

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0925-14

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240406

## 基于消斑通脉方抗动脉粥样硬化作用机制的网络药理学分析和体外实验验证

曹珊<sup>1</sup>, 张艺嘉<sup>2</sup>, 白杨<sup>3</sup>, 陈芳<sup>4</sup>, 谢莎<sup>4</sup>, 韩倩倩<sup>5</sup>

(1. 河南中医药大学中医学院方剂教研室, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学教务处, 河南 郑州 450046; 3. 河南中医药大学研究生院, 河南 郑州 450046; 4. 河南中医药大学医学院病理生理学教研室, 河南 郑州 450046; 5. 河南中医药大学基础实验中心, 河南 郑州 450046)

**[摘要]** **目的:** 利用网络药理学分析方法初步预测消斑通脉方抗动脉粥样硬化(AS)的潜在作用通路和靶点, 联合体外细胞实验对其可能机制进行验证。**方法:** 采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、GeneCards、Swiss Target Prediction和Uniprot等数据库, 收集消斑通脉方中活性化合物及对应靶点信息, 构建“成分-靶点-疾病”网络, 通过蛋白-蛋白互作(PPI)网络预测可能的作用靶点和通路, 对交集靶点进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。体外培养人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMCs)并鉴定, 采用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导HA-VSMCs异常增殖并进行鉴定。MTT法检测不同浓度消斑通脉方作用后各组HA-VSMCs增殖活性, 确定消斑通脉方安全性。HA-VSMCs分为空白组、模型组(诱导HA-VSMCs异常增殖)、瑞舒伐他汀组(诱导HA-VSMCs异常增殖后采用 $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 瑞舒伐他汀干预)及低、中和高剂量消斑通脉方组(诱导HA-VSMCs异常增殖后分别采用 $0.025$ 、 $0.050$ 和 $0.100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 消斑通脉方干预)。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组HA-VSMCs培养上清中人单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、白细胞介素6(IL-6)和白细胞介素8(IL-8)水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组HA-VSMCs中核因子 $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ ) p65 mRNA和成纤维细胞生长因子2(FGF2) mRNA表达水平, Western blotting法检测各组HA-VSMCs中NF- $\kappa\text{B}$  p65和FGF2蛋白表达水平。**结果:** 消斑通脉方中含有103种活性成分, 可通过作用于189个靶基因发挥抗AS作用, 潜在作用靶点包括IL-6、IL-8、血管内皮生长因子A(VEGFA)、核因子 $\kappa\text{B}1$ (NF- $\kappa\text{B}1$ )和RELA(NF- $\kappa\text{B}$  p65)等。GO功能分析和KEGG信号通路富集分析, 消斑通脉方通过调节脂质、缺氧诱导因子1(HIF-1)、表皮生长因子(EGF)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)和NF- $\kappa\text{B}$ 等信号通路发挥抗AS作用。细胞形态表现和免疫荧光染色结果证明细胞为HA-VSMCs。油红O染色, 可观察到大量红色脂滴, 表明造模成功。MTT法检测, 在一定剂量范围内消斑通脉方对HA-VSMCs增殖率无明显影响, 安全性良好。ELISA法检测, 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组HA-VSMCs培养上清中MCP-1和IL-6水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),  $0.050$ 和 $0.100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 消斑通脉方组HA-VSMC培养上清中IL-8降低( $P<0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 不同剂量消斑通脉方组HA-VSMCs培养上清中MCP-1降低( $P<0.01$ ),  $0.050$ 和 $0.100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 消斑通脉方组HA-VSMCs培养上清中IL-8降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, 瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组HA-VSMCs中NF- $\kappa\text{B}$  p65 mRNA表达水平降低( $P<0.01$ ), 瑞舒伐他汀组及 $0.050$ 和 $0.100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 消斑通脉方组HA-VSMCs中FGF2 mRNA表达水平降低( $P<0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较,  $0.050$ 和 $0.100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 消斑通脉方组HA-VSMCs中NF- $\kappa\text{B}$  p65和FGF2 mRNA表达水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模

[收稿日期] 2023-06-30

[基金项目] 河南省科技厅科技攻关项目(232102310434); 河南省科技厅面上科学基金项目(242300421295); 河南省卫健委中医药科学研究重大专项项目(2022ZYD20); 河南省卫健委中医药科学研究重点项目(2023ZY1031); 崔应民全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)

[作者简介] 曹珊(1978—), 女, 北京市人, 教授, 医学博士, 主要从事方剂配伍规律和作用机制方面的研究。

[通信作者] 曹珊, 教授, 博士研究生导师(E-mail: caoshan2000@163.com)

型组比较, 瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 FGF2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ )。结论: 消斑通脉方具有抗炎、抑制 HA-VSMCs 增殖和抗 AS 作用, 其作用机制可能与 NF- $\kappa$ B/FGF2 通路失活有关。

[关键词] 消斑通脉方; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 网络药理学; 细胞增殖

[中图分类号] R285.5; R541.4 [文献标志码] A

## Network pharmacological analysis and *in vitro* experimental verification based on anti-atherosclerosis mechanism of Xiaoban Tongmai Formula

CAO Shan<sup>1</sup>, ZHANG Yijia<sup>2</sup>, BAI Yang<sup>3</sup>, CHEN Fang<sup>4</sup>, XIE Sha<sup>4</sup>, HAN Qianqian<sup>5</sup>

(1. Department of Formula, School of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Department of Academic Affairs, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Graduate School, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Department of Pathophysiology, School of Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 5. Basic Experimental Center, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT Objective:** To preliminarily predict the potential pathways and targets of Xiaoban Tongmai Formula in anti-atherosclerosis (AS) by network pharmacology analysis, and to verify its possible mechanism combined with *in vitro* cell experiment. **Method:** The databases including Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), GeneCards, Swiss Target Prediction, and Uniprot were used to collect the information on active compounds and corresponding targets of Xiaoban Tongmai Formula to construct the “compound-target-disease” network. The potential targets and pathways were predicted by protein-protein interaction (PPI) network, and the intersection targets were subjected to Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMCs) were cultured and identified *in vitro*, and the abnormal proliferation of HA-VSMCs were induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and identified; MTT method was used to detect the proliferation activities of the HA-VSMCs in various groups after treated with different concentrations of Xiaoban Tongmai Formula; the safety of Xiaoban Tongmai Fang was confirmed. The HA-VSMCs were divided into blank group, model group (the abnormal proliferation of HA-VSMCs was induced), rosuvastatin group (treated with 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  rosuvastatin after inducing the abnormal proliferation of HA-VSMCs), and low, medium, and high doses of Xiaoban Tongmai Formula groups (treated with 0.025, 0.050, and 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Xiaoban Tongmai Formula after inducing the abnormal proliferation of HA-VSMCs); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8) in supernatant of the HA-VSMCs in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) p65 mRNA and fibroblast growth factors 2 (FGF2) mRNA in the HA-VSMCs in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and FGF2 proteins in the HA-VSMCs in various groups.

**Results:** Xiaoban Tongmai Formula contained 103 active ingredients that exert anti-AS effect by acting on 189 target genes. The potential targets included IL-6, IL-8, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), nuclear factor kappa B1(NF- $\kappa$ B1), and RELA (NF- $\kappa$ B p65). The GO functional analysis and KEGG pathway enrichment analysis results showed that Xiaoban Tongmai Formula exerted anti-AS effects by regulating lipid metabolism, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), epidermal growth factor (EGF), phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt), and NF- $\kappa$ B signaling pathways. The cell morphology and immunofluorescence staining results confirmed that the cells were HA-VSMCs. The oil red O staining results showed numerous red lipid droplets, indicating successful modeling. The MTT assay results showed that Xiaoban Tongmai Formula had no significant effect on the proliferation rate of HA-VSMCs within a certain dose range, indicating good safety. The ELISA results showed that compared with model group, the levels of MCP-1 and IL-6 in supernatant of the HA-VSMCs in rosuvastatin group and different doses of Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and the levels of IL-8 in supernatant of the HA-VSMCs in 0.050 and 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ); compared with rosuvastatin group, the levels of MCP-1 in supernatant of the HA-VSMCs in different doses of Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ), and the levels of IL-8 in supernatant of the HA-VSMCs in 0.050 and 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in the HA-VSMCs in rosuvastatin group and different doses of Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of FGF2 mRNA in the HA-VSMCs in rosuvastatin group and 0.050 and 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ); compared with rosuvastatin group, the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and FGF2 mRNA in the HA-VSMCs in 0.050 and 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with model group, the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and FGF2 proteins in the HA-VSMCs in rosuvastatin group and different doses of Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ); compared with rosuvastatin group, the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 protein in the HA-VSMCs in 0.050 and 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula groups were decreased ( $P<0.01$ ), and the expression level of FGF2 protein in the HA-VSMCs in 0.100 mg·L<sup>-1</sup> Xiaoban Tongmai Formula group was decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Xiaoban Tongmai Formula has anti-inflammatory effect, inhibitory effect on the proliferation of HA-VSMCs, and anti-AS effect, and its mechanism may be related to the inactivation of NF- $\kappa$ B/FGF2 pathway.

**KEYWORDS** Xiaoban Tongmai Formula; Atherosclerosis; Vascular smooth muscle cell; Network pharmacology; Cell proliferation

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是多数心脑血管疾病的基础病变, 主要病理过程是血管内皮慢性损伤和脂质浸润等使内皮下泡沫细胞积累, 进而平滑肌细胞泡沫化, 逐渐形成斑块, 最终参与血管钙化的形成<sup>[1]</sup>, 其发生发展与血管内皮细胞功能障碍、氧化应激、脂质代谢异常、糖尿病、管壁压力增高和异常剪切力等因素有密切关联<sup>[2]</sup>。AS 缓慢发展, 可导致颈动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病) 和心肌纤维化等, 甚至斑块继发不稳定性出血, 甚至斑块破裂, 导致动脉血栓, 患者可出现眩晕和心绞痛甚至心脏骤停等临床表现<sup>[3]</sup>。现代医学对于 AS 的治疗以抗凝血、调

脂、抗炎和预防血栓为主, 常靶向预防斑块破裂, 采用抗氧化剂、降脂药和钙通道阻滞剂等治疗<sup>[4]</sup>, 但临床效果欠佳, 虽能减缓疾病的进程, 但不良反应较多。中医药防治 AS 在控制症状、降低病死率和再住院率方面有明显优势<sup>[5]</sup>, 近年来中医药疗法辅助治疗 AS 等心脑血管类疾病临床效果较好, 中药复方汤剂、中成药、中药注射液和针灸等均有临床应用价值<sup>[6]</sup>。中医治疗多从活血化瘀、化痰降浊、扶助正气和痰瘀共治等方面入手<sup>[7]</sup>, 立足整体, 全面调节机能, 强调辨证论治, 且中药具有多途径和多环节干预的综合优势, 可更好地防治 AS。

消斑通脉方是第六批全国老中医专家学术经验

继承工作指导老师崔应民教授团队的自拟方,由西洋参、蒸首乌、生水蛭、丹参、三七、瓜蒌皮和天麻组成,有化痰祛瘀通络和益气补虚扶正的功效,对于AS导致的斑块形成和冠心病等心脑血管疾病临床疗效确切。实验研究<sup>[8-16]</sup>已证明:消斑通脉方中的中药及其中所含成分具有降脂、抗炎、抗氧化和抑制血小板聚集等作用。阐明复方消斑通脉方作用机制,对于防治AS相关心脑血管疾病具有重要意义。消斑通脉方已在临床上应用数十年,疗效确切,但其作用机制尚未明确。本文作者采用网络药理学方法和体外实验分析消斑通脉方对于AS的潜在作用机制,主要从核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)信号通路相关因子和成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)表达情况探讨AS炎症病理过程,初步阐明消斑通脉方抗AS的机制,为其防治AS提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 消斑通脉方活性成分和相应靶点筛选** 本研究应用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<https://tcmsp-e.com/>)搜索消斑通脉方组成中药西洋参、何首乌、水蛭、丹参、三七、瓜蒌皮和天麻,根据药代学调整标准,满足中药口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性(drug-likeness, DL) $\geq 0.18$ 筛选出有效化学成分和对应的靶点基因信息;TCMSP中无法搜索到的中药以评分(Score) $\geq 30$ 且 $P \geq 0.05$ 为条件,于基于网络药理学信息分析工具的中药分子作用机制分析系统(Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Chemnaism of Traditional Chinese Medicine, BATMAN-TCM)(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)再次进行搜索。各数据库中未收录的中药或成分,首先查阅文献获取有效成分结构<sup>[14]</sup>,再应用Swiss Target Prediction数据库(<http://old.swisstargetprediction.ch/>)进行靶点预测。

**1.2 疾病靶点收集** 以“atherosclerosis”为检索词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)中收集Score $\geq 1$ 的AS相关靶点和在线人类孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)数据库(<https://omim.org/>)中推荐的AS相关靶点,进行汇总去除重复信息。

**1.3 中药-活性化合物-靶点网络构建** 通过Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)中“Retrieve/ID mapping”将蛋白名称转化为基因名称,利用该数据库再次筛选和规范名称,去掉无法查询到及未经验证人类(Human)靶点信息。将药物与疾病的交集靶点及药物活性化合物制作成Network和Type表格文件,导入Cytoscape 3.8.2中绘制网络关系图。

**1.4 构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络和Hub基因网络** 将交集靶点上传至STRING 11.5数据库(<https://www.string-db.org/>)中,选择物种为人源(Homo Sapiens),最低相互作用阈值设定为高置信度0.7,证据类型设置为来源于实验、数据库和共表达等,建立PPI网络。将PPI网络tsv文件导入Cytoscape 3.8.2软件,应用CytoHuuba插件绘制Hub基因网络图。

**1.5 消斑通脉方对AS作用靶点的富集分析** 将交集靶点上传至DAVID Bioinformatics Resources数据库,进行基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析,将结果保存至Excel表格中进行处理,于微生信在线网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化分析。

**1.6 实验细胞、主要材料和仪器** 人主动脉血管平滑肌细胞(human aortic vascular smooth muscle cells, HA-VSMCs)购于上海一研科技有限公司,细胞复苏后传代至3~5代备用。消斑通脉方购于张仲景大药房郑州市学理路店,其组成成分为西洋参15g、生水蛭10g、蒸首乌12g、丹参15g、三七8g、瓜蒌皮15g和天麻10g。按上述组成称取消斑通脉方2付(约为172.8g),将其中6味药西洋参、丹参、蒸首乌、三七、瓜蒌皮和天麻用70%乙醇回流提取2次,每次1.5h;同时将生水蛭用纯水回流提取2次,每次1.5h。提取结束后将上述各溶液混匀,真空抽滤滤去残渣,置于旋转蒸发器中45℃减压回收,待液体出现黏稠和挂壁且浓缩液体积剩余1/5时停止浓缩,将其置于蒸发皿内于真空烘箱中恒温干燥成稠膏状,在真空冷冻干燥机内冷冻干燥,将冻干后的消斑通脉方刮药,粉碎细化制备成冻干粉,-20℃储存备用。精密称取100mg冻干粉于10mL离心管内,加入5mL DMEM培养基充分溶解,应用0.22 $\mu$ m滤膜除菌后得到浓度为20g $\cdot$ L<sup>-1</sup>

药液, 后续进行稀释即可。单核细胞趋化因子1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒和白细胞介素8 (interleukin-8, IL-8) ELISA 试剂盒均购自武汉云克隆科技股份有限公司, 氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 购于广州奕源生物科技有限公司, 瑞舒伐他汀粉购自上海源叶生物科技有限公司, 4%多聚甲醛组织固定液、Triton X-100、5%BSA 封闭液、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液和抗荧光衰减封片剂购于北京索莱宝科技有限公司, 油红O染液购于美国Sigma公司, 苏木素染液购于南京凯基生物科技发展有限公司, NF- $\kappa$ B p65一抗 (货号: 3033S) 购于美国CST公司, FGF2一抗 (货号: ab208687) 购于英国Abcam公司, 内参Lamin B抗体 (货号: bs-23709R) 和 $\beta$ -actin抗体 (货号: bsm-33034M) 购于北京博奥森生物技术有限公司, 二抗山羊抗小鼠IgG (货号: LF101) 购于上海雅酶生物医药科技有限公司, 二抗山羊抗兔IgG (货号: STAR208P) 购于北京安诺伦生物技术有限公司, 核蛋白提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。旋转蒸发仪 (型号: EYEL4N-1100) 购于上海爱朗仪器有限公司, 循环水式多用真空泵 (型号: SHZ-D) 购于郑州科丰仪器设备有限公司, 真空冷冻干燥机购于南京载智自动化设备有限公司, 细胞微孔成像检测仪 (型号: C5) 购于美国BioTeK公司, 低温离心机 (型号: Sorvall ST 16R) 购于美国Thermo公司, 激光共聚焦 (型号: FV1200) 购于日本Olympus公司, 凝胶成像系统 (型号: ChemiDoc MP) 购于美国Bio-Rad公司, 7500fast PCR仪 (型号: 9700) 购于美国ABI公司。

**1.7 HA-VSMCs 鉴定** 取生长状态良好的HA-VSMCs, 以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞的密度接种于12孔细胞培养板中, 次日细胞生长状态良好即可用于实验。从细胞培养板中取出盖玻片, 用PBS缓冲液漂洗3次, 每次2 min, 用4%多聚甲醛组织固定液固定30 min, PBS缓冲液清洗3次, 每次5 min。以含5%BSA和PBST的封闭液封闭, 室温封闭1 h。一抗孵育: 吸弃封闭液, 加入一抗200  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C反应过夜。二抗孵育: 取出反应后的12孔细胞培养板, 用PBS缓冲液漂洗3次, 避光

条件下加入荧光标记的二抗稀释液每孔200  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C避光反应1 h。PBS漂洗3次, 终止反应, 每孔加入DAPI 200  $\mu$ L, 室温避光孵育5 min。PBS缓冲液漂洗3次, 以抗荧光猝灭封片液封片, 置于荧光显微镜下观察HA-VSMCs形态表现。

**1.8 ox-LDL 浓度筛选** 取对数期HA-VSMCs, 96孔细胞培养板中每孔加入200  $\mu$ L细胞悬液 (5 000个细胞), 置于培养箱中预培养, 分为空白组和不同浓度 (0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0和0.200 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ox-LDL组。24 h后每孔加入含不同浓度ox-LDL的完全培养基100  $\mu$ L。继续培养细胞, 24 h后取出细胞培养板, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液并混匀, 培养箱孵育4 h。采用酶标仪检测450 nm波长处吸光度 (A) 值, 以A值代表各组细胞增殖活性。

**1.9 油红O染色法鉴定HA-VSMCs表型转换** 取适量第4~10代处于对数生长期的HA-VSMCs, 以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞的密度接种至12孔细胞培养板培养24 h后, 分别在空白组和模型组孔中加入1 mL完全培养基和含0.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL的1 mL完全培养基, 培养24 h, PBS缓冲液清洗2次, 每孔加入4%多聚甲醛组织细胞固定液1 mL固定20~30 min, 再用PBS缓冲液清洗3次, 加入60%异丙醇分化5 s, 迅速用PBS缓冲液清洗2次, 加入新配制的油红O染色工作液, 20~30 min后移去染色液, 加入苏木素染液, 2 min后用PBS缓冲液清洗, 置于倒置显微镜下观察细胞形态表现并拍照。

#### 1.10 MTT 法检测各组 HA-VSMCs 增殖活性

①取对数生长期HA-VSMCs, 以每孔5 000个细胞的密度接种至96孔细胞培养板中培养24 h后, 按以下分组方法进行处理: 空白组, 加含10%血清的完全培养基; 不同剂量消斑通脉方组, 分别加入含0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.800和1.600  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 消斑通脉方的完全培养基200  $\mu$ L。

②取对数生长期HA-VSMCs, 以每孔5 000个细胞的密度接种至96孔细胞培养板, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 条件下培养至融合度70%~80%, 按以下分组方法进行处理: 空白组, 加入含10%血清的完全培养基; 模型组, 加入含100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL的完全培养基; 瑞舒伐他汀组, 加入含100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL和4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 瑞舒伐他汀的完全培养基; 消斑通脉方组, 加入含100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL和不同剂量 (0.025、0.050、0.100、0.200、0.400和0.800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

消斑通脉方的完全培养基。③37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后取出细胞培养板,弃上清,每孔加入新鲜配制的0.005 g·L<sup>-1</sup> MTT 100 μL,孵育4 h。每孔中加入150 μL二甲基亚砷,孵育20 min,采用酶标仪检测490 nm波长处吸光度(A)值,以A值代表各组细胞增殖活性。

**1.11 ELISA法检测各组HA-VSMCs培养上清中MCP-1、IL-6和IL-8水平** 将HA-VSMCs以每孔5 000个细胞的密度接种至96孔细胞培养板中,待细胞贴壁生长至密度70%~80%时,按以下分组方法进行处理:空白组,加入含10%血清的完全培养基;模型组,加入含0.1 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL的完全培养基;瑞舒伐他汀组,加入0.1 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL和4 μmol·L<sup>-1</sup>瑞舒伐他汀的完全培养基;消斑通脉方组,加入含0.1 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL和不同剂量消斑通脉方(0.025、0.050和0.100 mg·L<sup>-1</sup>)的完全培养基。37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后取出细胞培养板,取各组细胞培养上清,离心20 min,留取上清,采用ELISA法检测各组HA-VSMCs培养上清中MCP-1、IL-6和IL-8水平。

**1.12 RT-qPCR法检测各组HA-VSMCs中NF-κB p65和FGF2 mRNA表达水平** 细胞分组见“1.11”。收集空白组、模型组、瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组HA-VSMCs,弃上清,加入TRIzol提取细胞RNA,检测提取的RNA样本浓度和纯度。RNA样本65℃变性5 min,结束后立即放于冰上冷却。根据反转录试剂ReverTra Ace qPCR RT Kit (FSQ-101)说明书进行反转录操作。试剂取出冰上融化,反应体系:在PCR管中加入2×ChamQ Universal SYBR qPCR MasterMix 10 μL、Primer 1/2各0.4 μL和模板cDNA 50 ng,无菌无酶水补至20 μL(需在冰上操作)。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃延伸30 s,40个循环。NF-κB p65引物序列:上游5'-ATGTGG-AGATCATTGAGCAG-3',下游5'-CCTGGTCC-TGTGTAGCCATT-3'; FGF2引物序列:上游5'-TCCACCTATAATTGGTCAAAGTGGT-3',下游5'-CATCAGTTACCAGCTCCCC-3'; GAPDH引物序列:上游5'-TCAAGATCATCAGCAAT-GCC-3',下游5'-CGATACCAAAGTTGTCAT-GGA-3'。使用PCR仪默认溶解曲线采集程序。反应结束后,导出所有数据,分析结果。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因mRNA表达水平。

**1.13 Western blotting法检测各组HA-VSMCs中NF-κB p65和FGF2蛋白表达水平** 将HA-VSMCs以每孔3×10<sup>4</sup>个细胞的密度接种到6孔细胞培养板,细胞生长至融合度80%后进行分组,分组方法见“1.11”。加药培养24 h后,采用蛋白裂解液裂解细胞并提取细胞核蛋白,BCA法测定蛋白浓度,计算样品蛋白浓度,上样后电泳提前准备合适大小的PVDF膜,浸于甲醇中,电泳结束后,小心撬开玻璃板,根据需要切除周围胶,将分离胶放置于经电转液浸泡后的滤纸上,覆盖之前剪好的PVDF膜。连接正负极,打开电源,转膜,用1×TBST缓冲液将PVDF膜清洗1遍,置于1×丽春红染液中染色3~5 min。1×TBST缓冲液中清洗3次,加入一抗(稀释比例均为1:1 000)。4℃孵育过夜,PVDF膜转移至相应的二抗(稀释比例均为1:2 000)抗体孵育盒中,室温孵育2 h。洗膜,ECL显色,使用凝胶成像系统设置,拍照并分析结果,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.14 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性及细胞培养上清液中MCP-1、IL-6和IL-8水平,各组细胞中NF-κB p65和FGF2 mRNA及蛋白表达水平,进行正态性和方差齐性检验,均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 消斑通脉方活性成分和靶基因** 经查阅文献,联合TCMSP、BATMAN-TAM和Swiss Target Prediction数据库共筛选出丹参有效成分59种,对应靶点基因927个;三七有效成分7个,对应靶点基因237个;西洋参有效成分9个,对应靶点基因76个;瓜蒌皮有效成分6个,对应靶点基因50个;水蛭有效成分22个,对应靶点基因282个;何首乌有效成分3个,对应靶点基因30个;天麻有效成分5个,对应靶点基因36个。将成分分别命名,如某种有效成分来源于丹参,命为“DS1”“DS2”“DS3”等以此类推,某些有效成分属于西洋参,则命名为“XYS1”“XYS2”“XYS3”等;若某种成分在2种以上中药里均被发现,即为药物的共有成分,分别命名为A、B、C和D。本研究部分重要成分和对应靶点信息见表1。

表1 消斑通脉方重要成分和对应靶点

Tab.1 Important components of Xiaoban Tongmai Formula and corresponding targets

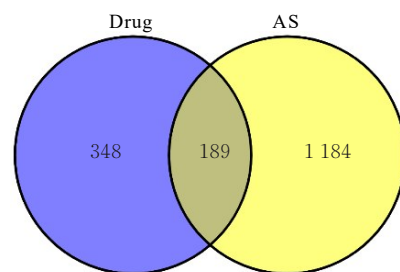
Herb	Ingredient	Name	Representative target
Salvia miltiorrhiza	Miltirone	DS49	MAPK9, ANG, SOD, JUN
	Dan-shexinkum D	DS8	AR, NOS2, PPARG
	Luteolin	DS51	AKT1, EGFR, IL-10, IL-6
	Tanshinone II A	DS25	NCOA1, FOS, MYC
	Cryptotanshinone	DS29	RELA, PTGS2, STAT3
	Prolithospermic acid	DS41	NOS2, PTGS1, ESR1
Pseudo-ginseng	Stigmasterol	SQ4	PTGS2, PLAU
	Quercetin	SQ5	PLAT, BCN5A, TNF, CXCL8
Panax quinquefolius	Papaverine	XYS2	APOA1, APOE, APOC1
	Daucosterol_qt	XYS5	PGR, NCOA2
Trichosanthes peel	Naphthalene	GLP4	NF- $\kappa$ B1, IL-6
	Methyl Palmitate	GLP3	NPR1, NPR2, NPR3, AR
Hirudo	Cholesterol	SZ4	PPARA, PPARG, PRKCG
	Adenosine	SZ2	DDP4, SRC, MAPK1
	Methyl 14-methylpentadecanoate	SZ11	JAK2, APOE, IDH1
	Methyl 11-methylhexadecanoate	SZ8	CA2, CA1, VDR, FABP4
Polygonum multiflorum	Tetrahydroxytaxadiene	HSW1	ESR1, PGR, VDR
	Fetidine	HSW2	HTR2A, DRD2
Gastrodia elata	p-Hydroxybenzyl alcohol	TM2	PTGS2, PPARG, IL-1B
	M-Hydroxybenzoic Acid	TM3	PPARG, MAPK9, IL-1B
Drug share ingredient	Ginsenoside rh2	A	BAX, TNF, NF- $\kappa$ BIA, IL-1B
	20-Hexadecanoylingenol	B	APOC2, PRKCA
	Beta-sitosterol	C	PIK3CG, PTGS1, PTGS2
	Gamma-sitosterol	D	NFKB1, WNT4, BAX, AR

A: Ginsenoside rh2; B: 20-Hexadecanoylingenol; C: Beta-sitosterol; D: Gamma-sitosterol.

**2.2 消斑通脉方抗AS的靶点基因** 通过GeneCards和OMIM数据库收集“atherosclerosis”和“cerebral atherosclerosis”相关基因分别为1 318个和215个,去除重复值后得到AS相关基因,将各中药靶点信息与其取交集,获得消斑通脉方抗AS的靶点基因共有189个。见图1和表2。

**2.3 中药-有效成分-作用靶点网络图** 将Network和Type数据文件导入Cytoscape 3.8.2软件,制作网络图(图2),右下方水绿色四边形方阵为交叉靶点,正方形上标注的是中药名,其他彩色圆形图标代表各中药所含的有效成分,其中黄色圆形图标A、B、C和D为中药间共有成分,图标越大代表Degree值越高,成为重要作用成分和靶点的可能性也越大。

**2.4 Hub基因网络图** 将交集基因导入STRING数据库构建PPI网络图(图3),将相互作用证据可信度设置为“中可信度-0.400”,下载tsv文件导入Cytoscape软件进一步分析。Hub基因是由插件



Drug referred to intersection relationship between two sets of disease target genes of Xiaoban Tongmai Formula and AS disease target genes.

图1 消斑通脉方作用靶点与AS疾病靶点的韦恩图  
Fig.1 Venn diagram of targets between Xiaoban Tongmai Formula and AS

CytoHubba计算出来的核心网络图,其中颜色越深成为关键基因的可能性越大。见图4。

**2.5 GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析** 应用DAVID生物信息数据库对189个重要

表2 抗AS部分靶点  
Tab.2 Partial targets of anti-AS

Gene	Corresponding protein
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
APOB	Apolipoprotein B-100
CASP-1/-3/-9	Caspase-1/-3/-9
CXCL8	Interleukin-8
FOS	Protein c-Fos
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
ICAM-1/-2/-3	Intercellular adhesion molecule 1/2/3
IL-6/IL-1β	Interleukin-8
JAK1/2	Tyrosine-protein kinase JAK1
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase
MTOR	Threonine-protein kinase mTOR
NFKB1/2	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
NOD1/2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2
NOS1/2/3	Nitric oxide synthase
RELA	Nuclear factor kappa B p65
PLAT	Tissue-type plasminogen activator
STAT1/2/3	Signal transducer and activator of transcription
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

作用靶点进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析。

GO功能富集分析：靶点基因参与的生物过程(biological process, BP)前10位包括调节炎症反应、转录正调控、细胞对脂多糖老化的反应、血液循环、对缺氧的反应、细胞增殖负调控和正向调节

细胞迁移等；细胞成分(cellular component, CC)前10位涉及转录调节质膜蛋白复合物、胞质核周区、内质网腔、细胞外基质、线粒体组成部分和肌纤维膜等；分子功能(molecular function, MF)前10位包括信号受体结合活性、蛋白激酶激活、氧化还原酶的活性、蛋白质结构域特异性结合、脂质结合、核受体活性、跨膜转运蛋白结合和泛素样蛋白连接酶结合等。见图5。

KEGG信号通路富集分析结果：作用靶点参与的较为重要的30条信号通路包括晚期糖基化终产物-晚期糖基化终产物受体(advanced glycation endproducts-receptor of advanced glycation endproducts, AGE-RAGE)信号通路、脂质与AS、流体剪切应力与AS、癌症中的通路、白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)信号通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子信号通路、辅助性T淋巴细胞17(T helper cell 17, Th17)分化、丙型肝炎、C型凝集素受体信号通路、化学致癌作用-活性氧、胰岛素抵抗、缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路、松弛素信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、Toll样受体信号通路、T淋巴细胞受体信号通路、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药性、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、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

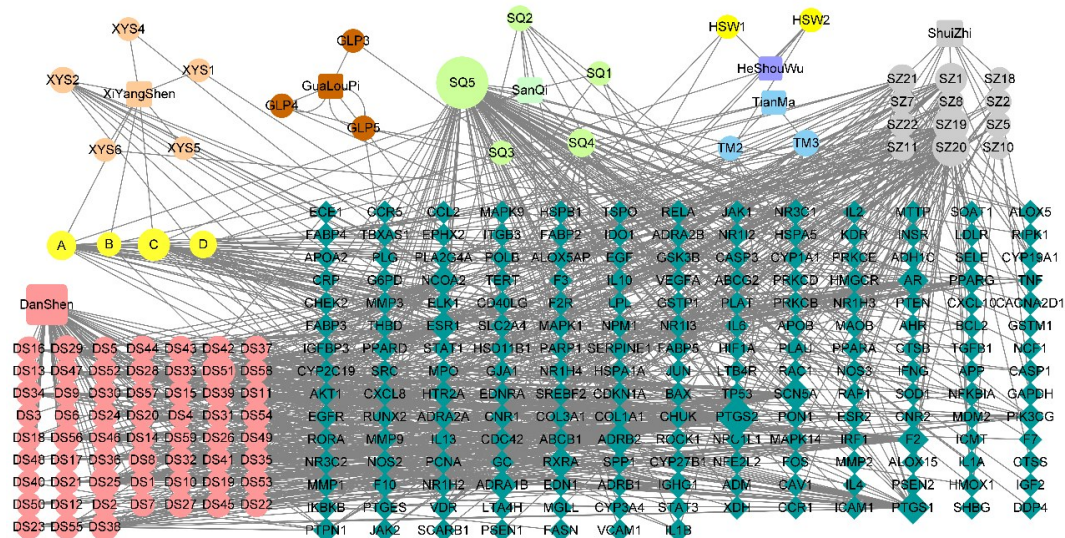


图2 中药-有效成分-作用靶点网络图  
Fig.2 TCM-component-target network diagram

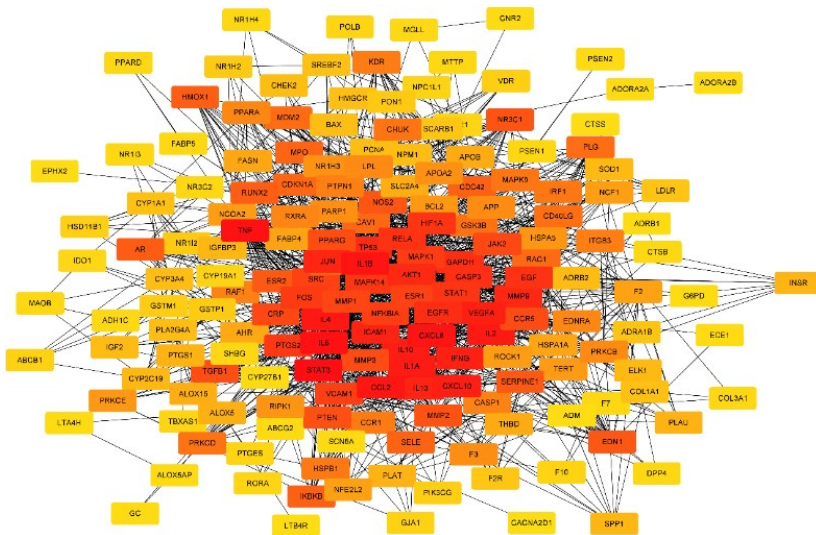


图3 PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagram

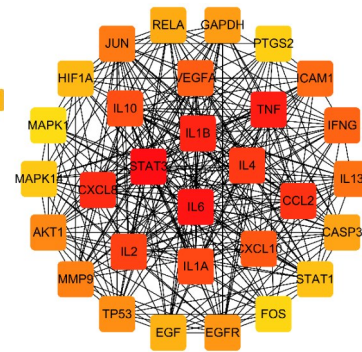


图4 Hub基因网络图

Fig. 4 Hub gene network diagram

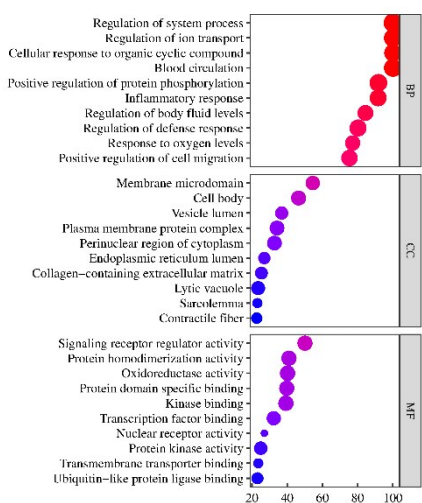


图5 GO功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis

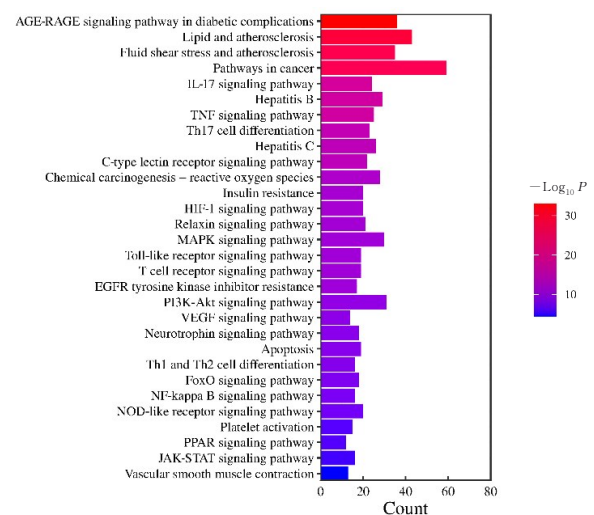


图6 KEGG信号通路富集分析

Fig. 6 KEGG signaling pathway enrichment analysis

factor, VEGF) 信号通路、趋化因子信号通路、细胞凋亡、辅助性 T 淋巴细胞 1 (T helper cell 1, Th1) 和辅助性 T 淋巴细胞 2 (T helper cell 2, Th2) 分化、叉头框蛋白 O (fork-head box O, FOXO) 信号通路、NOD 样受体信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、血小板激活、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR) 信号通路、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) / 信号传导和激活转录因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路、血管平滑肌细胞收缩、钙信号通路和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路等。见图 6。

**2.6 HA-VSMCs 的鉴定结果** 倒置显微镜下观察: 细胞状态良好, 呈贴壁生长, 多数细胞呈长梭形, 个别呈多角形、扇形或不规则三角形, 核居中, 胞浆丰富, 细胞密度高时可见其平行排列成束状, 偶有部分细胞重叠, 与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的形态特征相吻合 (图 7)。激光共聚焦显微镜下观察: 细胞核呈蓝色荧光, 胞质内呈现大量绿色荧光, 为细胞质内的纤维细丝即平滑肌肌动蛋白丝 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)。采用免疫荧光技术检测 HA-VSMCs 特异性标志蛋白  $\alpha$ -SMA 的表达, 进一步验证实验细胞为 HA-VSMCs (图 8)。

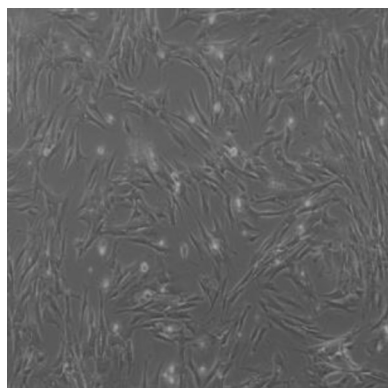
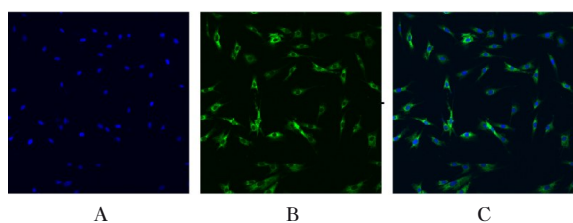


图7 倒置显微镜下观察 HA-VSMCs 形态表现( $\times 10$ )  
Fig. 7 Morphology of HA-VSMCs under inverted microscope ( $\times 10$ )



A: DAPI; B:  $\alpha$ -SMA; C: Merge.

图8 HA-VSMCs 免疫荧光染色情况( $\times 10$ )  
Fig. 8 Immunofluorescence staining of HA-VSMCs ( $\times 10$ )

**2.7 不同浓度 ox-LDL 诱导后各组 HA-VSMCs 增殖活性** 与空白组比较, 不同浓度 ox-LDL 组 HA-VSMCs 活性均升高 ( $P < 0.01$ )。0.012 5、0.025 0、0.050 0 和 0.100 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL 组 HA-VSMCs 活性随浓度增加呈上升趋势, 但 0.200 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL 组较 0.100 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组细胞活性有所降低, 故采用 0.100 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL 进行后续实验。见表 3。

**2.8 油红 O 染色法检测结果** 油红 O 染色可见:

表3 不同浓度 ox-LDL 诱导后各组 HA-VSMCs 增殖活性  
Tab. 3 Proliferation activities of HA-VSMCs in various groups after induced with different concentrations of ox-LDL  
( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Proliferation activity
Blank	1.212 $\pm$ 0.129
Ox-LDL ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
0.012 5	1.489 $\pm$ 0.223*
0.025 0	1.941 $\pm$ 0.131*
0.050 0	2.233 $\pm$ 0.094*
0.100 0	2.418 $\pm$ 0.166*
0.200 0	2.234 $\pm$ 0.106*

\* $P < 0.01$  vs blank group.

0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL 处理 HA-VSMCs 24 h 后, 细胞形态增大, 胞质内可见大量红色脂滴, 细胞核增大, 细胞呈泡沫样改变, 表明 ox-LDL 作用于 HA-VSMCs 细胞可促进平滑肌源性泡沫细胞形成, 模型建立成功。见图 9。

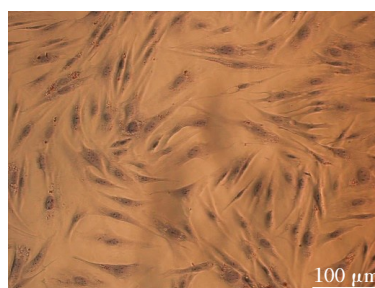


图9 ox-LDL 处理后 HA-VSMCs 的形态表现(油红 O 染色)

Fig. 9 Morphology of HA-VSMCs after ox-LDL treatment (Oil red O staining)

**2.9 各组 HA-VSMCs 增殖活性** 与空白组比较, 0.050、0.100、0.200 和 0.400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性降低 ( $P < 0.05$ ), 而 0.025 和 0.800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

**2.10 不同剂量消斑通脉方作用后各组 ox-LDL 诱导的 HA-VSMCs 增殖活性** 与空白组比较, 模型组 HA-VSMCs 增殖活性升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组及 0.025、0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性降低 ( $P < 0.01$ ), 0.200、0.400 和 0.800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑

表4 各组 HA-VSMCs 增殖活性  
Tab. 4 Proliferation activities of HA-VSMCs in various groups  
( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Proliferation activity
Blank	0.75 $\pm$ 0.06
XBTFM ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
0.025	0.71 $\pm$ 0.05
0.050	0.66 $\pm$ 0.07*
0.100	0.66 $\pm$ 0.02*
0.200	0.67 $\pm$ 0.05*
0.400	0.68 $\pm$ 0.03*
0.800	0.75 $\pm$ 0.07

XBTFM: Xiaoban Tongmai Formula. \* $P < 0.05$  vs blank group.

通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性降低 ( $P < 0.01$ ), 0.200、0.400 和 0.800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 增殖活性升高 ( $P < 0.01$ )。见表 5。因此选用 0.025、0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方进行后续实验。

### 2.11 各组 HA-VSMCs 培养上清中 MCP-1、IL-6 和 IL-8 水平

表 5 不同剂量消斑通脉方作用后各组 ox-LDL 诱导的 HA-VSMCs 增殖活性

Tab. 5 Proliferation activities of ox-LDL-induced HA-VSMCs in various groups after treated with different doses of XBTMF ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Proliferation activity
Blank	0.57 ± 0.03
Model	0.81 ± 0.05 <sup>*</sup>
Rosuvastatin	0.63 ± 0.04 <sup>△</sup>
XBTMF( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
0.025	0.66 ± 0.03 <sup>△</sup>
0.050	0.57 ± 0.05 <sup>△</sup>
0.100	0.45 ± 0.03 <sup>△#</sup>
0.200	0.83 ± 0.05 <sup>#</sup>
0.400	0.81 ± 0.06 <sup>#</sup>
0.800	0.80 ± 0.02 <sup>#</sup>

XBTMF: Xiaoban Tongmai Formula. <sup>\*</sup> $P < 0.01$  vs blank group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs rosuvastatin group.

培养上清中 MCP-1、IL-6 和 IL-8 水平均升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组 HA-VSMCs 培养上清中 MCP-1 和 IL-6 水平降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 0.025、0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 培养上清中 MCP-1 和 IL-6 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 0.025  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 培养上清中 IL-8 水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 培养上清中 IL-8 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 不同剂量消斑通脉方组 HA-VSMCs 培养上清中 MCP-1 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 培养上清中 IL-8 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 6。

### 2.12 各组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 mRNA 表达水平

与空白组比较, 模型组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), 瑞舒伐他汀组及 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 FGF2 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.01$ )。见表 7。

表 6 各组 HA-VSMCs 培养上清中炎症因子水平

Tab. 6 Levels of inflammatory factors in HA-VSMCs culture supernatant in various groups [ $n=5, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

Group	MCP-1	IL-6	IL-8
Blank	266.80 ± 18.04	36.66 ± 0.23	297.95 ± 18.06
Model	413.36 ± 39.99 <sup>**</sup>	41.12 ± 2.70 <sup>*</sup>	373.45 ± 22.37 <sup>*</sup>
Rosuvastatin	296.06 ± 8.42 <sup>△</sup>	13.11 ± 4.08 <sup>△△</sup>	340.03 ± 6.65
XBTMF( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
0.025	173.63 ± 0.94 <sup>△△#</sup>	14.49 ± 3.45 <sup>△△</sup>	333.81 ± 19.97
0.050	103.20 ± 15.34 <sup>△△#</sup>	11.32 ± 2.95 <sup>△△</sup>	208.46 ± 10.60 <sup>△△#</sup>
0.100	36.58 ± 0.07 <sup>△△#</sup>	9.24 ± 0.87 <sup>△△</sup>	156.68 ± 4.62 <sup>△△#</sup>

XBTMF: Xiaoban Tongmai Formula. <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs blank group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs rosuvastatin group.

### 2.13 各组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 蛋白表达水平

与空白组比较, 模型组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组和不同剂量消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 和 FGF2 蛋白

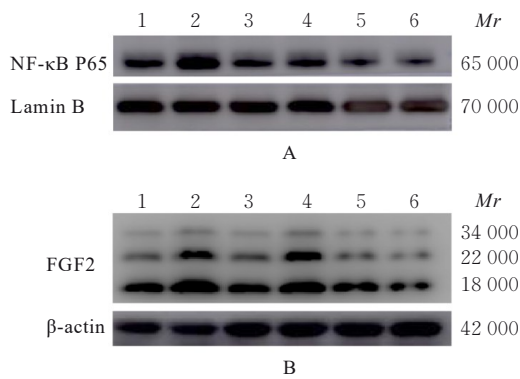
表达水平均降低 ( $P < 0.01$ ); 与瑞舒伐他汀组比较, 0.050 和 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 NF- $\kappa$ B p65 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 0.100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  消斑通脉方组 HA-VSMCs 中 FGF2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ )。见图 10 和表 8。

表7 各组 HA-VSMCs 中 NF-κB p65 和 FGF2 mRNA 表达水平

Tab. 7 Expression levels of NF-κB p65 and FGF2 mRNA in HA-VSMCs in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	NF-κB p65 mRNA	FGF2 mRNA
Blank	1.00±0.11	1.00±0.10
Model	1.85±0.22*	2.35±0.13*
Rosuvastatin	0.95±0.01 <sup>△</sup>	1.27±0.07 <sup>△</sup>
XBTMF(mg·L <sup>-1</sup> )		
0.025	1.13±0.13 <sup>△</sup>	2.30±0.08
0.050	0.43±0.02 <sup>△#</sup>	1.07±0.10 <sup>△#</sup>
0.100	0.33±0.04 <sup>△#</sup>	0.53±0.06 <sup>△#</sup>

XBTMF: Xiaoban Tongmai Formula. \* $P<0.01$  vs blank group; <sup>△</sup> $P<0.01$  vs model group; # $P<0.01$  vs rosuvastatin group.



XBTMF: Xiaoban Tongmai Formula. Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3: Rosuvastatin group; Lane 4: 0.025 mg·L<sup>-1</sup> XBTMF group; Lane 5: 0.050 mg·L<sup>-1</sup> XBTMF group; Lane 6: 0.100 mg·L<sup>-1</sup> XBTMF group.

图10 各组 HA-VSMCs 中 NF-κB p65(A)和 FGF2(B) 蛋白表达电泳图

Fig. 10 Electrophoretogram of expressions of NF-κB p65 (A) and FGF2 (B) proteins in HA-VSMCs in various groups

### 3 讨论

现代医学<sup>[17]</sup>认为: AS 的发病原因多与炎症反应、免疫应答、脂质代谢异常和氧化应激反应等有关,其中炎症机制是 AS 发展的重要环节。单核细胞分化为巨噬细胞,吞噬大量 ox-LDL 后形成泡沫细胞参与早期斑块生成,造成 AS 发生风险增加,同时引起免疫反应调控 Toll 样受体和 JAK/STAT 信号通路相关因子表达,促进 Th 细胞分化,参与 AS 进程<sup>[18-19]</sup>。抗 AS 重要的机制包括调节炎症相关因子分泌、胆固醇的代谢、VSMCs 增殖和迁移及稳定斑块等。研究<sup>[20]</sup>表明: M1 型巨噬细胞可进一步

表8 各组 HA-VSMCs 中 NF-κB p65 和 FGF2 蛋白表达水平  
Tab. 8 Expression levels of NF-κB p65 and FGF2 proteins in HA-VSMCs in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	NF-κB p65 protein	FGF2 protein
Blank	0.660±0.008	1.88±0.13
Model	1.200±0.002*	3.83±0.25*
Rosuvastatin	0.630±0.002 <sup>△</sup>	1.31±0.05 <sup>△</sup>
XBTMF(mg·L <sup>-1</sup> )		
0.025	0.710±0.003 <sup>△</sup>	2.41±0.11 <sup>△#</sup>
0.050	0.360±0.001 <sup>△#</sup>	1.26±0.03 <sup>△</sup>
0.100	0.250±0.002 <sup>△#</sup>	0.58±0.03 <sup>△#</sup>

XBTMF: Xiaoban Tongmai Formula. \* $P<0.01$  vs blank group; <sup>△</sup> $P<0.01$  vs model group; # $P<0.01$  vs rosuvastatin group.

激活 NF-κB 和 TNF-α 促炎信号,导致脂质进一步堆积,增加已有斑块的不稳定性。细胞自噬功能障碍可促进细胞衰老和斑块生成,进而影响内皮 VSMCs,造成血管钙化,使冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)发病率升高<sup>[21]</sup>。研究<sup>[22-23]</sup>显示: VSMCs 的异常增殖在 AS 早期会促进斑块形成,而在 AS 晚期,斑块中的 VSMCs 可防止纤维帽破裂,稳定斑块。在 AS 中, ox-LDL 在诱导 VSMCs 的增殖中起着至关重要的作用,泡沫细胞促进多种细胞因子和趋化因子的产生,引起慢性炎症反应,使 VSMCs 从静止的收缩型转化为合成型。合成型 VSMCs 下调收缩蛋白的表达,并促进生长因子、受体和细胞外基质蛋白酶形成。血小板源性生长因子与其受体结合后,影响下游多条信号通路,在 VSMCs 增殖中发挥核心作用<sup>[24]</sup>。此外,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)-1 可促进 VSMCs 的增殖。研究<sup>[25]</sup>显示:与较 FGF1 比较, FGF2 在血管发育和病理变化中发挥更重要的作用,抑制 VSMCs 增殖是预防和治疗 AS 的重要策略。

消斑通脉方所含的隐丹参酮、毛地黄黄酮、人参皂苷、槲皮素、白藜芦醇、谷甾醇和丹参酮 II A 等成分可能是抗 AS 的有效活性成分,具有较强的研究价值。本研究结果显示:消斑通脉方作用于华 AS 的关键靶点包括 IL-6、IL-8、IL-1β、VEGFA、NFκB1、RELA、MAPK1、AKT1、TNF 和环氧合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 等; GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路

富集分析显示: 消斑通脉方抗 AS 主要涉及调节脂质代谢和流体剪切力、HIF-1 途径参与心脏代谢和血管生成, 可有效改善心肌细胞的缺氧状态, 细胞外脂质堆积和 VSMCs 增殖迁移区域多存在 HIF-1 $\alpha$  高表达, 其上下游调节因子 IL-6、VEGF 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 等激活进而加重 AS。本方也可作用于内皮细胞的内质网腔, 内质网应激会消耗 Ca<sup>2+</sup>, 参与 AS 的形成。抗炎作用是治疗 AS 的关键, 潜在作用靶点 MAPK1、IL-1 $\beta$ 、TNF、SRC 和 NF $\kappa$ B1 等在 MAPK 信号通路、炎症介质对瞬时感受器离子通道蛋白 (transient receptor potential, TRP) 通道的调节和 NF- $\kappa$ B 信号通路中发挥作用, 缓解炎症反应, 同时激发免疫应答, 促进 Th2 细胞分化<sup>[26]</sup>; EGFR 表达降低可使 IL-1 和 TNF- $\alpha$  分泌减少, 对 AS 发展有抑制作用<sup>[27]</sup>; NOD 样受体信号通路也是本方较为重要的一条作用途径, 与细胞自噬有密切关联, 选择性自噬可调控 HA-VSMCs 的增殖和钙化, 负向调节 NOD1/2 有对抗 AS 的作用, 并可联合 Th17 细胞和 JAK/STAT 信号通路中相关因子以减轻炎症, 该通路中靶基因 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 也是有待验证的潜在靶点<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>表明: 阻断 PI3K/Akt/mTOR 通路可抑制 VSMCs 的增殖, mTOR 参与调节胆固醇的外排和脂质沉积。消斑通脉方可调控 mTOR 信号通路相关因子或可调节脂质代谢、减轻炎症和激活自噬等进而发挥抗 AS 作用。

FGF2 是一种具有广泛生物学作用的多效生长因子, 能调节细胞增殖、迁移、分裂和分化过程。在 AS 中, FGF2 由平滑肌细胞、巨噬细胞和内皮细胞分泌, 可促进平滑肌细胞的增殖和内皮细胞的游走。李文倩等<sup>[30]</sup>研究表明: FGF2 与 ox-LDL 诱导 VSMCs 的增殖呈正相关关系, 应用 FGF2 抑制剂或脂质体转染将 FGF2 抑制或沉默后, VSMCs 增殖率降低, JNK 磷酸化水平明显降低, 表明抑制 FGF2/JNK 信号通路能抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 异常增殖。梁文静等<sup>[31]</sup>研究表明: 敲除 FGF2 在 AS 疾病进展的各个时期均可明显抑制氧化应激反应、巨噬细胞浸润和促炎因子分泌, 进而促进 AS 斑块稳定和减轻斑块损伤面积。LEE 等<sup>[32]</sup>研究发现: 在角膜内皮细胞中, NF- $\kappa$ B 能与 FGF2 基因的启动区域结合, 表明 NF- $\kappa$ B 是 FGF-2 基因

的转录因子。朱莹<sup>[33]</sup>在多发性骨髓瘤中发现: FGF 通路与非经典 NF- $\kappa$ B 信号通路具有交互作用。本研究结果显示: ox-LDL 能上调 HA-VSMCs 中 FGF2 mRNA 和蛋白表达水平, 而消斑通脉方以剂量依赖性方式抑制 ox-LDL 诱导 HA-VSMCs 细胞中 FGF2 mRNA 和蛋白表达进而发挥抗 AS 作用。在 AS 中, NF- $\kappa$ B 和 FGF2 是否为信号传导通路的上下游因子目前尚未见报道, 有待进一步研究。

综上所述, 本文作者应用网络药理学研究方法将临床验方消斑通脉方中所含的活性成分、抗 AS 的靶点信息和作用通路进行了系统分析, 且通过体外实验验证消斑通脉方可能通过抑制 NF- $\kappa$ B/FGF2 通路发挥抗炎作用, 抑制 HA-VSMCs 过度增殖以发挥抗 AS 作用, 为消斑通脉方的进一步研究提供了理论依据, 也为传承名老中医药专家学术思想和在临床推广经验方起到积极作用。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

曹珊参与实验设计、统计学分析和论文审校, 张艺嘉和白杨参与实验研究、数据采集和论文撰写, 陈芳、谢莎和韩倩倩参与实验研究和论文修改。

#### [参考文献]

- [1] GROOTAERT M O J, BENNETT M R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a reassessment[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(11): 2326-2339.
- [2] GUIJARRO C, COSÍN-SALES J. LDL cholesterol and atherosclerosis: the evidence [J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2021, 33(Suppl 1): 25-32.
- [3] KATTOOR A J, POTHINENI N V K, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(11): 42.
- [4] DEROISSART J, PORSCH F, KOLLER T, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory therapies in atherosclerosis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2022, 270: 359-404.
- [5] 庞树朝, 张军平, 陈美玲, 等. 中医药治疗动脉粥样硬化新进展[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(1): 214-217.
- [6] 中国医师协会中西医结合分会心血管专业委员会, 中国中医药学会心血管病分会. 动脉粥样硬化中西医结合治疗专家共识 (2021年)[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(3): 287-293.
- [7] 张艺嘉, 樊珂, 崔小数, 等. 中医药治疗动脉粥样硬

- 化临床研究进展[J]. 中医学报, 2020, 35(9): 1908-1912.
- [8] 吴晶魁, 杨 乔, 李洋洋, 等. 水蛭通过p38MAPK信号通路对早期动脉粥样硬化大鼠VSMCs的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(16): 3191-3197.
- [9] 王 群, 杨关林, 贾连群, 等. 基于网络药理学探讨何首乌治疗动脉粥样硬化作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 136-139.
- [10] 郑云霞, 孟 萌. 中药丹参治疗冠心病的药理成分及作用分析[J]. 双足与保健, 2018, 27(17): 190-191.
- [11] 任 超, 王 萍, 闫东明, 等. 三七总皂苷对AS小鼠的治疗作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1289-1295.
- [12] 甄庆强, 张 洁, 雷 震, 等. 瓜蒌皮提取物对同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化的保护作用[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(2): 239-243.
- [13] 于 进. 天麻酚性成分抗AS的实验研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.
- [14] 荆文光, 符 江, 刘玉梅, 等. 水蛭的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 120-123.
- [15] 李国强, 李韵仪, 李 桃, 等. 水蛭的化学成分研究[J]. 天津中医药, 2018, 35(9): 703-705.
- [16] 许石钟. 水蛭经炮制后的化学成分变化研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(7): 980-982.
- [17] 朱 迪, 曹焯民. 动脉粥样硬化抗炎治疗的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(5): 50-55.
- [18] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [19] BÄCK M, YURDAGUL A Jr, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(7): 389-406.
- [20] 李思瑞, 冯泽清, 吴玉章. C1632通过MAPK和NF- $\kappa$ B抑制巨噬细胞M1型极化[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(3): 185-192.
- [21] ZHOU X, XU S N, YUAN S T, et al. Multiple functions of autophagy in vascular calcification [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 159.
- [22] BENNETT M R, SINHA S, OWENS G K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 692-702.
- [23] MARCOVECCHIO P M, THOMAS G D, MIKULSKI Z, et al. Scavenger receptor CD36 directs nonclassical monocyte patrolling along the endothelium during early atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2043-2052.
- [24] DONG X Z, HU H J, FANG Z D, et al. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 103: 844-850.
- [25] NEWBY A C, GEORGE S J. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies [J]. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(7): 1173-1183.
- [26] ZHANG S G, ZHANG S H, LIANG X, et al. Guanxinping ameliorates atherosclerosis via MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Perfusion*, 2023, 38(3): 557-566.
- [27] ZEBOU DJ L, GIRAUD A, GUYONNET L, et al. Selective EGFR (epidermal growth factor receptor) deletion in myeloid cells limits atherosclerosis—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(1): 114-119.
- [28] VLACIL A K, SCHUETT J, RUPPERT V, et al. Deficiency of Nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins (NOD) 1 and 2 reduces atherosclerosis [J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115(4): 47.
- [29] HANG M, LI F, WANG X, et al. MiR-145 alleviates Hcy-induced VSMCs proliferation, migration, and phenotypic switch through repression of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153: 357-366.
- [30] 李文倩. 齐墩果酸经FGF2/JNK/PON2通路抑制ox-LDL诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
- [31] 梁文静. 糖尿病及血管新生因子对动脉粥样硬化斑块不稳定性的影响及作用机制[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [32] LEE J G, KAY E P. NF- $\kappa$ B is the transcription factor for FGF-2 that causes endothelial mesenchymal transformation in cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3): 1530-1538.
- [33] 朱 莹. FGF/FGFR3与非经典NF- $\kappa$ B信号通路的交互作用及其在多发性骨髓瘤细胞增殖中的意义[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.