

• 丹红化瘀研究专栏 •

丹红化瘀口服液的二次开发研究

许浚^{1,2,3}, 张铁军^{1,2,3*}, 王文倩¹, 林娟⁴, 李楚源^{4*}

1. 天津药物研究院, 天津 300462
2. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462
3. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462
4. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

摘要: 中药大品种二次开发研究是中药创新研究的重要内容, 是继承和发展中医药理论、突破制约中医药理论和中药产业发展瓶颈的重要途径。药效物质基础和作用机制研究是中药大品种二次开发的核心内容。对丹红化瘀口服液的药效物质基础和作用机制进行了系统总结, 即通过对原料药材、复方制剂以及口服后血中移行成分的系统辨识, 阐释丹红化瘀口服液的主要化学物质组和潜在有效成分; 进一步通过网络药理学预测分析和相关受体活性测试实验, 筛选和明确了其主要药效物质基础; 通过与视网膜中央静脉阻塞症相关的整体动物模型、网络药理学分析、相关功能受体结合及酶学检测研究, 阐释了丹红化瘀口服液的作用机制, 为该药的临床应用和质量控制提供科学依据。

关键词: 丹红化瘀口服液; 二次开发; 丹酚酸 B; 丹酚酸 D; 丹参素; 迷迭香酸; 原儿茶醛; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 柚皮苷; 柠檬苦素; 羟基红花黄色素 A; 柴胡皂苷 a

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2022)06 - 1609 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.001

Study of secondary development of Danhong Huayu Oral Liquid

XU Jun^{1,2,3}, ZHANG Tie-jun^{1,2,3}, WANG Wen-qian¹, LIN Juan⁴, LI Chu-yuan⁴

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. State Key Laboratory of Drug Delivery and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Guangzhou Baiyun Mountain and Hutchison Whampoa Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

Abstract: To study the secondary development of major Chinese materia medica (CMM) varieties is the important content of CMM innovation research, and it is also the important approach of inheriting and developing traditional Chinese medicine (TCM) theory and breaking the bottleneck restricting the development of TCM theory and CMM industry development. The study of pharmacodynamic material basis and mechanism is the core content of the secondary development of CMM. The study on the material basis and mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid (丹红化瘀口服液) was reviewed in this paper. The chemical components of Danhong Huayu Oral Liquid were elucidated by identification and characterization of herbs, Danhong Huayu Oral Liquid and components ingested into the blood. Through the network pharmacology prediction analysis and related receptor activity test experiment, the main pharmacodynamic material basis was screened and identified. The mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid was explained by the studies of animal models, network pharmacology, and functional receptors related with central retinal vein occlusion, in order to provide

收稿日期: 2021-10-08

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81830111); 中央引导地方科技发展专项资助项目 (20ZYCGSN00200)

作者简介: 许浚, 研究员, 主要从事中药大品种二次开发及中药质量研究。E-mail: xuj@tjipr.com

*通信作者: 李楚源 E-mail: 1226976234@qq.com

张铁军 E-mail: zhangtj@tjipr.com

a scientific basis for the clinical application and quality control of Danhong Huayu Oral Liquid.

Key words: Danhong Huayu Oral Liquid; secondary development; salvianolic acid B; salvianolic acid D; salvianic acid; rosmarinic acid; protocatechuic aldehyde; ferulic acid; senkyunolide I; naringin; limonin; hydroxysafflor yellow A; saikosaponin a

丹红化瘀口服液为治疗视网膜中央静脉阻塞的确有疗效的中成药,由丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡、枳壳 7 味药材组成,具有活血化瘀、行气通络的功效,临床用于治疗气滞血瘀引起的视物不清、突然不见症及视网膜中央静脉阻塞症的吸收期见上述证候者,为《中国药典》2020 年版和《国家医保目录(2019 版)》收载品种。虽然已有药效及临床研究证实丹红化瘀口服液疗效确切^[1-5],但其药效物质基础并不十分清楚,现行的质量标准仅规定了丹参中原儿茶醛的定量测定^[6],不能真正反映制剂质量与疗效的关系,使得难以全面有效地控制其内在质量。

视网膜中央静脉阻塞是由于各种原因引起的筛板附近或筛板以上部位的视网膜中央静脉血流梗阻而导致的急性或亚急性视网膜血管性眼病。视网膜中央静脉阻塞症分为非缺血型和缺血型^[7]。缺血型视网膜中央静脉阻塞症患者的视网膜发生大面积的缺血区,产生血管生长因子,进而形成新生血管,晚期出现黄斑囊样水肿,新生血管性青光眼和玻璃体出血等并发症,严重影响视功能。本课题组对丹红化瘀口服液的原料药材、复方制剂、口服入血成分及其代谢产物的化学物质组进行了系统地表征和辨识,进而通过整体动物模型、网络药理学以及受体结合及酶学检测等方法,评价其有效性,阐释作用机制,确定药效物质基础,为丹红化瘀口服液的临床推广和应用和指导临床实践提供了重要的理论和实验依据。

1 化学物质组表征和辨识

中药化学成分是中药发挥功效作用的物质基础,是反映中药质量的客观实质。不同于化学单体药物,中药材来源于生物有机体,往往需要经历产地采收加工、饮片炮制、提取纯化、浓缩干燥以及制剂成型等复杂的药物制备过程,同时,药物体内过程也具有多组分交互作用的特点。因此,中药有效成分研究应着眼于中药形成的全过程^[8]。本课题组对丹红化瘀口服液的原料药材、复方制剂、口服入血成分及其代谢产物的化学物质组进行了系统地表征和辨识,明确了丹红化瘀口服液的化学物质基础及其传递规律^[9],为阐释该药的药效物质基础与作用机制,以及制订科学的质量控制方法和质量控

制体系提供了前提和依据。

1.1 原料药材物质组

丹红化瘀口服液由 7 味药材组成,本课题组采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(UPLC/Q-TOF-MS)方法,分别对丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.、桃仁 *Prunus persica* (L.) Batsch、红花 *Carthamus tinctorius* L.、柴胡 *Bupleurum chinense* DC.和枳壳 *Citrus aurantium* L. 7 味原料药材化学物质组进行表征和辨识^[9]。从丹参中共检测鉴定出 31 个化学成分,包括 19 个酚酸类、12 个二萜醌类成分;从当归中共检测鉴定出 16 个化学成分,包括 12 个苯酞类、4 个有机酸类成分;从川芎中共检测鉴定出 26 个化学成分,包括 15 个苯酞类、7 个有机酸类、4 个其他类成分;从桃仁中共检测鉴定出 3 个氰苷类化学成分;从红花中共检测鉴定出 16 个黄酮类化学成分;从枳壳中共检测鉴定出 18 个化学成分,包括 14 个黄酮类、2 个香豆素类、1 个柠檬苦素类和 1 个有机酸类成分;从柴胡中共检测鉴定出 24 个化学成分,包括 19 个三萜皂苷类、3 个有机酸类和 2 个黄酮类成分。

1.2 复方制剂物质组

运用 UPLC/Q-TOF-MS 方法,对丹红化瘀口服液中主要化学成分进行表征和辨识,在丹红化瘀口服液样品中共鉴定得到 55 个化学成分,包括酚酸类 16 个、二萜醌类 1 个、有机酸类 7 个、苯酞类 7 个、香豆素类 3 个、黄酮类 11 个、三萜皂苷类 4 个、氰苷类 2 个、柠檬苦素类 1 个、其他成分 3 个^[9]。

1.3 主要入血成分及其代谢产物

中药复方制剂口服后,其有效物质首先吸收入血,再通过血液运输到达疾病治疗靶点发挥治疗作用,因此,只有被吸收入血的化学成分或相关代谢物,才有机会在靶器官维持一定的浓度,才有可能被看作是潜在的生物活性成分。本课题组进一步采用血清药物化学方法^[9],运用 UPLC/Q-TOF-MS 技术,对口服丹红化瘀口服液后大鼠血浆中的吸收原型成分及其代谢产物进行辨识研究,通过建立给药血浆中移行成分指纹图谱,比对丹红化瘀口服液制剂、大鼠给药血浆及空白血浆样品的色谱图,筛选

分析血中移行的原型药物成分及代谢产物，结果在大鼠血浆中共鉴定得到 37 个丹红化瘀口服液相关的外源性化合物，包括 26 个吸收原型药物成分和 11 个代谢产物，它们可能是口服丹红化瘀口服液潜在的活性成分。

1.4 药材原有成分-制剂原型成分-血中效应成分的相关性分析

通过对丹红化瘀口服液原料药材、复方制剂、口服入血成分及其代谢产物的系统辨识，并将制剂中

的成分与药材中的成分进行比对归属，明确了质量属性的传递过程。丹红化瘀口服液中辨识出 55 个化学成分，其中来源于丹参 18 个、当归和川芎 16 个、枳壳 13 个、桃仁 2 个、红花 2 个及柴胡 4 个。在大鼠血浆中共鉴定得到 37 个与丹红化瘀口服液相关的外源性化合物，包括 26 个原型药物成分和 11 个代谢产物，主要来源于丹参、当归、川芎和枳壳。

丹红化瘀口服液及其入血成分与各味药材归属分析见表 1。

表 1 丹红化瘀口服液及其入血成分与各味药材归属分析

Table 1 Analysis of Danhong Huayu Oral Liquid and its blood components and attribution of various herbs

原料药材物质组		复方制剂物质组		主要入血成分及其代谢产物		共有成分
药材名	成分数	成分数	峰号	成分数	峰号	
丹参	31	18	5、6、7、10、19、21、 23、26、27、29、 31、32、36、37、 39、41、42、54	6	6、7、10、23、27、 54	丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、丹酚酸 D、迷迭香酸、新隐丹参酮
当归	16	7	11、17、33、35、45、 47、55	7	11、17、33、35、45、 47、55	绿原酸、隐绿原酸、阿魏酸、3-丁基-3,6,7-三羟基-4,5,6,7-四氢苯
川芎	26	16	1、2、3、9、11、13、 16、17、20、33、 35、38、45、46、 47、55	11	11、13、20、38、46、 17、33、35、45、 47、55	酞、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、乙基香兰素、洋川芎内酯 F、洋川芎内酯 G/K、6,7-环氧藜本内酯、藜本内酯
桃仁	3	2	8、14	1	14	苦杏仁苷
红花	16	2	12、15	1	15	红花黄色素 A
枳壳	18	13	4、18、22、24、25、 28、30、34、40、 44、48、50、53	7	25、28、30、34、 44、48、50	柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、柠檬苦素、蜜橘黄素
柴胡	24	4	43、49、51、52			

2 药效物质基础

基于成分-药效相关性研究有多种研究模式和方法^[10]。从方法论上可划分为还原论的成分-靶点的“要素-要素”化学生物学的筛选方式和系统论的化学复杂体系-生命复杂体系的“系统-系统”的筛选模式^[11]。相较于传统药物化学、药理实验筛选有效成分研究方法，利用中药网络药理学技术与体外活性验证实验相结合的方法研究中草药的药效成分、潜在作用靶点，突破了传统研究的不足，更加快速灵活，准确率更高。丹红化瘀口服液主要用于视网膜中央静脉阻塞症的治疗，本课题组首先利用网络药理学方法^[12]，选择丹红化瘀口服液中入血成分进行网络药理学研究，构建“成分-靶点-通路-药理作用-疾病”

网络，预测其可能的活性成分及作用机制。在此基础上，进一步选取与视网膜静脉中央阻塞症治疗密切相关的 G-蛋白偶联受体和酶进行体外活性实验^[13]，筛选验证丹红化瘀口服液的主要活性成分，确定其药效物质基础。

2.1 基于网络药理学的活性成分及作用机制预测分析

本课题组前期实验鉴定出丹红化瘀口服液中 55 个化学成分^[9]，并筛选出血中移行的 26 个原型药物成分及 11 个代谢物，在此基础上，进一步结合相关文献挖掘、整理，选取丹红化瘀口服液中 21 个入血成分（隐丹参酮、丹参酮 II_A、丹酚酸 D、丹参素、原儿茶醛、藜本内酯、洋川芎内酯 I、川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、苦杏仁苷、红花黄色素 A、槲皮

素、柴胡皂苷 A、丁香酚、柚皮苷、柠檬烯、芳樟醇、辛弗林、马尔敏、柠檬苦素), 通过 TCMSp 数据库获取其生物利用度, 进一步借助 TCMSp 和 CTD 数据库预测化合物的作用靶点, 利用 MAS 3.0 生物分子功能软件获取相关通路, 同时利用 FUNRICH 软件对获得的靶点通路进行基因本体功能富集分析, 最后利用 Cytoscape 软件构建网络药理图。实验表明, 21 个化合物可作用于 104 个蛋白靶点, 涉及 45 条相关通路, 其主要通过抗血栓形成、抑制新血管生成、舒张血管、抑制免疫炎症反应等相关通路起治疗视网膜静脉中央阻塞症的作用。其中, 抗血栓形成的有效成分有槲皮素、丹参酮 II_A、丹酚酸 D、红花黄色素 A、川芎嗪; 抑制新血管生成的有效成分有隐丹参酮、丹参酮 II_A、川芎嗪、丹酚酸 D、藁本内酯、洋川芎内酯、绿原酸、阿魏酸、苦杏仁苷; 舒张血管的有效成分有隐丹参酮、丹参酮 II_A、原儿茶醛、藁本内酯、阿魏酸、洋川芎内酯、槲皮素、丁香酚、柠檬烯; 抑制免疫炎症反应的有效成分有丹参素、丹参酮 II_A、阿魏酸、绿原酸、槲皮素、苦杏仁苷、红花黄色素 A。

2.2 基于受体及酶活性检测的药效物质基础验证研究

根据化学物质组和网络药理学研究结果, 丹红化瘀口服液可能通过抑制血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 活性, 降低视网膜血管通透性, 从而抑制新生血管的形成, 保护血-视网膜屏障; 通过抑制磷酸二酯酶 3A (phosphodiesterase 3A, PDE3A) 的活性阻断环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的裂解, 增高细胞内 cAMP 浓度, 从而抑制血小板聚集, 同时通过抑制凝血过程的关键酶凝血酶, 减少不溶性纤维蛋白的生成, 多途径抑制血栓的形成。丹红化瘀口服液一方面通过拮抗 α 1A 肾上腺素受体 (adrenergic receptor α 1A, ADRA1A) 舒张血管, 同时通过作用于内皮素生成的限速酶内皮素转化酶 1 (endothelin converting enzyme 1, ECE1), 抑制由内皮素引起的血管强烈收缩, 从 2 个途径使血管舒张, 从而减少血流阻力促进血液循环, 改善病变部位血流动力学。因此, 本部分选取与视网膜静脉中央阻塞症治疗密切相关的受体和酶 (VEGFR2、ADRA1A、PDE3A、凝血酶和 ECE1) 为研究载体, 通过运用胞内钙离子荧光检测和酶抑制剂检测技术对丹红化瘀口服液中主要

单体成分进行体外活性测试实验, 筛选验证丹红化瘀口服液的主要活性成分。

结果表明, 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、柠檬苦素对 VEGFR2 酪氨酸激酶有显著抑制活性, 是抑制新血管生成的主要有效成分; 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸和柚皮苷对 PDE3A 有明显的抑制活性, 是抑制血小板聚集, 发挥活血化瘀作用的主要有效成分; 丹酚酸 D、丹酚酸 B、原儿茶醛、迷迭香酸、羟基红花黄色素 A、洋川芎内酯 I、阿魏酸、柴胡皂苷 a、柚皮苷和柠檬苦素对凝血酶有明显的抑制活性, 是抑制血栓形成的主要有效成分; 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、羟基红花黄色素 A 对 ECE1 也具有显著抑制活性, 柴胡皂苷 a 对 ADRA1A 有显著的抑制作用, 是舒张血管的主要有效成分。

3 药效作用及作用机制

丹红化瘀口服液临床上主要用于气滞血瘀引起的视物模糊不清、突然不见症和视网膜中央静脉阻塞症, 对糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病心肌病和糖尿病黄斑水肿亦具有治疗作用。现代药理学研究表明, 丹红化瘀口服液对血栓和多种糖尿病并发症具有明显改善作用, 这与其抗炎和抗氧化应激等活性密切相关^[14-17]。本部分根据丹红化瘀口服液的功能主治, 进一步从活血化瘀、抗炎、抗 VEGF、免疫调节等方面研究丹红化瘀口服液治疗视网膜中央静脉阻塞症的作用机制。通过整体动物-网络药理-受体实验, 循序渐进, 逐级深入地探寻和阐释丹红化瘀口服液治疗视网膜中央静脉阻塞症的作用机制。

3.1 对大鼠气滞血瘀模型的影响及作用机制研究

中医认为, 视网膜中央静脉阻塞症主要因情志不舒、忧郁悲伤等致气机郁滞、血行不畅、血瘀脉阻而溢于目^[18]。血瘀的病理实质以微循环障碍致使病变组织由于缺血、缺氧产生营养代谢障碍等为主。因而, 采用气滞血瘀证大鼠模型, 研究丹红化瘀口服液对症候病理状态下眼结膜微循环的影响, 从中医药“整体观”和“证候理论”角度探索丹红化瘀口服液“活血化瘀、行气通络”的作用机制^[19]。实验分为对照组、模型组及丹红化瘀口服液低、中、高剂量 (3.25、6.5、13 mL/kg) 组和阳性对照组, 每组 10 只, 除对照组外, 其余大鼠采用复合刺激因素使其达到气滞血瘀状态, 造模同时给药, 每天给药 1 次, 连续给药 3 周。

结果显示,与模型组比较,丹红化瘀口服液低剂量组微血管管径显著增大,血流速度显著加快;中剂量组微血管交叉数显著增多,血管管径显著增大,血流速度显著加快;高剂量组镜下血管计数显著增加,血管交叉数显著增多,血管管径显著增大,血液流速显著加快。丹红化瘀口服液中、高剂量组血栓烷 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)/6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-prostaglandin F_{1α}, 6-keto-F_{1α}) 值显著降低,血小板聚集率也明显降低;高剂量组 cAMP/环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 值显著降低;3个剂量组诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 活性和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 自由基含量显著降低;中、高剂量组 VEGF 含量显著降低。丹红化瘀口服液3个剂量组眼结膜组织磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (phosphorylated cAMP response element binding protein, p-CREB) 和 iNOS 的蛋白表达水平均有不同程度的降低。

结果表明,丹红化瘀口服液具有良好的活血化瘀、行气通络作用,其行气作用与减少气滞应激产生的血清 NO 自由基,降低血清 iNOS 活性有关;其活血化瘀作用与降低血清 TXB₂ 含量、TXB₂/6-keto-F_{1α} 值和血小板最大聚集率,减少 VEGF 含量有关。其抗 VEGF 作用对治疗视网膜中央静脉阻塞症有非常积极的临床意义,其机制可能与减少 cAMP 和 p-CREB 有关。

3.2 对大鼠视网膜缺血再灌注的保护作用及机制研究

视网膜缺血再灌注损伤在视网膜中央动脉阻塞症的病理中起重要作用,常导致视网膜细胞死亡,对患者视功能造成不可逆损伤^[20]。本部分采用视网膜缺血再灌注大鼠模型,阐述丹红化瘀口服液对实验性高眼压致视网膜缺血再灌注诱发的视网膜损伤模型的保护作用及其机制^[21]。实验分为假手术组、模型组及丹红化瘀口服液低、中、高剂量 (3.25、6.50、13.00 mL/kg) 组和阳性对照组,每组 10 只,每天给药 1 次,连续给药 30 d。采用酶联免疫吸附测定法检测血清白细胞介素 (interleukin, IL) -1β、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 含量,比色法测定血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA)

含量;免疫组化检测视网膜缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、VEGF 和核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) p65 蛋白表达情况;HE 染色观察视网膜组织结构变化。

实验结果表明,模型组大鼠视网膜结构紊乱,神经节细胞层细胞减少,视网膜萎缩变薄;丹红化瘀口服液高、中、低剂量组均可改善视网膜组织结构及神经节细胞变性程度。酶联免疫吸附测定法检测显示,与模型组比较,丹红化瘀口服液低、中、高各剂量组均可明显提高血清中 SOD、GPX、IL-10 水平,显著提高血清中 CAT 活性,而高剂量组可显著降低 MDA 水平,低、中、高剂量组均显著降低 IL-1β 水平,中、高剂量组显著降低 IL-6、TNF-α 水平。免疫组化检测结果显示,与模型组比较,丹红化瘀口服液低、中、高剂量组均可显著降低 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF-κB p65 的蛋白表达水平。

结果表明,丹红化瘀口服液对视网膜缺血再灌注损伤具有防治作用,体现在抗缺血、抗氧化、抗炎、抗细胞损伤等方面,其抗炎作用与抑制炎症通路蛋白 NF-κB p65 表达有关,抗细胞损伤作用与减少视网膜组织 HIF-1、细胞凋亡关键蛋白酶 Caspase-3 表达有关。

3.3 基于网络药理学的作用机制研究

本部分在整体动物实验研究基础上,进一步采用网络药理学方法^[12],探究丹红化瘀口服液治疗视网膜静脉中央阻塞症的作用机制。选取丹红化瘀口服液中的 21 个入血成分为研究对象,借助 TCMS 和 CTD 数据库预测化合物的作用靶点,利用 MAS 3.0 生物分子功能软件获取相关通路、通过 FUNRICH 软件对获得靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析,最后利用 Cytoscape 软件构建网络药理图。结果表明,丹红化瘀口服液中槲皮素等化合物可作用于与血栓形成相关的蛋白如凝血因子 Xa、凝血因子 VII (辅助促凝血酶原激活酶)、凝血酶、血栓烷 A 合酶、前列腺素合酶、纤溶酶原激活物抑制剂 1、组织型纤溶酶原激活物、尿激酶型纤溶酶原激活物等,抑制凝血过程和血小板活化及影响纤溶系统,从而减少血瘀发生。丹红化瘀口服液中丹酚酸 D 等成分可作用于与血管生成有关的蛋白,如 VEGFA、内皮生长因子受体 (endothelial growth factor receptor, EGFR),参与调节 VEGF 信号通路等,抑制新生血管生成来抑制视

网膜中央静脉阻塞症的病情发展。丹红化瘀口服液中藜本内酯等成分可干预与血管平滑肌相关的蛋白,如ADRA1A、 α 1B肾上腺素受体、 β 2肾上腺素受体、电压门控钾通道亚族H-2蛋白、内皮素-1受体、ECE1、内皮型一氧化氮合酶、M3乙酰胆碱受体等,发挥舒张血管作用,以达到行气以行血目的。丹红化瘀口服液中丹参素等通过作用于与免疫、炎症反应相关的蛋白和通路,如花生四烯酸5-脂氧合酶、前列腺素受体、T-淋巴细胞活化抗原CD86、 γ 干扰素、白IL-1B、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、白三烯A-4水解酶,调节丝裂原活化蛋白激酶信号传导、花生四烯酸代谢、抗原的处理和表达等,干预花生四烯酸代谢等过程抑制炎症因子释放、促进免疫应答。

综上,丹红化瘀口服液通过作用于与凝血过程、新血管生成、血管舒张、免疫调节和炎症反应等相关的靶点,起到活血化瘀、行气通络的功效从而发挥视网膜中央静脉阻塞症治疗作用,具有多成分、多靶点、多通路的作用特点。

3.4 基于相关受体和酶的作用机制研究

在整体动物实验和网络药理学研究基础上,进一步选择与视网膜中央静脉阻塞症治疗相关的ADRA1A、VEGFR2、PDE3A、凝血酶以及ECE1为研究对象,通过运用胞内钙离子荧光检测和酶抑制剂检测技术评价丹红化瘀口服液及主要代表性单体成分给药后对ADRA1A的拮抗作用以及对VEGFR2酪氨酸激酶、PDE3A、凝血酶和ECE1的抑制活性,从细胞分子水平进一步研究丹红化瘀口服液的治疗作用机制,阐明其作用的靶点。

结果表明,丹红化瘀口服液分别稀释100、1000倍对VEGFR2酪氨酸激酶都有显著抑制活性^[13];丹红化瘀口服液稀释50、500倍对PDE3A、凝血酶、ECE1显示出较强的抑制效果,且呈现浓度相关性;丹红化瘀口服液稀释50倍对ADRA1A有显著的抑制作用,且呈现浓度相关性。故推测丹红化瘀口服液可能通过抑制VEGFR2酪氨酸激酶活性,降低视网膜血管通透性,从而抑制新生血管的形成,保护血-视网膜屏障;另外,通过抑制PDE3A的活性阻断cAMP的裂解,增高细胞内cAMP浓度,从而抑制血小板聚集,同时通过抑制凝血过程的关键酶凝血酶,减少不溶性纤维蛋白的生成,多途径抑制血栓的形成;并且丹红化瘀口服液一方面通过拮抗ADRA1A舒张血管,同时通过作用于内皮素生成的限速酶ECE1,抑制由内皮素引起的血管强烈收缩,

从2个途径使血管舒张,从而减少血流阻力促进血液循环,改善病变部位血流动力学。

4 结语

中药大品种的二次开发研究是中药现代化的重要内容,以确有疗效的中药大品种为载体进行系统研究,是继承和发展中医药理论,突破制约中医药理论和中药产业发展瓶颈的重要路径。通过现代化学生物学模型方法,阐释中医药针对疾病的治法原理、配伍理论和方剂的配伍规律,发展和完善中医药理论;通过二次开发研究,以现代科学方法、客观指标和实验证据阐明中药复杂体系的药效物质基础和作用机制,发现和提炼中药大品种的作用特点和比较优势,挖掘其临床核心价值,指导临床实践,提高临床疗效;并建立科学、有效的质量控制方法,保证药品的质量均一、稳定、可控。本课题组近年来对疏风解毒胶囊^[22]、元胡止痛滴丸^[23]、六经头痛片^[24]、海马补肾丸^[25]等多个中药大品种进行了系统的二次开发研究,建立了中药大品种二次开发研究的模式和方法^[26-28]。

本文对丹红化瘀口服液进行了系统的药效物质基础和作用机制研究,通过从原料药材-成方制剂-入血成分-网络药理学-体外活性筛选研究,发现丹红化瘀口服液发挥治疗作用的药效物质基础可能为丹参中的酚酸类成分(丹酚酸B、丹酚酸D、丹参素、迷迭香酸、原儿茶醛),川芎和当归中的阿魏酸、洋川芎内酯I,枳壳中的柚皮苷和柠檬苦素,红花中的羟基红花黄色素A,柴胡中的柴胡皂苷a。通过整体动物-网络药理学-体外受体试验研究,表明丹红化瘀口服液具有抗血栓作用、抗炎、抗新生血管生成和扩张血管等作用,对视网膜中央静脉阻塞症具有改善作用,其机制可能与抑制ADRA1A、VEGFR2酪氨酸激酶、PDE3A、凝血酶和ECE1活性有关,具有多成分、多靶点、多途径的特点,为丹红化瘀口服液的临床推广应用和指导临床实践提供了重要的理论和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang Z Y, Hu L Y, Chen W P, et al. Danhong Huayu Koufuye prevents deep vein thrombosis through anti-inflammation in rats [J]. *J Surg Res*, 2016, 201(2): 340-347.
- [2] Chen W P, Yao X L, Zhou C H, et al. Danhong Huayu Koufuye prevents diabetic retinopathy in streptozotocin-

- induced diabetic rats via antioxidation and anti-inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3059763.
- [3] Lin B Q, Zhou J Y, Ma Y, *et al.* Preventive effect of Danhong Huayu Koufuye on diabetic retinopathy in rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(6): 599-604.
- [4] 汤继明, 孟俭. 丹红化瘀汤治疗糖尿病视网膜病变疗效观察 [J]. 山东中医杂志, 2007, 26(5): 305.
- [5] 朱惠明, 江玉, 李玲, 等. 丹红化瘀口服液治疗单纯型糖尿病视网膜病变 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 320-323.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 677.
- [7] 骆新瑞, 郑钦象, 李文生. 视网膜中央静脉阻塞的循证医学研究进展 [J]. 中国实用眼科杂志, 2011, 29(2): 103-109.
- [8] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [9] Zhang H B, Wu X, Liu X Y, *et al.* Quality transitivity of Danhong Huayu Koufuye: A study on chemical profiles of medicinal herbs, compound preparation and dosed rat plasma using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(5): e4813.
- [10] 郭倩, 田成旺, 任涛, 等. 中药药效物质基础研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 648-654.
- [11] 韩彦琪, 曹勇, 董亚楠, 等. 疏风解毒胶囊疏风解表的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3534-3540.
- [12] 林娟, 韩彦琪, 武琦, 等. 基于网络药理学的丹红化瘀口服液治疗视网膜中央静脉阻塞症的作用机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1643-1650.
- [13] 韩彦琪, 武琦, 林娟, 等. 丹红化瘀口服液对视网膜中央静脉阻塞症关键靶点的调节作用 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1634-1642.
- [14] 秦文敏, 周彩虹, 杨克让. 丹红化瘀口服液对糖尿病肾病大鼠的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 2114-2117.
- [15] 胡路云, 包芷君, 刘涵, 等. 丹红化瘀口服液抗血栓形成作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 104-108.
- [16] 钟春梅, 马燕, 王延东, 等. 丹红化瘀口服液联合胰岛素对早期糖尿病肾病的防治作用 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(6): 568-572.
- [17] 林宝琴, 钟春梅, 林俊粒, 等. 丹红化瘀口服液联合胰岛素对早期糖尿病大鼠心肌病的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(7): 1218-1221.
- [18] 李学晶, 唐由之, 张守康, 等. 老年缺血型视网膜中央静脉阻塞治疗探析: 附 2 例病例分析 [J]. 中国中医眼科杂志, 2011, 21(5): 297-299.
- [19] 林娟, 徐旭, 李新, 等. 丹红化瘀口服液对气滞血瘀证大鼠眼结膜微循环的改善作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1628-1633.
- [20] Seong H, Ryu J, Yoo W S, *et al.* Resveratrol ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury in C57BL/6J mice via downregulation of caspase-3 [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(12): 1650-1658.
- [21] 王玉丽, 林娟, 李新, 等. 丹红化瘀口服液对大鼠视网膜中央静脉阻塞症的保护作用 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1621-1627.
- [22] 张铁军, 朱强, 许浚, 等. 疏风解毒胶囊二次开发的系统研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3517-3525.
- [23] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [24] 张铁军, 申秀萍, 王磊, 等. 六经头痛片的二次开发研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4145-4150.
- [25] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 海马补肾丸质量标志物研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4613-4619.
- [26] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药大品种质量标准提升研究的思路与实践 [J]. 天津中医药, 2017, 34(1): 4-12.
- [27] 张铁军, 白钢, 许浚, 等. 基于“精准医学”的中药质量认识与评价研究路径 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(1): 35-43.
- [28] 张铁军, 康海军. 元胡止痛滴丸二次开发研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2017.

[责任编辑 崔艳丽]