

基于网络药理学、分子对接技术及实验验证研究 黄芪提取物治疗缺血缺氧性脑病的机制

宋丽娅*,李丽华,毕思童

首都医科大学附属北京潞河医院儿科,北京 101149

摘要:运用网络药理学、分子对接技术探究黄芪提取物治疗缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)的机制,并进行实验验证。通过中药系统药理学数据库平台(TCMSP)、UniProt、GeneCards 和 OMIN 数据库获得黄芪提取物的主要活性成分和基因靶点,通过 GeneCards 数据库获得 HIE 的相关靶点;利用 Cytoscape 软件构建黄芪提取物“活性成分-药物靶点”网络。应用 PDB 和 TCMSP 数据库获取分子结构,使用 SYBYL-X2.1 软件进行模拟分子对接。建立大鼠动物试验模型,采用 Western blot 法检测关键蛋白的表达情况。根据 TCMSP 数据库,共得到黄芪提取物的 70 个活性成分及其 350 个相关靶点,去除重复靶点和基因注释后,最终获得“黄芪提取物”有效成分的 120 个靶点。通过将黄芪提取物的 120 个靶点与 HIE 的前 242 个靶点(相关性分数 >5)相映射,筛选出黄芪提取物治疗 HIE 的 18 个潜在靶点,发现 4-羟基肉桂酸、顺式阿维酸、黄芪紫檀烷苷、常春藤皂苷元、华良姜素为关键活性成分。将 18 个潜在靶点输入 STRING 中进行蛋白相互作用分析,共发现 3 个核心靶点(degree 值 >30),分别为诱导型一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、前列腺素氧化环化酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)。动物实验显示,黄芪提取物能够降低大鼠模型海马组织内的 NOS2、PTGS2、MAPK4、CASP8 蛋白表达。通过网络药理学分析和实验验证得出黄芪提取物能够通过多靶点、多通路起到抑制神经元凋亡、保护神经细胞的作用。

关键词:黄芪提取物;缺血缺氧性脑病;分子对接;网络药理学

中图分类号:R286

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)3-0520-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.3.015

Study on the mechanism of Astragali Radix extract in treating hypoxic-ischemic encephalopathy based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

SONG Li-ya*, LI Li-hua, BI Si-tong

Department of Pediatrics, Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

Abstract: Network pharmacology and molecular docking techniques were used to explore the mechanism of Astragali Radix extract in the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). Ischemic encephalopathy (HIE) was studied and verified. The main active components and gene targets of Astragali Radix extract were obtained through TCMSP, UniProt, GeneCards and OMIN databases, and HIE related targets were obtained through GeneCards database. The "active ingredient-drug target" network of Astragali Radix extract was constructed using Cytoscape software. PDB and TCMSP databases were used to obtain the molecular structure, and SYBYL-X2.1 software was used to simulate the molecular docking. The rat model was established and the expression of key proteins was detected by Western blot. According to the TCMSP database, a total of 70 active components and 350 related targets of Astragali Radix extract were obtained. After removing repeated targets and gene annotation, 120 targets of active components of Astragali Radix extract were obtained. By mapping 120 targets of Astragali Radix extract with the first 242 targets of HIE (correlation score >5), 18 potential targets of Astragali Radix extract for HIE were

selected. 4-Hydroxycinnamic acid, *cis*-ferulic acid, astrapterocarpan, hederagenin and kumatakenin were found to be the key active ingredients. Eighteen potential targets were input into STRING for protein interaction analysis, and a total of three core targets (degree > 30) were found, which were respectively inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), superoxide dismutase 1 (SOD1). Animal experiments showed that Astragalus Radix extract could reduce the expression of NOS2, PTGS2, MAPK4 and CASP8 proteins in the hippocampus of rat models. Through network pharmacological analysis and experimental verification, it is concluded that Astragalus Radix extract can inhibit neuronal apoptosis and protect nerve cells through multi-target and multi-pathway.

Key words: Astragalus Radix extract; ischemic hypoxic encephalopathy; molecular docking; network pharmacology

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是一类影响新生儿、婴幼儿神经生长发育的疾病,幸存者往往会遗留多种神经后遗症,给患儿及家庭带来沉重的负担。临幊上尚无特效治疗HIE的药物,研究HIE的病理生理机制对于找到更有效的治疗方案具有重要意义。研究表明,氧化应激、钙的内流、自由基生成、酸中毒、离子失衡、炎症、凋亡、自噬、坏死等在HIE发病机制中都起着重要作用^[1]。在中医药领域,有报道指出,黄芪及其制剂在治疗HIE方面显示出较好的效果^[2,3]。现代药理学证实,黄芪提取物具有清除氧自由基、抗感染、保护血管内皮的功效,在临幊上多被用于治疗心、脑血管疾病^[4]。本研究拟通过网络药理学和分子对接技术分析黄芪提取物治疗HIE的作用机制,为促进临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据库筛选黄芪的主要成分和基因靶点

利用中药系统药理学数据库平台(TCMSP)筛选黄芪提取物中的活性成分,根据毒药物动力学参数(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)设置筛选条件:口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%,药物相似性(drug-likeness, DL)≥0.18。建立活性成分库。利用TCMSP和Swiss Target Prediction数据库查询黄芪提取物活性成分对应的所有基因靶点,去除重复靶点后运用Perl语言和UniProt数据库对基因靶点进行符号转换。

1.2 HIE相关基因靶点获取

在Gene Cards和OMIM数据库中以“hypoxic-ischemic encephalopathy”为关键词检索HIE相关基因靶点,汇总后去除重复值并根据“相关性分数”提取排名靠前的242个基因靶点。利用Cytoscape软件构建“黄芪活性成分-药物靶点”网络图获得交集靶点,并对活性成分与潜在靶点的关系进行分析。

1.3 蛋白相互作用网络构建

通过STRING数据库进行黄芪活性成分的潜在

靶点与HIE靶点的蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,构建蛋白-蛋白相互作用关系网络。相关参数设置为:物种限制为人类,信度>0.40,余默认设置。删除离散目标并下载TSV文件导入Cytoscape3.6.1软件绘制PPI网络图。利用拓扑分析插件cytoHubba进行拓扑分析。根据节点大小及颜色深浅度、Degree值筛选黄芪提取物治疗HIE的核心活性成分及靶点。

1.4 分子对接技术

在PDB和TCMSP数据库中下载活性蛋白的3D共晶结构和小分子配体结构,将其保存为pdb格式;利用PyRx软件删除小分子配体和水分子,运用SYBYL-X2.1软件将活性成分和靶蛋白在加氢、加荷后由pdb格式转换为mol2格式,通过自对接方式运用SYBYL-X2.1进行对接,计算结合能,并进行可视化图像分析。

1.5 动物实验验证

1.5.1 药品、仪器和试剂

黄芪(批号:粤20160335,厂家:康美药业股份有限公司生产,鉴定信息:黄芪甲苷0.084%、毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.025%)。

蛋白提取试剂盒、ECL显色试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(批号:22080302、21121006、22110912,北京中杉金桥生物科技公司);诱导型一氧化氮合酶2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、前列腺素氧化环化酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)、丝裂原活化蛋白激酶4(mitogen-activated protein kinase 4, MPAK4)、胱天蛋白酶8(Caspase 8, CASP8)多克隆兔抗(批号:21111305、22020104、22061205、22021512、21100913,Abnova公司);β-actin鼠抗、十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)(批号:21091007、21110802,美国Sigma公司);ChemiDoc-MP全能型凝胶成像分析系统(山东三瑞科技有限公司);HS3345石蜡切片机(湖北慧

达仪器有限公司)。

1.5.2 黄芪提取物注射液的制备

取黄芪 50 g 切片,加水煎煮 2 次,合并提取液,减压浓缩,浓缩液加乙醇使含醇量达 60%,滤取析出物,加水溶解,离心除去不溶物,滤液减压浓缩至适量,加乙醇使含醇量达 80%,室温静置过夜,过滤,滤液回收乙醇,并浓缩至 5 mL,浓缩液中加入适量注射用水配至 50 mL 并冷藏过夜,过滤后滤液使用 20% NaOH 调节 PH 至 7.5 以上,煮沸后关火,稍冷后加活性炭 0.25 g,静置 4 h 后使用 4 号垂溶漏斗精滤,完成后按照《中国药典 2020 版》中中药注射剂型相关标准进行检验,合格按照 50 g 黄芪/支制备注射液并装入安瓿瓶中密封备用。

1.5.3 实验动物

SD 大鼠采购于首都医科大学动物实验中心(动物许可证号:SCXK(京)2018-0057)本实验已经首都医科大学动物实验伦理审核(伦理批号:AEEI-2023-015),将雌雄比 2:1 大鼠混合饲养于 SPF 级动物房内,保证充足的温度、湿度、食物。饮用水等条件,使雌鼠成功受孕,待自然分娩后将母鼠和新生大鼠单独饲养。按照 3R 原则给予动物人道主义关怀。

1.5.4 建模及分组

建模:将 7 日龄新生大鼠乙醚麻醉后,取仰卧位固定于操作台上,75% 酒精消毒颈部,于颈正中切开皮肤,暴露颈总动脉并结扎 2 h,而后恢复 2 h,建立大脑缺血模型,消毒缝合切口。而后将新生大鼠置于 37 °C 恒温水浴缺氧舱中,向舱内持续 2 h 通入 8% O₂ 和 92% N₂ 的混合气体,完成缺氧过程。至此完成缺血缺氧模型建立,建模小鼠分为治疗组和模型组,各 10 只。

假手术组模型建立:假手术组 10 只大鼠仅暴露左侧颈总动脉,不接扎,不做缺氧处理。而后将黄芪提取物注射液以 3 mL/kg 剂量尾静脉注射于治疗组,模型组和假手术组注射等量的生理盐水。每天 1 次,连续 5 d。而后末次给药结束后 24 h,用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,所有大鼠均实施安乐死,所有入组大鼠均分离出左侧海马组织,迅速置于-80 °C 冰箱中保存待用,操作完成后对大鼠尸体进行无害化处理。

1.5.5 相关蛋白表达检测

将分离出的海马组织使用蛋白提取试剂盒提取各海马组织总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。而后各取 50 μg 进行 SDS 电泳,转 PVDF 膜、脱脂、封闭、1:2 000 稀释后 NOS2、PTGS2、SOD1、MAPK4、CASP8 多克隆兔抗 4 °C 过夜孵育,用 ECL 显色试剂盒显色,以 β-actin 为内参,全能型凝胶成像分析系统分析蛋白表达水平。

1.6 统计学方法

统计分析采用 SPSS22.0 软件进行数据处理,计量数据采用平均数 ± 标准差表示,组间两两比较行 t 检验,多组间比较采用 F 检验,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪提取物的活性成分和基因靶点

根据 TCMSP 数据库,共得到黄芪提取物的 70 个活性成分。共获得 350 个相关靶点,去除重复靶点和基因注释后,最终获得“黄芪提取物”有效成分的 120 个靶点。

2.2 黄芪提取物潜在靶点的获得

通过将黄芪提取物的 120 个靶点与 HIE 的前 242 个靶点(相关性分数 >5)相映射,筛选出黄芪提

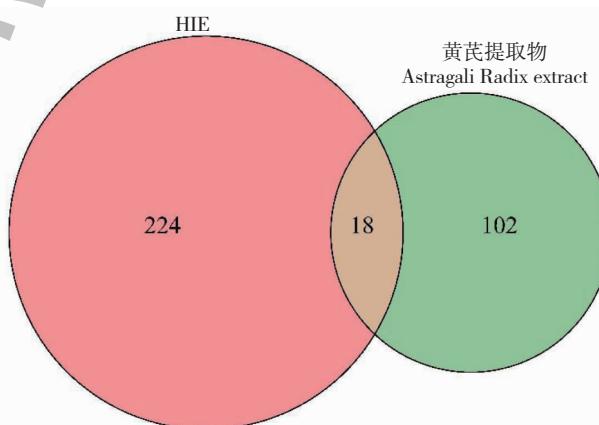


图 1 黄芪提取物与 HIE 靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn plot of Astragali Radix extract and HIE target

取物治疗 HIE 的 18 个潜在靶点,结果如图 1 所示;利用 Cytoscape 软件构建“黄芪提取物活性成分-药物靶点”网络图获得交集靶点,利用插件 cytoHubba 的 MCC 算法并对活性成分与潜在靶点的关系进行

分析(见图 2),发现 4-羟基肉桂酸、顺式阿维酸、黄芪紫檀烷苷、常春藤皂苷元、华良姜素具有较高的 Degree 值,为关键活性成分(见表 1)。

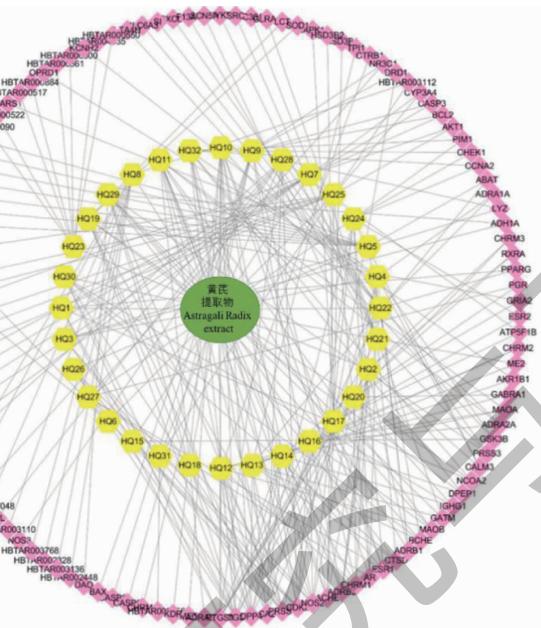


图 2 黄芪提取物化合物-靶点网络图

Fig. 2 Compound-target network of Astragalus Radix extract

注:绿色圆形表示目标中药;黄色圆形表示主要成分;粉色菱形表示靶点。Note: Green circle represents the target Chinese medicine; Yellow circles represent the main components; Pink diamond represents the target point.

表 1 黄芪提取物化合物-靶点网络中关键化合物的相关参数

Table 1 Related parameters of key compounds in Astragalus Radix extract compound-target network

序号 No.	代号 Code	分子量 Molecular weight	口服生物利用度 OB (%)	PubChem ID	化合物名称 Compound name
1	HQ12	164.16	45.98	1549106	4-羟基肉桂酸 4-Hydroxycinnamic acid
2	HQ16	194.18	54.97	1548883	顺式阿维酸 cis-Ferulic acid
3	HQ2	314.3	53.74	15689655	黄芪紫檀烷苷 Astrapterocarpan
4	HQ20	472.7	36.91	73299	常春藤皂苷元 Hederagenin
5	HQ24	314.29	50.83	5318869	华良姜素 Kumatakenin

2.3 PPI 网络分析

将 18 个潜在靶点输入 STRING 中进行蛋白相互作用分析,根据信度 > 0.40 提取结果,将 TSV 文件导入 Cytoscape3.6.1 软件绘制 PPI 网络图(见图 3);根据 PPI 分析结果,共存在 48 个节点,512 条边,利用插件 cytoHubba 的 MCC 算法发现 3 个核心靶点(Degree 值 > 30),分别为 NOS2、PTGS2、SOD1。前 10 个潜在靶点信息见表 2。

2.4 分子对接

利用 SYBYL-X2.1 软件对黄芪提取物治疗 HIE 的 3 个关键靶点(NOS2、PTGS2、SOD1)与 5 个活性化合物进行对接,探究其相互作用。从 PDB 数据库中检索并下载得到 3 个关键靶点的受体蛋白共晶结构。图 4 为分子对接的可视化结果,相关的详细信息列于表 3 中。通常认为分子对接得到的结合能若小于 -5 kcal/mol ,说明靶点与化合物具有一定的结

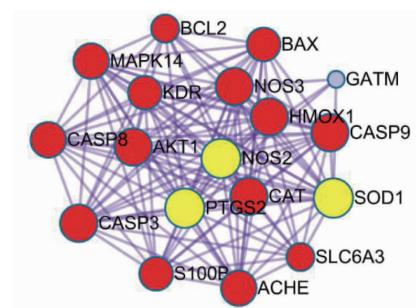


图3 黄芪提取物和HIE核心靶点PPI网络筛选图

Fig. 3 PPI network screening diagram of Astragalus Radix extract and HIE core target

表2 前10个潜在靶点的信息

Table 2 Information on the top 10 potential targets

靶点 Target	全称 Full name	度值 Degree
NOS2	诱导型一氧化氮合酶 2 Nitric oxide synthase 2	68
PTGS2	前列腺素氧化环化酶 2 Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	65
SOD1	超氧化物歧化酶 1 Superoxide dismutase 1	63
MAPK4	丝裂原活化蛋白激酶 4 Mitogen-activated protein kinase 4	60
CASP8	半胱氨酸蛋白酶 8 Caspase 8	59
CAT	过氧化氢酶 Catalase	55
SLC6A3	溶质载体家族 6 成员 3 Solute carrier family 6 member 3	52
NOS3	内皮型一氧化氮合酶 3 Nitric oxide synthase 3	49
AKT1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 AKT serine/threonine kinase 1	40
S100B	S100 钙结合蛋白 B S100 Calcium binding protein B	37

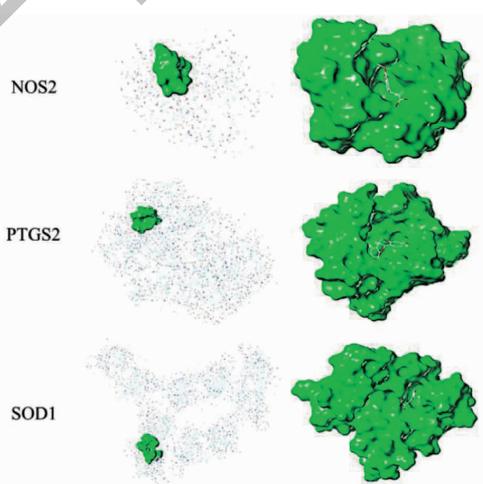


图4 4-羟基肉桂酸分子的对接可视化图

Fig. 4 Docking Visualization of 4-hydroxycinnamic acid molecule

注:左侧图片为NOS2、PTGS2、SOD1的分子结构及对接核心,右侧为4-羟基肉桂酸分子分别与NOS2、PTGS2、SOD1对接核心进行模拟对接。

Note: The left images show the molecular structures and docking cores of NOS2, PTGS2, and SOD1; the right images show the simulated docking of 4-hydroxycinnamic acid with NOS2, PTGS2, and SOD1 docking cores, respectively.

表3 黄芪提取物关键活性成分与关键靶点的结合能

Table 3 Binding energy of key active components and key targets of Astragalus Radix extract

成分 Ingredient	结合能 Binding energy (kcal/mol)		
	NOS2	PTGS2	SOD1
4-羟基肉桂酸 4-Hydroxycinnamic acid	-7.4	-6.8	-5.6
顺式阿维酸 <i>cis</i> -Ferulic acid	-8.1	-7.7	-8.8
黄芪紫檀烷苷 Astrapterocarpan	-7.6	-7.5	-8.9
常春藤皂苷元 Hederagenin	-6.0	-7.6	-7.4
华良姜素 Kumatakenin	-6.8	-8.2	-8.5

合活性,且结合能越低,两者结合越稳定。

2.5 动物实验证

动物实验显示,治疗组大鼠海马组织中 NOS2、PTGS2、MAPK4、CASP8 蛋白表达水平低于模型组,SOD1 蛋白表达水平高于模型组,假手术组大鼠海马组织中 NOS2、PTGS2、MAPK4、CASP8 蛋白表达水平低于治疗组和模型组,SOD1 水平高于治疗组和模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 5、表 4)。

3 讨论与结论

HIE 最主要的病理生理机制是脑组织的缺血缺氧。脑组织缺血缺氧后会引起一系列病理生理变化,主要有细胞凋亡、炎症反应、氧化应激反应,缺血缺氧神经损伤的不同阶段均由上述三种生理变化间的相互作用所致^[5]。新生儿 HIE 的治疗一直以来是临床的研究热点和难点。传统的“三支持”和“三

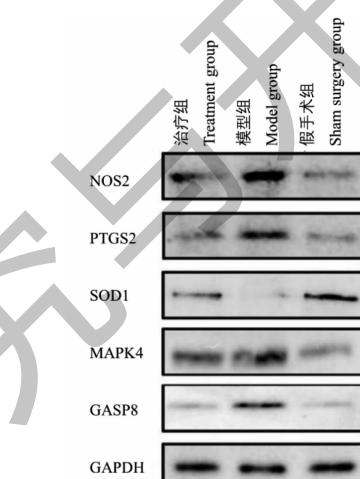


图5 大鼠海马组织中 NOS2、PTGS2、SOD1、MAPK4、CASP8 蛋白表达情况

Fig. 5 Expression of NOS2, PTGS2, SOD1, MAPK4 and CASP8 proteins in rat hippocampal tissue

表4 大鼠海马组织中 NOS2、PTGS2、SOD1、MAPK4、CASP8 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Expression of NOS2, PTGS2, SOD1, MAPK4, CASP8 proteins in rat hippocampal tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	NOS2	PTGS2	SOD1	MAPK4	CASP8
治疗组 Treatment group	0.37 ± 0.06	0.41 ± 0.08	0.47 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0.27 ± 0.04
模型组 Model group	$0.58 \pm 0.07^*$	$0.65 \pm 0.10^*$	$0.16 \pm 0.03^*$	$0.74 \pm 0.11^*$	$0.43 \pm 0.08^*$
假手术组 Sham surgery group	$0.09 \pm 0.02^*$	$0.13 \pm 0.03^{*\#}$	$0.75 \pm 0.12^{*\#}$	$0.24 \pm 0.05^{*\#}$	$0.19 \pm 0.02^{*\#}$

注:与治疗组比较,^{*} $P < 0.05$,与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with treatment group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$

对症”疗法受到胎龄、时间、医疗设施等多种因素的限制,HIE 的治疗效果有限。临幊上一直在迫切寻求 HIE 治疗的补充或替代疗法。黄芪作为我国的传统中药,近年来通过现代药理学研究对黄芪活性成分的作用取得了重大进展。研究表明,黄芪具有增强机体免疫力、抗缺氧和氧化应激及改善血管内皮功能的作用^[6]。动物实验研究显示,黄芪能够上调大鼠脑组织中 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白表达水平,抑

制神经细胞凋亡、减轻缺血缺氧所致的脑损伤^[7]。但目前临幊上关于黄芪的主要活性成分及作用机制研究尚不明确。网络药理学和分子对接是近年来兴起的一种基于大数据库进行药理学研究的技术,通过大数据获得相关药物的主要活性成分和作用靶点与疾病靶点进行分子对接进而分析药物的具体作用机制^[8]。根据 TCMSP 数据库,共得到黄芪提取物的 70 个活性成分。共获得 350 个相关靶点,去除重复

靶点和基因注释后,最终获得“黄芪提取物”有效成分的120个靶点。

通过拓扑分析得出的化合物-网络靶点图可以看出黄芪发挥治疗HIE的主要活性成分为4-羟基肉桂酸、顺式阿维酸、黄芪紫檀烷苷、常春藤皂苷元、华良姜素五个活性成分。4-羟基肉桂酸被证实具有清除氧自由基的作用。动物实验显示^[9],4-羟基肉桂酸能够缓解大鼠神经病理性疼痛。一项西藏地区的研究结果表明,顺式阿维酸能够有效提高机体的血氧饱和度,缓解缺氧造成的不良症状;且该活性成分能够促进黄芪甲苷在体内的吸收^[10]。黄芪甲苷已经被大量研究证实具有抗炎、抗细胞凋亡、免疫调节的生物活性,是一种重要的神经保护剂^[11]。黄芪紫檀烷苷是从黄芪中分离出来的一种化合物,可以抑制人血小板衍生生长因子bb(eukaryotic platelet derived growth factor BB, PDGF-BB)刺激诱导的细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)的激活,抑制丝裂原活化蛋白(mitogen activating protein, MAP)激酶的磷酸化^[12];还可通过抑制ERK1/2 MAP激酶级联反应途径,抑制PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞增殖^[13]。网络药理学研究表明,华良姜素作为黄芪的活性成分能够通过PDK-Akt信号通路、肿瘤坏死因子、MAPK信号通路发挥治疗膝骨关节炎的作用^[14]。

将120个靶点与HIE的242个靶点相映射后得到18个潜在靶点。再通过PPI网络分析得出NOS2、PTGS2、SOD1、MAPK4、CASP8为黄芪治疗HIE的核心靶点。炎症被认为是HIE的重要致病因素,大量炎症因子能够加速神经元细胞的凋亡和坏死。NOS2能够促进中枢神经系统和周围神经系统的神经组织内产生一氧化氮,参与炎症和氧化应激反应。动物实验显示,敲除大鼠NOS2基因能够抑制Rac1的合成,进而抑制肿瘤坏死因子- α 的促炎作用。SOD1的主要作用是在体内发挥抗氧化作用^[15]。SOD1在机体氧化应激反应中发挥着重要作用,其能够促进过细胞内的过氧化氢分解,减少氧自由基的产生,从而使得机体氧化-抗氧化系统维持平衡^[16]。体外细胞实验显示,PTGS2过表达能够加剧糖氧剥夺模型下的PC12的细胞损伤^[17]。当局部缺血缺氧并释放细胞因子后可以导致MAPK4通路激活,从而进一步刺激免疫细胞释放促炎因子导致局部炎症反应加重^[18]。CASP8是细胞凋亡和坏死性凋亡的关键调节因子,也是通过其二聚化和酶活性

调节炎症反应的关键因子,其含量升高预示着局部炎性反应的增强^[19,20]。从上述分析中我们可以看出黄芪的主要活性成分通过作用于上述靶点来发挥治疗HIE的作用,其生物过程可能涉及炎症反应、氧化应激细胞、损伤修复等。

分子对接结果显示,黄芪中的4-羟基肉桂酸、顺式阿维酸、黄芪紫檀烷苷3种活性成分与关键靶点具有良好的结合活性,主要是依靠疏水键或氢键结合,发挥治疗HIE作用。就结合能看,SOD1和黄芪紫檀烷苷的结合能最低,为-8.9 kcal/mol。动物实验验证结果显示治疗组大鼠海马组织中NOS2、PTGS2蛋白表达水平低于模型组,SOD1蛋白表达水平高于模型组,假手术组大鼠海马组织中NOS2、PTGS2蛋白表达水平低于治疗组和模型组,SOD1水平高于治疗组和模型组,进一步证实了黄芪提取物在治疗HIE中具有可靠作用。相关研究表明^[21],黄芪皂苷能够通过激活Nrf2/HO信号通路,上调下游抗氧化基因HO-1的表达,抑制一氧化氮生成,增加SOD活性,提高脑组织抗氧化能力。现代药理学还证实,黄芪除了具有强大的清除自由基的作用外,其所含的黄酮类物质还能够降低脑组织缺血再灌注时的血小板活性,抑制环氧合酶-2的表达,减轻脑组织缺血再灌注损伤^[22,23]。

综上所述,本文利用网络药理学和分子对接技术分析了黄芪提取物中的主要活性成分治疗HIE的机制,得出了黄芪提取物治疗HIE主要是4-羟基肉桂酸、顺式阿维酸、黄芪紫檀烷苷三种成分通过作用于NOS2、PTGS2、SOD1、MAPK4、CASP8等关键靶点,来发挥治疗HIE的作用。网络药理学分析也证实了此过程是一个多成分-多靶点-多通路协同作用的结果。

参考文献

- 1 Sun YF, Cai C. Research progress of treatment for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. Chin J Appl Clin Pediatr(中华实用儿科临床杂志), 2021, 36:631-634.
- 2 Lu N, Bai Y, Zhao C, et al. Effect of Huai Qi Huang on asthma in rats and the mechanism research[J]. Chin J Contemp Pediatr(中国当代儿科杂志), 2020, 22:171-176.
- 3 Zhang SB, Wang XY, Qi YH. Effects of Astragalus Injection on antioxidant capacity, insulin resistance and renal function in patients with DKD(CKD3)[J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol(中国中西医结合肾病杂志), 2020, 21:497-500.
- 4 Zhang YH, Yang ML, Zhou XQ, et al. Study on the mecha-

- nism of Huangqisan in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental verification [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 2119-2129.
- 5 Russ JB, Simmons R, Glass HC. Neonatal encephalopathy: beyond hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Neoreviews, 2021, 22:e148-e162.
- 6 Zhang Q, Zhang HF, Li ZY, et al. Effects of Huangqi Injection on the oxidative stress and intestinal mucosal barrier function in patients with acute pancreatitis [J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2021, 41:1616-1619.
- 7 Song H, Qiu J, Yu C, et al. Traditional Chinese medicine prescription Huang-Qi-Jian-Zhong-Tang ameliorates indomethacin-induced duodenal ulcers in rats by affecting NF- κ B and STAT signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156:113866.
- 8 Tang S, Chen SK, Tan XQ, et al. Network pharmacology and molecular docking analyses on Huangqin-Tang Decoction in the treatment of bacterial infection [J]. Hans J Med Chem (药物化学), 2022, 10:108-121.
- 9 Lee IC, Yang JJ, Liou YM. Early blood glucose level post-admission correlates with the outcomes and oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 11:22-27.
- 10 Dani C, Pratesi S, Ranieri G, et al. Changes of oxidative stress-related gene expression in an *in vitro* model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Neonatology, 2022, 119:611-618.
- 11 Yang G, Xue Z, Zhao Y. MiR-582-5p attenuates neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by targeting high mobility group box 1 (HMGB1) through inhibiting neuroinflammation and oxidative stress [J]. Curr Neurovasc Res, 2021, 18:295-301.
- 12 Su HF, Shaker S, Kuang Y, et al. Phytochemistry and cardiovascular protective effects of Huang-Qi (Astragali Radix) [J]. Med Res Rev, 2021, 41:1999-2038.
- 13 Xu Y, Huang L, Han J, et al. Effects of EPO combined with mild hypothermia on oxidative stress and neuroprotection in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2022, 68:36-45.
- 14 Victor S, Rocha-Ferreira E, Rahim A, et al. New possibilities for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Eur J Pediatr, 2022, 181:875-887.
- 15 Su GH, Liu LH, Chen HL, et al. Effect of astragalus polysaccharide on oxidative stress response and Wnt signaling pathway of AD rat model [J]. Chin J Coal Ind Med(中国煤炭工业医学杂志), 2020, 23:21-26.
- 16 Yang XH, Li C, Cui MX, et al. Effects of *Astragalus mongolicus* and its fermentative matters on kidney injury and oxidative stress of rats with hypothyroidism [J]. Med Recapit(医学综述), 2021, 27:3102-3106.
- 17 Huang WG, Yang DF, Feng JL, et al. Protective effect of astragaloside IV on 6-OHDA-induced oxidative stress injury in PC12 cells via activation of JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin J Clin Neurosurg(中国临床神经外科杂志), 2021, 26:270-273.
- 18 Islam SU, Lee JH, Shehzad A, et al. Decursinol angelate inhibits LPS-induced macrophage polarization through modulation of the NF κ B and MAPK signaling pathways [J]. Molecules, 2018, 23:1880.
- 19 Lin C, Lott AA, Zhu W, et al. Mitogen-activated protein kinase 4-regulated metabolic networks [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23:880.
- 20 Li X, Li F, Zhang X, Zhang H, et al. Caspase-8 auto-cleavage regulates programmed cell death and collaborates with RIPK3/mLKL to prevent lymphopenia [J]. Cell Death Differ, 2022, 29:1500-1512.
- 21 Greco P, Nencini G, Piva I, et al. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future [J]. Acta Neurol Belg, 2020, 120:277-288.
- 22 Huang XF. Huangqi injection for hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic evaluation [J]. Chin Pediatr Integr Tradit West Med(中国中西医结合儿科学), 2018, 10:48-53.
- 23 Li CY, Yu AX. Clinical effect of Astragali Radix extract injection in treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and the influence on serum endogenous opioid peptide, neurological factors, and inflammatory factors [J]. Matern Child Health Care China(中国妇幼保健), 2019, 34: 566-570.