

基于网络药理学和动物实验探讨复方丹参方延缓衰老、拮抗动脉粥样硬化的作用

梁丹¹，宋月月¹，刘德坤²，胡渊龙³，裴可⁴，杨雯晴^{1*}

(1. 山东中医药大学中医药创新研究院, 山东济南 250300; 2. 成都中医药大学针灸推拿学院, 四川成都 611137; 3. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东济南 250014; 4. 南京中医药大学中医院·中西医结合学院, 江苏南京 210023)

摘要：目的 结合网络药理学和动物实验探讨复方丹参方延缓衰老、拮抗动脉粥样硬化(AS)的作用。方法 通过TCMSP、ETCM数据库检索并结合文献筛选出复方丹参方中为主要药效物质基础、具有抗氧化作用的活性成分, 找出对应靶点, GeneCards、OMIM数据库筛选疾病靶点, Venny 2.1.0平台得到活性成分与疾病的交集靶点, 绘制药物-成分-靶点网络图并筛选核心靶点, STRING数据库完成蛋白互作分析网络, DAVID数据库对疾病与活性成分的相关靶点进行GO、KEGG富集分析, Autodock软件完成分子对接。建立AS小鼠模型, 给予复方丹参方主要活性成分进行干预, 油红O染色观察主动脉斑块变化, 检测血脂水平, ELISA法检测衰老相关分泌表型, SA-β-Gal染色法观察β-半乳糖苷酶活性, RT-qPCR法检测Akt、PI3K mRNA表达, Western blot法检测Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K蛋白表达。结果 筛选出6种主要活性成分, Akt1为核心靶点。复方丹参方与PI3K/Akt信号通路关系密切, 原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1可能参与介导PI3K/Akt信号通路。原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1可减少主动脉斑块, 降低血脂, 下调衰老相关分泌表型、β-半乳糖苷酶活性, 上调Akt、PI3K mRNA表达及Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K蛋白表达。结论 复方丹参方主要活性成分原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1可能通过干预PI3K/Akt信号通路, 发挥延缓衰老、拮抗AS的作用。

关键词：复方丹参方; 衰老; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 动物实验; PI3K/Akt信号通路

中图分类号：R285.5; R966

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2025)04-1356-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.04.049

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由脂质浸润、炎症反应、氧化应激、细胞衰老等因素引起的一种慢性炎症性疾病^[1], 动脉中斑块破裂引发的血管栓塞是AS最危险的并发症之一, 而血管中的细胞衰老及衰老标志物的出现会影响血管修复斑块的能力, 加重斑块的不稳定性^[2], 提示细胞衰老与AS的进展相关。复方丹参方最早由上海中药制药二厂研制, 由丹参、三七、冰片组成, 可降低血脂、保护血管, 进而减缓AS的发展^[3-4], 方中丹参具有活血定痛功效, 可发挥抗炎、抗氧化的作用, 进而修复内皮损伤^[5]; 三七具有散瘀止血功效, 可改善血管内皮功能, 减少AS斑块的形成^[6-7]; 冰片具有开窍醒神、止痛功效, 能保护心血管系统, 增强其他药物的生物利用度^[8], 但全方是否可减缓细胞衰老, 进而影响AS发展尚不清晰。本研究通过网络药理学及动物实验探究复方丹参方延缓细胞衰老、拮抗AS的活性成分和作用靶点, 并构建成分-靶点关系网络, 以期为该方治疗本病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 数据库与软件 中药系统药理分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/index.php>); ETCM数据库 (<http://www.tcmap.cn/ETCM/>); GeneCards数据库 (<https://www.genecards.org/>); 在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM, <https://www.omim.org/>); Uniprot数据库 (<https://www.uniprot.org/>); SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>); SEA (<https://sea.bkslab.org/>); Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); STRING数据库 (<http://string-db.org/>); DAVID数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>); RCSB (<https://www.rcsb.org/>); 微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>); Cytoscape 3.7.1软件; AutodockTools 1.5.6软件; Autodock软件; Pymol软件。

1.1.2 活性成分、靶点筛选 利用TCMSP数据库, 以口

收稿日期: 2024-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174337); 国家自然科学基金青年科学基金(82305122); 山东省高等学校“青创团队计划”(2022KJ257); 江苏省科技计划专项资金(基础研究计划自然科学基金)(BK20230450)

作者简介: 梁丹(1998—), 女, 硕士生, 从事中医治疗心系疾病研究。E-mail: liangd980@163.com

*通信作者: 杨雯晴(1987—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中医治疗心系疾病研究。E-mail: winnie0416q@163.com

服生物利用度 $OB \geq 30\%$ 、类药性 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件进行检索, ETCM 数据库搜集丹参、三七活性成分, 而冰片主要成分为右旋龙脑、左旋龙脑、异龙脑^[9], 结合文献找出与衰老相关、是主要药效物质基础的活性成分。从 TCMSP、ETCM 数据库中获取相应成分靶点, SwissTargetPrediction、SEA 数据库中进行靶点预测。

1.1.3 疾病靶点收集 使用 GeneCards、OMIM 数据库筛选靶点, 输入“aging atherosclerosis”“aging”“atherosclerosis”进行检索, 去重后取交集, 物种均设置为“*homo sapiens*”。将以上靶点通过 UniProt 转换为基因标志物, 并去除重复靶点。

1.1.4 活性成分与疾病交集靶点筛选及药物-成分-靶点关系网络图构建 利用 Venny 2.1.0 软件得到交集靶点, Cytoscape 3.7.1 软件构建药物-成分-靶点网络, Network Analyzer 工具计算成分网络拓扑参数, 得到成分度值 (degree)。

1.1.5 蛋白相互作用网络建立 将交集靶点提交至 STRING 数据库进行蛋白互作分析, 得到蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图。使用 CytoNCA 插件分析度值, 前 10 名的基因即为核心靶点。

1.1.6 GO、KEGG 富集分析 使用 DAVID 平台对交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析, 包括生物学过程 (biological process, BP) 模块、分子功能 (molecular function, MF) 模块、细胞组成过程 (cellular components, CC) 模块, 并进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析, 利用微生信将其可视化。

1.1.7 分子对接 将活性成分与度值较高的核心靶点进行对接, 从 RCSB 数据集中获取蛋白质受体的结构, 采用 PyMol 软件去除所有蛋白质水分子, AutodockTools 1.5.6 软件添加氢, Autodock 软件进行分子对接, PyMol 软件对部分结果可视化。

1.2 动物实验

1.2.1 动物 雄性 SPF 级 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 20 只、雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 10 只, 体质量 (21.2 ± 1.5) g, 8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006], 饲养于山东中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2022-0009] 屏障环境设施内, 12 h/12 h 明暗交替, 温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 $(50 \pm 5)\%$, 每笼 5 只, 自由摄食饮水。动物实验经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准 (批准号 SDUTCM20240103001)。

1.2.2 试剂与药物 原儿茶醛 (货号 B21613)、人参皂苷 Rg1 (货号 B21057)、三七皂苷 R1 (货号 B21099) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 生理盐水溶解并制成给药液。油红 O 染料 (货号 7BE10110) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。甘油三酯 (TG)、胆固醇 (CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白

胆固醇 (LDL-C) 测定试剂盒 (货号 U82885040、U82785040、U82985045、U83085045) 均购自桂林优特林医疗电子有限公司; 小鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 ELISA 试剂盒 (货号 E-MSEL-M0002、E-MSEL-M0003、E-MSEL-M0001) 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色试剂盒、Akt 抗体 (货号 9860、4691) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 2× SYBR Green q PCR Mix、SPARK-script II RT Plus kit、三色预染蛋白质 Marker (货号 AH0104-C、AG0304-B、EC1019) 均购自山东思科捷生物技术有限公司; RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)、极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (货号 P0013B、P0015L、P0018FS) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Omni-EasyTM 即用型 BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 ZJ102L) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 麦根酶标记山羊抗兔 IgG (货号 214120) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗、PI3K 抗体、p-Akt 抗体 (货号 SA00001-1、60225-1-Ig、66444-1-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; GAPDH 抗体 (货号 A19056) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; p-PI3K 抗体 (货号 ab182651) 购自英国 Abcam 公司。

1.2.3 仪器 M205FA 立体荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 全自动生化分析仪 (桂林优利特医疗电子有限公司); 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Tanon 5200 系列全自动化学发光图像分析系统 (上海天能生命科学有限公司)。

1.2.4 分组、造模及给药 适应性喂养 1 周后, 将 $ApoE^{-/-}$ 小鼠随机分为模型组和给药组, 每组 10 只, 10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组, 均给予高脂饲料 (含 0.15% 胆固醇、21% 脂肪) 连续喂养 12 周。根据前期研究结果^[10], 给药组按照原儿茶醛 14 mg/kg、人参皂苷 Rg1 10 mg/kg、三七皂苷 R1 10 mg/kg 的剂量进行腹腔注射, 模型组和正常组给予等体积生理盐水干预, 连续 8 周。

1.2.5 取材 连续干预 8 周后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉, 眼眶取血, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得血清, 于 -80 °C 冰箱中保存, 取血后打开胸腔, 迅速对心脏进行灌注, 提取主动脉至髂总动脉分叉处的血管, 生理盐水冲洗后剥离残余组织, 一部分浸泡于 4% 多聚甲醛中固定, 另一部分置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.6 主动脉油红 O 染色 将小鼠主动脉置于生理盐水中漂洗后置于 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 放入油红 O 染液中避光染色 10 min, 再置于 75% 乙醇中分化至脂肪斑块呈橘红色或鲜红色, 其他部位近无色, 生理盐水冲洗以终止分化, 立体荧光显微镜拍照保存。

1.2.7 血脂水平检测 收集小鼠血清, 采用全自动生化分析仪检测 TG、CHOL、HDL-C、LDL-C 水平。

1.2.8 ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平 取小鼠血清, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测 TNF-α、

IL-1 β 、IL-6水平。

1.2.9 衰老相关SA- β -Gal表达检测 采用SA- β -Gal染色试剂盒制备1×PBS、染色液、固定液及X-Gal、SA- β -Gal染色溶液,检测pH为6.0时SA- β -Gal活性。将小鼠主动脉置于6孔板中,固定液固定15 min, PBS洗涤2次后室温浸泡过夜,添加SA- β -Gal染色溶液,避光置于37℃孵育箱中过夜,观察主动脉是否染色,如果染色太浅,继续孵育24 h后再用立体荧光显微镜观察。

1.2.10 RT-qPCR法检测主动脉组织Akt、PI3K mRNA表达 使用TRIzol法提取小鼠主动脉组织总RNA,逆转录为cDNA,荧光定量试剂盒通过Light Cycler 480 II进行检测,观察扩增曲线、溶解曲线及C_r值,2^{-ΔΔCT}法计算相对表达量。扩增反应条件为94℃预变性2 min;94℃变性10 s,60℃退火/延伸20 s,共40个循环。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	序列(5'→3')
Akt	正向 CAAAGAAGTCAAAGGGGCTGC 反向 CTCCCTCACAAATAGCCACGTC
PI3K	正向 AGATCGCTCTGGCCTCATTG 反向 AGCCAGTTCAGAAGGGCATC
β -actin	正向 AACAGTCCGCCTAGAACAC 反向 CGTTGACATCCGTAAAGACC

1.2.11 Western blot法检测主动脉组织Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K蛋白表达 取出于-80℃保存的小鼠主动脉组织,RIPA、PMSF裂解,研磨,离心,取上清,BCA法进行蛋白定量,蛋白溶液与5×蛋白上样缓冲液混合后变性,冷冻保存,取等量蛋白上样,电泳,湿转法转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入Akt(1:1 000)、PI3K(1:5 000)、p-Akt(1:2 000)、p-PI3K(1:400)抗体,4℃过夜孵育,TBST洗膜3次,加入二抗(1:5 000)摇床孵育1 h,TBST洗膜3次,化学发光法显影,使用全自动化学发光图像分析系统进行拍照,ImageJ软件分析灰度值,计算蛋白相对表达量。

1.2.12 统计学分析 通过Graphpad Prism 9.0软件进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学

2.1.1 活性成分、靶点筛选 利用TCMSP、ETCM数据库并结合文献,共筛选出262种活性成分,其中丹参172种、三七87种、冰片3种。再查找与衰老有关、是主要药效物质基础的活性成分,最终确定7种,见表2,并在TCMSP、ETCM数据库中搜集靶点,Swiss Target Prediction、SEA数据库中预测靶点,去重后得到313个。

2.1.2 药物-成分-靶点网络构建 检索GeneCards选取Relevance score值0以上的靶点,与从OMIM选取的靶点取交集,删除重复后共获得1 106个与衰老、AS相关的靶点,Venny2.1.0软件取交集,得到110个交集靶点,见图1A。再将药物、活性成分、交集靶点制成Network、Typework

表2 复方丹参方主要活性成分信息

序号	英文名称	中文名称	度值
DS1	salvianolic acid B	丹酚酸B	37
DS2	danshensu	丹参素	36
DS3	protocatechuic aldehyde	原儿茶醛	26
DS4	tanshinone II _A	丹参酮II _A	23
SQ1	ginsenoside Rg1	人参皂苷Rg1	22
SQ2	notoginsenoside R1	三七皂苷R1	20
SQ3	ginsenoside Rb1	人参皂苷Rb1	16

表,导入Cytoscape3.7.1软件中构建药物-成分-靶点网络,Network Analyzer软件分析成分度值,见表2、图1B。

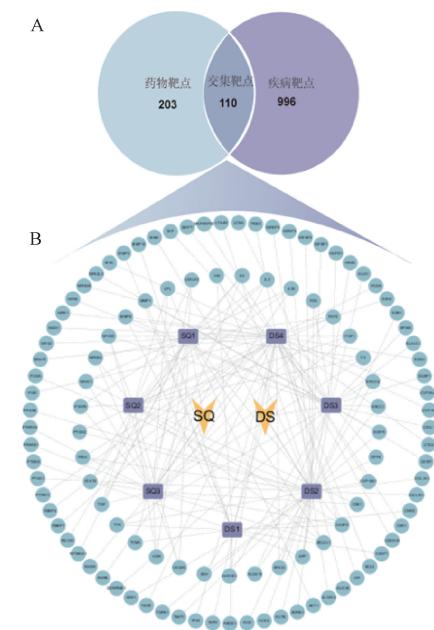


图1 韦恩图(A)与药物-成分-靶点网络图(B)

2.1.3 PPI网络构建 通过STRING数据库对110个交集靶点进行扩充分析后构建PPI网络图,包含180个节点、3 165条边及179个交集靶点,见图2A。采用Cytoscape 3.7.1软件中的CytoNCA插件对上述交集靶点进行中心度分析,发现度值100以上的共有38个。通过Cytoscape 3.7.1软件绘制度值排名前十的靶点网络(度值越大,圆圈越大),见图2B,可知分别为Akt1、TP53、ACTB、TNF、IL-6、JUN、VEGFA、EGFR、ESR1、MYC。

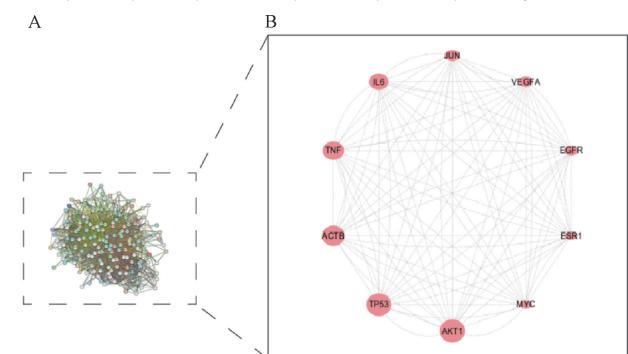


图2 PPI与核心靶点网络图

2.1.4 GO、KEGG富集分析 采用DAVID数据库将179个交集靶点进行GO富集分析,结果显示,179个靶点共涉及478条生物学过程、100条细胞组成过程、167条分子功能,并参与RNA聚合酶Ⅱ启动子转录的正调控、信号转导、RNA聚合酶Ⅱ启动子的转录负调控、RNA聚合酶Ⅱ启动子转录的调节等各种生物学过程,作用于细胞核、细胞质、细胞溶质、核质等细胞组成过程,同时与蛋白结合、

相同的蛋白质结合、金属离子结合、RNA聚合酶Ⅱ核心启动子端近序列特异性DNA结合等分子生物学功能相关联,排名前十者见图3A。

KEGG富集分析显示,179个靶点中共有157条通路被富集。使用微信将Count值排名前十的通路进行可视化,见图3B,可知排名前三的分别为癌症通路、PI3K/Akt信号通路、癌症中的蛋白聚糖通路。

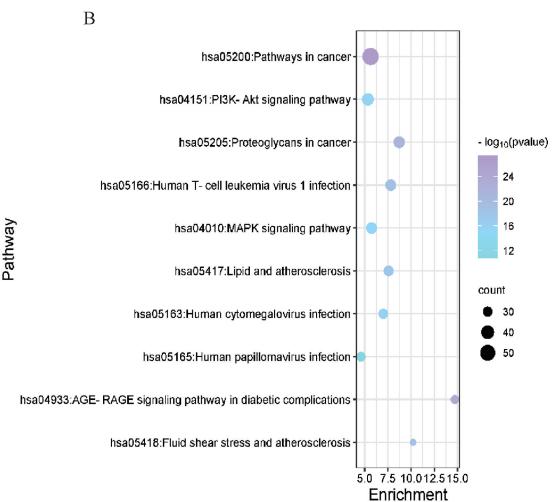
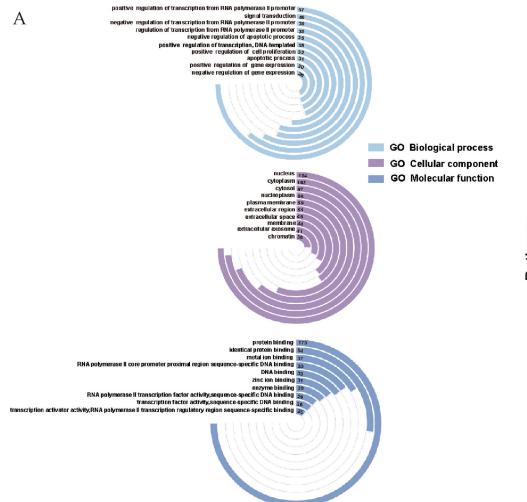


图3 GO (A)、KEGG富集分析 (B) 图

2.1.5 活性成分与靶点对接 根据“2.1.2”“2.1.3”项下结果,选取度值20以上的6种活性成分与排名前五的核心靶点进行对接,分析结合能(结合能越小,受体与配体亲和力越大,对接结果越稳定),见图4,可知Akt1与各活性成分对接的结合能均较高(小于-0.3 kcal/mol),即为关键靶点。再采用PyMol软件将Akt1与原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1对接结果可视化,见图5。

2.2 动物实验

2.2.1 原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1对AS小鼠主动脉斑块的影响 正常组小鼠主动脉边缘清晰,无红色斑块附着;与正常组比较,模型组小鼠主动脉红色斑块面积增加($P<0.01$);与模型组比较,给药组斑块面积减少($P<0.01$),见图6。

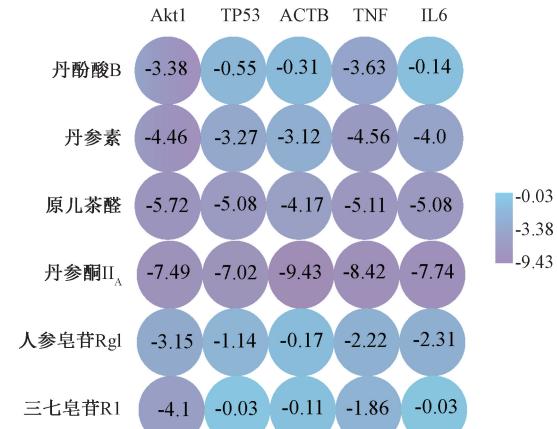


图4 分子对接参数 (kcal/mol)

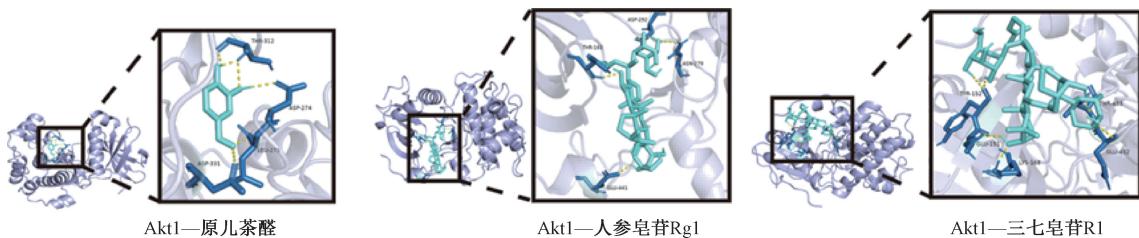
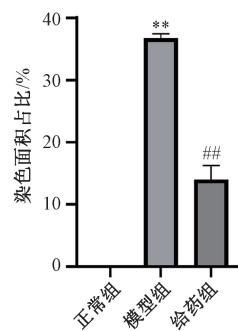
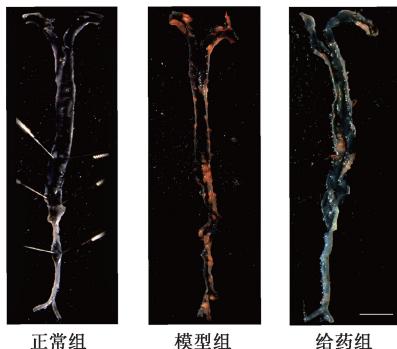


图5 分子对接结果可视化图

2.2.2 原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1对AS小鼠血脂水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清TG、CHOL、HDL-C、LDL-C水平升高($P<0.01$);与模型组比较,给药组小鼠血清TG、CHOL、HDL-C、LDL-C水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),见图7。

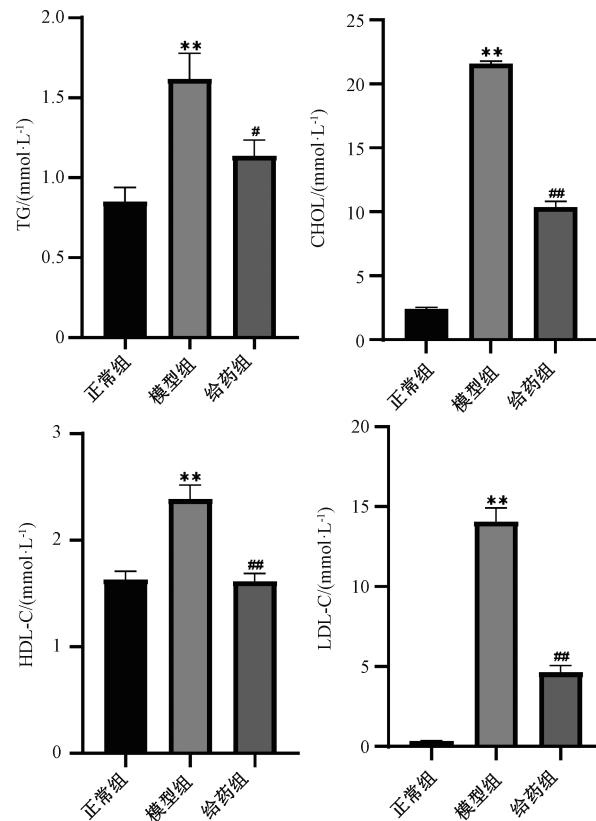
2.2.3 原儿茶醛、人参皂苷Rg1、三七皂苷R1对AS小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平升高($P<0.01$);与模型组比较,给药组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低($P<0.01$),见图8。



注: 比例尺为 5 mm。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

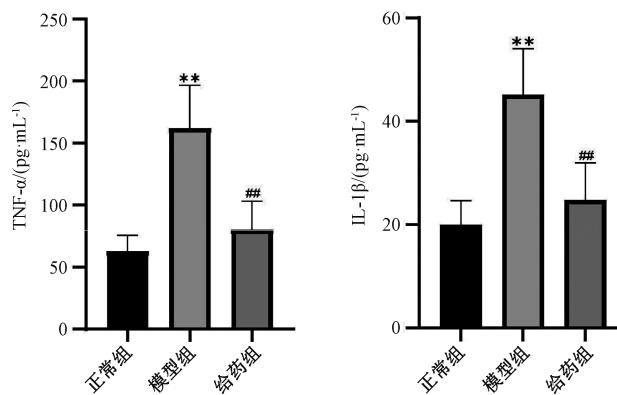
图 6 各组小鼠主动脉油红 O 染色图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.2.4 原儿茶醛、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 对 AS 小鼠主动脉衰老情况的影响 与正常组比较, 模型组小鼠主动脉蓝染区域增多, 出现衰老征象; 与模型组比较, 给药组蓝染区域减少, 表明三者可有效减缓血管衰老进程, 见图 9。



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 各组小鼠血清 TG、CHOL、HDL-C、LDL-C 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 8 各组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

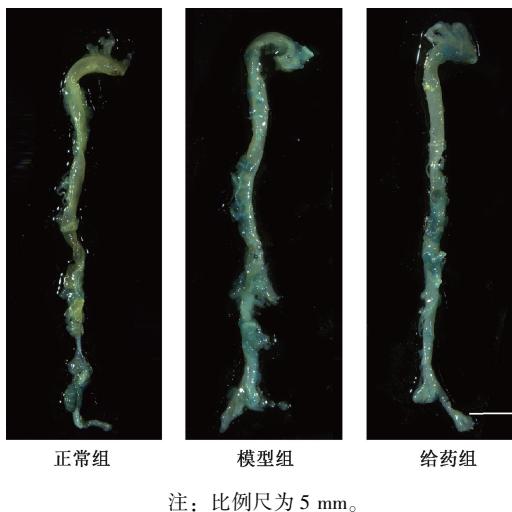
2.2.5 原儿茶醛、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 对 AS 小鼠主动脉组织 *Akt*、*PI3K* mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠主动脉组织 *Akt*、*PI3K* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药组小鼠主动脉组织 *Akt*、*PI3K* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 10。

2.2.6 原儿茶醛、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 对 AS 小鼠主动脉组织 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠主动脉组织 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较,

给药组小鼠主动脉组织 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 11。

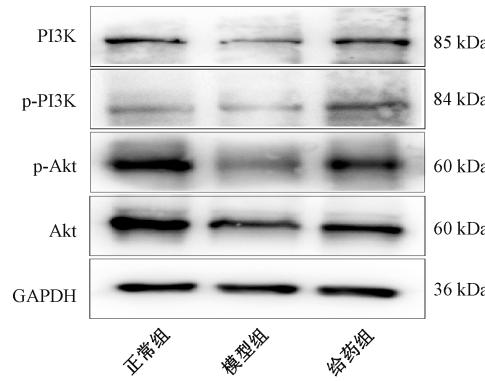
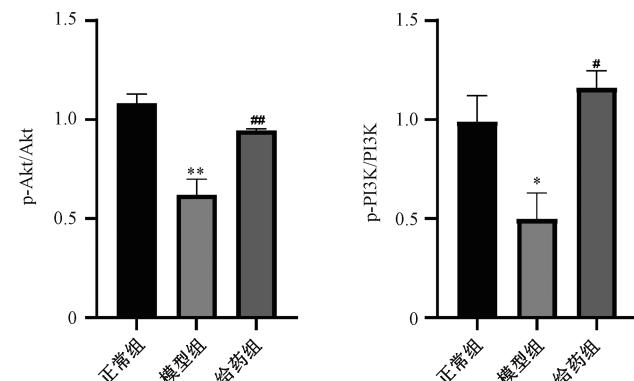
3 讨论

细胞衰老是指细胞形态、细胞代谢等方面发生永久、可逆的停滞^[11], 可以影响 AS 的发展。研究证实, 氧化应激、DNA 损伤等因素会导致血管内皮细胞与平滑肌细胞衰老、巨噬细胞的增多与极化, 从而释放细胞因子以及免疫调节剂等衰老相关分泌表型 (SASP), 进而导致 AS 斑块的形成^[1]。



注：比例尺为 5 mm。

图 9 各组小鼠主动脉 SA-β-Gal 染色图

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。图 10 各组小鼠主动脉组织 *Akt*、*PI3K* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。图 11 各组小鼠主动脉组织 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

网络药理学结合文献分析发现，复方丹参方与细胞衰老有关的关键活性成分有丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、丹参酮 II_A、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 等。其中，原儿茶醛是丹参的活性成分，有清除氧自由基的作用；人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 是三七的活性成分，具有抗氧化、抗炎等作用，这 3 种成分不仅能够延缓内皮细胞衰老，同时在修复内皮细胞形态、减少细胞过度增殖、保护内皮细胞方面也发挥着重要作用^[12-14]。斑块中的衰老细胞会产生高活性的 SA-β-Gal，影响 AS 的发展进程^[15]，而本研究结果显示，原儿茶醛、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 可延缓斑块形成，降低 AS 小鼠体内血脂水平及 SA-β-Gal 活性，延缓细胞衰老。

在细胞衰老过程中，会促使衰老相关分泌表型表达，包括细胞因子、白细胞介素、趋化因子、蛋白酶、生长因子等多种信号分子^[16]，AS 的持续发展促使 TNF-α、IL-1β、IL-6 等衰老相关分泌表型产生^[1]，引起血栓形成及线粒体功能紊乱，而阻断 TNF-α 可使这一情况改变^[17]。Zhao 等^[18]研究表明，IL-1β 可降低端粒酶活性，加快细胞衰老进程。Tyrrell 等^[19]研究发现，血管内皮细胞衰老可使 IL-6 表达升高，促进 AS 的发展。本研究结果显示，原儿茶醛、

人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 可降低 AS 小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，能够有效减缓体内细胞衰老进程。

网络药理学分析显示，Akt1 为关键靶点，PI3K/Akt 信号通路为主要通路。在 PI3K/Akt 信号通路中，Akt 是中心环节，可激活下游多种效应信号分子^[20]，细胞衰老可作用于 PI3K/Akt 信号通路，调控 ROS、NO 的产生，进而影响 AS 的发展^[21-22]。Akt 是一类有着 Akt1、Akt2、Akt3 亚型的丝氨酸/苏氨酸激酶^[23]，而 PI3K 属于脂质激酶，可激活处于 PI3K/Akt 信号通路中心环节的 Akt，诱导下游信号分子磷酸化^[24]，在心血管系统中发挥重要作用。本研究结果显示，原儿茶醛、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1 可升高 *Akt*、*PI3K* mRNA 表达及 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达，提示复方丹参方可通过 PI3K/Akt 信号通路减缓衰老进程，进而影响 AS 的发展。

综上所述，本研究依托生物信息学技术，融合各领域知识信息，构建多维多层次相互关联网络，挖掘出复方丹参方中的主要活性成分可能通过调控 PI3K/Akt 通路来发挥减缓细胞衰老、拮抗 AS 的作用，为临床研究提供理论依据。但只从体内实验角度验证了复方丹参方延缓细胞衰老，从而拮抗 AS 的发展，后续可开展体外实验加以完善。

参考文献:

- [1] Björkegren J L M, Lusis A J. Atherosclerosis: Recent developments[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [2] Gorenne I, Kavurma M, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1): 9-17.
- [3] 刘迅, 邓奕辉. 中医药发展的优势、劣势、机会与威胁分析[J]. 医学与哲学, 2021, 42(13): 62-66.
- [4] 李翔, 吴磊宏, 范晓辉, 等. 复方丹参方主要活性成分网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2911-2915.
- [5] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
- [6] 李娟, 王如锋, 杨莉, 等. 三七皂苷类成分及对心血管作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3480-3487.
- [7] Peng M, Yi Y X, Zhang T, et al. Stereoisomers of saponins in *Panax notoginseng* (Sanqi): A review[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 188.
- [8] 马青, 马蕊, 靳保龙, 等. 天然冰片资源研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 57-61.
- [9] 洪婷. 复方丹参方组分配伍对大鼠心肌损伤的保护作用[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [10] Zhang L, Li Y, Ma X, et al. Ginsenoside Rg1-notoginsenoside R1-protocatechuic aldehyde reduces atherosclerosis and attenuates low-shear stress-induced vascular endothelial cell dysfunction[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 588259.
- [11] Sikora E, Bielak-żmijewska A, Mosieniak G. What is and what is not cell senescence[J]. *Postepy Biochemii*, 2018, 64(2): 110-118.
- [12] 刘梅, 夏鑫华, 张志敏, 等. 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和丹酚酸 B 体外抗氧化活性比较研究[J]. 中药材, 2009, 32(2): 265-267.
- [13] 金建生, 赵朝晖, 陈晓春, 等. 人参皂苷 Rg1 抗衰老作用可能与改变 p16、cyclin D、CDK4 的表达有关[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(1): 29-34.
- [14] 赖小华, 雷燕, 杨静, 等. 基于 microRNA-34a/SIRT1/p53 通路探讨三七皂苷 R₁ 对血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 577-584.
- [15] Lee B Y, Han J A, Im J S, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 187-195.
- [16] Mohamad Kamal N S, Safuan S, Shamsuddin S, et al. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection methods[J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(6): 151108.
- [17] Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguilera S, et al. TNF- α -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging[J]. *Blood*, 2019, 134(9): 727-740.
- [18] Zhao J, He X, Zuo M, et al. Anagliptin prevented interleukin 1 β (IL-1 β) -induced cellular senescence in vascular smooth muscle cells through increasing the expression of sirtuin1 (SIRT1) [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3968-3977.
- [19] Tyrrell D J, Goldstein D R. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(1): 58-68.
- [20] Ghafouri-Fard S, Khanbabapour Sasi A, Hussen B M, et al. Interplay between PI3K/Akt pathway and heart disorders[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 9767-9781.
- [21] Yu J S, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/Akt/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-3060.
- [22] Chen J, Goligorsky M S. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(5): H1729-H1739.
- [23] Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 38-48.
- [24] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.