

基于网络药理学探讨丹红化瘀口服液治疗深静脉血栓的作用机制

黄博宁^{1,3}, 林娟², 彭思远³, 陈子健³, 林超³, 林宝琴^{1*}

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 基于网络药理学方法探讨丹红化瘀口服液治疗深静脉血栓 (deep vein thrombosis, DVT) 的作用机制。方法 利用中药系统药理学技术平台数据库 (TCMSP) 获取丹红化瘀口服液的主要化学成分及作用靶点, 利用 Uniprot 数据库对获取的作用靶点进行规范化处理; 通过 DisGeNet、GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库获取 DVT 相关靶点; 利用 Venny 2.1.0 绘图网站构建 Venn 图, 得到丹红化瘀口服液与 DVT 的交集靶点; 应用 String 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络; 通过 David 数据库对交集靶点进行基因本体 (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, 使用微生信网站绘制结果气泡图, 并利用 KEGG Mapper 平台制作通路机制图; 相关结果采用 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化研究及网络拓扑结构分析。**结果** 经过数据库分析共筛选丹红化瘀口服液化学成分 130 个, 潜在作用靶点 268 个, 其中涉及 DVT 靶点 136 个。“中药-成分-疾病靶点”网络显示, 槲皮素、木犀草素、山柰酚等是丹红化瘀口服液治疗 DVT 的主要活性成分, 转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等是丹红化瘀口服液治疗 DVT 的核心靶点。通过 GO 功能富集分析得到 211 条生物进程条目, 124 条分子功能条目, 72 条细胞成分条目。通过 KEGG 通路富集分析, 得到 3 条与 DVT 相关的通路, 即胞内磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路。**结论** 丹红化瘀口服液可通过多成分、多靶点和多通路发挥治疗 DVT 的作用, 为拓宽其临床用途提供基础。

关键词: 网络药理学; 丹红化瘀口服液; 深静脉血栓; 活性成分; 靶点; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)06-1652-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.007

Mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid in treatment of deep vein thrombosis based on network pharmacology

HUANG Bo-ning^{1,3}, LIN Juan², PENG Si-yuan³, CHEN Zi-jian³, LIN Chao³, LIN Bao-qin¹

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid (DHL) in the treatment of deep vein thrombosis (DVT) based on network pharmacology. **Methods** The main compounds and targets of DHL were obtained with Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP), then the acquired targets of DHL were standardized by Uniprot database. Related targets of DVT were collected through databases of DisGeNet, GeneCards, OMIM and DrugBank. Then the intersection targets of DHL-DVT were screened by constructing a Venn diagram with Venny 2.1.0 drawing website. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by String platform. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis were performed by DAVID database. The bubble charts were drawn by bioinformatics website,

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 广州市科技计划项目 (202002030108)

作者简介: 黄博宁, 男, 本科, 研究方向为新药研发。E-mail: huangboning2021@163.com

*通信作者: 林宝琴, 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为新药研发。E-mail: linbqcpu@126.com

and diagrams of signaling pathway were built by KEGG Mapper platform. All of the related results were visualized by Cytoscape 3.7.2, and network topology feature analysis was made by Network Analyzer. **Results** A total of 130 chemical components in DHOL, and 268 potential targets including 136 DVT targets were screened out with database analyses. The result of “traditional Chinese medicine-compound-disease target” network showed that quercetin, luteolin, kaempferol were main active ingredients of DHOL for the treatment of DVT, transcription factor AP-1 (JUN), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were core targets. Furthermore, 211 biological process terms, 124 molecular functional terms and 72 cellular component terms were obtained with GO function enrichment analysis. Moreover, three relative pathways of DVT including phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway, TNF signaling pathway and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway were obtained with KEGG pathway enrichment analysis. **Conclusion** DHOL plays a role in the treatment of DVT through multi-component, multi-target and multi-channel, which provides a basis for broadening its clinical application.

Key words: network pharmacology; Danhong Huayu Oral Liquid; deep vein thrombosis; active compounds; targets; mechanism

深静脉血栓形成 (deep vein thrombosis, DVT) 在人群中的发病率高达 0.152%^[1], 若不及时治疗, 可进展为肺栓塞引起死亡。随着科学技术发展, 现认为静脉血栓发生发展的 3 要素: ①血流改变 (停滞); ②内皮功能障碍; ③血液高凝状态^[2]。20 世纪 70 年代以来, 越来越多的研究发现炎症反应在 DVT 中起着关键作用^[3-4]。

丹红化瘀口服液为王清任“血府逐瘀汤”的加減方, 由丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳 7 味中药组成, 比例分别为 29.0%、11.5%、15.0%、11.5%、11.5%、11.5%和 10.0%^[5-6]。方中丹参活血祛瘀, 配合当归活血养血, 使瘀血去而又不伤血; 川芎活血行气, 桃仁润燥活血, 红花散瘀止痛, 助丹参活血祛瘀之效; 柴胡疏肝解郁, 枳壳理气宽中, 一升一降, 使气行则血行。因此, 丹红化瘀口服液具有活血化瘀、行气通络之功效。

DVT 属于中医血瘀证“脉痹”的范畴, 为气滞血瘀和气机不畅所致。因此, 丹红化瘀口服液对 DVT 有治疗作用。网络药理学是基于系统生物学、基因组学、蛋白组学等学科理论, 通过数据分析、计算机模拟及网络数据库检索等技术, 揭示药物-基因-靶点-疾病相互作用的网络关系, 符合中药复方治疗疾病的多成分、多靶点、多通路的特点^[7-8]。为较全面了解丹红化瘀口服液治疗 DVT 的作用机制, 本研究采用网络药理学方法, 对丹红化瘀口服液有效成分抗 DVT 的作用靶点进行预测, 为揭示其作用机制和拓宽其临床用途奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 丹红化瘀口服液相关靶点的筛选

通过中药系统药理学技术平台数据库 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 寻找丹

参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳 7 味中药的化学成分, 根据口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 以及类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 2 个药动学属性值进行初步筛选, 以获得丹红化瘀口服液的主要化学成分及其作用的蛋白靶点。筛选结束后, 为标准化蛋白质靶点信息, 统一在 Uniprot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将化学成分作用的蛋白靶点进行规范。

1.2 DVT 相关靶点的筛选

以“deep vein thrombosis”为关键词, 检索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>)、DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org>) 中 DVT 潜在靶点, 并进入 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca>) 寻找 DVT 临床一线化学药作用靶点予以补充。在 GeneCards 数据库中, Score 值越高则代表该靶点与疾病关系密切。根据经验, 若靶点过多则设定 Score 大于中位数的目标靶点为 DVT 的潜在靶点, 合并 4 个疾病数据库靶点后, 删除重复值得到 DVT 靶点。

1.3 “中药-成分-疾病靶点”网络的构建

为明确丹红化瘀口服液靶点与 DVT 靶点之间的相互作用, 利用 Venny 2.1.0 绘图网站 (<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将两者靶点取交集并绘制 Venn 图。进而将交集靶点基因导入 CytoScape 3.7.2 软件绘制“中药-成分-疾病靶点”网络图, 并根据网络图各个节点的度值筛选丹红化瘀口服液治疗 DVT 的主要活性成分。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建及核心基因的筛选

将上述交集靶点提交至 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org>) 构建 PPI 网络图, 将生物种类

设定为“Homo sapiens”，最小相互作用阈值设定为“highest confidence”(>0.9)，其余设置均为默认设置，并隐藏游离点后分析蛋白与蛋白的相互作用得到 PPI 网络。将导出的数据通过 Cytoscape 3.7.2 软件的 CytoHubba 插件，利用其 MCC 算法筛选核心靶点，利用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 对数据进行可视化处理。

1.5 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

将得到的交集靶点录入 David 平台 (<https://david.ncifcrf.gov>)，物种设置为“Homo sapiens”，分析主要的生物学过程与代谢通路并进行富集分析，选取 P 值小于 0.01 的前 20 条数据，利用微生信网站对其进行可视化处理。利用 KEGG Mapper 平台 (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper.html>) 对与 DVT 形成相关且较多关键基因所富集的通路，进行靶点-通路分析，并绘制通路机制图。

2 结果

2.1 丹红化瘀口服液的靶点

利用 TCMSP 平台以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件，分别检索丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳 7 味中药，共收集到 130 个化学成分。删除无法检索出与之相对应靶点的化学成分后，得到丹红化瘀口服液化学成分 109 个，靶点 1132 个。删除靶点重复项，利用 Uniprot 数据库将靶点转化成相对应基因名，并进行规范化处理，得到靶点基因 268 个。

2.2 DVT 的靶点

以“deep vein thrombosis”为检索关键词，收集 DVT 相关靶点，其中在 GeneCards 数据库收集到靶点 1042 个，OMIM 数据库 14 个，DisGeNet 数据库 230 个，DrugBank 数据库 25 个，删除重复基因，得到 1146 个 DVT 疾病基因。

2.3 “中药-成分-疾病靶点”网络的构建

利用 Venny 2.1.0 网站将丹红化瘀口服液化学成分靶点与疾病靶点取交集，得到交集靶点 136 个，并绘制 Venn 图，见图 1。为更加清晰阐明化学成分与靶点之间的关系，以中药名称拼音首字母对中药进行简化后对各类中药进行编码，如丹参(dan shen, DS)，以英文字母 A、B、C、D、E、F、G 对丹红化瘀口服液中中共有的 7 种化学成分进行编码，如 β -sitosterol 编码为 A，见表 1。

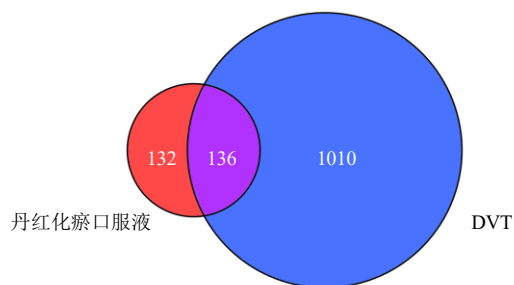


图 1 丹红化瘀口服液与 DVT 交集靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of Danhong Huayu Oral Liquid and DVT

利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 136 个交集靶点进行“中药化学成分-疾病靶点”网络图的绘制，见图 2。使用 Cytoscape 3.7.2 软件中 Network Analysis 功能计算分析得到 248 个节点，749 条边，平均度值为 6.4，筛选度值 ≥ 12.8 的化学成分作为丹红化瘀口服液治疗 DVT 的主要活性成分，见表 2。其中排名前 3 的槲皮素、木犀草素、山柰酚为共有化学成分。

2.4 PPI 网络图及核心靶点筛选结果

将 136 个交集靶点导入 String 数据库，获得 PPI 网络数据，将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑分析，得到 130 个节点，716 条边。研究发现 Cytoscape 3.7.2 软件的 Cytohubba 插件中的 MCC 算法在预测靶点方面发挥重要的作用，具有更大优势^[9]。故本次实验采用 MCC 算法，选取 MCC 数值排名前 20 靶点绘制条形图，见图 3。MCC 数值越高，代表节点在网络中越重要。选取 MCC 数值排名前 10 的靶点作为丹红化瘀口服液治疗 DVT 的核心靶点，分别为转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、IL-4、细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53)、IL-8 (又称为 CXCL8) 和免疫细胞的趋化因子 2 (C-C motif chemokine 2, CCL2)，见表 3。

2.5 GO 功能富集分析

将得到的 136 个交集靶点导入 David 数据库进行 GO 分析，包括生物过程 (biological processes, BP) 分析、分子功能 (molecular functions, MF) 分析和细胞成分 (cellular components, CC) 分析。根

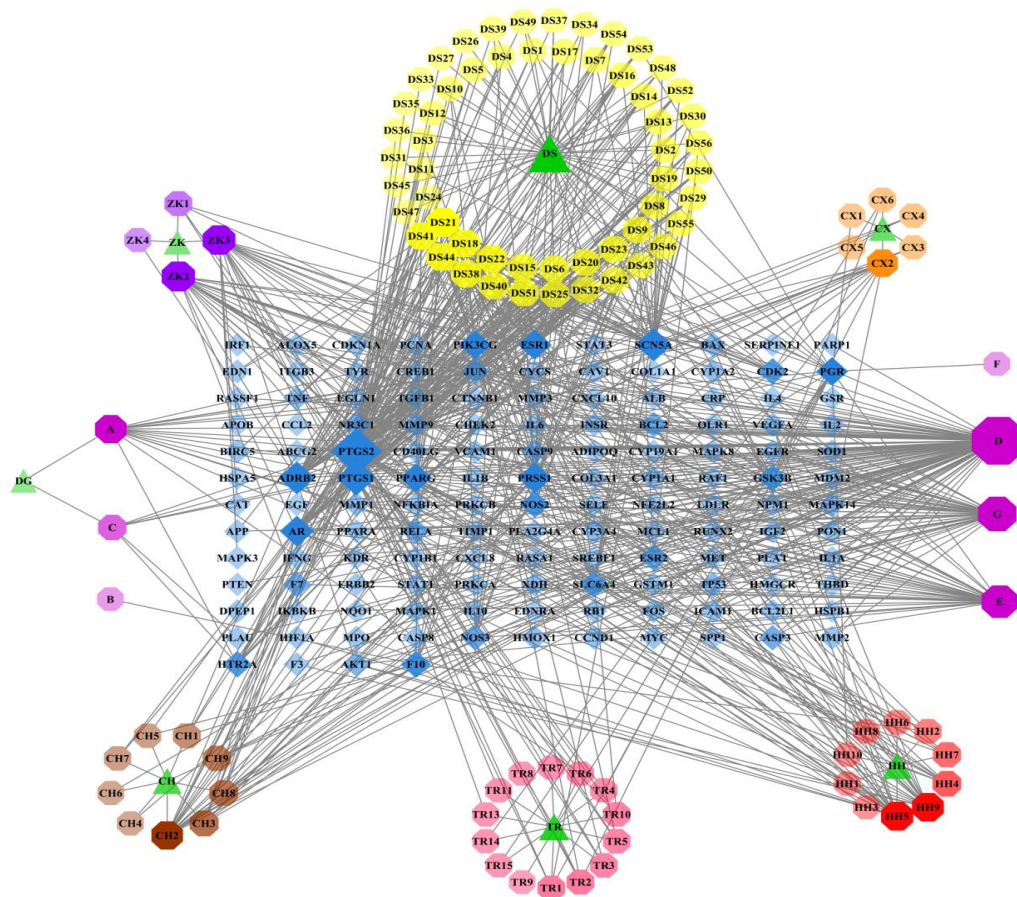
表 1 丹红化瘀口服液的化学成分

Table 1 Compounds of Danhong Huayu Oral Liquid

中药	编码	Mol ID	成分	OB/%	DL
丹参	DS1	MOL007064	przewalskin b	110.32	0.44
	DS2	MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	109.38	0.35
	DS3	MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	75.39	0.46
	DS4	MOL007058	formyltanshinone	73.44	0.42
	DS5	MOL007120	miltionone II	71.03	0.44
	DS6	MOL007105	epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31
	DS7	MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	65.26	0.45
	DS8	MOL007130	prolithospermic acid	64.37	0.31
	DS9	MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofuran-carboxaldehyde	62.78	0.40
	DS10	MOL007068	przewaquinone B	62.24	0.41
	DS11	MOL000569	digallate	61.85	0.26
	DS12	MOL007081	danshenol B	57.95	0.56
	DS13	MOL007082	danshenol A	56.97	0.52
	DS14	MOL007069	przewaquinone c	55.74	0.40
	DS15	MOL007108	isocryptotanshinone	54.98	0.39
	DS16	MOL007125	neocryptotanshinone	52.49	0.32
	DS17	MOL007079	tanshinaldehyde	52.47	0.45
	DS18	MOL007088	cryptotanshinone	52.34	0.40
	DS19	MOL007094	danshenspiroketallactone	50.43	0.31
	DS20	MOL007111	isotanshinone II	49.92	0.40
	DS21	MOL007154	tanshinone iia	49.89	0.40
	DS22	MOL007119	miltionone I	49.68	0.32
	DS23	MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	49.40	0.29
	DS24	MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	48.24	0.31
	DS25	MOL007156	tanshinone VI	45.64	0.30
	DS26	MOL007141	salvianolic acid g	45.56	0.61
	DS27	MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23
	DS28	MOL007115	manool	45.04	0.20
	DS29	MOL007101	dihydrotanshinone I	45.04	0.36
	DS30	MOL007045	3 α -hydroxytanshinone IIa	44.93	0.44
	DS31	MOL001659	poriferasterol	43.83	0.76
	DS32	MOL002651	dehydrotanshinone IIa	43.76	0.40
	DS33	MOL007077	sclareol	43.67	0.21
	DS34	MOL007142	salvianolic acid j	43.38	0.72
	DS35	MOL007152	przewaquinone E	42.85	0.45
	DS36	MOL007151	tanshindiol B	42.67	0.45
	DS37	MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	41.31	0.45
	DS38	MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.86	0.23
	DS39	MOL007071	przewaquinone f	40.31	0.46
	DS40	MOL007124	neocryptotanshinone II	39.46	0.23
	DS41	MOL007093	dan-shexinkum d	38.88	0.55
	DS42	MOL007122	miltirone	38.76	0.25
	DS43	MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	38.75	0.36
	DS44	MOL007100	dihydrotanshinolactone	38.68	0.32
	DS45	MOL007063	przewalskin a	37.11	0.65
	DS46	MOL007061	methylenetanshinquinone	37.07	0.36
	DS47	MOL007121	mltipolone	36.56	0.37
	DS48	MOL002222	sugiol	36.11	0.28
	DS49	MOL007107	C09092	36.07	0.25
	DS50	MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	34.72	0.37
	DS51	MOL007049	4-methylenemiltirone	34.35	0.23
	DS52	MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	33.77	0.29
	DS53	MOL007143	salvilenone I	32.43	0.23
	DS54	MOL007059	3- β -hydroxymethylenetanshinquinone	32.16	0.41
	DS55	MOL007145	salviolone	31.72	0.24
	DS56	MOL007085	salvilenone	30.38	0.38

续表 1

中药	编码	Mol ID	成分	OB/%	DL
桃仁	TR1	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
	TR2	MOL000493	campesterol	37.58	0.71
	TR3	MOL001368	3- <i>O-p</i> -coumaroylquinic acid	37.63	0.29
	TR4	MOL001323	sitosterol alpha1	43.28	0.78
	TR5	MOL001328	2,3-didehydro GA70	63.29	0.50
	TR6	MOL001352	GA54	64.21	0.53
	TR7	MOL001355	GA63	65.54	0.54
	TR8	MOL001361	GA87	68.85	0.57
	TR9	MOL001342	GA121-isolactone	72.70	0.54
	TR10	MOL001358	gibberellin 7	73.80	0.50
	TR11	MOL001340	GA120	84.85	0.45
	TR12	MOL001360	GA77	87.89	0.53
	TR13	MOL001329	2,3-didehydro GA77	88.08	0.53
	TR14	MOL001344	GA122-isolactone	88.11	0.54
	TR15	MOL001349	4a-formyl-7 α -hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4 α ,4b β -gibbane-1 α ,10 β -dicarboxylic acid	88.60	0.46
	TR16	MOL001353	GA60	93.17	0.53
	TR17	MOL001351	gibberellin A44	101.61	0.54
红花	HH1	MOL002694	4-[(<i>E</i>)-4-(3,5-dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene)but-2-enylidene]-2,6-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one	48.47	0.36
	HH2	MOL002695	lignan	43.32	0.65
	HH3	MOL002710	pyrethrin II	48.36	0.35
	HH4	MOL002712	6-hydroxykaempferol	62.13	0.27
	HH5	MOL002714	baicalein	33.52	0.21
	HH6	MOL002717	carthamone	51.03	0.20
	HH7	MOL002721	quercetagenin	45.01	0.31
	HH8	MOL002757	7,8-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrimido[5,6- <i>g</i>]quinoxaline-2,4-dione	45.75	0.19
	HH9	MOL002773	β -carotene	37.18	0.58
	HH10	MOL000953	CLR	37.87	0.68
柴胡	CH1	MOL013187	cubebin	57.13	0.64
	CH2	MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31
	CH3	MOL004609	areapillin	48.96	0.41
	CH4	MOL004624	longikaurin A	47.72	0.53
	CH5	MOL004653	(+)-anomalin	46.06	0.66
	CH6	MOL004718	α -spinasterol	42.98	0.76
	CH7	MOL001645	linoleyl acetate	42.10	0.20
	CH8	MOL004598	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	31.97	0.59
	CH9	MOL000490	petunidin	30.05	0.31
川芎	CX1	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	CX2	MOL002135	myricanone	40.60	0.51
	CX3	MOL001494	mandenol	42.00	0.19
	CX4	MOL002157	wallichilide	42.31	0.71
	CX5	MOL002140	perlolyrine	65.95	0.27
	CX6	MOL000433	FA	68.96	0.71
枳壳	ZK1	MOL002341	hesperetin	70.31	0.27
	ZK2	MOL005828	nobiletin	61.67	0.52
	ZK3	MOL004328	naringenin	59.29	0.21
	ZK4	MOL013381	marmin	38.23	0.31
红花、桃仁、枳壳、当归	A	MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75
红花、柴胡、丹参	B	MOL002776	baicalin	40.12	0.75
红花、柴胡、当归	C	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
红花、柴胡	D	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
	E	MOL000422	kaempferol	62.13	0.27
红花、丹参	F	MOL001771	poriferast-5-en-3 β -ol	36.91	0.75
	G	MOL000006	luteolin	36.16	0.25



正八边形代表从丹红化瘀口服液筛选的化学成分;菱形代表靶点;三角形代表丹红化瘀口服液中的 7 味中药;节点越大、颜色越深代表其在网络中越重要

Regular octagon represents the compounds selected from Danhong Huayu Oral Liquid; diamond represents target; triangle represents seven traditional Chinese medicine in Danhong Huayu Oral Liquid; the larger the node and darker the color is, the more important it is in the network

图 2 “中药-成分-疾病靶点”网络

Fig. 2 “Traditional Chinese medicine-compound-disease target” network

表 2 丹红化瘀口服液的主要活性成分

Table 2 Main active compounds of Danhong Huayu Oral Liquid

所属中药	编码	Mol ID	成分	度值
红花、柴胡	D	MOL000098	槲皮素	93
红花、丹参	G	MOL000006	木犀草素	42
红花、柴胡	E	MOL000422	山柰酚	34
枳壳	ZK2	MOL005828	川陈皮素	24
枳壳	ZK3	MOL004328	柚皮素	22
丹参	DS21	MOL007154	丹参酮 II _A	21
红花	HH5	MOL002714	黄芩素	20
红花	HH9	MOL002773	β-胡萝卜素	19
红花、桃仁、枳壳、当归	A	MOL000358	β-谷甾醇	18
柴胡	CH2	MOL000354	异鼠李素	18
川芎	CX2	MOL002135	杨梅酮	15
丹参	DS18	MOL007088	隐丹参酮	14
丹参	DS41	MOL007093	丹参新醌 D	14
丹参	DS44	MOL007100	二氢丹参内酯	14
丹参	DS22	MOL007119	丹参新醌 I	13
丹参	DS38	MOL007041	2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮	13

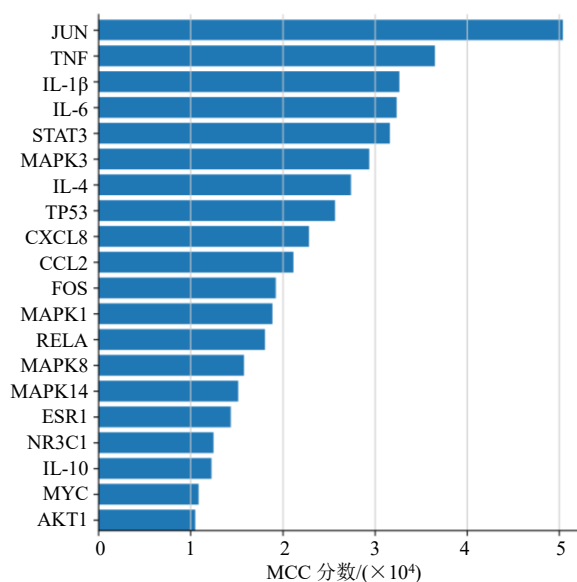


图 3 MCC 值前 20 的靶点

Fig. 3 Top 20 targets for MCC score

表 3 丹红化瘀口服液治疗 DVT 的核心靶点

Table 3 Core targets of Danhong Huayu Oral Liquid for treatment of DVT

靶点	MCC 值	排名
JUN	50 394	1
TNF	36 505	2
IL-1 β	32 646	3
IL-6	32 356	4
STAT3	31 634	5
MAPK3	29 380	6
IL-4	27 391	7
TP53	25 687	8
CXCL8	22 840	9
CCL2	21 168	10

据导出数据的 P 值、基因数值、基因比率值, 选取 P 值小于 0.01 的前 20 条数据, 利用微生信网站绘制气泡图。GO-BP 分析可得到 211 个条目, 发现丹红化瘀口服液治疗 DVT 富集在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、凋亡过程的负调控、DNA 模板转录正调控、对药物的反应和细胞增殖的正向调控等 BP, 见图 4-A。GO-MF 分析得到 124 个条目, 发现其富集在蛋白质结合、酶的结合、相同的蛋白质结合、蛋白质的同源二聚作用和蛋白质的异源二聚作用等 MF, 见图 4-B。GO-CC 分析得到 72 个条目, 发现其富集在细胞核、细胞溶质、细胞质、细胞膜、细胞外间隙等 CC, 见图 4-C。GO 功能分析

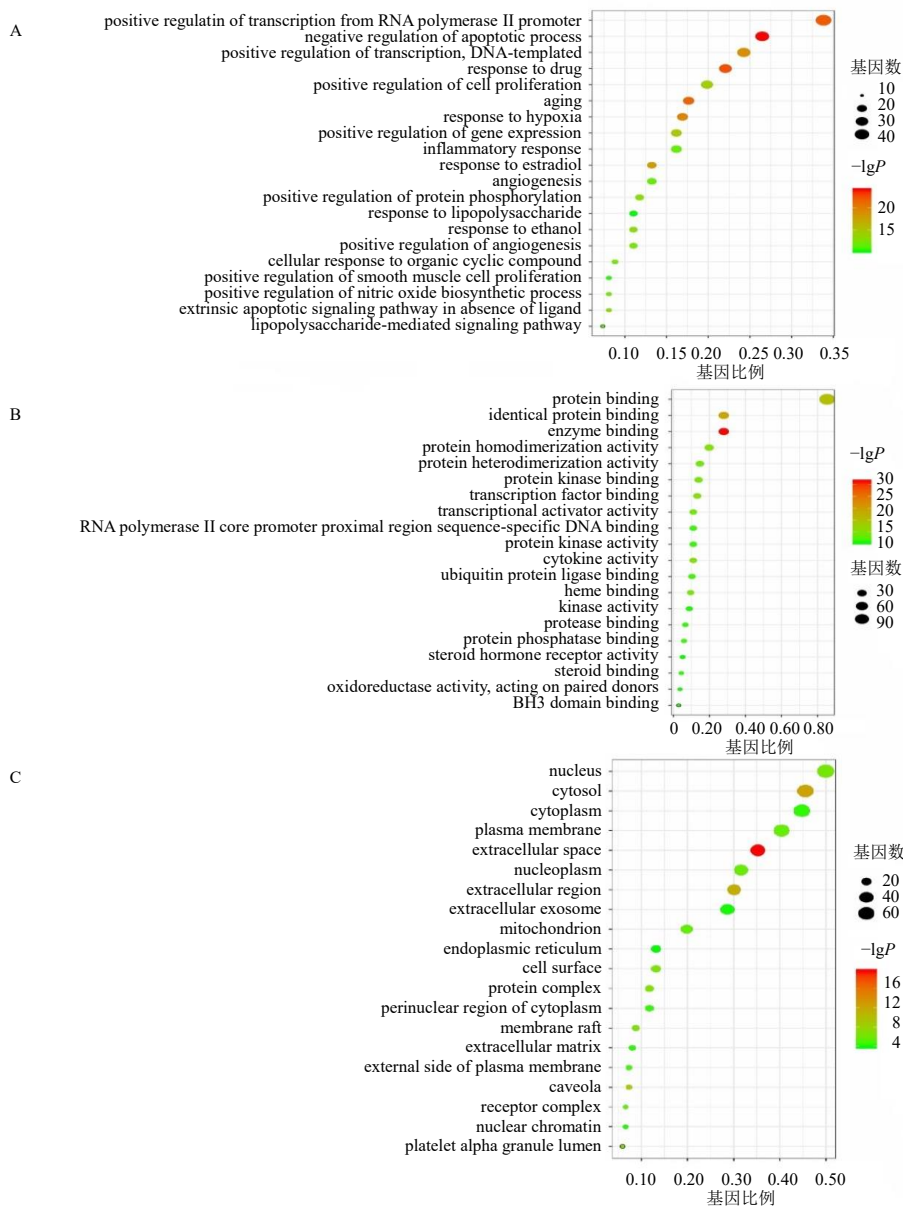


图 4 GO-BP (A)、GO-MF (B) 和 GO-CC (C) 分析气泡图

Fig. 4 Bubble charts of GO-BP (A), GO-MF (B) and GO-CC (C) analysis

结果表明丹红化瘀口服液可能通过影响 DNA 复制、转录,细胞的凋亡、增殖和应激反应等 BP,通过与酶、转录因子等靶点蛋白的结合影响靶点蛋白的 MF,通过干预细胞质、细胞膜等 CC 的合成,发挥治疗 DVT 的作用。

2.6 KEGG 通路富集分析

使用 David 数据库对 136 个交集靶点进行 KEGG 通路富集分析,得到 130 个富集通路条目。结果显示,基因主要富集于癌症相关通路、乙型肝炎通路、胞内磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路、癌症中的蛋白多糖通路、甲型流感通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路,见图 5。利用 KEGG Mapper 平台对排名靠前且与 DVT 相关的通路,即 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路绘制通路机制图,结合通路机制图进一步分析丹红化瘀口服液治疗 DVT 的具体作用机制,见图 6。

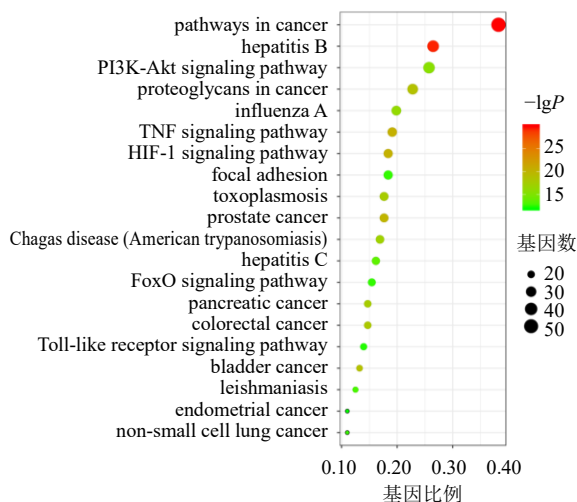


图 5 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis

3 讨论

国内临床研究表明,45% DVT 病人可发生肺栓塞。肺栓塞是临床上病人猝死的主要原因之一,因此必须重视 DVT 的防治^[10]。丹红化瘀口服液具有活血化瘀、行气通络等功效。本课题组前期研究均显示丹红化瘀口服液具有显著的抗 DVT 作用^[5,11-13]。

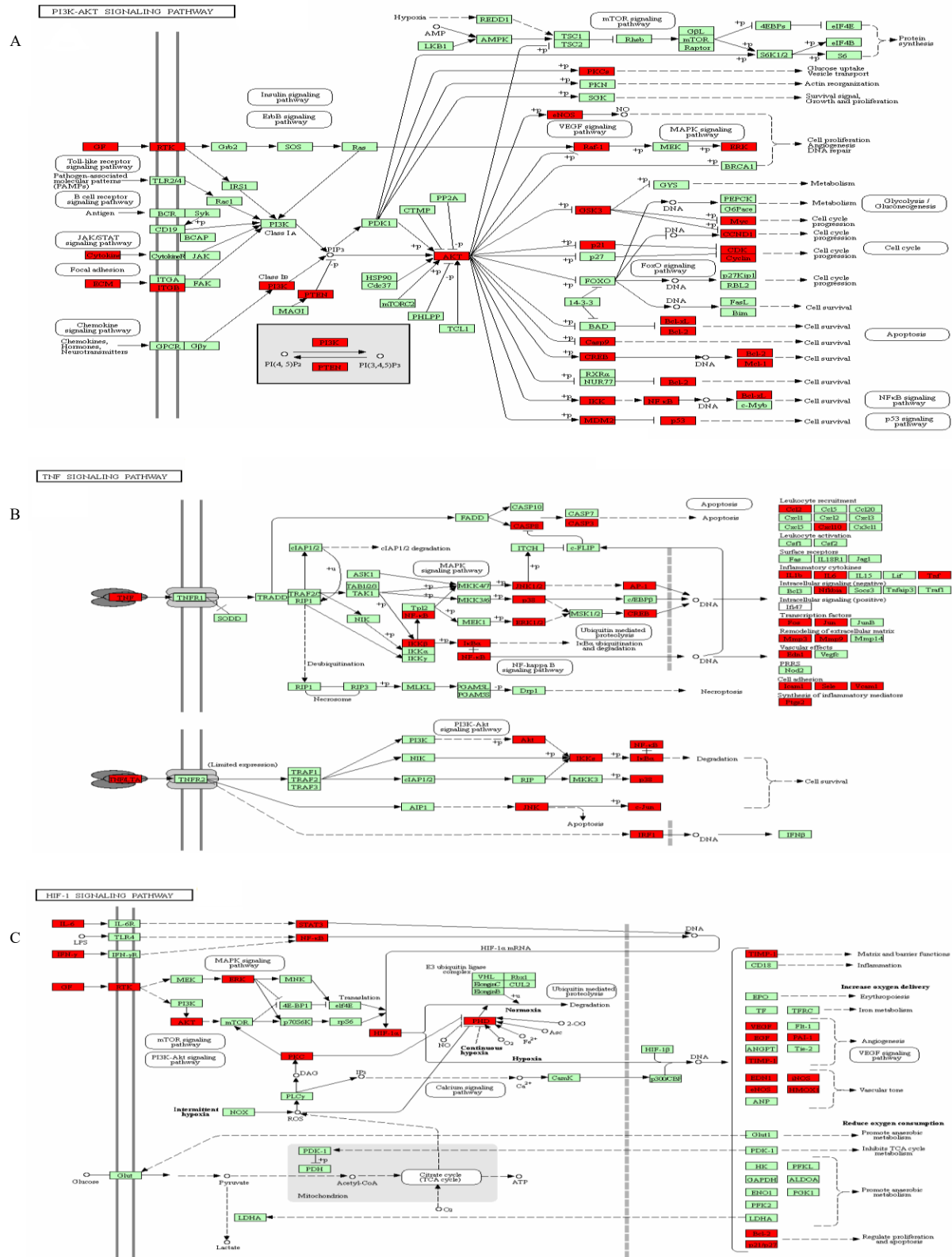
本研究根据“中药-成分-疾病靶点”网络图发现丹红化瘀口服液治疗 DVT 的主要活性成分为槲皮素、木犀草素和山柰酚等。研究表明,槲皮素、木

犀草素可显著抑制 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的释放^[14-16];木犀草素还能够抑制 IL-4、IL-8 的释放,同时调控 CCL2 的表达^[16];山柰酚能够显著抑制 MAPK 通路,进而抑制 MAPK 通路下游 IL-8(又名 CXCL8)等炎症因子的表达^[17]。

在筛选出来的 16 个丹红化瘀口服液治疗 DVT 的主要化学成分中,丹参占了 7 个,其次是红花占 6 个,柴胡和枳壳各占 3 个,推测丹参可能是丹红化瘀口服液抗 DVT 形成的核心中药,与原方君药地位相符。现代药理学研究表明,丹参具有抗凝血、抗氧化及抗炎等药理作用^[18],红花在血栓防治和抗炎等方面作用明显^[19]。可见,丹红化瘀口服液复方中诸药合用,共同发挥其抗血栓形成的作用。

利用 MCC 算法筛选丹红化瘀口服液治疗 DVT 的核心靶点,前 10 位分别为 JUN、TNF、IL-1 β 、IL-6、STAT3、MAPK3、IL-4、TP53、CXCL8 和 CCL2,多为炎症相关的靶点基因。炎症反应是 DVT 形成的病理机制^[20-22]。血小板 STAT3 的非转录活化可促进促炎因子释放和血栓的形成,并与凝血因子之间产生信号互动,正因为这种信号互动导致血小板的过度活化^[23]。TNF 是一种由巨噬细胞对细菌感染或其他免疫源反应自然产生的细胞因子,可分为 TNF- α 和 TNF- β 2 种亚型。研究表明,DVT 患者体内 TNF- α 水平显著升高^[24]。TNF- α 可促进 IL-1、IL-6 和 IL-8 等炎症介质的释放,参与调控炎症反应,从而影响血栓的发展;TNF- α 还可诱导内皮细胞表达组织因子(tissue factor, TF),抑制 TF 通路抑制剂合成及抑制内皮细胞表达血栓调节蛋白,促进血栓形成。研究表明,丹红化瘀口服液能够显著降低 DVT 大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平,下调 TF 蛋白表达^[5,10]。临床研究也表明丹红化瘀口服液可降低视网膜静脉阻塞患者体内的 TNF- α 水平^[25]。

对筛选出来的 136 个交集靶点进行 KEGG 通路富集分析,发现与 DVT 相关的通路主要为 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路。DVT 的形成可分为血流阻断和缺氧、内皮细胞活化以及炎症反应 3 个阶段^[26]。TNF- α 激活 TNF 受体 1 后,可活化下游一系列蛋白激酶,最终激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)。PI3K-Akt 通路在调节炎症反应中发挥着重要的作用^[27]。缺氧环境下,PI3K-Akt 通路激活,活化的 Akt 通过增强 NF- κ B 抑制蛋白的磷酸化和降解,进而导致 NF- κ B 活化^[28]。NF- κ B 作为重要的核转录因子,调控炎症、



A-PI3K-Akt 信号通路 B-TNF 信号通路 C-HIF-1 信号通路 红色节点为丹红化瘀口服液治疗 DVT 的潜在靶点, 绿色节点为通路中的相关靶点
A-PI3K-Akt signaling pathway B-TNF signaling pathway C-HIF-1 signaling pathway red nodes are potential targets of Danhong Huayu Oral Liquid in the treatment of DVT, green nodes are relevant targets in the pathway

图 6 信号通路机制图
Fig. 6 Diagram of signaling pathways

免疫反应、细胞增殖和凋亡等生物进程。NF- κ B 活化可诱导 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子以及细胞间黏附因子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 的表达, 进而趋化大量炎性细胞聚集到炎症部位, 诱导炎症反应^[29-30]。此外, 活化的 Akt 还可增强 HIF-1 α 的活性, 激活 HIF-1 信号通路下游靶基因如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子的转录^[31-32]。研究表明, 丹红化瘀口服液可降低链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠血清中 VEGF 和 ICAM-1 水平, 下调 VEGF 蛋白表达^[33]; 丹红化瘀口服液含药血清可下调高糖诱导的内皮细胞上清液中 NF- κ B、ICAM-1、HIF-1 α 、VEGF、VEGF 受体 1 和 VEGF 受体 2 蛋白表达^[34]; 丹红化瘀口服液可降低糖尿病视网膜病变患者血清 VEGF 水平^[35]。

综上所述, 本研究通过网络药理学的方法研究丹红化瘀口服液治疗 DVT 的作用机制, 发现丹红化瘀口服液可能通过槲皮素、木犀草素和山柰酚等化学成分, 与 JUN、TNF、IL-1 β 、IL-6 和 STAT3 等靶点蛋白结合, 进而调节 PI3K-Akt、TNF 和 HIF-1 等炎症通路, 通过抑制炎症反应和氧化应激来抑制 DVT 形成。研究结果进一步证明中药复方通过多成分、多靶点、多通路协调治疗疾病的特点, 为拓宽丹红化瘀口服液临床用途提供基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: A major contributor to global disease burden [J]. *Thromb Res*, 2014, 134(5): 931-938.
- [2] Byrnes J R, Wolberg A S. New findings on venous thrombogenesis [J]. *Hamostaseologie*, 2017, 37(1): 25-35.
- [3] Luther N, Shahneh F, Brähler M, et al. Innate effector-memory T-cell activation regulates post-thrombotic vein wall inflammation and thrombus resolution [J]. *Circ Res*, 2016, 119(12): 1286-1295.
- [4] Stark K, Philippi V, Stockhausen S, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2016, 128(20): 2435-2449.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学: 中药复方作用机制研究新视角 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2873-2876.
- [8] 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.
- [9] Chin C H, Chen S H, Wu H H, et al. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4): S11.
- [10] 张福先. 静脉血栓栓塞症诊治的最新关注 [J]. 外科理论与实践, 2019, 24(4): 293-296.
- [11] Liu H, Li P, Lin J, et al. Danhong Huayu Koufuye prevents venous thrombosis through antiinflammation via Sirtuin 1/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111975.
- [12] 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.
- [13] Liu H, Li P, Liu J, et al. Data for DHK effect on thrombus weight, blood coagulation, blood cell counts and whole blood viscosity in deep vein thrombosis rats [J]. *Data Brief*, 2019, 26: 104410.
- [14] Lee J Y, Park W. Anti-inflammatory effect of wogonin on RAW264.7 mouse macrophages induced with polyinosinic-polycytidylic acid [J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6888-6900.
- [15] Zhang L L, Zhang H T, Cai Y Q, et al. Anti-inflammatory effect of mesenchymal stromal cell transplantation and quercetin treatment in a rat model of experimental cerebral ischemia [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(7): 1023-1034.
- [16] Choi E M. Modulatory effects of luteolin on osteoblastic function and inflammatory mediators in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(9): 870-877.
- [17] Huang C H, Jan R L, Kuo C H, et al. Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(8): H254-H259.
- [18] 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.
- [19] 吴振华. 中药红花研究进展的概述 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(34): 33-34.
- [20] Glynn R J, Ridker P M. Inflammation, venous thromboembolism, and what we can do about it [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(39): 3615-3617.
- [21] Yao X L, Chen W P, Liu J, et al. Deep vein thrombosis is modulated by inflammation regulated via sirtuin 1/NF- κ B signalling pathway in a rat model [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(3): 421-430.

- [22] Saghazadeh A, Rezaei N. Inflammation as a cause of venous thromboembolism [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 272-285.
- [23] Zhou Z, Gushiken F C, Bolgiano D, *et al*. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity [J]. *Circulation*, 2013, 127(4): 476-485.
- [24] Poredoš P, Spirkoska A, Ježovnik M K. In patients with superficial vein thrombosis the inflammatory response is increased and related to the recanalization rate [J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(2): 393-401.
- [25] 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.
- [26] Budnik I, Brill A. Immune factors in deep vein thrombosis initiation [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(8): 610-623.
- [27] Roy A, Srivastava M, Saqib U, *et al*. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 79-89.
- [28] Shi Z M, Han Y W, Han X H, *et al*. Upstream regulators and downstream effectors of NF- κ B in Alzheimer's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2016, 366: 127-134.
- [29] Aggarwal B B. Nuclear factor-kappaB: The enemy within [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 203-208.
- [30] Hang C H, Shi J X, Li J S, *et al*. Concomitant upregulation of nuclear factor-kB activity, proinflammatory cytokines and ICAM-1 in the injured brain after cortical contusion trauma in a rat model [J]. *Neurol India*, 2005, 53(3): 312-317.
- [31] 杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 8-13.
- [32] Chen J, Bai M, Ning C, *et al*. Gankyrin facilitates follicle-stimulating hormone-driven ovarian cancer cell proliferation through the PI3K/AKT/HIF-1 α /cyclin D1 pathway [J]. *Oncogene*, 2016, 35(19): 2506-2517.
- [33] 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.
- [34] Zhang Z Y, Chen W P, Wang Y D, *et al*. Antioxidant and anti-inflammatory effects of DHK-medicated serum on high glucose-induced injury in endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7745-7751.
- [35] 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.

[责任编辑 李亚楠]