

本文引用: 吴子政, 陈 杏, 叶嘉豪, 王啸轶, 张君宇, 胡志希. 基于网络药理学及实验验证探讨冠心宁注射液对冠心病大鼠的干预机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1156-1168.

基于网络药理学及实验验证探讨冠心宁注射液对 冠心病大鼠的干预机制

吴子政, 陈 杏, 叶嘉豪, 王啸轶, 张君宇, 胡志希*
湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

【摘要】目的 运用网络药理学方法探讨冠心宁注射液(GXNI)对冠心病(CHD)大鼠的作用机制,并通过体内实验进行验证。**方法** 运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术、UNIFI 数据库和文献检索,筛选并验证 GXNI 有效入血成分。运用网络药理学构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络以识别潜在的治疗靶点,同时进行 GO 和 KEGG 分析以预测潜在的信号通路。将 50 只大鼠按照随机数字表法分为空白组,模型组,普萘洛尔组(10 mg/kg),冠心宁低、高剂量组(3.6、7.2 mL/kg),每组 10 只,分别连续预给药干预 7 d。在干预第 5、6 天时,除空白组外,其他组均采用背部皮下注射异丙肾上腺素(85 mg/kg)的方式构建 CHD 模型。检测各组大鼠心电图情况;采用 HE 染色、Masson 染色观察心肌病理学改变;ELISA 检测血清白细胞介素(IL)-6、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 以及丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平;Western blot 检测心肌组织自噬相关蛋白(Atg3 和 Atg5 蛋白表达水平。**结果** UPLC-Q-TOF-MS 分析显示,从 GXNI 中筛选出有效入血成分 11 种化合物,GXNI-有效成分-共同靶点网络图得到核心有效成分为丁烯基苯酚、开环异落叶松树脂酚、正丁基苯酚、丹酚酸 A 等。PPI 网络筛选得到 Degree 前 5 的靶点为 TNF、白蛋白、类固醇受体辅激活因子、表皮生长因子受体(EGFR)、胱天蛋白酶-3。通过 KEGG 富集分析预测出 GXNI 治疗 CHD 可能与环磷酸腺苷信号通路、神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路等疾病通路相关。心肌组织病理检测显示,与空白组比较,模型组心肌细胞肥大,心肌纤维排列紊乱,心肌组织粥样化、胶原化;冠心宁注射液低、高剂量组心肌细胞排列紊乱减轻,心肌细胞间隙轻度增宽,心肌组织粥样化,胶原化减轻。ELISA 结果显示,与空白组相比,模型组 LDH、CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MAD 水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),SOD 活性降低($P<0.01$);与模型组相比,普萘洛尔组和冠心宁高剂量组 CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LDH、MDA 水平显著降低($P<0.05$),SOD 活性升高($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠心肌组织中 Atg3、Atg5 蛋白相对表达显著升高($P<0.01$);与模型组相比,普萘洛尔组和冠心宁低、高剂量组中的 Atg3、Atg5 蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** GXNI 可能通过抑制炎症反应、调控自噬,使心肌细胞得到改善,从而治疗 CHD。

【关键词】 冠心病;冠心宁注射液;心肌缺血;网络药理学;细胞自噬

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.027

Intervention mechanism of Guanxinling Injection on rats with coronary heart disease based on network pharmacology and experimental verification

WU Zizheng, CHEN Xing, YE Jiahao, WANG Xiaoyi, ZHANG Junyu, HU Zhixi*

Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】Objective To investigate the intervention mechanism of Guanxinling Injection (GXNI) on rats with coronary heart disease (CHD) using network pharmacology and molecular docking, and to validate it through in vivo experiments. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS technology, UNIFI database, and literature retrieval were employed to screen and verify the effective blood-entry

【收稿日期】2025-03-03

【基金项目】国家自然科学基金项目(82274412)。

【通信作者】* 胡志希,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:515800272@qq.com。

components of GXNI. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed using network pharmacology to identify potential therapeutic targets, while GO and KEGG analyses were performed to predict potential signaling pathways. Molecular docking was conducted between key effective blood-entry components and core targets. Fifty rats were randomly divided into control, model, propranolol (10 mg/kg), low-dose GXNI (3.6 mL/kg), and high-dose GXNI (7.2 mL/kg) groups, with ten rats in each group. All groups received pre-administration interventions for seven consecutive days. Except for the blank group, the other groups were administered isoprenaline (85 mg/kg) via subcutaneous injection on the back to establish the CHD model on the 5th and 6th days of intervention. Electrocardiograms (ECG) were monitored. Myocardial pathological changes were observed by HE and Masson staining. Serum levels of interleukin (IL)-6, lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase-MB isoenzyme (CK-MB), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), and plasma malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) were measured by ELISA. Western blot was used to measure the expression levels of autophagy-related protein (Atg) 3 and Atg5 in myocardial tissue. **Results** UPLC-Q-TOF-MS analysis identified 11 effective blood-entry compounds in GXNI, including butylidenephthalide, secoisolariciresinol, n-butylphthalide, and salvianolic acid A as core active components based on the "GXNI-active components-common targets" network. The PPI network highlighted the top five targets by degree: tumor necrosis factor (TNF), albumin, steroid receptor coactivator, epidermal growth factor receptor (EGFR), and caspase-3. KEGG enrichment analysis predicted that GXNI's therapeutic effects on CHD may involve disease pathways such as cyclic adenosine monophosphate signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interactions, and calcium signaling pathway. Molecular docking showed binding affinities (absolute values) in descending order: EGFR-salvianolic acid A (-9.6 kcal/mol), EGFR-secoisolariciresinol (-9.1 kcal/mol), and EGFR-butylidenephthalide (-8.4 kcal/mol). Myocardial histopathology revealed that compared to the blank group, the model group exhibited myocardial hypertrophy, disordered myocardial fiber arrangement, atherosclerosis, and collagen deposition. The low- and high-dose GXNI groups showed reduced disarray of myocardial cells, mildly widened intercellular gaps, and attenuated atherosclerosis and collagen deposition compared with the model group. ELISA indicated that compared with the blank group, the model group had significantly elevated levels of LDH, CK-MB, IL-6, IL-1 β , TNF- α , and MDA ($P<0.05$, $P<0.01$), along with decreased SOD activity ($P<0.01$). Compared with the model group, the propranolol and high-dose GXNI groups showed significantly reduced levels of CK-MB, IL-6, IL-1 β , TNF- α , LDH, and MDA ($P<0.05$), along with increased SOD activity ($P<0.01$). Compared with the blank group, the model group had significantly elevated relative protein expression levels of Atg3 and Atg5 in myocardial tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, the propranolol, low- and high-dose GXNI groups showed decreased protein expression levels of Atg3 and Atg5 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** GXNI may improve myocardial cell function and treat CHD by inhibiting inflammatory responses and regulating autophagy.

[**Keywords**] coronary heart disease; Guanxinling Injection; myocardial ischemia; network pharmacology; autophagy

冠心病(coronary heart disease, CHD)又称冠状动脉粥样硬化性心脏病,其核心病因为冠状动脉血管硬化狭窄或血管痉挛引起心肌缺血、缺氧^[1]。全球缺血性心脏病负担报告指出^[2],2019年全球大概有1.97亿人患CHD,有914万人因CHD死亡,而中国是CHD死亡人口数量最多的国家,且发病人群逐渐年轻化^[3]。

CHD归属于中医学“胸痹”范畴,心主血脉,脉道通利是血液正常运行的基本条件。若瘀阻脉络,血行滞涩,瘀血不去,新血不生,留瘀日久,心气痹阻,不通则痛,则发为胸痹。研究表明,中药治疗CHD效果显著,其中活血化瘀类中药居多^[4]。冠心宁注射液(Guanxinling Injection,以下简称GXNI)是由丹参和川芎提取纯化制成的中药注射剂,丹参活血祛瘀、通经止痛,川芎活血行气、祛瘀止痛,二者作为中医经典药对,目前已广泛应用于CHD、不稳定型心绞痛、冠脉介入术后等心血管疾病的临床治疗^[5]。

由于中药中的成分具有复杂性和治疗靶点不确定性,GXNI治疗CHD的机制尚未明确,因此本研究采用UPLC-Q-TOF-MS预测GXNI有效入血成分,通过网络药理学预测GXNI治疗CHD的潜在作用靶点及信号通路,并通过体内实验验证,为GXNI治疗CHD的药效物质基础和临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

56只SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,体质量180~220g,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK2019-0004,饲养在湖南中医药大学动物实验中心。动物在(22 \pm 2)℃、相对湿度50%~70%和12h昼夜循环条件下饲养,自由饮食。该实验由湖南中医药大学动物伦理委员会批准,伦理审批号:HUCM21-2403-52。

1.2 药物与试剂

GXNI(神威药业集团有限公司,批号:221026B1, 10 mL/支);盐酸普萘洛尔片(江苏亚邦爱普森药业有限公司,批号:E231235,10 mg/片);盐酸异丙肾上腺素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:I129810,5 g/瓶)。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-myocardial band, CK-MB)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、IL-6、自噬相关基因(autophagy-related protein, Atg)3一抗、Atg5一抗、GAPDH 抗体试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司,批号:AF3262-A、AF3480-A、AF8503-A、AF2923-A、AF3500-A、AF3056-A、AF3066-A、AF15238、AF16350、B2901);HE 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1120);马松染色液试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1006);甲醇、乙腈(美国 TEDIA 天地公司,批号:23125027、23125140);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,批号:R510-22-10)。

1.3 仪器

UPLC-Q-TOF-MS(美国沃特世公司,型号:Xevo G2-XS Qtof);脱水机、染色机(意大利迪佩思公司,型号:Donatello、Giotto);包埋机、冷冻台(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5、JB-L5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);组织机(金华凯迪仪器设备有限公司,型号:KD-P);烤箱(天津雷瑞仪器有限公司,型号:GFL-230);载玻片(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:G6004);立式光学显微镜、成像系统(日本尼康株式会社,型号:Nikon Eclipse E100、NIKON DS-U3);数字心电图机(广州三锐电子科技有限公司,型号:ECG-2303B);小动物呼吸麻醉机(长沙临科仪器设备有限公司,型号:GOWEF680);台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司,型号:H1650R);全自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司,型号:SA-6600)。

2 方法

2.1 GXNI 有效入血成分质谱分析

2.1.1 含药血清制备 SPF 级 SD 大鼠 6 只,适应性饲养 7 d 后,随机分为空白组、含药血清组。根据实验

动物与人体体表面积等效方程确定给药剂量^[6],含药血清组腹腔注射给药剂量为 3.6 mL/kg,每日 1 次;空白组以等容积生理盐水灌胃,每日 1 次,两组均连续干预 7 d。末次给药禁食、禁水 24 h,异氟烷呼吸麻醉后以腹主动脉取血,静置离心后,准确量取 500 μ L 血清加入预冷的 1.5 mL 冰甲醇-乙腈混合液(1:1, v/v),涡旋震荡 3 min 后,于 4 $^{\circ}$ C 条件下以 13 000 r/min 高速离心 10 min(离心半径:5 cm)。收集 1.5 mL 上清液经氮气吹干至完全干燥后,采用 700 mL/L 甲醇水溶液 1.5 mL 进行复溶,再次涡旋震荡 3 min 并于同等离心条件下处理 15 min。最终取上清液转移至液相专用进样瓶,待 LC-MS 系统分析。

2.1.2 GXNI 入血成分质谱分析 取 2 mL 冠心宁注射液至 10 mL 容量瓶中,为冠心宁组。用 10% 甲醇含 0.02% 冰醋酸溶液定容,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。并用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过备用,入液相小瓶中进行 LC-MS 分析。

色谱条件:ACQUITY UPLC@BEH C₁₈ 型色谱柱,(50 mm \times 2.1 mm,1.7 μ m),流动相为 A:0.1% 甲酸水;B:乙腈。梯度洗脱条件为 0~4 min,5%~14% B;4~8 min,14%~17%B;8~12 min,17%~23%B;12~13 min,23%~25%B;13~15 min,25%~27%B;15~17 min,27%~30%B;17~21 min,30%~90%B;21~23 min,90%~5%B;23~25 min,5%B。检测波长为 288 nm,柱温为 40 $^{\circ}$ C,流速为 0.2 mL/min,进样量为 2 μ L。

质谱条件:电喷雾离子源,正/负离子检测模式下扫描范围 m/z100~1 500;毛细管电压为正离子 3.0 kV/负离子 2.5 kV,喷嘴电压 40 V,干燥气流速 800 L/h,离子源温度 120 $^{\circ}$ C,碰撞气体:氩气,碰撞能 20~50 eV。

2.1.3 GXNI 有效入血成分筛选 运用 UNIFI 软件对冠心宁组、空白组、含药血清组血清进行分析。通过整合 PubChem、SciFinder、Chemicalbook 及 UNIFI 中药数据库的化合物信息,结合文献调研构建了标准化合物数据库。针对 LC-MS 数据的处理,采用 UNIFI 软件平台对 Masslynx 采集的“raw”格式原始数据进行系统分析^[7]。

2.2 网络药理学相关分析

2.2.1 GXNI 有效靶点 通过 PubChem 数据库查找入血有效成分相关 smiles 号,随后用 SwissTarget Prediction 数据库对靶点进行预测,得到相关靶点。

2.2.2 GXNI 治疗 CHD 潜在作用靶点获取 将“GXNI-CHD”得到的靶点导入 STRING 数据库(<https://www>。

string-db.org/),选择“multiple proteins”功能,蛋白种属为“Homo sapiens”。构建GXNI治疗CHD靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,将分析得到的结果保存为“tsv”文件格式,导入Cytoscape 3.7.2软件对核心靶点进行可视化分析。

2.2.3 中药-活性成分-共同靶点网络及共同靶点PPI网络构建 将上述得到的GXNI活性成分、靶点、通路、疾病上传至Cytoscape 3.7.2软件进行可视化处理,即构建GXNI治疗CHD的“GXNI-有效成分-共同靶点”网络模型,再利用度(Degree)值、介数等参数对上述模型进行分析。

2.2.4 共同靶点GO及KEGG通路富集分析 将GXNI治疗CHD的靶点导入Bioconductor数据库以及RX64 4.0.4软件,对核心靶基因进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,GO富集分析选择生物过程、细胞组成和分子功能,制作条形图和气泡图。

2.3 体内实验验证

2.3.1 分组、给药及造模 50只SD大鼠适应性饲养7d后,按照Excel 2022软件生成的随机数字表随机分为5组:空白组,模型组,普萘洛尔组,冠心宁低、高剂量组,每组10只。根据实验动物与人体体表面积等效方程^[6]及参考文献^[8]确定给药剂量,冠心宁低、高剂量组分别腹腔注射给药3.6、7.2 mL/kg,普萘洛尔组灌胃给药10 mg/kg,空白组和模型组灌胃等体积的生理盐水,各组均连续给药干预7d。在给药第5、6天,给予冠心宁低剂量组、冠心宁高剂量组、普萘洛尔组和模型组背部皮下注射异丙肾上腺素(85 mg/kg),建立心肌缺血诱导的CHD模型^[9-11],空白组给予皮下注射等体积的生理盐水。造模期间死亡大鼠4只,造模成功率为90%。造模完成后24h,调节小动物呼吸麻醉机将异氟烷诱导浓度调节至3%~4%;待麻醉剂充满诱导盒约1min后,将大鼠放入诱导盒,浓度调节至2%~2.5%,流量0.6~0.8 L/min,随即关闭诱导盒,等待2~3min大鼠完全麻醉后,固定至鼠板,从腹主动脉采集血液,并将摘取的心脏用生理盐水冲洗后置于冰上,摘取左心室放于-80℃冰箱冻存,其余心脏组织用4%多聚甲醛固定,后续检测相关指标。

2.3.2 心电图检测 将大鼠固定在鼠板上,并使用异氟烷将其进行呼吸麻醉,将导联按顺序与大鼠的

四肢连接,观测并记录每只大鼠心电信号,以两个连续QRS波群的起点作出心电图基线,确定每个波群的J点,通过ImageJ软件测量计算心率。

2.3.3 血清IL-6、LDH、CK-MB、IL-1 β 、TNF- α 水平检测 将大鼠的血液在室温下静置2h,在4℃条件下,以3500 r/min,离心15min(离心半径:10cm),提取上清液,参照ELISA试剂盒说明书检测血清IL-6、LDH、CK-MB、IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.3.4 心肌组织中MDA、SOD活性的测定 心肌样本经无菌生理盐水按质量体积1:9稀释后,采用低温匀浆仪进行机械破碎。随后将组织悬液置于高速离心机中,在4℃条件下,以2500 r/min的离心力持续离心10min(离心半径:10cm)。收集离心管中上层澄清液体作为待测样本,使用ELISA法检测MDA、SOD含量。

2.3.5 Western blot检测心肌组织Atg3、Atg5蛋白表达水平 剪取适量左心室心尖组织,BCA法检测蛋白定量,配胶、浓缩胶电泳、转膜,用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1h;孵育一抗(5%TBST牛奶1:1000稀释),同时加入孵育盒,4℃过夜。第二天室温20min;TBST洗涤3次,每次5min;远红外荧光二抗1:10000 5%TBST,37℃1h;TBST洗涤4次,每次5min,最后成像。

2.3.6 HE染色观察心肌病理学改变 心脏组织样本经4%多聚甲醛溶液固定后,采用梯度乙醇脱水处理(75%→80%→95%→100%)实现组织脱水。通过二甲苯透明化处理增强组织透性,经熔融石蜡浸渍后完成包埋成型。使用精密切片机制备7 μ m厚度连续切片,经二甲苯-乙醇梯度脱蜡复水后,采用HE染色法进行组织染色。样本经中性树胶封固后,置于光学显微镜下进行显微结构观察及数字化图像采集。

2.3.7 Masson染色观察心肌病理学改变 石蜡切片脱蜡至水;沿横轴切下靠近心尖的下半区心脏,4%多聚甲醛固定,24h后进行石蜡包埋,石蜡切片脱蜡至水。将切片浸入重铬酸钾中浸泡过夜,自来水洗。第二天铁苏木素A液与B液等比混合成铁苏木素染液,切片入铁苏木素3min,自来水洗。切片入丽春红酸性品红浸染5~10min,自来水漂洗。磷钼酸水溶液浸染1~3min、苯胺蓝染色3~6min。切片用1%冰醋酸分化,两缸无水乙醇脱水。切片放入二甲苯5min透明,中性树胶封片。

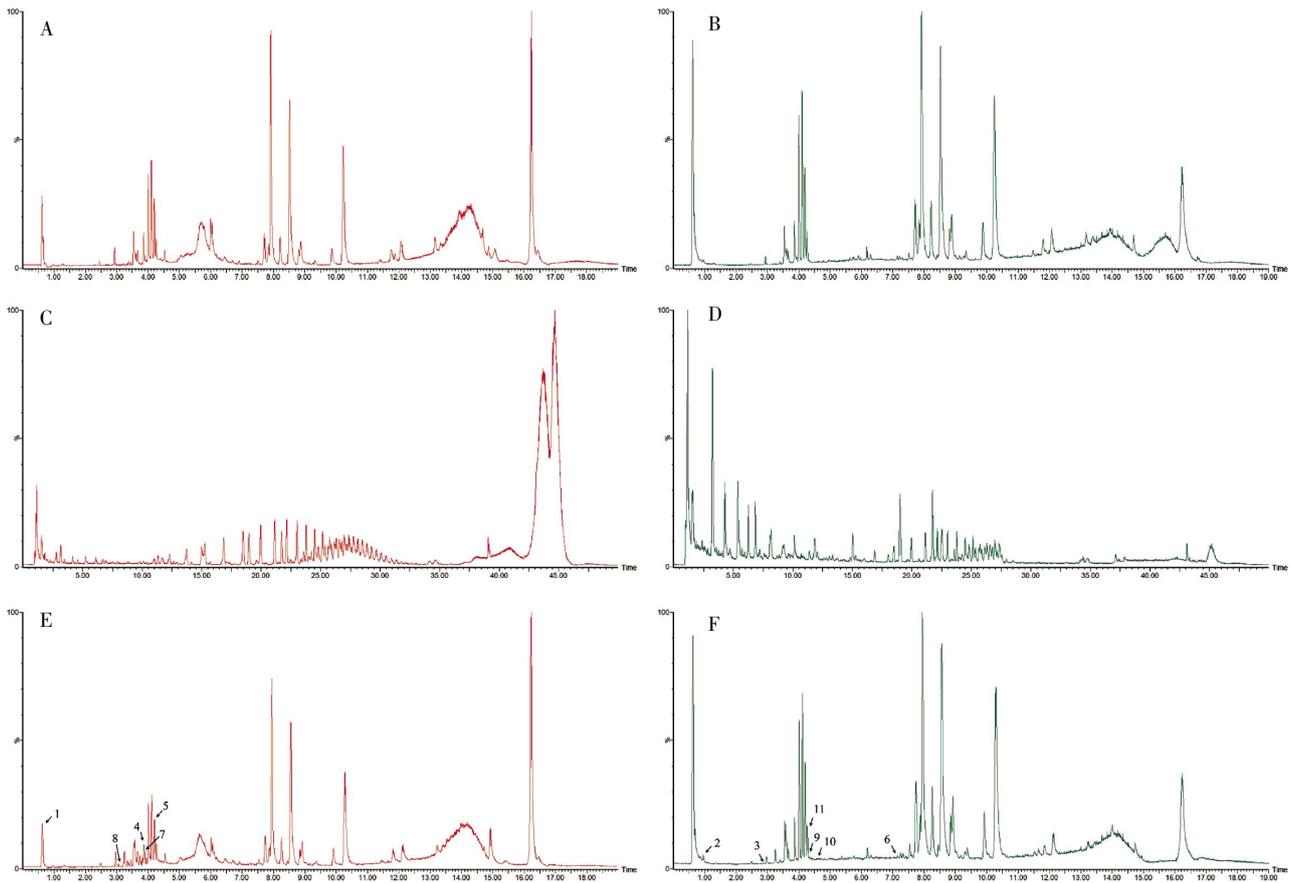


图 1 总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram

注:A.空白组正离子模式;B.空白组负离子模式;C.冠心宁组正离子模式;D.冠心宁组负离子模式;E.含药血清组正离子模式;F.含药血清组负离子模式。

2.4 统计学分析

数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组间比较若数据符合正态分布和满足方差齐性,用独立样本 t 检验;若不满足正态分布,则用秩和检验。多组间比较,采用单因素方差分析(ANOVA)评估组间差异,采用 LSD 检验进行多重线性比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。运用 GraphPadPrism 8.0 软件进行图表制作。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 质谱图采集

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术,对生物样品进行定性分析,正负离子模式下样品的总离子流图,详见图 1。

3.2 GXNI 入血成分及血清药物化学分析

空白组有效成分有 232 个,冠心宁组有效成分 892 个,含药血清组有效成分 404 个,有效入血成分 11 个,详见图 2。

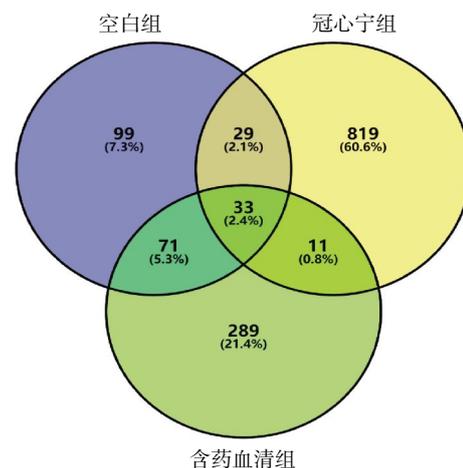


图 2 GXNI 有效入血成分韦恩图

Fig.2 Venny diagram of effective blood-entry components of GXNI

3.3 吸收入血成分

GXNI 吸收入血成分有 11 种,结果见表 1。

3.4 GXNI 治疗 CHD 潜在作用靶点

GXNI 吸收入血成分共 11 种,其中可预测靶点的入血成分有 10 种。去除重复靶点后,得到 606

表 1 GXNI 有效入血成分

Table 1 Effective blood-entry components of GXNI

编号	保留时间/min	化合物	分子式	加合物	预期质量数	观测质量数	M/Z	质量数误差/ppm	二级离子
1	0.66	senkyunolide R(川芎内酯 R)	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	240.099 8	240.095 6	258.129 4	-16.057 2	164.041 6
2	0.95	Vitamin B ₁ (维生素 B ₁)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	[M-Cl] ⁻	300.081 2	300.078 3	335.047 7	-8.431 8	124.013 9
3	2.97	Secoisolariciresinol(开环异落叶松树脂酚)	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	[M-HCOO] ⁻	362.172 9	362.173 4	407.171 5	1.090 7	203.080 8
4	3.87	Butylphthalide(正丁基苯酞)	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+e] ⁺	190.099 4	190.100 2	190.099 6	4.323 9	130.074 3;103.061 2
5	4.28	Chasmanine(查斯曼宁碱)	C ₂₅ H ₄₁ NO ₆	[M+Na] ⁺	451.293 4	451.294 6	474.283 8	2.581 7	129.111 3;229.142 3
6	7.05	Octadecanedioic acid(十八烷二酸)	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	[M-H] ⁻	314.245 7	314.244 4	313.237 1	-3.985 5	279.232 7
7	3.88	Butylidenephthalide(丁烯基苯酞)	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	[M+e] ⁺	188.083 7	188.084 9	188.084 3	6.071 6	115.062 3;118.073 3
8	3.18	Proline(D-脯氨酸)	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+e] ⁺	115.063 3	115.062 7	115.062 1	-5.627 2	89.044 2
9	4.27	Salvianolic acid A(丹酚酸 A)	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	494.121 3	494.119 5	493.112 2	-3.565 2	295.059 5
10	4.54	Monomethyl lithospermate(紫草酸单甲酯)	C ₂₈ H ₄₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	552.126 7	552.128 0	551.120 7	-2.250 3	353.066 1
11	4.26	Lithospermic acid(紫草酸)	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	538.111 1	538.109 9	537.102 6	-2.199 4	269.081 8

种靶点。从 GeneCards 数据库中筛选出 CHD 靶点 2 785 个、DisGeNET 数据库筛选出靶点 299 个,合并疾病数据库,随后删除重复靶点,最终得到疾病靶基因共 2 906 个。利用 PERL 软件筛选,得到 299 个 GXNI-CHD 共同靶点。详见图 3。

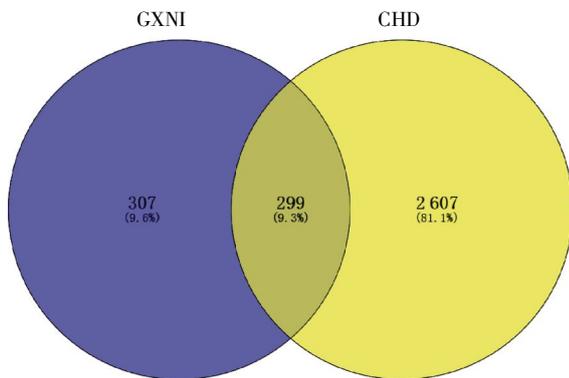


图 3 药物-疾病靶标交集情况

Fig.3 Intersection of drug-disease targets

3.5 药物-有效成分-共同靶点网络分析

按照 Degree 值筛选核心有效成分,结果显示 GXNI 治疗 CHD 的核心靶点为:丁烯基苯酞、开环异落叶松树脂酚、正丁基苯酞、丹酚酸 A。详见表 2、图 4。

表 2 核心有效成分

Table 2 Core active components

ID	化合物	Degree 值
A2	Butylidenephthalide(丁烯基苯酞)	63
A8	Secoisolariciresinol(开环异落叶松树脂酚)	60
A3	Butylphthalide(正丁基苯酞)	59
A7	Salvianolic acid A(丹酚酸 A)	59

3.6 PPI 网络分析

图 5 所示,PPI 网络共涉及 299 个节点、4 949 条边,平均节点度为 33.1,平均局部聚类系数为 0.456。采用 RX64 4.0.4 描绘前 20 个靶基因的柱状图,并对柱状图进行可视化。按照 Degree 值筛选出核心靶点,GXNI 治疗 CHD 的核心靶点为 TNF、白蛋白、类固醇受体辅激活因子、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、胱天蛋白酶-3。

3.7 GO 富集和 KEGG 通路富集分析

图 6 所示,GO 富集分析得到生物过程条目共 2 747 条,主要与丝裂原活化蛋白激酶级联的正调控等多种生物过程相关;得到细胞成分条目共 150 条,主要与膜筏、膜微区等多种细胞成分相关。分子功能条目共 286 条,主要与内肽酶活性、丝氨酸水解酶活性等多种分子功能相关。图 7 所示,GXNI 治疗 CHD 的通路主要富集的 KEGG 生物学通路有 195 条,其与环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路等疾病通路相关。

3.8 体内实验结果

3.8.1 心电图结果 与空白组比较,模型组大鼠心电图出现 T 波抬高,部分出现 T 波低平甚至倒置,ST 段偏移值显著升高($P<0.01$),心率加快($P<0.01$),提示心肌缺血模型制备成功。与模型组比较,冠心宁低、高剂量组和普萘洛尔组大鼠 ST 段偏移值显著降低($P<0.01$);与普萘洛尔组比较,冠心宁低、高剂量组 ST 段偏移值升高($P<0.05, P<0.01$);与冠心宁低剂量组比较,冠心宁高剂量组 ST 段偏移值显著降低($P<0.01$)。详见表 3 和图 8。

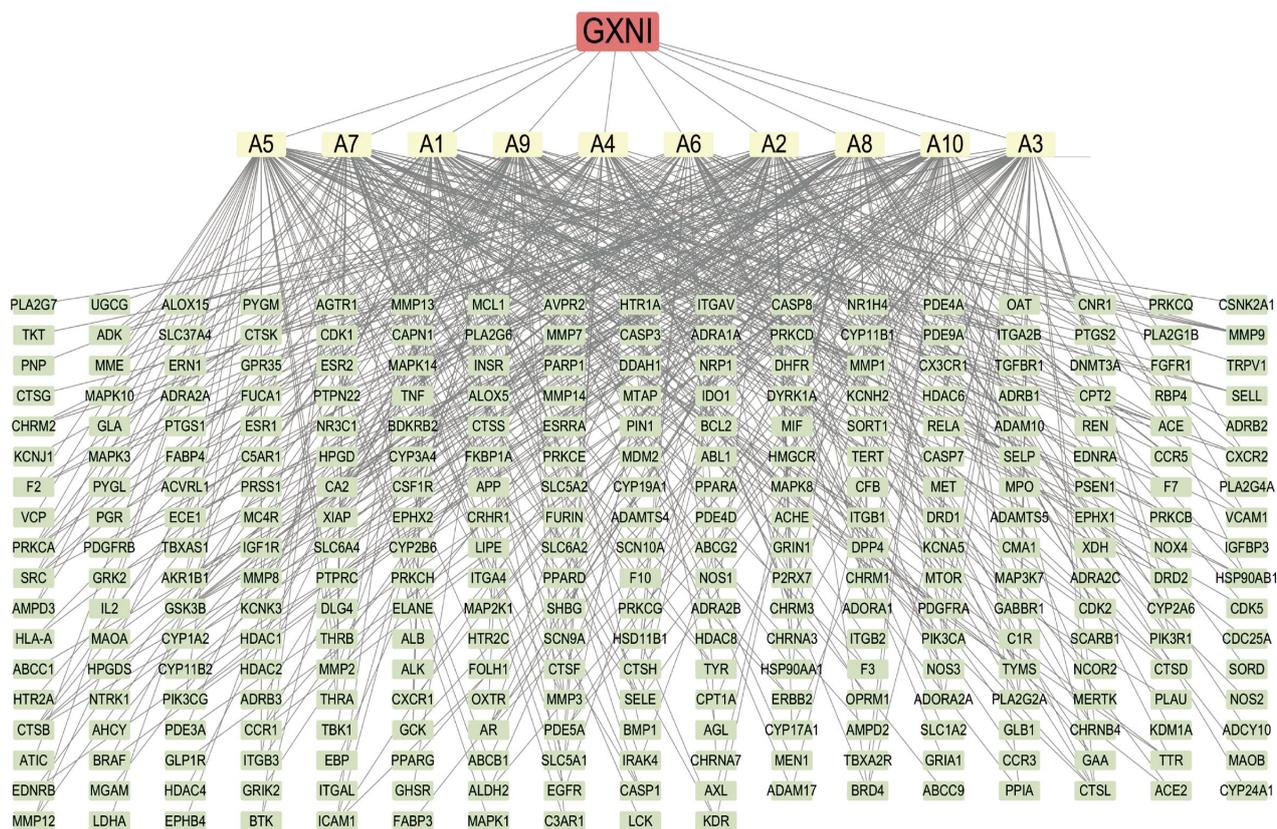


图 4 药物-有效成分-基本靶标网络图

Fig.4 Drug-active components-primary targets network diagram

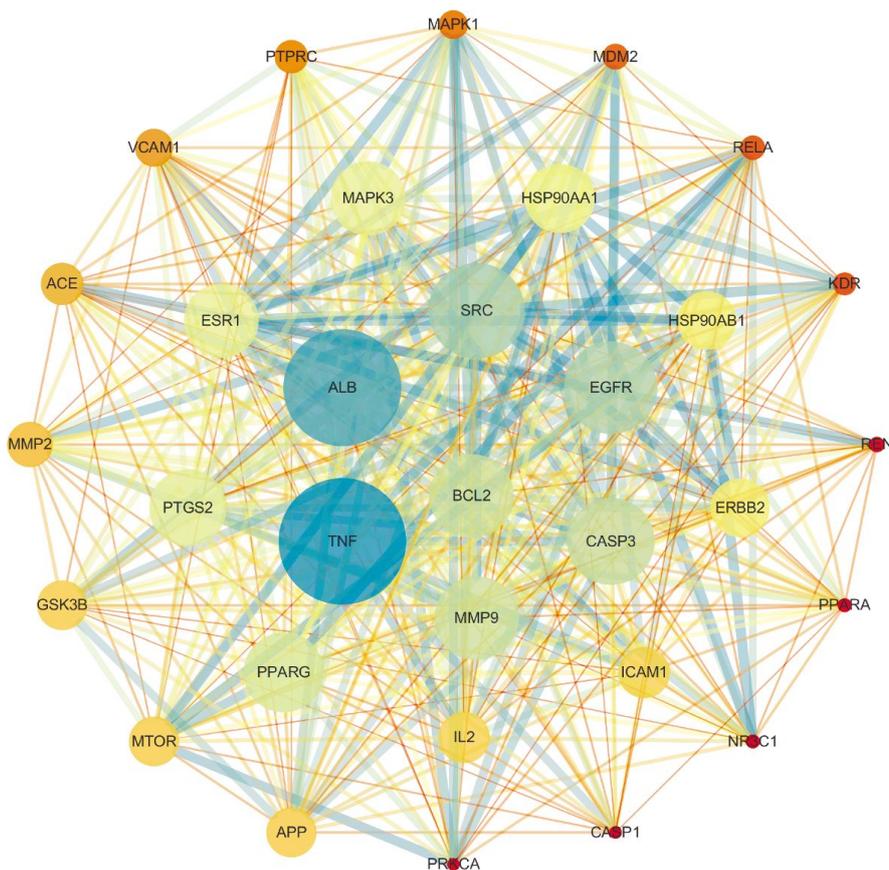


图 5 PPI 网络图

Fig.5 Protein-protein interaction network diagram

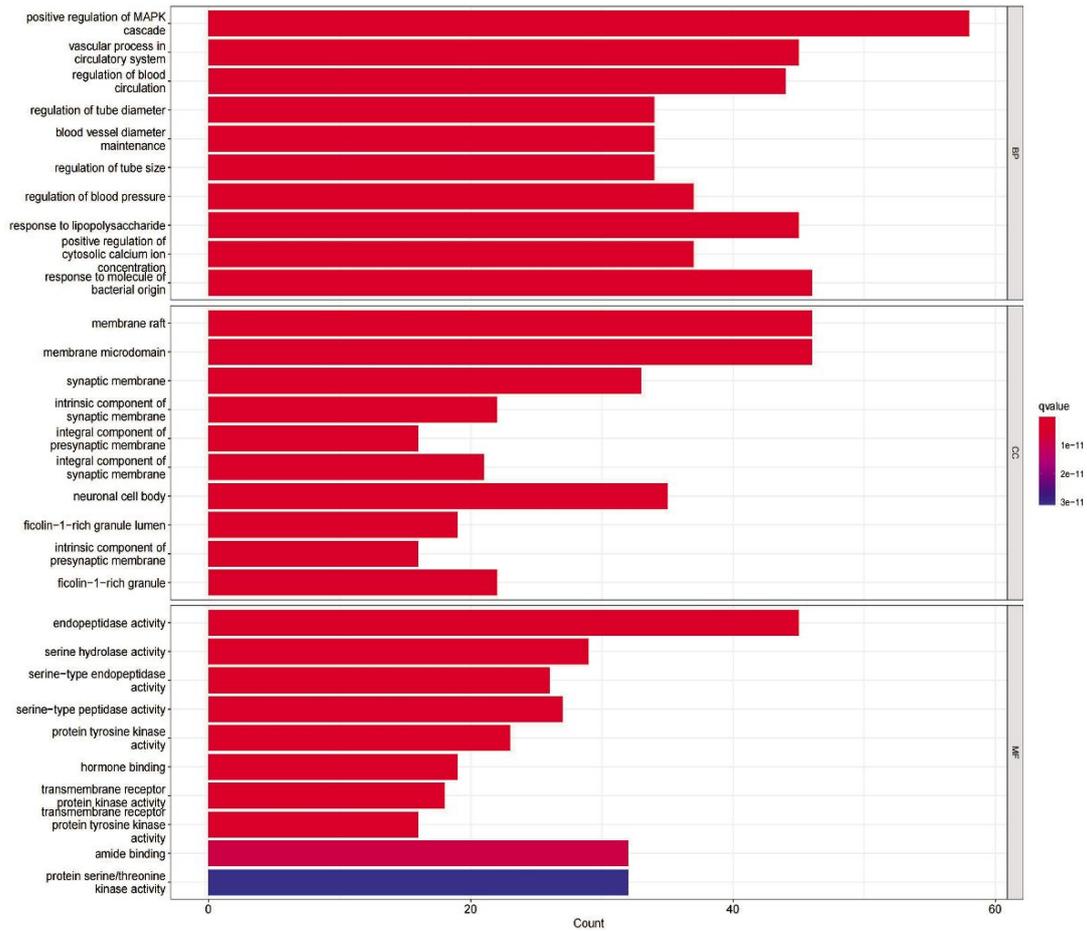


图 6 GO 富集分析图

Fig.6 GO enrichment analysis

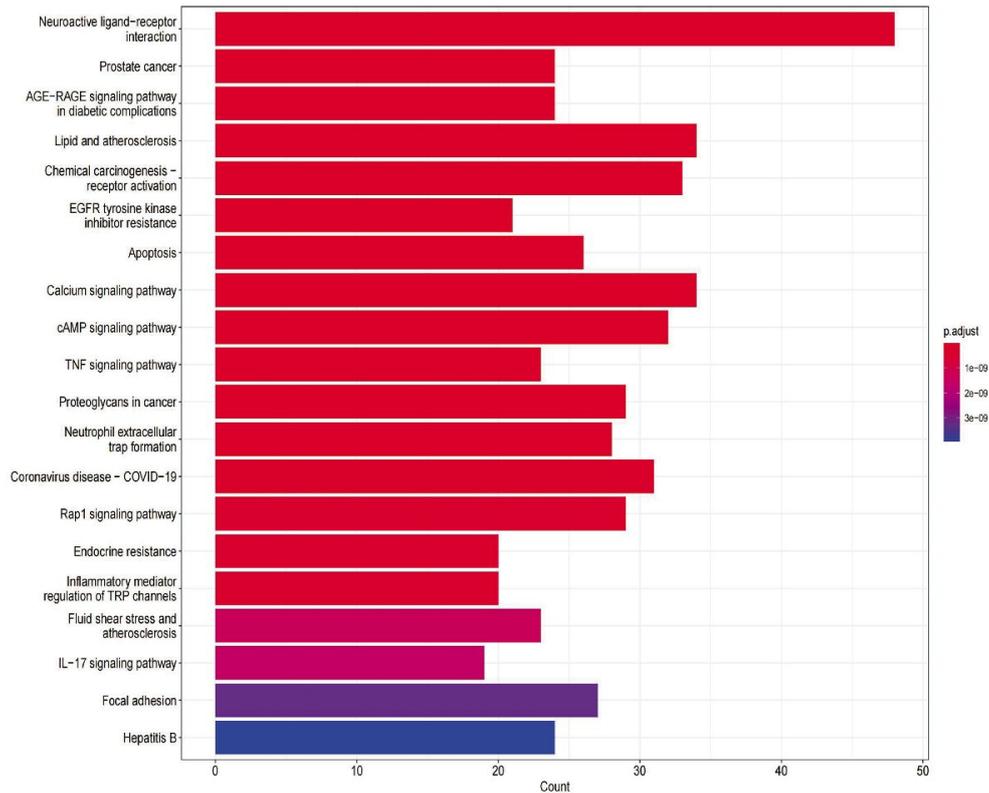


图 7 KEGG 富集分析图

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis

表 3 各组大鼠 ST 段偏移和心率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 ST-segment deviation and heart rate of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	ST 段偏移/($\times 10^3$ /mV)	心率/(次/min)
空白组	18.67 \pm 2.52	306.95 \pm 12.04
模型组	105.33 \pm 1.53 [#]	542.33 \pm 11.46 [#]
普萘洛尔组	33.67 \pm 6.11 ^{#**}	577.17 \pm 14.51 [#]
冠心宁低剂量组	57.67 \pm 2.08 ^{#**$\Delta\Delta$}	545.67 \pm 13.28 [#]
冠心宁高剂量组	37.67 \pm 3.21 ^{#**$\Delta\Delta\circ$}	557.32 \pm 5.94 [#]

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与普萘洛尔组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$;与冠心宁低剂量组比较, ^{\circ} $P<0.01$ 。

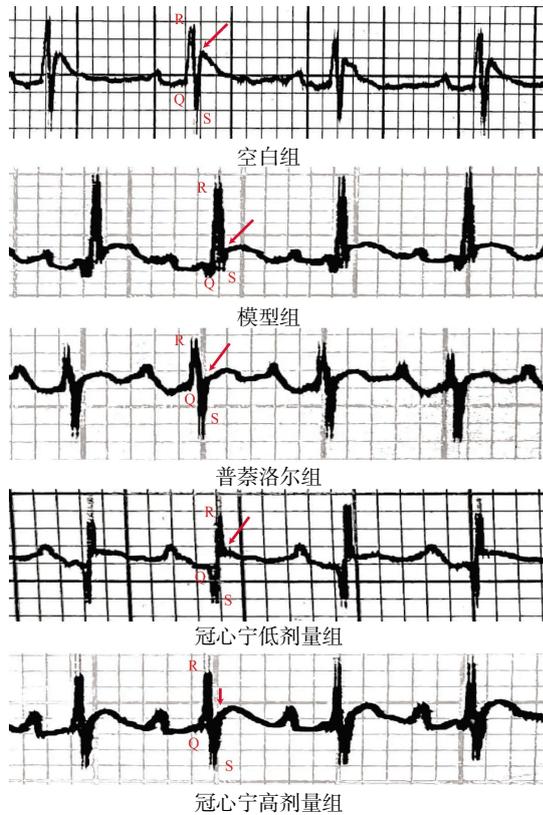


图 8 各组大鼠心电图比较

Fig.8 Comparison of ECGs among rats in each group

注:红色箭头指示 J 点。

3.8.2 HE 染色结果 空白组心肌细胞正常,肌纤维稍排列整齐。模型组心肌细胞重度肥大,肌纤维重度排列紊乱,心肌纤维变粗,染色不均。普萘洛尔组心肌细胞稍肥大,肌纤维稍排列紊乱,心肌纤维稍变粗。冠心宁低剂量组心肌细胞中度肥大,肌纤维中度排列紊乱,心肌纤维变粗,肌细胞间隙中度增宽。冠心宁高剂量组心肌细胞轻度肥大,肌纤维轻度排列紊乱,肌细胞间隙轻度增宽。详见图 9。

3.8.3 Masson 染色结果 空白组心肌组织未见明

显胶原化,肌纤维呈红色。模型组心肌组织明显胶原化,可见大量蓝色胶原纤维。普萘洛尔组心肌组织轻度胶原化,可见少量蓝色胶原纤维。冠心宁低剂量组心肌组织中度胶原化,可见蓝色胶原纤维;冠心宁高剂量组心肌组织轻度胶原化,可见少量蓝色胶原纤维。与空白组比较,模型组纤维蛋白沉积率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,普萘洛尔组及冠心宁低、高剂量组纤维蛋白沉积率显著降低($P<0.01$);与普萘洛尔组比较,冠心宁低剂量组纤维蛋白沉积率升高($P<0.05$)。详见表 4 和图 10。

表 4 GXNI 干预后大鼠纤维蛋白沉积率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Changes in fibrin deposition rate in rats after GXNI intervention ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	纤维蛋白沉积率/%
空白组	2.06 \pm 1.22
模型组	17.67 \pm 1.43 [#]
普萘洛尔组	5.39 \pm 0.54 ^{#**}
冠心宁低剂量组	8.38 \pm 0.14 ^{#**Δ}
冠心宁高剂量组	6.06 \pm 0.59 ^{#**}

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与普萘洛尔组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

3.8.4 GXNI 对 CHD 大鼠血清 LDH、CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 与空白组相比,模型组 LDH、CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,普萘洛尔组和冠心宁高剂量组 CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LDH 水平降低($P<0.05, P<0.01$),冠心宁低剂量组 IL-6、IL-1 β 、LDH、TNF- α 水平降低($P<0.05, P<0.01$);与普萘洛尔组相比,冠心宁低剂量组 CK-MB 水平显著升高($P<0.01$),冠心宁高剂量组 LDH 水平升高($P<0.05$);与冠心宁低剂量组相比,冠心宁高剂量组 CK-MB 水平降低($P<0.05$)。详见图 11。

3.8.5 GXNI 对 CHD 大鼠心肌组织 MDA 和 SOD 水平的影响 与空白组相比,模型组 SOD 活性显著降低($P<0.01$),MDA 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,普萘洛尔组和冠心宁低、高剂量组 SOD 活性显著升高($P<0.01$),MDA 水平显著降低($P<0.01$);与普萘洛尔组相比,冠心宁低、高剂量组 SOD 活性显著降低($P<0.01$),MDA 水平显著升高($P<0.01$)。详见图 12。

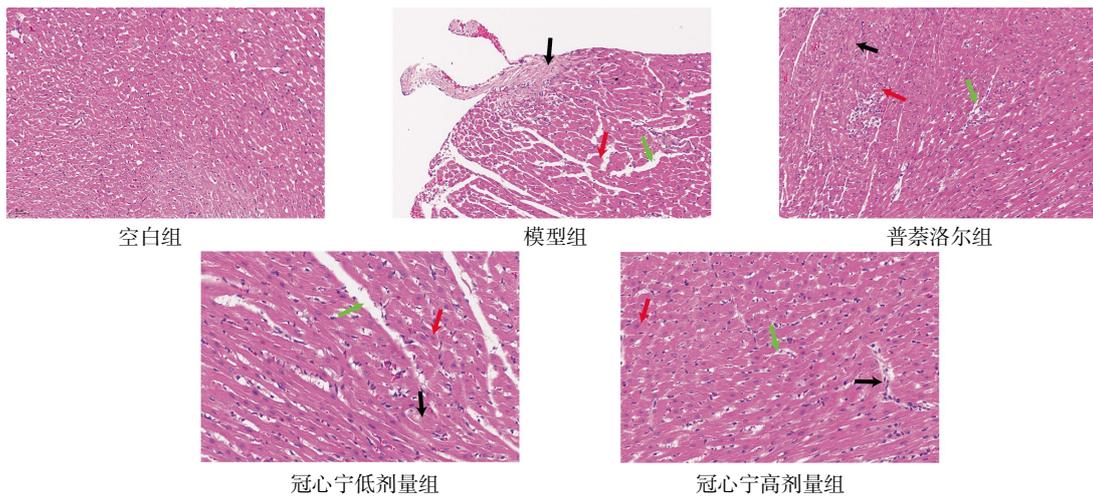


图 9 各组大鼠心肌组织 HE 染色($\times 200$)

Fig.9 HE staining of myocardial tissues of rats in each group ($\times 200$)

注:黑色箭头提示胶原化增加,绿色箭头提示细胞间隙增大,红色箭头提示细胞肥大。

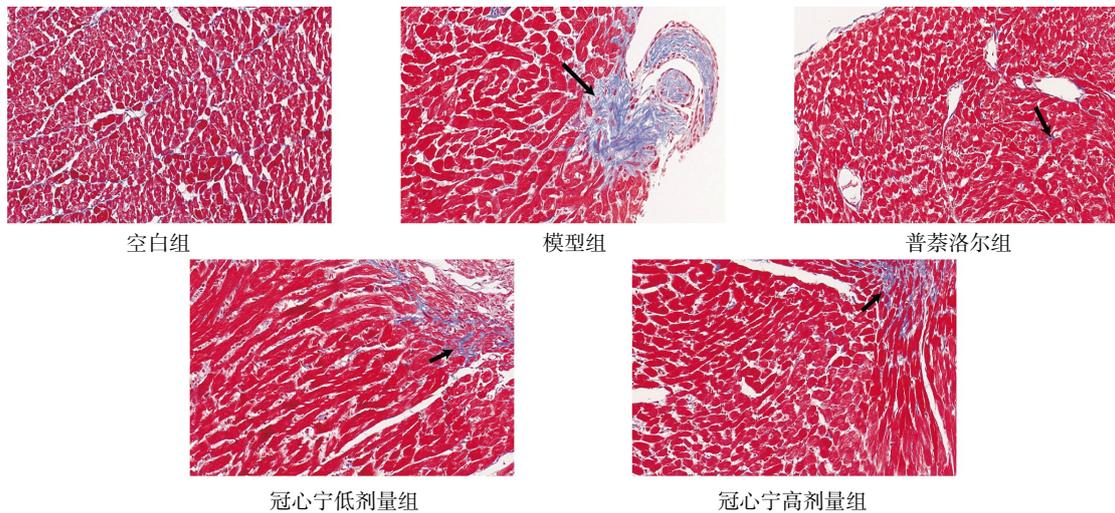


图 10 各组大鼠心肌组织 Masson 染色($\times 200$)

Fig.10 Masson staining of myocardial tissue of rats in each group ($\times 200$)

注:黑色箭头指示胶原化、纤维化。

3.8.6 GXNI 对 CHD 大鼠心肌组织 Atg3、Atg5 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠心肌组织中 Atg3、Atg5 蛋白相对表达明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,普萘洛尔组和冠心宁低、高剂量组中的 Atg3、Atg5 蛋白表达下降($P < 0.05, P < 0.01$)。详见图 13。

4 讨论

CHD 是由于心肌缺血导致的冠脉血流,无法满足心肌耗氧需求而引起的心脏疾病^[12]。血瘀被认为是 CHD 关键致病因素,活血化瘀是中医治疗 CHD 重要的策略。GXNI 是由丹参和川芎构成的中药注

射液,是有效治疗血瘀的中药之一。然而,GXNI 治疗 CHD 的机制阐述尚未明确,因此本研究通过网络药理学和体内实验探究 GXNI 治疗 CHD 的潜在机制。

本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术和 UNIFI 数据库共鉴定了 11 种化合物,其中丁烯基苯酚、开环异落叶松树脂酚、正丁基苯酚、丹酚酸 A 等有效入血成分可能在治疗心肌缺血 CHD 的功效中发挥重要作用。

丹参擅行血中之瘀滞,川芎擅行血中之气滞,二者相互协同,共奏活血化瘀、行气止痛之功效。研究表明^[13-14],丹参-川芎配伍较单味药相比,煎出的

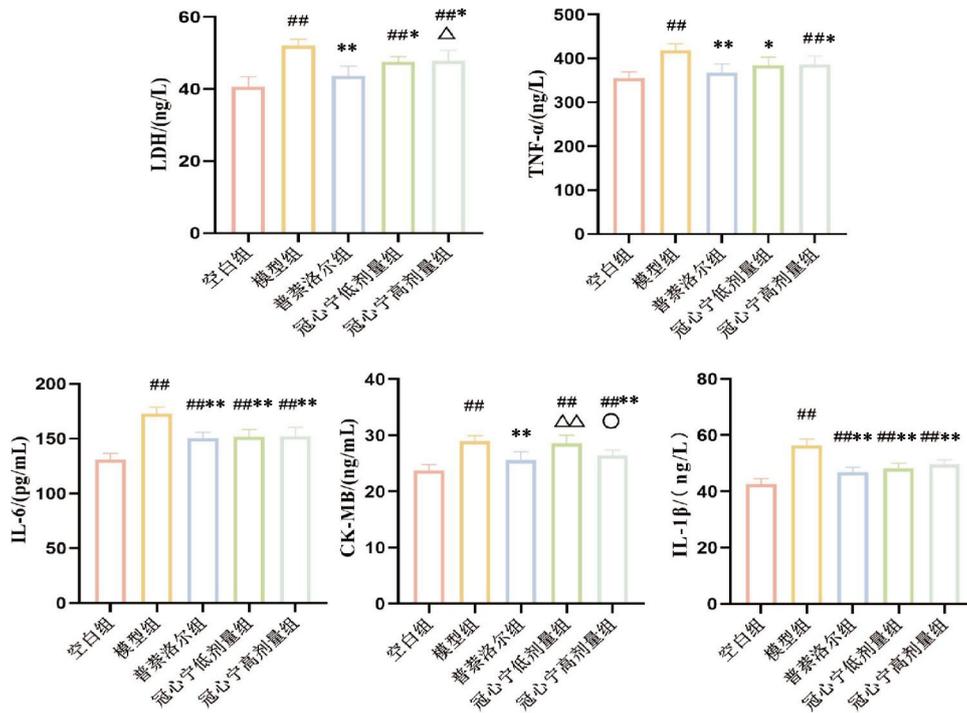


图 11 各组大鼠 LDH、CK-MB、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.11 Changes in the levels of LDH, CK-MB, IL-6, IL-1β, and TNF-α of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白组比较, # $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与普萘洛尔组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与冠心宁低剂量组比较, $\circ P<0.05$ 。

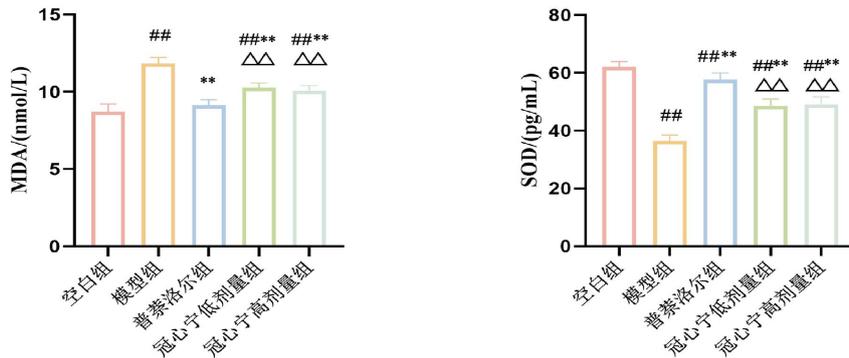


图 12 各组大鼠 MDA、SOD 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.12 Changes in the levels of MDA and SOD of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白组比较, # $P<0.01$;与模型组比较, ** $P<0.01$;与普萘洛尔组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

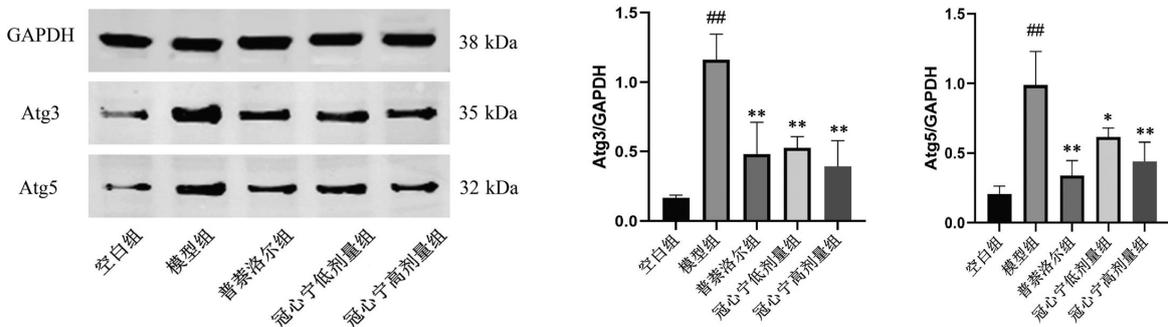


图 13 各组大鼠心肌组织 Atg3、Atg5 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.13 Comparison of protein expression levels of Atg3 and Atg5 in myocardial tissue among rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白组相比, # $P<0.01$,与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

有效成分有所提高。丹参-川芎在抗动脉粥样硬化、减轻血管内皮损伤、减轻缺血再灌注损伤、抗炎、抗血栓等心脑血管疾病中发挥重要的功效^[15]。

KEGG 富集分析结果显示, GXNI 治疗 CHD 的潜在作用靶点主要涉及 cAMP 信号通路等。cAMP 信号通路调节许多生物过程, 如细胞迁移、分化、增殖和凋亡^[16]。相关研究表明^[17], cAMP 信号传导可维持线粒体稳态, 调节细胞应激反应, 改善心肌损伤、减少胶原纤维增生。此外, 在 HT-29 细胞中, cAMP 水平升高可调控细胞自噬^[18]。

本研究通过 PPI 网络蛋白分析发现, TNF、白蛋白、类固醇受体辅激活因子, EGFR 等可能是 GXNI 治疗 CHD 的核心靶点, 主要涉及炎症反应、代谢调节、凋亡和自噬等相关机制。缺血修饰白蛋白是心肌缺血的生物标志物^[19-20]。TNF- α 是一种具有多效性的促炎细胞因子, 研究表明^[21], TNF- α 参与急性心肌缺血诱导的炎症反应, 加重 CHD 的发展。

中医学认为瘀血是由于血行滞缓或停积而形成的病理产物, 与现代医学中的微循环障碍、炎症因子激活以及血管内皮功能障碍相关^[22]。EGFR 调控细胞的增殖、分化、迁移及血管生成, 在慢性炎症下促进血管内皮间质转化, 使微血管基底膜增厚, 并且增强血小板聚集, 使得血流动力学改变^[23-24], 与中医血瘀证形成契合。cAMP 能够抑制炎症反应、血小板活化, 研究发现丹酚酸能有效降低 cAMP, 从而有效改善血管内皮功能, 改善血瘀症状^[25]。

通过动物实验结果可知, 与模型组相比, 冠心宁低、高剂量组可明显降低大鼠血清 LDH、CK-MB、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的水平, 降低心肌组织中 MDA 水平, 提高心肌组织中 SOD 水平, 上调 Atg3 和 Atg5 蛋白水平表达。LDH、CK-MB 是心肌缺血的敏感指标^[26-28], MDA 反映氧化应激损伤^[29], SOD 则介导抗氧化防御^[30-31]。IL-6、IL-1 β 等促炎细胞因子的过度表达可诱导心肌细胞损伤及心室重构^[32-33], 而 Atg3、Atg5 作为自噬关键基因, 其表达上调提示 GXNI 对心肌缺血诱导的自噬反应具有调节作用。细胞自噬在 CHD 中具有双重作用, 适度激活可保护心肌, 过度则促进凋亡^[34], 本研究中 GXNI 可能通过调控细胞自噬平衡发挥心肌保护效应。

因此, GXNI 可能通过 cAMP 信号通路结合

EGFR 潜在靶点, 根据调节细胞自噬、抑制炎症和保护血管内皮等机制靶向治疗 CHD。

参考文献

- [1] LAN Y, LUO F K, YU Y, et al. Coronary heart disease: Innovative understanding from traditional Chinese medicine and treatment by classic formulas[J]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 2024, 49(13): 3684-3692.
- [2] SAFIRI S, KARAMZAD N, SINGH K, et al. Burden of ischemic heart disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019[J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2022, 29(2): 420-431.
- [3] 《中国心血管健康与疾病报告》2023(冠心病部分内容)[J]. *心肺血管病杂志*, 2024, 43(10): 1015-1024.
- [4] 毛静远, 吴永健, 史大卓. 中成药治疗冠心病临床应用指南(2020年)[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(9): 1409-1435.
- [5] 傅应昌, 孟丽琴. 冠心宁注射液治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. *新中医*, 2011, 43(8): 8-9.
- [6] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [7] 田国芳, 薛岚, 刘曦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MSE 的 UNIFI 质谱数据库建立及其在血脂康胶囊化学成分的快速分析中的应用[J]. *药学学报*, 2023, 58(10): 2862-2874.
- [8] 张文龙, 姜美婷, 刘艳, 等. 冠心宁注射液对大鼠体内华法林抗凝作用的影响及机制[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(7): 577-583.
- [9] DU S B, ZHOU H H, XUE Z P, et al. Metagenomic sequencing revealed the regulative effect of Danshen and Honghua herb pair on the gut microbiota in rats with myocardial ischemia injury[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2024, 371: fnad133.
- [10] 王小平, 薛志鹏, 杜少兵, 等. 基于 PI3K/PDK1/Akt 信号通路研究丹参-红花药对对寒凝血瘀型心肌缺血大鼠的保护作用及机制[J]. *中草药*, 2022, 53(16): 5085-5092.
- [11] LU J K, HU Y C, WANG L C, et al. Understanding the multitarget pharmacological mechanism of the traditional Mongolian common herb pair GuangZao-RouDouKou acting on coronary heart disease based on a bioinformatics approach[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018(1): 7956503.
- [12] 张宇, 淡一航, 王婷, 等. 针刺疗法在冠心病治疗中的应用及其机制研究进展[J]. *山东医药*, 2023, 63(23): 93-96.
- [13] 张翠英, 章洪, 任伟光, 等. UPLC-MS/MS 测定丹参川芎对药中 4 种酚酸类成分在大鼠血浆和心脏组织的药代动力学[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(19): 4257-4262.
- [14] 张翠英, 章洪, 董宇, 等. 基于药效成分丹酚酸 B 和阿魏

- 酸在大鼠血浆的药代动力学研究丹参与川芎配伍[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1589-1593.
- [15] 赵玉涵, 肖光旭, 范斯文, 等. 丹参-川芎药对治疗心脑血管疾病的作用机制及临床研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(6): 461-469.
- [16] 吴华英, 邓凯, 李静, 等. 益气活血方调控 cAMP/Epac1/Rap1 信号改善冠心病气虚血瘀证大鼠的验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(18): 107-116.
- [17] ZHANG F, ZHANG L P, QI Y, et al. Mitochondrial cAMP signaling[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(24): 4577-4590.
- [18] GRISAN F, IANNUCCI L F, SURDO N C, et al. PKA compartmentalization links cAMP signaling and autophagy[J]. Cell Death and Differentiation, 2021, 28(8): 2436-2449.
- [19] SADLER P J, TUCKER A, VILES J H. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 220(1): 193-200.
- [20] 杨国建, 孙福成. 缺血修饰白蛋白的临床应用进展[J]. 中国心血管杂志, 2015, 20(6): 483-485.
- [21] 周雪玲. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨活心丸抗急性心肌缺血炎症反应的作用机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [22] 王阶, 李军, 董艳, 等. 泛血管疾病的中医内涵及防治策略[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(7): 1-14.
- [23] 张晗, 苏韞, 龚红霞, 等. 归芪白术方联合奥沙利铂对胃癌荷瘤小鼠 EGFR, VEGFR2 表达和血管生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 57-63.
- [24] 李钦, 阮成娟, 张睿雯, 等. 米非司酮联合消瘤方对子宫肌瘤气滞血瘀证患者血液流变学及 GPR30-EGFR 信号通路的影响[J]. 中国医药导报, 2023, 20(9): 33-37.
- [25] 王辉, 朱科燕, 林琳, 等. 丹酚酸浸膏粉对气虚血瘀大鼠血管内皮的保护作用[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(6): 774-779.
- [26] GUO W Z, JI H, YAN Z H, et al. Lovastatin changes activities of lactate dehydrogenase A and B genes in rat myocardial cells[J]. Chinese Medical Journal, 2011, 124(3): 423-428.
- [27] GOPCEVIC K, ROVCANIN B, KEKIC D, et al. Matrix metalloproteinases and membrane damage markers in sera of patients with acute myocardial infarction[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2011, 350(1/2): 163-168.
- [28] SAX H, CONTESSA J, DUBACH P, et al. Creatine kinase MB during myocardial infarction: Relationship to preexisting coronary heart disease and medication[J]. Acta Cardiologica, 1997, 52(5): 423-430.
- [29] GEORGIADOU P, ILIODROMITIS E K, VAROUNIS C, et al. Relationship between plasma osteopontin and oxidative stress in patients with coronary artery disease[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2008, 12(8): 917-920.
- [30] LUBRANO V, DI CECCO P, ZUCHELLI G C. Role of superoxide dismutase in vascular inflammation and in coronary artery disease[J]. Clinical and Experimental Medicine, 2006, 6(2): 84-88.
- [31] FAN G H, XIAO C Q, CHEN J M. Effect of ligustrazine on plasma lipid peroxidation, superoxide dismutase of the coronary heart disease[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1994, 14(1): 26-27, 4-5.
- [32] DONG Y, CHEN H W, GAO J L, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2019, 136: 27-41.
- [33] 禹晓宁, 陈安九. 红景天苷对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1926-1927.
- [34] 刘星, 刘佳丽, 聂连桂, 等. 二氧化硫对大鼠急性心肌缺血损伤后心肌纤维化的改善作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(5): 1125-1133.

(本文编辑 田梦妍)