

基于网络药理学和实验验证探究经典药对“瓜蒌-薤白”治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制

张 博, 梁玉宁, 鲍友利, 朱 利, 孙 鑫, 吴鸿飞*

(安徽中医药大学药学院, 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

摘要: “瓜蒌-薤白”药对 (GX) 应用历史悠久, 为历代医家长期遣方用药的经验总结, 但其治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制尚未完全阐明。本研究采用网络药理学分析与动物实验验证相整合的研究策略, 探究经典药对 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的分子作用机制。动物实验过程均遵循安徽中医药大学实验动物伦理委员会的规定 (批准号: AHUCM-rats-2021070)。基于前期 HPLC-Q-TOF-MS 分析结合数据库, 获取 69 个 GX 药对的化学成分及 163 个 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的靶点, 筛选出丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白介素 6 (IL6)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、细胞肿瘤抗原 p53 (Tp53) 等关键靶点, 富集分析表明 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的靶点主要参与 PI3K/Akt 信号通路、鞘脂代谢、血小板激活、缺氧诱导因子-1 (HIF-1)、ras 相关蛋白 1 (rap1) 等信号通路, 分子对接分析显示芹菜素、葫芦素 D、亚麻酸、山柰酚等 6 个关键化学成分与 Akt1、TNF、IL6、VEGFA 和 Tp53 均具有潜在的结合能力。在动物实验验证中, 与痰瘀互结证大鼠模型相比, GX 能显著降低模型大鼠的痰瘀互结证候积分, 改善血液流变学、血脂及血管内皮结构紊乱, 显著降低血清内皮素-1 (ET-1) 水平, 升高血清一氧化氮 (NO) 和一氧化氮合成酶 (eNOS) 水平, 恢复主动脉血管内皮功能; 并能显著减少主动脉中细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 及血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 表达, 改善主动脉血管内皮损伤; Western blot 实验显示 GX 显著降低主动脉磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 及 Akt 蛋白磷酸化水平。本研究揭示了 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的成分、多靶点、多通路的作用特征, 并阐明 GX 逆转痰瘀互结大鼠模型病理变化, 改善血管内皮功能及炎性损伤, 可能与其抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 瓜蒌-薤白; 痰瘀互结证; 心血管疾病; 网络药理学; 分子对接; 靶点; 通路; 磷酸化水平

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1452-12

The mechanism of "Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus" on phlegm and blood stasis syndrome-related cardiovascular diseases based on network pharmacology and experimental verification

ZHANG Bo, LIANG Yu-ning, BAO You-li, ZHU Li, SUN Xin, WU Hong-fei*

(Anhui Province Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Department of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

Abstract: This study aimed to investigate the mechanism of "Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus" (GX) on phlegm and blood stasis syndrome (PBSS) rats combining the methods of network pharmacology

收稿日期: 2023-01-31; 修回日期: 2023-03-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274137, 81873038); 安徽省自然科学基金资助项目 (2208085MH275); 安徽省高校杰出青年科研项目 (2022AH020041); 安徽高校自然科学研究项目 (KJ2021A0592).

*通讯作者 Tel: 86-551-68129184, E-mail: wuhongfei@ahctm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0086

and experimental verification. Animal experiment ethical requirements were approved by the Ethical Committee Experimental Animal Center of Anhui University of Chinese Medicine (grant number: AHUCM-rats-2021070). Based on the HPLC-Q-TOF-MS analysis and database, 69 chemical constituents of GX and 163 targets of GX for the treatment of phlegm and blood stasis-related cardiovascular diseases were obtained. Then, key targets such as serine/threonine kinase 1 (Akt1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL6), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), cellular tumor antigen p53 (Tp53) were screened. Pathway analysis showed that the targets of GX in the treatment of phlegm and blood stasis-related cardiovascular diseases were mainly involved in PI3K/Akt signaling pathway, sphingolipid metabolism, platelet activation, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), ras-proximate-1 (rap1) and other signaling pathways. In addition, molecular docking analysis showed that apigenin, cucurbitacin D, linolenic acid and kaempferol and other key components had potential binding ability with Akt1, TNF, IL6, VEGFA and Tp53. In the animal experiments, compared to the phlegm and blood stasis syndrome group, GX could significantly improve the traditional Chinese medicine syndrome score, blood lipid, vascular endothelial structure disorders and reduce serum endothelin-1 (ET-1) level, increase serum nitric oxide (NO) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) levels, which could restore aortic endothelial function. In addition, the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in aorta could be significantly reduced, which could improve the vascular endothelial injury of aorta. Western blot revealed that GX could significantly decrease the phosphorylation levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and Akt in aorta. This study revealed the mechanism of GX in treatment of phlegm and blood stasis-related cardiovascular diseases is consistent with the characteristics of multiple ingredients, multiple targets and multiple pathways. In addition, this study also clarified that the reversal of pathological of phlegm and blood stasis syndrome rats may be related to GX inhibiting PI3K/Akt signaling pathway, which could improve vascular inflammation and vascular endothelial function injury.

Key words: *Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus*; phlegm and blood stasis syndrome; cardiovascular disease; network pharmacology; molecular docking; target; pathway; phosphorylation level

痰瘀是诸多慢性疑难疾病的基本病机^[1], 与动脉粥样硬化、冠心病、高脂血症等心血管疾病密切相关, 亦为心血管疾病诊治的关键环节。

中医理论认为, “痰”为“痰浊”, 即体内水湿津液代谢障碍, 停聚而成的较稠浊的病理产物和致病因素; “瘀”为“血瘀”, 即血液循环迟缓, 流行不畅, 甚则血液停滞的病理状态。现代医学研究表明, “痰”与脂代谢紊乱具有高度相关性, “瘀”与微循环障碍有关, 具有血流变学异常、血脂异常、血管内皮损伤等病理改变^[2], 为众多心血管疾病的病理基础。近代医家从痰瘀论治心血管疾病, 临床疗效显著, 成果丰富, “痰瘀互结证”已经成为中医理论研究及临床关注的重点与热点^[3]。

“瓜蒌-薤白”药对 (GX) 始载于《金匱要略》的瓜蒌薤白白酒汤、瓜蒌薤白半夏汤、枳实薤白桂枝汤等经典方剂中。有学者统计含此药对的典型医案 120 例, 涉及临证处方 120 首, 广泛用于痰瘀互结心血管疾病的临床治疗^[4]。前期课题组利用 HPLC-Q-TOF-MS 解析出 GX 的 43 个化学成分^[5], 发现 GX 可显著纠正高脂血症大鼠及动脉粥样硬化小鼠体内脂质代谢紊乱^[6-8], 改善主动脉血管内皮炎性损伤^[9], 抑制高脂血症及动脉粥样硬化的发生发展。然而, 既往研究多聚焦于具

体疾病, 经典药对治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制尚不明确, 缺乏从证候的角度揭示药对治疗疾病的科学内涵。

网络药理学基于药物成分及作用靶标, 从系统生物学角度分析药物与疾病靶蛋白的相互作用, 整体观揭示中药治疗疾病的作用及机制^[10]。鉴于 GX 类方剂在临床治疗痰瘀互结心血管疾病的重要作用, 本研究以 GX 这一小复方为出发点, 以“痰瘀互结证”心血管疾病及中医证候收集疾病靶点, 利用现代科学技术揭示“痰瘀互结证”的科学内涵, 并解析 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的作用及机制, 为 GX 类方剂治疗心血管疾病提供理论依据。

材料与方法

药物与试剂 瓜蒌 (GL, 180601)、薤白 (XB, 1903129) 均购于北京同仁堂合肥药店, 经安徽中医药大学刘先华高级实验师鉴定, 符合 2020 年版《中国药典》要求。参考本课题组前期研究方法^[8], 称取瓜蒌皮-薤白 (2:1), 按比例混合, 充分粉碎, 用 50% 乙醇 (药材 5 倍量) 充分浸泡 1 h, 80 °C 回流提取 2 次, 每次 2 h。过滤提取物, 合并滤液, 减压浓缩, 制备质量浓度

为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于原药材) 的 GX 溶液。丹蒞片 (吉林康乃尔药业有限公司, Z20050244), 研碎后溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液^[11]; 高脂饲料 (江苏协同生物工程有限责任公司, 20210712); 胆固醇 (TC) 生物测定试剂盒 (XL-2038)、总甘油三酯 (TG) 测定试剂盒 (XL-2037)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 测定试剂盒 (XL-8469)、高密度脂蛋白 (HDL-C) 测定试剂盒 (XL-3159) 及一氧化氮 (NO) 测定试剂盒 (20214532) 均购于南京建成生物科技有限公司; 兔抗细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 抗体 (bs-4617R) 及血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 抗体 (bs-6562R) 均购于美国 Bioss 公司; 内皮素-1 (ET-1) ELISA 试剂盒 (ml025101)、一氧化氮合成酶 (eNOS) ELISA 试剂盒 (ml025093) 均购于上海酶联生物科技有限公司; 苏木素染液 (安徽欣乐技术有限公司, 批号 09232110); PI3K 一抗抗体、Akt 一抗抗体 (成都正能生物技术有限责任公司, 13256-1-AP、R25721); p-PI3K 一抗抗体 (美国 Abcam 公司, ab207484); p-Akt 一抗抗体 (合肥泽木生物科技有限公司, AF0016)。

实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 36 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购于江苏省东方养殖有限公司, 许可证号 SCXK (苏) 2017-0003。所有实验均获安徽中医药大学动物伦理委员会批准, 编号 AHUCM-rats-2021070。

主要仪器 SA-5000 型全自动血液流变仪 (北京赛科希德有限公司); YB-7F 型生物组织包埋机 (湖北亚光有限公司); RM2135 型封闭式切片机 (德国 LEICA 公司); ReadMax 1500 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); D-37520 型低温高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 股份公司); JEM-1230 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi Limited 公司); AI600 型超灵敏多功能成像仪 (美国 General Electric 公司)。

潜在活性成分收集 结合前期 HPLC-Q-TOF-MS 分析结果^[5]及文献检索收集药对化学成分, 并以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为条件经 TCMSP 数据库筛选成分信息, 共鉴定收集 GX 中 69 个化学成分。以此 69 个化学成分为研究对象, 通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台, 绘制化学结构。

靶点的预测与筛选 将 GX 中 69 个化学成分变換格式导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>) 及 SEA 数据库 (<https://sea.bkslab.org/>) 进行靶点预测^[12,13], 得到化学成分作用靶点。然后, 将靶点信息输入 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 规范靶点名称。在 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库中检索关键词“cardiovascular

diseases”、“atherosclerosis”、“coronary heart disease”、“hyperlipidemia”、“thrombus”、“inflammation”、“pain”、“insulin resistance”为关键词^[14], 汇总整理痰瘀互结心血管疾病相关病理及疾病靶点, 并与化学成分作用靶点整合取交集, 获得 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的潜在靶点。

蛋白互作 (PPI) 网络的构建 痰瘀互结心血管的发病分子机制复杂, 与疾病相关的靶点往往存在直接的物理相互作用或间接的功能关联, 从而影响痰瘀互结相关疾病的发生发展。为了更好地分析靶点间的相互作用, 将潜在作用靶点导入 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库, 物种选择“Human”。保存结果并导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建 PPI 网络, 对其网络进行分析, 并将节点 (node) 大小和颜色设置用于反映度值 (degree) 的大小。

KEGG 通路分析 将潜在作用靶点导入 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 物种选择“Human”, 进行 KEGG 通路分析 ($P < 0.05$), 分析潜在靶点聚类于痰瘀互结心血管疾病相关的信号通路^[15]。

“成分-靶点-通路”网络构建 将 GX 中化学成分、治疗痰瘀互结心血管疾病的潜在靶点、作用通路分析结果导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建“成分-靶点-通路”网络图。

分子对接虚拟计算 将 GX 核心成分与核心靶点进行分子对接。利用 ChemBio3DUltra14.0 将所得活性成分的 mol2 格式文件转化为 3D 结构。利用 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库获取核心靶点基因的 PDB 格式文件, 利用 PyMOL2.4.1 软件对蛋白质进行去水、加氢操作, 再通过 AutoDockVin1.1.2 软件进行药物活性成分与核心靶点基因进行分子对接^[16]。

痰瘀互结大鼠模型建立与药效学实验 取 SD 大鼠 36 只, 随机分组, 每组 6 只, 适应性饲养 1 周后, 设立空白组、模型组、GX 低剂量组 (GX-L)、GX 中剂量组 (GX-M)、GX 高剂量组 (GX-H)、丹蒞片组。按照文献^[17]方法, 除空白组外, 其余各组喂养高脂饲料, 并于每日 9:00 将大鼠浸入浴温 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的冰水中, 浸泡至大鼠全身僵直后取出 (约 20 min)。从造模第 15 天开始, 皮下注射盐酸肾上腺素, 每天 1 次, 给药剂量为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 持续造模共 30 天。依据文献^[17-19]动物造模方法, 采用观察症状体征与检测病理学指标相结合, 以痰瘀互结证候积分显著增加、血液流变学及血脂指标异常、血管内皮结构紊乱, 为痰瘀互结大鼠模型建立成功的判断标准。

痰瘀互结大鼠模型建立成功后, 空白组、模型组大鼠灌胃生理盐水, GX-L ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), GX-M ($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),

GX-H (8 g·kg⁻¹·d⁻¹) 组大鼠分别灌胃相应浓度 GX 提取液, 丹蒺片组 (0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹) 组大鼠灌胃相应浓度的丹蒺片混悬液。所有大鼠均在同一环境同时间内进行操作, 灌胃给药 2 周, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹。

中医证候评分量表评价痰瘀互结大鼠模型 参照文献^[18]制订中医证候评分量表, 对痰瘀互结大鼠进行中医证候评分, 从精神体质量、饮食饮水、毛发的色泽与脱落情况、粪便、舌象、皮肤瘀斑瘀点情况等 6 个方面的表征进行评估, 评分等级分为 0~3 分。证候的轻重程度与分值的高低呈正相关, 分值越高痰瘀互结证候越显著。

血液流变学及血脂的检测 大鼠麻醉后, 腹主动脉采集取血, 全自动血液流变分析仪测定 1、100、200 s⁻¹切变率下的全血黏度和红细胞聚集指数。剩余全血于 4 °C 条件下, 2 500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液测定 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。

ELISA 法测定血清 NO、ET-1 及 eNOS 含量 取大鼠全血于 4 °C 条件下, 2 500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 选取上清液后按照试剂盒说明书分别测定 ET-1、NO 及 eNOS 水平。

大鼠主动脉病理形态及黏附因子表达的检测 主动脉组织用 4% 甲醛磷酸盐缓冲液处理过夜, 脱水石蜡包埋, 苏木素-伊红染色 (HE) 染色, 光学显微镜下观察主动脉组织形态学变化, 并利用 Image J 图像分析系统对主动脉中膜厚度进行统计分析。免疫组化检测

ICAM-1、VCAM-1 表达, 光学显微镜下观察并拍照, 光学显微镜下可见棕黄色点状或纤维状染色集中在细胞膜、细胞浆或细胞间, 则为阳性表达, 阴性表达则无棕黄色染色, 并利用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统对 ICAM-1 及 VCAM-1 进行统计分析。

Western blot 法靶点表达验证 取主动脉组织适量, RIPA 裂解液提取总蛋白, 加入上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, -20 °C 储存。取适量蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 200 mA 湿法转膜, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭, TBST 漂洗, 加入一抗 4 °C 孵育; TBST 漂洗, 加入二抗, 室温孵育, TBST 漂洗, ECL 化学发光试剂显色, 超灵敏多功能成像仪检测, 图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行灰度分析。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 多组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

结果

1 靶点的预测与筛选

将 69 个 GX 化学成分导入 SwissTargetPrediction 及 SEA 数据库进行靶点预测, 通过整合得到 815 个靶点。检索 TTD 数据平台, 得到与痰瘀互结心血管疾病靶基因 362 个。Venn 软件作图取交集, 得到 163 个 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的潜在靶点 (表 1)。

Table 1 Information sheet of chemical compounds in "Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus" (GX). GL: Trichosanthis Fructus; XB: Allii Macrostemonis Bulbus

ID	Compound	Molecular weight	Formular	Source
GL1	Beta-D-arabinopyranose	150.05	C ₅ H ₁₀ O ₅	GL
GL2	Vanillic acid 4-β-D-glucoside	330.09	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	GL
GL3	2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid	216.09	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	GL
GL4	Rutin	610.15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	GL
GL5	Kaempferol-3-O-β-rutinoside	594.16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	GL
GL6	Quercitrin	448.10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	GL
GL7	Quercetin	302.04	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	GL
GL8	Quercetin-3-O-α-D-riboside	434.08	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	GL
GL9	Kaempferol-3-D-glucoside-7-O-rhamnoside	578.16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	GL
GL10	Apigenin-7-O-β-D-glucoside	432.11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	GL
GL11	Chrysoeriol-7-O-β-D-glucoside	462.12	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	GL
GL12	Bryoamaride	678.36	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₂	GL
GL13	25-O-Acetylbryoamaride	720.37	C ₃₈ H ₅₆ O ₁₃	GL
GL14	Cucurbitacin D	516.31	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	GL
GL15	Tianshic acid	330.24	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	GL
GL16	Cucurbitacin B	558.32	C ₃₂ H ₄₆ O ₈	GL
GL17	Isocucurbitacin B	558.32	C ₃₂ H ₄₆ O ₈	GL
GL18	Pentadecanoic acid	242.22	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	GL
GL19	Punicic acid	278.22	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	GL
GL20	Apigenin	270.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	GL
GL21	Chrysoeriol	300.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	GL
GL22	Kaempferol	286.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	GL
GL23	Mandenol	308.56	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	GL

Continued

ID	Compound	Molecular weight	Formular	Source
GL24	Diosmetin	300.28	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	GL
GL25	Spinasterol	412.77	C ₂₉ H ₄₈ O	GL
GL26	Hydroxygenkwanin	300.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	GL
GL27	Schottenol	414.79	C ₂₉ H ₅₀ O	GL
GL28	10 α -Cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	426.80	C ₃₀ H ₅₀ O	GL
GL29	7-Oxo-dihydrokaro-unidiol	456.78	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	GL
GL30	Karounidiol 3-O-benzoate	544.89	C ₃₇ H ₅₂ O ₃	GL
GL31	Linolenic acid ethyl ester	306.54	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	GL
GL32	Vitamin-e	490.69	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	GL
GL33	5-Dehydrokarounidiol	438.76	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	GL
XB1	DiAlIS ₂	146.02	C ₆ H ₁₀ S ₂	XB
XB2	(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3,4,9-Tetrahydro-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrido[3,4- <i>b</i>] indole-3-carboxylic acid	230.11	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	XB
XB3	Chinenoside V	916.47	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₉	XB
XB4	26-[(β -D-Glucopyranosyl)oxy]-2 β ,22-dihydroxy-5 β -furostan-25(27)-en-3 β -yl-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside	934.48	C ₄₅ H ₇₂ O ₂₀	XB
XB5	Macrostemonoside J	936.49	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	XB
XB6	Macrostemonoside I	932.46	C ₄₅ H ₇₂ O ₂₀	XB
XB7	Macrostemonoside G	934.48	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	XB
XB8	Macrostemonoside P	936.49	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	XB
XB9	25 <i>R</i> -Macrostemonoside P	936.49	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	XB
XB10	Macrostemonoside O	918.48	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉	XB
XB11	Timosaponin BII	920.50	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	XB
XB12	25 <i>R</i> -Timosaponin BII	920.50	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	XB
XB13	Macrostemonoside F	902.49	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	XB
XB14	Timosaponin C	902.49	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	XB
XB15	Macrostemonoside S	754.41	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₄	XB
XB16	Timosaponin A III	740.44	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃	XB
XB17	Macrostemonoside A	1 064.54	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	XB
XB18	Macrostemonoside D	1 106.55	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₄	XB
XB19	Sitogluside	576.44	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	XB
XB20	Macrostemonoside B	1 245.35	C ₅₇ H ₉₆ O ₂₉	XB
XB21	25 <i>S</i> -Macrostemonoside B	1 245.35	C ₅₇ H ₉₆ O ₂₉	XB
XB22	Sitosteryl acetate	456.83	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	XB
XB23	Hesperetin	302.30	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	XB
XB24	Beta-sitosterol	414.79	C ₂₉ H ₅₀ O	XB
XB25	Naringenin	272.27	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	XB
XB26	Macrostemonoside e_qt	416.71	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	XB
XB27	Prostaglandin A1	336.52	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	XB
XB28	Prostaglandin B1	336.52	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	XB
XB29	<i>n</i> -Coumaroyltyramine	283.35	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	XB
XB30	(<i>Z</i>)-3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	313.38	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	XB
XB31	Coumaroyltyramine	283.35	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	XB
GX1	Adenosine	267.10	C ₉ H ₁₃ O ₄ N ₅	GL/XB
GX2	Guanosine	283.09	C ₅ H ₅ N ₅ O	GL/XB
GX3	<i>L</i> -Phenylalanine	165.08	C ₉ H ₉ NO ₂	GL/XB
GX4	<i>DL</i> -Tryptophan	204.09	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	GL/XB
GX5	Linolenic acid	278.22	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	GL/XB

2 蛋白互作 (PPI) 网络的构建

潜在靶点的蛋白质相互作用 PPI 网络中共有 161 个节点 (靶点蛋白)、1 878 条边 (蛋白相互作用) (图 1)。节点大小和颜色表示该节点度值的大小, 节点越大、红色越深, 对应的度值越大, 表明在所预测的疾病相关靶点中, 能与该靶点产生有效互相作用的靶点越多。其中, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt1, 95)、肿瘤坏死因子 (TNF, 89)、白介素 6 (IL6, 84)、血管内皮生长因子 A (VEGFA, 76)、细胞肿瘤抗原 p53 (Tp53, 72) 度值较大,

可能为痰瘀互结心血管疾病的关键靶点。

3 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 6.8 数据平台对 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.05$) 并绘制柱状图 (图 2)。KEGG 分析主要涉及炎症通路、脂质代谢通路、凋亡通路和疾病相关通路等。炎症相关通路主要包括 PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway); 脂质代谢相关通路主要包括鞘脂信号通路

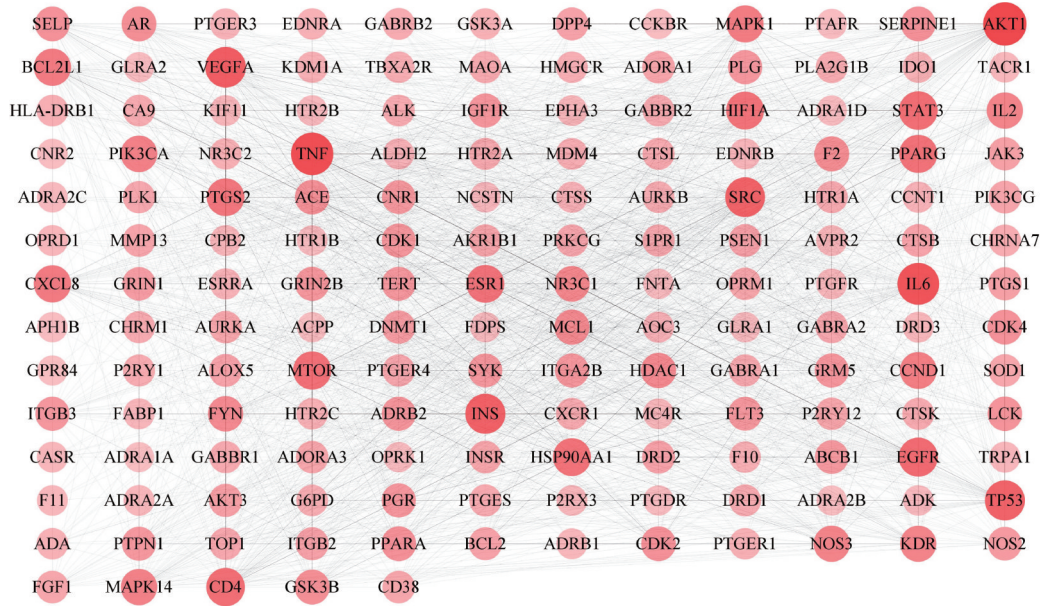


Figure 1 Protein-protein interaction (PPI) network of potential targets for GX treatment of phlegm and blood stasis

(sphingolipid signaling pathway)、脂肪细胞中脂肪分解的调节 (regulation of lipolysis in adipocytes); 凋亡相关通路主要包括 rap1 信号通路 (rap1 signaling pathway); 血小板形成相关通路包括血小板激活 (platelet activation); 疾病通路主要包括癌症通路 (pathways in cancer)、非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer) 等通路。

4 “成分-靶点-通路”网络构建

采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建网络时, 筛选 PPI 蛋白互作度值排名靠前的 30 个靶点参与“成分-靶点-通路”网络构建, 见图 3。该网络有 93 个节点和 401 条边。度值越大, 代表与该节点相连的其他节点越多, 证明该节点在网络中的贡献率较大。芹菜素 (apigenin, 11)、

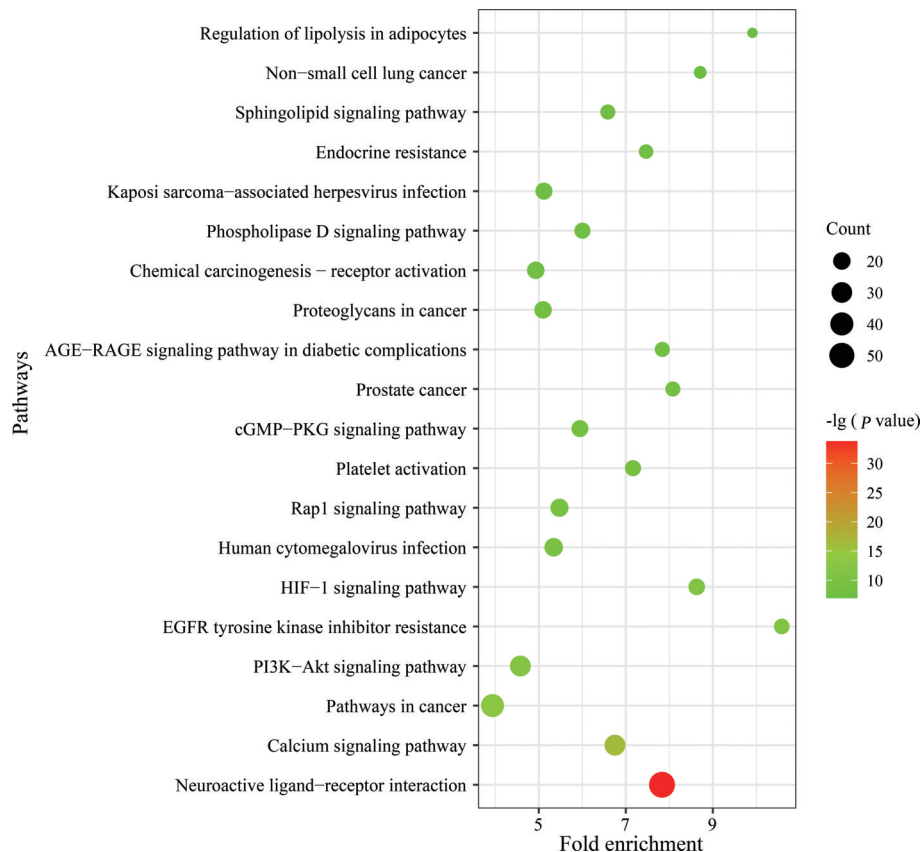


Figure 2 Enrich KEGG pathways analysis of potential targets for GX for treatment of phlegm and blood stasis syndrome

葫芦素 D (cucurbitacin D, 9)、亚麻酸 (linolenic acid, 9)、山柰酚 (kaempferol, 8)、柚皮素 (naringenin, 8)、槲皮素 (quercetin, 6) 等成分度值较大, 均与多个靶点连接, 可能是 GX 的核心化学成分。度值较大的靶点包括血管内皮生长因子 A (VEGFA, 24)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt1, 23)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1, 22) 等。对应度值较大的通路包括 PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway, 17)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway, 12)、rap1 信号通路 (rap1 signaling pathway, 10)、血小板活化 (platelet activation, 9) 和鞘脂信号通路 (sphingolipid signaling pathway, 9) 等。

5 分子对接虚拟计算结果

将 PPI 网络中排名靠前的靶点, 分别与 GX 核心成分进行分子对接验证, 结果见表 2。根据痰瘀互结心血管疾病特点, 靶点蛋白选取时, 分别选取了影响炎症、细胞凋亡和脂质代谢 3 个方面的靶蛋白, 参与分子对接。分子对接结合能越小, 表明其结合性越好。结果显示, 芹菜素、葫芦素 D、亚麻酸、山柰酚、柚皮素、槲皮素与 Akt1、TNF、IL6、VEGFA 和 Tp53 靶蛋白的平均结合性能绝大部分小于 $-1.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。以上结果表明, GX 核心成分能较好地与痰瘀互结心血管疾病相关靶点对接, 潜在生物活性高。

6 药效学实验及 Western blot 法验证关键靶点蛋白表达

6.1 GX 改善痰瘀互结证大鼠中医证候症状

高脂饮食喂养、冰水浸浴及皮下注射盐酸肾上腺素, 建立痰瘀互结大鼠模型。与空白组相比, 模型组大鼠痰瘀互结证候积分显著升高, 出现体胖腹大、不思饮食、皮肤瘀斑瘀点、舌色紫暗、大便黏腻不成形、小便黄等痰瘀互结证候的特征性表现。与模型组相比, GX 及丹莪片干预给药可显著降低大鼠中医证候积分 (表 3), GX 各剂量组及丹莪片组大鼠精神状态良好, 摄食量、饮水量呈上升趋势, 无嗜睡、纳呆、瘀斑瘀点, 毛发较光亮, 大便转干; 表明 GX 显著改善痰瘀互结证大鼠的中医证

Table 2 Molecular docking result of chemical ingredients of GX; "-" indicates that the molecular docking is not successful

Compound name	Gene target	PDB ID	Estimated $\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
Apigenin	Akt1	7NH5	-8.8
	TNF	6Q01	-6.1
	IL6	4CNI	-4.5
	VEGFA	3QTK	-6.1
	Tp53	4CZ7	-7.5
Cucurbitacin D	Akt1	7NH5	-10.8
	TNF	6Q01	-6.1
	IL6	4CNI	-5.1
	VEGFA	3QTK	-7.2
	Tp53	4CZ7	-
Linolenic acid	Akt1	7NH5	-5.7
	TNF	6Q01	-3.6
	IL6	4CNI	-2.8
	VEGFA	3QTK	-4.2
	Tp53	4CZ7	-5.7
Kaempferol	Akt1	7NH5	-8.7
	TNF	6Q01	-5.9
	IL6	4CNI	-4.4
	VEGFA	3QTK	-5.8
	Tp53	4CZ7	-6.7
Quercetin	Akt1	7NH5	-9.3
	TNF	6Q01	-6.4
	IL6	4CNI	-4.4
	VEGFA	3QTK	-6
	Tp53	4CZ7	-7.5
Naringenin	Akt1	7NH5	-8.7
	TNF	6Q01	-6.1
	IL6	4CNI	-4.5
	VEGFA	3QTK	-6.3
	Tp53	4CZ7	-7.4

候症状。

6.2 GX 改善痰瘀互结证大鼠血液流变学及血脂水平紊乱

与空白组相比, 模型组大鼠全血 (低切、中切、高切) 黏度及红细胞聚集指数均显著升高; 模型组大鼠血液流变学发生异常改变, 符合痰瘀互结证病理变化; 与模型组相比, GX 各剂量组及丹莪片组大鼠全血 (低切、中切、高切) 黏度及红细胞聚集指数均显著降低 (图 4)。

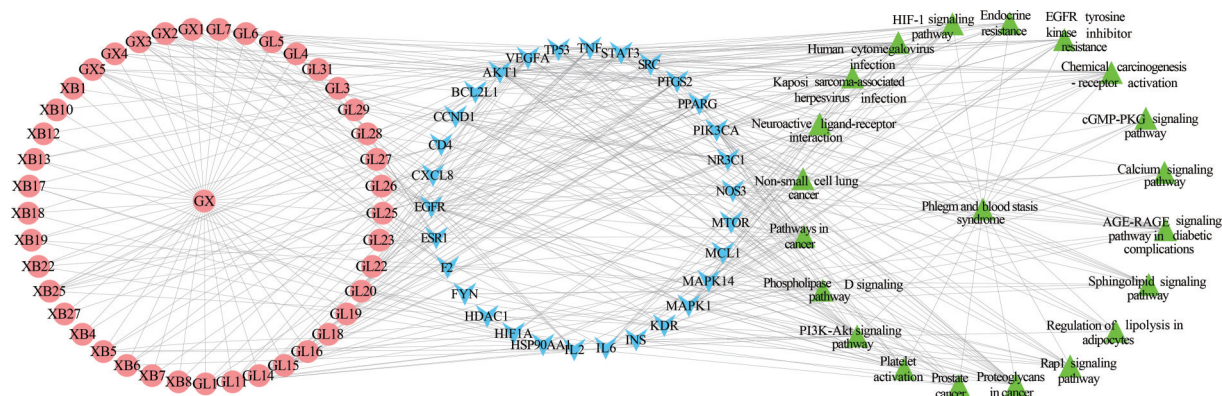


Figure 3 Network of drug ingredients-targets-pathways

Table 3 TCM syndrome score of phlegm and blood stasis syndrome rats. GX-L: 2 g·kg⁻¹·d⁻¹; GX-M: 4 g·kg⁻¹·d⁻¹; GX-H: 8 g·kg⁻¹·d⁻¹; Danlou tablet: 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹. n = 6, $\bar{x} \pm s$. **P < 0.01 vs control group; #P < 0.05, ###P < 0.01 vs model group

Group	Mental state and weight	Dietary quantity	Hair state	Feces state	Tongue coating	Skin state	Total score
Control	0	0	0	0	0	0	0
Model	2.60 ± 0.28**	2.26 ± 0.41**	1.65 ± 0.21**	1.88 ± 0.58**	2.40 ± 0.36**	2.45 ± 0.31**	13.24 ± 1.78**
GX-L	1.87 ± 0.30#	1.64 ± 0.36#	1.17 ± 0.21###	1.20 ± 0.35#	1.70 ± 0.22###	1.70 ± 0.26###	9.28 ± 1.41###
GX-M	1.77 ± 0.65#	1.35 ± 0.25###	0.72 ± 0.13###	1.15 ± 0.29#	1.55 ± 0.36###	1.53 ± 0.34###	8.06 ± 1.62###
GX-H	1.05 ± 0.39###	1.01 ± 0.39###	0.65 ± 0.18###	1.25 ± 0.19#	1.77 ± 0.33###	1.42 ± 0.26###	6.74 ± 1.24###
Danlou tablet	1.18 ± 0.40###	1.02 ± 0.30###	0.62 ± 0.22###	1.07 ± 0.27###	1.30 ± 0.35###	1.35 ± 0.26###	5.19 ± 0.89###

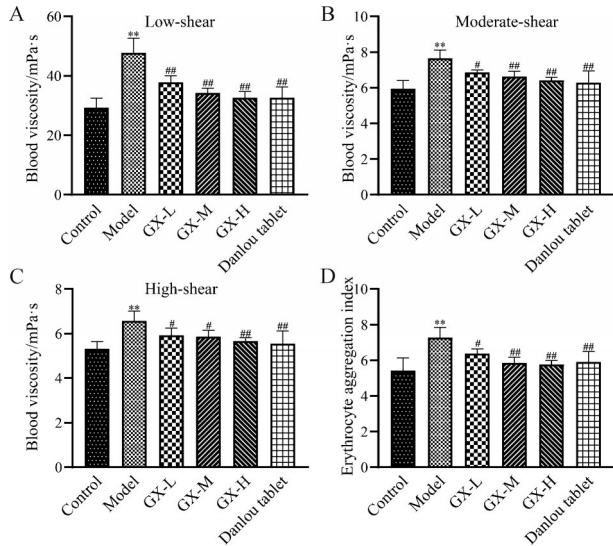


Figure 4 Effects of GX on hemorheology in phlegm and blood stasis syndrome rats. A: Low-shear blood viscosity; B: Moderate-shear blood viscosity; C: High-shear whole blood viscosity; D: Erythrocyte aggregation index. n = 6, $\bar{x} \pm s$. **P < 0.01 vs control group; #P < 0.05, ###P < 0.01 vs model group

与空白组比较, 模型组大鼠血清中 TC、TG 及 LDL-C 的水平均显著升高, HDL-C 水平显著降低; 模型组大鼠血脂发生异常改变, 符合痰瘀互结证病理变化; 与模型组相比, GX 各剂量组及丹蒌片组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著降低, HDL-C 水平显著升高且呈剂量依赖性 (图 5)。

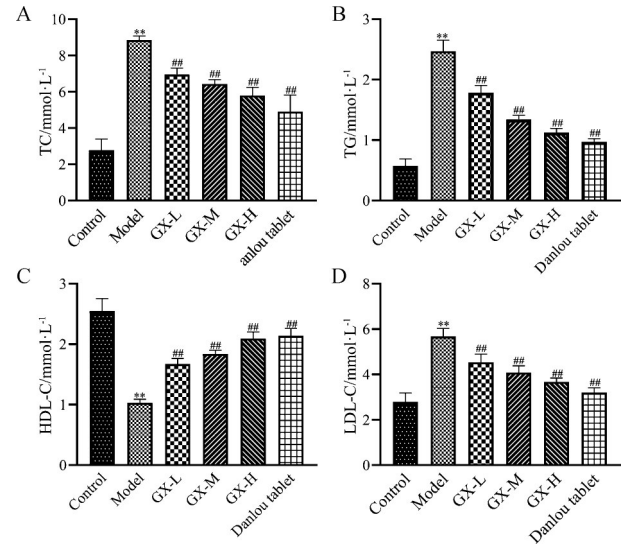


Figure 5 Effects of GX on the secretion of total cholesterol (TC, A), triglycerides (TG, B), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C, C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C, D) levels in serum. n = 6, $\bar{x} \pm s$. **P < 0.01 vs control group; ###P < 0.01 vs model group

6.3 GX 改善痰瘀互结证大鼠血管内皮结构异常 与空白组相比, 模型组大鼠主动脉内膜内皮细胞排列不齐, 内皮细胞有脱落, 中膜增厚; 与模型组相比, GX 各剂量组及丹蒌片组大鼠的主动脉组织形态均明显改善, 主动脉中膜厚度显著性降低 (图 6)。

与空白组相比, 模型组大鼠血清中 NO、eNOS 水

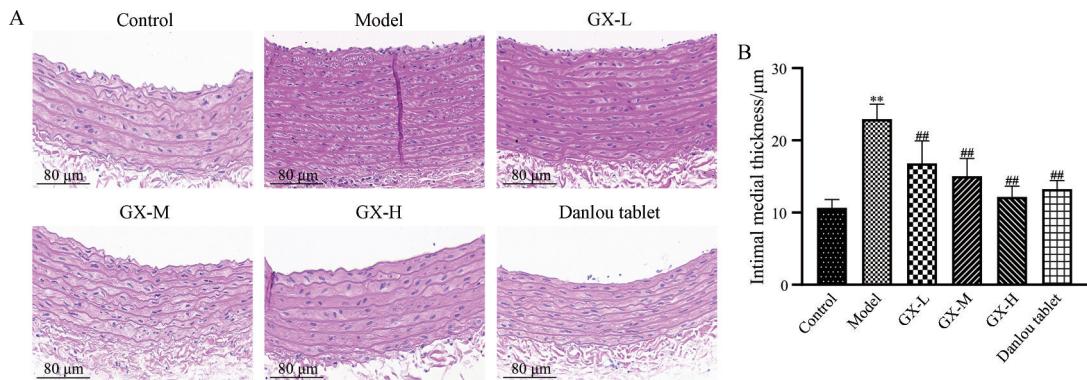


Figure 6 Effects of GX on aorta histological changes of phlegm and blood stasis syndrome rats (hematoxylin-eosin staining, HE 400×). A: Representative images of the aorta stained with HE; B: Medial thickness of the aorta. n = 3, $\bar{x} \pm s$. **P < 0.01 vs control group; #P < 0.05, ###P < 0.01 vs model group

平显著降低, ET-1 水平显著升高; 与模型组相比, GX 各剂量组及丹蒞片组大鼠血清中 NO 和 eNOS 水平均显著升高, ET-1 水平均显著降低, 且呈剂量依赖性 (表 4)。

Table 4 Comparison of nitric oxide (NO), endothelin nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) levels in six groups of rats. $n = 6, \bar{x} \pm s. **P < 0.01$ vs control group; $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$ vs model group

Group	ET-1/pg·mL ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹	eNOS/pg·mL ⁻¹
Control	18.86 ± 1.91	16.57 ± 2.85	15.74 ± 1.31
Model	34.11 ± 2.39**	2.66 ± 0.83**	8.49 ± 0.63**
GX-L	29.85 ± 2.44 ^{\#\#}	6.36 ± 0.80 ^{\#}	10.13 ± 0.51 ^{\#}
GX-M	26.29 ± 1.00 ^{\#\#}	8.15 ± 1.60 ^{\#\#}	11.69 ± 0.45 ^{\#\#}
GX-H	24.27 ± 1.47 ^{\#\#}	11.89 ± 2.05 ^{\#\#}	13.46 ± 1.28 ^{\#\#}
Danlou tablet	22.85 ± 1.04 ^{\#\#}	13.15 ± 1.86 ^{\#\#}	14.47 ± 0.90 ^{\#\#}

与空白组相比, 模型组大鼠主动脉组织中 ICAM-1、VCAM-1 的阳性表达均显著升高; 与模型组相比, GX 各剂量组及丹蒞片组大鼠主动脉组织中 ICAM-1、VCAM-1 的阳性表达均显著降低 (图 7、8)。

综上所述, GX 可显著改善痰瘀互结证大鼠血液“浓”、“黏”、“聚”的特点, 改善血管内皮结构紊乱及血管内皮功能, 抑制血管炎性反应, 逆转痰瘀互结证

大鼠特征病理性变化。

6.4 Western blot 法验证 GX 调控 PI3K/Akt 蛋白表达 血管炎症及血管内皮功能损伤是痰瘀互结心血管疾病的重要临床表现之一。在炎症和内皮损伤的进程中, PI3K/Akt 通路的表达发挥了关键作用^[20]。根据网络预测结果, 关键靶点 Akt1、IL6、VEGFA、Tp53 均富集在 PI3K/Akt 信号通路, 参与 PI3K/Akt 信号通路的调控。因此, 本实验以 PI3K、p-PI3K、Akt 及 p-Akt 蛋白表达, 对网络药理学预测结果进行验证。

与空白组相比, 模型组大鼠主动脉组织中 p-PI3K 及 p-Akt 蛋白的表达均明显升高; 与模型组相比, GX 各剂量及丹蒞片组大鼠主动脉中 p-PI3K 及 p-Akt 蛋白的表达明显降低 (图 9)。以上结果表明, GX 各剂量组可不同程度降低痰瘀互结大鼠主动脉组织中 p-PI3K 及 p-Akt 表达。

讨论

痰瘀互结证是中医常见证型, 与动脉粥样硬化、冠心病、高脂血症等心血管疾病密切相关^[21], 成为中医学理论与临床研究的热点。中医临床认为, 痰瘀互结证患

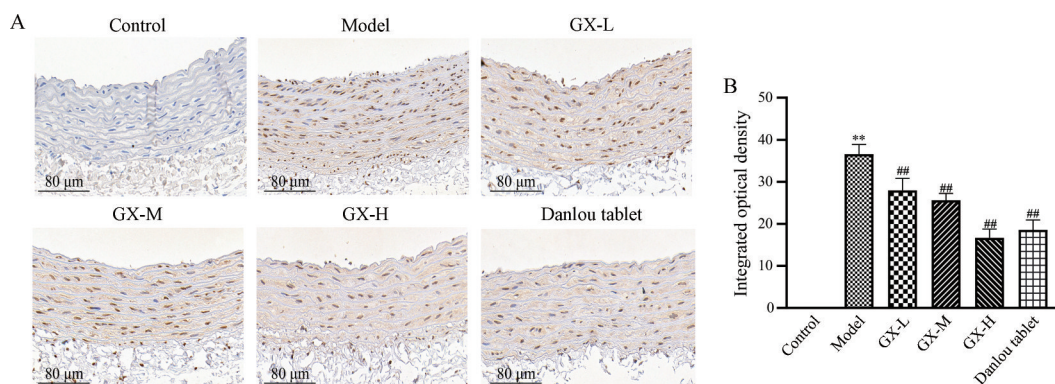


Figure 7 Effects of GX on intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in tissue of aorta in phlegm and blood stasis syndrome rats (immunohistochemistry, IHC 400×). A: Representative images of the aorta stained with IHC; B: Quantitative densitometric analyses of ICAM-1. $n = 3, \bar{x} \pm s. **P < 0.01$ vs control group; $^{\#\#}P < 0.01$ vs model group

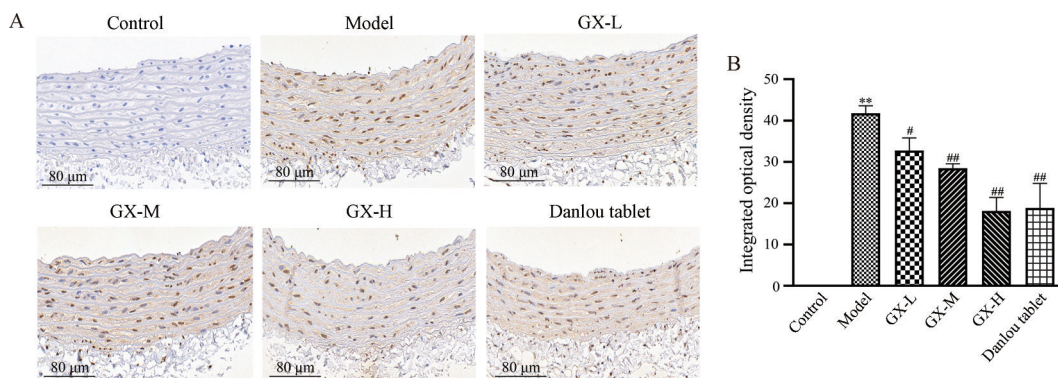


Figure 8 Effects of GX on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in tissue of aorta in phlegm and blood stasis syndrome rats (IHC 400×). A: Representative images of the aorta stained with IHC; B: Quantitative densitometric analyses of VCAM-1. $n = 3, \bar{x} \pm s. **P < 0.01$ vs control group; $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$ vs model group

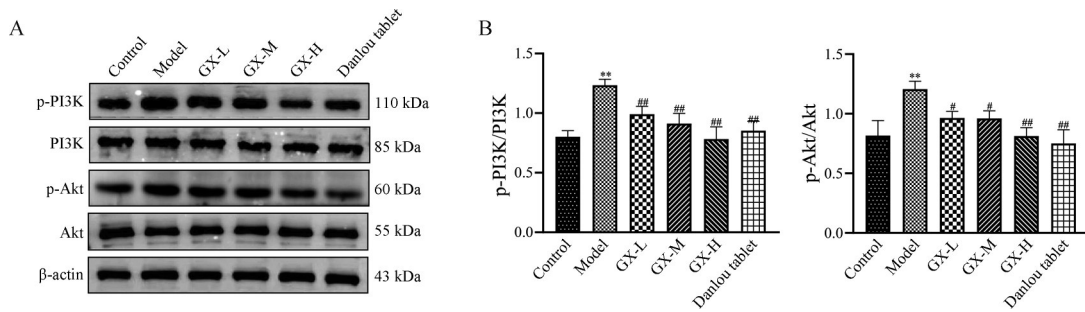


Figure 9 Effects of GX on protein expressions of PI3K/Akt in the phlegm and blood stasis syndrome rats. A: Western blot; B: Quantitative densitometric analyses. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

者可同时出现痰证、血瘀证的表现。痰证多见形体肥胖、纳呆、胸闷胸痛、眩晕、痰多、头身困重、嗜睡懒动、口干不欲饮水、大便黏腻不成形,舌苔白腻或黄腻,脉滑;血瘀证多见刺痛、痛有定处,脉络淤血(诸如口唇、齿龈、爪甲紫黯,肤表赤缕,或腹部青筋外露),皮下瘀斑,癥积,舌质紫黯或有瘀点瘀斑,脉细涩或沉弦等^[22,23],根据上述表现可判断为痰瘀互结证。

现代医学研究表明,痰瘀互结证具有某些实验室指标的特征性改变,痰证型冠心病患者更易出现脂肪代谢紊乱,血脂及血液黏度水平异常升高;血瘀型冠心病患者更易出现脂肪代谢紊乱,严重的血管细胞膜损伤等^[24]。研究表明,痰瘀互结模型大鼠血浆总胆固醇(CHO)、TG、LDL-C含量均显著升高,HDL-C含量显著降低^[25]。利用冰水浴联合盐酸肾上腺素注射大鼠研究可升高血浆黏度,导致血液易凝聚等血液流变性改变,并伴随严重的血管内皮损伤,为血瘀证重要的病理基础^[26]。本实验基于文献方法建立的痰瘀互结大鼠模型,与中医证候表现及现代药理学指标相一致。本研究表明,GX显著改善痰瘀互结证的中医证候症状,改善大鼠血液“浓”“黏”“聚”的特点,改善痰瘀互结大鼠血管内皮功能,抑制血管炎症反应,逆转痰瘀互结大鼠特征病理性变化。

GX药对主要由瓜蒌、薤白两味中药组成,“瓜蒌-薤白”类方可有效防治痰瘀互结型心血管疾病^[27,28],但其治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制尚未完全阐明。本研究利用网络药理学方法预测了GX药对治疗痰瘀互结心血管疾病的关键靶点、核心成分及相关通路。PPI网络显示,靶点之间存在着多种关联,连接度值越高,靶点的潜在治疗作用越大。Akt1、TNF、IL6、VEGFA和Tp53排名靠前,可能是GX治疗痰瘀互结心血管疾病的核心靶点。Akt1参与多种生物学过程,包括代谢、增殖、血管生成等,是PI3K/Akt信号通路中的核心因子^[29]。TNF是健康机体和疾病条件下哺乳动物免疫反应的关键中介和调节因子,可导致血管炎症、血脂异常及胰岛素抵抗,在早期动脉粥样硬化等心血管

疾病有明显升高趋势^[30]。IL6属于白细胞介素家族,在传递信息及炎症反应中起重要作用^[31]。VEGFA是VEGF家族的一员,可促进内皮细胞生长,伴随着较高的血管通透性,与梗死区微血管密度增加呈正相关^[32]。Tp53在细胞生长中起着关键调控作用,参与细胞生长、凋亡等生理功能,可通过调节甲羟戊酸途径,进而影响高脂血症的发展^[33]。课题组前期研究表明,GX可通过降低大鼠血清中TNF- α 及IL6等炎症因子的表达,抑制血管炎症反应^[8]。本实验结果亦表明,GX治疗痰瘀互结证心血管疾病所涉及的核心靶点主要在炎症反应、脂质代谢、细胞增殖分化和凋亡中发挥重要作用。靶点与靶点之间联系密切,也体现了GX具有多靶点多协同治疗疾病的优势。

“成分-靶点-通路”网络显示,GX治疗痰瘀互结心血管疾病的核心成分可能为芹菜素、葫芦素D、亚麻酸、山柰酚、柚皮素、槲皮素等活性成分。有研究表明芹菜素可通过抑制NF- κ B活化及其下游细胞因子ICAM-1的表达,减轻血管内皮炎症,改善内皮功能,发挥治疗心血管疾病的作用^[34]。葫芦素具有较强的抗炎活性,通过降低TNF- α 等炎症因子的释放,降低血管炎症反应^[35]。亚麻酸为人体必需脂肪酸,具有抗动脉粥样硬化、抗血栓形成、降低心血管疾病风险等药理作用。研究表明,亚麻酸可以通过抑制PI3K/Akt信号通路,改善高脂饮食大鼠主动脉血管的血栓形成^[36]。山柰酚通过减少TNF- α 、IL6等炎症因子,抑制血管黏附因子ICAM-1及VCAM-1表达,改善血管内皮炎症损伤^[37];其还可通过调节家兔体内血脂紊乱,减少动脉粥样硬化斑块面积,发挥抗动脉粥样硬化的作用^[38]。柚皮素可调节小鼠体内TC和TG水平,改善血脂代谢紊乱,降低血液黏度,抑制动脉粥样硬化发生发展^[39]。槲皮素降低主动脉血管壁细胞的NF- κ B转录活性,显著改善冠心病患者的临床症状^[40];柚皮素及槲皮素可降低黏附分子水平及炎症标志物,保护内皮细胞功能,治疗心血管疾病^[41]。

KEGG 信号通路富集分析发现, PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、鞘脂代谢信号通路等是调控痰瘀互结心血管疾病的重要通路。PI3K/Akt 信号通路可调节心肌细胞凋亡、血管内皮再生、物质代谢和炎症反应, 在冠心病的发生发展中起着重要作用^[42,43]。HIF-1 信号通路上调与血管系统相关蛋白基因的表达, 与心血管疾病的发生与发展密切相关^[44]。鞘脂代谢信号通路可保护心脏免受脂质堆积, 降低动脉粥样硬化等心血管疾病的发生率^[45], 其相关代谢物参与人冠状动脉平滑肌细胞炎症反应, 在炎症信号中起着至关重要的作用^[46]。可见, 上述信号通路参与炎症、脂质合成和内皮功能障碍等病理环节, 调控痰瘀互结心血管疾病的发生发展。结合动物实验验证, 本研究发现 GX 降低痰瘀互结模型大鼠主动脉内 p-PI3K、p-Akt 蛋白的表达, 与预测结果一致; 表明 GX 改善痰瘀互结模型大鼠血管炎症及内皮功能损伤, 与其调控 PI3K/Akt 信号通路密切相关。本研究以 GX 这一小复方为出发点, 利用现代科学技术解析 GX 治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制, 为 GX 类方剂治疗心血管疾病提供理论依据。

作者贡献: 本文设计思路由吴鸿飞教授提供; 张博和梁玉宁具体参与靶点筛选、通路富集、网络构建及分子对接工作; 张博、鲍友利、朱利和孙鑫负责 GX 药效实验及 Western blot 蛋白表达实验。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

References

- [1] Du S, Hu JQ, Lu HR. Literature review in origin and development of syndrome and treatment theory of phlegm and stasis [J]. J Basic Chin Med (中国中医基础医学杂志), 2015, 56: 811-815.
- [2] Bai D, Song J. Plasma metabolic biomarkers for syndrome of phlegm and blood stasis in hyperlipidemia and atherosclerosis [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32: 578-583.
- [3] Duan QJ, Xian NX, Pei YP, et al. The pathogenesis evolution of atherosclerotic-related cardiovascular diseases based on the "phlegm turbidity-phlegm coagulation-phlegm stasis" theory [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2022, 14: 81-84.
- [4] Fu YK, Ji XM. Composition pattern of prescription for Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus couplet medicine based on data mining [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2020, 22: 1757-1762.
- [5] Liu Y, Zhong H, Xu PB, et al. Deciphering the combination mechanisms of Gualou-Xiebai herb pair against atherosclerosis by network pharmacology and HPLC-Q-TOF-MS technology [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 941400.
- [6] Wang YT, Sun X, Qiu JW, et al. A UHPLC-Q-TOF-MS-based serum and urine metabolomics approach reveals the mechanism of Gualou-Xiebai herb pair intervention against atherosclerosis process in *ApoE*^{-/-} mice [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2023, 1215: 123567.
- [7] Xu PB, Ding LD, Qiu JW, et al. Study on effect of "Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus" on atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice based on liver metabolomics [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 5320-5329.
- [8] Zhong H, Qiu JW, Wu HF, et al. Mechanism of action of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus herb pairs against hyperlipidemia based on network pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 154-165.
- [9] Ding LD, Xu PB, Bao YL, et al. Effects of Trichosanthis fructus-Allii macrostemonis bulbus on the activation of NLRP3 inflammasomes in *ApoE*^{-/-} mice at different stages of atherosclerosis [J]. Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志), 2022, 30: 27-35.
- [10] Gan D, Xu X, Chen D, et al. Network pharmacology-based pharmacological mechanism of the Chinese medicine rhizoma drynariae against osteoporosis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 5700-5716.
- [11] Li JP, Guo LL, Chen Z, et al. Protective effect and mechanism of Danlou tablets on myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 95-100.
- [12] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. Bioinformatics, 2013, 29: 3073-3079.
- [13] Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25: 197-206.
- [14] Zhou Y, Zhang Y, Lian X, et al. Therapeutic target database update 2022: facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 7: D1398-D1407.
- [15] Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 23: W216-W221.
- [16] Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, et al. Protein data bank (PDB): the single global macromolecular structure archive [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1607: 627-641.
- [17] Zhou SQ, Zhang TT, Li TT, et al. Establishment and evaluation of phlegm and blood stasis syndrome nude mice model [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2019, 30: 256-258.
- [18] Yi Q, Li Y, Guo ZH, et al. Effect of xintongtai regulating p38 MAPK/AP-1 on traditional Chinese medicine syndrome score and collagen fibers in VSMCs of rabbits with atherosclerosis: an exploration based on theory of heart receiving Qi from spleen [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 56-65.
- [19] Li SJ, Li HL, Chen XL, et al. effects of Danlou tablets on NLRP3/GSDMD pathway about pyroptosis in rats after cerebral

- ischemia with phlegm and blood stasis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2022, 37: 4708-4714.
- [20] Li D, Guo YY, Cen XF, et al. Lupeol protects against cardiac hypertrophy via TLR4-PI3K-Akt-NF- κ B pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 1989-2002.
- [21] Li YB, Yu M, Li JL, et al. New understanding of phlegm and blood stasis and their clinical application [J]. *World Chin Med (世界中医药)*, 2022, 17: 3061-3064, 3069.
- [22] Xie R, Wang DH, Wang YP, et al. An analysis of the standard of phlegm syndrome differentiation [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)*, 2015, 32: 356-360.
- [23] Zhang WQ, Lv SC, Zhu YP, et al. Review of researches on syndromes of coronary heart disease with Qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2021, 62: 1092-1096.
- [24] Wu M, Hu JQ, Jiang LJ, et al. Research on the syndrome classification of coronary heart disease and its associated physiochemical indexes [J]. *World Sci Tech Mod Chin Mater Med (世界科学技术-中医药现代化)*, 2016, 18: 776-785.
- [25] Ling S, Bi Y, Cui HY, et al. Biological study of hemorheology and erythrocyte membrane of model rats with stagnation of phlegm and blood [J]. *Acta Chin Med Pharm (中医学导报)*, 2015, 43: 40-43.
- [26] Huang YH, Huang XL, Tan FZ, et al. Improvement effects of fibrinolytic enzyme from sipunculus nudus on hemorheology disorder and vascular endothelium injury of naked acute blood stasis model rats [J]. *J China Pharm (中国药房)*, 2019, 30: 2628-2631.
- [27] Du WT, Liu P, Deng P, et al. Clinical research on patients of the pattern of phlegm and blood stasis with coronary artery heart disease and carotid plaque treated by Gualou Xiebai Banxia Decoction based on the function and structure of vascular [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2016, 31: 4325-4328.
- [28] Zhu DJ, Chen W, Liu YY, et al. Clinical study on Zhishi Xiebai Guizhi decoction in treating unstable angina pectoris of cold coagulation, phlegm stasis and Qi stagnation [J]. *Inf Tradit Chin Med (中医药信息)*, 2020, 37: 88-92.
- [29] Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 38-48.
- [30] Ma K, Zhang H, Baloch Z. Pathogenetic and therapeutic applications of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in major depressive disorder: a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 733.
- [31] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a016295.
- [32] Yu F, Lu J, Li Z, et al. Correlation of plasma vascular endothelial growth factor and endostatin levels with symptomatic intra- and extracranial atherosclerotic stenosis in a Chinese Han population [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26: 1061-1070.
- [33] Moon SH, Huang CH, Houlihan SL, et al. p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression [J]. *Cell*, 2019, 176: 564-580.e19.
- [34] Ren B, Qin WW, Wu FH, et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 773: 13-23.
- [35] Li H, Chen HY, Li RL, et al. Cucurbitacin I induces cancer cell death through the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120: 2391-2403.
- [36] Yuan Q, Xie F, Huang W, et al. The review of alpha-linolenic acid: sources, metabolism, and pharmacology [J]. *Phytother Res*, 2022, 36: 164-188.
- [37] Bian Y, Liu P, Zhong J, et al. Kaempferol inhibits multiple pathways involved in the secretion of inflammatory mediators from LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 1958-1964.
- [38] Kong LX. Explore of the Anti-atherosclerosis Mechanism of Kaempferol and Study of It's Pharmacokinetics (山柰酚抗动脉粥样硬化作用机理探讨及其药代动力学研究) [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2015.
- [39] Assini JM, Mulvihill EE, Suhterland BG, et al. Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54: 711-724.
- [40] Chekalina N, Burmak Y, Petrov Y, et al. Quercetin reduces the transcriptional activity of NF- κ B in stable coronary artery disease [J]. *Indian Heart J*, 2018, 70: 593-597.
- [41] Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 889-904.
- [42] Pan Y, Yin J, Cai XM, et al. Research progress on intervention of traditional Chinese medicine on coronary heart disease through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 4100-4104.
- [43] Liu Y, Tie L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- α -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2019, 19: 279.
- [44] Bahrami A, Atkin SL, Majeed M, et al. Effects of curcumin on hypoxia-inducible factor as a new therapeutic target [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 137: 159-169.
- [45] Kang SC, Kim BR, Lee SY, et al. Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 67.
- [46] Edsfeldt A, Duner P, Stahlman M, et al. Sphingolipids contribute to human atherosclerotic plaque inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36: 1132-1140.