

姜黄在理血方剂中的配伍规律及系统药理机制分析

刘志强¹, 杨尚玉¹, 王博龙^{2*}¹鹤壁职业技术学院 鹤壁市天然药物研究与开发重点实验室, 鹤壁 458030; ²宜春学院化学与生物工程学院, 宜春 336000

摘要:姜黄可以有效治疗各种疾病,本研究使用广义规则归纳(GRI)算法分析了《中药方剂大词典》中含姜黄的理血方剂配伍规律。通过利用生物信息学数据挖掘技术和 MTT、Elisa 和 Western blotting 实验验证了姜黄关键配方的系统药理机制。发现“姜黄-川芎-当归”配方可以代表姜黄在理血方剂中的关键组方。PPI 网络和 KEGG 途径富集分析表明“姜黄-川芎-当归”能通过调节 PI3K/Akt、MAPK、Toll 样受体, T 细胞受体, EGFR, VEGFR, 细胞凋亡, HIF-1 等通路($P < 0.05$), 发挥抗炎、改善微循环和抗肿瘤作用。MTT, Elisa 法和 Western blotting 实验表明,“姜黄-川芎-当归”组方能下调 p-EGFR、p-PI3K、p-Akt、VEGF 和 HIF-1 的表达, 抑制人肺癌 A549 细胞增殖。“姜黄-川芎-当归”组方可能具有多靶点、多途径的药理作用, 治疗炎症, 微循环障碍, 心血管疾病和癌症。总之, 本研究找到了一种新的中药配方, 为后续研究姜黄的药理机制提供了理论依据和参考。

关键词: 中药; 中药药理; 姜黄; 配伍规律; 数据挖掘

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)3-0440-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.012

Analysis of the compatibility laws of Jianghuang in blood-regulating prescriptions and systemic pharmacological mechanism

LIU Zhi-qiang¹, YANG Shang-yu¹, WANG Bo-long^{2*}

¹Hebi Polytechnic Hebi City Key Laboratory for Research and Development of Natural Medicine, Hebi 458030, China;

²School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China

Abstract: Jianghuang (JH) could be effective for the treatment of various diseases. The compatibility laws of blood-regulating formulae containing JH from the Chinese Traditional Medicine Formula Dictionary were analyzed using a generalized rule induction (GRI) algorithm implemented. System pharmacological mechanisms are traced by leveraging data mining of bioinformatics databases and MTT cell proliferation assay, Elisa and Western blotting analysis. We found that the JH-CX-DG formula (Jianghuang-Chuanxiong-Danggui) could represent a key formula containing JH in blood-regulating TCM formulae. The PPI network and KEGG pathway enrichment analysis showed that the JH-CX-DG formula possess potential pharmacological effects including anti-inflammatory, improving microcirculation, and anti-tumor through the regulation of multiple pathways including PI3K/Akt, MAPK, Toll-like receptor, T cell receptor, EGFR, VEGFR, Apoptosis, HIF-1 ($P < 0.05$). The MTT assay, Elisa and Western blotting showed that the “JH-CX-DG” formula can inhibit human lung cancer A549 cells proliferation and down-regulate the expression of p-EGFR, p-PI3K, p-Akt, VEGF and HIF-1 α . The JH-CX-DG formula can exert beneficial pharmacological effects through multi-target and multi-pathway interactions. It maybe be effectively administered for the treatment of inflammatory diseases, microcirculation disorders, cardiovascular disease, and cancer. We found a new effective drug formula through analyzing the compatibility law and systemic pharmacological mechanism of JH. Our study provides a theoretical basis and directions for subsequent research on the JH-CX-DG formula.

Key words: traditional Chinese medicine; Chinese medicine pharmacology; Jianghuang; compatibility laws; data mining

收稿日期: 2020-09-07

接受日期: 2021-01-18

基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(202102310186); 鹤壁职业技术学院科技类重点课题(2020KJZD004)

* 通信作者 Tel: 86-013607059805; E-mail: wblong77@126.com

中药姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎, 其气香特异, 味苦、辛, 归脾、肝经, 有破血行气, 通经止痛之功效^[1]。姜黄以中药配伍于方剂, 始自《太平惠民和剂局方》的五痹汤, 以其理血

止痛等效用,治疗风寒湿邪、客留肌肤等证^[2]。后代医家多以姜黄为理血药用治于内科痹痛、妇科、骨伤、杂症等领域。此外,姜黄在伊朗、印度、泰国等地也常做为民族药材或保健食品,用以治疗皮肤病、感染、精神疾病等^[3]。鉴于姜黄能对多种疾病产生治疗作用,近年来,国内外不少学者为研究姜黄的分子药理机制做出了不懈努力。Eleonora 等^[4]综述了姜黄的现代药理机制,发现其具有改善代谢紊乱、改善慢性疾病、调节机能、抗氧化、保健等作用。Deguchi 等^[5]发现姜黄及其主要功效成分姜黄素安全性高,能介导多个靶点与多条通路发挥抗炎、抗肿瘤等作用。中国对姜黄的药理作用研究多集中在其抗肿瘤、抗炎、降血糖及对心血管系统的影响^[6]。

尽管当前研究揭示了姜黄的许多药理机制,但多局限于对姜黄单一药材或其成分的研究,鲜有对其配伍规律、复方协同药理机制进行研究者。姜黄做为中医方剂组份治疗疾病,其功效作用必然受到配伍药物的相互影响。中医药理论认为“药有个性之长,方有合群之妙”,方剂组份君、臣、佐、使功能作用各不相同,《神农本草经》中有“相须、相使者良,相恶、相反者勿用”等论述^[7]。因此,探索姜黄的药理作用不能仅局限于对其自身的研究,还应对其组方配伍进行整体分析。数据挖掘技术的进步为研究中医药配伍关联规律提供了新的方法,其中 Apriori 关联算法、广义规则归纳 (generalized rule induction, GRI) 算法为常用的简单关联规则算法,能有效地挖掘出方剂中关联度强的核心药对、药方,既简化了方剂成分数量,又不失中医配伍之妙,在中药配伍规律、核心组方的发现中应用最为广泛。例如,唐启盛^[8]等利用广义规则归纳 (GRI) 关联规则算法进行数据分析,发现了治疗焦虑的传统中药核心配方,即柴胡-郁金-酸枣仁-生龙骨等。本研究基于数据库挖掘技术原理,利用 GRI 算法、Arrowsmith 知识发现工具、生物信息学数据库等手段,研究中药姜黄在理血方剂中配伍规律及其药理机制,以期为开发新一代姜黄产品提供理论支持和技术线索。

1 材料与方法

1.1 数据来源与处理

本研究将《中医方剂大词典》^[9]中所有方剂资料构建数据库。按照纳入标准,检索收集符合要求的姜黄方剂。(一)纳入标准:①方剂中含有姜黄,且符合理血方剂的概念。理血剂应符合《方剂学》(第九版)^[10]标准且由两位副高职称以上中医师或

中西医结合医师认定。②为体现姜黄在方剂中的规律性,应排除药味数 > 15 的大方或姜黄在方中分量较轻的方剂。③排除外用的方剂。④同方异名者,以首现的古籍为准。(二)数据规范:按照 2015 年版《中华人民共和国药典》^[11]对检索的方剂进行药物名称规范统一。如“玄胡索”、“元胡索”统一为“延胡索”,“芎”、“芎穷”统一为“川芎”等。

1.2 关联规律分析

采用 GRI 广义规则归纳算法进行关联规律的挖掘,以 SPSS Clementine 12.0 软件中的 GRI 建模模板进行计算。参数包括频次、支持度、置信度、提升。X 中药支持度为含有 X 中药方剂数量与纳入方剂总数的比值;中药 X→中药 Y 的置信度为含有中药 X 的方剂中包含中药 Y 的概率;中药 X→中药 Y 的提升为“中药 X→中药 Y 置信度”与“中药 Y 支持度”的比值。置信度反应药物组合同时出现的概率,置信度用于表示药物间联系的紧密性,提升度体现了中药 X 对中药 Y 在方剂中出现概率的提升能力,三者应综合考量以反应姜黄在理血剂中的用药规律。

1.3 核心配伍靶标的数据挖掘

利用 Arrowsmith 知识发现工具挖掘探索姜黄核心配伍的协同药理机制。在 Arrowsmith 检索界面输入 A 集合检索词为姜黄的拉丁名与中文拼音名 (“*Curcuma longa*” or “Jianghuang”), 输入 C 集合检索词为姜黄核心配伍中其他药物名,例如,当归为 (“*Angelica sinensis*” or “Danggui”), 川芎为 (“*Ligusticum chuanxiong*” or “Chuanxiong”) 等。然后使用 Arrowsmith 工具将 A 集合和 C 集合关联,设置检索语义为 “Genes & Molecular Sequences, and Gene & Protein Names” 得到 A 集合与 C 集合相关的集合 B,从而发现姜黄与其配伍药物的共同相关靶点、靶蛋白,以此为两者协同药理机制的基础靶标。

1.4 药理机制预测

利用 STRING 蛋白质相互作用数据库 (<https://string-db.org/>) 和 KOBAS 3.0 数据库 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>), 对数据挖掘得到的姜黄核心组方靶标进行药理分子机制分析。并利用 Uniprot、Protein atlas 和 FunRich3.1.3 数据库预测靶基因的组织分布、细胞分布。综合以上信息归纳姜黄核心组分的潜在药理机制。STRING 数据库参数设置:物种为 “Homo sapiens (智人)”, 相互作用

数据来源为文本挖掘 (textmining)、实验 (experiments)、数据库 (databases), 阈值设为高 “high confidence = 0.7”。KOBAS 3.0 数据库设置: 物种为 “Homo sapiens (智人)”、通路为 “KEGG Pathway、KEGG Disease”。

1.5 体外抗肿瘤机制的药理测定

根据数据挖掘的预测结果, 采用 MTT 细胞增殖测定和 Western blotting 分析, 验证了含姜黄的关键配方在体外的抗肿瘤机制。细胞和主要试剂: 人肺癌细胞系 A549 由浙江如耀生物科技有限公司生物技术有限公司。中药材购自康美药业有限公司。抗体与 Elisa 试剂盒购自宁波海曙耀业生物有限公司。天津大药化学试剂厂提供了 MTT (3-(4,5-3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物) 和 DM-SO (二甲基亚砷), 并提供了 DMEM 培养基。统计分析: 基于 SPSS 25.0 软件的单向方差分析用于数据分析, 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄方剂的配伍关联规律

按照纳入标准, 在《中医方剂大词典》数据库共挖掘到姜黄理血方剂 47 首, 包含中药 126 味。两味药组合最常见配伍如表 1 所示, “姜黄-当归” 频次 29、“姜黄-川芎” 频次 15、“姜黄-赤芍” 频次 14, 为排名前三的组合。根据关联规则 GRI 算法, 姜黄配伍 3 味药关联规律如表 2、图 1 所示, 其中 “姜黄、川芎 \rightarrow 当归” (置信度 93.33%、支持度 31.91%、提升 1.51) 组合的关联性最强。表示 “姜黄、川芎” 配伍频率为 31.91%, “姜黄、川芎” 出现时, 当归有 93.33% 概率同时出现, 比当归单独出现的概率 61.70% (见表 1) 提升了 1.51。说明 “姜黄-当归-川芎” 组方频次最高, 川芎还能提升 “姜黄-当归” 的出现频率, 该组方很可能是姜黄理血方剂的核心配伍。“姜黄、赤芍 \rightarrow 当归” 和 “姜黄、蒲黄 \rightarrow 赤芍” 组合的频次、关联性位居第二、第三, 也是姜黄理血方剂的较好配伍形式。

表 1 姜黄配伍 2 味药组合频次表

Table 1 Frequency distribution of Jianghuang compatible drugs

序号 No.	中药组合 Combination of TCM	支持度 Support (%)	频次 Frequency
1	姜黄-当归	61.70	29
2	姜黄-川芎	31.91	15
3	姜黄-赤芍	29.79	14
4	姜黄-肉桂	27.66	13
5	姜黄-延胡索	25.53	12
6	姜黄-蒲黄	21.28	10
7	姜黄-红花	19.15	9
8	姜黄-莪术	17.02	8
9	姜黄-没药	17.02	8
10	姜黄-木香	17.02	8
11	姜黄-五灵脂	17.02	8
12	姜黄-三棱	14.89	7
13	姜黄-熟地	14.89	7
14	姜黄-甘草	12.77	6
15	姜黄-牡丹皮	12.77	6
16	姜黄-牛膝	12.77	6
17	姜黄-青皮	12.77	6
18	姜黄-桃仁	12.77	6
19	姜黄-白芍	10.64	5
20	姜黄-羌活	10.64	5

续表 1 (Continued Tab. 2)

序号 No.	中药组合 Combination of TCM	支持度 Support (%)	频次 Frequency
21	姜黄-生地	10.64	5
22	姜黄-白术	8.51	4
23	姜黄-陈皮	8.51	4
24	姜黄-大黄	8.51	4
25	姜黄-荷叶	8.51	4
26	姜黄-乳香	8.51	4
27	姜黄-芫花	8.51	4

表 2 姜黄配伍 3 味药关联规律

Table 2 Key combination of formulae containing Jianghuang

序号 No.	中药组合 Combination of TCM	置信度 Confidence (%)	支持度 Support (%)	提升 Lift
1	姜黄、川芎→当归	93.33	31.91	1.51
2	姜黄、赤芍→当归	92.86	29.79	1.50
3	姜黄、蒲黄→赤芍	70	21.28	2.35
4	姜黄、延胡索→肉桂	58.33	25.53	2.11
5	姜黄、牡丹皮→川芎	100	12.77	3.13
6	姜黄、没药→延胡索	62.5	17.02	2.45
7	姜黄、蒲黄→肉桂	50	21.28	1.81
8	姜黄、乳香→没药	100	8.51	5.87
9	姜黄、没药→乳香	50	17.02	5.88
10	姜黄、牛膝→熟地	66.67	12.77	4.48
11	姜黄、熟地→牛膝	57.14	14.89	4.48
12	姜黄、牡丹皮→莪术	66.67	12.77	3.92
13	姜黄、木香→三棱	50	17.02	3.36
14	姜黄、莪术→红花	50	17.02	2.61
15	姜黄、没药→肉桂	50	17.02	1.81
16	姜黄、大黄→荷叶	75	8.51	8.81
17	姜黄、荷叶→大黄	75	8.51	8.81
18	姜黄、生地→白术	60	10.64	7.05
19	姜黄、荷叶→赤芍	75	8.51	2.52
20	姜黄、桃仁→五灵脂	50	12.77	2.94
21	姜黄、青皮→五灵脂	50	12.77	2.94
22	姜黄、乳香→甘草	50	8.51	3.92

2.2 “姜黄-当归-川芎”配伍的靶蛋白预测

通过 GRI 关联算法分析,发现“姜黄-当归-川芎”是姜黄理血方剂的核心配伍。下一步运用 Arrowsmith 工具将姜黄 (“*Curcuma longa*” or “Jianghuang”) 文献集合与当归 (“*Angelica sinensis*” or “Danggui”) 文献集合关联,发现“姜黄-当归”靶点条目 227 个,关联分数 0.95 以上条目 33 个。姜黄

(“*Curcuma longa*” or “Jianghuang”) 文献集合与川芎 (“*Ligusticum chuanxiong*” or “Chuanxiong”) 文献集合关联,发现“姜黄-当归”靶点条目 175 个,关联分数 0.95 以上条目 22 个。如图 2、表 3 所示,“姜黄-当归-川芎”关联分数大于 0.95 共同靶点 13 个。13 个靶点涉及相关家族基因 27 个。

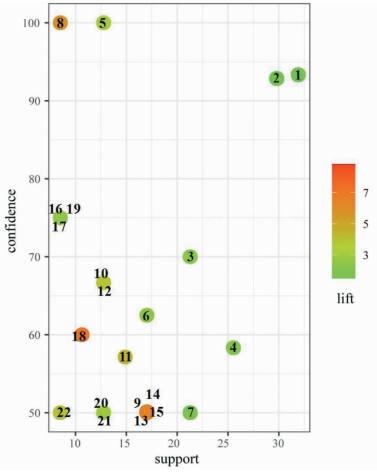


图 1 散点图

Fig. 1 Scatter diagram

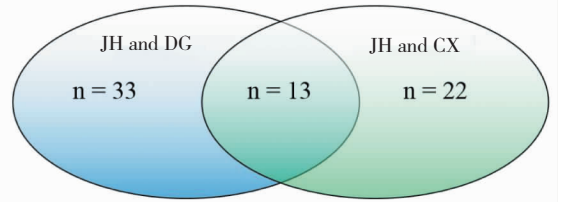


图 2 靶点数量韦恩图 (score ≥ 0.95)

Fig. 2 Venn diagram of number of targets (score ≥ 0.95)

2.3 靶点的 PPI 网络与组织分布

如图 3 所示,将 13 个潜在靶点 (27 个基因) 进行 PPI (Protein-protein interaction network) 网络分析,构建了 27 个基因、88 条相互作用的 PPI 网络。利用 Cytoscape 软件 cytoHubba 插件预测网络 Hub 基因,发现网络节点的平均度值为 6.52,平均最短距

表 3 “姜黄-当归-川芎”的共同靶点 (关联分数大于 0.95)

Table 3 Targets of the JH-CX-DG formula (score ≥ 0.95)

序号 No.	靶点 Target	靶点全称 Targets for the full name	家族主要基因 Gene family
1	AKT	Protein kinase B	AKT1、AKT2、AKT3
2	TLR4	Toll like receptor 4	TLR4
3	caspase-3	caspase-3	CASP3
4	PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase	PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIK3CD
5	mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase	MTOR
6	p38 MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinases	MAPK11、MAPK12、MAPK13、MAPK14
7	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGFA、VEGFB、VEGFC
8	iNOS	Inducible nitric oxide synthase	NOS2
9	Nrf2	Nuclear factor E2 related factor 2	NFE2L2
10	BDNF	Brain derived neurotrophic factor	BDNF
11	NF-κB	Nuclear factor-κB	NFKB1、NFKB2、REL、RELA、RELB
12	Bcl-2	B-cell lymphoma-2	BCL2
13	Bax	Bcl-2 Associated X Protein	BAX

离为 51.03×10^2 , 平均介数 4.09×10^2 , 其中 AKT1、PIK3CA、RELA、NFKB1、MAPK14、VEGFA 的三个网络参数超过了平均值,是 PPI 网络的枢纽节点,可能是“姜黄-当归-川芎”靶点网络的 Hub 基因。

利用 Uniprot、Protein atlas 和 FunRich3. 1. 3 数据库分析靶基因的细胞分布、组织分布情况,结果如图 4、表 4 所示,靶基因在组织的分布大多表达于单核/巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞、血小板等免疫细胞,而在其他器官的表达并不均匀。在细胞分布则有质膜、细胞质、细胞核、外泌等各种形式。

2.5 KEGG 通路分析

利用 KOBAS 3.0 数据库,将“姜黄-当归-川芎”的 13 个潜在靶点 (27 个基因) 进行 KEGG 通路

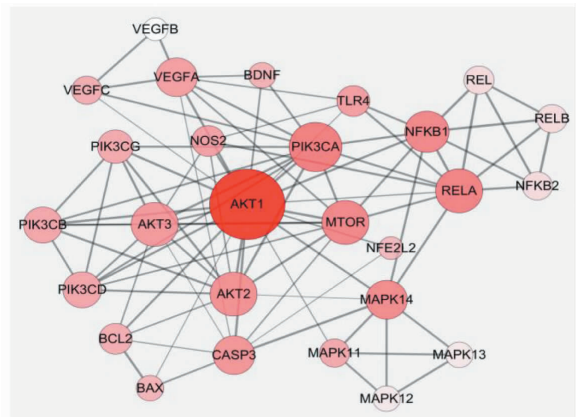


图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI network

表4 PPI网络的节点参数

Table 4 Node parameters in the PPI network

基因 Gene	类型 Type	度值 Degree	接近距离 Closeness	介数 Betweenness	主要亚细胞分布 Main Subcellular location
<i>AKT1</i>	Protein kinases	20	81.25×10^{-2}	40.25×10^{-2}	Plasma membrane
<i>PIK3CA</i>	Enzymes	12	61.90×10^{-2}	8.08×10^{-2}	Plasma membrane
<i>MTOR</i>	Protein kinases	10	59.09×10^{-2}	3.93×10^{-2}	Cytoplasm
<i>RELA</i>	Transcription factors	10	60.47×10^{-2}	12.02×10^{-2}	Nucleus
<i>AKT2</i>	Protein kinases	10	56.52×10^{-2}	3.31×10^{-2}	Plasma membrane
<i>AKT3</i>	Protein kinases	10	54.17×10^{-2}	1.75×10^{-2}	Plasma membrane
<i>NFKB1</i>	Transcription factors	9	59.09×10^{-2}	10.35×10^{-2}	Nucleus
<i>CASP3</i>	Enzymes	8	55.32×10^{-2}	3.83×10^{-2}	Cytoplasm
<i>MAPK14</i>	Protein kinases	8	57.78×10^{-2}	12.91×10^{-2}	Cytoplasm
<i>VEGFA</i>	Growth factors	8	53.06×10^{-2}	6.33×10^{-2}	Extracellular
<i>PIK3CB</i>	Enzymes	7	50.98×10^{-2}	0.05×10^{-2}	Plasma membrane
<i>PIK3CD</i>	Enzymes	7	50.98×10^{-2}	0.05×10^{-2}	Plasma membrane
<i>PIK3CG</i>	Enzymes	6	50.00×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Plasma membrane
<i>BCL2</i>	Apoptosis regulator	5	49.06×10^{-2}	0.32×10^{-2}	Mitochondrion
<i>NOS2</i>	Enzymes	5	52.00×10^{-2}	0.68×10^{-2}	Cytoplasm
<i>TLR4</i>	Pattern recognition receptors	5	53.06×10^{-2}	1.00×10^{-2}	Plasma membrane
<i>NFKB2</i>	Transcription factors	4	40.00×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Nucleus
<i>RELB</i>	Transcription factors	4	40.00×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Nucleus
<i>REL</i>	Transcription factors	4	40.00×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Nucleus
<i>MAPK11</i>	Protein kinases	4	50.00×10^{-2}	3.24×10^{-2}	Cytoplasm
<i>VEGFC</i>	Growth factors	4	49.06×10^{-2}	2.36×10^{-2}	Extracellular
<i>BAX</i>	Apoptosis regulator	3	47.27×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Mitochondrion
<i>MAPK12</i>	Protein kinases	3	38.24×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Cytoplasm
<i>MAPK13</i>	Protein kinases	3	38.24×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Cytoplasm
<i>BDNF</i>	Growth factors	3	48.15×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Extracellular
<i>VEGFB</i>	Growth factors	2	35.62×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Extracellular
<i>NFE2L2</i>	Transcription factors	2	46.43×10^{-2}	0.00×10^{-2}	Nucleus

富集,其中 P -value < 0.01 的前四十条通路结果如图5所示:8条通路与癌症相关;12条通路与感染和炎症相关;8条通路为信号转导通路;5条通路与神经内分泌相关;5条通路参与了一般生物过程;还有2条通路与其他疾病相关。

综上,四十条通路可简要归纳为图6~8所示,推测“姜黄-当归-川芎”可能具有通过调控 PI3K/Akt、MAPK、Toll-like receptor、T cell receptor、EGFR、VEGFR、Apoptosis、HIF-1 等信号通路,发挥增强免

疫力、抗炎、改善微循环、保护脑神经以及抗肿瘤、抗肿瘤血管生成等潜在药理作用。

2.6 组方 A549 细胞的抑制率

利用 5 g 姜黄,5 g 川芎和 5 g 当归制成粉末,将 300 mL 水煎至 150 mL,过滤除去残留物,然后加入 300 mL 水中,最后浓缩至 150 mL(相当于中药 100 mg/mL)。我们使用 MTT 测定法定量了 A549 细胞的抑制率和增殖。对数生长期的 A549 细胞分为六组(每组3孔)。第1组至第5组中分别添加100、

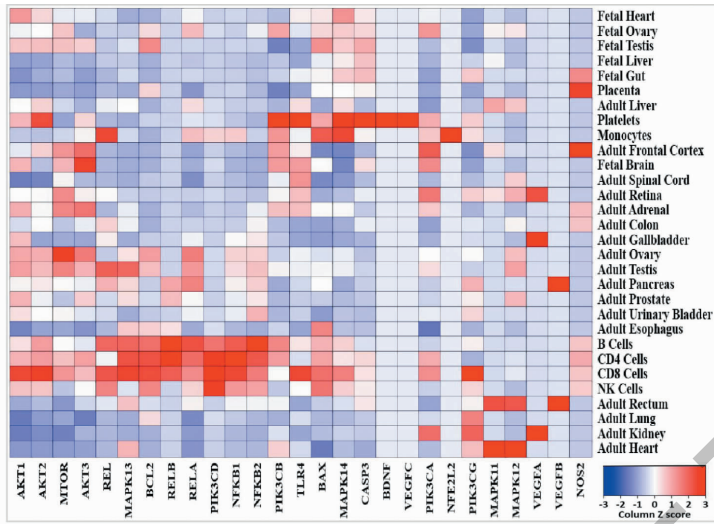


图 4 组织分布

Fig. 4 Tissue organ location

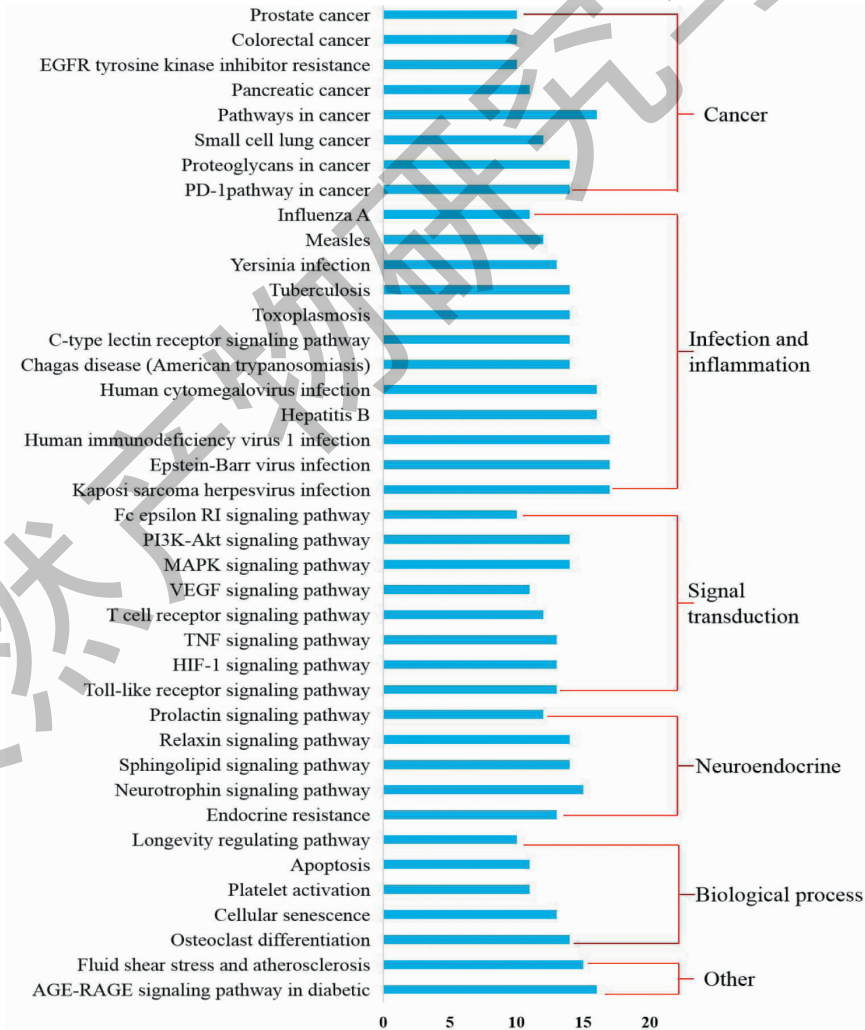


图 5 通路富集

Fig. 5 Pathway enrichment

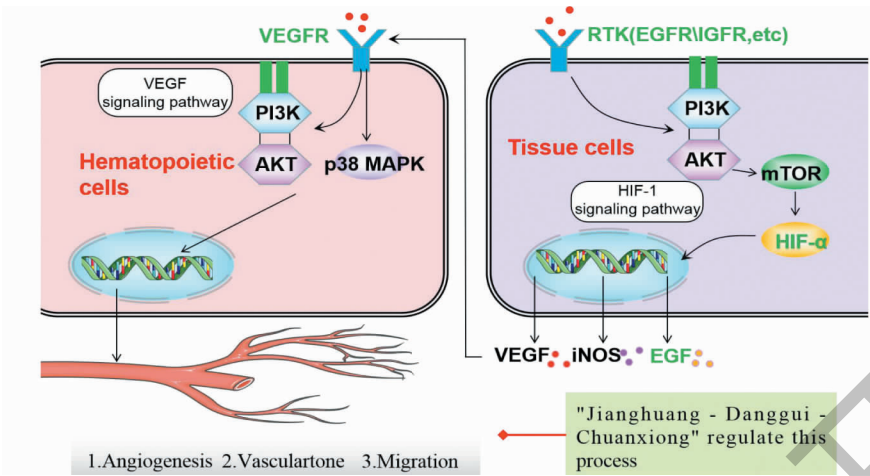


图 6 调控血管生成

Fig. 6 Regulating angiogenesis

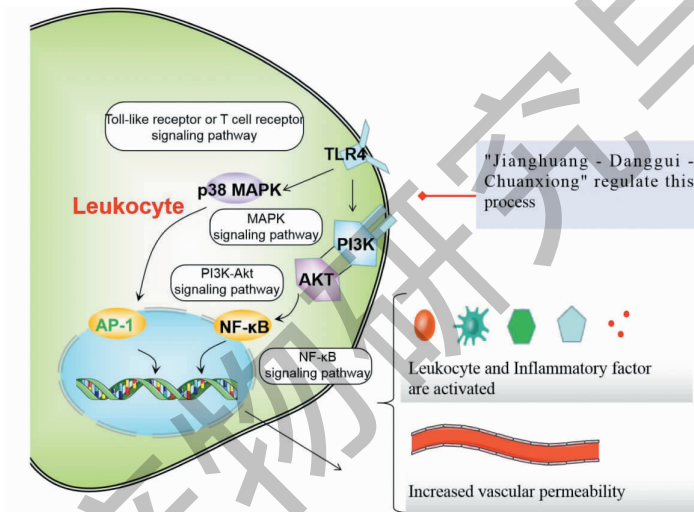


图 7 调节免疫反应

Fig. 7 Regulate immune response

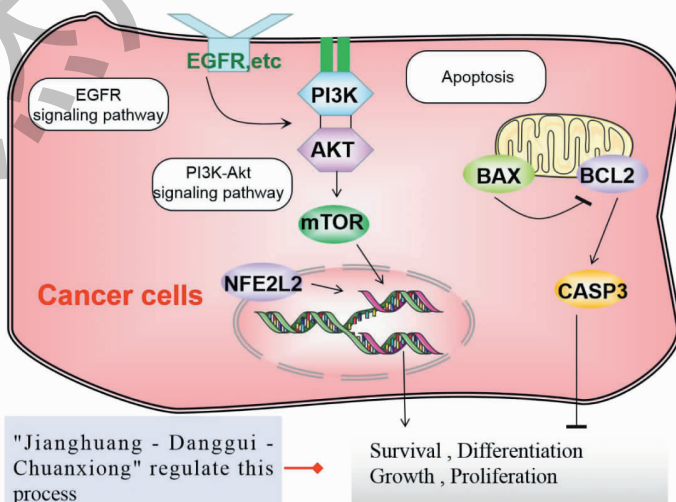


图 8 抗肿瘤

Fig. 8 Antitumor

50、25、12.5、6.25 mg/mL 的草药提取物 100 μ L, 对照组则添加 100 μ L DMSO。在二氧化碳培养箱中孵育 24、48、72 h 后, 我们通过每孔添加 20 μ L MTT (5 mg/L) 除去。温育 4 h 后, 用 DMSO 终止反应。

最后, 通过酶标仪在 570 nm 下测量每孔的吸光度。抑制率 = $(1 - OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。结果显示在表 5 和图 9 中。“姜黄-川芎-当归”配方可以剂量和时间依赖性抑制肿瘤细胞的增殖。

表 5 不同浓度组方对 A549 细胞的抑制率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Inhibition ratio of formula with different concentrations on the A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group(mg/mL)	24 h 抑制率 24 h inhibition ratio(%)	48 h 抑制率 48 h inhibition ratio(%)	72 h 抑制率 72 h inhibition ratio(%)
对照组 Control	-	-	-
6.25	13.91 \pm 0.42	21.33 \pm 1.35	24.87 \pm 2.30
12.50	22.87 \pm 1.30	38.66 \pm 0.56	43.55 \pm 1.26
25.00	38.29 \pm 2.97	66.22 \pm 0.65	76.08 \pm 0.77
50.00	54.44 \pm 2.41	74.64 \pm 1.82	82.26 \pm 0.86
100.00	64.47 \pm 0.91	75.48 \pm 3.27	85.35 \pm 1.32

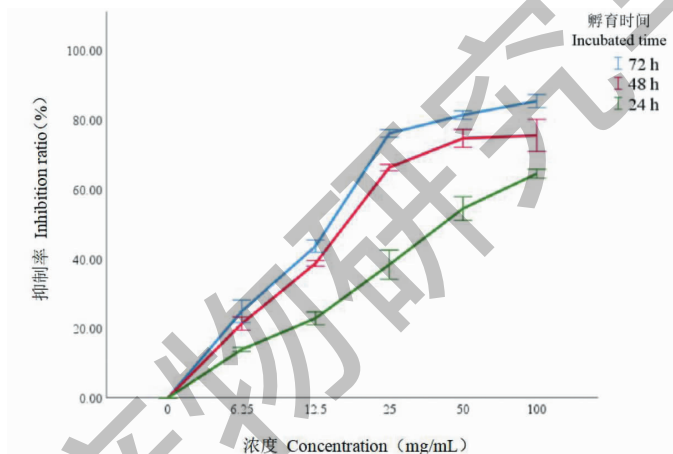


图 9 不同浓度组方对 A549 细胞抑制率的影响

Fig. 9 Effect of formula with different concentrations on the inhibition ratio of A549 cells

2.7 靶蛋白 p-EGFR、p-PI3K、p-Akt、VEGF 和 HIF-1 α 体外测定的体外表达

通过 Human Protein Atlas 数据库进行的生物信息学免疫组织化学分析表明, 在正常肺组织中 PI3K、EGFR 未表达, AKT 低表达, 但在肺癌组织样品中 PI3K、EGFR、AKT 明显表达(见图 10)。基于 Western blotting 检测了 p-EGFR、p-PI3K 和 p-Akt 在 A549 肺癌细胞的表达(见图 11)。将人类 A549 细胞分为四组(每组 3 孔): 对照, 小剂量(6.25 mg/mL)、中等剂量(12.5 mg/mL)、高剂量(25 mg/mL)。证明“姜黄-川芎-当归”配方可以明显抑制培养基中 p-EGFR、p-PI3K 和 p-Akt 的表达。孵育 24 h 后, 我们通过 Elisa 分析检测了 VEGF、HIF-1 α 的表

达。“姜黄-川芎-当归”配方可显著抑制各剂量组的 VEGF、HIF-1 α 的表达(见表 6)。

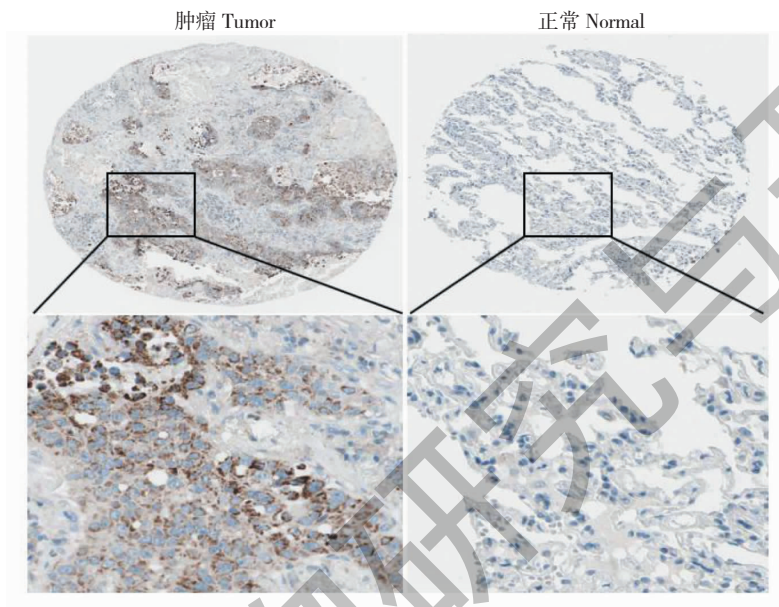
3 讨论

理血剂是一类具有调畅血行、散除瘀血、凉血止痛等效果的中医方剂, 现代医学常用以治疗外伤肿痛、妇科炎症、心脑血管疾病、肿瘤癌症等。本研究发现的姜黄核心配伍“姜黄-当归-川芎”中川芎属于活血化瘀药, 而当归属于活血补血药。姜黄与川芎、当归配伍具有较好的中医配伍理论依据。川芎为血中气药, 兼有行气止痛之效, 气行则血畅, 故能增强姜黄、当归活血化瘀之力^[12]。当归为补血圣药, 能祛瘀生新, 与姜黄、川芎配伍祛邪扶正、攻补兼施^[13]。古代经典名方“四物汤”便有当归配伍川芎

的用法。Li 等^[14]研究发现当归与川芎配伍后治疗血瘀大鼠比单独当归、单独川芎疗效更佳。Deng 等^[15]总结通过数据挖掘古今名方,发现姜黄具有治疗脑病的作用,并且最善与活血化瘀药当归、川芎等配伍,于本研究数据挖掘结论基本一致。综上,说明当归、川芎与姜黄具有协同增效的配伍依据,但后续仍需进一步实验分析姜黄与当归、川芎增效机制。

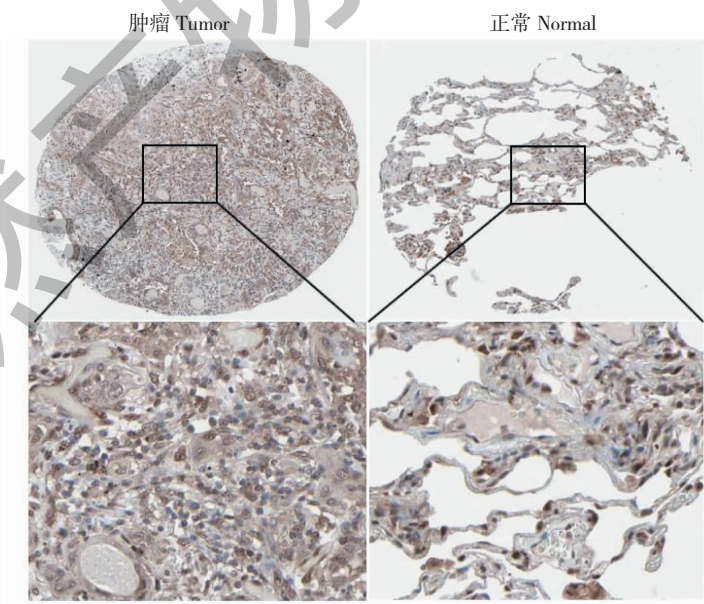
本研究首先通过 Arrowsmith 知识发现工具,发

现了“姜黄-当归-川芎”能联合作用于 AKT、TLR4、caspase-3、PI3K、mTOR、p38 MAPK、VEGF、iNOS、Nrf2、BDNF、NF- κ B、Bcl-2、Bax 等 13 个靶点,涉及相关基因 27 个。PPI 与通路富集显示“姜黄-当归-川芎”能通过 *AKT1*、*PIK3CA*、*RELA*、*NFKB1*、*MAPK14*、*VEGFA* 等 Hub 基因,参与调控 PI3K/Akt、MAPK、Toll-like receptor、T cell receptor、EGFR、VEGF、Apoptosis、HIF-1 等信号通路,预测其可能具有增强免疫



(A) 人蛋白质图谱数据库中 PI3K 在肿瘤和正常组织中的表达

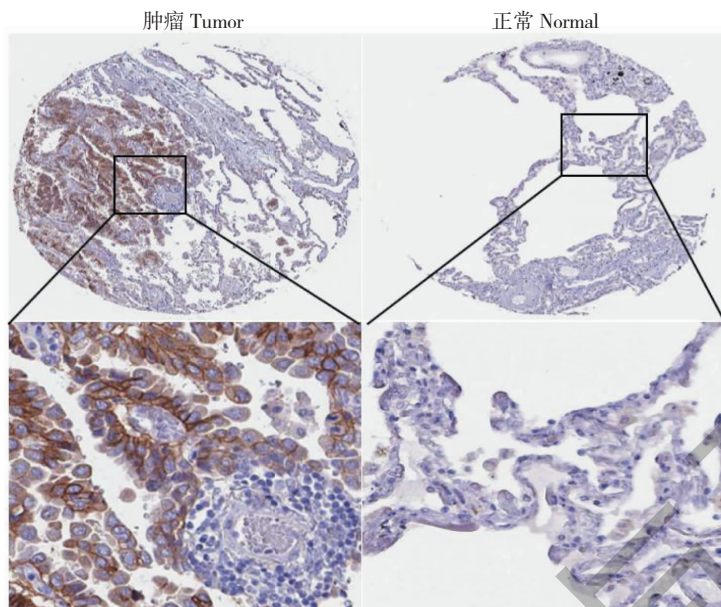
(A) The expression of PI3K in tumor and normal by Human Protein Atlas database



(B) 人蛋白质图谱数据库中 AKT 在肿瘤和正常组织中的表达

(B) The expression of AKT in tumor and normal by Human Protein Atlas database

续图 10(Continued Fig.10)



(C)人蛋白质图谱数据库中 EGFR 在肿瘤和正常组织中的表达

(C) The expression of EGFR in tumor and normal by Human Protein Atlas database

图 10 PI3K、Akt、EGFR 在肺癌组织中过表达

Fig. 10 PI3K, Akt, EGFR is overexpressed in lung cancer tissues

表 6 组方对 A549 细胞 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of formula on the expression of VEGF and HIF-1 α in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	VEGF 含量 VEGF content (pg/mL)	HIF-1 α 含量 HIF-1 α content (pg/mL)
空白对照 Control	819.33 \pm 8.47	577.17 \pm 4.52
小剂量 Small-dose	717.33 \pm 10.91	483.21 \pm 9.72
中剂量 Medium-dose	467.56 \pm 15.29	411.36 \pm 12.16
高剂量 High-dose	416.28 \pm 5.91	356.29 \pm 5.35

力、抗炎、改善微循环、保护脑神经以及抗肿瘤、抗肿瘤血管生成等潜在药理作用。

Liu 等^[16]发现姜黄能抑制 AKT/mTOR 途径而导致卵巢癌细胞 SK-OV-3 细胞凋亡。Ashrafizadeh 等^[17]发现姜黄通过靶向 Nrf2 信号通路具有多种作用,包括抗氧化剂,抗菌,抗肿瘤和抗炎作用。此外,有研究表明川芎和当归也可以发挥抗肿瘤作用,Shen 等^[18]使用 RT-qPCR 和 Western blotting 分析表明,川芎能显著降低 Akt 的表达和活性,增加 caspase-3 的活性,并且还显示出对多种类型的癌症具有抗肿瘤作用。当归可以通过抑制 mTOR 蛋白诱导胃癌细胞死亡,并可以显著延长癌症患者的生存率^[19]。当归还影响多种凋亡因子 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、Bcl-2 和 caspase-3 的表达并促进人乳腺

癌细胞的凋亡,因此已被证明是一种有前途的乳腺癌治疗剂^[20]。另外,“姜黄-当归-川芎”配方可能具有抗肿瘤血管生成作用。有 ELISA 分析表明,姜黄能抑制肿瘤细胞中 VEGF 的分泌,进一步抑制了肿瘤血管生成^[21]。Chen 等^[22]发现当归可以通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路并下调 HIF-1 α 和 VEGF 的表达来预防癌细胞的增殖和血管生成。这些研究表明“姜黄-当归-川芎”配方可发挥抗肿瘤作用。我们的结果与上述研究基本一致。

此外,本研究推测“姜黄-当归-川芎”配方还可以显示抗炎,保护脑神经的作用以及改善微循环的作用。Zhu 等^[23]使用免疫组织化学,酶联免疫吸附测定和蛋白质印迹,证明姜黄能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻实验性颅脑损伤的急

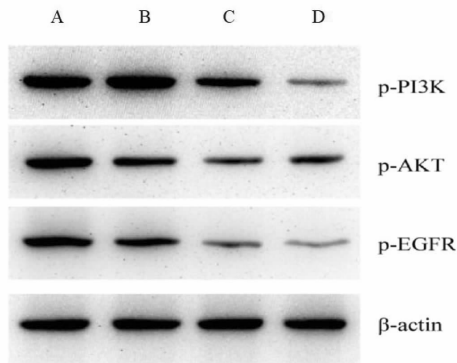


图 11 通过 Western blotting 在 A549 细胞中 p-EGFR、p-PI3K 和 p-Akt 的表达

Fig. 11 The expression of p-EGFR, p-PI3K and p-Akt in A549 cells by Western blotting

注:A:对照组;B:小剂量;C:中剂量;D:高剂量 Note: A: Control; B: Small-dose; C: Medium-dose; D: High-dose

性炎症损伤。有研究表明当归可以上调 TLR4 蛋白的表达,具有抗炎和镇痛的药理作用^[24]。川芎能通过抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路,使炎症性细胞因子和粘附分子在血管内皮细胞上的表达降低。这些研究证实了“姜黄-当归-川芎”配方抗炎作用的假设。Wu 等^[25]发现姜黄可以通过上调 caspase 3 和 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达并促进 PI3K/AKT 途径的活化而对缺血性脑损伤发挥有益作用。Hurley 等^[26]研究表明姜黄能导致海马 BDNF 剂量依赖性增加,具有保护脑神经作用。Cheng 等^[27]发现当归可通过下调 caspase 3 和上调 p-p38 MAPK,缺氧诱导因子(HIF-1),血管内皮生长因子-A(VEGF-A)来保护患者免受脑梗塞并改善神经系统损害。Chen 等^[28]发现当归四逆汤可以有效地通过 PI3K/Akt/iNOS 途径保护胰岛微血管的血管内皮细胞。我们的结果与以上研究一致,证明了“姜黄-当归-川芎”配方保护脑神经和改善微循环的药理作用。

最后,本研究使用 MTT、Elisa 和 Western blotting 实验,发现“姜黄-当归-川芎”配方可以抑制人肺癌 A549 细胞增殖并下调 A549 细胞中 p-EGFR、p-PI3K、p-Akt、VEGF 和 HIF-1 α 的表达。这些实验表明“姜黄-当归-川芎”配方在体外确实具有抗癌和抗肿瘤血管生成作用,证明数据挖掘信息可靠有效、可以预测中药的某些药理机制。本研究结果为中医药的发展和药理作用机理研究提供了方法参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015;264-265.
- 2 Zhou SY, Zhang SJ, Xu HZ, et al. Ancient and modern use of curcumin [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2019, 39: 635-640.
- 3 Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 27: 2889-2895.
- 4 Hay E, Lucariello A, Contieri M, et al. Therapeutic effects of turmeric in several diseases: an overview [J]. Chem Biol Interact, 2019, 310: 108729.
- 5 Deguchi A. Curcumin targets in inflammation and cancer [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015, 15: 88-96.
- 6 Wang Y, Guo LP, Huang LQ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Jianghuang, Ezhu and Yujin [J]. Chin Pharm (中国药房), 2015, 24: 3338-3341.
- 7 Liu CH, Geng G. Discussion on the composition of quanxie (scorpio) based on compatibility of drug-pairs [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2019, 60: 1563-1566.
- 8 Tang QS, Sun WJ, Qu M, et al. Compatibility rules research of herbs in anxiety disorders based on association rules [J]. Chin J Tradit Chin Med (中华中医药杂志), 2012, 27: 1941-1946.
- 9 Peng HR. Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中医方剂大辞典) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- 10 Li J. Preions of Chinese Materia Medica (方剂学) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press (中国中医药出版社), 2012.
- 11 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of china: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 12 Xu TF, He CG, Yang K. Network pharmacological study on the potential mechanism of Danggui Buxue Decoction in the treatment of diabetic nephropathy [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1499-1506.
- 13 Chen C, Wu Y, Li B. Contents Determination for 6 main compounds from *Ligusticum chuanyong* during growing period by UPLC [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 997-1001.
- 14 Ma CX, Zhang WS, Tian R, et al. Effects of different compati-

- bility proportions of Szechwan Lovage Rhizome and Turmeric Root Tuber on pharmacokinetics of ferulic acid in rabbits [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2006, 29: 474-478.
- 15 Li WX. Study on the bio-active components and compatibility action mechanism of Danggui-Chuanxiong herb pair [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2014.
- 16 Liu HY, Fu X, Li YF, et al. miR-15b-5p targeting amyloid precursor protein is involved in the anti-amyloid effect of curcumin in swAPP695-HEK293 cells [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14: 1603-1609.
- 17 Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohammadinejad R, et al. Curcumin activates the Nrf2 pathway and induces cellular protection against oxidative injury [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20: 116-133.
- 18 Shen J, Zeng L, Pan L, et al. Tetramethylpyrazine regulates breast cancer cell viability, migration, invasion and apoptosis by affecting the activity of Akt and caspase-3 [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15: 4557-4563.
- 19 Liao KF, Chiu TL, Huang SY, et al. Anti-cancer effects of Radix Angelica Sinensis (Danggui) and *N*-butylidenephthalide on gastric cancer: implications for REDD1 activation and mTOR inhibition [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48: 2231-2246.
- 20 Zhou WJ, Wang S, Hu Z, et al. Angelica sinensis polysaccharides promotes apoptosis in human breast cancer cells via CREB-regulated caspase-3 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467: 562-569.
- 21 Fu Z, Chen X, Guan S, et al. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 19469-19482.
- 22 Chen MC, Hsu WL, Chang WL, et al. Antiangiogenic activity of phthalides-enriched *Angelica sinensis* extract by suppressing WSB-1/pVHL/HIF-1 α /VEGF signaling in bladder cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5376.
- 23 Zhu HT, Bian C, Yuan JC, et al. Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury [J]. *Neuroinflammation*, 2014, 11: 59.
- 24 Qian B, Li F, Zhao LX, et al. Ligustilide ameliorates inflammatory pain and inhibits TLR4 upregulation in spinal astrocytes following complete Freund's adjuvant peripheral injection [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36: 143-149.
- 25 Wu L, Jiang C, Kang Y, et al. Curcumin exerts protective effects against hypoxia-reoxygenation injury via the enhancement of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in SHSY5Y cells: involvement of the PI3K/AKT pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45: 993-1004.
- 26 Hurley LL, Akinfiresoye L, Nwulia E, et al. Antidepressant-like effects of curcumin in WKY rat model of depression is associated with an increase in hippocampal BDNF [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 239: 27-30.
- 27 Cheng CY, Ho TY, Hsiang CY, et al. Angelica sinensis exerts angiogenic and anti-apoptotic effects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating p38MAPK/HIF-1/VEGF-A signaling in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45: 1683-1708.
- 28 Chen W, Huang C, Yang C, et al. Danggui Sini decoction protected endothelial cell survival from hypoxic damage via PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 10: 5421023.