

## • 药理与临床 •

## 基于斑马鱼模型和分子对接技术的心可舒片促血管生成活性成分研究

柳 晴<sup>1,2</sup>, 张 云<sup>2</sup>, 刘可春<sup>2</sup>, 王西新<sup>2</sup>, 张长青<sup>2</sup>, 周洪雷<sup>1\*</sup>, 夏 青<sup>2\*</sup>

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

**摘要:** **目的** 基于斑马鱼模型和分子对接技术研究心可舒片的促血管生成活性成分。**方法** 以人脐静脉内皮细胞 HUVECs 为模型, 采用 CCK-8 与 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒检测细胞活性与增殖能力, 采用划痕实验与 Transwell 实验评价细胞迁移能力, 采用成管实验检测各组细胞成管腔能力, 评价心可舒片对 HUVECs 的促血管生成活性。以斑马鱼为模型, 采用血管内皮细胞生长因子受体抑制剂 PTK787 建立斑马鱼节间血管损伤模型, 根据各组节间血管长度, 评价心可舒片对斑马鱼的促血管生成活性。心可舒片 29 个成分与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 和 VEGFR2 的 7 个晶体结构进行分子对接, 通过打分值与对接能筛选潜在活性成分, 采用斑马鱼模型评价潜在活性成分的促血管生成活性。**结果** 心可舒片可显著提高细胞增殖能力 ( $P < 0.001$ ), 提高细胞迁移能力及成管能力 ( $P < 0.05, 0.001$ ), 恢复 PTK787 造成的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.01, 0.001$ ); 通过分子对接共得到 12 个心可舒片潜在活性成分, 斑马鱼验证结果表明丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷、紫草酸、迷迭香酸和考迈斯托醇可显著恢复 PTK787 诱导的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。**结论** 采用分子对接技术与斑马鱼模型从心可舒片中筛选得到 10 个具有促血管生成作用的活性成分。

**关键词:** 心可舒片; 促血管生成; 人脐静脉内皮细胞; 斑马鱼; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 丹酚酸 D; 葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 3'-羟基葛根素; 大豆苷; 紫草酸; 迷迭香酸; 考迈斯托醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1418-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.017

## Study on angiogenesis promoting active constituents of Xinkeshu Tablets based on zebrafish model and molecular docking technology

LIU Qing<sup>1,2</sup>, ZHANG Yun<sup>2</sup>, LIU Ke-chun<sup>2</sup>, WANG Xi-xin<sup>2</sup>, ZHANG Chang-qing<sup>2</sup>, ZHOU Hong-lei<sup>1</sup>, XIA Qing<sup>2</sup>

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

**Abstract: Objective** To study the potential angiogenesis promoting components of Xinkeshu Tablets (心可舒片, XKS) based on zebrafish model and molecular docking technology. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used as model. The cell viability and proliferation ability of each group was detected by CCK-8 and EdU cell proliferation kit. The cell migration ability of each group was evaluated by wound-healing assay and Transwell test. The tube formation ability of each group was detected by tube formation assay. The angiogenesis promoting activity of XKS on HUVECs was evaluated. Zebrafish was used as model. The model of intersegmental vascular injury in zebrafish was established by using Vatalanib dihydrochloride (PTK787), and angiogenesis promoting activity of XKS on zebrafish was evaluated according to the length of intersegmental vascular in each group. A total of 29 constituents of XKS were obtained. And seven crystal structures of epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular

收稿日期: 2021-10-25

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2021QH155); 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) (2021CXGC010511); 国家重点研发计划 (2018YFC1707300); 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 科教产融合创新试点工程项目 (2020KJC-ZD08); 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 2020 年度生物及生物化学 ESI 培育学科开放课题 (ESIBBC202011)

作者简介: 柳 晴 (1996—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向为中药药效物质与作用机制。Tel: 17862987152 E-mail: Lq9775725@163.com

\*通信作者: 夏 青 (1988—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药效物质与作用机制。E-mail: sdqx1021@163.com

周洪雷 (1967—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药及天然药物有效成分与质量控制。E-mail: zhouhongleitcm@163.com

endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), protein kinase B (AKT) and VEGFR-2 were employed as molecular docking targets. The potential active components were picked out on the basis of docking score and docking energy. The angiogenesis promoting activity of potential active components was evaluated by zebrafish. **Results** The cell proliferation ability in XKS groups was significantly increased ( $P < 0.001$ ). The cell migration and tube forming ability were significantly enhanced ( $P < 0.05, 0.001$ ). The PTK787-induced intersegmental vascular injury in XKS groups was significantly rescued ( $P < 0.01, 0.001$ ). According to the molecular docking results, 12 potential active components of XKS were obtained. In the zebrafish validation experiments, the PTK787-induced intersegmental vascular injury was significantly rescued in salvianolic acid A, salvianolic acid B, salvianolic acid D, puerarin, 3'-methoxy puerarin, 3'-hydroxy puerarin, daidzin, lithospermic acid, rosmarinic acid and coumestrol groups ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** Ten angiogenesis promoting components were screened and verified from XKS by molecular docking technology and zebrafish model. The present study provided reference for clarifying effective substances of XKS in the treatment of cardiovascular diseases.

**Key words:** Xinkeshu Tablets; angiogenesis promotion; HUVECs; zebrafish; salvianolic acid A; salvianolic acid B; salvianolic acid D; puerarin; 3'-methoxy puerarin; 3'-hydroxy puerarin; daidzin; lithospermic acid; rosmarinic acid; coumestrol

我国心血管患病率不断上升, 已成为导致死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。据估计, 我国约有 3.3 亿心血管疾病患者, 其中约 1100 万人患有冠心病<sup>[2]</sup>。冠心病的主要病因是冠状动脉粥样硬化导致血管腔狭窄或阻塞, 引起心肌缺血, 诱发心肌梗死。通过治疗性血管新生, 促进缺血区域血运重建, 已成为缺血性疾病临床治疗和基础研究重点关注的领域<sup>[3]</sup>。血管属于中医的脉或血络。传统中医认为冠心病病机包括瘀血阻络导致的胸痹或心痛等, 临床常采用活血化瘀、祛瘀通络等方法进行治疗<sup>[4]</sup>。心可舒片由丹参、葛根、三七、山楂、木香 5 味药食同源中药组成, 具有活血化瘀、行气止痛的功效, 临床上用于治疗冠心病心绞痛, 疗效确切<sup>[5-6]</sup>。临床研究表明心可舒片能有效改善心绞痛症状, 提高运动耐量, 改善患者血液流变学及炎症状态, 且安全性高<sup>[7]</sup>。现代药理学研究表明, 心可舒片具有抗心肌缺血<sup>[8-9]</sup>、抗心肌缺血再灌注损伤<sup>[9]</sup>、抗焦虑/抑郁<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗血小板聚集<sup>[12]</sup>和内皮保护<sup>[13-14]</sup>等多种药理活性, 但心可舒片促血管生成作用尚无报道。本研究拟通过人脐静脉内皮细胞 HUVECs 和斑马鱼 2 种模型系统评价心可舒片促血管生成活性, 并采用分子对接技术虚拟筛选和斑马鱼实验验证相结合的方法研究心可舒片中具有促血管生成作用的小分子化合物, 为明确心可舒片治疗冠心病心绞痛的作用机制及药效成分提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞与斑马鱼

HUVECs 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 培养至 3~6 代的细胞用于本研究。

转基因斑马鱼 Is5 Tg/+ (AB) 由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供, 该品系斑马鱼可在血管与心脏中表达红色荧光。随机选取健康成年斑马鱼以雌-雄 (1:1) 进行交配产卵 2 h, 收集鱼卵置于斑马鱼恒温 (28 °C) 孵化箱中培养至受精后 21 h (hours post fertilization, hpf)。

### 1.2 药品与试剂

心可舒片 (0.31 g/片, 批号 0191105) 由山东沃华医药科技股份有限公司提供; CCK-8 试剂盒 (批号 10303010130) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (批号 042021210816)、hochest 33342 (批号 81820201204) 和结晶紫 (批号 070920201202) 均购自碧云天生物技术有限公司; DMEM 无糖培养基 (批号 WH01162103SP01) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 FBS00819-1) 购自澳大利亚 AusGenex 公司; 基质胶 (批号 356234) 购自美国 Corning 公司; 人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF, 批号 0331783-3870) 购自近岸蛋白质科技有限公司; 二甲基亚砜 (批号 F508BA0021) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; VEGF 受体抑制剂 PTK787 (批号 L1617021) 购自英国 Abcam 公司; N-苯基硫脲 (N-phenylthiourea, PTU, 批号 BCBW4842) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 对照品葛根素 (批号 DSTDG000201)、3'-甲氧基葛根素 (批号 DST210510-122)、3'-羟基葛根素 (批号 DST200612-075)、大豆苷 (批号 DST200706-019)、3'-甲氧基大豆苷 (批号 DST210825-186)、芒柄花素 (批号 DST201025-011)、丹酚酸 A (批号 DST191205-008)、丹酚酸 B (批号 DSTDD000901)、

丹酚酸 D (批号 DST200328-230)、紫草酸 (批号 DST190926-028)、迷迭香酸 (批号 DSTDM002701)、考迈斯托醇 (批号 DST210824-121) 均购自成都乐美天医药科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。

### 1.3 仪器

倒置荧光显微镜、体视荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Spectra MR 型酶标仪(美国 Dynex 公司); HPG280BX 型光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); Transwell 小室(美国 Corning 公司)。

## 2 方法

### 2.1 基于 HUVECs 模型的心可舒片促血管生成活性评价

**2.1.1 心可舒片醇提物母液的制备** 将心可舒片研磨成均匀细粉, 称取 10 g 细粉于 10 倍量甲醇中浸泡 30 min, 随后超声提取 30 min, 滤过, 药渣重复提取 2 次, 合并滤液, 于旋转蒸发器中浓缩, 最后置于真空干燥箱中干燥。精密称定心可舒片醇提物 5.864 g, 得率为 58.64%。心可舒片醇提物用二甲基亚砜溶解成质量浓度为 1 g/mL 的母液, 于 4 °C 冰箱保存。

**2.1.2 实验分组与给药** 心可舒片醇提物母液用 DMEM 培养基稀释为工作液备用。HUVECs 分为对照组、VEGF 组和心可舒片(12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 组。对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, VEGF 组加入 40 ng/mL VEGF, 心可舒片组分别加入相应质量浓度的心可舒片醇提物工作液。

**2.1.3 CCK-8 法检测细胞活力** 将 HUVECs 以  $3 \times 10^3$  个/孔均匀接种于 96 孔板中, 孵育 4 h 后, 用基础培养基饥饿处理 12 h。按“2.1.2”项下方法分组并给药, 每孔溶液体系为 100  $\mu\text{L}$ 。24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 孵育 3 h, 采用酶标仪检测细胞活力。

**2.1.4 EdU 法检测细胞增殖能力** 按“2.1.3”项下方法处理细胞, 24 h 后, 每孔加入 EdU (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 4 h, 随后细胞经渗透、水洗以及 Click 反应后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  hoechst 333422, 避光孵育 30 min。采用倒置显微镜进行细胞计数。

**2.1.5 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力** 将 HUVECs 以  $2 \times 10^5$  个/孔均匀接种到 6 孔板中, 24 h 后, 细胞生长至完全覆盖孔板底部状态, 使用 200  $\mu\text{L}$  枪头尖端进行划痕处理。按“2.1.2”项下方法分组并给药, 每孔溶液体系为 2 mL。孵育 24 h 后, 用倒置显微镜观察创面愈合情况, 计算划痕面积。

将  $2.5 \times 10^4$  个细胞接种于 Transwell 上室, 下室培养环境按“2.1.2”项下方法分组并给药。24 h 后,

对上室细胞进行固定及结晶紫染色, 采用倒置显微镜对迁移细胞进行计数, 计算迁移率。

**2.1.6 成管性实验** 将 250  $\mu\text{L}$  稀释后的基质胶均匀涂布于 24 孔板底部。30 min 后, 基质胶处于凝固状态。按“2.1.2”项下方法分组并给药, 每孔接种  $7 \times 10^4$  个细胞, 3 h 后采用倒置显微镜观察成管情况并拍照。

**2.1.7 数据处理** 采用 Image-Pro Plus 5.0 软件进行图片分析。实验结果采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析, 结果表示为  $\bar{x} \pm s$ 。组间差异比较采用单因素方差(one-way ANOVA)进行显著性分析。

### 2.2 基于斑马鱼模型的心可舒片促血管生成活性评价

**2.2.1 实验分组与给药** 取“2.1.1”项下的心可舒片醇提物母液, 用新鲜鱼水(5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.16 mmol/L MgSO<sub>4</sub>) 稀释为 2.5 mg/mL 工作液备用。将 21 hpf 斑马鱼幼鱼脱膜, 随机挑选脱膜后的斑马鱼幼鱼置于 24 孔板中, 每孔 10 枚, 分为对照组、模型组和心可舒片(12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 组。对照组给予含 3% PTU 的新鲜鱼水, 模型组和心可舒片组均给予 PTK787, 终质量浓度为 0.175  $\mu\text{g/mL}$ 。心可舒片组同时分别给予新鲜鱼水稀释的心可舒片醇提物工作液, 每孔溶液体系为 2 mL。

**2.2.2 图像采集与数据处理** 按“2.2.1”项下方法进行分组并给药。给药 24 h 后, 在体视荧光显微镜下观察各组斑马鱼节间血管发育情况并拍摄图片。利用 Image-Pro Plus 5.0 软件测量斑马鱼节间血管长度。实验结果采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析, 实验结果表示为  $\bar{x} \pm s$ 。组间差异比较采用单因素方差(One-way ANOVA)进行显著性分析。

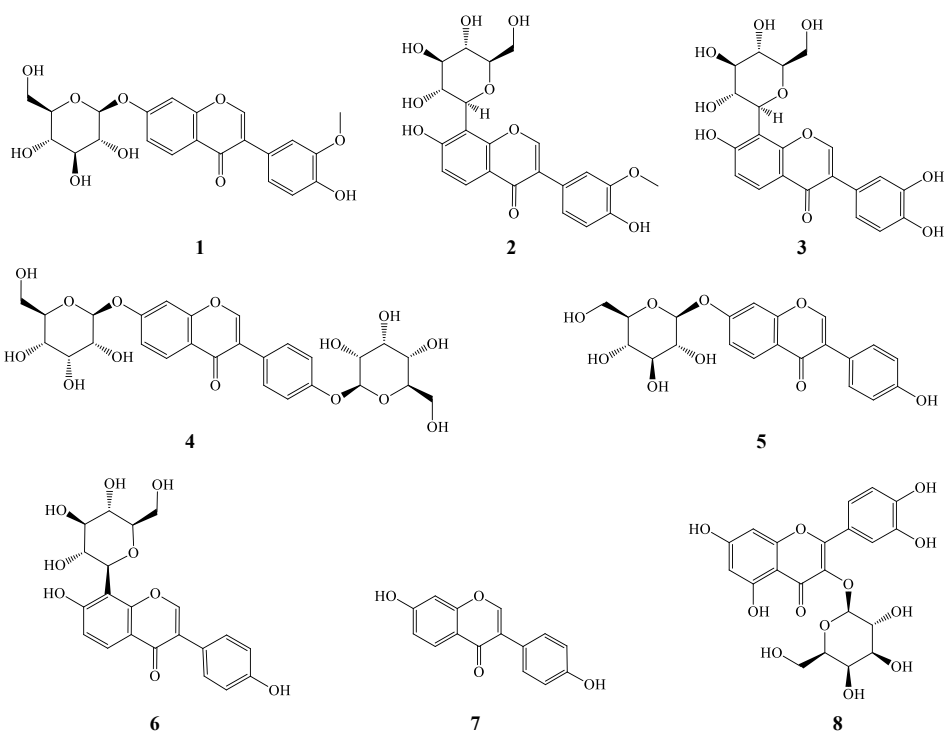
### 2.3 利用分子对接技术预测心可舒片促血管生成活性成分

**2.3.1 化合物收集及配体准备** 本课题组前期利用液质联用技术鉴定出心可舒片中的 105 个化学成分。通过文献检索, 共获得 29 个可能入血的成分<sup>[15-24]</sup>, 主要包括黄酮类、酚酸类、皂苷类等。PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得 29 个化合物的 2D 结构, 并利用 Chem 3D 19.0 软件进行 3D 结构转换, 储存为 mol2 格式。利用 Discovery Studio 2019 软件的 Small Molecules 模块对配体小分子进行加氢, 加电荷处理。具体化合物信息及分类见表 1, 结构式见图 1。

表 1 29 个化合物信息及分类

Table 1 Information and classification of 29 compounds

编号	名称	CAS	类型	PubChem ID
1	3'-甲氧基大豆苷	200127-80-6	黄酮类	10527347
2	3'-甲氧基葛根素	117047-07-1	黄酮类	5319485
3	3'-羟基葛根素	117060-54-5	黄酮类	5748205
4	大豆苷元 4',7-二葡萄糖苷	53681-67-7	黄酮类	171292
5	大豆苷	552-66-9	黄酮类	107971
6	葛根素	3681-99-0	黄酮类	5281807
7	大豆苷元	486-66-8	黄酮类	5281708
8	金丝桃苷	482-36-0	黄酮类	5281643
9	芒柄花素	485-72-3	黄酮类	5280378
10	原儿茶醛	139-85-5	酚酸类	8768
11	原儿茶酸	99-50-3	酚酸类	72
12	咖啡酸	331-39-5	酚酸类	689043
13	丹参素	76822-21-4	酚酸类	11600642
14	丹酚酸 A	96574-01-5	酚酸类	5281793
15	丹酚酸 B	121521-90-2	酚酸类	92132738
16	丹酚酸 D	142998-47-8	酚酸类	11683160
17	紫草酸	28831-65-4	酚酸类	6441498
18	迷迭香酸	20283-92-5	酚酸类	5281792
19	考迈斯托醇	479-13-0	香豆素类	5281707
20	木香炔内酯	553-21-9	倍半萜类	5281437
21	去氢木香内酯	477-43-0	倍半萜类	73174
22	齐墩果酸	508-02-1	三萜类	10494
23	三七皂苷 R <sub>1</sub>	80418-24-2	三萜皂苷类	441934
24	三七皂苷 R <sub>2</sub>	80418-25-3	三萜皂苷类	21599925
25	人参皂苷 Rg <sub>2</sub>	52286-74-5	三萜皂苷类	21599924
26	人参皂苷 Re	52286-59-6	三萜皂苷类	441921
27	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	22427-39-0	三萜皂苷类	441923
28	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	41753-43-9	三萜皂苷类	9898279
29	人参皂苷 Rd	52705-93-8	三萜皂苷类	12855892



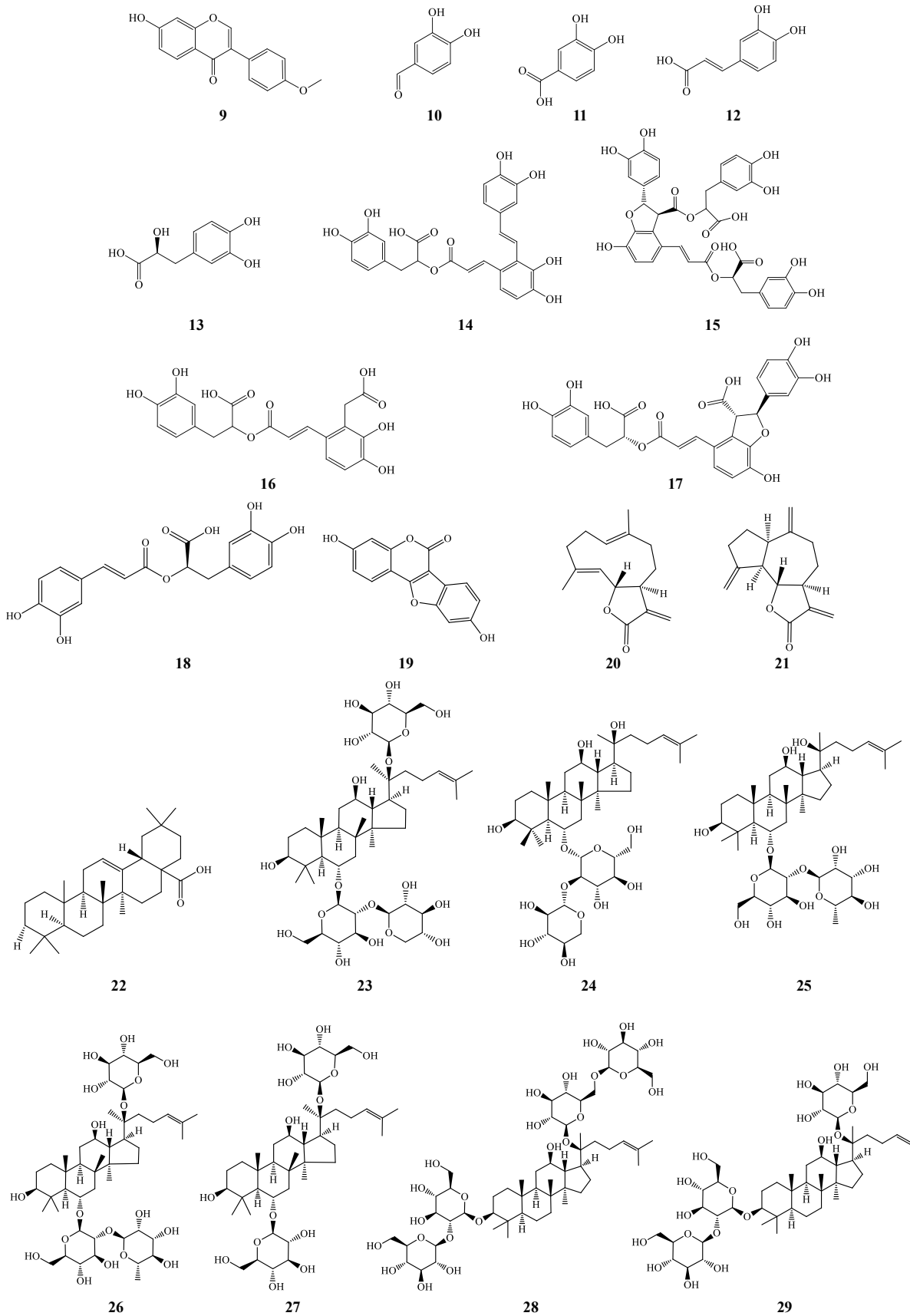


图 1 29 个化合物结构

Fig. 1 Structures of 29 compounds

**2.3.2 靶点蛋白收集及受体准备** 检索文献, 获取与血管生成相关的 4 种蛋白的 7 个晶体结构, 于 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 中获得 7 个晶体结构: 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR, PDB ID: 1M17<sup>[25]</sup>)、血管内皮生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1, PDB ID: 3HNG<sup>[26]</sup>)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT, PDB ID: 3OW4<sup>[27]</sup>)、VEGFR2 (PDB ID: 3B8R<sup>[28]</sup>, 3WZE<sup>[29]</sup>, 4AG8<sup>[30]</sup>, 4ASD<sup>[31]</sup>)。利用 Discovery Studio 2019 软件对受体蛋白进行去水, 去配体。运用 Macromolecules 模块进行各受体蛋白的准备和定义, 获得对接活性口袋。

**2.3.3 分子对接** 利用 Discovery Studio 2019 软件中 Receptor-Ligand Interactions 模块下的 Libdock 模式对 29 个配体进行分子对接, 对接结果以“Ligscore”由高到低排序, 选取与各受体结合分数前 20% 的化合物作为候选潜在活性成分。再次利用 Receptor-Ligand Interactions 模块下的 CDOCKER 模式获取配体与受体之间的对接能, 筛除“-CDOCKER”为负值的成分, 最终获得潜在活性成分, 用于后续实验验证。

**2.4 潜在活性成分的促血管生成活性验证**

**2.4.1 对照品母液的制备** 葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷、3'-甲氧基大豆苷、芒

柄花素、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、紫草酸、迷迭香酸、考迈斯托醇对照品使用二甲基亚砷溶解成 200 mmol/L 的母液, 于 4 °C 冰箱保存。

**2.4.2 实验分组与给药** 取“2.4.1”项下 12 个对照品母液, 用新鲜鱼水稀释为 5 mmol/L 工作液备用。将 21 hpf 斑马鱼幼鱼脱膜, 随机挑选脱膜后的斑马鱼幼鱼置于 24 孔板中, 每孔 10 枚, 分为对照组、模型组和药物处理组。对照组给予含 3% PTU 的新鲜鱼水, 模型组和药物处理组均给予 PTK787, 终质量浓度为 0.175 μg/mL。同时药物处理组分别给予新鲜鱼水稀释的 12 个化合物工作液, 终浓度分别为 25、50、100 μmol/L。每孔溶液体系为 2 mL。

**2.4.3 图像采集与数据处理** 按“2.4.2”项下方法进行分组并给药, 给药 24 h 后, 在体视荧光显微镜下观察各组斑马鱼节间血管发育情况并拍摄图片。利用 Image-Pro Plus 5.0 软件测量斑马鱼节间血管长度。实验结果采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析, 实验结果表示为  $\bar{x} \pm s$ 。组间差异比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 进行显著性分析。

**3 结果**

**3.1 基于 HUVECs 模型的心可舒片促血管生成活性**

**3.1.1 心可舒片增强 HUVECs 活力与增殖能力** 如图 2 所示, 与对照组相比, VEGF 组细胞活力和增殖能力明显增强 ( $P < 0.05, 0.001$ ), 心可舒片各剂量

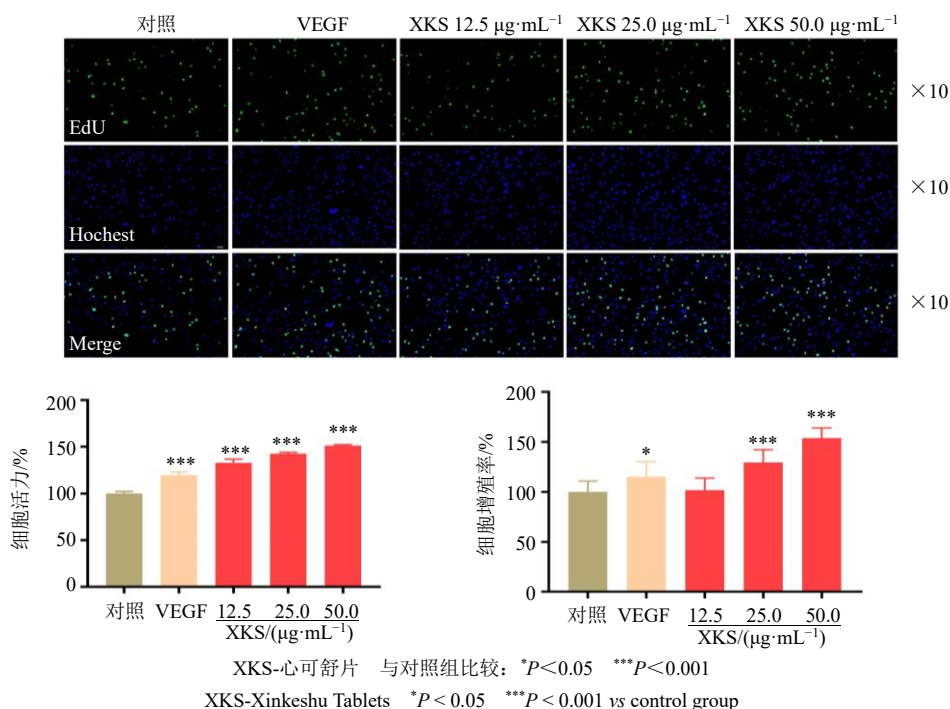


图 2 心可舒片对 HUVECs 活力和增殖能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effect of Xinkeshu Tablets on viability and proliferation of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组细胞活力显著升高 ( $P < 0.001$ ), 心可舒片 (25.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组细胞增殖能力显著增强 ( $P < 0.001$ )。3.1.2 心可舒片促进 HUVECs 迁移 如图 3 所示, 与 0 h 划痕面积相比, 对照组在孵育 24 h 后划痕面积减小。处理 24 h 时, 与对照组比较, VEGF 组和心可舒片 (25.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组划痕面积显著减小

( $P < 0.01$ 、0.001)。Transwell 迁移实验结果表明, 与对照组相比, VEGF 处理 24 h 后由 Transwell 上室穿过聚碳酸酯膜的细胞数量显著增加 ( $P < 0.001$ ), 心可舒片 (12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组细胞迁移数量显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.001)。以上结果表明心可舒片可提高 HUVECs 的迁移能力。

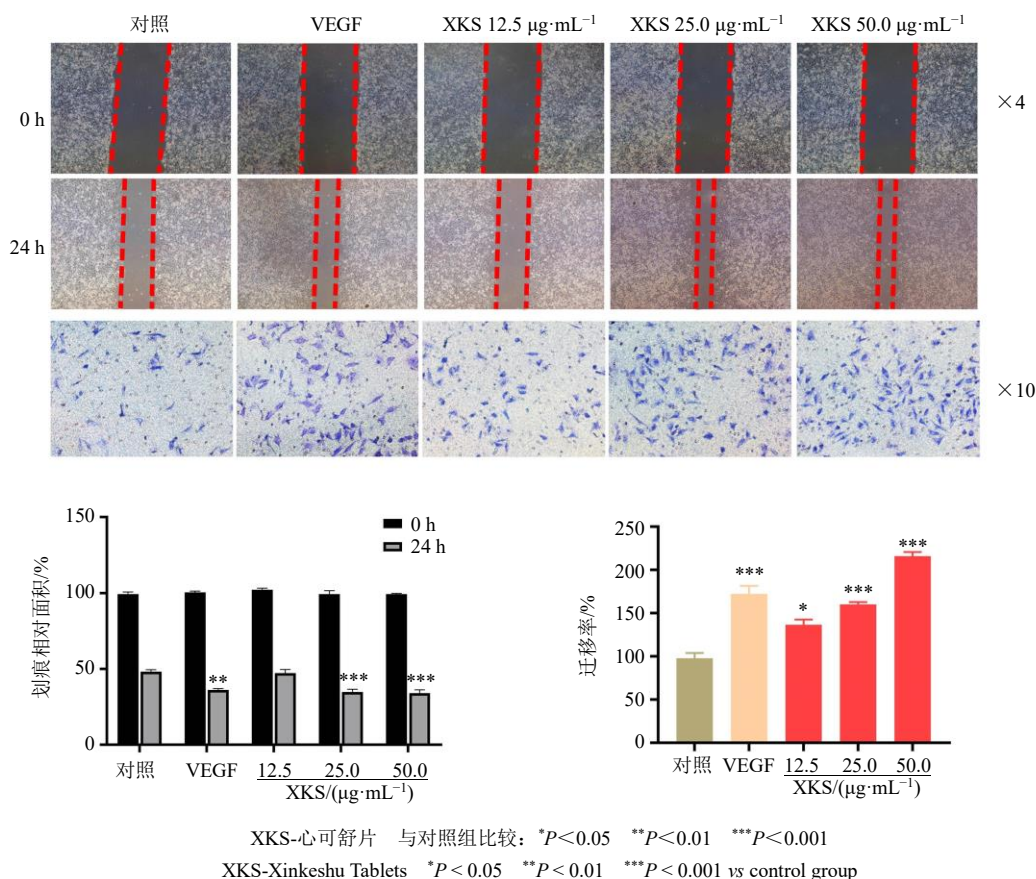


图 3 心可舒片对 HUVECs 迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 3 Effect of Xinkeshu Tablets on migration of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

3.1.3 心可舒片刺激 HUVECs 管腔形成 通过观察细胞在基质胶上的成管状况, 统计已生成小管的长度 (以 1 个节点出现 3 个分支为小管形成标志), 以研究心可舒片对细胞成管能力的影响。如图 4 所示, 孵育 3 h 后, 与对照组相比, VEGF 组和心可舒片 (25.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组小管长度均显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.001)。表明心可舒片可促进 HUVECs 的管腔形成能力。

### 3.2 基于斑马鱼模型的心可舒片促血管生成活性

如图 5 所示, 与对照组比较, PTK787 可显著抑制节间血管的生长 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 心可舒片 (12.5、25.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 均可恢复 PTK787 造成的斑马鱼节间血管损伤, 使血管长度显著增加

( $P < 0.01$ 、0.001)。表明心可舒片具有促斑马鱼节间血管生成活性。

### 3.3 分子对接结果

3.3.1 受体结构活性口袋信息 在 PDB 数据库下载获得 1M17、3HNG、3OW4、3B8R、3WZE、4AG8、4ASD 蛋白的三维结构, 各晶体结构活性口袋坐标及半径等具体信息见表 2。

3.3.2 虚拟筛选结果分析 29 个化合物与 7 个晶体结构以 Libdock 模式进行分子对接, 以 Libscore 打分值构建热图, 见图 6。对接结果显示, 3'-甲氧基大豆苷、大豆苷、迷迭香酸与各受体蛋白均有较好的结合, 且打分值较高; 丹酚酸 D 除与 4AG8 无对接外, 与其他受体蛋白均有较好的结合; 3'-羟基葛

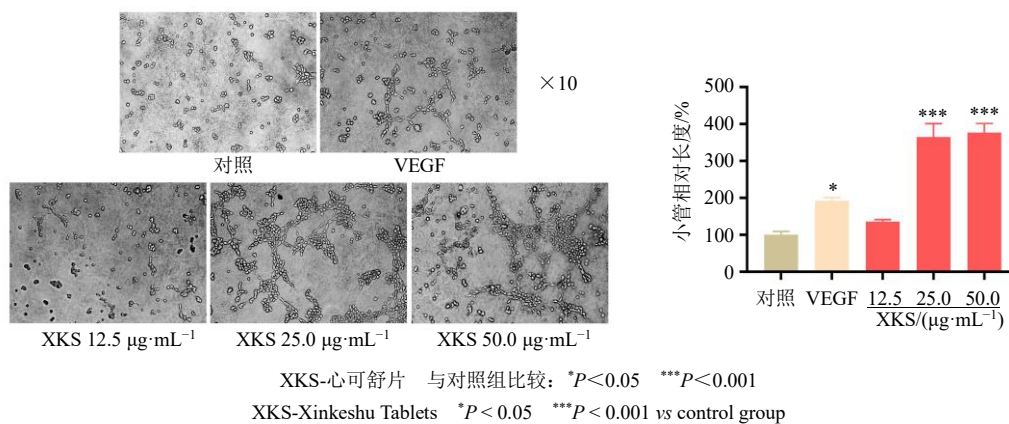
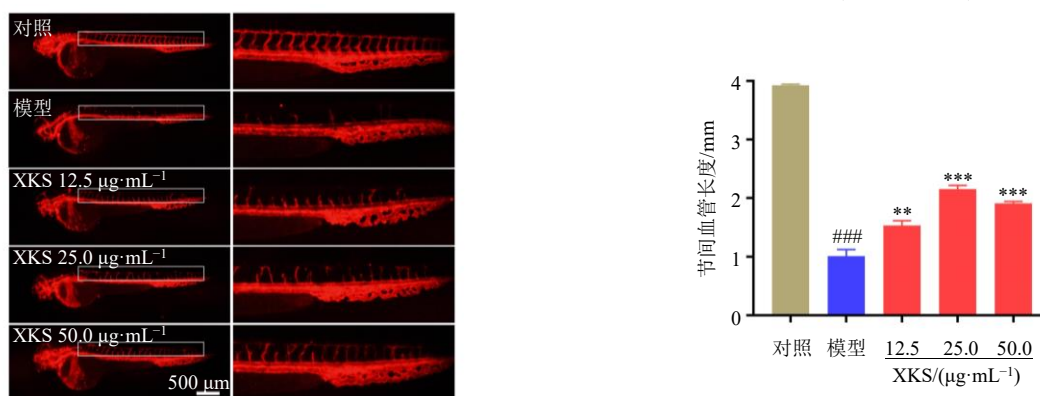


图 4 心可舒片对 HUVECs 成管能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effects of Xinkeshu Tablets on tubes formation of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



XKS-心可舒片 与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$   
 XKS-Xinkeshu Tablets ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

图 5 心可舒片对斑马鱼节间血管生成能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 5 Effect of Xinkeshu Tablets on growth of intersegmental vessels in zebrafish embryos ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表 2 靶点蛋白活性口袋信息

Table 2 Information of active pocket of target protein

蛋白名称	PBD ID	活性口袋半径/nm	活性口袋坐标
EGFR	1M17	98.000	25.721 060、1.259 241、52.633 992
VEGFR1	3HNG	83.000	4.301 986、15.843 237、34.374 188
AKT	3OW4	167.999	55.024 832、0.737 086、18.162 590
VEGFR2	3B8R	142.000	-2.637 332、35.519 000、67.890 929
	3WZE	107.000	21.509 602、25.079 008、39.352 989
	4AG8	138.000	24.321 439、22.953 435、36.629 939
	4ASD	134.000	-25.073 203、-0.922 464、-9.89 9495

根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素与 1M17、3B8R、3HNG、3OW4、3WZE 有较好的结合;此外,丹酚酸 B 与靶蛋白 3OW4 对接打分值最高;大豆苷元 4',7-二葡萄糖苷与靶蛋白 3B8R 对接打分值最高;丹酚酸 D 与靶蛋白 3HNG、3WZE、4ASD 有最高的对接值;大豆苷与靶蛋白 4AG8 有最高对接值。根据各蛋白对接“Libscore”分数由高到低排序,

选取与各受体结合分数前 20%的化合物,其次将“-CDOCKER”为负值的化合物进行筛选,最终得到 12 个 XKS 活性成分候选化合物,分别为丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、紫草酸、迷迭香酸、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基大豆苷、大豆苷、葛根素、考迈斯托醇、芒柄花素;具体 Libscore 分数与-CDOCKER 对接能见表 3。



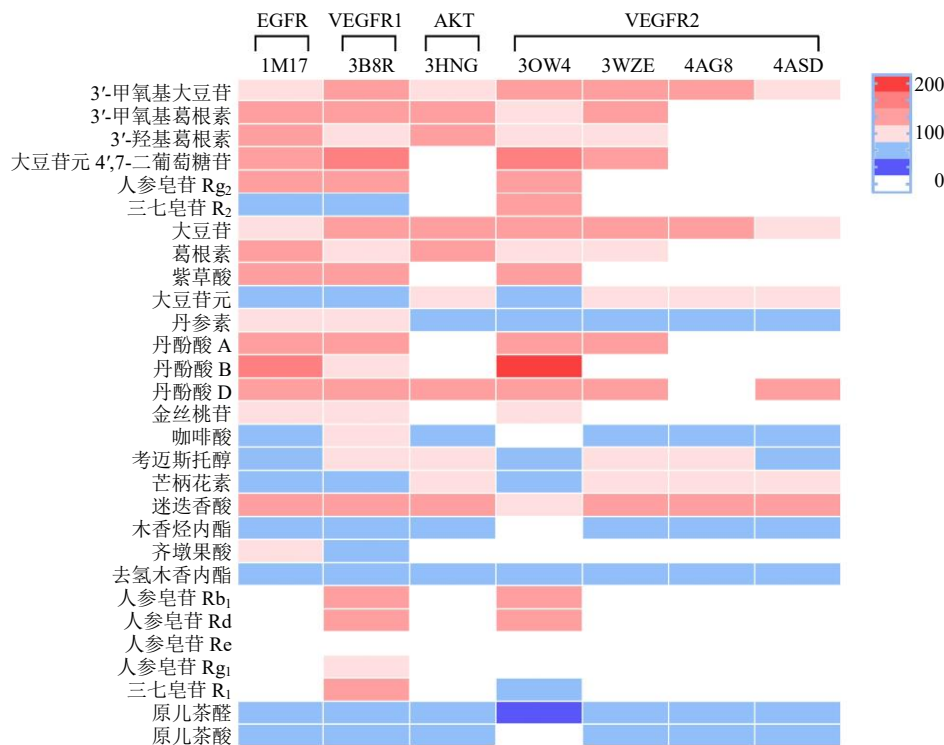


图 6 29 个成分与 7 个靶蛋白对接打分值热图

Fig. 6 Docking score heatmap of 29 components with seven target proteins

表 3 12 个候选化合物与 7 个靶蛋白之间的“Libscore”与“-CDOCKER”

Table 3 “Libscore” and “-CDOCKER” of 12 hits with seven target proteins

化合物	对接靶点	Libscore	-CDOCKER/(kJ·mol <sup>-1</sup> )
丹酚酸 A	1M17	142.983	45.348 7
丹酚酸 D	1M17	140.139	47.901 9
紫草酸	1M17	139.149	41.897 3
丹酚酸 D	3HNG	146.190	50.160 8
3'-甲氧基葛根素	3HNG	138.955	9.133 0
迷迭香酸	3HNG	133.614	50.160 8
3'-羟基葛根素	3HNG	133.236	12.300 8
葛根素	3HNG	129.505	14.703 7
丹酚酸 B	3OW4	180.190	31.755 5
紫草酸	3OW4	147.480	35.018 5
丹酚酸 A	3B8R	149.265	49.245 8
3'-甲氧基大豆苷	3B8R	141.316	15.953 5
紫草酸	3B8R	140.960	33.420 8
丹酚酸 D	3WZE	144.264	39.007 4
3'-甲氧基大豆苷	3WZE	136.947	5.655 6
迷迭香酸	3WZE	129.594	48.517 6
丹酚酸 A	3WZE	128.907	4.163 9
大豆苷	4AG8	147.453	4.130 7
3'-甲氧基大豆苷	4AG8	144.246	0.798 7
迷迭香酸	4AG8	131.851	33.187 0
考迈斯托醇	4AG8	116.715	0.798 7
芒柄花素	4AG8	108.567	30.362 7
丹酚酸 D	4ASD	138.100	22.980 2
迷迭香酸	4ASD	132.406	49.829 1
芒柄花素	4ASD	101.187	21.157 2

**3.3.3 活性成分与靶点对接结果与分析** 如图 7-A 所示,丹酚酸 A 与 1M17 之间的主要作用力有常规氢键、范德华力、 $\pi$ -sigma、 $\pi$ -sulfur、 $\pi$ -alkyl 相互作用,丹酚酸 A 与 1M17 A 链氨基酸残基 THR766、LEU764、MET769 均形成 3 个常规氢键,与 A 链 LEU694 和 GLY695 均形成  $\pi$ -sigma 相互作用,与 1M17 A 链 MET742 形成  $\pi$ -sulfur 相互作用,与 A 链 ALA719、LYS721、LEU764 和 VAL702 均形成  $\pi$ -alkyl 相互作用。

如图 7-B 所示,丹酚酸 A 与 3B8R 之间的主要作用力有常规氢键、碳氢键、范德华力、 $\pi$ -sigma 和  $\pi$ -alkyl 相互作用,与 3B8R B 链氨基酸残基 THR916、VAL914 均形成常规氢键,与 3B8R B 链 CYS919 形成 2 个常规氢键,与 B 链 ILE915 之间存在 1 个碳氢键,与 B 链 LYS868 形成  $\pi$ -sigma 相互作用,并且丹酚酸 A 与 3B8R B 链 VAL848、ALA866、LYS868、ARG1032、LEU840、LEU1035 形成  $\pi$ -alkyl 相互作用。

如图 8-A 所示,丹酚酸 D 与 3HNG 之间的相互作用力有常规氢键、范德华力、 $\pi$ -cation、 $\pi$ -anion、 $\pi$ -alkyl 相互作用,丹酚酸 D 与 3HNG A 链氨基酸残基 ASP1040、ALA859、VAL907 形成常规氢键,与 A 链 ASP1040 形成 2 个常规氢键,与 3HNG A 链 LYS861 形成  $\pi$ -cation 相互作用,与 A 链 PHE1041 形成  $\pi$ -anion 相互作用,与 A 链 LYS861、VAL909 形成  $\pi$ -alkyl 相互作用。

如图 8-B 所示,丹酚酸 B 与 3OW4 之间的相

互作用力除常规氢键作用力外,还有范德华力、盐桥、 $\pi$ -anion、 $\pi$ -sigma、 $\pi$ -alkyl 以及  $\pi$ - $\pi$  堆积作用力,丹酚酸 B 与 3OW4 B 链 LYS276 形成盐桥,与 B 链氨基酸残基 THR160 形成 2 个常规氢键,与 B 链氨基酸残基 GLU234、GLU198 形成常规氢键,与 3OW4 B 链 ASP292 形成  $\pi$ -anion 作用力,与 B 链 GLY159、PHE161 形成  $\pi$ -sigma 作用力,与 B 链 PHE161 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用力,与 B 链 LEU181 形成  $\pi$ -alkyl 作用力。

如图 8-C 所示,丹酚酸 D 与 3WZE 之间的相互作用力除常规氢键作用力外,还有范德华力、 $\pi$ -sigma、 $\pi$ -sulfur、 $\pi$ -alkyl 相互作用,丹酚酸 D 与 3WZE A 链氨基酸残基 HIS1026 形成常规氢键,与 A 链 LEU889、LEU1035 形成  $\pi$ -sigma 作用力,与 A 链 CYS919 形成  $\pi$ -sulfur 作用力,与 A 链 VAL848、ALA866、VAL899、VAL916 形成  $\pi$ -alkyl 作用力。

如图 8-D 所示,大豆苷与 4AG8 之间的相互作用力有常规氢键、范德华力、 $\pi$ -sigma、 $\pi$ - $\pi$  堆积和  $\pi$ -alkyl 相互作用,大豆苷与 4AG8 A 链 Glu885、VAL914、ASP1046 形成 3 个常规氢键,与 4AG8 A 链 VAL867、LYS868、CYS919 形成 3 个碳氢键,与 4AG8 A 链 LEU840 形成  $\pi$ -sigma 作用力,与 4AG8 A 链 PHE1047 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用力,与 4AG8 A 链 LEU840、ALA866、CYS919、LEU1035、VAL848、ALA866、LEU1035 和 CYS1045 形成  $\pi$ -alkyl 作用力。

如图 8-F 所示,丹酚酸 D 与 4ASD 之间的相互

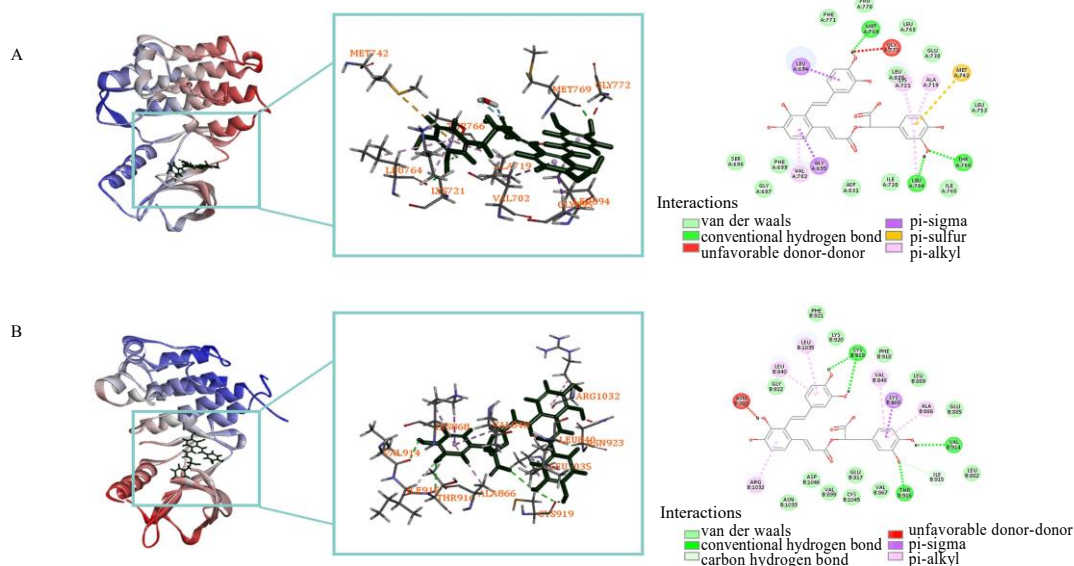


图 7 丹酚酸 A 与 1M17 (A)、3B8R (B) 的分子对接

Fig. 7 Molecular docking of salvanolic acid A with 1M17 (A) and 3B8R (B)

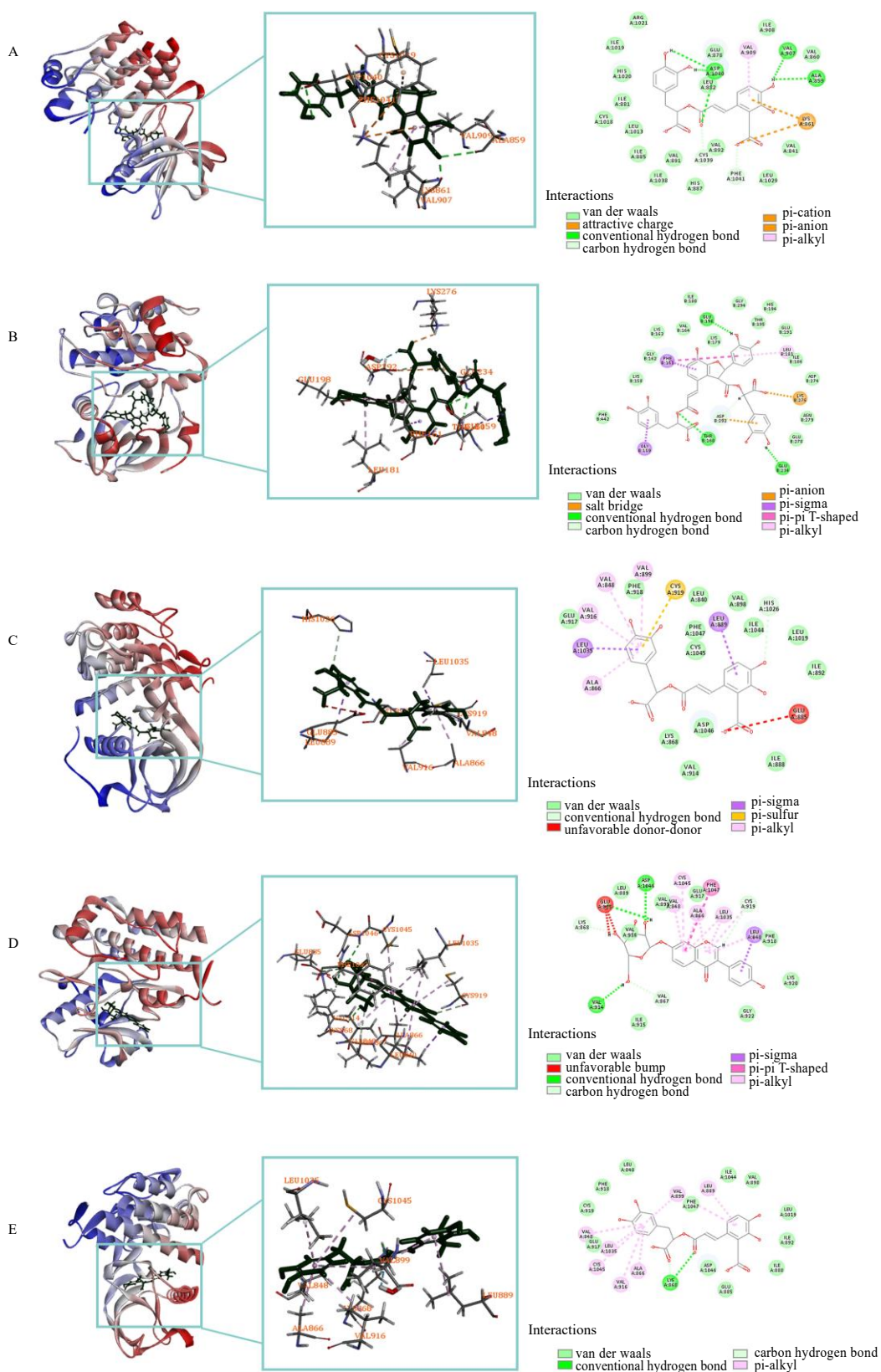


图 8 丹酚酸 D 与 3HNG (A)、丹酚酸 B 与 3OW4 (B)、丹酚酸 D 与 3WZE (C)、大豆苷与 4AG8 (D)、丹酚酸 D 与 4ASD (E) 的分子对接

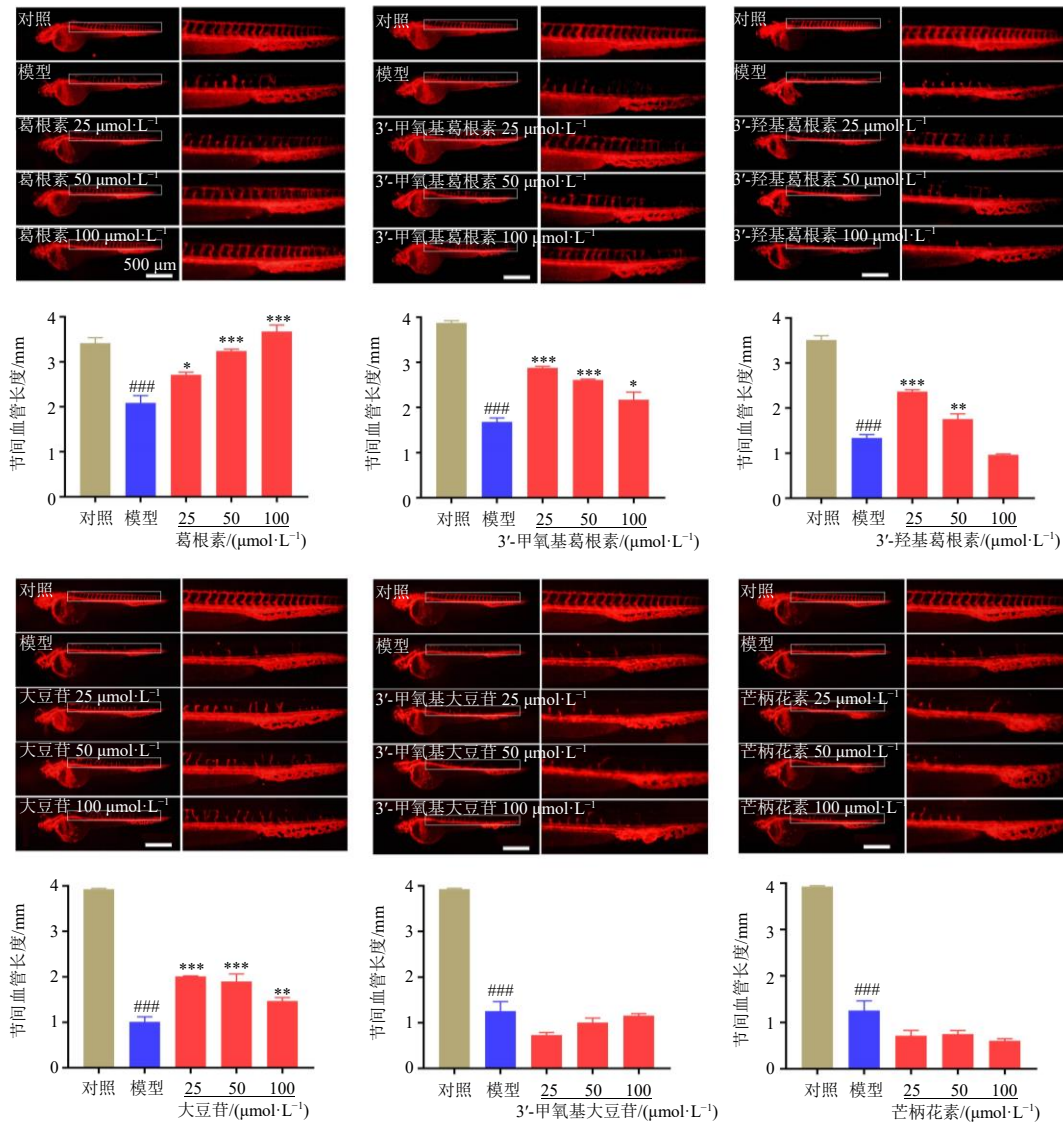
Fig. 8 Molecular docking of salvianolic acid D and 3HNG (A), salvianolic acid B and 3OW4 (B), salvianolic acid D and 3WZE (C), daidzin and 4AG8 (D), salvianolic acid D and 4ASD (E)

作用力有常规氢键、范德华力和  $\pi$ -alkyl 相互作用，丹酚酸 D 与 4ASD A 链 LYS868 形成 1 个常规氢键和 1 个碳氢键，丹酚酸 D 与 4ASD A 链 LEU889、VAL899、VAL848、ALA866、VAL916、LEU1035 和 CYS1045 形成  $\pi$ -alkyl 作用力。

**3.4 12 个潜在活性成分对斑马鱼的促血管生成活性**  
对“3.3.2”得到的 12 个潜在活性成分进行促血管生成活性验证，研究发现 12 个潜在活性成分中有 10 个具有促血管生成活性，2 个无促血管生成作用。

**3.4.1 黄酮类成分的促血管生成活性** 如图 9 所示，与对照组相比，PTK787 可显著抑制节间血管的生长 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较，葛根素 (25、50、

100  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.05$ 、0.001)，且呈剂量相关性；3'-甲氧基葛根素 (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.05$ 、0.001)；3'-羟基葛根素 (25、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.01$ 、0.001)；大豆苷 (25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.05$ 、0.001)；3'-甲氧基大豆苷和芒柄花素在 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  浓度下无促斑马鱼节间血管生成活性。结果表明，黄酮类成分中葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷具有促斑马鱼血管生成活性。



与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

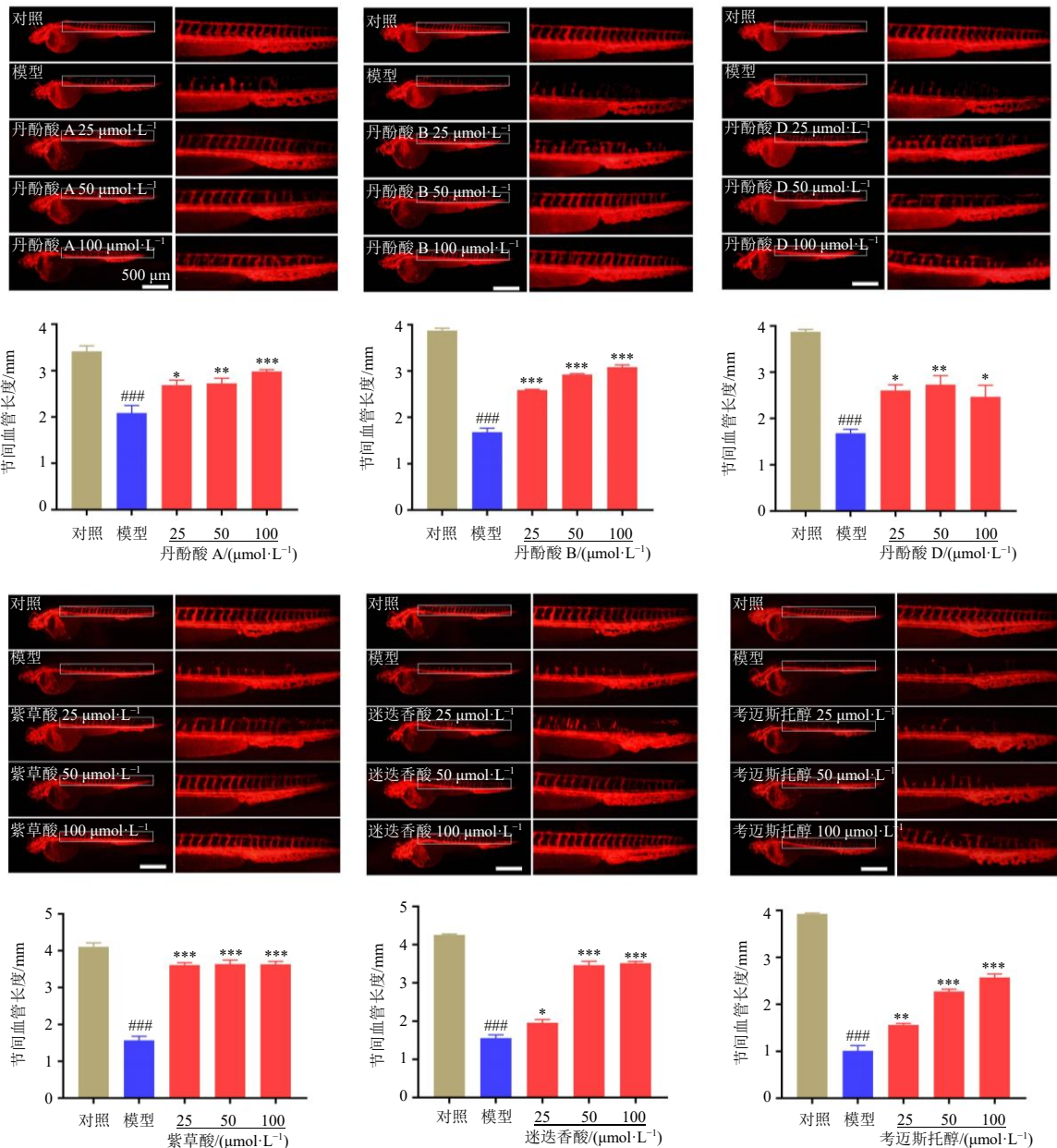
图 9 黄酮类成分对斑马鱼节间血管生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 9 Effect of flavonoids on growth of intersegmental vascular in zebrafish embryos ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.4.2 酚酸类成分的促血管生成活性** 如图 10 所示,与对照组相比,PTK787 可显著抑制节间血管的生长( $P<0.001$ )。与模型组比较,25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的丹酚酸 A 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤( $P<0.05、0.01、0.001$ );25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的丹酚酸 B 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤( $P<0.001$ ),且呈剂量相关性;25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的丹酚酸 D 可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤( $P<0.05、0.01$ );25、50、100

$\mu\text{mol/L}$  的紫草酸可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤( $P<0.001$ );25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的迷迭香酸可显著恢复 PTK787 导致的斑马鱼节间血管损伤( $P<0.05、0.001$ ),呈剂量相关性。结果表明,酚酸类成分中丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、紫草酸、迷迭香酸具有促斑马鱼血管生成活性。

**3.4.3 其他类成分的促血管生成活性** 如图 10 所示,与对照组比较,PTK787 可显著抑制节间血管的生长( $P<0.001$ );与模型组比较,25、50、100  $\mu\text{mol/L}$



与对照组比较: ### $P<0.001$ ; 与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$

### $P<0.001$  vs control group; \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group

图 10 酚酸类及其他类成分对斑马鱼节间血管生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 10 Effects of phenolic acids and others of intersegmental vascular in zebrafish embryos ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

的考迈斯托醇可显著恢复 PTK787 造成的斑马鱼节间血管损伤 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 呈剂量相关性。结果表明, 考迈斯托醇具有促斑马鱼血管生成活性。

#### 4 讨论

临床研究及现代药理学研究证实心可舒片治疗冠心病疗效确切, 但心可舒片促血管生成活性及其活性成分尚未报道。本研究运用 HUVECs 与斑马鱼模型初步探究心可舒片促血管生成作用, 发现心可舒片能显著提高血管内皮细胞增殖、迁移、成管能力, 显著恢复斑马鱼受损节间血管生长。斑马鱼实验中虽然 3 个给药浓度间未呈现明显的剂量相关性, 但 3 次生物学重复实验结果显示, 心可舒片具有稳定的促血管生成作用。由此, 可初步确定心可舒片具有促血管生成活性。

分子对接技术是基于计算机技术进行药物发现的热门手段<sup>[32]</sup>。EGFR、AKT、VEGFR1、VEGFR2 是血管生成途径中的重要靶蛋白<sup>[25-28]</sup>, 与该类靶蛋白的有效结合可促进/抑制血管生成相关基因的表达。血管生成相关基因表达上调可有效促进体内血管生成。本研究采用打分值与对接能双重筛选的方案, 筛选出心可舒片中 12 个促血管生成活性成分候选化合物。筛选结果显示, 12 个候选化合物中, 有 6 个黄酮类、5 个酚酸类及 1 个香豆素类成分。黄酮类化合物与 4 种蛋白均能对接成功, 除芒柄花素与 EGFR、VEGFR1 打分值较低以外, 其他 5 个化合物与 4 种蛋白均有较高打分值。酚酸类化合物中, 迷迭香酸、丹酚酸 D 与 4 种蛋白均能对接成功且有较高打分值; 丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸除与 AKT 无对接以外, 与其他 3 种蛋白均能对接成功且有较高打分值。考迈斯托醇与 4 种蛋白均能结合, 其中与 VEGFR1、AKT、VEGFR2 的打分值较高。

基于分子对接结果, 本研究采用 PTK787 抑制血管发育的方法建立斑马鱼节间血管损伤模型<sup>[33]</sup>, 通过斑马鱼体内实验对 12 个化合物进行促血管生成作用验证, 得到 10 个化合物都具有促斑马鱼节间血管生成活性。文献研究显示, 丹酚酸 A<sup>[34]</sup>与丹酚酸 B<sup>[35-36]</sup>可通过促进 VEGF 等促血管生长因子的表达, 促进心肌缺血小鼠心血管新生。葛根素可通过调控磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)、核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase) 等信号通路显著提高

HUVECs 的增殖、迁移、侵袭和血管形成能力<sup>[37]</sup>。丹酚酸 D、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-甲氧基大豆苷、大豆苷及考迈斯托醇的促血管生成活性目前还尚未见报道。本研究发现, 上述 9 个化合物均能显著促进斑马鱼血管生成。此外, 据文献报道, 芒柄花素可通过调节内皮细胞中胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R) 和细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达从而起到促血管生成作用, 发挥心血管保护功能<sup>[38-39]</sup>, 迷迭香酸可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路从而抑制肝癌小鼠体内炎症和血管生成<sup>[40]</sup>。本研究中, 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的芒柄花素无促斑马鱼血管生成活性, 迷迭香酸具有显著促血管生成活性。药物对血管新生的影响机制十分复杂, 需要内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、血小板和炎症细胞等多种细胞共同参与, 同一活性成分在不同剂量、疾病发展的不同阶段都可能表现出截然相反的调节作用, 例如黄芩苷低剂量与高剂量时分别发挥促血管生成与抑制血管生成作用<sup>[41-43]</sup>。因此, 芒柄花素与迷迭香酸的促血管生成活性值得进一步探索研究。

综上所述, 本研究首先采用 HUVECs 和斑马鱼模型, 系统评价了心可舒片促血管生成活性, 进而采用分子对接技术结合斑马鱼模型, 从心可舒片中筛选得到丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、紫草酸、迷迭香酸、葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-羟基葛根素、考迈斯托醇、大豆苷 10 个具有促血管生成的化合物, 为阐明心可舒片治疗冠心病心绞痛药效成分及作用机制提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 王增武, 胡盛寿. 《中国心血管健康与疾病报告 2019》要点解读 [J]. 中国心血管杂志, 2020, 25(5): 401-410.
- [2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
- [3] 顾宁越, 张艳达, 梁春. 冠状动脉血管生成的机制及治疗分子靶点研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20(6): 627-630.
- [4] 施雯婷, 赵外荣, 周忠焱, 等. 中医药促进冠心病血管新生的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(18): 3667-3671.
- [5] Xu T, Peng J B, Zhang W T, *et al.* Antiatherogenic and anti-ischemic properties of traditional Chinese medicine xinkeshu via endothelial protecting function [J]. *Evid*

- Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 302137.
- [6] 刘桂兰. 心可舒片联合阿托伐他汀治疗不稳定型心绞痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 271-275.
- [7] 白丽娜, 张虹, 严萍, 等. 心可舒治疗冠心病心绞痛的疗效及对血液流变学及炎症因子的影响: 一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究 [J]. 实用药物与临床, 2021, 24(8): 678-683.
- [8] Sun L L, Jia H M, Ma L Y, *et al.* Metabolic profiling of hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cells reveals the accumulation of phytosphingosine and the vital role of Dan-Shen in Xin-Ke-Shu [J]. *Phytomedicine*, 2018, 49: 83-94.
- [9] 卢金萍, 欧阳静萍. 心可舒对心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2003, 24(3): 254-257.
- [10] Ma H, Wang Y, Xue Y L, *et al.* The effect of Xinkeshu tablets on depression and anxiety symptoms in patients with coronary artery disease: Results from a double-blind, randomized, placebo-controlled study [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108639.
- [11] 李华, 耿强. 心可舒对冠状动脉介入术后炎症因子及预后的影响 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(10): 1610-1613.
- [12] 张以昆, 岳桂华, 王强, 等. 心可舒片对冠心病血瘀证凝血及纤溶系统的影响 [J]. 陕西中医, 2008, 29(10): 1282-1283.
- [13] 冯泽瑞, 王芬, 常方圆, 等. 心可舒联合尼可地尔对 X 综合征患者疗效及血管内皮功能的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(4): 381-383.
- [14] 杨张娅, 温恩懿. 内皮素-1 在血管平滑肌细胞增殖作用中的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2020, 41(5): 524-526.
- [15] 杨玉琴, 昶国平, 张志超, 等. 复方丹参保肝颗粒入血成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(3): 37-40.
- [16] 徐宝欣. 基于一测多评法的山楂叶提取物 4 种黄酮类成分含量测定及 UPLC-MS/MS 法药代动力学研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2019.
- [17] 信莎莎, 杜银飞, 董玉, 等. 蒙药复方述达格-4 的大鼠血清化学成分分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(9): 758-763.
- [18] 王源. 复方血栓通胶囊主要有效成分的药代动力学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [19] 潘玄玄. 沉香化气丸的质量控制及物质基础研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [20] 蔺瑞, 段佳林, 牟菲, 等. 丹参主要活性成分体内代谢途径及产物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(19): 2271-2277.
- [21] 郝二伟, 潘祥龙, 秦健峰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的复方益智颗粒大鼠体内入血成分研究 [J]. 中药材, 2019, 42(8): 1814-1819.
- [22] 郭洪梅, 苏振宇, 高诗凯, 等. 复方丹参滴丸在大鼠体内代谢产物的分析 [J]. 中成药, 2019, 41(10): 2307-2314.
- [23] 金慧. 葛根芩连汤血清药化学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [24] 金慧, 王彦, 阎超. 葛根芩连汤入血成分的归属 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2687-2691.
- [25] Sangande F, Julianti E, Tjahjono D H. Ligand-based pharmacophore modeling, molecular docking, and molecular dynamic studies of dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7779.
- [26] Rasouli H, Parvaneh S, Mahnam A, *et al.* Anti-angiogenic potential of trypsin inhibitor purified from *Cucumis melo* seeds: Homology modeling and molecular docking perspective [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 96: 118-128.
- [27] Shakya G, Balasubramanian S, Hoda M, *et al.* Inhibition of metastasis and angiogenesis in Hep-2 cells by wheatgrass extract-an *in vitro* and *in silico* approach [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2018, 28(3): 205-218.
- [28] Munni Y A, Ali M C, Selsi N J, *et al.* Molecular simulation studies to reveal the binding mechanisms of shikonin derivatives inhibiting VEGFR-2 kinase [J]. *Comput Biol Chem*, 2021, 90: 107414.
- [29] Zhao Y Q, Liu F F, He G J, *et al.* Discovery of arylamide-5-anilinoquinazoline-8-nitro derivatives as VEGFR-2 kinase inhibitors: Synthesis, *in vitro* biological evaluation and molecular docking [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(23): 126711.
- [30] Rampogu S, Baek A, Zeb A, *et al.* Exploration for novel inhibitors showing back-to-front approach against VEGFR-2 kinase domain (4AG8) employing molecular docking mechanism and molecular dynamics simulations [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 264.
- [31] Abdullaziz M A, Abdel-Mohsen H T, El Kerdawy A M, *et al.* Design, synthesis, molecular docking and cytotoxic evaluation of novel 2-furybenzimidazoles as VEGFR-2 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 136: 315-329.
- [32] Pinzi, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): E4331.
- [33] 朱宗萍, 王继森, 廖婉, 等. 基于模式生物斑马鱼研究姜黄抗血管新生的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3257-3268.
- [34] Li Y J, Duan C L, Liu J X. Salvianolic acid A promotes the acceleration of neovascularization in the ischemic rat

- myocardium and the functions of endothelial progenitor cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 218-227.
- [35] 马宇滢. 红景天苷和丹酚酸 B 对人内皮祖细胞增殖、迁移和凋亡的作用 [D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [36] 陈衡霞, 许立, 许波华. 丹酚酸 B 对心肌缺血大鼠缺血心肌血管新生的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 180-183.
- [37] 张杰, 龚妙添. 葛根素对人脐静脉内皮细胞的促血管生成作用及机制的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(19): 2579-2580, 2583.
- [38] Li S, Dang Y Y, Zhou X L, *et al.* Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16815.
- [39] 隋成亮. 刺芒柄花素对去势雌性大鼠血管内皮细胞保护作用机制研究 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2019.
- [40] Cao W, Hu C, Wu L L, *et al.* Rosmarinic acid inhibits inflammation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by suppression of NF- $\kappa$ B signaling in H22 tumor-bearing mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 132(2): 131-137.
- [41] Zhu D Q, Wang S S, Lawless J, *et al.* Dose dependent dual effect of baicalin and herb Huang Qin extract on angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167125.
- [42] 杨婷, 张莉君, 黄睿, 等. 中药活性成分调控血管新生的研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(9): 1995-2007.
- [43] 何建成, 王利. 中医药对血管新生促进或抑制作用的研究进展 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2018, 39(6): 775-778.

[责任编辑 李亚楠]