

# 基于网络药理学探讨加味二至丸治疗 动脉粥样硬化的作用机制

欧阳效强<sup>1</sup>, 饶炼<sup>1</sup>, 雷敏<sup>1</sup>, 陈晓坤<sup>1</sup>, 洪创雄<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:** 运用网络药理学研究方法探讨加味二至丸治疗更年期女性动脉粥样硬化的作用机制。**方法:** 在中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 和中药分子机制的生物信息学分析工 (BATMAN-TCM) 筛选加味二至丸的成分和靶点; 并通过相关数据库检索动脉粥样硬化相关靶点; 通过韦恩图得到加味二至丸和动脉粥样硬化的共同靶点, 利用 Cytoscape 3. 6. 1 建立成分-疾病-靶点作用网络, 然后使用 STRING 网站进行化合物-疾病共同靶点蛋白互作分析、运用 Cytoscape 3. 6. 1 进行可视化, 并使用复合分子检测法 (MCODE) 分析重要模块; 利用 David 数据库进行基因本体 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。**结果:** 筛选出加味二至丸 38 个成分和 266 个预测靶点, 动脉粥样硬化靶点 254 个; 通过韦恩图得到共同靶点 52 个, 筛选出 14 个关键基因; 这些共同靶点涉及炎症反应、调节胰岛素分泌、一氧化氮的合成调节等生物学过程; 生物学通路包括肿瘤坏死因子信号通路、核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路等 22 条信号通路。**结论:** 加味二至丸可能通过雌激素受体调节雌激素水平, 并可能通过抑制炎症反应, 改善胰岛素抵抗等机制治疗动脉粥样硬化。

**[关键词]** 网络药理学; 加味二至丸; 动脉粥样硬化; 机制

**[中图分类号]** R22; R24; R289; G353. 11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0175-08

**[doi]** 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20200336

**[网络出版地址]** <http://kns. cnki. net/kcms/detail/11. 3495. R. 20191021. 1038. 007. html>

**[网络出版时间]** 2019-10-21 10:49

## Mechanism of Modified Erzhiwan Combined with Epimedium for Atherosclerosis Based on Network Pharmacology

OU-YANG Xiao-qiang<sup>1</sup>, RAO Lian<sup>1</sup>, LEI Min<sup>1</sup>, CHEN Xiao-kun<sup>1</sup>, HONG Chuang-xiong<sup>2\*</sup>

(1. The First Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** In this study, a network pharmacology-based method was applied to analyze the mechanism of modified Erzhiwan combined with epimedium in treatment of atherosclerosis. **Method:** The compounds and targets of modified Erzhiwan combined with epimedium were screened in traditional Chinese medicine (TCM) systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of TCM (BATMAN-TCM). Mang related databases were applied to find the target-related to atherosclerosis. The common targets of modified Erzhiwan combined with epimedium and atherosclerosis were got by venn diagrams. Cytoscape 3. 6. 1 was used to construct ingredients-disease-targets networks. Then protein-protein interaction (PPI) analysis of ingredients-disease-targets was builed in STRING database, and was

**[收稿日期]** 20190716(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373799)

**[第一作者]** 欧阳效强, 在读博士, 从事中西医结合心血管疾病研究, E-mail: oyxq0310@163. com

**[通信作者]** \* 洪创雄, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合心血管疾病研究, E-mail: hongchuangxiong@ gzucm. edu. cn

visualized by Cytoscape 3.6.1, then important modules were analyzed with Molecular complex detection (MCODE). Biological information annotation databases (DAVID) was used to carry on gene ontology (GO) analysis and enrichment analysis of gene encyclopedia kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway.

**Result:** A total of 38 active ingredients and 266 potential targets of modified Erzhiwan combined with epimedium were obtained from TCMSp and BATMAN-TCM, 254 atherosclerosis-related targets were retrieved from disease database. Then 52 common targets were obtained and 14 core genes were screened. Biological processes were related to inflammatory response, regulation of insulin secretion, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, etc. The biological pathways mainly included tumor necrosis factor signaling pathway, NF-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway, peroxisome proliferators-activated receptors signaling pathway and so on.

**Conclusion:** Modified Erzhiwan combined with epimedium may play the anti-atherosclerosis role by estrogen-like effect through attach estrogen receptor, inhibiting inflammation and improving insulin resistance, which may provide guidance for further experimental research.

[**Key words**] network pharmacology; modified Erzhiwan; atherosclerosis; mechanism

心血管疾病是目前危害人类健康的首要疾病,据 WHO 统计,女性心血管疾病的病死率高于男性<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病形成的主要病理基础之一,有效防治 AS 对于预防心脑血管疾病发生发展至关重要。女性 AS 的发病与年龄密切相关,女性更年期前 AS 发病率低于男性,更年期后发病率要高于同年龄的男性<sup>[2]</sup>。据统计,我国 6.5 亿女性将有 1/3 的时间在绝经后渡过。因此,对绝经后女性 AS 的防治意义重大。现代研究已证实,雌激素对心血管系统具有直接保护作用<sup>[3]</sup>。绝经后女性 AS 的发病与雌激素水平下降密切相关。更年期女性雌激素水平下降,雌激素对心血管系统的保护作用减弱,故 AS 发病率升高<sup>[4]</sup>。虽然雌激素替代疗法可降低 AS 发病风险,但存在致癌风险,因此,对绝经期女性 AS 防治需探寻更安全的方法。

中医认为 AS 病机变化以血瘀、痰壅、寒凝为标,气虚、阳虚或阴虚为本,肾为人体阴阳之根本,故与肾有直接关系<sup>[5]</sup>。女子七七肾气衰,肾气虚则肾阳不足,心阳根于肾阳,肾阳虚可致心气心阳不足,无力行血,而致气虚血瘀;阳虚亦不能温养血脉,致血寒而凝;肾阴不足,无以生血,脉道空虚,血行失畅,血液瘀滞;阴虚火旺,虚火炼液成痰,煎熬心血可致瘀。因此,肾虚是绝经后 AS 发生发展的病理基础,补肾之阴阳是防治更年期动脉粥样硬化有效手段。加味二至丸是在二至丸基础上加上淫羊藿组方而成。方中女贞子滋补肝肾,墨旱莲补肾滋阴,兼能凉血止血。两味药合用,其性平和、偏寒,补肾养阴血而不滋腻,为平补肝肾之良方。淫羊藿补肾阳,强筋骨,祛风湿,三药合用,补肾阴的同时,兼顾补阳,调节人体阴阳平衡。加味二至丸在临床应用多年,

通过前期临床研究发现,该方能够改善绝经后女性雌激素缺乏症状,调节血脂代谢,促进一氧化氮(NO)的释放,改善绝经后女性的胰岛素抵抗,而不增加血中雌激素水平<sup>[6-7]</sup>。动物实验也证实加味二至丸可降低卵巢切除小鼠血清甘油三酯水平并改善小鼠的糖耐量<sup>[8]</sup>。更年期女性 AS 的发病机制较为复杂,雌激素水平下降、脂质代谢,炎症反应,胰岛素抵抗等与更年期女性 AS 均密切相关。加味二至丸成分复杂,靶点众多,其作用机制尚不明确。因此,本研究通过利用网络药理学方法,建立加味二至丸-AS-靶点互作网络,诠释加味二至丸治疗 AS 的可能作用机制,以期为更年期女性 AS 的防治提供新的治疗方法。

## 1 方法

**1.1 加味二至丸活性成分与潜在靶点筛选** 本研究采用中药系统药理学分析平台(TCMSp, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索女贞子、墨旱莲、淫羊藿 3 味中药的全部化学成分,TCMSp 数据库以化合物口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$  和类药性(DL)  $\geq 0.18$  作为活性化合物的筛选条件<sup>[9]</sup>。同时在中医分子机理生物学信息分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)对该 3 味药进行检索,检索条件为 score cutoff  $\geq 20$ , P-value cutoff  $< 0.05$ <sup>[10]</sup>;检索的化合物成分须符合 OB  $\geq 30\%$  和类 DL  $\geq 0.18$ ,得到对应的化合物靶点。将两个数据库的成分预测靶点合并,建立加味二至丸化学成分-靶点数据库。

**1.2 AS 疾病靶点的确定** 通过药物靶标数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>),比较毒理基因组学数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>),

在线《人类孟德尔遗传》数据库 (OMIM, <https://www.omim.org/>) 以及 DisGenet, <http://disgenet.org/>检索与 AS 相关靶点。

**1.3 成分-靶点网络构建** 利用韦恩图取交集, 获得加味二至丸-AS 的共同靶点, 并进行药物成分靶点-AS 疾病靶点映射, 利用 Cytoscape 3.6.1 软件构建“活性成分-作用靶点”网络, 药物活性成分和作用靶点以“节点”表示, 节点之间的相互作用以“边”表示。

**1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建** 将加味二至丸-AS 共同作用靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库中, 以置信度分数 score > 0.9 为条件进行筛选, 并隐藏网络中无联系的节点, 余参数不变, 将得到的结果以文本形式导入 Cytoscape 3.6.1 软件中进行可视化, 并使用 Cytoscape 3.6.1 的插件 (MCODE) 筛选重要的蛋白互作 (PPI) 网络的模块, 筛选标准为 degree cutoff =

2, node score cutoff = 0.2, K-score = 2, max depth = 100,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义<sup>[11]</sup>。

**1.5 基因本体 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析** 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对加味二至丸和 AS 共同作用靶点蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析主要用于描述基因靶点的功能, 包括细胞功能、分子功能和生物功能。KEGG 富集分析可以得到加味二至丸和 AS 共同靶点所富集的信号通路。GO 和 KEGG 分析均以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 加味二至丸化合物的筛选** 通过在 TCMSp 及 BATMAN-TCM 平台检索, 并将 2 个数据库筛选结果合并, 共获得加味二至丸化学成分 38 个 (见表 1, 根据 OB 值例举前 10 个), 其中墨旱莲 10 个, 麦冬 10 个, 五味子 23 个, 共有成分 5 个, 预测靶点共 266 个。

表 1 加味二至丸中 OB 值前 10 的化合物基本信息

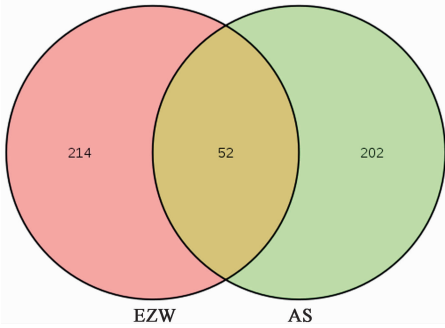
Table 1 Basic information of top 10 compounds of modified Erzhiwan combined with epimedium

Molecule ID	化合物	OB	DL	药物
MOL005212	olitoriside_qt	103.23	0.78	女贞子
MOL003402	demethylweddelolactone	72.13	0.43	墨旱莲
MOL005190	eriodictyol	71.79	0.24	女贞子
MOL002975	butin	69.94	0.21	墨旱莲
MOL005211	olitoriside	65.45	0.23	女贞子
MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19	淫羊藿
MOL004367	olivil	62.23	0.41	淫羊藿
MOL004388	6-hydroxy-11, 12-dimethoxy-2, 2-dimethyl-1, 8-dioxo-2, 3, 4, 8-tetrahydro-1H-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium	60.64	0.66	淫羊藿
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	女贞子
MOL003389	3'-O-methylorobol	57.41	0.27	墨旱莲

**2.2 AS 疾病靶点筛选** 通过在 TTD, CTD, OMIM 和 DisGenet 数据库检索, 并结合相关文献共得到与 AS 疾病相关人类靶点 254 个。

**2.3 治疗 AS 化合物及潜在靶点筛选** 通过韦恩图找出加味二至丸和 AS 共同靶基因, 得到 52 个, 见图 1。52 个基因对应化合物有 29 个 (女贞子 8 个, 墨旱莲 8 个, 淫羊藿 18 个), 见图 2。图 2 中黄色节点代表 3 个中药, 红色菱形节点代表化合物, 绿色圆形节点代表基因靶点, 一个节点的自由度表示网络中和节点相连接的边的数目。对图 2 进行拓扑分析可以看出, 有 4 个化合物的作用靶点数

量 > 10, 分别为 MOL000098 槲皮素 (40 个), MOL000422 山柰酚 (16 个), MOL000006 木犀草素 (11 个), MOL003402 去甲基蟛蜞菊内酯 (11 个), 这些化合物有可能在治疗 AS 过程中起着重要的作用。此外, 靶点基因前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 与 26 个化合物相联系, 其次是雄激素受体 (AR) 19 个, 雌激素受体 (ESR1) 12 个, 共有 28 个基因至少与 2 个化合物相互作用, 这说明 PTGS2, AR, ESR1 可能在加味二至丸作用于 AS 的重要靶点, 同时也说明加味二至丸治疗 AS 的机制十分复杂。



红色代表加味二至丸靶点;黄色代表 AS 靶点;橙色部分为共同靶点

图 1 加味二至丸-AS 共同基因靶点数

Fig. 1 Genes target set of modified Erzhiwan combined with epimedium-AS-gene

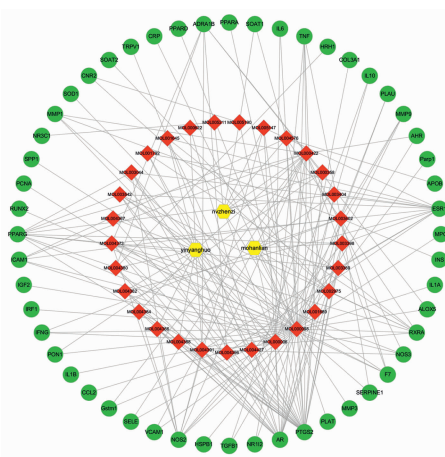


图 2 化合物-疾病靶点互作网络

Fig. 2 Interaction diagram of compounds and disease targets

#### 2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

将 52 个共同靶点导入 STRING 中,结果见图 3(图中线条粗细代表作用力强弱),将结果以文本形式导出,然后导入 Cytoscape 3.6.1 软件中,利用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件将加味二至丸靶点 PPI 网络进行聚类分析,见图 4,其聚类详细信息见表 2。

2.5 加味二至丸-AS-基因的生物学过程 根据显著性程度  $P < 0.05$  ( $P$  值由小到大)进行部分展示,

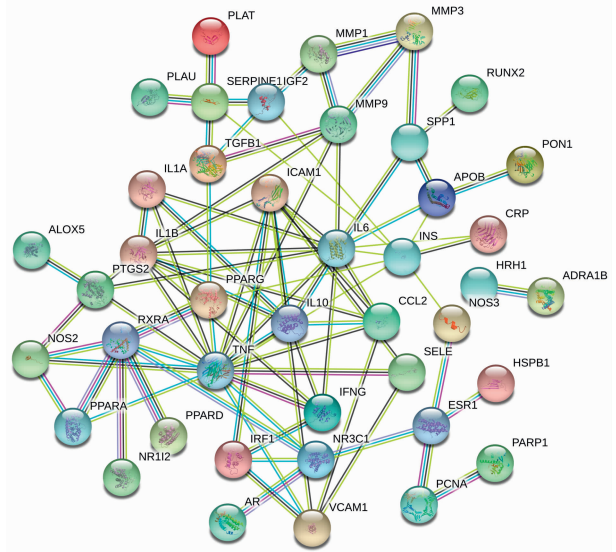


图 3 加味二至丸-AS-核心靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network diagram of modified Erzhiwan combined with epimedium-AS-gene

GO 分析结果提示加味二至丸-AS-基因的生物过程(BP)显著富集在类固醇激素介导的信号通路、炎症反应、氧化应激、细胞因子的分泌调节、一氧化氮的合成调节、胰岛素分泌等;分子功能(MF)主要富集在类固醇激素受体活性、细胞因子活性,胆固醇 O-酰基转移酶活性、血红素结合、一氧化氮合酶活性等。细胞组分(CC)主要富集在细胞外空间、细胞外基质、核、核染色质、质膜外侧、细胞外区域等。见表 3。

2.6 加味二至丸-AS-基因的生物学通路 KEGG 富集分析得到通路 42 条,根据  $P < 0.05$  并结合相关文献进行筛选,得到与 AS 相关通路 22 条,见图 5。其中与疾病相关通路有 9 条,类风湿关节炎、炎症性肠病、癌症中的转录失调、癌症的途径、癌症中的蛋白多糖,结核, I 型糖尿病,非酒精性脂肪性肝病,乙型肝炎;炎症相关通路 4 条, TNF 信号通路、核转录

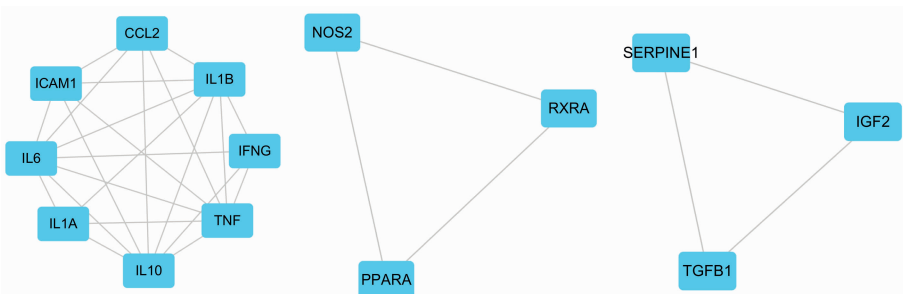


图 4 基于 MCODE 的加味二至丸-AS-基因互作模块

Fig. 4 Interaction module of modified Erzhiwan combined with epimedium-AS-gene based on MCODE

表 2 加味二至丸 PPI 网络节点聚类分析结果

Table 2 Clustering analysis results of modified Erzhiwan combined with epimedii PPI network node

类簇 (cluster)	类簇中包含的靶点	MCODE 聚类评分	类簇中包含 节点数	类簇中 包含边数
a	白细胞介素(IL)-10,肿瘤坏死因子(TNF),IL-6,IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\alpha$ ,趋化因子2(CCL2), 细胞间黏附因子-1(ICAM1),干扰素基因(IFNG)	6.571	8	23
b	视黄酸受体(RXRA),一氧化氮合酶(NOS2),过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPARA)	3	3	3
c	转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ),促生长因子2(IGF2),人纤溶酶原激活物抑制剂1 (SERPINE1)	3	3	3

表 3 加味二至丸-AS-基因的生物学过程

Table 3 Biological processes of modified Erzhiwan combined with epimedii-AS-gene

类别	基因功能	数目/个	P
BP	类固醇激素介导的信号通路(steroid hormone mediated signaling pathway)	4	$3.10 \times 10^{-5}$
BP	脂多糖介导的信号通路(lipopolysaccharide-mediated signaling pathway)	4	$4.50 \times 10^{-5}$
BP	去除超氧自由基(removal of superoxide radicals)	3	$6.80 \times 10^{-4}$
BP	细胞对脂多糖的反应(cellular response to lipopolysaccharide)	4	$8.30 \times 10^{-4}$
BP	细胞因子分泌的积极调节(positive regulation of cytokine secretion)	3	$9.90 \times 10^{-4}$
BP	一氧化氮生物合成过程的积极调节(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)	3	$1.40 \times 10^{-3}$
BP	调节胰岛素分泌(regulation of insulin secretion)	3	$1.80 \times 10^{-3}$
BP	蛋白激酶 B 信号传导(protein kinase B signaling)	3	$4.00 \times 10^{-3}$
BP	葡萄糖代谢过程(glucose metabolic process)	3	$4.70 \times 10^{-3}$
BP	炎症反应(inflammatory response)	5	$6.20 \times 10^{-3}$
CC	细胞外空间(extracellular space)	20	$3.60 \times 10^{-12}$
CC	细胞外基质(extracellular matrix)	5	$2.90 \times 10^{-4}$
CC	核(extracellular matrix)	17	$1.80 \times 10^{-3}$
CC	核染色质(nucleus)	4	$6.60 \times 10^{-3}$
CC	质膜外侧(nuclear chromatin)	4	$9.00 \times 10^{-3}$
CC	细胞外区域(extracellular region)	6	$1.50 \times 10^{-2}$
MF	类固醇激素受体活性(steroid hormone receptor activity)	6	$2.00 \times 10^{-6}$
MF	细胞因子活性(cytokine activity)	7	$8.60 \times 10^{-6}$
MF	类固醇结合(steroid binding)	3	$2.80 \times 10^{-3}$
MF	胆固醇 O-酰基转移酶活性(cholesterol O-acyltransferase activity)	2	$8.30 \times 10^{-3}$
MF	血红素结合(heme binding)	4	$9.70 \times 10^{-3}$
MF	一氧化氮合酶活性(nitric-oxide synthase activity)	2	$1.20 \times 10^{-2}$

因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路、核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLRs)信号通路、用于 IgA 生成的肠道免疫网络;此外还有低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、胰岛素抵抗、氧化物酶增殖物激活受体(PPARs)信号通路等。分析结果表明,加味二至丸可能通过作用于这些通路起到防治 AS 的作用。

### 3 讨论

#### 3.1 加味二至丸组方分析 二至丸药药少而精,

配伍精妙,具有滋补肝肾之功效,常用于治疗更年期女性相关疾病,如更年期综合症,骨质疏松等。现代药理研究表明,二至丸具有调节免疫机能、缩短血液凝血时间、改善血液流变性、抗炎、抗氧化等作用<sup>[12]</sup>。广州中医药大学洪创雄教授在二至丸的基础上加入补阳药淫羊藿,独创加味二至丸,其意有二,一是阴阳双补,协调平衡,即补阴不忘阳,补阳不忘阴,正所谓“无阳则阴无以生,无阴则阳无以化”;

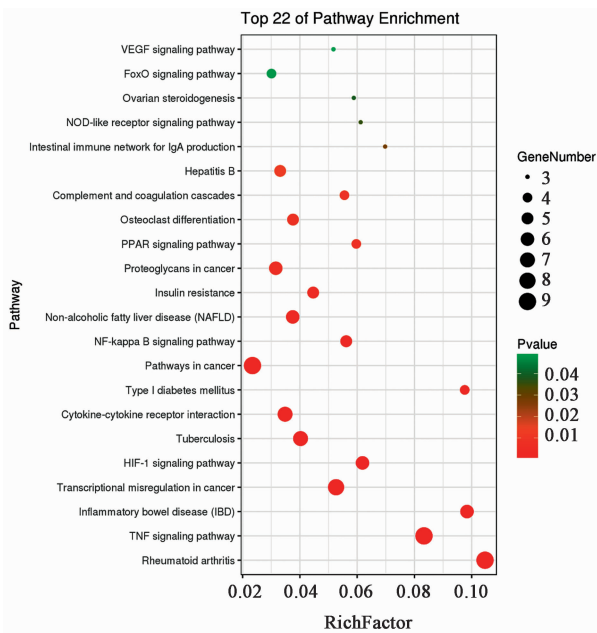


图 5 加味二至丸-AS-基因的生物通路  
Fig. 5 Biological pathways of modified Erzhiwan combined with epimedium-AS-gene

二是现代药理研究表明淫羊藿有植物雌激素效应<sup>[13]</sup>,其主要成分淫羊藿总黄酮具有抗动脉粥样硬化、改善血流动力学等心血管保护作用<sup>[14]</sup>。因此,该方既能对更年期女性 AS 的防治起到一定作用,又能避免雌激素替代疗法带来的副作用。三药合用,全方共奏滋补肝肾,调和阴阳之功。

**3.2 加味二至丸成分分析** 通过分析得出加味二至丸治疗 AS 的有效成分有 29 个,包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、去甲基蟛蜞菊内酯等,其中槲皮素、山柰酚、木犀草素均为黄酮类化合物,具有很好抗炎,抗氧化应激、抗血小板聚集等心血管保护作用<sup>[15]</sup>。此外,斛皮素能够抑制低密度脂蛋白氧化,具有内皮依赖性血管舒张作用<sup>[16]</sup>。木犀草素能够有效抑制肿瘤坏死因子诱导的血管炎症反应<sup>[17]</sup>;并能够抑制 TGF- $\beta_1$  型受体信号传导抑制血管平滑肌细胞增殖<sup>[18-19]</sup>;调节尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (NOX4)/活性氧 (ROS)/NF- $\kappa$ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路,抑制 NOX4 和 ROS 的表达,从而缓解氧化应激<sup>[20]</sup>。去甲基蟛蜞菊内酯能显著提高香烟烟雾提取物干预的肺支气管上皮细胞超氧化物歧化酶的活力,下调丙二醛的含量,显著降低环氧化酶-2 和 ICAM1 的表达<sup>[21]</sup>。

**3.3 关键靶点分析** 通过对加味二至丸-AS-基因网络分析可以发现,有 12 个化合物通过 ESR1 起作用。ESR1 是雌激素的作用靶点,调控着雌激素

水平。雌激素对血管具有直接保护作用,雌激素可直接作用于内皮细胞、平滑肌细胞、血管外膜的成纤维细胞,并能够调节血脂,增强抗氧化性能等<sup>[22]</sup>;此外,还能促进 NO 的释放,减轻血管损伤反应<sup>[23]</sup>。动物实验研究证实,二至丸能够提高血中雌二醇水平,并上调雌激素受体表达,发挥雌激素样作用<sup>[24]</sup>。另有研究表明,女贞子配伍淫羊藿能够发挥雌激素作用,改善绝经后骨质疏松<sup>[25]</sup>。本课题组前期研究也表明,加味二至丸能够改善更年期患者雌激素缺乏导致的临床症状,但并不增加血清雌二醇水平<sup>[7]</sup>。这说明加味二至丸可能通过作用于雌激素受体,调节雌性激素水平发挥抗 AS 的作用。

此外,本研究通过对加味二至丸 PPI 网络进行聚类分析得出了其中显著性较强的 3 个模块,其中显著性最强的模块 a 中包含 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , CCL2 等炎症相关因子,这表明加味二至丸可能通过抑制炎症反应发挥抗 AS 作用<sup>[26]</sup>。ICAM1 为免疫球蛋白超家族成员,主要表达于内皮细胞、血管平滑肌细胞表面,AS 发展和进展的重要因素,研究表明 AS 患者的 ICAM1 明显增加<sup>[27]</sup>。 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 在 AS 病变中以高水平表达,并参与了 AS 的各个阶段<sup>[28]</sup>。有研究发现,二至丸能够降低酒精性肝损伤大鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平,说明二至丸具有一定的抗炎作用<sup>[29]</sup>。综上所述,加味二至丸可能通过调节上述基因靶点的表达,减轻由其引发的免疫反应、炎症反应,从而延缓 AS 的发生和发展。

**3.4 通路结果分析** 目前研究认为,炎症在 AS 病理过程中起着基础性作用。KEGG 富集分析结果显示,加味二至丸有较多基因靶点有富集在与炎症相关的疾病通路和信号通路,这提示,加味二至丸可能通过作用于这些炎症因子靶点,调节炎症信号通路,抑制炎症反应,从而发挥抗 AS 的作用。TNF 信号通路, NF- $\kappa$ B 信号通路, NOD 样受体信号通路与炎症密切相关。TNF 参与细胞生长和增殖、炎性和免疫反应等过程, TNF 信号通路的激活,能够激活诱导 NF- $\kappa$ B 入核,激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,促进 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 等炎症因子的释放,从而引起和加重机体炎症反应<sup>[30]</sup>。NOD 样受体信号途径的激活促进 AS 的发展, NOD 蛋白质是重要模式识别受体, NOD 样受体主要包括 NOD1 和 NOD2,能够活化 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路,促进细胞释放 IL-6, IL-8, CCL2, TNF- $\alpha$  等促炎因子,促进机体炎症反应。此外, NOD1, NOD2 能够与 Toll 样受体协同增强机体的



免疫反应,当机体炎症和免疫反应太过,则会对血管造成损伤,促进 AS 的形成<sup>[31]</sup>。研究表明,载脂蛋白 E(ApoE)和 Nod1 双敲除小鼠证实可以减少 AS 早前病变,延缓 AS 进展<sup>[32]</sup>。综上所述,加味二至丸有可能通过调节 TNF 信号通路, NF- $\kappa$ B 信号通路及 NOD 样受体信号通路,来抑制 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  等炎症因子的产生。

加味二至丸具有调节过 PPAR 信号通路的潜在作用。PPAR 信号通路对 AS 的发展和糖代谢起着重要的调节作用。PPAR 主要有 PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  和 PPAR $\gamma$  3 种表型。研究表明, PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的激活能通过抑制血管内皮炎症反应,抑制细胞增殖和迁移,抑制单核细胞转化成泡沫细胞,减少血管细胞黏附分子-1, ICAM1 表达等多个方面,发挥抗 AS 的作用<sup>[33]</sup>。PPAR $\gamma$  对糖代谢的调节主要是增加外周组织对胰岛素的敏感性,从而改善胰岛素抵抗<sup>[34]</sup>。本研究发现 PPAR 信号通路上有加味二至丸与 AS 的共同靶点 PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ , 课题组前期研究也发现,加味二至丸能改善更年期患者的胰岛素抵抗,因此,推测加味二至丸可能通过调节 PPAR 信号通路,改善胰岛素抵抗来防治 AS。

综上所述,加味二至丸可能通过作用于雌激素受体发挥植物性雌激素作用来治疗 AS,同时研究发现加味二至丸可能通过作用于 IL-10, IL-6, TNF 等多个靶点,调节 TNF 信号通路, NF- $\kappa$ B 信号通路, NOD 样受体信号通路, PPAR 信号通路等,通过抑制炎症反应,改善胰岛素抵抗等机制治疗 AS,该研究为深入探讨加味二至丸治疗更年期女性 AS 的作用机制提供了指导。

#### [参考文献]

[1] Joseph P, Leong D, Mckee M, et al. Reducing the global burden of cardiovascular disease, part 1: the epidemiology and risk factors [J]. *Circ Res*, 2017, 121(6):677-694.

[2] 张航向, 宁晓暄, 王小明. 女性心血管病的研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(1): 95-97.

[3] Register T C, Appt S E, Clarkson T B. Atherosclerosis and vascular biologic responses to estrogens: histologic, immunohistochemical, biochemical, and molecular methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1366:517-532.

[4] Iorga A, Cunningham C M, Moazeni S, et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of

estrogen therapy [J]. *Biol Sex Differ*, 2017, 8(1):33.

[5] 刘超, 王阶. 从补肾对血脉的影响探讨其在冠心病治疗中的应用与研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3):841-843.

[6] 魏晓娜. 加味二至丸对高血压绝经后患者胰岛素抵抗影响的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.

[7] 张和针. 加味二至丸对绝经后女性高血压患者雌激素、血脂、内皮功能影响的临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[8] 徐进文, 许洁安, 李润美, 等. 加味二至丸对卵巢切除小鼠的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(3): 367-371.

[9] 师帅, 胡元会, 吴华芹, 等. “丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18): 192-197.

[10] 汤化琪, 梁瑞敏, 陈宇, 等. BATMAN-TCM 在线分析工具预测玄胡索散治疗骨关节炎作用及初步验证研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(1): 142-145.

[11] 黄秀芳, 高运吉, 廖钢, 等. 基于网络药理学探索射麻止咳液治疗哮喘的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20191461.

[12] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 272-275.

[13] 朱瑞清, 李志忠, 周建, 等. 淫羊藿苷及其拟代谢物的雌激素样作用研究 [J]. *中医药学报*, 2012, 40(3): 15-20.

[14] 胡彦武, 刘凯, 闫彤彤, 等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷的心血管保护作用及机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(13): 227-230.

[15] Basu A, Das A S, Majumder M, et al. Antiatherogenic roles of dietary flavonoids chrysin, quercetin, and luteolin [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(1): 89-96.

[16] Patel R V, Mistry B M, Shinde S K, et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155:889-904.

[17] JIA Z, Nallasamy P, LIU D, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKappaBalpha/NF-kappaB signaling pathway [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3): 293-302.

[18] JIANG D, LI D, WU W. Inhibitory effects and mechanisms of luteolin on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Nutrients*, 2013, 5(5):1648-1659.

[19] WU Y T, CHEN L, TAN Z B, et al. Luteolin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration

- by inhibiting TGFBR1 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1059.
- [20] XIA F, WANG C, JIN Y, et al. Luteolin protects HUVECs from TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation via its effects on the Nox4/ROS-NF-kappaB and MAPK pathways[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21(8):768-783.
- [21] 丁淑敏, 宋国强, 张焯, 等. 去甲基蒽醌菊内酯对香烟烟雾干预 NHBE 细胞损伤的保护作用[J]. *常州大学学报:自然科学版*, 2017, 29(4):32-38.
- [22] Kassi E, Spilioti E, Nasiri-Ansari N, et al. Vascular inflammation and atherosclerosis; the role of estrogen receptors [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(22):2651-2665.
- [23] Pare G, Krust A, Karas R H, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury [J]. *Circ Res*, 2002, 90(10):1087-1092.
- [24] 郑红霞, 赵元, 徐颖, 等. 二至丸对未成熟小鼠雌激素样作用分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4):103-107.
- [25] 李晓曦, 陈宇恒, 唐秀凤, 等. 基于雌激素作用的淫羊藿女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠的影响研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(9):1-6.
- [26] Escarcega R O, Lipinski M J, Garcia-Carrasco M, et al. Inflammation and atherosclerosis: cardiovascular evaluation in patients with autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(7):703-708.
- [27] Bielinski S J, Pankow J S, LI N, et al. ICAM1 and VCAM1 polymorphisms, coronary artery calcium, and circulating levels of soluble ICAM-1: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(2):339-344.
- [28] Voloshyna I, Littlefield M J, Reiss A B. Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(1):45-51.
- [29] 聂映, 姚卫峰. 二至丸不同极性部位对抗大鼠酒精性肝损伤的作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(20):145-149.
- [30] YU X H, ZHENG X L, TANG C K. Nuclear factor-kappaB activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 70:1-30.
- [31] Kim Y K, Shin J S, Nahm M H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases [J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(1):5-14.
- [32] Kanno S, Nishio H, Tanaka T, et al. Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in Apoe<sup>-/-</sup> mice [J]. *J Immunol*, 2015, 194(2):773-780.
- [33] XU P, ZHAI Y, WANG J. The role of PPAR and its cross-talk with CAR and LXR in obesity and atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4):1260-1277.
- [34] Ivanova E A, Myasoedova V A, Melnichenko A A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists as therapeutic agents for cardiovascular disorders; focus on atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(7):1119-1124.

[责任编辑 孙丛丛]