

基于网络药理学与分子对接技术探讨川蛭通络胶囊干预微循环障碍的机制研究

牟艳芳¹, 陈文璐^{2#}, 周冰¹, 李小倩², 库亚萍³, 李冰^{1,4*}, 李莎莎², 严诗楷⁴

1. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510006

3. 临沂市人民医院, 山东 临沂 276000

4. 上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要: **目的** 基于网络药理学与分子对接技术探讨川蛭通络胶囊干预微循环障碍的作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库及文献检索收集川蛭通络胶囊化学成分信息; 在 PubChem、SwissTargetPrediction、GeneCards 等数据库收集化学成分作用靶点及微循环障碍靶点; 利用 DAVID 数据库对共有靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 使用 Cytoscape 软件构建相关网络图, 筛选主要成分、靶点进行分子对接研究。**结果** 共整理得到川蛭通络胶囊的 150 个成分及其对应的 480 个靶点, 微循环障碍靶点 154 个, 二者共同靶点 32 个, 富集分析发现共同靶点主要参与血压调节、缺氧应答等生物过程, 以及催乳素信号通路、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) - 信号传导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、肾素-血管紧张素系统等信号通路。分子对接结果显示, 亚麻油酸乙酯、木犀草素、丹酚酸 J 等成分能与前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)、凝血因子 2 (coagulation factor 2, F2) 等靶点良好对接。**结论** 川蛭通络胶囊可能是通过亚麻油酸乙酯、木犀草素、丹酚酸 J 等关键成分作用于 PTGS2、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、STAT3、ACE、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、F2 等靶点改善氧化应激、减轻炎症反应, 从而干预微循环障碍。

关键词: 川蛭通络胶囊; 微循环障碍; 网络药理学; 分子对接; 亚麻油酸乙酯; 木犀草素; 丹酚酸 J

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7550-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.017

Mechanism of Chuanzhi Tongluo Capsules on microcirculation disturbance based on network pharmacology and molecular docking

MOU Yan-fang¹, CHEN Wen-lu², ZHOU Bing¹, LI Xiao-qian², KU Ya-ping³, LI Bing^{1,4}, LI Sha-sha², YAN Shi-kai⁴

1. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., Linyi 276000, China

2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China

3. Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China

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

Abstract: Objective To explore the mechanism of Chuanzhi Tongluo Capsules (川蛭通络胶囊) on microcirculation dysfunction through network pharmacology and molecular docking. **Methods** The compounds information of Chuanzhi Tongluo Capsules was summarized by TCMSP database and literature retrieval. The targets of compounds and microcirculation dysfunction were collected by PubChem, SwissTargetPrediction, GeneCards databases. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 广东省中医药防治难治性慢病重点实验室项目 (2018B030322012)

作者简介: 牟艳芳 (1983—), 女, 工程师, 从事中药研发。E-mail: lncattleya@163.com

*通信作者: 李冰, 男, 高级工程师, 从事中医药系统生物学研究。E-mail: libingt@126.com

#共同第一作者: 陈文璐 (1996—), 女, 硕士研究生, 从事中医药系统生物学研究。E-mail: chenwenlu2266@163.com

genomes (KEGG) pathway analysis of common targets were performed using DAVID database. Cytoscape was used to construct the relevant network diagram, and the major components and targets were screened for molecular docking. **Results** A total of 150 compounds of Chuanzhi Tongluo Capsules and its corresponding 480 targets, 154 microcirculation dysfunction targets, and 32 common targets were obtained. Enrichment analysis showed that the common targets were mainly involved in biological processes such as regulation of blood pressure and response to hypoxia, as well as prolactin signaling pathway, Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, adipocytokine signaling pathway, and renin-angiotensin system. Molecular docking results showed that mandenol, luteolin, salvianolic acid J and other components could dock well with prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), angiotensin converting enzyme (ACE) and coagulation factor 2 (F2). **Conclusion** Chuanzhi Tongluo Capsules might intervene in microcirculation dysfunction by acting on PTGS2, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), STAT3, ACE, heme oxygenase 1 (HMOX1), F2 through key components such as mandenol, luteolin and salvianolic acid J.

Key words: Chuanzhi Tongluo Capsules; microcirculation dysfunction; network pharmacology; molecular docking; mandenol; luteolin; salvianolic acid J

微循环是指微动脉和微静脉之间的血液循环，属于体循环的末端血管网络，由直径小于 20 μm 的微血管组成，主要包括微动脉、毛细血管后小静脉、毛细血管及其（亚）细胞成分等，帮助物质转换以支持细胞、组织功能^[1]。微循环障碍则是指其管道、血流或功能异常，导致内皮细胞损伤、血流减少等^[2]，参与阿尔兹海默症^[3]、心肌缺血^[4]、心衰^[5]、糖尿病^[6]、高胆固醇血症^[7]、脓毒症^[8]等神经系统、循环系统、全身炎症反应等多种疾病的发生发展。

现代医学一般采用保护微血管结构、改善血流动力学及血液流变性等方法改善微循环障碍，针对特定病理环节做出干预。而中医药则从整体观念、多靶点协同作用等方面综合改善微循环障碍。微血管在解剖结构上类似于“络脉”，《灵枢·脉度》中有言“经脉为里，支而横者为络，络之别者为孙”，络脉为机体经脉的分支，能够运行气血、沟通表里上下，所以当络脉结构及功能异常时，易出现气血运行不畅，导致微循环障碍。微循环障碍在中医中类似“血瘀证”，治疗从改善血流、抗凝等考虑，即为“活血化瘀”^[9-10]。

川蛭通络胶囊由水蛭、川芎、丹参、黄芪配伍组成，具有活血化瘀、益气通络的功效，临床用于治疗中风病中经络（脑梗塞）恢复期血瘀气虚证，质量控制标准按照《国家食品药品监督管理局标准 YBZ00482009》执行。水蛭可破血、逐瘀，川芎、丹参、黄芪共奏行气活血祛瘀之功。临床研究表明川蛭通络胶囊联合化学药治疗急性脑梗死效果优于化学药组，能够显著降低炎症指标，有效改善患者神经功能^[11-12]。微循环障碍是脑梗死发病及继发性损害的重要环节，改善内皮细胞缺血、缺氧及抗炎

等都是保护微循环的措施^[13]，基于此，本研究拟采用网络药理学^[14]及分子对接技术探索川蛭通络胶囊干预微循环障碍的机制，为川蛭通络胶囊的临床应用提供科学依据。

1 方法

1.1 川蛭通络胶囊成分库建立

通过 TCMSP 2.3 数据库^[15] (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 及文献检索，收集川蛭通络胶囊各个药物的成分。其中，口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为 TCMSP 数据库的筛选条件。

1.2 靶点库建立

通过 PubChem 数据库^[16] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到药物成分的 SMILES 字符串，输入 SwissTargetPrediction 网站^[17] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行化合物的靶点预测，整理得到川蛭通络胶囊成分靶点库。

以“microcirculation dysfunction”为关键词，在 GeneCards 5.5 数据库^[18] (<https://www.genecards.org/>) 检索，选取相关性分数 > 5 的靶点建立微循环障碍靶点库。

借助 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 网站将川蛭通络胶囊药物成分靶点与微循环障碍靶点进行交集，得到二者共同靶点。

1.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

将共同靶点输入 DAVID 6.8 数据库^[19] (<https://david.ncifcrf.gov/>)，设置标识符为

“OFFICIAL GENE SYMBOL”、物种选择为“homo sapiens”，其余保持默认，进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。

1.4 网络构建

采用 Cytoscape 3.7.2 软件^[20]将结果进行可视化，构建“中药-成分-共同靶点”“共同靶点互相作用”网络图，通过软件自带插件对网络展开分析，筛选其中度值较高的成分、靶点开展分子对接研究。

1.5 分子对接

通过 TCMSP 数据库及 PubChem 数据库得到川蛭通络胶囊成分的 3D 结构信息，同时通过 PDB 数据库^[21] (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶蛋白的 3D 结

构，使用 OpenBabel 3.0 软件^[22]、AutodockTool 4.0 软件^[23]分别对小分子和靶蛋白进行加氢、去电荷等前处理，借助 PyMOL 2.3.4 软件^[24]插件找到对接活性位点，即可在 Autodock Vina 1.1.2 软件^[25]将处理后的成分与靶蛋白进行分子对接，最后通过 PyMOL 2.3.4 软件将对接结果进行可视化。

2 结果

2.1 川蛭通络胶囊成分库的建立

根据 TCMSP 数据库的检索结果及文献检索^[26]，收集整理并去重后得到川蛭通络胶囊 150 个成分（表 1），其中川芎 7 个、黄芪 20 个、丹参 65 个、水蛭 59 个，1 个成分为川芎和黄芪共有。

表 1 川蛭通络胶囊化学成分

Table 1 Ingredients of Chuanzhi Tongluo Capsules

编号	成分	药物	编号	成分	药物
CZTL1	wallichilide	川芎	CZTL32	dehydrotanshinone IIa	丹参
CZTL2	senkyunone	川芎	CZTL33	baicalin	丹参
CZTL3	perloyrine	川芎	CZTL34	digallate	丹参
CZTL4	myricanone	川芎	CZTL35	luteolin	丹参
CZTL5	mandenol	川芎	CZTL36	α -amyrin	丹参
CZTL6	sitosterol	川芎	CZTL37	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	丹参
CZTL7	FA	川芎、黄芪	CZTL38	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	丹参
CZTL8	bifendate	黄芪	CZTL39	3 α -hydroxytanshinone IIa	丹参
CZTL9	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	黄芪	CZTL40	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	丹参
CZTL10	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	黄芪	CZTL41	4-methylenemiltirone	丹参
CZTL11	hederagenin	黄芪	CZTL42	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	丹参
CZTL12	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	黄芪	CZTL43	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester	丹参
CZTL13	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	黄芪	CZTL44	formyltanshinone	丹参
CZTL14	kaempferol	黄芪	CZTL45	3-beta-hydroxymethylenetanshinquinone	丹参
CZTL15	quercetin	黄芪	CZTL46	methylenetanshinquinone	丹参
CZTL16	calycosin	黄芪	CZTL47	przewalskin A	丹参
CZTL17	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside	黄芪	CZTL48	przewalskin B	丹参
CZTL18	isorhamnetin	黄芪	CZTL49	przewaquinone B	丹参
CZTL19	jaranol	黄芪	CZTL50	przewaquinone C	丹参
CZTL20	3,9-di-O-methylnissolin	黄芪	CZTL51	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	丹参
CZTL21	mairin	黄芪	CZTL52	przewaquinone f	丹参
CZTL22	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	黄芪	CZTL53	sclareol	丹参
CZTL23	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	黄芪	CZTL54	tanshinolaldehyde	丹参
CZTL24	formononetin	黄芪	CZTL55	danshenol B	丹参
CZTL25	7-O-methylisomucronulatol	黄芪	CZTL56	danshenol A	丹参
CZTL26	isoflavanone	黄芪	CZTL57	salvilenone	丹参
CZTL27	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	丹参	CZTL58	cryptotanshinone	丹参
CZTL28	poriferasterol	丹参	CZTL59	danshenxinkun C	丹参
CZTL29	poriferast-5-en-3beta-ol	丹参	CZTL60	danshenspiroketallactone	丹参
CZTL30	isoimperatorin	丹参	CZTL61	deoxyneocryptotanshinone	丹参
CZTL31	sugiol	丹参	CZTL62	dihydrotanshinolactone	丹参
			CZTL63	dihydrotanshinone I	丹参

续表 1

编号	成分	药物	编号	成分	药物
CZTL64	epidanshenspiroketallactone	丹参	CZTL104	13-docosenoic acid methyl ester	水蛭
CZTL65	C09092	丹参	CZTL105	campesterol	水蛭
CZTL66	isocryptotanshi-none	丹参	CZTL106	adenosine	水蛭
CZTL67	isotanshinone II	丹参	CZTL107	L-glutamic acid	水蛭
CZTL68	manool	丹参	CZTL108	methyl 12-methyltetradecanoate	水蛭
CZTL69	microstegiol	丹参	CZTL109	methyl 14-methylpentadecanoate	水蛭
CZTL70	miltionone I	丹参	CZTL110	methyl heptadecanoate	水蛭
CZTL71	miltionone II	丹参	CZTL111	2-piperidone	水蛭
CZTL72	miltipolone	丹参	CZTL112	indole-3-carboxaldehyde	水蛭
CZTL73	miltirone	丹参	CZTL113	methyl stearate	水蛭
CZTL74	miltirone II	丹参	CZTL114	L-arginine	水蛭
CZTL75	neocryptotanshinone II	丹参	CZTL115	L-isoleucine	水蛭
CZTL76	neocryptotanshinone	丹参	CZTL116	L-tryptophan	水蛭
CZTL77	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	丹参	CZTL117	L-threonine	水蛭
CZTL78	prolithospermic acid	丹参	CZTL118	valine	水蛭
CZTL79	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	丹参	CZTL119	L-histidine	水蛭
CZTL80	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	丹参	CZTL120	hexanal	水蛭
CZTL81	salvianolic acid G	丹参	CZTL121	phenylalanine	水蛭
CZTL82	salvianolic acid J	丹参	CZTL122	L-methionine	水蛭
CZTL83	salvilenone I	丹参	CZTL123	L-leucine	水蛭
CZTL84	salviolone	丹参	CZTL124	L-tyrosine	水蛭
CZTL85	NSC 122421	丹参	CZTL125	uridine	水蛭
CZTL86	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	丹参	CZTL126	cholesterol	水蛭
CZTL87	tanshindiol B	丹参	CZTL127	L-lysine	水蛭
CZTL88	przewaquinone E	丹参	CZTL128	L-aspartic acid	水蛭
CZTL89	tanshinone iia	丹参	CZTL129	L-serine	水蛭
CZTL90	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	丹参	CZTL130	L-alanine	水蛭
CZTL91	tanshinone VI	丹参	CZTL131	xanthine	水蛭
CZTL92	inosine	水蛭	CZTL132	uracil	水蛭
CZTL93	hypoxanthine	水蛭	CZTL133	taurine	水蛭
CZTL94	hementin	水蛭	CZTL134	butanedioic acid	水蛭
CZTL95	cholesterol	水蛭	CZTL135	palmitic acid	水蛭
CZTL96	hirudinoidine B	水蛭	CZTL136	nicotinic acid	水蛭
CZTL97	hirudinoidine A	水蛭	CZTL137	histamine	水蛭
CZTL98	hirudinoidine C	水蛭	CZTL138	heparin	水蛭
CZTL99	methyl 4-methyltetradecanoate	水蛭	CZTL139	glycerol	水蛭
CZTL100	hirudin	水蛭	CZTL140	glycine	水蛭
CZTL101	methyl(Z)-11-hexadecenoate	水蛭	CZTL141	proline	水蛭
CZTL102	cholesta-5,7-dien-3-one	水蛭	CZTL142	cystine	水蛭
CZTL103	13-octadecenoic acid methyl ester	水蛭	CZTL143	adenine	水蛭
			CZTL144	hexadecyl glyceryl ether	水蛭
			CZTL145	methyl 10-nonadecenoate	水蛭
			CZTL146	methyl 11-methyl hexadecanoate	水蛭
			CZTL147	methyl 14-methyl hexadecanoate	水蛭
			CZTL148	2-hydroxypurine nucleoside	水蛭
			CZTL149	2-hydroxypurine nucleoside 2-acetoxy-7,9-methyl19-enoate	水蛭
			CZTL150	indole-3-formic acid-O-D-pyranglucoside	水蛭

2.2 靶点库建立

将在 PubChem 数据库得到的 SMILES 字符串输入 SwissTargetPrediction 网站,进行药物成分的作用靶点预测,根据预测得分选取每个成分前 15 个

靶点纳入成分靶点库中,同时删去预测得分为 0 的靶点并进行去重,最终整理得到川蛭通络胶囊成分的作用靶点 480 个。

以“microcirculation dysfunction”为关键词输入

GeneCards 数据库检索得到相关靶点 1054 个, 筛选其中相关性分数 > 5 分的 154 个靶点建立微循环障碍靶点库。

借助 Venny 2.1 网站将川蛭通络胶囊药物成分靶点与微循环障碍靶点进行交集, 得到二者共同靶点 32 个, 分别为血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor γ , PPAR γ)、磷酸二酯酶 5A (recombinant phosphodiesterase 5A, PDE5A)、淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2)、酪氨酸羟化酶 (tyrosine 3 hydroxylase, TH)、凝血因子 2 (coagulation factor 2, F2)、孤儿受体酪氨酸激酶 (orphan receptor tyrosine kinase, RET)、信号和传导转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、胸苷磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TYMP)、NOS1、血纤维蛋白溶酶原 (plasminogen, PLG)、1 型血管紧张素 II 受体 (type 1 angiotensin II receptor, AGTR1)、STAT1、F3、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase, XDH)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、5-羟色胺受体 2A (hydroxytryptamine 2A receptor, HTR2A)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase mTOR, MTOR)、肾素 (renin, REN)、端粒

酶逆转录酶基因 (telomerase reverse transcriptase, TERT)、MMP1、PPAR α 、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)、二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、细胞周期素 D1 (Cyclin D1, CCND1)。

2.3 富集分析

将 32 个共有靶点导入 DAVID 数据库中, 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。以 P 值作为筛选条件, GO 富集分析分别选取生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell composition, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 的前 10 条通路进行展示, 如图 1 所示, 纵坐标代表富集的通路名称, 横坐标为每条通路上的基因数占共有靶点的比例。根据分析结果, 发现共有靶点可能调控了血压调节、缺氧应答、凋亡过程中半胱氨酸型内肽酶活性的激活、脂多糖反应、正向调控血管平滑肌细胞增殖等 BP, 作用于膜小凹、细胞质、细胞外空间、树突、胞质核周区域等 CC, 参与了酶结合、受体结合、血红素结合、四氢生物蝶呤结合、转录因子结合等 MF。

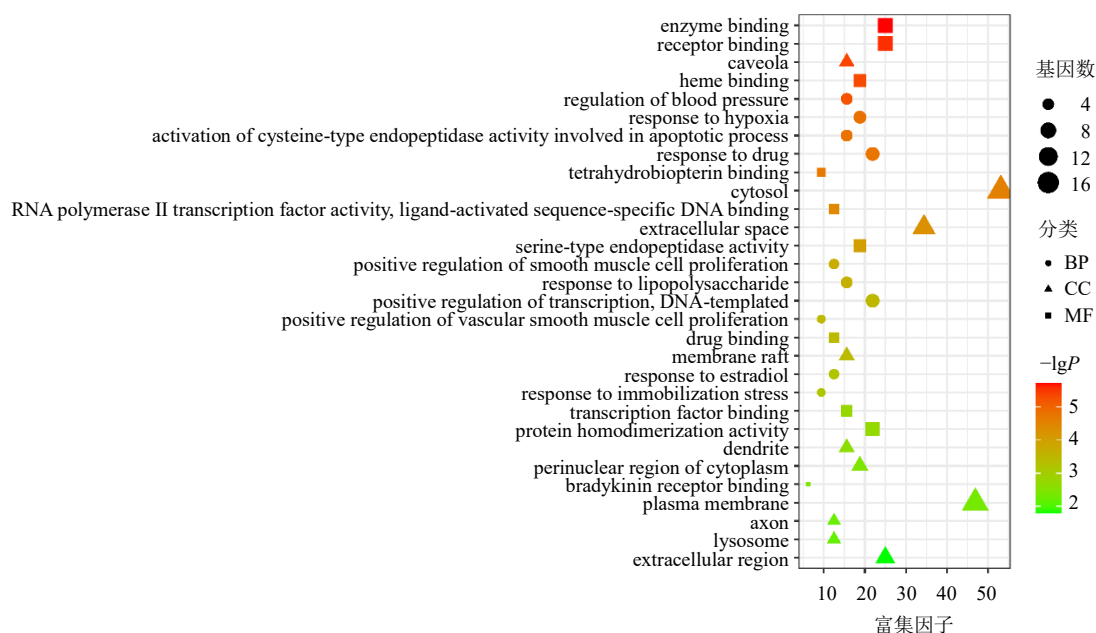


图 1 共有靶点 GO 富集分析

Fig. 1 GO enrichment analysis of common targets

以 P 值作为筛选条件, KEGG 通路分析展示前 20 条通路 (图 2), 纵坐标代表富集的通路名称, 横坐标为每条通路上的基因数占共有靶点的比例。由图 2 可知, 32 个共有靶点主要富集在催乳激素信号通路、JAK-STAT 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、肾素-血管紧张素系统、胰岛素抵抗以及癌症等多种疾病通路上。

2.4 网络构建及分析

将成分、共同靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 剔除与共同靶点无作用关系的成分, 构建“中药-成

分-共同靶点”网络 (图 3) 以及“共同靶点互相作用”网络 (图 4)。

“中药-成分-共同靶点”网络中, 来自川芎、黄芪、丹参、水蛭 4 味中药的 81 个有效成分作用于 32 个靶点, 是中药复方多成分、多靶点共同作用的体现。分析该网络图, 结合度值及中介中心性 (betweenness centrality, BC) 值筛选, 发现 methyl 10-nonadecenoate (CZTL145, 10-十九碳烯酸甲酯, 度值=8, BC=0.064)、hirudinoidine A (CZTL97, 度值=8, BC=0.046)、proline (CZTL141, 脯氨酸, 度值=6, BC=0.047)、13-octadecenoic acid methyl ester (CZTL103, 13-十八烯酸甲酯, 度值=6, BC=0.045)、13-docosenoic acid methyl ester (CZTL104, 13-二十二烯酸甲酯, 度值=6, BC=0.046)、mandenol (CZTL5, 亚麻油酸乙酯, 度值=6, BC=0.040)、methyl (Z)-11-hexadecenoate (CZTL101, 11-十六碳烯酸甲酯, 度值=6, BC=0.045)、luteolin (CZTL35, 木犀草素, 度值=6, BC=0.024)、salvianolic acid J (CZTL82, 丹酚酸 J, 度值=6, BC=0.030)、jaranol (CZTL19, 熊竹素, 度值=4, BC=0.022)、quercetin (CZTL15, 槲皮素, 度值=4, BC=0.020) 等度值及 BC 较大, 推测可能是作用于 32 个共同靶点的关键成分。

对“共同靶点互相作用”网络进行分析发现, PTGS2 (度值=25, BC=0.115)、MMP9 (度值=

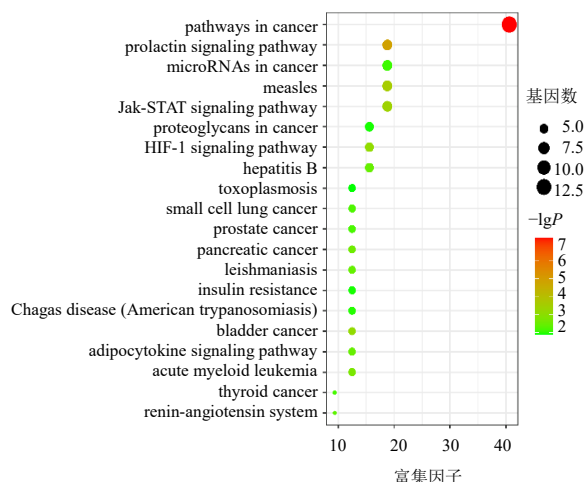


图 2 共有靶点 KEGG 通路分析

Fig. 2 KEGG pathway analysis of common targets

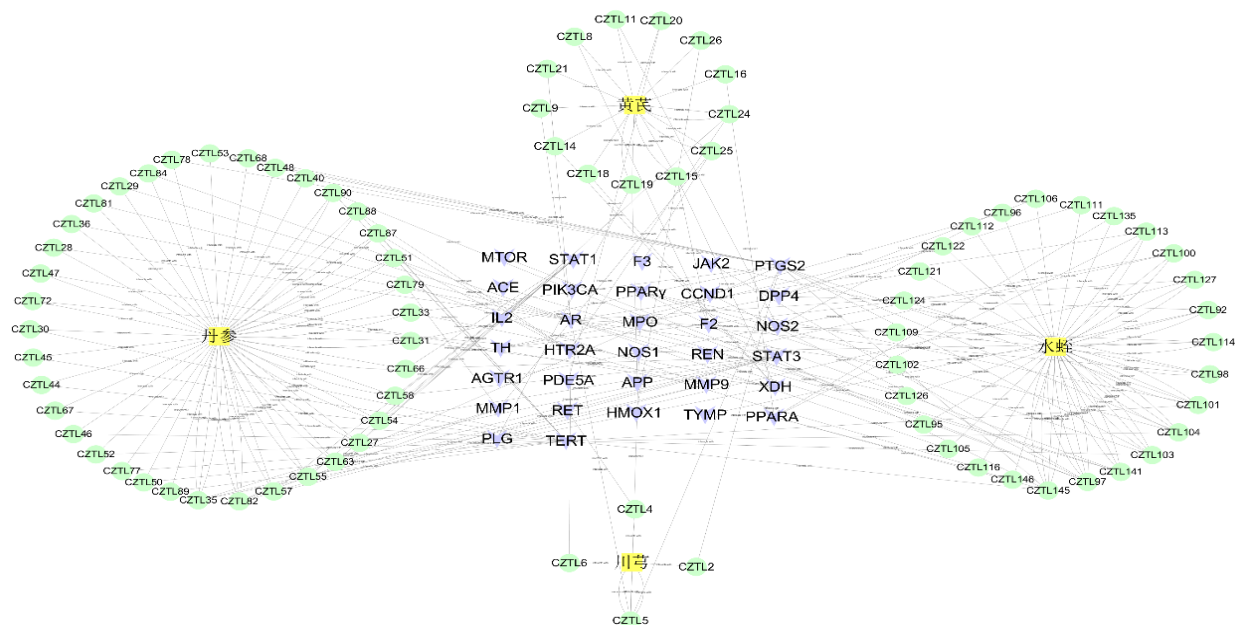


图 3 “中药-成分-共同靶点”网络图

Fig. 3 “Herb-ingredient-common target” network

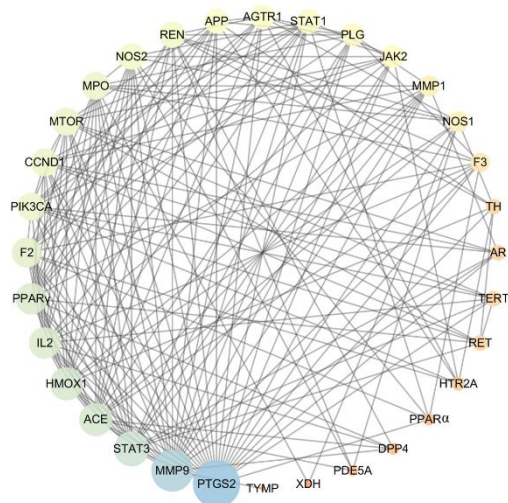


图 4 共有靶点的 PPI 图

Fig. 4 PPI of common targets

22, BC=0.117)、STAT3 (度值=18, BC=0.039)、ACE (度值=17, BC=0.041)、HMOX1 (度值=17, BC=0.030)、IL2 (度值=16, BC=0.034)、PPAR γ (度值=16, BC=0.036)、F2 (度值=15, BC=0.033)、MPO (度值=14, BC=0.050) 等靶点的度值及 BC 较高, 可能在川蛭通络胶囊干预微循环障碍中发挥主要作用。

2.5 分子对接

通过分子对接技术对网络药理学结果进一步分析, 筛选网络中度值较高的成分和靶点进行对接,

对川蛭通络胶囊中成分干预微循环障碍靶点的能力进行预测打分。根据图 3 分析结果, 在选择度值的情况下同时考虑每个药物, 故筛选来自川芎的 CTZL4 (myricanone, 杨梅酮)、CTZL5 (mandenol, 亚麻油酸乙酯), 来自黄芪的 CZTL15 (quercetin, 槲皮素)、CZTL25 (7-O-methylisomucronulatol), 来自丹参的 CZTL35 (luteolin, 木犀草素)、CZTL82 (salvianolic acid J, 丹酚酸 J), 来自水蛭的 CZTL101 [methyl (Z)-11-hexadecenoate, 11-十六碳烯酸甲酯]、CZTL141 (proline, 脯氨酸) 这 8 个成分作为对接成分。根据图 4 分析结果, 选取 PTGS2、MMP9、STAT3、ACE、HMOX1、IL2、PPAR γ 、F2、MPO、PIK3CA 等度值较大的蛋白作为对接靶蛋白, 对接结果以热图形式展示 (图 5)。一般用结合能来评估成分与靶点的结合能力, 结合能<0 表明可以自由结合, 结合能越低表明受体与配体之间的亲和力越大, 二者发生相互作用的可能性就越高。

部分分子对接结合模式见图 6, 其中蓝色为蛋白受体, 绿色为小分子配体, 黄色虚线为形成的氢键, 表示配体与受体之间的结合较稳定。分子对接结果显示成分与靶点能够较好结合。其中, 来自川芎的亚麻油酸乙酯以及来自丹参的木犀草素、丹酚酸 J 与各个靶点的亲和力较好, 而 PTGS2、ACE、F2 等靶点与各成分间的对接结果较好, 可能在川蛭通络胶囊干预微循环障碍中起着较为重要的作用。

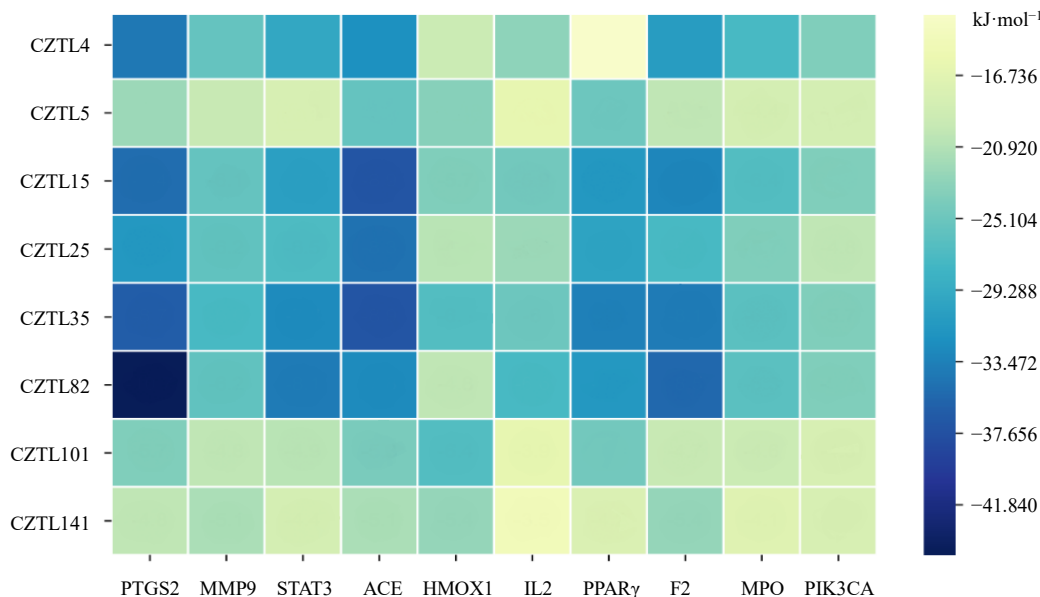
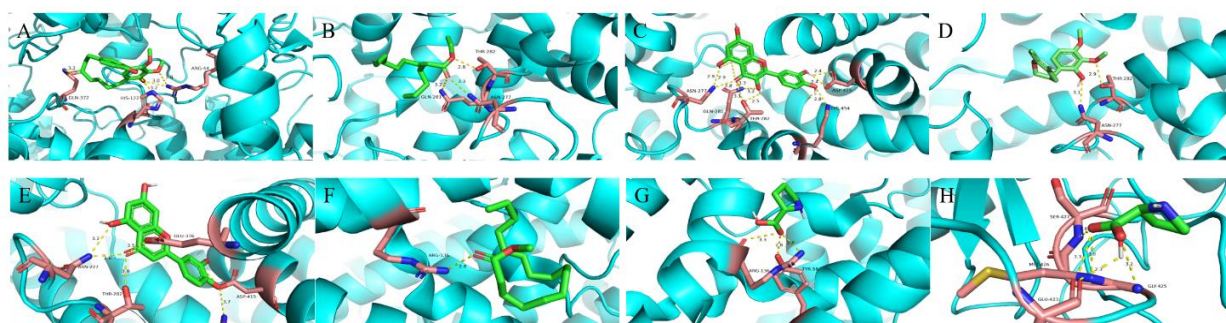


图 5 分子对接结果

Fig. 5 Molecular docking results



A-PTGS2-杨梅酮 B-ACE-亚麻油酸乙酯 C-ACE-槲皮素 D-ACE-7-O-methylisomucronulatol E-ACE-木犀草素 F-HMOX1-methyl (Z)-11-hexadecenoate G-HMOX1-脯氨酸 H-F2-丹酚酸 J
A-PTGS2-myricanone B-ACE-mandenol C-ACE-quercetin D-ACE-7-O-methylisomucronulatol E-ACE-luteolin F-HMOX1-methyl (Z)-11-hexadecenoate G-HMOX1-proline H-F2-salvianolic acid J

图 6 对接结果示意图

Fig. 6 Schematic diagram for molecular docking

3 讨论

3.1 川蛭通络胶囊干预微循环障碍药效成分分析

网络药理学研究结果显示, 10-十九碳烯酸甲酯、hirudinoidine A、脯氨酸、13-十八烯酸甲酯、13-二十二烯酸甲酯、亚麻油酸乙酯、11-十六碳烯酸甲酯、木犀草素、丹酚酸 J、熊竹素、槲皮素等成分可能是川蛭通络胶囊干预微循环障碍的主要成分, 分子对接结果也证明亚麻油酸乙酯、木犀草素、丹酚酸 J、槲皮素等与靶点具有良好的结合能力。

亚麻油酸乙酯属于不饱和脂肪酸, 具有抗菌抗炎特性^[27]。亚麻油酸乙酯不仅能够帮助肝脏分解胆固醇为胆酸并排出体外, 也可以减少进入肝脏的脂肪酸从而降低三酰甘油, 使高脂血症发生几率变小; 除了脂质代谢, 亚麻油酸乙酯还参与蛋白质代谢、促进组织再生^[28]。根据现有报道, 可以推测亚麻油酸乙酯可能通过减轻机体炎性反应, 促进受损内皮细胞恢复等途径来治疗高脂血症等与微循环障碍密切相关的疾病。

木犀草素是具有多种药理活性如抗癌、抗炎的黄酮类化合物。研究表明, 低剂量木犀草素能够抑制 NLRP3 炎症小体激活, 降低 M1 巨噬细胞标志物 (TNF- α 、IL-6 和 iNOS) 的表达, 增强 M2 巨噬细胞标志物 (Arg-1 和 IL-10) 的表达, 促进巨噬细胞向 M2 表型分化, 证实了木犀草素的抗炎活性^[29]。动物实验表明木犀草素可以有效改善脂多糖诱导的心肌损伤小鼠的心脏功能, 减轻线粒体损伤和炎症反应, 减少氧化应激, 抑制心脏细胞凋亡^[30]。另外, 木犀草素还具有神经保护作用, 可缓解脑水肿, 改善神经行为功能障碍和记忆力减退^[31]。以上研究可

以表明木犀草素可能是川蛭通络胶囊治疗与微循环障碍相关的循环系统及神经系统疾病的重要成分。

丹参中的酚酸类化合物有良好的抗氧化活性, 能够保护血管内皮、保护心肌, 对心血管疾病具有防治作用, 减轻微循环障碍靶器官损害^[32]。槲皮素是一种多酚类黄酮化合物, 能够通过调节谷胱甘肽活性、清除活性氧从而抵抗氧化损伤^[33]; 另外, 槲皮素还具有抗炎、抗阿尔茨海默病、抗糖尿病、抗高血压、心血管保护作用^[34]。川蛭通络胶囊有效成分可能是通过抗炎、抗氧化作用, 减少和修复微血管损伤, 从而干预微循环障碍。

3.2 川蛭通络胶囊干预微循环障碍关键靶点分析

根据网络分析和分子对接验证, 发现 PTGS2、MMP9、STAT3、ACE、HMOX1、IL2、PPAR γ 、F2、MPO 等靶点可能是川蛭通络胶囊干预微循环障碍的关键靶点。

MMP9 可以通过影响 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等多种细胞因子、生长因子来发挥作用, 如 MMP9 可以释放血管生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 从而参与血管内皮功能调节; MMP9 还可以降低血脑屏障的通透性, 影响炎症细胞以减少神经炎症, 通过 CAV-1/VEGF 途径促进神经、血管再生, 减少氧化应激损伤等^[35-36]。MMP9 可能通过抗炎、抗氧化, 以保护血管内皮促进其再生, 改善微循环障碍。

HMOX1 是参与血红素降解的关键酶, 是心肌中内源性保护因子, 上调 HMOX1 表达可以抑制心肌细胞的凋亡, 保护心肌细胞缺血再灌注损伤^[37];

HMOX 也可以通过干预血红素应激及内质网应激来改善粥样硬化、治疗血管疾病^[38]。F2 则可以诱导血管生成素 II 的表达增加和血管平滑肌细胞增殖,血管生成素 II 参与调节血管通透性和血管生成,并调节血管内皮功能,是血管疾病的重要因子;血管平滑肌细胞增殖会形成纤维帽,稳定动脉粥样硬化斑块、保护斑块不破裂^[39-40]。

MPO 作为炎症标志物,在机体组织、细胞的修复和再生中发挥重要作用。研究表明,MPO 可能通过对细胞外基质的降解,使冠状动脉痉挛、血管内斑块破裂而形成血栓^[41]。临床试验表明,丹参中的丹酚酸 A 能够通过调控过敏毒素 C3a 受体,抑制中性粒细胞中 MPO 的表达,减轻血管疾病风险^[42]。川蛭通络胶囊通过其有效成分,对关键靶蛋白的表达进行调控,参与到保护血管内皮细胞、减少炎症因子表达、减少血栓形成等过程,干预微循环障碍。

3.3 川蛭通络胶囊干预微循环障碍作用机制分析

对 32 个靶点进行富集分析发现,它们可能参与了催乳激素信号通路、JAK-STAT 信号通路、HIF-1 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、肾素-血管紧张素系统、胰岛素抵抗等信号通路,以及血压调节、缺氧应答、凋亡过程中半胱氨酸型内肽酶活性的激活、脂多糖反应、正向调控血管平滑肌细胞增殖等 BP。

HIF-1 是一种异二聚体转录因子,由氧敏感亚基 HIF-1 α 和芳烃核转运蛋白 HIF-1 β 组成。HIF 在转录水平上介导了大多数细胞对缺氧的反应,HIF-1 α 参与机体缺血缺氧等病理状态,也可以调节血管内皮生长因子、促红细胞生成素和糖酵解酶的表达,促进组织重塑,维持机体氧气稳态^[43-44]。组织缺氧在动脉粥样硬化、心力衰竭等多种心血管疾病中均有表现,调控 HIF-1 信号通路可改善机体缺氧状态。HIF-1 不仅与氧化应激状态相关,在炎症中也发挥重要作用,如羟化酶抑制剂可以通过激活 HIF-1 α 途径发挥抗炎作用^[45]。

脂肪组织不仅是能量储存器官,也是重要的内分泌器官,能够分泌激素、细胞因子、细胞外基质、血管活性脂肪因子、抗炎细胞因子等,参与炎症、免疫、糖脂代谢、血压控制等一系列生理病理反应^[46]。而血管周围的脂肪组织作为血管壁的活性成分,可以参与调节血管稳态,影响动脉粥样硬化的发病机制,脂肪组织正常分泌生物活性因子时,血管周围脂肪组织则具有抗动脉粥样硬化的能力,在肥胖等

病理状态下,血管周围脂肪组织则会分泌促炎脂肪因子,诱导内皮功能障碍和炎症细胞浸润,导致微循环障碍的发生^[47]。脂联素作为脂肪细胞分泌较多的细胞因子,在肥胖、II 型糖尿病、心血管疾病中起重要作用,具有胰岛素增敏、抗炎、抗动脉粥样硬化作用^[48]。

血压调节与免疫系统、炎症相互关联,当免疫系统触发炎症过程时机体血压可能升高,导致器官损伤。免疫系统会产生可以杀死病原体的活性氧,但是当免疫系统触发长期炎症时,会增加活性氧的产生引起氧化应激,从而导致内皮功能障碍,影响其调节血管张力、结构的功能。另外,当炎症持续时,一氧化氮生物利用度降低,破坏其作为血管扩张剂的主要功能,使血管松弛和血管舒张作用消失^[49]。

综上,本研究采用网络药理学和分子对接技术,发现川蛭通络胶囊可能通过亚麻油酸乙酯、木犀草素、丹酚酸 J、槲皮素等关键成分,作用于 PTGS2、MMP9、STAT3、ACE、HMOX1、F2 等靶点,通过改善氧化应激、减轻炎症反应等机制发挥保护微血管、改善血流变等作用,从而干预微循环障碍。本研究可为川蛭通络胶囊防治微循环障碍及其他相关疾病的研究及临床应用提供一定的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guven G, Hilty M P, Ince C. Microcirculation: physiology, pathophysiology, and clinical application [J]. *Blood Purif*, 2020, 49(1/2): 143-150.
- [2] 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.
- [3] Toth P, Tarantini S, Csiszar A, et al. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: Mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(1): H1-H20.
- [4] Mejia-Renteria H, Matias-Guiu J A, Lauri F, et al. Microcirculatory dysfunction in the heart and the brain [J]. *Minerva Cardioangiol*, 2019, 67(4): 318-329.
- [5] Miličić D, Jakuš N, Fabijanović D. Microcirculation and heart failure [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(25): 2954-2959.
- [6] Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, et al. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(6): 1901-1929.

- [7] Padró T, Vilahur G, Badimon L. Dyslipidemias and microcirculation [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(25): 2921-2926.
- [8] Miranda M, Balarini M, Caixeta D, *et al.* Microcirculatory dysfunction in sepsis: Pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 311(1): H24-H35.
- [9] 徐家淳, 覃启京, 孙伟明, 等. 脑梗死后大脑微循环障碍与中医学“通络”之探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(1): 78-80.
- [10] 张米锋, 徐霄龙, 郭玉红, 等. 微循环障碍的中医药治疗进展 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(8): 1496-1500.
- [11] 王世俊, 孙科, 王永革. 川蛭通络胶囊联合长春西汀治疗脑梗死恢复期的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(9): 1821-1825.
- [12] 王健康, 李静. 川蛭通络胶囊联合瑞舒伐他汀对血脂水平正常急性脑梗死患者神经功能的影响 [J]. 中国社区医师, 2021, 37(3): 127-128.
- [13] 黄如训, 王新. 脑梗死的微循环改变及其治疗 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2004, 30(4): 315-316.
- [14] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [15] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [16] Li Q, Cheng T, Wang Y, *et al.* PubChem as a public resource for drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(23/24): 1052-1057.
- [17] Zoete V, Daina A, Bovigny C, *et al.* SwissSimilarity: A web tool for low to ultra high throughput ligand-based virtual screening [J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(8): 1399-1404.
- [18] Safran M, Solomon I, Shmueli O, *et al.* GeneCards 2002: Towards a complete, object-oriented, human gene compendium [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1542-1543.
- [19] Huang da W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [20] Lopes C T, Franz M, Kazi F, *et al.* Cytoscape Web: An interactive web-based network browser [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(18): 2347-2348.
- [21] Joosten R P, Long F, Murshudov G N, *et al.* The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization [J]. *IUCrJ*, 2014, 1(Pt 4): 213-220.
- [22] O'Boyle N M, Banck M, James C A, *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox [J]. *J Cheminform*, 2011, 3: 33.
- [23] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [24] Lill M A, Danielson M L. Computer-aided drug design platform using PyMOL [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2011, 25(1): 13-19.
- [25] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [26] 姜妍, 连妍洁, 佟彤, 等. 基于网络药理学分析“黄芪-水蛭”药对治疗气虚血瘀型冠心病作用机制 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(2): 306-315.
- [27] Ko G A, Kim Cho S. Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(1): 53-61.
- [28] 邱建利, 张慧娟, 赵倩义, 等. 基于网络药理学的川芎作用机制研究 [J]. 医药论坛杂志, 2021, 42(7): 1-6.
- [29] Zhang B C, Li Z, Xu W, *et al.* Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1): 265-273.
- [30] Wu B, Song H, Fan M, *et al.* Luteolin attenuates sepsis-induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(5): 1477-1487.
- [31] Tan X, Yang Y, Xu J, *et al.* Luteolin exerts neuroprotection via modulation of the p62/Keap1/Nrf2 pathway in intracerebral hemorrhage [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1551.
- [32] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
- [33] Xu D, Hu M J, Wang Y Q, *et al.* Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1123.
- [34] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 4.
- [35] Meschiari C A, Ero O K, Pan H, *et al.* The impact of aging on cardiac extracellular matrix [J]. *Geroscience*, 2017, 39(1): 7-18.
- [36] Huang Q, Zhong W, Hu Z, *et al.* A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 348.
- [37] 代天, 杨萍, 刘波, 等. miR-1224-5p 靶向调控 HMOX1 基因对心肌细胞缺血再灌注损伤的影响 [J]. 河北医药, 2021, 43(3): 325-329.
- [38] Gáll, Balla, Balla. Heme, heme oxygenase, and endoplasmic Reticulum stress—A new insight into the pathophysiology of vascular diseases [J]. *Int J Mol Sci*,

- 2019, 20(15): 3675.
- [39] Akwii R G, Sajib M S, Zahra F T, *et al.* Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 471.
- [40] 柳丽, 黄菁菁, 李晓庆, 等. 血管平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 实用老年医学, 2021, 35(4): 414-418.
- [41] 古丽扎·哈米提, 高英, 玛丽亚尔·斯拉木, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清 MPO 和外周血 NK 细胞水平与心肌损伤程度的相关性 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20(6): 541-544.
- [42] 马璐璐, 陈璐, 张璐莎, 等. 丹酚酸 A 调控 C3aR 的表达治疗缺血性疾病作用机制研究 [J]. 中医学报, 2021, 36(6): 1261-1266.
- [43] Zhang Z, Yao L, Yang J H, *et al.* PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3547-3554.
- [44] Hayashi Y, Yokota A, Harada H, *et al.* Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1510-1517.
- [45] 朱培, 唐梦燕, 闫东梅. HIF-1 α 及其相关信号转导通路在疾病中的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(13): 1650-1653.
- [46] Recinella L, Orlando G, Ferrante C, *et al.* Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 578966.
- [47] Qi X Y, Qu S L, Xiong W H, *et al.* Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: A double-edged sword [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 134.
- [48] Achari A, Jain S. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1321.
- [49] Agita A, Alsagaff M T. Inflammation, immunity, and hypertension [J]. *Acta Med Indones*, 2017, 49(2): 158-165.
- [责任编辑 李亚楠]