

基于网络药理学和分子对接技术探究 红花治疗缺血性脑卒中的作用机制

梁瑞敏^{1,2}, 王凯^{1,2}, 陈悦^{1,2}, 曹金一², 乔逸², 冯智军², 杨志福^{2*}

¹陕西中医药大学药学院, 咸阳 712046; ²空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710032

摘要: 本文采用网络药理学与分子对接法探索红花治疗缺血性脑卒中的主要活性成分及作用靶点。利用 TCMSp、Genecards、Venny、DAVID 等数据库检索红花与缺血性脑卒中疾病的共同靶点, 绘制相互作用关系网络图, 并进行 GO 和 KEGG 富集分析; 通过 AutoDock Tools 对红花主要活性成分与关键靶点进行分子对接验证。结果从 TCMSp 数据库收集 22 种红花活性成分与 459 个相关靶点, 并在 Uniprot 转换靶点基因名。最终在 Venny 2.1.0 中得到 73 个红花活性成分与缺血性脑卒中疾病共同靶点, 进而构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”网络图。分子对接结果表明, 主要活性成分分别与关键靶点结合展现出较好的亲和力。因此推断, 红花的主要活性成分与关键靶点结合, 进而调控 AGE-RAGE、TNF 和 IL-17 信号通路可能是红花治疗缺血性脑卒中中发挥作用的重要机制。

关键词: 红花; 缺血性脑卒中; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)7-1214-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.7.017

Mechanism of safflower on ischemic stroke based on network pharmacology and molecular docking

LIANG Rui-min^{1,2}, WANG Kai^{1,2}, CHEN Yue^{1,2},
CAO Jin-yi², QIAO Yi², FENG Zhi-jun², YANG Zhi-fu^{2*}

¹School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

²Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: In this study, network pharmacology and molecular docking were used to explore the main active components and targets of safflower in the treatment of ischemic stroke. The common targets of safflower and ischemic stroke disease were searched by TCMSp, Genecards, Venny and DAVID databases, and the interaction network diagram was drawn. GO and KEGG enrichment analysis were performed. AutoDock Tools was used to verify the molecular docking between the main active components of safflower and key targets. Twenty-two safflower active ingredients and 459 related targets were collected from TCMSp database, and the target gene names were converted by Uniprot. Then 73 common targets of safflower active ingredients and ischemic stroke disease were obtained in Venny 2.1.0, and the network diagram of “safflower-active ingredients-cerebral ischemia common target” was constructed. Molecular docking results showed that the main active components showed good affinity to key targets, respectively. Therefore, the combination of the main active components of safflower with key targets to regulate AGE-RAGE, TNF and IL-17 signaling pathways may be an important mechanism of safflower in the treatment of ischemic stroke.

Key words: safflower; ischemic stroke; network pharmacology; molecular docking

近年来缺血性脑卒中的致残率和死亡率持续上升^[1]。缺血性脑卒中是最常见的中风类型, 发生在

颈部或脑部血管阻塞时, 导致脑组织局部缺血缺氧, 引起脑组织软化甚至坏死的神经系统疾病^[2]。目前西医治疗缺血性脑卒中的方法有抗血小板治疗、急性期降压处理及去血肿颅骨切除术、脑室内置管引流术、微创穿刺血肿清除术等^[3,4]。这些方法迅

收稿日期: 2020-12-23 接受日期: 2021-05-20

基金项目: 国家自然科学基金 (81503280, 81573549)

* 通信作者 E-mail: 13572931173@163.com

速、有效,但也伴随一些副作用,如术后再出血、感染及神经损伤、脑灌注压不足等风险。目前中药改善缺血性脑卒中的主要作用包括对抗缺血性脑卒中后的细胞凋亡,减少出血量,同时缓解脑血管痉挛、脑水肿以及神经功能障碍等并发症,进而降低炎症反应。

红花为菊科红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,具有活血通经,散瘀止痛之效^[5]。其主要化学成分有黄酮类、甾体类、酚酸类、木脂素、查尔酮和挥发油等^[6]。近年来红花抗缺血性脑卒中的作用受到关注,其主要通过抑制自由基的产生、抑制血栓形成、抑制细胞凋亡与炎症反应、保护神经细胞、抗氧化能力以及通过调节一些信号通路等发挥脑保护作用^[5,8]。但是,中药发挥疗效具有多成分、多靶点的特点,因此红花抗缺血性脑卒中的机制也是多方面的,但现阶段缺乏对红花抗缺血性脑卒中的药效成分及作用机制的整体认识。因此,本研究采用网络药理学和分子对接技术相结合的方法,通过构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”三者间网络关系,并对红花抗缺血性脑卒中疾病中作用较强的靶点进行验证,从整体角度阐述红花抗缺血性脑卒中的复杂关系,进而说明红花多成分、多靶点、多通路的药理作用机制。

用^[5,8]。但是,中药发挥疗效具有多成分、多靶点的特点,因此红花抗缺血性脑卒中的机制也是多方面的,但现阶段缺乏对红花抗缺血性脑卒中的药效成分及作用机制的整体认识。因此,本研究采用网络药理学和分子对接技术相结合的方法,通过构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”三者间网络关系,并对红花抗缺血性脑卒中疾病中作用较强的靶点进行验证,从整体角度阐述红花抗缺血性脑卒中的复杂关系,进而说明红花多成分、多靶点、多通路的药理作用机制。

1 资料

本研究使用的数据库及软件相关信息(见表1)。

表1 数据库及软件相关信息

Table 1 Database and software related information

| 名称 Name | 网址 Website | 版本 Version |
|----------------------------|---|------------|
| TCMSP | https://tcmspw.com/tcmsp.php | - |
| Uniprot | https://www.uniprot.org/ | - |
| Genecards | https://www.genecards.org/ | - |
| OMIM | https://omim.org/ | - |
| STRING | https://string-db.org/cgi/input.pl | - |
| RCSB PDB | http://www1.rcsb.org/ | - |
| DAVID | https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp | 6.8 |
| Venny | https://bioinfop.cnib.csic.es/tools/venny/ | 2.1 |
| Cytoscape | - | 3.7.2 |
| AutoDock Tools | - | 1.5.6 |
| AutoDock Vina | - | 1.1.2 |
| Pymol | - | 2.5.0 |
| ChemBio3D Ultra | - | 14.0 |
| Discovery Studio Visualize | - | - |

2 方法

2.1 收集红花活性成分、潜在靶点及转换基因名

登录中药系统药理学数据库与分析平台(TCM-SP),选择“Herb name”,输入“honghua”进行检索,以化合物口服药物生物利用度(oralbioavailability, OB)和类药性(drug-like, DL)为标准,设置 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$,将符合条件的成分导入 Excel 表,即得红花活性成分。研究表明红花中的活性成分羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA),对缺血性脑卒中具有神经保护作用^[9-12]。因此将 HSYA 也列在其中。将红花活性成分对应的靶点导入 Uniprot 数据库中进行基因名的转换,去除重复后

获得红花活性成分对应的基因名。

2.2 筛选缺血性脑卒中疾病靶点

利用人类基因(Genecards)、人类孟德尔遗传(OMIM)数据库,以“ischemic stroke”作为关键词检索,去除重复后,得到与缺血性脑卒中相关靶点。从中筛选出评分大于 15 的缺血性脑卒中疾病靶点进行分析。

2.3 获取共同靶点

将红花活性成分对应靶点与缺血性脑卒中疾病对应靶点导入在线 Venny 中,绘制韦恩图,得到红花作用靶点与缺血性脑卒中疾病靶点的交集,即共同靶点。获得红花潜在治疗缺血性脑卒中疾病作用靶点。

2.4 构建 PPI 网络及筛选核心靶点

将 Venny 中筛选到的共同靶点, 导入 STRING 数据库, 选择“Homo sapiens”, 隐藏离散节点, 得到蛋白质之间的相互作用关系, 获得 PPI 网络中的关键节点基因。利用 Cytoscape 3.7.2 将关键节点基因按 degree 值排列, 绘制相关靶点网络图, 并构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”三者间网络关系图, 该网络中有 10 个化合物能与 5 个及以上靶点发生相互作用。

2.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将共同靶点导入 DAVID 数据库, 构建可视化网络。选择“Homo sapiens”, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 设定 $P\text{-value} \leq 0.05$, 筛选出符合条件的条目, 对其进行可视化分析。GO 富集分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC) 相关过程, 这些参与红花治疗缺血性脑卒中的整个过程。KEGG 富集分析主要对信号通路进

行富集, 筛选出红花治疗缺血性脑卒中最可能的信号通路。

2.6 分子对接验证

选择共同靶点中 degree 值排名较高的靶点基因与“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”网络中排名靠前的活性成分进行分子对接。从 TCMS 数据库获取红花活性成分的分子结构 mol2 格式, 在 RCSB PDB 数据库将对应靶点基因转换成 3D 分子结构 pdb 格式。通过 Pymol 2.5.0 对分子进行去水和剔除修饰配体, 利用 AutoDock Tools 1.5.6 将红花活性成分和靶点基因转换为 pdbqt 格式。最后采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接, 通过 Pymol 2.5.0 获得化合物的优势构象, 运用 Discovery Studio Visualize 将分子对接得分较高且构象较稳定的化合物与靶点基因进行可视化分析。

3 结果

3.1 红花活性成分

通过筛选获得红花活性成分 23 种 (见表 2)。

表 2 红花 23 种活性成分信息表

Table 2 Information table of 23 active ingredients of safflower

| 序号 No. | 分子 ID Mol ID | 分子名称 Molecule name | 生物利用度 OB (%) | 类药性 DL |
|-----------|-----------------|--|-----------------|-----------|
| 1 | MOL000449 | 豆甾醇 Stigmasterol | 43.83 | 0.76 |
| 2 | MOL001771 | Poriferast-5-en-3beta-ol | 36.91 | 0.75 |
| 3 | MOL002776 | 中黄芩苷 Baicalin | 40.12 | 0.75 |
| 4 | MOL000358 | β -谷甾醇 Beta-sitosterol | 36.91 | 0.75 |
| 5 | MOL000953 | CLR | 37.87 | 0.68 |
| 6 | MOL002690 | 羟基红花黄色素 A Hydroxysafflor yellow A | 4.77 | 0.68 |
| 7 | MOL002695 | 木脂素 Lignan | 43.32 | 0.65 |
| 8 | MOL002773 | β -胡萝卜素 Beta-carotene | 37.18 | 0.58 |
| 9 | MOL002680 | Flavoxanthin | 60.41 | 0.56 |
| 10 | MOL002706 | Phytoene | 39.56 | 0.50 |
| 11 | MOL002707 | Phytofluene | 43.18 | 0.50 |
| 12 | MOL002694 | 4-[(E)-4-(3,5-Dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene)but-2-enylidene]-2,6-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one | 48.47 | 0.36 |
| 13 | MOL002710 | Pyrethrin II | 48.36 | 0.35 |
| 14 | MOL002698 | Lupeol-palmitate | 33.98 | 0.32 |
| 15 | MOL002721 | 槲皮万寿菊素 Quercetagetin | 45.01 | 0.31 |
| 16 | MOL000098 | 槲皮素 Quercetin | 46.43 | 0.28 |
| 17 | MOL002712 | 6-羟基山柰酚 6-Hydroxykaempferol | 62.13 | 0.27 |
| 18 | MOL000006 | 木犀草素 Luteolin | 36.16 | 0.25 |
| 19 | MOL002719 | 6-Hydroxynaringenin | 33.23 | 0.24 |

续表 2(Continued Tab. 2)

| 序号 No. | 分子 ID Mol ID | 分子名称 Molecule name | 生物利用度 OB(%) | 类药性 DL |
|-----------|-----------------|--|----------------|-----------|
| 20 | MOL000422 | 山柰酚 Kaempferol | 41.88 | 0.24 |
| 21 | MOL002714 | 黄芩素 Baicalein | 33.52 | 0.21 |
| 22 | MOL002717 | Qt_carthamone | 51.03 | 0.20 |
| 23 | MOL002757 | 7,8-Dimethyl-1 <i>H</i> -pyrimido[5,6- <i>g</i>]quinoxaline-2,4-dione | 45.75 | 0.19 |

3.2 获取共同靶点

将 23 种红花活性成分对应的靶点去除重复后导入 Uniprot 数据库转换基因名,共获得 459 个靶点,利用 Genecards 数据库筛选出评分大于 15 的缺

血性脑卒中疾病靶点 249 个,在 Venny 中取交集得 74 个红花潜在治疗缺血性脑卒中疾病的作用靶点(见图 1)。

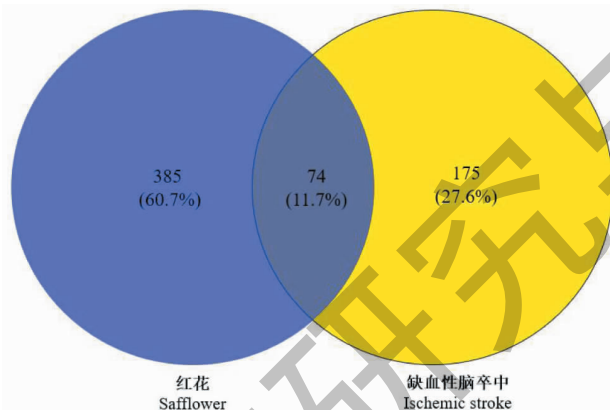


图 1 红花与缺血性脑卒中靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the targets of safflower and ischemic stroke

3.3 构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”网络图及核心靶点筛选

将 74 个共同靶点导入 STRING 数据库,选择“Homo sapiens”,得到各靶点间相互作用网络图(见图 2)。将 STRING 数据库中运行的结果导入 Cytoscape 3.7.2 中,对各靶点之间关系进行处理,依据 degree 值筛选出排名前 20 的靶点,绘制各靶点间相互作用关系图,图中圆圈大小表示靶点作用强度,圆圈越大,表明作用越强(见图 3)。将红花、红花活性成分和红花与疾病共同作用靶点导入 Cytoscape 3.7.2,构建“红花-活性成分-脑缺血共同靶点”网络图(见图 4)。

3.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

采用 DAVID 6.8 数据库和 R 语言,将 74 个潜在靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。通过 GO 富集分析,共得 226 个条目,其中 BP 条目 170 个, MF 条目 28 个, CC 条目 28 个;根据 Count 值由大到小的顺序,分别选取前 6 个分析条目, BP 中排

名靠前的三个过程分别为 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、炎症反应(inflammatory response)和基因表达的正调控(positive regulation of gene expression),说明红花治疗缺血性脑卒中疾病的靶点主要与炎症反应等密切相关(见图 5)。通过 KEGG 富集分析,共得 92 条信号通路,根据 *P*-adjust 和 Count 值对红花治疗缺血性脑卒中疾病的代谢通路进行分析,发现主要涉及 AGE-RAGE、PI3K-Akt、TNF、HIF-1、IL-17 信号通路(见图 6)。

3.5 分子对接验证

一般认为配体与受体结合,结合能越低,其构象越稳定,结合能 ≤ -4.25 kcal/mol 提示有一定结合活性, ≤ -5.0 kcal/mol 说明有较好结合活性, ≤ -7.0 kcal/mol 表示有较强结合活性^[13]。通过 AutoDock Vina 进行分子对接,对接结果如表 3,利用 Discovery Studio Visualize 将红花 5 种主要活性成分与关键靶点对接,将结合活性强的结果进行可视化处理(见图 7)。

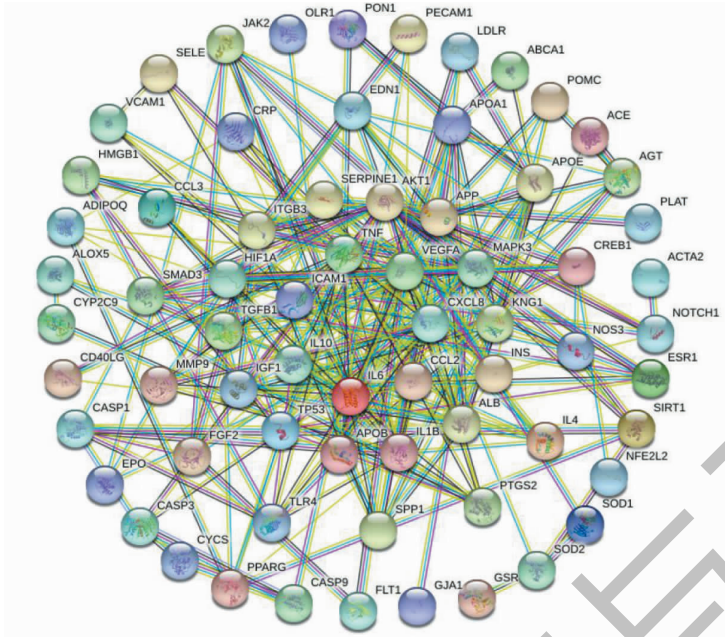


图2 红花潜在在治疗缺血性脑卒中作用靶点 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network of potential therapeutic targets of safflower for ischemic stroke

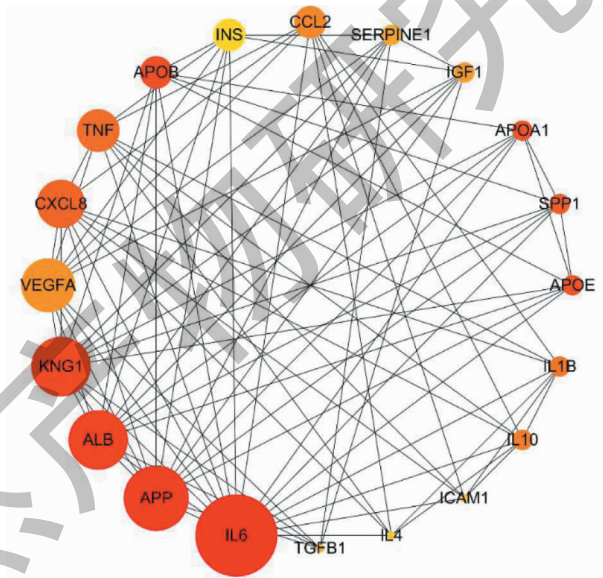


图3 排名前20靶点间相互作用关系

Fig. 3 Interaction relationships among the top 20 targets

4 讨论与结论

缺血性脑卒中会造成一系列不利影响,包括氧化应激、炎症反应、神经细胞凋亡和认知障碍等^[1]。中医认为中风的主要病机在于阴阳失调,气血逆乱,治疗原则多以祛风通络、活血化瘀为主^[14]。而红花是我国传统中药,属活血化瘀类,多见于活血化瘀类的复方中^[15]。近年来在脑血管疾病中应用广泛,但其作用机制仍不明确,因此本文首次采用网络药理

学和分子对接技术对红花治疗缺血性脑卒中机制进行探讨。

通过网络药理学发现,红花活性成分中槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)、豆甾醇(stigmasterol)、木犀草素(luteolin)和羟基红花黄色素A(HSYA)作用靶点居多,是红花的主要活性成分。其中槲皮素^[16]、山奈酚^[17]、豆甾醇^[18]、木犀草素^[19]、羟基红花黄色素A^[20]均具有抗炎抗氧化的

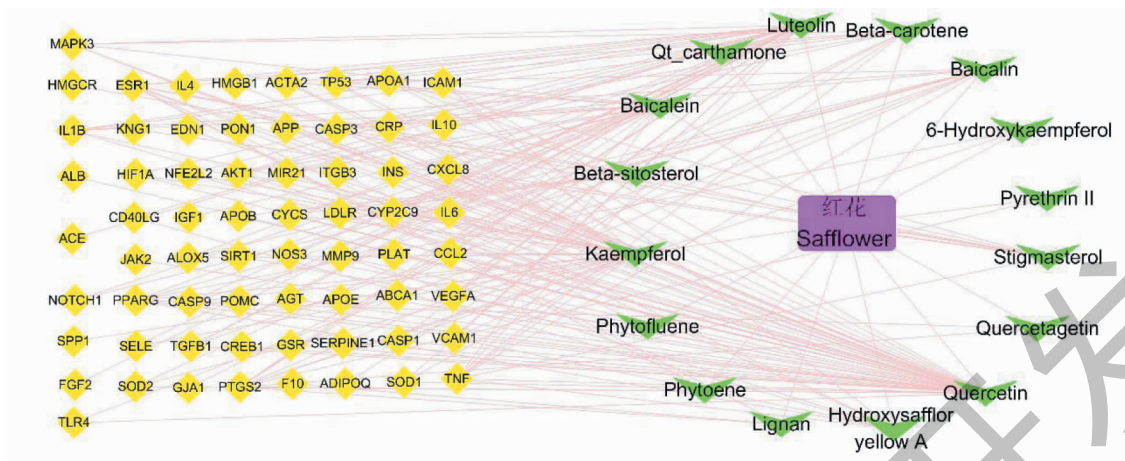


图4 “红花-活性成分-脑缺血共同靶点”网络图

Fig. 4 Network diagram of “safflower-active ingredient-cerebral ischemia common target”

注:绿色节点表示红花活性成分;黄色节点表示红花与疾病共同作用靶点。Note: Green nodes represent active components of safflower; Yellow nodes represent common targets of safflower and disease.

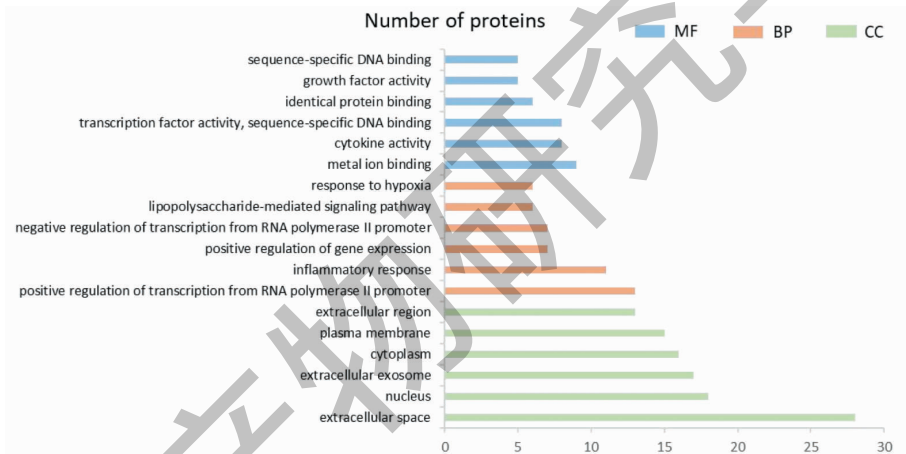


图5 GO 功能富集分析图

Fig. 5 GO functional enrichment analysis diagram

注:图中蓝色、黄色和绿色分别表示 MF、BP 和 CC 过程。Note: Blue, yellow and green represent MF, BP and CC processes respectively.

作用,有作为炎症反应和氧化应激辅助治疗的潜力,山奈酚^[17]和羟基红花黄色素 A^[20]还具有抑制细胞凋亡,改善微循环,矫正受损代谢通路的作用。因此推测这些成分可能是红花治疗缺血性脑卒中的关键。

将靶点间相互作用关系进行分析,通过 degree 值筛选发现 TNF、VEGFA、IL6、CXCL8、ICAM1 和 CCL2 靶点与红花活性成分作用关系强,是红花治疗缺血性脑卒中的关键靶点。研究发现肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 对细胞间黏附分子 1(ICAM1) 的表达具有调节作用,可引发血管炎性,并诱导炎性细胞从血管内转移至神经组织^[21],

白介素-6 (IL-6)^[22]、CXCL8^[23]、趋化因子配体 2 (Chemokine ligand 2, CCL2)^[24] 在缺血性脑卒中后炎症发生、发展过程中起着重要作用,而血管内皮生长因子 A(VEGFA)^[25] 主要参与缺血性脑卒中后血管新生过程。通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,AGE-RAGE、PI3K-Akt、TNF、HIF-1、IL-17 信号通路是红花治疗缺血性脑卒中的主要通路。PI3K-Akt 是细胞内重要存活和抗凋亡的信号转导通路^[26], AGE-RAGE 信号通路可促进炎症因子的表达和释放,诱导细胞凋亡和促进血管新生^[27], HIF-1 信号通路在急性脑缺血时可被激活,介导血管内皮生长因子 VEGF 的表达^[28],表明血管内皮生长因子在

AGE-RAGE 和 HIF-1 信号通路富集,且课题组前期研究表明 HSYA 通过刺激 VEGF 信号传导可治疗缺血性卒中^[29],这与网络药理学预测结果相一致。

因此,红花治疗缺血性卒中是通过多成分、多靶点、多通路发挥抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡和促进血管新生等作用。

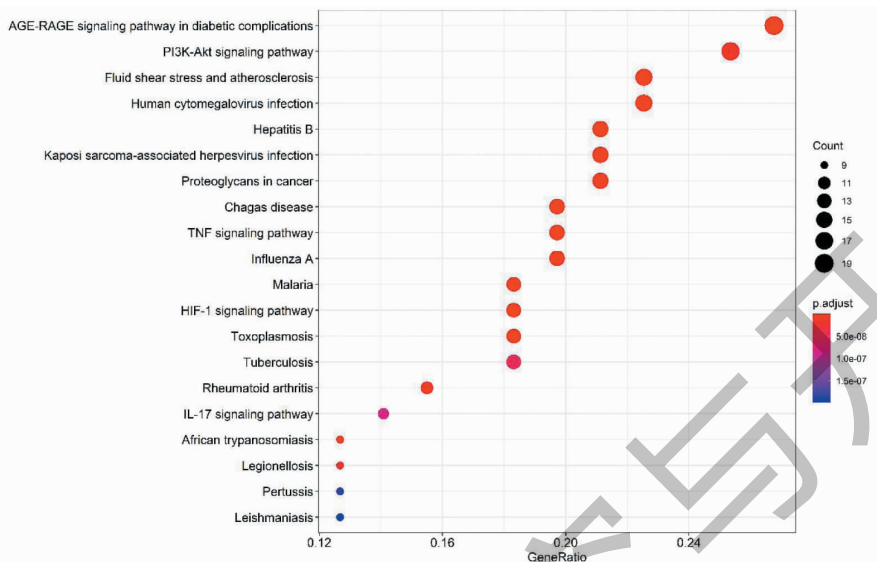


图6 KEGG 通路富集分析气泡图(排名前20)

Fig. 6 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

注:图中气泡大小与颜色表示代谢通路富集程度,气泡越大,颜色越深表明富集程度越高。Note: The bubble size and color in the figure indicate the enrichment degree of metabolic pathway. The larger the bubble, the deeper the color, and the higher the enrichment degree.

表3 红花关键活性成分与靶蛋白对接结果

Table 3 Docking results of key active components of safflower with target protein

| 靶点名称 Target name | 靶蛋白 Target protein | 结合能 Affinity(kcal/mol) | | | | | |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|-------------------|----------------------|------------------|---|
| | | 原始配体 Original ligands | 槲皮素 Quercetin | 山柰酚 Kaempferol | 大豆甾醇 Stigmasterol | 木犀草素 Luteolin | 羟基红花 黄色素 A Hydroxysafflor yellow A |
| TNF | 2AZ5 | -9.1 | -7.8 | -7.3 | -8 | -7.9 | -7.4 |
| IL6 | 4N19 | - | -7.9 | -8 | - | -7.5 | - |
| VEGFA | 4QAF | -6.2 | -5.8 | -6.2 | - | -6.5 | - |
| CXCL8 | 6LFO | - | -6.1 | -5.9 | -7 | -6.3 | - |
| ICAM1 | 1IAM | - | -5.5 | -5.8 | - | -5.7 | -4.7 |
| CCL2 | 1DOK | - | -5.3 | -5.3 | - | -5.6 | - |

通过分子对接技术进一步揭示红花治疗缺血性卒中疾病的作用机制,结果显示关键靶点与红花活性成分对接效果好,其中 TNF 与红花 5 种主要活性成分的结合能均 ≤ -7.0 kcal/mol,表明有较强结合活性,IL6 与槲皮素、山柰酚、木犀草素也有较强结合活性,而 CXCL8 和 VEGFA 与槲皮素、山柰酚、木犀草素结合能均 ≤ -5.0 kcal/mol,有较好结合活性。因此推测红花主要活性成分与关键靶点结合可

能是红花发挥治疗缺血性卒中中的关键。

综上所述,本研究从整体角度阐述红花抗缺血性卒中中的复杂关系,通过网络药理学的方法对红花治疗缺血性卒中机制进行分析,并运用分子对接技术对关键靶点进行验证。研究发现红花主要通过槲皮素、山柰酚和木犀草素等活性成分,作用于 TNF、VEGFA、IL6、CXCL8 等关键靶点,调节炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和血管新生等作用,进而调

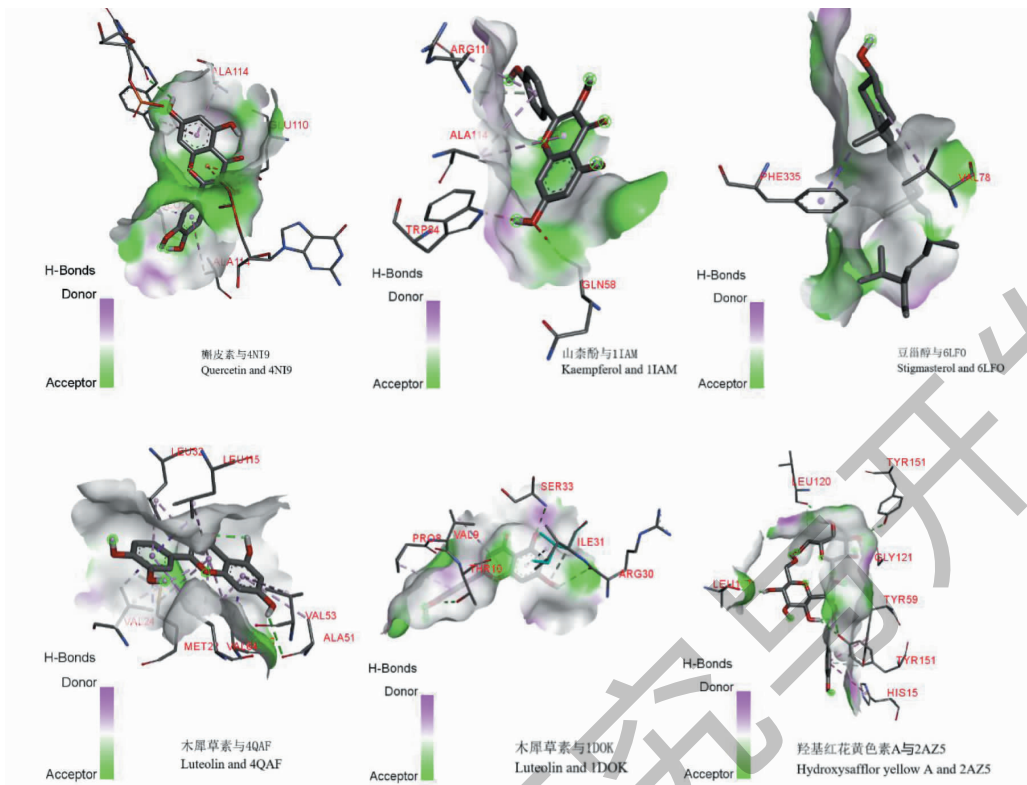


图7 红花关键活性成分与靶蛋白对接可视化图

Fig. 7 Visualization of the docking of key active components of safflower with target protein

控 AGE-RAGE、TNF 和 IL-17 等信号通路治疗缺血性脑卒中。研究结果为红花治疗缺血性脑卒中中的作用机制提供理论指导,也为缺血性脑卒中的药物研发提供参考。

参考文献

- Chen J, Liu PY, Dong XH et al. The role of lncRNAs in ischemic stroke[J]. *Neurochem Int*, 2021, 147:105019.
- Randolph SA. Ischemic Stroke[J]. *Workplace Health Saf*, 2016, 64:444.
- Cordonnier C, Demchuk A, Ziai W, et al. Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management[J]. *Lancet*, 2018, 392:1257-1268.
- Feng ZL, Sun Q, Chen W, et al. The neuroprotective mechanisms of ginkgolides and bilobalide in cerebral ischemic injury: a literature review[J]. *Mol Med*, 2019, 25:57.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:76-77, 151.
- Yang ZF, Mei QB, Jiang YP. Effective components and pharmacological effects of safflower[J]. *Northwest Pharm J(西北药学杂志)*, 2001, 16(3):131-133.
- Wang MJ, Pan XW, Zhang YY, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of hemorrhagic stroke[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(17):226-234.
- Yu L, Liu ZL, He WD, et al. Hydroxysafflor yellow A confers neuroprotection from focal cerebral ischemia by modulating the crosstalk between JAK2/STAT3 and SOCS3 signaling pathways[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40:1271-1281.
- Yu L, Duan Y, Zhao Z, et al. Hydroxysafflor yellow A (HSYA) improves learning and memory in cerebral ischemia reperfusion-injured rats via recovering synaptic plasticity in the hippocampus[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:371.
- Deng L, Wan H, Zhou H, et al. Protective effect of hydroxysafflor yellow A alone or in combination with acetylglutamine on cerebral ischemia reperfusion injury in rat: a PET study using (18) F-fluorodeoxyglucose[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018(825):119-132.
- Sun Y, Xu DP, Qin Z, et al. Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on ischemic stroke[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818:604-609.
- Wang K, Lei L, Cao JY, et al. Research progress on protective effects of safflower and astragalus on cerebral ischemia injury[J]. *Chin Med Herald(中国医药导报)*, 2020, 17(3):22-

- 25.
- 13 Zhang JL, Li H, Wang WJ, et al. Investigation on the mechanism of *Salviae Miltiorrhizae-Cortex Moutan* against cerebral ischemic injury based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:103-113.
- 14 Mo JH, Hua R, Xu HB, et al. Analysis of medication rules of the first batch of masters of Chinese medicine in the treatment of acute stroke [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2020, 51: 4284-4290.
- 15 Zhang ZJ. Synopsis of Golden Chamber (金匱要略) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2017.
- 16 Tian CL, Liu X, Chang Y, et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. 2021, 137:257-264.
- 17 Al-Brakati A, Albarakati AJA, Lokman MS, et al. Possible role of kaempferol in reversing oxidative damage, inflammation, and apoptosis-mediated cortical injury following cadmium exposure [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39:198-209.
- 18 Ahmad Khan M, Sarwar AHMG, Rahat R, et al. Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85:106642.
- 19 Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, et al. Autophagy regulation using luteolin: new insight into its anti-tumor activity, 2020, 20(1):537.
- 20 Ma JY, Chu SL. The research progress of hydroxysafflor yellow A in improving the mechanism of ischemic stroke [J]. *Chin J Modern Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2019, 36:1012-1017.
- 21 Lin WD, Li ZX, Shi SY, et al. Effect of atorvastatin on the expression of IL-17, IL-10 and TNF- α in brain tissue of rats after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2018, 35:504-507.
- 22 Zhang Y. Research progress on the mechanism of acupuncture in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury related signaling pathways [J]. *Shanghai J Acupunct Moxib* (上海针灸杂志), 2021, 40:234-242.
- 23 Villa P, Triulzi S, Cavalieri B, et al. The interleukin-8 (IL-8/CXCL8) receptor inhibitor reparixin improves neurological deficits and reduces long-term inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats [J]. *Mol Med*, 2007, 13:125-133.
- 24 Guo YQ, Zheng LN, Wei JF, et al. Expression of CCL2 and CCR2 in the hippocampus and the interventional roles of propofol in rat cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8:657-661.
- 25 Sui SH, Sun L, Zhang WJ, et al. LncRNA MEG8 attenuates cerebral ischemia after ischemic stroke through targeting miR-130a-5p/VEGFA signaling [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 41:1311-1324.
- 26 Zhang W, Song JK, Yan R, et al. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39:1259-1272.
- 27 Li Z, Xu D, Jing J et al. Network pharmacology-based study to explore the mechanism of the Yiqi Gubiao pill in lung cancer treatment [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21:321.
- 28 Zhang HL, Liu XM, Yang FY, et al. Overexpression of HIF-1 α protects PC12 cells against OGD/R-evoked injury by reducing miR-134 expression [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19:990-999.
- 29 Cao JY, Wang K, Lei L, et al. Astragaloside and/or hydroxysafflor yellow A attenuates oxygen-glucose deprivation-induced cultured brain microvessel endothelial cell death through downregulation of PHLPP-1 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:3597527.