

## 栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛的网络药理学研究

郑 雅, 王博龙\*

宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000

**摘要:**目的 基于网络药理学研究栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛的作用机制。方法 利用 TCMSP 数据库、SwissTarget Prediction 数据平台筛选栝楼桂枝汤活性成分靶点, 并借助 Gephi 软件构建活性成分-靶点网络, 运用 Genecard、DisGeNET、TTD 疾病数据库筛选作用于脑卒中、下肢痉挛靶基因, 应用 STRING 平台构建靶蛋白相互作用网络, 利用 ClueGO 软件对靶基因进行 GO 功能分析, 通过 DAVID v6.8 平台对关键靶点 KEGG 通路进行分析。结果 栝楼桂枝汤中黄酮类、有机酸类、皂苷类等成分作用于 IL6、TNF、EGFR、ESR1、TP53、STAT3、F2 等 49 个关键靶基因; 参与横纹肌细胞增殖、骨重塑、平滑肌细胞增殖正调控、肌细胞增殖、内皮细胞增殖等 14 类生物过程; 调控 TNF、MAPK、PI3K-Akt、ALS、神经营养、5-羟色胺能神经突触等 30 条信号通路。结论 栝楼桂枝汤多种活性成分通过抗炎、抗氧化、神经营养及保护等药理作用, 以及参与肌细胞增殖等生物过程, 从中枢神经系统及外周肌肉组织双向治疗脑卒中后下肢痉挛。

**关键词:** 栝楼桂枝汤; 脑卒中; 下肢痉挛; 靶点; 信号通路; 网络药理学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5499-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.017

## Study on network pharmacology of Gualou Guizhi Decoction in treatment of lower limb spasm after cerebral apoplexy

ZHENG Ya, WANG Bo-long

School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China

**Abstract: Objective** The mechanism of Gualou Guizhi Decoction (GGD) in the treatment of lower limb spasm after stroke was analyzed based on network pharmacology. **Methods** Using the TCMSP and SwissTarget Prediction platform to screen the main components and targets of GGD, the obtained target information was imported into Gephi software to build the active components-targets network of GGD. Genecard, DisGeNET, and TTD disease databases were used to screen target genes for stroke and lower limb spasm; Target protein interaction network was constructed by using STRING platform; KEGG pathways, and GO (Gene Ontology) function were analyzed by using ClueGO software and DAVID v 6.8 platform. **Results** Flavonoids, organic acids, and saponins of GGD was applied to 49 key target genes, such as IL6, TNF, EGFR, ESR1, TP53, STAT3, and F2, etc; Forteen category biological processes including proliferation of striated muscle cells, bone remodeling, smooth muscle cells, muscle cells and endothelial cells proliferation were involved; Thirty signaling pathways, including TNF, MAPK, PI3K-Akt, ALS, serotonergic synapse, and neurotrophin, etc, were regulated. **Conclusion** Various active ingredients of GGD has pharmacological effects such as anti-inflammatory, antioxidant, neurotrophic, and participate in some biological processes, such as muscle cell proliferation, so as to treat lower limb spasm after stroke from central nervous system and peripheral muscle tissue two-ways.

**Key words:** Gualou Guizhi Decoction; stroke; lower limb spasm; targets; signal pathway; network pharmacology

下肢痉挛是脑卒中的主要后遗症之一, 典型表现为不对称性划圈步态, 伴有反射亢进、肌肉痉挛、肌肉无力等, 不仅患肢承重能力下降, 关节活动范围缩小, 躯体运动受限, 还可造成疼痛、挛缩、畸形等并发症, 严重影响患者生活质量。目前常用治

疗方法包括康复训练、应用抗痉挛药物、局部神经化学阻滞、鞘内注射巴氯芬、外科手术等, 这些方法虽有一定的治疗效果, 但在有效性、安全性和经济性等方面都存在各自的缺陷<sup>[1]</sup>。

栝楼桂枝汤出自《金匱要略》, 书中记载: “太

收稿日期: 2019-05-05

作者简介: 郑 雅 (1994—), 女, 硕士研究生, 从事临床药学、药理学等研究。E-mail: 304987677@qq.com

\*通信作者 王博龙 (1977—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物临床前药理研究及临床有效性与安全性评价。E-mail: wblong77@126.com

阳病，其证备，身体强，几几然，脉反沉迟，此为痉，栝楼桂枝汤主之”，原方主要治疗太阳汗出恶风的柔痉，具有发散风寒、解肌舒筋之功效<sup>[2]</sup>。近年来研究<sup>[3-4]</sup>发现栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛可显著改善患肢功能、提升患者生活自理能力，对康复训练起到易化作用，但其具体药效物质及作用机制并不清楚。许文等<sup>[5-6]</sup>应用高效液相色谱-二极管阵列检测（HPLC-DAD）法分析了栝楼桂枝汤血中移行成分，为研究栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛奠定了物质基础。本研究应用网络药理学方法与技术，运用大数据分析、关联网络等手段探究栝楼桂枝汤血中移行成分作用靶点，通过基因本体（gene ontology, GO）分析和通路富集等，尝试从宏观角度系统阐述栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛的科学内涵，为其临床应用提供参考证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 栝楼桂枝汤入血成分及成分-靶点网络构建

本研究以栝楼桂枝汤血中移行成分为研究对象，运用 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 数据库检索入血成分已知靶点，利用 ChemicalBook 数据库 (<https://www.chemicalbook.com/ProductIndex.aspx>) 查找入血成分分子结构式，保存 .mol 格式文件后导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 数据库中利用相似性靶点搜寻方法查找靶点，运用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 将靶点统一转换为基因名称保存，将以上 2 个来源的基因合并，构建栝楼桂枝汤靶基因汇总，最后利用 Gephi 0.9.2 软件构建栝楼桂枝汤入血成分-靶点网络。

### 1.2 脑卒中-下肢痉挛基因集合构建

以“Stroke、cerebral ischemic stroke”“cerebral infarction”“ischemic stroke”“cerebral stroke”“cerebral hemorrhage”“Lower limb spasticity”“Lower limb spasm”为关键词，在 DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>)、GeneCards (<https://www.genecards.org>)、TTD ([http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/TTD\\_TVD.asp](http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/TTD_TVD.asp)) 数据库中收集汇总脑卒中、下肢痉挛相关靶点，筛除重复后合并，构建脑卒中-下肢痉挛基因集合。

### 1.3 关联网络构建与关键靶基因筛选

为研究栝楼桂枝汤靶基因间的相互作用，利用 STRING 平台 (<https://string-db.org/>) 构建栝楼桂枝汤靶点群蛋白相互作用（protein-protein interaction,

PPI）网络，蛋白种类设置为“Homo sapiens”，其余参数均保持默认，结果保存为 TSV 格式并导入 Cytoscape 3.7.0 软件；利用 Cytoscape 的“Network Analyzer”功能进行网络拓扑属性分析筛选出关键靶点。

### 1.4 GO 分析

利用 Cytoscape 3.7.1 软件的“CluGO”插件并对关键靶基因进行 GO 生物过程富集分析，建立 GO 生物过程层级关系图，分析靶点在体内参与的生物过程。设置参数：来源为“Homo sapiens”（智人）， $P$  值  $\leq 0.05$ ，Interval Min Level = 2，Max Level = 3。

### 1.5 KEGG 信号通路富集

将关键靶基因导入 DAVID v 6.8 平台 (<https://david.ncifcrf.gov>)，物种与背景设置均为“Homo sapiens”（智人），研究关键靶基因富集的主要信号通路，并通过 Omicshare 平台 (<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>) 对富集通路进行可视化分析。

## 2 结果

### 2.1 栝楼桂枝汤活性成分及活性成分-靶点网络构建

栝楼桂枝汤中主要入血成分为 6-姜烯酚、对羟基苯甲酸、甘草次酸、肉桂酸、甘草酸、绿原酸、4-羟基肉桂酸、甘草查耳酮 A、原儿茶醛、6-姜酚、香草酸、甘草素、没食子酸、芍药苷、3-羟基肉桂酸、甘草酚、异甘草素等<sup>[5-6]</sup>，选择其中最主要的 33 种入血成分作为研究对象，结果见表 1。

在 TCMSP 数据库得到栝楼桂枝汤靶基因 182 个（筛除重复），在 SwissTarget Prediction 服务器获取栝楼桂枝汤靶基因 107 个（筛除重复），两者合并删除重复后得到靶基因共 261 个。栝楼桂枝汤 33 种入血成分作用于 261 个靶基因的网状图见图 1，图中 294 个节点、704 条线充分体现了栝楼桂枝汤多成分、多靶点的药理作用。

### 2.2 脑卒中-下肢痉挛基因集合构建

如图 2 所示，筛除重复后得到栝楼桂枝汤-脑卒中共同基因有 174 个，为栝楼桂枝汤直接作用于脑卒中靶点；栝楼桂枝汤-下肢痉挛共同基因有 83 个，为栝楼桂枝汤直接作用于下肢痉挛靶点；其中既作用于脑卒中又作用于下肢痉挛的靶点有 76 个。

### 2.3 关联网络构建与关键靶基因筛选

如图 3 所示，将栝楼桂枝汤 261 个靶基因输入 STRING 数据库中构建栝楼桂枝汤靶点-脑卒中-下肢痉挛基因关联网络，共有 247 个节点（14 个靶基因未参与）、2 485 条相互作用连线构成关联网络

表 1 栝楼桂枝汤活性成分基本信息

Table 1 Active ingredients basic information of Gualou Guizhi Decoction (GGD)

入血成分	英文名	CAS 编号	分子式	入血成分	英文名	CAS 编号	分子式
甘草酚	glycyrol	23013-84-5	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	没食子酸	gallic acid	149-91-7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
异甘草素	isoliquiritigenin	961-29-5	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	6-姜烯酚	6-shogaol	555-66-8	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
甘草查耳酮 B	licochalcone B	58749-23-8	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	甘草苷	liquiritin	551-15-5	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
甘草次酸	glycyrrhetic acid	471-53-4	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	瓜氨酸	citrulline	372-75-8	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
芍药苷	paeoniflorin	23180-57-6	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	肉桂酸	cinnamic acid	621-82-9	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
2-羟基肉桂酸	2-hydroxycinnamic acid	583-17-5	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	甘草酸	glycyrrhizin	1405-86-3	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>
绿原酸	chlorogenic acid	327-97-9	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	香草酸	vanillic acid	121-34-6	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
3-羟基肉桂酸	3-hydroxycinnamic acid	14755-02-3	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	新甘草苷	neoliquiritin	5088-75-5	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
4-羟基肉桂酸	4-hydroxycinnamic acid	501-98-4	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	芒柄花苷	ononin	486-62-4	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
甘草查耳酮 A	licochalcone A	58749-22-7	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	8-姜酚	8-gingerol	30462-35-2	C <sub>43</sub> H <sub>32</sub> O <sub>20</sub>
原儿茶醛	protocatechualdehyde	139-85-5	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	异甘草苷	isoliquiritin	5041-81-6	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
苯甲酰芍药苷	benzoylpaeoniflorin	38642-49-8	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	乌拉皂苷 B	uralsaponin B	105038-43-5	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>
芹糖异甘草苷	isoliquiritin apioside	120926-46-7	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	甘草素	liquiritigenin	578-86-9	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
芹糖甘草苷	liquiritin apioside	199796-12-8	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	6-姜酚	6-gingerol	23513-14-6	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>
甘草皂苷 H2	licoricesaponin H2	135815-61-1	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	芍药内酯苷	albiflorin	39011-90-0	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>
五没食子酰葡萄糖	pentagalloylglucose	14937-32-7	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>	对羟基苯甲酸	4-hydroxybenzoic acid	99-96-7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
甘草皂苷 G2	licoricesaponine G2	118441-84-2	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>				

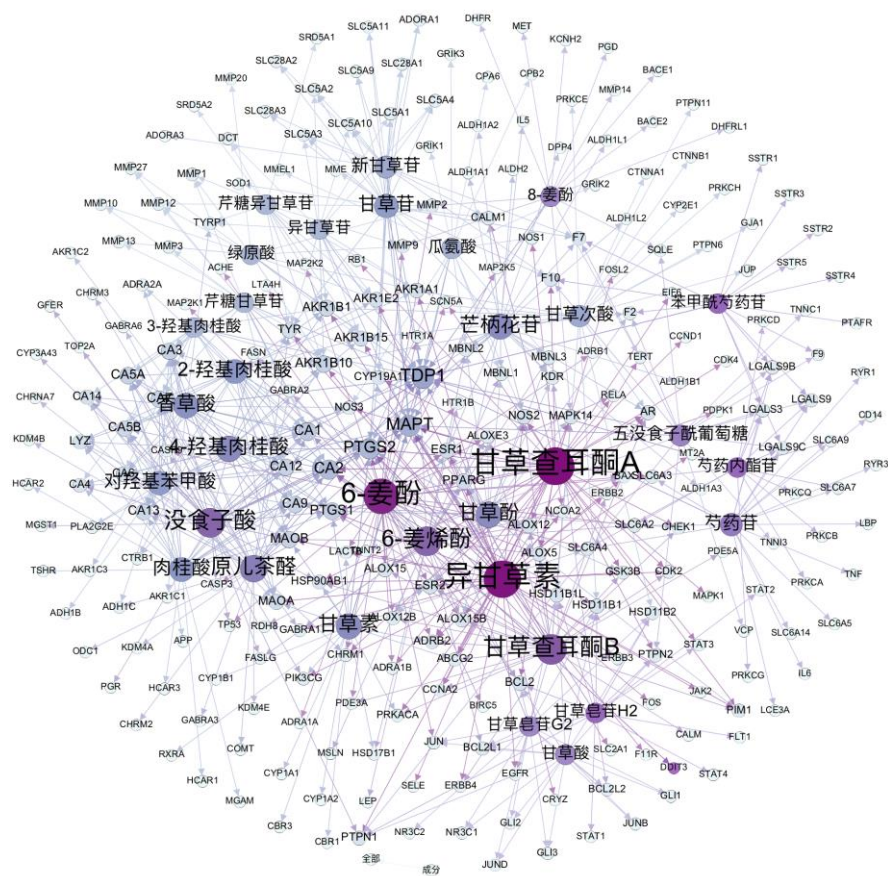


图 1 “成分-靶点”网络

Fig. 1 Network of “ingredients-targets”

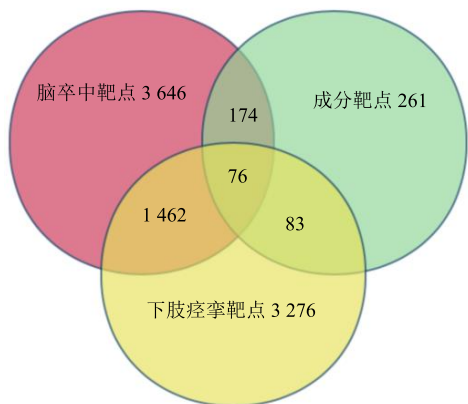


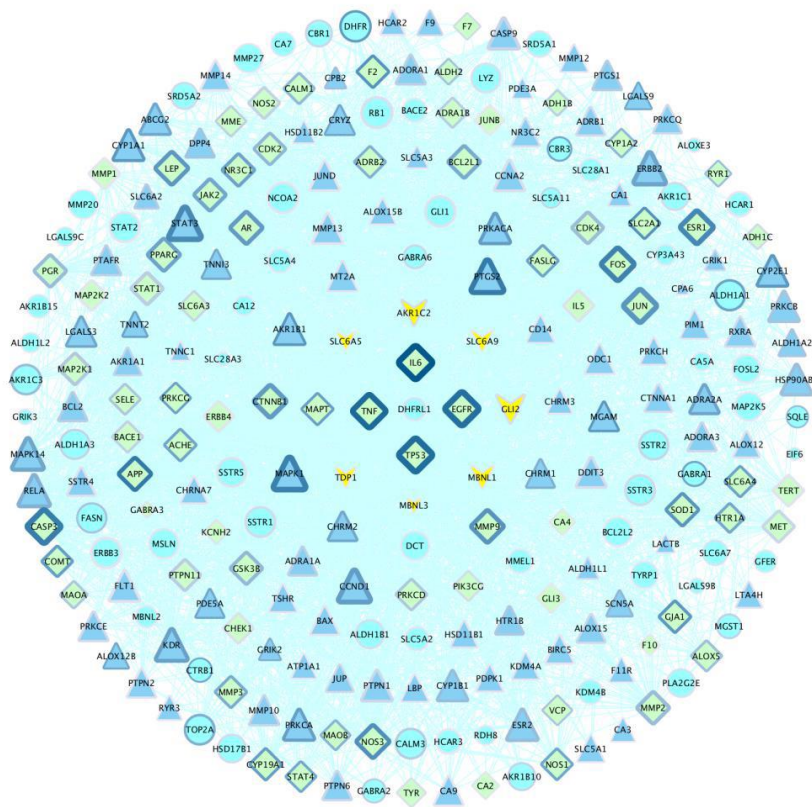
图 2 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of composition target-disease target

图中节点边的粗细代表度值 (degree) 大小, 边越粗代表度值越大; 节点边的颜色代表介数 (betweenness) 大小, 边的颜色越深代表介数越大。PPI 关联网络的平均度值为 20.12, 平均介数为  $5.92 \times 10^{-3}$ , 平均最短距离 (Closeness) 为 0.418, 其中共有 49 个基因参数在平均值之上, 为网络中心性作用脑卒中、下肢痉挛关键靶点, 见表 2。

2.4 GO 富集注释

将 49 个关键靶点进行基因本体 GO 富集研究, 结果如图 4、5 所示, 49 个关键靶点能参与 61 个 GO 条目, 包含 143 条层级关系连线, 可分为 14 组 GO 功能注释: 横纹肌细胞增殖 (15.66%)、骨重塑 (12.05%)、平滑肌细胞增殖正调控 (12.05%)、肌



● 栝楼桂枝汤靶点 ▲ 栝楼桂枝汤-脑卒中相同靶点 ▼ 栝楼桂枝汤-下肢痉挛相同靶点 ◆ 栝楼桂枝汤-脑卒中-下肢痉挛相同靶点  
 ● GGD targets ▲ GGD-stroke same targets ▼ GGD-lower limb spasm same targets ◆ GGD-stroke-lower limb spasm same targets

图 3 栝楼桂枝汤靶基因关联网络

Fig. 3 Association network of GGD target genes

细胞增殖 (9.64%)、女性性别分化 (9.64%)、雌激素反应 (9.64%)、内皮细胞增殖 (8.43%)、调节分枝结构形态 (6.02%)、成纤维细胞增殖调控 (4.82%)、离子转运负调控 (4.82%)、质膜筏 (3.61%)、转录后基因沉默的正调控 (1.21%)、蛋白质自结合 (1.21%) 及神经元识别 (1.21%)。

2.5 KEGG 信号通路分析

如表 3 所示, 依据  $P < 0.05$  筛选栝楼桂枝汤靶基因 KEGG 通路, 得到肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、缺氧诱导因子

表 2 关键靶基因

Table 2 Main anticancer target genes

靶点	平均距离	度	介数	疾病	靶点	平均距离	度	介数	疾病
IL6	0.594	95	0.0733	1、2	CCND1	0.538	69	0.0158	1
TNF	0.572	85	0.0590	1、2	COMT	0.458	31	0.0153	1、2
TP53	0.589	95	0.0564	1、2	CYP19A1	0.474	29	0.0153	1、2
EGFR	0.592	94	0.0543	1、2	PRKCA	0.476	34	0.0150	1、2
APP	0.514	54	0.0457	1、2	MAPT	0.471	24	0.0141	1、2
PTGS2	0.556	74	0.0442	1、2	KDR	0.510	49	0.0127	1、2
CASP3	0.508	84	0.0426	1、2	SLC6A4	0.454	25	0.0122	1、2
MAPK1	0.556	84	0.0395	1、2	ALDH1A1	0.444	22	0.0119	1
FOS	0.549	77	0.0384	1、2	NR3C1	0.494	37	0.0112	1、2
ESR1	0.551	74	0.0337	1、2	FASLG	0.461	25	0.0107	1、2
STAT3	0.551	81	0.0326	1、2	ADRA2A	0.441	33	0.0104	1
NOS3	0.529	55	0.0272	1、2	PPARG	0.510	48	0.0103	1、2
SLC2A1	0.458	25	0.0262	1、2	ERBB2	0.524	59	0.0999	1
F2	0.478	30	0.0253	1、2	ACHE	0.476	27	0.0934	1、2
MMP9	0.522	61	0.0240	1、2	ABCG2	0.463	27	0.0823	1
SOD1	0.498	39	0.0223	1、2	NOS1	0.463	26	0.0814	1、2
JUN	0.560	78	0.0220	1、2	MAPK14	0.509	54	0.0803	1、2
AKR1B1	0.471	23	0.0219	1	LGALS3	0.445	22	0.0802	1、2
LEP	0.524	54	0.0209	1、2	HTR1A	0.429	27	0.0789	1、2
GJA1	0.477	33	0.0208	1、2	CHRM2	0.432	24	0.0757	1
CYP2E1	0.476	32	0.0207	1	STAT4	0.447	23	0.0750	1、2
CYP1A1	0.472	32	0.0204	1	JAK2	0.492	48	0.0723	1、2
CTNNA1	0.523	68	0.0174	1、2	BCL2L1	0.500	46	0.0618	1、2
AR	0.509	56	0.0173	1、2	MMP3	0.470	29	0.0612	1、2
PRKACA	0.465	37	0.0168	1、2					

“1”代表直接作用脑卒中靶点；“2”代表直接作用下肢痉挛靶点

“1” represents direct targets for stroke; “2” represents direct targets for lower limb spasm

1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、5-羟色胺突触 (serotonergic synapse)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等 30 条 KEGG 信号通路。P 值最小的是肿瘤坏死因子信号通路，富集因子最高的是肌萎缩性侧索硬化症，而目标基因最多的是 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路。

### 3 讨论

现代医学认为脑卒中后上运动神经元受损，中枢对脊髓运动神经元的抑制减弱，脊髓  $\alpha$  运动神经元和  $\gamma$  运动神经元的互相制约失衡， $\gamma$  运动神经元的兴奋性持续传入肌梭，从而产生肌痉挛。而祖国医学认为脑卒中即中风后肢体痉挛为阴阳失调、元神受损、肝魂失统，其藏血主筋之功受损，肌肉筋脉不得肝血濡养，筋肌失养而拘挛，进而发为痉挛。栝楼桂枝汤由天花粉、桂枝、芍药、生姜、大枣、

甘草 6 味中药配伍而成，能够柔润筋脉、生津养营、止痉解肌，药理研究表明其具有抗炎<sup>[7]</sup>、抗氧化应激<sup>[8]</sup>、抗兴奋性氨基酸毒性<sup>[9]</sup>、抗神经细胞凋亡<sup>[10]</sup> 等多重脑保护作用。

为深入研究栝楼桂枝汤治疗脑卒中下肢痉挛的药效物质及作用靶点，本研究基于复方药效物质研究的血清药物化学思维，即分析栝楼桂枝汤的血中移行成分，以血中移行成分作为其体内药效物质开展研究。通过挖掘栝楼桂枝汤血清药物化学文献，选取了甘草酚、没食子酸、6-姜烯酚、甘草苷、芍药苷、肉桂酸、甘草酸绿原酸、瓜氨酸、芒柄花苷、6-姜酚、香草酸、芹糖甘草苷等 33 种入血成分作为研究对象。实验研究<sup>[11]</sup>发现这些入血成分大都可以进入卒中后的脑组织，而且许多已被证实具有神经保护作用。如君药天花粉的主要成分瓜氨酸，为抑制

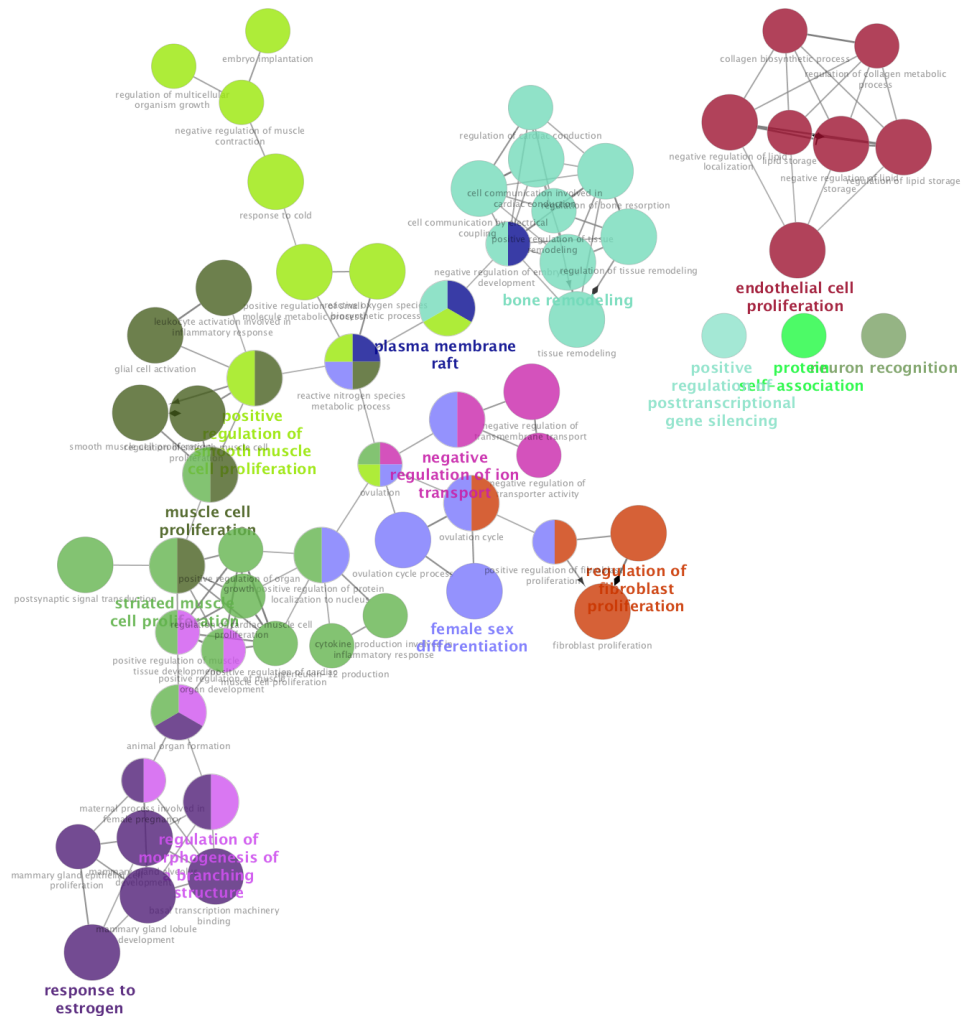


图 4 GO 功能注释网络

Fig. 4 Network of GO function annotation

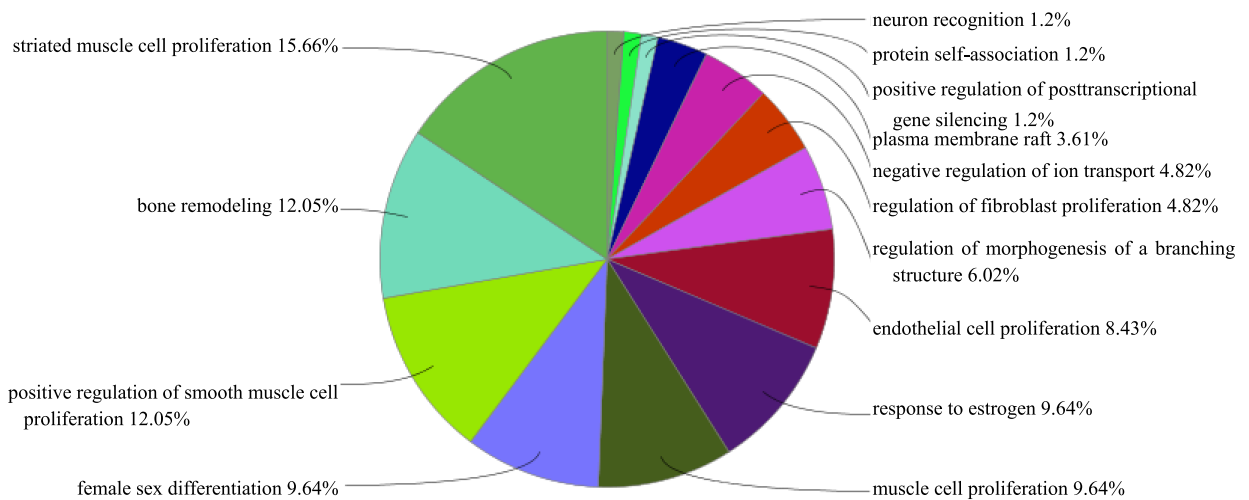


图 5 GO 功能注释饼状图

Fig. 5 Pie diagram of GO function annotation

表 3 KEGG 信号通路  
Table 3 KEGG signaling pathways

KEGG 信号通路	参与的靶基因	P 值
TNF signaling pathway	FOS、JUN、CASP3、IL6、MMP3、MMP9、MAPK1、MAPK14、PTGS2、TNF	$3.20 \times 10^{-8}$
MAPK signaling pathway	FASLG、FOS、JUN、CASP3、EGFR、MAPK1、MAPK14、PRKCA、PRKACA、TNF、TP53	$7.20 \times 10^{-7}$
amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	BCL2L1、CASP3、MAPK14、NOS1、SOD1、TNF、TP53	$9.30 \times 10^{-7}$
HIF-1 signaling pathway	EGFR、ERBB2、IL6、MAPK1、NOS3、PRKCA、STAT3、SLC2A1	$3.30 \times 10^{-6}$
serotonergic synapse	HTR1A、APP、CASP3、MAPK1、PTGS2、PRKCA、PRKACA、SLC6A4	$8.70 \times 10^{-6}$
PI3K-Akt signaling pathway	BCL2L1、FASLG、JAK2、CHRM2、CCND1、EGFR、IL6、KDR、MAPK1、NOS3、PRKCA、TP53	$1.50 \times 10^{-5}$
VEGF signaling pathway	KDR、MAPK1、MAPK14、NOS3、PTGS2、PRKCA	$5.40 \times 10^{-5}$
cholinergic synapse	FOS、JAK2、ACHE、CHRM2、MAPK1、PRKCA、PRKACA	$9.70 \times 10^{-5}$
FoxO signaling pathway	FASLG、CCND1、EGFR、IL6、MAPK1、MAPK14、STAT3	$2.70 \times 10^{-4}$
Jak-STAT signaling pathway	BCL2L1、JAK2、CCND1、IL6、LEP、STAT3、STAT4	$4.20 \times 10^{-4}$
Toll-like receptor signaling pathway	FOS、JUN、IL6、MAPK1、MAPK14、TNF	$7.20 \times 10^{-4}$
apoptosis	BCL2L1、FASLG、CASP3、TNF、TP53	$8.00 \times 10^{-4}$
glioma	CCND1、EGFR、MAPK1、PRKCA、TP53	$9.50 \times 10^{-4}$
adipocytokine signaling pathway	JAK2、LEP、STAT3、SLC2A1、TNF	$1.30 \times 10^{-3}$
calcium signaling pathway	CHRM2、EGFR、ERBB2、NOS1、NOS3、PRKCA、PRKACA	$1.30 \times 10^{-3}$
sphingolipid signaling pathway	MAPK1、MAPK14、NOS3、PRKCA、TNF、TP53	$1.30 \times 10^{-3}$
osteoclast differentiation	FOS、JUN、MAPK1、MAPK14、PPARG、TNF	$1.90 \times 10^{-3}$
ErbB signaling pathway	JUN、EGFR、ERBB2、MAPK1、PRKCA	$2.80 \times 10^{-3}$
rheumatoid arthritis	FOS、JUN、IL6、MMP3、TNF	$2.90 \times 10^{-3}$
Ras signaling pathway	BCL2L1、FASLG、EGFR、KDR、MAPK1、PRKCA、PRKACA	$4.10 \times 10^{-3}$
T cell receptor signaling pathway	FOS、JUN、MAPK1、MAPK14、TNF	$4.60 \times 10^{-3}$
retrograde endocannabinoid signaling	MAPK1、MAPK14、PTGS2、PRKCA、PRKACA	$4.80 \times 10^{-3}$
Alzheimer's disease	APP、TNF、NOS1、MAPK1、CASP3、MAPK1	$5.50 \times 10^{-3}$
NOD-like receptor signaling pathway	IL6、MAPK1、MAPK14、TNF	$6.40 \times 10^{-3}$
neurotrophin signaling pathway	FASLG、JUN、MAPK1、MAPK14、TP53	$8.80 \times 10^{-3}$
cAMP signaling pathway	HTR1A、FOS、JUN、CHRM2、MAPK1、PRKACA	0.011 0
dopaminergic synapse	FOS、COMT、MAPK14、PRKCA、PRKACA	0.011 0
signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	JAK2、CTNNB1、MAPK1、MAPK14、STAT3	0.015 0
neuroactive ligand-receptor interaction	HTR1A、ADRA2A、CHRM2、F2、LEP、NR3C1	0.039 0
leukocyte transendothelial migration	MMP9、MAPK14、PRKCA、CTNNB1	0.043 0

性氨基酸，对卒中后的脑部兴奋性毒性有拮抗作用<sup>[12]</sup>；芍药苷可以通过激活大麻素受体 2 保护脑缺血再灌注损伤模型大鼠的海马神经细胞<sup>[13]</sup>；甘草苷、芒柄花苷、甘草素等甘草黄酮类成分以及肉桂酸、2-羟基肉桂酸、3-羟基肉桂酸等肉桂酸类成分则

具有良好抗氧化活性，对神经细胞氧化应激具有保护作用<sup>[14-15]</sup>；此外，生姜中的姜酚、大枣中的有机酸、甘草中的甘草酸、甘草次酸等三萜类成分都具有良好的抗炎作用。上述研究充分体现了以入血成分作为栝楼桂枝汤治疗脑卒中下肢痉挛药效物质的可

靠性。

将栝楼桂枝汤入血成分靶基因与脑卒中-下肢痉挛基因构建关联网络,得到了 IL6、TNF、EGFR、ESR1、TP53、STAT3、F2、CHRM2、HTR1A、MMP3、MMP9、NOS1、AR 等 49 个关键靶基因,全部都是脑卒中靶点,部分同时为下肢痉挛靶点。对这些关键靶基因进行 GO 生物过程富集,发现可参与横纹肌细胞增殖、骨重塑、平滑肌细胞增殖正调控、肌细胞增殖、内皮细胞增殖、成纤维细胞增殖调控、神经元识别等生物过程。这说明栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛主要作用于脑神经,其次为肌组织,具有中枢和外周双重作用。

通路富集可有效了解栝楼桂枝汤靶点的整体协同作用,其 30 条信号通路主要存在于炎症、神经等方面。炎症反应在脑卒中发生发展中具有重要作用,与疾病的严重程度以及预后密切相关。TNF- $\alpha$  是一种具有广泛性生物学功能的多效性细胞因子,参与机体多种免疫应答反应,刺激产生多种炎症因子,引起炎症反应级联放大,释放各种细胞毒性成分,加重免疫损伤和神经元死亡。本研究发现栝楼桂枝汤可作用于白细胞介素 (IL)、MAPK、基质金属蛋白酶 (MMP)、半胱氨酸蛋白酶 (CASP)、前列腺素 G/H 合成酶 (PTGS) 等家族的多种蛋白,重点调控肿瘤坏死因子信号通路,以及血管内皮生长因子、白细胞跨内皮迁移、T 细胞受体、NOD 样受体、Toll 样受体等其他多条炎症通路,与研究<sup>[16-17]</sup>发现栝楼桂枝汤能够抑制脑组织的炎症浸润、炎症细胞活化以及神经元死亡;促进脂多糖诱导的小胶质细胞表达抗炎因子,发挥抗神经炎症的药理作用相一致。栝楼桂枝汤靶点在神经方面主要富集在肌萎缩性侧索硬化症、神经营养信号通路、阿尔茨海默病、5-羟色胺能神经突触、多巴胺能神经突触等通路,说明其具有神经营养及保护作用,实验也显示栝楼桂枝汤对斑马鱼神经元损伤具有明显的保护作用<sup>[18]</sup>。MAPK 和 PI3K-Akt 是栝楼桂枝汤靶基因富集最多的通路,它们在脑卒中后即被激活,对神经元的生存与凋亡起着重要的调控作用<sup>[19]</sup>。其中 PI3K-Akt 信号通路参与细胞增殖、存活和凋亡等多种生物学过程,可减轻脑血管内皮细胞氧化损伤和细胞凋亡<sup>[20]</sup>。MAPK 信号通路在中枢神经系统中广泛表达,而栝楼桂枝汤可以抑制 MAPK 磷酸化和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 激活,减少一氧化氮 (NO)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的产生及环氧合酶-2 (COX-2) 的表达,

从而治疗大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[21]</sup>。

本研究通过网络药理学方法与技术,分析了栝楼桂枝汤成分、靶点及通路,发现其主要通过抗炎、抗氧化、神经营养与保护等药理作用,以及参与肌细胞增殖等生物过程,从中枢神经系统及外周肌肉组织双向治疗脑卒中后下肢痉挛,为揭示栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛作用机制提供了新的思路与线索。

#### 参考文献

- [1] 王虹,赵晨光,袁华,等. A 型肉毒毒素联合冲击波疗法对脑卒中后下肢痉挛状态的疗效观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(7): 773-778.
- [2] 杨春梅,陈立典,陶静. 古方今用瓜蒌桂枝汤 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1599-1600.
- [3] 祝玉朴. 应用栝楼桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛患者的临床效果分析 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(29): 27-28.
- [4] 贾军丽. 瓜蒌桂枝汤治疗脑卒中后下肢痉挛临床研究 [J]. 河南中医, 2015, 35(8): 1748-1750.
- [5] 许文,吴献,黄鸣清,等. 栝楼桂枝汤的血清药物化学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2033-2043.
- [6] 向青,许文,刘杰,等. HPLC-DAD 法分析栝楼桂枝汤血中移行成分 [J]. 福建中医药, 2015, 46(2): 42-43.
- [7] Hu H X, Li Z F, Zhu X Q, et al. Gua Lou Gui Zhi decoction suppresses LPS-induced activation of the TLR4/NF-kappa B pathway in BV-2 murine microglial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6): 1327-1332.
- [8] Hu H X, Li Z F, Zhu X Q, et al. Gua Lou Gui Zhi decoction inhibits LPS-induced microglial cell motility through the MAPK signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(6): 1281-1286.
- [9] Chen X W, Li H, Huang M Q, et al. Effect of Gua Lou Gui Zhi decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating the expression of excitatory amino acids and their receptors [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 248-254.
- [10] Li Z F, Hu H X, Lin R H, et al. Neuroprotective effects of Gua Lou Gui Zhi decoction against glutamate-induced apoptosis in BV-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 597-604.
- [11] 李煌. 栝楼桂枝汤治疗脑卒中后肌肉痉挛的药效物质基础研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [12] Li H, Ye M, Zhang Y Q, et al. Blood-brain barrier permeability of Gualou Guizhi granules and neuroprotective effects in ischemia/reperfusion injury [J].



- Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1272-1278.
- [13] Cai J, Rao M, Tang M, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on the hippocampus in rats with cerebral ischemia-reperfusion through activating cannabinoid receptor 2 [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(4): 443-447.
- [14] Zeng L H, Zhang H D, Xu C J, *et al.* Neuroprotective effects of flavonoids extracted from licorice on kainate-induced seizure in mice through their antioxidant properties [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 14(11): 1004-1012.
- [15] Silva T, Summavielle T, Remiao F, *et al.* Development of neuroprotective antioxidants: *In vitro* and cellular activity of lipophilic cinnamic acid derivatives [J]. *Toxicol Lett*, 2014, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.305.
- [16] 胡海霞. 基于 TLR3/4 信号通路探讨栝楼桂枝汤调控脑卒中后炎症反应的作用机制研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [17] 胡海霞, 朱晓勤, 李钻芳, 等. 栝楼桂枝汤对活化小胶质细胞抗炎作用的研究 [J]. 实用中西医结合临床, 2017, 17(1): 152-155.
- [18] 李 煌, 乔丽菲, 张玉琴, 等. 基于化学成分和生物效应的栝楼桂枝汤质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1877-1882.
- [19] 于 淼, 高维娟, 钱 涛. 脑缺血/再灌注信号转导通路的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2010, 27(1): 64-6.
- [20] Wang S W, Deng L X, Chen H Y, *et al.* MiR-124 affects the apoptosis of brain vascular endothelial cells and ROS production through regulating PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(2): 498-505.
- [21] Hu H, Zhu X, Lin R, *et al.* Suppressive effects of Gua Lou Gui Zhi decoction on MCAO-induced NO and PGE2 production are dependent on the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5141-5147.