

基于 miRNA-mRNA 互作探讨化痰通络汤联合丁苯酞治疗脑梗死的潜在机制

龚翠兰¹, 杨仁义¹, 傅馨莹¹, 颜思阳¹, 刘峻呈¹, 周德生^{2*}

1. 常德市第一中医医院, 湖南 常德 415000

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410000

摘要:目的 采用GEO数据差异分析,探讨脑梗死疾病中可能存在的miRNA-mRNA互作模式,同时采用网络药理学方法,分析化痰通络汤联合丁苯酞在脑梗死疾病中的潜在机制,为中西医结合防治脑梗死疾病的深层机制进行探讨。方法 利用GEO、TargetScans、TCMSP、PubChem、Swiss Target Prediction数据库资源,采用Cytoscape 3.7.2、R语言软件,对脑梗死疾病中可能存在的miRNA-mRNA互作关系、化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点、具体miRNA-mRNA互作模式在联合用药中的调控机制进行探讨。结果 脑梗死疾病中可能存在145个差异基因与32个miRNA构成520组miRNA-mRNA互作关系;化痰通络汤能单独调控14个靶点,如FGF2、STAT3、IL1B、JUN等,化痰通络汤与丁苯酞能联合调控4个靶点: HMOX1、TSPO、ICAM1、SELE; PPI、GO、KEGG富集及miRNA-mRNA-KEGG关联分析结果显示,联合用药能调节73组miRNA-mRNA互作关系,在6个细胞组分,通过5个分子功能,介导16条通路,在脑梗死的76个生命进程中发挥作用。结论 脑梗死疾病中可能存在520组miRNA-mRNA互作关系,其中化痰通络汤联合丁苯酞的能调控其中73组miRNA-mRNA互作关系,以多组分、多功能、多途径的形式,介导TNF、p53、NF-κB、HIF-1等信号通路,在脑梗死疾病中发挥作用。

关键词: 差异分析; miRNA; mRNA; 网络药理学; 化痰通络汤; 丁苯酞

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)01-0078-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.01.011

Based on miRNA-mRNA interaction to explore potential mechanism of Huatan Tongluo Decoction combined with butylphthalide in treatment of cerebral infarction

GONG Cuilan¹, YANG Renyi¹, FU Xinying¹, YAN Siyang¹, LIU Juncheng¹, ZHOU Desheng²

1. The First Traditional Chinese Medicine Hospital of Changde City, Changde 415000, China

2. The First Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410000, China

Abstract: Objective To explore the possible interaction mode of miRNA-mRNA in cerebral infarction disease by using GEO data difference analysis, and to analyze the potential mechanism of Huatan Tongluo Decoction combined with butylphthalide in cerebral infarction disease by means of network pharmacology, so as to explore the deep mechanism of integrated traditional Chinese and western medicine in the prevention and treatment of cerebral infarction disease. **Methods** Using the database resources of GEO, TargetScans, TCMSP, PubChem and SwissTargetPrediction, and using Cytoscape3.7.2 and R language software, the possible miRNA-mRNA interaction relationship in cerebral infarction, the therapeutic target of Huatan Tongluo decoction combined with butylphthalide and the regulation mechanism of specific miRNA-mRNA interaction mode in the combined use of drugs were discussed. **Results** There may be 145 differential genes and 32 miRNA in cerebral infarction to form 520 miRNA-mRNA interaction relationship, Huatan Tongluo decoction can regulate 14 targets alone, such as FGF2, STAT3, IL1B, JUN, etc. Huatan

收稿日期: 2020-07-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81874463);湖南省科技厅科技创新平台与人才计划(2017SK4005);湖南省财政中医药项目名院工程 院内优势病种项目(rsk-010-013/006-09);常德市科技局项目(2018SK08);湖南省中医药管理局资助项目(201824; 202046;2020037)。

第一作者: 龚翠兰(1983—),女,硕士,副主任医师,研究方向为神经系统疾病的中西医结合防治。E-mail:719267108@qq.com

***通信作者:** 周德生(1966—),博士,主任医师,教授,研究方向为中医药防治脑血管病。E-mail:zds1101@foxmail.com

Tongluo Decoction and butylphthalide can jointly regulate four targets, such as HMOX1, TSPO, ICAM1, SELE. The results of PPI, GO, KEGG enrichment and miRNA-mRNA-KEGG correlation analysis showed that the combination of drugs could regulate the interaction of miRNA-mRNA in 73 groups, and that six cellular components, 16 pathways, through five molecular functions, to play a role in 76 life processes of cerebral infarction. **Conclusion** There may be 520 groups of miRNA-mRNA interactions in cerebral infarction diseases. Huatan Tongluo Decoction combined with butylphthalide can regulate 73 groups of miRNA-mRNA interactions, mediate TNF, p53, NF- κ B, HIF-1 and other signal pathways in the form of multi-components, multi-functions and multi-pathways, and play a role in cerebral infarction diseases.

Key words: difference analysis; miRNA; mRNA; network pharmacology; Huatan Tongluo Decoction; butylphthalide

脑梗死又称“缺血性卒中”,属“缺血中风”范畴,是局部脑血流障碍,导致脑组织缺血缺氧,出现相应神经功能缺损症状的疾病,是老年人常见病、多发病,具有高致残、高致死的特点,严重影响和危害人类健康,脑梗死的防治具有重要的社会意义。脑梗死超早期(小于6 h)[重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)、尿激酶]溶栓^[1]和/或桥接机械取栓是目前治疗脑梗死最为有效手段,但严格的时间窗限制了溶栓比率、出血转化限制了治疗效果,因此中西医结合联合用药在治疗上具有重要地位。

最新脑梗死中西医结合诊治指南(2017)^[2]指出,急性脑梗死中经络期风痰阻络证者,以突发半身不遂、偏身麻木、痰多而黏,脉弦等症状为主要表现,以熄风化痰,活血通络之法,方用化痰通络汤治之。西医治疗上,具有溶栓禁忌症的患者,改善脑循环对早期疾病恢复具有重要作用,临床上常使用丁苯酞改善缺血区侧支循环,促进血管新生,对于神经功能损伤具有良好的改善作用,临床上脑梗死早期常采用化痰通络汤联合丁苯酞治疗,且取得了较好的临床疗效^[3-4]。

为进一步探讨化痰通络汤联合丁苯酞在临床治疗中的潜在靶点及相互作用机制,本研究拟采用生物信息学方法,结合miRNA靶向mRNA转录后翻译的miRNA-mRNA互作机制,分析二者联合用药治疗脑梗死的潜在机制,为中西医结合治疗脑梗死提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 差异miRNA(DEMs)与靶基因的获取

通过美国国家图书馆(NCBI)基因表达综合数据库GEO子数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以“Cerebral infarction”或“Cerebral ischemia”为检索词,下载GSE97532数据集脑梗死miRNA表达矩阵文件。采用R语言limma包对表达矩阵进行差异分析,以 $|\lgFC| > 1$, P 值 < 0.05 为筛选条件确定DEMs。通过TargetScans(<http://www.targetscan.org>)数据库,对DEMs下游靶基因进行预测,以获取DEMs的下游靶基因。

1.2 差异靶基因(DETGs)的获取

通过NCBI基因表达综合数据库GEO子数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以“Cerebral infarction”或“Cerebral ischemia”为检索词,获取GSE97537数据集,下载脑梗死模型(MCAO)组与假手术(Sham)组芯片数据,即MCAO组:GSM2571735、GSM2571736、GSM2571737、GSM2571738、GSM2571739、GSM2571740、GSM2571741,共7组;Sham组:GSM2571742、GSM2571743、GSM2571744、GSM2571745、GSM2571746,共5组。采用R语言limma包对表达矩阵进行差异分析,以 $|\lgFC| > 1$; P 值 < 0.05 为筛选条件确定差异基因(Differential Expression Genes, DEGs)。

取DEGs与DEMs下游靶基因两者的交集,并利用韦恩图进行可视化,获取差异靶基因(Differential Expression Target Genes, DETGs)。

1.3 miRNA-mRNA互作关系构建

在“1.1”项DEMs与其下游靶基因的对应关系中,反向寻找DETGs的上游miRNA,形成miRNA-mRNA的互作关系,通过Cytoscape 3.7.2对miRNA-mRNA互作关系进行可视化。

1.4 化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点获取及“靶点-miRNA”互作关系构建

化痰通络汤与丁苯酞有效成分及结构式收集:(1)采用TCMSP^[5](<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)数据库,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$;药物类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选条件^[6],获取化痰通络汤中茯苓、半夏、白术、天麻、天南星、天竺黄、丹参、香附、大黄、三七10味中药有效成分。(2)采用PubChem^[7](<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库收集化痰通络汤有效成分及消旋-3-正丁基苯酞SDF结构式。

化痰通络汤与丁苯酞潜在药物靶点收集:采用Swiss Target Prediction^[8](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库,将结构式导入,获取化痰通络汤与丁苯酞的潜在药物靶点。

取DETGs与潜在药物靶点的交集,采用韦恩图可视化,获取化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点。同时根据DEMs与其下游靶基因的对应关系,构建治疗靶点与miRNA之间的“靶点-miRNA”互作关系。

1.5 化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点PPI网络构建及拓扑分析

通过String^[9](<https://string-db.org/>)数据库,将化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点导入数据库,获取PPI相关信息。利用Cytoscape 3.7.2软件对PPI信息进行网络可视化,并对PPI网络进行Degree、Betweenness、Closeness算法拓扑分析。

1.6 治疗靶点GO、KEGG富集及“miRNA-mRNA-KEGG”关联分析

通过DAVID^[10-11](<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)数据库,将化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点导入,进行GO、KEGG富集分析,获取生物进程(Biological Process, BP)、细胞组分(Cellular Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)及KEGG富集分析数据。

利用KEGG通路中富集的相关靶点,根据DEMs与其下游靶基因的对应关系,寻找调控的miRNA,构建“miRNA-mRNA-KEGG”关联性桑基图。

2 结果

2.1 DEMs及其靶基因结果

通过GEO数据库,下载GSE97532数据集脑梗死miRNA表达矩阵文件,其中包括MCAO组: GSM2571675、GSM2571676、GSM2571677, Sham组: GSM2571678、GSM2571679、GSM2571680。采用R语言limma包对表达矩阵进行差异分析,以 $|\lgFC| > 1$ 、 P 值 < 0.05 为筛选条件获取DEMs,见表1。共获取36个DEMs,其中miR-107-5p、miR-191b、miR-883-3p等 $\lgFC > 1$ 的9个miRNA在MCAO中表达上调;miR-6327、miR-146a-3p、miR-429等 $\lgFC < -1$ 的27个miRNA在MCAO中表达下调。

通过TargetScans数据库,对36个DEMs的下游靶基因进行预测,以获取其下游靶基因,去除重复值保留唯一值后,共获取14 221个DEMs靶基因。

表1 GSE97532差异miRNA分析结果

Table 1 Results of GSE97532 differential miRNA analysis

miRNA	P值	lgFC	miRNA	P值	lgFC
miR-107-5p	0.027 581	2.514 780	miR-410-5p	0.042 748	-1.284 85
miR-191b	0.005 505	1.484 599	miR-344b-1	0.046 682	-1.306 54
miR-883-3p	0.028 256	1.389 285	miR-873-3p	0.032 877	-1.352 30
miR-208a-3p	0.041 513	1.344 865	miR-203a-5p	0.006 241	-1.401 12
miR-3552	0.000 343	1.292 740	miR-377-3p	0.038 176	-1.428 68
miR-126b	0.041 671	1.092 200	miR-127	0.003 683	-1.450 89
miR-181a-2-3p	0.000 206	1.069 723	miR-429	0.027 078	-1.462 60
miR-23b-5p	0.017 919	1.037 473	miR-137-3p	0.000 230	-1.518 26
miR-6323	0.014 763	1.014 626	miR-3590-5p	0.026 596	-1.579 13
miR-206	0.010 380	-1.003 480	miR-10b	0.043 222	-1.609 06
miR-9a-5p	0.038 913	-1.029 660	miR-153-5p	0.003 118	-1.639 65
miR-883-5p	0.006 430	-1.035 600	miR-499	0.030 562	-1.649 15
miR-666-3p	4.15×10^{-5}	-1.087 590	miR-194-1	0.013 113	-1.747 28
miR-325	0.004 300	-1.152 57	miR-743a	0.031 042	-1.836 14
miR-3591	0.049 392	-1.175 27	miR-201-3p	0.039 090	-1.955 36
miR-544	0.017 559	-1.208 09	miR-6327	0.000 423	-1.993 03
miR-6320	0.030 925	-1.236 76	miR-146a-3p	0.004 192	-2.139 24
miR-542-3p	0.025 790	-1.276 86	miR-429	0.024 081	-2.209 69

2.2 DETGs结果分析

通过GEO数据库,下载GSE97537数据集脑梗死mRNA表达矩阵文件,其中包括MCAO组: GSM2571735、GSM2571736、GSM2571737、GSM257

1738、GSM2571739、GSM2571740、GSM2571741; Sham组: GSM2571742、GSM2571743、GSM2571744、GSM2571745、GSM2571746。采用R语言limma包对表达矩阵进行差异分析,以 $|\lgFC| > 1$ 、 P 值 $<$

0.05 为筛选条件获取 DEGs。结果中共有 203 个 DEGs, 其中 HSPB1、GFAP、CD14 等 198 个 mRNA 在 MCAO 中表达上调; SYNDIG1L、OLR59、PAMR1 等 5 个 mRNA 在 MCAO 中表达下调。

取 203 个 DEGs 与 14 221 个 DEMs 靶基因两者的交集, 并利用韦恩图进行可视化(图 1), 共获取 145 个 DETGs, 具体结果见表 2。

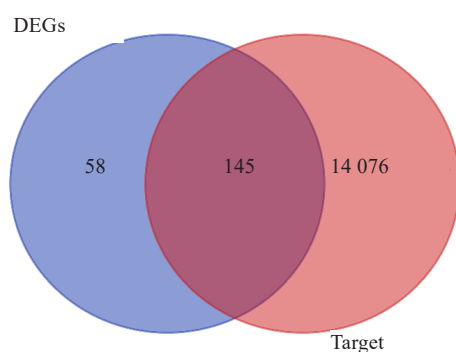


图 1 DEGs 与 DEMs 靶基因交集韦恩图

Fig. 1 Wayne map of intersection of DEGs and Dems target genes

2.3 miRNA-mRNA 互作关系结果

根据“1.1”项中 DEMs 与其下游靶基因的对应关系, 反向寻找 DETGs 的上游 miRNA, 形成 miRNA-mRNA 的互作关系, 结果显示, 145 个 DETGs 中有 11 个与 miR-9a-5p、10 个与 miR-107-5p、25 个与 miR-10b-3p、29 个与 miR-126b、0 个与 miR-127-3p、3 个与 miR-137-3p、28 个与 miR-146a-3p、38 个与 miR-153-5p、18 个与 miR-181a-2-3p、7 个与 miR-191b、5 个与 miR-194-5p、24 个与 miR-201-3p、15 个与 miR-203a-5p、3 个与 miR-206-3p、0 个与 miR-208a-3p、15 个与 miR-23b-5p、21 个与 miR-325-3p、1 个与 miR-344b-1-3p、25 个与 miR-3552、21 个与 miR-3590-5p、27 个与 miR-3591、14 个与 miR-377-3p、6 个与 miR-410-5p、0 个与 miR-429、; 2 个与 miR-499-5p、2 个与 miR-542-3p、23 个与 miR-544-3p、18 个与 miR-6320、19 个与 miR-6323、15 个与 miR-6327、24 个与 miR-666-3p、14 个与 miR-743a-3p、15 个与 miR-873-3p、17 个与 miR-883-3p、25 个与 miR-883-5p 构成 miRNA-mRNA 互作关系。

表 2 DEGs 与 DEMs 靶基因交集的 DETGs

Table 2 DETGs of target gene intersection between DEGs and DEMs

DETs	DETs	DETs	DETs	DETs	DETs	DETs	DETs	DETs	DETs
CDK1	CXCL1	TPM4	SOX7	HMOX1	SELE	GADD45A	TNFAIP6	S100A10	S100A6
SOCS3	GFAP	INHBA	MDFIC	SYNDIG1L	PLA1A	CLEC7A	TNFRSF1A	NES	SPRR1A
GADD45B	TFPI2	SRXN1	HSPB8	PDLIM4	STAT3	CD74	MGP	IL11	FBN1
ANXA2	CDKN3	ADAMTS1	CHSY1	TGIF1	CAPG	LOX	GPX2	CTS2	CCL2
TMBIM1	CLCF1	ICAM1	FCGR2B	IL1B	SFN	RPS27L	CSRNP1	JUN	S100A11
ITGAX	HSPB1	SERPINE1	TAGLN2	CYP1B1	SLC6A20	LCP1	MYC	RBP1	GPR88
ODC1	MYL12A	UPP1	CCL7	FGL2	TNFRSF12A	ADM	CXCL2	FOSL1	ANGPT2
MRPS6	SBNO2	YBX3	RUNX1	ANXA1	IFRD1	FCER1G	FXYD5	S100A9	TAGLN
IGFBP3	RRAD	CEBPB	VIM	TGM2	PDPN	IFITM1	RAB32	RHOC	TNC
MAFF	CEBPD	GEM	PTBP1	ATF3	GADD45G	S1PR3	CDKN1A	PLIN2	TSPO
MSN	SPP1	CCL3	CDO1	LBP	IFITM3	PLEK	MT2A	NEK6	PMEP1
GPNMB	PTGS2	TGFBI	SDC1	CNN3	FOS	FLNC	PROCR	IER3	KLF10
FBXO27	RGS1	CD44	PAMR1	LITAF	TUBB6	SDC4	CH25H	FCGR3A	CXCL16
PLP2	CNN2	NCF4	CD63	EMP1	FGF2	MYD88	ESM1	BAG3	CP
HBEGF	ANGPTL4	DUSP5	PRSS23	CCL20					

通过 Cytoscape 3.7.2 对 miRNA-mRNA 互作关系进行可视化(图 2)。此网络图中共有 177 个节点, 520 条边, 即 145 个 DETGs 与 32 个 miRNA 构成 520 组互作关系。

2.4 化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点及“靶点-miRNA”互作关系构建结果

通过 TCMSP、PubChem、Swiss Target Prediction

数据库对化痰通络汤及消旋-3-正丁基苯酞的潜在药物靶点进行预测, 本次共获取化痰通络汤潜在药物靶点 824 个, 丁苯酞潜在药物靶点 108 个。

采用韦恩图取化痰通络汤及丁苯酞潜在药物靶点与 DETGs 的交集(图 3-A), 韦恩图结果显示, 丁苯酞能调控 miRNA-mRNA 互作关系中的

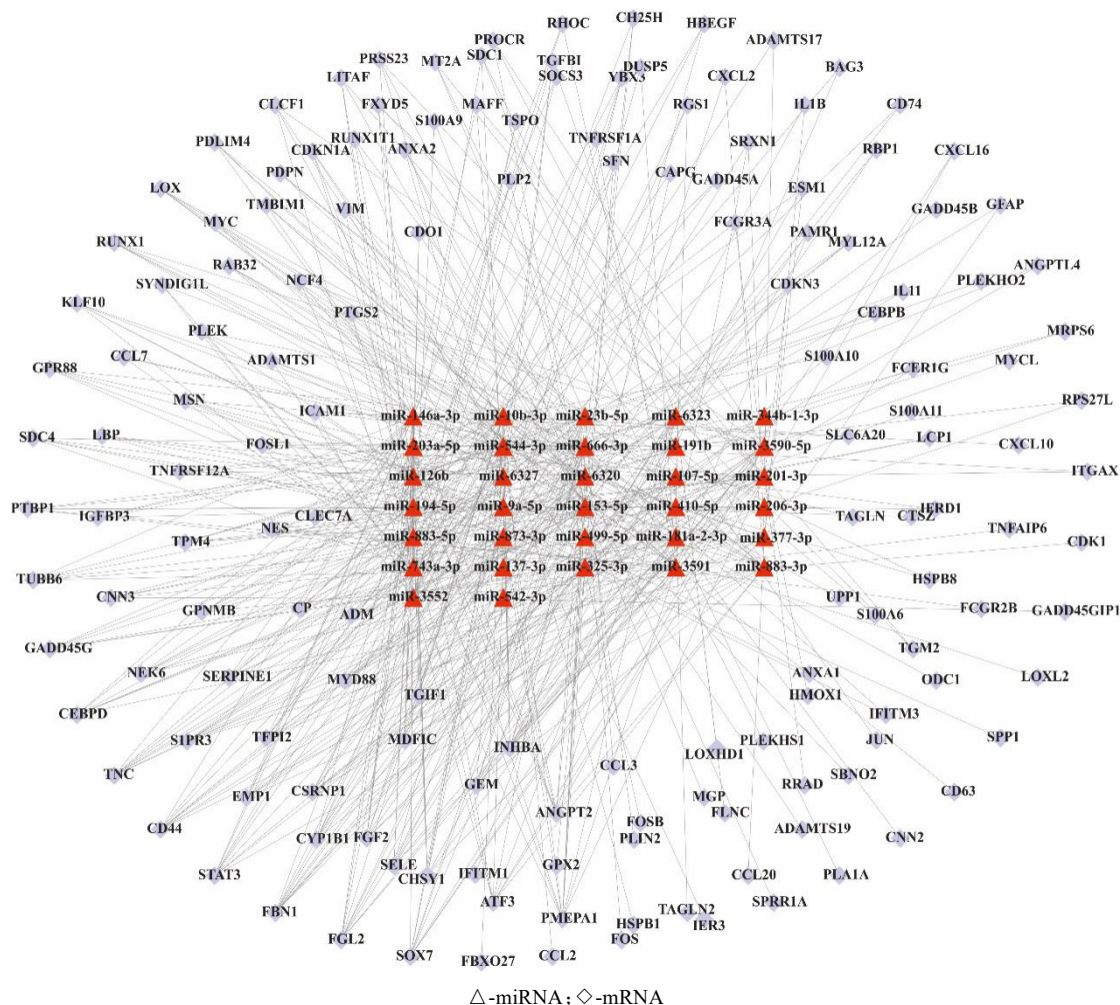
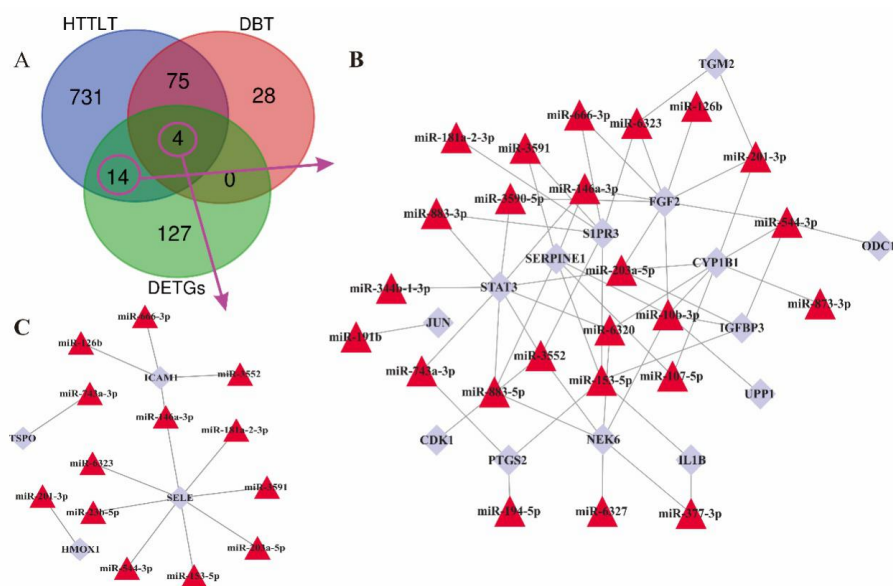


图2 miRNA-mRNA 互作关系
Fig. 2 miRNA-mRNA interaction



A-huatan Tongluo Decoction "target miRNA" diagram; B-wayne map; C-butyphthalide "target miRNA" diagram; △-miRNA; ◇-target mRNA

图3 化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点与 DETGs 韦恩图及互作关系
Fig. 3 Therapeutic targets of Huatan Tongluo Decoction combined with butylphthalide and their interaction with DETGs

HMOX1、TSPO、ICAM1、SELE 靶点在脑梗死疾病中发挥作用,同时这4个靶点与化痰通络汤调控 miRNA-mRNA 互作关系的靶点有重合部分,故可认为此4个靶点为联合用药协同增益效应的主要靶点;化痰通络汤能调控 miRNA-mRNA 互作关系中,除与丁苯酞共有的4个靶点外,其余的14个靶点,如 FGF2、STAT3、IL1B、JUN 等。

分别在 DEMs 与其下游靶基因的对应关系中,寻找化痰通络汤与丁苯酞治疗靶点的 miRNA,并构建“靶点-miRNA”互作图(图 3-B、C)。图 3-B 结果中共有 38 个节点,59 条边,即 14 个单独的化痰通络汤靶点对应 24 个 miRNA,共有 59 组互作关系;图 3-C 结果中共有 17 个节点,14 条边,即 4 个化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点对应 13 个 miRNA,共有 14 组互作关系。

2.5 化痰通络汤联合丁苯酞治疗靶点 PPI 网络构建及拓扑分析结果

通过 String 数据库,获取 PPI 相关信息,利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 PPI 信息进行网络可视化(图 4-A),并对 PPI 网络进行 Degree(图 4-B)、Betweenness(图 4-C)、Closeness(图 4-D)算法拓扑分析。结果显示,在 PPI 网络图中,共有 18 个节点,92 条边,即 18 个靶点之间可相互作用,共有 92 组互

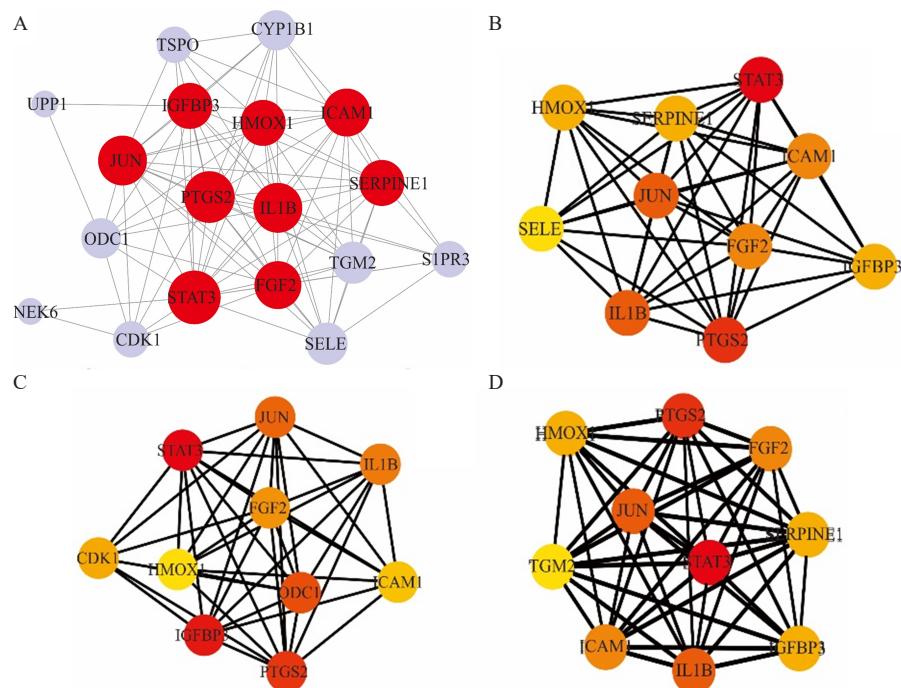
作关系,拓扑分析结果见表 3,拓扑分析结果中 Degree 算法共有 10 个节点,43 条边;Closeness 算法共有 10 个节点,44 条边;Betweenness 算法共有 10 个节点,40 条边。

表 3 Degree、Betweenness、Closeness 算法分析结果
Table 3 Analysis results of Degree, Betweenness and Closeness algorithm

Degree		Closeness		Betweenness	
靶点	评分	靶点	评分	靶点	评分
STAT3	16	STAT3	16.5	STAT3	36.685 06
PTGS2	15	PTGS2	16.0	IGFBP3	22.157 58
JUN	14	JUN	15.5	PTGS2	12.685 06
IL1B	14	IL1B	15.5	ODC1	12.499 57
FGF2	13	FGF2	15.0	JUN	9.027 922
ICAM1	13	ICAM1	15.0	IL1B	8.418 398
SERPINE1	12	SERPINE1	14.5	FGF2	7.116 667
HMOX1	12	HMOX1	14.5	CDK1	6
IGFBP3	12	IGFBP3	14.5	ICAM1	5.469 913
SELE	10	TGM2	13.5	HMOX1	4.319 913

2.6 治疗靶点 GO、KEGG 富集及“miRNA-靶点-KEGG”关联分析结果

通过 DAVID 数据库^[10-11],获取化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点、生物进程(biological process,



A-PPI网络图;B-Degree拓扑分析图;C-Betweenness拓扑分析图;D-Closeness拓扑分析图

A-PPI network diagram; B-Degree topology analysis diagram; C-Betweenness topology analysis chart; D-Closeness topology analysis chart

图4 治疗靶点 PPI 网络图及拓扑分析图

Fig. 4 PPI network and topological analysis of therapeutic targets

BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及 KEGG 富集分析数据。如图 5 所示, BP 结果中治疗靶点共富集平滑肌细胞增殖正调控、细胞增殖负调控、血管生成正调控、炎症反应、RNA 聚合酶 II 启动子的 Pri-miRNA 转录正调控等 76 个; CC 结果中治疗靶点共富集细胞外空间、小窝、胞浆等 6 个; MF 结果中治疗靶点共富集血红素结合、蛋白质结合、信号传导活性等 5 个; KEGG 结果中治疗靶点共富集 TNF 信号通路、p53 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路等

16 条信号通路, 根据 P 值选出 BP 中前 30 位及 CC、MF、KEGG 的全部结果, 对选定的 GO、KEGG 结果中 P 值取 $-\lg P$, 并作为横坐标, 绘制 GO、KEGG 条形图。结果见图 5。

综合文献报道及 $P < 0.05$, 挑选出 TNF 信号通路、p53 信号通路、NF- κ B 信号通路、HIF-1 信号通路, 并对其进行关联性分析。利用 KEGG 通路中富集的相关靶点, 根据 DEMs 与其下游靶基因的对应关系, 寻找调控的 miRNA, 构建“miRNA-mRNA-KEGG”关联性桑基图 (图 6)。

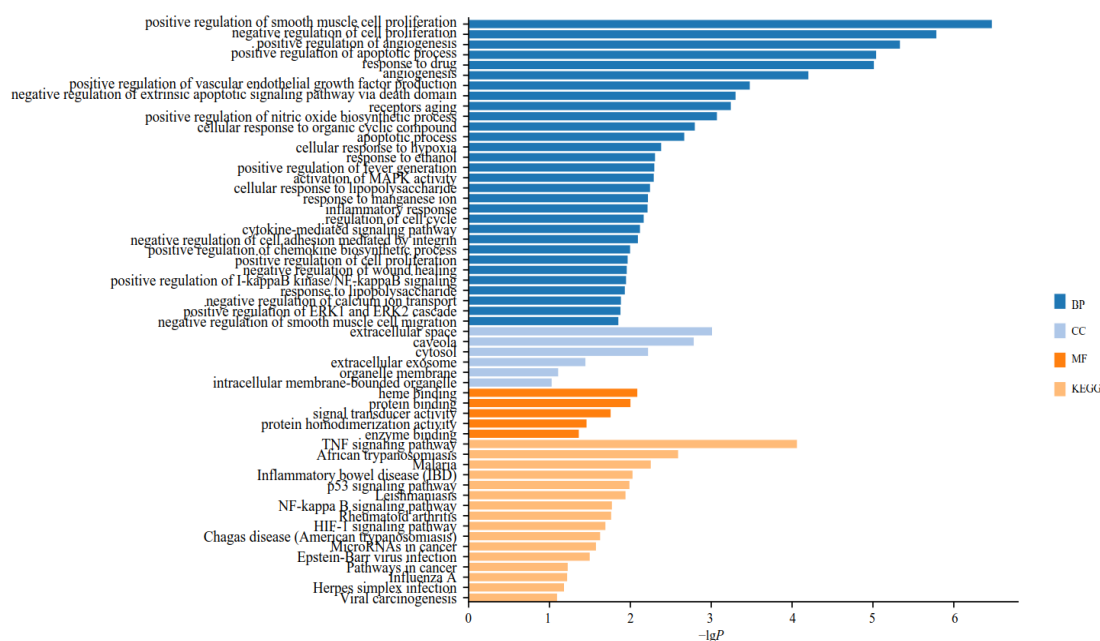


图 5 GO、KEGG 富集分析图

Fig. 5 Enrichment analysis of GO and KEGG



图 6 miRNA-mRNA-KEGG 关联性桑基图

Fig. 6 Sangji map of miRNA-mRNA-KEGG association

3 讨论

脑梗死又称“缺血卒中”,属中医“缺血中风”范畴,病机总属本虚标实,病因不外乎风、火、痰、热、瘀、气、血、虚,以肝肾阴虚、气血亏虚为本,风火痰热瘀为标。中风风痰阻络之证,肝脾肾虚,精微气血不足或运化无力,聚湿成痰,痰湿内停,瘀血内生,痰瘀阻滞脑络,发为中风,治疗上当以熄风化痰,活血通络之化痰通络汤治之。《中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)》^[2]与《中国急性缺血性脑卒中诊治指南(2018)》^[1]指出脑梗死急性期推荐(Ⅱ级推荐,B级证据)使用丁苯酞改善脑侧支循环,阻止脑梗死灶的进一步扩大,同时指明中西医结合应用能协同增效。因此,针对脑梗死早期具有溶栓禁忌症患者,采用化痰通络汤与丁苯酞联合应用是促进病情恢复的重要手段。

miRNA是一类长度为20个核苷酸左右的非编码小RNA,能与目的基因的mRNA的3'端非编码区(3' UTR)互补配对,靶向抑制目的基因的转录后翻译过程。随着芯片及高通量测序技术的快速发展,预测发现miRNA-mRNA互作模式在多种疾病中发挥作用^[12-13],同时部分miRNA被实验证实能在机体生理病理过程中发挥作用。Wang等^[14]通过体内、体外实验证实miR-182-5p-TLR4互作模式能抑制下游TNF信号通路中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 因子的表达,减轻脑梗死后的炎症反应。Sun等^[15]与Zhang等^[16]研究证实miR-210与miR-433能与HIF-1 α 形成miRNA-mRNA互作模式,在调控脑梗死的神经细胞凋亡中发挥作用。因此miRNA-mRNA互作模式能调控基因的表达,介导下游诸多信号通路(如PI3K/AKT通路^[17]、TNF通路、HIF-1信号通路等),调节胚胎发育、细胞增殖、细胞死亡等多种生命进程,在心脑血管疾病、肿瘤^[18]、糖尿病^[19]等多种疾病中发挥重要作用。

本研究通过GEO数据差异分析,获取脑梗死疾病中差异表达的miRNA及mRNA,以miRNA-mRNA互作为基点,构建差异表达的miRNA-mRNA互作网络;同时结合网络药理学的方法,分析化痰通络汤联合丁苯酞在脑梗死疾病中的治疗靶点及相互作用,并探讨治疗靶点通过miRNA-mRNA互作模式介导下游通路,在多组分、多功能、多生命进程中发挥作用,为中西医结合治疗脑梗死疾病提出理论和实践依据。

本研究通过R语言limma包对GEO数据库中GSE97532、GSE97537表达矩阵进行差异分析,共获

取miR-107-5p、miR-191b、miR-883-3p等9个DEMs miRNA表达上调;miR-6327、miR-146a-3p、miR-429等27个DEMs miRNA表达下调;HSPB1、GFAP、CD14等198个DEGs mRNA表达上调;SYNDIG1L、OLR59、PAMR1等5个DEGs mRNA表达下调,通过TargetScans数据库算法预测36个DEMs共14221个靶基因,取靶基因与DEGs的交集,从而得到32个DEMs调控145个DEGs的miRNA-mRNA互作关系共520组。Takuma等^[20]通过对脑梗死大鼠模型全血DNA芯片分析,发现miR-107-5p与H2AFZ、miR-196b-5p与PTPRC、miR-3552与SRSF2之间存在相互作用。Wang等^[21]采用荧光素酶报告基因实验及RT-PCR法,证明miR-9a-5p能靶向ATG5,抑制脑梗死大鼠的自噬性损伤。Lee等^[22]研究发现miR-429能靶向PHD2在脑梗死大鼠模型中发挥神经保护作用;Xiao等^[23]研究发现miR-429靶向GATA4在脑梗死神经细胞模型中具有脑保护作用;同时Yang等^[24]研究发现miR-429能负调控Notch1信号通路,抑制脑梗死神经细胞凋亡。因此,本研究中的520组miRNA-mRNA互作关系可为脑梗死精准治疗提供靶点,为临床和基础研究提供理论支撑。

进一步通过网络药理学方法,获取化痰通络汤与丁苯酞的潜在药物靶点,与DEGs取交集,分析出化痰通络汤与丁苯酞单用/联用的治疗靶点。同时对化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点进行反向寻找miRNA,及PPI、GO、KEGG分析,以明确其在脑梗死疾病中调控miRNA-mRNA互作关系的作用机制。本研究共筛选出药物作用共同靶点18个,其中化痰通络汤单独靶点14个,化痰通络汤联合丁苯酞共同靶点4个,可认为共同靶点为联合用药协同增益效应的主要靶点,为后续实验验证提供了生物信息学依据。14个化痰通络汤单独靶点共对应24个miRNA,构成59组miRNA-mRNA互作关系;4个联合用药共同靶点共对应13个miRNA,构成14组miRNA-mRNA互作关系。同时,对18个共同靶点在同一蛋白层次进行PPI分析,获得92组蛋白-蛋白互作关系。进一步行拓扑分析显示,蛋白互作主要与STAT3、JUN、IL1B、FGF2等蛋白有关。已有研究发现miR-216a能抑制JAK2/STAT3信号通路,参与神经细胞凋亡与炎症途径,在脑梗死疾病中发挥脑保护作用^[25];miR-210能靶向SOCS1,上调STAT3、VEGF的表达,在脑梗死后血管新生与神经再生中发挥作用^[26]。Wang等研究发现丁苯酞能激活HIF-

1 α /VEGF/Notch/Dll4 信号通路,促进脑梗死大鼠神经功能恢复^[27],同时研究发现化痰通络汤能上调脑梗死患者血清 VEGF 水平,改善神经功能^[28];也能抑制脑梗死大鼠 MMP9 的表达^[29],明显改善大鼠神经功能。研究证实有效成分黄芩素能通过降低 NF- κ B 的 I κ B α 磷酸化与 p65 的核转位,减少促炎因子 IL-6、IL-18 释放;还能降低 LC3-II/LC3-I 比值,促进 PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化,抑制自噬,从而减轻缺血再灌注大鼠神经炎症、细胞自噬,对脑梗死损伤发挥神经保护作用^[30]。因此,化痰通络汤联合丁苯酞可能通过调控 miRNA-mRNA 与蛋白互作关系,激活下游通路,在多途径中发挥脑梗死后神经及血管修复作用。

GO、KEGG 富集与 miRNA 关联分析结果显示,化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点能调控 miRNA-mRNA 互作,在多组分、多通路、多生命进程中起作用,主要在细胞外基质、胞浆等细胞组分中,影响 miR-107-5p、miR-153-5p、miR-201-3p 等 miRNA 靶向下游 IL1B、JUN、STAT3 等蛋白,介导 TNF、p53、NF- κ B、HIF-1 等信号通路,调控平滑肌细胞增殖、细胞凋亡、血管生成、炎症反应等生命进程,在脑梗死疾病中发挥作用。研究发现丁苯酞能介导 NF- κ B 信号通路,抑制 NF- κ B p65 活化,降低 IL-6、TNF- α 表达水平,对缺血性脑卒中具有保护作用^[31];李浪等^[32]研究发现,化痰通络汤联合西医常规疗法,能降低患者 TNF- α 、IL-6 表达水平,从而改善临床症状,提高患者生活质量。但是尚未报道化痰通络汤与丁苯酞单用/联用,影响 TNF、p53、NF- κ B、HIF-1 等信号通路上游的 miRNA-mRNA 互作,从而在脑梗死疾病中发挥作用。因此,结合本研究结果认为化痰通络汤联合丁苯酞能通过调控 miR-107-5p-SERPINE1/IGFBP3,介导 HIF/P53 等信号通路;或调控 miR-883-5p-STAT3/SERPINE1,介导 HIF/P53 等信号通路,余 miRNA-mRNA-KEGG 结果可根据桑基图类推,本研究为化痰通络汤联合丁苯酞治疗脑梗死疾病提供了深层次的靶点互作关系,为进一步实验验证提供了理论依据。

本研究基于 GEO 数据差异分析,得出了脑梗死疾病中可能存在的 miRNA-mRNA 互作关系;结合网络药理学方法,筛选出化痰通络汤联合丁苯酞的治疗靶点;进一步通过共表达网络及富集分析,聚焦出具体 miRNA-mRNA 互作模式,及其在联合用药治疗脑梗死中的调控机制。脑梗死疾病中可能存在 520 组 miRNA-mRNA 互作关系,其中化痰通络

汤联合丁苯酞的能调控其中 73 组,以多组分、多功能、多途径的形式,介导 TNF、p53、NF- κ B、HIF-1 等信号通路,在脑梗死疾病中发挥作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2014 [J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4): 258-273.
Neurology branch, Chinese Medical Association, cerebrovascular disease group, neurology branch, Chinese Medical Association. Guidelines for secondary prevention of ischemic stroke and transient ischemic attack in China, 2014 [J]. Chin J Neurol, 2015, 48(4): 258-273.
- [2] 中国中西医结合学会神经科专业委员会.中国脑梗死中西医结合诊治指南 (2017) [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2):136-144.
Neurology Committee of Chinese society of Integrated Chinese and Western Medicine. Guidelines for diagnosis and treatment of cerebral infarction in China (2017) [J]. Chin J Integr Med, 2018, 38(2): 136-144.
- [3] 刘艳霞,路丹,徐天蛟.丁苯酞治疗急性脑梗死的疗效及药理分析 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(11): 32-33.
Liu Y X, Lu D, Xu T J. Efficacy and pharmacological analysis of butylphthalide in the treatment of acute cerebral infarction [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2016, 10(11): 32-33.
- [4] 张玮,马静萍.丁苯酞通过 NLRP3 炎症小体信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤后细胞焦亡的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(6): 898-902.
Zhang W, Ma J P. Effect of butylphthalide on cell death after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through NLRP3 inflammatory body signaling pathway [J]. Chin J Integr Med Cardio/ Cerebrovasc Dis, 2020, 18(6): 898-902.
- [5] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [6] 张彧,吴东升,徐寅,等.基于网络药理学分析半夏-黄芩-黄连治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 592-599.
Zhang Y, Wu D S, Xu Y, et al. Mechanism of *Pinellia baicalensis* *Coptidis* in the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastritis based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev, 2020, 32(4):

- 592-599.
- [7] Kim S, Chen J, Cheng T J, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1102-D1109.
- [8] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [9] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [10] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1-13.
- [11] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [12] Zhang H M, Zhang Q Y, Liao Z N. Microarray data analysis of molecular mechanism associated with stroke progression [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 67(3): 424-433.
- [13] Qu Y M, Sun X, Yan X L, et al. Identification of microRNAs and messenger RNAs involved in human umbilical cord mesenchymal stem cell treatment of ischemic cerebral infarction using integrated bioinformatics analysis [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(9): 1610-1616.
- [14] Wang J, Xu Z M, Chen X F, et al. MicroRNA-182-5p attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting Toll-like receptor 4 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 677-684.
- [15] Sun J J, Zhang X Y, Qin X D, et al. MiRNA-210 induces the apoptosis of neuronal cells of rats with cerebral ischemia through activating HIF-1 α -VEGF pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2548-2554.
- [16] Zhang L, Zhang Y X, Zhang X H, et al. MicroRNA-433 inhibits the proliferation and migration of HUVECs and neurons by targeting hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(2): 135-143.
- [17] Liang Z, Chi Y J, Lin G Q, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [18] Szebeni G J, Vizler C, Kitajka K, et al. Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 9294018.
- [19] Alicka M, Major P, Wysocki M, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from patients with type 2 diabetes show reduced "stemness" through an altered secretome profile, impaired anti-oxidative protection, and mitochondrial dynamics deterioration [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(6): E765.
- [20] Takuma A, Abe A, Saito Y, et al. Gene expression analysis of the effect of ischemic infarction in whole blood [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): E2335.
- [21] Wang N, Yang L, Zhang H X, et al. MicroRNA-9a-5p alleviates ischemia injury after focal cerebral ischemia of the rat by targeting ATG5-mediated autophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(1): 78-87.
- [22] Lee S T, Chu K, Jung K H, et al. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning [J]. *Stroke*, 2010, 41(8): 1646-1651.
- [23] Xiao J, Kong R R, Hu J Y. Inhibition of microRNA-429 attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal injury by promoting expression of GATA-binding protein 4 [J]. *Neuroreport*, 2018, 29(9): 723-730.
- [24] Yang C X, Zhang X C, Yin H Q, et al. MiR-429/200a/200b negatively regulate Notch1 signaling pathway to suppress CoCl₂-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 65: 104787.
- [25] Tian Y S, Zhong D, Liu Q Q, et al. Upregulation of miR-216a exerts neuroprotective effects against ischemic injury through negatively regulating JAK2/STAT3-involved apoptosis and inflammatory pathways [J]. *J Neurosurg*, 2018, 130(3): 977-988.
- [26] Meng Z Y, Kang H L, Duan W, et al. MicroRNA-210 promotes accumulation of neural precursor cells around ischemic foci after cerebral ischemia by regulating the SOCS1-STAT3-VEGF-C pathway [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(5): e005052.
- [27] Wang Y P, Shen Y F, Liu Z Y, et al. DL-NBP (dl-3-N-butylphthalide) treatment promotes neurological functional recovery accompanied by the upregulation of white matter integrity and HIF-1 α /VEGF/notch/Dll4 expression [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1595. Doi: 10.3389/fphar.2019.01595.
- [28] 王世彬, 程丽平, 李冲, 等. 自拟化痰通络汤治疗急性脑梗死的临床疗效及对血清 VEGF、Ang-2 水平的影响 [J]. *中医药导报*, 2015, 21(6): 100-103.
- Wang S B, Cheng L P, Li C, et al. Clinical efficacy of Huatan Tongluo Decoction in the treatment of acute cerebral infarction and its influence on serum VEGF and Ang-2 levels [J]. *Guid Tradit Chin Med*, 2015, 21(6): 100-103.

- [29] 吴相春, 王少卿, 唐 璐, 等. 化痰通络汤对MCAO大鼠脑组织ICAM-1、MMP9表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2964-2966.
- Wu X C, Wang S Q, Tang L, et al. Effect of Huatan Tongluo Decoction on the expression of ICAM-1 and MMP9 in brain tissue of MCAO rats [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2014, 29(9): 2964-2966.
- [30] Yang S L, Wang H G, Yang Y L, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109102.
- [31] 张晓璇, 朱 江, 李佳佳, 等. 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠脑组织NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(15):1825-1828, 1834.
- Zhang X X, Zhu J, Li J J, et al. Effects of butylphthalide on the expression of NF - κ B p65, IL-6 and TNF - α in cerebral tissue of rats with ischemic stroke [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(15): 1825-1828, 1834.
- [32] 李 浪, 李承芬. 化痰通络汤对急性脑梗死病人血清hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平的影响及疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(6): 970-972.
- Li L, Li C F. Effect of Huatan Tongluo Decoction on serum hs CRP, IL-6, TNF- α levels in patients with acute cerebral infarction and its curative effect observation [J]. Chin J Integr Med Cardio/ Cerebrovasc Dis, 2020, 18(6): 970-972.

[责任编辑 兰新新]