

黄芪-水蛭药对调控铁死亡治疗脑缺血再灌注损伤作用机制探析



杨智倩^{1,2}, 江杰^{1,2}, 刘为^{1,2}, 王晶菊^{1,2}, 杨鸿^{1,2}

1. 中国中医科学院医学实验中心(北京 100700)

2. 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室(北京 100700)

【摘要】目的 “黄芪-水蛭”药对可以减轻脑缺血再灌注损伤(CIRI),但其作用机制尚未明确。铁死亡是 CIRI 的新靶点,本文利用网络药理学方法探究“黄芪-水蛭”药对通过调控铁死亡治疗 CIRI 的作用机制。**方法** 通过检索 PubChem、SwissTargetPrediction、Batman-TCM、UniProt、TCMSP 等数据库分别获得黄芪、水蛭的有效活性成分和作用靶点;检索 GeneCards 数据库收集 CIRI 相关靶点;利用 Venny 在线工具获得“黄芪-水蛭”药对活性成分和 CIRI 的共同作用靶点。通过 Cytoscape 软件得出“黄芪-水蛭”药对活性成分、疾病及预测靶点之间相互关系的网络,将蛋白互作网络图进行可视化处理,并使用 CytoHubba 插件计算得出核心靶点。应用 R 语言软件对“黄芪-水蛭”治疗 CIRI 的靶点进行 GO 分析和 KEGG 分析。利用 FerrDb 数据库,获取调控铁死亡的相关基因,将“黄芪-水蛭”药对活性成分、CIRI、铁死亡三者之间的公共基因进行分析,探究其关系并作出预测。使用 AutoDockTools 1.5.7 等软件对药对活性成分与关键靶点进行分子对接验证。**结果** 通过数据库检索共收集到“黄芪-水蛭”药对有效活性成分 28 个、预测得到药对基因靶点 680 个, CIRI 相关靶点 1 513 个,药对-疾病的共同靶点 253 个,铁死亡相关靶点 259 个,进行相关预测得到包括 PIK3CA、RELA、MAPK1、MAPK8、PTGS2、STAT3、SRC、NOS2 等 28 个“黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预 CIRI 的可能作用靶点,及包括 PI3K-Akt、Ras、TNF、MAPK、HIF-1 信号传导途径在内的 279 条信号通路。分子对接显示,药对关键成分和核心靶点之间有相互作用关系,“黄芪-水蛭”药对可能通过调控铁死亡干预 CIRI 的发生发展而发挥治疗作用。**结论** 利用网络药理学方法,分析挖掘出“黄芪-水蛭”药对活性成分通过调控铁死亡抗 CIRI 的潜在靶点及其相关通路,提示“黄芪-水蛭”可能通过氧化应激和抗炎途径调控铁死亡途径发挥其抗 CIRI 的作用,并为后续进一步的细胞和动物实验提供依据。

【关键词】 黄芪;水蛭;网络药理学;分子对接;脑缺血再灌注损伤;铁死亡;氧化应激;炎症;作用机制

Mechanism of "Astragalus-Leech" medicine pair for treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating ferroptosis

YANG Zhiqian^{1,2}, JIANG Jie^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, WANG Jingju^{1,2}, YANG Hong^{1,2}

1. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Major

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202401048

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ2018017)

通信作者:杨鸿,博士,硕士研究生导师,Email: yanghongchina@163.com

<https://zgys.whuzhmedj.com>

Diseases, Beijing 100700, China

Corresponding author: YANG Hong, Email: yanghongchina@163.com

【Abstract】Objective "Astragalus-Leech" medicine pair can reduce cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), but its mechanism of action is not yet clear. Ferroptosis is a new target of CIRI. In this paper, the mechanism of the "Astragalus-Leech" medicine pair on regulating ferroptosis in the treatment of CIRI was investigated using the network pharmacology approach. **Methods** The active ingredients and targets of Astragalus-Leech were obtained by searching databases, such as PubChem, SwissTargetPrediction, Batman-TCM, UniProt, TCMSP and other databases, respectively; the CIRI-related targets were collected by searching GeneCards database; the Venny online tool was used to obtain the common targets of "Astragalus-Leech" medicine pairs for active ingredients and CIRI. Cytoscape software was used to construct a network of interrelationships between the active ingredients, disease and predicted targets of the "Astragalus-Leech" medicine pair, the protein interaction network was visualized, and CytoHubba plug-in was used to calculate the core targets. The GO analysis and KEGG analysis of the targets of "Astragalus-Leech" in the treatment of CIRI were performed using R language software. Using FerrDb database, the genes related to the regulation of ferroptosis were obtained, and the common genes among the active ingredients, CIRI and ferroptosis in the "Astragalus-Leech" medicine pair were analyzed to investigate their relationship and make predictions. AutoDockTools 1.5.7 and other softwares were used to verify the molecular docking between the active ingredients and key targets. **Results** Through searching the databases, 28 active ingredients of "Astragalus-Leech" medicine pair, 680 predicted gene targets of the drug pair, 1 513 targets related to CIRI, 253 common targets of drug pair-disease, 259 targets related to ferroptosis were obtained. 28 potential targets, including PIK3CA, RELA, MAPK1, MAPK8, PTGS2, STAT3, SRC, NOS2, etc. on the regulation of ferroptosis and intervention in CIRI, and 279 signaling pathways including PI3K-Akt, Ras, TNF, MAPK, and HIF-1 were obtained through related prediction. Molecular docking showed that there was an interaction between the key components of the drug pair and the core targets. The "Astragalus-Leech" medicine pair may intervene in the development of CIRI by regulating ferroptosis and exert its therapeutic effects. **Conclusion** Using network pharmacology methods, the potential targets and related pathways of "Astragalus-Leech" on the active ingredients by regulating ferroptosis against CIRI were analyzed, suggesting that "Astragalus-Leech" may play its role in anti-CIRI through oxidative stress and anti-inflammatory pathways to regulate ferroptosis pathway, and provide a basis for further cell and animal experiments.

【Keywords】 Astragalus; Leech; Network pharmacology; Molecular docking; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Ferroptosis; Oxidative stress; Inflammation; Mechanism

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 是指脑组织持续缺血一段时间后恢复缺血区域的血液供应, 导致脑组织结构及功能损伤更严重的一种脑血管疾病。其病理机制错综复杂, 有氧化应激、炎症反应等多种病理环节参与其中, 并与细胞凋亡、细胞焦亡等多种细胞死亡方式有关, 最终导致线粒体功能障碍、血脑屏障破坏及神经元坏死^[1-2]。铁死亡是不同于细胞凋亡

的细胞程序化死亡方式, 呈铁依赖性, 是由脂质过氧化物堆积导致的。新近研究显示, 铁死亡作为新的细胞死亡方式参与 CIRI: 脑缺血再灌注诱导神经元铁死亡, 使用铁死亡抑制剂等可以显著减轻 CIRI^[3-4]。铁死亡已经成为 CIRI 干预的重要潜在靶点, 寻找干预铁死亡的中药及其有效组分, 可能成为 CIRI 药物研究的方向之一^[5]。

缺血性中风的基本病机之一是气虚血瘀, 其

基本治法为益气活血，而黄芪、水蛭为益气活血法的代表药物，同时也是临床脑梗通汤、芪蛭通络胶囊等常用药的共有重要药对。本团队前期实验研究显示，黄芪、水蛭配伍可以有效降低脑卒中大鼠的脑梗死面积，并能明显延长凝血酶原时间，显示出对脑缺血的有效保护作用^[6]。现代药理学研究显示，黄芪有效成分可以增强脑细胞的抗缺氧能力，具有改善微循环、抗自由基等作用，同时还能够促进脑组织血流量的增加，改善临床症状^[7]。另有研究显示，黄芪能抑制耳蜗组织中活性氧（reactive oxygen species, ROS）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）、白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）等水平，发挥抗氧化应激和抗炎作用，从而抑制细胞凋亡^[8]。水蛭不仅在抗血栓方面发挥重要作用，同时也具有抗炎、抗纤维化作用^[9]。研究表明，水蛭水提物可以提高血清超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、总谷胱甘肽（total glutathione, T-GSH）含量和谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽（glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG）比值，降低血管组织内 ROS、MDA 和血清中 TNF- α 含量^[10]。提示黄芪、水蛭配伍可能通过抗炎抗氧化应激作用调控铁死亡，对 CIRI 发挥保护作用，但目前对“黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预 CIRI 治疗的机制层面的研究未见报道。本研究利用网络药理学系统地分析“黄芪-水蛭”药对的活性成分-靶点-疾病-通路之间相互作用的网络关系，探索该药对通过调控铁死亡治疗 CIRI 的潜在作用机制，为后续实验研究提供理论参考和新思路。

1 资料与方法

1.1 数据库及软件

TCMSP 数据库（<https://tcmsp.com/tcmsp.php>）；BATMAN-TCM 分析工具（<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>）；PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）；SwissTargetPrediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）；UniProt 数据库（<https://www.uniprot.org/>）；STRING 数据库（<https://stringdb.org>）；GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org/>）；Venny 图在线工具（[\[bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/\]\(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/\)）；FerrDb 数据库（<http://www.zhounan.org/ferrdb/>）；Cytoscape 3.9.1 软件；R 软件（<https://www.r-project.org/>）；RStudio 软件（<https://www.rstudio.com/>）；PDB 数据库（<https://www.rcsb.org/>）；CbDock（<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/index.php>）](http://</p></div><div data-bbox=)

1.2 方法

1.2.1 黄芪-水蛭活性成分的收集筛选及药物靶点预测

黄芪：通过 TCMSP 数据库检索得到黄芪的主要活性成分，设置口服生物利用度（oral bioavailability, OB） $\geq 30\%$ 和类药性（drug-like, DL） ≥ 0.18 为条件对检索结果进行筛选，得到黄芪活性较高的成分。经过查阅文献，将不在筛选结果中但药理作用较好的成分黄芪甲苷 IV、黄芪多糖纳入研究范围。分别将筛选得到的化合物名称输入 TCMSP 数据库，获取化合物的对应靶点，最终得到黄芪有效活性成分的蛋白作用靶点。再将活性成分化合物名称输入 PubChem 数据库获取其 SMILES 结构，利用 SwissTargetPrediction 数据库，将化合物 SMILES 结构输入其中，并选择物种为“Homo sapiens”，筛选出可能性大于 10% 的蛋白作用靶点进行补充。

水蛭：通过 BATMAN-TCM 数据库，设置目标预测参数值为 20、 P 为 0.05，输入“SHUIZHI”进行搜索，得到水蛭的主要活性成分和蛋白作用靶点。考虑化合物在中药中的含量、代谢及药理作用对水蛭的有效成分进行补充，将水蛭素纳入水蛭的研究范围。将活性成分化合物名称输入 PubChem 数据库获取其 SMILES 结构，通过 SwissTargetPrediction 数据库检索化合物的 SMILES 结构，物种选择“Homo sapiens”，补充可能性大于 10% 的蛋白作用靶点。基于 UniProt 数据库中 UniProtKB 搜索功能，将“Organisms”选项设置为“human”，对黄芪、水蛭的蛋白作用靶点进行 Gene symbol 规范化名称转换。

1.2.2 “药对-活性成分-靶点”网络构建

使用 Excel 表格建立黄芪、水蛭各活性成分与预测靶点之间对应关系文件，将表格导入 Cytoscape 3.9.1 软件建立“药对-活性成分-靶点”网络图。

1.2.3 CIRI 潜在致病靶点筛选

在 GeneCards 数据库中搜索获得 CIRI 相关

的人类基因靶点，检索词为“cerebral ischemia reperfusion injury”，得到 CIRI 的全部基因靶点。

1.2.4 蛋白质相互作用网络的构建与核心靶点的筛选

将“黄芪-水蛭”活性成分靶点集与 CIRI 靶点集分别输入 Venny 在线工具中，得到交集靶点，即为“黄芪-水蛭”药对活性成分治疗 CIRI 的潜在作用靶点。将交集基因靶点导入 STRING，物种选择“Homo sapiens”，Required score 设为 0.4；获取各靶点之间相互作用关系网络，设置导出格式为 TSV。将 TSV 格式文件导入 Cytoscape 软件中，对得到的蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络进行可视化处理并分析，再依据节点的度（degree）值进行调节。

Cytoscape 中的插件 CytoHubba，可以提供 11 种基于最短路径的拓扑分析方法，其中最大集团中心度算法被证实可以较为精确地预测重要靶点，用以对网络的特征进行分析，完成对网络中的节点的排序。通过最大相关熵（maximum correlation criterion, MCC）拓扑算法分析的到“黄芪-水蛭”治疗 CIRI 的关键靶点，构建关键靶点的子网络。

1.2.5 基因通路与生物学功能富集分析

通过 R 软件，安装相关数据包进行各种生物信息学分析和结果可视化。设定 $P < 0.05$ 与 $Q < 0.05$ ，对交集基因进行 GO 分析和 KEGG 分析，将 GO 功能分析中生物过程（biological process, BP）、分子功能（molecular function, MF）和细胞组分（cellular component, CC）的前 10 项以及 KEGG 富集分析中与 CIRI 关系最密切的前 20 条信号通路分别进行可视化处理，用条形图展示 GO 功能分析的结果，用气泡图展示 KEGG 富集分析的结果。

1.2.6 铁死亡调控基因获取及其与“黄芪-水蛭”药对、CIRI 三者靶点综合分析

利用 Excel 表格收集通过 FerrDb 数据库检索

得到的铁死亡过程的标记基因、驱动基因及抑制基因。利用 Venny 在线分析工具获取铁死亡调控基因与“黄芪-水蛭”药对参与调控 CIRI 的靶基因提取公共基因，得到“黄芪-水蛭”药对通过调控铁死亡干预 CIRI 的靶点。利用 STRING 数据库对得到的 3 者公共基因构建 PPI 网络，并用 R 软件对上述公共基因进行 GO 分析和 KEGG 分析。

1.2.7 “黄芪-水蛭”药对有效活性成分与 CIRI 和铁死亡作用靶蛋白的分子对接验证

取结果中得到的“黄芪-水蛭”药对中发挥主要作用的有效成分，在 Pubchem 网站中输入其 CAS 号得到其 3D 结构；利用 UniProt 网站下载“黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预 CIRI 中发挥重要作用的靶点的 PDB 文件；通过 AutoDockTools 对蛋白质受体和小分子配体进行结构优化；使用 CBDock 预测蛋白质结构的潜在活性口袋，通过 AutoDock Vina 平台将蛋白质结构中已有的结合口袋和预测活性口袋与小分子进行分子对接，根据蛋白的活性口袋设置对接盒子的大小、坐标、格点数、格点距离；设置对接的构象数为 200 个，运行 AutoGrid4.exe 和 AutoDock4.exe 程序生成对接结果。根据打分排序，选出得分最高的小分子结合构象。根据分子对接模型，筛选可以和靶点结合的潜在构象。

2 结果

2.1 “黄芪-水蛭”药对主要活性成分筛选

检索 TCMS 数据库得到黄芪化学成分 87 个，根据条件筛选后得到 14 种黄芪有效活性成分，文献补充后最终获得 16 种黄芪的有效活性成分，将其分别编号为 HQ1~HQ16；通过 BATMAN-TCM 数据库共收集了水蛭活性成分 11 种，结合文献补充后最终得到有效活性成分 12 种，将其分别编号为 SZ1~SZ12。“黄芪-水蛭”药对主要活性成分的基本信息见表 1。

表1 “黄芪-水蛭”药对活性成分信息

Table 1. Information of active ingredients of "Astragalus-Leech" medicine pair

编号	CAS号	活性成分名称	中文名称
HQ1	472-15-1	mairin	白桦脂酸
HQ2	3301-49-3	jaranol	华良姜素
HQ3	465-99-6	hederagenin	常春藤皂苷元
HQ4	56362-42-6	(24S)-24-Propylcholesta-5-ene-3beta-ol	(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇
HQ5	480-19-3	isorhamnetol	异鼠李素
HQ6	—	3, 9, 10-trimethoxypterocarpan	3,9,10-三甲氧基紫檀

续表1

编号	CAS号	活性成分名称	中文名称
HQ7	—	7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	7- <i>O</i> -甲基-异微凸剑叶莎醇
HQ8	—	9, 10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷
HQ9	73340-41-7	(6aR, 11aR)-9, 10-dimethoxy-6a, 11a-dihydro-6H-benzofurano[3, 2- <i>c</i>]chromen-3-ol	美迪紫檀素
HQ10	73536-69-3	bifendatatum	联苯双酯
HQ11	485-72-3	formononetol	芒柄花素
HQ12	4737-27-3	3-phenylchroman-4-one	异黄烷酮
HQ13	20575-57-9	3'-hydroxyformononetin	毛蕊异黄酮
HQ14	520-18-3	kaempferol	山萘酚
HQ15	89250-26-0	2-(chloromethyl)-4-(4-nitrophenyl)-1, 3-Thiazole	黄芪多糖
HQ16	84687-43-4	astragaloside IV	黄芪甲苷IV
SZ1	42553-65-1	crocin	西红花苷
SZ2	24512-62-7	gardenoside	栀子苷
SZ3	77-52-1	ursolic Acid	熊果酸
SZ4	27745-20-6	geniposide	京尼平苷
SZ5	608-66-2	dulcitol	半乳糖醇
SZ6	—	gardnerilin A	—
SZ7	69-65-8	<i>D</i> -mannitol	甘露醇
SZ8	679809-58-6	enoxaparin	依诺肝素钠
SZ9	27876-94-4	crocetin	藏红花酸
SZ10	37270-89-6	nadroparin	肝素钠
SZ11	3615-44-9	<i>D</i> -mannoheptulose	<i>D</i> -甘露庚酮糖
SZ12	8001-27-2	hirudin	水蛭素

2.2 “黄芪-水蛭”药对潜在靶点预测

通过 TCMSp 数据库得到黄芪有效活性成分对应的靶点, 经过 SwissTargetPrediction 平台的补充, 去除无效和重复靶点, 并通过 UniPort 数据库完成基因名的转换, 最终得到 411 个黄芪潜在活性成分的作用靶点。通过 BATMAN-TCM 数据库搜索并去重后得出水蛭有效活性成分对应的 345 个作用靶点。

2.3 “黄芪-水蛭”药对干预 CIRI 的相关基因靶点

利用 GeneCards 数据库获得 CIRI 相关分子靶点 1 513 个。通过 Venny 图在线工具获得“黄芪-水蛭”药对干预 CIRI 的 253 个预测作用靶点。其中属于黄芪的靶点有 180 个, 属于水蛭的靶点有 110 个靶点, 两者共有靶点有 37 个, 提示“黄芪-水蛭”药对配伍治疗 CIRI, 两味药既可以单独起作用, 又可以共同发挥作用。

2.4 “药对-成分-靶点”网络图构建

通过 Cytoscape 软件建立“药对-活性成分-靶点”网络图(图 1)。其中, 左、右侧圆圈圆

心分别代表药物黄芪、水蛭, 左、右圈上节点分别代表黄芪、水蛭有效活性成分, 中间节点代表活性成分的对应靶点, 连接线代表活性成分与靶点的相互关系。在“药对-成分-靶点”网络中有 710 个节点和 1 161 条边。

2.5 “黄芪-水蛭”药对调控 CIRI 作用靶点蛋白互作网络

将“黄芪-水蛭”药对与 CIRI 的 253 个交集基因导入 STRING 得到 PPI 网络图, PPI 网络中共有 253 个节点, 代表靶点; 1 821 条相互作用连线, 代表靶点之间相互联系。对 PPI 网络进行可视化处理后, 根据 Cytoscape 插件中的 MCC 算法筛选出排名前 20 的靶点(表 2 和图 2)。其之间的网络联系可能在“黄芪-水蛭”药对抗 CIRI 发病机制中发挥重要作用。

2.6 GO 功能分析和 KEGG 富集分析

利用 R 软件, 对“黄芪-水蛭”药对和 CIRI 共同靶点进行 GO 富集 ($P < 0.001$), 对 GO 分析排名靠前的类别进行说明。BP 类分析表明, 这些靶点主要与激活酶的正向调节、炎症反应的

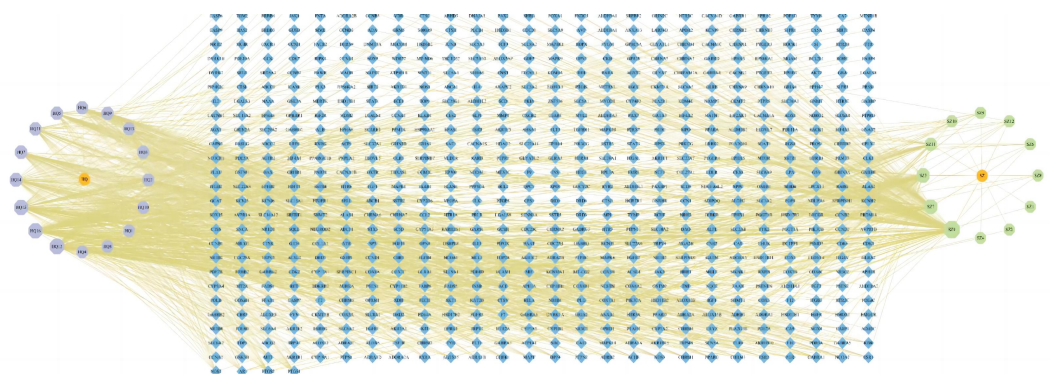


图1 黄芪-水蛭“药对-成分-靶点”网络图

Figure 1. "Medicine pair-component-target" network of Astragalus-Leech

表2 MCC算法提取排名前20的核心靶点

Table 2. Top 20 targets screened by MCC

排序	核心靶点	Score
1	VEGFA	1.60×10^{22}
2	STAT3	1.60×10^{22}
3	INS	1.60×10^{22}
4	CASP3	1.60×10^{22}
5	TNF	1.60×10^{22}
6	ALB	1.60×10^{22}
7	SRC	1.59×10^{22}
8	IL1B	1.59×10^{22}
9	EGFR	1.59×10^{22}
10	STAT1	1.58×10^{22}
11	BCL2L1	1.58×10^{22}
12	PTGS2	1.57×10^{22}
13	CCND1	1.54×10^{22}
14	PPARG	1.49×10^{22}
15	IL2	1.47×10^{22}
16	IGF1	1.32×10^{22}
17	MTOR	1.32×10^{22}
18	AKT1	1.20×10^{22}
19	NOTCH1	1.07×10^{22}
20	PTPRC	1.02×10^{22}

调节、对细菌来源分子的反应、钙离子稳态等有关。CC类分析表明，靶点主要分布在膜筏、膜微区、突触膜、神经元细胞体的组成部分中。MF类分析包括肽结合、神经递质受体活性、蛋白酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性等(图3)。KEGG通路分析共富集到155条通路($P < 0.001$)，人工筛选与疾病无关的信号通路，涉及到PI3K-Akt信号通路、钙信号传导途径、Rap1信号传导途径、Ras信号传导途径、催乳素信号传导途径、炎症介质对TRP通道的调节、IL-17信号传导途径等20条信号通路(图4)。

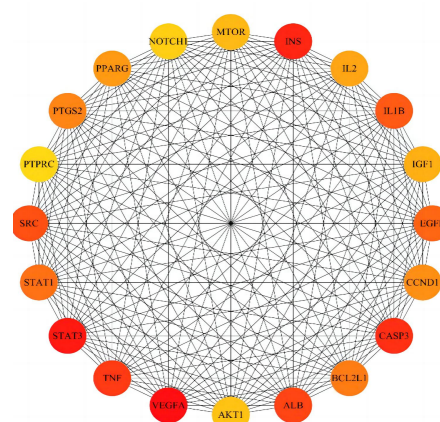


图2 “黄芪-水蛭”药对与CIRI共同作用靶点PPI拓扑分析前20核心基因

Figure 2. Top 20 core genes of the common targets of "Astragalus-Leech" medicine pair and CIRI in the PPI analysis

2.7 铁死亡调控因子的获取及其与“黄芪-水蛭”药对、CIRI共同基因筛选和分析

在FerrDb数据库中检索到259个与铁死亡过程相关的基因，通过Venny分析，得到铁死亡过程相关基因与“黄芪-水蛭”药对和CIRI的253个公共基因共28个交集基因，即为“黄芪-水蛭”药对调控铁死亡过程干预CIRI的关键基因(图5)，包括PIK3CA、RELA、MAPK1、MAPK8、PTGS2、STAT3、SRC、NOS2等。通过STRING数据库得到28个交集基因PPI网络可视图(图6)，表明这些基因之间有相互作用且联系紧密。

对交集基因进行KEGG分析，共得到279条信号通路。包括PI3K-Akt信号通路、Ras信号传导途径、HIF-1信号传导途径、IL-17信号传导途径、炎症介质对TRP通道的调节、细胞凋亡、TNF信号传导途径、MAPK信号传导途径等信号通路

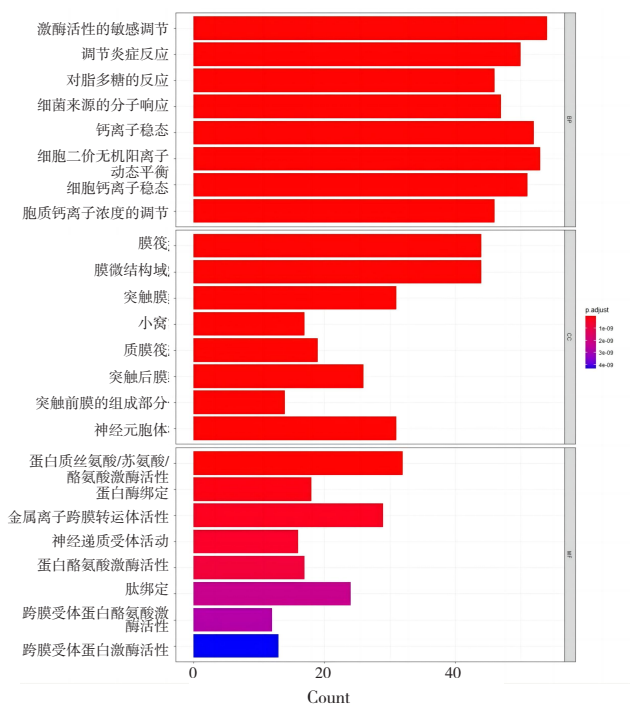


图3 “黄芪-水蛭”药对调控CIRI作用靶点GO功能分析

Figure 3. GO analysis of the targets of "Astragalus-Leech" pair in regulating CIRI

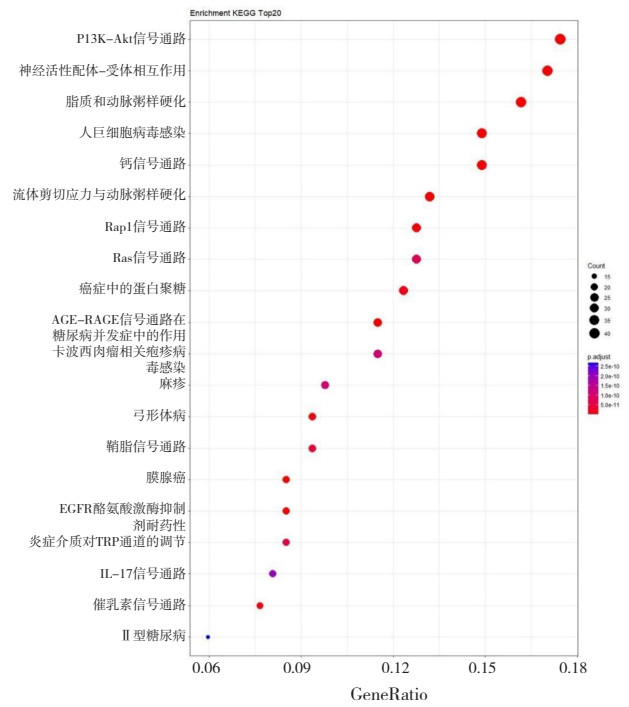


图4 “黄芪-水蛭”药对调控脑CIRI作用靶点KEGG富集分析

Figure 4. KEGG analysis of the targets of "Astragalus-Leech" pair in regulating CIRI

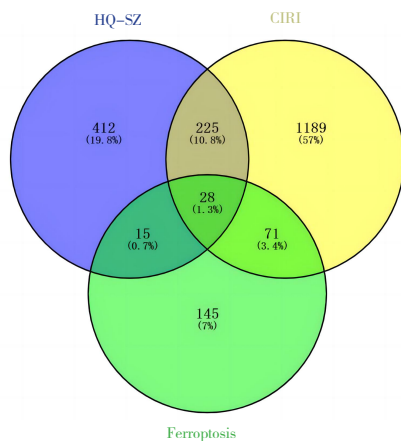


图5 “黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预CIRI的靶点Venny图

Figure 5. Venny diagram of targets of "Astragalus-Leech" pair regulating ferroptosis in the intervention of CIRI

(图7)。本研究发现，“黄芪-水蛭”药对调控铁死亡途径的靶点与参与CIRI的核心靶点及核心蛋白质网络高度重合，推测“黄芪-水蛭”药对能够通过调控铁死亡途径干预CIRI。

2.8 “药对-活性成分-靶点-通路”网络的构建与分析

将“黄芪-水蛭”的活性化合物与筛选的排名

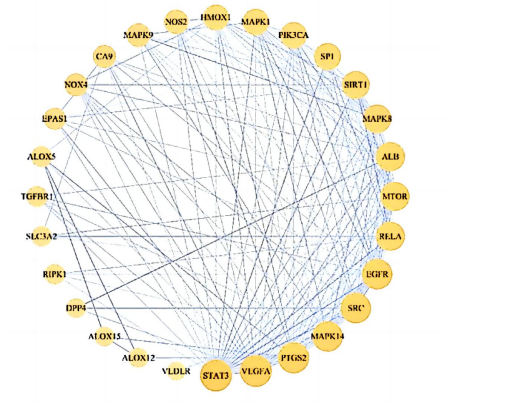


图6 “黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预CIRI靶点的PPI网络可视化图

Figure 6. Visualization of PPI network of targets of "Astragalus-Leech" pair regulating ferroptosis in the intervention of CIRI

前20信号通路及其作用核心靶点基因结合，应用Cytoscape软件构建网络(图8)。如图所示，共17种活性化合物作用于上述20种信号通路，分析显示kaempferol(山萘酚)、2-(chloromethyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole(黄芪多糖)、astragaloside IV(黄芪甲苷)、crocetin(藏花酸)、hirudin(水蛭素)等成分发挥着重要作用；

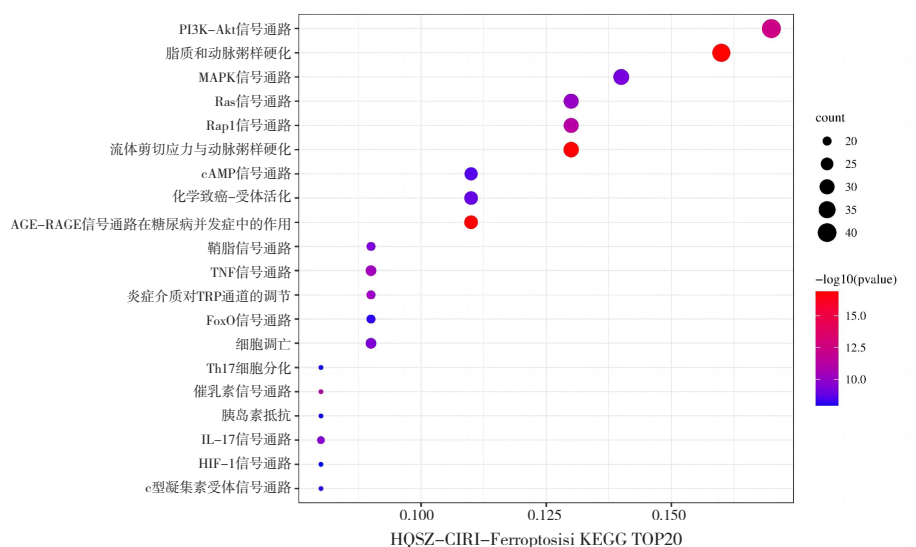


图7 “黄芪-水蛭”药对调控铁死亡干预CIRI作用靶点KEGG分析

Figure 7. KEGG analysis of targets of "Astragalus-Leech" pair regulating ferroptosis in the intervention of CIRI

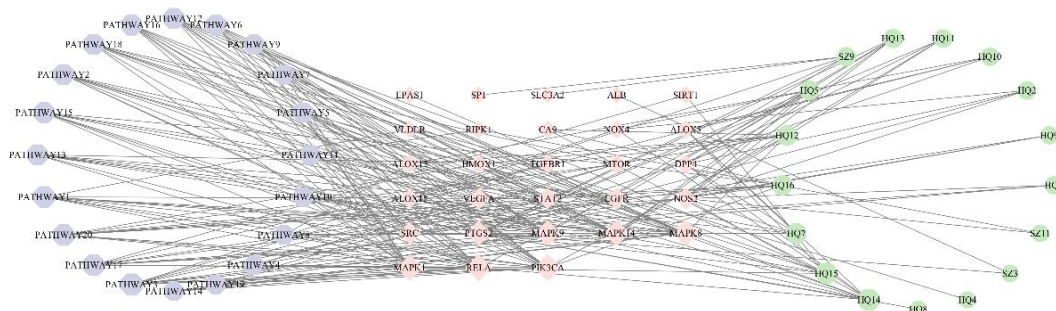


图8 “黄芪-水蛭”药对调控铁死亡抗CIRI的“药对-活性成分-靶点-通路”网络

Figure 8. "Medicine pair-compound-target-pathway" network of "Astragalus-Leech" pair regulating ferroptosis in the intervention of CIRI

注：紫色六边形表示通路；粉色菱形表示潜在靶点基因；绿色圆形表示化合物。

PIK3CA、RELA、MAPK1、MAPK8、MAPK9、MAPK14、PTGS2、STAT3、SRC、NOS2可能是“黄芪-水蛭”调控铁死亡抗CIRI的关键靶点。

2.9 分子对接验证药物关键成分与靶点间作用情况

根据“2.8”项下结果，选择“黄芪-水蛭”中发挥主要作用的关键成分黄芪多糖、黄芪甲苷及水蛭素与核心靶点 PIK3CA、RELA、PTGS2、

SRC（表3）进行分子对接，预测药物成分与靶点之间结合模型（图9）。分子对接结果显示黄芪多糖与 PIK3CA、PTGS2 之间有相互作用，黄芪甲苷与 PIK3CA 之间有相互作用，水蛭素与4个靶点蛋白均有相互作用关系，并预测其结合模型（图9）。1种成分可以调控多个靶点，同时1个靶点可以被多种成分调控，表明“黄芪-水蛭”药对可以通过多靶点、多通路调控铁死亡干预CIRI。

表3 进行分子对接的核心靶点信息

Table 3. Information on the core targets for molecular docking

靶点	Uniprot ID	PDB ID	蛋白全称
PIK3CA	P42336	2RD0	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
SRC	P12931	2H8H	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
PTGS2	P35354	5F1A	prostaglandin G/H synthase 2
RELA	Q04206	NFI	transcription factor p65

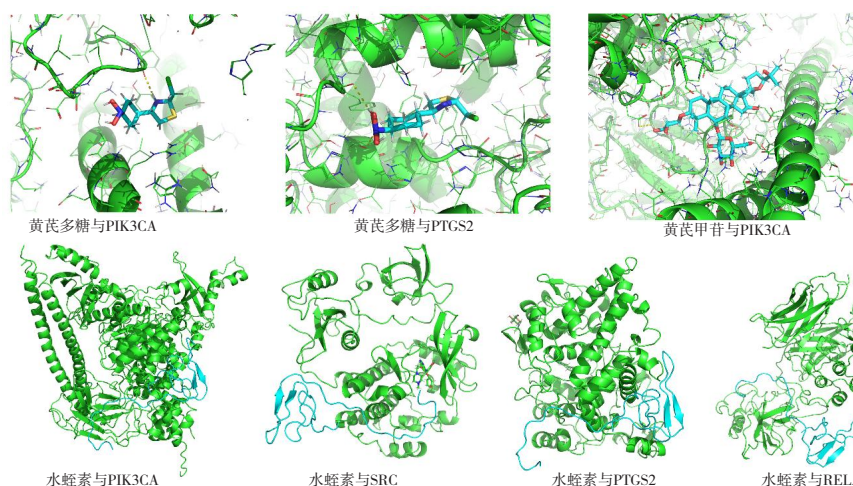


图9 关键成分与预测靶点结合的分子模型

Figure 9. Molecular modeling of key components binding to predicted targets

3 讨论

CIRI 在中医理论中属于“中风”范畴，主要病机是气虚血瘀，其中瘀血为贯穿整个疾病过程的病理因素^[11]。黄芪归属肺脾二经，能够行气补脾、活血生血，扶助正气以逐瘀；水蛭作为活血化瘀代表药，破血消癥效强，同时具有祛风通络的功效，两药合用，共行补气活血、逐瘀去癥之用。现代药理学研究表明，黄芪、水蛭相伍能够减少血小板凝聚，具有抗凝血、促进受损组织修复的作用^[12]。CIRI 的主要特征有炎症级联反应、氧化应激，再灌注过程引起大量的 ROS 和炎症因子的释放，从而导致脑水肿和神经功能缺陷。铁死亡的概念是由 Dixon 等^[13]于 2012 年首次提出，是一种非凋亡的、新的调节性细胞死亡形式，呈铁依赖性，有氧化还原体系的失衡、脂质过氧化物的过度蓄积等表现。过度蓄积的活性氧和脂质过氧化物将加重细胞内炎症因子级联释放和细胞凋亡，最终导致细胞免疫反应失调和组织损伤^[14]。新近研究发现，铁代谢失调、脂质过氧化物蓄积及 GSH/GPX4 轴失衡与 CIRI 密切相关，提示铁死亡可能参与了 CIRI 的病理过程^[15-16]。“黄芪-水蛭”药对可能通过调控铁死亡成为干预 CIRI 的有效治疗手段。

本研究通过网络药理学分析发现“黄芪-水蛭”药对关键成分黄芪多糖、黄芪甲苷、水蛭素等发挥主要是通过参与氧化应激反应和 ROS 类反应发挥调控铁死亡治疗 CIRI 的作用，这些成分作用的靶点通过调控与铁代谢紊乱、脂质过氧化和炎症反应等相关的信号通路调控铁死亡，抑制氧

化应激和炎症反应治疗 CIRI。

铁死亡可能是氧化应激过程中重要的一环，氧化应激中包含着铁死亡，两者相互作用^[17]。PIK3CA^[18]、SRC-1（属于 SRC 家族）^[19]能够激活 PI3K/AKT 信号通路，激活的 AKT 通过磷酸化级联反应调控下游效应分子，上调 AKT 的磷酸化减少 ROS 的生成，从而缓解氧化应激，减轻神经元的氧化损伤^[20]。低氧条件下，PI3K/AKT 通路可激活铁死亡的重要介质缺氧诱导因子 1 α （hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α ）。HIF-1 α 在脑缺血后神经元和星形胶质细胞中的表达显著升高^[21]，缺氧诱导 PI3K/AKT 通路通过激活 HIF-1 上调铁死亡核心基因 GPX4 的表达^[22]，从而抑制脂质过氧化物的积累，降低细胞铁死亡水平^[14]。PI3K/AKT 通路在调节 CIRI 的炎症、细胞死亡以及氧化应激中发挥重要作用^[20]。研究发现，SRC 敲除可以缓解脑卒中小鼠的脑梗死和神经元损伤。SRC 是 miR-137 的靶基因，上调 miR-137 或抑制 SRC 可抑制炎症因子的分泌，抑制氧化应激，减少星形胶质细胞的凋亡^[23]。MAPK1 又称 ERK2，是 Ras/ERK 通路的关键激酶，研究显示 Ras/ERK 通路调控 HIF-1 α 的表达^[24]。EGFR 通过激活 MAPK 信号通路降低 GPX4 的表达，并通过 NOX4 增加 H₂O₂ 的产生，从而增加了细胞对铁死亡的敏感性^[25]。黄芪甲苷^[26]可以通过激活 PI3K-AKT 信号通路，抑制 CIRI 引起的氧化应激反应，调节细胞凋亡，减少 ROS 生成，保护机体组织细胞。Zhou^[27]和黎晨等^[28]的实验结果显示，由黄芪多糖处理过的心肌微血管内皮细胞（MMECs）

凋亡率降低, NO 含量增加, 其作用与黄芪多糖通过调控 PI3K/Akt/eNOS 信号通路来缓解氧化应激引起的损伤有关。

TP53 编码的肿瘤抑制因子 p53 是细胞铁死亡启动过程的重要调节因子, 在 ROS 应激下, p53 通过抑制 SLC7A11 的转录过程, 下调 SLC7A11 的表达, 从而使胱氨酸合成减少, 诱导细胞铁死亡的发生^[29-30]。研究表明, TP53 受到 PI3K/AKT 信号通路的调控, PI3K/AKT 通路下游调控因子 MDM2 负向调控 p53, 这可能是减轻 CIRI 中神经元铁死亡的重要途径^[31]。MAPK8 又称 JNK, 编码 JUN N-末端激酶。JNK 信号通路作为 p53 重要的上游信号, 可以上调 p53 的表达^[29, 32]。MAPK9 又名 JNK2, 与 MAPK8 关系最为密切。JNK1/2 抑制剂可以通过抑制 p53 的表达从而抑制铁死亡, 同时经过铁死亡诱导剂的处理使 p-JNK 的蛋白表达显著增加^[33]。ALOX15, 由 p53 的诱导基因 SAT1 调控, 研究显示, p53 介导的 SAT1 的转录激活对 ROS 诱导的铁死亡至关重要^[34]。Yang 等^[35] 研究发现黄芪甲苷可以下调 p-JNK/JNK 通路的激活, 抑制 Bax/Bcl-2 的表达, 最终上调 Nrf2/Keap1 信号通路, 通过抑制氧化应激和凋亡对大鼠原代培养星形胶质细胞 OGD/R 损伤起保护作用及其分子机制。

HMOX1 编码铁死亡过程中铁依赖性脂质过氧化的必需酶血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)^[36]。HO-1 是 Nrf2 调控的抗氧化蛋白, Nrf2/HO-1 信号通路是细胞抗氧化应激的重要信号通路, 激活 Nrf2 可以促进 HO-1 的表达^[37]。HO-1 通过减少体内自由基的生成, 降低氧化应激损伤, 发挥抗氧化作用^[38]。HO-1 一方面可以阻止游离血红素参与氧化反应, 同时 HO-1 及其酶解产物也发挥着抗氧化、抗炎、改善组织微循环等作用。越来越多的研究表明, 在 CIRI 等神经系统疾病中, Nrf2/HO-1 信号通路发挥抑制铁死亡、减轻神经损伤及神经功能障碍的作用^[39-40]。研究显示, 水蛭水提物可以降低 ROS 积累和 MDA 含量, 提高 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平, 通过 Nrf2 介导的抗氧化作用预防静脉血栓形成, 显著减轻了血管损伤^[10]。

炎症反应是脑缺血/再灌注的主要病理特征, 而铁死亡与炎症反应关系密切。研究报道铁死亡具有较强的促炎作用, 通过释放损伤模式相关分子 (DAMPs) 激活固有免疫, 继而释放 IL-1 β 、

IL-6 等促炎因子、激活促炎通路; 另外, 铁死亡可通过脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 和环氧化酶 (cy-clooxygenase, COX) 产物参与并加重炎症反应^[41], 最终导致细胞免疫反应失调、细胞死亡和组织损伤^[42]。

PTGS2 基因主要编码 COX2, 研究发现铁死亡组织中该基因表达增加, 花生四烯酸通过 COX 途径进一步代谢为炎症介质, 从而促进炎症信号分子的释放^[43-44]。RELA 为原癌基因, 编码 NF- κ B 的 p65 亚基。NF- κ B 转录因子家族参与免疫、炎症和凋亡等多种生物过程, 是一系列信号转导事件的终点, 同时 NF- κ B 通路也是调节细胞氧化还原状态的关键。研究显示 RELA 在铁死亡抑制剂的处理下水平降低^[45], 提示其可能参与调控铁死亡。研究表明, MAPK1 在 MAPK/ERK 通路同样发挥关键作用, 其磷酸化后激活该通路, 进而调控下游炎症反应^[46]。黄芪甲苷通过下调 MAPK1 的磷酸化继而抑制 MAPK/ERK 通路的激活, 减弱神经炎症^[47]。

多种基因如 STAT3、NOS2 等同样参与炎症, 增强促炎介质如 IL-6 的合成, 刺激 NF- κ B 的激活, 调控铁死亡的过程。GPX4 通过调控 NF- κ B 信号通路实现对 LOX 和 ROS 合成的抑制作用, 以缓解机体炎症反应^[48]。反之若缺乏 GPX4, 则可以诱发或加重炎症反应^[49]。NF- κ B 是 p38 MAPK 的下游分子, 抑制 p38 MAPK 通路, 可抑制 NF- κ B 的激活, 从而减弱 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等细胞因子的释放, 减轻脑组织损伤^[50]。研究显示, 重组水蛭素降低 ApoE- 小鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 CRP 的水平, 改善慢性炎症状态; 同时减少 TLR4 和 NF- κ B 的表达, 从而抑制炎症反应、改善内皮功能^[51]。

新进研究显示铁死亡在 CIRI 的发病过程中起着重要作用, 已成为 CIRI 的研究热点。本研究通过网络药理学的方法, 预测“黄芪-水蛭”药对可能通过 PIK3CA、RELA、MAPK1、MAPK8、PTGS2、STAT3、SRC、NOS2 等 28 个核心靶点干预 CIRI 的铁死亡进程, 其作用机制与 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号传导途径、HIF-1 信号传导途径等信号通路密切相关, 且其关键成分与 PI3K-AKT 通路上的靶蛋白相互结合能力较好, 为课题组进一步探索“黄芪-水蛭”药对通过调控铁死亡治疗缺血性脑卒中的作用机制提供了新

的思路和方向, 后续将开展相关实验研究来证实此研究预测结果的可靠性。

参考文献

- 1 李兆珍, 张丹参. 脑缺血再灌注损伤相关机制的研究进展[J]. 神经药理学报, 2020, 10(6): 60–63. [Li ZZ, Zhang DS. Research progress on related mechanisms of cerebral ischemia–reperfusion injury[J]. Journal of Hebei North University (Medical Edition), 2020, 10(6): 60–63.] DOI: 10.3969/j.issn.2095–1396.2020.06.011.
- 2 任靓明, 田红旗. 炎症因子及其抑制剂对脑缺血再灌注损伤作用的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(12): 61–64. [Ren JM, Tian HQ. Research progress of inflammatory factors and their inhibitors on cerebral ischemia–reperfusion injury[J]. China Medical Herald, 2021, 18(12): 61–64.] <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotol–YYCY202112016.htm>.
- 3 Yuan H, Pratte J, Giardina C. Ferroptosis and its potential as a therapeutic target[J]. Biochemical Pharmacology, 2021, 186: 114486. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114486.
- 4 胡淼, 门运政, 陈蕾, 等. 右美托咪定通过抑制铁死亡发挥对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47(5): 600–609. [Hu M, Men YZ, Chen L, et al. Dexmedetomidine exerts its protective effect on cerebral ischemia reperfusion injury in mice by inhibiting ferroptosis[J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2022, 47(5): 600–609.] DOI: 10.11817/j.issn.1672–7347.2022.210443.
- 5 She X, Lan B, Tian H, et al. Cross talk between ferroptosis and cerebral ischemia[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 776. DOI: 10.3389/fnins.2020.00776.
- 6 钟菊迎, 刘钊, 李晶哲, 等. 黄芪水蛭对实验性脑缺血大鼠的改善作用研究[J]. 山西医药杂志, 2015, 44(4): 380–382. [Zhong JY, Liu Z, Li JZ, et al. Effect of Astragalus membranous and leech on experimental cerebral ischemia of rat[J]. Shanxi Medical Journal, 2015, 44(4): 380–382.] <https://www.cnki.com.cn/article/cjfdtotal–sxxy201504004.htm>.
- 7 王琳, 聂容荣, 秦凤玲, 等. 中西医结合治疗气虚血瘀型脑梗死恢复期患者的临床观察[J]. 世界中医药, 2019, 14(6): 1490–1492, 1497. [Wang L, Nie RR, Qin FL, et al. Clinical observation on combined treatment of traditional chinese and western medicine in convalescent stage of cerebral infarction of Qi deficiency and blood stasis syndrome[J]. World Chinese Medicine, 2019, 14(6): 1490–1492, 1497.] DOI: 10.3969/j.issn.1673–7202.2019.06.028.
- 8 谢慧, 赵小君, 张玉箫, 等. 黄芪介导 PGC–1 α /Nrf2 通路对年龄相关听力损失保护作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(8): 1249–1253. [Xie H, Zhao XJ, Zhang YX, et al. Research of protective effect of astragalus mediated PGC–1 α /Nrf2 pathway on age related hearing loss[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2022, 28(8): 1249–1253.] DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006–3250.2022.08.004.
- 9 姜秋, 王玲娜, 刘谦, 等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5806–5816. [Jiang Q, Wang LN, Liu Q, et al. Research progress on processing history evolution, chemical constituents, and pharmacological effects of Hirudo[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(21): 5806–5816.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220411.201.
- 10 周成浩. 蚂蟥水提取物抗血栓作用及激活 Nrf2 抑制静脉血栓的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018. DOI: 10.27044/d.cnki.ggz.2018.000237.
- 11 Zhao Y, Zhang X, Chen X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review)[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(2): 15. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5070.
- 12 连妍洁, 刘思娜, 刘红旭, 等. 基于数据挖掘分析含水蛭中成药的配伍规律[J]. 世界中医药, 2022, 17(4): 505–511. [Lian YJ, Liu SN, Liu HX, et al. Compatibility regularity of chinese patent medicine containing Hirudo based on data mining[J]. World Chinese Medicine, 2022, 17(4): 505–511.] DOI: 10.3969/j.issn.1673–7202.2022.04.012.
- 13 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron–dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- 14 曹珍珍, 赵迎雪, 覃虹倩, 等. 铁死亡代谢通路研究进展及在急性肺损伤中的作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2023, 22(3): 214–217. [Cao ZZ, Zhao YX, Tan HQ, et al. Research progress on ferroptosis metabolic pathway and its role in acute lung injury[J]. Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2023, 22(3): 214–217.] DOI: 10.7507/1671–6205.202204057.
- 15 Jin Y, Zhuang Y, Liu M, et al. Inhibiting ferroptosis: A novel approach for stroke therapeutics[J]. Drug Discov Today, 2021, 26(4):916–930. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.12.020.

- 16 Yan HF, Tuo QZ, Yin QZ, Lei P. The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury[J]. *Zool Res*, 2020, 41(3):220-230. DOI: [10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042](https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042).
- 17 张宇, 孙文爽, 赵建宁. 等. 铁死亡与氧化应激的关系及其在运动系统疾病中的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(4): 438-442. [Zhang Y, Sun WS, Zhao JN, et al. Relationship between ferroptosis and oxidative stress and its research progress in locomotor diseases[J]. *Journal of Medical Research & Combat Trauma Care*, 2020, 33(4): 438-442.] DOI: [10.16571/j.cnki.1008-8199.2020.04.019](https://doi.org/10.16571/j.cnki.1008-8199.2020.04.019).
- 18 杨柳. 组蛋白 H3K9 乙酰化修饰通过调控 Pik3ca 转录参与阿霉素诱导的 H9c2 细胞凋亡 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021. DOI: [10.27652/d.cnki.gzyku.2021.000868](https://doi.org/10.27652/d.cnki.gzyku.2021.000868).
- 19 李颖慧. SRC-1 调控 PI3K/AKT 信号通路介导突触可塑性改善认知障碍的研究 [D]. 四川南充: 川北医学院, 2021. DOI: [10.27755/d.cnki.gbyx.2021.000090](https://doi.org/10.27755/d.cnki.gbyx.2021.000090).
- 20 马春伟, 张海鸿. 氧化应激在脊髓损伤中的作用及机制研究进展 [J]. *医学新知*, 2024, 34(3): 339-346. [Ma CW, Zhang HH. Research progress on the role and mechanism of oxidative stress in spinal cord injury[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2024, 34(03): 339-346.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202312102](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202312102).
- 21 Hirayama Y, Koizumi S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 α expression in astrocytes after ischemic preconditioning[J]. *Glia*. 2017, 65(3): 523-530. DOI: [10.1002/glia.23109](https://doi.org/10.1002/glia.23109).
- 22 郭常法. 缺氧通过 PI3K/AKT/HIF-1 α 轴上调 GPX4 增强胶质母细胞瘤对铁死亡抵抗的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2022. DOI: [10.27272/d.cnki.gshdu.2022.001164](https://doi.org/10.27272/d.cnki.gshdu.2022.001164).
- 23 Tian R, Wu B, Fu C, et al. miR-137 prevents inflammatory response, oxidative stress, neuronal injury and cognitive impairment via blockade of Src-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(11): 10873-10895. DOI: [10.18632/aging.103301](https://doi.org/10.18632/aging.103301).
- 24 毕雅维. P22phox 通过调控 RAS/ERK/HIF-1 α 通路在胰腺导管腺癌中的作用及机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-91020-1019123186.htm>.
- 25 杨玲. DEHP 通过 p38 α /p53 通路和脂质 ROS 形成反馈循环引起铁死亡的机制研究 [D]. 辽宁大连: 大连医科大学, 2022. DOI: [10.26994/d.cnki.gdlyu.2022.000300](https://doi.org/10.26994/d.cnki.gdlyu.2022.000300).
- 26 李姿毅, 夏源, 王军义. 黄芪甲苷抗氧化应激分子机制的研究进展 [J]. *广东药科大学学报*, 2022, 38(4): 118-122. [Li ZY, Xia Y, Wang JY. Progress of the antioxidant molecular mechanism of astragaloside IV[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2022, 38(4): 118-122.] DOI: [10.16809/j.cnki.2096-3653.2022041101](https://doi.org/10.16809/j.cnki.2096-3653.2022041101).
- 27 Zhou Q, Meng G, Teng F, et al. Effects of astragalus polysaccharide on apoptosis of myocardial microvascular endothelial cells in rats undergoing hypoxia/reoxygenation by mediation of the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 806-816. DOI: [10.1002/jcb.26243](https://doi.org/10.1002/jcb.26243).
- 28 黎晨, 尤培蒙, 王晨曦, 等. 黄芪多糖抗氧化作用的分子机制研究进展 [J]. *西北民族大学学报 (自然科学版)*, 2019, 40(4): 78-82. [Li C, You PM, Wang CX, et al. Molecular mechanism and research progress of antioxidant effect of astragalus polysaccharide[J]. *Journal of Northwest Minzu University (Natural Science Edition)*, 2019, 40(4): 78-82.] DOI: [10.14084/j.cnki.cn62-1188/n.2019.04.014](https://doi.org/10.14084/j.cnki.cn62-1188/n.2019.04.014).
- 29 Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression[J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62. DOI: [10.1038/nature14344](https://doi.org/10.1038/nature14344).
- 30 Chu B, Kon N, Chen D, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(5): 579-591. DOI: [10.1038/s41556-019-0305-6](https://doi.org/10.1038/s41556-019-0305-6).
- 31 明道靖, 郭梦梦, 张晋辉, 等. 前列腺癌中 PI3K/AKT 通路调控 PHF19 基因表达的机制研究 [J]. *医学新知*, 2024, 34(2): 121-128. [Ming DJ, Guo MM, Zhang JH, et al. Mechanism research of PI3K/AKT pathway regulating PHF19 gene expression in prostate cancer[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2024, 34(2): 121-128.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202401008](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202401008).
- 32 Kang R, Kroemer G, Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 162-168. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074).
- 33 Wu C, Zhao W, Yu J, et al. Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 574. DOI: [10.1038/s41598-017-18935-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18935-1).
- 34 Ou Y, Wang SJ, Li D, et al. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(44): E6806-E6812. DOI: [10.1073/pnas.1607152113](https://doi.org/10.1073/pnas.1607152113).

- 35 Yang J, Shao C, Li W, et al. Protective effects of Astragaloside IV against oxidative injury and apoptosis in cultured astrocytes by regulating Nrf2/JNK signaling[J]. *Exp Brain Res*, 2021, 239(6): 1827–1840. DOI: [10.1007/s00221-021-06096-7](https://doi.org/10.1007/s00221-021-06096-7).
- 36 江杰, 杨智倩, 杨鸿. 栀子调控铁死亡治疗脑缺血再灌注损伤的网络药理学研究 [J]. *中国药师*, 2023, 26(12): 361–373. [Jiang J, Yang ZQ, Yang H. Network pharmacology study of Gardeniae Fructus in regulating ferroptosis for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *China Pharmacist*, 2023, 26(12): 361–373.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202311207](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202311207).
- 37 Gao X, Hu W, Qian D, et al. The Mechanisms of Ferroptosis Under Hypoxia[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(7): 3329–3341. DOI: [10.1007/s10571-023-01388-8](https://doi.org/10.1007/s10571-023-01388-8).
- 38 Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221–3247. DOI: [10.1007/s00018-016-2223-0](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0).
- 39 Gabre J, Chabasse C, Cao C, et al. Activated protein C accelerates venous thrombus resolution through heme oxygenase-1 induction[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(1): 93–102. DOI: [10.1111/jth.12424](https://doi.org/10.1111/jth.12424).
- 40 Sun Y, Chen P, Zhai B, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110108. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110108](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110108).
- 41 朱容慧, 陈俐, 陈阳, 等. 雷公藤红素用于脑卒中治疗的研究进展 [J]. *中国药师*, 2024, 24(4): 711–721. [Zhu RH, Chen L, Chen Y, et al. Research progress of celastrol in the treatment of stroke[J]. *China Pharmacist*, 2024, 24(4): 711–721.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202312187](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202312187).
- 42 Yamada N, Karasawa T, Kimura H, et al. Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 144. DOI: [10.1038/s41419-020-2334-2](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2334-2).
- 43 Stockwell BR, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 478–490. DOI: [10.1016/j.tcb.2020.02.009](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.009).
- 44 王佳, 李忻炎, 李琳钰, 等. IRF8 靶向铁死亡在急性肺损伤中的作用及机制研究 [J]. *医学新知*, 2024, 34(4): 363–371. [Wang J, Li XY, Li YL, et al. Role and mechanism of IRF8 targeting ferroptosis in the pathogenesis of acute lung injury[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2024, 34(4): 363–371.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202403082](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202403082).
- 45 Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(47): 16836–16841. DOI: [10.1073/pnas.1415518111](https://doi.org/10.1073/pnas.1415518111).
- 46 朝博, 任君浩, 苏优勒. 塞来昔布通过 MAPK/ERK 信号通路抑制炎症反应改善急性脑出血大鼠神经功能的机制研究 [J]. *中国药师*, 2023, 26(11): 181–188. [Chao B, Ren JH, Su YL. Mechanism study of celecoxib to improve neurological function in rats with acute intracerebral hemorrhage by inhibiting inflammation through the MAPK/ERK signal pathway[J]. *China Pharmacist*, 2023, 26(11): 181–188.] DOI: [10.12173/j.issn.1008-049X.202310025](https://doi.org/10.12173/j.issn.1008-049X.202310025).
- 47 Yue R, Li X, Chen B, et al. Astragaloside IV Attenuates Glutamate-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells through Raf-MEK-ERK Pathway[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126603. DOI: [10.1371/journal.pone.0126603](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126603).
- 48 Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, et al. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 449. DOI: [10.1038/s41419-019-1678-y](https://doi.org/10.1038/s41419-019-1678-y).
- 49 Wang C, Yuan W, Hu A, et al. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 175–184. DOI: [10.3892/mmr.2020.11114](https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11114).
- 50 张富慧, 郝静峰, 张自艳, 等. 菊苣酸调控 p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡及炎症反应的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2022, 39(8): 694–698. [Zhang FH, Hao JF, Zhang ZY, et al. Impacts of cichoric acid on neuronal apoptosis and inflammatory response in ischemic stroke rats by regulating p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway cichoric acid[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2022, 39(8): 694–698.] DOI: [10.19845/j.cnki.zfysjbjzz.2022.0175](https://doi.org/10.19845/j.cnki.zfysjbjzz.2022.0175).
- 51 赖吴芳. 重组水蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的作用及其机制的初步研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2018. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10598-1019125601.htm>.

收稿日期: 2024 年 01 月 08 日 修回日期: 2024 年 03 月 27 日
本文编辑: 李 阳 钟巧妮