

·数字中医药·

本文引用: 杨毅, 李若冰, 黄丽娜, 王博, 蒋希成. 基于脂质与动脉粥样硬化通路探讨侯氏黑散治疗脑缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(4): 675-688.

基于脂质与动脉粥样硬化通路探讨侯氏黑散治疗脑缺血再灌注损伤的机制研究

杨毅, 李若冰, 黄丽娜, 王博, 蒋希成*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

[摘要] **目的** 利用网络药理学和动物实验验证分析《金匱要略》侯氏黑散治疗脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)的成分、靶点及信号通路,并通过脂质与动脉粥样硬化通路研究其作用机制。**方法** 在TCMIP、GeneCards和OMIM疾病数据库获取侯氏黑散与CIRI的交集靶点,使用STRING网站构建交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,使用Cytoscape软件筛选核心靶点和成分并构建“成分-靶点”网络。使用R语言进行GO和KEGG富集分析,使用AutoDock Vina验证成分与靶点的对接能。动物实验中将60只SPF级SD大鼠随机分为假手术组、模型组、西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组。用线栓法制备大鼠中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)大鼠模型,造模7d后通过改良神经功能评分(modified neurological severity score, mNSS)评估神经功能, TTC染色检测脑梗死体积, HE染色观察脑组织病理变化,全自动生化分析仪检测血清低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglycerides, TG)含量, ELISA检测血清白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平,免疫组织化学和RT-qPCR检测脑组织中HSP90AA1、NF- κ B1、SRC的蛋白及mRNA表达水平。**结果** 从侯氏黑散中筛选得到508种有效成分及549个药物靶标,1592个CIRI疾病靶点,交集靶点共153个,核心靶点为HSP90AA1、SRC、NF- κ B1,与棕榈酸、三磷酸腺苷、穿贝海绵甾醇、腺苷等核心成分均具有较强的结合力。GO富集分析的生物过程主要涉及对外源性刺激的反应、位置维护、炎症反应的调节等,KEGG通路分析主要富集在脂质和动脉粥样硬化、cAMP信号通路、花生四烯酸代谢等。与模型组相比,侯氏黑散各剂量组mNSS评分、脑梗死率、血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量、脑组织HSP90AA1蛋白表达水平和HSP90AA1、NF- κ B1和SRC mRNA表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$);侯氏黑散高剂量组LDL-C、TC、TG水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),HDL-C水平增高($P<0.05$);侯氏黑散中剂量组TG水平降低($P<0.01$);西药组和侯氏黑散中、高剂量组NF- κ B1和SRC蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与侯氏黑散低剂量组相比,侯氏黑散中、高剂量组mNSS评分、脑梗死率,血清TG水平,血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,脑组织中NF- κ B1 mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$);侯氏黑散高剂量组脑组织HSP90AA1、NF- κ B1和SRC蛋白表达水平和HSP90AA1、NF- κ B1 mRNA表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与侯氏黑散中剂量组相比,侯氏黑散高剂量组mNSS评分、脑梗死率,血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,脑组织HSP90AA1蛋白表达水平和NF- κ B1 mRNA表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 侯氏黑散以多成分、多靶点、多通路治疗CIRI,其中抑制核心靶点HSP90AA1、NF- κ B1、SRC的mRNA和蛋白表达,调控脂质与动脉粥样硬化通路是侯氏黑散治疗CIRI的重要机制。

[关键词] 侯氏黑散;脑缺血再灌注损伤;脂质与动脉粥样硬化通路;网络药理学;动物实验

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.04.025

Mechanism of Hou's Black Powder in treating cerebral ischemia reperfusion injury based on lipid and atherosclerosis pathways

YANG Yi, LI Ruobing, HUANG Lina, WANG Bo, JIANG Xicheng*

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China

[收稿日期] 2023-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174261, 81673865);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021H084);黑龙江中医药大学新药临床前研究基金项目(2019XY01)。

[通信作者] *蒋希成,男,博士,博士研究生导师, E-mail: jiangxicheng5303@163.com。

[Abstract] Objective To verify and analyze the ingredients, targets, and signaling pathways of Hou's Black Powder (HBP) from Jin Gui Yao Lve (Essentials from the Golden Cabinet) in treating cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) by network pharmacology and animal experiments, and to investigate its mechanism of action through lipid and atherosclerosis pathways. **Methods** The intersection targets of HBP and CIRI were obtained from TCM Integrated Pharmacology Research Platform (TCMIP) V2.0, GeneCards, and OMIM disease databases, and their protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING website. Cytoscape was used to screen the core targets and ingredients and to construct an ingredient-target network. R language was used for GO and KEGG enrichment analyses, and AutoDock Vina was employed to verify the docking ability between ingredients and targets. In animal experiments, sixty SPF-grade SD rats were randomized into sham-operated group, model group, western medicine group, and low-, medium-, and high-dose HBP groups. A MCAO/R rat model was prepared by suture-occluded method. Seven days after modeling, the rat neurological function was evaluated by modified neurological severity score (mNSS). The volume of cerebral infarction was determined by TTC staining and the pathological changes of the brain tissue were observed by HE staining. The serum content of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) was measured by fully automatic biochemical analyzer. The serum levels of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were examined by ELISA. The protein and mRNA expressions of HSP90AA1, NF- κ B1, and SRC in the brain tissue were measured by immunohistochemistry and RT-qPCR. **Results** A total of 508 active ingredients, 549 drug targets and 1,592 CIRI disease targets were screened from HBP. A total of 153 intersection targets were found, with HSP90AA1, SRC, and NF- κ B1 identified as the core targets. These core targets exhibited a strong binding affinity with core ingredients such as palmitic acid, adenosine triphosphate, clonasterol, and adenosine. The biological processes of GO enrichment analysis mainly involved the response to exogenous stimuli, location maintenance, and inflammatory response regulation. KEGG pathway analysis was primarily enriched in lipid and atherosclerosis pathways, cAMP signal pathway, and arachidonic acid metabolism. Compared with the model group, the mNSS score, cerebral infarction rate, serum content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , as well as HSP90AA1 protein expression level and mRNA expression levels of HSP90AA1, NF- κ B1, and SRC in the brain tissue of each dose HBP group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the levels of LDL-C, TC, and TG decreased in high-dose HBP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the HDL-C level increased ($P < 0.05$); the TG level in medium-dose HBP group decreased ($P < 0.01$); the protein expression levels of NF- κ B1 and SRC decreased in western medicine group and medium- and high-dose HBP groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with low-dose HBP group, the mNSS scores, cerebral infarction rates, serum levels of TG, serum content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , and mRNA expression levels of NF- κ B1 in the brain tissue of the medium- and high-dose HBP groups decreased significantly ($P < 0.01$); the protein expression levels of HSP90AA1, NF- κ B1, and SRC and the mRNA expression levels of HSP90AA1 and NF- κ B1 in the brain tissue of high-dose HBP group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with medium-dose HBP group, the high-dose HBP group showed reduced mNSS score, cerebral infarction rate, and serum content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , as well as decreased expression levels of HSP90AA1 protein and NF- κ B1 mRNA in the brain tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Hou's Black Powder treats CIRI with a multi-ingredient, multi-target and multi-pathway approach. A key mechanism of its therapeutic effect involves suppressing the mRNA and protein expressions of the core targets HSP90AA1, NF- κ B1, and SRC, as well as regulating the lipid and atherosclerosis pathways.

[Keywords] Hou's Black Powder; cerebral ischemia reperfusion injury; lipid and atherosclerosis pathways; network pharmacology; animal experiment

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)是由于大脑中供血动脉发生梗阻,血管复通后血液再灌注而导致的继发性脑组织损伤。CIRI是一种常见的脑血管疾病,具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点^[1]。有50%~70%的患者在发病治疗后伴随严重的后遗症,如瘫痪、失语等,严

重影响患者的生活质量。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是以管腔内皮下脂质沉积和血管炎为特征的炎性病理状态,当管腔沉积形成的不稳定斑块脱落后堵塞脑部动脉,或脑AS致使管腔狭窄甚至闭塞,会引发脑血管疾病^[2],降低脂质和AS风险对CIRI的发生,从而起到预防作用^[3]。

CIRI 属于中医学“中风病”范畴,病机以气血亏虚为本,复感受外邪,以致痰瘀互结,阻滞经络。侯氏黑散首见于《金匱要略·中风历节病脉证第五》,谓其“治大风,四肢烦重,心中恶寒不足者”,全方共 14 味药,其中菊花与防风可祛内外之风,桂枝、细辛可助气流行而无瘀滞,白术、茯苓、人参和干姜可助脾胃化生气血,川芎、当归行血补血,黄芩助菊花清风中郁热,桔梗、牡蛎、矾石清热化痰除湿。全方寒热并用,补泄同施,具有补益气血、活血通络、祛风化痰之功效。其方证内涵与中风的病因病机均相符合,可谓中风治疗“第一方”^[4]。现代研究证实,侯氏黑散对于多证型的缺血性脑中风后神经及血管的修复具有显著的临床疗效^[5-7],具有药理研究价值。

由于侯氏黑散组方复杂,成分繁多,因此,侯氏黑散治疗 CIRI 的作用机制未完全明确。网络药理学作为近年来针对网络数据库的热门研究,能够从分子水平阐释中药药物的成分靶点网络与疾病靶点网络之间的关联性。故本研究利用网络药理学、分子对接和动物实验研究,归纳侯氏黑散治疗 CIRI 的核心成分及靶点,通过脂质与动脉粥样硬化通路探讨其作用机理,为临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 数据库

网络药理学研究中使用的数据库,详见表 1。

表 1 网络药理学数据库及其网址

数据库	网址
TCMIP	http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home
GeneCards	https://www.genecards.org/
OMIM	https://omim.org/
STRING	http://string-db.org
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
RCSB PDB	http://www.rcsb.org/

1.2 实验动物

60 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠(260±20) g 来源于黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证号:SCXK(黑)2018-003。实验前适应性饲养 1 周,统一饲喂标准大鼠维持饲料及纯净水,控制室温 20~26 °C,湿度 60%±5%。所有动物实验均符合相关伦理规定,

并通过黑龙江中医药大学伦理委员会批准,实验动物伦理号:2023051603。

1.3 主要试剂

兔抗 HSP90AA1 抗体、兔抗 NF-κB1 抗体(成都正能生物技术有限责任公司,批号:251634、263819);兔抗 SRC 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号:R091824);苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、2%氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色剂(北京索莱宝科技有限公司,批号:20230113、20221221);兔二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:2252D0725);白介素-1β(interleukin 1β, IL1-β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:230218、221024、230605);TRIzol 试剂(美国 Thermo 公司,批号:5301247);TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(日本 Takara 公司,批号:AN90399A)。

1.4 主要设备

石蜡包埋机(德国 Leica 公司,型号:EG1150);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2135);光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CX41);全自动生化分析仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号:AU680);超微量分光光度计(美国 Thermo 公司,型号:Nano-Drop 2000);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKOREAL96)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 侯氏黑散化学成分及靶点 利用 TCMIP 数据库分别收集菊花、白术、细辛、防风、茯苓、桔梗、干姜、牡蛎、人参、黄芩、矾石、当归、川芎、桂枝的化学成分及其靶点(相似性分数≥0.8),去重后获得中药成分和靶点。

2.1.2 CIRI 靶点收集 以“cerebral ischemia reperfusion injury”为关键词在 GeneCards、OMIM 数据库中进行检索,其中 GeneCards 数据库设定 score≥75 百分位数,检索结果合并去重后作为 CIRI 疾病靶点。

2.1.3 核心网络构建及核心靶点、成分收集 TCMIP V2.0 平台得到的药物靶点与 CIRI 疾病靶点取交集

得到交集靶点,输入 STRING 数据库,设置物种为“Homo sapiens”,互作阈值 ≥ 0.9 ,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。Cytoscape 3.9.0 软件分析 PPI 网络的相关数据,利用 Cytohubba 插件的最大团中心性(maximum clique centrality, MCC)、最大邻居组件(maximum neighborhood component, MNC)、发散性(radiality)、边缘渗透组件(edge percolated component, EPC)、连接度(degree)、紧密度(closeness)算法得到与 CIRI 相关的 TOP 10 靶点,取 6 种算法的交集为核心靶点;构建“成分-靶点”网络并通过 Analyze Network 进行拓扑分析,选择中介中心性(betweenness centrality, BC)、度中心性(degree centrality, DC)和紧密中心性(closeness centrality, CC)三个指标均大于各自中位数的成分,再将 DC 值排名前十位者作为核心成分^[8]。

2.1.4 GO 基因功能和 KEGG 通路富集分析 使用 R 软件中“org. Hs. eg. db”“clusterProfiler”“DOSE”“enrichplot”“stringi”“ggplot2”等对交集靶蛋白进行 GO 和 KEGG 功能富集分析,设置 $P < 0.05$ 。GO 富集分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三个模块,以 P 值由小到大排序,各部分展示前 10 位条目。KEGG 富集分析根据 P 值由小到大展示排名前 20 位通路。

2.1.5 分子对接 PubChem 数据库得到核心成分的“sdf”格式结构,经 OpenBabel GUI 转化为“mol2”格式。RCSB PDB 数据库检索蛋白晶体结构,保存为“pdb”格式,应用 AutoDock Vina 1.2.5 软件进行分子对接。R 软件展示对节能热图,根据对节能评价活性成分和关键靶点之间的对接结果。

2.2 动物实验

2.2.1 动物造模方法 大脑中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型:采用改良线栓法首先构建 MCAO 模型^[9],10%水合氯醛按 3 mL/kg 体重腹腔注射麻醉,分离大鼠右侧颈总、颈内和颈外动脉,颈总动脉插线栓,入颈内动脉,进栓深度 18~20 mm,缝合刀口,进栓 2 h 后将线栓拔出 10 mm 建立 MCAO/R 模型^[10]。采用 Zealunga 五分制评分法^[11]进行评测大鼠症状和体征,将

评分为 1~3 分的大鼠判定为 MCAO/R 造模成功,纳入后续实验,剔除 0 分和 4 分大鼠。假手术模型:上述方法分离右侧颈总、颈内和颈外动脉后即缝合,以 Zealunga 五分制评分法评分,0 分视为造模成功,纳入后续实验。

2.2.2 动物分组及给药 60 只大鼠按随机数字法分为假手术组、模型组、西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组,每组 10 只大鼠。假手术组为假手术模型,其余组为 MCAO/R 模型。侯氏黑散由菊花 40 g,白术 10 g,细辛 3 g,茯苓 3 g,牡蛎 3 g,桔梗 8 g,防风 10 g,人参 3 g,矾石 3 g,黄芩 5 g,当归 3 g,干姜 3 g,川芎 3 g,桂枝 3 g(批号分别为 210301、210155、211001、211205、210401、210601、210603、211203、211005、210201、210111、211223、210131、211121)组成,药物饮片由黑龙江中医药大学第一附属医院药剂科提供。饮片煎煮两次后药液合并浓缩至相当于生药量 2 g/mL 的浓缩液,经成人用量换算^[12]后侯氏黑散低、中、高剂量组大鼠每日剂量分别为 8.4 g/kg、16.8 g/kg、33.6 g/kg。西药组使用银杏叶提取物片(金纳多, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG 公司,批号:0850521,规格:40 mg/片),经成人用量换算^[12]后大鼠每日剂量为 28 mg/kg。假手术组、模型组大鼠每日灌胃蒸馏水 10 mL/kg。各组大鼠于造模完成后开始灌胃,每日定时灌胃 1 次,直至造模 7 d 后取材。取材时将 10%水合氯醛按 3 mL/kg 体重腹腔注射麻醉,暴露腹腔后经腹主动脉取血。取血结束后做 TTC 检测的大鼠立即断头取脑后按相关流程染色,做 RT-qPCR 检测的大鼠快速断头取脑,经液氮速冻后存放于 -80 °C 冰箱。做 HE 染色、免疫组织化学检测的大鼠在近心端夹闭腹主动脉,剪开胸腔暴露心脏,由心尖处灌注生理盐水和 4%多聚甲醛,后断头取脑,存放于 4%多聚甲醛中继续固定。

2.2.3 改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS) 采用 mNSS 评测各组大鼠神经功能^[13],造模当天术后 3 h 至取材日每日定时评估。mNSS 分值区间为 0~18 分,分数越高则提示神经功能损伤程度越重。

2.2.4 TTC 染色 大鼠取脑后以 2 mm 厚度切冠状面,于 37 °C 水浴锅中用 2% TTC 溶液避光染色 30 min,4%多聚甲醛固定后拍照,经 Image J 软件计算梗死

表2 PCR引物序列

引物名称	正向(5'-3')	反向(5'-3')	长度/bp
GAPDH	TGTGGCATCAATGGATTTGG	ACACCATGTATTCCGGGTC AAT	116
HSP90AA1	CATAACGATGATGAGCACTACGC	GACCCATAGGTTACCTGTGT	85
NF- κ B1	AACAGAGAGGATTTCCGTTCCG	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT	104
SRC	CTCAGCACAGGACAGACAGGCTAC	CACCTTTCGTGGTCTCACTTTCTCG	178

区占脑切片面积比率,即脑梗死率(%)=脑梗死面积/全脑面积 \times 100%。

2.2.5 血脂检测 大鼠腹腔麻醉后腹主动脉取血,在4℃、3 500 r/min(离心半径8 cm)的低温离心机中离心15 min后取血清,按试剂盒说明书,利用全自动生化分析仪检测低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(how density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、总胆固醇(total cholesterol,TC)和甘油三酯(triglycerides,TG)含量。

2.2.6 ELISA 检测 血清提取方法同2.2.5,按试剂盒说明书,ELISA检测血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量。

2.2.7 HE染色 大鼠取脑后制成石蜡包块,切制5 mm的石蜡切片,置于65℃烘箱2 h,脱蜡复水后按HE试剂说明书染色并封片,于显微镜下观察组织形态。

2.2.8 免疫组织化学检测 石蜡切片制备同2.2.7,经脱蜡复水、3% H₂O₂去酶、抗原修复、山羊血清封闭、一抗孵育过夜(HSP90AA1、NF- κ B1和SRC均按1:200比例稀释)、二抗孵育、DAB显色、苏木精复染、梯度脱水和封片等流程,在显微镜下采集棕色阳性表达部位。应用Image Pro Plus 6.0软件计算平均光密度(average optical density,AOD)。

2.2.9 RT-qPCR 检测 称取100 mg液氮冻存的脑组织,TRIzol试剂提取RNA后根据微量分光光度计测量取1 μ g RNA,经逆转录合成cDNA,再通过荧光定量PCR得到Ct值,荧光定量PCR设置参数:95℃30 s预变性,循环1次;95℃5 s变性,60℃30 s退火,循环40次;采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算其表达量。由上海生工生物工程股份有限公司设计并提供HSP90AA1、NF- κ B1和SRC引物。各指标引物序列详见表2。

2.2.10 统计学分析 采用SPSS 25.0分析实验结果,实验计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态性和方

差齐性时采用单因素方差分析。不符合正态性或方差不齐时采用秩和检验。以P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CIRI及侯氏黑散成分靶标预测

在TCMIP V2.0平台中,共得到侯氏黑散有效成分508种,预测靶标549个。在GeneCards、OMIM数据库检索结果合并去重后,共得到疾病靶点1 592个。

3.2 侯氏黑散与CIRI的交集靶点

将侯氏黑散与CIRI的靶标映射取交集,共得153个治疗CIRI的交集靶点。详见图1。

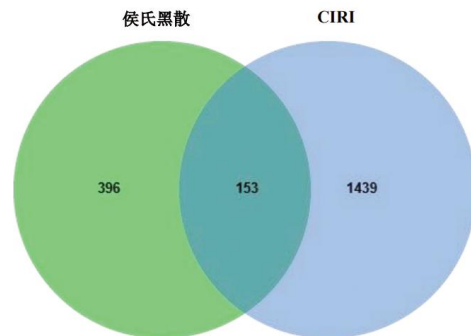


图1 侯氏黑散与CIRI交集靶标韦恩图

3.3 侯氏黑散治疗CIRI的PPI网络

将交集靶点输入STRING数据库,分析结果导入Cytoscape软件重新构建得到侯氏黑散治疗CIRI的PPI网络,详见图2。该网络含有111个节点,444条边,节点平均连接度4.362,节点的大小和颜色与其degree值成正比。通过CytoHubba插件下的6种不同算法得到Top 10靶点,详见图3。6种算法结果取交集,得到3个核心靶点,即:HSP90AA1、SRC、NF- κ B1。

3.4 侯氏黑散治疗CIRI的核心成分

核心成分筛选标准为同时大于DC、BC和CC的中位数,按DC值由大到小取前10位成分。详见表3。

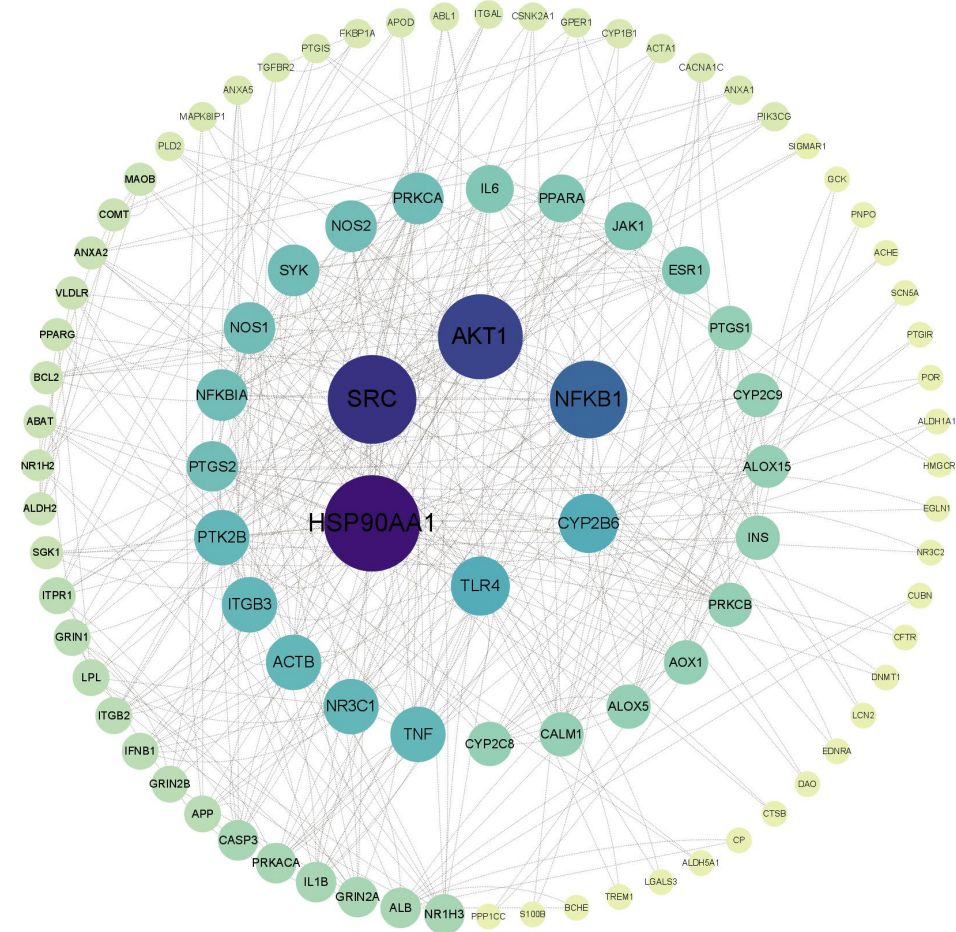


图 2 侯氏黑散治疗 CIRI 的 PPI 网络

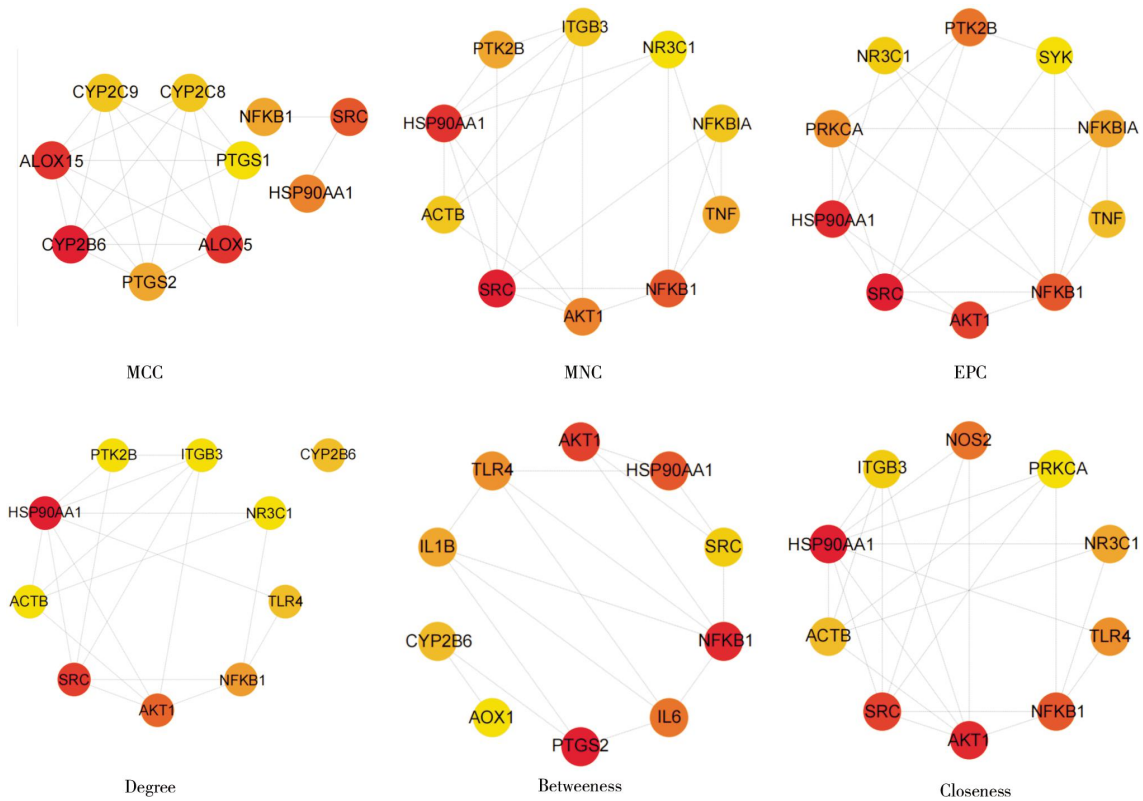


图 3 CytoHubba 插件 6 种算法 Top 10 靶点 PPI 网络

表3 侯氏黑散治疗 CIRI 的核心成分及拓扑参数

Pubchem CID	英文名	中文名	DC	BC	CC
985	Palmitic Acid	棕榈酸	427	0.015 355 2	0.389 308 5
14308007	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷	399	0.413 073 3	0.475 514 5
457801	Clionasterol	穿贝海绵甾醇	221	0.002 322 2	0.380 034 0
60961	Adenosine	腺苷	155	0.099 406 2	0.405 323 7
5281330	Poriferasterol	多孔甾醇	133	0.002 322 2	0.380 034 0
5280450	Linoleic Acid	亚油酸	129	0.009 248 7	0.384 394 7
5988	Sucrose	蔗糖	112	0.008 333 6	0.378 531 1
5283637	Campesterol	菜油甾醇	95	0.002 473 5	0.380 681 8
379	Octanoic Acid	辛酸	87	0.015 355 2	0.389 308 5
60961	Lauric Acid	月桂酸	87	0.015 355 2	0.389 308 5

3.5 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集分析共得到条目 2 237 条,其中 BP 条目 1 926 条,主要涉及对外源性刺激的反应、位置维护、炎症反应的调节、脂肪酸代谢过程、对低氧的反应等;CC 条目 130 条,包括膜筏、膜微区、树突棘等;MF 条目 181 条,包括铁离子结合、四吡咯结合、血红素结合等,详见图 4。KEGG 富集分析得到通路

180 条,包括脂质与动脉粥样硬化、cAMP 信号通路、花生四烯酸代谢等,详见图 5。按 *P* 值排名首位是脂质与动脉粥样硬化通路,通路图详见图 6,核心靶点 HSP90AA1、SRC、NF- κ B1 均富集在通路中。

3.6 分子对接

将核心成分分别与核心靶点蛋白 HSP90AA1 (PDB ID:1YC1)、SRC(PDB ID:1O43)、NF- κ B1(PDB

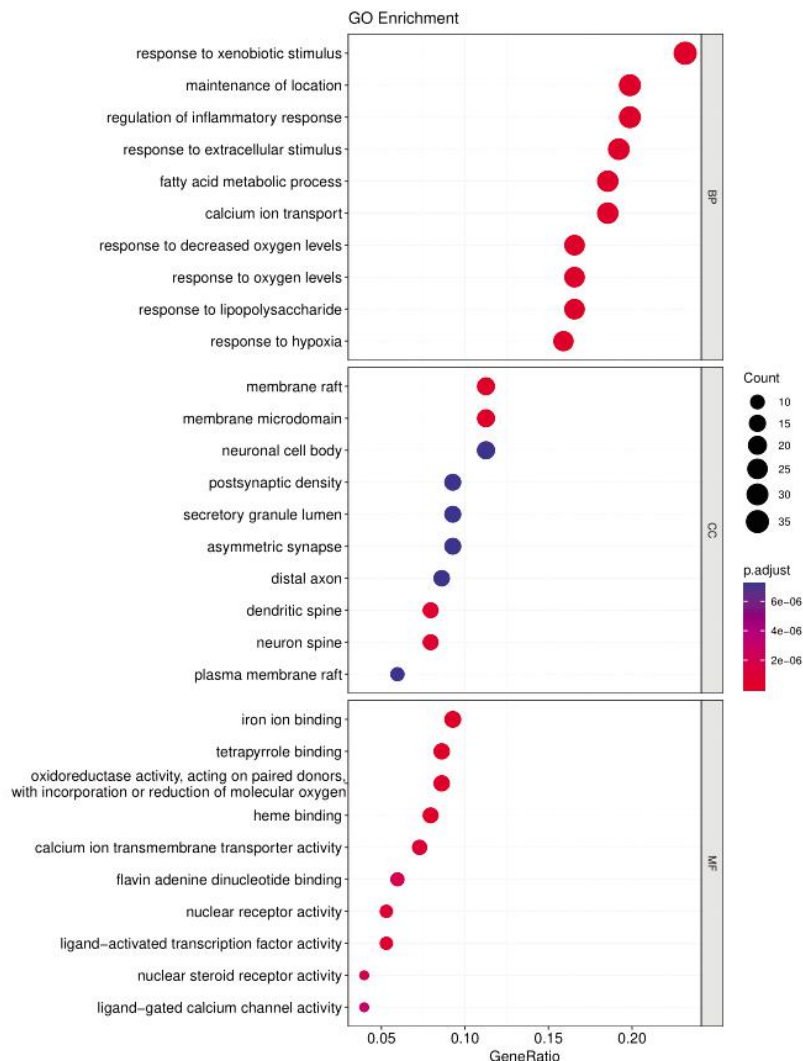


图4 侯氏黑散治疗 CIRI 的 GO 功能分析

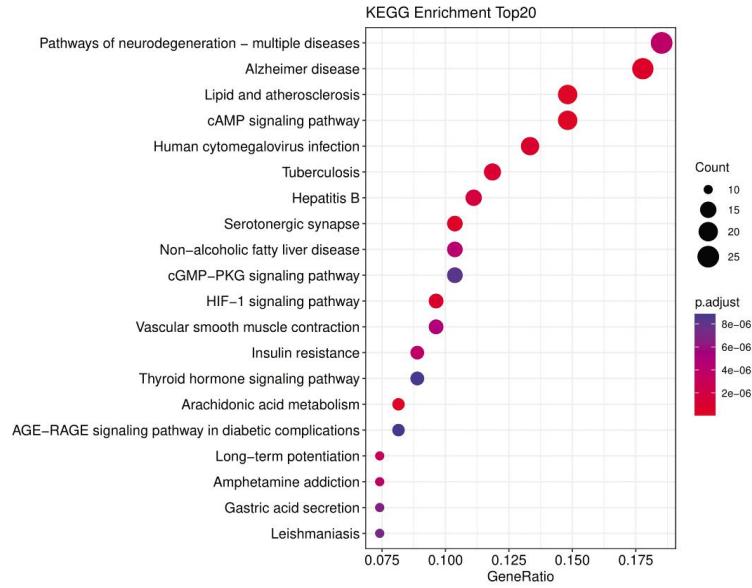


图 5 侯氏黑散治疗 CIRI 的 KEGG 通路富集分析

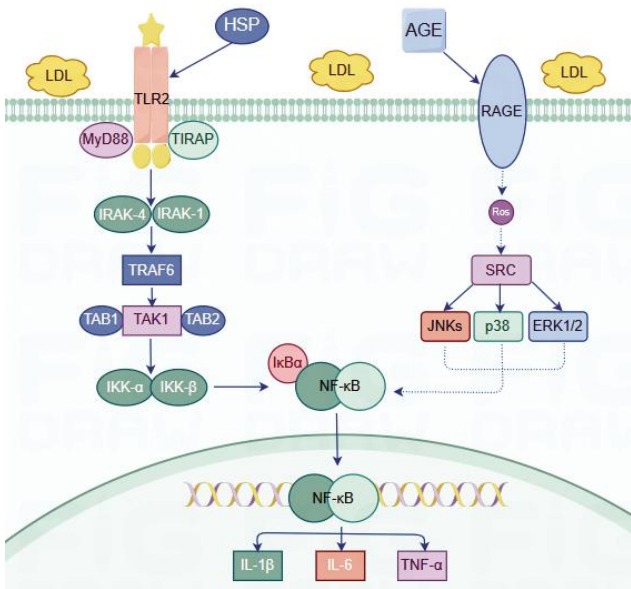


图 6 核心靶点在脂质与动脉粥样硬化通路的作用机制

ID:7RG5)进行分子对接。对接分值 ≤ -5.0 kcal/mol表示有较好的结合活性,对接分值越低,分子构象越稳定,结合能力热图详见图 7。选取对接分值 ≤ -5.0 kcal/mol 的 5 组活性成分与靶蛋白,通过 PyMOL 软件进行 3D 展示,图中展示了 HSP90AA1、SRC 和 NF- κ B1

与其核心成分的对接部位,详见图 8。分子对接结果显示,HSP90AA1和 Campesterol、NF- κ B1 和 Poriferasterol、HSP90AA1 和 Clionasterol、SRC 和 Campesterol、SRC 和 Poriferasterol 等均具有较强的结合力。

3.7 侯氏黑散对各组大鼠 mNSS 评分影响

与造模日相比,其余各组术后第 7 天的 mNSS 评分降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与假手术组相比,模型组、西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组 mNSS 评分明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组 mNSS 评分明显降低($P < 0.01$);与西药组相比,侯氏黑散低、中剂量组 mNSS 评分升高($P < 0.05, P < 0.01$);与侯氏黑散低剂量组相比,侯氏黑散中、高剂量组 mNSS 评分明显降低($P < 0.01$);与侯氏黑散中剂量组相比,侯氏黑散高剂量组 mNSS 评分降低($P < 0.05$)。详见表 4。

3.8 侯氏黑散对各组大鼠脑梗死率影响

除假手术组正常外,其余各组均表现不同程度梗死,详见图 9。与假手术组相比,其余各组梗死率明显增高($P < 0.01$);与模型组相比,西药组和侯氏

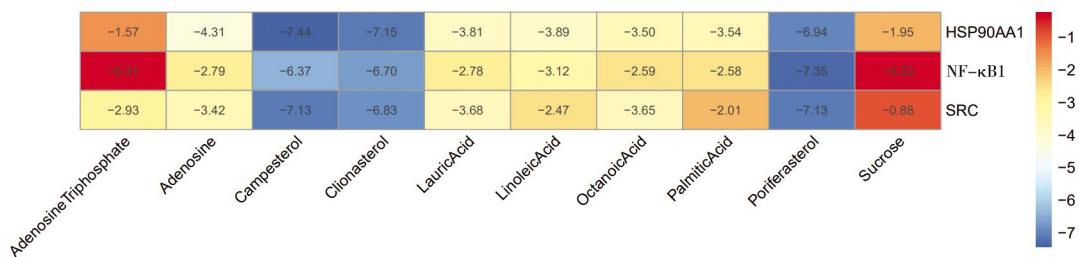


图 7 分子对接结合能力热图

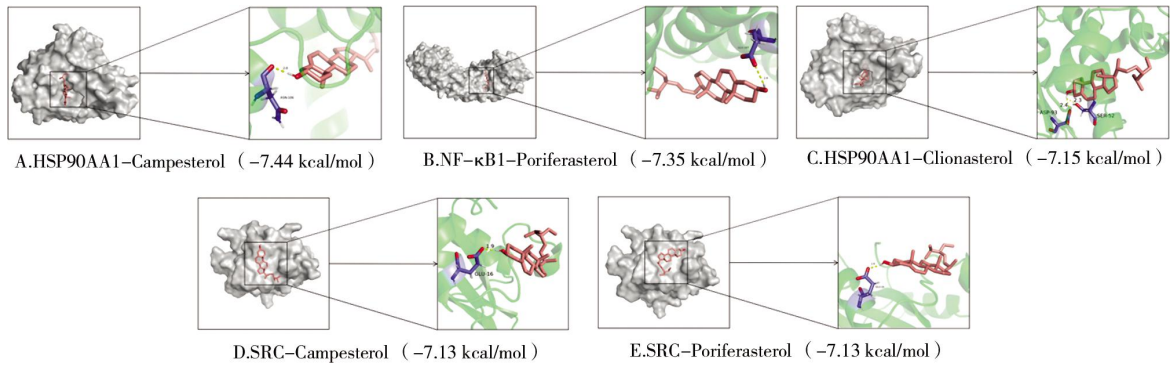


图 8 关键成分与核心靶蛋白相互作用

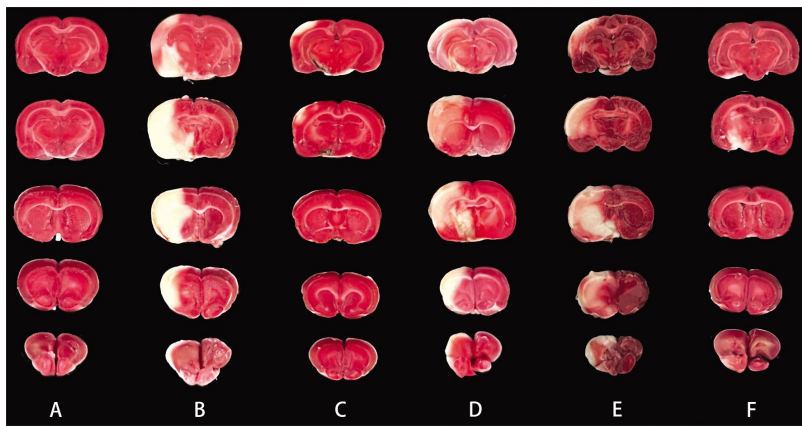


图 9 侯氏黑散对各组大鼠脑梗死体积的影响(TTC 染色)

注:A.假手术组;B.模型组;C.西药组;D.侯氏黑散低剂量组;E.侯氏黑散中剂量组;F.侯氏黑散高剂量组。

表 4 造模日及术后 7 d 大鼠 mNSS 评分结果($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	造模日	术后 7 d
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	16.60±1.14	14.40±1.14 ^{&##}
西药组	16.80±0.84	6.20±0.84 ^{&##*#}
侯氏黑散低剂量组	16.80±0.84	11.40±1.34 ^{&##*#▲▲}
侯氏黑散中剂量组	16.20±0.84	8.00±1.23 ^{&##*#▲▲△}
侯氏黑散高剂量组	16.20±0.87	6.40±1.14 ^{&##*#▲▲△*}

注:与造模日相比,[&] $P<0.05$,^{&&} $P<0.01$;与假手术组相比,^{**} $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.01$;与西药组相比,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$;与侯氏黑散低剂量组相比,^{△△} $P<0.01$;与侯氏黑散中剂量组相比,^{*} $P<0.05$ 。

黑散低、中、高剂量组脑梗死率降低($P<0.05, P<0.01$);与西药组相比,侯氏黑散低、中剂量组脑梗死率明显增高($P<0.01$);与侯氏黑散低剂量组相比,侯氏黑散中、高剂量组脑梗死率明显降低($P<0.01$);与侯氏黑散中剂量组相比,侯氏黑散高剂量组脑梗死率降低($P<0.05$)。详见图 10。

3.9 侯氏黑散对各组大鼠脂质代谢水平影响

与假手术组相比,模型组和侯氏黑散低、中剂量组 LDL-C、TC、TG 水平明显增高($P<0.01$),HDL-C

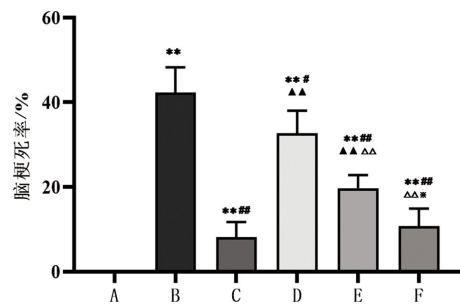


图 10 侯氏黑散对各组大鼠脑梗死率影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:A.假手术组;B.模型组;C.西药组;D.侯氏黑散低剂量组;E.侯氏黑散中剂量组;F.侯氏黑散高剂量组。与假手术组相比,^{**} $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与西药组相比,^{▲▲} $P<0.01$;与侯氏黑散低剂量组相比,^{△△} $P<0.01$;与侯氏黑散中剂量组相比,^{*} $P<0.05$ 。

水平明显降低($P<0.01$);侯氏黑散高剂量组 TC、TG 水平明显增高($P<0.01$),HDL-C 水平明显降低($P<0.01$)。与模型组相比,西药组和侯氏黑散高剂量组 LDL-C、TC、TG 水平降低($P<0.05, P<0.01$),HDL-C 水平升高($P<0.05, P<0.01$);侯氏黑散中剂量组 TG 水平明显降低($P<0.01$)。与西药组相比,侯氏黑散低剂量组 LDL-C、TC、TG 水平增高($P<0.01$),HDL-C 水平降低($P<0.05$);侯氏黑散中剂量组 LDL-C、TC 水

平明显增高($P<0.01$), HDL-C 水平降低($P<0.05$); 侯氏黑散高剂量组 TC 水平明显增高($P<0.01$)。与侯氏黑散低剂量组相比, 侯氏黑散中、高剂量组 TG 水平明显降低($P<0.01$)。详见表 5。

3.10 侯氏黑散对各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 影响

与假手术组相比, 其余各组血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量增高($P<0.05, P<0.01$); 与模型组相比, 西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量明显降低($P<0.01$); 与西药组相比, 侯氏黑散低、中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量增高($P<0.05, P<0.01$); 与侯氏黑散低剂量组相比, 侯氏黑散中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量明显降低($P<0.01$); 与侯氏黑散中剂量组相比, 高剂量组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量明显降低($P<0.01$)。详见表 6。

3.11 侯氏黑散对各组大鼠神经细胞损伤影响

假手术组脑组织神经细胞结构完整, 排列有序, 核仁清晰; 模型组脑缺血区部位出现大面积空腔, 神经细胞排列明显不规律且稀疏, 细胞核缩小, 部分细胞坏死; 与模型组比较, 西药组、侯氏黑散低、

中、高剂量组的神经细胞数量增多, 细胞结构完整性及核萎缩表现均有改善, 说明神经细胞损伤程度均有缓解, 其中西药组损伤程度最轻, 侯氏黑散低剂量组至高剂量组损伤程度呈递减趋势。详见图 11。(图中箭头标注为细胞核固缩及坏死病变区域)。

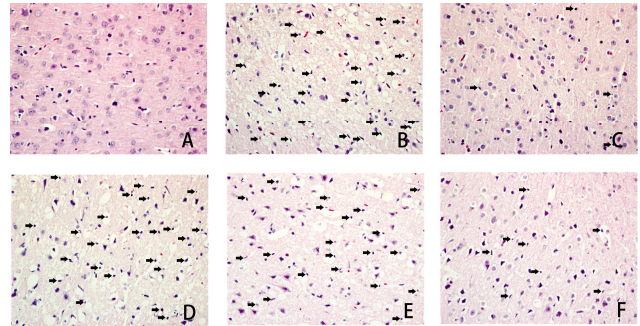


图 11 侯氏黑散对各组大鼠脑组织神经细胞形态的影响 (HE, $\times 400$)

注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 西药组; D. 侯氏黑散低剂量组; E. 侯氏黑散中剂量组; F. 侯氏黑散高剂量组。

3.12 侯氏黑散对各组大鼠 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC 蛋白表达影响

与假手术组相比, 模型组和侯氏黑散低、中、高剂量组的 HSP90AA1 表达增高($P<0.05, P<0.01$), 模

表 5 侯氏黑散对各组大鼠脂质代谢水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3, \text{mmol/mL}$)

组别	LDL-C	HDL-C	TC	TG
假手术组	0.54 \pm 0.05	1.16 \pm 0.11	1.41 \pm 0.06	0.33 \pm 0.05
模型组	0.92 \pm 0.15**	0.66 \pm 0.05**	2.04 \pm 0.10**	0.87 \pm 0.13**
西药组	0.55 \pm 0.05 [#]	0.98 \pm 0.18 [#]	1.53 \pm 0.06 [#]	0.44 \pm 0.05 [#]
侯氏黑散低剂量组	0.80 \pm 0.11*** \blacktriangle	0.73 \pm 0.10*** \blacktriangle	1.92 \pm 0.14*** \blacktriangle	0.80 \pm 0.11*** \blacktriangle
侯氏黑散中剂量组	0.78 \pm 0.10*** \blacktriangle	0.76 \pm 0.09*** \blacktriangle	1.91 \pm 0.10*** \blacktriangle	0.59 \pm 0.06*** $\blacktriangle\triangle$
侯氏黑散高剂量组	0.70 \pm 0.07 [#]	0.85 \pm 0.07*** [#]	1.76 \pm 0.04*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.51 \pm 0.05*** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$

注: 与假手术组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$; 与西药组相比, \blacktriangle $P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$; 与侯氏黑散低剂量组相比, $\triangle\triangle$ $P<0.01$ 。

表 6 侯氏黑散对各组大鼠血清炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	17.00 \pm 0.43	100.72 \pm 0.39	188.60 \pm 0.43
模型组	29.10 \pm 0.42**	215.12 \pm 0.80**	421.05 \pm 0.97**
西药组	17.69 \pm 0.15* [#]	137.26 \pm 1.13* [#]	210.83 \pm 0.56* [#]
侯氏黑散低剂量组	23.38 \pm 0.33*** $\blacktriangle\blacktriangle$	183.73 \pm 0.54*** $\blacktriangle\blacktriangle$	353.87 \pm 1.48*** $\blacktriangle\blacktriangle$
侯氏黑散中剂量组	21.06 \pm 0.51*** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$	168.48 \pm 0.39*** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$	268.48 \pm 0.39*** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$
侯氏黑散高剂量组	18.72 \pm 0.10*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	143.10 \pm 0.38*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	243.10 \pm 0.38*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

注: 与假手术组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组相比, [#] $P<0.01$; 与西药组相比, \blacktriangle $P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$; 与侯氏黑散低剂量组相比, $\triangle\triangle$ $P<0.01$, 与侯氏黑散中剂量组相比, *** $P<0.01$ 。

型组和侯氏黑散低、中剂量组 NF- κ B1 和 SRC 表达增高 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组相比, 西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组 HSP90AA1 表达降低 ($P<0.05, P<0.01$), 西药组、侯氏黑散中、高剂量组 NF- κ B1 和 SRC 表达降低 ($P<0.05, P<0.01$); 与西药组相比, 侯氏黑散低、中、高剂量组 HSP90AA1 表达增高 ($P<0.05, P<0.01$), 侯氏黑散低剂量组 NF- κ B1 和 SRC 表达显著增高 ($P<0.01, P<0.01$); 与侯氏黑散低剂量组相比, 侯氏黑散高剂量组 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC 表达降低 ($P<0.05, P<0.01$); 与侯氏黑散中剂量组相比, 侯氏黑散高剂量组 HSP90AA1 表达降低 ($P<0.05$)。详见图 12、图 13。

3.13 侯氏黑散对各组大鼠 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC mRNA 表达影响

与假手术组相比, 模型组和侯氏黑散低、中、高剂量组的 HSP90AA1 mRNA 表达明显升高 ($P<0.01$), 模型组和侯氏黑散低、中剂量组的 NF- κ B1 mRNA 表

达明显升高 ($P<0.01$), 模型组、西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组 SRC mRNA 表达升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组相比, 西药组和侯氏黑散低、中、高剂量组的 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC mRNA 表达降低 ($P<0.05, P<0.01$); 与西药组相比, 侯氏黑散低、中剂量组 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC mRNA 表达升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与侯氏黑散低剂量组相比, 侯氏黑散高剂量组 HSP90AA1 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$), 侯氏黑散中、高剂量组 NF- κ B1 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。与侯氏黑散中剂量组相比, 侯氏黑散高剂量组 NF- κ B1 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。详见图 14。

4 讨论

本研究通过数据库挖掘得到侯氏黑散 508 种化学成分, 与 CIRI 交集靶点 153 个, 其中棕榈酸、三磷酸腺苷、亚油酸等为核心成分, HSP90AA1、NF- κ B1

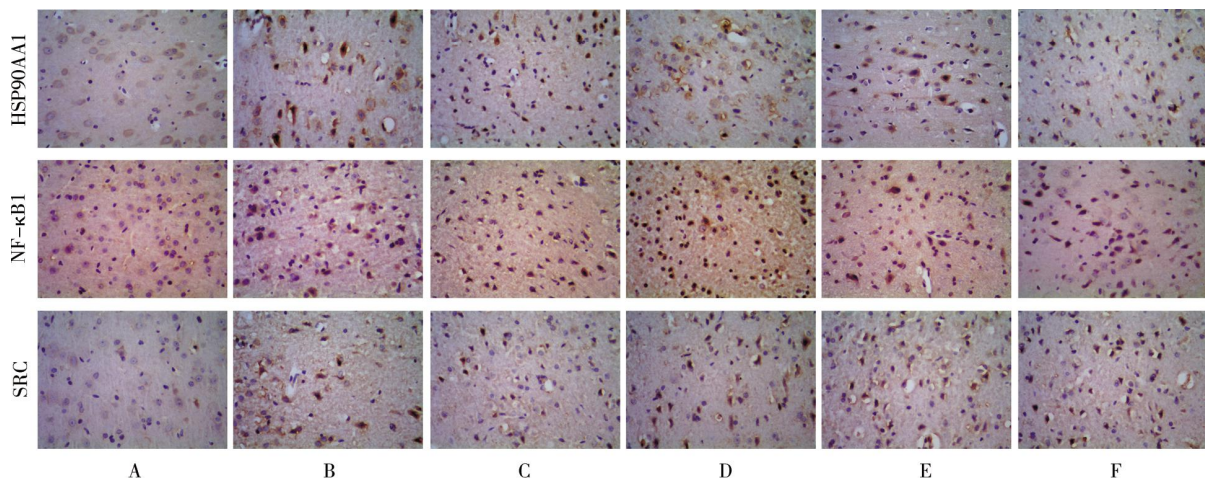


图 12 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC 各组大鼠脑组织中的表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)

注: A.假手术组; B.模型组; C.西药组; D.侯氏黑散低剂量组; E.侯氏黑散中剂量组; F.侯氏黑散高剂量组。

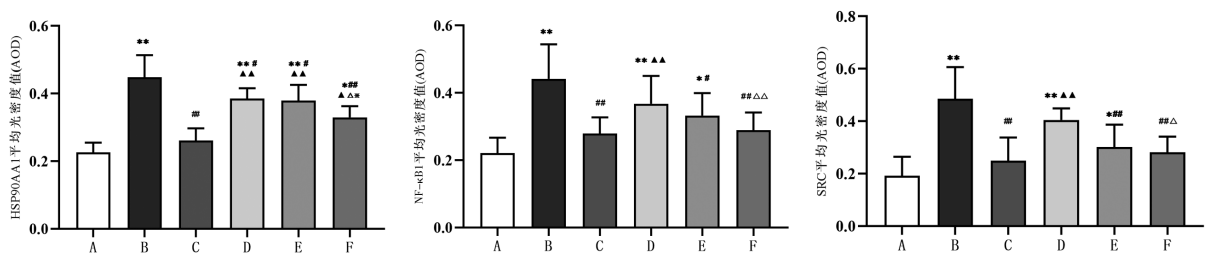


图 13 侯氏黑散对各组大鼠脑组织 HSP90AA1、NF- κ B1 和 SRC 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

注: A.假手术组; B.模型组; C.西药组; D.侯氏黑散低剂量组; E.侯氏黑散中剂量组; F.侯氏黑散高剂量组。与假手术组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与西药组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与侯氏黑散低剂量组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, 与侯氏黑散中剂量组相比, * $P<0.05$ 。

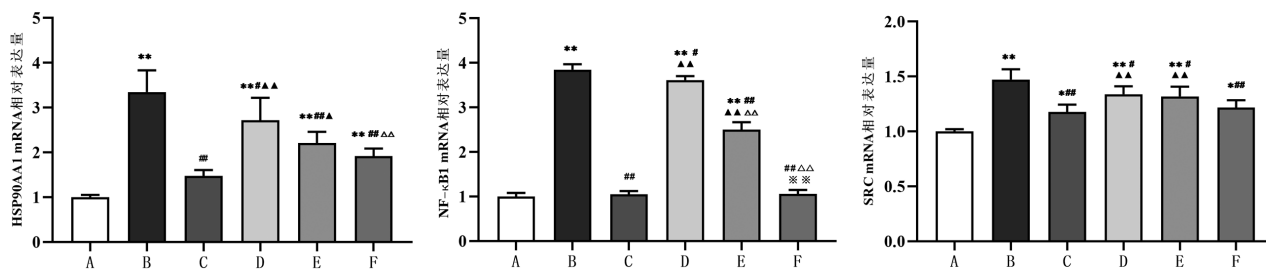


图 14 侯氏黑散对各组大鼠脑组织中 HSP90AA1、NF-κB1 和 SRC mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:A.假手术组;B.模型组;C.西药组;D.侯氏黑散低剂量组;E.侯氏黑散中剂量组;F.侯氏黑散高剂量组。与假手术组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与西药组相比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与侯氏黑散低剂量组相比,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与侯氏黑散中剂量组相比,※ $P < 0.05$,※※ $P < 0.01$ 。

和 SRC 为核心靶点。交集靶点的 GO 功能分析生物过程主要涉及对外源性刺激的反应、位置维护、炎症反应的调节等,KEGG 通路分析主要集中在脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路、花生四烯酸代谢等方面。动物实验发现,侯氏黑散给药 7 d 后可显著改善各组大鼠 mNSS 评分、脑梗死率及神经细胞形态;侯氏黑散低、中、高剂量组均可降低大鼠血清 LDL-C、TG 和 TC 含量,并提高 HDL-C 含量,降低各组大鼠 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量,降低各组大鼠脑组织 HSP90AA1、NF-κB1 和 SRC 的 mRNA 和蛋白表达水平,以高剂量组结果最为显著。研究结果表明,HSP90AA1、NF-κB1 和 SRC 是侯氏黑散治疗 CIRI 的有效靶点。

侯氏黑散作为治疗 CIRI 的经典方剂,其作用机制主要包括促进神经元修复与损伤、降低总胆固醇和甘油三酯等。相关研究证实,侯氏黑散能够下调淀粉样前体蛋白表达,抑制 β -淀粉样蛋白产生的神经毒性^[4],提高生长关联蛋白、突触素、微管相关蛋白-2 等神经再生因子表达^[5],同时调节脂质水平后改善血液状态^[6]。本研究发现,脂质和 AS 通路是其主要作用途径之一,而 AS 的主要诱因包括脂质积累、炎症反应、内皮功能障碍等。侯氏黑散核心成分能够围绕这一通路及其诱因发挥治疗作用。棕榈酸是人体循环血液中含有最多的游离脂肪酸之一,其病理高浓度状态会减少内皮一氧化氮(nitric oxide, NO)释放,抑制内皮型一氧化氮合酶的磷酸化激活,损伤血管内皮功能,促进 AS 生成^[7]。三磷酸腺苷是分布人体全身的内源性核苷,当激活血管内皮的三

磷酸腺苷受体后可以促进 NO 释放,从而改善微循环和内皮功能。亚油酸属于不饱和脂肪酸,能够刺激平滑肌细胞及内皮细胞中促炎性细胞因子的表达,如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等^[8],并提高对 LDL 的敏感性,影响正常的血脂代谢,进而加重 AS 进展^[9]。

侯氏黑散核心靶点 HSP90AA1、NF-κB1、SRC 均富集于脂质和 AS 通路。研究发现,AS 患者的硬化斑块中 HSP90AA1 表达增加,并与斑块不稳定性有关^[20];同时血清中 HSP90AA1 水平升高能够诱导免疫反应,被认为是 AS 免疫机制的自身抗原^[21]。HSP90AA1 抑制剂能够抑制炎症因子核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)表达,并通过抑制血管平滑肌细胞迁移而减缓 AS 斑块形成^[22]。AS 的发生发展与炎症因子关系密切,而炎症介质又作为 NF- κ B 的靶基因受其调控^[23]。NF- κ B 作为真核细胞内重要的转录因子,以 p50 和 p65 组成的二聚体为存在形式^[24],在激活状态下,NF- κ B 从细胞质移至细胞核,并诱导 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子释放^[25],抑制 NF- κ B 活化是抗炎治疗的关键步骤^[26]。类固醇受体辅激活因子(steroid receptor coactivator,Src)参与脑神经元的增殖和分裂等生理过程^[27],脑缺血发生后 Src 被激活^[28]。细胞外信号调节激酶 1/2、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B、p38 丝裂原激活的蛋白激酶等信号通路与细胞增殖、细胞分化和炎症反应等过程关系密切^[29-31],而 Src 蛋白激酶能够通过上述通路导致血管内皮功能障碍,破坏其本身的屏障功能^[32]。Src 也作用于巨噬细胞的脂质吞噬、炎症反应和凋亡过程^[33]。在血管平滑肌细胞中,Src 也可以诱导其发生迁移和

增殖,影响其局部黏着复合物形成,促使发生炎症反应^[34]。由此可见,HSP90AA1、NF- κ B1和SRC均可影响AS形成的各个过程,对AS具有重要调节作用。

5 结论

本研究采用网络药理学、分子对接及动物实验探讨了《金匱要略》中侯氏黑散治疗CIRI的作用机制,充分体现了侯氏黑散通过多成分、多靶点、多通路的调节机制发挥其整体治疗CIRI的优势,并验证了其可能主要通过作用于HSP90AA1、NF- κ B1、SRC核心靶点调控脂质和AS过程,进而实现对CIRI的治疗作用,为临床研究提供了一定的参考和指导价值。

参考文献

- [1] CHUMBOATONG W, THUMMAYOT S, GOVITRAPONG P, et al. Neuroprotection of agomelatine against cerebral ischemia/reperfusion injury through an antiapoptotic pathway in rat[J]. *Neurochemistry International*, 2017, 102: 114–122.
- [2] CARRESI C, MOLLACE R, MACRÌ R, et al. Oxidative stress triggers defective autophagy in endothelial cells: Role in atherosclerosis development[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 387.
- [3] KIM Y J, KIM O Y, CHO Y, et al. Plasma phospholipid fatty acid composition in ischemic stroke: Importance of docosahexaenoic acid in the risk for intracranial atherosclerotic stenosis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 418–424.
- [4] 王兴, 杨志宏, 郭珍, 等. 从寒热并用法探析侯氏黑散治疗缺血性中风的理论[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(1): 145–149.
- [5] LU Y, HSIANG F, CHANG J H, et al. Houshiheisan and its components promote axon regeneration after ischemic brain injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(7): 1195–1203.
- [6] XIANG Y Y, YAO X Q, WANG X, et al. Houshiheisan promotes angiogenesis via HIF-1 α /VEGF and SDF-1/CXCR4 pathways: in vivo and in vitro[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(10): BSR20191006.
- [7] WANG X, WANG Z Y, ZHENG J H, et al. TCM network pharmacology: A new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2021, 19(1): 1–11.
- [8] BARABÁSI A L, GULBAHCE N, LOSCALZO J. Network medicine: A network-based approach to human disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12: 56–68.
- [9] 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.
- [10] WANG H L, LIU F L, LI R Q, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation[J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(6): 1011–1016.
- [11] XING Y, WANG M M, FENG Y S, et al. Possible involvement of PTEN signaling pathway in the anti-apoptotic effect of electroacupuncture following ischemic stroke in rats[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, 38(8): 1453–1463.
- [12] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(5): 52–53.
- [13] 王晋晨, 熊晓星. 缺血性脑卒中动物模型研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(10): 1881–1886, 1892.
- [14] 王海征, 张秋霞, 赵晖, 等. 风药、补虚药对脑缺血大鼠淀粉样 β 蛋白及其蛋白前体表达的影响[J]. *世界中医药*, 2013, 8(8): 942–945.
- [15] 张秋霞, 赵晖, 王蕾, 等. 经方侯氏黑散对脑缺血损伤大鼠神经可塑性相关蛋白的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(3): 341–346.
- [16] 李敬孝, 张岩. 侯氏黑散对ICVD兔血流变及脂质过氧化物影响的实验研究[J]. *四川中医*, 2007, 25(1): 20–21.
- [17] WU D, LIU J T, PANG X M, et al. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 34(6): 1706–1712.
- [18] WOO LEE Y, JOO PARK H, HENNIG B, et al. Linoleic acid induces MCP-1 gene expression in human microvascular endothelial cells through an oxidative mechanism[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, 12(11): 648–654.
- [19] TSIMIKAS S, PHILIS-TSIMIKAS A, ALEXOPOULOS S, et al. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999, 19(1): 122–130.
- [20] KIM J, JANG S W, PARK E, et al. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis[J]. *Journal of*

- Molecular and Cellular Cardiology, 2014, 72: 157-167.
- [21] HOTER A, EL-SABBAN M E, NAIM H Y. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2560.
- [22] ZHANG X Q, SHI H, WANG Y L, et al. Down-regulation of hsa-miR-148b inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and migration by directly targeting HSP90 in atherosclerosis[J]. American Journal of Translational Research, 2017, 9(2): 629-637.
- [23] LAMON B D, HAJJAR D P. Inflammation at the molecular interface of atherogenesis: An anthropological journey[J]. The American Journal of Pathology, 2008, 173(5): 1253-1264.
- [24] 周智慧, 陈贺, 吴锦波, 等. 基于TLR4/NF- κ B信号通路探究心脉康改善兔动脉粥样硬化的机制[J]. 中国药房, 2021, 32(22): 2736-2742.
- [25] 范增光, 袁野. 基于p38MAPK/NF- κ B信号通路探讨苏木提取物对ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的机制研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2022, 24(6): 2294-2301.
- [26] LI D D, HU J, WANG T, et al. Silymarin attenuates cigarette smoke extract-induced inflammation via simultaneous inhibition of autophagy and ERK/p38 MAPK pathway in human bronchial epithelial cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37751.
- [27] MOYSENOVICH A M, TATARSKIY V V, YASTREBOVA M A, et al. Akt and Src mediate the photocrosslinked fibroin-induced neural differentiation[J]. Neuroreport, 2020, 31(10): 770-775.
- [28] 戚明珠, 张妮雪, 苏晓慧, 等. 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的网络药理学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 163-170.
- [29] FUJITA Y, YOSHIZUMI M, IZAWA Y, et al. Transactivation of fetal liver kinase-1/kinase-insert domain-containing receptor by lysophosphatidylcholine induces vascular endothelial cell proliferation[J]. Endocrinology, 2006, 147(3): 1377-1385.
- [30] ZHANG Y, KHOI P N, CAI B R, et al. Sulforaphane regulates eNOS activation and NO production via src-mediated PI3K/akt signaling in human endothelial EA.hy926 cells[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5422.
- [31] REN Q, GUO F, TAO S B, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 122: 109772.
- [32] SUN C X, WU M H, LEE E S, et al. A disintegrin and metalloproteinase 15 contributes to atherosclerosis by mediating endothelial barrier dysfunction via Src family kinase activity[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012, 32(10): 2444-2451.
- [33] CHEN J C, WU M L, HUANG K C, et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression[J]. Cardiovascular Research, 2008, 80(1): 138-150.
- [34] YLÄ-HERTTUALA S, BENTZON J F, DAEMEN M, et al. Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology[J]. Thrombosis and Haemostasis, 2011, 106(1): 1-19.

(本文编辑 田梦妍)