基于网络药理学整合体内实验探究脉络舒通丸抗血栓性浅静脉炎的作用机制

曹宁宁[1]，李市荣[2]，王清果[1]，王　伟[3]，孙成宏[2]，姚景春[2]，张贵民[2*]，肖学凤[1*]

1. 天津中医药大学中药学院，天津　301617
2. 鲁南制药集团股份有限公司 新药药理中心，山东 临沂　276000
3. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室，山东 临沂　276000

摘　要：目的　基于网络药理学整合体内实验方法探究脉络舒通丸抗血栓性浅静脉炎（superficial thrombophlebitis，STP）的作用机制。**方法**　借助网络药理学方法，从药物及疾病相关数据库筛选脉络舒通丸的成分作用靶点及 STP 疾病相关靶点，根据拓扑特征值筛选关键靶点后，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。将日本大耳白兔随机分为对照组、模型组、地奥司明（0.168 g/kg）组和脉络舒通丸低、中、高剂量（0.56、1.68、5.04 g/kg）组。除对照组外，其余各组均采用耳缘 iv 20%甘露醇建立 STP 兔模型。造模同时各给药组连续 ig 给药 14 d。采用苏木素-伊红（HE）染色法检测各组兔耳组织病理变化；ELISA 检测各组血清中白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和 IL-6 水平；Western blotting 检测耳组织蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）、磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylin-ositol-3-kinase，PI3K）、Janus 激酶 2（Janus kinase 2，JAK2）和信号传导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）蛋白表达及磷酸化水平。**结果**　共筛选得到脉络舒通丸活性成分作用靶点 1112 个，STP 疾病相关靶点 837 个，二者共同靶点 84 个，根据拓扑特征值筛选出核心靶点 31 个，富集分析发现核心靶点主要与平滑肌细胞增殖的正调控、炎症反应的正调控、凋亡过程的调控等生物过程，以及 JAK/STAT 信号通路、PI3K/Akt 信号通路有关。体内动物实验结果显示，脉络舒通丸组兔耳组织病理损伤显著改善，血清中 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 水平显著降低（P＜0.05、0.01），耳组织 Akt、PI3K、JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平均显著下调（P＜0.05、0.01）。**结论**　脉络舒通丸可能通过下调 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达，抑制炎症和血栓的形成，从而发挥抗 STP 的作用。

关键词：脉络舒通丸；血栓性浅静脉炎；网络药理学；磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路；Janus 激酶 2/信号传导和转录激活因子信号 3 通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)06 - 1860 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.018

Mechanism of Mailuo Shutong Pills in treatment of superficial thrombophlebitis based on network pharmacology and experimental verification *in vivo*

CAO Ning-ning[1], LI Shi-rong[2], WANG Qing-guo[1], WANG Wei[3], SUN Cheng-hong[2], YAO Jing-chun[2], ZHANG Gui-min[2], XIAO Xue-feng[1]

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
2. New Drug Pharmacology Center of Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China
3. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

Abstract: Objective　To explore the mechanism of Mailuo Shutong Pills (脉络舒通丸, MLSTW) in treatment of superficial thrombophlebitis (STP) based on combination of network pharmacology and animal experimental validation *in vivo*. **Methods**　Drug

收稿日期：2022-11-22

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81973557）；天津市自然科学基金重点项目（20JCZDJC00010）；释药技术与药代动力学国家重点实验室（天津药物研究院）开发课题资助（010162001）

作者简介：曹宁宁，博士研究生，从事中药质量控制研究。E-mail: cnn01070980@163.com

***通信作者：**张贵民，研究员，主要从事创新药物研发。E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

肖学凤，教授，主要从事新药研发。E-mail: kai1219@163.com

targets of MLSTW and targets related to STP were screened from disease and drug related database, and key targets were screened according to topological eigenvalues. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. The Japanese white rabbits were randomly divided into control group, model group, diosmin (0.168 g/kg) group and MLSTW low-, medium-, high-dose (0.56, 1.68, 5.04 g/kg) groups. Except for control group, the rabbit model of STP was established by injecting 20% mannitol into bilateral auricular vein in other groups. At the same time, the treated groups were ig drugs for 14 d. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of rabbit ear tissues; ELISA was used to detect the levels of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 in serum; Western blotting was used to detect the expressions of protein kinase B (Akt), phosphatidylin-ositol-3-kinase (PI3K), Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) proteins and phosphorylation levels in rabbit ear tissues. **Results** A total of 1112 compounds targets of MLSTP, 837 STP disease targets, 84 common targets and 31 key targets were obtained. Enrichment analysis showed that the key targets were mainly involved in biological processes such as positive regulation of smooth muscle cell proliferation, positive regulation of inflammatory response, positive regulation of apoptotic process, as well as PI3K/Akt signaling pathway, JAK/STAT signaling pathway. *In vivo* experiment results showed that pathological damage of rabbit ear tissues in MLSTW group was significantly improved, levels of IL-1β, TNF-α, IL-6 in serum of rabbits were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), phosphorylation levels of Akt, PI3K, JAK2 and STAT3 in rabbit ear tissues were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** MLSTP can play an anti-STP role by down-regulating the expressions of PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins, inhibiting inflammation and thrombosis.

Key words: Mailuo Shutong Pills; superficial thrombophlebitis; network pharmacology; phosphatidylin-ositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway

血栓性浅静脉炎（superficial thrombophlebitis，STP）是临床常见的一种血栓性、炎症病变的血管性疾病，主要表现为病变浅静脉出现条索状硬块，形如蚯蚓，色赤，可出现局部红肿疼痛[1]。由于其早期临床症状相对较轻，患者未进行及时有效的治疗，出现血栓脱落，可诱发深静脉血栓、心、肺、脑血管栓塞等并发症，对生命健康造成严重威胁。临床上常用的治疗药物多为抗感染、抗凝、溶栓类药物、非甾体抗炎药、免疫抑制剂等，虽然能在一定程度上缓解患者的临床症状，但其治愈率低，治疗效果欠佳，治疗成本较高且常导致多种不良反应[2]。中医认为 STP 属于“赤脉、青蛇毒、恶脉、脉痹”等范畴，湿热浊瘀阻络是基本病机，应采用清热利湿、化瘀通络、祛湿消肿的方式治疗。

脉络舒通丸源于国医大师唐祖宣先生的经验方，全方由黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、水蛭、蜈蚣、全蝎和甘草共 12 味中药组成，方中黄芪、金银花为君药；黄柏、苍术、薏苡仁、当归、白芍、玄参为臣药；水蛭、全蝎、蜈蚣为佐药；甘草为使药，调和诸药；共奏清热解毒、化瘀通络、祛湿消肿的功效，与 STP 湿热浊瘀阻络的病机相契合。现代药理学研究显示，黄芪和当归及其活性成分均具有抗氧化、抑制炎症介质表达、抗血小板凝集和抗血栓形成的作用[3-4]；金银花和玄参的提取物可显著降低白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的产生，达到良好的抗炎作用[5-6]；水蛭、蜈蚣和全蝎均可抑制血小板聚集，增强纤溶活性，具有明显的抗血栓形成的功效[7]，表明脉络舒通丸可起到防止血栓形成和抑制炎症作用。目前，脉络舒通丸广泛应用于临床治疗 STP[8]，疗效显著，不良反应少，但关于脉络舒通丸的研究主要集中在临床疗效方面，缺乏其具体作用机制方面的研究。

网络药理学是在系统生物学的基础上结合现代的计算机技术构建“药物-靶点-疾病”相互作用网络，揭示药物与治疗疾病之间的分子关联规律，从多维度探讨中医药与疾病的关系，体现中医药治疗疾病的整体性[9-11]。因此，本研究首先基于网络药理学探讨脉络舒通丸抗 STP 的潜在作用机制，筛选出关键信号通路，然后通过体内动物实验，采用 20% 甘露醇建立 STP 兔模型，运用 Western blotting 技术进一步探究脉络舒通丸抗 STP 的作用机制，为其临床治疗 STP 奠定坚实的理论基础和科学依据。

1 材料

1.1 动物

36 只健康日本大耳白兔，雌雄各半，2.50～2.75 kg，购自中国食品药品检定研究院［许可证号 SCXK（京）2019-0006］，饲养于天津中医药大学实验动物中心，适应性饲养 7 d。饲养条件为 12 h 光照/12 h

黑暗，单笼饲养，室温（25±2）℃，自由饮水和进食。本实验中所有操作均符合相关动物实验伦理原则，并获得天津中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 TCM-LAEC2021253）。

1.2 药品与试剂

脉络舒通丸（批号 918200011）由鲁南厚普制药有限公司提供；20%甘露醇（批号 201003A01）购自山东华鲁制药有限公司；0.9%氯化钠注射液（批号 2112221909）购自石家庄四药有限公司；TNF-α、IL-1β、IL-6 ELISA 试剂盒（批号分别为 JYM0003Rb、JYM0011Rb、JYM0006Rb）购自武汉基因美科技有限公司；ECL 化学发光试剂盒（批号 S7105010）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 20201ES76）购自上海翊圣生物科技有限公司；RIPA 组织/细胞裂解液（批号 R0010）购自北京索莱宝科技有限公司；Janus 激酶 2（Janus kinase 2，JAK2）兔单克隆抗体（批号 AB32101）、信号传导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）鼠单克隆抗体（批号 AB68153）购自英国 Abcam 公司；磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylin-ositol-3-kinase，PI3K）鼠单克隆抗体（批号 BS4605）购自美国 Bioworld 公司；p-PI3K 鼠单克隆抗体（批号 4228）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）鼠单克隆抗体（批号 2920）、p-Akt 鼠单克隆抗体（批号 5106）、p-JAK2 兔单克隆抗体（批号 3771）、p-STAT3 兔单克隆抗体（批号 9145）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）鼠单克隆抗体（批号 97166）购自美国 CST 公司；HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（批号 S0001）、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗（批号 S0002）购自美国 Affinity Biosciences 公司。

1.3 仪器

Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；3K15 型冷冻高速离心机（美国 Sigma 公司）；ASP200S 型自动真空组织脱水机、EG1150H 型自动生物组织包埋机、RM2255 型切片机（德国 Leica 公司）；DYY-7C 型、DYCZ-40D 型电泳转膜设备（北京六一生物科技有限公司）；Chemi Scope6200 型化学发光成像系统（上海勤翔科学仪器有限公司）；Nikon Ci-L 型显微镜（日本 Nikon 公司）。

2 方法

2.1 网络药理学预测脉络舒通丸抗 STP 的作用机制

2.1.1 脉络舒通丸活性成分及其作用靶点获取 运用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）检索脉络舒通丸活性成分，并根据药物的吸收、分布、代谢、排泄（absorption，distribution，metabolism，excretion，ADME）参数，设定口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、类药性（drug-likeness，DL）≥0.18 作为筛选条件，得到脉络舒通丸的潜在活性成分。由于 TCMSP 中未筛选到水蛭、蜈蚣、全蝎的活性成分，故通过 CNKI 数据库中相关文献补充水蛭、蜈蚣、全蝎的活性成分[12-17]，将补充成分整合到 TCMSP 数据库的筛选结果中。并应用 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获取活性成分的简化分子线性输入规范（simplified molecular input line entry system，SMILES）。

将脉络舒通丸活性成分的 SMILES 导入 SwissTargetPrediction 数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/），限定物种为“Homo sapiens”，选择“possibility”大于 0 的靶点作为脉络舒通丸活性成分的成分作用靶点。

2.1.2 STP 疾病作用靶点获取 以“superficial thrombophlebitis”和“superficial vein thrombosis”关键词进行检索，在 GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（https://www.omim.org/）和 GisGeNET（https://www.disgenet.org/）数据库中进行检索，并将 3 个数据库获得的靶点合并去重复项后，规范化后得到 STP 疾病作用靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络构建及分析 将脉络舒通丸的潜在活性成分作用靶点与 STP 疾病作用靶点导入 VENN（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/）在线工具，取其交集，获得共同靶点。通过 STRING 数据库（https://cn.string-db.org/）对共同靶点进行 PPI 网络构建。

将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 平台进行可视化分析，并使用 Network Analyzer 插件进行网络节点的拓扑参数分析。以“度值＞中位数、介数中心性＞中位数、中心接近度＞中位数”作为筛选条件，获取脉络舒通丸抗 STP 的核心靶点。

2.1.4 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 为进一步探索脉络舒通丸治疗 STP 的作用机制，将核心靶点导入 DAVID 6.8 数据库（https://david.ncifcrf.gov/），使

用“Functional Annotation”功能，将物种设置为“Homo sapiens”，进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。根据 *P* 值从小到大，筛选出脉络舒通丸抗 STP 的主要生物过程及信号通路。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、造模及给药 将 36 只兔随机分为对照组、模型组、地奥司明（0.168 g/kg，相当于临床等效剂量）组和脉络舒通丸低、中、高剂量（0.56、1.68、5.04 g/kg，分别相当于临床剂量的 1/3、1、3 倍）组，每组 6 只。除对照组外，其余各组采用双侧耳缘 iv 20%甘露醇建立 STP 兔模型，采用兔固定器限制兔子活动，距耳尖 2 cm 处，用生理盐水进行耳缘静脉预穿刺，确保头皮针在静脉中同时药液无渗漏，以 1 mL/min 缓慢推注 20%甘露醇溶液（4.0 mL/kg），药物注射结束后推注 1 mL 生理盐水，每日 2 次注射，共注射 14 d。造模期间每日观察耳缘静脉及其周围组织皮肤颜色，若皮肤变红并有硬结，表示 STP 兔模型构建成功。造模同时，对照组和模型组 ig 纯水，各给药组 ig 相应药物，1 次/d，连续 14 d。实验结束后，ip 戊巴比妥钠麻醉，静脉取血，离心获取血清；以静脉穿刺点前方 1.5 cm 为中心，切取 1 cm^2 耳廓组织，用于后续实验。

2.2.2 兔耳组织苏木素-伊红（HE）染色 取兔耳组织经 4%多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋后进行连续切片，进行常规 HE 染色步骤，在光学显微镜下观察耳组织耳缘静脉及周围组织的病理学变化。

2.2.3 血清炎症因子水平检测 取各组兔血清，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平。

2.2.4 Western blotting 检测兔耳组织相关蛋白表达 取兔耳组织匀浆，RIPA 裂解液进行充分裂解，离心提取兔耳总蛋白，采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，用含 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液室温封闭 1 h，分别加入 PI3K（1∶1000）、p-PI3K（1∶1000）、Akt（1∶1000）、p-Akt（1∶1000）、JAK2（1∶1000）、p-JAK2（1∶1000）、STAT3（1∶1000）、p-STAT3（1∶1000）和 GAPDH（1∶3000）抗体，4 ℃孵育过夜；加入相应二抗（1∶3000），室温孵育 1 h 后洗膜，ECL 显影，凝胶成像系统拍照并进行灰度值分析。

2.3 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析，多组间比较为正态分布时，采用单因素方差分析，方差齐使用 LSD 法进行组间比较，方差不齐则用 Dunnett*T*3 检验；非正态分布用 Kruskal-Wallis 秩和检验。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 脉络舒通丸活性成分及其作用靶点获取 根据 TCMSP 数据库的检索结果及文献检索，收集整理并去除重复成分后得到脉络舒通丸 145 个活性成分，其中黄芪活性成分 14 个、金银花活性成分 15 个、黄柏活性成分 29 个、苍术活性成分 2 个、薏苡仁活性成分 8 个、玄参活性成分 4 个、当归活性成分 2 个、白芍活性成分 6 个、甘草活性成分 61 个、水蛭活性成分 11 个、蜈蚣活性成分 12 个、全蝎活性成分 6 个。将各活性成分的 SMILES 导入 SwissTargetPrediction 数据库进行脉络舒通丸活性成分的作用靶点预测，共获取 10 591 个成分作用靶点，去除 9479 个重复靶点，得到脉络舒通丸的 1112 个活性成分作用靶点。

3.1.2 STP 疾病作用靶点获取 以“superficial thrombophlebitis”和“superficial vein thrombosis”关键词分别在 GeneCards、OMIM 和 GisGeNET 数据库中进行检索，分别得到 272 个、384 个和 5 个 STP 疾病作用靶点，合并整理 3 个数据库检索结果共获得 856 个疾病作用靶点，删除 19 个重复项，获得 837 个 STP 疾病作用靶点。

3.1.3 脉络舒通丸活性成分与 STP 疾病的共同靶点 PPI 网络构建及分析 将脉络舒通丸的 1112 个活性成分作用靶点与 837 个 STP 疾病作用靶点导入 Venn 在线工具，取其交集，并绘制 Venn 图，得到共同靶点 84 个，见图 1。将得到的 84 个共同靶点导入 STRING 数据库中，隐藏孤立靶点，构建得到具有 80 个点，825 条边的共同靶点 PPI 网络，见图 2，

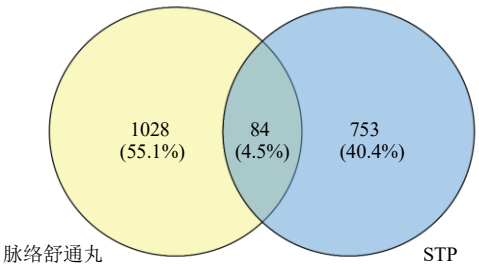


图 1 脉络舒通丸活性成分与 STP 疾病作用靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of targets of Mailuo Shutong Pills and STP

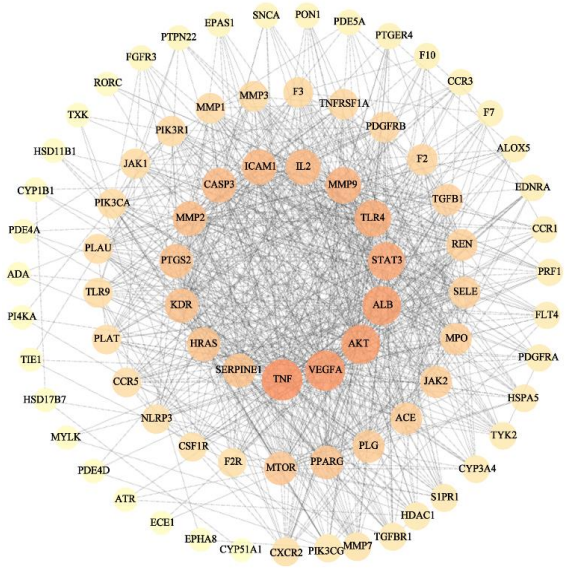


图 2　脉络舒通丸活性成分与 STP 疾病共同靶点 PPI 网络

Fig. 2　PPI network of common targets between Mailuoshutong Pills and STP

其中节点代表共同靶点；节点大小和颜色深浅代表度值大小，节点越大、颜色越深，代表度值越大，靶点越关键；节点间连接的直线表示 2 个共同靶点之间有相互作用。

将脉络舒通丸活性成分与 STP 疾病的共同靶点 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 平台进行可视化分析，并使用 NetworkAnalyzer 插件进行网络节点的拓扑参数分析。以度值＞中位数（19.00）、介数中心性＞中位数（14.99）、中心接近度＞中位数（0.54）作为筛选条件，得到 31 个脉络舒通丸抗 STP 的核心靶点，其关键拓扑参数，见表 1。

3.1.4　脉络舒通丸抗 STP 的关键靶点的 GO 功能和 KEGG 通路富集分析　使用 DAVID 6.8 数据库对 31 个脉络舒通丸抗 STP 的核心作用靶点进行 GO 功能富集分析（P＜0.05），共得到 150 个条目，包括 113 个生物过程（biological processes，BP）、22 种细胞组分（cellular components，CC）、15 种分子功能（molecular functions，MF），根据 P 值分别选取前 10 条进行可视化处理，见图 3。BP 主要涉及平滑肌细胞增殖的正调控、炎症反应的正调控、凋亡过程的调控等，CC 主要涉及细胞外区域、细胞外间隙、细胞膜等，MF 主要涉及 PI3K 结合、蛋白磷酸酶结合、内肽酶活性等，体现脉络舒通丸抗 STP 是多重作用的结果。

KEGG 通路富集分析中共获得 118 条相关信号通路（P＜0.05），根据 P 值由小到大顺序制作排名前 20 的信号通路气泡图，见图 4，其中包括 JAK/STAT、PI3K/Akt 2 条主要炎症相关信号通路，流体剪切应力和动脉粥样硬化、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）2 条与血管性疾病相关信号通路，5 条癌症相关信号通路，7 条病毒相关信号通路，4 条其他信号通路。由于 STP 的发生发展与炎症和血栓密切相关，因此，本研究对 KEGG 信号通路富集分析结果中 2 条炎症相关信号通路和 2 条与血管性疾病相关信号通路进行文献调研。

表 1　脉络舒通丸抗 STP 核心靶点的拓扑参数信息

Table 1　Topological parameter information of core targets of Mailuo Shutong Pills in treatment of STP

编号	核心靶点	度值	介数中心性	中心接近度	编号	核心靶点	度值	介数中心性	中心接近度
1	TNF	62	0.797 980	736.075 7	17	SERPINE1	35	0.617 188	69.222 8
2	VEGFA	58	0.782 178	498.956 5	18	ACE	30	0.603 053	164.923 5
3	AKT	55	0.759 615	514.126 7	19	JAK2	30	0.603 053	69.113 9
4	ALB	54	0.745 283	387.315 5	20	PLG	31	0.593 985	37.378 0
5	STAT3	49	0.692 982	216.191 0	21	REN	28	0.593 985	57.553 8
6	TLR4	47	0.692 982	220.982 8	22	MPO	29	0.585 185	25.228 4
7	MMP9	44	0.669 492	101.539 0	23	F2	26	0.585 185	63.707 4
8	CASP3	39	0.652 893	161.049 3	24	PDGFRB	25	0.576 642	23.088 6
9	IL2	41	0.647 541	160.433 0	25	F3	24	0.564 286	18.518 8
10	ICAM1	41	0.647 541	76.020 5	26	JAK1	23	0.564 286	31.812 2
11	PTGS2	37	0.642 276	122.467 6	27	TLR9	22	0.556 338	17.295 0
12	MMP2	38	0.637 097	63.438 5	28	PIK3R1	24	0.552 448	128.309 5
13	KDR	37	0.637 097	86.210 3	29	NLRP3	20	0.548 611	15.036 3
14	MTOR	34	0.632 000	200.423 7	30	PIK3CA	22	0.544 828	73.736 6
15	HRAS	36	0.626 984	170.374 2	31	CCR5	21	0.544 828	16.407 8
16	PPARG	34	0.622 047	99.089 8					

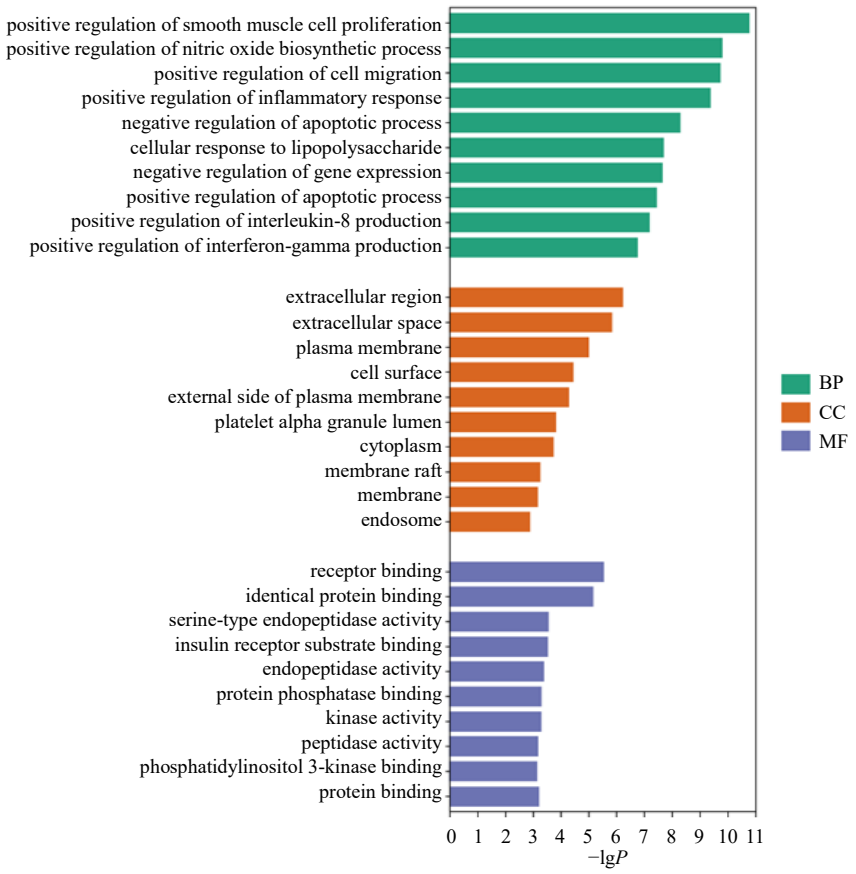


图 3　脉络舒通丸抗 STP 的核心靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 3　GO function enrichment analysis of core targets of Mailuo Shutong Pills in treatment of STP

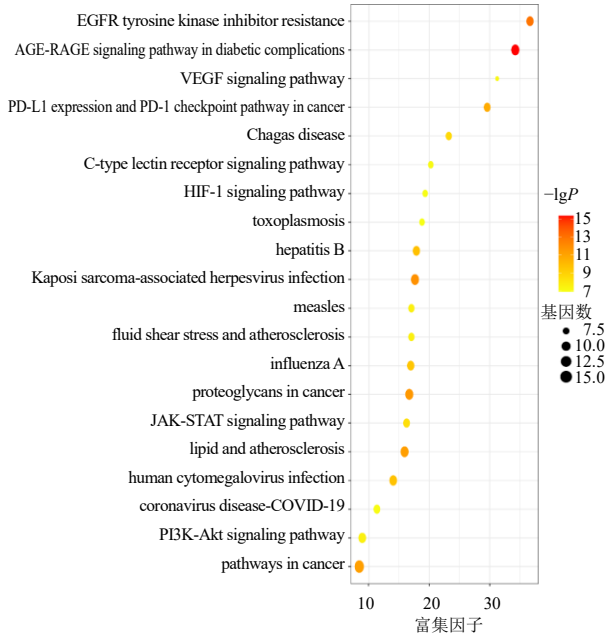


图 4　脉络舒通丸抗 STP 的核心靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 4　KEGG pathway enrichment analysis of core targets of Mailuo Shutong Pills in treatment of STP

经文献检索，流体剪切应力和动脉粥样硬化、VEGF 信号通路参与机体血管生成，促进血管内皮细胞增生与凋亡[18-19]；JAK/STAT 信号通路可通过维持血管内皮细胞的稳态、抑制血管内的氧化应激及炎症损伤，PI3K/Akt 信号通路具有抑制炎症和抗血栓形成的作用[20-21]。由此可知，流体剪切应力和动脉粥样硬化、VEGF 信号通路以影响血栓为主；而 PI3K/Ak 和 JAK/STAT 信号通路主要与炎症反应和血栓形成密切相关，且这 2 条信号通路的相关研究较多，*P* 值排名较小。故本研究预测脉络舒通丸可能是通过调控 PI3K/Akt 和 JAK/STAT 信号通路发挥抗 STP 作用。

3.2　脉络舒通丸抗 STP 的体内实验作用机制研究

3.2.1　脉络舒通丸对 STP 模型兔耳组织病理形态的影响　如图 5 所示，对照组兔耳组织中静脉内皮细胞形态完整，呈梭形均匀有序的排列，内膜光滑无脱落现象，且无任何血栓和炎性细胞的浸润。与对照组比较，模型组兔耳组织血管管腔被破坏，静脉内膜无规则性严重脱落，管腔内有明显血栓产生，

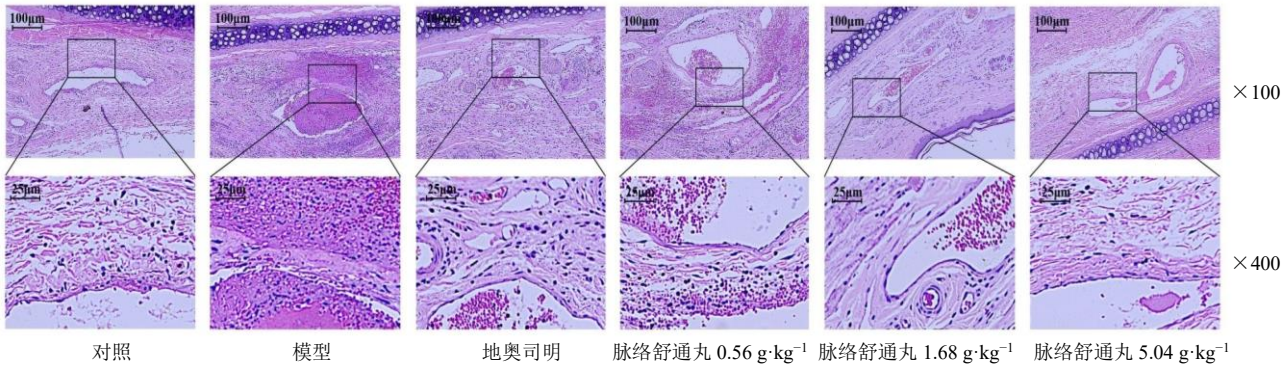


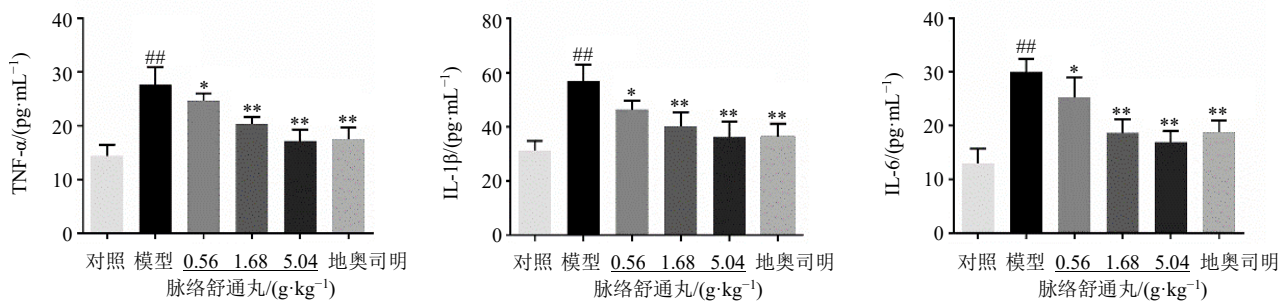
图 5　脉络舒通丸对 STP 模型兔耳组织病理变化的影响 (HE)

Fig. 5　Effect of Mailuo Shutong Pills on histopathological changes of ear tissues in STP rabbits (HE)

管壁及周围组织可见大量炎性细胞的浸润，表示 STP 兔模型建立成功。与模型组比较，各给药组兔耳组织静脉内皮细胞形态完整性和内膜脱落情况均有不同程度的改善，仅可见轻微血栓形成，少量炎性细胞局部浸润于管腔和周围组织，以脉络舒通丸高剂量组病理改善最为明显。

3.2.2　脉络舒通丸对 STP 模型兔血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响　如图 6 所示，与对照组比较，模型组兔血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均显著降低（P＜0.05、0.01）。提示脉络舒通丸对 STP 模型兔血清炎症水平具有显著的抑制作用。

3.2.3　脉络舒通丸对 STP 模型兔 JAK/STAT、PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响　为了进一步研究脉络舒通丸抗 STP 的分子机制，本研究测定网络药理学预测 PI3K/AKT、JAK/STAT 信号通路中关键蛋白的表达水平。如图 7 所示，与对照组比较，模型组兔耳组织中 Akt、PI3K、JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平明显上调（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组 Akt、PI3K、JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平明显下调（P＜0.05、0.01）。表明脉络舒通丸可通过抑制 PI3K/Akt、JAK2/STAT3 信号通路发挥抗 STP 作用。



与对照组比较：##P＜0.01；与模型组比较：*P＜0.05　**P＜0.01，图 7 同

##P < 0.01 *vs* control group; *P < 0.05　**P < 0.01 *vs* model group, same as fig. 7

图 6　脉络舒通丸对 STP 模型兔血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Fig. 6　Effect of Mailuo Shutong Pills on levels of inflammatory factors in serum of STP rabbits ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

4　讨论

STP 为临床常见的周围血管疾病，临床以躯干部或肢体处浅静脉发生血栓性、炎症病变，静脉循行处出现结节或条索状，伴有明显触痛等为主要表现特征。STP 归属于中医学“脉痹”“赤脉”“青蛇毒”等范畴。《医宗金鉴·外科心法要诀》中阐述：青蛇毒，此证又名青蛇便，生于小腿肚下，形长二三寸，结肿，紫块，僵硬[22]。其主要病机为热毒、水湿和血瘀阻于脉络。故中医治疗以清热利湿、活血化瘀为主。脉络舒通丸由黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、水蛭、蜈蚣、全蝎、甘草组成，具有清热解毒、化瘀通络、祛湿消肿之功效，切中 STP 湿热浊瘀阻络的基本病机[23]。然而，脉络舒通丸抗 STP 的作用机制尚未完全明确。

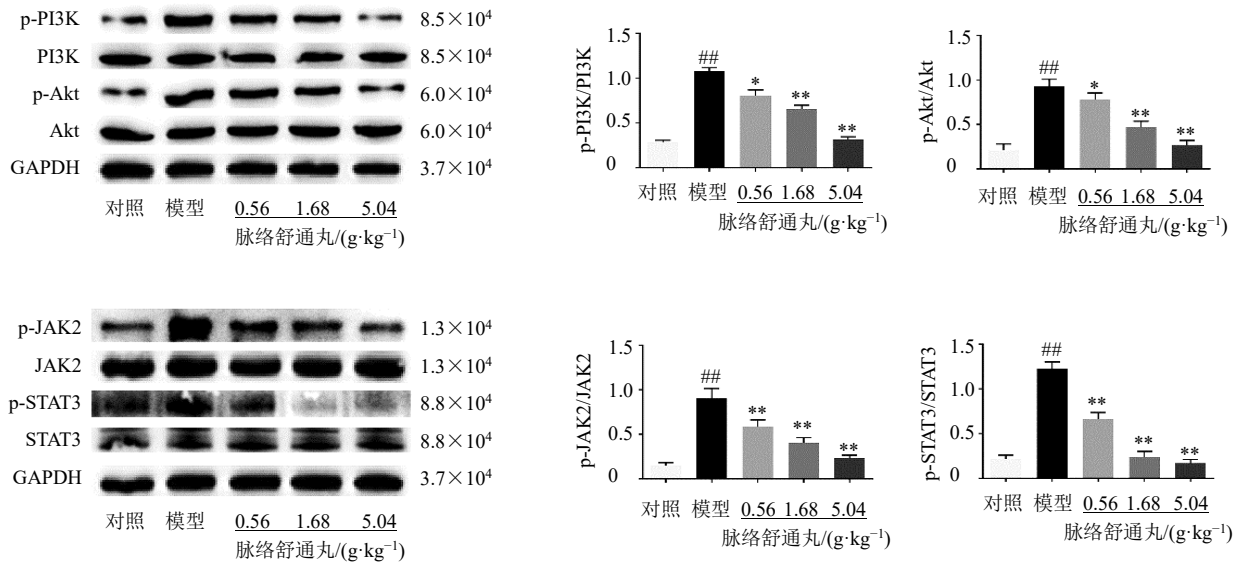


图 7　脉络舒通丸对 STP 模型兔耳组织 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 7　Effect of Mailuo Shutong Pills on expressions of PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathway-related proteins in ear tissues of STP rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

本研究采用网络药理学整合体内实验的方式从多靶点、多角度、多途径揭示脉络舒通丸抗 STP 的作用机制，探讨脉络舒通丸抗 STP 的潜在靶点和分子机制。网络药理学结果显示，共筛选出脉络舒通丸 145 个活性成分及 1112 个成分作用靶点，837 个 STP 疾病作用靶点，2 者共同靶点共 84 个；将 84 个共同靶点导入 STRING 数据库中，隐藏孤立靶点，进行 PPI 网络分析，共筛选得到 31 个脉络舒通丸抗 STP 的核心靶点，经 KEGG 通路富集分析脉络舒通丸抗 STP 主要涉及 PI3K/Akt、JAK/STAT、VEGF、流体剪切应力和动脉粥样硬化等介导的信号通路。研究发现，PI3K/Akt 和 JAK/STAT 信号通路是与炎症反应和血栓形成密切相关的信号通路，且这 2 条信号通路的相关研究较多，P 值排名较小。因此，本研究基于 PI3K/Akt 和 JAK/STAT 2 条信号通路深入探讨脉络舒通抗 STP 的作用机制。

PI3K/Akt 信号通路是重要的细胞内信号转导通路，已被报道在结肠炎、关节炎、脑缺血再灌注损伤的炎症反应中发挥重要作用[24]。PI3K 是一种由调节亚基 p85 和催化亚基 P110 构成的异源二聚体，调节亚基 p85 可通过 SH2 结构与磷酸化的酪氨酸残基作用，激活 PI3K，进而增加 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate，PIP3）的产生，PIP3 能够使 PI3K 下游关键靶蛋白 Akt 的 Thr308、Ser473 残基磷酸化并使其活化，活化的 Akt 可调控下游多种靶蛋白介导的生物过程，包括炎症反应和内皮损伤等[25-27]。研究发现，豨莶草水煎液可通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制 NF-κB、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达，从而改善脑缺血再灌注损伤模型大鼠的炎症反应[28]。此外，PI3K/Akt 信号通路也可介导依赖凝血酶的血小板信号转导，调控蛋白酶活化受体表达进而抑制血小板活化及黏附，延迟血栓的形成[29]。研究表明，水溶性番茄浓缩物通过抑制 PI3K/Akt 信号通路发挥抗血小板聚集和血栓形成的作用[30]。因此，本研究应用 Western blotting 技术检测各组兔耳组织中 PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达水平，结果显示脉络舒通丸能明显下调 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平，表明脉络舒通丸可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路来发挥抗 STP 作用。

JAK/STAT 信号通路主要通过多种细胞因子介导调节细胞增殖、凋亡及炎症反应。JAK2/STAT3 是在炎性疾病中研究较多的信号通路，且 JAK2 特异性激活 STAT3[31]。当受到外界信号刺激时，干扰素等配体与细胞膜上多种细胞因子受体结合，以同源或异源二聚体的形式磷酸化 JAK2，磷酸化的 JAK2 随即募集细胞质中的 STAT3，磷酸化后的 STAT3 形成二聚体进入到细胞核，最终与目的基因启动子相结合，调控血管内皮细胞功能及炎症反应等生物过程[32]。研究表明，白藜芦醇可通过抑制 JAK2/STAT3

通路，下调 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达，减轻 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉血管内的炎症损伤[33]。AG490（一种 JAK2/STAT3 信号通路的专效抑制剂）可显著抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤，其作用机制是通过阻断 JAK2/STAT2 信号通路，维持血管内皮细胞的稳态[34]。此外，AG490 也可通过阻断 JAK2/STAT3 信号通路，抑制月桂酸钠溶液诱导的血栓闭塞性脉管炎大鼠的炎症反应和血栓形成[35]。故本研究应用 Western blotting 技术检测各组兔耳组织中 JAK2、STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的表达水平，结果显示脉络舒通丸可显著下调 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平，表明脉络舒通丸也可能通过调控 JAK/STAT 信号通路来发挥抗 STP 作用。

综上所述，本研究通过网络药理学方法预测了脉络舒通丸抗 STP 的作用机制，并进一步通过体内实验探讨其潜在的作用机制。结果表明，脉络舒通丸可抑制 STP 模型兔血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平，并显著改善 STP 模型兔的病理损伤。其作用机制可能通过抑制 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 2 条信号通路的激活，并下调多种炎症因子表达水平来发挥抗 STP 作用，为临床脉络舒通丸治疗 STP 提供坚实的理论基础和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Sobreira M L. Complications and treatment of superficial thrombophlebitis [J]. *J Vasc Bras*, 2015, 14(1): 1-3.

[2] 高杰, 张婷, 付晨菲, 等. 血栓性浅静脉炎中西医治疗概述 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(12): 3089-3092.

[3] 吴佳, 尧雪洲. 在慢阻肺炎症反应中黄芪多糖的抗炎作用及抑制 TLR4/NF-κB 通路的机制 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2018, 39(5): 760-764.

[4] Chen M J, Xiao J B, El-Seedi H R, *et al*. Kaempferol and atherosclerosis: From mechanism to medicine [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, doi: 10.1080/10408398.2022.2121261.

[5] Ma F T, Shan Q, Jin Y H, *et al*. Effect of *Lonicera japonica* extract on lactation performance, antioxidant status, and endocrine and immune function in heat-stressed mid-lactation dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(11): 10074-10082.

[6] 王淑琪, 孙克寒, 陈菲, 等. 基于网络药理学探讨“金银花-玄参”药对治疗动脉粥样硬化的分子机制 [J]. 中国医药导报. 2021,18(15): 21-26.

[7] 辛家东, 张法荣. 脉络舒通丸治疗下肢血栓性浅静脉炎组方特点及作用机制 [J]. 世界中医药, 2021, 16(22): 3358-3362.

[8] 张志. 脉络舒通丸治疗下肢血栓性浅静脉炎的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(6): 1315-1319.

[9] 石娅, 刘文, 刘兴德, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探究当归补血汤干预大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5052-5065.

[10] 涂宛晴, 梁秋儿, 谢鹏程, 等. 基于 TNF-α/IKKβ/NF-κB 信号通路研究消积丸治疗 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化的机制 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5074-5084.

[11] 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.

[12] 杨志欣, 汲丽丽, 刘慧, 等. 全蝎化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中南药学, 2020, 18(9): 1523-1529.

[13] 王国玉, 渠源, 陈亚飞, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨钩藤-全蝎药对治疗支气管哮喘的作用机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(1): 123-135.

[14] 侯淋飞. 基于网络药理学研究麝香乌龙丸治疗类风湿性关节炎的分子机制 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.

[15] 吴福林, 董庆海, 王涵, 等. 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 108-111.

[16] 郭晓庆, 孙佳明, 张辉. 水蛭的化学成分与药理作用 [J]. 吉林中医药, 2015(1): 47-50.

[17] 汲丽丽, 吕邵娃, 杨志欣. 蜈蚣化学成分与药理作用研究进展 [J]. 特产研究, 2020, 42(4): 75-84.

[18] 陈苑, 黎宝留, 许二巾, 等. 基于血流剪切力与炎性反应探讨当归补血汤治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(6): 786-793.

[19] Wang Z H, Liu P R, Hu M Y, *et al*. Naoxintong restores ischemia injury and inhibits thrombosis via COX2-VEGF/NF-κB signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113809.

[20] 孙文静, 马惠昇, 穆静, 等. 理筋手法通过 PI3K-Akt 通路干预兔静力性损伤的机制研究 [J]. 江苏中医药, 2022, 54(11): 72-76.

[21] 莫建文, 黄河, 张春强, 等. JAK-STAT 信号通路在创伤性深静脉血栓形成中作用的实验研究 [J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(26): 6212-6214.

[22] 庞雪, 刘明, 孙庆, 等. 基于中医传承辅助平台的治疗血栓性浅静脉炎方剂组方规律分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(3): 375-378.

[23] 谢思远, 李正贵, 李军. 脉络疏通丸辅治急性期下肢肌间静脉血栓的疗效及对血流动力学水平的影响 [J]. 中国处方药, 2022, 20(9): 161-163.

[24] 严美茹, 张燕平, 罗瑞琦, 等. PI3K/Akt 信号通路与脑出血的研究进展 [J]. 新医学, 2022, 53(5): 310-313.

[25] 王凌云, 金梦, 王丽双. 抑制糖尿病大鼠 PI3K/Akt 信号通路对其氧化应激水平及血管内皮生长因子的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(10): 1047-1050.

[26] 王贺, 罗明华, 沈晓君, 等. 丹蒌片通过 PI3K/Akt 信号通路抗动脉粥样硬化机制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(6): 1194-1197.

[27] Zhu F, Zheng J J, Xu F, *et al*. Resveratrol alleviates dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in mice by mediating PI3K/Akt/VEGFA pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 693982.

[28] 王文杰, 徐煜彬, 徐珊珊. 基于 PI3K/Akt 通路豨莶草抗脑缺血再灌注损伤作用机制研究 [J]. 中国现代医生, 2022, 60(18): 28-31.

[29] Meng Y, Yin Q, Ma Q, *et al*. FXII regulates the formation of deep vein thrombosis via the PI3K/AKT signaling pathway in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 87.

[30] 凡蝶, 田泽众, 马熙麟, 等. 水溶性番茄浓缩物 Fruitflow 通过调控血小板 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路抑制其活化、聚集及血栓形成 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2020, 41(2): 243-250.

[31] Salas A, Hernandez-Rocha C, Duijvestein M, *et al*. JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(6): 323-337.

[32] 彭长铁, 邓礼明, 熊国祚, 等. JAK2-STAT3 信号通路在缺血性疾病的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 159-164.

[33] 李自立, 马小峰, 黄江伟. 白藜芦醇抑制 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉血管氧化应激及炎症损伤的作用研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(22): 2905-2908.

[34] 李潮生, 王振花, 李晓丽, 等. *N*-乙酰半胱氨酸通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路对高糖诱导的内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 941-948.

[35] 张含霁. Ag490 通过抑制 JAK2/STAT3 通路对同型半胱氨酸诱导的血栓闭塞性脉管炎治疗作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.

[责任编辑 李亚楠]