

基于 GC-MS 技术及网络药理学探讨醒脑静注射液入脑成分抗脑缺血损伤的作用机制

吴京霓, 刘瑞敏, 许丹妮, 李玥璇, 常中满, 郝佳雪, 贾 璞, 廖 莎*, 郑晓晖

西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

摘 要: 目的 基于气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、网络药理学及分子对接技术识别并探究醒脑静注射液入脑成分及其治疗脑缺血损伤的作用机制, 为其药效物质基础研究提供参考依据。方法 调研文献获取醒脑静入脑成分并采用 GC-MS 技术对其入脑成分进行补充, 在此基础上, 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 和 Swiss 数据库对醒脑静注射液入脑成分进行靶点预测; 同时通过 CTD、OMIM、GeneCards 等数据库获取脑缺血靶点; 进一步利用 OmicShare 平台对药物与脑缺血共有靶点进行基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析; 采用 String 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件构建蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络图及“入脑成分-脑缺血靶点-通路”网络图, 并对入脑成分与核心靶点进行分子对接验证。结果 鉴定出龙脑、麝香酮、樟脑、莪术二酮等 13 种醒脑静注射液入脑成分; 通过网络药理学技术得到 93 个醒脑静注射液治疗脑缺血的作用靶点, 包括 MPO、PPARG、HMOX1、MMP2 等。通路富集分析表明神经营养蛋白信号通路 (neurotrophin signaling pathway)、雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway) 及血管内皮生长因子信号通路 (vascular endothelial growth factor signaling pathway) 等可能是醒脑静注射液发挥抗脑缺血损伤的主要途径。通过分子对接技术验证得出代表性成分 (栀子苷、莪术二酮、麝香酮) 与治疗脑缺血潜在靶点具有较好的亲和。结论 明确了醒脑静注射液的入脑成分, 预测了入脑成分治疗脑缺血损伤的作用机制并初步验证了其靶点, 为深入阐明醒脑静注射液的药效物质基础及作用机制提供了实验及理论依据。

关键词: 醒脑静注射液; 入脑成分; 脑缺血; 栀子苷; 莪术二酮; 麝香酮; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0808-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.024

Anti-cerebral ischemia mechanisms of brain absorption components of Xingnaojing Injection based on GC-MS and network pharmacology

WU Jing-ni, LIU Rui-min, XU Dan-ni, LI Yue-xuan, CHANG Zhong-man, HAO Jia-xue, JIA Pu, LIAO Sha, ZHENG Xiao-hui

College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Objective To identify and explore the anti-cerebral ischemic injury mechanism of the brain absorption components of Xingnaojing Injection (醒脑静注射液) by using gas chromatography-mass spectrometry technology (GC-MS), network pharmacology and molecular docking technology, and provide some evidences for the research of its pharmacodynamic substances. **Methods** In this study, the brain absorption components of Xingnaojing Injection was investigated through the literature mining and GC-MS technology was used to supplement their components. On this basis, TCMSP and Swiss databases were used to predict the targets of the brain absorption components of Xingnaojing Injection, while the targets of cerebral ischemia were screened through CTD, OMIM, GeneCards and other databases. Next, the KEGG pathway annotation analysis and GO enrichment analysis on common targets of drugs and cerebral ischemia were carried out through OmicShare platform. String database and Cytoscape 3.7.2 software were further used to construct separately protein-protein interaction network diagram and “the brain absorption

收稿日期: 2020-08-12

基金项目: 教育部“创新团队发展计划”项目 (IRT_15R55); 国家自然科学基金面上项目 (31971143); 陕西省重点研发计划国际合作项目 (2017KW-055)

作者简介: 吴京霓, 女, 在读硕士研究生, 从事中药学研究。E-mail: 18404968356@163.com

*通信作者: 廖 莎, 女, 副教授, 硕士生导师, 从事药理学研究。Tel: (029)88302686 E-mail: liaosha@nwu.edu.cn

components-cerebral ischemia targets-pathways” network diagram, and molecular docking was used to verify the brain absorption components and core targets. **Results** A total of 13 brain absorption components were identified in Xingnaojing Injection, such as borneol, muscone, camphor and curdione. And 93 Xingnaojing Injection targets of anti-cerebral ischemia were found through network pharmacology technology, including MPO, PPARG, HMOX1, MMP2, etc. Pathway enrichment analysis revealed that neurotrophin signaling pathway, estrogen signaling pathway and VEGF signaling pathway might be the main action pathways of anti-cerebral ischemia injury of Xingnaojing Injection. The results of molecular docking showed that representative components (geniposide, curdione, and muscone etc.) had good affinity with potential targets of anti-cerebral ischemia. **Conclusion** In this study, the brain absorption components of Xingnaojing Injection were clarified, and the mechanism of the brain absorption components treating anti-cerebral ischemia injury was predicted and its targets were preliminarily verified. The results provided experimental and theoretical basis for further clarifying the pharmacodynamic material basis and mechanism of Xingnaojing Injection.

Key words: Xingnaojing Injection; brain absorption components; cerebral ischemia; geniposide; curdione; muscone; network pharmacology; mechanisms

脑卒中是一种急性脑血管疾病,是我国成年人群致死、致残的首位病因,具有发病率高、致死率高、死亡率高和复发率高的特点^[1]。脑卒中可分为缺血性和出血性卒中,其中缺血性脑卒中占比 85% 以上^[2]。众所周知,脑缺血损伤机制是一个复杂的过程,包括兴奋毒性、自由基损伤、炎症反应、细胞凋亡等^[3]。化学药主要通过神经保护、抗炎、清除自由基等途径来治疗脑缺血,但结果不尽人意。中药具有多成分、多靶点、多效应的特点,在治疗复杂的脑缺血疾病中具有优势;临床用药大多数为中药制剂,如补阳还五汤、四君子汤、醒脑静注射液等^[4]。

醒脑静注射液(简称醒脑静)是经典凉开方剂安宫牛黄丸的减方,是由麝香 *Moschus*、冰片 *Borneolum Syntheticum*、栀子 *Gardeniae Fructus*、郁金 *Curcumae Radix* 4 味药材经过 2 次水蒸气蒸馏法制得^[5-6]。临床上其常用于气血逆乱、脑脉瘀阻所致的中风昏迷、偏瘫口喎等的治疗。研究表明,醒脑静能减轻意识障碍严重程度、改善神经功能缺损症状,并能加强日常生活活动^[7-8];还可降低脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性^[9],缓解再灌注损伤引起的各种炎症反应^[10],调节细胞凋亡及自噬^[11-12]。但其药效物质基础仍然不明,质量不可控,严重限制其临床应用^[13]。

网络药理学融合多个学科,结合多种高新技术平台、软件,将数据进行可视化,从而直观阐述中药复方与复杂疾病之间的关联,也能充分体现中药及其复方多成分、多靶点、多途径的优势^[14]。血脑屏障(blood brain barrier)为正常的神经元功能和突触传递维持安全稳定的环境,相反,血脑屏障也是药物进入中枢神经系统的主要障碍^[15]。因而本研

究拟采用气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)识别醒脑静入脑成分,同时运用网络药理学及分子对接技术,构建“药物-成分-靶点-通路”网络,探索醒脑静治疗脑缺血药效物质基础及潜在分子机制,为其临床使用提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 仪器及试剂

醒脑静注射液(批号 1909032),大理药业有限公司; GCMS-TQ8040 气相色谱质谱联用仪、SH-Rxi-5Si1 弱极性色谱柱(日本岛津公司);正己烷(色谱级)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 8 周龄左右 SD 大鼠,动物合格证号 SCXK(陕)2018-001,体质量(240±20)g,由西安交通大学医学院动物研究中心提供。购回后适应性喂养 1 周,实验间饲养环境的温度为(25±1)℃,湿度(55±5)%。所有实验动物方案都通过了西北大学动物伦理委员会,所有程序均符合相关道德规范,动物实验伦理证明决议编号: NWU-AWC-20190102M。

1.3 网络药理学数据库及软件

中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSPP, <http://tcmsp.w.com/tcmsp.php>); Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>); STRING 数据库(<https://string-db.org/>); OMIM 数据库(<https://omim.org/>); GeneCards

数据库 (<https://www.genecards.org/>); DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)。R 语言 R-3.6.3 软件、Cytoscape3.7.2 软件、MOE Dock 软件、Venny 2.1 软件; Uniprot (<https://www.uniprot.org/>); OmicShare (<https://www.omicshare.com/>)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及样品处理

SD 雄性大鼠 20 只, 自由饮水和进食, 适应性喂养 1 周后开始实验。实验设置对照组 (2 只) 和给药组 (8 只), 对照组尾 iv 生理盐水 0.5 mL/100 g、给药组尾 iv 醒脑静 1.5 mL/100 g, 给药后于枕骨大孔处抽取脑脊液。

将空白脑脊液、给药后脑脊液 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清; 然后分别用与上清等倍量正己烷溶剂萃取醒脑静、空白脑脊液、给药后脑脊液。涡旋 2 min 后, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清氮气吹干, -20 °C 保存。将上述得到样品用 150 μ L 正己烷溶液复溶, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 用于 GC-MS 分析。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 采用岛津 SH-Rxi-5Sil 毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.32 μ m), 进样量为 2 μ L, 分流比 6:1, 体积流量 1.6 mL/min, 进样口温度 250 °C, FID 检测器温度 280 °C, 载气为高纯 He、H₂ (99.999%)。升温程序: 初始温度 70 °C, 以 2 °C/min 升温至 110 °C; 以 5 °C/min 升温至 150 °C; 以 1 °C/min 升温至 180 °C。

2.2.2 质谱条件 四级杆温度 250 °C、溶剂延迟时间 2 min, 质量扫描模式全扫描, 扫描范围: m/z 50~500。比较质谱碎片图谱与 NIST14 质谱库, 鉴别醒脑静成分及其入脑成分。

2.3 醒脑静入脑成分及靶点预测

调研文献获取醒脑静入脑成分, 并通过 GC-MS 分析对其进行补充^[16-17]。运用 PubChem 数据库获取成分的 3D 结构, 将其导入 TCMSP^[18]和 Swiss Target Prediction^[19]数据库进行靶点预测, 合并 2 个数据库的靶点信息。最后采用 Uniprot 平台将靶点转化成“Gene Symbol”^[20]。

2.4 疾病靶点的查询

通过 CTD、OMIM、GeneCards、DisGeNET、DrugBank 数据库分别搜索“cerebral ischemia”, 合并各数据库疾病靶点, 去重后得到脑缺血疾病靶点。

2.5 药物与疾病共有靶点

将上述得到的药物靶点和疾病靶点上传至 Venny 2.1 软件构建韦恩图。将得到的药物与疾病共有靶点传至 STRING^[21]平台, 选择蛋白种属“Homo sapiens”, 构建药物与疾病共有靶点间蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。并采用 R-3.6.3 软件对其核心靶点进行可视化。

2.6 基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集可视化

将药物与疾病共有靶点通过 Uniprot 转化成“ensembl”格式, 上传至 OmicShare 云平台进行 GO、KEGG 富集及可视化^[22]。

2.7 网络构建

将上述得到的醒脑静入脑成分、治疗脑缺血靶点、涉及通路上传至 Cytoscape 3.7.2 软件构建网络图。

2.8 分子对接验证

从 PDB (Protein Data Bank) 数据库下载靶点的晶体结构, 随后采用 MOE Dock 软件将靶点与其对应的入脑成分进行分子对接验证^[23]。

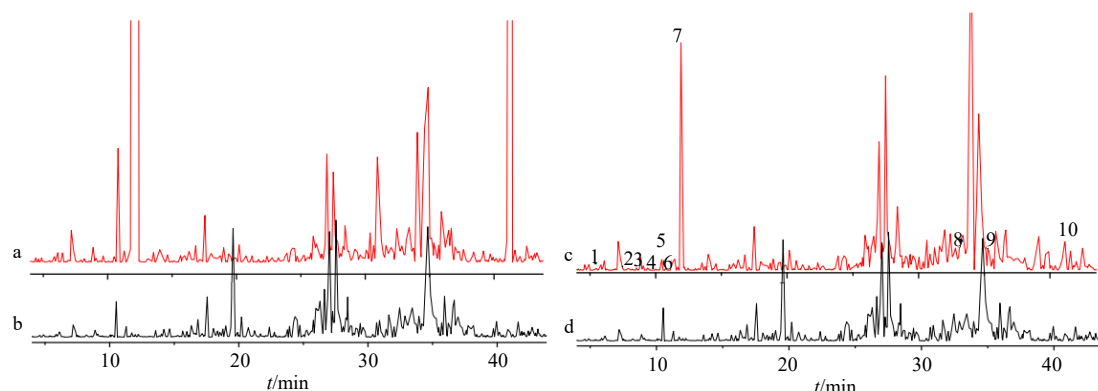
3 结果

3.1 醒脑静入脑成分汇总及靶点预测

为了得到更全面的醒脑静入脑成分, 在调研文献的基础上, 基于上述分析条件对醒脑静及其入脑成分进行定性分析, 共得到 13 种入脑成分。其中栀子苷、栀子苷酸、京尼平龙胆双糖苷 3 种成分均由文献查询获得^[16]。GC-MS 得到龙脑、麝香酮、莪术二酮等 10 种原注射液入脑成分, 总离子流图见图 1, 结果见表 1, 各成分质谱图见图 2, 13 种入脑成分归属见表 2。运用 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库对 13 种入脑成分进行靶点预测, 共得到基于入脑成分的 237 个潜在作用靶点, 提示醒脑静入脑成分分布于 4 味药材, 且均作用于多个靶点。

3.2 药物与疾病相关靶点及 PPI 网络构建

为了更好地阐明药物与疾病的关系及靶点间相互作用。通过 CTD、OMIM、GeneCards 等数据库得到 1720 个脑缺血靶点, 将上述得到的药物靶点和脑缺血靶点取交集, 得到 93 个醒脑静入脑成分治疗脑缺血损伤的靶点, 如图 3-A 所示。将药物与脑缺血相关靶点上传至 STRING 平台得到 PPI 互作图, 如图 3-B 所示; 并采用 R 软件对其进行可视化处理, 结果如图 3-C 所示; 其中度 (degree) 值排名前 30 靶点信息见表 3, 涉及靶点蛋白激酶 B (protein



a-醒脑静总离子流图 b-正己烷溶剂总离子流图 c-给药后脑脊液总离子流图 d-空白脑脊液总离子流图

a-total ion flow diagram of Xingnaojing Injection b-total ion flow diagram of *n*-hexane solvent c-total ion flow of cerebrospinal fluid (CSF) after administration d-total ion flow diagram of blank cerebrospinal fluid

图 1 醒脑静成分、入脑成分 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion current diagram of Xingnaojing Injection components and brain absorption components

表 1 GC-MS 测得醒脑静入脑成分

Table 1 Summary of brain absorption components of Xingnaojing Injection measured by GC-MS

序号	t_R/min	化合物名称	分子式	相对分子质量	离子碎片	峰面积百分比/%
1	4.070	α -蒎烯 (alpha-pinene)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136	93	0.01
2	6.380	柠檬烯 (limonene)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136	68、67、93	0.03
3	6.480	桉油精 (eucalyptol)	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	154	81、93、108	0.01
4	9.660	异佛尔酮 (isophorone)	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}$	138	82	0.01
5	10.790	樟脑 (camphor)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	152	95、81、152	0.23
6	11.180	芳樟醇 (linalool)	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	154	71、93、55	0.01
7	11.926	龙脑 (borneol)	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	154	95	6.75
8	33.480	新莪术二酮 (neocurdione)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$	236	69、180、109	0.02
9	34.920	莪术二酮 (curdione)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$	236	69、109、180	0.05
10	41.131	麝香酮 (muscone)	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}$	238	55、85、238	0.87

activated B, AKT)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen activated protein kinase 3, MAPK3)、丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen activated protein kinase 8, MAPK8)、前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、内型皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 等。提示醒脑静入脑成分可能有 93 个直接作用于脑缺血损伤的靶点, 度值越高的靶点可能治疗脑缺血损伤中越关键。

3.3 GO、KEGG 通路富集

为了更好地研究候选靶点涉及的机制, 对其参与的基因功能和信号通路进行富集分析。将 93 个药物与疾病共有靶点上传至 OmicShare 云平台进行 GO、KEGG 富集及可视化, 保留前 25 条 P 值 ≤ 0.01 的 KEGG 通路 (pathway) 进行可视化分析,

见图 4-A, 排名较前的信号通路有神经营养蛋白信号通路、鞘脂信号通路、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路等, 见表 4。由此可见, 富集的信号通路主要涉及神经、血管、炎症等方面, 这与醒脑静注射液功能主治开窍醒脑相吻合, 提示本研究的合理性。

GO 富集结果见图 4-B~D, 分别从生物过程 (biological process)、细胞组成 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 进行注释。其中生物过程主要涉及含氧化合物反应、含氮化合物反应、血液循环等, 同时这些靶点与细胞组成中的神经元、

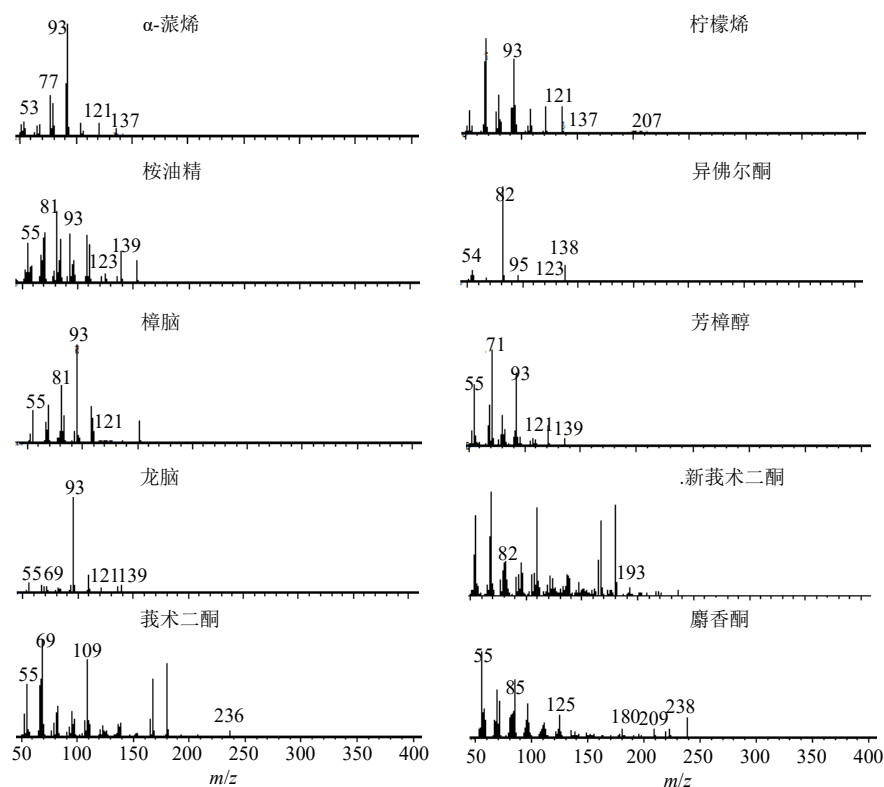


图 2 醒脑静入脑成分 GC-MS 质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of brain absorption components of Xingnaojing Injection measured by GC-MS

表 2 醒脑静入脑成分归属

Table 2 Summary of brain absorption components of Xingnaojing Injection

CAS 号	化合物名称	BBB	成分来源	鉴定依据
507-70-0	龙脑 (borneol) ^[19]	1.43	冰片	N、R
541-91-3	麝香酮 (muscone) ^[19]	1.62	麝香	N、R
7785-70-8	α-蒎烯 (alpha-pinene)	2.18	郁金	N
78-70-6	芳樟醇 (linalool)	0.74	郁金	N
76-22-2	樟脑 (camphor)	1.71	郁金/冰片	N
470-82-6	桉油精 (eucalyptol)	2.06	郁金/冰片	N
108944-67-8	新莪术二酮 (neocurdione)	0.86	郁金/栀子	N
13657-68-6	莪术二酮 (curdione)	0.86	郁金/栀子	N
78-59-1	异佛尔酮 (isophorone)	1.66	栀子	N
24512-63-8	栀子苷 (geniposide) ^[15]	-2.61	栀子	R
27741-01-1	栀子苷酸 (geniposidic acid) ^[15]	-2.70	栀子	R
20831-76-9	京尼平龙胆双糖 (gentiopicroside) ^[15]	-1.60	栀子	R
5989-27-5	柠檬烯 (limonene)	2.12	栀子/冰片	N

N 表示 Nist 数据库 R 表示文献 BBB 表示 TCMSP 平台预测得到的血脑屏障值

N represents the Nist database R represents the literature BBB represents the blood-brain barrier value predicted by the TCMSP platform

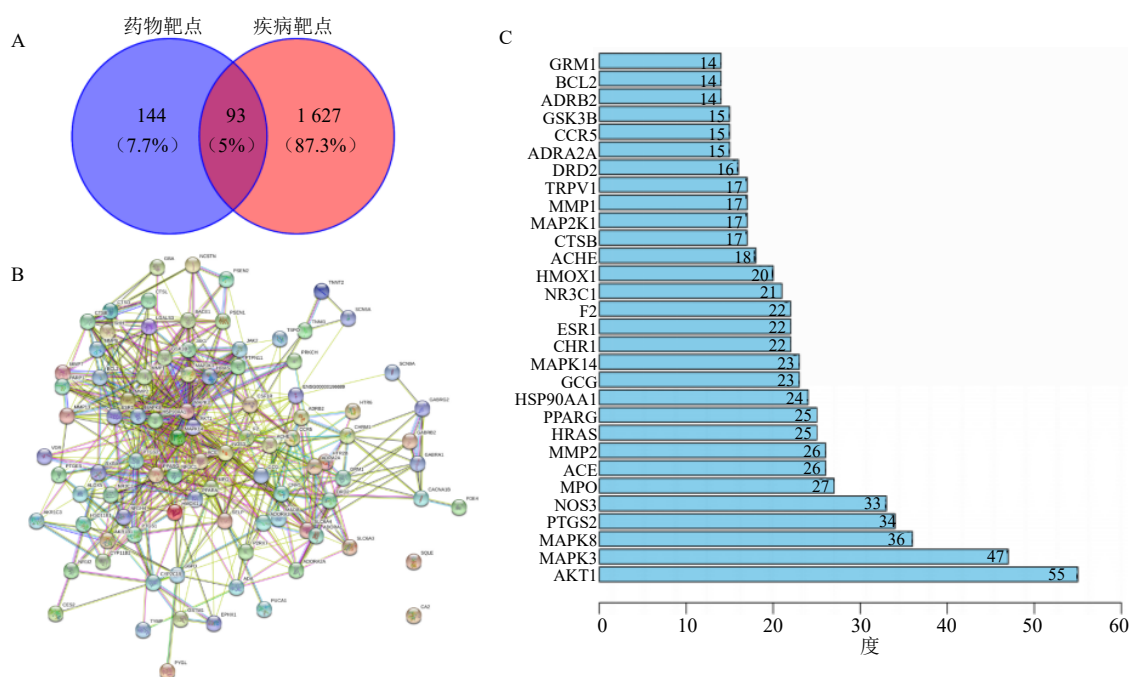


图 3 药物与疾病共有靶点 Venn 图 (A)、PPI 图 (B) 和可视化结果 (C)

Fig. 3 Venn diagram (A), PPI diagram (B) and visualization results (C) of common targets for drugs and diseases

表 3 药物与疾病共有靶点信息汇总 (前 30)

Table 3 Summary of common targets for drugs and diseases (Top 30)

UniprotID	靶点	蛋白名称	度值
P31749	AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Akt/PKB)	55
P27361	MAPK3	丝裂原激活的蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3)	47
P45983	MAPK8	丝裂原激活的蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8)	36
P35354	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	34
P29474	NOS3	内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)	33
P05164	MPO	髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)	27
P12821	ACE	血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE)	26
P08253	MMP2	基质金属蛋白酶 2 (72 kDa type IV collagenase, MMP-2)	26
P01112	HRAS	转化蛋白 p21 (transforming protein p21, Ha-Ras)	25
P37231	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR- γ)	25
P07900	HSP90AA1	热休克蛋白 HSP 90-alpha (heat shock protein HSP 90-alpha, HSP90 α)	24
P01275	GCG	胰高血糖素 (glucagon, GRPP)	23
Q16539	MAPK14	丝裂原激活的蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14)	23
P21554	CNR1	大麻受体 1 (cannabinoid receptor 1, CB-R1)	22
P03372	ESR1	雌激素受体 (estrogen receptor1, ER)	22
P00734	F2	凝血酶原 (prothrombin)	22
P04150	NR3C1	糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)	21

续表 3

UniprotID	靶点	蛋白名称	度值
P09601	HMOX1	血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1)	20
P22303	ACHE	乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE)	18
P07858	CTSB	组织蛋白酶 B (cathepsin B)	17
Q02750	MAP2K1	双重特异性促分裂原活化蛋白激酶激酶 1 (dual specificity mitogen activated protein kinase kinase 1, MEK1)	17
P03956	MMP1	基质金属蛋白酶 1 (interstitial collagenase, MMP-1)	17
Q8NER1	TRPV1	瞬时受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TrpV1)	17
P14416	DRD2	D(2)多巴胺受体 [D(2) dopamine receptor]	16
P08913	ADRA2A	α -2A 肾上腺素受体 (alpha-2A adrenergic receptor, α -2AAR)	15
P51681	CCR5	5 型 C-C 趋化因子受体 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5)	15
P49841	GSK3B	糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β)	15
P07550	ADRB2	β 2 肾上腺素受体 (beta-2 adrenergic receptor)	14
P10415	BCL2	凋亡调节剂 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2)	14
Q13255	GRM1	代谢型谷氨酸受体 1 (metabotropic glutamate receptor 1, mGluR1)	14

突触膜、突触前膜等密切相关；也涉及神经递质受体活性、核受体活性等分子功能。

3.4 网络构建

通过构建醒脑静入脑成分与其治疗脑缺血靶点及 KEGG 通路网络图，可进一步揭示入脑成分靶点的协同治疗作用及治疗脑缺血机制。如图 5 所示，13 种入脑成分靶点频次较高的为莪术二酮 (35)、新莪术二酮 (31)、芳樟醇 (27)、栀子苷 (23)、麝香酮 (19) 等。入脑成分涉及脑缺血靶点 93 个，其中 4 味药材共有靶点有 3 个，环氧合酶类 (COX-2、COX-1) 及重组人碳酸酐酶-2 (carbonic anhydrase 2, CA-2)；3 味药材共有靶点有 15 个，过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α)、eNOS、 γ -氨基丁酸受体类 (GABRA1、GABRB2)、单胺氧化酶类 (MAO-B)、雌激素受体 (estrogen receptor, ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、P2X 嘌呤受体 7 (P2X purinoceptor 7, P2X7)、聚[ADP-核糖]聚合酶 1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1, PARP-1) 等；2 味药材共有靶点有 27 个；栀子特有靶点 25 个，郁金特有靶点 13 个，麝香特有靶点 6 个。在 25 条通路中，4 味药材入脑成分共同参与的有 16 条，包括 cAMP 信号通路、VEGF 信号通路、IL-17 信号

通路等；其余 9 条为郁金、栀子、麝香共同参与的通路，神经营养蛋白信号通路、叉头盒 O (FoxO) 信号通路等。成分-靶点-通路网络揭示了入脑成分靶点协同治疗作用及靶点与通路间相互作用，从而体现中药复方的整体性的特点。

3.5 整合醒脑静治疗脑缺血通路

为了更好地理解醒脑静注射液入脑成分治疗脑缺血的整体调控，根据上述结果建立了一条整合的醒脑静治疗脑缺血通路，如图 6 所示。22 个靶点分别分布在整合通路的上下游，可被醒脑静入脑成分直接靶向，表明醒脑静可直接作用于这些靶点发挥治疗作用。醒脑静的入脑成分通过调控鞘脂信号通路、cAMP 信号通路、VEGF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K (磷脂酰肌醇 3 激酶)/蛋白激酶 B (AKT) 信号通路、松弛素信号通路中部分靶点，主要集中在细胞增殖、细胞凋亡、炎症、神经保护、血管生成及花生四烯酸代谢方面发挥治疗脑缺血损伤作用。

3.6 分子对接验证

分子对接技术可研究活性成分与关键靶点的结合能力，有利于验证网络中的关键成分和靶点。将 PPI 网络中前 30 个靶点与其对应成分进行分子对接，结合能 ≤ -5.0 kJ/mol，表明其结合性好^[24]。分子对接结果显示栀子苷、莪术二酮、新莪术二酮可

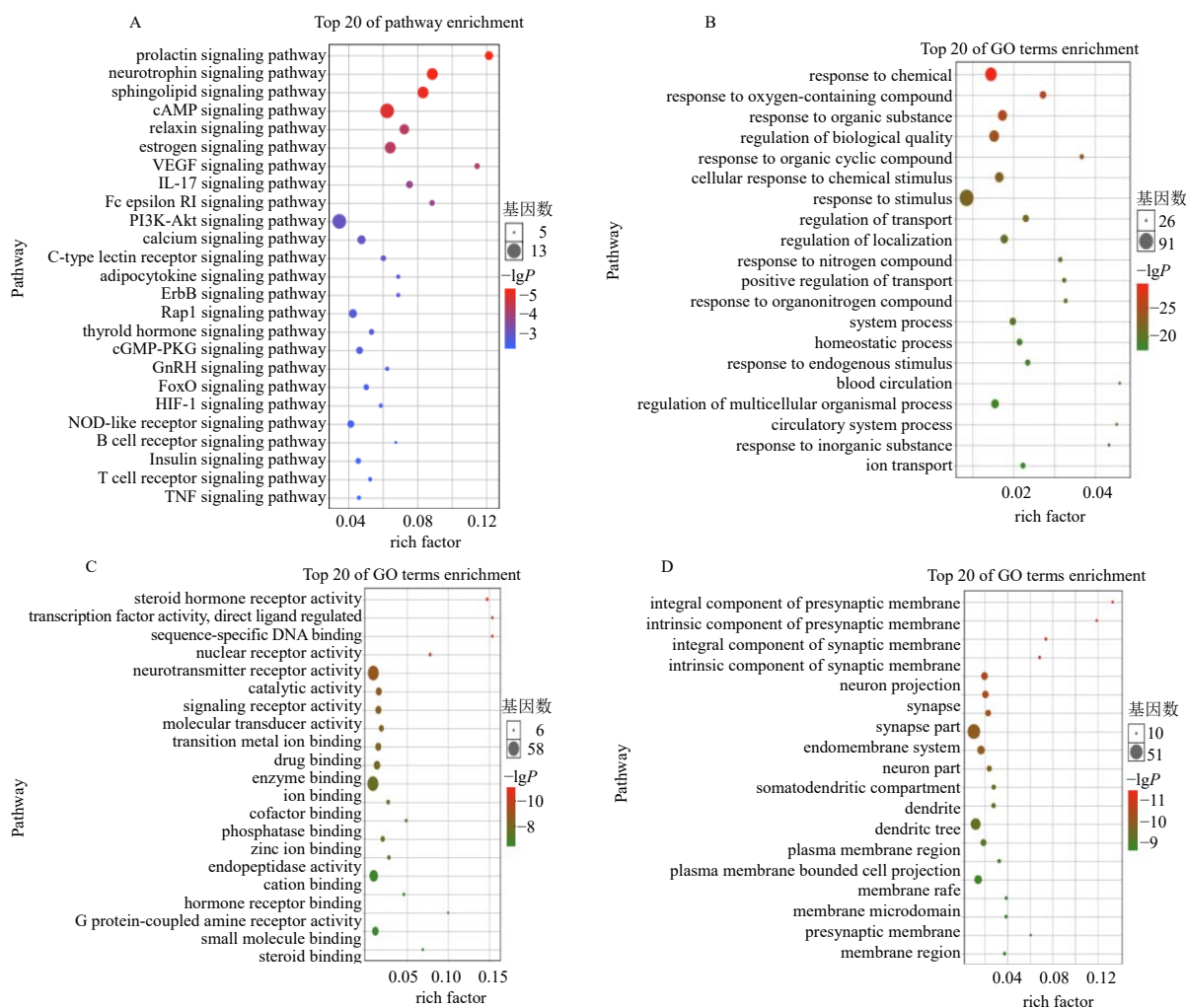


图 4 KEGG、GO 富集可视化结果

Fig. 4 KEGG and GO enrichment visualization results

表 4 KEGG 富集后的主要通路 (前 10)

Table 4 Main pathways after KEGG enrichment (Top 10)

通路	参与靶点数 (90)	总靶点数 (8514)	P 值	靶点
neurotrophin signaling pathway	11	124	6.29×10^{-8}	PSEN1、GSK3B、MAPK3、MAPK8、MAPK14、AKT1、PSEN2、MAP2K1、BCL2、HRAS、PTPN11
prolactin signaling pathway	9	74	6.91×10^{-8}	GSK3B、ESR1、JAK2、MAPK3、MAPK8、MAPK14、AKT1、MAP2K1、HRAS
sphingolipid signaling pathway	11	132	1.20×10^{-7}	MAPK3、MAPK8、MAPK14、CTSD、AKT1、ADORA1、NOS3、MAP2K1、BCL2、HRAS、ADORA3
cAMP signaling pathway	13	208	2.38×10^{-7}	MAPK3、MAPK8、ADORA2A、TNNI3、AKT1、DRD2、HTR6、ADORA1、CHRM1、MAP2K1、ADRB2、PDE4B、PPARA

续表 4

通路	参与靶点数 (90)	总靶点数 (8514)	P 值	靶点
estrogen signaling pathway	11	171	1.64×10^{-6}	HSP90AA1、MMP2、ESR1、MAPK3、CTSD、AKT1、GRM1、NOS3、MAP2K1、BCL2、, HRAS
relaxin signaling pathway	10	138	1.71×10^{-6}	MMP2、MAPK3、MAPK8、MAPK14、MMP13、AKT1、NOS3、MAP2K1、HRAS、MMP1
VEGF signaling pathway	7	61	3.20×10^{-6}	PTGS2、MAPK3、MAPK14、AKT1、NOS3、MAP2K1、HRAS
IL-17 signaling pathway	8	106	1.47×10^{-5}	PTGS2、HSP90AA1、GSK3B、MAPK3、MAPK8、MAPK14、MMP13、MMP1
Fc epsilon RI signaling pathway	7	79	1.82×10^{-5}	ALOX5、MAPK3、MAPK8、MAPK14、AKT1、MAP2K1、HRAS
PI3K-Akt signaling pathway	13	374	1.40×10^{-4}	HSP90AA1、GSK3B、JAK2、MAPK3、AKT1、JAK1、NOS3、CHRM1、MAP2K1、BCL2、HRAS、CSF1R、RXRA

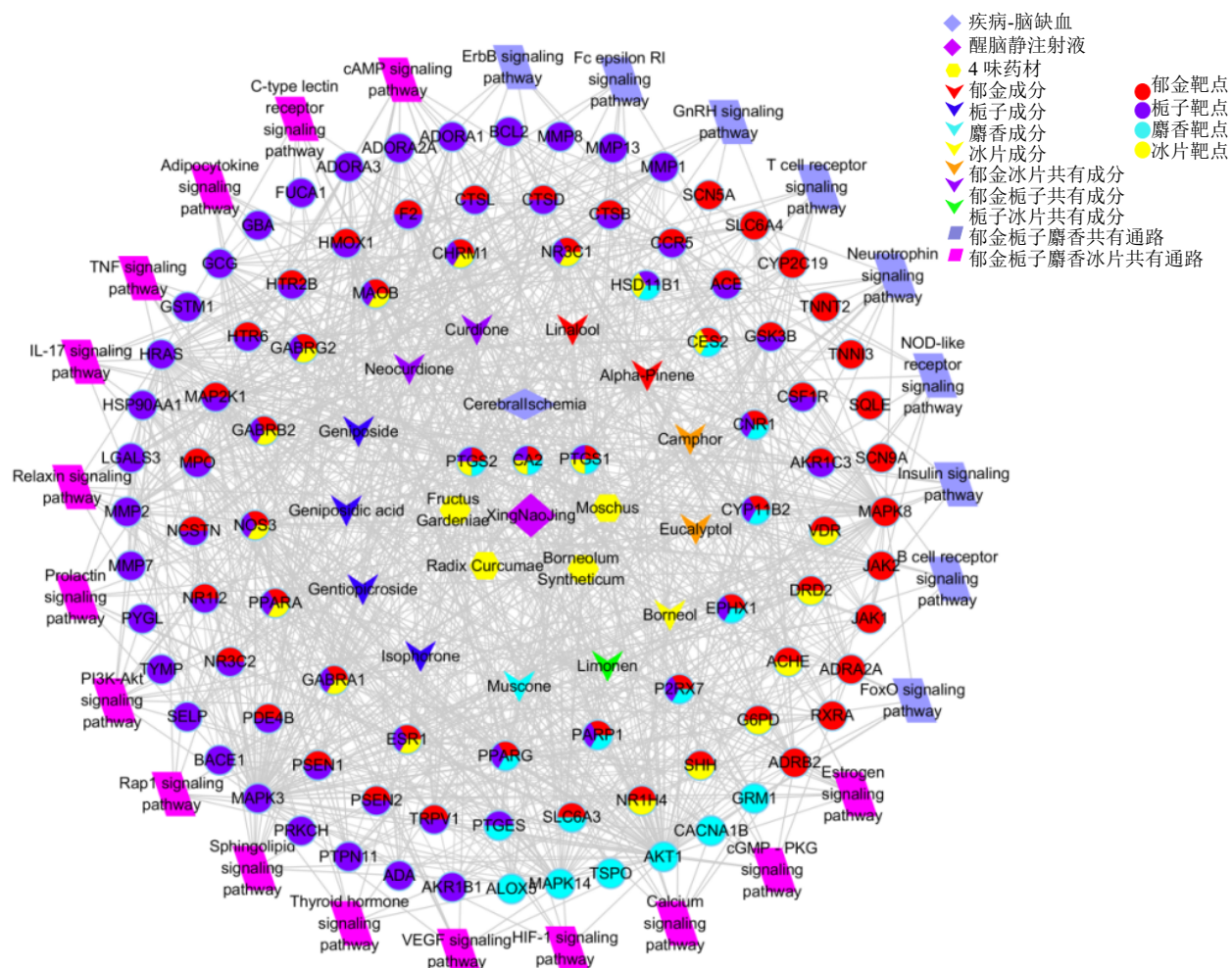


图 5 醒脑静入脑成分-脑缺血靶点-KEGG 通路网络图

Fig. 5 Brain absorption components of Xingnaojing Injection-cerebral ischemic target-KEGG pathway network diagram

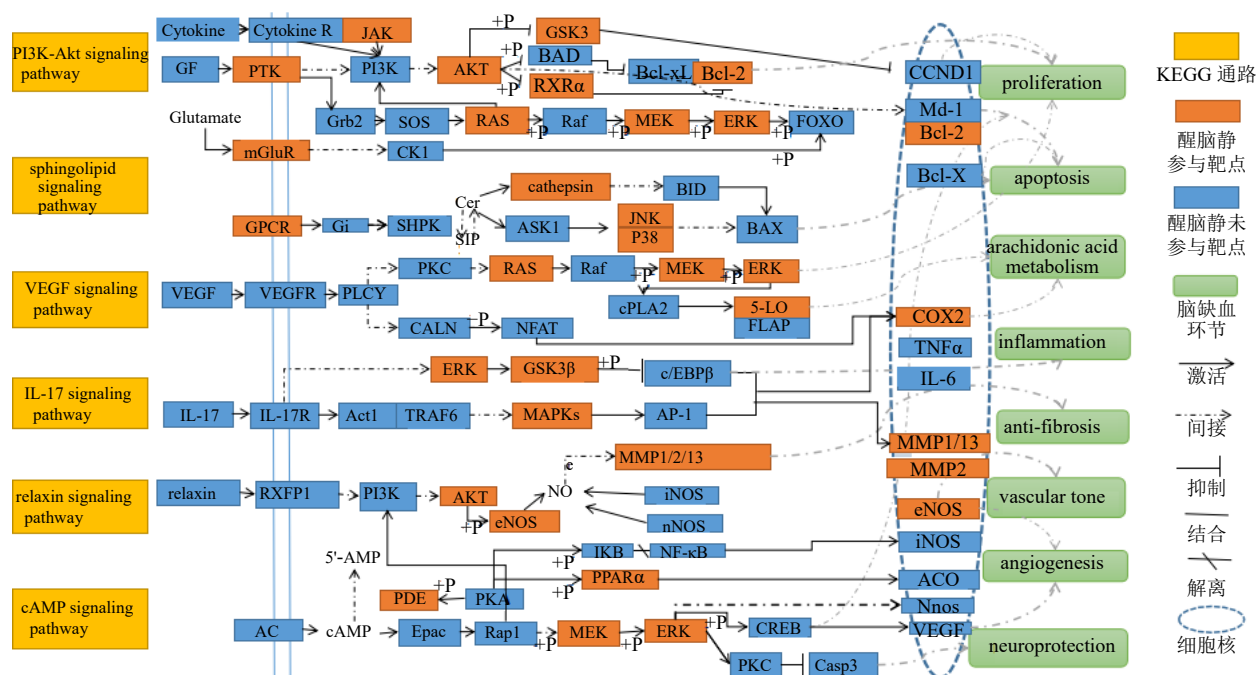


图 6 醒脑静注射液治疗脑缺血主要通路图

Fig. 6 Main pathway diagram of Xingnaojing Injection for treatment of cerebral ischemia

能为醒脑静治疗脑缺血的关键活性成分，分别选取 4 组亲和力较强的靶点构建分子对接的 3D 及 2D 模式图（图 7）。分子对接结果（表 5）表明，多数醒脑静入脑成分与关键靶点具有较好的结合力。

4 讨论

本研究通过 TCMSP 查询醒脑静成分，得知除了

栀子中的环烯醚萜类成分外，其余成分 TCMSP 预测得到的 $BBB \geq 0.56$ 。对于脑部疾病的治疗，血脑屏障是其一大障碍，良好的 BBB 值为其治疗脑部疾病提供了可能^[25]。通过文献调研及 GC-MS 鉴定得到 13 种醒脑静注射液入脑成分，郁金涉及成分 6 种（特有 4 种，共有 2 种）；栀子涉及成分 7 种（特有

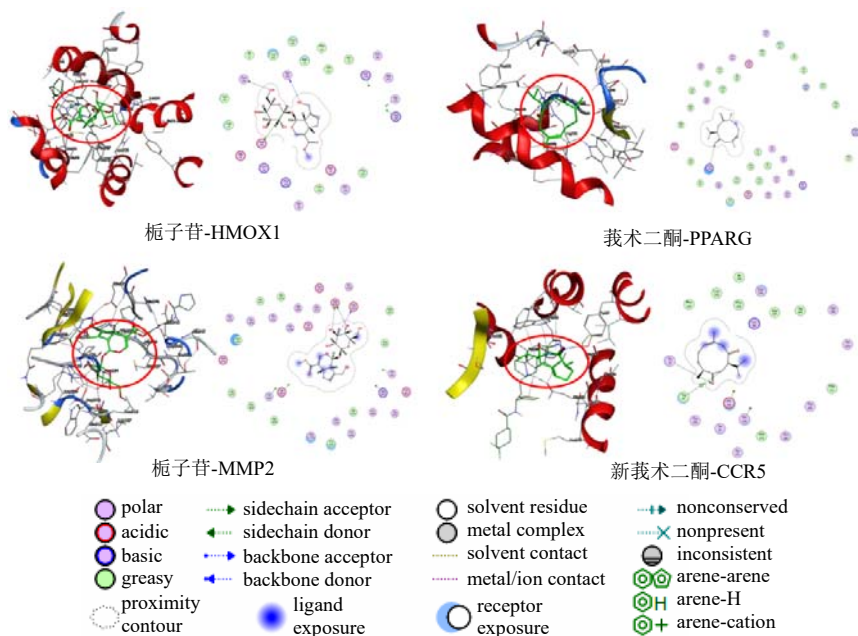


图 7 部分分子对接结果

Fig. 7 Part of molecular docking results

表 5 分子对接结果

Table 5 Molecular docking results

成分	靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	成分	靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
麝香酮	AKT1	-6.573 8	新莪术二酮	F2	-4.211 8
异佛尔酮	MAPK3	-5.216 6	芳樟醇	NR3C1	-5.350 4
芳樟醇	MAPK8	-5.552 6	异佛尔酮	NR3C1	-5.537 7
麝香酮	PTGS2	-5.996 9	冰片	NR3C1	-5.061 1
芳樟醇	PTGS2	-5.569 4	栀子苷	HMOX1	-6.851 6
柠檬烯	PTGS2	-5.552 6	新莪术二酮	HMOX1	-5.541 6
桉油精	PTGS2	-4.482 6	莪术二酮	HMOX1	-5.541 4
冰片	PTGS2	-4.314 2	芳樟醇	HMOX1	-4.605 2
莪术二酮	NOS3	-6.259 0	桉油精	ACHE	-5.046 9
桉油精	NOS3	-5.502 5	α -蒎烯	ACHE	-4.966 1
新莪术二酮	MPO	-5.080 5	新莪术二酮	CTSB	-5.881 8
莪术二酮	MPO	-4.342 8	莪术二酮	CTSB	-5.801 8
莪术二酮	ACE	-5.858 3	莪术二酮	MAP2K1	-6.291 1
新莪术二酮	ACE	-5.547 9	新莪术二酮	MAP2K1	-6.215 5
栀子苷	MMP2	-6.515 3	栀子苷	MMP1	-6.161 7
栀子苷	HRAS	-5.776 0	新莪术二酮	TRPV1	-5.444 1
麝香酮	PPARG	-6.483 6	莪术二酮	TRPV1	-5.410 4
新莪术二酮	PPARG	-6.124 8	异佛尔酮	TRPV1	-4.924 1
莪术二酮	PPARG	-5.858 3	α -蒎烯	TRPV1	-4.894 3
栀子苷	HSP90AA1	-7.107 6	芳樟醇	DRD2	-5.953 4
栀子苷	GCG	-5.660 0	冰片	DRD2	-4.523 9
麝香酮	MAPK14	-7.080 3	芳樟醇	ADRA2A	-5.602 9
麝香酮	CNR1	-6.909 5	莪术二酮	CCR5	-5.804 0
莪术二酮	CNR1	-6.573 8	新莪术二酮	CCR5	-5.735 5
冰片	ESR1	-5.394 0	异佛尔酮	CCR5	-4.631 8
α -蒎烯	ESR1	-5.069 6	新莪术二酮	GSK3B	-5.710 2
异佛尔酮	ESR1	-5.058 3	芳樟醇	ADRB2	-5.436 5
栀子苷酸	F2	-5.178 3	栀子苷	BCL2	-5.910 5
莪术二酮	F2	-4.506 1	麝香酮	GRM1	-5.263 8

4 种, 共有 3 种); 冰片涉及成分 3 种, 均为共有成分; 麝香涉及 1 种特有成分。其中莪术二酮、新莪术二酮、麝香酮、栀子苷靶点频次较高, 据报道栀子苷可以下调基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotein, MMP)、星形胶质细胞水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 表达从而保护脑缺血再灌注大鼠模型血脑屏障^[26]; 麝香酮可以抑制神经细胞凋亡从而具有神经保护的特性^[27]。

本研究关于入脑成分龙脑、麝香酮、莪术二酮、栀子苷、桉油精、芳樟醇、柠檬烯、 α -蒎烯、栀子

苷、栀子苷酸、京尼平龙胆双糖苷的靶点预测结果与其他文献报道高度一致。文献中预测龙脑的靶点有雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、前列腺素 G/H 合酶 1 (prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1)、前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、内皮型一氧化氮合酶 3 (endothelial nitric oxide synthase 3, eNOS3)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA reductase inhibitors, HMGCR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor

gamma, PPARG)、基质金属蛋白酶 3(stromelysin-1, MMP3)等, 研究中预测到的靶点有 ESR1、PTGS1、PTGS2、NOS3、MAOB、GABRA1、DRD2 等, 龙脑靶点参与多条抗炎通路, 其中以花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢通路为主^[28-29]。

文献中预测到麝香酮的靶点有 AKT1、MAPK14、ADRB1、PTGS2、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等^[20], 研究中预测到的靶点有 AKT1、MAPK14、ADRB1、PTGS2、ALOX5、NOS2 等; 文献中预测到莪术二酮的靶点有 NOS3、PTGS2、PDE4B、ADRB1 等^[30], 本研究预测到的靶点有 NOS3、PTGS2、PDE4B、HMOX1 等; 文献中预测到梔子中环烯萜类成分(梔子苷、梔子苷酸、京尼平龙胆双糖苷)涉及靶点有 BCL2、MMP12、HSP90AA1、NOS3、ALOX5 等^[31-32], 本研究预测到的靶点为 BCL2、MMP12、HSP90AA1、HMOX1、F2 等。在本研究预测的入脑成分靶点中, 龙脑、麝香酮、莪术二酮、桉油精均涉及靶点 PTGS2, 龙脑、莪术二酮、桉油精均涉及靶点 NOS3, 龙脑、芳樟醇、柠檬烯、蒎烯涉及靶点 GABRA1 等, 说明这些入脑成分在治疗脑缺血疾病时可能存在协同作用。本研究预测的是与脑缺血相关的靶点, 其他文献为不同疾病的靶点, 如冠心病、哮喘等, 因而存在差异。

醒脑静注射液可能作用于 93 个脑缺血靶点, 这些靶点有潜在的协同治疗作用, 如 COX-2、MAO 等可介导脑缺血损伤的炎症反应, COX-2 作为花生四烯酸代谢产生前列腺素的主要限速酶, 被称为“炎症反应基团”, 参与合成前列腺素, 调控有丝分裂、细胞生长^[33]; 说明醒脑静可能通过降低 COX-2 活性减轻脑缺血损伤炎症反应从而改善脑缺血造成的脑组织损伤^[34]。有研究表明单胺氧化酶可参与调控神经方面的疾病^[30]。AKT1、Bcl-2、eNOS 等调节细胞凋亡, AKT1 又称蛋白激酶 B, 对脑缺血神经细胞凋亡起重要的调控作用^[33]。磷酸化的 eNOS 可抑制细胞凋亡, 改善脑缺血损伤^[10]。

丝裂原活化蛋白激酶家族(JNK、P38)在氧化应激、DNA 损伤等条件下可被激活。说明醒脑静主要调节 COX-2、MAO、AKT1、Bcl-2、eNOS、MAPKs 等靶点参与炎症、凋亡、血管、神经等脑缺血相关环节。

根据预测结果醒脑静主要参与神经营养蛋白

信号通路、VEGF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、松弛素信号通路等, 神经营养蛋白信号通路主要调节脑源性神经营养因子和神经生长因子发挥神经保护作用^[35]; VEGF 能够增加血管通透性, 醒脑静可能通过调节花生四烯酸通路及 VEGF 通路, 抑制炎症因子造成的脑缺血损伤^[10]; IL-17 参与了血管生成、免疫调节等环节, 拮抗 IL-17 可有效抑制 ERK 通路的活化^[36]; PI3K-Akt 信号通路是一条重要的抗细胞凋亡、促细胞增殖信号通路, 多种神经营养因子可激活该通路发挥脑保护作用^[37]; 松弛素可舒张血管、促进血管再生等来改善脑卒中患者的血管状态^[38]。综上所述, 醒脑静可能通过调节 VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经营养蛋白信号通路、IL-17 信号通路参与炎症、血管、凋亡、神经因子等的调节来达到治疗脑缺血目的, 充分体现中药复方“多成分、多靶点、多途径”的特性。本研究仅对醒脑静治疗脑缺血的物质基础进行了初步预测, 后期还需要通过细胞和动物实验对其入脑成分治疗脑缺血机制进行深入验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen H S, Chen X, Li W T, *et al.* Targeting RNS/caveolin-1/MMP signaling cascades to protect against cerebral ischemia-reperfusion injuries: Potential application for drug discovery [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5): 669-682.
- [2] Jayaraj R L, Azimullah S, Beiram R, *et al.* Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 142.
- [3] Moskowitz M A, Lo E H, Iadecola C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments [J]. *Neuron*, 2010, 67(2): 181-198.
- [4] 张强. 缺血性脑血管病的治疗现状以及进展分析 [J]. 中西医结合心脑血管病电子杂志, 2018, 6(7): 41.
- [5] Yang C S, Lin Y Z, Guo Q, *et al.* Chinese herbal medicine Xingnaojing Injection (醒脑静注射液) for hypoxic ischemic encephalopathy in newborns: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(2): 147-155.
- [6] 李芮琳, 张彤, 刘文杰, 等. 醒脑静注射液的活性成分对 BV-2 细胞中白细胞介素 1 受体拮抗剂分泌的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(19): 2331-2334.
- [7] Xu Y M, Wang X C, Zhang S J, *et al.* Role of Xingnaojing combined with naloxone in treating intracerebral haemorrhage [J]. *Medicine*, 2018, 97(43): e12967.
- [8] 周奎, 唐小宾, 钟挥. 醒脑静注射液联合胞磷胆碱治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(9): 2681-2685.

- [9] Qu X Y, Zhang Y M, Tao L N, *et al.* XingNaoJing injections protect against cerebral ischemia/reperfusion injury and alleviate blood-brain barrier disruption in rats, through an underlying mechanism of NLRP3 inflammasomes suppression [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(7): 498-505.
- [10] Zhang Y M, Qu X Y, Tao L N, *et al.* XingNaoJing injection ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury via SIRT1-mediated inflammatory response inhibition [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 16-24.
- [11] Zhang Y M, Qu X Y, Zhai J H, *et al.* Xingnaojing injection protects against cerebral ischemia reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2361046.
- [12] Wei G, Huang Y C, Li F, *et al.* XingNaoJing, prescription of traditional Chinese medicine, prevents autophagy in experimental stroke by repressing p53-DRAM pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 377.
- [13] 宋福江, 范斌, 孙健. 基于网络药理学的醒脑静注射液治疗脑梗死配伍机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1366-1372.
- [14] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [15] Langen U H, Ayloo S, Gu C. Development and cell biology of the blood-brain barrier [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, 35: 591-613.
- [16] 徐攀, 杜守颖, 陆洋, 等. UPLC-MS/MS 测定醒脑静口服制剂中 3 种环烯醚萜在大鼠脑中含量及其脑药动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2351-2355.
- [17] Song Y F, Chu Y, Ma X H, *et al.* GC-MS/MS method for the determination and pharmacokinetic analysis of borneol and muscone in rat after the intravenous administration of Xingnaojing injection [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(21): 4264-4271.
- [18] 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.
- [19] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [20] Tao W Y, Xu X, Wang X, *et al.* Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [21] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [22] Zhao J, Lv C, Wu Q L, *et al.* Computational systems pharmacology reveals an antiplatelet and neuroprotective mechanism of Deng-Zhan-Xi-Xin injection in the treatment of ischemic stroke [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104365.
- [23] 王哲. 基于分子对接的虚拟筛选方法的评测、优化和应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019: 30-61.
- [24] 黄友, 杨莎莎, 林夏, 等. 基于网络药理-分子对接研究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 药学报, 2020, 55(8): 1812-1822.
- [25] 曹辉, 周霖, 孙志, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合整合网络药理学的藤黄健骨胶囊化学成分识别及作用机制初步研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2408-2417.
- [26] 涂华, 胡光强, 陈碧琼, 等. 栀子苷预处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(6): 508-510.
- [27] Wei G, Chen D F, Lai X P, *et al.* Muscone exerts neuroprotection in an experimental model of stroke via inhibition of the fas pathway [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(8): 1069-1074.
- [28] 胡佳, 高宇, 吴雨薇, 等. 冰片治疗脑卒中的抗炎作用机制: 基于网络药理探讨 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(4): 174-178.
- [29] 樊亚梅, 王建, 黄维, 等. 基于网络药理学探究冰片改善冠心病的作用机制 [J]. 中成药, 2020, 42(5): 1334-1339.
- [30] 张磊. 基于网络药理学的郁金治疗哮喘的作用机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(1): 61-67.
- [31] Liu F Z, Li Y B, Li M, *et al.* Study on mechanism of iridoid glycosides derivatives from *Fructus Gardeniae* in Jiangxi Province by network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4062813.
- [32] 陈浩, 高璇, 赵威, 等. 基于网络药理学的栀子抗胆汁淤积的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2709-2718.
- [33] 吴波, 黄盛璟, 邢婧, 等. 基于网络药理学的复方当归注射液治疗缺血性脑损伤作用机制分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(23): 2384-2390.
- [34] 向净匀, 吴杰, 王琰, 等. 基于网络药理学的黄芩素、京尼平抗脑缺血作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5802-5811.
- [35] 杨正飞, 杨小燕, 陈叶飞, 等. 当归-川芎药对治疗脑梗死的“调控网络”和机制 [J]. 中医学报, 2020, 35(1): 149-154.
- [36] 孙浠哲, 张宇驰, 刘雨新, 等. 基于网络药理学探讨热毒宁注射液治疗新型冠状病毒肺炎机制研究 [J]. 中药材, 2020(7): 1791-1798.
- [37] Li Y, Zhang J X, Zhang L L, *et al.* Systems pharmacology to decipher the combinational anti-migraine effects of Tianshu formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 45-56.
- [38] 吴作敏, 郭丽娜, 王单单, 等. 黄芪-川芎药对治疗脑卒中的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1749-1756.

[责任编辑 潘明佳]