

· 数据挖掘 ·

## 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的网络药理学

戚明珠, 张妮雪, 苏晓慧, 孔祥英\*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:使用网络药理学的方法研究黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的机制。方法:在药物靶点预测平台 Swiss Target Prediction 上预测黄芪甲苷的靶点,借助人基因数据库(GeneCards),药物靶标数据库(TTD),中医药研究综合数据库(TCMID)及中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索缺血性脑卒中疾病的靶点;将化合物靶点与疾病靶点作交集得到黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的潜在靶点。使用蛋白质相互作用平台(String)构建蛋白相互作用(PPI)网络,并通过网络拓扑分析筛选核心靶点。在生物学信息注释数据库(DAVID)中对交集靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。最后进行分子对接验证,进一步明确黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的核心靶点。结果:黄芪甲苷与缺血性脑卒中的靶点取交集后获得44个共同靶点,PPI网络拓扑分析发现蛋白激酶B1(Akt1),肾素(REN),表皮生长因子受体(EGFR),血管内皮生长因子A(VEGFA),非受体酪氨酸蛋白激酶Src(SRC)是黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的核心靶点。KEGG通路富集分析结果显示,黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的通路涉及神经活性配体-受体相互作用通路,环磷酸鸟苷(cGMP)/cGMP依赖的蛋白激酶(PKG)信号通路、钙信号通路、小分子G蛋白(Rap1)信号通路、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路等。结论:黄芪甲苷可能通过作用于Akt1,REN,EGFR,VEGFA,Src等靶点促进血管生成及抑制血小板活性进而改善脑血流量,又可以抑制脑部缺血组织细胞的凋亡及炎症反应等减轻神经功能的损伤,最终产生治疗缺血性脑卒中的效果。该研究结果为深入探究黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的作用机制提供了思路和引导方向。

**[关键词]** 黄芪甲苷; 缺血性脑卒中; 网络药理学; 分子对接; 信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R289;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0163-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210338

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201215.1324.007.html>

**[网络出版日期]** 2020-12-15 13:47

### Network Pharmacology Study of Astragaloside IV in Treatment of Ischemic Stroke

QI Ming-zhu, ZHANG Ni-xue, SU Xiao-hui, KONG Xiang-ying\*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of astragaloside IV in the treatment of ischemic stroke by means of network pharmacology. **Method:** The targets of astragaloside IV were predicted using Swiss Target Prediction platform, and the targets of ischemic stroke were retrieved using GeneCards, Therapeutic Target Database (TTD), Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID) and Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) databases. The potential targets of astragaloside IV acting on ischemic stroke were obtained by the intersection of the targets of astragaloside IV and ischemic stroke. STRING platform was used to build protein-protein interaction (PPI) network, and eigenvalues were calculated through network topology analysis to screen core targets. Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed on the related targets in

**[收稿日期]** 20200913(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81673630,82074048);国家重点研发计划项目(2017YFC1702005);国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731-002)

**[第一作者]** 戚明珠,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:15077868613@163.com

**[通信作者]** \*孔祥英,研究员,硕士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:kongu0051@163.com

DAVID database. Finally, molecular docking verification was conducted to further clarify the core targets of astragaloside IV acting on ischemic stroke. **Result:** The 44 common targets were obtained after the intersection of the targets of astragaloside IV and ischemic stroke. PPI network topology analysis showed that RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Akt1), renin (REN), epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase (SRC) were the core targets of astragaloside IV in the treatment of ischemic stroke. Enrichment analysis results of KEGG pathway showed that the pathways of astragaloside IV acting on ischemic stroke involved the neuroactive ligand-receptor interaction pathway, cGMP-PKG signaling pathway, calcium signaling pathway, Rap1 signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, etc. **Conclusion:** Astragaloside IV may promote angiogenesis and inhibit platelet activity by acting on Akt1, REN, EGFR, VEGFA, SRC, thus improving cerebral blood flow. It can also inhibit the apoptosis of ischemic brain tissue cells and inflammation to reduce the damage of nerve function, and finally treat ischemic stroke. This study provides ideas and guidance for further exploring the mechanism of astragaloside IV in the treatment of ischemic stroke.

[Key words] astragaloside IV; ischemic stroke; network pharmacology; molecular docking; signaling pathway

脑卒中是我国成年人致死和致残的首位原因,临床上以缺血性脑卒中为主,因而缺血性脑卒中的防治成为医学研究领域亟待解决的重大问题<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中属于中医“中风”范畴,气虚血瘀是其根本病机,气虚为本,血瘀为标,故常采用益气活血法进行治疗<sup>[2]</sup>。“补气圣药”黄芪在缺血性脑卒中的治疗中起着重要作用,其能补中益气,配合活血行气药,能够达到气行血畅的效果<sup>[3-4]</sup>。黄芪甲苷(astragaloside IV)是黄芪中的主要有效成分,也是治疗缺血性脑卒中的重要活性成分<sup>[5]</sup>。实验研究表明,黄芪甲苷可以有效减轻脑缺血再灌注损伤,发挥神经保护作用,但是其具体作用机制尚不明确<sup>[6]</sup>。因此,借助网络药理学方法从系统生物学角度研究黄芪甲苷抗缺血性脑卒中具有重要意义。

网络药理学将系统网络分析和药理学结合起来,能够综合地反映药物对疾病网络的干预机制<sup>[7]</sup>。本研究采用网络药理学的分析方法,从分子水平探讨了黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的潜在效应机制,为深入探究黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的药理作用研究提供了思路和引导方向,进而为黄芪甲苷在临床的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 黄芪甲苷的作用靶点预测** 在 Pubchem 化合物数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取黄芪甲苷的 Smiles 结构,上传至 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)<sup>[8]</sup>,限定物种为“Homo sapiens”,对黄芪甲苷的作用靶点进行预测。利用 Uniprot 蛋白质数据库

(<https://www.uniprot.org/>)<sup>[9]</sup>检索预测出的靶点,将黄芪甲苷作用的蛋白质靶点和基因信息进行规范。

**1.2 缺血性脑卒中疾病靶点数据库的构建** 以“ischemic stroke”“stroke, ischemic”等为关键词,在人类基因数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)<sup>[10]</sup>,药物靶标数据库 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)<sup>[11]</sup>,中医药研究综合数据库 TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid/>),中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP (<https://tcmispw.com/tcmisp.php>) 收集汇总缺血性脑卒中疾病的相关靶点,并运用 Uniprot 数据库进行靶点-人类基因名转换。在 GeneCards 数据库中 keywords 一栏输入“ischemic stroke”,Score 值越大,表明该靶点与疾病相关性越高。设定 GeneCards 数据库中 Score 大于中位数的目标靶点为缺血性脑卒中的靶点,将这些靶点数据以表格的形式输出。TTD 数据库可以查询靶标、药物及疾病相关信息,在 Search Drugs and Targets by Disease or ICD Identifier 一栏中查询“ischemic stroke”,收集 Target 中的靶点信息。TCMSP 数据库是中药系统药理学数据库与分析平台,选择 Disease name 后输入“ischemic stroke”,收集 Related targets 中的靶点信息。在 TCMID 数据库选择 Disease 一栏,输入“stroke, ischemic”,收集 Related targets 中的靶点信息。删除不同数据库中的重复靶点基因后合并所有的靶点,构建缺血性脑卒中疾病靶点数据库。

**1.3 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的潜在靶点预测及蛋白相互作用(PPI)网络构建** 利用 Venny

2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图取交集,得出药物和疾病的共同靶点,以明晰黄芪甲苷相关靶点与缺血性脑卒中靶点之间的相互作用。将得到的交集靶点上传至STRING 11.0平台 (<https://string-db.org>)<sup>[12]</sup>,限定物种为“Homo sapiens”,靶点间的最低联系分数设置为0.400,构建黄芪甲苷成分靶标-缺血性脑卒中疾病靶标的PPI网络,下载tsv格式文件。将该文件导入Cytoscape 3.7.2软件<sup>[13]</sup>中,对PPI网络进行可视化分析,并利用Network Analyzer插件分析相关靶点的拓扑参数,以节点度值和介数中心性来评价节点的重要性,筛选出排名前5的关键靶点。节点度值代表与该节点相连的边的数目,节点大小与度值成正比例关系;介数中心性指网络中最短路径通过此节点的数目占路径总数的比例,由此可知该节点在整个网络中的作用和影响<sup>[14]</sup>。节点对应的以上两个参数值越大,则其在网络中起到的作用越重要。

**1.4 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析** 将黄芪甲苷成分与缺血性脑卒中疾病的交集基因导入至生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>)<sup>[15]</sup>,背景数据库和基因List均将物种限定为“Homo Sapiens”。选择生物过程(BP),细胞成分(CC)和分子功能(MF)对黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的靶点进行GO富集分析;基于KEGG数据库进行靶点基因的通路富集分析。设置阈值为 $P < 0.05$ ,按P value升序进行排序,筛选出具有显著差异的生物过程和可靠的靶点通路,使用微生信软件(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化分析,将结果以条形图和气泡图形式输出。

**1.5 分子对接验证** 分析PPI网络中排名前5靶点,即黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的核心靶点,进行分子对接验证。利用TCMSP数据库下载黄芪甲苷的结构,并对3D化合物结构进行MM2能量最小化,保存为mol2格式,并借助AutodockTools-1.5.6软件最终生成pdbqt格式的文件。通过PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载靶蛋白PDB格式数据文

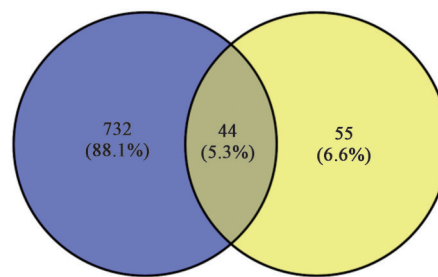
件,并对其进行去水、加氢,最终亦转换成pdbqt格式的文件。采用Autodock Vina软件<sup>[16]</sup>将黄芪甲苷与5个核心靶点进行分子对接分析。AutoDock Vina作为一个做分子对接的开源程序,具有运算速度快、精度高的优点,是目前最常用于小分子与蛋白质对接的软件之一<sup>[17-18]</sup>。

## 2 结果

**2.1 黄芪甲苷的作用靶点预测** 在Pubchem数据库获取黄芪甲苷的Smiles结构,上传至Swiss Target Prediction数据库平台,共得到99个黄芪甲苷的潜在作用靶点。

**2.2 缺血性脑卒中疾病靶点数据库的构建** 以“ischemic stroke”“stroke, ischemic”为关键词,在GeneCards, TTD, TCMSP, TCMID数据库全面检索,共获得3 207个靶点,其中GeneCards中3 187个靶点,TTD中14个靶点,TCMSP中5个靶点,TCMID中1个靶点。GeneCards中设定Score大于中位数的目标靶点为缺血性脑卒中的靶点,中位数为5.72,故设定 $Score > 5.72$ 进行靶点筛选。结合TTD, TCMSP, TCMID数据库补充靶点信息,合并后删除重复值,最终共得到776个靶点。

**2.3 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的潜在靶点预测** 将黄芪甲苷的预测作用靶点及缺血性脑卒中疾病的靶点导入VENNY2.1.0,取两者的交集。黄芪甲苷与缺血性脑卒中的共同靶点有44个,见图1。44个靶点的具体信息见表1。



黄色代表黄芪甲苷靶点;紫色代表缺血性脑卒中疾病靶点;两者交集为共同靶点

图1 黄芪甲苷-缺血性脑卒中共同靶点数

Fig. 1 Common targets of astragaloside IV -ischemic stroke

表1 黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的潜在靶点

Table 1 Targets of astragaloside IV in treatment of ischemic stroke

No.	靶点中文名	靶点英文名	基因名	Uniprot ID
1	成纤维细胞生长因子2	fibroblast growth factor 2	FGF2	P09038
2	血管内皮生长因子A	vascular endothelial growth factor A	VEGFA	P15692
3	维生素D <sub>3</sub> 受体	vitamin D <sub>3</sub> receptor	VDR	P11473

续表1

No.	靶点中文名	靶点英文名	基因名	Uniprot ID
4	凝血因子X	coagulation factor X	F10	P00742
5	RAC- $\alpha$ 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	Akt1	P31749
6	表皮生长因子受体	epidermal growth factor receptor	EGFR	P00533
7	信号传导与转录激活因子3	signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763
8	瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1	transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	TRPV1	Q8NER1
9	肾素	renin	REN	P00797
10	溶酶体酸葡萄糖基神经酰胺酶	lysosomal acid glucosylceramidase	GBA	P04062
11	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 mTOR	serine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	P42345
12	IV型胶原酶 72 kDa	72 kDa type IV collagenase	MMP2	P08253
13	非受体酪氨酸蛋白激酶 Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC	P12931
14	$\beta$ -分泌酶 1	beta-secretase 1	BACE1	P56817
15	整合素 $\alpha$ -IIb	integrin alpha- II b	ITGA2B	P08514
16	纤维蛋白溶酶原	plasminogen	PLG	P00747
17	白细胞介素-2	interleukin-2	IL-2	P60568
18	细胞色素 P450 2D6	cytochrome P450 2D6	CYP2D6	P10635
19	大麻素受体 1	cannabinoid receptor 1	CNR1	P21554
20	维生素K 依赖蛋白 C	Vitamin K-dependent protein C	PROC	P04070
21	血浆激肽释放酶	plasma kallikrein	KLKB1	P03952
22	$\beta$ -2 肾上腺素能受体	beta-2 adrenergic receptor	ADRB2	P07550
23	半乳糖凝集素 3	galectin-3	LGALS3	P17931
24	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3 激酶催化亚基异构体 $\alpha$	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	PIK3CA	P42336
25	I型血管紧张素受体	type-1 angiotensin II receptor	AGTR1	P30556
26	间质胶原酶	interstitial collagenase	MMP1	P03956
27	Rho 相关蛋白激酶 1	Rho-associated protein kinase 1	ROCK1	Q13464
28	基质分解素 1	stromelysin-1	MMP3	P08254
29	$\beta$ -1 肾上腺素能受体	beta-1 adrenergic receptor	ADRB1	P08588
30	钠依赖性去甲肾上腺素转运蛋白	sodium-dependent noradrenaline transporter	SLC6A2	P23975
31	醛脱氢酶	aldehyde dehydrogenase	ALDH2	P05091
32	P2Y 嘌呤受体 12	P2Y purinoceptor 12	P2RY12	Q9H244
33	$\alpha$ -1A 肾上腺素能受体	alpha-1A adrenergic receptor	ADRA1A	P35348
34	II型血管紧张素受体	type-2 angiotensin II receptor	AGTR2	P50052
35	凝血因子 XI	coagulation factor XI	F11	P03951
36	D(2)多巴胺受体	D(2) dopamine receptor	DRD2	P14416
37	5-羟色胺受体 2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	HTR2A	P28223
38	$\alpha$ -1D 肾上腺素能受体	alpha-1D adrenergic receptor	ADRA1D	P25100
39	5-羟色胺受体 2C	5-hydroxytryptamine receptor 2C	HTR2C	P28335
40	早老素-2	presenilin-2	PSEN2	P49810
41	D(1A)多巴胺受体	D(1A) dopamine receptor	DRD1	P21728
42	D(3)多巴胺受体	D(3) dopamine receptor	DRD3	P35462
43	$\alpha$ -2B 肾上腺素能受体	alpha-2B adrenergic receptor	ADRA2B	P18089
44	$\alpha$ -2C 肾上腺素能受体	alpha-2C adrenergic receptor	ADRA2C	P18825

**2.4 PPI网络的构建及分析** 为获取蛋白质间的相互作用关系,将2.3项下的黄芪甲苷与缺血性脑卒中的44个交集靶点基因导入STRING数据库,选择下载tsv格式的文件。将该文件导入Cytoscape 3.7.2,绘制靶点蛋白相互作用的网络图,结果见图2。“节点”代表靶点,“边”表示靶点之间的关联。图3中共有44个节点,226条边。根据度值的大小来设定节点的大小以及颜色,节点的面积越大,颜色越亮,表示其节点度值越大;两个靶点之间的关系值评分由边的粗细及颜色的亮度表示,即边越粗,颜色越亮,表明该边连结的蛋白之间关系值越大。利用Cytoscape 3.7.2软件中的Network Analyzer插件对网络的拓扑参数进行分析,以节点度值和介数中心性对节点的重要性进行评价,筛选网络中排列前5的节点,见表2,包括RAC- $\alpha$ 丝氨酸/蛋白激酶B1(Akt1),肾素(REN),表皮生长因子受体(EGFR),血管内皮生长因子A(VEGFA),非受体酪氨酸蛋白激酶Src(SRC),推测这些靶点可能是黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的核心靶点。其中度值最高的是Akt1,能与28个蛋白产生相互作用,度值紧随Akt1后的为REN,EGFR,VEGFA,SRC,分别可以与20,20,20,18个蛋白发生相互作用。

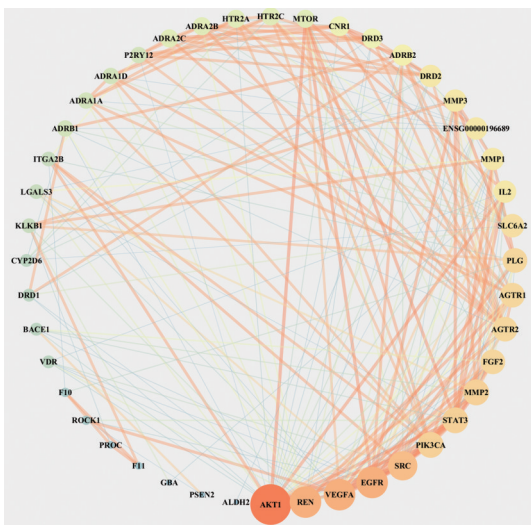


图2 蛋白互作网络

Fig. 2 Protein-protein interaction network diagram

**2.5 黄芪甲苷对缺血性脑卒中相关靶点GO富集分析** 为了进一步了解黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的靶点在生物体中发挥的作用,利用DAVID 6.8数据库对黄芪甲苷作用于缺血性脑卒中的44个靶点进行BP,CC和MF分析,根据P值进行排序,对富集结果排名靠前且 $P < 0.05$ 的条目进行分析。DAVID中GO功能富集分析得到GO条目201个,其中BP

表2 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中核心靶点基本信息

Table 2 Basic information of core targets of astragaloside IV in treating ischemic stroke

靶点	平均最短路径	介数中心性	中心接近度	聚类系数	度值
Akt1	1.395 348 84	0.212 365 28	0.716 666 67	0.338 624 34	28
REN	1.558 139 53	0.144 025 37	0.641 791 04	0.326 315 79	20
EGFR	1.627 906 98	0.051 340 01	0.614 285 71	0.505 263 16	20
VEGFA	1.651 162 79	0.048 395 35	0.605 633 80	0.500 000 00	20
SRC	1.697 674 42	0.019 965 63	0.589 041 10	0.575 163 40	18

条目156个,CC条目16个,MF条目29个,每个种类分别选取前10项进行可视化分析,见图3。结果显示,黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的靶点主要富集在腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路、血管收缩的正向调控、温度稳态,ERK1和ERK2级联的正向调控、去甲肾上腺素分泌的负向调控、药物反应、胞质内游离钙离子的释放、一氧化氮生物合成过程的正向调控、对可卡因的行为反应,MAP激酶活性的正向调控等生物学过程中;在细胞组分中,主要包括质膜、质膜的组成、细胞外间隙、胞外区、细胞表面、内吞小泡、树突、细胞质膜微囊、膜筏、轴突等;在分子功能上,涉及了肾上腺素结合、药物结合、丝氨酸型内肽酶活性、多巴胺神经递质受体活性、多巴胺结合、蛋白质异构化活性、化学引诱物活性、蛋白质结合,Ras-鸟苷酸交换因子活性、天冬氨酸型内肽酶活性等。

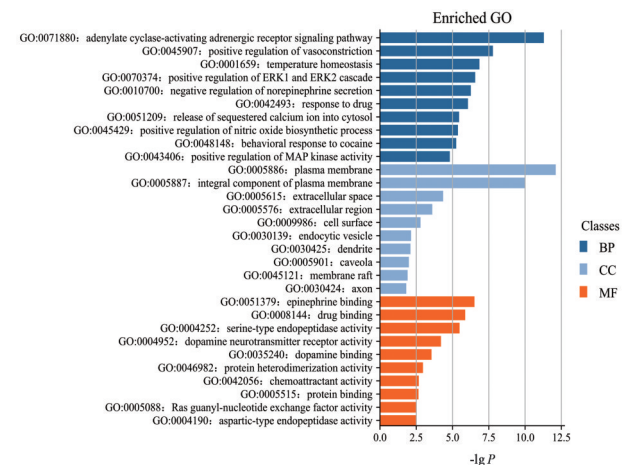


图3 GO富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

**2.6 黄芪甲苷对缺血性脑卒中相关靶点KEGG通路富集分析** 通过DAVID数据库对44个靶点进行KEGG通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为基准筛选,44个交集靶点基因显著富集在45条通路中。依据P以

及Count进行排序,选择前20个具有代表性的通路作为重要通路并进行可视化分析,结果见图4。结果显示,黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的效应机制涉及环境信息处理-信号分子和相互作用通路1个,具体体现为神经活性配体-受体相互作用通路;人类疾病-癌症概述通路有2个,包括癌症中的蛋白多糖通路、癌症信号通路;人类疾病-特定类型癌症信号通路有3个,包括膀胱癌通路、胰腺癌通路、急性髓系白血病通路;环境信息处理-信号转导通路有7个,包括钙信号通路,环磷酸鸟苷(cGMP)/cGMP依赖的蛋白激酶(PKG)信号通路,小分子G蛋白(Rap1)信号通路,低氧诱导因子(HIF)-1信号通路,环磷酸腺苷(cAMP)信号通路, ErbB 信号通路,磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路;细胞过程-真核生物细胞群落通路有2个,包括缝隙连接通路、黏着力通路;有机系统通路有5个,包括循环系统的心肌细胞的肾上腺素能信号转导通路、免疫系统的血小板活化通路及补体和凝血级联通路、感觉系统的TRP通道的炎症介质调节通路、内分泌系统的雌激素信号通路。

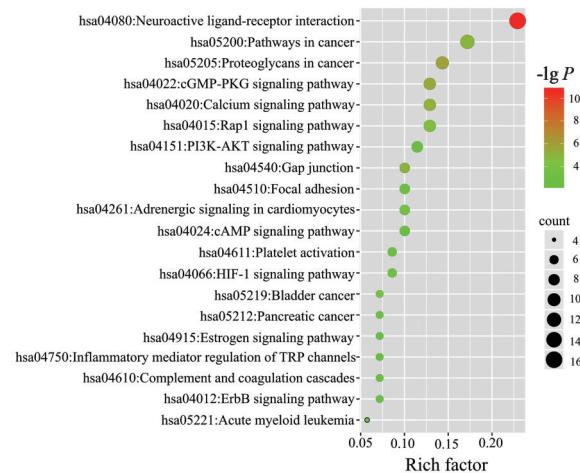


图4 KEGG通路富集

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

2.7 分子对接验证 依据前文 2.4 项的分析结果可知, PPI 蛋白互作网络中的核心靶点为 Akt1, REN, EGFR, VEGFA, SRC, 故使用 Autodock Vina 软件对黄芪甲苷与核心靶点的相互作用进行半柔性分子对接计算。Vina 评价小分子与蛋白质结合的活性主要通过结合自由能表示, 结合能 < 0, 表明配体与受体可自发结合, 能量越低则两者产生作用的可能性越大。根据文献报道, 当结合能 < -5.0 kcal·mol<sup>-1</sup> 时, 表示结合活性较佳<sup>[19]</sup>。黄芪甲苷与 5 个核心靶点的对接的结合自由能皆 < -5.0 kcal·mol<sup>-1</sup>, 表明黄

芪甲苷与 Akt1, REN, EGFR, VEGFA, SRC 这 5 个核心靶点均有较好的结合活性, 见表 3。

表3 黄芪甲苷分子对接的结合能

Table 3 Affinity of molecular docking of astragaloside IV

蛋白	PDB ID	结合自由能/kcal·mol <sup>-1</sup>
Akt1	4EJN	-9.0
REN	3SFC	-9.3
EGFR	5X2C	-9.1
VEGFA	3QTK	-8.2
SRC	1Y57	-9.8

### 3 讨论

缺血性脑卒中的主要病因为供血动脉栓塞、脑供血不足以及继发性的神经损伤、炎症反应等, 目前缺血性脑卒中的治疗策略主要集中在改善脑循环和神经保护这两方面。现代实验研究表明, 益气活血中药对于缺血性脑卒中有明显的治疗作用。黄芪是补气要药, 其重要活性成分黄芪甲苷可以有效减轻脑缺血再灌注损伤, 发挥神经保护作用<sup>[20]</sup>。

本研究通过 PPI 蛋白互作网络的拓扑学性质筛选出黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的核心靶点, 结果显示, 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的效应机制与 Akt1, REN, EGFR, VEGFA, SRC 等靶点密切相关。本研究进一步通过分子对接技术对以上的 5 个核心靶点进行分子对接验证, 发现 Akt1, REN, EGFR, VEGFA, SRC 等靶标蛋白与黄芪甲苷的结合能均 < -5.0 kcal·mol<sup>-1</sup>, 表示这些核心靶点蛋白与黄芪甲苷的结合活性较佳。Akt 包含 3 种结构相似的同型异构体, 分别为 Akt1, Akt2 和 Akt3。Akt1 能调节代谢、增殖、细胞存活、生长以及血管生成<sup>[21]</sup>。Akt1 基因缺失会诱导血管内皮细胞功能障碍, 细胞血管平滑肌迁移和存活改变, 促进动脉粥样硬化<sup>[22]</sup>。而动脉粥样硬化是脑中风的最主要的诱因。REN 是一种高度特异性的内肽酶, 研究发现, 肾素-血管紧张素系统与缺血性脑卒中的发生、发展密切相关<sup>[23]</sup>。EGFR 属于表皮生长因子受体家族, 是一种多功能跨膜糖蛋白, 广泛存在于成纤维细胞及胶质细胞等表面<sup>[24]</sup>。GU 等<sup>[25]</sup> 研究发现黄芪甲苷通过激活 EGFR/Nrf2 信号通路对缺血再灌注损伤神经元发挥保护作用。血管内皮生长因子(VEGF)家族是大脑中血管新生、神经保护和神经发生的重要调节因子, 其中 VEGFA 最受关注<sup>[26]</sup>。孙丽等<sup>[27]</sup> 实验研究证明, 黄芪甲苷能通过增强 BDNF, VEGF, VEGFR 蛋白的表达来减少神经细胞的凋亡, 进而对脑缺血

再灌注损伤的大鼠产生神经保护作用。非受体酪氨酸蛋白激酶 Src 家族由原癌基因编码,脑缺血后 Src 激酶激活后,介导血管通透性的改变,加剧脑水肿。此外,Src 可能通过 NMDA 信号通路影响神经兴奋毒性<sup>[28]</sup>。

KEGG 富集分析结果表明,黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中可能与神经活性配体-受体相互作用通路、cGMP/PKG 信号通路,钙信号通路,Rap1 信号通路,PI3K/Akt 信号通路等多条通路密切相关。上述 PPI 网络筛选的 5 个核心靶点主要与细胞存活及增殖、血管生成、炎症、血管通透性相关,其中 Akt1 基因富集于 cGMP/PKG 信号通路,Rap1 信号通路及 PI3K/Akt 信号通路;VEGFA 富集于钙信号通路,Rap1 信号通路及 PI3K/Akt 信号通路;EGFR 富集于钙信号通路,Rap1 信号通路及 PI3K/Akt 信号通路;SRC 富集于 Rap1 信号通路。神经活性配体-受体相互作用信号通路是质膜上所有与细胞内外信号通路相关的受体和配体的集合<sup>[29]</sup>。cGMP 作为细胞中的第二信使,可调节炎症、心血管稳态、神经元可塑性和细胞生长等过程。磷酸二酯酶能水解细胞内第二信使,使之失活,磷酸二酯酶 5 抑制剂可以提高细胞内 cGMP 水平,通过激活 PKG 发挥神经保护作用<sup>[30]</sup>。研究证实,黄芪甲苷可能通过激活 cGMP/PKG 信号通路,进而产生对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用<sup>[31]</sup>。钙信号通路是导致神经元缺氧损伤的重要因素,缺氧从根本上改变了神经元中的 Ca<sup>+</sup> 信号传导,进而影响其对缺血的反应<sup>[32]</sup>。钙敏感受体在调节及维持机体钙稳态过程中发挥了重要作用,其参与缺血再灌注损伤过程的机制可能与增加细胞钙离子超载及诱导细胞凋亡等有关。Rap1 信号通路在血小板整合素激活及血小板生成过程中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。在脑中风早期,神经细胞以坏死为主,其后以凋亡为主,在大鼠局灶性脑缺血模型中发现了严重的神经凋亡现象<sup>[34]</sup>。PI3K/Akt 信号通路参与细胞增殖、存活和凋亡等多种生物学过程,对大脑缺氧缺血后神经细胞的凋亡具有关键的调控作用,保护缺氧/缺血再灌注损伤<sup>[35]</sup>。张佳琳等<sup>[36]</sup> 实验研究发现,黄芪甲苷可能通过 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路保护缺氧缺血复供损伤的 PC12 细胞。

目前为止,有关黄芪甲苷防治缺血性脑卒中的作用机制报道较零散,本研究通过网络药理学技术,对黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的可能作用机制进行整体地预测和分析,为深入探究黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的作用机制提供了思路和引导方向。

基于本研究网络预测分析结果并结合文献报道,发现黄芪甲苷可能通过作用于 Akt1,REN,EGFR,VEGFA, SRC 等靶点,在神经活性配体-受体相互作用通路,cGMP/PKG 信号通路,钙信号通路,Rap1 信号通路,PI3K/Akt 信号通路等相关的信号通路发挥治疗缺血性脑卒中的作用。以上结果提示黄芪甲苷既能通过促进血管生成及抑制血小板活性等改善脑血流量,又可以抑制脑部缺血组织细胞的凋亡及炎症反应等减轻神经功能的损伤,最终产生治疗缺血性脑卒中的效果。不过该研究是基于公开发表的数据或数据库进行研究,而数据具有实时性,且研究过程中无法保证数据的全面性,因而有一定的局限性。尽管已有的文献报道证实了部分预测的结果,但是还需要进一步实验以验证本研究中其他预测的结果。

#### [参考文献]

- [1] 王陇德,刘建民,杨弋,等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(2):105-119.
- [2] 詹佳虹,楚世峰. 补益药治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 神经药理学报,2018,8(6):61.
- [3] 黄娟,彭熙炜,廖君,等. 中医药治疗急性缺血性脑卒中的用药规律分析[J]. 湖南中医杂志,2017,33(1):115-116.
- [4] 罗飘,楚世峰. 黄芪在脑卒中中的临床药理学及机制研究[J]. 神经药理学报,2018,8(6):42.
- [5] 滕跃,马文波,王晶,等. 黄芪甲苷及缬苧滴丸对急性缺血性脑卒中患者影像学表现的影响[J]. 检验医学与临床,2017,14(19):2839-2841,2844.
- [6] WANG H L, ZHOU Q H, XU M B, et al. Astragaloside IV for experimental focal cerebral ischemia: preclinical evidence and possible mechanisms[J]. Oxid Med Cell Longev,2017,2017:8424326.
- [7] 潘家祜. 基于网络药理学的药物研发新模式[J]. 中国新药与临床杂志,2009,28(10):721-726.
- [8] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (1) : 357-364.
- [9] UNIPROT C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Res,2019,47(1):506-515.
- [10] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator[J]. Database,2010,doi:10.1093/database/baq020.
- [11] WANG Y, ZHANG S, LI F, et al. Therapeutic target

- database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [12] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [13] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-504.
- [14] LE D H, PHAM V H. HGPEC: a Cytoscape app for prediction of novel disease-gene and disease-disease associations and evidence collection based on a random walk on heterogeneous network [J]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11(1): 61.
- [15] DENNIS G, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): 418-427.
- [16] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [17] ZHANG Y, WAN Y, CHEN Y, et al. Ultrasound-enhanced chemo-photodynamic combination therapy by using albumin "nanoglu" -based nanotheranostics [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(5): 5560-5569.
- [18] URBAN T J, NICOLETTI P, CHALASANI N, et al. Minocycline hepatotoxicity: clinical characterization and identification of HLA-B35:02 as a risk factor [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 137-144.
- [19] MORRIS G M, HUEY R, OLSON A J. Using AutoDock for ligand-receptor docking [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2008, doi: 10.1002/0471250953.bi0814s24.
- [20] 靳晓飞, 张弋宁, 周晓红, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注大鼠炎症因子及超微结构的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 1-6.
- [21] HERS I, VINCENT E E, TAVARE J M. Akt signalling in health and disease [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(10): 1515-1527.
- [22] FERNANDEZ-HERNANDO C, JOZSEF L, JENKINS D, et al. Absence of Akt1 reduces vascular smooth muscle cell migration and survival and induces features of plaque vulnerability and cardiac dysfunction during atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(12): 2033-2040.
- [23] 王雅惠, 江澜, 陈沛, 等. 肾素-血管紧张素系统与缺血性脑卒中的关系研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2019, 18(2): 184-188.
- [24] 张芹, 奥婷, 肖淑英, 等. 表皮生长因子受体-细胞外信号调节激酶信号通路在缺血性脑血管病中的相关研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(9): 36-40.
- [25] GU D M, LU P H, ZHANG K, et al. EGFR mediates astragaloside IV -induced Nrf2 activation to protect cortical neurons against in vitro ischemia/reperfusion damages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(3): 391-397.
- [26] GEISELER S J, MORLAND C. The janus face of VEGF in stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1362.
- [27] 孙丽, 王岭, 李艳, 等. 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和机制研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2014, 22(1): 43-49.
- [28] 丁明芹. 非受体酪氨酸激酶 Src 在脑缺血损伤中研究进展 [J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(9): 169-170.
- [29] 潘玲珍, 闫智勇, 左长英, 等. 长期使用地西洋对神经活性配体受体相互作用信号通路的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 2011, 42(5): 443-446.
- [30] OLMESTIG 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.
- [31] 张丽敏. 黄芪甲苷抗 PC12 细胞氧化损伤作用机制研究 [D]. 石家庄: 河北联合大学, 2014.
- [32] HENRICH M, BUCKLER K J. Cytosolic calcium regulation in rat afferent vagal neurons during anoxia [J]. *Cell Calcium*, 2013, 54(6): 416-427.
- [33] LAGARRIGUE F, PAUL D S, GINGRAS A R, et al. Talin1 is the principal platelet Rap1 effector of integrin activation [J]. *Blood*, 2020, 136(10): 1180-1190.
- [34] 宋修云, 胡金凤, 陈乃宏. 神经细胞凋亡与脑缺血疾病 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(3): 307-310.
- [35] 杜帅, 刘佳, 刘婷, 等. 基于 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨益母草碱对缺血性脑卒中大鼠脑组织病理变化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(10): 853-861.
- [36] 张佳琳, 李元元, 杨文亮, 等. 黄芪甲苷基于 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路对 PC12 细胞 OGD/R 损伤的保护机制研究 [J]. *神经药理学报*, 2017(5): 1-8.

[责任编辑 孙丛丛]