

基于网络药理学和分子对接技术探究水蛭素改善微循环的作用机制

路婉杉, 周友良, 何聪芬, 董坤*

(北京工商大学 轻工科学与工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京, 100048)

摘要: 水蛭素抑制凝血酶活性, 可以改善微循环, 在药品和化妆品领域具有很好的发展潜力。为探究水蛭素基于抑制凝血酶活性的改善微循环的作用机制, 文章基于网络药理学的分析方法, 结合相关数据库筛选出水蛭素片段改善微循环的核心靶点, 并对其进行 GO 和 KEGG 富集分析; 基于分子对接技术及 10U/mL 凝血酶刺激 C166 (小鼠血管内皮细胞) 微循环阻滞细胞模型, 初步探究水蛭素片段与其改善微循环的核心靶点的相互作用。为拓展水蛭素应用范围提供理论依据。

关键词: 水蛭素; 微循环; 网络药理学; 分子对接; 微循环阻滞细胞模型

作者简介: 路婉杉, 硕士研究生, 研究方向: 网络药理学与天然产物开发。E-mail: 18310356193@163.com。



微循环系统由肉眼看不见的小血管组成, 以内皮细胞为主, 有助于炎性介质平衡, 止血平衡^[1-2]。微循环受阻可引发高血压等心血管疾病^[3-4]以及糖尿病等代谢障碍性疾病^[5], 其发生机制主要包括: (1) 脂质过氧化产物导致的内皮细胞调节血管张力及修复血管能力下降^[6]; (2) 糖基化终末产物调控非受体途径导致的血管老化^[7], 或与糖基化终产物受体结合, 诱发氧化应激, 引发的血管老化^[8]; (3) 血小板活化和聚集, 凝血酶产生不当^[9]及凝血酶诱导的纤维蛋白沉积, 形成血栓^[10]; (4) 炎症因子, 如肿瘤坏死因子- α 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 引起的内皮完整性丧失, 导致微血管网络无法增加血流量以满足代谢需求^[11]。微循环受阻还会导致皮肤状态变差, 毛细血管扩张影响血液循环, 损害皮肤导致红血丝等面部问题^[12]。研究发现睡眠不足、压力大影响微循环系统, 导致眼周血液淤滞, 形成血管型黑眼圈^[13-14]。黑眼圈出现在皮肤血液淤滞或充血区域, 黑眼圈区域的黑色素和血红蛋白含量增加, 血红蛋白氧饱和度比率降低, 血流缓慢^[15]。因此, 对改善微循环的机制进行研究有助于相关化妆品产品的开发。

水蛭是我国历史悠久的中药材, 可用于治疗血瘀经闭, 癥瘕痞块等^[16]。天然水蛭素是一种酸性单链多肽, 是水蛭中最主要的活性成分^[17], 提取自药用水蛭的唾液腺, 具有抗凝血、抗血栓、抗炎、抗痛风等药理学作用^[18], 主要应用于药品和保健品领域。此外, 水蛭素具有良好的自由基清除能力, 抗氧化功效显著, 在化妆品中可用于乳液、眼霜等产品的开发, 改善黑眼圈, 延缓衰老^[19]。

水蛭素具有良好的抑制凝血酶活性能力, 能加快血流

速度^[20], 降低毛细血管通透性, 防止血小板聚集^[21], 改善血液循环, 重组水蛭素可以延迟血栓形成缓解体内微循环^[22], 但目前对水蛭素改善微循环机制的研究相对欠缺。文章以水蛭素为研究对象, 基于网络药理学-分子对接技术构建水蛭素改善微循环网络, 筛选其作用靶点, 同时结合凝血酶刺激 C166 (小鼠血管内皮细胞) 微循环阻滞细胞模型进行靶点验证, 探讨水蛭素改善微循环的作用机制, 为水蛭素开发利用, 拓展应用范围, 提供理论基础和新的思路。

1. 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料: 硫酸化水蛭素 (54-65), 合成于湖北强耀生物科技有限公司, HPLC, 95%。

试验试剂: 凝血酶 (碧云天生物技术公司)、C166/小鼠血管内皮细胞 (浙江美森细胞科技有限公司)、DMEM (Gibco)、PBS (Gibco)、胎牛血清 (Gibco)、青链霉素混合液 (Gibco)、胰酶 (Gibco)、CCK-8 检测试剂盒 (碧云天生物技术公司)、Flt-1 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司)、ET-1 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司)、NO 试剂盒 (碧云天生物技术公司)。

1.2 主要仪器设备

Centrifuge 5810 R 台式冷冻离心机 (Eppendorf)、HHS 型水浴锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、ME204/02 分析天平 (梅特勒-托利多仪器)、infinite M200 PRO 酶标仪 (TECAN)、206471-6608 恒温培养箱 (Thermo)、AB-

CD13超净工作台（北京世安科林净化技术有限公司）、YXQ-LS-50S11立式压力蒸汽灭菌锅（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）。

1.3 试验方法

1.3.1 基于网络药理学-分子对接的水蛭素改善微循环核心靶点筛选验证

1.3.1.1 水蛭素改善微循环靶点筛选

在 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中, 以“*hirudin*”为关键词, 将筛选得到的水蛭素的 SMILES String 或化学结构导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://old.swisstargetprediction.ch/>) 中, 预测其所有作用靶点 (Probability>0)。以“*microcirculation dysfunction*”为关键词, 在 Genecards 数据库 (<https://auth.lifemapsc.com/>) 中筛选微循环障碍靶点。以水蛭素作用靶点和微循环障碍靶点为研究对象, 利用 VENNY2.1 数据库 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 筛选得到水蛭素改善微循环靶点。

1.3.1.2 水蛭素改善微循环靶点蛋白互作网络构建

以水蛭素改善微循环靶点为研究对象, 采用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建水蛭素改善微循环靶点蛋白互作 (Protein-Protein Interaction Networks, PPI) 网络, 结合 Cytoscape3.9.1 软件的 CytoNCA 插件将构建的 PPI 网络进行可视化处理。

1.3.1.3 水蛭素改善微循环核心靶点筛选

以水蛭素改善微循环靶点为研究对象, 采用 Cytoscape 3.9.1 软件, 结合 CytoHubba 插件中的 Degree 算法, 筛选 Degree 值排名前 30 的靶点作为水蛭素改善微循环的核心靶点。

1.3.1.4 水蛭素改善微循环核心靶点 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

以水蛭素改善微循环核心靶点为研究对象, 采用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>), 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析, 通过微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 对富集结果进行可视化。

1.3.1.5 “水蛭素-改善微循环核心靶点-通路”网络构建

以水蛭素、水蛭素改善微循环核心靶点及其 KEGG 通路为研究对象, 采用 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建“水蛭素-改善微循环核心靶点-通路”网络。

1.3.1.6 分子对接

以 1.3.1.1 中获取的水蛭素和 1.3.1.3 中 Degree 值前 3 的水蛭素改善微循环核心靶点为研究对象, 进行分子对接验证: (1) 通过 RCSB PDB 数据库和 AlphaFold2, 获取水蛭素改善微循环核心靶点对应的晶体结构。在 Schrodinger Maestro 13.5 软件中对获得的晶体进行蛋白质预处理、天然配体的再生状态, 氢键分配优化, 蛋白质能量最小化, 和去除水等处理。(2) 通过 Schrodinger Maestro 13.5 软件的 LigPrep 模块, 将水蛭素的 2D sdf 结构文件进行处理并生成其所有 3D 构象。(3) 通过 Schrodinger Maestro 13.5 软件的 SiteMap 模块预测最佳的结合位点, 将预测出来的结合位点包裹后获取水蛭素改善微循环核心靶点晶体结构的活性位点。(4) 在 Schrodinger Maestro 13.5 软件中将水蛭素 3D 构象与水蛭素改善微循环核心靶点晶体结构的活性位点进行分子对接。

1.3.2 基于凝血酶刺激 C166 微循环阻滞模型的水蛭素改善微循环靶点验证

1.3.2.1 CCK8 法筛选凝血酶、水蛭素安全浓度

将 C166 (小鼠血管内皮细胞) 按 10000 个/孔接种在 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μ L。96 孔板最外面一圈用 PBS 点板, 只添加 DMEM 作为无 C166 空白对照, 只铺 C166 不加药作为阴性对照, 铺板结束后放入培养箱培养 24h。培养结束后, 弃去各孔中培养基废液, 然后加入 PBS 清洗 1~2 次 (100 μ L)。(1) 凝血酶安全浓度筛选: 终浓度依次为 1.25U/mL、2.5U/mL、5U/mL、10U/mL、20U/mL、40U/mL; (2) 水蛭素安全浓度筛选: 终浓度依次为 0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.8mg/mL。孵育 24h 后, 移除待测样品, PBS 清洗一至两次, 依据 CCK8 检测试剂盒 (碧云天生物技术公司) 说明书, 计算 C166 活率, 以 C166 存活率 80% 为筛选指标, 确定凝血酶和水蛭素安全浓度。

$$\text{细胞存活率} = \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{阴性}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中:

$OD_{\text{样品}}$ —— 样品在 450nm 下的吸光度;

$OD_{\text{空白}}$ —— 空白对照在 450nm 下的吸光度;

$OD_{\text{阴性}}$ —— 阴性对照在 450nm 下的吸光度。

1.3.2.2 基于凝血酶刺激 C166 微循环阻滞模型的水蛭素改善微循环核心靶点相关指标检测

采用含 89%DMEM、10%FBS、1%双抗的培养基, 在

5%CO₂、37℃的培养箱中培养 C166。取对数生长期 C166 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24h（细胞融合度 60%~75%）弃上清，设空白组 BC（只加培养基）、模型组 NC（10U/mL 凝血酶）和样品组（M₁: 10U/mL 凝血酶 + 0.05mg/mL 水蛭素；M₂: 10U/mL 凝血酶 + 0.1mg/mL 水蛭素；M₃: 10U/mL 凝血酶 + 0.2mg/mL 水蛭素）。每组设 2 个复孔，继续培养 24h 后，收集细胞上清，每组 2 个复孔，采用 ELISA 法，检测 NO、FIt-1、ET-1 含量。

1.3.2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10 对试验数据进行统计分析，正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用单因素方差分析进行多组间比较， $P < 0.05$ 说明具有统计学差异，其中 * ($P < 0.05$)、** ($P < 0.01$)、*** ($P < 0.001$)、**** ($P < 0.0001$)。

2. 结果与讨论

2.1 基于网络药理学-分子对接的水蛭素改善微循环核心靶点筛选验证

2.1.1 水蛭素改善微循环靶点筛选

将 Pubchem 数据库中以“hirudin”为关键词筛选得到的水蛭素的 SMILES String 导入 Swiss Target Prediction 数据库，发现有 3 个水蛭素可以预测到作用靶点，这三个水蛭素分别为硫酸化水蛭素（54-65）、脱硫水蛭素（54-65）、硫酸化水蛭素（55-65），如表 1 所示，其化学结构如图 1-3 所示。

表 1 3 种水蛭素 Pubchem 数据库信息

化合物	SMILES 式
硫酸化水蛭素 (54-65)	<chem>CCC(C)C(NC(=O)C(CCC(O)=O)NC(=O)C(CCC(O)=O)NC(=O)C(Cc1cccc1)NC(=O)C(CC(O)=O)NC(=O)CN)C(=O)N2CCCC2C(=O)NC(CCC(O)=O)C(=O)NC(CCC(O)=O)C(=O)NC(Cc3ccc(OS(O)(=O)=O)cc3)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CCC(N)=O)C(O)=O</chem>
脱硫水蛭素 (54-65)	<chem>CCC(C)C(C(=O)N)CCCC1C(=O)NC(CCC(=O)O)C(=O)NC(CCC(=O)O)C(=O)NC(CC2=CC=C(C=C2)O)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CCC(=O)N)C(=O)O)NC(=O)C(CCC(=O)O)NC(=O)C(CCC(=O)O)NC(=O)C(CC3=CC=CC=C3)NC(=O)C(CC(=O)O)NC(=O)CN</chem>
硫酸化水蛭素 (55-65)	<chem>CCC(C)C(C(=O)N)CCCC1C(=O)NC(CCC(=O)O)C(=O)NC(CCC(=O)O)C(=O)NC(CC2=CC=C(C=C2)OS(=O)(=O)O)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CCC(=O)N)C(=O)O)NC(=O)C(CCC(=O)O)NC(=O)C(CCC(=O)O)NC(=O)C(CC3=CC=CC=C3)NC(=O)C(CC(=O)O)N</chem>

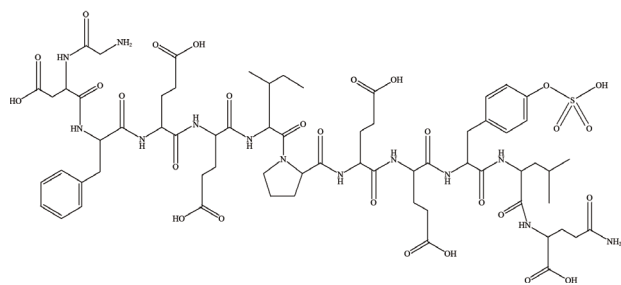


图 1 硫酸化水蛭素（54-65）化学结构

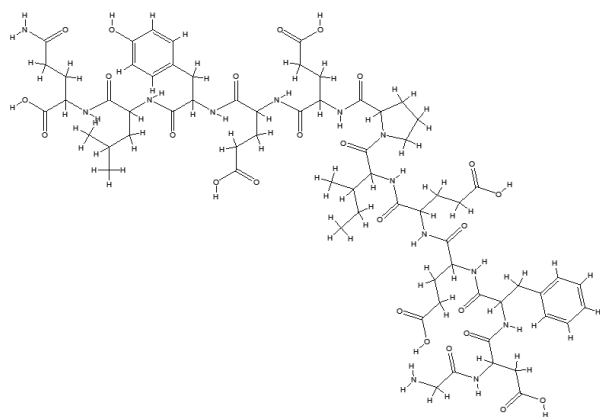


图 2 脱硫水蛭素（54-65）化学结构

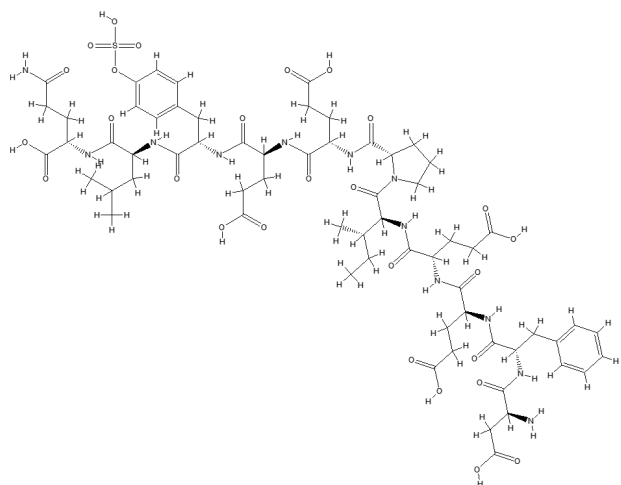


图 3 硫酸化水蛭素（55-65）化学结构

研究发现，水蛭素片段（55-65）发挥与凝血酶稳定结合功能^[23]，水蛭素片段（54-65）参与与凝血酶形成复合物，抑制凝血活性^[24]，水蛭素羧基端 63 位酪氨酸硫酸化对维持抗栓功能起重要作用，将此基团去除后抗栓活性降低 50%^[25]。

以上述三种水蛭素为研究对象，Swiss Target Prediction 数据库检索得到三种水蛭素的作用靶点 105 个；以“microcirculation dysfunction”为关键词，在 Genecards 数据库中，筛选到与微循环障碍相关靶点 1176 个；利用 VENNY2.1 数据库筛选到 47 个水蛭素与微循环障碍共有的靶点，即水蛭素改善微循环靶点，如图 4 所示。

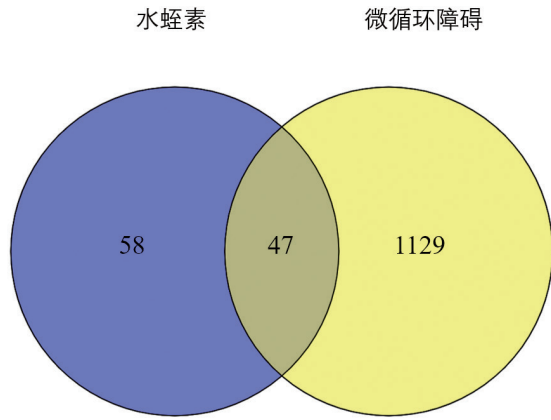


图4 水蛭素改善微循环靶点 Venn图

2.1.2 水蛭素 - 改善微循环靶点蛋白互作网络构建

以47个水蛭素改善微循环靶点为研究对象，采用STRING数据库，创建PPI网络，PPI网络中共有272条互作线，节点平均Degree值为11.6，说明节点具有较高的度中心性，与其他蛋白的关联度较高。如图5所示，通过Cytoscape3.9.1软件的CytoNCA插件对水蛭素改善微循环靶点进行可视化处理，介数中心性（Betweenness Centrality, BC）值越大，节点越大，说明节点越处于PPI网络中心。

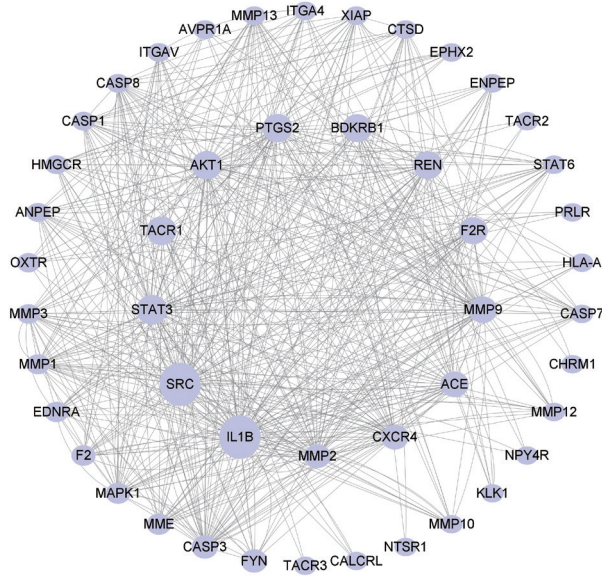


图5 水蛭素改善微循环靶点 PPI网络互作图

2.1.3 水蛭素改善微循环核心靶点筛选

以47个水蛭素改善微循环靶点为研究对象，结合Cytoscape 3.9.1软件的CytoHubba插件，选取Degree值排名前30的靶点作为水蛭素改善微循环的核心靶点，结果如图6所示，其Degree值如表2所示。Degree值越大说明该节点在为网络图中越重要，IL1B、AKT1、MMP9是Degree值最高的前3个靶点，在PPI网络中处于关键位置。

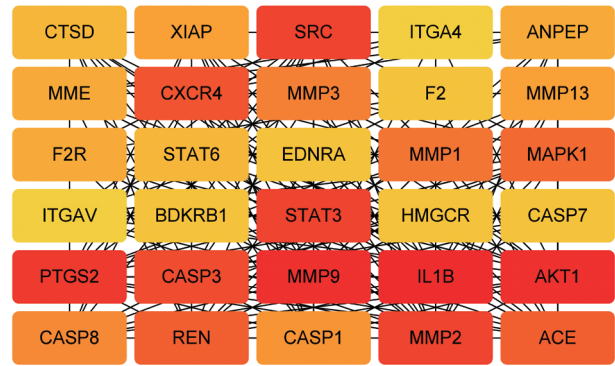


图6 水蛭素改善微循环障碍核心靶点网络图

表2 水蛭素改善微循环障碍核心靶点 Degree 值

排序	靶点	度	排序	靶点	度
1	IL1B	64	16	CASP1	26
2	AKT1	56	17	MMP13	24
2	MMP9	56	17	XIAP	24
4	PTGS2	50	19	F2R	22
5	SRC	48	19	ANPEP	22
5	MMP2	48	19	MME	22
5	STAT3	48	22	STAT6	20
8	CASP3	46	22	CTSD	20
9	CXCR4	40	24	CASP7	18
10	REN	38	24	HMGCR	18
10	ACE	38	24	EDNRA	18
12	MAPK1	34	24	BDKRB1	18
13	MMP1	32	24	F2	18
14	MMP3	30	29	ITGAV	16
15	CASP8	28	29	ITGA4	16

2.1.4 水蛭素改善微循环核心靶点 GO&KEGG 富集分析

以三种水蛭素的30个改善微循环核心靶点为研究对象，通过Metascape数据库中对水蛭素改善微循环核心靶点进行GO功能（图7）及KEGG通路（图8）富集分析。

如图7所示，以 $P < 0.01$ 为筛选条件进行GO富集分析，由 P 值从小到大排列出前10个条目。在生物过程方面，水蛭素主要参与对细菌的反应（response to bacterium）、对肽的反应（response to peptide）、细胞对氮化合物的反应（cellular response to nitrogen compound）等过程。在细胞组分方面，水蛭素主要作用于膜筏（membrane raft）、细胞外基质（extracellular matrix）、溶酶体（lysosome）等部位。在分子功能方面，水蛭素主要富集在内肽酶活性（endopeptidase activity）、金属肽酶活性（metallopeptidase activity）、丝氨酸水解酶活性（serine hydrolase activity）等。

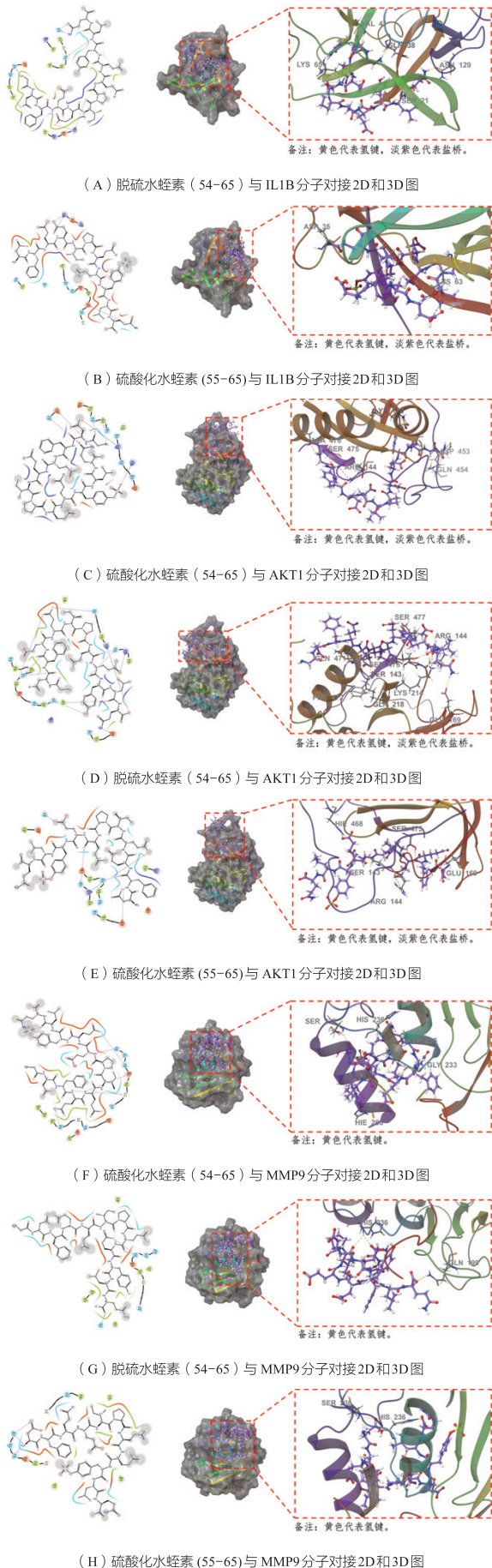


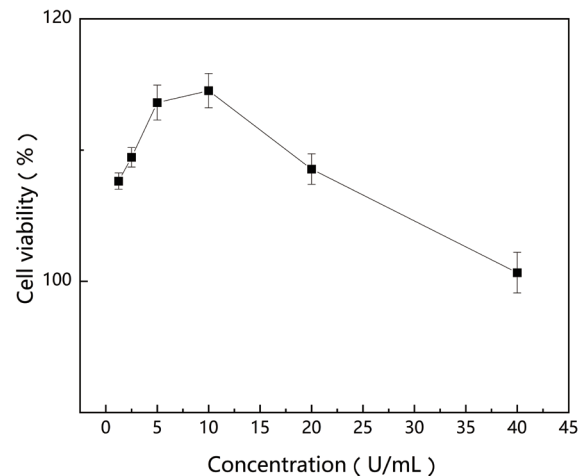
图 10 三种水蛭素与三个水蛭素改善微循环核心靶点分子对接结果

2.2 基于凝血酶刺激 C166 微循环阻滞模型的水蛭素改善微循环靶点验证

结合 KEGG 数据库对 KEGG 富集结果进行分析，在人类巨细胞病毒感染通路中，IL1B 靶点蛋白通过 NF- κ B 途径作用于 IL-6，IL-6 通过 JAK-STAT 途径影响 VEGF 表达；在炎症因子刺激下，VEGF 与其细胞表面受体 Flt-1 结合，导致血管内皮通透性增加^[26]；糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路中 AKT 靶点蛋白间接作用于 NF- κ B，影响 ET-1 的表达^[27]；松弛素信号通路中，PI3K、PKA 蛋白可影响 NO 合成酶 (eNOS、nNOS、iNOS) 活性，调控 NO 合成，NO 进一步影响 MMP9 的表达^[28]。因此，文章采用凝血酶刺激 C166 微循环阻滞模型，硫酸化水蛭素 (54-65) (合成于湖北强耀生物科技有限公司，HPLC 级，95%) 为研究对象，Flt-1、ET-1、NO 为检测指标，初步验证水蛭素改善微循环的作用靶点。

2.2.1 CCK8 法筛选凝血酶、硫酸化水蛭素 (54-65) 安全浓度

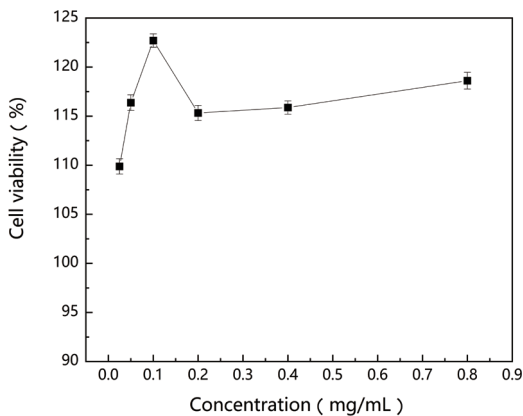
如图 11 所示，1.25U/mL、2.5U/mL、5U/mL、10U/mL、20U/mL、40U/mL 的凝血酶作用下，C166 活率均大于 100%，说明该浓度下的凝血酶不具有细胞毒性且具有促增殖作用，选择 10U/mL 的凝血酶作为刺激 C166 建立微循环阻滞模型的作用浓度。



注：横坐标代表凝血酶浓度，纵坐标代表 C166 存活率。

图 11 基于 CCK8 法不同浓度梯度凝血酶对 C166 细胞活率影响结果

如图 12 所示，0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.8mg/mL 的硫酸化水蛭素 (54-65) 作用下 C166 活率均大于 100%，说明该浓度下的硫酸化水蛭素 (54-65) 不具有细胞毒性且具有促增殖作用，选择 0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL 的硫酸化水蛭素 (54-65) 用于 Flt-1、ET-1、NO 等微循环指标的检测。



注：横坐标代表硫酸化水蛭素(54-65)浓度，纵坐标代表C166存活率。
图12 基于CCK8法的不同浓度梯度硫酸化水蛭素(54-65)对C166安全浓度筛选结果

2.2.2 基于10U/mL凝血酶刺激C166微循环阻滞模型的硫酸化水蛭素(54-65)改善微循环相关指标检测

2.2.2.1 硫酸化水蛭素(54-65)抑制NO能力测定

基于10U/mL凝血酶刺激C166微循环阻滞模型，评价不同浓度梯度硫酸化水蛭素(54-65)抑制NO能力，结果如图13所示，正常培养C166(BC组)释放的NO浓度为(0.13±0.09)μmol/L；与BC组相比，10U/mL凝血酶处理后(NC组)，C166释放的NO浓度为(1.44±0.03)μmol/L ($P<0.0001$)；0.05mg/mL (M_1)、0.1mg/mL (M_2)、0.2mg/mL (M_3)硫酸化水蛭素(54-65)处理后，与NC组相比，C166释放的NO浓度分别减少至(1.00±0.09)μmol/L ($P<0.01$)、(0.54±0.10)μmol/L ($P<0.001$)、(0.31±0.08)μmol/L ($P<0.0001$)，依次降低了30.56%、62.5%、78.47%，说明硫酸化水蛭素(54-65)可通过抑制C166释放NO影响MMP9表达，改善凝血酶诱导的微循环阻滞。

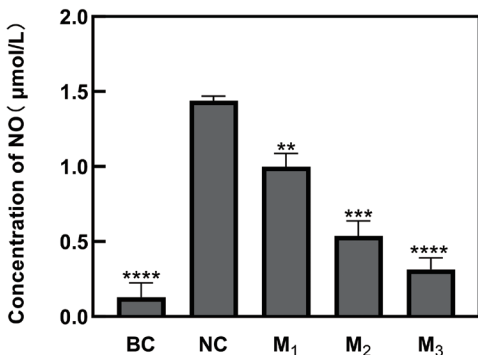


图13 不同浓度硫酸化水蛭素(54-65)对10U/mL凝血酶诱导C166释放NO的影响

2.2.2.2 硫酸化水蛭素(54-65)抑制Flt-1能力测定

基于10U/mL凝血酶刺激C166微循环阻滞模型，评价不同浓度梯度硫酸化水蛭素(54-65)抑制Flt-1能力，如图14所示，正常培养C166(BC组)释放的Flt-1浓度为

(1.00±0.19)ng/mL；与BC组相比，10U/mL凝血酶处理后(NC组)，C166释放的Flt-1浓度为(5.33±0.37)ng/mL ($P<0.0001$)；0.05mg/mL (M_1)、0.1mg/mL (M_2)、0.2mg/mL (M_3)硫酸化水蛭素(54-65)处理后，与NC组相比，C166释放的Flt-1浓度分别减少至(3.78±0.43)ng/mL ($P<0.01$)、(1.31±0.25)ng/mL ($P<0.001$)、(1.19±0.39)ng/mL ($P<0.001$)，依次降低了29.08%、75.42%、77.67%，说明硫酸化水蛭素(54-65)可能通过调控上游的IL1B蛋白，抑制Flt-1的表达，改善凝血酶诱导的微循环阻滞。

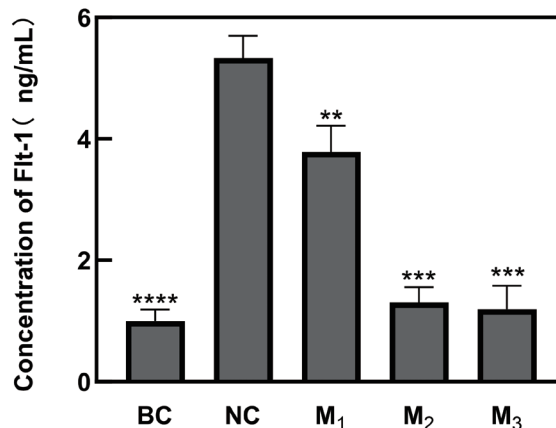


图14 不同浓度硫酸化水蛭素(54-65)对10U/mL凝血酶诱导C166释放Flt-1的影响

2.2.2.3 硫酸化水蛭素(54-65)抑制ET-1能力测定

基于10U/mL凝血酶刺激C166微循环阻滞模型，评价不同浓度梯度硫酸化水蛭素(54-65)抑制ET-1能力，如图15所示，正常培养C166(BC组)释放的ET-1浓度为(0.66±0.05)pg/mL；与BC组相比，10U/mL凝血酶处理后(NC组)，C166释放的ET-1浓度为(1.67±0.07)pg/mL ($P<0.0001$)；0.05mg/mL (M_1)、0.1mg/mL (M_2)、0.2mg/mL (M_3)硫酸化水蛭素(54-65)处理后，与NC

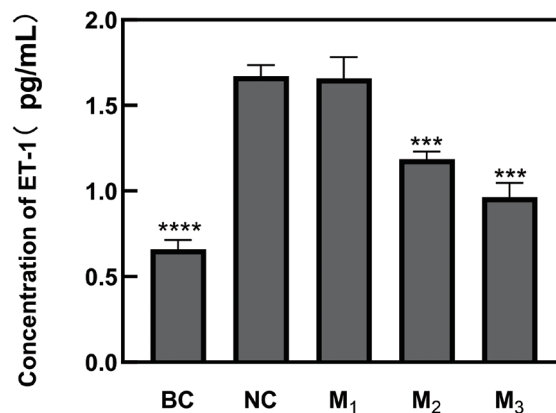


图15 不同浓度梯度硫酸化水蛭素(54-65)对10U/mL凝血酶诱导C166释放ET-1的影响

组相比, C166 释放的 ET-1 浓度分别减少至 (1.66 ± 0.12) pg/mL ($P > 0.05$), (1.19 ± 0.05) pg/mL ($P < 0.001$), (0.96 ± 0.08) pg/mL ($P < 0.001$), 依次降低了 0.6%、28.92%、42.51%, 说明硫酸化水蛭素 (54-65) 可能作用于 AKT 靶点抑制 ET-1 的表达, 改善凝血酶诱导的微循环阻滞。

2.3 讨论

2.3.1 基于网络药理学-分子对接的水蛭素改善微循环核心靶点筛选验证

基于网络药理学-分子对接分析推测, 水蛭素通过人类巨细胞病毒感染通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路等作用于 IL1B、AKT、MMP9 等靶点。

IL1B 促进炎症因子释放, 炎症因子的增加会破坏微血管内皮, 影响血管微循环过程^[29]; 结合 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>) 进行分析, IL1B 靶点蛋白调控人类巨细胞病毒感染通路, 通过其中的 NF- κ B 途径释放炎症因子, 进而由 JAK-STAT 途径影响 VEGF 表达, VEGF 与其细胞表面受体 Flt-1 结合, 增加血管内皮通透性, 影响微循环。

AKT 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 有助于人类血小板的信号传导和激活反应, 促进小鼠的血栓形成^[30]以及导致 NO 释放增加, 血管内径增大和血流增加^[31], 影响微循环; KEGG 数据库中, AKT 靶点蛋白调控糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路, 其中 AKT 靶点蛋白间接作用于 NF- κ B 调控 ET-1 的表达, ET-1 具有收缩血管作用, 影响脑微循环^[32]以及促进血栓形成。

MMP (基质金属蛋白酶) 活性的增加被认为会促进炎症, 并与内皮通透性增加相关。肺微循环障碍促进 MMP-9 的表达^[33], 在 KEGG 数据库中, MMP9 靶点蛋白参与松弛素信号通路, 其中 PI3K、PKA 蛋白可影响 NO 合成酶 (eNOS、nNOS、iNOS) 活性, 调控 NO 合成, NO 在炎症期间调节内皮屏障功能中发挥着重要作用。NO 合成引起血管扩张, 导致纤维化、凋亡和血栓形成^[34], 影响微循环并调控 MMP9 靶点蛋白。

2.3.2 基于凝血酶刺激 C166 微循环阻滞模型的水蛭素改善微循环核心靶点相关指标验证

细胞试验结果说明水蛭素具有抑制 NO、Flt-1、ET-1 的能力, 进一步验证了水蛭素可能作用于 IL1B 靶点调控人类巨细胞病毒感染通路影响 Flt-1 的表达; 作用于 AKT 靶

点调控糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路影响 ET-1 的表达, 缓解血栓形成; 通过松弛素信号通路调控 NO 的合成, 影响 MMP9 表达。说明水蛭素能够缓解凝血酶导致的微循环受阻。

2.3.3 水蛭素改善微循环机制

结合网络药理学、分子对接和细胞试验, 推测水蛭素改善微循环的机制 (图 16)。晚期糖基化终产物 (AGE) 在内皮细胞上具有细胞受体 (RAGE), AGE-RAGE 相互作用可诱发血管系统中的氧化应激, 自由基增加或减少导致内皮水平氧化应激增加, 也可能直接或间接影响毛细血管通透性, 影响微循环^[35]。微血管扩张减少可能会使组织发生炎症, 从而促进心外膜动脉粥样硬化, 微循环障碍可能导致炎症^[36]。在糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路中, 水蛭素可能作用于 AKT 靶点通过 NF- κ B 途径调控 ET-1, 缓解血栓形成, 改善微循环; 在人类巨细胞病毒感染通路中, 水蛭素可能作用于 IL1B 靶点通过 NF- κ B 途径调节炎症因子 IL-6, IL-6 通过 JAK-STAT 途径调控 VEGF, 抑制 Flt-1, 改善微循环阻滞; 在松弛素信号通路中, 水蛭素通过 PI3K-AKT、MAPK、NF- κ B 途径调控一氧化氮合成酶活性抑制 NO, 进而影响 MMP9 的表达, 改善微循环。说明水蛭素可以通过缓解炎症、血栓生成的角度改善微循环。

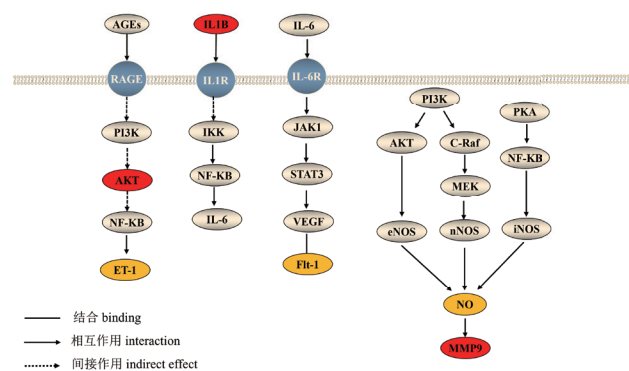


图 16 水蛭素改善微循环的机制图

3. 结论

文章基于网络药理学筛选水蛭素改善微循环的靶点及信号通路, 结合分子对接验证水蛭素与 IL1B、AKT1、MMP9 靶点有较好的结合能力。细胞试验结果说明水蛭素可明显抑制 NO、Flt-1、ET-1, 推测水蛭素改善微循环的机制为: (1) 作用于 AKT 靶点, 抑制糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路中 ET-1 合成; (2) 作用于 IL1B

靶点,抑制人类巨细胞病毒感染通路中 Flt-1 合成;(3)抑制松弛素信号通路中 NO 合成,作用于 MMP9 靶点。总之,文章初步探讨了水蛭素改善微循环的作用机制,为拓宽水蛭素的应用领域提供新的思路。

参考文献

- [1] Cracowski J L, Roustit M. Human skin microcirculation[J]. *Compr Physiol*, 2020, 10(3): 1105–1154.
- [2] Crimi E, Ignarro L J, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress[J]. *Free Radical Research*, 2007, 41(12): 1364–1375.
- [3] Laurent S, Agabiti-Rosei C, Bruno R M, et al. Microcirculation and macrocirculation in hypertension: a dangerous cross-link?[J]. *Hypertension*, 2022, 79(3): 479–490.
- [4] Padro T, Manfrini O, Bugiardini R, et al. ESC Working Group on Coronary Pathophysiology and Microcirculation position paper on ‘coronary microvascular dysfunction in cardiovascular disease’ [J]. *Cardiovascular Research*, 2020, 116(4): 741–755.
- [5] Horton W B, Barrett E J. Microvascular dysfunction in diabetes mellitus and cardiometabolic disease[J]. *Endocrine Reviews*, 2021, 42(1): 29–55.
- [6] 谌素华, 王维民, 蔡璐, 等. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯对高脂血症小鼠抗脂质过氧化的作用 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(09): 38–44.
- [7] 梁越欣, 李电东. 非酶糖基化作用与衰老的关系 [J]. *实用老年医学*, 2004(03): 152–154.
- [8] Sullivan R. Contributions to senescence: non-enzymatic glycosylation of proteins[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1996, 104(7): 797–806.
- [9] Khismatullin R R, Shakirova A Z, Weisel J W, et al. Age-dependent differential staining of fibrin in blood clots and thrombi[J]. *BioNanoScience*, 2020, 10: 370–374.
- [10] 季顺东. 血栓形成机制及抗凝药物的药理特点 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2021, 13(03): 25–28.
- [11] Payne G W. Effect of inflammation on the aging microcirculation: impact on skeletal muscle blood flow control[J]. *Microcirculation*, 2006, 13(4): 343–352.
- [12] 闫利伟. 基于深度学习的人脸肤质测评系统的研究与实现 [D]. 沈阳工业大学, 2022.
- [13] 蒲委, 杨登蓉, 贾肖蓉, 等. 基于不同类型及病因的黑眼圈治疗进展 [J]. *皮肤病与性病*, 2023, 45(04): 242–245.
- [14] Park S R, Kim H J, Park H K, et al. Classification by causes of dark circles and appropriate evaluation method of dark circles[J]. *Skin Research and Technology*, 2016, 22(3): 276–283.
- [15] Kikuchi K, Masuda Y, Hirao T. Imaging of hemoglobin oxygen saturation ratio in the face by spectral camera and its application to evaluate dark circles[J]. *Skin research and technology*, 2013, 19(4): 499–507.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 87.
- [17] 柳志诚, 方永晟, 杨国华等. 水蛭素的药理作用研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2022, 12(21): 56–59+115.
- [18] 徐明杰, 赵迪, 李龙宇, 伍一炜, 徐敬海, 刘铜华. 水蛭素的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(04): 747–754. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20200108007.
- [19] 谢思跃. 天然水蛭素的抗氧化性及其在化妆品中的应用 [D]. 广州: 广东工业大学, 2020.
- [20] 芦峰, 许强, 张博等. 中药水蛭素对微循环及体液免疫的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(12): 47–49.
- [21] Junren C, Xiaofang X, Huiqiong Z, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives—a review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 660757.
- [22] Roesken F, Vollmar B, Rücker M, et al. In vivo analysis of antithrombotic effectiveness of recombinant hirudin on microvascular thrombus formation and recanalization[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 1998, 28(3): 498–505.
- [23] Ni F, Ripoll D R, Purisima E O. Conformational stability of a thrombin-binding peptide derived from the hirudin C-terminus[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(9): 2545–2554.
- [24] Mao S J T, Yates M T, Owen T J, et al. Interaction of hirudin with thrombin: identification of a minimal binding domain of hirudin that inhibits clotting activity[J]. *Biochemistry*, 1988, 27(21): 8170–8173.
- [25] 李秀珍. 开发中的抗栓剂——水蛭素及其 12 肽 [J]. *军事医学科学院院刊*, 1996, (01): 74–76.
- [26] 刘文婷, 何聪芬, 董银卯. 抑制面部毛细血管扩张的生物学机理及相关中草药 [J]. *北方园艺*, 2011(01): 196–199.
- [27] Zhang Y, Liu J, Jia W, et al. AGEs/RAGE blockade downregulates Endothelin-1 (ET-1), mitigating Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) injury in deep vein thrombosis (DVT)[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1360–1368.
- [28] Li T, Li X, Feng Y, et al. The role of matrix metalloproteinase-9 in atherosclerotic plaque instability[J]. *Mediators of Inflammation*, 2020, 2020: 3872367.
- [29] Guven G, Hilty M P, Ince C. Microcirculation: physiology, pathophysiology, and clinical application[J]. *Blood Purification*, 2020, 49(1–2): 143–150.
- [30] Woulfe D S. Akt signaling in platelets and thrombosis[J]. *Expert review of hematology*, 2010, 3(1): 81–91.
- [31] Lee M Y, Gamez-Mendez A, Zhang J, et al. Endothelial cell autonomous role of Akt1: regulation of vascular tone and ischemia-induced arteriogenesis[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2018, 38(4): 870–879.
- [32] Qin L, Wang Y, Xie Z, et al. The Role of ET-1 in Early Cerebral Microcirculation Changes after Subarachnoid Hemorrhage[J]. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, 2022: 4592986.
- [33] Lin F, Liu Y Y, Xu B, et al. Salviaolic acid B protects from pulmonary microcirculation disturbance induced by lipopolysaccharide in rat[J]. *Shock*, 2013, 39(3): 317–325.
- [34] Gutterman D D, Chabowski D S, Kadlec A O, et al. The human

microcirculation: regulation of flow and beyond[J]. *Circulation Research*, 2016, 118(1): 157–172.

[35] Bonnardel-Phu E, Wautier J L, Schmidt A M, et al. Acute modulation of albumin microvascular leakage by advanced glycation end products in microcirculation of diabetic rats in vivo[J]. *Diabetes*,

1999, 48(10): 2052–2058.

[36] Balasubramanian G V, Chockalingam N, Naemi R. The role of cutaneous microcirculatory responses in tissue injury, inflammation and repair at the foot in diabetes[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 732753.

Exploring the Microcirculation Improvement Mechanism by Leeches Based on Network Pharmacology-Molecular Docking and Experimental Validation

Lu Wan-shan, Zhou You-liang, He Cong-fen, Dong Kun*

(Beijing Technology and Business University College of Light Industry Science and Engineering Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing, 100048)

Abstract : Hirudin inhibits thrombin activity and can improve microcirculation, which has a promising potential in the field of drugs and cosmetics. To investigate the mechanism of action of hirudin to improve microcirculation based on the inhibition of thrombin activity, the article uses the analytical method of network pharmacology, and combines it with relevant databases to screen out the core targets of hirudin fragment to improve microcirculation, and to conduct GO and KEGG enrichment analysis. Based on molecular docking technology and 10 U/mL thrombin-stimulated C166 (mouse vascular endothelial cells) microcirculation blocking cell model, this work preliminarily investigates the interaction of hirudin fragments with its core target for improving microcirculation. This study provides a theoretical basis for expanding the application of hirudin.

Keywords : hirudin; microcirculation; cyberpharmacology; molecular docking; cellular model of microcirculatory blockage