

• 药效与代谢 •

基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究

樊启猛^{1,2}, 杨岩涛^{1,2,3}, 肖美凤^{1,2,3}, 刘文龙^{1,2,3}, 周 晋^{1,2,3}, 贺玉婷^{1,2}, 贺 鹏^{1,2}, 李海英^{1,2},
潘 雪^{1,2,3}, 贺福元^{1,2,3*}, 邓凯文^{4*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208
4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 运用分子对接技术研究补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用, 探索补阳还五汤的有效物质基础及主要作用靶点。 **方法** 选取与缺血性脑卒中有关的人体 46 个关键蛋白靶标, 从数据库中筛选 204 个补阳还五汤活性成分, 采用分子对接技术将所获得的活性分子与关键靶点对接, 得到 Total Score, 同时建立多成分-多靶点网络模型, 再运用总量统计矩相似度法分析各靶点与所有靶点总体行为的相似性。 **结果** 通过分子对接虚拟筛选补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的活性小分子, 其中有 22 个成分与 40 个或以上蛋白靶点有较好的相互作用, 虚拟筛选治疗缺血性脑卒中的主要靶点, 其中 22 个蛋白靶点与 80 个或以上成分有较好的相互作用。 **结论** 基于分子对接的虚拟筛选方法可用来寻找补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的活性成分及主要靶点, 为进一步深入研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制提供一定参考。

关键词: 补阳还五汤; 分子对接; 缺血性脑卒中; 相互作用; 超分子化学; 药物代谢网络动力学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)17-4200-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.028

Interaction between components of Buyang Huanwu Decoction and targets associated with ischemic stroke based on molecular docking method

FAN Qi-meng^{1,2}, YANG Yan-tao^{1,2,3}, XIAO Mei-feng^{1,2,3}, LIU Wen-long^{1,2,3}, ZHOU Jin^{1,2,3}, HE Yu-ting^{1,2},
HE Peng^{1,2}, LI Hai-ying^{1,2}, PAN Xue^{1,2,3}, HE Fu-yuan^{1,2,3}, DENG Kai-wen⁴

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Drugability and Preparation Modification of TCM, Changsha 410208, China
3. Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. The First Affinity Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective To investigate the interaction between the components of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) and the targets associated with ischemic stroke by using molecular docking technique, and explore the effective material basis and main targets of BYHWD. **Methods** A total of 46 key protein targets associated with cerebral infarction of the human body were selected, 204 components of BYHWD were screened from the TCMSP database, and these components and targets were docked using molecular docking technology, thereby to get the Total Score. Cytoscape3.7.1 software was applied to establish network model of component-protein targets. At the same time, total quantum statistical moment similarity method was used to analyze the imprinting

收稿日期: 2019-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874507); 国家自然科学基金资助项目 (81703824); 国家自然科学基金资助项目 (81573691); 湖南省科技厅重点实验室建设资助项目 (2016TP1017); 湖南省自然科学基金资助项目 (2016JJ4065); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目 (18K071); 湖南省“国内一流培育学科”药学 2018 年开放基金项目 (2018YX06); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20190570); 湖南中医药大学研究生科研创新课题 (2018CX18)

作者简介: 樊启猛, 在读博士研究生, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究。

Tel: (0731)85381372 E-mail: qimengfan1989@qq.com

***通信作者** 贺福元, 博士, 教授, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究。

Tel: (0731)85381372 E-mail: pharshmsharking@tom.com

邓凯文, 副教授, 硕士生导师, 主要从事针灸、中医药超分子与数理特征化的研究。E-mail: dkaiwen03@163.com

behaviors of these targets. **Results** From molecular docking results, 22 components had good interactions with 40 or more protein targets, and 22 protein targets had good interactions with 80 or more components for the treatment of cerebral infarction. **Conclusion** Molecular docking method can be used to find the active ingredients and main targets of BYHWD in treating ischemic stroke, providing certain reference for further study on the mechanism of BYHWD in treating ischemic stroke.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; molecular docking; ischemic stroke; interaction; supramolecular chemistry; network pharmacokinetic

脑卒中是一种常见的难治性疾病, 易复发, 具高发病率、高致残率、高死亡率等特点, 严重影响了患者的身体健康和生活质量, 给家庭和社会经济带来沉重负担^[1]。脑卒中包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中 2 种, 其中缺血性脑卒中占有所有脑卒中的 80% 以上^[1]。缺血性脑卒中实质是脑供血动脉被血栓堵塞, 神经组织随即发生不可逆的缺血梗死, 出现神经功能障碍^[2-3]。补阳还五汤首载于清代医学家王清任的《医林改错·卷下·瘫痿论》^[4], 为中医益气活血名方, 是目前治疗缺血性脑卒中疗效公认的著名方剂。该方具有“不在逐瘀以活血, 重在补气以活血”的配伍特点, 全方由黄芪、当归、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙 7 味药组成, 生黄芪为君药, 当归为臣药, 赤芍、川芎、桃仁、红花为佐药, 地龙为使药。临床研究表明, 补阳还五汤能够降低脑梗死患者的神经功能缺损积分和中医证候积分, 提高日常生活能力指数评分^[5-6]。分子对接技术是通过化学计量学方法模拟小分子配体与蛋白受体的几何匹配、能量匹配, 计算出两者间的作用力, 以进行分子间相互作用识别并预测受体-配体复合物结构的一种方法, 可用于研究成分与靶点的相互作用^[7-9]。故本研究通过分子对接技术筛选补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的物质基础及主要作用靶点, 研究补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用, 并构建成分-蛋白靶点网络模型, 以初步阐明补阳还五汤多成分、多靶点复方效应机制, 同时从配体-受体层面揭示补阳还五汤治疗脑梗死的超分子化学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究工作均在 Microsoft Windows 7 Professional 操作系统中完成, 采用 ChemOffice 2015 程序 (CambridgeSoft) 中的 ChemDraw 模块、Sybyl-X2.0 (Tripos) 中的 Minimize 模块、Surflex-Dock 模块和 Cytoscape 3.7.1 软件。

1.2 缺血性脑卒中相关靶点蛋白的获取

查阅国内外关于缺血性脑卒中的文献报道^[10-14],

结合临床报道, 搜索蛋白质 PDB 结构数据库 RCSB (<http://www.rcsb.org/>), 选取与缺血性脑卒中相关的 46 个关键靶点蛋白, 得到其 3D 晶体结构的 PDB 格式文件, 所有蛋白来源均为人种, 见表 1。

1.3 补阳还五汤所含化学成分的收集

调研关于补阳还五汤的国内外文献, 同时从 TCMSP 中药系统药理学数据库与分析平台^[15] (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中共收集得到补阳还五汤中含有的 781 种化学成分, 并根据口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.05 (黄芪中黄芪皂苷类、川芎中川芎内酯类、川芎与当归共有的阿魏酸等成分均已被证实为活性成分, 但其类药性均小于 0.18, 当阈值为 0.05 时, 可囊括这些成分) 的原则, 最后筛选得到 204 种成分。通过 ChemDraw 软件绘制分子结构保存为 mol 文件格式后, 导入软件 Sybyl-X2.0 进行三维结构转换、加氢处理、使用 Minimize 模块对分子能量优化 (添加 Gasteiger-Hückel 电荷, 能量优化迭代次数为 10 000, 能量收敛标准为 $0.005 \text{ kcal/mol} \times 0.1 \text{ nm}$, 其他参数默认)^[10], 结果保存为 mol2 文件格式。

1.4 成分-靶点的分子对接

利用分子对接对缺血性脑卒中靶点与补阳还五汤成分的相互作用进行研究, 分别提取 46 个靶点蛋白晶体结构的配体以暴露活性位点、除结晶水、加氢和除侧链的残基后, 采用 AMBER7 FF99 力场能量优化^[10], 其他参数默认, 生成具活性口袋的对接文件, 无配体的晶体结构由自动生成对接文件, 再使用 Surflex-Dock Screen 对接模式, 与筛选得到的补阳还五汤 204 个成分进行对接, 得到 204 个化合物分别与 46 个靶点对接后的 Total Score 分值。Total Score 打分函数是以负对数为单位模拟结合能力, 换算结合自由能公式 ($\Delta G_0 = -2.303 RT \times \text{Total Score}$, 其中 R 为分子的理想气体常数, T 为理想气体的热力学温度), 因此 Total Score 值越大, 配体与受体结合越稳定。Total Score ≥ 5 , 可推测该成分分子与相应蛋白靶点存在较强的相互作用, Total

表 1 与缺血性脑卒中相关的 46 个蛋白靶点

Table 1 Forty-six protein targets associated with ischemic stroke

序号	蛋白靶点全称	缩写	PDB 编号	序号	蛋白靶点全称	缩写	PDB 编号
1	白细胞介素-6	IL-6	1ALU	24	钙/钙调蛋白激酶 4	CaMKIV	2W4O
2	脑源性神经营养因子	BDNF	1BND	25	抗凋亡蛋白 1-x1	Bcl-x1	2YXJ
3	P-选择素	P-selectin	1GIS	26	细胞外调节蛋白激酶 1	ERK1	2ZOQ
4	基质金属蛋白酶-9	MMP-9	1GKC	27	谷胱甘肽过氧化物酶 8	GPX-8	3CYN
5	p38MAPK 激酶	p38MAPK	1KV2	28	血红素加氧酶-1	HO-1	3CZY
6	凋亡诱导因子	AIF	1M6I	29	丝裂原活化蛋白激酶 14	MAPK14	3DT1
7	细胞间黏附分子-1	ICAM-1	1P53	30	一氧化氮合成酶 2	NOS2	3E7G
8	细胞外调节蛋白激酶 2	ERK2	1PME	31	c-JunN-氨基末段激酶-1	JNK1	3ELJ
9	转化生长因子-β	TGF-β	1PY5	32	Janus 激酶 2	JAK-2	3JY9
10	基质金属蛋白酶-2	MMP-2	1QIB	33	血管生成素受体-2	Tie-2	3L8P
11	半胱天冬酶-8	Caspase-8	1QTN	34	c-JunN-氨基末段激酶-2	JNK2	3NPC
12	白细胞介素-1β	IL-1β	1RWN	35	Janus 激酶 3	JAK-3	3PJC
13	有丝分裂原激活蛋白激酶 1	MEK-1	1S9J	36	钙/钙调蛋白激酶 2	CaMKII	3SOA
14	血管内皮生长因子受体-2	VEGFR-2	1VR2	37	c-JunN-氨基末段激酶-3	JNK3	3TTI
15	血管内皮黏附分子-1	VCAM-1	1VSC	38	钙/钙调蛋白激酶 1	CaMKI	4FG8
16	抗凋亡蛋白-2	Bcl-2	1YSW	39	核转录因子-κB	NF-κB	4G3D
17	肿瘤坏死因子-α	TNF-α	2AZ5	40	Janus 激酶 1	JAK-1	4I5C
18	半胱天冬酶-3	Caspase-3	2CNK	41	凝血因子 II	F2	4LZ1
19	谷胱甘肽过氧化物酶 1	GPX-1	2F8A	42	肿瘤坏死因子受体 6	TNFSF6	4MSV
20	谷胱甘肽过氧化物酶 2	GPX-2	2HE3	43	受体丝氨酸/苏氨酸激酶-1	RIPk-1	4NEU
21	谷胱甘肽过氧化物酶 7	GPX-7	2P31	44	促分裂原活化蛋白激酶激酶 9	MLK1	4UY9
22	多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1	PARP-1	2RCW	45	促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 MLK4	MLK4	4UYA
23	超氧化物歧化酶	SOD	2V0A	46	E-选择素	E-selectin	6EYI

Score 越大,可推测该成分分子与相应蛋白靶点相互作用越强烈^[16]。采用 Sybyl-X 2.0 软件对有配体的靶点蛋白进行对接方法的可靠性验证,将靶点蛋白原配体抽离,按上述操作重新对接计算其均方根偏差(RMSD),结果 RMSD 都小于 0.2 nm,认为对接前后构象差异较小,表明该对接方法可行、可靠,可用于成分-靶点相互作用研究。

1.5 分子-蛋白作用网络的构建

采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物-靶点(D-T)网络,通过 network analyzer 分析补阳还五汤活性分子与靶蛋白的 D-T 网络特征,以观察补阳还五汤活性成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用情况。

1.6 总量统计矩相似度分析

统计矩原理为非房室模型分析方法,可通过总量零阶矩、总量一阶矩、总量二阶矩对补阳还五汤成分与各靶点的相互作用进行分析。其中零阶矩表示补阳还五汤所有成分的摩尔质量的加和;一阶矩为平均 Total Score (或平均结合能),即该靶点与所有成分相互作用的评分(或平均结合能);二阶矩为平均 Total Score (或平均结合能)的方差。总量统计矩及相似度的计算可参照本课题组前期关于总量

统计矩(相似度)法的相关研究^[17-19]。

2 结果

2.1 分子对接结果

将 46 个缺血性脑卒中靶点蛋白与处理好的 204 个补阳还五汤活性分子进行对接,筛选出 124 个成分,与 10 个或 10 个以上蛋白靶点有较强的相互作用(Total Score ≥ 5),其中有 22 个成分与 40 个或以上蛋白靶点有较好的相互作用,结果见表 2。而 46 个缺血性脑卒中靶点与补阳还五汤成分的相互作用(Total Score ≥ 5)情况见表 3,其中 JNK2、ERK2、AIF、TGF-β、Tie-2、MEK-1、PARP-1、CaMK I、p38MAPK、JNK1 与 100 个以上成分有较好的相互作用,JAK-3、MAPK14、RIPk-1、CaMK II、JAK-2、JAK-1、ERK1、F2、MMP-9、CaMK IV、MMP-2、JNK3 与 80 个以上成分有较强的相互作用。结合已有文献,发现预测成分参与脑缺血相关机制的调节已有部分见报道,如二氢辣椒素(dihydrocapsaicin)^[20-21]、13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid^[22]、八氢番茄红素(phytoene)与六氢番茄红素(phytofluene)^[23]、油酸(oleic acid)^[24]和亚麻酸(linolenic acid)^[25]等;相关靶点也已有部分见报道,如 JNK、ERK、

表 2 补阳还五汤成分与缺血性脑卒中 46 个靶点的对接结果 (Total Score ≥ 5, 靶点数 ≥ 10)

Table 2 Molecular docking results of components of BYHWD and 46 targets associated with ischemic stroke (Total Score ≥ 5, targets number ≥ 10)

TCMSP 编号 (成分)	靶点数量	TCMSP 编号 (成分)	靶点数量	TCMSP 编号 (成分)	靶点数量
MOL002203	45	MOL000359	28	MOL007005	19
MOL006202	44	MOL000374	28	MOL007008	19
MOL010485	44	MOL001771	28	MOL002721	18
MOL000131	43	MOL002695	28	MOL007347	18
MOL000675	43	MOL008265	28	MOL000417	17
MOL001308	43	MOL000006	27	MOL000438	17
MOL001641	43	MOL000033	27	MOL000449	17
MOL001739	43	MOL000387	27	MOL002098	16
MOL002204	43	MOL002101	27	MOL002719	16
MOL000381	42	MOL005043	27	MOL005928	16
MOL000432	42	MOL000296	26	MOL000389	15
MOL008698	42	MOL000354	26	MOL000401	15
MOL001398	41	MOL000493	26	MOL001918	15
MOL001494	41	MOL000953	26	MOL002712	15
MOL001746	41	MOL002746	26	MOL000371	14
MOL001818	41	MOL002769	25	MOL000392	14
MOL002683	41	MOL003955	25	MOL000422	14
MOL002883	41	MOL006999	25	MOL002714	14
MOL005320	41	MOL000378	24	MOL000380	13
MOL002706	40	MOL000436	24	MOL002140	13
MOL002707	40	MOL002178	24	MOL007025	13
MOL008277	40	MOL002680	24	MOL000414	12
MOL002151	39	MOL006992	24	MOL002099	12
MOL000433	38	MOL001368	23	MOL002124	12
MOL001371	38	MOL001924	23	MOL002142	12
MOL001442	38	MOL001925	23	MOL002157	12
MOL002773	38	MOL002717	23	MOL007016	12
MOL000379	34	MOL007004	23	MOL007021	12
MOL007022	34	MOL000098	22	MOL008252	12
MOL002676	32	MOL006990	22	MOL000360	11
MOL002199	31	MOL006994	22	MOL000435	11
MOL002710	31	MOL007012	22	MOL002152	11
MOL002776	31	MOL007018	22	MOL002181	11
MOL002694	30	MOL000239	21	MOL002189	11
MOL002698	30	MOL000348	21	MOL008285	11
MOL000439	29	MOL001921	21	MOL000405	10
MOL002165	29	MOL004355	21	MOL002127	10
MOL004743	29	MOL000398	20	MOL002143	10
MOL007003	29	MOL000403	19	MOL002209	10
MOL007345	29	MOL000442	19	MOL008251	10
MOL012144	29	MOL001323	19		
MOL000358	28	MOL002144	19		

TGF- β 、Tie-2、p38MAPK、MMP-2、MMP-9^[26], 确属补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的有效物质及主要作用靶点。

选取 Total Score 得分较高的 13-羟基-9,11-十八碳二烯酸 (13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid)、亚油酸乙酯 (mandenol)、六氢番茄红素 (phytofluene) 分别与 JNK2、JAK-1、AIF、P38MAPK

进行结合模式分析, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 化合物的主链或母核插入到了活性口袋内部的疏水区, 而极性较大的一端则通过氢键与活性口袋外侧的残基结合, 相互作用强, 成分-靶点结合后的空间结构呈现稳定状态。

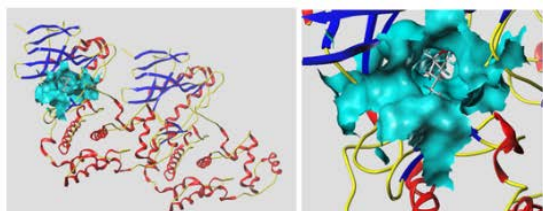
2.2 D-T 网络图构建及结果

将“2.1”项下得到的补阳还五汤的 124 个活性

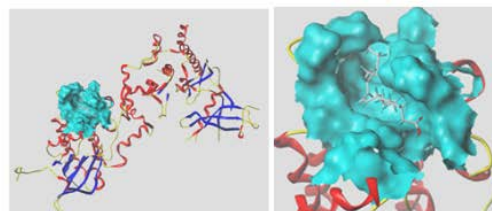
表 3 缺血性脑卒中 46 个靶点与补阳还五汤成分的对接结果 (Total Score ≥ 5)

Table 3 Molecular docking results of 46 targets associated with ischemic stroke and components of BYHWD (Total Score ≥ 5)

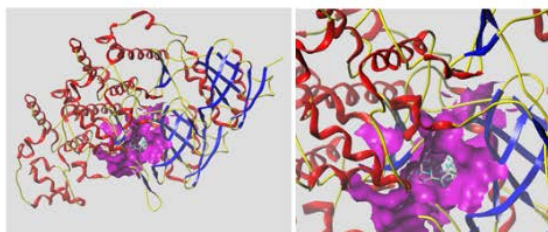
靶点	成分数	靶点	成分数	靶点	成分数
JNK2	123	ERK1	92	Bcl-x1	60
ERK2	119	F2	86	NOS2	60
AIF	115	MMP-9	84	TNFSF6	53
TGF-β	112	CaMK IV	84	IL-1β	47
Tie-2	112	MMP-2	80	IL-6	45
MEK-1	106	JNK3	80	GPX-7	42
PARP-1	104	HO-1	75	E-selectin	42
CaMKI	103	P-selectin	71	GPX-8	38
p38MAPK	102	TNF-α	71	GPX-1	30
JNK1	102	VEGFR-2	68	GPX-2	26
JAK-3	97	VCAM-1	68	Caspase-3	25
MAPK14	96	MLK4	63	SOD	18
RIPk-1	96	Bcl-2	61	ICAM-1	8
CaMK II	95	NF-κB	61	BDNF	3
JAK-2	93	MLK1	61		
JAK-1	93	Caspase-8	60		



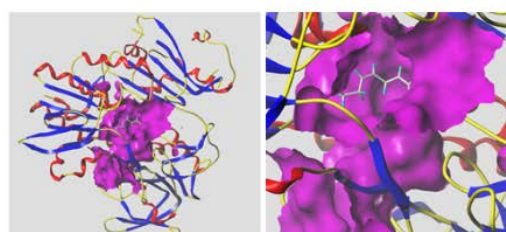
13-羟基-9,11-十八碳二烯酸与 JNK2 的分子对接图



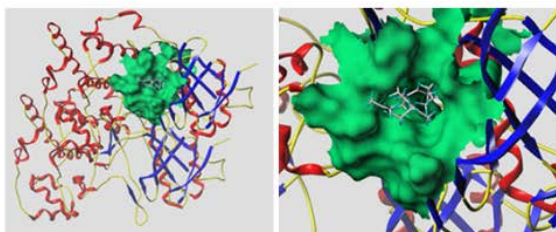
13-羟基-9,11-十八碳二烯酸与 JAK-1 的分子对接图



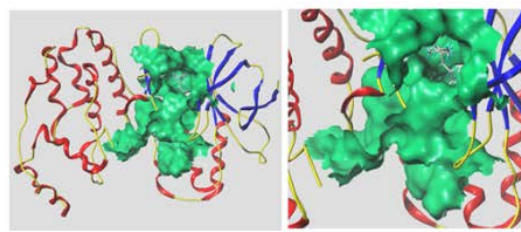
亚油酸乙酯与 JNK2 的分子对接图



亚油酸乙酯与 AIF 的分子对接图



六氢番茄红素与 JNK2 的分子对接图



六氢番茄红素与 P38MAPK 的分子对接图

图 1 补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的分子对接示意图

Fig. 1 Examples of molecular docking between components of BYHWD and targets associated with ischemic stroke

成分（与 10 个或 10 个以上蛋白靶点有较强的相互作用）及 46 个关键靶点蛋白导入 Cytoscape 3.7.1 软件，建立 D-T 网络图，结果见图 2。通过网络分析可

知平均每个活性成分对应 25.12 个靶点，平均每个靶点对应 66.96 个活性成分，反映了补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的多成分、多靶点作用特点，同时也提

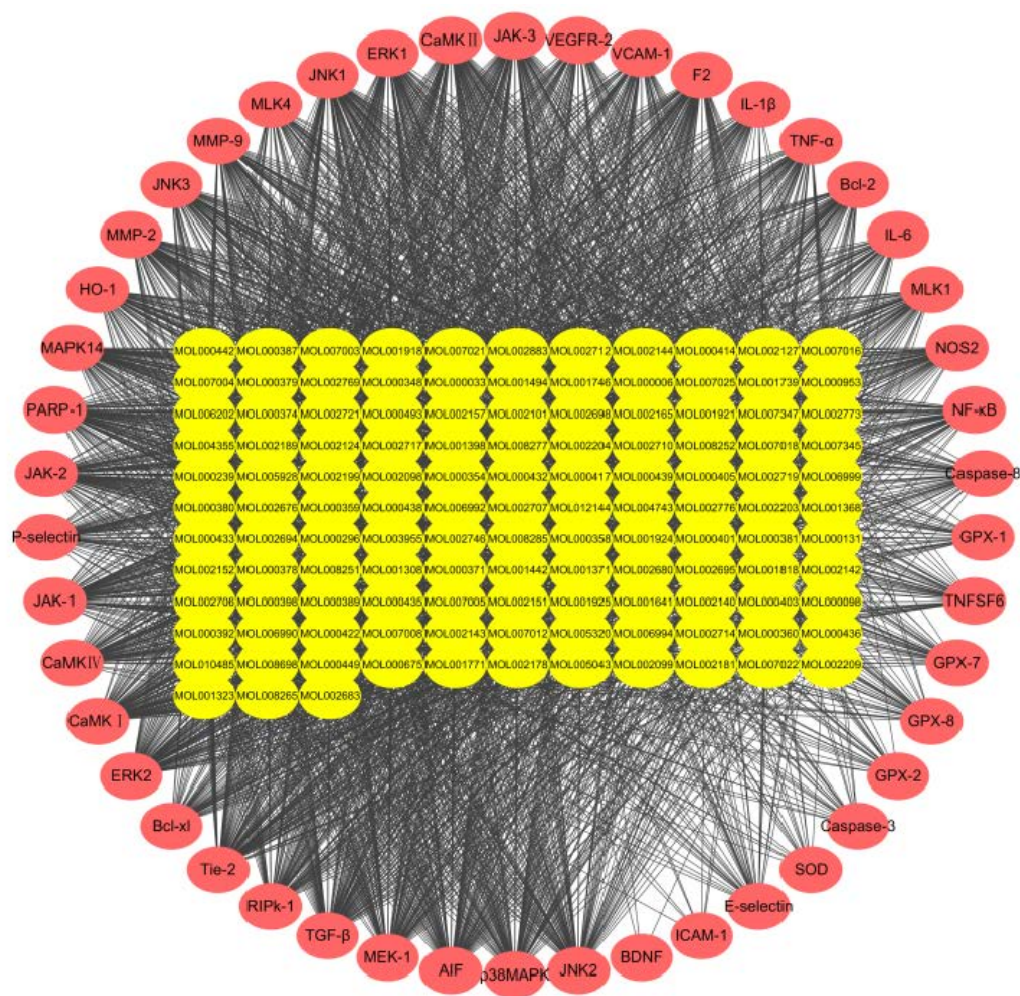


图 2 补阳还五汤成分-缺血性脑卒中蛋白靶点的相互作用网络图

Fig. 2 Network diagram of interaction between components of BYHWD and targets associated with ischemic stroke

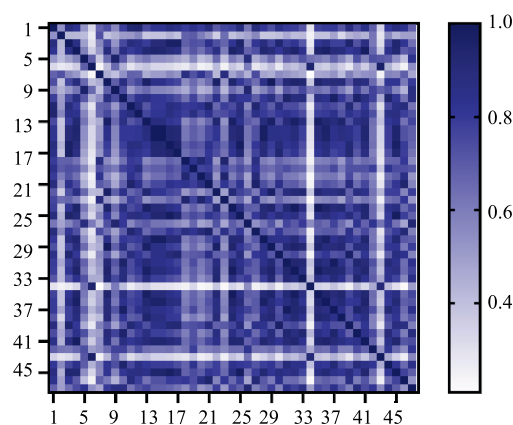
示补阳还五汤活性成分与缺血性脑卒中蛋白靶点的相互作用应是补阳还五汤复方效应的基础。

2.3 总量统计矩相似度分析

将补阳还五汤的 204 个活性成分与缺血性脑卒中的 46 个关键蛋白靶点的 Total Score 进行总量统计矩相似度分析,结果见图 3 及表 4。ERK1、JAK-1、MMP-2、TGF- β 、Tie-2、MLK1、JNK3、JNK1、p38MAPK、TNFSF6 这 10 个靶点的总量统计矩相似度大于临界值 0.803^[17-18],说明这些靶点与补阳还五汤成分的作用与成分靶点的相互作用的总体行为为相似,可认为是较为重要的已证实的或潜在靶点,此外结合表 3 可得到印证,这 10 个靶点与 80 个或以上成分的相互作用较强 (Total Score ≥ 5)。

3 讨论

缺血性脑卒中属中医中风范畴,其标在脏腑经络,其本在脑。气血逆乱、气虚血瘀为缺血性脑卒



图中靶点序号按表 1 中序号进行排列

Target numbers in this figure are arranged according to Table 1

图 3 缺血性脑卒中 46 个靶点的总量统计矩相似度热图

Fig. 3 Heat map of total quantum statistical moment similarity of 46 targets associated with ischemic stroke

表 4 缺血性脑卒中 46 个靶点的总量统计矩相似度

Table 4 Total quantum statistical moment similarity of 46 targets associated with ischemic stroke

靶点	与 TQ 相似度	靶点	与 TQ 相似度	靶点	与 TQ 相似度
TQ	1.000 0	CaMKIV	0.757 6	TNF- α	0.621 0
ERK1	0.926 9	JAK-3	0.755 5	Caspase-8	0.617 9
JAK-1	0.891 6	F2	0.740 4	NF- κ B	0.592 3
MMP-2	0.870 1	MMP-9	0.739 5	GPX-8	0.590 2
TGF- β	0.867 7	IL-1 β	0.719 8	NOS2	0.581 1
Tie-2	0.858 7	CaMK II	0.716 1	GPX-7	0.576 9
MLK1	0.855 8	CaMK I	0.707 0	RIPk-1	0.564 8
JNK3	0.837 7	GPX-1	0.705 5	Caspase-3	0.555 2
JNK1	0.832 6	MLK4	0.688 4	AIF	0.543 2
p38MAPK	0.825 8	VEGFR-2	0.684 7	E-selectin	0.530 9
TNFSF6	0.813 3	HO-1	0.682 7	GPX-2	0.522 6
ERK2	0.793 7	VCAM-1	0.682 5	SOD	0.513 5
MAPK14	0.785 3	Bcl-xl	0.679 4	JNK2	0.497 6
PARP-1	0.784 7	IL-6	0.672 0	BDNF	0.496 6
JAK-2	0.772 5	Bcl-2	0.663 0	ICAM-1	0.475 6
MEK-1	0.761 3	P-selectin	0.634 8		

TQ 为所有靶点与补阳还五汤各成分相互作用的总量

TQ was total quantum of interactions between 46 targets associated with ischemic stroke and components of BYHWD

中发病的基本病理基础^[27]。《医学发明·中风有三》云“中风者，非外来风邪，乃本气自病也。凡人年逾四旬，气衰者多有此疾”。现代医学研究认为，缺血性脑卒中发病的根本原因是脑供血动脉被血栓堵塞，神经组织随即发生不可逆的缺血梗死，出现神经功能障碍^[2]，其病理病机主要包括脑细胞能量衰竭与缺氧去极化、兴奋性氨基酸毒性损伤、钙离子超载的细胞毒、氧化应激与硝化应激损伤、炎症反应与免疫调节异常、细胞凋亡等方面^[7]。目前临床上主要通过改善供血和保护神经细胞功能 2 种策略进行治疗，包括溶栓、抗血小板聚集、抗凝、扩充血容量和神经保护等多种具体治疗方法^[26,28]。但真正针对性的药物十分有限，美国仅批准组织纤溶酶原激活剂（tPA）一药，我国也已批准 tPA、丁苯酞、依达拉奉、银杏二萜内酯、丹参多酚酸、金纳多等药物^[26,28]。但存在溶栓复流时间窗短、溶栓程度及有效性不易控制、药物本身毒副作用及对脑梗死后中枢神经保护与再生、脑功能恢复的疗效不佳等诸多问题^[26,28]。

中医活血化瘀的著名方剂补阳还五汤，其所含化学成分基本涵盖了目前我国批准的缺血性脑卒中治疗药物的结构类型，包含了银杏注射剂、丹参制剂、灯盏花素注射剂、葛根素注射剂和三七皂苷等中药制剂的基本母核^[26]。因此，可推测补阳还五汤

可能是治疗缺血性脑卒中最好的药物^[26]，对于补阳还五汤的研究开发，首先需阐明该方成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用。本研究通过查阅国内外与缺血性脑卒中相关的文献，获取 46 个人体关键蛋白靶标。将补阳还五汤中 204 种化学成分与所获得的关键靶点蛋白进行分子对接，并构建补阳还五汤多成分-多靶点的网络模型。分子对接结果表明，补阳还五汤中的 124 个成分与 10 个以上靶点蛋白有较强的相互作用，其中有 22 个成分与 40 个以上靶点蛋白有较强的相互作用；同时，缺血性脑卒中的 22 个靶点与 80 个以上的补阳还五汤成分具有良好的相互作用，其中有 10 个靶点分别与 100 个以上补阳还五汤成分具有良好的相互作用。但需要注意的是，中药成分主要是以血液为介质输送到靶器官，原成分或其代谢产物再与相关靶点作用，进而发挥药效，因此后期还应采用更为精密、准确的测定技术检测补阳还五汤入血、入脑成分及其代谢产物。

本研究虚拟地构建了补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用，然而未能考虑到中药多成分在体内复杂环境下与多靶点间的交互作用，亦即成分与成分、靶点与靶点间的相互影响。需引入中药超分子化学，建立起一种既能解释成分与靶点间的微观普遍作用规律，同时还需运用基于平衡常数的药物代谢网络动力学方法研究成分-靶点、成分-

成分、靶点-靶点的相互作用关系。中药与人体均为自然界生物超分子体,其药效基础为生物超分子“印迹模板”的聚集体,进入人体后按超分子自主印迹行为发挥药效作用^[29-30]。“印迹模板”理念起源于 Fischer 的酶与底物作用的“锁钥模型”及 Pauling 的“抗体-抗原”学说,与药理学经典的配体-受体理论相似(分子对接即是基于配体-受体理论),可解释配体-受体理论,但又与之不同,内涵更为广泛。“印迹模板”是指以某一特定的目标分子为模板,制备对该分子具有特异选择性空间结构的聚合物,属超分子化学中主-客体化学研究范畴,具自组装、自组织、自识别与自复制的特点^[31-32]。因此,“在空间结构和结合位点上能完全匹配的模板物”即为超分子“印迹模板”,对中药成分来说既是其分子结构的活性空间结构,也可以说是活性原子团的空间排列点阵,据此可从化学物质的本源上阐明主-客体分子自主作用的普遍规律^[33]。因此,运用超分子“印迹模板”自主作用规律整合成分与靶点的作用关系,可极大地降低复方效应研究的难度^[34-42]。本课题组前期已将 Wei 等^[43]复杂化学反应系统结构与分析方法应用到多成分网络药物代谢动力学研究,获得各节点质量浓度通解表达式,进一步得到了生物代谢数学量变规律:各节点 AUC_{∞} (各节点质量浓度对时间由零到无穷积分,亦生物利用度)与平衡常数(由网络内向网络外转化的平衡常数)乘积的代数和等于各节点的初始质量浓度之和。由 AUC_{∞} 、平衡常数、初始质量浓度可建立线性方程组,经改变各节点浓度的构成,通过实验测定各节点 AUC_{∞} ,再通过矩阵计算求得各节点的平衡常数。则此线性方程组可表征中药复方对机体的多维非线性复杂效应,其系数矩阵即由平衡常数所构成的数字阵列,其特征值及特征向量所构成的线性空间控制着该复方对机体的作用,此线性空间即“作用域”,可用于阐明中药复方效应的作用域,建立中药复方效应的数理表征^[44]。

综上,将分子对接技术应用于多成分、多靶点复方效应的研究,可预测有效物质基础及主要作用靶点,同时可构建多成分-多靶点之间的网络关系。然而,体内环境极其复杂,不仅包含成分与靶点间的作用,还存在成分与成分、靶点与靶点间的相互作用。因此,在采用多种药效学评价方法验证成分-靶点作用关系的同时,还需通过中药生物超分子化学体系进行整合,并运用基于平衡常数的药物代谢

网络动力学方法,全面揭示中药多成分在体内产生药效的物质基础及作用机制,最终揭示中药复方整体效应的科学本质及其内涵。

参考文献

- [1] 王陇德. 中国脑卒中防治报告 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2015.
- [2] Members W G, Mozaffarian D, Benjamin E J, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4): e38.
- [3] 李克宁, 郑惠婷, 张雨, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选葛根治疗缺血性脑卒中的物质基础研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1847-1853.
- [4] 王清任. 医林改错 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1966.
- [5] 徐辉, 邹艳丽, 周辉, 等. 补阳还五汤对缺血性脑卒中患者恢复期的疗效评价 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(8): 1155-1157.
- [6] 张利军, 白宇. 补阳还五汤治疗脑梗死临床疗效观察 [J]. 中医药导报, 2009, 15(1): 23-24.
- [7] Morris G M, Limwilby M. Molecular docking [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 443(443): 365-382.
- [8] Pandey R K, Kumbhar B V, Sundar S, *et al.* Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase [J]. *J Receptor Res*, 2017, 37(1): 60-70.
- [9] Cao X, He Y, Dan L, *et al.* Characterization of interaction between scoparone and bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking methods [J]. *Rsc Adv*, 2018, 8(45): 25519-25525.
- [10] 朱冬宁, 吴纯伟, 陈驰, 等. 基于分子对接模拟预测复方脑脉通治疗缺血性脑卒中的物质基础 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 673-679.
- [11] 邓桂珠, 吴纯伟, 林捷欣, 等. 分子对接技术虚拟预测人参治疗缺血性脑卒中的物质基础 [J]. 中药材, 2016, 39(6): 1377-1383.
- [12] 王瑞雪, 柳莲, 王志勇. 缺血性脑卒中神经保护药物及其潜在分子靶点的研究进展 [J]. 世界临床药物, 2013, 34(12): 760-764.
- [13] Mehta S L, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 34-66.
- [14] 路丽, 关琴笑, 田元新, 等. 基于分子对接技术模拟预测大黄用于缺血性脑中风的物质基础 [J]. 中药材, 2015, 38(4): 781-785.

- [15] Ru J, Li P, Wang, J N, *et al.* TCMSp: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.
- [16] 邓桂珠, 林捷欣, 吴纯伟, 等. 复方脑脉通治疗缺血性脑中风多靶点作用的分子对接 [J]. 中成药, 2016, 38(8): 1673-1678.
- [17] Zhang Y T, Xiao M F, Liao Q, *et al.* Application of TQSM polypharmacokinetics and its similarity approach to ascertain Q-marker by analyses of transitivity *in vivo* of five candidates in Buyanghuanwu injection [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.012.
- [18] Fan Q, Liu W, Yang Y, *et al.* A new similarity method for assessment of pharmacokinetic interaction between flucloxacillin and midazolam [J]. *Die Pharmazie*, 2019, 74(7): 397-405.
- [19] 刘惠, 贺红, 朱志飞, 等. 金银花与山银花体外印迹等效性的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 829-835.
- [20] Janyou A, Wicha P, Jittiwat J, *et al.* Dihydrocapsaicin attenuates blood brain barrier and cerebral damage in focal cerebral ischemia/reperfusion via oxidative stress and inflammatory [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10556.
- [21] Wu D, Shi J, Elmadhoun O, *et al.* Dihydrocapsaicin (DHC) enhances the hypothermia-induced neuroprotection following ischemic stroke via PI3K/Akt regulation in rat [J]. *Brain Res*, 2017, 1671: 18-25.
- [22] Curcio M, Picci N. *Antioxidant Polymers: Engineered Materials as Food Preservatives and Functional Foods (Functional Polymers in Food Science)* [M]. New York: Wiley-Blackwell, 2015.
- [23] Kim J Y, Lee J S, Han Y S, *et al.* Pretreatment with lycopene attenuates oxidative stress-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells [J]. *Biomolecules Ther*, 2015, 23(6): 517.
- [24] Chan P H, Fishman R A, Longar S, *et al.* *Cellular and Molecular Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Brain Ischemia and Injury (Progress in Brain Research)* [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- [25] Heurteaux C, Laigle C, Blondeau N, *et al.* Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia [J]. *Neuroscience*, 2006, 137(1): 241-251.
- [26] 肖美凤, 刘金玲, 杨岩涛, 等. 补阳还五汤的研究现状及其新药创制关键技术 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1688-1694.
- [27] 张文娟. 气虚血瘀与缺血性卒中 [J]. 中华中医药杂志, 2002, 17(9): 574-574.
- [28] 张雯, 杜立达, 马寅仲, 等. 抗缺血性脑卒中中药物的应用与研究进展 [J]. 医药导报, 2016, 35(10): 1035-1040.
- [29] 贺福元, 周逸群, 邓凯文, 等. 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1534-1543.
- [30] 李惟. 生物超分子体系 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [31] Lehn J M. Supramolecular chemistry: Where from? Where to? [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(9): 2378-2379.
- [32] Mattia E, Otto S. Supramolecular systems chemistry [J]. *Nat Nanotechnol*, 2015, 10(2): 111-119.
- [33] 陶叶琴. 金(山)银花超分子客体“印迹模板”特征及其代谢研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [34] 周晋, 刘惠, 刘文龙, 等. 基于超分子“印迹模板”分析的中药毒与效整合模式探讨 [J]. 药学学报, 2018, 53(11): 1808-1816.
- [35] 周晋, 刘惠, 肖美凤, 等. 基于超分子“印迹模板”的中药成药性及制剂修饰研究策略 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 6-12.
- [36] 刘惠, 刘文龙, 唐闻汉, 等. 基于超分子“印迹模板”理论探讨中药四性 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4473-4479.
- [37] 李海英, 贺鹏, 贺玉婷, 等. 中药复方配伍研究的关键问题及超分子化学解决对策 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2757-2762.
- [38] 贺鹏, 李海英, 樊启猛, 等. 超分子“印迹模板”理论解析中药五味 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2763-2770.
- [39] 刘润南, 贺福元, 刘文龙, 等. 基于超分子“印迹模板”理论探讨中药升降浮沉 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2771-2776.
- [40] 樊启猛, 贺鹏, 李海英, 等. 基于超分子“印迹模板”整合分析中药“十八反”配伍禁忌 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2777-2784.
- [41] 陈思阳, 李文姣, 樊启猛, 等. 中药提取工艺的超分子“印迹模板”作用规律探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2785-2790.
- [42] 李文姣, 刘文龙, 杨岩涛, 等. 基于超分子“印迹模板”特征的中药制剂体系可调配性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5733-5739.
- [43] Wei J, Prater C D. *The Structure and Analysis of Complex Reaction Systems (Advances in Catalysis)* [M]. Cambridge: Academic Press, 1962.
- [44] 贺福元, 周宏灏, 罗杰英. 多成分药物代谢网络动力学数学模型建立及参数分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(12): 1321-1331.