

本文引用: 刘 辉, 张 恒, 陶叶琴, 聂 格, 欧阳文. 基于指纹图谱和网络药理学预测丹楂通脉丸药效物质基础[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1373-1384.

基于指纹图谱和网络药理学预测丹楂通脉丸药效物质基础

刘 辉^{1,2,3}, 张 恒¹, 陶叶琴^{2,3}, 聂 格^{1,2,3}, 欧阳文^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 浏阳市中医医院, 湖南 浏阳 410300;

3. 湖南中医药大学附属第二中西医结合医院, 湖南 浏阳 410300

〔摘要〕 **目的** 建立丹楂通脉丸的指纹图谱, 利用化学计量学分析色谱峰贡献率, 结合网络药理学方法预测其药效物质基础。**方法** 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 流动相 0.1% 磷酸水-乙腈, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 建立丹楂通脉丸甲醇提取物指纹图谱。利用网络药理学筛选相关成分的靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络, 对丹楂通脉丸潜在的药效物质与关键靶点进行分子对接验证。通过体外实验验证潜在的药效物质的抗炎活性。**结果** 10 批样品指纹图谱中有 15 个共有峰, 2 个特征峰被指认, 分别为丹酚酸 B 和丹酚酸 A。网络药理学分析表明, 丹酚酸 B 和丹酚酸 A 是丹楂通脉丸发挥活性作用的有效成分, 预测其可作为丹楂通脉丸的主要药效物质。体外细胞实验证明, 与模型组比较, 丹酚酸 B 高、中、低剂量组 NO 释放量均明显降低($P<0.01$), 丹酚酸 A 高剂量组 NO 释放量显著下降($P<0.01$), 具有一定的抗炎活性。**结论** 通过指纹图谱和网络药理学预测丹楂通脉丸药效物质, 为丹楂通脉丸质量的全面控制和评价提供了科学依据。

〔关键词〕 丹楂通脉丸; 高效液相色谱; 指纹图谱; 网络药理学; 分子对接; 药效物质

〔中图分类号〕 R284.1

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.004

Predicting the pharmacodynamic material basis of Danzha Tongmai Pill based on fingerprint and network pharmacology

LIU Hui^{1,2,3}, ZHANG Heng¹, TAO Yeqin^{2,3}, NIE Ge^{1,2,3}, OUYANG Wen^{1,2,3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang,

Hunan 410300, China; 3. The Second Hospital of Integrative Medicine of Hunan University of Chinese Medicine, Liuyang,

Hunan 410300, China

〔Abstract〕 Objective To establish the fingerprint of Danzha Tongmai Pill (DZTMP), and to analyze the contribution rate of chromatographic peaks using chemometrics, and predict its pharmacodynamic material basis combined with network pharmacology methods **Methods** Using a Agilent C₁₈ chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a detection wavelength of 280 nm, a mobile phase of 0.1% phosphoric acid water-acetonitrile, a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and gradient elution, the fingerprint of the methanol extract of DZTMP was established. Using network pharmacology to screen relevant component targets and pathways, a "component-target-pathway" network was constructed, and molecular docking verification was performed on the potential pharmacodynamic materials and key targets of DZTMP. The anti-inflammatory activity of potential pharmacodynamic materials was verified through in vitro experiments. **Results** Among the fingerprint spectra of 10 batches of samples, there were 15 common peaks, with two characteristic peaks identified as salvianolic acid B and salvianolic acid A. Network pharmacology analysis indicated that salvianolic acid B and salvianolic acid A were the active components responsible for the efficacy of DZTMP, and they were predicted to be the main pharmacodynamic material basis of the medicine. In vitro cell experiments demonstrated that, compared with the model group, the

〔收稿日期〕 2023-11-30

〔基金项目〕 湖南省普通高等教育教学改革研究项目(HNJG-2021-0577); 湖南中医药大学中药学一流建设学科项目(校行科字[2018]3号); 湖南省中医药管理局基金项目(B2024135); 湖南中医药大学校级科研基金项目(2022XYLH071)。

〔通信作者〕 * 欧阳文, 男, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: oyw810225@126.com。

NO release in the high-, medium-, and low-dose salviolic acid B groups was significantly reduced ($P<0.01$), and the NO release in the high-dose salviolic acid A group was also significantly decreased ($P<0.01$), indicating certain anti-inflammatory activity.

Conclusion Predicting the pharmacodynamic material basis of DZTMP through fingerprint spectra and network pharmacology provides a scientific basis for the comprehensive control and evaluation of the quality of DZTMP.

[**Keywords**] Danzha Tongmai Pill; HPLC; fingerprint; network pharmacology; molecular docking; pharmacodynamic materials

丹楂通脉丸为浏阳市中医医院的院内制剂,由酒丹参、山楂、三七、西洋参四味中药组成,具有活血祛瘀、化痰通络的功效,用于治疗痰瘀阻滞所致的心脑血管疾病。方用丹参“生新血,去恶血”,长于活血祛瘀,主含丹参酮、水溶性丹参素、丹酚酸和挥发油等有效成分;山楂“消积化痰,行气散瘀”,现代医学证实其降脂作用较强,可化痰降浊、行气散瘀,主含黄酮类、有机酸类、多糖类等有效成分。二药共用行活血化瘀、化痰降浊之功,合为君药。三七助君药活血化瘀通脉,为臣药。西洋参补元气,生津血,使君臣逐痰瘀而不伤正,益气血以助血行,为佐使。纵观全方,攻补兼施,标本兼治,选药性味平和,不温不燥,切中痰瘀致病之要害,使痰瘀得化,气血宣达,血脉通畅,共奏活血散瘀,化痰通络之功效。本品在浏阳市中医医院使用10余年,因具有良好的临床疗效,年使用量达数万瓶,销售金额达百万元以上,大批患者受益,但其作用机制尚未阐明,且暂时缺乏统一的质量控制标准,不利于该制剂的全面推广应用。

中药指纹图谱通过对化学成分的整体把控,更加直观地了解中药材及制剂的成分信息,从而全面、准确地评价药物的内在质量。网络药理学综合了多项学科的技术和内容,从生物网络和系统层次的整体角度,通过研究药物、靶点、疾病的相互关系,阐释药物作用机制和疾病发生发展规律,为药物的主要药效物质提供理论支持^[1]。本研究尝试对丹楂通脉丸指纹图谱和网络药理学进行研究,初步确定其药效物质基础,为控制丹楂通脉丸的质量提供科学依据,推动该制剂服务于更多的患者。

1 材料

SHIMADZU 高效液相色谱仪(岛津科技有限公司);ME204E 型万分之一天平(梅特勒托利多仪器有限公司);SB-5200DTD 型超声清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

丹楂通脉丸样品10批(批号:S1-210323、S2-210325、S3-210511、S4-210714、S5-211204、S6-220-405、S7-220409、S8-220613、S9-220618、S10-220822),由浏阳市中医医院提供。对照品丹酚酸A(含量为测

定用,批号96574-01-5)与对照品丹酚酸B(含量为测定用,批号121521-90-2),购于成都植标化纯生物技术有限公司。色谱甲醇与乙腈均购于安徽天地高纯溶剂有限公司,磷酸(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司),超纯水。

细胞株 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞株(武汉普诺赛科技有限公司,货号:CL-0190);RAW264.7细胞专用培养基(武汉普诺赛公司,货号:CM-0190);脂多糖(美国Sigma公司,货号:L8274);CCK-8 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物公司,货号:E-CK-A362);Griess 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号:D11IR234770);地塞米松(上海麦克林公司,批号:C12912459);96孔细胞培养板、6孔细胞培养板、T25培养瓶(浙江赛宁生物科技有限公司,货号:1014300、1010300、1030010);NO检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:110922230515);75%医用酒精(山东安捷高科消毒科技有限公司,批号:20230503)。

2 方法

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长280 nm;柱温30℃;流速为1.0 mL/min;进样量20 μL;流动相为0.1%磷酸水(A)-乙腈(B),丹楂通脉丸梯度洗脱程序:0~10 min,10%~20% B;10~20 min,20%~25% B;20~40 min,25%~30% B;40~60 min,30%~55% B;60~80 min,55%~75% B;80~90 min,10% B。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸A、丹酚酸B适量,加甲醇溶解,制成质量浓度为0.05、0.32 mg/mL的混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定丹楂通脉丸1.00 g置于带塞锥形瓶中,加入甲醇10 mL,密封,40 kHz超声提取90 min,提取液浓缩蒸干,加甲醇至5 mL容量瓶中定容,摇匀后过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 丹楂通脉丸有效成分筛选 利用传统 TCM-

SP 数据库和 ETCM 数据库检索丹楂通脉丸的主要活性成分,设置药代动力学参数的筛选条件为药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 、口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,满足条件的化学成分纳入为丹楂通脉丸的有效成分。

2.2.2 丹楂通脉丸潜在靶点预测、动脉粥样硬化靶点筛选 通过 TCMS 数据库查询丹楂通脉丸主要活性成分所对应的靶点^[2-5],在 Uniprot 数据库查询靶点对应的基因名,设置物种为“Homo sapiens(人类)”,建立数据集,统一将靶点名称对应 Uniprot 数据集转换为基因名。接着检索 GeneCards 在线数据库,设置关键词为“atherosclerosis”,得到抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)相关靶点的数据集。运用 TBtools 软件的“Graphics Venn”功能,提取药物和疾病相交靶点,即丹楂通脉丸治疗动脉粥样硬化的潜在作用靶点。

2.2.3 丹楂通脉丸蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 使用 STRING 在线数据库,将丹楂通脉丸治疗动脉粥样硬化的潜在作用靶点导入后取得 PPI 网络^[5-6],设置物种为“人类”,置信度为 0.400,运行 Cytoscape 3.9.0 中 CytoNCA 插件中的 Degree 值算法,将得分在前 30 个潜在核心靶点导入 STRING 数据库,设置物种为“人类”,置信度为 0.900,得到丹楂通脉丸潜在核心靶点蛋白的 PPI 网络。

2.2.4 “药材-成分-靶点”网络构建与分析 将“药材-成分”和“成分-靶点”信息导入 Cytoscape3.9.0^[5],绘制出“药材-成分-靶点”网络图。在网络图中用节点表示药材、成分、靶点,两个节点间用边表示相互作用。

2.2.5 “核心靶点-活性成分”网络构建 将筛选得到的核心靶点与相应的活性成分匹配^[5],运用 Cytoscape 3.9.0 绘制“核心靶点-活性成分”网络图。

2.2.6 丹楂通脉丸 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 将丹楂通脉丸核心靶点信息导入 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析^[5],分别列出 *P* 值从小到大前 10 位富集结果。

2.2.7 丹楂通脉丸活性成分和核心靶点分子对接验证 使用 PDB 数据库下载得到核心靶点蛋白的三维结构。使用 PubChem 在线数据库下载获得活性成分的三维结构图^[7]。接着通过 Open Babel-2.4.1 软件得到 PDB 格式的活性成分的三维结构图^[5]。将准备的靶点蛋白与活性成分,在 Autodock 4.2.6 软件中进

行前处理后,在 Autodocking 中与小分子进行对接,使用 Auto 工具计算成分与靶蛋白的对接结合能,再通过 Pymol 程序将对接结果可视化。

2.3 丹酚酸 A、丹酚酸 B 体外抗炎活性研究

采用 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型评价丹楂通脉丸中丹酚酸 A 及丹酚酸 B 的体外抗炎活性。将 RAW 264.7 细胞以 8×10^4 个/孔进行 96 孔板的铺板,每孔 200 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。

将原培养液弃去,设置空白组、模型组(含 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、丹酚酸 B 高、中、低剂量组(80、50、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、丹酚酸 A 高、中、低剂量组(10、5、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)及地塞米松组(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

各组相应药物或培养基孵育 24 h 后,取各组上清液 100 μL ,加入 Griess 试剂 100 μL ,在波长 550 nm 处的酶标仪上测定各孔的吸光度值(OD 值),根据标准曲线测定 NO 释放量($\mu\text{mol}/\text{L}$)。

2.4 数据处理

实验数据均用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行显著性差异分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 参照峰的选择 在丹楂通脉丸 HPLC 指纹图谱中,丹酚酸 B 为君药丹参的主要活性成分之一,且其色谱峰稳定、保留时间及峰面积适中、分离度较好,因此选择参照峰为丹酚酸 B。

3.1.2 精密度实验 取同一供试品(S5),根据“2.1.1”项中色谱条件,连续进样 6 次,采用丹酚酸 B 的保留时间和峰面积作为对照,结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD $<1.24\%$,相对峰面积 RSD $<3.00\%$,说明仪器精密度良好。

3.1.3 重复性实验 取同一批次丹楂通脉丸(S5)6 份,按照“2.1.3”项中方法制备供试品溶液,采用“2.1.1”项中色谱条件进样分析,以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积作为对照,结果各共有峰的相对保留时间 RSD $<1.24\%$,相对峰面积 RSD $<2.73\%$,说明该方法重复性良好。

3.1.4 稳定性实验 取同一供试品(S5),根据“2.1.1”项中色谱条件,分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样,记录峰面积,以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积作为对照,结果各共有峰的相对保留时间 RSD $<1.51\%$,相对峰面积 RSD $<2.93\%$,说明样品溶液在 48 h 内稳定。

3.2 指纹图谱的建立及相似度评价

取10批次丹楂通脉丸样品,按照“2.1.3”项中方法制备供试品溶液,采用“2.1.1”项中色谱条件进样分析,得到相应色谱图。使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012年版)^[8-10],以S5-211204样品图谱为参照图谱,运用平均数法,设时间窗宽度为0.5 min,得到10批丹楂通脉丸的叠加指纹图谱,见图1。

3.2.1 丹楂通脉丸相似度分析 将10批丹楂通脉丸(S1~S10)的指纹图谱,同时导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件2012版》^[11-13],依次计算样品与对照图谱相比的相似度,结果分别为0.997、

0.889、0.999、0.296、0.995、0.743、0.997、0.988、0.861、0.997。其中,S4与对照图谱的相似度较低,对比S4的高效液相色谱图发现,S4号样品中丹酚酸B的色谱峰峰面积偏低,而其他共有峰的峰面积偏高,是导致该样品相似度降低的主要原因。除S4号样品外,其他样品相似度均在0.7以上,说明丹楂通脉丸的指纹图谱相似度良好。S4号样品相似度较低,其可能原因与生产该批次所采用的原药材有关。

3.2.2 共有峰的指认及相关分析 使用指纹图谱软件分析丹楂通脉丸10批样品的叠加指纹图谱,通过对比各批样品中色谱峰与参照峰的相对保留时间,

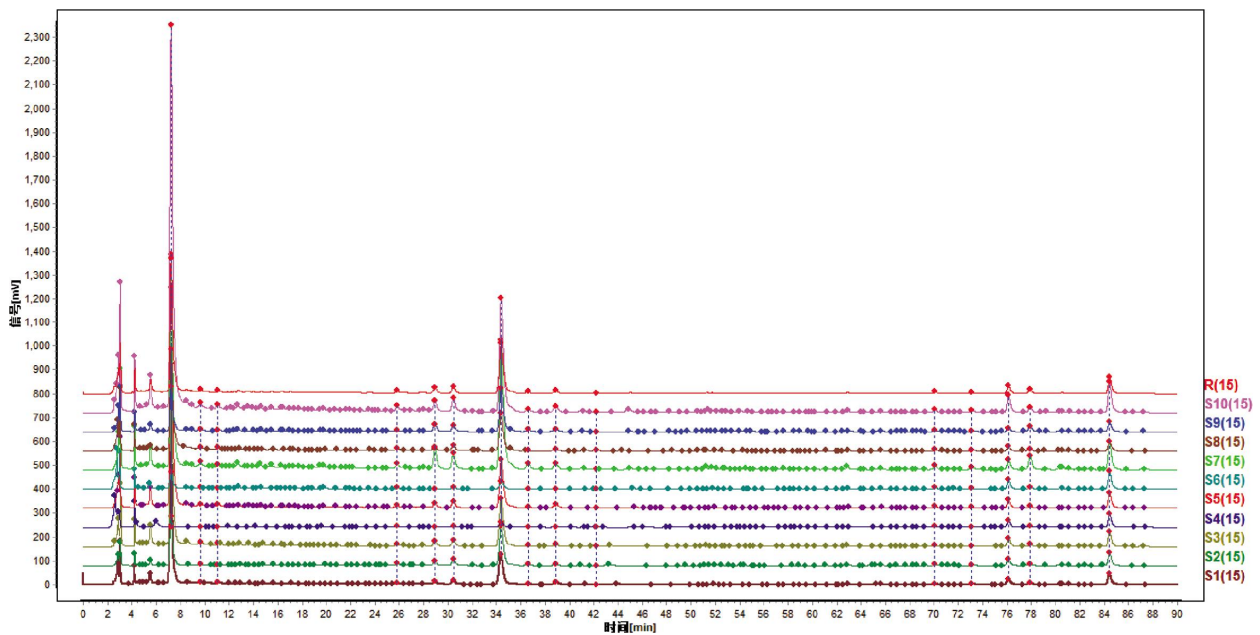


图1 丹楂通脉丸高效液相色谱指纹图

Fig.1 HPLC fingerprint of DZTMP

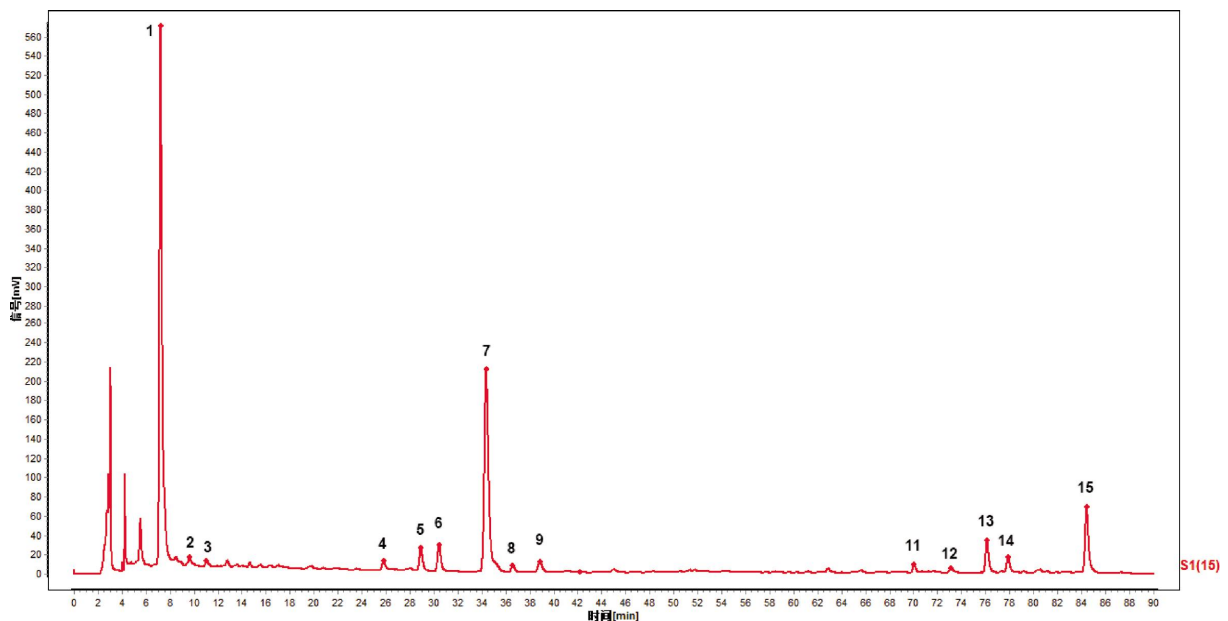


图2 丹楂通脉丸高效液相共有峰色谱图

Fig.2 HPLC common peak chromatogram of DZTMP

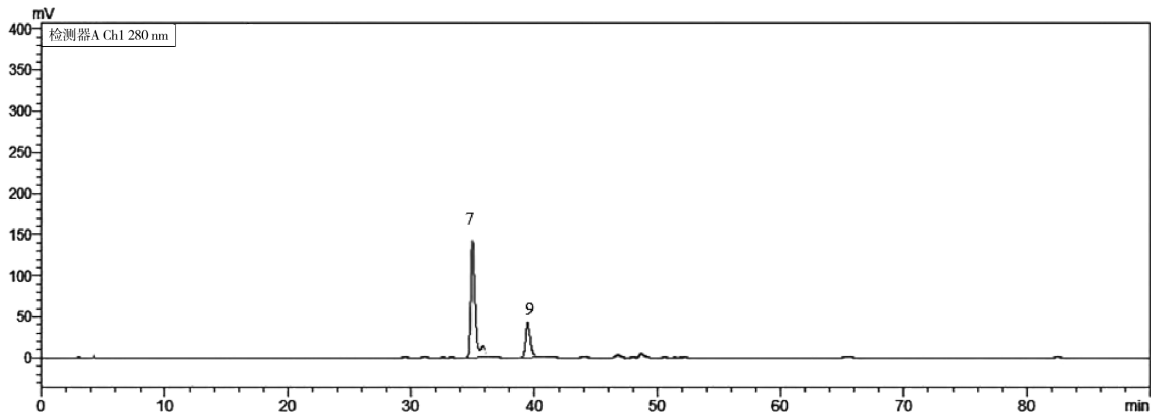


图3 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of mixed reference substance

注:7—丹酚酸 B;9—丹酚酸 A。

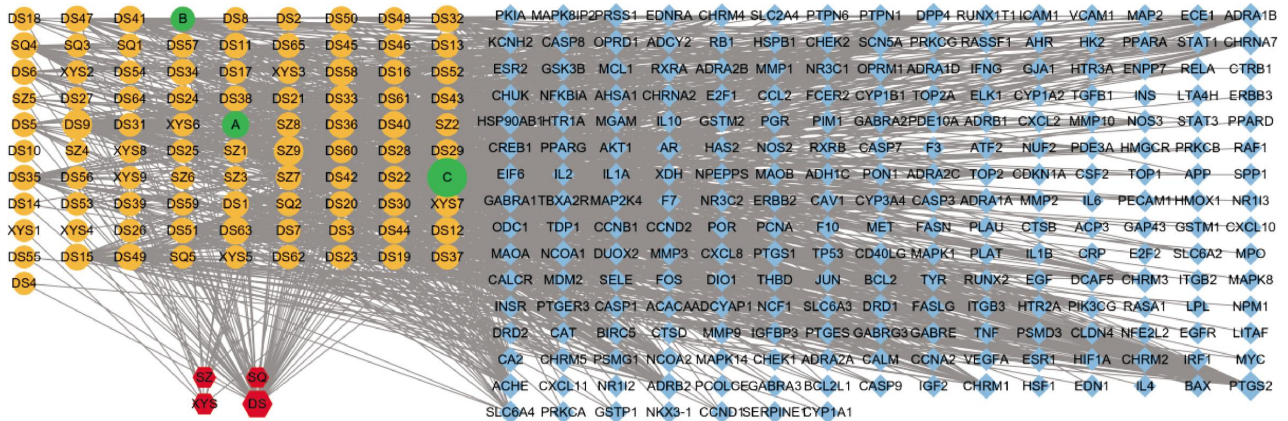


图4 丹楂通脉丸潜在活性成分与靶点网络

Fig.4 Potential active components and target network of DZTMW

注:红色六边形节点代表药材,橙色圆形节点代表药材的活性成分,绿色圆形节点代表药材共有活性成分,蓝色菱形节点代表靶点;节点的大小与度值相关,节点面积越大越重要。

在 10 批样品中共确定 15 个共有峰^[14],详见图 2。与混合对照品图谱对比,共指认了 2 个共有峰,分别是丹酚酸 B 和丹酚酸 A,详见图 3。

3.3 丹楂通脉丸网络药理学分析

3.3.1 有效成分及靶点筛选 丹楂通脉丸经筛选共有 91 个潜在成分,其中丹参 65 个、山楂 8 个、三七 8 个、西洋参 11 个。其中,三七、西洋参共有成分 2 个,分别命名为 A、B;三七、山楂共有成分 1 个,命名为 C。丹楂通脉丸潜在活性成分筛选结果详见表 1。

通过 Cytoscape 3.9.0 将以上成分及对应的靶点绘制“成分-靶点”网络,丹楂通脉丸“成分-靶点”网络图如图 4 所示,其中,丹参对应 122 个靶点,山楂对应 172 个靶点,三七对应 167 个靶点,西洋参对应 55 个靶点,将各药材重复靶点去除后汇总,最终丹楂通脉丸共含 232 个靶点。

3.3.2 丹楂通脉丸抗动脉粥样硬化作用靶点预测 通

过 GeneCards 数据库检索得到 4 073 个 AS 相关靶点,其中 186 个为与丹楂通脉丸有交集的潜在作用靶点。详见图 5。

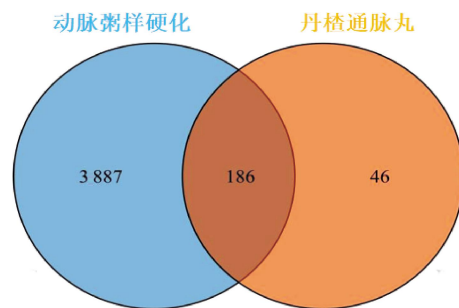


图5 丹楂通脉丸-动脉粥样硬化共有靶点韦恩图

Fig.5 Venn diagram of shared targets for DZTMW-AS

3.3.3 丹楂通脉丸抗动脉粥样硬化潜在作用靶点 PPI 网络的构建 将上述 186 个交集靶点全部导入 STRING 在线数据库,得到靶点间的相互作用关系,

表 1 从丹楂通脉丸中筛选出的潜在成分及相关信息

Table 1 Potential components and related information screened from DZTMP

命名	MOL ID	成分名称	来源
DS1	MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	丹参
DS2	MOL001659	poriferasterol	丹参
DS3	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	丹参
DS4	MOL001942	isoimperatorin	丹参
DS5	MOL002222	sugiol	丹参
DS6	MOL002651	dehydrotanshinone II A	丹参
DS7	MOL002776	baicalin	丹参
DS8	MOL000569	digallate	丹参
DS9	MOL000006	luteolin	丹参
DS10	MOL006824	α -amyrin	丹参
DS11	MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one ^[15]	丹参
DS12	MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	丹参
DS13	MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	丹参
DS14	MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	丹参
DS15	MOL007049	4-methylenemiltirone	丹参
DS16	MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	丹参
DS17	MOL007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester	丹参
DS18	MOL007058	formyltanshinone	丹参
DS19	MOL007059	3-beta-Hydroxymethylenetanshinquinone	丹参
DS20	MOL007061	methylenetanshinquinone	丹参
DS21	MOL007063	przewalskin a	丹参
DS22	MOL007064	przewalskin b	丹参
DS23	MOL007068	przewaquinone B	丹参
DS24	MOL007069	przewaquinone c	丹参
DS25	MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione ^[15]	丹参
DS26	MOL007071	przewaquinone f	丹参
DS27	MOL007077	sclareol	丹参
DS28	MOL007079	tanshinaldehyde	丹参
DS29	MOL007081	danshenol B	丹参
DS30	MOL007082	danshenol A	丹参
DS31	MOL007085	salvilenone	丹参
DS32	MOL007088	cryptotanshinone	丹参
DS33	MOL007093	dan-shexinkum d	丹参
DS34	MOL007094	danshenspiroketallactone	丹参
DS35	MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	丹参
DS36	MOL007100	dihydrotanshinlactone	丹参
DS37	MOL007101	dihydrotanshinone I	丹参
DS38	MOL007105	epidanshenspiroketallactone	丹参
DS39	MOL007107	C09092	丹参
DS40	MOL007108	isocryptotanshinone	丹参
DS41	MOL007111	isotanshinone II	丹参
DS42	MOL007115	manool	丹参
DS43	MOL007118	microstegiol	丹参
DS44	MOL007119	miltionone I	丹参
DS45	MOL007120	miltionone II	丹参
DS46	MOL007121	miltipolone	丹参
DS47	MOL007122	miltirone	丹参
DS48	MOL007123	miltirone II	丹参
DS49	MOL007124	neocryptotanshinone II	丹参

表1(续)

命名	MOL ID	成分名称	来源
DS50	MOL007125	neocryptotanshinone	丹参
DS51	MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	丹参
DS52	MOL007130	prolithospermic acid	丹参
DS53	MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid ^[15]	丹参
DS54	MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid ^[15]	丹参
DS55	MOL007141	salvianolic acid G	丹参
DS56	MOL007142	salvianolic acid J	丹参
DS57	MOL007143	salvilenone I	丹参
DS58	MOL007145	salviolone	丹参
DS59	MOL007149	NSC 122421	丹参
DS60	MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone ^[15]	丹参
DS61	MOL007151	tanshindiol B	丹参
DS62	MOL007152	przewaquinone E	丹参
DS63	MOL007154	tanshinone IIA	丹参
DS64	MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione ^[15]	丹参
DS65	MOL007156	tanshinone VI	丹参
SZ1	MOL000073	ent-Epicatechin	山楂
SZ2	MOL000300	dehydroeburicoic Acid	山楂
SZ3	MOL001979	lanosterol	山楂
SZ4	MOL001506	squalene	山楂
SZ5	MOL004368	hyperoside	山楂
SZ6	MOL006504	(-)-Catechin gallate	山楂
SZ7	MOL000415	rutin	山楂
SZ8	MOL000749	linoleic	山楂
SZ9	MOL000511	ursolic acid	山楂
SQ1	MOL001494	mandenol	三七
SQ2	MOL001792	dFV	三七
SQ3	MOL002879	diop	三七
SQ4	MOL000449	Stigmasterol	三七
SQ5	MOL007475	ginsenoside f2	三七
XYS1	MOL011394	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[[[(3S,5R,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S)-12-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-17-[(2S)-6-methyl-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-c ^[16]	西洋参
XYS2	MOL011434	polyacetylene PQ-2	西洋参
XYS3	MOL011435	PQ-2	西洋参
XYS4	MOL011442	(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-1,2,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-7-one ^[16]	西洋参
XYS5	MOL011455	20-Hexadecanoylingenol	西洋参
XYS6	MOL006774	stigmast-7-enol	西洋参
XYS7	MOL006980	papaverine	西洋参
XYS8	MOL008173	daucosterol_qt	西洋参
XYS9	MOL008397	daturilin	西洋参
A	MOL000358	beta-sitosterol	三七、西洋参
B	MOL005344	ginsenoside rh2	三七、西洋参
C	MOL000098	quercetin	三七、山楂

在置信度为 0.4 的中等条件下,网络中含有节点 186 个,相互作用关系 3 881 条。将 STRING 数据库 PPI 网络导出后,通过 Cytoscape 3.9.0 软件中的 CytoNCA 插件,进行 degree 值算法分析。丹楂通脉丸的核心靶点为 degree 值排名前 30 的靶点,依次为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, AKT1, degree=133)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF, degree=121)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6, degree=117)、抑癌基因 p53(tumor suppressor gene p53,

TP53, degree=115)、胰岛素(insulin, INS, degree=114)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A, degree=112)等。将上述 30 个靶点全部导入 STRING 数据库,设置物种为“Homo sapiens”,置信度为 0.900,得到丹楂通脉丸核心靶点的 PPI 网络,详见图 6。

3.3.4 丹楂通脉丸“核心靶点-活性成分”网络构建
将丹楂通脉丸核心靶点匹配对应的活性成分,得到“核心靶点-活性成分”网络图,详见图 7。

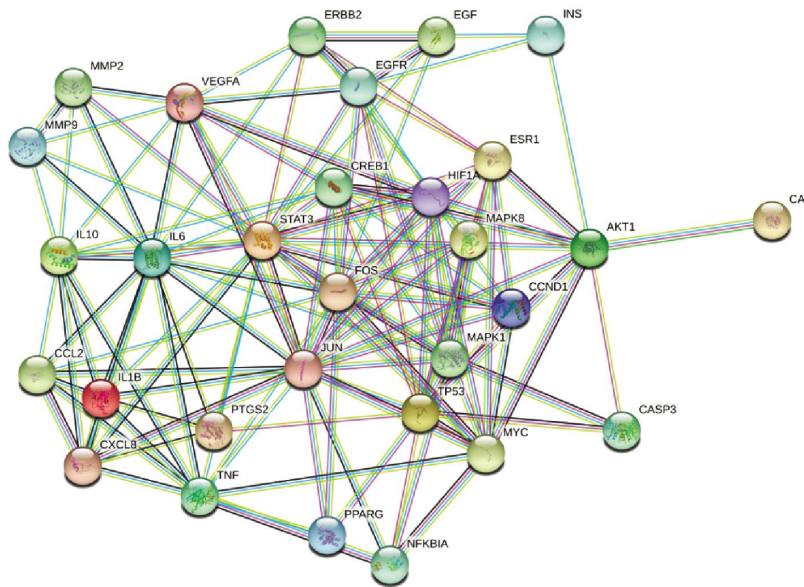


图 6 丹楂通脉丸核心靶点的 PPI 网络(前 30)
Fig.6 PPI network of core targets of DZTMW (top 30)

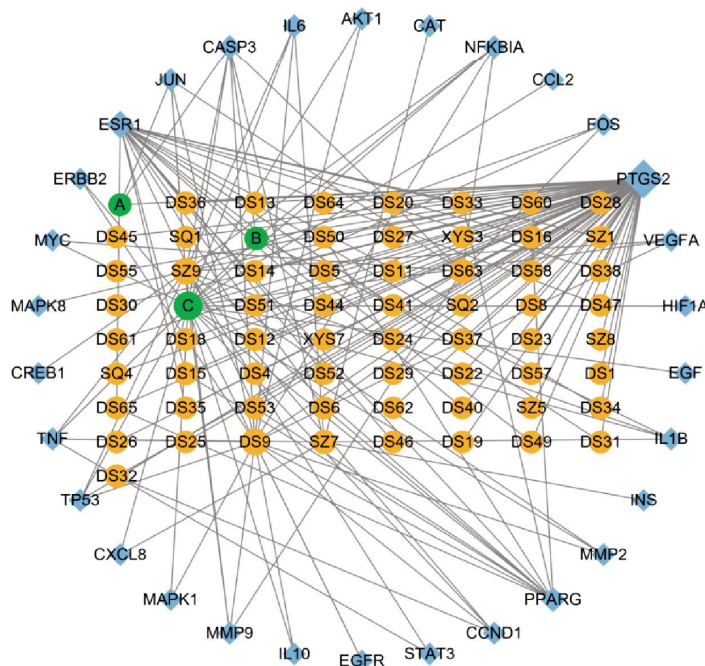


图 7 丹楂通脉丸“核心靶点-活性成分”网络图
Fig.7 The "core target-active ingredient" network diagram of DZTMW
注:蓝色菱形节点为靶点,橙色圆形节点为药材的活性成分,绿色圆形节点为药材共有活性成分,节点的大小与度值相关,节点面积越大越重要。

3.3.5 GO及KEGG通路富集分析 通过DAVID在线分析平台,进行GO功能富集分析,得到与生物学过程(biological process, BP)有关的GO条目328条,分子功能(molecular function, MF)通路富集相关GO条目47条,细胞组分(cellular component, CC)通路富集相关GO条目23条,筛选出GO-BP、GO-MF、GO-CC结果中 $P < 0.05$ 且排名前10的条目,绘制柱形图,详见图8。

其中,GO-BP富集结果表明,丹楂通脉丸抗动脉粥样硬化的机制可能与DNA模块转录正调控、RNA聚合酶II启动子转录的正调控、强化基因表达、信号传导以及对细胞凋亡的调控等生物学过程密切相关。GO-MF富集结果表明,丹楂通脉丸抗AS的机制可能与蛋白质结合、相同的蛋白质结合、转录因子、活性酶结合、序列特异性DNA结合以及RNA聚合酶II核心启动子近端区域序列特异性DNA结合等分子功能相关^[17-18]。GO-CC富集结果表明,丹楂通脉丸抗AS的机制可能与细胞核、细胞质、细胞溶质、核质以及细胞外隙等细胞组分相关。

共得到146条KEGG富集条目,筛选条件 $P < 0.05$,取排名前10的条目,得到KEGG通路富集结果,见图9。该通路结果表明丹楂通脉丸抗AS可能与癌症通路、病毒感染、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路以及TNF信号通路等紧密相关。

3.3.6 丹楂通脉丸分子对接验证结果 利用AutoDock软件,将丹楂通脉丸的活性成分丹参酮II A、丹酚酸B等,分别与核心靶点蛋白AKT1、TNF等,进行分子半柔性对接验证,结果采用图片的形式进行可视化展示。其分子对接结果见表2,其中AKT1蛋白、TNF蛋白、TP53蛋白与丹酚酸B对接结合能均小于 $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,结合能分别为 -31.67 、 -33.51 、 $-31.51 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。通过Pymol程序将对接结果可视化输出,结果见图10。丹楂通脉丸核心靶点蛋白与活性成分的对接结合能均为负数,表明进行分子对接的受体与配体间自发紧密结合,丹楂通脉丸筛选所得的活性成分与核心靶点具有较强的对接亲和力,结果表明丹楂通脉丸抗动脉粥样硬化作用可能是通过调节以上核心靶点产生,符合网络药理学机制预测。

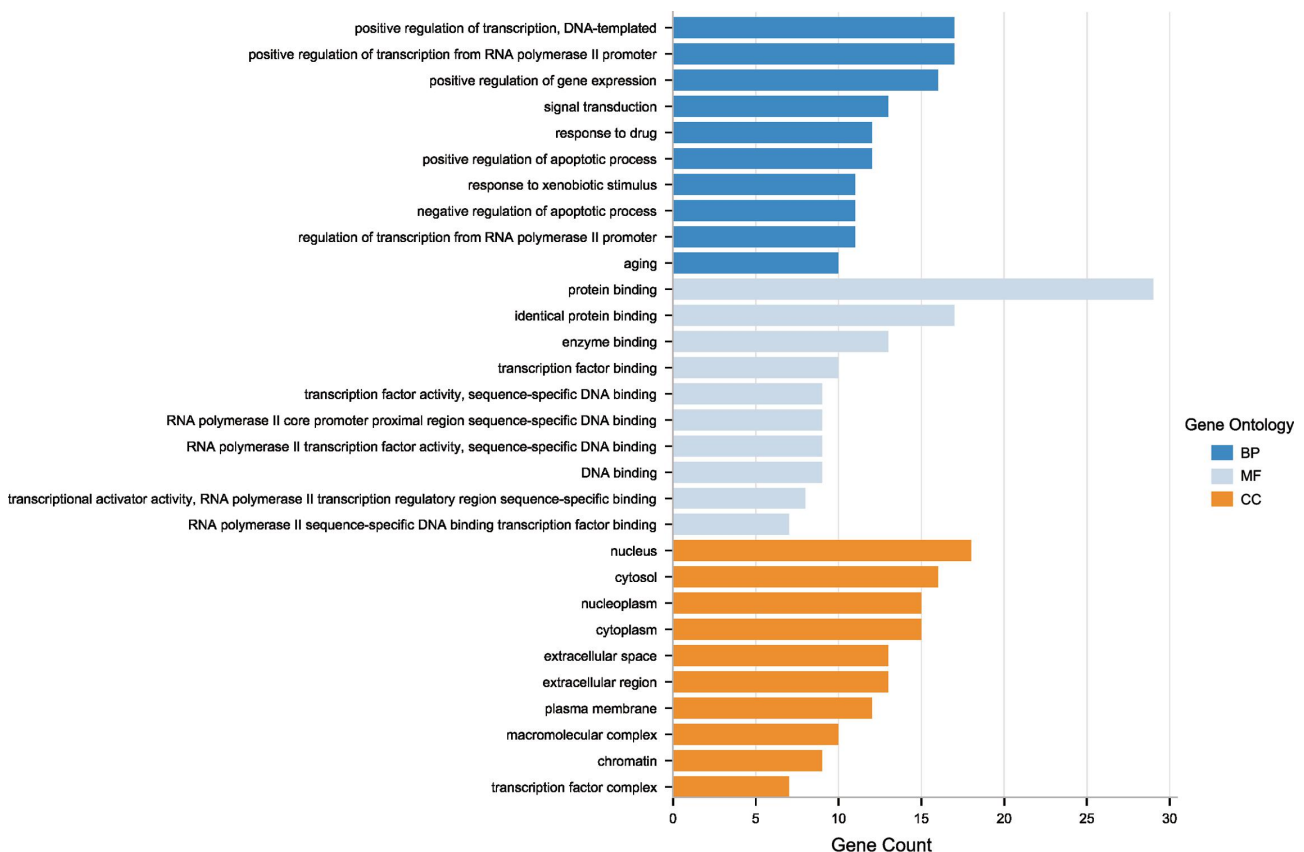


图8 丹楂通脉丸-动脉粥样硬化GO功能富集分析

Fig.8 GO Functional Enrichment Analysis of DZTMW-AS

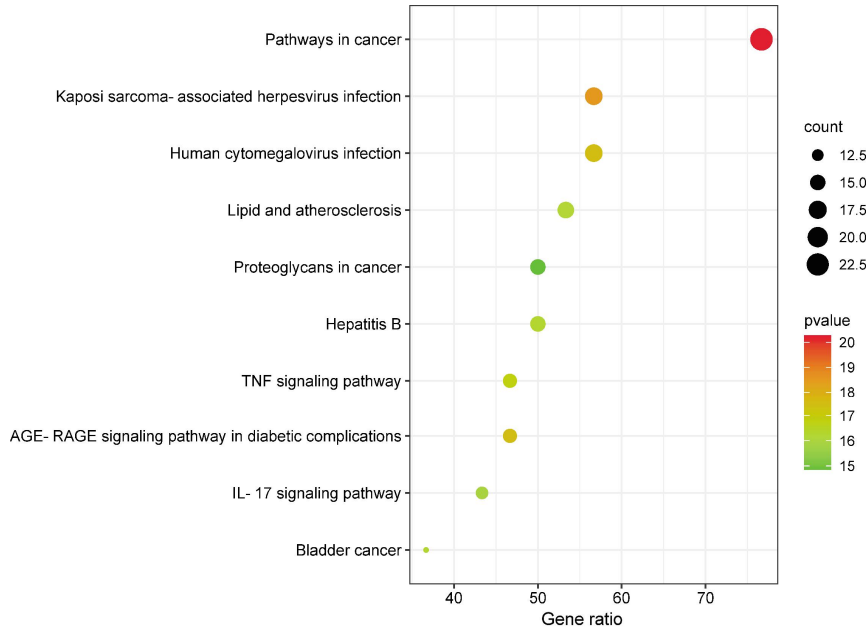


图 9 丹楂通脉丸-动脉粥样硬化 KEGG 通路富集分析(前 10)

Fig.9 GO Functional Enrichment Analysis of DZTMP-AS (top 10)

表 2 丹楂通脉丸活性成分分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of active components of DZTMW

靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	丹酚酸 B	丹参酮 II A	表儿茶素	三七皂苷	人参皂苷 Rh2
AKT1	-31.67	-37.36	-34.89	-28.79	-53.64
TNF	-33.51	-40.75	-36.57	-16.40	-57.11
IL-6	-18.83	-31.09	-23.01	-16.61	-35.98
TP53	-31.51	-33.26	-28.03	-21.25	-43.97
INS	-19.87	-27.91	-23.39	-10.50	-37.03

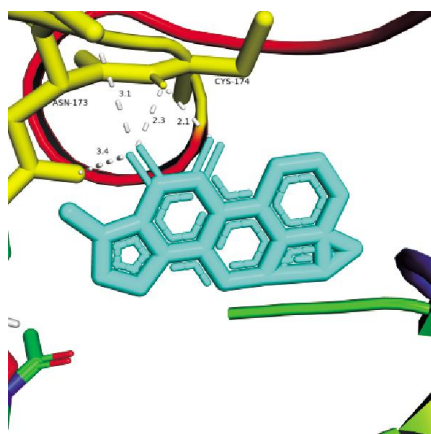


图 10 AKT1 与丹酚酸 B 分子对接模式图

Fig.10 Molecular docking mode diagram of AKT1 and salvianolic acid B

3.4 丹酚酸 A、丹酚酸 B 体外抗炎活性研究结果

与空白组相比,模型组 NO 释放量显著升高($P <$

0.01),说明 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症造模成功;与模型组相比,丹酚酸 B 高、中、低剂量组 NO 释放量均剂量依赖性降低($P < 0.01$)。与模型组相比,丹酚酸 A 高、中、低剂量组 NO 释放量均剂量依赖性降低,但只有高剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 3。

表 3 丹酚酸 A、丹酚酸 B 体外抗炎活性研究结果

Table 3 Results of anti-inflammatory activity in vitro of salvianolic acid B and salvianolic acid A

组别	给药浓度/($\mu\text{mol/L}$)	NO 释放量/($\mu\text{mol/L}$)
空白组	—	8.52±1.34
模型组	—	28.25±0.43 [#]
丹酚酸 B 高剂量组	80	13.20±1.01 ^{**}
丹酚酸 B 中剂量组	50	18.71±0.79 ^{**}
丹酚酸 B 低剂量组	20	25.62±0.43 ^{**}
丹酚酸 A 高剂量组	10	13.02±0.21 ^{**}
丹酚酸 A 中剂量组	5	25.12±0.85
丹酚酸 A 低剂量组	1	28.41±0.44
地塞米松治疗组	10	6.25±1.75 ^{**}

注:与空白组相比,[#] $P < 0.01$,与模型组相比,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

丹楂通脉丸是我院研制的治疗 AS 的独具特色专科、专病中药复方制剂,在我院应用多年,临床疗效显著,毒副作用少。本研究采用指纹图谱和网络

药理学技术相结合方法,对丹楂通脉丸药效物质基础进行预测分析。近年来,随着各类中药与化学成分数据库的发展,网络药理学对于数据筛选的要求更加科学化、规范化^[19-21]。为确保数据的可靠性,本研究对文中的数据进行了多次溯源确认与重复考察,并结合数据库与相关文献,以提高网络药理学部分数据的规范性。

中药成分复杂,单一成分难以评价中药整体质量,而指纹图谱具有整体性特点,是目前中药制剂质量一致性评价的有效手段^[23-24]。本研究建立了10批丹楂通脉丸指纹图谱,共确认15个共有峰,对丹酚酸B、丹酚酸A的色谱峰进行指认,同时对其方法学进行考察,其精密度、稳定性和重复性(RSD<3.0%)符合要求,表明此方法准确可靠。综上所述,丹酚酸B、丹酚酸A可作为丹楂通脉丸潜在的质量标志物,为建立和完善丹楂通脉丸质量控制体系提供了参考依据。

采用网络药理学方法对丹楂通脉丸进行药效成分筛选与靶点预测,本研究筛选丹楂通脉丸潜在有效成分91个,“成分-靶点”有232个,与抗AS的相关潜在靶点186个,构建PPI网络中有节点186个,相互作用关系3881条。本研究发现,靶点蛋白AKT1、TNF、IL-6、TP53、INS、VEGF-A等排名前30位的degree值高于72,说明上述靶标蛋白作为关键靶点参与调控抗AS信号通路^[25]。AKT1参与调节内皮型一氧化氮合成酶及一氧化氮生成,具有调节细胞增殖和生长、调控炎症反应等作用,可有效治疗和预防AS疾病。TNF、IL-6为促炎细胞因子,可加速血管平滑肌细胞增殖;TP53调节巨噬细胞的脂质代谢;上述蛋白影响AS发展进程,如能有效抑制它们的表达,对AS的防治有积极意义。INS直接影响血糖的控制,研究表明糖尿病患者的主要死亡原因是以AS为病理基础的大、中动脉病变。VEGF-A通过与血管内皮细胞上的酪氨酸蛋白激酶受体结合,具有促进内皮细胞分化、血管新生等作用,该作用在VEGF家族中是最强的,可在治疗心血管疾病中起到关键作用^[26]。对丹楂通脉丸进行GO和KEGG富集分析,选取BP、MF、CC及KEGG各富集通路前10个条目进行富集可视化绘制,相对明确了丹楂通脉丸抗AS的机制是依靠多成分、多靶点、多途径共同实现的。通过对丹楂通脉丸筛选所得的活性成分与核心靶点

进行分子对接,具有较强的对接亲和力,说明丹楂通脉丸可能是通过调节AKT1、TNF、IL-6、TP53、INS等靶点蛋白来发挥抗AS的作用,与网络药理学机制预测结果一致。

现代研究表明,AS斑块的构成与炎症反应密不可分,炎症反应在动脉内壁引起损伤和炎症介质的释放,导致血管内皮细胞受损、白细胞浸润、血小板聚集等炎症效果,最终形成动脉粥样斑块^[27]。控制炎症反应的发生发展可以减少斑块形成、稳定斑块、降低血栓形成风险,改善血管功能,从而起到治疗动脉粥样硬化的效果^[28-29]。相关文献表明,丹参酮IIA具有抑制炎症反应的作用,可以减少炎症介质的释放和炎症反应的程度,有助于缓解炎症相关疾病如关节炎、动脉粥样硬化等^[30]。体外实验结果显示,丹楂通脉丸中丹酚酸A与丹酚酸B具有良好的抗炎活性,与网络药理学预测相一致,说明丹楂通脉丸可能通过抑制炎症反应的发生发展从而产生抗动脉粥样硬化作用。

综合分析,丹酚酸B和丹酚酸A是丹楂通脉丸发挥活性作用的有效成分,本研究为进一步完善了该制剂的质量控制体系奠定了科学的依据。通过本次研究,分析丹楂通脉丸治疗AS的活性成分、作用核心靶点及分子对接机制,对丹楂通脉丸治疗AS机制做出了整体性预测,为其临床治疗及进一步的科学研究提供参考和依据。

参考文献

- [1] 覃柳堂,梁丽金,胡懿,等.基于UPLC指纹图谱和网络药理学的当归炮制前后差异质量标志物研究[J].中草药,2023,54(18):5892-5903.
- [2] 青格勒,巴特金,包秋胜.利用网络药理学方法揭示中药红花对动脉粥样硬化的潜在治疗机制[J].中国民族医药杂志,2022,28(9):70-75.
- [3] 吕红君,杨清鑫,纪雅菲,等.十神汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨[J].中药药理与临床,2020,36(2):109-116.
- [4] 邓少东,丁晨,王颖,等.巴戟天-淫羊藿药对防治老年痴呆作用机制的网络药理学分析[J].中药新药与临床药理,2021,32(7):988-997.
- [5] 张恒,王玉凤,唐纯玉,等.基于网络药理学及实验验证探讨喉咽清治疗咽炎的作用机制[J].世界科学技术:中医药现代化,2023,25(5):1714-1728.
- [6] 刘昊源,李彦杰,秦合伟,等.基于网络药理学探讨五参顺脉汤

- 对动脉粥样硬化 AopE⁺小鼠的作用机制[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(01): 377-389.
- [7] 周靖惟, 张 星, 李 莎, 等. 基于“入血成分-复方功效-靶点通路”的四妙勇安汤潜在质量标志物研究[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7795-7807.
- [8] 周 渊. 五味子饮片质量控制及木脂素对照提取物研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [9] 胡明勋, 马 俊, 吴 兵, 等. 川产鸡矢藤和毛鸡矢藤的 UPLC 指纹图谱对比研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2413-2415.
- [10] 张永志, 佟 玲, 李东翔, 等. 藿香正气滴丸 UFLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2246-2250.
- [11] 周 霖, 孙 志, 薛文华, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的丹灯通脑胶囊质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3279-3284.
- [12] 许晨新, 张思访, 毛贤贤. 不同产地威灵仙的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广东化工, 2022, 49(24): 80-82, 99.
- [13] 杨胜岩, 赵国华, 王仁久, 等. 红景天注射液 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天津医科大学学报, 2016, 22(02): 164-167.
- [14] 曹国琼, 游珊珊, 徐 剑, 等. 化风丹药母指纹图谱的建立及不同发酵时间样品中 7 种核苷类成分的含量测定[J]. 中国药房, 2021, 32(2): 158-163.
- [15] 牟艳芳, 陈文璐, 周 冰, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨川蛭通络胶囊干预微循环障碍的机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(24): 7550-7560.
- [16] 王笑语. 归脾汤治疗卒中后抑郁的 Meta 分析及网络药理学研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2022.
- [17] 张敬周, 刘金豹, 许 波, 等. 基于网络药理学探讨葛根桂枝牛膝汤治疗痛风性关节炎作用机制[J]. 陕西中医, 2023, 44(4): 519-523.
- [18] 孙琳洁, 陈 昕, 俞佳利, 等. 基于网络药理学分析益气活血化痰方抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(19): 3490-3496.
- [19] 高 烁. 中药系统药理学一体化分析平台的构建和应用[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2018.
- [20] 牛 明, 张斯琴, 张 博, 等.《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [21] 张振巍, 崔 瑾, 毛璐璐, 等. 网络药理学丰富中药药效物质基础研究的思路探略[J]. 环球中医药, 2024, 17(7): 1328-1332.
- [22] 谢成志, 任建勋. 中药及复方功效的网络药理学研究与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(1): 198-207.
- [23] 贾 豪, 张维方, 雷敬卫, 等. 经典名方一贯煎红外指纹图谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2023, 43(10): 3202-3210.
- [24] 谭金桃, 周思倩, 方 艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术建立银花抗病毒口服液的指纹图谱及多指标含量测定[J]. 中草药, 2024, 22(3): 760-766.
- [25] 刘明月, 杨玉梅, 郑延泽. 川芎-丹参药对主要药理成分的网络药理学和指纹图谱研究[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(15): 98-103.
- [26] 王钰莹, 王 川, 胡 锐, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨丹参-川芎药对治疗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 67-73.
- [27] 陶 军, 谭红梅. 机械门控阳离子通道 Piezo1 与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1): 9-16, 33.
- [28] 邓 晗, 杨 硕. 基于网络药理学与分子对接研究人参-五味子药对治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的作用机制[J]. 中医临床研究, 2023, 15(31): 19-25.
- [29] 王 晨, 朱爱松. 基于网络药理学及分子对接探讨当归补血汤治疗动脉粥样硬化机制[J/OL]. 中国动脉硬化杂志, 1-17[2024-07-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20231010.1804.002.html>.
- [30] 杨荣来, 王凤荣. 丹参及其制剂治疗冠心病的药理及机制研究新进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-14[2024-07-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240226.1102.002.html>.

(本文编辑 苏 维)