

## 基于网络药理学解析冠心宁片抗血栓及新冠病毒引起的微血栓的潜在机制

公佩钰<sup>1,2</sup>, 肖光旭<sup>1,2</sup>, 李文君<sup>1,2</sup>, 樊官伟<sup>1,2</sup>, 吕明<sup>1\*</sup>, 朱金墙<sup>1\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193)

**摘要:** 血栓形成是增加新冠肺炎患者死亡率和导致长新冠后遗症的关键因素。由活血化瘀中药丹参、川芎组成的冠心宁片 (GXNT) 具有显著的抗血栓活性, 但其抗常规血栓与由新冠病毒引起微血栓机制之间的异同仍不清楚。本文运用体外抗血小板实验、网络药理学分析、分子对接技术和分子生物学实验, 初步揭示了 GXNT 治疗血栓及新冠病毒引起的微血栓的主要活性成分、潜在靶点和作用机制。体外血小板聚集和黏附实验结果表明, GXNT 具有显著的抗血小板聚集和黏附的活性, 且呈一定的剂量依赖性。网络药理学分析发现, GXNT 中的丹酚酸 B、丹参酮 IIA、咖啡酸和川芎嗪能够通过关键靶点高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL6) 和丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT serine/threonine kinase 1, AKT1) 来抗血栓及由新冠病毒引起的微血栓。其中, HMGB1 信号通路为其关键的共同机制之一。Western blot 实验结果也表明, GXNT 对血小板中 HMGB1 蛋白的表达水平有显著抑制作用。综上, 本文探究的 GXNT 抗常规血栓与由新冠病毒引起微血栓机制之间的异同为临床防治长新冠后遗症提供用药参考和理论依据。该动物实验已通过天津中医药大学实验动物伦理委员会审核批准 (编号: TCM-LAEC2023187g1549)。

**关键词:** 冠心宁片; 抗血栓; COVID-19; 长新冠; HMGB1 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2545-11

## Analysis of the mechanisms of Guanxinning Tablet for antithrombotic and microthrombotic effects caused by COVID-19 based on network pharmacology

GONG Pei-yu<sup>1,2</sup>, XIAO Guang-xu<sup>1,2</sup>, LI Wen-jun<sup>1,2</sup>, FAN Guan-wei<sup>1,2</sup>, LÜ Ming<sup>1\*</sup>, ZHU Jin-qiang<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, the First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** Thrombosis is a key factor that increases the mortality rate of COVID-19 patients and causes long COVID sequelae. Guanxinning Tablet (GXNT), which is composed of *Salvia miltiorrhiza* and *Ligusticum Chuanxiong*, has significant antithrombotic activity, but the similarities and differences between its anti-conventional thrombus and microthrombus induced by COVID-19 remain unclear. In this paper, the main active components, potential targets and mechanisms of GXNT in the treatment of thrombus and microthrombus caused by COVID-19 were preliminarily revealed by using anti-platelet experiments *in vitro*, network pharmacology

收稿日期: 2024-05-14; 修回日期: 2024-07-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82274436); 天津市教委科研计划项目 (2023KJ149); 正大青春宝药业有限公司技术服务委托项目 (QCB-YXB-20220029).

\*通讯作者 Tel: 18920772803, E-mail: zhujinqiang1860@163.com;

Tel: 18020039001, E-mail: minglyu@tjutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0460

analysis, molecular docking technology and molecular biology experiments. The results of platelet aggregation and adhesion experiments *in vitro* showed that GXNT had significant anti-platelet aggregation and adhesion activities in a dose-dependent manner. Using network pharmacology analysis, it was revealed that salvianolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid and ligustrazine in GXNT could resist thrombus and microthrombus caused by COVID-19 through key targets as the high mobility group box 1 protein (HMGB1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL6) and AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1). HMGB1 signaling pathway is one of its key common mechanisms. Western blot also indicated that GXNT significantly inhibited the expression of HMGB1 protein in platelets. In summary, this paper explores the similarities and differences between the mechanism of GXNT against conventional thrombus and microthrombus caused by COVID-19 and provides drug reference and theoretical basis for clinical prevention and treatment of long COVID sequelae. The animal experiment has been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (No. TCM-LAEC2023187g1549).

**Key words:** Guanxinling Tablet; anti-thrombosis; COVID-19; long COVID; HMGB1 signaling pathway

血栓形成是一个多因素参与的、复杂的病理生理过程,其导致的心肌梗死和缺血性脑卒中等缺血性事件是全球死亡和致残的主要原因<sup>[1]</sup>。在新型冠状病毒肺炎(COVID-19)暴发后,发现急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)能够引起COVID-19患者(尤其是长新冠患者)凝块强度(CS)增加、血小板对CS的贡献增加、纤维蛋白原对CS的贡献增加、D-二聚体水平升高等促凝特征,其表现为微血栓<sup>[2]</sup>。微血栓的形成不仅与SARS-CoV-2引起的内皮炎症、补体激活、凝血酶生成有关,而且SARS-CoV-2可能直接影响血小板功能来调节其血栓形成。目前,预防微血栓是减轻长新冠后遗症的重要策略之一<sup>[3,4]</sup>。

血小板作为血栓形成的主要参与者,在缺血性脑卒中、动脉粥样硬化、深静脉血栓、心肌梗死以及COVID-19等疾病的发展过程中,被活化而发生聚集和黏附,进而参与血管内血栓的形成<sup>[3-6]</sup>。目前,抗血小板药物主要有环加氧酶抑制剂(阿司匹林)、P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>拮抗剂(氯吡格雷、替卡格雷)、 $\alpha$ Ib $\beta$ 3拮抗剂(阿昔单抗)等<sup>[7]</sup>。但这些药物存在一定的不良反应,如引起胃肠道出血等<sup>[8,9]</sup>。研究发现,由活血化瘀中药丹参和川芎组成的冠心宁片(GXNT)具有显著的抗血栓作用,且不增加出血风险<sup>[10]</sup>,但GXNT抗血栓的潜在机制仍不清楚。因此,本研究运用体外抗血小板实验、网络药理分析、分子对接技术和分子生物学实验的方法探讨GXNT中有效活性成分抗血栓及COVID-19引起微血栓的共同靶点与机制,并通过体外血小板聚集实验、黏附实验和Western blot实验进行初步验证,以期GXNT的临床应用提供理论基础和科学依据。

## 材料与方法

**药品、试剂与细胞系** GXNT由正大青春宝药业

有限公司提供(国药准字Z20150028)。TBS(G0001)、Tween-20(GC204002)和prestained protein marker II(G2058-250UL)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。Y-Tec 5min(YWB0501)即用型封闭液购自上海七纯生物科技有限公司。Future PAGE™(ET15412LGel)蛋白预制胶购自常州伯仪生物科技有限公司。Affinity™ ECL kit(KF8003)购自Affinity Biosciences公司。Pierce™ BCA protein assay kits(23227)购自Thermo Fisher Scientific公司。SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(P0015L)、RIPA裂解液(P0013B)和蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(P1045)购自碧云天生物技术有限公司。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1, ab18256)和丝氨酸/苏氨酸激酶1(AKT serine/threonine kinase 1, AKT1, ab245355)购自Abcam公司。水蛭素(hirudin, H24700-1mg)购自上海吉至生化科技有限公司。凝血酶(thrombin, T4648-1KU)和纤维蛋白原(fibrinogen, F3879)购自Sigma公司。Calcein-AM(C3100MP)购自Invitrogen公司。4%细胞组织固定液(P1110)购自北京索莱宝科技有限公司。DMEM高糖培养基(12800-017)、fetal bovine serum(10099-141)和0.25% trypsin-EDTA(25200-072)购自Gibco公司。Penicillin streptomycin(SV30010)购自HyClone公司。EA.hy926人脐静脉细胞融合细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

多功能酶标仪(Varioskan Lux)、二氧化碳培养箱(51030670)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;高内涵筛选系统(Operetta)购自英国Perkin Elmer公司。

**实验动物** 健康雄性SD大鼠,体重200~220 g, SPF级,合格证号为110322231103253986,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号为SCXK(津)2020-0005。以上动物均在天津中医药大学实验室清

洁级动物中心饲养, 室温 20~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 采用标准方式饲养, 明暗环境各交替 12 h。该动物实验已通过天津中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(编号: TCM-LAEC2023187g1549), 动物福利和实验过程均遵循天津中医药大学实验动物伦理委员会的规定。

**血小板的提取** 三溴乙醇将大鼠麻醉, 利用含有 1 mL 抗凝剂 (ACD) 的 10 mL 注射器进行腹主动脉取血。血液 200 ×g 离心, 10 min 后, 吸取上清液得到富血小板血浆 (PRP)。在其中加入适量的前列腺素 PGE<sub>1</sub>, 使其终浓度为 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 800 ×g 离心 10 min, 得到血小板和红细胞的分层液。用 buffer 缓冲液轻柔缓慢地重悬血小板, 并将血小板吸至干净的 EP 管中, 最后将每毫升血小板数量调整为 2×10<sup>8</sup> 个。

**血小板聚集实验** 将血小板分为 control 组、模型 (thrombin) 组、阳性药 (水蛭素, hirudin, 20 μmol·L<sup>-1</sup>) 组、0.03 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT 组、0.1 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT 组和 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT 组。阳性药组和不同剂量 GXNT 组预给药 2 h 后, 取各组 150 μL 的预给药血小板加到 96 孔白板中, 并加入 50 μL 含激动剂 thrombin 和 CaCl<sub>2</sub> 的 buffer 缓冲液, 使 thrombin 的终浓度为 0.3 U·mL<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 的终浓度为 2 mmol·L<sup>-1</sup>。Control 组孔内血小板加入 50 μL 不含激动剂的 buffer 缓冲液。利用多功能酶标仪检测各组 405 nm 波长处的 A 值, 每次间隔 30 s, 持续检测 45 min, 观测各组 A 值变化。按照  $(A_{t=0} - A_{t=n}) / A_{t=0} \times 100\%$  计算各组不同时间点的血小板聚集率, 减去 control 组得到去除自身干扰的血小板聚集率, 并绘制成曲线图。

**血小板与纤维蛋白原的黏附实验** 提取好的血小板加入 Calcein-AM 至终浓度为 2 μmol·L<sup>-1</sup>, 室温染色 30 min, 650 ×g 离心 3 min, 弃去上清液, buffer 重悬并离心, 重复清洗 3 次, 最后用 buffer 将血小板稀释至原体积的 5 倍。分组处理同上述血小板聚集实验。阳性药组和不同剂量 GXNT 组预给药 2 h 后, 取各组 99 μL 的血小板加到铺有纤维蛋白原的 96 孔黑板中, 并加入 1 μL 10 U·mL<sup>-1</sup> 激动剂 thrombin, 使其终浓度为 0.1 U·mL<sup>-1</sup>。Control 组孔内仅加 100 μL 血小板, 不加激动剂。37 °C 孵育 30 min, 100 μL PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μL 的 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min。PBS 清洗 1 次, 每孔再加入 100 μL PBS, 用高内涵分析系统检测黏附的血小板数量。血小板黏附率 =  $(\text{Count}_{\text{模型组/实验组}} - \text{Count}_{\text{空白组}}) / (\text{Count}_{\text{模型组}} - \text{Count}_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**血小板与内皮细胞的黏附实验** 将 EA.hy926 细胞接种于 96 孔黑板中, 待细胞生长至 90% 以上时, 提取大鼠血小板。标记血小板的方法同上述血小板与纤

维蛋白原黏附实验, 分组处理同上述血小板聚集实验。阳性药组和不同剂量 GXNT 组预给药 2 h 后, 取各组 99 μL 血小板加到铺有 EA.hy926 内皮细胞的 96 孔黑板中, 并加入 1 μL 10 U·mL<sup>-1</sup> 激动剂 thrombin, 使其终浓度为 0.1 U·mL<sup>-1</sup>。Control 组孔内仅加 100 μL 血小板, 不加激动剂。37 °C 孵育箱中继续培养 24 h, 100 μL PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μL 的 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, 高内涵分析系统检测黏附的血小板数量。

**GXNT 活性成分与靶点筛选** 通过检索 GXNT 的成分鉴定文章并结合中国药典确定 GXNT 中的 20 种单体成分。PubMed 文献查阅检索出丹参中的隐丹参酮、丹参素、二氢丹参酮 I、紫草酸、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参酮 I、丹参酮 IIA 有 296 个已报道的相关靶点。川芎中的咖啡酸、绿原酸、阿魏酸、藁本内酯、原儿茶酸、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、川芎嗪、香草醛有 240 个相关靶点。整合以上靶点删除重复数据后得到 GXNT 的靶点 414 个。

**疾病靶点筛选** 以“thrombosis”、“COVID-19”和“microthrombosis”为关键词, 以 Gene Cards 数据库的前 30% 为原则, 结合 Ingenuity Pathway Analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com>) 选取疾病相关靶点, 并查找重要组学文献对未筛选出的靶点进行补充。整合疾病靶点删除重复数据后得到 thrombosis 的靶点 575 个、COVID-19 的靶点 2 178 个和 microthrombosis 的靶点 535 个。

**药物与疾病交集靶点的筛选** 运用 Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将 GXNT 中主要活性成分的靶点与 thrombosis、COVID-19、microthrombosis 相关的疾病靶点取交集, 制作韦恩图。

**GO 和 KEGG 富集分析** 利用 IPA 的“overlay-canonical pathway”模块分析靶点相关的核心通路, 并进行类似基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 和基因本体 (Gene Ontology, GO) 的富集分析。通过 IPA 获得排名前 20 的通路和生物学疾病功能, 运用 Origin 2022 制作气泡图进行可视化展示。

**构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络** 利用 IPA 的“upstream regulator”模块和 PPI 数据关系, 并结合靶点数据库, 选取排名前 20 的核心靶点, 在“build-connection”模块中构建核心靶点与其他靶点的 PPI 关系图。

**药物-活性成分-核心靶点-通路关系图** 利用 IPA 的“overlay-canonical pathway”模块进行交集靶点的 KEGG 富集分析, 导出排名前 20 通路的数据信息, 结合核心成分和核心靶点, 运用 Origin 2022 制作桑基

图进行可视化展示。

**Western blot** 对上述血小板聚集实验的各组血小板进行离心收集,裂解得到含有蛋白的上清液,用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。利用SDS-PAGE对蛋白样品进行分离,并转移至PVDF膜。Y-Tec 5 min即用型封闭液封闭10 min,一抗(HMGB1, 1:1 000; GAPDH, 1:10 000)孵育,4 °C过夜。次日,洗膜,二抗孵育,室温1 h。利用化学发光成像仪检测蛋白条带,用Image J软件分析条带灰度值。

**分子对接** 在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载关键作用靶点蛋白的“PDB”格式晶体结构,在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载核心活性成分的“SDF”格式结构。通过Discovery Studio 2019 Client软件中的“大分子”模块对蛋白质进行去水、加氢等操作,利用“小分子”模块对配体进行预处理。通过-cdocking energy评价受体-配体相互作用情况,值越大则结合越好,并展示3D和2D效果图。

**统计学分析** 使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析,单因素多组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 结果

### 1 GXNT对thrombin诱导血小板聚集和黏附的影响

为了检测GXNT的抗血小板活化作用,本研究进行体外血小板聚集和黏附实验。在thrombin诱导血小

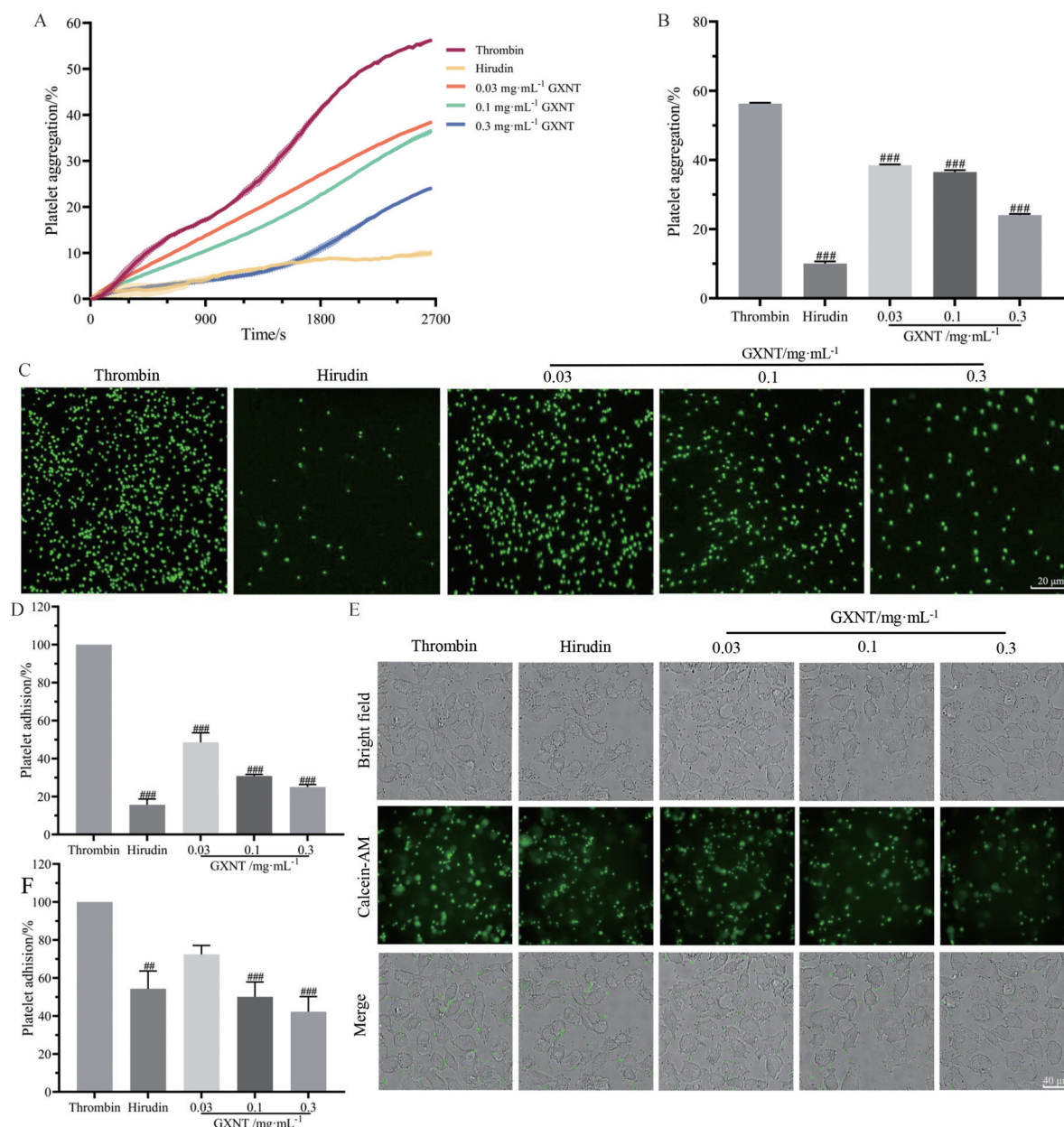
板聚集实验中,thrombin能够导致血小板聚集,且聚集率随时间增长而增加,而阳性药hirudin和不同剂量GXNT能够显著降低thrombin诱导的血小板聚集(图1A、B)。在血小板与细胞外基质的黏附实验中,阳性药hirudin和不同剂量GXNT也显著降低thrombin诱导的血小板与纤维蛋白原的黏附(图1C、D)。为了进一步模拟血管内的血小板黏附,本研究使用thrombin诱导血小板与内皮细胞之间的黏附,发现阳性药hirudin和剂量为0.1和0.3 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT显著抑制thrombin诱导的血小板与内皮细胞的黏附,虽然0.03 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT未产生明显的抑制作用,但仍存在一定的抑制趋势(图1E、F)。总之,这些结果指出GXNT能够对血小板的聚集和黏附产生显著的抑制作用。

### 2 GXNT抗血栓及COVID-19引起微血栓的作用靶点

为探究GXNT抗血栓及COVID-19引起微血栓的作用靶点,将414个GXNT的作用靶点与575个血栓形成的作用靶点通过Venny图取交集,得到117个共同靶点,即GXNT抗血栓的潜在靶点。将414个GXNT作用靶点、2 178个COVID-19疾病靶点和535个微血栓形成的靶点通过Venny图取交集,得到54个交集靶点,即GXNT抗COVID-19引起微血栓的潜在靶点。将上述得到的117个交集靶点和54个交集靶点导入IPA进行PPI关系分析。再根据上游调控因子的P-value值,分别列出GXNT抗血栓和抗COVID-19引起微血栓的前20个核心靶点(表1、2)。其中,GXNT抗血栓及COVID-19引起微血栓的共同靶点有HMGB1、IL17A、AKT1、IL1B、STAT3、HMOX1、IL6、TNF、IL10、TLR2,

**Table 1** Network pharmacology analysis-core targets of GXNT against thrombosis

No.	Symbol	Entrez gene name	Location	Type	P-value of overlap
1	TNF	Tumor necrosis factor	Extracellular space	Cytokine	1.53E-56
2	APOE	Apolipoprotein E	Extracellular space	Transporter	2.15E-50
3	NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	Nucleus	Ligand-dependent nuclear receptor	2.15E-46
4	LEP	Leptin	Extracellular space	Growth factor	3.84E-46
5	IL1B	Interleukin 1 beta	Extracellular space	Cytokine	5.36E-46
6	IL6	Interleukin 6	Extracellular space	Cytokine	7.29E-44
7	IL17A	Interleukin 17A	Extracellular space	Cytokine	3.52E-39
8	IL10	Interleukin 10	Extracellular space	Cytokine	1.28E-38
9	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Nucleus	Transcription regulator	6.67E-38
10	TLR4	Toll like receptor 4	Plasma membrane	Transmembrane receptor	4.81E-37
11	TNFRSF1A	TNF receptor superfamily member 1A	Plasma membrane	Transmembrane receptor	2.73E-36
12	PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Nucleus	Ligand-dependent nuclear receptor	3.48E-35
13	TLR2	Toll like receptor 2	Plasma membrane	Transmembrane receptor	1.8E-34
14	HMOX1	Heme oxygenase 1	Cytoplasm	Enzyme	3.71E-32
15	IL2	Interleukin 2	Extracellular space	Cytokine	3.45E-30
16	MYD88	MYD88 innate immune signal transduction adaptor	Plasma membrane	Other	3.48E-30
17	F2	Coagulation factor II, thrombin	Extracellular space	Peptidase	3.44E-23
18	JAK2	Janus kinase 2	Cytoplasm	Kinase	4.76E-20
19	HMGB1	High mobility group box 1	Nucleus	Transcription regulator	9.48E-17
20	AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	Cytoplasm	Kinase	8.22E-13



**Figure 1** Guanxinling Tablet (GXNT) significantly inhibits thrombin induced platelet aggregation and adhesion. A: The change curves of platelet aggregation at different time points in each group after thrombin activation of platelets; B: Quantification of thrombin activation of platelets for 45 min; C: Representative images of thrombin induced platelet adhesion to fibrinogen; D: Quantification of thrombin induced platelet adhesion to fibrinogen; E: Representative images of thrombin induced platelet adhesion to endothelial cells; F: Quantification of thrombin induced platelet adhesion to endothelial cells.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group

GXNT 抗血栓的特异靶点有 TLR4、MYD88、JAK2、TNFRSF1A、PPARG、F2、APOE、IL2、LEP、NR3C1, GXNT 抗 COVID-19 引起微血栓的特异靶点有 VEGFA、MTOR、EGFR、HSPA5、MAPK1、LDLR、MAPK14、HIF1A、NR3C1、PTGS2 (表 3)。

### 3 药物-活性成分-核心靶点-通路网络图

GXNT 抗血栓的药物-活性成分-核心靶点-通路网络图见图 2A, 抗 COVID-19 引起微血栓的网络图见图 2B。

### 4 GO 功能富集与 KEGG 通路分析

GO 富集分析表明, GXNT 抗血栓排名前 20 的疾病与功能的相关条目包括心血管病、机体损伤和异常、炎症反应、细胞运动、免疫细胞运输、炎症性疾病、血液疾病、血液系统的发展与功能、细胞间的信号传导和相互作用、呼吸道疾病、清除自由基、有机体的生存、骨骼和肌肉疾病、心血管系统的发展与功能、有机体的发展、组织形态、结缔组织疾病、免疫疾病、内分泌系统疾病、胃肠道疾病 (图 3A)。GXNT 抗 COVID-19 引起微

**Table 2** Network pharmacology analysis-core targets of GXNT against microthrombosis induced by COVID-19

No.	Symbol	Entrez gene name	Location	Type	P-value of overlap
1	IL1B	Interleukin 1 beta	Extracellular space	Cytokine	4.66E-36
2	IL17A	Interleukin 17A	Extracellular space	Cytokine	8.54E-33
3	TNF	Tumor necrosis factor	Extracellular space	Cytokine	1.58E-32
4	IL10	Interleukin 10	Extracellular space	Cytokine	2.82E-28
5	NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	Nucleus	Ligand-dependent nuclear receptor	8.48E-28
6	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	Nucleus	Transcription regulator	2.08E-27
7	HMOX1	Heme oxygenase 1	Cytoplasm	Enzyme	5.16E-27
8	IL6	Interleukin 6	Extracellular space	Cytokine	1.16E-25
9	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Nucleus	Transcription regulator	1.46E-25
10	EGFR	Epidermal growth factor receptor	Plasma membrane	Kinase	7.86E-22
11	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	Cytoplasm	Kinase	1.68E-19
12	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Cytoplasm	Enzyme	1.1E-17
13	TLR2	Toll like receptor 2	Plasma membrane	Transmembrane receptor	2.54E-17
14	LDLR	Low density lipoprotein receptor	Plasma membrane	Transporter	1.2E-16
15	MTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase	Nucleus	Kinase	3.83E-16
16	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Extracellular space	Growth factor	1.3E-15
17	HMGB1	High mobility group box 1	Nucleus	Transcription regulator	1.67E-15
18	AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	Cytoplasm	Kinase	1.49E-09
19	HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	Cytoplasm	Enzyme	9.14E-05
20	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	Cytoplasm	Kinase	3.72E-03

**Table 3** Comparison of core targets of GXNT against thrombosis and microthrombosis induced by COVID-19

Category	Target
Common targets of GXNT against thrombosis and microthrombosis induced by COVID-19	HMGB1, IL17A, AKT1, IL1B, STAT3, HMOX1, IL6, TNF, IL10, TLR2
Specific targets of GXNT against thrombosis	TLR4, MYD88, JAK2, TNFRSF1A, PPARG, F2, APOE, IL2, LEP, NR3C1
Specific targets of GXNT against microthrombosis induced by COVID-19	VEGFA, MTOR, EGFR, HSPA5, MAPK1, LDLR, MAPK14, HIF1A, NR3C1, PTGS2

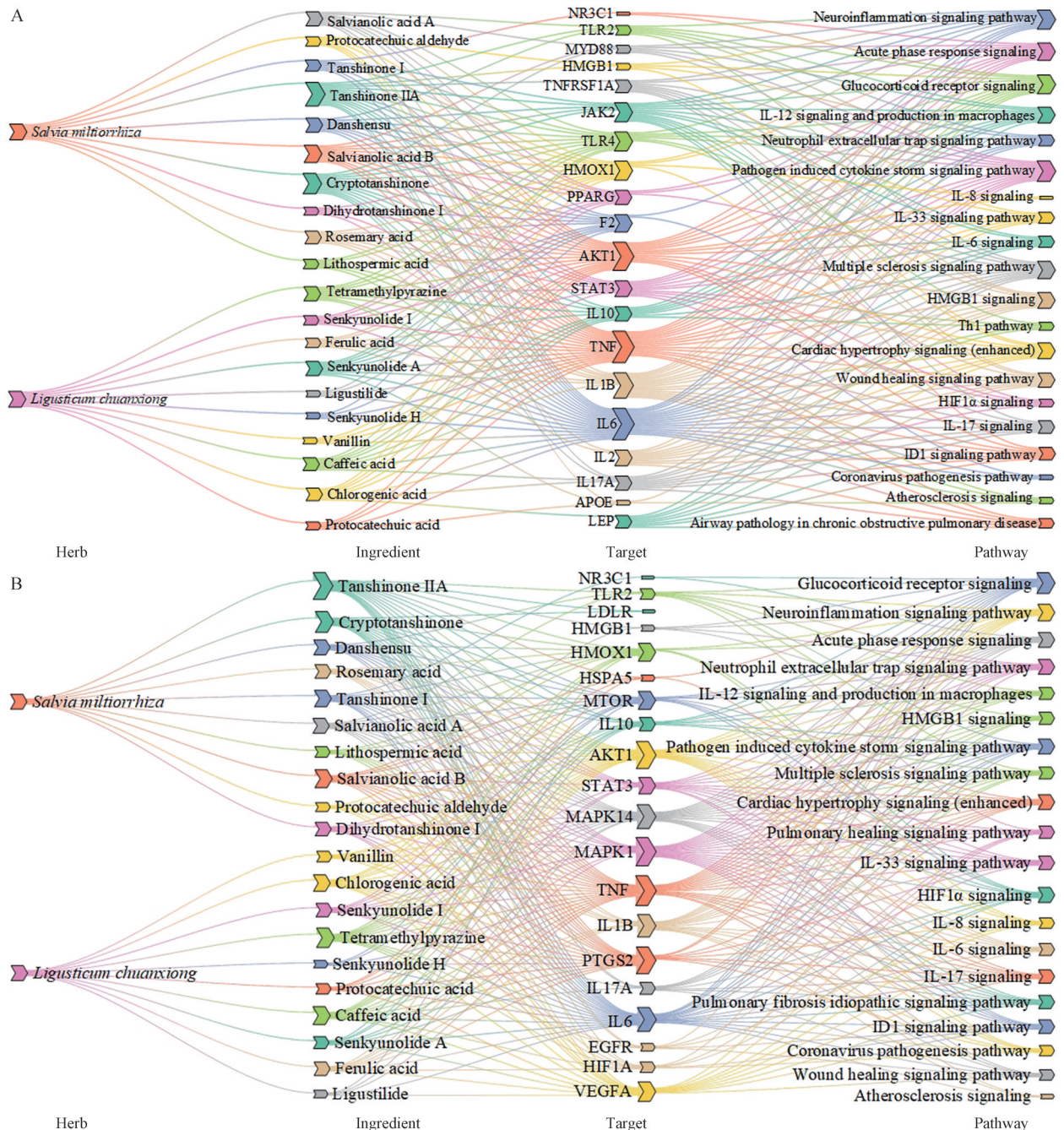
血栓排名前20的疾病与功能的相关条目包括细胞运动、免疫细胞运输、血液系统的发展与功能、心血管病、有机体损伤和异常、炎症反应、组织形态、组织发展、呼吸道疾病、细胞死亡与存活、清除自由基、心血管系统的发展与功能、有机体的发展、结缔组织疾病、炎症性疾病、骨骼和肌肉疾病、有机体的生存、细胞信号传导、小分子生物化学、免疫疾病(图3B)。

KEGG富集分析表明, GXNT抗血栓排名前20的相关通路包括神经炎症信号通路、病原体诱导的细胞因子风暴信号通路、糖皮质激素受体信号通路、IL-33信号通路、HMGB1信号通路、IL-17信号通路、ID1信号通路、IL-12在巨噬细胞中的信号转导和产生、HIF-1 $\alpha$ 信号通路、IL-8信号通路、中性粒细胞胞外陷阱信号通路、急性相位反应信号、动脉粥样硬化信号通路、心肌肥厚信号(增强)通路、冠状病毒发病途径、Th1通路通路、伤口愈合信号通路、多发性硬化信号通路、慢性阻塞性肺疾病的气道病理学、IL-6信号通路(图3C)。GXNT抗COVID-19引起微血栓排名前20的相关通路

包括糖皮质激素受体信号通路、IL-33信号通路、HMGB1信号通路、ID1信号通路、神经炎症信号通路、IL-8信号通路、IL-6信号通路、急性相位反应信号、IL-17信号通路、肺纤维化特发性信号通路、HIF-1 $\alpha$ 信号通路、病原体诱导的细胞因子风暴信号通路、中性粒细胞胞外陷阱信号通路、多发性硬化信号通路、肺愈合信号通路、冠状病毒发病途径、动脉粥样硬化信号通路、伤口愈合信号通路、IL-12在巨噬细胞中的信号转导和产生、心肌肥厚信号(增强)通路(图3D)。根据GXNT可调控的基因集合映射到通路中的基因数目与该通路总的基因数目比值, 即ratio, 最终发现HMGB1信号通路为GXNT抗血栓及COVID-19引起微血栓共同的关键信号通路, 该通路中涉及的蛋白分子见图3E。

## 5 分子对接结果

通过“药物-活性成分-核心靶点-通路”网络图的可视化分析, 根据节点大小及连接线的数量, 发现GXNT中的4种关键活性成分为丹酚酸B、丹参酮IIA、咖啡酸、川芎嗪, 且抗血栓及COVID-19引起微血栓的



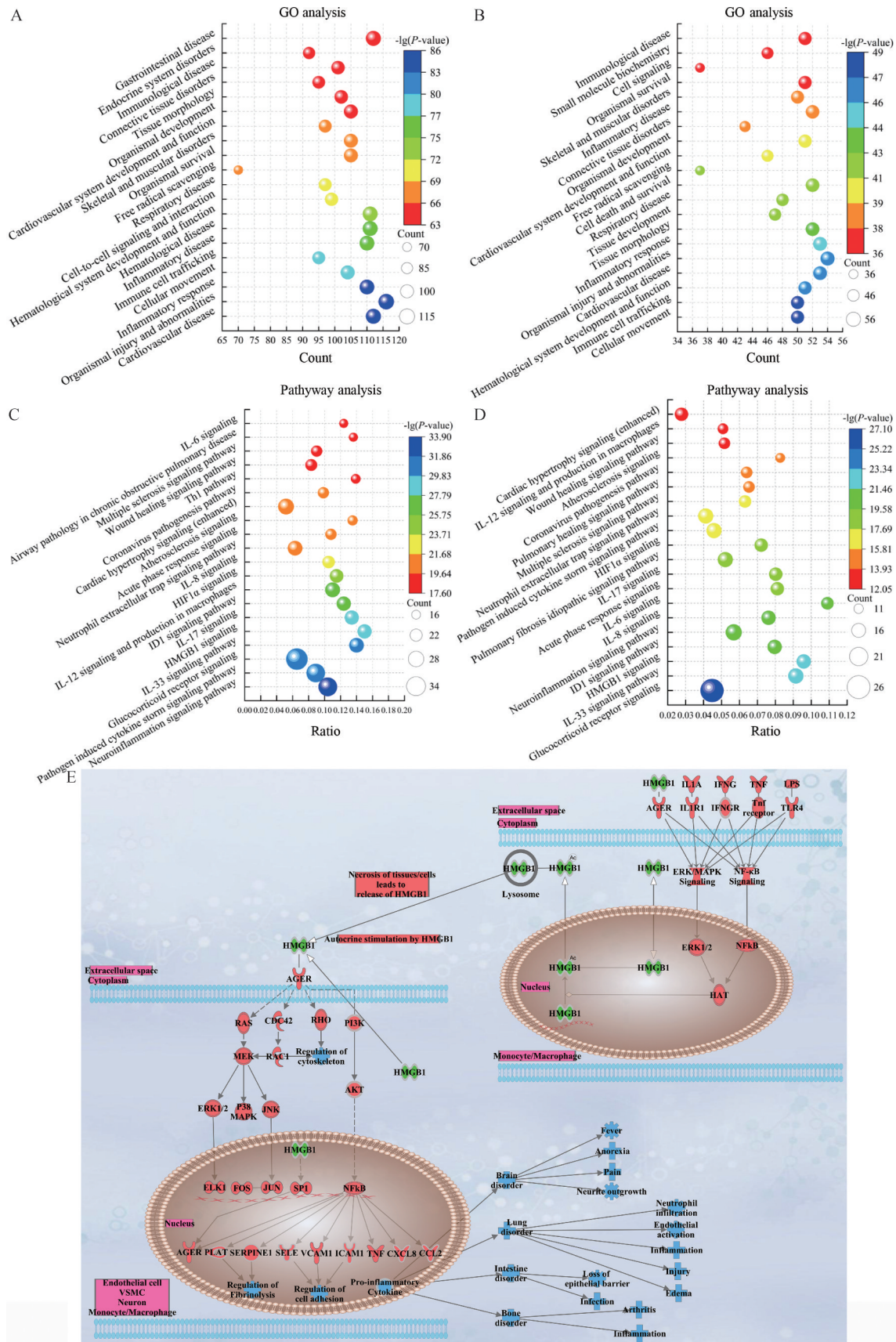
**Figure 2** The "drugs-active ingredients-core targets-pathways" network diagram. A: GXNT against thrombosis; B: GXNT against microthrombosis induced by COVID-19

关键靶点为 TNF、IL6。KEGG 富集分析结果可知, 靶点 HMGB1 与其相关性较高, GO 富集分析结果可知, 心血管疾病与其相关性较高。因此, 将 TNF、IL6、HMGB1 和 AKT1 作为关键靶点进行分子对接, 并选用落新妇苷、人参皂苷 Rh1、冬凌草甲素、甘草酸分别作为阳性对照, 配体和蛋白之间的结合情况用 -cdocker energy 表示, 值越大则结合越好 (图4)。通过上述分析和分子对接结果揭示了丹参酮 IIA、咖啡酸和川芎嗪为

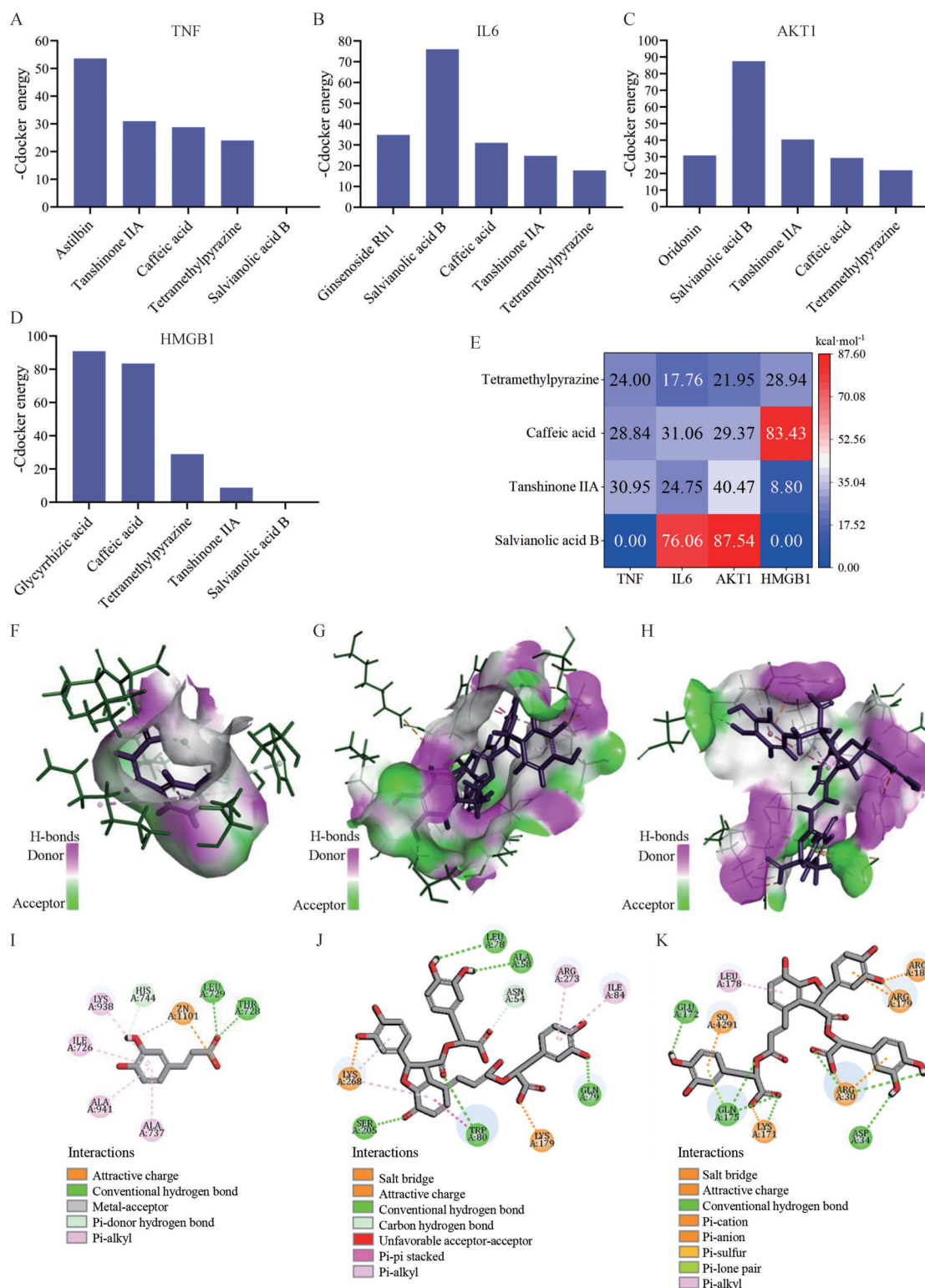
GXNT 通过 HMGB1 信号通路发挥抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的重要活性成分。

## 6 GXNT 对 HMGB1 信号通路中 HMGB1 蛋白表达的影响

为验证上述分析结果的准确性, 本研究通过 Western blot 评价 GXNT 对 thrombin 激活的血小板 HMGB1 信号通路中 HMGB1 蛋白表达的影响。结果显示, thrombin 可以上调 HMGB1 蛋白的表达水平, 与

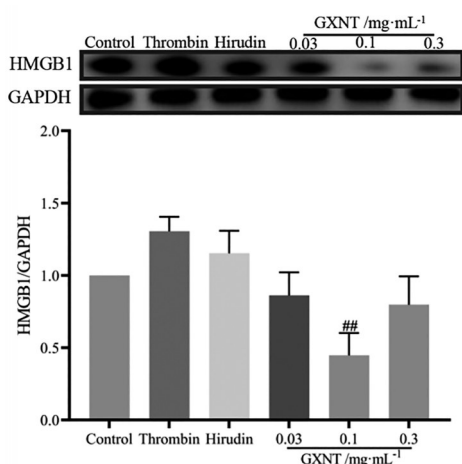


**Figure 3** The analysis of potential mechanisms. A: GO functional enrichment of GXNT against thrombosis; B: GO functional enrichment of GXNT against microthrombosis induced by COVID-19; C: KEGG pathway analysis of GXNT against thrombosis; D: KEGG pathway analysis of GXNT against microthrombosis induced by COVID-19; E: The HMGB1 signaling pathway



**Figure 4** Molecular docking. A: The score of -CDOCKER energy of astilbin, salvanolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid, tetramethylpyrazine and TNF; B: The score of -CDOCKER energy of ginsenoside Rh1, salvanolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid, tetramethylpyrazine and IL6; C: The score of -CDOCKER energy of oridonin, salvanolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid, tetramethylpyrazine and AKT1; D: The score of -CDOCKER energy of glycyrrhizic acid, salvanolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid, tetramethylpyrazine and HMGB1; E: Heat map based on the -CDOCKER energy of salvanolic acid B, tanshinone IIA, caffeic acid, tetramethylpyrazine and TNF, IL6, HMGB1, AKT1; F-H: 3D model showed the active binding sites of caffeic acid interacting with HMGB1 (F), salvanolic acid B with AKT1 (G), and salvanolic acid B with IL6 (H); I-K: 2D model showed the active binding sites of caffeic acid interacting with HMGB1 (I), salvanolic acid B with AKT1 (J), and salvanolic acid B with IL6 (K)

模型组 (thrombin) 比较, 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> GXNT 能够导致 HMGB1 蛋白表达水平的显著降低 (图 5), 此实验结果与上述 KEGG 预测结果保持一致。



**Figure 5** Effects of GXNT on the expression level of HMGB1 protein in HMGB1 signaling pathway.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group

## 讨论

微血栓的高发不仅是 COVID-19 患者的临床特征之一, 也是导致一系列长新冠后遗症的重要因素<sup>[11]</sup>。本研究证实了 GXNT 对血小板聚集和黏附具有显著的抑制作用, 而这展示出 GXNT 对 COVID-19 引起微血栓的治疗潜力。通过网络药理学分析及分子对接发现, HMGB1 信号通路为 GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的共同机制, 且丹参酮 IIA、咖啡酸、川芎嗪是其活性成分。此外, Western blot 实验结果也证明了 GXNT 能够降低激活后血小板中 HMGB1 蛋白的表达水平。而最近研究发现, 靶向 HMGB1 可能成为治疗 COVID-19 的潜在治疗策略<sup>[12]</sup>。SARS-CoV-2 病毒能够激活血小板, 使其高表达 HMGB1 蛋白, 而对其进行抑制可阻止血栓形成<sup>[13]</sup>。Wei 等<sup>[13]</sup>研究发现, 抑制 HMGB1 及下游通路是缓解小鼠模型中卡拉胶诱导血栓形成的重要策略。同时, 这些报道为本研究揭示 HMGB1 信号通路为 GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的共同机制提供了一定支持, 也增加了网络药理学分析结果的可靠性。

除 HMGB1 外, IL17A、AKT1、IL1B、STAT3、HMOX1、IL6、TNF、IL10、TLR2 也是 GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的共同靶点。由此发现, GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的作用机制以抑制炎症反应为主。众所周知, COVID-19 患者中出现的内皮炎症、补体激活、凝血酶生成、血小板和白细胞招募, 以及先天和适应性免疫反应的启动, 将最终导致免疫

血栓形成<sup>[3]</sup>。因此, 减轻炎症反应和免疫应答是抑制 COVID-19 引起微血栓的关键<sup>[3,14]</sup>。此外, 由表 3 中差异靶点可知, 与抗常规血栓不同的是 GXNT 抗 COVID-19 引起的微血栓更偏向于调控 MAPKs 信号通路。MAPKs 信号通路作为一种重要的血小板激活途径, 可以被胶原蛋白和凝血酶激活, 进而介导血小板变形、黏附和聚集, 参与血栓形成<sup>[15,16]</sup>。GXNT 对 MAPKs 信号通路中相关靶点的调控有助于减轻 COVID-19 引起的微血栓。以上这些说明 GXNT 可作为防治 COVID-19 患者中微血栓形成的候选药物。

然而, 本研究也存在一些局限性, GXNT 的成分复杂, 其抗血栓形成的潜在机制可能是多方面的。对于 GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的其他共同机制, 如糖皮质激素受体信号通路、IL-33 信号通路、IL-8 信号通路等, 也应进一步验证。此外, 进行 SARS-CoV-2 病毒的研究, 对实验室条件要求较高, 导致相关实验不易开展, 虽然网络药理学分析为揭示 GXNT 抗血栓及 COVID-19 引起微血栓的共同机制提供了可能, 却仍缺乏直接的实验证据。但是, 本研究探讨 GXNT 抗常规血栓与由 COVID-19 引起微血栓之间的共同机制, 不仅为临床治疗血栓导致的相关疾病提供了用药参考, 也为临床防治长新冠后遗症提供了理论依据和候选药物。

**作者贡献:** 朱金墙和吕明负责实验设计及论文指导; 公佩钰和肖光旭负责实验操作及文章撰写; 李文君协助实验开展; 樊官伟负责修订文章。

**利益冲突:** 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2023, 147: e93-e621.
- [2] Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18: 1747-1751.
- [3] McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The emerging threat of (micro)thrombosis in COVID-19 and its therapeutic implications [J]. *Circ Res*, 2020, 127: 571-587.
- [4] Gyöngyösi M, Alcaide P, Asselbergs FW, et al. Long COVID and the cardiovascular system-elucidating causes and cellular mechanisms in order to develop targeted diagnostic and therapeutic strategies: a joint scientific statement of the esc working groups on cellular biology of the heart and myocardial and pericardial diseases [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119: 336-356.
- [5] Jha V, Xiong B, Kumari T, et al. A critical role for ERO1 $\alpha$  in arterial thrombosis and ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2023, 132:

- e206-e222.
- [6] Wu MD, Atkinson TM, Lindner JR. Platelets and von Willebrand factor in atherogenesis [J]. *Blood*, 2017, 129: 1415-1419.
- [7] Mackman N, Bergmeier W, Stouffer GA, et al. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 333-352.
- [8] Lin L, Lim WS, Zhou HJ, et al. Clinical and safety outcomes of oral antithrombotics for stroke prevention in atrial fibrillation: a systematic review and network meta-analysis [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2015, 16: 1103.e1-19.
- [9] Dregan A, Ravindrarajah R, Charlton J, et al. Long-term trends in antithrombotic drug prescriptions among adults aged 80 years and over from primary care: a temporal trends analysis using electronic health records [J]. *Ann Epidemiol*, 2018, 28: 440-446.
- [10] Yang QQ, Fang MS, Tu J, et al. Guanxinning tablet inhibits the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet GPIIb/IIIa for antithrombosis without increased bleeding risk [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20: 589-600.
- [11] Katneni UK, Alexaki A, Hunt RC, et al. Coagulopathy and thrombosis as a result of severe COVID-19 infection: a microvascular focus [J]. *Thromb Haemost*, 2020, 120: 1668-1679.
- [12] Bagheri V. Pharmacological targeting of HMGB-1 translocation: a potential therapeutic strategy for COVID-19 [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106455.
- [13] Wei X, Zhang B, Wei F, et al. Gegen Qinlian pills alleviate carrageenan-induced thrombosis in mice model by regulating the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154083.
- [14] Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms [J]. *Blood*, 2019, 133: 906-918.
- [15] Lien LM, Lin KH, Huang LT, et al. Licochalcone A prevents platelet activation and thrombus formation through the inhibition of PLC $\gamma$ 2-PKC, AKT, and MAPK pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1500.
- [16] Manne BK, Münzer P, Badolia R, et al. PDK1 governs thromboxane generation and thrombosis in platelets by regulating activation of Raf1 in the MAPK pathway [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16: 1211-1225.