

参附注射液作用机制的计算机系统生物学分析

吕燕妮, 付龙生, 周健, 蔡军, 陈璿瑛, 钟海利*
(南昌大学第一附属医院 药学部, 南昌 330046)

[摘要] **目的:**参附注射液是传统中药红参与附子的复方制剂,临床主适应症为充血性心力衰竭、缺血性脑卒中等。以缺血性脑卒中为导向,采用系统生物学和实验研究方法,对参附注射液调节生物学网络的分子机制做一阐释。**方法:**以参附注射液的 28 个成分出发,分别从 TCMGeneDIT 数据库系统和 Agilent literature search 系统中挖掘参附注射液中成分作用的蛋白质数据,并辅助以 Phammapper 反向对接靶标,构建参附注射液多成分-蛋白网络,在 Genecards, BIND, BioGRID, IntAct, Mint 等数据库中挖掘蛋白之间关联,建立蛋白相互作用网络。提取显著性差异蛋白子网络一个,并对其中通路以 Western blot 蛋白印迹方法加以验证。**结果:**参附注射液成分与 55 个蛋白有连接,构成 53 个无孤立结点的蛋白相互作用网络。应用 ClusterOne 模块对蛋白相互作用网络富集分析,提取显著性差异 $P < 0.05$ 的子网络 1 个,子网络中含有关键蛋白 15 个,经 Biocart 信号通路映射,涉及 NF- κ B 信号通路, AKT 信号通路, Toll 样受体信号通路, MAPK 信号通路等。采取 Western blot 方法对富集指数 P 值最小的 NF- κ B 信号通路进行验证,发现参附注射液在缺血 1 h 再灌注 24 h 的 MCAO 模型上对 NF- κ B p65 和 I κ B- α 的磷酸化表达有明显下调作用。**结论:**采用计算机系统生物学和实验验证方式初步阐释了参附注射液主要化合物防治疾病的分子机制,并以分子生物学实验方式对所预测的信号通路进行验证,为中药复方的系统研究提供参考。

[关键词] 计算机系统生物学; 参附注射液; 作用机制; 信号通路; 网络; 大脑中动脉栓塞模型

[中图分类号] R287.6; R945; R944.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0217-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210217

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150924.1036.006.html>

[网络出版时间] 2015-09-24 10:36

Action Mechanism of Shenfu Injection by Computational System Biology Analysis LYU Yan-ni, FU Long-sheng, ZHOU Jian, CAI Jun, CHEN Xuan-ying, ZHONG Hai-li* (*Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330046, China*)

[Abstract] **Objective:** Shenfu injection is a compound preparation of traditional Chinese medicine, which is comprised of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Aconiti Lateralis Radix Praeparata. Its main clinical indications of congestive heart failure, ischemic stroke had been widely accepted by medical community. Based on ischemic stroke, system biology and experimental research was adopted to explain functional mechanisms of Shenfu injection regulating biological network. **Method:** Departure of 28 compounds in Shenfu injection, Research used combined methods of TCMGeneDIT database and Agilent literature search (ALS) system addition to Phammapper reverse docking to dig the protein information of Shenfu injection to build multi-compounds protein network. Protein interaction network was built based on protein-protein interaction extracted from Genecards, BIND, BioGRID, IntAct, Mint database. Extracted significant difference subnetwork from the network and subjected it to Western blot verification. **Result:** The whole 28 compounds had connections with 55 proteins, while protein interaction network was built with none-isolated nodes of 53 proteins, from which one subnetwork was extracted with significant difference. Fifteen key proteins in subnetwork were mapped on Biocart signaling pathway, which had relationship with NF- κ B signaling pathway, AKT signaling pathway, Toll signaling pathway, MAPK signaling pathway, etc. Western blot confirmed Shenfu injection could attenuate phosphorylation expression of NF- κ B p65, I κ B- α on

[收稿日期] 20150506(019)

[基金项目] 江西省卫生计生厅课题(20155144)

[第一作者] 吕燕妮, 博士, 主管药师, 从事药理学研究和药物不良反应监测研究, Tel: 15180155979, E-mail: lvyanni@126.com

[通讯作者] * 钟海利, 硕士, 副主任药师, 从事临床药师及临床药理研究, Tel: 0791-88692482, E-mail: 305260242@qq.com

ischemia 1 h reperfusion 24 h MCAO model. **Conclusion:** Computational system biology and experimental study approach preliminary explores molecular mechanism of Shenfu injection for preventing and curing diseases, it can provide references for researches on Chinese medicines.

[Key words] computational system biology; Shenfu injection; action mechanism; signaling pathway; network; Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

参附注射液方剂出自明代方贤所编著的《奇效良方》^[1],经研究制成参附注射液,由红参与附子组成,具有回阳救逆、益气固脱等功效,主用于阳气暴脱的厥脱症和阳虚气虚所致的惊悸症。其临床主适应症包括充血性心力衰竭、肺心病等心脏疾病,疗效确切,已为医学界普遍接受^[2-3]。在前期临床疗效中发现,参附注射液除了其临床主适应症外,在缺血性脑血管疾病中也有明显疗效,其与降血压药、溶栓药、改善微循环等西药联合,可协同增效并改善脑缺血预后。方中红参可保护血管内皮细胞,抗脂质过氧化和清除自由基,保护心肌和抗动脉粥样硬化;黑附子临床药理作用最显著的为强心作用,可增强心肌收缩力,加快心率,增加心输出量,同时具有扩张血管、增加血流、改善血液循环作用。参附注射液在整体动物、细胞模型及临床应用中均有研究,如发现参附注射液对短暂性局灶性脑缺血损伤具有保护作用,影响脑缺血组织的通透性及神经功能^[4-5],并能通过改善人源葡萄糖转运蛋白 1 和 3,丙二醛,超氧化物歧化酶,人 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$,一氧化氮等指标保护脑缺血再灌注大鼠^[6],其对微循环也具有改善作用。在分子水平上仅有报道参附注射液可通过影响热休克蛋白 70 的表达^[7],B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 蛋白,丝裂原蛋白激酶 p38,核转录因子 NF- κ B 的表达对缺血性脑损伤具有保护作用^[8-10]。但关于参附注射液对脑缺血性疾病的研究报道仍较少,并且仍停留在整体动物模型及指标,缺乏深入分子生物学水平分析,尤其缺乏分子信号通路机制的研究水平。

脑卒中疾病,尤其是缺血性脑卒中是严重威胁人类健康的重要疾病^[11],已经成为仅次于缺血性心脏病之后的第二大致死原因,也是首要的严重致残原因,对于改善及防治卒中的新药研究一直是各国医药领域的重大课题。中药复方是在中医理论指导下临床用药的主要形式,体现中医学的治未病思想,然而由于中药复方化学成分复杂性和功能主治多样性,作用机制往往不明确性,给继续研究带来了巨大困难。系统生物学、网络药理学等^[12-13]信息学方法将参附注射液作为一个整体,采用文本挖掘,蛋白相互作用网络构建,显著性差异子网络的提取及信号通路及疾病关联预测等系统生物学方法,挖掘参附注射液中主要化合物的作用蛋白与其信号通路及疾病间的关联,解决蛋白与信号通路关联弱的问题,将参附注射液从整体方式在蛋白-信号通路-疾病的角度阐释其防治疾病的相关分子作用机制,为复杂成分、复杂靶点的中药复方作用机制的阐释提供了思路 and 手段,为参附注射液后续实验研究提供参考。

1 材料

1.1 文本挖掘 文本挖掘采用 TCMGeneDIT 数据库系统,

由国立台湾大学开发,从 Medline 数据库中,应用自动文本挖掘方式获得中药、基因和疾病之间相互关联的信息,已成功应用于阐释红花与丹参配伍协同的分子机制研究^[14]。参附注射液成分参照杨瑞杰博士论文《参附注射液化学成分》所提供的 28 个成分为对象进行研究,其中将人参皂苷 Rg_3 和人参皂苷 20(R)- Rg_3 ,人参皂苷 Rh_1 和人参皂苷 20(R)- Rh_1 异构体作为同一个成分,最终确定为 26 个成分,分别以成分的英文名为搜索词,搜索条件为概率 95% 为 T 的阈值,在 TCMGeneDIT 数据库中自动搜索得化合物及其作用的蛋白信息(以基因名为词条)。Agilent literature search(ALS) 软件是由安捷伦实验室系统生物学组开发的搜索系统,检索系统从文献的句子中解析出蛋白质或基因名字,并初步建立蛋白或基因关联,建立可视化的蛋白或基因网络结果,多用于挖掘化合物与蛋白之间关联,如挖掘生脉散血中移行成分分子靶标等^[15]。在 ALS 软件中分别以人参和附子英文名为词条进行搜索作用蛋白信息,对 TCMGeneDIT 数据库中的作用蛋白信息进行补充。

1.2 反向对接 经过文本挖掘,发现其中仅有人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Re ,人参皂苷 Rf ,人参皂苷 Rg_2 ,人参皂苷 Rb_1 ,人参皂苷 Rd ,人参皂苷 Rg_3 ,人参皂苷 Rh_4 ,人参皂苷 Rg_3 ,人参皂苷 Rh_1 共 10 个成分在数据库中有匹配的靶标信息,而人参皂苷 Rc ,人参皂苷 Rb_2 ,人参皂苷 Rb_3 ,人参皂苷 F_1 ,人参皂苷 F_3 ,人参皂苷 F_5 ,人参皂苷 Rk_1 ,人参皂苷 Rk_3 ,人参皂苷 Rg_6 ,人参皂苷 F_4 ,苯甲酰脱氧乌头碱,苯甲酰次乌头碱,苯甲酰乌头碱,苯甲酰新乌头碱,乌头原碱,次乌头碱共 16 个成分没有相应匹配的靶标。由于参附注射液中所有成分以网络的形式作用于靶标网络,故以反向对接的方式在 PharmMapper 数据库中补充人参皂苷 Rc 等 16 个成分的信息。以成分的 mol2 格式输入 search 栏中,设置参数为不选择构象变化,选择人类数据库,设置最终产生 50 个蛋白构象。将反向对接产生的构象与 1.1 项下文本挖掘所产生的构象合并为参附注射液作用蛋白集,得参附注射液化合物和相互作用蛋白群。

1.3 参附注射液多成分-蛋白网络和蛋白相互作用网络的构建与信号通路的映射 在 Genecards 数据库中以疾病脑卒中进行搜索,搜寻出与脑卒中相关联的 1 093 个蛋白,将参附注射液蛋白作用集与脑卒中中的蛋白进行交集,筛选出蛋白集中与脑卒中相关联的蛋白,最终得参附注射液化合物-相互作用蛋白群。将化合物以搜索词条形式,通过 PubMed 数据库与相互作用蛋白群中的已有蛋白进行关联,建立关联词条,在 Cytoscape 软件中建立参附注射液多成分-蛋白网络。以相互作用蛋白群中的蛋白名为检索词,从 Genecards,

BIND, BioGRID, IntAct, Mint 等蛋白相互作用数据库中, 找寻其相互作用蛋白质, 建立关联词条, 在 Cytoscape 软件中建立可视化蛋白相互作用网络。采用 ClusterOne 方法对蛋白相互作用网络进行富集, 提取其中具有显著性差异 ($P < 0.05$) 的子网络。将显著性差异的子网络中的关键蛋白进行 Biocart 信号通路的映射, 得相关 Biocart 信号通路。

1.4 线栓法致小鼠局灶性大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型制备及参附注射液给药 雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 由扬州大学比较医学中心提供, 合格证号 SCXK (苏) 2007-0001。按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉后, 分离并暴露右侧的颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉, 脉近心端预留结扎线。于颈外动脉远心端用显微剪刀剪一小口, 插入制备好的线栓直径约 0.2 mm, 通过颈总动脉分叉进入颈内动脉, 以过颈总动脉分叉 8 mm, 颈部伤口常规缝合。手术时间约 15 min, MCAO 1 h 后, 分离暴露颈外动脉, 松开固定线, 再灌注 24 h。整个手术过程中动物肛温保持在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒中, 自由饮水、进食。参附注射液 (雅安三九药业有限公司, 国药准字 Z51020664, $10 \text{ mL}/\text{支}$)。小鼠按完全随机方法将 18 只小鼠分为 3 组, 假手术组、模型组 (MCAO 组, 术前 1 h 以同等体积生理盐水腹腔注射) 及参麦组, 每组 6 只, 术前 1 h 参附注射液按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。

1.5 Western blot 蛋白印迹法验证信息学预测所得的信号通路 与统计学分析 切取小鼠皮层边缘组织, 提取总蛋白, BCA 定量蛋白质量为 $40 \text{ } \mu\text{g}$ 上样。采用 12% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用核转录因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p-p65, 核因子 κB 抑制蛋白 α 抗体 ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$) (1:1 000 稀释比例, 美国 CST 公司) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 用适当的辣根过氧化物酶抗体孵育 50 min。并使用 BioRad 生物图像系统捕获图像并进行分析。所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于两组间的比较用 t 检验, 当 3 组或 3 组以上比较时用单因素方差分析, 后检验采用 Dunnett's test, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 方法与结果

2.1 参附注射液化多成分-蛋白网络的分析 参附注射液成分与蛋白在网络中相互交叉分布, 即成分可同时作用于疾病网络中的多个结点, 参附注射液的 26 个成分, 共作用于 55 个蛋白, 见图 1。根据 Cytoscape 中 Centiscape 中 network analysis degree 分析结果, 参附注射液多成分-蛋白网络平均 degree 为 5.049, 其中 12 个成分的连接度 > 5 , 表明其至少与 5 个蛋白作用。参附注射液中 20 个人参皂苷类成分与 55 个蛋白有相互作用, 人参皂苷与全部蛋白网络中的蛋白均有相互作用, 表明其作用的广度。6 个附子碱成分与丝裂原活化蛋白激酶 MAPK14 和 1, 人胱天蛋白酶 1 和 3, 细胞色素 CYP2C9, 热休克蛋白 90AA1, 核转录因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 1 共 7 个蛋白有相互作用, 虽然作用的蛋白数较少, 但其连接的蛋白在蛋白-蛋白相互作用网络中占据高连接度, 其中 MAPK1, MAPK14, NFKB1 共 3 个蛋白连接度均 > 13 , 对网络健康度有极大影响, 表明虽然附子碱作用蛋白较少, 但其能够作用

于蛋白网络的关键结点。

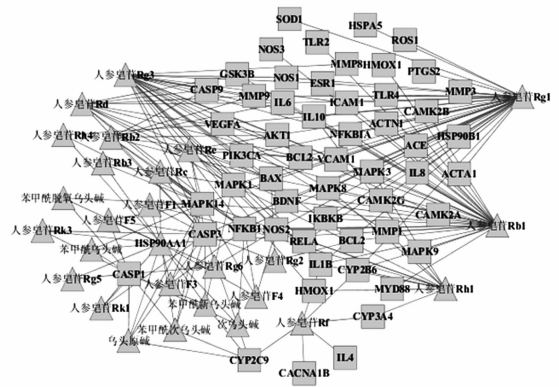


图 1 参附注射液多成分-蛋白网络 (以网络中蛋白以基因名为词条)
Fig. 1 Multi-compounds-proteins network of Shenfu injection (Protein represented using its gene name)

2.2 参附注射液蛋白相互作用网络的分析 通过 Cytoscape 构建蛋白-蛋白网络, 去除冗余蛋白, 发现除电压依赖型 N 型钙通道 $\alpha 1\text{B}$ 抗体 CACNA1B 和血管紧张素 I 转换酶 ACE 所代表的蛋白与其余蛋白无相互作用连接外, 其余 53 个蛋白构成无孤立结点的蛋白相互作用网络, 见图 2A。应用 ClusterOne 模块对蛋白相互作用网络富集分析, 提取显著性差异 $P < 0.01$ 的子网络 1 个, 子网络中含有关键蛋白 15 个, 见图 2B。这 1 个网络代表了参附注射液蛋白相互作用网络中的高连接区部分, 所提取的子网络是通过曼-惠特尼 U 检验进行打分, 将网络与其外部的网络进行比较, P 越低表示内网络比外网络存在差异。对有显著性差异的子网络进行分析, 将子网络中的蛋白作为关键蛋白, 并映射在 Biocart 信号通路上, 关键蛋白涉及的信号通路按照打分先后, 分别为 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路 ($P = 2.70 \times 10^{-5}$), AKT 信号通路 ($P = 6.17 \times 10^{-4}$), Toll 样受体信号通路 ($P = 4.26 \times 10^{-4}$), MAPK 信号通路 ($P = 4.27 \times 10^{-4}$) 和 TNF/Stress 相关信号通路 ($P = 1.05 \times 10^{-3}$)。

2.3 参附注射液关键蛋白和信号通路的验证 采取 Western blot 方法对富集指数 P 最小的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路进行验证, 发现 MCAO 模型造模后, 相较于假手术组, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路上的代表性受体—— $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 和 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 的磷酸化表达有明显升高, 而 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 和 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 本身的表达无明显变化。但经过参附注射液干预后, 在 MCAO 模型上对 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 和 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 的磷酸化表达有明显下调作用。

3 讨论

以系统生物学为代表的信息学方法, 采取网络构建的方法将参附注射液作为一个整体, 研究其在与疾病关联的信号通路上的作用。采用 TCMGeneDIT 和反向对接相结合的方法挖掘中药复方中的化合物与靶标间关联, ALS 方法所挖掘的信息多来自于 Medline 数据库, 较多是根据已报道的文献信息。反向对接可以提供文献数据库中未报道的靶标信息, 其靶标信息基于化合物的构效团结构信息, 可以对未涉及文

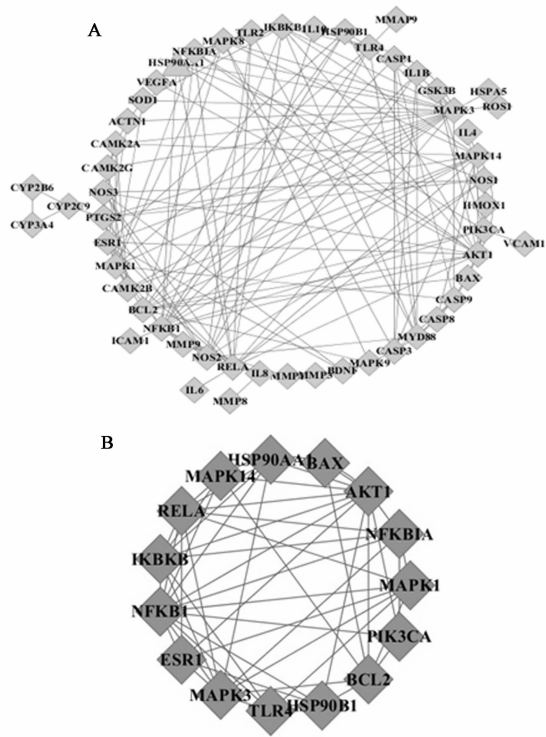
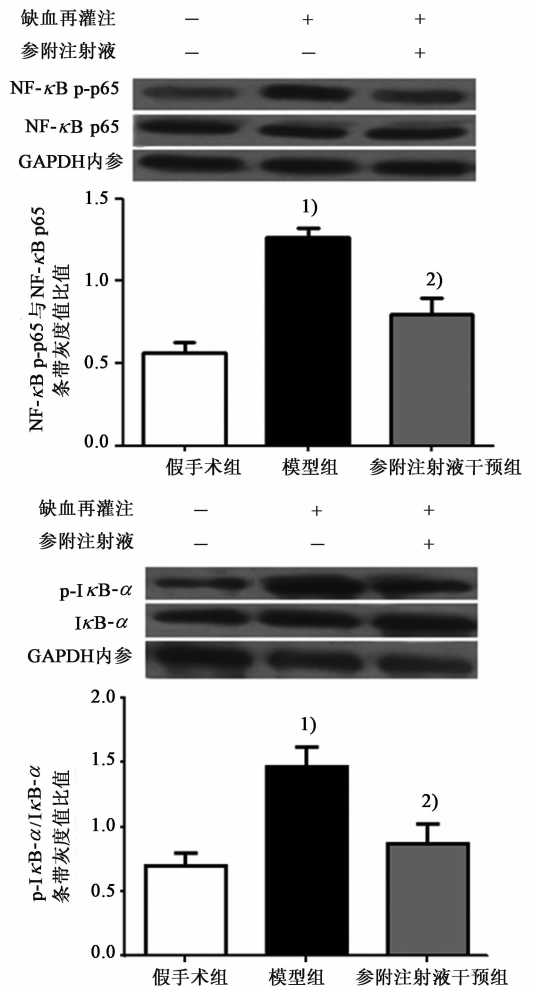


图 2 参附注射液蛋白相互作用网络及信号通路(网络中蛋白以基因为词条)

Fig.2 Protein interaction network and related signaling pathways of Shenfu injection (Protein represented using its gene name)

献报道的结构信息进行补充,两部分结构信息互补,对最终中药复方化合物的结构信息提供有效证明。以网络度方法挖掘,根据化合物所作用的蛋白数进行计算,参附注射液多成分-蛋白网络平均 degree 为 5.049,不仅表明中药多成分、多靶点特点,同时也表明参附注射液主要化合物对网络的健康度影响较大。通过成分-蛋白网络挖掘,其中人参皂苷类成分能连接网络中的全部蛋白,能很大程度地影响网络的健康度,然而附子碱成分的蛋白挖掘信息量少,其药理作用集中在混合物提取物的报道中,单个成分报道较少。在 Phammapper 反向对接结构中也以寻找附子碱的成分为主,通过反向对接观察附子的相互作用蛋白,发现能够作用于 MAPK14 和半胱氨酸蛋白酶 1(CASP1)等 7 个蛋白。虽然相对人参皂苷的匹配靶标较少,但是这 7 个蛋白所涉及的网络占据整个蛋白网络的大部分,能较大幅度地影响网络。剔除这 7 个蛋白后,网络度由 5.09 下降到 4.08,平均蛋白连接度下降约 1,表明对网络健康度影响大,表明虽然附子碱作用蛋白较少,但是能够作用于蛋白网络的关键结点。

在参附注射液蛋白相互作用网络中,提取的具有显著性差异的子网络与丝裂原激酶蛋白 1 和 14,细胞凋亡蛋白 BAX,Toll 样受体 4,半胱天冬酶 3,热休克蛋白 90,一氧化氮合酶 2,基质金属蛋白酶 9 等均有作用,其参与抗炎、细胞凋亡与免疫、调节一氧化氮等作用。具有显著性差异的子网络从庞大的蛋白相互作用网络中,提取出具有关键作用的对网络健康度有很大影响的子网络。由图 3 可知,参附注射液最



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

图 3 参附注射液干预缺血 1 h 再灌注 24 h 的 MCAO 小鼠 NF-κB 信号通路上的代表性受体 NF-κB p65 和 IκB-α 的表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.3 Shenfu injection attenuated NF-κB p65, IκB-α expression of ischemia 1 h reperfusion 24 h MCAO mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

主要通过 5 条信号通路发挥作用,这 5 条通路在与脑缺血相关的疾病中均有报道,NF-κB 信号通路和 AKT 信号通路参与脑缺血调节作用^[16-17],其不同程度代表了脑缺血调节作用中的抗炎作用。Nod 样受体蛋白,Toll 样受体,视黄酸诱导基因 RIG-I 样受体及 C 型凝集素受体共同组成了固有免疫的模式识别受体,其中 Toll 受体所代表的 Toll 信号通路,最新研究表明其防治中枢神经系统的感染性疾病还可能与调节其固有免疫识别受体有关还可能与有关^[18]。MAPK 信号通路和 TNF 信号通路所代表的氧化应激、炎症刺激洗脑通路,其与缺血性脑病的机制与炎症的调节密切相关,可控制炎症的进程,防治炎症因子对脑血管及神经细胞进行损害^[19]。

本文还在虚拟信息的基础上,通过蛋白印迹 Western blot 实验验证在 MCAO 模型上参附注射液对 NF-κB 信号通路上的 NF-κB p65 和 IκB-α 受体的调节作用,以实验的方式对虚拟预测的网络信息进行验证。MCAO 模型是模拟脑缺

血疾病的经典模型,本文采用线栓法制备模型,在蛋白印迹实验中 MCAO 组 NF- κ B 的表达磷酸化升高,同样 I κ B- α 的表达磷酸化也升高,证实模型成功。然而参附注射液干预后,NF- κ B p65 的表达降低,验证结果证明了信息学可以为实验信号通路的筛选提供先导信息。通过计算机系统生物学方法挖掘中药复方主要化合物、蛋白、信号通路及疾病间的信息,可以发掘其防治疾病的关键蛋白、信号通路及其与新的潜在疾病的关联。本研究挖掘参附注射液主要化合物作用的关键蛋白及信号通路,初步揭示其防治疾病的分子机制,为进一步实验研究提供先导信息和基础,也为研究成分更为复杂的中药复方作用机制提供借鉴。

[参考文献]

[1] 徐丹,范颖. 参附汤方源考证及其配伍内涵探析[J]. 中华中医药学刊,2010,28(5):1062-1063.

[2] Yang L J, Wang J, Tian Z F, et al. Shenfu injection attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rat [J]. *Neurol Sci*,2013,34(9):1571-1574.

[3] 洪芬芳,贺长生,刘晓军,等. 参附注射液减轻血栓闭塞性脉管炎模型大鼠损伤的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):222-226.

[4] 江承平,王柏强,刘福,等. 参附注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠 GLUT1 和 GLUT3 的影响[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(6):442-444.

[5] 江承平,刘福,李毅,等. 参附注射液对脑缺血再灌注大鼠 MDA、SOD、TXB-2 及 6-keto-PGF1 α 的影响及意义[J]. 中国医科大学学报,2012,41(2):124-127.

[6] 万敬枝,程梦琳,吴基良. 参附注射液对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 NO、MDA 含量和 SOD 活性的影响[J]. 中国中医急症,2004,13(6):381-382.

[7] 张秀玲,刘玉萍,杨欢,等. 参附注射液对大鼠全脑缺血再灌注时核转录因子 NF- κ B 表达的影响[J]. 脑卒中与神经疾病,2008,15(6):363-366.

[8] 于腊梅,杨丽娟,蒋淑君. 参附注射液对大鼠脑缺血再灌注后 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 滨州医学院学报,2010,33(2):93-94,108.

[9] 蒋淑君,杨丽娟,于腊梅. 参附注射液对局灶性脑缺血小鼠 P38 MAPK 表达的影响[J]. 现代生物医学进

展,2010,11(10):2067-2069.

[10] 于腊梅,李乃选,王桂华,等. 参附注射液对大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区 Caspase-3 表达的影响[J]. 滨州医学院学报,2011,34(3):179-181.

[11] Zhang N, Liu G, Zhang G, et al. External validation of the iScore for predicting ischemic stroke mortality in patients in China[J]. *Stroke*,2013,44(7):1924-1929.

[12] Zhang A H, Sun H, Wang P, et al. Future perspectives of personalized medicine in traditional Chinese medicine: A systems biology approach Review Article [J]. *Complement Ther Med*,2012,20(1/2):93-99.

[13] 李梢. 网络靶标:中药方剂网络药理学研究的一个切入点[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2017-2020.

[14] 吕燕妮,付龙生,魏筱华. 丹参与红花配伍机制的系统生物学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):220-224.

[15] 朱艳芳,朱伟. 生脉散血中移行成分分子靶标的计算机系统生物学预测[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):278-282.

[16] Huang H, Zhong R, Xia Z, et al. Neuroprotective effects of rhynchophylline against ischemic brain injury via regulation of the Akt/mTOR and TLRs signaling pathways[J]. *Molecules*,2014,19(8):11196-11210.

[17] Liu X Y, Zhou X Y, Hou J C, et al. Ginsenoside Rd promotes neurogenesis in rat brain after transient focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2015,36(4):421-428.

[18] Huang H, Zhong R, Xia Z, et al. Neuroprotective effects of rhynchophylline against ischemic brain injury via regulation of the Akt/mTOR and TLRs signaling pathways[J]. *Molecules*,2014,19(8):11196-11210.

[19] Zhang S, Qi Y, Xu Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation [J]. *Neurochem Int*, 2013,63(5):522-532.

[责任编辑 刘德文]