

基于网络药理学的脑震宁颗粒治疗脑外伤的机制分析

卢紫娟¹, 刘海霞², 李 昆², 秦正国², 秦雪梅¹, 杜冠华³, 朱 平^{2*}, 李震宇^{1*}

1. 山西大学中医现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西振东安特生物制药有限公司, 山西 晋中 030600

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 借助网络药理学技术预测脑震宁颗粒主要成分的潜在作用靶点, 探讨其治疗脑外伤多成分-多靶点-多通路的作用机制。 **方法** 依据反向分子对接服务器 (DRAR-CPI) 和 CoolGen 数据库预测和筛选脑震宁颗粒主要成分的作用靶点; 采用 Cytoscape 软件 ClueGO 插件对靶点进行 GO 富集分析, 借助生物信息学注释数据库 (DAVID) 对获取的靶点信息进行 KEGG 通路注释分析; 采用 Cytoscape 软件构建药材-成分-靶点-通路-疾病网络。 **结果** 脑震宁颗粒的 33 个主要成分涉及丝裂原活化蛋白激酶-1 (MAPK1)、胱天蛋白酶-3 (CASP3)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK3B) 等 34 个靶点, GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析提示脑震宁颗粒可作用于活性氧的生物合成、平滑肌细胞增殖等生物过程, 以及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)、MAPK 通路、JAK/STAT、mTOR 等信号转导通路; 网络分析显示脑震宁颗粒的作用机制可能与调控氧化应激、抑制炎症反应和神经细胞凋亡、调节脑内硫化氢生成和纤溶酶原 (PLG) 活性、改善认知功能及脑外伤后抑郁等相关。 **结论** 揭示了脑震宁颗粒多成分、多靶点、多通路的作用机制, 为进一步深入研究脑震宁颗粒药效物质基础及作用机制奠定了基础。

关键词: 脑震宁颗粒; 网络药理学; 脑震荡; 脑外伤; 作用机制; 丝裂原活化蛋白激酶-1; 胱天蛋白酶-3; 糖原合成酶激酶-3 β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3531-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.010

Network pharmacology based study on mechanism of Naozhenning Granule for treatment of cerebral trauma

LU Zi-juan¹, LIU Hai-xia², LI Kun², QIN Zheng-guo², QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua³, ZHU Ping², LI Zhen-yu¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Zhendong Ante Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To predict the targets of the main ingredients in Naozhenning Granule and explore its molecular mechanism of multi-components, multi-targets, and multi-pathways. **Methods** Reverse molecular docking (DRAR-CPI) and CoolGen database were used to predict and screen the targets of Naozhenning Granule; GO enrichment was performed in ClueGO of Cytoscape; KEGG pathway analysis was conducted in DAVID database; The herbs-ingredients-targets-pathways-disease network was constructed in the Cytoscape software. **Results** A total of 33 candidate compounds were screened out, and a total of 34 potential targets were revealed for Naozhenning Granule, such as MAPK1, CASP3, and GSK3B. The results of GO enrichment and KEGG pathway analysis indicated that Naozhenning Granule was involved in a series of biological process, such as reactive oxygen species biosynthetic process and positive regulation of smooth muscle cell proliferation as well as some signaling pathways, including PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT, and mTOR. The herbs-ingredients-targets-pathways-disease network suggested that the mechanism of Naozhenning Granule was involved with the regulation of oxidative stress, inhibiting the inflammatory response and the apoptosis of neural cells, regulation of the formation of H₂S and the activity of PLG, improving the cognitive function and post traumatic depression. **Conclusion** The study suggested that the molecular mechanism of Naozhenning Granule was related with the multi-components, multi-targets, and multi-pathways, which provided a scientific basis for further elucidation of the active ingredients and pharmacological action of

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 山西省重点研发计划 (201603D3113003); 山西省中药现代化振东专项基金 (2106ZD0404)

作者简介: 卢紫娟 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分。Tel: 15534062940 E-mail: luzjsxu@163.com

*通信作者 李震宇, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制及活性成分研究。Tel: 15834101402 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

朱 平, 男, 高级工程师, 研究方向为中药工艺。Tel/Fax: (0354)2467991 E-mail: zp8236@sohu.com

Naozhenning Granule.

Key words: Naozhenning Granule; network pharmacology; brain concussion; cerebral trauma; molecular mechanism; MAPK1; CASP3; GSK3B

脑震宁颗粒是治疗脑外伤、脑震荡的常用药品,由丹参、陈皮、当归、川芎、牡丹皮等 11 味药组成,具有活血凉血、化瘀通络、益血安神、宁心定智、除烦止呕等功效,可用于脑外伤引起的头疼、头晕、烦躁、失眠、健忘、惊悸、恶心、呕吐等。其中当归、川芎、丹皮、地龙等可养血活血、凉血通瘀,枣仁、地黄、茯苓等可宁心定智、益气安神,竹茹可和胃降逆,主、辅、佐共同发挥作用^[1]。

目前对脑震宁颗粒的药理药效研究较少,张明升等^[2]研究了脑震宁的镇静和镇痛药效学作用,发现脑震宁能减少正常小鼠的自发活动次数,缩短戊巴比妥钠所致小鼠睡眠的诱导期,显著延长小鼠睡眠时间,提高小鼠的痛阈和减少乙酸所致扭体反应。其他研究主要集中在脑震宁颗粒对脑外伤^[1,3]、脑震荡^[4]、颅内血肿^[5]的临床疗效观察,证实其对重型颅脑损伤病人的头痛、头晕、失眠有良好的治疗作用^[5]。然而,对脑震宁颗粒治疗脑外伤、脑震荡的作用机制目前尚未开展过相关研究。

融合系统生物学和多向药理学提出的网络药理学可构建药物-靶点-疾病之间的复杂网络,利用网络分析理论从整体角度研究药物作用机制,为中药多成分、多靶点的药物作用机制阐释提供了一种新的研究策略^[6]。目前网络药理学已经用于远志^[7]、六经头痛片^[8]、大川芎方^[9]等多种中药或复方的作用机制研究。王昊等^[7]用网络药理学的方法发现远志中的多种活性成分通过调控 $A\beta$ 的生成与细胞的凋亡起到治疗阿尔茨海默病的作用。董亚楠等^[8]研究发现六经头痛片中 18 个化合物可通过 72 个作用靶标作用于 88 条通路,其作用机制与干预血管内稳态、炎症、神经中枢、免疫及激素调节等相关通路有关。本研究以脑震宁颗粒 11 味中药的主要成分为基础,运用网络药理学方法构建药材-成分-靶点-通路-疾病网络,系统预测其多成分、多靶点、多通路的作用特点,为进一步阐明其活性成分、作用机制以及发挥临床疗效的科学内涵提供依据。

1 材料与方法

1.1 活性成分的筛选及吸收、分布、代谢、排泄(ADME)性质评估

通过查阅文献整理出脑震宁颗粒中每味药材的

主要化学成分,同时利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)对各成分的 ADME 性质进行筛选,包括口服生物吸收利用度(OB)和类药性(DL)。利用 PubChem 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载各成分 sdf 格式的结构式,使用 ChemDraw3D 软件将其转为 mol2 格式文件保存。

1.2 靶点的预测

登陆 DRAR-CPI(<http://cpi.bio-x.cn/drar>)服务器上传筛选得到的脑震宁颗粒候选成分的 mol2 格式文件,下载计算结果。对接得分(Z-score)代表活性成分与蛋白质的相互作用强度,设定蛋白靶点纳入标准为 $Z\text{-score} < -1$ 。将筛选得到的蛋白靶点的 PDB ID 导入 UniProt 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/uniprot>),经过检索和转化操作得到脑震宁颗粒主要成分的潜在作用靶点^[10]。将反向预测获得的靶点与 CoolGen(<http://ci.smu.edu.cn/CoolGen/>)、Gene Card(<https://www.genecards.org/>)数据库中查询到的与脑震荡、脑外伤、神经保护、神经再生的靶点比对分析,筛选与脑震宁颗粒相关的作用靶点。

1.3 靶点类型归属

DisGeNET(<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>, Version 5.0)是一个包含与人类疾病相关的基因和变异的数据库。选择靶点检索后,依次输入脑震宁颗粒相关靶点,得到靶点类型的相关信息。

1.4 靶点间相互作用分析

String 数据库(<https://string-db.org/>)是一个搜寻蛋白间相互作用的数据库。既包括蛋白之间的直接物理作用,也包括间接功能相关性。选择 Multiple Proteins 检索,输入脑震宁颗粒相关靶点,设定物种为人,得到靶点之间的作用关系。

1.5 靶点生物学功能注释分析

将筛选得到的脑震宁颗粒作用靶点导入 Cytoscape 3.5.1 软件 ClueGo 插件,通过输入靶基因名称列表并限定物种为人,经检索和转化操作,设定阈值 $P < 0.05$,用 CluePedia 插件进行绘图,进行 GO 生物学过程富集分析。

1.6 靶点通路注释分析

将筛选得到的脑震宁颗粒作用靶点导入

DAVID 数据库,通过输入靶点名称列表并限定物种为人,并将所有靶点名称校正为其正式名称(official gene symbol),经上述数据库检索和转化操作,设定阈值 $P < 0.05$,用 GraphPad Prism 5 绘图,进行 KEGG 代谢通路富集分析,并将脑震宁颗粒对应的靶点直接映射到通路上,药物靶点富集的通路被认为是药物调控的通路。对其中富集的疾病部分进行 MeSH(<https://www.nlm.nih.gov/mesh/>)分类分析。

1.7 药材-成分-靶点-通路-疾病网络构建

根据脑震宁颗粒潜在作用靶点的预测结果,采用 Cytoscape 3.5.1 软件的关联(Merge)功能构建脑震宁颗粒的药材-成分-靶点-通路-疾病网络模型。采用 Network Analyzer 功能对网络的度(degree)、中介度(betweenness centrality)、网络集中化(network centralization)和网络异质性(network

heterogeneity)参数进行分析。网络中节点(node)表示药材、成分、靶点、通路以及疾病,若某一靶点为某化合物的潜在作用靶点,则以边(edge)相连。

2 结果

2.1 脑震宁颗粒治疗脑外伤活性成分的初步筛选

由于目前尚无脑震宁颗粒活性成分的研究报道,因此对脑震宁颗粒 11 味组方药材的主要化学成分进行文献检索,并通过 TCMSP 数据库对这些成分的 ADME 性质进行分析,以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为指标^[10]进一步筛选。虽然部分成分(如阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 A 等)OB 值和 DL 值较低,或无 OB、DL 值报道(羽扇豆烯醇、羽扇豆烯酮等),但是这些成分在药材中含量较高,或研究显示其具有明显的药理作用,因此将这些成分也纳入后续的网络药理学分析,共得到 10 味药材的代表性化学成分 33 个(表 1)。

表 1 脑震宁颗粒中代表性成分信息

Table 1 Chemical information of main compounds in Naozhenning Granule

编号	化合物	OB/%	DL	度值	药材归属
1	阿魏酸(ferulic acid)	40.43	0.06	4	川芎、当归
2	橙皮苷(hesperidin)	13.33	0.67	1	陈皮
3	川陈皮素(nobiletin)	61.67	0.52	2	陈皮
4	丹参酮 I(tanshinone I)	29.27	0.36	4	丹参
5	丹参酮 II _A (tanshinone II _A)	49.89	0.40	1	丹参
6	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76	2	当归、地黄
7	梓醇(catalpol)	5.07	0.44	1	地黄
8	毛蕊花糖苷(acteoside)	2.94	0.62	1	地黄
9	常春藤皂苷元(hederagenin)	36.91	0.75	5	茯苓
10	茯苓酸 B(poricoic acid B)	30.52	0.75	6	茯苓
11	茯苓新酸 A(poricoic acid A)	51.30	0.07	8	茯苓
12	去氢土莫酸(dehydrotumulosic acid)	31.07	0.82	4	茯苓
13	苯甲酰芍药苷(benzoyl paeoniflorin)	31.14	0.54	2	牡丹皮
14	丹皮酚(paeonol)	28.79	0.04	4	牡丹皮
15	槲皮素(quercetin)	46.43	0.28	6	牡丹皮
16	没食子酸(gallic acid)	31.69	0.04	5	牡丹皮
17	芹菜素(apigenin)	23.06	0.21	3	酸枣仁
18	斯皮诺素(spinosin)	6.31	0.72	1	酸枣仁
19	酸李碱(zizyphusine)	41.53	0.55	3	酸枣仁
20	酸枣仁皂苷 A(jujuboside A)	8.04	0.02	2	酸枣仁
21	(S)-乌药碱[(S)-coclaurine]	42.35	0.24	2	酸枣仁
22	藜本内酯(cis-ligustilide)	23.50	0.07	3	川芎、当归
23	洋川芎内酯 I(senkyunolide I)	46.80	0.08	1	川芎、当归
24	洋川芎内酯 A(senkyunolide A)	26.56	1.34	3	川芎、当归
25	α -雪松醇[(+)-cedrol]	16.23	0.12	6	柏子仁
26	表儿茶精[(-)-epicatechin]	28.93	0.24	1	柏子仁
27	儿茶精[(+)-catechin]	54.83	0.24	2	柏子仁
28	柏子仁双醇(platydiol)	—	—	2	柏子仁
29	红松内酯(pinusolide)	—	—	3	柏子仁
30	木栓醇(friedelanol)	—	—	4	竹茹
31	木栓酮(friedelin)	—	—	4	竹茹
32	羽扇豆烯醇(lupinenol)	—	—	3	竹茹
33	羽扇豆烯酮(lupeone)	—	—	5	竹茹

2.2 脑震宁颗粒活性成分靶点的预测、类型归属及靶点之间作用分析

将脑震宁颗粒的 33 个代表性化学成分输入 DRAR-CPI 后返回各成分所对应靶点的 chemical-protein 打分值, 以 $Z\text{-score} < -1$ 为阈值筛选后共得到 349 个靶点。在 Uniprot 网站输入这些靶点的 PDB ID, 共对应得到 301 个靶点。运用 CoolGen 和 Gene Card 数据库搜索文献报道中与脑外伤 (cerebral trauma)、脑震荡 (brain concussion)、

神经保护 (neuroprotection、neuroprotective)、神经再生 (nerve regeneration) 相关的靶点, 并与上述 301 个靶点进行对比分析, 得到 34 个可能与脑震宁颗粒治疗脑震荡、脑外伤相关的潜在作用靶点 (表 2)。其中茯苓新酸 A 拥有最多的潜在靶点 (10 个), 其次是茯苓酸 B (9 个)、藁本内酯 (8 个)、丹参酮 I (7 个)、槲皮素 (6 个)、 α -雪松醇 (6 个)、没食子酸 (6 个)、丹皮酚 (5 个)、阿魏酸 (5 个)、洋川芎内酯 A (4 个), 这些拥有较多靶点的成分对于

表 2 脑震宁颗粒活性成分治疗脑外伤潜在靶点及其类型归属

Table 2 Potential targets and classification of Naozhenning Granule for treatment of cerebral trauma

编号	PDB ID	靶点	蛋白	靶点分类
1	1GFW	CASP3	caspase-3	protease, enzyme modulator, hydrolase
2	1F0R	F10	coagulation factor X	protease, enzyme modulator, hydrolase, signaling molecule, calcium-binding protein, receptor
3	1Z6J	F3	tissue factor (TF)	defense/immunity protein, receptor
4	1RFN	F9	coagulation factor IX	protease, enzyme modulator, hydrolase, signaling molecule, calcium-binding protein, receptor
5	1RFN	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	null
6	1O6L	GSK3B	glycogen synthase kinase-3 beta	transferase, kinase
7	1GMN	HGF	hepatocyte growth factor	protease, enzyme modulator, hydrolase, signaling molecule, calcium-binding protein, receptor
8	2ILK	IL10	interleukin-10 (IL-10)	signaling molecule
9	2CYK	IL4	interleukin-4 (IL-4)	signaling molecule
10	2B7A	JAK2	tyrosine-protein kinase JAK2	transferase, kinase
11	2Z5X	MAOA	monoamine oxidase type A	transferase, oxidoreductase, nucleic acid binding
12	1TVO	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	transferase, kinase
13	2PK4	PLG	plasminogen	protease, hydrolase
14	1LQW	PROC	vitamin K-dependent protein C	defense/immunity protein, calcium-binding protein
15	1A8M	TNF	cachectin (TNF- α)	signaling molecule
16	1UZF	ACE	angiotensin-converting enzyme	null
17	1F8U	ACHE	acetylcholinesterase	
18	1ES7	BMP2	bone morphogenetic protein 2	signaling molecule
19	2CAB	CA1	carbonic anhydrase 1	
20	1A42	CA2	carbonic anhydrase 2	lyase
21	1JBQ	CBS	cystathionine beta-synthase	isomerase, lyase, hydrolase
22	3BWY	COMT	catechol-O-methyltransferase	transferase
23	2BH9	G6PD	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	oxidoreductase
24	1OGS	GBA	glucosylceramidase	null
25	1HWL	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme	null
26	1ZSX	KCNAB2	voltage-gated potassium channel subunit beta-2	transporter, oxidoreductase
27	1NSI	NOS2	nitric oxide synthase	nitric oxide synthase 2
28	1WWB	NTRK2	BDNF/NT-3 growth factors receptor	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
29	1I7I	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	transcription factor, receptor, nucleic acid binding
30	2C9V	SOD1	superoxide dismutase 1	oxidoreductase
31	1Q1Z	SULT2B1	sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	transferase
32	1QAB	TTR	transthyretin	transfer/carrier protein, transport
33	1Q11	YARS	tyrosine-tRNA	null
34	ITYL	INS	insulin	null

脑震宁颗粒治疗脑外伤可能发挥关键作用。此外, 1 个靶点也可能对应脑震宁颗粒的多种化学成分, 如靶点 MAPK1 对应的成分数量最多 (15 个), 其次是 IL10 (10 个)、CASP3 (10 个)、IL4 (8 个)、F9 (8 个)、GSK3B (7 个)、HGF (6 个)。

将脑震宁颗粒的 34 个潜在作用靶点依次输入 DisGeNET 数据库, 得到靶点类型的相关信息。由表 2 可知, 脑震宁颗粒的作用靶点类型包括信号分子、受体、蛋白 (免疫蛋白、钙结合蛋白等)、酶 (蛋白酶、水解酶、激酶、转移酶、氧化还原酶等), 说明脑震宁颗粒可通过不同的靶点类型共同发挥药效作用。

将筛选到的靶点输入 String 数据库中, 选择物种为人, 得到靶点之间相互作用网络图 (图 1), 该网络图包含 34 个节点、117 条边, 平均节点度为 6.88, 平均局部聚类系数为 0.66。节点之间连线越粗, 代表联系节点之间关联度越大。由图 1 可见, MAPK1、CASP3、GSK3B、JAK2、PLG、TNF 等靶点的相互联系密切, 说明脑震宁颗粒可能通过作用于多种靶点协同发挥药效作用。

2.3 脑震宁颗粒治疗脑外伤潜在作用靶点生物学功能注释分析

将脑震宁颗粒治疗脑外伤的 34 个潜在作用靶点通过 Cytoscape 3.5.1 软件 ClueGo 插件进行 GO 生

物学功能分析 (图 2)。GO 是一个国际标准化的基因功能分类体系, 包括 3 个分支, 即生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组分 (cellular component)。脑创伤会导致线粒体产生大量活性氧 (ROS), 其生成过量可直接破坏 ATP 酶的结构、氧化 ATP 酶上的氨基酸, 从而影响酶的活性, 抑制 ATP 酶合成速率, 导致 ATP 生成下降, 影响线粒体能量转换过程, 从而导致细胞凋亡^[11]。重度脑外伤急性期容易激活内、外源性凝血系统, 引起凝血功能障碍, 进而表现为血液高凝状态、弥散性血管内凝血等, 导致继发性脑出血。创伤、酸中毒、缺氧等因素能够造成组织内皮细胞出现损伤, 影响内皮功能, 一氧化氮 (NO) 作为血管的舒张因子, 也是主要的神经递质, 脑外伤时 NO 能够使脑部血流量增加, 抑制血管痉挛^[12]。GO 分析结果显示, 脑震宁颗粒治疗脑外伤的药效机制发挥可能与 reactive oxygen species biosynthetic process、positive regulation of smooth muscle cell proliferation、blood coagulation extrinsic pathway 和 neurotransmitter catabolic process 等生物过程有关。

2.4 靶点通路注释分析

将脑震宁颗粒治疗脑外伤的 34 个潜在作用靶点通过生物学信息注释数据库 (DAVID) 进行 KEGG 通路注释。由图 3 可知, 有 7 个靶点参与 PI3K-Akt

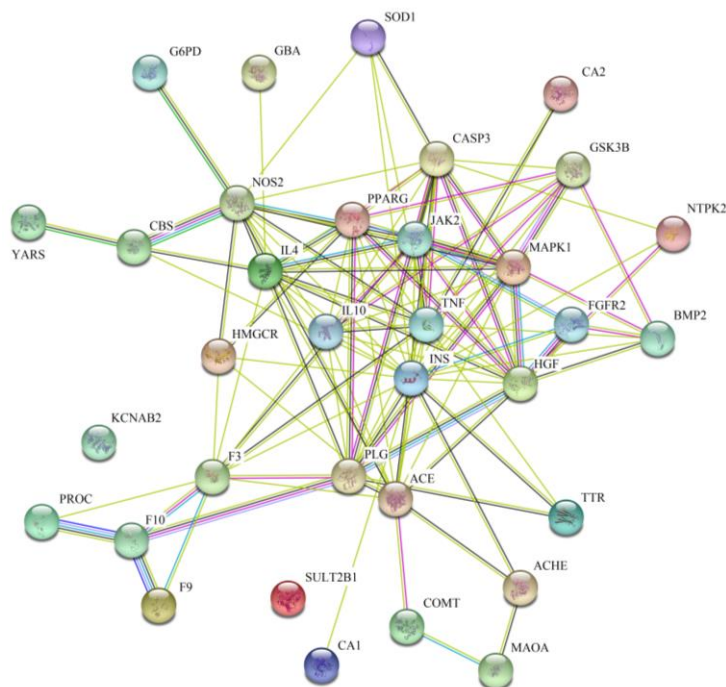


图 1 脑震宁颗粒治疗脑外伤潜在作用靶点之间相互作用网络图

Fig. 1 Interaction network of potential targets of Naozhenning Granule

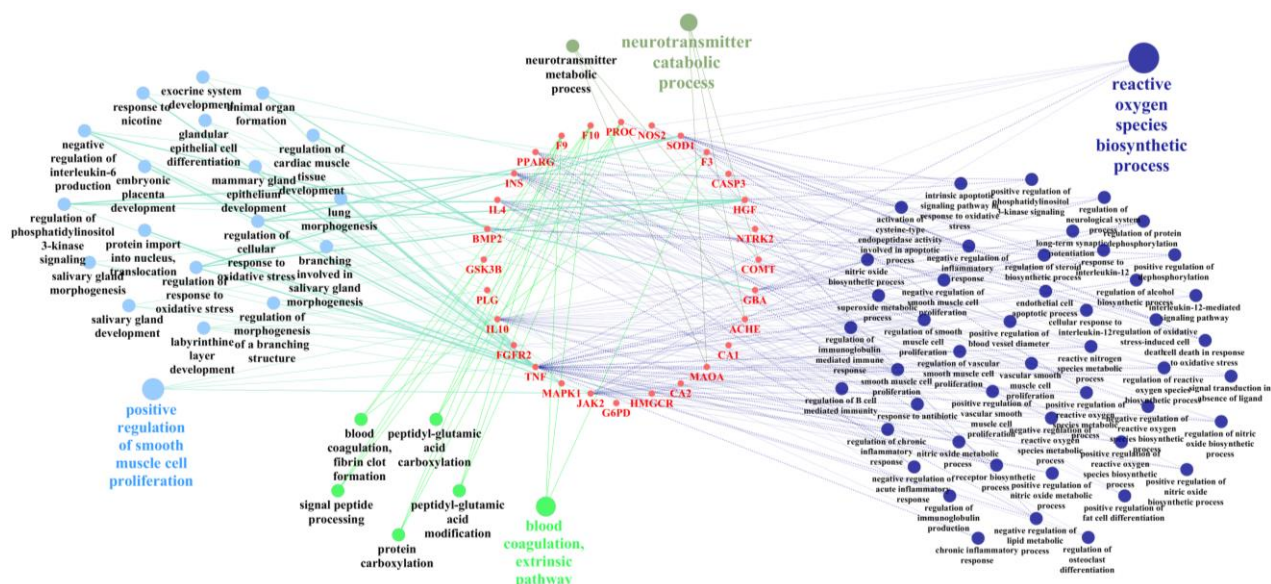


图2 脑震宁颗粒活性成分治疗脑外伤潜在作用靶点的GO生物过程富集分析

Fig. 2 GO biological process analysis of potential targets of Naozhenning Granule

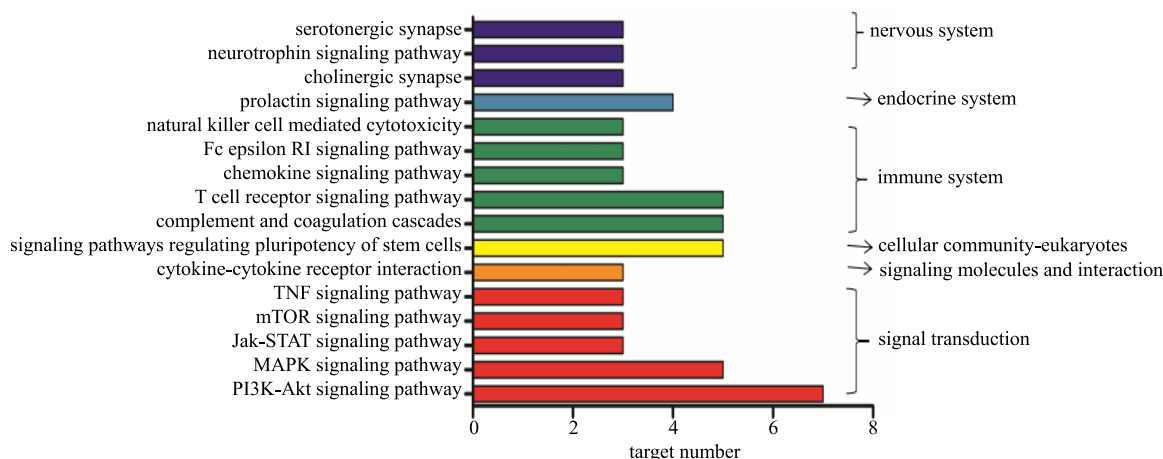


图3 脑震宁活性成分潜在治疗脑外伤靶点的 KEGG 代谢通路分析

Fig. 3 Enriched KEGG pathways analysis of potential targets of Naozhenning Granule

通路（占总靶点数量的 21.2%）分别有 5 个靶点参与 T cell receptor signaling pathway、MAPK signaling pathway、signaling pathways regulating pluripotency of stem cells 及 complement and coagulation cascades 通路（占总靶点数量的 15.2%），有 4 个靶点参与 prolactin signaling pathway 通路（占总靶点数量的 12.1%），分别有 3 个靶点参与 Fc epsilon RI signaling pathway、allograft rejection、Jak-STAT signaling pathway 等通路（占总靶点数量的 9.1%）。对注释得到的 16 条通路导入 KEGG 数据库进行通路分类，其中信号传导通路（signal transduction）有 5 条，包括 PI3K-Akt signaling pathway、MAPK signaling

pathway、Jak-STAT signaling pathway、mTOR signaling pathway 和 TNF signaling pathway; 免疫系统 (immune system) 相关通路有 5 条, 分别为 complement and coagulation cascades、T cell receptor signaling pathway、chemokine signaling pathway、Fc epsilon RI signaling pathway 和 natural killer cell mediated cytotoxicity; 神经系统 (nervous system) 相关通路有 3 条, 分别为 cholinergic synapse、neurotrophin signaling pathway 和 serotonergic synapse; 信号分子和交互通路 (signaling molecules and interaction) 有 1 条, 为 cytokine-cytokine receptor interaction; 真核细胞群体通路 (cellular community-

0.1604573815)、CASP3 (degree: 7; Betweenness: 0.10462409)、GSK3B (degree: 6; Betweenness: 0.02289136) 等拥有较高的度值和中介度值, 表明这些靶点可能为脑震宁颗粒治疗脑外伤、脑震荡的关键靶点。

2.6 脑震宁颗粒治疗脑外伤潜在靶点对应疾病及其 MeSH 分类

通过生物学信息注释数据库 (DAVID) 对脑震宁颗粒 34 个潜在作用靶点进行疾病分析, 将其中富集的疾病部分进行 MeSH 分类。由图 5 所示, 脑震宁颗粒治疗脑外伤潜在作用靶点所对应的疾病主要

是神经系统疾病和精神障碍。其中神经系统疾病包括脑缺血 (brain ischemia)、脑卒中 (stroke)、偏头痛症 (migraine disorders)、痴呆 (dementia)、脑肿瘤 (brain neoplasms) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease); 精神障碍类疾病包括重度抑郁障碍 (major depressive disorder)、情绪障碍 (mood disorders)、自闭症 (autism) 和精神分裂症 (schizophrenia)。由此推测, 除了脑外伤、脑震荡, 脑震宁颗粒还有治疗其他神经系统疾病和精神障碍类疾病的潜在作用, 这与其活血凉血、化瘀通络、益血安神、宁心定智、除烦止呕功效密切相关。

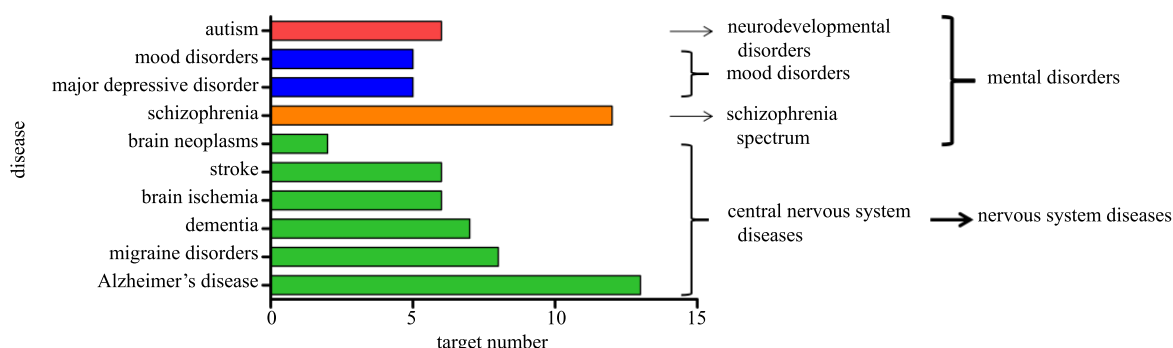


图 5 脑震宁颗粒潜在作用靶点相关疾病的 MeSH 疾病分类

Fig. 5 MeSH disease classification of potential targets of Naozhenning Granule

3 讨论

脑外伤的病理生理机制复杂, 自由基反应、炎症反应及细胞凋亡等均是脑外伤后继发性脑损伤的重要原因^[17]。脑外伤后, 自由基大量产生, 炎症反应加剧, 导致神经细胞凋亡, 从而进一步加重外伤性脑损伤, 影响预后^[18]。脑震荡属于轻型脑外伤, 是最常见的脑损伤之一。

氧化应激是创伤性脑损伤的关键因素, 已有文献报道^[17-18]氧化苦参碱、柴胡皂苷等化合物可通过 MAPK 信号通路减少脑氧化损伤, 从而改善神经功能和认知功能, 降低脑水肿和血脑屏障通透性^[19]。脑震宁颗粒中可作用于 MAPK1 的潜在成分包括苯甲酰芍药苷、茯苓酸 B、常春藤皂苷元、槲皮素等, 说明调控氧化应激可能是脑震宁颗粒的作用机制之一。

脑损伤能诱导促炎因子 IL-1 β 、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、髓过氧化物酶 (MPO) 的表达增加和抗炎因子 arginase-1 和 IL-10 水平增加^[20], 而炎症因子水平的高低不仅影响脑外伤后的认知功能, 而且与脑外伤的预后有一定相关性^[19]。有研究

发现, 丙酮酸乙酯可以减少脑外伤后大鼠血脑屏障的渗漏, 抑制小胶质细胞的过度激活, 降低多种炎症介质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、环氧合酶-2 (COX-2) 和 iNOS mRNA 水平, 减少脑外伤后的轴突损伤和髓鞘脱失, 并对少突胶质细胞祖细胞具有显著的保护作用, 其神经保护作用机制与减轻脑外伤导致的血脑屏障破坏和白质损伤有关^[21]。神经细胞凋亡是各类脑损伤引起神经元丢失的一种重要形式, 及时防治神经细胞凋亡是治疗脑损伤的关键^[22]。另有研究发现, 外周血超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA)、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 表达水平可显著影响神经细胞凋亡进程^[18]。NO 在中枢神经系统的生理病理中起着重要的作用。过量 NO 与缺氧缺血脑损伤后的炎症反应、兴奋性毒性及神经元的死亡有关。缺氧缺血脑损伤时, iNOS (NOS2) 和神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 催化神经元产生过量 NO, 诱导神经元凋亡^[23]。脑震宁颗粒中的木栓酮、木栓醇等成分与 iNOS 相关, 说明脑震宁颗粒可通过调控 NO 的生成缓解脑外伤后

炎症反应。颅脑外伤会导致患者脑组织损伤出现一系列病理生理变化,其中认知功能是脑外伤常见的并发症之一^[24]。Tau 蛋白是维系神经元骨架系统稳定的重要分子细胞内靶点,CASP3 和糖原合成酶激酶-3 β (GSK3B) 共同调节 Tau 蛋白磷酸化水平,抑制 GSK3B 可显著改善多种因素诱导的 Tau 过度磷酸化及动物认知障碍,从而改善脑外伤患者的认知障碍^[7,25]。脑震宁颗粒中丹参酮 I、橙皮苷、茯苓新酸 A、茯苓酸 B 等成分可潜在作用于 CASP3 和 GSK3B,说明调控 Tau 的过度磷酸化可能与脑震宁颗粒的作用机制相关。

单胺氧化酶可催化单胺类物质发生氧化脱氨反应,其中单胺氧化酶 A (MAOA) 主要分布在儿茶酚胺能神经元中,抑制 MAOA 可增加 5-羟色胺(5-HT) 和多巴胺(DA) 浓度^[26]。脑外伤后最常见的社会心理问题是抑郁,有研究显示脑外伤后 1 年抑郁障碍的发病率高达 12.8%,占脑外伤所致各类精神障碍之首,明显高于一般人群^[27]。脑震宁颗粒中洋川芎内酯 I 可作用于 MAOA,说明脑震宁颗粒对脑震荡、脑外伤后抑郁可能具有一定的改善作用。

Janus 激酶(JAK) 是一种非受体型酪氨酸蛋白激酶,脑缺血再灌注损伤后可引发 JAK2 的活化,缺血再灌注损伤后凋亡细胞也显著增多,JAK2 特异性抑制剂 AG490 可以阻断 JAK2 的磷酸化,具有抗细胞凋亡作用^[28]。脑震宁颗粒中丹参酮 I、丹参酮 II_A、槲皮素、川陈皮素等成分与 JAK2 相关,说明脑震宁颗粒可通过抗细胞凋亡来发挥药效作用。葡萄糖脑苷酯酶(GBA) 是一种可溶性的糖脂类物质,是细胞的组成成分之一,当溶酶体中 β -葡萄糖脑苷脂酶活性降低时,葡萄糖脑苷脂不能被水解而聚积在脑组织溶酶体及单核-巨噬系统中,导致细胞失去原有的功能而产生脑损伤症状^[29]。脑震宁颗粒中木栓醇、羽扇豆烯醇、羽扇豆烯酮等成分有可能作用于 GBA,推测脑震宁颗粒可通过加速葡萄糖脑苷脂的降解来缓解脑损伤症状。胱硫醚 β -合酶(CBS) 是脑内产生硫化氢的主要酶,CBS 产生的硫化氢参与了缺血性脑损伤的病理生理过程^[30]。脑震宁颗粒中作用于该靶点的成分有木栓醇、酸枣仁皂苷 A 等,推测脑震宁颗粒还可能通过调控硫化氢的生成来缓解缺血性脑损伤。纤溶酶原(PLG) 活性在脑缺血再灌注期间呈明显进行性下降,乌司他丁能防止脑缺血再灌注损伤引起的纤溶酶原进行性下降,提示其有维持血浆抗凝功能及纤维蛋白溶解

系统稳定的作用,对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[31]。脑震宁颗粒中茯苓新酸 A、茯苓酸 B、去氢土莫酸、常春藤皂苷元、没食子酸等成分可能作用于该靶点,推测脑震宁颗粒还可通过调节 PLG 活性缓解脑缺血症状。

本研究以脑震宁颗粒的主要成分为基础,通过 DRAR-CPI 数据库中的 chemical-protein 相互作用并借助 GooLGeN 及 GeneCard 数据库检索分析,发现 MAPK1、CASP3、GSK3B、IL10 等 34 个脑震宁颗粒治疗脑外伤的潜在作用靶点,包括信号分子、受体、蛋白(免疫蛋白、钙结合蛋白等)、酶(蛋白酶、水解酶、激酶、转移酶、氧化还原酶)等。对靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路注释提示脑震宁颗粒可能通过活性氧的生物合成、平滑肌细胞增殖等生物过程发挥药效,其作用与 PI3K/Akt、MAPK、JAK/STAT、mTOR 等信号转导通路相关。通过构建药材-成分-靶点-通路-疾病网络,进一步推测脑震宁颗粒的作用机制与调控氧化应激、抑制炎症反应和细胞凋亡、调控 Tau 的过度磷酸化、调节脑内硫化氢生成和 PLG 活性、改善认知功能及脑外伤后抑郁等相关。其中茯苓新酸 A、茯苓酸 B、丹参酮 I、丹参酮 II_A、洋川芎内酯 I、常春藤皂苷元、槲皮素、苯甲酰芍药苷等成分与脑震宁颗粒可能的作用机制密切相关。本研究从网络药理学的角度系统揭示了脑震宁颗粒多成分、多靶点、多通路的作用机制,为进一步深入研究其药效物质基础及作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 张华志,刘 豪,盛永富,等. 脑震宁、脑益嗉、谷维素结合治疗脑外伤后综合征 568 例 [J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(1): 55.
- [2] 张明升,孙殿春,高尚进,等. 脑震宁冲剂的药效学实验研究 [J]. 中成药, 1997, 19(6): 33-34.
- [3] 王学建,季炜鹏. 脑震宁治疗脑外伤后头痛 53 例疗效观察 [J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2017, 3(5): 292-293.
- [4] 阮观忠. 脑震宁治疗脑震荡后综合征 102 例 [J]. 福建中医药, 2000(3): 51.
- [5] 王晓明. 脑震宁冲剂对颅内血肿病人术后康复的作用 [J]. 现代康复, 2001, 5(6): 127.
- [6] Liu C X, Liu R, Fan H R, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. Chin Herb Med, 2015, 7(1): 3-17.

- [7] 王 昊, 赵振宇, 沈 霞, 等. 基于系统药理学研究远志治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 药学学报, 2017, 52(10): 1554-1561.
- [8] 董亚楠, 韩彦琪, 王 磊, 等. 基于网络药理学的六经头痛片治疗偏头痛的作用机制探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4174-4180.
- [9] 袁荣高, 顾明华, 古江勇. 基于网络药理学研究大川芎方治疗偏头痛的作用机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(6): 571-576.
- [10] 张 潇, 高 耀, 向 欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1584-1590.
- [11] 黄慧玲, 刘 锐, 王 琴, 等. 亚低温对颅脑创伤大鼠脑线粒体活性氧和 ATP 酶合成能力的影响 [J]. 天津医药, 2008, 36(6): 438-440.
- [12] 王建宇, 王伯良, 田小溪, 等. 神经节苷脂联合高压氧对重度脑外伤急性期患者凝血功能的影响及促醒作用 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(9): 1674-1677.
- [13] 郁 迪, 莫绪明. PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在缺血性脑损伤中的保护作用 [J]. 医学综述, 2015, 21(2): 210-213.
- [14] 薛 翔, 刘红梅, 邵旦兵, 等. JAK/STAT 信号通路调节机制的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(11): 2161-2165.
- [15] 崔小芬, 李鑫鑫, 张丽丽, 等. 小胶质细胞介导的炎症反应在缺血再灌注引起脑损伤中的作用研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(86): 83-85.
- [16] 徐 祥. mTOR 信号通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [17] 王 刚, 董晓巧, 杜 权, 等. 氧化苦参碱抗大鼠脑外伤后神经细胞凋亡及机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(4): 289-294.
- [18] Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2010, 24(4): 495-509.
- [19] 袁 静. 虫草素改善脑外伤大鼠模型中血脑屏障损害的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [20] Das M, Leonardo C C, Rangooni S, *et al.* Lateral fluid percussion injury of the brain induces CCL20 inflammatory chemokine expression in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(2): 148-148.
- [21] 施 宏. 丙酮酸乙酯对脑外伤后大鼠的神经保护作用及其机制研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [22] 马 允, 杨 帆, 昂文平. 针刺对脑损伤保护机制的实验研究进展 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(1): 120-124.
- [23] 刘海婷, 母得志. 诱导型一氧化氮合酶和缺氧缺血脑损伤 [J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 962-967.
- [24] 董 勇. 通窍活血汤加味结合西药治疗脑外伤认知障碍的疗效观察 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [25] 宋祯彦, 王珊珊, 贺 旭, 等. 网络药理学方法研究石菖蒲治疗神经退行性疾病的作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(8): 848-855.
- [26] 孙 楷, 孙 凡, 朱 亮. 单胺氧化酶抑制剂在临床方面的应用 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1180-1182.
- [27] 刘金凤, 吴志江. 脑外伤后精神障碍的研究进展 [J]. 山东精神医学, 2005, 18(2): 120-122.
- [28] 谢惠芳, 徐如祥, 魏继鹏, 等. JAK2/STAT3 信号转导通路在缺血性脑损伤中作用机制的研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(2): 135-138.
- [29] 刘林玉, 杜司晨, 张 进, 等. 戈谢氏病致病机制及治疗方法 [J]. 遗传, 2015, 37(6): 510-516.
- [30] 邵建林, 朱俊超, 吴滨阳, 等. 异氟醚、七氟醚和地氟醚预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 CBS/H₂S、iNOS/NO 和 HO-1/CO 的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(10): 907-910.
- [31] 潘 云, 骆喜宝, 陈 燕. 乌司他丁对脑缺血再灌注损伤大鼠血浆抗凝血酶 III 活性及纤溶酶原活性的影响 [J]. 广东医学, 2011, 32(20): 2640-2642.