

·数字中医药·

本文引用: 贾子君, 周庆兵, 张艳, 徐凤芹. 基于网络药理学和体外实验探讨瓜蒌-薤白药对抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 2061-2070.

基于网络药理学和体外实验探讨瓜蒌-薤白药对抗动脉粥样硬化的作用机制

贾子君^{1,2}, 周庆兵², 张艳², 徐凤芹^{2*}

1.中日友好医院, 北京 100029; 2.中国中医科学院西苑医院老年医学研究所, 北京 100091

〔摘要〕 **目的** 通过网络药理学和体外实验探讨瓜蒌-薤白药对(Gualou-Xiebai herb pair, GXHP)抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的作用机制。**方法** 利用 TC MSP、DrugBank、GeneCards 和 Therapeutic Target 等数据库筛选并收集 GXHP 的潜在成分、抗 AS 效应靶点;通过 Cytoscape 软件将药物靶点与疾病靶点进行网络化展示,通过网络拓扑算法筛选出关键靶基因;并通过 STRING 数据库平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络;京都基因和基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析 GXHP 抗 AS 所涉及的核心通路。采用 CCK-8 法检测不同浓度 GXHP 对 Raw264.7 细胞的增殖抑制情况;以氧化型低密度脂蛋白(oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL)处理 Raw264.7 细胞 48 h,形成泡沫细胞;将细胞分为 5 组,分别为空白组(无处理)、模型组(80 μg/mL ox-LDL 处理)、GXHP 低剂量组(80 μg/mL ox-LDL+0.2 g/L GXHP)、GXHP 中剂量组(80 μg/mL ox-LDL+0.6 g/L GXHP)和 GXHP 高剂量组(80 μg/mL ox-LDL+1.8 g/L GXHP);气相色谱质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和 ELISA 法分别检测各组总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离胆固醇(free cholesterol, FC)以及炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达;Western blot 法检测各组 MAPK 信号通路核心蛋白,包括磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated-extracellular signal-regulated kinases, p-ERK)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated-p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38MAPK)和磷酸化细胞核因子 p65(phosphorylated-p65, p-p65)的表达。**结果** 确定 GXHP 含有 21 种成分,包括槲皮素、亚麻酸乙酯、香叶木素等;21 种成分分别对应 154 个作用靶点和 36 个核心靶点;KEGG 分析发现核心靶点参与多种信号通路,包括脂质和 AS、MAPK 和 PI3K-Akt 等信号通路。体外实验结果显示,GXHP 浓度在 4 g/L 时可显著抑制 Raw264.7 细胞的增殖($P<0.01$),并选用 1.8、0.6、0.2 g/L 作为后续实验处理浓度。与空白组比较,模型组可见大量橘红色脂质颗粒,TC 及 FC 的表达水平显著升高($P<0.01$),细胞上清液中 IL-6、ICAM-1 的表达水平显著升高($P<0.01$),p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-p65/p65 的相对表达水平明显升高($P<0.01$)。与模型组相比,GXHP 高、中剂量组 TC 及 FC 的表达明显降低($P<0.01$),GXHP 高、中、低剂量组 IL-6 的表达明显下调($P<0.01$);GXHP 高、中剂量组 ICAM-1 的表达明显下调($P<0.01$),GXHP 高、中、低剂量组中 p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-p65/p65 相对表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 网络药理学分析联合体外实验表明,GXHP 可能通过抑制 MAPK 信号通路实现抗 AS 效应。

〔关键词〕 网络药理学;瓜蒌-薤白药对;动脉粥样硬化;泡沫细胞;MAPK 信号通路

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.020

〔收稿日期〕2023-02-10

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81973679);中国中医科学院科技创新工程(CI2021A01408);中日友好医院高水平医院临床业务费专项临床研究项目(2023-NHLHCRF-BQ-13)。

〔第一作者〕贾子君,女,博士,研究方向:中西医结合心血管病的研究。

〔通信作者〕* 徐凤芹,女,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:dr.xufengqin@outlook.com。

The anti-atherosclerosis mechanism of the classic Gualou-Xiebai herb pair based on network pharmacology and in vitro experiments

JIA Zijun^{1,2}, ZHOU Qingbing², ZHANG Yan², XU Fengqin^{2*}

1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. Institute of Geriatric Medicine, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of action of Gualou (*Trichosanthis Fructus*)-Xiebai (*Allii Macrostemonis Bulbus*) herb pair (GXHP) against atherosclerosis (AS) by network pharmacological analysis and in vitro experiments. **Methods** The databases of TCMS, DrugBank, GeneCards, and Therapeutic Target were taken to screen and collect potential components and anti-AS disease targets of GXHP. Cytoscape was used to network display the drug targets and disease targets, and the key target genes were screened by network topology algorithm. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING data platform. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was taken to analyze the core pathways involved in the GXHP anti-AS. CCK-8 assay was applied to measure the proliferation inhibition of Raw264.7 cells treated with different concentrations of GXHP. Raw 264.7 cells were treated with oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL) for 48 hours to form foam cells. The cells were assigned into five groups: blank control (no treatment), model (treat with 80 μg/mL ox-LDL), and low- (80 μg/mL ox-LDL and 0.2 g/L GXHP), medium- (80 μg/mL ox-LDL and 0.6 g/L GXHP), and high- (80 μg/mL ox-LDL and 1.8 g/L GXHP) dose GXHP groups. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and ELISA were taken to measure the levels of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), and expressions of inflammatory factor interleukin-6 (IL-6) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in each group. Western blot was used to measure the expressions of core proteins of MAPK signaling pathway in each group, including phosphorylated-extracellular signal-regulated kinases (p-ERK), phosphorylated-p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK), and phosphorylated nuclear factor-κB p65 (p-p65). **Results** It was determined that GXHP contained 21 components, including quercetin, ethyl linolenic acid, diosmetin, etc. The 21 components corresponded to 154 targets of action and 36 core targets, respectively. KEGG analysis showed that the core targets were involved in multiple signaling pathways, including lipid and AS, MAPK, and PI3K-Akt. The in vitro experiments showed that the proliferation of Raw264.7 cells were significantly inhibited ($P < 0.01$) by GXHP with concentration of 4 g/L, and concentrations of 1.8, 0.6, and 0.2 g/L were selected as the treatment ones for subsequent experiments. Compared with blank group, a large number of orange lipid particles were observed in the model group, the expression levels of TC and FC were significantly higher ($P < 0.01$), the expression levels of IL-6 and ICAM-1 in the cell supernatant were significantly higher ($P < 0.01$), and the relative expression levels of p-ERK/ERK, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-p65/p65 were significantly higher ($P < 0.01$). Compared with model group, the expressions of TC and FC in high- and medium-dose GXHP groups were significantly reduced ($P < 0.01$), the expressions of IL-6 in high-, medium- and low-dose GXHP groups were significantly lower ($P < 0.01$), the expressions of ICAM-1 in high- and medium-dose GXHP groups were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the relative expression levels of p-ERK/ERK, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-p65/p65 in high-, medium- and low-dose GXHP groups were significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Network pharmacological analysis combined with in vitro experiments suggested that GXHP may achieve its anti-AS effects by inhibiting the MAPK signaling pathway.

[Keywords] network pharmacology; Gualou-Xiebai herb pair; atherosclerosis; foam cell; MAPK signaling pathway

以动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)为病理基础的冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease, CHD)是目前导致人类死亡的主要疾病之一^[1-2]。在过去 30 年中,他汀类药物奠定了 AS 类疾病的治疗基石。然而,在临床实际使用中发现,他汀类药物存在相对较多的不良反应,包括增加

患糖尿病的风险以及引起肌肉疼痛等,这些不良反应限制了他汀类药物的使用^[3]。越来越多的证据表明,中医药在对包括 CHD 在内的 AS 类疾病的预防、治疗和康复方面发挥重要作用^[4],值得进一步深入挖掘。

中医学并无 AS 的对应疾病病名,根据 AS 类疾

病的常见临床症状表现,可将其归于“胸痹”“眩晕”等范畴^[5]。瓜蒌-薤白药对(Gualou-Xiebai herb pair, GXHP)是《金匮要略》中治疗胸痹的常用药对,其中瓜蒌性寒,味甘、苦,能宽胸散结、清润化痰;薤白性温,味辛、苦,可温中通阳、行气散结、活血止痛。千百年来,GXHP一直是治疗AS类疾病最常用的药对,经典名方瓜蒌薤白白酒汤在治疗CHD心绞痛时疗效显著,可有效降低患者的血脂及血液黏度^[6]。田盼盼等^[7]通过临床试验发现,瓜蒌薤白半夏汤合丹参饮能有效缓解不稳定型心绞痛痰瘀互结证患者心绞痛的临床症状,降低患者的血脂,减少发作次数及硝酸甘油的用量。但GXHP抗AS的作用机制仍不清楚,从而限制了其进一步运用,因而有必要从现代生物学角度阐明其抗AS的效应机制。

本研究将网络药理学方法与体外实验结合,探讨GXHP抗AS的效应机制。通过网络药理学预测GXHP中的主要成分,筛选出GXHP在AS治疗中的核心靶点、相关信号通路,并构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。在细胞实验部分,运用CCK-8检测GXHP对Raw264.7细胞的增殖抑制作用,以此确定后续的药物作用浓度,以氧化型低密度脂蛋白(oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL)处理Raw264.7细胞构建泡沫细胞模型,并利用该模型评估GXHP的抗AS效应,包括抗炎与降脂效应。最后,采用Western blot法对网络药理学筛选的信号通路进行验证。

1 材料和方法

1.1 主要药物与试剂、仪器

GXHP由三九药业按照瓜蒌与薤白生药质量1:1制成颗粒剂(批号:314125),溶解于完全培养基中,得到浓度为32 mg/mL的储存液,储存液使用0.22 μm的过滤膜进行过滤,保证无菌后使用。ox-LDL(广东奕源生物科技有限公司,批号:YB-002-8231);高糖培养基、EDTA(0.05%)、胎牛血清(中国赛默飞世尔科技有限公司,批号:C11995500BT-065、25300054、10100-147);CCK-8细胞活力检测试剂盒(日本同仁有限公司,批号:CK04-500);油红O染料(美国Sigma-Aldrich公司,批号:O0625);小鼠细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)

ELISA试剂盒、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(中国依科赛生物科技有限公司,批号:EM013-96、EM004-96);磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated-extracellular signal-regulated kinases, p-ERK)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)、磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated-p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38MAPK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:#CST4377、#CST/4695、#CST9215、#CST8690);磷酸化细胞核因子p65(phosphorylated-nuclear factor-kB p65, p-p65)抗体(武汉Proteintech公司,批号:#10745-1-AP);NF-κB p-p65抗体(英国Abcam公司,批号:#ab76302);无水乙醇(中国国药集团,批号:10009218)。酶联免疫检测仪(美国BioTek公司,型号:Biotek SynergyTM4);CO₂培养箱(美国Thermo公司,型号:240i)。

1.2 GXHP成分筛选

通过TCMSP数据库(<https://old.tcmsp-e.com/index.php>)获取瓜蒌与薤白所含化合物,结合吸收、分布、代谢及排泄评价指标,根据药代动力学特性,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(drug-likeness, DL)≥0.18为限定条件对所收集到的化合物进行筛选^[8]。

1.3 药物-成分-分子靶点网络构建

通过SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)确定GXHP的成分靶点。从OMIM数据库(<http://www.omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、Drugbank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)以及Therapeutic Target数据库(<https://db.idrblab.org/ttd/>)等数据库中获取AS的靶点,并与GXHP的成分靶点取交集。使用Cytoscape 3.7.7软件构建药物-成分-分子靶点-AS的网络图。在本研究中,大于Degree值中位数2倍的节点被选为核心靶点。

1.4 PPI构建

为了更好地理解核心靶标之间的相互作用,应用STRING 3.0(<https://string-db.org/>)构建PPI网络。

限定物种为 *Homo sapiens*(智人),并选择置信度 ≥ 0.9 作为筛选条件,使用 Cytoscape 3.7.7 软件对结果进行可视化展示。

1.5 京都基因和基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析

将筛选到的核心靶点运用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 KEGG 富集分析,得到 GXHP 治疗 AS 的关键信号通路,根据 $P < 0.01$ 的标准,使用 R 语言对 KEGG 的前 15 条结果进行可视化展示。

1.6 泡沫细胞模型建立

Raw264.7 细胞株由中国中医科学院医学实验中心提供,培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的孵育箱中进行培养,在细胞密度达 80%左右时进行传代。参考既往文献资料^[9],以 ox-LDL 处理 Raw264.7 细胞 48 h,油红 O 染色观察细胞内脂质颗粒。

1.7 油红 O 染色

使用异丙醇(分析纯级)溶解油红 O 粉末,制备 0.5 w/v 浓度的油红 O 原液,使用时将油红 O 原液与去离子水以 3:2 比例进行稀释,使用双层滤纸过滤 3 次,室温放置 10 min,弃下层沉淀。使用 6 孔板培养细胞,负压弃去培养液,加入 4%多聚甲醛固定 20 min,吸出多聚甲醛溶液,加入油红 O 染色液静置 10 min,使用自来水缓慢漂洗,对背景进行脱色处理,直至去除染色液,放置在显微镜下观察、拍照。

1.8 CCK-8 观察 GXHP 对 Raw264.7 细胞的增殖抑制作用

制备细胞悬液,密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板中,4 h 后加入含有不同浓度 GXHP 的完全培养基,继续于培养箱中培养 48 h 后弃去药液,加入培养液与 CCK-8 试剂的混合液(比例为 9:1),1 h 后使用酶标仪在 450 nm 处进行吸光度的检测,计算各组的细胞存活率,根据细胞存活率确定后续实验的药物处理浓度。

1.9 气相色谱质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测 GXHP 的降脂效应

将细胞分为 5 组,分别为空白组(无处理)、模型组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理)、GXHP 低剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL+0.2 g/L GXHP)、GXHP 中剂量

组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL+0.6 g/L GXHP)和 GXHP 高剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL+1.8 g/L GXHP),于 6 孔板中培养,处理 48 h 后采集各组细胞进行 GC-MS 检测。步骤如下:(1)总胆固醇(total cholesterol, TC)样本,取样品 0.5 mL,加入 3 mL 无水乙醇、2 mL 60% 氢氧化钾,100 °C 回流 1 h 后加 5 mL 10%氯化钠溶液、2 mL 石油醚与乙醚混合液(石油醚:乙醚=1:1),振摇后离心取上层进样;(2)游离胆固醇(free cholesterol, FC)样本,量取样品 0.5 mL,加 10%氯化钠 2 mL 后混匀,加石油醚、乙醚混合物 2 mL,振摇后离心取上层进样;(3)设置气相色谱质谱仪参数,采用 RtX-5MS 色谱柱,进样口温度设置为 280 °C,升温程序为 150 °C 保持 1 min,以 40 °C/min 升至 300 °C,保持 7 min。

1.10 ELISA 法检测 GXHP 的抗炎效应

分组同上,处理 48 h 后采集各组细胞上清液进行 ELISA 检测,按照检测试剂盒说明书中的步骤进行操作,根据标准品的浓度和吸光度值,使用 Excel 软件计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样本的 OD 值计算出对应样本中炎症因子(IL-6、ICAM-1)的浓度。

1.11 Western blot 检测 GXHP 对 MAPK 信号通路的作用

分组同上,处理 48 h 后收集各组细胞,使用蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,BCA 法测定各组蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳 3 h,随后将蛋白样本转移至 PDVF 膜上,以 TBST 洗膜后封闭 1 h,洗膜后加入不同比例一抗并室温孵育过夜,各一抗比例如下:抗 p-ERK(1:500)、抗 ERK(1:1 000)、抗 p-p38(1:1 000)、抗 p38(1:1 000)、抗 NF- κ B-p65(1:1 000)和抗 NF- κ B p-p65(1:1 000)。再次洗膜后加入二抗,使用增强型化学发光试剂,于曝光机曝光,扫描后使用 Quantity One 分析目标条带灰度值,做定量统计。

1.12 统计学方法

采用 SPSS 25.00 进行统计,各组数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,正态分布的计量资料采用方差分析,非正态分布的计量资料使用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GXHP 活性成分

在 TCMSP 数据库检索到 GXHP 中具有相关作用靶点的成分 21 个,包括 10 种来自瓜蒌的成分和 11 种来自薤白的成分。成分相关信息分别列于表 1 和表 2。

2.2 GXHP-活性成分-AS 靶点网络

通过 GeneCards、Drugbank、GeneCards 以及 Therapeutic Target 等数据库共确定 34 012 个 AS 疾病相关靶点。将 GXHP 中主要成分对应的作用靶点与 34 012 个 AS 相关靶点取交集,得到 21 种主要成分,共对应 154 个作用靶点,进一步通过网络拓扑分析得到 36 个核心靶点,包括 JUN、STAT3、MAPK3 和 AKT1 等,使用 Cytoscape 3.7.7 软件构建药物-GXHP 活性成分-AS 靶点网络。详见图 1。

2.3 GXHP 核心靶点的 PPI 网络图

将 36 个核心靶点导入 STRING 数据库,获取 PPI 网络图。图 2 显示 JUN、STAT3、MAPK3、AKT1 等在网络图中占有核心位置。

2.4 KEGG 富集分析

将 36 个核心靶点导入 DAVID 6.8 在线数据分析平台,进行 KEGG 富集分析。按 *P* 值升序排列,选取前 15 条 KEGG 信号通路进行展示。图 3 显示 GXHP 治疗 AS 的核心靶点涉及脂质与 AS、MAPK 和 PI3K-Akt 等信号通路。

2.5 GXHP 对 Raw264.7 细胞的增殖抑制作用

CCK-8 结果显示,GXHP 在 0~2.0 g/L 之间,48 h 处理后细胞的存活率可达 95% 以上。与 0 g/L 比较,4、8、16、32 g/L GXHP 细胞存活率降低($P < 0.01$) (图 4)。为避免 GXHP 的细胞毒性作用,本研究在后续实验中选择 1.8、0.6、0.2 g/L 分别作为 GXHP 高、中、低剂量组浓度。

表 1 瓜蒌的活性成分

编号	Mol ID	分子英文名	分子中文名	Pubchem CID	分子式	分子量/(g/mol)	OB/%	DL
GL1	MOL001494	Mandenol	亚油酸乙酯	5282184	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.50	42.00	0.19
GL2	MOL002881	Diosmetin	香叶木素	5281612	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.26	31.14	0.27
GL3	MOL004355	Spinasterol	A-波菜甾醇	5281331	C ₂₉ H ₄₈ O	412.70	42.98	0.76
GL4	MOL005530	Hydroxygenkwanin	羟基羌花素	5318214	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.26	36.47	0.27
GL5	MOL006756	Schottenol	—	441837	C ₂₉ H ₅₀ O	414.70	37.42	0.75
GL6	MOL007165	10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	葫芦二烯醇	—	C ₃₀ H ₅₀ O	426.70	44.02	0.74
GL7	MOL007171	5-dehydrokaroundiol	5-去氢栝楼萜二醇	—	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	438.70	30.23	0.77
GL8	MOL007172	7-oxodihydrokaroundiol	7-氧代二氢栝楼萜二醇	—	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	456.70	36.85	0.75
GL9	MOL007179	Linolenic acid ethyl ester	亚麻酸乙酯	5367460	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.50	46.10	0.20
GL10	MOL007180	Vitamin-e	维生素-E	3476	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.70	32.29	0.70

表 2 薤白的活性成分

编号	Mol ID	分子英文名	分子中文名	Pubchem CID	分子式	分子量/(g/mol)	OB/%	DL
XB1	MOL001973	Sitosteryl acetate	B-谷甾醇乙酸酯	5354503	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	456.70	40.39	0.85
XB2	MOL002341	Hesperetin	橙皮素	72281	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	70.31	0.27
XB3	MOL000332	N-coumaroyltyramine	N-对香豆酰酪胺	5372945	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	283.32	85.63	0.20
XB4	MOL000358	Beta-sitosterol	β -谷甾醇	222284	C ₂₉ H ₅₀ O	414.70	36.91	0.75
XB5	MOL004328	Naringenin	柚皮素	439246	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	59.29	0.21
XB6	MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	N-顺式阿魏酰酪胺	6440659	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.30	118.35	0.26
XB7	MOL000631	Coumaroyltyramine	对香豆酰酪胺	13939145	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	283.32	112.90	0.20
XB8	MOL007640	Macrostemonside E qt	薤白昔己	—	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈	1 227.30	35.26	0.87
XB9	MOL007650	PGA(sup 1)	前列腺素 A1	5281912	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.50	43.98	0.25
XB10	MOL007651	Prostaglandin B1	前列腺素 B1	5280388	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.50	40.21	0.25
XB11	MOL000098	Quercetin	槲皮素	5280343	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	46.43	0.28

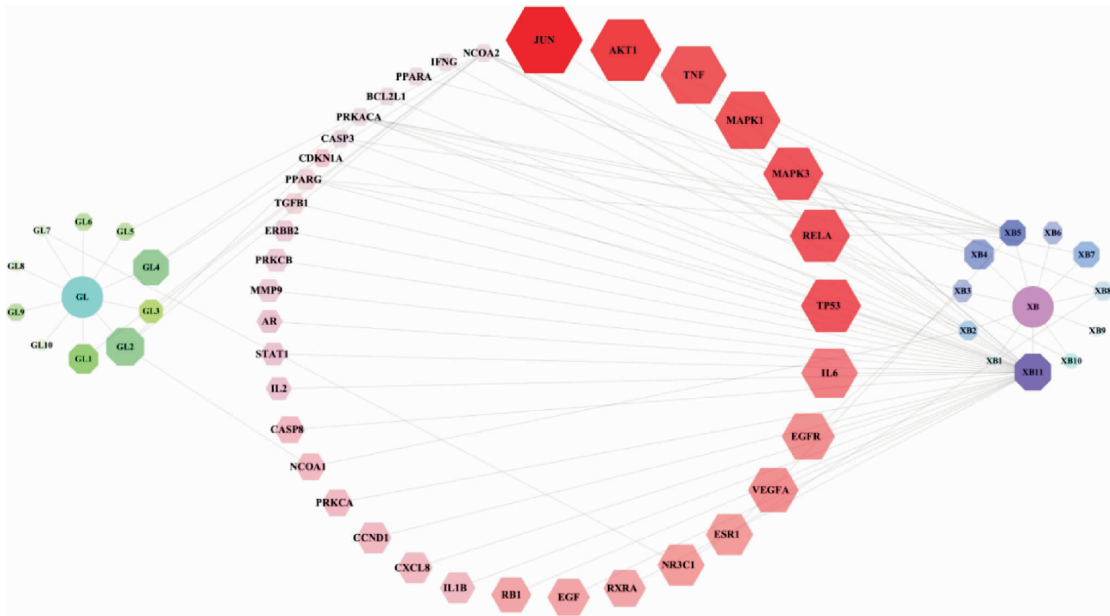


图 1 药物-GXHP 活性成分-AS 靶点网络图

注:红色六边形代表 36 个核心靶点,绿色代表瓜蒌的主要成分,紫色代表薤白的主要成分,颜色越深代表 Degree 值越高。

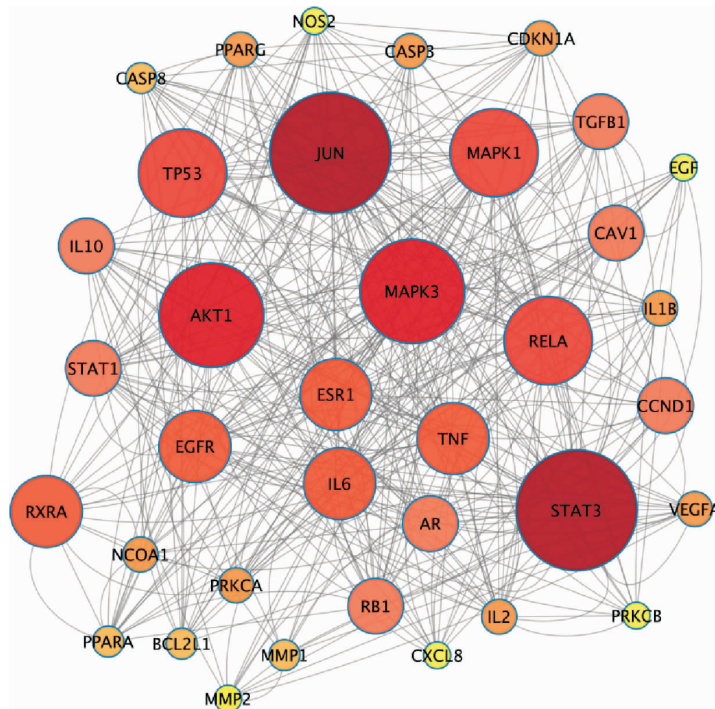


图 2 36 个核心靶点 PPI 网络

注:节点的颜色越深代表 Degree 值越高,红色节点表示相对较高的 Degree 值。

2.6 GXHP 对泡沫细胞 TC、FC 及 ICAM-1、IL-6 的影响

油红 O 染色结果显示,经 ox-LDL 处理后,空白组细胞中无橙红色脂滴(图 5A),模型组细胞内可见大量橙红色脂滴(图 5B)。

与空白组比较,模型组中 TC 及 FC 的表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,GXHP 高、

中剂量组 TC 及 FC 的表达显著降低($P < 0.01$)(图 6A、B)。

与空白组比较,模型组细胞上清液中 IL-6、ICAM-1 的表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,GXHP 高、中、低剂量组 IL-6 的表达水平明显下调($P < 0.01$);GXHP 高、中剂量组 ICAM-1 的表达水平明显下调($P < 0.01$)(图 6C、D)。

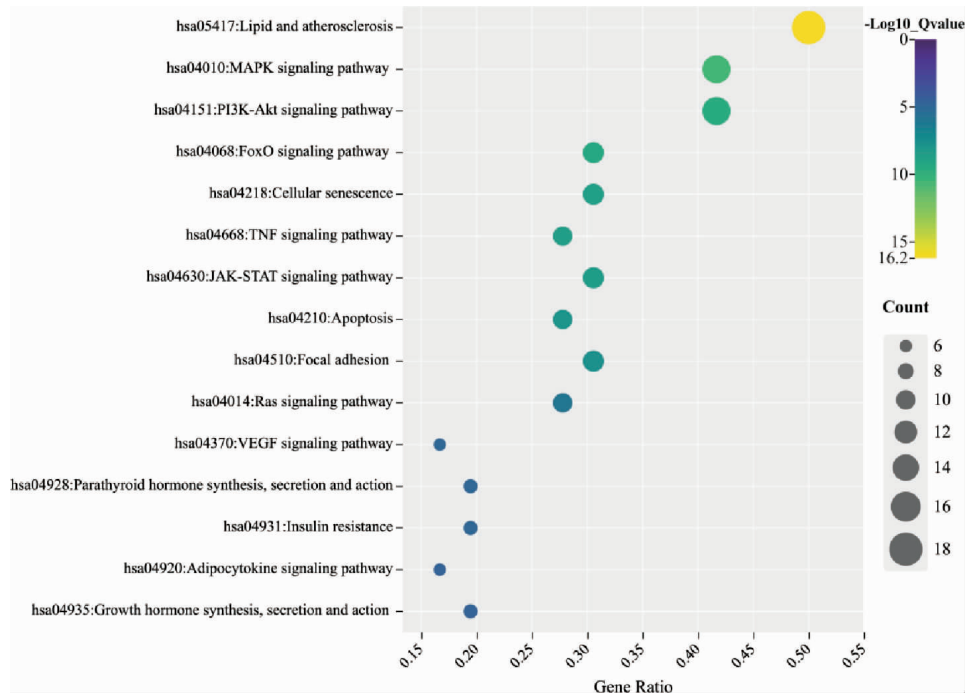


图3 GXHP核心靶点KEGG富集分析气泡图

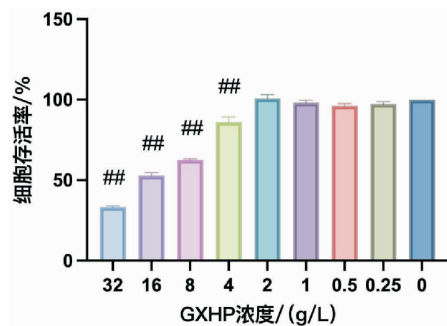


图4 GXHP对Raw264.7细胞存活率的影响(48 h, $\bar{x} \pm s, n=3$)
注:与0 g/L比较, # $P<0.01$ 。

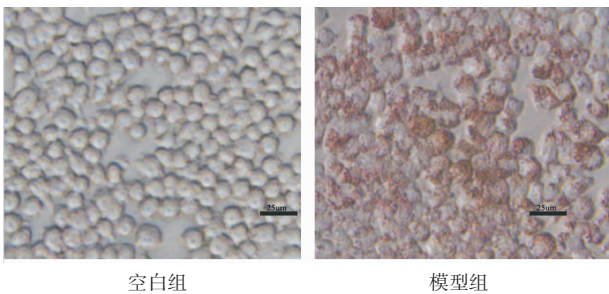


图5 油红O染色结果($\times 200$)

2.7 GXHP抑制MAPK信号通路核心蛋白的表达

与空白组相比,模型组泡沫细胞中p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK和p-p65/p65的相对表达水平明显升高($P<0.01$);与模型组相比,GXHP高、中、低剂量组中p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK和p-p65/p65相对表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见图7。

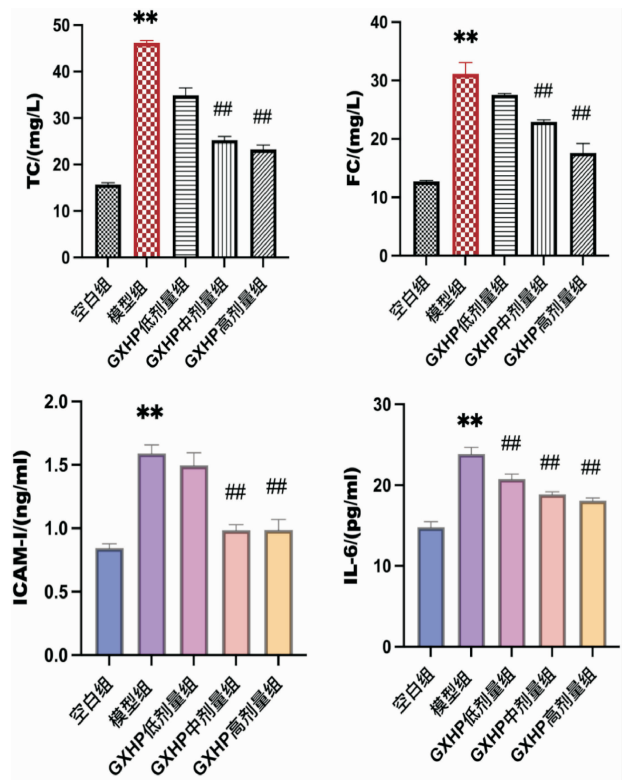


图6 GXHP对泡沫细胞脂质和炎症因子的表达作用($\bar{x} \pm s, n=5$)
注:与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.01$ 。

3 讨论

AS是包括CHD在内众多疾病的主要病理基础,是目前导致人口死亡的主要原因。GXHP为张仲景治疗胸痹的最常用药对,在防治AS类疾病中显示出了其独特的临床疗效,如刘丽清等^[10]使用瓜蒌

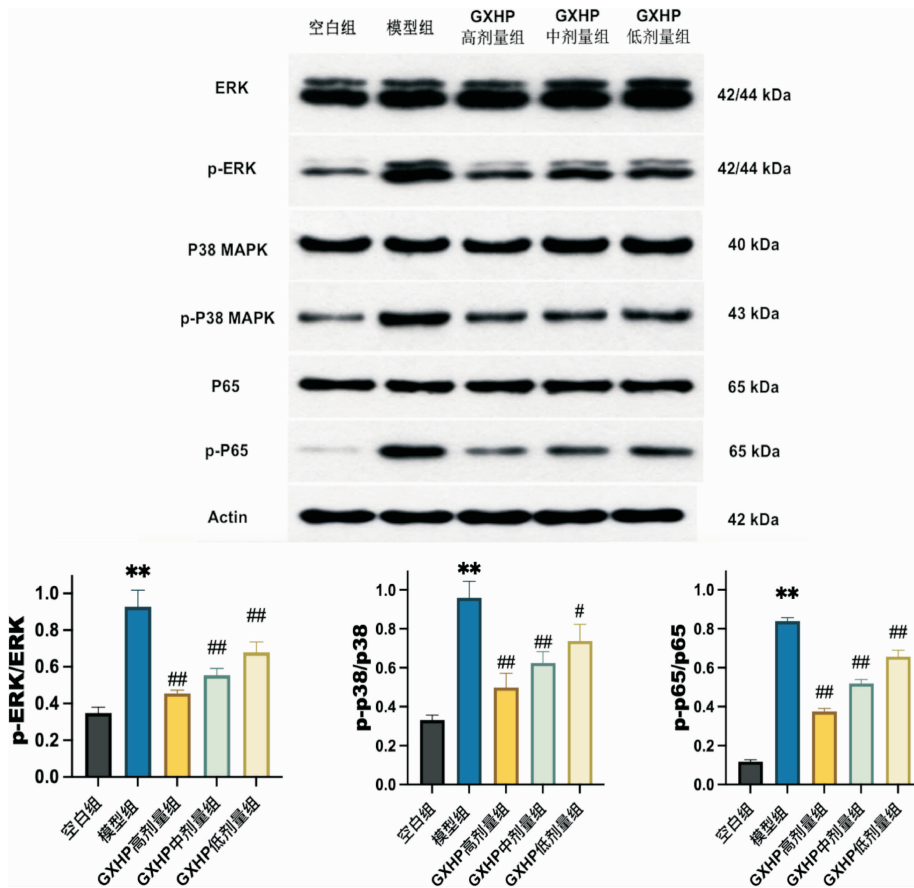


图 7 GXHP 对各组 p-ERK/ERK、p-p38/p38、p-p65/p65 相对蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

薤白半夏汤治疗心绞痛患者获得了良好的临床效果。周宏伟等^[11]发现,瓜蒌薤白半夏汤在治疗 CHD 患者时可抑制炎症因子的表达。彭喜洋等^[12]发现,瓜蒌薤白半夏汤加减能显著降低 CHD 痰浊痹阻证患者的血脂水平且提高患者心功能。然而,关于 GXHP 抗 AS 的分子机制的报道较少,这限制了其治疗 AS 的临床应用范围。

网络药理学目前已被广泛用于揭示中药的分子作用机制^[13]。在本次研究中,我们发现 GXHP 有 21 个可能的活性成分,包括槲皮素、柚皮素、葫芦素 D 和香叶木素。同时确定了 GXHP 活性成分对应的 36 个核心作用靶点,包括 JUN、STAT3、MAPK3 和 AKT1 等,在此基础上构建了药物-成分-分子靶点-疾病网络。与此同时,对 36 个核心靶点进行 KEGG 富集分析,发现 GXHP 治疗 AS 的核心靶点涉及脂质与 AS、MAPK 和 PI3K-Ak 等信号通路。既往研究表明,MAPK 信号通路与 AS 疾病的炎症反应密切相关^[14]。NEWBY 等^[15]和 ELKHAWAD 等^[16]进一步发现,抑制 MAPK 信号通路可以减少 AS 患者的血管炎症。因

此,我们选择 MAPK 信号通路作为 GXHP 体外抗 AS 效应机制的靶通路,进行实验验证。

巨噬细胞摄取大量 ox-LDL 可形成泡沫细胞,泡沫细胞的形成是 AS 早期病变的标志性事件^[17-18]。此外,泡沫细胞在受到 ox-LDL 刺激后还会释放出大量的促炎症因子,进一步加速 AS 的发展^[19-20]。因此,泡沫细胞模型可用来评估药物的抗 AS 效应及作用机制^[21-22]。在本研究中,我们以 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 处理 Raw264.7 细胞 48 h,油红 O 染色观察到细胞内有大量橙红色脂滴颗粒,提示造模成功。CCK-8 结果显示,GXHP 对 Raw264.7 细胞的增殖具有显著的抑制作用,为了避免 GXHP 对 Raw264.7 细胞的细胞毒性作用,在后续实验中,选择 1.8、0.6、0.2 g/L 分别作为 GXHP 高、中、低剂量组的处理浓度来观察 GXHP 的抗 AS 效应及相关机制。

炎症反应是导致 AS 发病及进展的一个核心机制,其中 IL-6 可由巨噬细胞释放,能够增强局部炎症反应,是参与 AS 病变及进展的重要炎症因子^[23]。ICAM-1 属于免疫球蛋白家族,ICAM-1 的大量表达

则增强了单核细胞与内皮细胞之间的黏附,促进 AS 炎症的发生和发展,还能加重脂质代谢的紊乱^[24]。在本研究中,我们也发现经 ox-LDL 处理后,细胞培养液中炎症因子 ICAM-1 和 IL-6 明显升高。更重要的是,GXHP 不仅能降低 TC 和 FC 的水平,还能减少炎症因子 ICAM-1 和 IL-6 的表达,提示 GXHP 具有显著的抗 AS 效应。

为进一步探索 GXHP 抗 AS 作用的分子机制,我们观察了 GXHP 处理后各组 MAPK 信号通路核心蛋白 ERK、p38 和 p65 等的表达变化。MAPK 级联是细胞内重要的信号转导方式之一,参与多种细胞生物学反应的调节。MAPK 信号通路在未受刺激时,处于静止状态,受到炎性刺激时,在上游激酶的作用下,发生级联磷酸化而激活,MAPK 被激活后进入细胞核,使一些转录因子磷酸化,参与细胞的增殖、分化、转化及凋亡等细胞过程的调控,其核心蛋白包括 p-JNK、JNK、p-ERK、ERK、p-p38、p38 等。大量的基础研究证实,MAPK 信号通路的激活是 AS 发生和发展的重要因素,与炎症、血管内皮与平滑肌细胞的增殖迁移密切相关。如动物实验发现,ERK、p38 的激活均可促进内膜增厚和血管平滑肌细胞的增殖,而抑制 ERK、p38 能够减少 AS 斑块的形成^[25];ZHAO 等^[26]通过体外实验发现,抑制 MAPK 信号通路可诱导巨噬细胞呈现 M2 表型,减缓炎症的发生,对 AS 有保护作用。WANG 等^[27]认为,抑制 p38 MAPK 的激活可减少 ox-LDL 诱导巨噬细胞产生的促炎作用,起到抗 AS 的作用。同时,研究发现,血管紧张素 II 参与内皮损伤和炎症,加速 AS,应用 p38 MAPK 抑制剂可以抑制血管紧张素 II 对内皮损伤及炎症的影响^[28]。本研究发现,与空白组比较,模型组细胞中 p-ERK、p-p38 和 p-p65 的表达水平明显增加,而 GXHP 能降低处理组泡沫细胞中 p-ERK、p-p38 和 p-p65 的表达水平。

综上,基于网络药理学与体外实验的研究表明,GXHP 可能通过抑制 MAPK 信号通路实现抗 AS 效应。研究发现的活性成分如槲皮素、柚皮素、葫芦素 D 和香叶木素,以及 GXHP 的核心靶点包括 JUN、STAT3、MAPK3 和 AKT1 等,为未来进一步深入进行抗 AS 研究奠定了基础。中医药治疗 AS 引起的 CHD、心绞痛等疾病具有良好的疗效,且具有药物价格低及不

良反应少等优势,有着不可替代的地位。本研究仅基于网络药理学及体外实验探究 GXHP 抗 AS 的作用机制,缺乏对 GXHP 中的有效成分研究。在今后的研究中,我们将进一步明确其活性成分并对其深入研究。中医药在治疗心系疾病方面有着悠久的历史,我们相信深入研究中医药防治 AS 的机制,将为 AS 疾病的预防和治疗提供更好的方案。

参考文献

- [1] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. *Circulation Research*, 2016, 118(4): 535-546.
- [2] RAHMAN M S, WOOLLARD K. Atherosclerosis[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1003: 121-144.
- [3] THAKKER D, NAIR S, PAGADA A, et al. Statin use and the risk of developing diabetes: A network meta-analysis[J]. *Pharmacoeconomics and Drug Safety*, 2016, 25(10): 1131-1149.
- [4] ZHANG Y, MEI J, LI J, et al. DNA methylation in atherosclerosis: A new perspective[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 25(10): 1131-1149.
- [5] 康 骏, 叶良策, 胡 恣, 等. 动脉粥样硬化中医研究进展[J]. *实用中西医结合临床*, 2020, 20(6): 181-183.
- [6] 陈丽萍, 张晓乐, 韩 乐, 等. 瓜蒌薤白白酒汤治疗冠心病心绞痛的临床疗效分析[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(9): 132-135.
- [7] 田盼盼, 李 军, 陈恒文, 等. 瓜蒌薤白半夏汤合丹参饮治疗不稳定型心绞痛痰瘀互结证的临床研究[J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(14): 1059-1063.
- [8] LI J S, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15290.
- [9] YIN M Z, LU J W, GUO Z Z, et al. Reduced SULT2B1b expression alleviates ox-LDL-induced inflammation by upregulating miR-148-3P via inhibiting the IKK β /NF- κ B pathway in macrophages[J]. *Aging*, 2021, 13(3): 3428-3442.
- [10] 刘丽清, 刘 英, 曹 娟, 等. 瓜蒌薤白半夏汤治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛患者的临床疗效[J]. *中医临床研究*, 2019, 11(24): 34-35.
- [11] 周宏伟, 孟建宏, 张红鸽, 等. 瓜蒌薤白半夏汤治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛疗效观察[J]. *中医学报*, 2018, 33(10): 2012-2015.
- [12] 彭喜洋, 王月爱, 陈晓琼, 等. 瓜蒌薤白半夏汤对冠心病痰浊痹阻证患者室壁运动幅度的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022,

- 42(9): 1523–1529.
- [13] HE D, HUANG J H, ZHANG Z Y, et al. A network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Liuwei Dihuang pill in treating type 2 diabetes mellitus[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 3989–4005.
- [14] PARK J, HA S H, ABEKURA F, et al. 4-O-carboxymethylascocochlorin inhibits expression levels of on inflammation-related cytokines and matrix metalloproteinase-9 through NF- κ B/MAPK/TLR4 signaling pathway in LPS-activated RAW264.7 cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 304.
- [15] NEWBY L K, MARBER M S, MELLONI C, et al. Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: A randomised phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2014, 384(9949): 1187–1195.
- [16] ELKHAWAD M, RUDD J H, SAROV-BLAT L, et al. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on vascular and systemic inflammation in patients with atherosclerosis[J]. *JACC Cardiovascular Imaging*, 2012, 5(9): 911–922.
- [17] MUNJAL A, KHANDIA R. Atherosclerosis: Orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition[J]. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2020, 120: 85–122.
- [18] WOLF M P, HUNZIKER P. Atherosclerosis: Insights into vascular pathobiology and outlook to novel treatments[J]. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2020, 13(5): 744–757.
- [19] CAO H, JIA Q L, YAN L, et al. Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced RAW264.7 macrophage foam cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 6093.
- [20] KATTOOR A J, KANURI S H, MEHTA J L. Role of ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(9): 1693–1700.
- [21] 刘孟楠, 韩梅, 秦旭佩, 等. 基于内质网应激探讨蛭龙活血通瘀胶囊对 ox-LDL 诱导巨噬细胞凋亡及泡沫细胞形成的影响[J]. *中药材*, 2021, 44(6): 1463–1469.
- [22] 于红红, 俞琦, 许滔, 等. 黄连解毒汤含药血清对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞模型自噬及炎症反应的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3828–3832.
- [23] BACCHIEGA B C, BACCHIEGA A B, USNAYO M J, et al. Interleukin 6 inhibition and coronary artery disease in a high-risk population: A prospective community-based clinical study[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2017, 6(3): e005038.
- [24] LIAO J K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(2): 540–541.
- [25] WU Y L, WANG F, FAN L H, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 97: 1673–1679.
- [26] ZHAO X N, LI Y N, WANG Y T. Interleukin-4 regulates macrophage polarization via the MAPK signaling pathway to protect against atherosclerosis[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(1): 1–9.
- [27] WANG S, ZHOU H, FENG T, et al. β -Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway[J]. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 2014, 24(3): 248–255.
- [28] ZHANG X L, WU M H, JIANG H, et al. Angiotensin II up-regulates endothelial lipase expression via the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107634.

(本文编辑 周旦)