

· 基础研究 ·

基于网络药理学探讨人参虎杖复方抗小鼠
动脉粥样硬化的作用李丹丹¹ 王 娅¹ 任智雄² 贾子君¹ 梅 俊¹ 张 颖¹ 周庆兵¹ 徐凤芹¹

摘要 **目的** 探讨人参虎杖复方对动脉粥样硬化小鼠的干预作用。**方法** 基于网络药理学方法,利用 TCMSP、GeneCards、David 等数据库和 CytoScape 3.6.1 软件依次检索、分析人参虎杖复作用于动脉粥样硬化潜在有效成分、作用靶点及其 GO 生物功能、KEGG 疾病信号通路,并进行可视化展示。实验验证:采用高脂饲料连续喂养 ApoE^{-/-} 小鼠 2 个月制备小鼠动脉粥样硬化模型,造模成功后按随机数字表法分为模型组、人参虎杖复方水煎剂组,每组 6 只;同时 6 只同期 C57/BL6J 小鼠作为对照组。以人参 10 g 和虎杖 12 g 折算临床等效剂量制备复方水煎剂连续灌胃 12 周。采用病理染色、ELISA 检测血清白介素 1 β (IL-1 β) 含量,观察其对小鼠动脉粥样硬化的干预作用。**结果** 人参虎杖复作用于 141 个动脉粥样硬化靶点,共有 120 个潜在有效成分作用于 28 个核心靶点,其中 IL-1 β 、IL-6、AP-1 转录因子亚基 (JUN)、丝裂原活化蛋白激酶 1、3、8、14 (MAPK1、MAPK3、MAPK8、MAPK14)、单核细胞趋化因子 (MCP-1/CCL2)、表皮生长因子 (EGF) 及受体 (EGFR) 可能为人参虎杖复方治疗动脉粥样硬化的重要靶点;涉及的生物过程主要包括调控转录因子活性、对血管内皮生长因子刺激的反应、一氧化氮 (NO) 生物合成过程的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控等;涉及的信号通路主要包括 NOD 样受体信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、Toll 样受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) - 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、HIF-1 信号通路、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路、MAPK 信号通路等。动物实验初步表明:与模型组比较,人参虎杖复方水煎剂可以降低动脉粥样硬化小鼠血清 IL-1 β 含量 ($P < 0.01$),减少 AS 小鼠主动脉斑块部位炎症细胞黏附、增加斑块内胶原纤维稳定性和血管中膜连续性。**结论** 人参虎杖复方可能主要通过作用于炎症靶点,进而调节炎症反应相关信号通路发挥干预动脉粥样硬化的作用。

关键词 人参;虎杖;动脉粥样硬化;网络药理学;炎症

Anti-Atherosclerotic Effect of Ginseng and Polygonum cuspidatum Compound in Mice Based on Network Pharmacology LI Dan-dan¹, WANG Ya¹, REN Zhi-xiong², JIA Zi-jun¹, MEI Jun¹, ZHANG Ying¹, ZHOU Qing-bing¹, and XU Feng-qin¹ 1 Institute of Gerontology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing (100091); 2 Department of Emergency, Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing (100040)

ABSTRACT **Objective** To investigate the intervention effect of Ginseng and Polygonum cuspidatum compound in atherosclerosis mice. **Methods** Based on the network pharmacology method, TCMSP, Gene cards, David and other databases and the software of CytoScape 3.6.1 were used to successively retrieve and analyze the potential effective components, targets, GO biological function and KEGG disease signal pathway of Ginseng and Polygonum cuspidatum compound on atherosclerosis, and then visualized them. Experimental verification: ApoE^{-/-} mice were continuously fed with high-fat diet for 2 months to establish atherosclerosis model in mice. After successful modeling, the rats were divided into model group and Ginseng and Polygonum cuspidatum compound decoction group according to random number table, with 6 rats in each

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81973679, No. 81774143)

作者单位: 1. 中国中医科学院西苑医院老年病研究所 (北京 100091); 2. 中国中医科学院眼科医院急诊科 (北京 100040)

通讯作者: 徐凤芹, Tel: 010-62835397, E-mail: 18800021979@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221205.220

group. Meanwhile, C57/BL6J mice fed at the same time were selected as the control group. The compound water decoction was prepared with 10 g *Ginseng* and 12 g *Polygonum cuspidatum* as clinical equivalent dose by gavage for 12 weeks. The content of serum interleukin-1 β (IL-1 β) was detected by ELISA, pathological staining was used to observe its intervention effect on atherosclerosis in mice. **Results** *Ginseng* and *Polygonum cuspidatum* compound could act on 141 targets in atherosclerosis, and there were 120 potential effective components can act on 28 core targets, mainly including IL-1 β , IL-6, AP-1 transcription factor subunit (JUN), mitogen-activated protein kinase 1, 3, 8, 14 (MAPK1, MAPK3, MAPK8, MAPK14), monocyte chemokine 1 (MCP-1/CCL2), epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptors (EGFR), which maybe the important targets for the treatment of atherosclerosis with *Ginseng* and *Polygonum cuspidatum* compound. The biological processes involved in the 28 core targets mainly include regulatory sequence specific DNA binding transcription factor activity, cell response to vascular endothelial growth factor stimulation, positive regulation of nitric oxide biosynthesis process, positive regulation of smooth muscle cell proliferation. The signal pathways involved include nod like receptor signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) signaling pathway, Toll like receptor signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, MAPK signaling pathway, etc. Animal experiments preliminarily showed that the decoction of *Ginseng* and *Polygonum cuspidatum* compound can significantly reduce the serum IL- β content of atherosclerotic mice ($P < 0.01$). It could reduce the adhesion of inflammatory cells in the aortic plaque of atherosclerosis mice, increase the stability of collagen fibers in the plaque and the continuity of vascular media. **Conclusion** *Ginseng* and *Polygonum cuspidatum* compound can intervene atherosclerosis mainly by acting on inflammation target and regulating inflammation related signal pathway.

KEYWORDS *Ginseng*; *Polygonum cuspidatum*; atherosclerosis; network pharmacology; inflammation

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是常见慢性心脑血管疾病的病理基础, 其发病机制涉及脂质代谢失衡、氧化应激和免疫炎症反应等^[1, 2]。卡那单抗抗炎血栓形成结局研究 (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study, CANTOS) 研究显示, 针对炎症机制的防治策略为 AS 防治带来新的希望, 但与安慰剂组比较, 卡那单抗治疗增加了伪膜性结肠炎、严重感染、败血症等不良反应的发生率, 且单次卡那单抗输注的费用约为 1.6 万美元, 其应用前景不明^[3, 4]。显然, 单成分单靶点的研发策略不能完全解决 AS 这种由复杂的多基因网络调控的疾病^[5], 中药复方因含有多种有效成分为 AS 防治带来了新的方向。目前中医学者大都认为, AS 基本病机为正虚邪实, 虚以脾虚、肾虚为主, 实主要包括浊、痰、瘀、毒等, 通过辨证论治取得了一系列研究成果^[6]。基于中医学对 AS 的病机认识, 在结合自身临床实践的基础上, 笔者创制了人参虎杖复方, 该复方由人参与虎杖组成, 具有益气解毒活血的功效。人参是五加科人参 *Panax: c ginseng* C. A. Mey 的干燥根及根茎, 具有大补元气、补脾益肺、生津养血、安神益智的功效, 现代药理研究表明其具有降脂、抗炎、调节免疫等多种作用^[7-10]。虎杖为蓼

科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc 的干燥根及根茎, 具有清热解毒、散瘀止痛的作用, 其抗炎、降脂作用被多项研究予以证实^[11, 12]。目前尚未对人参虎杖复方进行整体的抗 AS 效应及机制研究, 其具体的活性成分及作用靶点也有待明确。

网络药理学方法通过综合各权威数据库收录的数据, 从多维角度系统揭示中药作用的网络机制, 并能预测中药作用途径及潜在活性成分^[13]。基于此, 本研究借助网络药理学方法分析人参虎杖复方干预 AS 的潜在靶点和相关作用机制, 通过动物实验初步揭示人参虎杖复方抗 AS 作用, 为阐明人参虎杖复方药效物质基础及作用机制提供前期基础。

材料与方法

1 数据构建 中药系统药理数据库和分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology, TCMSP) 数据库包含较为完善的中药成分靶点疾病数据, 迄今为止涵盖了常见中药共 500 种^[14], 为中医药网络药理学研究提供了极大便利。本研究依托 TCMSP 数据库, 设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) >30、类药性 (drug likeness, DL) >0.18 分别检索人参和虎杖的化学成分及作用靶

点;在 GeneCards 数据库以“atherosclerosis”为关键词全面检索确定 AS 相关疾病靶点信息。以上靶点信息均在 UniProt 数据库中转换成标准基因名,以便后续研究。

2 人参虎杖复方-活性成分-AS 靶点网络构建 CytoScape 软件是一款集构建可视化网络图、分析网络节点关系、进行基因功能注释和通路富集的离线软件,为阐明人参虎杖复方潜在活性成分在 AS 疾病靶点中的作用关系,本研究借助 CytoScape 3.6.1 软件分别对以上获取的人参虎杖复方化学成分及靶点和 AS 疾病靶点构建可视化网络图,以 Merge 功能获取交互靶点并构建“人参虎杖复方-成分-靶点-AS 网络”。

3 蛋白-蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 除成分间存在互作关系,靶点之间也有复杂的相互作用,STRING 数据库在线平台可以分析并构建指定靶点蛋白之间的相互作用关系。因此,为合理的阐明“人参虎杖复方-成分-靶点-AS 网络”中的靶点蛋白之间的互作关系,将以上获取的靶点进行 PPI 网络分析,借助 CytoScape 3.6.1 软件的 CytoNCA 插件分析每个节点度值,以 >2 倍中位度值的节点确定为人参虎杖复方参与 AS 的核心靶点。

4 GO 功能注释和 KEGG 富集分析 为说明人参虎杖复方参与调控的 AS 靶点的生物功能信息和作用的信号通路,在 DAVID 数据库中对以上获取的核心靶点进行 GO 基因本体功能注释分析和 KEGG 通路富集分析,并以气泡图进行可视化展示,最后构建了人参虎杖复方作用的 AS 核心靶点-信号通路网络以直观展示人参虎杖复方作用通路及靶点的关系。

5 动物实验

5.1 动物 6 只 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,12 只 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 背景的 ApoE^{-/-} 小鼠,体重 (18±2) g,购于北京斯贝福公司,动物许可证:SCXK (京) 2016-0002。生活环境为屏障环境,温度 (22±2) °C,湿度 (55±5) %。高脂饲料由北京斯倍福公司提供,配方为:0.15% 胆固醇,21% 脂肪,78.85% 基础维持饲料。动物实验经过中国医药研究开发中心动物实验伦理委员会批准 (No. 20200925-129)。

5.2 药物、主要试剂与仪器 人参、虎杖由西苑医院药剂科提供,产地分别为吉林、安徽安琥,经郑蕊主任鉴定为真,人参虎杖复方水提物由西苑医院制剂室制备,为保证人参虎杖水提剂质量,故进行冻干处理,以冻干粉室温密封储存。ELISA 试剂

盒,购于 Abcam 公司,货号:ad197742。油红 O 染料购于北京索莱宝公司,货号:G1260。冰冻切片机,德国 Leica 公司生产,型号:CM1900;展片器,德国 Leica 公司生产,型号:HI1210;全自动封片装置,日本 Sakura 公司生产,型号:Tissue-Tek Glas。Movat 染色试剂由中日病理实验室配置,参考《实验病理学技术图鉴》^[15]。

5.3 动物分组及造模给药 参考既往文献 [16],ApoE^{-/-} 小鼠普通维持饲料适应性喂养 1 周,高脂饲料喂养 2 个月,自由饮水。2 个月,按随机数字表法分为模型组、人参虎杖复方水煎剂组,每组 6 只,并以 6 只同期普通饲料喂养的 C57/BL6J 小鼠作为空白对照组。人参 500 g、虎杖 600 g 制备复方水提物共计 186.84 g,换算关系为“人参虎杖复方生药:人参虎杖复方水提冻干粉=1:0.17”,灌胃给药时,现用现配。按照小鼠与人给药剂量换算的传统体表面积法^[17],以成人 (70 kg) 每日人参 10 g、虎杖 12 g 生药计算小鼠等效剂量约为 29 mg/10 g 体重 [(22 g/70 kg) × 9.1],换算为人参虎杖复方水提物的等效给药剂量为 4.93 mg/10 g 体重,每日灌胃给药 1 次,连续灌胃给药 12 周,同时空白组、模型组予饮用水灌胃。

5.4 检测指标及方法

5.4.1 血清 IL-1β 含量 给药结束后,末次给药 1 h,异弗烷吸入麻醉,球后静脉取血,室温静置 1 h,3 000 r/min 4 °C 离心 10 min,吸取上层血清进行检测;取出 ELISA 试剂盒,平衡至室温后,按照说明书检测小鼠血清 IL-1β 含量。

5.4.2 病理染色 经心脏充分灌流后,自主动脉根部至髂动脉分叉处整体分离、取下主动脉;在体视镜下仔细剥离外膜结缔组织至完全干净,以眼科剪沿纵轴轻轻剖开主动脉;按照油红 O 染液说明书参考相关文献 [18],配置油红 O 工作液进行染色,染色后将血管轻轻平铺于黑色卡纸上,防止出现气泡或者血管脱水,快速拍照、观察小鼠主动脉斑块情况。主动脉窦部在 -20 °C 条件下行冰冻切片处理,切片厚度 8 μm,连续切片至观察到 3 个主动脉瓣完全融合开始留取 8 张切片,参考《实验病理学技术图鉴》^[15]进行 Movat 染色,在显微镜下观察斑块各成分组成的变化。

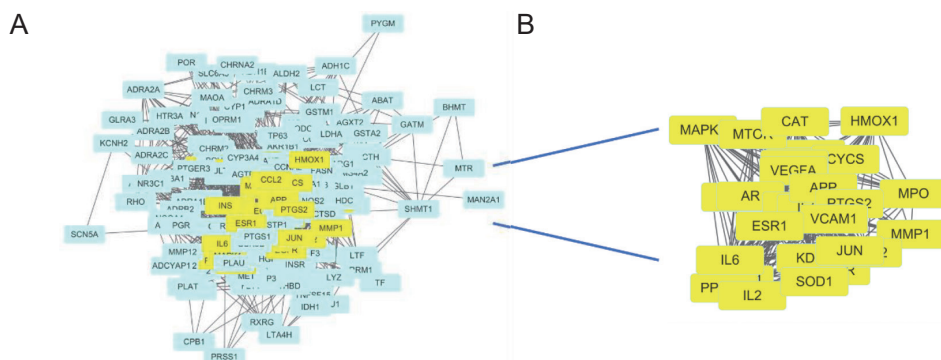
6 统计学方法 采用 SPSS 23 软件统计分析、GraphPad Prism 8 软件作图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异选择单因素方差分析, LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 人参虎杖复方-活性成分-疾病靶点网络 在 TCMSP 数据库检索到人参虎杖复方具有相关作用靶点的成分共 146 个, 共同含有的成分是 β -谷甾醇和 3, 5-二甲基对茴香酸, 人参单独含有的成分共 98 个, 虎杖有 46 个, 总共作用于 205 个已知靶点。以“Atherosclerosis”在 GeneCards 数据库检索得到 4 063 个靶点, 人参虎杖复方作用的 205 个靶点中有 141 个靶点是与 AS 疾病相关的靶点。

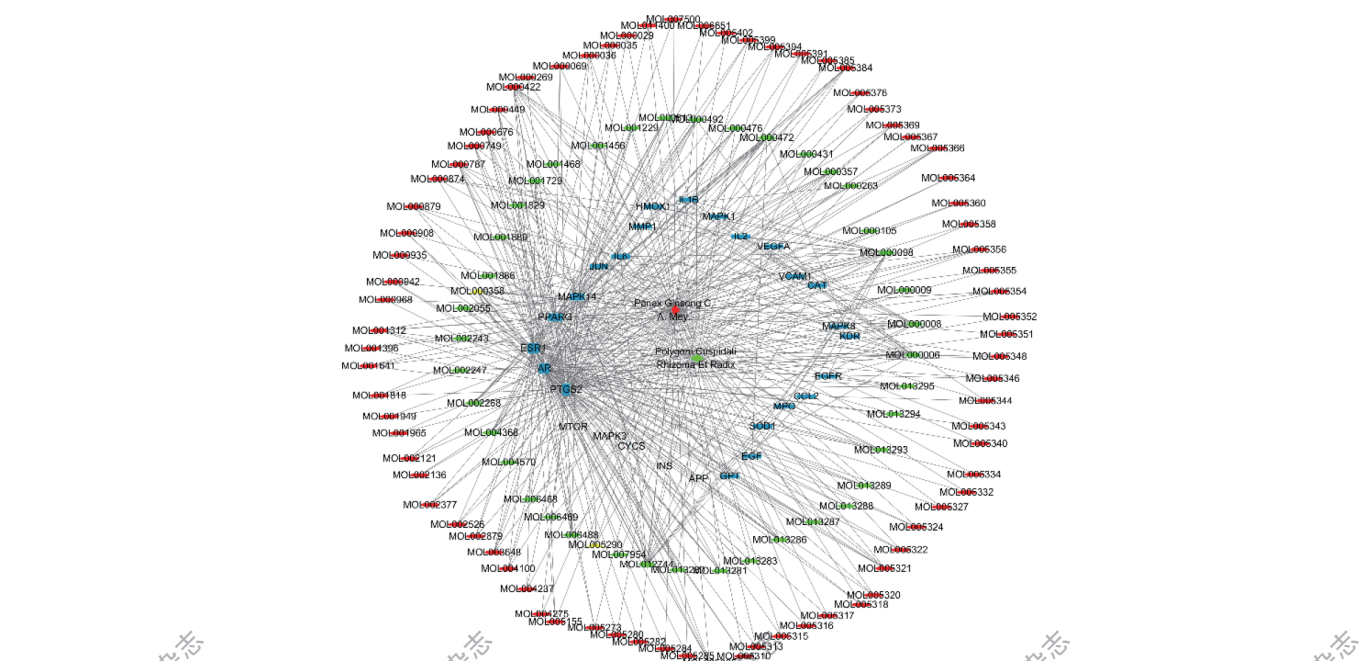
1.1 人参虎杖复方抗 AS 效应靶点 (图 1、2) 检索到的 141 个靶点 PPI, 网络如图 1A, PPI 网络中节点度值最大为 89, 中位数是 17。本研究

以 >2 倍中位数值度的节点确定为人参虎杖复方作用于 AS 的核心靶点, 共 28 个 (图 1B), 包括环加氧酶 2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、IL-6、核受体过氧化物酶体增殖激活受体 gamma (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase14, MAPK14)、基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1) 等。28 个核心靶点及映射得到的 120 个潜在活性成分构建的“人参虎杖复方-活性成分-AS 靶点”网络如图 2, 人参虎杖复方作用的 AS 核心靶点包括 IL-1 β 、IL-2、IL-6、AP-1 转录因子亚基 (AP-1



注: A 为蛋白-蛋白相互作用网络 (PPI); B 为核心靶点互作网络

图 1 人参虎杖复方作用于 AS 的核心靶点网络



注: 网络包括 150 个节点, 其中外层红色节点表示人参中作用于 AS 靶点的活性化合物, 中层绿色节点为虎杖中作用于 AS 的活性化合物, 内圈蓝色节点为人参、虎杖作用于 AS 的核心靶点; 连接节点的边表示两节点间有直接关系, 用度值进行衡量节点间的关系强度, 度值越大, 表示该节点代表的化合物或靶点在整个网络中参与的过程越多, 可能是具有关键作用的靶点或者活性化合物

图 2 “人参虎杖复方-活性成分-AS 靶点”网络

transcription factor subunit, JUN)、MAPK1、MAPK8、MAPK14、血管细胞黏附因子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM1)、PTGS2、MMP1、PPARG、ESR1、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、激酶插入区受体 (kinase insert domain receptor, KDR)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1) 共 15 个。另外 13 个靶点只与虎杖的活性成分有直接关系, 分别是雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, MTOR)、MAPK3、CCL2、细胞色素 C (cytochrome C, CYCS)、EGF、EGFR、VEGFA、淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、胰岛素 (insulin, INS)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, GTP)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)。

1.2 人参虎杖复方活性成分抗 AS 靶点分析 (表 1) 人参虎杖复方-活性成分-AS 靶点网络成分节点度值中位数为 2, >2 倍度值中位数的节点有 29 个, 集中作用于 27 个 AS 靶点。作用靶点数最多的是虎杖中的槲皮素和白藜芦醇, 共同靶点分别是 ESR1、AR、PTGS2、IL-6、MAPK1、JUN、CCL2、IL-1 β 、MPO、VCAM1、SOD1、VEGFA、

MAPK14, 槲皮素其他作用靶点为 MMP1、EGF、EGFR、HMOX1、IL-2、PPARG, 白藜芦醇其他靶点为 MAPK3、MTOR、MAPK8、CAT; 人参中的山柰酚靶点数为 9 个, 分别是 ESR1、PTGS2、MMP1、JUN、VCAM1、MAPK8、HMOX1、AR、PPARG、MAPK14。

2 GO 功能富集分析 (图 3) 对 28 个核心靶点基因 GO 功能分析后, 根据 $FDR < 0.05$ 确定了其参与的前 20 个生物过程。主要包括调控转录因子活性、对血管内皮生长因子刺激的反应、NO 生物合成过程的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控等。

3 KEGG 通路富集分析 (图 4) 28 个核心靶点进行 KEGG 通路富集分析后, 以 $FDR < 0.05$ 筛选出前 15 条信号通路。基因富集程度最高的是 NOD 样受体信号通路, 共有 7 个基因参与该通路, 其次分别是 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路、Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路等。

4 人参虎杖复方作用的核心靶点-信号通路网络 (图 5、6) 人参虎杖复方参与调节的信号通路及每条通路中的靶点如图 5 所示, 最外圈矩形则为 15 条信号通路, 菱形节点是人参虎杖复方作用的 28 个核心靶点, 圆形节点表示成分。人参虎杖复方参与调节的免疫炎症通路及相关的靶点可见图 6, 主

表 1 主要潜在活性成分及作用靶点数相关信息

ID	成分	靶点	中药	ID	成分	靶点	中药
MOL000098	槲皮素	19	虎杖	MOL004570	间苯二酚	3	虎杖
MOL012744	白藜芦醇	17	虎杖	MOL013287	毒扁豆次碱	3	虎杖
MOL000006	木犀草素	14	虎杖	MOL000263	齐墩果酸	3	虎杖
MOL000008	芹菜素	12	虎杖	MOL001229	顺式白藜芦醇	3	虎杖
MOL000472	大黄素	9	虎杖	MOL001829	葡萄糖欧鼠李苷	3	虎杖
MOL000492	(+)-儿茶素	6	虎杖	MOL000422	山柰酚	10	人参
MOL002268	大黄酸	6	虎杖	MOL000787	元阿片碱	6	人参
MOL000357	胡萝卜苷	5	虎杖	MOL000676	邻苯二甲酸二丁酯	5	人参
MOL000476	大黄素	5	虎杖	MOL001312	棕榈油酸甲酯	5	人参
MOL000513	3, 4, 5-三羟基苯甲酸	5	虎杖	MOL005305	泽兰黄酮	5	人参
MOL001729	结晶酚	5	虎杖	MOL005321	Frutinone A	5	人参
MOL002055	决明酮	5	虎杖	MOL005384	苏齐内酯	5	人参
MOL004368	金丝桃苷	5	虎杖	MOL000449	豆甾醇	4	人参
MOL006488	甲基大黄素	5	虎杖	MOL003648	山槐素	4	人参
MOL013286	迷入醇	5	虎杖	MOL005356	吉九里香碱	4	人参
MOL013281	6, 8-二羟基-7-甲氧基黄酮	5	虎杖	MOL000874	丹皮酚	3	人参
MOL013293	6-羟基芦柰素-8-单甲醚	5	虎杖	MOL005354	人参炔 D	3	人参
MOL013295	芦荟大黄素-8-葡萄糖苷	3	虎杖	MOL005366	锦葵酸	3	人参
MOL013289	虎杖苷	3	虎杖	MOL004100	N-水杨基-水杨胺	3	人参
MOL013280	(-)-3-羟基-4-甲氧基-8-9-亚甲基二氧基翼果烷	5	虎杖	MOL000358	β -谷甾醇	12	虎杖、人参

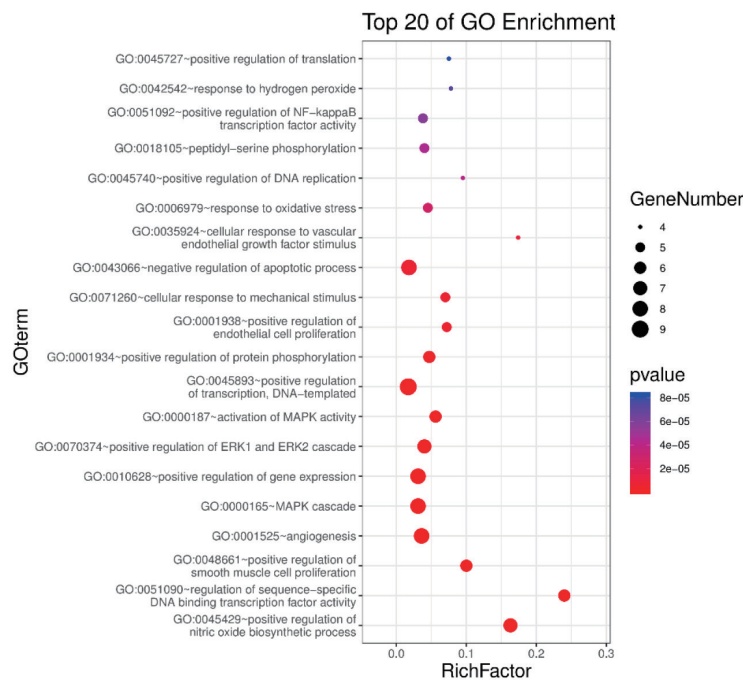


图 3 28 个核心靶点 GO 生物过程功能分析

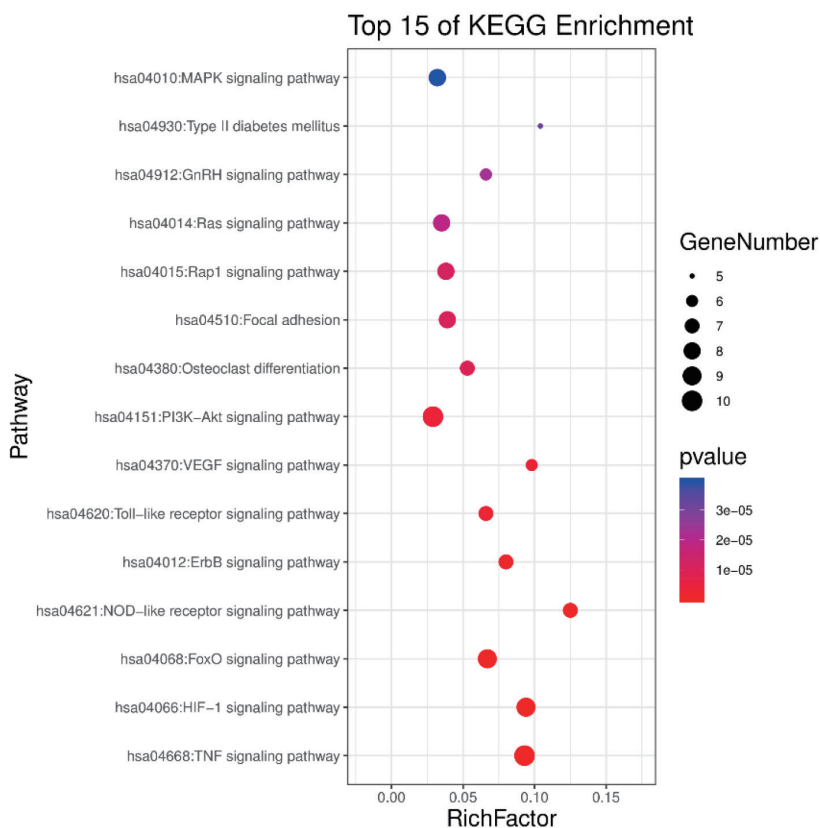


图 4 28 个核心靶点与 KEGG 通路富集分析

要包括 NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路的 10 个靶点，分别是 IL-1B、IL-6、JUN、MAPK1、MAPK3、MAPK8、MAPK14、CCL2、EGF、EGFR。

5 人参虎杖复方对小鼠 AS 的影响

5.1 人参虎杖复方对 AS 小鼠斑块的影响 (图 7)

空白对照组大体油红 O 染色可见正常对照组小鼠主动脉无斑块形成，主动脉根部切片 Movat 染色亦未见

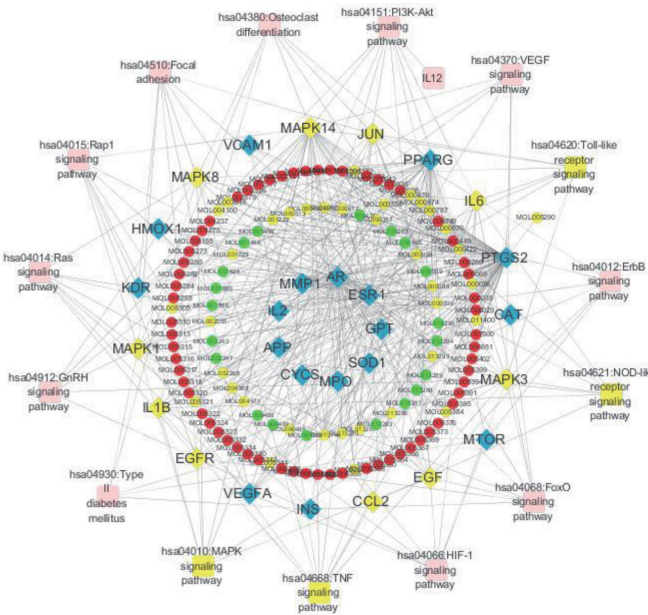


图 5 人参虎杖复方作用的核心靶点 - 信号通路网络

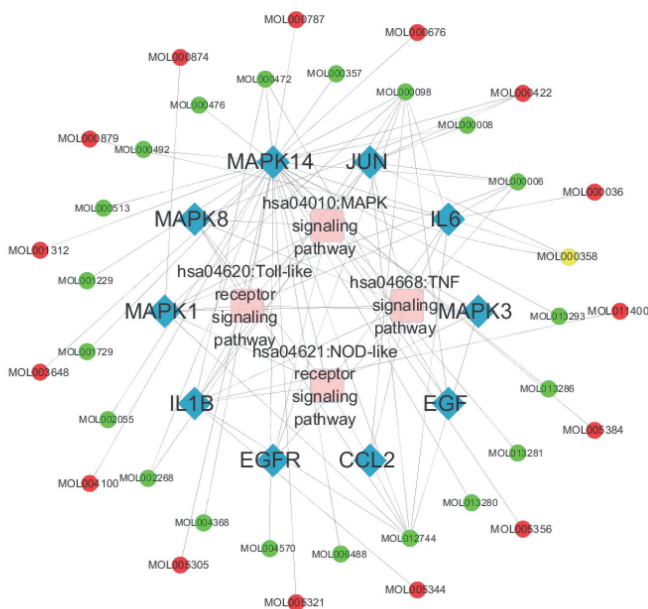
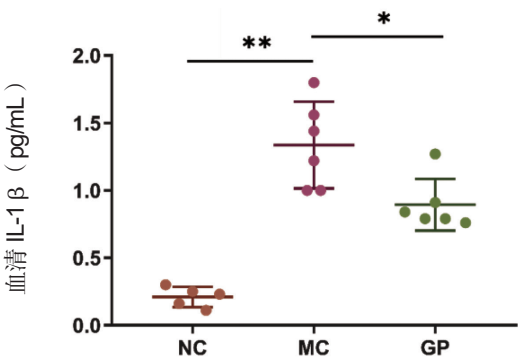


图 6 人参虎杖复方作用的免疫炎症相关通路 - 靶点网络

斑块结构, 血管壁结构正常, 弹力纤维弯曲连续、富于弹性, 血管壁中膜血管平滑肌周围有少量胶原纤维和网状纤维结构。模型组小鼠主动脉在油红 O 染色后可见被染红的斑块图像管腔, 以主动脉弓小弯处、主动脉弓分支处、腹主动脉远段、髂动脉分支处斑块形成显著, 主动脉根部切片 Movat 染色后, 可见斑块显著凸向管腔, 斑块表面有大量炎症细胞浸润黏附, 血管中膜失去连续性、血管壁弹力纤维绷直、失去弹性, 胶原纤维、网状纤维大量增生。人参虎杖复方水煎剂组用药后, 小鼠主动脉斑块面积有所减少, 主动脉根部切片 Movat 染色显示斑块炎症浸润有所减轻, 炎症细胞黏附减少, 斑块内胶原纤维结构稳定, 覆盖包裹在脂质表面, 血管中膜连续性较未干预的 AS 小鼠有所改善。

5.2 各组小鼠血清 IL-1 β 水平比较 (图 8) 与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-1 β 含量较增加 ($P<0.001$); 人参虎杖复方用药干预后, 人参虎杖复方水煎剂组小鼠血清 IL-1 β 含量下降 ($P<0.01$)。

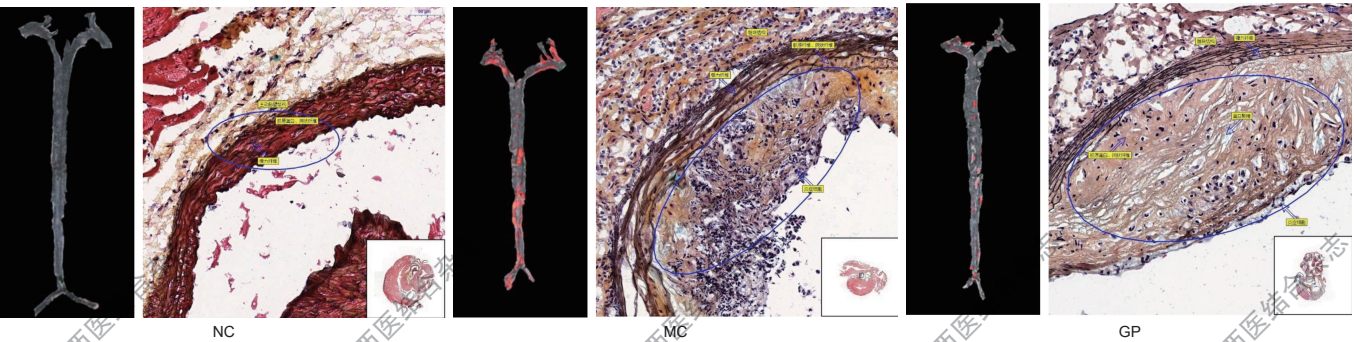


注: * $P<0.01$, ** $P<0.001$

图 8 各组小鼠血清 IL-1 β 水平比较

讨论

炎症反应是 AS 发病及进展的关键病理机制^[1, 2], 本研究通过网络药理学分析, 发现人参虎杖复方可



注: NC 为空白对照组; MC 为模型组; GP 为人参虎杖复方水煎剂组; 下同

图 7 各组主动脉病理染色结果 (Movat 染色, $\times 400$)

作用于多个靶点, 如 IL-1 β 、IL-6、JUN、MAPK1、MAPK3、MAPK8、MAPK14、CCL2、EGF、EGFR, 涉及多条免疫炎症信号通路, 主要包括 NOD 样受体信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路等, 表明人参虎杖复方治疗 AS 的作用可能主要是通过干预炎症反应实现的。

IL-1 β 是主要促炎因子, 由其无活性前体 pro-IL-1 β 在半胱天冬酶 1 (Caspase-1) 裂解作用下激活, 进而促进下游 IL-6、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等炎性因子、趋化因子的产生。无活性前体 pro-IL-1 β 的转录需要 TLR/MAPK/AP-1 信号通路介导^[19], Caspase-1 的活化则由 NOD 样受体信号通路形成的 NLRP3 炎性小体激发^[20]。本研究表明人参虎杖复方可降低 AS 小鼠血清 IL-1 β 含量, 具有抗 AS 炎症反应的作用。不仅可直接作用于 IL-1 β 、IL-6 靶点, 还可能通过影响 TLR/MAPK/AP-1 信号通路和 NOD 样受体信号通路进而介导 pro-IL-1 β 表达与 Caspase-1 的活化从而影响 IL-1 β 的产生, 进而干预了 IL-1 β 介导的下游炎症反应。

在抗 AS 的具体活性成分方面, 人参虎杖复方主要潜在有效成分可能是 β -谷甾醇、山柰酚、元阿片碱、豆甾醇、槲皮素、白藜芦醇、芹菜素、大黄素等, 既往研究也发现 β -谷甾醇和豆甾醇具有抗炎、降低胆固醇吸收作用^[21, 22], 山柰酚可降低 ox-LDL 诱导的脐静脉内皮细胞炎症和氧化应激反应^[23], 异吡啶类生物碱元阿片碱具有抑制肝星状细胞表型转变后的增殖活化、诱导细胞凋亡作用^[24], 以及虎杖^[25]及其单体成分如虎杖苷^[26, 27]、大黄素^[28]、白藜芦醇^[29]具有抗炎作用, 推测上述成分是人参虎杖复方抗 AS 的物质基础。人参皂苷是人参中研究最多、药理活性最为明确的有效部位, 人参皂苷 Rh1、Rh2、Rh3、Rg3、Rg5 具有防治肿瘤的药理作用, Rg1、Rg2、Rb2 等具有良好的心血管药理活性, 可抗血小板聚集、改善心肌缺血、抗氧化。依据本研究采用的网络药理学方法并未纳入人参皂苷进行靶点预测, 但是并不意味着本研究否认人参皂苷早心血管疾病预防中的药理作用, 反而表明初药理作用研究广泛的人参皂苷外, 人参中尚有多种活性成分是潜在的发挥药理作用的物质基础。

本研究基于网络药理学方法, 首次对益气活血解毒人参虎杖复方治疗 AS 的潜在效应靶点进行了探讨, 研究揭示了人参虎杖复方抗 AS 具有多成分、多靶点和多通路协同作用的特点, 并确定了具体的靶点与相

关通路, 这些靶点与通路炎症反应密切相关。动物实验可见正常小鼠在同期常规饲料喂养时, 主动脉血管内未出现任何病变, 模型组 AS 小鼠的主动脉内明显可见斑块形成, 内含大量炎性细胞浸润, 而经过人参虎杖复方灌胃给药干预 12 周的 AS 小鼠主动脉斑块面积有所减少。Movat 染色可将斑块内不同成分染成不同颜色, 主动脉根部切片 Movat 染色显示人参虎杖复方减轻了 AS 小鼠斑块炎症浸润状态, 炎症细胞黏附减少, 推测这可能与 β -谷甾醇、豆甾醇、山柰酚、虎杖苷、大黄素、白藜芦醇等活性成分的抗炎作用相关。

动物实验初步证实人参虎杖复方可以降低 AS 炎症因子 IL-1 β 表达, 具有抗 AS 炎症反应作用, 为将来进一步深入阐明该方治疗 AS 作用机制提供了十分重要方向。对于人参虎杖抗 AS 炎症的药效物质基础、作用机制仍需体外实验进行阐明, 是本课题组下一步主要工作之一。

利益冲突: 所有作者均声明在本研究中无相关利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Jukema RA, Ahmed TAN, Tardif JC. Does low-density lipoprotein cholesterol induce inflammation? If so, does it matter? Current insights and future perspectives for novel therapies[J]. BMC Med, 2019, 17 (1): 197.
- [2] Chiva-Blanch G, Badimon L. Cross-talk between lipoproteins and inflammation: the role of microvesicles[J]. J Clin Med, 2019, 8 (12): 2059.
- [3] Weber C, von Hundelshausen P. CANTOS trial validates the inflammatory pathogenesis of atherosclerosis: setting the stage for a new chapter in therapeutic targeting[J]. Circ Res, 2017, 121 (10): 1119-1121.
- [4] Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial [J]. Lancet, 2017, 391 (10118): 319-328.
- [5] 陈可冀, 刘玥. 多效药片与心血管疾病的预防: 证据、评价与思考[J]. 中国循证医学杂志, 2015, 15 (7): 745-748.

- [6] 李婧, 徐凤芹, 王海云, 等. 徐凤芹教授治疗慢性稳定性心绞痛经验 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15 (1): 81–83, 118.
- [7] 白玉洁, 郑厚胜, 王英平, 等. 人參免疫调节作用研究进展 [J]. 特产研究, 2019, 41 (1): 99–103.
- [8] 于雪妮, 冯小刚, 张建民, 等. 人參化学成分与药理作用研究新进展 [J]. 人參研究, 2019, 31 (1): 47–51.
- [9] 赵晓燕, 梁英然, 薛玉润, 等. 人參对异丙肾上腺素致心肌缺血大鼠的保护作用 [J]. 中国药师, 2019, 22 (6): 1059–1062, 1084.
- [10] 高嘉敏, 邓剑平, 王一飞, 等. 黄连与人參协同抗氧化活性的研究 [J]. 现代食品科技, 2019, 35 (6): 110–118, 199.
- [11] 李姣姣, 于猛, 高源, 等. 基于谱效关系的中药虎杖抗炎活性成分探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (12): 208–213.
- [12] 赵圣剑, 田霞霞. 虎杖提取物血脂调节作用及其机制研究 [J]. 中医药学报, 2019, 47 (3): 41–46.
- [13] 赵静. 对中药网络药理学发展的思考 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32 (11): 873–875.
- [14] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41 (1): 171–178.
- [15] 潘琳主编. 实验病理学技术图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 83–85.
- [16] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14: 133–140.
- [17] 张均田主编. 现代药理实验方法 (下册) [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1143.
- [18] 陈小翠, 马依彤, 孙明慧, 等. 小鼠主动脉斑块大体油红 O 染色技术的改进 [J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43 (10): 1308–1311, 1317.
- [19] Hornung V, Latz E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation [J]. Eur J Immunol, 2010, 40 (3): 620–623.
- [20] 陈馨浓, 郭晓辰, 张军平, 等. 需肌醇酶 1 (IRE1) 激活 NLRP3 炎性体在动脉粥样硬化中的作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34 (4): 373–378.
- [21] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究 [J]. 中国粮油学报, 2018, 33 (12): 80–86, 94.
- [22] 卢婧霞, 郑祖国, 徐志猛, 等. 植物甾醇降血脂机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (21): 4552–4559.
- [23] 康桂兰, 景增秀. 山奈酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34 (4): 525–530.
- [24] 吴新玉, 李靖, 张金娟, 等. 原阿片碱对人肝星状细胞 HSC-LX2 增殖的抑制作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2019, 30 (23): 3210–3215.
- [25] 杨蕾, 张正菊, 相瑞阳, 等. 虎杖对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 PPAR γ /NF- κ B 信号途径的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (5): 591–596.
- [26] Zou J, Yang Y, Yang Y, et al. Polydatin suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via NF- κ B pathway [J]. Elsevier Masson SAS, 2018, 108: 130–136.
- [27] Peng Y, Xu J, Zeng Y, et al. Polydatin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of reverse cholesterol transport [J]. Phytomedicine, 2019, 62: 152935.
- [28] 张国华, 胡淑橙, 郁利. 大黄素对大鼠实验性牙周炎模型中 NLRP3 炎性小体通路的影响研究 [J]. 中国药师, 2019, 22 (9): 1596–1601.
- [29] Li YX, Wang P, Yang XF, et al. SIRT1 inhibits inflammatory response partly through regulation of NLRP3 inflammasome in vascular endothelial cells [J]. Mol Immunol, 2016, 77: 148–156.

(收稿: 2021–12–08 在线: 2023–03–01)

责任编辑: 白霞