

• 药理与临床 •

三七茎叶总皂苷促血管新生抗缺血性脑卒中的作用机制

余慧芳¹, 肖海燕¹, 谢皓辰¹, 刘树森², 刘金羽³, 王 敏^{1*}, 孙桂波^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 探究三七茎叶总皂苷改善缺血性脑卒中、促进缺血性脑卒中损伤后血管新生作用及机制。**方法** 采用网络药理学技术预测三七茎叶总皂苷促进缺血性脑卒中损伤后血管新生可能的机制, 利用分子对接技术对筛选出的核心靶点与主要成分的结合进行初步验证。雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及三七茎叶总皂苷低、中、高剂量 (73、146、292 mg/kg) 组和 3-正丁基苯酞 (3-*n*-butylphthalide, NBP, 60 mg/kg) 组, 每组 20 只。建立大鼠脑中动脉阻塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 模型, 给药 7 d 后取材。每隔 1 d 对大鼠进行神经功能评分; 通过 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察大鼠脑梗死体积及脑神经细胞形态状况; 通过激光多普勒血流仪观察大鼠梗死侧血流恢复情况; 通过光学相干断层扫描血管成像观察大鼠脑微血管新生状况; 通过 ELISA 和 Western blotting 测定与血管新生相关蛋白表达。**结果** 网络药理学分析显示, 共收集到 60 个三七茎叶总皂苷活性成分和 297 个关键靶点, 与血管新生和缺血性脑卒中取交集后得到 64 个交集靶点, 并且三七茎叶总皂苷主要成分与这些核心靶点均有较好结合力。三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的关键通路主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 等通路。动物实验结果显示, 与模型组比较, 三七茎叶总皂苷能够显著降低 MCAO/R 大鼠神经功能评分 ($P < 0.01$), 改善大鼠神经功能, 降低脑梗死体积 ($P < 0.01$ 、 0.001), 减少脑组织损伤, 恢复梗死侧侧脑血流 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 促进梗死侧皮层微血管密度 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提高血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 水平和 HIF-1 α 、PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 三七茎叶总皂苷能够显著改善 MCAO/R 大鼠脑损伤, 有效促进 MCAO/R 大鼠缺血脑区血管新生, 促血管新生机制可能与提高 MCAO/R 大鼠脑中 VEGF、bFGF、HIF-1 α 表达和激活 PI3K/Akt 通路有关。

关键词: 三七茎叶总皂苷; 缺血性脑卒中; 血管新生; 网络药理学; 缺氧诱导因子-1 α ; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 三七皂苷 R₁

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4735-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.011

Mechanism of total saponins in stems and leaves of *Panax notoginseng* on promoting angiogenesis and preventing ischemic stroke

YU Huifang¹, XIAO Haiyan¹, XIE Haochen¹, LIU Shusen², LIU Jinyu³, WANG Min¹, SUN Guibo¹

1. Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of total saponins in stems and leaves of *Panax notoginseng* (PNGL) on improving ischemic stroke and promoting angiogenesis after ischemic stroke injury. **Methods** Network pharmacology was used to

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2022-I2M-2-001); 国家重点研发计划项目 (2023YFD2201802)

作者简介: 余慧芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理研究。E-mail: 13520717936@163.com

*通信作者: 王 敏, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: mwang@implad.ac.cn

孙桂波, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: sunguibo@126.com

predict the possible mechanism of PNGL on promoting angiogenesis after ischemic stroke injury, and molecular docking technology was used to verify the combination of the selected core targets and main components. Male SD rats were randomly divided into sham group, model group, PNGL low-, medium-, high-dose (73, 146, 292 mg/kg) groups and 3-*n*-butylphthalide (NBP, 60 mg/kg) group, with 20 mice in each group. Middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was established in rats, samples were taken after 7 d of administration. Neurological function scoring on rats was performed every two day; 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and hematoxylin-eosin(HE) staining were used to observe the volume of cerebral infarction and the morphology of brain nerve cells in rats; The recovery of cerebral blood flow on the infarcted side of rats was observed using laser Doppler flow meter; Cerebral microvascular neovascularization in rats was observed through optical coherence tomography angiography; The expressions of proteins related to angiogenesis was determined by ELISA and Western blotting. **Results** The network pharmacology analysis showed that a total of 60 active ingredients and 297 key targets of PNGL were collected. After intersection with angiogenesis and ischemic stroke, 64 intersection targets were obtained, and the main components of PNGL had good binding affinity with these core targets. The key pathway of PNGL on promoting angiogenesis and improving ischemic stroke was mainly enriched in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and other pathways. Animal experimental results showed that compared with model group, PNGL could significantly reduce the neurological function score of MCAO/R rats ($P < 0.01$), improve neurological function, reduce cerebral infarction volume ($P < 0.01, 0.001$), reduce brain tissue damage, restore cerebral blood flow on the infarcted side ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), promote microvascular density in the infarcted cerebral cortex ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and increase levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and expressions of HIF-1 α , PI3K and p-Akt/Akt proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** PNGL can significantly improve brain injury in MCAO/R rats, effectively promote angiogenesis in the ischemic brain area of MCAO/R rats, and the mechanism of promoting angiogenesis may be related to the increasing of VEGF, bFGF and HIF-1 α expressions in brain of MCAO/R rats and activation of PI3K/Akt pathway.

Key words: total saponins in stems and leaves of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; ischemic stroke; angiogenesis; network pharmacology; hypoxia inducible factor-1 α ; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rd; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; notoginsenoside R₁

缺血性卒中是由脑血流中断引起的疾病，会导致严重的神经损伤。2019 年全球疾病负担研究系统分析发现，全球卒中是第 2 大死因（占死亡人数的 11.6%），也是致残致死的第 3 大原因（占残疾调整生命年的 5.7%）^[1]。目前，临床上治疗缺血性脑卒中的手段匮乏，只有静脉溶栓治疗和机械性切除血栓^[2]，其中 FDA 唯一批准的静脉溶栓治疗药物只有组织纤溶酶原激活物阿替普酶，然而阿替普酶不仅治疗窗口较窄（卒中发生 4.5 h 内），而且有大出血的风险；机械性血栓切除术并发症多，如脑出血、脑栓塞等，而且临床上成功恢复再灌注的比例只有 27%^[3]。目前针对缺血性脑卒中的药物非常有限，迫切需要新的治疗方法及药物。

血管新生是指从已有的血管生成新的血管结构的过程^[4]。脑血管新生与缺血性脑卒中后的大脑功能恢复密切相关。缺血性卒中促进梗死周围血管新生可有效减少梗死面积，促进神经细胞存活，恢复神经血管网络功能^[5]。大量研究发现促进血管新生能有效改善缺血性脑卒中后神经功能，减少大脑损伤^[6-7]。有研究表明，脑缺血可短暂诱导大脑血管

新生，然而这些新生的血管往往为代偿性血管新生，不足以建立足够丰富的侧支循环以修复神经功能^[8]，因此通过药物干预促进血管新生成为治疗缺血性脑卒中的新策略。

传统中药三七味甘、微苦，性温，具有散瘀止血、消肿止痛的功效，主要以干燥根入药，现代研究发现三七茎叶中具有和根中极为类似的生物活性物质^[9]，而以三七茎叶为主要原料开发的中药 5 类新药七叶通脉胶囊治疗缺血性脑卒中瘀血阻络症已进入 III 期临床^[10]。三七茎叶中含有大量三萜皂苷成分，三七茎叶总皂苷为三七茎叶的主要活性成分，主要含人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁, GRb₁)、人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd, GRd)、人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁, GRg₁)、人参皂苷 Re (ginsenoside Re, GRE)、三七皂苷 R₁ (notoginsenoside R₁, NGR₁) 等^[11]。与临床上治疗缺血性脑卒中药物阿替普酶相比，三七茎叶总皂苷具有活血止血的双向调节的特点，在改善缺血性脑卒中损伤的同时并不会造成出血。课题组前期已证实三七茎叶总皂苷预给药能改善缺血性脑卒中对大脑的损伤，抑制炎症反应，改善缺

血再灌注损伤^[12]；改善脑缺血大鼠代谢紊乱^[13]、减轻脑缺血大鼠线粒体氧化损伤、维持线粒体稳态^[14]等。前期研究均表明三七茎叶总皂苷能恢复脑中动脉阻塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 大鼠梗死脑侧血流量, 推测其与促进脑缺血后血管新生相关, 本研究拟从促进脑血管新生的方面探究三七茎叶总皂苷保护缺血性脑卒中的作用及机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只, 体质量 280~320 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006, 质量合格证号 110011231112867587, 使用许可证号 SYXK (京) 2023-0008。动物实验由中国医学科学院药用植物研究所实验动物中心批准, 审查批号为 SLXD-20230718029。

1.2 药品与试剂

三七茎叶总皂苷 (批号 PCS0841) 购自成都植标化纯生物技术有限公司, 其中 NGR₁ 质量分数为 10.74%、GR_{g1} 质量分数为 43.84%、GR_e 质量分数为 5.18%、GR_{b1} 质量分数为 31.82%、GR_d 质量分数为 8.42%; 3-正丁基苯酐 (3-*n*-butylphthalide, NBP, 批号 1182206134) 购自石家庄恩必普有限公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, 批号 707E032) 购自北京索莱宝科技有限公司; 4% 组织固定液 (批号 BL539A) 购自安徽 Biosharp 公司; 蛋白酶抑制剂 (批号 CW2200S)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (批号 CW2383S)、BCA 定量试剂盒 (批号 CW0014S) 购自康为世纪生物科技股份有限公司; 大鼠碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) ELISA 检测试剂盒 (批号 YJ003037)、大鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) ELISA 检测试剂盒 (批号 YJ064294) 购自 Mibio 公司; 兔缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 抗体 (批号 A17906)、兔抗蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 A17909)、兔抗 p-Akt 抗体 (批号 AP0098)、兔抗 β -actin 抗体 (批号 AC026)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 AS014) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 兔抗磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体 (批号

4249) 购自美国 CST 公司; MCAO 栓线 (批号 2838-A5) 购自北京易科拜德科技有限公司; 4-0 非吸收性外科缝线 (批号 20160702) 购自扬州利源康医疗器械有限公司。

1.3 仪器

Micro-VCC 型血管微循环活体监测系统 (英国 Optoprobe 公司); MoorFLPI-2 型激光多普勒血流监测系统 (英国 Moor 公司); 5430-R 型低温多功能高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); VL0000D0 型多功能微孔型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DYY-5D 型电泳仪电源 (北京六一生物科技有限公司); 552BNGR134574 型电泳槽、CHEMIDOC XBS+凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 三七茎叶总皂苷活性成分及靶基因的收集与筛选 以“三七茎叶”为关键词, 在 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、SymMap 数据库 (<http://www.symmap.org/>)、TCMID 数据库 (<https://bidd.group/TCMID/>)、HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>)、ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/>)、HIT 数据库 (<http://hit2.badd-cao.net/>)、TCMIP 数据库 (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/>) 中检索收集三七茎叶总皂苷的化学成分和作用靶点信息, 检索中国知网、PubMed 等网站三七茎叶总皂苷相关文献补充上述数据库未收录的化学成分和作用靶点信息。删除重复的化学成分, 收录不完整的信息通过化学专业数据库 (<https://organchem.csdb.cn>) 和 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行补充。使用 SwissTargetPrediction 平台 (<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>) 获取三七茎叶总皂苷成分的作用靶点, 整理删除重复靶点后, 通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 获得标准化基因名。

2.1.2 三七茎叶总皂苷、血管新生和缺血性脑卒中交集靶点的获取 将三七茎叶总皂苷活性成分作用相关靶点与促进血管新生、改善缺血性脑卒中潜在靶点取交集获得共同靶点, 作为三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的关键靶点。使用 R 语言的 VennDiagram 软件包^[15]绘制韦恩图可视化展示, 获得三七茎叶总皂苷、血管新生、缺血性脑卒中交集靶点图。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein

interaction, PPI) 网络构建及核心靶点查找 将“2.1.2”项下三七茎叶与疾病交集靶点基因导入 STRING 网站 (<https://cn.string-db.org/>), 选择蛋白种类为“Homo sapiens”, 设置 minimum required interaction score 为 highest confidence (0.400), 并去除游离节点, 在线预测各基因间的相互联系。使用 Cytoscape 3.10.0 软件中的 CytoHubba 插件^[16]对 PPI 网络进行可视化, 然后根据度值大小筛选核心靶点。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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 使用 R 语言的 clusterProfiler 软件包^[17], 对三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的关键靶点基因分别进行 GO 生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC) 分析和 KEGG 信号通路富集分析, 借助 ggplot2 软件包进行可视化处理。

2.1.5 分子对接验证 结合结果并参考现有文献, 选取三七茎叶总皂苷中含量最高和最主要的成分, 从 PubChem 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) 中下载相应的 sdf 格式文件。从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 下载“2.1.3”项下得到的核心靶点的蛋白质晶体结构, 选择分辨率较高 (小于 0.25 nm) 的晶体结构进行对接。将化学成分的结构进行优化处理, 并使用 Open Babel 2.4.1 将其从自然格式转换为 pdbqt 格式。然后, 使用 Autodock Vina 2.0 软件进行分子对接研究。对接过程使用遗传算法进行计算, 所有对接运行选项均为默认设置。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、造模及给药 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 按体质量随机分为假手术组、模型组及三七茎叶总皂苷低、中、高剂量 (73、146、292 mg/kg)^[12] 组和 NBP (60 mg/kg) 组, 每组 20 只。模型组和各给药组均进行 MCAO/R 手术, 并于 2 h 后拔栓线恢复血流供应, 假手术组不结扎血管。三七茎叶总皂苷和 NBP 临用前均用生理盐水溶解, 超声 30 min, 4 °C 避光保存。各给药组 ig 相应药物, 假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。第 1 天记录改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS), 并每隔 1 d 记录 1 次。第 8 天对大鼠进行指标测定和取材。

2.2.2 mNSS 测定 大鼠缺血再灌注后, 测定 mNSS 评定动物神经系统功能^[18]: 正常大鼠为 0 分, mNSS

为 1~6 分为轻度损伤, 7~12 分为中度损伤, 13~18 分为重度损伤。给药第 1、3、5、7 天对大鼠进行 mNSS 测定。评分标准: 前、后肢屈曲各得 1 分; 不能直线行走得 1 分, 向轻瘫侧转圈得 2 分, 向轻瘫侧倾倒得 3 分; 耳廓反射、角膜反射、惊恐反射、肌张力障碍丧失各得 1 分; 放置实验和本体感觉实验各得 1 分; 紧抓平衡木得 1 分, 一肢从平衡木下落得 2 分, 二肢从平衡木下落得 3 分, 在平衡木上持续 40 s 以上、最终跌落得 4 分, 持续 20 s 最终但跌落得 5 分; 最高得分为 18 分。

2.2.3 大脑 TTC 染色 取脑后组织切片, 于 -80 °C 冷冻 6~7 min, 每隔 2 mm 冠状将脑切成 6 片。配制好的 2% TTC 溶液于 37 °C 温箱中预热, 将切好的脑片放入染液中染色 15 min。待脑片被均匀染色后将其取出, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h。将固定好的脑片放在滤纸上用数码相机拍照, 计算缺血区体积比^[8]。

缺血区体积比 = (各切片白色缺血面积之和 × 脑片厚度) / 各切片脑片面积之和

2.2.4 大脑苏木素-伊红 (HE) 染色 脑后组织用 4% 多聚甲醛固定, 常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、脱蜡, 用苏木素染色 6~10 min 后用流动的水冲洗几次, 蒸馏水平衡后用含 1% 盐酸的乙醇进行分色, 反蓝 10 min 后用伊红染色 10 s, 封片。采用 Leica 数字玻片图像扫描及分析系统观察病理形态的改变, 并利用 Image Scope 软件取不同脑区分析。

2.2.5 激光多普勒测定脑血流 将麻醉的大鼠平放, 手术剪剪开大鼠头顶部皮肤, 用蘸有生理盐水的棉球清理头部剪开位置残留的毛发, 将大鼠头部正对着激光多普勒血流仪摄像头下。用 Moor FLPI Review V4.0 软件处理数据, 计算平均血流量。

平均血流量 = 右脑血流量 / 左脑血流量

2.2.6 光学相干断层扫描血管成像技术测定脑血管 将“2.2.5”项下大鼠露出头皮的肌肉和骨膜去除, 置于立体定向架上俯卧位, 头部稳定, 采用牙钻向外侧进行开颅, 用镊子小心取出一块圆形颅骨, 并用直径 5 mm 的圆形透明玻璃罩代替, 使用氰基丙烯酸骨水泥将玻璃罩黏在颅骨开口上。随后, 利用光学相干断层扫描血管成像系统对靶区血管信号进行层析和算法重构, 形成三维空间血管网络。

2.2.7 ELISA 测定大脑皮层 VEGF 和 bFGF 水平 取各组大鼠缺血测皮层脑组织, 置于离心管中, 加

入组织蛋白抽提试剂（组织蛋白提取液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂以 98：1：1 的比例混合）。将脑组织剪碎后放入匀浆机中匀浆 2 min，于冰浴中静置 30 min，4 ℃、14 000 r/min 离心 20 min，小心吸取上清备用。采用 BCA 定量试剂盒测定蛋白浓度，根据试剂盒说明书测定 VEGF 和 bFGF 水平。

2.2.8 Western blotting 测定大脑皮层 HIF-1 α 、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白的表达 按“2.2.7”项下方法提取各组脑组织蛋白，采用 BCA 定量试剂盒测定蛋白浓度，将各样品稀释成 8 mg/mL，再与 Loading buffer 以 4：1 的比例混匀，放入沸水中煮 10 min 使蛋白变性，冷却至室温得蛋白样品。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，封闭后分别加入 HIF-1 α （1：1 000）、PI3K（1：1 000）、p-Akt（1：500）、Akt（1：1 000）、 β -actin（1：100 000）一抗，4 ℃孵育过夜；再加入对应的二抗（1：10 000），常温孵育 2 h。ECL 化学发光后通过蛋白印迹成像系统扫描，用 Image J 软件分析各条带灰度值。

2.2.9 统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用单因素（One-way ANOVA）对多组样本均值进行方差分析，后通过 Tukey 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 三七茎叶总皂苷活性成分及靶基因的收集与筛选

通过各数据库及检索到的三七茎叶总皂苷相关文献，共收集到三七茎叶总皂苷相关化学成分 93 个，去除不规范名称、SwissTargetPrediction 平台无法识别信息的数据后，得到 60 个三七茎叶总皂苷有效成分，并且获得三七茎叶总皂苷有效成分的预测靶标 279 个。

3.2 三七茎叶总皂苷、血管新生和缺血性脑卒中交集靶点的获取和 PPI 网络分析

检索 GeneCards 数据库、PathCards 数据库及 DrugBank 数据库中血管新生、缺血性脑卒中相关靶点，然后去除重复靶点，通过 Uniprot 数据库规范和标准化靶点的基因名，获得血管新生相关的潜在靶点 2 324 个，获得缺血性脑卒中相关的潜在靶点 1 207 个。

采用三七茎叶总皂苷作用相关靶基因、促进血管新生和改善缺血性脑卒中相关靶基因绘制 Venn 图，见图 1，获得三七茎叶总皂苷促进血管新生改

善缺血性脑卒中的关键靶点 64 个。采用三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的共同靶点构建 PPI 网络图，通过 Cytoscape 软件的中 cytoHubba 插件进行拓扑学参数筛选，以度值排序得到三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的 30 个核心靶点，见图 2。

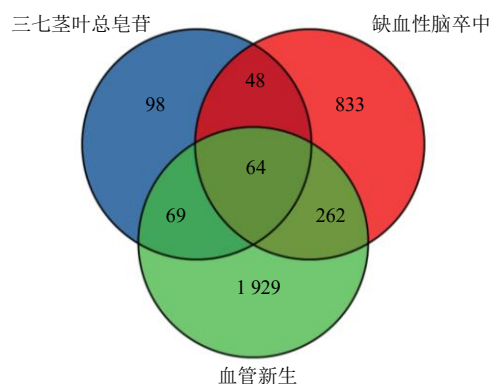


图 1 三七茎叶总皂苷、血管新生、缺血性脑卒中相关共同靶基因 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of common target genes associated with total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng*, angiogenesis and ischemic stroke

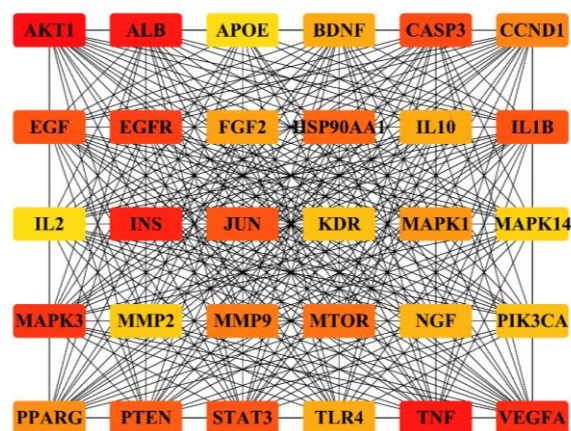


图 2 三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的核心靶点

Fig. 2 Core targets of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* on promoting angiogenesis and improving ischemic stroke

3.3 关键靶点基因 GO 功能及 KEGG 富集分析

在 GO 富集分析结果中，三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中从 BP 方面得到 4 291 个条目，主要富集在激酶活性的正调控（positive regulation of kinase activity）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）级联反应的正调控（positive regulation of MAPK cascade）、蛋

白激酶活性的正调控 (positive regulation of protein kinase activity) 等方面; 在 MF 方面得到 533 个条目, 涉及蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity)、跨膜受体

蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity) 等方面; 在 CC 方面得到 364 个条目, 涉及膜饰板 (membrane raft)、膜微区域 (membrane microdomain)、囊泡腔 (vesicle lumen) 等。各结果按照排序选取前 30 条, 见图 3。

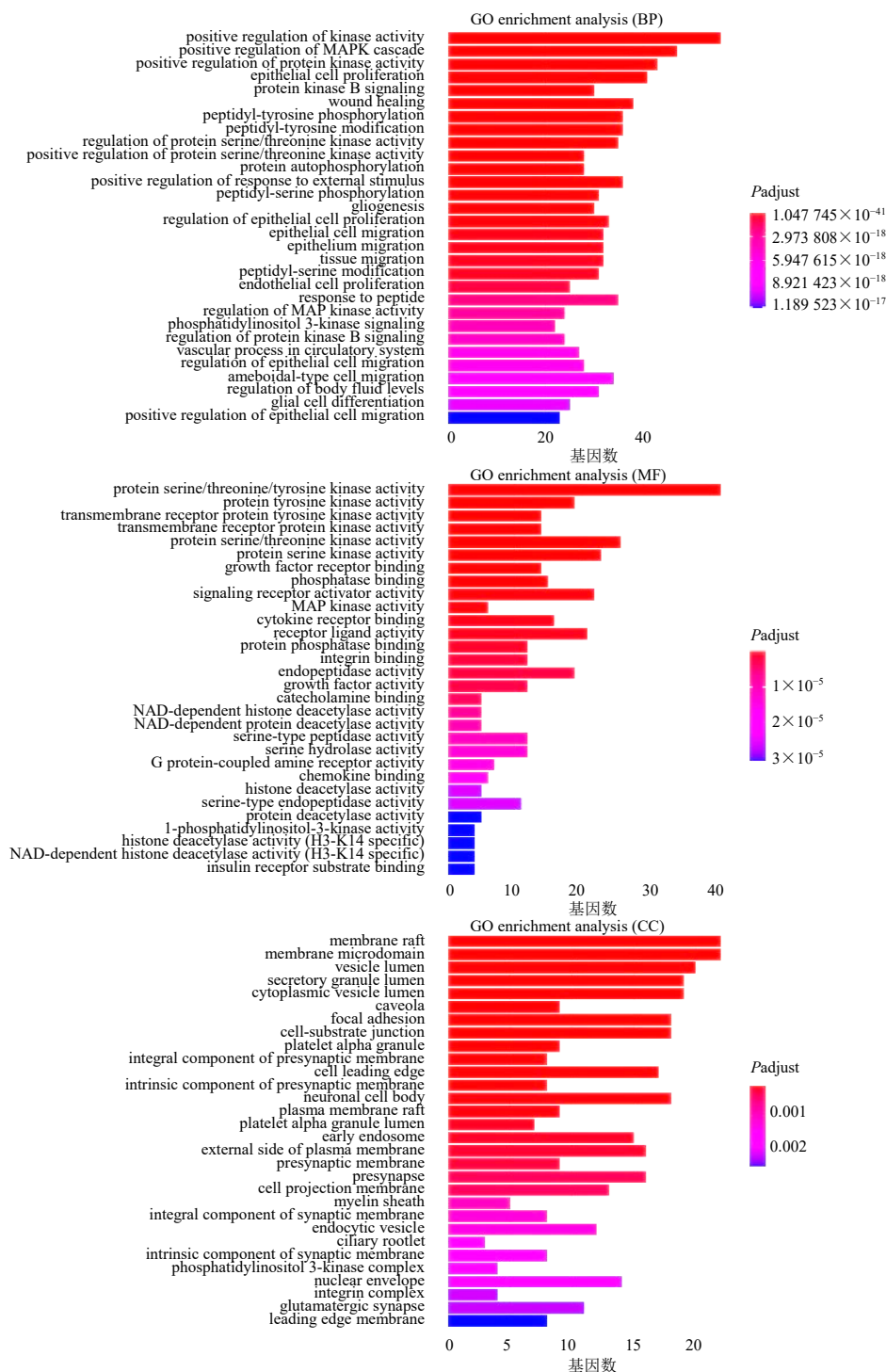


图 3 三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中关键靶点的 GO 富集分析 (前 30)

Fig. 3 GO enrichment analysis of key targets of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* on promoting angiogenesis and improving ischemic stroke (top 30)

对三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的关键靶点基因进行 KEGG 通路分析, 得到 261 条 KEGG 通路; 去除如癌症中的蛋白聚糖 (proteoglycans in cancer)、前列腺癌 (prostate cancer)、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的抗药性 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) 等与三七茎叶总皂苷促进血管新生和改善缺血性脑卒中不相关的通路, 得到三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中的关键通路。排序前 30 的核心通路如图 4 所示。

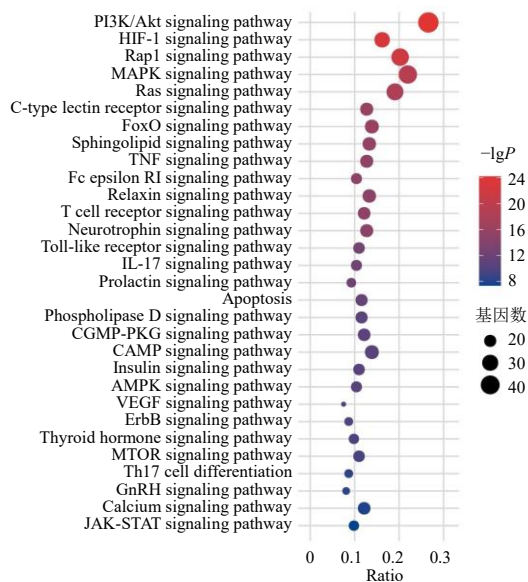


图 4 三七茎叶总皂苷促进血管新生改善缺血性脑卒中关键靶点 KEGG 通路富集分析 (前 30)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of key targets of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* on promoting angiogenesis and improving ischemic stroke (top 30)

3.4 分子对接验证结果

根据文献检索与数据库的整理结果, 结合文献调研^[9,19], 选择三七茎叶中主要皂苷 GRb₁、GRd、GRg₁、GRe、NGR₁ 作为三七茎叶总皂苷关键成分^[20]。结合现有文献与课题组前期研究结果, 选择与血管新生高度相关通路中的靶点 (HIF1A、bFGF、PI3K、AKT1、VEGFA), 采用分子对接技术与三七茎叶总皂苷关键成分的结合情况进行验证。如图 5 所示, GRb₁、GRd、GRg₁、GRe、NGR₁ 与核心靶点亲和力较好, 能自发结合。

3.5 三七茎叶总皂苷改善 MCAO/R 大鼠神经功能

如图 6 所示, 在所有大鼠中模型组大鼠神经功能评分最高, 说明神经损伤最严重; 与模型组比较,

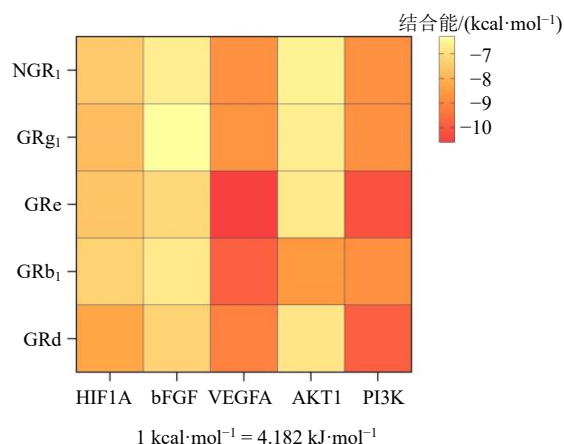
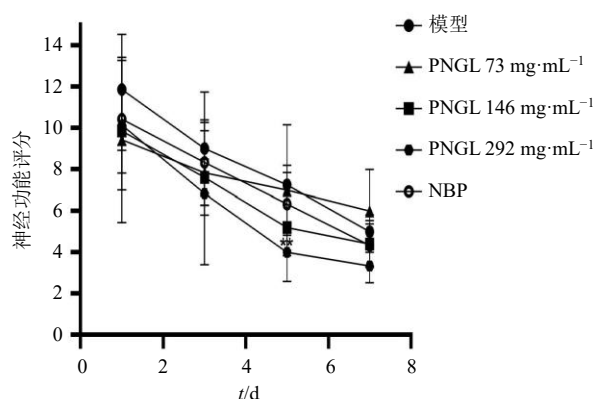


图 5 三七茎叶总皂苷关键成分与核心靶点分子对接热图

Fig. 5 Molecular docking heat map of key components of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* with core targets



PNLG-三七茎叶总皂苷; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。

PNLG-total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng*; ** $P < 0.01$ vs model group.

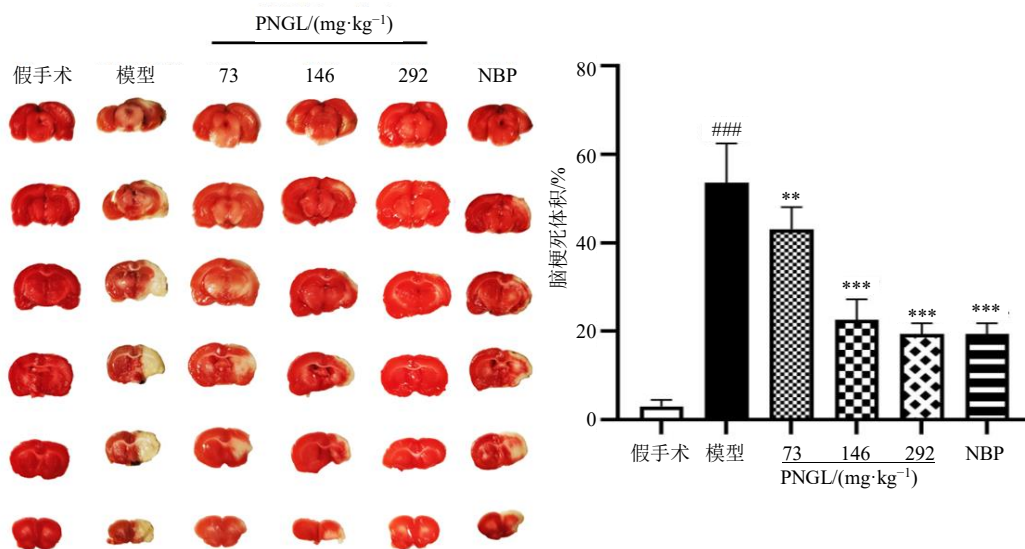
图 6 三七茎叶总皂苷改善大鼠缺血再灌注造成的神经损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 6 Total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* improves nerve injury induced by ischemia reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

各给药组大鼠神经功能评分均有下降趋势, 其中三七茎叶总皂苷高剂量组在第 5 天神经功能评分显著下降 ($P < 0.01$), 说明三七茎叶总皂苷高剂量组在给药第 5 天能够有效改善 MCAO/R 大鼠的神经功能。

3.6 三七茎叶总皂苷降低 MCAO/R 大鼠脑梗死体积

如图 7 所示, 假手术组未见梗死灶, 模型组大鼠有明显梗死灶出现, 缺血核心区和半暗区明显; 与模型组比较, 各给药组均能显著降低大鼠脑梗死体积 ($P < 0.01, 0.001$)。表明三七茎叶总皂苷能够有效减少缺血大鼠脑梗死体积, 减少脑缺血造成的脑损伤。



PNGL-三七茎叶总皂苷; 与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下图同。
PNGL-total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng*; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 7 三七茎叶总皂苷降低 MCAO/R 大鼠脑梗死体积 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* decreases cerebral infarction volume in MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠脑组织病理改变的影响

HE 染色观察各组大鼠皮层及海马 CA1、CA3 区细胞形态的病理性变化, 如图 8 所示, 假手术组细胞形态完全, 细胞核轮廓清晰, 呈明显圆形, 细胞核核仁明显; 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组

织区神经空白间隙变大, 细胞数目明显减少, 核数目减少; 与模型组比较, 三七茎叶总皂苷各给药组脑组织空袭变小, 正常形态细胞数目更多, 细胞排列更加规则, 核固缩现象更少, 胞体空泡化减少。表明三七茎叶总皂苷可以减轻缺血再灌注造成的脑组织损伤。

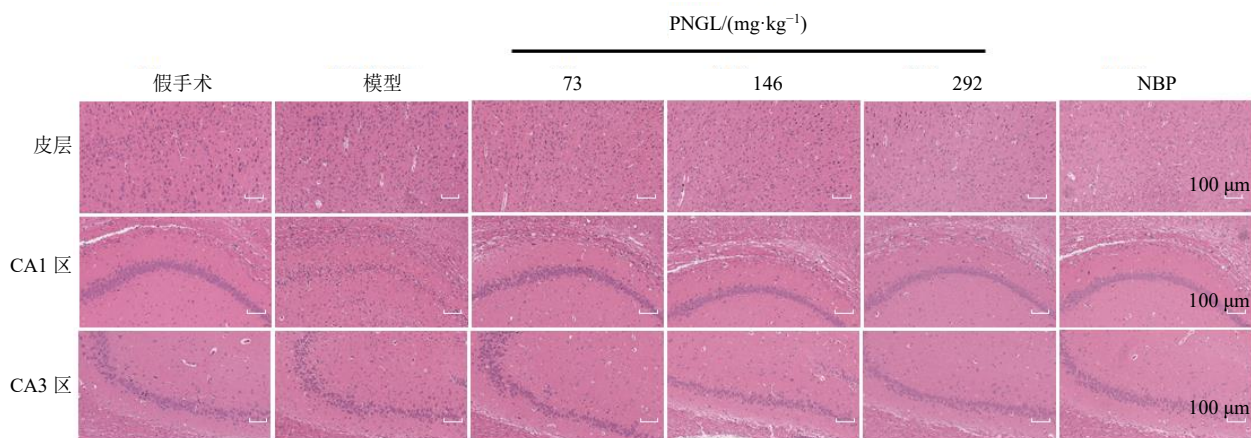


图 8 三七茎叶总皂苷减少 MCAO/R 大鼠脑组织中由缺血引起的病理性变化 (HE, $\times 20$)

Fig. 8 Total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* reduces ischemic pathological changes in brain tissue of MCAO/R rats (HE, $\times 20$)

3.8 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠梗死脑区血流的影响

如图 9 所示, 假手术组左右大脑血流量大致相等, 说明假手术组大鼠脑部无梗死; 与假手术组比

较, 模型组大鼠右脑血流明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组均能显著恢复大鼠右脑血流量 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。表明三七茎叶总皂苷能够显著恢复 MCAO/R 大鼠梗死脑侧血流量。

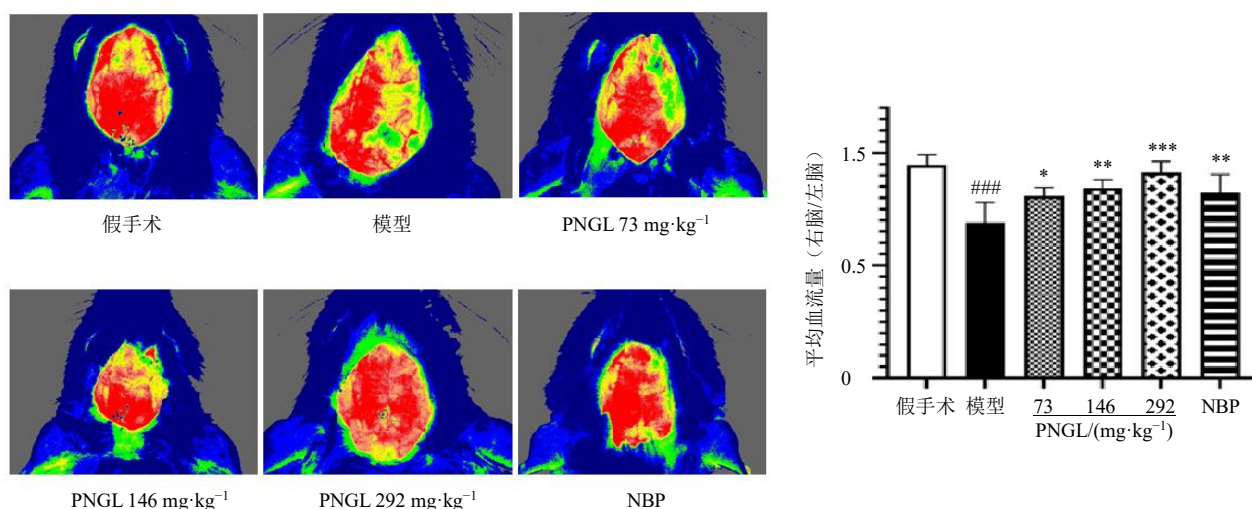


图 9 三七茎叶总皂苷提高 MCAO/R 大鼠脑梗死脑侧血流 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 9 Total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* improves blood flow in infarcted brain area of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

3.9 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠脑梗死脑区脑血管新生的影响

如图 10 所示,与假手术组比较,模型组大鼠大脑小血管明显较少;与模型组比较,各给药组均能增加脑微血管数目。定量分析结果表明,与假手术组比较,模型组血管复杂度指数、血管骨架密度、血管周长指数、血管面积密度均显著降低 ($P <$

0.001),表明模型组大鼠微血管较少;与模型组比较,三七茎叶总皂苷高剂量组能显著降低血管直径指数 ($P < 0.05$),各给药组均能显著升高血管复杂度指数、血管骨架密度、血管周长指数、血管面积密度 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),表明三七茎叶总皂苷能够显著提高 MCAO/R 大鼠缺血侧脑皮层微血管密度,有促进血管新生的作用。

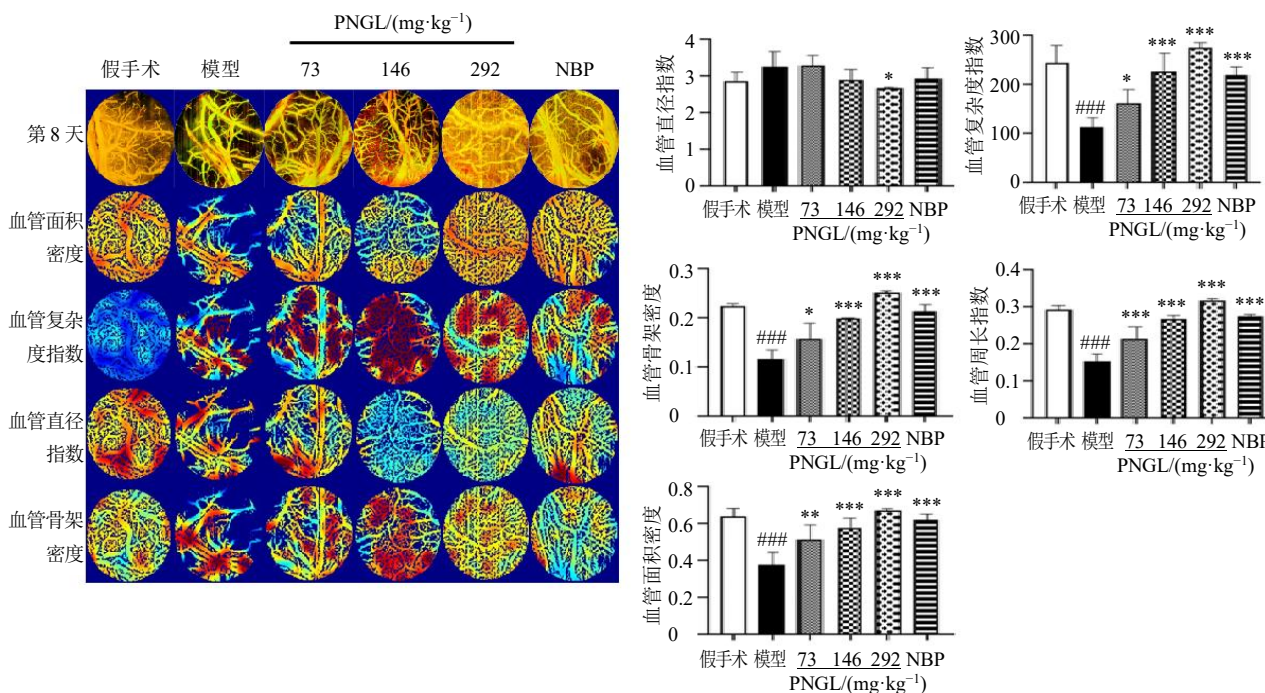
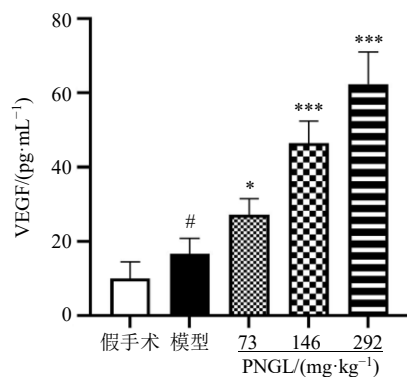


图 10 三七茎叶总皂苷促进 MCAO/R 大鼠大脑血管新生 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 10 Total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* promotes cerebral angiogenesis in MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.10 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠大脑皮层 VEGF、bFGF 水平的影响

如图 11 所示,与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层中 VEGF 和 bFGF 水平均显著升高 ($P < 0.05$),提示大鼠在 MCAO/R 后促血管新生蛋白含量增加;与模型组比较,三七茎叶总皂苷各剂量组大鼠大脑皮层 VEGF 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001),三七茎叶总皂苷中、高剂量组大鼠皮层 bFGF 水平显著升高 ($P < 0.001$),表明在脑缺血损伤后促血管新生蛋白代偿增加的基础上,三七茎叶总皂苷能够进一步能增加促血管新生蛋白含量。



3.11 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠大脑皮层 HIF-1 α 、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达的影响

如图 12 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑侧皮层 HIF-1 α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,三七茎叶总皂苷中、高剂量组 HIF-1 α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$),三七茎叶总皂苷各剂量组 PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。提示在脑缺血损伤后促血管新生相关蛋白表达升高的基础上,三七茎叶总皂苷能够进一步提高促血管

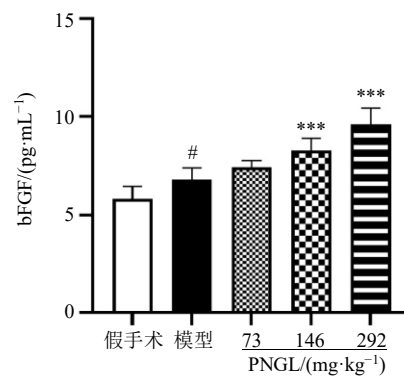


图 11 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠梗死侧皮层 VEGF、bFGF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 11 Effect of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* on levels of VEGF and bFGF in infarcted cerebral cortex of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

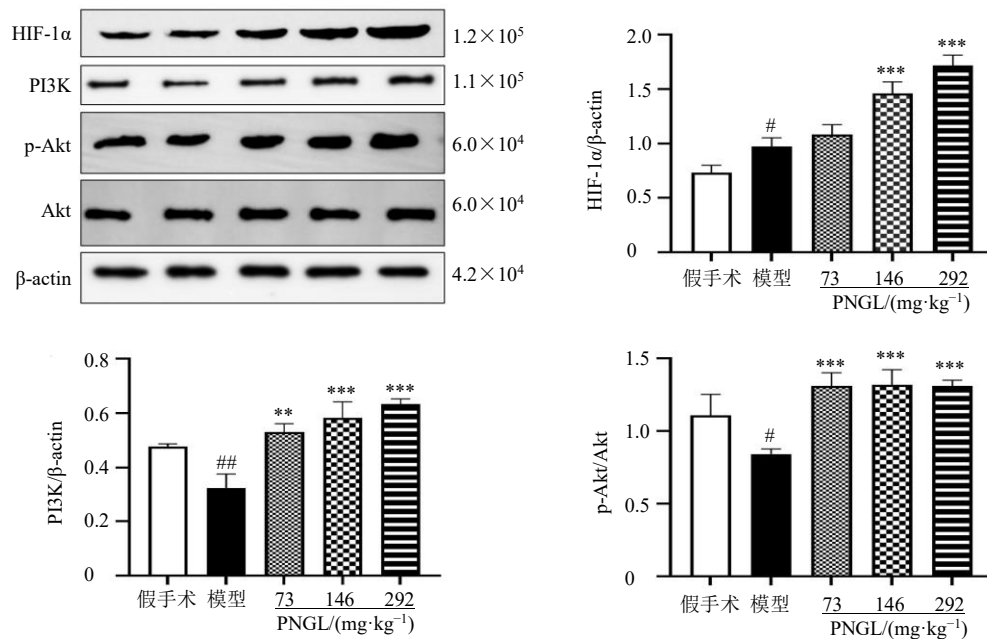


图 12 三七茎叶总皂苷对 MCAO/R 大鼠梗死侧皮层 HIF-1 α 、PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of total saponins in stems and leaves of *P. notoginseng* on expressions of HIF-1 α , PI3K, p-Akt/Akt proteins in infarcted cerebral cortex of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

新生蛋白 HIF-1 α 、PI3K 表达, 提高 Akt 蛋白磷酸化水平。

4 讨论

中医学认为缺血性脑卒中主要病机为瘀血阻滞、脑络不通, 而三七能活血化痰, 因而以三七为原料开发出多种主治脑络瘀阻的中成药, 如血栓通胶囊、血塞通胶囊和三七通舒胶囊等。近年来三七茎叶总皂苷抗缺血性脑卒中损伤作用已有报道。Xie 等^[21]发现预防性给药三七茎叶总皂苷能通过减少 MCAO/R 大鼠线粒体氧化损伤、抑制高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein box 1, HMGB1) 诱导的炎症^[12]发挥抗脑缺血作用。本研究发现三七茎叶总皂苷治疗性给药 7 d 能够有效改善 MCAO/R 大鼠脑损伤, 改善其神经功能, 减少脑梗死体积, 改善缺血后脑组织病理学变化, 恢复梗死脑侧血流量, 促进梗死脑侧大脑皮层微血管新生, 表明三七茎叶总皂苷治疗性给药 7 d 能够发挥抗脑缺血损伤作用。

大量研究表明促进脑梗死周围、血管新生对改善缺血性脑卒中损伤具有重要意义^[22-25], 能够重建侧支循环以修复神经功能。血管新生是一个复杂的生理、病理过程, 大量生长因子、细胞因子和血管生成介质均参与了此过程的调控。在脑缺氧后, 转录因子 HIF-1 α 能稳定存在, 易位到细胞核中与 HIF-1 β 形成二聚体复合物后与 DNA 作用, 从而激活靶基因的表达^[26], 如上调 VEGF、bFGF, 调节 PI3K/Akt 通路等^[27]。VEGF 是最重要的血管生成调节因子之一, 遗传研究表明在神经上皮中 VEGF 表达缺失将导致神经上皮细胞周围内皮细胞迁移停滞、血管生成的失败^[28]。bFGF 是 FGF 家族中最有效的促血管生成因子, 能刺激血管生成的相关过程^[29]。目前三七茎叶总皂苷及其主要成分的促进血管新生作用已有报道。三七茎叶中主要成分为原人参二醇型皂苷^[9], 研究发现 20(S)-原人参二醇型皂苷能通过激活 p70S6 激酶促进 HIF-1 α 介导的 VEGF 分泌, 从而促进糖尿病小鼠血管新生和伤口愈合^[30]。三七茎叶中主要成分之一 NGR₁ 能够通过 VEGF/血管内皮生长因子受体和 PI3K/Akt 通路促进血管新生^[31]。本研究结果显示, 三七茎叶总皂苷治疗性给药 7 d 能够显著提高 MCAO/R 大鼠脑中 HIF-1 α 、VEGF 和 bFGF 的含量, 激活 PI3K/Akt 通路。表明三七茎叶总皂苷治疗性给药 7 d 促进血管新生作用或与 HIF-1 α 介导的 VEGF、bFGF 分泌和 PI3K/Akt 通路的激活有关。

综上, 本研究发现三七茎叶总皂苷治疗性给药

能显著改善 MCAO/R 大鼠脑损伤, 促进缺血性脑卒中脑血管新生, 其机制可能与通过 HIF-1 α 介导的 VEGF、bFGF 分泌和 PI3K/Akt 通路激活有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kisa A, Kisa S, Collaborators G S. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.
- [2] Qin C, Yang S, Chu Y H, *et al.* Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 215.
- [3] Renú A, Millán M, San Román L, *et al.* Effect of intra-arterial alteplase vs placebo following successful thrombectomy on functional outcomes in patients with large vessel occlusion acute ischemic stroke: The choice randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2022, 327(9): 826-835.
- [4] Liu Z L, Chen H H, Zheng L L, *et al.* Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 198.
- [5] Manoonkitiwongsa P S, Jackson-Friedman C, McMillan P J, *et al.* Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: The clean-up hypothesis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(10): 1223-1231.
- [6] Dai M J, Gui X X, Jia S M, *et al.* DL-3-n-butylphthalide promotes angiogenesis in ischemic stroke mice through upregulating autocrine and paracrine sonic hedgehog [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2404-2417.
- [7] Xu S C, Yang J H, Wan H T, *et al.* Combination of *Radix astragali* and safflower promotes angiogenesis in rats with ischemic stroke via silencing PTGS2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2126.
- [8] 朱婷. 三七皂苷 R₁ 对缺血性脑卒中的神经修复作用及分子机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.
- [9] Gao M Y, Cao X N, Wei S J, *et al.* Quantitative comparison and chemical profile of different botanical parts of *Panax notoginseng* from different regions [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 841541.
- [10] 郑晓娇, 丁涛, 刘博, 等. 七叶通脉胶囊对大鼠脑缺血再灌注模型的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(6): 1055-1058.
- [11] 魏均娴, 唐宝书, 王菊芳, 等. 三七叶皂甙成分的研究 [J]. 华西药学杂志, 1986, 1(1): 7-10.
- [12] Xie W J, Zhu T, Dong X, *et al.* HMGB1-triggered inflammation inhibition of notoginseng leaf triterpenes

- against cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 512.
- [13] Wang L, Zhu T, Xu H B, *et al.* Effects of notoginseng leaf triterpenes on small molecule metabolism after cerebral ischemia/reperfusion injury assessed using MALDI-MS imaging [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(3): 246.
- [14] Xie W J, Zhu T, Zhou P, *et al.* Notoginseng leaf triterpenes ameliorates OGD/R-induced neuronal injury via SIRT1/2/3-Foxo3a-MnSOD/PGC-1 α signaling pathways mediated by the NAMPT-NAD pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7308386.
- [15] Chen H B, Boutros P C. VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 35.
- [16] Chin C H, Chen S H, Wu H H, *et al.* cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4): S11.
- [17] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [18] Chen J, Sanberg P R, Li Y, *et al.* Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682-2688.
- [19] Chen Y G, Zhan E Y, Chen H F, *et al.* Saponins with low sugar chain from the leaves of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen [J]. *J Chin Med Mater*, 2002, 25(3): 176-178.
- [20] Li X, Liu J, Zuo T T, *et al.* Advances and challenges in ginseng research from 2011 to 2020: The phytochemistry, quality control, metabolism, and biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2022, 39(4): 875-909.
- [21] Xie W J, Zhu T, Zhou P, *et al.* Notoginseng leaf triterpenes ameliorates mitochondrial oxidative injury via the NAMPT-SIRT1/2/3 signaling pathways in cerebral ischemic model rats [J]. *J Ginseng Res*, 2023, 47(2): 199-209.
- [22] 薛子卓, 姚宇晴, 张燕欣, 等. 中成药和经典名方治疗脑水肿的药理及临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(8): 1794-1801.
- [23] 王哲义, 孙怿泽, 邓欣祺, 等. 丹参酮类脂溶性成分及其干预缺血性脑卒中机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1181-1190.
- [24] Tian D S, Qin C, Zhou L Q, *et al.* FSAP aggravated endothelial dysfunction and neurological deficits in acute ischemic stroke due to large vessel occlusion [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 6.
- [25] Zhang J H, Badaut J, Tang J P, *et al.* The vascular neural network: A new paradigm in stroke pathophysiology [J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(12): 711-716.
- [26] Semenza G L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Physiology*, 2009, 24: 97-106.
- [27] Cheng Y L, Park J S, Manzanero S, *et al.* Evidence that collaboration between HIF-1 α and Notch-1 promotes neuronal cell death in ischemic stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 286-295.
- [28] Raab S, Beck H, Gaumann A, *et al.* Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91(3): 595-605.
- [29] Sieber C C, Sumanovski L T, Stumm M, *et al.* *In vivo* angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: Role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide [J]. *J Hepatol*, 2001, 34(5): 644-650.
- [30] Zhang E Y, Gao B, Shi H L, *et al.* 20(S)-Protopanaxadiol enhances angiogenesis via HIF-1 α -mediated VEGF secretion by activating p70S6 kinase and benefits wound healing in genetically diabetic mice [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(10): e387.
- [31] Yang B R, Hong S J, Lee S M, *et al.* Pro-angiogenic activity of notoginsenoside R₁ in human umbilical vein endothelial cells *in vitro* and in a chemical-induced blood vessel loss model of zebrafish *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(6): 420-429.

[责任编辑 李亚楠]