

UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS 结合网络药理学和实验验证 探讨西洋参治疗动脉粥样硬化的作用机制

何林¹, 彭伟¹, 张学建², 陶飞燕^{2*}, 吴纯洁^{1*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ²四川中烟工业有限责任公司, 成都 610066

摘要: 本文旨在运用网络药理学和分子对接探讨冷冻干燥西洋参 (freeze-drying Panacis Quinquefolii Radix, FDPQ) 治疗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的潜在作用机制。首先通过 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS 分析得到 FDPQ 的皂苷类成分, 利用 SwissTargetPrediction 平台预测其潜在靶点, 从 GeneCards 数据库获取 AS 的相关靶点, 取交集获得候选靶点。其次利用 Cytoscape 软件筛选出枢纽基因, 构建蛋白互作网络 (PPI)。通过 Metascape 平台对枢纽基因进行基因本体论富集 (GO) 和京都基因与基因组百科全书通路分析 (KEGG)。然后构建药物-成分-靶点-疾病-通路网络获得治疗疾病的活性成分和靶点, 并应用 Discovery Studio 软件对二者的亲和力进行预测。最后采用 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立氧化损伤细胞模型, FDPQ 干预后, CCK-8 法检测细胞活力、检测线粒体膜电位、测定抗氧化酶活性、qRT-PCR 检测相关基因的 mRNA 表达, 初步验证网络药理学的预测结果。最终从 FDPQ 中鉴定出人参皂苷 Rg₄、拟人参皂苷 F₁₁ 等 28 种皂苷类化合物, 得到 PIK3CA、VEGFA 等 21 个 FDPQ 治疗 AS 的核心靶点。GO 和 KEGG 分析显示主要的生物过程及信号通路有: 跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、黏着斑、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化相关通路、VEGF 信号通路等。分子对接结果表明主要活性成分和靶点的结合力较好, 其中, 20(R)-人参皂苷 Rh₁ 和靶点 VEGFA、拟人参皂苷 F₁₁ 和靶点 PIK3CA 有较高的亲和力。细胞实验表明, 与空白组比较, 模型组细胞活力降低 ($P < 0.05$), 线粒体膜电位降低, SOD、CAT 活性降低 ($P < 0.05$), MDA 水平升高 ($P < 0.05$), PI3K/Akt 表达下调; 与模型组比较, FDPQ 干预组的细胞活力升高 ($P < 0.05$), 线粒体膜电位升高, SOD、CAT 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 水平降低 ($P < 0.05$), PI3K/Akt 表达上调。本研究初步提示了 FDPQ 治疗 AS 多成分、多靶点、多途径的作用特点, 为进一步阐释其物质基础和作用机制奠定了一定的基础。

关键词: 冷冻干燥西洋参; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)8-1400-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.8.015

Exploration of the potential mechanism of Panacis Quinquefolii Radix on treating atherosclerosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification *in vitro*

HE Lin¹, PENG Wei¹, ZHANG Xue-jian², TAO Fei-yan^{2*}, WU Chun-jie^{1*}

¹School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

²China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610066, China

Abstract: This study aims to explore the potential action mechanism of freeze-drying Panacis Quinquefolii Radix (FDPQ) on atherosclerosis (AS) based on network pharmacology and molecular docking. Firstly, the saponins of FDPQ were characterized by UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS analysis. Then, the related targets of FDPQ and AS were predicted using the SwissTargetPrediction database and GeneCards database, respectively. The overlapping targets of FDPQ and AS were obtained and subjected to GO and KEGG analysis. Further, the PPI and drug-compounds-targets-disease-pathways networks were constructed by Cytoscape software. Discovery studio software was employed to predict the docking affinity between the potential targets

收稿日期: 2022-01-04

接受日期: 2022-04-18

基金项目: “杏林学者”学科人才科研提升计划 (NO. CXTD2018007)

* 通信作者 E-mail: taofeiyan@163.com, wucjedtcm@163.com

for AS treatments and active components from FDPQ. Finally, PC12 cells were induced by H_2O_2 to establish an oxidative damage cell model and treated with FDPQ. CCK-8 method, mitochondrial membrane potential detection, antioxidant enzyme activity determination, and qRT-PCR detection of related gene mRNA expression were used to preclinically verify the prediction results of network pharmacology. According to the results of UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS analysis, 28 ginsenosides of FDPQ were identified, such as ginsenosides Rg_4 and pseudo-ginsenoside F_{11} . A total of 21 core targets including PIK3CA and VEGFA were obtained through PPI network analysis. The most significantly enriched pathway of GO and KEGG involved transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, focal adhesion, protein serine/threonine/tyrosine kinase activity, PI3K-Akt signaling pathway, Lipid and atherosclerosis, VEGF signaling pathway, et al. The results of molecular docking show that the main active components have a good binding affinity with the key targets. For example, pseudo-ginsenoside F_{11} had a high affinity with the target PIK3CA. Cell experiments showed that compared with blank group, cell viability of model group decreased ($P < 0.05$), mitochondrial membrane potential decreased and MDA level increased ($P < 0.05$), SOD and CAT activities decreased ($P < 0.05$), PI3K/Akt expression was down-regulated; Compared with model group, FDPQ group increased cell viability ($P < 0.05$), mitochondrial membrane potential increased and MDA level decreased ($P < 0.05$), SOD and CAT activities increased ($P < 0.05$), PI3K/Akt expression was up-regulated. This network pharmacology-based research indicates that FDPQ's effect on AS is characterized by multi-ingredients, multi-targets, and multi-pathways, laying a preliminary foundation for further study of its material basis and mechanism of action.

Key words: freeze-drying Panacis Quinquefolii Radix; atherosclerosis; network pharmacology; mechanism of action

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是引发血管疾病的主要原因,其病变以动脉部分脂质沉积为特征,伴有平滑肌细胞和纤维基质增殖,逐渐发展为动脉粥样硬化斑块^[1]。AS的临床表现包括缺血性心脏病、缺血性中风和外周血管病等^[2]。AS的发病机制十分复杂,具有多种信号传导途径,实验和临床研究表明其可能与炎症、氧化应激、先天和适应性免疫、感染等有关。目前倾向于“损伤反应-炎症学说”,性质与炎症相似,但尚无定论^[3,4]。

西洋参(Panax Quinquefolii Radix)是五加科人参属植物的干燥根,含有丰富的人参皂苷^[5]。研究表明,多种人参皂苷具有抗炎、免疫调节和保护心血管系统等药理活性^[6]。西洋参传统干燥方式为烘干,但干燥后的成品表皮皱缩,颜色焦黄,质地坚硬,切片或粉碎困难。冷冻干燥(冻干)可在低温和真空下将物料脱水干燥。采用冷冻干燥制备的西洋参(freeze-drying Panacis Quinquefolii Radix, FDPQ)表皮平整,颜色鲜亮,质地疏松,复水性好,服用方便,脱水彻底,易于贮藏和运输。此外,FDPQ中人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的含量总和亦显著高于烘干西洋参^[7]。综上,FDPQ在外观品相和内在成分上较烘干西洋参均有优势,具有广阔的市场前景。

课题组前期研究发现,FDPQ可改善动脉粥样硬化小鼠氧化应激损伤,减少主动脉弓部位粥样斑块以及脂质沉积,但机制尚不明确。网络药理学可从系统层面揭示药物对机体的调控作用,为研究中

药成分与疾病之间的相互关系提供新的思路^[8]。本文拟采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS 技术结合网络药理学和分子对接的方法,探索 FDPQ 治疗 AS 的药效物质、作用靶点和潜在通路,并辅以细胞实验进行初步验证,以期为进一步开展相关实验,研究作用机制奠定基础。实验流程设计如图 1 所示。

1 材料和方法

1.1 FDPQ 的制备

鲜西洋参从中国吉林省靖宇县购买,由成都中医药大学吴纯洁教授鉴定为五加科人参属植物西洋参(*Panax quinquefolium* L.)的根。将鲜西洋参冷冻干燥,粉碎后过 50 目分析筛(孔径为 0.355 mm)。冷冻干燥工艺:-80 °C 预冻 2 h 后入仓,真空度抽至 10 Pa,温度由-50 °C 升至 20 °C,维持 32 h。

1.2 皂苷类成分鉴定

1.2.1 试剂试药

色谱纯甲醇和乙腈购自美国 Thermo Fisher Scientific;甲醇、甲酸等分析纯试剂购自成都市科隆化学制品有限公司。

1.2.2 供试品溶液制备

精密称取 FDPQ 粉末 1.0 g 置具塞锥形瓶中,加入 80% 甲醇 30 mL,超声提取 60 min,过滤,取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

1.2.3 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 分析

色谱条件:色谱柱为 Thermo Scientific™ Accucore™ C_{18} (3 mm \times 100 mm, 2.6 μm);流速:0.35 mL/min;柱温:35 °C;进样量:5 μL ;流动相 A 为

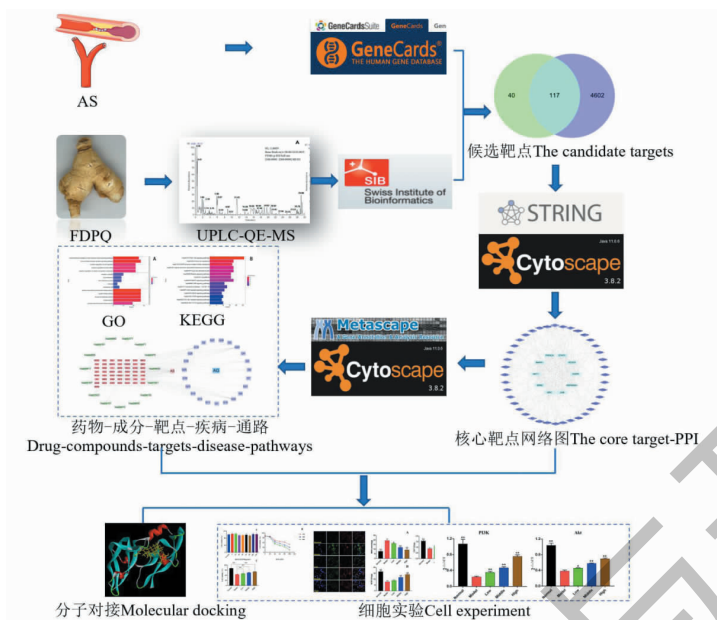


图1 研究设计的详细流程图

Fig. 1 The detailed flowchart of the study design

0.1% 甲酸-乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-水; 梯度洗脱程序为: 0 ~ 3 min, 10% A → 20% A; 3 ~ 25 min, 20% A → 38% A; 25 ~ 30 min, 38% A → 85% A; 30 ~ 30.1 min, 85% A → 100% A。

质谱条件: 质谱仪为 Thermo Scientific Q Exactive-MS 高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher)。电喷雾离子源, 选择正负离子模式(HESI+/ESI-), 在 100 ~ 1 500 m/z 范围内进行全扫描分析; 离子源温度: 120 °C, 喷雾电压: 3.0 kV; 毛细管温度: 320 °C; 最大喷射电流: 100 A; 探针加热器温度: 350 °C; 洗脱溶剂温度: 400 °C; 鞘气和辅助气体均为氮气, 流速分别为 35.00 L/min 和 10.00 L/min。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 候选靶点库和蛋白互作网络(PPI)构建

利用 SwissTargetPrediction 平台预测在 FDPQ 中鉴定出的皂苷类成分的潜在靶点。以“atherosclerosis”为关键词, 从 GeneCards 数据库中收集疾病相关靶点。对成分靶点和疾病靶点求交集, 建立候选靶点库。将候选靶点导入 String 数据库, 选择 high confidence(0.700), 将生成的文件导入 Cytoscape 软件(3.8.2), 筛选出 MCC 下的 top 50 枢纽基因(hub genes), 并可视化获得 PPI 网络图; 同时进行网络拓扑分析, 计算出“degree”“betweenness centrality”“closeness centrality”值, 进而得到核心靶点。使用的数据库和在线分析平台见表 1。

表 1 数据库和在线分析平台

Table 1 Database and online analysis platform

数据库/在线分析平台 Database/ Online analysis platform	网址 Uniform resource locator (URL)
SwissTargetPrediction	http://www.swisstargetprediction.ch/
GeneCards	https://www.genecards.org/
String	https://string-db.org/
Metascape	https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1
微信信云平台	http://www.bioinformatics.com.cn/
RCB PDB	https://www1.rcsb.org/

1.3.2 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 平台^[9]对筛选出的 50 个枢纽基因进行基因本体论富集(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书通路分析(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)。均选取 $P < 0.01$ 的结果, 并使用微信信云平台对重要结果进行可视化。

1.4 分子对接

利用 Discovery Studio(4.5 Client)软件将筛选出的活性成分和靶点进行分子对接。首先, 使用“Prepare Ligands”模块生成活性成分的三维结构并加氢。从 RCB PDB 数据库下载靶点的大分子蛋白质(具有原配体), 筛选条件为: Homo sapiens、X-Ray Diffraction, 分辨率在 0.25 ~ 0.40 nm 之间。删掉水

分后,使用“Prepare Protein”模块去除蛋白多构象,补充非完整的氨基酸残基,为蛋白加氢。拆分蛋白和原配体,利用 LibDock 方法将原配体和活性成分一同与蛋白进行对接,以 LibDockScore 评估活性成分和目标蛋白的亲合力。LibDock 方法相关参数均为默认设置。

1.5 细胞实验

1.5.1 试剂与材料

胎牛血清(FBS)(批号:O30629)、RPMI1640 培养基(批号:8121592)购自美国纽约 GIBCO; H_2O_2 (批号:BCCG3062)购自美国 sigma; 抗生素(青霉素-链霉素溶液)(批号:16D28C16)、PBS 缓冲液(批号:16G02A30)、胰蛋白酶(含 EDTA)(批号:17A20167)、CCK-8 试剂盒(批号:16H19B60)购自武汉博士德生物; RAPI lysis buffer 裂解液(批号:90013B)、超氧化物歧化酶(SOD)(批号:032219190614)和丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号:030819190614)、BCA 蛋白测定试剂盒(批号:070919919113)购自上海碧云天; JC-1 探针(批号:2019042)购自江苏凯基生物; 过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(批号:20201218)购自南京建成生物工程研究所; Trizol(批号:213409)购自美国 Thermo Fisher; DEPC 水(批号:681165)购自上海吉至公司; 逆转录试剂盒(批号:S2028)、SYBR Green q-PCR Master Mix 试剂盒(批号:S2014)购自苏州宇恒生物。

1.5.2 FDPQ 提取物冻干粉制备

精密称取 FDPQ 粉末适量,按“1.2.2”项下供试品溶液制备方法制备提取液,将滤液减压浓缩至无醇味后,冷冻干燥 36 h 得到提取物冻干粉,冻干工艺同“1.1”项下。

1.5.3 细胞培养

大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基在环境为 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养。每三天传代一次,取 3 到 5 代的细胞用于实验。

1.5.4 细胞活力测定

采用 CCK-8 法检测 PC12 细胞的活力,确定 H_2O_2 处理 PC12 细胞的最佳浓度和时间,以及 FDPQ 提取物的最佳干预浓度。将处于对数生长期的 PC12 细胞接种到 96 孔板中(1×10^4 个细胞/孔)。细胞完全贴壁后,加入不同浓度的 FDPQ 提取物(5 ~ 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养 24 h,或加入不同浓度的 H_2O_2 培养 12、24、48 h。干预后更换新的细胞培养液,每

孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C 暗箱培养 1 h。最后,使用 iMARK 酶标仪(美国伯乐)在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度(OD)值,计算细胞存活率。在测定 FDPQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的影响时,先用 FDPQ 提取物预处理 PC12 细胞 24 h,再用确定的最佳 H_2O_2 浓度和处理时间干预细胞,最后检测干预后的细胞活力。

1.5.5 线粒体膜电位测定

将 PC12 细胞接种于激光共聚焦培养皿(1×10^4 个细胞/孔),用不同浓度的 FDPQ 提取物和最佳浓度的 H_2O_2 干预后,PBS 洗涤细胞 3 次,加入 200 μL 的 JC-1 染色工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),使其能够完全覆盖住细胞表面,避光孵育 20 min,吸除残余染液,吸取适量的 $1 \times$ Assay Buffer 清洗细胞三次,加入含有 DAPI 的封闭剂孵育,最后在 Olympus IX71 倒置荧光显微镜(日本 Olympus)下观察,记录图像。

1.5.6 抗氧化酶活性的测定

将 PC12 细胞配制成细胞悬液,接种于 6 孔板(每孔 1×10^6 个细胞),然后用不同浓度的 FDPQ 提取物和最佳浓度 H_2O_2 处理。干预结束后弃去上清液,用预冷的 PBS 溶液冲洗细胞 3 次,用 RAPI 裂解液对细胞进行裂解,收集细胞总蛋白。按试剂盒说明书测定细胞的 SOD、CAT 活性和 MDA 水平;同时用 BCA 试剂盒测定细胞总蛋白含量。

1.5.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 mRNA 表达

通过 qRT-PCR 法测定 PI3K 和 Akt 的 mRNA 表达。将 PC12 细胞接种在 6 孔板中(每孔 1×10^6 个细胞),用不同浓度的 FDPQ 提取物和最佳浓度的 H_2O_2 处理。随后收集细胞,使用 Trizol Plus RNA 纯化试剂盒分离总 RNA。使用逆转录试剂盒合成 cDNA,SYBR Green q-PCR 试剂盒进行 cDNA 扩增。qRT-PCR 分析所用引物见表 2。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的相对定量分析表示。

表 2 qRT-PCR 分析所用基因引物序列

Table 2 The sequence of primers for qRT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')	引物长度 Primer length(bp)
PI3K	F: TTGGAATAGTAGCAGGCGGC	20
	R: AAGTAGGGAGGCATCTCG	18
Akt	F: AGTCCCACTCAACAACCTTCT	21
	R: AAGTAGGGAGGCATCTCG	18
GAPDH	F: AAGGAGCGGAGAAGAGGAC	20
	R: CGTCCTTACGAGTCACTTCAGG	22

1.5.8 统计和分析

所有数据均使用 GraphPad Prism (9.3.1) 软件分析, 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($n = 3$) 表示。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS 鉴定结果

本文使用高分辨质谱对 FDPQ 皂苷类成分进行

分析鉴别。将化合物的相对分子量、保留时间和二级质谱裂解碎片信息与 Thermo Scientific 建立的化合物库 (mz Cloud 和 mz Vault) 以及相关文献^[10-12] 中的进行比对, 在 FDPQ 中鉴定出 28 种皂苷类化合物。总离子流图见图 2, 化合物的详细信息见表 3。

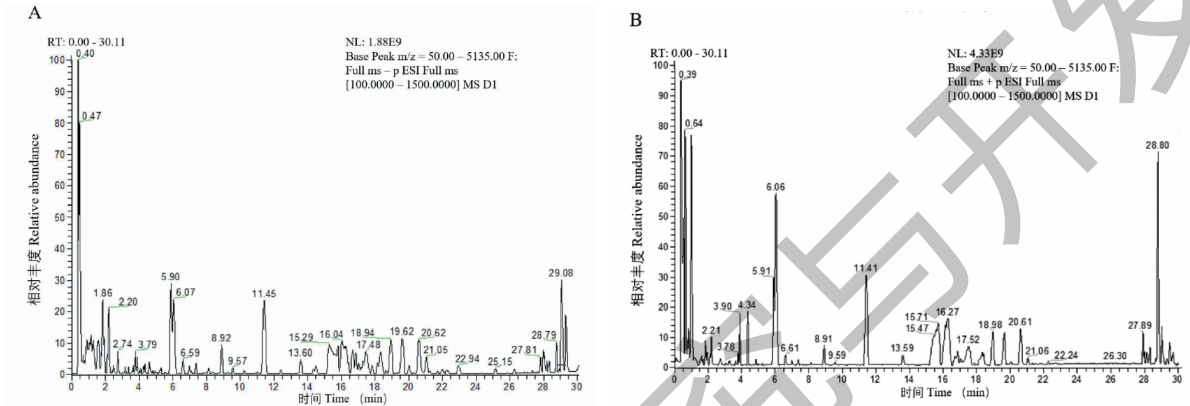


图 2 总离子流图

Fig. 2 UPLC-QE-Orbitrap-MS total ion chromatogram

注: A: 负离子模式; B: 正离子模式。Note: A: ESI⁻; B: ESI⁺。

表 3 FDPQ 中的人参皂苷

Table 3 Ginsenosides identified from FDPQ

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	理论值 Theoretical mass (m/z)	实际值 Experimental mass (m/z)	加合 Selective ion	误差值 Error value (ppm)	碎片离子 Fragment ion (m/z)
G1	8.19	人参皂苷 R _{G1}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.490 4	845.491 3	[M + FA-H] ⁻	1.06	799.486 5, 637.432 9, 101.023 6, 845.491 1
G2	8.26	人参皂苷 R _E	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.542 8	945.543 2	[M-H] ⁻	0.42	945.544 4, 71.012 9, 85.028 6, 113.023 7
G3	11.50	拟人参皂苷 F ₁₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.499 5	801.498 8	[M + H] ⁺	0.87	85.029 0, 107.086 0, 421.347 6, 71.049 8
G4	17.38	20(S)- 人参皂苷 R _{G2}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.495 5	829.497 1	[M + FA-H] ⁻	1.93	783.491 6, 101.023 7, 475.379 7, 113.023 7
G5/ G6	17.40	20(R/S)- 人参皂苷 R _{H1}	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.437 6	683.439 1	[M + FA-H] ⁻	2.19	637.434 6, 683.438 9, 101.023 5, 475.378 6
G7	17.86	20(R)- 人参皂苷 R _{G2}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.495 5	829.495 3	[M + FA-H] ⁻	0.24	783.491 6, 101.023 7, 475.379 7, 113.023 7
G8	17.83	人参皂苷 R _{B1}	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.595 7	1 107.596 9	[M-H] ⁻	1.08	945.543 5, 221.066 6, 161.045, 179.055 8
G9	18.74	人参皂苷 R _C	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 1	1 077.586 9	[M-H] ⁻	1.67	191.055 9, 945.545 0, 783.492 0, 621.437 0
G10	18.96	人参皂苷 R _O	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.490 8	955.492 2	[M-H] ⁻	1.47	71.012 9, 113.023 7, 89.023 6, 613.375 5
G11	20.06	人参皂苷 R _{B2}	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 1	1 077.587 4	[M-H] ⁻	2.13	191.056 0, 915.531 3, 945.542 7, 783.483 7

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	理论值 Theoretical mass (m/z)	实际值 Experimental mass (m/z)	加合 Selective ion	误差值 Error value (ppm)	碎片离子 Fragment ion (m/z)
G12	20.11	人参皂苷 Rb ₃	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 123.590 6	1 123.593 9	[M + FA-H] ⁻	2.94	113.023 7, 85.028 6, 131.034 3, 149.045 0
G13	20.16	人参皂苷 F ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.437 6	683.439 0	[M + FA-H] ⁻	2.05	59.012 9, 637.430 7, 71.012 8, 89.023 5
G14	20.31	人参皂苷 Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.542 8	945.543 7	[M-H] ⁻	0.95	945.544 7, 783.492 4, 946.545 3, 621.439 0
G15	21.72	人参皂苷 Rs ₁	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1 165.601 1	1 165.603 4	[M + FA-H] ⁻	1.97	1059.577 3, 89.023 6, 101.023 6, 113.023 8
G16	21.92	人参皂苷 Rs ₂	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1 165.601 1	1 165.605 0	[M + FA-H] ⁻	3.35	1059.577 3, 89.023 6, 101.023 6, 113.023 8
G17	23.17	绞股蓝皂苷 XVII	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.542 8	945.542 5	[M-H] ⁻	0.32	945.544 1, 71.012 9, 89.023 6, 101.023 6
G18	23.45	人参皂苷 Rg ₆	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.484 9	811.487 7	[M + FA-H] ⁻	3.45	765.480 4, 59.012 9, 71.013 0, 101.023 6
G19	27.02	人参皂苷 Rg ₄	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.484 9	811.487 8	[M + FA-H] ⁻	3.57	765.480 8, 59.012 9, 71.012 9, 101.023 7
G20	27.50	人参皂苷 Rk ₃	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	665.427 0	665.429 6	[M + FA-H] ⁻	3.91	619.316 0
G21	27.53	人参皂苷 F ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.495 5	829.498 0	[M + FA-H] ⁻	3.01	71.013 0, 621.438 7, 783.490 7, 59.012 9
G22	27.82	人参皂苷 Rh ₄	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	665.427 0	665.428 8	[M + FA-H] ⁻	2.71	619.316 0
G23	28.23	20(S)- 人参皂苷 Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.495 5	829.498 1	[M + FA-H] ⁻	3.13	783.491 4, 71.013 0, 89.023 6, 101.023 7
G24	28.36	20(R)- 人参皂苷 Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.495 0	829.497 9	[M + FA-H] ⁻	2.89	783.491 4, 71.013 0, 89.023 6, 101.023 7
G25	28.59	人参皂苷 Rs ₃	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₄	871.506 1	871.508 4	[M + FA-H] ⁻	2.64	783.490 5, 101.023 5, 113.023 8, 825.501 0
G26	29.59	人参皂苷 Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.484 9	811.487 4	[M + FA-H] ⁻	3.08	765.481 3, 71.012 8, 101.023 5, 113.023 6
G27	29.72	人参皂苷 Rg ₅	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.484 9	811.486 5	M + FA-H] ⁻	1.97	765.481 3, 71.012 8, 101.023 5, 113.023 6
G28	29.72	20(R/S)- 人参皂苷 Rh ₂	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	667.442 7	667.444 5	[M + FA-H] ⁻	2.70	621.439 5, 161.044 9, 71.012 9, 59.012 9

2.2 候选靶点库和 PPI 分析

通过 SwissTargetPrediction 和 GeneCards 数据库的筛选,删除重复值后,获得了 27 个皂苷类化合物的相关靶点 157 个,疾病相关靶点 4 719 个。构建韦恩(Venny)图(见图 3),得到二者交集靶点 117 个,作为候选靶点。按“1.3.1”项下的方法,使用 Cytoscape 软件从候选靶点中筛选出 top 50 枢纽基因,并可视化获得 PPI 网络图(见图 4)。如图所示,

该网络有 50 个靶点和 329 条边。以“degree”“betweenness centrality”“closeness centrality”值大于中位数为阈值进行筛选,将获得的 21 个交集靶点作为核心靶点,结果见表 4。“degree”值越高,表明其关联的节点越多,重要程度越高,其中, SRC、STAT3、HSP90AA1、EGFR、MAPK1、JUN、GRB2、AKT1、PIK3CA、VEGFA 排名靠前(degree > 21),表明这些靶点可能发挥着重要作用。

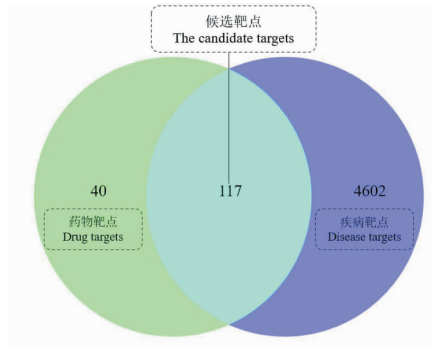


图3 药物和疾病靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of drug targets and disease targets

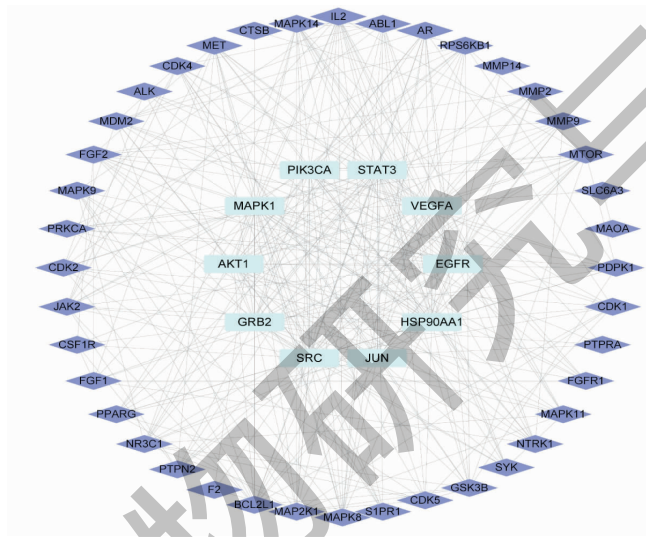


图4 枢纽基因蛋白互作网络

Fig. 4 Hub genes protein-protein interaction (PPI) network

表4 FDPQ 治疗动脉粥样硬化的核心靶点及拓扑参数

Table 4 The core targets of FDPQ for AS treatment and the topological parameters

序号 No.	靶点 Target	度值 Degree	中心度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
1	SRC	34	0.148	0.754
2	STAT3	32	0.074	0.710
3	HSP90AA1	29	0.069	0.690
4	EGFR	28	0.073	0.690
5	MAPK1	28	0.084	0.690
6	JUN	26	0.037	0.653
7	GRB2	26	0.051	0.645
8	AKT1	24	0.027	0.636
9	PIK3CA	21	0.022	0.605
10	VEGFA	21	0.024	0.613
11	IL2	18	0.009	0.583

续表 4 (Continued Tab. 4)

序号 No.	靶点 Target	度值 Degree	中心度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
12	BCL2L1	16	0.034	0.576
13	MAPK14	16	0.009	0.570
14	MAP2K1	16	0.017	0.570
15	MTOR	15	0.010	0.576
16	RPS6KB1	13	0.007	0.563
17	FGF2	13	0.007	0.551
18	JAK2	13	0.006	0.557
19	NR3C1	13	0.006	0.544
20	ABL1	12	0.007	0.544
21	MDM2	12	0.005	0.544

2.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果

为了研究靶基因的生物学功能,对 50 个枢纽基因进行了三种 GO 功能分析,包括生物过程(biological processes, BP)、细胞组分(cellular components, CC)和分子功能(molecular functions, MF),将富集显著的结果可视化($P < 0.01$),见图 5A。BP 主要包括跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路(transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway)、酶联受体蛋白信号通路(enzyme linked receptor protein signaling pathway)、细胞迁移正向调节

(positive regulation of cell migration)等。CC 主要有受体复合物(receptor complex)、黏着斑(focal adhesion)、细胞-基质结(receptor complex)等。MF 主要涉及蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)、磷酸转移酶活性(phosphotransferase activity)等。KEGG 通路富集分析可说明 FDPQ 在治疗 AS 时,作用于何种通路。50 个枢纽基因筛选出了 15 条($P < 0.01$)富集显著且与疾病相关性大的信号通路,结果如图 5B 和表 5 所

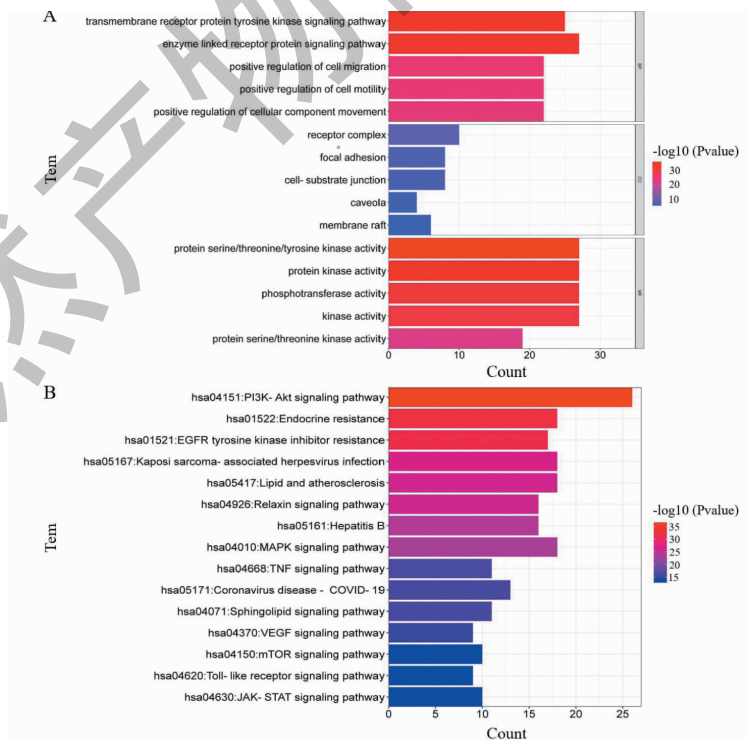


图 5 枢纽基因 GO (A) 和 KEGG (B) 通路分析

Fig. 5 GO (A) and KEGG (B) pathway analysis of hub genes

示。主要信号通路包括 PI3K-Akt 信号通路、脂质和 MAPK 信号通路、VEGF 信号通路等。动脉粥样硬化相关通路 (lipid and atherosclerosis)、

表 5 枢纽基因 KEGG 通路分析

Table 5 KEGG pathway analysis of hub genes

hsa 号 hsa number	通路名称 Pathway name	Log P	富集靶点数 Number of enriched targets
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	-36.6	26
hsa01522	Endocrine resistance	-32.3	18
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-31.7	17
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	-26.6	18
hsa05417	Lipid and atherosclerosis	-25.8	18
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	-23.0	14
hsa04926	Relaxin signaling pathway	-25.7	16
hsa05161	Hepatitis B	-24.0	16
hsa04010	MAPK signaling pathway	-23.3	18
hsa04668	TNF signaling pathway	-16.4	11
hsa05171	Coronavirus disease - COVID-19	-16.2	13
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	-16.1	11
hsa04370	VEGF signaling pathway	-15.3	9
hsa04150	mTOR signaling pathway	-13.1	10
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	-13.0	9
hsa04630	JAK-STAT signaling pathway	-12.9	10

2.4 药物-成分-靶点-疾病-通路网络图

为了进一步筛选 FDPQ 皂苷类成分治疗 AS 的作用机制,利用 Cytoscape 软件构建了药物-成分-靶点-疾病-通路网络图(见图 6),直观地展示了各部分间的关系。此网络由 90 个节点和 470 条边构成,其中包括动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) (粉色圆角方形节点),西洋参 (*Panaxis Quinquefolii Radix*, PQ) (蓝色方形节点),23 个皂苷类化合物 (紫色圆角方形节点),50 个靶点 (红色长方形节点)和 15 条作用通路 (绿色 V 形节点)。以 degree 值筛选关联紧密的节点。G20、G22、G19、G5、G3、G6 度值大,表

明人参皂苷 Rk₃ (G-Rk₃)、人参皂苷 Rh₄ (G-Rh₄)、人参皂苷 Rg₄ (G-Rg₄)、20(R)-人参皂苷 Rh₁ (20(R)-G-Rh₁)、拟人参皂苷 F₁₁ (P-F₁₁)、20(S)-人参皂苷 Rh₁ (20(S)-G-Rh₁)可能是 FDPQ 治疗 AS 的重要成分;STAT3、PIK3CA、MAPK1、AKT1、VEGFA 排名靠前,提示他们是治疗疾病的重要靶点;PI3K-Akt 信号通路、内分泌抵抗 (endocrine resistance)、脂质和动脉粥样硬化相关通路 (lipid and atherosclerosis)、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路则是治疗疾病的重要信号通路。

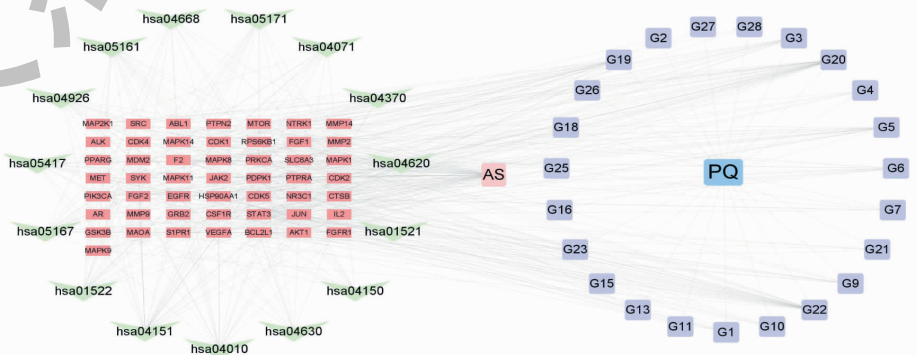


图 6 药物-成分-靶点-疾病-通路网络

Fig. 6 Drug-compounds-targets-disease-pathways network

2.5 分子对接结果和分析

依据前文结果,选择 STAT3、PIK3CA、MAPK1、AKT1、VEGFA 等靶点与 G-Rk₃、G-Rh₄、G-Rg₄、20(R)-G-Rh₁、P-F₁₁、20(S)-G-Rh₁ 进行对接,预测靶点和成分间的结合能力,通过与原配体的对接分数进行比较,来评估化合物和靶点蛋白的亲合力。对接分数如表 6 所示,与原配体相比,6 个化合物均与靶点 VEGFA(原配体 PDB ID: MES)有强烈的亲合力,与靶点 PIK3CA(原配体 PDB ID: VY4)有较好的或与原配体相似的亲合力;G-Rg₄ 与靶点 STAT3(原配体 PDB ID: KQV)、MAPK1(原配体 PDB ID: KE8)展现出较好的亲合力;20(R)-G-Rh₁、P-F₁₁ 和靶点 AKT1(原配体 PDB ID: G4K)的亲合力与原配体的

相似。因此,推测 G-Rk₃、G-Rh₄、G-Rg₄、20(R)-G-Rh₁、P-F₁₁ 可能是 FDPQ 治疗 AS 的主要活性成分,PIK3CA、VEGFA 是主要的潜在靶点。靶点和活性成分的典型对接结果如图 7 所示。其中,20(R)-G-Rh₁ 相较于原配体和靶点 VEGFA 有着最高的对接得分。20(R)-G-Rh₁ 以良好的姿态镶嵌于靶点 VEGFA 的结合区域中,残基 CYS68、ILE46、ASP63、TYP45 在对接过程中发挥了重要作用。残基 ASP63 的羧基与配体的 C₁₂ 羟基氢形成了弱氢键,氢键距离为 4.45 nm;TYR45 的酚羟基与配体的羟基氢形成了弱氢键,氢键距离为 5.48 nm。残基 CYS68 和 ILE46 分别在配体的两端发生了疏水相互作用,见图 7(E-3)。

表 6 活性成分和关键靶点分子对接结果

Table 6 Molecules docking results of active components and key targets

靶点 Target	PDB ID	成分 Component	对接分数 LibDock score
STAT3	6NUQ	KQV	126.376
		G-Rk ₃	126.139
		G-Rh ₄	114.539
		G-Rg ₄	133.739
		20(R)-G-Rh ₁	126.401
		P-F ₁₁	112.378
		20(S)-G-Rh ₁	115.688
PIK3CA	7K6N	VY4	123.867
		G-Rk ₃	143.408
		G-Rh ₄	130.62
		G-Rg ₄	165.429
		20(R)-G-Rh ₁	149.269
		P-F ₁₁	172.014
		20(S)-G-Rh ₁	133.368
MAPK1	6RQ4	KE8	118.072
		G-Rk ₃	106.861
		G-Rh ₄	105.727
		G-Rg ₄	130.091
		20(R)-G-Rh ₁	122.467
		P-F ₁₁	105.612
		20(S)-G-Rh ₁	99.779
AKT1	6HHF	G4K	159.091
		G-Rk ₃	156.694
		G-Rh ₄	111.947
		G-Rg ₄	152.394
		20(R)-G-Rh ₁	168.583
		P-F ₁₁	162.514
		20(S)-G-Rh ₁	118.894
VEGFA	6BFT	MES	72.080
		G-Rk ₃	137.938

续表 5 (Continued Tab. 5)

靶点 Target	PDB ID	成分 Component	对接分数 LibDock score
VEGFA	6BFT	G-Rh ₄	109.290
		G-Rg ₄	121.993
		20(<i>R</i>)-G-Rh ₁	150.279
		P-F ₁₁	131.244
		20(<i>S</i>)-G-Rh ₁	102.906

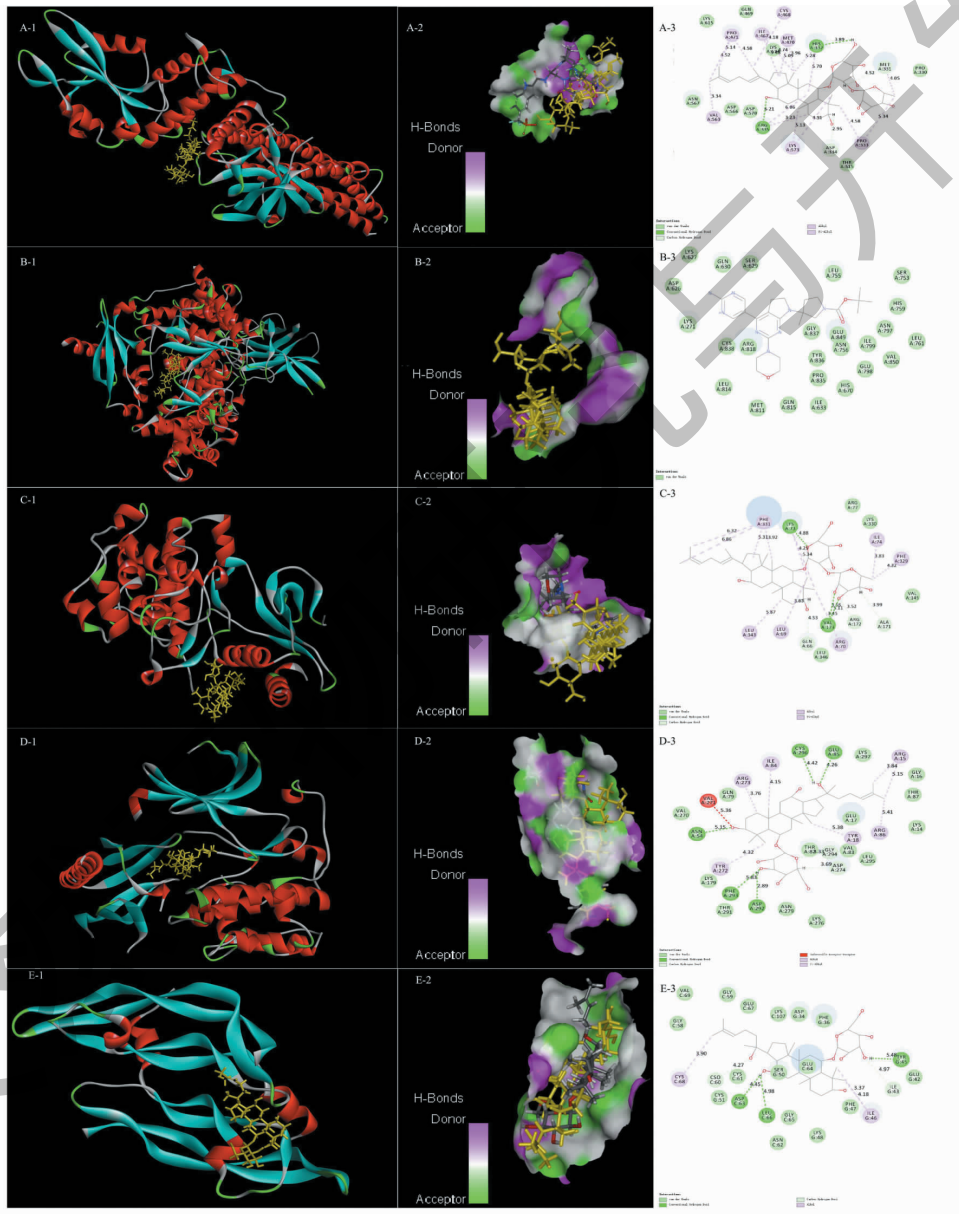


图 7 6 个活性化合物与 5 个靶点蛋白的分子对接作用模式

Fig. 7 The represented results for the action mode of 6 active compounds with 5 targets protein using molecular docking
 注: A-1 ~ A-3: G-Rg₄ 和靶点 STAT3 (6NUQ); B-1 ~ B-3: P-F₁₁ 和靶点 PIK3CA (7K6N); C-1 ~ C-3: G-Rg₄ 和靶点 MAPK1 (6RQ4); D-1 ~ D-3: (R)-G-Rh₁ 和靶点 AKT1 (6HHF); E-1 ~ E-3: 20(*R*)-G-Rh₁ 和靶点 VEGFA (6BFT)。Note: A-1 ~ A-3: Action mode of G-Rg₄ with target STAT3 (6NUQ); B-1 ~ B-3: Action mode of P-F₁₁ with target PIK3CA (7K6N); C-1 ~ C-3: Action mode of G-Rg₄ with target MAPK1 (6RQ4); D-1 ~ D-3: Action mode of 20(*R*)-G-Rh₁ with target AKT1 (6HHF); E-1 ~ E-3: Action mode of 20(*R*)-G-Rh₁ with target VEGFA (6BFT).

2.6 细胞实验验证结果

2.6.1 FDPQ 对 H_2O_2 处理的 PC12 细胞具有保护作用

如图 8A 所示, FDPQ 提取物的浓度在 5、10、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 PC12 细胞无明显的抑制作用, 各组的细胞活力是近似的, 说明提取物在该浓度范围内对 PC12 细胞基本无毒性。因此, 我们选择 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低剂量组)、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (中剂量组)、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (高剂量组) 作为本研究的干预浓度。

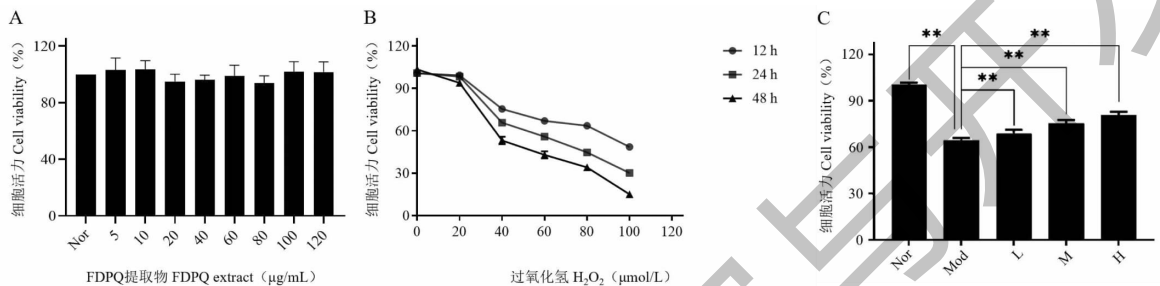


图 8 FDPQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的保护作用

Fig. 8 Protective effects of CPM on H_2O_2 -induced PC12 cells

注: A: FDPQ 对正常 PC12 细胞的影响; B: 不同浓度的 H_2O_2 和处理时间对正常 PC12 细胞的影响; C: FDPQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的影响。Nor: 正常组; Mod: 模型组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组, 下同。与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: A: Effects of FDPQ on cell viability of normal PC12 cells; B: Effects of different concentrations and treatment times of H_2O_2 on cell viability of PC12 cells; C: Effects of FDPQ on cell viability of H_2O_2 -induced PC12 cells. Nor, Mod, L, M, and H represent normal group, model group, low-dose group, medium-dose group, and high-dose group, respectively, the same below. Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6.2 FDPQ 可升高 PC12 细胞线粒体膜电位

线粒体膜电位 (MMP, $\Delta\Psi_m$) 下降被认为是细胞凋亡的早期特征。同时, MMP 在维持线粒体正常生理功能方面亦具有重要意义, MMP 的降低常被作为线粒体功能障碍的重要指标^[13]。JC-1 探针是一种理想的荧光探针, 广泛用于检测细胞 MMP 的变化。在正常的生理条件下, JC-1 聚集在细胞线粒体的基质中, 形成一种能发出红色荧光的聚合物。当 MMP 被还原时, JC-1 不能聚集到线粒体基质上, 以单体形式存在, 发出绿色荧光。通过比较荧光强度的变化可以检测 MMP 的变化 (见图 9)。在 H_2O_2 作用 24 h 后, PC12 细胞的红色荧光显著减弱, 对应的绿色荧光显著增强, 表明细胞发生了 MMP 损失。但与模型组相比, 不同浓度的 FDPQ 提取物 (40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理后, 细胞的红色荧光逐渐增强, 提示 FDPQ 可以降低 H_2O_2 诱导的 MMP 损失。

2.6.3 FDPQ 可降低 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞氧化应激

当细胞出现氧化应激时, 细胞内的抗氧化酶系

图 8B 显示了不同浓度的 H_2O_2 在不同处理时间对 PC12 细胞活力的影响。40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 刺激 24 h 后, PC12 细胞活性下降约 40%, 因此确定本研究的最佳干预浓度为 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 最佳干预时间为 24 h。如图 8C 所示, 与模型组相比, FDPQ 提取物能增加 H_2O_2 处理的 PC12 细胞的细胞活力, 且呈剂量依赖性。表明 FDPQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤具有改善作用。

统会被激活, 抑制活性氧 (ROS) 的过度产生, SOD、CAT 是重要的活性氧清除酶。MDA 是氧化应激引起的脂质过氧化形成的脂质过氧化物, 具有细胞毒性, 会攻击并破坏细胞膜^[14]。MDA 水平检测亦可评估细胞内氧化应激水平^[13]。因此, 为了评价 FDPQ 对 H_2O_2 诱导的氧化应激的影响, 我们检测了 FDPQ 提取物 (40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 干预后 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞中的 MDA 的生成以及 SOD、CAT 的活性。如图 10 所示, 与正常组比较, PC12 细胞在 H_2O_2 刺激 24 h 后, 细胞内 MDA 水平显著升高, FDPQ 预处理可抑制 MDA 的产生, 并具有浓度依赖性 (见图 10A)。此外, H_2O_2 刺激可降低细胞中抗氧化酶 CAT、SOD 的活性, FDPQ 预处理可以提高这些酶的活性 (见图 10B、10C)。上述结果表明, FDPQ 可通过提高活性氧清除酶的活性来降低 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞氧化应激。

2.6.4 FDPQ 可上调相关基因的 mRNA 表达

为了阐明 FDPQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用的分子机制, 采用 qRT-PCR 检测

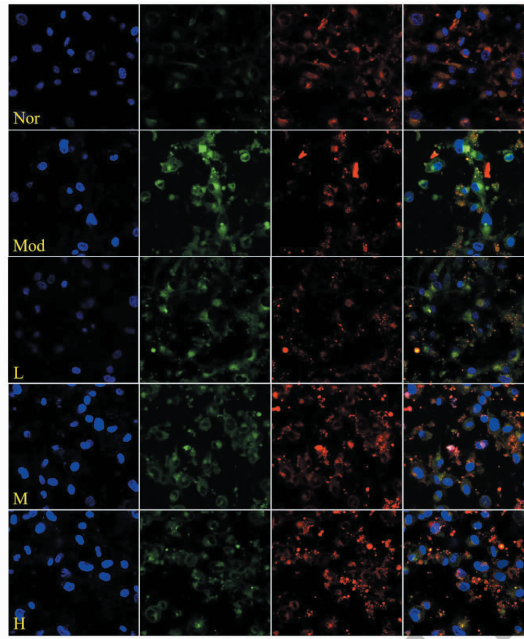


图9 FDPQ对PC12细胞的膜电位的影响

Fig. 9 Effects of FDPQ on mitochondrial membrane potential of PC12 cells

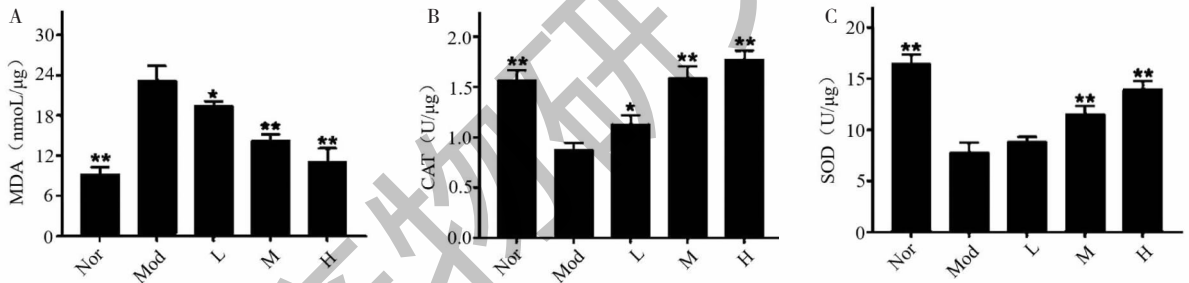


图10 FDPQ对H₂O₂诱导的PC12细胞的MDA水平(A)、抗氧化酶CAT(B)、SOD(C)的活性的影响

Fig. 10 Effects of FDPQ on MDA levels (A), antioxidant enzyme CAT (B), and SOD (C) activities in H₂O₂-induced PC12 cells

相关基因的mRNA表达。如图11所示,与正常组相比,H₂O₂诱导后,PI3K、Akt的mRNA表达显著下调。不同浓度的FDPQ提取物(40、60、80 μg/mL)预处理PC12细胞后,这些基因的mRNA表达较模

型组上调,且具有浓度依赖性。提示FDPQ可能通过调控PI3K/Akt的表达来改善H₂O₂诱导的PC12细胞的氧化损伤。

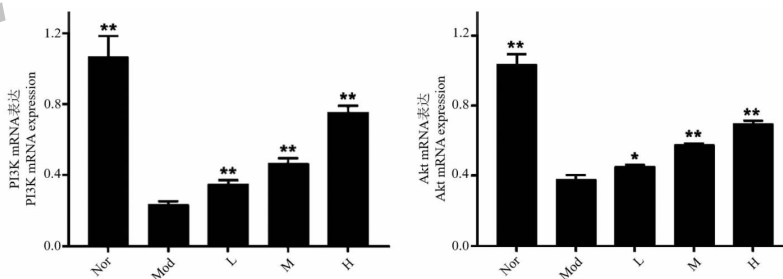


图11 FDPQ对H₂O₂诱导的PC12细胞中PI3K(A)和Akt(B)的mRNA表达的影响

Fig. 11 Effects of FDPQ on mRNA expressions of PI3K (A) and Akt (B) in H₂O₂-induced PC12 cells

3 讨论与结论

目前,每年死于缺血性心脑血管疾病的人数居全球首位,以 AS 引起的心肌梗塞和脑梗塞是死亡率最高的血管类疾病^[15]。课题组前期研究发现,FDPQ 或具有干预或治疗动脉粥样硬化的作用。FDPQ 相较于传统烘干西洋参,部分皂苷类成分含量有所提高,但由于干燥方式机理的不同,尚不确定皂苷类成分种类是否改变;同时,中药数据库中有效成分的信息来源单一,甚至陈旧,不能全面、及时地反映 FDPQ 中所含成分^[16]。因此,本文先通过 UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS 鉴定出 FDPQ 中的皂苷类成分,再以网络药理学结合分子对接探索其治疗 AS 的药效物质和作用机制,并辅以细胞实验进行初步验证。

UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS/MS 分析鉴定出了 28 种人参皂苷,包括人参皂苷 Rb₁、Rc、Rd 等原人参二醇型,人参皂苷 Re、Rh₁、Rg₄ 等原人参三醇型以及奥克梯隆型的拟人参皂苷 F₁₁。基于数据库的筛选,获得 FDPQ 治疗 AS 的候选靶点 117 个,包括 STAT3、EGFR、MAPK1、AKT1、PIK3CA、VEGFA 等 21 个核心靶点。表明 FDPQ 治疗 AS 具有多成分、多靶点的特点。药物-成分-靶点-疾病-通路网络分析显示,人参皂苷 Rk₃、人参皂苷 Rh₄、人参皂苷 Rg₄、拟人参皂苷 F₁₁、20(R/S)-人参皂苷 Rh₁ 等成分关联的靶点较多,可能是 FDPQ 治疗 AS 的重要成分。现有研究表明人参皂苷 Rk₃ 具有抗氧化、抗凋亡和抗炎作用,可显著降低 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的表达,显著降低血清中 AST 和 ALT 水平,减少氧化应激发生^[17]。人参皂苷 Rg₄ 可显著清除 ROS,抑制 ROS 诱导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的激活,有助于维持内皮细胞的完整性^[18]。拟人参皂苷 F₁₁ 是西洋参的特有成分,研究表明其可通过减轻自噬/溶酶体缺陷和抑制钙超载,对中风起到神经保护作用,亦可通过激活 BDNF/TrkB 通路,改善脑卒中后长期神经功能损伤,促进脑卒中后神经发生,尤其是在缺血性脑卒中的慢性康复中有着巨大的潜在作用^[19]。GO 和 KEGG 富集结果提示 FDPQ 治疗 AS 的机制主要与 PI3K-Akt 信号通路、内分泌抵抗(endocrine resistance)、脂质和动脉粥样硬化相关通路(lipid and atherosclerosis)、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路等相关,显示出 FDPQ 治疗 AS 具有多靶点、多途径的特点。分子对接结果表明活性成分与潜在靶点具有较好的结合

活性,网络药理学的分析结果具有一定的可靠性。

越来越多的研究支持 AS 是一种始于血管内皮损伤的慢性炎症疾病^[20],相关炎症是由促炎细胞因子、炎症信号通路、生物活性脂质和黏附分子介导的。近年来的研究证实,PI3K/Akt 信号通路在炎症反应中起着重要作用。PI3K 是一类特异性催化磷脂酰肌醇脂类物质的蛋白激酶,Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,又称蛋白激酶 B。PI3K 特异性催化 PI 产生的 PIP3 可使 Akt 完全活化,从而引起 PI3K/Akt 信号传导通路的级联反应,如调节 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的释放^[21]。调控这些信号通路可以达到抑制炎症反应,改善氧化应激损伤,减轻脂质沉积和内皮损伤的作用^[22]。NF- κ B 通路的激活在炎症反应中起着重要作用^[23]。蛋白激酶 MAPK 是转导信号引起细胞反应的重要物质。MAPK 家族亚系 p38MAPK 应激敏感性激酶被激活后,可通过磷酸化或促炎细胞因子(如 TNF- α)来活化 NF- κ B,NF- κ B 被激活后亦通过其产生的促炎细胞因子反向激活 p38MAPK,二者间的双向作用加速了 AS 的发展^[24]。血管内皮生长因子(VEGF)由多种细胞分泌,并与内皮细胞中的同源酪氨酸激酶 VEGF 受体(VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)结合,产生各种下游效应,促进新生血管的形成及血管内皮细胞的生长,进而促进心脏或脑组织缺血再灌注后的功能恢复^[25]。VEGF-Akt 是经典的促进内皮细胞增殖、抑制细胞凋亡和促进血管新生的信号通路。研究显示,VEGF 通过下游的 PI3K-Akt 信号级联,以 BAD 途径抑制细胞凋亡,以 mTORC2 和 FOXO1 促进内皮细胞增殖和血管新生^[26]。在本研究中,对筛选出的可能机制展开了体外细胞实验验证,结果表明 FDPQ 可升高 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞的线粒体膜电位,提高 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性,降低细胞内 MDA 水平,同时上调 PI3K/Akt 的表达,提示 FDPQ 治疗动脉粥样硬化可能与其改善氧化损伤、抑制凋亡和炎症有关。

本研究初步阐释了 FDPQ 治疗 AS 多成分、多靶点、多途径的作用机制,但仍需进一步的实验验证。同时,本研究的另一个局限性是未包括多糖、蛋白质等大分子化合物,亦需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(8): C7-C12.

- 2 Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 535-546.
- 3 Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124: 315-327.
- 4 Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2019, 29: 468-472.
- 5 Lin HQ, Li YP, Liu JP. Research progress on identification, chemical constituents and pharmacological effects of wild American ginseng [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 2157-2162.
- 6 Fan W, Huang Y, Zheng H, et al. Ginsenosides for the treatment of metabolic syndrome and cardiovascular diseases: pharmacology and mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110915.
- 7 Yang Y, Zhao DQ, Li JQ, et al. Analysis of saponins of American ginseng under different drying methods based on fingerprint and chemometric method [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2021, 39(10): 21-25.
- 8 Zhang YH, Zhou XQ, Wu DH, et al. Study on mechanism of Sijunzi decoction in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 313-321.
- 9 Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1523.
- 10 Huang X, Liu Y, Zhang Y, et al. Multicomponent assessment and ginsenoside conversions of *Panax quinquefolium* L. roots before and after steaming by HPLC-MSⁿ [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(1): 27-37.
- 11 Sun BS, Xu MY, Li Z, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis for steaming times-dependent profiling of steamed *panax quinquefolius* and its ginsenosides transformations induced by repetitious steaming [J]. *J Ginseng Res*, 2012, 36(3): 277-290.
- 12 Chen Y, Zhao Z, Chen H, et al. Chemical differentiation and quality evaluation of commercial Asian and American ginsengs based on a UHPLC-QTOF/MS/MS metabolomics approach [J]. *Phytochem Anal*, 2015, 26(2): 145-160.
- 13 Li RL, Zhang Q, Liu J, et al. Hydroxy- α -sanshool possesses protective potentials on H₂O₂-stimulated PC12 cells by suppression of oxidative stress-induced apoptosis through regulation of PI3K/Akt signal pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3481758.
- 14 Cui MY, Yin YF, Zhu FM, et al. Effects of FVGL on levels of SOD, MDA and GSH-Px in rats with oxidative damage induced by d-galactose [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医学报), 2021, 49(12): 47-51.
- 15 Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 531-534.
- 16 Chen J, Chen QL. Current situation and thinking of network pharmacology in the research of traditional Chinese medicine [J]. *J Shanghai Univ Chin Med* (上海中医药大学学报), 2021, 35(5): 1-6.
- 17 Qu L, Zhu Y, Liu Y, et al. Protective effects of ginsenoside Rk₃ against chronic alcohol-induced liver injury in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 126: 277-284.
- 18 Lee YH, Choi HJ, Kim JY, et al. Ginsenoside Rg₄ enhances the inductive effects of human dermal papilla spheres on hair growth via the AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31: 933-941.
- 19 Yuan L, Sun S, Pan X, et al. Pseudoginsenoside-F₁₁ improves long-term neurological function and promotes neurogenesis after transient cerebral ischemia in mice [J]. *Neurochem Int*, 2020, 133: 104586.
- 20 Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 80.
- 21 Xie YZ, Ma J, Zou X. Effect of PI3K/Akt signal pathway crosstalk in myocardial ischemia reperfusion injury and prevention and treatment with traditional Chinese medicine therapy [J]. *Chin Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26(24): 201-210.
- 22 Lin Q. Study on the mechanism of the compatibility of American ginseng and salvia miltiorrhiza in regulating PI3K/Akt/NF- κ B pathway to stabilize atherosclerotic vulnerable plaques [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2021.
- 23 Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- 24 Zhao YF, Pan SJ, Gao ZZ, et al. Research progress in inflammatory signaling pathways of atherosclerosis [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis* (中华老年心脑血管病杂志), 2014, 16: 1332-1334.
- 25 Karaman S, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease [J]. *Development*, 2018, 145(14): dev151019.
- 26 Xiang BX, Liu TT, Sun FL, et al. Advances in research on VEGF-related signaling pathways in angiogenesis [J]. *Chin J Comp Med* (中国比较医学杂志), 2015, 25(12): 81-86.