

网络药理学结合 GEO 芯片技术探讨黄芩方治疗缺血性脑卒中的作用机制及实验验证

赵赛红¹, 王磊¹, 张平平¹, 黄莹莹^{1, 2, 3, 4*}, 汪宁^{1, 2, 3, 4*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230012

3. 安徽省中药配方重点实验室, 安徽 合肥 230012

4. 安徽省中医药研究院中药疗效与安全评价研究所, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 基于GEO芯片联合网络药理学方法探讨黄芩方治疗缺血性脑卒中的作用机制, 并构建脑缺血/再灌注(I/R)大鼠模型验证黄芩方药效和核心靶点。方法 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库及文献检索, 获得黄芩方的主要活性成分, 通过Swiss Target Prediction数据库检索其相应的靶点。通过R软件limma包对GEO平台缺血性脑卒中患者数据集GSE16561进行差异基因分析。利用Venny 2.1.0进行黄芩方成分靶点和缺血性脑卒中差异基因靶点交集靶点分析, 采用DAVID数据库对交集靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用Cytoscape 3.9.0软件构建成分-靶点-通路网络并筛选核心成分, 通过STRING数据库与Cytoscape 3.9.0软件构建蛋白质相互作用(PPI)网络并筛选核心靶点基因。利用PyMOL软件对度值排名靠前的成分和靶点基因进行分子对接。通过single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA)进行免疫浸润分析。采用线栓法制备I/R大鼠模型, 除假手术组外($n=21$), 将69只大鼠随机分为模型组、黄芩方组($3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、阿司匹林($9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。黄芩方组和阿司匹林组每日ig给药1次, 假手术组和模型组ig给予等量生理盐水, 持续7 d。采用Longa分级评分法对大鼠进行神经行为评分, TTC染色测定大鼠脑梗死体积, 免疫组织化学染色法检测离子钙接头蛋白分子1(Iba1)阳性表达, ELISA法检测脑组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素-6(IL-6)的表达, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测大鼠脑组织Toll样受体4(TLR4)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、缺氧诱导因子1A(HIF1A)、髓过氧化物酶(MPO)、基质金属蛋白酶9(MMP9)的mRNA表达。结果 通过TCMSP数据库和文献检索共筛选得到黄芩方的有效活性成分35个, 成分靶点754个, 缺血性脑卒中基因芯片差异表达基因677个, 交集靶点56个。GO富集分析表明, 黄芩方治疗缺血性脑卒中与细胞对炎症反应、脂多糖反应和环氧化酶途径等生物学过程相关。KEGG通路分析显示, 主要涉及包括代谢途径、中性粒细胞胞外诱捕网形成、HIF-1信号传导途径等通路。筛选出5个核心成分 α -细辛醚、3, 4, 5-三甲氧基肉桂酸、 β -细辛醚、异阿魏酸、阿魏酸, 5个核心靶点TLR4、STAT3、HIF1A、MPO、MMP9。分子对接结果显示, 5个核心成分与5个核心靶点具有稳定的结合能力。免疫浸润分析表明, 核心靶点基因与中性粒细胞、激活B细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞等关系密切。体内实验结果显示, 黄芩方显著降低I/R大鼠的神经行为学评分、脑梗死体积、脑组织病理学损伤、脑组织炎症因子的表达, 在脑组织中验证了黄芩方对5个核心靶点基因mRNA表达的调节作用。结论 黄芩方可能通过多成分、多靶点、多通路治疗缺血性脑卒中, 其可能通过TLR4、STAT3、HIF1A、MPO和MMP9核心靶点发挥治疗作用。

关键词: 黄芩方; 缺血性脑卒中; 网络药理学; GEO数据库; 分子对接; α -细辛醚; 3, 4, 5-三甲氧基肉桂酸; β -细辛醚; 异阿魏酸; 阿魏酸; Toll样受体4; 信号转导和转录激活因子3; 缺氧诱导因子1A; 髓过氧化物酶; 基质金属蛋白酶9

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)05-0983-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.008

Network pharmacology combined with GEO chip to investigate mechanism of action and experimental validation of Huangxiong Formula in treatment of ischemic stroke and experimental verification

收稿日期: 2023-02-01

基金项目: 安徽省高校优秀科研创新团队(2022AH010034); 安徽省高等学校科学研究项目(2022AH050478); 安徽中医药大学自然重点项目(2021zrzd10); 安徽中医药大学人才支持计划项目(2020rcyb005)

第一作者: 赵赛红, 硕士, 研究方向为中药药理学。E-mail: zsh53231323@163.com

*共同通信作者: 黄莹莹, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药理学。E-mail: huangyy9101@163.com

汪宁, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及药理学。E-mail: wnscl23@163.com

ZHAO Saihong¹, WANG Lei¹, ZHANG Pingping¹, HUANG Yingying^{1, 2, 3, 4}, WANG Ning^{1, 2, 3, 4}

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China

4. Institute for Evaluation of Efficacy and Safety of Chinese Medicines, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Huangxiong Formula (HXF) in treatment of ischemic stroke (IS) based on GEO chip combined with network pharmacology, and to verify its pharmacodynamics and core targets by using the rat ischemia-reperfusion (I/R) model. **Methods** The active ingredients of HXF were searched by using the TCMSP database and the literature, and their corresponding targets were searched by using the Swiss Target Prediction database. GEO platform IS dataset GSE16561 was used for variance analysis by R software limma package. The Venny 2.1.0 was used to perform intersection target analysis, and the DAVID database GO and KEGG pathway enrichment analysis on intersection target. Cytoscape 3.9.0 software was used to construct the components-target-pathway network and screen the core ingredients, and the STRING database and Cytoscape 3.9.0 software was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network and screen the core target genes. The top ranked components and target genes based on the degree values were molecularly docked using PyMOL software. Immuno-infiltration analysis was performed by single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA). A rat model of cerebral I/R was prepared by the wire bolus method. Totally 69 rats were randomly divided into the model group, the Huanxiong Formula (3.6 g·kg⁻¹) group and the aspirin (9 mg·kg⁻¹) group, except for the sham-operated group (*n*=21). Huanxiong Formula and Aspirin groups were given ig once a day, and equal amount of saline was given to the sham-operated and model groups ig for 7 d. The rats were scored for neurobehaviour using the Longa grading scale. TTC staining was used to determine the volume of brain infarction in the rats. Immunohistochemical staining was used to detect positive expression of ion calcium junction protein molecule 1 (Iba1). The levels of tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) in brain tissue was measured by ELISA. The expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), hypoxia inducible factor 1A (HIF1A), myeloperoxidase (MPO) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) mRNA in rat brain tissue was measured by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** A total of 35 active ingredients, 754 component targets, 677 differentially expressed genes on IS gene chips and 56 intersecting targets of the HXF was screened. GO enrichment analysis indicated that HXF treatment of IS was associated with biological processes such as inflammatory response, response to lipopolysaccharide and cyclooxygenase pathway. KEGG pathway analysis showed that the main signaling pathways were involved in Metabolic pathways, Neutrophil extracellular trap formation and HIF-1 signaling pathway, etc. The top 5 core components such as α -asarone, 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, β -asarone, isoferulic acid and ferulic acid were screened, and top 5 targets TLR4, STAT3, HIF1A, MPO, and MMP9. The molecular docking results showed that the core components have stable binding ability to the core targets. Immune infiltration indicated that core target genes were closely related to neutrophil, activated B cell, natural killer cell and mast cell, etc. *In vivo* experiments showed that Huanxiong Formula significantly reduced the neurobehavioural scores, brain infarct volume, brain histopathological damage and expression of inflammatory factors in brain tissue of I/R rats, and its regulatory effects on mRNA expression of five core target genes were verified in brain tissue. **Conclusion** Huangxiong Formula may be a multi-component, multi-target and multi-pathway treatment for ischemic stroke, which may exert therapeutic effects through the core targets of TLR4, STAT3, HIF1A, MPO and MMP9.

Key words: Huangxiong Formula; ischemic stroke; network pharmacology; GEO database; molecular docking; α -asarone; 3,4,5-trimethoxycinnamic acid; β -asarone; isoferulic acid; ferulic acid; TLR4; STAT3; HIF1A; MPO; MMP9

缺血性脑卒中是因脑血管栓塞或脑供血不足导致的脑组织缺血坏死的疾病。缺血性脑卒中具有发病率高、致残率高、致死率高、复发率高的“四高”特征^[1-2]。近年来,缺血性脑卒中患者的数量也在不断增加,在临床中较为常见,对人类的生命安全具有较大威胁,因此,迫切需要更有效的药物治疗这种疾病。中药已有几千年的历史,广泛应用于缺血性脑卒中的临床治疗,具有不良反应少和整体调节等特点。黄芩方(黄芩抗栓胶囊、通脑精胶囊)

由大黄、石菖蒲、川芎、郁金中药组成,全方具有活血解毒、行气化痰的功效^[3]。黄芩方在临床上主要用于卒中的治疗,包括缺血性脑卒中、腔隙性脑梗死及糖尿病并发脑卒中等^[4-6]。临床研究表明,黄芩方能有效抑制炎症因子,改善神经功能缺失,改善缺血缺氧,从而更好地保护大脑^[7-9]。然而,黄芩方治疗缺血性脑卒中的作用机制尚不明确。

网络药理学结合系统生物学、组学和计算生物学,从整体角度阐明药物作用机制,它具有完整性、

协同性和动态性的特点^[10]。这些特征与中医整体观相似^[11]。该方法为中药的多成分、多靶点治疗提供了新的视角^[12]。该方法通过网络映射和分析提供了对药物作用和疾病复杂性的系统理解,网络药理学方法在阐释中药治疗疾病作用机制方面发挥了重要的作用^[13]。本研究采用网络药理学、生物信息学和分子对接的方法,对黄芩方治疗缺血性脑卒中可能的作用途径和靶点进行初步预测;在此基础上,构建脑缺血/再灌注(I/R)大鼠模型,并给予黄芩方治疗,进一步验证黄芩方治疗缺血性脑卒中效果及作用机制,为黄芩方治疗缺血性脑卒中的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物

6~8周龄SPF级雄性大鼠,体质量(180±220)g,购于湖南安生美药物研究院公司,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。SPF环境下饲养,温度为22~24℃,相对湿度为40%~60%。动物实验方案经安徽中医药大学伦理委员会批准,该实验符合动物实验伦理学要求(伦理审批号:2022026)。

1.2 试剂与仪器

阿司匹林肠溶片(辰欣药业股份有限公司,批号150908502);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA检测试剂盒(批号:JL2260001)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA检测试剂盒(批号:JL22040001)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(批号:JL22070002)均购自上海江莱生物科技有限公司;离子钙接头蛋白分子1(Iba-1,批号:C2020)购自Santa Cruz Biotechnology。1500型全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司);MX3000P PCR仪器(Stratagene公司)。

1.3 药材

大黄、川芎、郁金药材均购自亳州康美中药城,石菖蒲购自北京同仁堂有限公司,由安徽中医药大学药学院杨青山副教授鉴定,大黄为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill 的干燥根及根茎,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,郁金为姜科植物姜黄 *Curcuma Longa* L. 的干燥块根,石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎,经检测均符合《中国药典》2020年版要求。

2 方法

2.1 黄芩方治疗缺血性脑卒中的网络药理学及分子对接研究

2.1.1 黄芩方有效成分及靶点筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)数据库以及中国知

网(CNKI)、PubMed相关文献报道获取黄芩方组方药材石菖蒲、大黄、川芎和郁金的主要活性成分,以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18^[14],筛选出黄芩方潜在的活性成分。同时通过查阅文献寻找不满足上述筛选条件,但在治疗缺血性脑卒中方面有相关活性的化合物,如 α -细辛醚、 β -细辛醚、阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯A等,将这些成分一并作为候选成分纳入分析。基于数据库Swiss Target Predictions(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),将可能性设置为Probability>0,提取上述筛选得到的化学成分的可能作用靶点。

2.1.2 基于GEO数据库的缺血性脑卒中差异表达基因筛选 从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获得基因芯片GSE16561^[15],该数据集纳入缺血性脑卒中患者样本24例和健康对照受试者39例,测序方法是Illumina,芯片平台是GPL6883。利用R软件limma包进行差异分析,差异基因的筛选标准为 $|\log_2FC|>1$, $P<0.05$ 。选取上调和下调的各前100个基因以热图呈现。利用Venny 2.1.0软件绘制黄芩方成分靶点基因与缺血性脑卒中差异基因的韦恩图。

2.1.3 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 在DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库提交获得的交集靶点,以“*homo sapiens*”和“ $P<0.05$ ”为筛选条件,进行GO富集分析和KEGG通路富集分析,并采用微生物在线绘图云平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制高级气泡图,将结果可视化。

2.1.4 成分-靶点-通路网络构建与分析 药物活性成分、交集靶点及通路靶点导入软件Cytoscape 3.9.0,构建成分-靶点-通路可视化网络。图中节点分别为成分、靶点、通路,边表示各节点之间的相互关系。利用插件CytoNCA对网络图进行分析,获取黄芩方治疗缺血性脑卒中的核心成分。

2.1.5 靶点蛋白相互作用(PPI)网络构建 将交集靶点基因导入STRING平台(<http://string-db.org/>),物种限定为“*Homo Sapiens*”,获取PPI网络,并导出TSV格式文件,再将TSV格式文件导入Cytoscape 3.9.0软件中对PPI网络进行可视化,并用插件cytoHubba筛选核心靶点基因。

2.1.6 分子对接 在RCSB PDB(<https://www.pdb.org/>)搜索靶点基因对应的蛋白结构,以score值为标准,选取score值最高的蛋白,获取其3D分子

结构.pdb格式。然后通过Pymol 2.5.2对分子进行去水和剔除修饰配体,并利用AutoDock Tools 1.5.6将活性成分和靶点基因对应的蛋白受体转换为.pdbqt格式,再通过AutoDock Vina 1.1.2进行分子对接,通过Pymol 2.5.2将化合物与靶点基因受体蛋白结合位置进行可视化分析。

2.1.7 免疫浸润分析 利用R语言GSVA包中single sample Gene Set Enrichment Analysis(ssGSEA)分析免疫细胞的浸润情况。进行缺血性脑卒中与正常样本的免疫细胞的差异分析,并结合相关性分析核心基因与免疫细胞的相关性。

2.2 黄芩方对I/R模型大鼠的影响

2.2.1 黄芩方提取物的制备 大黄、石菖蒲、川芎、郁金以10:8:8:8的比例称取,第1次加8倍量70%乙醇,回流2h,第2次加6倍量70%乙醇,回流1.5h,合并2次醇提液,回收乙醇。药渣加8倍量的水煎煮提取1.5h,滤取药液,同醇提液合并,减压浓缩^[16]。

2.2.2 动物造模及分组 SD雄性大鼠ip戊巴比妥钠麻醉后,仰卧位固定,颈部中线切口。分离左侧的颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。采用无创血管夹,同时夹闭近心端CCA及远端ICA。于CCA用显微剪刀剪一小口,插入制备好的线栓。通过CCA分叉,进入ICA。调整线栓角度以避免误入翼腭动脉。插入线段直至遇到轻微阻力,深度以过CCA分叉17~18mm为宜。插线结束后,将预先放置于ECA的结扎线缚紧,以防止线段滑出和出血。颈部伤口常规缝合。缺血2h后,将线栓拔出3~4mm,即可实现再灌注。假手术组不将线栓插入大脑中动脉。除假手术组外($n=21$),将69只I/R大鼠随机分为3组:模型组、黄芩方($3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,根据前期研究以及文献报道^[17]确定此剂量)组、阿司匹林($9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[26]组。I/R手术后,黄芩方组和阿司匹林组每日ig给药1次,连续7d。假手术组和模型组ig给予等量生理盐水,持续7d。

2.2.3 神经行为评分 采用Longa分级评分法^[18]对大鼠进行神经行为学评分。评分标准:0级:行为无明显变化;1级:左前肢屈曲,左后肢伸展;2级:有左侧追尾现象;3级:行走困难,摇摆不定;4级:无自发性活动,有意识障碍。大鼠清醒后,对大鼠进行神经行为学评分,评分介于1~3分视为造模成功。

2.2.4 TTC染色测定大鼠脑梗死体积 末次给药24h后,各组随机选取3只大鼠,大鼠麻醉后进行腹主动脉取血,断头取出脑组织,置于 -20°C 冰箱中冷冻30min后切片,将脑片置于用锡纸包裹的2%TTC染

色液中,放入恒温箱 37°C 孵育20~30min;染色后置于4%多聚甲醛溶液中固定24h,以滤纸吸干后,可见大鼠脑组织正常区域呈红色,梗死区域呈苍白色。采用ImageJ软件计算各组大鼠脑组织的梗死体积。

$$\text{梗死体积} = t \times (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$$

$t=2\text{ mm}$, $n=3$, A 为单个脑切片的梗死面积

2.2.5 免疫组织化学染色法检测Iba1阳性表达 采用免疫组织化学法检测大鼠下丘脑Iba-1的表达,取出脑组织适量,石蜡切片, 42°C 烤片2h,再经脱蜡和水化后,枸橼酸钠缓冲溶液高温高压修复。TBST洗3次,每次5min,5%BSA室温封闭1h后,加1:200羊抗Iba-1一抗(5%BSA稀释) 4°C 过夜。回收一抗后,切片TBST洗3次,每次5min。3% H_2O_2 覆盖15min后,再TBST洗3次,每次5min。滴加反应增强液,室温孵育20min,TBST洗3次,每次5min。增强酶标兔抗山羊IgG聚合物室温孵育20min,TBST洗3次,每次5min。DAB避光显色15min,流水冲洗后擦干,组织脱水透明,中性树脂胶封片,显微镜拍摄。

2.2.6 ELISA检测大鼠脑组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达 取部分缺血脑组织在磷酸盐缓冲液中匀浆,并以 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,取上清液,按照ELISA说明书检测IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。

2.2.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测大鼠脑组织核心基因mRNA的表达 用Trizol试剂处理脑组织,提取总RNA。使用ReverTra Ace Q-PCRT Master Mix试剂盒将RNA反转录成cDNA,再根据SYBR Green Real time PCR Master Mix使用PCR仪器定量mRNA含量,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对基因表达水平。引物序列见表1。

2.2.8 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间均数比较、结果统计,所有数据分析采用SPSS 23.0软件, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学结果及分析

3.1.1 黄芩方活性成分及靶点筛选 通过TCMSP数据库以及相关文献检索^[19-22],选择标准参数 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 对主要化学成分进行筛选。通过Pubchem数据库获得成分对应的SMILES结构,将SMILES结构输入到Swiss Target Prediction数据库中,将可能性设置为Probability >0 ,检索得到有21个有效成分,对应潜在靶点624个。除上述成分之外,基于文献研究^[23-25]有14个候选化合物纳入研

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>TLR4</i>	CCTGGCTAGGACTCTGAT	CTTGGTTGAAGAAGGAATGTC
<i>STAT3</i>	CACCTTGGATTGAGAGTCAAGAC	AGGAATCGGCTATATTGCTGGT
<i>HIF1A</i>	CAGTATCTTCCTCACTCGACACAG	GCAGGCTCTTGGTCACATGATC
<i>MPO</i>	CTGGCACGGAAGCTGAT	AATGAGGCAGGCAAGGAG
<i>MMP9</i>	GATCCCCAGAGCGTTACTCG	GTTGTGGAAACTCACACGCC
<i>GAPDH</i>	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

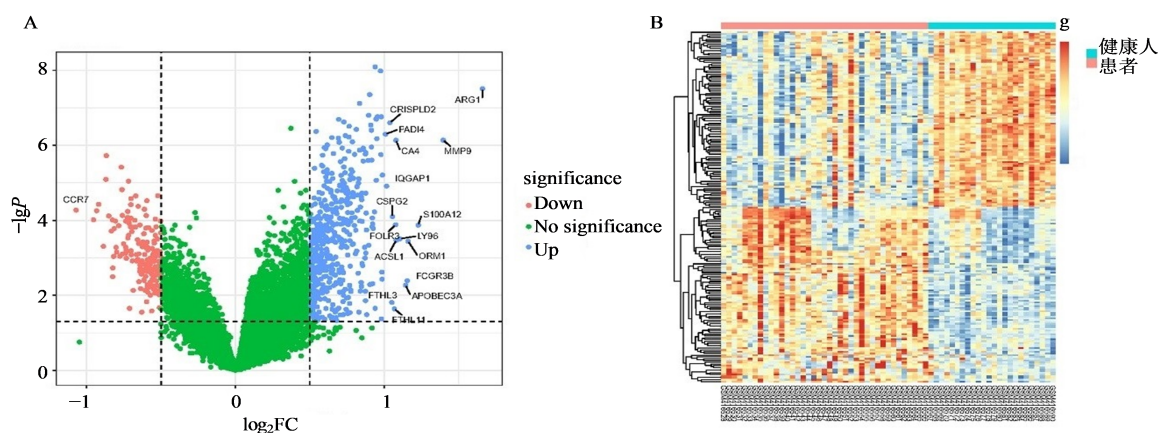
表2 黄芩方主要活性成分
Table 2 Active components of Huanxiong Formula

Mol ID	化合物	OB/% DL
MOL002235	泽兰黄醇(eupatin)	50.80 0.41
MOL002259	大黄素甲醚双葡萄糖(phycion diglucoside)	41.65 0.63
MOL002268	大黄酸(rhein)	47.07 0.28
MOL002281	决明内酯(toralactone)	46.46 0.24
MOL002288	大黄素-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷(emodin-1- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopyranoside)	44.81 0.80
MOL002293	番泻苷D(sennoside D qt)	61.06 0.61
MOL002303	棕榈蛋白A(palmidin A)	32.45 0.65
MOL001729	大黄酚(crysophanol)	18.64 0.21
MOL002289	大黄素甲醚(phycion)	19.38 0.27
MOL000472	大黄素(emodin)	24.40 0.24
MOL006478	1,8-二羟基蒽醌(danthron)	28.74 0.19
MOL003542	8-异戊烯-山柰酚(8-isopentenyl-kaempferol)	38.04 0.39
MOL003578	环阿屯醇(cycloartenol)	38.69 0.78
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88 0.24
MOL002124	β -细辛醚(beta-asarone)	35.61 0.06
MOL003547	α -细辛醚(alpha-asarone)	38.39 0.06
MOL003549	γ -细辛醚(gamma-asarone)	22.76 0.06
MOL000269	榄香素(elemicin)	21.94 0.06
MOL005928	异阿魏酸(isoferulic acid)	50.83 0.06
MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91 0.75
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91 0.75
MOL004260	1,7-二苯基-3-羟基-1-庚烯-5-酮[(<i>E</i>)-1,7-diphenyl-3-hydroxy-1-hepten-5-one]	64.66 0.18
MOL004263	(<i>E</i>)-5-羟基-7-(4-羟基苯基)-1-苯基-1-庚烯[(<i>E</i>)-5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-1-heptene]	46.90 0.19
MOL004305	泽多内酯A(zedoalactone A)	111.43 0.19
MOL000417	毛蕊异黄酮(calycosin)	47.75 0.24
MOL002581	姜黄素(curcumin)	4.37 0.41
MOL001494	亚油酸乙酯(mandenol)	42.00 0.19
MOL002135	杨梅酮(myricanone)	40.60 0.51
MOL002151	洋川芎醌(senkyunone)	47.66 0.24
MOL000433	叶酸(FA)	68.96 0.71
MOL011782	藁本内酯(ligustilide)	23.50 0.07
MOL000360	阿魏酸(ferulic acid)	39.56 0.06
MOL002208	洋川芎内酯A(senkyunolide A)	26.56 0.07
MOL009047	桉叶(eudesmin)	33.29 0.62

究,对应的潜在靶点有392个。通过TCMSP平台无法检索到黄芩方中3,4,5-三甲氧基肉桂酸成分,通过查阅文献获取3,4,5-三甲氧基肉桂酸进行后续分析^[19]。具体成分信息见表2。

3.1.2 GEO数据库筛选缺血性脑卒中差异基因表达结果 利用R软件和limma包分析GSE16561中的数据,根据筛选标准筛选绘制火山图,找出677个

差异基因,其中上调基因509个、下调基因168个(图1-A)。选择上调和下调的各前100个基因以热图表示,列代表样本,行代表基因,颜色代表P值(图1-B)。黄芩方成分靶点与缺血性脑卒中差异基因的共同靶点基因共56个,即为黄芩方治疗缺血性脑卒中的潜在作用靶点(图2)。



A-基因芯片GSE16561差异分析火山图;B-缺血性脑卒中患者和健康人的全血样本中差异表达基因热图

A-volcano map of GeneChip GSE16561 difference analysis; B-heat map of GeneChip GSE16561 difference analysis between patients with ischemic stroke and healthy people

图1 缺血性脑卒中差异基因分析

Fig. 1 Difference gene analysis of ischemic stroke

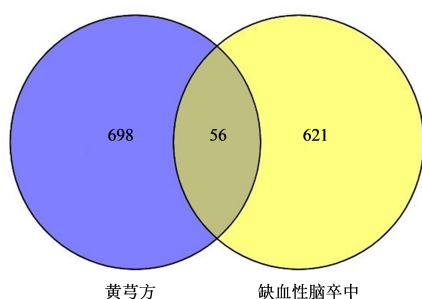


图2 黄芩方成分靶点与缺血性脑卒中差异基因靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of component targets of Huangqiong Formula and differential gene targets of ischemic stroke

3.1.3 交集靶点富集分析结果 将黄芩方治疗缺血性脑卒中的56个靶点上传至DAVID数据库进行GO富集分析和KEGG分析。GO功能注释分析显示,生物过程(BP)主要涉及炎症反应、脂多糖反应和环氧化酶途径等;细胞组分(CC)主要涉及分泌颗粒膜、胞外体和质膜等;分子功能(MF)主要涉及对蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、葡萄糖结合和蛋白激酶活性等,均取排名靠前的10个条目可视化(图3-A)。KEGG通路富集,以P值排序,对排名前10的与缺血性脑卒中相关的信号通路进行可视化(图3-B),

这些通路包括代谢途径、中性粒细胞胞外诱捕网形成、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号传导途径等。

3.1.4 成分-靶点-通路网络 采用Cytoscape 3.9.0软件得到黄芩方成分-靶点-通路网络(图4),再利用CytoNCA插件进行度值分析, α -细辛醚(度值=9)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸(度值=9)、 β -细辛醚(度值=8)、异阿魏酸(度值=8)、阿魏酸(度值=8)作为主要活性成分,这些成分可能在黄芩方治疗缺血性脑卒中发挥重要作用。

3.1.5 PPI网络分析 将56个交集靶点上传至STRING数据库,物种选择人类,设置相互作用阈值 ≥ 0.4 ,隐藏游离节点,构建PPI网络,并保存为TSV格式文件,利用Cytoscape 3.9.0软件构建可视化网络图。基因PPI网络中包含46个节点和120条边(图5)。利用cytoHubba插件进行分析,按度值排序,前5位靶点基因分别为Toll样受体4(TLR4)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、缺氧诱导因子1A(HIF1A)、髓过氧化物酶(MPO)、基质金属蛋白酶9(MMP9)。

3.1.6 分子对接结果 利用分子对接模拟分析主要活性成分与核心基因之间的结合能。其中亲和

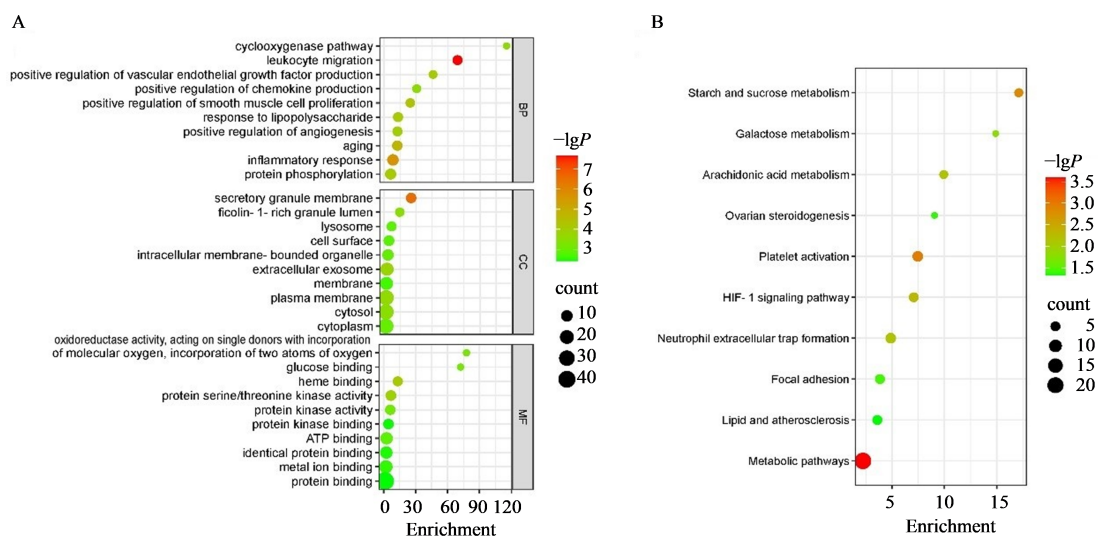


图3 黄芩方治疗缺血性卒中靶点基因GO(A)和KEGG(B)通路富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO (A) and KEGG pathways (B) of target genes of Huangxiong Formula for treatment of ischemic stroke

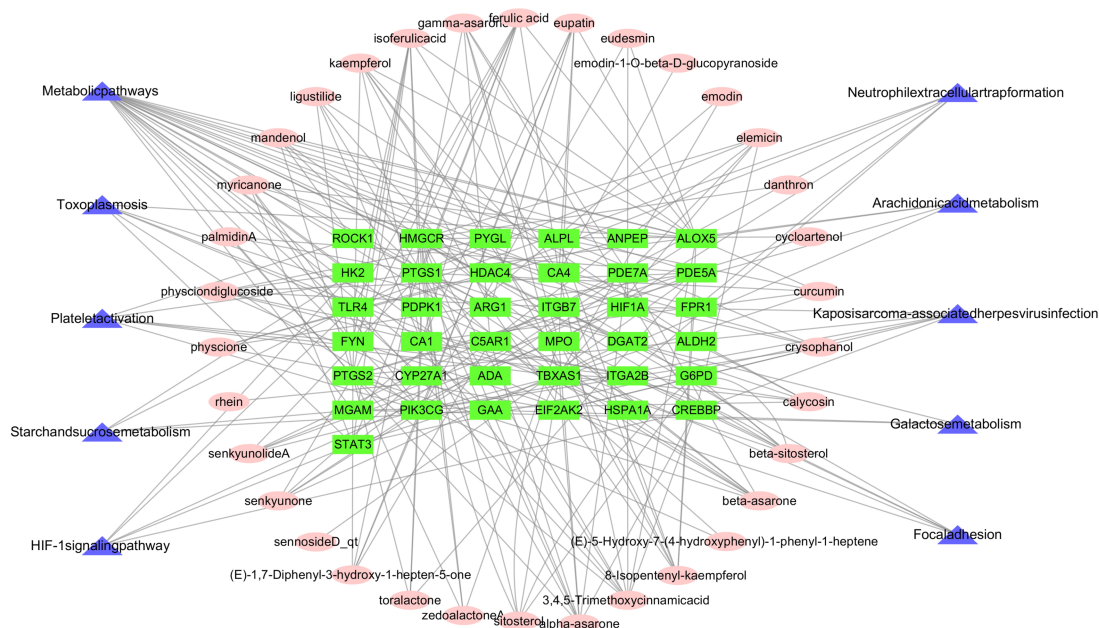


图4 黄芩方治疗缺血性卒中活性成分-靶点-通路网络

Fig. 4 Active component-target-pathway network of Huangxiong Formula for treatment of ischemic stroke

力是分子对接结果的分值,结合能 $<-5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 代表具有较强的结合活性。黄芩方5个核心成分分别为 α -细辛醚、3,4,5-三甲氧基肉桂酸、 β -细辛醚、异阿魏酸、阿魏酸,治疗缺血性卒中中的5个核心靶点分别为TLR4、STAT3、HIF1A、MPO、MMP9。将核心成分与核心靶点分别进行分子对接,结合能结果见表3。代表性分子对接可视化结果见图6。

3.1.7 免疫浸润分析结果 对GSE16561进行ssGSEA分析,得到了免疫细胞在缺血性卒中患

者和健康人中的统计差异。GSE16561数据集显示中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、浆样树突状细胞、激活树突状细胞、自然杀伤细胞、记忆性B细胞、调节性T细胞、2型辅助性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、效应型CD4 T细胞、中枢型记忆CD8 T细胞的浸润水平在缺血性卒中患者中显著增加(图7-A)。提取患者免疫细胞相关数据,将缺血性卒中患者按照核心基因分析免疫细胞数量差异。结果显示,TLR4表达与中性粒细胞呈显著正相关,激

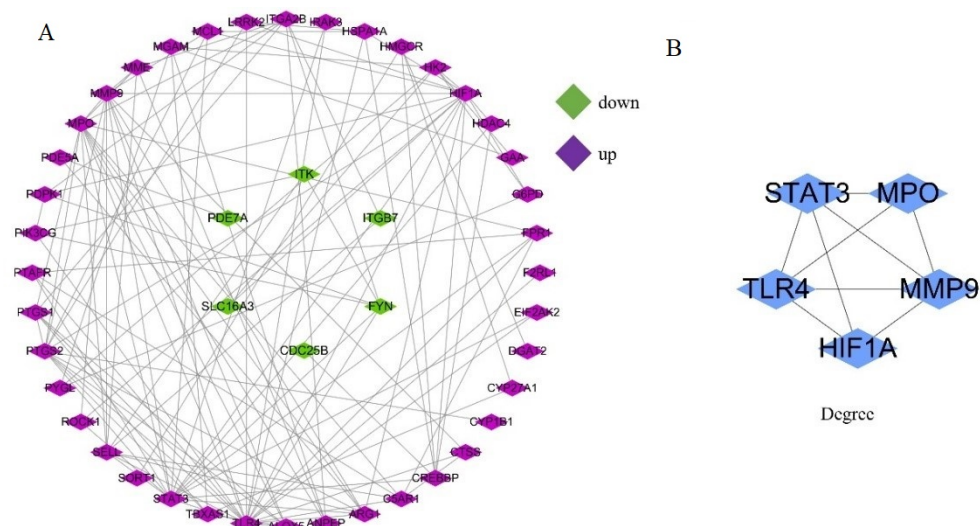


图5 黄芩方治疗缺血性卒中靶点PPI网络(A)及核心靶点基因(B)

Fig. 5 PPI network (A) and core target genes (B) of Huangxiong Formula for treatment of ischemic stroke

表3 黄芩方核心成分与核心靶点分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energy of Huangxiong Formula core components and core targets

核心成分	结合能/($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)				
	TLR4 (PDBID 2Z62)	STAT3 (PDBID 6NJS)	HIF1A (PDBID 1H2K)	MPO (PDBID 7QZR)	MMP9 (PDBID 1L6J)
α -细辛醚	-21.3	-21.3	-19.2	-23.4	-21.3
3,4,5-三甲氧基肉桂酸	-18.5	-20.9	-21.7	-19.6	-18.0
β -细辛醚	-22.3	-20.1	-17.6	-22.2	-20.9
异阿魏酸	-22.7	-22.6	-19.6	-20.1	-17.6
阿魏酸	-21.0	-23.0	-23.4	-19.6	-18.8

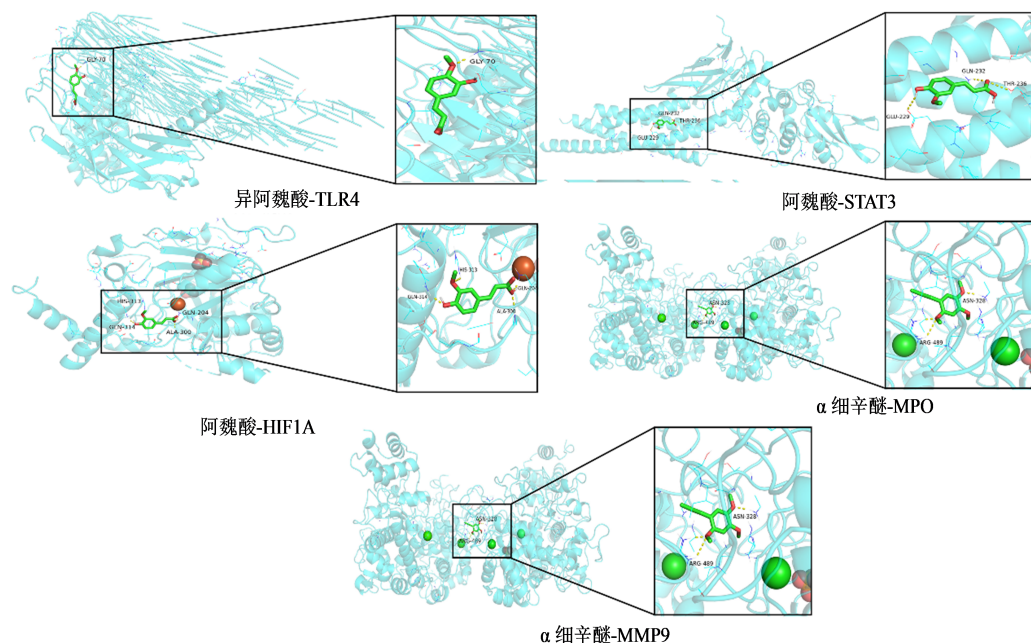


图6 黄芩方治疗缺血性卒中主要核心成分与核心靶点分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking patterns between main core components and core targets of Huangxiong Formula for treatment of ischemic stroke

活B细胞呈显著负相关;STAT3表达与激活树突状细胞呈显著正相关,激活CD8 T细胞呈显著负相关;HIF-1A表达与自然杀伤细胞呈显著正相关;MPO表达与肥大细胞呈显著正相关,激活CD4 T细胞呈最显著负相关;MMP9表达与肥大细胞呈显著正相关,激活CD8 T细胞呈显著负相关(图7-B~F)。

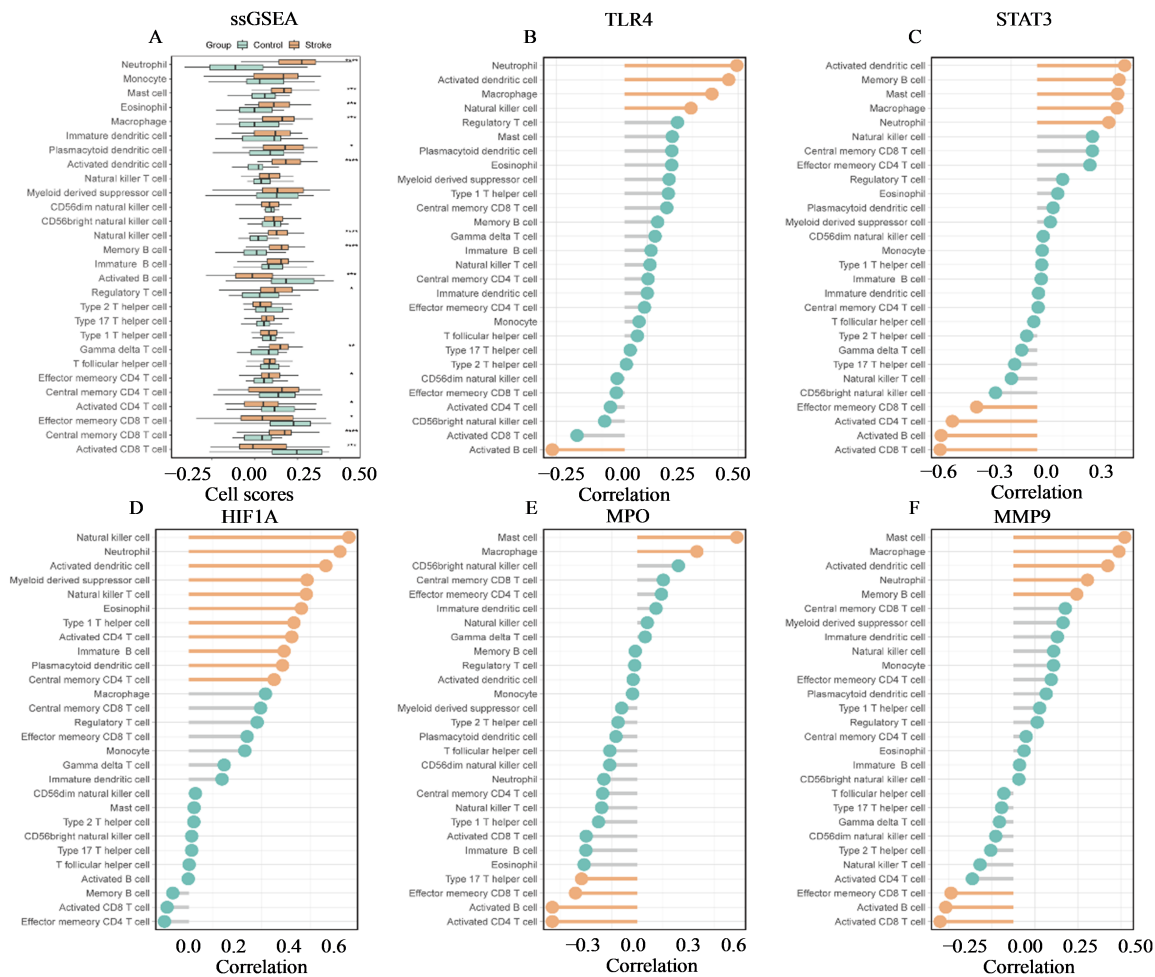
3.2 黄芩方对I/R大鼠的保护作用及相关机制

3.2.1 黄芩方对I/R大鼠的保护作用 如图8-A所示,假手术组大鼠未观察到神经行为的缺损,而模型组大鼠的神经行为学评分显著升高,出现显著的神经行为损伤($P<0.01$)。与模型组相比,黄芩方组和阳性药阿司匹林组大鼠的神经行为缺陷程度均明显降低,其可有效减少缺血对局部脑区神经元的损伤($P<0.01$)。采用TTC染色从梗死体积方面评价黄芩方对I/R大鼠的脑保护作用。各组TTC染色

脑切片见图8-B,梗死体积统计数据见图8-C。假手术组大鼠无脑梗死体积,模型组大鼠脑组织出现严重的梗死($P<0.01$),黄芩方组和阿司匹林组可显著降低I/R大鼠脑梗死体积($P<0.01$)。

3.2.2 黄芩方对I/R大鼠脑组织中Iba-1表达的影响 Iba-1(小胶质细胞标记物)免疫组织化学染色显示:假手术组海马CA1区Iba-1标记的小胶质细胞呈分枝杆状,胞质较小,此为静息小胶质细胞;模型组海马CA1区Iba-1阳性小胶质细胞免疫反应性较假手术组显著升高,多呈棕色颗粒状的阿米巴样,且胞质增大,分支缩短变粗;然而,黄芩方组海马CA1区Iba-1阳性小胶质细胞免疫反应性则明显降低,可见少许体积变大,呈棕色颗粒状的阿米巴样小胶质细胞(图9)。

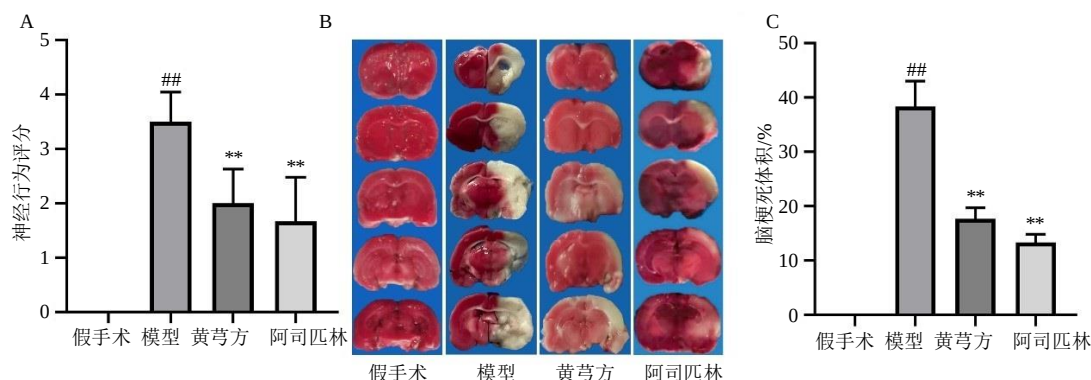
3.2.3 黄芩方对I/R大鼠脑组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平的影响 如图10所示,与假手术组比较,



A-缺血性脑卒中患者与健康人的免疫细胞差异分析;B~F-黄芩方治疗缺血性脑卒中核心靶点基因免疫浸润分析
A-difference analysis of immune cells between ischemic stroke patients and healthy people; B~F-immune infiltration analysis of core target genes of Huangqiong Formula for treatment of ischemic stroke

图7 缺血性脑卒中患者免疫浸润分析

Fig. 7 Immune infiltration analysis of ischemic stroke patients



A-神经行为学评分; B-TTC染色; C-脑梗死体积定量分析; 与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
A-neurological score; B-TTC staining; C-quantitative analysis of cerebral infarction volume; ^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图8 黄芩方对I/R损伤大鼠神经行为学评分及脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Effect of Huangxiong Formula on neurological score and infarct volume in rats with cerebral ischemia reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)

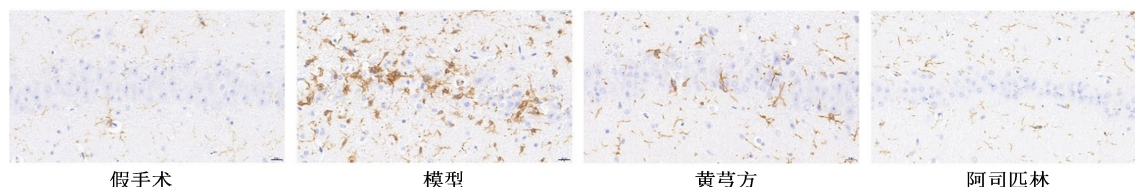
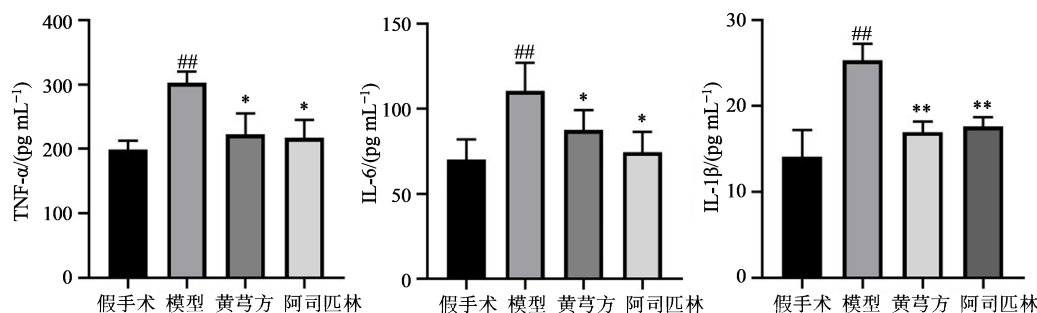


图9 黄芩方对I/R大鼠脑组织中Iba-1表达的影响($\times 400$)

Fig. 9 Effect of Huangxiong Formula on Iba-1 expression in brain tissue of I/R rats ($\times 400$)



与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图10 黄芩方对I/R大鼠脑组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 10 Effect of Huangxiong Formula on TNF- α , IL-1 β and IL-6 in brain tissue of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

模型组大鼠脑组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芩方和阿司匹林组大鼠脑组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

3.2.4 黄芩方对I/R大鼠核心基因mRNA表达的影响 如图11所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑

4 讨论

缺血性脑卒中是全世界人民死亡和残疾的主

组织TLR4、STAT3、MPO和MMP9 mRNA表达显著升高($P < 0.01$),HIF1A mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芩方组和阿司匹林组大鼠脑组织TLR4、STAT3、MPO、MMP9 mRNA表达水平明显降低($P < 0.01$),同时HIF1A mRNA的表达明显升高($P < 0.01$)。

要原因之一,目前缺乏有效的治疗方法^[27]。越来越多的证据表明,中药复方在治疗缺血性脑卒中方面

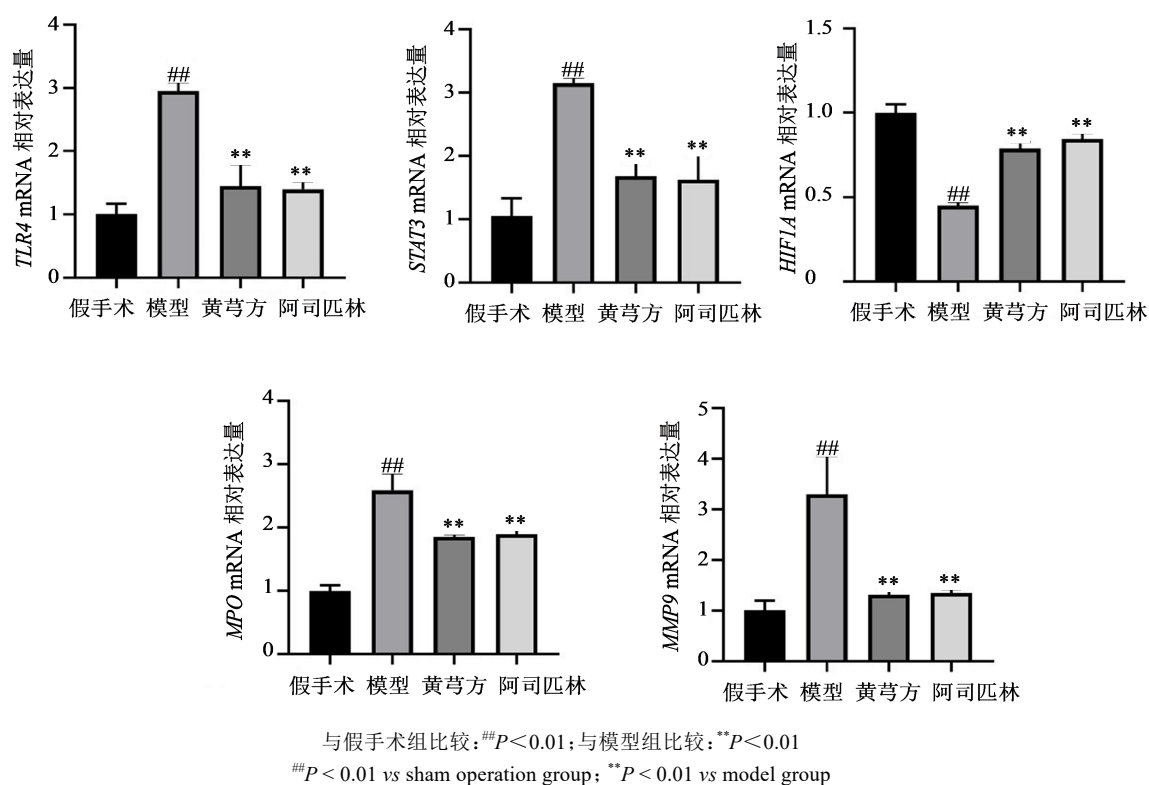


图11 黄芩方对I/R大鼠脑组织TLR4、STAT3、HIF1A、MPO和MMP9 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effect of Huangxiong Formula on expression of TLR4, STAT3, HIF1A, MPO, and MMP9 mRNA in I/R rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

具有副作用少、生物机制多途径的特点^[28]。研究表明,黄芩方对缺血性脑卒中的临床疗效好,但其作用机制尚不清楚^[29]。本研究采用网络药理学的方法探索黄芩方治疗缺血性脑卒中的作用机制,并进一步对其药效进行动物实验验证。

本研究利用TCMSP数据库($OB \geq 30$ 且 $DL \geq 0.18$)和文献检索获得35种黄芩方活性成分,通过Swiss Target Prediction数据库获得对应靶点754个。利用GEO数据库获取了677个缺血性脑卒中相关靶点,通过与黄芩方靶点的交集,获得了56个交集靶点。为了进一步明确黄芩方治疗缺血性脑卒中的机制,对交集靶点进行了GO和KEGG分析,GO分析表明黄芩方中活性成分可能通过分泌颗粒膜、胞外体和质膜等细胞组分参与炎症反应、脂多糖反应和环氧化酶途径等生物学过程。这些结果提示黄芩方可能作用于多细胞组分产生不同生物学功能,从而发挥治疗缺血性脑卒中的功效。KEGG分析表明,代谢途径、中性粒细胞胞外诱捕网形成、HIF-1信号传导途径等可能在黄芩方治疗缺血性脑卒中发挥重要作用。

基于成分-靶点-通路网络,发现黄芩方治疗缺

血性脑卒中的主要活性成分为 α -细辛醚、 β -细辛醚和阿魏酸等。有研究报道 α -细辛醚在改善缺血性脑卒中诱导的脑损伤中发挥了明显作用,且能减少脑I/R引起的脑梗死体积,改善脑神经功能等,其可能机制是下调IL-1 β 、IL-18表达^[30]。异阿魏酸具有抗炎活性^[31]。 β -细辛醚具有抗炎活性,易透过血脑屏障到达脑组织,为治疗各种脑疾病方面提供了重要保障^[32]。阿魏酸具有清除和抑制氧自由基、抗脂质过氧化作用,进而加强脑缺血再灌注损伤的保护作用^[33-34],阿魏酸还具有可明显抑制小胶质细胞活化、神经性炎症的作用^[35]。3,4,5-三甲氧基肉桂酸对脂多糖诱导的BV2小胶质细胞NO生成具有显著抑制作用^[36-37]。由此推测,黄芩方具有多成分、多靶点的特点,这些活性化合物与缺血性脑卒中的相关性有待深入研究。

运用cytoHubba插件筛选出黄芩方治疗缺血脑卒中的核心靶点TLR4、STAT3、HIF1A、MPO和MMP9,这些靶点基因与缺血性脑卒中关系密切。TLR4参与神经系统缺血低氧损伤,TLR4是1种先天性免疫受体家族,在调节炎症和参与脑卒中引起的神经炎症中发挥重要作用,多项研究证实TLR4

是脑卒中治疗的重要靶点^[38]。已有研究表明, STAT3在小胶质细胞活化过程中发挥重要作用,小胶质细胞活化介导的炎症反应在缺血性脑卒中的发病机制中起重要作用^[39]。MPO是缺血性脑卒中发生的炎症因素之一,通过与不同的细胞信号分子的复杂相互作用,受多种细胞信号机制所调节^[40]。研究发现,HIF1A显著减轻I/R大鼠脑水肿并改善其神经功能^[41]。脑缺血后MMP9的表达上调,与随后发生的脑损伤密切相关^[42]。分子对接结果验证了 α -细辛醚、3,4,5-三甲氧基肉桂酸、 β -细辛醚、异阿魏酸和阿魏酸与TLR4、STAT3、HIF1A、MPO和MMP9具有良好的结合能力,说明成分与靶点发生作用的可能性较大。

免疫炎症反应在缺血性脑卒中的发病和治疗过程中扮演着重要角色。本研究运用ssGSEA免疫浸润分析算法探究核心靶点基因与免疫细胞间的关系,结果表明TLR4表达与中性粒细胞与激活B细胞密切相关。STAT3与激活树突状细胞和CD8 T细胞密切相关。HIF1A与自然杀伤细胞密切相关。MPO与肥大细胞、激活CD4 T细胞关系密切。MMP9与肥大细胞、激活CD8 T细胞密切相关。提示上述核心靶点基因与免疫系统密切相关。

将网络药理预测结果与动物实验相结合,评估黄芩方对缺血性脑卒中的治疗效果,并验证其预测靶点的可靠性。本研究观察了黄芩方对脑I/R损伤大鼠的脑保护作用,黄芩方可减少神经行为学评分、梗死体积、活化小胶质细胞向阿米巴样形态转化。ELISA结果表明,与模型组相比,黄芩方明显降低模型大鼠脑组织促炎因子TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的水平。这些结果表明,黄芩方可以改善脑损伤,与以往的研究一致^[9]。进一步验证了黄芩方对脑组织中核心靶点的调节作用,与模型组相比,黄芩方组大鼠脑组织的TLR4、STAT3、MPO、MMP9 mRNA表达水平明显降低。同时,与模型组相比,黄芩方组大鼠脑组织的HIF1A mRNA的表达明显增加。这些结果表明,黄芩方对缺血性脑卒中的治疗机制与TLR4、STAT3、HIF-1A、MPO和MMP9的核心靶点有关。

本研究采用网络药理学、分子对接、免疫浸润分析与动物实验相结合的方法,揭示黄芩方治疗缺血性脑卒中的作用机制,为中药治疗缺血性脑卒中提供新的策略和研究思路。由于黄芩方治疗缺血性脑卒中多成分、多通路的特点,仍需进一步研究黄芩方对缺血性脑卒中的调控机制,为其临床提供

科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu B, Li F, Shi J S, et al. Gastrodin ameliorates subacute phase cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis in rats [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4144-4152.
- [2] «中国脑卒中防治报告»编写组. «中国脑卒中防治报告2019»概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272-280.
Report on Stroke Prevention and Treatment in China Writing Group. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2019 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2020, 17(5): 272-280.
- [3] 陈浩, 夏伦祝. 正交试验优选通脑精胶囊的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 30-32.
Chen H, Xia L Z. Orthogonal test to optimize the extraction process of Tongnaojing capsule [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2009, 15(5): 30-32.
- [4] 李清晖. 探讨黄芩抗栓胶囊治疗腔隙性脑梗死的临床疗效和对认知功能的影响 [J]. 四川解剖学杂志, 2019, 27(4): 60-61.
Li Q H. To explore the clinical effect of Huangxiong Kangshuan Capsule on lacunar cerebral infarction and its influence on cognitive function [J]. Sichuan J Anat, 2019, 27(4): 60-61.
- [5] 郑文旭. 黄芩抗栓胶囊对脑梗死急性期风痰瘀阻证的临床意义 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(7): 829-830.
Zheng W X. Clinical significance of Huangxiong Kangshuan capsule on syndrome of wind-phlegm and blood stasis in acute cerebral infarction [J]. J Basic Chin Med, 2015, 21(7): 829-830.
- [6] 李其英, 江婷战, 陈永华. 黄芩抗栓胶囊治疗糖尿病并发脑梗死急性期患者的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(2): 170-172.
Li Q Y, Jiang T Z, Chen Y H. Observation on the therapeutic effect of Huangxiong Kangshuan capsule on diabetic patients complicated with acute cerebral infarction [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2013, 11(2): 170-172.
- [7] 谢道俊, 江婷战, 李之和, 等. 通脑精胶囊对IR大鼠局灶性脑缺血高胰岛素血症和胰岛素敏感性的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(1): 36-39.
Xie D J, Jiang T Z, Li Z H, et al. Effects of tongnaojing capsules on hyperinsulinemia and insulin sensitivity in the rat model of insulin resistance complicated with focal

- cerebral ischemia [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2003, 26(1): 36-39.
- [8] 桂军明, 谢道俊, 韦彪, 等. 黄芩抗栓胶囊治疗脑梗死急性期风痰瘀阻型伴胰岛素抵抗的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 848-851.
- Gui J M, Xie D J, Wei B, et al. Treatment of acute-stage cerebral infarction (type of wind-phlegm obstruction) accompanied by insulin resistance with Huangxiong Kangshuan Capsules [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2013, 36(12): 848-851.
- [9] 曹仕健, 刘妮, 黄为, 等. 黄芩抗栓胶囊对急性脑梗死患者炎症因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24(3): 246-248.
- Cao S J, Liu N, Huang W, et al. Effect of Huangxiong Kangshuan capsule on inflammatory factors in patients with acute cerebral infarction [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care, 2017, 24(3): 246-248.
- [10] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. Chin Herb Med, 2016, 8 (2): 107-116.
- [11] Wang M L, Yang Q Q, Ying X H, et al. Network pharmacology-based approach uncovers the mechanism of GuanXinNing Tablet for treating Thrombus by MAPKs signal pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 652.
- [12] Chen L D, Cao Y, Zhang H, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Yangxinshi Tablet for treating heart failure [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 219: 359-368.
- [13] Zhang C, Su T, Yu D, et al. Revealing active ingredients, potential targets, and action mechanism of Ermiao Fang for treating endometritis based on network pharmacology strategy [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 113051.
- [14] 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.
- [15] Barr T L, Conley Y, Ding J, et al. Genomic biomarkers and cellular pathways of ischemic stroke by RNA gene expression profiling [J]. Neurology, 2010, 75(11): 1009-1014.
- [16] 陈浩. 薄层扫描法测定通脑精胶囊中大黄素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 103-104.
- Chen H. Determination of emodin in tongnaojing capsules by TLC scanning [J]. Chin J Hosp Pharm, 2006, 26(1): 103-104.
- [17] 汪远金, 方正清, 雷黎, 等. 通脑精胶囊对急性局灶性脑缺血胰岛素抵抗大鼠 NO 和 TNF α 的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2002(3): 39-41.
- Wang Y J, Fang Z Q, Lei L, et al. Influences of Tongnaojing capsule on the contents of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in insulin resistance rats after local cerebral ischemia [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2002 (3): 39-41.
- [18] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [19] Zhang F H, Wang Z M, Liu Y T, et al. Bioactivities of serotonin transporter mediate antidepressant effects of Acorus tatarinowii Schott [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 241: 111967.
- [20] Zhang L, Yang D H, Zhao X, et al. Metabolism of Chuanxiong Rhizoma Decoction: Identification of the metabolites in WZS-miniature pig urine [J]. Fitoterapia, 2015, 105: 177-186.
- [21] Qin Y W, Fei C H, Zhang W, et al. Based on UPLC/MS/MS and bioinformatics analysis to explore the difference substances and mechanism of *Curcuma Radix* (*Curcuma wenyujin*) in dysmenorrhea [J]. Chem Biodivers, 2022, 19 (10): e202200361.
- [22] 吴惠勤, 张桂英, 曾莉, 等. 超临界 CO₂ 萃取石菖蒲有效成分的 GC-MS 分析 [J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 70-71.
- Wu H Q, Zhang G Y, Zeng L, et al. Analysis of essential oil from rhizoma acori tatarinowii by GC-MS with supercritical fluid extraction [J]. J Instrum Anal, 2000, 19 (6): 70-71.
- [23] Yu Y, Liu H, Yang D, et al. Aloe-emodin attenuates myocardial infarction and apoptosis via up-regulating miR-133 expression [J]. Pharmacol Res, 2019, 146: 104315.
- [24] 于潇, 王贵阳, 侯宇东, 等. 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1471-1484.
- Yu X, Wang G Y, Hou D Y, et al. Research progress on effect and mechanism of traditional Chinese medicine against cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(5): 1471-1484.
- [25] 徐飞飞, 崔恺, 王立有, 等. α -细辛醚通过调控 NLRP3 通路保护氧糖剥夺/再灌注损伤 BV2 细胞的研究 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(8): 1209-1218.
- Xu F, Cui K, Wang L Y, et al. Study of α -Asarone protecting BV2 cells damaged by OGD/R by regulating of NLRP3 pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38 (8): 1209-1218.
- [26] 刘德彬, 陈晓璞, 陈文杰, 等. 阿司匹林、氯吡格雷抵抗相关基因多态性及其与复发性脑梗死的关系 [J]. 临床荟萃, 2022, 37(4): 320-324.
- Liu D B, Chen X P, Chen W J, et al. Relations between aspirin & clopidogrel resistance-related gene

- polymorphisms and corresponding recurrent cerebral infarction [J]. Clin Foc, 2022, 37(4): 320-324.
- [27] Jiang C T, Wu W F, Deng Y H, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review) [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(5): 2006-2018.
- [28] Xu X B, Lai Y Y, Hua Z C. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20180992.
- [29] 李之和, 刘妮, 黄为, 等. 通脑精对大鼠局灶脑缺血一氧化氮和自由基的影响[J]. 安徽中医临床杂志, 2001(4): 249-250.
- Li Z H, Liu N, Huang W, et al. Influence of Tongnaojing on nitric oxide and free radicals in focal cerebral ischemia in rats [J]. Clin J Anhui Tradit Chin Medicine, 2001(4): 249-250.
- [30] Balakrishnan R, Cho D Y, Kim I S, et al. Molecular mechanisms and therapeutic potential of α - and β -asarone in the treatment of neurological disorders [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(2): 281.
- [31] 武密山, 赵素芝, 高维娟, 等. 升麻苷H-1对脑缺血大鼠纹状体氨基酸类神经递质含量的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5): 831-835.
- Wu M S, Zhao S Z, Gao W J, et al. Effect of cimicifugoside H-1 on amino acid neurotransmitters in striatum of rats with cerebral ischemia [J]. Chin J Pathophysiol, 2016, 32(5): 831-835.
- [32] Huang L P, Deng M Z, He Y P, et al. β -asarone and levodopa co-administration increase striatal dopamine level in 6-hydroxydopamine induced rats by modulating P-glycoprotein and tight junction proteins at the blood-brain barrier and promoting levodopa into the brain [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(6): 634-643.
- [33] Ren Z K, Zhang R P, Li Y Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5): 1444-1456.
- [34] 杨琳洁, 杨凯丽, 钟宛凌, 等. 基于网络药理学探讨川芎嗪与阿魏酸抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(12): 2555-2562.
- Yang L J, Yang K L, Zhong W L, et al. Study on anti-arteriosclerosis mechanism of ligustrazine and ferulic acid based on network pharmacology [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(12): 2555-2562.
- [35] Bao Y F, Chen Q J, Xie Y S, et al. Ferulic acid attenuates oxidative DNA damage and inflammatory responses in microglia induced by benzo(a)pyrene [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 77: 105980.
- [36] Zhao Z F, Song H H, Xie J, et al. Research progress in the biological activities of 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid (TMCA) derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2019, 173: 213-227.
- [37] Cho N, Huh J, Yang H, et al. Chemical constituents of *Polygala tenuifolia* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2012, 27(1): 1-4.
- [38] Zhang J W, Jiang H, Wu F, et al. Neuroprotective effects of hesperetin in regulating microglia polarization after ischemic stroke by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. J Healthc Eng, 2021, 2021: 9938874.
- [39] Gao J L, Yao M J, Zhang W, et al. *Panax notoginseng* saponins alleviates inflammation induced by microglial activation and protects against ischemic brain injury via inhibiting HIF-1 α /PKM2/STAT3 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 155: 113479.
- [40] Chen S, Chen H S, Du Q H, et al. Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: Potential application of natural compounds [J]. Front Physiol, 2020, 11: 433.
- [41] 刘庆新, 陈金波, 朱玉红, 等. 脑出血灶周缺氧诱导因子-1 α 表达与脑水肿的关系 [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(9): 921-924.
- Liu Q X, Chen J B, Zhu Y H, et al. Correlation between the expression of HIF-1 α in perihematomal brain tissue and formation of brain edema in patients with hypertensive cerebral hemorrhage [J]. Chin J Emerg Med, 2007, 16(9): 921-924.
- [42] Hu C, Dong Z L. microRNA-212 promotes the recovery function and vascular regeneration of endothelial progenitor cells in mice with ischemic stroke through inactivation of the Notch signaling pathway via downregulating MMP9 expression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7090-7103.

[责任编辑 刘东博]