

基于网络药理学和实验验证探讨补阳还五汤治疗冠状动脉微血管疾病的作用机制

蔡 轶^{1,3}, 赵盈坤^{1,3}, 姜尧浩^{1,3}, 吴亦枫^{1,3}, 孙文婷^{1,3}, 毛 敏², 郭 宁¹, 刘瑞鑫³, 李天力^{2*}, 常佩芬^{1*}

1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700

2. 中日友好医院, 北京 100029

3. 北京中医药大学, 北京 100029

摘要: **目的** 采用网络药理学结合动物实验探究补阳还五汤治疗冠状动脉微血管疾病 (CMD) 的潜在机制。 **方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、SymMap 筛选补阳还五汤活性成分, GeneCards、OMIM、TTD 获取 CMD 靶点, 构建“药物-成分-靶点”网络, 进行基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析及分子对接验证。建立 CMD 大鼠模型, 用补阳还五汤与尼可地尔干预 4 周, 通过超声心动图评估心功能, 苏木精-伊红 (HE) 及 Masson 染色观察心肌病理变化, 透射电镜观察微血管内皮超微结构, 免疫组化观察心脏微血管密度, 免疫荧光验证缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 通路蛋白表达情况。 **结果** 筛选出补阳还五汤活性成分 62 个、交集靶点 148 个, 核心成分为槲皮素、木犀草素等, 核心靶点包括白细胞介素 6 (IL6)、蛋白激酶 B (AKT1) 等, 靶点富集于炎症反应、细胞凋亡相关过程及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-Akt、HIF-1 等通路, 分子对接显示关键成分和核心靶点结合活性良好。动物实验证实, 补阳还五汤可显著提高 CMD 大鼠左室射血分数 (LVEF) 及左室短轴缩短率 (FS) ($P < 0.001$), 减轻心肌纤维化, 修复内皮超微结构损伤, 可能和增强 HIF-1 α /血红素氧合酶 1 (HO-1) 通路活性有关。 **结论** 补阳还五汤通过多成分协同作用于多靶点, 调控相关信号通路, 保护血管内皮、减轻心肌损伤, 从而治疗 CMD, 为临床应用提供理论支撑。

关键词: 网络药理学; 冠状动脉微血管疾病; 分子对接; 补阳还五汤; 心功能

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)10-3665-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.022

Investigating mechanism of Buyang Huanwu Decoction in treating coronary microvascular disease based on network pharmacology and experimental validation

CAI Yi^{1,3}, ZHAO Yingkun^{1,3}, JIANG Yaohao^{1,3}, WU Yifeng^{1,3}, SUN Wenting^{1,3}, MAO Min², GUO Ning¹, LIU Ruixin³, LI Tianli², CHANG Peifen¹

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

2. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of Buyang Huanwu Decoction in treating coronary microvascular disease (CMD) by integrating network pharmacology with animal experiments. **Methods** Active components of Buyang Huanwu Decoction were screened from the TCMSP and SymMap databases. CMD-related targets were collected from GeneCards, OMIM, and TTD. A “drug-component-target” network was constructed, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses, and molecular docking validation. A rat CMD model was established. The model rats were treated with Buyang Huanwu Decoction or nicorandil for four weeks. Cardiac function was assessed via echocardiography, myocardial histopathology was observed using HE and Masson staining, microvascular endothelial ultrastructure was examined with transmission electron microscopy, immunohistochemistry was performed to evaluate cardiac microvascular density. Cytokine expression, and

收稿日期: 2026-01-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8240153568)

作者简介: 蔡 轶, 女, 博士研究生, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病。E-mail: 2630639815@qq.com

*通信作者: 常佩芬, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病。E-mail: 13661022016@163.com

李天力, 主治医师, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病。E-mail: 1099188092@qq.com

immunofluorescence verification of HIF1 α pathway protein expression. **Results** Network pharmacology identified 62 active components and 148 intersection targets for Buyang Huanwu Decoction. Core active components included quercetin and luteolin, and core targets comprised IL6 and AKT1. The targets were significantly enriched in biological processes related to inflammation, apoptosis, and signaling pathways such as PI3K-Akt and HIF-1. Molecular docking confirmed favorable binding activity between key components and core targets. Animal experiments demonstrated that Buyang Huanwu Decoction significantly improved left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS) in CMD rats ($P < 0.001$), alleviated myocardial fibrosis, and repaired ultrastructural damage, which may be associated with enhanced HIF-1 α /HO-1 pathway activity. **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction exerts therapeutic effects on CMD through a multi-component, multi-target, and multi-pathway mechanism, involving endothelial protective and anti-myocardial injury actions. This study provides a theoretical basis for the clinical application of Buyang Huanwu Decoction.

Key words: network pharmacology; coronary microvascular disease; molecular docking; Buyang Huanwu Decoction; cardiac function

冠状动脉微血管疾病 (CMD) 是因冠状动脉微血管系统的结构或功能异常, 造成心肌微循环灌注不足、进而诱发心肌缺血的一类临床综合征^[1]。根据病因不同, CMD 可分为原发性和继发性 2 大类; 其中, 继发性 CMD 常继发于心肌梗死 (MI)、心脏病及心脏手术等病理过程。学术界早在 40 余年前便已关注到冠状动脉微循环功能异常可参与心肌缺血与心绞痛的发生。进一步研究表明, MI 后即使成功开通心外膜血管, 仍有高达 5%~50% 的患者存在 CMD^[2]。CMD 既是心肌缺血与心功能下降的关键机制, 又与心源性猝死密切相关^[1,3]。值得关注的是, 尽管当前对 CMD 在不同临床场景下的病理生理机制及预后意义已有较为清晰的认识, 目前仍缺乏针对该病的特异性治疗手段。

中医对 CMD 的认识可追溯至“胸痹”“心痛”等病证范畴, 病机以“气虚血瘀”为核心, 治疗强调益气活血^[4]。补阳还五汤载于清代王清任《医林改错》, 是益气活血的经典方, 长期用于改善卒中后遗症的神经功能恢复^[5-7]。越来越多的研究表明, 补阳还五汤对心血管疾病具有显著的治疗效果, 机制涉及促进血管生成^[8]、抑制内膜增生^[9]、减少血小板活化^[10]、抗炎及抗氧化应激^[11]等多种途径。尽管初步研究^[12]发现补阳还五汤可以减轻 MI 后冠状动脉微血管损伤, 但仍需进一步的研究来验证其在 CMD 中的作用机制。因此, 本研究通过网络药理学预测补阳还五汤治疗 CMD 的核心成分、关键靶点及信号通路, 结合动物实验验证其作用机制, 为补阳还五汤治疗 CMD 的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (190 $\pm$ 20) g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2024-0001。实验开始前, 所有实验动物饲养

于中日友好医院 SPF 级屏障环境动物室适应性喂养 3 d, 饲养条件为恒温恒湿, 12 h/12 h 光暗交替, 动物可自由获取食物和水。本研究方案经中日友好医院临床医学研究所伦理委员会审批 (伦理审批号 ZRDWLL250078)。

1.2 药物和试剂

补阳还五汤组方为黄芪 30 g、当归 15 g、地龙 10 g、赤芍 15 g、川芎 15 g、桃仁 10 g、红花 10 g, 饮片均购自中日友好医院中药房。黄芪 (批号 62509084)、当归 (批号 HM760430504)、地龙 (批号 HM250418002)、赤芍 (批号 MKT260421003)、川芎 (批号 HM760412504)、桃仁 (批号 MKT260320003)、红花 (批号 HM760305501), 经中日友好医院药学部毛敏副主任药师鉴定, 以上饮片质量均符合《中国药典》2025 年版相关规定。饮片加 10 倍体积蒸馏水浸泡, 煎煮 1 h 后取药液, 同法再次煎煮, 将 2 次药液混合后浓缩至 0.945 g $\cdot$ mL⁻¹, 其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数为 0.127 mg $\cdot$ g⁻¹。尼可地尔片 (批号 24F020Z, 日本日机装制药公司), 加蒸馏水研磨, 制成 0.3 mg $\cdot$ mL⁻¹ 混悬液。所有药液于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

伊红 (K1002)、苏木素 (K1001)、EDTA (pH9.0) 抗原修复液 (K2002)、DAPI (K0011) 购自北京锆越生物科技有限公司; 抗荧光淬灭封片剂 (K0007)、酪胺-488、酪胺-CY3, 购自国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇 (10009218、100092683)、丙酮 (10000418)、二甲苯 (10023418)、盐酸 (10011008)、氨水 (10002108)、中性树胶 (10004160), 购自 SPI 公司; 812 包埋剂 (90529-77-4); Masson 染液套装 (G1006)、BSA (GC305006)、DAB 显色试剂盒 (G1212) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 兔抗人缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 抗体 (20960-1-AP)、兔抗人血红素氧合酶 1 (HO-1) 抗体 (10701-1-AP)

购自武汉三鹰生物技术有限公司; 血小板-内皮细胞黏附分子-1 (CD31) 抗体 (ab182981) 购自 Abcam 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG (5220-0336) 购自 SeraCare 公司。

1.3 仪器

TECNAI G2 20 TWIN 透射电子显微镜 (FEI 公司); NIKON ECLIPSE CI 正置光学/荧光显微镜、NIKON DS-U3 成像系统 (日本尼康公司); Vevo2100 小动物超声成像系统 (加拿大 VisualSonics 公司); FX-7202 多道自动分析心电图机 (北京福田电子医疗器械公司); ALC-V8-SLB 动物呼吸机 (上海奥尔特科特生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学预测

2.1.1 补阳还五汤相关成分筛选 补阳还五汤由川芎、当归、赤芍、红花、桃仁、地龙及黄芪组成。通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3) 检索川芎、当归、赤芍、红花、桃仁及黄芪的化学成分, 并依据以下标准筛选潜在活性成分: 口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) $\geq 0.18^{[13]}$ 。因地龙不收录于 TCMSP 数据库, 其成分信息通过 SymMap 数据库^[14] (<http://www.symmap.org/>) 进行补充, 再采用上述相同筛选标准筛选其潜在活性成分。

2.1.2 CMD 相关靶点收集 以 “coronary microvascular disease” “coronary microvascular dysfunction” “microvascular angina” 为关键词, 分别在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd>) 数据库中检索 CMD 相关的疾病靶点。将 3 个数据库所得结果进行合并, 去除重复条目。

2.1.3 获取补阳还五汤和 CMD 交集靶点 利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制补阳还五汤有效活性成分靶点与 CMD 疾病相关靶点的 Venn 图, 得到交集靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建与枢纽基因分析 将补阳还五汤与 CMD 的共有靶点导入 STRING 12.0 数据库, 设置物种为 “Homo sapiens”, 最低互作得分设为 0.4, 获取 PPI 数据^[15]。利用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化, 并借助其插件 CytoNCA 计算度 (degree) 值、介数中心性 (BC) 和接近中心性 (CC), 识别网络中的核心靶点^[16]。

将补阳还五汤-CMD 交集靶点、草药和活性成

分的数据整合进 Cytoscape 3.10.3, 构建补阳还五汤干预 CMD 的 “化合物-靶点-疾病” 网络。

2.1.5 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 使用 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>) 对交集靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析, 随后, 根据 $P < 0.05$ 取 Top 20 的通路, 借助微生信平台对富集结果进行可视化处理。

2.2 分子对接

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取药物核心活性成分 3D 结构, 使用 OpenBabel 3.1.1 将 PubChem 的 sdf 文件转换为 pdb 格式。通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载蛋白质 3D 结构。所有分子对接模拟均使用 AutoDock 1.5.7 完成, 对接过程采用其默认参数设置。最终, 对接结果通过 PyMOL 3.1 软件进行可视化分析与展示。

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物造模及分组给药 参照文献报道^[17]采用左前降支结扎法建立 CMD 模型。大鼠麻醉后 (ip 2%戊巴比妥钠) 行气管插管机械通气, 于左心耳下缘 2 mm 处穿刺并结扎 LAD, 术后记录大鼠心电图。8 只假手术组仅穿线不结扎。给药剂量依据人体与动物体表面积等效剂量换算法确定。70 kg 成人临床日用生药量为 105 g, 折合为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 按人至 SD 大鼠的体表面积折算系数计算, SD 大鼠等效剂量为 $9.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药计)。将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组、补阳还五汤 ($9.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和尼可地尔 (阳性药, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。给药体积为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 模型组和假手术组 ig 给予同等体积蒸馏水, 每周 1 次, 持续 4 周。

2.3.2 经胸超声心动图 大鼠 ip 2%戊巴比妥钠麻醉, 仰卧位备皮。采用 M 型超声模式评估心室收缩功能, 测量指标包括: 左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室射血分数 (LVEF) 及左室短轴缩短率 (FS)。每只大鼠连续测量 3 个心动周期, 取平均值进行分析。

2.3.3 苏木精-伊红 (HE) 染色 取大鼠左心室组织, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤组织, 固定于 4% 多聚甲醛中, 常规脱水、透明、石蜡包埋并切片, 经烘片、脱蜡后行 HE 染色。染色完成后常规脱水透明, 中性树胶封片, 于光学显微镜下观察心肌组织形态学变化。

2.3.4 Masson 染色 石蜡切片脱蜡水化后, 经铁苏

木素和丽春红酸性品红液染色，磷钼酸溶液分化，苯胺蓝液复染胶原纤维。1%冰醋酸分化后常规脱水透明，中性树脂胶封片。于光学显微镜下观察胶原纤维沉积情况，胶原纤维呈蓝色，心肌纤维呈红色。

2.3.5 透射电子显微镜 取大鼠心尖组织，切成 1 mm^3 大小的小块，用 2.5%戊二醛和 1%锇酸溶液固定。将组织进行梯度脱水，然后用环氧树脂渗透包埋，制备超薄切片，铀铅双染色后于透射电子显微镜下观察心肌微血管超微结构，并摄片记录。

2.3.6 免疫荧光 大鼠心脏切片经脱蜡、水化及 EDTA (pH 9.0) 微波抗原修复后，依次经 3% H_2O_2 和 3% BSA 封闭。首先检测 HIF-1 α ：切片与兔抗人 HIF-1 α 一抗 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育，随后与 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1:400) 室温孵育 50 min，最后与新鲜配制的酪胺-CY3 (1:300，含 0.003% H_2O_2) 室温孵育 10 min，生成红色荧光信号。随后，切片经相同条件再次进行 EDTA 微波抗原修复。修复后，依次与兔抗人 HO-1 一抗 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育、相同种属 HRP (1:400) 标记二抗室温孵育，以及酪胺-488 (1:1500，含 0.003% H_2O_2) 室温孵育 10 min，生成绿色荧光信号。最后，DAPI 复染细胞核，抗荧光淬灭封片剂封片，于荧光显微镜下采集图像分析共定位。

2.3.7 免疫组化 大鼠心脏石蜡组织切片经二甲苯脱蜡，并通过梯度乙醇水化。将切片置于 EDTA 抗原修复液 (pH 9.0) 中，微波炉中高火加热 8 min 进行抗原修复，随后自然冷却。使用 3% H_2O_2 避光孵育 25 min，PBS 洗涤后，切片用 3% BSA 室温封闭 30 min。随后，切片与稀释于 PBS 的一抗 CD31 (1:500) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后，加入对应种属的 HRP (1:500) 标记二抗，室温避光孵育 50 min。使用 DAB 显色试剂盒在显微镜下控制显色。苏木素复染细胞核，经 1%盐酸酒精分化及氨水返蓝。最后，切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明，并使用中性树脂封片。

2.4 统计方法

本研究所有数据均采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析与图形绘制。数据正态性采用 Shapiro-Wilk 检验并结合直方图及 $Q-Q$ 图进行综合评估，方差齐性采用 Levene 检验进行判断。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，不符合正态分布的数据以中位数 (四分位数间距) [M (IQR)] 表示。多组间比较时，对于服从正态分布且方差齐的数据，采

用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 Tukey 事后多重比较检验；若方差不齐，则采用 Dunnett T3 事后多重比较检验。对于非正态分布的数据，采用 Kruskal-Wallis H 检验进行多组比较，若差异有统计学意义，进一步采用 Mann-Whitney U 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 药物活性成分和靶点获取

通过 TCMSP 和 SymMap 数据库筛选得到符合条件的补阳还五汤的活性成分共 62 个，去除与疾病交集靶点无关成分，并删除重复值后进行汇总，最终得到 256 个靶点。

3.2 疾病相关靶点

基于 Relevance score 对各靶点进行重要性评估，筛选出高于中位数的靶点纳入，通过对 GeneCards、OMIM、TTD 数据库的靶点信息进行整合，共获得 2 881 个与 CMD 相关的疾病靶点。将上述筛选得到的补阳还五汤的活性成分作用靶点与 CMD 疾病靶点集进行交集分析，最终得到 148 个补阳还五汤治疗 CMD 的潜在靶点基因。

3.3 核心靶点及 PPI 网络

将 148 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络，并将网络数据导入 Cytoscape 3.10.3 软件，通过 CytoNCA 插件计算网络的拓扑参数，得到平均 BC 值为 209.73、CC 值为 0.430、Degree 值为 20.30。筛选出上述 3 个参数均大于平均值的节点，得到包含 32 个核心靶点和 310 条互作关系的核心 PPI 子网。进一步筛选出 Degree 值排名前 10 位的核心靶点基因，依次为 IL6、AKT1、TP53、EGFR、TNF、STAT3、IL1B、JUN、NFKB1、HIF1A，将其定义为最终核心靶点集。见图 1。

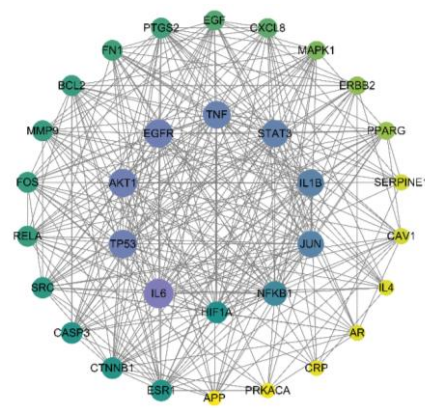


图 1 核心靶点 PPI 网络

Fig. 1 PPI network of core targets

3.4 药物-成分-靶点预测

利用 Cytoscape 软件构建的补阳还五汤-活性成分-靶点网络。该网络拓扑结构包括 7 种中药组分、56 个活性成分以及 148 个 CMD 相关作用靶点。系统揭示中药多成分-多靶点协同作用机制。基于 Degree 值对各成分进行重要性排序,选取排名前 10 的关键活性成分作为核心研究对象:槲皮素、木犀草素、山柰酚、7-*O*-甲基异芒柄花素、异鼠李素、芒柄花素、黄芩素、 β -谷甾醇、豆甾醇、杨梅酮(表 1)。

表 1 核心活性成分信息

Table 1 Information on core active ingredients of Buyang Huanwu Decoction		
MOL 编号	成分	Degree
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	105
MOL000006	木犀草素 (luteolin)	44
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	40
MOL000378	7- <i>O</i> -甲基异芒柄花素 (7- <i>O</i> -methylisomucronulatol)	29
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	27
MOL000392	芒柄花素 (formononetin)	26
MOL002714	黄芩素 (baicalein)	24
MOL000358	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	23
MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	20
MOL002135	杨梅酮 (myricanone)	19

3.5 GO 和 KEGG 富集分析结果

将 148 个药物、疾病共同靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析得到生物过程 (BP) 1 874 条,细胞组分 (CC) 111 条,分子功能 (MF) 有 192 条,分别取 *P* 值排名前 10 位的 BP、CC、MF 绘制 GO 富集柱状图(图 2)。综合结果表明,补阳还五汤治疗 CMD 的核心靶点主要富集于缺氧应答、氧化应激调控、内皮细胞迁移与修复等 BP。

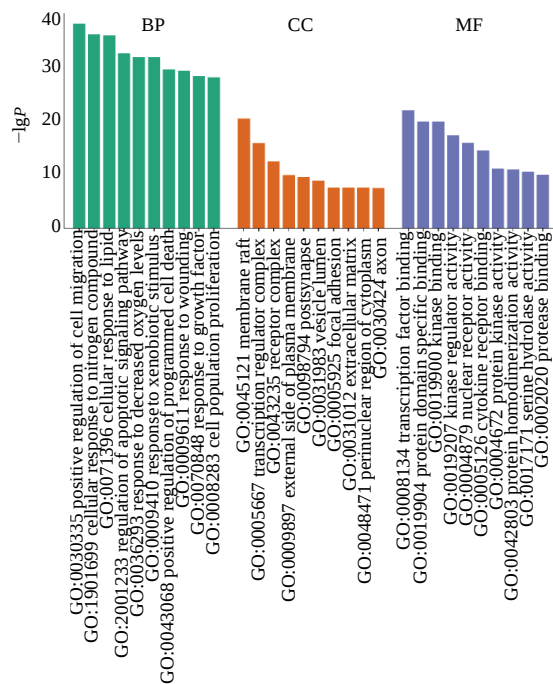


图 2 GO 富集分析

Fig. 2 GO functional enrichment analysis

MF 以转录因子结合、信号转导活性为主。CC 主要定位在细胞膜受体复合物及细胞外基质结构中。

KEGG 通路富集分析得到 210 条通路,按 *P* 值由小到大排序,展示前 20 位(图 3)。依次为癌症相关通路、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路、化学致癌-受体激活、HIF-1 信号通路、肿瘤抑制基因 p53 (p53) 信号通路、癌症中的转录失调、甲状腺激素信号通路等。

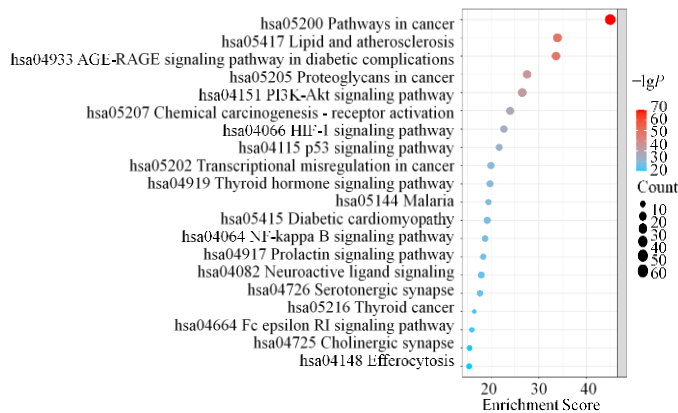


图 3 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis

3.6 核心活性成分和关键靶点的分子对接验证

选择“药物-活性成分-共同靶点”网络分析中
度值排名前 10 位的药物核心活性成分作为对接的
配体, PPI 网络分析中排名前 10 位的靶点蛋白作为
对接受体, 进行分子对接, 结果见图 4。结合能越
低提示两者间相互作用力越大。在本研究的 100 对

“核心活性成分和关键靶点”的结合对中, 有 80%
的结合能 $<-20.93\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明核心靶点与关键
活性成分呈现显著结合亲和力。进一步对结合度最
优的前 4 组合 (TP53-豆甾醇、AKT1- β -谷甾醇、
AKT1-豆甾醇、HIF1A-豆甾醇) 进行可视化分析。
见图 5。

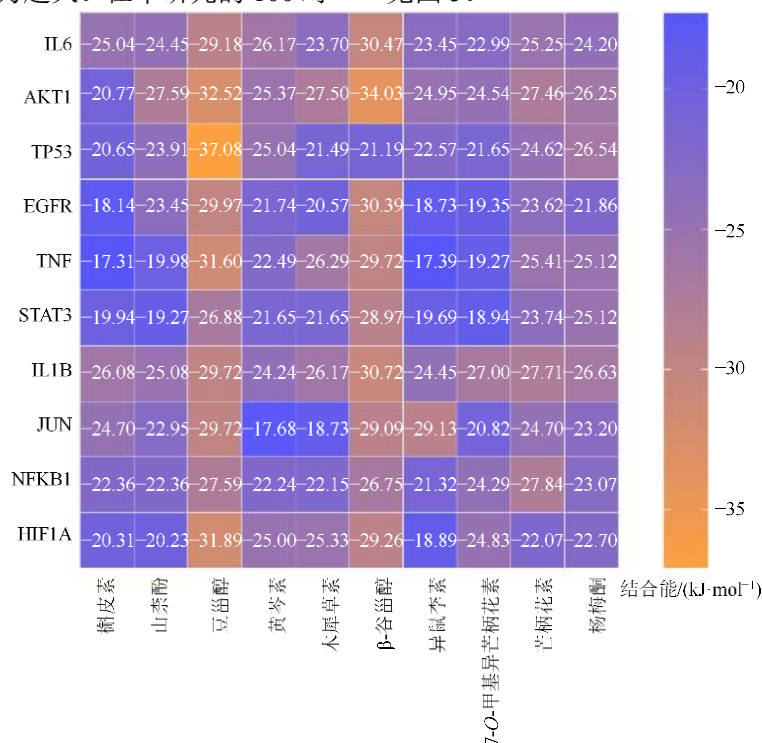


图 4 主要活性成分与关键靶点结合能热图

Fig. 4 Binding-energy heatmap between major active ingredients and key targets

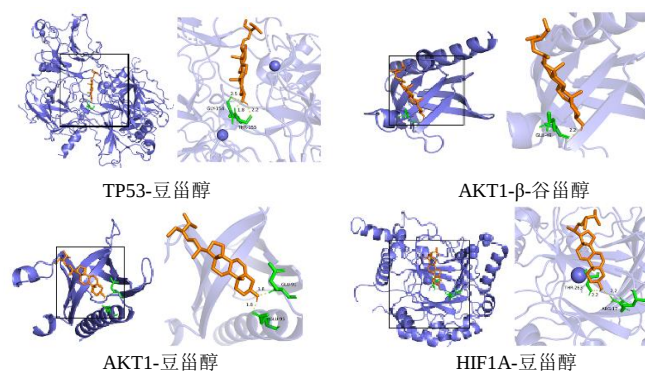


图 5 分子对接结果

Fig. 5 Molecular docking results

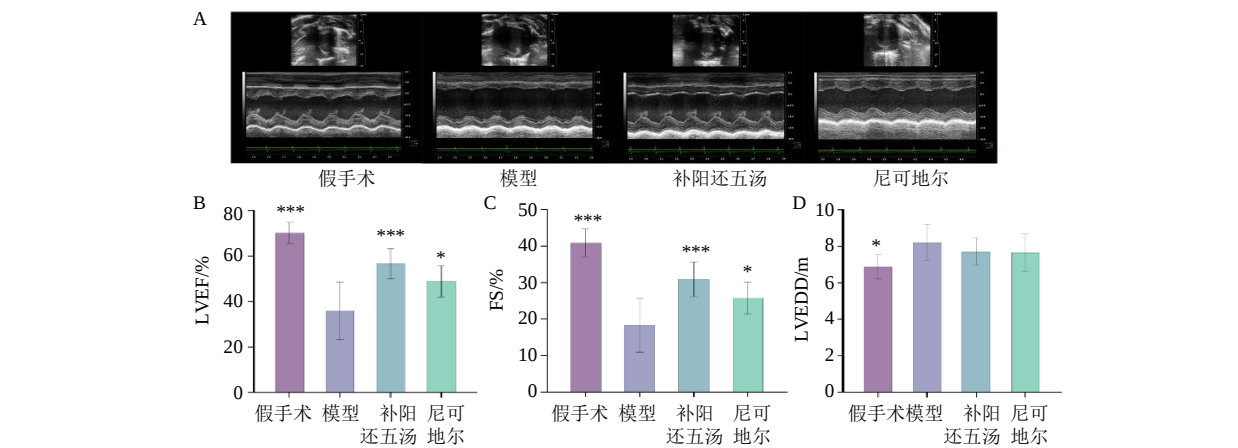
3.7 大鼠心功能

超声心动图结果提示, 模型组心肌收缩功能明
显减弱, 补阳还五汤干预可显著改善其收缩异常。与
假手术组相比, 模型组 LVEF、FS 均显著降低 ($P<$

0.001); 补阳还五汤干预后, LVEF 及 FS 较模型组
均显著回升 ($P<0.001$), 尼可地尔组亦表现出相似
的改善作用 ($P<0.05$)。LVEDD 仅在模型组与假手
术组间差异具有统计学意义, 其余各组间未见显著
差异。见图 6。

3.8 大鼠心肌组织病理学

与假手术组比较, 模型组心肌组织可见明显
的病理改变, 表现为心肌纤维排列紊乱、细胞间
隙增宽, 且伴有大量炎症细胞浸润, 心肌结构完
整性受损; 补阳还五汤组与尼可地尔组的心肌组
织病理损伤均得到显著改善, 心肌细胞排列较模
型组更为整齐, 炎症浸润减少, 心肌结构改善 (图
7)。同时, 模型组较假手术组心肌间质出现大量
蓝色胶原纤维沉积, 补阳还五汤干预后胶原纤维
沉积明显减少, 心肌间质纤维化程度较模型组显
著减轻 (表 2)。



A-大鼠心脏超声 M 型代表性图像; B-LVEF; C-FS; D-LVEDD; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
A-representative M-mode echocardiographic images of rat hearts in each group; B-LVEF; C-FS; D-LVEDD; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

图 6 大鼠心脏功能 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 6 Cardiac function in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

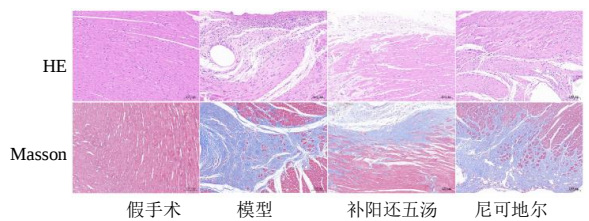


图 7 大鼠心肌组织 HE 和 Masson 染色 ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 200$)

Fig. 7 HE and Masson staining of rat myocardial tissues in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 200$)

3.9 大鼠心肌组织电镜下微血管结构

透射电镜观察显示,模型组血管形态稍不规则,管腔未见明显狭窄或闭塞,但基膜结构模糊,部分区域菲薄;内皮细胞形态异常,细胞间紧密连接增宽,提示内皮屏障功能受损。经药物干预后,以上超微结构异常显著改善,表现为血管基膜结构趋于

表 2 大鼠心肌组织胶原容积分数比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Comparison of collagen volume fraction in rat myocardium ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	胶原容积分数/%
假手术	—	0.10±0.08
模型	—	38.74±9.819###
补阳还五汤	9.45 g·kg ⁻¹	15.44±7.224**
尼可地尔	3.00 mg·kg ⁻¹	29.88±5.678

与假手术组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ 。
$P<0.001$ vs sham group; ** $P<0.01$ vs model group.

清晰,内皮细胞连接紧密。见图 8。

3.10 大鼠心肌组织 CD31 表达

与假手术组相比,模型组心肌组织中 CD31 阳性微小血管数量显著减少。经补阳还五汤治疗后,大鼠心肌组织的微血管数量较模型组明显回升,其改善效果与尼可地尔相近。见图 9。

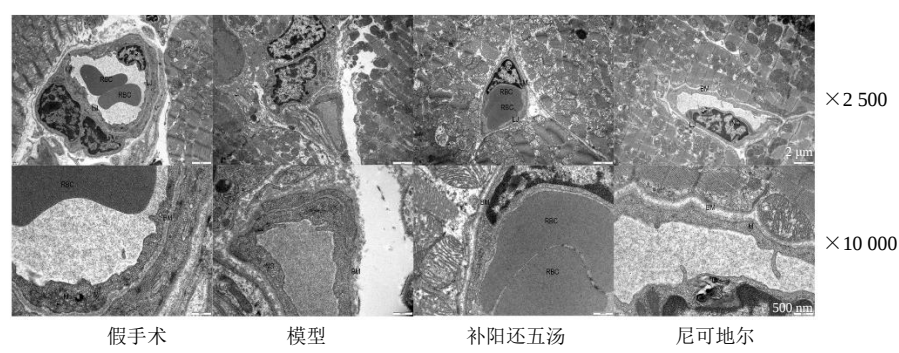
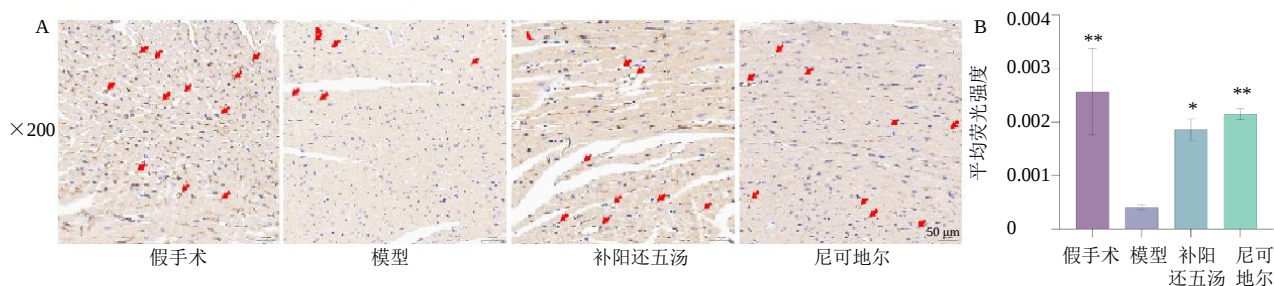


图 8 大鼠心肌组织电镜下微血管结构

Fig. 8 Transmission electron microscopy images of myocardial microvascular structure in rats



红色箭头指示中小血管; A-大鼠心肌组织免疫组化染色; B-免疫组化检测大鼠心肌 CD31 水平; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

Red arrows indicate CD31-positive regions in small- and medium-sized blood vessels; A-immunohistochemical staining images of CD31 in rat myocardial tissues of each group; B- quantitative analysis of CD31 expression in rat myocardial tissues of each group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 9 大鼠心肌组织 CD31 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

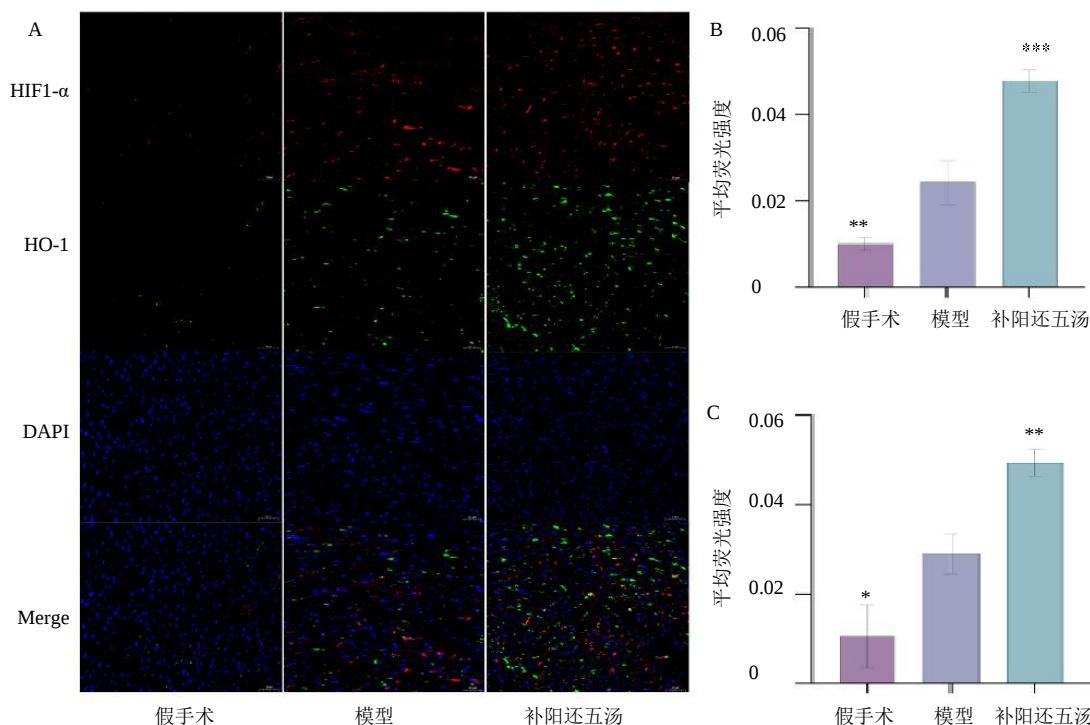
Fig. 9 CD31 expression in rat myocardial tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.11 大鼠心肌通路蛋白表达情况

免疫荧光共定位结果显示 (图 10), 正常状态下心肌组织的 HIF-1 α 与 HO-1 表达较低, 表明此信号通路基础活性不强。在心肌缺血缺氧损伤模型中, HIF-1 α 与 HO-1 的表达均明显增强, 提示损伤激活了该通路。经补阳还五汤处理后, HIF-1 α 与 HO-1 的表达与共定位信号进一步增强, HIF-1 α 进入细胞核的数量明显增多。

4 讨论

CMD 可继发于冠心病、高血压、糖尿病等多种心脏及全身性疾病, 其发生主要与微血管结构重塑及功能紊乱密切相关。不同临床场景下, CMD 的发病机制存在明显差异, 但均与心肌缺血密切相关, 且可提示不良心血管事件发生风险升高^[18]。因此, 积极防治 CMD 对心血管疾病预防具有重要意义。本研究采用网络药理学与动物实验验证相结合的



A-各组大鼠心肌组织免疫荧光共定位染色; B-C: 免疫荧光检测大鼠心肌 HIF1 α 、HO-1 水平。与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
A-immunofluorescence co-localization images; B-C-quantitative analysis of fluorescence intensities of HIF1 α and HO-1 in rat myocardial tissues of each group. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 10 大鼠心肌通路蛋白表达 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Expression of pathway-related proteins in rat myocardium ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

研究策略^[19]，系统解析补阳还五汤治疗 CMD 的潜在分子机制。

网络药理学结果显示，补阳还五汤中共获得 62 个核心活性成分，其中槲皮素、木犀草素、山柰酚等黄酮类化合物占比最高，是其发挥心血管保护作用的核心物质基础。研究表明，槲皮素可以抑制炎症介质释放，并通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进微血管再生^[20]。木犀草素可有效减轻 TNF- α 诱导的人微血管内皮细胞炎症损伤^[21]，同时抑制氧化应激，改善心肌微循环灌注^[22]。靶点分析显示，补阳还五汤与 CMD 的交集靶点共 148 个，其中 IL6、AKT1、TP53 等 10 个核心靶点直接参与 CMD 的病理生理进程。GO 与 KEGG 富集分析进一步揭示了补阳还五汤治疗 CMD 的潜在通路。GO 富集分析显示，核心靶点主要参与缺氧应答、氧化应激调控、细胞迁移调控、炎症反应、细胞增殖与凋亡等生物过程，定位于细胞膜受体复合物及细胞外基质，提示补阳还五汤可能通过调控上述生物过程发挥作用。KEGG 富集分析显示，核心靶点显著富集于 PI3K-Akt、HIF-1、AGE-RAGE 等信号通路。分子对接结果显示，核心活性成分与关键靶点结合能较低，结合亲和力良好。

动物实验结果进一步证实了补阳还五汤对心肌梗后 CMD 的治疗作用及机制。超声心动图结果显示，补阳还五汤可显著提高心肌梗后 CMD 大鼠 LVEF、FS，改善心肌收缩功能，与尼可地尔作用相近，提示补阳还五汤可有效改善心肌梗后 CMD 大鼠心功能异常。HE 染色及 Masson 染色结果显示，补阳还五汤可减轻心肌纤维排列紊乱、炎症细胞浸润，减少心肌间质胶原纤维沉积，降低心肌纤维化程度。冠状动脉微血管内皮细胞是调节冠状动脉血流的核心结构，其功能障碍是 CMD 发生发展的关键病理环节^[23]。本研究通过透射电子显微镜观察发现，补阳还五汤能够修复心肌梗后 CMD 大鼠心肌微血管基膜模糊、内皮细胞连接松散等超微结构异常。免疫组化结果显示，补阳还五汤还显著上调了内皮标志物 CD31 的表达，增加了梗死区微血管密度。这提示补阳还五汤可通过修复微血管结构，改善心肌微循环灌注，进而减轻心肌缺血损伤。

活性氧 (ROS) 爆发及促炎因子持续释放导致的冠脉微血管内皮损伤，是 CMD 发生发展的核心病理环节^[3]。HIF-1 α 作为细胞缺氧应答的关键转录因子，其心肌保护效应主要依赖于下游靶基因 HO-

1 的转录激活^[24]。HIF-1 α 通过结合 HO-1 启动子区的缺氧反应元件 (HRE) 诱导其表达。HO-1 的上调已被证实是减轻心肌损伤、改善心功能及修复微血管内皮功能结构的重要机制^[24-25]。因此，尽管 HO-1 未在网络药理学核心节点中显现，但基于其在 HIF-1 α 信号通路中的核心地位及对微血管功能的确切保护作用，同时也是连接“补阳还五汤活性成分”与“CMD 疾病靶点”的潜在交集靶点之一，本研究选取 HO-1 作为 HIF-1 α 通路激活的关键下游功能验证指标。免疫荧光结果显示，补阳还五汤能显著增强 HIF-1 α 与 HO-1 的共定位表达及通路活性，提示该方可能通过激活“HIF-1 α /HO-1”轴发挥心脏保护作用。

本研究结合网络药理学预测与动物实验验证，证实补阳还五汤可通过多成分、多靶点、多通路协同作用，改善心肌梗后 CMD 大鼠心功能，减轻心肌病理损伤及微血管结构异常，其作用机制可能与调控 HIF-1 等信号通路相关。本研究为补阳还五汤治疗 CMD 的临床应用提供了实验依据与理论支撑，也为中医药治疗 CMD 的机制研究提供了新的思路与方法。

然而，本研究尚存在一些局限性：化学成分与靶点的筛选主要依赖公共数据库，缺乏对补阳还五汤体外提取液及体内原型成分、代谢产物进行定性定量分析；虽然动物实验证实补阳还五汤可调控 HIF-1 α 通路并改善内皮功能与心功能，但缺乏抑制剂或 siRNA 反向阻断证据，无法确证该通路在药效发挥中的必要性；CMD 存在显著性别差异，女性发病率明显高于男性，但本研究仅采用雄性 SD 大鼠开展模型构建与药效评价，未纳入雌性动物，可能会限制结论在女性群体中的外推性与临床参考价值。未来研究拟通过 UPLC-MS/MS 明确补阳还五汤体内药效物质基础，结合 HIF-1 α 通路阻断实验及雌雄双性别动物模型，从正反双向明确“成分-靶点-功效”的因果机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Del Buono M G, Montone R A, Camilli M, et al. Coronary microvascular dysfunction across the spectrum of cardiovascular diseases JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol, 2021, 78(13): 1352-1371.
- [2] 张运, 陈韵岱, 傅向华, 等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.

- Zhang Y, Chen Y D, Fu X H, et al. China expert consensus on diagnosis and treatment of coronary microvascular disease [J]. *Chin Circ J*, 2017, 32(5): 421-430.
- [3] Yang Z H, Liu Y X, Li Z Z, et al. Coronary microvascular dysfunction and cardiovascular disease: Pathogenesis, associations and treatment strategies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 115011.
- [4] 陈佳萍, 李享, 刘红旭, 等. 中医药治疗冠状动脉微血管疾病诊治规律及作用机制研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(6): 961-970.
Chen J P, Li X, Liu H X, et al. Mechanism of traditional Chinese medicine for treating coronary microvascular diseases [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2024, 22(6): 961-970.
- [5] Shao L, She Y, Yong S N, et al. An evidence-based evaluation of Buyang Huanwu Decoction for the treatment of the sequelae of stroke: A PRISMA-compliant systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154312.
- [6] Li M C, Li M Z, Lin Z Y, et al. Buyang Huanwu Decoction promotes neurovascular remodeling by modulating astrocyte and microglia polarization in ischemic stroke rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323: 117620.
- [7] 李海英, 贺鹏, 李文姣, 等. 补阳还五汤化学成分、药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. *中草药*, 2024, 55(13): 4575-4587.
Li H Y, He P, Li W J, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of Buyang Huanwu Decoction and predictive analysis of quality markers [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(13): 4575-4587.
- [8] Han X, Zhang G Y, Chen G H, et al. Buyang Huanwu Decoction promotes angiogenesis in myocardial infarction through suppression of PTEN and activation of the PI3K/Akt signalling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 287: 114929.
- [9] Xu T, Hu C L, Zhang G Y, et al. Buyang Huanwu Decoction attenuates arterial in-stent restenosis via transforming growth factor beta receptor 1-mediated suppression of neointimal hyperplasia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 352: 120244.
- [10] Gao J M, Guo H, Li J M, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates myocardial injury and attenuates platelet activation by regulating the PI3 kinase/Rap1/integrin α (IIb) β (3) pathway [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 109.
- [11] Liu B, Song Z Y, Yu J P, et al. The atherosclerosis-ameliorating effects and molecular mechanisms of BuYangHuanWu decoction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109664.
- [12] Chang X, Wu D, Gao X, et al. BuyangHuanwu decoction alleviates endothelial cell apoptosis and coronary microvascular dysfunction via regulation of the MAPKK4/p38 signaling axis [J]. *Int J Med Sci*, 2024, 21(13): 2464-2479.
- [13] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] Wu Y, Zhang F L, Yang K, et al. SymMap: An integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1110-D1117.
- [15] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [16] Buzzao D, Steininger L, Guala D, et al. The FunCoup Cytoscape App: Multi-species network analysis and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2024, 41(1): btac739.
- [17] Cui L W, Liu Y Z, Hu Y Y, et al. Shexiang Tongxin Dropping Pill alleviates M1 macrophage polarization-induced inflammation and endothelial dysfunction to reduce coronary microvascular dysfunction via the Dectin-1/Syk/IRF5 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116742.
- [18] Konst R E, Guzik T J, Kaski J C, et al. The pathogenic role of coronary microvascular dysfunction in the setting of other cardiac or systemic conditions [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4): 817-828.
- [19] 丁潇滢, 梁新丽, 周家华, 等. 基于网络药理学与实验验证探讨柴胡-当归挥发油抑制大鼠乳腺增生的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(15): 5476-5490.
Ding X X, Liang X L, Zhou J H, et al. Mechanism of essential oil from *Bupleuri Radix-Angelicae Sinensis Radix* in inhibiting hyperplasia of mammary gland in rats based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(15): 5476-5490.
- [20] Liu X F, Liu X H, Luo S D, et al. Quercetin promotes angiogenesis and protects the blood-spinal cord barrier structure after spinal cord injury by targeting the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 958.
- [21] Lu Q Y, Guo L, Zhang Q Y, et al. Luteolin alleviates the TNF- α -induced inflammatory response of human microvascular endothelial cells via the Akt/MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2024, 2024: 6393872.
- [22] Qin X C, Qin H, Li Z M, et al. Luteolin alleviates

- ischemia/reperfusion injury-induced no-reflow by regulating Wnt/ β -catenin signaling in rats [J]. *Microvasc Res*, 2022, 139: 104266.
- [23] Deng J Y. Research progress on the molecular mechanism of coronary microvascular endothelial cell dysfunction [J]. *IJC Heart Vasc*, 2021, 34: 100777.
- [24] Czibik G, Sagave J, Martinov V, et al. Cardioprotection by hypoxia-inducible factor 1 alpha transfection in skeletal muscle is dependent on haem oxygenase activity in mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 107-114.
- [25] 靳文芳. 芪参益心颗粒通过 Nrf2/HO-1 通路改善冠脉微循环障碍血管内皮损伤的作用机制 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2025.
- Jin W F. Mechanism of Qishen Yixin Granules in improving vascular endothelial injury in coronary microcirculation dysfunction through Nrf2/HO-1 pathway [D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2025.

[责任编辑 齐静雯]