

丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究

王乐琪^{1,2}, 张云帆¹, 李莎莎², 孙元芳^{2,3}, 洪佳娜¹, 肖雪^{1*}, 严诗楷^{1,3*}

1. 广东省代谢病中西医结合研究中心, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120

3. 上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要:目的 基于网络药理学分析丹参治疗微循环障碍的分子生物学机制。方法 借助TCMSP、PubChem Search、Genecards数据库和 Swiss target prediction 在线工具得到丹参的活性成分治疗微循环障碍的作用靶标, 利用 Cytoscape 3.3.0 软件构建丹参活性成分-微循环障碍作用靶标网络, 通过 STRING 数据库构建靶蛋白相互作用 (PPI) 网络, 通过生物学信息注释数据库 (DAVID) 进行基因本体 (GO) 生物学过程和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。结果 从丹参中共筛选出治疗微循环障碍的 65 个相关活性成分, 并发现微循环障碍相关的 9 个关键靶点。GO 和 KEGG 通路富集分析发现, 丹参治疗微循环障碍可能与氧化还原、钙离子稳态等生物过程有关, 能够调节血管内皮生长因子信号通路、神经突触信号传导、催产素信号通路、醛固酮-调节钠重吸收等信号通路。结论 丹参治疗微循环障碍体现了多成分、多靶点、多途径的作用特点, 为进一步开展丹参治疗微循环障碍作用机制研究提供了新的思路和方法。

关键词: 微循环障碍; 丹参; 网络药理学; 作用机制; 氧化还原过程; 钙离子稳态; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)02-0439-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.022

Study on component-target-pathway multiple interactive network to reveal mechanism of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of microcirculation disturbance

WANG Le-qi^{1,2}, ZHANG Yun-fan¹, LI Sha-sha², SUN Yuan-fang^{2,3}, HONG Jia-na¹, XIAO Xue¹, YAN Shi-kai^{1,3}

1. Guangdong Metabolic Disease Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou 510006, China

2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

3. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Salvia miltiorrhiza* in treatment of microcirculatory disturbance based on network pharmacology. **Methods** The targets of *S. miltiorrhiza*'s active components for treatment of microcirculatory disturbance were screened and predicted by utilizing TCMSP, PubChem Search, Genecards database and Swiss target prediction online tool. Cytoscape 3.3.0 software was adopted to construct an active component-microcirculatory disturbance target network. The protein-protein interaction (PPI) network was established by using STRING database. DAVID database was used to analyze metabolism pathway in target gene ontology (GO) biological process, Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). **Results** Totally 65 active components of *S. miltiorrhiza* and nine related targets were screened. GO and KEGG pathway enrichment analysis revealed that active components of *S. miltiorrhiza* participated in oxidation-reduction process, cellular calcium ion homeostasis and other biological processes, and *S. miltiorrhiza* may regulate VEGF signaling pathway, cholinergic synapse signal transduction, oxytocin signaling pathway, aldosterone-regulated sodium reabsorption pathway and so on. **Conclusion** This study reflects the characteristics of multi-components, multi-targets, and multi-pathways of *S. miltiorrhiza* in the treatment of microcirculation disturbance, which may provide new ideas and methodology for further research on the treatment of microcirculatory disturbance using *S. miltiorrhiza*.

收稿日期: 2019-08-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603070); 广州市科技计划项目珠江科技新星专项 (201610010113)

作者简介: 王乐琪 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药系统生物学。Tel: (020)39353115 E-mail: wang_leqi@163.com

*通信作者 肖雪, 男, 硕士生导师, 研究方向为中药分析与质量评价。Tel: (020)39353115 E-mail: erxiaohappy@163.com

严诗楷, 男, 硕士生导师, 研究方向为中医药系统生物学。Tel: (021)34205989 E-mail: shkyan@sjtu.edu.cn

Key words: microcirculatory disturbance; *Salvia miltiorrhiza* Bunge; network pharmacology; mechanism; oxidation-reduction process; cellular calcium ion homeostasis; VEGF

微循环障碍 (microcirculatory disturbance) 是微循环管道、血流及其功能发生紊乱的总称, 几乎与人体各个系统疾病都存在着密切关系, 包括冠状动脉微循环障碍^[1]、糖尿病微循环障碍^[2]、脑小血管病变^[3]、慢性炎性类风湿性疾病^[4]、突发性耳聋^[5]和肠缺血^[6]等。目前, 现代医学对大血管、中血管甚至是小血管的研究都取得了很大的进展, 但对微循环的研究只停留在解剖学结构和理化特性层面, 国际上尚未提出相关治疗策略。近年来, 中医络病研究为微循环障碍的发病机制、治疗和稳态提供了一系列新的研究成果, 对靶器官功能的恢复有至关重要的意义, 为提高中药防治血管病变水平提供临床指导^[7]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 其味苦, 性微寒, 归心、肝经, 具有活血化瘀、通经止痛、清心除烦等功效^[8]。丹参成分复杂, 主要包括脂溶性和水溶性成分; 其中丹参水溶性成分, 特别是酚酸类成分一般认为是其活血化瘀的主要物质基础^[9]。前期研究发现^[10-11], 丹参在治疗微循环障碍方面具有良好的应用前景, 但多停留在临床观察、整体动物指标或者以单一通路或靶点为切入点进行探讨, 缺乏宏观的认识和分析。网络药理学融合了系统生物学、多向药理学及计算机分析技术, 能够多层次地阐明药物的作用机制, 具有整体性、系统性的特点, 近年来已经成为中药研究的一种有效技术手段^[12-13]。本研究应用网络药理学的思路构建“成分-靶点-通路”相互作用网络, 预测丹参治疗微循环障碍的潜在作用靶点及其分子机制, 以期对丹参的临床应用和基础研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 丹参活性成分的搜集和筛选

以“丹参”作为关键词, 通过 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>) 进行检索, 获取丹参所有化学成分的相关信息, 选取同时满足口服生物利用度 (OB) > 30%、类药性 (DL) > 0.18 的成分作为丹参的活性成分^[14]。

使用 PubChem Search 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) 和 Scifinder 数据库 (<https://scifinder.cas.org/scifinder/>), 查询所得成分的 CAS 号和 Canonical SMILES 字符串 (simplified molecular input line entry specification, SMILES)。

1.2 丹参活性成分靶点预测

Swiss Target Prediction^[15] (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>) 是基于所提交的小分子化合物结构, 从 2D 和 3D 结构相似性的角度, 间接预测提交小分子化合物的作用靶点。将查询到的 Canonical SMILES 字符串输入 Swiss Target Prediction 网站进行靶点对接, 获得丹参潜在的靶点基因, 即为活性成分作用靶点。

1.3 微循环障碍相关靶点预测

GeneCards 数据库^[16] (<http://www.genecards.org/>) 可以提供已知或正在探索的基因信息。以“microcirculatory disturbance”为关键词进行搜索, 收集与微循环障碍相关的基因靶点信息。

1.4 网络构建

利用 Cytoscape 3.3.0 软件^[17]构建成分-靶点网络、疾病靶点互作网络、成分-潜在靶点网络和成分-靶点-通路互作网络。将 GeneCards 数据库中得到的靶点输入 String 10.0^[18]中得到疾病靶蛋白相互作用 (PPI) 网络图。

1.5 网络分析

使用 David 在线软件^[19] (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对丹参治疗微循环障碍网络中的 GO 生物学过程 (GO-BP) 和 KEGG 通路进行富集分析, 并以 $P < 0.05$ 作为显著功能与通路的临界值。

2 结果

2.1 丹参活性成分筛选

口服给药是中药制剂最常见的给药途径, OB 是评价中药临床药效的有效指标^[20]。通过 TCMSP 数据库, 结合“DL > 0.18”与“OB > 30%”筛选出丹参中可被口服吸收的 65 个活性成分。查找 65 个成分的 SMILES 字符串, 得到有 SMILES 字符串的成分 54 个, 见表 1。

2.2 丹参活性成分靶点预测结果

通过 Swiss Target Prediction 网站进行反向对接, 选择“Homo sapiens”, 输入活性成分的 SMILES 字符串, 得到每个成分对应的基因靶点。导出数据, 共 806 个成分靶点, 去重后剩余 208 个靶点, 用 Excel 表格整理“成分-靶点”对。

2.3 疾病靶点预测结果

通过 GeneCards 数据库检索微循环障碍, 共得

表 1 丹参活性成分筛选结果
Table 1 Screened active ingredients of *S. miltiorrhiza*

序号	化合物	OB/%	DL	TCMSP 编号
S1	1,2,5,6-四氢丹参酮 (1,2,5,6-tetrahydrotanshinone)	38.75	0.36	MOL001601
S2	多孔甾醇 (poriferasterol)	43.83	0.76	MOL001659
S3	γ -谷甾醇 (γ -sitosterol)	36.91	0.75	MOL001771
S4	异欧前胡素 (isoimperatorin)	45.46	0.23	MOL001942
S5	柳杉酚 (sugiol)	36.11	0.28	MOL002222
S6	去氢丹参酮 II _A (dehydrotanshinone II _A)	43.76	0.4	MOL002651
S7	黄芩苷 (baicalin)	40.12	0.75	MOL002776
S8	间双没食子酸 (digallate)	61.85	0.26	MOL000569
S9	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25	MOL000006
S10	α -香树脂醇 (α -amyrin)	39.51	0.76	MOL006824
S11	5,6-二羟基-7-异丙基-1,1-二甲基-2,3-二氢菲-4-酮 (5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one)	33.77	0.29	MOL007036
S12	2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮 (2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione)	40.86	0.23	MOL007041
S13	(<i>E</i>)-3-[2-(3,4-二羟基苯基)-7-羟基-4-苯并呋喃基]丙烯酸 [(<i>E</i>)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-4-benzofuranyl]acrylic acid]	48.24	0.31	MOL007048
S14	4-亚甲丹参新酮 (4-methylenemiltirone)	34.35	0.23	MOL007049
S15	醛基丹参酮 (formyltanshinone)	73.44	0.42	MOL007058
S16	3- β -羟基甲基琳恩丹参醌 (3- β -hydroxymethylenetanshinquinone)	32.16	0.41	MOL007059
S17	亚甲基丹参醌 (methylenetanshinquinone)	37.07	0.36	MOL007061
S18	紫丹参萜醚 A (przewalskin A)	37.11	0.65	MOL007063
S19	紫丹参萜醚 B (przewalskin B)	110.32	0.44	MOL007064
S20	紫丹参素 B (przewaquinone B)	62.24	0.41	MOL007068
S21	紫丹参素 C (przewaquinone C)	55.74	0.40	MOL007069
S22	丹参二醇 C (tanshinodiol C)	41.31	0.45	MOL007070
S23	紫丹参素 F (przewaquinone F)	40.31	0.46	MOL007071
S24	香紫苏醇 (sclareol)	43.67	0.21	MOL007077
S25	丹参醛 (tanshinaldehyde)	52.47	0.45	MOL007079
S26	丹参醇 B (danshenol B)	57.95	0.56	MOL007081
S27	丹参醇 A (danshenol A)	56.97	0.52	MOL007082
S28	鼠尾草呋萜嵌苯 (salvilene)	30.38	0.38	MOL007085
S29	隐丹参酮 (cryptotanshinone)	52.34	0.40	MOL007088
S30	丹参新醌 d (dan-shexinkum d)	38.88	0.55	MOL007093
S31	丹参螺旋缩酮内酯 (danshenspiroketallactone)	50.43	0.31	MOL007094
S32	脱氧基新隐丹参酮 (deoxyneocryptotanshinone)	49.40	0.29	MOL007098
S33	二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I)	45.04	0.36	MOL007101
S34	表丹参螺旋缩酮内酯 (epidanshenspiroketallactone)	68.27	0.31	MOL007105
S35	弥罗松酚 (ferruginol)	36.07	0.25	MOL007107
S36	异隐丹参酮 (isocryptotanshinone)	54.98	0.39	MOL007108
S37	异丹参酮 II (isotanshinone II)	49.92	0.40	MOL007111
S38	泪杉醇 (manool)	45.04	0.20	MOL007115

续表 1

序号	化合物	OB/%	DL	TCMSP 编号
S39	微甾醇 (microstegiol)	39.61	0.28	MOL007118
S40	丹参环庚三烯酚酮 (miltipolone)	36.56	0.37	MOL007121
S41	丹参新酮 (miltirone)	38.76	0.25	MOL007122
S42	新隐丹参酮 (neocryptotanshinone)	52.49	0.32	MOL007125
S43	1-甲基-8,9-亚甲基-7H-萘酚[5,6-g]苯并呋喃-6,10,11-三酮 (1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione)	34.72	0.37	MOL007127
S44	原紫草酸 (prolithospermic acid)	64.37	0.31	MOL007130
S45	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	109.38	0.35	MOL007132
S46	丹参酚酸 G (salvianolic acid G)	45.56	0.61	MOL007141
S47	丹参酚酸 J (salvianolic acid J)	43.38	0.72	MOL007142
S48	鼠尾草酚酮 (salviolone)	31.72	0.24	MOL007145
S49	12-羟基阿松香-8(14),9(11),12-三乙四胺-7-酮 [12-hydroxyabieta-8(14),9(11),12-trien-7-one]	34.49	0.28	MOL007149
S50	丹参二醇 B (tanshindiol B)	42.67	0.45	MOL007151
S51	紫丹参甲素 (przewaquinone E)	42.85	0.45	MOL007152
S52	丹参酮 II _A (tanshinone II _A)	49.89	0.40	MOL007154
S53	丹参酮 II _B (tanshinone II _B)	65.26	0.45	MOL007155
S54	丹参酮 VI (tanshinone VI)	45.64	0.30	MOL007156

到 174 个与微循环障碍相关的基因, 作为疾病候选靶点基因。

2.4 网络构建

2.4.1 “成分-靶点”网络构建 将整理好的“成分-靶点”对以 xls 格式导入 Cytoscape 3.3.0 软件, 设置网络风格化显示, 建立“成分-靶点”网络, 见图 1-A。由图可知, 该网络共有节点 262 个, 边 806 条, 其中 54 个节点代表丹参活性成分, 208 个节点代表与成分对应的靶点, 即成分靶点。该网络的平均邻居节点数为 6.130。

2.4.2 疾病靶点互作网络构建 将 GeneCards 数据库查询到的疾病基因靶点导入 String 数据库, 查询疾病靶点的相互作用关系。导出 PPI 网络到 Cytoscape 3.3.0 中进行风格化显示, 筛选 degree 值大于 60 的靶点共 24 个呈现于外圈, 见图 1-B。

同时使用 Cytoscape 3.3.0 的 Merge 功能, 将“成分-靶点”网络与“疾病靶点”互作网络取交集, 用 Excel 导出数据, 得到疾病与成分的 9 个共同靶点, 见表 2。

2.4.3 “成分-潜在靶点”互作网络构建 将疾病靶点相互作用网络中疾病靶点与成分靶点二者不重合的靶点删除, 得到丹参治疗微循环障碍的靶点的相

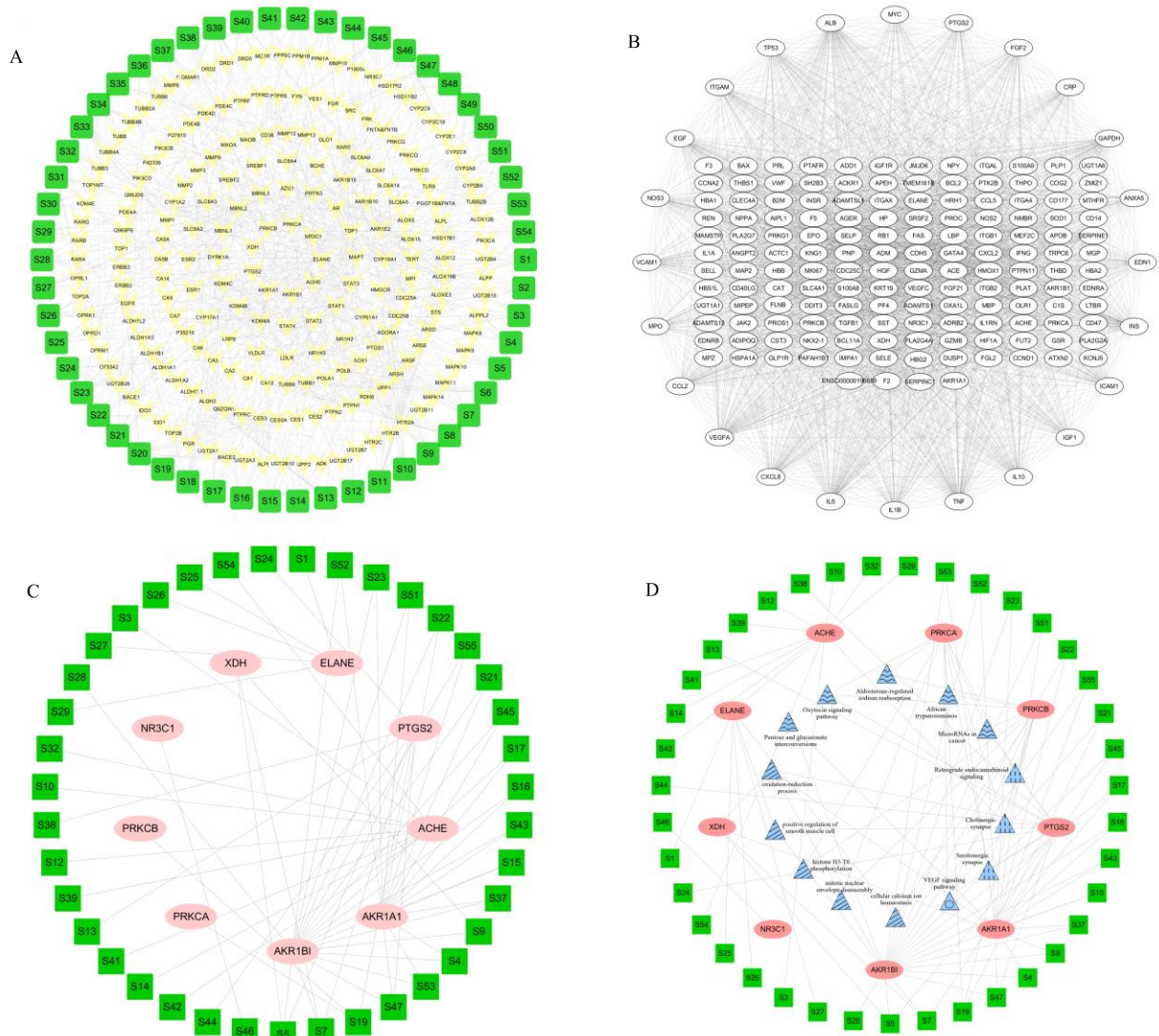
互作用网络图, 再使用 Merge 功能将此网络图与“成分-靶点”网络图取并集, 用时删除没有对应疾病靶点的 15 个活性成分, 得到 39 个有疾病靶点的丹参活性成分和“成分-潜在靶点”互作网络图, 见图 1-C。由图可知, 该网络共有节点 48 个, 边 62 条, 其中 39 个节点代表丹参成分, 9 个节点代表潜在靶点。该网络的平均邻居节点数为 2.583。

2.4.4 “成分-靶点-信号通路”网络构建 将“2.4.2”项中得到的 9 个共有基因使用 DAVID 在线工具进行 GO、KEGG 功能注释和富集分析, 表 3 中显示 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.05$)。

为进一步研究成分、靶点与信号通路之间的相互作用关系, 采用 Cytoscape 3.3.0 软件构建“靶点-信号通路”网络, 并采用 Merge 功能将其与上述“成分-潜在靶点”互作网络进行合并, 构建丹参“成分-靶点-信号通路”网络图, 见图 1-D。

2.5 靶点通路分析

利用 KEGG Mapper 工具获取丹参治疗微循环障碍的通路图, 筛选靠前的几条通路整合并绘制成最终的通路图 (图 2)。图中通路靶点标记为蓝色, 丹参治疗微循环障碍靶点标记为粉色。图中显示丹参治疗微循环障碍的靶点分散于 VEGF、Ras、



A-“成分-靶点”网络图 (■为成分, ◆为成分靶点) B-疾病靶蛋白相互作用网络 C-“成分-潜在靶点”互作网络图 (■为成分, ●为潜在靶点) D-“成分-靶点-信号通路”网络图 (■为成分, ●为潜在靶点, ▲为通路; 其中 ▲为 VEGF 信号通路, ▲为神经突触信号传导通路, ▲为其他信号通路, ▲为 GO 功能生物学分析通路)

A-component-target network (■ represent the components, ◆ represent the targets) B-protein interaction network of disease's targets C-component-potential target network (■ represent the components, ● represent the potential targets) D-component-target-pathway network (■ represent the components, ● represent the potential targets, ▲ represent the pathways, ▲ is VEGF signaling pathway, ▲ is synaptic signaling pathway, ▲ are the other signaling pathways, and ▲ is GO functional biological analysis pathway)

图 1 丹参治疗微循环障碍的“有效成分-靶点-通路”网络互动图

Fig. 1 Component-target-pathway multiple interactive network of *S. miltiorrhizain* for treatment of microcirculation disturbance

PI3K-Akt、MAPK、AA 等信号通路中, 绝大多数靶点在多条通路中发挥作用, 如 PRKCA、PRKCB 和 PTGS2 等。

3 讨论

微循环障碍是由血液理化性质改变而引起的临床疾病, 与心脑血管等疾病、衰老、慢性疾病和癌症关系密切。微循环的运行正常, 是人体健康的重

要标志。临床上常运用活血化瘀的药物, 通过改变血液的质从而达到化瘀通络的功效。目前研究结果已表明^[10], 丹参及其复方制剂单用或与化学药联合用药, 比单纯化学药对微循环障碍的临床症状改善率高。但受限于临床标本的收集困难、微循环障碍评价指标不一致, 使丹参治疗微循环障碍的研究受到限制。因此, 为推动丹参治疗微循环障碍的机制

表 2 成分与疾病共有靶点

Table 2 Common targets of components and diseases

序号	Uniprot ID	靶基因名称	靶蛋白名称	degree
1	P15121	AKR1B1	醛糖还原酶 (aldo-keto reductase family 1 member B1)	19
2	P14550	AKR1A1	醇脱氢酶 (aldo-keto reductase family 1 member A1)	15
3	P22303	ACHE	乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase)	9
4	P35354	PTGS2	前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2)	8
5	P08246	ELANE	中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase)	5
6	P47989	XDH	黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase)	3
7	P17252	PRKC α	蛋白激酶 C- α 型 (protein kinase C alpha type)	1
8	P05771	PRKC β	蛋白激酶 C- β 型 (protein kinase C beta type)	1
9	P04150	NR3C1	糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor)	1

表 3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

Table 3 Enrichment analysis results of GO and KEGG pathway

序号	条目	通路	靶点名称	P 值
1	GO: 0006874	细胞钙离子稳态（cellular calcium ion homeostasis）	ELANE、PRKCB	0.043
2	GO: 0007077	有丝分裂核膜的拆卸（mitotic nuclear envelope disassembly）	PRKCA、PRKCB	0.021
3	GO: 0035408	组蛋白 H3-T6 磷酸化（histone H3-T6 phosphorylation）	PRKCA、PRKCB	9.50×10^{-4}
4	GO: 0048661	平滑肌细胞阳性调节（positive regulation of smooth muscle cell）	PTGS2、AKR1B1、ELANE	3.50×10^{-4}
5	GO: 0055114	氧化还原过程（oxidation-reduction process）	XDH、PTGS2、AKR1A1、AKR1B1	0.044
6	hsa00040	戊糖和葡萄糖酸盐转化（pentose and glucuronate interconversions）	AKR1A1、AKR1B1	0.038
7	hsa04370	血管内皮生长因子信号通路（VEGF signaling pathway）	PRKCA、PTGS2、PRKCB	2.10×10^{-3}
8	hsa04723	逆行神经的信号（retrograde endocannabinoid signaling）	PRKCA、PTGS2、PRKCB	5.60×10^{-3}
9	hsa04725	胆碱能突触（cholinergic synapse）	PRKCA、ACHE、PRKCB	6.80×10^{-3}
10	hsa04726	5-HT 的神经突触（serotonergic synapse）	PRKCA、PTGS2、PRKCB	6.80×10^{-3}
11	hsa04921	催产素信号通路（oxytocin signaling pathway）	PRKCA、PTGS2、PRKCB	2.10×10^{-3}
12	hsa04960	醛固酮-调节钠重吸收（aldosterone-regulated sodium reabsorption）	PRKCA、PRKCB	0.012
13	hsa05143	非洲锥虫病（African trypanosomiasis）	PRKCA、PRKCB	0.038
14	hsa05206	癌症中的小分子 RNA（microRNAs in cancer）	PRKCA、PTGS2、PRKCB	0.041

研究,本研究结合网络药理学对其进行解释和探讨。

3.1 丹参治疗微循环障碍活性成分

前期研究发现^[21],以丹参为代表的中药复方和活性成分对微循环缺血再灌注后引起的心脏、脑、肝和肠等功能障碍和器官损伤具有保护和治疗作用,其机制可能与清除过氧化物、抑制白细胞、血小板和血管内皮中的黏附分子表达和抑制炎症介质释放等多种途径有关。因此,本研究运用网络药理学的方法能够间接预测丹参治疗微循环障碍的活性成分和直接/间接靶点,为其有效成分筛选和作用机制的研究提供参考。

结合表 1 和图 1,本研究发现丹参中迷迭香酸、丹参素、丹酚酸 G、丹酚酸 J、丹参酮 II_A、隐丹参

酮等主要活性成分参与治疗微循环障碍。丹参中的水溶性化合物具有清除过氧化物的能力,丹酚酸 B 通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶衍生的活性氧物质,抑制血管内皮和白细胞中黏附分子的表达^[22]。脂溶性成分可防止血管损伤的发生,丹参酮 II_A 通过细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK-2) 信号通路抑制 NADPH 氧化酶和血小板聚集和活化^[23],减少炎症细胞因子释放和抑制 Nox2 信号传导^[24]。隐丹酮能够抑制人脐静脉内皮细胞中的血管内皮生长因子 (VEGF),调控下游 Src/FAK 和 ERK1/2 信号通路,进而抑制 VEGF 诱导的血管生成^[25]。15,16-二氢丹参酮能够通过 Caspase-9、Caspase-3、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 等

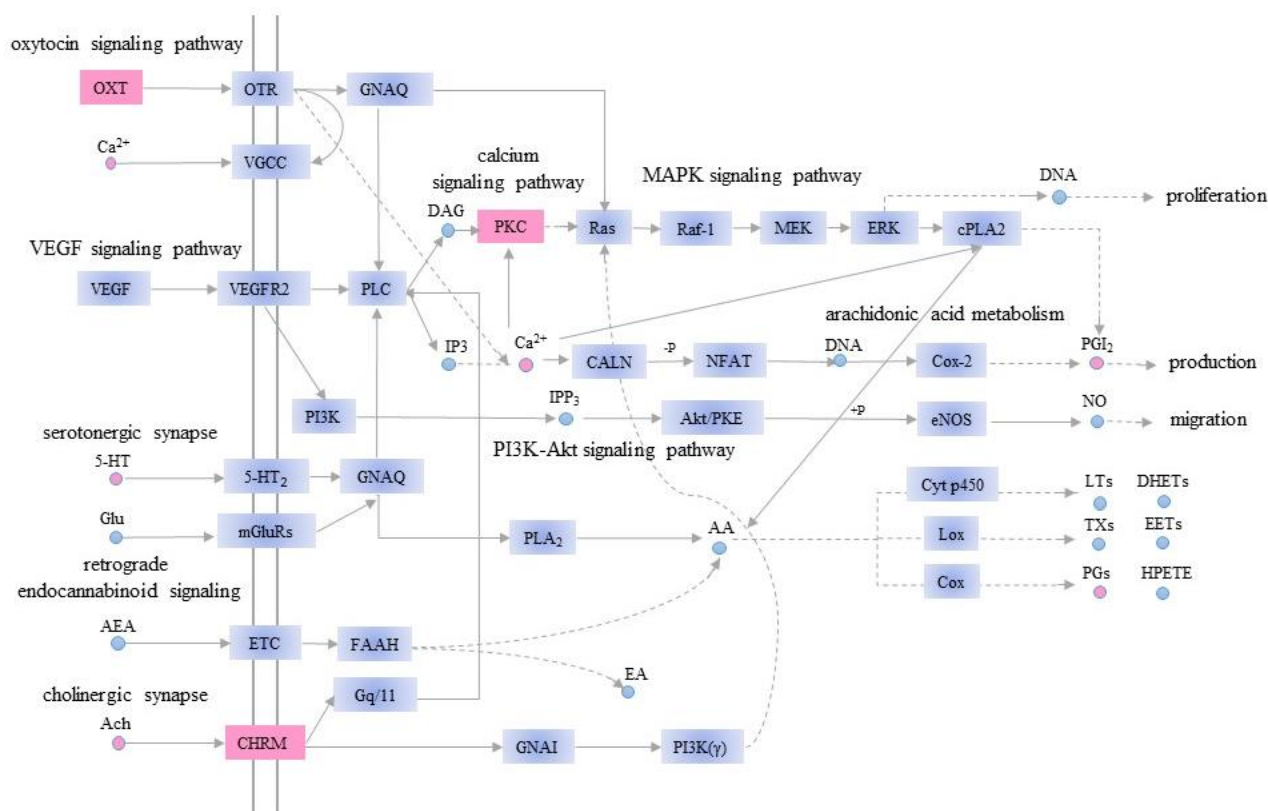


图 2 丹参治疗微循环障碍相关靶点及通路

Fig. 2 Targets and related pathways of *S. miltiorrhiza* in treatment of microcirculatory disturbance

蛋白诱导细胞凋亡，降低血管瘤细胞增殖，抑制血管生成和血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 表达^[26]。因此，丹参的水溶性和脂溶性化合物能协同改善缺血性灌注诱导的微循环障碍及靶器官损伤^[27]。

除上述活性成分外，通过“成分-靶点”网络图可知，黄芪苷、紫丹参萜醚 B、柳杉酚、紫丹参素的 degree 值也较高，与多个微循环障碍疾病靶点相关。本研究中，由于丹酚酸 B 的 DL 值为-2.52，OB 值为 3.01%，不满足“DL>0.18”和“OB>30%”的筛选条件，所以丹酚酸 B 未出现在表 1 中。但丹酚酸 B 是丹参的主要有效成分，具有抗氧化、保护心脏微循环、脑微循环等作用，并且丹参酚酸类成分存在相互转化的现象。因此，丹酚酸 B 治疗微循环障碍的药效和作用机制，同样值得进一步研究。

3.2 丹参治疗微循环障碍潜在作用靶点

由疾病靶蛋白相互作用网络可知，白蛋白 (ALB)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL-6)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、IL-10、C-X-C 趋化因子配体 8 (CXCL8)、表皮生长因子 (EGF)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM1)、细胞间黏附分子 1 (ICAM1)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)

等 24 个靶标是微循环障碍疾病互作网络中主要靶蛋白。ALB 是血浆中主要的蛋白质，与 H₂O、Ca²⁺、Na⁺、K⁺、脂肪酸、胆红素等具有良好的结合能力，能够调节血液的胶体渗透压。TNF 能够通过诱导诱导型一氧化氮合酶的表达，从而导致微血管内皮细胞凋亡^[28]。胰岛素能够扩张毛细血管前小动脉，增强导管动脉的顺应性，扩充微血管血容量^[29]，并通过调节环氧合酶-2 (COX-2) 和 VCAM-1 表达来减轻肠系膜微循环功能障碍^[30]。VEGFA 能够诱导内皮细胞增殖，促进细胞迁移，抑制细胞凋亡并诱导血管透化，在血管生成和内皮细胞生长中扮演重要作用^[31]；通过动物实验发现，糖尿病模型小鼠胰岛内皮细胞线粒体肿胀且排列紊乱，经过胰岛素治疗后，能够抑制血小板内皮细胞黏附分子-1 (PECAM-1) 和 VEGFA，恢复糖尿病微血管舒缩的功能^[32]。因此，ALB、TNF、INS、VEGFA 和 VCAM1 可能与微循环障碍的发生、发展密切相关。

本研究发现丹参酮 II_A、隐丹参酮、迷迭香酸、丹参素、丹酚酸 G 等药效成分可与蛋白激酶 C (PKC)、乙酰胆碱酯酶 (ACHE)、PTGS2 等多个靶点形成相互作用。其中部分成分与靶点相互作用关

系已被大量研究报道所证实, Yin 等^[33]在星形胶质细胞构造的脑缺血/再灌注的体外模型研究中发现, PKC 是丹酚酸 B 的重要作用靶点。丹酚酸 B 通过 PKC 对 Ser368 位点磷酸化, 下调星形胶质细胞半通道通透性, 抑制异常的星形胶质细胞半通道开放和 ATP 释放, 从而提供有效的神经保护作用。Fei 等^[34]在永久性脑缺血损伤模型 SD 大鼠动物实验中, 通过蛋白质印迹实验测定血小板 PKC 的表达水平时发现, PKC 是丹参酮的重要表达蛋白; 丹参酮能够抑制 PKC 和血栓素 2 的释放与激活, 从而抑制血小板活化, 增加脑血流量, 减少脑梗死面积和脑水肿。Zhou 等^[35]通过体外实验证明, 丹参酮对 ACHE 具有显着的抑制作用, 能够减少淀粉样蛋白- β 肽诱导的细胞毒性, 从而保护大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞。Tang 等^[36]利用分子对接和酶动力学相结合的筛选方法, 发现丹酚酸 A 以混合竞争的方式可逆地抑制 ACHE, 为丹参通过 ACHE 与阿尔茨海默病 (AD) 的相互作用提供了更多依据。同时, 大量实验研究表明^[37-41], PTGS2 是丹参中迷迭香酸、咖啡酸、丹参素和丹酚酸 B 的关键靶点, 通过影响 COX-2 信号传导途径, 下调 PTGS2 的表达, 发挥抗炎活性。

因此, 本研究通过网络药理学预测出丹参治疗微循环障碍的活性成分, 与目前大量药理学实验研究结果相吻合, 后期可根据潜在起作用的药效成分进行进一步调配优化, 为丹参治疗微循环障碍的有效成分筛选提供参考。

3.3 丹参治疗微循环障碍分子机制

3.3.1 VEGF 信号通路 血管内皮生长因子参与许多血管生成依赖性疾病的发病及其进展, 包括糖尿病视网膜膜病变^[42]、脑小血管病变^[43]、癌症^[44]及某些炎症性疾病。VEGF 信号通路在血管发生、生成过程中发挥着不可替代的作用。炎症刺激和肿瘤生长是病理条件下 VEGF 释放的主要因素。大量研究发现, VEGF 能够促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成^[45]。此外, VEGFR-2 是内皮细胞中 VEGF 驱动反应的主要介质, 被认为是生理和病理血管生成中的关键信号转导; 同时, VEGF 与 VEGFR-2 的结合导致不同信号传导途径的级联并介导的内皮细胞增殖和迁移, 促进其内皮细胞存活和血管通透性的基因的上调^[46]。

由成分-靶点-信号通路网络可知, PRKCa、PRKCb 和 PTGS2 参与了 VEGF 信号通路。其中柳杉酚、黄芩苷、紫丹参萜醚、丹酚酸 G、香紫苏醇、

原紫草酸、泪杉醇为 PTGS2 对应的活性成分; 紫丹参萜醚为 PRKCa、PRKCb 和 PTGS2 3 个靶点的共有活性成分。通过 KEGG 通路分析, PKC (PRKCa、PRKCb) 上游受到钙信号通路调控, 下游参与 MAPK 信号通路和花生四烯酸代谢 (AA); PTGS2 通过 COX-2 间接调控前列腺环素 (PGI₂), 与 PKC 共同影响 AA 代谢。胞外的 VEGF 与胞膜上的 VEGFR-2 结合, 激活底物磷脂酰肌醇磷脂酶 C (PLC)。在钙信号通路中, 上游被激活的 PLC 通过甘油二酯 (DAG) 激活 PKC。PKC 通过 MAPK 信号通路激活丝氨酸/苏氨酸激酶 (Raf-1) 和细胞溶质磷脂酶 A2 (cPLA2), 并通过 AA 代谢通路间接作用于 PGI₂。Chu 等^[47]研究发现, PGI₂ 具有扩血管和抗血小板聚积作用, 能够通过 PPAR/14-3-3 途径保护内皮细胞存活并减少血管平滑肌细胞凋亡。花生四烯酸作为 PGI₂、PGE₂ 等炎症介质的直接前体, 对血液流变学、血管弹性、血小板激活和脂质代谢发挥了重要的调节作用。因此, PKC、PTGS2 和 PGI₂ 是在 VEGF 信号通路中的重要调控靶点。

3.3.2 神经突触信号传导通路 血清素又称 5-羟色胺 (5-HT), 是一种血管活性胺, 能够影响各种器官的血液循环。当突触前轴末端释放的 5-HT 结合突触后端 5-HT 受体能够激活 PLC 和 cPLA2。PLC 能够激活 DAG 和 PKC, 间接通过丝裂原活化蛋白激酶作用于基因表达; cPLA2 通过 3 条花生四烯酸经典代谢途径——细胞色素 450、脂氧合酶和 COX 释放一系列炎症介质, 包括血栓素、前列腺素等。5-HT 有 2 种受体 5HT2A 和 5-HT1B; 5-HT2A 经常用作血管扩张剂, 而 5-HT1B 则充当血管收缩剂, 可对冠状动脉血管系统产生 2 种相反的作用^[48]。Robich 等^[49]研究发现, 通过 5-HT 或其他受体激活的 cPLA2 有助于改善心脏停搏液和心肺分流术后血管收缩和血管功能障碍。

内源性大麻素 (eCBs) 是一类脂质分子, 包括至少 5 种花生四烯酸衍生物, 可作为突触传递和可塑性的关键调节因子。当突触前段释放的谷氨酸作用于突触后端代谢性谷氨酸受体, PLC- β 被激活, 并通过 DAG 激活 PRKCa 和 PRKCb, 间接通过 PTGS2 作用于前列腺素 G。Araque 等^[50]研究发现, eCBs 通过调控海马、纹状体和新皮质等典型脑区的 eCBs 信号能够影响大脑认知、运动控制和情绪功能; 同时, eCBs 系统的失调也会导致抑郁症、孤独症和 AD 等神经精神性疾病。

乙酰胆碱 (ACh) 是外周和中枢胆碱能系统中重要的神经递质之一, 能特异性地作用于各类胆碱受体。脑内细胞外乙酰胆碱的变化主要反映胆碱能神经元的活动, 皮层和海马等脑区的 ACh 主要来源于基底前脑胆碱能神经元的纤维投射。AD 与脑小血管病变之间存在着密切联系。大多数 AD 患者会出现 A β 淀粉样血管病变、毛细血管退行性变化和缺血性实质异常, 而非结构性血管功能障碍是 AD 患者脑灌注不足的主要原因^[51]。然而, 皮质斑块水平与 AD 相关的认知障碍之间没有真正的相关性, 胆碱能神经元的受损是影响该病进程的重要因素^[52], 并且 ACh 能够显著改善 AD 患者的临床症状。因此, 胆碱能突触信号的改变能够为以脑小血管病变为代表的微循环障碍疾病研究提供新的研究思路。

3.3.3 其他生物过程和信号通路 丹参治疗微循环障碍的 GO 生物学过程富集涉及氧化还原、细胞钙离子稳态、有丝分裂核膜的拆卸、组蛋白 H3-T6 磷酸化、平滑肌细胞阳性调节等多种生物过程。微血管功能障碍常伴随着氧化环境的改变, 包括活性氧 (ROS) 的产生和氧化还原信号传导途径的激活^[53]。NADPH 氧化酶 (Noxs) 是血管系统中 ROS 的主要来源, 在心血管疾病中起重要作用。Nox1/Nox2 能够引起内皮功能障碍、高血压和炎症。Nox4 可能在压力过程中起到保护脉管系统的作用。钙依赖性 Nox5 与动脉粥样硬化中的氧化损伤有关^[54]。Noxs 的持续活化受血小板生长因子、表皮生长因子、细胞因子 (TNF、IL-1、血小板聚集因子等)、内皮素、血管紧张素和代谢因素的影响^[55]。此外, C-src、p21Ras、PKC、磷脂酶 D 和磷脂酶 A2 在 Noxs 激活的信号通路中发挥关键作用^[56]。钙是细胞信号传导、激素调节和骨健康的重要离子, 参与维持细胞内钙离子稳态。虽然 Ca²⁺ 不直接影响血液动力学, 但神经血管耦合与功能性充血反应与其密切相关^[57]。研究表明^[58], 空气中污染物可通过钙信号传导和氧化应激导致人肺动脉内皮细胞损伤^[59], 血管紧张素 II 受体能够调节血管内皮细胞钙稳态。同时, 本研究发现钙信号通路与 VEGF 信号通路关系密切, 但目前关于钙离子稳态在微循环障碍中的作用机制研究较少, 这也为微循环障碍的研究方向提供了新的思路。

催产素 (OT) 是由位于下丘脑的视上和室旁核中的巨细胞神经元合成的九肽, 不仅刺激分娩期间的子宫收缩和哺乳期间的乳汁释放, 还影响心血管调节。Gutkowska 等^[60]发现, OT 能够通过一氧化氮

和心房利钠肽改善心脏愈合过程和功能, 改善微循环障碍, 减少炎症反应和氧化应激, 调节血管代谢。

醛固酮-调节钠重吸收是调节细胞外液容量和电解质平衡的重要途径, 也是影响血压和血容量的重要因素。醛固酮的分泌主要受肾素-血管紧张素调节, 当机体循环血量减少时, 醛固酮的分泌量会增加, 从而导致对 Na⁺ 和水的重吸收增强, K⁺ 的排出量增加, 以此维持水盐代谢的平衡。Romero 等^[61]研究发现, 醛固酮和血管紧张素 II 能够调节连接肾小管-肾小球反馈 (CTGF)。CTGF 能够将连接小管中的钠处理与肾小球血流动力学相结合, 是一种新的肾脏微循环调节机制。CTGF 的缺乏会促进血压升高, CTGF 过度活化可能会导致肾小球损伤和蛋白尿。因此, 醛固酮与肾脏微循环的关系以及肾脏微循环改变对高血压和肾小球损伤的作用机制值得进一步探讨。

综上, 本研究通过网络药理学方法, 发现丹参中的主要药效成分迷迭香酸、丹参素、丹酚酸 G、丹酚酸 J、丹参酮 II_A、隐丹参酮等作用于 PRKC α 、PRKC β 、PTGS2、ACHE 和 ELANE 等多个靶点, 参与氧化还原、钙离子稳态等生物过程, 调节 VEGF 信号通路、神经突触信号传导、催产素信号通路、醛固酮-调节钠重吸收等信号通路, 从而发挥治疗微循环障碍的作用, 为进一步研究丹参药理药效机制提供了思路和科学依据。

本研究也存在一些不足。首先, 由于药物成分、靶点、疾病数据库的不完善, 网络药理学的预测结果需要进一步验证。其次, 以 OB 值和 DL 值筛选活性成分的方法无法将全面的活性成分及其在药材中的含量考虑在内, 也未对丹参的配伍、制法、用量等进行探讨, 在一定程度上局限了预测结果。微循环障碍几乎与各个系统疾病都存在着密切关系, 但不同器官的微循环障碍临床表现和共同病理机制不一样; 同时其发病机制与大血管病变、小血管病变也存在共性与差异, 导致对微循环障碍的界定相对模糊, 机制研究和临床观察实验相对欠缺。因此, 笔者建议将微循环障碍和小血管病变、大血管病变进行区分, 为其机制探讨和早期预防提供更有利的研究基础。

参考文献

- [1] Niccoli G, Scalone G, Lerman A, *et al.* Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(13): 1024-1033.

- [2] Kristensen S L, Rorth R, Jhund P S, *et al.* Microvascular complications in diabetes patients with heart failure and reduced ejection fraction—insights from the beta-blocker evaluation of survival trial [J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(11): 1549-1556.
- [3] Drachman D A, Smith T W, Alkamachi B, *et al.* Microvascular changes in down syndrome with Alzheimer's-type pathology: Insights into a potential vascular mechanism for down syndrome and Alzheimer's disease [J]. *Alzheimer's Dement*, 2017, 13(12): 1389-1396.
- [4] Faccini A, Kaski J C, Camici P G. Coronary microvascular dysfunction in chronic inflammatory rheumatoid diseases [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(23): 1799-1806.
- [5] Kocak H E, Filiz Acipayam A S, Acipayam H, *et al.* Microvascular dysfunction affects the development and prognosis of sudden idiopathic hearing loss [J]. *Clin Otolaryngol*, 2017, 42(3): 602-607.
- [6] Vollmar B, Menger M D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences [J]. *Langenbeck's Archiv Surgery*, 2011, 396(1): 13-29.
- [7] Miranda M, Balarini M, Caixeta D, *et al.* Microcirculatory dysfunction in sepsis: Pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2016, 311(1): 24-35.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 陈天玲, 毕昌琼, 肖雪, 等. 贵州松桃产丹参水溶性成分指纹图谱及多指标成分同时定量研究 [J]. *中药材*, 2015, 38(3): 536-539.
- [10] 王乐琪, 谢志茹, 李莎莎, 等. 丹参及其复方制剂用于与微循环障碍有关疾病的研究进展 [J]. *中国药房*, 2018, 29(23): 3297-3302.
- [11] 谢志茹, 李莎莎, 王乐琪, 等. 基于国家知识产权局数据库的丹参研究趋势分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(9): 1523-1530.
- [12] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [13] 宗阳, 董宏利, 陈婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨 [J]. *中草药*, 2019, 50(4): 888-894.
- [14] Veber D F, Johnson S R, Cheng H Y, *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates [J]. *J Med Chem*, 2002, 45(12): 2615-2623.
- [15] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [16] Li Y H, Yu C Y, Li X X, *et al.* Therapeutic target database update 2018: Enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acid Res*, 2018, 46(D1): D1121-1127.
- [17] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [18] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [19] Huang D A W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protocol*, 2009, 4(1): 44-57.
- [20] 夏海建, 张振海, 姚冬冬, 等. 改善中药口服生物利用度的剂型设计的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(17): 2911-2916.
- [21] Han J Y, Li Q, Ma Z Z, *et al.* Effects and mechanisms of compound Chinese medicine and major ingredients on microcirculatory dysfunction and organ injury induced by ischemia/reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 3(5): 146-173.
- [22] Zhang H S, Wang S Q. Salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* inhibits tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced MMP-2 upregulation in human aortic smooth muscle cells via suppression of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(1): 138-148.
- [23] Maione F, De Feo V, Caiazzo E, *et al.* Tanshinone II_A, a major component of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, inhibits platelet activation via Erk-2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1236-1242.
- [24] Huang L, Zheng M, Zhou Y, *et al.* Tanshinone II_A attenuates cardiac dysfunction in endotoxin-induced septic mice via inhibition of NADPH oxidase 2-related signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 444-449.
- [25] Xu X, Wu L, Zhou X, *et al.* Cryptotanshinone inhibits VEGF-induced angiogenesis by targeting the VEGFR2 signaling pathway [J]. *Microvasc Res*, 2017, doi: 10.1016/j.mvr.2016.12.011.
- [26] Cai Y, Lv F, Kaldybayeva N, *et al.* 15, 16-Dihydrotanshinone I inhibits hemangiomas through inducing pro-apoptotic and anti-angiogenic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(25): 1-10.
- [27] Han J Y, Fan J Y, Horie Y, *et al.* Ameliorating effects of

- compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(2): 280-295.
- [28] Arai S, Harada N, Kubo N, *et al.* Induction of inducible nitric oxide synthase and apoptosis by LPS and TNF- α in nasal microvascular endothelial cells [J]. *Acta Oto-Laryngol*, 2008, 128(1): 78-85.
- [29] Zheng C, Liu Z. Vascular function, insulin action, and exercise: An intricate interplay [J]. *Trend Endocrinol Metabol*, 2015, 26(6): 297-304.
- [30] Xu J, Cao L, Suo Y, *et al.* Chitosan-microcapsulated insulin alleviates mesenteric microcirculation dysfunction via modulating COX-2 and VCAM-1 expression in rats with diabetes mellitus [J]. *Inter J Nanomed*, 2018, doi: 10.2147/IJN.S174030.
- [31] Dong B, Zhou B, Sun Z. LncRNA-FENDRR mediates VEGFA to promote the apoptosis of brain microvascular endothelial cells via regulating miR-126 in mice with hypertensive intracerebral hemorrhage [J]. *Microcirculation*, 2018, 25(8): e12499.
- [32] Liu M, Zhang X, Li A, *et al.* Insulin treatment restores islet microvascular vasomotion function in diabetic mice [J]. *J Diabet*, 2017, 9(10): 958-971.
- [33] Yin X, Feng L, Ma D, *et al.* Roles of astrocytic connexin-43, hemichannels, and gap junctions in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanisms of salvianolic acid B and carbenoxolone [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 1-24.
- [34] Fei Y X, Wang S Q, Yang L J, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) extract attenuates permanent cerebral ischemia through inhibiting platelet activation in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 207(6): 57-66.
- [35] Zhou Y, Li W, Xu L, *et al.* In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid beta-induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, 31(3): 443-452.
- [36] Tang H, Song P, Li J, *et al.* Effect of *Salvia miltiorrhiza* on acetylcholinesterase: Enzyme kinetics and interaction mechanism merging with molecular docking analysis [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2019, 135(3): 3-13.
- [37] Zhao L, Zhang Y, Liu G, *et al.* Black rice anthocyanin-rich extract and rosmarinic acid, alone and in combination, protect against DSS-induced colitis in mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(5): 2796-2808.
- [38] Jin B R, Chung K S, Cheon S Y, *et al.* Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 46252(7): 1-11.
- [39] Chen W P, Jin G J, Xiong Y, *et al.* Rosmarinic acid down-regulates NO and PGE2 expression via MAPK pathway in rat chondrocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 346-353.
- [40] Tao L, Wang S, Zhao Y, *et al.* Phenolcarboxylic acids from medicinal herbs exert anticancer effects through disruption of COX-2 activity [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1473-1482.
- [41] Zhang W L, Cao Y A, Xia J, *et al.* Neuroprotective effect of tanshinone II_A weakens spastic cerebral palsy through inflammation, p38MAPK and VEGF in neonatal rats [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 2012-2018.
- [42] Simo R, Sundstrom J M, Antonetti D A. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Diabet Care*, 2014, 37(4): 893-899.
- [43] Shim J W, Madsen J R. VEGF signaling in neurological disorders [J]. *Inter J Mol Sci*, 2018, 19(1): 1-22.
- [44] Itatani Y, Kawada K. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway [J]. *Inter J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1981-1988.
- [45] Li G J, Yang Y, Yang G K, *et al.* Slit2 suppresses endothelial cell proliferation and migration by inhibiting the VEGF-Notch signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1981-1988.
- [46] Herkenne S, Paques C, Nivelles O, *et al.* The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis [J]. *Sci Sign*, 2015, 8(403): 117-125.
- [47] Chu L Y, Liou J Y, Wu K K. Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway [J]. *Prostag Oth Lipid Med*, 2015, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.04.006.
- [48] Cote F, Fligny C, Fromes Y, *et al.* Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function [J]. *Trend Mol Med*, 2004, 10(5): 232-238.
- [49] Robich M P, Araujo E G, Feng J, *et al.* Altered coronary microvascular serotonin receptor expression after coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass [J]. *J Thorac Cardiovasc Sur*, 2010, 139(4): 1033-1040.
- [50] Araque A, Castillo P E, Manzoni O J, *et al.* Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 124: 13-24.
- [51] Love S, Miners J S. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2016,

- 131(5): 645-658.
- [52] Ferreira-vieira T H, guimaraes I M, Silva F R, *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2016, 14(1): 101-115.
- [53] Li Y, Pagano P J. Microvascular NADPH oxidase in health and disease [J]. *Free Rad Biol Med*, 2017, 109: 33-47.
- [54] Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, *et al.* NADPH oxidases in vascular pathology [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2014, 20(17): 2794-2814.
- [55] Purushothaman D, Sarin A. Cytokine-dependent regulation of NADPH oxidase activity and the consequences for activated T cell homeostasis [J]. *J Exper Med*, 2009, 206(7): 1515-1523.
- [56] Zulato E, Ciccarese F, nardo G, *et al.* Involvement of NADPH oxidase 1 in liver kinase B1-mediated effects on tumor angiogenesis and growth [J]. *Front Oncol*, 2018, 8(195): 1-10.
- [57] Kannurpatti S S. Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2017, 37(2): 381-395.
- [58] Deweirdt J, Quignard J F, Crobeddu B, *et al.* Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter-induced damages in human pulmonary artery endothelial cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 45(3): 340-350.
- [59] Kamal M, Jacques D, Bkaily G. Angiotensin II receptors' modulation of calcium homeostasis in human vascular endothelial cells [J]. *Can J Physiol Pharm*, 2017, 95(10): 1289-1297.
- [60] Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin revisited: Its role in cardiovascular regulation [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(4): 599-608.
- [61] Romero C A, Carretero O A. A novel mechanism of renal microcirculation regulation: Connecting tubule-glomerular feedback [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2019, 21(1): 1-8.