

# 基于血清药物化学与加权基因共表达网络分析探究葛兰心宁胶囊治疗冠心病的作用

靳琪鹏<sup>1,2</sup>, 王肖龙<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 上海 200021; 2. 上海中医药大学研究生院, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 探究葛兰心宁胶囊治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病 (CAD) 可能调控的关键靶点基因。**方法** HPLC 法对入血成分进行鉴定, 同时借助 GSE20680 数据集, 基于  $P < 0.05$  标准, 筛选出 15 549 个差异表达基因。利用加权基因共表达网络分析, 鉴定与疾病相关的模块基因。确定入血成分可能调控的关键靶点基因, 进一步取交集, 对其靶点进行富集分析, 探索关键靶点的功能和参与的通路, 并完成其与相关成分的分子对接。通过动物实验验证加权基因共表达网络分析结果。**结果** 鉴定出 21 种入血成分。GO 分析显示, 交集基因主要参与凋亡、炎症反应的调控。KEGG 分析显示, 入血成分治疗 CAD 主要参与 NF- $\kappa$ B 信号通路、糖尿病心肌病等相关通路。分子对接实验验证了同时调控关键靶点 PTGS2、PLAU 4 种入血成分的相互作用。动物实验显示, 葛兰心宁胶囊能够降低小鼠主动脉窦的脂质蓄积, 缩小斑块面积, 减少 PTGS2、PLAU 表达。**结论** 本研究揭示了葛兰心宁胶囊入血成分及其治疗 CAD 可能调控的关键靶点基因, 为其进一步临床应用提供了重要依据。

**关键词:** 葛兰心宁胶囊; 冠心病; 血清药物化学; 加权基因共表达网络分析; PTGS2; PLAU

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)10-3483-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.050

目前, 我国心血管疾病患者约 3.3 亿, 其中冠心病约 1 139 万, 因心血管疾病死亡的人数占城乡居民死亡数的首位。冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAD) 由于冠状动脉血管痉挛、狭窄、血流受限等因素导致心肌缺血、缺氧的缺血性心脏病, 简称冠心病, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其发生的关键环节, 由于动脉内皮损伤、脂质浸润、斑块形成, 最终导致动脉狭窄, 血流受限, 其常见的治疗方法包括药物治疗、冠状动脉介入治疗和冠状动脉旁路移植手术, 虽然能够有效缓解患者的症状, 但就提高生存率、降低复发率的远期疗效尚不明确<sup>[1]</sup>。药物治疗仍是 CAD 治疗的基石, 《中国心血管健康与疾病报告 2022 概要》<sup>[2]</sup> 指出, 我国心血管发病率和死亡率仍在升高, 疾病负担下降拐点尚未出现, 故相关新药的开发与应用势在必行。由葛根总黄酮、山楂提取物、绞股蓝总皂苷等组成的葛兰心宁胶囊在冠心病临床治疗中颇见成效, 但其具体成分及机理仍不明确, 故本研究以该制剂为对象, 探究其治疗冠心病的可能作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 6 只、SPF 级 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠 12 只, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自浙江维通

利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0001]。本研究通过上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理审批号 PZSHUTCM18113010)。

1.2 试剂与药物 葛兰心宁胶囊 (西安千禾药业股份有限公司, 批号 Z20025490)。葛根素对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 T19M7F11461); 染料木素、熊果酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111704-201703、110742-201220); 黄豆黄素对照品 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 J0405AS)。ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒、HiScript III SuperMix 逆转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 批号 Q711-02、R323-01)。甲醇、乙腈 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号 216515、F22M7B202)。高脂饲料 (0.2% 胆盐、1% 胆固醇、10% 蛋黄粉、10% 猪油、78.8% 繁殖属料) 购自江苏省协同生物工程有限责任公司, 生产许可证号苏饲证 (2014) 01008。

1.3 仪器 Thermo Scientific Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统、Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱系统 (美国 Thermo Fisher 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu$ m) (美国 Waters 公司); MJ PTC-100PCR 仪 (美国 MJ Research 公司); F-4500 荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司)。

收稿日期: 2024-03-07

基金项目: 上海市中医临床重点实验室项目 (14DZ2273200); 上海市临床重点专科项目 (shslczdk05301)

作者简介: 靳琪鹏 (1996—), 男, 博士生, 从事中西医结合防治心血管病研究。Tel: 18434376338, E-mail: 18434376338@163.com

\* 通信作者: 王肖龙 (1965—), 男, 教授, 从事中西医结合防治心血管病研究。Tel: (021) 20256343, E-mail: wxlqy0214@163.com

2 方法

2.1 入血成分分析

2.1.1 混悬液制备 取本品内容物适量，加入超纯水，按照人与动物给药剂量换算表进行换算，确定灌胃剂量为 52.78 mg/mL，调整质量浓度为 60 mg/mL，摇匀，即得。

2.1.2 药材原液制备 精密称取本品内容物 10 mg，加入 1 mL 超纯水，超声研磨 30 min 后离心，取 80 μL 上清液，加到液相小瓶中，即得，用于与含药血清成分进行对比。

2.1.3 分组、给药与血清采集 C57BL/6 小鼠随机分为空白组和给药组，给药前禁食 12 h，自由饮水，灌胃给予 0.2 mL 60 mg/mL 药物混悬液，分别于给药后 0.5、1、2 h 取血约 0.8 mL，静置 30 min，离心 15 min 后取上层血清。

2.1.4 分析条件 色谱：ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相 0.1% 甲酸（C）-乙腈（D），梯度洗脱（0~1 min，95% C；1~6 min，95%~68% C；6~12 min，68%~45% C；12~19 min，45%~5% C；19~22 min，5%~95% C）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 45℃；进样量 3 μL。

质谱：离子源 HESI；负离子扫描；喷雾电压 2.5 kV；碰撞能量 50 eV；毛细管加热温度 330℃；辅助气加热温度 300℃，体积流量 12 L/min；鞘气体积流量 40 L/min；扫描范围  $m/z$  80~1 200，分辨率 70 000。

2.1.5 成分库建立 通过 CNKI、PubMed 等数据库对化学成分进行总结，共得到 21 种，利用 PubChem（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）平台搜索其化学式、结构式、相对分子质量等信息。

2.1.6 对照品溶液制备 精密称取葛根素、黄豆黄素、染料木素、熊果酸对照品各 1 mg，1 mL 甲醇溶解，得各成分质量浓度为 1 000 μg/mL 的贮备液，4℃冰箱中冷藏，分别取 20 μL，甲醇定容至 10 mL，即得。

2.2 加权基因共表达网络分析

2.2.1 成分靶点构建 由质谱分析得到入血成分，通过 PubChem 获取其 SMILES 化学式，输入至 Swiss Target Prediction 平台<sup>[1]</sup>，选择物种人类（*Homo sapiens*）进行蛋白靶点的预测。

2.2.2 冠心病患者数据获取 从 GEO 数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）下载 GSE20680 数据集的探针矩阵文件，含有 87 个冠状动脉粥样硬化性心脏病患者的全血样品和 52 个健康人群体检的全血样品，通过基因芯片平台 GLP4133（<http://www.agilent.com/>）下载相关数据注释信息。

2.2.3 冠心病患者差异基因筛选 利用 R 语言（4.3.0 版）对 GEO 数据库转录组数据进行整理，选择差异分析，以  $P<0.05$  为筛选条件，limma 包获取差异表达基因，pheatmap 数据包得到火山图。

2.2.4 加权基因共表达分析

2.2.4.1 数据获取与预处理 采用公开可用的 GSE20680 数据集，包括 139 个样本和 45 015 个基因。在进行加权基

因共表达网络分析前，首先对 GSE20680 数据集进行质量控制和标准化处理，通过 limma 包中的 Normalize Between Arrays 函数进行数据标准化处理，主成分分析（principal component analysis，PCA）对样本进行聚类，以排除潜在的异常样本。

2.2.4.2 网络构建和模块检测 使用加权基因共表达网络分析 R 包进行分析。首先进行差异分析，获取的差异基因计算其之间的皮尔逊相关系数，构建一个相似性矩阵。然后，选择软阈值  $\beta=6$ ，将相似性矩阵转换为加权邻接矩阵。

然后，使用基于层次聚类的方法识别密切相关的基因模块。每个模块都是 1 个基因集合，在网络中高度相互连接，通过动态树剪枝方法来确定，并设置最小者为 50 个基因。

2.2.4.3 模块特征基因获取 每个模块都用一个模块特征基因（ME）来表示，它是模块内所有基因表达谱的第一主成分。再计算了模块特征基因与 GSE20680 数据集中样本临床特征之间的相关性，获取最强者备用。

2.2.5 交集基因筛选 将加权基因共表达网络分析构建所获得的与疾病相关系最高的 2 个基因模块进行数据合并，并将数据、差异基因通过 String 数据库进行靶点转化，再与成分靶点进行对比，获取抗动脉粥样硬化的潜在靶点。

2.2.6 GO、KEGG 富集分析 利用 R 语言的 org. Hs. eg. db 数据包对“2.2.5”项下交集基因进行 ID 转换，cluster Profiler、dplyr、enrichplot 等软件进行分析。

2.2.7 关键靶点与入血成分分子对接 通过 PubChem 数据库下载成分相应 3D 结构，由“openbabel”途径进行格式转化，转化为结尾为 pdb 的文件格式，导入 Auto dock Tool 1.5.7 软件进行配体编辑；通过 NCBI 数据库或 RCSB Protein Data Bank 数据库查询关键靶点蛋白质结构，在相应的检索条目下搜索受体的名称，下载后的文件同上操作。采用 Auto dock Tool 1.5.7 软件输出结合的最优构象，导入 PyMol 程序进行配体与受体最优构象的详细读取。

2.3 动物实验

2.3.1 分组、造模及给药 6 只 C57BL/6 雄性小鼠为空白组，12 只 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠按随机数字表法分为模型组和葛兰心宁胶囊组，每组 6 只。小鼠适应性喂养 1 周后，空白组给予基础饲料，其余各组给予高脂饲料，同时葛兰心宁胶囊组灌胃给予 60 mg/mL 药物混悬液，空白组和模型组灌胃给予蒸馏水，连续 8 周。

2.3.2 HE 染色及油红 O 染色 给药结束后，各组小鼠禁食不禁水 12 h，麻醉后迅速暴露心脏，剪除部分心耳，将装有 PBS 的注射器针头插入心尖，缓慢注入清洗心脏，通过心耳或主动脉排出，直至流出液清澈，后换 4% 多聚甲醛继续灌流以确保心脏被充分固定，最后取下心脏。心尖朝下，置于 OCT 包埋剂中，迅速转移至液氮中连续切片（5 μm）12 张，防脱玻片贴片，置于室内阴凉处晾干，4% 多聚甲醛固定 10 min，双蒸水清洗后于 -80℃ 冰箱中保存，

复温后进行 HE 染色及油红 O 染色。

2.3.3 高通量测序 空白组、模型组、葛兰心宁胶囊组各选 3 只小鼠冠状动脉进行高通量测序，提取总 RNA 纯度，OD 值在 1.8~2.2 之间，Adilent 2100 score ≥7，总量 ≥1 μg。并完成原始测序数据的质控：使用 cutadapt-v 1.8.1 去除接头序列，FASTX-v0.0.13 去除低质量、长度小于 17nt、含有 poly-A/T/C/G/N 的 reads，获得高通量测序数据。

2.3.4 RT-qPCR 法检测小鼠 *Ptgs2*、*Plau* mRNA 表达 取各组小鼠主动脉，TRIzol 法提取总 RNA，使用逆转录试剂盒在梯度 PCR 仪上将其反转录成 cDNA。采用 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒，通过荧光定量 PCR 仪平台，检测基因 *Plau*、*Ptgs2* mRNA 表达，以 *GAPDH* 为内参，按  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因相对表达，引物由生工生物工程（上海）有限公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
<i>Ptgs2</i>	正向 GGAGTTGCCTTTTATGGAC
	反向 GAAACAGCTCTCCTCCTACAC
<i>Plau</i>	正向 CCCGTGCTCTGTCTTAAC
	反向 GGCTTTGCTGGCTACCACTC
<i>GAPDH</i>	正向 AACAGCCTCAAGATCATC
	反向 ACTGTGCAACCGTCACCC

2.3.5 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理，符合正态分布的数据以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析，事后检验采用 Tukey's HSD 法。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

表 3 葛兰心宁胶囊给药后入血成分鉴定结果

编号	化合物	化学式	理论相对分子质量 $[M+H]^+m/z$ $[M+HCOO]^-m/z$ $[M-H]^-m/z$			$t_R/\text{min}$
1	葛根素( puerarin)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	416. 110 18	417. 118 01	—	5. 60
2	染料木素( genistein)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270. 052 27	271. 060 10	—	9. 80
3	黄豆黄素( glycitein)	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284. 067 93	285. 075 75	—	8. 77
4	芒柄花苷( ononin)	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	428. 110 18	429. 118 01	—	5. 78
5	葛花苷( kakkalide)	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	608. 173 57	609. 181 40	—	6. 78
6	羟丙基酸( calophyllic acid)	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	420. 156 74	421. 164 57	—	15. 35
7	2,3-二甲基喹唑啉( 2,3-dimethylquinizarin)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	322. 119 96	323. 127 79	—	12. 99
8	葛根素-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷( puerarin-4'-β- <i>D</i> -glucopyranoside)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	578. 163 01	579. 170 83	—	8. 71
9	鸢尾黄酮( tectorigenin)	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300. 062 84	301. 070 66	—	10. 1
10	3,2'-二羟基黄酮( 3,2'-dihydroxyflavone)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	258. 088 66	259. 096 49	—	6. 59
11	3'-甲氧基大豆苷( 3'-methoxydaidzin)	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	446. 120 75	—	491. 118 40	9. 28
12	绞股蓝皂苷 XI IX ( gypenoside XI IX )	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	1 046. 565 61	—	1 091. 563 27	10. 31
13	绞股蓝皂苷 A ( gypenoside A )	C <sub>46</sub> H <sub>73</sub> O <sub>17</sub>	897. 484 23	—	942. 481 88	11. 99, 12. 23
14	人参皂苷 RbI ( ginsenoside Rb1)	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	1 108. 602 39	—	1 153. 600 04	11. 08
15	葡萄糖牡荆素( glucosylvitexin)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594. 157 92	—	—	593. 150 10
16	3'-羟基脯氨酸( 3'-hydroxypuerarin)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432. 105 10	—	—	431. 097 27
17	栎精( quercetin)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302. 042 10	—	—	301. 034 28
18	熊果酸( ursolic acid)	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456. 359 80	—	—	455. 351 97
19	绞股蓝皂苷 IX X V ( gypenoside IX X V )	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	784. 460 36	—	—	783. 452 53
20	绞股蓝皂苷 XI VI ( gypenoside XI VI )	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	962. 544 48	—	—	961. 536 66
21	人参皂苷 Rd ( ginsenoside Rd)	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	946. 549 57	—	—	945. 541 74

3.2.3 关键基因获取 对 631 个入血成分靶点蛋白、1 230 个绿色模块预测蛋白、64 个黄绿色模块预测蛋白及 1 190

### 3 结果

3.1 入血成分 对照品信息见表 2，总离子流图见图 1A，药材原液总离子流图见图 1B，给药 2 h 后血浆样品总离子流图见图 1C，对照品各成分峰提取图见图 2。采用外标一点法，通过与对照品进行比对得到入血成分共 21 种，具体见表 3。

表 2 对照品信息

对照品	分子式	理论相对分子质量	$[M+H]^+m/z$	$t_R/\text{min}$
葛根素	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	416. 110 18	417. 118 01	5. 60
染料木素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270. 052 27	271. 060 10	9. 80
黄豆黄素	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284. 067 93	285. 075 75	8. 77
熊果酸	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456. 359 80	455. 351 97	16. 84

3.2 入血成分靶点与加权基因共表达网络

3.2.1 入血成分靶点 通过 SwissTarget 数据库获得 631 个预测靶点，见图 3。

3.2.2 GSE20680 数据集加权基因共表达网络 对 GSE20680 包含的 195 个全血样本进行筛选，选择主要血管狭窄 ≥70% 及 ≤25% 者进行主成分分析，见图 4A；根据  $P<0.05$  获取 15 549 个差异表达基因及其火山图，见图 4B；差异表达基因进行加权基因共表达网络分析，见图 4C~4D，根据无标度拓扑拟合指数 >0.85，选择软阈值为 6 进行分析；根据组别的差异性分出 14 个与疾病相关联的模块基因，见图 4E~4F，其中绿色、黄绿色模块与冠心病相关性最强，前者包含 1 303 个基因，后者包含 118 个基因，见图 4G。



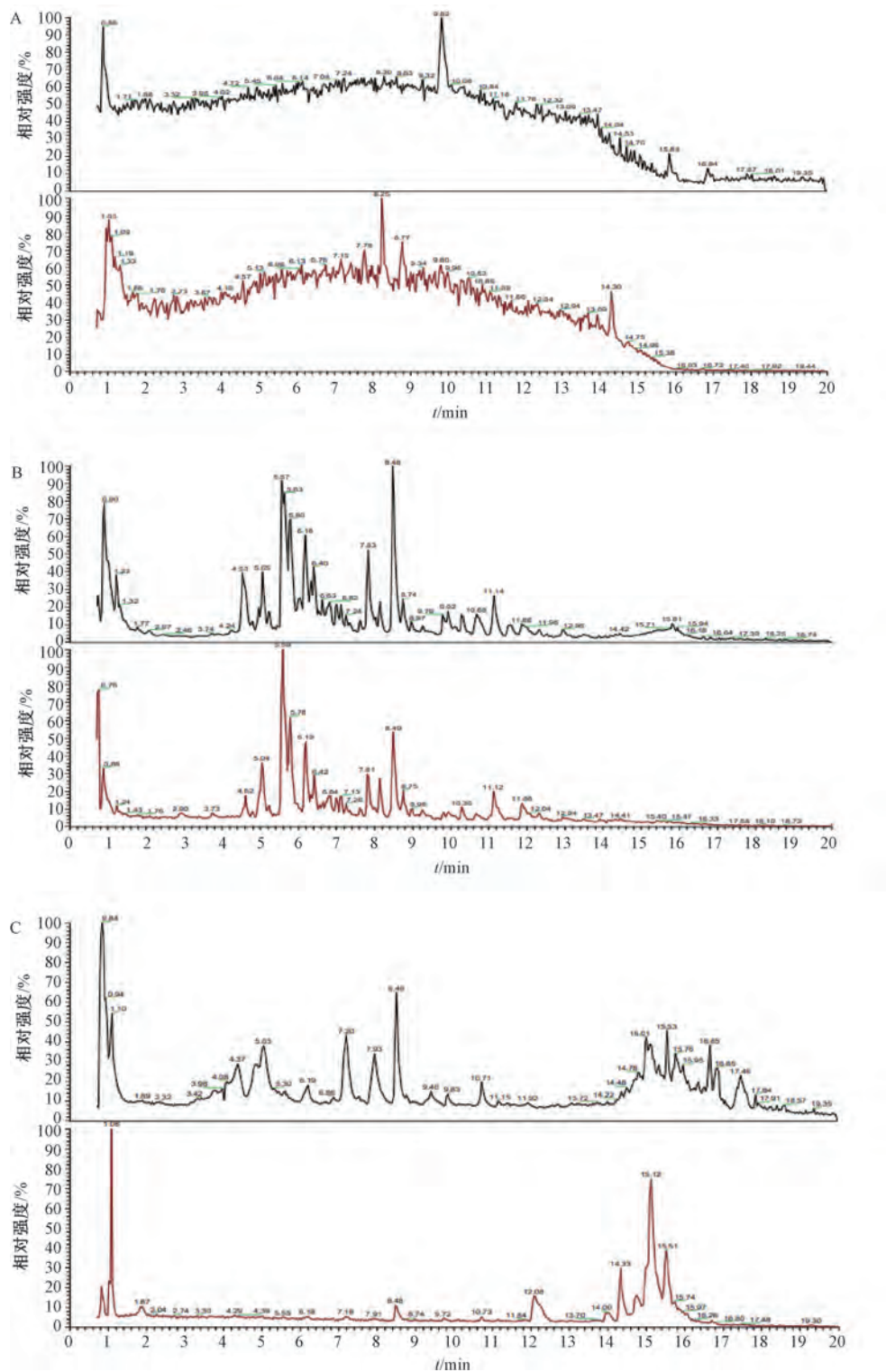


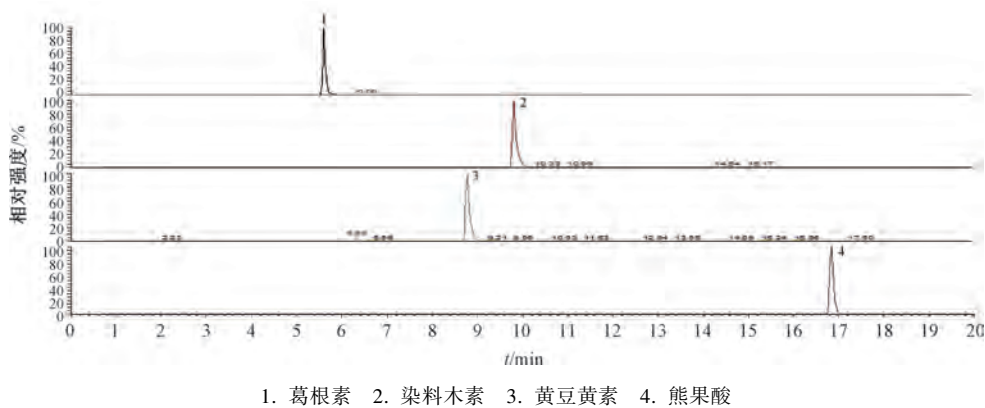
图 1 葛兰心宁胶囊入血成分总离子流图

个差异基因 logFC 绝对值>1.5 的预测蛋白取交集，得到 14 种入血成分可能调控的关键靶点（MMP9、ALPL、CA4、DAPK1、PRKDC、PTGS2、PLAU、SLC2A1、BCL2A1、ABCC5、F2RL1、LRRK2、CTSD、ALOX5AP），见图 5。

3.2.4 关键靶点 GO 功能分析与 KEGG 通路分析 将 14 个关键靶点导入 David 数据库进行富集分析，得出的数据导入 R 语言中进行绘图，见图 6。GO 分析结果显示，关键靶点

的功能在于参与凋亡过程中的半胱氨酸型内肽酶活性的调控、对无机物质、金属离子、肽类激素、化学应激的细胞反应以及相关炎症反应的调控。KEGG 分析结果显示，它主要参与 NF-κB 信号通路、糖尿病心肌病相关通路、癌症相关通路，并且参与 NF-κB 信号通路的关键靶点有 PTGS2、PLAU、BCL2A1。

3.2.5 分子对接及结合能 将入血成分预测靶点与参与



1. 葛根素 2. 染料木素 3. 黄豆黄素 4. 熊果酸  
图 2 对照品 SIM 图

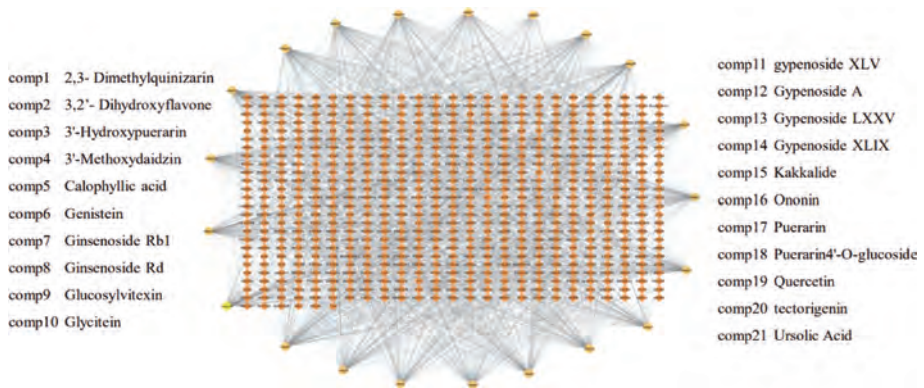


图 3 葛兰心宁胶囊入血成分靶点图

NF-κB 信号通路的关键靶点 PTGS2、PLAU、BCL2A1 进行对比后发现，可作用于 PTGS2 的成分有 12 种，可作用于 PLAU 的成分有 6 种，可作用于 BCL2A1 的成分有 1 种，同时作用于 PTGS2、PLAU 的入血成分有 4 种，分别是 3'-羟基脯氨酸、染料木素、黄豆黄素、葛根素。因此，对以上 4 种入血成分与作用靶点 PTGS2（PDB ID：5IKR）、PLAU（PDB ID：1F92）进行分子对接，结果见表 4、图 7。

表 4 分子对接最佳结合能及氢键结合位点

分子	PTGS2 结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )	氢键结合位点	分子	PLAU 结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )	氢键结合位点
3'-羟基脯氨酸	-10.64	THR-129 GLY-135 GLN-461	3'-羟基脯氨酸	-9.06	ARG-37A ARG-35 LYS-61 ASP-60A
染料木素	-8.59	ARG-333 GLN-241 SFR-143	染料木素	-7.54	CYS-58 VAL-41 TYR-149 TYR-151
黄豆黄素	-8.50	CYS-47 GLN-461 GLU-465	黄豆黄素	-7.23	CYS-58 TYR-151
葛根素	-8.99	CYS-47 GLY-135 GLU-461 HIS-39	葛根素	-8.74	ASP-60A ASP-63 LYS-61 ARG-37A

3.3 动物实验

3.3.1 对小鼠主动脉粥样斑块形成及脂质蓄积的影响 与空白组比较，模型组小鼠主动脉粥样斑块面积和脂质蓄积增加 ( $P<0.05$ )；与模型组比较，葛兰心宁胶囊组小鼠主动脉粥样斑块面积和脂质蓄积减少 ( $P<0.05$ )，见图 8、表 5。

3.3.2 对小鼠关键靶点 *Ptgs2*、*Plau* 的影响 与空白组比

较，模型组 *Ptgs2*、*Plau* 表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )；与模型组比较，葛兰心宁胶囊组 *Ptgs2*、*Plau* 表达降低 ( $P<0.05$ )，见图 9。

3.3.3 对小鼠 *Ptgs2*、*Plau* mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组 *Ptgs2*、*Plau* mRNA 表达升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，葛兰心宁胶囊组 *Ptgs2* mRNA 表达降低 ( $P<$

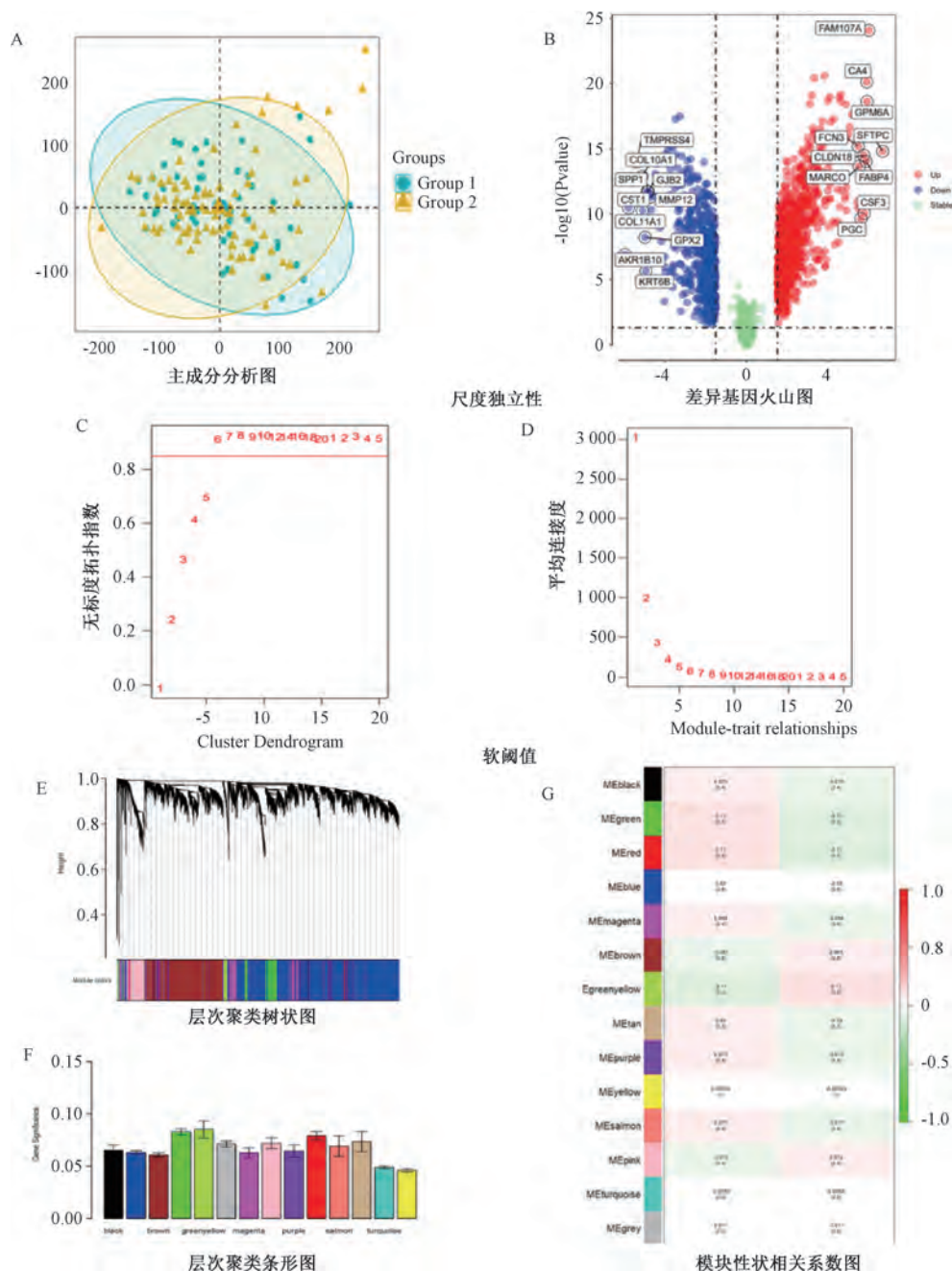


图 4 GSE20680 数据集 PCA、差异分析和加权基因共表达网络分析

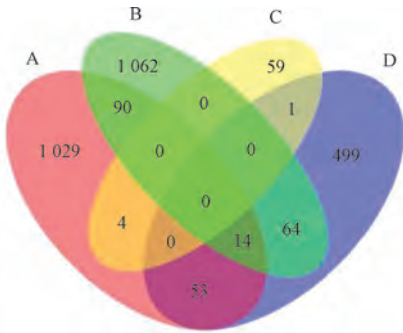


图 5 关键靶点蛋白筛选 Venn 图

0.05), 而 *Plau* mRNA 表达有降低趋势, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 10。

4 讨论

多项临床试验发现, 葛兰心宁胶囊能够有效缓解冠脉狭窄、缩小冠脉斑块、促进血管内皮功能的恢复、调节血脂谱, 减轻炎症反应, 改善患者心绞痛症状、提升患者生活质量, 且临床安全有效<sup>[3-8]</sup>。本次研究通过 HPLC 分析得出其主要包含黄酮类 (葛根素、黄豆黄素、葛根素-4'-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、鸢尾黄酮、3, 2'-二羟基黄酮、3'-甲基大豆苷)、皂苷类 (多种绞股蓝皂苷及多种人参皂苷等及其它成分)。现代药理学研究发现, 葛根素作为由葛根提取出的一种黄酮类物质, 能够调节肝脏脂肪沉积、减低氧化

注: A 为 logFC 绝对值>1.5 的差异基因的调控靶点, B 为绿色模块靶点蛋白, C 为黄绿色模块靶点蛋白, D 为入血成分靶点蛋白。



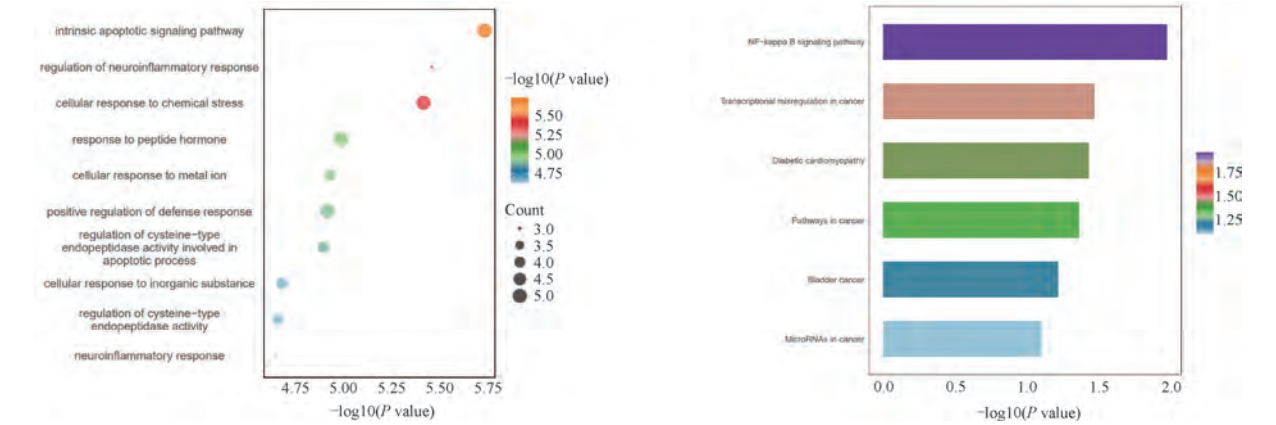


图 6 GO 功能、KEGG 通路富集分析图

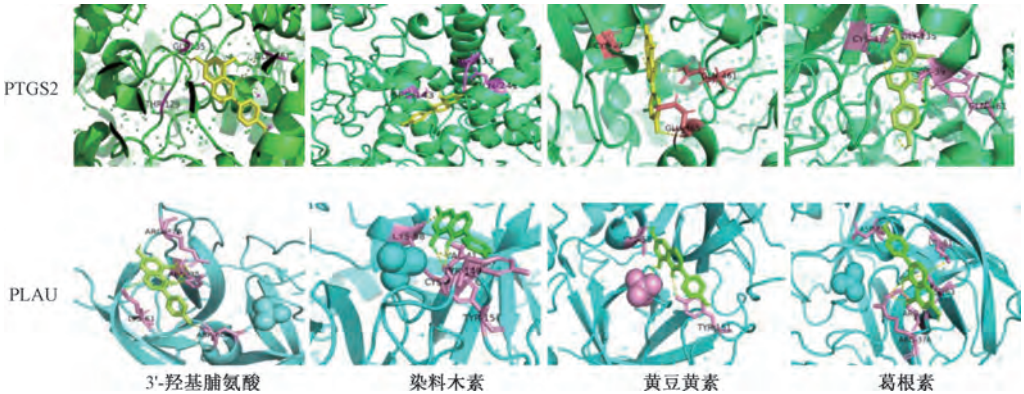


图 7 分子对接图

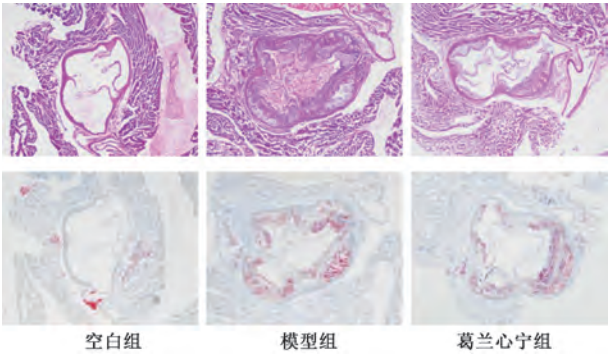


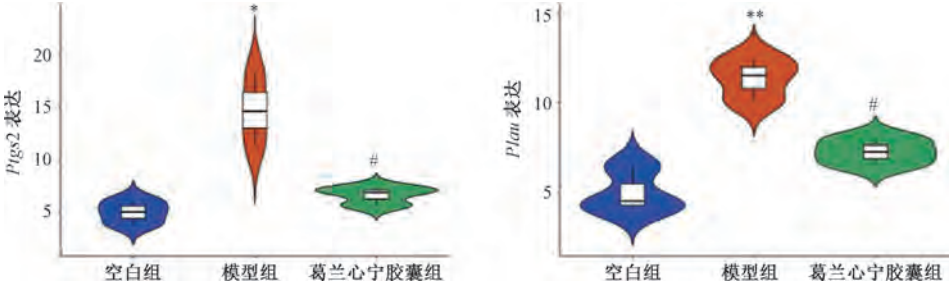
图 8 各组小鼠主动脉窦 HE 染色和油红 O 染色图 (×40)

表 5 各组小鼠主动脉窦斑块面积、脂质蓄积面积比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	斑块面积占比/%	脂质蓄积面积占比/%
空白组	0±0	0±0
模型组	63.58±2.05 *	20.12±4.82 *
葛兰心宁胶囊组	28.52±5.98 #	6.58±1.84 #

注：与空白组比较，\*  $P<0.05$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ 。

应激和炎症反应<sup>[9]</sup>；一项临床试验表明，葛根素能缓解急性心绞痛发作频率、减少硝酸甘油的剂量，改善不稳定性心绞痛患者症状<sup>[10]</sup>；皂苷类的绞股蓝苷能够调节小鼠肠道微环境、抑制血管细胞黏附分子-1 等多种炎症因子减轻炎



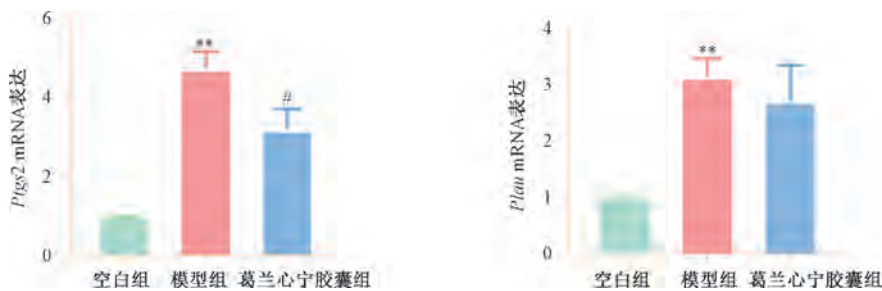
注：与空白组比较，\*  $P<0.05$ ，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ 。

图 9 高通量测序分析各组 *Ptgs2*、*Plau* 表达

症反应改善动脉粥样硬化<sup>[11-13]</sup>，但针对于葛兰心宁胶囊药物成分及作用机制研究较少，仅对部分成分进行质谱分析，

故对其进行全面考察是必要的。

本研究在检测葛兰心宁胶囊有效入血成分的基础上，



注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ 。

图 10 RT-qPCR 分析各组 *Ptg2*、*Plau* mRNA 表达

充分借助公共数据库，使用冠心病患者与健康人的全血转录组进行差异分析及加权基因共表达网络分析。全血转录组涵盖血液中所有细胞类型，以白细胞为主（单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等），通过分析可以了解不同人群的基因表达模式的变化，为生物标志物的识别、疾病相关的分子机制的探讨，以及药物治疗对基因表达的影响提供依据<sup>[14]</sup>。加权基因共表达网络分析是一种保留基因之间网络拓扑关系，用于探索不同疾病状态下基因表达情况，提供一种全局视角用于理解基因表达情况和调控关系<sup>[15]</sup>。单核细胞作为 AS 发生发展的关键细胞，随着近年来中性粒细胞与 AS 研究的逐步深入，其作用机制值得深入研究。故选择以样本量较大的 GSE20680 作为挖掘对象，同时结合药物网络药理学与分子对接为关键成分及关键靶点的相互作用提供可能的依据。

**4.1 葛兰心宁胶囊与 PLAU** 尿激酶型纤溶酶原激活酶（plasminogen activator urokinase, PLAU）是纤溶系统中编码尿激酶型纤溶酶原激活酶的关键基因，可以激活纤溶酶原，将其转化为纤溶酶。有研究表明，纤溶酶原的激活导致纤维连接蛋白降解产物能够作为中性粒细胞的激动剂发挥作用<sup>[16]</sup>。对于 AS 而言，骨髓细胞中的单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞在其发生发展过程中起着重要的作用，在人类总循环白细胞总数 70% 的中性粒细胞的激活与心血管事件的发生增加密切相关<sup>[17]</sup>。由颗粒蛋白形成的 NET 是中性粒细胞激活的最终产物，NET 形成的标志物已被证明与 AS 的严重程度相关<sup>[18]</sup>。Zhu 等<sup>[19]</sup>通过高通量测序结合 ROC 分析斑块破裂患者外周血单个核细胞基因表达谱，表明 PLAU—PLAUR 系统在稳定斑块中起主要作用。PLAU 在人类晚期斑块和易破裂区域高度表达，其丰度与斑块稳定性有关，斑块中 PLAU 活性升高会导致基底膜蛋白丢失和斑块破裂<sup>[20-21]</sup>，导致斑块的破裂出血，加剧了心血管事件的发生风险。此外，一项纳入 78 名冠心病患者的随机对照临床试验发现，服用 2 个月的葛兰心宁胶囊能够抑制炎症反应，恢复内皮功能及显著减低可溶性尿激酶纤溶酶原激活剂受体的表达<sup>[22]</sup>。通过葛兰心宁胶囊血清靶点预测与冠心病患者全血转录组数据，结合小鼠高通量测序数据中 PLAU 的表达，发现结果与现有研究一致。由此可知，葛兰心宁胶囊可能调控 PLAU 的表达，介导中性粒细胞 NET 的异常形成，起到减缓动脉粥样硬化，稳定斑块，减少冠心病患

者心血管事件发生的风险的作用。

**4.2 葛兰心宁胶囊与 PTGS2** PTGS2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2）是高度可变的，用于编码环氧酶（cyclooxygenases 2, COX-2）的基因，其中单核苷酸多态性 rs5275 位点的突变与急性冠脉综合征的发生密切相关<sup>[23]</sup>。众所周知，氟化物会增强炎症反应，而受其影响的分化的单核细胞中 COX-2 的转录产物高度增加，分化的单核细胞在炎症刺激下易形成泡沫细胞，进而加速 AS 的发生<sup>[24]</sup>。一系列的体外实验发现，COX-2 是巨噬细胞 M1 与 M2 型相互转化的关键酶，M1 与 M2 比例的变化决定了动脉粥样硬化斑块的稳定性<sup>[25]</sup>，由此可见 PTGS2 在 AS 的进程中扮演着重要的角色。Zhou 等<sup>[26]</sup>通过获取处在不同时期的冠状动脉组织发现，在冠状动脉斑块中 PTGS2 的表达显著上调，与 AS 的等级及分期呈正相关。葛兰心宁胶囊入血成分 3'-羟基脯氨酸、染料木素、黄豆黄素、葛根素等的预测靶点均与 PTGS2 相关联，其作用可能通过减轻炎症反应，稳定斑块，进而改善患者不适症状。

本研究通过 HPLC 法对葛兰心宁胶囊进行定性定量分析，并利用差异分析、加权基因共表达网络分析、网络药理学、分子对接等多种手段，发现其入血成分可能通过作用于 PTGS2、PLAU 等靶点。此外，葛兰心宁胶囊能够减轻小鼠主动脉窦的脂质蓄积，缩小斑块面积，结合高通量测序、PCR 结果认为其作用可能与减轻炎症反应、调节脂质代谢，进而起到改善心肌缺血缺氧和冠心病患者症状相关，可为其开发应用提供借鉴。

参考文献：

[ 1 ] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗冠心病临床应用指南（2020 年）[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(4): 391-417.

[ 2 ] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583-612.

[ 3 ] 徐俊伟, 郭树领. 葛兰心宁软胶囊联合瑞舒伐他汀治疗冠心病心绞痛的效果研究[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2023, 29(9): 1628-1631.

[ 4 ] 刘天骄, 王晓菲, 张田田, 等. 葛兰心宁软胶囊联合替格瑞洛片对冠心病心绞痛患者心功能和血管内皮功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(4): 651-654; 765.



[ 5 ]

曹新芳. PCI 术后强效他汀联合葛兰心宁降低 LDL-C 的效果[J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 36(2): 183-185.

[ 6 ]

付博文, 宫丽鸿. 葛兰心宁软胶囊治疗冠心病临床疗效及对血清 ICAM-1 和 Ang II 影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 99-102.

[ 7 ]

阮小芬, 王英杰, 邵春林, 等. 葛兰心宁软胶囊治疗冠心病心绞痛的临床效果及对脂质代谢的影响[J]. 中国医药导报, 2017, 14(18): 138-141; 152.

[ 8 ]

孙元隆, 王肖龙, 李益萍, 等. 葛兰心宁软胶囊治疗冠心病临床疗效和安全性的 Meta 分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(5): 513-519.

[ 9 ]

Zhou J, Zhang N, Aldhahrani A, *et al.* Puerarin ameliorates nonalcoholic fatty liver in rats by regulating hepatic lipid accumulation, oxidative stress, and inflammation [ J ]. *Front Immunol*, 2022, 13: 956688.

[ 10 ]

Wang Q, Wu T, Chen X, *et al.* Puerarin injection for unstable angina pectoris[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(3): CD004196.

[ 11 ]

Gao M, Heng X, Jin J, *et al.* Gypenoside XLIX ameliorate high-fat diet-induced atherosclerosis *via* regulating intestinal microbiota, alleviating inflammatory response and restraining oxidative stress in ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(9): 1056.

[ 12 ]

Huang T H, Tran V H, Roufogalis B D, *et al.* Gypenoside XLIX, a naturally occurring PPAR- $\alpha$  activator, inhibits cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and activity in human endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 565(1-3): 158-165.

[ 13 ]

Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [ J ]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.

[ 14 ]

Basu M, Wang K, Ruppin E, *et al.* Predicting tissue-specific gene expression from whole blood transcriptome[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(14): eabd6991.

[ 15 ]

Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [ J ]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.

[ 16 ]

Wachtfogel Y T, Abrams W, Kucich U, *et al.* Fibronectin degradation products containing the cytoadhesive tetrapeptide stimulate human neutrophil degranulation [ J ]. *J Clin Invest*, 1988, 81(5): 1310-1316.

[ 17 ]

Tucker B, Ephraums J, King T W, *et al.* Impact of impaired cholesterol homeostasis on neutrophils in atherosclerosis [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(5): 618-627.

[ 18 ]

Novotny J, Oberdieck P, Titova A, *et al.* Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction [ J ]. *Neurology*, 2020, 94 ( 22 ): e2346-e2360.

[ 19 ]

Zhu G, Gao Y, Qian J, *et al.* Comprehensive analysis of atherosclerotic plaques reveals crucial genes and molecular mechanisms associated with plaque progression and rupture[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 951242.

[ 20 ]

Sama I E, Woolley R J, Nauta J F, *et al.* A network analysis to identify pathophysiological pathways distinguishing ischaemic from non-ischaemic heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2020, 22(5): 821-833.

[ 21 ]

Liang O D, Chavakis T, Kanse S M, *et al.* Ligand binding regions in the receptor for urokinase-type plasminogen activator[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 28946-28953.

[ 22 ]

Dong M Y, Jiang H Y, Wang Y Y, *et al.* Gelanxinning capsule improves coronary microvascular dysfunction by inhibiting inflammation and restoring endothelial function[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(18): 8579-8587.

[ 23 ]

Agúndez J A, Blanca M, Cornejo-García J A, *et al.* Pharmacogenomics of cyclooxygenases [ J ]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(5): 501-522.

[ 24 ]

Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Goschorska M, *et al.* Fluoride as a factor initiating and potentiating inflammation in THP1 differentiated monocytes/macrophages [ J ]. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29(7): 1661-1668.

[ 25 ]

Luo X, Xiong H, Jiang Y, *et al.* Macrophage reprogramming *via* targeted ROS scavenging and COX-2 downregulation for alleviating inflammation [ J ]. *Bioconj Chem*, 2023, 34(7): 1316-1326.

[ 26 ]

Zhou Y, Zhou H, Hua L, *et al.* Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171: 55-68.