

基于网络药理学和分子对接技术探讨丹参治疗缺血性脑卒中的作用机制

王哲义^{1, 2, 3}, 孙泽泽¹, 刘碧原², 樊竹², 王春国⁴, 田金洲^{3*}, 卢涛^{2*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100010

4. 北京中医药大学 中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 利用网络药理学、分子对接技术, 筛选并分析丹参治疗缺血性脑卒中(CIS)的关键化合物、作用靶点、生物学功能及信号通路, 阐述其可能的作用机制。方法 使用TCMSP数据库检索丹参的活性成分及作用靶点, 在GeneCards、NCBI和OMIM数据库中获取CIS的靶点, 并将药物和疾病交集后的靶点输入STRING数据库, 构建蛋白质相互作用网络, 利用Cytoscape 3.7.2软件构建药物-化合物-作用靶点-疾病网络。通过Bioconductor进行GO功能富集和KEGG通路分析。采用AutoDock Tools 1.5.6、AutoDock vina 1.1.2将得到的关键活性成分和核心靶点进行分子对接, 运用Pymol和Ligplot软件对结果进行可视化。结果 从丹参中共筛选出65个活性成分和108个对应靶点, 以及CIS交集后获得靶点87个, 其中度值大于50的靶点有6个, 包括AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR, 即本研究的核心靶点。GO功能富集分析得到GO条目124个($P < 0.05$), KEGG通路富集分析筛出134条信号通路($P < 0.05$), 以PI3K-AKT信号通路所占靶点数目最多。构建的药物-化合物-作用靶点-疾病网络显示, 木犀草素、丹参酮II_A等活性化合物在整个网络中发挥着关键作用; 分子对接结果显示, 木犀草素、丹参酮II_A与6个核心靶蛋白均具有较好的亲和力(结合能远小于-5 kJ/mol)。结论 丹参的主要活性化合物, 包括木犀草素、丹参酮II_A等, 可作用于AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR等核心靶点, 共同参与调节PI3K-AKT等多条信号通路, 发挥抑制细胞凋亡、抗炎、神经保护等作用, 可能是丹参治疗CIS的潜在机制。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 丹参; 缺血性脑卒中; PI3K/AKT信号通路; 木犀草素; 丹参酮II_A

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2021)02-0344-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.02.013

Mechanism of *Salviae miltiorrhizae* in treatment of cerebral ischemic stroke based on network pharmacology and molecular docking techniques

WANG Zheyi^{1,2,3}, SUN Yize¹, LIU Biyuan², FAN Zhu², WANG Chunguo⁴, TIAN Jinzhou³, LU Tao²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100010, China

4. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To screen the key compounds, targets, biological functions and signal pathways of *Salviae miltiorrhizae* in treatment of cerebral ischemic stroke by using network pharmacology and molecular docking techniques, and to analyze the possible mechanism of action. **Methods** TCMSP database was employed to search for the active ingredients and targets of *Salviae miltiorrhizae*, as well as the targets of CIS were obtained in GeneCards, NCBI and OMIM database. Then drug targets and disease targets were overlapped, and put into STRING database to establish a protein interaction network. Moreover, drug-compound-target-disease network was constructed and GO function and KEGG pathway enrichment analysis were carried out in Bioconductor. With the aid of AutoDock Tools 1.5.6 and AutoDock vina 1.1.2, the key active ingredients and core targets were docked at molecular

收稿日期: 2020-07-23

基金项目: 北京市双一流高层次人才科研经费项目(1000041510053)

第一作者: 王哲义(1991—),男,博士研究生,研究方向为复杂性疾病的研究。E-mail: zheyi91@126.com

*通信作者: 卢涛(1968—),男,博士,研究方向为复杂性疾病的研究。E-mail: taolu@bucm.edu.cn

田金洲(1956—),男,博士,研究方向为神经变性的中医药防治。E-mail: jztian@hotmail.com

level, and the results were visualized by using Pymol and Ligplot software. **Results** A total of 65 active ingredients and 108 targets were selected out from *Salviae miltiorrhizae*, and 2 558 targets were collected related to CIS. After intersection, 87 targets were obtained, among which the degree value of 6 targets was greater than 50, including AKT1, IL6, FOS, VEGFA, MAPK1, EGFR, as the core targets of this study. A total of 124 GO entries and 134 signal pathways were identified, with the PI3K/AKT signal pathway occupying the largest number of targets. The results showed that luteolin and tanshinone II_A played a key role in the drug-compound-target-disease network and well connected to six core targets (binding energy is much less than -5 kJ/mol). **Conclusion** The main active compounds of *Salviae miltiorrhizae*, such as luteolin, tanshinone II_A, could target for AKT1, IL6, FOS, VEGFA, MAPK1, EGFR, and participated in the regulation of PI3K/AKT signaling pathway and many other pathways, responsible for anti-apoptosis, anti-inflammatory, neuroprotection and other biological functions, that may be potential mechanisms of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of CIS.

Key words: network pharmacology; molecular docking; *Salviae miltiorrhizae* Bge.; cerebral ischemic stroke; PI3K/AKT signaling pathway; luteolin; tanshinone II_A

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)约占所有脑卒中病例的87%,因其高发病率、高致残率、高死亡率和高复发率的特点,受到全球公共卫生的关注^[1-2]。卒中的特异性治疗包括改善脑循环(静脉溶栓、血管内治疗、抗血小板、抗凝、降纤、扩容)、他汀及神经保护等^[3-4]。其中重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)和血管内治疗是缺血性脑卒中的重要干预手段^[5]。虽然疗效确切,但因药物不良反应、治疗时间窗狭窄以及缺血再灌注损伤等,使其临床使用存在一定的局限性^[6]。

丹参是唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,味苦微寒,归心、肝经,活血兼能养血,《妇人明理论》记载丹参“补血生血,功过归地;调血敛血,力堪芍药;逐瘀生新,性倍川芎”,一味药物有四物之功。它在改善脑缺血再灌注损伤、改善血液流变学及血小板功能、保护心脑血管系统等方面有药理活性^[7-8],在治疗CIS的临床实践中应用广泛。但目前的研究主要集中在丹参单体成分,丹参的分子作用机制及各个成分间的相互作用有待进一步阐明。

网络药理学以系统生物学和药理学为基础,提供“多靶点、多通路、多环节”的新型网络模式,为中医从经验医学向循证医学转变提供了新的研究范式,已成为探索中药潜在机制的不可或缺的方法^[9-10]。分子对接是药物设计中最常用的方法之一,它能够预测小分子配体与靶结合位点的结合构象^[11]。本研究搜索丹参的有效成分和靶蛋白,构建靶标网络,确定网络中的核心靶点,并进行生物功能和通路富集分析,使用分子对接技术对丹参有效成分和核心靶点对接验证,以期在分子层面上探索丹参治疗CIS的可能药理学机制。

1 资料与方法

1.1 丹参主要活性化合物的筛选及作用靶点确定

本研究依托中药系统药理学分析平台^[12](TCMSP)检索丹参的主要活性化合物。设置口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18为筛选参数^[13]。利用该数据库查询丹参主要活性化合物的作用靶点,得到的靶点蛋白信息使用Uniprot^[14]数据库(<https://uniprot.org/>)进行标准化,进而得到丹参中活性化合物对应靶点的基因号。

1.2 CIS靶点的收集及潜在靶点预测

使用GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)及OMIM(<https://omim.org/>)数据库获取CIS靶点,选择物种为“Homo sapiens”,以“cerebral ischemic stroke”为关键词检索获取CIS的相关基因。使用Venny 2.1绘图软件,将药物预测的靶点与疾病的靶点进行映射,获得丹参治疗CIS的潜在作用靶点。

1.3 蛋白互作网络(PPI)、药物-化合物成分-作用靶点-疾病网络的构建

将潜在靶点通过STRING^[15](Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)数据库构建靶标蛋白互作(protein protein interaction, PPI)网络。利用Cytoscape 3.7.2软件构建药物-化合物成分-作用靶点-疾病网络。

1.4 靶点功能通路富集分析

将核心靶点基因进行功能富集和主要作用通路分析,使用Bioconductor生物信息软件包(<http://www.bioconductor.org/>),以 $P < 0.05$ 进行GO(Gene Ontology)富集^[16]和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析^[17],并对富集分析结果进行可视化处理。

1.5 成分-靶点分子对接

为进一步明确丹参中可能干预CIS的潜在活性成分,将“1.3”项中筛选出的核心化合物和核心靶点进行分子对接。在ZINC网站(<http://zinc.docking.org/>)下载化合物mol2格式。从PDB数据库^[18](<https://www.rcsb.org/>)下载靶蛋白的PDB格式结构,采用AutoDock Tools 1.5.6软件删除靶蛋白的水分子,分离配体和受体,添加非极性氢,计算Gasteiger电荷,保存为pdbqt格式的文件。将mol2格式的化合物导入AutoDock Tools 1.5.6,添加原子电荷,分配原子类型,所有柔性键均默认可旋转,保存为pdbqt格式,作为对接配体。运行AutoDock

Vina 1.1.2 软件^[19]进行对接,采用Pymol^[20]和Ligplot^[21]软件进行可视化处理。

2 结果

2.1 丹参主要活性化合物筛选及其作用靶点结果

本研究通过TCMSP平台检索得到丹参202个化合物,按照OB $\geq$ 30%,DL $\geq$ 0.18的条件,筛选出主要活性化合物65个,见表1。接着利用TCMSP数据库查询丹参主要活性化合物的调控靶点信息,共筛选出对应的作用靶点108个,通过Uniprot对靶点和基因信息进行标准化,运用Cytoscape3.7.2软件构建丹参成分-靶点网络(图1),菱形代表丹参有效成分,椭圆代表其作用靶点。

表1 丹参活性化合物基本信息

Table 1 Basic information of active compounds from *Salviae miltiorrhizae*

编号	化合物	OB/%	DL	MW
MOL007064	przewalskin B	110.32	0.44	330.46
MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	109.38	0.35	360.34
MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	88.54	0.26	314.31
MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	75.39	0.46	312.34
MOL007058	formyltanshinone	73.44	0.42	290.28
MOL007120	miltionone II	71.03	0.44	312.39
MOL007105	epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31	284.38
MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	65.26	0.45	310.37
MOL007130	prolithospermic acid	64.37	0.31	314.31
MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	62.78	0.40	356.40
MOL007068	przewaquinone B	62.24	0.41	292.30
MOL000569	digallate	61.85	0.26	322.24
MOL007081	danshenol B	57.95	0.56	354.48
MOL007082	danshenol A	56.97	0.52	336.41
MOL007069	przewaquinone C	55.74	0.40	296.34
MOL007108	isocryptotanshi-none	54.98	0.39	296.39
MOL007125	neocryptotanshinone	52.49	0.32	314.41
MOL007079	tanshinaldehyde	52.47	0.45	308.35
MOL007088	cryptotanshinone	52.34	0.40	296.39
MOL007094	danshenspiroketallactone	50.43	0.31	282.36
MOL007111	isotanshinone II	49.92	0.40	294.37
MOL007154	tanshinone II _A	49.89	0.40	294.37
MOL007119	miltionone I	49.68	0.32	312.39
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	49.4	0.29	298.41
MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	48.24	0.31	312.29
MOL007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester	46.69	0.71	628.64
MOL007156	tanshinone VI	45.64	0.30	296.34
MOL007141	salvianolic acid G	45.56	0.61	340.30
MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23	270.30
MOL007101	dihydrotanshinone I	45.04	0.36	278.32
MOL007115	manool	45.04	0.20	304.57

续表1

编号	化合物	OB/%	DL	MW
MOL007123	miltirone II	44.95	0.24	272.32
MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II _A	44.93	0.44	310.37
MOL001659	poriferasterol	43.83	0.76	412.77
MOL002651	dehydrotanshinone II _A	43.76	0.40	292.35
MOL007077	sclareol	43.67	0.21	308.56
MOL007142	salvianolic acid J	43.38	0.72	538.49
MOL007152	przewaquinone E	42.85	0.45	312.34
MOL007151	tanshindiol B	42.67	0.45	312.34
MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	41.31	0.45	312.34
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.86	0.23	264.34
MOL007071	przewaquinone F	40.31	0.46	312.34
MOL002776	baicalin	40.12	0.75	446.39
MOL007118	microstegiol	39.61	0.28	298.46
MOL006824	α -amyrin	39.51	0.76	426.8
MOL007124	neocryptotanshinone II	39.46	0.23	270.35
MOL007093	dan-shexinkum D	38.88	0.55	336.41
MOL007122	miltirone	38.76	0.25	282.41
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	38.75	0.36	280.34
MOL007100	dihydrotanshinolactone	38.68	0.32	266.31
MOL007063	przewalskin A	37.11	0.65	398.49
MOL007061	methylenetanshinquinone	37.07	0.36	278.32
MOL001771	poriferast-5-en-3 β -ol	36.91	0.75	414.79
MOL007121	multipolone	36.56	0.37	300.43
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	286.25
MOL002222	sugiol	36.11	0.28	300.48
MOL007107	C09092	36.07	0.25	286.50
MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	34.72	0.37	280.29
MOL007149	NSC 122421	34.49	0.28	300.48
MOL007049	4-methylenemiltirone	34.35	0.23	266.36
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	33.77	0.29	298.41
MOL007143	salvilenone I	32.43	0.23	270.40
MOL007059	3- β -hydroxymethylenetanshinquinone	32.16	0.41	294.32
MOL007145	salviolone	31.72	0.24	268.38
MOL007085	salvilenone	30.38	0.38	292.40

2.2 丹参治疗CIS的潜在靶点预测

在NCBI、GeneCards和OMIM数据库中分别检索到475、2 529、101个CIS的潜在靶点,去掉470个重复靶点后,得到2 635个CIS相关靶点。运用Venny 2.1绘图软件将丹参主要活性成分调控的靶点与CIS的疾病靶点取交集,得到87个潜在治疗靶点,见图2。

2.3 丹参与CIS交集靶点PPI网络构建

将药物和疾病相映射得到的87个交集基因在STRING平台进行PPI网络分析,将数据导入Cytoscape 3.7.2得到图3,1 011条边,其中节点表示

蛋白,度值表示连接到1个节点的线条数,用来评估网络中每个节点的重要性。节点越大、颜色越深,表明度值越大,每条边则表示蛋白与蛋白之间的相互作用关系,线条越多表示关联度越大。靶蛋白平均节点度值为23.2,超过平均度值的靶蛋白有38个。由图可见,AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR、MYC、CASP3、JUN、STAT3、PTGS2、CCND1、BCL2L1、ESR1、MMP9、ERBB2、MAPK14、RELA、PPARG、IL10、MDM2等靶点的度值较高,在PPI网络中起着重要的联系作用。

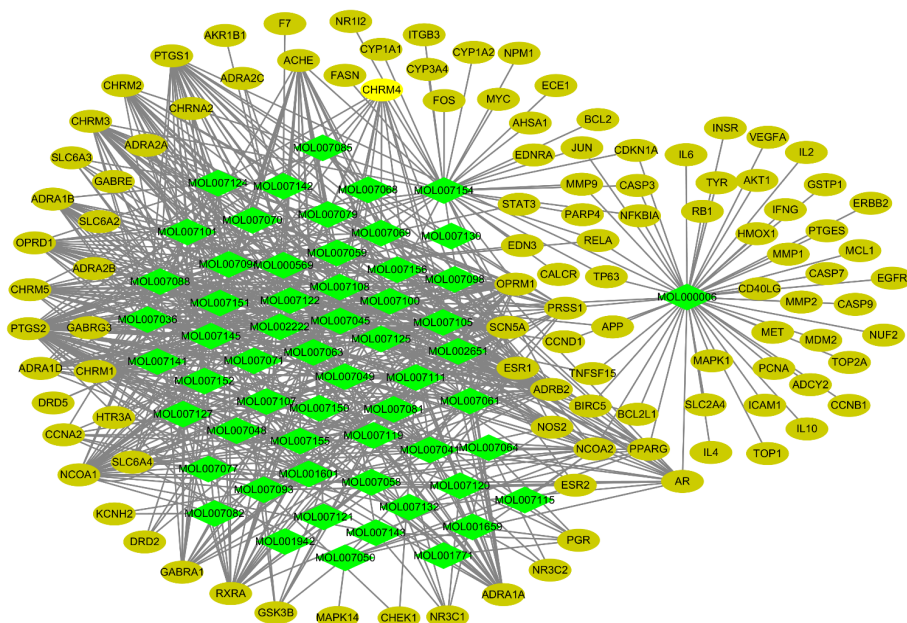


图1 丹参成分-靶点网络

Fig. 1 Compound-target network of *Salviae miltiorrhizae*

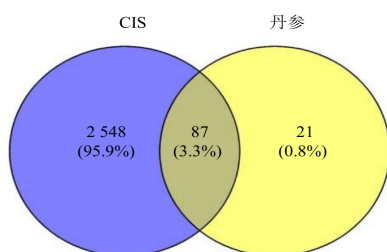


图2 丹参治疗CIS潜在靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of *Salviae miltiorrhizae* for CIS targets

2.4 药物-化合物成分-作用靶点-疾病网络

运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-化合物成分-作用靶点-疾病网络(图4),网络共 146 个节点,菱形节点代表疾病,六边形节点代表药物丹参,长方形节点代表丹参主要活性化合物,椭圆节点代表潜在靶点,每条边表示化合物和靶点之间的相互作用关系。根据节点度值等网络拓扑学特征进行核心节点的筛选。结果显示,木犀草素、丹参酮 II_A 、4-亚甲丹参新酮、二氢丹参内酯、鼠尾草酚酮、隐丹参

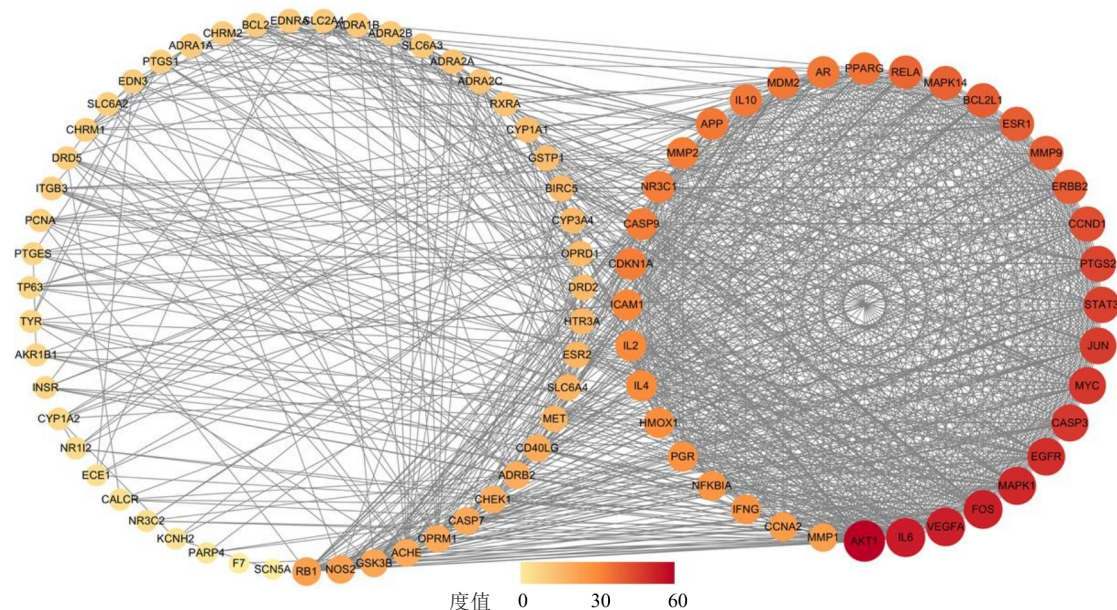


图3 丹参治疗CIS潜在靶点的PPI网络

Fig. 3 PPI network of intersection targets between *Salviae miltiorrhizae* and CIS

酮等化合物在整个网络中发挥着关键作用,可能是丹参治疗 CIS 的关键化合物。

2.5 靶点通路分析

通过 Bioconductor 数据库进行 GO 功能富集分析,得到生物过程(BP)条目 124 个($P < 0.05$),将前 20 个 GO 条目绘制气泡图,见图 5。在肽结合(peptide binding)、酰胺结合(amide binding)、泛素蛋白连接酶结合(ubiquitin protein ligase binding)、泛素样蛋白连接酶结合(ubiquitin-like

protein ligase binding)、磷酸酶结合(phosphatase binding)、细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、核受体活性(nuclear receptor activity)、转录因子活性(transcription factor activity)、类固醇激素受体活性(steroid hormone receptor activity)、G 蛋白偶联的胺受体活性(G protein-coupled amine receptor activity)等生物过程中,靶点富集较集中。这提示丹参活性化合物通过调控多种生物学途径对 CIS 产生影响。

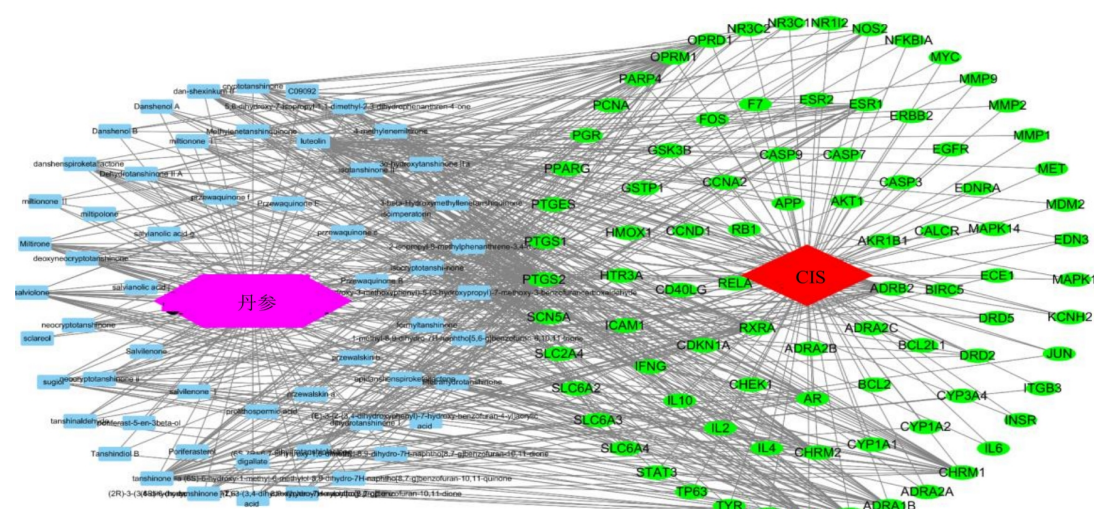


图4 药物-化合物成分-作用靶点-疾病网络

Fig. 4 Drug-compound components-targets-disease network

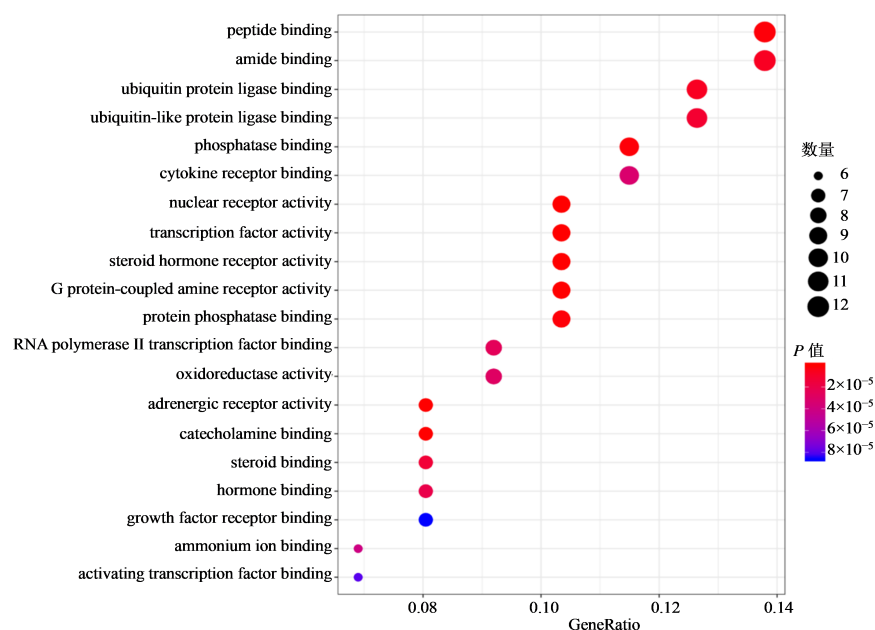


图5 GO 功能气泡图

Fig. 5 GO function bubble chart

KEGG通路富集筛选出134条信号通路($P < 0.05$), 选取 P 值较小的20条通路, 如图6所示。这些基因数目在PI3K/Akt信号通路(PI3K/Akt signaling pathway)、

IL-17信号通路(IL-17 signaling pathway)以及炎症和癌症等通路上富集较多。这预示着丹参在细胞凋亡、炎症反应中有非常重要作用, 可能是其治疗CIS的原因。

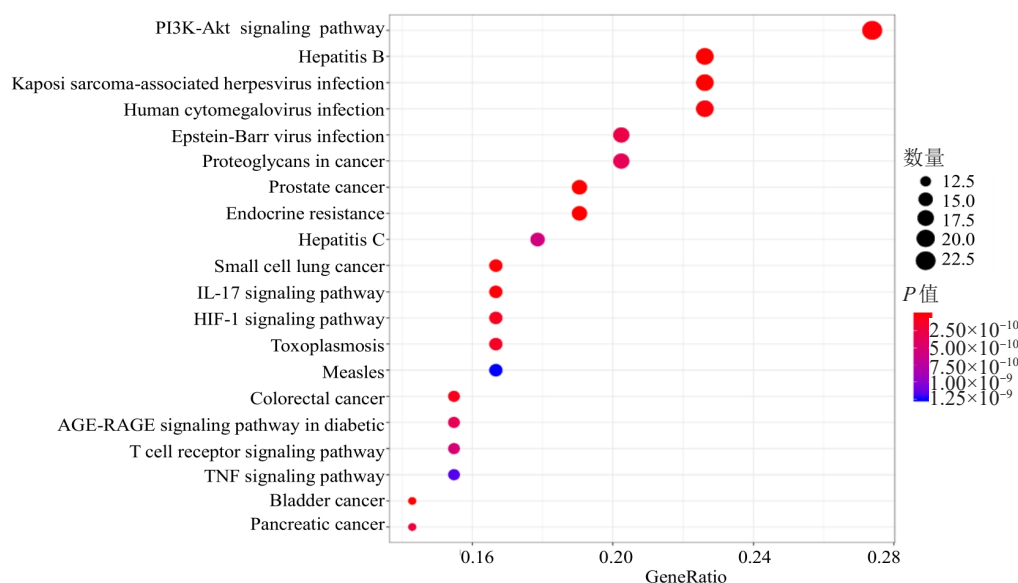


图6 KEGG通路气泡图

Fig. 6 Bubble diagram of KEGG pathway

2.6 分子对接

一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生作用的可能性越大。本研究以结合能 ≤ -5 kJ/mol作为筛选标准, 对“2.4”项中筛选出核心化合物进行分子对接, 见表2。结果显示丹参中的核心化合物与PPI核心靶蛋白结合能均远小于 -5 kJ/mol, 这些核心化合物与受体蛋白形成构象能量低, 结构稳定, 结合活性较高。其中亲和力较好的前4个分子对接模式见图7。

木犀草素和丹参酮II_A分别与MAPK1、EGFR相互作用二维图见图8。木犀草素与MAPK1互作残基中, 配体羟基可与Lys54、Ile103、Asp111形成氢键作用。图中虚线为氢键, 数值为键长(重原子距离)。其他疏水残基如Leu107、Ile31、Met108、Gln105等, 可与配体疏水环形成较强的堆积作用,

表2 丹参核心化合物和核心靶蛋白的结合能

Table 2 Binding energy values of core compounds of *Salviae miltiorrhizae* and core targets

化合物	靶点	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
木犀草素	AKT1	1unq	-26.752
	IL6	4cni	-27.588
	FOS	2wt7	-23.408
	VEGFA	3v2a	-27.170
	MAPK1	1tvo	-35.530
	EGFR	5wb7	-34.694
丹参酮II _A	AKT1	1unq	-29.678
	IL6	4cni	-30.096
	FOS	2wt7	-24.662
	VEGFA	3v2a	-28.006
	MAPK1	1tvo	-37.620
	EGFR	5wb7	-35.948

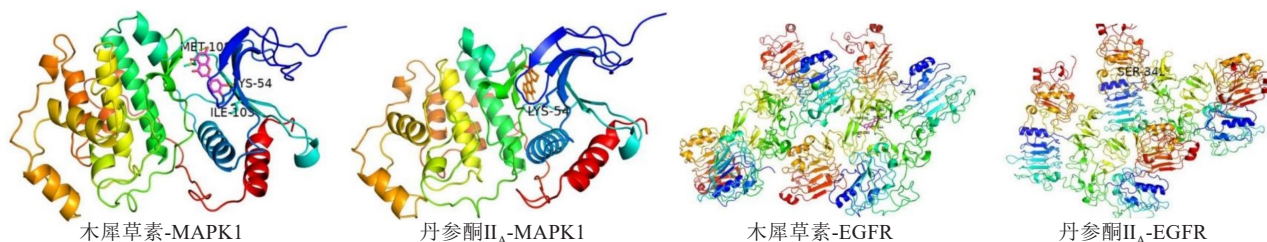


图7 丹参核心化合物与核心靶蛋白分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking diagram of *Salviae miltiorrhizae* core compounds and core targets

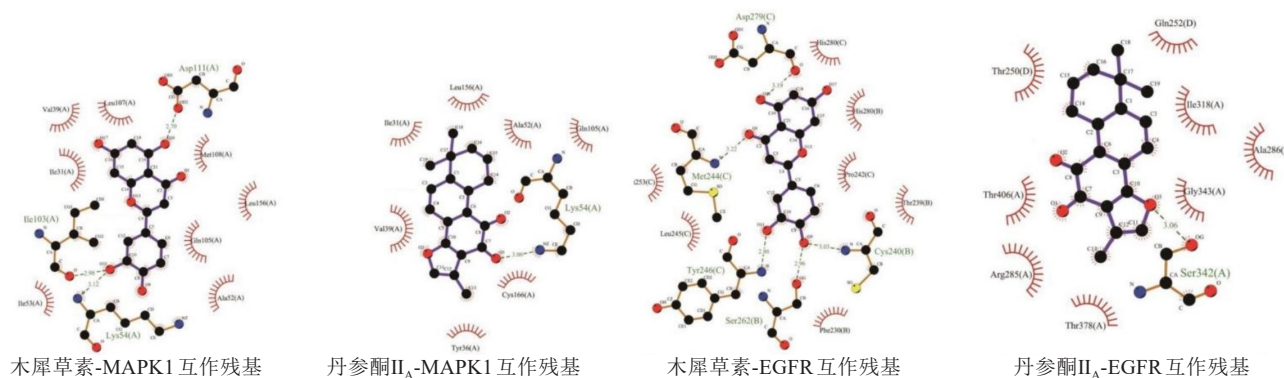


图8 丹参核心化合物和核心靶蛋白相互作用二维图

Fig. 8 Two-dimensional diagram of interaction between core compounds of *Salviae miltiorrhizae* and core targets

有利于其结合。木犀草素与EGFR互作残基中,配体羟基可与Asp279、Met244、Tyr246、Ser262、Cys240形成氢键作用。丹参酮II_A的配体羟基可与MAPK1氨基酸残基Lys54形成氢键作用。丹参酮II_A的配体羟基可与EGFR氨基酸残基Ser342形成氢键作用。

3 讨论

缺血性脑卒中是由于大脑的血液供应中断而导致永久性脑组织损伤的神经退行性疾病,是由一系列复杂的病理事件随时间和空间演变而形成的^[22]。受损脑组织可分为缺血中心区和缺血半暗带,缺血中心区的脑细胞由于血流供应中断导致能量耗竭和反应性氧化物过量产生而引发不可逆的坏死;对于缺血半暗带而言,葡萄糖/能量代谢障碍所引发的瀑布级联反应以及缺血再灌注损伤,才是导致脑损伤的主要原因^[23],这些级联反应主要包括能量代谢紊乱、谷氨酸兴奋毒性、细胞内钙超载、炎症反应、氧化损伤和细胞凋亡等^[24]。其中,炎症因子、细胞凋亡是脑卒中进展和演变的中心特征,旨在减轻炎症、抑制细胞凋亡、延长细胞存活的治疗策略尤其具吸引力^[25]。

本研究采用网络药理学方法构建基于丹参的“药物-化合物成分-作用靶点-疾病”网络,得到57个化合物,87个靶点,90条信号通路。进一步筛选出度值大于50的靶点,包括AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR,即本研究的核心靶点。AKT1的度值远高于其他靶点,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶之一^[26],在调节细胞增殖、生长和存活中起重要作用,尤以细胞存活为关键,并显示抗凋亡作用^[27]。研究表明,磷酸化的AKT在缺血后数小时内瞬时增加,在24 h内恢复到基线^[28]。神经元AKT过表达的小鼠显示梗死体积明显减少^[29],它的激活被

认为是缺血性损伤后神经元存活的主要因素,在脑缺血模型的体外实验中提供了有利的临床结果^[30]。急性卒中的严重程度和临床结局与外周炎症反应程度有关,据报道,卒中1周后,血浆白细胞介素6(IL-6)的峰值与疾病3个月的临床结局呈显著相关^[31]。IL-6是炎症细胞因子,与不稳定的颈动脉斑块相关,并且在缺血性卒中急性期明显升高;在亚急性期和慢性期又可作为神经营养介质,参与脑缺血后损伤修复过程^[32],其神经保护作用是通过上调神经元腺苷A1受体的表达和功能来实现的^[33]。血管内皮生长因子A(VEGFA)是VEGF家族的成员之一,是脑缺血后血管生成、神经生成和神经保护过程中重要的生长因子,在梗死及梗死周围区域、远端皮层区域的表达升高^[34],可在神经元细胞中激活PI3K/AKT通路^[35],已被证明能显著增强缺血脑组织的血管生成,促进神经功能恢复^[36]。Fos原癌基因(FOS)相关蛋白包括c-Fos、FosB、Fos相关抗原-1(FRA-1)和Fos相关抗原-2(FRA-2),它们均属于AP-1转录因子范畴。在脑缺血模型中,AP-1活性涉及神经可塑性、神经元对损伤的适应和耐受诱导^[37]。研究表明,c-Fos和FRA-2由缺血区神经元特异性表达,且FRA-2上调与神经元存活相关^[38]。MAPK1,又称ERK2,是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的一种,是增殖、分化和生存信号的关键调节因子^[39]。ERK2的磷酸化可能在神经轴突和树突状细胞的生长和稳定中起重要作用^[40],还参与了促炎细胞因子的调节以及血脑屏障的破坏^[41]。脑缺血会导致ERK的时间依赖性激活,而上游MEK的抑制则会导致损伤区炎症细胞因子和细胞凋亡的显著降低^[42]。表皮生长因子受体(EGFR),也称ERBB1或HER1,属于酪氨酸家族激酶受体,受体酪氨酸激酶通过其细胞内结构域介导细胞对生长因子的反应,并与主导

发育、分化、增殖的下游通路相互作用^[43]。在大脑中动脉同侧皮质梗死区中的神经元和巨噬细胞/小胶质细胞亚群中,EGFR显著上调,可能参与促进缺血性和创伤性脑损伤后神经元的可塑和修复机制^[44]。梗死灶内大量增殖的胶质细胞和梗死灶周围的星形胶质细胞对EGFR具有高度的免疫反应性^[45]。EGFR及其配体可能在调节与反应性胶质增生相关的基因中发挥作用^[46]。由上可知,本研究得出的核心靶点主要涉及细胞存活与凋亡、炎症反应、细胞生长与增殖、血管生成等生物学过程。

正如气泡图所示,PI3K/AKT信号通路所占靶点数目最多,多种生长因子和神经营养因子能启动其激活过程,调节细胞的生长、存活及炎症反应^[47]。PI3K/AKT信号通路激活参与了脑缺血的病理过程,促进神经干细胞增殖和分化,保护神经细胞免受缺血造成的损伤和死亡^[48],延长细胞存活。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,激活后在质膜上产生第二信使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP₃),细胞内AKT与PIP₃结合后,从胞质转移至细胞膜内侧进行磷酸化。AKT作为通路上的关键节点,能影响下游多种效应分子的活化状态,在本研究中它可以磷酸化B淋巴细胞瘤-2(BCL-2)相关神经细胞凋亡促进因子(BAD)、半胱氨酸蛋白酶9(Caspase-9)、鼠双微体(MDM2),抑制凋亡通路激活,提高细胞存活率^[49];以AKT为中心通过抑制糖原合酶激酶3(GSK3),协调中枢神经系统轴突再生的复杂机制^[50];AKT协同P21调控细胞周期停滞和ROS水平诱导的细胞衰老,预防氧化性死亡^[51];磷酸化的AKT激活NF- κ B(核转录因子 κ B)亚单位,并促其入核,诱导炎症因子的基因转录^[52]。总之,本研究获得的丹参有效化合物可靶向作用于中心节点AKT及其下游信号BAD、Caspase-9、MDM2、NF- κ B、GSK3、P21等,从而调节PI3K/AKT信号通路,这可能是丹参干预缺血性脑卒中的主要机制。

在57个活性化合物当中,木犀草素、丹参酮II_A的度值远高于其他活性成分,木犀草素具有抑制细胞凋亡、抗炎、神经保护、血管生长和抗氧化等作用^[53],可激活PI3K/AKT信号通路,增强细胞活力并下调细胞凋亡^[54],减少大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)后的梗死体积。另外,木犀草素可通过抑制脑内IL-6的产生,减轻神经炎症^[55]。丹参酮II_A是丹参脂溶性化合物的主要活性成分,能负调控半胱氨酸蛋白酶(Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)等凋亡诱导因子的表达,减轻脑组织损害^[56];明显

抑制大鼠缺血再灌注损伤N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)蛋白的表达,保护神经细胞^[57];降低缺血-再灌注大鼠脑组织NF- κ B和NF- κ B的抑制蛋白(I κ B)蛋白的表达水平,有效减少脑中炎症反应的发生,改善脑组织缺血-再灌注损伤^[58],具备抑制细胞凋亡、抗炎、神经保护等作用^[59]。另外,隐丹参酮也是目前研究较多的丹参成分之一,能减少Caspase-3的活化和聚ADP-核糖聚合酶(PARP)的降解,并降低Bax/Bcl-2比值,抑制神经细胞凋亡^[60];通过激活PI3K/Akt信号通路,保护原代皮质神经免受谷氨酸诱导的神经毒性^[61],还显示出对卒中脑组织的保护作用^[62]。由上可知,丹参中筛选出的核心活性化合物主要有抑制细胞凋亡、神经保护、抗炎、抗氧化等作用。

分子对接结果显示,丹参的核心有效化合物木犀草素和丹参酮II_A与核心靶蛋白AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR的结合能均远小于-5 kJ/mol,由此可见这些核心化合物与受体蛋白的结合活性较高,进一步验证了网络药理学所得出的结果。

综上所述,本研究采用网络药理学、分子对接技术,对丹参治疗缺血性卒中的关键化合物、作用靶点、生物学功能、信号通路及可能的作用机制做了初步探讨。结果显示,丹参中木犀草素和丹参酮II_A等成分可能通过PI3K/AKT等信号通路,作用于AKT1、IL6、FOS、VEGFA、MAPK1、EGFR等靶点,发挥抑制细胞凋亡、抗炎和神经保护等作用,说明丹参通过多成分、多靶点、多途径产生协同治疗CIS的潜在作用,体现了中医整体性的特点。但本研究存在一定的局限性,仅以数据进行分析,未来可进行相关实验来进一步验证本研究的结果,以期对CIS治疗药物的研发提供方向及依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet, 2017, 390(10100): 1211-1259.
- [2] Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2017, 135(10): e146-e603.
- [3] 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. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.
Chinese Society of Neurology, Chinese Stroke Society. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke 2018 [J]. Chin J Neurol, 2018, 51(9): 666-682.
- [4] Simão F, Ustunkaya T, Clermont A C, et al. Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused by tissue plasminogen activator therapy in mice after stroke [J]. Blood, 2017, 129(16): 2280-2290.
- [5] Berkhemer O A, Fransen P S, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke [J]. N Engl J Med, 2015, 372(1): 11-20.
- [6] Weinstein J R, Koerner I P, Möller T. Microglia in ischemic brain injury [J]. Future Neurol, 2010, 5(2): 227-246.
- [7] 马丙祥, 董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展 [J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.
Ma B X, Dong C K. New progress in pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. China Pharm, 2014, 25(7): 663-665.
- [8] 王富江, 李芮琳, 贾壮壮, 等. 注射用丹参多酚酸和血栓通注射液联合应用对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4029-4036.
Wang F J, Li R L, Jia Z Z, et al. Effect and mechanism of Salvianolate Lyophilized Injection combined with Xueshuantong Injection on expression of astrocytes and microglia on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(19): 4029-4036.
- [9] Luo T T, Lu Y, Yan S K, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine for *Mula*: methodology, application and prospective [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(1): 72-80.
- [10] 李昊楠, 孔浩天, 史永平, 等. 基于网络药理学的双丹方治疗冠心病的作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4985-4994.
Li H N, Kong H T, Shi Y P, et al. Mechanism of Shuangdan Recipe on treatment of coronary heart disease based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(20): 4985-4994.
- [11] Prieto-Martínez F D, Medina-Franco J L. Computer-aided drug design: when informatics, chemistry and art meets [J]. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2019, 21(2): 124-134.
- [12] 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.
- [13] Lee W Y, Lee C Y, Kim Y S, et al. The methodological trends of traditional herbal medicine employing network pharmacology [J]. Biomolecules, 2019, 9(8): E362.
- [14] Apweiler R. UniProt: the Universal Protein knowledgebase [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(90001): 115-119.
- [15] 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.
- [16] The Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D331-D338.
- [17] Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D353-D361.
- [18] Burley S K, Berman H M, Kleywegt G J, et al. Protein data bank (PDB): the single global macromolecular structure archive [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1607: 627-641.
- [19] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.
- [20] Yuan S, Chan H C S, Hu Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design [J]. WIREs Comput Mol Sci, 2017, 7(2): e1298.
- [21] Laskowski R A, Swindells M B. LigPlot+ : multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. J Chem Inf Model, 2011, 51(10): 2778-2786.
- [22] 杨 渊, 张苏明, 方思羽, 等. 脑缺血大鼠神经细胞凋亡与坏死的时空动态演变 [J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11(1): 3-7.
Yang Y, Zhang S M, Fang S Y, et al. The dynamic progression of the temporal and spatial profile of neuronal cell apoptosis and necrosis after reversible focal cerebral ischemia in rats [J]. Stroke Nerv Dis, 2004, 11(1): 3-7.
- [23] 张艾嘉, 王 爽, 王 萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5): 227-240.
Zhang A J, Wang S, Wang P, et al. Progress in pathological mechanism of ischemic stroke and prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(5): 227-240.
- [24] Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke [J]. Expert Rev Neurother, 2015, 15(5): 523-531.

- [25] Zhou Y, Wang Y C, Wang J, et al. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 25-44.
- [26] Franke T F, Hornik C P, Segev L, et al. PI₃K/Akt and apoptosis: size matters [J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 8983-8998.
- [27] Berkels R, Breitenbach T, Bartels H, et al. Different antioxidative potencies of dihydropyridine calcium channel modulators in various models [J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 42(4): 145-152.
- [28] Janelidze S, Hu B R, Siesjö P, et al. Alterations of Akt1 (PKBA) and p70S6K in transient focal ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8(1): 147-154.
- [29] Ohba N, Kiryu-Seo S, Maeda M, et al. Transgenic mouse overexpressing the Akt reduced the volume of infarct area after middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 359(3): 159-162.
- [30] Fukunaga K, Kawano T. Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 92(4): 317-327.
- [31] Smith C J, Emsley H C, Gavin C M, et al. Erratum to: Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome [J]. *BMC Neurol*, 2004, 4: 5.
- [32] Waje-Andreassen U, Kråkenes J, Ulvestad E, et al. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke [J]. *Acta Neurol Scand*, 2005, 111(6): 360-365.
- [33] Moidunny S, Dias R B, Wesseling E, et al. Interleukin-6-type cytokines in neuroprotection and neuromodulation: oncostatin M, but not leukemia inhibitory factor, requires neuronal adenosine A1 receptor function [J]. *J Neurochem*, 2010, 114(6): 1667-1677.
- [34] Stowe A M, Plautz E J, Nguyen P, et al. Neuronal HIF-1 α protein and VEGFR-2 immunoreactivity in functionally related motor areas following a focal M1 infarct [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(3): 612-620.
- [35] Ma Y, Qu Y, Fei Z. Vascular endothelial growth factor in cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(7): 969-978.
- [36] Manoonkitiwongsa P S, Schultz R L, McCreery D B, et al. Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(6): 693-702.
- [37] Kovács A D, Cebers G, Liljequist S. Prolonged enhancement of AP-1 DNA binding by blockade of glutamate uptake in cultured neurons [J]. *Neuroreport*, 1999, 10(9): 1805-1809.
- [38] Butler T L, Pennypacker K R. Temporal and regional expression of Fos-related proteins in response to ischemic injury [J]. *Brain Res Bull*, 2004, 63(1): 65-73.
- [39] Sun J, Nan G X. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway as a discovery target in stroke [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 59(1): 90-98.
- [40] Veeranna, Amin N D, Ahn N G, et al. Mitogen-activated protein kinases (Erk1, 2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(11): 4008-4021.
- [41] Vikman P, Ansar S, Henriksson M, et al. Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries [J]. *Exp Brain Res*, 2007, 183(4): 499-510.
- [42] Gladbach A, van Eersel J, Bi M, et al. ERK inhibition with PD184161 mitigates brain damage in a mouse model of stroke [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121(5): 543-547.
- [43] Rickman O B, Vohra P K, Sanyal B, et al. Analysis of ErbB receptors in pulmonary carcinoid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10): 3315-3324.
- [44] Xu Z F, Ford B D. Upregulation of erbB receptors in rat brain after middle cerebral arterial occlusion [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 375(3): 181-186.
- [45] Canoui-Poittrine F, Luc G, Mallat Z, et al. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study [J]. *Neurology*, 2011, 77(12): 1165-1173.
- [46] Planas A M, Justicia C, Soriano M A, et al. Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive *Glia* following transient focal ischemia in the rat brain [J]. *Glia*, 1998, 23(2): 120-129.
- [47] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [48] Zhou Z Y, Dun L L, Wei B X, et al. Musk ketone induces neural stem cell proliferation and differentiation in cerebral ischemia via activation of the PI₃K/Akt signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2020, 435: 1-9.
- [49] Luo H R, Hattori H, Hossain M A, et al. Akt as a mediator of cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11712-11717.
- [50] Saijilafu, Hur E M, Liu C M, et al. PI₃K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1 [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2690.
- [51] Kim Y Y, Jee H J, Um J H, et al. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(5): 1094-1103.
- [52] Lv H, Li J, Che Y Q. CXCL8 gene silencing promotes neuroglial cells activation while inhibiting

- neuroinflammation through the PI₃K/Akt/NF- κ B-signaling pathway in mice with ischemic stroke [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7341-7355.
- [53] 王继双, 何焱, 张文静, 等. 木犀草素的药理作用研究进展 [J]. *生命科学*, 2013, 25(6): 560-565.
- Wang J S, He Y, Zhang W J, et al. Advances in studies on pharmacological effects of luteolin [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2013, 25(6): 560-565.
- [54] Luo S J, Li H Q, Mo Z H, et al. Connectivity map identifies luteolin as a treatment option of ischemic stroke by inhibiting MMP9 and activation of the PI₃K/Akt signaling pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(3): 1-11.
- [55] Jang S, Kelley K W, Johnson R W. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(21): 7534-7539.
- [56] 韩若东, 汤其强, 肖晗, 等. 丹参酮II_A对早期脑缺血和脑缺血再灌注损伤的脑保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(6): 655-658.
- Han R D, Tang Q Q, Xiao H, et al. Neuroprotective effect of Tanshinone II_A on early cerebral ischemia and cerebral ischemia-reperfusion models [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2012, 47(6): 655-658.
- [57] 林翔, 王荣茂, 刘蔚楠, 等. 丹参酮II_A对大鼠脊髓神经细胞NMDA受体的影响 [J]. *中医临床研究*, 2018, 10(23): 1-4.
- Lin X, Wang R M, Liu W N, et al. Effects of tanshinone II_A on NMDA receptor of rat spinal cord neurons [J]. *Clin J Chin Med*, 2018, 10(23): 1-4.
- [58] 周丽, 刘艳平, 王芳, 等. 丹参酮II_A对I/R大鼠脑组织NF- κ B和I κ B活性的影响 [J]. *中药材*, 2013, 36(7): 1136-1139.
- Zhou L, Liu Y P, Wan F, et al. Effect of tanshinone II_A on NF- κ B and I κ B activity in brain tissue of I/R rats [J]. *J Chin Med Mater*, 2013, 36(7): 1136-1139.
- [59] 王媛媛, 陶婍娜, 宋燕青, 等. 丹参酮II_A对脑缺血保护的作用机制研究进展 [J]. *中国药业*, 2019, 28(9): 1-4.
- Wang Y Y, Tao L N, Song Y Q, et al. Research progress of the mechanism of protective effect of tanshinone II_A on cerebral ischemia [J]. *China Pharm*, 2019, 28(9): 1-4.
- [60] Zhao H Y, Zheng T Z, Yang X H, et al. Cryptotanshinone attenuates oxygen-glucose deprivation/ recovery-induced injury in an *in vitro* model of neurovascular unit [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 381.
- [61] Zhang F Y, Zheng W H, Pi R B, et al. Cryptotanshinone protects primary rat cortical neurons from glutamate-induced neurotoxicity via the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *Exp Brain Res*, 2009, 193(1): 109-118.
- [62] Zhu W X, Qiu W H, Lu A L. Cryptotanshinone exhibits therapeutic effects on cerebral stroke through the PI₃K/AKT-ENOS signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9361-9366.

[责任编辑 高源]