

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.011

两面针活血化癥机制网络药理学研究*

马庆¹, 郭国松², 陈剑洪¹, 詹若挺^{3△}, 韩正洲¹

(1. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110; 2. 南方医科大学南方医院白云分院, 广东 广州 510500; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要:目的 基于网络药理学方法探讨两面针活血化癥的作用机制。方法 采用计算机检索 TCSP 数据库和 PharmMapper 数据库, 筛选两面针的活性成分及其相关靶点; 通过 OMIM, TTD, String 等数据库筛选血瘀证相关靶点, 并构建蛋白交互网络; 采用 Cytoscape 3.5.1 软件构建活性成分-靶点-疾病网络, 获得与两面针活血化癥直接相关的靶点; 利用 DAVID 数据库对筛选的靶点进行 KEGG 通路富集, 采用 Cytoscape 3.5.1 软件进行相关靶点生物学功能分析, 最终构建活性成分-关键靶点-通路网络; 采用分子对接技术验证其成分与靶点。结果 共获得两面针活性成分 19 个, 包括白屈菜红碱、血根碱、香叶木苜、芝麻脂素等; 直接靶点 24 个, 包括环氧合酶-2、内皮型一氧化氮合酶、凝血酶原、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1、血管内皮生长因子受体 2、基质金属蛋白酶 3、纤维蛋白原 γ 链等; 与两面针活血化癥最相关的通路包括血管内皮生长因子、血小板活化、环磷酸腺苷、附着斑块、肿瘤坏死因子、磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶等信号通路; 成分和靶点的分子对接结果均低于 -5 kcal/mol 。结论 两面针通过多成分、多靶点、多通路发挥活血化癥作用, 其作用机制可能与血管内皮生长因子、血小板活化等信号通路有关。

关键词: 网络药理学; 两面针; 活血化癥; 作用机制; 分子对接

中图分类号: R932; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)11-0039-08

Network Pharmacology of the Mechanism of Zanthoxyli Radix for Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis

MA Qing¹, WU Guosong², CHEN Jianhong¹, ZHAN Ruoting³, HAN Zhengzhou¹

(1. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong, China 518110; 2. Baiyun Branch of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 510500; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis based on network pharmacology. **Methods** Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCSP) and PharmMapper server were searched to screen the active ingredients and related targets of Zanthoxyli Radix. The related targets of syndrome of blood stasis were screened through OMIM, TTD, String and other databases, and the protein-protein interaction (PPI) network was constructed. The active ingredients-targets-diseases network was constructed through Cytoscape

*基金项目: 国家科技重大专项子课题[2014ZX09301306-001]。

第一作者: 马庆, 男, 硕士, 中级工程师, 研究方向为中药资源开发, (电子信箱)maq@999.com.cn。

△通信作者: 詹若挺, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药资源开发, (电子信箱)ruotingzhan@vip.163.com。

表明, 黄酮类化合物在款冬花生品、蜜炙品及甘草炙品中均较稳定, 可用来衡量款冬花生品及炮制品的质量优劣。李明晓等^[9]研究发现, 甘草水可减少款冬花中有毒生物碱的含量, 有较好的解毒作用。

本研究中以甘草水和炼蜜作为辅料炮制款冬花, 并在传统炮制方法基础上研究了甘草水和炼蜜共制款冬花的炮制方法, 从芦丁、槲皮素含量看, 款冬花的最优炮制方法依次为甘草蜜复制和甘草蜜炙。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 346.
- [2] 曹坤, 徐溢, 王昌瑞, 等. 款冬花活性成分的分离纯化和质量控制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(4): 619-625.
- [3] 韩聪聪. 款冬花中萜类和黄酮类化合物分离技术研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2015.

- [4] 郑开颜, 韦杰, 王乾, 等. 款冬花化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(7): 89-92.
- [5] 史辑, 景海漪, 卢莹, 等. 综合评分法优选辅料甘草汁的制备工艺[J]. 中国医药指南, 2014, 12(8): 40-41.
- [6] 刘效栓, 高小恒, 李喜香. 正交试验法优选蜜炙款冬花的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 56-58.
- [7] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范: 第一册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 附录 9.
- [8] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典(古代部分)[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1998: 204.
- [9] 李明晓, 周臻, 田素英, 等. 正交试验优选甘草制款冬花的炮制减毒工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 17-20.
- [10] 卢紫娟. 款冬花蜜炙品商品规格等级及蜜炙前后的化学差异研究[D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [11] 薛非非, 王勃, 吕辰子, 等. 款冬花不同炮制品的 HPLC 指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 7-14.

(收稿日期: 2021-08-30; 修回日期: 2022-02-17)

3.5.1 software to obtain the targets directly related to Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways analysis of the screened targets was conducted through DAVID database. The biological functions of related targets were analyzed through Cytoscape 3.5.1 software. Finally the active ingredients – key targets – pathways network was constructed. The ingredients and targets were verified through molecular docking technology.

Results Nineteen active ingredients were obtained from Zanthoxyli Radix, including chelerythrine, sanguinarine, diosmetin, sesamin and so on. Twenty – four direct targets were obtained from Zanthoxyli Radix, including cyclooxygenase – 2 (COX – 2), endothelial nitric – oxide synthase (eNOS), prothrombin (F2), serine – threonine protein kinase (AKT1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), matrix metalloproteinase – 3 (MMP3), fibrinogen γ chain (FGG) and so on. The most relevant pathways for promoting blood circulation and removing blood stasis with Zanthoxyli Radix included vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet activation, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), focal adhesion, tumor necrosis factor (TNF), phosphatidylinositol 3 – kinase / serine – threonine protein kinase (PI3K / AKT) and other signaling pathways. The molecular docking results of ingredients and targets were all lower than – 5 kcal / mol. **Conclusion** Zanthoxyli Radix plays a role in promoting blood circulation and removing blood stasis through the multi – components, multi – targets and multi – channels, and its mechanism may be related to VEGF, platelet activation and other signaling pathways.

Key words: network pharmacology; Zanthoxyli Radix; promoting blood circulation and removing blood stasis; mechanism; molecular docking

活血化瘀药具有通利血脉、促进血行、消散瘀血等功效,临床可用于抗血栓、抗凝血、预防动脉硬化斑块形成等^[1-2]。两面针为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根,具有活血化瘀、行气止痛、解毒消肿等功效^[3],可有效治疗击打损伤、气滞血瘀所致胃痛等病症^[4]。网络药理学融合了系统生物学、药理学、计算机技术,从系统和整体的角度关联药物和疾病^[5-6],建立成分、靶点和靶蛋白、基因的相互关系,提供中药机制探索和新药研发的新策略^[7]。本研究中基于网络药理学探讨了两面针活血化瘀的作用机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 活性成分、靶点的筛选及其网络构建

基于中药及中药制剂的吸收 – 分布 – 代谢 – 排泄性质[即药物口服生物利用度(OB) > 30% 和类药性(DL) > 0.18]及“类五药原则”[即相对分子质量(Mr) < 500、氢键受体数(Hacc) < 10、氢键供体数(Hdon) < 5、油水分配系数(LogP) < 5]^[8-9],检索TCMSP数据库(<http://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>),筛选两面针的活性成分;检索PharmMapper数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>),预测两面针的作用靶点,限定为人源靶点,筛选药效基因匹配分值排名前10的靶点,并将靶点的蛋白质数据库编号(PDB ID)导入UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>),获得各靶点的UniProt ID,去除重复项,建立两面针靶点数据库,导入String数据库(<https://string-db.org/>),构建两面针蛋白互作网络(PPI),采用Cytoscape 3.5.1软件构建两面针的活性成分 – 预测靶点网络。

1.2 活血化瘀靶点确认及其网络构建与分析

检索OMIM数据库(<https://omim.org/>)和TTD数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库中与凝血 –

抗凝和血液循环相关的靶点,关键词为“thrombus”“coagulant”,在String数据库中导入相关靶点并构建PPI。采用Cytoscape 3.5.1软件构建两面针活性成分 – 靶点 – 疾病网络,提取交集靶点,即为两面针活血化瘀的潜在作用靶点;利用该软件的Network Analyzer功能分析靶点的度值和介数中心度^[10],筛选条件为 ≥ 1 倍介数中心度的中位数及 ≥ 2 倍度值的中位数,获得靶点的度值和介数中心度越大,靶点越关键。

1.3 KEGG 通路富集及 GO 生物学功能分析

通过DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对关键靶点进行KEGG通路富集,采用Cytoscape 3.5.1软件的ClueGO插件对相关靶点进行GO生物学功能分析,采用其Merge功能合并以上网络,构建活性成分 – 关键靶点 – 通路网络。

1.4 分子对接验证

检索PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>),下载关键靶点的结构,并检索PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),获得活性成分的3D结构文件,分别采用AutoDock 1.5.6软件、Discovery studio 2.5软件对靶点和活性成分进行去水、加氢、计算电荷等预处理,采用AutoDock Vina 1.2.3软件对靶点和成分进行分子对接,采用Pymol软件绘图。成分与靶点的最小结合能小于0时,表明两者能自发结合,以最小结合能 ≤ -5 kcal / mol作为分子对接的验证依据^[11]。

2 结果

2.1 活性成分的收集与筛选

通过TCMSP数据库获得两面针化学成分59个,最终筛选出符合要求的活性成分19个,其中白屈菜红碱、血根碱、香叶木苷、芝麻脂素为主要活性成分^[12]。详见表1。

表 1 两面针活性成分基本信息

Tab. 1 Basic information of active ingredients of Zanthoxyli Radix

活性成分 ID	活性成分名称	Mr	AlogP	Hdon	Hacc	DL	OB(%)
MOL001458	黄连碱	320.34	3.25	0	4	0.86	30.67
MOL001461	二氢白屈菜红碱	349.41	3.91	0	5	0.81	32.73
MOL001474	血根碱	332.35	3.47	0	4	0.86	37.81
MOL001558	芝麻脂素	354.38	2.24	0	6	0.83	56.55
MOL002644	珊瑚菜素	300.33	3.64	0	5	0.28	40.19
MOL002663	茴苳碱	259.28	2.33	0	5	0.2	40.14
MOL002881	香叶木苳	300.28	2.32	3	6	0.27	31.14
MOL005081	5,7-二甲氧基-A8(3-甲 基-2-烯-1-基)-2- 苳基-4H-苳-4-酮	290.34	3.32	0	5	0.19	45.77
MOL005084	7-去甲基-6-甲氧基-5,6- 二氢白屈菜红碱	365.41	3.73	1	6	0.83	30.74
MOL005088	瓜蒌碱苳醇	312.35	-2.11	4	7	0.28	35.68
MOL005100	5,7-二羟基-2-(3-羟基- 4-甲氧基苳基)-色苳-4-酮	302.3	2.28	3	6	0.27	47.74
MOL005102	氧化两面针碱	363.39	3.15	0	6	0.84	62.09
MOL005103	6-[(2R)-2,3-二羟基-3- 甲基苳基]-5,7-二甲氧 基苳豆素	308.36	1.66	2	6	0.22	33.55
MOL005105	氧化白屈菜红碱	363.39	3.15	0	6	0.84	44.22
MOL005106	氧化特日哈宁碱	349.36	2.90	1	6	0.81	33.93
MOL005107	乙氧基白屈菜红碱	393.47	4.33	0	6	0.88	62.21
MOL005108	异崖椒足碱	334.37	3.42	1	4	0.77	38.34
MOL002666	白屈菜红碱	332.37	4.29	0	4	0.78	34.18
MOL010425	羟基磷灰石	347.34	2.95	0	6	0.87	53.09

2.2 活性成分 - 预测靶点网络构建与分析

结合 PharmMapper 数据库和 TCMSP 数据库,共获得 236 个成分靶点,将其导入 String 数据库构建 PPI,并将成分 - 靶点及 PPI 导入 Cytoscape 3. 5. 1 软件,构建活性成分 - 预测靶点网络(图 1)。通过计算可知,在该网络中,每个成分平均与 39. 60 个靶点有关联作用,每个靶点平均与 4. 22 个成分有关联作用,表明两面针中 1 个活性成分可作用于多个靶点,多个活性成分也可作用于同一靶点,提示两面针通过多成分、多靶点发挥活血化痰作用。

2.3 两面针活血化痰靶点确认及其网络构建与分析

采用 Cytoscape 3. 5. 1 软件构建两面针活血化痰的活性成分 - 靶点 - 疾病网络(图 2)。提取交集,确认 24 个活血化痰的潜在靶点(表 2),其中 22 个靶点存在互作关系(图 3),即为潜在靶点。其中,血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)、丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)、内皮一氧化氮合酶(eNOS)、环氧合酶 2(COX - 2)、凝血酶原(F2)、基质金属蛋白酶 3(MMP3)、纤维蛋白原 γ 链(FGG)等靶点与血瘀所致心脑血管疾病密切相关,可作为本研究的核心潜在靶点。在两面针活血化痰的活性成分 - 靶点 - 疾病网络中,节点度值和介数中心度的中位数分别为 9 和 0. 020,COX - 2,F2,AKT1 的节点度值和介数中心度均不低于 18 和 0. 020,且介数中心度居前 4 的成分分别为白屈菜红碱、芝麻脂素、香叶木苳、黄连碱,提示这些靶点和活性成分对两面针的活血化痰功效发挥关键作用。

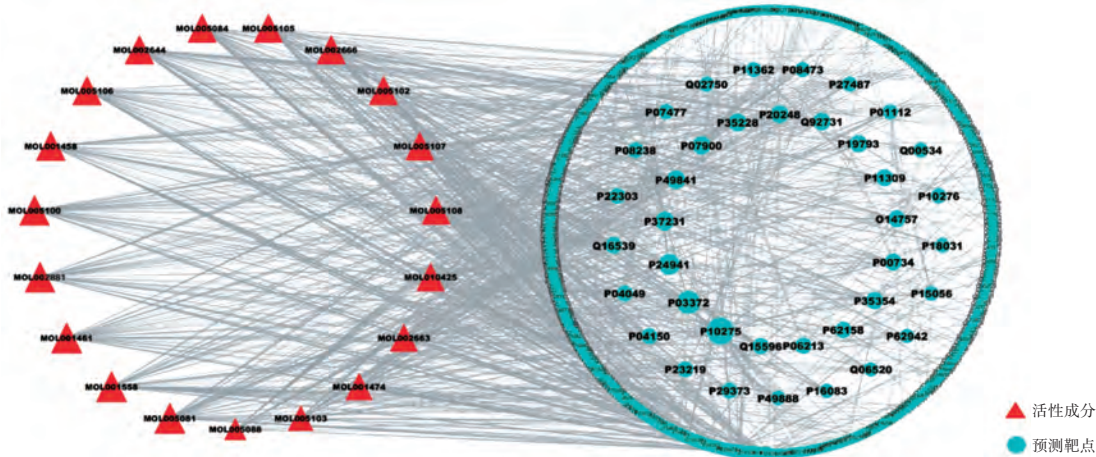


图 1 两面针活性成分 - 预测靶点网络

Fig. 1 Network of active ingredients - predicted targets of Zanthoxyli Radix

2.4 潜在靶点的 KEGG 通路富集及 GO 生物功能注释

生物通路通过不同靶蛋白间的相互作用执行生物学功能^[13],通过 DAVID 数据库对上述 24 个潜在靶点进行 KEGG 通路分析,结果共富集出 26 条通路,其中 21 条通路有统计学意义($P < 0. 05$),详见表 3。和血瘀证密切

相关的信号通路为血管内皮生长因子(VEGF)、血小板活化、环磷酸腺苷(cAMP)、附着斑块、肿瘤坏死因子(TNF)、磷脂酰肌醇 3 - 激酶 / 丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶(PI3K / AKT)等信号通路,其中 VEGF 信号通路是两面针活血化痰靶点富集最显著的通路,提示该通路可能是两面



图 2 两面针活血化瘀的活性成分 - 靶点 - 疾病网络

Fig. 2 Network of active ingredients - targets - diseases of Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis

针发挥活血化瘀功效的关键途径。受以上通路调控的靶点主要参与细胞、组织、器官、代谢、免疫、应激等过程，主要通过影响 COX, eNOS, VEGFR2, F2, MMP3, FGG 等靶点发挥活血化瘀功效。

采用 Cytoscape 3. 5. 1 软件的 ClueGO 插件分析相关靶蛋白的生物学功能发现，两面针活血化瘀靶点注释为 eNOS 活性的调节、活性氧的生物合成、血小板活化的负调控、血管内皮细胞迁移的正调控、内皮细胞凋亡过程的负调控等，详见图 4。可见，两面针活血化瘀靶点除了调控血管舒缩和血管内皮细胞迁移、凋亡外，还通过调控病灶的炎症反应及血液流变等发挥功效。

2. 5 活血化瘀活性成分 - 关键靶点 - 通路网络构建

采用 Cytoscape 3. 5. 1 软件中的 Merge 功能合并两面针活血化瘀靶点 PPI 及 KEGG 通路，筛选和瘀血症相关的通路，构建两面针活血化瘀的活性成分 - 关键靶点 - 通路网络(图 5)，提示两面针的活血化瘀作用可能与干预血小板活化、细胞凋亡、血管再生、细胞粘连、炎症调控有关。

2. 6 分子对接验证

在各靶点的原配体位点设置活性成分与关键靶点对接区域，并进行对接，白屈菜红碱、黄连碱、香叶木苷、芝麻脂素 4 个重点成分与 COX - 2, F2, AKT1(PDB ID 分别为 3LN1, 1T5G, 3O96)3 个关键靶点的最小结合能均低于 - 5 kcal / mol，详见表 4。表明各成分与靶点不仅能自发结合，而且亲和力较强，各成分与靶点位点空腔

表 2 两面针活血化瘀潜在靶点及其拓扑参数

Tab. 2 Potential targets and their topological parameters of Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis

Uniprot ID	基因 / 蛋白质名称(英文)	介数中心度	度值
P00734	凝血酶原(F2)	0. 247	26
P31749	丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)	0. 093	23
P35354	环氧合酶 2(COX - 2)	0. 074	18
P23219	环氧合酶 1(COX - 1)	0. 041	15
P18031	蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B(PTP1B)	0. 053	13
P29474	内皮型一氧化氮合酶(eNOS)	0. 034	13
P12821	血管紧张素转换酶(ACE)	0. 047	12
P15056	RAF 激酶蛋白(BRAF)	0. 025	12
P10721	肥大 / 干细胞生长因子受体(KIT)	0. 034	11
P07900	热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)	0. 012	11
P49888	硫酸转移酶 1E1(SULT1E1)	0. 018	10
P02679	纤维蛋白原 γ 链(FGG)	0. 053	9
P35968	血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)	0. 007	9
P08254	基质金属蛋白酶 3(MMP3)	0. 013	9
P63000	Ras 相关 C3 内毒素底物 1(RAC1)	0. 004	8
P06276	胆碱酯酶(BCHE)	0. 012	8
P27338	单胺氧化酶 B(MAO - B)	0. 036	8
P07550	β ₂ 肾上腺素能受体(ADRB2)	0. 010	7
Q14449	生长因子受体结合蛋白 14(GRB14)	0. 023	7
P11413	葡萄糖 - 6 - 磷酸 1 - 脱氢酶(G6PD)	0. 016	7
P16442	组织血型 ABO 系统转移酶(ABO)	0. 012	6
P23946	糜酶(CMA1)	0. 005	4
P49763	胎盘生长因子(PGFP)	0. 000	3
P17752	色氨酸 5 - 羟化酶 1(TPH1)	0. 000	2

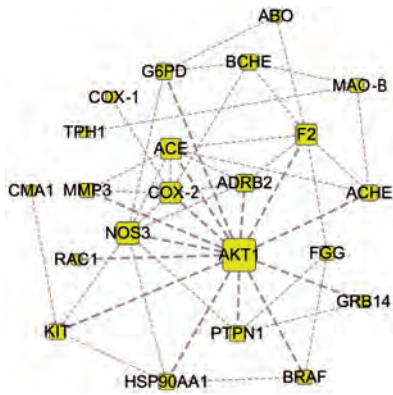


图 3 两面针活血化瘀的潜在靶点

Fig. 3 Potential targets of Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis

结合紧密，详见图 6。其中，芝麻脂素与上述 3 个靶点的对接结果均低于各原配体与对应靶点的最小结合能，提示对接结果具有可靠性和参考价值。

3 讨论

3. 1 具有活血化瘀功效的活性成分

本研究中通过对两面针活性成分 - 关键靶点 - 通

表 3 潜在靶点的 KEGG 通路富集
Tab.3 KEGG pathway enrichment of potential targets

通路名称(英文)	靶点数量	占比(%)	P值
血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)	5	20	3.6×10^{-5}
5-羟色胺能突触(Serotonergic synapse)	5	20	3.8×10^{-4}
Rap1 信号通路(Rap1 signaling pathway)	6	24	4.4×10^{-4}
磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶信号通路(PI3K / AKT signaling pathway)	7	28	5.7×10^{-4}
脂肪细胞脂质的调节(Regulation of lipolysis in adipocytes)	4	16	7.1×10^{-4}
癌症途径(Pathways in cancer)	7	28	1.1×10^{-3}
附着斑块(Focal adhesion)	5	20	3.7×10^{-3}
Ras 信号通路(Ras signaling pathway)	5	20	5.2×10^{-3}
血小板活化(Platelet activation)	4	16	7.8×10^{-3}
急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia)	3	12	1.4×10^{-2}
结直肠癌(Colorectal cancer)	3	12	1.6×10^{-2}
癌症的中枢碳代谢(Central carbon metabolism in cancer)	3	12	1.7×10^{-2}
胰腺癌(Pancreatic cancer)	3	12	1.8×10^{-2}
肾细胞癌(Renal cell carcinoma)	3	12	1.9×10^{-2}
环磷酸腺苷信号通路(cAMP signaling pathway)	4	16	2.4×10^{-2}
癌症中的蛋白多糖(Proteoglycans in cancer)	4	16	2.5×10^{-2}
孕酮介导的卵母细胞成熟(Pregnosterone-mediated oocyte maturation)	3	12	3.1×10^{-2}
前列腺癌(Prostate cancer)	3	12	3.2×10^{-2}
雌激素信号通路(Estrogen signaling pathway)	3	12	3.9×10^{-2}
肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)	3	12	4.5×10^{-2}
胰岛素抵抗(Insulin resistance)	3	12	4.6×10^{-2}

路网络的搭建、分析、挖掘发现,两面针的生物碱类(黄连碱、血根碱、白屈菜红碱等)、黄酮类(香叶木苷等)、木脂素类(芝麻脂素等)具有活血化瘀活性。血瘀疾病的发生、发展均与血管平滑肌细胞异常增殖、血管狭窄、冠状动脉粥样硬化等症密切相关^[14],生长因子、炎症因子、血脂异常、机械应激^[15]等也有影响。黄连碱^[16]、血根碱^[17]、芝麻脂素^[18]等成分均能抑制 PI3K / AKT 的磷酸化,诱导细胞凋亡,减弱细胞过度增殖,防止血管内壁进一步增生,防治一系列心脑血管病理症状;芝麻脂素可通过激活 AKT / eNOS 通路,增加一氧化氮(NO)的合成,从而抑制心肌细胞的凋亡,减轻大鼠心脏缺血再灌注所致心肌损伤^[19]。血根碱^[20]、香叶木苷^[21]直接抑制 VEGF 的表达,干预内皮细胞的增殖,从而阻断 VEGF 诱导的 AKT1 活化。两面针抗炎效果显著,且与 COX - 2 及其诱导产物前列腺素 E₂(PGE₂)密切相关^[22];其潜在活性成分生物碱类(黄连碱^[23]、血根碱^[24]、白屈菜红碱^[25]、羟基磷灰石^[26]等)、芝麻脂素^[27]、香叶木苷^[28]等成分抗炎效果显著,主要表现在平衡病灶组织中 PGE₂、TNF - α 、白细胞介素 6(IL - 6)等炎症介质和促炎因子的含量,提示两面针活性成分可能通过减轻炎症对血管内皮的继续损伤,从而加速血管内皮及其微环境恢复正常。黄连碱、血根碱、香叶木苷^[29]等成分也可抑制花生四烯酸、胶原和凝血酶诱

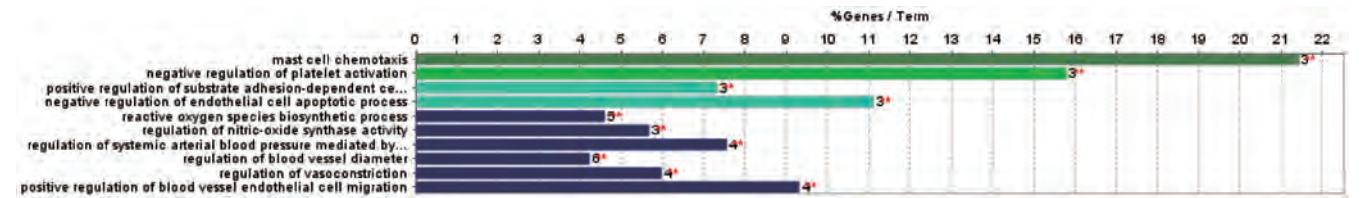


图 4 两面针抗血栓靶蛋白的生物学功能注释

Fig. 4 Annotation of biological functions of antithrombotic target proteins of Zanthoxyl Radix

导的血小板聚集,其通过抑制血栓素 A₂ 的生成而发挥作用。香叶木苷还可通过抑制 F2 的合成和降低成纤维细胞生长因子的水平来改善心脑血管疾病。黄连碱、血根碱、芝麻脂素等成分还可激活 cAMP 通路,抑制钙离子的活化,促进 eNOS 表达,进而抑制血小板聚集和扩张血管^[30],故两面针可通过干预血栓形成和心脑血管缺血、缺氧,治疗血瘀所致疾病。由动脉粥样斑块破裂继发血栓引起的心肌梗死高达 90%^[31],故动脉粥样斑块破裂被认为是冠状动脉血栓形成的主要触发机制^[32]。MMP3 可降解局部基质蛋白,导致斑块不稳定和破裂^[33]。芝麻脂素可明显降低 MMP3 的表达水平,表明芝麻脂素对心脑血管疾病有潜在价值^[34]。

3.2 与活血化瘀相关的靶点

本研究结果显示,VEGFR2,AKT1,eNOS,COX - 2,

F2,MMP3,FGG 靶点与活血化瘀密切相关。血瘀类疾病多数由内皮细胞受损,经基底膜暴露,胶原纤维粘连,促凝物质、炎性细胞、有害物质释放及透入而引起大量的血小板聚集、黏附、释放等形成^[35]。VEGFR2 有促进内皮细胞增殖、分裂及修复血管的功能^[36],其过度表达会导致一系列心血管疾病;AKT1 参与调节细胞存活、增殖、凋亡及血管生成,VEGFR2 受 AKT1 的调控^[37],故药物对两者的共同调控可起到协同作用,能从血瘀证的根源上干预其发生、发展。由内皮细胞产生的 NO 能使血管平滑肌松弛,同时抑制血小板的黏附、聚集,内皮细胞一旦受损,会引起 NO 减少。内皮细胞产生 NO 的限速酶为 eNOS,正向调控 eNOS 可促进 NO 生成,从而改善血管的异常收缩,并抑制血小板黏附^[38]。前列腺素合成的限速酶 COX - 2 能诱导花生四烯酸产生 PGE₂,

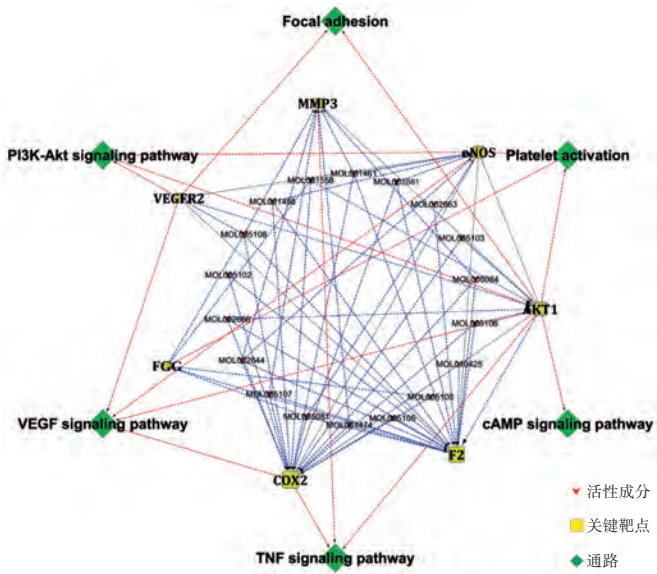


图 5 两面针活血化痰活性成分 - 关键靶点 - 通路网络
Fig.5 Network of active ingredients - key targets - pathways of Zanthoxyli Radix for promoting blood circulation and removing blood stasis

表 4 重点成分与关键靶点的对接结果(kcal / mol)
Tab.4 Docking results of key ingredients and targets (kcal/mol)

原配体 / 活性成分	与关键靶点的最小结合能		
	COX - 2(3LN1)	F2(1T5G)	AKT1(3O96)
COX - 2(HEM)	- 7. 8		
F2(ARG)		- 7. 2	
AKT1(IQO)			- 9. 1
白屈菜红碱	- 7. 6	8. 6	- 8. 5
黄连碱	- 7. 4	7. 4	- 9. 1
香叶木苣	- 7. 4	- 7. 9	- 8. 0
芝麻脂素	- 8. 8	- 9. 1	- 9. 4

注: 3LN1, 1T5G, 3O96, HEM, ARG, IQO 为原配体或关键靶点的 PBD ID。

Note: 3LN1, 1T5G, 3O96, HEM, ARG, IQO are the PBD ID of original ligands or key targets.

从而产生炎性介质和促炎因子,加重发热、疼痛、乏力等症状^[39];在炎性微环境中,COX - 2的富集会促进血栓素 A₂等下游产物的表达,并促进血管收缩和血小板聚集,导致全血黏度增高、微循环障碍等^[40]。故抑制 COX - 2的活性能解除炎症、散瘀止痛。F2被激活后形成凝血酶,将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,同时激活 V, VII, VIII, XIII 因子,同血栓调节蛋白 C 复合,能加速血小板聚集和纤维蛋白形成血栓。MMP3 是在动脉粥样斑块中表达的基质金属蛋白家族的主要成员,能

本栏目
重庆药友制药有限责任公司
协办

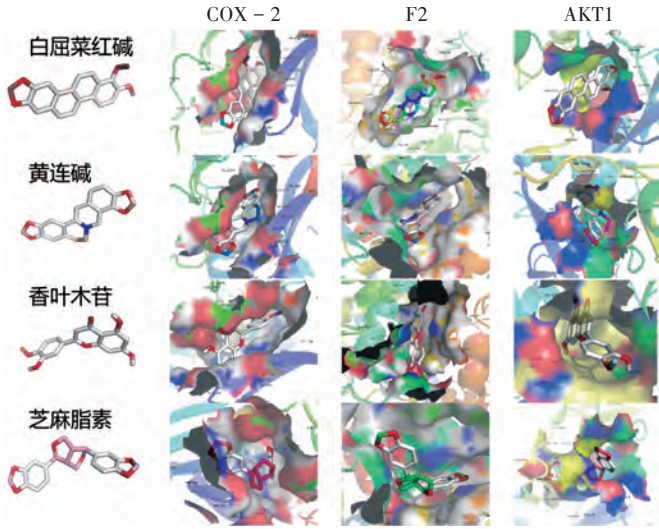


图 6 重点成分与关键靶点的分子对接
Fig.6 Molecules docking of key ingredients and targets

降解纤维连接蛋白和层黏蛋白, I, III, IV, V 型明胶, III, IV, X, IX 型胶原, 软骨蛋白聚糖, 可能在斑块裂解中起重要作用^[41]。纤维蛋白的前体物质 FGG 是凝血块的主要成分,在凝血时与纤维蛋白原 α 和纤维蛋白原 β 聚合成不溶性纤维蛋白基质,促进血细胞和纤维蛋白结合而形成牢固结构,进而产生稳定的血栓^[42]。上述靶点可改善血流动力学、抗凝血、抗炎、调控细胞凋亡和细胞增殖,且均可与两面针的主要活性成分产生相互作用,表明两面针是通过调控该类靶点而发挥活血化痰功效。

3.3 与活血化瘀相关的信号通路

富集是同一通路中的点点相连和不同通路中的环相扣,通路上的靶点被激活或被抑制均会影响整条通路的发展,在病理状态可出现恶性循环,从而加快病情的进展。通过 KEGG 通路分析发现,与两面针活血化痰密切相关的靶点主要富集在 PI3K / AKT, cAMP, VEGF 及附着斑块、血小板活化、TNF 等信号通路。血管壁损伤时,血小板活化,信号通路被激活,促进活化剂二磷酸腺苷、肾上腺素、5 - 羟色胺、凝血酶和血栓素 A₂ 的释放,诱导血小板活化^[43];纤维蛋白原等物质介导的血小板黏附和聚集,促进血小板加速成块,并加固血块结构,产生稳定血栓。VEGF 和 PI3K / AKT 信号通路可调节血管细胞的增殖与凋亡,有利于血管的再生和修复,以及防止血管细胞的过度增殖^[44]。附着斑块信号通路和整合素有关,当出现外伤血管破裂时,整合素被激活,从而促进血小板对血管损伤部位的修复^[45]。高浓度的钙离子能诱导血小板聚集;eNOS 诱导产生的 NO 可扩张血管;cAMP 能降低钙离子水平^[46],促进 eNOS 表达。提示激活 cAMP 信号通路能干预血栓形成,扩张血管,增加心肌供血、供氧,从而改善心肌的缺血、缺氧状

态^[47]。TNF信号通路是典型的炎症通路,通过调控COX-2、一氧化氮合酶等靶点,促进PGE₂和NO等炎性介质和TNF- α , IL-6等促炎因子的产生及释放;炎症会加重,且会诱发新的并发症;当血管受损时,炎症可诱导内皮损伤,导致机体缺失生理抗凝剂,增加促凝因子的释放,抑制溶解纤维蛋白的活性,促进血栓形成,加重血瘀证病情^[48]。故可抑制炎症和治疗血瘀类疾病共同影响血瘀对机体的损伤^[49]。含有丹参^[50]、川芎、红花^[51]中药的活血化瘀功效和抑制炎症反应相关,故消减炎症能减轻、消除血瘀证引起的疼痛和肿胀症状。两面针活性成分的活血化瘀相关靶点主要富集在上述信号通路,这些靶点在各自富集的通路上又可产生级联反应,提示其活性成分对这些靶点的调控可起到协同增效作用。

3.4 活性成分与关键靶点的分子对接

成分和靶点的相互作用能激活或抑制受体的活性。计算机药物辅助设计中常用的分子对接能阐明药物与靶点的作用机制^[52]。本研究结果显示,两面针活性成分和关键靶点间的亲和力强,验证了网络药理学预测、分子对接验证结果、文献研究结论的一致性,以及研究方法的科学性和可靠性。其中,芝麻脂素与COX-2, F2, AKT1 3个关键靶点的结合均优于原配体与靶点的对接,表明芝麻脂素的活血化瘀作用较强。

参考文献

- [1] 杨凯麟,曾柳庭,葛安琪,等. 基于网络药理学探讨桃仁-红花药对活血化瘀的分子机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2018,20(12):2208-2216.
- [2] 吕明,王泰一,田晓轩,等. 网络药理学分析揭示的常用活血化瘀中药抗炎-抗血栓作用[J]. 药学学报,2015,50(9):1135-1141.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:176.
- [4] 陈炜璇,秦泽慧,曾丹,等. 两面针根、茎抗击打损伤和镇痛抗炎作用比较研究[J]. 中药材,2015,38(11):2358-2363.
- [5] 刘志华,孙晓波. 网络药理学:中医药现代化的新机遇[J]. 药学学报,2012,47(6):696-703.
- [6] XIE WG, JI LX, ZHAO T, et al. Identification of transcriptional factors and key genes in primary osteoporosis by DNA microarray[J]. Med Sci Monit, 2015, 21(4):1333-1344.
- [7] 张彦琼,李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2015,29(6):883-892.
- [8] LI JS, 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] 田盛. 基于中药资源的计算机辅助药物分子设计[D]. 苏州:苏州大学,2014.
- [10] ASSENOV Y, RAMÍREZ F, SCHELHORN SE, et al. Computing topological parameters of biological networks[J]. Bioinformatics, 2007, 24(2):282-284.
- [11] 牛明,王睿林,王仲霞,等. 基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用[J]. 中国中药杂志,2020,45(6):1213-1218.
- [12] 马庆,邹国松,郑丽婷,等. 两面针根与茎的UPLC特征图谱研究及药效成分分析[J]. 中药材,2020,43(12):2959-2965.
- [13] 庄静,刘丽娟,周超,等. 网络药理学与分子对接技术指导下土大黄苷对慢性粒细胞白血病作用机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(22):1477-1482.
- [14] ZHU F, SHI Z, QIN C, et al. Therapeutic target database update 2012: A resource for facilitating target-oriented drug discovery[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(Database issue):D1128-D1136.
- [15] CASTORENO AB, EGGERT US. Small molecule probes of cellular pathways and networks[J]. ACS Chemical Biology, 2010, 6(1):86-94.
- [16] TANABE H, SUZUKI H, NAGATSU A, et al. Selective inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by coptisine isolated from Coptis rhizoma, one of the crude drugs composing Kampo medicines Unsei-in[J]. Phytomedicine, 2006, 13(5):334-342.
- [17] RAHMAN A, THAYYULLATHIL F, PALLICHANKANDY S, et al. Hydrogen peroxide / ceramide / Akt signaling axis play a critical role in the antileukemic potential of sanguinarine[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 96:273-289.
- [18] 胡浩然,宣佳利,杨解人,等. 芝麻脂素改善自发性高血压大鼠肾损伤的作用及与PI3K / AKT / mTOR信号通路的关系[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(4):719-725.
- [19] 赵梦秋,涂鹏程,任尤楠,等. 芝麻脂素预处理激活Akt / eNOS通路减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤[J]. 中药材,2016,39(7):1633-1637.
- [20] BASINI G, BUSSOLATI S, SANTINI SE, et al. Sanguinarine inhibits VEGF-induced angiogenesis in a fibrin gel matrix[J]. Bio Factors, 2007, 29(1):11-18.
- [21] FELDO MA, WÓJCIAK-KOSIOR M, SOWA I, et al. Effect of Diosmin Administration in Patients with Chronic Venous Disorders on Selected Factors Affecting Angiogenesis[J]. Molecules, 2019, 24(18):3316.
- [22] 邹国松,郑丽婷,马庆,等. 基于网络药理学的两面针干预炎症靶点预测及作用机制研究[J]. 中草药,2019,50(3):659-668.
- [23] HU YF, LI W, LI X, et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling for Coptisine Challenge of Inflammation in LPS-Stimulated Rats[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):1450.
- [24] LI WF, LI HN, MU QL, et al. Protective effect of sanguinarine on LPS-induced endotoxic shock in mice and its effect on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated

- PGE₂ release from peritoneal macrophages [J]. International Immunopharmacology, 2014, 22(2): 311 – 317.
- [25] 文 屏, 李加福, 高咏莉, 等. 两面针中白屈菜红碱等成分的抗炎活性研究[J]. 今日药学, 2018, 28(4): 217 – 220.
- [26] HU J, ZHANG WD, LIU RH, et al. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, and their analgesic and anti-inflammatory activities [J]. Chem Biodivers, 2006, 3(9): 990 – 995.
- [27] LIN TY, WU PY, HOU CW, et al. Protective Effects of Sesamin against UVB-Induced Skin Inflammation and Photodamage *In Vitro* and *In Vivo* [J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 479.
- [28] LI WH, CHANG ST, CHANG SC, et al. Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark [J]. Natural Product Research, 2008, 22(12): 1085 – 1093.
- [29] JENG JH, WU HL, LIN BR, et al. Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(2): 250 – 258.
- [30] 陈柏年, 于晓彦, 孙加琳, 等. 黄连碱对 L-NAME 诱导高血压大鼠胸主动脉功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 610 – 613.
- [31] DAVIES MJ, THOMAS AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina [J]. Br Heart, 1985, 53(4): 363 – 373.
- [32] FALK E, SHAH PK, FUSTER V. Coronary plaque disruption [J]. Circulation, 1995, 92(3): 657 – 671.
- [33] GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques [J]. J Clin Invest, 1994, 94(6): 2493 – 2503.
- [34] KANG OH, CHAE HS, CHOI JG, et al. *ent* – pimara – 8(14), 15 – dien – 19 – oic acid isolated from the roots of *Aralia cordata* inhibits induction of inflammatory mediators by blocking NF – κ B activation and mitogen – activated protein kinase pathways [J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 601(1/3): 179 – 185.
- [35] BEESER A, JAFFER ZM, HOFMANN C, et al. Role of group A p21 – activated kinases in activation of extracellular – regulated kinase by growth factors [J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36609 – 36615.
- [36] 徐 琳, 张永青, 白谊涵, 等. 活血祛瘀方对兔腹主动脉内膜损伤后 VEGF 的影响 [J]. 中华保健医学杂志, 2015, 17(3): 212 – 214.
- [37] GUO DL, ZHANG BG, LIU SQ, et al. Xanthohumol induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl – 2, and inhibition of PI3K / Akt / mTOR – kinase in human gastric cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1300 – 1306.
- [38] 黄 兴, 李艳芬, 寇冠军, 等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1187 – 1190.
- [39] ZHANG J, HE J, ZHANG L. The down – regulation of micro RNA – 137 contributes to the up – regulation of retinoblastoma cell proliferation and invasion by regulating COX – 2 / PGE₂ signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 35 – 42.
- [40] 许晶晶, 唐晓芳, 姚 懿, 等. 阿司匹林抵抗与环氧化酶 – 1、环氧化酶 – 2 及血栓烷 A₂ 受体基因多态性相关性研究 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(7): 644 – 648.
- [41] 陈明光, 陈仕强, 杨 宁, 等. 活血化瘀法与氨基葡萄糖胶囊治疗创伤性膝骨性关节炎基质金属蛋白酶表达的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13(11): 2753 – 2757.
- [42] WESTERGAARD UB, ANDERSEN MH, HEEGAARD CW, et al. Tetraneetin binds hepatocyte growth factor and tissue – type plasminogen activator [J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(8): 1850 – 1854.
- [43] MEGA JL, SIMON T. Pharmacology of antithrombotic drugs: An assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments [J]. Lancet, 2015, 386(9990): 281 – 291.
- [44] FU ZP, CHEN X, GUAN SW, et al. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor – derived VEGF in tumor model through modulating VEGF – VEGFR2 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6(23): 19469 – 19482.
- [45] CARRIM N, WALSH TG, CONSONNI A, et al. Role of focal adhesion tyrosine kinases in GPVI – dependent platelet activation and reactive oxygen species formation [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113679.
- [46] CANOBBIO I, CIPOLLA L, GUIDETTI GF, et al. The focal adhesion kinase Pyk2 links Ca²⁺ signalling to Src family kinase activation and protein tyrosine phosphorylation in thrombin – stimulated platelets [J]. Biochem J, 2015, 469(2): 199 – 210.
- [47] LEE DH, KIM HH, CHO HJ, et al. Cordycepin – Enriched WIB801C from *Cordyceps militaris* Inhibits Collagen – Induced [Ca²⁺]_i Mobilization via cAMP – Dependent Phosphorylation of Inositol 1, 4, 5 – Trisphosphate Receptor in Human Platelets [J]. Biomol Ther (Seoul), 2014, 22(3): 223 – 231.
- [48] Angiolillo DJ. The evolution of antiplatelet therapy in the treatment of acute coronary syndromes: From aspirin to the present day [J]. Drugs, 2012, 72(16): 2087 – 2116.
- [49] SAMAD F, WOLFRAM R. Inflammation, obesity, and thrombosis [J]. Blood, 2013, 122(20): 3415 – 3422.
- [50] STUMPF C, FAN Q, HINTERMANN C, et al. Anti – inflammatory effects of danshen on human vascular endothelial cells in culture [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2013, 41(5): 1065 – 1077.
- [51] ASGAR PANAH J, KAZEMIVASH N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(2): 153 – 159.
- [52] KITCHEN DB, DECORNEZ H, FURR JR, et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(11): 935 – 949.

(收稿日期: 2021 – 07 – 20; 修回日期: 2021 – 12 – 12)