

基于网络药理学和动物实验探讨复方芪地化瘀汤对糖尿病大血管病变的改善作用

张世昭¹, 艳梅², 梁朋朋¹, 刘佳敏¹, 黄海¹, 李桂云¹, 吴红彦^{1,2*}
(1. 上海中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518004; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000)

摘要: **目的** 探讨复方芪地化瘀汤对糖尿病大血管病变 (DMD) 的改善作用。**方法** UPLC-Q-TOF-MS 技术对复方芪地化瘀汤化学成分进行鉴定。Swiss Target Prediction 数据库筛选药物靶点, OMIM、GeneCards 数据库筛选疾病靶点, STRING 数据库构建 PPI 网络, 交集靶点进行 GO、KEGG 富集分析, 分子对接进行验证。ApoE^{-/-}小鼠经高脂饮食喂养及腹腔注射链脉佐菌素 (STZ) 建立 DMD 模型, 对照组 (C57BL/6 小鼠) 及模型组灌胃生理盐水, 复方芪地化瘀汤低、中、高剂量组灌胃 7.785、15.57、31.14 g/kg 药液, 联合西药组灌胃 0.002 86 g/kg 阿托伐他汀钙片和 0.107 14 g/kg 盐酸二甲双胍片溶液, 12 周后取材, 检测血糖、血脂、炎症因子水平及核心靶点表达。**结果** 共鉴定出 159 种成分, 包括苯丙素、黄酮、生物碱等。复方芪地化瘀汤改善 DMD 的核心靶点有 18 个, 涉及 123 条相关通路, 天师酸、亚油酸、太子参环肽 B、苹果酸和鼠李素为关键活性成分, 太子参环肽 B、鼠李素、亚油酸、锦葵酸和天师酸与核心靶点 Akt1、TP53、STAT3、PTK2、JUN 结合活性较强。复方芪地化瘀汤能改善小鼠血糖、血脂、体质量, 降低炎症水平, 抑制 TP53 表达, 促进 Akt、JAK2、STAT3、PTK2、JUN 等核心靶点的激活。**结论** 复方芪地化瘀汤可能通过抑制 TP53 表达, 促进 Akt、JAK2、STAT3、PTK2、JUN 等表达改善 DMD, 其关键活性成分可能为太子参环肽 B、鼠李素、亚油酸、锦葵酸和天师酸。

关键词: 复方芪地化瘀汤; 糖尿病大血管病变; 自噬; 胰岛素抵抗; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3480-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.046

糖尿病是一种常见的代谢性疾病, 2021 年全球约有 5.37 亿例患者 (发病率为 10.5%), 预计到 2045 年将增至 7.83 亿例 (发病率为 12.2%)^[1], 糖尿病大血管病变 (diabetic macrovascular disease, DMD) 是糖尿病最主要、最危险的并发症之一, 主要累及全身各大动脉, 以动脉粥样硬化和内皮损伤为基本表现^[2]。研究表明, 糖尿病患者心脑血管疾病的发生风险高出非糖尿病患者的 2~4 倍^[3], 死亡率是后者的 2 倍^[4], 对于老年人危害巨大, DMD 已成为严峻的医疗挑战。DMD 发病因素众多, 最直接的是脂代谢紊乱及胰岛素抵抗, 主要涉及代谢紊乱、活性氧的过量产生、晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 的形成、AGEs 受体 (receptor for AGEs, RAGE) 轴的激活、细胞自噬、慢性血管炎症等^[5]。

复方芪地化瘀汤是由深圳市罗湖区中医院老年病科临床治疗糖尿病的协定方清化消瘀方演化而来, 具有清浊排毒、益气养阴活血、化瘀通络功效。前期研究表明, 复方芪地化瘀汤能降低 2 型糖尿病合并高血脂患者血浆人糖化

低密度脂蛋白、氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 水平, 从而有效阻断糖化修饰进程, 降低血糖, 减缓动脉粥样硬化进程, 对提高患者生活质量有明显作用^[6-7]。

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定复方芪地化瘀汤化学成分, 网络药理学构建“中药-核心成分-关键靶点-通路-疾病”网络, 筛选出与药效相关的潜在靶点, 再通过动物实验验证, 旨在揭示该方改善 DMD 的潜在机制, 为后续其作用机制、临床疗效研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级健康雄性 ApoE^{-/-}小鼠, 6~8 周龄; 10 只 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 (20±2) g, 均购自珠海百试通生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2020-0051], 饲养于深圳市人民医院 SPF 级实验动物中心, 温度 (23±2)℃, 相对湿度 40%~60%, 自由摄食饮水, 实验员定期更换垫料、饲料及饮用水, 适应性喂养 1 周。实验操作严格遵守实验动物管理与保护相关准

收稿日期: 2025-01-07
基金项目: 全国老中医药专家学术经验继承项目 (国中医药人教函 [2022] 76 号); 广东省名中医传承工作室建设项目 (粤中医办函 [2020] 1 号); 广东省自然科学基金项目 (2020A1515010217); 广东省中医药管理局科研项目 (20222198); 罗湖区软科学研究计划项目 (LX202302102)
作者简介: 张世昭, 男, 博士生, 从事中西医结合治疗心脑血管疾病研究。Tel: 15610176914, E-mail: ZHANGshizhaobb@163.com
*通信作者: 吴红彦, 男, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗心脑血管疾病研究。Tel: 13923843012, E-mail: wu.hy@163.com

则，经深圳市人民医院实验动物中心伦理委员会审核批准（批准号 AUP-230220-HH-573-01）。

1.2 药物 复方芪地化瘀汤由黄芪（批号 A230130）、太子参（批号 A230303）、山药（批号 230401）、生地黄（批号 230301）、酒黄精（批号 230401）、丹参（A230426）、鸡内金（A230128）、苍术（批号 D2301135）、鬼箭羽（批号 230304241）、淫羊藿（批号 A230417）、黄连片（批号 D2209037）、干姜（批号 A230407）组成，均购自上海中医药大学深圳医院中药房，经上海中医药大学吴红彦教授鉴定为正品，符合 2020 年版《中国药典》标准。阿托伐他汀钙片（20 mg/片，批号 2401028，乐普制药科技有限公司）；盐酸二甲双胍片（0.25 g/片，批号 202401216C，北京京丰制药集团有限公司）。

1.3 试剂 造模用西式饮食（Western Diet）饲料（美国 Research Diets 公司，货号 D12079B）；链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）（美国 Sigma-Aldrich 公司，货号 S0130）；柠檬酸盐缓冲液（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，货号 C301549）；辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗（长沙艾碧维生物科技有限公司，货号 AWS0001、AWS0002）；肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）- α 、白细胞介素（interleukin, IL）-6、IL-1 β 、ox-LDL 检测试剂盒（武汉华美生物工程有限公司，货号 CSB-E04741m、CSB-E04639m、CSB-E08054m、CSB-E07933m）；TC、TG、LDL-c、HDL-c 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A110-1-1、A111-1-1、A112-1-1、A113-1-1）；肿瘤蛋白 p53（tumor protein p53, TP53）抗体（英国 Abcam 公司，货号 ab26）；内源性酪氨酸激酶 2（janus kinases 2, JAK2）、磷酸化（phospho, p-）JAK2、信号转导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）、p-STAT3 抗体（武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号 A19629、AP0373、A19566、AP1468）；蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）、p-Akt、JUN 原癌基因（jun proto-oncogene, JUN）、蛋白酪氨酸激酶 2（protein tyrosine kinase 2, PTK2）、GAPDH 抗体（美国 Proteintech 公司，货号 60203-2-Ig、66444-1-Ig、24909-1-AP、12636-1-AP、10494-1-AP）。

1.4 仪器 SCIEX Exion LC 联合 X500B Q-TOF mass spectrometer 型液质联用仪（上海爱博才思分析仪器贸易有限公司）；A3S-10-10-CE 型超纯水机（美国艾科浦国际有限公司）；KQ5200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SCIENTZ-12N/C 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；荧光定量 RCP 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；电泳仪（北京六一生物科技股份有限公司）；化学发光成像系统（上海勤翔科学仪器有限公司）。

2 方法

2.1 化学成分分析 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术。

2.1.1 供试品溶液制备 取黄芪、生地黄、太子参、山药、酒黄精、丹参、鸡内金、苍术、鬼箭羽、淫羊藿、黄

连片、干姜适量，加入 800 mL 水浸泡 30 min 后煎煮 1 h，过滤，再加入 600 mL 水煎煮 40 min，合并滤液并浓缩至 200 mL，浓缩液真空干燥成干膏，粉碎，精密称取 0.1 g 粉末，加 10 mL 甲醇，超声（200 W、40 kHz）处理 30 min，甲醇补足减失的质量，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，收集滤液，即得。

2.1.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（150 mm $\times$ 4.6 mm，1.7 μm ）；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~10 min，10%~30% B；10~20 min，30%~40% B；20~25 min，40%~50% B；25~35 min，50%~45% B）；体积流量 0.8 mL/min；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 3 μL 。

2.1.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI），质量重心模式（centroid mode）；质量扫描范围 m/z 100~1 500；正负离子扫描；雾化器（N₂）体积流量 50 L/h；脱溶剂气（N₂）体积流量 600 L/h，温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ；源温度 120 $^{\circ}\text{C}$ ；毛细管电压 3.0 kV；试样锥电压 30 V；萃取锥电压 4.0 V。

2.2 网络药理学

2.2.1 靶点预测及标准化 借助 Swiss Target Prediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）对化学成分进行靶点预测；采用 OMIM（<https://www.omim.org/>）、GeneCards（<https://www.genecards.org/>）数据库，以“diabetic macrovascular disease”“diabetic macroangiopathy”为关键词筛选疾病靶点，再将成分靶点、疾病靶点名称通过 Uniport 数据库（<https://www.uniprot.org>）来标准化为基因名。

2.2.2 交集靶点筛选及蛋白-蛋白相互作用（PPI）网络构建 利用 Draw Venn Diagram 数据库（<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>）将成分与疾病的靶点取交集，绘制韦恩图，得到交集靶点。再将交集靶点输入 STRING 数据库（<https://www.string-db.org/>）中检索，设置最高置信度>0.9，去除游离靶点，构建 PPI 网络。

2.2.3 关键靶点、核心成分筛选 将互作信息的 TSV 文本导入 Cytoscape 3.8.0 软件，进行网络构建和拓扑学分析，以 Degree 中位数为阈值，筛选 PPI 网络关键节点。在此基础上，计算 Degree、Betweenness、Closeness 拓扑结构特征值，选择 3 个拓扑结构特征值均大于中位数的节点作为关键靶点。

2.2.4 GO 功能、KEGG 通路富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>），进行基因本体（gene ontology, GO）功能、京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）通路富集分析，采用微生信在线数据分析平台（<http://www.bioinform-atics.com.cn/>）对结果进行可视化，分别以柱状图、气泡图形式呈现。

2.2.5 “活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络构建 选取活性成分、交集靶点、KEGG 富集的前 20 条通路，采

用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络,并进行拓扑分析,根据节点连接度的大小筛选核心成分。

2.3 分子对接 分别在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载核心靶点的蛋白晶体结构、核心成分 3D 结构,将两者导入 CB-Dock2 软件 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>) 进行分析,并使用 PyMOL 2.4.0 软件进行可视化处理。

2.4 动物实验

2.4.1 复方芪地化瘀汤制备 将黄芪、太子参、山药、生地黄、酒黄精、丹参、鸡内金、苍术、鬼箭羽、淫羊藿、黄连、干姜加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后煎煮 2 次,每次 40 min,滤出药液,加热浓缩至每 1 mL 含 1 g 生药,高温灭菌冷却,即得,4 ℃ 冰箱保存,使用时稀释至所需浓度。

2.4.2 造模、分组及给药 C57BL/6 小鼠作为对照组,ApoE^{-/-}小鼠采用喂养高脂饲料结合腹腔注射 STZ 诱导 DMD 模型^[8]。适应性饲养 1 周后,ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料喂养,C57BL/6 小鼠给予普通饲料喂养,4 周后体质量达到 26~30 g。ApoE^{-/-}小鼠通过腹腔注射 50 mg/kg STZ (0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液稀释,pH=4.5) 连续 5 d 诱导糖尿病,C57BL/6 小鼠腹腔注射等量 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液,1 周后随机血糖水平>16.7 mmol/L,说明糖尿病诱导成功,继续高脂饲料喂养 7 周建立 DMD 模型^[8-9]。造模后,各组小鼠随机分为模型组,复方芪地化瘀汤低、中、高剂量组 (7.785、15.57、31.14 g/kg),联合西药组 (0.002 86 g/kg 阿托伐他汀钙片+0.107 14 g/kg 二甲双胍片),每组 10 只,给药组剂量参考小鼠与 70 kg 成人临床用量折算,以复方芪地化瘀汤中剂量组为临床等效剂量^[10]。各给药组灌胃给予相应剂量药液,对照组和模型组灌胃给予等体积生理盐水,每天 1 次,连续 12 周。

2.4.3 ELISA 法检测血糖、血脂、炎症因子、ox-LDL 水平 按照相关试剂盒说明书,检测血糖、TC、TG、LDL-c、HDL-c、IL-6、IL-1β、TNF-α、ox-LDL 水平。

2.4.4 HE 染色观察主动脉组织病理形态 取主动脉组织,经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡后苏木素染色 1~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝,伊红染色 1~5 min,蒸馏水冲洗,梯度 (95%~100%) 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜下观察。

2.4.5 Western blot 法检测主动脉组织各蛋白表达 取主动脉组织 25 mg,裂解液提取组织蛋白,离心,取上清液,BCA 法进行定量,加热变性,冷冻保存,经制备凝胶、上样、电泳、转膜后加 5% 脱脂奶粉溶液封闭 90 min,加入一抗 TP53、JUN、JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、PTK2、Akt、GAPDH 抗体,4 ℃ 孵育过夜,洗膜,加入二抗,室温孵育 90 min,洗膜,ECL 法进行曝光、显色,通过 ImageJ 软件分析灰度值。

2.4.6 RT-qPCR 法检测主动脉组织基因 mRNA 表达 TRIzol

法提取主动脉组织总 RNA,检测浓度,按照试剂盒说明书进行逆转录。PCR 扩增条件为 95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火/延伸 30 s,40 次循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各目的基因 mRNA 相对表达。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度/bp
Akt	正向 5'-CGCCTGCCCTTCTACAACCAG-3'	175
	反向 5'-GCATGATCTCCTTGGCATCCTC-3'	
JAK2	正向 5'-ACTGGACTATATGTGCTACGA-3'	153
	反向 5'-GTTCTCTTAGTCCCCTGA-3'	
STAT3	正向 5'-CAATACCATTGACCTGCCGAT-3'	109
	反向 5'-GAGCGACTCAAAGTCCCT-3'	
TP53	正向 5'-TCCTCCCCAGCATCTTATCCG-3'	164
	反向 5'-CCATGCAGGAGCTATTACACA-3'	
PTK2	正向 5'-CTCCTGAGCCTCTGACCGTA-3'	79
	反向 5'-CGGCAGTATCCATCAATCAGGT-3'	
JUN	正向 5'-CGACCTTCTACGACGATGCCCTCA-3'	112
	反向 5'-TCGGCCAGGTTCAAGGTCATGCT-3'	
GAPDH	正向 5'-CGCACTTCAACAGCAACTCCC-3'	122
	反向 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCGTA-3'	

2.5 统计学分析 通过 GraphPad Prism 10.3.1 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,若数据满足正态性和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析;若方差不齐,多组间比较采用 Dunnett's T3 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 化学成分 共鉴定出 159 种成分,包括苯丙素、黄酮、生物碱、皂苷、环烯醚萜等。黄芪中主要含有黄酮和三萜皂苷,如芒柄花苷、黄芪皂苷等;太子参中含有黄酮、有机酸等,另外还检测到特征的环肽类物质,如太子参环肽 B 等;苍术成分较少,其中较为特征的有白术内酯Ⅲ等内酯类化合物;黄连中的特征成分大多为季铵型异喹啉类生物碱,如小檗碱、黄连碱等;丹参中具有特征的丹酚酸类化合物、丹参酮等;山药化学成分较少,薯蓣皂苷为其特征成分;地黄含有环烯醚萜苷,如梓醇、益母草苷等;黄精、淫羊藿与鬼箭羽均以黄酮为主要化学类型,其中淫羊藿有更为特征的 8-异戊烯基黄酮苷类母核,如淫羊藿苷等;干姜中主要含有姜酚类化合物,如 6-姜酚、姜酮等。此外,在复方中还检测到胆汁酸类化合物,推测可能来自鸡内金,还有生物中的共有成分,如氨基酸、糖类等。总离子流图见图 1。

3.2 网络药理学

3.2.1 交集靶点 共获得复方芪地化瘀汤相关靶点 915 个、DMD 相关靶点 1 332 个,再采用 Draw Venn Diagram 在线作图网站绘制韦恩图,筛选交集靶点 123 个,见图 2。

3.2.2 关键靶点 通过网络拓扑学参数分析,选择 Degree、Betweenness、Closeness 中位数作为筛选依据,提取交集靶点关键网络,最终筛选出 18 个关键靶点,见图 3。

3.2.3 PPI 网络 通过 STRING 12.0 数据库构建 PPI 网

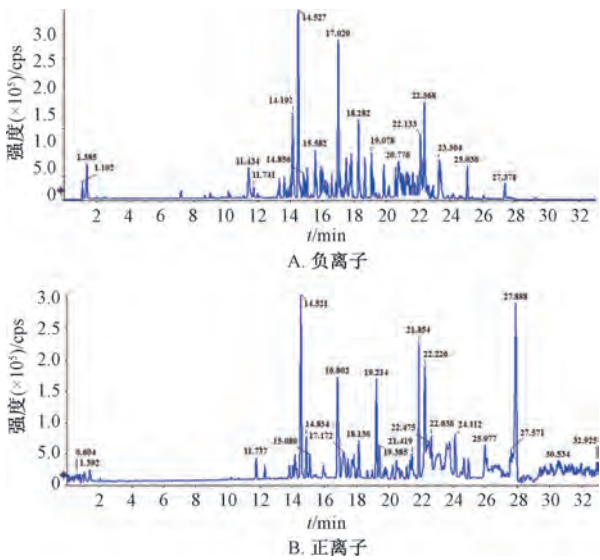


图 1 复方芪地化療汤总离子流图

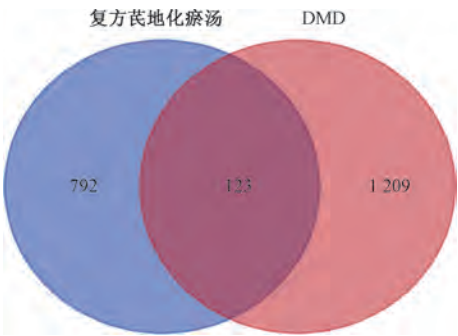


图 2 复方芪地化療汤与 DMD 交集靶点的韦恩图

络, Cytoscape 3. 8. 0 软件对其进行调节, 见图 4。图中节点越大, 与其作用的基因数目越多, 相关性越大。

3. 2. 4 GO 功能富集分析 应用 DAVID 数据库对交集靶点进行分 析, 微生信数据分析平台对结果进行可视化展示。结果, 复方芪地化療汤治疗 DMD 的生物过程 (biological

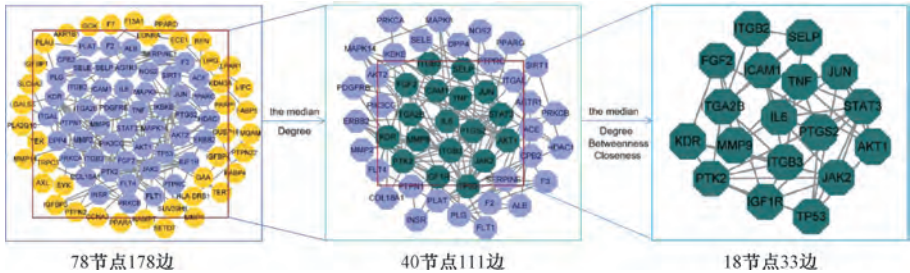


图 3 复方芪地化療汤治疗 DMD 关键靶点图

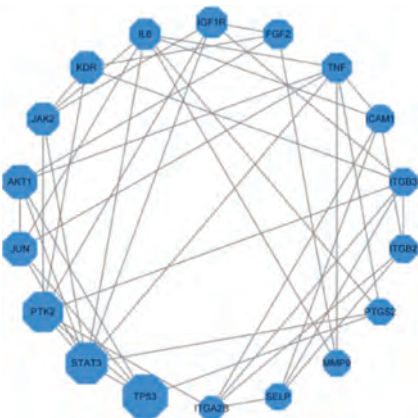


图 4 关键靶点 PPI 网络图

process, BP) 主要富集于细胞凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process)、基因表达的正向调控 (positive regulation of gene expression)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应的正向调控 (positive regulation of MAPK cascade) 等, 细胞组成 (cellular component, CC) 主要富集于质膜 (plasma membrane)、胞外间隙 (extracellular space)、胞外分泌体 (extracellular exosome) 等, 分子功能 (molecular function, MF) 主要富集于蛋白结合 (protein binding)、锌离子结合 (zinc ion binding)、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性

(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity) 等, 见图 5。

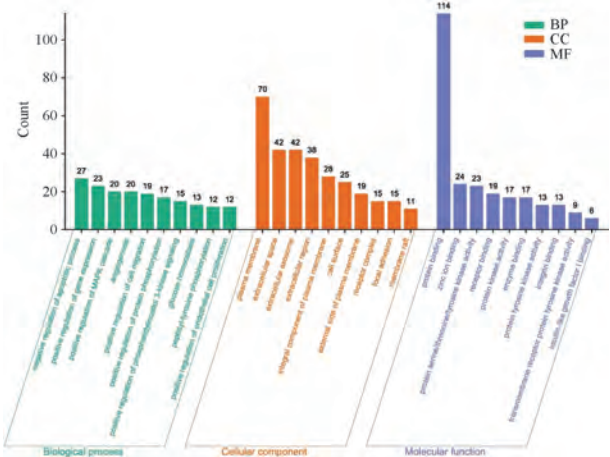


图 5 交集靶点 GO 功能富集分析图

3. 2. 5 KEGG 通路富集分析 排名前 20 位的相关通路见图 6, 可知主要与磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /Akt、Ras 家族小分子 G 蛋白 1 (ras-associated protein 1, RAP1)、MAPK 等相关。

3. 2. 6 “活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络 见图 7, 可知排名前 5 位的核心成分为天师酸、亚油酸、太子参环肽 B、锦葵酸和鼠李素。

3. 3 分子对接 将排名前 5 位的核心靶点 Akt1、TP53、

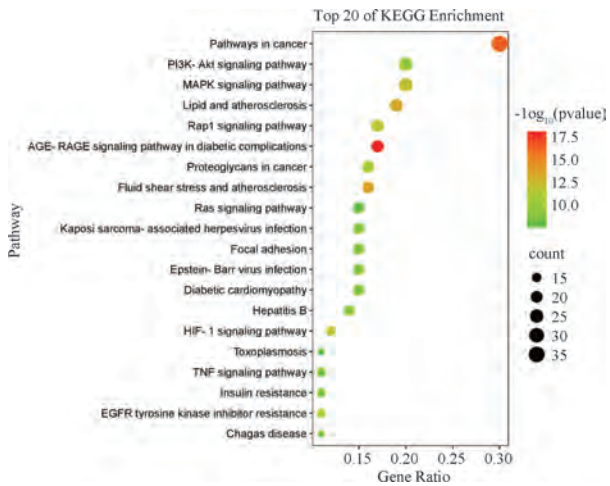


图 6 交集靶点 KEGG 通路富集分析图

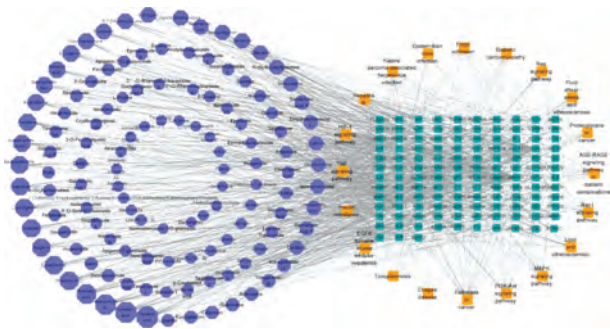


图 7 “活性成分-交集靶点-通路”网络图

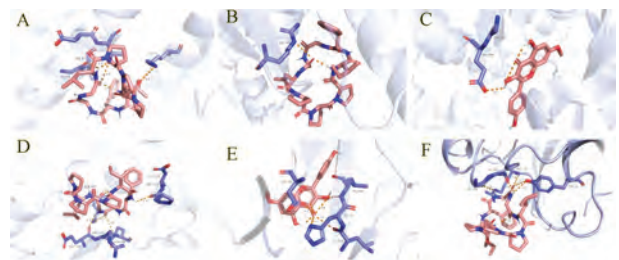
STAT3、PTK2、JUN 与核心成分太子参环肽 B、亚油酸、锦葵酸、鼠李素和天师酸进行分子对接，结果见表 2。再将结合活性最强的前 6 个对接结果利用 PyMOL 2.4 软件进行可视化，见图 8。

表 2 分子对接结果

成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	Akt1	JUN	PTK2	STAT3	TP53
太子参环肽 B	-7.0	-7.8	-7.3	-8.3	-7.6
亚油酸	-4.4	-4.6	-6.3	-5.3	-4.5
锦葵酸	-4.4	-4.4	-6.2	-5.8	-4.5
鼠李素	-5.9	-6.4	-7.2	-7.3	-6.7
天师酸	-4.7	-5.0	-6.0	-5.5	-5.3

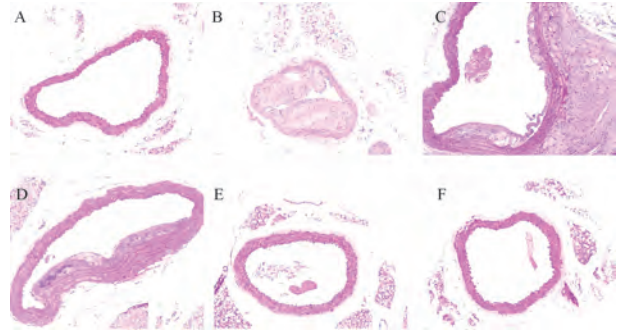
3.4 复方芪地化瘀汤对 DMD 小鼠动脉粥样硬化的影响 对照组主动脉无斑块，内膜结构保持完整，无增厚或管腔狭窄；模型组主动脉斑块面积增大，炎症细胞浸润内膜增厚，管腔狭窄明显；与模型组比较，复方芪地化瘀汤低剂量组主动脉斑块面积减少，炎症细胞浸润内膜增厚，管腔狭窄减少；中剂量组主动脉斑块面积减少，内膜增厚减轻，管腔狭窄减少；高剂量组与联合西药组主动脉斑块面积进一步减少，内膜无明显增厚，管腔狭窄减少，见图 9。

3.5 复方芪地化瘀汤对 DMD 小鼠一般情况、血糖的影响 对照组小鼠毛质光泽，精神状态良好，活动、饮食、体质量正常，血糖水平平稳。给药前，与对照组比较，其



注：A 为 JUN（6Y3V）-太子参环肽 B，B 为 PTK2（6YOJ）-太子参环肽 B，C 为 PTK2（6YOJ）-鼠李素，D 为 STAT3（6NJS）-太子参环肽 B，E 为 STAT3（6NJS）-鼠李素，F 为 TP53（3D06）-太子参环肽 B。

图 8 分子对接图



注：A 为对照组，B 为模型组，C~E 分别为复方芪地化瘀汤低、中、高剂量组，F 为联合西药组。

图 9 各组小鼠主动脉 HE 染色（×20）

余各组均有少量小鼠死亡，存活小鼠体质量增加，出现脱毛、皮肤溃破现象，模型组血糖水平升高（ $P<0.01$ ）。给药后，与对照组比较，模型组小鼠体质量降低，皮肤脱毛、溃破增多；与模型组比较，各给药组小鼠体质量增加，毛发油滑、皮肤溃破减少，血糖水平降低（ $P<0.01$ ）。见表 3~4。

表 3 各组小鼠体质量比较（g， $\bar{x}\pm s$ ， $n=10$ ）

组别	给药前	给药后
对照组	29.07±1.40	32.72±1.36
模型组	34.43±1.87	27.95±4.01
复方芪地化瘀汤低剂量组	32.27±1.97	36.99±6.44
复方芪地化瘀汤中剂量组	35.02±6.69	39.53±8.13
复方芪地化瘀汤高剂量组	33.28±1.99	34.13±5.15
联合西药组	34.25±1.74	37.82±2.63

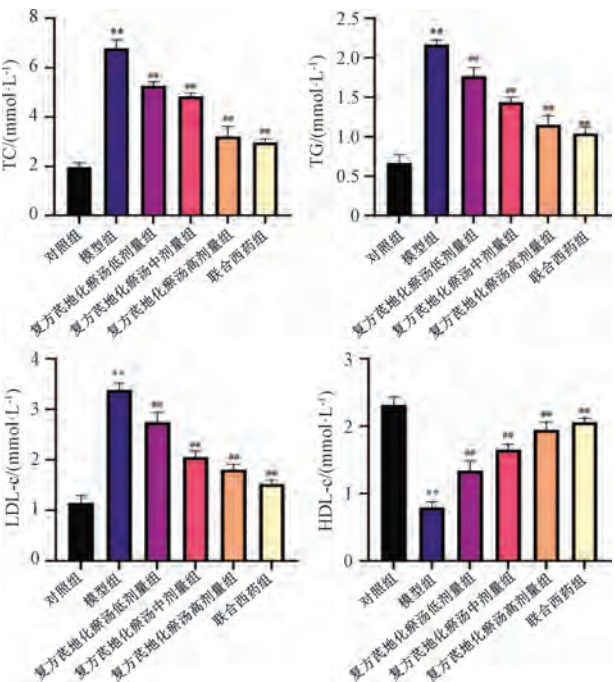
表 4 各组小鼠血糖水平比较（mmol/L， $\bar{x}\pm s$ ， $n=10$ ）

组别	给药前	给药后
对照组	5.19±1.07	5.85±1.01
模型组	17.42±1.64**	17.27±1.66**
复方芪地化瘀汤低剂量组	15.58±4.00	10.22±2.56##
复方芪地化瘀汤中剂量组	15.73±4.70	6.72±1.71##
复方芪地化瘀汤高剂量组	14.62±2.82	7.60±1.80##
联合西药组	15.50±3.39	9.22±4.34##

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

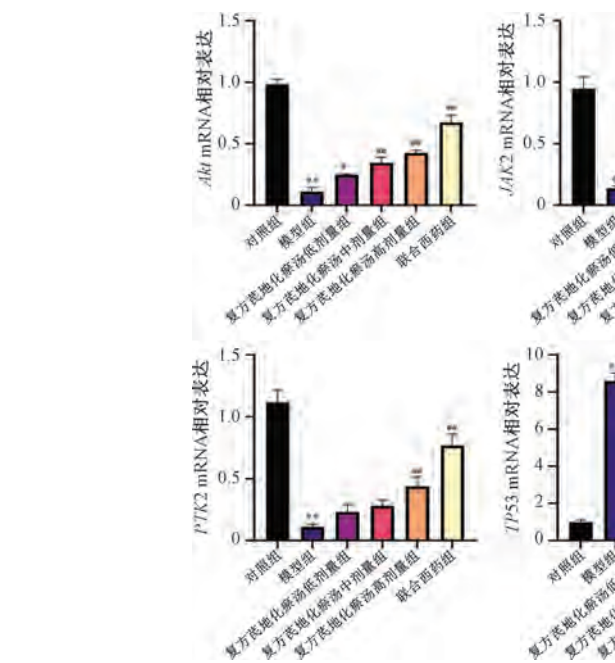
3.6 复方芪地化瘀汤对 DMD 小鼠脂质代谢、血管炎症的影响 与对照组比较，模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-c 水

平升高 ($P<0.01$), HDL-c 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清 TC、TG、LDL-c 水平降低 ($P<0.01$), HDL-c 水平升高 ($P<0.01$), 见图 10。与对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、ox-LDL、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、ox-LDL、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$), 见图 11。

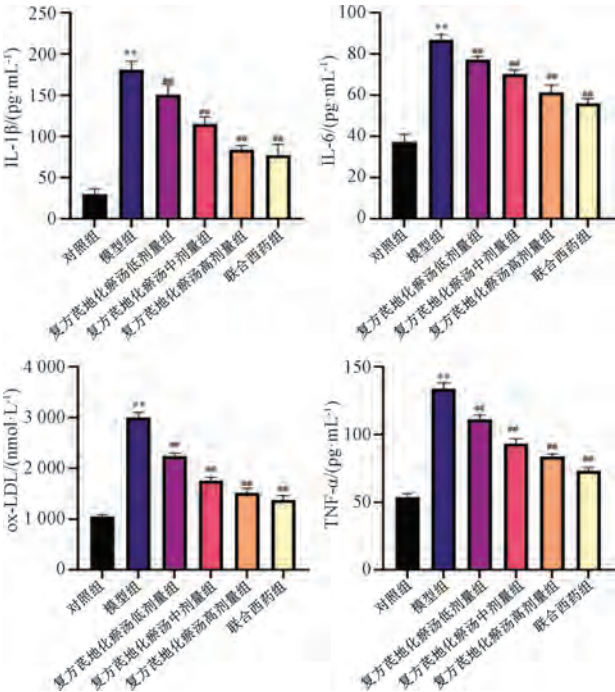


注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.01$ 。
图 10 各组小鼠 TC、TG、LDL-c、HDL-c 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.7 复方芪地化癆汤对 DMD 小鼠主动脉组织核心靶点表达的影响

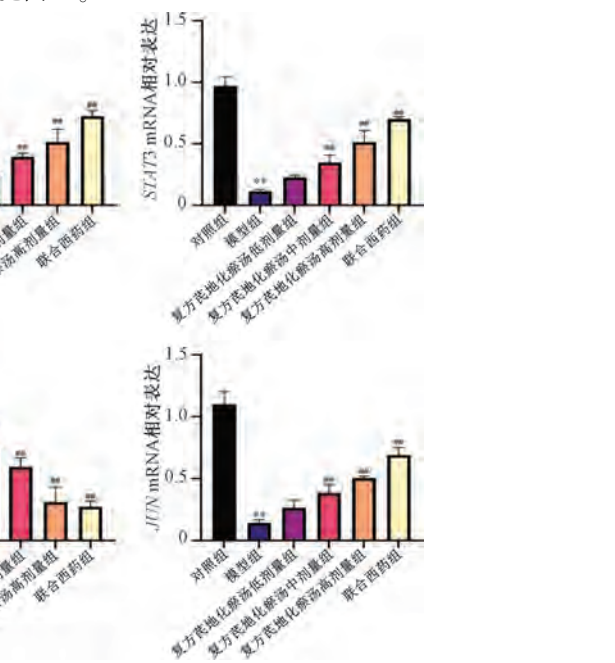


注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 12 各组小鼠主动脉组织 Akt、JAK2、STAT3、JUN、PTK2、TP53 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.01$ 。
图 11 各组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、ox-LDL、TNF- α 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

JUN、PTK2 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), TP53 mRNA 表达升高 ($P<0.01$). 与模型组比较, 复方芪地化癆汤低剂量组 Akt mRNA 表达升高 ($P<0.05$), TP53 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 中剂量组 Akt、JAK2、STAT3、JUN mRNA 表达升高 ($P<0.01$), TP53 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 高剂量组和联合西药组 Akt、JAK2、STAT3、JUN、PTK2 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), TP53 mRNA 表达降低 ($P<0.01$). 见图 12。



注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 12 各组小鼠主动脉组织 Akt、JAK2、STAT3、JUN、PTK2、TP53 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

与对照组比较，模型组 p-STAT3/STAT3、p-Akt/Akt、p-JAK2/JAK2、JUN、PTK2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，TP53 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，复方芪地化瘀汤低剂量组 PTK2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，TP53 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；中剂量组 p-STAT3/STAT3、JUN、PTK2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，TP53 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；高剂量组和联合西药组 p-STAT3/STAT3、p-Akt/Akt、p-JAK2/JAK2、JUN、PTK2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，TP53 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。见图 13~14。

4 讨论

本研究从复方芪地化瘀汤中共鉴定出 159 种成分，网络药理学表明，太子参环肽 B、鼠李素、亚油酸、锦葵酸和天师酸为复方芪地化瘀汤治疗 DMD 的关键活性成分。研究表明，太子参环肽 B 是一种潜在的二肽基肽酶 4 抑制剂，可减缓胰高血糖素样肽-1 降解以增加胰岛素分泌来治疗 2 型糖尿病^[11]；鼠李素具有抗动脉粥样硬化、抗氧化应激、抗肿瘤、抗菌、抗炎等药理作用^[12]；锦葵酸具有改善糖耐

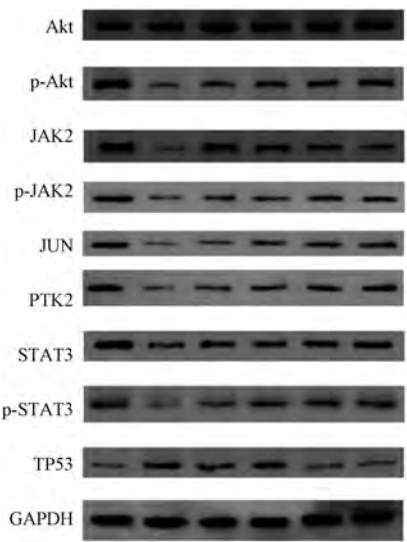
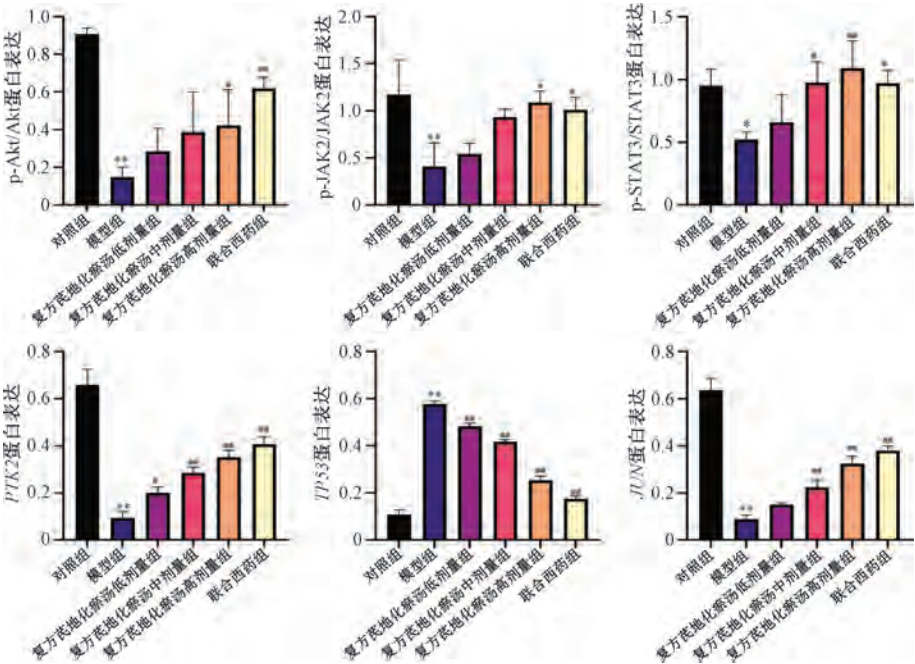


图 13 各组小鼠主动脉组织 p-STAT3/STAT3、p-Akt/Akt、p-JAK2/JAK2、JUN、PTK2、TP53 蛋白电泳图



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 14 各组小鼠主动脉组织 p-STAT3/STAT3、p-Akt/Akt、p-JAK2/JAK2、JUN、PTK2、TP53 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

量和血压、改善血清 TG 和脂联素水平等药理作用^[13]；亚油酸能通过调节肠道微生物群与宿主的代谢和免疫调节相互作用，抑制炎症信号通路，促进胰岛素信号传导和葡萄糖运输，并可提高抗氧化酶活性，降低氧化应激水平，从而改善胰岛素敏感性和脂代谢^[14-15]。另外，复方芪地化瘀汤可能通过 Akt1、TP53、STAT3、PTK2、JUN 核心靶点，以及 PI3K/Akt、RAP1、MAPK 等信号通路发挥改善 DMD 的作用；太子参环肽 B、鼠李素、亚油酸、锦葵酸和天师酸与核心靶点 Akt1、TP53、STAT3、PTK2、JUN 结合活性

强，提示复方芪地化瘀汤具有多种改善 DMD 的药效物质基础。

动物实验结果表明，复方芪地化瘀汤可降低 DMD 小鼠血糖、血脂、炎症因子水平，减轻主动脉血管内皮损伤与炎性浸润，减少粥样斑块面积与管腔狭窄，抑制动脉粥样硬化发展。Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路的核心因子，与糖脂代谢和主动脉内皮细胞自噬密切相关，抑制 PI3K/Akt 通路可能会加重胰岛素抵抗和细胞自噬，促进 DMD 发展^[16]。JAK2 是一种蛋白酪氨酸激酶，而 STAT3 是其下游核心靶

点,前者受到上游因子激活后磷酸化后促使后者磷酸化,进而影响下游靶点^[17], JAK2/STAT3 信号通路与细胞生长、增殖、分化有关,可调节免疫、炎症、凋亡等病理生理过程^[18]。TP53 是一种肿瘤抑制基因,涉及细胞生长、免疫调节,其突变往往与肿瘤发展相关^[19],抑制它能激活 JAK2/STAT3 信号通路,调节细胞自噬,有效改善糖尿病^[20]。JUN 或 c-Jun 是转录复合物激活蛋白-1 中最活跃的转录因子,可编码一个参与多个细胞过程的基本区域,氧化应激和紫外线照射可通过不同的机制激活 c-Jun 蛋白表达,调节细胞增殖和凋亡^[21]。PTK2 参与细胞增殖和凋亡、细胞迁移和侵袭,可抑制 NF-κB 表达,减轻糖尿病及动脉粥样硬化的炎症反应^[22-23]。本研究结果显示,复方芪地化瘀汤可促进 DMD 小鼠 Akt、JAK2、STAT3、JUN、PTK2 mRNA、蛋白表达,抑制 TP53 mRNA、蛋白表达,可能通过调控 Akt、JAK2、STAT3、JUN、PTK2、TP53,影响 DMD 小鼠的糖脂代谢、炎症反应和细胞自噬,从而改善 DMD。

综上所述,本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合网络药理学,明确了复方芪地化瘀汤改善 DMD 的关键成分,并通过动物实验证实了 Akt1、TP53、STAT3、PTK2、JUN 可能是该方改善糖脂代谢、炎症、自噬的潜在靶点,为进一步探索其改善 DMD 的作用机制提供了理论基础。

参考文献:

[1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, *et al.* IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2021, 183: 1019119.

[2] Li Y, Liu Y, Liu S, *et al.* Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 152.

[3] Marx N, Federici M, Schütt K, *et al.* 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes[J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(39): 4043-4140.

[4] Bragg F, Holmes M V, Iona A, *et al.* Association between diabetes and cause-specific mortality in rural and urban areas of China[J]. *JAMA*, 2017, 317(3): 280-289.

[5] Katakami N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(1): 27-39.

[6] 何 泮,曾庆明,廖蔚茜,等. 清化消瘀方对代谢综合征患者 PPARγ、Leptin、TNF-α 表达的干预研究[J]. 中国中医急症, 2008, 17(12): 1691-1692; 1698.

[7] 张炜宁,曾庆明,周 晓,等. 清化消瘀方对Ⅱ型糖尿病合并高脂血症患者糖氧化修饰过程的影响[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(6): 325-326.

[8] Yu J, Liu H, Chen Y, *et al.* miR-449a disturbs atherosclerotic plaque stability in streptozotocin and high-fat diet-induced diabetic mice by targeting CEACAM1[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2024, 16(1): 98.

[9] Han W M, Chen X C, Li G R, *et al.* Acacetin protects against

high glucose-induced endothelial cells injury by preserving mitochondrial function *via* activating Sirt1/Sirt3/AMPK signals[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 607796.

[10] 徐叔云,卞如瀛,陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 920.

[11] Liao H J, Tzen J T C. The potential role of cyclopeptides from *Pseudostellaria heterophylla*, *Linum usitatissimum* and *Drymaria diandra*, and peptides derived from heterophyllin B as dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: an *in silico* study[J]. *Metabolites*, 2022, 12(5): 387.

[12] Patel D K. Biological importance and therapeutic benefit of rhamnocitrin: a review of pharmacology and analytical aspects[J]. *Drug Metab Bioanal Lett*, 2022, 15(3): 150-158.

[13] eláez R, Pariente A, Pérez-Sala Á, *et al.* Sterculic acid: the mechanisms of action beyond stearyl-CoA desaturase inhibition and therapeutic opportunities in human diseases[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 140.

[14] Wu L, Ye S, Deng X, *et al.* Conjugated linoleic acid ameliorates high fat-induced insulin resistance *via* regulating gut microbiota- host metabolic and immunomodulatory interactions[J]. *Nutrients*, 2024, 16(8): 1133.

[15] Malinska H, Hüttl M, Oliarnyk O, *et al.* Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriacylglycerolemia[J]. *Nutrition*, 2015, 31(7-8): 1045-1051.

[16] Kaneko K, Lin H Y, Fu Y, *et al.* Rap1 in the VMH regulates glucose homeostasis[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(11): e142545.

[17] Guo B, Yu Y, Wang M, *et al.* Targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway with natural plants and phytochemical ingredients: a novel therapeutic method for combatting cardiovascular diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 172: 116313.

[18] 侯胜迪,于 欢,冯定庆,等. 合并 p53 突变的多重分子分型子宫内膜癌的临床特点与研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2024, 33(12): 944-947.

[19] Yu Y, Ba X, Li T, *et al.* PTPN22 and the pathogenesis of ulcerative colitis: insights into T cell differentiation and the JAK/STAT signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2024, 127: 111551.

[20] 金美英,潘韦韦,崔镇海. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨参茸地黄汤调控自噬改善糖尿病的作用机制[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2022, 24(12): 4760-4767.

[21] Zhang Q, Chen L, Gao M, *et al.* Molecular docking and *in vitro* experiments verified that kaempferol induced apoptosis and inhibited human HepG2 cell proliferation by targeting BAX, CDK1, and JUN[J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 478(4): 767-780.

[22] Kumar S, Mulchandani V, Das Sarma J. Methanolic neem (*Azadirachta indica*) stem bark extract induces cell cycle arrest, apoptosis and inhibits the migration of cervical cancer cells *in vitro*[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 239.

[23] Tian Y, Liu Y F, Wang Y Y, *et al.* Molecular mechanisms of PTEN in atherosclerosis: a comprehensive review[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 979: 176857.