

基于网络药理学和分子对接探究经典名方桃红四物汤异病同治作用机制

邓晶晶, 江华娟, 兰 兴, 李敏敏, 王升菊, 何 瑶*

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

摘 要: 目的 以经典名方桃红四物汤养血、活血、逐瘀功效为核心, 通过构建“成分-靶点-通路-疾病”作用网络探讨其临床异病同治的作用机制。方法 利用生物科学与网络药理学平台、蛋白数据库和 String 数据库收集桃红四物汤化学成分及其相关靶点数据, 建立“成分-靶点”作用网络; 基于筛选得到的靶点, 对桃红四物汤治疗的疾病进行关联分析, 建立“靶点-疾病”网络; 进而开展基因本体论 (gene ontology, GO) 和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析桃红四物汤治疗疾病的关键通路; 同时将筛选得到的关键有效成分和核心靶点进行分子对接验证, 综合探讨桃红四物汤在临床上异病同治的复杂作用网络。结果 从桃红四物汤中筛选出 40 个活性化合物, 其中 32 个成分涉及 221 个相关靶点、286 种相关疾病。其中阿魏酸、山柰酚、槲皮素、丹皮酚、芍药苷、藁本内酯、咖啡酸能匹配到较多靶点。预测到桃红四物汤可治疗疾病主要包括 3 大类, 分别为癌症相关疾病 (乳腺癌、前列腺癌等)、心血管疾病 (高血压、心肌梗死、心脏衰竭)、神经系统疾病; 核心靶点蛋白涉及 RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、血清白蛋白、白细胞介素 17、血管内皮生长因子 A、转录因子 AP-1 等; KEGG 信号涉及促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤增生、免疫调节、血液循环系统调节、内分泌调节等多种生物过程的 165 条通路。结论 构建了桃红四物汤“成分-靶点-通路-疾病”之间的关联, 一定程度上揭示桃红四物汤多成分、多靶点的复杂作用机制, 为经典名方桃红四物汤的临床广泛应用提供理论基础。

关键词: 桃红四物汤; 网络药理学; 分子对接; 异病同治; 阿魏酸; 山柰酚; 槲皮素; 芍药苷; 丹皮酚; 藁本内酯; 咖啡酸
中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-3018-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.019

Based on network pharmacology and molecular docking to explore mechanism of classic prescription Taohong Siwu Decoction in treating different diseases simultaneously

DENG Jing-jing, JIANG Hua-juan, LAN Xing, LI Min-min, WANG Sheng-ju, HE Yao

Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** Based on the efficacy of the classic prescription Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤) for nourishing blood, promoting blood circulation, and removing blood stasis, the mechanism of Taohong Siwu Decoction in treating different clinical diseases with the same treatment was explored by constructing a “component-target-pathway-disease” action network. **Methods** Using biological science and network pharmacology platform, protein database and string database to collect the chemical components and related target data of Taohong Siwu Decoction and establish the “component-target” action network. Based on the selected targets, the association analysis of diseases treated by Taohong Siwu Decoction was carried out, and the “target-disease” network was established; The GO and KEGG pathway enrichment analysis of Taohong Siwu Decoction were carried out. The key effective components and targets screened were verified by molecular docking, and the complex network of Taohong Siwu Decoction in treating different diseases in clinic was comprehensively discussed. **Results** A total of 40 active compounds were screened from Taohong Siwu Decoction, and 32 of which involved 221 related targets and 286 related diseases. Ferulic acid, kaempferol, quercetin, paeonol, paeoniflorin, ligustilide and caffeic acid can match more targets. It was predicted that the diseases

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YFS0567); 四川省教育厅高校科研创新团队项目 (18TD0017); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (CXTD2018018); 四川省重点研发项目 (2021YFS0256); 四川省科技创新苗子工程培育及小发明小创造项目 (2020094)

作者简介: 邓晶晶, 女, 实验师, 研究方向为中药品种、品质与资源开发研究。E-mail: dengjingjing@cdutcm.edu.cn

*通信作者: 何 瑶, 博士, 副教授, 主要从事中药新制剂、新工艺和质量控制研究。Tel: (028)61800231 E-mail: 20660306@qq.com

treated by Taohong Siwu Decoction mainly included three categories: cancer related diseases (breast cancer, prostate cancer, etc.), cardiovascular diseases (hypertension, myocardial infarction, heart failure), and nervous system diseases; The key target proteins are RAC- α serine/threonine protein kinase (AKT1), serum albumin (ALB), and interleukin 17, vascular endothelial growth factor A, transcription factor AP-1, etc. KEGG signaling involved 165 pathways that promoted tumor cell apoptosis and inhibited tumor proliferation, immune regulation, blood circulation system regulation and endocrine regulation, etc. **Conclusion** The relationship between Taohong Siwu Decoction “component-target-pathway-disease” was established in this study, revealing the complex action mechanism of Taohong Siwu Decoction with multiple components and multiple targets to some extent. It provides a theoretical basis for the extensive clinical application of the classic prescription Taohong Siwu Decoction.

Key words: Taohong Siwu Decoction; network pharmacology; molecular docking; treating different diseases with same method; ferulic acid; kaempferol; quercetin; paeoniflorin; paeonol; ligustilide; caffeic acid

桃红四物汤是古代经典名方目录（第 1 批）中收录的百首经典名方之一，也是国家最早发布古代经典名方关键信息的 7 首方剂之一。该方出自清代柴得华《妇科冰鉴》，处方组成为生地（3 钱，酒洗）、当归（4 钱，酒洗）、白芍钱（5 分，酒炒）、川芎（1 钱）、桃仁（14 粒，去皮尖研泥）、红花（1 钱，酒洗），功效为“养血、活血、逐瘀”^[1]。该方最早见于清代吴谦所著《医宗金鉴·妇科心法要诀》，是在妇科圣方四物汤（补血活血）的基础上，加桃仁-红花药对增强活血化瘀之功，对血瘀而兼有血虚者尤为适宜，适用于血瘀引起的多种病症^[2-3]。按照《医林改错》记载，根据病变部位不同，“血瘀”可分为头部、胸部、腹部、少腹部、肢体经络 5 个方面，其代表疾病依次为脑梗死^[4-5]、冠心病和心绞痛^[6-9]、高血压^[10]、肝硬化^[11]、月经失调^[12]、类风湿性关节炎^[13]等，桃红四物汤均可治之。

桃红四物汤已成为中医临床使用最广泛的活血化瘀方剂之一，也是异病同治的典型方剂。课题组前期对该方剂的化学成分、药理作用及临床应用进行文献挖掘^[14]，发现其较多临床应用的治疗作用机制研究还不深入、缺乏实验研究基础。中药复方化学成分复杂，临床疗效的表现是其多成分、多靶点、多途径的协同作用，桃红四物汤以其养血和活血化瘀功效为核心应用于多种疾病的治疗，其成分-靶点-通路-疾病之间的交互作用网络如何关联，是该方剂现代应用中亟待探究的关键问题。

随着组学技术的发展完善，系统生物学及多向药理学已广泛应用于多种疾病及药理、毒理等方面研究。网络药理学（network pharmacology）融合了系统生物学和多向药理学的思想，通过构建“成分-靶点-通路-疾病”之间的复杂网络分析药物有效成分的作用机制，使药理研究由寻找单一靶点的传统研究理念转向了网络综合分析思维，已经开始逐步

渗透到中医药领域的各个方面，系统科学地解析中药或中药复方。网络药理研究中，同一疾病在不同发展阶段，可由不同的蛋白（或基因）调控；部分蛋白亦可在多种疾病中起中枢调控作用，与“同病异治”和“异病同治”的中医药理论不谋而合。本研究采用网络药理学的方法，以桃红四物汤活血化瘀功效为核心，系统综合地探寻桃红四物汤对疾病网络的干预与影响，探索其多成分与多靶点、多疾病之间的复杂关系，从系统生物学整体水平揭示其潜在有效成分和药理作用机制，为其基础研究和临床应用奠定理论基础。

1 方法

1.1 研究思路

本研究基于网络药理学的桃红四物汤主要成分与作用机制关联分析研究思路见图 1。

1.2 桃红四物汤有效成分筛选

以桃红四物汤中生地黄、当归、川芎、白芍、

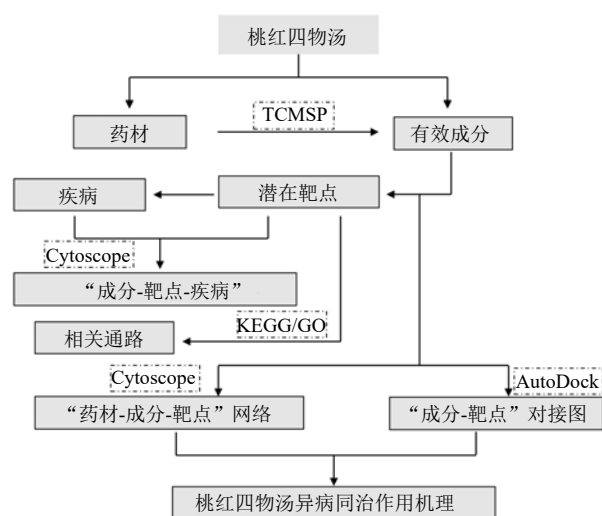


图 1 桃红四物汤网络药理学研究思路

Fig. 1 Schematic diagram of network pharmacology research of Taohong Siwu Decoction

桃仁和红花 6 味药材为关键词,在中药系统药理学数据库及分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmisp.php>)中筛选出桃红四物汤现有成分的数据;以药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 ,小肠渗透率(Caco-2) ≥ 0.4 为标准。同时,结合课题组前期研究结果及文献检索对有效活性成分进行完善。

1.3 桃红四物汤化学成分潜在靶点预测、蛋白-蛋白相互作用网络构建与分析及疾病预测

将筛选得到的有效成分在 TCMSP 中预测相关靶点,将获得的桃红四物汤潜在靶点数据导入 STRING 11.0 软件(<http://string-db.org>),并将物种限定为“homo sapiens”。选取置信度高于 0.9 的数据,构建桃红四物汤的蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,根据网络中基因与邻接基因的数目,找出网络的核心基因。将筛选得到桃红四物汤潜在作用靶点作为关键词,在 TCMSP 中匹配靶点所对应的疾病。

1.4 网络构建与分析

将“药材-成分”“成分-靶点”“靶点-疾病”文件输入 Cytoscape 3.7.2 构建桃红四物汤“药材-成分-靶点”“疾病-靶点”网络图。在网络中,药材、成分、靶点、疾病是由节点来表示,两个节点之间的相互作用由边来表示。

1.5 基因本体论(gene ontology, GO)和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析

使用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)对核心靶点及 PPI 核心基因进行 GO 生物学过程富集分析;使用 KEGG(<http://www.kegg.jp/>)对靶点进行通路注释,筛选 $P \leq 0.05$ 的显著途径进行聚类分析。

1.6 分子对接验证

使用 AutoDock 软件(4.2 版)进行分子对接,该软件采用 Lamarckian 遗传算法验证复合靶的关联性。在 Autodock 工具中准备蛋白质和配体,目标蛋白的三维结构从 RCSB-PDB 数据库(<http://www.pdb.org>)下载。对接数据库进行再对接,加入氢原子,通过 Auto 工具计算对接结合能,探讨成分与靶点之间的结合作用。通过程序 Pymol 绘制靶点蛋白和分子的对接图。

2 结果

2.1 活性成分筛选

通过筛选,确定了桃红四物汤中的 25 个潜在化合物(OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 , Caco-2 ≥ 0.4)。同时,据文献查阅,纳入了 15 个活性化合物进行研究。共从桃红四物汤中筛选出 40 个活性化合物,其中 9 个来自桃仁、16 个来自红花、5 个来自当归、10 个来自川芎、8 个来自白芍、5 个来自地黄。其中川芎、当归共有成分 3 个,桃仁、红花、当归、白芍共有成分 1 个,红花、白芍共有成分 1 个,红花、桃仁共有成分 2 个;川芎、白芍、生地黄共有成分 1 个,红花、当归、生地黄共有成分 1 个。筛选出的 40 个成分见表 1。

2.2 桃红四物汤作用靶点预测及 PPI 网络构建

本研究利用 TCMSP 靶点预测技术对上述活性成分进行作用靶点预测,排除重复靶点,共获得 32 个化合物对应的预测靶点 221 个。将靶点蛋白对应的基因输入 String 数据库获取 PPI 网络,网络中含有 220 个节点,798 条相互作用关系。利用 String 绘制得分前 30 个 PPI 蛋白的互作网络图,见图 2。利用 Cytoscape 3.7.2 的 Cytohubba 插件中的 degree 算法筛选出得分前 30 的蛋白作为 Hub 蛋白,见图 3。其中关键靶点包括:RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC- α serine/threonine protein kinase, AKT1, degree=132)、血清白蛋白(albumin, ALB, degree=122)、白细胞介素-6(intedeukin-6, IL-6, degree=120)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA, degree=112)、AP-1 转录激活因子(transcription factor AP-1, JUN, degree=106)等。

2.3 构建“疾病-靶点”网络

将 221 个相关靶点蛋白在 TCMSP 数据库中进行匹配,其中 92 个靶点蛋白可匹配 286 种疾病,129 个靶点蛋白未能匹配到相关疾病。根据靶点蛋白与疾病的关系可以构建“疾病-靶点”网络,涉及 92 个靶点,286 个疾病,为了能够更加直观地探析桃红四物汤治疗疾病的作用机制,本研究对 286 种疾病的 degree 值进行计算,分析得到的关键疾病主要为癌症相关疾病(乳腺癌 D43、前列腺癌 D33 等)、心血管相关疾病(高血压 D10、心肌梗死 D47、心脏衰竭 D11)、神经系统相关疾病(阿尔茨海默病 D3),见图 4。从中筛选代表性疾病(乳腺癌、高血压),根据桃红四物汤成分、靶点蛋白与疾病的关系构建“成分-靶点-疾病”网络,见图 5。

表 1 从桃红四物汤中筛选出的 40 个活性成分及其参数

Table 1 Forty active ingredients and their parameters in Taohong Siwu Decoction

Pubchem 编号	成分	OB/%	DL	Caco-2	药材
5319022	藁本内酯 [(Z)-ligustilide]	53.72	0.07	1.30	川芎、当归
5281800	毛蕊花糖苷 (acteoside)	2.94	-1.89	0.62	生地黄
656516	苦杏仁苷 (amygdalin)	4.42	-1.91	0.61	桃仁
5281605	黄芩苷 (baicalin)	33.52	0.21	0.63	红花
5280489	β -胡萝卜素 (beta-carotene)	37.18	0.58	2.25	红花
222284	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75	1.32	桃仁、红花、当归、白芍
173283	菜油甾醇 (campesterol)	37.58	0.71	1.31	桃仁
91520	梓醇 (catalpol)	5.07	-1.72	0.44	生地黄
5597	胆固醇 (cholesterol)	37.87	0.68	1.43	红花
1548883	阿魏酸 (ferulic acid)	54.97	0.06	0.53	当归、川芎
5281238	flavoxanthin	60.41	0.56	0.97	红花
25245018	GA120 [(1R,2R,5R,8R,9S,10R,11S)-11-methyl-6-methylidene-16-oxo-15-oxapentacyclo[9.3.2.15,8.01,10.02,8]heptadec-13-ene-9-carboxylate]	84.85	0.45	0.38	桃仁
73299	常春藤苷 (hederagenin)	36.91	0.75	1.32	桃仁
5280863	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.26	0.24	红花、白芍
261166	lignan	43.32	0.65	0.42	红花
161739	lupeol-palmitate	33.98	0.32	1.52	红花
64971	mairin	55.38	0.78	0.73	白芍
5282184	mandenol	42.00	0.19	1.46	川芎
161748	杨梅酮 (myricanone)	40.60	0.51	0.67	川芎
442534	芍药苷 (paeoniflorin)	53.87	-1.47	0.79	白芍
11092	丹皮酚 (paeonol)	28.79	0.04	0.93	白芍
160179	川芎啉 (perlolyrine)	65.95	0.27	0.88	川芎
5280784	八氢番茄红素 (phytoene)	39.56	0.50	2.22	红花
643672	phytofluene	43.18	0.50	2.29	红花
92735	populoside_qt	108.89	0.20	0.49	桃仁
457801	poriferast-5-en-3 β -ol	36.91	0.75	1.45	红花
5281555	pyrethrin II	48.36	0.35	0.53	红花
5280343	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	0.05	红花、桃仁
338	水杨酸 (salicylic acid)	32.13	0.03	0.63	白芍
91726743	senkyunone	47.66	0.24	1.15	川芎
222284	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75	1.32	川芎、白芍、生地黄
9548595	谷甾醇 α 1 (sitosterol alpha 1)	43.28	0.78	1.41	桃仁
5280794	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	1.44	红花、当归、生地黄
10873344	川芎萜呋内酯 (wallichilide)	42.31	0.71	0.82	川芎
689043	咖啡酸 (caffeic acid)	25.76	0.05	0.21	川芎、当归
6443665	羟基红花色素 A (hydroxysafflor yellow A)	3.53	0.68	-3.03	红花
237332	5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	45.07	0.02	0.05	地黄
370	没食子酸 (gallic acid)	31.69	0.04	-0.09	白芍
1794427	绿原酸 (chlorogenic acid)	11.93	0.33	-1.03	红花、桃仁
3085257	洋川芎内酯 A (senkyunolide A)	26.56	0.07	1.30	川芎

2.4 桃红四物汤作用靶点预测及“药材-成分-靶点”网络构建

利用 Cytoscape 3.7.2 将筛选得到的有效成分和

预测得到的相关靶点, 进行关系网络绘制和分析, 桃红四物汤发挥重要作用的有效成分与对应的作用靶点的相互关系共 546 个, 见图 6。

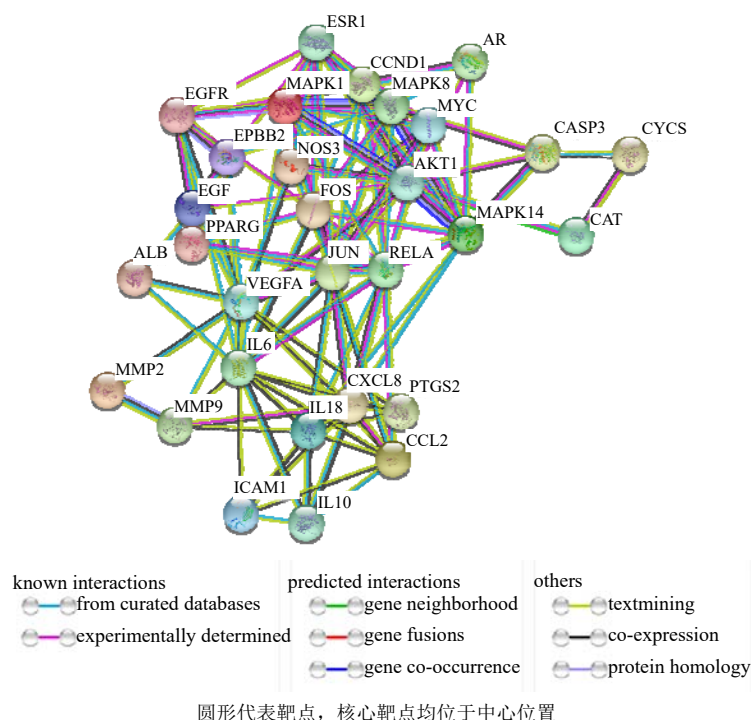


图 2 桃红四物汤相关靶点的 PPI 网络 (前 30)

Fig. 2 PPI network of Taohong Siwu Decoction related targets (top 30)

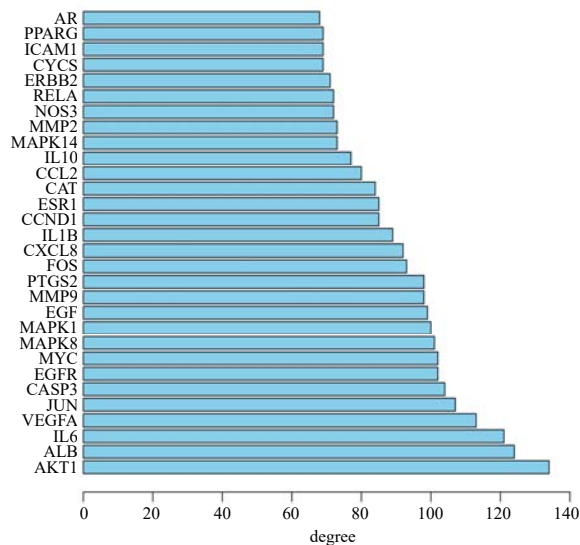


图 3 桃红四物汤关联的核心靶点柱状图 (前 30)

Fig. 3 Histogram of core targets associated with Taohong Siwu Decoction (top 30)

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析结果

将 221 个基因输入 DAVID Bioinformatics Resources 6.8, 得到 646 条 GO 条目与生物学过程有关, 参与促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤增生、免疫调节、内分泌调节、血液循环系统调节等多种生

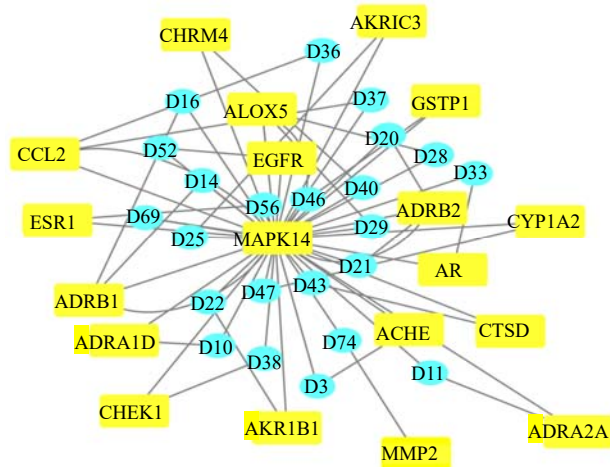


图 4 “疾病-靶点”网络

Fig. 4 “Disease-target” network

物学过程。根据 $P \leq 0.05$ 筛选出 169 个 GO 条目, 在 GO 富集分析中, 其中前 30 个差异基因的结果见图 7。将获得的靶点导入 KEGG 数据库, 在通路水平上全面揭示桃红四物汤的作用机制。最终得到了 165 条关键通路, 根据 $P \leq 0.05$ 筛选出前 30 条富集通路, 见图 8。通路上的所含基因产物(靶点)越多, 桃红四物汤越有可能通过这些通路发挥作用, 包括 IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis

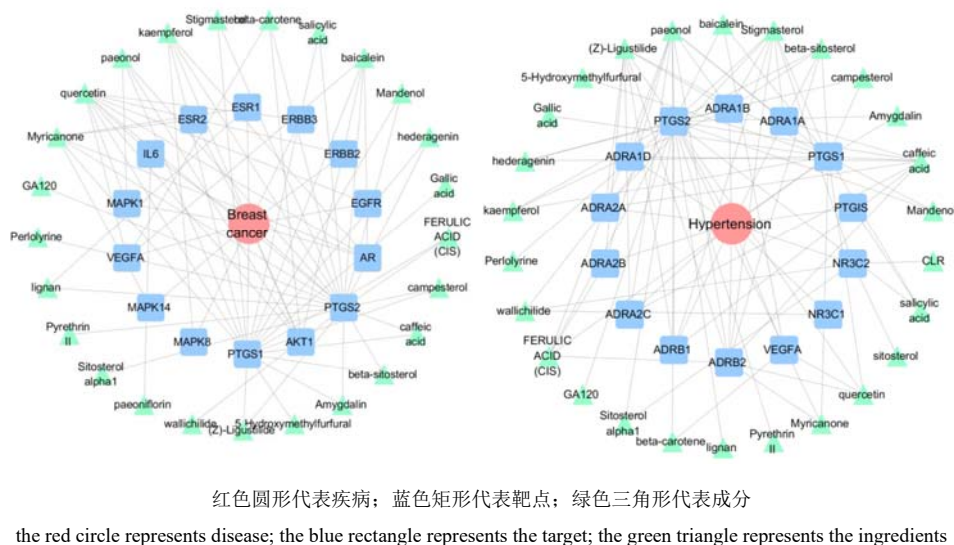


图 5 “成分-靶点-疾病”网络
Fig. 5 “Component-target-disease” network

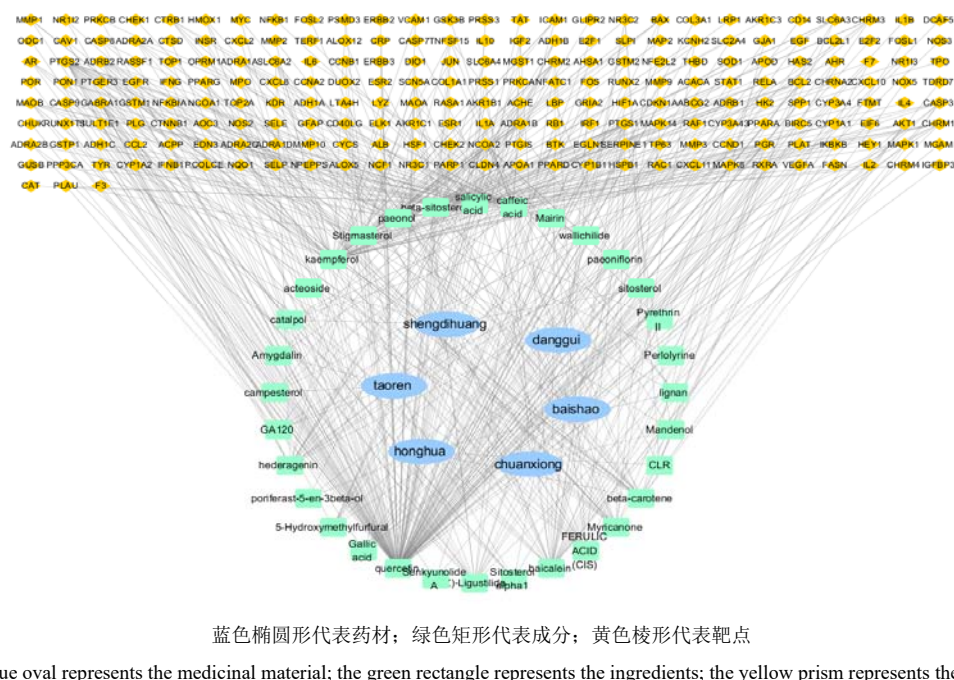


图 6 桃红四物汤“药材-成分-靶点”网络
Fig. 6 “Medicinal material-component-target” network of Taohong Siwu Decoction

factor, TNF) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路等。这 165 条关键通路的生物学功能可以分为 4 个主要调节模块：促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤增生、免疫调节、内分泌调节、血液循环系统调节。从主要的 4 个模块中筛选出关键通

路的代表，分别为 TNF 通路、IL-17 通路、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路(图 9)。结果表明，AKT1、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、I κ B 激酶 β (inhibitor of NF- κ B kinase β , IKK β) 等核心靶点在通路网络中起着关键作用。

2.6 桃红四物汤活性成分和核心靶点分子对接验证

将桃红四物汤筛选得到的核心靶点与其所对应的关键蛋白使用 AutoDock 软件进行分子对接验证，

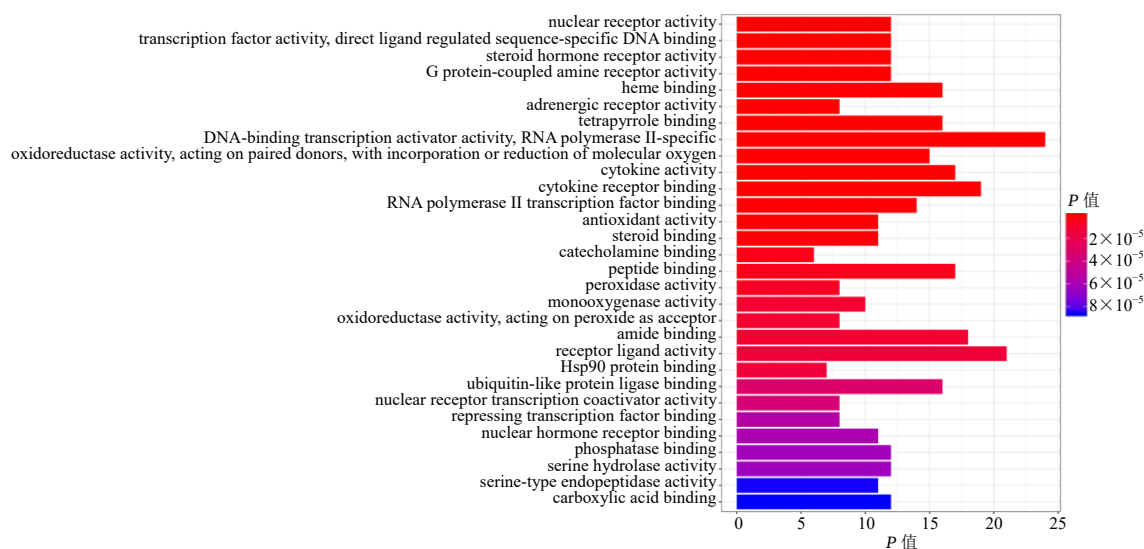


图 7 GO 通路富集分析结果

Fig. 7 Analysis results of GO pathway enrichment

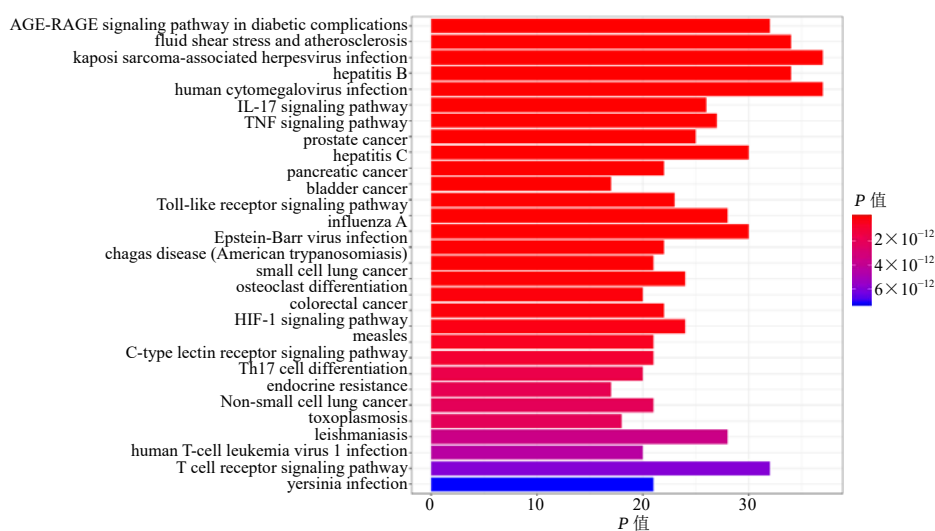


图 8 KEGG 通路富集分析结果

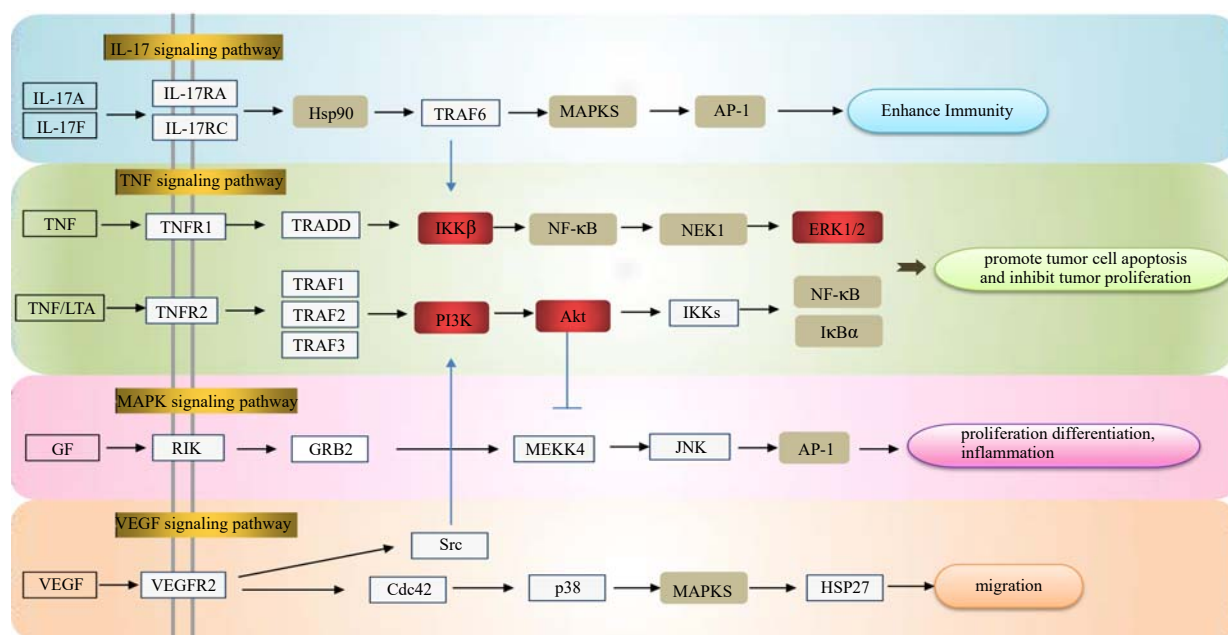
Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis results

以直观的方式展示了关键成分的最佳构型和核心靶点之间的相互作用, 对接结果如表 2 所示, 分子与靶蛋白的最低结合能均小于 0, 说明配体与受体均可以自发结合, 其中 AKT1 蛋白与咖啡酸、阿魏酸、山柰酚的对接结合能均小于 -5 kJ/mol, 结合能分别为 -5.09、-6.17、-6.24 kJ/mol; IL-6 蛋白与山柰酚结合能为 -5.68 kJ/mol。主要活性成分和核心靶点之间的结合情况与预测关系相符。如图 10-A 所示, 咖啡酸与 AKT1 的 ARG-15 和 LYS-20 残基的氢键连接; 如图 10-F 所示, 阿魏酸与 IL-6 的 LYS41 残基的氢键相对接; 如图 10-I 所示, 槲皮素与

VEGFA 的 LYS-48 残基的氢键对接。桃红四物汤中的主要活性成分与核心靶点的高结合亲和力表明, 桃红四物汤可能是通过调节以上相关靶标发挥治疗作用。

3 结论与讨论

桃红四物汤在四物汤的基础上加用桃仁、红花 2 味药, 增强了活血化瘀的功效, 具有补血而不滞血、和血而不伤血的特点, 临床用于血瘀证引起的诸多疾病。瘀血学说始见于《黄帝内经》, 奠基于张仲景, 瘀血既成后, 又可作为病因影响人体气血和脏腑功能, 引起疼痛、出血、经脉瘀塞不通、脏腑



灰色代表了桃红四物汤作用的靶点，其中红色代表桃红四物汤作用的关键靶点
grey represents the target of Taohong Siwu Decoction, and red represents the key target of Taohong Siwu Decoction

图 9 桃红四物汤关键通路图

Fig. 9 Key pathway diagram of Taohong Siwu Decoction

表 2 桃红四物汤核心有效成分分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of core active ingredients of Taohong Siwu Decoction

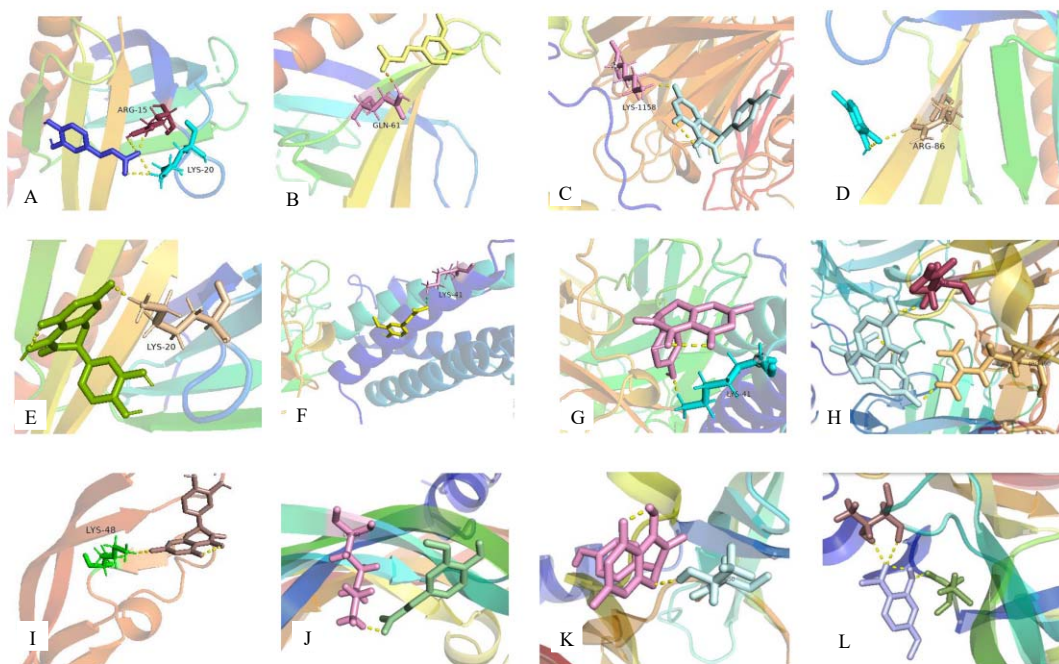
靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	咖啡酸	阿魏酸	山柰酚	丹皮酚	槲皮素
AKT1	-5.09	-6.17	-6.24	-4.46	-4.62
IL-6	-3.22	-4.35	-5.68	-3.12	-4.45
MAPK1	-3.52	-4.33	-3.66	-3.24	-4.63
VEGFA	-3.19	-4.22	-3.59	-4.89	-3.58

症结，以及“瘀血不去，新血不生”等诸多病理变化，为桃红四物汤在临床上异病同治奠定了理论基础。本研究通过成分、靶点匹配和分子对接，发现桃红四物汤中活性成分阿魏酸、山柰酚、槲皮素、丹皮酚、咖啡酸、芍药苷、藁本内酯能匹配到较多靶点，关键靶点分别与肿瘤细胞增殖与凋亡、免疫调节、内分泌调节、血液系统调节相关，主要涉及 TNF、IL-17、MAPK、VEGF 信号通路，预测得到桃红四物汤治疗的主要疾病主要为癌症相关疾病、心血管相关疾病、神经系统相关疾病。

阿魏酸、山柰酚、槲皮素、丹皮酚、芍药苷、藁本内酯、咖啡酸能匹配到较多靶点，且常用于桃红四物汤的质量控制，阿魏酸、山柰酚、芍药苷分别为《中国药典》2015 年版规定的当归和川芎、红花、白芍的含量测定指标。研究表明，阿魏酸是当

归、川芎的共有成分，具有抗血栓、调脂、抗氧化、抗菌、抗炎作用^[15]；山柰酚为红花、白芍的共有成分，能抗癌、抗氧化、抗炎、抗骨质疏松等^[16-17]；槲皮素为红花、桃仁的共有成分，可抑制各种肿瘤细胞的增殖，与凋亡调节因子 Bax 和 Bcl-2 有关，能上调半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（cysteine aspartic acid protease, Caspase），下调 NF-κB 表达；芍药苷为白芍的主要有效成分，具有解痉镇痛、解热、抗炎、抗肿瘤等药理作用^[18-19]；藁本内酯为川芎和当归的共有活性成分，具有抗癌、抗炎、抗氧化以及神经保护作用^[20]；咖啡酸是川芎、当归中的活性成分，具有抗肿瘤作用，其作用机制与抑制 Akt 有关^[21]。由此可见，这些成分可以作为桃红四物汤重要的有效成分，并用于该方剂的质量控制。

基于活性化合物筛选得到的关键靶点可分为 4



A-AKT1 与咖啡酸 B-AKT1 与阿魏酸 C-AKT1 与山奈酚 D-AKT1 与丹皮酚 E-AKT1 与槲皮素 F-IL-6 与阿魏酸 G-IL-6 与山奈酚
H-IL-6 与槲皮素 I-VEGFA 与槲皮素 J-VEGFA 与山奈酚 K-VEGFA 与阿魏酸 L-VEGFA 与丹皮酚
A-AKT1 and caffeic acid B-AKT1 and ferulic acid C-AKT1 and kaempferol D-AKT1 and paeonol E-AKT1 and quercetin F-IL-6 and ferulic
acid G-IL-6 and kaempferol H-IL-6 and quercetin I-VEGFA and quercetin J-VEGFA and kaempferol K-VEGFA and ferulic acid L-VEGFA
and paeonol

图 10 分子对接模式图

Fig. 10 Molecular docking diagram

类, 分别与肿瘤细胞增殖与凋亡、免疫调节、内分泌调节、血液系统调节相关。抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡相关靶点蛋白为 AKT1、ALB、JUN、myc 原癌基因蛋白质 (myc proto-oncogene protein, MYC)、Caspase-3 蛋白酶 (CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1) 等; 免疫调节相关靶点为 IL-6、IL-1 β 、IL-10 等; 内分泌调节相关靶点为 ESR1、前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、受体酪氨酸蛋白激酶 (receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, ERBB2)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 等; 血液系统调节相关靶点为 VEGFA、HIF-1A、表皮生长因子 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、前表皮生长因子 (pro-epidermal growth factor, EGF)、内皮型一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, endothelial, NOS3)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 等。桃红四物汤临床上治疗疾病多与这 4 个方面相关, 其治疗原发性痛经^[22]、月经不调^[23]、子宫肌瘤^[24]、多囊卵巢综合征^[25]、子宫出血^[26]等妇

科疾病, 可能均与内分泌调节有关; 治疗冠心病、高血压^[27]、脑梗死^[28]、脑出血^[29]等疾病则与血液系统的靶点相关; 治疗类风湿性关节炎^[30]、肾小球肾炎^[31]等疾病可能与免疫调节相关; 治疗乳腺癌^[32]可能与肿瘤细胞增殖与凋亡的靶点相关。

从主要的 4 个模块中筛选出关键通路, 分别为 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路。(1) TNF 信号通路调节着很多重要的生物学活动, 如免疫反应、炎症反应、细胞凋亡和肿瘤发生。研究发现 TNF- α 与其配体 TNFR 的相互作用参与了许多人类疾病的发生, 如败血症、糖尿病、癌症、骨质疏松症和类风湿性关节炎等^[33]。桃红四物汤有效成分可抑制 TNF 的表达, 阻断 TNF 信号通路起到抗肿瘤的作用^[34]。(2) IL-17 是一个重要的促炎症细胞因子, 其信号通路与免疫调节相关, 在多种炎症反应及自身免疫性疾病病理过程中发挥关键作用^[35]。大量临床研究也发现, 桃红四物汤在治疗腰椎间盘突出^[36]、改善全髋关节置换术后凝血功能及疼痛程度^[37]等疾病时, 可降低患者血清中炎症介质 IL-17 水平, 其可作用于这些靶点提高

免疫系统功能。(3) MAPK 信号通路与炎症和肿瘤相关,该通路参与了细胞生长、发育、增殖、分化等多种生理、病理过程^[38]。研究也发现,桃红四物汤通过调节 MAPK 信号通路抑制血管平滑肌的迁移和增殖^[39],联合化学药治疗哮喘^[40]等。(4) VEGF 是调节血管生成和血管新生的重要调节因子。分泌 VEGF 对于维持血管平衡稳定和存活起着十分重要的作用。生理状态下,血管生成过程被严格调控,只有在特殊情况下被激活,如伤口愈合过程;病理状态下,如癌症发生发展过程中,往往伴随着过度的血管生成,以提供更多营养供癌细胞生长。因此,现代治疗肿瘤的方法中,很重要的一个策略就是抑制肿瘤中血管生成^[41]。研究发现,桃红四物汤活血化瘀治疗痛经、乳腺癌等疾病与 VEGF 信号通路有着密切的联系^[42-44]。

将匹配的关键靶点进行疾病关联,得到桃红四物汤治疗的主要疾病主要为癌症相关疾病、心血管相关疾病、神经系统相关疾病。(1) 其中癌症相关疾病包括乳腺癌、前列腺癌等。乳腺癌属于中医“乳岩”范畴,瘀血内结是乳岩发生、发展的重要病机之一。中医认为血瘀与肿瘤互为因果,且贯穿肿瘤进展的始终;现代临床研究表明,中医辨证为瘀毒内阻型的乳腺癌术后患者 45% 发生血行转移^[45],大多数乳腺癌患者体内普遍存在着血液高凝状态。桃红四物汤能抑制乳腺癌患者肿瘤血管生成^[46],提高化疗疗效,改善患者临床症状及减轻毒副反应^[47],改善术后上肢肿胀^[48-50]等并发症。本研究发现,桃红四物汤治疗乳腺癌的关键作用靶点(图 4)主要包括激素调节相关靶点 ESR1、ESR2、PGR、PTGS2,以及 EGFR,与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移密切相关。(2) 心血管相关疾病包括高血压、心肌梗死、心脏衰竭等,均是血瘀证的常见疾病。临床研究表明桃红四物汤联合苯磺酸氨氯地平片治疗老年高血压,可更有效地将血压控制在正常值之内,进而降低脏器损害,避免并发症^[51];桃红四物汤合真武汤联合化学药,治疗阳虚血瘀型慢性射血分数降低性心力衰竭患者具有良好的临床效果,改善患者心功能^[52]。本研究发现,桃红四物汤治疗心血管相关疾病作用的关键靶点(图 4)主要包括血管新生相关靶点 VEGFA;激素调节相关靶点肾上腺素(ADRB1、ADRB2、ADRA2A、ADRA1D)、前列腺素(PTGS2、PTGIS)、雌激素(ESR1)。(3) 本研究预测出桃红四物汤可用于神经

系统相关疾病如阿尔茨海默病的治疗。阿尔茨海默病是一种不可治愈的神经退行性脑病,淀粉样斑块是其病理特征和临床诊断指标;中医认为淀粉样斑块沉积是“浊毒”的一个方面,可以被认为是中医的“脑络受损”范畴^[53]。但网络药理学研究过程中没有考虑成分血脑屏障的参数(IgBBB),故其作用需要进一步探索。

本研究通过网络药理学和分子对接,构建了其主要有效成分、作用靶点和通路、治疗疾病的复杂网络,一定程度上揭示了桃红四物汤活血化瘀功效在临床上异病同治的作用网络,为桃红四物汤的实验研究和临床应用提供了理论依据。然而筛选得到的成分只是考虑其活性和入血情况,并未衡量其在复方中的含量等问题,且只通过分子对接对主要成分和关键靶点进行了验证。在此基础上,可进一步通过体内、外实验来验证成分和靶点之间的作用关系,深入揭示桃红四物汤的药效物质基础和作用机制,用现代科学语言诠释传统经典名方的科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知 [EB/OL]. [2018-04-16]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] Zhang X, Li P, Hua Y, et al. Urinary metabolomics study the mechanism of Taohong Siwu Decoction intervention in acute blood stasis model rats based on liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1074/1075: 51-60.
- [3] Zuo C J, Zhang Y Y, Wang J C, et al. Deciphering the intervention mechanism of Taohong Siwu Decoction following the abnormal uterine bleeding rats based on serum metabolic profiles [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170: 204-214.
- [4] Yen T L, Ong E T, Lin K H, et al. Potential advantages of Chinese medicine Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤) combined with tissue-plasminogen activator for alleviating middle cerebral artery occlusion-induced embolic stroke in rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, doi: 10.1007/s11655-014-1847-x.
- [5] Li L, Yang N, Nin L, et al. Chinese herbal medicine formula Tao Hong Si Wu decoction protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt and the Nrf2 signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2015, 69(1):

- 76-85.
- [6] Tao T Q, He T, Mao H M, *et al.* Non-targeted metabolomic profiling of coronary heart disease patients with Taohong Siwu decoction treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 651.
- [7] Luo Z R, Li H, Xiao Z X, *et al.* Taohong siwu decoction exerts a beneficial effect on cardiac function by possibly improving the microenvironment and decreasing mitochondrial fission after myocardial infarction [J]. *Cardiol Res Pract*, 2019, 2019: 5198278.
- [8] Tao T Q, Mao H M, Xia L, *et al.* Efficacy and safety evaluation of Taohong siwu decoction for patients with angina pectoris: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Chin J Integr Med*, 2019: 1-7.
- [9] Yuan G, Han A, Wu J, *et al.* Bao Yuan decoction and Tao Hong Si Wu decoction improve lung structural remodeling in a rat model of myocardial infarction: Possible involvement of suppression of inflammation and fibrosis and regulation of the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B pathways [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(5): 491-501.
- [10] Liu T H, Chen W H, Chen X D, *et al.* Network pharmacology identifies the mechanisms of action of Taohong Siwu decoction against essential hypertension [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920682.
- [11] Wang T S, Wu D L, Li P P, *et al.* Effects of Taohongsiwu decoction on the expression of α -SMA and TGF- β 1 mRNA in the liver tissues of a rat model of hepatic cirrhosis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1074-1080.
- [12] 刘立, 段金彪, 宿树兰, 等. 用于妇科血瘀证痛经的四物汤类方: 桃红四物汤的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 814-821.
- [13] Zheng C S, Xu X J, Ye H Z, *et al.* Network pharmacology-based prediction of the multi-target capabilities of the compounds in Taohong Siwu decoction, and their application in osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(1): 125-132.
- [14] 聂欣, 成颜芬, 王琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(4): 226-234.
- [15] Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65: 185-195.
- [16] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅, 等. 山萘酚药理作用的研究进展 [J]. *微量元素与健康研究*, 2017, 34(2): 61-62.
- [17] 张燕玲, 薛小平. 山萘酚的作用机理研究 [J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(12): 1-3.
- [18] 张育贵, 张淑娟, 边甜甜, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [19] Zhang Q, Yuan Y H, Cui J C, *et al.* Paeoniflorin inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells through suppressing Notch-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 197-203.
- [20] Xie Q, Zhang L, Xie L, *et al.* Z-ligustilide: A review of its pharmacokinetics and pharmacology [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(8): 1966-1991.
- [21] Huang Q, Li S, Zhang L W, *et al.* CAPE-pNO₂ inhibited the growth and metastasis of triple-negative breast cancer via the EGFR/STAT3/Akt/E-cadherin signaling pathway [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 461.
- [22] 王升菊, 刘倩倩, 江华娟, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨桃红四物汤治疗原发性痛经的有效成分及作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(22): 5373-5382.
- [23] 刘晓燕. 基于数据挖掘研究王旭教授临床运用桃红四物汤治疗内分泌疾病的经验 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [24] 陈敏. 桃红四物汤加味治疗气滞血瘀子宫肌瘤 80 例临床观察 [J]. *实用中医内科杂志*, 2016, 30(12): 26-27.
- [25] 王盾. 桃红四物汤联合克罗米芬治疗多囊卵巢综合征患者疗效观察 [J]. *新中医*, 2015, 47(11): 146-147.
- [26] 巴雅尔图, 王爱军. 桃红四物汤加减治疗妇女功能失调性子宫出血 49 例临床观察 [J]. *中国临床医生*, 2005, 33(4): 56.
- [27] 钟恩云. 桃红四物汤联合苯磺酸氨氯地平片治疗老年高血压血瘀证的临床效果 [J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(31): 41-42.
- [28] 利顺欣, 彭智, 尚发军. 桃红四物汤对老年急性脑梗死患者神经功能影响的临床研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(4): 136-138.
- [29] 王文兵, 刘旭, 李明友, 等. 桃红四物汤加减治疗脑出血的临床疗效 [J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(8): 32-33.
- [30] 尚娟. 桃红四物汤加减治疗类风湿性关节炎 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(7): 555.
- [31] 谢彦英. 桃红四物汤加味治疗慢性肾小球肾炎 48 例 [J]. *医药论坛杂志*, 2003, 24(10): 54.
- [32] 杨海燕, 童彩玲, 楚爱景, 等. 桃红四物汤对乳腺癌血管生成的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6): 623-626.
- [33] 高咏梅. 肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 II 对血管内皮细胞组织因子表达及转录调控的影响 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000.
- [34] 段贤春. 基于网络药理学与转录组学探索桃红四物汤治疗缺血性中风主要物质基础及作用机制 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [35] 王心媛. MST3(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3)通过促进 NF- κ B 的磷酸化正向调控 IL-17 信号通路 [D]. 杭州:

- 浙江大学, 2015.
- [36] 邵晏清. 中西医结合治疗腰椎间盘突出症的疗效及对患者炎症因子的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(8): 37-39.
- [37] 卢朝霞, 王欣, 周少怀. 全髋关节置换术后使用桃红四物汤对凝血功能、疼痛程度以及 RANKL、OPG 含量的影响 [J]. 海南医学院学报, 2016, 22(22): 2728-2731.
- [38] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34.
- [39] 易善清. 桃红四物汤含药血清对 VSMC 迁移及 $\beta 3$ 整合素、MMP9 和 FAK/P38MAPK 信号表达的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2007.
- [40] 黄丰, 吴赛春, 李满萍, 等. 三子养亲汤、桃红四物汤单用及联用治疗哮喘大鼠作用的比较 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(5): 457-461.
- [41] 张轶璇. RKTG 对 VEGF 信号通路的调控研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2010.
- [42] 王飞龙, 韩岚, 樊玲, 等. 桃红四物汤对实验性脑缺血大鼠血清中 ET-1, Ang-1, VEGF 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 101-106.
- [43] 尹登科, 杨晔, 尹娟娟, 等. 桃红四物汤对蛋白酶激活受体激活诱导血小板释放 VEGF 和 Endostatin 的影响 [J]. 中成药, 2012, 34(9): 1631-1635.
- [44] 杨泽娟, 李国康, 李军. 桃红四物汤对晚期乳腺癌患者血清 VEGF 的影响 [J]. 中国中医药科技, 2012, 19(2): 102-103.
- [45] 刘培, 段金廛, 白钢, 等. 用于妇科血瘀证原发性痛经的四物汤类方主要活性成分网络药理学分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 113-120.
- [46] 卢雯平, 林洪生. 160 例乳腺癌术后血行转移患者中医辨证分型的研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(6): 425-426.
- [47] 杨海燕, 童彩玲, 楚爱景, 等. 桃红四物汤对乳腺癌血管生成的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6): 623-626.
- [48] 杨海燕, 童彩玲, 黄梅. 桃红四物汤配合新辅助化疗治疗瘀血内阻型乳腺癌的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(10): 1327-1328.
- [49] 万晓燕, 任东峰. 桃红四物汤加味配合功能锻炼治疗乳腺癌术后上肢肿胀 21 例 [J]. 吉林中医药, 2007, 27(11): 30.
- [50] 陈鹤汀, 胡庚坤, 王振东, 等. 桃红四物汤治疗乳腺癌术后皮瓣血运障碍 40 例 [J]. 河北职工医学院学报, 2003, 20(1): 29.
- [51] 胡建荣. 桃红四物汤联合氨氯地平治疗高血压合并冠心病临床观察 [J]. 光明中医, 2018, 33(22): 3383-3385.
- [52] 历飞. 真武汤合桃红四物汤治疗阳虚血瘀型慢性射血分数降低性心力衰竭的疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2018, 13(9): 6-8.
- [53] 谭琰. “解毒通络”方药栀子与三七配伍防治阿尔茨海默症的作用效果和机制探究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[责任编辑 潘明佳]