Cytoscape 软件中进行可视化分析,并利用 CytoNCA 插件分析相关靶点的拓扑参数,以节点度值(Degree)和介数中心性(between-

ness centrality, BC)来评价节点的重要性,筛选出排名前 7 的关键靶点。节点对应的 Degree 和 BC 值越大,则其在网络中起到的作用越重要。

1.1.4 GO 和 KEGG 富集分析 采用 R 语言 ClusterProfiler.org.Hs.eg.db 和 enrichplot 等数据包分析药物-疾病共同靶基因的生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF),对冰片、AST IV、PNS 作用于脑卒中后 OPCs 髓鞘再生的靶点进行 GO 富集分析;基于 KEGG 数据库进行靶点基因的通路富集分析。进行可视化分析,将结果以条形图和气泡图形式输出。

1.2 益气活血开窍组中药对大鼠脑缺血再灌注后白质损伤的促修复作用

1.2.1 药品与试剂 冰片主要成分左旋龙脑(1,7-三甲基-二环庚-2-醇, *L*-Borneol),纯度 86%,批号:20170815,购自湖北俊辉有限公司;AST IV,纯度 99.89%,批号: MUST-20090308,购自成都曼思特生物科技有限公司;PNS,纯度 $\geq 98\%$,批号: MUST-20031901,购自成都曼思特生物科技有限公司。药物以 0.5%羧甲基纤维素钠配成混悬液备用。

1.2.2 动物 SPF 级 Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠,体质量 250~270 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产合格证号:4307272111006536。饲养于湖南中医药大学动物实验中心,场地许可证号:SYXK(湘)2019-0009。实验前适应性喂养 5~7 d。动物的使用符合国家科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。大鼠在手术前禁食 12 h,不禁水。手术在室温 26 °C 左右下进行,操作过程中用加热垫保持大鼠体温。

1.2.3 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立 采用 Zea Longa^[20]等方法,用线栓造成大鼠中动脉阻塞,缺血 2 h 后,再灌注 7 d,制作大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型。2%戊巴比妥按照 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,钝性分离颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。结扎 ECA;在结扎处剪一小切口,将线栓从切口向 ICA 缓慢插入,推至遇到轻微阻力时停止,固定。脑缺血 2 h 后,将线栓退出约 5 mm,制作缺血再灌注模型。假手术组只分离 ICA、ECA,不插线栓,其余操作与模型组一致。

1.2.4 实验用药剂量及分组 根据我们前期实验结果^[16],冰片、AST IV、PNS 配伍抗脑缺血再灌注损伤的有效配伍剂量为冰片 7.5 mg/kg、AST IV 10 mg/kg、

PNS 25 mg/kg,将动物随机分为假手术组、模型组、冰片组(剂量:7.5 mg/kg)、AST IV+PNS 配伍组(AST IV+PNS 组,剂量:AST IV 10 mg/kg+PNS 25 mg/kg)、冰片+AST IV+PNS 配伍低剂量组(低剂量组,剂量:冰片 7.5 mg/kg+AST IV 10 mg/kg+PNS 25 mg/kg)、冰片+AST IV+PNS 配伍高剂量组(高剂量组,剂量:冰片 15 mg/kg+AST IV 20 mg/kg+PNS 50 mg/kg)。各组于造模苏醒后开始灌胃给药,每天两次,间隔 12 h。假手术组和模型组灌胃等量 0.5%羧甲基纤维素钠。末次给药后次日检测。

1.2.5 神经行为学测定 各组大鼠于 MCAO 后第 1、第 3、第 5、第 7 天,采用改良神经功能缺损程度评分法(mNSS 评分法)分别进行神经行为学测试,主要评价大鼠的感觉、运动、反射及平衡功能,并计算总分,最高分 18 分。得分越高,表示其神经损害越严重。测试方法:由 3 位测试人员分别以盲法对大鼠进行打分和记录,然后计算平均分,进行统计分析。

1.2.6 白质区(胼胝体、纹状体)神经纤维损伤检测

染色液在乙醇中与髓鞘特异性结合,使髓鞘呈现浅蓝色,故可采用髓鞘染色法评估大鼠白质区髓鞘损伤程度。选取 6 μm 脑组织冠状切面的石蜡切片。脱蜡后(二甲苯 I 20 min \rightarrow 二甲苯 II 20 min \rightarrow 无水乙醇 10 min \rightarrow 95%乙醇 5 min \rightarrow 85%乙醇 2 min \rightarrow 75%乙醇 2 min \rightarrow 纯水),立即放入预热 1 h 的 KB 染液 A 液中,再放回恒温箱中孵育 4 h。流水冲洗后,再放入碳酸锂中浸洗 15 s,75%乙醇中脱色 15 s,在显微镜下进行观察,至灰质与白质较好的分色后,流水冲洗,封片。在 TissueFAXS Plus S 仪器下采集图片,计算单位面积蓝色区域百分比,进行定量分析。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,重复测量数据多组比较采用两因素重复测量方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验;同一样本多组间数据采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。 $P<0.05$ 被认为

具有统计学意义。

2 结果

2.1 益气活血开窍组分中药主要成分对脑卒中后髓鞘再生的网络药理学预测结果

2.1.1 AST IV、冰片与 PNS 活性成分特性及预测靶标 在 TCMS 及 PubChem 中获得 AST IV、冰片主要活性成分左旋龙脑和 PNS 主要活性成分人参皂苷 Re、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd 的 ADME 特性、Mol ID 号和 CAS 号(见表 1)。筛选 AST IV、冰片和 PNS 主要活性成分的靶基因并去除 7 个成分中重复基因,得到 365 个预测靶点。

2.1.2 脑卒中后 OPCs 髓鞘再生的靶标基因筛选 从 GEO 数据库中筛选脑卒中后 OPCs 差异表达的数据集 GSE53737,下载其原始数据,筛选出卒中 5 d 及卒中 15 d 的 OPCs 的 DEGs,并进行人小鼠同源基因转换,最终得到 1422 个 DEGs。此外,在 GeneCards 人类基因数据库中检索到 7349 个靶基因,在 CTD 数据库中检索到 37 520 个靶基因,合并并删除重复值后最终得到 16 426 个脑卒中背景基因。将高通量数据集获得的 DEGs 与脑卒中背景基因取交集,合并并删除重复项后得到 1162 个靶基因,即为脑卒中后 OPCs 髓鞘再生的候选基因(见图 1a)。将 365 个药物靶基因与 1162 个脑卒中后 OPCs 髓鞘再生 DEGs 取交集,获得 33 个共同靶基因(见图 1b)。

2.1.3 中药组分-疾病靶标网络分析 为获取 PPI 网络,将“2.1.2”项下的益气活血开窍组分中药与脑卒中后 OPCs 髓鞘再生的 33 个交集靶点基因导入 STRING 数据库,下载 TSV 格式文件。将该文件导入 Cytoscape 软件中,构建有效成分-作用靶点网络图(图 2)。并用 Cytoscape 软件中的 CytoNCA 插件对网络的拓扑参数进行分析,以 Degree 和 BC 值对节点的重要性进行评价,绘制 PPI 网络(图 3)。筛选网络中排列前 7 的节点(表 2),包括 VEGFA、PTGS2、NTRK1、ESR2、TYMS、F2R 和 GLI1,推测这些靶点

表 1 AST IV、冰片和 PNS 主要活性成分的性质

化学成分	Mol ID	CAS	OB/%	MW	DL	Caco-2	RBN
AST IV	MOL000407	84687-43-4	22.50	785.09	0.15	-2.11	7
左旋龙脑	MOL000244	464-45-9	81.80	154.28	0.05	1.22	0
人参皂苷 Re	MOL005338	51542-56-4	4.27	947.30	0.12	-3.20	12
三七皂苷 R1	MOL012851	80418-24-2	4.27	933.27	0.13	-2.57	12
人参皂苷 Rg1	MOL005341	22427-39-0	10.04	801.14	0.28	-2.27	10
人参皂苷 Rb1	MOL007476	41753-43-9	6.29	1109.46	0.04	-3.72	16
人参皂苷 Rd	MOL007480	62025-49-4	12.23	460.82	0.77	0.65	4

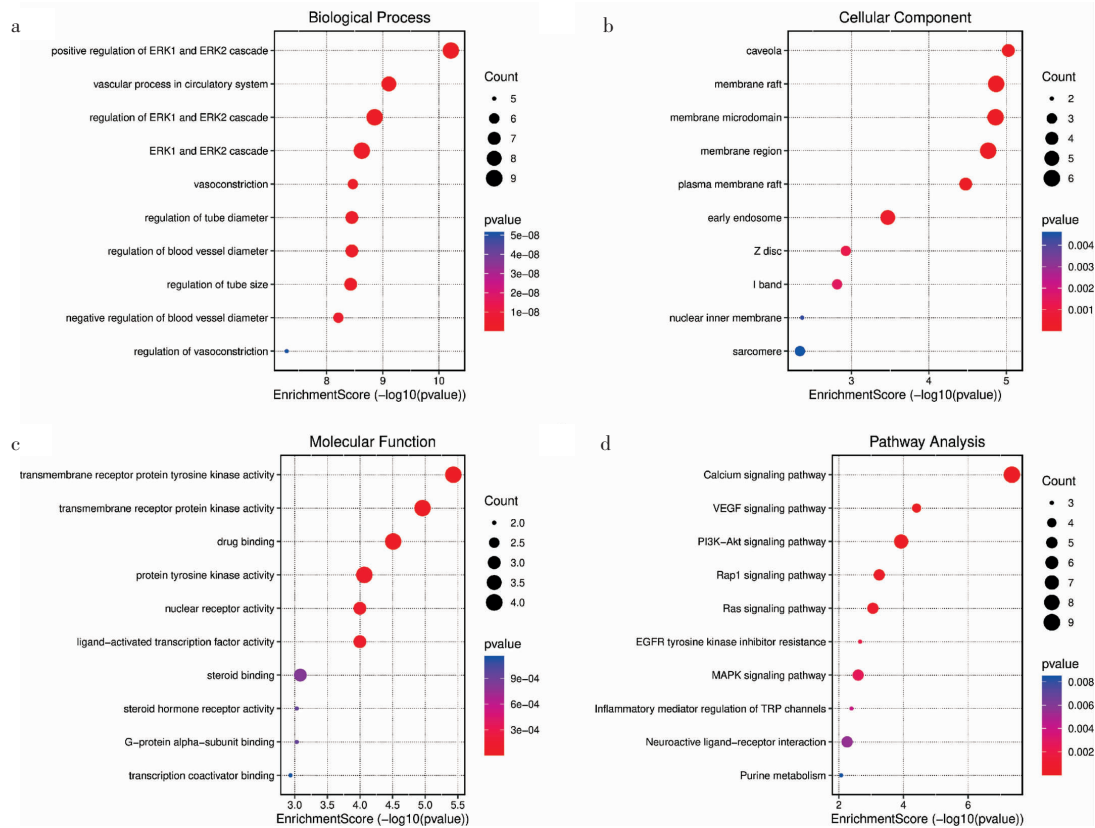


图4 GO和KEGG富集分析

注:a.GO生物学过程分析;b.GO细胞组分分析;c.GO分子功能分析;d.KEGG富集分析。

神经功能均有一定程度改善,均能不同程度减轻脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损症状,随着给药时间的延长,mNSS评分逐渐下降,以高剂量组下降最为明显(图6a)。对再灌注第7天各组大鼠mNSS评分进行比较(图6b),结果显示,与假手术组比较,模型组mNSS评分显著升高($P<0.001$)。与模型组比较,AST IV+PNS组及低、高剂量组mNSS评分显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),以低、高剂量组下降最为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 益气活血开窍组中药对脑缺血再灌注后脑白质损伤的影响

图7a显示缺血再灌注7d后脑胼胝体损伤情况。假手术组大鼠中未见胼胝体髓鞘空泡化和白质病变。模型组大鼠示髓鞘纤维疏松和紊乱,髓鞘空泡化明显甚至有髓鞘的断裂和脱失。冰片组、AST IV+PNS组以及低、高剂量组髓鞘空泡化、纤维紊乱和疏松情况均有一定程度改善,以高剂量组效应最为明显,未见明显空泡样变性或者髓鞘脱失。图7b显示各组大鼠单位面积脑胼胝体髓鞘化百分比的比较。与假手术组相比,模型组胼胝体髓鞘化百分比降低($P<0.001$)。与模型组比较,冰片组、AST IV+PNS组及低、高剂量组胼胝体髓鞘化百分比均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$),且与低剂量组相比,

高剂量组作用明显,差异具有统计学意义($P<0.01$)。图7c显示缺血再灌注7d后脑纹状体损伤情况。在假手术组,纹状体髓鞘呈块状,成团均匀分布,髓鞘排列紧密有序,界限清楚。模型组大鼠纹状体区损伤严重,髓鞘溶解消失。与模型组相比,冰片组、AST IV+PNS组见少量的髓鞘呈点状分布,脱髓鞘化无明显改善。低剂量组大鼠纹状体髓鞘脱失情况有所改善,保留少量界限清楚的髓鞘团块,但仍存在髓鞘空泡化和髓鞘断裂缺失。高剂量组纹状体虽有明显髓鞘溶解和空泡化,纹状体内髓鞘数量不多,但界限清楚。图7d显示各组大鼠单位面积脑纹状体髓鞘百分比的比较。与假手术组相比,模型组纹状体髓鞘百分比显著减少($P<0.001$)。与模型组相比,低剂量组和高剂量组纹状体髓鞘百分比显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.001$),低剂量组与冰片组、AST IV+PNS组相比显著减轻了脑缺血后的髓鞘脱失($P<0.01$),且高剂量组的髓鞘百分比显著高于低剂量组($P<0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注是加重缺血性脑卒中后神经损伤的主要原因之一,亦属于中医学“中风”范畴。神经系统主要由神经细胞(即神经元)与神经胶质细胞组成。神经元包括胞体、树突与轴突;神经胶质细胞包

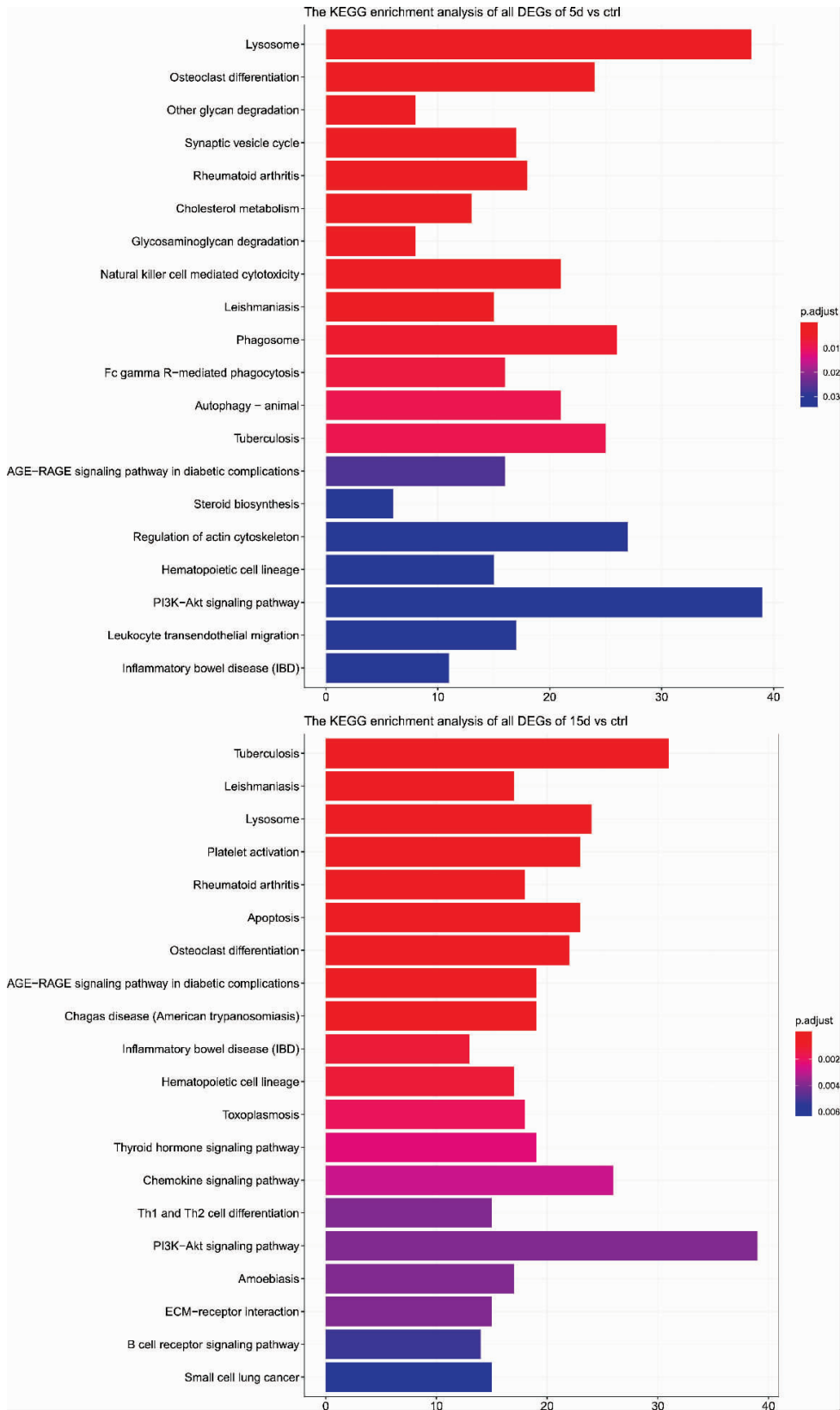


图 5 DEGs 的 KEGG 富集分析

括星形胶质细胞、OLs 及小胶质细胞^[21]。在中枢神经系统内神经元胞体及树突的聚积处,新鲜标本因富含血管而颜色灰暗,称为灰质;神经纤维集聚处因髓鞘色泽亮白称为白质。脑白质血流量较灰质少,且深部缺乏侧支循环。因此,脑白质更易受缺血的影响,且较灰质受损严重^[22-23]。

响,且较灰质受损严重^[22-23]。

本研究利用网络药理学方法预测了益气活血开窍组方中药中的 AST IV、冰片主要有效成分左旋龙脑与 PNS 的有效成分人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 促脑梗卒中后 OPCs 髓鞘

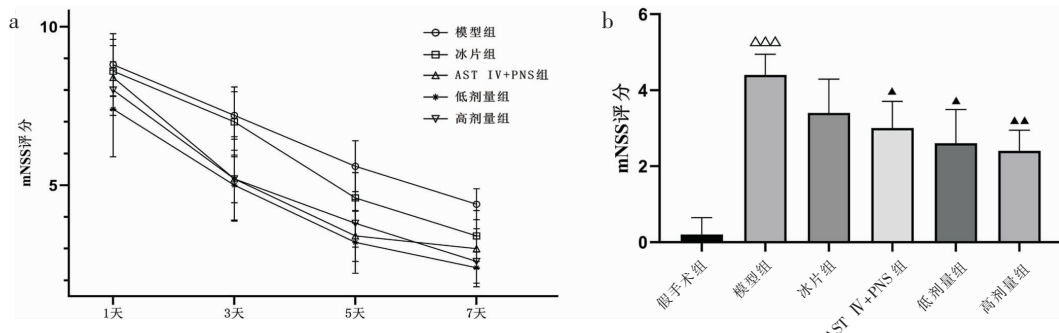


图 6 益气活血开窍组中药对脑缺血再灌注后神经功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:a.再灌注不同时间点各组 mNSS 评分情况;b.再灌注第 7 天各组 mNSS 评分的比较;与假手术组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

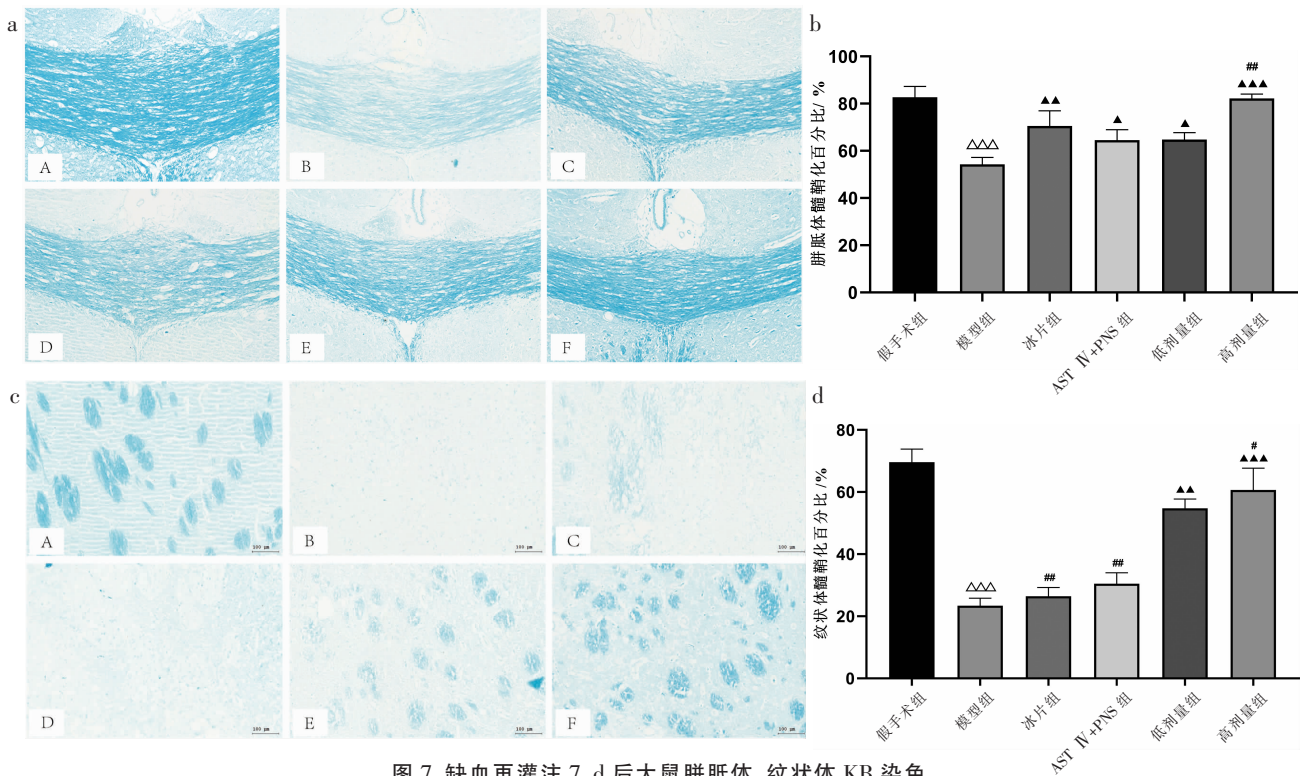


图 7 缺血再灌注 7 d 后大鼠胼胝体、纹状体 KB 染色

注: a 为胼胝体区的代表性图像(比例尺=100 μm);c 为纹状体区的代表性图像(比例尺=100 μm)。A 为假手术组,B 为模型组,C 为冰片组,D 为 AST IV+PNS 组,E 为低剂量组,F 为高剂量组。b 为各组胼胝体髓鞘化百分比($\bar{x}\pm s, n=5$);d 为各组纹状体髓鞘化百分比($\bar{x}\pm s, n=5$);与假手术组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与低剂量组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

再生的作用及靶点。收集到 365 个药物成分作用靶点,1162 个脑卒中促 OPCs 髓鞘再生靶点,最终筛选出 33 个药物-疾病共同靶基因。中药组分-疾病靶点 VEGFA、PTGS2、NTRK1、ESR2、和 MET 等基因与脑卒中后 OPCs 增殖和分化密切相关。通过 PPI 网络的拓扑学性质筛选出益气活血开窍组中药主要有效成分促进脑卒中 OPCs 髓鞘再生的核心靶点,结果显示,该组分中药有效成分促进脑卒中 OPCs 髓鞘再生与 VEGFA、PTGS2、NTRK1、ESR2、TYMS、F2R 和 GLI1 等靶点密切相关。GO 和 KEGG 通路富集分析结果提示,7 种有效成分对 OPCs 髓鞘再生的调控

与钙离子、PI3K-Akt、VEGF、Rap1、Ras、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗性和 MAPK 等信号通路密切相关。此外,数据集分析结果表明,7 种有效成分在卒中后不同时间段可以产生不同的影响,而且有一些信号通路在两个时间点(卒中后 5 d 与 15 d)均起作用,如 PI3K-Akt 信号通路。网络药理学研究表明益气活血开窍组中药中的主要有效成分可以促进脑卒中后 OPCs 髓鞘再生,且该作用与 PI3K-Akt 等信号通路密切相关,是多靶点、多途径相互作用的结果。

药效学实验结果表明,脑缺血再灌注后 1、3、5、

7 d, mNSS 评分显著增加,提示神经功能严重缺损。各给药组均能减轻神经功能缺损症状。在再灌注后第 7 天,各给药组 mNSS 评分不同程度下降,且以低、高剂量组作用更为明显,表明益气活血开窍组中药可有效改善脑缺血再灌注后的神经功能。大鼠胼胝体和纹状体形态学检测显示,脑缺血再灌注后,胼胝体和纹状体髓鞘空泡化明显甚至有髓鞘的断裂和脱失,髓鞘面积减少。各药物组髓鞘空泡化和疏松情况均有一定程度改善,能显著增加胼胝体髓鞘面积,改善脑白质脱髓鞘化,且以高剂量组的作用最为明显。药效学研究表明益气活血开窍组中药对脑缺血再灌注后白质(胼胝体和纹状体)损伤具有改善作用。

综上所述,益气活血开窍组中药对脑缺血再灌注后白质损伤具有改善作用,其作用可能与促进脑卒中后 OPCs 髓鞘再生有关,但其确切机制有待进一步研究。以该网络药理学预测和药效学结果为依据,进一步开展益气活血开窍组中药促脑缺血后白质修复作用和机制的研究,可作为今后的研究方向。

参考文献

- [1] LI Z X, JIANG Y, LI H, et al. China's response to the rising stroke burden[J]. *BMJ*, 2019, 364: 879.
- [2] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 70.
- [3] WANG W Z, JIANG B, SUN H X, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [4] SARKAR S, CHAKRABORTY D, BHOWMIK A, et al. Cerebral ischemic stroke: Cellular fate and therapeutic opportunities[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2019, 24(3): 435-450.
- [5] LIANG S X, ZHANG J Y, ZHANG Q Q, et al. Longitudinal tracing of white matter integrity on diffusion tensor imaging in the chronic cerebral ischemia and acute cerebral ischemia[J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 154: 135-141.
- [6] MATUTE C, RANSOM B R. Roles of white matter in central nervous system pathophysiology[J]. *ASN Neuro*, 2012, 4(2): e00079.
- [7] WANG Y, LIU G, HONG D D, et al. White matter injury in ischemic stroke[J]. *Progress in Neurobiology*, 2016, 141: 45-60.
- [8] CHOI B R, KIM D H, BACK D B, et al. Characterization of white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 542-547.
- [9] BALTAN S, BESANCON E F, MBOW B, et al. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28(6): 1479-1489.
- [10] BAUMANN N, PHAM-DINH D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(2): 871-927.
- [11] HESP Z C, GOLDSTEIN E Z, MIRANDA C J, et al. Chronic oligodendrogenesis and remyelination after spinal cord injury in mice and rats[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2015, 35(3): 1274-1290.
- [12] ITOH K, MAKI T, LOK J, et al. Mechanisms of cell-cell interaction in oligodendrogenesis and remyelination after stroke[J]. *Brain Research*, 2015, 1623: 135-149.
- [13] SEKERDAG E, SOLAROGLU I, GURSOY-OZDEMIR Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options[J]. *Current Neuropharmacology*, 2018, 16(9): 1396-1415.
- [14] 杜澍金,高维娟,黄芪甲苷对急性缺血性脑卒中神经保护作用研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(9): 1532-1534.
- [15] 朱小云,吴春红.三七总皂苷对局部脑缺血大鼠神经保护作用的研究[J]. *新中医*, 2022, 54(6): 1-4.
- [16] 杨筱倩,陈仙蕾,杨仁义,等.冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷抗脑缺血再灌注损伤有效剂量的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(4): 441-447.
- [17] 刘晓丹,杨筱倩,唐三,等.冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响[J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1649-1656.
- [18] 杨筱倩,丁煌,刘晓丹,等.冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷促进脑缺血再灌注后神经修复作用的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12): 5854-5859.
- [19] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSPP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6: 13.
- [20] 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.
- [21] ALLEN N J, LYONS D A. Glia as architects of central nervous system formation and function[J]. *Science*, 2018, 362(6411): 181-185.
- [22] FERN R F, MATUTE C, STYS P K. White matter injury: Ischemic and nonischemic[J]. *Glia*, 2014, 62(11): 1780-1789.
- [23] CHEN Y Z, YI Q, LIU G, et al. Cerebral white matter injury and damage to myelin sheath following whole-brain ischemia[J]. *Brain Research*, 2013, 1495: 11-17.