

基于UPLC-MS/MS和网络药理学探讨温阳通脉颗粒 治疗动脉粥样硬化的物质基础和机制

张荔¹, 李娟², 路立枝³, 张育葵¹, 何永华⁴, 侯立静^{5*}

(1 襄阳市中医医院(襄阳市中医药研究所), 湖北 襄阳 441000; 2 湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065;
3 滨州市中医医院 药学部, 山东 滨州 256600; 4 荆门市中医医院, 湖北 荆门 448000; 5 山东省中医药研究院,
山东 济南 250014)

摘要 采用高分辨质谱分析温阳通脉颗粒(Wenyang Tongmai Granules, WTG)的化学成分, 筛选鉴定出槲皮素、阿魏酸、朝藿定B、肉桂酸、药根碱等关键活性成分, 并预测其作用于动脉粥样硬化(AS)的潜在靶点共203个。通过PPI网络、GO和KEGG富集分析发现, WTG可能通过参与缺氧反应、炎症反应等生物学过程, 作用于AGE-RAGE信号通路、流体剪切力与动脉粥样硬化等通路, 从而干预治疗AS。关键活性成分与AS疾病靶点的分子对接显示, 关键成分与炎症因子TNF- α 、IL-6和PTGS2凋亡相关蛋白、CASP3等靶点具有较强的结合活性; 进一步分子动力学模拟实验显示槲皮素(Quercetin)-TNF- α 、肉桂酸(Cinnamic acid)-TNF- α 、药根碱(Jatrorrhizine)-PTGS2和药根碱(Jatrorrhizine)-CASP3复合物在模拟中结构稳定, 并保持一定的氢键相互作用, 提示活性成分与靶蛋白结合良好。细胞实验表明, WTG能提高高糖损伤的血管内皮细胞存活率和SOD活性, 降低LDH释放及ICAM-1、MCP-1 mRNA表达。综上, WTG通过多成分、多靶点、多通路机制干预治疗动脉粥样硬化。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱; 网络药理学; 温阳通脉颗粒; 动脉粥样硬化; 分子动力学模拟

中图分类号 X703 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2026)06-0763-12

doi: 10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260605

Material basis and mechanism of Wenyang Tongmai Granules in the treatment of atherosclerosis based on UPLC-MS/MS and network pharmacology

Zhang Li¹, Li Juan², Lu Lizhi³, Zhang Yukui¹, He Yonghua⁴, Hou Lijing^{5*}

(1 Xiangyang Traditional Chinese Medicine Hospital (Xiangyang Traditional Chinese Medicine Research Institute),
Xiangyang 441000, Hubei China; 2 School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065,
Hubei China; 3 Pharmacy Department, Binzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Binzhou 256600, Shandong
China; 4 Jingmen Traditional Chinese Medicine Hospital, Jingmen 448000, Hubei China; 5 Shandong Traditional
Chinese Medicine Research Institute, Jinan 250014, Shandong China)

Abstract Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was employed to analyze the chemical composition of Wenyang Tongmai Granules (WTG). Key active components—quercetin, ferulic acid, epimedin B, cinnamic acid, and jatrorrhizine—were identified. A total of 203 potential targets associated with atherosclerosis were predicted. PPI network, GO, and KEGG enrichment analyses revealed that WTG likely exerted its effects by participating in biological processes such as hypoxia response and inflammatory response, as well as through pathways including the AGE-RAGE signaling pathway and fluid shear stress-related atherosclerosis pathway. Molecular

收稿日期 2025-11-26

* 通信作者 侯立静(1981-), 女, 研究员, 硕士, 研究方向: 中药药理及药效研究. E-mail: deborah22@126.com

基金项目 山东省中医药科技资助项目(M-2022172); 湖北省自然科学基金创新发展联合基金资助项目(2025AFD606);
襄阳市医疗卫生领域重点资助项目(2022YL42A); 山东省科技厅科技攻关资助项目(2011GSF11848)

docking of key active components with atherosclerosis-related disease targets demonstrated strong binding affinity between these components and inflammatory factors such as TNF- α , IL-6 and PTGS2, as well as apoptosis-related protein CASP3. Molecular dynamics simulation results indicated that small molecules—quercetin, cinnamic acid, and jatrorrhizine—exhibited favorable binding interactions with target proteins TNF- α , PTGS2, and CASP3. Cellular experiments showed that WTG could enhance the survival rate and SOD activity of vascular endothelial cells injured by high glucose, while reducing LDH release and mRNA expression of *ICAM-1* and *MCP-1*. These findings collectively suggest that WTG exerts its anti-atherosclerotic effects through a multi-component, multi-target, and multi-pathway regulatory mechanism.

Keywords UPLC-MS/MS; network pharmacology; Wenyang Tongmai Granules; atherosclerosis; molecular dynamics simulation

心血管疾病占全球死亡人数的31.5%以上,且致死率居于首位^[1],动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病发病率和致死率大幅升高的主要原因之一^[2-3].氧化损伤、炎症、脂质代谢等变化是AS发病的常见因素^[4],其中,高糖和过量的ROS导致的炎症和氧化应激易导致血管内皮细胞损伤^[5],进而影响AS的进程.因此,保护内皮细胞对延缓动脉粥样硬化尤为重要.温阳通脉颗粒(Wenyang Tongmai Granules, WTG, 针对糖尿病引起的AS)为名老中医在国家发明专利(专利号:CN200910017097.6)的基础上临床优化形成的组方,主要由肉桂、黄芪、桂枝、仙灵脾、三七、红花、川芎、黄连、川牛膝组成.基于临床创新研究,认为糖尿病内皮损伤的发病多为“阳不化气”,阳失温煦作用所致,从而导致体内湿浊阻络而引发,由此确立了温阳通脉的治疗原则.长期临床实践表明,温阳通脉颗粒可调节血糖水平,防治糖尿病并发症AS相关的血管内皮损伤.前期实验研究也显示,WTG含药血清能提高氧化损伤模型细胞的活力,提升超氧化物歧化酶(SOD)酶活性,降低上清液中乳酸脱氢酶(LDH)漏液量,并能从RNA水平抑制细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达,从而对抗炎症损伤、保护内皮细胞,延缓动脉粥样硬化的发展^[6].复方中主要成分三七总皂苷、黄芪甲苷、淫羊藿苷^[7-9]等可缓解H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化损伤,有效保护内皮细胞,对预防糖尿病及其并发症动脉粥样硬化的发生发展有重要作用.

因此,本文在前述研究的基础上,采用UPLC-MS/MS分析鉴定WTG治疗AS的物质基础,运用网络药理学和分子对接技术研究WTG治疗AS的作用机制,并通过分子动力学模拟对活性成分与作用靶点的结合进行验证.同时,构建高糖损伤的血管内皮细胞模型,进一步探究WTG抗动脉粥样硬化的疗效.

1 实验方法

1.1 材料和仪器

温阳通脉颗粒WTG(20240201,成分:肉桂6 g,黄芪15 g,桂枝3 g,淫羊藿20 g,三七3 g,红花3 g,川芎3 g,黄连1.5 g,牛膝3 g,合计57.5 g)经浓缩后制备成药粉,一个处方量13.89 g,由襄阳市中医院提供.甲醇、乙腈为默克色谱纯试剂.

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(美国SCIEX, ExionLC™ AD);离心机(德国Eppendorf 5804 r);冻干机(新芝生物, Scientz-100F);研磨仪(德国Retsch, MM 400),电子天平(瑞士梅特勒, MS105DM).

1.2 色谱采集条件

色谱分离采用Agilent SB-C18色谱柱.流动相A为含0.1%甲酸的超纯水,B为含0.1%的甲酸的乙腈.洗脱程序如下:0.0~9.0 min, 5%→95% B; 9.0~10.0 min 95% B; 10.0~11.1 min, 95%→5% B; 11.1~14.0 min, 5% B.柱温40℃,进样量2 μ L,流速0.35 mL·min⁻¹.

1.3 质谱采集条件

采用电喷雾离子源(ESI),正/负离子模式下的离子喷雾电压分别设定为5500 V和-4500 V.离子源温度为550℃.雾化气(GS1)50 psi,辅助加热气(GS2)60 psi,气帘气(CUR)25 psi.采用多反应监测(MRM)模式进行扫描,碰撞气为氮气.

1.4 化学成分分析

使用三重四极杆质谱(Triple Quadrupole Mass Spectrometry)的多反应监测(MRM)模式进行定量分析,并依据二级质谱图(MS/MS)进行化合物定性.质谱数据的采集与处理通过Analyst 1.6.3软件完成.

1.5 WTG的网络药理学分析

1.5.1 WTG成分靶点与相关疾病靶点收集

TCMSP中药系统药理学数据库与分析平台用于检索组分对应靶点.通过Unrpiot数据库补充和确

认目标基因.使用疾病靶点 DisGent (<https://www.disgenet.org/>)、Genecards (<https://www.genecards.org/>)及 TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>)数据库,以“atherosclerosis”为关键词检索动脉粥样硬化及其相关疾病的靶点.

从 GEO 数据库获取了动脉粥样硬化早期与晚期患者的动脉组织基因测序数据(GSE28829),并对基因进行标注. GSE28829 数据集来源于美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO),标题为“Gene Expression in early and advanced atherosclerotic plaque from human carotid”,发布于2011年4月25日.该数据集共纳入29例人颈动脉粥样硬化斑块组织样本,依据病理分期分为两组:早期斑块组13例,晚期斑块组16例,旨在通过基因芯片技术探究人颈动脉斑块从早期向晚期发展过程中的基因表达谱变化,筛选与疾病进展相关的差异表达基因和关键调控分子.本文基于该公开数据,通过生物信息学方法分析目标基因在动脉粥样硬化不同阶段的表达差异及其生物学意义.将清理后的数据导入R软件包,并对差异表达基因(Limma包)、差异信号通路(GSVA软件包)以及与差异表达基因功能密切相关的信号通路(ClusterProfiler软件包)进行分析,进一步丰富相关的靶点信息.

1.5.2 韦恩图及成分靶点网络图构建

将筛选所得成分的靶点和动脉粥样硬化相关靶点导入在线韦恩图分析平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/venn/>)获取两者交集靶点,从而确定WTG治疗AS的潜在作用靶点.在软件Cytoscape3.8.0中导入所得结果,构建WTG治疗AS的“成分-靶点”网络图.

1.5.3 靶点PPI网络构建

输入交集靶点至String数据库,以“Homo sapiens”为物种设定,构建蛋白质-蛋白质互作网络(PPI).随后导入Cytoscape 3.8.0中进行可视化与拓扑分析,最终识别并筛选出核心靶点.

1.5.4 基因本体(GO)和(KEGG)富集分析

为探讨AS与药物WTG相关的生物过程,将交集靶点导入DAVID数据库进行GO和KEGG富集分析.通过DAVID数据库对核心靶点开展通路富集分析,设置标识符为“OFFICIAL GENE SYMBOL”,列表类型为“Gene list”,物种为“Homo sapiens”,筛选条件设为 $P<0.05$,其余参数保持默认.最终获得GO和KEGG富集分析结果,其中GO分析涵盖生物过

程、细胞组成和分子功能三个类别,进一步使用Omicshare平台对结果进行可视化分析.

1.6 分子对接试验

利用CytoNCA分析靶点数据,并将结果导入Cytoscape 3.8.0,选取介数中心TOP5的靶点作为核心成分.将核心成分导入String数据库,确定蛋白结构,利用AutoDocktools1.5.6对蛋白分子分析.通过PubChem和TCMSP数据库构建分子3D结构文件,导入AutoDOCKTools1.5.6对接,用半柔性分子对接并计算最低结合能.应用PubChem、TCMSP数据库构建TOP5核心成分mol2结构式,通过RCSB PDB数据库下载靶点蛋白的3D晶体结构(PDB格式).利用AutoDocktools1.5.6软件进行分子对接,对蛋白晶体结构去水、加氢、计算电荷、去除原配体的处理;使用Autogrid插件计算格点能量;对接运算采用拉马克遗传算法,最后通过Discovery studio2016软件将对接结果进行可视化分析.

1.7 分子动力学模拟验证

使用GROMACS 2022进行分子动力学模拟.受体蛋白采用AMBER14SB力场,配体通过sobtop_1.0(dev3.1)生成GAFF2力场拓扑,并使用RESP方法分配电荷.体系采用TIP3P水模型和1 nm立方体水盒子进行溶剂化^[10],并添加0.15 mol·L⁻¹NaCl以维持电中性与生理离子浓度.能量优化分阶段进行:首先经3000步最陡下降法和2000步共轭梯度法约束溶质优化水分子,随后约束抗衡离子优化,最后对全体系进行无约束优化.

模拟在NPT系综下运行,温度310 K(Nosé-Hoover控温)与压强1 bar(Parrinello-Rahman控压),积分步长2 fs,总时长100 ns.长程静电使用PME方法处理,截断半径1 nm;键约束采用LINCS算法.利用GROMACS内置工具对轨迹进行分析,计算均方根偏差(RMSD)、均方根波动(RMSF)、氢键(HBonds)、回旋半径(Rg)及溶剂可及表面积(SASA),以评估体系稳定性、结构动态与溶剂效应.

1.8 细胞实验验证

1.8.1 制备含药血清

按照前期试验方法制备^[6],每个处方剂量为13.89 g·人⁻¹,参照人和大鼠的体型系数折算方法,计算得大鼠等效给药剂量为13.89 g×0.09·kg⁻¹=1.25 g·kg⁻¹,按照10 mL·kg⁻¹剂量灌胃体积给药,设定高剂量组给药浓度为0.25 g·mL⁻¹,低剂量组为0.125 g·mL⁻¹.

1.8.2 HUVECs高糖损伤模型的建立

取对数生长期细胞,以5×10⁴个·mL⁻¹密度接种于

96孔板,每孔加入160 μL 细胞悬液.随机分为6组,每组设5个复孔,分别加入不同浓度的Glu(葡萄糖)^[11](0、5、10、20、40、80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理,24 h后给予5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MTT孵育2 h,弃上清每孔加入150 μL 二甲基亚砜(DMSO),使用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度,以确定模型组最佳高糖造模浓度.

1.8.3 温阳通脉颗粒对细胞活力的影响

取对数生长期细胞,模型组采用30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu进行造模用.实验分为正常组、模型组(30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu)、空白血清组(30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu+10%空白血清)、WTG高剂量组(30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu+10%高浓度含药血清)和WTG低剂量组(30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu+10%低浓度含药血清).细胞存活率测定法同1.8.2.

1.8.4 SOD和LDH含量测定

按照检测试剂盒说明,参照1.8.3分组处理细胞,分别测定各组细胞SOD活性和LDH含量.

1.8.5 检测MCP-1、ICAM-1的表达

按1.8.3分组处理细胞,采用Trizol试剂法提取各组细胞总RNA,按反转录试剂盒说明合成cDNA模板,按qPCR试剂盒进行相对表达量检测.采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目标基因的相对表达量,并比较各组间的表达差异^[12].

1.9 统计结果

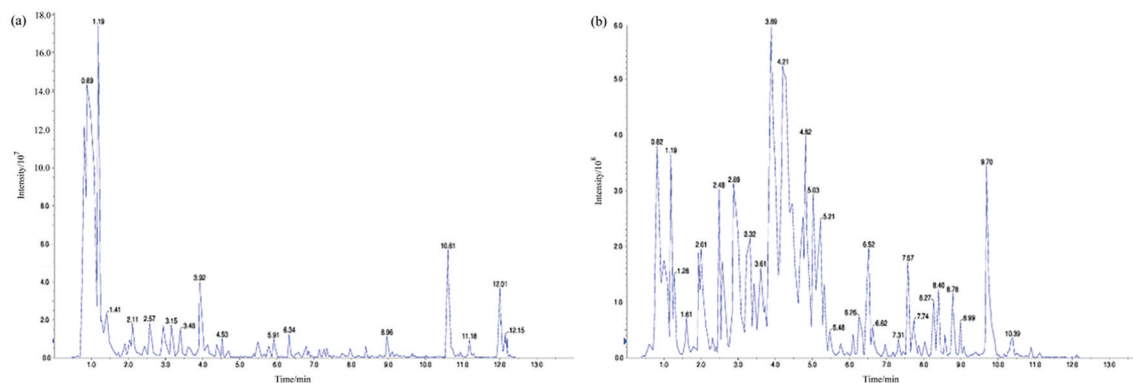
采用GraphPad Prism 10.4.1软件进行数据统计分析,多组比较采用单因素方差分析,* $P<0.05$ 和** $P<$

0.01均认为结果具有统计学意义.

2 结果

2.1 WTG的化学成分分析

WTG总离子流见图1,共检测到包括生物碱类、黄酮类化合物等在内的1551个化合物.通过峰面积比较,参照《中华人民共和国药典》及相关标准中的化学成分,并比对标准品,最终鉴定出30个化合物,具体信息见表1.经核查,Epimedin B和Epimedin C并非同分异构体,两者的分子式和分子量均存在明显差异.Epimedin B的分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{19}$,相对分子质量为808.28 Da,在正离子模式下形成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰,质荷比(m/z)为809.29,其特征碎片离子质荷比为369.14 m/z ,CAS登记号为110623-73-9.Epimedin C的分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}$,相对分子质量为822.29 Da,在正离子模式下形成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰,质荷比(m/z)为823.30,其特征碎片离子质荷比为531.20, CAS登记号为110642-44-9.从结构上看,Epimedin C较Epimedin B多一个甲基(CH_2),导致两者分子量相差约14 Da,因此在UPLC-MS/MS分析中可通过准分子离子的质荷比直接区分这两种化合物.此外,两者的二级质谱特征碎片离子也存在显著差异(369.14 m/z 与531.20 m/z),进一步验证了化合物鉴定的准确性.



(a) 负离子模式;(b) 正离子模式

图1 WTG质谱总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of WTG mass spectrometry analysis

2.2 WTG活性成分作用靶点

2.2.1 AS差异表达基因和信号通路分析

GEO筛选出的差异基因构成了网络药理学预测WTG作用靶点的病理基础.网络药理学预测的WTG作用靶点中,排名靠前中的TNF- α 、IL6、PTGS2、CCL2、IFNG、NOS2、ICAM-1蛋白与炎症反应及免疫

调节通路密切相关;ESR1、CASP3、MYC、TGFB1靶点与细胞增殖、分化和凋亡通路密切相关;MMP2在炎症和动脉粥样硬化斑块破裂中发挥多种作用;PPARG参与脂类分解代谢,属于代谢通路相关靶点.

基于动脉粥样硬化的动脉组织基因测序数据(GSE28829),发现动脉粥样硬化的发生发展与炎症

表 1 温阳通脉颗粒中化学成分的上PLC-MS/MS分析
Tab. 1 UPLC-MS/MS analysis of chemical components in Wenyang Tongmai Granules

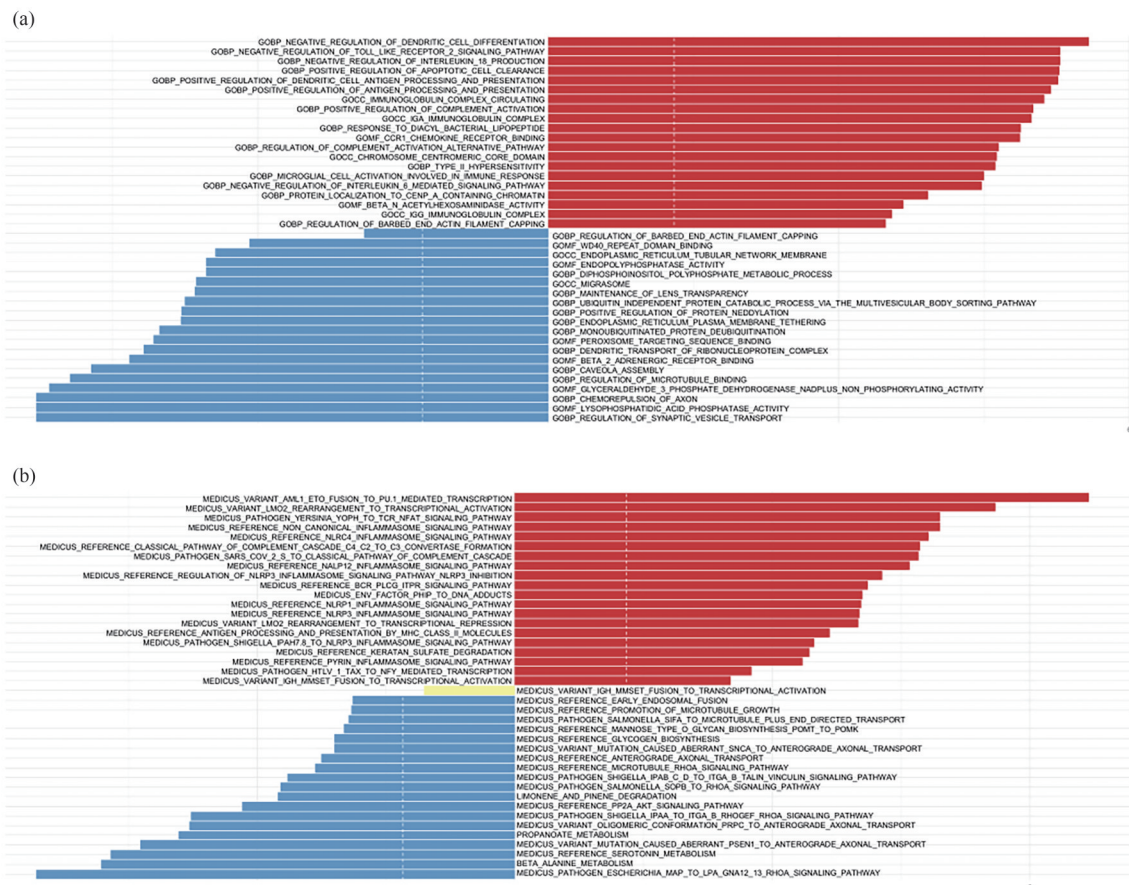
编号	Compounds	物质	RT/min	峰面积	分类	中药	分子式
LD1	Epiberberine	表小檗碱	4.3	6.18×10 ⁸	生物碱	黄连	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄
LD2	Dihydroberberine	二氢小檗碱	3.88	6.01×10 ⁸	生物碱	黄连	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄
LD3	Jatrorrhizine	药根碱	3.88	4.51×10 ⁸	生物碱	黄连	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄
LD4	Palmatine	掌叶防己碱	4.21	4.25×10 ⁸	生物碱	黄连	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄
LD5	Icariin	淫羊藿苷	4.85	2.34×10 ⁸	黄酮	淫羊藿	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅
LD6	Senkyunolide A	洋川芎内酯A	7.58	1.99×10 ⁸	苯酞类	川芎	C ₁₂ H ₁₆ O ₂
LD7	Epimedin C	朝藿定C	4.89	1.90×10 ⁸	黄酮	淫羊藿	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉
LD8	Icariside I	淫羊藿次苷I	6.52	1.60×10 ⁸	黄酮	淫羊藿	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁
LD9	Formononetin-7-O-glucoside (Ononin)	芒柄花素-7-O-葡萄糖苷(芒柄花苷)	4.69	1.47×10 ⁸	黄酮	黄芪	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
LD10	Calycosin-7-O-glucoside	毛蕊异黄酮苷	3.81	1.33×10 ⁸	黄酮	黄芪	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
LD11	Cinnamaldehyde	肉桂醛	6.09	9.77×10 ⁷	酚酸类	肉桂/桂皮	C ₉ H ₈ O
LD12	Luteolin-4'-O-glucoside	木犀草素-4'-O-葡萄糖苷	4.16	7.26×10 ⁷	黄酮	黄芪、川芎等	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
LD13	Z-Ligustilide	Z-蒿本内酯	8.28	6.74×10 ⁷	苯酞类	川芎/当归	C ₁₂ H ₁₄ O ₂
LD14	Epimedin B	朝藿定B	4.81	4.39×10 ⁷	黄酮	淫羊藿	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉
LD15	Safflor yellow A	红花黄色素A	3.43	4.06×10 ⁷	醌类	红花	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
LD16	Cinnamic acid	肉桂酸	5.48	3.72×10 ⁷	酚酸类	肉桂/桂皮	C ₉ H ₈ O ₂
LD17	Neoligustilide	新藁本内脂	7.69	3.56×10 ⁷	苯酞类	川芎/当归	C ₁₂ H ₁₄ O ₂
LD18	Baohuoside I	宝藿苷 I (淫羊藿次苷II)	6.96	3.40×10 ⁷	黄酮	淫羊藿	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀
LD19	Epimedin A	朝藿定A	4.77	1.59×10 ⁷	黄酮	淫羊藿	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀
LD20	Ferulic acid	阿魏酸	4.14	2.40×10 ⁶	酚酸类	当归	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
LD21	Ginsenoside Rg1	人参皂苷 Rg1	4.46	4.84×10 ⁵	萜类	三七	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
LD22	Cyasterone	杯苋甾酮	4.34	2.23×10 ⁴	甾体	牛膝	C ₂₉ H ₄₄ O ₈
LD23	Notoginsenoside R1	三七皂苷 R1	4.3	6.66×10 ⁶	萜类	三七	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈
LD24	Ginsenoside Rb1	人参皂苷 Rb1	5.38	4.92×10 ⁷	萜类	三七	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃
LD25	Quercetin	槲皮素	5.07	5.67×10 ⁷	黄酮	黄芪、川芎等	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
LD26	Kaempferol	山柰酚	5.76	2.89E×10 ⁷	黄酮	黄芪、川芎等	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
LD27	Astragaloside A	黄芪甲苷A	6.03	4.10×10 ⁷	萜类	黄芪	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄
LD28	Cnidilide	蛇床内酯	8.23	4.06×10 ⁷	苯酞类	川芎	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
LD29	Apigenin-7-O-glucuronide	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	4.46	1.24×10 ⁶	黄酮	黄芪、川芎等	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁
LD30	8-Oxycoptisine	8-氧化黄连碱	3.87	4.93×10 ⁶	生物碱	黄连	C ₁₉ H ₁₃ NO ₅

注:序号:物质排列顺序;编号:物质代号;Compounds:物质英文名称;物质:物质中文名称;RT:物质保留时间;峰面积:物质峰面积;分类:物质中文一级类别;分子式:物质分子式.

及相关代谢信号通路的改变密切相关.如图2(a)所示,重症动脉粥样硬化患者的动脉组织中,有136个基因表达差异显著,其中ATP1A2、ACADL、TMEM35等基因的表达呈现明显下调,而MMP12、MMP9、CCL18、CCL3等基因的表达量则显著上升.对差异表达基因进行KEGG富集分析发现,动脉粥样硬化的发生发展与炎症、糖类及脂类代谢改变、吞噬小体和溶酶体功能异常[图2(b)]关系密切.此外,基于GO的富集分析也提示,炎症与氧化应激刺激信号通路的过度激活是促进动脉粥样硬化发展的重要因素[图2(c)].

为了进一步研究炎症与代谢信号通路之间的关系,采用基因集变异分析(GSVA)方法,对基因

芯片中的基因表达模式以及相关信号通路的激活与抑制状态进行了分析(图3).结果显示:动脉粥样硬化患者动脉组织中,炎症相关信号通路呈现过度活化(如GO positive reguation of dendritic cell antigen processing and presentation, GO positive reglation of complement activation);而微粒体代谢通路及糖代谢相关通路的信号活性(包括GOMF clyceraldehyde 3 phosphatase NAD+ non phosphorylating activity, GOMF lysophaophatidic acid phosphatase activity, MEDICUS beta alanine metabolism, MEDICUS Propionate metabolism)则受到显著抑制.这一结果提示炎症信号通路与代谢相关通路的信号活性失衡与动脉粥样硬化的发展密切相关.



(a) 基于GO数据库的GSVA分析结果;(b) 基于KEGG数据库的GSVA分析结果

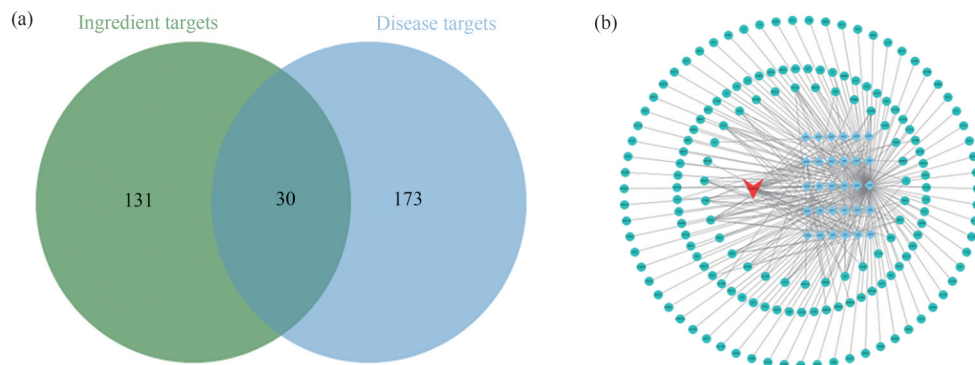
图3 动脉粥样硬化患者动脉组织的信号通路活化状态分析

Fig. 3 Analysis of the activation status of signaling pathways in arterial tissue of patients with atherosclerosis

(使用GSVA软件对信号通路的活化状态进行了分析)

AS疾病相关靶点.通过取交集获得30个交叉基因,并绘制韦恩图[图4(a)],这些交叉基因即WTG治疗AS的潜在作用靶点.使用Cytoscape软件构建“WTG-活性成分-靶点”网络图[图4(b)].在介数中心性

(betweenness)最高的前10种成分中,包括阿魏酸、槲皮素、朝藿定B、肉桂酸、药根碱、淫羊藿次苷I、掌叶防己碱、表小檗碱、肉桂醛和三七皂苷R1,这些成分可能在WTG治疗糖尿病及其并发症AS中发挥重要作用.



红色代表WTG,◇代表中药成分,○代表靶点基因.

(a) WTG成分靶点与动脉粥样硬化疾病靶点韦恩图;(b) WTG-活性成分-靶点网络图

图4 WTG成分与动脉粥样硬化疾病靶点关系图

Fig. 4 Diagram of WTG component and atherosclerosis disease target relationship

将交集靶点上传至STRING平台,获得蛋白质互作网络如图5所示.随后导入Cytoscape3.8.0软件

进行可视化分析,该网络共包含30个节点和254条边,其中连接线条代表蛋白质的作用关系,线条越

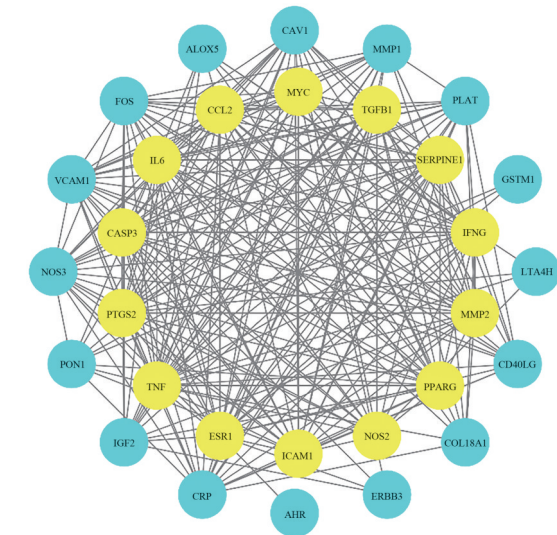


图5 WTG治疗动脉粥样硬化靶点的PPI网络

Fig. 5 PPI network of WTG therapeutic targets for atherosclerosis

密集表示相互作用越强.利用 Cytoscape3.8.0 插件 CytoNCA 对网络进行拓扑分析,以介数中心性为评价指标,识别出排名靠前的关键靶点,包括 ESR1、TNF- α 、PTGS2、CASP3、IL6、CCL2、MYC、TGFBI、

SERPINE1、IFNG、MMP2、PPARG、NOS2、ICAM1 等.这些靶点可能在 WTG 治疗动脉粥样硬化过程中发挥关键作用.

2.2.3 WTG 治疗动脉粥样硬化的 GO、KEGG 富集分析

利用 DAVID 数据库对 30 个交集靶点进行分析.如图 6 所示,在生物过程(Biological Processes)中,共富集到 265 个条目,主要包括对缺氧的反应、基因表达的正调控、对外源生物刺激的反应以及炎症反应等.细胞组成(Cellular Component)主要涉及细胞外间隙、血小板 α 颗粒管腔、细胞表面、质膜外侧面等.分子功能(Molecular Function)方面则主要富集于细胞因子活性、酶结合和转录辅因子结合等.依据 p 值筛选出 TOP20 条通路,KEGG 富集分析 30 个交叉靶点.结果显示,WTG 治疗动脉粥样硬化主要富集于脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 及炎症信号通路等关键通路,提示其可能通过这些途径发挥对动脉粥样硬化的预防与治疗作用.

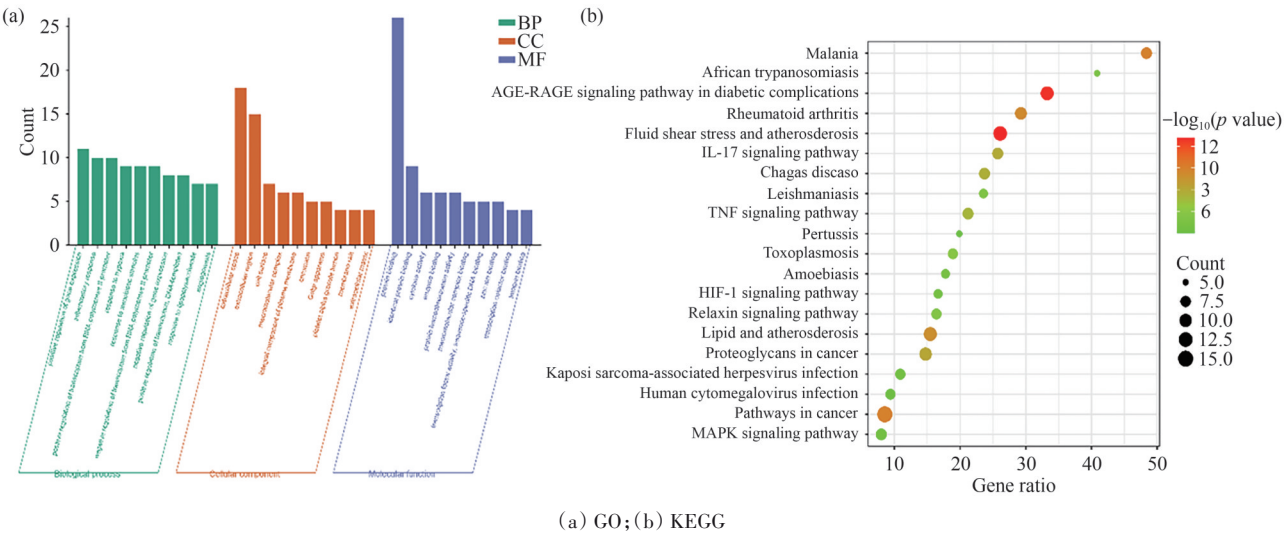


图6 WTG治疗动脉粥样硬化靶点GO和KEGG分析图

Fig. 6 GO and KEGG analysis diagram of WTG treatment target for atherosclerosis

2.3 WTG 治疗动脉粥样硬化靶点的分子对接分析

以 Betweenness 值为参照,筛选出 PPI 网络排名前 5 位的核心靶点,并与 Betweenness 值前 5 位的核心成分进行分子对接,结果见表 2.研究表明,结合能绝对值 $>7\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示有强烈结合活性, $>5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示稳定结合.活性成分药根碱、槲皮素与靶点的结合能均大于 $5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 而朝藿定 B 与靶点结合能均小于 $3.5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.AS 靶点与 WTG 活性成分的结合能力较好.

2.4 分子动力学模拟实验

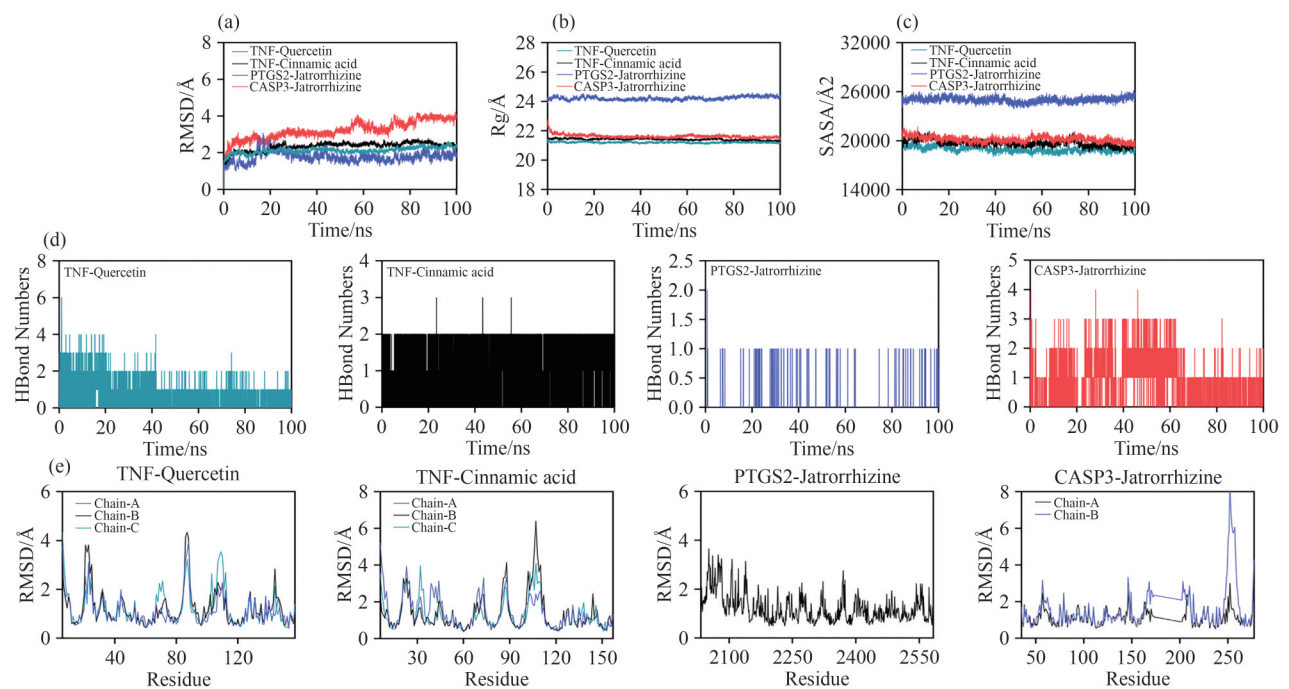
对蛋白质-配体复合物进行分子动力学模拟,结果见图 7.均方根偏差(RMSD)分析表明,各复合物体系均在模拟后期达到平衡.TNF-Quercetin 在 10 ns 后达到平衡,波动范围约为 $2.3\text{ \AA}$;TNF-Cinnamic acid 在 25 ns 后达到平衡,波动范围约为 $2.4\text{ \AA}$;PTGS2-Jatrorrhizine 在 45 ns 后达到平衡,波动范围约为 $2\text{ \AA}$;CASP3-Jatrorrhizine 在 80 ns 后达到平衡,波动范围约为 $4\text{ \AA}$,表明各复合物整体构象稳定.

回转半径(R_g)与溶剂可及表面积(SASA)在整

表2 活性成分与相关靶点分子对接最低结合能
Tab. 2 Minimum binding energy of active ingredients and related target molecules docking

核心成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	ESR1(5kra)	TNF(1a8m)	PTGS2(1cvu)	CASP3(1cp3)	IL6(1alu)
Quercetin(槲皮素)	-5.12	-9.00	-6.14	-5.29	-5.91
Ferulic acid(阿魏酸)	-4.26	-5.35	-5.17	-4.71	-5.41
Epimedin B(朝藿定 B)	-1.17	-2.36	-2.03	-3.15	-2.18
Cinnamic acid(肉桂酸)	-4.87	-6.50	-4.57	-4.17	-5.72
Jatrorrhizine(药根碱)	-5.33	-6.14	-8.80	-7.70	-6.05

注:括号内为蛋白 RSB ID.



(a) 蛋白质-配体复合物随时间变化的 RMSD 值;(b) 蛋白质-配体复合物随时间变化的 Rg 值;(c) 蛋白质-配体复合物随时间变化的 SASA 值;
(d) 蛋白质-配体复合物随时间变化的 HBonds 值;(e) 蛋白质-配体复合物的 RMSF 值

图7 蛋白质-配体复合物分子动力学模拟

Fig. 7 Protein-ligand complex molecular dynamics simulation

个模拟过程中波动平稳,提示复合物结构紧凑,未发生明显膨胀或收缩,配体结合未引起蛋白构象的显著变化。

氢键分析显示,TNF-Quercetin 复合物氢键数主要为 2 个(范围 0-6),TNF-Cinnamic acid 复合物主要为 2 个(0-3),PTGS2-Jatrorrhizine 复合物主要为 1 个(0-2),CASP3-Jatrorrhizine 复合物主要为 2 个(0-4),表明各体系均存在稳定的氢键相互作用。

均方根波动(RMSF)结果显示,各复合物中氨基酸残基的波动普遍较低(TNF 体系大多<4 Å,PTGS2 与 CASP3 体系大多<3 Å),提示蛋白柔性较小,结构稳定性较高。

综上,TNF-Quercetin、TNF-Cinnamic acid、PTGS2-Jatrorrhizine 和 CASP3-Jatrorrhizine 复合物在模拟中结构稳定,并保持一定的氢键相互作用,提示配体

与靶蛋白结合良好.RMSD 和 RMSF 分析显示 TNF-Quercetin、TNF-Cinnamic acid、PTGS2-Jatrorrhizine 和 CASP3-Jatrorrhizine 复合物在模拟中结构稳定,并保持一定的氢键相互作用;结合分子对接结果(4 组复合物结合能分别为-9.00、-6.5、-8.8、-7.7 kcal/mol),提示配体与靶蛋白结合稳定。

2.5 细胞验证实验

2.5.1 葡萄糖处理后各组 HUVECs 细胞活力

应用 GraphPad Prism 10.4.1 软件绘制拟合曲线(图 8),分析得到葡萄糖对 HUVECs 的 IC₅₀ 为 42.84 mmol·L⁻¹.造模浓度选用了 30 mmol·L⁻¹.选择低于 IC₅₀ 的浓度是为了构建“损伤模型”而非“致死模型”,以观察药物的保护作用。

2.5.2 含药血清对高糖损伤 HUVEC 细胞的保护作用

空白血清组细胞活力与模型组比,无显著差

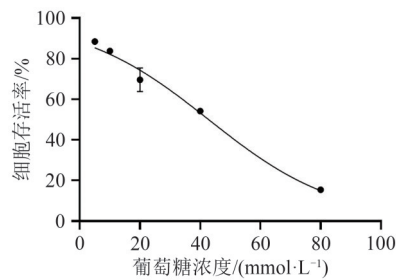


图8 不同浓度葡萄糖的HUVECs细胞活力

Fig. 8 Cell viability of HUVECs under different concentrations of glucose

异,含药血清组显著升高(** $P<0.01$),含药血清能保护受损细胞,提高细胞存活率,结果见表3.

表3 各组细胞活力的变化($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab. 3 Changes in cell viability of each group($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	细胞存活率/%
正常细胞组	99.43±0.61
30 mmol·L ⁻¹ 高糖组	56.71±1.12 ^{##}
空白血清组	58.22±1.18
低剂量血清组	66.06±1.15 ^{**}
高剂量血清组	76.27±2.48 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$.

2.5.3 SOD和LDH的表达

空白血清组与模型组比,差异不显著,含药血清组SOD活性升高(** $P<0.01$),LDH含量显著降低(** $P<0.01$),结果见表4.

表4 温阳通脉方对细胞LDH和SOD水平的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab. 4 Effect of Wenyang Tongmai Formula on the levels of LDH and SOD in cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	SOD酶活/(U·mg ⁻¹)	LDH值/(U·mg ⁻¹)
正常细胞组	31.08±1.13	128.47±4.62
30 mmol·L ⁻¹ 高糖组	16.34±1.11 ^{##}	255.69±4.90 ^{##}
空白血清组	15.70±0.85	248.44±5.86 [*]
低剂量血清组	20.08±0.86 ^{**}	214.94±4.24 ^{**}
高剂量血清组	25.34±0.71 ^{**}	189.13±6.48 ^{**}

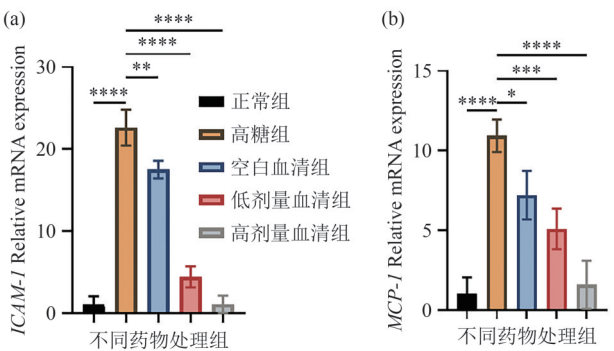
注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$.

2.5.4 各组细胞MCP-1和ICAM-1表达

模型组ICAM-1、MCP-1表达显著高于正常组,血清组均能逆转ICAM-1、MCP-1 mRNA的表达升高,含药血清效果非常显著(**** $P<0.001$),结果见图8.

3 讨论

心脑血管疾病发生的病因主要是AS,目前其发病机理尚未完全明确^[13].中医认为^[14],AS可辨证为气虚痰瘀、痰瘀互结等证型.根据病因病机和辨证分型,AS的中医治疗法则主要分为:益气活血化痰、健



与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{****} $P<0.001$.

图9 各组细胞ICAM-1和MCP-1的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 9 Expression of ICAM-1 and MCP-1 in cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

脾通络、补肾降浊、疏肝活血、清热活血解毒.AS归属中医“胸痹”范畴,病位在心脉,以阳气虚为本,痰瘀阻塞心脉为标.《灵枢·百病始生》中记载:“凝血蕴里而不散,津液涩渗,着而不去,而积皆成矣”,其核心机制为机体阳气亏虚,无力推动精血津液运行,或嗜食肥甘厚腻之品,致痰浊血瘀积聚于血脉,进而引起血管狭窄、内皮受损,加重心脑血管疾病进展.

WTG组方中,川芎提取物可通过调节自噬延缓高糖诱导的内皮细胞老化^[15];红花主要成分红花黄色素A(As-IV)可抑制血管内皮细胞凋亡^[16];淫羊藿苷诱导的微小RNA(mi-RNA)主要调控AS病变中PI3K/Akt信号通路、Ras信号通路、ErbB信号通路和VEGF信号通路,发挥抗AS的作用.黄连-川芎通过多组分、多靶点、多途径治疗冠状动脉粥样硬化及急性心肌梗死.肉桂的主要成分肉桂醛(CA)既能通过激活TRPA1-Ca²⁺胰岛素途径降低空腹血糖,也可通过抑制清道夫受体(CD36)介导的Toll样受体4/6-IL-1R相关激酶4/1(TLR4/6-IRAK4/1)信号通路减轻氧化应激,还能提高细胞活力,缓解心肌细胞损伤^[17].槲皮素可通过调控PI3K/Akt通路减轻炎症反应,改善小鼠AS进程^[18].阿魏酸、黄芪甲苷具有抗氧化作用,可保护血管内皮功能^[19-20].药根碱通过调节低密度脂蛋白受体(LDLR)和胆固醇7 α -羟化酶(CYP7A1)的mRNA表达,改善胆固醇的利用和排泄,实现降脂功效^[21].可见,WTG组方中各成分均具有保护血管内皮细胞、维护血管稳态的功效.

本文表明,WTG中发挥主要作用的活性成分包括槲皮素、阿魏酸、朝藿定B、肉桂酸、药根碱等,其药效成分作用的核心靶点为雌激素受体1(ESR1)、肿瘤坏死因子(TNF)、前列腺素内过氧化物合酶(PTGS2)、半胱天冬酶3(CASP3)、白细胞介素6(IL6)等.GO及KEGG富集结果显示,WTG治疗AS涉及的

信号通路包括流体剪切力与动脉粥样硬化通路及糖尿病并发症相关的晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)信号通路等。AGE是一类异质性修饰分子,其过度积累可促进活性氧(ROS)生成,导致线粒体功能受损^[22-24]。RAGE作为膜蛋白,配体为AGE等,可通过激活多种蛋白激酶,介导下游炎症信号通路。分子对接结果显示,槲皮素与TNF、药根碱与PTGS2的结合活性强。分子动力学模拟实验表明,TNF-Quercetin、TNF-Cinnamic acid、PTGS2-Jatrorrhizine和CASP3-Jatrorrhizine复合物体系结合稳定,且存在良好的氢键相互作用。因此,槲皮素(Quercetin)、肉桂酸(Cinnamic acid)和药根碱(Jatrorrhizine)小分子与TNF、PTGS2和CASP3靶蛋白结合作用良好。健康生物体内,氧化系统和抗氧化系统处于动态平衡状态,但是由于多种因素导致体内的活性氧水平与抗氧化剂平衡失调,即产生氧化应激^[25]。高糖状态产生的活性氧是细胞氧化应激损伤的重要机制^[26],LDH含量的增加,SOD含量降低常被用于反映细胞受损程度^[27-28]。MCP-1参与炎症反应和内皮细胞功能调控,可趋化单核细胞向血管内皮的炎症部位聚集,加重血管炎症^[29-30]。ICAM-1在动脉硬化早期细胞增殖过程中发挥重要作用^[31]。本文发现,高糖诱导HUVECs细胞后,模型组细胞活力显著降低,WTG给药组可改善氧化应激指标,升高SOD活性,降低LDH含量。模型组炎症相关功能因子ICAM-1和MCP-1表达上调,提示高糖诱导的氧化应激往往伴随炎症因子水平升高;给药后,两者表达均显著降低,表明WTG可抑制动脉粥样硬化早期炎症因子的分泌。

综上所述,WTG中的槲皮素、阿魏酸、朝藿定B、肉桂酸、药根碱等是延缓AS进展的关键药效成分,其作用机制可能与调控TNF、PTGS2、CASP3、IL6、ESR1等关键靶点相关。温阳类药物(如肉桂)在现代药理中常被证实与抗氧化应激作用相关,本文也进一步证实WTG可改善受损细胞氧化应激反应。结合GO及KEGG富集结果,WTG治疗AS涉及的信号通路包括流体剪切力与AS通路、类风湿关节炎通路与糖尿病并发症相关的AGE-RAGE信号通路等。推测WTG可能通过调控AGE-RAGE信号通路清除ROS、改善线粒体功能,从而减轻血管内皮细胞氧化损伤;同时参与调控流体剪切力与动脉粥样硬化、炎症相关信号通路等干预治疗AS。

参 考 文 献

- [1] Ralph S. Taking aim in the global fight against NCDs American Heart Association Scientific Session [N]. Daily News, 2013-11-16(9).
- [2] Roth G A, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015 [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2017, 70(1): 1-25.
- [3] 廖海涛,唐秋萍,张烯,等. 中药单体保护内皮细胞抗动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(11): 1619-1622.
- [4] Kong P, Cui Z Y, Huang X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: Signaling pathways and therapeutic intervention [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, 7(1): 131.
- [5] 周涛. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化的关系[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(5): 708-710.
- [6] 张荔,侯立静,孙付军,等. 温阳通脉颗粒对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国药物警戒, 2020, 17(12): 856-860, 866.
- [7] 侯立静,孙付军,张荔,等. 三七总皂苷对过氧化氢损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 69-71.
- [8] 张荔,孙付军,李贵海,黄芩甲苷对过氧化氢损伤模型人脐静脉内皮细胞的改善作用[J]. 中国药业, 2019, 28(22): 7-9.
- [9] 张荔,黄德红,孙付军,等. 淫羊藿苷对H₂O₂诱导HUVECs细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(10): 581-587.
- [10] 陈宇罡,屠艳琼,王聪庆,等. 应用网络药理学和分子对接技术探讨金虎通胆汤治疗胆石症的作用机制及实验验证[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(10): 1090-1098.
- [11] 王芹,申国明,王浩,等. 益气活血通络方对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎性因子表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(5): 65-69.
- [12] 罗云梅,付晓霞,杨丹莉,等. 淫羊藿苷对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及机制[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(1): 40-45.
- [13] 姜森青,于波. 滋养血管在动脉粥样硬化斑块进展中的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(3): 324-326.
- [14] 王椿野,赵振武,李新龙,等. 基于现代文献的动脉粥样硬化中医病机研究[J]. 环球中医药, 2013, 6(2): 92-95.
- [15] 王雪,方靖漪,杨静,等. 人参三七川芎提取物对高糖高脂诱导的衰老血管内皮细胞自噬的影响[J]. 中

- 国中医药信息杂志, 2019, 26(4): 52-56.
- [16] 卢芬萍, 苏宁, 朱明明, 等. 羟基红花黄色素A联合黄芪甲苷-IV对TNF- α 诱导内皮细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 88-94.
- [17] 宋宗辉, 张艺雯, 王玲洁, 等. 肉桂醛的药理活性及其研究进展[J]. 解放军药学报, 2018, 34(6): 550-554.
- [18] Lu X L, Zhao C H, Yao X L, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis *via* ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85: 658-671.
- [19] 裴可, 张倩, 杜孜玮, 等. 黄芪甲苷对动脉粥样硬化炎症反应及周细胞生物学功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2501-2506.
- [20] 魏康康, 刘敏, 赵小晗, 等. 黄连-川芎治疗冠状动脉粥样硬化和急性心肌梗死作用机制差异性的网络药理学分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(23): 4263-4271.
- [21] 吴昊. 药根碱对HepG2细胞和金黄地鼠的降血脂活性及机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [22] Mi L, Zhang Y, Xu Y, et al. HMGB1/RAGE pro-inflammatory axis promotes vascular endothelial cell apoptosis in limb ischemia/reperfusion injury [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 116: 109005.
- [23] Mi L, Zhang N, Wan J, et al. Remote ischemic post-conditioning alleviates ischemia/reperfusion-induced intestinal injury via the ERK signaling pathway-mediated RAGE/HMGB axis [J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 24(5): 773.
- [24] Zhang S, Feng Z, Gao W, et al. Aucubin attenuates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting the HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling pathway, oxidative stress, and apoptosis [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 544124.
- [25] 邓旭坤, 郑珊珊, 宋杨璐, 等. 去铁胺对丙戊酸钠诱导药物性肝损伤的保护作用[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2026, 45(3): 333-341.
- [26] Rani V, Deep G, Singh R K, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies[J]. Life Sciences, 2016, 148: 183-193.
- [27] Alak G, Yeltekin A Ç, Tas I H, et al. Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 65: 136-144.
- [28] Tas F, Karabulut S, Serilmez M, et al. Elevated circulating monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL-2) level may be an unfavorable predictive factor to platinum- and taxane-based combination chemotherapy in patients with gastric cancer[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2016, 77(1): 127-131.
- [29] 袁佳利, 刘静, 夏艳辉, 等. 单核细胞趋化蛋白-1与自身免疫性疾病研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2017, 14(2): 126-129.
- [30] Schmitt B M, Laschke M W, Rössler O G, et al. Nerve/glia antigen (NG) 2 is a crucial regulator of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2018, 1865(1): 57-66.

(责编&校对 刘钊)