

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250218.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250218.1418.004>

基于网络药理学和动物实验探讨扶阳方治疗缺血性脑中风的作用机制

翟 阳¹, 庞兴旺¹✉, 王 瀚¹, 舒建龙², 庞 延³, 吴海标¹, 韦玉鲁¹, 莫智珍¹, 黎 芳¹, 梅小平⁴, 邹 敏^{5,6}

(1. 南宁市第七人民医院脑病科, 广西南宁 530012; 2. 浙江中医药大学研究生院, 浙江杭州 310053; 3. 广西中医药大学第一附属医院急诊科, 广西南宁 530219; 4. 广西国际壮医医院脑病科, 广西南宁 530001; 5. 广西国际壮医医院儿科, 广西南宁 530001; 6. 澳门科技大学中医药学院, 中国澳门 999078)

[摘要] **目的:** 基于网络药理学与分子对接(molecular docking, MD)探讨扶阳方治疗缺血性脑中风(ischemic stroke, IS)的核心作用靶点及信号通路等, 并通过构建大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型验证扶阳方对IS的作用机制。 **方法:** 通过网络药理学方法预测药物成分及作用疾病的核心靶点, 分析GO功能富集和KEGG信号通路, 借助AutoDock Vina1.1.2软件完成MD。通过建立MCAO大鼠模型, 设立对照组、模型组、假手术组以及扶阳方低、高剂量组进行灌胃治疗, Western blot检测各组大鼠IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、P-STAT3/STAT3蛋白表达情况, 验证扶阳方对IS的作用。 **结果:** 扶阳方中药组成共有活性成分143个, 扶阳方治疗IS的核心靶点172个, 所涉及的主要活性物质包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、芒柄花黄素与7-甲氧基-2-甲基异黄酮, 核心靶点包括TNF、IL-6、AKT1、IL-1 β 、TP53、STAT3、EGFR、JUN、CASP3和MMP9。MD结果显示, 筛选所得药物有效, 能较好地结合核心靶点蛋白。GO富集生物过程主要包括: 基因表达的正调控、细胞凋亡活动、细胞凋亡活动的正向调节、信号转导、炎症活动、细胞凋亡活动的负调控等。KEGG通路富集与IL-17信号途径、脂质和动脉粥样硬化、TNF信号途径、流体切应力和动脉粥样硬化、MARK信号途径、PI3K-Akt信号途径等相关。动物实验表明, 扶阳方中药组能明显下调MCAO大鼠模型STAT3、IL-6、P-STAT3、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达量, 下调P-STAT3/STAT3值, 且与药物溶度呈正相关。 **结论:** 扶阳方中药可经由多途径、多组分与多靶点治疗IS; 实验结果显示, 扶阳方通过调节TNF信号途径相关靶点来释放对IS的治疗效能。

[关键词] 网络药理学; 分子对接; 扶阳方; 缺血性脑中风; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)24-1889-11

Mechanism of Fuyang Formula treating ischemic stroke based on network pharmacology and animal experiments

ZHAI Yang¹, PANG Xingwang¹✉, WANG Han¹, SHU Jianlong², PANG Yan³, WU Haibiao¹, WEI Yulu¹, MO Zhizhen¹, LI Fang¹, MEI Xiaoping⁴, ZOU Min^{5,6}

(1. Department of Brain Diseases, the Seventh People's Hospital of Nanning, Nanning 530012, China; 2. Graduate School, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 3. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530219, China; 4. Department of Brain Diseases, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530001, China; 5. Department of Pediatrics, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530001, China; 6. School of Traditional Chinese Medicine, University of Macau, Macau 999078, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Natural Science Foundation Project of Guangxi Province (2024GXNSFAA010252); Guangxi Youth Qihuang Scholar Training Program (GXQH202419)

[Author]: ZHAI Yang, Associate Professor, E-mail: 332871803@qq.com.

[Correspondence to]: PANG Xingwang, Associate Chief Physician, E-mail: 13788508009@163.com.

Received: 2024-10-08

Revised: 2025-01-03

JHMu, 2025;31(24):1889-1899

[基金项目] 广西自然科学基金(2024GXNSFAA010252); 广西青年岐黄学者培养项目(GXQH202419)

[作者简介] 翟阳, 副教授, E-mail: 332871803@qq.com。

[通讯作者] 庞兴旺, 副主任医师, E-mail: 13788508009@163.com。

[收稿日期] 2024-10-08 **[修回日期]** 2025-01-03 **网络出版时间:** 2025-02-18 17:53:13

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To explore the core targets and signaling pathways of Fuyang Formula in treating ischemic stroke (IS) based on network pharmacology and molecular docking (MD), and to verify the mechanism of action of Fuyang Formula on IS through middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model. **Methods:** By using network pharmacology methods to predict the composition of drugs and the core targets of diseases, GO functional enrichment and KEGG signaling pathways were analyzed, and MD was completed using the AutoDock Vina1.1.2 software. By establishing the MCAO rat model, the control group, the model group, the sham surgery group, and the low-dose and high-dose Fuyang Formula groups were treated by gavage. Western blot was used to detect the protein expressions of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and P-STAT3/STAT3 in each group of rats to verify the effect of Fuyang Formula on IS. **Results:** There were 143 active ingredients in the traditional Chinese medicine composition of Fuyang Formula, with 172 core targets for treating IS. The main active substances involved included quercetin, kaempferol, luteolin, mangiferin, and 7-methoxy-2-methylisoflavone. The core targets included TNF, IL-6, AKT1, IL-1 β , TP53, STAT3, EGFR, JUN, CASP3, and MMP9. The MD results also showed that the screened drugs were effective and could bind well to the core target protein. The biological processes enriched in GO mainly included: positive regulation of gene expression, apoptosis activity, positive regulation of apoptosis activity, signal transduction, inflammatory activity, and negative regulation of apoptosis activity, *etc.* The enrichment of KEGG pathway was related to the IL-17 signaling pathway, lipid and atherosclerosis, TNF signaling pathway, fluid shear stress and atherosclerosis, MAPK signaling pathway, and PI3K-Akt signaling pathway, *etc.* Animal experiments showed that the Fuyang Formula traditional Chinese medicine groups could significantly downregulate the protein expression levels of STAT3, IL-6, P-STAT3, IL-1 β , and TNF- α in MCAO rat models, and downregulate the P-STAT3/STAT3 values, which are positively correlated with drug solubility. **Conclusion:** The Fuyang Formula traditional Chinese medicine can treat IS through multiple pathways, components, and targets. Experimental verification results show that Fuyang Formula can release its therapeutic efficacy for IS by regulating targets related to the TNF signaling pathway.

[Key words] Network pharmacology; Molecular docking; Fuyang Formula; Ischemic stroke; Mechanism of action

中风是由脑梗死或出血引起的突发性脑血液循环障碍^[1],为全世界第二大死因,年病死率在550万左右。该病还是全世界致残的一大原因,50%的幸存人员要面对慢性残疾困扰^[2,3]。缺血性脑中风(ischemic stroke, IS)是一类因脑血管堵塞使血流量下降或中断,导致大脑缺血缺氧性损伤的脑血管疾病,有极高的致残和致死率,其治疗过程中的缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是临床面临的棘手问题^[4]。脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤过程涉及到众多复杂的病理生理活动,以氧自由基损伤、炎症因子释放、兴奋性氨基酸神经毒性、能量代谢异常、细胞内钙离子超载等为主,最终造成脑组织的急性坏死与神经元细胞的凋亡^[5]。

火神派认为扶阳是治疗IS的重要途径。火神派源自《周易》与《黄帝内经》,经《伤寒杂病论》(东汉张仲景著)获得发展,后基于宋代、元代、明代与清代等众多医家的不断探索与创新,最后由清代四川著名医家郑寿全建立了一套全面且完善的理论与实践体系。扶阳方(由白附片、黄芪、党参、淫羊藿、三七、石菖蒲、桂枝、炙甘草等单味药组成)是根据扶阳学派提出的扶阳理念(即“病在阳者,扶阳抑阴;病在阴者,用阳化阴”),采取“扶其真元”手段,使机体呈“阴阳合”状态的理论配伍而成。前期通过基础实验及临床实验初步发现,扶阳方可明显缓解I/R患者的脑损伤;扶阳方可对脑部施以广泛刺

激,在脑缺血区、非缺血区、缺血半暗区联合作用改善大鼠的自噬程度,由此减轻CIR,释放脑保护效应^[6]。

扶阳方的药理作用机制尚不明确,目前的文献报道仅有证明扶阳方可明显改善IS的临床症状^[7],未能深入剖析配伍条件下扶阳方的作用机制及其疗效。以中药组方的复杂体系为基础,通过网络药理学可有效探究中药组方的主要活性成分与潜在作用靶点,研究其多成分协同效应,分析药物和疾病两者在分子水平上的潜在联系^[8]。所以,本研究经网络药理学及动物实验验证以揭示扶阳方治疗IS的机制,解析配伍规律,为后续临床实验研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

动物来源于广西中医药大学科学实验中心,实验用Sprague Dawley大鼠,雄性,SPF级,8周龄,21只。动物于无特定病原体安全条件下饲养。饲养环境保持为(22±2)℃,相对湿度保持为50%~60%,人工光照模仿自然条件明暗各12 h,并且在饲养时给予充足的食物和饮水。每位实验操作人员皆拥有《实验动物专业技术考试合格证书》。动物实验全部与《实验动物伦理证》所示规定吻合,其生产许可证号为[SCXK(湘)2019-0004],获得广西中医药大学伦理委员会的准可,伦理批号:DW20220517-83,规范遵循3R原则。

1.2 药物与试剂

扶阳方构成:党参、黄芪与白附片各 30 g,石菖蒲 20 g,三七与淫羊藿各 15 g,桂枝 10 g与炙甘草 6 g;所有药物是单味中药浓缩颗粒剂,取自南宁培力药业,每包颗粒即一付扶阳方饮片同等换算配比,所涉及的批号包括:A200151410、A210163010、A210055200、A210848210、A210173610、A19003-1032、A200113610、A210175010。

尼莫地平片:由四川科伦药业股份有限公司提供,规格为 20 mg×50 片/瓶,货号:B210301B21。

器材:多功能酶标仪,INFINITE 200PRO 型,购自 TECAN;低温离心机,5418R 型,购自 eppendorf;水平摇床,TS-3D 型,购自其林贝尔;凝胶成像系统,Tanon 5200 型,购自上海天能;电泳仪,PowerPac Basic 型,购自 Bio-Rad;3 mm 研磨珠,G0203-150G 型,购自 Servicebio;蛋白转印模块(湿转),Mini Trans-Blot Cell 型,购自 Bio-Rad;制冰机,SPR80 型,购自 SIMAG;高速低温组织研磨仪,KZ-III-F 型,购自 Servicebio。

试剂:IL-6、IL-1 β 、Phospho-STAT3-S727、STAT3、TNF- α polyclonal antibody (货号:PAB45871、PAB45925、PAB36336-P、PAB46077、PAB45964),购自 Bioswamp;GAPDH 一抗(货号:BL006B),购自 Biosharp。ELISA 试剂盒:TNF- α 试剂盒(货号:RA20035),购自 Bioswamp;丙二醛(MDA)试剂盒(货号:BC0025),购自 Solarbio;IL-6 试剂盒(货号:RA20607),购自 Bioswamp;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(货号:RA20004),购自 Bioswamp。

1.3 扶阳方的化学成分收集及靶点预测

依托中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>),并将口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 作为限定条件,检索附子、黄芪、党参、石菖蒲、淫羊藿、三七、甘草与桂枝的全部有效成分,筛选出活性物质。将整理获得的靶点先通过 Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)数据校准,再对非人源基因进行剔除,将重复、无效的靶点删除,得到标准化的基因名。

1.4 IS 相关靶点的获取

向数据库 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、pharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)与 OMIM(<https://omim.org/>)内录入关键词“ischemic stroke”,开始检索,以获取和疾病有关的靶点,把来自 3 个数据库得到的全部靶点整合至 Excel 表格内,并将重复基因剔除,再借助数据库 Uniprot 加以校正,获得疾病靶点基因信息。

1.5 药物-疾病靶点预测结果

使所得药物成分靶点和疾病靶点互相映射,再进行 Venn 图的绘制,以此得到交集基因。接着借助软件 Cytoscape 3.7.2 完成“药物-成分-治疗靶点”网络的构建。

1.6 靶蛋白相互作用网络构建

为了更加深入地探究扶阳方治疗 IS 的蛋白与蛋白之间的互作(PPI),向 String 数据库(<https://string-db.org/>)上传药物-交集基因,开展 PPI 图的绘制;物种设定为“*Homo sapiens*”,设定 0.7 的最低互作评分,为了充分保障本研究的可信性,其它参数皆采用默认值,以 TSV 格式保存结果,向软件 Cytoscape 3.8.2 内导入 TSV 文件,同时开展网络分析(步骤依次为 cytoscape、tools、network analyzer、networkanalysis、analyze network),保存所得结果,并通过节点大小与颜色表示 degree 大小,节点越大,表示 degree 值越大,绘制 PPI 网络图。

1.7 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

向数据库 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)上传药物-疾病交集作用基因,将 OFFICIAL_GENE_SYMBOL 作为基因标识符,物种设置为“*Homo sapiens*”。基于 DAVID6.8 GO 基因功能由细胞成分(CC)、生物过程(BP)、分子功能(MF)3 方面注释扶阳方治疗 IS 的作用靶蛋白于基因功能方面的效能。为明确扶阳方治疗 IS 的靶点在信号途径内开展 KEGG 途径富集分析。根据伪发现率(FDR)由小至大排序,找出 GO 功能内 MF、CC、BP 位居前 10 的条目,KEGG 途径条目和 IS 相关的 20 条途径($P < 0.01$)即是扶阳方治疗 IS 的主要基因功能富集过程与信号途径,预测扶阳方作用于 IS 的潜在机制。

1.8 分子对接

使用自数据库 PDB(<https://www.rcsb.org/>)进行 PPI 图内核心靶点蛋白的下载,主要下载排名前 10 的 3D 结构 PDB 格式文件,借助软件 ChemBio-Draw Ultra 14.0 构建药物-靶点-成分网络内位居前 5 物质的 2D 结构,并以 .mol2 格式进行保存。待软件 AutoDockTools1.5.6、PyMol 处理结束,借助 AutoDock Vina1.1.2 对重要活性化合物与疾病中相关靶点蛋白进行分子对接。当结合能(BE)为 -7.0 kcal/mol 及以下时,提示活性分子和靶点间的结合非常强烈。 -7.0 kcal/mol $<$ 结合能 ≤ -5.0 kcal/mol,表示活性分子和靶点之间呈较好直接结合表现;为明确分子和靶点之间的互作,本研究以 2 个 BE 最低的组进行 MD 模式图的构建,使用 Discovery studio(版本 V19.1.0)软件实施可视化。

1.9 动物造模、分组及给药方式

1.9.1 动物造模 经线栓法对大鼠右侧大脑中动脉行栓塞处理,构建大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。参考文献[9]及本实验室方法,造模步骤如下:(1)实验动物麻醉使用戊巴比妥钠,双人进行腹腔麻醉(40 mg/kg),颈部去毛,备皮。(2)仰卧位固定在固定板,选取颈正中中线,行切口,顺胸锁乳突肌内缘对左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid, ICA)这3支动脉行分离操作。选取CCA,于左侧远心端与近心端及ECA的分叉区域挂线备用。(3)借助微动脉夹取来ICA,并行短暂夹闭处理,再借助丝线对左侧CCA、ECA近心端行结扎处理。接着在相距左侧CCA分叉处4 mm区域剪一小口,大小能够插入拴线即可,把其顶至ICA,此时通过绕在左侧CCA远心端的细线对其位置加以固定,并小心系牢拴线。(4)借助细小的眼科镊对拴线行轻推处理,待达到18 mm的插入深度,即可自血管分叉区域开始算距离,并将远心端的细线系紧。(5)结扎固定好线栓及颈外动脉血管,保持40 min,拔出线栓至颈外动脉,再次扎紧颈外动脉防止出血的情况出现。最后缝合皮肤,实现CIR。

1.9.2 动物分组及给药方式 扶阳方剂量参考本课题组前期^[6]及预实验结果。主要算法如下:按照成人(60 kg)每天服用扶阳方原生药156 g,基于动物和人类的体重剂量折算系数,进行大鼠剂量的换算,具体为体重280~300 g大鼠的用量为22 g/kg,故扶阳方高剂量采用44 g/kg。(1)假手术组($n=7$):大鼠接受大脑中动脉缺血手术,但不插入线栓,正常饲养,自由饮水。(2)模型组($n=7$):按照上述动物造模法进行造模,成功后2 h灌胃,注射和扶阳方组等量的生理盐水,共进行7 d,再调整为正常饲养,保持大鼠自由饮水。(3)扶阳方干预组(低剂量、高剂量, $n=7$):低、高剂量组按照上述动物造模法途径建模。建模2 h后,灌胃扶阳方(低剂量为 $11\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、高剂量为 $44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续7 d,每天1次。(4)对照组($n=7$):按照上述动物造模方法建模,建模后2 h灌胃尼莫地平片(剂量为 $17.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续7 d,每天1次。

大鼠尾部标号区分组别,以上5组大鼠需成功造模,并根据入选及排除条件,将不符合条件的大鼠排除。完成各组所需干预后,进行动物观察。

1.10 Western blot 检测蛋白表达

处理1周后,对所有实验动物实施安乐死,并将其脑组织的组织块放到液氮中,之后取出,行分解、

匀浆处理,接着离心,留存上清(即神经组织细胞);基于BCA蛋白定量试剂盒所示步骤进行蛋白浓度的测定,提取蛋白以1:4比例与 $5\times\text{SDS-PAGE}$ 蛋白上样缓冲液混匀,先压胶、浓缩凝固,再电泳、转膜,接着将预先配制的TBST当做封闭液,根据各抗体说明书所示比例由此封闭液稀释与孵育一抗,同时洗膜3遍,再实施二抗孵育,将膜置于自动化学发光分析仪中进行检测,并根据不同的发光强度调整曝光条件。使用TANONGIS软件读取相关条带的灰度值。

1.11 ELISA 法检测大鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、SOD、MDA 的水平

取“1.10项”中大鼠腹主动脉血清,并于室温下先静置2 h,再借助离心机($3\,000\text{ r/min}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)实施15 min离心处理。剔除上层血清,同时基于ELISA使用说明,借助酶标仪测定MDA、 $\text{TNF-}\alpha$ 、SOD、IL-6的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值,制作样品标准曲线,同时开展定量分析。

1.12 统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数对比采用 t 检验。多样本间对比则采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 扶阳方活性成分及靶点预测

使用TCMSP检索,条件为 $\text{OB}\geq 30\%$ 且 $\text{DL}\geq 0.18$,将无效成分剔除,经筛选获得附子、黄芪、党参、石菖蒲、淫羊藿、三七、桂枝、甘草依次为6、17、17、4、21、8、6、88个成分,获得所有中药共有143个成分。

2.2 IS 相关靶点及药物作用靶点

通过GeneCards、OMIM、pharmGKB分别获得IS靶点4 558、20、46个,经去重,得到4 598个和IS有关的靶点,之后通过数据库Uniprot对所得基因进行校正。取药物的治疗靶点和IS的靶点基因两者的交集,得到172个IS和药物的交集靶点基因,即药物治疗IS的交互靶点基因。见图1。

2.3 药物-成分-靶点预测结果

通过药物-成分-靶点数据,进行“network.xlsx”文件、“type.xlsx”文件的构建,向软件Cytoscape 3.7.2内导入上述文件,用于开展网络拓扑分析,此网络内节点有319个,边有2 219条;其中度值位居前5的中药组成成分包括“MOL000098”“MOL000422”“MOL000006”“MOL003896”“MOL000392”。见图2。

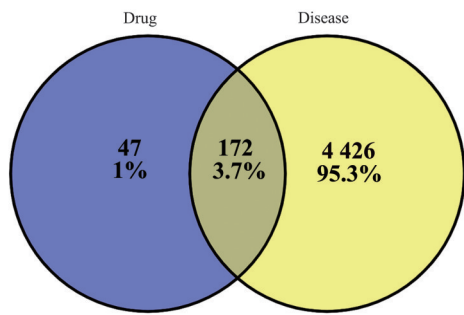


图1 扶阳方-IS靶点交集图

Fig 1 Intersection diagram of Fuyang Formula-IS targets

2.4 核心靶点及网络相互作用

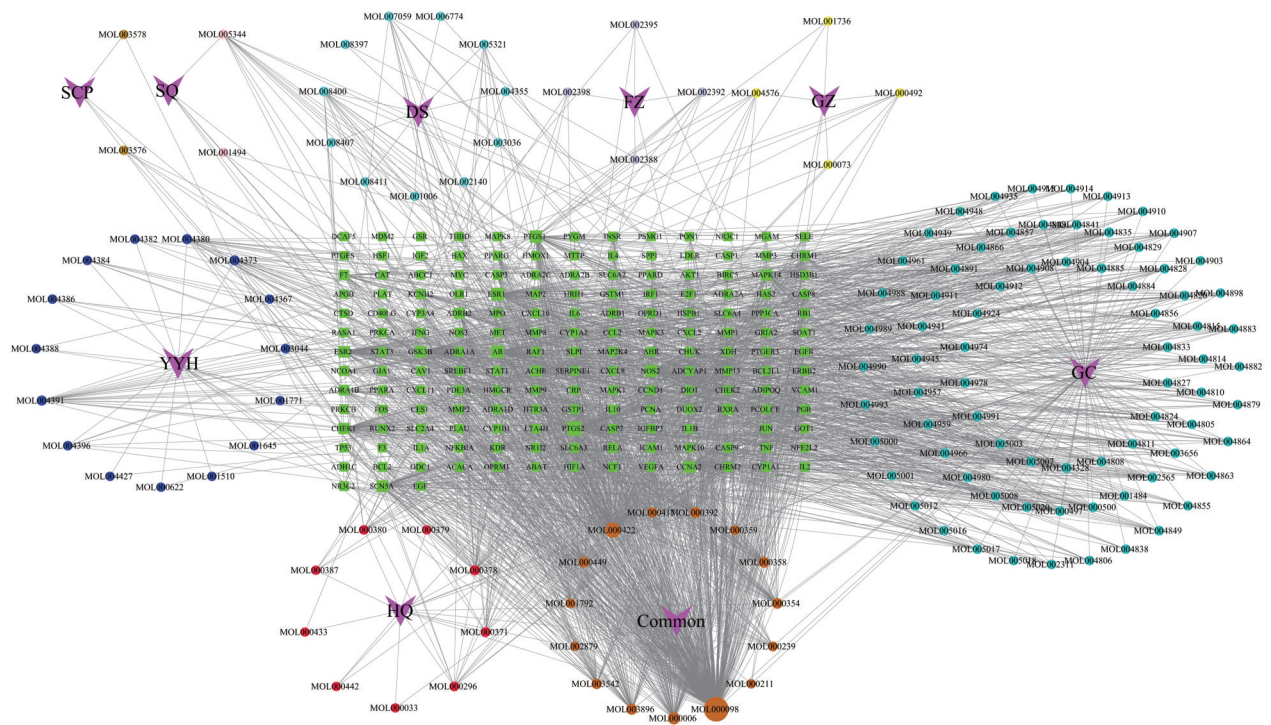
取全部药物作用靶点和IS靶点基因两者的交集,得到172个两者交集靶点基因,即药物治疗IS的交互靶点基因。向数据库String (<https://string-db.org/>)内导入172个交集靶点基因,用以PPI预测,物种与置信度分别设置为“Homo sapiens”、0.7。以TSV格式存储网络文件,向软件Cytoscape 3.7.2内导入TSV文件,完成PPI网络的绘制,选取degree值在5以上的靶点,图内含节点107个,边2368条,对网络开展拓扑分析,通过靶点大小、颜色表示degree值,通过combined score值了解边的粗细,以此建立PPI网络。核心靶点包括IL-6、

MMP9、TP53、CASP3、IL-1 β 、JUN、AKT1、EGFR、STAT3、TNF。见图3。

2.5 生物功能富集分析

2.5.1 GO富集分析 针对药物-疾病交集基因,经数据库DAVID开展GO基因功能富集分析,将 $P<0.01$ 作为标准,筛选得到402条扶阳方治疗IS的富集BP主要条目,主要与细胞凋亡过程的正向/负向调节、基因表达的正/负调控、细胞对脂多糖的反应、信号转导、炎症活动、细胞增殖的正向调节功能、细胞凋亡过程有关;CC相关的有44条,包括染色质、细胞溶胶、胞外分泌体、质膜、质膜构成部分、核、胞外区、细胞质、细胞外间隙、核原形质核浆;其中有81条与MF相关,涉及序列特异性DNA结合、蛋白质结合、蛋白激酶结合、相同蛋白结合、锌离子结合、酶结合、DNA结合、蛋白质同源二聚化活性、蛋白质异源二聚化活性、蛋白激酶活性。见图4。

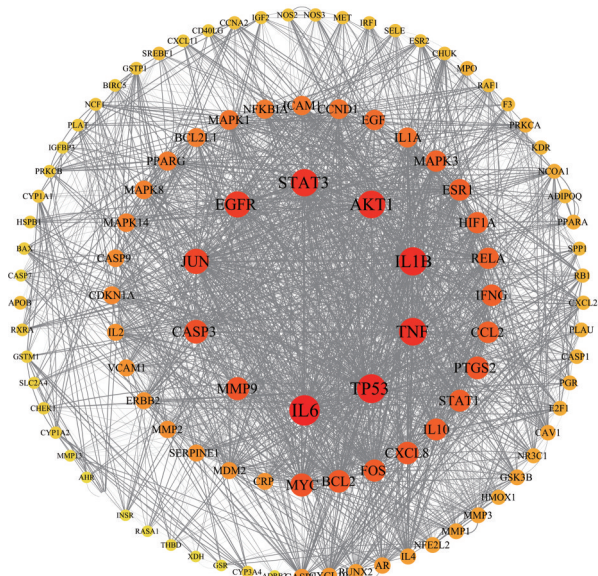
2.5.2 KEGG通路富集分析 利用DAVID数据库进行通路富集分析,共富集到177条与扶阳方治疗IS相关的通路,根据 $P<0.01$ 筛选出扶阳方治疗IS的通路154条,筛选出与IS相关的通路20条,分别为癌症中的通路、乙型肝炎、脂质和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、化学致癌-受体激活、人巨细胞病毒感染、流体切应力与动脉粥样硬化、PI3K-Akt信号通路、人T细胞白血病病毒1型感



矩形表示靶点,椭圆形表示药物成分,V形节点代表药物

图2 药物-成分-靶点网络图

Fig 2 Drug-component-target network diagram



颜色越深,点越大,代表靶点的重要性越大

图3 核心靶点网络图

Fig 3 Core target network diagram

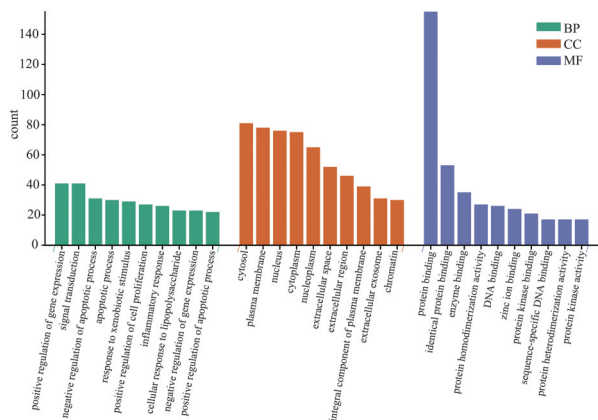


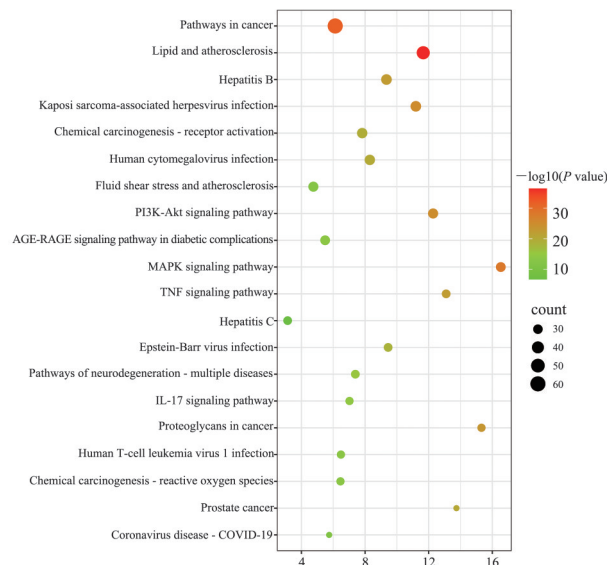
图4 扶阳方治疗IS GO富集分析图

Fig 4 GO enrichment analysis of Fuyang Formula in IS treatment

染、糖尿病并发症的年龄-年龄信号通路、癌症中的蛋白多糖、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、神经退行性变通路-多种疾病、丙型肝炎、爱泼斯坦-巴尔病毒感染、化学致癌性、活性氧(ROS)、前列腺癌、冠状病毒病-2019 冠状病毒病。见图5。

2.6 分子对接结果

以下为活性成分和靶点的MD结果:在50对MD关系中,28对的BE为-7.0 kcal/mol及以下,占比56%;22对的BE处于-7.0~-5.0 kcal/mol范

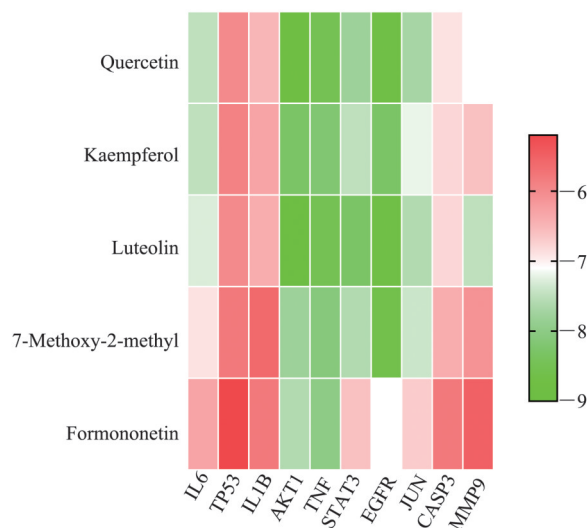


圆圈大小反映富集于相应途径上基因的数据,从绿至红反映P值不断下降

图5 扶阳方治疗IS KEGG通路富集分析图

Fig 5 KEGG pathway enrichment analysis of Fuyang Formula in IS treatment

围,占比44%。本研究所预测核心靶点和潜在成分存在良好结合性能,见图6。其中槲皮素与木犀草素

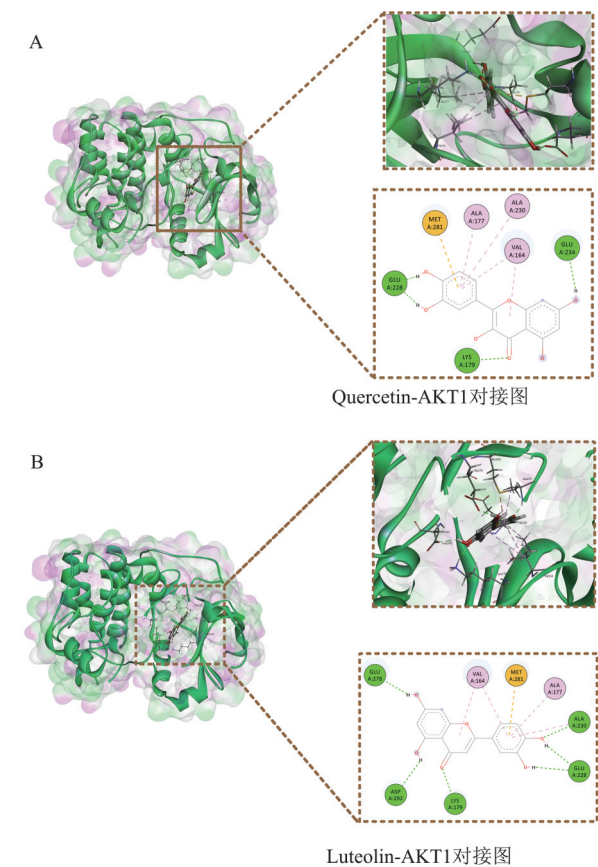


横、纵坐标各自表示关键靶点、主要活性成分,颜色从红至绿表示BE越强

图6 扶阳方治疗IS重要化合物与作用靶点分子对接情况热图

Fig 6 Docking heat map of important compounds and target molecules for Fuyang Formula in IS treatment

和AKT1靶点BE最低,BE分别为-8.8 kcal/mol、-9.0 kcal/mol,能发现木犀草素、槲皮素与AKT1主要经碳氢键、 π 硫碱与 π 烷基化结合,其可视化对接模式见图7A、B。



A:木犀草素-AKT1对接图;B:槲皮素-AKT1对接图;绿色为碳氢键、粉色为 π 烷基化、黄色为 π 硫键

图7 靶点蛋白与重要化合物分子对接图

Fig 7 Molecular docking diagram of target proteins and important compounds

2.7 扶阳方对MCAO大鼠IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、P-STAT3/STAT3蛋白表达情况比较

与假手术组比较,模型组大鼠IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3蛋白表达明显上升,

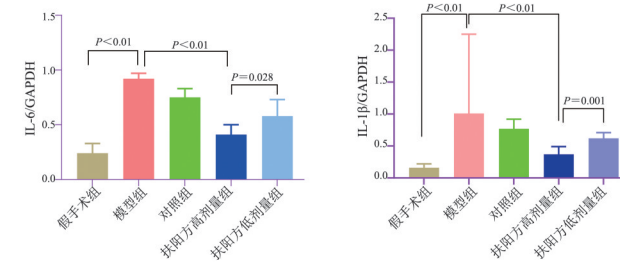


图9 扶阳方对MCAO大鼠IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、P-STAT3/STAT3蛋白表达的影响

Fig 9 Effect of Fuyang Formula on IL-6, TNF- α , IL-1 β , and P-STAT3/STAT3 protein expressions in MCAO rats

2.8 扶阳方对MCAO大鼠IL-6、TNF- α 、MDA、SOD血清水平情况比较

与假手术组比较,模型组实验动物的血清MDA、IL-6与TNF- α 水平明显上调,SOD水平明显

P-STAT3/STAT3比值明显上升($P<0.01$);与模型组比较,扶阳方高剂量组、扶阳方低剂量组、对照组IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3蛋白表达明显下调,P-STAT3/STAT3比值下降($P<0.05$),与对照组相比,扶阳方高剂量组IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3蛋白表达下调,P-STAT3/STAT3比值明显下降($P<0.05$);扶阳方低剂量组在下调STAT3、P-STAT3蛋白水平方面与对照组相当,略呈下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$),在下调IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平方面,优于对照组($P<0.05$);扶阳方低、高剂量组之间比较,在下调IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3蛋白表达方面,P-STAT3/STAT3比值下降方面,扶阳方高剂量组明显优于低剂量组($P<0.05$)。见图8、9。

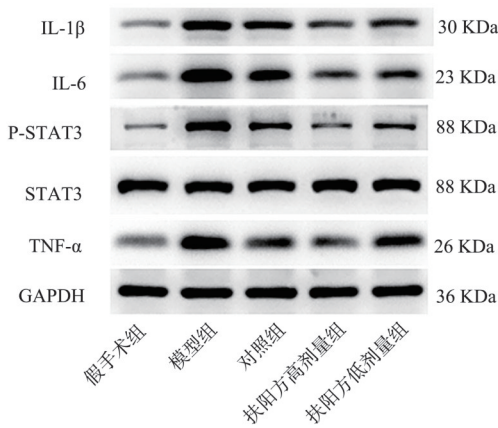


图8 大鼠脑组织IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3蛋白电泳表达

Fig 8 Expressions of IL-6, TNF- α , IL-1 β , STAT3, and P-STAT3 in rat brain by electrophoresis

降低($P<0.01$);相比模型组,扶阳方高剂量组、扶阳方低剂量组、对照组血清IL-6、TNF- α 、MDA水平下调,SOD水平升高($P<0.05$),与对照组相比,扶阳方高剂量组血清IL-6、TNF- α 水平下调,SOD水

平升高 ($P<0.05$), 扶阳方高剂量组在下调MDA水平方面与对照组相当, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 扶阳方低、高剂量组之间比较, 在

下调血清 IL-6、TNF- α 、MDA 水平及上调血清 SOD 水平方面, 扶阳方高剂量组明显优于低剂量组 ($P<0.05$)。见图 10。

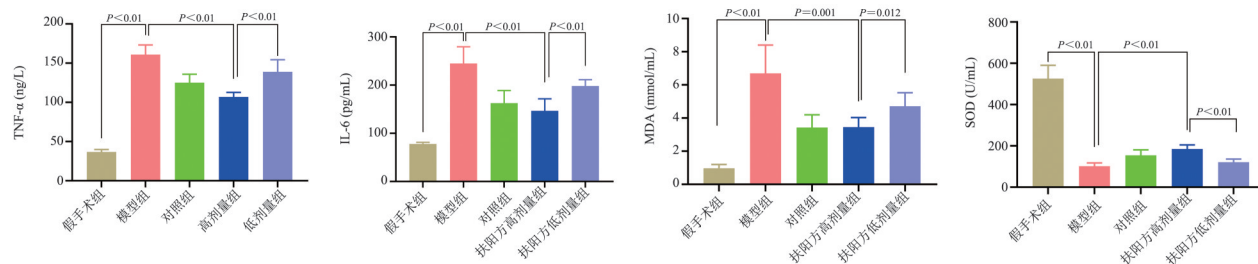


图 10 扶阳方对MCAO大鼠IL-6、TNF- α 、MDA、SOD血清水平表达的影响

Fig 10 Effect of Fuyang Formula on IL-6, TNF- α , MDA, and SOD serum level expressions in MCAO rats

3 讨论

中风又名脑卒中, 被归入4大难治病(风、膨、膈、癆)之列。率先提及“中风”一词的古籍为《黄帝内经》, 相关描述包括“偏枯”“仆击”等。中风以气虚、风动、血瘀、痰阻者最为多见, 病性多为本虚标实。扶阳学派认为扶其真元、温补元阳是治疗中风包括IS的主要法则。对于阳气对于人体生命活动的影响, 郑钦安给予了高度重视, 提出了“有阳则生, 无阳则死”观点^[10]。扶阳学派在中风的认识和治疗上亦体现了其一以贯之的扶阳思想, 严格遵循“阴阳之要, 阳密乃固”以及“阳主阴从”“人生立命在于以火立极”“病在阳者, 扶阳抑阴; 病在阴者, 用阳化阴”治则。

扶阳方以白附片、黄芪、党参共为君药。附片温复肾中元阳, 使黄芪、党参生化气血所赖之阳气, 其有根源; 故石菖蒲、三七为臣药, 共治痰治瘀, 疏通经络, 可助附片、黄芪、党参温复的阳气通达; 淫羊藿与桂枝合用, 沟通内外, 帮助阳气启动, 连接表里, 二药共为佐药。炙甘草温暖脾土, 伏火固阳, 如四逆汤中“土伏火”之意, 又调和诸药, 使诸药步伐协调一致, 是为使药。现代药理学研究表明, 附子通过活化PI3K/Akt途径与KEAP1/Nrf2途径, 可减轻IS沙土鼠的炎症反应, 抑制氧化应激(OS), 增强血管内皮细胞功能, 从而防止缺血性脑损伤^[11]。作为黄芪根中的基本成分之一, 黄芪甲苷IV (astragaloside IV, AST IV) 对脑I/R损伤等神经系统疾病发挥保护作用^[12,13]。研究发现AST IV可通过下调NFKB/NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路蛋白的表达, 并调控NLRP3炎症小体介导的与脑I/R相关的焦亡, 减少大鼠脑缺血体积和脑水肿面积, 改善脑I/R损伤^[14]。有研究显示, 党参主要有效成分党参总皂苷可以明显抑制TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达

水平, 以减少大鼠CIR的梗死面积, 改善脑组织水肿, 降低死亡率^[15]。石菖蒲所含成分以挥发油为主, β -细辛脑在挥发油中呈95%占比, 相关研究发现, β -细辛脑可改善MCAO大鼠的神经功能、增强运动协调性、减少炎症反应并恢复53种异常代谢物^[16,17]。研究发现三七中的活性化合物三七皂苷能干预IS多级联病理反应(调节肠道菌群、OS、修复血脑屏障、炎症、促进血管新生、抑制钙超载、焦亡、凋亡)^[18,19], 判断作用机制和激活信号途径P13K/Akt-HO-1与抑制信号途径TLR4/NF- κ B有关。研究表明, 淫羊藿苷的活性成分可能通过调节MAPK/ERK和NF- κ B信号通路, 发挥抗氧化、抗神经炎和抗凋亡作用和减少血脑屏障损伤等作用, 对IS产生积极影响, 其可以直接减轻OS损伤, 减少ROS的产生, 淫羊藿可以减少小胶质细胞和星形胶质细胞的活化, 具有较强神经保护功能^[20]。综上所述, 扶阳方可以通过减轻IS炎症反应、抑制OS, 加速血管内皮功能的新生, 改善脑损伤, 展示出扶阳方治疗IS的潜在治疗效果。

本研究通过构建“药物-成分-靶点”网络图和核心靶点互作图, 对扶阳方治疗IS的主要活性物质展开预测, 发现主要活性物质包括槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素、木犀草素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮, 预测核心靶点包括IL-6、MMP9、TP53、CASP3、IL-1 β 、JUN、AKT1、EGFR、STAT3与TNF。MD结果也证明筛选所得药物活性成分都可较好地结合核心靶点蛋白, 其中活性成分槲皮素、木犀草素与IS相关治疗靶点的BE相比其它成分普遍偏低, 可见这两个关键性活性成分在结合核心靶点蛋白方面能力更强, 表明在扶阳方治疗IS方面起到核心作用。研究显示, 槲皮素可产生较强的一氧化氮抑制作用, 发挥调节炎症的作用^[21], 改善微循环, 疏通血管。

槲皮素可以调节自噬(抑制/诱导)以减轻脑I/R^[22]。山奈酚可以通过抑制miR-138-5p表达、反向上调去乙酰化酶沉默信息调节因子相关酶1(SIRT1)表达,来削弱法尼醇X受体(FXR)乙酰化(进而调节Nrf2和Nrf2),明显缓解OS程度,并调节肠道微生物菌群^[23]。山奈酚的神经保护作用已在缺血性脑血管病(ICVD)中得到证实^[24,25]。该核心靶点可分为4个模块,主要与炎症、凝血、血管生成和细胞凋亡相关。越来越多的证据证实,在缺血性脑病、中风、I/R损伤及Wnt/ β -catenin通路激活下,IL-6^[26]、IL-1 β ^[27]、TNF^[26]、MMP9^[28]和STAT3^[29]等靶点是重要的基因蛋白,通过减轻胶质细胞神经炎症,抑制STAT3磷酸化在大脑中动脉闭塞小鼠模型中细胞因子的过量产生,从而对I/R脑损伤产生神经保护作用^[29]。白细胞介素经由信息传递以及免疫细胞的活化和调节,对B细胞与T细胞的活化、增殖、分化以及炎症反应施以介导,在IS中起双向作用。IL-1 β 加重血脑屏障功能障碍,经由增强内皮细胞间黏附分子的表达,诱导白细胞向缺血处迁移,从而激活炎症活动,导致缺血性损伤加剧^[30]。通过IRAK途径,导致IL-1 β 介导的I κ B- α 的磷酸化和泛素化,最终上调细胞核中NF- κ B的表达,同时诱导相关靶基因(TNF- α 与IL-8等)转录的加强^[31]。IL-6与其它促炎细胞因子的上调对JAK2/STAT3的磷酸化有利^[32,33]。待P-STAT3进入胞核,其会结合靶基因启动子区特征的DNA序列,使得TNF- α 、IL-1 β 与IL-6基因的转录增强^[33]。恶性循环使得炎症持续发展,不能恢复已受损脑细胞。EGFR下游的信号途径(例如PI3K/AKT/mTOR)与自噬的调节相关,这表明EGFR抑制和自噬之间存在重要的交互作用。Liu等^[34]研究表明,PI3K/AKT/NF- κ B信号传导在调节线粒体OS、神经炎症与神经元细胞凋亡方面起到重要作用,亦有研究证明上调P-AKT1水平,可以抑制MCAO模型大鼠的炎症细胞因子的释放及神经元细胞凋亡^[35]。

GO生物过程分析结果显示,扶阳方的治疗靶点主要和细胞对脂多糖反应、基因表达的正调控、炎症反应、信号转导、细胞增殖的正向调节功能、细胞凋亡活动的负调控、对外源性刺激的反应、细胞凋亡活动、基因表达的负调控、细胞凋亡过程的正向调节等BP有关,如此可判断扶阳方的有效成分经由调控细胞炎症与细胞凋亡、削弱细胞OS途径释放对IS的治疗效能。经KEGG通路富集分析发现,扶阳方治疗IS以脂质与AS、IL-17信号通路、流体切应力和AS、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通

路、MAPK信号通路等相关。研究表明,在缺血性卒中的I/R过程中,过量ROS引起的脑组织OS是CIR损伤的主要病理机制,通过抑制大脑皮层的OS,表现为ROS和MDA水平的降低,以及SOD水平的增加,可改善CIR损伤引起的认知功能异常和神经元损伤^[36]。亦有研究证实,激活PI3K/AKT/NF- κ B信号通路,经由削弱炎症,抑制OS,减少细胞凋亡,从而对MCAO大鼠发挥脑神经保护作用,避免CIR^[34]。伴随血脑屏障的炎症级联与肿瘤坏死TNF- α 水平升高有关,导致脑损伤,在中枢神经系统缺血后24 h达到峰值,通过抑制神经炎症,能保护CIR的神经功能^[37]。在已知的几种刺激可以激活神经炎症过程中,MAPKs被认为是一个重要的神经炎症信号通路,在被应激或神经元损伤激活后,ERK、JNK和p38 MAPKs在特定位置被磷酸化,并诱导一系列炎症细胞因子和OS的基因表达,通过阻断MAPK信号通路,可以抑制神经炎症介质产生,展示出抗神经炎症和神经保护作用^[38]。

通过经线栓法栓塞大鼠右侧大脑中动脉构建MCAO模型验证扶阳方治疗IS的潜在作用,本研究选取TNF信号通路上的几个关键因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、STAT3、P-STAT3进行验证,结果表明,扶阳方可明显改善其蛋白表达水平,降低STAT3的磷酸化水平,进一步证实扶阳方可通过调控TNF信号通路相关作用靶点发挥治疗IS的作用。本研究进一步通过分析MCAO大鼠腹主动脉血清IL-6、TNF- α 、MDA、SOD水平,发现扶阳方可明显降低TNF信号通路上的关键指标(IL-6、TNF- α)血清水平,改善MCAO大鼠OS反应,且与扶阳方药物溶度呈正相关。

综上所述,本研究通过MD和动物实验整体分析与预测了扶阳方对IS的治疗机制,结果显示扶阳方对IS治疗效能的实现基础在于多途径、多组分与多靶点的联合作用。体内动物实验发现扶阳方可在一定程度上改善IS的神经炎症,同时对该病的主要靶点蛋白水平具调控作用。本研究为进一步分析扶阳方对IS的治疗机制,开辟IS的临床治疗新路径,和为以扶阳方治疗IS为基础研发新药物提供了理论支撑。

作者贡献度说明:

翟阳:论文撰写与修改;庞兴旺:提供论文修改建议及思路;王瀚、舒建龙:统计分析;庞延:课题润色及提供一定的思路;吴海标、韦玉鲁、莫智珍:作图及分析;黎芳、梅小平、邹敏:初步审稿与修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Shi Q, Cheng Q, Chen C. The role of autophagy in the pathogenesis of ischemic stroke[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2021, 19(5): 629-640.
- Donkor ES. Stroke in the 21st century: A snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life[J]. *Stroke Res Treat*, 2018, 2018: 3238165.
- Liang D, Guan Q, Huang M, et al. Changing trends of disease burden of stroke from 1990 to 2019 and its predictions among the Chinese population[J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1255524.
- Yuan Q, Yuan Y, Zheng Y, et al. Anti-cerebral ischemia reperfusion injury of polysaccharides: A review of the mechanisms[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111303.
- Zhang M, Liu Q, Meng H, et al. Ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 12.
- 莫雪妮, 唐农, 蒋春丽, 等. 扶阳方治疗脑梗死临床研究[J]. *新中医*, 2014, 46(3): 55-57.
Mo XN, Tang N, Jiang CL, et al. Clinical study on the treatment of cerebral infarction with Fuyang Formula[J]. *New Chin Med*, 2014, 46(3): 55-57.
- 韦梦华, 梅小平, 莫雪妮, 等. 扶阳方治疗缺血性中风恢复期患者 25 例临床观察[J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(8): 6-9.
Wei MH, Mei XP, Mo XN, et al. Clinical effect of Fuyang prescription in treatment of the convalescence stage of ischemic stroke: An analysis of 25 cases[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2022, 38(8): 6-9.
- 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战[J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4789-4797.
Ren Y, Deng YJ, Ma HB, et al. Research progress and challenges of network pharmacology in field of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Herbal Med*, 2020, 51(18): 4789-4797.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- 李丽娅, 刘昊, 王超云, 等. 地黄饮子对大鼠脑缺血再灌注后炎症反应的抑制作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(1): 23-28.
Li LY, Liu H, Wang CY, et al. Inhibitory effect of Dihuang Yinzi on inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(1): 23-28.
- Zhou L, Jia R, Zeng W, et al. Study on the difference of protective efficacy and mechanism of *Radix aconiti* Coreani and *Rhizoma typhonii* in gerbils with ischemic stroke[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(19): 3686-3693.
- Guo Y, Wang J, Hua Y, et al. Network pharmacology and *in vitro* experimental verification to reveal the mechanism of astragaloside IV against kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21711.
- Costa IM, Lima FO, Fernandes LC, et al. Astragaloside IV supplementation promotes a neuroprotective effect in experimental models of neurological disorders: A systematic review[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2019, 17(7): 648-665.
- Hou Y, Yan Z, Wan H, et al. A combination of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow a attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury *via* NF- κ B/NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway[J]. *Brain Sci*, 2024, 14(8): 781-797.
- 杨鹏飞, 楚世峰, 陈乃宏. 党参的药理学研究进展及其抗脑缺血再灌注损伤的机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(12): 5-10.
Yang PF, Chu SF, Chen NH. Advances in pharmacological researches of Dangshen and the protective mechanisms of Dangshen on brain ischemia-reperfusion injury[J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2015, 35(12): 5-10.
- Liu F, Zhao Q, Liu S, et al. Revealing the pharmacological mechanism of *Acorus tatarinowii* in the treatment of ischemic stroke based on network pharmacology[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3236768.
- Lu F, Su X, Liu J, et al. The combination of individual herb of Mi-Jian-Chang-Pu Formula exerts a synergistic effect in the treatment of ischemic stroke in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9365760.
- 周玉嘉, 张允岭, 周晶, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及炎症细胞因子的影响[J]. *中国中医急症*, 2021, 30(8): 1340-1344.
Zhou YJ, Zhang YL, Zhou J, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins on TLR4/NF- κ B signaling pathway and inflammatory cytokines in rats with cerebral ischemia-reperfusion[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2021, 30(8): 1340-1344.
- 唐标, 唐文静, 戴姿薇, 等. 三七总皂苷抑制缺氧缺糖/复氧复糖诱导的 SH-SY5Y 细胞焦亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(7): 1178-1184.
Tang B, Tang WJ, Dai ZW, et al. *Panax notoginseng* saponins suppress oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced pyroptosis of SH-SY5Y cells[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2020, 36(7): 1178-1184.

- 20 Xu H, You M, Xiang X, et al. Molecular mechanism of epimedium extract against ischemic stroke based on network pharmacology and experimental validation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3858314.
- 21 To DC, Hoang LM, Nguyen HT, et al. Dataset on the compounds from the leaves of Vietnamese *Machilus thunbergii* and their anti-inflammatory activity[J]. *Data Brief*, 2023, 51: 109713.
- 22 Wang Y, Chang C, Lin S, et al. Quercetin protects against cerebral ischemia/reperfusion and oxygen glucose deprivation/reoxygenation neurotoxicity[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 8: 108436.
- 23 Ge J, Li G, Chen Z, et al. Kaempferol and nicotiflorin ameliorated alcohol-induced liver injury in mice by miR-138-5p/SIRT1/FXR and gut microbiota[J]. *Helvion*, 2024, 10(1): e23336.
- 24 Li W, Cheng X, Yang Y, et al. Kaempferol attenuates neuroinflammation and blood brain barrier dysfunction to improve neurological deficits in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *Brain Res*, 2019, 1722: 146361.
- 25 Wang J, Mao J, Wang R, et al. Kaempferol protects against cerebral ischemia reperfusion injury through intervening oxidative and inflammatory stress induced apoptosis[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 424.
- 26 Yu L, Huang L, Zhao Y, et al. Atorvastatin promotes pro/anti-inflammatory phenotypic transformation of microglia *via* Wnt/ β -catenin pathway in hypoxic-ischemic neonatal rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 61 (6) : 3559-3577.
- 27 Zhang S, Zhang Y, Wang N, et al. Long non-coding RNA MIAT impairs neurological function in ischemic stroke *via* up-regulating microRNA-874-3p-targeted IL-1 β [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 175: 81-89.
- 28 Araki T, Sangtian J, Ruanpeng D, et al. Acute elevation of interleukin 6 and matrix metalloproteinase 9 during the onset of pituitary apoplexy in Cushing's disease [J]. *Pituitary*, 2021, 24(6): 859-866.
- 29 Wang X, Zhang S, Lyu B, et al. Circular RNA PTP4A2 regulates microglial polarization through STAT3 to promote neuroinflammation in ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 30(4): e14512.
- 30 Yang J, Ma K, Zhang C, et al. Burns impair blood-brain barrier and mesenchymal stem cells can reverse the process in mice[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 578879.
- 31 Shang Y, Yang D, Ha Y, et al. Brassinosteroid-insensitive 1-associated receptor kinase 1 modulates abscisic acid signaling by inducing PYR1 monomerization and association with ABI1 in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 849467.
- 32 Kong X, Gong Z, Zhang L, et al. JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation[J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 79: 159-173.
- 33 Zhu H, Jian Z, Zhong Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation *via* JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714943.
- 34 Liu D, Wu W, Wang T, et al. *Lithocarpus polystachyus* Rehd. ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B pathway and regulating NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1365642.
- 35 Liao W, Wang M, Wu Y, et al. The mechanisms of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in treating ischaemic stroke based on network pharmacology and experiment verification[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 1014-1029.
- 36 Ni C, Huang B, Huang Y, et al. Keap1-independent GSK-3 β /Nrf2 signaling mediates electroacupuncture inhibition of oxidative stress to induce cerebral ischemia-reperfusion tolerance [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 217: 111071.
- 37 Zhang Y, Wang S, Lu F, et al. The neuroprotective effect of pretreatment with carbon dots from *Crinis Carbonisatus* (carbonized human hair) against cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19 (1): 257.
- 38 Zeng K, Yu Q, Song F, et al. Deoxysappanone B, a homoisoflavone from the Chinese medicinal plant *Caesalpinia sappan* L., protects neurons from microglia-mediated inflammatory injuries *via* inhibition of I κ B kinase (IKK)-NF- κ B and p38/ERK MAPK pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 748: 18-29.

[本文编辑] 陈思润