

本文引用: 伍小玲, 宁为民, 李文昭, 郭炫, 刘发生, 赵湛. 基于网络药理学与细胞实验探讨天麻健脑方调控 GPER/EGFR 信号轴改善缺血性脑卒中的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(8): 1443-1452.

## 基于网络药理学与细胞实验探讨天麻健脑方调控 GPER/EGFR 信号轴改善缺血性脑卒中的作用机制

伍小玲<sup>1</sup>, 宁为民<sup>1</sup>, 李文昭<sup>2</sup>, 郭炫<sup>2</sup>, 刘发生<sup>1</sup>, 赵湛<sup>1\*</sup>

1. 广州中医药大学东莞医院, 广东 东莞 523000; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

**[摘要]** **目的** 探讨天麻健脑方治疗缺血性脑卒中(IS)的机制以及对天麻健脑方的活性成分进行筛选。**方法** 通过 TCMSp 数据库获取天麻健脑方的活性成分和靶点, 在 GeneCards、DisGeNET、OMIM 获取 IS 相关靶点, Venny 在线平台获取天麻健脑方和 IS 的交集靶点并通过 STRING 数据库和 Cytoscape 3.7 获得 PPI 网络图, 利用 DAVID 数据库对筛选靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, 用 Cytohub 插件计算前 10 位靶基因。通过 ELISA、RT-qPCR、Western blot 验证天麻健脑方对海马神经元细胞 HT22 中 G 蛋白偶联雌激素受体(GPER)/表皮生长因子受体(EGFR)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)信号通路的调控作用。**结果** 天麻健脑方核心成分包括黄芩素、槲皮素、四氢鸭脚木碱等, 主要作用于基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、肿瘤蛋白 53(TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)等关键靶点, 参与对外源性刺激的反应、对缺氧的反应、脂多糖反应等生物学过程, 调控缺氧诱导因子-1A(HIF-1A)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)、甲状腺、雌激素等信号通路。细胞实验证实, 天麻健脑方可促进氧糖剥夺/复氧(OGD/R)损伤的 HT22 细胞增殖( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 降低缺血性脑卒中标志因子 MMP-9 和 C 反应蛋白(CRP)的表达水平( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 上调 GPER/EGFR/cAMP/PKA 信号通路相关蛋白的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。雌激素受体抑制剂 G15 和 ICI182780 作用后, 天麻健脑方对 HT22 细胞的作用受到不同程度的抑制。**结论** 天麻健脑方治疗缺血性脑卒中可能是通过激活 GPER 受体介导雌激素非基因组效应实现的。

**[关键词]** 缺血性脑卒中; 网络药理学; 天麻健脑方; 雌激素信号通路; 环磷酸腺苷/蛋白激酶 A

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.08.007

## Mechanism of action of Tianma Jiannao Formula in ischemic stroke rehabilitation by regulating the GPER/EGFR signaling axis based on network pharmacology and cell experiments

WU Xiaoling<sup>1</sup>, NING Weimin<sup>1</sup>, LI Wenzhao<sup>2</sup>, GUO Xuan<sup>2</sup>, LIU Fasheng<sup>1</sup>, ZHAO Zhan<sup>1\*</sup>

1. Dongguan Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan, Guangdong 523000, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanism of Tianma Jiannao Formula (TMJNF) in treating ischemic stroke (IS) and to screen its active components. **Methods** The active components and targets of TMJNF were obtained from the TCMSp database, while IS-related targets were retrieved from GeneCards, DisGeNET, and OMIM. The intersection targets of TMJNF and IS were

**[收稿日期]** 2025-02-05

**[基金项目]** 东莞市名中医专家传承工作室(5000074)。

**[通信作者]** \* 赵湛, 女, 博士, 主任医师, E-mail: zhaozhan205@163.com。

obtained from the Venny online platform, and the protein-protein interaction (PPI) network diagram was obtained from the STRING database and Cytoscape 3.7. The DAVID database was used for Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the screened targets, and the top 10 target genes were calculated using the Cytoscape plugin. The regulatory effects of TMJNF on the G protein-coupled estrogen receptor (GPER)/epidermal growth factor receptor (EGFR)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway in hippocampal neuronal HT22 cells were verified by ELISA, RT-qPCR, and Western blot. **Results** The core components of TMJNF, including baicalin, quercetin, tetrahydroplatyphylline, mainly act on key targets such as matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tumor protein p53 (TP53), and protein kinase B (AKT1). These components were involved in biological processes such as response to exogenous stimuli, hypoxia, and lipopolysaccharide, and regulated signaling pathways including hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt), thyroid hormone, and estrogen. Cellular experiments confirmed that TMJNF can promote the proliferation of HT22 cells damaged by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), reduce the expression levels of IS marker factors matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and C-reactive protein (CRP) ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and upregulate the protein expressions related to the GPER/EGFR/cAMP/PKA signaling pathway ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). After treatment with estrogen receptor inhibitors G15 and ICI182780, the effect of TMJNF on HT22 cells was suppressed to varying degrees. **Conclusion** TMJNF may treat IS by activating the GPER receptor and mediating the non-genomic effects of estrogen.

[**Keywords**] ischemic stroke; network pharmacology; Tianma Jiannao Formula; estrogen signaling pathway; cAMP/PKA

脑卒中是全球范围内导致死亡的第三大因素,也是导致残疾和认知障碍的主要原因<sup>[1]</sup>。目前,脑卒中的发病率仍在不断增加,脑卒中包括缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)和出血性脑卒中两种类型,其中绝大多数患者为 IS<sup>[2]</sup>。目前,IS 主要采用静脉溶栓治疗和介入治疗,但静脉溶栓治疗不仅受到时间窗和适应证的限制,且大多数患者治疗后仍会出现不同程度的残疾。IS 中会导致不同程度的神经元损伤和脑损伤,而神经元丢失是脑损伤的主要病理标志<sup>[3]</sup>。神经元保护以及损伤后神经元再生在减少卒中后脑损伤和大脑功能修复中至关重要<sup>[4]</sup>。目前,神经保护类药物的种类较少,价格高昂,且相关研究表明其在临床应用中疗效并不显著<sup>[5]</sup>。抗血小板药物(如阿司匹林、氯吡格雷)和抗凝药物(如华法林、新型口服抗凝药)常用于 IS 的一级、二级预防,以降低血栓复发风险。然而,抗血小板药物存在个体差异,部分患者会出现阿司匹林抵抗或氯吡格雷抵抗现象。抗凝药物则需严格监测凝血指标,且存在出血风险,剂量调整困难,增加了临床应用的复杂性<sup>[6]</sup>。

目前,中医各家多认为 IS 的病机是“阴阳失调,气血逆乱,脑络瘀阻”,这与西医 IS 发病时脑部微血管阻塞的理念不谋而合<sup>[7-9]</sup>。在实际 IS 病例观察中,患者常出现头晕、四肢麻木、关节酸痛、喉中痰鸣、形体肥胖、舌苔白腻、脉弦等临床表现,从中医辨证的

角度多为气虚夹痰湿<sup>[10]</sup>。半夏白术天麻汤具有化痰息风、健脾祛湿的功效,多用于治疗风痰上扰所致头痛、眩晕等疾病<sup>[11]</sup>。近年来,有国内研究者对半夏白术天麻汤治疗 IS 的药效学进行临床研究,展现出显著疗效<sup>[12-14]</sup>。

天麻健脑方是以《医学心悟》中“半夏白术天麻汤”为基础,结合东莞市中医院多年临床经验化裁而成的名老中医验方。仅 2013—2018 五年间,此方于东莞市中医院共验证病例 7 000 余例,在治疗风痰上扰型眩晕中体现突出效果。国内研究者有进行半夏白术天麻汤治疗风痰型 IS 的药效学临床观察研究,均展现出显著疗效<sup>[12-17]</sup>。但目前对于天麻健脑方全方的系统性药理药效研究暂无报道,相关药效物质基础也尚不清晰,使得该方临床用药、二次开发中减方优方、质量控制等关键步骤缺失重要理论基础,难以建立统一质量标准以获得稳定的药效,以致其在临床上的应用和推广受到制约。本研究通过网络药理学技术构建“药物活性成分-靶点-通路”网络,分析关键靶点、重要信号通路和活性成分,筛选主要活性成分和信号通路,构建小鼠海马神经元氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型,运用 ELISA 检测疗效指标,Western blot、RT-qPCR 验证通路,以探究天麻健脑方作用机制和药效物质,为临床精准用药提供证据。

## 1 材料

### 1.1 细胞来源

小鼠海马神经元细胞 HT22 购自合肥万物生物科技有限公司(生产批号:202108)。

### 1.2 试剂与药物

MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号:C0009S)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)ELISA 试剂盒(货号:PC186)购自碧云天生物技术有限公司;Anti-环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)抗体(货号:ab76238)、Anti-表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体(货号:ab52894)、Anti-G-protein coupled receptor 30 抗体(货号:ab260033)、Anti-CREB(环磷酸腺苷效应元件结合蛋白, phospho S133)抗体(货号:ab32096)、Anti-beta I Tubulin( $\beta$  微管蛋白)抗体(货号:ab179511)、ER $\alpha$  和 ER $\beta$  抑制剂 ICI182780(货号:ab120131)购自 Abcam 公司;蛋白酶 A(protein kinase A, PKA) alpha Antibody(货号:PA5-17626)购自赛默飞世尔科技有限公司;G 蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)抑制剂 G15(货号:TargetMol-T7389)购自美国 Cayman 公司;MMP-9 ELISA 试剂盒(货号:CSB-E08007m)购自武汉华美生物工程有限公司;尼莫地平(货号:SN8560)购自北京索莱宝科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学方法

2.1.1 获取药物相关靶点 在 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)中,通过设定口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL)  $\geq 0.18$ 、血脑屏障透过率(blood-brain barrier, BBB)  $\geq -0.3$  的条件,分别查询泽泻、天麻、石菖蒲、茯苓、半夏、白术、钩藤,以探寻这些中药的活性成分及相应的靶点;由于 TCMSP 数据库没有红景天的活性成分及其相应靶点信息,因此,在 TCMID(<http://www.megabionet.org/tcmid/>)数据库获取红景天的活性成分信息,并在 TCMSP 数据库中收集符合设定条件的红景天活性成分及其相应靶点,整合所有中药靶点信息后,在 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中将靶点蛋白名称替换为基因名称。

2.1.2 获取疾病相关靶点 通过在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)和 OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库中使用“ischemic stroke”作为检索词,得到相关靶点然后合并删除重复值。

2.1.3 获取疾病与药物交集靶点 将疾病和药物成分靶点上传到 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)在线平台,生成韦恩图并获取交集靶点。

2.1.4 网络拓扑分析活性成分作用靶点 创建适用于 Cytoscape 3.7 版本软件的网络图构建所需的基础数据文件,将天麻健脑方的活性成分与 IS 的靶基因信息,连同所准备的工作文件,一并导入至 Cytoscape 3.7 软件中。采用“CytoNCA”插件中的 Degree 指令执行拓扑分析,并依据此结果进行排序。

2.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将天麻健脑方与 IS 相关基因的交集基因导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),选择“Homo Sapiens”进行筛选,隐藏无关靶点,利用 Cytoscape 3.7 软件对导出的 tsv 文件进行可视化处理,生成 PPI 网络图。

2.1.6 GO 功能和 KEGG 富集分析 为系统解析交集靶点的生物学功能及通路机制,本研究采用 DAVID 数据库(<http://david.nifcrf.gov/>),对靶点基因进行 GO 功能注释富集分析和 KEGG 通路富集分析。

### 2.2 细胞实验方法

2.2.1 含药血清制备 天麻健脑方组成:法半夏、白术、天麻、钩藤、泽泻、石菖蒲各 14 g,红景天 9 g,茯苓 23 g。加入 12 倍体积的水煎煮 2 次(武火煮沸、文火慢煎),每次 1 h,滤过,合并滤液,分别浓缩至含生药 0.366、0.442、0.504 g/mL 的天麻健脑方低、中、高剂量组,给药剂量按照小鼠与人体间的等效剂量换算<sup>[8]</sup>。天麻健脑方低、中、高剂量组小鼠灌胃天麻健脑方药液,对照组及模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。末次给药 2 h 后,腹主动脉取血,放入 4 °C 冰箱 5 h 后取出,3 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 5 min,收集上清液。将同组的上清液混合,56 °C 水浴灭活 30 min,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,最后放入冰箱-80 °C 保存。

2.2.2 细胞培养 海马神经元细胞被置于含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,在 37 °C 且含有

5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱环境中进行培养,隔天传代。

**2.2.3 OGD/复氧(reoxygenation/R)模型建立** HT22 细胞正常培养传代后弃去正常培养基,改用无糖无血清 DMEM 培养基,将细胞置于充满 95%N<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub> 的厌氧袋中孵育 8 h。显微镜下观察细胞形态,HT22 细胞出现皱缩,细胞体变小,突起缩短、变细,部分细胞变圆,确定 OGD/R 模型建立。

**2.2.4 实验分组** 收集对数增长期的 HT22 细胞,以 5×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 6 孔板。将细胞分为对照组、模型组(OGD/R)、天麻健脑方低剂量组(OGD/R+低剂量含药血清)、天麻健脑方中剂量组(OGD/R+中剂量含药血清)、天麻健脑方高剂量组(OGD/R+高剂量含药血清)、阳性对照组(OGD/R+尼莫地平)、膜受体组(OGD/R+0.504 g/mL 含药血清+GPER 抑制剂G15)、核受体组(OGD/R+0.504 g/mL 含药血清+雌激素核受体抑制剂 ICI182780)。对照组为 DMEM 高糖培养基培养的海马神经元细胞;模型组是 OGD 后往各孔加入 2 mL DMEM 无糖培养基;含药血清组是 OGD 后往各孔加入用 DMEM 无糖培养基稀释的含药血清;膜受体组是 OGD 后往各孔加入用 DMEM 无糖培养基稀释的含药血清和 G15(10 μmol·L<sup>-1</sup>);核受体组是 OGD 后往各孔加入用 DMEM 无糖培养基稀释的含药血清和 ICI182780(1 μmol·L<sup>-1</sup>);阳性对照组给予尼莫地平(10 μmol·L<sup>-1</sup>)。各组细胞给予相应干预后,在 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。

**2.2.5 MTT 测定细胞活力** 各组细胞给予相应干预后,在 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。分别给每组每孔加入 10 μL 配制好的 MTT 溶液,4 h 后小心吸弃孔内上清,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,轻轻震荡培养板 10 min,直至蓝紫色结晶完全溶解,使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 A,计算细胞存活率。

**2.2.6 ELISA 检测 MMP-9 和 CRP 因子水平** 各处理组完成后,根据 ELISA 试剂盒的操作步骤检测各组 MMP-9 和 CRP 浓度。

**2.2.7 Western blot 检测细胞中 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB、β-Tubulin 的蛋白表达水平** 海马神经元细胞分组处理结束后,弃上清液,加入 RIPA 裂解液 100 μL,冰上充分裂解,4 ℃下 12 000 r/min

低温高速离心 30 min 后取上清液。根据 BCA 法测定蛋白浓度。根据测定的蛋白浓度计算出每组标本的上样量,将同样浓度的蛋白质样品等体积加入样品孔中,SDS-PAGE 电泳后转膜,封闭 30 min,分别孵育一抗:GPER(1:1 000)、EGFR(1:1 000)、cAMP(1:20 000)、PKA(1:1 000)、p-CREB(1:5 000)、β-Tubulin(1:1 000),冰上孵育 12 h 后 TBST 洗膜,二抗(1:1 000)室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜,后滴加 ECL 显影并采集图像,以 β-Tubulin 为内参,用 Image J 分析各组灰度值。

**2.2.8 RT-qPCR 检测细胞中 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB、β-Tubulin 的 mRNA 表达水平** HT22 细胞分组处理结束后,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, RNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录生成 cDNA。反应条件设定如下:95 ℃预变性 10 min,95 ℃退火 10 s,60 ℃下退火 20 s,72 ℃延伸 35 s。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物	引物长度/bp
Gpr30	正向 ATGGATGCGACTACTCCAGC	179
	反向 AAGAGGGCAATCACCTACTGC	
Egfr	正向 GCCATCTGGGCCAAAGATAACC	101
	反向 GTCTTCGCATGAATAGGCCAAT	
Camp	正向 GGCTGTGGCGTCACTATC	116
	反向 GTCTAGGGACTGCTGGTTGAA	
Pkaca	正向 GGTGACAGACTTCGGTTTTGTC	115
	反向 CACAGCCTTGTGTAGCCCTT	
Creb1	正向 AGCAGCTCATGCAACATCATC	152
	反向 AGTCCTTACAGGAAGACTGAAC	
Tubb5	正向 GATCGGTGCTAAGTTCTGGGA	139
	反向 AGGGACATACTTGCCACCTGT	

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学结果

**3.1.1 天麻健脑方活性成分、靶点及 IS 靶点的筛选** 在数据库的检索结果中,识别到了天麻健脑方的 55 种活性成分。经过整理并去除重复项后,这些成分所对应的作用靶点总计达到了 244 个,相关疾病靶点 1 584 个。将药物活性成分靶点和疾病靶点进行交集分析得到 95 个共同靶点,为天麻健脑方防治 IS 的潜在靶点。详见图 1。

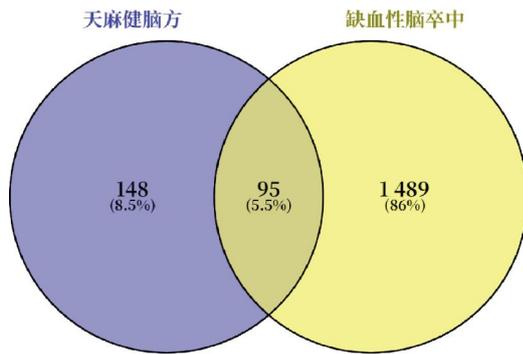


图 1 天麻健脑方有效成分-缺血性脑中风疾病基因韦恩图

Fig.1 Venn diagram of active components of TMJNF vs. IS-associated genes

3.1.2 天麻健脑方抗 IS“药物-活性成分-靶点”网络图 网络图包含了 157 个节点,其中有 55 个活性成分、95 个靶点(涉及 7 味药物),共 468 条相互作用的线。利用 Cytoscape 3.7 软件进行计算,根据“degree”值由大到小排列,获得前十的活性成分信息。详见图 2 和表 2。

3.1.3 天麻健脑方活性成分抗 IS PPI 网络分析 利用 Cytoscape 3.7 软件进行计算,根据 MMC 值计算前六位靶基因,获得靶基因为 MMP-9、肿瘤蛋白 53(tumor protein p53, TP53)、蛋白激酶 B(protein kinaseB, Akt1)、调控缺氧诱导因子-1A(hypoxia-inducible factor-1A,

表 2 度值排名前十的化学成分信息

Table 2 Top 10 chemical components ranked by degree value

分子编号	活性成分	度值	来源
MOL000422	山柰酚	38	红景天
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	36	钩藤,半夏
MOL008488	育亨宾	19	钩藤,半夏
MOL002714	黄芩苷	18	半夏
MOL000198	芳樟醇	18	红景天
MOL008468	methyl(E)-2-[(2S,3Z,12bS)-3-ethylidene-2,4,6,7,12,12b-hexahydro-1H-indolo[3,2-h]quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate	17	钩藤
MOL008465	毛钩藤碱	16	钩藤
MOL008489	去氢毛钩藤碱	15	钩藤
MOL008457	四氢鸭脚木碱	14	钩藤
MOL008490	isocorynantheic acid	13	钩藤

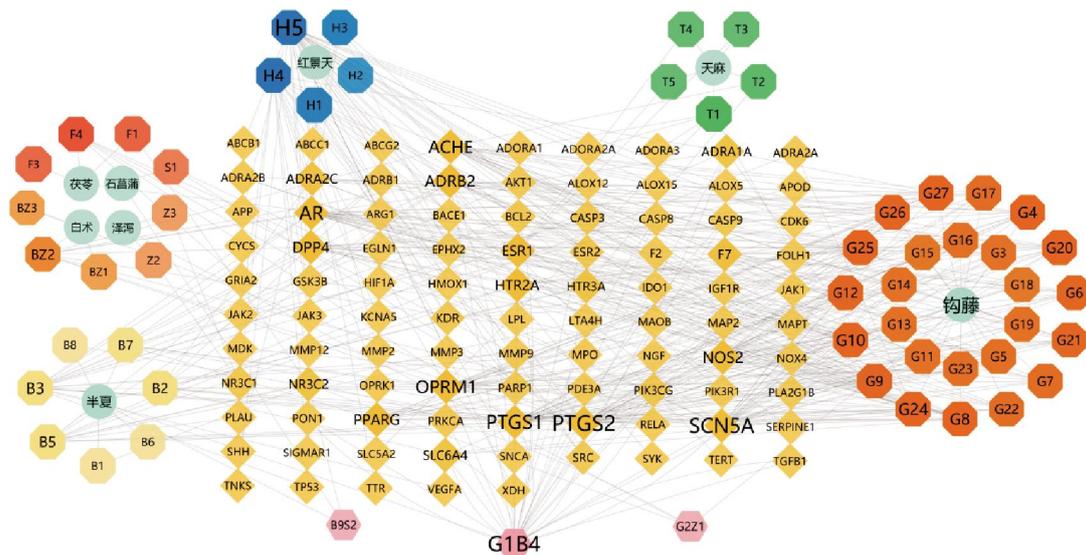


图 2 药物-成分-靶点相互作用网络图

Fig.2 Drug-component-target interaction network diagram

注:Degree 越高节点越大、颜色越深、字体大小越大,预示着该靶点所涉及的生物学功能更为广泛,更具重要性。

HIF-1A)、转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor beta-1, TGF- $\beta 1$ )、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR- $\gamma$ )。详见图 3。

**3.1.4 GO 和 KEGG 富集分析** 利用 DAVID 数据库进行富集分析后,发现共计 595 个 GO 富集项,其中包括生物过程 405 个、分子功能 113 个和细胞组成 77 个。分别从生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)中筛选最显著的 10 个过程制作 GO 功能分析图(图 4),此外,KEGG 富集通路共 30 条,结果展示排名前 20 的通路(图 5)。GO 分析结果显示对外源性刺激的反应、对缺氧的反应、脂多糖反应等在 BP 中富集度较高;膜筏、细胞质膜、神经元细胞体等在 CC 中富集度较高;酶结合、相同蛋白质结合、肽酶活性等在 MF 中富集度较高。KEGG 富集分析显示,雌激素信号通路富集基因数目较多,排名靠前,富集显著性较高,前十的关键靶蛋白有 5 个富集在该通路上,包括肉瘤病毒蛋白(sarcoma virus

protein, SRC)、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma 2, BCL-2)、AKT1、雌激素受体  $\alpha$ (estrogen receptor alpha, ESR1)、MMP-9,均为该通路上的关键靶蛋白。详见图 4。

## 3.2 细胞实验结果

**3.2.1 天麻健脑方含药血清对 OGD/R 后 HT22 细胞活力的影响** 与对照组比较,模型组 HT22 细胞存活率显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组 HT22 细胞存活率显著升高( $P < 0.01$ )。与低剂量组比较,中剂量组 HT22 细胞存活率显著升高( $P < 0.05$ );与中剂量组比较,高剂量组细胞存活率升高( $P < 0.01$ ),即当给药浓度达到 0.504 g/mL 时含药血清的抑制作用最强,因此,后续实验选用 0.504 g/mL 的含药血清作用 HT22 细胞。详见图 5。

**3.2.2 天麻健脑方对各组 HT22 细胞中 MMP-9 和 CRP 因子水平的影响** 与对照组比较,模型组 MMP-9 和 CRP 的因子表达水平显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,天麻健脑方组和阳性对照组 MMP-9 和 CRP 的因子表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。

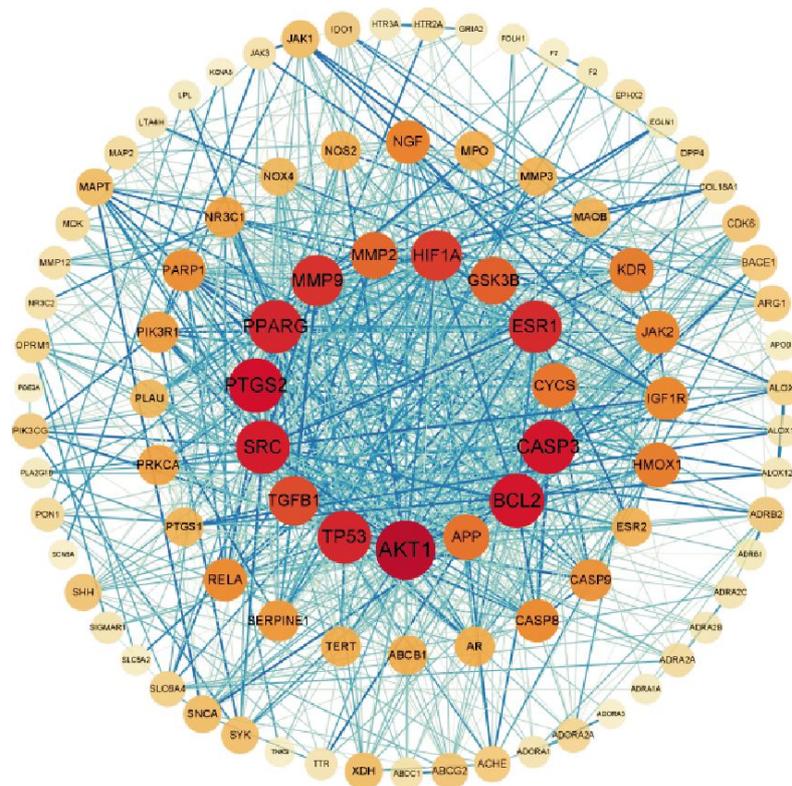


图 3 天麻健脑方抗 IS 潜在靶点 PPI 网络

Fig.3 PPI network of potential targets for TMJNF against IS

注:网络图中节点颜色越深、图形越大表明在网络中越重要。

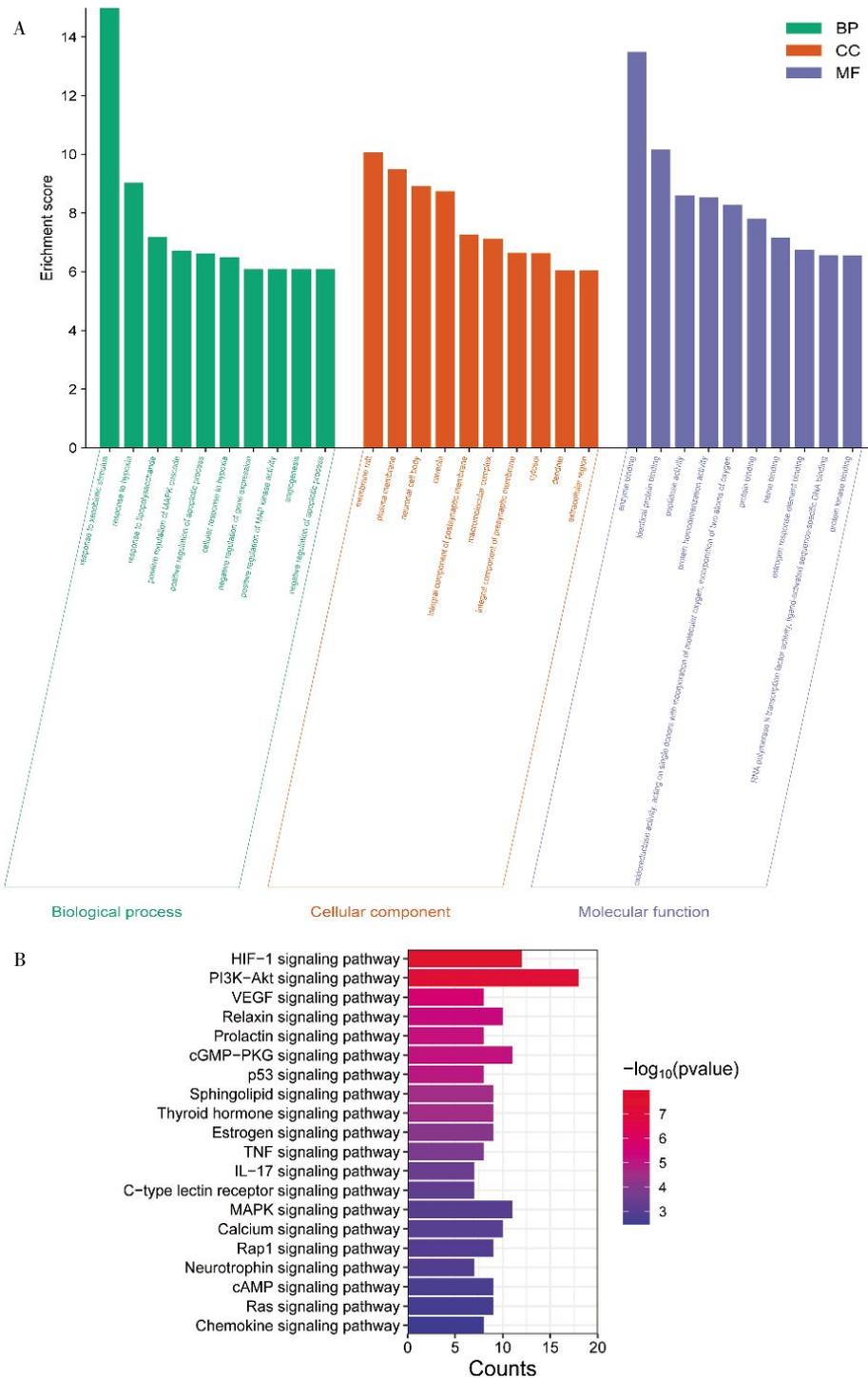


图 4 天麻健脑方抗 IS 潜在靶点 GO 功能(A)及 KEGG 通路富集(B)分析柱状

Fig.4 Bar chart analysis of GO functions (A) and KEGG pathway enrichment (B) for potential targets of TMJNF against IS

详见图 6。

3.2.3 天麻健脑方对各组 HT22 细胞 GPER/EGFR/cAMP/PKA 信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较,天麻健脑方组 HT22 细胞中 GPER、EGFR、cAMP、PKA 以及 p-CREB 蛋白表达升高( $P<0.01$ ),膜受体组和核受体组 GPER、cAMP、PKA 以及 p-CREB 的表达均下降( $P<0.01$ );与模型组比较,天麻健脑方组

的 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB 蛋白表达升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),核受体组和膜受体组 GPER、cAMP、PKA、p-CREB 蛋白表达均升高( $P<0.01$ );与核受体组比较,膜受体组的蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ )。详见图 7。

3.2.4 天麻健脑方对各组 HT22 细胞中 GPER、EGFR、cAMP、PKA mRNA 表达水平的影响 与对

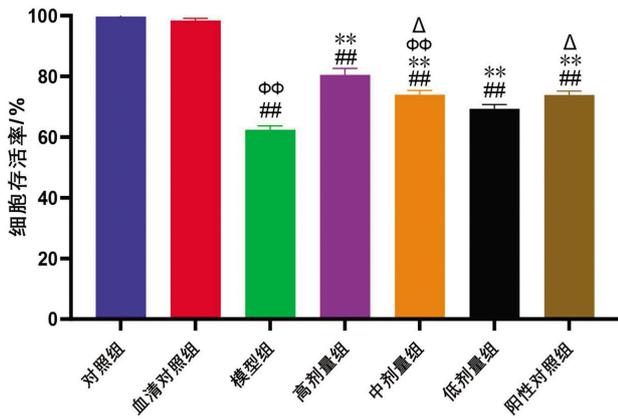


图 5 不同浓度含药血清对 HT22 细胞活力的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of drug-containing serum on HT22 cells

注:与对照组比较, # $P<0.01$ ;与模型组比较, \*\* $P<0.01$ ;与高剂量组比较,  $\Phi\Phi P<0.01$ ;与低剂量组比较,  $\Delta P<0.05$ 。

对照组比较,模型组 HT22 细胞的 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB mRNA 表达水平均降低( $P<0.01$ );与模型组比较,天麻健脑方组和核受体组 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB mRNA 表达水平均升高( $P<0.01$ );与天麻健脑方组比较,膜受体组和核受体组 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB mRNA 表达水平均降低( $P<0.01$ );与膜受体组比较,核受体组 GPER、EGFR、cAMP、PKA、p-CREB mRNA 表达水平均降低( $P<0.01$ )。详见图 8。

#### 4 讨论

IS 容易诱发脑梗死,同时伴有脑组织坏死和局灶性神经元损伤,有较高的致死致残风险<sup>[19]</sup>。因此,确定可逆的风险因素、可靠的生物标志物、急性期管理的治疗目标以及促进神经功能恢复的干预措

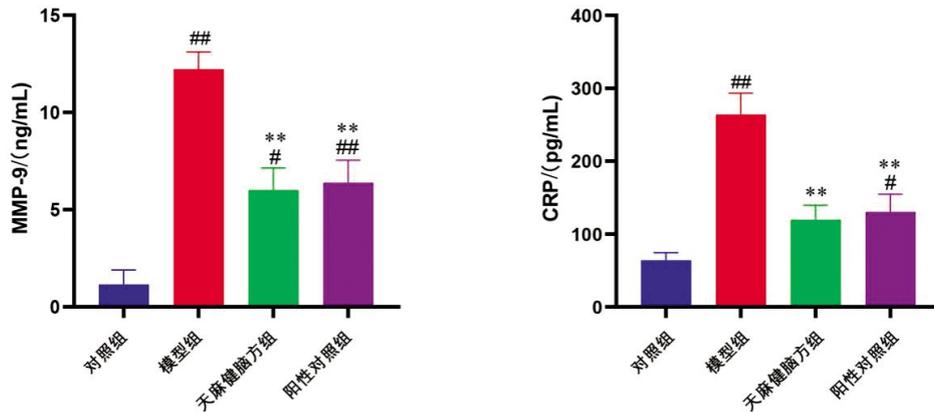


图 6 ELISA 检测天麻健脑方对 OGD 模型 HT22 细胞 MMP-9 和 CRP 的影响

Fig.6 Effects of TMJNF on MMP-9 and CRP in OGD-modeled HT22 cells examined by ELISA

注:与对照组比较, # $P<0.01$ ,  $\Phi P<0.05$ ;与模型组比较, \*\* $P<0.01$ 。

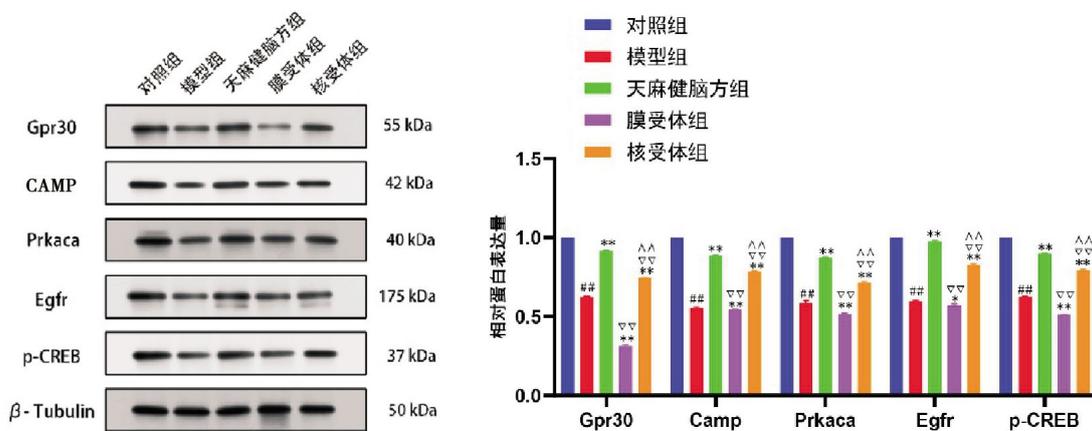


图 7 Western blot 检测各组 HT22 细胞 GPER/cAMP/PKA 通路中蛋白的表达水平

Fig.7 Protein expression levels in the GPER/cAMP/PKA pathway of HT22 cells of each group checked by Western blot

注:与对照组比较, # $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与天麻健脑方组比较,  $\nabla\nabla P<0.01$ ;与膜受体组比较,  $\sim P<0.01$ 。

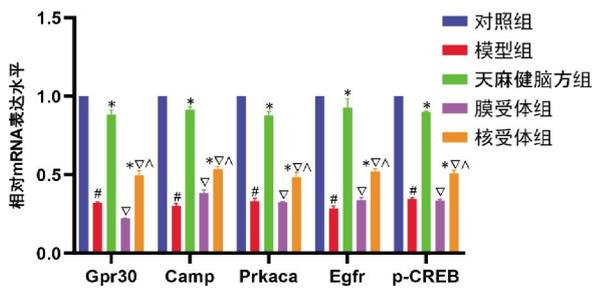


图8 qPCR检测各组HT22细胞中GPER、EGFR、cAMP、PKA的mRNA表达水平

Fig.8 mRNA expression levels of GPER, EGFR, cAMP, and PKA in HT22 cells of each group checked by qPCR

注:与对照组比较, # $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.01$ ;与天麻健脑方组比较, ∇ $P<0.01$ ;与膜受体组比较, ▲ $P<0.01$ 。

施,对防治该疾病至关重要。目前,IS后的神经元损伤机制是重要的研究方向<sup>[20]</sup>,用于IS神经保护的药物亟待开发<sup>[21]</sup>。

天麻健脑方由法半夏、天麻、白术、茯苓、泽泻、石菖蒲、钩藤、红景天8味中药组成。君药法半夏燥湿化痰、降逆止呕,天麻息风止痉、平抑肝阳;臣药白术、茯苓,健脾祛湿、湿去痰消;佐以泽泻利下焦,石菖蒲开上焦,配合钩藤加强平肝息风之功;并以活血化瘀通络之红景天为佐药,从痰湿论治IS,具有化痰祛湿,祛风通络的功效。

本研究运用网络药理学的方法,分析天麻健脑方治疗IS的关键靶点、重要信号通路和活性成分。通过Cytoscape的hubba插件分析,发现山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、黄芩苷、毛钩藤碱、四氢鸭脚木碱等成分可能在天麻健脑方治疗IS中发挥重要作用,这些成分来源于红景天、半夏和钩藤。相关研究表明,山柰酚可以通过抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡等机制在阿尔茨海默病、IS等神经退行性疾病起到神经保护作用<sup>[22-24]</sup>。四氢鸭脚木碱可以提高OGD/R诱导的皮质神经元细胞活力,通过Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径调节自噬<sup>[25]</sup>。此外,对于毛钩藤碱、去氢毛钩藤碱等活性成分治疗中枢神经系统疾病也有一定的研究进展。相关研究表明,这些活性成分涉及Janus激酶1(Janus kinase 1, JAK1)/信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt/核转录因子 $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、核因子E2相

关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/溶质载体家族7成员11, SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)等多条信号通路<sup>[23,24,26]</sup>,均与IS病理进程中的炎症反应、氧化应激及细胞凋亡调控密切相关,提示天麻健脑方可能通过多通路协同作用干预IS病理发展。通过PPI网络拓扑分析,得到天麻健脑方治疗IS的潜在靶点,这些靶点主要富集在HIF-1、PI3K-Akt、甲状腺、雌激素等信号通路中。其中,雌激素信号通路可以通过其核受体ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和膜受体GPER介导基因组效应和非基因组效应,激活下游的PI3K/Akt/mTOR、cAMP/PKA、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等多条信号通路,在IS中起到神经保护作用<sup>[27]</sup>。核受体主要介导的基因组效应起效较慢,而膜受体GPER可以启动并转录调控EGFR/cAMP/PKA快速信号通路<sup>[28]</sup>。如果IS后,该通路被激活,有望可以快速发挥神经保护作用,降低脑组织损伤和局灶神经元的风险,促进神经功能恢复。

本研究首先研究了天麻健脑方对OGD/R模型下HT22细胞活力的影响,结果发现天麻健脑方含药血清可以显著提高HT22细胞的存活率,同时这种作用可以被G15和ICI182780抑制,GPER抑制剂G15的抑制效果更加显著。实验研究表明,激活GPER可减少谷氨酸诱导的神经元过度自噬,对染料木素抗脂多糖(genistein against lipopolysaccharide, Gen-LPS)诱导的神经炎症起到抗炎作用<sup>[29-30]</sup>,该抗炎作用可被G15所阻断。为了研究天麻健脑方对雌激素信号通路的影响,运用Western blot和RT-qPCR检测了天麻健脑方含药血清给药后EGFR/cAMP/PKA通路的变化情况,发现天麻健脑方通过上调相关蛋白的表达发挥其神经保护作用,且该通路主要由GPER介导的雌激素快速信号通路调控。MMP-9是炎症反应的调控因子,可通过兴奋性毒性、氧化应激等直接诱导神经元损伤<sup>[31]</sup>。CRP是重要的炎症标志物,可与补体C3结合形成膜攻击复合体,促进神经炎症的产生,参与血脑屏障破坏。天麻健脑方对IS的标志蛋白MMP-9和CRP同样具有抑制作用,这种作用受到雌激素核受体和膜受体的影响。GPER抑制剂G15较核受体抑制剂ICI182780对该抑制作用的阻断作用更加显著。

综上所述,天麻健脑方可以通过多成分、多靶点、多途径治疗 IS。雌激素膜受体 GPER 所介导的快速非基因组效应是天麻健脑方的主要作用途径。本研究为天麻健脑方二次开发、减方优方、质量控制提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet*, 2024, 403(10440): 2100–2132.
- [2] KIMURA H. Stroke[J]. *Brain and Nerve*, 2020, 72(4): 311–321.
- [3] BRUCE A J, BOLING W, KINDY M S, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors[J]. *Nature Medicine*, 1996, 2(7): 788–794.
- [4] CHEN Y C, MA N X, PEI Z F, et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through in vivo astrocyte-to-neuron conversion [J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(1): 217–234.
- [5] 刘嘉嘉, 罗 琼, 罗 敏, 等. 基于真实世界数据缺血性脑卒中神经保护剂类药物治疗效果与经济性评价[J]. *中国医院药学杂志*, 2025, 45(7): 786–791.
- [6] 倪 慧, 孙晓辉, 马雨东, 等. 缺血性脑卒中患者口服抗血小板药物的疗效及危险因素分析[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2024, 44(5): 496–499.
- [7] 秦瑜玲, 舒 杨, 卢 岩, 等. 中风病因病机新说[J]. *河南中医*, 2019, 39(9): 1309–1313.
- [8] 练志润, 张家蔚, 赵子珺, 等. 侯氏黑散方证中“大风”内涵的考证[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(9): 1453–1456.
- [9] 徐青云, 苗 琦, 李文武, 等. 益气活血类方药调控血管稳态抗缺血性脑中风的作用机制研究进展[J]. *中医药学报*, 2023, 51(10): 120–124.
- [10] 薛 昊, 陈仁寿. 经典名方半夏白术天麻汤源流与应用考[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(15): 14–19.
- [11] 徐 男, 时海燕, 王淑玲, 等. 基于正交试验配合多药效指标综合评价半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压的有效组分配伍[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 7–13.
- [12] 程 松. 加味半夏白术天麻汤合桃红四物汤联合西药治疗风痰阻络证中风的临床效果[J]. *内蒙古中医药*, 2022, 41(7): 38–40.
- [13] 王 虎, 陈顺喜, 陈益丹. 针灸联合半夏白术天麻汤治疗中风的临床疗效观察[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(11): 35–38.
- [14] 敖微微. 半夏白术天麻汤治疗风痰阻络型中风的疗效评价[J]. *当代医药论丛*, 2020, 18(7): 194–195.
- [15] 李学国. 半夏白术天麻汤加味治疗风痰瘀阻型缺血性中风的疗效观察[J]. *北京中医*, 2007, 26(5): 287–288.
- [16] 罗 文, 张 旭. 半夏白术天麻汤治疗中风病风痰阻络证效果观察[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(19): 15–16.
- [17] 谢乐军, 黄富强. 半夏白术天麻汤随证加减治疗风痰瘀阻型缺血性中风临床研究[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(18): 108–109.
- [18] 李 玥, 陈俊逾, 常春雷, 等. 基于 NLRP3/IL-18/NF- $\kappa$ B 通路探讨化痰安神方改善神经元细胞凋亡的作用机制[J]. *首都医科大学学报*, 2025, 46(3): 487–495.
- [19] ZHAO S C, MA L S, CHU Z H, et al. Regulation of microglial activation in stroke[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(4): 445–458.
- [20] ZHAO Y, ZHANG X, CHEN X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2022, 49(2): 15.
- [21] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies[J]. *Experimental Neurology*, 2021, 335: 113518.
- [22] RAHUL, SIDDIQUE Y H. Neurodegenerative diseases and flavonoids: Special reference to kaempferol[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(4): 327–342.
- [23] YUAN Y, ZHAI Y, CHEN J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923.
- [24] ZHANG S S, LIU M, LIU D N, et al. Network pharmacology analysis and experimental validation of kaempferol in the treatment of ischemic stroke by inhibiting apoptosis and regulating neuroinflammation involving neutrophils[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12694.
- [25] LIAO Y, WANG J Y, PAN Y, et al. The protective effect of (-)-tetrahydroalstonine against OGD/R-induced neuronal injury via autophagy regulation[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2370.
- [26] TANG X, YAN T, WANG S Y, et al. Treatment with  $\beta$ -sitosterol ameliorates the effects of cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing cholesterol overload, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis[J]. *Neural Regeneration Research*, 2024, 19(3): 642–649.
- [27] 张梦杰, 方世才, 黄志华. GPER 调控缺血性脑卒中相关分子机制的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(6): 1121–1126.
- [28] PROSSNITZ E R, BARTON M. The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: An update[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2023, 19(7): 407–424.
- [29] YUE J, WANG X S, FENG B, et al. Activation of G-protein-coupled receptor 30 protects neurons against excitotoxicity through inhibiting excessive autophagy induced by glutamate[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, 10(10): 4227–4236.
- [30] DU Z R, GU Y, XIE X M, et al. GPER and IGF-1R mediate the anti-inflammatory effect of genistein against lipopolysaccharide (LPS)-induced nigrostriatal injury in rats[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 214: 105989.
- [31] MANABE S I, GU Z Z, LIPTON S A. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005, 46(12): 4747–4753.

(本文编辑 苏 维)