益肺宣肺降浊方抗血管性痴呆的作用机制研究Δ

卓桂锋[1,2*]，陈　炜[1]，张金枝[1]，黄德庆[1]，袁炳茂[1]，蒲珊珊[1]，朱小敏[1]，廖乃彬[1]，苏明阳[1]，陈湘怡[3]，符钰岚[1]，吴　林[1,4#]（1.广西中医药大学第一附属医院脑病科，南宁　530022；2.广西中医药大学第一临床医学院，南宁　530022；3.广西中医药大学壮医药学院，南宁　530200；4.广西中医药大学科学实验中心，南宁　530200）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）18-2207-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.18.04

摘　要　目的　探讨益肺宣肺降浊方（YFXF）抗血管性痴呆（VD）的作用机制。**方法**　通过网络药理学方法获取YFXF差异表达作用靶点（YDEGs）；利用列线图模型从YDEGs中筛选高风险基因；基于高风险基因从广义线性、支持向量机、极限梯度上升和随机森林模型中筛选最优机器学习模型。采用双侧颈总动脉闭塞术构建大鼠VD模型，并随机分为模型组、YFXF组（12.18 g/kg，以生药总量计），另设假手术组，每组6只。评价YFXF对VD大鼠行为学（以逃避潜伏期和穿越平台次数为指标）、大脑皮层组织病理形态学变化以及分泌磷酸蛋白1（SPP1）/磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（又名Akt）信号通路相关蛋白及SPP1 mRNA表达的影响。**结果**　共获得6个YDEGs，其中*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*可能是VD的高风险基因；基于高风险基因的广义线性模型预测准确性最高（曲线下面积为0.954）。与模型组比较，YFXF可显著缩短VD大鼠的逃避潜伏期，显著增加穿越平台次数（$P<0.05$）；可改善大脑皮层组织神经元固缩和坏死等病理损伤，显著降低SPP1蛋白及mRNA的表达水平（$P<0.05$），显著升高PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平（$P<0.05$）。**结论**　VD高风险基因*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*和*HSPB1*可能是YFXF的重要作用靶点；YFXF可能通过下调SPP1蛋白及mRNA的表达、激活PI3K/Akt信号通路来发挥抗VD作用。

关键词　益肺宣肺降浊方；血管性痴呆；网络药理学；列线图模型；机器学习模型；SPP1/PI3K/Akt信号通路

Study on the mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula against vascular dementia

ZHUO Guifeng[1,2], CHEN Wei[1], ZHANG Jinzhi[1], HUANG Deqing[1], YUAN Bingmao[1], PU Shanshan[1], ZHU Xiaomin[1], LIAO Naibin[1], SU Mingyang[1], CHEN Xiangyi[3], FU Yulan[1], WU Lin[1,4]（1. Dept. of Encephalopathy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 2. The First Clinical College of Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 3. College of Zhuang Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 4. Science Experiment Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula (YFXF) against vascular dementia (VD). **METHODS** The differentially expressed genes of YFXF (YDEGs) were obtained by network pharmacology. High-risk genes were screened from YDEGs by using the nomogram model. The optimal machine learning models in generalized linear, support vector machine, extreme gradient boosting and random forest models were screened based on high-risk genes. VD model rats were established by bilateral common carotid artery occlusion, and were randomly divided into model group and YFXF group (12.18 g/kg, by the total amount of crude drugs), and sham operation group was established additionally, with 6 rats in each group. The effects of YFXF on behavior (using escape latency and times of crossing platform as indexes), histopathologic changes of cerebral cortex, and the expression of proteins related to the secreted phosphoprotein 1 (SPP1)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (aka Akt) signaling pathway and the mRNA expression of SPP1 in cerebral cortex of VD rats were evaluated. **RESULTS** A total of 6 YDEGs were obtained, among which *SPP1*, *CCL2*, *HMOX1* and *HSPB1* may be high-risk genes of VD. The generalized linear model based on high-risk genes had the highest prediction accuracy (area under the curve of 0.954). Compared with the model group, YFXF could significantly shorten the escape latency of VD rats, significantly increase the times of crossing platform ($P<0.05$); improve the pathological damage of cerebral cortex, such as neuronal shrinkage and neuronal necrosis; significantly reduce the expressions of SPP1 protein and mRNA ($P<0.05$), while significantly increase the phosphorylation levels of PI3K and Akt ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** VD high-risk genes *SPP1*, *CCL2*, *HMOX1* and *HSPB1* may be the important targets of YFXF. YFXF may play an anti-VD role by down-regulating

Δ **基金项目**　国家自然科学基金项目（No. 82374387, No. 82160885）；国家中医药管理局高水平中医药重点学科（中医内科学）建设项目（No.zyyzdxk-2023166）；广西中医药大学研究生教育创新计划项目（No.YCBXJ2023009，YCBXJ2023029，No.YCSW2023384）

＊**第一作者**　博士研究生。研究方向：中医药防治脑系疾病。E-mail：12942105@qq.com

＃**通信作者**　教授，博士生导师。研究方向：中医药防治脑系疾病。E-mail：358304005@qq.com

the protein and mRNA expressions of SPP1 and activating PI3K/Akt signaling pathway.
KEYWORDS Yifei xuanfei jiangzhuo formula; vascular dementia; network pharmacology; nomogram model; machine learning model; SPP1/PI3K/Akt signaling pathway

血管性痴呆（vascular dementia，VD）是脑血管病变或血管危险因素致脑损害所引发的痴呆，是除阿尔茨海默病外最常见的年龄相关性痴呆。调查显示，预计到2030年，我国痴呆总人数将达到1 600万，给患者及其家庭带来极大的痛苦和经济压力[1]。目前，临床尚无能够治愈VD的特效药物，故积极探索VD发病的分子机制并寻找新的治疗药物具有重要意义。

益肺宣肺降浊方（Yifei xuanfei jiangzhuo formula，YFXF）是广西中医药大学第一附属医院脑病科治疗VD的常用协定方，由黄芪、人参、苏子、苦杏仁等9味中药组成。全方诸药相合，既可益肺、宣肺、补本，又能通络祛痰、通腑降浊，共奏治疗VD之功。临床实践证实，YFXF可明显提高VD患者的认知及行为能力[2]。进一步的基础研究结果显示，该方上述作用的发挥可能与调控磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（又称Akt）等信号通路有关[3-4]。由于现有研究有限，YFXF抗VD的具体作用途径尚缺乏系统探索。随着高新生物技术的发展与应用，网络药理学、列线图模型和机器学习模型等生物信息学方法被逐渐应用于人体疾病生物信息系统分析、新治疗靶点挖掘等领域。基于此，本研究拟应用上述生物信息学方法结合动物实验，探讨YFXF抗VD的潜在作用机制，以期为该方在VD治疗中的应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX43型光学显微镜、UC90型成像系统（日本Olympus公司），Multiskan Sky型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Bio-Rad公司），DYCp-31DN型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

黄芪、人参、麦冬、桔梗、苦杏仁、三七、苏子、石菖蒲、酒大黄饮片（批号分别为240501、231001、240501、240301、231001、230801、240301、240301、201103）均购自广西中医药大学第一附属医院，经该院药学部主任中药师田元春鉴定均为真品。

苏木精、伊红染液（批号分别为BA-4041、BA-4024）均购自珠海贝索生物技术有限公司；RIPA裂解液（批号R0020）购自北京索莱宝科技有限公司；鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体、兔源分泌磷酸蛋白1（secreted phosphoprotein 1，SPP1）抗体、兔源PI3K抗体、鼠源Akt抗体、鼠源磷酸化Akt（phosphorylated Akt，p-Akt）抗体（批号分别为60004-1-Ig、22952-1-AP、20584-1-AP、60203-2-Ig、66444-1-Ig）和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、抗鼠IgG二抗（批号分别为SA00001-2、SA00001-1）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源磷酸化PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）抗体（批号AF3242）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；实时定量PCR试剂盒、RNA提取试剂、逆转录试剂盒（批号分别为Q712、R701-01、R123-01）均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；所用PCR引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠18只，体重为（200±20）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004。该动物中心符合SPF级医学实验动物环境及设施要求。动物实验方案经过广西中医药大学伦理委员会审核批准，批准编号为DW20220215-053-02。

2 方法

2.1 生物信息学研究

2.1.1 YFXF活性成分和潜在靶点筛选

采用TCMSP数据库（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php），以类药性≥0.18且口服生物利用度≥30%为条件[5]，筛选黄芪、人参、三七、苏子、麦冬、石菖蒲、桔梗、苦杏仁、酒大黄的活性成分和潜在靶点；采用BATMAN-TCM数据库（http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/），以评分（化合物与靶点相互作用的可能性）临界值≥20、$P<0.05$为条件[6]，对上述9味中药的活性成分和潜在靶点进行补充；然后通过UniProt数据库（http://www.uniprot.org/）和Perl软件对结果进行注释，得到药物靶点的txt文本并命名为“allTargets”。

2.1.2 VD数据集差异基因筛选

通过GEO数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）检索获得VD相关人大脑皮层数据集GSE122063（正常组44例、VD组36例），经数据注释后通过R语言的“Limma”包对该数据集的基因表达谱进行标准化校正，得到txt文本并命名为“normalize”。以各基因表达量差异倍数对数的绝对值（$|\log_2 FC|$）≥1且校正后$P<0.05$为阈值[7]，利用R语言的“Limma”包进行分析，获取GSE122063数据集的差异基因。

2.1.3 YFXF差异表达作用靶点的筛选

通过韦恩图在线工具（https://www.bioinformatics.com.cn/）获得YFXF潜在靶点与VD数据集差异基因的交集，即YFXF差异表达作用靶点（YFXF differentially

expressed genes，YDEGs），并利用R语言的“Ggboxplot”包进行可视化展示。

2.1.4　高风险基因筛选

参考文献方法[8]，基于“2.1.2”项所得“normalize”文本和“2.1.3”项所得YDEGs，采用R语言的“Rmda”和“Rms”包建立VD列线图模型，评估YDEGs的风险性，并根据代表风险性的列线图横坐标长度来筛选GSE122063数据集的高风险基因。采用Bootstrap内部验证法重复抽样1 000次进行验证，根据Hosmer-Lemeshow检验评估模型的拟合优度，检验水准$\alpha=0.05$。采用“Rms”包可视化校准曲线以评估模型准确性，采用“Rmda”包绘制决策曲线以评估其临床应用价值。

2.1.5　最优机器学习模型筛选

参考文献方法[8]，采用Logistic回归基于GSE122063数据集的高风险基因建立机器学习模型。基于“2.1.4”项所得高风险基因和“2.1.2”项所得“normalize”文本，利用R语言的“Random Forest”“Xgboos”“Ggplot2”“Caret”“Kernlab”“DALEX”包建立广义线性模型（generalized linear model，GLM）、支持向量机（support vector machine，SVM）模型、极限梯度上升（extreme gradient boosting，XGB）模型和随机森林（random forest，RF）模型，并绘制残差箱线图。应用R语言的“pROC”包绘制受试者操作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线，并使用该包的“ci”函数评估ROC曲线下面积（area under the curve，AUC）。根据残差值和AUC评估4个机器学习模型的预测性能[残差值越小越好；0.5≤AUC＜0.6为失败，0.6≤AUC＜0.7为很差，0.7≤AUC＜0.8为一般，0.8≤AUC＜0.9为良好，0.9≤AUC＜1为优秀][9]，以选择最优机器学习模型。

2.2　动物实验研究

2.2.1　YFXF制备

分别称取黄芪、人参、麦冬、三七、苏子、石菖蒲各15 g，桔梗、苦杏仁各10 g，酒大黄6 g，置于烧瓶中，加水2 000 mL，煎煮2 h×3次；过滤，合并3次滤液，于45 ℃水浴中减压浓缩至1.218 g/mL（以生药量计），于4 ℃下保存，备用。

2.2.2　造模、分组与给药

将SD大鼠按照随机数字表法分为假手术组（6只）和手术组（12只）。采用双侧颈总动脉闭塞术构建VD模型[10]：经异氟烷维持麻醉后，切开手术组大鼠颈部皮肤，在不刺激迷走神经的情况下，分离双侧颈总动脉并结扎；假手术组大鼠仅切开颈部，但不结扎。所有大鼠均完成手术，无死亡。造模后第3天，进行水迷宫行为学测评（具体操作见“2.2.3”项），以假手术组大鼠逃避潜伏期为参考值，计算两组大鼠逃避潜伏期的差值与参考值之比，若该比值＞20%，则评定VD模型构建成功。

手术组大鼠均造模成功，将其随机分为模型组和YFXF组，每组6只。YFXF组大鼠灌胃相应药液12.18 g/kg（以生药总量计，根据临床等效剂量换算而得），模型组和假手术组大鼠灌胃生理盐水，每天1次，每次10 mL/kg，连续30 d。

2.2.3　大鼠行为学测评

于末次给药前6 d开始进行水迷宫实验，包括定位航行实验和空间探索实验。

（1）定位航行实验：将水迷宫分为4个象限，在第2象限内放置平台，然后注水（没过平台）。将大鼠寻找平台的时间设置为60 s，然后将各组大鼠依照第1、2、3、4象限的顺序放入水中，记录其从入水到爬上平台所需的时间，即逃避潜伏期。若大鼠无法在设置时间内找到平台，则引导大鼠找到平台并让其在平台上停留10～20 s再归笼，其逃避潜伏期按60 s计。每只大鼠每天依次游完4个象限，连续训练5 d后进行检测。

（2）空间探索实验：大鼠完成定位航行实验后，于末次给药后24 h进行空间探索实验——撤走平台，将大鼠依照第1、2、3、4象限的顺序放入水中，分别记录其60 s内穿越平台次数。

2.2.4　标本制备

水迷宫实验结束后，随机抽取各组3只大鼠用于Western blot实验和实时荧光定量PCR检测：大鼠用20%乌拉坦麻醉，剥离大脑皮层并于－80 ℃下保存，备用。取各组剩余大鼠用于苏木精-伊红（HE）染色实验：大鼠同法麻醉后，行心脏灌注术，灌注后取出大脑，用多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，于4 ℃下保存，备用。

2.2.5　大鼠大脑皮层组织病理形态学观察

取“2.2.4”项下各组大鼠经石蜡包埋的脑组织，切片（厚度约5 μm），经脱蜡、水洗后，行HE染色，使用光学显微镜观察其脑皮层组织病理形态学变化并拍照。

2.2.6　大鼠大脑皮层组织中通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2.4”项下各组大鼠冻存的大脑皮层组织适量，提取蛋白、测定蛋白浓度后作变性处理，制备蛋白上样样品，随后进行电泳分离、转膜、封闭，加入GAPDH、SPP1、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt一抗（稀释比例分别为1∶50 000、1∶1 000、1∶600、1∶1 000、1∶5 000、1∶2 000），于4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例均为1∶10 000），于室温下孵育1.5 h；洗膜后显影，成像。使用Image J软件分析各蛋白条带的灰度值，以SPP1与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值表示SPP1蛋白的表达水平，以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt的灰度值比值表示PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平。

2.2.7　大鼠大脑皮层组织中SPP1 mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取“2.2.4”项下各组大鼠冻存的大脑皮层组织适量，提取mRNA，检测纯度、浓度后，逆转录合成cDNA并进行PCR扩增。PCR反应体系包括：cDNA模板1 μL，SYBR Green Master Mix 5 μL，正、反向引物各0.4 μL，加无核酸酶水至20

μL。PCR扩增条件如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算SPP1 mRNA的表达水平，结果以假手术组为参照进行归一化处理。PCR引物序列和产物大小见表1。

表1　PCR引物序列和产物大小

基因	引物序列(5′→3′)	产物大小/bp
GAPDH	正向引物:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	反向引物:GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
SPP1	正向引物:GAACAGTATCCCGATGCCACA	180
	反向引物:GTGTGTTTCCACGCTTGGTTC	

2.2.8　统计学方法

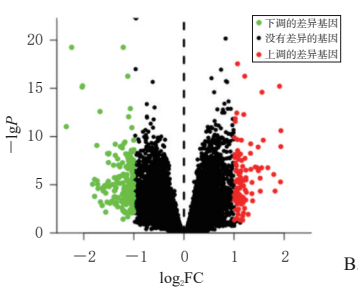
采用SPSS 25.0软件进行统计分析。动物实验数据均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐)或Games-Howell检验(方差不齐)。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

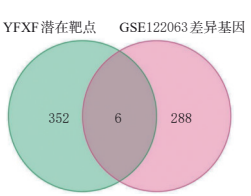
3.1　生物信息学分析结果

3.1.1　YFXF活性成分、潜在靶点和YDEGs的筛选结果

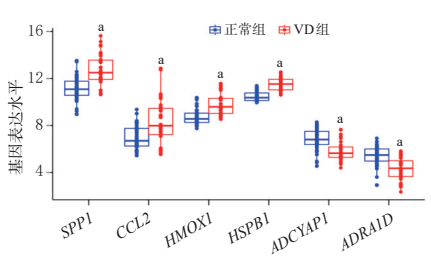
共获得YFXF活性成分125个，包括黄芪的20个、人参的22个、三七的8个、苏子的16个、麦冬的13个、石菖蒲的4个、桔梗的7个、苦杏仁的19个、酒大黄的16个。共获得YFXF潜在靶点358个，GSE122063数据集差异基因294个，两者取交集得到YDEGs 6个。其中，*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*在VD组受试者大脑皮层组织中的表达显著高于正常组($P<0.05$)，*ADCYAP1*、*ADRA1D*在VD组受试者大脑皮层组织中的表达显著低于正常组($P<0.05$)。结果见图1。



A. GSE122063差异基因的火山图



B.YFXF潜在靶点与GSE122063差异基因的韦恩图



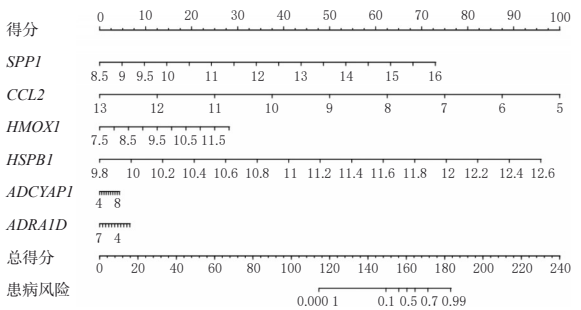
C. YDEGs的箱线图

a：与正常组比较，$P<0.05$。

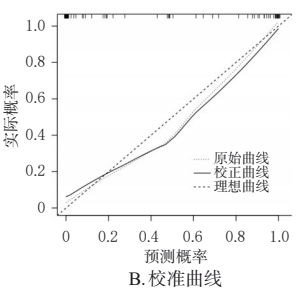
图1　YDEGs的筛选结果

3.1.2　高风险基因筛选结果

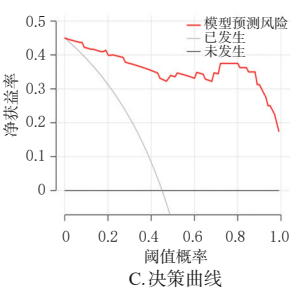
VD列线图模型分析结果显示，*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*可能是VD的高风险基因，而*ADCYAP1*、*ADRA1D*的风险较低(图2A)。校正曲线的平均绝对误差为0.05，平均平方误差为0.003 4，绝对误差的分位数为0.089，预测校正曲线和原始曲线都比较贴近理想曲线(图2B)，提示根据YDEGs构建的VD列线图模型预测误差较小。决策曲线显示在阈值概率0～1.0范围内，模型预测风险的净获益率均高于“已发生”曲线且与其距离较远(图2C)，提示VD列线图模型具有较高的临床价值。



A. VD列线图模型



B. 校准曲线

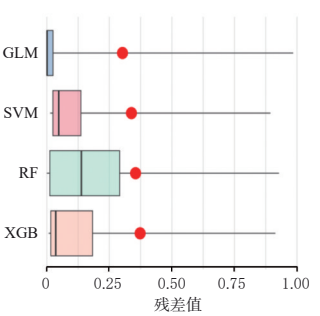


C. 决策曲线

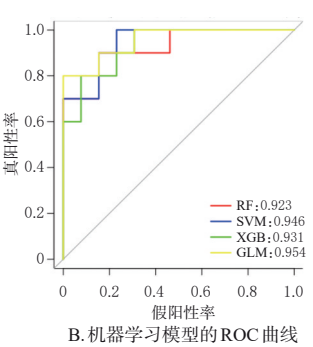
图2　高风险基因筛选结果

3.1.3　最优机器学习模型筛选结果

GLM的残差值最小(残差值的均方根为0.301)，AUC最高(AUC为0.954，95%置信区间为0.892～0.980)，表明基于高风险基因的GLM预测效能较高。结果见图3。



A. 机器学习模型残差箱线图(红点代表残差值的均方根)



B. 机器学习模型的ROC曲线

图3　最优机器学习模型筛选结果

3.2　动物实验结果

3.2.1　各组大鼠行为学指标比较

与假手术组比较，模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长，穿越平台次数显著减少($P<0.05$)。与模型组比较，YFXF组大鼠的逃避潜伏期显著缩短，穿越平台次数显著增多($P<0.05$)。结果见表2。

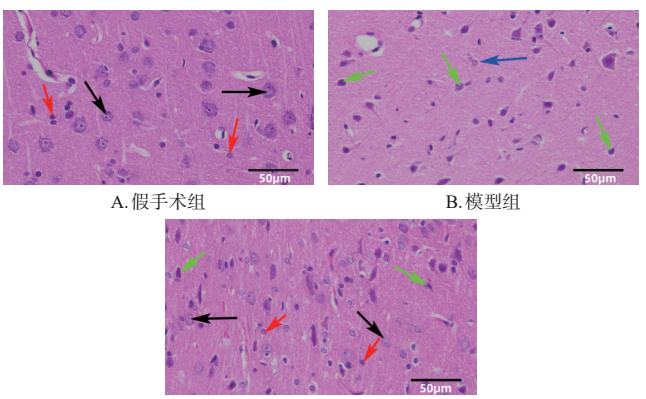
表2　各组大鼠行为学指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数
假手术组	7.87±2.72	5.17±1.07
模型组	43.57±5.06[a]	1.33±0.94[a]
YFXF组	23.72±4.92[b]	3.83±1.34[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.2.2　各组大鼠大脑皮层组织病理形态学比较

假手术组大鼠大脑皮层区形态完整，结构正常，锥体细胞和小胶质细胞排列整齐、胞核饱满、核仁清晰、染色均匀，无明显坏死现象。与假手术组比较，模型组大鼠大脑皮层区结构损伤较明显，形态紊乱，大量神经元固缩，甚至有部分神经元完全坏死，未见正常结构的锥体细胞。与模型组比较，YFXF组大鼠大脑皮层区结构损伤明显减轻，可见大量锥体细胞及小胶质细胞，核仁清晰，染色均匀，有少量神经元固缩。结果见图4。



A. 假手术组　B. 模型组　C. YFXF组

黑色箭头：锥体细胞；红色箭头：小胶质细胞；绿色箭头：固缩的神经元；蓝色箭头：坏死的神经元。

图4　各组大鼠大脑皮层组织病理形态学观察的显微图（HE染色）

3.2.3　各组大鼠大脑皮层组织中通路相关蛋白表达比较

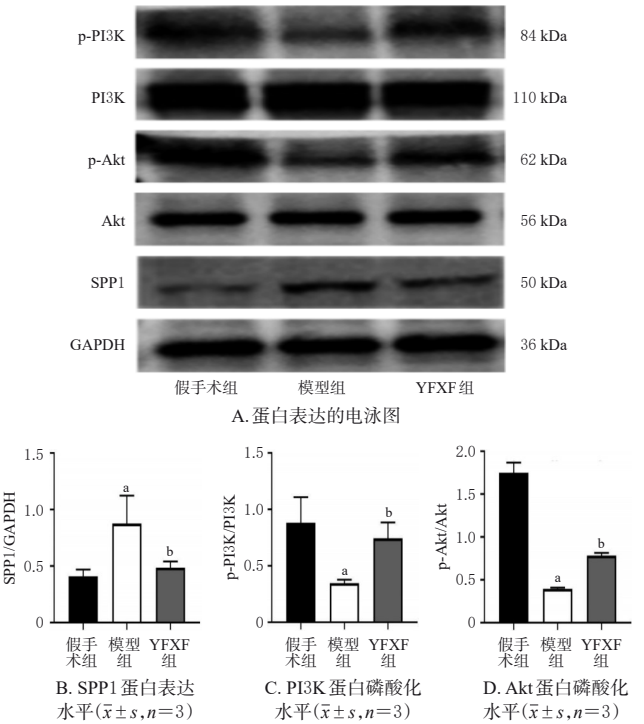
与假手术组比较，模型组大鼠大脑皮层组织中SPP1蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$），PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，YFXF组大鼠大脑皮层组织中SPP1蛋白的表达水平显著降低（$P<0.05$），PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图5。

3.2.4　各组大鼠大脑皮层组织中SPP1 mRNA表达比较

与假手术组比较，模型组大鼠大脑皮层组织中SPP1 mRNA的表达水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，YFXF组大鼠大脑皮层组织中SPP1 mRNA的表达水平显著降低（$P<0.05$）。结果见图6。

4　讨论

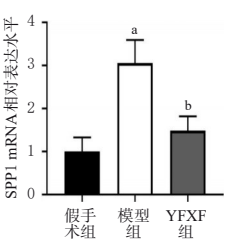
本研究首先通过网络药理学方法获得YFXF治疗VD的潜在作用靶点，即*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*、*ADCYAP1*和*ADRA1D*。通过列线图和机器学习模型进一步分析，*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*可能是VD的高风险基因；基于高风险基因的GLM预测准确性最高



A. 蛋白表达的电泳图　B. SPP1蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）　C. PI3K蛋白磷酸化水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）　D. Akt蛋白磷酸化水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

图5　各组大鼠大脑皮层组织中SPP1/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达比较



a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

图6　各组大鼠大脑皮层SPP1 mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

（AUC=0.954）。这提示*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*既是YFXF的潜在作用靶点，又可用于预测和评估VD的患病风险。

本研究生物信息学初步分析结果显示，*SPP1*作为YFXF的重要靶点在VD组受试者的大脑皮层中呈高表达。该基因编码蛋白SPP1，又称骨桥蛋白，是一种多功能酸性分泌糖蛋白，可分泌到细胞外发挥促进细胞凋亡等生物学功能。据报道，脑缺血再灌注后，SPP1蛋白在神经血管单位细胞中的表达显著增加，且该蛋白的高表达对血脑屏障具有不利影响[11]。SPP1可与多种整合素结合，调控PI3K/Akt、核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）等下游信号通路，从而发挥调控炎症反应等生物学功能[12−13]。大脑皮层是在整合认知和情感行为、调节自主神经和神经内分泌功能方面具有重要作用的区域[14]。据报道，VD大鼠大脑皮层中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均较正常大鼠显著降低，而逆转PI3K、Akt蛋白的磷酸化可使VD大鼠的学习认知能力明显提高[15]。由此，

本课题组推测YFXF改善VD患者认知障碍和神经损伤的作用可能与调控SPP1/PI3K/Akt信号通路有关。

为验证这一推测，本研究进行了相关动物实验。通过行为学指标检测和HE染色观察发现，VD大鼠出现了明显的认知障碍和大脑皮层神经损伤，而YFXF对此具有明显的改善作用。进一步通过Western blot实验和实时荧光定量PCR检测发现，YFXF可显著降低VD大鼠大脑皮层组织中SPP1蛋白及mRNA的表达水平，升高其PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平。这与生物信息学分析和已有研究[15]结果一致。

综上所述，YFXF的重要作用靶点——*SPP1*、*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*可能是VD的高风险基因；基于高风险基因的GLM具有较高的临床应用价值。YFXF可能通过下调SPP1蛋白及mRNA的表达、激活PI3K/Akt信号通路来发挥抗VD作用。*CCL2*、*HMOX1*、*HSPB1*在VD发生中的作用，以及其与YFXF抗VD作用的相关性有待进一步深入研究。

参考文献

[1] JIAO C Z, WEI S C, LIU T T, et al. The prevalence of vascular dementia in China: a systematic review and meta-analysis from 2009-2019[J]. Iran J Public Health, 2021, 50(1): 11-23.

[2] 黄晓丹. 益肺宣肺降浊方联合多奈哌齐治疗痰浊阻窍型血管性痴呆的临床研究[D]. 南宁：广西中医药大学，2019.
HUANG X D. Clinical study of Yifei xuanfei jiangzhuo recipe combined with donepezil in treating vascular dementia of phlegm and turbidity obstruction[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2019.

[3] 陈炜，朱小敏，胡跃强，等. 益肺宣肺降浊方通过EGFR调节PI3K/Akt-MAPK/ERK通路改善血管性痴呆大鼠的记忆[J]. 中华中医药学刊，2023，41(8)：46-50，266-269.
CHEN W, ZHU X M, HU Y Q, et al. Yifei xuanfei jiangzhuo prescription improves memory of vascular dementia rats by EGFR regulating PI3K/Akt-MAPK/ERK pathway[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(8): 46-50, 266-269.

[4] 王晋平，唐农，刘布谷，等. 益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经细胞凋亡及cAMP/PKA信号通路关键因子的影响[J]. 中华中医药学刊，2016，34(4)：778-781.
WANG J P, TANG N, LIU B G, et al. The effects of Yifei xuanfei jiangzhuo fang on neuronal apoptosis and essential contributing factor of cAMP/PKA signaling pathway in rats with vascular dementia[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(4): 778-781.

[5] 孙晓丽，杨若聪，刘俊杰，等. 基于网络药理学研究龙生蛭胶囊抗脑卒中的作用机制[J]. 中华中医药杂志，2019，34(5)：2165-2168.
SUN X L, YANG R C, LIU J J, et al. Mechanism of Longshengzhi capsule in the treatment of stroke based on network pharmacology[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(5): 2165-2168.

[6] KONG X R, LIU C, ZHANG Z Z, et al. BATMAN-TCM 2.0: an enhanced integrative database for known and predicted interactions between traditional Chinese medicine ingredients and target proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D1110-D1120.

[7] 俎高钰，李凤娇，咸伟伟，等. 正常和帕金森病患者基底神经节的转录差异分析[J]. 解剖学报，2024，55(4)：482-492.
ZU G Y, LI F J, XIAN W W, et al. Differential expression analysis of the transcriptome for human basal ganglia from normal donors and Parkinson's disease patients[J]. Acta Anat Sin, 2024, 55(4): 482-492.

[8] LAI Y X, LIN C J, LIN X, et al. Identification and immunological characterization of cuproptosis-related molecular clusters in Alzheimer's disease[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 932676.

[9] RAMKUMAR P N, KARNUTA J M, NAVARRO S M, et al. Deep learning preoperatively predicts value metrics for primary total knee arthroplasty: development and validation of an artificial neural network model[J]. J Arthroplasty, 2019, 34(10): 2220-2227.e1.

[10] GUAN T Y, XIAO Y N, XIE X H, et al. Dulaglutide improves gliosis and suppresses apoptosis/autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in vascular dementia rats[J]. Neurochem Res, 2023, 48(5): 1561-1579.

[11] SPITZER D, GUÉRIT S, PUETZ T, et al. Profiling the neurovascular unit unveils detrimental effects of osteopontin on the blood-brain barrier in acute ischemic stroke[J]. Acta Neuropathol, 2022, 144(2): 305-337.

[12] LIU K, HU H Y, JIANG H Y, et al. Upregulation of secreted phosphoprotein 1 affects malignant progression, prognosis, and resistance to cetuximab via the KRAS/MEK pathway in head and neck cancer[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(10): 1147-1158.

[13] ZHANG H, GUO M, CHEN J H, et al. Osteopontin knockdown inhibits α_v, β_3 integrin-induced cell migration and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by inducing autophagy and inactivating the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(4): 991-1002.

[14] SALAT D H, KAYE J A, JANOWSKY J S. Selective preservation and degeneration within the prefrontal cortex in aging and Alzheimer disease[J]. Arch Neurol, 2001, 58(9): 1403-1408.

[15] WANG M Y, MENG M, YANG C C, et al. Cornel iridoid glycoside improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via activating PI3K/Akt/GSK-3β/CREB pathway in rats[J]. Behav Brain Res, 2020, 379: 112319.

（收稿日期：2024-04-07　修回日期：2024-08-22）
（编辑：邹丽娟）