

通心络胶囊对脑缺血再灌注损伤小鼠的保护作用及作用机制

高志杰¹, 王立新^{2*}

(1. 广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510000; 2. 广东省中医院, 广州 510000)

[摘要] **目的:**研究通心络胶囊对脑缺血再灌注损伤的保护作用,并通过网络药理学探讨通心络胶囊治疗脑缺血的作用机制。**方法:**C57BL/6小鼠采用改良线栓法制作小鼠中动脉闭塞(MCAO)模型,分为假手术组、模型组、通心络低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg⁻¹,灌胃给药)、阿司匹林组(2.055 g·L⁻¹,腹腔注射),于小鼠脑缺血再灌注24,48,72 h参照Longa评分法对小鼠进行神经功能评分,苏木素-伊红(HE)染色法观察脑组织病理学变化情况,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定小鼠脑梗死面积。首先从BATMAN-TCM数据库中筛选通心络胶囊化学成分并分析作用靶点,然后分析靶点富集的信号通路,之后构建中药-活性成分-靶点网络,最后预测通心络胶囊治疗脑缺血的多维药理作用机制。**结果:**Longa评分法,HE染色和TTC染色法都提示通心络胶囊可改善脑缺血再灌注小鼠的脑损伤,并且通心络胶囊对脑损伤的改善程度随着通心络胶囊剂量升高而逐渐升高。在通心络胶囊所含12味中药中筛选得到132个有效活性成分及环磷酸腺苷(cAMP)依赖性蛋白激酶催化亚基(PRKACA),腺苷酸环化酶1(ADCY1),丝氨酸/苏氨酸激酶1(Akt1),多巴胺受体D2(DRD2),Discs大同源物4(DLG4)等240个交集靶点。基因本体(GO)富集于阳离子通道活性、离子门控通道活性、门控通道活性、神经递质受体活性、离子通道活性等。京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集于cAMP信号通路,钙信号通路,神经活性配体-受体相互作用,环磷酸鸟苷(cGMP)/蛋白激酶G(PKG)信号通路、多巴胺能突触信号通路。**结论:**通心络胶囊可减轻脑缺血再灌注小鼠的脑损伤,其通过多靶点、多环节实现脑保护作用;网络药理学揭示了通心络胶囊治疗脑缺血的有效成分、靶点及通路,为通心络胶囊治疗脑缺血的作用机制提供理论支持。

[关键词] 通心络胶囊; 脑缺血; 网络药理学; 药理作用机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0093-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200803

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200102.1315.003.html>

[网络出版日期] 2020/1/2 18:40

Protective Effect of Tongxinluo Capsule on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury and Its Mechanism of Action

GAO Zhi-jie¹, WANG Li-xin^{2*}

(1. *The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;*

2. *Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)*

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Tongxinluo capsule on cerebral ischemia-reperfusion injury, and explore the mechanism of Tongxinluo capsule in treating cerebral ischemia through network pharmacology. **Method:** The C57BL/6 mouse middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by improved suture method and divided into sham operation group, model group, low, medium and high-dose Tongxinluo groups (crude drug 1, 2, 4 g·kg⁻¹, intragastric administration), Aspirin group (2.055 g·L⁻¹, intraperitoneal injection). Then, neurological function score and 2, 3, 5-triphenyltetrazole

[收稿日期] 20190920(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373569)

[第一作者] 高志杰,在读硕士,从事脑血管疾病研究,E-mail:1218875535@qq.com

[通信作者] *王立新,教授,主任医师,博士生导师,从事脑血管疾病研究,E-mail:plawlx@126.com

chloride (TTC) staining method were used to determine the infarct size of mice at 24, 48, 72 h by cerebral ischemia-reperfusion. First, chemical constituents of Tongxinluo capsule were screened from the BATMAN-TCM database, and the targets were analyzed. Then, gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were performed, and traditional Chinese medicine (TCM)-active ingredient-target network was constructed. Finally, the multi-dimensional pharmacological mechanism of Tongxinluo capsule in the treatment of cerebral ischemia was predicted. **Result:** Longa score, HE staining and TTC staining all suggested that Tongxinluo capsule could alleviate brain injury in mice after cerebral ischemia and reperfusion, and the improvement degree of Tongxinluo capsule on brain injury was gradually enhanced with the increase of Tongxinluo capsule dose. A total of 132 active components and 240 intersection targets, including cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PRKACA), adenylate cyclase 1 (ADCY1), serine/threonine kinase 1 (Akt1), dopamine receptor D2 (DRD2) and discs large homolog 4 (DLG4) were screened from 12 TCM in Tongxinluo capsule. GO was enriched in cationic channel activity, ion gated channel activity, gate channel activity, neurotransmitter receptor activity, ion channel activity, etc. KEGG was enriched in cAMP signaling pathway, calcium signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathway and dopaminergic synaptic signaling pathway. **Conclusion:** Tongxinluo capsule can alleviate brain damage in mice with cerebral ischemia-reperfusion, and achieve brain protection through multiple targets and multiple links. Network pharmacology reveals effective components, targets and pathway of Tongxinluo capsule in the treatment of cerebral ischemia, which provides theoretical support for the mechanism of Tongxinluo capsule in the treatment of cerebral ischemia.

[Key words] Tongxinluo capsule; cerebral ischemia; network pharmacology; pharmacological mechanism

脑缺血是人类发病和死亡的最主要原因之一, 约占所有卒中病例的87%^[1-3]。目前, 我国脑血管病病例中约70%为缺血性脑卒中。通心络胶囊是根据中医络病理论研制而成的中药复方制剂, 全方由人参片、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍药、冰片等中药组成, 具有益气活血、通络止痛之功效, 临床用于治疗缺血性脑血管疾病取得良好疗效^[3], 研究表明通心络胶囊在脑缺血神经保护通过抗自由基, 抑制钙超载, 降低一氧化氮(NO)毒性, 并促进脑缺血后血管内皮生长因子表达等, 从而起到脑保护作用^[3]。然而通心络胶囊治疗脑缺血的作用机制错综复杂, 目前研究尚未完全阐明其作用机制, 有待进一步深入, 并通过网络药理学等现代方法阐明其机制。网络药理学方法为促进传统中医从基于经验的医学转化为循证医学系统提供了一种新的研究范式, 该系统将加速中药的发现, 并改善目前的药物发现策略^[4-6]。基于网络药理学方法的有效性证明了生物活性化合物的发现和阐明草药配方的作用机制, 对于解决中药开发中降低来源消耗、提高疗效和降低毒性具有重要意义。本研究拟通过动物实验证明通心络胶囊改善脑缺血再灌注损伤,

并通过基于中药网络药理学的相关原理及软件, 探索并构建通心络胶囊治疗脑缺血的作用机制网络, 为进一步研究通心络胶囊的作用机制及新药开发提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6小鼠, 雄性, 体质量(25~28)g, 10~12周龄, 共36只, 由广东省医学实验动物中心提供, 合格证号SCXK(粤)2018-0002。动物使用许可证号SYXK(粤)2018-0094。本实验经广东省中医院实验动物伦理委员会审查(批准号2018028)。

1.2 药物与试剂 通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司, 批号A1709019, 每克超微粉含1.47g生药)。阿司匹林(广东省中医院, 批号BJ37903); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染料(美国Sigma公司, 批号T8877-25G); 苏木素-伊红(HE)染色液(安徽雷根生物技术有限公司, 批号20180731); 其余所用试剂均为分析纯均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器 RFLSI Pro⁺型激光散斑血流成像仪, 69013型体温维持仪, R540IP型小动物麻醉机,

Olympus SZ61型体视显微镜(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);JJ-12J型脱水机,JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);Nikon Eclipse Ti-SR型倒置荧光显微镜,Nikon DS-U3型成像系统(日本尼康公司)。

1.4 数据库和软件 在线数据库包括BATMAN-TCM^[7]数据库, GeneCards^[8] (<https://www.genecards.org/>), OMIN数据库^[9] (<http://omim.org/>)和String 10.5^[10] (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes)在线数据库 (<http://www.string-db.org>); Cytoscape v3.7.0软件和Rx64 3.5.2用于分析结果。

2 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型制作方法 采用改良线栓法制作小鼠中动脉闭塞(MCAO)模型。小鼠经气体麻醉后,仰卧位固定,注意保持呼吸通畅。剃去颈部毛发,酒精棉球消毒,颈部正中切口约1 cm,显微镜下暴露和分离右侧的颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,使用7-0号缝合线结扎颈外动脉并在颈外动脉上小心剪一小口,将头端直径0.22 mm的尼龙线栓由颈外动脉的开口插入颈内动脉,至颈外动脉和颈内动脉分叉约1 cm,略感阻力后停止推进并固定栓线,即可堵塞大脑中动脉。缺血60 min后,轻轻抽出尼龙线进行再灌注,常规缝合皮肤。假手术组仅暴露和分离右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,不进行上述其他操作。手术过程中使用激光散斑血流成像仪监测小鼠大脑中动脉血流情况,血流下降70%~80%说明模型成功^[11]。术中使用体温维持仪维持小鼠体温,术后将动物转移至37℃恒温箱内至苏醒,给予自由进食、饮水。

2.2 动物分组与给药方法 随机将实验小鼠分为6组,每组6只,分别为假手术组、模型组、通心络低、中、高剂量组(生药1,2,4 g·kg⁻¹,灌胃给药)、阿司匹林组(2.055 g·L⁻¹,腹腔注射)。通心络胶囊灌胃给药3 d,给药体积10 mL·kg⁻¹,每日1次。假手术组和模型组每次灌胃给予等量生理盐水。

2.3 神经行为学评分 参照Longa评分法^[12]于小鼠再灌注24,48,72 h对小鼠进行神经功能评分,无精神损伤症状为0分;不能完全伸展对侧前爪为1分;向对侧转圈为2分;向对侧倾倒是3分;不能自发行走,意识丧失为4分。评分在1~3分为造模成功,评分为0,4分及生命体征不平稳的动物则不使用。

2.4 HE染色观察脑组织病理形态 各组小鼠缺血再灌注72 h后,取部分脑组织。常规固定,石蜡包埋后,进行石蜡切片及HE染色,光镜下观察各组脑组织病理组织学变化。

2.5 脑梗死面积测定 参考相关文献,使用TTC染色法测定小鼠脑梗死面积占全脑组织面积的百分比,术后24,48,72 h对小鼠进行行为学评分后,腹腔注射过量10%水合氯醛(350 mg·kg⁻¹)将小鼠进行深度麻醉,打开胸腔,进行心脏灌注,灌注结束后,剖开颅骨,取出脑组织。去除嗅球、小脑及脑干,从前往后作冠状位连续切5片,每片厚度为2 mm。将脑组织切片置于2%的TTC磷酸缓冲溶液中,避光温育15 min,其中每隔7~8 min翻动1次。正常脑组织染为红色,梗死区脑组织为白色,温育完毕后将脑片照相,采用Image J图像分析系统计算梗死区域的面积。

脑梗死面积=(白色梗死面积/脑片总面积)×100%。

2.6 通心络胶囊有效成分筛选及作用靶点分析 在BATMAN-TCM^[7]数据库中,以“人参片、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香、酸枣仁、冰片”为关键词,设置“药物-靶点”相似性模型阈值Score cutoff>80和P<0.05,检索筛选通心络胶囊活性成分及对应的潜在靶点。利用GeneCards^[8] (<https://www.genecards.org/>)和OMIN数据库^[9] (<http://omim.org/>)预测靶基因,输入检索词“Cerebral ischemia”“Ischemic stroke”“Brain infarction”导出结果到EXCEL。

2.7 药物-活性成分-靶点网络构建 运用Cytoscape v3.7.0软件构建通心络胶囊-活性成分-靶点网络关系图,椭圆形代表中药,三角形代表活性成分,菱形代表靶点,连线代表两者之间的中药-活性成分或者活性成分-靶点的相互关系。

2.8 核心基因分析 首先将所得的靶基因集合导入String 10.5^[10] (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes)在线数据库 (<http://www.string-db.org>),设置interaction score为high confidence(0.7)进行互作预测分析并导出互作关系的tsv文件,然后再将得到的分析结果导入Cytoscape v3.7.0获得靶基因集合编码蛋白质间相互作用(PPI)网络图,Rx64 3.5.2进行基因连接数的统计,利用Cytoscape中的Cytohubba插件筛选核心靶基因。

2.9 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 根据基因的GO注释,以本物种的所有基因为背景基因,用超几何分步法计算P

值,以GO注释富集程度 $P < 0.05$ 为显著性阈值,获得相对于背景基因具有统计意义的GO高频率注释。以KEGG通路富集程度的 $P < 0.05$ 为显著性阈值,获得相对于背景具有统计学意义的基因集合信号转导通路。利用R软件ClusterProfiler Package^[13]实现GO和KEGG可视化,分别找到富集的GO生物学过程、功能和细胞组分,以及代谢通路。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注损伤小鼠神经行为学评分的影响 与假手术组比较,小鼠脑缺血再灌注24,48,72 h,模型组Longa评分显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,小鼠脑缺血再灌注24 h和48 h时,通心络胶囊组和阿司匹林组的神经功能评分略降低,但差异无统计学意义,与模型组比较,小鼠脑缺血再灌注72 h时,通心络胶囊组、阿司匹林组的神经功能评分明显降低,尤其是通心络胶囊高剂量组和阿司匹林组($P < 0.05$)。见表1。

表1 通心络胶囊对脑缺血再灌注损伤小鼠神经行为学评分的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Tongxinluo capsule on neurologic deficit score in mice of cerebral ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n=6$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	24 h	48 h	72 h
假手术	-	0	0	0
模型	-	2.67±0.52 ¹⁾	2.83±0.41 ¹⁾	3.33±0.52 ¹⁾
通心络胶囊	1	2.67±0.52	2.50±0.55	2.67±0.82
	2	2.50±0.55	2.50±0.55	2.17±0.75
	4	2.50±0.55	2.00±0.63	1.83±0.41 ²⁾
阿司匹林	2.055 ³⁾	2.33±0.52	2.33±0.82	2.00±0.63 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;³⁾表示剂量单位为g·L⁻¹(表2同)。

3.2 对脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织病理学的影响 假手术组小鼠神经细胞形态基本正常,具有完整的结构;与假手术组小鼠比较,模型组小鼠神经细胞减少明显,排列紊乱,细胞核固缩深染,形成较多的空泡;与模型组小鼠比较,通心络给药组神经细胞结构比较完整,细胞形态改变较轻,核固缩少,且通心络胶囊对脑损伤的改善程度随着通心络胶囊剂量增大而逐渐增强,提示通心络胶囊可改善脑缺血再灌注小鼠的脑损伤。见图1。

3.3 对脑缺血再灌注损伤小鼠脑梗死面积的影响 与假手术组比较,模型组脑梗死面积明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,通心络胶囊低、中、高剂量组和阿司匹林组明显降低($P < 0.05$),并且随着通心络胶囊剂量的增加,脑梗死面积逐渐减少,说明

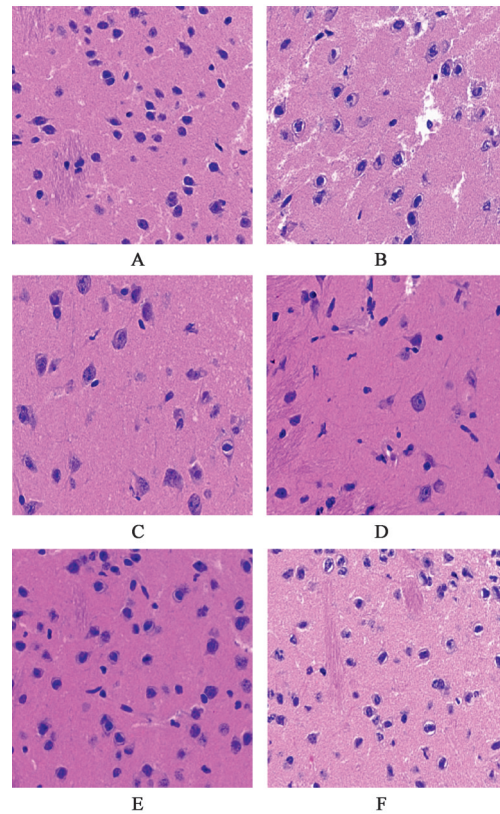


图1 通心络对脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织病理变化的影响(HE,×200)

Figure 1 Effect of Tongxinluo capsule on pathological changes of brain tissue in mice of cerebral ischemia-reperfusion injury (HE,×200)

Table 2 Effect of Tongxinluo capsule on area of cerebral infarction in mice of cerebral ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n=6$)

通心络胶囊高剂量组对于减轻脑缺血再灌注损伤的作用更明显。见表2,图2。

表2 通心络对脑缺血再灌注损伤小鼠脑梗死面积的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Tongxinluo capsule on area of cerebral infarction in mice of cerebral ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	梗死面积/%
假手术	-	0
模型	-	44.60±7.89 ¹⁾
通心络胶囊	1	36.36±5.66 ²⁾
	2	30.82±7.98 ²⁾
	4	23.31±7.67 ²⁾
阿司匹林	2.055 ³⁾	25.36±5.85 ²⁾

3.4 通心络胶囊有效成分及其作用靶点 在BATMAN-TCM平台输入人参片、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香、酸枣仁、冰

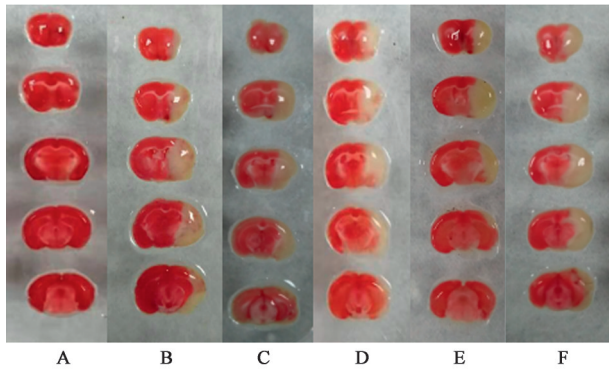


图2 通心络对脑缺血再灌注损伤小鼠脑梗死面积的影响(TTC)
Fig. 2 Effect of Tongxinluo capsule on area of cerebral infarction in mice of cerebral ischemia-reperfusion injury(TTC)

片,得到主要化学成分共572个,无结构的化合物266个,Score cutoff<80的化合物为174个,最终得到132个有效成分,中药和有效成分的对应关系详见表3。利用GeneCards和OMIM数据库预测脑缺血靶基因2805个,通过与通心络胶囊的499个靶点匹配,得到交集基因240个。

表3 通心络胶囊有效成分

Table 3 Active ingredients of Tongxinluo capsule

中药	总化合物	无结构信息的化合物	Score cutoff<80的化合物	最终化合物
人参	293	138	89	66
水蛭	35	20	8	7
全蝎	16	9	4	3
赤芍	21	2	16	3
蝉蜕	4	1	2	1
土鳖虫	3	2	0	1
蜈蚣	8	1	3	4
檀香	58	36	7	15
降香	7	3	4	0
乳香	44	25	6	13
酸枣仁	51	14	26	11
冰片	32	15	9	8

3.5 药物-活性成分-靶点网络图可视化 共有224个节点,828条边。其中椭圆形代表中药,三角形代表活性成分,菱形代表靶点,连线代表两者之间的中药-活性成分或者活性成分-靶点的相互关系。见图3。

3.6 核心基因结果——GO和KEGG富集分析可视化 借助String数据库实现PPI网络图构建,通过R语言对每一个基因所连接的基因数目进行统计,得出排名前30的基因。见图4。针对靶基因进行

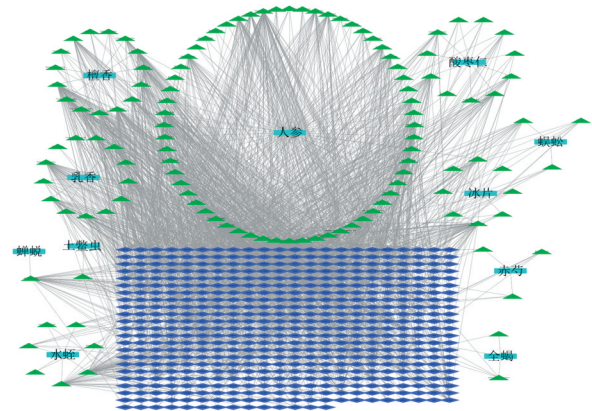


图3 药物-活性成分-靶点网络
Fig. 3 Drug-active ingredient-target network diagram

GO和KEGG富集可视化,图5中横坐标代表基因数量,红色越深,校正P值越小,蓝色越深,校正P值越大。图6中圆圈大小代表基因数量,红色越深,校正P值越小,蓝色越深,校正P值越大。GO结果显示靶基因富集于阳离子通道活性、离子门控通道活性、门控通道活性、神经递质受体活性、离子通道活性等。KEGG富集于cAMP信号通路、钙信号通路、神经活性配体-受体相互作用等信号通路。

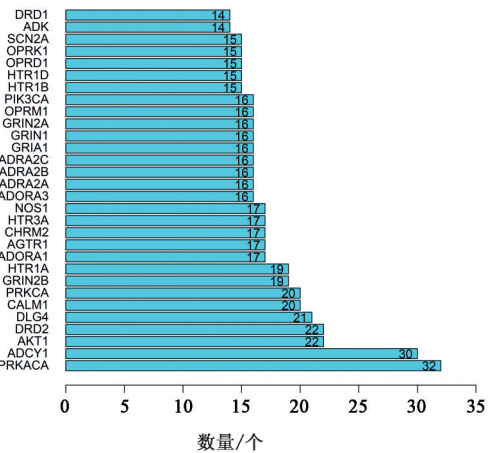


图4 基于连接基因数目统计的核心基因
Fig. 4 Core genes based on number of connected genes

4 讨论

脑缺血又称缺血性脑血管病或缺血性脑卒中,是指供应大脑血液的血管血流量降低或者完全闭塞所致脑组织变性、坏死而引起的一系列症状或体征,其临床表现为肢体无力、偏瘫、感觉障碍、语言障碍、视觉障碍、共济失调等^[1-3]。属于中医学“中风”“类中”“卒中”的范畴。脑缺血是人类发病和死亡的最主要原因之一,目前,我国脑血管病病例中约有70%为缺血性脑卒中。大量研究表明,中药复方对于脑缺血具有很好的治疗作用。中药复方主

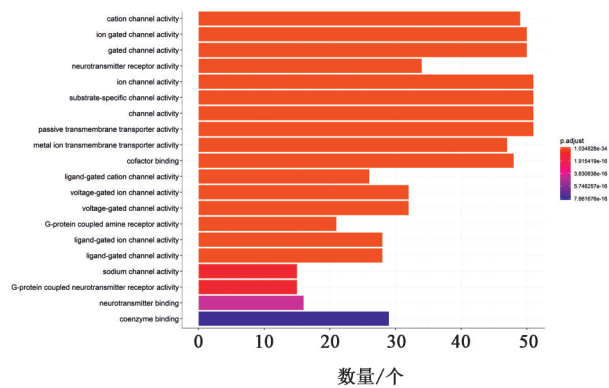


图 5 靶基因 GO 分析靶

Fig. 5 Target gene GO analysis

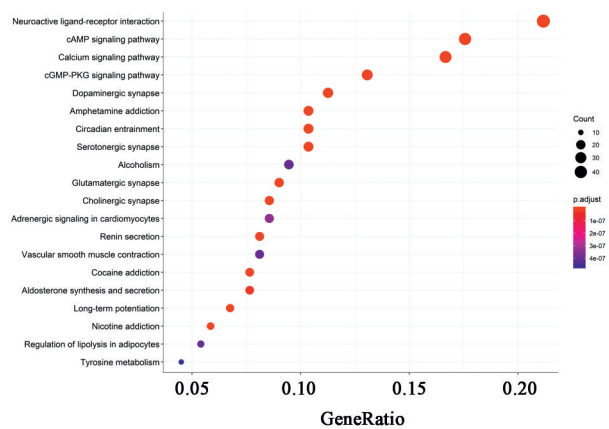


图 6 基因 KEGG 分析

Fig. 6 Target gene KEGG analysis

要通过降低兴奋性神经递质和酸的毒性作用、抑制脂质过氧化和硝化反应、减轻炎症反应和抑制细胞凋亡等途径减轻缺血性脑损伤,具有多成分、多靶点、多途径以及整体调控的作用特点^[14-15],可以实现多靶点、多环节、多层次的脑保护作用。

本研究表明,通心络胶囊减轻 C57 小鼠脑缺血再灌注损伤,脑缺血再灌注后第 3 天存在统计学意义,随着通心络胶囊的剂量增加,其效果越明显。网络药理学表明通心络胶囊治疗脑缺血的核心基因主要有环磷酸腺苷(cAMP)依赖性蛋白激酶催化亚基(PRKACA),腺苷酸环化酶 1(ADCY1),丝氨酸/苏氨酸激酶 1(Akt1),多巴胺受体 D2(DRD2),Discs 大同源物 4(DLG4)等,这些基因可通过介导阳离子通道活性、离子门控通道活性、门控通道活性、神经递质受体活性调控脑缺血的发展。通心络胶囊治疗脑缺血的交集基因的 KEGG 通路众多,这些通路主要包括 cAMP 信号通路、钙信号通路、神经活性配体-受体相互作用、苯丙胺成瘾、昼夜节律夹带,环磷酸鸟苷(cGMP)/蛋白激酶 G(PKG)信号通路等。研究表明 DRD2 是调节神经炎症反应的关键

靶点,调节炎症信号可能是治疗缺血性中风的潜在治疗方法^[16]。WANG 等^[17]研究表明脑缺血后 Akt1 磷酸化受体结合,诱导受体胞浆部分酪氨酸残基自身磷酸增加,促进神经细胞存活;陈燕等^[18]发现电针可以促进 Akt1 的表达量,促进脑缺血后血管再生。研究表明脑缺血再灌注后,钙调蛋白基因(CALM1)表达水平升高。这些证据提示通心络胶囊有可能通过调控 Akt1,DRD2 等靶点影响脑缺血的发病机制^[19]。而目前对 PRKACA,ADCY1,DLG4,PRKCA(蛋白激酶 C α)等靶点与脑缺血的研究较少、甚至未曾研究,可作为潜在的研究方向。

脑缺血的发生是多种机制间的复杂相互作用的结果^[20],包括兴奋性毒性,酸性毒性和由膜去极化引起的离子失衡。膜去极化及细胞内钙超载引起细胞内大量兴奋性氨基酸释放,尤其是谷氨酸,兴奋性毒性能够介导神经细胞死亡,包括细胞坏死、凋亡和自噬^[21]。当然还有其他未知的坏死性凋亡机制。这些过程共享重叠和冗余的特征,对神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞造成伤害。这些研究与本研究中差异基因可通过介导阳离子通道活性、离子门控通道活性、门控通道活性、神经递质受体活性调控脑缺血发展的结果相一致。cAMP 信号通路^[22]通过 CREB 活化导致编码神经保护分子的基因的表达,并且有助于缺血损伤后神经元的存活。本研究中 PIK3CA, PDE4D, CREB1, Akt1, GRIN2A 等基因调控 cAMP 信号通路。cGMP 可调节多种细胞过程,包括细胞生长、炎症、神经元可塑性和心血管稳态等^[23],磷酸二酯酶抑制剂可促进缺血半暗带血管生成,增加局部脑血流量,促进功能恢复,这种神经保护作用依赖于 NO/cGMP/PKG 通路^[24]。NO 是一种重要的活性物质,同时作为第二信使及神经递质,通过细胞间的信息传递及激活 cGMP-PKG 通路对脑缺血再灌注损伤起着重要作用^[25]。本研究中 AGTR1, CREB1, Akt1, PDE5A, ADRB1 等基因调控 cGMP/PKG 信号通路。

本研究通过动物实验证明通心络胶囊减轻脑缺血再灌注损伤,尤其是脑缺血再灌注后第 3 天其保护作用最明显,并且随着通心络胶囊的剂量增加,其效果越明显。通过网络药理学对通心络胶囊所含化合物群进行靶点基因预测,然后针对这些基因进行 GO 富集和 KEGG 富集后,笔者得知通心络胶囊通过 cAMP 信号通路,cGMP/PKG 信号通路等发挥治疗脑缺血的作用,参与通心络胶囊治疗脑缺血的调控基因包括 PRKACA, ADCY1, Akt1,

DRD2, DLG4等, 这些研究结果为通心络胶囊治疗脑缺血的作用机制提供理论支持, 但仍需通过更多基础实验进行后续的验证。

[参考文献]

- [1] GOLDSTEIN L B, BUSHNELL C D, ADAMS R J, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association [J]. *Stroke*, 2011, 42: 517-584.
- [2] JEON J H, JUNG H W, JANG H M, et al. Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical features, magnetic resonance imaging, histopathology, and immunohistochemistry [J]. *J Vet Sci*, 2015, 16: 75-85.
- [3] 刘深, 王宏涛, 魏聪, 等. 通心络胶囊治疗缺血性脑卒中作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(11): 2321-2326.
- [4] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [5] BARABÁSI A L, GULBAHCE N, LOSCALZO J. Network medicine: a network-based approach to human disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1): 56-68.
- [6] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [7] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep21146.
- [8] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1-30.
- [9] AMBERGER J S, HAMOSH A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): a knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58(1): 1-12.
- [10] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: D362-D368.
- [11] YANG Y, LIU H, ZHANG H, et al. ST2/IL-33-dependent microglial response limits acute ischemic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(18): 4692-4704.
- [12] 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.
- [13] YU G. ClusterProfiler: universal enrichment tool for functional and comparative study [J]. *bioRxiv*, 2018, doi: <https://doi.org/10.1101/256784>.
- [14] 李鑫, 邵瑞, 王彧. 中药调节神经干细胞增殖分化的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9): 221-227.
- [15] 陈孝男, 杨爱琳, 赵亚楠, 等. 缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 422-432.
- [16] QIU J, YAN Z, TAO K, et al. Sinomenine activates astrocytic dopamine D2 receptors and alleviates neuroinflammatory injury via the CRYAB/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 263.
- [17] WANG X T, PEI D S, XU J, et al. Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(9): 1844-1856.
- [18] 陈燕, 朱娟, 崔苏扬. 电针促进脑缺血后血管再生的研究进展 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(5): 511-513.
- [19] 袁梅, 周成芳, 夏健, 等. 急性缺血性脑卒中患者血清钙调蛋白水平检测及意义 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(7): 645-647.
- [20] 刘抒雯, 杨丽华, 马春, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(23): 225-234.
- [21] TAOUIK E P L. Ischemic neuronal damage [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(33): 3565-3573.
- [22] KITAGAWA K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain [J]. *FEBS J*, 2007, 274(13): 3210-3217.
- [23] FRANCIS S H, BUSCH J L, CORBIN J D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action [J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(3): 525-563.
- [24] ÖLMESTIG J N E, MARLET I R, HAINSWORTH A H, et al. Phosphodiesterase 5 inhibition as a therapeutic target for ischemic stroke: a systematic review of preclinical studies [J]. *Cell Signal*, 2017, 38: 39-48.
- [25] PLEKHOVA N G, SOMOVA L M. The physiological role of nitric oxide in infectious process [J]. *Jusp Fziol Nauk*, 2012, 43(3): 62-81.

[责任编辑 周冰冰]