

本文引用: 刘红梅, 周平兰, 王竹鑫, 彭 敏, 欧巧玲, 邓蓝冰, 周 宜. 基于 JAK-STAT/NF- κ B 通路探究黄精“生熟异治”治疗缺血性脑卒大鼠的保护作用及分子机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 598–607.

基于 JAK-STAT/NF- κ B 通路探究黄精“生熟异治”治疗缺血性脑卒中大鼠的保护作用及分子机制研究

刘红梅, 周平兰, 王竹鑫, 彭 敏, 欧巧玲, 邓蓝冰, 周 宜*

湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

〔摘要〕 **目的** 基于网络药理学和实验探究生、熟黄精及其有效成分治疗缺血性脑卒中(IS)大鼠的保护作用及分子机制。**方法** 运用网络药理学方法构建生、熟黄精治疗 IS 的“关键成分-核心靶点-通路”网络图。将 56 只大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组(20 mg/kg)、生黄精多糖低剂量组(0.1 g/kg)、生黄精多糖高剂量组(0.4 g/kg)、熟黄精多糖低剂量组(0.1 g/kg)、熟黄精多糖高剂量组(0.4 g/kg)。除手术组外,其余组采用线栓法建立大鼠 IS 模型。造模成功后,灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d。按照 Zea Longa 评分标准对各组大鼠给药前及给药后 0.5、1、3、5、7 d 的 Longa 神经功能进行评分;给药 7 d 后,取脑组织,计算脑含水量;ELISA 法检测大鼠血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)、泛素羧基端酯酶 L1(UCH-L1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)含量;Western blot 检测脑组织中磷酸化 Janus 激酶 2/Janus 激酶 2(p-JAK2/JAK2)、磷酸化信号转导和转录激活因子 3/信号转导和转录激活因子 3(p-STAT3/STAT3)和磷酸化核因子 κ B/核因子 κ B(p-NF- κ B/NF- κ B)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的蛋白表达水平;RT-qPCR 法检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 相对表达水平。**结果** 网络药理学结果表明,蛋白激酶 B α 、细胞色素 P450 家族 2 亚家族 D 成员 6 和 STAT3 等为生、熟黄精治疗 IS 的共同潜在靶点;雌激素受体 α 、二肽基肽酶-4 和雄激素受体等为生黄精治疗 IS 的特有靶点;Caspase-3、代谢型谷氨酸受体 1 和溶质载体家族 1 成员 2 等为熟黄精治疗 IS 的潜在靶点;氧化应激反应和炎症反应信号转导等为生、熟黄精治疗 IS 的共同信号通路。与假手术组相比,模型组大鼠脑含水量、神经功能评分均升高($P<0.01$);血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、UCH-L1、NSE 和 GFAP 水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$),血清 CAT 和 SOD 水平显著降低($P<0.01$);脑组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平升高($P<0.05$),Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平升高($P<0.05$),Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与模型组相比,生黄精多糖低、高剂量组和熟黄精多糖低、高剂量组大鼠的神经功能评分在给药治疗 5 d 后降低($P<0.01$);生黄精多糖组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),熟黄精多糖组大鼠血清 MDA、UCH-L1 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),生黄精多糖高剂量组及熟黄精多糖组血清 SOD 水平升高($P<0.05$);熟黄精多糖高剂量组脑组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$);生、熟黄精多糖高剂量组脑组织中 Bcl-2 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。**结论** 生、熟黄精多糖可改善 IS 大鼠的神经损伤,其机制可能通过减少炎症因子表达、改善氧化应激、降低神经损害标志物表达水平,并调控 JAK-STAT/NF- κ B 信号通路,从而减轻脑组织炎症反应。

〔关键词〕 生黄精;熟黄精;缺血性脑卒中;JAK-STAT/NF- κ B 通路;生熟异治

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.003

〔收稿日期〕 2024-10-14

〔基金项目〕 王竹鑫全国老药工传承工作室(国中医药人教函[2024]255 号);第七批全国老中医药专家学术经验继承项目;湖南省中医药管理局重点课题(A2023033);湖南省自然科学基金科药联合项目(2021JJ80063);湖南省中医药管理局重点课题(C2022028)。

〔通信作者〕 * 周 宜,男,硕士,副主任医师, E-mail: 226405736@qq.com。

Protective effects and molecular mechanisms of "differential treatments of the raw and processed" Huangjing (Polygonati Rhizoma) on ischemic stroke rats based on JAK-STAT/NF- κ B pathway

LIU Hongmei, ZHOU Pinglan, WANG Zhuxin, PENG Min, OU Qiaoling, DENG Lanbing, ZHOU Yi*

The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects and molecular mechanisms of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) and their active components in treating ischemic stroke (IS) rats through network pharmacology and experimental studies. **Methods** A network pharmacology approach was used to construct a "key component-core target-pathway" network diagram for raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) in IS treatment. Fifty-six rats were randomly divided into sham-operated, model, nimodipine (20 mg/kg), low-dose raw Huangjing polysaccharide (0.1 g/kg), high-dose raw Huangjing polysaccharide (0.4 g/kg), low-dose processed Huangjing polysaccharide (0.1 g/kg), and high-dose processed Huangjing polysaccharide (0.4 g/kg) groups. Except for the sham-operated group, IS models were established via the suture-occluded method. After successful modeling, drugs were administered by gavage once daily for seven days. Longa neurological function was scored using the Zea Longa scale before administration and at 0.5, 1, 3, 5, and 7 days after administration. After seven days, brain tissue was collected to calculate brain water content. Serum levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), neuron-specific enolase (NSE), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were measured by ELISA. Western blot was used to determine protein expression levels of phosphorylated Janus kinase 2/Janus kinase 2 (p-JAK2/JAK2), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3/signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3/STAT3), phosphorylated nuclear factor- κ B/nuclear factor- κ B (p-NF- κ B/NF- κ B), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and caspase-3 in brain tissue. RT-qPCR was used to measure the relative mRNA expression levels of Bcl-2, Bax, and caspase-3. **Results** Network pharmacology identified protein kinase B α , cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6, and STAT3 as common potential targets of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) for IS treatment. Estrogen receptor α , dipeptidyl peptidase-4, and androgen receptor were unique targets for raw Huangjing (Polygonati Rhizoma), while caspase-3, metabotropic glutamate receptor 1, and solute carrier family 1 member 2 were potential targets for processed Huangjing (Polygonati Rhizoma). Oxidative stress response and inflammatory signaling transduction were common pathways for both. Compared with the sham-operated group, the model group showed increased brain water content and neurological function scores ($P < 0.01$); elevated serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA, UCH-L1, NSE, and GFAP levels ($P < 0.05$); and significantly decreased CAT and SOD levels ($P < 0.01$). The protein expression levels of p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and p-NF- κ B/NF- κ B in brain tissue increased ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression levels of Bax and Caspase-3 elevated ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression level of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, both low- and high-dose raw and processed Huangjing polysaccharide groups showed reduced neurological function scores after five days of drug treatment ($P < 0.01$). Raw Huangjing polysaccharide groups had lower serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while processed Huangjing polysaccharide groups showed reduced serum levels of MDA and UCH-L1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). High-dose raw Huangjing polysaccharide group and processed Huangjing polysaccharide groups showed increases in serum SOD level ($P < 0.05$). High-dose processed Huangjing polysaccharide group showed decreases in p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and p-NF- κ B/NF- κ B protein expression levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), as well as mRNA expression levels of Bax and caspase-3 in brain tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). High-dose raw and processed Huangjing polysaccharide groups exhibited elevated Bcl-2 mRNA expression level ($P < 0.05$). **Conclusion** Both raw and processed Huangjing polysaccharides can alleviate neural injury in IS rats, and the mechanism may involve reducing inflammatory cytokines, improving oxidative stress, lowering neural damage biomarkers expression, and modulating the JAK-STAT/NF- κ B signaling pathway, thereby attenuating cerebral inflammatory reaction.

[Keywords] raw Huangjing (Polygonati Rhizoma); processed Huangjing (Polygonati Rhizoma); ischemic stroke; JAK-STAT/NF- κ B pathway; differential treatments of the raw and processed

脑卒中是由多种原因导致脑血管受损,产生局灶性或整体脑组织损害的疾病,主要分为缺血性和出血性两种,其中 86% 为缺血性脑卒中(ischaemic stroke, IS)^[1],临床表现为失语、半身不遂等症状。现代医学采用溶栓、抗凝等方法治疗,但易引发缺血再灌注损伤^[2]。中医学认为 IS 属于“中风”范畴,病因在于阴阳失调、气血逆乱,导致炎症、氧化应激等反应,加剧脑损伤^[3]。中药通过扶正祛邪、调和阴阳、益气活血等作用,维持血脑屏障稳定,抑制炎症,改善微循环。目前,研究多聚焦于单味中药活性成分(如黄芩苷、人参皂苷)对脑卒中的防治作用及其机制^[4]。

黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 的干燥根茎,是临床常用的“生熟异治”中药。生黄精偏润肺,熟黄精偏滋补,炮制过程导致其化学成分及含量发生显著变化,形成“一润一补”功效差异的物质基础^[5]。黄精主要活性成分包括黄精多糖、黄精皂苷及黄酮类成分,具有抗氧化、抗炎、免疫调节、神经保护等药理作用^[6]。研究表明,黄精多糖可通过调节细胞凋亡相关蛋白的表达,抑制神经细胞缺氧性凋亡,并显著改善阿尔茨海默病模型大鼠的学习记忆能力^[7]。此外,黄精不同炮制品可调节气阴两虚模型大鼠的糖脂代谢、供氧能力及免疫功能,增加血清免疫球蛋白 A 和免疫球蛋白 M 水平^[8]。以上研究提示,黄精及其活性成分对 IS 诱导的神经元损伤具有潜在治疗作用。

研究表明,脑卒中后缺血再灌注损伤与炎症、氧化应激及神经细胞凋亡密切相关^[9]。脑卒中后,细胞因子与受体结合激活 Janus 激酶 2(janus kinase 2, JAK2),进而磷酸化信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),促进其核转位及下游基因转录^[10]。核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路是炎症和免疫反应的核心调控途径,其活化可诱导炎症因子表达,加剧神经细胞凋亡^[11]。研究表明,抑制 NF- κ B 通路可减轻脂多糖诱导的小胶质细胞活化及炎症反应,而 STAT3 在调节 NF- κ B 活化中起重要作用^[12]。基于此,本研究以“生熟异治”理论为指导,结合网络药理学方法构建生、熟黄精治疗 IS 的“成分-靶点-通路”网络,并通过线栓法建立 IS 大鼠模型,探讨生、熟黄精

多糖通过 JAK-STAT/NF- κ B 信号通路改善 IS 的作用机制差异,为中药炮制理论的现代研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠[斯贝福(北京)生物技术有限公司],由湖南中医药大学实验动物中心代购,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010,SPF 级,雄性,7 周龄,体质量(260±5) g。大鼠自由饮水摄食,于温度(25±2)℃、相对湿度(55%±5%)、12 h 光照/12 h 暗循环的条件下适应性饲养 1 周。实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准:HNUCM21-2312-16。

1.2 主要药物、试剂、仪器

生黄精、熟黄精(山西元和堂中药有限公司,批号:230704、230622),经湖南中医药大学第二附属医院王竹鑫老药工鉴定为正品系百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 的干燥根茎,符合《中华人民共和国药典》(2020 版)规定。

白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、泛素羧基端酯酶 L1(ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, UCH-L1)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) ELISA 试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号:RA20020、RA20607、RA20035、BTK076、BTK032、RA21277、RA20076、RA20774);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A003-1-2);B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 同源的水溶性相关蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、JAK2、STAT3、NF- κ B 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:A00183、A00040-1、BA2142、BM4165、BM4052、BA0610)。

RE-2000B 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DE-100 g 型万能高速粉碎机(浙江红景天工贸有限公司);U3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);GGNOME-XRQ-NPC 型 GeneGnome 成像系统(Syngene 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

课题组前期采用超高效液相色谱高分辨率质谱技术,对生、熟黄精中的化学成分进行检测,筛选其中的糖类等活性成分^[13],详见表 1。通过 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),收集每个活性成分的作用靶点,获得成分靶点数据集。以“IS”为关键词,通过 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>),搜索 IS 相关的基因和蛋白靶点,获得疾病靶点数据集。通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)统一基因名称。对活性成分潜在作用靶点与疾病靶点取交集,得到生、熟黄精活性成分治疗 IS 疾病的潜在作用靶点。通过绘制韦恩图,基于 Gene Degree 中位数进行筛选,纳入大于中位数的靶点,以获得更具有相关性的疾病靶点作为关键靶点。将关键靶点导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)获取蛋白质-蛋白质相互作用关系,并对成分-靶点-疾病进行网络拓扑分析,通过 NetworkX 软件包(networkx-2.8.2, https://networkx.org/documentation/stable/release/release_2.8.2.html) 绘制相关网络图。通过 GO 数据库(geneontology.org)和 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)进行 GO 分析和 KEGG 分析,并通过 R 语言对通路富集分析的结果进行可视化处理,对比推测分析生、熟黄精活性成分参与 IS 的治疗网络及生物效应通路差异。

表 1 生、熟黄精活性成分

Table 1 Active ingredients of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma)

来源	名称	来源	名称
生黄精	Levulose	熟黄精	D-Psicose
	Palatinose		β -Gentiobiose
	Sucrose		Levulose
	D-Turanose		Psicose
	Leucrose		D-(+)-Cellobiose
	myo-Inositol		D-Turanose
	β -D-Galactose		Lactose
	D-(+)-Galactose		Sucrose
	D-Psicose		L-Rhamnose
	D-(+)-Trehalose		D-Glucose 6-phosphate
	D-Glucose 6-phosphate		Melibiose
	D-Glucose		β -D-Galactose
	D-Xylose		D-Glucosamine
			α,β -Trehalose

2.2 生黄精和熟黄精水提物的制备及含量测定

2.2.1 生黄精和熟黄精水提物的制备 生、熟黄精药材适量,分别加入蒸馏水浸泡 30 min 后,加 8 倍量体积蒸馏水,加热回流提取 40 min,过滤,收集提取液;药渣再加入 6 倍量体积蒸馏水,加热回流 40 min,过滤;合并 2 次提取液,于 50 ℃减压浓缩,得含药量为 1 g/mL 的生、熟黄精水提物,4 ℃储存,用于后续实验^[14]。

2.2.2 色谱条件 高效液相色谱仪, Hypersil GOLD aQ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),柱温 35 ℃,流速 0.9 mL/min,进样量 5 μ L,检测波长 240 nm,流动相为乙腈-水,梯度洗脱。ELSD 检测条件:漂移管温度为 105 ℃;载气流速为 2.5 L/min。

2.2.3 溶液制备 对照品溶液的制备:取果糖和葡萄糖对照品,加水溶解,配制成质量浓度为 2 mg/mL(果糖)、0.4 mg/mL(葡萄糖)、0.2 mg/mL(5-HMF)的对照品溶液,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,留续滤液,即得。供试品溶液的制备:取生、熟黄精粉末各约 1 g,精密称定,加水 50 mL,称定重量,超声处理 40 min 后,放至室温,用水补足减失的重量,摇匀,上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜,留续滤液,即得。

2.2.4 生、熟黄精水提物含量测定 校准曲线方程 果糖: $Y=1.032X+4.921$, $r=0.999\ 8$; 葡萄糖: $Y=1.963X+2.648$, $r=0.999\ 1$; 5-HMF: $Y=1.776X+6.533$, $r=0.996\ 6$ 。计算得生黄精水提物中果糖、葡萄糖和 5-HMF 质量分数分别为 10.73%±1.96%、5.93%±1.43%和 1.07%±0.39%;熟黄精水提物中果糖、葡萄糖和 5-HMF 质量分数分别为 17.9%±1.98%、10.53%±0.85%和 2.2%±0.70%。

2.3 IS 大鼠模型的制备、分组及给药

适应性饲养 1 周后,将 56 只大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组(20 mg/kg)、生黄精多糖低剂量组(0.1 g/kg)、生黄精多糖高剂量组(0.4 g/kg)、熟黄精多糖低剂量组(0.1 g/kg)、熟黄精多糖高剂量组(0.4 g/kg)^[15],每组 8 只。假手术组大鼠取颈部正中切口,分离颈部血管,不插入线栓,逐层缝合;其余各组大鼠均采用线栓法建立 IS 模型^[16]。以大鼠在苏醒后均出现左侧肢体瘫痪、站立不稳,且提尾时向一侧转圈为造模成功标准^[17]。造模成功的大鼠灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d。

2.4 指标检测

2.4.1 神经功能评分标准 按照 Zea Longa 评分标准对各组大鼠给药前及给药后 0.5、1、3、5、7 d 的 Longa 神经功能进行评分^[7]。0 分:无神经功能损伤;1 分:对侧前爪不能完全伸展;2 分:行走时向外侧转圈;3 分:行走时向外侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;5 分:死亡。剔除评分为 0 分和 5 分的大鼠。

2.4.2 脑含水量测定 末次给药后,取脑组织,作厚约 3 mm 的冠状切片,立刻用电子天平称质量,得脑湿重。将脑片于 102 ℃烘干 12 h,称质量,得脑干重,计算脑含水量[脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%]。

2.4.3 ELISA 法 按照试剂盒说明书,检测大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ,氧化应激因子 MDA、CAT 和 SOD,神经损害标志物 UCH-L1、NSE 和 GFAP 的水平。

2.4.4 Western blot 检测 将组织浸泡在蛋白裂解液中超声破碎,每 5 分钟涡旋一次以充分溶解,以 12 500 r/min 离心 15 min,收集蛋白上清液测定蛋白浓度。根据分离蛋白的分子量制备不同浓度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,电泳条件为 120 V, 90 min。PVDF 膜用甲醇活化,转膜条件为 280 mA, 90 min。5%脱脂牛奶室温下封闭 1 h,孵育 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、NF- κ B(p65)、p-NF- κ B(p-p65)、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 一抗,4 ℃过夜。次日取出 PVDF 膜,用 1×TBST 摇床洗涤 3 次,每次 8 min。将膜洗涤后与二抗室温孵育 1 h,用 1×TBST 摇床洗涤 3 次,按 1:1 比例配制 ECL 超敏发光液。GeneGnome 成像系统捕捉图像,Image J 软件进行灰度分析,GAPDH 对目标蛋白进行归一化。

2.4.5 RT-qPCR 检测 取大鼠脑组织,提取总 RNA,按照逆转录试剂盒合成 cDNA,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 相对表达水平,以 β -actin 作为内参,引物序列如下。Bcl-2:正向 5'-CAGACATGCACCTACCCAGC-3',反向 5'-GTCGC TACCGTCGTGACTTC-3',长度 284 bp;Bax:正向 5'-CAGACATGCACCTACCCAGC-3',反向 5'-GTCGC TACCGTCGTGACTTC-3',长度 229 bp;Caspase-3:正向 5'-CGACCCGTCCTTTGAATTTCT-3',反向 5'-CTGACTGGAAAGCCGAAACTC-3',长度 189 bp; β -actin:正向 5'-AAAGAAAGGGTGTAACGCA-3',

反向 5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3',长度 150 bp。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行数据分析。所有计量资料数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据符合正态分布且方差齐性检验采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生、熟黄精治疗 IS“关键成分-核心靶点-通路”网络图的构建

网络药理学分析得到 57 个生黄精治疗 IS 可能的潜在靶点、57 个熟黄精治疗 IS 可能的潜在靶点(图 1A)。根据成分-靶点-疾病做拓扑分析,取前 50 个作为核心靶点(交集不足 50 的选取全部),根据成分-核心靶点数据及 GO 通路分析前 20 的结果,绘制“关键成分-核心靶点-通路”网络图,可知:蛋白激酶 B α (protein kinase B α , AKT1)、多巴胺受体 D2(dopamine receptor D2, DRD2)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGCR)、细胞色素 P450 2D6(cytochrome P450 2D6, CYP2D6)、STAT3、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)和早老素 1(presenilin 1, PSEN1)为生、熟黄精治疗 IS 的共同潜在靶点;雌激素受体 α (estrogen receptor α , ESR1)、多巴胺受体 D2(dopamine receptor D2, DRD2)、核受体亚家族 1 H 组第 4 成员(nuclear receptor subfamily 1 group H member 4, NR1H4)、二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP4)和雄激素受体(androgen receptor, AR)为生黄精治疗 IS 的潜在靶点;代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptor, GRM)2、5-羟色胺受体 2A(5-hydroxytryptamine receptor 2A, HTR2A)、GRM3、Caspase-3、GRM1、溶质载体家族 1 成员 2(solute carrier family 1 member 2, SLC1A2)和 5-羟色胺受体 2C(5-hydroxytryptamine receptor 2C, HTR2C)为熟黄精治疗 IS 的潜在靶点。

通过 GO 数据库对核心靶点进行通路功能注释及通路富集分析,结果表明氧化应激反应、炎症反应和磷脂酰肌醇 3-激酶/Akt 信号转导等为生、熟黄精治疗 IS 的共同信号通路(图 1B)。通过 KEGG 数据

库对核心靶点进行通路功能注释及通路富集分析,可知癌症通路、化学致癌-受体活化、催乳素信号通路和内分泌的阻力为生黄精治疗 IS 的潜在通路(图 1C)。神经活性配体-受体相互作用、含血清素的神经突触、磷脂酶 D 信号通路、谷氨酸能突触、间隙连接、弓形体病、麻疹、脂质和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、人类乳头瘤病毒感染、人类巨细胞病毒感染、丙型肝炎、乙型肝炎、EB 病毒感染、可卡因成瘾、钙信号通路、阿尔茨海默病和晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体信号通路在糖尿病并发症中的作用为熟黄精治疗 IS 的潜

在通路(图 1D、图 1E)。以上结果提示生、熟黄精治疗 IS 的潜在分子机制存在差异。

3.2 生、熟黄精对大鼠神经功能评分、脑含水量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠神经功能评分及脑含水量显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,治疗 1、3 d 后生黄精多糖高剂量组和熟黄精多糖高剂量组大鼠神经功能评分均下降($P<0.05$, $P<0.01$);治疗 5 d 后尼莫地平组、生黄精多糖低剂量组、生黄精多糖高剂量组、熟黄精多糖低剂量组和熟黄精多糖高剂量组大鼠神经功能评分均下降($P<0.01$);治疗后

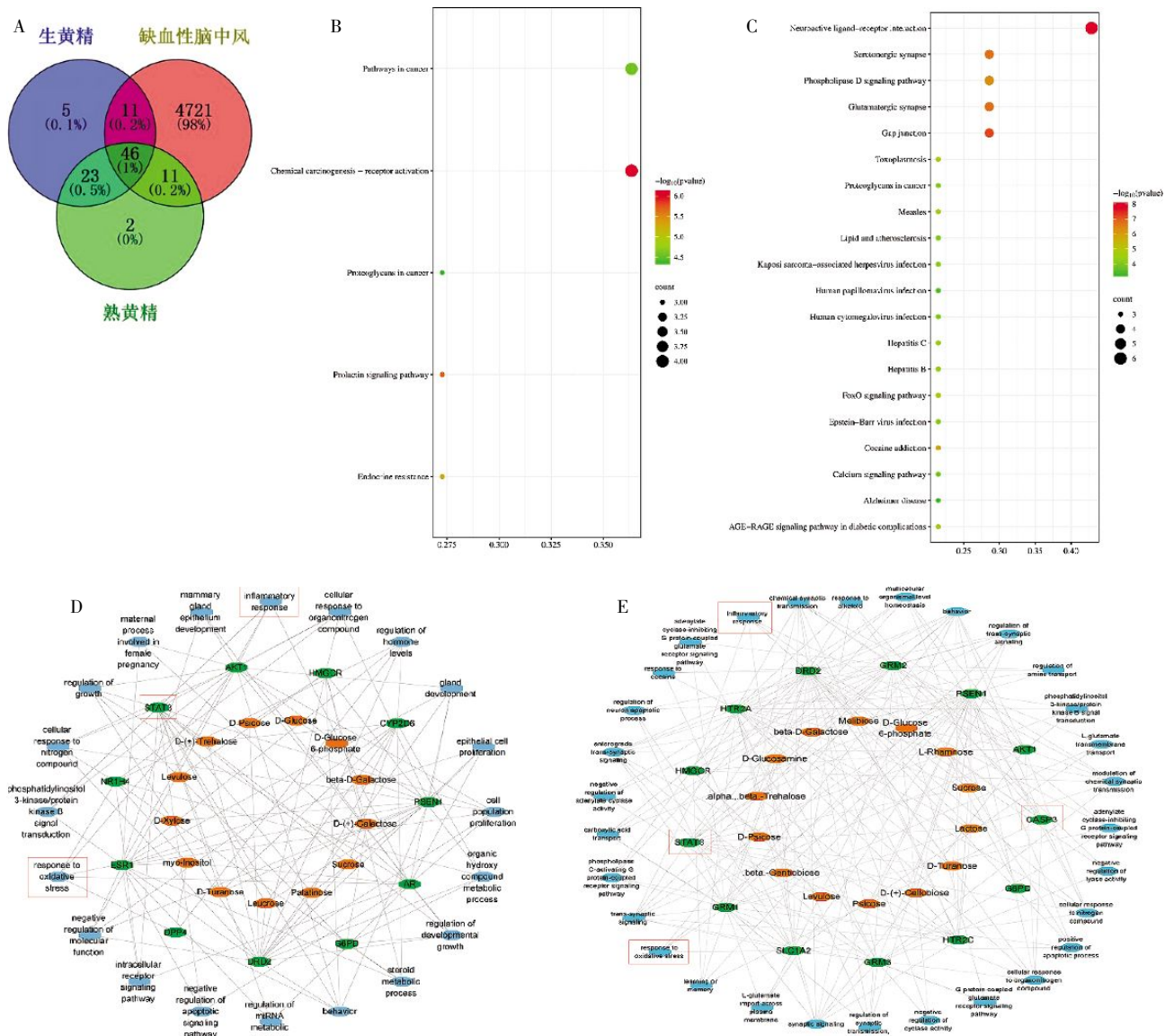


图 1 生、熟黄精治疗 IS“关键成分-核心靶点-通路”网络图

Fig.1 Network diagram of "key component-core target-pathway" for the treatment of IS with raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma)

注: A. 韦恩图; B. 黄精 GO 通路图; C. 黄精 KEGG 通路图; D. 生黄精治疗 IS 的“关键成分-核心靶点-通路”网络图; E. 熟黄精治疗 IS 的“关键成分-核心靶点-通路”网络图。

7 d 尼莫地平组、生黄精多糖高剂量组、熟黄精多糖低剂量组和熟黄精多糖高剂量组大鼠神经功能评分均下降($P<0.01$)。与模型组相比,尼莫地平组和熟黄精多糖高剂量组脑含水量降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 2。

3.3 生、熟黄精对大鼠血清炎症、氧化应激水平及神经损害标志物的影响

与假手术组相比,模型组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、UCH-L1、NSE 和 GFAP 水平均升高($P<0.05, P<0.01$),CAT 和 SOD 水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,尼莫地平组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、UCH-L1、NSE 和 GFAP 水平均降低($P<0.05, P<0.01$),CAT 水平升高($P<0.05$);生黄精多糖低剂量组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均降低($P<0.05, P<0.01$);生黄精多糖高剂量组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均降低($P<0.05, P<0.01$),SOD 水平升高($P<0.05$);熟黄精多糖低剂量组血清中 IL-6、MDA、UCH-L1 均降低($P<0.05, P<0.01$),SOD 水平均升高($P<0.05$);熟黄精多糖高剂量组血清中 IL-6、MDA、UCH-L1、NSE 和 GFAP 均降低($P<0.05, P<0.01$),CAT 和 SOD 水平均升高($P<0.05$)。详见图 3。

3.4 生、熟黄精对大鼠脑组织 JAK-STAT/NF- κ B 通路及凋亡相关蛋白的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、p-NF- κ B/NF- κ B、Bax 和

Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,生黄精多糖低剂量组和熟黄精多糖高剂量组 p-JAK2/JAK2 蛋白表达水平降低($P<0.05$);熟黄精多糖低、高剂量组 p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$);尼莫地平组、生黄精多糖高剂量组和熟黄精多糖低、高剂量组 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);生黄精多糖低剂量组和熟黄精多糖低、高剂量组 Bax 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$);熟黄精多糖低剂量组大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);熟黄精多糖低剂量组、生黄精多糖高剂量组 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 4。

3.5 生、熟黄精对大鼠脑组织凋亡水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 相对表达水平均显著升高($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 相对表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,尼莫地平组、生黄精多糖高剂量组和熟黄精多糖低、高剂量组 Bax mRNA 相对表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$);尼莫地平组、生黄精多糖高剂量组和熟黄精多糖高剂量 Bcl-2 mRNA 相对表达水平均升高($P<0.05, P<0.01$);尼莫地平组和熟黄精多糖高剂量组 Caspase-3 的 mRNA 相对表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 5。

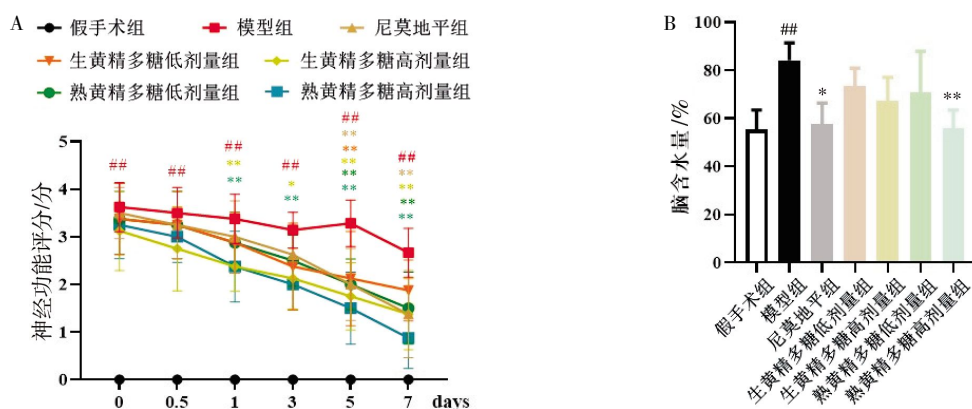


图 2 生、熟黄精对 IS 大鼠脑损伤指标的影响

Fig.2 Effects of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) on brain injury indexes in IS rats

注:A.生、熟黄精对 IS 大鼠神经功能评分;B.脑含水量($\bar{x}\pm s, n=3$)。与假手术组相比, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

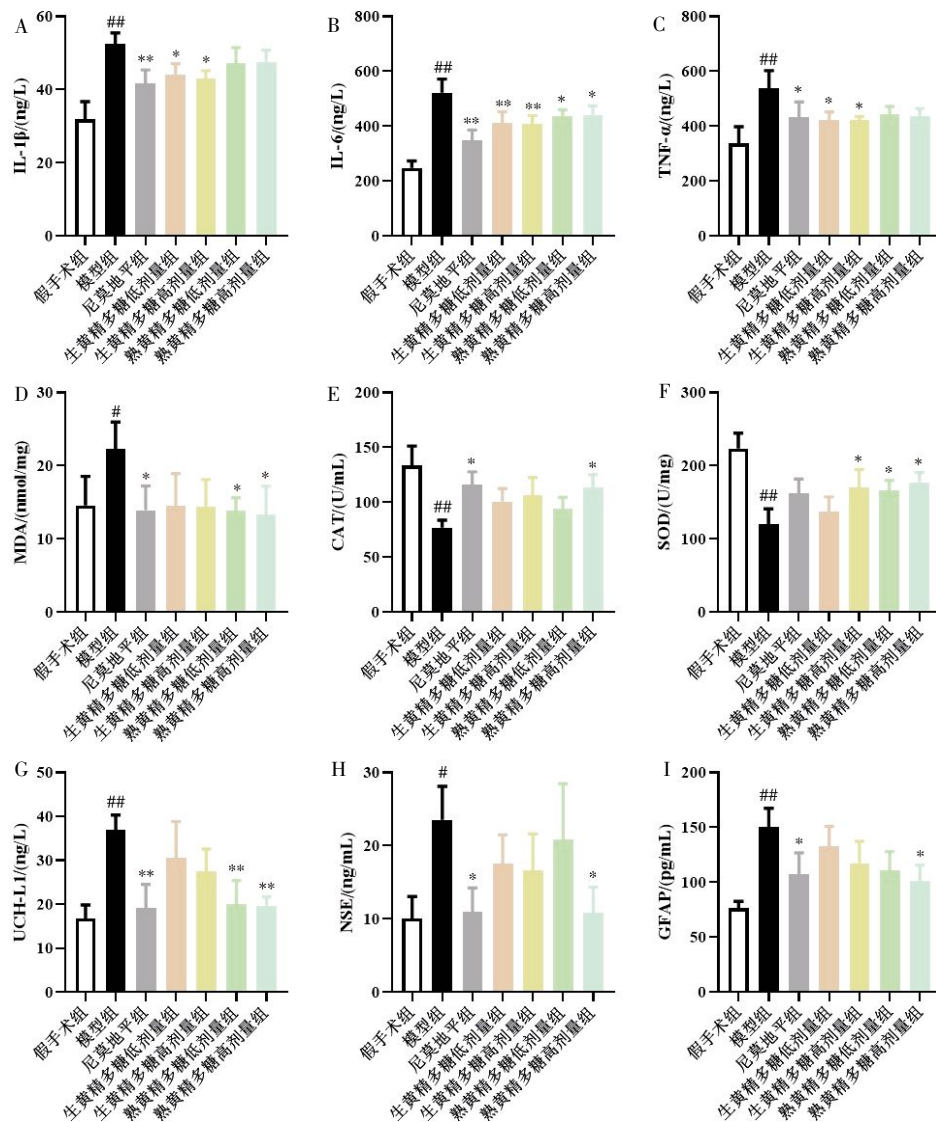


图3 生、熟黄精对IS大鼠血清中炎症、氧化应激和神经损害标志物的影响($n=6$)

Fig.3 Effects of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) on markers of inflammation, oxidative stress and nerve damage in IS rats ($n=6$)

注:A-C. IS大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量;D-F. IS大鼠血清中MDA、CAT和SOD含量;G-I. IS大鼠血清中UCH-L1、NSE和GFAP含量。与假手术组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

4 讨论

目前,IS的发病机制尚未完全阐明,可能涉及血栓形成、血管痉挛、脑水肿、细胞凋亡等多方面,可能导致脑组织缺血、缺氧、炎症反应和氧化应激,引起神经元和神经胶质细胞的损伤或死亡^[18]。在慢性脑缺血状态下,小胶质细胞和星形胶质细胞被过度激活而诱发炎症反应,释放大量的IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子,导致神经元损伤和神经元细胞死亡^[18]。中医临床用药强调炮制,生、熟药性各异。开展基于临床疗效的生、熟饮片药性及其差异作用机制的评价研究,是中药炮制现代研究亟待突破的关键科学

问题。目前,已有研究表明,生、熟黄精及其有效成分在抑制炎症因子表达、改善神经损伤、保护心脑血管等方面有显著作用^[19]。因此,本文基于“生熟异治”炮制理论,以线栓法建立大鼠脑卒中模型,观察生、熟黄精及其有效成分对脑卒中大鼠症状的改善作用,结果表明生、熟黄精及其药效成分均可不同程度地降低IS大鼠神经功能评分和脑含水量,改善IS大鼠血清炎症、氧化应激和神经损害标志物水平。

网络药理学可从整体视角研究中药的作用机制,与中医药的整体观念一致,充分展现了中药方剂以“君、臣、佐、使”配伍为基本原理的优势。本研究运用网络药理学方法构建生、熟黄精治疗IS的“关键

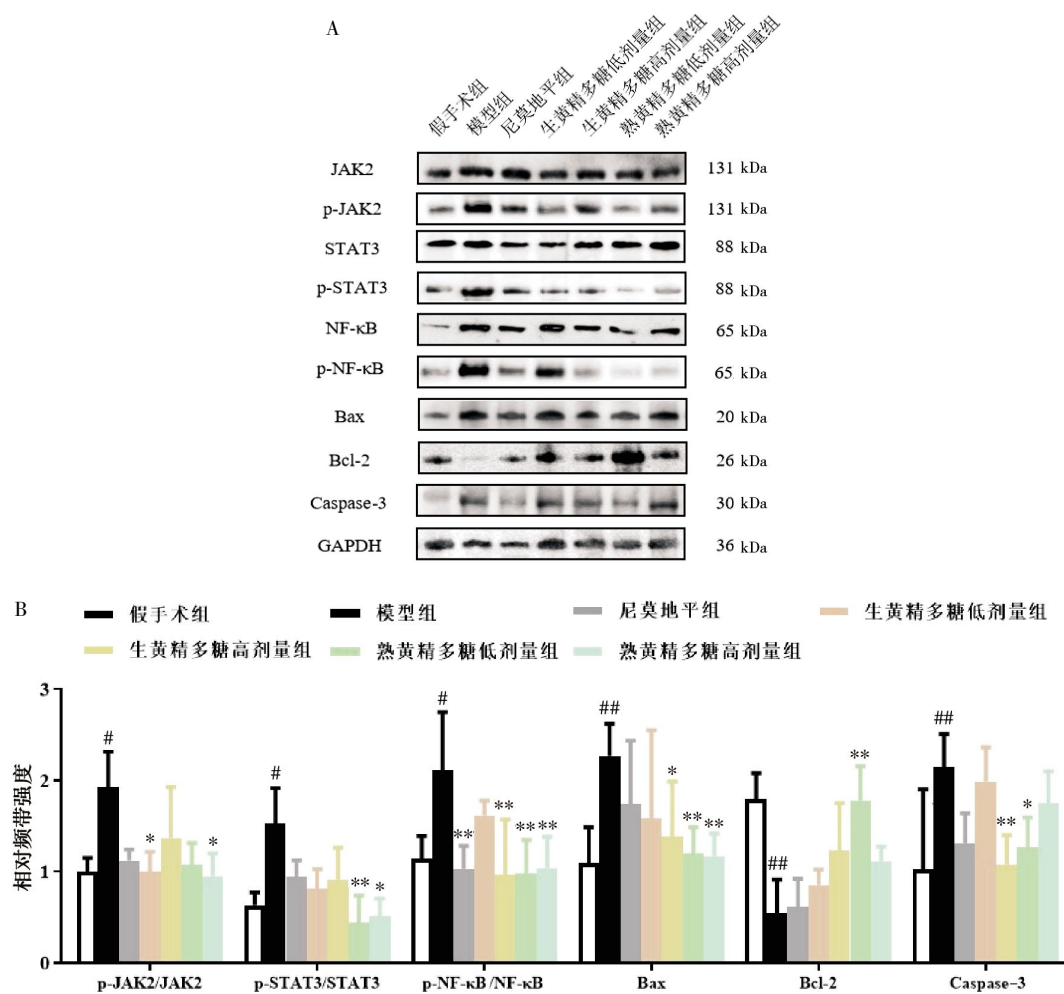


图 4 生、熟黄精对大鼠脑组织 JAK-STAT/NF-κB 通路及凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig.4 Effects of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) on JAK-STAT/NF-κB pathway and apoptosis-related proteins in rat brain tissue

注:A. IS 大鼠 JAK-STAT/NF-κB 通路及凋亡相关蛋白条带图;B. IS 大鼠脑组织 JAK-STAT/NF-κB 通路及凋亡相关蛋白表达情况。与假手术组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

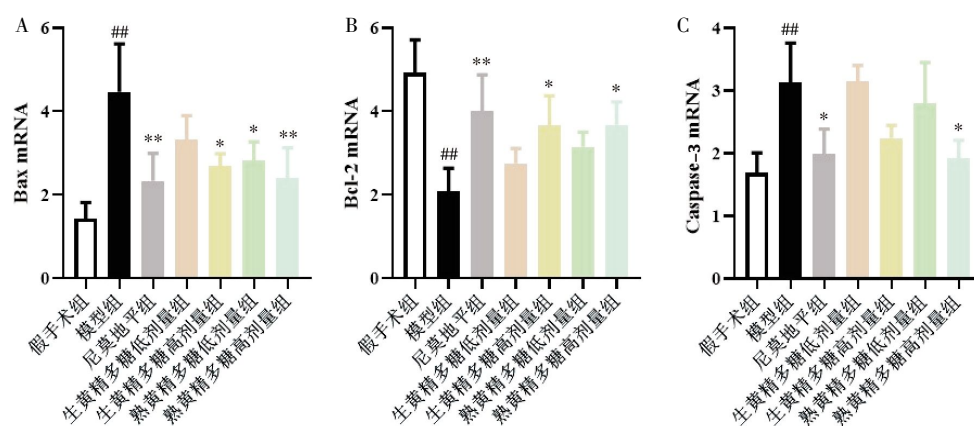


图 5 生、熟黄精对大鼠脑组织凋亡相关指标水平的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of raw and processed Huangjing (Polygonati Rhizoma) on apoptosis levels in rat brain tissue ($n=3$)

注:与假手术组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

成分-核心靶点-通路”网络图。结果表明,AKT1、CYP2D6、STAT3 和 PSEN1 等为生、熟黄精治疗 IS 的共同潜在靶点;ESR1、DPP4 和 AR 等为生黄精治疗 IS 的潜在靶点;CASP3、GRM1、SLC1A2 和 HTR2C 等

为熟黄精治疗 IS 的潜在靶点;氧化应激反应、细胞对有机氮化合物的反应、炎症反应和磷脂酰肌醇 3-激酶/Akt 信号转导等为生、熟黄精治疗 IS 的共同信号通路。

JAK2 是一种非受体酪氨酸激酶,参与细胞周期进程、凋亡、有丝分裂重组、遗传不稳定性及组蛋白修饰等过程,可被 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子激活;p-JAK2 可激活 STAT3,p-STAT3 易位至细胞核中,启动炎症基因的转录和表达,引发神经炎症和细胞凋亡;JAK2/STAT3 通路是神经炎症的有效治疗靶点^[19]。NF- κ B 在细胞的炎症反应、免疫应答等过程中起关键作用,其失调会引发自身免疫病、慢性炎症等,据此推测阻断炎症因子激活 JAK-STAT/NF- κ B 通路可能对抑制 IS 大鼠脑组织局部炎症反应具有重要作用。本研究基于 JAK-STAT/NF- κ B 信号通路,探讨了生、熟黄精多糖对 IS 大鼠作用机制的差异性。结果表明,生黄精多糖在调节炎症反应方面表现出更显著的效果,而熟黄精多糖在改善氧化应激和抑制细胞凋亡方面作用更为突出。此外,生、熟黄精多糖均能下调 IS 大鼠脑组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、p-NF- κ B/NF- κ B、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达水平,同时上调 Bcl-2 蛋白的表达水平,从而有效改善 IS 大鼠的神经功能损伤症状。由于生、熟黄精作为中药具有多成分、多靶点的特点,其具体药效物质基础及潜在作用机制仍需进一步深入研究。

综上,生、熟黄精多糖可改善 IS 大鼠,其机制可能与调节炎症因子表达、改善氧化应激、降低神经损害标志物的表达水平,通过 JAK2-STAT3/NF- κ B 通路改善脑组织中的炎症反应相关。

参考文献

- [1] GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *The Lancet Neurology*, 2021, 20(10): 795–820.
- [2] HURFORD R, SEKHAR A, HUGHES T A T, et al. Diagnosis and management of acute ischaemic stroke[J]. *Practical Neurology*, 2020, 20(4): 304–316.
- [3] 张米玲, 包亮英, 代玉洁, 等. 牛黄清心丸及其活性成分防治脑中风的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(18): 251–259.
- [4] 曹东敏, 关琴笑, 刘雅莉, 等. 基于 ¹H-NMR 的人参皂苷治疗缺血性脑中风的血清代谢组学研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5): 1142–1148.
- [5] 杨晓东, 邓成程, 杨文惠, 等. 黄精炮制研究进展与应用[J]. *广东化工*, 2025, 52(3): 82–85.
- [6] 陈小磊, 徐 哲, 钱华丽, 等. 黄精炮制历史沿革及现代研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(11): 150–157.
- [7] 易玉新, 吴石星, 叶茂盛, 等. A β 1–42 海马注射致大鼠海马细胞凋亡作用及黄精多糖干预的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(4): 1044–1045.
- [8] 马慕祯. 炮制方法对黄精多糖成分和“补气养阴”功效相关药理作用的影响[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2019.
- [9] SHAH F A, KURY L A, LI T, et al. Polydatin attenuates neuronal loss via reducing neuroinflammation and oxidative stress in rat MCAO models[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 663.
- [10] GONG P, ZHANG Z, ZOU Y C, et al. Tetramethylpyrazine attenuates blood–brain barrier disruption in ischemia/reperfusion injury through the JAK/STAT signaling pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 854: 289–297.
- [11] YAN L, ZHU T. Effects of rosuvastatin on neuronal apoptosis in cerebral ischemic stroke rats via Sirt1/NF- κ B signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(12): 5449–5455.
- [12] ALHADIDI Q, SHAH Z A. Cofilin mediates LPS-induced microglial cell activation and associated neurotoxicity through activation of NF- κ B and JAK-STAT pathway[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(2): 1676–1691.
- [13] LIAO X J, LIU H M, WANG Z X, et al. Exploration of the pharmacological components and therapeutic mechanisms in treatment of Alzheimer’s disease with Polygonati Rhizoma and its processed product using combined analysis of metabolomics, network pharmacology, and gut microbiota[J]. *Heliyon*, 2024, 10(15): e35394.
- [14] 常 亮, 陈珍珍, 吴 毅, 等. HPLC-ELSD 法测定黄精炮制过程中四种糖的含量[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(12): 1653–1656, 1665.
- [15] 段 华, 王保奇, 张跃文. 黄精多糖对肝癌 H22 移植瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(1): 5–7.
- [16] WANG Y, GUO W J, LIU Y, et al. Investigating the protective effect of gross saponins of Tribulus terrestris fruit against ischemic stroke in rat using metabolomics and network pharmacology[J]. *Metabolites*, 2019, 9(10): 240.
- [17] 江利敏, 桑 锋, 刘向哲, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨益气活血法对缺血性脑中风险急性期大鼠脑神经元的保护作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(6): 1358–1365.
- [18] 程明星, 李晨辉, 孟 卫, 等. 小胶质细胞在缺血性脑卒中的双重作用及机制[J]. *生理学报*, 2021, 73(6): 963–972.
- [19] HAN C Y, SUN T T, LIU Y W, et al. Protective effect of Polygonatum sibiricum polysaccharides on gentamicin-induced acute kidney injury in rats via inhibiting p38 MAPK/ATF2 pathway[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 595–601.

(本文编辑 田梦妍)