

· 数据挖掘 ·

细胞膜固相色谱法联合网络药理学探讨补阳还五汤促进缺血性脑卒中康复的作用

闫向丽^{1,2}, 贺颖颖³, 白明^{1,2*}, 许二平^{1,2*}

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046;

2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046; 3. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:采用细胞膜固相色谱法联合网络药理学探讨补阳还五汤促进缺血性脑卒中康复的作用机制。方法:细胞膜固相色谱法筛选补阳还五汤供试液中与海马神经元细胞特异性结合的成分;检索 PubChem, PharmMapper, 在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM), GeneCards 等数据库获取特异性结合成分的作用靶点及缺血性脑卒中疾病的靶点;借助 STRING, Cytoscape 3.7.1 软件绘制蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;利用 DAVID 在线数据库对 PPI 网络中的核心靶点进行基因本体(GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)生物途径分析,探讨补阳还五汤促进缺血性脑中风康复可能的作用机制。结果:通过细胞膜固相色谱法,筛选出了 13 个与海马神经元细胞特异性结合的成分;通过网络分析和靶点富集,显示作用靶点主要关联细胞增殖调控、蛋白质磷酸化、缺氧反应、血管生成等生物过程,对叉头转录因子(FoxO)信号通路、腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路、细胞凋亡通路等具有广泛的干预作用。结论:补阳还五汤可能通过调节 FoxO, AMPK, NF- κ B, 细胞凋亡等信号通路促进缺血性脑中风的康复。

[关键词] 补阳还五汤; 缺血性脑中风; 细胞膜固相色谱法; 网络药理学

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0191-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220111 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211126.1212.001.html>

[网络出版日期] 2021-11-26 14:33

Effect of Buyang Huanwutang on Rehabilitation of Ischemic Stroke by Cell Membrane Solid-phase Chromatography Combined with Network Pharmacology

YAN Xiang-li^{1,2}, HE Ying-ying³, BAI Ming^{1,2*}, XU Er-ping^{1,2*}

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Key Laboratory for Modern Research on Zhongjing's Herbal Formulae, Zhengzhou 450046, China;

3. College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Objective: To explore the effect of Buyang Huanwutang (BHD) on rehabilitation of ischemic stroke (IS) by cell membrane solid-phase chromatography and network pharmacology. **Method:** Cell membrane solid-phase chromatography was performed to screen the specific binding components of BHD with hippocampal neurons. Targets of the specific components were retrieved based on PubChem and PharmMapper and those of IS were searched from Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and GeneCards. Then, the protein-protein interaction (PPI) network was constructed with STRING and Cytoscape 3.7.1, followed by Gene Ontology

[收稿日期] 20210716(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873228);广东省教育厅计划项目(2017KZDXM018)

[第一作者] 闫向丽,博士,助理研究员,从事中医药防治常见病研究, Tel:020-86253082, E-mail:1583134900@qq.com

[通信作者] *白明,硕士,教授,硕士生导师,从事中药药理研究, Tel:0371-86253082, E-mail:baiming666@126.com;

*许二平,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治常见病研究, Tel:020-86253082, E-mail:xuerping@sina.com

(GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of the hub genes in the PPI network. Thereby, the mechanism of BHD in promoting IS rehabilitation was clarified. **Result:** A total of 13 specific components were identified. The hub genes were mainly involved in the biological processes of regulation of cell proliferation, protein phosphorylation, hypoxia response, and angiogenesis, and the pathways of Forkhead box O (FoxO) signaling pathway, adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway, and apoptosis pathway. **Conclusion:** BHD may promote the recovery of IS by regulating FoxO, AMPK, NF- κ B, and apoptosis pathways.

[Keywords] Buyang Huanwutang; ischemic stroke; cell membrane solid-phase chromatography; network pharmacology

缺血性脑中风是脑血管疾病的主体,具有发病率高、死亡率高、复发率高等特点,是导致死亡的第二大原因^[1-3]。补阳还五汤源于清代名医王清任的《医林改错》,方中由黄芪、当归、赤芍、桃仁、川芎、红花和地龙7味药材组成,是中医临床上治疗缺血性脑中风经典方剂,其对缺血性脑中风临床有效率高达80%。中药方剂具有多成分、多靶点、多途径的特点。补阳还五汤中活性成分的复杂性及人体内可调节靶点的多样性,促使其促进缺血性脑中风恢复的科学依据和潜在药理机制有待进一步明确。

现代药理学认为,能够与受体、通道等效应靶点结合并发挥一定生物活性的成分才是真正的效应成分。细胞膜是生物效应靶点最集中的部位,细胞膜固相色谱法正是利用细胞膜上的生物靶点实现对中药提取物中效应成分进行分离的一种技术^[4-5]。课题组前期利用血小板固相色谱法筛选出来的成分,可能是补阳还五汤抗血栓、抗血小板聚集“行血”的活性成分^[6];用红细胞膜固相色谱法筛选出来的成分,可能是补阳还五汤“行血活血”的活性成分^[7];用脑微血管内皮细胞固相色谱法筛选出来的成分,可能是补阳还五汤促进血管新生“生新”的活性成分^[8],但就目前而言,对补阳还五汤在神经细胞上的靶点成分研究尚少。网络药理学融合了多学科的内容和技术,可以在分子水平上阐明成分与成分网络、成分与靶点网络、疾病与靶标网络,为药物靶点的发现及新药研发提供了科学依据^[9-13]。因此,本研究拟采用细胞膜固相色谱法检测补阳还五汤中与海马神经元细胞特异性结合的成分,再结合网络药理学的方法对各特异性结合成分可能促进缺血性脑中风康复的作用机制进行探讨,为该复方的临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 细胞 小鼠海马神经元细胞系,购自上海康朗生物科技有限公司。

1.2 仪器 Oasis HLB型固相萃取小柱(美国沃特世公司);AE2000型倒置相差显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);CCL-170T-8型三气培养箱(新加坡Esco公司);LC-30 AD型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB SCIEX Triple TOF™ 5600型系统(美国AB SCIEX公司)。

1.3 药物及试剂 黄芪(批号181001571),当归(批号170808041),赤芍(批号180901751),桃仁(批号180900571),川芎(批号181200441),红花(批号170806121)均购自康美药业股份有限公司,地龙为广州百合堂零售产品,7味饮片均由广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定为正品;DMEM基础培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Gibco公司,批号8118119,8196564);青霉素-链霉素溶液(中国Biosharp公司,批号BL791A);柠檬酸三钠、柠檬酸(国药集团化学试剂有限公司);质谱甲酸(美国Thermo Fish公司);甲醇(美国Merk公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤供试液的制备 按照补阳还五汤的处方要求,称取全方各味药材(黄芪60g,当归9g,赤芍9g,桃仁9g,川芎6g,红花9g,地龙9g),分别用8倍量,6倍量的蒸馏水回流提取2次,每次1h,合并2次提取液,减压浓缩至50mL,采用D101型大孔树脂柱吸附,去离子水洗脱多糖类成分(Molish反应阴性),收集40%和70%乙醇洗脱部位,减压浓缩至100mL,即得1.1g·mL⁻¹补阳还五汤供试液。

2.2 给药浓度的筛选 将处于对数生长期的海马神经元细胞以一定的密度接种至96孔板中,孵育24h后,分别加入275,137.5,110,55,27.5g·L⁻¹质量

浓度的药物溶液 100 μL ;另外设空白对照孔。继续培养 24 h 后,吸弃各孔中原培养溶液,向每孔中加入混有 10% 细胞增殖与活性检测(CCK-8)液的完全培养基 100 μL ,2 h 后用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 A ,以处理组 A 与空白组 A 的比值计算细胞活力。

2.3 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的配制 称取柠檬酸 1.06 g,超纯水定容至 50 mL;称取柠檬酸钠 1.48 g,超纯水定容至 50 mL;量取柠檬酸溶液 13.1 mL,柠檬酸钠溶液 6.9 mL,混合均匀。调节 pH 至 4.0,0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。

2.4 解离液的制备 细胞以 8×10^7 个/L 的密度接种至 75 cm^2 的细胞培养瓶中,当细胞融合至 80% 时将其分为给药组和空白组,弃去培养瓶中的原培养基,PBS 洗涤 3 次后加入 55 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的补阳还五汤供试液 5 mL,空白组加入等量的完全培养基,将细胞置于细胞培养箱中孵育 2 h。孵育结束后,弃去培养瓶中的培养基,加入 PBS(pH 7.4)洗涤 5 次,每次洗涤轻轻摇晃培养瓶确保每个部位均可被润洗到。清洗完后向培养瓶中加入 pH 4.0 的柠檬酸钠缓冲溶液 10 mL,将培养瓶放入细胞培养箱中解离 2 h。收集解离液于离心管中。

2.5 解离液的纯化与富集 依次吸取甲醇和去离子水 4 mL 活化和平衡固相萃取小柱(SPE 小柱),吸取解离液匀速上样,室温静置 1 min 后,5 mL 去离子水冲洗 SPE 小柱,然后用 50% 乙腈水溶液 10 mL 洗脱被吸附的成分,收集洗脱液。氮气吹干,超纯水定容至 1 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,低温保存备用。

2.6 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析 色谱条件为 Kinetex C_{18} 反相色谱柱(2.1 mm \times 50 mm,2.6 μm);流动相甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B),流动相梯度洗脱(0~5 min,10%~40%A;5~10 min,40%~60%A);进样量 3 μL ;流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱条件为离子源温度 600 $^{\circ}\text{C}$;雾化器压力(GS1)379 211 Pa;辅助气压力(GS2)379 211 Pa;气帘气压力(CUR)241 316 Pa;喷雾电压(ISVF)4 500 V;二级质谱参数为去簇电压(DP)100 V;碰撞能量(CE)45 V。

2.7 特异性结合成分的作用靶点预测 通过 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库获取各特异性结合成分的 3D 结构,以 sdf 格式保存,然后将特异性结合成分的 3D 结构导入 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/>

[pharmmapper/submitfile.html](http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html))数据库预测各特异性结合成分的作用靶点,限定研究物种为人类(Homosapiens),点击“submit”,获取各特异性结合成分的潜在作用靶点信息,构建特异性结合成分潜在的作用靶点数据集。

2.8 缺血性脑中风疾病的靶点预测 通过在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM,<http://omim.org/>),GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库获取缺血性脑中风疾病相关靶点,细胞水平对该疾病的研究常用氧糖剥夺再灌注模型,动物水平对该疾病的研究常用大脑中动脉闭塞模型,为确保检索靶点的全面性,搜索关键词“缺血性脑中风(IS)”“氧糖剥夺再灌注(OGD/R)”“大脑中动脉闭塞(MCAO)”,查找与缺血性脑中风疾病相关的基因,删除重复靶点进而建立缺血性脑中风疾病靶点数据集。

2.9 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与整合 分别将特异性结合成分的作用靶点和缺血性脑中风疾病的靶点导入 STRING(<https://string-db.org/>)数据库,构建 PPI 网络,结果以 tsv 格式保存。然后分别将靶点的相互作用网络导入 Cytoscape 3.7.1 软件,进一步优化特异性结合成分靶点和缺血性脑中风疾病靶点的蛋白质相互作用关系网络,并利用 Merge 功能将特异性结合成分靶点和缺血性脑中风疾病靶点的相互作用网络进行合并,通过 NetworkAnalyzer 进行网络拓扑参数分析计算,获取网络信息,包括节点度(Degree),介数中心性(BC),紧密度中心性(CC)。

2.10 核心靶点的基因本体(GO)注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)生物途径分析 通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)在线数据库对网络合并后获得的核心靶点进行 GO 分析。限定研究物种为人类(Homosapiens),从生物过程(BP),分子功能(MF),细胞组成(CC)3 个方面进行 GO 富集分析,然后选择 Pathway 分析中的 KEGG 生物途径分析,进一步寻找特异性结合成分作用靶点显著富集的主要功能注释与体内通路,并将显著富集的体内通路制作成气泡图,从而探讨特异性结合成分促进缺血性脑中风康复可能的作用机制。

3 结果

3.1 给药浓度的确定 检测结果显示,药物质量浓度在 55 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞活力最大,而当质量浓度 > 110 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞活力呈现明显下降的趋势,说明高浓度药物会影响细胞活力。因此,选用 55 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为后续实验的给药浓度。见表 1。

表1 不同药物浓度对海马神经元细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of different Buyang Huanwutang concentrations on viability of hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 质量浓度/g·L ⁻¹ | 细胞活力 |
|------------------------|-----------|
| 27.5 | 1.05±0.09 |
| 55.0 | 1.15±0.10 |
| 110.0 | 1.12±0.06 |
| 137.5 | 1.02±0.09 |
| 275.0 | 0.09±0.07 |

3.2 特异性结合成分的鉴定 运用PeakView软件

表2 补阳还五汤解离液中各特异性结合成分碎片离子信息

Table 2 Fragment ion information of each specific binding component in dissociation solution of Buyang Huanwutang

| 特异性结合成分 | 筛选模式 | 预测值/Da | 真实值/Da | 误差/ppm | 特征离子碎片 |
|--------------------------------------|--------------------|------------|-----------|--------|--|
| 毛蕊异黄酮苷 | [M+H] ⁺ | 447.128 57 | 447.127 6 | -2.2 | 285.075 7, 270.051 4, 253.048 6, 225.054 8 |
| 芒柄花苷 | [M+H] ⁺ | 431.133 66 | 431.133 0 | -1.6 | 269.080 4, 253.051 1, 213.090 1 |
| 苯丙氨酸 | [M+H] ⁺ | 166.086 26 | 166.085 6 | -4.1 | 120.080 3, 103.053 3 |
| 毛蕊异黄酮 | [M+H] ⁺ | 285.075 75 | 285.075 2 | -2.1 | 270.052 3, 253.048 3, 242.056 3, 225.054 2, 213.054 5, 185.059 5, 137.023 0 |
| 芒柄花素 | [M+H] ⁺ | 269.080 84 | 269.080 3 | -2.0 | 225.054 7, 197.059 8, 169.063 6 |
| 3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷 | [M+H] ⁺ | 301.107 05 | 301.107 3 | 0.8 | 167.070 5, 152.047 9, 124.049 5 |
| 亮氨酸 | [M+H] ⁺ | 132.101 91 | 132.101 6 | -2.4 | 86.098 1, 72.939 1, 56.054 0 |
| 色氨酸 | [M+H] ⁺ | 205.097 15 | 205.096 0 | -5.5 | 170.059 7, 142.065 1, 130.065 6 |
| 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷 | [M+H] ⁺ | 465.175 52 | 465.174 4 | -2.4 | 315.122 9, 167.069 3, 123.041 4 |
| 6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷 | [M-H] ⁻ | 625.141 02 | 625.138 7 | -3.7 | 463.087 6, 301.034 4, 299.018 7, 271.022 4 |
| 芍药苷 | [M-H] ⁻ | 481.170 44 | 481.170 2 | -0.5 | 343.083 2, 121.031 4, 77.042 3 |
| 没食子酰芍药苷 | [M-H] ⁻ | 631.166 84 | 631.165 0 | -2.9 | 613.155 5, 491.118 8, 399.091 2, 313.052 6, 211.021 6, 177.053 5, 169.013 5, 125.025 3 |
| 儿茶素 | [M-H] ⁻ | 289.071 76 | 289.069 0 | -9.5 | 152.981 4, 108.991 0 |

3.3 特异性结合成分-作用靶点网络构建 特异性结合成分靶点的预测须基于分子的3D结构,通过PubChem数据库查找特异性结合成分的3D结构,Cytoscape软件构建特异性结合成分与作用靶点网络,见增强出版附件内容。

3.4 特异性结合成分靶点蛋白与缺血性脑中风疾病靶点蛋白的网络构建 通过Cytoscap软件构建特异性结合成分靶点蛋白网络、缺血性脑中风疾病靶点蛋白网络。将特异性结合成分靶点蛋白的相互作用网络与缺血性脑中风疾病靶点蛋白的相互作用网络进行合并,取其交集部分,合并后的网络图见增强出版附件材料。通过“Degree>10”筛选关键基因,共筛选出26个关键基因,见表3。

对所得的质谱图进行解析,结合文献建立各成分分子信息数据库^[14-18],确定给药组解离液中特有的分子离子峰,提取其二级质谱图,通过对碎片离子进行归属,推断特异性结合成分可能是毛蕊异黄酮苷,芒柄花苷,苯丙氨酸,毛蕊异黄酮,芒柄花素,3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷,亮氨酸,色氨酸,7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷,6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷,芍药苷,没食子酰芍药苷,儿茶素,各特异性结合成分碎片离子信息见表2。特异性结合成分的二级质谱图及可能的裂解方式见增强出版内容。

3.5 特异性结合成分与缺血性脑中风疾病核心靶点的富集分析 为进一步阐明26个关键基因的可能作用,通过使用DAVID对关键基因进行GO注释和KEGG生物途径分析,从而确定关键基因最主要的生物途径。分析获得了84个生物过程信息,其中共有21个生物过程信息具有统计学意义($P<0.05$),见表4。这些生物过程分别属于细胞增殖调控、蛋白质磷酸化、缺氧反应、血管生成。通过KEGG生物途径分析,富集到60条特异性结合成分可能促进缺血性脑中风疾病恢复的相关基因通路,其中共有20条基因通路差异具有统计学意义($P<0.05$),图见增强出版内容。

表3 特异性结合成分与缺血性脑中风疾病共同的关键基因

Table 3 Specific binding components share key genes with ischemic stroke disease

| No. | 基因 | 蛋白全称 |
|-----|------------------------|--|
| 1 | 蛋白激酶B α(Akt1) | Akt serine/threonine kinase 1 |
| 2 | 血管内皮生长因子A(VEGFA) | vascular endothelial growth factor A |
| 3 | 过氧化氢酶(CAT) | catalase |
| 4 | 细胞色素C(CYCS) | cytochrome c, somatic |
| 5 | 白细胞介素-4(IL4) | interleukin 4 |
| 6 | CXC趋化因子配体8(CXCL8) | CXC motif chemokine ligand 8 |
| 7 | NOTCH1 | notch receptor 1 |
| 8 | 沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1) | sirtuin 1 |
| 9 | 异柠檬酸脱氢酶1(IDH1) | isocitrate dehydrogenase 1 |
| 10 | 膜联蛋白A5(ANXA5) | annexin A5 |
| 11 | 神经营养因子(BDNF) | brain derived neurotrophic factor |
| 12 | 磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基α(PIK3CA) | phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha |
| 13 | 共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM) | ATM serine/threonine kinase |
| 14 | 叉头转录因子1(FOXO1) | Forkhead transcription factor 1 |
| 15 | 柠檬酸合酶(CS) | citrate synthase |
| 16 | 结合珠蛋白(HP) | haptoglobin |
| 17 | 髓样分化因子8(MYD8) | MYD88 innate immune signal transduction adaptor |
| 18 | 白细胞介素-17A(IL17A) | interleukin 17A |
| 19 | 一型胰岛素样生长因子受体(IGF1R) | insulin like growth factor 1 receptor |
| 20 | 葡萄糖激酶(GCK) | glucokinase |
| 21 | 天冬氨酸蛋白水解酶1(CASP1) | Caspase 1 |
| 22 | AMPA型谷氨酸受体1(GRIA1) | glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1 |
| 23 | 酪氨酸激酶(LYN) | LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase |
| 24 | 髓鞘碱性蛋白(MBP) | myelin basic protein |
| 25 | 甲状腺素运载蛋白(TTR) | transthyretin |
| 26 | 补体3(C3) | complement 3 |

4 讨论

细胞膜固相色谱法是生物色谱的一种,其直接用活细胞对效应成分进行特异性结合,是研究以细胞膜为作用靶点的效应成分的有效手段^[19-21],在该方法中运用到的 Oasis HLB 型 SPE 小柱填料为水可润湿性反相吸附剂,由两种基本单体按特定比例聚合而成,能很好的保持润湿性,提高了固相萃取方法的稳定性和重现性。液相色谱高分辨串联质谱仪是集准确质量数、高分辨率、高速扫描速度等优点于一体的质谱系统平台。笔者通过细胞膜固相色谱法联合液相色谱高分辨串联质谱仪筛选出了13个特异性结合成分。

网络药理学研究结果显示,13个特异性结合成分对应的生物学作用靶点达到26个。通过查阅文

献^[22-29],发现补阳还五汤能通过26个关键基因的直接或间接作用保护脑缺血再灌注模型大鼠脑损伤,见表5。对26个关键基因富集后发现 FoxO 信号通路, AMPK 信号通路, NF-κB 信号通路、凋亡通路等通路得分水平较高。其中 AMPK 信号通路的主要功能是促进 ATP 产生并抑制各种组织中 ATP 的消耗,当细胞处于低葡萄糖、缺血、缺氧等状态时, AMPK 信号通路被激活^[30-33]。因此,当脑缺血再灌注时, AMPK 信号通路可能被激活从而发挥对脑组织的保护作用。脑缺血恢复血流后,脑组织中产生的大量自由基会损伤线粒体,并促进脑神经细胞的凋亡或坏死,因此,抑制细胞凋亡通路是保护脑缺血再灌注损伤的重要途径^[32-34]。NF-κB 信号通路控制了很多与炎症相关的基因,大量研究证实, SIRT1 可以通过调节 NF-κB, FoxO 等下游分子,从而发挥

表4 补阳还五汤作用关键基因的生物过程分析

Table 4 Biological process analysis of key genes with Buyang Huanwutang

| 基因功能条目 | 数目/个 | P | 基因 |
|---|------|-------|------------------------------|
| GO:0031663 lipopolysaccharide-mediated signaling pathway | 3 | 0.001 | Akt1,MYD88,LYN |
| GO:0001666 response to hypoxia | 4 | 0.002 | VEGFA,CAT,CASP1,ATM |
| GO:0046777 protein autophosphorylation | 4 | 0.002 | Akt1,IGF1R,LYN,ATM |
| GO:0030335 positive regulation of cell migration | 4 | 0.002 | IGF1R,Notch1,LYN,VEGFA |
| GO:0042542 response to hydrogen peroxide | 3 | 0.002 | HP,CAT,SIRT1 |
| GO:0001525 angiogenesis | 4 | 0.004 | VEGFA,CXCL8,PIK3CA,SIRT1 |
| GO:0032868 response to insulin | 3 | 0.004 | LYN,CAT,SIRT1 |
| GO:0008284 positive regulation of cell proliferation | 5 | 0.004 | IGF1R,Notch1,LYN,VEGFA,SIRT1 |
| GO:0001938 positive regulation of endothelial cell proliferation | 3 | 0.004 | Akt1,VEGFA,SIRT1 |
| GO:0033138 positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation | 3 | 0.004 | Akt1,VEGFA,PIK3CA |
| GO:0032869 cellular response to insulin stimulus | 3 | 0.005 | Akt1,GCK,FoxO1 |
| GO:0031295 T cell costimulation | 3 | 0.005 | Akt1,LYN,PIK3CA |
| GO:0008286 insulin receptor signaling pathway | 3 | 0.005 | Akt1,IGF1R,FoxO1 |
| GO:0071456 cellular response to hypoxia 3 | 3 | 0.008 | Akt1,VEGFA,SIRT1 |
| GO:0048015 phosphatidylinositol-mediated signaling | 3 | 0.010 | Akt1,IGF1R,PIK3CA |
| GO:0006979 response to oxidative stress | 3 | 0.010 | Akt1,IDH1,SIRT1 |
| GO:0030168 platelet activation | 3 | 0.010 | Akt1,LYN,PIK3CA |
| GO:0030225 macrophage differentiation | 2 | 0.020 | VEGFA,SIRT1 |
| GO:0006468 protein phosphorylation | 4 | 0.020 | Akt1,LYN,PIK3CA,ATM |
| GO:0097150 neuronal stem cell population maintenance | 2 | 0.030 | Notch1,FoxO1 |
| GO:0045892 negative regulation of transcription,DNA-templated | 4 | 0.030 | IL4,Notch1,FoxO1,SIRT1 |

表5 补阳还五汤抗脑缺血再灌注作用靶点

Table 5 Targets of Buyang Huanwutang on cerebral ischemia reperfusion

| 组方 | 作用靶点 | 参考文献 |
|-----------|----------------------|------|
| 补阳还五汤 | p-Akt | [22] |
| 补阳还五汤 | Notch1 | [23] |
| 补阳还五汤及拆方 | BDNF,VEGF | [24] |
| 补阳还五汤 | HIF-1 α ,VEGF | [25] |
| 补阳还五汤含药血清 | SIRT1 | [26] |
| 补阳还五汤 | SIRT1,VEGF | [27] |
| 补阳还五汤 | VEGF,Caveolin-1 | [28] |
| 补阳还五汤 | Akt,GSK3 β | [29] |

对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织的保护作用^[35-39]。

综上所述,通过细胞膜固相色谱法联合网络药理学的方法,对补阳还五汤促进缺血性脑中风康复可能的作用机制进行预测,发现补阳还五汤可能通过调节FOXO,AMPK,NF- κ B,细胞凋亡等信号通路促进缺血性脑中风的康复。本研究为中药复方

药理学机制的研究提供了新的研究方向和理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VALERY L F, BO N, MENSAH G A. Global burden of stroke[J]. Circ Res, 2017, 120(3):439-448.
- [2] ZHONG L L, DING L S, HE W, et al. Systolic hypertension related single nucleotide polymorphism is associated with susceptibility of ischemic stroke [J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2017, 21(12):2901-2906.
- [3] JEONG H G, KO S B, KIM C K, et al. Tachycardia burden in stroke unit is associated with functional outcome after ischemic stroke [J]. Int J Stroke, 2016, 11(3):313-320.
- [4] 王君,刘新民,潘瑞乐. SH-SY5Y细胞膜固相色谱法的建立及其对远志皂苷水解产物效应物质的研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(7):661-663.
- [5] TANG D, ZHU J X, WU A G, et al. Pre-column incubation followed by fast liquid chromatography

- analysis for rapid screening of natural methylglyoxal scavengers directly from herbal medicines: case study of *Polygonum cuspidatum* [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1286(1):102-110.
- [6] LIAO F Y, YU A M, YU J Y, et al. Identification of active ingredients mediating anti-platelet aggregation effects of Buyang Huanwu decoction using a platelet binding assay, solid phase extraction, and HPLC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2018, 6:1-38.
- [7] YU A M, ZHENG H Z, YAN X L, et al. Erythrocyte membrane affinity chromatography, solid-phase extraction and UPLC-QTOF-MS/MS to screen active ingredients of Buyang Huanwutang [J]. *Rsc Adv*, 2019, 9(50):29217-29224.
- [8] LIAO F Y, MENG Y J, ZHENG H Z, et al. Biospecific isolation and characterization of angiogenesis-promoting ingredients in Buyang Huanwutang using affinity chromatography on rat brain microvascular endothelial cells combined with solid-phase extraction, and HPLC-MS/MS[J]. *Talanta*, 2018, 179:490-500.
- [9] 刘楠,姜云耀,黄婷婷,等. 基于网络药理学方法研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(11):2190-2198.
- [10] WU R M, JIANG B, LIA H, et al. A network pharmacology approach to discover action mechanisms of Yangxinshi tablet for improving energy metabolism in chronic ischemic heart failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246(6):1-10.
- [11] 付智慧,赵玲玲,周霖,等. 基于网络药理学探讨大承气汤治疗脓毒症的作用机制及关键靶点通路验证[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20):5351-5361.
- [12] ZHANG Z Y, YI P J, YANG J J, et al. Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of Bushen Tiansui formula on Alzheimer's disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 19(2):1-28.
- [13] QIN T Y, WU L L, HU Q, et al. Prediction of the mechanisms of action of Shengkang in chronic kidney disease: a network pharmacology study and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246(3):1-14.
- [14] LIU E H, QI L W, PENG Y B, et al. Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(8):828-842.
- [15] LEEHSIN S, LIECHWEN L, TSAI T. HPLC-MS/MS analysis of a traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43848.
- [16] 王李俊,杨琴,王飞,等. 大鼠 *ig* 毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷后尿中代谢产物的分离和鉴定[J]. *中草药*, 2017, 48(12):2382-2384.
- [17] WEN X D, LIU E H, JIE Y G, et al. Identification of metabolites of Buyang Huanwutang in rat urine using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2012, 67(8):114-122.
- [18] 黄晶,廖婧竹,刘武平,等. 基于 UPLC/ESI-Q-TOF-MS 技术的毛蕊异黄酮苷在大鼠血清中的代谢成分分析[J]. *广东化工*, 2017, 9(44):50-52.
- [19] 郑华珠,王利胜,吴银爱,等. UPLC-MS/MS 联合细胞膜固相色谱法分析补阳还五汤作用于神经元样 PC12 细胞的效应成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4):14-20.
- [20] 胡敏敏. 细胞生物色谱法在中药研究中的应用[J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(21):234-235.
- [21] LIU S, TAN Z, LI P, et al. HepG2 cells biospecific extraction and HPLC-ESI-MS analysis for screening potential antiatherosclerotic active components in *Bupeiuri Radix* [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2016, 121(4):56-62.
- [22] WANG X, LI X, WANG L N, et al. Buyang Huanwutang ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via downregulation of related protein and gene expression [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2018, 2018(5):85-91.
- [23] GUO Z P, HUANG M N, LIU A Q, et al. Buyang Huanwutang up-regulates Notch1 gene expression in injured spinal cord [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(8):13-21.
- [24] QU T B, YU T H, LIU Z T, et al. Effect of Buyang Huanwutang and its disassembled recipes on rats' neurogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *Chin J Integr Trad West Med*, 2014, 34(3):342-347.
- [25] CHEN Z Z, GONG X, GUO Q, et al. Bu Yang Huan Wu decoction prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of HIF-1 α , VEGF and promotion β -ENaC expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228(5):70-81.
- [26] ZHANG L, WEI C, RUAN Y, et al. Serum containing Buyang Huanwutang prevents age-associated migration and invasion of human vascular smooth muscle cells by up regulating SIRT1 expression [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3):282-290.

- [27] ZHENG X W, XU Q Q, WANG Y, et al. Buyang Huanwutang targets SIRT1/VEGF pathway to promote angiogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Neurosci-Switz*, 2018, 12: 1-10.
- [28] ZHU J Z, BAO X Y, ZHENG Q, et al. Buyang Huanwutang exerts cardioprotective effects through targeting angiogenesis via Caveolin-1/VEGF signaling pathway in mice with acute myocardial infarction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019(2): 42-55.
- [29] LI Z, WANG H, WANG Q, et al. Buyang Huanwutang vigorously rescues PC12 cells against 6-OHDA-induced neurotoxicity via Akt/GSK3 β pathway based on serum pharmacology methodology [J]. *Rejuv Res*, 2016, 19(6): 467-477.
- [30] PINEDA N R, ALQUISIRAS I B, ORTIZ A P, et al. Resveratrol activates neuronal autophagy through AMPK in the ischemic brain [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(2): 1055-1069.
- [31] MA C, WANG X, XU T, et al. Qingkailing injection ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury and modulates the AMPK/NLRP3 inflammasome signalling pathway [J]. *BMC Complem Altern Med*, 2019, 19(1): 320-330.
- [32] LIU T, HAN S, DAI Q, et al. IL-17A-Mediated excessive autophagy aggravated neuronal ischemic injuries via Src-PP2B-mTOR pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 29-52.
- [33] YU J, WANG W N, MA T N, et al. Ezetimibe attenuates oxidative stress and neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP pathway after MCAO in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(3): 47-58.
- [34] ZHANG W, JIN Y, WANG D, et al. Neuroprotective effects of leptin on cerebral ischemia through JAK2/STAT3/PGC-1 α mediated mitochondrial function modulation [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 156 (3) : 118-130.
- [35] ZHAO L, AN R, YANG Y, et al. Melatonin alleviates brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via attenuating inflammation, apoptosis, and oxidative stress: the role of SIRT1 signaling [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(4): 230-239.
- [36] DOU B, ZHOU W, LI S, et al. Buyang Huanwutang attenuates infiltration of natural killer cells and protects against ischemic brain injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1286-1300.
- [37] LI Z G, SHUI S F, HAN X W, et al. NLRP10 ablation protects against ischemia/reperfusion-associated brain injury by suppression of neuroinflammation [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 20(6): 11-19.
- [38] LI Y, LIANG W, GUO C, et al. Renshen Shouwu extract enhances neurogenesis and angiogenesis via inhibition of TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway following ischemic stroke in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253(5): 112-116.
- [39] YE Y, JIN T, ZENG X, et al. Meisoindigo protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and regulating microglia/macrophage polarization via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13(4): 50-53.

[责任编辑 顾雪竹]