

• 药理与临床 •

基于分子对接及网络药理学的托里消毒散精简方促糖尿病创面愈合作用机制研究

李依洋¹, 杨 珍², 张晓娜¹, 翟仰魁¹, 孙 蓓¹, 潘从清^{1*}

1. 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300070

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘要: **目的** 探索托里消毒散精简方中黄芪、当归、白芷、皂角刺 4 味中药促糖尿病创面愈合的药物成分及其潜在分子作用机制。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF/MS 在正、负离子模式下对方中的药物成分进行分析, 分子对接技术对药物作用的靶蛋白进行预测, Uniprot、KEGG 等相关数据库对靶蛋白功能及通路进行注释, 利用 Cytoscape 软件构建药物成分-靶点-功能网络图。

结果 在正、负离子模式下从托里消毒散精简方醇提物中共鉴定出包含黄酮、皂苷、香豆素、甾体类及萜类成分的 28 个化合物。通过对分子对接的结果分析发现 17 个化合物可与 17 个靶蛋白相互作用, 成分-靶点关系共计 210 对。其中与免疫调节相关的靶点 5 个, 与抗菌、抗炎作用相关的靶点 6 个, 与细胞分化相关的靶点 6 个, 与细胞迁移相关的靶点 10 个, 与血管新生相关的靶点 6 个, 与上皮生长因子刺激相关的靶点 2 个, 与血管的舒张功能相关的靶点 6 个, 与雌激素相关的靶点 2 个。**结论** 托里消毒散精简方中含有的黄酮、皂苷、香豆素、甾体类及萜类成分可通过调节 NF- κ B、MAPK、PI3K、ERK2 等靶点进而调节 NF- κ B、PI3K/Akt/eNOS、MAPK 等相关信号通路, 从而共同产生抗菌、抗炎、免疫调节及促血管新生等生物学效应。

关键词: 托里消毒散; 黄芪; 当归; 白芷; 皂角刺; 创面愈合; 分子对接; 网络药理学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3298-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.014.016

Mechanism of simplified formula of Tuoli Xiaodu Powder in promoting of diabetic wound healing based on molecular docking and network pharmacology

LI Yi-yang¹, YANG Zhen², ZHANG Xiao-na¹, ZHAI Yang-kui¹, SUN Bei¹, PAN Cong-qing¹

1. Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health), Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the active ingredients and molecular mechanism of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, *Angelica sinensis*, *Angelica dahurica*, and *Gleditsia sinensis* in Tuoli Xiaodu Powder in promoting of diabetic wound healing.

Methods UPLC-Q-TOF/MS in positive and negative ion modes was applied to analyze the components in the ethanol extract from Tuoli Xiaodu Powder. Molecular docking technology was used to predict the targets proteins of these components. The function and pathway annotations of target proteins were performed through relevant databases such as Uniprot and KEGG. The drug components-target-function diagram was constructed using Cytoscape software. **Results** Twenty-eight compounds containing flavonoids, saponins, coumarins, alkaloids, and triterpenoids were identified in positive and negative ion modes. Among these compounds, 17 compounds could interact with 17 target proteins, and there were 210 pairs of component-target relationships by analyzing the results of molecular docking. Among them, five targets were related to immune regulation, six targets were related to antibacterial and anti-inflammatory effects, six targets were related to cell differentiation, 10 targets were related to cell migration, six targets were related to angiogenesis, two targets were related to stimulation of epithelial growth factor, six targets were related to vasodilation, and two targets were related to estrogen. **Conclusion** The flavonoids, saponins, coumarins, steroids, and triterpenoids

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273916)

作者简介: 李依洋 (1991—), 女, 硕士在读。Tel: 13820620519 E-mail: yiyang688@126.com

*通信作者 潘从清 (1965—), 男, 医学博士, 硕士生导师, 主要研究方向为糖尿病及并发症的中西医结合临床和基础研究。

Tel: (022)23333251 E-mail: cq.pan@163.com

contained in the simplified formula possess many biological effects such as antibacterial, anti-inflammatory, immune regulation, and angiogenesis. These functions may be related to its modulation of NF- κ B, PI3K/Akt/eNOS, and MAPK pathway through regulating NF- κ B, MAPK, PI3K, and ERK2 targets.

Key words: Tuoli Xiaodu Powders; *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.; *Gleditsia sinensis* Lam.; wound healing; molecular docking; network pharmacology

糖尿病患者皮肤因供血和神经营养不良易受到损伤, 损伤后其愈合迟缓, 极易形成慢性的溃疡性创面, 内源性的病理异常与外在因素(感染、压力等)共同导致了糖尿病创面复杂的微环境。慢性难愈性创面所导致的截肢是糖尿病患者致残、致死的重要原因^[1]。托里消毒散(组方为生黄芪、人参、当归、白术、金银花、连翘、茯苓、赤芍、白芷、皂角刺、桔梗、甘草)出自明代陈实功所著《外科正宗》, 主治因气血俱虚、肿不能溃、溃而不敛的疮疡等相关病证^[2], 为中医治疗疮疡补托法的主要代表性方剂, 方中黄芪、当归益气补血, 白芷、皂角刺消肿排脓, 深刻包含了中医“托”与“透”的治疗思想。临床实践表明内服托里消毒散加减方可有效促进多种原因所导致的创面难愈, 缩短治愈时间^[3], 对普通溃疡及糖尿病坏疽的治疗效果显著。

前期实验表明含有托里消毒散复方中黄芪、当归、白芷、皂角刺 4 味中药的精简方醇提取物具有良好的促糖尿病大鼠创面溃疡愈合的作用^[4-5], 可以明显促进创面愈合早期血管的生成与愈合后期炎症反应的消散, 但该方的主要药物成分和具体分子作用机制目前尚不明确。网络药理学建立在高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索的基础之上, 结合了系统生物学、多向药理学等技术内容与内容, 通过进行生物网络的构建与分析进而进行药物作用机制研究及新药的研发^[6-7], 其所具有的整体性及系统性的特点与中药方剂多成分、多靶点、系统调控机体的作用特点相吻合, 目前已被广泛应用于探索中药药效物质基础、药物作用机制及阐释配伍规律的相关研究中^[8-10]。以往基于吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程的药动学过程联合网络药理学研究思路广泛用于中药药效物质基础与作用机制的研究中, 但该方法的不足之处是基于化合物的二维结构来预测。如今根据化合物的三维(3D)结构及其在分子场中的相互作用来预测其理化性质及药动学的性质则是一种全新的方法^[11]。在本研究中主要通过 UPLC-Q-TOF/MS 对托里消毒散精简方中黄芪、当归、白芷及皂角刺中的药物成分进行分

析鉴定, 并借助网络药理学研究方法探讨方中主要化学成分促糖尿病创面愈合的潜在靶标及可能作用机制, 以期以托里消毒散精简方的物质基础研究奠定良好基础的同时为后续作用机制的验证实验提供科学的理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

黄芪(批号 141250581)、当归(批号 151255164)、白芷(批号 151253169)、皂角刺(批号 151250673)4 种中药饮片均由天津天士力制药集团股份有限公司提供, 经天津中医药大学李天祥教授分别鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根及豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺。乙腈(批号 20161127, 色谱纯, Fisher 公司); 甲酸(批号 20161025, 色谱纯, Acros 公司); 超纯水(Millipore 公司)。

1.2 仪器

Waters Acquity™ 超高效液相色谱系统(Waters 公司); Waters Q-TOF Premier 质谱仪(Waters MS Technologies 公司); Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters 公司); AB54、XS205 分析天平(Mettler 公司); 超纯水仪(Millipore 公司)。

2 方法

2.1 托里消毒散精简方提取物制备及处理

托里消毒散精简方成人剂量为生黄芪和当归各 15 g/d, 白芷和皂角刺各 12 g/d, 本研究将黄芪、当归、白芷、皂角刺按照 5:5:4:4 的比例混合粉碎, 加入 70%乙醇回流提取 2 次, 每次乙醇用量分别为 10 倍量、8 倍量, 每次提取 1.5 h。药液滤过合并减压回收乙醇得到含黄芪和当归各 0.267 g/mL, 含白芷和皂角刺各 0.214 g/mL 的浸膏。实验时将浸膏配制成相当于原药材 100 μ g/mL 的水溶液, 经 0.45 μ m 滤膜滤过备用。

2.2 提取物的 UPLC-Q-TOF/MS 分析鉴定

2.2.1 液相色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 0~10% A; 2~5.5 min, 10%~30% A; 5.5~10 min, 30%~80% A; 10~13 min, 80%~10% A。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 质谱扫描模式采用正、负离子 2 种扫描模式, 毛细管电压为 0.8 kV, 锥孔电压为 20 V。离子源温度 120 °C, 脱溶剂气体 (氮气) 温度为 550 °C, 脱溶剂气流量为 800 L/h, 锥孔气流量为 50 L/h。MSE 扫描模式检测, 质量扫描范围为 m/z 50~1 200, 碰撞气为氩气。用亮氨酸脑啡肽 (m/z 556.267 7 [M+H]⁺) 作为内标进行质量实时校正, 体积流量为 0.5 μL/min, 进样量 10 μL。

2.3 靶蛋白的搜集与药物分子、靶蛋白结构的前处理

本研究基于前期工作基础并结合相关文献报道^[12-14], 以 “diabetes” “wound healing” 为检索词搜集与糖尿病创面愈合相关的靶点, 通过 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home.do>) 下载其蛋白结构。药物分子利用 TCMSP 数据库 (<http://tcmspnw.com>) 及 ChemBioDraw 软件搜集并绘制各药物成分的结构, 以 mol2 格式的文件保存化合物的 3D 化学结构。因从 PDB 数据库中下载的蛋白结构往往会出现结构不完整、存在多聚体、缺少氢原子或含有多余的溶剂分子、水分子等情况, 因此本研究采用 Discovery Studio 4.5 中 clean protein 模块补充蛋白中不完整的氨基酸残基、添加氢原子并纠正其可变构象。再次通过文献调研删除其他配体分子、水分子及其他溶剂分子, 并对相应的氨基酸残基进行质子化处理。对于搜集得到的化合物分子添加 CHARMM 力场, simulation 模块对其进行能量最小化处理。

2.4 分子对接

采用 Discovery Studio 4.5 中 CDocker 模块进行分子对接研究, 输入蛋白名称并限定物种为人, 利用高温动力学方法研究所搜集化合物与蛋白的相互作用。根据配体分子所在位置定义活性口袋。采用高温动力学搜索配体分子的柔性空间, 利用模拟退火的方法将各个构象在受体活性位点进行优化。Pose cluster radius 设为 0.5, random conformations 设为 10, 在计算过程中考虑静电相互作用并利用格

点技术计算非键作用。综合考虑计算得到的配体-受体相互作用结合能及配体分子与受体活性位点的相互作用情况得到可与靶标作用的化合物。

2.5 药物-成分-靶点-功能网络图的构建

Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 对预测出可作用的蛋白查询其基因名称, 利用 KEGG 及 GO 数据库对其功能进行注释, Cytoscape 3.0 (<http://www.cytoscape.org>) 网络分析软件构建药物-成分-靶点-功能网络图。

3 结果

3.1 托里消毒散精简方药物成分的鉴定分析

通过 UPLC-Q-TOF/MS 对托里消毒散精简方的醇提取物中黄芪、当归、白芷、皂角刺可能发挥药效的成分进行分析鉴定。结果表明, 在正离子模式下共鉴定出 26 个化合物, 对这些化合物进行分类整理发现这些化合物主要为黄酮、皂苷、香豆素、甾体和三萜类成分。负离子模式下鉴定出花椒毒素、东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素) 及 zizyberanolic acid。正、负离子模式下均检测到了当归中的香豆素类成分花椒毒素, 因此在正、负离子模式下检测并分析的化合物共 28 个, 将所测成分的质谱图与质谱数据库和相关文献数据进行核对^[15]并进行药物归属, 成分鉴定结果见表 1, 正、负离子模式下的色谱图见图 1。

3.2 托里消毒散精简方中药物成分与靶蛋白的分子对接

药物分子要与受体相结合进而发挥药效, 两分子通过采取合适的取向使两者的必要部位相互契合, 通过适当的构象进而得到稳定的药物分子与靶蛋白相结合的复合物, 在这一过程中会产生特定的共价相互作用或非键相互作用, 而非键相互作用更为普遍。分子对接就是把配体分子放在受体活性位点的位置, 然后按照几何互补、能量互补以及化学环境互补的原则来实时评价配体与受体相互作用的强弱, 并找到两个分子之间最佳的结合模式。通过对结合自由能的计算可以得出配体与受体结合前后体系的非键相互作用能差。在本研究中药物分子与靶蛋白对接的自由能越小则表明药物分子与靶蛋白的相互作用越稳定。本研究通过质谱鉴定分析得到复方中共含有 28 个化合物, 鉴于现有的资料 11 个化合物并未搜集到其 3D 化学结构, 相关文献报道^[16-17]对这些成分化学结构及药理作用的挖掘也较少, 因此本研究仅对剩余的 17 个化合物进行分子对

表 1 托里消毒散精简方活性成分 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 1 Identification results of TLXDS ingredients by UPLC-Q-TOF/MS

编号	<i>t_R</i> /min	相对分子质量	模式	准分子离子	鉴定结果	归属药材
1	0.71	254.989 3	+	[M+K+Na] ⁺	花椒毒素	白芷
2	0.75	287.069 9	+	[M+H] ⁺	黄颜色素	皂角刺
3	0.79	203.052 2	+	[M+H] ⁺	花椒毒酚	白芷
4	0.80	219.046 8	+	[M+H] ⁺	5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	白芷
5	0.85	307.060 2	+	[M+Na] ⁺	毛蕊异黄酮	黄芪
6	1.16	232.058 1	+	[M+Na] ⁺	黄芪碱 A	黄芪
7	1.60	323.101 0	+	[M+Na] ⁺	珊瑚菜素	白芷
8	1.84	247.093 7	+	[M+H] ⁺	紫花前胡苷元 (虎耳草素)	白芷
9	3.95	276.076 4	+	[M+Na] ⁺	黄芪碱 D	黄芪
10	4.10	635.389 9	+	[M+H] ⁺	3β- <i>O-trans-p</i> -caffeoyl aliphatic acid	皂角刺
11	4.24	269.078 6	+	[M+H] ⁺	芒柄黄花素	黄芪、皂角刺
12	4.26	271.130 7	+	[M+H] ⁺	黄芪碱 F	黄芪
13	4.32	485.084 3	+	[M+K+Na] ⁺	毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	黄芪
14	4.54	457.374 8	+	[M+H] ⁺	桦木酸 (白桦酸)	皂角刺
15	4.66	481.326 8	+	[M+H] ⁺	白桦脂醇 (桦皮醇)	皂角刺
16	4.93	453.344 0	+	[M+K] ⁺	β-谷甾醇 (谷甾醇)	皂角刺
17	4.97	907.449 4	+	[M+K+Na] ⁺	黄芪皂苷 I	黄芪
18	5.02	951.476 0	+	[M+K+Na] ⁺	黄芪皂苷 VIII	黄芪
19	5.66	657.360 4	+	[M+H+K+Na] ⁺	3β- <i>O-trans-p</i> -coumaroyl aliphatic acid	皂角刺
20	5.80	503.131 1	+	[M+K] ⁺	2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	黄芪
21	6.95	785.482 5	+	[M+H] ⁺	黄芪皂苷 IV	黄芪
22	7.04	689.368 5	+	[M+K] ⁺	膜荚黄芪茎叶皂苷 A	黄芪
23	7.06	733.394 9	+	[M+K] ⁺	膜荚黄芪茎叶皂苷 D	黄芪
24	7.18	661.358 3	+	[M+K] ⁺	膜荚黄芪苷 II	黄芪
25	7.32	325.046 6	+	[M+H+K+Na] ⁺	氧化前胡素	白芷
26	7.99	191.106 4	+	[M+H] ⁺	新藁本内酯	当归
27	0.77	215.036 3	-	[M-H] ⁻	花椒毒素	白芷
28	0.85	191.022 6	-	[M-H] ⁻	6-甲氧基-7-羟基香豆素	白芷、当归
29	3.96	469.346 7	-	[M-H] ⁻	zizyberanolic acid	皂角刺

接, 这些化合物主要包括皂苷、黄酮、香豆素、挥发油、甾体类和萜类成分。通过对分子对接的结果进行分析发现 17 个化合物可以与 17 个靶蛋白相互作用, 其中黄芪中的皂苷类成分可作用于核因子-κB (NF-κB)、酪氨酸激酶 (JAK1)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、IκB 激酶 β (IKKβ)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、蛋白激酶 B (Akt)、蛋白激酶 C (PKC) 这些靶点, 而黄酮类成分则可作用于血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR2)、雌激素受体 (ER) 和 PKC 这些靶点。香豆素类作为白芷中的主要有效成分之一, 紫花前胡苷、珊瑚菜素和氧化前胡素均可作用于 ERK2、JAK、PI3K、MAPK、VEGFR2、

Akt、ER 和 PKC, 总体以紫花前胡苷的结合作用较稳定。皂角刺中含量相对较高的黄酮类成分黄颜色素可作用的靶点则非常多, 几乎可作用于所有搜集到的相关靶点, 而其萜类化合物白桦脂醇则可作用于 MAPK, 甾体类化合物 β-谷甾醇则可作用于 PI3K-γ、ERK2 及 PKC。当归中的挥发油成分藁本内酯虽可作用于 ERK2、IKKβ、MAPK、PDK1、环氧合酶-2 (COX-2) 和 PKC, 但总体来说相比较其他化合物, 藁本内酯与靶蛋白结合的稳定性稍差些。

托里消毒散精简方活性成分分子对接的结合能由小到大的顺序排列见表 2。黄芪皂苷 IV 是黄芪中含量相对较高的主要化学成分, 具有广泛的生物活性。

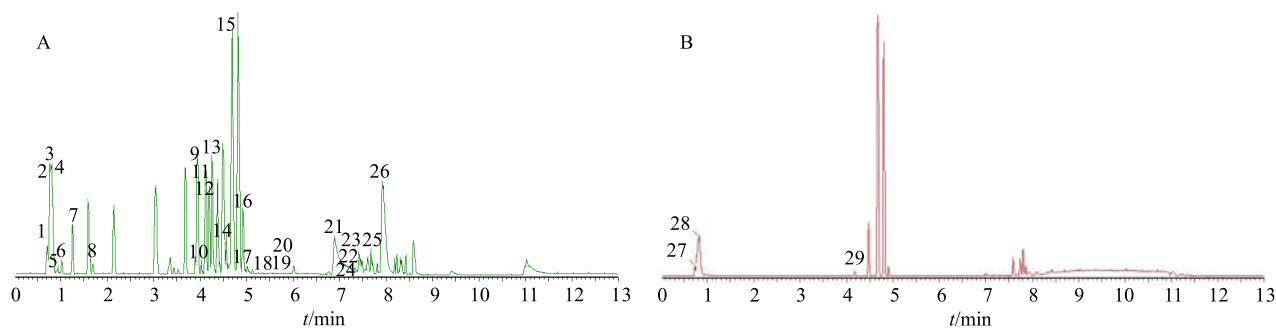


图 1 托里消毒散精简方活性成分正离子 (A) 和负离子 (B) 模式质谱离子流图

Fig. 1 Positive (A) and negative (B) total ion chromatograms of extracts of TLXDS

表 2 托里消毒散精简方活性成分的分子对接

Table 2 Molecular docking results of TLXDS ingredients

PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
1LE9	NF-κB	黄芪皂苷 VIII	-49.572 5	5E1E	JAK1	膜荚黄芪苷 II	-57.335 2
		黄芪皂苷 IV	-47.979 8			紫花前胡苷	-49.500 4
		黄芪皂苷 I	-43.710 5			黄芪皂苷 I	-42.551 8
		膜荚黄芪苷 II	-33.446 4			黄芪皂苷 VIII	-39.571 5
		紫花前胡苷	-32.325 5			毛蕊异黄酮	-39.077 7
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-22.369 5			(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-38.599 6
		毛蕊异黄酮	-21.948 8			(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-38.469 0
		珊瑚菜素	-18.964 4			珊瑚菜素	-37.111 0
		(S)-(-)-氧化前胡素	-17.761 5			黄芪皂苷 IV	-36.040 9
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-17.751 2			(S)-(-)-氧化前胡素	-34.741 9
		芒柄花素	-17.170 7			芒柄花素	-33.174 6
		花椒毒酚	-15.122 1			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-28.783 6
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-14.646 3			东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-28.564 8
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-14.544 3			花椒毒素	-26.560 1
		花椒毒素	-14.454 2			花椒毒酚	-25.660 6
4QP9	ERK2	紫花前胡苷	-55.130 4	3UGC	JAK2	(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-42.699 2
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-47.359 2			珊瑚菜素	-41.609 3
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-47.243 9			紫花前胡苷	-38.753 3
		β-谷甾醇	-46.724 5			(S)-(-)-氧化前胡素	-38.002 6
		膜荚黄芪苷 II	-44.602 8			(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-35.455 0
		毛蕊异黄酮	-41.425 6			花椒毒素	-31.907 6
		珊瑚菜素	-40.444 1			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-30.588 0
		(S)-(-)-氧化前胡素	-39.650 3			毛蕊异黄酮	-27.924 4
		芒柄花素	-38.837 5	4WAF	PI3K-α	东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-27.327 2
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-33.923 3			花椒毒酚	-26.479 5
		花椒毒素	-29.296 7			芒柄花素	-26.143 1
		藁本内酯	-28.737 8			膜荚黄芪苷 II	-49.339 1
		黄芪皂苷 IV	-28.605 5			(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-41.969 6
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-28.021 2			黄芪皂苷 IV	-39.652 5
		花椒毒酚	-26.712 8			紫花前胡苷	-39.450 9
						黄芪皂苷 I	-38.809 6

续表 2

PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
4WAF	PI3K- α	(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-37.453 0	4KIN	MAPK	白桦脂醇	-48.114 2
		毛蕊异黄酮	-37.062 8			黄芪皂苷 I	-47.660 4
		黄芪皂苷 VIII	-34.022 9			黄芪皂苷 IV	-44.601 2
		(S)-(-)-氧化前胡素	-32.607 5			(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-42.736 9
		珊瑚菜素	-31.555 6			(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-41.719 8
		芒柄花素	-31.293 8			毛蕊异黄酮	-40.549 3
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-26.767 7			膜荚黄芪苷 II	-39.600 5
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-26.417 8			芒柄花素	-36.891 1
		花椒毒素	-25.669 0			珊瑚菜素	-36.298 1
		花椒毒酚	-23.428 8			(S)-(-)-氧化前胡素	-35.562 7
3RZF	IKK β	黄芪皂苷 I	-71.450 1	3RWP	PDK1	黄芪皂苷 VIII	-35.122 8
		黄芪皂苷 IV	-57.527 6			东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-33.052 5
		膜荚黄芪苷 II	-53.626 7			藜本内酯	-32.937 8
		黄芪皂苷 VIII	-50.646 1			花椒毒酚	-32.674 1
		紫花前胡苷	-49.805 5			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-30.361 9
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-39.422 2			花椒毒素	-29.774 3
		(S)-(-)-氧化前胡素	-35.726 6			黄芪皂苷 IV	-57.011 4
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-35.356 4			黄芪皂苷 I	-56.855 0
		珊瑚菜素	-35.218 1			膜荚黄芪苷 II	-55.972 0
		毛蕊异黄酮	-33.054 3			紫花前胡苷	-47.915 5
		芒柄花素	-32.464 9			黄芪皂苷 VIII	-43.467 3
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-28.982 6			毛蕊异黄酮	-39.351 4
		藜本内酯	-25.955 8			珊瑚菜素	-38.778 9
		花椒毒酚	-24.941 3			(S)-(-)-氧化前胡素	-36.622 6
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-24.890 1			芒柄花素	-36.571 7
		花椒毒素	-23.648 5			花椒毒素	-33.396 0
		紫花前胡苷	-53.617 2			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-31.930 4
4WWO	PI3K- γ	(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-42.452 3	2OH4	VEGFR2	藜本内酯	-30.156 6
		黄芪皂苷 I	-42.230 0			东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-29.883 6
		膜荚黄芪苷 II	-41.494 8			花椒毒酚	-28.389 8
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-40.728 4			紫花前胡苷	-45.544 4
		β -谷甾醇	-40.687 1			(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-42.892 1
		黄芪皂苷 IV	-36.732 2			(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-41.619 4
		珊瑚菜素	-36.463 4			毛蕊异黄酮	-40.974 6
		毛蕊异黄酮	-34.436 9			芒柄花素	-37.477 3
		(S)-(-)-氧化前胡素	-34.224 1			珊瑚菜素	-33.948 5
		芒柄花素	-33.888 5			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-29.644 4
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-32.635 8			(S)-(-)-氧化前胡素	-29.630 6
		花椒毒酚	-30.264 1			东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-27.877 7
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-26.789 0			花椒毒素	-27.122 4
		花椒毒素	-25.893 7			花椒毒酚	-26.449 9
		黄芪皂苷 VIII	-21.019 5	3NT1	COX-2	(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-38.087 3
		紫花前胡苷	-49.670 7			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-34.930 5

续表 2

PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	PDB ID	靶点	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
3NT1	COX-2	(S)-(-)-氧化前胡素	-34.634 9	1M9K	eNOS	芒柄花素	-36.171 4
		芒柄花素	-33.821 2			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-34.842 1
		珊瑚菜素	-33.554 5			花椒毒素	-34.062 0
		毛蕊异黄酮	-31.939 4			花椒毒酚	-33.368 3
		紫花前胡苷	-31.612 9			东莨菪素(6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-32.670 0
		花椒毒酚	-31.022 6	1A52	ER- α	紫花前胡苷	-42.888 6
		藁本内酯	-30.023 8			(+)-二氢非瑟素[(+)-黄颜木素]	-42.624 9
		花椒毒素	-29.789 0			毛蕊异黄酮	-42.603 7
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-29.480 3			珊瑚菜素	-41.609 6
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-29.047 6			(-)-二氢非瑟素[(-)-黄颜木素]	-41.159 9
3QKM	Akt	黄芪皂苷 IV	-81.434 8			(S)-(-)-氧化前胡素	-40.621 0
		黄芪皂苷 VIII	-49.305 3			芒柄花素	-39.845 7
		膜荚黄芪苷 II	-48.738 7			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-31.732 3
		紫花前胡苷	-46.993 4			花椒毒素	-28.835 6
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-38.988 2			东莨菪素(6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-27.425 7
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-36.262 5	2YLY	ER- β	花椒毒酚	-26.667 2
		珊瑚菜素	-35.745 8			紫花前胡苷	-49.558 5
		毛蕊异黄酮	-35.654 6			(-)-二氢非瑟素[(-)-黄颜木素]	-46.863 4
		(S)-(-)-氧化前胡素	-33.278 2			毛蕊异黄酮	-45.385 6
		芒柄花素	-29.798 3			(+)-二氢非瑟素[(+)-黄颜木素]	-44.569 4
4HVD	JAK3	5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-29.588 9			芒柄花素	-43.596 0
		花椒毒素	-27.033 1			珊瑚菜素	-39.067 9
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-26.832 9			(S)-(-)-氧化前胡素	-36.995 8
		花椒毒酚	-24.064 2			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-30.593 9
		紫花前胡苷	-50.393 7	3TXO	PKC	花椒毒酚	-28.751 2
		黄芪皂苷 I	-49.924 9			东莨菪素(6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-28.225 3
		膜荚黄芪苷 II	-48.072 7			花椒毒素	-27.169 1
		黄芪皂苷 IV	-47.392 5			黄芪皂苷 I	-50.108 3
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-40.516 5			紫花前胡苷	-48.866 8
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-39.438 9			膜荚黄芪苷 II	-45.982 6
1M9K	eNOS	毛蕊异黄酮	-39.012 1			β -谷甾醇	-45.774 8
		珊瑚菜素	-37.556 5			(-)-二氢非瑟素[(-)-黄颜木素]	-44.529 2
		芒柄花素	-35.708 4			毛蕊异黄酮	-42.350 5
		(S)-(-)-氧化前胡素	-34.847 5			黄芪皂苷 IV	-41.360 1
		黄芪皂苷 VIII	-32.744 9			(+)-二氢非瑟素[(+)-黄颜木素]	-39.993 0
		5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-32.220 5			珊瑚菜素	-39.147 3
		东莨菪素 (6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-28.010 1			(S)-(-)-氧化前胡素	-37.943 2
		花椒毒素	-25.654 3			黄芪皂苷 VIII	-36.261 8
		花椒毒酚	-24.227 8			芒柄花素	-35.811 1
		(+)-二氢非瑟素 [(+)-黄颜木素]	-48.180 3			5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	-32.996 3
		(-)-二氢非瑟素 [(-)-黄颜木素]	-47.018 6			藁本内酯	-30.623 1
		珊瑚菜素	-39.781 6			花椒毒素	-29.013 4
		毛蕊异黄酮	-38.423 4			东莨菪素(6-甲氧基-7-羟基香豆素)	-28.989 5
		(S)-(-)-氧化前胡素	-36.765 1			花椒毒酚	-26.286 6

根据上述分子对接所得结合能的结果可见黄芪皂苷 IV 与靶蛋白相互作用的稳定性较好。另据相关文献报道^[18]黄芪皂苷 IV 可抑制糖尿病小鼠视网膜病变中 NF-κB 的磷酸化, 通过与靶蛋白 NF-κB 的相互作用进而发挥抗炎作用, 与上述分子对接所得结果相符, 说明本部分研究具有一定的可信性, 本研究以出示黄芪皂苷 IV 与 NF-κB、Akt 的 3D 结合模型为例, 见图 2。黄芪皂苷 IV 与 NF-κB 相互作用的分子对接示意图(图 2-A)显示黄芪皂苷 IV 可分别与 GLU60、ARG54、LYS218、LYS241 形成氢键; 黄芪皂苷 IV 与 Akt 相互作用的分子对接示意图(图 2-B)显示黄芪皂苷 IV 可分别与 GLU234、ASP292、TYR437、ASP439 形成氢键。

3.3 托里消毒散精简方药物成分-靶点-功能网络构建

对预测出可作用的蛋白, 利用 Uniprot 数据库查询其基因名称, KEGG 及 GO 数据库对其功能进行注释, 具体靶蛋白及其功能见表 3。利用 Cytoscape 2.6.0 软件将托里消毒散精简方中所含有化合物的

潜在作用靶点及其功能进行整合, 构建药物分子-靶点-功能网络(图 3)。网络图中的节点分别代表药物分子和靶蛋白, 边代表特定分子与蛋白质之间存在的相互作用, 成分-靶点关系共计 210 对。该网络图表明托里消毒散精简方中所含有的皂苷、黄酮、香豆素、甾体类和三萜类成分可通过调节相关靶蛋白而发挥抗菌, 抗炎, 免疫调节, 促细胞分化、迁移及成管等作用。4 味中药中即存在一个药物分子与多个靶蛋白相结合, 同时也存在不同的药物分子共同作用于同一个靶蛋白继而发挥协同作用, 引发不同的生物学效应。这一结果表明了托里消毒散精简方所具有的多成分-多靶点-多效应的作用特点, 符合传统中药复方多成分、多靶点、多途径相互作用的特点。

4 讨论

皮肤创面的愈合是一个高度有序而又复杂精细的动态过程, 正常的伤口愈合由凝血期、炎症期、增殖期和重塑期所组成, 4 个阶段连续发生相互交

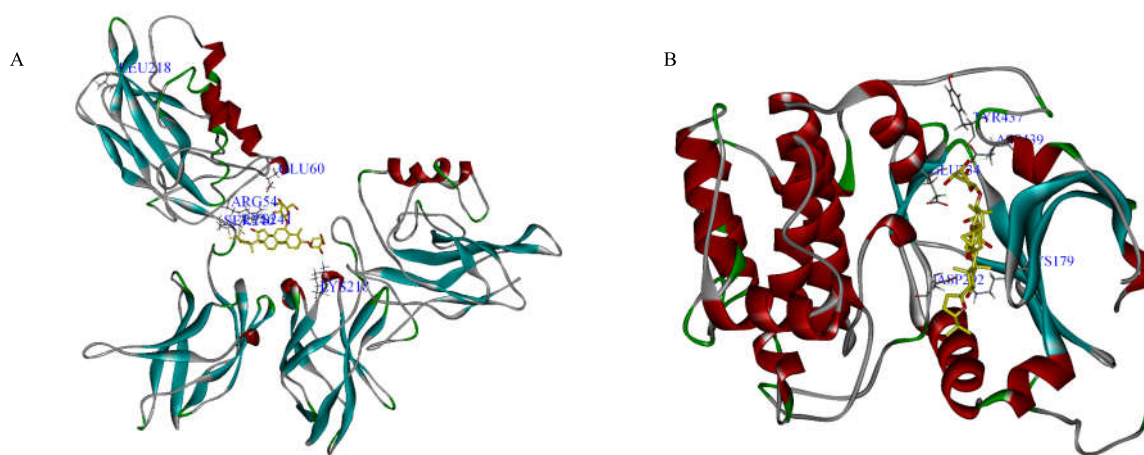


图 2 黄芪皂苷 IV 与 NF-κB (A) 和 Akt (B) 相互作用的分子对接示意图
Fig. 2 Diagrams of interaction of astragaloside IV with NF-κB (A) and Akt (B)

表 3 靶蛋白及其对应的生物学功能

Table 3 Target protein and its corresponding biological function

功能	相关靶点
抗菌	JAK1、JAK2
抗炎	NF-κB、COX-2、ER-α、JAK2、PI3K-γ、Akt、IKKβ
免疫调节	PI3K-γ、IKKβ、JAK1、JAK2、JAK3
细胞分化	Akt、PKC、MAPK、COX-2、JAK1、JAK2
细胞迁移	PDK1、ERK2、VEGFR2、Akt、MAPK、eNOS、PI3K-α、JAK1、JAK2、JAK3
血管新生	PI3K-α、PI3K-β、COX-2、MAPK、eNOS、VEGFR2
上皮生长因子刺激	Akt、PDK1
凋亡	Akt、NF-κB、IKKβ、VEGFR2、PI3K-α、PI3K-β
血管发育及血管舒张	Akt、ERK2、PDK1、VEGFR2、MAPK、COX-2

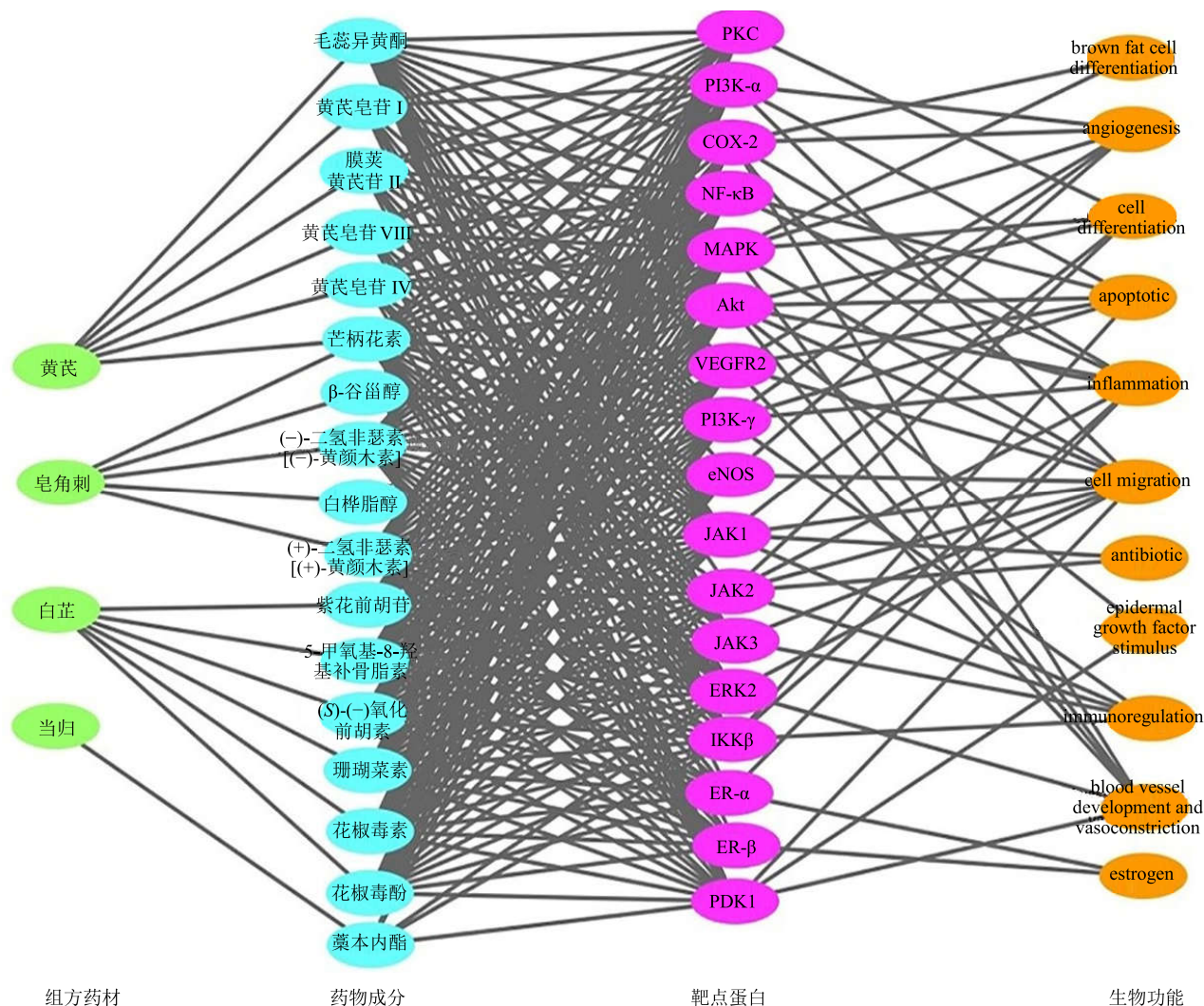


图 3 中药-成分-靶点-功能网络图

Fig. 3 Herbal medicine-component-target-function network of TLXDS

错^[19]。糖尿病所伴发的一系列血管及神经并发症使得糖尿病患者的皮肤更易受到损伤且其伤口愈合延迟。异常的炎症反应^[20]、血管生成受损及基质沉积的减少是糖尿病性创面的主要病理性特征。托里消毒散精简方含有的黄芪、当归、白芷、皂角刺可以流通气血、托毒外出防止毒邪内陷。现代药理学研究表明黄芪主要含有黄芪多糖、黄芪皂苷及黄芪黄酮等成分，黄芪多糖广泛参与机体免疫的调节，而黄芪皂苷及黄酮类成分则具有血管活性调节的作用^[21]。当归含有挥发油、有机酸及多糖类等成分，同样具有血管活性的调节作用。研究表明当归水提物可以促进斑马鱼体内的血管新生及人脐静脉内皮细胞（HUVEC）体外的血管生成^[22]。白芷含有丰富的香豆素类化合物，具有良好的抗炎活性。但另有研究报道白芷的活性提取物可以促进内皮细胞的

体外增殖^[23]。皂角刺则含有黄酮类、甾体类及萜类成分，其抗炎活性显著^[24]。本研究通过 UPLC-Q-TOF/MS 对托里消毒散精简方中的成分进行分析发现复方中含有皂苷、黄酮和香豆素类等成分，因此推测这些成分可能是托里消毒散促糖尿病创面愈合的主要有效物质基础。

炎症反应在创面的愈合过程中发挥着重要的作用，早期高效的炎症反应不但可以清除创面的异物与细菌，还有利于向增殖期过渡，若创面的修复一直停滞在炎症期则发展为慢性创面，而炎性细胞的消散延迟还会产生各种蛋白酶，降解细胞外基质从而不利于胶原的沉积^[25]，影响了创面的闭合收缩。NF- κ B 及其下游信号通路的激活在糖尿病中发挥了重要的作用。NF- κ B 是一种主要由 p50 和 p65 亚基组成的异二聚体蛋白，正常情况下 NF- κ B 与细胞质

中的抑制性因子 IKB 相结合以无活性的状态存在, 其上游 IKK 可与 IKB 亚型相结合引起 IKB 的磷酸化并对其进行降解, 当 IKB 从无活性的细胞质复合物解离时会导致其活性亚基 NF- κ B p65 蛋白向细胞核进行转位, 与 DNA 位点相结合并触发下游相关基因的表达^[26]。相关研究^[27]表明高糖可以刺激核转录因子 NF- κ B 的活化, 导致大量白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8 等相关炎症因子的释放。本研究利用分子对接及网络药理学方法探讨托里消毒散精简方中的药物成分促糖尿病创面愈合可能作用的靶点并构建药物分子-靶蛋白-功能网络, 发现方中黄芪、皂角刺和白芷中所含有的皂苷、黄酮及香豆素类成分均可作用于 IKK β 和 NF- κ B, 而当归中的藁本内酯也可作用于 IKK β , 提示这些成分可能通过 NF- κ B 信号通路协同发挥抗炎作用, 抑制创面的炎症反应, 改善创面局部微环境, 为糖尿病创面的完整修复提供良好的条件。

增殖期肉芽组织的填充是创面愈合的重要步骤, 新生血管的生成不但可以改善创面的微循环, 而且可以为组织提供丰富的氧气和营养物质, 促进创面的血管化已然成为了促糖尿病创面愈合的另一重要手段。创面的血管生成需要内皮细胞的活化、增殖、迁移并形成管状结构, 多种生长因子及多条信号通路共同参与了这一过程的调节。糖尿病创面中堆积的糖基化终末产物 (AGEs) 可通过降低一氧化氮合酶 (NOS) 的活性减少 NO 的产生, 导致内皮细胞的功能障碍, 创面血管生成减少; AGEs 还可以导致创面中生长因子的减少和其活性下降从而不利于创面中主要的修复细胞发生活化、迁移等作用。促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 在介导从细胞表面到细胞核中的生长因子受体的细胞内信号中处于核心地位, MAPK 家族主要包括细胞外调节激酶 (ERK) 1/2、JNK 和 p38 MAPK, 其中 ERK1/2 在介导众多细胞的分化、增殖及迁移过程中起到了重要的作用^[28]。血管内皮生长因子 (VEGF) 作为最强大的生长因子, 是血管生成过程中最重要的内皮细胞促有丝分裂原。VEGF 与其受体 VEGFR2 相结合可以促进内皮细胞的增殖、迁移及血管的生成, 激活细胞内酪氨酸激酶并触发多条促进血管生成的下游信号如 PI3K/Akt 和 eNOS 等^[29]。活化后的 PI3K 可通过磷酸化 Akt 的 Ser473 和 Thr308 位点激活 Akt, Akt 进一步磷酸化 eNOS 的 Ser1177 位点激活 eNOS 从而诱导细胞内 NO 的生成。NO 作为刺激血

管生成强有力的介质, 其可以增加血管通透性, 促进血管内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成等。因此通过对糖尿病创面中 ERK1/2、PI3K/Akt 等众多信号通路的调节将利于修复细胞向创面中增殖、迁移。在本研究中托里消毒散精简方中黄芪、皂角刺和白芷所含有的黄酮和香豆素类成分均可作用于靶蛋白 VEGFR2, 香豆素、皂苷和黄酮类化合物还可作用于 PI3K 及 Akt, 而香豆素和黄酮类化合物又可结合 eNOS, 提示托里消毒散可能通过 VEGF 及 PI3K/Akt/eNOS 信号通路促进内皮细胞的迁移和成管进而促进创面的血管化。

糖尿病难愈性创面在中医属于“疮疡”范畴, “补里透托”即通过补益气血和透脓的药物, 以扶助正气、托毒外出, 为中医外科疮疡疾病中最具有特色的内治方法之一。本研究表明托里消毒散精简方中所含有的黄酮、皂苷和香豆素、甾体类及萜类成分可能为该方发挥糖尿病创面愈合作用的主要药效物质基础, 进一步分析药物成分-靶蛋白-功能网络发现这些成分可能通过调节相关的靶蛋白进而调节相关信号通路发挥不同的生物学效应。方中皂苷、黄酮及香豆素类成分既可通过调节 NF- κ B 信号通路发挥抗炎的作用, 又可以通过 VEGF 和 PI3K/Akt/eNOS 信号通路促进创面的血管新生, 透脓而载毒外泄, 改善创面微环境的同时促进创面的血管化, “托”与“透”相结合以利于糖尿病创面的愈合。据相关文献报道黄芪中的主要皂苷类成分黄芪甲苷 IV 可以抑制 LPS 刺激下单核细胞与巨噬细胞向内皮细胞的黏附作用, 抑制 LPS 或 TNF- α 诱导条件下 NF- κ B 的活性^[30]。黄芪甲苷 IV 还可以通过 ERK1/2 通路促进人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的增殖和体外血管生成^[31-32]。黄芪中的黄酮类成分毛蕊异黄酮, 可以促进斑马鱼模型体内的血管新生和 HUVECs 的体外血管生成^[33], 其促血管生成的作用可能与作用于雌激素受体 ER 和 MAPK 信号通路有关。本研究通过网络药理学研究方法初步显示托里消毒散精简方中的药物成分能够调节相关靶蛋白进而调节相关信号通路从而共同产生抗菌、抗炎、免疫调节及促血管新生等生物学效应, 为后续作用机制的实验验证提供了一定的参考方向。

参考文献

- [1] Lipsky B A, Apelqvist J, akker K, *et al.* Diabetic foot disease: Moving from roadmap to journey [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(9): 674-675.
- [2] 郝福明. 托里消毒散研究述评 [J]. 中华中医药学刊,

- 2008, 26(3): 598-599.
- [3] 元建中. 托里消毒散加减内服配合外用治疗压疮疗效分析 [J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(10): 962-963.
- [4] Zhang X N, Ma Z J, Wang Y, *et al.* The Four-Herb Chinese medicine formula Tuo-Li-Xiao-Du-San accelerates cutaneous wound healing in Streptozotocin-induced diabetic rats through reducing inflammation and increasing angiogenesis [J]. *J Diabetes Res*, 2016, doi: 10.1155/2016/5639129.
- [5] 李玉珠, 张晓娜, 王颖, 等. 托里消毒散精简方对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的影响及机制 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1560-1566.
- [6] 张彦琼, 李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [7] 程肖蕊, 周文霞, 张永祥. 网络药理学实验研究相关技术 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 131-137.
- [8] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [9] 董亚楠, 韩彦琪, 王磊, 等. 基于网络药理学的六经头痛片治疗偏头痛的作用机制探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4174-4180.
- [10] Liu C X, Liu R, Fan H R, *et al.* Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.
- [11] Cruciani G, Pastor M, Guba W. VolSurf: A new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds [J]. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Feder Pharm Sci*, 2000, 11 (Suppl 2): S29-S39.
- [12] 孙晓磊, 施森, 何延政. 糖尿病创面难愈机制的研究进展 [J]. 西南军医, 2008, 10(5): 92-94.
- [13] Yuan X, Han L, Fu P, *et al.* Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(6): 783-798.
- [14] Zhang X, Ma Z, Wang Y, *et al.* *Angelica dahurica* ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177862.
- [15] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [16] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.
- [17] 杨晓峪, 李振麟, 濮社班, 等. 皂角刺化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 38-41.
- [18] Ding Y, Yuan S, Liu X, *et al.* Protective effects of astragaloside IV on db/db mice with diabetic retinopathy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112207.
- [19] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, *et al.* Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314-321.
- [20] Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, *et al.* Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(2): 245-253.
- [21] 张小鸿, 徐先祥, 汪宁卿. 黄芪保护血管内皮细胞作用机制研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(18): 1526-1530.
- [22] Lam H W, Lin H C, Lao S C, *et al.* The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on HUVEC *in vitro* and zebrafish *in vivo* [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 195-211.
- [23] 白晓智, 胡大海, 刘佳琦, 等. 白芷活性提取物对人脐静脉内皮细胞生物特性的影响 [J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2012, 7(1): 26-29.
- [24] Ha H H, Park S Y, Ko W S, *et al.* *Gleditsia sinensis* thorns inhibit the production of NO through NF-kappa B suppression in LPS-stimulated macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118(3): 429-434.
- [25] Schonfelder U, Abel M, Wiegand C, *et al.* Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6664-6673.
- [26] Adli M, Merkhofer E, Cogswell P, *et al.* IKK α and IKK β each function to regulate NF- κ B activation in the TNF-induced/canonical pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9428.
- [27] Lee Y J, Kang D G, Kim J S, *et al.* Effect of *Buddleja officinalis* on high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Exper Biol Med*, 2008, 233(6): 694-700.
- [28] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 661: 3-38.
- [29] Chen J L, Xu C, Alex Z, *et al.* Niaspan increases angiogenesis and improves functional recovery after stroke [J]. *Ann Neurol*, 2007, 62(1): 49-58.
- [30] Zhang W J, Hufnagl P, Binder B R, *et al.* Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappa B activation and adhesion molecule expression [J]. *Thromb Haemost*, 2003, 90(5): 904-914.
- [31] Wang S, Chen J, Fu Y, *et al.* Promotion of astragaloside IV for EA-hy926 cell proliferation and angiogenic activity via ERK1/2 pathway [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(6): 4239-4244.
- [32] Wang S G, Xu Y, Chen J D, *et al.* Astragaloside IV stimulates angiogenesis and increase nitric oxide accumulation via JAK2/STAT3 and ERK1/2 pathway [J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 12809-12819.
- [33] Tang J Y, Li S, Li Z H, *et al.* Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11822.