

· 药理 ·

灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血的分子作用机制分析

曹光昭¹, 徐核¹, 张毅¹, 周瑞¹, 项昌培¹, 张晶晶^{1,2*}, 杨洪军^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京脑科学与类脑研究中心, 北京 102206)

[摘要] 目的:在确定灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血作用基础上,采用网络药理学技术对其可能的作用机制进行解析。方法:采用右侧颈总动脉结扎法制备慢性脑缺血模型,分为假手术组、模型组、金纳多组(48 mg·kg⁻¹)、灯盏生脉胶囊低、高剂量组(0.040 5、0.162 g·kg⁻¹)。通过Morris水迷宫实验及旷场实验对其药效进行评价,基于PubChem、GeneCards、Metascape等数据库进行靶点搜集、富集等分析,通过STRING 11.0、Cytoscape 3.7.1构建灯盏生脉胶囊成分靶点与慢性脑缺血疾病靶点相互作用网络、核心靶点网络及“成分-核心靶标-通路”网络,采用网络药理学对其作用机制进行探究,并通过分子生物学实验进行了验证。结果:训练第3~5天,灯盏生脉胶囊低剂量组小鼠的逃避潜伏期明显缩短;灯盏生脉胶囊高、低剂量组小鼠的穿越平台次数、原平台象限停留时间、总运动距离及中央区域运动距离增加。网络药理学结果表明,灯盏生脉胶囊可能通过参与炎症反应、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、血液循环、血管生成、细胞外基质等相关的生物学过程及通路,干预白细胞介素-6(IL-6)、TNF、胰岛素样生长因子1(IGF1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)和表皮细胞生长因子(EGF)等靶点发挥抗慢性脑缺血的作用。分析生物学实验验证结果表明,灯盏生脉胶囊可降低小鼠脑组织中IL-6表达。结论:灯盏生脉胶囊具有明显抗慢性脑缺血作用,网络药理学揭示了灯盏生脉胶囊多成分、多途径、多靶点的作用机制,为进一步深入研究其作用机制奠定了基础。

[关键词] 网络药理学; 灯盏生脉胶囊; 慢性脑缺血; 右侧颈总动脉结扎; 药效评价; 分子机制; 白细胞介素-6(IL-6)

[中图分类号] R743;R28;R96;R857.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0049-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211851 **[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.20210805.1109.002.html>

[网络出版日期] 2021-08-05 14:38

Molecular Mechanism Analysis of Dengzhan Shengmai Capsules Against Chronic Cerebral Hypoperfusion

CAO Guang-zhao¹, XU He¹, ZHANG Yi¹, ZHOU Rui¹, XIANG Chang-pei¹,
ZHANG Jing-jing^{1,2*}, YANG Hong-jun^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Chinese Institute for Brain Research, Beijing 102206, China)

[Abstract] **Objective:** Based on the protective effect of Dengzhan Shengmai capsules (DZSM) on chronic cerebral hypoperfusion (CCH), network pharmacology was employed to investigate the molecular mechanism. **Method:** CCH model was established by right common carotid artery ligation. The mice were divided into sham operation group, model group, ginaton group (48 mg·kg⁻¹), DZSM low- and high-dose groups (0.040 5, 0.162 g·kg⁻¹). The efficacy was evaluated by the Morris water maze test and open-field test. The underlying mechanism of DZSM for CCH was analyzed by network pharmacology and verified by molecular

[收稿日期] 2021-05-03

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1708900);国家自然科学基金项目(81974550)

[第一作者] 曹光昭,在读博士,从事中药药理及其应用研究,E-mail:cgzbu2020@163.com

[通信作者] *张晶晶,博士,副研究员,从事中药心脑血管分子药理学研究,E-mail:zjj4785@163.com;

*杨洪军,博士,研究员,从事中药心脑血管药理学研究及中药大品种培育研究,E-mail:hongjun0420@vip.sina.com

biology experiments. PubChem, GeneCards, Metascape and other databases were used for targets collection and enrichment analysis. Besides, the association of ingredients targets of DZSM with disease targets of CCH, core target network and chemical components-core targets-pathways network were constructed by STRING 11.0 and Cytoscape 3.7.1. **Result:** The escape latency of CCH mice significantly shortened on the 3rd to 5th day after DZSM low-dose treatment, the crossing times, time spent in the target quadrant, movement distance and distance in the central region of CCH mice significantly increased after DZSM low-dose and high-dose treatment. The results of network pharmacology indicated that DZSM might play a key role by regulating inflammatory response, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, blood circulation, angiogenesis, extracellular matrix and other related biological processes and pathways, and acting as targets such as interleukin-6 (IL-6), TNF, insulin-like growth factor 1 (IGF1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), epidermal growth factor (EGF). The results of biological experiments showed that DZSM could reduce the expression of IL-6 in brain tissue of CCH mice. **Conclusion:** DZSM provides a protective effect during CCH, and its multi-component, multi-pathway, multi-target mechanism is also revealed, which provides a basis for further study of the mechanism.

[Keywords] network pharmacology; Dengzhan Shengmai capsules; chronic cerebral hypoperfusion; ligation of right common carotid artery; pharmacodynamic evaluation; molecular mechanism; interleukin-6 (IL-6)

慢性脑缺血是指由高血压、糖尿病、全身性动脉粥样硬化和心脏病等诱发的脑血流长期灌注不足,在血管性痴呆、阿尔茨海默病等神经系统疾病发生发展过程中起着关键作用,主要表现为学习、认知及记忆能力下降^[1-4]。目前临床上主要采用组胺类药物、血管扩张剂、钙通道阻滞剂等对症治疗药物治疗慢性脑缺血^[5],但疗效欠佳且不良反应明显。中药复方具有多成分、多途径、多靶点的作用特点,在防治缺血性疾病中具有优势,因此,开展防治慢性脑缺血中药的研究具有重要意义。

灯盏生脉胶囊是以灯盏细辛为主药,以人参、麦冬、五味子为辅药制成的复方中药口服制剂,具有益气养阴、活血健脑的功效,主治气阴两虚、瘀阻脑络引起的胸痹心痛、中风后遗症等^[6]。该制剂治疗慢性脑灌注不足、痴呆等脑血管病疗效显著^[7],是国家药品监督管理局批准的具有中风二级预防功能的中成药,现已广泛应用于缺血性脑血管病恢复期,其临床疗效已经得到证实^[8]。

因中药复方具有多成分、多途径、多靶点的作用特点,这种复杂性使得很难对其展开系统的研究^[9]。网络药理学可从整体水平探讨中药与疾病之间的关系,系统地分析、模拟及预测药物对疾病网络的干预和影响,具有整体、协同的特点,这些特点对探究中医药治疗疾病的潜在机制具有独特优势^[10-11]。基于此,本研究拟选择右侧颈总动脉结扎(rUCCAO)导致的小鼠慢性脑缺血模型,采用

Morris水迷宫和旷场实验研究灯盏生脉胶囊对小鼠学习记忆能力、行为能力、焦虑情绪方面的影响,利用网络药理学方法探索灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血可能的作用机制,以期为该制剂后续的临床应用及实验研究提供参考。

1 材料

Morris水迷宫系统和通用自发活动(旷场)视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司)。白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-EI-M0044c),戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号P3761),灯盏生脉胶囊(云南生物谷灯盏花药业有限公司,批号Z20026439),银杏叶提取物片(金纳多,德国威玛舒培博士药厂,批号HJ20140768)。

SPF级雄性C57BL/6小鼠,体质量19~24 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号SYXK(京)2019-0003,经中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会审查通过,批准号202013151。

2 方法

2.1 灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血药效研究

2.1.1 灯盏生脉胶囊及金纳多溶液的配制及给药

将灯盏生脉胶囊溶于水,配成质量浓度分别为4.05、16.2 mg·L⁻¹的溶液;将金纳多溶于水,配成2.4 mg·L⁻¹溶液。灯盏生脉胶囊低、高剂量组分别按0.040 5、0.162 g·kg⁻¹·d⁻¹给予相应药液,金纳多组按

48 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给予相应药液,于造模后第2天开始给药,每天灌胃1次,共给药35 d。

2.1.2 rUCCAO 动物模型的建立及分组^[12] 小鼠用腹腔注射1%戊巴比妥钠(0.05 g·kg⁻¹)进行麻醉,仰卧位固定,颈部正中切口,分离右侧颈总动脉与迷走神经,用6-0丝线永久性结扎右侧颈总动脉以阻断血流;假手术组小鼠仅分离右侧颈总动脉,但不阻断血流,其他步骤与模型组相同。另将rUCCAO小鼠随机分为4组,即模型组、阳性药组(金纳多组)及灯盏生脉胶囊高、低剂量组(以下分别简称“中药高、低剂量组”)。

2.1.3 Morris 水迷宫实验^[13] 在直径100 cm的圆形水池中注入自来水,平台置于水面下1 cm,在水中加入奶粉并将水搅浑,以免让动物看清水下平台,水温保持在22~24℃,摄像机位于水池中央上方200 cm,可记录动物的位置、游泳距离和时间、游泳路径等。正式实验开始前1 d,将小鼠逐一放入水中适应性游泳1次。实验前5 d进行定位巡航实验,将小鼠头朝池壁,依次从4个象限放入水中,每2次训练间隔15 min,小鼠找到平台则记录停止,所用时间即为逃避潜伏期。在每次训练中,若90 s内小鼠仍未找到平台,则引导其到平台上,停留10 s。第6天将平台撤除,进行空间探索实验,将小鼠从平台象限对侧的象限头朝池壁放入水中,每只测试1次,记录其90 s内穿越平台次数和原平台象限停留时间。

2.1.4 旷场实验 将小鼠置于正方形的中央区域中,观察5 min内总运动距离和中央区域运动距离,每只小鼠测试结束后用75%乙醇彻底清洁实验箱。

2.1.5 脑组织取材及苏木素-伊红(HE)染色 小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠进行麻醉,断头,剪开皮肤拨向两侧暴露颅骨,从枕骨大孔处沿正中中线剪开颅骨,暴露脑组织,用弯头镊子将脑组织勾出,用无核糖核酸(RNA)酶水冲洗后,将脑放入脑模具内,依视交叉为基准,远心端切2片,近心端切4片,共切制6片,每片厚度2 mm,放入4%组织固定液中固定24 h后进行常规脱水浸蜡包埋,于加热的水中将切片展平,贴附于多聚赖氨酸载玻片上,将载玻片置于烘片机上,55℃烘24 h。依次将不同组的载玻片放入二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、95%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、70%乙醇 5 min 进行脱蜡,将脱蜡后的片子用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3,下同)洗去乙醇,浸于苏木素染液中染色5 min,用自来水冲洗干净后用1%盐酸乙醇溶液分化3 s,继续使用自来水冲洗,

再浸入伊红染液中染色5 min,用自来水将切片冲洗干净,依次浸入无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、无水乙醇 III 5 min 脱去水分,再置于二甲苯 I 5 min 和二甲苯 II 5 min,使标本透明,在脑组织表面滴加中性树胶封片,置于通风橱,贴好标签,观察形态学变化并拍照。

2.1.6 统计学分析 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2 基于网络药理学的灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血机制研究

2.2.1 灯盏生脉胶囊化学成分的收集及潜在活性成分靶点预测 灯盏生脉胶囊化学成分主要来自文献[14],通过 PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得灯盏生脉胶囊潜在化学成分的国际化合物标识(InChI)编码,上传至中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM),对其潜在活性成分的靶点进行预测。

2.2.2 慢性脑缺血相关靶点的筛选 通过 GeneCards 数据库,以“cerebral hypoperfusion”为关键词检索慢性脑缺血相关疾病靶点。

2.2.3 成分靶点与疾病靶点的关联分析及网络构建 将灯盏生脉胶囊成分靶点与慢性脑缺血疾病靶点通过 STRING 11.0 数据库进行关联,筛选出能够相互关联的成分靶点与疾病靶点,通过 Cytoscape 3.7.1 构建网络。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 以度中心性(degree) ≥ 26 、接近中心性(closeness) ≥ 0.46 和中介中心性(betweenness) ≥ 0.001 的条件对能够相互关联的成分靶点与疾病靶点进行筛选,将获得的核心靶点采用 Cytoscape 3.7.1 进行网络构建,并将网络图像可视化。

2.2.5 灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血靶点的富集分析 将灯盏生脉胶囊干预慢性脑缺血的核心靶点通过 Metascape 数据库进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。将富集度显著($P<0.01$)且与慢性脑缺血相关的GO或KEGG条目进行柱状图和气泡图的绘制。

2.2.6 “成分-核心靶点-通路”网络的构建 将灯盏生脉胶囊化学成分、核心靶点、与慢性脑缺血相关的通路导入 Cytoscape 3.7.1,构建“成分-核心靶点-通路”网络。

2.2.7 ELISA 测定慢性脑缺血小鼠 IL-6 表达 取不同组脑组织匀浆,采用二喹啉甲酸法(BCA)测定

样本蛋白浓度后,按试剂盒说明书进行操作,检测慢性脑缺血小鼠脑组织中IL-6的水平。

3 结果

3.1 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠学习能力的影响 在定位巡航实验中,小鼠的逃避潜伏期越长,表明小鼠的学习能力越差。由表1可知,训练

第1~5天,模型组小鼠逃避潜伏期均明显长于假手术组($P<0.05, P<0.01$),说明慢性脑缺血小鼠的学习能力显著下降,但假手术组小鼠仍具有很好的学习能力。训练第3~5天,与模型组比较,中药低剂量组小鼠的逃避潜伏期明显降低($P<0.05, P<0.01$),表明低剂量灯盏生脉胶囊可提高模型小鼠的学习能力。

表1 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠学习能力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of Dengzhan Shengmai capsules on learning ability of chronic cerebral hypoperfusion(CCH) mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	逃避潜伏期/s				
			第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术组	9~10		23.70±9.81	25.72±11.82	23.92±14.51	14.00±8.02	13.56±8.31
模型组	9		63.26±16.88 ²⁾	51.78±24.28 ¹⁾	53.37±30.25 ¹⁾	55.14±27.05 ²⁾	40.66±30.79 ¹⁾
金纳多组	8~10	48	31.86±15.44 ³⁾	30.97±12.95	28.86±17.15 ³⁾	32.22±12.69	25.47±13.60
中药低剂量组	10~11	40.5	46.00±25.76	32.09±16.46	24.22±17.20 ³⁾	19.69±9.469 ⁴⁾	15.84±9.07 ³⁾
中药高剂量组	10~11	162	50.06±23.69	31.19±25.16	20.92±16.87 ⁴⁾	27.47±21.31 ³⁾	26.47±20.53

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;实验开始时考虑到假手术组动物死亡率低,模型组动物死亡率偏高,所以每组动物只数不同;在后续实验中,由于动物出现了异常行为等情况(未出现动物死亡),故对异常值进行剔除,导致每组动物只数存在差别(表2同)

3.2 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠记忆能力的影响 空间探索实验用于考察小鼠的记忆能力。由表2可知,模型组小鼠穿越平台次数、原平台象限停留时间均显著低于假手术组($P<0.01$),说明慢性脑缺血小鼠的记忆能力出现下降,但假手术组小鼠

仍具有很好的记忆能力。与模型组比较,中药高、低剂量组小鼠的穿越平台次数和原平台象限停留时间明显升高($P<0.05$),金纳多组小鼠的原平台象限停留时间显著升高($P<0.01$),表明灯盏生脉胶囊及金纳多均可提高慢性脑缺血小鼠的记忆能力。

表2 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠记忆能力、行为能力及情绪的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Dengzhan Shengmai capsules on memory ability, behavior ability and emotion of CCH mice ($\bar{x}\pm s$)

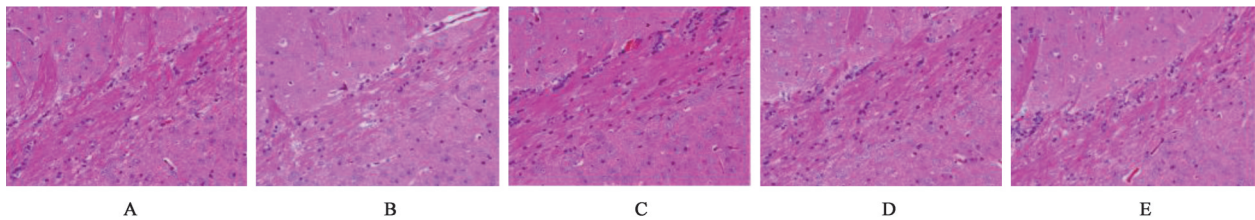
组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	穿越平台数/次	原平台象限停留时间/s	总运动距离/mm	中央区域运动距离/mm
假手术组	10~13		4.13±1.73	41.26±13.99	18 638.27±5 199.72	5 110.46±2 977.25
模型组	11~13		1.33±1.00 ¹⁾	19.63±7.98 ¹⁾	13 015.69±4 397.02 ¹⁾	1 834.15±1 116.38 ¹⁾
金纳多组	10	48	3.13±2.42	41.57±18.45 ³⁾	21 004.34±3 442.32 ³⁾	4 281.39±737.59 ³⁾
中药低剂量组	13~14	40.5	3.33±2.23 ²⁾	31.51±6.84 ²⁾	29 264.66±2 995.14 ³⁾	5 531.11±2 514.24 ³⁾
中药高剂量组	12~13	162	3.50±2.45 ²⁾	30.29±7.68 ²⁾	24 068.97±5 904.22 ³⁾	3 538.29±1 598.11 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

3.3 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠行为能力及情绪的影响 由表2可知,模型组小鼠总运动距离、中央区域运动距离均显著低于假手术组($P<0.01$),说明慢性脑缺血小鼠的自主活动性能下降、出现焦虑样情绪,但假手术组小鼠仍具有很好的行为能力且未出现焦虑样情绪。与模型组比较,中药低、高剂量组及金纳多组能明显提高小鼠总运动距离和中央区域运动距离($P<0.05, P<0.01$),表明灯盏生脉胶囊和金纳多均可提高慢性脑缺血小鼠的自主活动性能并改善其焦虑样情绪。

3.4 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠胼胝体的影响 由图1可知,假手术组小鼠胼胝体未发现明显的病理学变化。模型组小鼠胼胝体可见明显的空泡样改变,脑白质纤维排列不整齐,与假手术组差异明显;中药低、高剂量组及金纳多组小鼠胼胝体仅有少量空白样改变,脑白质纤维排列较为整齐、规则,表明灯盏生脉胶囊和金纳多均可改善慢性脑缺血小鼠胼胝体受损程度。

3.5 灯盏生脉胶囊潜在活性成分及潜在作用靶点预测 通过文献分析共搜集到灯盏生脉胶囊化学



注:A.假手术组;B模型组;C.金纳多组;D.中药低剂量组;E.中药高剂量组

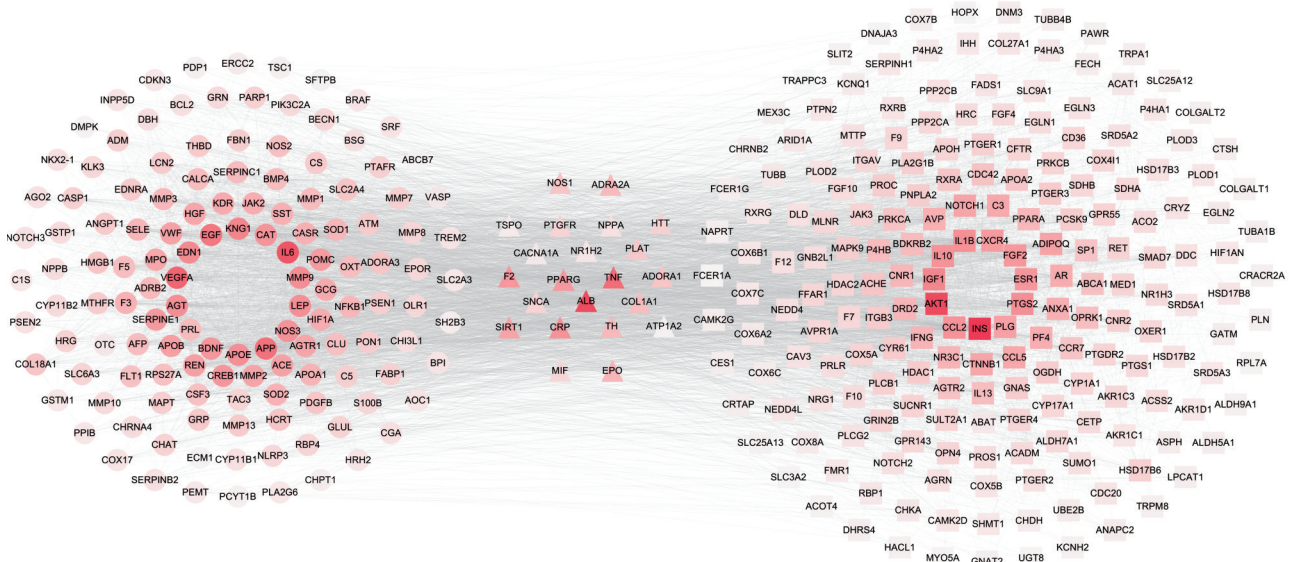
图1 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠胼胝体的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Dengzhan Shengmai capsules on callosum of CCH mice(HE,×400)

成分133个,得548个潜在成分靶点;在GeneCards收集到疾病靶点218个。见增强出版附加材料。

3.6 灯盏生脉胶囊成分靶点与慢性脑缺血疾病靶点的相互作用网络 通过将灯盏生脉胶囊的化学成分靶点与慢性脑缺血疾病靶点进行关联分析,发

现201个成分靶点与135个疾病靶点具有相互作用关系,其中交集靶点22个,主要包括肿瘤坏死因子(TNF)、白蛋白(ALB)、神经元型一氧化氮合酶1(NOS1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、C反应蛋白(CRP)等,网络图见图2。



注:圆形代表疾病靶点,三角形代表交集靶点,方形代表化学成分靶点;颜色代表degree的大小,颜色越深degree越大

图2 灯盏生脉胶囊成分靶点与疾病靶点的关联分析

Fig. 2 Association of ingredients targets of Dengzhan Shengmai capsules with disease targets of CCH

3.7 灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血的PPI网络 由图3可知,在灯盏生脉胶囊与慢性脑缺血核心蛋白互作的网络中,包含137个关键节点(节点代表靶点)和2988条边(边代表靶点间相互作用),其中成分靶点56个、交集靶点14个、疾病靶点67个。

3.8 灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血靶点的富集分析 利用Metascape数据库对灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血的核心靶点进行GO富集分析和KEGG通路富集分析,具体结果见增强出版附加材料。GO富集分析结果包括373个生物过程(BP),91个细胞组成(CC)及120个分子功能(MF)。BP主要涉及血液循环、血管生成、炎症反应的调节、细胞死亡的正调控、调节血压等,CC主要包括细胞外基质、神经

元胞体等,MF主要涉及受体调节器活动、细胞因子活性、抗氧化活性等;KEGG通路富集分析结果显示,与慢性脑缺血相关的通路主要涉及神经活动配体-受体相互作用、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、IL-17信号通路、TNF信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用等。

3.9 灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血“成分-核心靶点-通路”网络构建 对核心靶点进行富集分析,得到10条与慢性脑缺血相关的通路,通路上的78个核心靶点关联到47个灯盏生脉胶囊有效化学成分,即木犀草素、十五烷酸、棕榈酸、拟人参皂苷F₁₁、齐

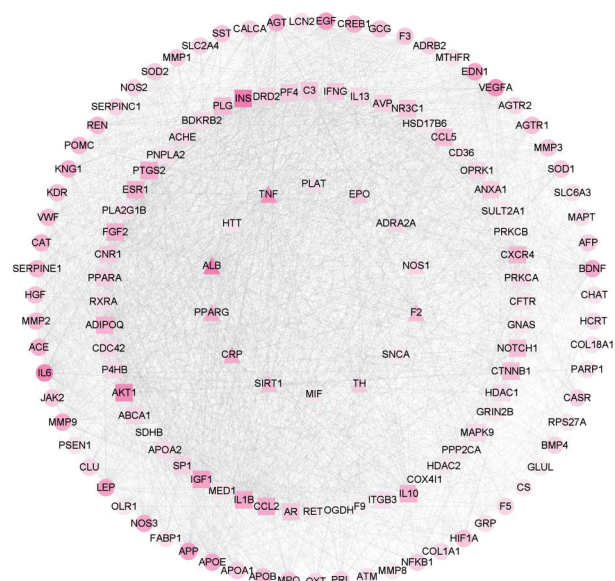


图3 灯盏生脉胶囊干预慢性脑缺血的核心靶点网络
Fig. 3 Core targets network of CCH intervened by Dengzhan Shengmai capsules

墩果酸、人参皂苷CK、三七皂苷R₁、麦冬皂苷A、瞿麦吡喃酮苷、20(R)-人参皂苷Rg₅、芹菜素、咖啡酸、竹节参皂苷IVa、三七皂苷Fe、人参皂苷Mb、人参皂苷Rg₄、人参皂苷Rg₅、人参皂苷Rh₃、人参皂苷Rh₄、苦玄参苷IA、gynoside C、绞股蓝皂苷VN₃、异金雀花苏素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、叶含长管贝壳杉素B、叶含长管贝壳杉素C、三七皂苷F₁、麦冬黄烷酮C、五味子醇甲H、姜状三七皂苷R₁、榎木皂苷1、戈米辛H、戈米辛O、叶含长管贝壳杉素F、麦冬皂苷D'、竹节参皂苷III、五味子醇甲B、肉豆蔻木酚素、五味子素C、戈米辛M₂、戈米辛R、绞股蓝皂苷VN₅、绞股蓝皂苷VN₆、绞股蓝皂苷XVII、麦冬皂苷D、麦冬黄烷酮C、前戈米辛。其中78个核心靶点包括灯盏生脉胶囊成分靶点34个,交集靶点5个[包括组织型纤溶酶原激活因子(PLAT)、促红细胞生成素(EPO)、α2A肾上腺素能受体基因(ADRA2A)、TNF、凝血因子II(F2)],疾病靶点39个,采用Cytoscape 3.7.1构建“成分-核心靶点-通路”网络图,见增强出版附加材料。结果表明灯盏生脉胶囊能够关联到慢性脑缺血相关靶点,并调控细胞迁移、炎症反应等生物学过程。

3.10 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠IL-6表达的影响 结合网络药理学分析结果,为评估灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠炎症的影响,采用ELISA检测不同组小鼠脑组织中IL-6表达情况,见表3。结果发现模型组小鼠脑组织中IL-6表达显著高于假手术组($P<0.01$),说明慢性脑缺血小鼠出现炎症。

与模型组比较,中药低、高剂量组及金纳多组均能显著降低小鼠脑组织中IL-6表达($P<0.01$),表明灯盏生脉胶囊和金纳多均可减轻慢性脑缺血小鼠炎症。

表3 灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠IL-6表达的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effect of Dengzhan Shengmai capsules on IL-6 expression of CCH mice($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
假手术组	8		6.63±0.22
模型组	6		7.23±0.26 ¹⁾
金纳多组	9	48	6.63±0.25 ²⁾
中药低剂量组	8	40.5	6.62±0.09 ²⁾
中药高剂量组	7	162	6.67±0.32 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$

4 讨论

本研究采用慢性脑缺血模型对灯盏生脉胶囊的药效进行了评价,并进一步采用网络药理学技术探究灯盏生脉胶囊抗慢性脑缺血的分子机制。药效学评价结果发现灯盏生脉胶囊可以明显改善慢性脑缺血小鼠的学习能力、记忆能力、行为能力、焦虑情绪及胼胝体受损程度。网络药理学结果表明灯盏生脉胶囊可能通过参与炎症反应、PI3K/Akt信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF信号通路、血液循环、血管生成、细胞外基质等相关的生物学过程及通路,干预IL-6、TNF、胰岛素样生长因子1(IGF1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、表皮细胞生长因子(EGF)等靶点发挥抗慢性脑缺血作用。分子生物学实验验证结果表明灯盏生脉胶囊可减轻慢性脑缺血小鼠炎症,为进一步深入研究灯盏生脉胶囊作用机制奠定了基础。

本研究主要采用rUCCAO制备慢性脑缺血模型,目前该模型已广泛用于慢性脑缺血药物疗效评价及其作用机制研究^[15-16]。行为学的改变是慢性脑缺血小鼠的显著特征之一,其学习能力、记忆能力和行为能力是反映动物脑缺血症状的关键指标^[17]。因此,本研究通过Morris水迷宫实验和旷场实验来综合评价灯盏生脉胶囊对慢性脑缺血小鼠的干预作用。Morris水迷宫是检测学习、记忆能力的经典方法^[18]。相关研究表明,慢性脑缺血后大鼠的逃避潜伏期显著增长,穿越平台次数显著减少^[19],与本文研究结果相似,证明灯盏生脉胶囊对脑缺血小鼠学习、记忆的损伤有保护作用。焦虑是脑缺血引起的不可逆脑损伤后常见的一种情感性障碍^[20],25%

以上的中风幸存者都患有中风后焦虑症^[21],焦虑样情绪容易延缓身体和认知功能的恢复^[21]。旷场实验被广泛用于评价啮齿类动物的运动能力、探索行为和焦虑样情绪。相关研究表明,大鼠自发运动距离越长,表明其运动能力越强^[22],在中央区域活动距离越短,表明其情绪越焦虑^[23]。此外,双侧颈总动脉结扎导致的慢性脑缺血能引起小鼠明显的焦虑样行为^[24]。本文研究发现灯盏生脉胶囊可以提高慢性脑缺血小鼠的自主活动性能,改善其焦虑样情绪。

据报道,脑血流长期灌注不足会引发血脑屏障受损、炎症反应、神经细胞凋亡等反应,最终造成脑白质疏松变性等损伤。胼胝体临近侧脑室,是慢性脑缺血后脑白质中最易受损区域之一,胼胝体联合双侧大脑半球,综合汇聚双侧大脑半球的运动、言语、认知等功能,大量研究表明胼胝体受损会对患者的认知、智能等功能造成较大影响^[25]。本文研究发现模型组小鼠胼胝体可见明显的空泡样改变,脑白质纤维排列不整齐;经灯盏生脉胶囊治疗后,小鼠胼胝体空白样改变减少,且脑白质纤维排列趋于整齐、规则,证明灯盏生脉胶囊可以改善慢性脑缺血小鼠胼胝体受损程度。

本研究进一步通过网络药理学方法对灯盏生脉胶囊治疗慢性脑缺血的作用机制进行解析。通过构建PPI网络,筛选到的核心靶点主要包括IL-6、TNF、IGF1、VEGFA、EGF等。免疫炎症损伤是导致慢性脑缺血的重要机制^[26],IL-6及TNF- α 是与中枢神经系统缺血相关的2种重要炎症反应分子^[27],抑制免疫炎症反应可以有效治疗慢性脑缺血。IGF1是维持脑内稳态的中心,也是脑内蛋白质网络的中心,大脑缺血损伤使IGF1表达量显著增加,阻断IGF1后,海马神经显著减弱,表明IGF1在脑缺血损伤修复中起关键作用^[28]。VEGF是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,能够使血管通透性增加、造成血管内皮细胞迁移、促进细胞外基质变性、促进增殖和血管形成^[29]。据报道,当脑组织缺血缺氧后,可诱导HIF-1 α 稳定表达,HIF-1 α 与 β 亚基结合后可以通过与靶基因的缺氧反应元件结合,进而促进VEGFA的表达。此外,VEGFA的表达受多种因素的调控,EGF是其中一个重要的因素^[30],EGF可激活受体及介导的下游通路保护神经元的功能从而发挥脑保护作用^[31]。

本研究预测灯盏生脉胶囊可能是通过细胞迁移、炎症反应、PI3K/Akt信号通路等生物学过程干

预慢性脑缺血。已有研究证实,PI3K/Akt信号通路与中枢神经系统损伤的保护机制密切相关^[32],该通路通过抑制细胞凋亡,使细胞存活^[33]。HIF-1信号通路在脑缺血的发生发展过程中起着重要作用,有研究表明,激活了非受体酪氨酸蛋白激酶2/信号转导与转录激活因子3/HIF-1 α (JAK2/STAT3/HIF-1 α)信号通路能够减轻脑缺血的损伤、减少神经细胞的凋亡^[34]。此外,慢性脑缺血大鼠脑组织TNF- α 水平高于正常脑组织,其大量表达能够加剧血管炎性反应^[35]。另有研究表明,脑缺血后VEGF在慢性期能够促进血管及神经再生,参与神经保护,增强神经干细胞移植效用^[36]。综上所述,灯盏生脉胶囊具有明显抗慢性脑缺血作用,从网络药理学的角度揭示了灯盏生脉胶囊多成分、多途径、多靶点的作用机制,可为进一步深入研究灯盏生脉胶囊的作用机制奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 鲍余,陈颖,曾贵荣,等. 人参总皂苷对尾吊模拟微重力大鼠学习记忆损伤和焦虑的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(7):49-56.
- [2] ZHAO Y, GONG C X. From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 5(1):101-110.
- [3] BACK D B, KWON K J, CHOI D H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces post-stroke dementia following acute ischemic stroke in rats [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1):216.
- [4] 周伟,刘志刚,宋卫中,等. 大蒜素对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(12):82-88.
- [5] 曾晓莉,张文娟,赵博,等. 慢性脑缺血神经保护机制及药物研究进展[J]. 中国脑血管病杂志,2017,14(11):607-611.
- [6] 穆雪梅,米楠,祖先鹏,等. 灯盏生脉胶囊化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志,2019,44(18):3917-3923.
- [7] SHENG N, ZHENG H, LI M, et al. 4,5-Caffeoylquinic acid and scutellarin, identified by integrated metabolomics and proteomics approach as the active ingredients of Dengzhan Shengmai, act against chronic cerebral hypoperfusion by regulating glutamatergic and GABAergic synapses [J]. Pharmacol Res, 2020, 152: 104636.
- [8] 吕光耀,蒋萍,魏晓丽. 灯盏生脉胶囊对脑缺血再灌

- 注大鼠神经保护作用初探[J]. 新疆中医药, 2013, 31(6):46-48.
- [9] 姚运秀, 潘春晖, 王晨, 等. 网络药理学在中药复方的研究进展与应用策略[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3):257-263.
- [10] 高耀, 吴丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(15):3483-3492.
- [11] 陶嘉磊, 汪受传, 陈彦臻, 等. 中药复方网络药理学研究述评[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9):3903-3907.
- [12] YAO K X, LYU H, LIAO M H, et al. Effect of low-dose levamlodipine besylate in the treatment of vascular dementia[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):18248.
- [13] WANG X J, GAO Y P, LU N N, et al. Endogenous polysialic acid based micelles for calmodulin antagonist delivery against vascular dementia[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(51):35045-35058.
- [14] SHENG N, ZHENG H, XIAO Y, et al. Chiral separation and chemical profile of Dengzhan Shengmai by integrating comprehensive with multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1517:97-107.
- [15] WAN Y S, YOU Y, DING Q Y, et al. Triptolide protects against white matter injury induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, doi: 10. 1038/s41401-021-00637-0.
- [16] YOUSSEF M I, ZHOU Y, EISSA I H, et al. Tetradecyl 2, 3-dihydroxybenzoate alleviates oligodendrocyte damage following chronic cerebral hypoperfusion through IGF-1 receptor[J]. *Neurochem Int*, 2020, 138:104749.
- [17] 何婧, 黄燕, 杜果, 等. 慢性脑低灌注致模型大鼠学习记忆受损及海马 α -突触核蛋白变化[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(20):3230-3236.
- [18] MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1):47-60.
- [19] 尚立芝, 毛梦迪, 许二平, 等. 酸枣仁汤加味对抑郁大鼠海马谷氨酸受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23):20-26.
- [20] LU Y, LI C J, CHEN C, et al. Activation of GABAB2 subunits alleviates chronic cerebral hypoperfusion-induced anxiety-like behaviours: A role for BDNF signalling and Kir3 channels[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 110(Pt A):308-321.
- [21] PETER K, ALEXANDER D, NIMAH S, et al. Frequency of anxiety after stroke: An updated systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Int J Stroke*, 2020, 15(3):244-255.
- [22] 肖敏, 郭莲军, 罗攀. 巴氯芬改善慢性脑缺血大鼠情感障碍的作用及其机制[J]. 医药导报, 2020, 39(5):599-603.
- [23] 陈文, 任超, 刘娇, 等. 玫瑰花茶对束缚应激小鼠旷场活动性的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9):396-398.
- [24] 平吴达, 王涵, 许广智, 等. 慢性脑低灌注大鼠焦虑样行为与海马区域炎性细胞因子水平的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(3):449-454.
- [25] 吴峥嵘. 白质疏松对大动脉粥样硬化型卒中患者预后的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [26] FREEMAN L, GUO H, DAVID C N, et al. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(5):1351-1370.
- [27] 金涛. 慢性缺血致血管性痴呆大鼠脑血流量、病理及细胞因子的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2004.
- [28] 曾文钦, 刘钦, 姚前尹, 等. 内源性 IGF-1 有利于短暂脑缺血损伤新生大鼠海马神经发生[J]. 广州医学院学报, 2014, 42(1):5-9.
- [29] 渠泽平, 杨丙飞, 格日乐图, 等. 远隔缺血预适应对脑小血管病患者认知功能障碍及血管内皮生长因子表达水平的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2021, 24(8):675-679.
- [30] 李自保. 缺氧诱导的 VEGFA/VEGFR2 通路关键因子基因多态性与缺血性脑血管病[D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- [31] 张雅婷, 马静萍. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤后 EGF 表达的影响[J]. 当代医学, 2020, 26(18):143-144.
- [32] 杨帆, 周其全. PI3K/Akt 信号通路与神经保护[J]. 国际脑血管病杂志, 2013(2):143-147.
- [33] 郁迪, 莫绪明. PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在缺血性脑损伤中的保护作用[J]. 医学综述, 2015, 21(2):210-213.
- [34] 林建国, 刘冰冰, 梁飞, 等. JAK2/STAT3/HIF-1 α 信号通路对脑卒中的影响[J]. 新医学, 2020, 51(1):6-11.
- [35] 曹燕, 张璩文, 孙宁, 等. 慢性脑缺血炎症反应机制的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24(8):1-4.
- [36] 张海涛, 张平, 蒋传路, 等. 血管内皮生长因子在脑缺血再灌注损伤中的作用研究进展[J]. 疑难病杂志, 2015, 14(7):756-758.

[责任编辑 刘德文]