

整合网络药理学和代谢组学探讨补阳还五汤改善大鼠脑缺血再灌注损伤后肠道黏膜屏障损伤的作用机制

周慧睿¹, 董晓茜², 刘怡彤², 阮琳², 姜晓琳¹, 刘禹岐^{2*}, 郝欧^{2*}

1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

2. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁 沈阳 110034

摘要:目的 探讨补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWT)对大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)后肠道黏膜屏障损伤的保护作用及机制。方法 采用网络药理学筛选 BYHWT 治疗 CIRI 后肠道黏膜损伤的靶点, 并进行富集分析。采用改良的 Zea-Longa 线栓法制备大鼠 CIRI 模型, 随机分为模型组和 BYHWT 低、中、高剂量(1.29、2.57、5.14 g/kg)组, 每组 6 只, 另取假手术组大鼠 6 只。连续给药 5 d 后, 测定神经功能缺损评分和脑梗死面积; 采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、TUNEL 染色及电镜观察结肠组织病理、细胞凋亡及超微结构变化; 免疫组化和 Western blotting 检测结肠组织闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)蛋白表达; 非靶向代谢组学分析肠道内容物, 联合网络药理学构建“代谢物-反应-酶-基因”网络, 并利用分子对接、ELISA 及 Western blotting 验证关键靶点。结果 网络药理学获得 BYHWT 治疗 CIRI 后肠道黏膜损伤的 22 个核心靶点, 涉及脂质代谢、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等通路。与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能损伤加重($P < 0.001$), 脑梗死面积增加($P < 0.05$), 结肠黏膜结构破坏, Occludin 与 ZO-1 表达降低($P < 0.01$), 细胞凋亡增加($P < 0.05$); 与模型组比较, BYHWT 显著改善以上指标($P < 0.05$ 、 0.01)。代谢组学发现 9 个差异代谢物回调, 主要富集于类固醇激素、胆汁酸和花生四烯酸代谢途径。代谢组学与网络药理学整合分析提示 BYHWT 通过调控花生四烯酸/二高- γ -亚麻酸-前列腺素代谢通路发挥作用。分子对接显示前列腺素 E₁(prostaglandin E₁, PGE₁)与前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)结合良好, BYHWT 干预后大鼠结肠组织中 PGE₁水平显著升高($P < 0.05$), PTGS2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 BYHWT 可能通过调节花生四烯酸/二高- γ -亚麻酸-PTGS2-前列腺素代谢网络, 改善 CIRI 后肠道黏膜屏障损伤。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血再灌注损伤; 肠道黏膜; 代谢组学; 网络药理学; 黄芪甲苷; 羟基红花黄色素 A; 阿魏酸; 芍药苷; PTGS2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)09-3458-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.017

Mechanism of Buyang Huanwu Decoction in ameliorating intestinal mucosal barrier injury after cerebral ischemia-reperfusion in rats integrating network pharmacology and metabolomics

ZHOU Huirui¹, DONG Xiaoqian², LIU Yitong², RUAN Lin², JIANG Xiaolin¹, LIU Yuqi², XI Ou²

1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤, BYHWT) on intestinal mucosal barrier injury following cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats. **Methods** Network pharmacology was employed to screen potential targets of BYHWT for treating intestinal mucosal injury post-CIRI, followed by enrichment analysis. The improved Zea Longa suture method was used to prepare a rat CIRI model, which was randomly divided into model group and BYHWT

收稿日期: 2025-11-14

基金项目: 辽宁省科技计划联合计划项目(2024-MSLH-247)

作者简介: 周慧睿, 硕士研究生, 从事中医药防治脑血管病研究。E-mail: 2328265264@qq.com

*通信作者: 刘禹岐, 副主任中医师, 从事中医药防治脑血管病研究。E-mail: 731380787@qq.com

郝欧, 博士, 副主任中医师, 从事中医药防治脑血管病研究。E-mail: 114885566@qq.com

low-, medium-, and high-dose (1.29, 2.57, 5.14 g/kg) groups, with six rats in each group, and six rats in sham group. After continuous administration for 5 d, the neurological deficit score and cerebral infarction area were measured. Hematoxylin-eosin (HE), TUNEL staining and electron microscopy were used to observe the pathological, apoptotic and ultrastructural changes of colon tissue. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the protein expressions of Occludin and zonula occludin-1 (ZO-1) in colon tissue. Non-targeted metabolomics was performed on intestinal contents, and the results were integrated with network pharmacology to construct a “metabolite-reaction-enzyme-gene” network. Key pathways were validated using molecular docking, ELISA and Western blotting. **Results** Network pharmacology identified 22 core targets of BYHWT for treating post-CIRI intestinal mucosal injury, involving pathways such as lipid metabolism and mitogen activated protein kinase (MAPK). Compared with sham group, model group showed aggravated neurological damage ($P < 0.001$), increased cerebral infarction area ($P < 0.05$), disrupted colon mucosal structure, decreased expressions of Occludin and ZO-1 ($P < 0.01$), and increased cell apoptosis ($P < 0.05$). Compared with model group, BYHWT significantly improved the above indicators ($P < 0.05, 0.01$). Metabolomics discovered nine differential metabolite downregulation pathways, mainly enriched in steroid hormones, bile acids and arachidonic acid metabolism pathways. The integrated analysis of metabolomics and network pharmacology suggested that BYHWT exerted its effect by regulating arachidonic acid/dihydro- γ -linolenic acid prostaglandin metabolic pathway. Molecular docking showed that prostaglandin E₁ (PGE₁) bind well to prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2). After BYHWT intervention, the level of PGE₁ in colon tissue was significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of PTGS2 protein was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** BYHWT may alleviate intestinal mucosal barrier injury following CIRI by modulating arachidonic acid/dihomo- γ -linolenic acid-PTGS2-prostaglandin metabolic network.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; cerebral ischemia reperfusion injury; intestinal mucosa; metabolomics; network pharmacology; astragaloside IV; hydroxysafflor yellow A; ferulic acid; paeoniflorin; PTGS2

脑卒中是一种急性神经系统疾病, 脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 为其主要诱因, 可导致局灶性或弥漫性神经功能缺损^[1]。流行病学研究显示, 脑卒中是全球第 2 大死因, 也是导致残疾的第 3 大原因, 目前全球有超过 1 亿脑卒中患者^[2]。在我国, 脑卒中的负担也在逐年增加, 据统计目前中国脑卒中患病人数超过 2 800 万人, 已成为过早死亡和疾病负担的主要原因^[3]。脑卒中后常见的并发症如肺炎和深静脉血栓等, 皆可导致发病率及死亡率的增加。但胃肠并发症方面则关注较少, 有研究表明 50% 的脑卒中患者可能出现胃肠并发症, 且胃肠并发症还可能导致住院时间延长、预后不佳甚至死亡^[4]。现代研究还证实, 脑缺血发生后, 肠道黏膜是首当其冲的受损器官, 表现为肠黏膜屏障功能破坏及应激性溃疡形成, 这种病理改变可能进一步引发致病菌易位传播、心肺继发性细菌感染, 并伴随全身微循环障碍、系统性炎症反应失控及血管内皮损伤等连锁反应^[5]。中医提出胃肠功能失调可通过气机逆乱、浊气上蒙清窍或气血生化不足致脑失所养, 从而与卒中的发病机制相关联, 体现出脑与肠在病理及生理方面皆紧密相关^[6]。

补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BYHWT) 出自王清任的《医林改错》, 方中重用黄芪以补气, 加之活血药以达益气通络、活血祛瘀之

功效。此方切合卒中病本虚标实之证的核心病机-气虚血瘀互结^[7]。现代药理学研究表明, BYHWT 主要成分可能从抗炎、抗凋亡、促进血管生成等多方面治疗脑卒中^[8], 在脑肠轴方面近些年广受关注, 但关于缺血性脑卒中引发肠道黏膜损伤尚缺乏研究。本研究旨在探讨 BYHWT 对 CIRI 损伤后肠道黏膜屏障的保护作用, 为临床治疗脑源性肠损伤以及远程器官的继发性损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 (300±20) g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物饲养于辽宁中医药大学附属第二医院实验动物中心, 许可证号 SYXK (辽) 2023-0004。动物实验经辽宁中医药大学附属第二医院动物伦理委员会批准 (批准号 LZYY241108)

1.2 药材

黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花 (批号分别为 240301、240401、240401、240201、240401、240601、240601) 均购自亳州三峰中药饮片有限公司, 经辽宁中医药大学附属第二医院中药局周半子副教授鉴定分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科植物当

归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子及菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 均符合《中国药典》2025年版规定。

1.3 药品与试剂

2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液、凋亡检测试剂盒、DAB 显色试剂盒、电镜固定液 (批号分别为 G1017、G1005、G1507、G1212、G1102) 购自武汉赛维尔生物有限公司; 紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1)、闭合蛋白 (Occludin)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号分别为 21773-1-AP、66378-1-Ig、66351-1-Ig、60004-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; LC-MS 级甲醇、乙腈购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 2-氯-L-苯丙氨酸购自上海 Aladdin 公司; LC-MS 级甲酸购自上海 TCI 公司; 甲酸铵购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 前列腺素 E₁ (prostaglandin E₁, PGE₁) ELISA 试剂盒 (批号 ml002867) 购自上海酶联生物科技有限公司。

1.4 仪器

H1850-R 型高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); BE-2600 型涡旋振荡器 (江苏其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-800DE 型超声波清洗器 (昆山舒美实验仪器有限公司); MB-96 型组织研磨仪 (浙江美壁实验仪器有限公司); Vanquish 型液相色谱仪、Q Exactive Focus 型质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BVE-4 型垂直电泳仪、SPW-DSE 型电泳电源、SCG-W2000 型化学发光成像系统 (武汉赛维尔生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 补阳还五汤的化学成分收集及靶点预测 利用 TCMSP 数据库 (<https://www.91tcmsp.com/#/database>), 以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为标准筛选黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、桃仁、

红花的活性成分。对于未检索到活性成分的药物, 通过检索 CNKI (www.cnki.net) 和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库收集其有效成分, 检索活性成分的规范 SMILES 结构和化学结构式。将所有候选成分导入 SwissADME 平台 (<http://www.swissadme.ch/index.php>), 依据胃肠道吸收 (GI absorption) 为 “High”、血脑屏障透过性 (BBB permeant) 为 “High” 且符合 Lipinski 五规则的标准进行筛选。将通过筛选的活性成分结构式导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>) 预测潜在作用靶点, 并筛选重要靶点。将所有预测靶点提交至 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化校准, 剔除无效及冗余条目, 获得统一的标准化基因名称。

2.1.2 CIRI 与肠道黏膜损伤相关靶点获取 分别以 “cerebral ischemia reperfusion injury” 和 “intestinal mucosal injury” 为检索词, 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 中查询相关疾病靶点。整合 2 个数据库的检索结果, 相互补充后剔除重复的基因靶点条目。将整合后的靶点列表导入 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化处理, 获得标准基因名。将获得的药物活性成分作用靶点集与上述标准化的疾病相关靶点集共同导入 jvenn 在线工具 (<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>), 识别两者之间的共同靶点, 并构建 Venny 图进行可视化展示。

2.1.3 “药物-成分-疾病-靶点” 网络的构建 将补阳还五汤活性成分与疾病的交集靶点导入 Cytoscape 3.10.3 软件, 构建 “药物-成分-疾病-靶点” 网络。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 设置物种为 *Home sapiens*, highest confidence 为 0.7, 去除游离蛋白, 将结果导入 Cytoscape 3.10.3 进行 PPI 网络拓扑分析, 用 NetworkAnalyze 计算度值, 同时根据 CytoNCA 工具, 对于度值、介度中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、局部边连通性 (local average connectivity, LAC)、网络中心性 (network centrality, NC) 结果进行筛选, 取各项均超过中位数的靶点作

为核心靶点。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 基因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 将“2.1.4”项下筛选出的核心基因导入 R 语言 4.5.0 软件中的 org.Hs.eg.db、BiocManager、clusterProfiler 等数据库, 进行 GO 富集分析, 并将分析结果可视化。利用 R 语言 4.5.0 软件中 BiocManager 数据库下的 clusterProfiler、pathview 等程序包, 进行 KEGG 信号通路分析, 并将分析结果可视化。

2.2 BYHWT 的制备

BYHWT 由黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 4.5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g 组成, 按照组方准确称取药材, 加入 10 倍量的水, 浸泡 40 min 后, 武火煮沸文火续煮 30 min, 滤过; 重复煎煮, 滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩至生药量 1.2 g/mL。经检测, BYHWT 中黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、芍药苷的质量浓度分别为 0.34、0.12、0.03、0.16 mg/mL。

2.3 动物实验

2.3.1 模型制备 采用改良的 Zea-Longa 线栓法^[9]制备大鼠 CIRI 模型: 大鼠称定质量后, ip 2%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 分离右侧颈总动脉及其分支, 结扎颈外动脉近心端, 随后将线栓经颈总动脉插入。当线栓头部抵达距颈总动脉分叉处约 18.0 mm 的位置时停止推进, 缝合手术创面。缺血 2 h 后, 移除线栓以恢复血流灌注。假手术组仅分离右侧颈总动脉及其分支。大鼠清醒后, 参照 Longa 评分法^[9], 对神经功能缺损程度进行评估, 评分为 1~3 分的大鼠视为造模成功, 纳入后续实验。

2.3.2 分组及给药 取假手术组大鼠 6 只, 将造模成功的大鼠随机分为模型组和 BYHWT 低、中、高剂量 (1.29、2.57、5.14 g/kg) 组, 每组 6 只。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 5 d。

2.3.3 神经功能缺损评分 在缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 参照 Longa 评分法^[9]进行神经功能缺损评分。评分标准: 0 分, 无可见神经损伤体征, 活动正常; 1 分, 手术对侧前肢伸展不完全; 2 分, 自主爬行时出现向手术侧方向的持续转圈行为; 3 分, 站立平衡障碍, 移动时向手术侧倾倒; 4 分, 意识或运动功能严重受损, 丧失自主行走能力。

2.3.4 TTC 染色测定脑梗死面积 末次给药结束

后, 将大鼠断头处死并迅速取脑。脑组织于 -20 °C 放置 15 min, 随后进行冠状位连续切片, 切片厚度为 2 mm。将脑片置于 2% TTC 溶液中, 37 °C 避光孵育 30 min 至染色完全。染色后, 正常脑组织呈现深红色, 梗死区域呈灰白色, 使用 Image J 软件进行图像分析并计算梗死区域面积。

2.3.5 HE 染色观察结肠组织病理变化 末次给药结束后, 收集各组大鼠结肠组织, 使用 4%多聚甲醛迅速固定。固定组织经包埋、切片、脱水后进行 HE 染色, 观察各组结肠组织病理形态学改变。

2.3.6 TUNEL 染色检测结肠组织细胞凋亡 结肠石蜡切片经脱蜡至水后, 进行蛋白酶 K 抗原修复, 通透处理。依次孵育 TUNEL 反应液及链霉亲和素-辣根过氧化物酶反应液。DAB 显色后, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片, 于光学显微镜下采集图像, 使用 Image J 软件进行分析。

2.3.7 免疫组化检测结肠组织 Occludin 和 ZO-1 表达 结肠石蜡切片经 1×柠檬酸钠抗原修复液热修复, 自然冷却。5%牛血清白蛋白封闭后, 加入 Occludin、ZO-1 一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的二抗孵育, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.3.8 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察结肠组织超微结构

(1) SEM: 各组大鼠结肠组织经蒸馏水冲洗表面黏液, 2.5%戊二醛溶液固定, 4 °C 保存。固定后样品用 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 5~10 min, 依次经 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇梯度脱水 (各体积分数处理 10~15 min)。脱水样品经 CO₂ 临界点干燥, 用石墨粉导电胶固定于样品台上, 经离子溅射仪喷镀金属膜以增强导电性, 采用 SEM 观察并拍照。

(2) TEM: 各组大鼠结肠组织经 2.5%戊二醛 4 °C 固定过夜, 依次经 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇脱水后进行渗透包埋, 聚合, 定位, 超薄切片, 染色, 采用 TEM 观察并拍照。

2.3.9 ELISA 检测结肠组织中 PGE₁ 水平 各组大鼠结肠组织经预冷 PBS 缓冲液冲洗去除残留血液, 称定质量后机械破碎, 按 1:9 质量体积比加入含蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液, 于冰浴条件下使用玻璃匀浆器充分研磨, 4 °C、5 000×g 离心 10 min, 收集上清液, 按照试剂盒说明书测定 PGE₁ 水平。

2.3.10 Western blotting 检测结肠组织 Occludin、ZO-1 和 PTGS2 蛋白表达 取结肠组织，加入含蛋白酶抑制剂的裂解液提取总蛋白，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，经无蛋白封闭液封闭 20 min，加入一抗，4 °C 孵育过夜；TBST 清洗 3 次，每次 10 min，加入二抗，室温孵育 30 min，TBST 清洗 3 次后，加入 ECL 化学发光试剂显影，通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.3.11 粪便代谢组学分析

(1) 样本处理：精确称取肠道内容物样本，加入含 4 mg/L 2-氯-L-苯丙氨酸的甲醇溶液 600 μ L，涡旋混匀 30 s。加入钢珠，50 Hz 研磨 120 s，室温超声提取 10 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μ m 滤膜滤过后进样。

(2) 色谱条件：Thermo Vanquish 超高效液相色谱系统，使用 Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)，体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 °C；进样量 2 μ L。正离子模式，流动相为 0.1%甲酸乙腈 (B1) 和 0.1%甲酸水溶液 (A1)；负离子模式，流动相为乙腈 (B2) 和 5 mmol/L 甲酸铵水溶液 (A2)。梯度洗脱：0~1.0 min, 10% B；1.0~5.0 min, 10%~98% B；5.0~6.5 min, 98% B；6.5~6.6 min, 98%~10% B；6.6~8.0 min, 10% B。

(3) 质谱条件：Thermo Q Exactive Focus 质谱检测器，电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI)，正、负离子喷雾电压分别为 3.50、-2.50 kV，鞘气 40 arb，辅助气 10 arb，毛细管温度 325 °C，以分辨率 70 000 进行一级全扫描，一级离子扫描范围 m/z 100~1 000，采用 HCD 进行二级裂解，碰撞能量为 30 eV，二级分辨率为 17 500，采集信号前 3 名的离子进行碎裂，同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

(4) 数据处理和分析：原始质谱数据经 Proteowizard 软件包 (v3.0.8789) 中 MSConvert 工具转换为 mzXML 格式^[10]。采用 R XCMS (v3.12.0) 软件包进行峰检测、峰过滤、峰对齐^[11]，生成代谢物定量列表。基于质控样本进行支持向量回归校正并过滤 RSD > 30% 的代谢物，用于后续的数据分析。利用 HMDB、massbank、LipidMaps、mzcloud、KEGG 及自建标准品库进行物质鉴定，得到代谢物定性结果。具体原理通过母离子 m/z 匹配和二级谱图碎片离子匹配完成。采用 R 软件包 Ropls^[12]进行主成分

分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。通过置换检验评估过拟合，模型拟合优度以 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 评估。差异代谢物筛选标准为 $P < 0.05$ 且变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) > 1。使用 MetaboAnalyst^[13]进行差异代谢物的功能通路富集与拓扑分析，显著通路经 KEGG Mapper 可视化。

2.4 整合网络药理学与代谢组学分析

利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 MetScape 插件，导入差异代谢物与交集靶点，构建“代谢物-反应-酶基因”网络。

2.5 代谢物与靶点分子对接验证

基于“代谢物-反应-酶基因”网络分析结果，选取差异代谢物 PGE₁ 作为配体，其互作靶点 PTGS2 作为受体。从 PubChem 数据库获取 PGE₁ 的二维结构，经 OpenBabel 将 SDF 格式文件转换为 Mol2 格式，随后通过 AutoDock 进行添加氢键、识别可旋转键并设定旋转自由度，完成配体结构预处理。从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得受体蛋白 PTGS2 的三维结构，经 AutoDock 去除蛋白质多余的水分子、优化氢键网络等操作优化蛋白。对受体-配体复合物进行分子对接获得结合能，通过 PyMOL 实现对接构象的可视化分析。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.4.1 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 基于网络药理学预测 BYHWT 治疗 CIRI 引起的肠道黏膜损伤的潜在作用靶点

3.1.1 BYHWT 活性成分及靶点的筛选 从 TCMSP 数据库中得到黄芪有效成分 17 种，红花有效成分 17 种，赤芍有效成分 14 种，桃仁有效成分 19 种，当归有效成分 2 种，川芎有效成分 6 种。地龙经 PubChem 数据库、CNKI 文献检索并结合 SwissADME 筛选得到 4 种有效成分。最终 BYHWT 共收集到 67 种活性成分，364 个作用靶点。

3.1.2 BYHWT 治疗 CIRI 及肠道黏膜损伤靶点的筛选 从 GeneCards 及 OMIM 数据库检索 CIRI、肠道黏膜损伤的靶点，去重后共收集疾病靶点 1 454

个, 与 BYHWT 活性成分的 364 个作用靶点取交集, 得到 175 个交集靶点作为 BYHWT 治疗 CIRI 及肠道黏膜损伤的潜在作用靶点, 见图 1。

3.1.3 “药物-成分-疾病-靶点”网络的构建 通过 Cytoscape 3.10.3 软件绘制 BYHWT 活性成分与 CIRI、IMI 交集靶点网络, 见图 2。根据度值筛选出

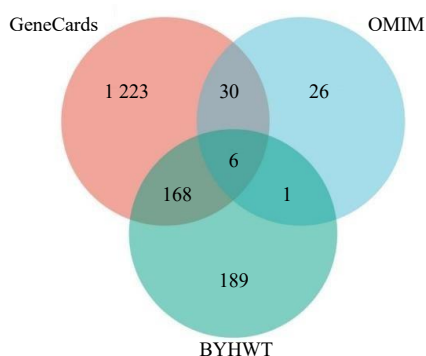
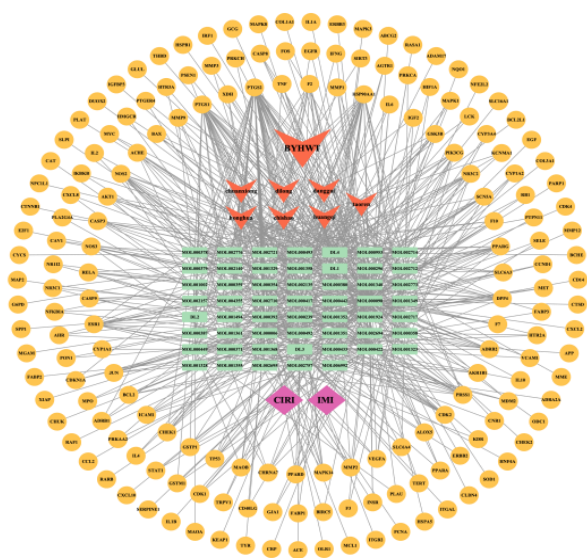


图 1 补阳还五汤治疗 CIRI 及肠道黏膜损伤的潜在靶点
Fig. 1 Potential therapeutic targets of BYHWT for CIRI and intestinal mucosal injury



红色箭头表示 BYHWT 及其成分, 紫色菱形表示 CIRI、肠道黏膜损伤, 绿色长方形表示 BYHWT 的活性成分, 黄色圆形表示活性成分治疗 CIRI 与肠道黏膜损伤的潜在共同靶点。

Red arrow represents BYHWT and its components, purple diamond represents CIRI and intestinal mucosal injury, green rectangle represents active ingredient of BYHWT, and yellow circle represents potential common target of active ingredient in treating CIRI and intestinal mucosal injury.

图 2 补阳还五汤治疗 CIRI 及肠道黏膜损伤的“药物-成分-疾病-靶点”网络
Fig. 2 “Drug-active ingredient-disease-target” network of BYHWT in treatment of CIRI and intestinal mucosal injury

核心成分, 分别为槲皮素、木犀草素、花生四烯酸、山柰酚、二十二碳五烯酸、异鼠李素、黄芩素、7-O-methylisomucronulatol、 β -谷甾醇、芒柄花黄素。

3.1.4 PPI 网络的构建及核心靶点筛选 将 175 个交集靶点导入 STRING 数据库, 结果通过 CytoScape 3.10.3 软件进行可视化分析, 共由 175 个节点、1 453 条边组成, 根据 CytoNCA 分析节点的属性值, 通过计算度值、BC、CC、EC、LAC、NC 各属性值的中位数进行 2 次筛选, 2 次筛选后度值中位数为 26, BC 中位数为 15.479 409 98, CC 中位数为 0.680 555 556, EC 中位数为 0.136 930 816, LAC 中位数为 17.840 909 09, NC 中位数为 20.258 342 8, 构建 PPI 网络 (图 3), 共筛选出 22 个核心靶点。

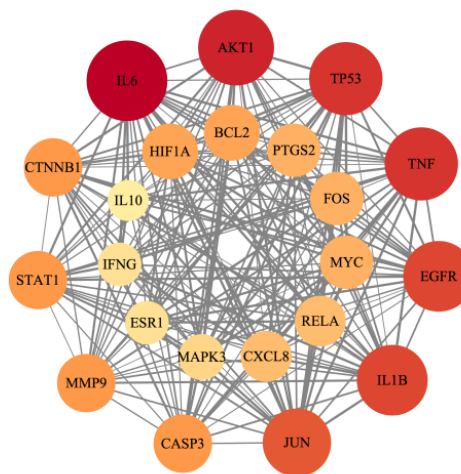


图 3 补阳还五汤治疗 CIRI 与肠道黏膜损伤关键靶点的 PPI 网络
Fig. 3 PPI network of key target proteins for BYHWT in treatment of CIRI and intestinal mucosal injury

3.1.5 GO 功能富集分析 CO 功能富集分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个方面, 如图 4 所示, 22 个核心靶点的 BP 分析主要富集在对外源刺激的反应、肌肉细胞增殖、对脂多糖的反应等; CC 分析主要富集在 RNA 聚合酶 II 转录调节复合物、膜筏、膜微区等; MF 分析主要富集在 DNA 结合转录因子结合、细胞因子受体结合、类泛素蛋白连接酶结合等。

3.1.6 KEGG 通路富集分析 BYHWT 治疗 CIRI、IMI 的 22 个核心靶点共富集在 155 条通路上, 按照富集的数量及显著性排序后, 将排名前 15 的通路可视化处理 (图 5)。富集结果提示乙型肝炎病毒、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、脂质与动脉粥样硬

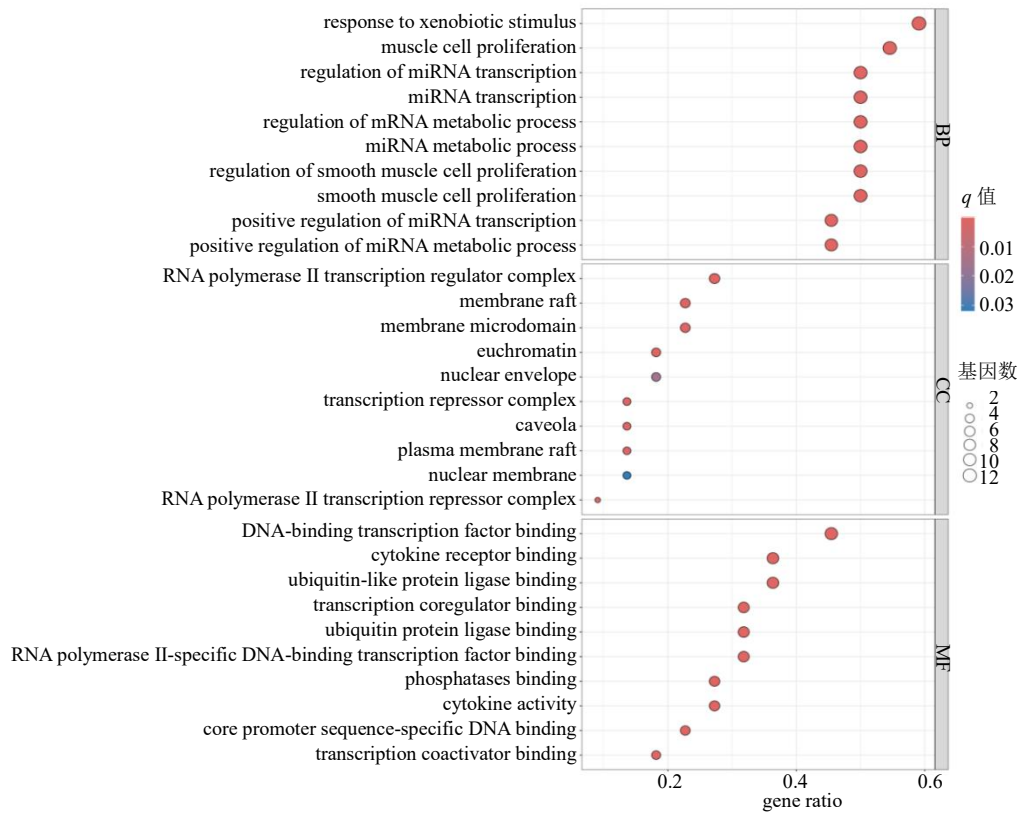


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

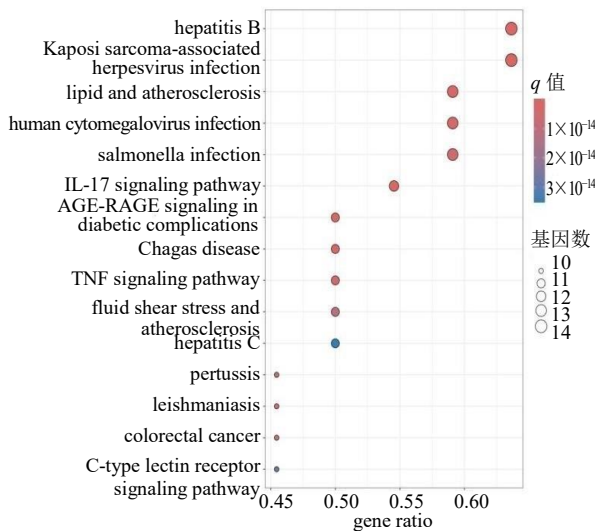


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

化、人巨细胞病毒感染、沙门氏菌感染可能为 BYHWT 治疗 CIRI 引起 IMI 的重要机制。

3.2 BYHWT 对 CIRI 大鼠神经功能缺损评分的影响

如表 1 所示，假手术组大鼠未出现神经行为学损伤；与假手术组比较，模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，BYHWT

表 1 补阳还五汤对 CIRI 大鼠神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of BYHWT on neurological deficit scores in CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能缺损评分
假手术	—	0.00 ± 0.00
模型	—	2.67 ± 0.52 ^{###}
BYHWT	1.29	2.33 ± 0.52
	2.57	1.83 ± 0.41 [*]
	5.14	1.67 ± 0.52 ^{**}

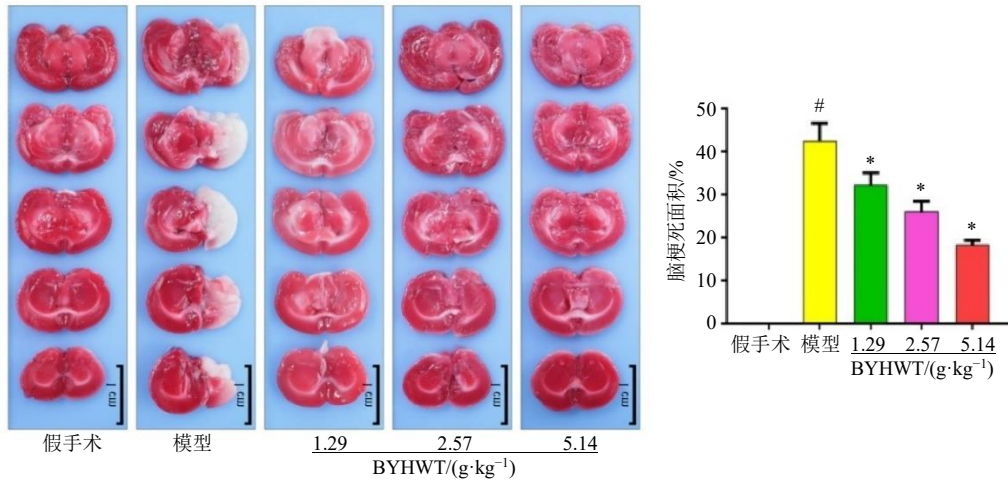
与假手术组比较：^{###} $P < 0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ，表 2 同。

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as table 2.

中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.3 BYHWT 对 CIRI 大鼠脑梗死面积的影响

如图 6 所示，假手术组大鼠脑组织未见白色梗死区，模型组和 BYHWT 低、中、高剂量组大鼠脑组织均有不同程度的白色梗死灶。与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死面积显著增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，BYHWT 各剂量组大鼠脑梗死面积显著减小 ($P < 0.05$)。



与假手术组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, 下图同。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$ vs model group, same as below figures.

图6 BYHWT对CIRI大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Effect of BYHWT on cerebral infarction area in CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 BYHWT对CIRI大鼠结肠组织黏膜损伤的影响

HE染色结果(图7)显示,假手术组大鼠肠绒毛排列整齐,组织结构基本完整,无水肿及炎性浸润;模型组结肠组织出现黏膜破坏、水肿,肠绒毛缩短、倒伏甚至断裂等;与模型组比较,BYHWT各剂量组结肠组织病理损伤均有不同程度的减轻。

TUNEL染色结果(图8)显示,与假手术组比较,模型组肠细胞凋亡明显增加;而BYHWT低、中、高剂量组处理后肠细胞凋亡明显减少,其中高剂量组改善作用最为明显。

3.5 BYHWT对CIRI大鼠结肠组织中Occludin和ZO-1表达的影响

免疫组化结果(图9)显示,与假手术组比较,

模型组大鼠结肠组织中Occludin和ZO-1的阳性表达减少;与模型组比较,BYHWT中、高剂量组Occludin和ZO-1的阳性表达增加。

Western blotting结果(图10)显示,与假手术组比较,模型组大鼠结肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,BYHWT中、高剂量组结肠组织中Occludin和ZO-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。

3.6 BYHWT对CIRI大鼠结肠组织超微结构的影响

SEM结果(图11)显示,假手术组、模型组和BYHWT各剂量组肠黏膜表面肠绒毛形态、数量及分布情况无明显差异。TEM结果(图12)显示,假手术组大鼠肠上皮细胞连续紧密,结肠绒毛形态完

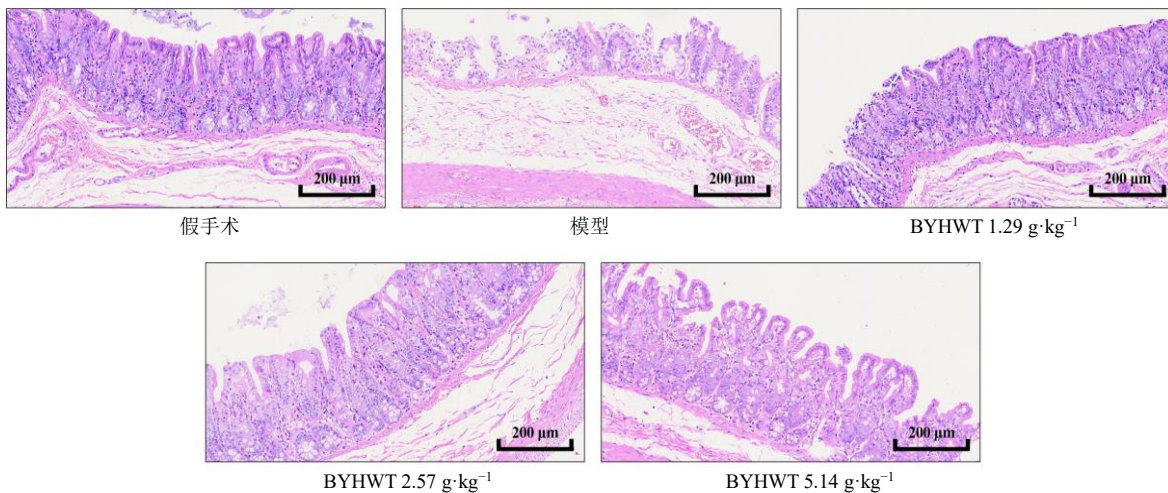


图7 各组大鼠结肠组织HE染色结果($\times 200$)
Fig. 7 HE staining results of colonic tissue in each group of rats ($\times 200$)

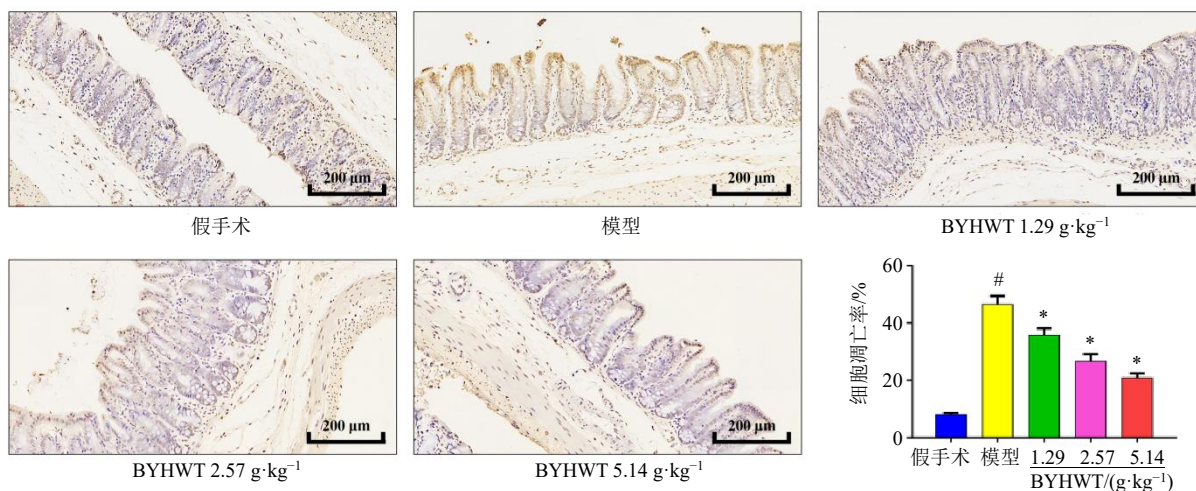


图 8 各组大鼠结肠组织 TUNEL 染色结果 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 TUNEL staining results of colonic tissue in each group of rats (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

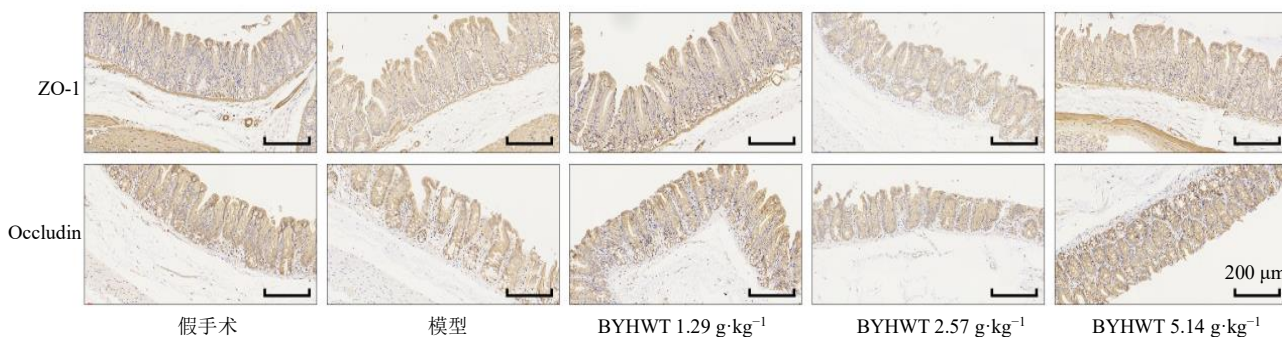


图 9 各组大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin 表达 (免疫组化, ×200)

Fig. 9 ZO-1 and Occludin protein expressions in colonic tissues of rats in each group (immunohistochemistry, × 200)

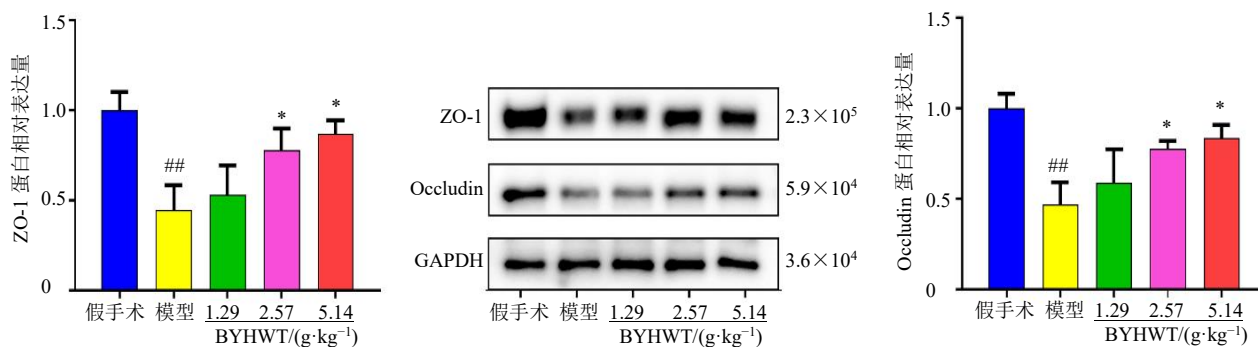


图 10 BYHWT 对 CIRI 大鼠结肠组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of BYHWT on ZO-1 and Occludin protein expressions in colonic tissues of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

整、排列整齐；模型组大鼠结肠上皮黏膜的完整性丧失，结肠绒毛明显变短、稀疏而不规整，细胞膜损伤并局部空缺，细胞质水肿，细胞内超微结构发生变化；而 BYHWT 低、中、高剂量组肠上皮细胞紧密连接复合体完整，连接嵌合紧密，结肠绒毛排

列整齐，明显增多变长，其中高剂量组变化最为明显。如表 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠结肠组织紧密连接宽度显著增加 ($P < 0.001$)；与模型组比较，BYHWT 各剂量组大鼠结肠组织紧密连接宽度显著减少 ($P < 0.05$)。

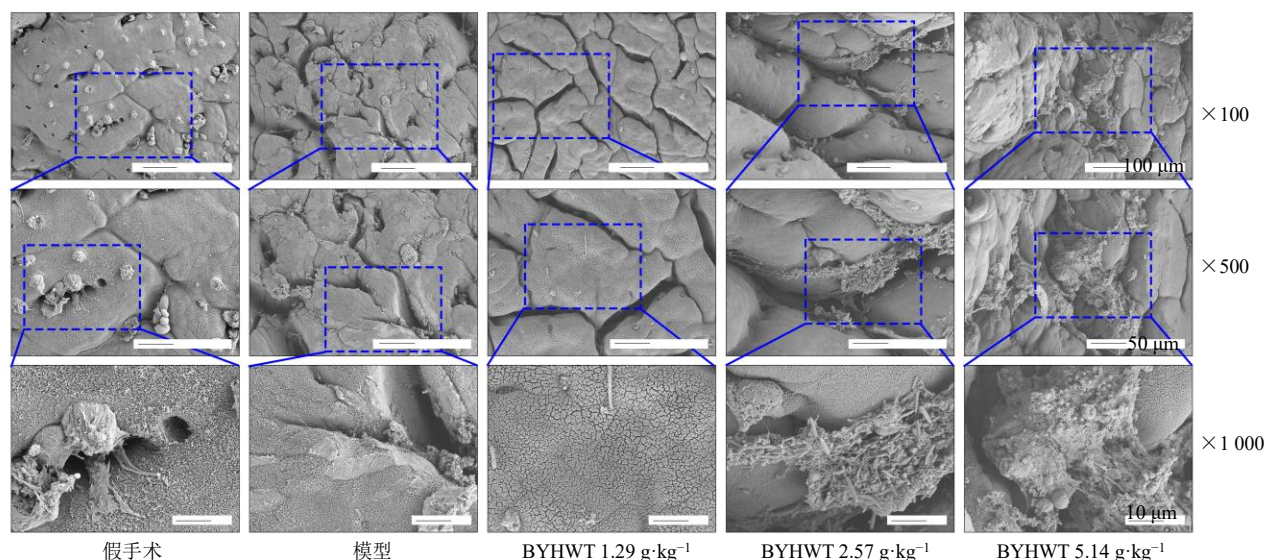


图 11 各组大鼠结肠组织 SEM 结果

Fig. 11 SEM results of colonic tissues in rats in each group

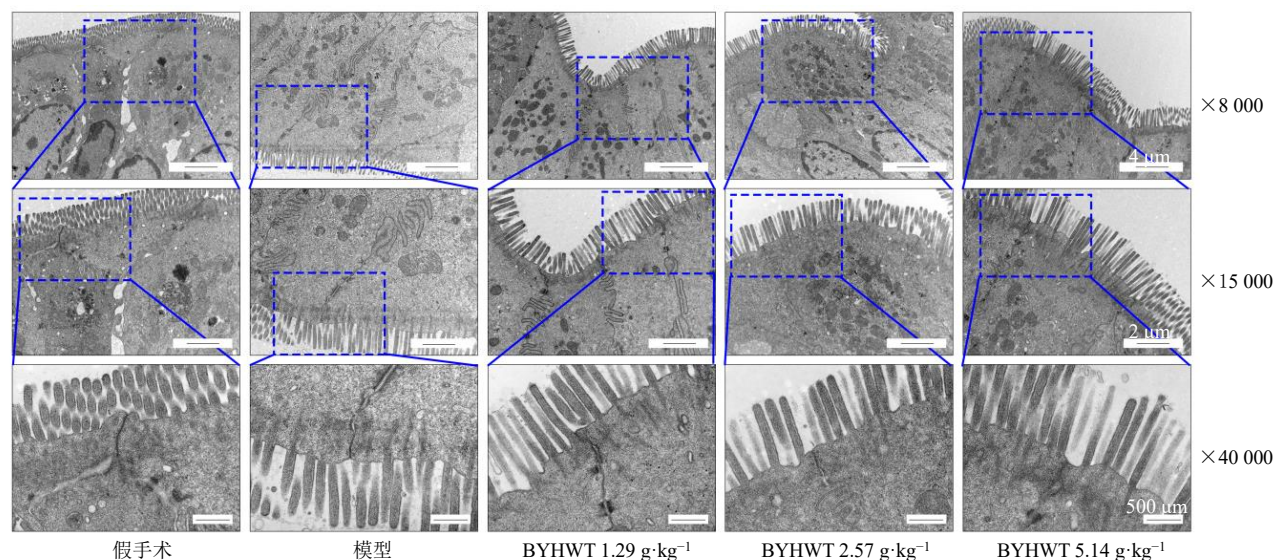


图 12 各组大鼠结肠组织 TEM 结果

Fig. 12 TEM results of colonic tissues in rats in each group

表 2 BYHWT 对 CIRI 大鼠结肠组织紧密连接宽度的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of BYHWT on tight junction width in colonic tissues of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

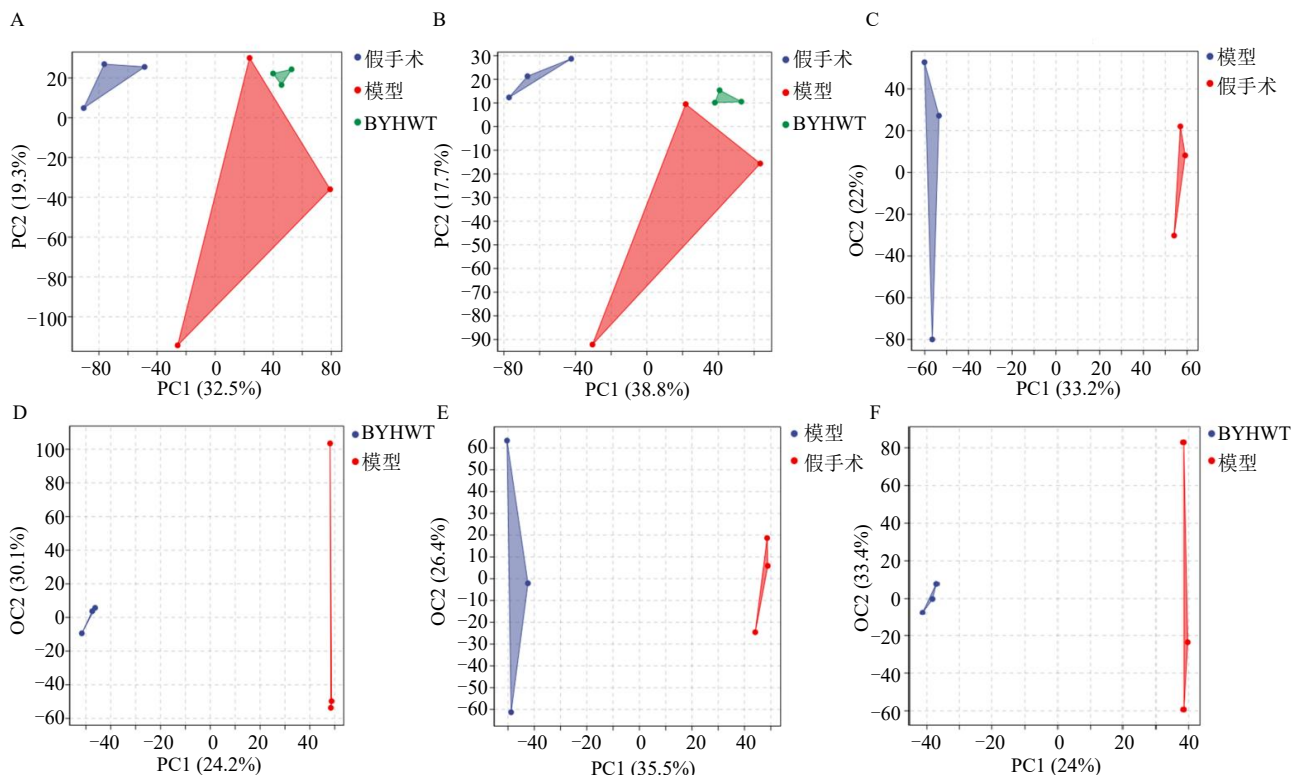
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	紧密连接宽度/nm
假手术	—	1 922.17 ± 143.27
模型	—	2 407.83 ± 109.70 ^{###}
BYHWT	1.29	2 242.33 ± 51.80*
	2.57	2 144.33 ± 74.26*
	5.14	2 130.00 ± 60.96*

3.7 粪便代谢组学分析

3.7.1 多元统计学分析 为了进一步确定组间代谢差异, 采用多变量统计方法分析代谢数据。PCA

结果(图 13-A、B)显示, 假手术组、模型组和 BYHWT 高剂量组大鼠代谢谱在不同区域呈显著分布。模型组和假手术组样本呈现明显分离, 而 BYHWT 高剂量组与假手术组样本距离较远, 这说明各组大鼠的代谢物存在明显差异。OPLS-DA 结果(图 13-C~F)显示, 正、负离子模式下假手术组与模型组、模型组与 BYHWT 高剂量组样本分离明显。这提示模型拟合效果良好, 组间存在一定差异, 且没有出现过度拟合现象。

3.7.2 差异代谢物的筛选和分析 以 VIP>1 结合单变量统计分析($P<0.05$)筛选显著性差异代谢物。与假手术组比较, 模型组筛选出 73 种主要代谢差



A-正离子模式下 PCA; B-负离子模式下 PCA; C、D-正离子模式下 OPLS-DA; E、F-负离子模式下 OPLS-DA。
A-PCA in positive ion mode; B-PCA in negative ion mode; C, D-OPLS-DA in positive ion mode; E-OPLS-DA in negative ion mode.

图 13 多元统计学分析

Fig. 13 Multivariate statistical analysis

异物, 包括胞嘧啶、5-氧代己酸、L-酪氨酸甲酯、N-(1-羧乙基)丙氨酸、PGE₁、3,4,5-三甲氧基苯甲酸、佛手苷酸等, 其中有 33 个上调、40 个下调, 上述代谢物可能参与 CIRI 的发病进程中。BYHWT 干预后, 模型组有 9 个差异代谢物出现回调。

3.7.3 代谢通路分析 如图 14 所示, BYHWT 改善 CIRI 引起的肠道黏膜损伤可能与类固醇激素生物合成、类固醇生物合成、初级胆汁酸生物合成、花生四烯酸代谢、维生素消化和吸收、亚油酸代谢、氨基酸的生物合成等相关。

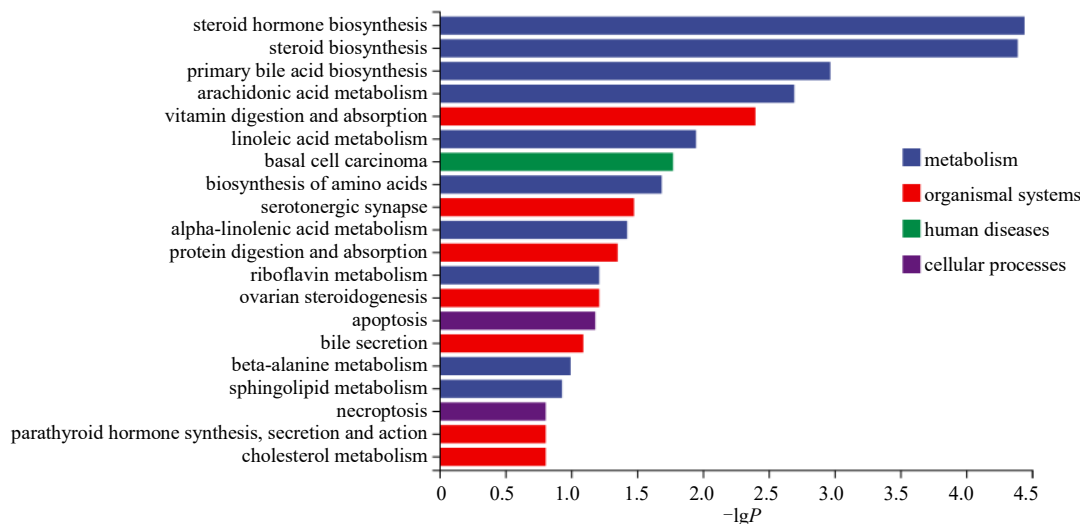


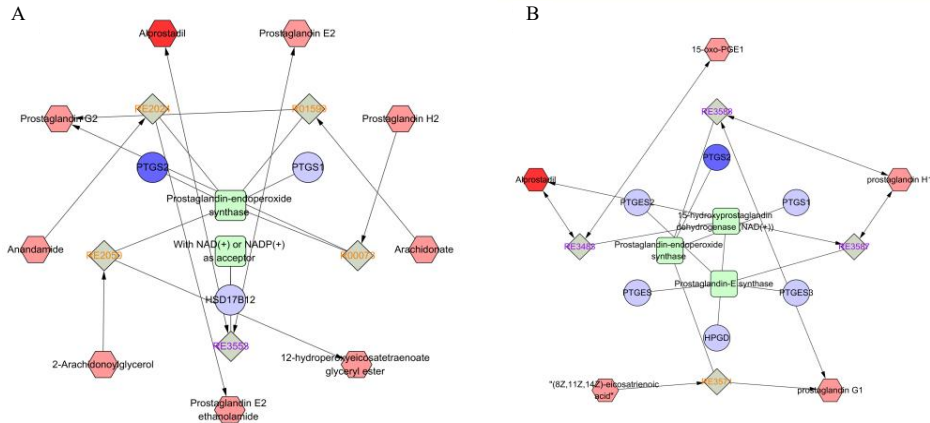
图 14 差异代谢物的 KEGG 通路富集分析

Fig. 14 Enrichment analysis of KEGG pathway for differential metabolites

3.8 肠道内容物代谢组学与网络药理学整合分析

利用 Cytoscape 3.10.0 软件中的 MetScape 插件，整合肠道内容物代谢组学筛选的差异代谢物与网络药理学获得的 BYHWT 治疗 CIRI 与 IMI 的交

集靶点，通过构建“代谢物-反应-酶-基因”网络进行整合分析，识别关键代谢通路，MetScape 分析得到代谢通路为花生四烯酸生成前列腺素途径和二高-γ-亚麻酸生成前列腺素途径（图 15）。



A-花生四烯酸生成前列腺素途径；B-二高-γ-亚麻酸生成前列腺素途径；红色六边形表示化合物（其中深红色表示代谢组学筛选出的 BYHWT 回调差异代谢物），反应为灰色菱形，绿色矩形代表酶，蓝色圆形代表基因（深蓝色代表 BYHWT 治疗 CIRI 与肠道黏膜损伤的核心靶点）。A-prostaglandin formation from arachidonate; B-prostaglandin formation from dihomo-γ-linolenic acid; Red hexagons represent compounds (where dark red represents BYHWT regulated differential metabolites screened by metabolomics), reactions are represented by gray diamonds, green rectangles represent enzymes, and blue circles represent genes (dark blue represents core targets of BYHWT therapy for CIRI and intestinal mucosal injury).

图 15 “代谢物-反应-酶-基因”网络

Fig. 15 “Metabolite-reaction-enzyme-gene” network

3.9 分子对接结果

基于整合分析结果，选择差异代谢物 PGE₁ 与核心靶点 PTGS2 进行分子对接。结合能的负值越大，表明配体-受体相互作用越强，结合能 < -5 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol) 时，提示分子与蛋白具有显著结合活性。PGE₁ 与 PTGS2 结合能为 -6.9 kcal/mol，表明受体与配体有较好的结合活性，进一步说明了“代谢物-反应-酶-基因”网络中 PGE₁ 与 PTGS2 紧密相关。利用 Pymol 进行可视化分析，见图 16。

3.10 BYHWT 对 CIRI 大鼠结肠组织中 PGE₁ 水平与 PTGS2 蛋白表达的影响

如图 17 所示，与假手术组比较，模型组大鼠结肠组织中 PGE₁ 水平显著降低 ($P < 0.05$), PTGS2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，BYHWT 高剂量组大鼠结肠组织中 PGE₁ 水平显著升高 ($P < 0.05$), PTGS2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

随着现代社会的发展，缺血性脑卒中患病率与死亡率不断攀升，已成为全球性健康难题，CIRI 在缺血性脑卒中极易发生，且会导致更严重的损伤^[14]。脑卒中后，受损脑组织经脑肠轴作用于肠道，引发功能障碍、屏障破坏与菌群失调；这些肠道改变又可进一步加重脑损伤^[15]。而从中医整体观念出发，脑与肠生理病理上相互关联，相互为用^[16]。卒中后气血津液运行失司，气滞血瘀互结，痹阻脑络，进而导致胃肠传化失职，可见便秘、腹胀等症；清浊升降失调，清阳不升则脑窍失养，浊阴不降则上蒙清窍，致使卒中发作加重。王清任在《医林改错》中指出卒中半身不遂、偏身麻木属“气虚血瘀”，主张以益气活血化瘀为治。以益气活血为核心治法的

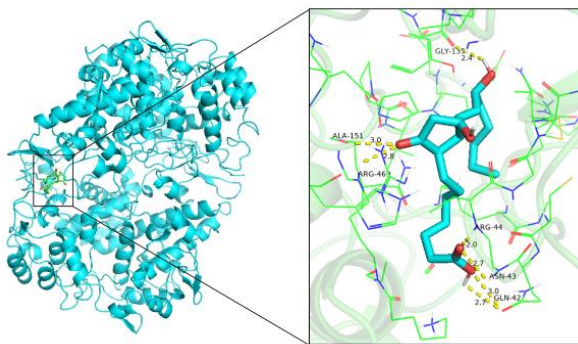


图 16 PGE₁ 与 PTGS2 分子对接示意图

Fig. 16 Molecular docking schematic of PGE₁ with PTGS2

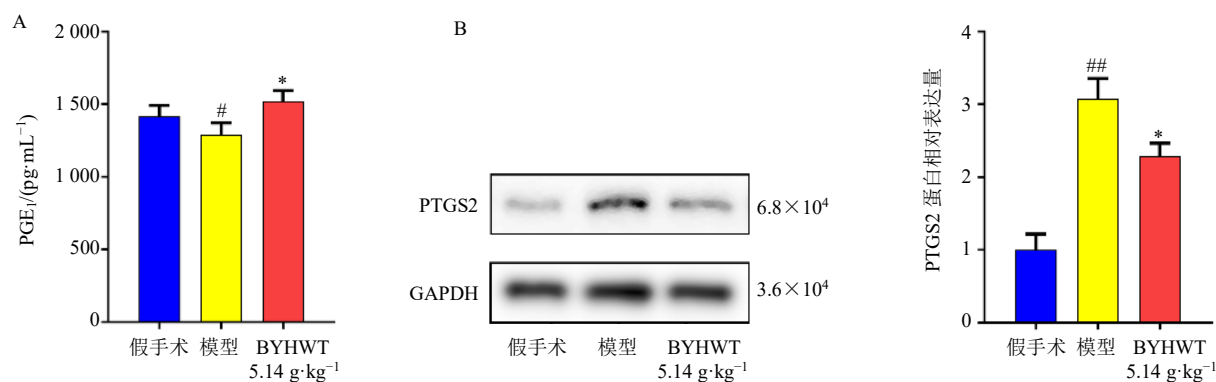


图 17 BYHWT 对 CIRI 大鼠结肠组织中 PGE₁ 水平 (A) 与 PTGS2 蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 17 Effect of BYHWT on PGE₁ level (A) and PTGS2 protein expression (B) in colonic tissues of CIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BYHWT 在脑卒中治疗领域的应用现已十分广泛, 现代临床研究结果表明, BYHWT 不仅疗效显著, 还可改善 CIRI 后肠道黏膜屏障损伤, 且安全性良好^[17]。近年来, 基于肠-脑轴来改善脑卒中的治疗方案逐渐受到广泛关注, 但缺少 BYHWT 通过肠脑轴改善 CIRI 后肠道黏膜屏障损伤的相关研究。本研究结果显示, CIRI 后大鼠神经功能缺损评分明显降低, 脑梗死灶增大, 提示造模成功; BYHWT 可显著改善 CIRI 后大鼠神经功能缺损评分, 减少脑梗死面积。

脑卒中会增加肠道通透性, 促使毒性肠道内容物进入体循环, 从而加重脑损伤。肠黏膜屏障损伤在脑卒中后发挥重要作用, 但其机制尚未完全明确^[18]。据此, 本研究进一步探讨 BYHWT 对 CIRI 后肠道屏障损伤的修复作用。HE 和 TUNEL 染色显示, CIRI 后大鼠结肠组织出现黏膜结构破坏、水肿, 绒毛缩短倒伏, 细胞凋亡增加; BYHWT 可显著改善上述病理变化。SEM 未见各组肠绒毛形态明显差异, 因此采用 TEM 进一步观察肠道黏膜屏障超微结构变化, 结果显示 BYHWT 能有效恢复结肠上皮完整性及细胞超微结构。值得注意的是, CIRI 组结肠组织紧密连接宽度增加, BYHWT 干预后反而有所恢复, 可能由于 CIRI 为急性疾病, 急性期结肠组织水肿从而导致增厚, 给药后水肿有所改善。

肠道黏膜屏障包含物理、免疫、化学和生物屏障 4 个部分, 其中物理屏障最为重要, 而上皮细胞间的紧密连接由跨膜蛋白 (如 Occludin) 和骨架连接蛋白 (如 ZO-1) 等蛋白维持, 在维持肠道屏障稳态和调控肠道通透性中起关键作用^[19-20]。因此, 检测了结肠组织中 2 种紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达。CIRI 组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达显著

降低, BYHWT 则可逆转这一趋势, 表明其能增强紧密连接蛋白表达, 维持屏障结构与功能完整性, 防止有害物质穿过肠道屏障, 从而减缓卒中进展。

由于中药成分复杂多样, 其药效机制多通过多靶点、多通路协同作用, 因此系统阐释其分子机制对指导临床应用具有重要意义。近年来, 网络药理学为揭示中药对多因素疾病的作用网络提供了一种新的形式^[21-22], 代谢组学则通过高通量、高灵敏度检测技术揭示中药复方对代谢网络的整体调控作用^[23-24]。为较全面阐明 BYHWT 改善 CIRI 后肠道黏膜屏障损伤的药效物质及作用机制, 进行网络药理学及肠道内容物代谢组研究, 网络药理学结果显示 BYHWT 治疗 CIRI 后肠道黏膜损伤的核心靶点为肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL1B)、IL6、蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1A)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、JUN 等, 主要涉及脂质与动脉粥样硬化、巨细胞病毒感染、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路。代谢组学结果显示 CIRI 大鼠肠道内容物中有 33 种代谢物上调、40 种下调, BYHWT 干预后可回调 9 种代谢物, KEGG 富集分析提示类固醇激素合成、初级胆汁酸生成、花生四烯酸代谢、维生素消化吸收等通路可能为关键通路。本研究将 BYHWT 治疗 CIRI 后肠道黏膜损伤的代谢组学与网络药理学相结合, 旨在探究上游靶点和下游代谢物之间的关联, 并构建“代谢物-反应-酶-基因”网络。研究结果显示, 花生四烯酸生成前列腺素的途径以及二高- γ -亚麻酸生成前列腺素

的途径,或许是BYHWT在对抗CIRI所致肠道黏膜损伤中发挥重要作用的重要机制。

花生四烯酸及其代谢产物与缺血性卒中关系密切,其在炎症反应、血小板功能、止血及预防血栓形成等方面起重要作用^[25-26]。花生四烯酸又可通过环氧合酶(cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)及细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)酶进一步代谢,生成前列腺素等众多代谢物,参与炎症与药物代谢过程^[27]。二高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)作为一种 ω -6多不饱和脂肪酸,源自亚油酸,可选择性抑制血栓素A₂的生物活性,显著减少血小板聚集和促炎性细胞因子的释放^[28],在缺血性卒中治疗中具有潜在价值。尤为重要的是,DGLA是PGE₁的直接前体,PGE₁可以抑制血管内皮细胞黏附,阻断平滑肌增殖,并延缓动脉粥样硬化进程^[29]。

PGE₁是前列腺素家族的一员,是花生四烯酸经环氧合酶和脂质氧化酶催化后衍生的自身反应物质^[30],具有扩张血管、抑制血小板聚集、改善微循环等作用^[31-33]。PGE₁已被初步证明对缺血性心脏病有保护作用^[34-35],主要是由于血管扩张作用,但其在脑缺血中的作用研究相对较少。Ling等^[36]发现PEG₁可促进脑梗死后血管新生、神经新生,有助于神经系统的恢复。PGE₁类似物米索前列醇,不仅对小肠糜烂和缺血再灌注引起的肠道损伤具有保护作用,还可以预防及减轻酒精、感染引起的肠道损伤,并能改善肠道微生物群和黏膜完整性^[37-39]。以上研究表明,PGE₁在缺血性脑卒中中显示出神经修复潜力,其类似物对肠道黏膜损伤也具有明确的保护作用。

PTGS2(COX-2)作为前列腺素生物合成的关键限速酶^[40],参与花生四烯酸和DGLA代谢生成前列腺素的途径。COX-2在缺血性卒中的发展中起关键作用,缺血诱导的炎症介质释放可增加COX-2水平,进而加剧神经炎症,COX-2衍生物也会增加ROS的产生,引发氧化应激,从而加重缺血后的脑损伤^[41-42]。COX-2信号通路的异常激活同样在肠道病理中至关重要。正常情况下,COX-2及其mRNA在肠道组织中的基础表达水平较低且降解迅速;然而,在脂多糖、促炎细胞因子或应激等刺激下,其表达会显著上调^[43]。而COX-2信号传导已被证实能抑制肠上皮细胞的再生修复能力并加剧结肠炎等肠道炎症状态^[44]。关于COX-2抑制剂的效应存

在复杂性:选择性COX-2抑制剂虽能抑制炎症,但可能增加心肌梗死和缺血性卒中风险。其机制在于它们能够抑制前列环素、脂毒素、溶解蛋白和内皮型一氧化氮,却无法有效抑制血小板COX-1衍生的血栓素A₂^[45]。与之相比,阿司匹林作为非选择性COX抑制剂,可同时阻断COX-1和COX-2酶,进而增加细胞内DGLA、花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的水平,DGLA、花生四烯酸和二十碳五烯酸分别形成PGE₁、前列腺素I₂(prostaglandin I₂, PGI₂)和PGI₃的前体(PGE₁、PGI₂和PGI₃是有效的血管舒张剂和血小板抗聚集剂),因此有助于预防血栓形成^[46]。

基于代谢及网络药理学联合分析结果及既往报道,BYHWT可能通过调节花生四烯酸和DGLA代谢生成前列腺素的途径,影响关键差异代谢物PGE₁的水平并作用于核心靶点PTGS2,从而改善CIRI后的肠道黏膜屏障损伤。分子对接结果表明PGE₁与PTGS2有较好的结合活性,进一步实验验证结果显示BYHWT给药后,结肠组织中PGE₁水平升高,同时PTGS2表达显著降低,表明BYHWT可能通过调控花生四烯酸/DGLA-PTGS2-前列腺素代谢网络,改善肠道继发损伤和脑原发损伤。

综上,本研究基于代谢组、网络药理学及体内实验证实,BYHWT可能通过调控花生四烯酸/DGLA-PTGS2-前列腺素代谢网络,减轻CIRI后继发肠道黏膜屏障损伤。课题组后续研究将聚焦于细胞层面,深入解析该调控网络的具体分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang Y, Huang X T, Wang Y G, *et al.* The impact of triglyceride-glucose index on ischemic stroke: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1): 2.
- [2] Hilkens N A, Casolla B, Leung T W, *et al.* Stroke [J]. *Lancet*, 2024, 403(10446): 2820-2836.
- [3] Tu W J, Wang L D, Special Writing Group of China Stroke Surveillance Report. China stroke surveillance report 2021 [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 33.
- [4] Camara-Lemarroy C R, Ibarra-Yruegas B E, Gongora-Rivera F. Gastrointestinal complications after ischemic stroke [J]. *J Neurol Sci*, 2014, 346(1/2): 20-25.
- [5] 范加维, 杨森, 杨拯, 等. 原花青素对脑缺血再灌注损伤后肠道功能的保护作用 [J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(10): 1138-1144.

- [6] 贺晨菲, 马驰远, 刘向哲. 基于“脑肠互动”探讨通腑法治疗缺血性中风的机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2024, 26(3): 617-621.
- [7] 杨璐平, 孙红梅, 盖聪, 等. 补阳还五汤及其拆方对缺血性中风气虚血瘀证大鼠脑血流及脂质代谢的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(10): 1029-1036.
- [8] 陈博威, 欧阳银, 曾繁佐, 等. 补阳还五汤通过小窝蛋白 1 调控 Shh 信号通路促进脑缺血后星形胶质细胞转分化 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 811-821.
- [9] 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.
- [10] Rasmussen J A, Villumsen K R, Ernst M, *et al.* A multi-omics approach unravels metagenomic and metabolic alterations of a probiotic and synbiotic additive in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 21.
- [11] Navarro-Reig M, Jaumot J, García-Reiriz A, *et al.* Evaluation of changes induced in rice metabolome by Cd and Cu exposure using LC-MS with XCMS and MCR-ALS data analysis strategies [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(29): 8835-8847.
- [12] Thévenot E A, Roux A, Xu Y, *et al.* Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3322-3335.
- [13] Xia J G, Wishart D S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(6): 743-760.
- [14] Xu Y F, Liu Y, Li K X, *et al.* COX-2/PGE₂ pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1619-1631.
- [15] Nie H F, Ge J W, Yang K L, *et al.* Naotaifang III protects against cerebral ischemia injury through LPS/TLR4 signaling pathway in the microbiota-gut-brain axis [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2023, 17: 3571-3588.
- [16] 陈震霖, 张硕, 张景明, 等. 论中医整体观的基本特性 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1348-1351.
- [17] 苏紫威, 马妍, 周彦彰, 等. 从“气虚血瘀”论探讨补阳还五汤治疗缺血性中风研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(12): 2991-2994.
- [18] Xu K Y, Gao X X, Xia G H, *et al.* Rapid gut dysbiosis induced by stroke exacerbates brain infarction in turn [J]. *Gut*, 2021: gutjnl-gu2020-323263.
- [19] Kuo W T, Odenwald M A, Turner J R, *et al.* Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1514(1): 21-33.
- [20] Liang J, Dai W G, Liu C H, *et al.* Gingerenone a attenuates ulcerative colitis via targeting IL-17RA to inhibit inflammation and restore intestinal barrier function [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(28): 2400206.
- [21] Li X, Liu Z Q, Liao J, *et al.* Network pharmacology approaches for research of Traditional Chinese Medicines [J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21(5): 323-332.
- [22] Zhao W B, Wang B Y, Li S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 558-560.
- [23] 常佳东, 吴江, 韩瑞, 等. 整合脑组织代谢组学和肠道菌群测序分析研究酸枣仁汤抗抑郁的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 905-918.
- [24] 张旭, 张晨晨, 杨颖, 等. 基于代谢组学研究保利尔胶囊的调血脂作用 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 60-72.
- [25] Badimon L, Vilahur G, Rocca B, *et al.* The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(9): 2001-2015.
- [26] Kursun O, Karatas H, Bariskaner H, *et al.* Arachidonic acid metabolites in neurologic disorders [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2022, 21(2): 150-159.
- [27] Wang B, Wu L J, Chen J, *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 94.
- [28] Nilsen D W T, Myhre P L, Kalstad A, *et al.* Serum levels of dihomo-gamma (γ)-linolenic acid (DGLA) are inversely associated with linoleic acid and total death in elderly patients with a recent myocardial infarction [J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3475.
- [29] Wang X P, Lin H P, Gu Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases [J]. *Lipids Health Dis*, 2012, 11: 25.
- [30] Braune S, Küpper J H, Jung F. Effect of prostanoids on human platelet function: An overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9020.
- [31] Shen J B, Cao M S, Zhou T T, *et al.* PGE₁ triggers Nrf2/HO-1 signal pathway to resist hemin-induced toxicity in mouse cortical neurons [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 634.
- [32] Palma-Barqueros V, Torregrosa J M, Caparrós-Pérez E, *et al.* Developmental differences in platelet inhibition response to prostaglandin E₁ [J]. *Neonatology*, 2020, 117(1): 15-23.
- [33] Shen Y J, Wang X, Yuan R S, *et al.* Prostaglandin E₁ attenuates AngII-induced cardiac hypertrophy via EP3

- receptor activation and Netrin-1 upregulation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 159: 91-104.
- [34] Chen Y, Wang M D, Yang Y L, *et al*. Efficacy and safety of alprostadil in microcirculatory disturbances during emergency PCI: A Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2024, 24(4): 547-556.
- [35] Su C L, Fan X H, Xu F, *et al*. Prostaglandin E₁ attenuates post-cardiac arrest myocardial dysfunction through inhibition of mitochondria-mediated cardiomyocyte apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2): 110.
- [36] Ling L, Zhang S P, Ji Z G, *et al*. Therapeutic effects of lipoprostaglandin E₁ on angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke in rats [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(5): 469-477.
- [37] Taha A S, McCloskey C, McSkimming P, *et al*. Misoprostol for small bowel ulcers in patients with obscure bleeding taking aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs (MASTERS): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(7): 469-476.
- [38] Topcu I, Vatansever S, Var A, *et al*. The effect of Misoprostol, a prostaglandin E₁ analog, on apoptosis in ischemia-reperfusion-induced intestinal injury [J]. *Acta Histochem*, 2007, 109(4): 322-329.
- [39] Zackular J P, Kirk L, Trindade B C, *et al*. Misoprostol protects mice against severe *Clostridium difficile* infection and promotes recovery of the gut microbiota after antibiotic perturbation [J]. *Anaerobe*, 2019, 58: 89-94.
- [40] Gómez-Valenzuela F, Escobar E, Pérez-Tomás R, *et al*. The inflammatory profile of the tumor microenvironment, orchestrated by cyclooxygenase-2, promotes epithelial-mesenchymal transition [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 686792.
- [41] Aïd S, Bosetti F. Targeting cyclooxygenases-1 and-2 in neuroinflammation: Therapeutic implications [J]. *Biochimie*, 2011, 93(1): 46-51.
- [42] Fesharaki-Zadeh A. Oxidative stress in traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13000.
- [43] Guo S H, Huang Z H, Zhu J, *et al*. CBS-H₂S axis preserves the intestinal barrier function by inhibiting COX-2 through sulfhydrating human antigen R in colitis [J]. *J Adv Res*, 2023, 44: 201-212.
- [44] Li Y, Soendergaard C, Bergenheim F H, *et al*. COX-2-PGE₂ signaling impairs intestinal epithelial regeneration and associates with TNF inhibitor responsiveness in ulcerative colitis [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 497-507.
- [45] Fitzgerald G A. Coxibs and cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(17): 1709-1711.
- [46] Das U N. COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(7): RA233-7.

[责任编辑 李亚楠]