

基于网络药理学的黄芩素、京尼平抗脑缺血作用机制研究

向净匀, 吴 杰, 王 琰, 高原雪, 何 林, 李 豪, 李 敏, 史永恒, 王 斌*

陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

摘 要: **目的** 采用网络药理学及分子对接技术, 以灯盏花乙素苷元 (scutellarein, SE) 作为参照, 预测黄芩素 (baicalein, BE)、京尼平 (genipin, GE) 抗脑缺血作用靶点, 为脑缺血疾病的临床防治和开发研究提供参考。 **方法** 利用 TCMSP、Swiss Target Prediction 和 Stitch 数据库检索和文献挖掘方法, 预测 SE、BE、GE 作用靶点, 同时应用 DisGeNET、CTD、NCBI Gene、OMIM、DrugBank 和 PharmGkb 数据库预测脑缺血疾病相关靶点。通过 Cytoscape 3.3.0 构建小分子-靶点网络图, 用 DAVID 软件分析 SE、BE、GE 特有抗脑缺血靶点的 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。采用 Autodock Vina 软件对 SE、BE、GE 与抗脑缺血共同靶点分别进行对接研究, 根据受体与配体的结合能和抑制浓度排序, 选择最佳的靶点蛋白。 **结果** SE、BE、GE 分别预测出 30、59、35 个靶蛋白, SE 与 BE 共同抗脑缺血疾病靶点有 PIK3CG、CYP1A2、VEGFA、ALOX5、PTGS2, SE 与 GE 共同抗脑缺血靶点为 PTGS2。分子对接结果显示受体 PTGS2 与 SE、BE、GE 对接结合能及抑制浓度相对较低。GO 功能富集结果显示 BE-SE 共同靶点主要分布于细胞质、细胞器膜、内质网膜等部位, 具有与金属离子、阳离子结合功能及催化、氧化还原酶活性, 参与细胞脂质、羧酸、含氧酸、有机酸代谢及脂肪酸合成等过程有关; KEGG 分析结果显示受体 PTGS2 主要作用于花生四烯酸代谢通路和 VEGF 信号通路, BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病通过抑制 PTGS2 (COX-2) 和 VEGF 蛋白的表达, 从而减轻炎症因子造成的脑组织损伤并改善血脑屏障 (Blood brain barrier, BBB) 的通透性发挥脑保护作用。 **结论** 预测了 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病的潜在靶点, 初步验证了治疗脑缺血疾病的作用机制, 为进一步深入研究 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血作用机制提供参考, 也为下一步合成新的衍生物提供基础。

关键词: 黄芩素; 灯盏花乙素苷元; 京尼平; 脑缺血; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)23-5802-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.023

Anti-cerebral ischemia mechanisms of baicalein and genipin based on network pharmacology

XIANG Jing-yun, WU Jie, WANG Yan, GAO Yuan-xue, HE Lin, LI Hao, LI Min, SHI Yong-heng, WANG Bin
Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective Using network pharmacology and molecular docking technology along with scutellarein (SE) as a reference, this study predicted the anti-cerebral ischemia targets of both baicalein (BE) and genipin (GE). It is hoped that these will provide a reference for clinical prevention and development of ischemic diseases. **Methods** SE, BE and GE targets were predicted using TCMSP, Swiss Target Prediction, Stitch database search and literature mining methods. Targets related to cerebral ischemia diseases could be predicted by DisGeNET, CTD, NCBI Gene, OMIM, DrugBank and PharmGkb databases. Cytoscape 3.3.0 was used to construct the small molecule-target network. GO function enrichment and KEGG pathway analysis of SE, BE and GE specific anti-cerebral ischemia targets were analyzed with the DAVID database. Autodock Vina software was used for molecular docking, testing the binding energy of BE, GE and SE to targets of cerebral ischemia. The optimal target protein was selected according to the binding energy and inhibition concentration of receptor and ligand. **Results** A total of 30 potential targets of SE, 59 potential targets of BE and 35 potential targets of GE were found. Common anti-cerebral ischemia targets of SE and BE were PIK3CG, CYP1A2, VEGFA, ALOX5 and PTGS2, while common anti-cerebral ischemia targets of SE and GE were PTGS2. Molecular docking results demonstrated that the binding energy and inhibitory concentration of receptor PTGS2 to the three drugs were relatively low. Enrichment of GO function showed that common targets of BE-SE were mainly distributed in cytoplasm, organelle membrane,

收稿日期: 2019-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473385); 陕西省自然科学基金项目 (2018JM7111)

作者简介: 向净匀 (1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为心脑血管疾病药理学研究。E-mail: 1032233140@qq.com

*通信作者 王 斌 (1978—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为心脑血管疾病药理学研究。E-mail: wangbin812@126.com

endoplasmic reticulum and other elements. These elements had binding functions with metal ions and cations, catalytic and oxidoreductase activities, and they participated in cell lipid, carboxylic acid, oxygenic acid, organic acid metabolism and fatty acid synthesis. Results of the KEGG analysis demonstrated that receptor PTGS2 mainly acted on the arachidonic acid metabolism pathway and the vascular endothelial growth factor signaling pathway. A combination of BE and GE functioned in the treatment of cerebral ischemia disease by inhibiting expression of PTGS2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor protein, thus reducing brain injury caused by inflammatory factors and improving the permeability of the blood brain barrier (BBB). **Conclusion** This study predicted potential targets of BE and GE compatibility in the treatment of cerebral ischemia diseases and preliminarily verified mechanisms of action in the treatment of cerebral ischemia diseases. It provides valuable data for further study into the mechanisms of BE and GE compatibility for the treatment of cerebral ischemia as well as developing a basis for the next synthesis of new derivatives.

Key words: baicalein; scutellarein; genipin; cerebral ischemia; network pharmacology; molecular docking

近年来,随着对传统毒邪的深化认识,以及对卒中的病理机制和临床研究的深入,提出了“毒损脑络”的病理机制,认识到毒邪与卒中发病密切相关。采用解毒祛毒法治疗卒中已经成为现代医药学研究的热点。目前,较多学者认为热毒是卒中发病的一个关键因素,因此,通过清热解毒法治疗卒中值得进一步的研究。

黄连解毒汤是《肘后备急方》中清热解毒的经典方剂,由黄连、黄芩、黄柏、栀子配伍组成,大量文献研究^[1-5]表明该方剂具有治疗脑缺血疾病的作用,钱智磊等^[6]研究黄连解毒汤中主要药效成分治疗脑缺血疾病的时量关系发现,黄芩苷(baicalin, BC)、栀子苷(geniposide, GP)在 0.5 h 时血药浓度能到达峰值。曾明飞等^[7-8]研究黄连解毒汤中 BC 和 GP 在正常及脑缺血大鼠体内的药动学差异,证明了在脑缺血病理状态下,BC 和 GP 的达峰浓度(C_{max})、药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)明显增加。基于此,本课题组对黄连解毒汤拆方,研究了黄芩与栀子配伍治疗脑缺血损伤,具有一定的改善作用^[9],且课题组采用了基线等比增减法找出 BC 与 GP 的最优配比,分别按照 BC-GP 3:7、1:1、7:3 配伍给药,发现 BC-GP 7:3 配伍时能更好地发挥脑保护作用^[10],并深入研究了相关机制,证明 BC-GP 配伍对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠血脑屏障(BBB)的损伤具有保护作用^[11],研究发现 BC-GP 7:3 配伍给药 7~21 d 能够降低大鼠脑缺血区的炎性细胞浸润,降低了肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 在血清中的含量,下调了 5-脂氧合酶(5-LOX)、半胱氨酰白三烯受体 1 (CysLT1)、CysLT2 蛋白的表达^[12-13]。课题组前期采用微透析结合液质联用技术以及基因芯片技术,从基因层面上证明了 BC-GP 能够抑制兴奋性氨基酸毒性受体来发挥脑保护作用,用微透析技术对样品进行检测,

仅检测到 GP、谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp) 3 种化合物^[14], BC 未检测到,可能是代谢为黄芩素(baicalein, BE)等其他物质而发挥脑保护作用,因此,本研究借助网络药理学方法,通过数据挖掘技术,从 BC 与 GP 在体内代谢后的物质 BE^[15]和京尼平(genipin, GE)^[16]来研究脑保护的作用机制,虚拟筛选灯盏花乙素苷元(scutellarein, SE)与 BE、GE 抗脑缺血的作用靶点,并采用 PyRx 0.8 中的 AutoDock Vina^[17]进行靶点验证,为下一步合成新的衍生物提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 BE、GE 和 SE 对应靶点的预测

通过 TCMSP (traditional Chinese medicine systems pharmacology database、<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 数据库,分别输入 baicalein (黄芩素)、genipin (京尼平)、scutellarein (灯盏花乙素苷元),找到 BE、GE、SE 的相关靶点(related targets);使用 STITCH (<http://stitch.embl.de>) 在“Item Name”中分别输入 baicalein、genipin、scutellarein,选择 Organism 为“Homo sapiens”进行搜索相关靶蛋白信息;将 BE、GE、SE 的分子式用 OpenBabel-2.4.1 转换成 SMILES 格式,分别上传至 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),选择物种为“Homo sapiens”,分别获得 BE、GE、SE 潜在的作用靶点。分别将上述不同数据库搜索获得的靶蛋白信息导入 Excel 中进行合并并剔除重复信息,最终获得 BE、GE、SE 相关的靶点蛋白信息。选择蛋白质数据库(UniProt)中 UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) 将检索得到的靶蛋白校正为其官方名称(official symbol),最终得到 3 个化合物的相关靶蛋白基因。

1.2 BE、GE 和 SE 抗脑缺血作用靶点的获取

预测获得的脑缺血疾病靶点信息参考了 6 个疾

病数据库进行比对分析: DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>)、CTD (<http://ctdbase.org/>)、NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、OMIM (<http://omim.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)、PharmGkb (<https://www.pharmgkb.org/>), 以“cerebral ischemia”为关键词搜索脑缺血疾病相关的靶蛋白, 将检索结果导入 Excel 中合并并剔除重复的靶蛋白信息, 用蛋白质数据库 (UniProt) 中 UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) 将检索得到的靶点校正为其官方名称 (official symbol)。最后分别将“1.1”项下预测的化合物基因与脑缺血疾病基因相互映射, 归纳总结出 BE、GE、SE 抗脑缺血作用的靶点基因。

1.3 网络的构建及分析

使用 Cytoscape 3.3.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 对收集的 3 个药物小分子作用靶点构建药物小分子-靶点网络图。通过 DAVID Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对筛选得到的共同靶蛋白进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析, 结合 R 语言构建气泡图, 并根据富集因子值分析重要的作用通路来探究其作用机制, 气泡图中节点的大小代表富集的靶点数, 节点的颜色由绿色至红色表明 P 值由小到大。并通过 Cytoscape 3.3.0 软件构建相关预测靶点-通路网络图。

1.4 分子对接验证

1.4.1 配体及受体准备 从 TCMSP 数据库获得配体 SE、BE、GE 的结构将其保存为 mol2 格式, 再从靶蛋白数据库 (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 获得 BE-SE 及 GE-SE 共同受体蛋白的三维结构, 用 DS 4.5 对受体蛋白进行预处理, 去除所有水分子, 并进行力场优化。

1.4.2 分子对接准备 用 AutoDock Tools (ADT, 由 Molecular Graphic 实验室的 Olson 科研小组开发) 给处理后的受体和配体添加极性氢及 Gasteiger 电荷, 并分别保存处理好之后的受体及配体文件为 PDBQT 格式, 接下来用 AutoGrid 设置对接盒子的参数 (调整 X-Y-Z 的坐标和网格大小), 选择 Lamarckian 遗传算法 (LGA) 寻找最佳的对接条件进行柔性对接, 记录受体与配体的对接位置, 对接结果的分析参考结合能和抑制浓度, 受体与配体的结合能和抑制浓度越低, 其对接效果相对较好。对接结果用分子模拟图形界面软件 Discovery Studio Visualizer 4.5 进行处理查看。

2 结果

2.1 预测的靶点信息

通过 TCMSP 等数据库及文献挖掘, 预测出了 BE 的潜在作用靶点数为 59 个, GE 的潜在作用靶点数为 35 个, SE 的潜在作用靶点数为 30 个, 并通过 Cytoscape 3.3.0 构建了 BE-GE-SE-靶点网络图 (图 1)。通过查找 CTD 等 6 个数据库并删除重复项筛选出 455 个与脑缺血疾病相关的靶点, BE、GE、SE 抗脑缺血靶点分别为 13、10 和 6 个 (表 1), 从靶点角度解释其治疗脑缺血疾病的科学内涵。

2.2 相关靶点的 GO 功能富集分析

将表 1 中 BE-SE 的共同作用靶蛋白 PTGS2、PIK3CG、VEGFA、ALOX5、CYP1A2、XDH 导入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 分析, 得到 GO 相关的生物过程、细胞成分、分子功能和 KEGG 通路信息。由 GO 分子功能富集结果可知 (图 2~4), 在生物过程中, 细胞脂质代谢 (4 个靶点)、羧酸代谢 (3 个靶点)、含氧酸代谢 (3 个靶点)、有机酸代谢 (3 个靶点)、脂肪酸生物合成 (2 个靶点) 等 18 个生物过程存在着显著性差异 ($P < 0.05$); 分子功能分析中, 催化活性 (4 个靶点)、氧化还原酶的活性 (3 个靶点)、金属离子结合 (3 个靶点)、阳离子结合 (3 个靶点) 等 9 个分子功能存在着显著性差异 ($P < 0.05$); 细胞成分中与细胞质 (4 个靶点)、细胞器膜 (3 个靶点)、内质网膜 (2 个靶点) 等 6 个细胞组分存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 KEGG 富集通路分析及预测靶点-通路网络

通过 KEGG 富集通路分析映射出 8 条与脑缺血相关的通路, 其中咖啡因代谢 (2 个靶点) 和癌症途径 (3 个靶点) 2 条通路存在着显著性差异 ($P < 0.05$), 在雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路、花生四烯酸代谢、肾细胞癌、胰腺癌、小细胞肺癌通路上分别有 2 个靶蛋白富集 (图 5)。关于 BE、SE 预测出的抗脑缺血靶点从通路图 (图 6) 可知, 主要作用于 PTGS2、PIK3CG、VEGFA 等靶蛋白, 同时这些靶蛋白参与不同通路从多途径抗脑缺血疾病。

2.4 分子对接分析

以具有明确抗脑缺血疾病的药物 SE 作为参照, 预测 BE 和 GE 抗脑缺血疾病的靶点, 参考文献预测出 BE 与 SE 的共同靶点 PTGS2、PIK3CG、CYP1A2、VEGFA、ALOX5, GE 与 SE 的共同靶点为 PTGS2。采用 Autodock vina 1.5.6 进行分子对接,

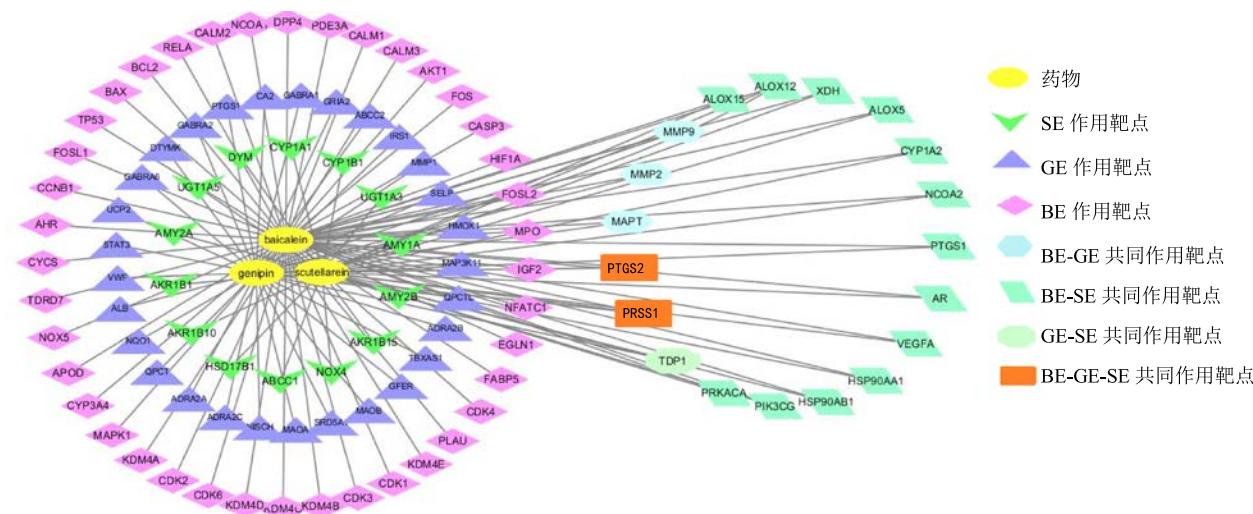


图 1 药物-靶点网络

Fig. 1 Network diagram of drug-target

表 1 BE、GE、SE 特有抗脑缺血靶点

Table 1 Specific anti-cerebral ischemia targets of BE, GE, and SE

化合物	基因	靶点	UniProtID
BE	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	P35354
	PIK3CG	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ -异构体 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform)	P48736
	VEGFA	血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	P15692
	BCL2	凋亡调节因子 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2)	P10415
	FOS	原癌基因 c-fos (proto-oncogene c-Fos)	P01100
	MMP9	基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9)	P14780
	HIF1A	缺氧诱导因子 1- α (hypoxia-inducible factor 1-alpha)	Q16665
	MPO	过氧化物酶 (myeloperoxidase)	P05164
	CYP1A2	细胞色素 P450 1A2 (cytochrome P450 1A2)	P05177
	PLAU	尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator)	P00749
	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1)	P28482
	ALOX5	花生四烯酸 5-脂氧合酶 (arachidonate 5-lipoxygenase)	P09917
	XDH	黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase)	P47989
GE	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	P35354
	GABRA6	γ -氨基丁酸受体亚基 α -6 (gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6)	Q16445
	UCP2	线粒体线粒体蛋白 2 (mitochondrial uncoupling protein 2)	P55851
	STAT3	信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3)	P40763
	VWF	血管假性血友病因子 (von Willebrand factor)	P04275
	SELP	血小板选择蛋白 (P-selectin)	P16109
	ALB	血清白蛋白 (serum albumin)	P02768
	HMOX1	血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1)	P09601
	MAP3K11	丝裂原活化蛋白激酶-11 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11)	Q16584
SE	MMP9	基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9)	P14780
	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	P35354
	PIK3CG	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ -异构体 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform)	P48736
	VEGFA	血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	P15692
	CYP1A2	细胞色素 P450 1A2 (cytochrome P450 1A2)	P05177
	ALOX5	花生四烯酸 5-脂氧合酶 (arachidonate 5-lipoxygenase)	P09917
	XDH	黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase)	P47989

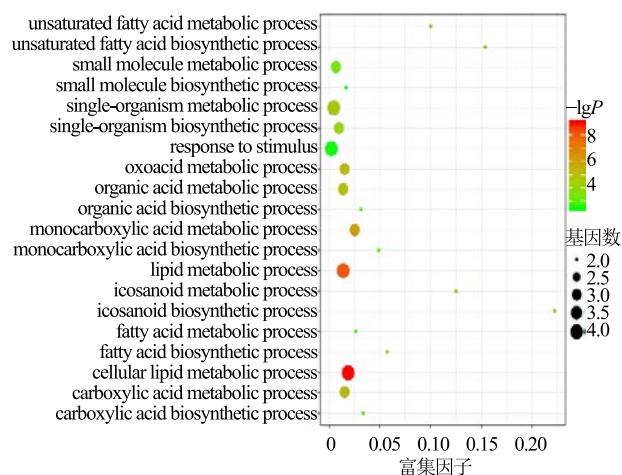


图 2 预测靶点的 GO 富集分析-生物过程

Fig. 2 GO enrichment analysis of targets for biological processes

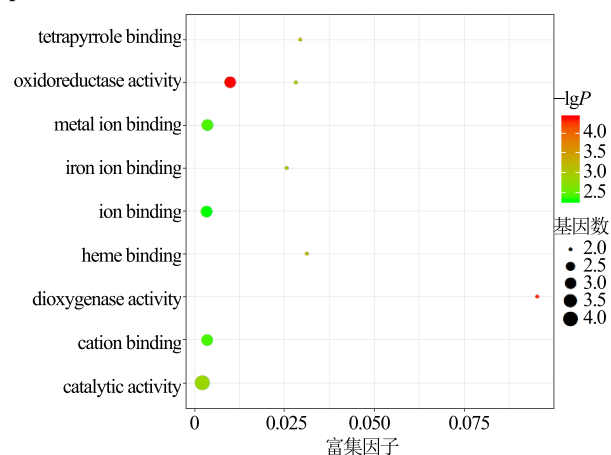


图 3 预测靶点的 GO 富集分析-分子功能

Fig. 3 GO enrichment analysis of targets for molecular functions

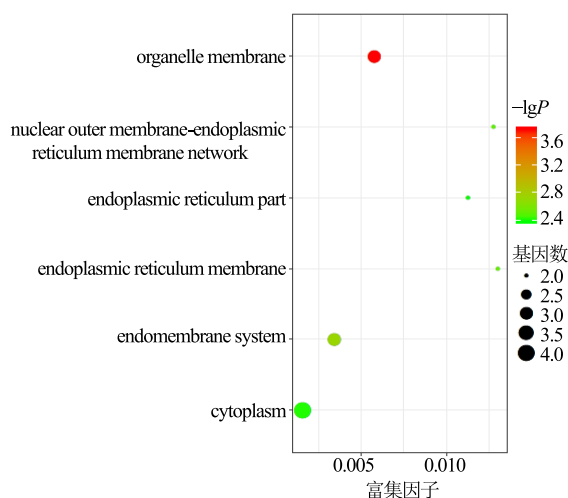


图 4 预测靶点的 GO 富集分析-细胞组分

Fig. 4 GO enrichment analysis of targets for cell components

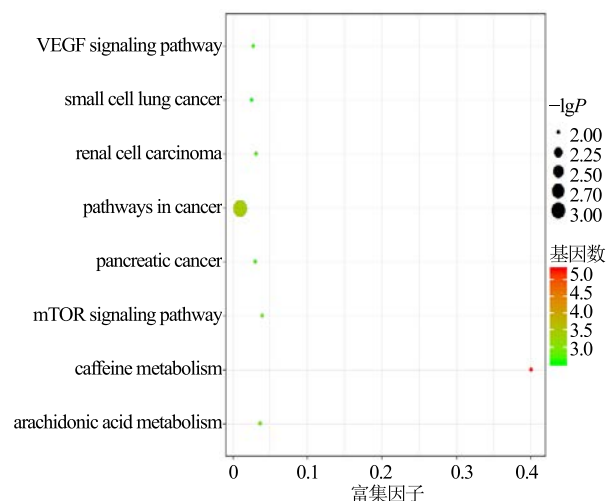


图 5 预测靶点的 KEGG 富集通路分析

Fig. 5 KEGG enrichment pathway analysis of predicting targets

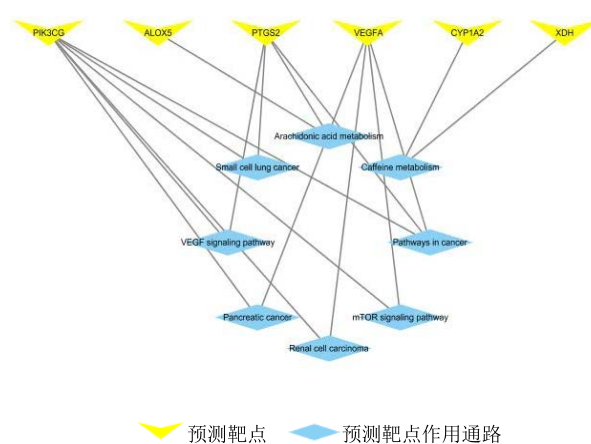


图 6 预测靶点-通路图

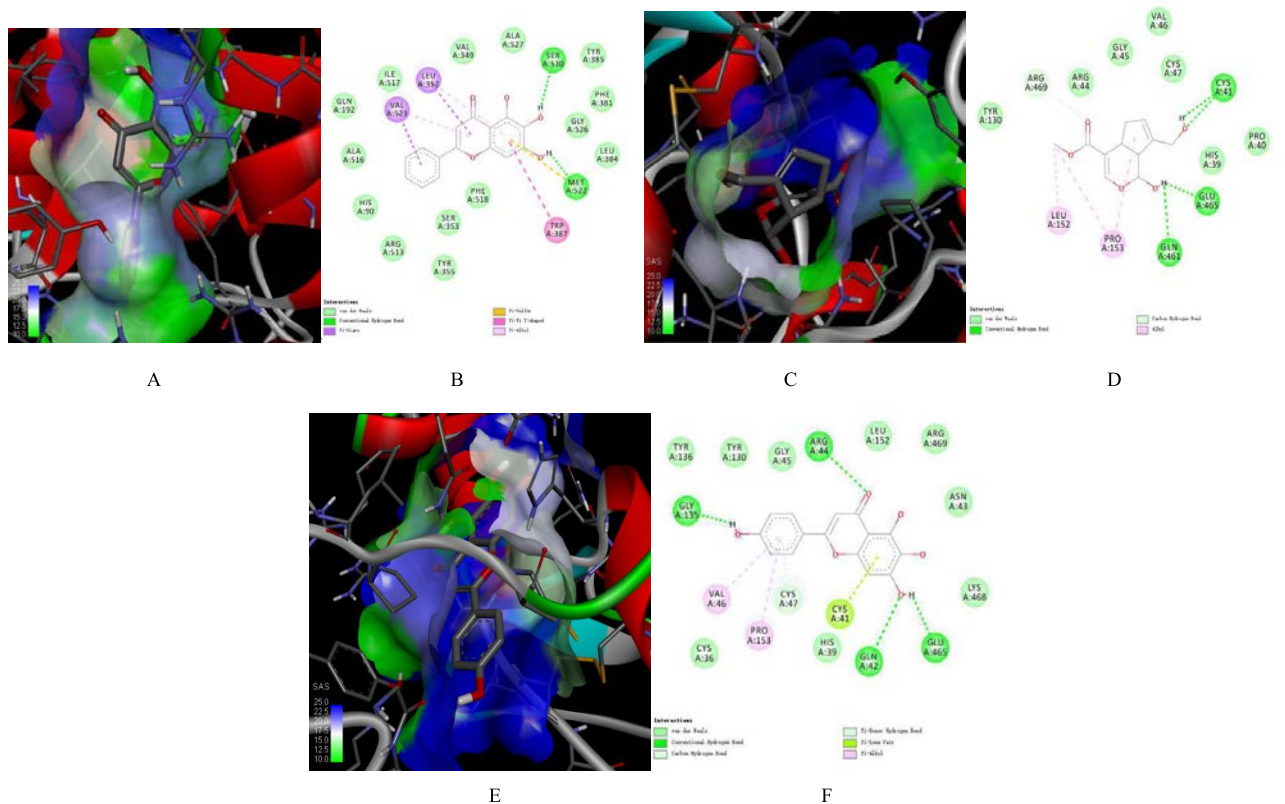
Fig. 6 Network diagram of predictive target-pathway

对接的参数设置及相应的计算结果见表 2。从表 2 的对接结果得知, 3 个药物与 PTGS2 受体对接的结合自由能和抑制浓度相对较低, BE、GE、SE 与 PTGS2 对接的结合自由能分别为 -7.54 、 -5.6 、 -6.74 kcal/mol, 抑制浓度分别为 2.96、11.52、78.22 $\mu\text{mol/L}$, 图 7-A 为 PTGS2 与配体对接的最佳复合结构, 配体小分子能很好地契合在 PTGS2 受体活性口袋里。图 7-B 右侧为 3 个药物与靶点 PTGS2 的相互作用示意图, 结果发现 BE 与 PTGS2 的残基甲硫氨酸 (Met) 522、丝氨酸 (Ser) 530 发生氢键相互作用; GE 与 PTGS2 的残基谷氨酰胺 (Gln) 461 及谷氨酸 (Glu) 461、精氨酸 (Arg) 469 形成 1 个氢键; SE 与 PTGS2 残基谷氨酰胺 (Gln) 42、谷氨酸 (Glu) 465、甘氨酸 (Gly) 135、精氨酸 (Arg) 44、半胱氨酸 (Cys) 47 发生氢键相互作用。

表 2 药物与靶点对接参数及相应计算结果

Table 2 Drug and target docking parameters and corresponding calculation results

化合物	靶点	PDB ID	(X×Y×Z)/nm ³	Center (X, Y, Z)	结合自由能/ (kcal·mol ⁻¹)	抑制浓度/ (μmol·L ⁻¹)
BE	PTGS2	5KIR	126×94×126	31.408, 12.428, 35.311	-7.54	2.96
	PIK3CG	4FJZ	126×104×104	34.634, 3.497, 28.656	-6.33	23.08
	CYP1A2	2HI4	126×116×126	6.157, 21.813, 26.682	-7.13	5.98
	VEGFA	4KZN	126×88×110	5.056, -5.557, 4.942	-5.92	45.73
	ALOX5	3V99	80×122×94	8.484, -46.788, -25.308	-5.23	147.50
SE	PTGS2	5KIR	126×98×126	31.408, 12.083, 35.311	-6.74	11.52
	PIK3CG	4FJZ	126×102×104	31.946, 1.462, 27.357	-6.24	26.54
	CYP1A2	2HI4	126×114×126	5.408, 19.777, 24.020	-6.51	16.79
	VEGFA	4KZN	106×74×102	6.118, -1.626, 4.802	-5.79	57.34
	ALOX5	3V99	88×118×92	8.484, -49.669, -25.308	-4.02	1.13
GE	PTGS2	P35354	126×92×126	31.408, 13.265, 35.311	-5.60	78.22



A、B-BE 与 PTGS2 对接的最佳复合结构及相互作用示意图 C、D-GE 与 PTGS2 对接的最佳复合结构及相互作用示意图 E、F-SE 与 PTGS2 对接的最佳复合结构及相互作用示意图

A and B-best composite structure and interaction diagram of BE and PTGS2 C and D-best composite structure and interaction diagram of GE and PTGS2 E and F-best composite structure and interaction diagram of SE and PTGS2

图 7 BE、GE、SE 与 PTGS2 对接的最佳复合结构及相互作用示意图

Fig. 7 Best composite structure and interaction diagram of BE, GE, and SE with PTGS2

3 讨论

脑缺血疾病是脑部供血不足，大脑得不到氧气和营养物质造成局部组织的细胞凋亡和坏死的心脏

血管疾病。脑缺血疾病常发于高龄人群中，是导致中老年患者死亡的首要疾病，且发病率和患病率呈逐年上升趋势，据《2018 中国卫生健康统计提要》

显示, 全国每年死于脑缺血疾病的患者人数高达 196 万。目前, 对于脑缺血疾病的治疗机制多是从抑制炎症发挥神经保护作用、抑制兴奋性氨基酸毒性、抗氧化自由基等环节进行研究。本课题组前期研究发现 BC、GP 配伍给药能够治疗脑缺血疾病^[9], 通过下调 P 糖蛋白 (P-gp)、水通道蛋白 (AQP-4) 蛋白的表达改善 BBB 的通透性^[11], 通过调节炎症因子的失衡减轻脑缺血损伤^[12]; 采用微透析技术及基因芯片技术证明 BC 与 GP 配伍能够降低兴奋性氨基酸的毒性, GP 能够透过 BBB 发挥脑保护作用^[14]。但脑缺血疾病治疗药物要透过 BBB 才能发挥脑保护作用, 在脑脊液检测中仅药物 GP 透过 BBB, 这表明 BC 与 GP 配伍治疗脑缺血疾病可能有其他代谢途径或代谢为小分子物质 BE 和 GE 而发挥脑保护作用。BE 和 GE 是 BC 和 GP 的主要代谢物质, 研究发现, BE 通过抑制 12/15 脂氧合酶 (12/15-LOX) 通路对脑缺血损伤细胞起到神经保护作用^[18-19], GE 通过抑制解偶联蛋白 2 (UCP2) 的表达发挥脑缺血再灌注损伤的保护作用^[20], 对 BE、GE 配伍治疗脑缺血疾病的具体机制研究尚不完善, 可能还存在其他通路参与 BE、GE 配伍治疗脑缺血疾病。因此, 通过网络药理学的方式深入挖掘 BE、GE 配伍治疗脑缺血疾病的作用靶点对于揭示其作用机制具有重要的意义。

本研究以 SE 作为参照预测 BE、GE 抗脑缺血作用靶点, 由于灯盏花注射剂在临床上广泛用于治疗脑缺血疾病^[21], SE 是灯盏花乙素的主要吸收形式, 且近年来研究表明, SE 对脑缺血造成的神经损伤保护作用要明显优于灯盏花乙素^[22-23], 且能改善脑缺血组织的损伤, 对大脑中动脉阻塞所致的局部脑缺血动物模型发挥神经保护作用^[24], 因此以 SE 作为参照预测 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病的靶点及作用机制。本研究通过 TCMSP 等数据库预测到 BE、GE、SE 的潜在抗脑缺血作用靶点分别为 13、10、6 个, 随后利用 DAVID 数据库对 BE 与 SE 的共同靶点进行 GO 分析, 结果表明, 这些靶点主要分布于细胞质、细胞器膜、内质网膜等部位, 具有与金属离子、阳离子结合功能及催化、氧化还原酶活性, 参与细胞脂质、羧酸、含氧酸、有机酸代谢及脂肪酸合成等过程; 进行 KEGG 通路分析发现, 共有 8 条通路, 包括癌症的途径、花生四烯酸代谢、VEGF 信号通路、mTOR 信号通路、小细胞肺癌途径、胰腺癌途径、肾细胞癌途径、咖啡因代

谢通路。从图 4 可以看出靶点 PTGS2、PIK3CG、VEGFA、CYP1A2 较多的富集在癌症途径、花生四烯酸代谢、VEGF 信号通路及小细胞肺癌等通路上, 调控 PTGS2、PIK3CG、VEGFA、CYP1A2 可能对治疗脑缺血具有重要的作用。前列腺素合酶 (PTGS) 也称为环氧化酶 (COX、COX-1 和 COX-2), PTGS2 (COX-2) 是前列腺素产生中的限速酶^[25]。在缺血性脑卒中 PTGS2 表达上调, 导致脑损伤加重^[26], 研究表明 PTGS2 抑制剂能够降低 PTGS2 的活性, 减轻脑缺血损伤的炎症反应从而改善脑缺血造成的脑组织损伤^[27]。PIK3CG 负责编码位于染色体 7q223 的基因 PI3K γ ^[28], 研究证明在脑损伤后 PI3K γ 的表达增加^[29], 在大鼠脑缺血 72 h 后的缺血半影区中 PI3K γ 蛋白的表达升高^[30], 抑制 PIK3CG 的活性有利于减少 PI3K γ 在脑缺血损伤组织中的表达。VEGFA 是血管内皮生长因子, 一般 VEGFA 即 VEGF, 研究发现脑缺血患者及 MACO 啮齿动物模型中 VEGF 蛋白的表达升高, 使得血管通透性增加^[31], 进一步造成 BBB 的通透性增加, 加速了脑缺血病理状态下脑组织的损伤^[32-33], 从一定程度上抑制 VEGFA 的表达能减轻脑缺血病理状态下脑组织的损伤。CYP1A2 是 CYP450 同工酶系统的主要成员, 约占细胞色素 P450 总含量的 13%。约有 5%~10% 的临床药物被 CYP1A2 代谢, 包括一些循环系统药物, 如美西律和华法林等。许多研究表明, 黄酮类化合物可抑制人和大鼠的 CYP1A2 活性^[34-36]。临床研究表明灯盏花乙素发挥脑缺血、抗炎、抗氧化等保护作用, 主要是通过改善微循环、抑制血小板聚集活性及增加脑血流量。Jian 等^[37]研究灯盏花乙素对 CYP1A2 活性的影响, 用非那西丁作为 CYP1A2 的探针底物来确定其代谢活性, 结果表明灯盏花乙素能直接抑制大鼠体内的 CYP1A2 活性, SE 是灯盏花乙素直接代谢产物, 可能通过抑制 CYP1A2 的活性发挥脑缺血改善作用。刘伯东等^[38]研究黄连解毒汤中主要有效成分对人体 CYP450 酶体外抑制作用, 结果表明 BE 对 CYP1A2 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 37.7 mol/L, 说明 BE 对 CYP1A2 的活性具有一定的抑制作用, 从而发挥脑缺血损伤后的保护作用。

AutoDock 分子对接结果显示, PTGS2 与 BE、GE、SE 有较好的结合性, 其结合能和抑制浓度相对较低。根据 KEGG 通路分析显示靶蛋白 PTGS2 主要作用于花生四烯酸代谢、VEGF 信号通路。

PTGS2 作为花生四烯酸代谢产生 PG 的主要限速酶,在炎症组织中能够显著表达,多数研究表明脑缺血损伤后 PTGS2 表达增加,参与炎症反应,同时加重脑出血区域神经细胞的损害。研究表明 SE 在临床上可通过抑制炎症反应发挥脑缺血保护作用。Cheng 等^[39]研究结果表明 SE 发挥抗炎作用的机制可能为抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 的表达,进而抑制 PTGS2 基因的表达。Xu 等^[40]发现 SE 对脂多糖 (LPS) 刺激的巨噬细胞 RAW264.7 中 PTGS2 基因的表达呈现浓度依赖性抑制,同时也抑制了 PGE2 的积累。Gong 等^[41]研究了 BE 和 BC 的抗炎功能,证明了 BE 能够通过抑制 PTGS2 的表达起到抗炎的作用。PTGS2 作为活化小胶质细胞的主要促炎因子^[42],BE 能够抑制缺氧状态下小胶质细胞中 PTGS2 蛋白的表达,减轻炎症在缺氧状态下造成的脑损伤中的关键作用^[43]。研究表明 BE 通过抑制大鼠脑中的中性粒细胞介导抗炎反应从而减轻脑缺血损伤^[44],BE 对炎性细胞因子的治疗效果发现,能够通过 NF- κ B 信号通路显著下调 COX-2、MMP-2、MMP-9 基因的表达发挥抗炎的作用^[45],有报道花生四烯酸代谢通路是 NF- κ B 信号通路的下游信号传导,并且可以被 NF- κ B 通路通过促炎细胞因子激活而被反式激活^[46],表明 BE 减轻脑缺血损伤可能会通过抗炎作用于花生四烯酸代谢通路而发挥脑保护作用。比较 BE 与塞来西布 (Celecoxib, COX-2 抑制剂) 对 COX-2 的影响时发现,BE 抑制 COX-2 基因的表达主要是降低了前列腺素的生成^[47],而且 BE 能够抑制 LPS 诱导前列腺素 (PGE2) 的生成来保护细胞免受氧化应激^[48]。GE 具有抗炎等一系列药理作用^[49-50],GE 抗脑缺血损伤多是抑制炎症反应,抑制了炎性因子对小胶质细胞的激活,能够提升小胶质细胞神经元的活力,减少其炎症反应^[51]。Sun 等^[52]研究发现 GE 与非甾体类药偶联之后对 COX-2 的选择性抑制作用高于 COX-1,且 GE 在中枢神经系统中的抗炎作用时表明,GE 能降低 LPS 诱导的 BV-2 中 COX-2 mRNA 表达水平^[53]。对 VEGF 信号通路参与血管新生的研究表明,VEGF 能够增加血管通透性,造成病理状态下 BBB 的通透性增加,有研究报道 GE 的浓度增加能够降低 VEGF 的表达,通过抑制 ERK 信号传导途径抑制 VEGF 的表达^[54]。Han 等^[55]在实验中发现 BE 通过抑制 COX-2/PGE2 通路,降低 COX-2 的表达,抑制 VEGF 介导血管生成,从而防止炎性因子的转运

发挥保护作用。

综上所述,对 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病的初步作用机制研究表明,可能是通过调控花生四烯酸通路和 VEGF 信号通路,抑制 PTGS2 和 VEGF 的表达,抑制炎症因子对脑缺血组织造成的影响,改善 BBB 的通透性并维持 BBB 的完整性,从而维持脑部微环境稳定。本研究通过网络药理学分析了 BE 和 GE 配伍治疗脑缺血疾病的分子生物学机制,预测了 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病的潜在靶点及作用机制,但是由于网络信息技术的不全面及数据实时性的影响,对 BE 与 GE 配伍治疗脑缺血疾病的作用机制初步研究具有一定的局限性,有待进一步进行基础实验性验证。

参考文献

- [1] 吴彦. 黄连解毒汤有效部位对实验性脑缺血的保护作用及机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2004.
- [2] 姜莉莉, 李盛建, 黄春燕, 等. 黄连解毒汤对 PC12 细胞和小鼠全脑缺血损伤的保护作用 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(12): 1333-1337.
- [3] 王志潭, 窦锦明, 王修彬, 等. 黄连解毒汤药效部位对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 山东中医杂志, 2012(5): 354-356.
- [4] Ferrer I, Ballabriga J, Marti E, et al. BDNF and TrkB co-localize in CA1 neurons resistant to transient forebrain ischemia in the adult gerbil [J]. *J Neuropathol Exper Neurol*, 1997, 56(7): 790-797.
- [5] Springer J E, Mu X, Bergmann L W, et al. Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue [J]. *Exper Neurol*, 1994, 127(2): 167-170.
- [6] 钱智磊, 李欢, 朱华旭, 等. 黄连解毒汤中指标性成分药动学与药效学相关性的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 122-128.
- [7] 曾明飞, 潘林梅, 朱华旭, 等. 黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 617-620.
- [8] Zeng M F, Pan L M, Zhu H X, et al. Comparative pharmacokinetics of baicalin in plasma after oral administration of Huang-Lian-Jie-Du-Tang or pure baicalin in MCAO and sham-operated rats [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(6): 490-496.
- [9] 王斌, 李敏, 侯建平, 等. 栀子、黄芩药材与标准品对小鼠脑缺血保护作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 74-76.
- [10] 李敏, 王斌, 唐志书, 等. 黄芩苷、栀子苷对大鼠脑缺血保护作用的机制 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 34-36.

- [11] 李 敏, 王 斌, 曹 慧, 等. 基于 AQP-4、P-gp 黄芩苷、栀子苷配伍对缺血/再灌注损伤大鼠血脑屏障保护机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(3): 443-444.
- [12] 刘 寒, 张欢欢, 康亚国, 等. 黄芩苷、栀子苷配伍对脑缺血大鼠恢复期炎症因子的影响 [J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(3): 75-81.
- [13] 刘 寒, 李 敏, 王 斌, 等. 黄芩苷与栀子苷组合物对脑缺血损伤大鼠 5-LOX/CysLTs/CysLT 通路的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1020-1025.
- [14] 张欢欢. 黄芩苷和栀子苷配伍抗脑缺血兴奋性氨基酸毒性损伤的作用机制研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2018.
- [15] He X L, Wang Y H, Gao M, *et al.* Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage [J]. *Brain Res*, 2009, 1249: 212-221.
- [16] Shi F, Pan H, Li Y, *et al.* A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of geniposide and its active metabolite genipin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(3): e4126.
- [17] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [18] Leyen K V, Kim H Y, Lee S R, *et al.* Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain [J]. *Stroke*, 2006, 37(12): 3014-3018.
- [19] Lapchak P A, Maher P, Schubert D, *et al.* Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes [J]. *Neuroscience*, 2008, 150(3): 585-591.
- [20] Su J, Liu J, Yan X Y. Cytoprotective effect of the UCP2-SIRT3 signaling pathway by decreasing mitochondrial oxidative stress on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Inter J Mol Sci*, 2017, doi: 10.3390/ijms18071599.
- [21] 周 莉. 灯盏花素的心脑血管药理及临床研究进展 [J]. 中医药信息, 2013, 30(6): 134-136.
- [22] Estevez-Garcia I O, Gallegos-Nava S, Vera-Pérez E, *et al.* Levels of cytokines and micro RNAs in individuals with asymptomatic hyperuricemia and ultrasonographic findings of gout: A bench-to-bedside approach [J]. *Arthr Care Res*, 2018, 70(12): 1814-1821.
- [23] Ni G, Tang Y, Li M, *et al.* Synthesis of scutellarein derivatives with a long aliphatic chain and their biological evaluation against human cancer cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 310.
- [24] 宋 艳, 张红梅, 马建建, 等. 灯盏花乙素苷元对实验性脑缺血的保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(21): 2061-2064.
- [25] Cox D G, Pontes C, Guino E, *et al.* Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(2): 339-343.
- [26] Zhao Y. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats [J]. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1162-1175.
- [27] Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, *et al.* Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Brain Res*, 2004, 1007(1/2): 98-108.
- [28] Uliana V, Grosso S, Cioni M, *et al.* 3. 2 Mb microdeletion in chromosome 7 bands q22.2-q22.3 associated with overgrowth and delayed bone age [J]. *Eur J Med Genet*, 2010, 53(3): 168-170.
- [29] Huang L, Sherchan P, Wang Y, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma contributes to neuroinflammation in a rat model of surgical brain injury [J]. *J Neur*, 2015, 35(29): 10390-10401.
- [30] Jin R, Yu S, Song Z, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(3): 458-464.
- [31] Bates D O, Curry F E. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca^{2+} -dependent pathway [J]. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*, 1997, 273(2): 687-694.
- [32] Zhang Z G, Zhang L, Jiang Q, *et al.* VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829-838.
- [33] Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease [J]. *Annal Neurol*, 2013, 72(5): 648-672.
- [34] Breinholt V M, Offord E A, Brouwer C, *et al.* *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(5): 609-616.
- [35] Chaudhary A, Willett K L. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort [J]. *Toxicology*, 2006, 217(2/3): 194-205.
- [36] He L, He F, Bi H, *et al.* Isoform-selective inhibition of

- chrysin towards human cytochrome P450 1A2. Kinetics analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(20): 6008-6012.
- [37] Jian T Y, He J C, He G H, *et al.* Scutellarin inhibits cytochrome P450 isoenzyme 1A2 (CYP1A2) in rats [J]. *Phytotherapy Res*, 2012, 26(8): 1226-1230.
- [38] 刘柏东, 吴晓霞, 于友华. 黄连解毒汤主要有效成分对人 CYP450 酶的体外抑制作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 115-118.
- [39] Cheng C Y, Hu C C, Yang H J, *et al.* Inhibitory effects of scutellarein on proliferation of human lung cancer A549 cells through ERK and NFκB mediated by the EGFR pathway [J]. *Chin J Physiol*, 2014, 57(4): 182-187.
- [40] Xu Y, Wang C, Wu L, *et al.* Comparison of inhibitory effects of nine flavonoids on Prostaglandin E2 production and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages [A] // 2012 International conference on biomedical engineering and biotechnology [C]. New York: IEEE, 2012.
- [41] Gong G, Wang H, Kong X, *et al.* Flavonoids are identified from the extract of *Scutellariae Radix* to suppress inflammatory-induced angiogenic responses in cultured RAW 264.7 macrophages [J]. *Sci Rep*, 2018, doi: 10.1038/s41598-2018-35817-2.
- [42] Kim Y S, Joh T H. Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Exper Mol Med*, 2006, 38(4): 333-347.
- [43] Hwang K Y, Oh Y T, Yoon H, *et al.* Baicalein suppresses hypoxia-induced HIF-1 protein accumulation and activation through inhibition of reactive oxygen species and PI 3-kinase/Akt pathway in BV2 murine microglial cells [J]. *Neur Lett*, 2008, 444(3): 264-269.
- [44] Hwang Y S, Shin C Y, Huh Y, *et al.* Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats [J]. *Life Sci*, 2002, 71(18): 2105-2117.
- [45] Chandrashekar N, Selvamani A, Subramanian R, *et al.* Baicalein inhibits pulmonary carcinogenesis-associated inflammation and interferes with COX-2, MMP-2 and MMP-9 expressions *in-vivo* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1): 10-21.
- [46] Chen S. Natural products triggering biological targets-a review of the anti-inflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(3): 288-301.
- [47] Burnett B P, Jia Q, Zhao Y, *et al.* A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation [J]. *J Med Food*, 2007, 10(3): 442-451.
- [48] Chen Y C, Shen S C, Chen L G, *et al.* Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(11): 1417-1427.
- [49] Koo H J, Lim K H, Jung H J, *et al.* Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(3): 496-500.
- [50] Phatak R S. Phytochemistry, pharmacological activities and intellectual property landscape of *Gardenia jasminoides* Ellis: A review [J]. *Pharmacognosy J*, 2015, 7(5): 254-265.
- [51] Nam K N, Choi Y S, Jung H J, *et al.* Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2010, 10(4): 493-499.
- [52] Sun L L, Wu H, Zhang Y Z, *et al.* Design, synthesis and preliminary evaluation of the anti-inflammatory of the specific selective targeting druggable enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) small molecule [J]. *Pharm Biol*, 2016, doi: 10.3109/13880209.2016.1160939.
- [53] Araki R, Hiraki Y, Yabe T. Genipin attenuates lipopolysaccharide-induced persistent changes of emotional behaviors and neural activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central amygdala nucleus [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.038.
- [54] Lee S Y, Hong J K, Sang C O, *et al.* Genipin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by the suppression of HIF-1α accumulation and VEGF expression [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 116(Pt B): 70-76.
- [55] Han S E, Park C H, Nam-Goong I S, *et al.* Anticancer effects of baicalein in FRO thyroid cancer cells through the up-regulation of ERK/p38 MAPK and Akt pathway [J]. *In Vivo*, 2019, 33(2): 375-382.