

基于网络药理学、分子对接和实验验证研究天麻钩藤饮改善高血压血管内皮损伤的作用及机制

王 洁¹, 寿迪文¹, 周衡朴^{2*}

1. 浙江中医药大学附属第一医院(浙江省中医院), 浙江 杭州 310006

2. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接和实验验证探究天麻钩藤饮改善高血压血管内皮功能的潜在活性成分、作用靶点及分子机制, 明确其是否通过磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 信号通路发挥作用。**方法** 通过 HERB、SwissTargetPrediction 数据库筛选天麻钩藤饮的活性成分及靶点, 结合 OMIM、GeneCards 数据库获取高血压相关靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI) 网络并进行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; 选取核心成分与 PI3K/Akt/eNOS 通路关键靶点进行分子对接验证。以血管紧张素-II(angiotensin-II, Ang-II) 诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤为模型, 通过 CCK-8、qRT-PCR、Western blotting、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、一氧化氮(nitric oxide, NO) 检测等实验验证天麻钩藤饮对细胞活力、氧化应激、炎症反应及 PI3K/Akt/eNOS 通路的影响。**结果** 网络药理学筛选出天麻钩藤饮 228 个活性成分及 969 个高血压相关交集靶点, 核心靶点包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、PI3K 家族成员[磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 β (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta, PIK3CB) 等], KEGG 富集分析显示 PI3K/Akt 信号通路为关键通路; 分子对接证实山柰酚、芹菜素等核心成分与 PI3K/Akt 通路靶点结合亲和力强。细胞实验结果显示, 25~100 mg/mL 天麻钩藤饮对正常 HUVECs 无细胞毒性, 可剂量相关性改善 Ang-II 诱导的细胞活力降低 ($P < 0.001$); 显著抑制血管紧张素-II 1 型受体(angiotensin-II type 1 receptor, AT1R)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4) 表达及 ROS 生成 ($P < 0.001$), 上调超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase 1, GPX1) 等抗氧化酶水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 下调白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1) 等炎症因子表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 增加 NO 生成并抑制内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 上调 p-PI3K、p-Akt、p-eNOS 蛋白表达 ($P < 0.001$); 给予 PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin 后, 可显著削弱天麻钩藤饮对 PI3K/Akt 通路的激活效应, 明确其内皮保护作用依赖于 PI3K/Akt/eNOS 信号通路。**结论** 天麻钩藤饮可能通过山柰酚、芹菜素等核心成分, 多靶点协同激活 PI3K/Akt 通路, 改善氧化应激与炎症反应, 调节 NO 与 ET-1 的平衡, 从而保护高血压状态下的血管内皮功能。

关键词: 天麻钩藤饮; 高血压; 血管内皮功能; 氧化应激; 炎症反应; PI3K/Akt/eNOS 信号通路; 网络药理学; 山柰酚; 芹菜素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)15-5953-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.15.015

Effect and mechanism of Tianma Gouteng Yin in improving hypertensive vascular endothelial injury based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

WANG Jie¹, SHOU Diwen¹, ZHOU Hengpu²

1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University (Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Hangzhou 310006, China

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(ZCLTGY24H2901); 浙江省自然科学基金资助项目(LY24H280005)

作者简介: 王 洁(1997—), 女, 中药师, 研究方向为中药药理与新产品开发。E-mail: 1065238319@qq.com

*通信作者: 周衡朴(1997—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事中药药理与新产品开发。E-mail: zhp9751@163.com

2. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To explore the potential active components, targets and molecular mechanism of Tianma Gouteng Yin (天麻钩藤饮) in improving vascular endothelial function in hypertension based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification, and to clarify whether it exerts effects via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway. **Methods** Active components and targets of Tianma Gouteng Yin were screened through HERB and SwissTargetPrediction databases. Hypertension-related targets were obtained from OMIM and GeneCards databases. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed. Molecular docking was used to verify the binding affinity between core components and key targets in PI3K/Akt/eNOS pathway. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by angiotensin II (Ang-II) were used as the cell model. CCK-8, qRT-PCR, Western blotting, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) assays were applied to evaluate the effects of Tianma Gouteng Yin on cell viability, oxidative stress, inflammatory response and PI3K/Akt/eNOS pathway. **Results** Network pharmacology identified 228 active components and 969 overlapping hypertension-related targets of Tianma Gouteng Yin. Core targets included serine/threonine kinase 1 (AKT1) and PI3K family members [phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta (PIK3CB), etc.]. KEGG enrichment indicated that PI3K/Akt pathway was the key pathway. Molecular docking confirmed that core components such as kaempferol and apigenin showed strong binding affinity to PI3K/Akt pathway targets. The results of cell experiment showed that 25—100 mg/mL Tianma Gouteng Yin had no cytotoxicity in normal HUVECs, and dose-dependently attenuated Ang-II-induced reduction in cell viability ($P < 0.001$), significantly inhibited the expressions of angiotensin-II type 1 receptor (AT1R) and NADPH oxidase 4 (NOX4), as well as ROS production ($P < 0.001$), upregulated the levels of antioxidant enzymes including superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) and glutathione peroxidase 1 (GPX1) ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), reduced the expressions of inflammatory factors including interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) ($P < 0.01, 0.001$), increased NO production and suppressed endothelin-1 (ET-1) expression ($P < 0.01, 0.001$), upregulated the protein expressions of p-PI3K, p-Akt and p-eNOS ($P < 0.001$). After administering the PI3K specific inhibitor Wortmannin, the activation effect of Tianma Gouteng Yin on PI3K/Akt pathway was significantly weakened, indicating that its endothelial protective effect depends on PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. **Conclusion** Tianma Gouteng Yin may activate PI3K/Akt pathway through multi-target synergistic effects of core components such as kaempferol and apigenin, improve oxidative stress and inflammatory response, regulate the balance of NO and ET-1, and protect endothelial function in hypertension.

Key words: Tianma Gouteng Yin; hypertension; vascular endothelial function; oxidative stress; inflammation; PI3K/Akt/eNOS signaling pathway; network pharmacology; kaempferol; 2-apigenin.

我国成人高血压患病率超过 30%，患病人数约为 2.45 亿，已成为危害我国居民健康的一大问题。高血压初期并不会会有明显的症状，因此会被大部分患者所忽视，等到患者出现明显头痛、胸闷、视力模糊等症状时，往往血压已经长期偏高。长期处于高血压状态，患者体内可能出现血管内皮功能障碍、动脉硬化及氧化应激等，出现心脑血管疾病的风险显著增加^[1-3]。中医药治疗高血压经验丰富，常见方剂有天麻钩藤饮、滋肾平肝方、熄风醒脑汤等，能够多途径、多靶点治疗高血压病，患者依从性较好，且不良反应小^[4-6]。天麻钩藤饮首载于胡光慈先生所著的《中医内科杂病证治新义》，后被收录于中国中医药院校高等教育《方剂学》教材，其颗粒剂也被收录于《中国药典》2025 年版中，成为临床常

用的经典方剂之一。天麻钩藤饮具有平肝熄风、清热安神的功效，可用于肝阳上亢或高血压所引起的头痛、眩晕等，临床研究表明，天麻钩藤饮可显著降低患者血压，同时显著降低患者血管内皮素和改善血管内皮功能^[7-8]。

近年来，磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路在心血管疾病治疗方面引起广大学者的关注^[9-10]。PI3K/Akt 信号通路通过整合肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS)、交感神经、氧化应激等多条上游信号，调控血管重构、钠水滞留、心肌肥厚等关键病理过程，在高血压的发生发展及靶器官损伤中发挥核心调控作用^[11-12]。研究表明，天麻钩藤饮可能促进 Akt、PI3K 蛋白的磷酸化，激

活下游效应分子内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 产生一氧化氮 (nitric oxide, NO), 进而降低血管压力, 改善高血压和血管损伤^[13-14]。因此, 本研究通过网络药理学、分子对接等手段, 筛选出天麻钩藤饮改善高血压血管功能损伤的潜在化学成分和作用机制, 并采用细胞实验进行验证, 明确天麻钩藤饮是否通过 PI3K/Akt 信号通路改善高血压血管内皮损伤。

1 材料

1.1 细胞

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs, 货号 CP-H082) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药材

天麻钩藤饮由天麻 9 g、钩藤 12 g、石决明 18 g、栀子 9 g、黄芩 9 g、川牛膝 12 g、杜仲 9 g、益母草 9 g、桑寄生 9 g、首乌藤 9 g、茯神 9 g 组成。天麻 (批号 20250906)、石决明 (批号 20250406)、栀子 (批号 20250515)、黄芩 (批号 20250908)、川牛膝 (批号 20250916)、杜仲 (批号 20250813)、桑寄生 (批号 20250629)、朱茯神 (批号 20250923) 购自浙江培元堂中药饮片有限公司, 钩藤 (批号 20250515)、益母草 (批号 20250228)、首乌藤 (批号 20241111) 购自杭州华东中药饮片有限公司, 以上饮片均由浙江省中医院寿迪文副主任中药师鉴定, 天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 钩藤为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的干燥带钩茎枝, 石决明为鲍科动物杂色鲍 *Haliotis diversicolor* Reeve 的贝壳, 栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根, 杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分, 桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝, 首乌藤为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎, 茯神为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 菌核中抱有松根的白色部分。

1.3 药品与试剂

对照品山柰酚、芹菜素 (批号分别为

KB372599、M29GB150104, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 血管紧张素-II (angiotensin-II, Ang-II, 批号 519994)、PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin (Wort, 批号 10197)、p-eNOS 抗体 (批号 414653) 购自美国 MedChemExpress 公司; p-PI3K 抗体 (批号 AP0427) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; PI3K 抗体 (批号 db13949)、Akt 抗体 (批号 db11977)、p-Akt 抗体 (批号 db13991)、eNOS 抗体 (批号 db15947) 购自杭州戴格生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10029187)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 20001765) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 缬沙坦胶囊 (国药准字 H20054408, 80 mg/粒, 批号 20250626) 购自常州四药制药有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8, 批号 CA1210)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 CA1410) 购自北京索莱宝科技有限公司; NO 检测试剂盒 (DAF-FM DA 荧光探针, 批号 A280250409) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 引物由生工生物设计及合成; 色谱级乙醇 (货号 75-05-8)、色谱级甲醇 (货号 67-56-1) 购自美国 TEDIA 公司; 其余试剂为分析级。

1.4 仪器

Motic BA410 型生物显微镜 (厦门麦克奥迪实业有限公司); MB24R 型台式冷冻离心机 (深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司); VE-180 型垂直电泳槽 (杭州三合创新科技有限公司); TS-100 型脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); AR2140 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山舒美超声仪器有限公司); Synergy H4 型酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); Eva3100 型微量核酸蛋白检测仪 (莫纳生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 天麻钩藤饮冻干粉的制备

按组方配比称取各药材饮片, 加 10 倍量水浸泡 30 min。石决明先煎 30 min, 加入其余药材, 一煎 40 min, 二煎 30 min, 滤过, 合并 2 次滤液, 冷冻干燥 48 h 后备用, 冻干粉出膏率为 $(19.67 \pm 1.77)\%$ 。

2.2 HPLC 检测天麻钩藤饮冻干粉中山柰酚和芹菜素含量

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (55:45); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 360 nm。

2.2.2 供试品溶液的制备 取天麻钩藤饮冻干粉(过 4 号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 20 mL, 称定质量, 超声(功率 400 W、频率 40 kHz)提取 40 min, 放至室温, 用 70%甲醇补充缺失的质量, 密塞, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 精密称取山柰酚和芹菜素对照品, 用 70%甲醇配制成质量浓度分别为 88、148 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.4 系统适应性考察 取混合对照品溶液和供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件进样检测, 结果见图 1, 供试品溶液中山柰酚和芹菜素与混合对照品溶液中出峰时间一致, 分离度良好, 符合检测要求。

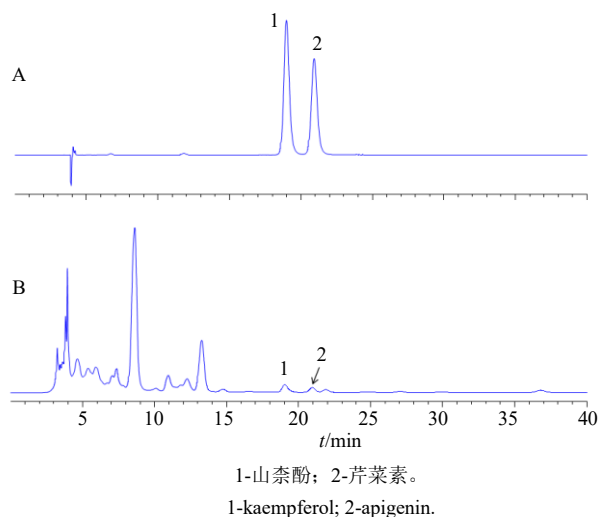


图 1 混合对照品 (A) 及供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference (A) and test solution (B)

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液 0.80、0.60、0.50、0.40、0.30、0.20、0.10、0.05 mL 至 1 mL 量瓶中, 加 70%甲醇定容至刻度。取以上溶液, 按“2.2.1”项下条件进样检测, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算线性回归方程, 结果分别为山柰酚 $Y=172.66X-188.12$, $r=0.9998$, 线性范围为 4.4~88.0 μg/mL; 芹菜素 $Y=78.64X-97.91$, $r=0.9998$, 线性范围为 7.4~148.0 μg/mL。结果表明山柰酚和芹菜素线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取混合对照品溶液, 按“2.2.1”

项下条件进样检测, 重复进样 6 次。结果显示山柰酚和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.10%和 0.21%, 表明该方法精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件进样检测。结果显示山柰酚和芹菜素质量分数的 RSD 分别为 2.21%和 2.91%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 12 h 内每隔 1 h 进样 1 次, 按“2.2.1”项下条件检测。结果显示山柰酚和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.33%和 0.34%, 表明在 12 h 内供试品溶液具有良好的稳定性。

2.2.9 加样回收率考察 精密称取 0.5 g 天麻钩藤饮冻干粉 6 份, 分别加入 100%量的对照品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件进样检测。结果显示山柰酚和芹菜素的加样回收率分别为 102.58%~104.57%、96.37%~103.74%, RSD 分别为 0.67%和 2.56%, 表明该方法准确度良好。

2.2.10 含量测定 取 3 批天麻钩藤饮冻干粉, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件进样检测。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 天麻钩藤饮的活性成分筛选以及靶点预测 采用 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/v2/>) 收集天麻钩藤饮的活性成分, 该数据库整合了 SymMap、TCMID、TCMSP 和 TCM-ID 等多个中药数据库, 能够全面体现中药中化学成分信息。通过 SwissADME 预测平台 (<https://swissadme.ch/>) 对所有活性成分进行吸收、分布、代谢、排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 预测, 仅保留符合所有类药五原则的成分作为候选成分, 使用 SwissTargetPrediction (<https://swisstargetprediction.ch/>, Probability>0) 对候选成分进行靶点预测, 即得到天麻钩藤饮成分-靶点信息库。使用 Cytoscape 3.10.3 软件进行成分-靶点网络的可视化, 并根据度值筛选排名前 10 的化合物作为关键候选化合物。

2.3.2 高血压相关靶点与关键交集靶点的获取 收集与高血压相关的靶点, 以“hypertension”为关键词检索 OMIM (<https://omim.org/>) 以及 GeneCards (<http://www.genecards.org>) 数据库。整合所有的预测靶点并去重, 得到高血压相关的靶点信息库。将

药物与疾病的相关靶点取交集,获得天麻钩藤饮治疗高血压的靶点。

2.3.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与关键基因鉴定 将交集靶点输入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 中,将物种设置为人类,并将最低要求的相互作用评分设置为最高可信度 (>0.9),其他参数保持默认值。删除未连接靶点,将网络数据以 TSV 格式导出,并导入 Cytoscape 软件进行网络构建和可视化。为了识别潜在的关键靶点,使用 Cytoscape 中的 CytoNCA 插件进一步分析网络节点的拓扑特征,重点关注度中心性、介数中心性和接近中心性 3 个主要指标。基于对这些指标的综合评估,选择排名前 10 的关键基因作为后续分析的候选靶点。

2.3.4 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 为了阐明药效靶点的生物学功能,使用 R 语言中的“clusterProfiler”和“ggplot2”包对交集基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 作为筛选标准,结果分别以柱状图和气泡图形式可视化。

2.3.5 “药物-成分-靶点-信号通路-疾病”网络构建 将 KEGG 通路富集分析中排名前 10 条通路,高血压相关靶点以及对应的活性成分导入 Cytoscape 软件,构建“药物-成分-靶点-信号通路-疾病”网络图。

2.3.6 分子对接验证 为验证候选活性成分与靶点蛋白的相互作用,对排名前 10 的化合物与关键靶点进行分子对接分析。通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取排名前 10 的化合物的三维结构,包括槲皮素 (CID: 5280343)、山柰酚 (CID: 5280863)、芹菜素 (CID: 5280443)、小檗碱 (CID: 2353)、邻苯二甲酸丁酯 (CID: 3026)、邻苯二甲酸二丁酯 (CID: 171810)、黄芩素 (CID: 5281605)、白杨素 (CID: 5281607)、表小檗碱 (CID: 160876)、药根碱 (CID: 72323)。靶点蛋白三维结构来源于 Protein Data Bank 及 AlphaFold3,包括 PIK3R1 (PDB: 1PBW)、PIK3CA (PDB: 8EXL)、PIK3CD (PDB: 7JIS)、PRKACA (PDB: 4WB8) 及 PIK3CB (由 AlphaFold3 预测获得)。采用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,通过设置网格框限定结合区域,为避免预设结合位点带来的偏倚,采用较大的网格框覆盖蛋白整体区域进行盲对接,以保证潜在活性位点的充分覆盖及配体构象的充分采样。采

用 Vina 默认参数,根据结合自由能对对接结果进行排序,选取得分最优构象用于后续分析。利用 PyMOL 对接结果进行可视化展示及相互作用分析。

2.4 细胞实验验证

2.4.1 细胞培养 HUVECs 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基,于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养,取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

2.4.2 CCK-8 法检测细胞活力

(1) 天麻钩藤饮对 HUVECs 细胞活力的影响: HUVECs 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。分别用含 25、50、100 mg/mL 天麻钩藤饮的培养基处理细胞^[15-16],另设置不给药的对照组和不接种细胞不给药的空白组,各组设置 6 个复孔。作用 24 h 后,吸去各孔内液体,每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 试剂的基础培养液,继续孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值,计算细胞相对活力。

$$\text{细胞相对活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

(2) 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞活力的影响: HUVECs 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组、缬沙坦 (50 $\mu\text{mol/L}$)^[17] 组和天麻钩藤饮 (25、50、100 mg/mL) 组,模型组和各给药组给予 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang-II 刺激后^[18-19],各给药组加入含相应药物的新鲜培养液处理细胞,对照组仅加入培养基,另设置不接种细胞不给药的空白组,各组设置 6 个复孔。作用 24 h 后,加入 CCK-8 试剂,测定各孔 A 值,计算细胞相对活力。

2.4.3 qRT-PCR 检测相关基因表达 HUVECs 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。按“2.4.2 (2)”项下进行分组和处理,每组设置 3 个复孔。作用 24 h 后,收集细胞,使用总 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA,并采用试剂盒将其逆转录为 cDNA。将 cDNA 模板、特异性引物、SYBR Green Master Mix 等混合,在实时 PCR 系统上进行 qRT-PCR。超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, *SOD1*)、过氧化氢酶 (catalase, *CAT*)、谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase 1, *GPX1*)、血管紧张素-II 1 型受体 (angiotensin-II type 1 receptor, *AT1R*)、烟酰胺腺嘌呤

呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, *NOX4*)、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, *ICAM1*)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, *VCAM1*)、白细胞介素-1 β

(interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-6*、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、内皮素-1 (endothelin-1, *ET-1*)、*GAPDH* 引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>SOD1</i>	GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG	CCACAAGCCAAACGACTTCC
<i>CAT</i>	TGGAGCTGGTAACCCAGTAGG	CCTTTGCCTTGGAGTATTTGGTA
<i>GPX1</i>	CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG	GAGGGACGCCACATTCTCG
<i>AT1R</i>	GGCTATTGTTCAACCAATGAAGT	TGGGACTCATAATGGAAAGCAC
<i>NOX4</i>	TGTGCCGAACACTCTTGCC	ACATGCACGCCTGAGAAAATA
<i>ICAM1</i>	GTATGAAGTGAAGCAATGTGCAAG	GTTCCACCCGTTCTGGAGTC
<i>VCAM1</i>	TTTGACAGGCTGGAGATAGACT	TCAATGTGTAATTTAGCTCGGCA
<i>IL-1β</i>	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTGCAAGAA
<i>IL-6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTGAGGTTG
<i>TNF-α</i>	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
<i>ET-1</i>	AAGGCAACAGACCGTGAAAAT	CGACCTGGTTTGTCTTAGGTG
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

2.4.4 细胞内 ROS 水平的测定 HUVECs 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。按“2.4.2 (2)”项下进行分组和处理, 每组设置 3 个复孔。作用 24 h 后, 收集细胞, 按照试剂盒说明书步骤操作, 在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.4.5 细胞内 NO 水平的测定 HUVECs 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。按“2.4.2 (2)”项下进行分组和处理, 每组设置 3 个复孔。作用 24 h 后, 收集细胞, 用 DAF-FM DA 染色工作液 (1 : 2 000) 重悬细胞, 于 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀, 使探针和细胞充分接触。37 °C 孵育结束后, 4 °C、600 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。采用酶标仪在 488 nm 激光下检测 NO 表达量。

2.4.6 Western blotting 检测 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白的表达 HUVECs 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。按“2.4.2 (2)”项下进行分组和处理, 每组设置 3 个复孔。作用 24 h 后, 收集细胞, 加入适量 RIPA 裂解液, 冰上静置 30 min, 离心取上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 牛血清白蛋白于室温封闭 2 h, 分别加入 p-PI3K (1 : 1 000)、PI3K (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000)、Akt

(1 : 1 000)、p-eNOS (1 : 1 000)、eNOS (1 : 3 000)、GAPDH (1 : 10 000) 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 ECL 化学发光液后, 采用 Modena 凝胶成像仪检测蛋白条带, 并用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.4.7 PI3K 抑制剂反向验证天麻钩藤饮对 PI3K/Akt/eNOS 通路的调控作用 HUVECs 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组、Wort (30 nmol/L) 组、天麻钩藤饮 (100 mg/mL) 组和 Wort (30 nmol/L) + 天麻钩藤饮 (100 mg/mL) 组, 每组设置 3 个复孔。模型组和各给药组给予 1 μ mol/L Ang-II 刺激后, 各给药组加入含相应药物的新鲜培养液处理细胞, 对照组仅加入培养基。作用 24 h 后, 收集细胞, 按“2.4.6”项下方法检测相关蛋白表达。

2.4.8 统计学分析 利用 GraphPad Prism 10 软件对数据进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐则采用单因素方差分析, 方差不齐时采用 Welch's *t* 检验。

3 结果

3.1 天麻钩藤饮冻干粉中山柰酚和芹菜素的含量测定

含量测定结果显示, 3 批天麻钩藤饮冻干粉中山柰酚和芹菜素的质量分数分别为 (90.40 $\pm$ 2.00)、(119.53 $\pm$ 3.48) μ g/g。

3.2 网络药理学和分子对接分析

3.2.1 药物和疾病靶点筛选 筛选得到天麻钩藤饮活性成分 228 个，对应靶点 1 117 个，高血压疾病相关的靶点 14 734 个，二者取交集，得到 969 个交集靶点（图 2）。根据天麻钩藤饮改善高血压的 969 个潜在靶点，反向筛选天麻钩藤饮中治疗高血压的潜在药效成分，将相关的药效成分以及作用靶点导入 Cytoscape 软件进行分析。结果显示，排名前 10 的化合物分别为槲皮素、山柰酚、芹菜素、小檗碱、邻苯二甲酸丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、黄芩素、白杨素、表小檗碱、药根碱，表明这些成分可能是天麻钩藤饮改善高血压血管内皮损伤的关键生物活性成分。

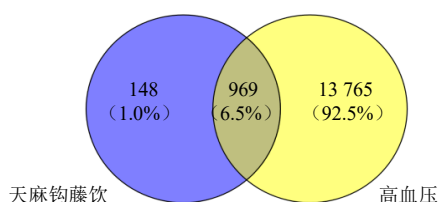
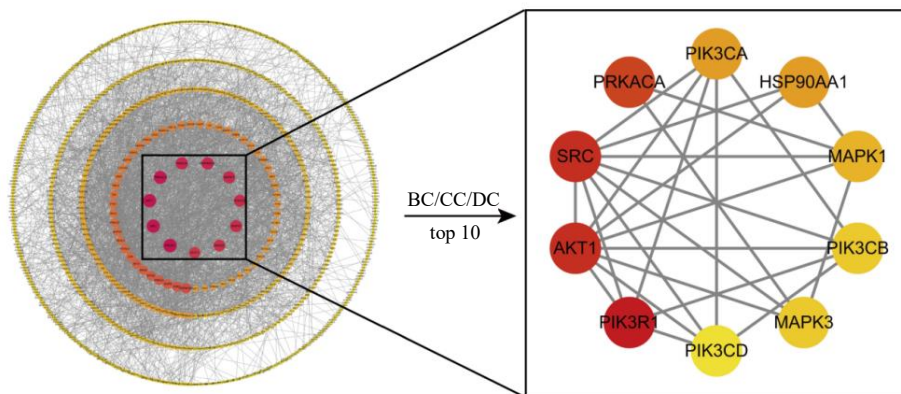


图 2 天麻钩藤饮与高血压的交集靶点 Venn 图
Fig. 2 Venn diagram of overlapping targets between Tianma Gouteng Yin and hypertension



节点代表蛋白质，边表示蛋白质之间的相互作用关系。
Nodes represent proteins, and edges indicate protein-protein interactions.

图 3 基于 CytoNCA 的 PPI 网络图及核心网络分析
Fig. 3 PPI network diagram with CytoNCA core network analysis

3.2.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 分析结果（图 4-A）显示，天麻钩藤饮治疗高血压的潜在靶点主要富集在对异物刺激的反应、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路的正向调节和蛋白质自磷酸化等生物过程，各种氨基酸激酶的活性等分子功能，膜筏、膜微区和蛋白激酶复合体等细胞成分。KEGG 分析结果（图 4-B）显示，根据 *P* 值排序，前 5 条的信号

3.2.2 核心靶点 PPI 网络构建 将交集靶点输入 STRING 数据库中，并导入 Cytoscape 软件进行网络构建和可视化，结果见图 3。筛选出的排名前 10 关键基因为丝裂原活化蛋白激酶 1（mitogen-activated protein kinase 1, *MAPK1*）、*MAPK3*、热休克蛋白 90αA 家族 1 型成员（heat shock protein 90 alpha family class A member 1, *HSP90AA1*）、SRC 原癌基因非受体酪氨酸激酶（SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, *SRC*）、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1（serine/threonine kinase 1, *AKT1*）、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, *PIK3R1*）、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, *PIK3CA*）、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 β（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta, *PIK3CB*）、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 δ（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta, *PIK3CD*）、蛋白激酶 A 催化亚基 α（protein kinase A catalytic subunit alpha, *PRKACA*）。

通路分别为神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路和环磷酸腺苷信号通路。

3.2.4 “药物-成分-靶点-通路-疾病”网络构建 将 KEGG 通路富集分析中鉴定出的靶点最多的前 10 条通路、天麻钩藤饮中成分相关靶点以及对应的活性成分数量导入 Cytoscape 软件，构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络图（图 5）。

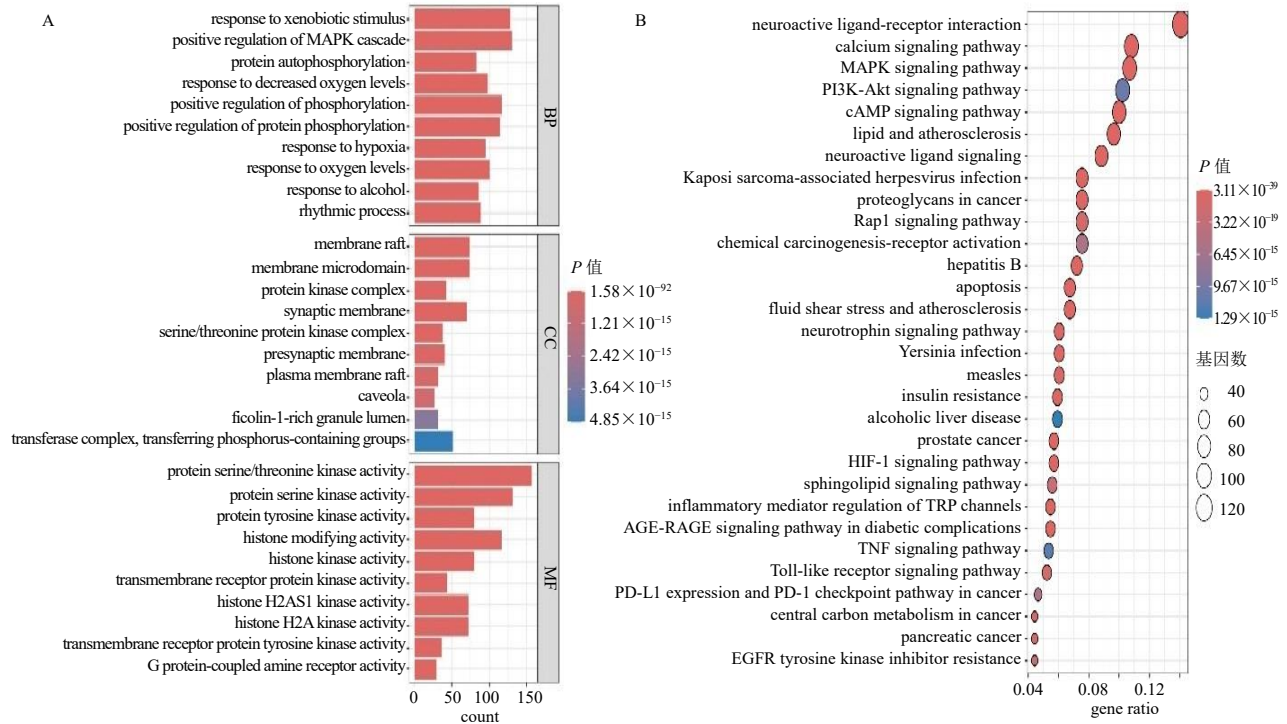


图4 GO功能(A)和KEGG通路(B)富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis

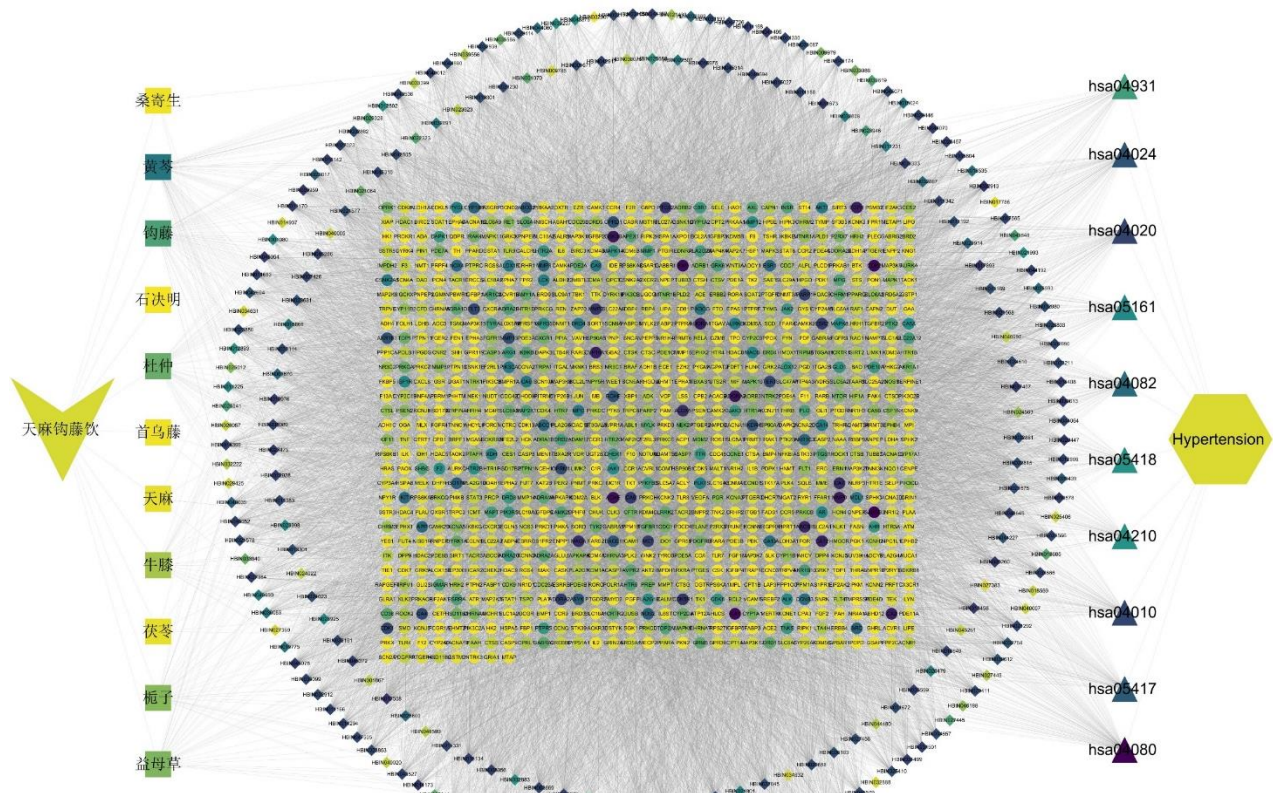


图5 “药物-成分-靶点-通路-疾病”网络

Fig. 5 “Drug-ingredient-target-pathway-disease” network

3.2.5 分子对接验证 对排名前 10 的活性成分和 PI3K/Akt 信号通路中靶点蛋白进行分子对接验证, 结果如图 6 所示。受体和配体之间的结合能在 $-9.4 \sim -4.8$ kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$), 通常认为结合能小于 -5 kcal/mol 即可认为稳定结合。其中槲皮素、山柰酚和芹菜素与 PI3K/Akt 信号通路中各个靶点蛋白均能稳定结合, 尤其是与 PIK3CA 结合非常稳定。表明这些成分与预测通路的受体靶点结合亲和力强、构象稳定, 是天麻钩藤饮发挥抗高血压作用的关键活性成分。

3.3 细胞实验结果

3.3.1 天麻钩藤饮对 HUVECs 细胞活力的影响 如图 7-A 所示, $25 \sim 100 \text{ mg/mL}$ 天麻钩藤饮干预 HUVECs 细胞 24 h, 对细胞活力无明显影响。如图 7-B 所示, 给予 $1 \mu\text{mol/L}$ Ang-II 干预 24 h 后, HUVECs 细胞活力明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组

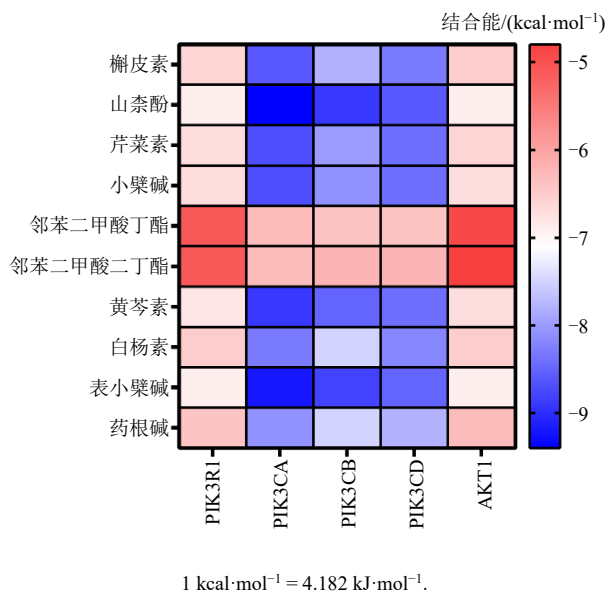


图 6 分子对接结合能热图

Fig. 6 Heatmap of molecular docking binding energy

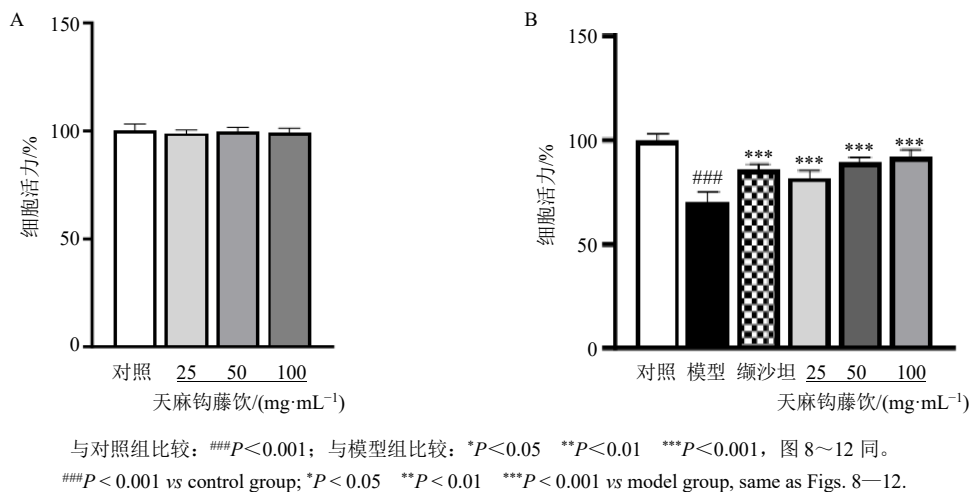


图 7 天麻钩藤饮对 HUVECs 细胞 (A) 和 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Tianma Gouteng Yin on viability of HUVECs cells (A) and Ang-II-induced HUVECs cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

比较, 各给药组细胞活力显著升高 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。表明天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的细胞损伤具有改善作用。

3.3.2 天麻钩藤饮降低 HUVECs 细胞中 AT1R、NOX4 表达从而减少 ROS 的产生 如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 AT1R 和 NOX4 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), ROS 生成明显增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 AT1R 和 NOX4 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), ROS 生成明显减少 ($P < 0.001$)。表明天麻钩藤饮能够抑制 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞中 AT1R 的过度激活以及氧化应激反应。

3.3.3 天麻钩藤饮调控 HUVECs 细胞中抗氧化应激酶的表达 如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 CAT、SOD1 和 GPX1 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 缬沙坦组和天麻钩藤饮中、高剂量组 CAT、SOD1 和 GPX1 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。表明天麻钩藤饮能够增强 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞的抗氧化应激能力。

3.3.4 天麻钩藤饮改善 HUVECs 细胞炎性损伤 如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 IL-6、

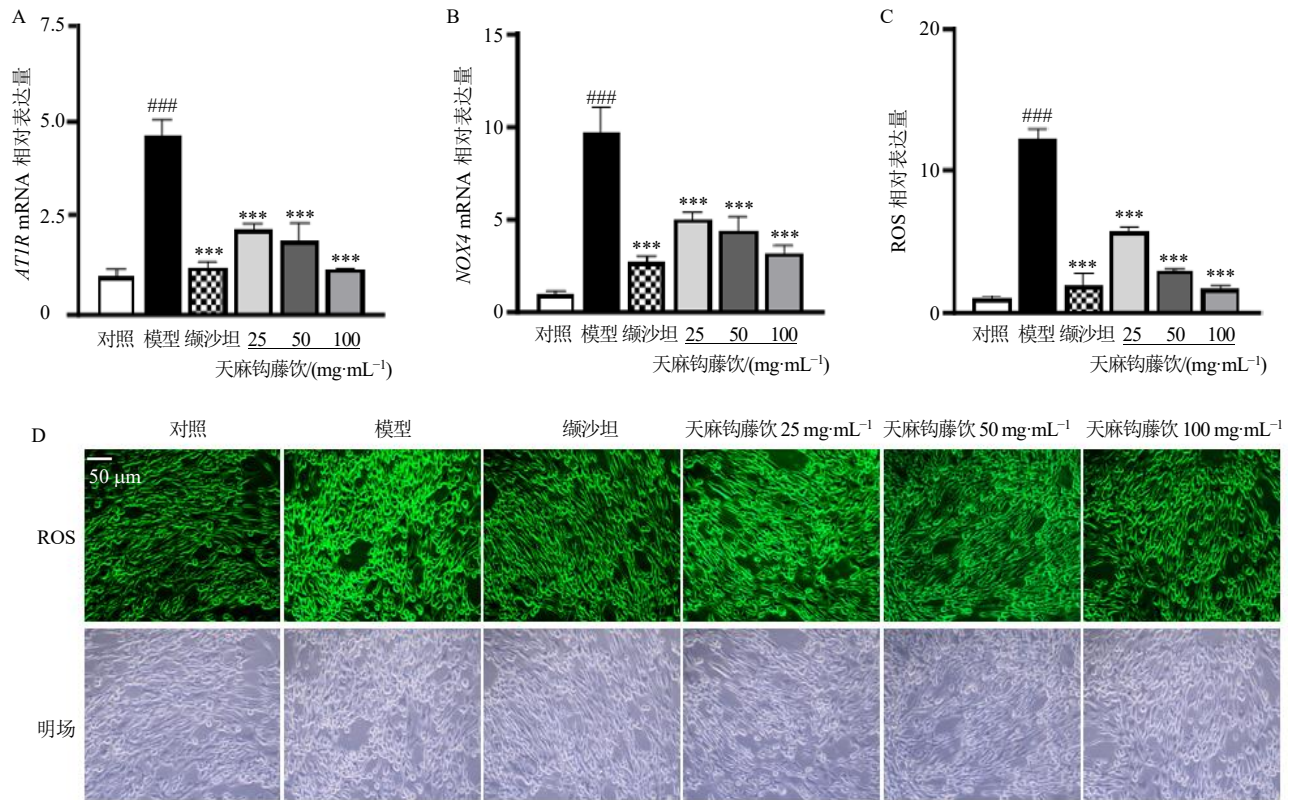


图 8 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 *AT1R*、*NOX4* mRNA 表达 (A、B) 以及 ROS 产生 (×40, C、D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Tianma Gouteng Yin on *AT1R*, *NOX4* mRNA expressions (A, B) and ROS production (× 40, C, D) in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

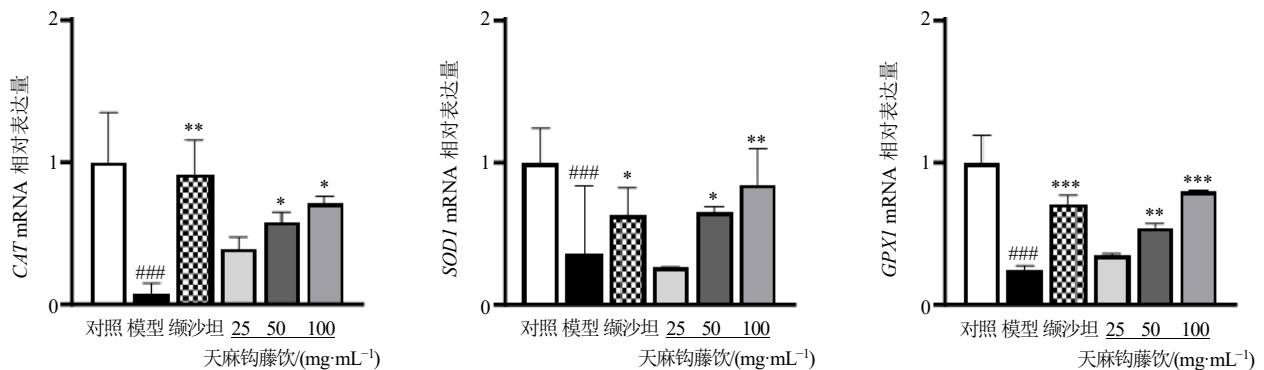


图 9 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 *CAT*、*SOD1* 和 *GPX1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of Tianma Gouteng Yin on *CAT*, *SOD1* and *GPX1* mRNA expressions in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-1 β 、*TNF- α* 、*ICAM1* 和 *VCAM1* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明天麻钩藤饮能够改善 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞的炎性损伤。

3.3.5 天麻钩藤饮增加 HUVECs 细胞 NO 含量并抑制 ET-1 表达 如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组 NO 生成量显著降低 ($P < 0.001$), *ET-1* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各

给药组 NO 的生成量显著升高 ($P < 0.001$), *ET-1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001) 表明天麻钩藤饮能够增加 HUVECs 细胞中 NO 含量并抑制 ET-1 的水平, 维持血管舒张稳态。

3.3.6 天麻钩藤饮通过 PI3K/Akt 通路激活 eNOS 如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 的表达水平显著降低

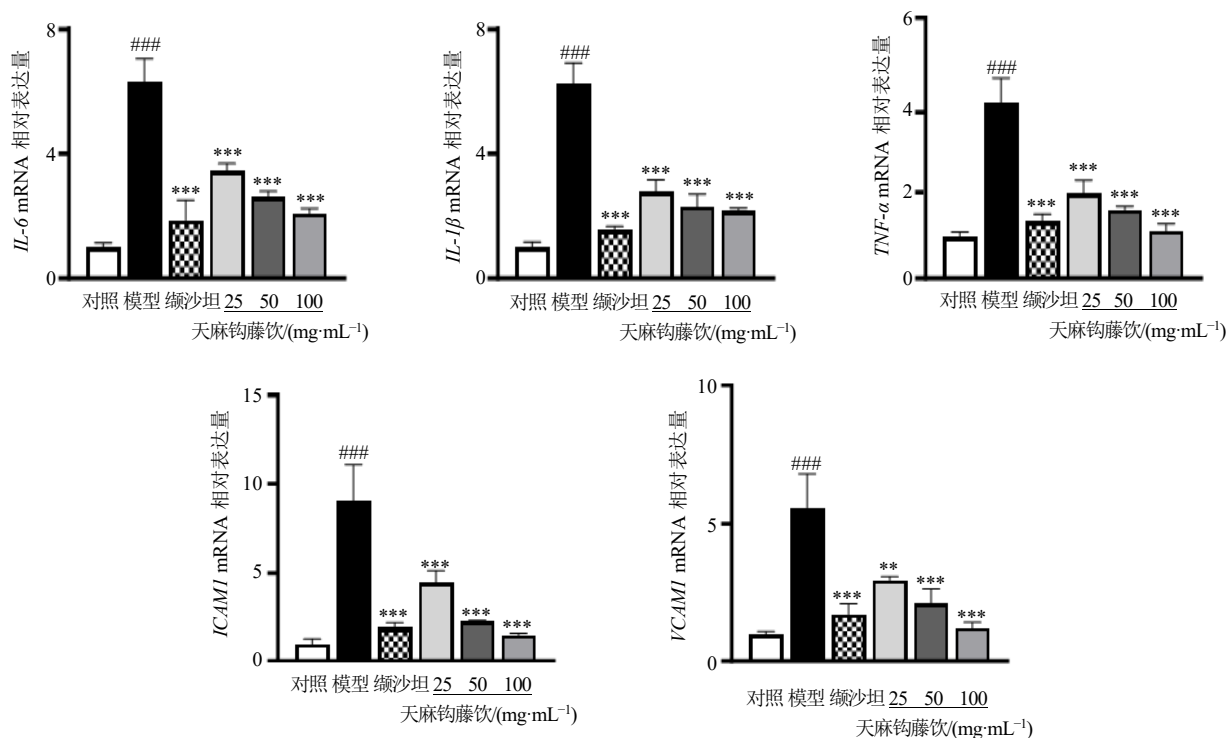


图 10 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 *IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α*、*ICAM1* 和 *VCAM1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of Tianma Gouteng Yin on *IL-6*, *IL-1β*, *TNF-α*, *ICAM1* and *VCAM1* mRNA expressions in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

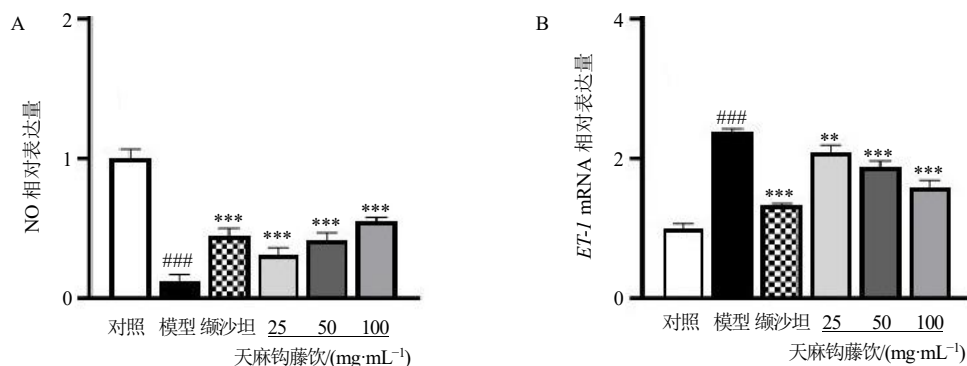


图 11 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 NO 生成 (A) 和 *ET-1* mRNA 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of Tianma Gouteng Yin on NO production (A) and *ET-1* mRNA expression (A) in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 的表达水平均显著升高 ($P < 0.001$)。表明天麻钩藤饮可能通过 PI3K/Akt 通路激活 eNOS 磷酸化, 进而促进 NO 的生成。

为明确天麻钩藤饮改善 Ang-II 诱导的内皮损伤的作用是否依赖 PI3K/Akt 信号通路, 采用 PI3K 特异性抑制剂 Wort 进行反向验证。如图 13 所示, Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 的表达

水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 天麻钩藤饮组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Wort 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 联合 Wort 干预后, 天麻钩藤饮对 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 表达的上调效应被明显阻断 ($P < 0.05$ 、 0.01), 证实天麻钩藤饮对 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的激活作用具有通路特异性。

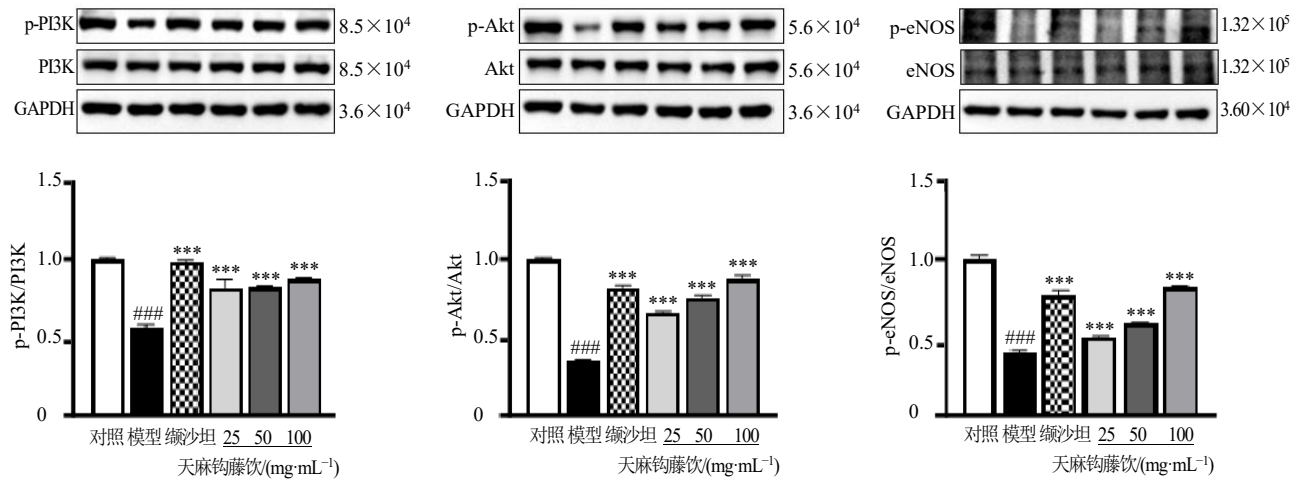
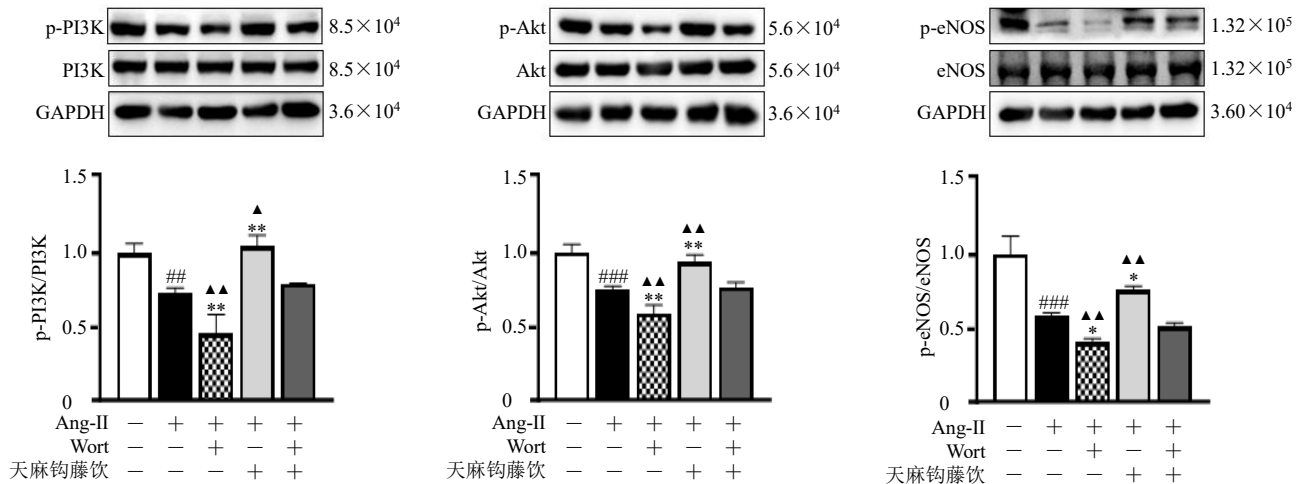


图 12 天麻钩藤饮对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 PI3K/Akt/eNOS 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of Tianma Gouteng Yin on expressions of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway related proteins in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与天麻钩藤饮+Wort 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs Tianma Gouteng Yin + Wort group.

图 13 天麻钩藤饮联用 PI3K 抑制剂对 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞 PI3K/Akt/eNOS 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of Tianma Gouteng Yin combined with PI3K inhibitor on expressions of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway related proteins in Ang-II-induced HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

现在我国临床常用血管紧张素转换酶抑制剂、Ang-II 受体拮抗剂等药物进行治疗高血压，化学药物在治疗高血压时聚焦于降低血压，但无法很好改善血管内皮损伤、动脉硬化等病理基础。在《中国高血压防治指南（2024 年修订版）》中，首次将中医药治疗高血压列入治疗方法之一，中医药治疗或者与化学药联合治疗高血压，可通过遵循多成分-多靶点-多通路同时降低血压和改善血管损伤等，这为高血压的治疗带来新的思路。天麻钩藤饮是临床上

常用于治疗高血压的中药方剂，方中君药天麻和钩藤共用平肝熄风，臣药栀子和黄芩清热活血，诸药合用具有平肝熄风、清热活血、补益肝肾的功效，主治肝阳偏亢、肝风上扰证。本研究通过网络药理学与分子对接技术系统分析了天麻钩藤饮改善高血压血管内皮损伤的潜在作用机制。结果显示，天麻钩藤饮中 228 个活性成分可能通过作用于 969 个高血压相关靶点，尤其是 MAPK1、MAPK3、PIK3R1、PIK3CA、AKT1 等核心靶点，从而发挥多成分、多靶点、多通路的协同调节作用。KEGG 通

路富集分析进一步提示,天麻钩藤饮的作用机制可能广泛涉及神经活性配体-受体相互作用、PI3K/Akt 信号通路及 cAMP 信号通路等。其中,PI3K/Akt 信号通路在调节血管内皮功能、细胞存活与代谢、一氧化氮合成及血管舒缩平衡中具有核心地位,且与高血压所致内皮损伤的病理过程密切相关。已有大量文献^[11,20-21]表明,PI3K/Akt 信号通路与高血压及高血压血管功能改变有关,对于维持血管内皮细胞的正常功能、调节血管张力与结构稳定至关重要。结合文献报道^[22-25]及本研究中该通路关键基因(如 PIK3CA、PIK3CB、AKT1 等)在 PPI 网络中的显著地位,推测 PI3K/Akt 信号通路可能是天麻钩藤饮改善高血压血管内皮功能的关键调控途径之一。在“药物-靶点-通路”网络中,山柰酚、槲皮素和芹菜素等成分显示出较高的靶点连接度,提示它们可能是天麻钩藤饮发挥血管保护作用的重要物质基础。本研究对天麻钩藤饮进行含量测定,结果发现槲皮素低于检测限,芹菜素和山柰酚质量分数分别为 (119.53 ± 3.48) 、 (90.40 ± 2.00) $\mu\text{g/g}$,虽然槲皮素是筛选出的相关性最强的成分,但由于其含量偏低,可能在临床使用中效果不如山柰酚和芹菜素。分子对接结果显示,这 3 个成分与 PI3K/Akt 信号通路中 PIK3R1、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CD、AKT1 等多个靶点均具有很好的结合。结合 KEGG、PPI 网络和分子对接的结果,后续选择 PI3K/Akt 信号通路进行细胞实验验证,以深入阐明天麻钩藤饮在调节血管内皮舒张功能中的具体分子机制,为其临床应用提供更充分的药理学依据。

血管内皮的核心功能是维持血管收缩与舒张的动态平衡,其中 NO 作为主要的内皮源性舒张因子,其生成不足是内皮功能障碍的直接标志;而 ET-1 作为强效血管收缩因子,其与 NO 的失衡是高血压血管张力异常的关键原因^[26]。NO 的生成依赖于 eNOS 的激活,而 PI3K/Akt 信号通路是调控 eNOS 激活的核心通路。PI3K 激活后可磷酸化下游的 Akt,进而促进 eNOS 的 Ser1177 位点磷酸化,增强 eNOS 活性,促进 NO 生成^[27]。本研究结果显示,Ang-II 诱导 HUVECs 细胞中 NO 生成量显著降低,ET-1 的 mRNA 表达水平显著升高,同时 PI3K、Akt 及 eNOS 的磷酸化水平被显著抑制,表明 Ang-II 通过抑制 PI3K/Akt/eNOS 通路,破坏了 NO 与 ET-1 的平衡,导致血管舒张功能障碍,这与高血压的病理生理特征高度一致。而天麻钩藤饮干预后,这一病理过程

被有效逆转,表明天麻钩藤饮可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 eNOS 的激活,进而增加 NO 的生成,同时抑制血管收缩因子 ET-1 的表达,调节 NO 与 ET-1 的平衡,最终改善血管内皮的舒张功能。

然而,本研究仅采用 Ang-II 诱导的 HUVECs 细胞模型探究天麻钩藤饮对高血压血管内皮功能的保护作用,尚未开展动物实验及临床小样本验证,其体内药效及临床应用价值仍需进一步研究;仅明确了天麻钩藤饮整体通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路发挥作用,未深入探究天麻钩藤饮中核心成分的协同作用机制及各单味药在复方中的配伍规律。后续研究可建立高血压动物模型(如自发性高血压大鼠)验证天麻钩藤饮的体内药效及作用机制,同时通过拆方实验探究核心成分的协同作用及复方配伍规律,为其临床精准应用提供充分的实验依据。

综上,天麻钩藤饮中的活性成分可通过调控 PI3K/Akt 信号通路,在直接促进 eNOS 磷酸化以增加 NO 生成的同时,还通过改善氧化应激和炎症反应,为通路激活和内皮功能恢复创造条件,最终实现对高血压血管内皮功能的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ohya Y, Sakima A, ARIMA H, *et al*. Key highlights of the Japanese Society of Hypertension Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension 2025 (JSH2025) [J]. *Hypertens Res*, 2025, 48(10): 2500-2511.
- [2] Dong X L, Ling Q H, Zhao X Y, *et al*. Benefit and harm of intensive blood pressure control by cardiovascular risk [J]. *Hypertension*, 2025, 82(8): 1392-1400.
- [3] Shihora D, Bono K, Modak A. Generalizability and effect size of the impact of anti-hypertensive medication adherence on long-term cardio-cerebrovascular mortality [J]. *J Clin Hypertens*, 2022, 24(6): 789-790.
- [4] 王月琴. 滋肾平肝方对阴虚阳亢型高血压肾损害的临床与实验研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [5] 王艺臻, 商行, 刘蕾, 等. 中医药治疗青年高血压随机对照试验结局指标分析 [J]. *吉林医学*, 2025, 46(6): 1299-1303.
- [6] 盛日强. 天麻钩藤汤对老年高血压患者的治疗效果及安全性分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2025, 19(18): 124-127.
- [7] 张佳璐, 刘广正, 吴彩凤. 天麻钩藤汤治疗高血压病的效果评价 [J]. *内蒙古中医药*, 2025, 44(6): 16-18.
- [8] 姜英莹. 天麻钩藤饮加减治疗高血压的临床疗效 [J].

- 中国药物经济学, 2024, 19(6): 53-56.
- [9] Ma S Y, Liu Y M, Wang J. Potential bidirectional regulatory effects of botanical drug metabolites on tumors and cardiovascular diseases based on the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1467894.
- [10] Liang X, Zhang C R, Tang Y Y, *et al.* A Meta-analysis of the risk of adverse cardiovascular events in patients with cancer treated with inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2025, 25(2): 269-281.
- [11] Perrotta M, Perrotta S, Carnevale L, *et al.* PI3K γ signaling controls trafficking of CD8⁺ T cells between lymphoid and non-lymphoid organs and drives hypertension in a murine model [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 5818.
- [12] Gao H L, Yu X J, Feng Y Q, *et al.* Luteolin attenuates hypertension via inhibiting NF- κ B-mediated inflammation and PI3K/Akt signaling pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus [J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 502.
- [13] 张红晓, 李纳川, 赵凡莹, 等. 天麻钩藤饮通过 PI3K/Akt 信号通路介导细胞凋亡改善高血压合并血管性认知障碍作用机制 [J]. 海南医科大学学报, 2025, 31(15): 1141-1152.
- [14] 程申, 郎旭东, 方芳, 等. 天麻钩藤饮对抽动障碍模型大鼠行为改善及神经保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1475-1480.
- [15] Jin M Y, Cao B, Lin C, *et al.* Tianma Gouteng Decoction exerts pregnancy-protective effects against preeclampsia via regulation of oxidative stress and NO signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 849074.
- [16] Liu L F, Song J X, Lu J H, *et al.* Tianma Gouteng Yin, a traditional Chinese medicine decoction, exerts neuroprotective effects in animal and cellular models of Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16862.
- [17] 葛昭, 任思霖, 周梦雪, 等. 不同浓度理气化痰活血方含药血清对大鼠心脏微血管内皮细胞活力的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(12): 2712-2718.
- [18] Dang H M, Song B R, Dong R, *et al.* Atorvastatin reverses the dysfunction of human umbilical vein endothelial cells induced by angiotensin II [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 5286-5297.
- [19] Ulusoy B S S, Tuncer M C, Özdemir İ. Clonidine protects endothelial cells from angiotensin II-induced injury via anti-inflammatory and antioxidant mechanisms [J]. *Life*, 2025, 15(8): 1193.
- [20] Perrotta M, Lembo G, Carnevale D. The multifaceted roles of PI3K γ in hypertension, vascular biology, and inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1858.
- [21] Tan X, Ye P, Li W Y, *et al.* The interleukin-enhanced binding factor 3-mediated inhibition of nitric oxide production via phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway contributes to central cardiovascular regulation in the rostral ventrolateral medulla in hypertension [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2022, 323(6): R861-R874.
- [22] Yang X B, Li X S, Lin Q Y, *et al.* Up-regulation of microRNA-203 inhibits myocardial fibrosis and oxidative stress in mice with diabetic cardiomyopathy through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway via PIK3CA [J]. *Gene*, 2019, 715: 143995.
- [23] Xu W, Wang Z Q, Zhang Z, *et al.* PIK3CB promotes oesophageal cancer proliferation through the PI3K/Akt/mTOR signalling axis [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(9): 1399-1408.
- [24] Kopaliani I, Egorov D, Tugtekin S M, *et al.* The endothelial angiotensin II type 1 receptor/Akt1 axis mediates vascular remodeling during hypertension [J]. *FASEB J*, 2020, 34(S1): 9251.
- [25] Zhang H N, Cao Y H, Jiao L T, *et al.* Apigenin inhibits cell ferroptosis by activating the PI3K/Akt pathway and alleviates renal injury caused by hypertension [J]. *Dose Response*, 2025, 23(2): 15593258251335814.
- [26] 田昕彤, 周巍, 杨继, 等. 钩藤及其配伍制剂治疗高血压的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4395-4403.
- [27] 朱炳旭, 张儒奇, 陈林, 等. 中药活性成分调控线粒体自噬治疗高血压及其并发症的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4453-4463.

[责任编辑 李亚楠]