

基于 PI3K/Akt 信号通路探究当归补血汤干预大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的作用机制

石 娅^{1,2}, 刘 文^{1,2,3*}, 刘兴德¹, 宋信莉^{1,2}, 李 鑫^{1,2}, 舒万芬^{1,2}, 张甘纯^{1,2}, 秦 琴^{1,2}, 王洪鑫^{1,2}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学药学院, 国家苗药工程技术研究中心, 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550025

摘要:目的 基于网络药理学结合体内实验探讨当归补血汤对脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 大鼠的干预作用及相关作用机制。方法 通过数据库收集当归补血汤中的活性成分及其治疗 CIRI 的靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和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; 通过 Auto Dock 软件对关键作用靶点与主要活性成分进行分子对接验证。SD 大鼠给予尼莫地平或当归补血汤 2 周后, 采用改良 Longa 线栓法复制大鼠中动脉栓塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 模型, 对神经行为学进行评分, 并测定脑组织梗死面积; 采用 TUNEL 染色法测定脑组织细胞凋亡情况; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法考察脑组织病理变化; 采用 ELISA 测定血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 水平; 采用 qRT-PCR 检测脑组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测脑组织蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达。结果 筛选出当归补血汤 30 种活性成分, 得到当归补血汤治疗 CIRI 的靶点 467 个, 核心靶点 55 个。KEGG 通路富集分析表明磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /Akt 信号通路是当归补血汤抗 CIRI 的关键机制之一。分子对接显示, 当归补血汤中主要活性成分与核心作用靶点中的 Akt1、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53)、TNF 和 IL-6 等具有较为稳定的结合活性。动物实验结果表明, 当归补血汤能够改善 CIRI 大鼠神经功能损伤 ($P < 0.05$); 减少脑组织梗死面积 ($P < 0.05, 0.01$); 减轻脑组织病理损伤; 降低脑组织细胞凋亡指数 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 降低血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平 ($P < 0.05, 0.01$); 降低脑组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达 ($P < 0.01, 0.001$); 增加脑组织中 Akt 的磷酸化水平 ($P < 0.01, 0.001$) 而激活 PI3K/Akt 信号通路, 进一步上调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 下调 Bax 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.001$)。结论 当归补血汤可能通过作用多靶点及多通路治疗 CIRI, 其机制与影响 Akt1、TNF、IL-6、IL-1 β 等蛋白的表达进而调控 PI3K/Akt 信号通路抑制炎症和细胞凋亡有关。

关键词: 当归补血汤; 脑缺血再灌注损伤; 网络药理学; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 炎症; 细胞凋亡; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮; 阿魏酸; 芒柄花素; 藜本内酯; 黄芪甲苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)16-5052-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.015

Mechanism of Danggui Buxue Decoction in intervention of experimental cerebral ischemia reperfusion injury in rats based on PI3K/Akt signaling pathway

SHI Ya^{1,2}, LIU Wen^{1,2,3}, LIU Xing-de¹, SONG Xin-li^{1,2}, LI Xin^{1,2}, SHU Wan-fen^{1,2}, ZHANG Gan-chun^{1,2}, QIN Qin^{1,2}, WANG Hong-xin^{1,2}

1. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060704); 贵州省特色功能食品与中药制剂开发攻关平台项目 (黔教合 KY 字[2020]006); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心项目 (贵中医党办发[2019]70)

作者简介: 石 娅 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术与新制剂研究。Tel: 18285148380 E-mail: 328697640@qq.com

*通信作者: 刘 文 (1969—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药新技术与新制剂研究。E-mail: 642771631@qq.com

2. Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Center, National Miao Medicine Engineering Technology Research Center, School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
3. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To explore the interventional effect and related mechanism of Danggui Buxue Decoction (当归补血汤) on rats with cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) based on network pharmacology combined with *in vivo* experiments. **Methods** Active ingredients in Danggui Buxue Decoction and targets for the treatment of CIRI were collected from databases, protein-protein interaction (PPI) network was constructed, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed; Key targets and main active ingredients were selected for molecular docking by AutoDock software. After SD rats were given nimodipine or Danggui Buxue Decoction for 2 weeks, middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was established by modified Longa suture method, neurobehavioral scores were evaluated and brain tissue infarct size was determined; TUNEL staining was used to determine the apoptosis of brain tissue; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to investigate the pathological changes of brain tissue; Levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β in serum were determined by ELISA; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* in brain tissue; Western blotting was used to detect protein expressions of protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in brain tissue. **Results** Thirty active ingredients of Danggui Buxue Decoction were screened out, 467 targets and 55 core targets of Danggui Buxue Decoction in the treatment of CIRI were obtained. KEGG pathway enrichment analysis showed that phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway was one of key mechanisms of Danggui Buxue Decoction against CIRI. Molecular docking showed that main active components in Danggui Buxue Decoction had relatively stable binding activities with core targets such as Akt1, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and transcription factor AP-1 (JUN), epidermal growth factor receptor (EGFR), cellular tumor antigen p53 (TP53), TNF and IL-6. The results of animal experiments showed that Danggui Buxue Decoction improved the neurological function damage in CIRI rats ($P < 0.05$), reduced the infarct size of brain tissue ($P < 0.05, 0.01$), alleviated the pathological damage of brain tissue, reduced the apoptosis index of brain tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), decreased TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in serum ($P < 0.05, 0.01$), decreased *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* mRNA expressions in brain tissue ($P < 0.01, 0.001$), activated PI3K/Akt signaling pathway by increasing the phosphorylation level of Akt in brain tissue ($P < 0.01, 0.001$), further up-regulated Bcl-2 protein expression ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and down-regulated Bax protein expression ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Danggui Buxue Decoction may treat CIRI by acting on multiple targets and multiple pathways, and its mechanism is related to affecting the expression of Akt1, TNF, IL-6, IL-1 β and other proteins, thereby regulating PI3K/Akt signaling pathway to inhibit inflammation and apoptosis.

Key words: Danggui Buxue Decoction; cerebral ischemia reperfusion injury; network pharmacology; PI3K/Akt signaling pathway; inflammatory response; cell apoptosis; calycosin-7-*O*-glucoside; calycosin; ferulic acid; formononetin; ligustolide; astragaloside IV

缺血性脑卒中是常见的中风类型，临床治疗常以药物介导的静脉溶栓和动脉内血栓切除术为主^[1-2]，旨在通过再灌注恢复缺血脑组织的血液供应。然而，在脑缺血再灌注后，虽可以减少缺血引起的脑梗死面积和组织功能障碍，但快速的再灌注会对功能恢复造成更严重的影响，加重组织损伤^[3]，称为脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)，是导致患者严重残疾和死亡的首要因素之一^[4]。此外，CIRI的病理机制复杂，包括炎症反应、氧化应激、凋亡、血脑屏障功能障碍、白细胞浸润等^[5-10]，致使目前的治疗策略难以达到预期效果。

在中医药理论指导下，传统中医药尤其是复方中药制剂在临床上治疗脑卒中及其并发症已有数千

年的历史^[11-13]。中医认为“气虚血瘀”是缺血性脑卒中和 CIRI 的主要病机特点之一，而“益气活血”是治疗关键环节之一^[14-15]。现代药理学研究显示，益气活血类中药及中药复方具有抗炎、清除氧自由基、保护血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 完整性、抑制细胞凋亡等作用，在防治缺血性脑卒中及 CIRI 方面具有良好的优势与前景^[16-17]。当归补血汤出自《内外伤辨惑论》，是益气补血的代表方剂，由黄芪和当归 (5:1) 组成，具有明显的益气营血、扶正固本的功效^[18]。现有研究表明，当归补血汤可通过改善 BBB 通透性，影响海马区一氧化氮合酶和脑源性促红细胞生成素的表达等保护 CIRI 的神经组织^[19-21]。但目前对于其抗 CIRI 的主要生物活性

成分和分子机制尚未被全面阐明,既不能充分认识其在临床疗效的科学内涵,亦不能对中医的传统理论做出科学的诠释,从而制约了其在医学上的运用和药物的进一步研制。

网络药理学结合系统生物学和交叉药理学的概念,从多维角度探讨中医药与疾病的关系,强调整体性和系统性,从而阐释药物、靶点与疾病间的多重相互作用,符合中医学从整体观念和辨证论治的角度诊治疾病的原则^[22-24]。因此,本研究拟采用网络药理研究,分析当归补血汤的有效成分,筛选当归补血汤抗 CIRI 的作用靶点并挖掘其潜在通路,并进一步通过体内实验验证预测的主要通路,为药物研发提供新思路。

1 材料

1.1 数据库及软件

TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)、SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<http://disgenet.org/>)、Venny 2.1 (<https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、String Version 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>)、Cytoscape 3.6.0 软件、DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、KOBAS 3.0 数据库 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/genelist/>)、ZINC 数据库 (<https://zinc.docking.org/substances/home/>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>)、PyMOL 软件、Openbabel 软件、GraphPad Prism 9 软件。

1.2 药材

黄芪(批号 200801,产地甘肃)、当归(批号 200721,产地甘肃)购自北京同仁堂贵阳药店,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定分别为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200±20)g,6~7 周龄,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物质量合格证编号 SCXK(辽)2020-0001。饲养于通风良好,室温 18~25℃,相对湿度 50%~70%

的动物房,确保动物自由进食与饮水。动物实验经贵州中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理批准号 20210052)。

1.4 药品与试剂

尼莫地平片(批号 20200709,国药准字 H20003010)购自拜耳医药保健有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC,批号 0719A21)购自北京雷根生物技术有限公司;大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号分别为 E-EL-R0015c、E-EL-R2856c、E-EL-R0012c)购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AB-P-R 001)购自杭州贤至生物有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)多克隆兔抗(批号 AF0016)购自 Affinity 公司;B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)兔抗(批号 A19693)购自 Abclonal 公司;Akt 兔抗(批号 60203-2-Ig、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)兔抗(批号 50599-2-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 BA1054)购自武汉博士德生物工程有限公司;Trizol(批号 15596-026)购自 Ambion 公司;HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)、SYBR Green Master Mix(批号分别为 R233-01、Q111-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号 E-CK-A322)购自 Elabscience 公司。

1.5 仪器

FlexStation 3 型多功能酶标仪(德国 Molecular Devices 公司);H1650R 型冷冻高速离心机(湖南湘仪离心机有限公司);ICV-450 型电热恒温培养箱(日本 ASONE 公司);Pannoramic 250 型数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪、Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 当归补血汤活性成分与靶点预测 以“黄

芪”“当归”或其拉丁文为关键词,在TCMSP数据库、TCMID数据库中进行检索,收集筛选有效成分。此外,将《中国药典》2020年版中2味中药的质量控制成分以及中国知网(CNKI)中已有报道的生物活性物质纳入分析。在TCMSP数据库、TCMID数据库、SwissTargetPrediction数据库中收集活性成分靶点,将3者整合,通过Uniprot数据库将靶点蛋白名进行标准化处理,去重。

2.1.2 潜在靶点预测 通过GeneCards、OMIM、DisGeNET数据库收集与“cerebral ischemia-reperfusion injury”“cerebral thrombosis”“ischemic stroke”和“cerebral embolism”病名相关的靶点,整合去除重复靶点,筛选得到CIRI相关靶点。当归补血汤活性成分靶点和CIRI靶点的韦恩图通过Venny 2.1在线工具绘制,将交集靶点作为当归补血汤治疗CIRI的潜在靶点。

2.1.3 蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 的构建和分析 通过String Version 11.0数据库对潜在靶点进行PPI分析,限定Homo sapiens、minimum required interaction score ≥ 0.9 ,并隐藏游离蛋白。将结果以“TSV”格式导入Cytoscape 3.6.0软件中,拓扑分析由CytoNCA插件^[25]完成,其中,介数中心线(betweenness centrality, BC)、紧密中心(closeness centrality, CC)和度值均是评价网络中节点贡献程度的重要参数,其数值越高,该靶点对网络参与度和贡献率越大^[26]。通过参数分析,探索当归补血汤治疗CIRI可能的相关核心作用靶点。

2.1.4 “活性成分-靶点-疾病”网络的构建与分析 基于交集靶点,反向筛选得到对应活性成分,制作网络关系表及属性文件,依次导入Cytoscape 3.6.0软件,构建“活性成分-靶点-疾病”图,通过Network Analyzer插件计算度值,分析筛选主要药效成分。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能与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 分别通过DAVID 6.8数据库、KOBAS 3.0数据库进行GO功能和KEGG通路富集分析。下载分析结果,将其分别按P值和“Count”(每条通路中含有的潜在基因靶点的数量)值的大小进行排序。

2.1.6 分子对接验证 通过ZINC数据库、PubChem数据库下载成分结构的sdf格式文件,通过PyMOL将其转换为pdb格式;从PDB数据库筛

选下载靶点蛋白结构。运用Auto Dock软件对蛋白结构去水、加全氢、导出为pdbqt(设置为配体);对小分子加全氢、设置为配体(自动分布电荷)、检测扭转键、选择扭转键、导出为pdbqt;设置对接Box、导出为gpf、运行Autogrid 4、设置对接参数及运算方法、导出为dpf、运行Autodock 4、查看结果;导出结果为pdbqt,运用Openbabel软件将其转换为pdb,后采用PyMOL进行可视化处理。

2.2 实验验证

2.2.1 当归补血汤的制备 按处方比例黄芪-当归(5:1)准确称取适量药材,混匀,加8倍量纯水浸泡30 min,煎煮提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液,煎煮浓缩至适当浓度,备用。通过HPLC法对制备的浓缩液进行分析,通过直接与对照品的保留时间相比较,定性了毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、芒柄花素、藜本内酯和黄芪甲苷6个成分,质量分数(以生药计)分别为0.546、0.154、0.296、0.109、0.302、0.751 mg/g。

2.2.2 动物分组与给药 大鼠适应性喂养1周后,随机分为假手术组、模型组、尼莫地平(32.4 mg/kg,相当于临床剂量的6倍)组和当归补血汤低、中、高剂量(5.84、11.67、23.34 g/kg,分别相当于临床剂量的3、6、12倍)组,每组18只,分别称定质量、标记。各给药组ig相应药物(10 mL/kg),假手术组和模型组ig等体积生理盐水,每隔24 h给药1次,连续14 d。

2.2.3 造模与取材 给药14 d后,采用改良的Longa线栓法^[27-29]复制大鼠大脑中动脉栓塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型。缺血2 h后,小心匀速抽出线栓以恢复再灌注过程,涂抹适当碘伏进行消毒以防感染。假手术组除未插入线栓外,其他操作相同;再灌注22 h后,深度麻醉大鼠,从腹主动脉采集约5 mL血液,室温放置1 h,3000 r/min离心15 min,吸取上清液,转移至-80 °C冰箱中保存,备用。采血后,迅速断头取脑,以冰的生理盐水清洗,滤纸拭干,浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定,于-80 °C超低温保存备用。

2.2.4 神经行为学评分 再灌注22 h后,分别随机挑选12只大鼠参照国际通用的Longa法^[29]进行神经行为学评分,选取评分 ≥ 1 的大鼠进行后续实验。

2.2.5 脑梗死面积测定 再灌注22 h后,剔除小脑与嗅球的脑组织放入-20 °C预冻30 min后,进行冠

状切片,将脑切片用2% TTC 避光染色 15 min,正常部位为红色,梗死区为白色时,切片置于4%多聚甲醛中,24 h后取出切片进行拍照记录。将记录的TTC染色图像导入Image J图像处理软件,根据脑梗死严重程度自定义圈选梗死区域(白色)和全脑区域,通过“Analyze-Measure”模块分别计算面积,并计算梗死率。

梗死率=脑梗死总面积/脑切片总面积

2.2.6 病理形态学观察 将固定的脑组织脱水并经石蜡包埋及切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察并拍照。

2.2.7 细胞凋亡指数测定 取各组大鼠脑组织切片,按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,于显微镜下观察脑组织中的凋亡细胞,计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数

2.2.8 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的测定 按 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。

2.2.9 qRT-PCR 检测大鼠脑组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达 取各组大鼠脑组织,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	产物大小/bp
GAPDH	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	253
	R: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
IL-6	F: GTTGCTTCTTGGGACTGATG	102
	R: TACTGGTCTGTTGTGGGTGGT	
TNF- α	F: CCGATTTGCCATTTTCATACCAG	232
	R: TCACAGAGCAATGACTCCAAAG	
IL-1 β	F: CCTGTGTGATGAAAGACGGC	218
	R: TATGTCCCAGACCATTGCTGT	

2.2.10 Western blotting 测定脑组织中 Akt、p-Akt、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 将低温冷冻保存的各组大鼠脑组织剪碎,加入细胞裂解液提取总蛋白。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h 后,分别加入兔抗 Akt (1:5000)、兔抗 p-Akt (1:1000)、兔抗 Bax (1:5000)、兔抗 Bcl-2 (1:1000) 和兔抗 GAPDH (1:1000),4 °C 孵育过夜;加入二抗,室温孵育 2 h。使用 ECL 工作液显色曝光,扫描胶片,用 BandsScan 分析胶片灰度值(以 GAPDH

为内参蛋白)。

2.2.11 统计分析方法 数据使用软件 SPSS 26.0 进行统计处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较各组间差异的显著性。采用 Mann-Whitney 检验,对神经行为学评分进行非参数统计分析。所有数据作图均由 GraphPad Prism 9 软件生成。

3 结果

3.1 活性成分及潜在靶点的收集

TCMSP 数据库检索到 212 个活性成分。通过口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 筛选,得到黄芪的 20 个活性成分,当归的 2 个活性成分。查阅《中国药典》2020 年版和文献,将部分成分纳入后续研究,共计 30 个活性成分,见表 2。通过各数据库收集整理,得到 695 个活性成分靶点,5336 个 CIRI 相关靶点。通过韦恩图分析,得到 467 个药物-疾病共同靶点作为当归补血汤治疗 CIRI 的潜在靶点。

3.2 PPI 分析

为了获得潜在靶点交互作用的信息,将 467 个潜在靶点 PPI 网络的 TSV 文件导入 Cytoscape 3.6.0 进行分析,分析内容包括:(1)大于度值的 2 倍中位数;(2)同时大于 CC、BC、度值的 1 倍。筛选得出靶点蛋白 55 个,即为当归补血汤治疗 CIRI 的关键靶点蛋白,见图 1。根据度值进行排序,将排名前 20 的靶点作为核心靶点,用于分子对接,见表 3。提示这些靶点在 PPI 网络中起着较为关键的作用,在治疗 CIRI 中可能占据重要地位。

3.3 “活性成分-靶点-疾病”网络

“活性成分-靶点-疾病”网络见图 2。该网络中共有 497 个节点,1926 条边,更加直观地展示多成分、多靶点的相互关系。经度值对当归补血汤活性成分进行排序,排名前 10 的活性成分见表 4,将其作为当归补血汤治疗 CIRI 的关键活性成分,用于分子对接。

3.4 GO 功能富集分析

GO 功能富集分析结果显示,经 $P < 0.01$ 筛选后,得到 1087 条 GO 结果,其中生物过程(biological process, BP) 795 条、分子功能(molecular function, MF) 192 条、细胞组成(cellular component, CC) 100 条,分别选取前 10 条进行可视化处理,见图 3。BP 主要涉及 G 蛋白偶联受体信号通路、RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控、凋亡过程的调控、细胞因子介导的信号通路、炎症反应等;CC 主要涉及质

表 2 活性成分信息

Table 2 Information of active ingredients

编号	分子编码	化合物	OB/%	DL	PubChem CID
DBT1	MOL000211	mairin	55.38	0.78	64971
DBT2	MOL000239	jaranol	50.83	0.29	5318869
DBT3	MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75	73299
DBT4	MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	15976101
DBT5	MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31	5281654
DBT6	MOL000371	3,9-di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48	15689655
DBT7	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di- <i>O</i> -glucoside	41.72	0.69	/
DBT8	MOL000378	7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	74.69	0.30	15689652
DBT9	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	36.74	0.92	74977390
DBT10	MOL000380	(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i>]chromen-3-ol	64.26	0.42	14077830
DBT11	MOL000387	联苯双酯	31.10	0.67	108213
DBT12	MOL000392	芒柄花素	69.67	0.21	5280378
DBT13	MOL000398	异黄酮酮	109.99	0.30	160767
DBT14	MOL000401	黄芪甲苷 I	46.79	0.11	51346122
DBT15	MOL000403	黄芪甲苷 II	46.06	0.13	13996693
DBT16	MOL000405	黄芪甲苷 III	31.83	0.10	441905
DBT17	MOL000407	黄芪甲苷 IV	22.50	0.15	13943297
DBT18	MOL000414	咖啡酸酯	54.97	0.05	1549111
DBT19	MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	5280448
DBT20	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	5280863
DBT21	MOL000433	FA	68.96	0.71	6037
DBT22	MOL000438	(3 <i>R</i>)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26	10380176
DBT23	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62	15689653
DBT24	MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	5316760
DBT25	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	5280343
DBT26	MOL009290	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	5.49	0.81	5318267
DBT27	MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	222284
DBT28	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	5280794
DBT29	MOL000360	阿魏酸	39.56	0.06	445858
DBT30	MOL002201	藜本内酯	51.30	0.07	5877292

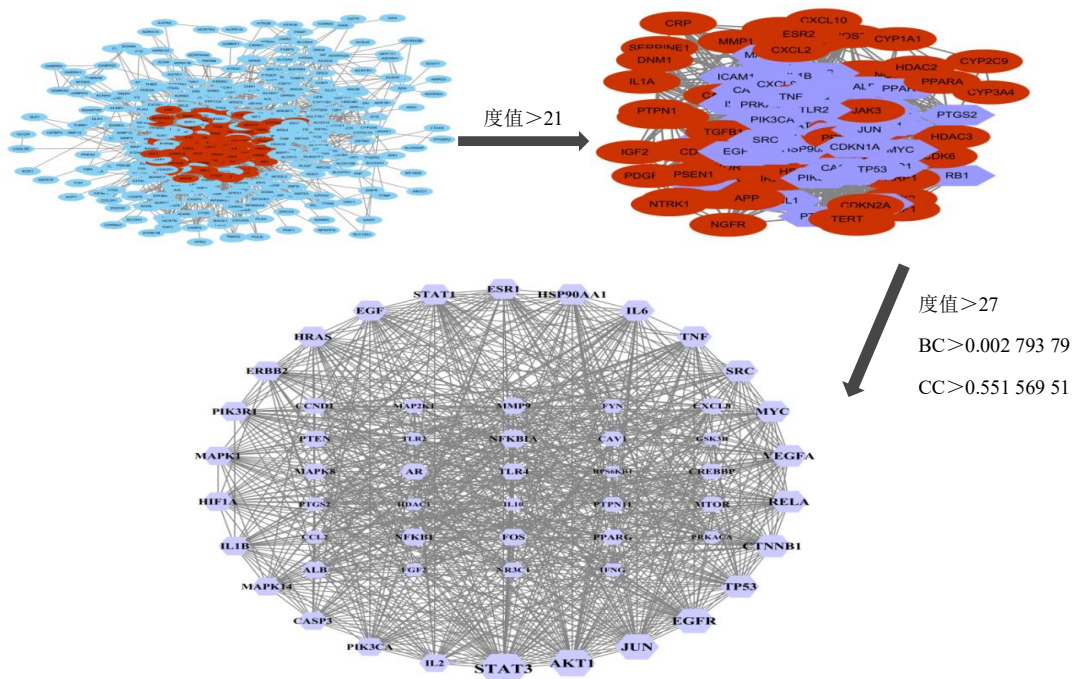


图 1 关键靶点蛋白 PPI 网络筛选图

Fig. 1 PPI network screening map of key target proteins

表3 核心靶点蛋白拓扑参数信息

Table 3 Topological parameter information of core target proteins

序号	蛋白	BC	CC	度值	序号	蛋白	BC	CC	度值
1	STAT3	0.038 205 13	0.947 368 42	51	11	TNF	0.013 254 28	0.729 729 73	34
2	Akt1	0.026 395 36	0.857 142 86	45	12	IL-6	0.012 844 07	0.729 729 73	34
3	JUN	0.026 197 20	0.830 769 23	43	13	HSP90AA1	0.015 546 76	0.729 729 73	34
4	EGFR	0.020 950 66	0.805 970 15	41	14	ESR1	0.009 983 05	0.72	33
5	TP53	0.012 616 80	0.760 563 38	37	15	STAT1	0.013 734 34	0.72	33
6	CTNNB1	0.016 963 08	0.760 563 38	37	16	EGF	0.009 975 97	0.72	33
7	RELA	0.016 293 61	0.75	36	17	HRAS	0.009 565 44	0.72	33
8	VEGFA	0.016 670 83	0.75	36	18	ERBB2	0.010 972 39	0.701 298 70	31
9	MYC	0.011 939 46	0.739 726 03	35	19	PIK3R1	0.011 611 46	0.701 298 70	31
10	SRC	0.010 534 45	0.739 726 03	35	20	MAPK1	0.009 144 18	0.692 307 69	30

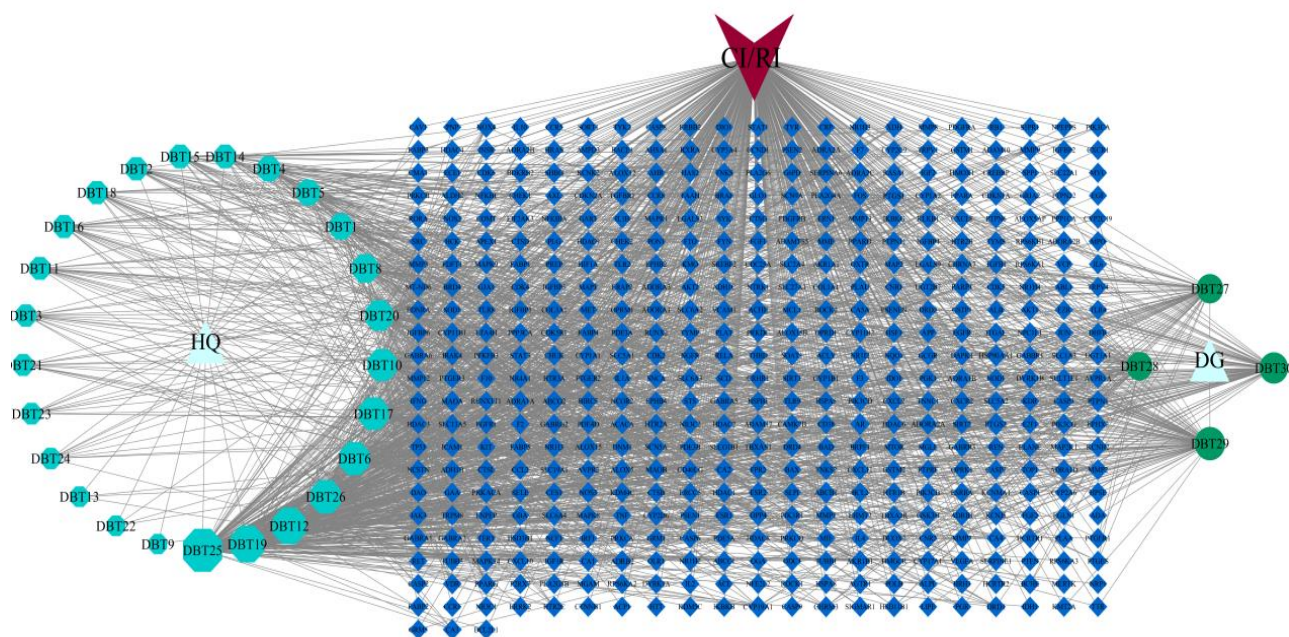


图2 “活性成分-靶点-疾病”网络

Fig. 2 “Active ingredient-target-disease” network

表4 关键活性成分信息

Table 4 Information of key active components

编号	活性成分	度值
DBT25	槲皮素	159
DBT19	毛蕊异黄酮	115
DBT12	芒柄花素	111
DBT29	阿魏酸	92
DBT26	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	91
DBT6	3,9-di-O-methylnisoslin	89
DBT17	黄芪甲苷	86
DBT10	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	81
DBT30	藜本内酯	78
DBT20	山柰酚	71

膜、细胞溶质、细胞质等；MF 主要涉及蛋白质结合、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等。体现

当归补血汤对 CIRI 的治疗是多重作用的结果。

3.5 KEGG 通路分析

KEGG 通路分析结果，经 $P < 0.01$ 筛选后，共得到 229 条通路结果，前 20 名见图 4。包括代谢通路、PI3K/Akt 信号通路、有丝分裂原激活蛋白激酶（mitogen activated protein kinase, MAPK）信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、Ras 信号通路等。其中，抗 CIRI 最相关的通路为 PI3K/Akt 信号通路，且多数核心靶点主要富集于此条通路上。因此以其作为后续动物实验验证通路。

3.6 分子对接验证

分子对接中，对接分数表示活性物质与蛋白质的亲和力和构象的稳定性，如图 5 所示，各成分与蛋白对接的结合能均小于 -21.42 kJ/mol，说明各成

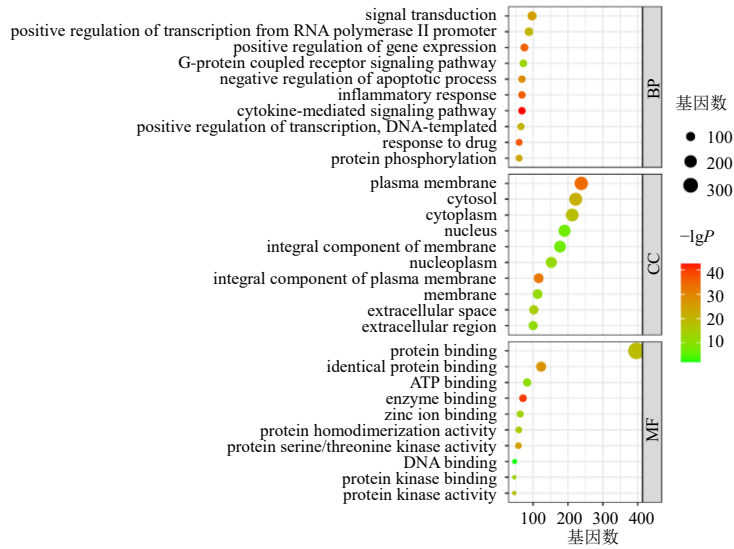


图3 GO功能富集分析

Fig. 3 GO function enrichment analysis

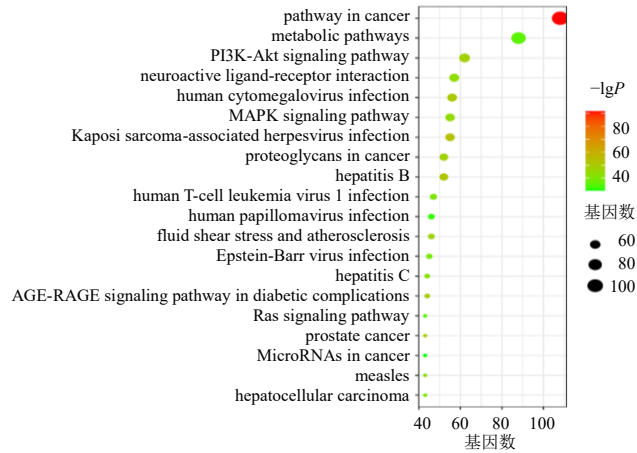


图4 KEGG通路富集分析 (前20)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

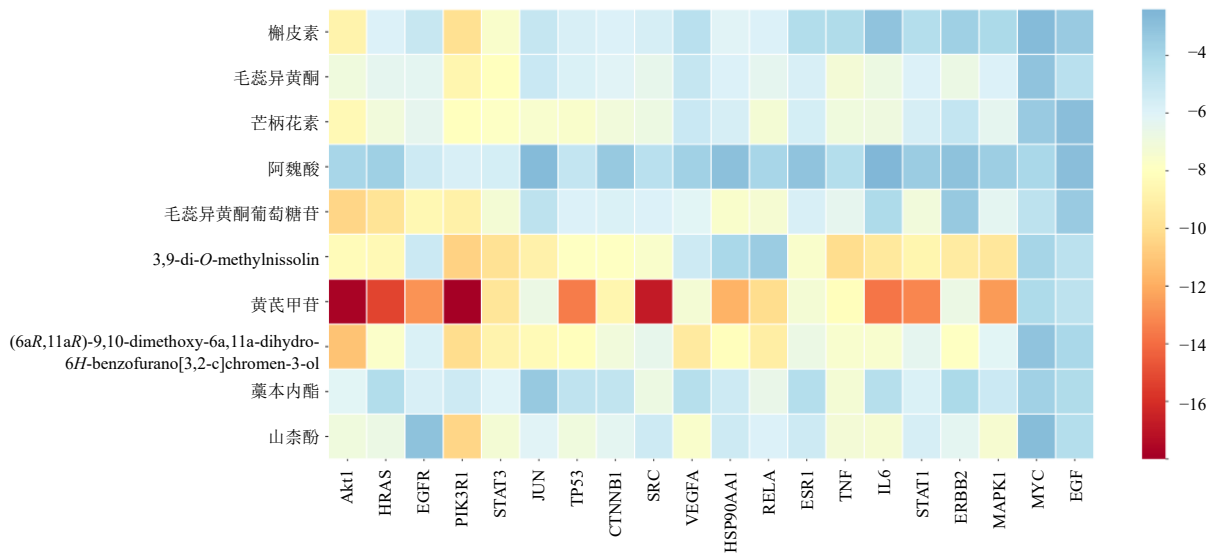


图5 分子对接结果图

Fig. 5 Molecular docking results

分与蛋白均能较好地结合^[30]。此外,使用 PyMoL 软件对部分结果进行结构匹配分析见图 6,成分与靶点之间通过形成氢键等相互作用使结构趋于稳定。

3.7 当归补血汤对 CIRI 大鼠神经功能损伤的影响如表 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠神

经行为学评分显著升高 ($P < 0.001$),神经功能损伤严重。与模型组比较,尼莫地平组和当归补血汤中、高剂量组大鼠神经行为学评分明显降低 ($P < 0.05$),表明当归补血汤可以改善 CIRI 诱导的大鼠神经功能损伤。

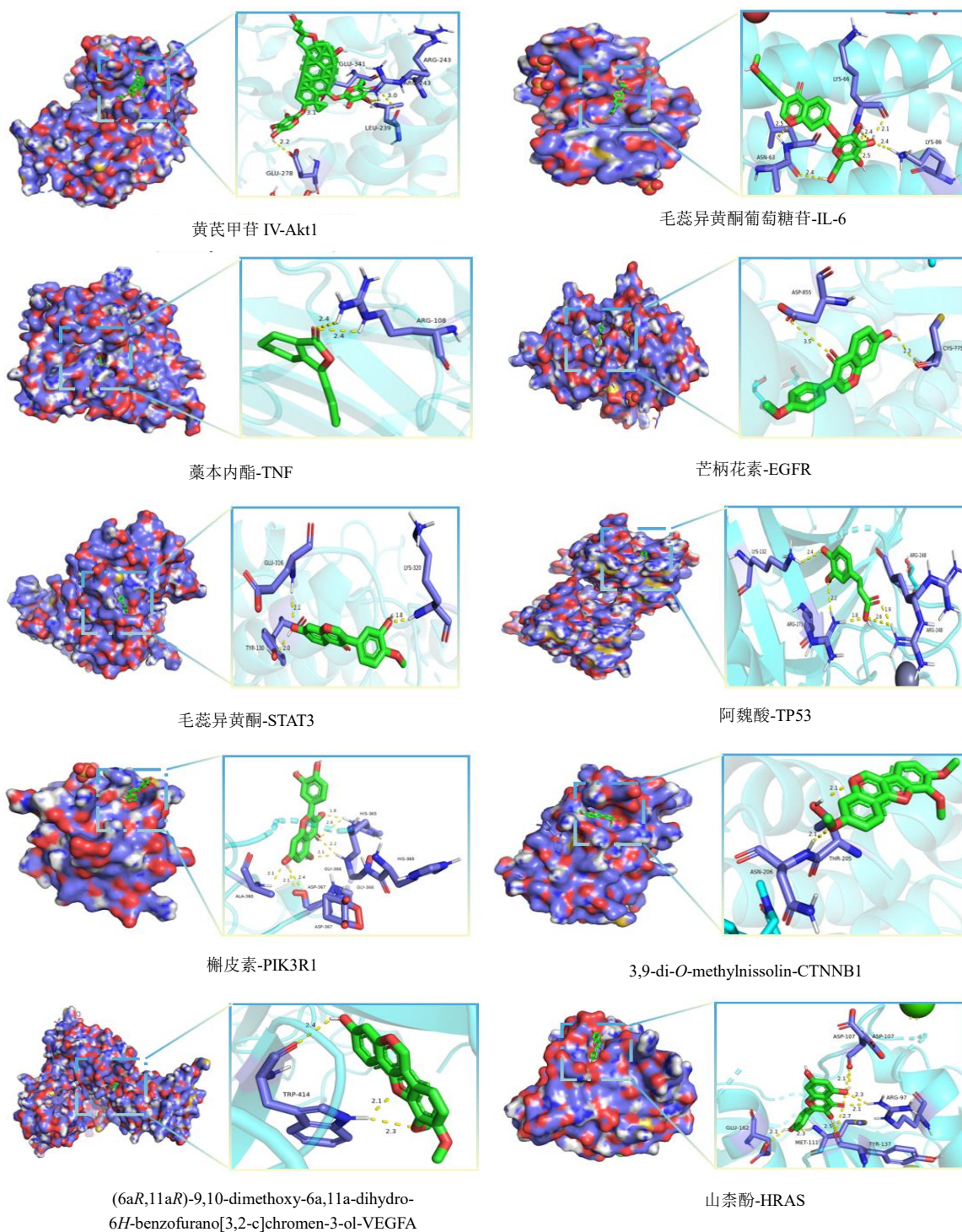


图 6 部分分子对接结果可视化处理

Fig. 6 Visualization processing of partial molecular docking results

表 5 当归补血汤对 CIRI 大鼠神经功能损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Danggui Buxue Decoction on neurological damage in CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经行为学评分
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	3.15±0.94***
尼莫地平	0.032 4	2.30±0.49#
当归补血汤	5.84	2.85±0.72
	11.67	2.31±0.78#
	23.34	2.42±0.90#

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下表同

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below tables



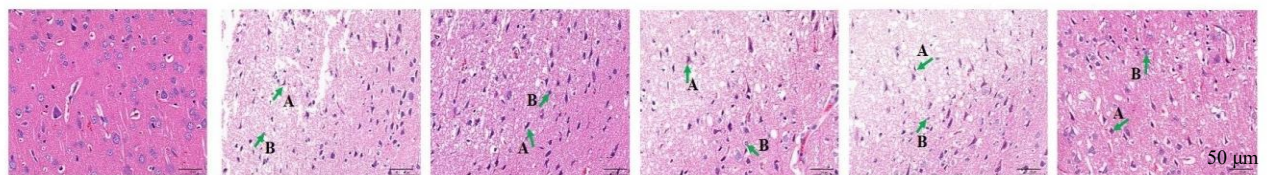
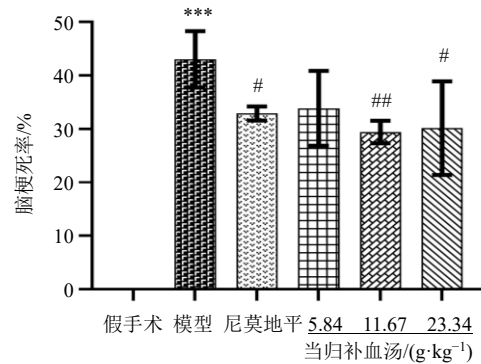
假手术 模型 尼莫地平 5.84 11.67 23.34
当归补血汤/(g·kg⁻¹)

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 7 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Danggui Buxue Decoction on cerebral infarction area of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



假手术 模型 尼莫地平 当归补血汤 5.84 g·kg⁻¹ 当归补血汤 11.67 g·kg⁻¹ 当归补血汤 23.34 g·kg⁻¹

A-神经元坏死 B-胶质细胞
A-neuronal death B-glia cells

图 8 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 8 Effect of Danggui Buxue Decoction on histopathological changes of brain in CIRI rats (HE, ×400)

坏死灶与周围正常组织分界较明显, 坏死中央见神经元坏死, 细胞崩解, 胞质渗出, 细胞核碎裂或溶解消失, 坏死灶中央亦见核小呈圆形的胶质细胞增生, 坏死灶周围神经元变性坏死, 亦见胶质细胞增生。与模型组相比, 各给药组脑组织病理形态学异常均得到改善, 具体表现为皮质区坏死灶有所好转, 少量神经元变性坏死, 见少量胶质细胞增生。

3.8 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑梗死面积的影响

如图 7 所示, 假手术组大鼠脑组织并未观察到脑梗死情况, 而模型组大鼠脑组织出现明显的脑梗死, 脑梗死率高达 (43.76±4.56)%。与模型组比较, 尼莫地平能够明显降低大鼠脑梗死率 ($P < 0.05$); 当归补血汤中、高剂量组脑梗死率明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.9 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织病理形态的影响

如图 8 所示, 假手术组大鼠脑组织软脑膜结构完整, 炎性渗出不明显, 血管丰富; 皮质区神经元细胞形态正常, 无细胞变性坏死、炎性细胞浸润或胶质细胞增生。而模型组脑组织皮质区可见坏死灶,

3.10 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色后, 在荧光显微镜下, 红色荧光为凋亡的细胞, 蓝色荧光为细胞核。如图 9 所示, 模型组可见细胞核收缩、染色质浓缩等典型的凋亡形态学特征; 各给药组凋亡细胞数量均明显减少。定量分析结果见表 6, 与假手术组相比, 模型组细胞

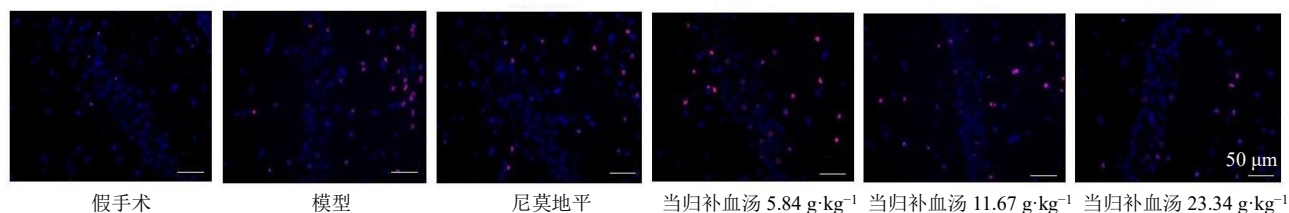


图9 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织细胞凋亡的影响 (×400)

Fig. 9 Effect of Danggui Buxue Decoction on cell apoptosis of brain in CIRI rats (×400)

表6 各组大鼠脑组织细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Cell apoptosis ratio in brain of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凋亡率/%
假手术	—	4.66±0.63
模型	—	28.21±2.68***
尼莫地平	0.032 4	9.71±1.12###
当归补血汤	5.84	25.13±0.95#
	11.67	21.07±0.54##
	23.34	17.40±1.18###

凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

3.11 当归补血汤对 CIRI 大鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平的影响

如表 7 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组大鼠血清中 TNF-α 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 尼莫地平组和当归

表7 当归补血汤对 CIRI 大鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Effect of Danggui Buxue Decoction on levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in serum of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	116.454±21.959	44.155±5.232	20.289±2.615
模型	—	156.976±14.899***	58.239±3.565***	31.521±2.573***
尼莫地平	0.032 4	134.146±16.259#	51.385±5.503#	27.187±3.055#
当归补血汤	5.84	138.390±12.427#	53.230±4.585	29.015±2.949
	11.67	134.040±8.321#	52.452±3.650#	27.555±2.827#
	23.34	131.693±10.102##	52.306±3.480#	27.598±3.207#

补血汤中、高剂量组大鼠血清中 IL-6 和 IL-1β 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.12 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β mRNA 表达的影响

如表 8 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织 TNF-α、IL-6 和 IL-1β mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01, 0.001$)。

表8 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织 IL-6、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of Danggui Buxue Decoction on TNF-α, IL-6 and IL-1β mRNA expressions in brain of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		IL-6	TNF-α	IL-1β
假手术	—	0.996±0.012	1.081±0.071	0.899±0.088
模型	—	7.543±0.319***	7.798±0.659***	6.110±0.086***
尼莫地平	0.032 4	4.669±0.962###	4.284±0.234###	3.236±0.268###
当归补血汤	5.84	5.365±0.323##	5.812±0.091###	4.040±0.327###
	11.67	3.966±0.079###	4.623±0.142###	2.742±0.244###
	23.34	2.540±0.345###	2.458±0.175###	2.361±0.204###

3.13 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织中 Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 10 和表 9 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中 p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织 p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$)。

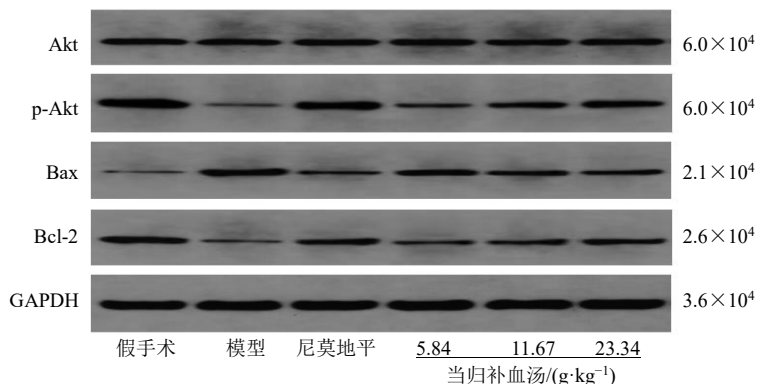


图 10 各组大鼠脑组织 Akt、p-Akt、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的 WB 图

Fig. 10 WB of Akt, p-Akt, Bax and Bcl-2 protein expressions in brain of rats in each group

表 9 当归补血汤对 CIRI 大鼠脑组织 Akt、p-Akt、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of Danggui Buxue Decoction on Akt, p-Akt, Bax and Bcl-2 protein expressions in brain of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
假手术	—	0.680 ± 0.058	0.535 ± 0.036	0.244 ± 0.076	0.753 ± 0.031
模型	—	0.763 ± 0.067*	0.119 ± 0.036***	0.857 ± 0.049***	0.169 ± 0.025***
尼莫地平	0.032 4	0.717 ± 0.042	0.493 ± 0.019###	0.438 ± 0.065###	0.600 ± 0.047###
当归补血汤	5.84	0.731 ± 0.029	0.248 ± 0.041##	0.725 ± 0.053#	0.311 ± 0.093#
	11.67	0.722 ± 0.032	0.325 ± 0.021###	0.565 ± 0.065###	0.432 ± 0.044##
	23.34	0.679 ± 0.046#	0.445 ± 0.022###	0.450 ± 0.061###	0.597 ± 0.029###

4 讨论

缺血性脑卒中常伴有神经功能障碍、脑梗死和病理学可观察到的组织损伤。以上各项指标可作为临床评价脑卒中病情的重要指标，亦可用于实验中药物治疗效果的评价。临床常通过再灌注治疗缺血性脑卒中，但随着脑组织恢复血液供应，将引起更严重的 CIRI。目前，中和炎症反应、增加抗氧化能力被认为是治疗缺血性疾病的有益疗法^[31]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 是与 CIRI 的发生和发展密切相关的代表性促炎细胞因子，是影响炎症反应的关键因素。多项研究表明，TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 可能成为防治 CIRI 的重要靶点^[32-34]。分子对接结果表明，当归补血汤可能主要通过 Akt1、转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53)、TNF 和 IL-6 等核心靶点治疗 CIRI。同时，体内实验结果显示，当归补血汤组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显降低，脑组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达水平显著降低。结合以上指标表明，当归补血汤能够通过减轻神经功能缺损、减少

脑梗死面积、改善脑组织形态学异常、抑制炎症反应等方面发挥抗 CIRI 的作用。

本研究基于网络药理学，构建并分析当归补血汤抗 CIRI 的“活性成分-靶点-疾病”网络图，通过数据库搜索和筛选，获得当归补血汤的 30 种主要活性成分，分子对接研究显示其主要的活性成分与核心靶点均具有较好的结合活性，结合文献表明槲皮素^[35]、芒柄花素^[36]、毛蕊异黄酮^[37]和阿魏酸^[38]等可能是当归补血汤抗 CIRI 的主要药效物质基础。

KEGG 通路富集分析表明，当归补血汤可能通过调控 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路发挥抗 CIRI 的作用。其中，Akt1、JUN、EGFR、TP53、TNF 和 IL-6 等 62 个核心靶点均富集于 PI3K/Akt 信号通路，作为一条关键的抗凋亡信号通路，激活 PI3K/Akt，可使细胞凋亡受到抑制，线粒体功能得以改善，从而改善脑缺血再灌注所致的神经元损伤^[39]。越来越多的证据表明，PI3K/Akt 信号通路在 CIRI 中发挥重要作用^[40-44]。Akt 是一类抗凋亡调节因子，作为 PI3K/Akt 信号通路的核心效应器，当 Akt 磷酸化后可作用于 Bcl-2 蛋白家族，其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 充当线粒体守门人，抑制细胞凋亡^[45]。Bax 蛋白位

于细胞质中,是 Bcl-2 家族中的一员,当细胞发生凋亡时, Bax 可以迁移到线粒体膜中,使细胞色素 C 得到释放,加速细胞凋亡。此外,凋亡是否发生取决于 Bcl-2/Bax 表达,据报道, Bcl-2/Bax 值的降低与凋亡的增加有关^[46]。本研究表明,在模型大鼠脑组织中,细胞凋亡指数显著升高, p-Akt/Akt 和 Bcl-2/Bax 显著降低,而当归补血汤可显著降低细胞凋亡指数,上调 p-Akt/Akt 和 Bcl-2/Bax,表明当归补血汤可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,进一步调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,发挥抗凋亡作用而保护 CIRI,初步验证了网络药理学的预测结果。

秦秀德等^[47]总结张伯礼院士治疗脑卒中的方法,发现其更注重补气养阴、化痰、清热活血。当归补血汤作为益气补血的代表方,方中重用黄芪以大补脾肺、益气生血,再加少许当归滋补血营、阳生阴久、气旺血生^[48],目前已有相关研究对其进行初步证实,研究表明当归补血汤可保护 CIRI 的神经组织^[19-21]。本研究结合网络药理学、分子对接和动物实验,首次对当归补血汤治疗 CIRI 的机制进行研究,明确了当归补血汤多成分、多靶点的协同作用机制。同时,借助改良 Longa 线栓法复制的 CIRI 大鼠模型,证实当归补血汤可以通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制炎症来减少脑组织中细胞的凋亡,从而保护大鼠脑组织。本研究为当归补血汤抗 CIRI 的更深层次研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Goda T, Oyama N, Kitano T, *et al.* Prestroke conditions of acute ischemic stroke patients are associated with functional outcome after mechanical thrombectomy [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(2): 104540.
- [2] Dong Q, Dong Y, Liu L P, *et al.* The Chinese Stroke Association scientific statement: Intravenous thrombolysis in acute ischaemic stroke [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2017, 2(3): 147-159.
- [3] Lin L, Wang X, Yu Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: Mechanisms and potential therapeutic strategies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 5(4): 213.
- [4] Pan J, Konstantin A A, Bateman B, *et al.* Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, MR imaging, and potential therapies [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(2): 93-102.
- [5] Jin R, Liu L, Zhang S H, *et al.* Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(5): 834-851.
- [6] Li P Y, Stetler R A, Leak R K, *et al.* Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 208-217.
- [7] Jiang X Y, Andjelkovic A V, Zhu L, *et al.* Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163/164: 144-171.
- [8] Kalogeris T, Baines C P, Krenz M, *et al.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298: 229-317.
- [9] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 263-275.
- [10] Ma Y Y, Liu Y Q, Zhang Z J, *et al.* Significance of complement system in ischemic stroke: A comprehensive review [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(2): 429-462.
- [11] Han S Y, Hong Z Y, Xie Y H, *et al.* Therapeutic effect of Chinese herbal medicines for post stroke recovery: A traditional and network meta-analysis [J]. *Medicine*, 2017, 96(49): e8830.
- [12] Sun K, Fan J Y, Han J Y. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [13] 于潇, 王贵阳, 侯宇东, 等. 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1471-1484.
- [14] 胡建鹏. 益气活血法对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡 Fas/FasL 信号转导通路及调控的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2004.
- [15] 王永炎. 中医内科学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 124-132.
- [16] Peng T M, Jiang Y Z, Farhan M, *et al.* Anti-inflammatory effects of traditional Chinese medicines on preclinical *in vivo* models of brain ischemia-reperfusion-injury: Prospects for neuroprotective drug discovery and therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 204.
- [17] Zhang B, Saatman K E, Chen L. Therapeutic potential of natural compounds from Chinese medicine in acute and subacute phases of ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 416-424.
- [18] Lin P L, Li Z C, Xie R F, *et al.* Compatibility study of Danggui Buxue Tang on chemical ingredients, angiogenesis and endothelial function [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45111.
- [19] 余晴晴, 柏建峰, 王江军. 当归补血汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血管新生及 Ang-1、Ang-2、VEGF 和 Tie-2 的影响 [J]. *国际医药卫生导报*, 2017, 23(9): 1317-1321.
- [20] 高晓兰, 王强, 陈彦文, 等. 当归补血汤及其加味方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(12): 2885-2887.
- [21] 陆莹, 罗亚非, 范瑞娟. 当归补血汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注血-脑屏障和大脑皮质神经元的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(3): 301-305.

- [22] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, *et al.* Network-based approaches in pharmacology [J]. *Mol Inform*, 2017, 36: 1700048.
- [23] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [24] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [25] Tang Y, Li M, Wang J X, *et al.* CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks [J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67-72.
- [26] Wang C Q, Jiang W, Li W, *et al.* Topological properties of the drug targets regulated by microRNA in human protein-protein interaction network [J]. *J Drug Target*, 2011, 19(5): 354-364.
- [27] Rickels E. Middle cerebral artery occlusion in rats: A neurological and pathological evaluation of a reproducible model [J]. *Neurosurgery*, 1993, 32(3): 479.
- [28] Woodruff T M, Thundyil J, Tang S C, *et al.* Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke [J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1): 11.
- [29] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [30] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [31] Pan Z H, Cui M D, Dai G L, *et al.* Protective effect of anthocyanin on neurovascular unit in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 947.
- [32] Lin S Y, Wang Y Y, Chang C Y, *et al.* TNF- α receptor inhibitor alleviates metabolic and inflammatory changes in a rat model of ischemic stroke [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(6): 851.
- [33] Liu S J, Zhu S Y, Zou Y, *et al.* Knockdown of IL-1 β improves hypoxia-ischemia brain associated with IL-6 up-regulation in cell and animal models [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(2): 743-752.
- [34] Gertz K, Kronenberg G, Kälin R E, *et al.* Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis [J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 6): 1964-1980.
- [35] Ashrafizadeh M, Samarghandian S, Hushmandi K, *et al.* Quercetin in attenuation of ischemic/reperfusion injury: A review [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(4): 537-558.
- [36] Wu Q L, Cheng Y Q, Liu A J, *et al.* Formononetin recovered injured nerve functions by enhancing synaptic plasticity in ischemic stroke rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(1):67-72.
- [37] Hsu C C, Kuo T W, Liu W P, *et al.* Calycosin preserves BDNF/TrkB signaling and reduces post-stroke neurological injury after cerebral ischemia by reducing accumulation of hypertrophic and TNF- α -containing microglia in rats [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(2): 326-339.
- [38] Cheng C Y, Tang N Y, Kao S T, *et al.* Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 anti-apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155748.
- [39] Wang C Y, Wan H Z, Li M, *et al.* Celastrol attenuates ischemia/reperfusion-mediated memory dysfunction by downregulating AK005401/MAP3K12 [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153441.
- [40] Feng C, Wan H F, Zhang Y Y, *et al.* Neuroprotective effect of Danhong Injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by activation of the PI3K-Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 298.
- [41] Yu Y, Jia X J, Zong Q F, *et al.* Remote ischemic postconditioning protects the heart by upregulating ALDH2 expression levels through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 536-542.
- [42] Zhang Y Q, Wang H Y, Li H, *et al.* Gualou Guizhi Granule protects against OGD/R-induced injury by inhibiting cell pyroptosis via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6613572.
- [43] Zhang H Y, Song Y M, Feng C. Improvement of cerebral ischemia/reperfusion injury by daucosterol palmitate-induced neuronal apoptosis inhibition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(6): 1035-1044.
- [44] Liang K, Ye Y, Wang Y, *et al.* Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Neurol Sci*, 2014, 344(1/2): 100-104.
- [45] Wang P P, Zhao M Y, Chen Z H, *et al.* Hydrogen gas attenuates hypoxic-ischemic brain injury via regulation of the MAPK/HO-1/PGC-1 α pathway in neonatal rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6978784.
- [46] Uzdensky A B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(9/10): 687-702.
- [47] 秦秀德, 刘玉, 吴彦青, 等. 张伯礼院士治疗中风恢复期及后遗症期处方统计分析 [J]. *新中医*, 2017, 49(3): 19-21.
- [48] 金·李东垣. 内外伤辨惑论 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 24.

[责任编辑 李亚楠]