

中图分类号: R93; R743.3 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)06-0040-09
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.06.010



丹参-当归治疗缺血性脑卒中作用机制网络药理学研究*

王红^{1,2}, 蒋征³, 刘玲^{1,2}, 付媛媛^{1,2}, 崔永伟^{1,2}, 瞿城^{3△}

(1. 江苏省中西医结合医院南部院区·南京市溧水区中医院药学部, 江苏 南京 211200; 2. 扬州大学医学院附属医院药学部, 江苏 南京 211200; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 探讨丹参-当归治疗缺血性脑卒中(CIS)的潜在作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、Swiss TargetPrediction 数据库获取丹参和当归的活性成分及作用靶点,并通过检索 PubMed、中国知网相关文献进行补充;通过 GeneCards、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、DisGeNET 数据库获取 CIS 的潜在靶点;将丹参-当归治疗 CIS 的共有靶点导入 String 11.0 平台,构建活性成分与疾病靶点蛋白的蛋白相互作用(PPI)网络,利用 Cytoscape 3.8.2 软件构建疾病-药物-活性成分-靶点可视化网络;将共有靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体论(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并利用 Cytoscape 3.8.2 软件构建活性成分-核心靶点-通路网络;利用 AutoDock 软件对疾病-药物-活性成分-靶点网络中中度值排名前 6 的核心靶点和活性成分进行分子对接验证。结果 共检索到 82 种活性成分,其中丹参 65 个、当归 17 个,潜在作用靶点 787 个,疾病靶点 671 个,共有靶点 76 个。度值排名前 6 的活性成分为丹参醇 B、丹参新醌 D、木犀草素、阿魏酸、蒙本内酯、丹参酮 II_A,核心靶点为 MAPK14, MAPK1, AKT1, PTGS2, EGFR, JAK2。共获得 GO 功能条目 2 545 个,其中生物学过程 2 244 个,细胞组成 128 个,分子功能 173 个,分别涉及对脂多糖的反应、膜筏、内肽酶活性等;KEGG 信号通路 152 条,主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、钙信号通路等。分子对接结果证明了 6 种活性成分与其相应核心靶点均有较好的结合活性。结论 丹参-当归治疗 CIS 具有多成分-多靶点-多通路的调控特点,其作用机制可能与抗炎、抗氧化应激、抗神经细胞凋亡、调节自噬功能等有关。

关键词: 丹参; 当归; 药对; 缺血性脑卒中; 作用机制; 网络药理学; 分子对接技术

Mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Angelicae Sinensis Radix* in the Treatment of Cerebral Ischemic Stroke Based on Network Pharmacology

WANG Hong^{1,2}, JIANG Zheng³, LIU Ling^{1,2}, FU Yuanyuan^{1,2}, CUI Yongwei^{1,2}, QU Cheng³

(1. Department of Pharmacy, The South Part of Jiangsu Province Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine · Lishui District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 211200; 2. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Yangzhou University Medical College, Nanjing, Jiangsu, China 211200; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210046)

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Angelicae Sinensis Radix* in the treatment of cerebral ischemic stroke (CIS). **Methods** The active ingredients and targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Angelicae Sinensis Radix* were obtained by the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Swiss TargetPrediction database, and relevant literature in the PubMed and CNKI were searched for supplementary analysis. The potential targets of CIS were obtained by the GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and DisGeNET databases. The common targets of active ingredients in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Angelicae Sinensis Radix* and CIS were imported into the String 11.0 platform to construct a protein-protein interaction (PPI) network, and a disease-drug-active ingredient-target visualization network was constructed by the Cytoscape 3.8.2 software. The common targets were imported into the DAVID database for Gene Ontology (GO) functional enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and an active ingredient-core target-pathway network was constructed by the Cytoscape 3.8.2 software. The top six core targets and active ingredients with high degree in the disease-drug-active ingredient-target network were selected for molecular docking verification by the AutoDock software. **Results** A total of 82 active ingredients (65 from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, 17 from *Angelicae Sinensis Radix*), 787 potential targets, 671 disease targets and 76 common targets were obtained. The top six active ingredients with high degree were tanshinol B, danshenxinkun D, luteolin, ferulic acid, ligustilide and tanshinone II_A, the top six core targets were MAPK14, MAPK1, AKT1, PTGS2, EGFR and JAK2. A total of 2 545 GO functional entries were obtained, including 2 244 biological processes, 128 cellular compositions and 173 molecular functions, involving response to lipopolysaccharide, membrane raft, endopeptidase activity and so on respectively. A total of

* 基金项目: 国家自然科学基金[82204597]; 南京市中医药青年人才培养计划项目[ZYZQ20059]; 南京药学会-常州四药医院药学科研基金[2019YX023]; 南京市中医药科技专项中医药青年人才项目[ZYZQN202209]。

第一作者: 王红, 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为中药品质评价与临床用药安全, (电子信箱) wanghong198942@126.com。

△通信作者: 瞿城, 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药质量评价和中药药效物质基础研究, (电子信箱) qucheng@njucm.edu.cn。

152 KEGG signaling pathways were obtained, mainly involving PI3K - Akt signaling pathway, lipid and atherosclerosis, calcium signaling pathway and so on. The molecular docking showed that six active ingredients had good binding energies with their corresponding core targets. **Conclusion** Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix in the treatment of CIS has the characteristics of multiple - ingredients, multiple - targets and multiple - pathways regulation. Its mechanism may be related to the anti - inflammatory, antioxidant stress, anti - neuronal apoptosis and autophagy function regulation.

Key words: Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; Angelicae Sinensis Radix; drug pair; cerebral ischemic stroke; mechanism; network pharmacology; molecular docking technology

缺血性脑卒中(CIS)常表现为平衡或协调能力的丧失、口眼喎斜、言语困难,甚至突然晕倒,意识障碍等^[1]。由于溶栓时间窗及溶栓风险等原因,西医治疗存在一定局限。中医称CIS为“中风”,认为瘀血存在于中风发生的各个时期,血虚血瘀是中风发病过程中的致病因素,现代中医多从该角度来治疗,如使用活血化瘀药治疗能取得良好效果^[2-3]。丹参-当归药对为常见的活血化瘀类药物,两者一温一凉,相使配伍,具有活血化瘀、益气强心、通脉止痛功效,常用于治疗血瘀血虚诸证,也是经典复方活络效灵丹的重要组方药材^[4]。现代药理学研究表明,丹参主要含有丹酚酸类、丹参酮类成分,具有保护心脑血管系统、抗炎、抗氧化、清除自由基等药理作用^[5];当归中主要含有挥发油、有机酸类成分,能保护心脑血管、增强造血功能、提高免疫功能等药理作用^[6]。王灿等^[7]研究发现,补虚药(当归)及活血化瘀药(丹参)出现频次较高;王佳楠^[8]的研究发现,丹参、当归为对脑卒中治疗效果影响较大的核心药物。但由于中药成分和治疗靶点的多样性与复杂性,丹参-当归治疗CIS的药效物质、生物过程及分子机制尚未明晰。网络药理学可通过构建“药物-疾病-靶点-通路”网络预测药物治疗疾病的作用机制^[9],符合中医治病的整体观念与辨证论治特点,与中药多成分、多途径、多靶点的作用机制相吻合。分子对接技术可为探究中药药效物质基础和作用机制提供可行的思路与方法^[10]。因此,本研究中采用中药网络药理学,筛选丹参-当归中的活性成分,预测治疗CIS的作用靶点及信号通路,并以分子对接技术进行验证,为治疗CIS的药物研发和指导临床用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 活性成分筛选和作用靶点预测

检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),设置口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18,获取丹参和当归的主要活性成分及作用靶点,并通过PubMed、中国知网等数据库查询文献补充活性成分及其作用靶点,使用Swiss TargetPrediction数据库补充各活性成分的作用靶点。以Uniprot蛋白质数据库(<http://ebi14.uniprot.org>)对所有靶点信息进行标准化和去重。

1.2 CIS疾病靶点的获取

利用人类基因数据库(GeneCards, <http://www.genecards.org>)、人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)、DisGeNET(<http://www.Disgenet.org/>)数据库,以“Cerebral ischemic stroke / CIS”或“cerebral infarction / CI”为关键词,检索CIS的潜在靶点。汇总各数据库获得的疾病靶点,去重后得到CIS疾病靶点。

1.3 共有靶点的获取与蛋白相互作用(PPI)网络构建

将1.1项下筛选得到的活性成分作用靶点与1.2项下筛选的CIS疾病靶点取交集,即得丹参-当归治疗CIS的共有靶点,并利用Venny 2.1.0工具制作维恩图。将共有靶点上传至String 11.0平台,生物种类选定“homo sapiens”,选择高度可信(high confidence)的互相作用阈值(设为0.9),默认其他设置,所得靶点通过Cytoscape 3.2.8进行可视化处理,构建PPI网络。

1.4 疾病-药物-活性成分-靶点网络构建

运用Cytoscape 3.8.2软件将获得的数据进行可视化处理,构建丹参-当归治疗CIS的疾病-药物-活性成分-靶点的可视化网络。在可视化网络中,每个数据即为1个节点,其度(Degree)值越高参与度越高,可信性越强。

1.5 富集分析

将共有靶点导入DAVID数据库,分别进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。功能富集通过细胞成分(CC)、生物学过程(BP)、分子功能(MF)3个维度来解释和注释基因,筛选条件为 $P < 0.01$;根据通路富集结果获得相应的 P 值,选择 $P \leq 0.01$ 作为聚类标准,筛选排名前25的通路。最后将丹参-当归治疗CIS的核心靶点、核心靶点密切相关的活性成分及KEGG富集得到的通路导入Cytoscape 3.8.2软件中,构建活性成分-核心靶点-通路网络。

1.6 分子对接

采用AutoDock Tools软件对疾病-药物-活性成分-靶点网络中度值排名前6的靶点蛋白和活性成分进行分子对接验证。首先通过PubChem数据库和ChemBioOffice软件获得活性成分的3D结构,并将其保存为.mol2格式;其次运用PDB(<http://www.rcsb.org/>)

数据库检索核心靶点的 3D 结构,利用 PyMOL 软件去除水分子,分离得到的蛋白及配体经 Autodock 软件处理保存为 .pdbqt 格式;最后使用 Autodock Vina 软件进行分子对接。

2 结果
2.1 丹参 – 当归药对活性成分及作用靶点筛选
共检索到活性成分 82 个,其中丹参 65 个、当归 17 个,详见表 1。丹参对应 716 个靶点,当归对应 401 个

表 1 丹参 – 当归的活性成分
Tab.1 Active ingredients of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma – Angelicae Sinensis Radix

序号	来源	MOL ID	活性成分	OB(%)	DL	序号	来源	MOL ID	活性成分	OB(%)	DL
1	丹参	MOL001601	1,2,5,6 – tetrahydrotanshinone	38.75	0.36	32	丹参	MOL007088	cryptotanshinone	52.34	0.40
2	丹参	MOL001659	poriferasterol	43.83	0.76	33	丹参	MOL007093	dan – shexinkum d	38.88	0.55
3	丹参	MOL001771	poriferast – 5 – en – 3β – ol	36.91	0.75	34	丹参	MOL007094	danshenspiroketallactone	50.43	0.31
4	丹参	MOL001942	isoperatorin	45.46	0.23	35	丹参	MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	49.4	0.29
5	丹参	MOL002222	sugiol	36.11	0.28	36	丹参	MOL007100	dihydrotanshinlactone	38.68	0.32
6	丹参	MOL002651	dehydrotanshinone II _A	43.76	0.40	37	丹参	MOL007101	dihydrotanshinone I	45.04	0.36
7	丹参	MOL002776	baicalin	40.12	0.75	38	丹参	MOL007105	epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31
8	丹参	MOL000569	digallate	61.85	0.26	39	丹参	MOL007107	C09092	36.07	0.25
9	丹参	MOL000006	luteolin	36.16	0.25	40	丹参	MOL007108	isocryptotanshi – none	54.98	0.39
10	丹参	MOL006824	α – amylin	39.51	0.76	41	丹参	MOL007111	Isotanshinone II	49.92	0.40
11	丹参	MOL007036	5,6 – dihydroxy – 7 – isopropyl – 1,1 – dimethyl – 2,3 – dihydrophenanthren – 4 – one	33.77	0.29	42	丹参	MOL007115	manool	45.04	0.20
12	丹参	MOL007041	2 – isopropyl – 8 – methylphenanthrene – 3,4 – dione	40.86	0.23	43	丹参	MOL007118	microstegiol	39.61	0.28
13	丹参	MOL007045	3α – hydroxytanshinone II _a	44.93	0.44	44	丹参	MOL007119	miltionone I	49.68	0.32
14	丹参	MOL007048	(E) – 3 – [2 – (3,4 – dihydroxyphenyl) – 7 – hydroxy – benzofuran – 4 – yl]acrylic acid	48.24	0.31	45	丹参	MOL007120	miltionone II	71.03	0.44
15	丹参	MOL007049	4 – methylenemiltirone	34.35	0.23	46	丹参	MOL007121	miltipolone	36.56	0.37
16	丹参	MOL007050	2 – (4 – hydroxy – 3 – methoxyphenyl) – 5 – (3 – hydroxypropyl) – 7 – methoxy – 3 – benzofuran – carboxaldehyde	62.78	0.40	47	丹参	MOL007122	miltirone	38.76	0.25
17	丹参	MOL007051	6 – o – syringyl – 8 – o – acetyl shanzhiside methyl ester	46.69	0.71	48	丹参	MOL007123	miltirone II	44.95	0.24
18	丹参	MOL007058	formyltanshinone	73.44	0.42	49	丹参	MOL007124	neocryptotanshinone II	39.46	0.23
19	丹参	MOL007059	3 – β – Hydroxymethyllenetanshinquinone	32.16	0.41	50	丹参	MOL007125	neocryptotanshinone	52.49	0.32
20	丹参	MOL007061	methylenetanshinquinone	37.07	0.36	51	丹参	MOL007127	1 – methyl – 8,9 – dihydro – 7H – naphtho[5,6 – g]benzofuran – 6,10,11 – trione	34.72	0.37
21	丹参	MOL007063	przewalskin a	37.11	0.65	52	丹参	MOL007130	prolithospermic acid	64.37	0.31
22	丹参	MOL007064	przewalskin b	110.32	0.44	53	丹参	MOL007132	(2R) – 3 – (3,4 – dihydroxyphenyl) – 2 – [(Z) – 3 – (3,4 – dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy – propionic acid	109.38	0.35
23	丹参	MOL007068	przewaquinone B	62.24	0.41	54	丹参	MOL007140	(Z) – 3 – [2 – [(E) – 2 – (3,4 – dihydroxyphenyl)vinyl] – 3,4 – dihydroxy – phenyl] – 3,4 – acrylic acid	88.54	0.26
24	丹参	MOL007069	przewaquinone c	55.74	0.40	55	丹参	MOL007141	salvianolic acid g	45.56	0.61
25	丹参	MOL007070	(6S,7R) – 6,7 – dihydroxy – 1,6 – dimethyl – 8,9 – dihydro – 7H – naphtho[8,7 – g]benzofuran – 10,11 – dione	41.31	0.45	56	丹参	MOL007142	salvianolic acid j	43.38	0.72
26	丹参	MOL007071	przewaquinone f	40.31	0.46	57	丹参	MOL007143	salvilenone I	32.43	0.23
27	丹参	MOL007077	sclareol	43.67	0.21	58	丹参	MOL007145	salviolone	31.72	0.24
28	丹参	MOL007079	tanshinaldehyde	52.47	0.45	59	丹参	MOL007149	NSC 122421	34.49	0.28
29	丹参	MOL007081	danshenol B	57.95	0.56	60	丹参	MOL007150	(6S) – 6 – hydroxy – 1 – methyl – 6 – methylol – 8,9 – dihydro – 7H – naphtho[8,7 – g]benzofuran – 10,11 – quinone	75.39	0.46
30	丹参	MOL007082	danshenol A	56.97	0.52	61	丹参	MOL007151	tanshindiol B	42.67	0.45
31	丹参	MOL007085	salvilenone	30.38	0.38	62	丹参	MOL007152	przewaquinone E	42.85	0.45
						63	丹参	MOL007154	tanshinone II _A	49.89	0.40

续表 1 丹参 – 当归的活性成分

Continued Tab. 1 Active ingredients of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma – Angelicae Sinensis Radix											
序号	来源	MOL ID	活性成分	OB(%)	DL	序号	来源	MOL ID	活性成分	OB(%)	DL
64	丹参	MOL007155	(6S) – 6 – (hydroxymethyl) – 1,6 – dimethyl – 8,9 – dihydro – 7H – naphtho[8,7 – g]benzo-furan – 10,11 – dione	65.26	0.45	73	当归	MOL000433	folic acid	68.96	0.71
						74	当归	MOL002201	cis – ligustilide	51.30	0.07
						75	当归	MOL002098	3 – butylidene – 7 – hydroxyphthalide	62.68	0.08
65	丹参	MOL007156	tanshinone VI	45.64	0.30	76	当归	MOL002208	senkyunolide A	26.56	0.07
66	当归	MOL000358	β – sitosterol	36.91	0.75	77	当归	MOL002143	senkyunolide C	46.80	0.08
67	当归	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	78	当归	MOL002145	senkyunolide E	34.40	0.08
68	当归	MOL000414	caffeic acid	54.97	0.05	79	当归	MOL002099	senkyunolide K	61.75	0.08
69	当归	MOL000360	ferulic acid	39.56	0.06	80	当归	MOL002143	senkyunolide I	46.80	0.08
70	当归	MOL001955	chlorogenic acid	11.93	0.33	81	当归	MOL008287	(3E) – 3 – butylidene – 7 – hydroxy – 2 – benzo-furan – 1 – one	42.17	0.08
71	当归	MOL008288	coniferyl ferulate	4.54	0.39						
72	当归	MOL004792	nodakenin	57.12	0.69	82	当归	MOL011782	riligustilide	23.50	0.07

靶点,去除重复靶点,得到潜在作用靶点 787 个。

2.2 共有靶点筛选

检索 GeneCards 数据库得 CIS 疾病靶点 752 个, OMIM 数据库 131 个, DisGeNET 数据库 10 个,去重后得 671 个,丹参 – 当归治疗 CIS 的共有靶点 76 个,详见图 1。

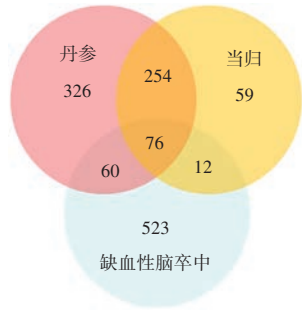


图 1 丹参 – 当归活性成分作用靶点与 CIS 潜在靶点维恩图
Fig. 1 Venn diagram of targets of active ingredients in Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma – Angelicae Sinensis Radix and potential targets of CIS

2.3 疾病 – 药物 – 活性成分 – 靶点网络构建

疾病 – 药物 – 活性成分 – 靶点网络见图 2(图中, 圆形代表药物与疾病的共有靶点,其中紫色代表丹参与当归共同作用的靶点;菱形代表活性成分)。该网络由 232 个节点和 1 016 条边组成,其中节点分别包括 148 个靶点、2 种药物和 82 种活性成分。以度值作为判别重要成分的指标,使用 Cytoscape 中的 Network Analyzer 工具分析网络拓扑参数,关联靶点数排名前 6 的活性成分为丹参醇 B(丹参)、丹参新醌 D(丹参)、木犀草素(丹参)、阿魏酸(当归)、藁本内酯(当归)、丹参酮 II_A(丹参)。

2.4 PPI 网络构建及核心靶点分析

共有 111 个节点和 544 条边代表靶点间的相互作用关系,平均度值为 4.99,PPI 网络见图 3。根据度值将核心靶点进行排序,初步得到丹参 – 当归治疗 CIS 中发挥重要作用的前 10 个靶点为 MAPK14,MAPK1,AKT1,PTGS2,EGFR,JAK2,VEGFA,ITGB3,MAPK3,ESR1。

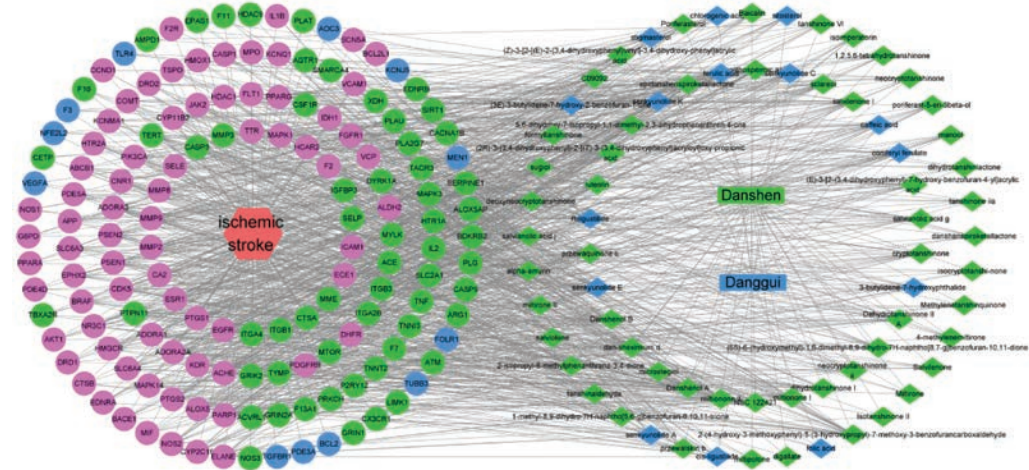


图 2 疾病 – 药物 – 活性成分 – 靶点网络
Fig. 2 Network of disease – drug – active ingredient – target

2.5 富集分析

GO功能富集:共获得2 545个条目。其中BP 2 244个, CC 128个, MF 173个;各选取排名前10的条目进行可视化分析,结果见图4。其中BP主要涉及对脂多糖的反应,对细菌来源分子的反应,细胞对化学应激的反应,对氧气水平的反应,化学突触传递的调节等;靶点蛋白主要存在于膜筏、膜微区、膜区、囊泡腔等CC中;与内肽酶、丝氨酸水解酶、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶、金属离子跨膜转运器、通路的活性及蛋白酶、磷酸酶、生长因子、酰胺的结合等MF关系密切。

KEGG通路富集:共得到152条信号通路,根据P值按筛选前25个通路制作气泡图,结果见图5。可见,丹

参-当归药对可能通过PI3K-Akt信号通路、脂质和动脉粥样硬化、钙信号通路、Rap1信号通路、神经活性配体-受体相互作用等发挥治疗CIS的作用。活性成分-核心靶点-通路网络见图6(图中,菱形代表活性成分,平行四边形代表作用靶点,其他节点代表信号通路)。丹参-当归药对治疗CIS是多种活性成分作用于多个靶点并参与不同信号通路的结果。

2.6 分子对接

一般认为,受体和配体的结合能数值越小,两者结合越牢固,化学性质越稳定。当结合能小于-5.0 kcal(-20.92 kJ/mol)时,两者之间有良好的结合活性;当结合能小于-7.0 kcal(-29.29 kJ/mol)时,两者之间

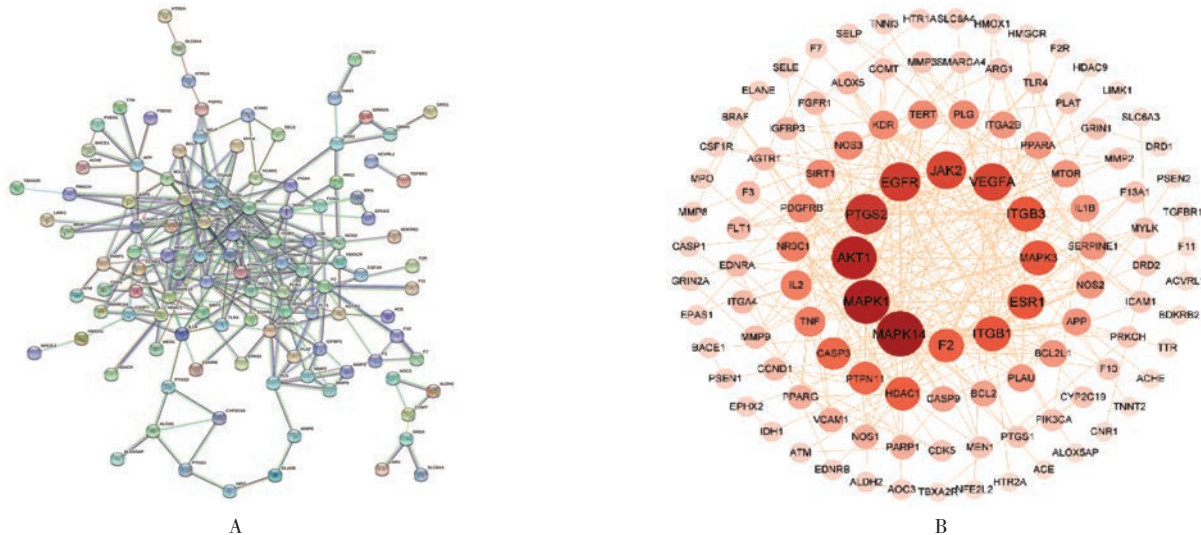


图3 丹参-当归治疗CIS的共有靶点PPI网络

Fig. 3 PPI network of common targets of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix in the treatment of CIS

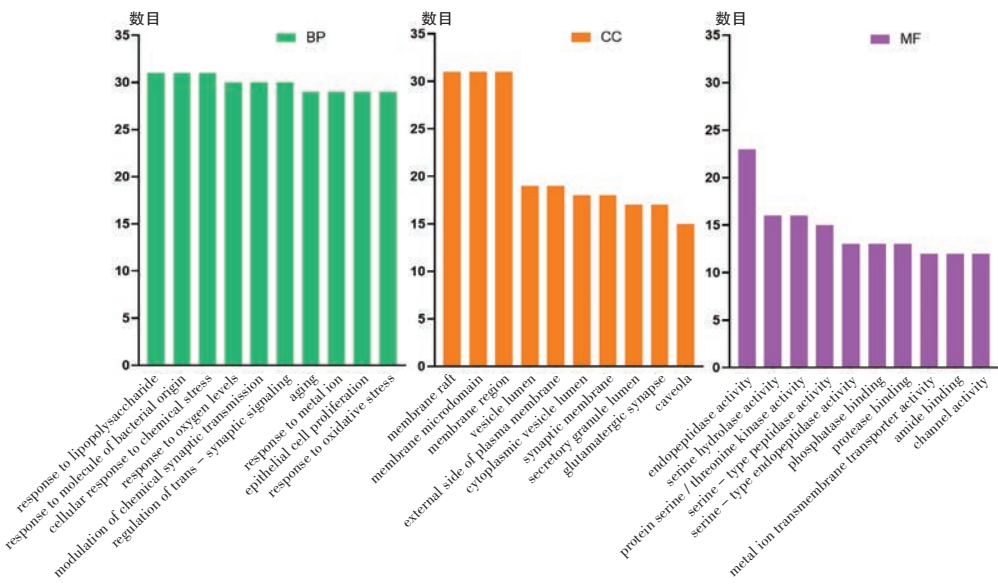


图4 丹参-当归治疗CIS的GO功能富集分析柱状图

Fig. 4 Histogram of GO functional enrichment analysis of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix in the treatment of CIS

有强烈的结合活性^[11]。将度值排名前6的核心靶点与关联靶点数排名前6的活性成分进行分子对接,发现丹参-当归药对中的活性成分与对应的核心靶点均有较好的结合活性,详见表2、图7。

3 讨论

CIS的病因病机较复杂,涉及神经炎症、能量衰竭、细胞凋亡及自噬等,且各环节相互影响,重叠发生,导致了疾病过程的复杂性。丹参、当归为常见的活血化瘀药材,是张锡纯《医学衷中参西录》中活络效灵丹的重要组成部分,具有活血化瘀、通络止痛功效,可用于脑血栓形成、心绞痛等疾病的治疗^[12]。

本研究表明,按共有靶点统计,丹参醇B、丹参新甾D、木犀草素、阿魏酸、藁本内酯、丹参酮Ⅱ_A对应的靶点较多,考虑为丹参-当归治疗CIS的关键活性成分。其中,木犀草素具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等药理作用,能抑制神经细胞变性,减轻运动和感觉功能障碍。体外试验表明,木犀草素能缓解小胶质细胞激活引起的神经细胞活力减弱,防止氧化应激引起的内皮细胞损伤^[13]。刘

亚鹭等^[14]在大脑中动脉栓塞模型大鼠中发现,阿魏酸在缺血前后、缺血再灌注等不同时间点均能减小梗死区面积,明显下调胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、线粒体Bcl2关联X蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)的表达,调控P38 MAPK / p90RSK / CREB / Bcl-2信号通路,对抗脑神经细胞凋亡。高娟等^[15]发现,藁本内酯可显著改善卒中患者的神经功能缺损,并促进卒中后神经再生。吴倩等^[16]通过建立氧糖剥夺/复糖复氧OGD/R损伤后HT22细胞模型发现,藁本内酯逆转了细胞模型内活性氧(ROS)的释放、钙离子超载及线粒体膜电位的下降等。徐璇等^[17]研究发现,丹参酮Ⅱ_A可增强脑缺血模型大鼠磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)的表达,抑制自噬通路PI3K / Akt / mTOR的表达,起到保护脑组织的作用。丹参醇B和丹参新甾D同属丹参中的二萜类化合物,但其药理作用研究远少于同类成分丹参酮Ⅱ_A,缺少相应的文献考证。

PPI网络拓扑分析筛选出的核心靶点包括MAPK14,

表2 丹参-当归活性成分与核心靶点的分子对接信息

Tab.2 Molecular docking between active ingredients and core targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix*

Sinensis Radix							
靶点名称	PDB ID	活性成分	结合能(kcal)	靶点名称	PDB ID	活性成分	结合能(kcal)
MAPK14	5eti	丹参醇B	-6.9	MAPK1	6g54	丹参醇B	-6.7
		丹参新甾D	-7.3			阿魏酸	-5.4
		藁本内酯	-7.1	EGFR	5gtj	丹参醇B	-9.0
		丹参酮Ⅱ _A	-7.4			丹参新甾D	-8.2
AKT1	2uzr	木犀草素	-6.8			木犀草素	-8.8
		藁本内酯	-7.2			阿魏酸	-6.4
		丹参酮Ⅱ _A	-7.0			丹参酮Ⅱ _A	-8.8
		丹参新甾D	-9.4			丹参新甾D	-8.9
PTGS2	5ikv	木犀草素	-9.6	JAK2	6e2q	藁本内酯	-8.9
		阿魏酸	-6.8			丹参酮Ⅱ _A	-9.5
		丹参酮Ⅱ _A	-8.9				

图5 丹参-当归治疗CIS的KEGG通路富集分析气泡图
Fig.5 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix* in the treatment of CIS

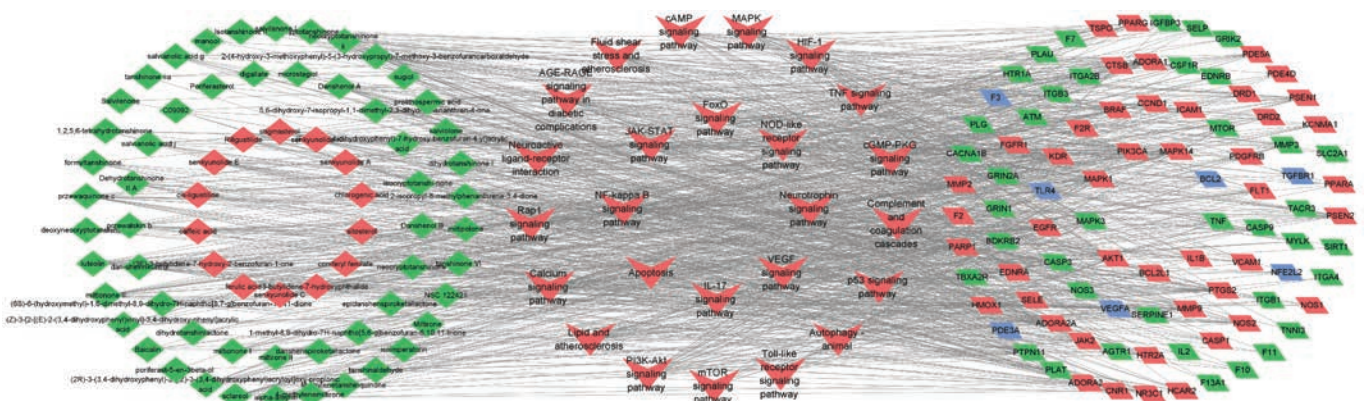
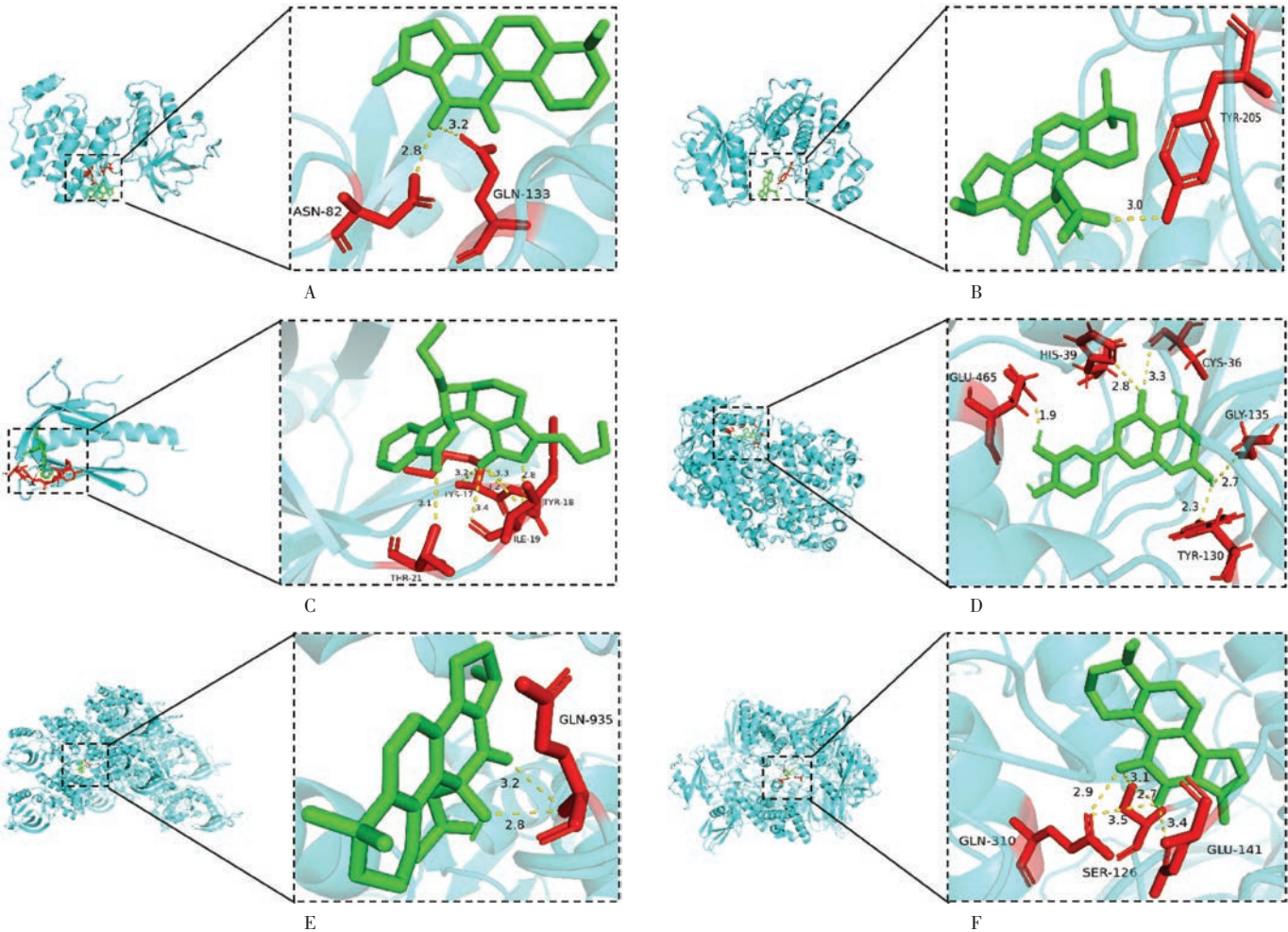


图6 丹参-当归治疗CIS的活性成分-核心靶点-通路网络
Fig.6 Network of active ingredient - core target - pathway of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix* in the treatment of CIS



A. MAPK14 - 丹参酮Ⅱ_A B. MAPK1 - 丹参醇B C. AKT1 - 藜本内酯 D. PTGS2 - 木犀草素 E. EGFR - 丹参醇B
F. JAK2 - 丹参酮Ⅱ_A

图7 丹参-当归治疗CIS活性成分与核心靶点的分子对接模式图

A. MAPK14 - tanshinone II_A B. MAPK1 - tanshinol B C. AKT1 - ligustilide D. PTGS2 - luteolin E. EGFR - tanshinol B
F. JAK2 - tanshinone II_A

Fig.7 Molecular docking between active ingredients and core targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma - Angelicae Sinensis Radix* in the treatment of CIS

MAPK1, AKT1, PTGS2, EGFR, JAK2, VEGFA等。其中,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径普遍存在于生物体内的大多数细胞中,与细胞的增殖、分化、存活、凋亡等生理过程密切相关,MAPK的异常已被证实能导致多种神经系统疾病。MAPK14能控制炎症进展,可阻止促炎细胞因子分泌,并控制抗氧化基因的表达^[14,18]。MAPK1又称ERK2,ERK2的磷酸化在神经轴突和树突状细胞的生长和稳定中起重要作用,脑缺血会导致ERK的时间依赖性激活,而上游MEK的抑制则会导致损伤区炎性细胞因子和细胞凋亡的显著降低^[19]。蛋白激酶B(AKT1)在调节代谢、促进血管生成,调节血管内皮细胞功能等方面发挥重要作用,能被多种上游细胞因子激活,从而对缺血性损伤后的神经细胞发挥保护作用^[20]。PTGS2是能催化花生四烯酸转化为前列腺素的类过氧化物酶,是重要的炎性介质,参与炎症初期到

炎症形成的全过程,PTGS2的过量表达可破坏内环境平衡,参与脑损伤后的炎症反应,并促进脑梗死面积的扩大^[21]。表皮生长因子受体(EGFR)属酪氨酸家族激酶受体,EGFR通过其细胞内结构域介导细胞对生长因子的反应。在大脑中动脉同侧皮质梗死区神经细胞和巨噬细胞/小胶质细胞亚群中,EGFR明显上调,可能参与了缺血性和创伤性脑损伤后神经细胞的可塑和修复机制^[22]。血管内皮生长因子A(VEGFA)是血管内皮生长因子(VEGF)家族中神经保护的重要生长因子,能促进脑缺血后的血管生成。CHEN等^[23]发现,当VEGFA表达水平升高时,神经干细胞、神经细胞和星形胶质细胞的数量也随之增加。

GO富集分析结果表明,关键靶点主要分布于膜筏、膜区、囊泡腔、质膜外侧,靶点中主要描述了内肽酶、丝氨酸水解酶、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶等在分子

水平上的活性。同时,主要靶点涉及了对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、细胞对化学应激的反应、对氧气水平的反应等多个生物学过程。在KEGG富集分析中,PI3K - Akt信号通路与丹参 - 当归药对治疗CIS高度相关,其在抗神经细胞凋亡、氧化应激、炎症反应及自噬中发挥重要作用^[24]。如PI3K / Akt信号通路的激活可抑制NF - κ B引起的促炎因子的表达,抑制细胞介导的神经炎症,促进M1型(促炎表型)小胶质细胞向M2型(抗炎表型)转化,减轻炎症反应^[25];能发生一系列磷酸化级联反应,延缓细胞凋亡;活化的Akt可进一步激活氧化应激中的关键调节因子,阻止Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白 - 1与其耦联,增加抗氧化蛋白的表达;通过激活PI3K / Akt信号通路的下游靶点mTOR,减少细胞的过度自噬与脑损伤的程度,保护缺血脑组织^[26]。故丹参 - 当归可能通过多种途径调节PI3K / Akt信号通路改善CIS的临床症状,但仍需进一步验证。

分子对接技术发现,筛选的6个活性成分与核心靶点MAPK14, MAPK1, AKT1, PTGS2, EGFR, JAK2的结合能均小于 - 5.0 kcal,表明其具有较好的结合活性。其中,丹参醇B与EGFR、丹参新醌D分别与MAPK14, PTGS2, JAK2,木犀草素分别与PTGS2, EGFR, 藁本内酯分别与MAPK14, AKT1, JAK2, 丹参酮II_A分别与MAPK14, AKT1, PTGS2, EGFR, JAK2的结合能均小于等于 - 7.0 kcal,强于原始配体的结合活性,表明这些活性成分与其对应的靶点的结合活性强。

综上所述,丹参 - 当归可能通过丹参醇B、丹参新醌D、木犀草素、阿魏酸、藁本内酯、丹参酮II_A等活性成分,作用于MAPK14, MAPK1, AKT1, PTGS2, EGFR, JAK2等关键靶点,继而调节炎症反应、氧化应激、抗神经细胞凋亡和自噬等生物学过程,调控PI3K / Akt等主要的信号通路而发挥抗脑缺血损伤的作用。

参考文献

- [1] 马腾云,高玉元,马桂贤,等. 缺血性脑卒中脑动脉血栓病理研究及应用进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(12):1339 - 1341.
- [2] 陈嘉慧,陈文霖,霍绮雯. 谭峰教授缺血性中风早期运用活血化瘀药治疗经验[J]. 中国中医急症, 2018, 27(6):1091 - 1093.
- [3] 麻玉成,张梦帆,张运克. 益气活血类方药防治缺血性脑卒中的作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 34 - 42.
- [4] 施侠威,胡珏,王鼎,等. 基于数据挖掘法探析“丹参 - 当归”活血药对在古代中风方剂中的配伍规律[J]. 中国中医急症, 2018, 27(8):1329 - 1332.
- [5] 万新焕,王瑜亮,周长征,等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(3):788 - 798.
- [6] 刘妍如,唐志书,宋忠兴,等. 以药效成分群 - 活性 - 功效关联作用筛选当归质量标志物[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2626 - 2637.
- [7] 王灿,刘茜茜,田单单,等. 基于数据挖掘中药治疗中风病用药规律分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 116 - 120.
- [8] 王佳楠. 基于数据挖掘的脑卒中中医用药规律研究[D]. 北京: 北京交通大学, 2021.
- [9] 毛丽斯,朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(13):98 - 102.
- [10] JIA L, ZHOU H, LI W, et al. Network Pharmacology Integrated Molecular Docking Revealed the Mechanism of Jianpi Yiqi Taohua Decoction Against Ulcerative Colitis [J]. Medical Science Monitor, 2022, 28:e933537.
- [11] 陈云婷,罗光明,周丽,等. 基于网络药理学 - 分子对接探讨茵陈蒿汤治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的作用机制[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2021, 23(5):1588 - 1597.
- [12] 周鑫,李一铭,翁志伟,等. 活络效灵丹及其主要活性成分防治脑缺血的研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(2):359 - 362.
- [13] 曾雪,王龙,赖玉洁,等. 木犀草素通过抑制Drp1活性改善自噬流过程减少脑缺血再灌注后氧化应激损伤[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(18):1777 - 1786.
- [14] 刘亚鹭,徐士欣,张军平,等. 川芎 - 当归药对有效成分在缺血性脑卒中应用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(6):660 - 663.
- [15] 高娟,苏刚,刘骥飞,等. 藁本内酯对缺血性脑卒中的神经保护作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(9):609 - 613.
- [16] 吴倩,刘娇,田丽宇,等. 藁本内酯介导的线粒体自噬减轻HT22细胞的缺糖缺氧/复氧损伤[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7):1897 - 1903.
- [17] 徐璇,汤其强. 丹参酮II_A对大鼠脑缺血后PTEN - PI3K / AKT / mTOR信号通路的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(11):1706 - 1709.
- [18] WANG M, WANG L, PU L, et al. LncRNAs related key pathways and genes in ischemic stroke by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) [J]. Genomics, 2020, 112(3):2302 - 2308.
- [19] ZHANG L, WANG J, LIU Q, et al. Knockdown of long non-coding RNA AL049437 mitigates MPP + - induced neuronal injury in SH - SY5Y cells via the microRNA - 205 - 5p / MAPK1 axis [J]. NeuroToxicology, 2020, 78:29 - 35.
- [20] ROTWEIN P. Variation in Akt protein kinases in human populations [J]. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2017, 313(6): R687 - R692.
- [21] ZHANG Z, MEI Y, XIONG M, et al. Genetic Variation of Inflammatory Genes to Ischemic Stroke Risk in a Chinese Han Population [J]. Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 2021, 14:977 - 986.
- [22] COCHARD LM, LEVROUS JRLC, JOPPÉ SE, et al. Manipulation of EGFR - Induced Signaling for the