

## 基于网络药理学的青蒿-川芎配伍治疗脑型疟作用分析

刘慧<sup>1,2</sup>, 陈利娜<sup>2,3</sup>, 郑钟原<sup>2,4</sup>, 王茜<sup>2,4</sup>, 杨婷<sup>2,4</sup>, 瞿水清<sup>1,2</sup>, 杨源民<sup>2,3</sup>, 陈磊<sup>1</sup>,  
李玉洁<sup>2,3\*</sup>, 崔红花<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院 青蒿素研究中心, 北京 100700; 4. 山西医科大学 药学院, 太原 030001)

**[摘要]** 目的:基于网络药理学的方法探讨青蒿、川芎组合抗脑型疟配伍用药的合理性及其作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)及SymMap检索青蒿、川芎的所有化学成分并筛选作用靶点,构建成靶点的蛋白质-蛋白质的相互作用(PPI)网络。通过GeneCards,DisGeNET数据库收集脑疟相关靶基因。将药物靶点和疾病靶点进行映射筛选出共同靶点,并对关键靶点进行蛋白互作网络分析,基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析,进一步采用经典的实验性脑型疟小鼠模型检测生存曲线,原虫血症水平,存活率,实验性脑型疟(ECM)昏迷及行为学评分,并采用RayBio®细胞因子抗体阵列检测组织中细胞因子的表达水平,进行实验验证。结果:筛选后得到青蒿、川芎配伍后的有效活性成分23个,药物靶点179个,药物靶点与脑型疟疾病靶点映射获得共有靶点100个。GO功能分析确定了59个条目( $P<0.05$ ),涉及细胞因子活性、生长因子活性、免疫反应等方面。KEGG通路分析发现相关信号通路51条。实验验证结果表明,青蒿、川芎代表性成分配伍组合对ECM小鼠生存状态、昏迷及行为学评分等临床体征有明显改善作用。检测小鼠相关细胞因子的表达水平,发现与模型组相比,配伍用药组合中 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),白细胞介素-10(IL-10),IL-4,IL-1 $\beta$ 的表达水平明显升高( $P<0.05$ ),与网络药理学预测ECM疾病与药物重合核心靶标相符。结论:该研究通过网络药理学的筛选和体内实验验证,证实了青蒿、川芎配伍组合治疗脑型疟的协同增效作用,为进一步的机制研究指明了方向,为脑型疟临床干预提供了新的可能。

**[关键词]** 青蒿; 川芎; 脑型疟; 网络药理学; 细胞因子

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)06-0159-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210201

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210108.1131.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-1-10 7:37

## Effect Analysis of Artemisiae Annuae Herba and Chuanxiong Rhizoma in Treatment of Cerebral Malaria Based on Network Pharmacology

LIU Hui<sup>1,2</sup>, CHEN Li-na<sup>2,3</sup>, ZHENG Zhong-yuan<sup>2,4</sup>, WANG Xi<sup>2,4</sup>, YANG Ting<sup>2,4</sup>, QU Shui-qing<sup>1,2</sup>,  
YANG Yuan-min<sup>2,3</sup>, CHEN Lei<sup>1</sup>, LI Yu-jie<sup>2,3\*</sup>, CUI Hong-hua<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the reasonable combination of Artemisiae Annuae Herba and

**[收稿日期]** 20200915(010)

**[基金项目]** 中国中医科学院“十三五”重点领域项目(Z2017021);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-001-001-3);国家自然科学基金应急管理项目项目(81641002);国家自然科学基金青年基金项目(81803814)

**[第一作者]** 刘慧,在读硕士,从事中药药理学原虫方向研究,E-mail:15871421085@163.com

**[通信作者]** \* 崔红花,副教授,从事中药质量标准及药效物质基础研究,E-mail:honghuacui@163.com;

\* 李玉洁,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理心血管方向研究,E-mail:yjli@icmm.ac.cn

Chuanxiong Rhizoma in treatment of cerebral malaria and investigate its mechanism based on network pharmacology. **Method:** The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and SymMap were used to obtain all the chemical components of Artemisiae Annuae Herba and Chuanxiong Rhizoma and the action targets were screened to construct a component target protein-protein interaction (PPI) network. Target genes related to cerebral malaria were collected with use of GeneCards and DisGeNET databases. Common targets were screened by overlapping drug targets and disease targets, and protein-protein interaction network analysis was performed to get key targets. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out to get main signaling pathways. Furthermore, the classical experimental cerebral malaria mouse model was used to detect survival curve, protozoanemia level, survival rate, experimental cerebral malaria (ECM) coma and behavior scores. RayBio<sup>®</sup> cytokine antibody array was used to detect the expression level of cytokines in tissues and experiment was conducted for verification. **Result:** After combination of Artemisiae Annuae Herba and Chuanxiong Rhizoma, 23 active ingredients, 179 drug targets, and a total of 100 common targets of the drug and disease were obtained. GO functional analysis identified 59 items ( $P<0.05$ ), involving cytokine activity, growth factor activity, immune response, etc. KEGG pathway analysis revealed 51 related signaling pathways. The experimental results showed that the combined use of Artemisiae Annuae Herba and Chuanxiong Rhizoma could significantly improve the clinical signs of ECM mice, such as survival state, coma and behavioral scores. In the detection of expression levels of related cytokines in mice, the expression levels of  $\gamma$ -interferon (IFN- $\gamma$ ), interleukin-10 (IL-10), IL-4, and IL-1 $\beta$  in the compatible drug combination drug were significantly higher than those in the model group ( $P<0.05$ ), which was consistent with the overlapping core targets predicted by network pharmacology. **Conclusion:** Based on the network pharmacology analysis and *in vivo* experiment verification, this study confirmed the synergistic effect of the combination of Artemisiae Annuae Herba and Chuanxiong Rhizoma in the treatment of cerebral malaria, providing clear direction for further mechanism research, and a new possibility for the clinical intervention of cerebral malaria.

**[Key words]** Artemisiae Annuae Herba; Chuanxiong Rhizoma; cerebral malaria; network pharmacology; cytokine

疟疾是全球关注的重要公共卫生问题之一,脑型疟(CM)是由恶性疟原虫感染所致神经系统并发症,是人类中枢神经系统中最常见、最严重的寄生虫感染性疾病。2019年世界卫生组织(WHO)疟疾报告显示,大部分疟疾病例发生在非洲区域,主要与恶性疟原虫有关(99.7%)<sup>[1]</sup>,且CM幸存者易出现严重的神经系统障碍<sup>[2]</sup>。尽管目前在治疗CM方面取得了很大的进展,但疟原虫对抗疟药抗性的产生,仍需要新的治疗方案。目前,奎宁和青蒿素等植物衍生物是治疗CM的标准抗疟药物<sup>[3-4]</sup>。最近的报告表明,使用青蒿素衍生物的基础治疗常常不能保护细胞死亡、神经损伤和认知缺陷<sup>[5]</sup>,在这种情况下,联合疗法有望开发出降低疟疾死亡率的有效一线抗疟药物<sup>[6]</sup>,以青蒿素类治疗为基础,以改善临床结果和/或降低死亡率、预防长期神经认知缺陷为目标的辅助治疗研究是CM新的干预策略,可通过多环节调节机制有效降低CM的死亡率<sup>[7]</sup>。

活血化瘀药具有扩张外周血管和降低血管阻力<sup>[8]</sup>、改善血流动力学、血液流变学、抑制血栓形成、改善微循环等药理学作用<sup>[9]</sup>。中药川芎为活血化瘀代表药,主治血瘀气滞诸痛<sup>[10]</sup>,可上行巅顶,在心脑血管系统疾病的临床治疗应用非常广泛<sup>[11]</sup>。通过文献查阅,发现川芎也用于疟疾相关疾病的治疗,《万病回春》中记载包括川芎、白芷、麻黄等药味的散邪汤可治疟疾初发,憎寒壮热、头身痛无汗;《中草药大全》载有川芎、白芷、桂枝、苍术各研细粉纳入鼻孔及贴肚脐处预防疟疾发作的描述;《蒙药》中有川芎外用塞鼻可治疗疟疾的记载。根据中医学理论,本课题组拟尝试运用青蒿、川芎配伍治疗实验性脑型疟(ECM),探究该组合是否具有协同抗疟及改善ECM神经损伤作用。

本研究应用网络药理学的方法筛选青蒿、川芎配伍组合治疗CM可能的活性成分及靶点,分析其治疗CM的可能性、关键靶点及作用途径,为进一步

深入研究提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 青蒿-川芎主要活性成分及靶点预测** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), SymMap (<http://www.symmap.org/>)数据库平台,根据口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) $\geq 0.18$ 作为筛选标准,得到候选化合物,再检索并获取潜在作用靶点。

**1.2 疾病靶点筛选** 在 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)数据库, DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>)数据库输入关键词“cerebral malaria”获取疾病的潜在作用靶点。

**1.3 靶点蛋白与蛋白互作网络分析** 进一步明确青蒿-川芎潜在靶点与CM疾病靶点之间的相互作用,将筛选的得到的共有靶标蛋白上传至 STRING 11.0(<https://string-db.org/>)平台,建立蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,将PPI网络图导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行拓扑属性分析,选取度值(degree)和聚集序数(clustering coefficient)同时在平均数之上的靶标作为关键靶标。

**1.4 基因本体(GO)功能分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 将上述筛选出的PPI网络核心靶标导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中进行分析,设定阈值  $P < 0.05$ ,进行GO功能分析和KEGG通路富集分析。

**1.5 实验动物及疟原虫株** SPF级C57BL/6J雄性小鼠,鼠龄6~8周,体质量14~16 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SYXK(京)2017-0033,中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验设施编号2019-004,恶性疟原虫株Pb ANKA,第四军医大学赵亚教授实验室惠赠,本实验室进行传代,液氮中冻存并长期保存。

**1.6 药物及试剂** Giemsa染液(美国Sigma公司,批号SLBT6353);青蒿琥酯注射液(重庆华方武陵山制药有限公司,批号C00220171106);盐酸川芎嗪注射液(北京永康药业有限公司,批号P18050701);小鼠 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),白细胞介素-10(IL-10),IL-4,IL-1 $\beta$ 定量芯片(广州瑞博奥生物科技有限公司)。

**1.7 仪器** CX31型显微镜(日本Olympus公司);YP3002N型体质量秤(南京晓晓仪器设备有限公司);Anymaze动物行为学视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司)。

## 1.8 实验验证方法

**1.8.1 复苏与传代** 将液氮中保存的 Plasmodium

berghei ANKA(Pb ANKA)疟原虫株取出,37℃水浴锅中解冻,待融化,用注射器吸取血液,按照0.2 mL/只腹腔注射接种C57BL/6小鼠。待接种小鼠感染率达15%~30%,尾尖取血于抗凝血管中,摇匀后按照0.2 mL/只血传于下一代小鼠,待小鼠感染率达15%~30%时,即可作种鼠进行接种实验。

**1.8.2 动物分组与疟原虫接种** 将C57BL/6小鼠称质量,随机分为3组( $n=10$ ),模型组(M),青蒿琥酯组(Art),青蒿琥酯-川芎嗪组合组(Art+TMP)。实验小鼠适应性喂养后,待种鼠感染率达15%~30%,摘眼球取血后计数红细胞总数和染疟红细胞(pRBC)数,按照 $1 \times 10^6$ 个pRBC腹腔注射0.2 mL,建立ECM模型,即为接种第0天(D0)。

**1.8.3 给药处理** 从接种后第2天(D2)开始,Art组按照 $7.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行滴鼻给药,Art+TMP组按照 $18.20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿琥酯川芎嗪混合溶液滴鼻给药。抓取小鼠后使其头部平躺,使用10  $\mu\text{L}$ 移液枪吸取所需药物与小鼠鼻孔成45°倾斜角度滴入,待其吸入后继续滴入下一滴,左右鼻孔交替给药,直至给药结束,保持此位置15 s以便小鼠将药物完全吸入,连续给药4 d<sup>[12]</sup>。

**1.8.4 小鼠一般情况** 每天观察并记录各组小鼠精神、活动状态,接种D0起每天观察小鼠的死亡情况,连续统计12 d,生存率=生存小鼠数量/实验小鼠数量 $\times 100\%$ ,体质量D2开始,每天同一时间测定小鼠体质量。

**1.8.5 感染率检测** 感染第3天(D3)起每日测定各组小鼠感染率<sup>[13]</sup>。小鼠尾尖取血一小滴,滴于病理载玻片上,用另一玻片边缘轻轻推开制成厚度适宜的薄血膜,风干后使用甲醇固定至干,使用Giemsa染液按照染液-水1:9比例配制染色(无气泡,全覆盖血膜)20 min后,用水冲洗并用滤纸吸净水分,晾干。滴香柏油于薄血膜玻片上,100倍油镜进行观察计数,计数1 000个以上红细胞中pRBC数目,感染率=pRBC数目/总红细胞数 $\times 100\%$ 。

**1.8.6 ECM小鼠快速昏迷行为量表评分** 根据文献[14],采用小鼠快速昏迷及行为量表(RMCBS)对其ECM模型进行评估。从D0开始<sup>[12]</sup>,从步态、平衡性、运动相关行为、身体所处位置、四肢力量、触摸反应、耳廓反射、脚趾触碰反应、进攻行为、卫生行为这10个方面评分。

**1.8.7 运用AAM-CUST蛋白芯片技术结合数据分析软件进行分析** 使用AAM-CUST试剂盒检测脑组织中的细胞因子表达水平,所有操作均按照试剂

盒说明书进行,观察各组小鼠脑组织中差异蛋白的变化,比较各组间的差异。

**1.9 统计学分析** 使用 GraphPad Prism 8.0 版分析,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据通过单因素方差分析和非参数检验进行分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 青蒿-川芎主要活性成分及靶点** 经过筛选整理,青蒿主要活性成分 17 个、川芎主要活性成分 7 个, sitosterol 重复,因此共得到 23 个唯一有效活性成分。其中青蒿素、双氢青蒿素、斛皮素、川芎嗪等与 CM 及脑缺血性疾病文献报道及临床治疗经验相关,见表 1。

**2.2 药效靶点筛选** 检索 23 个主要活性成分共获得药物靶点 194 个,通过 GeneCards, DisGeNET 数据库收集 CM 的相关靶点 2 851 个。将药物预测靶点与疾病靶点进行基因映射可获得 100 个青蒿-川芎药物治疗 CM 的药效靶点。

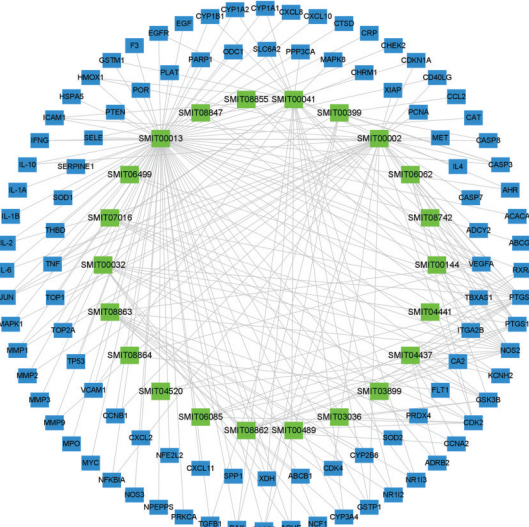
**2.3 活性成分-靶点网络构建** 通过 Cytoscape 3.7.1 软件对活性成分与药效靶点进行分析,得到青蒿-川芎活性成分-靶点网络图,见图 1。网络分析结果显示,青蒿-川芎中活性成分主要含有青蒿素、双氢青蒿素、蒿黄素、川芎嗪等,可能是干预 CM 的物质基础。根据分析结果结合相关文献报道,发现除青蒿素类成分外,未见其他有明显有抗疟活性单体成分。现代药理学证实,川芎化学成分多样,其中研究表明川芎嗪可拮抗钙调素激活的核苷酸磷酸二酯酶活性,发挥对电位依赖性钙通道的阻滞作用,改善患者脑部血管,提高脑血管血流速度和血流量<sup>[15-19]</sup>。还具有抗氧化作用,可减轻脑组织缺血及再灌注损伤,发挥组织保护作用,改善患者神经功能<sup>[20]</sup>。川芎嗪的药理活性有可能对 CM 所致脑缺血性病变改善有所帮助,故选用川芎嗪作为川芎的代表成分。CM 作为危重疾病,世界卫生组织(WHO)推荐临床上一线药为青蒿琥酯<sup>[21-22]</sup>,考虑到青蒿琥酯比双氢青蒿素有更好的溶解性,并且青蒿琥酯进

表 1 青蒿-川芎活性成分基本信息

Table 1 Basic information on active components of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma

成分ID	成分名称	OB/%	DL
MOL007274	玄参黄酮 skrofulin	30.35	0.30
MOL004083	柽柳黄素 tamarixetin	32.86	0.31
MOL000006	木犀草素 luteolin	36.16	0.25
MOL000358	谷甾醇 sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	山柽酚 kaempferol	41.88	0.24
MOL007412	dmqt	42.60	0.37
MOL007401	条叶蓟素 cirsiliol	43.46	0.34
MOL000098	槲皮素 quercetin	46.43	0.28
MOL004609	茵陈黄酮 areapillin	48.96	0.41
MOL005229	蒿黄素 artemetin	49.55	0.48
MOL000354	异鼠李素 isorhamnetin	49.60	0.31
MOL007424	青蒿素 artemisinin	49.88	0.31
MOL007425	双氢青蒿素 dihydroartemisinin	50.75	0.30
MOL002235	泽兰黄醇 eupatin	50.80	0.41
MOL004112	万寿菊素 patuletin	53.11	0.34
MOL007415	[(2S)-2-[[[(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropyl] acetate	58.02	0.52
SMIT08862	6,8-Di-C-glucosylapigenin_Qt	59.85	
MOL002157	华利西内酯 wallichilide	42.31	0.71
MOL000433	Fa	68.96	0.71
MOL001494	十八碳二烯 mandenol	42.00	0.19
MOL002135	杨梅酮 myricanone	40.60	0.51
MOL002140	川芎嗪 perlolyrine	65.95	0.27
MOL002202	川芎嗪 tetramethylpyrazine	20.01	0.03

入人体内以活性代谢产物双氢青蒿素发挥药效作用<sup>[23]</sup>,故笔者采用青蒿琥酯为青蒿的代表成分,与川芎嗪组合进行后续实验验证。



绿色代表药物活性成分;蓝色代表共有靶点  
图1 青蒿-川芎活性成分-靶点网络

Fig. 1 Active components of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma-target network

2.4 关键靶点筛选 将100个共有靶点导入STRING11.0平台构建药物和疾病靶点蛋白互作

表2 青蒿-川芎治疗CM关键靶点的拓扑参数

Table 2 Topological parameters of key targets of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma treating for CM

靶点全称	中文名	简称	degree	clustering coefficient
NF-κB inhibitor α	NF-κB 抑制剂 α	NFKBIA	8	0.536
C-X-C motif chemokine 10	C-X-C 基序趋化因子 10	CXCL10	7	0.619
nitric oxide synthase, inducible	一氧化氮合酶 2, 可诱导的	NOS2	7	0.476
interleukin-2	白细胞介素-2	IL-2	9	0.694
interferon-γ	γ-干扰素	IFNG	9	0.611
interleukin-4	白细胞介素-4	IL-4	12	0.576
intercellular adhesion molecule 1	细胞间黏附分子 1	ICAM1	8	0.678
C-C motif chemokine 2	C-C 基序趋化因子 2	CCL2	12	0.576
interleukin-1beta	白细胞介素-1β	IL-1β	15	0.495
interleukin-10	白细胞介素-10	IL-10	12	0.621
cyclin B1	细胞周期蛋白 B1	CCNB1	8	0.607
cyclin dependent kinase1	细胞周期蛋白依赖性激酶 1	CDK1	9	0.583
cyclin dependent kinase inhibitor 1A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1a	CDKN1A	11	0.509
cyclin dependent kinase 4	细胞周期蛋白依赖性激酶 4	CDK4	8	0.643
cyclin A2	细胞周期蛋白 A2	CCNA2	8	0.75
cyclin dependent kinase 2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2	CDK2	9	0.667
proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原	PCNA	8	0.678
C-X-C motif chemokine ligand 2	趋化因子配体 2	CXCL2	8	0.643

表,对所得到的PPI网络进行功能分析,将共有蛋白基因输入Cytoscape 3.7.1软件,网络平均degree为6.45,平均clustering coefficient为0.42,degree,clustering coefficient均超过平均值的靶点共有18个,即为青蒿-川芎药对发挥抗疟药效作用的关键靶点。关键靶点的拓扑参数见表2。主要包括趋化因子、白细胞介素、干扰素、细胞周期调控因子,NOS2等,具有调节固有免疫和适应性免疫、血细胞生成、细胞生长、以及损伤组织修复等多种功能。

2.5 GO功能分析和KEGG通路富集 将2.4项核心靶蛋白基因进行GO分析和KEGG信号通路的富集分析。其中生物学过程(BP)主要包括脂多糖的细胞反应,免疫反应,p53介导的DNA损伤反应和信号转导导致细胞周期阻滞等;细胞成分(CC)主要包括细胞外区、细胞外间隙、质膜外侧等;分子功能(MF)主要包括:趋化因子活性、细胞因子活性、生长因子活性等,见图2。同样,共得到51条KEGG信号通路(P<0.05),按照P从小到大的顺序筛选前20条,列举了前20个富集分析结果,见表3。主要涉及到肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway),NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)等。见图3。

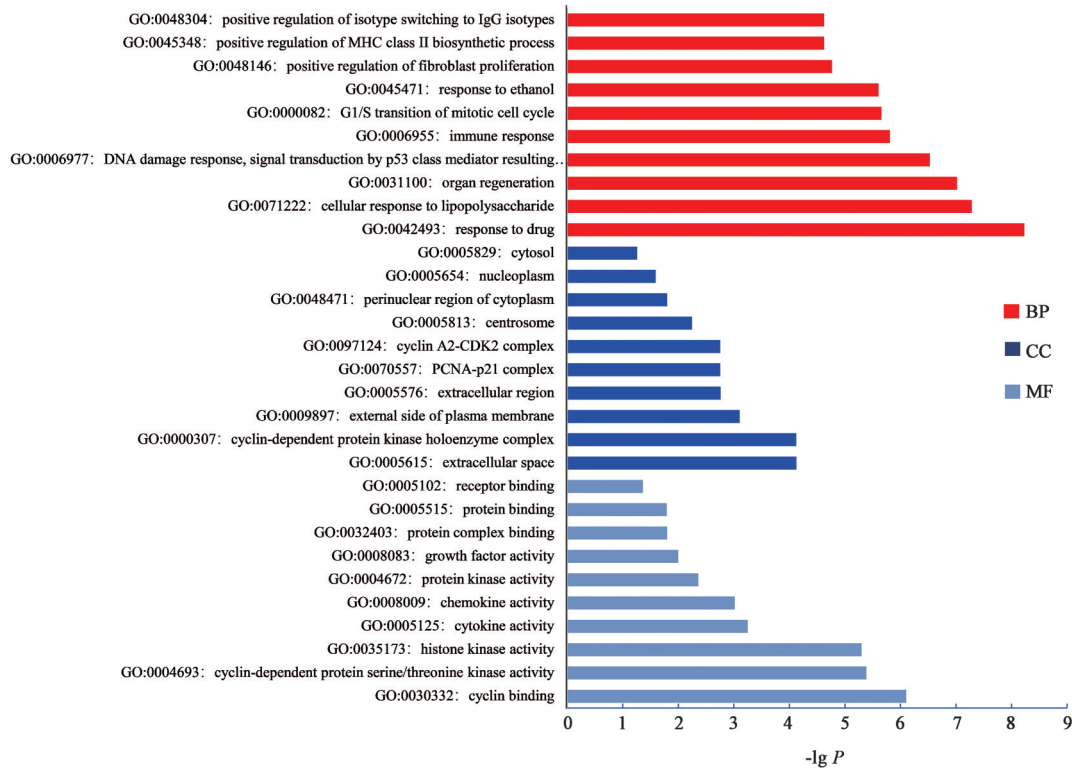


图 2 青蒿-川芎治疗 CM 的 GO 富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis results of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma treating for CM

表 3 青蒿-川芎治疗 CM 关键靶点的 KEGG 分析

Table 3 KEGG analysis of key targets of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizom treating for CM

KEGG 代谢通路	靶点数	百分率%	P
chagas disease (American trypanosomiasis)	7	38.9	6.95
cell cycle	7	38.9	6.49
measles	7	38.9	6.31
leishmaniasis	6	33.3	6.24
cytokine-cytokine receptor interaction	8	44.4	6.04
T cell receptor signaling pathway	6	33.3	5.50
TNF signaling pathway	6	33.3	5.35
malaria	5	27.8	5.30
inflammatory bowel disease (IBD)	5	27.8	4.83
p53 signaling pathway	5	27.8	4.75
hepatitis B	6	33.3	4.71
influenza A	6	33.3	4.33
herpes simplex infection	6	33.3	4.22
african trypanosomiasis	4	22.2	4.19
allograft rejection	4	22.2	4.03
viral carcinogenesis	6	33.3	3.99
epstein-barr virus infection	5	27.8	3.73
HTLV-I infection	6	33.3	3.55
NOD-like receptor signaling pathway	4	22.2	3.49
salmonella infection	4	22.2	2.99

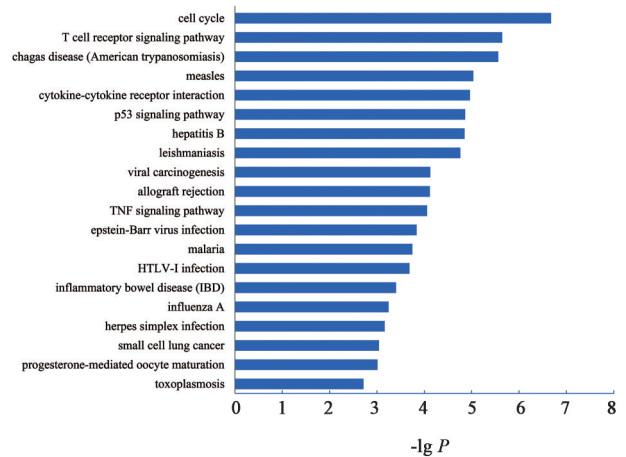
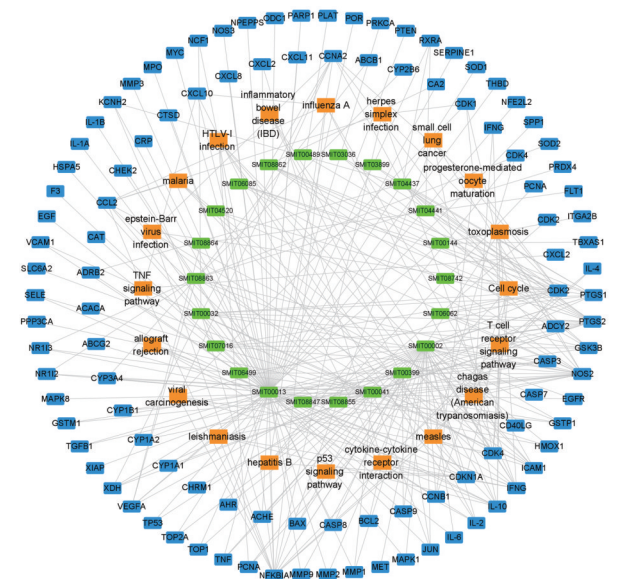


图 3 青蒿-川芎治疗 CM 的 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma treating for CM

2.6 网络拓扑图构建 将上述获得的化合物,关键靶点,KEGG 通路信息通过 STRING 及 Cytoscape 3.7.1 软件构建多维网络图,见图 4。表明青蒿-川芎的各有效成分通过与多个靶点,多个信号通路共同起到治疗 CM 的作用。

2.7 Art 和 TMP 对 ECM 小鼠的保护作用 经网络药理学预测,结合文献及临床经验,用青蒿和川芎的 Art, TMP 单体组合,建立 ECM 模型,观察 Art+TMP 对 ECM 小鼠保护作用是否优于 Art。



绿色代表药物活性成分;橙色代表信号通路;蓝色代表共有靶点

图4 青蒿-川芎成分-靶点-信号通路网络

Fig. 4 Network of compounds of Artemisiae Annuae Herba-Chuanxiong Rhizoma components-targets-signaling pathway

表4 Art和TMP对ECM小鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of ART and TMP on body mass in ECM mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	2 d	4 d	6 d	8 d
M		18.70±2.00	17.50±2.30	16.10±2.70	15.78±1.23
Art	7.80	18.20±1.01	17.70±2.33	17.30±2.78	16.56±2.20
Art+TMP	18.20	17.90±2.00	17.50±1.01	17.20±2.42	17.30±2.20

注:与M组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表5~7同)。

**2.7.2 Art和TMP对ECM小鼠感染率,RMCBS得分的影响** 在接种第6,8天,与M组在第8天感染率比较,Art组和Art+TMP组感染率显著降低( $P<0.01$ ),表明Art+TMP组能够有效降低小鼠的感染率。见表5。M组第4天开始出现明显的探索能力下降、四肢力量减弱、走路不稳等症状;第7天开始,

表5 Art和TMP对ECM小鼠感染率的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of ART and TMP on infection rate in ECM mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	2 d	4 d	6 d	8 d
M		1.70±1.00	3.50±2.30	12.90±2.70	22.78±3.23
Art	7.80	0.20±0.01	0.70±0.33	3.30±2.78	9.56±2.20 <sup>3)</sup>
Art+TMP	18.20	0.10±0.001	0.50±0.01	2.30±0.42	4.23±1.20 <sup>3)</sup>

表6 Art和TMP对ECM小鼠RMCBS得分的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of ART and TMP on RMCBS score in ECM mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	2 d	4 d	6 d	7 d	8 d
M		15.20±0.30	13.33±0.30	12.00±0.00	6.20±0.70	4.59±0.30
Art	7.80	13.21±0.01	13.85±1.42	12.14±1.02	12.36±0.70 <sup>2)</sup>	11.14±0.50 <sup>2)</sup>
Art+TMP	18.20	13.40±0.70	13.85±0.50	12.64±0.60	12.69±0.16 <sup>2)</sup>	12.50±0.70 <sup>2)</sup>

**2.7.1 Art和TMP对ECM小鼠生存率和体质量的影响** M组接种第4天开始出现死亡,第12天死亡率达100%;Art组第10天出现小鼠死亡,Art+TMP组开始出现死亡,至观察终止,组内存活率为60%。Art和Art+TMP组均与M组存在显著的统计学差异( $P<0.01$ ),结果表明Art+TMP组与Art组相比能显著提高ECM小鼠生存率,见图5。各组间体质量变化差异无明显统计学意义。见表4。

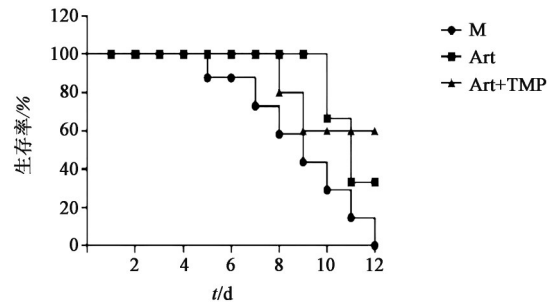


图5 Pb ANKA感染小鼠生存率

Fig. 5 Survival of mice infected with Pb ANKA

脑型疟症状开始出现,RMCBS得分迅速下降,小鼠明显出现步态不稳、平衡性下降、活动减少、背部拱起,四肢力量开始明显减弱、进攻行为减弱,皮毛不顺甚至立毛等现象。第7天时,Art组和Art+TMP组在RMCBS上明显高于M组评分( $P<0.01$ )。见表6。

**2.7.3 Art和TMP对ECM小鼠脑组织细胞因子的表达水平** 根据网络药理学结果提示,使用AAM-CUST试剂盒检测ECM小鼠脑组织中相关细胞因子表达水平。发现其中IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-1 $\beta$ 与

网络药理学预测ECM疾病与药物重合核心靶标相符。与M组比较,Art+TMP组IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-1 $\beta$ 的表达水平显著升高( $P<0.01$ ),M组与Art组相比表达水平差异无统计学意义。见表7。

表7 Art和TMP对ECM小鼠脑组织中细胞因子的表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-4	IL-1 $\beta$
M		185.41±48.52	1 228.33±172.56	709.19±63.79	52.75±9.24
Art	7.80	233.30±29.44	1 317.28±140.00	775.64±82.76	40.54±45.56
Art+TMP	18.20	830.15±118.39 <sup>2)</sup>	1 911.97±187.64 <sup>2)</sup>	1 354.48±128.34 <sup>2)</sup>	626.32±64.41 <sup>2)</sup>

### 3 讨论

中药化学成分复杂,其进入人体发挥药效的作用机制包含了大量未知的信息,中药在中医药治疗中往往不是单味药发挥作用而是多味药配伍发挥药效。网络药理学为研究复杂中药体系提供了新思路<sup>[24-25]</sup>。本文通过构建青蒿-川芎治疗CM的多维网络图,并结合体内验证实验,结果表明青蒿琥酯与川芎嗪配伍组合能对ECM小鼠的生存率、体质量、原虫血症等起到改善作用,同时显著缓解特有的神经症状,说明青蒿琥酯与川芎嗪组合优于青蒿琥酯单药治疗组。

网络药理学结果提示,青蒿与川芎配伍组合后,其药效作用的关键靶点和主要分子功能集中指向了细胞因子、趋化因子、干扰素、细胞周期调控因子、及对固有免疫和适应性免疫的调节方面。文献查阅可知,促炎介质如细胞因子和趋化因子在CM发病过程中以及在调节血脑屏障的通透性中发挥重要作用<sup>[26]</sup>,宿主体内一氧化氮合酶2(NOS2)变异及一氧化氮水平可影响宿主对疟原虫感染的易感性和CM并发症的发生<sup>[27]</sup>,且有研究表明NO的产生和NOS2的表达及NOS2的多态性与疟疾的严重程度相关<sup>[28]</sup>。细胞因子之间协同、拮抗、重叠和多效等效应在疟疾发病,特别是在CM和脊髓性肌萎缩(SMA)发生中作用显著<sup>[29]</sup>。CM的发生与原虫感染红细胞(pRBC)对血管内皮细胞(尤其是脑血管内皮细胞)的黏附密切相关,大量研究表明,这一黏附作用主要是由疟原虫黏附蛋白或配体与血管内皮细胞上的黏附受体如细胞间黏附分子-1(ICAM-1),血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)等结合来介导的<sup>[30]</sup>。CM患者体内存在着多种细胞因子水平的异常,特别是TNF- $\alpha$ <sup>[31-32]</sup>。KHAW等<sup>[33]</sup>构建人脑内皮细胞(HBEC)-恶性疟原虫感染红细胞(iRBC)-外周

血单核细胞(PBMC)共培养人CM模型,发现在此实验体系中增加PBMC时IFN- $\gamma$ 产生增多,同时IL-10减少,CXCL10和ICAM-1的表达增加。在患有CM的儿童中,那些死于疟疾并发症的人往往比那些康复的人有更高浓度的IL-10/CXCL10和IFN-3<sup>[34]</sup>。有报道,青蒿琥酯与促红细胞生成素联用可通过抑制辅助性T细胞(Th)免疫反应,提高调节性T细胞数量和IL-10水平,改善了CM模型小鼠的存活率及脑组织病理学变化<sup>[35]</sup>。本研究在验证青蒿与川芎配伍组合的增效作用基础上,进一步检测了组织细胞因子表达水平,结果显示二者联用可明显上调IL-10水平,与文献报道青蒿素类药物作用相符<sup>[36]</sup>。同时,IFN- $\gamma$ 和IL-4表达水平显著增高,提示该组合有可能通过影响IFN- $\gamma$ 诱导的初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Th1细胞分化而参与细胞免疫应答调节,可能通过影响IL-4诱导的初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Th2细胞分化,从而参与体液免疫应答的调节,与网络药理学分析结果一致,充分证明了青蒿、川芎配伍组合治疗CM是多分子-多靶点-多途径相互作用的结果。另外,结果还发现,青蒿琥酯与川芎嗪联用后,IL-1 $\beta$ 的表达上调明显,推测通过调动宿主活化天然免疫应答对感染疟原虫的杀灭作用,从而释放促炎细胞因子、趋化因子等<sup>[37]</sup>有关,或与在CM后期一系列典型病理过程中趋化因子、黏附因子、炎症因子等大量释放有关,相关研究有待进一步验证。

从关键靶点的通路富集结果分析可知,青蒿-川芎配伍组合主要通过影响炎症,细胞周期,p53,T细胞,疟疾相关等通路发挥治疗CM作用。①T细胞信号通路,在疟疾症状期免疫衰竭和衰老标志物的上调可能影响T细胞的效应功能,导致寄生虫清除效率低下,无法形成对疟疾的无菌免疫<sup>[38]</sup>。最近有研究发现疟原虫胞外囊泡分泌的组胺释放因子和

生长因子1通过抑制特异性T细胞反应来促进免疫逃避<sup>[39]</sup>。②p53信号通路。有研究通过透射电镜(TEM)研究监测了CM感染小鼠脑组织线粒体的结构完整性,研究结果显示,受感染的脑内线粒体广泛空泡化和肿胀,提示晚期退变,结果强调了线粒体相关凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)诱导的细胞内死亡途径的激活,Bcl-2相关X蛋白(Bax)和细胞色素C,并进一步设想p53的诱导可能是CM炎症反应后肿瘤坏死因子诱导相关受体后信号事件的延续<sup>[40]</sup>。③细胞周期相关通路。恶性疟原虫的生命周期受到严格的调控,疟原虫的48h无性循环复制与高等真核生物的细胞分裂有明显的不同,通过阻断G<sub>1</sub>/S的过渡,在G<sub>1</sub>期(侵入后约15h)诱导细胞不可避免的周期阻滞,细胞周期阻滞的寄生虫进入静止的G<sub>0</sub>样状态,但加入外源性多胺后,重新启动其细胞周期<sup>[41]</sup>。这些预测结果为进一步的药效机制研究提供了线索。

本研究应用网络药理学及实验验证的方法对青蒿-川芎配伍的活性成分、靶点、和作用通路进行分析并验证。同时,也发现网络药理学为经典药效学研究分析药物作用提供了全新的视角和依据,但它仍存在着很多局限性和亟待解决的问题,部分预测分析数据结果与预期不符或无法被成功验证,但它是复杂药物研究中必不可少的手段,为探讨其作用机制提供了新思路和潜在的研究方向。

[参考文献]

[1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World Malaria Report*[M]. Geneva: World health organization, 2018: 1-204.  
[2] 李建良,李凯,郭媛,等. 脑型疟研究新进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(23):4548-4555.  
[3] GOLENSER J, WAKNINE J H, KRUGLIAK M, et al. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins[J]. *Int J Parasitol*, 2006, 36(14): 1427-1441.  
[4] WAKNINE-GRINBERG J H, HUNT N, BENTURA-MARCIANO A, et al. Artemisone effective against murine cerebral malaria[J]. *Malar J*, 2010, 9:227.  
[5] VANKA R, NAKKA V P, KUMAR S P, et al. Molecular targets in cerebral malaria for developing novel therapeutic strategies[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 157:100-107.  
[6] GHOSH A, BANERJEE T. Nanotized curcumin-benzothiothiophene conjugate: a potential combination for treatment of cerebral malaria[J]. *IUBMB Life*, 2020,

72(12):2637-2650.  
[7] GAY F, ZOUGBÉDÉ S, N'DILIMABAKA N, et al. Cerebral malaria: what is known and what is on research[J]. *Rev Neurol*, 2012, 168(3):239-256.  
[8] 林培贤,高辉耀. 脑出血早期应用活血化瘀药的研究进展[J]. 中医临床研究,2011,3(17):115-116.  
[9] 陈晨,刘倩,高华. 活血化瘀药药理作用研究进展[J]. 中国药事,2011,25(6):603-605.  
[10] SHAN C, XU Q, SHI Y, et al. Chuanxiong formulae for migraine: a systematic review and meta-analysis of high-quality randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi:10.3389/fphar.2018.00589.  
[11] SHAO Z, LI J, ZHAO Z, et al. Effects of tetramethylpyrazine on nitric oxide/cGMP signaling after cerebral vasospasm in rabbits [J]. *Brain Res*, 2010, 1361:67-75.  
[12] 姜晓慧. 基于改善脑疟疾神经损伤的青蒿琥酯川芎嗪组合协同治疗脑型疟探索性研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2019.  
[13] 李轲,周水森,黄芳,等. 3种PCR方法检测低密度恶性疟原虫血症的比较研究[J]. 中国病原生物学杂志,2013,8(4):331-335.  
[14] HOFFMANN A, PFEIL J, ALFONSO J, et al. Experimental cerebral malaria spreads along the rostral migratory stream [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(3): e1005470.  
[15] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J]. 中国全科医学,2011,14(35):4013-4017.  
[16] 顾任钧,李子赞,李鹏飞,等. 川芎嗪注射液对急性缺血性脑卒中疗效与安全性的Meta分析[J]. 世界中医药,2020,15(19):2900-2909.  
[17] VANEZIS A P, ARNOLD J R, RODRIGO G, et al. Daily remote ischaemic conditioning following acute myocardial infarction: a randomised controlled trial [J]. *Br Heart J*, 2018, 104(23):1955-1962.  
[18] 姚丽丽,朱晓晖,唐祝奇,等. 丹参川芎嗪联合甲钴胺对早期DPN患者血液流变学及炎症因子水平的影响[J]. 东南大学学报:医学版,2016,35(6):922-926.  
[19] 吕行直,李瑞芳,罗雪婷,等. 川芎嗪对肾性高血压大鼠左心室肥厚和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(6):513-517.  
[20] 祁景,刘小军,祁邵艳,等. 盐酸川芎嗪联合奥扎格雷对急性脑梗死患者神经功能缺损和血液流变学的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2020,15(4):710-713.  
[21] 华海涌,孙芳,陈伟,等. 世界卫生组织《重症疟疾管

- 理实用手册》(第三版)解读[J]. 中国热带医学, 2018, 18(7): 643-645.
- [22] OLUPOT-OLUPOT P, MAITLAND K. Management of severe malaria: results from recent trials [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 764: 241-250.
- [23] KOUAKOU Y I, TOD M, LÉBOUCHER G, et al. Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria [J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 89: 30-44.
- [24] 陈铭泰, 肖娇, 林海丹, 等. 基于网络药理学探讨逍遥散对动脉粥样硬化和抑郁症“异病同治”的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4099-4111.
- [25] 赵元, 郑红霞, 徐颖, 等. 青盐方治疗围绝经期焦虑症的网络分析及实验验证 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4129-4139.
- [26] IDRO R, MARSH K, JOHN C C, et al. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome [J]. *Pediatr Res*, 2010, 68(4): 267-274.
- [27] TROVOADA M D J, MARTINS M, BEN MANSOUR R, et al. NOS2 variants reveal a dual genetic control of nitric oxide levels, susceptibility to *Plasmodium* infection, and cerebral malaria [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(3): 1287-1295.
- [28] LEVESQUE M C, HOBBS M R, O'LOUGHLIN C W, et al. Malaria severity and human nitric oxide synthase type 2 (NOS2) promoter haplotypes [J]. *Hum Genetics*, 2010, 127(2): 163-182.
- [29] WILSON N O, JAIN V, ROBERTS C E, et al. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria [J]. *Dis Markers*, 2011, 30(1): 39-49.
- [30] CHULAY J D, OCKENHOUSE C F. Host receptors for malaria-infected erythrocytes [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 43(2 Pt 2): 6-14.
- [31] GRAU G E, TAYLOR T E, MOLYNEUX M E, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria [J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(24): 1586-1591.
- [32] KWIATKOWSKI D, HILL A V, SAMBOU I, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria [J]. *Lancet*, 1990, 336(8725): 1201-1204.
- [33] KHAW L T, BALL H J, GOLENSER J, et al. Endothelial cells potentiate interferon- $\gamma$  production in a novel tripartite culture model of human cerebral malaria [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69521.
- [34] CABANTOUS S, POUDIOUGOU B, BERGON A, et al. Understanding human cerebral malaria through a blood transcriptomic signature: evidences for erythrocyte alteration, immune/inflammatory dysregulation, and brain dysfunction [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, doi: 10.1155/2020/3280689.
- [35] DU Y, CHEN G, ZHANG X, et al. Artesunate and erythropoietin synergistically improve the outcome of experimental cerebral malaria [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 48: 219-230.
- [36] BESNARD A, GUABIRABA R, NIEDBALA W, et al. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): e1004607.
- [37] 周时. 中药川芎中有效成分的药理作用研究 [J]. *内蒙古中医药*, 2015, 34(5): 157-170.
- [38] FRIMPONG A, KUSI K A, ADU-GYASI D, et al. Phenotypic evidence of T cell exhaustion and senescence during symptomatic *Plasmodium falciparum* Malaria [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1345.
- [39] DEMARTA-GATSI C, RIVKIN A, Di BARTOLO V, et al. Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell responses [J]. *Cell Microbiol*, 2019, 21(7): e13021.
- [40] KUMAR K A, BABU P P. Mitochondrial anomalies are associated with the induction of intrinsic cell death proteins-Bcl<sub>2</sub>, Bax, cytochrome-c and p53 in mice brain during experimental fatal murine cerebral malaria [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 329(3): 319-323.
- [41] VAN BILJON R, NIEMAND J, VAN WYK R, et al. Inducing controlled cell cycle arrest and re-entry during asexual proliferation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16581.

[责任编辑 周冰冰]