

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.03.010

# 龙生蛭胶囊中“桃仁-红花-川芎”药组治疗脑卒中网络药理学研究\*

许海燕<sup>1</sup>, 王 珊<sup>1</sup>, 彭修娟<sup>1</sup>, 陈衍斌<sup>2</sup>, 侯敏娜<sup>1</sup>, 刘艳红<sup>1</sup>, 逯 莉<sup>1</sup>, 刘 峰<sup>1, 2Δ</sup>

(1. 陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075)

**摘要:**目的 预测龙生蛭胶囊中“桃仁-红花-川芎”药组治疗脑卒中的药效物质基础及作用机制。方法 利用中医药整合药理学研究平台 V2.0 (TCMIP V2.0), 将“桃仁-红花-川芎”药组化学信息进行靶标预测, 构建与脑卒中相关疾病靶标信息的蛋白互作网络 (PPI), 采用通路富集分析药组干预疾病的关键靶标, 并构建“桃仁-红花-川芎”药组活性成分、关键核心靶标和疾病相关通路的 PPI, 绘制“中药-活性成分-关键核心靶标-通路”网络图, 分析与核心靶标相关的主要成分, 并采用分子对接技术对活性成分进行虚拟筛选。结果 共预测到活性成分 19 个, 核心网络靶标 62 个, 其中药物靶标 27 个, 疾病靶标 35 个, 疾病与药物共有靶标 2 个 (NR3C1, APP); 其药效物质基础主要为生物碱类、挥发油类、黄酮类、有机酸类等成分; “桃仁-红花-川芎”药组主要活性物质与细胞外信号调节蛋白激酶 2 (ERK2)、Janus 激酶 2 (JNK2) 形成较好的对接模式与较高的亲和力, 具有治疗脑卒中的活性。结论 龙生蛭胶囊中“桃仁-红花-川芎”药组通过多成分、多靶点、多通路的形式发挥脑卒中治疗作用, 其作用机制可能与调控 ERK2 和 JNK2 等核心靶标有关。

**关键词:** 龙生蛭胶囊; “桃仁-红花-川芎”药组; 脑卒中; 细胞外信号调节蛋白激酶 2; Janus 激酶 2; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R932; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)03-0036-06

## Network Pharmacology of "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" Drug Group in Longshengzhi Capsules in the Treatment of Stroke

XU Haiyan<sup>1</sup>, WANG Shan<sup>1</sup>, PENG Xiujuan<sup>1</sup>, CHEN Yanbin<sup>2</sup>, HOU Minna<sup>1</sup>, LIU Yanhong<sup>1</sup>, LU Li<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>1,2</sup>

(1. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an, Shaanxi, China 712046; 2. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710075)

**Abstract: Objective** To predict the pharmacodynamic material basis and mechanism of "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group in Longshengzhi Capsules in the treatment of stroke. **Methods** Through the Integrative Pharmacology - Based Research Platform of Traditional Chinese Medicine V2.0 (TCMIP V2.0), the target of chemical information of "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group was predicted to construct the protein - protein interaction (PPI) network of target information of stroke - related diseases. Pathway enrichment was used to analyze the key targets of the drug group for disease intervention, and the PPI of the active ingredients, key targets and disease - related pathways of the "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group were constructed, the interaction network of "traditional Chinese medicine - active ingredients - key targets - pathways" was drawn, the main ingredients related to the key targets were analyzed, and the virtual screening of active ingredients was conducted by the Molecular docking technology. **Results** A total of 19 active ingredients and 62 key network targets were predicted, including 27 drug targets, 35 disease targets and two common targets of disease and drug (NR3C1, APP). The pharmacodynamic material basis of active ingredients were mainly alkaloids, volatile oils, flavonoids, organic acids and so on. The main active ingredients of "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group form a better docking mode and high affinity with extracellular signal - regulated protein kinase 2 (ERK2) and Janus kinase 2 (JNK2), which had good a activity of treating stroke. **Conclusion** The "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group in Longshengzhi Capsules plays a role in the treatment of stroke in the form of multi - component, multi - target and multi - channel, and its mechanism may be related to the regulation of key targets such as ERK2 and JNK2.

**Key words:** Longshengzhi Capsules; "Persicae Semen - Carthami Flos - Chuanxiong Rhizoma" drug group; stroke; ERK2; JNK2; network pharmacology; mechanism

脑卒中具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高等特点,是导致人类死亡的第二类原因,与缺血性心脏病、恶性肿瘤构成多数国家的三大致死疾病<sup>[1-2]</sup>。龙生蛭胶囊由黄芪、水蛭、桃仁、红花、川芎等 12 味中药

材组方,具有补气活血、逐瘀通络功效,临床用于治疗气虚血瘀型中风<sup>[3]</sup>。方中桃仁味苦、甘,性平,活血化瘀,润肠通便<sup>[4]</sup>;红花味辛,性温,活血通经,祛瘀止痛<sup>[5]</sup>;川芎味辛,性温,活血行气,祛风止痛<sup>[6]</sup>。桃仁破血力强,红

\* 基金项目:陕西省中医药管理局科研课题[2019-ZZ-ZY001];陕西省咸阳市重大科技专项计划项目[2018k01-47];陕西省教育厅专项科研项目[20JK0514];陕西省教育厅 2021 年度重点科研计划项目[21JY001]。

第一作者:许海燕,女,硕士,副教授,研究方向为中药药效物质基础,(电子信箱)xpzwd@126.com。

Δ 通信作者:刘峰,男,博士,主任药师,研究方向为中药新药开发和中药大品种技术升级改造,(电子信箱)liufeng1720@163.com。

花行血力盛,川芎相须为用,共为臣药行气化瘀,三药配伍,共奏活血破瘀之功,具有活血而不伤血、补血而不留瘀的特点,可祛瘀生新<sup>[7]</sup>。本研究中基于中医药整合药理学研究平台 V2.0(TCMIP V2.0)<sup>[8]</sup>预测了龙生蛭胶囊中臣药桃仁-红花-川芎药组治疗脑卒中的药效物质基础和作用机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 药组化学成分来源

在 TCMIP V2.0“中药材数据库”项下分别以“桃仁”“红花”“川芎”为关键词进行检索,收集其化学成分,建立“桃仁-红花-川芎”药组化学成分数据库。

### 1.2 药组候选靶标来源

在 TCMIP V2.0“疾病数据库”项下以“Stroke”为关键词进行检索,获得与脑卒中相关的靶点。在“中药(含方剂)靶标预测及功能分析”中,依次添加“桃仁”“红花”“川芎”,对“桃仁-红花-川芎”药组化学成分库中成分的靶标进行预测,选择“相似性分数 $\geq 0.8$ ”的成分预测靶标,作为候选靶标。TCMIP V2.0采用二维结构(.mol或.sdf)进行相似性比对,以 Tanimoto 系数定义的相似度计量方法进行相似性评分,并与美国食品药品监督管理局(FDA)上市药品的化学结构进行比对<sup>[9]</sup>。

### 1.3 蛋白互作网络(PPI)

TCMIP V2.0 镶嵌了 HAPPI, Reactome, molecular interaction database(MINT),online predicted human interaction database(OPHID),database of interacting proteins(DIP)等数据库中的PPI数据,可直接获得“桃仁-红花-川芎”药组的潜在靶标与脑卒中疾病靶标间的PPI<sup>[10]</sup>。

### 1.4 中医药关联网络构建与关键网络靶标基因功能挖掘分析

在 TCMIP V2.0“中医药关联网络挖掘”项下建立“桃仁-红花-川芎”药组作用的潜在靶标与脑卒中疾病靶标间的PPI,通过计算网络节点连接度、节点介度和节点紧密度,筛选核心节点基因,作为“桃仁-红花-川芎”药组治疗脑卒中的关键靶标网络。根据中药、化学成分、核心靶标、通路、疾病间的关联性,构建中药多维关联网络,筛选“桃仁-红花-川芎”药组关键网络靶标基因显著参与的生物学反应、所行使分子功能及其所在细胞内定位。基于 Drugbank, onlinemendelian inheritance in man(OMIM), human phenotype ontology(HPO), gene ontology(GO), therapeutic target database(TTD)及基因相关性数据库(DisGeNET)等数据库对“桃仁-红花-川芎”药组的预测靶标进行基因功能分析和通路富集分析,利用 Reactome 数据库的 Pathway 信息,筛选“桃仁-红花-川芎”药组关键网络靶标基因显著参与的分子通路;利用 ETCM 数据库的疾病和表型

数据库,筛选“桃仁-红花-川芎”药组关键网络靶标基因显著相关的疾病和表型。最终构建“中药-活性成分-关键核心靶标-通路”多层次网络关联图<sup>[11-12]</sup>。

### 1.5 主要活性物质与靶点的分子对接

采用 Sybyl-X7.3 软件中的 Surflex-Dock 程序,将“桃仁-红花-川芎”药组主要活性物质与细胞外信号调节蛋白激酶2(ERK2)、Janus 激酶2(JNK2)进行对接,验证此药组治疗脑卒中的药效物质基础。

## 2 结果

### 2.1 靶点预测结果

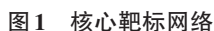
靶标预测及功能分析结果共得到化学成分 121 种,包括桃仁 3 种,红花 46 种,川芎 72 种,主要为有机酸、甾醇类、黄酮类、糖苷类、挥发油类、生物碱类、酯类等。为保证靶标预测结果的可信度,设定桃仁、红花、川芎中化学成分与 FDA 上市药物间的相似性分数 $\geq 0.8$ ,得到三者的靶标数目分别为 90,426,358 个。其中,上述 3 种药材共有靶标 14 个,包括一氧化氮合酶(NOS)及 CSNK2A1, FabZ, NQO2, NR1H2, AKT1, NCOA1, NCOA2, ESR1, ESR2, GLTP, CBR1, SHBG, AHR。

基因功能分析和通路富集分析结果显示,候选靶标基因功能涉及氧化还原过程,离子传输、类固醇激素介导的信号通路、脂质代谢过程,细胞内受体信号通路、神经系统的过程,心肌细胞动作电位参与心肌收缩、类固醇代谢过程,化学突触传递、钙离子传输与导入等生物学过程。中药候选靶标通路富集分析结果显示,涉及通路有核受体转录途径、氨基丁酸(GABA)受体激活、叶酸代谢、胆汁酸和盐的循环利用、胰岛素分泌调节、突触前去极化和钙通道开放、外源性物质等通路。

### 2.2 核心靶标网络分析

共得到 62 个与脑卒中及药物相关核心网络靶标,其中 27 个靶标与药物相关,35 个靶标与疾病相关。利用 PPI 构建核心靶标网络图(见图 1),平台设定同时满足大于节点连接度、节点介度、节点紧密度的中位数为卡值。得到关键核心靶标 25 个,包括 HSP90AA1, AR, AKT1, CALM1, NFKB1, ESR1 等;已知疾病靶标 11 个,包括 NR3C1, LIMK1, VHL, JAK2, HIF1A, APP, SMAD4, GTF2I, GTF2IRD1, FLNA, NOTCH3;药物与疾病共有靶标 2 个,包括 NR3C1 和 APP。闫宇翔等<sup>[13]</sup>从基因整体层面研究发现, NR3C1 与心血管疾病危险因素间存在相关性。APP 致病变体或重复会导致脑淀粉样血管病的发生,引发原发性非创伤性脑出血。HSP90AA1 与抑郁症有关<sup>[14]</sup>,可通过调节 HSP90AA1 的表达水平来抑制脑卒中后抑郁。AKT1 能介导心血管疾病,促进血管内皮生长因子(VEGF)分泌,并介导内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)的磷酸化过程<sup>[15]</sup>。因此, AKT1 可能在许多心血





**Fig. 1** Network of key targets

### 2.3 药组治疗脑卒中基因功能及通路信息分析

介导的血管通透性等条目。如通过BH<sub>4</sub>的合成、回收及调控,增加eNOS的活性,抑制缺血再灌注引起的损伤<sup>[18]</sup>。缺血性脑损伤的发生与SUMO化有关<sup>[19-20]</sup>; VEGFR-2可调控血管内皮细胞的增殖、迁移、存活和通透性,促进脑组织缺血区域再灌注<sup>[21]</sup>。

上述靶标功能和分子通路多数与神经系统、循环系统、内分泌系统、免疫系统有关。现代医学研究发现,神经-内分泌-免疫网络系统调节功能的表达异常,导致神经系统、内分泌系统、免疫系统功能异常<sup>[22]</sup>,从而导致脑卒中发生。

## 2.4 网络可视化图分析

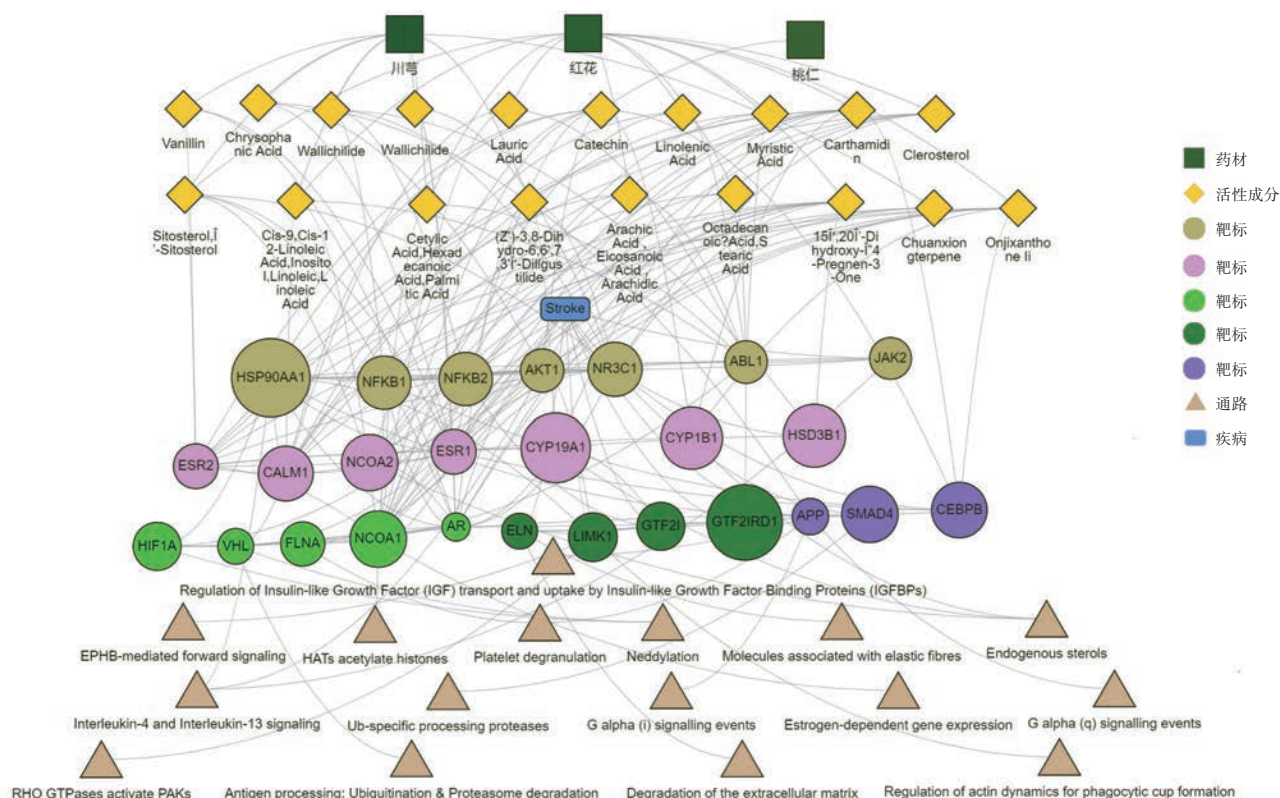
运用整合药理学平台获得了“桃仁-红花-川芎”药组治疗脑卒中的核心靶标,推测“桃仁-红花-川芎”药组可能通过作用于药物与疾病共有靶标而发挥

表1 “桃仁-红花-川芎”药组治疗脑卒中的靶标与疾病靶标基因功能列表

**Tab.1** List of targets and disease target gene functions of "Persicae Semen – Carthami Flos – Chuanxiong Rhizoma" drug group in the treatment of stroke

| 条目(中英文)                                                   | 数目 | <i>P</i> 值  |
|-----------------------------------------------------------|----|-------------|
| positive regulation of nitric – oxide synthase activity   | 4  | 1. 81E – 08 |
| positive regulation of nitric oxide biosynthetic process  | 4  | 2. 44E – 07 |
| apoptotic process                                         | 9  | 2. 72E – 07 |
| negative regulation of gene expression                    | 6  | 1. 10E – 06 |
| positive regulation of transcription by RNA polymerase II | 10 | 1. 37E – 06 |
| regulation of nitric – oxide synthase activity            | 3  | 2. 78E – 06 |
| negative regulation of apoptotic process                  | 7  | 1. 07E – 05 |
| regulation of gene expression                             | 5  | 1. 14E – 05 |
| transcription by RNA polymerase II                        | 5  | 3. 78E – 06 |
| intracellular receptor signaling pathway                  | 3  | 2. 02E – 05 |
| signal transduction                                       | 11 | 2. 07E – 05 |

**Tab.2 List of molecular pathways of "Persicae Semen – Carthami Flos – Chuanxiong Rhizoma" drug group in the treatment of stroke**



**Fig. 2 Multi – dimensional network of "traditional Chinese medicine – active ingredients – key targets – pathways"**

管炎症,也可抑制血小板黏附及血栓形成,扩张血管<sup>[24-25]</sup>。川芎嗪通过调节凝血、纤溶系统,调控血小板活化、神经活性配体-受体相互作用等信号通路发挥治疗缺血性脑卒中的作用<sup>[26]</sup>;川芎嗪、阿魏酸能保护脑卒中缺血后的急性损伤<sup>[27]</sup>。红花素可通过抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡通路,减少血小板聚集和黏附,发挥防治心血管疾病的作用<sup>[28]</sup>;何新康等<sup>[29]</sup>给予脑缺血再灌注模型大鼠腹腔注射不同剂量红花素,结果显示,红花素对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。亚麻酸可通过增加缺血区局部的血流量,减轻脑组织缺血坏死的程度,提高脑缺血后的存活率<sup>[23,30]</sup>。

从 Protein Data Bank(PDB)<sup>[31]</sup>数据库中下载 ERK2



和JNK2蛋白晶体结构,分别提取2个靶点蛋白晶体结构的配体,暴露活性位点及除结晶水、加氢和除侧链的残基后;采用AMBER7 FF99力场能量优化;使用Surflex-Dock程序对接分子<sup>[32]</sup>,与筛选得到的“桃仁-红花-川芎”药组中主要活性成分进行对接,得到化合物与核心靶点对接后的均方根偏差值(RMSD)。当 $RMSD \leq 2.0 \text{ \AA}$ 时<sup>[33]</sup>,说明该对接方法能较好地重现出配体受体原来的结合模式,验证了对接参数设置的合理性。主要活性成分与靶蛋白的对接结果见表3。可知,“桃仁-红花-川芎”药组中主要活性成分儿茶素、川芎嗪、阿魏酸、红花素、亚麻酸与ERK2和JNK2均对接成功,推测“桃仁-红花-川芎”药组确有治疗脑卒中的作用。对其活性成分进行文献验证,发现预测出的活性分子,如儿茶素<sup>[24-25]</sup>、川芎嗪<sup>[26-27]</sup>、阿魏酸<sup>[27]</sup>、红花素<sup>[28-29]</sup>、亚麻酸<sup>[23,30]</sup>等活性分子确属治疗脑卒中的有效物质,验证了本研究方法的合理性与可靠性。

表3 主要活性成分与靶蛋白对接结果

Tab. 3 Docking results of main active ingredients and target proteins

| 序号 | 化合物名称 | RMSD值(Å) |      |
|----|-------|----------|------|
|    |       | ERK2     | JNK2 |
| 1  | 儿茶素   | 1.24     | 1.06 |
| 2  | 川芎嗪   | 0.98     | 0.81 |
| 3  | 阿魏酸   | 1.03     | 1.21 |
| 4  | 红花素   | 0.86     | 0.69 |
| 5  | 亚麻酸   | 1.18     | 1.35 |

### 3 讨论

“桃仁-红花-川芎”作为龙生蛭胶囊中的活血破瘀药组,治疗脑卒中疗效显著<sup>[34]</sup>。本研究中共预测得到活性成分19个,核心网络靶标62个,其中药物靶标27个,疾病靶标35个,疾病与药物共有靶标2个;其药效物质基础主要为生物碱类、挥发油类、黄酮类、有机酸类等成分。采用分子对接技术进行的虚拟筛选结果表明,“桃仁-红花-川芎”药组中的主要活性成分易与ERK2和JNK2形成较好的对接模式与较高的亲和力,具有治疗脑卒中的活性,也证实了TCMIP V2.0在预测中药及复方作用机制方面的可靠性。

TCMIP V2.0数据源于ETCM中医百科全书数据库,包括中药数据库、中药化学成分数据库、中药靶标数据库、疾病相关分子库等。设置了3种拓扑结构特征值节点连接度、节点介度、节点紧密度,以确定中药矫正疾病失衡网络的候选靶标。通过基因功能分析和通路富集分析,确定靶标基因的生物學功能及其所参与的生物學通路。本研究借助TCMIP V2.0,以龙生蛭胶囊中的“桃仁-红花-川芎”药组为研究对象,初步阐明了此活血化瘀药组治疗脑卒中的作用机制,为龙生

蛭胶囊的进一步深入研究提供了理论及数据支持。但本研究结果是基于网络大数据所做的预测,还需通过进一步研究加以验证。

### 参考文献

- [1] 陈健. 生存分析与病证结合评价在活血法治疗急性脑梗死的应用[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [2] 张克英. tDCS对缺血性脑卒中大鼠运动功能康复的促进作用及机制研究[D]. 西安:中国人民解放军空军军医大学,2018.
- [3] 孙晓丽,王勇,刘俊杰,等. 龙生蛭胶囊对脑卒中大鼠行为学的影响及脑组织的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(24):23-29.
- [4] 许筱凤,李婷,王一涛,等. 桃仁的研究进展[J]. 中草药, 2015,46(17):2649-2655.
- [5] 徐如英,童树洪. 红花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药业,2010,19(20):86-87.
- [6] 李海刚,胡晒平,周意,等. 川芎主要药理活性成分药理研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2018,23(11):1302-1308.
- [7] 冯桂玲. 褚玉霞教授学术思想及运用活血化瘀法经验总结[D]. 郑州:河南中医学院,2010.
- [8] XU HY, ZHANG YQ, LIU ZM, et al. ETCM: An encyclopedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [9] 崔如意,许海玉. 基于TCMIP V2.0人参治疗心衰质量标志物研究[J]. 中草药,2019,50(19):4628-4633.
- [10] ZHANG YQ, MAO X, SU J, et al. A network pharmacology-based strategy deciphers the underlying molecular mechanisms of Qixuehe Capsule in the treatment of menstrual disorders[J]. Chin Med,2017,12(1):23.
- [11] YU GH, ZHANG YQ, REN WQ, et al. Network pharmacology-based identification of key pharmacological pathways of Yin-Huang-Qing-Fei capsule acting on chronic bronchitis[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2016,12:85-94.
- [12] 许海燕,彭修娟,陈衍斌,等. 基于网络药理学的“柴胡-黄芩”药对治疗糖尿病的“理法-方药-成分-靶标-活性”关联研究[J]. 药学报,2018,53(9):1414-1421.
- [13] 闫宇翔,董晶,刘佑琴,等. NR3C1基因多态性与心血管疾病危险因素相关性[J]. 中国公共卫生,2015,31(4):385-389.
- [14] 陈凡,叶俊梅,张玉彬. Akt在心血管疾病中的调控作用[J]. 药学研究,2018,37(5):291-294.
- [15] 丁屹,蔡鋈鑫,厉廷有. 神经型一氧化氮合酶竞争性底物抑制剂的研究进展[J]. 中国新药杂志,2015,24(24):2814-2825.
- [16] 王永亭,曾丽莉,吕海燕,等. 缺血性卒中病因学与发病机制研究的十年进展[J]. 中国现代神经疾病杂志,2010,10(1):2-27.
- [17] 王卓飞,陈锦文,铁璐,等. 四氢生物蝶呤的合成及其生物學功能[J]. 生理科学进展,2015,46(4):259-264.
- [18] 刘艳丽,余春晓,汤海霞,等. 小泛素样修饰(SUMO)与心血管