

· 数据挖掘 ·

利用知识发现工具 Arrowsmith 探讨龙血竭及其有效成分 治疗缺血性脑卒中的潜在作用机制

王仁杰^{1,2}, 张艳军^{1,2}, 王星星^{1,2}, 张新庄¹, 周建明¹, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;
2. 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的:探讨龙血竭治疗缺血性脑卒中的可能机制。方法:运用非相关文献知识发现工具 Arrowsmith 在线软件,通过分析龙血竭和缺血性脑卒中两个主题词文献集合的中间词,探求潜在机制。结果:Arrowsmith 软件的初步探索结果显示龙血竭及其有效成分对环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), 瞬时感受器电位香草酸受体 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1), 一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS), 电压门控性钾通道 1.3 (voltage-gated potassium channel 1.3, Kv1.3) 及转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 具有调节作用,同时在缺血性脑卒中过程中上述指标也出现异常表达。结论:龙血竭治疗缺血性脑卒中的机制可能与下调缺血性脑组织中 COX-2 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达、拮抗 TRPV1 和 Kv1.3 通道、上调内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和 TGF- β_1 的表达有关,可为进一步开展机制验证性研究提供参考。

[关键词] 龙血竭; 缺血性脑卒中; Arrowsmith; 环氧合酶-2; 瞬时感受器电位香草酸受体 1; 一氧化氮合酶; 电压门控性钾通道 1.3; 转化生长因子- β_1

[中图分类号] R287;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0194-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220194

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1332.010.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:32

Explore Latent Mechanism of *Dracaena Cochinchinensis* Resina in Treating Ischemic Stroke by Using Knowledge-Discovery Tool Arrowsmith

WANG Ren-jie^{1,2}, ZHANG Yan-jun^{1,2}, WANG Xing-xing^{1,2}, ZHANG Xin-zhuang¹,
ZHOU Jian-ming¹, XIAO Wei^{1,2*}

(1. *State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;*
2. *Key Laboratory for New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Lianyungang 222001, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanism of *Dracaena Cochinchinensis* Resina in the treatment of ischemic stroke. **Method:** Online software of Arrowsmith based on the theory of Swanson's non-correlated literature-bases knowledge discovery was applied to explore the underlying mechanism by analyzing the intermediate words in the literature on *Dracaena Cochinchinensis* Resina and ischemic stroke. **Result:** The preliminary investigation results by Arrowsmith software showed that *Dracaena Cochinchinensis* Resina and its

[收稿日期] 20170616(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 王仁杰, 硕士, 工程师, 从事中药新药研究与开发, Tel:15705130109, E-mail:Wwj447320766@126.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士生导师, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152328, E-mail:Kanionlunwen@163.com

active components might have certain ability to regulate the expression levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), nitric oxide synthase (NOS), voltage-gated potassium channel 1.3 (Kv1.3) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); and these above indexes had abnormal expression in ischemic stroke. **Conclusion:** The mechanism may be associated with down-regulating the expression of COX-2 and iNOS, blocking TRPV1 and Kv1.3 channel, and promoting the expression of eNOS and TGF- β_1 . This can provide strong reference for the laboratory to conduct further mechanism verification studies.

[Key words] Dracaena Cochinchinensis Resina; ischemic stroke; Arrowsmith; cyclooxygenase-2; transient receptor potential vanilloid 1; nitric oxide synthase; voltage-gated potassium channel 1.3; transforming growth factor- β_1

脑卒中俗称“中风”，是严重危害人类生命安全的难治性疾病，具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点。在 2008 年我国卫生部公布的死因顺位中，脑卒中在城市中为第三位的致死原因，在农村中为第二位的致死原因。缺血性脑卒中，又称脑梗死，是指由于脑部血液供应障碍，缺血、缺氧引起的局限性脑组织的缺血性坏死或脑软化，其占卒中患者总数的 75% ~ 85%^[1]。在缺血性脑卒中过程中，由各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍，导致脑组织缺血缺氧性病变坏死，进而产生临床上对应的神经功能缺失表现，严重影响了患者的生存质量^[2]。

西医认为，动脉粥样硬化（大血管疾病）、心源性脑栓塞、小血管病变（腔隙性卒中）是缺血性脑卒中最常见的病因^[3]。其易发因素主要分为可干预因素和不可干预因素，其中可干预因素主要包括高血压、糖尿病、血脂异常、心脏病、颈动脉狭窄、代谢综合征、高同型半胱氨酸血症、性激素水平、高尿酸血症、低胆红素血症、血浆溶血磷脂酸水平、炎症反应、基因多态性等；不可干预因素主要有年龄、性别、种族、环境因素、遗传等^[4]。目前公认的关于缺血性脑卒中发病机制的学说涉及能量耗竭、兴奋性氨基酸毒性作用及钙超载、梗死灶周边半暗带去极化、炎症细胞因子、一氧化氮和自由基损伤及细胞凋亡等^[5-7]。

在临床上，缺血性脑卒中的治疗方式主要包括手术治疗和药物治疗。药物治疗研究的热点主要是改善脑血循环和神经保护。其中，改善脑血循环的措施主要是抗血栓治疗。抗血栓药物可分为溶栓药、抗血小板聚集药和抗凝血药。目前主要的神经保护剂有：钙离子拮抗剂、谷氨酸拮抗剂、谷氨酸释放抑制剂、 γ -氨基丁酸（GABA）受体激动剂、自由基清除剂及细胞膜稳定剂等^[2]。当前，临床上缺血性脑卒中的早期治疗以溶栓为主，然而由于其治疗窗

过窄（ ≤ 3 h），单纯以溶栓为主的治疗，不能改善患者缺血-再灌注损伤，应在溶栓的同时强调神经保护，逆转神经元凋亡、提高神经元存活率、改善神经功能^[8]。

中医学认为缺血性脑卒中的病理性质多属本虚标实、肝肾阴虚、气血衰少而致病，其病因主要有痰瘀故邪、气虚血瘀、毒邪痹脑、脏腑亏虚^[4]。因此，临床多施用活血化瘀类（如川芎、银杏叶）和补虚类（如黄芪、当归、刺五加）中药进行防治^[9]。

具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌等功效的传统中药-龙血竭，主要产于我国的广西和云南，系百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* 的含脂木材经提取得到的树脂，常用于跌打损伤、瘀血作痛、妇女气血凝滞、外伤出血等病症。现代研究表明，龙血竭具有抗菌、抗炎、抗痉挛、镇痛、抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤等多种药理活性，可增强免疫功能、促进皮肤修复、止血以及促进血液循环^[10-11]。酚类化合物是龙血竭主要的生物活性成分，根据结构上的不同主要分为①二氢查尔酮类，该类化合物所占含量最大，约占 60% 以上，代表性的有龙血素 A、B、C、D 和剑叶龙血素 A；②查尔酮类；③黄烷类；④色原酮类；⑤黄酮类和二氢黄酮类；⑥聚合黄酮类，如剑叶龙血素 B、D、E、F、G 以及血竭红素 A、B；⑦其他酚类，如白藜芦醇、紫檀芪、剑叶龙血素 C^[12]。

近年来，对于龙血竭治疗缺血性脑卒中的研究也取得了一定的进展。XIN 等^[13]的研究发现，龙血竭的 95% 乙醇提取物具有很好的抗血栓作用，可改善血小板功能及凝血活性^[14]，其中的黄烷类成分具有抗血小板聚集的功能。由龙血竭中酚类成分制成的滴丸可改善神经功能、减小脑梗死体积、减轻脑水肿和脑指数、调节氧化应激，对局灶性脑缺血大鼠具有保护作用^[15]。同样由龙血竭总酚提取物制备而成的龙血通络胶囊，临床用于治疗中风病中经络

(轻中度脑梗死)恢复期血瘀证,药效学实验表明其可以减轻动脉粥样硬化损伤^[16]、快速降低全血黏度和改善红细胞功能来恢复血液流变学特性^[17]。临床试验证实龙血通络胶囊治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期疗效确切,安全性较好,能有效改善患者神经功能缺损程度和病残情况,对中医血瘀证候也有较好的改善作用^[18]。

虽然龙血竭及其有效成分治疗缺血性脑卒中的作用已经比较明确,但是其作用机制,目前还鲜见报道,并不明确,这在一定程度上限制了其在临床中的使用。为了探讨其治疗缺血性脑卒中的可能靶点和作用机制,本文以美国国家生物技术信息中心开发的生物医学信息检索数据库(PubMed)中的英文文献为分析对象,利用非相关文献知识发现工具-Arrowsmith,尝试探索龙血竭及其有效成分和缺血性脑卒中之间的关联关系,得到了一些有意义的结果,可为后期进一步的机制研究提供方向及一定的理论基础。

1 方法

网页版 Arrowsmith 是一种基于闭合式知识发现方法的在线软件,其基本原理主要为:用户假设认为两个主题词 A 和 C 之间存在某些途径的联系,首先在数据库中分别检索形成文献集合 A 和 C,将所有连接两个文献的中间词 B 根据相对词频从高到底排列形成中间词表 B-List,而后利用词频限定和语义筛选将表中低相关性、冗余无用的中间词移除,最后对表中剩余的高相关性中间词的相关文献进一步深入阅读,以验证假设、找出合理的联系途径。

登陆 Arrowsmith 网页版 http://arrowsmith.psych.uic.edu/cgi-bin/arrowsmith_uic/start.cgi,点击“start”进入检索界面。以“Resina draconis [title/abstract] OR Dragon's blood [title/abstract]”为检索式形成的文献集作为来源文献 A,以“Cerebral infarction [title/abstract] OR Ischemic stroke [title/abstract]”为检索式形成的文献集作为来源文献 C。结果 A 集合中的 124 篇文献与 C 集合中 25 000 篇文献有 2 篇文献在标题或文摘字段中同时含有龙血竭和缺血性脑卒中,其 PubMed 唯一标识码(PMID)为 27591127^[16] 和 24051215^[15]。文献 27591127 证实,龙血通络胶囊通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核转录因子 Kappa B 抑制蛋白激酶(IKK)/核转录因子 Kappa B 抑制蛋白(IκB)/核转录因子-Kappa B(NF-κB)信号通路抑制单核细胞对人脐静脉内皮细胞的黏附,从而减轻高脂小鼠的主

动脉窦动脉粥样硬化损伤,阐明了其抗动脉粥样硬化的保护作用机制。文献 24051215 的研究结果表明龙血竭滴丸对局灶性脑缺血大鼠具有保护作用,包括改善神经功能、减小脑梗死体积、减轻脑水肿和脑指数、调节氧化应激。在 A,C 集合共有的 2 篇文献中,文献 27591127 涉及了一定的抗动脉粥样硬化机制研究,文献 24051215 研究了保护作用,未涉及到作用机制。

为了较深入且全面地探讨龙血竭及其有效成分治疗缺血性脑卒中的可能靶点和作用机制,对 A,C 两个集合的中间关联词进行了挖掘。连接文献集合 A 和 C 的中间词表 B 中有 658 个词,这些词分别出现在龙血竭或缺血性脑卒中的相关文献的标题或文摘字段中,按照相关度从高到低排列,相关度 > 0.5 (即有密切关联关系)的词有 90 个。本研究旨在探讨龙血竭及其有效成分治疗缺血性脑卒中的可能机制,因此选择“Chemical & Drugs”和“Genes & Molecular Sequences, and Gene & Protein Names”对相关词表 B 进行语义筛选,相关度 > 0.5 (0.55 ~ 0.99)的 24 个词被筛选出来。进一步阅读文献,发现其中有研究意义的关联词主要有环氧合酶-2(COX-2),瞬时感受器电位香草酸受体 1(TRPV1),一氧化氮合酶(NOS),Kv1.3 通道及转化生长因子-β₁(TGF-β₁)等。

2 结果

笔者在科学研究的过程中,往往需要结合自身经验通过阅读大量的已有研究文献来了解前人的研究进展,但在同一个研究主题下的各个细分专业、交叉学科的诸多文献杂乱分散在数据库中,使得大部分研究者经常只能从自身熟悉的专业背景中收集相关资料,而忽视了交叉学科的相关科研信息。Swanson 教授基于非相关文献知识发现的研究结果表明,立足于生物医学领域的大数据资源进行文献间关联关系的研究,可以为研究者带来独特的视角和科研思维的革新^[19-20]。笔者通过非相关知识发现工具 Arrowsmith 在线软件的分析结果,并结合原始文献的研究,具体分析具有实际意义的关联词,以探索挖掘出其中可能的作用靶点和机制。

2.1 COX-2 在龙血竭及其有效成分与缺血性脑卒中之间的关联性分析 从 Arrowsmith 的分析结果可以看出,在关联词表中,关联度最高的为 COX-2 (0.99)。COX 是催化花生四烯酸转化为前列腺素和血栓素的关键限速酶,在生理状态下发挥很重要的作用^[21]。由 COX-2 催化花生四烯酸生成的前列

腺素和血栓素,可以促使血管收缩、凝血、血栓形成及血脑屏障开放,从而加重缺血性脑损伤。脑损伤,尤其是缺血性脑卒中诱导触发的小胶质细胞 COX-2 基因过表达,扩大了脑梗死范围^[22-23]。应用选择性 COX-2 抑制剂可以明显减小小鼠脑梗死体积^[24-25]、保护神经元^[26]、减轻缺血性脑损伤、改善缺血性脑卒中引起的行为功能障碍^[27]。

一系列研究表明,龙血竭的乙醇提取物可以显著抑制脂多糖诱导的 COX-2 基因表达上调,发挥其抗炎、镇痛的作用^[28-29],其中剑叶龙血素 B 可能是有效成分^[30]。

龙血竭及其有效成分-剑叶龙血素 B 可能作为一种环氧合酶-2 抑制剂,通过抑制花生四烯酸环氧酶(COX),使丝氨酸残基 Ser-529 和 Ser-516 不可逆地乙酰化,从而阻断血小板激活剂-血栓素 A2(TXA2)的合成,发挥抗血小板聚集和舒张血管的作用,从而治疗缺血性脑卒中。

2.2 瞬时感受器电位香草酸受体 1 (TRPV1) 在龙血竭及其有效成分与缺血性脑卒中之间的关联性分析 TRPV1 是一个配体门控非选择性阳离子通道,广泛存在于中枢神经系统及末梢神经系统中,其存在于脑的多个部位,如黑质多巴胺能神经元、海马锥体神经元、下丘脑神经元及皮肤^[31]。TRPV1 可以被各种外因性及内因性的物理及化学刺激所激发,例如:温度超过 43 °C, pH 低于 5.9, 内源性大麻素花生四烯酸乙醇胺, N-花生四烯酰基多巴胺以及辣椒素。TRPV1 被激活后,通道打开引起 Ca²⁺ 内流,从而通过增加细胞的兴奋性等作用机制导致神经元凋亡^[32]。在缺血-再灌注损伤过程中,异常的 Ca²⁺ 内流将引起细胞内钙离子超载,进而诱导神经元凋亡。其机制有:兴奋性谷氨酸大量释放产生兴奋性毒性、线粒体功能障碍抑制细胞呼吸、三羧酸循环抑制、半胱天冬酶(Caspase)等凋亡因子启动、钙调素激活引起脑血管痉挛、血脑屏障通透性增高加重脑水肿以及多巴胺释放^[33]。使用 TRPV1 抑制剂-辣椒平(Capsazepine)阻断 TRPV1 通道后能够保护成年大鼠脑缺血再灌注引起的血脑屏障功能异常^[34]。

WEI 等^[35]在研究龙血竭镇痛机制时发现,龙血竭中的 3 个有效成分-剑叶龙血素 A, 剑叶龙血素 B 及龙血素 B 可以协同抑制辣椒素诱导的 TRPV1 电流峰值振幅。单独使用龙血素 B 亦可对 TRPV1 通道产生拮抗作用,且这种拮抗作用并不能通过增高辣椒素溶液的浓度而被克服,因此推测其作用位点与辣椒素的作用位点不同^[36],龙血素 B 通过该作用

位点与 TRPV1 结合,导致 TRPV1 构型的改变,促使激动剂与 TRPV1 结合的亲和力与活性下降,进而产生拮抗的作用,且这种拮抗作用是可逆的^[37]。

龙血竭中的剑叶龙血素 A, B, 尤其是龙血素 B, 可能通过拮抗 TRPV1 通道,减少 Ca²⁺ 内流,从而减轻兴奋性谷氨酸产生的毒性、线粒体功能障碍,保护血脑屏障功能以及抑制神经细胞凋亡,继而发挥治疗缺血性脑卒中的作用。

2.3 NOS 在龙血竭及其有效成分与缺血性脑卒中之间的关联性分析 人体内 NO 由 NOS 在催化 L-精氨酸生成 L-瓜氨酸的过程中产生,是一种多态性内源性调节物质。作为 NO 生物合成限速酶的 NOS,存在于多种神经元中,通过催化 L-精氨酸合成 NO,扩散到邻近胶质细胞或神经元发挥作用。目前已知 NO 的 3 种来源,分别由 eNOS, 神经型一氧化氮合酶(nNOS)及 iNOS 催化产生,它们是 NOS 的 3 种异构体。在缺血性脑卒中发生时,异构体中的 nNOS 和 iNOS 可生成 NO,产生神经毒性作用。一方面,NO 与超氧阴离子形成了 ONOO⁻,该自由基可直接引起线粒体酶和脱氧核糖核酸(DNA)损伤;另一方面,NO 还通过诱导和激活基质金属蛋白酶(MMP)家族成员造成水肿^[38-39]。然而由异构体 eNOS 产生的 NO 则对急性缺血性脑卒中后的脑组织具有保护作用^[40]。这种双重作用提示在治疗方面应抑制 nNOS 和 iNOS 的活性而增强 eNOS 的活性^[41-42]。一系列的试验性研究表明,选择性 nNOS 和 iNOS 抑制剂可以作为急性缺血性脑卒中治疗的候选药物^[43],如依布哌啶通过下调 iNOS 的表达水平对氧糖剥夺模型中大鼠海马神经元起到了保护作用^[44]。

在研究血竭乙醇提取物抗炎、抗糖尿病机制的过程中,研究人员发现,血竭乙醇提取物下调了 iNOS 基因的表达,该作用可能与其抑制了 NF-κB 的激活有关^[29, 45]。从龙血竭中提取分离出的黄酮和酚类化合物对脂多糖诱导小胶质细胞和巨噬细胞的 NO 生成有显著抑制作用^[28, 46-47]。血竭醇提物同时亦被发现可以抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞 NO 的产生^[48]。龙血竭的这种抑制诱导型 NO 生成的作用也在辐射小鼠抗氧化应激反应的研究中得到了证实^[49]。此外,以龙血竭酚类提取物为主要内容物的龙血通络胶囊通过恢复氧化低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞中减少了的 NO 生成量来减轻其功能障碍,该作用可能与上调了人脐静脉内皮细胞中 eNOS 的表达有关^[16]。

龙血竭乙醇提取物对缺血性脑卒中的治疗作用可能有两个方面,一方面,通过上调 eNOS 的表达,扩张血管以增加脑局部血流来保护脑组织;另一方面,通过下调 iNOS 的表达,抑制其合成的 NO 所介导的神经元兴奋性谷氨酸毒性作用。

2.4 Kv1.3 通道在龙血竭及其有效成分与缺血性脑卒中之间的关联性分析 Kv1.3 通道属于电压门控钾通道,其相对限制性地分布在免疫系统和中枢神经系统,人类 T 淋巴细胞发育早期即有 Kv1.3 通道的表达。静息状态下,未致敏的 T 细胞、中心记忆 T 细胞和效应记忆 T 细胞表达类似数量的 Kv1.3 通道。激活状态下,其在效应记忆 T 细胞上表达的数量显著上调,并在维持 T 细胞激活、基因表达和细胞增殖中发挥重要作用。Kv1.3 通道活化后,促使钙离子内流,升高的钙离子浓度激活钙调蛋白依赖的钙调磷酸酶,引起转录因子通路的级联反应,调节白细胞介素(IL)-2,干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 等细胞因子的表达和细胞增殖^[50-54]。在脑部炎症疾病的病理条件下,Kv1.3 通道的表达上调,促进了免疫因子的释放,从而造成了神经毒性^[55],该通道已然成为促进神经修复的一个新靶点^[56]。Kv1.3 通道的特异性抑制剂选择性地减少急性缺血性脑卒中患者 CD8 阳性 T 细胞(CD8)及辅助性 T 细胞(Th2)的钙离子内流;在中枢神经系统受损后数小时内,其通过抑制 CD8 细胞来防止过度的组织损伤;而受损 1 周后,它又可通过抑制 Th2 细胞来提高炎症应答,以减少不必要的脑卒中诱导免疫抑制的临床后果。由于 Kv1.3 通道抑制剂可以靶向作用于 T 淋巴细胞,从而显示其具有很好的治疗急性缺血性脑卒中的潜力^[57]。

YIN 等^[58]研究了龙血素 B 介导免疫抑制的分子基础,结果表明,龙血素 B 是一种 Kv1.3 通道阻滞剂,其通过抑制 Jurkat T 淋巴细胞膜去极化,从而减少钙离子内流,抑制炎症细胞因子 IL-2 的释放,表现出较强的抑制 T 淋巴细胞激活作用。

龙血竭治疗缺血性脑卒中的作用可能与龙血素 B 阻滞 T 淋巴细胞膜上的 Kv1.3 通道,使细胞膜去极化,减少钙离子内流,抑制炎症细胞因子释放所产生的免疫抑制效应有关。

2.5 TGF- β_1 在龙血竭及其有效成分与缺血性脑卒中之间的关联性分析 TGF- β_1 是一种相对分子质量为 25 千道尔顿(kDa)的多功能活性肽,可以抑制免疫相关细胞的增殖、激活,具有抗炎和动脉保护作用^[59-60]。在中枢神经系统神经元、星形胶质细胞和

小胶质细胞都可表达 TGF- β_1 。在缺血性脑损伤中,TGF- β_1 具有抗氧化,阻止细胞凋亡,调节炎症反应,调节小胶质细胞和星形胶质细胞反应的多种作用;它可以通过抑制缺血早期中枢神经系统的炎症反应,从而减轻脑水肿,减小梗死面积,促进微血管增生,对脑组织损伤修复发挥重要作用^[61-62]。

在对急性脑梗死患者血清 TGF- β_1 浓度的观察中发现,TGF- β_1 浓度在急性期降低,病程第 3 天降至最低,此后逐渐回升且处于稳定期(7~14 d),进入恢复期后随着病情的好转,TGF- β_1 浓度也逐渐恢复到接近正常水平。脑梗死患者血清 TGF- β_1 水平降低的机制尚未完全确定,可能是早期 TGF- β_1 被过度利用或积聚在病变脑组织中,此后脑组织中巨噬细胞及小胶质细胞被缺血、缺氧所激活释放 TGF- β_1 ,并以自分泌或旁分泌的形式调节免疫反应,参与组织修复及促进血管生成,故血清 TGF- β_1 含量逐渐接近正常。研究表明,TGF- β_1 浓度较低时,脑梗死面积增大,提示其对脑梗死患者具有保护作用,所以早期提高 TGF- β_1 浓度可以改善预后^[63]。

在探讨龙血竭乙醇提取物促进创面愈合作用的分子机制时发现,龙血竭乙醇提取物明显上调了大鼠创面组织中 TGF- β_1 及其信使 RNA(mRNA)的表达,从而起到了促进血管生成和伤口收缩的作用^[64]。张宪发^[65]在研究龙血竭对糖尿病大鼠烫伤创面修复的作用也发现,龙血竭可以显著刺激创面的 TGF- β_1 ,促进了胚胎干细胞的增殖分化,有利于创面的再上皮化。

龙血竭乙醇提取物可能通过上调 TGF- β_1 的表达,以阻止细胞凋亡、抑制缺血早期中枢神经系统的炎症反应,继而减轻脑水肿,减小梗死面积,促进微血管增生。这或许是其治疗缺血性脑卒中的一种潜在机制。

3 讨论

缺血性脑卒中的病理过程十分复杂,经过近些年的大量研究,已对其有了一定的了解。在早期缺血情况下,由于氧和葡萄糖的供应不足,神经元代谢紊乱,三磷酸腺苷(ATP)大量消耗,从而使得能量依赖的离子泵受损,继而细胞内外离子梯度紊乱。一方面,细胞内钙离子大量增加,引发一系列有害的级联反应;另一方面,胞外钾离子增多,过度激活其受体门控离子通道,使得胞内钙离子、氯离子、钠离子和水增多,引起急性神经元肿胀坏死。在再灌注期间,血氧部分或全部恢复,一方面生成很多氧自由基,在铁蛋白的存在下转变为羟自由基,攻击膜结构

和 DNA,最终破坏细胞结构和功能;另一方面,产生的前列腺素和 TXA₂ 以及白三烯,收缩血管引起继发性脑缺血。此外,脑缺血后,许多炎症因子、趋化因子的上调,使得血脑屏障通透性增加,单核细胞和巨噬细胞浸润脑组织,进一步加重了脑损伤^[8]。

中药具有多靶点、疗效广泛的特点,结合缺血性脑卒中的复杂病理过程,使得中药治疗缺血性脑卒中中具有目前西药无法比拟的优势。以龙血竭酚类提取物为主要成分的龙血通络胶囊,具有活血化瘀通络的功效,用于中风病中经络(脑梗死)恢复期血瘀证。临床试验证明,其可以有效改善中风恢复期神经功能缺损和病残情况,疗效确切,安全性好^[18]。

本文利用知识发现工具 Arrowsmith 对 PubMed 中龙血竭和缺血性脑卒中(脑梗死)的英文文献进行分析,目的是从文献情报学的角度探讨龙血竭及其有效成分对缺血性脑卒中的可能治疗机制,从而为其机制研究提供合理的线索和方向。从汇总研究的结果来看,龙血竭可能通过以下几条途径实现其治疗缺血性脑卒中的效应,①剑叶龙血素 B 下调 COX-2 基因的表达,阻断 TXA₂ 的合成,抗血小板聚集及舒张血管;②剑叶龙血素 A,B,尤其是龙血素 B 拮抗 TRPV1 通道,抑制钙离子内流,减轻兴奋性谷氨酸产生的毒性、线粒体功能障碍,保护血脑屏障功能以及抑制神经细胞凋亡;③上调 eNOS 的表达,扩张血管以增加脑局部血流来保护脑组织;下调 iNOS 的表达,抑制其合成的 NO 所介导的神经元兴奋性谷氨酸毒性作用;④龙血素 B 阻滞 T 淋巴细胞上的 Kv1.3 通道,减少钙离子内流,抑制炎症细胞因子释放,介导免疫抑制;⑤上调 TGF- β_1 的表达,阻止细胞凋亡,抑制缺血早期中枢神经系统的炎症反应,继而减轻脑水肿,减小梗死面积,促进微血管增生。以上 5 个关联因素可以作为龙血竭治疗缺血性脑卒中机制研究的切入点,以后续的实验研究来加以验证。

[参考文献]

[1] 段云霞,陈小玉,张梓倩,等. 缺血性脑卒中治疗药物研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版, 2012, 21(2): 65-70.

[2] 孟文婷,李东翔,佟玲. 缺血性脑卒中的治疗进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(10): 1114-1120.

[3] Dichgans M. Genetics of ischemic stroke[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(2): 149-161.

[4] 孙晓丽,曹奕. 缺血性脑卒中病因研究[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(11): 1079-1081.

[5] Osuga H, Hakin A M. Relevance of interstitial glutamate to selective vulnerability in focal cerebral

ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(2): 343.

[6] ZHENG Z, Yenari M V. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. Neurol Res, 2004, 26(8): 884-892.

[7] 安泳潼,夏玉叶,闵旸. 缺血性脑卒中的发病机制及其治疗[J]. 世界临床药物, 2010, 31(1): 35-39.

[8] 王瑞雪,柳莲,王志勇. 缺血性脑卒中神经保护药物及其潜在靶点的研究进展[J]. 世界临床药物, 2013, 34(12): 760-764.

[9] 李珊珊. 缺血性脑卒中中药防治的研究进展[J]. 解剖学研究, 2016, 38(3): 200-202.

[10] XU H, ZHANG Y, LEI Y, et al. A systems biology-based approach to uncovering the molecular mechanisms underlying the effects of dragon's blood tablet in colitis, involving the integration of chemical analysis, ADME prediction, and network pharmacology[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101432.

[11] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(3): 361-380.

[12] 董恩双. 龙血竭化学研究及降血糖有效部位的筛选[D]. 北京:北京中医药大学, 2008.

[13] XIN N, LI Y J, LI Y, et al. Dragon's blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 510-514.

[14] YI T, CHEN H B, ZHAO Z Z, et al. Comparison of the chemical profiles and anti-platelet aggregation effects of two "Dragon's Blood" drugs used in traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2): 796-802.

[15] XIN N, YANG F J, LI Y, et al. Dragon's blood dropping pills have protective effects on focal cerebral ischemia rats model[J]. Phytomedicine, 2013, 21(1): 68-74.

[16] ZHENG J, LIU B, LUN Q, et al. Longxuetongluo capsule inhibits atherosclerosis progression in high-fat diet-induced ApoE^{-/-} mice by improving endothelial dysfunction[J]. Atherosclerosis, 2016, 255(23): 156-163.

[17] ZHENG J, LIU B, LUN Q, et al. Longxuetongluo capsule improves erythrocyte function against lipid peroxidation and abnormal hemorheological parameters in high-fat diet-induced ApoE^{-/-} mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, doi:10.1155/2016/2603219.

[18] 赵宾江,王振中,罗惠平,等. 龙血通络胶囊治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期血瘀证的随机、

- 双盲、安慰剂对照、多中心临床试验[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 2473-3477.
- [19] Swanson D R. Fish oil, raynauds syndrome, and undiscovered public knowledge[J]. *Perspect Biol Med*, 1986, 30(1): 7-18.
- [20] Swanson D R. Migraine and magnesium-11 neglected connections[J]. *Perspect Biol Med*, 1988, 31(4): 526-557.
- [21] Cannon C P, Cannon P J. Physiology COX-2 inhibitors and cardiovascular risk [J]. *Science*, 2012, 336(6087): 1386-1387.
- [22] Koistinaho J, CHAN P H. Spreading depression-induced cyclooxygenase-2 expression in the cortex[J]. *Neurochem Res*, 2000, 25(5): 645-651.
- [23] Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, et al. Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans [J]. *Acta Neuropathol*, 2000, 99(1): 26-30.
- [24] Candelario-Jalil E, Mhadu N H, Gonzalez-falcon A, et al. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on cerebral infarction and neurological deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *J Neuroinflammation*, 2005, 2(1): 1-11.
- [25] Dore S, Otsuka T, Mito T, et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction[J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(2): 155-162.
- [26] JIANG C, CUI K, WANG J, et al. Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1925-1931.
- [27] Lapchak P A, Araujo D M, SONG D, et al. Neuroprotection by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 results in improvements in behavioral deficits induced by reversible spinal cord ischemia[J]. *Stroke*, 2001, 32(5): 1220-1225.
- [28] Heo S K, YI H S, YUN H J, et al. Ethylacetate extract from *Draconis resina* inhibits LPS-induced inflammatory responses in vascular smooth muscle cells and macrophages *via* suppression of ROS production [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(5): 1129-1136.
- [29] Choy C S, HU C M, Chiu W T, et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by *Sanguis Draconis*, a dragon's blood resin, in RAW 264.7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 455-462.
- [30] LI Y S, WANG J X, JIA M M, et al. Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(1): 43-54.
- [31] Mezey E, Toth Z E, Cortright D N, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1) and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 3655-3660.
- [32] Pedersen S F, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview [J]. *Cell Calcium*, 2005, 38(3/4): 233-252.
- [33] 杨佳丹, 董志. 脑缺血再灌注损伤的病因学研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(10): 935-938.
- [34] HU D E, Easton A S, Fraser P A. TRPV1 activation results in disruption of the blood-brain barrier in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146(4): 576-584.
- [35] WEI L S, CHEN S, HUANG X J, et al. Material basis for inhibition of dragon's blood on capsaicin-induced TRPV1 receptor currents in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 702(1/3): 275-284.
- [36] 王乐, 曹宇. TRPV1 阻断剂的研究进展[J]. *国际病理理学科学与临床杂志*, 2008, 28(3): 220-224.
- [37] WANG S T, CHEN S, GUO M, et al. Inhibitory effect of cochinchinenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Brain Res*, 2008, 1201(2): 34-40.
- [38] Mohammadi M T, Shid-Moosavi S M, Dehghani G A. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat [J]. *Pathophysiology*, 2012, 19(1): 13-20.
- [39] Mohammadi M T, Shid-Moosavi S M, Dehghani G A. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats [J]. *Iran Biomed J*, 2011, 15(1/2): 22-30.
- [40] HUA Q, ZHU X, LI P, et al. Refined Qing Kai Ling, traditional chinese medicinal preparation, reduces ischemic stroke-induced infarct size and neurological deficits and increases expression of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 633-637.
- [41] 黄文胜. 急性脑卒中患者血清一氧化氮、一氧化氮合酶、丙二醛、超氧化物歧化酶及过氧化脂质水平动态变化与病情预后分析[J]. *临床医学*, 2009, 29(7): 82-84.

- [42] Niwa M, Inao S, Takayasu M, et al. Time course of expression of the three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2001, 41(2): 63-73.
- [43] Willmot M, Gibson C, Gray L, et al. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(3): 412-425.
- [44] Porciuncula L O, Rocha J B, Cimarosti H, et al. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunocontent of inducible nitric oxide synthase [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 346(1/2): 101-104.
- [45] HU C M, LI J S, Cheah K P, et al. Effect of sanguis draconis (a dragon's blood resin) on streptozotocin-and cytokine-induced β -cell damage, in vitro and in vivo [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 417-425.
- [46] PANG D R, SU X Q, ZHU Z X, et al. Flavonoid dimers from the total phenolic extract of Chinese dragon's blood, the red resin of *Dracaena cochinchinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 115(18): 135-141.
- [47] SU X Q, SONG Y L, ZHANG J, et al. Dihydrochalcones and homoisoflavanones from the red resin of *Dracaena cochinchinensis* (Chinese dragon's blood) [J]. *Fitoterapia*, 2014, 99: 64-71.
- [48] CHANG Y, CHANG T C, Lee J J, et al. Sanguis draconis, a dragon's blood resin, attenuates high glucose-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Scientific World J*, 2014, doi: 10. 1155/2014/423259.
- [49] RAN Y, WANG R, LIN F, et al. Radioprotective effects of Dragon's blood and its extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells [J]. *Phys Med*, 2014, 30(4): 427-431.
- [50] Panyi G, Varga Z, Gaspar R. Ion channels and lymphocyte activation [J]. *Immunol Lett*, 2004, 92(1/2): 55-66.
- [51] HU L, Pennington M, JIANG Q, et al. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4563-4570.
- [52] Wulff H, Calabresi P A, Allie R, et al. The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(11): 1703-1713.
- [53] Krasznai Z. Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, 53(2): 127-135.
- [54] Panyi G, Vamosi G, Bodnar A, et al. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(11): 565-569.
- [55] WANG T, Lee M H, Chol E, et al. Granzyme B-induced neurotoxicity is mediated via activation of PAR-1 receptor and Kv1.3 channel [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43950.
- [56] WANG T, Lee M H, Johnson T, et al. Activated T-cells inhibit neurogenesis by releasing granzyme B: rescue by Kv1.3 blockers [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(4): 5020-5027.
- [57] Folyovich A, Biro E, Orban C, et al. Kv1.3 lymphocyte potassium channel inhibition as a potential novel therapeutic target in acute ischemic stroke [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014, 13(5): 801-806.
- [58] YIN S, HU Q, LUO J, et al. Loureirin B, an essential component of Sanguis Draconis, inhibits Kv1.3 channel and suppresses cytokine release from Jurkat T cells [J]. *Cell Biosci*, 2014, doi:10.1186/12045-3701-4-78.
- [59] Yoo S W, CHANG D Y, Lee H S, et al. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 58(10): 249-257.
- [60] Harvey B K, Hoffer B J, WANG Y, et al. Stroke and TGF-beta proteins: glial cell line-derived neurotrophic factor and bone morphogenetic protein [J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 105(2): 113-125.
- [61] 付剑亮, 刘雨, 聂成福, 等. 转化生长因子 β 与脑缺血 [J]. *卒中与神经疾病*, 2000, 7(2): 125-126.
- [62] MENG H, SONG Y, ZHU J, et al. LRG1 promotes angiogenesis through upregulating the TGF- β_1 pathway in ischemic rat brain [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5535-5543.
- [63] 周刚, 徐丽珍. 急性脑梗死患者血清转化生长因子- β_1 含量变化及其临床意义 [J]. *临床内科杂志*, 2002, 19(4): 293-294.
- [64] LIU H, LIN S, XIAO D, et al. Evaluation of the wound healing potential of Resina Draconis (*Dracaena cochinchinensis*) in animal models [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10. 1155/2013/709865.
- [65] 张宪发. 龙血竭对糖尿病大鼠烫伤创面修复作用的实验研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2012.

[责任编辑 邹晓翠]