

基于 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 及网络药理学的冠心七味片入血成分抗动脉粥样硬化机制研究

廖园红¹, 陆景坤², 牛燕², 李君¹, 布仁¹, 张彭鹏³, 康跃³, 王跃武^{1*}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古呼和浩特 010110;
3. 包头中药有限公司, 内蒙古包头 014040)

摘要: 以冠心七味片入血成分为基础, 结合网络药理学筛选冠心七味片抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的关键通路, 明确冠心七味片抗 AS 的作用机制, 并通过细胞实验加以验证。采用 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术对冠心七味片入血成分进行分析, 确定化合物的精确质荷比, 并利用二级质谱裂解碎片、文献比对所含成分进行全面分析, 最终共鉴定出冠心七味片入血成分 42 个。利用 Swiss Target Prediction 数据库对其成分靶点预测。在疾病数据库 Genecard、OMIM、Disgent 中搜索 AS 靶点, 用 Venny 2.1.0 软件绘制 Venny 图得到疾病靶点与成分靶点的交集靶点 181 个, 利用 String 数据库分析蛋白质相互作用, 并用 Cytscape 软件筛选得到核心靶点 32 个。DAVID 数据库进行核心靶点的 GO (Gene Ontology) 富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析, 发现冠心七味片抗 AS 的通路主要包括脂质代谢与动脉粥样硬化 (lipid metabolism and atherosclerosis)、高级糖基化终末产物-受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications) 等。将核心靶点和核心化合物进行分子对接发现, 冠心七味片中隐丹参酮、丹参酮 II A 与 TNF、PPAR γ 、AKT1、PTG2 等靶点结合较好。使用人 h1-7702 肝细胞构建脂滴模型, 验证冠心七味片调控脂质代谢与动脉粥样硬化的关键通路。这项研究初步鉴定了冠心七味片治疗 AS 的潜在药效成分并预测了作用通路, 对冠心七味片调节脂质代谢与动脉粥样硬化的关系进行体外实验验证, 为该方药效物质基础及作用机制的深入研究提供参考。本实验经过内蒙古医科大学医学伦理委员会批准 (编号: YKD202401262)。

关键词: 冠心七味片; 网络药理学; 动脉粥样硬化; 入血成分; 脂代谢

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0449-10

Study on anti-atherosclerosis mechanism of blood components of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS/MS and network pharmacology

LIAO Yuan-hong¹, LU Jing-kun², NIU Yan², LI Jun¹, BU Ren¹, ZHANG Peng-peng³,
KANG Yue³, WANG Yue-wu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 3. Baotou Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Baotou 014040, China)

Abstract: The analysis presented here is based on the blood components of Guanxin Qiwei tablets, the key anti-atherosclerosis pathway of Guanxin Qiwei tablets was screened by network pharmacology, and the anti-atherosclerosis mechanism of Guanxin Qiwei tablets was clarified and verified by cell experiments. HPLC-Q-

收稿日期: 2024-07-31; 修回日期: 2024-11-28.

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2023YFHH0082); 国家自然科学基金项目 (81960757); 内蒙古自治区科技成果转化专项 (2019CG042); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2020MS08045).

*通讯作者 Tel: 15847177513, E-mail: wywimmu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0741

Exactive-MS/MS technique was used to analyze the components of Guanxin Qiwei tablets into blood, to determine the precise mass charge ratio of the compounds, and to conduct a comprehensive analysis of the components by using secondary mass spectrometry fragments and literature comparison. Finally, a total of 42 components of Guanxin Qiwei tablets into blood were identified. To better understand the interactions, we employed the Swiss Target Prediction database to predict the associated targets. Atherosclerosis (AS) disease targets were searched in disease databases Genecard, OMIM and Disgent, and 181 intersection targets of disease targets and component targets were obtained by Venny 2.1.0 software. Protein interactions were analyzed by String database. The 32 core targets were selected by Cytoscape software. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed in DAVID database. It was found that the anti-atherosclerosis pathways of Guanxin Qiwei tablets mainly include lipid metabolism and atherosclerosis and AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications and other signal pathways. The core targets and the core compounds were interlinked, and it was found that cryptotanshinone and tanshinone IIA in Guanxin Qiwei tablets were well bound to TNF, PPAR γ , AKT1, PTG2 and other targets. The lipid metabolism and atherosclerotic pathway was verified using human hl-7702 hepatocytes. This study preliminarily identified the potential pharmacodynamic components of Guanxin Qiwei tablets in the treatment of AS diseases and predicted their pathways of action, and verified the relationship between regulating lipid metabolism and atherosclerosis of Guanxin Qiwei tablets *in vitro*, providing a reference for the further study of the pharmacodynamic material basis and mechanism of action of this prescription. This experiment was approved by the Medical Ethics Committee of Inner Mongolia Medical University (No. YKD202401262).

Key words: Guanxin Qiwei tablet; network pharmacology; atherosclerosis; blood component; lipid metabolism

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是迄今为止最常见的冠状动脉疾病、颈动脉疾病和外周动脉疾病的潜在原因。AS 是一种慢性疾病^[1], 其诱因主要有高血压、高血脂、糖尿病及生活习惯等。AS 一般不是独立发病的, 通常和其他心血管疾病伴随发生^[2]。

冠心七味片由丹参、肉豆蔻、檀香、广枣、山柰、降香、沙棘七味药材组成, 蒙药名为“乌兰温都顺-7”, 临床用于治疗冠心病、心烦心悸、心绞痛^[3-7]。其复方中丹参作为君药含有多种活性成分, 具有促进血液循环, 减少血小板聚集, 降低血液黏稠度^[8,9], 从而改善微循环, 防治血栓形成, 抗氧化, 舒张血管, 抗炎等作用^[10,11]。在临床上用于治疗心血管疾病的丹参复方药物有很多, 如丹参滴丸、丹参益心胶囊、丹参保心茶等^[12]。药理学研究表明, 冠心七味片可通过降血脂、抗炎、改善血管弹性等途径对实验性 AS 起到延缓或治疗作用^[13,14], 但目前对于冠心七味片抗 AS 的物质基础和作用机制尚不明确。药物成分如何经消化道吸收入血到达靶器官或靶点在体内发挥相应的药效尚不清楚^[15]。本项目在冠心七味片入血成分的基础上, 结合网络药理学筛选出冠心七味片治疗 AS 的相关靶点和通路, 对网络药理学预测结果通过体外实验进行验证, 进一步明确冠心七味片治疗 AS 的物质基础和作用机制, 探索冠心七味片治疗 AS 疾病的科学内涵, 以期为临床用药提供理论支撑。

材料与方法

仪器 HPLC-Q-Exactive 型高效液相色谱-质谱联用系统和全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); CVE-3110 真空离心浓缩仪 (日本东京理化公司); 3-18K 高速温控离心机 (德国 Sigma 公司)。

药品与试剂 冠心七味片 (C24017, 片重 0.31 g, 包头中药有限公司); 甲醇 (210386, 色谱纯)、乙腈 (203096, 色谱纯), 美国 Thermo Fisher 公司; 胆固醇试剂盒 (cholesterol, TC, ATWH25101)、甘油三酯试剂盒 (triglyceride, TG, ATWH22101), Abbkine 生物技术有限公司; 饱和油红 O 染液 (G2013, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 纯净水 (屈臣氏)。

实验动物 雄性 SD 大鼠, 体质量 (230 \pm 50 g), 购自于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (蒙) 2020-0003。经过内蒙古医科大学医学伦理委员会批准 (编号: YKD202401262)。动物实验严格按照动物伦理学进行操作, 动物饲养于内蒙古医科大学实验动物研究中心, 适应性喂养 5 d, 给予标准饲料和饮用水, 实验前 12 h 禁食, 正常饮水。

细胞 人 hl-7702 细胞系为本实验室保存。

冠心七味片入血成分分析

色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORB-AX SB-Aq (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 5% A; 5~12 min, 5% \rightarrow 34% A; 12~16 min, 34% \rightarrow 65% A; 16~20 min, 65% \rightarrow

70% A; 20~25 min, 70%→85% A; 25~35 min, 85%→95% A; 35~40 min, 95% A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 4 °C 自动进样; 柱温 25 °C, 进样 10 μL。

质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 检测方式为 Full MS/dd-MS2, Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS2 分辨率为 17 500, 正、负离子模式下获取质谱信息。条件如下: ① 鞘气流速: 35 L·min⁻¹ (+), 40 L·min⁻¹ (-); ② 辅助气流速: 5 L·min⁻¹; ③ 锥孔电压: 3.5 kV (-), 4.0 kV (+); ④ 毛细管离子传输管温度: 320 °C; ⑤ S-lens 电压: 50 kV; ⑥ 加热温度: 350 °C, 质谱扫描范围为 m/z 100~1 200^[16]。

药物处理 冠心七味片去包衣后研钵研细, 过 60 目筛得粗粉, 加入 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液, 配制成为 0.36 g·mL⁻¹ 的药液备用。

血清样本的制备与处理 SD 大鼠随机分为空白组 ($n=6$) 和给药组 ($n=6$)。给药组灌胃给予冠心七味片药液 10 mL·kg⁻¹ (相当于冠心七味片药量 3.6 g·kg⁻¹, 临床给药剂量的 15 倍), 空白组给予相同体积的 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液。在给药 15、30、45 min 和 1、1.5、2 h 后分别麻醉腹主动脉取血, 放室温静置 1 h, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 加 4 倍甲醇涡旋 5 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 除蛋白, 取上清真空离心浓缩仪浓缩干燥, 用 100 μL 甲醇溶解, 涡旋 15 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液于进样瓶中, 待进样^[16]。

数据处理 通过中国知网、PubMed 数据平台查找冠心七味片中丹参、肉豆蔻、檀香、广枣、山奈、降香、沙棘的化学成分、质谱碎片信息等文献资料, 并创建包括化合物名称、分子式、多级质谱碎片等信息的数据库。通过 Xcalibur 3.0 提取冠心七味片离子碎片信息, 通过与相关文献比对进行入血成分鉴定。

网络药理学分析

成分靶点、疾病靶点的获取 在入血成分的基础上, 运用 ChemicalBook (<https://www.chemicalbook.com/>) 数据库搜索成分 CAS 号, 在 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库根据 CAS 号得到 Canonical SMILES 号, 通过 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库获取成分靶点, 去除重复得冠心七味片入血成分相关靶点。利用疾病数据库 Gencard (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、Disgenet (<https://www.disgenet.org/search>) 以 AS 为关键词搜索疾病靶点, 去除重复靶点, 得到疾病靶点。将成分靶点与疾病靶点用 Venny 2.1.0 (<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>) 取交集, 得到交集靶点。

PPI 网络构建与核心靶点筛选 将潜在靶点导入 String (<http://www.string-db.org/>) 数据库, 获取蛋白相互作用信息, 导入 Cytoscape3.9.1 软件, 以平均节点度值 (degree) 大于 30.177 777 78、平均介数 (betweenness) 大于 170.933 333 3、最短路径 (closeness) 大于 0.002 906 131 为标准筛选, 得到核心靶点。

GO 和 KEGG 富集分析 将核心靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库中, 得到 GO 和 KEGG 富集分析结果, 用微生信可视化平台进行可视化。

分子对接 在 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据库中搜索入血成分中度值排名前 10 的化合物, 下载其 mol 2 形式结构作为小分子配体, 通过 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库查找度值排名前 10 的核心靶点的 3D 结构, 用 Autodock1.5.6 软件进行分子对接, 用 Pymol 2.6 软件进行可视化。

体外验证

脂滴模型的建立 复苏人 h1-7702 肝细胞, 调整细胞悬液浓度并分布于 T25 培养瓶中, 待细胞长至 80% 左右, 转移至 12 孔板中, 每孔 1 mL, 约有 2.0×10^5 个细胞。将细胞孔板放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 12 h 后换无胎牛血清培养基培养 24 h, 后向细胞培养液中分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L⁻¹ 油酸 (用 10% NaOH+10% BSA 配制), 继续培养 24 h。油红 O 脂质染色, 拍照, 后用异丙醇溶解油红, 检测吸光度。

最佳给药浓度确定 将人 h1-7702 肝细胞接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养至对数生长期, 分别用含 0%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15% 含药血清的培养基培养细胞 24、48 h。最后用 CCK-8 检测含药血清对细胞增殖能力的影响, 细胞存活率 (%) = (实验组的吸光度 - 空白组吸光度) / (对照组的吸光度 - 空白组吸光度) × 100%。细胞存活率越大, 说明药物对细胞的损伤越小。最后筛选出含药血清的最佳作用浓度。

冠心七味片含药血清对肝细胞内 TC、TG 及脂质含量的影响 将人 h1-7702 肝细胞分为 3 组: 空白对照组 (培养液中加入等量普通培养基); 模型组 (培养基中加入 0.6 mmol·L⁻¹ 油酸处理); 治疗组 (加入 0.6 mmol·L⁻¹ 油酸 24 h, 再给予 12.5% 含药血清预处理 24 和 48 h)。根据试剂盒说明书制备标准曲线并利用无水乙醇制备细胞悬液, 通过 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后取上清, 在 96 孔板中加入上清和 TC、TG 工作液进行 37 °C 孵育 15 min, 500 nm 测定吸光值, 将吸光度值代入标准曲线中计算得到 TC、TG 浓度值。油红 O 脂质染色, 拍照。后用异丙醇溶解油红, 检测吸光度。

冠心七味片含药血清对人hl-7702肝细胞ABCA1、ABCG1、PPAR γ 蛋白表达水平的影响 将各组细胞用RIPA缓冲液(1% PMSF)裂解30 min提取蛋白质,经蛋白定量后行蛋白变性。配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,凝胶固定后上样进行电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭90 min,加一抗ABCA1(1:1 000)、ABCG1(1:1 000)、PPAR γ (1:1 000)、 β -actin(1:2 000)4 °C孵育过夜,洗膜,加二抗(1:1 000)室温孵育1 h,显影并拍照,Image J 6.0软件分析其灰度值。

统计学分析 所有数据均使用GraphPad Prism 6.0

软件进行数据处理,多组之间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结果

1 入血成分鉴定

制备含药血清,分析鉴定后得到42个入血成分,其中有机酸12个、木酚素3个、苯丙素类3个、黄酮类14个、萜类8个、其他类2个。正、负离子模式下血清样本总离子流图见图1所示,化合物具体信息见表1^[17-23]。

Table 1 Identification of blood components of GXQW. DS: *Salvia miltiorrhiza*; RDK: Myristicae Semen; GZ: Fructus Choerospondiatis; JX: *Dalbergia odorifera*; SN: Rhizoma Kaempferiae; TX: *Santalum album* Linn; SJ: *Hippophae rhamnoides* L.; A: Organic acids; B: Lignans; C: Phenylpropanoids; D: Flavonoid; E: Terpene; F: Other. *Compounds verified by reference

No.	Compound	Formula	t_R /min	Ion mode	Theoretical value	Measured value	Error (ppm)	Ion fragment	Classification	Source
1	5-Hydroxymethylfurfural ^[21]	C ₆ H ₆ O ₃	0.93	[M+H] ⁺	127.038 9	127.037 2	-4.25	81.032 7, 109.026 9, 127.037 1	F	GZ
2*	Quinic acid ^[21]	C ₇ H ₁₂ O ₆	1.09	[M-H] ⁻	191.056 1	191.054 6	-2.27	93.032 9, 128.038 3	A	GZ
3	Malic acid ^[21]	C ₄ H ₆ O ₅	1.28	[M-H] ⁻	133.014 2	133.012 5	4.81	71.012 1, 115.001 8	A	GZ
4	Trimethyl citrate ^[21]	C ₇ H ₁₀ O ₇	2.09	[M-H] ⁻	205.035 3	205.033 9	-1.99	87.068 8, 111.006 9, 143.033 6	A	GZ
5	Triethyl citrate ^[21]	C ₈ H ₁₂ O ₇	2.27	[M-H] ⁻	219.051 0	219.049 4	-2.59	87.001 0, 111.007 2, 157.075 3	A	GZ
6	2-Isopropylmalic acid ^[21]	C ₇ H ₁₂ O ₅	11.77	[M-H] ⁻	175.061 1	175.059 5	-3.19	85.064 1, 113.059 0, 115.038 3	A	GZ
7*	Protocatechuic acid ^[21]	C ₇ H ₆ O ₄	13.83	[M-H] ⁻	153.019 3	153.017 6	-4.28	91.016 8, 108.051 4, 109.027 7	A	GZ
8*	Ferulic acid ^[21]	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	15.53	[M-H] ⁻	193.050 6	193.047 4	-7.11	134.035 6, 178.025 5, 193.047 3	A	GZ
9*	Caffeic acid ^[17]	C ₉ H ₈ O ₄	18.32	[M-H] ⁻	179.034 9	179.033 4	-2.54	135.043 4, 179.033 4	A	DS
10	Danshensu ^[17]	C ₉ H ₁₀ O ₅	19.01	[M-H] ⁻	197.049 9	197.044 1	-1.72	178.996 9, 197.044 1	A	DS
11	Isorhamnetin ^[23]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	19.43	[M-H] ⁻	315.052 3	315.052 3	7.36	151.038 3, 315.052 2	D	SJ/SN
12	Scopolamine ^[21]	C ₁₀ H ₈ O ₄	19.63	[M+H] ⁺	193.049 5	193.046 5	-5.77	122.058 2, 133.099 2, 149.958 7, 178.047 0, 193.046 4	C	GZ
13	Xenognoside B ^[22]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	20.14	[M-H] ⁻	283.061 1	283.060 1	-0.03	195.137 2, 224.046 2, 268.036 5, 283.060 0	D	JX
14	3-Hydroxyvestitone ^[22]	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	20.17	[M-H] ⁻	301.071 7	301.070 5	-0.64	135.007 1, 301.070 4	D	JX
15	Homoeriodictyol ^[22]	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	20.17	[M-H] ⁻	301.071 7	301.070 5	-0.64	121.027 2, 135.071 3, 177.017 6, 178.020 7, 268.036 5, 301.070 4	D	JX
16	2-(2-(4-Dimethoxy-phenyl)-2-oxoe-thoxy-4-hydrobenzoic acid ^[22]	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	20.21	[M-H] ⁻	331.082 3	331.081 5	0.84	176.010 5, 255.030 3, 301.069 7, 331.081 5	A	JX
17	Myristicin ^[19,20]	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	20.7	[M+H] ⁺	193.085 9	193.082 3	-8.54	105.068 7, 133.062 6, 165.087 8, 193.082 3	C	RDK
18	Ellagic acid ^[23]	C ₁₄ H ₆ O ₈	20.78	[M-H] ⁻	300.998 9	300.997 8	-0.41	185.059 4, 229.049 1, 257.116 3, 283.059 8	A	SN/SJ
19*	Kaempferol ^[23]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	21.3	[M+H] ⁺	287.055 0	287.054 1	-3.25	153.052 1, 165.052 1, 286.074 3, 287.054 0, 289.136 5	D	SN
20	α -Curcumene ^[19]	C ₁₅ H ₂₂	22.47	[M+H] ⁺	203.179 4	203.176 0	-6.72	81.069 2, 95.084 6, 109.099 6, 147.114 6, 203.176 0	E	TX

Continued

No.	Compound	Formula	t_R /min	Ion mode	Theoretical value	Measured value	Error (ppm)	Ion fragment	Classification	Source
21	(3 <i>R</i>)-7,3'-Dihydroxy-6,2',4'-trime-thoxyisoflavanone ^[22]	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	23.48	[M-H] ⁻	345.097 9	345.098 9	5.71	149.095 3, 271.135 6, 301.143 3, 315.049 9, 330.072 6, 345.098 8	D	JX
22	5,7-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxyisoflavanone ^[22]	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	23.67	[M-H] ⁻	345.097 9	345.096 8	-0.23	135.007 6, 151.038 4, 177.017 9, 295.060 7, 315.049 3, 330.072 7, 345.096 8	D	JX
23	Fisetin ^[22]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	23.68	[M-H] ⁻	285.040 4	285.042 7	6.56	121.064 3, 149.022 4, 162.098 6, 239.164 1, 257.080 3, 285.042 6	D	JX
24	Fustin ^[22]	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	24.18	[M-H] ⁻	287.056 1	287.058 2	4.09	109.027 5, 149.058 7, 225.111 3	D	JX
25	Genistein ^[22]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	24.34	[M-H] ⁻	269.045 5	269.044 5	0.14	133.064 3, 135.079 3, 159.100 6, 201.021 0, 269.044 4	D	JX
26	3'- <i>O</i> -Methylviolanone ^[22]	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	24.38	[M-H] ⁻	329.103 0	329.101 6	-1.04	135.006 9, 148.016 4, 161.022 5, 284.099 4, 299.054 7, 314.005 4, 329.101 6	A	JX
27	Vestitone ^[22]	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	25.77	[M-H] ⁻	285.076 8	285.076 3	1.89	135.007 4, 241.122 1, 270.052 0, 285.076 2	D	JX
28	Dehydrodiisoeugenol ^[20]	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	26.16	[M+H] ⁺	327.159 0	327.153 8	-6.12	137.057 6, 171.077 7, 203.103 3, 329.131 4	B	RDK
29	Machilin A ^[20,21]	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	26.16	[M+H] ⁺	327.159 0	327.153 8	-6.12	137.057 6, 151.072 9, 171.077 7, 203.103 3	B	RDK
30	Ristiphenol (±) ^[22]	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	26.58	[M-H] ⁻	271.097 5	271.096 7	0.82	109.027 9, 135.043 4, 256.109 1, 271.096 7	D	JX
31	Methyl eugenol ^[22]	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	26.91	[M+H] ⁺	179.106 6	179.103 6	-6.95	119.083 9, 151.072 8, 164.076 5, 179.103 6	C	RDK
32	Luteolin ^[22]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	27.13	[M-H] ⁻	285.040 4	285.039 4	0.01	241.122 7, 285.039 3	D	JX
33	2'-Methoxyisoliquiritigenin ^[22]	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	27.96	[M-H] ⁻	269.081 9	269.080 6	-0.76	226.094 4, 239.107 1, 254.057 2, 269.080 6	D	JX
34	Pterolinus B ^[22]	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	27.96	[M-H] ⁻	269.081 9	269.080 6	-0.76	225.090 7, 239.107 1, 254.057 2, 269.080 6	F	JX
35*	Cryptotanshinone ^[17,18]	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	28.31	[M+H] ⁺	297.148 5	297.148 5	-5.98	279.133 4, 297.143 7	E	DS
36	Galbacin ^[18,19]	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	28.44	[M+H] ⁺	341.138 3	341.130 6	-2.66	151.073 0, 163.052 8, 203.203 4, 341.130 6	B	RDK
37	Methylenedihydro-tanshin-quinone ^[17]	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	28.45	[M-H] ⁻	279.102 6	279.101 4	-0.46	261.092 1, 279.101 4	E	DS
38	Dan shen spiroketal lactone ^[17]	C ₁₈ H ₂₂ O ₃	29	[M-H] ⁻	285.149 6	285.148 6	0.24	239.143 9, 285.148 5	E	DS
39	Tanshinone II B ^[17,18]	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	29.12	[M+H] ⁺	311.127 7	311.123 0	-5.31	247.107 0, 250.094 3, 275.103 1, 293.112 3, 311.123 0	E	DS
40	Danshenxinkun A ^[17]	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	31.45	[M-H] ⁻	295.097 5	295.095 8	-2.22	277.180 7, 295.095 8	E	DS
41*	Tanshinone I ^[17,18]	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	32.21	[M+H] ⁺	277.085 9	277.081 5	-5.91	193.118 8, 203.103 5, 221.150 7, 249.087 0, 277.081 5	E	DS
42	Tanshinone IIA ^[17,18]	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	33.21	[M+H] ⁺	295.132 8	295.128 3	-5.48	249.123 5, 262.095 0, 266.089 8, 277.118 1, 280.105 2, 295.128 3	E	DS

2 网络药理学分析

2.1 核心靶点网络构建 从成分数据库中检索得到冠心七味片入血成分的作用靶点 1 900 个, 通过去重后得到 565 个。通过疾病数据库检索并去除重复后获得

疾病靶点 2 015 个。将成分靶点和疾病靶点做韦恩图, 得到交集靶点 181 个, 以交集靶点作为冠心七味片抗 AS 的潜在靶点, 在 String 数据库中导入潜在靶点, 获取蛋白互作关系, 在 Cytoscape3.9.1 中筛选平均度值

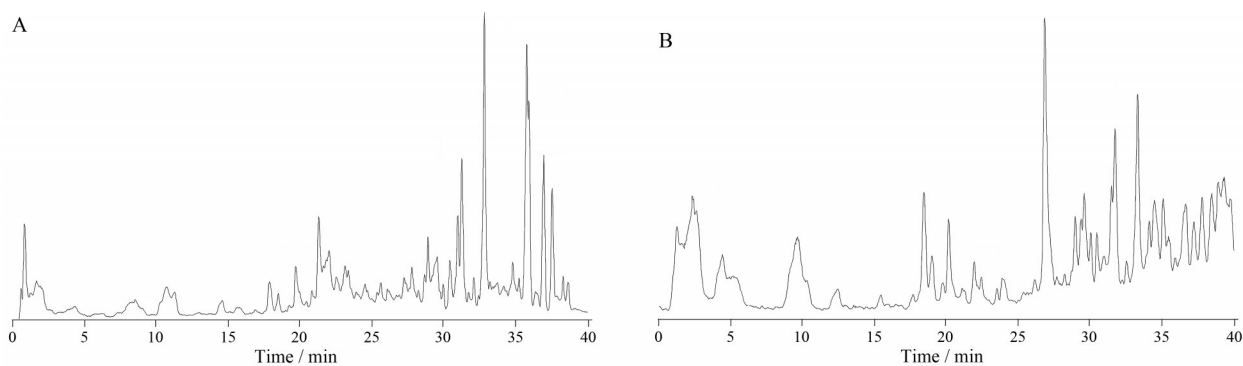


Figure 1 Total ion flow diagram of serum HPLC-Q-Exactive-MS/MS in rats treated with Guanxin Qiwei tablets (GXQW). A: Positive ion scanning mode; B: Negative ion scanning mode

(30.177 777 78), 平均最短路径 (170.933 333 3) 和平均介数 (0.002 906 131) 得到核心靶点32个, 结果见图2A、D。

2.2 核心靶点 GO 功能富集和 KEGG 信号通路分析 对32个核心靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析, 删除 $P > 0.05$ 的数据,

结果得到生物学过程 (biology process, BP) 共涉及有 229 个, 主要有 RNA 聚合酶 II 启动子正调控、细胞凋亡过程的负调控、基因表达的正调控等。分子功能 (molecular function, MF) 共涉及 46 个, 主要是关于蛋白结合、酶结合、DNA 结合等。细胞组分 (cellular

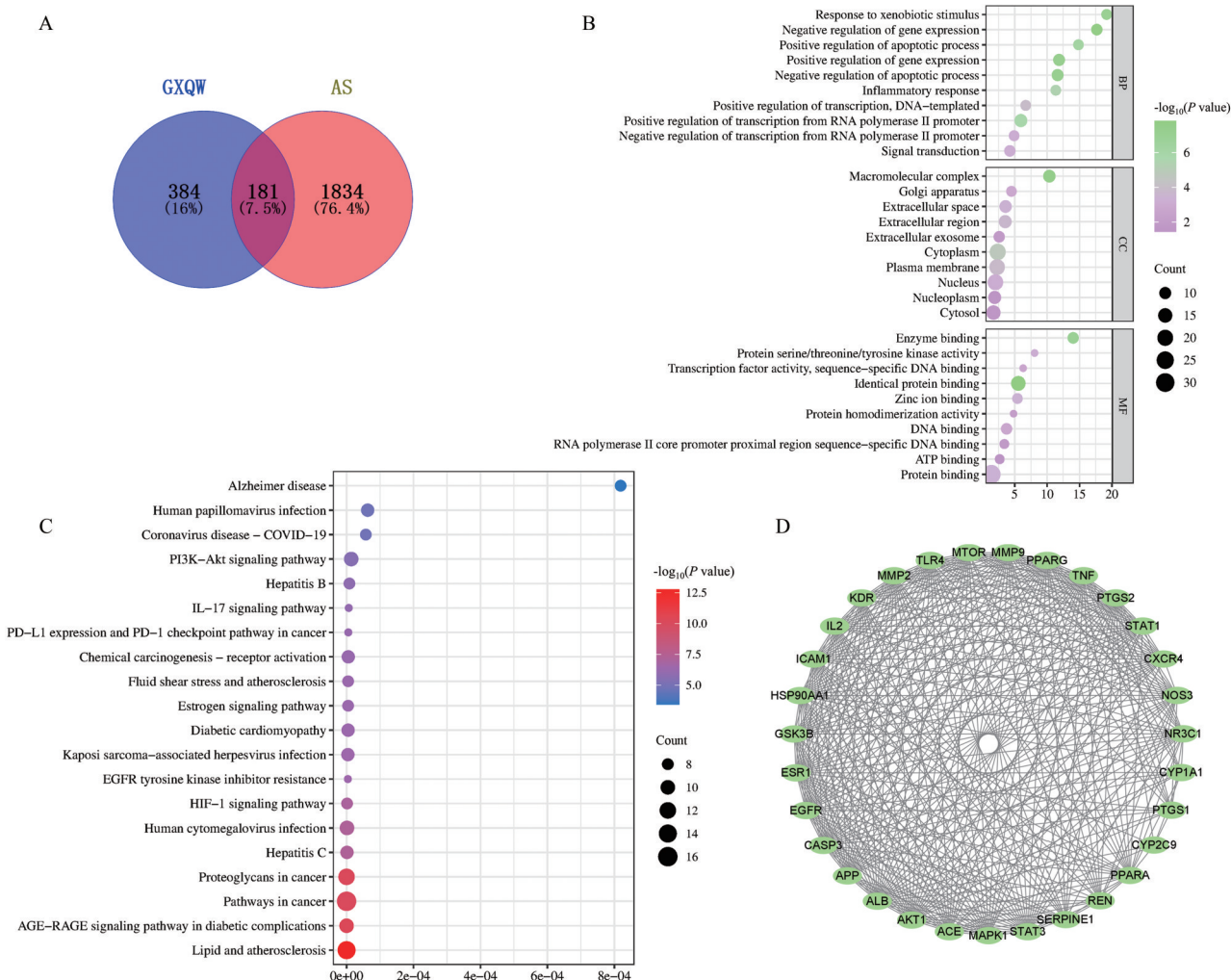


Figure 2 Network pharmacological analysis. A: The targets of blood components of GXQW and the targets of atherosclerotic disease; B: KEGG analysis of the core targets of GXQW; C: Core targets GO analysis of GXQW; D: Core targets action diagram

function, CC) 共涉及 30 个, 主要有细胞核、质膜、细胞质等见图 2B。KEGG 信号通路分析共得到 110 条信号通路, 主要包括参与 AS 斑块形成的脂质和 AS 通路、介导糖尿病的 AGE-RAGE 信号通路、参与细胞凋亡的 PI3K-AKT 信号通路、参与阿尔茨海默症 (Alzheimer disease, AD) 通路、IL-17 信号通路等见图 2C。

2.3 分子对接结果 为了进一步验证冠心七味片中药效成分与核心靶点的相互作用关系, 以靶点最多的隐丹参酮和丹参酮 IIA 为配体, 以 TNF、AKT1、ALB、PPAR γ 、STAT3、PTGS2、EGFR、MMP9、CASP3、ESR1 为受体进行结合能力预测 (图 3)。对接结果只保留每

对分子对接的 predicted binding affinity 绝对值最高的 (一般认为结合能小于 $-4.25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 提示配体与受体有一定的结合活性, 小于 $-5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 有较好的结合活性, 小于 $-7.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 有强烈的结合活性)。实验结果显示, 隐丹参酮与 PPAR γ 、丹参酮 IIA 与 PPAR γ 结合活性最高, 与其结合较好的还有 TNF、PTGS2、ESR1 等。

3 体外实验

3.1 最佳油酸浓度 为了探究冠心七味片与 AS 脂代谢的作用关系、确定最佳油酸浓度, 首先采用油红 O 染色人 hl-7702 肝细胞, 结果显示见图 4A、B, 细胞内出现呈红色的脂肪滴, 随着油酸干预浓度升高, 出现红色脂

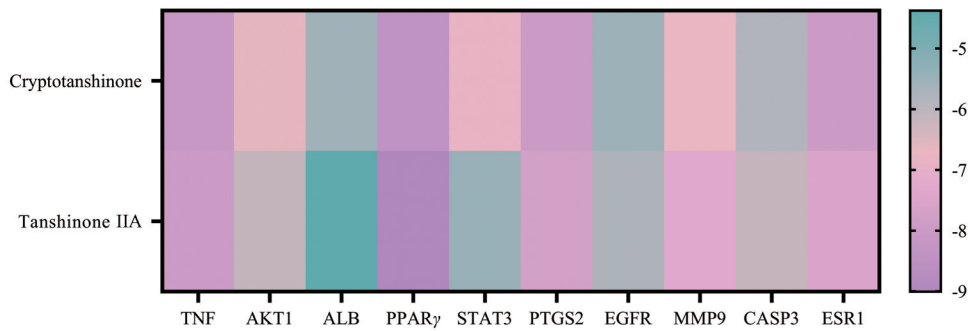


Figure 3 Thermal map of binding energy of core components and core target molecules

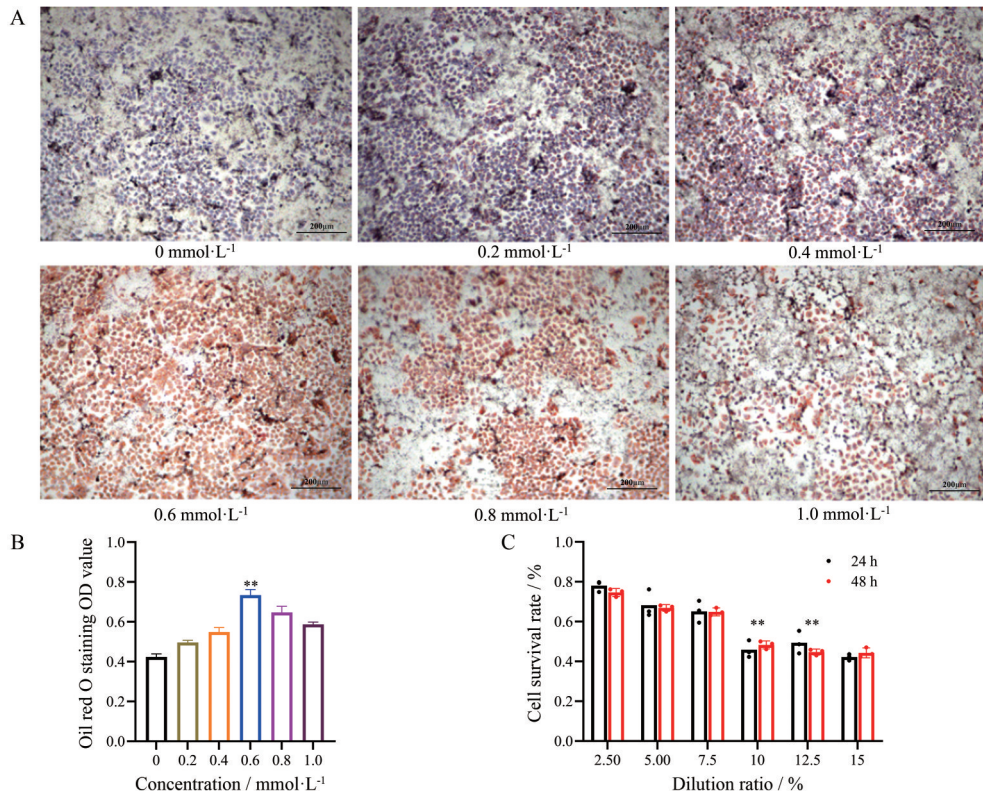


Figure 4 Effects of different concentrations of drug-containing serum on hl-7702 hepatocytes. A, B: Observation of the effect of different concentrations of oleic acid on the lipid content of hl-7702 hepatocytes by oil red O staining (200 μm); C: Effect of different concentrations of GXQW on the survival rate of hl-7702 hepatocytes detected by CCK8. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹/2.50%, 5.00% and 7.50% group

滴的细胞增多,在0.6 mmol·L⁻¹时脂滴最多,而后脂滴减少,且有部分细胞开始死亡。因此,选择0.6 mmol·L⁻¹油酸干预hl-7702肝细胞来构建脂滴模型。

3.2 最佳含药血清浓度 为了确定最佳含药血清稀释倍数,经过CCK8实验可知,用10%的含药血清处理hl-7702肝细胞24或48 h后,测得的细胞存活率均低于半数存活率(50%),增加含药血清浓度,细胞存活率均低于50%,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图4C。因此,选用10%含药血清进行后续实验。

3.3 冠心七味片抑制肝细胞脂代谢水平 通过冠心七味片与AS的KEGG富集分析发现,其抗AS与脂代谢通路密切相关。因此,通过对人hl-7702肝细胞进行脂滴积累造模,并给予10%含药血清,收集细胞裂解后的

上清液进行TC、TG的测定,发现给予10%含药血清后大大降低了肝细胞内TC、TG水平。其次,对细胞进行油红O染色并测量异丙醇溶解液的OD值,结果显示给予含药血清可以降低肝细胞脂质积累,见图5。

4 冠心七味片含药血清对ABCA1、ABCG1、PPAR γ 的影响

通过KEGG通路富集和分子对接结果,发现冠心七味片与AS的作用关系主要是经过脂代谢通路且主要靶点为PPAR γ ,因此对相关靶点用蛋白免疫印迹法进行验证,发现与空白组比较,模型组ABCA1、ABCG1和PPAR γ 的蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,冠心七味组的蛋白表达水平显著上升($P < 0.05$),见图6。

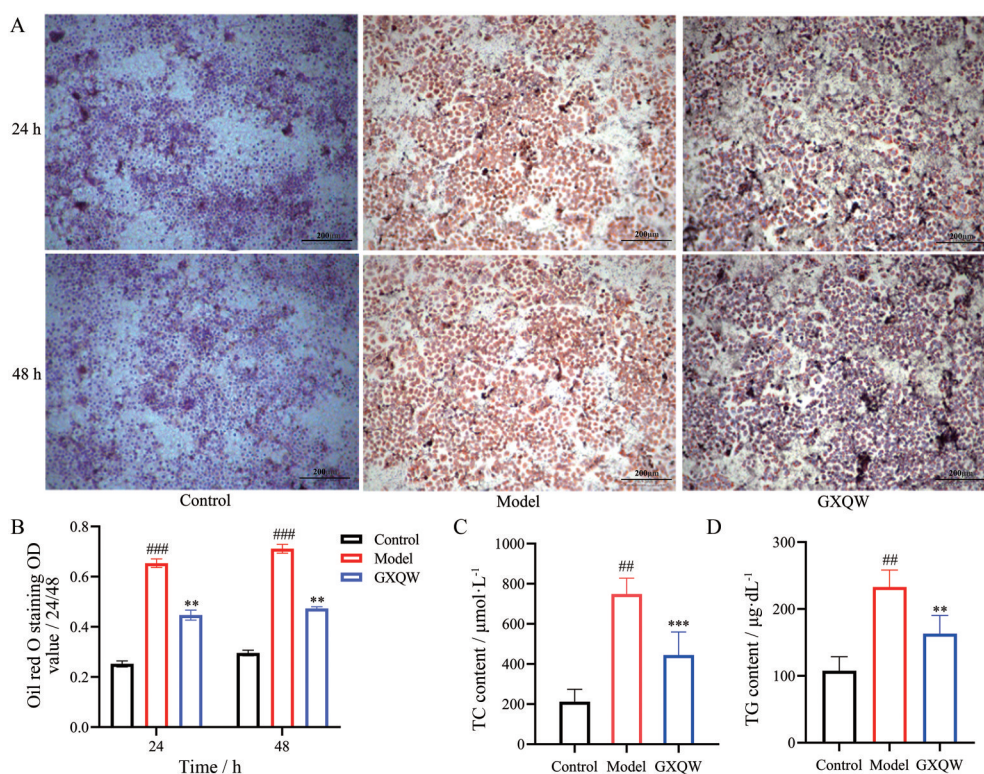


Figure 5 Effect of 10% GXQW drug-containing serum on lipid droplet accumulation in human hl-7702 hepatocytes. A: hl-7702 hepatocyte lipid oil red O staining (200 μm); B: hl-7702 hepatocyte lipid red O absorbance value; C, D: TC (cholesterol) and TG (triglyceride) content of hl-7702 hepatocyte lytic supernatant. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

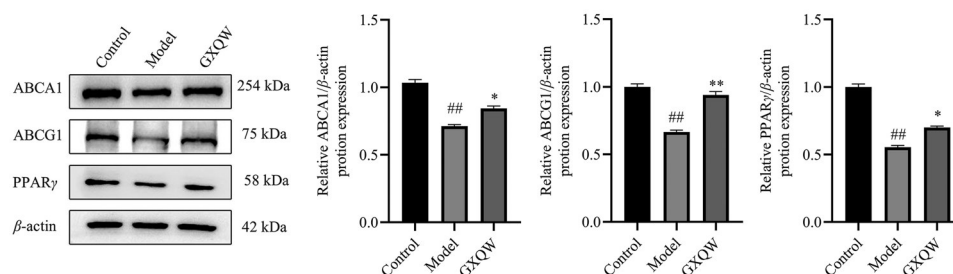


Figure 6 Expression levels of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model

讨论

AS是心血管疾病的一个重要致病因素,是一种缓慢的终身进行性疾病^[24],其发病率随着年龄的增长是呈正比增长的。目前的治疗手段包括手术治疗和药物治疗,主要以药物治疗为主,但都不能彻底解决问题。因此,在斑块还未完全形成之前对其进行治疗是很有必要的^[25]。

冠心七味片是一种常见的蒙药,主要由丹参、广枣、肉豆蔻等七味药物组成,具有强心镇痛、活血化瘀的功效。其中,丹参蒙古名为热贡巴,为唇形科植物丹参的根和根茎,有清血热、祛恶血之功效。肉豆蔻蒙古名为查干苏格莫勒,有祛肾寒、抑赫依症、调胃火、消食等功效^[26]。

研究发现,丹参中成分隐丹参酮、丹参酮IIA与PPAR γ 受体结合能较低。PPAR γ 为过氧化物酶体增生激活受体 γ 编码基因,包括PPAR γ 1和PPER γ 2两种亚型,主要负责脂类的分解代谢等^[27]。PPAR γ /ABCA1/ABCG1脂代谢通路是经典的抗AS通路之一^[28],可以通过降低TC、TG含量,从而降低血液血脂水平,降低AS的发生^[29]。另外,对排名前10的核心靶点进行分子对接发现,隐丹参酮、丹参酮IIA和TNF、PTGS2、MMP9和ESR1结合能也较低,而这些核心靶点都和血管内皮细胞炎症反应紧密相关^[30,31]。而AS的发生与发展慢性炎症反应密不可分,在本实验中冠心七味片既可以通过调节脂质代谢来治疗AS,同时也可以通过抗炎抗氧化而抗AS。

综上所述,本研究以冠心七味片入血成分为基础,通过网络药理学通路富集得到关键通路,并在细胞水平得到了相应的验证,为冠心七味片临床用药提供理论支撑。

作者贡献: 廖园红、陆景坤、牛燕、李君负责实验;廖园红、张彭鹏、康跃负责数据整理并撰写文章;布仁、王跃武负责文章修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Mohanta SK, Peng L, Li Y, et al. Neuroimmune cardiovascular interfaces control atherosclerosis [J]. *Nature*, 2022, 605: 152-159.
- [2] Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 531-534.
- [3] Liu CD, Guo JY, Li J, et al. Qualitative analysis of chemical constituents of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS technique [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2024, 22: 691-698.
- [4] Zhao T. Relieving effect of Mongolian medicine Guanxin Qiwei tablet in treating angina pectoris symptoms of ischemic heart disease [J]. *J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志)*, 2021, 27: 31-32.
- [5] Wu C, Wang YX. Review on the new progress of combined treatment of coronary heart disease by Mongolian and western medicine [J]. *J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志)*, 2019, 25: 40-42.
- [6] Na Ren Grile. Curative effect of Mongolian medicine on angina pectoris of coronary heart disease [J]. *World's Latest Med Inf Dig (世界最新医学信息文摘)*, 2019, 19: 151-158.
- [7] Yan SG, Shi HL, Hui Y, et al. Network pharmacological studies of Guanxin Qiwei tablet in treating coronary heart disease [J]. *J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报)*, 2017, 38: 1075-1080.
- [8] Sun Z, Zhang YY, Zhou SN, et al. Explore potential pharmacodynamic substances basis and mechanism of Gualouxiebai Decoction in treatment of coronary heart disease based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and bioinformatics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 5613-24.
- [9] Han MD. Study on Serum Pharmacology, Serum Fingerprint and Pharmacokinetics of Main Components of Mongolian Medicine Bluepenhua (蒙药蓝瓣花主要成分的血清药理学、血清指纹图谱及药动学研究) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2020.
- [10] Meng H, Wu J, Shen L, et al. Microwave assisted extraction, characterization of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and its antioxidant effects via ferroptosis-mediated activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 215: 398-412.
- [11] Zhang XM. Study on the Anti-AS Effect and Mechanism of Total Flavones of Aromatic Neotaenia on Endothelial Cell Protection and Inflammation Inhibition (芳香族荆芥总黄酮对内皮细胞的保护和炎症抑制作用及其机制研究) [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.
- [12] Zhong J, Zhou J, Sun H, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* injection on apoptosis of Schwann cells induced by hydrogen peroxide [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10: 625-632.
- [13] Narentua. Clinical analysis of Mongolian medicine Guanxin Qiwei tablet in treating ischemic heart disease [J]. *Healthy Way (健康之路)*, 2016, 15: 79-80.
- [14] Kang GJ. Effects of hyperhomocysteinemia on cardiac structure and function in patients with uremia [J]. *J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志)*, 2016, 22: 29-30.
- [15] Kambayashi A, Shirasaka Y. Food effects on gastrointestinal physiology and drug absorption [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2023, 48: 100488.
- [16] Fu Y, Feng QX, Zhang CS, et al. Exploration of the material basis and mechanism of the synergistic effect of safflower on cardiocerebral axis based on the strategy of "Migration-Target-Net-work" [J]. *Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志)*, 2023, 43: 252-259.

- [17] Yang N, Huang W, Shan LL, et al. Rapid classification and identification of salvia miltiorrhiza components by UPLC-Q-TOF/MS combined with data post-processing [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2019, 30: 2408-2412.
- [18] Tu Y, Sun LN, Dong ZY, et al. Study on chemical constituents differences of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma from different producing areas based on UPLC-QTOF-MS technology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2021, 44: 1337-1342.
- [19] Liang FY, Bu R, Yang L, et al. Effect of Guangzao in Sanwei Sandalwood powder based on spectrum-effect correlation analysis [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2023, 25: 1218-1226.
- [20] Xiao JL, Zhao L, Zhang DX, et al. Identification of chemical constituents in Mongolian medicine Anshen Buxin Liuwei pills based on HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2021, 44: 1656-1667.
- [21] Yang LM, Yang LJ, Jia P, et al. HPLC-Q-TOF-MS/MS-based analysis of chemical constituents in Choerospondiatis fructus [J]. J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2016, 37: 159-166.
- [22] Meng XW, Zhu Q, Zhang N, et al. Rapid identification on chemical components in Dalbergiae Odoriferae Lignum by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 107-118.
- [23] Zheng WH, Bai HY, Han S, et al. Analysis on the constituents of branches, berries, and leaves of *Hippophae rhamnoides* L. by UHPLC-ESI-QTOF-MS and their anti-inflammatory activities [J]. Nat Prod Commun, 2019, 14: 141-145.
- [24] Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. Biomolecules, 2018, 8: 80.
- [25] Liu H, Zhang J, Yan X, et al. The anti-atherosclerosis mechanism of *Ziziphora clinopodioides* Lam. based on network pharmacology [J]. Cell Biochem Biophys, 2023, 81: 515-532.
- [26] Gao JX, Ding YR. Investigation of the mechanism of action and identification of candidate traditional Chinese medicines for the treatment of ischemic stroke in the Danshen-Jiangxiang pair based on drug-target-disease association network [J]. J Biomed Eng (生物医学工程学杂志), 2023, 40: 762-769.
- [27] Wang M, Cui B, Gong M, et al. Arctium lappa leaves based on network pharmacology and experimental validation attenuate atherosclerosis by targeting the AMPK-mediated PPAR γ /LXR α pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113503.
- [28] Ma JX, Guo JZ, Chen HN, et al. Isoflavones from Sojae Semen Praeparatum regulate lipid metabolism in atherosclerotic mice through PPAR γ /LXR α /ABCA1 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 110-118.
- [29] Lai LN, Li JX, Zheng CX, et al. Effects of Wushou Huoxue Huayu Prescription on blood lipid metabolism, liver tissue and ABCA1, PPAR γ expression in New Zealand rabbits with blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 78-84.
- [30] Bao L, Zhang B, Zhao C, et al. Association between ESRI gene polymorphism and risk of knee osteoarthritis [J]. J Pract Orthop (实用骨科杂志), 2020, 26: 888-891.
- [31] Ma X, Zhang L, Gao F, et al. *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone IIA reduce endothelial inflammation and atherosclerotic plaque formation through inhibiting COX-2 [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115501.