

· 数据挖掘 ·

# 基于整合药理学平台探究三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的分子机制

徐男<sup>1,2</sup>, 王亮<sup>1</sup>, 孙蓉<sup>3</sup>, 黄欣<sup>4</sup>, 张成博<sup>2</sup>, 时海燕<sup>4\*</sup>

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学中医学博士后流动站, 济南 250355;  
3. 山东大学高等医学研究院, 济南 250012; 4. 山东省千佛山医院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的:探讨三棱抗血小板聚集及抗血栓形成的分子机制。方法:利用中药整合药理学平台(TCM-IP)的中药材数据库、中药成分数据库和疾病靶标数据库的数据信息和分析功能,检索三棱所含的化学成分信息,构建三棱作用的潜在靶标和疾病靶标之间的相互作用网络,然后富集计算核心靶标,进行基因功能分析和通路分析,再进一步构建“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路”多维关系网络。结果:对三棱预测活性成分主要包括黄酮、酚酸等成分,如山柰酚、三棱酸等;抗血栓形成涉及202个核心靶标,包括蛋白激酶C $\delta$ (PRKCD),葡萄糖激酶(GCK),腺嘌呤核糖核苷酸活化蛋白激酶 $\alpha$ -2催化亚基等;涉及内分泌系统、循环系统、神经退行性疾病等相关生物过程和信号通路。抗血小板聚集涉及136个核心靶标,包括PRKCD,细胞色素C氧化酶蛋白7C(COX7C),GCK等;涉及帕金森病、循环系统、神经退行性疾病等相关生物过程和信号通路。结论:三棱主要通过调控中枢神经系统的神经递质活性达到调节血管内皮细胞黏附分子表达以及血小板线粒体功能介导血小板的凋亡,从而发挥抗血栓形成及抗血小板聚集的药效作用。

**[关键词]** 三棱; 血栓形成; 血小板聚集; 整合药理学; 作用机制; 关键通路; 核心靶标

**[中图分类号]** R22;R24;R28;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0192-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20182111

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180821.1743.015.html>

**[网络出版时间]** 2018-08-23 09:43

## Molecular Mechanism of Anti-thrombosis and Anti-platelet Aggregation of Sparganii Rhizoma Based on Integrated Pharmacological Platform

XU Nan<sup>1,2</sup>, WANG Liang<sup>1</sup>, SUN Rong<sup>3</sup>, HUANG Xin<sup>4</sup>, ZHANG Cheng-bo<sup>2</sup>, SHI Hai-yan<sup>4\*</sup>

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. Postdoctoral Mobile Station of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

3. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China;

4. Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Ji'nan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the molecular mechanism of anti-platelet aggregation and anti-thrombosis of Sparganii Rhizoma. **Method:** Based on the data information and analysis functions of traditional Chinese medicine (TCM) database, TCM composition database and target database in TCM platform for integration of pharmacology, information of chemical compositions in Sparganii Rhizoma was retrieved, interaction

**[收稿日期]** 20180303(011)

**[基金项目]** 山东省中医药科技发展计划项目(2017-165);山东省自然科学基金项目(ZR2015HL117);山东省重点研发计划项目(2017CXGC1308);山东省泰山学者工程专项(ts201511107)

**[第一作者]** 徐男,博士,助理研究员,从事中药新药开发与药效物质研究,E-mail:93679706@qq.com

**[通信作者]** \*时海燕,博士,主管中药师,从事中药药效物质基础研究,E-mail:shihaiyan123@163.com

network between potential targets of *Sparganii Rhizoma* and disease targets was built, and the key targets were enriched and calculated, the gene functions and pathways were analyzed, multidimensional relationship network of "herbal medicines-chemical components-key targets-key pathways" was built. **Result:** Active ingredients of *Sparganii Rhizoma* mainly included flavonoids and phenolic acids, such as mountain kaempferol, sanleng acid, linoleic acid, etc. Anti-thrombosis involved 202 key targets, including protein kinase C $\delta$  (PRKCD), glucose kinase (GCK), (PRKAA2), adenosine ribonucleotide activated protein kinase  $\alpha$ -2 catalytic subunit, etc; and it was related to the endocrine system, circulatory system, neurodegenerative diseases and other related biological processes and signal pathways. Anti-platelet aggregation involved 136 key targets, including PRKCD, cytochrome C oxidase protein 7C (COX7C), GCK, etc; and it was involved in Parkinson's disease, circulatory system, neurodegenerative diseases and other related biological processes and signal pathways. **Conclusion:** *Sparganii Rhizoma* regulates vascular endothelial cell adhesion molecule expression and platelet mitochondrial function mediated apoptosis of platelets mainly through regulating neurotransmitter activity in the central nervous system, in order to exert antithrombotic effect and anti-platelet aggregation effect.

[**Key words**] *Sparganii Rhizoma*; thrombosis; platelet aggregation; integrated pharmacology; mechanism; key pathways; key targets

随着现代医药技术的快速发展,传统研发遵循的“单基因-单靶点-单疾病”的线性模式遇到了巨大瓶颈及严峻挑战,耗费越来越大、成功率却越来越低,不仅在复杂疾病及其药物的研究上遭遇瓶颈,同时也难以解释临床行之有效的中医药的科学内涵。网络药理学集成了系统生物学、网络生物学与化学生物学等学科,而且还整合了计算预测与实验验证等研究方法,已逐渐成为现代医药研究中的前沿交叉学科,其所强调整体性与系统性和中医药理论不谋而合,更加适合中医药的学术特点和实际,能够很好的解释中药作用机制<sup>[1-2]</sup>。

三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* 的干燥块茎,属于破血逐瘀类中药,具有破血行气、消积止痛等功能,临床常以其炮制品醋三棱入药治疗血瘀证。近代中西医结合奠基人张锡纯极为推崇三棱,誉之为“化瘀血之要药”,常与莪术配伍,有“三棱长于破血,莪术长于破气”之说<sup>[3]</sup>。现代研究发现,三棱能抗血小板活化和聚集,在抑制血栓形成过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。本课题组基于绿色荧光蛋白标记转基因斑马鱼血栓模型筛选三棱抗血栓活性部位为乙酸乙酯萃取部位,并对其乙酸乙酯部位的化学成分进行了研究,测定了其中 4 种酚类化学成分(对羟基苯甲酸、香兰素、对香豆酸和阿魏酸)的含量<sup>[5]</sup>,为进一步的药效物质和作用机制研究奠定了基础。本文利用中药整合药理学平台(TCM-IP, <http://www.tcmip.cn/>)的数据库信息<sup>[6]</sup>,构建三棱作用的药物靶标和疾病靶标之间的相互作用网络及“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路”

多维关系网络,挖掘三棱抗血小板聚集及抗血栓形成的关键靶标和信号通路,探讨其分子作用机制,为三棱创新药物的开发、质控标准的制定和临床应用的推广提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 化学成分与疾病靶标检索** 在 TCM-IP 中药材数据库中对三棱进行化学成分信息收集,包括化学文摘(CAS)和中文名称、英文名称、分子式、相对分子质量、药理作用,并建立化学成分信息数据库。在疾病/症状靶标数据库中,以“thrombosis”“platelet aggregation(PAg)”作为疾病或症状关键词进行检索,提取治疗二者的药物名称、药物疗效、药物靶标的基因和蛋白质相关信息,作为候选靶标来源。

**1.2 候选靶标预测** TCM-IP 利用 Open Babel 2.4.1 软件提取药物化学成分分子指纹,通过药物中化学成分二维结构(.mol)与美国食品药品监督管理局(FDA)上市药物进行化学指纹特征比对,以 Tanimoto 系数定义的相似度计量方法进行相似性打分,取打分系数 > 0.6 所得的药物靶标为本研究所需要的潜在靶标,建立药物候选靶标信息数据库。

**1.3 网络构建与分析** 通过 TCM-IP 的蛋白质-蛋白质相互作用信息(PPI)数据库直接获得潜在作用靶标与血栓形成(thrombosis)和血小板聚集(PAg)疾病靶标之间的 PPI,并构建相互作用网络,以节点连接度(degree)的 2 倍中位数为卡值,选取靶标-疾病基因互作网络的核心节点(hubs);在此基础上,以 degree,节点紧密度(closeness)和节点介度(betweenness)的中位数为卡值,选取同时满足 3 个

卡值的节点为药物矫正疾病失衡网络的候选靶标;通过对上述药物候选靶标所参与的功能和通路进行富集分析,构建“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路-疾病关键病理环节”的多层次网络关联图<sup>[8]</sup>。

**1.4 基因功能和通路分析** 采用 TCM-IP 基因本体(GO)数据库和京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库,提取靶标基因或蛋白质的分子功能、细胞内定位及其所参与的生物学过程和通路,结合富集计算得出的药物直接作用靶标和疾病的核心

靶标,通过基因功能分析和通路分析进一步挖掘三棱缓解疾病关键病理环节的分子机制。

## 2 结果

**2.1 化学成分靶标预测** 三棱主要含有酚酸和黄酮类成分,包括三棱酸、山柰酚和 5,7,3',5'-四羟基双氢黄酮醇-3-O-β-D-葡萄糖苷等,预测靶标数量 638 个。对候选靶标进行基因分析,取 P 排名前 20 的作为候选靶标,见表 1。对候选靶标进行通路富集分析,取 P 排名前 20 的作为候选靶标参与的通路信息,见表 2。

表 1 三棱候选靶标具有的功能信息

Table 1 Functional information of candidate targets of Sparganii Rhizoma

| ID         | 功能条目   | 基因数目/个 | P                      |
|------------|--|--------|------------------------|
| GO:1902600 | 氢离子跨膜运输(hydrogen ion transmembrane transport)                                  | 20     | $5.65 \times 10^{-26}$ |
| GO:0031418 | 抗坏血酸结合(L-ascorbic acid binding)  | 14     | $5.68 \times 10^{-25}$ |
| GO:0004129 | 细胞色素-C 氧化酶活性(cytochrome-C oxidase activity)                                    | 13     | $2.01 \times 10^{-19}$ |
| GO:0006123 | 线粒体电子传递,细胞色素 C 转变为氧(mitochondrial electron transport, cytochrome-C to oxygen)  | 11     | $1.70 \times 10^{-18}$ |
| GO:0055114 | 氧化还原过程(oxidation-reduction process)  | 33     | $5.07 \times 10^{-18}$ |
| GO:0005506 | 铁离子结合(iron ion binding)  | 18     | $1.19 \times 10^{-16}$ |
| GO:0006122 | 线粒体电子传递,泛醇与细胞色素 C(mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome-C) | 9      | $8.23 \times 10^{-16}$ |
| GO:0005743 | 线粒体内膜(mitochondrial inner membrane)  | 25     | $1.69 \times 10^{-14}$ |
| GO:0008121 | 泛醇-细胞色素-C 还原酶活性(ubiquinol-cytochrome-C reductase activity)                     | 7      | $3.12 \times 10^{-13}$ |
| GO:0006091 | 前体代谢物和能量生成(generation of precursor metabolites and energy)                     | 10     | $1.60 \times 10^{-11}$ |
| GO:0005750 | 线粒体呼吸链复合物Ⅲ(mitochondrial respiratory chain complex Ⅲ)                          | 6      | $2.69 \times 10^{-11}$ |
| GO:0005739 | 线粒体(mitochondrion)   | 35     | $1.69 \times 10^{-10}$ |
| GO:0070062 | 胞外体(extracellular exosome)   | 55     | $2.70 \times 10^{-10}$ |
| GO:0009060 | 有氧呼吸(aerobic respiration)  | 7      | $3.55 \times 10^{-9}$  |
| GO:0044245 | 多糖消化(polysaccharide digestion)   | 4      | $4.87 \times 10^{-9}$  |
| GO:0042493 | 药物反应(response to drug)   | 16     | $1.59 \times 10^{-8}$  |
| GO:0018401 | peptidyl-proline hydroxylation to 4-hydroxy-L-proline                          | 4      | $2.42 \times 10^{-8}$  |
| GO:0045277 | respiratory chain complex IV   | 4      | $2.42 \times 10^{-8}$  |
| GO:0006119 | 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)   | 5      | $4.88 \times 10^{-8}$  |
| GO:0005751 | mitochondrial respiratory chain complex IV                                     | 5      | $4.88 \times 10^{-8}$  |

**2.2 靶标网络构建** 通过 PPI 数据库建立三棱候选药物靶标与疾病靶标之间的相互作用网络,根据条件筛选出抗血栓形成核心靶标 202 个,其中直接靶标(known disease target)14 个,潜在靶标(putative drug target)59 个。筛选出抗血小板聚集核心靶标 136 个,其中直接靶标 4 个,潜在靶标 57 个。根据 degree 排序仅显示排名前 100 的靶点,根据 P 排序仅显示排名前 30 的 KEGG 通路,得三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的候选靶标网络,见图 1,2。图中

节点的大小与 degree 成正比关系,节点的 degree 值越大,说明这个节点在网络中的作用越大。

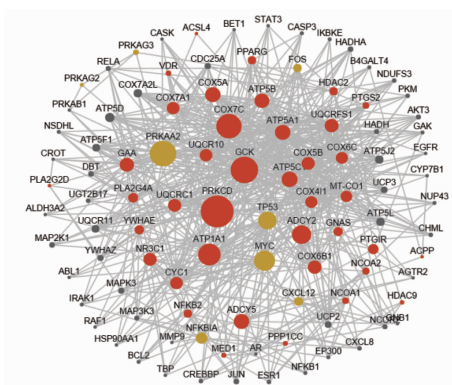
由图 1 可知,degree 最高的蛋白激酶 Cδ(PRKCD)能与 60 个疾病靶标发生相互作用,紧随其后的葡萄糖激酶(GCK),能与 50 个疾病靶标发生相互作用,再次为腺嘌呤核糖核苷酸(AMP)活化蛋白激酶 α-2 催化亚基(PRKAA2),能与超过 48 个疾病靶标发生相互作用;其他候选靶标还包括细胞色素 C 氧化酶蛋白 7C(COX7C),磷酸化钠钾三磷

表 2 三棱候选靶标参与的通路信息

Table 2 Pathway information of candidate targets of Sparganii Rhizoma

| ID       | 通路名称  | 靶点数目/个 | P                      |
|----------|---|--------|------------------------|
| hsa04260 | 心肌收缩 (cardiac muscle contraction)   | 20     | $1.92 \times 10^{-18}$ |
| #        | 循环系统 (circulatory system)   | 30     | $9.70 \times 10^{-17}$ |
| hsa05010 | 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)   | 24     | $1.04 \times 10^{-15}$ |
| hsa05012 | 帕金森病 (Parkinson's disease)  | 22     | $3.77 \times 10^{-15}$ |
| hsa00190 | 氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)   | 21     | $9.93 \times 10^{-15}$ |
| hsa05016 | 亨廷顿氏病 (Huntington's disease)  | 23     | $7.55 \times 10^{-14}$ |
| #        | 能量代谢 (energy metabolism)  | 21     | $4.37 \times 10^{-13}$ |
| #        | 神经退化性疾病 (neurodegenerative diseases)  | 28     | $5.93 \times 10^{-12}$ |
| hsa04932 | 非酒精性脂肪性肝病 [non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)]   | 18     | $1.25 \times 10^{-10}$ |
| #        | 内分泌和代谢性疾病 (endocrine and metabolic diseases)  | 22     | $1.31 \times 10^{-10}$ |
| hsa00052 | 半乳糖代谢 (galactose metabolism)  | 7      | $9.14 \times 10^{-7}$  |
| hsa04973 | 碳水化合物的消化和吸收 (carbohydrate digestion and absorption)   | 8      | $1.04 \times 10^{-6}$  |
| #        | 脂质代谢 (lipid metabolism)   | 21     | $2.35 \times 10^{-6}$  |
| #        | 消化系统 (digestive system)   | 20     | $1.36 \times 10^{-5}$  |
| hsa04913 | 卵巢类固醇生成 (ovarian steroidogenesis)   | 7      | $2.99 \times 10^{-5}$  |
| hsa00500 | 淀粉与蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)   | 7      | $5.56 \times 10^{-5}$  |
| hsa00140 | 甾体激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis)   | 7      | $6.25 \times 10^{-5}$  |
| hsa04750 | 炎症介质对瞬时受体电位 (TRP) 通道的调节 (inflammatory mediator regulation of transient receptor potential channels) | 9      | $6.28 \times 10^{-5}$  |
| hsa04978 | 矿物质吸收 (mineral absorption)  | 6      | $2.71 \times 10^{-4}$  |
| hsa04270 | 血管平滑肌收缩 (vascular smooth muscle contraction)  | 9      | $2.95 \times 10^{-4}$  |

注: #. 大通路 (同表 5, 6)



红色代表潜在的药物靶标;黄色代表已知疾病的靶标;灰色代表其他靶标(图 2 同)

图 1 三棱抗血栓形成的候选靶标网络

Fig.1 Hub interactional network between putative drug targets of Sparganii Rhizoma for thrombosis

酸腺苷 (ATP) 酶蛋白  $\alpha 1$  受体 (ATP1A1), 原癌基因 MYC, 腺苷酸环化酶 2 (ADCY2) 等。由图 2 可知, degree 最高的 PRKCD 和 COX7C 均能与 42 个疾病靶标发生相互作用, 其次为 GSK, 能与超过 35 个疾

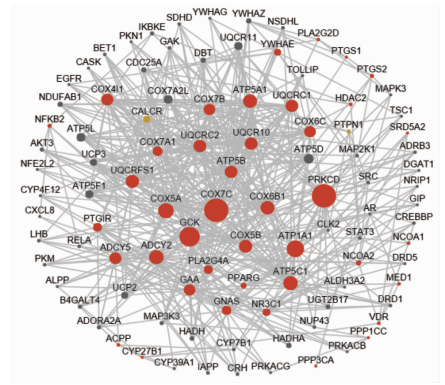


图 2 三棱抗血小板异常聚集的候选靶标网络

Fig.2 Hub interactional network between putative drug targets of Sparganii Rhizoma for platelet aggregation

病靶标发生相互作用;其他候选靶标还包括 ATP1A1, COX5A, ADCY2 等。常见的血栓形成危险因素<sup>[7]</sup>有血管因素 (内皮细胞受损、动脉粥样硬化、感染、炎症、吸烟、高脂血症等均可导致血管壁损伤), 血液理化性质的改变 (血小板、凝血系统、抗凝系统、纤溶系统失衡), 血液流变学改变 (血流速度

在全身或局部减慢、在局部形成涡流均可促进血栓形成及凝血)等。上述核心靶标在抗血栓形成过程中具有十分重要的作用。PRKCD 能调节血小板功能反应<sup>[8]</sup>、抑制凝血酶<sup>[9]</sup>、调节核转录因子-κB(NF-κB)信号传导途径介导血管内皮细胞功能<sup>[10-11]</sup>。ADCY2 和 ADCY5 属于腺苷酸环化酶,通过介导环磷酸腺苷(cAMP)-蛋白激酶 A 途径影响中枢神经系统的神经递质调节<sup>[12-13]</sup>,进而调节血管内皮细胞功能。血小板凋亡与机体的多种生理功能及病理过程密切相关,可引起机体凝血异常<sup>[14]</sup>。线粒体内有血小板代谢需要的 ATP 合成酶和细胞色素 C 氧化酶(COX)<sup>[15]</sup>,介导的血小板凋亡是主要调控过程<sup>[16]</sup>。

**2.3 三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的基因功能和通路分析** 针对三棱药物靶标和血栓形成、血小板异常聚集疾病靶标进行基因功能以及通路分析,

将 *P* 排名前 20 的展示在表 3~6。大量研究已经证实,雌激素<sup>[17]</sup>、甲状腺激素<sup>[18]</sup>、促性腺激素<sup>[19]</sup>、催产素<sup>[20]</sup>均与血栓形成有密切关系。下丘脑与脑下垂体组成一个完整的神经内分泌功能系统,人体多种激素水平的调节是由下丘脑-垂体系统支配和反馈的,包括甲状腺激素、促性腺激素、促肾上腺皮质激素等。中枢神经系统疾病会引起血管内皮细胞的功能异常,导致血管内皮细胞的黏附分子表达增加<sup>[21]</sup>,进而影响血栓的形成过程。线粒体功能障碍在帕金森病、阿尔茨海默氏病等神经退行性疾病的早期发生过程中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。神经元线粒体的功能和血小板线粒体功能相似,体外血小板线粒体加入具有线粒体保护作用的药物能短时增强血小板功能<sup>[23]</sup>。垂体激素(促性腺激素、甲状腺激素、雌激素)可以激活血小板调节系统,维持血小板的正常功能<sup>[24]</sup>。

表 3 三棱抗血栓形成关键靶标具有的功能信息

Table 3 Functional analysis of key targets of Sparganii Rhizoma for thrombosis

| ID         | 功能条目   | 基因数目/个 | <i>P</i>               |
|------------|--|--------|------------------------|
| GO:0042493 | response to drug   | 30     | $9.51 \times 10^{-20}$ |
| GO:0008134 | 转录因子结合(transcription factor binding)   | 28     | $1.67 \times 10^{-19}$ |
| GO:0005739 | mitochondrion  | 52     | $3.70 \times 10^{-18}$ |
| GO:0045944 | 从 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter) | 45     | $8.78 \times 10^{-18}$ |
| GO:0005743 | mitochondrial inner membrane   | 31     | $1.79 \times 10^{-17}$ |
| GO:0045893 | 转录的正向调节,DNA 模板(positive regulation of transcription,DNA-templated)                           | 31     | $1.74 \times 10^{-15}$ |
| GO:0043066 | 负调控凋亡过程(negative regulation of apoptotic process)  | 29     | $4.43 \times 10^{-15}$ |
| GO:0005654 | 核质(nucleoplasm)  | 72     | $1.84 \times 10^{-14}$ |
| GO:0043209 | 髓鞘(myelin sheath)  | 18     | $2.28 \times 10^{-14}$ |
| GO:0005829 | 细胞质(cytosol)   | 79     | $2.74 \times 10^{-13}$ |
| GO:1902600 | hydrogen ion transmembrane transport   | 13     | $2.81 \times 10^{-13}$ |
| GO:0007165 | 信号转导(signal transduction)  | 40     | $1.71 \times 10^{-12}$ |
| GO:0004672 | 蛋白激酶活性(protein kinase activity)  | 18     | $4.39 \times 10^{-12}$ |
| GO:0005524 | ATP 结合(ATP binding)  | 47     | $7.26 \times 10^{-12}$ |
| GO:0032403 | 蛋白质复合物结合(protein complex binding)  | 19     | $7.41 \times 10^{-12}$ |
| GO:0006954 | 炎症应答(inflammatory response)  | 23     | $1.06 \times 10^{-11}$ |
| GO:0006754 | ATP 生物合成过程(ATP biosynthetic process)   | 9      | $1.21 \times 10^{-11}$ |
| GO:0031625 | 泛素蛋白连接酶结合(ubiquitin protein ligase binding)  | 20     | $1.43 \times 10^{-11}$ |
| GO:0006123 | mitochondrial electron transport,cytochrome-C to oxygen                                      | 8      | $1.60 \times 10^{-11}$ |
| GO:0006468 | 蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)  | 25     | $1.85 \times 10^{-11}$ |

表 4 三棱抗血小板聚集关键靶标具有的功能信息

Table 4 Functional analysis of key targets of Sparganii Rhizoma for platelet aggregation

| ID         | 功能条目   | 基因数目/个 | P                      |
|------------|--|--------|------------------------|
| GO:0005743 | mitochondrial inner membrane   | 29     | $1.42 \times 10^{-20}$ |
| GO:1902600 | hydrogen ion transmembrane transport   | 13     | $1.51 \times 10^{-15}$ |
| GO:0005739 | mitochondrion  | 38     | $5.83 \times 10^{-15}$ |
| GO:0042493 | response to drug   | 21     | $1.44 \times 10^{-14}$ |
| GO:0006123 | mitochondrial electron transport, cytochrome-C to oxygen   | 8      | $6.29 \times 10^{-13}$ |
| GO:0004129 | cytochrome-C oxidase activity  | 9      | $8.79 \times 10^{-13}$ |
| GO:0006091 | generation of precursor metabolites and energy   | 9      | $1.02 \times 10^{-10}$ |
| GO:0043209 | myelin sheath  | 12     | $6.15 \times 10^{-10}$ |
| GO:0006754 | ATP biosynthetic process   | 7      | $1.09 \times 10^{-9}$  |
| GO:0032403 | protein complex binding  | 14     | $1.32 \times 10^{-9}$  |
| GO:0034199 | 激活蛋白激酶 A 活性(activation of protein kinase A activity)   | 6      | $1.35 \times 10^{-9}$  |
| GO:0003091 | 肾水稳态(renal water homeostasis)  | 7      | $1.81 \times 10^{-9}$  |
| GO:0042776 | 线粒体 ATP 合成耦合质子运输(mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport)                           | 6      | $2.93 \times 10^{-9}$  |
| GO:0005753 | 线粒体质子转运 ATP 合成酶复合体(mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex)                       | 6      | $5.80 \times 10^{-9}$  |
| GO:0005829 | cytosol  | 52     | $6.29 \times 10^{-9}$  |
| GO:0032869 | 胰岛素刺激的细胞反应(cellular response to insulin stimulus)  | 9      | $6.80 \times 10^{-9}$  |
| GO:0046933 | 质子转运 ATP 合成酶活性、旋转机制(proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism)             | 5      | $2.09 \times 10^{-8}$  |
| GO:0022857 | 跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity)   | 6      | $2.39 \times 10^{-8}$  |
| GO:0020037 | 血红素结合(heme binding)  | 10     | $3.10 \times 10^{-8}$  |
| GO:0007189 | 腺苷酸环化酶激活 G 蛋白偶联受体信号通路(adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway) | 7      | $3.94 \times 10^{-8}$  |

表 5 三棱抗血栓形成关键靶标参与的通路信息

Table 5 Pathway analysis of key targets of Sparganii Rhizoma for thrombosis

| ID       | 通路名称   | 靶点数目/个 | P                      |
|----------|--|--------|------------------------|
| #        | 内分泌系统(endocrine system)                      | 67     | $3.82 \times 10^{-23}$ |
| #        | neurodegenerative diseases                   | 44     | $3.28 \times 10^{-19}$ |
| hsa05016 | Huntington's disease                         | 33     | $4.95 \times 10^{-19}$ |
| hsa05161 | 乙型肝炎(hepatitis B)                            | 28     | $5.67 \times 10^{-17}$ |
| #        | circulatory system                           | 36     | $1.20 \times 10^{-16}$ |
| hsa05012 | Parkinson's disease                          | 27     | $3.27 \times 10^{-16}$ |
| #        | endocrine and metabolic diseases             | 33     | $1.61 \times 10^{-15}$ |
| #        | 细胞生长与死亡(cell growth and death)               | 37     | $1.89 \times 10^{-15}$ |
| hsa05169 | EB 病毒感染(Epstein-Barr virus infection)        | 30     | $6.13 \times 10^{-15}$ |
| hsa05215 | 前列腺癌(prostate cancer)                        | 21     | $7.28 \times 10^{-15}$ |
| hsa04915 | 雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)          | 22     | $7.74 \times 10^{-15}$ |
| hsa04932 | NAFLD  | 26     | $1.25 \times 10^{-14}$ |
| hsa04919 | 甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway) | 23     | $3.60 \times 10^{-14}$ |
| hsa04921 | 催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)          | 25     | $3.67 \times 10^{-13}$ |
| hsa04062 | 趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)        | 27     | $4.23 \times 10^{-13}$ |
| #        | signal transduction                          | 83     | $5.16 \times 10^{-13}$ |
| hsa05200 | 癌症通路(pathways in cancer)                     | 35     | $6.78 \times 10^{-13}$ |
| hsa05010 | Alzheimer's disease                          | 25     | $1.33 \times 10^{-12}$ |
| hsa04912 | 促性腺激素释放激素信号通路(GnRH signaling pathway)        | 19     | $1.98 \times 10^{-12}$ |
| hsa05203 | 病毒致癌机制(viral carcinogenesis)                 | 27     | $3.49 \times 10^{-12}$ |

表 6 三棱抗血小板聚集关键靶标参与的通路信息

Table 6 Pathway analysis of key targets of Sparganii Rhizoma for platelet aggregation

| ID       | 通路名称                               | 靶点数目/个 | P                      |
|----------|------------------------------------|--------|------------------------|
| hsa05012 | Parkinson's disease                | 28     | $8.14 \times 10^{-22}$ |
| #        | circulatory system                 | 32     | $2.33 \times 10^{-18}$ |
| #        | neurodegenerative diseases         | 35     | $1.34 \times 10^{-17}$ |
| hsa05016 | Huntington's disease               | 25     | $1.32 \times 10^{-15}$ |
| hsa00190 | oxidative phosphorylation          | 22     | $1.33 \times 10^{-15}$ |
| hsa05010 | Alzheimer's disease                | 24     | $1.87 \times 10^{-15}$ |
| #        | endocrine and metabolic diseases   | 27     | $8.57 \times 10^{-15}$ |
| #        | energy metabolism                  | 22     | $7.19 \times 10^{-14}$ |
| hsa04932 | NAFLD                              | 21     | $2.25 \times 10^{-13}$ |
| #        | endocrine system                   | 42     | $3.04 \times 10^{-13}$ |
| hsa04912 | GnRH signaling pathway             | 16     | $6.07 \times 10^{-12}$ |
| hsa04260 | cardiac muscle contraction         | 15     | $6.31 \times 10^{-12}$ |
| hsa04919 | thyroid hormone signaling pathway  | 16     | $3.43 \times 10^{-10}$ |
| #        | 神经系统(nervous system)               | 30     | $1.41 \times 10^{-9}$  |
| hsa04915 | estrogen signaling pathway         | 14     | $2.73 \times 10^{-9}$  |
| hsa04270 | vascular smooth muscle contraction | 15     | $4.03 \times 10^{-9}$  |
| #        | cell growth and death              | 23     | $4.32 \times 10^{-9}$  |
| hsa05161 | hepatitis B                        | 16     | $7.31 \times 10^{-9}$  |
| hsa04913 | ovarian steroidogenesis            | 10     | $2.04 \times 10^{-8}$  |
| hsa05203 | viral carcinogenesis               | 18     | $2.93 \times 10^{-8}$  |

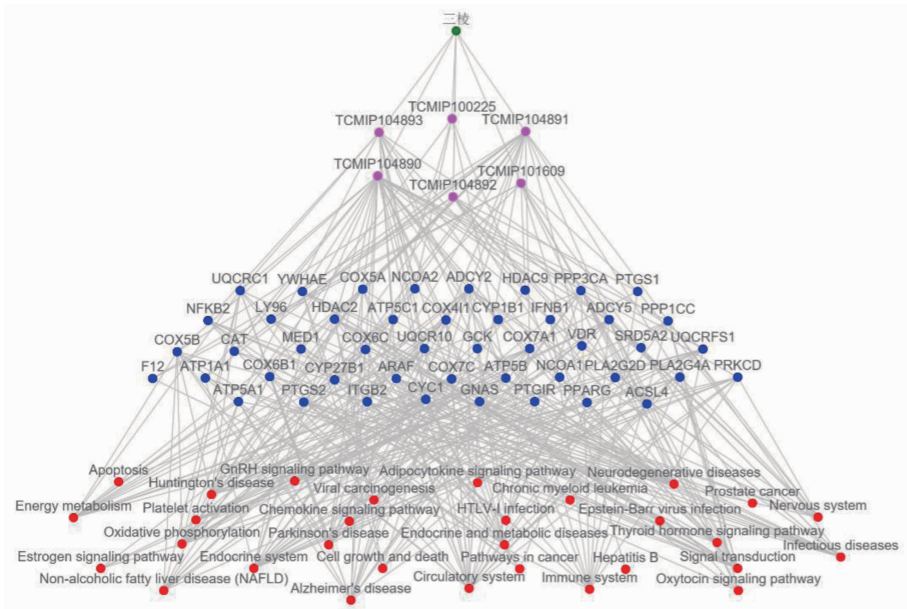
**2.4 多维网络构建及分析** 根据以上信息,通过TCM-IP 构建三棱“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路”的多层次网络关联图,见图 3,4。结果发现三棱抗血栓形成主要作用于 30 条主要作用通路的 202 个核心靶标;抗血小板聚集主要作用于 30 条主要作用通路的 136 个核心靶标。这是该中药发挥抗血栓形成及抗血小板聚集药效的核心所在,也体现了中药多成分、多靶点共同作用的特点。根据预测的核心靶标和信号通路,推测三棱主要通过调控中枢神经系统的神经递质活性达到调节血管内皮细胞黏附分子表达以及血小板线粒体功能介导血小板的凋亡,从而发挥抗血栓形成及抗血小板聚集的药效作用。

### 3 讨论

本研究采用 TCM-IP 相关数据库对三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的分子机制进行预测,结果表明三棱主要通过调控中枢神经系统的神经递质活性,进而调节血管内皮细胞功能发挥抗血栓形成药理作用,调控血小板线粒体功能达到抗血小板聚集目的。这提示中枢神经下丘脑-垂体系统在三棱发

挥抗血栓形成和抗血小板聚集过程中发挥了十分重要的作用。因此,单纯采用体外细胞实验不能真正全面反映三棱的药理作用<sup>[25]</sup>。斑马鱼作为一种相对新颖的模式脊椎动物,具有保守的神经系统构造,可以模拟中枢神经系统的调控作用,其血栓模型作为一种整体模式生物,相比体外细胞模型,更有利于全面反映中药三棱药效物质的作用机制<sup>[26-29]</sup>。

斑马鱼血栓模型的血栓形成机制与人类类似,亦包括血小板的黏附、激活聚集、释放反应,凝血细胞表达血小板糖蛋白 GP II b/III a 和 GPIb,并且同时具有内外源和外源性的凝血途径<sup>[30]</sup>。此外,斑马鱼表达多种药物代谢酶与哺乳动物的代谢酶系高度相似,其幼鱼与成鱼均较成功地模拟了哺乳动物 I 和 II 相代谢、肠道菌群代谢以及多途径整体代谢,可以模拟人体内的药物代谢过程<sup>[31]</sup>。本课题组通过以绿色荧光蛋白标记转基因斑马鱼抗血小板聚集活性为导向,追踪到三棱乙酸乙酯部位有抗血小板聚集活性,对该活性部位进一步纯化,作为抗血小板聚集作用的候选单体;同时以斑马鱼为代谢模型,研究三棱抑制血小板聚集的活性酚类成分的体内药效物质



绿色代表中药;紫色代表成分;蓝色代表关键靶标;红色代表通路(图4同)

图 3 三棱抗血栓形成“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路”的多维网络关系

Fig. 3 Multidimensional relationship network of 'herbal medicines-chemical components-key targets-key pathways' of Sparganii Rhizoma for thrombosis

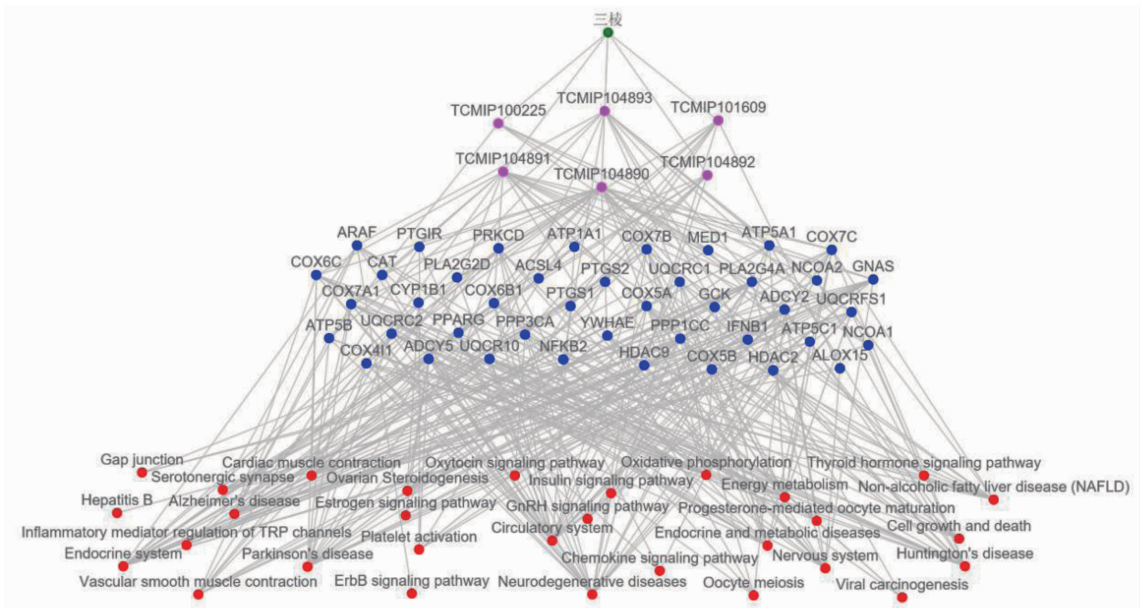


图 4 三棱抗血小板聚集“中药材-化学成分-核心靶标-关键通路”的多维网络关系

Fig. 4 Multidimensional relationship network of 'herbal medicines-chemical components-key targets-key pathways' of Sparganii Rhizoma for platelet aggregation

及代谢轮廓,从而全面系统阐明三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的药效物质和作用机制。后续将借鉴网络药理学中靶点研究的结果,基于斑马鱼血栓模型,建立“双向验证”策略<sup>[32]</sup>,进行三棱抗血栓形成相关的代谢型生物标志物进行研究,深入探讨三棱的活性药效物质和作用机制,为创制靶标明确、有临床应用价值的三棱多酚类活性成分组合物奠定

基础。

[参考文献]

- [ 1 ] 韦明婵,林江,莫明月,等. 网络方剂学特征的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(11):218-224.
- [ 2 ] 吴纯伟,路丽,梁生旺,等. 药物靶标预测技术在中药网络药理学中的应用[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):377-382.

- [ 3 ] 徐男,黄欣,孙蓉,等. 与三棱“功效-毒性-物质基础”相关的化学成分、制备工艺和质量控制研究进展[J]. 中国药房,2016,27(33):4749-4752.
- [ 4 ] 张军武,郭斌,尉亚辉. 黑三棱的生物学、药理作用及化学成分研究进展[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(6):639-644.
- [ 5 ] 徐男,曹铭晨,黄欣,等. 三棱乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱及4种酚类成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(18):1783-1786.
- [ 6 ] 许海玉,刘振明,付岩,等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3633-3638.
- [ 7 ] 贾斯达,袁晋青. 血栓形成机制和临床抗栓策略的研究进展[J]. 中国分子心脏病学杂志,2016,16(3):1748-1752.
- [ 8 ] Chari R, Getz T, Nagy B, et al. Protein kinase C $\delta$  differentially regulates platelet functional responses[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2009,29(5):699-705.
- [ 9 ] TAN M, XU X, Ohba M, et al. Thrombin rapidly induces protein kinase D phosphorylation, and protein kinase C delta mediates the activation[J]. *J Biol Chem*,2003,278(5):2824-2828.
- [10] Bair A M, Thippegowda P B, Freichel M, et al. Ca<sup>2+</sup> entry via TRPC channels is necessary for thrombin-induced NF-kappaB activation in endothelial cells through AMP-activated protein kinase and protein kinase C $\delta$ [J]. *J Biol Chem*,2009,284(1):563-574.
- [11] LI Z, NI J. Role of microRNA-26a in the diagnosis of lower extremity deep vein thrombosis in patients with bone trauma [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 ( 5 ): 5069-5074.
- [12] Chee M J, Pissios P, Maratos-Flier E. Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus[J]. *J Comp Neurol*, 2013, 521 ( 10 ): 2208-2234.
- [13] Sanabra C, Mengod G. Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain[J]. *J Chem Neuroanat*,2011,41(1):43-54.
- [14] 袁媛. 线粒体途径介导血小板凋亡的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(22):4066-4068.
- [15] 赵丽丽,陈梦醒,张明逸,等. 血小板内蛋白激酶C活化诱导血小板发生凋亡[J]. 中国实验血液学杂志,2013,21(5):1207-1210.
- [16] 夏乐敏,郑秦,张爱萍,等. 线粒体途径在免疫性骨髓衰竭性血小板凋亡中的作用机制研究[J]. 中国实验血液学杂志,2017,25(1):176-180.
- [17] 甘卫冬,眭承志. 从血管内皮功能探讨雌激素与血瘀关联性的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(6):711-713.
- [18] Rodilla Fiz A M, Garvı López M, Gómez Garrido M. Changes in haemostasis and thrombosis associated with thyroid disease; presentation of 2 cases [J]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*,2016,63(6):357-360.
- [19] Basarici I, Belgi A, Yalcinkaya S. Tricuspid valve thrombus: a case report associated with gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and review of the literature[J]. *Can J Cardiol*,2008,24(5):401-403.
- [20] LIU S, PAN S, TAN J, et al. Oxytocin inhibits ox-LDL-induced adhesion of monocytic THP-1 cells to human brain microvascular endothelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2017,337:104-110.
- [21] WU F, LIU L, ZHOU H. Endothelial cell activation in central nervous system inflammation[J]. *J Leukoc Biol*, 2017,101(5):1119-1132.
- [22] 孙竞,高静. 靶向线粒体抗神经退行性疾病新型药物研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2016,43(1):79-86.
- [23] 邱洁,邬加佳,郭开华. 雌激素对体外大鼠血小板线粒体功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2008(16):1594-1596.
- [24] Bodis J, Papp S, Vermes I, et al. " Platelet-associated regulatory system( PARS) " with particular reference to female reproduction [J]. *J Ovarian Res*, 2014, doi: 10.1186/1757-2215-7-55.
- [25] 冯娅茹,张文婷,李二文,等. 三棱化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2017,48(22):4804-4818.
- [26] 尚春峰,穆宇,杜久林. 以透明脑,观澄明心-斑马鱼神经功能研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2015,45(3):223-236.
- [27] 田丽莉,朱国福. 斑马鱼在中药研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):822-827.
- [28] 李晓稳,佟玲,李东翔,等. 斑马鱼神经元损伤模型在养血清脑颗粒质量控制中的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(9):1-4.
- [29] 陈志亮. 斑马鱼在药物筛选中的应用[J]. 中国中药杂志,2015,40(7):1235-1239.
- [30] QI Y, ZHAO X, LIU H, et al. Identification of a quality marker ( Q-marker ) of Danhong injection by the Zebrafish thrombosis model [J]. *Molecules*, 2017, 22 ( 9 ): E1443.
- [31] 宁青,韦英杰,王丹丹,等. 斑马鱼药物代谢模型的适用性研究进展[J]. 中草药,2015,46(8):1231-1236.
- [32] 韩利文,李智平,何秋霞,等. 采用双向验证法和斑马鱼模型探索血管生成相关的内源性代谢物及代谢网络的变化[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(10):1041-1045.

[责任编辑 刘德文]