

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

韩彦琪^{1,2}, 武琦³, 林娟⁴, 刘耀晨⁵, 许浚^{1,2,6}, 张洪兵^{1,2}, 张铁军^{1,2*}, 刘昌孝^{1,2,6*}

1. 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

2. 天津药物研究院 释药技术与药物代谢动力学国家重点实验室, 天津 300462

3. 康龙化成(北京)生物技术有限公司, 北京 100176

4. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

5. 天津医科大学, 天津 300070

6. 天津药物研究院 中国医学科学院药物代谢新技术创新单元, 天津 300462

摘要:目的 采用 G 蛋白偶联受体及酶活检测实验方法, 探究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, 明确其作用机制。方法 选取磷酸二酯酶 3A (phosphodiesterase 3A, PDE3A)、凝血酶 (Thrombin)、内皮素转化酶 1 (endothelin converting enzyme 1, ECE1)、血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、 $\alpha 1A$ 肾上腺素受体 ($\alpha 1A$ adrenergic receptor, ADRA1A) 为研究载体, 通过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 14 个主要单体成分对 PDE3A、Thrombin、ECE1、VEGFR2 酪氨酸激酶和 ADRA1A 的抑制活性。结果 丹红化瘀口服液对以上 5 个靶点均有显著的抑制作用 ($P < 0.001$); 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸和柚皮苷对 PDE3A 有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.001); 14 个化合物对 Thrombin 均有显著的抑制活性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 对 ECE1 有显著的抑制活性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、柠檬苦素对 VEGFR2 酪氨酸激酶有显著的抑制效果 ($P < 0.01$ 、 0.001); 柴胡皂苷 a 可显著抑制 ADRA1A 活性 ($P < 0.001$)。结论 ADRA1A、VEGFR2、PDE3A、Thrombin 和 ECE1 可能为丹红化瘀口服液治疗中央静脉阻塞症的关键作用靶点, 其药效物质基础可能为丹参酮 II_A、丹酚酸 B、丹酚酸 D、丹参素、迷迭香酸、原儿茶醛、阿魏酸、川芎嗪、洋川芎内酯 I、羟基红花黄色素 A、苦杏仁苷、柴胡皂苷 a、柚皮苷和柠檬苦素。

关键词: 丹红化瘀口服液; 视网膜中央静脉阻塞症; 磷酸二酯酶; 凝血酶; 内皮素转化酶; 血管内皮生长因子受体 2; $\alpha 1$ 肾上腺素受体; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 丹酚酸 D; 丹参素; 迷迭香酸; 原儿茶醛; 阿魏酸; 川芎嗪; 洋川芎内酯 I; 羟基红花黄色素 A; 苦杏仁苷; 柴胡皂苷 a; 柚皮苷; 柠檬苦素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1634-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.005

Regulatory effect of Danhong Huayu Oral Liquid on key targets of central retinal vein occlusion

HAN Yan-qi^{1,2}, WU Qi³, LIN Juan⁴, LIU Yao-chen⁵, XU Jun^{1,2,6}, ZHANG Hong-bing^{1,2}, ZHANG Tie-jun^{1,2}, LIU Chang-xiao^{1,2,6}

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Pharmaron Beijing Co., Ltd., Beijing 100176, China

收稿日期: 2021-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81830111); 中医药现代化研究重点专项 (2019YFC1711200); 天津市自然科学基金资助项目 (19JCQNJC12700); 广西中药药效研究重点实验室开放课题 (20-065-38); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助 (2019-I2M-5-020)

作者简介: 韩彦琪 (1989—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: hanyq@tjipr.com

*通信作者: 张铁军, 研究员, 研究方向为中药新药研发及中药大品种二次开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士, 从事药理学与药动力学研究。E-mail: liucx@tjipr.com

4. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China
5. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
6. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

Abstract: Objective To explore the regulatory effect and mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid (丹红化瘀口服液, DHOL) on key targets of central retinal vein occlusion (CRVO) by G protein coupled receptor (GPCR) and enzyme activity assay. **Methods** Phosphodiesterase 3A (PDE3A), thrombin, endothelin converting enzyme 1 (ECE1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and α 1A adrenergic receptor (ADRA1A) were selected as research vectors. Intracellular calcium fluorescence detection and enzyme inhibitor detection techniques were used to evaluate the inhibitory effects of DHOL and 14 main compounds on ADRA1A, VEGFR2 tyrosine kinase, PDE3A, thrombin and ECE1. **Results** DHOL significantly inhibited the above five targets ($P < 0.001$); Salvianolic acid D, salvianolic acid B, danshensu, rosmarinic acid and naringin significantly inhibited PDE3A ($P < 0.05, 0.001$); All the 14 compounds had significant inhibitory effects on thrombin ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); Salvianolic acid D, salvianolic acid B, danshensu, rosmarinic acid, ferulic acid and hydroxysafflor yellow A had inhibitory activities on ECE1 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); Salvianolic acid D, salvianolic acid B, danshensu, rosmarinic acid and limonin had inhibitory effects on VEGFR2 tyrosine kinase ($P < 0.01, 0.001$); Saikosaponin a had significant antagonize on ADRA1A ($P < 0.001$). **Conclusion** ADRA1A, VEGFR2, PDE3A, thrombin and ECE1 may be the key targets of DHOL in the treatment of CRVO. The pharmacodynamic material basis may be tanshinone II_A, salvianolic acid B, salvianolic acid D, danshensu, rosmarinic acid, protocatechualdehyde, ferulic acid, ligustrazine, senkyunolide I, hydroxysafflor yellow A, amygdalin, saikosaponin a, naringin and limonin.

Key words: Danhong Huayu Oral Liquid; central retinal vein occlusion; phosphodiesterase 3A; thrombin; endothelin converting enzyme 1; vascular endothelial growth factor receptor 2; α 1A adrenergic receptor; tanshinone II_A; salvianolic acid B; salvianolic acid D; danshensu; rosmarinic acid; protocatechualdehyde; ferulic acid; ligustrazine; senkyunolide I; hydroxysafflor yellow A; amygdalin; saikosaponin a; naringin; limonin

丹红化瘀口服液由丹参、川芎、当归、桃仁、红花、柴胡、枳壳 7 味药材组成，有活血化瘀、行气通络之功效，用于气滞血瘀引起的视物不清、突然不见症；视网膜中央静脉阻塞症（central retinal vein occlusion, CRVO）的吸收期见上述证候者^[1]。方中丹参、当归为君药，活血化瘀、养血润燥、消目中之瘀血；川芎、桃仁、红花等为臣药，活血化瘀；更以疏肝、行气之柴胡、枳壳为“佐使”，行气以助化瘀；共奏活血化瘀，行气通络之功。临床研究表明^[2-5]，丹红化瘀口服液对 CRVO 的疗效表现为视力提高、眼底出血消退，眼底荧光血管造影可见静脉充盈时间缩短、血管渗漏消失或减退。提示丹红化瘀口服液具有活血化瘀、行气通络的功效，可抑制体外血栓形成，改善血液流变性，能够增加眼内巨噬细胞数，增强其吞噬能力，抑制胶原纤维及胶原组织的增生。

为探究丹红化瘀口服液的关键作用靶点并明晰其药效物质基础，本研究基于前期化学物质组、血中移行成分^[6]及网络药理学研究并综合相关文献，选取了 7 味药材中各结构类型的主要代表性成分共 14 个化合物为研究对象，同时以磷酸二酯酶 3A

（phosphodiesterase 3A, PDE3A）、凝血酶（Thrombin）、内皮素转化酶 1（endothelin converting enzyme 1, ECE1）、血管内皮生长因子受体 2（vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2）、 α 1A 肾上腺素受体（ α 1A adrenergic receptor, ADRA1A）5 个关键靶点为研究载体，通过运用胞内钙离子荧光检测和酶抑制剂检测技术评价丹红化瘀口服液及 14 个主要单体成分对 5 个靶点的抑制活性。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

PDE3A（批号 110802HEGE）购自 BPS 公司；羧基荧光素标记的环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）（FAM-cAMP，批号 2873747）、IMAP FP IPP Explorer Kit（批号 3171238）、FLIPR[®] Calcium 4 assay kit（批号 GPCRC4AK20180917XJ-a）购自 Molecular Devices 公司；曲喹辛（批号 1B/235609）、磷酸二肽（批号 20130301）、激酶反应底物 Poly(Glu, Tyr)_{4:1}（批号 SLCB3414）、肾上腺素（批号 107K0710）、丙磺舒（批号 GPCR027720180917XJ）、三磷酸腺苷（adenosine

triphosphate, ATP, 批号 SLBR1590V)、二甲基亚砜 (methyl sulfoxide, DMSO 批号 RNBj6295) 购自美国 Sigma 公司; 凝血酶 (批号 20140228)、Z-GPR-AMC (批号 20131129)、加贝酯 (批号 20131129) 购自 Enzo 公司; 内皮素转化酶 (批号 MLD0414021)、Mca-RPPGFSAFK (Dnp) (批号 FCH0716101) 购自 R&D 公司; 酪氨酸激酶 VEGFR2 (批号 WAB0366-E) 购自 Eurofins 公司; 抗磷酸化酪氨酸的单克隆抗体 PY99 (批号 J2220) 购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (批号 140193) 购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT, 批号 SLCG9541)、邻苯二胺 (1,2-

diaminobenzene, OPD, 批号 E410BA1007) 购自上海生工生物工程股份有限公司; 舒尼替尼 SU11248 (批号 D0909A) 购自大连美仑生物技术有限公司; WB4101 (批号 7) 购自 Tocris 公司; 14 个单体化合物详细信息见表 1; 丹红化瘀口服液 (10 mL/支) 购自广州白云山和记黄埔中药有限公司。

Envision 多功能酶标仪 (PerkinElmer 公司); Echo550 型超声波纳升液体处理系统 (Labcyte 公司); PHERA Star Plus 荧光酶标仪 (BMG Labtech 公司); Spectra Max Plus 384 型可调波长式微孔板酶标仪、FLIPR Tetra 实时荧光成像分析系统 (Molecular Devices 公司)。

表 1 14 个单体化合物信息

Table 1 Information of 14 compounds

编号	结构类型	成分	化学式	厂家/批号	质量分数	来源
1	丹参酮类	丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18101510	≥98%	丹参
2	丹酚酸类	丹酚酸 D	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18121703	≥96%	丹参
3		丹酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-17040503	≥98%	丹参
4	有机酸类	丹参素	C ₉ H ₁₀ O ₅	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18060920	≥98%	丹参
5		原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18071608	≥98%	丹参
6		迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18053110	≥98%	丹参
7		阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18032928	≥98%	川芎、当归、柴胡
8	生物碱类	川芎嗪	C ₈ H ₁₂ N ₂	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-17052403	≥98%	川芎、当归
9	苯酞类	洋川芎内酯 I	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18083105	≥98%	川芎、当归
10	氰苷	苦杏仁苷	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	中国食品药品检定研究院/110820-201607	99.28%	桃仁
11	查耳酮类	羟基红花黄色素 A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	中国食品药品检定研究院/111637-201609	≥95%	红花
12	皂苷类	柴胡皂苷 A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18042105	≥98%	柴胡
13	黄酮类	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-18050808	≥98%	枳壳
14	萜类	柠檬苦素	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	成都曼斯特生物科技有限公司/MUST-17120113	≥98%	枳壳

1.2 方法

1.2.1 PDE3A 抑制活性实验 反应缓冲液由 2 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)、2 mmol/L MgCl₂、0.01% NaN₃、0.002% 聚山梨酯-20、1 mmol/L DTT 组成, 反应终止液由 0.85 倍 IMAP progressive binding A 溶液、0.15 倍 IMAP progressive binding B 溶液、1/600 倍 IMAP progressive binding bead 溶液组成, 阳性抑制剂曲喹辛 (Trequinsin) 给药浓度为 0.1 μmol/L, 丹红化瘀口服液给药浓度为原液稀释 50 倍和 500 倍, 14 个化合物给药浓度为 100、10 μmol/L。

将化合物用 DMSO 在 Echo384 孔板上稀释到所需要的浓度, 用 Echo550 仪器从 Echo384 孔板中转移 200 nL 样品到 Echo384 反应板中, 阴性对照 (加酶组) 和阳性对照 (不加酶组) 均转移 200 nL DMSO。对于丹红化瘀给药组, 分别吸取 0.8 μL 的 2 倍溶液和 20 倍溶液到反应板上, 阴性对照和阳性对照均转移 0.8 μL 水。然后向 384 反应板中加入 10 μL 的 2 倍 PDE 酶溶液 (终浓度为 0.53 nmol/L), 阳

性对照加入 10 μL 反应缓冲液, 1000 r/min 离心 1 min, 室温下孵育 15 min 后每孔加入 10 μL 的 2 倍 FAM-cAMP 底物溶液, 1000 r/min 离心 1 min, 25 °C 反应 30 min。最后, 每孔加入 60 μL 反应终止液, 室温下摇床 600 r/min 振荡孵育 60 min。采用 Envision 多功能酶标仪读数, 参数设置 Ex=480 nm (s)、Em=535 nm (p), Ex 代表激发光, Em 代表发射光, s、p 分别代表垂直和水平方向上的发射光, 计算抑制率。

抑制率 = 1 - (样品值 - 最小值) / (最大值 - 最小值)

最大值 (加 DMSO 加酶组) 指 DMSO 对照的信号值, 最小值 (加 DMSO 不加酶组) 指无酶活对照的信号值

1.2.2 Thrombin、ECE1 活性抑制实验 以 50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、1% PEG6000、pH 6.5 为蛋白酶 Thrombin 的反应缓冲液, 以 0.1 MES、0.1 mol/L NaCl、pH 6.0、0.05% Brij-35 为蛋白酶 ECE-1 的反应缓冲液配制阳性抑制剂和样品: Thrombin 阳性抑制剂加贝酯最高浓度为 20 μmol/L, ECE-1 阳

性抑制剂磷酸二肽最高浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 14 个化合物给药浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$, 丹红化瘀口服液给药浓度为原液稀释 50 倍和 500 倍。

分别以蛋白酶 Thrombin 和蛋白酶 ECE-1 的反应缓冲液配制合适浓度的蛋白酶溶液 (蛋白酶 Thrombin 最终质量浓度为 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 蛋白酶 ECE-1 最终质量浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$), 向 Echo384 孔板中加入 3 μL 稀释的检测样品及阳性对照, 阴性对照组加入 3 μL 反应缓冲液, 室温孵育 20 min, 用 TopSeal-A 384 封好密封。分别以蛋白酶 Thrombin 和蛋白酶 ECE-1 的反应缓冲液配制合适浓度的底物溶液 (蛋白酶 Thrombin 的底物 Z-GPR-AMC 最终检测浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$, 蛋白酶 ECE-1 的底物 Mca-RPPGFSAFK (Dnp) 最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 各组均加入 3 μL 蛋白酶的底物, 开始反应。用 PHERAstarPLUS (BMG) 的动力学模块 (蛋白酶 Thrombin 检测模块 $E_x=360\text{ nm}$, $E_m=460\text{ nm}$, 蛋白酶 ECE-1 检测模块 $E_x=320\text{ nm}$, $E_m=405\text{ nm}$) 检测 10 min。计算样品抑制率。

1.2.3 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制活性实验 酶反应底物 Poly(Glu, Tyr)_{4:1} 用无钾离子的 PBS 溶液稀释成 20 g/mL, 包被酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12~16 h, 弃去孔中液体, T-PBS 洗板 3 次, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥酶标板, 在包被好酶标板孔内加入阳性抑制剂 (SU11248 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$) 及受试样品 (丹红化瘀口服液终浓度为原液稀释 100 和 1000 倍, 14 个化合物终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$)。然后加入用反应缓冲液稀释的 ATP 溶液 (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$), 最后加入用反应缓冲液稀释的受试酪氨酸激酶, 反应体系总体积为 100 μL , 同时设立阴性对照孔和无 ATP 对照孔, 阴性对照孔加酶加 ATP, 同时对照加入等体积 DMSO。将反应体系置于湿盒内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床避光反应 1 h, 反应结束后 T-PBS 洗板 3 次。每孔加入 100 μL PY9 抗体 9, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床反应 30 min, T-PBS 洗板 3 次。每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床反应 30 min, T-PBS 洗板 3 次。每孔加入 100 μL OPD 显色液, 室温避光反应 1~10 min。加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 中止反应, 用可调波长式微孔板酶标仪测 A_{490} 值, 计算样品抑制率。

1.2.4 ADRA1A 受体拮抗活性实验 本实验分别以肾上腺素 (Epinephrine) 和 WB4101 为阳性激动化合物和阳性拮抗化合物, 最高浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,

5 倍稀释、8 个浓度点。14 个化合物均用 DMSO 溶解制成 50 mmol/L 储液, 检测时用 HBSS-20 mmol/L HEPES 缓冲液进行稀释, 最终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 。丹红化瘀口服液最终给药浓度为原液稀释 50、500 倍。本研究中 DMSO 浓度均未超过 0.2%。

稳定表达 ADRA1A 受体的 CHO-K1 细胞用含 10% 胎牛血清的 Ham's F12 培养基培养于 10 cm 培养皿中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养, 当细胞融合度达到 80%~85% 时, 进行消化处理, 将收集到的细胞悬液, 以 1.5×10^4 个/孔接种到 Echo384 微孔板, 放入培养箱中继续过夜培养后将细胞取出, 阴性对照组、阳性对照组及待测样品组均加入 20 μL 染料, 阳性对照组及待测样品组分别加入 10 μL 配制好的阳性拮抗剂溶液及待测样品溶液后, 将细胞板放到培养箱孵育 1 h, 再于室温平衡 15 min。检测时, 将细胞板、阳性激动剂板和枪头盒放到实时荧光成像分析系统内, 运行抑制剂检测程序, 仪器总体检测时间为 120 s, 在第 21 秒时自动将 12.5 μL 阳性激动剂加入到各组细胞内。

通过 ScreenWorks (version 3.1) 获得原始数据以 FMD 文件保存在计算机网络系统中。数据采集和分析使用 Excel 和 GraphPad Prism 6 软件程序。对于每个检测孔而言, 以 1~20 s 的平均荧光强度值作为基线, 21~120 s 的最大荧光强度值减去基线值即为相对荧光强度值 (ΔRFU), 根据该数值计算激活或抑制百分率。

$$\text{抑制率} = 1 - (\Delta\text{RFU}_{\text{化合物}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}}) / (\Delta\text{RFU}_{\text{阳性激动剂}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}})$$

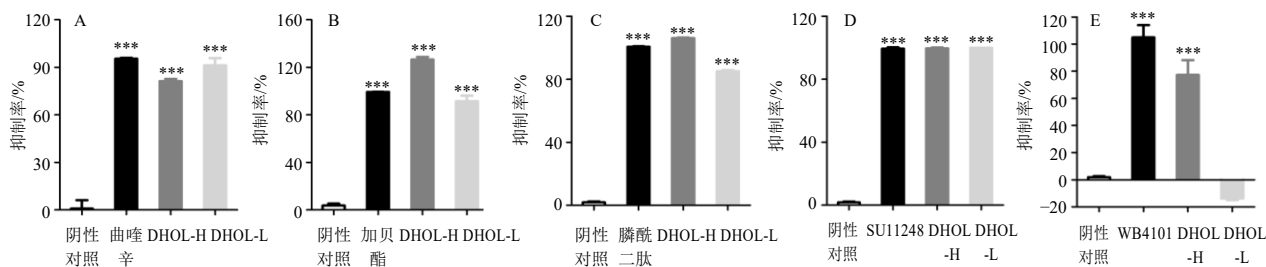
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 软件进行数据统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 PDE3A 抑制实验结果

如图 1-A 所示, 丹红化瘀口服液在稀释 50 倍 (DHYY-H) 和 500 倍 (DHYY-L) 的浓度下对 PDE3A 的抑制率分别为 80.3% 和 94.5%, 与阴性对照组比较具有显著的抑制活性 ($P < 0.001$)。14 个化合物实验结果见图 2, 14 个化合物中来源于君药丹参药材的丹酚酸类成分丹酚酸 D、丹酚酸 B, 有机酸类成分丹参素、迷迭香酸, 来源于枳壳药材的黄酮类成分柚皮苷在高浓度对 PDE3A 的抑制率分别为 89.2%、102.8%、61.6%、98.0%、48.0%, 与阴性



与阴性对照比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control, same as below figures

图 1 丹红化瘀口服液对 PDE3A (A)、Thrombin (B)、ECE1 (C)、VEGFR2 (D) 和 ADRA1A (E) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 1 Inhibitory effect of Danhong Huayu Oral Liquid on PDE3A (A), Thrombin (B), ECE1 (C), VEGFR2 (D) and ADRA1A (E) ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

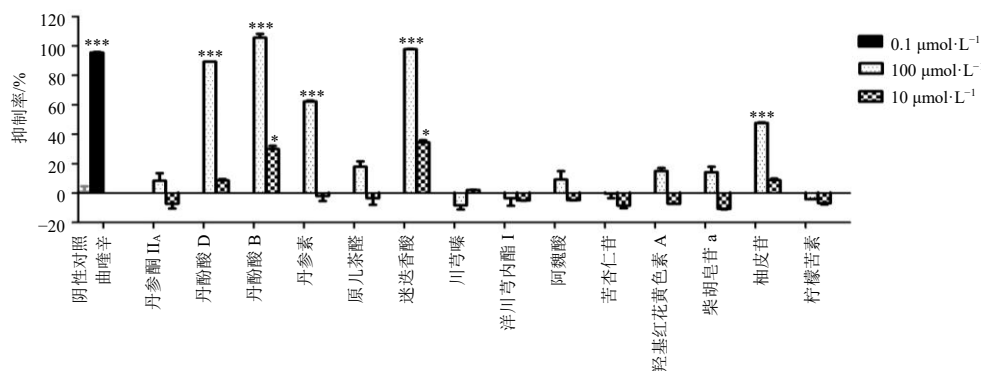


图 2 14 个化合物对 PDE3A 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 2 Inhibitory effect of 14 compounds on PDE3A ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

对照组比较具有显著的抑制作用 ($P < 0.001$), 丹酚酸 B 和迷迭香酸在低浓度对 PDE3A 也有较弱的抑制活性 ($P < 0.05$)。

2.2 Thrombin、ECE1 抑制实验结果

丹红化瘀口服液在稀释 50 倍的浓度下对 Thrombin (图 1-B)、ECE1 (图 1-C) 的抑制率均大于 100%, 在稀释 500 倍的浓度下抑制率大于 85%, 与阴性对照组比较均具有显著的抑制活性 ($P < 0.001$), 显示出较强的抑制效果, 且呈现剂量相关性。14 个化合物对 Thrombin、ECE1 抑制活性实验

结果见图 3、4, 14 个化合物在高浓度下对 Thrombin 均有显著的抑制活性 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 丹参素、迷迭香酸、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、柴胡皂苷 a 在低浓度对该酶无显著抑制活性, 其他 9 个化合物在低浓度均有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、0.01)。另外, 丹参药材中的丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素在高、低给药浓度下对 ECE1 有显著的抑制活性 ($P < 0.05$ 、0.01), 迷迭香酸、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 只在高浓度下对该酶有显著的抑制活性 ($P < 0.01$ 、0.001)。

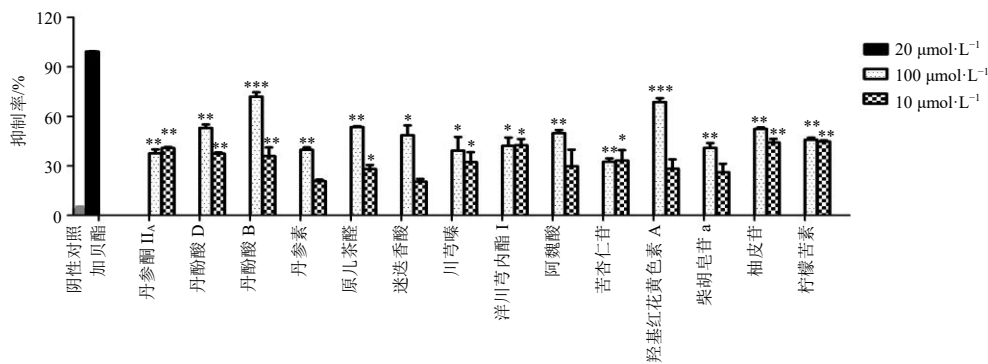


图 3 14 个化合物对 Thrombin 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 3 Inhibitory effect of 14 compounds on Thrombin ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

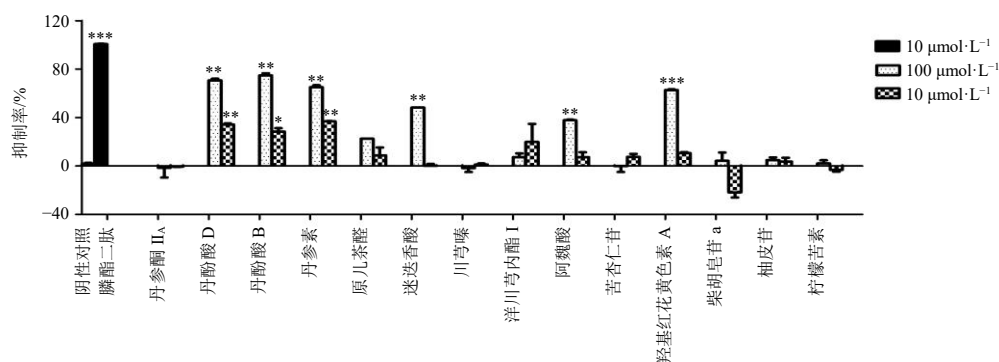


图 4 14 个化合物对 ECE1 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 4 Inhibitory effect of 14 compounds on ECE1 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

2.3 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制实验结果

与阴性对照组比较,丹红化瘀口服液在稀释 100 和 1000 倍的浓度下对 VEGFR2 酪氨酸激酶均有显著的抑制活性 ($P < 0.001$),抑制率高达 100%,表明其能通过作用于该酶发挥治疗作用(图 1-D)。如图 5 所示,14 个化合物中来源于君药丹参药材的丹酚酸类成分丹酚酸 D、丹酚酸 B 及有机酸类成分丹参素、迷迭香酸在高浓度下对 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制率分别达到 82.50%、80.60%、77.75%和 90.90%,显示出显著的抑制效果 ($P < 0.001$),在低浓度下抑制效果依

然显著 ($P < 0.01, 0.001$)。来源于枳壳药材的萜类成分柠檬苦素高浓度下抑制率为 74.65%,同样对 VEGFR2 酪氨酸激酶有显著的抑制活性 ($P < 0.01$)。

2.4 ADRA1A 拮抗实验结果

丹红化瘀口服液稀释 50 倍给药后对 ADRA1A 受体抑制率达到 77.27% (图 1-E),对其有显著的拮抗作用 ($P < 0.001$)。如图 6 所示,14 个化合物中只有柴胡中皂苷类成分柴胡皂苷 a 对 ADRA1A 有显著的拮抗作用 ($P < 0.001$),而其他化合物给药后对该受体无拮抗作用。

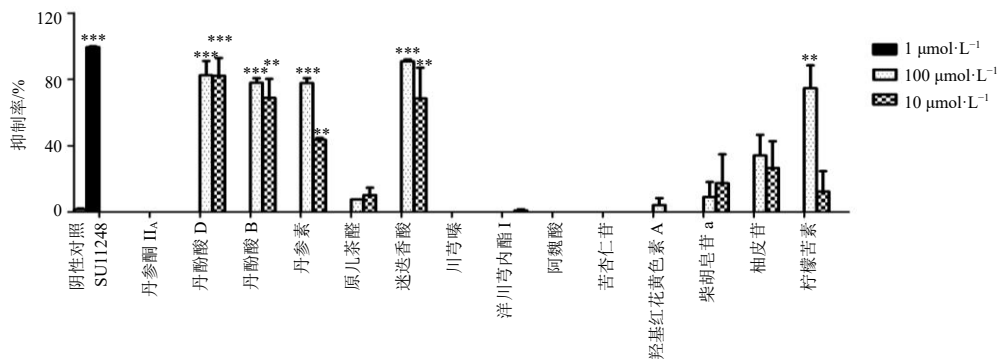


图 5 14 个化合物对 VEGFR2 酪氨酸激酶的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 5 Inhibitory effect of 14 compounds on VEGFR2 tyrosine kinase ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

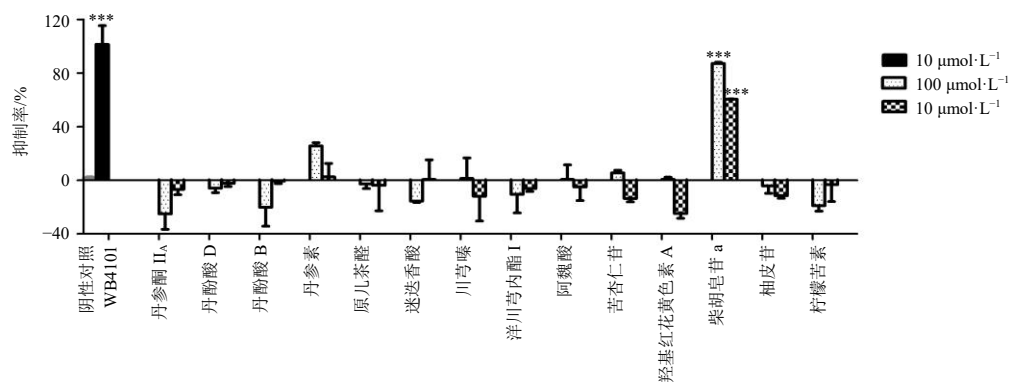


图 6 14 个化合物对 ADRA1A 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 6 Inhibitory effect of 14 compounds on ADRA1A ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

3 讨论

CRVO 是常见的视网膜血管病变之一,是致盲的重要原因。其特点是视网膜微血管进行性损害,血管通透性增加,新生血管形成,导致视力丧失。VEGF 等生长因子在缺血、缺氧状态呈高表达,是促进 CRVO 患者形成新生血管的最强因子,它能通过与其受体结合而发挥增加血管通透性,促进细胞外基质变性,引起视网膜渗出、出血,诱导血管生成素增加;并能刺激血管内皮细胞增殖、迁移,促进微血管内皮细胞增生,还能诱导氧化应激损伤和亚临床的细胞炎症反应,这些因素都可促进新生血管的形成^[7-8]。抗 VEGF 药物能抑制内皮细胞及视网膜色素上皮血管 VEGF 的表达,抑制新生血管的形成,从而降低视网膜血管通透性,保护血-视网膜屏障,是治疗黄斑水肿的重要靶点,是目前临床治疗 CRVO 的最流行措施^[9]。本课题组前期动物药效结果发现,气滞血瘀大鼠 ig 丹红化瘀口服液 3 周后,血清中 VEGF 含量降低,与临床等效剂量的阿司匹林比较具有一定的潜在优势。因此,本研究对丹红化瘀口服液的 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制活性进行了探究,发现该方对其有显著的抑制活性,抑制率高达 100%,效果明显。并且在选择的 14 个代表性化合物对该酶抑制活性实验结果中,丹参药材中的丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸对 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制率均达到了 75%以上,具有显著的抑制效果;同样来源于枳壳药材的柠檬苦素抑制率为 74.65%,也有显著的抑制活性。由此推断,丹红化瘀口服液治疗 CRVO 的最关键机制之一为抑制 VEGFR2 酪氨酸激酶,从而抑制血管再生,而其最主要的药效物质基础可能为君药丹参中的成分。

CRVO 是血栓引起的疾病之一,血栓的形成及调节主要与血管、血小板、凝血因子等有关。内皮素是目前所知的最强的长效缩血管活性多肽^[10],主要由血管内皮细胞分泌,对维持基础血管张力与心血管系统稳态起重要作用。其引起的血管收缩、心肌缺血、代谢紊乱和细胞增殖是与血管损伤有关疾病的共同致病因素。内皮素转换酶是内皮素生物合成的限速酶,是内皮素发挥生物功能的重要调节因素。血小板内 cAMP 含量对血小板的聚集有重要调节作用^[11-12]。cAMP 升高可抑制血小板磷脂酶 A₂ 和环氧化酶的活性,干扰膜的花生四烯酸代谢,从而减少血栓素 A₂ 合成。而血栓素 A₂ 可促进血小板内二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP)、Ca²⁺、

5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 等活性物质释放,以进一步促进血小板聚集;同时 cAMP 升高可激活致密小管 (钙贮库) 的钙泵,加速胞质 Ca²⁺ 重摄回钙库,从而降低胞质内游离钙离子浓度。而 Ca²⁺ 是激活血小板、启动血小板收缩和释放反应的关键物质^[13]。血小板内 cAMP 含量主要受血小板腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 和 PDE 活性的调节,PDE 被激活,可加速 cAMP 降解^[14-16]。因此,抑制 PDE 的活性可抑制 cAMP 的降解,增高细胞内 cAMP 浓度,从而抑制血小板聚集。凝血酶是凝血过程的关键酶。当血管组织损伤时,引起血浆因子、组织因子及血小板的释放,这 3 类凝血因子的激活导致凝血酶原致活物的生成,它可将凝血酶原转变成有活性的凝血酶。凝血酶可促进可溶性血浆纤维蛋白原转变成不溶性的纤维蛋白,进而形成血栓^[17-18]。因此,本研究考察了丹红化瘀口服液和代表性化合物对 ECE1、PDE3A 和 Thrombin 的抑制作用。结果显示,丹红化瘀口服液对 3 个酶都有很强的抑制活性,并且丹酚酸 D、丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、羟基红花黄色素 A 对 ECE1 也具有显著的抑制活性;丹酚酸 B、迷迭香酸、丹酚酸 D、丹参素和柚皮苷对 PDE3A 的抑制效果显著;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 Thrombin 都显示出较好的抑制活性。由此推测,丹红化瘀口服液可通过抑制 ECE1、PDE3A 和 Thrombin 活性,减少 ET 合成,抑制血管收缩,阻断 cAMP 降解,抑制血小板聚集,阻断纤维蛋白合成,抑制血栓,进而发挥活血化瘀的治疗作用。

由于 CRVO 的病理过程为机体的血液流变学水平异常,促使眼底微循环障碍,引起视网膜静脉迂曲扩张,血管内的血流变慢甚至停滞^[19]。多种活血化瘀药物都可扩张冠状动脉、增加冠脉血流量,还能扩张外周血管,减低外周阻力,增加器官组织血流量,具有改善心功能和血流动力学的作用^[20]。丹红化瘀口服液含有丹参、川芎、红花等多种活血化瘀药材,因此本研究选择了目前在所有 G 蛋白偶联膜表面受体中相对了解最清楚的一种—— α_1 肾上腺素受体进行作用机制的深入研究。结果发现,丹红化瘀口服液能显著抑制 α_{1A} 受体,体现出很好的生物活性,提示该方的作用途径之一可能为拮抗 α_{1A} 受体、扩张血管、改善血流动力学。实验选取的 14

个化合物中, 柴胡皂苷 a 对 α_{1A} 受体有显著的抑制作用, 可能是丹红化瘀口服液拮抗 α_{1A} 的药效物质基础。

综上, ADRA1A、VEGFR2、PDE3A、Thrombin、ECE1 可能为丹红化瘀口服液治疗 CRVO 的部分作用靶点。如图 7 所示, 丹红化瘀口服液可能通过抑

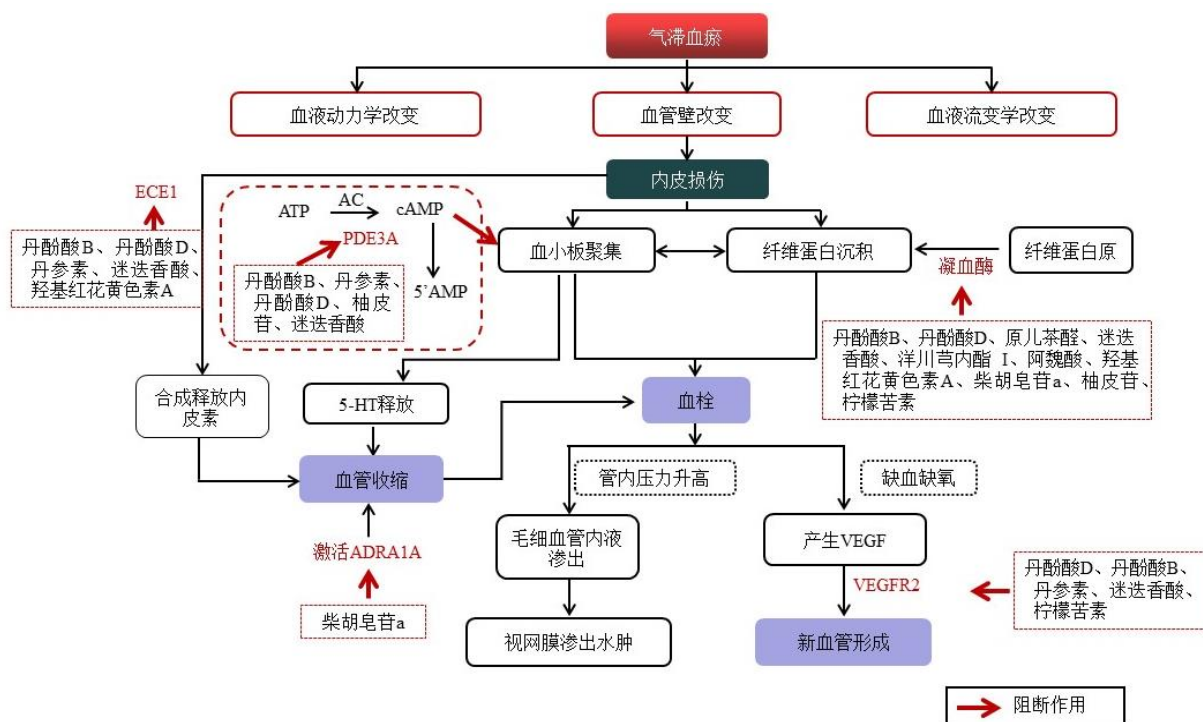


图 7 丹红化瘀口服液治疗视网膜中央静脉阻塞症的作用机制

Fig. 7 Mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid on central retinal vein occlusion

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; 通过抑制 PDE3A 的活性阻断 cAMP 的裂解, 升高细胞内 cAMP 浓度, 从而抑制血小板聚集; 通过抑制凝血过程的关键酶 Thrombin, 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 ADRA1A 受体舒张血管, 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。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李鹏, 林娟, 唐萍, 等. 丹红化瘀口服液药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1616-1620.
- [2] 孙建国, 张玉明, 王芳芳. 丹红化瘀口服液对非增生性糖尿病视网膜病变血管生成的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 170-174.
- [3] 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.

- [4] 王峰, 杨志艳, 苏颖, 等. 丹红化瘀口服液治疗视网膜静脉阻塞临床观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(3): 178.
- [5] 李海威, 靖鹏举, 孙晓萍, 等. 丹红化瘀口服液联合卵磷脂络合碘治疗视网膜静脉阻塞的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(4): 655-658.
- [6] Zhang H, Wu X, Liu X, 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.
- [7] 吴学志. 血栓通联合丹红化瘀口服液对糖尿病性视网膜病变患者 hs-CRP、VEGF 及 IGF-1 水平的影响 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(7): 141-142.
- [8] Campa C, Alivernini G, Bolletta E, et al. Anti-VEGF therapy for retinal vein occlusions [J]. Curr Drug Targets, 2016, 17(3): 328-336.
- [9] 符郁, 郭翠玲. 丹红化瘀口服液对视网膜中央静脉阻

- 塞细胞因子网络的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 210-215.
- [10] 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.
- [11] Haslam R J, Dickinson N T, Jang E K. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 82(2): 412-423.
- [12] Raslan Z, Naseem K M. The control of blood platelets by cAMP signalling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(2): 289-294.
- [13] Weber A A, Hohlfeld T, Schrör K. cAMP is an important messenger for ADP-induced platelet aggregation [J]. *Platelets*, 1999, 10(4): 238-241.
- [14] Begum N, Shen W, Manganiello V. Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: Implications in cardiovascular diseases and infertility [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(6): 725-729.
- [15] Tilley D G, Maurice D H. Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE)3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP *in vivo* [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(3): 497-506.
- [16] Zhao H, Quilley J, Montrose D C, *et al*. Differential effects of phosphodiesterase PDE-3/PDE-4-specific inhibitors on vasoconstriction and cAMP-dependent vasorelaxation following balloon angioplasty [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(6): H2973-H2981.
- [17] Lundblad R L, Bradshaw R A, Gabriel D, *et al*. A review of the therapeutic uses of thrombin [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91(5): 851-860.
- [18] Leoncini G, Signorello M G, Segantin A, *et al*. In retinal vein occlusion platelet response to thrombin is increased [J]. *Thromb Res*, 2009, 124(6): e48-e55.
- [19] Ip M, Hendrick A. Retinal vein occlusion review [J]. *Asia Pac J Ophthalmol*, 2018, 7(1): 40-45.
- [20] 陈晨, 刘倩, 高华. 活血化瘀药药理作用研究进展 [J]. 中国药事, 2011, 25(6): 603-605.

[责任编辑 李亚楠]