

基于网络药理学和体外实验探究参红胶囊防治高原反应的作用机制

张梦迪, 邱海莹, 王广云, 吴燕

Mechanism of *Shen Hong* capsule in preventing and treating acute mountain sickness based on network pharmacology and *in vitro* experiments

ZHANG Mengdi, QIU Haiying, WANG Guangyun, WU Yan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202405056>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学探讨参苓白术散治疗肿瘤恶病质的作用机制

Molecular mechanism of Shenling Baizhu powder in treatment of cancer cachexia based on network pharmacology

药学实践与服务. 2025, 43(5): 242-250 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202208115

基于网络药理学和分子对接技术研究路路通抗肿瘤的潜在机制

The antitumor mechanism of *Fructus liquidambaris* based on network pharmacology and molecular docking

药学实践与服务. 2026, 44(1): 32-38 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404067

基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479-486 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202401073

基于网络药理学和分子对接技术研究金芪清疏颗粒治疗社区获得性肺炎的潜在机制

Study on the potential mechanism of JQQSG for the treatment of CAP based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 471-478 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312014

基于UHPLC-Q-TOF/MS结合网络药理学研究柴胡桂枝干姜汤治疗慢性非萎缩性胃炎的物质基础及疗效机制

Exploring effective components and therapeutic mechanism of Chaihu-Guizhi-Ganjiang decoction in treatment of chronic non-atrophic gastritis by UHPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology

药学实践与服务. 2025, 43(9): 455-462 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312061



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于网络药理学和体外实验探究参红胶囊防治高原反应的作用机制

张梦迪^{1,2}, 邱海莹¹, 王广云¹, 吴 燕¹ (1. 空军特色医学中心, 北京 100142; 2. 63680 部队医院, 江苏 无锡 214000)

[摘要] **目的** 基于生物信息平台及体外实验探讨参红胶囊防治高原反应的作用机制。**方法** 利用中药信息数据库和分析平台(TCMSP)、中药集成数据库(TCMID)结合文献筛选参红胶囊的活性成分和靶点, 治疗靶点数据库(TTD)、疾病相关基因和变异信息的综合平台(DisGeNET)、基因数据库(GeneCards)进行高原反应相关疾病靶点检索, 得到潜在治疗靶点, 通过蛋白相互作用数据库(String)进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析, 生物信息数据库(DAVID)在线平台分析生物注释(GO)及信号通路(KEGG)富集情况, 采用 Cytoscape 软件进行网络可视化, 根据拓扑数据得到 PPI 中的关键靶点, 采用分子对接对主要活性成分和关键治疗靶点进行结合能力分析, 采用液相色谱-质谱联用分析技术(LC-MS)对筛选出来的主要活性成分进行验证; 制备 H9c2 细胞缺氧模型, Hoechst33342 染色观察细胞凋亡, 免疫印迹试验验证关键靶蛋白。**结果** 筛选出参红胶囊 91 个活性成分、3 个主要活性成分, 150 个预测作用靶点; 筛选出高原反应相关疾病靶点 515 个, 参红胶囊调控高原反应潜在治疗靶点 37 个; 富集分析出 HIF-1 信号通路、PPAR 信号通路、药物代谢-细胞色素 P450 等 44 条相关信号通路, PPI 分析得到 TNF、IL1B、VEGFA、NOS3、EGFR、ESR1、PPARG、NR3C1、HMOX1、IFNG 10 个关键靶点, 分子对接结果表明主要活性成分与关键靶蛋白的对接构象稳定。LC-MS 鉴定网络药理学筛选出的槲皮素、木犀草素、山奈酚 3 个主要活性成分, 并通过 H9c2 细胞体外实验证明了参红胶囊可通过调控 HIF-1 α 、PPARG、NOS3、TNF 的表达, 缓解缺氧引起的损伤。**结论** 参红胶囊能够通过多成分、多靶点、多途径的方式, 调节机体代谢, 提高机体耐缺氧能力, 从而起到防治高原反应的作用。本研究为深入探讨参红胶囊作用机制提供方向, 也为进一步对其开发及临床应用提供理论基础。

[关键词] 参红胶囊; 高原反应; 网络药理学; 液相色谱-质谱联用分析技术; 体外实验

[文章编号] 2097-2024(2026)08-0408-09

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202405056

Mechanism of *Shen Hong* capsule in preventing and treating acute mountain sickness based on network pharmacology and *in vitro* experiments

ZHANG Mengdi^{1,2}, QIU Haiying¹, WANG Guangyun¹, WU Yan¹ (1. Air Force Medical Center, PLA, Beijing 100142, China; 2. Unit 63680 Hospital of PLA, Wuxi 214000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of *Shen Hong* capsule in preventing and treating acute mountain sickness based on biological information platform and *in vitro* experiment. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) and Traditional Chinese Medicine Information Database (TCMID) were used to obtain the active components and predicted targets of *Shen Hong* capsule. Therapeutic Target Database (TTD), Disease Gene Network (DisGeNET) database and GeneCards database were used to search for the targets of acute mountain sickness related diseases, and the potential therapeutic targets were obtained. The protein-protein interaction (PPI) was analyzed by Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING), the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) online platform was used to analyse the Gene Ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway enrichment. The network information was visualized by Cytoscape software, the key targets in PPI network were obtained according to the topology data, and the binding ability of main active components and key therapeutic targets were analyzed by molecular docking. The validation of the main active components was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The hypoxia model was created by H9c2 cells, apoptosis was visualized by Hoechst33342 staining, and key target proteins were verified by Western blot. **Results** 91 active components, 3 main active components and 150 predicted targets were selected from *Shen Hong* capsule. 515 targets of altitude sickness-related diseases and 37 targets of *Shen Hong* capsule regulating altitude sickness-related diseases were screened out. 44 related signal pathways, such as HIF-1 signal pathway, PPAR signal pathway, drug metabolism - cytochrome P450, were enriched and analyzed. TNF, IL1B, VEGFA, NOS3, EGFR, ESR1, PPARG, NR3C1, HMOX1 and IFNG were 10 key targets. The molecular docking results showed that the docking conformations between the main active components and

[基金项目] 军委后保部卫生局中医药研究专项(2021ZY026); 军队后勤科研项目(BKJ17C007)

[作者简介] 张梦迪, 硕士研究生, 研究方向: 中药制剂研发、中药药理学, Email: 18937520896@163.com

[通信作者] 吴 燕, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药制剂研究与开发, Email: wuyan2001@163.com

the key targets were stable. The three main active components of quercetin, luteolin and kaempferol were identified by LC-MS, and *in vitro* experiments proved that *Shen Hong* capsule could relieve acute hypoxia injury by regulating the expression of HIF-1 α , PPARG, NOS3, and TNF. **Conclusion** *Shen Hong* capsule could regulate the body's hypoxia response and metabolism through multi-component, multi-target and multi-channel ways, so as to prevent and treat acute mountain sickness. This study provided a direction for further exploring the mechanism of *Shen Hong* capsule, and also provided a theoretical basis for further development and clinical application.

[Key words] *Shen Hong* capsule; acute mountain sickness; biological information; liquid chromatography-mass spectrometry; *in vitro* experiment

高原反应是指短期内由平原进入高原,或由低海拔地区进入到高海拔地区时,由于对低氧环境的适应能力不全或失调而发生脑肺综合征^[1]。高原反应又分为急性高原反应、高原脑水肿和高原肺水肿等。正常人进入高原后,会因为高原低压低氧的环境而导致缺氧,短时间内机体处于低压低氧环境(3000 m 以上地区)会发生头痛、头晕、心悸、失眠、食欲减退、疲倦、呼吸困难等临床症状^[2-3]。根据流行病学调查显示:部队进驻高原地区时,急性高原反应总发病率为48.7%,有91.6%的人出现不同程度的头痛、胃肠反应、睡眠障碍等高原反应症状。当部队需要大批快速进入高原时,高原反应的发生率过高会直接影响部队战斗力,如有严重病例出现,可能会危及生命,对部队作战能力及部队官兵的生命安全都造成了很大的影响^[4-5]。因此,研制出安全有效的预防及治疗高原反应的药物,降低高原反应发病率具有非常重要的意义。

根据中医对高原反应的认识,认为其症候因气虚、血虚和伤阴所致,故采用补气、活血、养阴的疗法,以增强机体对低氧的耐力^[6]。参红胶囊由丹参、三七、西洋参、砂仁、檀香、藏红花、山楂、冰片8种中药材组成,是以经典名方丹参饮为基础,根据几代中医的临床经验,在实践中不断改进所得。此药方中丹参具有活血化瘀、养血安神的功效,三七助丹参活血化瘀,西洋参益气养阴,砂仁、檀香行气止痛,藏红花活血定痛,山楂消食和胃,冰片开窍醒脑,并引诸药上达颠顶,以止头痛。已有研究表明丹参、西洋参单独使用均具有扩张脑血管、缓解高原反应的作用,藏红花具有调节免疫功能的作用,檀香则可缓解抗高原反应所带来的身体疲劳^[7-10]。该药方为高原地区老中医经验方,经过多年的临床应用和疗效观察,确认疗效可靠。但关于参红胶囊防治高原反应的具体作用机制尚不清楚。本研究基于生物信息平台,通过网络药理学及分子对接技术,对参红胶囊防治高原反应的有效成分、作用靶点、作用通路进行预测,验证活性成分与靶蛋白之间的结合能力,并通过体外实验验证部

分关键靶蛋白,为参红胶囊的深入探究及进一步推广应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 参红胶囊活性成分及作用靶点预测

结合中药信息数据库和分析平台(TCMSP)、中药集成数据库(TCMID)及相关文献报道,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选条件,对丹参、三七、西洋参、砂仁、檀香、藏红花、冰片、山楂8味中药进行活性成分检索。再根据得到的活性成分进行作用靶点检索,将所有的靶点蛋白名通过 Uniprot 数据库转化为通用基因名。通过 Cytoscape 软件进行数据可视化,构建“中药-活性成分-预测靶点”网络图。

1.2 参红胶囊防治高原反应潜在疾病治疗靶点检索

通过治疗靶点数据库(TTD)、疾病相关基因和变异信息的综合平台(DisGeNET)、基因数据库(GeneCards)进行疾病靶点检索,以“high altitude pulmonary edema”、“high altitude cerebral edema”、“high altitude reaction”、“acute mountain sickness”等为检索关键词。得到疾病靶点后,剔除得分较低的靶点。通过 Venny 网站在线绘制韦恩图,将筛选后得到的疾病靶点与参红胶囊的预测靶点取交集,交集靶点即为参红胶囊防治高原反应的潜在治疗靶点。

1.3 参红胶囊防治高原反应潜在治疗靶点蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将得到的参红胶囊防治高原反应的潜在治疗靶点导入蛋白相互作用数据库(String),检索到靶点蛋白之间相互作用关系,导出数据,通过 Cytoscape 软件构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图,使用 CytoNCA 插件进行数据拓扑分析,根据节点的度值(Degree)对 PPI 网络图进行可视化分析。

1.4 参红胶囊防治高原反应潜在治疗靶点进行富集分析

将参红胶囊防治高原反应的潜在治疗靶点导

入生物信息数据库(DAVID),得到生物过程富集注释(GO)及信号通路(KEGG)。将数据导出,以 P 值作为筛选条件,剔除 $P>0.01$ 的生物过程及信号通路。

1.5 主要活性成分与潜在治疗靶点进行分子对接

选取 PPI 中 Degree 值排名前 10 的潜在靶蛋白作为关键靶点,从 PDB 蛋白数据库找到合适的蛋白复合晶体结构,下载 *.pdb 格式文件,导入 PyMOL 软件中,将复合晶体结构中原有的配体及水分子删除,只保留蛋白大分子结构,仍然保存为 *.pdb 格式。将整理所得靶点蛋白所对应的、相关性较强的活性成分作为分子对接的小分子配体,从 PubChem 数据库中找到活性成分 2D 分子结构,下载 *.mol2 格式文件,导入 OpenBabel 软件,将 *.mol2 格式转化为 *.pdb 格式。蛋白大分子与活性成分配体通过 Autodock 软件进行分子对接,对接完成后,根据键能的大小选取最佳对接构象。

1.6 液相色谱-质谱联用分析技术鉴定主要活性成分

取 2 g 参红胶囊药粉用 200 ml 70% 乙醇加热回流提取 6 h,转移全部提取液,将提取液浓缩至近干,用甲醇溶解并定容至 5 ml,溶液过 0.45 μm 微孔滤膜后上机测试。实验仪器型号:赛默飞 U3000+MSQ Plus;色谱柱:Xtimate UHPLC C₁₈, 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm;柱温:55 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 ml/min;进样量:10 μl ;流动相:乙腈和 0.1% 甲酸水,梯度洗脱信息见表 1。质谱条件:离子源为 ESI 源,正离子扫描, Cone 75 v, Needle 3.5 kv, Probe temperature 350 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 主要活性成分梯度洗脱信息

时间(t/min)	乙腈(%)	0.1%甲酸水(%)
0	10	90
2	10	90
5	90	10
8	90	10
8.1	10	90
15	10	90

1.7 体外实验

1.7.1 材料

心肌细胞 H9c2 由空军特色医学中心临床医学实验中心提供;DMEM 培养基(批号:GP22030160220)、青链霉素(批号:CR2201019)、胰酶(批号:CA22030013660)、制胶试剂盒(批号:P0012AC)、电泳缓冲液(批号:20211215)、转膜缓冲液(批号:20211210)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;四季青胎牛血清(批号:20201124)、CCK-8 试剂盒(批号:20210323)、IDF-11774 抑制剂(批号:HY-111387)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;NOS3 抗体(批号:00103575)、PPARG 抗体(批

号:10014314)、HMOX1 抗体(批号:00100097)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号:00101747)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;Hoechst 33342 染色液(批号:C1026)购自上海碧云天生物技术有限公司。

根据筛选出来主要活性成分的性质,均不溶或者微溶于水、可溶于乙醇,因此选择参红胶囊药粉醇提物进行体外实验。药粉加 10 倍量无水乙醇超声 1.5 h,滤液浓缩干燥,每 1 g 醇提物加 1 ml 乙醇溶解后,加完全培养基(90% DMEM + 10% FBS)稀释,终浓度调整为每 1 ml 药液含有 1 mg 醇提物,分装后储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。通过 LC-MS 对醇提物中关键活性成分进行鉴定,取 1 ml 浓度为 1 mg/ml 的药液用甲醇溶解并定容至 5 ml,溶液过 0.45 μm 微孔滤膜上机测试。检测条件同 1.6。

1.7.2 细胞培养、分组及体外缺氧模型建立

H9c2 心肌细胞需要 90% DMEM + 10% FBS 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中生长。分组:正常组、模型组、参红胶囊组(SH)、IDF-11774 抑制剂组。体外细胞缺氧模型建立:将对数生长期的细胞放入缺氧盒中,12 h 后,转入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱继续培养 6 h,模拟高原急性缺氧^[11-12]。IDF-11774 为缺氧诱导因子抑制剂,可在低氧环境下抑制缺氧诱导因子 HIF-1 α 的积累。

1.7.3 CCK-8 检测细胞存活率

将对数生长期的 H9c2 细胞经消化后加入培养基制成细胞悬液,进行细胞计数,调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μl ,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中稳定 4 h,待细胞完全贴壁后,将孔内培养基倒掉,于吸水纸上轻拍,补充培养基,分别加入参红胶囊醇提取物和 IDF-11774 抑制剂,参红胶囊醇提取物终浓度分别为 1000、750、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{g/ml}$,IDF-11774 抑制剂终浓度依次为 20、15、10、7.5、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 $\mu\text{mol/L}$ 。药物处理 24 h 后,弃板中培养基,加入配好的 CCK-8 溶液(每 100 μl 含 10 μl CCK-8),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度。

1.7.4 Hoechst 33342 染液检测细胞凋亡

收集对数生长期的 H9c2 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,每孔 2 ml,接种于 6 孔板,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中稳定 4 h,按 1.7.2 分组,各组加入不同的药物处理 24 h,除正常组外,其他各组按 1.7.2 方法模拟高原急性缺氧。取出 6 孔板,弃上层液,加 4% 多聚甲醛进行细胞固定 10 min,

PBS 洗涤 3 次, 每次 1 min, 每孔加入 1 ml Hoechst 33342 染液, 室温反应 30 min, 弃染液, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.7.5 蛋白印迹法检测蛋白水平

按 1.7.4 分组细胞并处理, 收集各组细胞加入细胞裂解液, 冰浴 1 h, 每 15 min 涡旋一次, 充分裂解, 离心取上清即得到所需蛋白, 通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。以 50 μg 为每组总蛋白量计算上样体积。SDS-PAGE 凝胶电泳, 冰浴转膜, 蛋白条带 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入对应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗掉残留一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 HRP 标记的二抗 2 h, TBST 洗掉残余二抗, 滴加 ECL 发光液, 凝

胶成像仪显影。

2 结果

2.1 参红胶囊活性成分及预测靶点

通过 TCMSP、TCMID 数据库及相关文献^[13-22]检索并筛选后得到 91 个活性成分, 其中丹参 61 个、三七 8 个、藏红花 5 个、檀香 3 个、砂仁 9 个、西洋参 9 个、冰片 3 个、山楂 2 个, 有 2 个活性成分存在于 3 味中药, 有 5 个活性成分存在于 2 味中药, 同时检索到 150 个成分靶点。通过 Cytoscape 构建“中药-活性成分-预测靶点”网络图, 如图 1 所示。

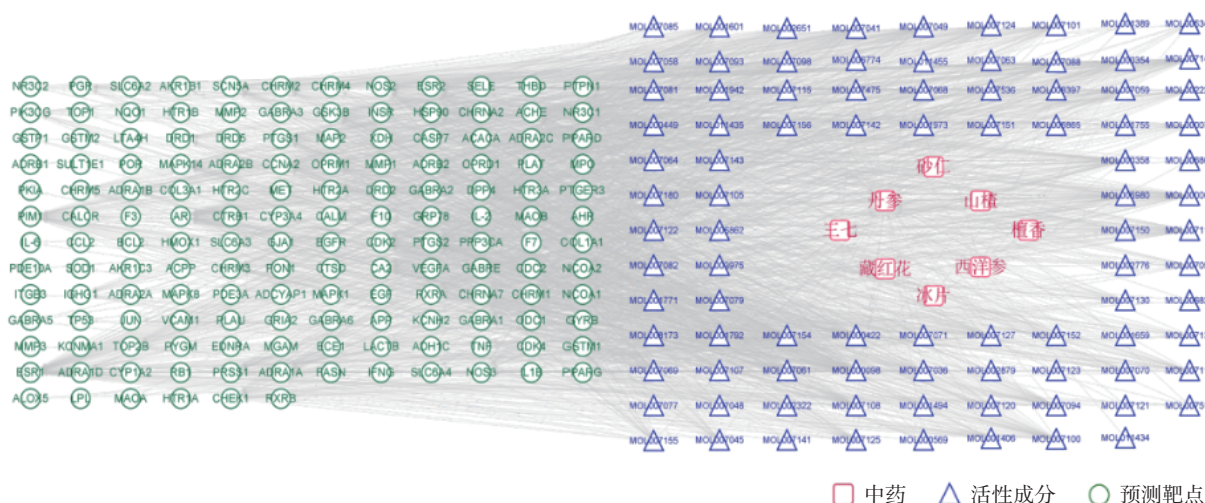


图 1 参红胶囊“中药-活性成分-预测靶点”网络图

2.2 潜在治疗靶点筛选

TTD、DisGeNET、GeneCards 数据库检索到 515 个高原反应相关疾病靶点, TCMSP 数据库检索到 150 个参红胶囊成分预测靶点, 通过 Venny 分析平台取二者交集靶点, 即为参红胶囊防治高原反应的潜在治疗靶点, 交集靶点韦恩图如图 2 所示。

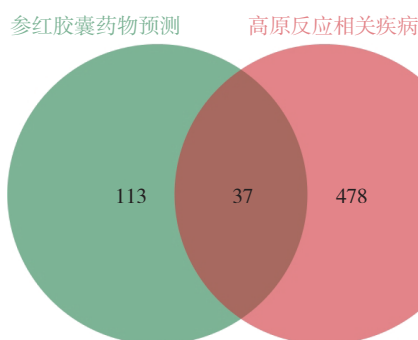


图 2 参红胶囊成分预测靶点与相关疾病靶点韦恩图

2.3 潜在治疗靶点 PPI 网络分析

将潜在治疗靶点导入 STRING 分析平台, 得到各靶点 PPI 关系, 将数据导出, 通过 Cytoscape 进行

可视化, 如图 3 所示。经拓扑分析, 根据 Degree 值大小, 排前 10 的靶点分别为 TNF(26.0)、IL1B(22.0)、VEGFA(22.0)、NOS3(20.0)、EGFR(19.0)、ESR1(18.0)、PPARG(17.0)、NR3C1(14.0)、HMOX1(14.0)、IFNG(14.0), 作为核心靶点, 用于之后的分子对接。

2.4 潜在治疗靶点富集分析

将潜在治疗靶点导入 DAVID 数据分析平台, GO 功能注释得到 163 个生物过程目录, KEGG 富集分析得到 44 个信号通路目录。以 $P < 0.01$ 为筛选条件, 生物过程主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、对缺氧的反应、氧化还原过程、血管舒张的正调节、一氧化氮生物合成过程的正调控、血压调节、序列特异性 DNA 结合转录因子活性的正调控、细胞对脂多糖的反应、血管生成的正向调节、细胞增殖等; 信号通路主要富集于 HIF-1 信号通路、癌症的途径、雌激素信号通路、破骨细胞分化、PPAR 信号通路、药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢等信号通路,

其中与目标疾病相关性较强的通路有 HIF-1 信号通路、药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢等。GO 功能注释生物过程如图 4 所示,KEGG 信号通路富集分析如图 5 所示。

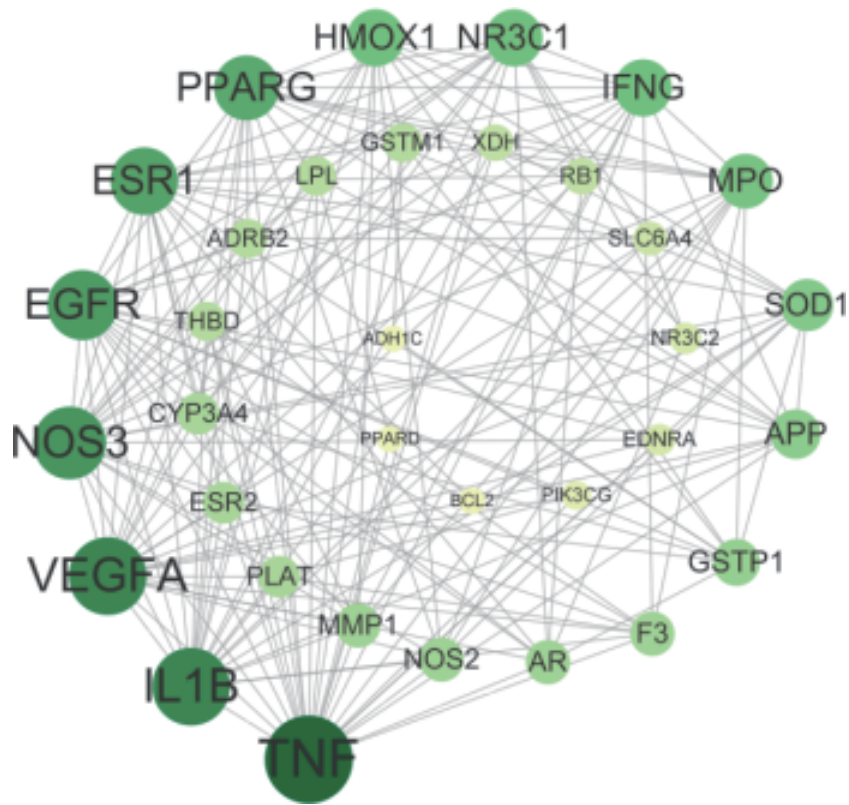


图 3 潜在治疗靶点 PPI 网络

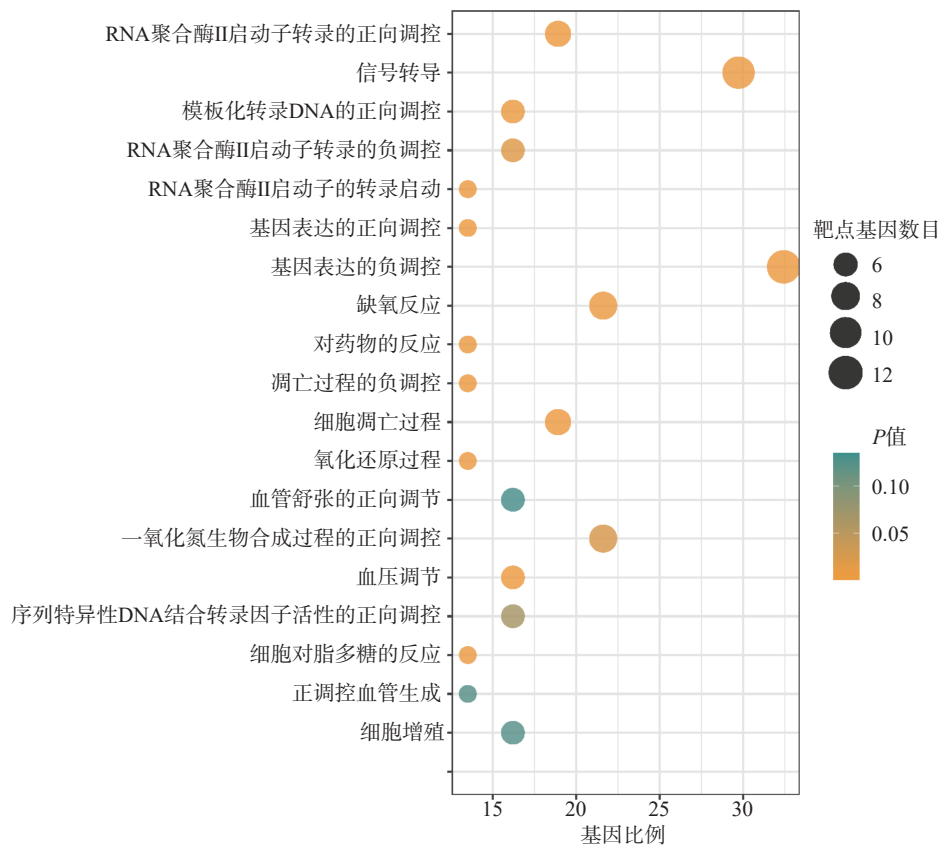


图 4 潜在治疗靶点 GO 注释生物过程

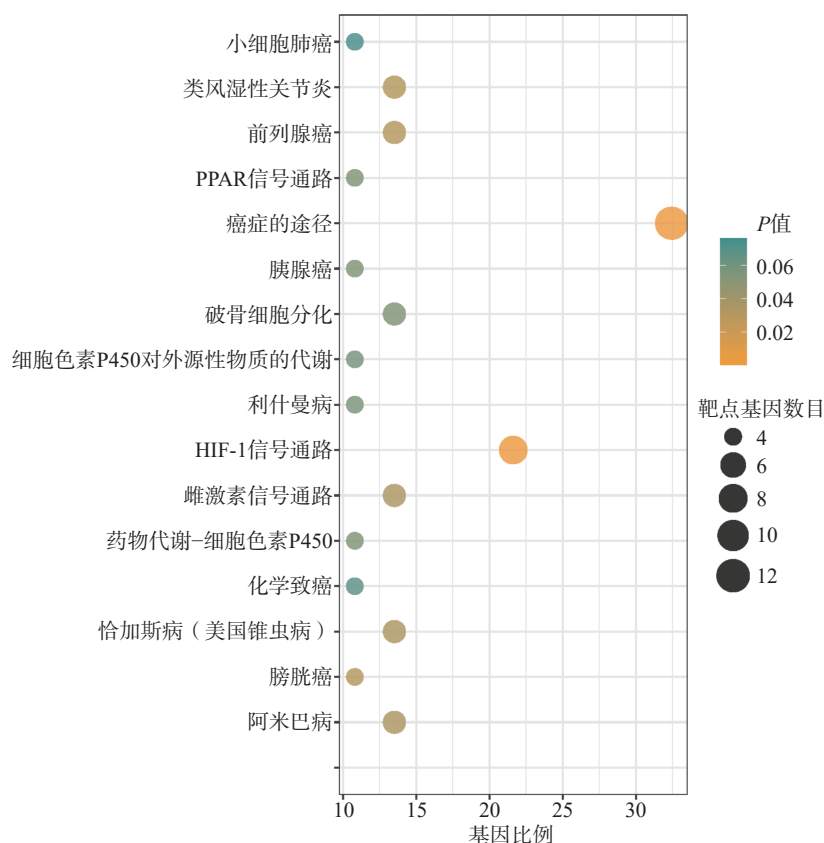


图 5 潜在治疗靶点 KEGG 信号通路富集分析

2.5 潜在治疗靶点与活性成分分子对接

根据信号通路上富集的靶点蛋白,找寻其对应的活性成分,选取槲皮素、木犀草素、山奈酚 3 个活性成分,作为分子对接中的小分子配体。由 PPI 网络图筛选出的 10 个核心靶点 TNF、IL1B、VEGFA、NOS3、EGFR、ESR1、PPARG、NR3C1、HMOX1、IFNG 作为分子对接中的蛋白大分子受体,从 PDB 蛋白数据库中寻找合适的蛋白晶体结构。将活性成分与相对应的靶点蛋白进行分子对接,分子间键能越大,代表活性成分在该靶点的潜在作用越强。参红胶囊主要活性成分与核心靶点分子对接结果(图 6)可以看出,对接构象稳定、活性成分与靶蛋白形成稳定氢键、匹配度良好和结合活性良好。

2.6 主要活性成分鉴定

通过 LC-MS 鉴定网络药理学筛选出的参红胶囊 3 个主要活性成分,包括槲皮素、木犀草素、山奈酚。如图 7 所示,参红胶囊药粉及醇提物中槲皮素、木犀草素和山奈酚的出峰保留时间分别为 6.940、6.975 和 7.305 min,与对应标准品的出峰保留时间相同。

2.7 体外实验

药物最适浓度的筛选,参红胶囊组 IC_{50} 为

888.5 $\mu\text{g/ml}$,当浓度为 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 时不影响细胞增殖,见图 8A; IDF-11774 组 IC_{50} 为 12.41 $\mu\text{mol/L}$,选择 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 为细胞最适浓度,见图 8B。

各组细胞经处理后,通过 Hoechst 33342 染液观察细胞凋亡情况。如图 9 所示,正常组细胞核呈均匀状,淡蓝色荧光;模型组细胞不规则、细胞核皱缩,显亮蓝色荧光;参红胶囊组和 IDF-11774 组细胞形态趋近于正常组。

通过蛋白印迹法检测处理后细胞蛋白表达水平的变化。如图 10 所示,缺氧诱导因子 HIF-1 α 在模型组中处于高表达水平,参红胶囊组和 IDF-11774 组低于模型组并趋近于正常组;预测靶点 PPARG、NOS3、TNF 在模型组中呈低表达水平,参红胶囊组和 IDF-11774 组高于模型组趋近于正常组的表达水平。

3 讨论

中医理论认为,在高原低氧环境影响下,人体正气虚损,气虚不运化水谷之精微,机体组织无精气营养而造成的病态反应,故辩证施治多采用扶正补气、活血化瘀、益肺健脾及补益肝肾的药物进行配伍和组方来提高机体的抗缺氧能力。出自《时方歌括》的经典方剂丹参饮,由丹参、檀香、砂仁组

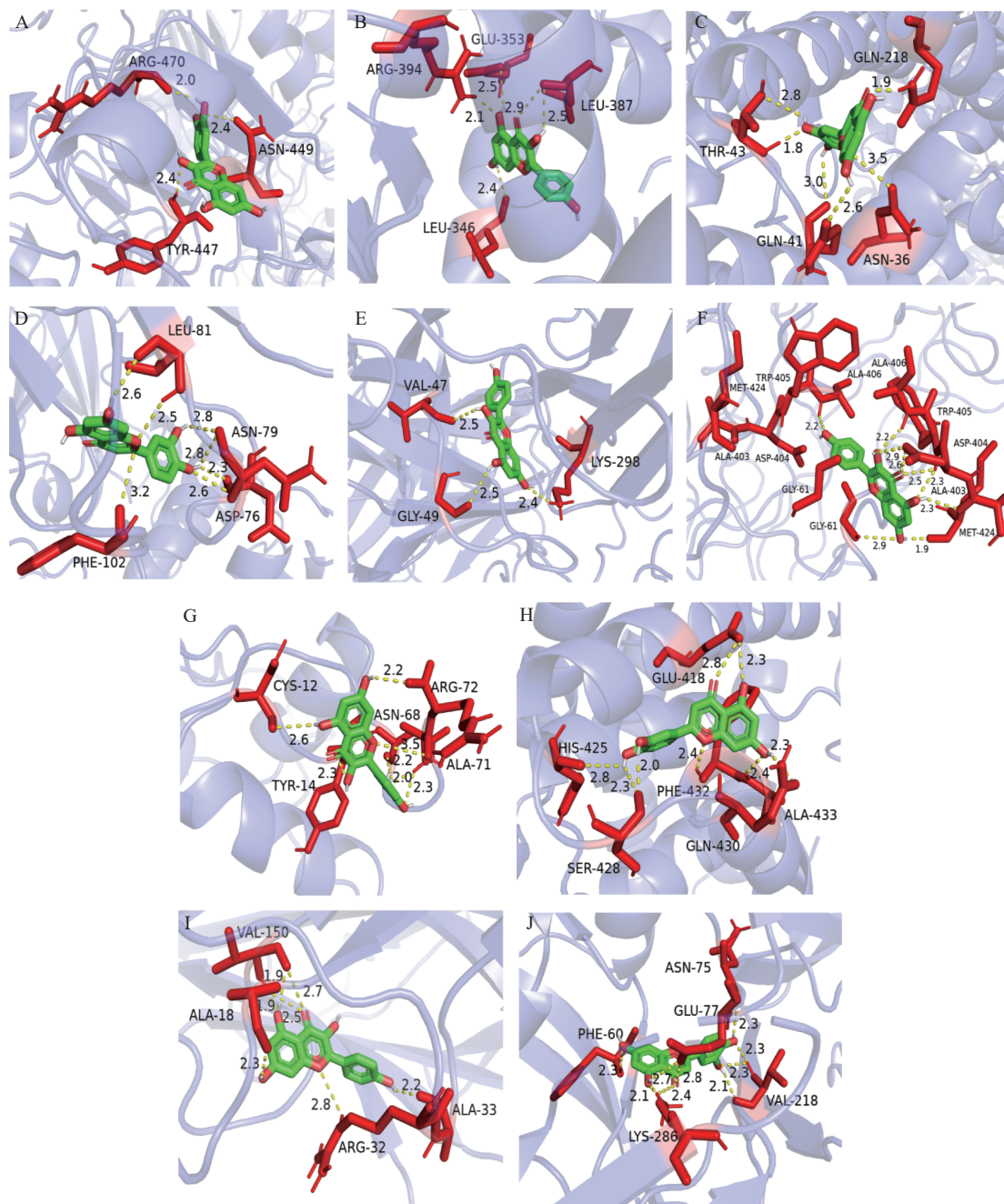


图 6 参红胶囊主要活性成分与核心靶点分子对接构象

A.槲皮素-EGFR(-5.91 kcal/mol); B.山奈酚-ESR1(-7.07 kcal/mol); C.木犀草素-HMOX1(-5.93 kcal/mol); D.木犀草素-IFNG(-6.26 kcal/mol); E.山奈酚-IL1B(-6.95 kcal/mol); F.山奈酚-NOS3(-7.94 kcal/mol); G.槲皮素-NR3C1(-7.60 kcal/mol); H.木犀草素-PPARG(-8.46 kcal/mol); I.山奈酚-TNF(-8.90 kcal/mol); J.木犀草素-VEGFA(-7.25 kcal/mol)

成,主治心痛、胃脘诸痛^[23]。参红胶囊在丹参饮的基础上进行加味,经多年的临床使用,不断改进,在实践中总结而得的可行方。前期,通过小鼠密闭缺氧实验发现参红胶囊能够剂量依赖性地显著提高抗缺氧能力^[24],但具体的作用机制目前还不明确。因此,本研究基于生物信息学平台,通过网络药理学的方法对参红胶囊防治高原反应的作用机制进行探讨并通过体外细胞实验进行初步验证。检索并筛选得到,参红胶囊 8 味中药的 91 个活性成分、

150 个药物作用靶点,515 个高原反应相关疾病靶点, Venn 分析得到 37 个潜在治疗靶点, GO 和 KEGG 富集分析找到 163 个生物过程条目及 44 条信号通路,充分体现了参红胶囊通过多成分、多靶点、多途径来防治高原反应。GO 生物过程及 KEGG 信号通路分析可知,参红胶囊可能通过 HIF-1 信号通路及细胞色素 P450 相关信号通路,作用于 IL1B、VEGFA、EGFR、HMOX1、NOS3、PPARG、TNF 等靶点,从而调节机体缺氧反应及氧化还原过

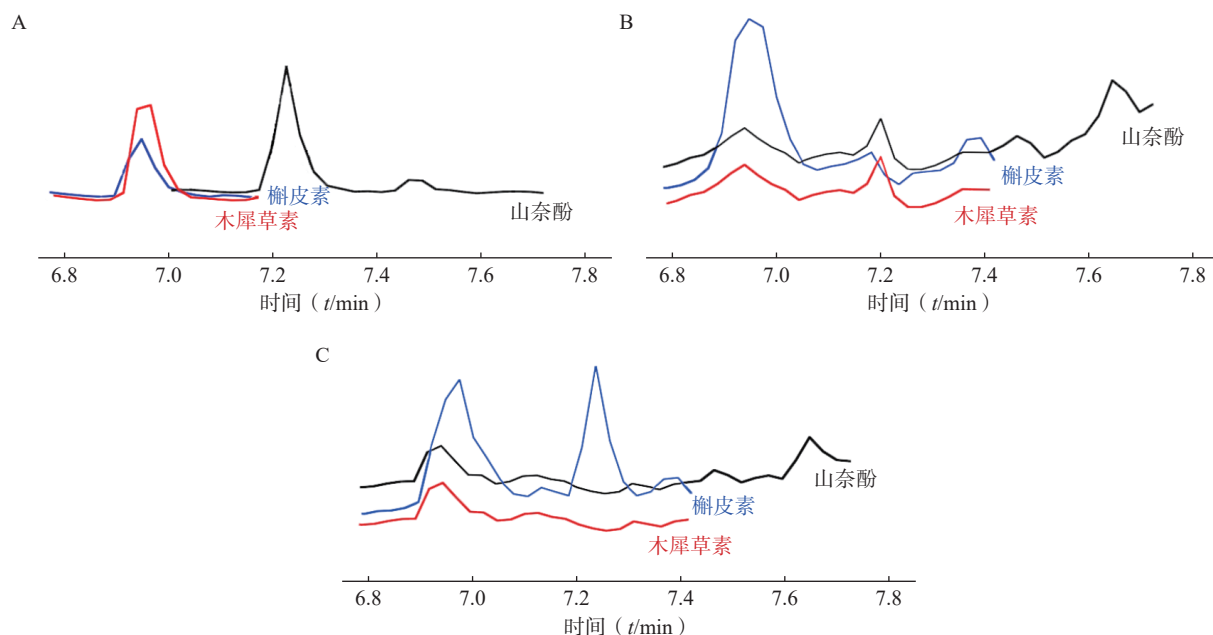


图7 主要活性成分鉴定

A. 标准品; B. 原药粉; C. 醇提取物

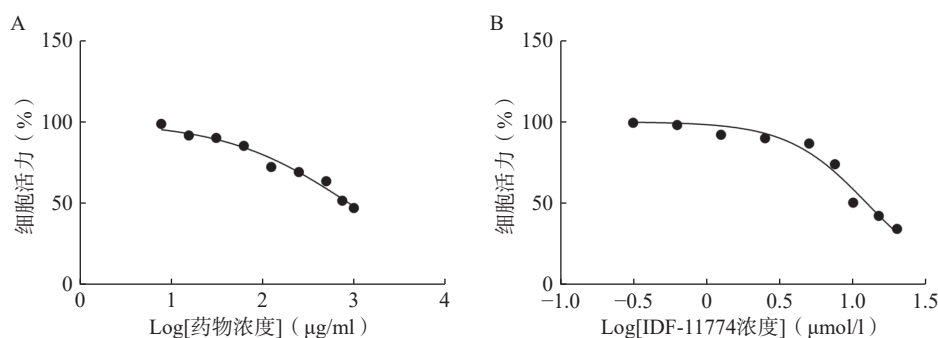


图8 体外细胞实验浓度筛选

A. 参红胶囊; B. 缺氧诱导因子抑制剂 IDF-11774

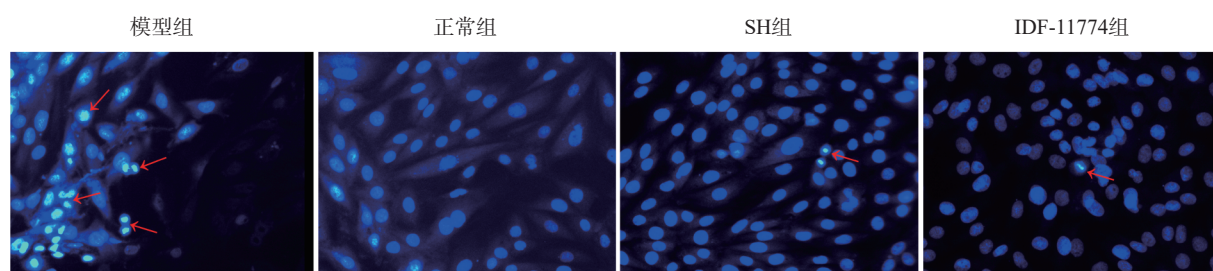


图9 荧光显微镜观察参红胶囊干预对细胞凋亡的影响($\times 100$)

程,提高机体耐缺氧能力,调控血压、血管生成及细胞增殖,降低高原性高血压、高原性低血压、高原性红细胞增多症等的发生率。分子对接结果显示 NOS3-山奈酚、PPARG-木犀草素、TNF-山奈酚的对接键能较高,对接构象稳定,活性成分与靶蛋白形成稳定氢键,匹配度、结合活性良好。一氧化氮合成酶(NOS3)参与精氨酸和脯氨酸代谢,并催化生成一氧化氮(NO),NO是一种内皮松弛因子,具有舒张血管、调节血流、抑制血管平滑肌细胞增

殖、抑制血小板和白细胞粘附等重要功能,可以预防在低压低氧环境中,机体血压、血流突增的病理状态^[25];过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)参与机体代谢过程,维持机体生理功能正常运转^[26-27];肿瘤坏死因子(TNF)除了可杀死或者抑制肿瘤细胞外,还参与调控免疫系统、炎症因子表达等,对低氧环境下脑组织、肺组织的炎症反应有重要意义^[28-30]。提示 NOS3、PPARG、TNF 等靶蛋白可能成为参红胶囊防治高原反应的核心治疗靶

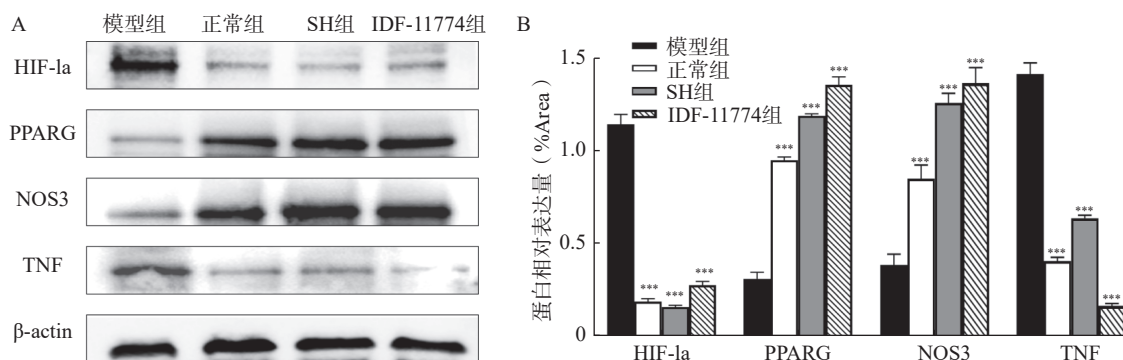


图 10 免疫印迹试验结果

A.H9c2 细胞被干预后靶点蛋白表达量变化; B.图 A 定量分析

*** $P < 0.001$, 与模型组比较。

点。为验证生物信息学预测结果,进行了体外细胞实验。在之后的实验中,H9c2 细胞经缺氧、复氧处理模拟高原急性缺氧建立体外模型,经药物处理后,可以减少由于缺氧造成的细胞凋亡;参红胶囊组与缺氧诱导因子抑制剂 IDF-11774 组同样都可使缺氧诱导因子 HIF-1 α 的表达水平降低,缓解缺氧环境中 HIF-1 α 高表达所造成的损伤;对预测靶蛋白检测后发现,模型组中 NOS3、PPARG、TNF 等可参与机体代谢、缓解低氧环境中机体炎症损伤的靶蛋白表达降低,药物处理后可逆转上述蛋白的表达。

综上所述,本研究通过网络药理学及分子对接技术,建立了参红胶囊防治高原反应的作用机制探究网络体系,初步阐述了参红胶囊基于 HIF-1 信号通路及细胞色素 P450 相关信号通路等途径,调节机体抗缺氧能力,从而起到防治高原反应的作用机制,充分体现了中药复方多成分、多靶点、多途径的整体治疗理念。同时选取了部分关键靶蛋白及信号通路进行了实验验证,结果同样印证了预测结果。本研究为深入探讨参红胶囊作用机制提供方向,也为其进一步开发及临床应用提供理论基础。

【参考文献】

- [1] 格日力. 高原医学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2015: 134.
- [2] ZHANG S F, LUO X H. Acute high altitude reaction syndrome and systemic inflammatory response syndrome[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2007, 29(4): 551-556.
- [3] 洪丽, 申宝德, 袁海龙, 等. 抗高原反应的药物研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(1): 125-128.
- [4] 郑双锦. 急进高原后心率、血压和血氧饱和度的变化规律及与急性高原病的关系 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [5] 卢娟, 苟于强, 王涛, 等. 高原驻训部队急性高原反应流行病学调查 [J]. 西北国防医学杂志, 2016, 37(4): 253-255.
- [6] 王成文, 王东林, 沙莉. 急性高原反应中医证候类型特点的探讨 [J]. 青海医药杂志, 2015, 45(11): 90-92.

- [7] 马婧, 陈茜, 边亚倩, 等. 基于系统中药学的丹参活血化癥功效标志物研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3259-3265.
- [8] 钟运香, 袁娇, 刘丰惠, 等. 西洋参化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(7): 130-133.
- [9] 张娜, 李林森. 藏红花药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 394-396.
- [10] 颜仁梁, 林励. 檀香的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 218-220.
- [11] 辛高杰, 付建华, 韩笑, 等. 丹酚酸 B 调控 NIX 介导的线粒体自噬保护 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2960-2965.
- [12] 杨吉平, 费琳, 钟钰西, 等. 褪黑素对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及其机制 [J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(8): 761-765.
- [13] 刘明月, 杨玉梅, 郑延泽. 川芎-丹参药对主要药理成分的网络药理学和指纹图谱研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(15): 98-103.
- [14] 姚宇晴, 陈璐, 李德坤, 等. 丹参活性成分及制剂改善脑侧支循环及促进血管生成的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(1): 216-224.
- [15] 宋玉琴, 鲁梓旭, 余婕, 等. 基于斑马鱼模型及分子对接技术研究丹参促进血管生成的关键活性成分 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3394-3401.
- [16] 杨芷清. 三七和丹参活性成分的提取分离及抗氧化性能与配伍性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2021.
- [17] 邓爱华, 刘凤英, 谢鹏, 等. 藏红花香气活性成分的 GC-MS 分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(24): 8172-8178.
- [18] 李莉, 朱为为, 陈永刚. 不同地产砂仁挥发油中 7 种活性成分的含量考察 [J]. 抗感染药学, 2020, 17(9): 1248-1252.
- [19] 高立强, 赵方杰, 张吉光, 等. 不同产地西洋参主要活性成分检测与品质评价 [J]. 西北农业学报, 2021, 30(9): 1402-1409.
- [20] 刘慧茹. 新型慢性疲劳综合征斑马鱼模型的多组学评价及西洋参关键活性成分的筛选发现 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
- [21] 邓婷, 谢林江, 徐颖, 等. 山楂抗氧化活性成分及作用机制研究进展 [J]. 保鲜与加工, 2020, 20(5): 231-236.
- [22] 张晓波, 邓捷, 温玲蓉, 等. 不同品种山楂活性成分及其抗氧化活性的研究 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(9): 91-95.
- [23] 李晶, 张念志, 朱笑笑, 等. 张念志教授运用丹参饮加减治疗胸痹经验 [J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(4): 7-9.

(下转第 430 页)

- [7] CHOW C H T, VAN LIESHOUT R J, SCHMIDT L A, et al. Systematic review: audiovisual interventions for reducing preoperative anxiety in children undergoing elective surgery[J]. *J Paediatr Psychol*, 2016, 41(2): 182-203.
- [8] YAO Y S, SUN Y, LIN J C, et al. Intranasal dexmedetomidine versus oral midazolam premedication to prevent emergence delirium in children undergoing strabismus surgery: a randomised controlled trial[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2020, 37(12): 1143-1149.
- [9] SHI M Z, MIAO S, GU T C, et al. Dexmedetomidine for the prevention of emergence delirium and postoperative behavioral changes in pediatric patients with sevoflurane anesthesia: a double-blind, randomized trial[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 897-905.
- [10] HU Q X, LIU X, WEN C L, et al. Remimazolam: an updated review of a new sedative and anaesthetic[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3957-3974.
- [11] CAI Y H, ZHONG J W, MA H Y, et al. Effect of remimazolam on emergence delirium in children undergoing laparoscopic surgery: a double-blinded randomized trial[J]. *Anesthesiology*, 2024, 141(3): 500-510.
- [12] SIKICH N, LERMAN J. Development and psychometric evaluation of the pediatric anesthesia emergence delirium scale[J]. *Anesthesiology*, 2004, 100(5): 1138-1145.
- [13] SOMAINI M, SAHILLIOĞLU E, MARZORATI C, et al. Emergence delirium, pain or both? a challenge for clinicians[J]. *Paediatr Anaesth*, 2015, 25(5): 524-529.
- [14] WATSON A T, VISRAM A. Children's preoperative anxiety and postoperative behaviour[J]. *Paediatr Anaesth*, 2003, 13(3): 188-204.
- [15] WILTSHIRE H R, KILPATRICK G J, TILBROOK G S, et al. A placebo- and midazolam-controlled phase I single ascending-dose study evaluating the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of remimazolam(CNS 7056): Part II. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling and simulation[J]. *Anesth Analg*, 2012, 115(2): 284-296.
- [16] SOMAINI M, ENGELHARDT T, FUMAGALLI R, et al. Emergence delirium or pain after anaesthesia--how to distinguish between the two in young children: a retrospective analysis of observational studies[J]. *Br J Anaesth*, 2016, 116(3): 377-383.
- [17] KAIN Z N, CALDWELL-ANDREWS A A, MARANETS I, et al. Preoperative anxiety and emergence delirium and postoperative maladaptive behaviors[J]. *Anesth Analg*, 2004, 99(6): 1648-1654.
- [18] LEE-ARCHER P F, VON UNGERN-STERMBERG B S, READE M, et al. The effect of dexmedetomidine on postoperative behaviour change in children: a randomised controlled trial[J]. *Anaesthesia*, 2020, 75(11): 1461-1468.
- [收稿日期] 2024-11-22 [修回日期] 2025-03-19
[本文编辑] 李春德

(上接第 416 页)

- [24] 马亚中, 吴清, 吉保民, 等. 中药抗高原病方的抗缺氧效能及其机制研究 [J]. *空军医学杂志*, 2020, 36(3): 226-230.
- [25] XIAO J M, WANG J J, SUN L L. Effect of miR-134 against myocardial hypoxia/reoxygenation injury by directly targeting NOS3 and regulating PI3K/Akt pathway[J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(8): e201900802.
- [26] MACIEJEWSKA-SKRENDÓ A, PAWLIK A, SAWCZUK M, et al. *PPARA* *PPARD* and *PPARG* gene polymorphisms in patients with unstable angina[J]. *Gene*, 2019, 711: 143947.
- [27] 康洁, 丁珊珊, 张凌媛, 等. 不同证型代谢综合征与 *CDKAL1*、*PPARG* 基因的关系分析 [J]. *中国医学创新*, 2019, 16(12): 6-9.
- [28] VARFOLOMEEV E, VUCIC D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease[J]. *Cytokine*, 2018, 101: 26-32.
- [29] 高钰琪, 黄斌. 炎症反应与高原病 [J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(3): 215-219.
- [30] 是文辉, 许永华, 宋来阳, 等. 急性低氧暴露下大鼠脑组织的病理学改变及脑 IL-6、TNF- α 的表达变化 [J]. *实验动物科学*, 2016, 33(4): 58-62.
- [收稿日期] 2024-05-28 [修回日期] 2025-06-25
[本文编辑] 费永和