

基于网络药理学和实验验证探讨瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的作用机制

高锐, 朱春胜, 于东升, 李晓萍*

郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 基于网络药理学和实验验证探讨瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的作用机制。 **方法** 检索瓜蒌皮注射液的化学成分报道, 通过 Swiss ADME 和 Swiss Target Prediction 预测活性成分和靶点。通过 OMIM、TTD、GeneCards 数据库获得动脉粥样硬化的靶点, 使用 Venny 2.1 软件获得瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的共有靶点。采用 Cytoscape 3.6.1 软件构建“药物-成分-靶点”网络, String、DAVID 数据库进行蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建, 基因本体 (GO)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。通过高脂饮食建立动脉粥样硬化小鼠模型, 将小鼠随机分为对照组、模型组、瓜蒌皮注射液 (0.6、1.2 mL/kg) 组, 每组 6 只。瓜蒌皮注射液组分别 im 0.6、1.2 mL/kg 瓜蒌皮注射液, 连续给药 3 周。全自动生化分析仪检测小鼠血脂相关指标, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察主动脉病理变化, 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 法检测核心蛋白的表达。 **结果** 筛选出芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、香草酸等 21 个瓜蒌皮注射液活性成分, 共有靶点 89 个, 核心靶点包括蛋白激酶 B1 (Akt1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、非受体酪氨酸激酶 (SRC) 等。GO 功能分析获得 702 个条目, KEGG 富集获得 42 条信号通路。动物实验显示, 瓜蒌皮注射液可显著降低血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01); HE 染色显示, 瓜蒌皮注射液可减少斑块在主动脉管壁上附着; Western blotting 显示, 瓜蒌皮注射液可显著升高 Caspase-3 蛋白表达, 降低 p-SRC、p-Akt1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 瓜蒌皮注射液通过多个成分调控 Caspase-3、p-SRC、p-Akt1 等核心靶点, 降低斑块在主动脉附着, 进而发挥治疗动脉粥样硬化。

关键词: 瓜蒌皮注射液; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷; 木犀草素; 香草酸; 蛋白激酶 B1; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 非受体酪氨酸激酶

中图分类号: R285.5; R972 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)01-0041-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.006

Mechanism of Gualoupi Injection in treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and animal experiments

GAO Kun, ZHU Chunsheng, YU Dongsheng, LI Xiaoping

The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of action of Gualoupi Injection in treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** To search the chemical composition reports of Gualoupi Injection, and predict the active constituents and targets by Swiss ADME and Swiss Target Prediction. The targets of atherosclerosis were obtained by OMIM, TTD, and GeneCards databases, and the common targets of Gualoupi Injection for the treatment of atherosclerosis were obtained by Venny 2.1 software. Cytoscape 3.6.1 software was used to construct the “drug - component - target” network, String and DAVID databases were used to construct the PPI network, GO and KEGG enrichment analysis. The atherosclerosis mouse model was established by high-fat diet, and the mice were randomly divided into control group, model group, Gualoupi Injection (0.6, 1.2 mL/kg) group, with 6 mice in each group. Gualoupi Injection group was given 0.6 and 1.2 mL/kg of Gualoupi Injection, respectively, for 3 weeks. The relevant indexes of blood lipids were detected by automatic biochemical analyzer, the pathological changes of aorta were observed by HE staining, and the expression of core proteins was detected by Western blotting. **Results** 21 Active components of Gualoupi Injection, including apigenin-7-O- β -D-glucoside, luteolin, and vanillic acid were selected, with 89 targets. The core targets

收稿日期: 2023-09-26

基金项目: 郑州大学第一附属医院横向课题 (K2020-0233)

作者简介: 高锐, 男, 主管药师, 研究方向为中药炮制学。E-mail: gaokun.29@163.com

*通信作者: 李晓萍, 女, 主任药师, 研究方向为医院药学管理、中药临床药学。E-mail: lixiaoping630209@163.com

included Akt1, Caspase 3, and SRC. GO functional analysis obtained 702 items, KEGG enrichment obtained 42 signaling pathways. Animal experiments showed that the levels of TC, TG, and LDL-C in serum could be significantly reduced by Gualoupi Injection ($P < 0.05, 0.01$). HE staining showed that Gualoupi Injection could reduce plaque adhesion on the active vascular wall. Western blotting showed that Gualoupi Injection significantly increased the protein expression of Caspase 3, and decreased the protein expressions of p-SRC and p-Akt1 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Gualoupi Injection regulates Caspase 3, p-SRC, p-Akt1 and other targets through multiple components, thereby reducing blood lipids and plaque attachment, and thus treating atherosclerosis.

Key words: Gualoupi Injection; atherosclerosis; network pharmacology; apigenin-7-O- β -D-glucoside; luteolin; vanillic acid; Akt1; Caspase 3; SRC

动脉粥样硬化是血管内膜内各种细胞、脂质和碎片组织形成斑块的过程,是一种由传统和非传统危险因素介导的慢性血管炎症^[1]。临床大量研究表明动脉粥样硬化是心血管疾病的病理基础,其中不稳定的动脉粥样硬化斑块破裂、血小板聚集、血栓形成引起血管狭窄或闭塞,是导致心肌梗死、缺血性心肌病、中风和外周动脉疾病等心血管疾病的主要因素^[2-3]。美国国家健康与营养检查数据显示,2005—2008 年美国高低密度脂蛋白胆固醇的总体人口患病率已达 33.5%^[4]。《中国心血管健康与疾病报告 2019》指出,我国目前心血管病患病率处于逐年上升阶段,患病人数已达 3.3 亿人,且平均每 5 例死亡病例中就有 2 例死于心血管病^[5]。因此,开展动脉粥样硬化的治疗对防治心血管病带来的风险显得尤为重要。

瓜蒌皮注射液是由瓜蒌皮提取纯化制成的中药注射剂,目前已被广泛应用于冠心病、不稳定型心绞痛、冠脉介入术后等心血管疾病的临床治疗^[6]。然而瓜蒌皮注射液对心血管疾病的前期动脉粥样硬化是否有影响还未见相关报道。中药产生的药效是多靶点、多成分的综合效应,其生物活性及其分子机制非常复杂,如何避免中药多成分割裂式的研究,构建反映中药“整体性”特色的药效成分筛选模式是一个值得不断深入探索的科学问题^[7]。随着生物信息学的发展,网络药理学能从多成分、多靶点、多途径层面系统阐述中药发挥药效的物质基础和作用机制,较好地体现了中医的“整体观”,已逐步获得了业内人士的认可^[8-9]。因此,本研究将结合网络药理学和动物实验,从体内外 2 个维度探讨了瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的物质基础和作用机制,以期对瓜蒌皮注射液向临床深入推广提供依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 瓜蒌皮注射液化学成分与潜在靶点筛选 以

“瓜蒌皮注射液”“*Trichosanthis Pericarpium Injection*”“Gualoupi Injection”为关键词,在 CNKI、万方数据库、PubMed 数据库检索并收集有关瓜蒌皮注射液的化学成分文献报道。将上述获得的化合物导入 PubChem 数据库下载化合物 2D 结构的 SDF 图,并导入 Swiss ADME 数据库,以胃肠道吸收度(GI absorption)为“High”和满足类药性五原则 lipinski、ghose、veber、egan、muegge 其中的 2 个或 2 个以上为条件再次筛选。同时,将上述符合条件的化合物导入到 Swiss Target Prediction 数据库中检索相应的靶点,收集靶点信息。

1.1.2 动脉粥样硬化靶点检索及“药物-成分-靶点”网络构建 在 OMIM、TTD、Gene Cards 3 个数据库中输入关键词“atherosclerosis”进行检索,汇总与动脉粥样硬化相关的靶点,并结合 Uniprot 蛋白库对上述靶点进行标准化处理,构建动脉粥样硬化靶点数据库。

将瓜蒌皮注射液活性成分与瓜蒌皮注射液-动脉粥样硬化相关靶点使用 Cytoscape 3.6.1 软件,构建“药物-成分-靶点”相互作用网络图,使用 Network Analyzer 功能对瓜蒌皮注射液的主要活性成分进行拓扑性质分析,根据 degree 值进行排序,以获得瓜蒌皮注射液活性成分成分和靶点的网络图。使用 Venny 2.1 软件将 1.1.1 项下瓜蒌皮注射液活性成分预测靶点和动脉粥样硬化靶点进行匹配,绘制共同靶点韦恩图,获得瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的共有靶点。

1.1.3 基于 String 的蛋白相互作用网络(PPI)构建 将瓜蒌皮注射液和动脉粥样硬化共有靶点输入到 String 数据库,限定物种为“Homo sapiens”进行检索,以获得 PPI 图,同时通过 degree 值来筛选瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的核心靶点。

1.1.4 通路富集分析 将瓜蒌皮注射液和动脉粥样硬化共有靶点输入 DAVID 数据库,限定物种为“Homo sapiens”,进行关键靶点基因本体(GO)生

物学富集分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 代谢通路富集分析。利用微生信在线绘图工具对 GO 分析结果中的生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 以及 KEGG 结果作可视化处理。

1.2 动物实验验证

1.2.1 药品与试剂 瓜蒌皮注射液购自上海上药第一生化药业有限公司, 规格 4 mL/瓶, 批号 2103201; 三酰甘油 (TG) 试剂盒 (批号 141722012)、总胆固醇 (TC) 试剂盒 (批号 141622014)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂盒 (批号 142122013)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (批号 142022013) 均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 蛋白激酶 B1 (Akt1) 抗体 (批号 51077-1-AP)、p-Akt1 抗体 (批号 28731-1-AP)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) (批号 66470-z-Ig)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC) 抗体 (批号 11097-1-AP) 均购自美国 Proteintech 公司, p-SRC 抗体 (批号 595485) 购自美国 CST 公司。

1.2.2 主要仪器 BS-240VET 全自动生化分析仪 (深圳迈瑞公司); 石蜡组织切片机 (美国 AO 公司); Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); 5430R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); YB3002 分析天平 (上海力能电子仪器公司); 恒温水浴锅 (北京医疗设备厂)。

1.2.3 动物 SPF 级 8 周龄雄性 Apo E^{-/-} 小鼠 18 只及相同周龄及遗传背景的雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物中心, 动物批号 110324210106099213, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。实验期间全程喂养于动物实验中心适应 1 周, 室内温度 22~25 °C, 相对湿度 40%~45%。本实验获得郑州大学第一附属医院生命科学伦理委员会批准, 批号 2023-KY-1400。

1.2.4 动物模型建立及分组 Apo E^{-/-} 小鼠给予高脂饮食 8 周建立动脉粥样硬化小鼠模型, 周龄及遗传背景相同的雄性 C57BL/6J 对照组小鼠给予普通饮食^[10]; 高脂饮食饲养 7 周后, 18 只 Apo E^{-/-} 小鼠随机分为模型组、瓜蒌皮注射液 (0.6、1.2 mL/kg) 组, 每组 6 只。瓜蒌皮注射液组分别 im 0.6、1.2 mL/kg 瓜蒌皮注射液, 连续给药 3 周。

1.2.5 取材 末次给药后, 小鼠麻醉后, 腹主动脉采血, 放于普通试管中, 3 000×g 离心 10 min, 分离上清液, 用于测定 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水

平; 同时剥离主动脉, 部分置于 4% 多聚甲醛固定用于病理学观察, 部分置于液氮用于核心蛋白表达的验证。

1.2.6 观察主动脉组织病理变化 取新鲜主动脉组织, 固定液固定组织, 固定后清水冲洗, 并采用梯度乙醇进行处理, 并进行石蜡组织包埋, 后经脱蜡、脱水等一系列操作后, 伊红染色 3 min, 脱水封片, 显微镜下观察组织病理情况。

1.2.7 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 法检测核心蛋白表达 称取各组小鼠主动脉组织, 加入裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 法对各样本蛋白浓度进行定量。提取的蛋白 (20 μg) 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 °C 一抗孵育过夜 (核心蛋白抗体 Akt1、Caspase 3、p-SRC 及内参 β-actin 稀释比例 1:1 000, p-Akt1 稀释比例 1:2 000, SRC 稀释比例 1:500)。用 TBST 缓冲溶液洗涤后, 二抗孵育 1 h。用 ECL 显色, Bio-RAD 曝光仪曝光, 采集不同时段的显色条带。以 β-actin 为内参, 用 Image J 软件对条带的灰度值进行定量分析。

1.2.8 统计学方法 使用 GraphPad Prism 8.01 (美国 San Diego) 进行数据处理和分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, 美国) 进行 Western blotting 分析。

2 结果

2.1 瓜蒌皮注射液主要活性成分的筛选

通过对瓜蒌皮注射液相关文献报道^[11-14]的梳理, 共搜集瓜蒌皮注射液化学成分 63 个, 结合 Swiss ADME 数据库, 以 GI absorption 为 “High” 和满足类药性五原则中的 2 个或以上为筛选件, 共筛选出包括芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素、香草酸等 21 个化学成分, 见表 1。

2.2 “药物-成分-靶点” 网络

通过 Cytoscape 3.6.1 软件, 构建瓜 “药物-成分-靶点” 网络图 (图 1), 该网络共包含 294 个节点和 443 条边。degree 值排名前 3 位的化合物分别是芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素、香草酸, 分别与 104、104、35 个靶点相互作用。

2.3 “瓜蒌皮注射液-动脉粥样硬化” 共有靶点预测和 PPI 网络构建

将筛选出的 21 个瓜蒌皮注射液活性成分的潜在作用靶点与动脉粥样硬化靶点绘制韦恩图, 见图

表 1 瓜蒌皮注射液主要活性成分

Table 1 Main active ingredients of Gualoupi Injection

编号	活性成分
GLPI1	芹菜素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
GLPI2	木犀草素
GLPI3	酪氨酸
GLPI4	黄嘌呤
GLPI5	香草酸
GLPI6	烟酰胺
GLPI7	烟酸
GLPI8	<i>N,N</i> -二甲基- <i>L</i> -组氨酸
GLPI9	腺嘌呤
GLPI10	次黄嘌呤
GLPI11	鸟嘌呤
GLPI12	1-carbamimidoyl-4-piperidinecarboxylic acid
GLPI13	prolylleucine
GLPI14	鸟苷
GLPI15	亮氨酸
GLPI16	肉碱
GLPI17	异亮氨酸
GLPI18	<i>DL</i> -色氨酸
GLPI19	缬氨酸
GLPI20	<i>N</i> ₆ , <i>N</i> ₆ , <i>N</i> ₆ -trimethyl- <i>L</i> -lysine
GLPI21	腺苷

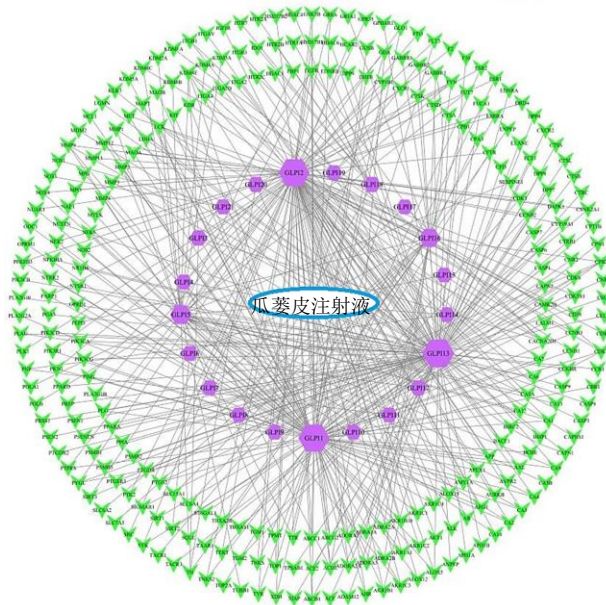


图 1 “药物 - 成分 - 靶点”网络

Fig. 1 “Drug - ingredient - target” network

2. 将上述共有蛋白输入 String 数据平台, 以获得 PPI 网络图, 见图 3, 其中 degree 值排名前 5 位的潜在靶点包括 Akt1、Caspase-3、前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、SRC、表皮生长因子受体 (EGFR), 上述蛋白可能是瓜蒌皮注射液发挥治疗动脉粥样硬化作用的核心靶点。

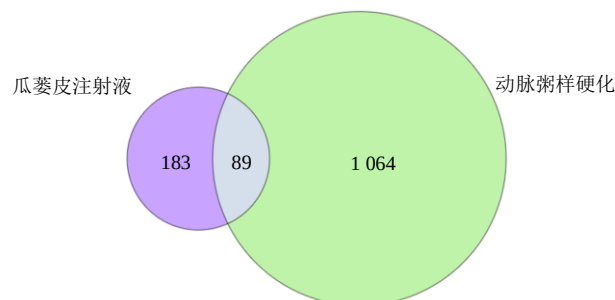


图 2 “瓜蒌皮注射液 - 动脉粥样硬化”共有靶点维恩图

Fig. 2 Venn diagram of common targets of “Gualoupi Injection - atherosclerosis”

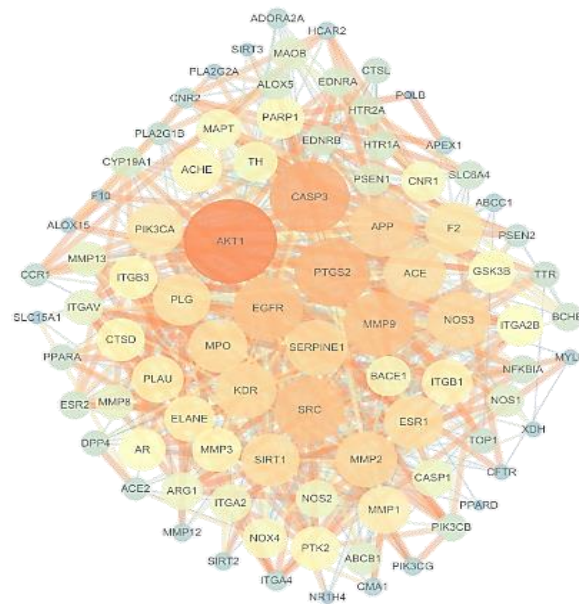


图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI Network

2.4 GO 生物学功能分析和 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析共获得 702 条目, 其中 BP 545 个, CC 67 个, MF 90 个。根据 P 值 < 0.05 、FDR < 0.05 的条目将前 10 位作可视化处理, 结果见图 4。主要涉及对细胞增殖的调控、细胞凋亡的调控、程序性细胞死亡的调控、细胞死亡的调控等 BP 过程, CC 包括神经元投射、细胞表面、等离子体膜、轴突等, MF 包括肽酶的活动、钙离子结合、丝氨酸水解酶活性、铁离子结合等。KEGG 通路富集分析共得到 42 条信号通路 ($P < 0.05$), 选取排名前 20 位的信号通路并作可视化分析, 结果见图 5, 提示白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、神经活性配体 - 受体相互作用、精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、肾素 - 血管紧张素系统、核因子- κ B (NF- κ B) 等通路与动脉粥样硬化密切相关。

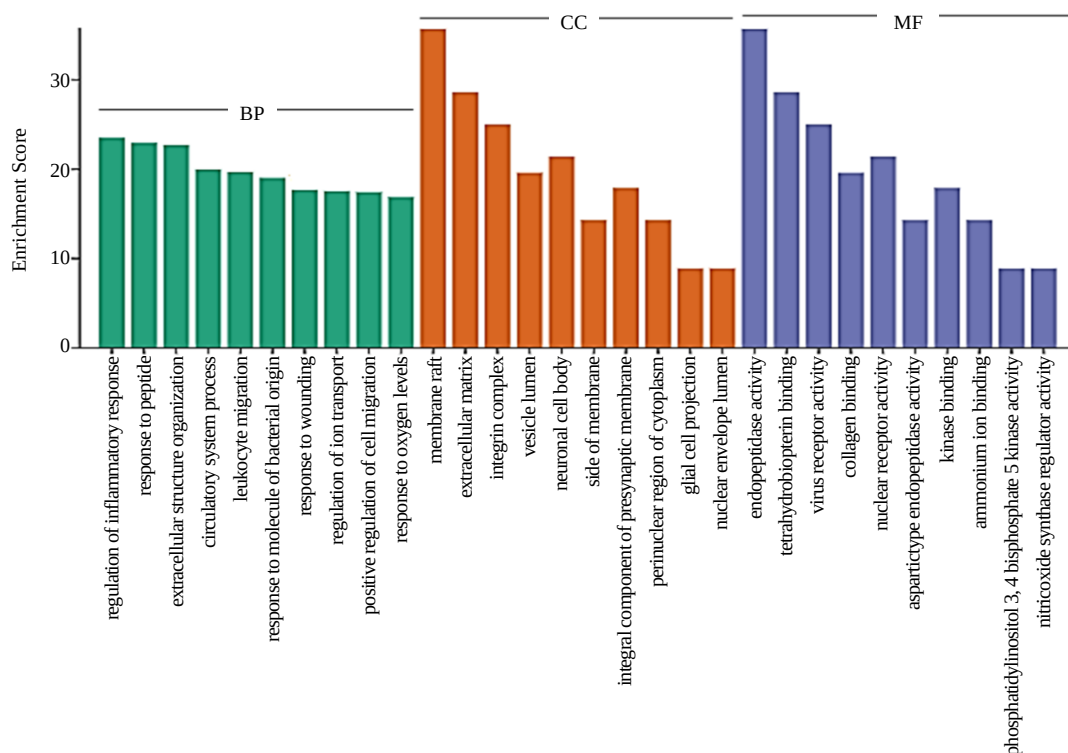


图 4 瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of Gualoupi Injection in treatment of atherosclerosis

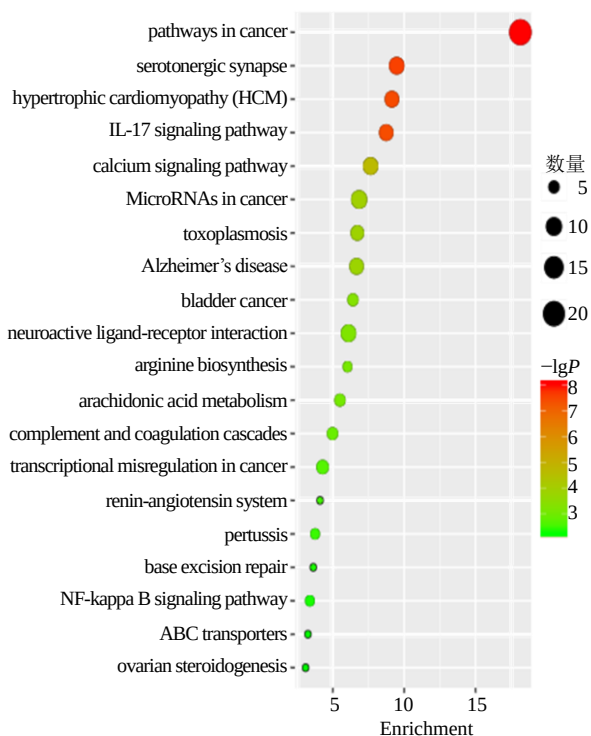


图 5 瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis of Gualoupi Injection in treatment of atherosclerosis

2.5 瓜蒌皮注射液对动脉粥样硬化小鼠血脂水平的影响

与对照相比,模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 显著升高, HDL-C 显著降低 ($P<0.01$); 与模型相比,瓜蒌皮注射液组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),而对 HDL-C 无显著改变,见表 2。

2.6 瓜蒌皮注射液对动脉粥样硬化小鼠主动脉的影响

HE 染色结果显示,对照组小鼠主动脉内膜光滑完整,无斑块形成。模型组小鼠主动脉壁破损,可见较大斑块附着于管壁上,斑块内见少量泡沫细胞。与模型组相比,瓜蒌皮注射液组小鼠主动脉壁较完整,部分可见少量斑块和泡沫细胞附着于管壁上,见图 6。

2.7 瓜蒌皮注射液对核心蛋白的影响

与对照组比较,模型组 p-SRC、p-Akt1 蛋白表达水平显著升高, Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较,瓜蒌皮注射液组 p-SRC、p-Akt1 蛋白表达水平显著降低, Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.05),而 SRC、Akt1 蛋白在各组中无显著变化,见图 7。

表 2 瓜蒌皮注射液对动脉粥样硬化小鼠血清 TC、TG、LDI-C、HDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Gualoupi Injection on serum TC, TG, LDI-C, and HDL-C of atherosclerosis mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mL kg ⁻¹)	TC/(mmol L ⁻¹)	TG/(mmol L ⁻¹)	HDL-C/(mmol L ⁻¹)	LDL-C/(mmol L ⁻¹)
对照	—	0.84 ± 0.11	2.17 ± 0.33	1.25 ± 0.16	0.30 ± 0.04
模型	—	1.97 ± 0.44**	27.73 ± 2.32**	0.82 ± 0.11**	11.33 ± 1.97**
瓜蒌皮注射液	0.6	1.18 ± 0.29##	22.86 ± 4.63#	0.74 ± 0.09	9.08 ± 0.90#
	1.2	0.95 ± 0.24##	13.90 ± 2.12##	0.75 ± 0.10	5.67 ± 1.00##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

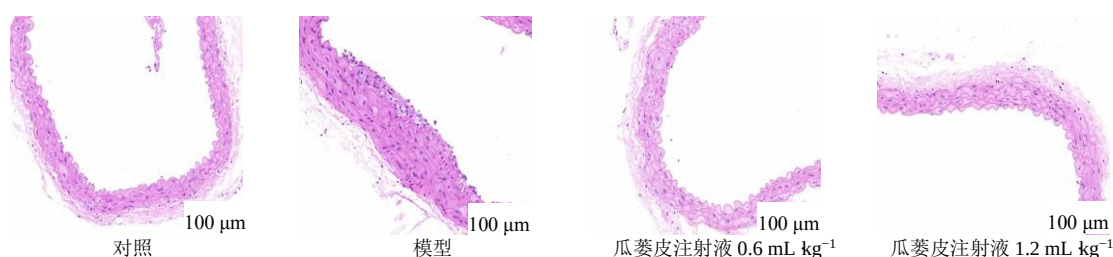
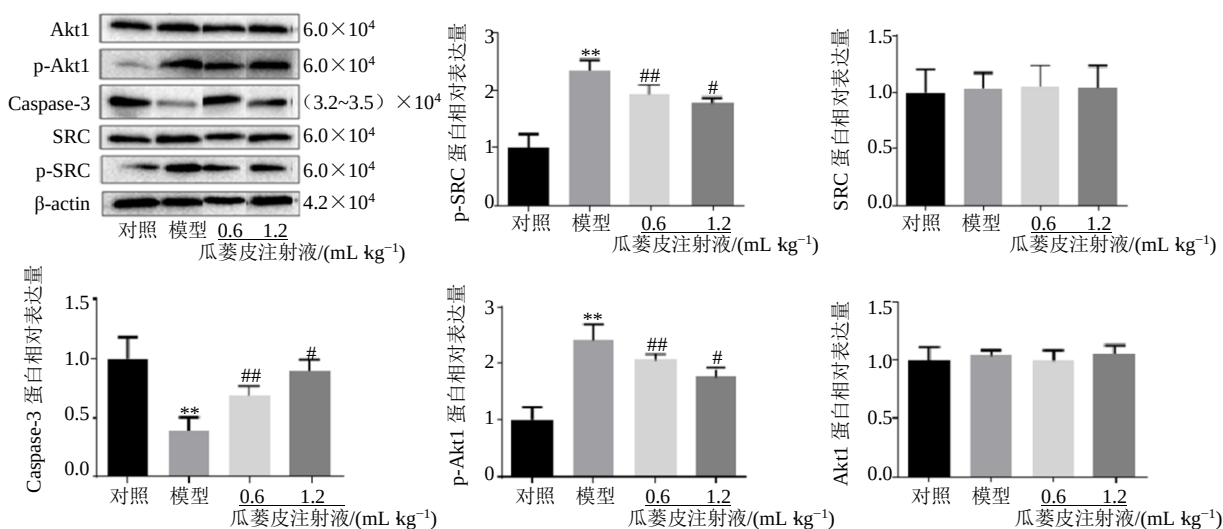


图 6 瓜蒌皮注射液对动脉粥样硬化小鼠主动脉的影响

Fig. 6 Effect of Gualoupi Injection on aorta in mice with atherosclerosis



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 瓜蒌皮注射液对动脉粥样硬化小鼠主动脉核心蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Gualoupi Injection on aortic core protein in atherosclerosis mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

传统中医并无动脉粥样硬化记载,根据其临床症状及病理表现,将其归属于“胸痹”“脉痹”“中风”等范畴^[15]。历代医家对动脉粥样硬化的病因病机进行了不同的阐述,《医学正传》记载:“津液稠黏,为痰为饮,积久渗入脉中,血为之浊”,提出痰

饮相生而互结,留滞于脉中即可发展为动脉粥样硬化^[16];《医林改错》记载:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”提出气虚血瘀可发展为动脉粥样硬化^[17];冯文伟等^[18]根据课题组多年的临床实践经验,提出“脉络积”学说,认为气滞、血瘀、痰浊等积聚内生于脉是形成动脉粥样硬化的

核心病机；余锋等^[19]根据现代医学对动脉粥样硬化的认识及临床实践，认为形成动脉粥样硬化的病机是“气阳亏虚，血瘀热毒”。可见气虚、痰饮、血瘀是形成动脉粥样硬化的主要病机。而瓜蒌皮注射液作为化痰泄浊类的代表，具有行气除满、开胸除痹之功，现代药理研究亦表明瓜蒌皮注射液具有抗血小板聚集、抗自由基、活血化瘀等作用^[20]，但是对动脉粥样硬化的作用机制系统报道较少。

因瓜蒌皮注射液在中药系统药理数据库和分析平台上检索不到相应成分，实验基于文献报道结合胃肠道吸收度为“High”和满足类药性五原则中的 2 项作为瓜蒌皮注射液活性成分的筛选，共筛选出包括芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、香草酸、亮氨酸、烟酸等 21 个成分。Ashokkumar 等^[21]发现香草酸可引起除血浆 HDL 水平升高外的相当大的脂质谱降低，此外，还可以减少肝组织中胶原蛋白的积累。孙霁寒等^[22]研究发现木犀草素可以通过降低高脂血症大鼠的 TC、TG、LDL-C 水平，升高过氧化氢酶来发挥抗氧化应激作用，减轻肝细胞脂肪在肝脏的沉积。李志乐等^[23]研究发现烟酸可通过显著提高主动脉 B7-H3、B7-H4 蛋白表达，调控血脂 TC、TG、LDL-C 和炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-10 (IL-10) 水平，从而发挥治疗动脉粥样硬化药效。本实验结果表明瓜蒌皮注射液可显著降低动脉粥样硬化小鼠血清 TC、TG、LDL 水平，HE 染色显示瓜蒌皮注射液还可减少斑块和泡沫细胞主动脉管壁上的黏附，提示瓜蒌皮注射液可能是通过上述多个成分减少血脂在血管中蓄积进而发挥治疗动脉粥样硬化作用。

PPI、GO、KEGG 结果显示，瓜蒌皮注射液通过调节 Akt1、Caspase-3、SRC 等在内的多个活性靶点，从细胞表面、等离子体膜、轴突等层面影响肽酶的活动、钙离子结合、丝氨酸水解酶活性进而干预对细胞增殖的调控、细胞凋亡的调控、程序性细胞死亡的调控等过程，最终通过调控 IL-17 信号通路、花生四烯酸代谢、NF- κ B 等多个通路发挥治疗动脉粥样硬化。有研究显示，Akt1 基因的缺失会导致小鼠体生长迟缓，伴随着多个器官的缩小，限制性细胞类型的细胞凋亡水平升高^[24-25]，同时还表现出胚胎外血管模式受损和胎盘萎缩，以及围产期高胎儿死亡率^[26]。此外，Akt1 可通过参与调节一氧化氮合成酶和一氧化氮的生成，对动脉粥样硬化斑块

具有保护作用^[27]。近年来随着人们的深入研究，发现 Caspase-3 可通过介导细胞焦亡引起炎症反应，进而参与心血管疾病的发生和发展^[28]。而 Caspase-3 作为细胞凋亡的终末蛋白，其升高与动脉粥样硬化、心肌病、心肌缺血等密切相关^[29]。在 3 221 名受试者研究中，发现 Caspase 3 与冠状动脉钙化、主动脉壁厚度、主动脉顺应性独立相关，提示 Caspase-3 与动脉粥样硬化之间存在联系^[30]。SRC 是人类发现较早的一类由多种胞外信号分子激活的非跨膜型蛋白，包括 9 种结构相似的家族成员，有研究发现 SRC 参与了细胞中多种活动，如细胞增殖、迁移、脂质代谢等^[31]。Ba 等^[32]发现红景天苷可通过增强 SRC 的活性和 Caveolin-1 的自噬降解来抑制 LDL 胞吞作用从而预防动脉粥样硬化。Western blotting 研究发现，与对照组比较，模型组 p-SRC、p-Akt1 蛋白表达水平显著升高，Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)；瓜蒌皮注射液可逆转上述蛋白的表达 ($P < 0.01$ 、0.05)，而对 SRC、Akt1 蛋白表达无显著影响，说明瓜蒌皮注射液发挥抗动脉粥样硬化的作用机制可能与调控 p-SRC、p-Akt1、Caspase-3 的蛋白表达有关，同时也间接证实网络药理学筛选核心蛋白的合理性。

综上，本研究采用网络药理学整合动物实验探讨瓜蒌皮注射液治疗动脉粥样硬化的作用机制，发现瓜蒌皮注射液可能通过芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、香草酸等多个成分调控 Caspase-3、p-SRC、p-Akt1 等靶标蛋白，降低 TC、TG、LDL 血脂水平，减少斑块在主动脉附着，进而发挥治疗动脉粥样硬化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kong P, Cui Z Y, Huang X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: Signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal transduct Tar*, 2022, 7: 131.
- [2] Libby P, Buring J E, Badimon L, et al. Atherosclerosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 56.
- [3] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: Prevalence, treatment, and control of high levels of low-density lipoprotein cholesterol-United States, 1999—2002 and 2005—2008 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2011, 60(4): 109-114.
- [5] 王增武, 胡盛寿. 《中国心血管健康与疾病报告 2019》

- 要点解读 [J]. 中国心血管杂志, 2020, 25(5): 401-410.
- [6] 邢雅璇, 张京春, 艾玉珍, 等. 瓜蒌皮注射液“从痰论治, 痰瘀同调”治疗冠心病理论探析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(10): 1247-1252.
- [7] Zhu C S, Lin Z J, Xiao M L, *et al.* The spectrum-effect relationship-a rational approach of screening effective components and reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(3): 177-184.
- [8] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [9] 赵少磊, 原震, 朱艳茹, 等. 基于网络药理学和分子对接探究地骨皮调血脂的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1487-1497.
- [10] 曹媛, 贾连群, 宋囡, 等. Apo E^{-/-}动脉粥样硬化小鼠肝脏胆固醇代谢相关 miRNA-mRNA 网络构建及化痰祛痰方的调控作用 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4371-4377.
- [11] 张晶晶, 揭琼, 朱余兵. 一测多评法同时测定瓜蒌皮注射液中 6 种有效成分含量 [J]. 中国药师, 2018, 21(10): 1779-1782.
- [12] Yang J Y, Li W Z, Ding J G, *et al.* A multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) technology assisted ¹H-NMR methodology for multi-component quantitation of *Trichosanthis pericarpium* injection [J]. *Phytochem Anal*, 2023, 34(1): 40-47.
- [13] 张静娴, 胡青, 于泓, 等. HILIC/ESI-Orbitrap HRMS 法结合 Compound Discoverer 软件快速智能化鉴定瓜蒌皮注射液中的化学成分 [J]. 药学报, 2018, 53(10): 1705-1712.
- [14] 王辉俊, 柯樱, 叶冠. 瓜蒌皮注射液中化学成分的 UPLC/ESI-QTOF-MS 分析 [J]. 上海医药, 2017, 38(5): 60-65.
- [15] 孙夕童, 陈博, 张世亮. 细胞焦亡在动脉粥样硬化中的作用及中医药调控研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2024-01-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230726.0938.014.html>.
- [16] 郭文平. 散结通脉方干预颈动脉粥样硬化的临床观察及实验研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [17] 李晓辉, 王莉, 张敏, 等. 中医药通过调控血管外膜抗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(10): 3888-3895.
- [18] 冯文伟, 叶小汉, 吕洪雪, 等. 从“脉络积”理论论治动脉粥样硬化 [J]. 中医学报, 2021, 36(11): 2306-2309.
- [19] 余锋, 信梦雪, 洪永敦. 基于“虚-瘀-毒”理论探讨中医药防治动脉粥样硬化 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(19): 2720-2723.
- [20] 李飞高, 刘西哲. 瓜蒌皮注射液临床应用研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11(8): 1627-1630.
- [21] Ashokkumar N, Vinothiya K. Protective impact of vanillic acid on lipid profile and lipid metabolic enzymes in diabetic hypertensive rat model generated by a high-fat diet [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2023, 20(3): e240223214005.
- [22] 孙霁寒, 王兆丹, 孙桂菊, 等. 木犀草素对高血脂症 SD 大鼠肝脏脂肪变性及抗氧化水平的影响 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 308-312.
- [23] 李志乐, 韦秋宇, 言纬, 等. 烟酸对实验性动脉粥样硬化兔协同刺激分子 B7-H3 和 B7-H4 表达的影响 [J]. 吉林医学, 2022, 43(2): 296-300.
- [24] Chen W S, Xu P Z, Gottlob K, *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(17): 2203-2208.
- [25] Cho H, Thorvaldsen J L, Chu Q, *et al.* Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38349-38352.
- [26] Yang Z Z, Tschopp O, Hemmings-Mieszczyk M, *et al.* Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 32124-32131.
- [27] 孟中华, 尚莎莎, 王建茹, 等. 巨噬细胞 PI3K/Akt 通路与动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(1): 102-106.
- [28] 杨光, 何浩强, 周思远, 等. Caspase 家族与心血管疾病及中药复方的干预研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(10): 1680-1684.
- [29] 李霞. Caspase 家族与心血管疾病的关系 [J]. 国外医学: 心血管疾病分册, 2002, 29(3): 150-152.
- [30] Matulevicius S, Rohatgi A, Khera A, *et al.* The association between plasma caspase-3, atherosclerosis, and vascular function in the Dallas Heart Study [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(10): 1281-1289.
- [31] 查晴, 王燕萍, 曹丽娟, 等. Src 调控动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞脂质累积的机制研究 [J]. 内科理论与实践, 2016, 11(6): 375-379.
- [32] Ba X, Jia X, Lu Y, *et al.* Salidroside-mediated autophagic targeting of active Src and Caveolin-1 suppresses low-density lipoprotein transcytosis across endothelial cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9595036.

【责任编辑 高源】