

基于斑马鱼模型及分子对接技术研究丹参促进血管生成的关键活性成分

宋玉琴^{1,2}, 鲁梓旭², 余 婕², 董梦旋², 郭 爽², 祚方圻², 陈昊南², 张友刚², 韩利文^{2*}

1. 淄博市食品药品检验研究院, 山东 淄博 255086

2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学与制药科学学院, 山东 济南 250000

摘要: **目的** 建立新方法探索丹参中潜在的促进血管生成的活性成分。**方法** 以绿色荧光蛋白标记血管的转基因斑马鱼为实验动物,以血管抑制剂PTK787损伤造模建立血管生成活性评价模型,评价不同产地的丹参提取物对血管生成的促进作用。采用分子对接技术筛选丹参促血管生成的潜在活性成分,结合分子对接筛选结果与斑马鱼活性实验结果,确认关键的活性成分。**结果** 与模型组比较,不同产地的丹参提取物均能明显促进斑马鱼节间血管的生成($P < 0.01$)。通过分子对接筛选发现丹酚酸B与VHL-缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)复合物的对接结合能最低,并初步揭示可能的作用位点。利用斑马鱼模型实验发现,丹酚酸B具有明显的促进血管生成作用($P < 0.01$)。**结论** 建立了一种基于斑马鱼模型的“虚拟筛选-活性评价”的中药药效物质辨识新方法,将计算化学数据挖掘技术与斑马鱼活性实验结合,发现了丹酚酸B是丹参中促血管生成的关键活性成分之一,为冠心病的防治及后续的新药研发提供科学依据。

关键词: 丹参; 血管生成; 斑马鱼; 分子对接; 丹酚酸B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)11-3394-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.015

Crucial proangiogenic components in *Salvia miltiorrhiza* based on zebrafish model and molecular docking technique

SONG Yu-qin^{1,2}, LU Zi-xu², YU Jie², DONG Meng-xuan², GUO Shuang², ZHUO Fang-qi², CHEN Hao-nan², ZHANG You-gang², HAN Li-wen²

1. Zibo Institute for Food and Drug Control Shandong, Zibo 255086, China

2. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China

Abstract: Objective To establish a new method to explore the potential angiogenesis-promoting active components in Danshen (*Salvia miltiorrhiza*). **Methods** Transgenic zebrafish with green fluorescent protein-labeled blood vessels was used as experimental animal, and PTK787, a vascular inhibitor, was used to establish the angiogenesis inhibition model. And this kind of experimental model was used to evaluate the angiogenesis-promoting effect of *S. miltiorrhiza* extracts of different origins. The molecular docking technique was used to screen the potential active components of *S. miltiorrhiza* for pro-angiogenesis. The results of molecular docking screening were combined with the results of zebrafish activity assay to identify the key active ingredients. **Results** Compared with model group, *S. miltiorrhiza* extracts from different origins significantly promoted intersegmental vessels development in zebrafish ($P < 0.01$). The lowest docking binding energy of salvianolic acid B with VHL-hypoxia inducible factor-1 α complex was found by molecular docking screening, and the possible sites of action were initially revealed. The experiments using zebrafish model revealed that salvianolic acid B had a significant angiogenesis-promoting effect ($P < 0.01$). **Conclusion** A new method of “virtual screening-bioactivity evaluation” based on zebrafish model was established for identification of pharmacological substances in traditional Chinese medicine. Combining computational chemistry data mining technology with zebrafish activity experiments, salvianolic acid B was discovered as one of key pro-angiogenic active ingredients in *S. miltiorrhiza*. The research provides a scientific basis for the prevention and treatment of coronary

收稿日期: 2022-02-23

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2019MH037); 中央本级重大增减支项目(2060302-1907-09); 山东第一医科大学学术提升计划项目(2019LJ003); 山东省农业科技资金(园区产业提升工程)项目(2019YQ033)

作者简介: 宋玉琴(1978—), 硕士, 副主任药师, 从事中药质量控制研究。Tel: 13953357709 E-mail: zbdasck@163.com

*通信作者: 韩利文(1980—), 博士, 副研究员, 从事药物筛选及中药质量控制研究。Tel: (0531)59567223 E-mail: hanliwen08@126.com

heart disease and subsequent development of new drugs.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; angiogenesis; zebrafish; molecular docking; salvianolic acid B

冠心病也称为冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CHD), 是由冠状动脉狭窄、供血不足引起的心肌功能障碍和 (或) 器质性病变^[1]。目前冠心病的治疗主要为药物治疗、介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 及冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass grafting, CABG)^[2]。已有研究表明, 传统中药可通过促进心肌梗死区或缺血区的旁路血管新生来治疗 CHD^[3]。促进血管新生可改善 CHD 患者的心肌缺血、减缓症状发作并能改善预后, 降低不良心血管事件的发生率^[4-5]。因此, 从传统中药中筛选发现具有促进血管再生的关键药效成分, 对于 CHD 的防治具有重要价值。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效。现代药理学研究表明, 丹参具有增加冠脉流量^[6]、降低心肌兴奋性和传导性、保护心肌缺血性损伤^[7]、抗氧化^[8-9]、保护心血管^[10]、改善肾功能^[11]、抗菌消炎^[12]、抗肿瘤^[13]等作用。丹参的主要化学成分为脂溶性的二萜醌类、水溶性酚酸类及其他类型化合物^[14]。虽然目前已有较多丹参药效成分的研究, 但采用新模型、新技术探索丹参中是否存在其他潜在的抗 CHD 活性成分, 依然具有重要价值。

斑马鱼是一种国际新兴的新型脊椎模式动物, 在血管生成途径上与人类表现出高度的遗传和功能的保守性, 有 87% 的基因片段相同^[15]。斑马鱼为整体动物, 可以观察到整体表型, 与体外细胞模型相比, 具有明显优势。血管标记荧光的转基因系的斑马鱼不用染色即可观察斑马鱼节间血管情况, 使得测量血管再生结果更直观精准^[16]。分子对接技术主要是研究受体与药物分子之间的结合与相互作用, 通过受体独有特征, 筛选可能结合的药物分子以及

结合模式和亲和力, 是当下计算机模拟在药物研究领域的重要辅助手段^[17]。自 20 世纪 70 年代中期首次出现以来, 分子对接已成为协助药物设计和发现的独特计算机模拟工具, 如在大型化合物库中识别新的化学支架^[18], 为药物重新定位、靶点确认、预测不良反应和其他方面进行数据分析^[19]。中药组成成分复杂, 通过分子对接技术可以实现活性成分的虚拟筛选, 进一步提高筛选的效率, 降低筛选成本, 已成为新药发现的重要方法。因此, 本研究应用新型模式动物斑马鱼模型和分子对接技术深入研究丹参中促血管再生作用活性的关键成分, 为候选药物的发现、资源开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材

共收集 2020—2021 年不同产地的丹参药材饮片, 详细信息见表 1。所有样品经山东第一医科大学韩利文副研究员鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 保藏于药理学与制药科学学院中药资源样品库中。

1.2 药品与试剂

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 K1723046) 购自北京芯硅谷; 酪氨酸激酶抑制剂 PTK787 (批号 M1648-04) 购自 AbMole 公司; 亚甲基蓝 (批号 619H022) 购自北京索莱宝科技有限公司; 链酶蛋白酶 (批号 41844523) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 动物

血管标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼 *Tg (flila: EGFP)* 来自国家斑马鱼资源中心。

1.4 仪器

Z-A-S5 型斑马鱼养殖系统 (上海海圣生物实验设备有限公司); IX83 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); ZSA0745 型体式显微镜 (重庆光电

表 1 不同产地丹参样品信息

Table 1 Information of *S. miltiorrhiza* samples from different origins

编号	收集日期	产地	编号	收集日期	产地
DS01	2020-11-08	山东菏泽	DS06	2021-02-18	湖北神农架
DS02	2021-03-13	山东日照	DS07	2021-02-23	云南文山
DS03	2020-10-10	山东菏泽	DS08	2021-03-16	陕西丹凤
DS04	2021-03-02	山东菏泽	DS09	2021-03-23	四川德阳
DS05	2020-11-12	河南禹州	DS10	2021-02-18	云南丽江

仪器有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津); DFY-1000 型摇摆式多功能高速中药粉碎机(温州顶历医疗器械有限公司); TDZ5 型台式低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); RE-2000A 型旋转蒸发仪(郑州科泰实验设备有限公司); DZF 型真空干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司)。

2 方法

2.1 丹参提取物的制备

不同产地的丹参样品按照相同方法进行平行提取。丹参样品用中药粉碎机粉碎为粗粉,过 3 号筛;称取 15 g 丹参样品粉末放入 500 mL 圆底烧瓶中,加入 90%乙醇 120 mL(料液比 1:8),90 °C 水浴提取,提取 2 次,每次 1.5 h;合并 2 次上清液,减压浓缩,真空 60 °C 干燥,即得丹参提取物。

随机选取 1 个提取物样本(DS01),准确称定,置 10 mL 量瓶中,加入 80%甲醇溶解定容,配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液。按照《中国药典》2020 年版一部丹参药材含量测定项下规定,采用岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪,以乙腈-0.02%磷酸水溶液为流动相,测定 DS12 提取物中丹酚酸 B 的质量分数为 21.46%,丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 之和为 0.29%。

2.2 丹参提取物的斑马鱼耐受实验

选择发育至 24 h(hours post fertilization, hpf)的斑马鱼受精卵,用脱膜剂链酶蛋白酶(1 mg/mL)进行脱膜处理。随机选取 1 个提取物样本(DS01)进行实验。设置不同质量浓度的丹参提取物(100、200、400、600、800、1000、1500、2000 µg/mL)组和对照组(给予 pH 7.1~7.4、温度 26.5~28.5 °C、电导率 490~530 µS、溶解氧质量浓度 5.0~7.5 mg/L 的养鱼水)。于体式镜下观察,记录给药 24 h 后斑马鱼畸形与死亡情况,计算死亡率。

采用 GraphPad Prism 9 统计软件通过回归分析计算丹参提取物的最低致死质量浓度,考察斑马鱼对丹参提取物的耐受性。

2.3 丹参提取物对斑马鱼促进血管生成活性的研究

将发育至 24 hpf 的斑马鱼受精卵用 1 mg/mL 的脱膜剂链酶蛋白酶进行脱膜处理,将脱膜的斑马鱼放入 24 孔板,每孔 10 条。模型组中加入 0.2 µg/mL PTK787,处理组先加入 0.2 µg/mL PTK787 后再加入丹参提取物或单体,对照组中加入空白溶剂(0.5% DMSO)。每孔加入养鱼水保证每孔体积为 2 mL。24 h 后于荧光显微镜下观察斑马鱼的节间血管情况并进

行拍照,用 Image Pro 6 软件测量血管长度,统计节间血管总长度,统计结果用 GraphPad Prism 9 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表明有统计学差异。

2.4 基于分子对接技术筛选丹参促血管生成的活性成分

在 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)中以“丹参”为关键词检索丹参的化学成分,剔除没有 PubChem 信息的化合物,将具有 PubChem CID 的化合物批量导入 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中获得化合物的 sdf 结构,构建丹参小分子库,将获得丹参小分子库导入 Schrodinger 分子模拟包中,利用 Ligpre 模块进行 2D sdf 分子转化为 3D sdf 格式,用于后期分子对接的准备。

抑癌基因 VHL 介导的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)降解是调控下游血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的重要途径。因此,在 RCSB pdb 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载 VHL-HIF-1 α 复合物的晶体结构(PDB: 3ZRC),将 3ZRC 导入 Schrodinger 的 Maesro10.1 进行蛋白前处理,由于 3ZRC 有多条同源链,选择其中 1 条包含活性口袋的链进行分子对接。蛋白经过 protein preparation 模块进行补足缺失残基以及中性化等操作,最后进行能量最小化并添加 OPLS2005 力场。

分子对接的活性口袋由 3ZRC 自带的配体进行定义,直接选中 3ZRC 晶体中的配体生成对接盒子,对接盒子参数选择软件默认。先进性 HTVS(high through virtual screening)模式的高通量筛选,将得到的化合物再次进行 SP(standard precision)模式的筛选,根据对接的结果筛选前 10 个结合能较高的化合物进行可视化。为了验证对接的可靠性,本研究将 3ZRC 自带配体抽出再对接到 3ZRC 中 5 次,计算对接结合模式的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值以评估对接的可靠性。对接的结果分别采用 Pymol 2.4.1 和 Ligplus 进行可视化。

3 结果

3.1 丹参提取物在斑马鱼模型的耐受性实验结果

为了更好地观察药物对于斑马鱼的致死效应,将剂量的对数值与死亡率进行回归曲线拟合。GraphPad Prism 9 软件拟合的结果(图 1)显示,丹参提取物质量浓度为 800 µg/mL 时,斑马鱼开始出现死亡;丹参提取物质量浓度为 1000 µg/mL 时,斑

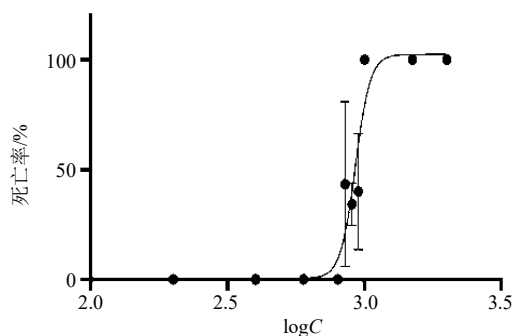
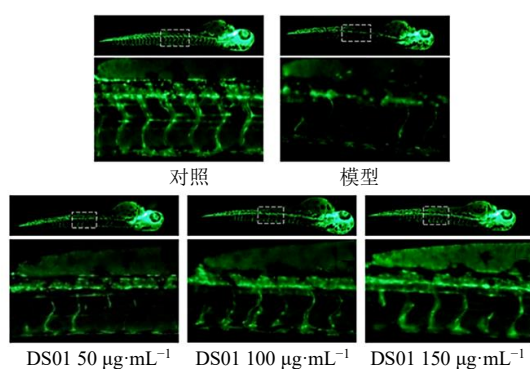


图 1 斑马鱼幼鱼死亡率回归曲线图

Fig. 1 Regression curve of zebrafish juvenile mortality



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$, 图 3、5 同

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as fig. 3 and 5

图 2 不同质量浓度的丹参提取物对斑马鱼节间血管生长情况的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of *S. miltiorrhiza* extract on growth of intersegmental blood vessels in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

丹参提取物 (DS01) 考察样品在斑马鱼模型上促进血管生成作用的量效关系。发现丹参提取物质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 斑马鱼没有明显的血管生长出现; 丹参提取物质量浓度为 100、150 $\mu\text{g/mL}$ 时, 斑马鱼开始出现明显的血管生长, 与模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。说明丹参提取物能够逆转 PTK787 造成的斑马鱼血管损伤, 且随着丹参质量浓度的增加, 促血管再生作用有增强的趋势。

3.3 不同产地的丹参提取物对斑马鱼损伤血管生成的促进作用

如图 3 所示, 不同产地的丹参提取物 (150 $\mu\text{g/mL}$) 均出现了不同程度的促血管生成作用, 与模型组相比, 均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。不同产地的丹参提取物表现出了不完全一致的生物活性, 其中 DS06 样品促血管生成的活性最低, DS05 样品促血管生成的活性最高。

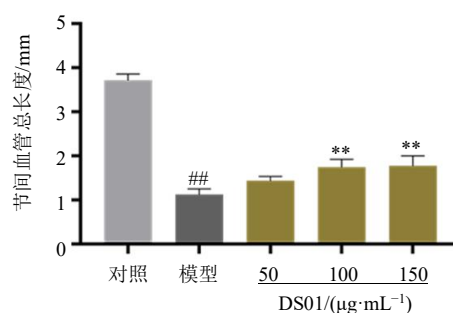
3.4 分子对接技术分析

从 TCMSP 数据库中总共获得 143 个具有 PubChem 信息的化合物, 经过 Ligpre 进行处理转化

成 3D 结构。在对接模型验证 (Redocking) 过程中, 进行了 5 次对接, 最终 3ZRC 自带的配体 (PubChem ID: 56684144) 均对接到了活性口袋, 且 5 次对接结合能均为 -39.079 kJ/mol , RMSD 值为 0, 对接具有非常高的可重复性, 证明对接模型的可靠性。

3.2 丹参提取物促进斑马鱼血管生成的剂量效应

如图 2 所示, PTK787 处理斑马鱼后, 斑马鱼节间血管生长不完整, 没有闭合, 与对照组相比节间血管总长度显著缩短 ($P < 0.01$) 且无畸形或死亡出现, 表明血管损伤模型建立成功。随机选取 1 个



成 3D 结构。在对接模型验证 (Redocking) 过程中, 进行了 5 次对接, 最终 3ZRC 自带的配体 (PubChem ID: 56684144) 均对接到了活性口袋, 且 5 次对接结合能均为 -39.079 kJ/mol , RMSD 值为 0, 对接具有非常高的可重复性, 证明对接模型的可靠性。

在 HTVS 对接模式下由 132 个化合物成功对接到活性口袋, 对接结合能 $-26.865 \sim -2.807 \text{ kJ/mol}$ 。在 SP 对接模式下, 总共有 137 个结合能小于 0 的化合物被成功对接, 结合能为 $-31.091 \sim -0.197 \text{ kJ/mol}$, 有 3 个化合物的结合能大于 0 kJ/mol , 可能是 VHL-HIF1a 非抑制剂。表 2 为排名前 10 的化合物与 3ZRC 对接结合能及化合物信息, 对接排名最高的化合物为丹酚酸 B, 结合能为 -31.091 kJ/mol 。对接结果显示, 3ZRC 晶体自带的共晶阳性配体 (positive ligand, PL) 刚好与 3ZRC 蛋白晶体的活性口袋契合 (图 4-A), 具有很好的重现性。进一步分析发现, PL 与活性口袋的 TYR-98、HIS-110、SER-111 和 HIS-115 4 个氨基酸残基形成氢键。图 4-B 为丹酚酸 B 与 3ZRC 对接的模式图, 丹酚酸 B

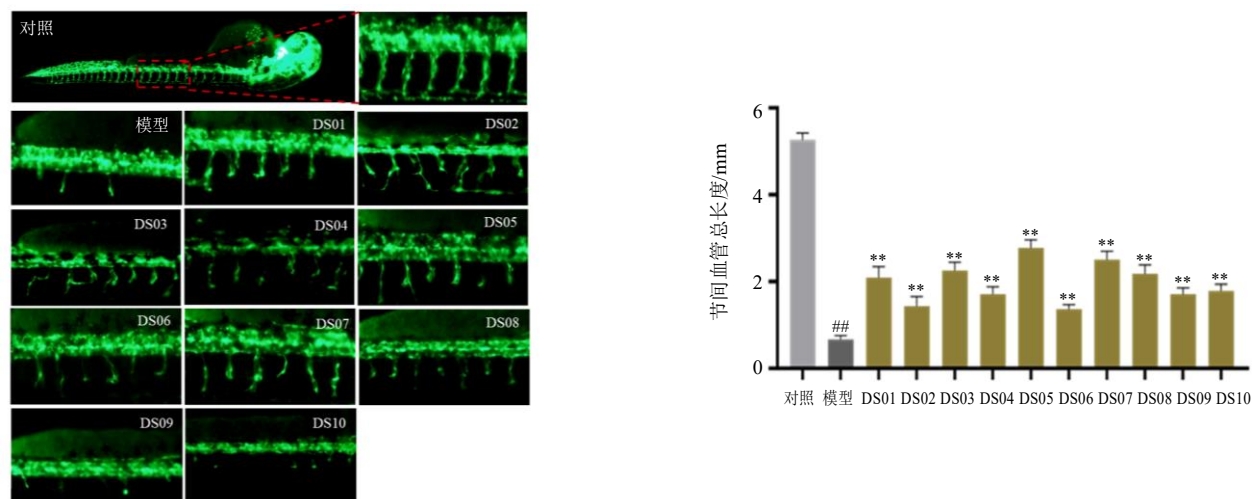
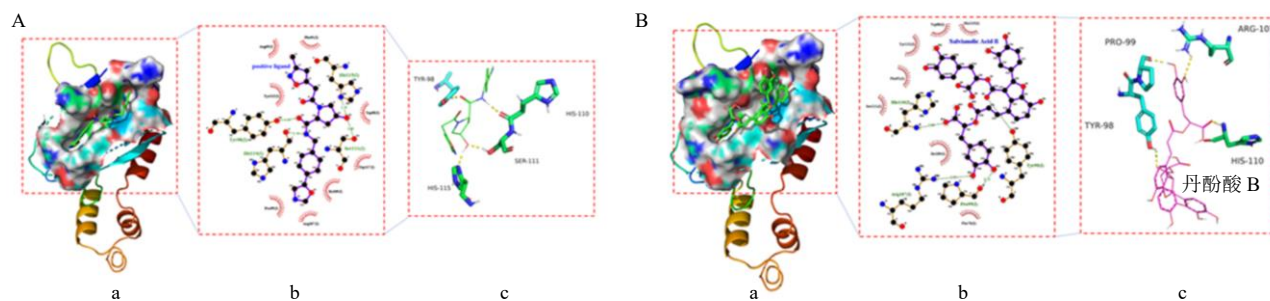
图 3 不同产地的丹参提取物对斑马鱼节间血管生长情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Effect of *S. miltiorrhiza* extracts from different origins on growth of intersegmental vessels in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 排名前 10 的化合物信息与结合能

Table 2 Information and binding energy of top 10 compounds

序号	Pubchem CID	化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
1	6451084	丹酚酸 B	-31.091
2	1794427	绿原酸	-28.146
3	10403222	紫丹酸 A	-27.573
4	16730071	丹参二醇 A	-27.179
5	5316800	ziganein	-26.447
6	5280445	木犀草素	-25.799
7	5280443	芹菜素	-25.782
8	64982	黄芩苷	-25.485
9	6709746	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-1-benzofuran-3-carbaldehyde	-25.451
10	51066555	(2R)-2-[(E)-3-[(2S,3R)-3-[(1R)-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]carbonyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-4-yl]prop-2-enoyl]oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid	-24.966



A-3ZRC 自带的共晶 PL 与活性口袋契合 B-丹酚酸 B 与 3ZRC 对接的模式图 a-3 维对接结合图 b、c-2 维对接结合图
 A-co-crystal PL of 3ZRC fits with active pocket B-docking pattern diagram of salvianolic acid B and 3ZRC a-3-dimensional docking and binding diagram b, c-2-dimensional docking and binding diagrams

图 4 丹酚酸 B 的对接结合图

Fig. 4 Docking binding diagram of salvianolic acid B

主要通过 PRO-99、TYR-98、ARG-107 和 HIS-110 4 个氨基酸残基形成氢键并锚定在 3ZRC 的活性口袋，其中 TYR-98 和 HIS-110 2 个氨基酸残基同样出现了 PL 与 3ZRC 的对接模式中。

3.5 丹酚酸 B 对斑马鱼损伤血管生成的促进作用

如图 5 所示，与模型组比较，10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 的丹酚酸 B 均具有显著的促血管生成作用 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性。

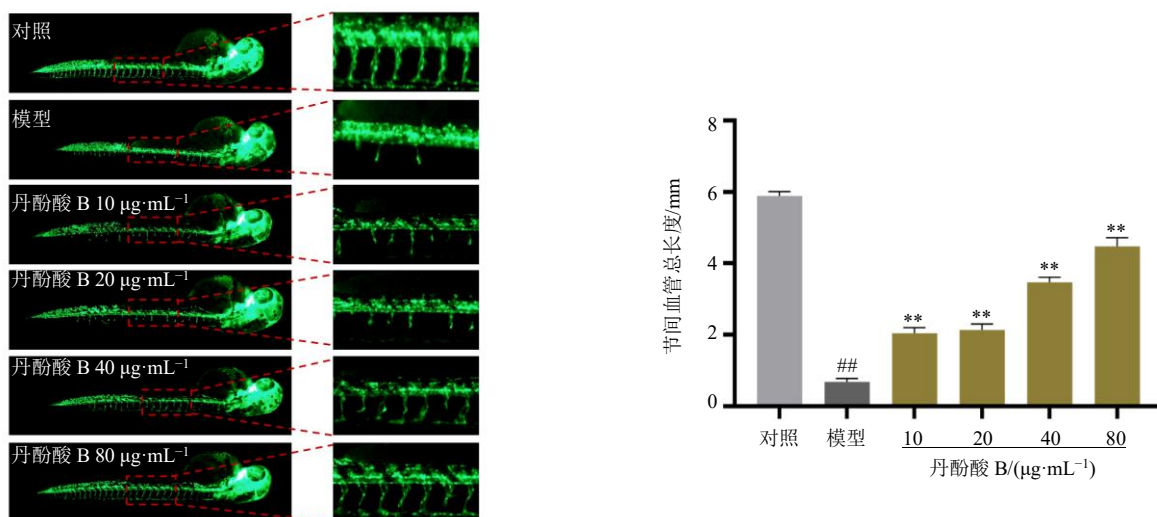


图 5 不同质量浓度的丹酚酸 B 对斑马鱼节间血管生长情况的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of salvianolic acid B on growth of intersegmental vessels in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

斑马鱼体系现已被广泛用于药物筛选和毒理学研究^[20-21]。斑马鱼胚胎和幼鱼体积很小,可用微孔培养板培养,故适合于高通量筛选^[22]。斑马鱼属于脊椎动物,是一种活体研究体系,可保留药动学过程,故其与其他的体外研究体系相比更加适合于中药这种复杂化学体系的药效学研究^[23]。斑马鱼的受精卵或者鱼苗能够便利地从培养介质中吸收亲水或亲脂的物质,使得其检测中药的活性变得非常方便^[24]。PTK787 是一种酪氨酸激酶抑制剂,能够特异性地抑制血管内皮生长因子受体的表达,进而抑制血管生成^[25]。研究表明,瓜蒌^[26]、白芍^[27]、天麻^[28]、丹红注射液^[29]等在斑马鱼模型上均体现了明显的促进血管生成的作用,可逆转 PTK787 诱导的血管损伤。

中药的成分非常多,理化性质复杂,在常规的细胞学筛选体系和分子筛选体系中采用中药进行新药筛选时常常难以避免非特异性影响,从而产生假阳性或假阴性结果。传统中药具有多成分、多靶点、协同作用的特点^[30-31],建立注重整体、精准识别的药效成分发现技术,一直是本领域的瓶颈环节。本研究借助计算化学的数据挖掘技术,建立了基于斑马鱼模型的“虚拟筛选-活性评价”的药效成分发现方法,使计算机模拟与实验结合,有效节约实验时间,降低实验成本,为天然药效成分的高效发现提供新思路。研究表明,VHL 蛋白中 pVHL 是 HIF-1 α 家族的底物识别位点,靶向 HIF-1 α 家族进行泛素介导

的蛋白酶体的降解^[32-34]。在正常有氧条件下,HIF-1 α 通过脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD)家族,在脯氨酸上被羟基化引发下游信号级联。在低氧或缺氧条件下,当 PHD 不能发挥功能或 VHL 突变时,则会改变 pVHL 与 HIF-1 α 或 elongin C 的结合,HIF-1 α 不能被 pVHL 识别^[35-37]。HIF-1 α 的聚集和转录会上调一些血管发育的重要基因(如促红细胞生成素、VEGF),细胞增生的基因(血小板衍生因子- β 、转化生长因子- α)和糖代谢的基因(葡萄糖转运蛋白-1)^[38]。本研究发现,丹参中丹酚酸 B 与 VHL-HIF-1 α 复合物具有较高的对接性能,提示丹酚酸 B 促进血管生成的作用可能与此作用有关,为后续的深入研究提供了方向。

综上,本研究中成功建立了一个基于斑马鱼模型的“虚拟筛选-活性评价”的药物筛选方法,并发现丹参中丹酚酸 B 是发挥促进血管生成作用的关键成分,为丹酚酸 B 应用于冠心病的防治以及新药研发提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 汤世民,邢小燕,邓雪红,等.冠心丹参方及其有效成分治疗冠心病的研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(20):3721-3726.
- [2] Amsterdam E A, Wenger N K, Brindis R G, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J].

- Circulation*, 2014, 130(25): e344-e426.
- [3] 刘群, 吕超, 张卫东, 等. 麝香保心丸研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1409-1417.
- [4] Gürses K M, Yalçın M U, Koçyiğit D, *et al.* The association between serum angiogenin and osteopontin levels and coronary collateral circulation in patients with chronic total occlusion [J]. *Anatol J Cardiol*, 2019, 22(2): 77-84.
- [5] Scrimgeour L A, Potz B A, Aboul Gheit A, *et al.* Extracellular vesicles promote arteriogenesis in chronically ischemic myocardium in the setting of metabolic syndrome [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(15): e012617.
- [6] Koon C M, Woo K S, Leung P C, *et al.* *Salviae Miltiorrhizae Radix* and *Puerariae Lobatae Radix* herbal formula mediates anti-atherosclerosis by modulating key atherogenic events both in vascular smooth muscle cells and endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 175-183.
- [7] Chen S X, Liu J L, Liu X Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins inhibit ischemia-induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomyocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 263-270.
- [8] Zhu R, Wang W, Yang S X. Cryptotanshinone inhibits hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis in renal tubular epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13354-13360.
- [9] 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.
- [10] Yuan X, Jing S B, Wu L Z, *et al.* Pharmacological postconditioning with tanshinone II_A attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 973-977.
- [11] 王钦汶, 戴新新, 项想, 等. 丹酚酸和丹参酮干预糖尿病肾病的分子机制研究进展 [J]. 药学报, 2019, 54(8): 1356-1363.
- [12] 原景, 杜韩, 万梅绪, 等. 丹参有效成分及丹参类制剂抗炎药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2322-2332.
- [13] Tsioumpekou M, Cunha S I, Ma H S, *et al.* Specific targeting of PDGFR β in the stroma inhibits growth and angiogenesis in tumors with high PDGF-BB expression [J]. *Theranostics*, 2020, 10(3): 1122-1135.
- [14] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- [15] Liao S, Han L W, Zheng X P, *et al.* Tanshinol borneol ester, a novel synthetic small molecule angiogenesis stimulator inspired by botanical formulations for angina pectoris [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(17): 3143-3160.
- [16] Yu X Y, Li J L, Yang M T, *et al.* Role of epigallocatechin gallate in collagen hydrogels modification based on physicochemical characterization and molecular docking [J]. *Food Chem*, 2021, 360: 130068.
- [17] Ferreira L G, dos Santos R N, Oliva G, *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13384-13421.
- [18] Pinzi, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): E4331.
- [19] Dong R, Tian Q P, Shi Y P, *et al.* An integrated strategy for rapid discovery and identification of quality markers in *Gardenia fructus* using an omics discrimination-grey correlation-biological verification method [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 705498.
- [20] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(5): 504-512.
- [21] 李洁斐, 李卫华, 王强毅, 等. 斑马鱼应用于毒理学研究的现状 [J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4): 247-252.
- [22] Matsumoto M, Miyamoto M, Sawahata M, *et al.* Establishing a high throughput drug screening system for cerebral ischemia using zebrafish larvae [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 147(1): 138-142.
- [23] Saiki P, Mello-Andrade F, Gomes T, *et al.* Sediment toxicity assessment using zebrafish (*Danio rerio*) as a model system: Historical review, research gaps and trends [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 793: 148633.
- [24] 梁爱华. 斑马鱼: 一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2839-2842.
- [25] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2037-2041.
- [26] 段文娟, 赵伟, 李月, 等. 瓜蒌不同部位对斑马鱼促血管生成及心脏保护作用 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1261-1264.
- [27] 段文娟, 李月, 杨国红, 等. 白芍对斑马鱼促血管生成和抗血栓作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 834-837.
- [28] Liu M, Zhao L, Han L W, *et al.* Discovery and identification of proangiogenic chemical markers from *Gastrodiae Rhizoma* based on zebrafish model and metabolomics approach [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(6): 1261-1264.

- 835-845.
- [29] 史永平, 刘发生, 孔浩天, 等. 利用斑马鱼模型研究丹红注射液及代表性成分的促进血管生成作用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2588-2590.
- [30] Wei M Y, Liu Y Y, Pi Z F, *et al.* Systematically characterize the anti-Alzheimer's disease mechanism of lignans from *S. chinensis* based on *in-vivo* ingredient analysis and target-network pharmacology strategy by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1203.
- [31] 许晴, 李智, 万梅绪, 等. 中药活性成分筛选新技术研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1541-1547.
- [32] Kaelin W G Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(11): 865-873.
- [33] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721-732.
- [34] Soga T. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(3): 275-281.
- [35] Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog E M. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3): 153-162.
- [36] Dann C E 3rd, Bruick R K, Deisenhofer J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15351-15356.
- [37] Terzuoli E, Puppo M, Rapisarda A, *et al.* Amino flavone, a ligand of the aryl hydrocarbon receptor, inhibits HIF-1 α expression in an AhR-independent fashion [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6837-6848.
- [38] Yang C, Wang W, Chen L, *et al.* Discovery of a VHL and HIF1 α interaction inhibitor with *in vivo* angiogenic activity via structure-based virtual screening [J]. *Chem Commun*, 2016, 52(87): 12837-12840.

[责任编辑 李亚楠]