

本文引用: 殷 坚, 李美丽, 李 亮, 潘 波, 金 政, 陈苗苗, 赵俊杰, 唐 曦. 基于网络药理学及实验验证探讨补阳还五汤治疗脊髓损伤的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1261-1269.

## 基于网络药理学及实验验证探讨补阳还五汤 治疗脊髓损伤的作用机制

殷 坚<sup>1</sup>, 李美丽<sup>1</sup>, 李 亮<sup>1</sup>, 潘 波<sup>1</sup>, 金 政<sup>1</sup>, 陈苗苗<sup>1</sup>, 赵俊杰<sup>1</sup>, 唐 曦<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学医学院解剖教研室, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南省脑科医院(湖南省第二人民医院)康复医学科, 湖南 长沙 410015

**[摘要]** **目的** 运用网络药理学及实验验证探讨补阳还五汤治疗脊髓损伤的潜在靶点及机制。**方法** 通过网络药理学相关数据库筛选补阳还五汤和脊髓损伤相关靶点并进行映射, 将共有靶点进行 PPI 网络分析、GO 和 KEGG 富集分析。构建大鼠脊髓损伤模型, 并将造模成功的 24 只大鼠随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤组, 每组 8 只探索和验证补阳还五汤治疗脊髓损伤的相关通路和靶点。**结果** 获得 214 个补阳还五汤靶点、2 647 个脊髓损伤相关靶点, 取交集的 58 个共有靶点。PPI 网络筛选得到两个核心子网络, 其中 ALB、Akt1、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 和 JUN 为关键靶点。GO 分析得到 1 583 个条目。KEGG 分析表明补阳还五汤治疗脊髓损伤与 PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、P53 等多条通路密切相关。补阳还五汤组 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分高于模型组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ )。补阳还五汤上调脊髓损伤后关键蛋白 HIF-1 $\alpha$ 、ALB、VEGFA 和 JUN 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 补阳还五汤下调脊髓损伤后通路蛋白 p-PI3K/PI3K、p-Akt1/Akt1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、P53 水平 ( $P < 0.05$ )。**结论** 补阳还五汤能够抑制脊髓损伤后 SD 大鼠脊髓损伤节段 PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、P53 等通路和促进 HIF-1 $\alpha$ 、ALB、VEGFA 和 JUN 等关键蛋白表达, 从而促进神经功能恢复, 发挥治疗脊髓损伤的作用。

**[关键词]** 脊髓损伤; 补阳还五汤; 网络药理学; PI3K/Akt 通路; NF- $\kappa$ B 通路; P53 通路

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.017

## Mechanism of action of Buyang Huanwu Decoction in treating spinal cord injury based on network pharmacology and experimental verification

YIN Jian<sup>1</sup>, LI Meili<sup>1</sup>, LI Liang<sup>1</sup>, PAN Bo<sup>1</sup>, JIN Zheng<sup>1</sup>, CHEN Miaomiao<sup>1</sup>, ZHAO Junjie<sup>1</sup>, TANG Xi<sup>2\*</sup>

1. Department of Human Anatomy of School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208,

China; 2. Department of Rehabilitation, Brain hospital of Hunan Province (Hunan Second People's Hospital),

Changsha, Hunan 410015, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the potential targets and mechanisms of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) in the treatment of spinal cord injury through a combination of network pharmacology and experimental validation. **Methods** Relevant targets for BYHWD and spinal cord injury were screened through network pharmacology databases and mapped. Common targets

**[收稿日期]** 2023-12-30

**[基金项目]** 湖南省教育厅一般项目(21C0253); 湖南省卫生健康委科研项目(20200741); 湖南省中医药管理局科技项目(2017128)。

**[通信作者]** \* 唐 曦, 男, 硕士, 副主任医师, E-mail: 26774345@qq.com。

were subjected to PPI network analysis and GO and KEGG enrichment analyses. A rat model of spinal cord injury was established, and the successfully modeled rats were randomized into sham-operated, model, and BYHWD groups to explore and validate the relevant pathways and targets of BYHWD in the treatment of spinal cord injury. **Results** A total of 214 BYHWD targets and 2,647 spinal cord injury-related targets were obtained, with 58 common targets intersected. PPI network analysis identified two core subnetworks, with ALB, Akt1, HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, and JUN as key targets. GO analysis yielded 1,583 entries. KEGG analysis indicated that the treatment of spinal cord injury with BYHWD was closely associated with multiple pathways, including PI3K-Akt, NF- $\kappa$ B, and P53. The Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score of the BYHWD group was higher than that of the model group ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ ). BYHWD upregulated the levels of key proteins HIF-1 $\alpha$ , ALB, VEGFA, and JUN after spinal cord injury ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and downregulated the levels of pathway proteins p-PI3K/PI3K, p-Akt1/Akt1, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65, and P53 after spinal cord injury ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** BYHWD can inhibit the PI3K-Akt, NF- $\kappa$ B, and P53 pathways and promote the expressions of key proteins such as HIF-1 $\alpha$ , ALB, VEGFA, and JUN in the injured segment after SD rat spinal cord injury, thereby promoting the recovery of neural function and exerting a therapeutic effect on spinal cord injury.

[**Keywords**] spinal cord injury; Buyang Huanwu Decoction; network pharmacology; PI3K/Akt pathway; NF- $\kappa$ B pathway; P53 pathway

脊髓损伤是一种由脊柱受重创或相关疾病引发的脊髓功能暂时或永久性改变的损伤<sup>[1]</sup>,具有发病率高、治疗费用高、致残率高、发病年龄低等特征<sup>[2]</sup>。脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤,然而其具体机制尚不明确,但大多数学者认为包括血液循环障碍、生化活性物质改变及能量代谢障碍等多个方面<sup>[3]</sup>。中医学也认为,脊髓损伤属于“体惰”“痿证”等范畴。正如《灵枢·寒热病》载:“身有所伤,血出多,及中风寒,若有所堕坠,四肢懈惰不收,名曰体惰。”可见脊髓损伤多由外伤所致,督脉受损,导致气血、经络、脏腑功能失常而使躯体久而成痿,治疗上以补益气血、活血化瘀、健脾益肾、养血柔肝、补肾填精为原则<sup>[4]</sup>。随着中医药的发展,中医药在脊髓损伤的治疗领域得到广泛研究与应用。其中,《医林改错·卷下·瘫痿论》中的补阳还五汤具有补气活血通络之效,补阳还五汤由黄芪 120 g、当归 8 g、赤芍 5 g、川芎 8 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g 组成。黄芪具有祛瘀通脉之功效,为君药;当归具有补气生血、通络化瘀等功效,为臣药;赤芍与川芎能发挥活血通络作用,可改善机体局部血液循环,地龙可助推药力通达全身,具有祛瘀通络之功效,红花、桃仁则具有活血化瘀作用,可加快机体血液流动,为佐使药<sup>[5]</sup>。大量补气药与少量活血药相配,气旺则血行,活血而又不伤正,共奏补气活血通络之功。本课题组前期研究已证实,补阳还五汤对脊髓损伤大鼠大脑运动皮质的神

经具有保护作用<sup>[6-7]</sup>。然而其研究范围相对狭窄,因此,本研究采用网络药理学方法,通过构建“补阳还五汤-靶点-脊髓损伤”网络,初步预测补阳还五汤治疗脊髓损伤的作用机制<sup>[8]</sup>,并结合实验深入探讨和验证,旨在为补阳还五汤治疗脊髓损伤的相关机制进行补充并提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠,雄性 24 只,周龄 6~8 周,体质量 200~220 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物合格证编号:430727221102825654,伦理审批号:SLBH-202210180006。饲养环境:饮食符合清洁级动物的卫生质量要求,环境温度 21~27  $^{\circ}$ C,湿度 45%~50%,每 12 h 光暗替换,垫料每 2 天更换一次,手术后每天进行观察。

### 1.2 主要药品与仪器

补阳还五汤:黄芪 120 g、当归 8 g、赤芍 5 g、川芎 8 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g,由湖南中医药大学第一附属医院提供,符合中药质量标准,水煎至 150 mL,相当于含生药 1 g/mL 水煎剂;兔抗 ALB (批号:16475-1-AP)、HIF-1 $\alpha$  (批号:20960-1-AP)、VEGFA (批号:19003-1-AP)、JUN (批号:24909-1-AP)、AKT (批号:10176-2-AP)、GAPDH (批号:10494-1-AP)、山羊抗兔二抗 (批号:SA00001-2) 均购自美

国 Proteintech 公司;兔抗 P53(批号:ab26)、PI3K(批号:ab191606)、NF- $\kappa$ B p65(批号:ab16502)、p-NF- $\kappa$ B p65(批号:ab76302)、p-Akt(批号:ab38449)、p-PI3K(批号:ab278545)均购自英国 Abcam 公司;Chemi-Doc XRS+化学发光成像系统、Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳系统均购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 网络药理学研究 通过 TCMS (http://isp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)及中国知网等分别以黄芪、当归、赤芍、川芎、地龙、桃仁、红花为关键词检索补阳还五汤的活性成分,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且化合物类药性 $\geq 0.18$ 的标准筛选药物成分<sup>[9]</sup>;将 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索到的预测活性成分的 3D 结构导入 pharmMapper(<http://www.lilabecust.cn/pharmmapper/>)中,以最大生成构象为 300、药效团模型 pKd $\geq 6.0$  的条件进行成分靶点的预测;通过 NCBI Gene(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)等获取脊髓损伤相关靶点,并与补阳还五汤靶点相互映射,获得共有靶点;通过 STRING(<https://STRING-db.org>)以“Multiple Proteins”为条件,对共有靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建,建立 PPI 网络模型,将该 PPI 网络导入 Cytoscape 构建网络模型,并使用 MCODE 软件进行 PPI 网络中的关键子网络分析;通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)对共有靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。

1.3.2 动物分组、造模、给药及取材 (1)动物分组:将 24 只大鼠随机化分组,分为假手术组、模型组和补阳还五汤组,每组 8 只。(2)动物造模:麻醉后暴露 C3-C4 之间的脊髓,确认右侧脊神经背根,从背根相连处向外横断脊髓右外侧索,再逐层缝合。动物苏醒后可见患侧前肢屈曲运动不协调表明手术成功<sup>[10]</sup>。并在术后 2 h 显示大鼠脊髓损伤(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)评分为 0 时表明模型构建成功<sup>[11]</sup>;假手术组只打开椎板,模型组和补阳还五汤组进行手术造模。(3)动物给药:术后第 1 天开始给药,灌胃,10 mL/kg,1 次/d,连续 8 周,假手术组和模型组给予生理盐水,补阳还五汤组给予补阳还五汤水煎剂,给药方式、剂量和补阳还五汤水煎剂制备按照该文献进行<sup>[6-7]</sup>。(4)动物取材:大鼠麻醉后,以脊髓损

伤处为中心,取长约 1 cm 的脊髓段,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.3 BBB 评分 造模前和造模后 1、7、14、28 d 分别进行 BBB 评分,评分标准按对脊髓损伤大鼠的后肢功能恢复情况进行评价<sup>[11]</sup>。将动物放入开口盆,轻敲盆壁,使其爬行,观察动物的臀、膝、踝关节行走、躯干运动及其协调情况。评分者独立观察 5 min 后给出评分,结果取平均值。评分分为 22 级,21 分为正常,0 分为完全瘫痪。评分者为两名对 BBB 评分熟悉的非本实验参与人员。

1.3.4 Western blot 检测 每组取 3 只 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的大鼠脊髓段,加入细胞裂解液提取总蛋白;BCA 定量法测定蛋白浓度;配制上样体系;以恒定电压 89 V 电泳;以恒定电流 290 mA、70 min 转膜;5%脱脂奶粉封闭 3 h;TBST 洗净后加入一抗稀释液配制的相应一抗:ALB(1:10 000)、HIF-1 $\alpha$ (1:1 000)、VEGFA(1:1 000)、JUN(1:3 000)、PI3K(1:500)、Akt(1:10 000)、P53(1:10 000)、NF- $\kappa$ B(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、GAPDH(1:10 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;洗涤后室温孵育二抗;洗涤后显影;采用 Image-Pro 分析蛋白条带吸光度,并以目标蛋白/GAPDH 的吸光度反应蛋白表达水平。

### 1.4 统计学方法

用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间数据分布的正态性和方差齐性分别以 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene 检验确定;两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间有差异进一步采用 SNK-*q* 检验进行两两比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学研究

2.1.1 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点的预测 通过 TCMS 和知网等数据库,获得补阳还五汤所含活性成分,并根据成分进行靶点预测,删除冗余,得到 214 个成分相关靶点。通过 NCBI Gene 等数据库得到 2 647 个脊髓损伤相关靶点。并构建韦恩图预测

补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点(图 1)。

### 2.1.2 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点的网络构建

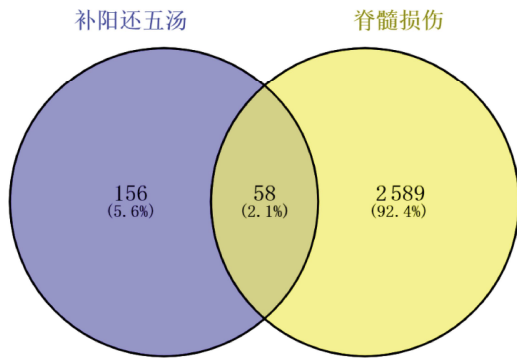


图 1 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of shared targets for BYHWD-SCI

采用 Cytoscape 3.9.1 软件中的网络分析功能进行分析,得到补阳还五汤-成分-靶点-脊髓损伤网络(图 2),该网络涉及 58 个靶点节点和 36 个成分节点。此外,将 PPI 导入 Cytoscape 3.9.1 进行可视化(图 3),发现 1 个关键的子网络,其中,ALB、Akt1、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 和 JUN 为补阳还五汤治疗脊髓损伤的关键靶点。

2.1.3 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点的 GO 功能富集分析 通过对补阳还五汤治疗脊髓损伤的作用及机制进行 GO 功能富集分析,分别涉及对活性氧、对氧化应激和细胞对氧化应激的反应等 1 404 个生

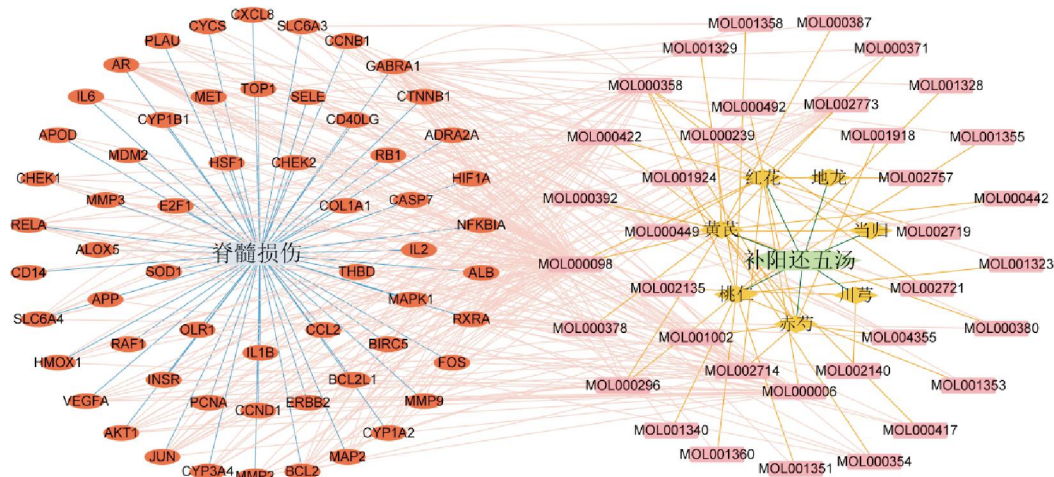


图 2 补阳还五汤的成分靶点与脊髓损伤靶点网络

Fig.2 Network of Targets for Components of BYHWD and SCI

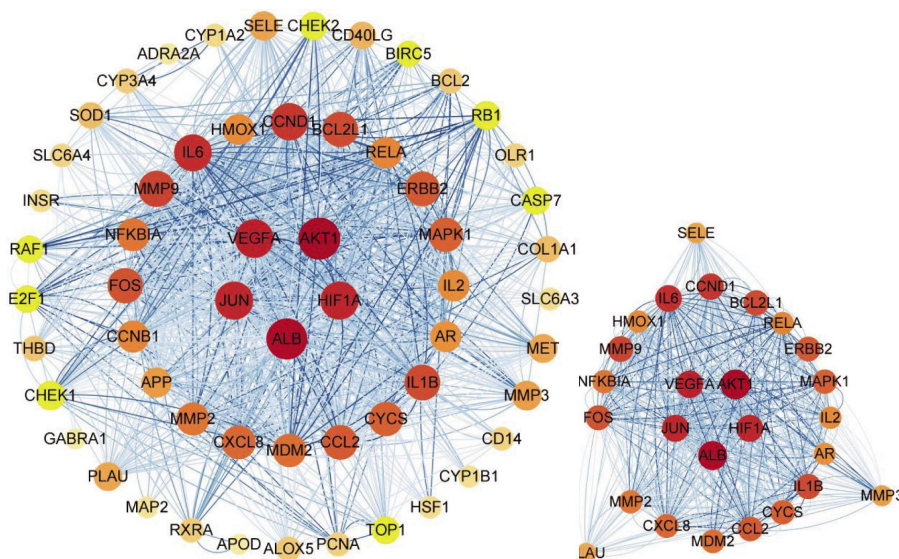


图 3 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点相互作用网络

Fig.3 Network of shared target interactions in BYHWD-SCI

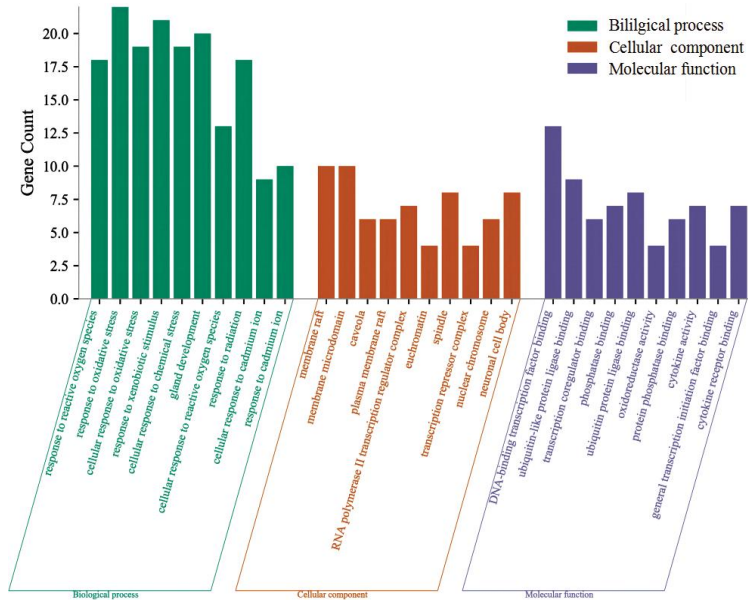


图 4 补阳还五汤-脊髓损伤 GO 功能富集分析

Fig.4 GO Functional Enrichment Analysis of BYHWD-SCI

物进程,膜筏、膜微区和小凹等 65 个细胞组成,DNA 结合转录因子结合、泛素样蛋白连接酶结合和转录共调节因子结合等 69 个分子功能,根据  $P<0.05$ ,选出排名前 10 的条目。详见图 4。

2.1.4 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点的 KEGG 通路富集分析 补阳还五汤治疗脊髓损伤相关靶点的 KEGG 通路涉及 143 条,根据  $P<0.05$ ,选出排名前 15 的通路。KEGG 结果表明,补阳还五汤治疗脊髓损伤与 PI3K-Akt、HIF-1 $\alpha$ 、P53、NF- $\kappa$ B 等信

号通路密切相关。详见图 5。

### 2.2 动物实验验证

2.2.1 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠 BBB 评分评价 与假手术组比较,模型组 BBB 评分降低( $P<0.0001$ )表明脊髓损伤造模成功。采用补阳还五汤干预,并分别于 1、7、14、28 d 四个时间点进行 BBB 评分。结果显示,造模后 1 d,模型组与补阳还五汤组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );造模后 7、14、28 d,补阳还五汤组 BBB 评分大于模型组,差异有统计学意义( $P<$

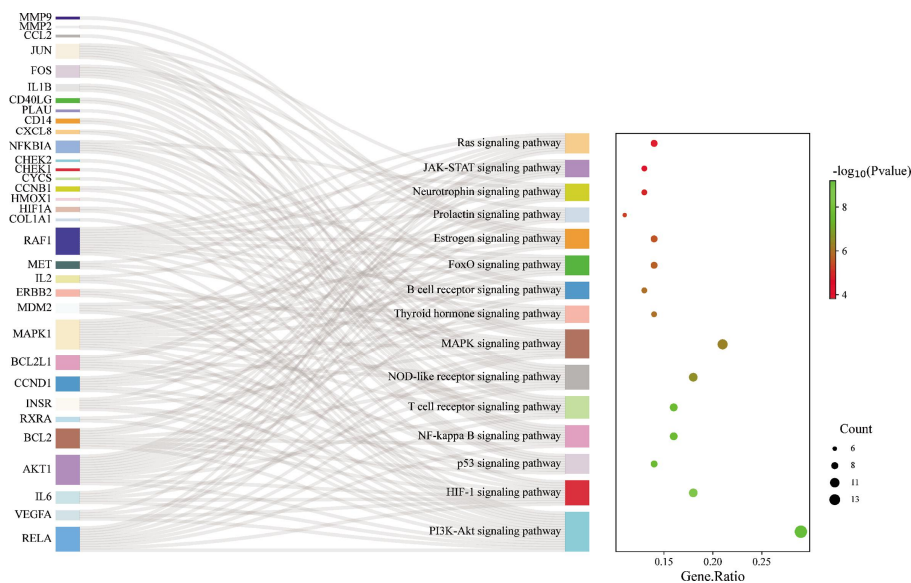


图 5 补阳还五汤-脊髓损伤共有靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig.5 KEGG Pathway Enrichment Analysis of BYHWD-SCI

0.01,  $P < 0.0001$ )。结果表明,补阳还五汤能够改善脊髓损伤大鼠的双后肢运动功能。详见图 6。

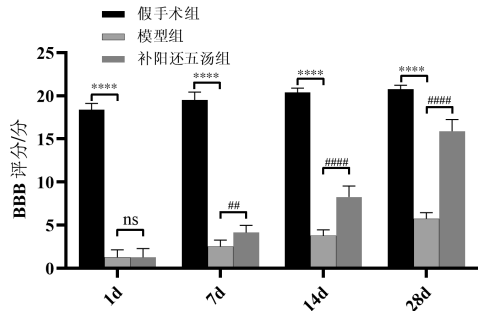


图 6 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠 BBB 评分结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig.6 The BBB score results of BYHWD on SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

注:与假手术组比较,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ 。

2.2.2 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠部位 ALB、HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 等关键蛋白的影响 与假手术组相比,模型组 HIF-1 $\alpha$ 、ALB 和 VEGFA 水平升高( $P < 0.05$ ),JUN 水平显著降低( $P < 0.001$ );与模型组相比,补阳还五汤组 HIF-1 $\alpha$ 、ALB、VEGFA 和 JUN 水平升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。详见图 7。

2.2.3 补阳还五汤通过调控 PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、P53 等通路治疗脊髓损伤 与假手术组相比,模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt1/Akt1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、P53 水平升高( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组相比,

补阳还五汤组 p-PI3K/PI3K、p-Akt1/Akt1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65、P53 水平降低( $P < 0.05$ )。详见图 8。

### 3 讨论

全球范围内脊髓损伤发病率呈逐年上升趋势<sup>[12]</sup>,脊髓损伤不仅本身呈现高危险性,还伴随着严重的继发性损伤,使得患者生活质量低下,目前临床仍然缺乏行之有效的治疗药物。因此,寻找行之有效的药物并探索其治疗机制至关重要。基于中医理论和临床实践,脊髓损伤的病机可概括为督脉瘀阻,治疗上应活血化瘀、疏通督脉<sup>[4]</sup>。补阳还五汤始载于清代王清任所撰《医林改错》,方中重用黄芪补气通络,当归尾、川芎养血行气不伤本,地龙善于通经活络,赤芍、桃仁、红花助当归尾活血通络,使气旺血行以固本、散瘀通络以治标,终得标本兼治<sup>[13]</sup>。

补阳还五汤治疗脊髓损伤具有较好的临床疗效,但其具体作用机制尚未明确。其相关机制研究主要包括改善脊髓组织缺血状态、抑制炎症反应、减少神经细胞死亡、改善轴突再生的微环境、抑制胶质瘢痕的形成以及抑制脂质过氧化反应<sup>[14]</sup>。但未有补阳还五汤治疗脊髓损伤的系统性研究。基于此,本研究通过构建脊髓损伤大鼠模型发现,假手术组 BBB 评分无统计学差异,而补阳还五汤组在经过补阳还五汤灌胃治疗 7、14、28 d 后 BBB 评分均高于模型组,表

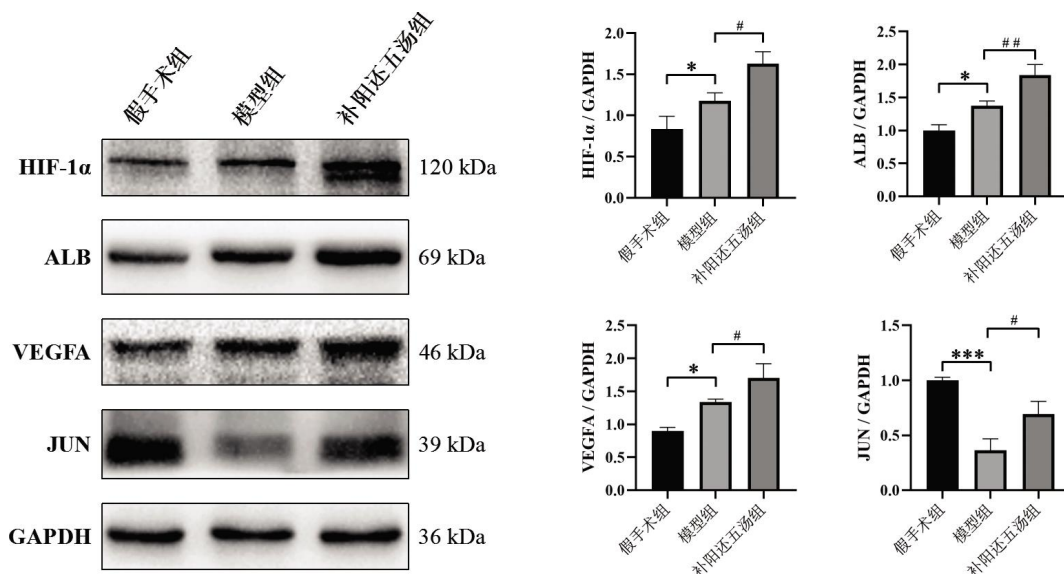


图 7 补阳还五汤对脊髓损伤关键蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.7 Effects of BYHWD on Key Proteins in SCI ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

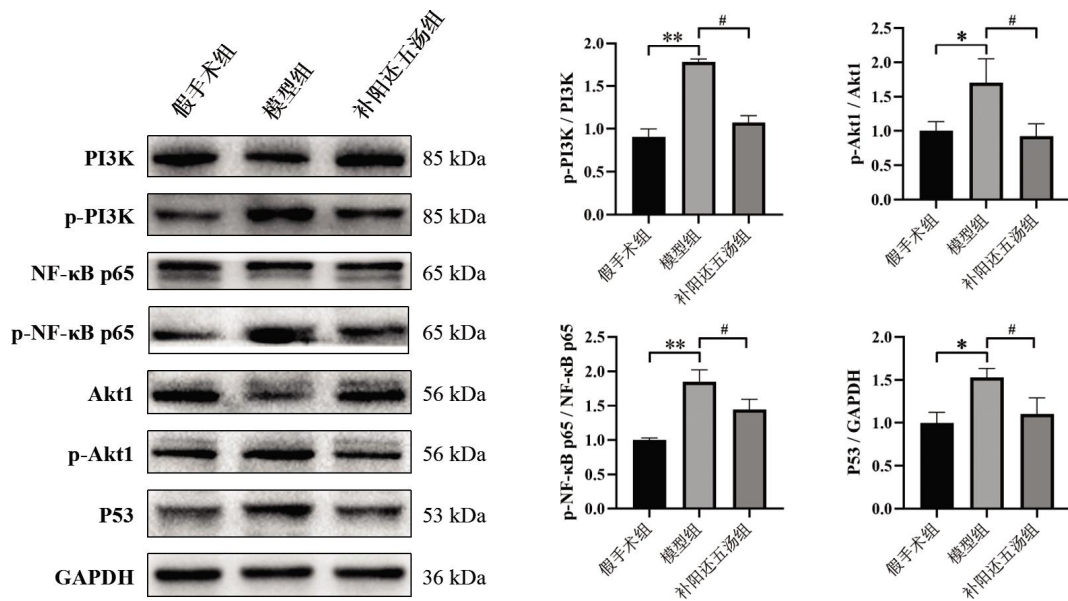


图8 补阳还五汤对脊髓损伤相关通路蛋白的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Fig.8 Effect of BYHWD on proteins in SCI-associated pathways ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

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

明补阳还五汤可促进脊髓损伤后大鼠的双后肢运动功能,然而其相关机制还需进一步探索。因此,在此基础上,进一步通过网络药理学和脊髓损伤大鼠模型探索了补阳还五汤治疗脊髓损伤的作用机制。

脊髓损伤的病理过程可分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段,其中原发性损伤是在机械外力的作用下脊髓组织和神经细胞直接损伤和坏死,而继发性损伤则是在原发性损伤的基础上进一步出现继发性脊髓出血、水肿、自由氧损伤和炎症等事件导致细胞凋亡,进而出现进行性组织损伤<sup>[15]</sup>。原发性损伤是不可逆转的,而继发性损伤是一个动态调节过程,因此,干预这一阶段的脊髓损伤的病理过程具有重要意义<sup>[16]</sup>。本研究 PPI 网络发现,补阳还五汤治疗脊髓损伤涉及 ALB、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 和 JUN 等关键靶点。已有研究表明,补阳还五汤能促进脊髓损伤后 SD 大鼠脊髓损伤节段 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达,改善局部缺血缺氧环境,减轻因脊髓损伤缺血缺氧时对脊髓造成的损伤,从而促进神经功能恢复<sup>[3]</sup>。因此,本文主要讨论 ALB 与 JUN 等关键靶点。脊髓损伤后机体会出现炎症反应和细胞凋亡等过程,进而导致血液-脊髓屏障被破坏和神经组织损伤,而 ALB 作为血液中最丰富的蛋白质之一,具有维持血浆渗透压、运输营养物质等多种生理功能,不仅能够通过抗

氧化和抗炎等作用减轻损伤,还能进一步提供营养和神经保护因子<sup>[17]</sup>。JUN 是转录因子家族成员之一,对细胞生长分化和炎症反应等生物学过程密切相关。研究发现,脊髓损伤后损伤部位 JUN 蛋白表达降低与炎症反应、细胞凋亡及神经再生受阻等密切相关<sup>[18]</sup>。本研究显示,模型组 JUN 水平低于假手术组,模型组 ALB、HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 水平高于假手术组,表明机体为了适应脊髓损伤部位的环境变化以及启动自我修复功能使其表达增加,通过补阳还五汤干预能进一步促进上述蛋白的表达,从而改善损伤部位缺氧缺血环境,减少继发性损伤,恢复神经功能。此外,补阳还五汤治疗脊髓损伤还与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、MMP-9 等其他靶点密切相关,上述研究均表明,补阳还五汤治疗脊髓损伤与多靶点相关。目前,补阳还五汤治疗脊髓损伤的相关研究主要涉及 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 信号通路<sup>[19-20]</sup>。本研究通过 KEGG 通路富集分析发现,补阳还五汤治疗脊髓损伤除了涉及 PI3K/Akt 信号通路外,还与 P53 和 NF- $\kappa$ B 等其他信号通路密切相关。补阳还五汤通过调控 PI3K-Akt 信号通路治疗脊髓损伤的相关研究已较为深入,因此,本研究主要探讨 P53 和 NF- $\kappa$ B 等信号通路。P53 信号通路在调控细胞周期、DNA 损伤、凋亡等发面发挥关键作用。研究发现,脊髓损伤发生

后,在炎症因子的刺激下,损伤部位细胞通过激活 P53 信号通路诱导细胞凋亡,并且由于脊髓压力的逐步增加,压迫时间持续延长,也会进一步刺激 P53 的表达,诱导细胞发生凋亡<sup>[4]</sup>。另有研究发现,脊髓损伤大鼠损伤部位总 P53 和磷酸化 P53 水平增加,并且 P53 信号通路的激活与中枢神经系统多种类型的促氧化活性相关,这也会进一步加剧与氧化应激相关的细胞损伤<sup>[21]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种具有多种活化信号的核因子,在组织细胞的炎症反应、增殖和凋亡等方面发挥关键调控作用。脊髓损伤发生后,NF- $\kappa$ B 信号通路在损伤部位的胶质细胞和神经元等细胞中呈过度激活状态,其主要作用是调节损伤后的高度炎症反应,同时还参与细胞凋亡、瘢痕生成和细胞毒性反应等过程<sup>[22]</sup>。本研究显示,模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt1/Akt1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 和 P53 水平高于假手术组,表明脊髓损伤大鼠损伤部位上述通路均被激活,而补阳还五汤干预后,补阳还五汤组 PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B 和 P53 水平显著降低,表明补阳还五汤主要通过抑制 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B、P53 等信号通路治疗脊髓损伤。此外,KEGG 通路分析表明,补阳还五汤治疗脊髓损伤还与 NOD 样受体信号通路和 MAPK 信号通路密切相关。NOD 样受体信号通路与炎症及细胞焦亡密切相关,并且李亚峰等<sup>[23]</sup>研究表明,补阳还五汤联合脊髓减压治疗急性脊髓损伤效果明显,作用机制可能是通过抑制 NL- $\text{RP1/Caspase-1}$  通路以减少细胞焦亡。然而,补阳还五汤通过抑制细胞焦亡治疗脊髓损伤的研究极少,并且脊髓损伤、细胞焦亡和炎症三者密切相连。因此,深入探索补阳还五汤、细胞焦亡与脊髓损伤的关系具有重要的意义。MAPK 信号通路与增殖、炎症和抑制凋亡密切相关。邵杨等<sup>[24]</sup>研究发现,甘草苷可通过抑制 MAPK 通路抑制炎症和神经元凋亡,减轻小鼠脊髓损伤。综上,目前关于补阳还五汤治疗脊髓损伤的相关靶点和通路研究依旧较少,且研究主要集中于特定的靶点与通路,基于上述网络药理学结果,后续的研究可深度探索其他的靶点和通路,进而完善补阳还五汤治疗脊髓损伤的研究。

补阳还五汤的临床应用广泛,但用药不应局限于药方本身,而应该依据病人的实际情况进行加减方<sup>[25]</sup>以及与其他治疗方法联用,使其具有更佳的治疗

效果。已有研究表明,补阳还五汤加麝香后治疗效果显著提高<sup>[26]</sup>。此外,补阳还五汤还可联合针灸和骨髓间质干细胞移植等治疗脊髓损伤<sup>[27-28]</sup>。不仅如此,为了方便临床使用,也应在保证补阳还五汤疗效的基础上对其剂型进行创新,并利用网络平衡常数拓扑学、定量谱学和超分子印迹技术等理论和技术创制出作用机制清楚、制剂工艺可行、量-时-效关系明确、毒与效整合的补阳还五汤处方<sup>[29]</sup>。

本研究通过网络药理学及实验表明,补阳还五汤能够改善脊髓损伤大鼠的双后肢运动功能并促进脊髓损伤部位的修复,其机制可能与上调 HIF-1 $\alpha$ 、ALB、VEGFA 和 JUN 等关键蛋白的表达、抑制 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B、P53 等信号通路有关。本研究为补阳还五汤治疗脊髓损伤的机制研究奠定了基础,并为补阳还五汤的临床应用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] MÜLLER-JENSEN L, PLONER C J, KRONEBERG D, et al. Clinical presentation and causes of non-traumatic spinal cord injury: An observational study in emergency patients[J]. *Frontiers in Neurology*, 2021, 12: 701927.
- [2] Spinal cord injury (SCI) 2016 facts and figures at a glance[J]. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 2016, 39(4): 493-494.
- [3] 乔若飞, 李俊杰, 梁舒涵, 等. 补阳还五汤对 SD 大鼠脊髓损伤后 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2018, 24(14): 30-34.
- [4] 王峰, 彭锐, 宋建东, 等. 基于网络药理学探讨大黄治疗脊髓损伤的作用机制[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(19): 20-24.
- [5] 李静, 姜磊. 康复治疗结合加味补阳还五汤方在脑梗死患者恢复过程中的价值分析[J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(S2): 73.
- [6] 黄胜, 袁莉, 陈安, 等. 补阳还五汤及其四类有效部位对脊髓损伤大鼠大脑运动皮质的神经保护作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(9): 36-39.
- [7] 殷坚, 陈红艳, 陈安, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤后大鼠大脑皮层运动神经元 IL-17 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(21): 4028-4031.
- [8] LIU L H, DU B, ZHANG H Y, et al. A network pharmacology approach to explore the mechanisms of Erxian Decoction in polycystic ovary syndrome[J]. *Chinese Medicine*, 2018, 13: 46.
- [9] AHMED S S, RAMAKRISHNAN V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: Optimal descriptors for oral



- bioavailability prediction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40654.
- [10] LIANG LI, FENG LI, JIAN YIN, et al. Establishment and Evaluation of a Rat Model of Spinal Cord Injury with the Pathopattern of Qi-Deficiency and Blood-Stasis in Traditional Chinese Medicine[J]. *Digital Chinese Medicine*, 2018, 1(1): 102-112.
- [11] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *Journal of Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [12] GAO L S, PENG Y C, XU W L, et al. Progress in stem cell therapy for spinal cord injury[J]. *Stem Cells International*, 2020, 2020: 2853650.
- [13] 宋思雨, 丁露, 李雅馨, 等. 基于网络药理学探讨补阳还五汤治疗特发性肺纤维化的生物学机制[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(12): 2988-2994.
- [14] 苏文硕, 安忠诚, 陈晨, 等. 补阳还五汤治疗脊髓损伤作用机制的研究进展[J]. *中医正骨*, 2022, 34(8): 49-53.
- [15] KIM Y H, HA K Y, KIM S I. Spinal cord injury and related clinical trials[J]. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 2017, 9(1): 1-9.
- [16] AHUJA C S, NORI S, TETREAU L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S): S9-S22.
- [17] AVILA-MARTIN G, GALAN-ARRIERO I, GOMEZ-SORIANO J, et al. Treatment of rat spinal cord injury with the neurotrophic factor albumin-oleic acid: Translational application for paralysis, spasticity and pain[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26107.
- [18] HU X, XU W, REN Y L, et al. Spinal cord injury: Molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 245.
- [19] 宋颖军, 李旭, 刘小舟, 等. 补阳还五汤通过调控 PI3K/Akt、JAK2/STAT3 信号促进 BMSC 趋化迁移对外伤性脊髓损伤大鼠神经元活性及认知功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(17): 4206-4213.
- [20] 吴成林, 郭德华, 许洋, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨补阳还五汤联合骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的机制[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(7): 1543-1546.
- [21] KOTIPATRUNI R R, DASARI V R, VEERAVALLI K K, et al. p53- and Bax-mediated apoptosis in injured rat spinal cord[J]. *Neurochemical Research*, 2011, 36(11): 2063-2074.
- [22] 高梦丹, 林敬铨, 童亮, 等. 姜黄素抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路对脊髓损伤修复作用的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(3): 272-277.
- [23] 李亚锋, 王延雷, 宋继鹏, 等. 补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠 NOD 样受体蛋白 1/半胱氨酸蛋白酶-1 细胞焦亡通路的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(4): 6-9, 14.
- [24] 邵杨, 安丹蕾, 杨杨, 等. 脊髓损伤小鼠中甘草苷通过抑制 MAPK 通路抑制炎症和神经元凋亡[J]. *中国医科大学学报*, 2022, 51(6): 518-523, 547.
- [25] 蔺卓华, 董卫兵, 陈长安. 补阳还五汤加减方对脊髓损伤术后患者神经功能的影响[J]. *陕西中医*, 2017, 38(5): 607-609.
- [26] 叶承莉, 唐勇, 漆伟, 等. 补阳还五汤加麝香治疗脊髓损伤临床研究[J]. *实用中医药杂志*, 2015, 31(12): 1090-1092.
- [27] 苏文硕, 樊光亚, 肖连根, 等. 补阳还五汤联合电针疗法对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的研究[J]. *中国现代医生*, 2023, 61(2): 61-64, 69.
- [28] 郭德华, 吴成林, 许洋, 等. 补阳还五汤对脊髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的影响及作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 2-7.
- [29] 肖美凤, 刘金玲, 杨岩涛, 等. 补阳还五汤的研究现状及其新药创制关键技术[J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1688-1694.

(本文编辑 苏维)