

基于网络药理学研究黄芪抗动脉粥样硬化的作用机制

王 超, 张 咪, 赵丽萍, 范春雷*
(浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 利用网络药理学研究黄芪治疗动脉粥样硬化的潜在靶点和作用机制, 并通过体外实验进行初步验证。**方法** 通过多个数据库筛选出黄芪的活性成分以及与其作用的动脉粥样硬化相关靶点, 借助 Cytoscape 软件构建中药-成分-靶点网络, 利用 DAVID 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 确定相关的靶点和通路。体外实验通过 MTT 法检测黄芪提取物和 H_2O_2 对 HUVECs 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞中 ROS 水平, 试剂盒检测细胞 SOD 活性, RT-qPCR 和 Western blot 检测通路相关 mRNA 和蛋白表达。**结果** 从黄芪中共筛选出 16 个与动脉粥样硬化相关的活性成分, 76 个相关的靶点; GO 功能分析得到 96 个条目, KEGG 通路分析得到 62 条相关通路。MTT 法确定 H_2O_2 最佳处理浓度为 0.9 mmol/L, 黄芪提取物最佳处理剂量为 30 mg/L。与模型组比较, 黄芪提取物处理后细胞凋亡率及 ROS 水平均降低 ($P<0.05$), 而 SOD 活性呈升高趋势; 黄芪提取物处理后的细胞中 p38 MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 和蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。**结论** 本研究利用网络药理学筛选出了黄芪抗动脉粥样硬化的潜在靶点, 经初步验证发现黄芪提取物可能通过 p38 MAPK 途径抑制氧化损伤细胞的凋亡, 降低炎症因子的表达, 进而影响动脉粥样硬化的发生与发展。

关键词: 黄芪; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 黄芪提取物; 凋亡

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0987-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.057

动脉粥样硬化是由多种因素引起的慢性炎症性疾病, 同时也是冠心病、脑卒中、外周血管病等疾病的主要病理基础^[1]。动脉粥样硬化的中医临床表现包含“中风”“眩晕”“健忘”“胸痹”等, 从整体观进行辨证论治认为是本虚标实之症, 本虚指气血阴阳的亏虚, 标实指瘀、痰、热、毒等^[2]。以本虚标实为病机, 中医多采用祛瘀化痰、清热解毒、益气固本等治疗方法, 安全性较高。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有益气升阳、利水消肿、固表止汗等功效, 主要活性成分包括黄芪多糖、黄酮类、皂苷类以及生物碱类等, 临床上常用于冠状动脉粥样硬化、病毒性心肌炎、肝炎、糖尿病等疾病的治疗^[3]。研究表明, 黄芪具有扩张血管、抗炎、抗肿瘤、增强机体免疫的作用, 也常用于动脉粥样硬化患者的治疗^[4]。

由于中药具有多成分、多靶点及多途径的特点, 黄芪的活性成分抗动脉粥样硬化的作用机制尚不明确, 而网络药理学能从构建“药物-靶点-疾病”关系网络的角度为中药分子作用机制的研究提供科学的方法。本研究利用网络药理学的方法, 筛选出黄芪治疗动脉粥样硬化的潜在药效

成分与作用靶点, 并通过体外实验进行初步验证, 以期黄芪治疗动脉粥样硬化的基础研究与临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞系 (HUVECs), 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 试剂与药物 黄芪提取物 (中药黄芪购自浙江中医药大学附属医院并经鉴定为正品, 取 200 g 黄芪加水浸泡 2 h, 加热煮沸, 过滤收集药液, 再将残余药渣重新提取, 合并 2 次滤液, 通过旋转蒸发仪浓缩药液至含生药量 1 g/L)。DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 8117033); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所, 批号 19110503); 胰蛋白酶 (浙江吉诺生物医药技术有限公司, 批号 2019092902); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (美国 Ameresco 公司, 批号 3068B512); 二甲基亚砜 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 20170204); 过氧化氢 (美国 Sigma 公司, 批号 MKBN5879V); 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 20170409); 活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 20180402、20180403); 高灵

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY14H290007)

作者简介: 王 超 (1995—), 男, 硕士, 从事中药抗动脉粥样硬化研究。Tel: 17826867313, E-mail: wangchao9585@163.com

* 通信作者: 范春雷 (1965—), 男, 教授, 从事中西医结合抗动脉粥样硬化研究。Tel: (0571) 86613723, E-mail: taijisppear@126.com

网络出版日期: 2021-03-11

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.r.20210310.1523.006.html>

敏度化学检测试剂盒、Trizon Reagen、UltraSYBR Mixture (High ROX)、RIPA 裂解液(强)、去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏康为世纪生物科技有限公司,批号 30338、03878、40327、20152、01410、30334);引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Bax、Bcl-2、IL-1 β 、TNF- α 、p38 MAPK、p-p38 MAPK 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 201709、201710、201803、201805、201802、201804); β -actin 抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(杭州达文生物有限公司,批号 Q17892、J805472713、SG081018A)。

1.3 仪器 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Guava EasyCyte 8 型微流式细胞分析仪(美国 EMD Millipore 公司);Q5000 超微量紫外可见分光光度计(美国 Quawell 公司);Nikon 研究级倒置生物显微镜 Ti-S(日本 Nikon 公司);ABI 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);凝胶发光化学成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 资料与方法

2.1 黄芪有效成分的筛选 使用中药系统药理学平台(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>),以“huangqi”为关键词进行检索,筛选出黄芪化合物中符合口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和生物活性分子的类药性(DL) ≥ 0.18 的化合物作为活性成分,并且根据相关文献报道进行补充。之后再检索出黄芪各个活性成分所相关的靶点,通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)查找其靶点对应的基因信息,并将其导出归纳整理。

2.2 疾病靶点筛选 通过 OMIM 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)和 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)以“atherosclerosis”作为关键词进行检索并去除假阳性与重复基因后导出结果。再将获得的基因与黄芪潜在活性成分作用的基因通过 Venny 2.1(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)进行比对取交集,并将相关结果导出。

2.3 药物-疾病网络模型的构建与分析 将黄芪的活性成分和动脉粥样硬化交集靶点等相关信息导入 Cytoscape 3.7.1 软件,构建黄芪-活性成分-动脉粥样硬化-作用靶点网络。通过 String 数据库(<https://string-db.org/>)分析动脉粥样硬化和黄芪活性成分之间的相互作用关系,设置最高置信度,标准为 confidence > 0.9 ,物种设置为“Homo sapiens”,以网络中的各靶基因的“节点连接度(Degree)”为指标,通过 Degree 的测算筛选出网络中的核心蛋白质靶标,从而获得蛋白质相互作用的关系。

2.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 通过 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对筛选出的核心靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。将之前筛选出来的黄芪治疗动脉粥样硬化的靶点导入 DAVID 数据库之中,设定物种为“Homo Sapiens”,将基因

的名称核对为官方的名称,阈值设置为 $P < 0.05$ 后,进行 GO 生物学过程富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析,并将前 20 个富集结果进行可视化。

2.5 细胞培养与增殖能力的检测 将复苏后的 HUVECs 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DEME 培养基中培养,待细胞状态稳定后进行分组,设置正常组、模型组、加药组。将对数生长期的细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板中,用不同浓度 H_2O_2 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mmol/L) 进行处理。通过 MTT 检测 H_2O_2 对 HUVECs 细胞增殖的影响;并且用不同剂量黄芪提取物(5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 mg/L)对 H_2O_2 损伤后的 HUVECs 细胞进行处理,再通过 MTT 法检测黄芪提取物对受氧化应激损伤的 HUVECs 细胞增殖的影响。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 取 1×10^6 个对数生长期的 HUVECs 细胞接种于 6 孔板中,分为空白组(不作处理)、模型组(0.9 mmol/L H_2O_2 处理)、加药组(0.9 mmol/L H_2O_2 处理后,再用 30 mg/L 黄芪提取物处理)。培养 48 h 后收集细胞,经 PBS 重悬后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,室温避光孵育 20 min,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.7 细胞中 ROS 水平及 SOD 活性的检测 从 6 孔板中收集各组正常培养的细胞,弃去原培养液,用无血清培养基洗涤 3 次后,各孔加入 2 mL 无血清培养基和 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min 后 PBS 洗 3 遍,通过酶标仪检测各组细胞荧光的强弱,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm,并在荧光共聚焦显微镜上,实时检测荧光强弱并拍照。根据试剂盒说明书操作步骤检测细胞中 SOD 活性。

2.8 RT-qPCR 法检测相关基因表达 取处于对数生长期的各组细胞,消化细胞并收集,用 Trizol 法提取细胞的总 RNA,使用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,进行荧光定量 PCR 检测。以 β -actin 作为内参基因,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
β -actin	正向 ATCATGTTTGAGACCTCAACA
	反向 CATCTCTTGCTCGAAGTCCA
p38 MAPK	正向 ACTCCGGCTGAGAGGCTGAT
	反向 ATGCCGTTGCAGAGATCGTG
TNF- α	正向 TGGGATCATTGCCCTGTGAG
	反向 GGTGTCTGAAGGAGGGGTA
IL-1 β	正向 GGCTGCTCTGGGATTCTCTT
	反向 ATTTCATGCGAGCTCAGG

2.9 Western blot 检测相关蛋白表达 离心收集各组细胞后加入细胞裂解液提取蛋白,并通过 BCA 法对蛋白进行定量,制备样品。将样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),使用相关抗体进行 Western blot 检测,通过凝胶成像仪进行显影观察。

2.10 统计学分析 通过 GrapPad Prim7.0、Image J 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪活性成分及作用靶点的筛选 以“huangqi”为

检索词通过 TCMSP 数据库检索总共检索到 87 种化合物。以 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 作为化合物筛选条件, 共筛选得到 20 种化合物, 之后通过文献补充黄芪皂苷类成分 2 种, 所得数量占有总化合物的 25.29%, 见表 2。

表 2 黄芪潜在有效成分的基本信息

编号	分子名称	相对分子质量	OB/%	DL
MOL000211	mairin	456.78	55.38	0.78
MOL000239	jaranol	314.31	50.83	0.29
MOL000296	hederagenin	414.79	36.91	0.75
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	428.82	36.23	0.78
MOL000354	isorhamnetin	316.28	49.60	0.31
MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	314.36	53.74	0.48
MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	642.67	41.72	0.69
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	316.38	74.69	0.30
MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	462.49	36.74	0.92
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	300.33	64.26	0.42
MOL000387	bifendate	418.38	31.10	0.67
MOL000392	formononetin	268.28	69.67	0.21
MOL000398	isoflavanone	316.33	109.99	0.30
MOL000417	calycosin	284.28	47.75	0.24
MOL000422	kaempferol	286.25	41.88	0.24
MOL000433	FA	441.45	68.96	0.71
MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	302.35	67.67	0.26
MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	626.67	49.28	0.62
MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	314.31	39.05	0.48
MOL000098	quercetin	302.25	46.43	0.28
MOL000401	astragalosideI	867.19	47.79	0.11
MOL000403	astragalosideII	827.13	46.06	0.13

3.2 疾病相关靶点及黄芪治疗动脉粥样硬化潜在靶点筛选结果 动脉粥样硬化的相关靶点基因在 GeneCards 数据库与 OMIM 数据库中进行检索, 共得到 3 736 个靶点基因, 将上述筛选出来的黄芪中具有潜在作用的靶点基因和动脉粥样硬化靶点基因进行匹配并在线绘制韦恩图 (图 1), 获得共同靶点基因 76 个, 见表 3。

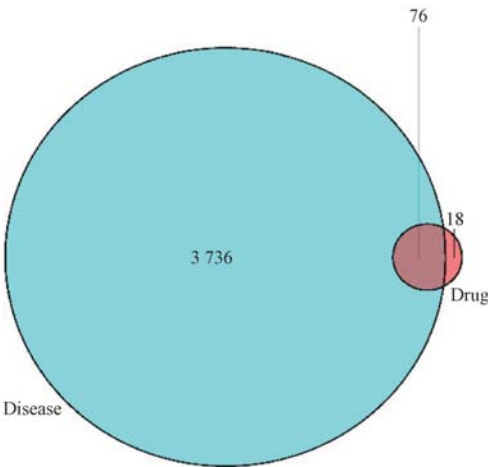


图 1 黄芪潜在活性成分与动脉粥样硬化相关靶点韦恩图

3.3 黄芪-活性成分-靶点-疾病网络与 PPI 的构建与分析 通过 Cytoscape 3.7.1 软件构建黄芪-活性成分-动脉粥样硬化-靶点网络, 结果显示, 该网络由 94 个节点组成, 其中活性成分节点 16 个, 基因节点 76 个, 疾病节点 1 个, 药物节点 1 个, 具有 138 条边 (图 2)。其中红色节点代表疾病; 蓝色节点代表药物; 紫色节点代表药物成分; 绿色节点代表关键作用靶点。将黄芪-动脉粥样硬化共有的 76 个靶点基因导入 String 数据库平台, 获得蛋白质相互作用关系网络图 (图 3), 其中关联度值最高的前 5 个节点依次为 IL6、CASP3、VEGFA、MAPK8、EGFR (图 4), 表明了这些基因可能是黄芪治疗动脉粥样硬化的潜在靶点。

3.3.1 GO 功能富集分析 将黄芪-动脉粥样硬化共同靶点导入 DAVID 数据库中进行 GO 富集分析共得到 96 个条目, 其中 DNA 结合转录激活因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性涉及 15 个靶标; 近端启动子序列特异性 DNA 结合涉及 15 个靶标; RNA 聚合酶 II 近端启动子序列特异性 DNA 结合涉及 14 个靶标, 此外还与蛋白质异二聚化活性、染色质结合、泛素样蛋白连接酶结合、核受体活性等功能相关, 见图 5 (展示了前 20 位的 GO 分析结果)。

表 3 黄芪抗动脉粥样硬化的潜在靶点

编号	基因名称	蛋白名称	编号	基因名称	蛋白名称
1	<i>NCOA2</i>	Nuclear receptor coactivator 2	39	<i>PTGS1</i>	Prostaglandin G/H synthase 1
2	<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	40	<i>GSK3B</i>	Glycogen synthase kinase-3β
3	<i>IKBKB</i>	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β	41	<i>BCL2</i>	Apoptosis regulator Bcl-2
4	<i>ALOX5</i>	Arachidonate 5-lipoxygenase	42	<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase P
5	<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase Mu 1	43	<i>CASP9</i>	Caspase-9
6	<i>NFE2L2</i>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	44	<i>PRKCA</i>	Protein kinase Cα type
7	<i>AKR1B1</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B1	45	<i>CCNB1</i>	G2/mitotic-specific cyclin-B1
8	<i>IGFBP3</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 3	46	<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor II
9	<i>CHRM1</i>	Muscarinic acetylcholine receptor M1	47	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor β
10	<i>CHEK2</i>	Serine/threonine-protein kinase Chk2	48	<i>NCOA1</i>	Nuclear receptor coactivator 1
11	<i>CASP3</i>	Caspase-3	49	<i>MAPK8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8
12	<i>VCAM1</i>	Vascular cell adhesion protein 1	50	<i>NR1I3</i>	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3
13	<i>PLAU</i>	Urokinase-type plasminogen activator	51	<i>RB1</i>	Retinoblastoma-associated protein
14	<i>HIF1A</i>	Hypoxia-inducible factor 1-α	52	<i>ERBB2</i>	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
15	<i>NQO1</i>	NAD	53	<i>PARP1</i>	Poly[ADP-ribose] polymerase 1
16	<i>TP63</i>	Tumor protein 63	54	<i>PON1</i>	Serum paraoxonase/arylesterase 1
17	<i>PRSS1</i>	Trypsin-1	55	<i>AR</i>	Androgen receptor
18	<i>ACHE</i>	Acetylcholinesterase	56	<i>IL6</i>	Interleukin-6
19	<i>PTGER3</i>	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	57	<i>PGR</i>	Progesterone receptor
20	<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450 1A1	58	<i>CRP</i>	C-reactive protein
21	<i>CYP3A4</i>	Cytochrome P450 3A4	59	<i>FOS</i>	Proto-oncogene c-Fos
22	<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA carboxylase 1	60	<i>AHR</i>	Aryl hydrocarbon receptor
23	<i>COL3A1</i>	Collagen α-1	61	<i>F7</i>	Coagulation factor VII
24	<i>RASA1</i>	Ras GTPase-activating protein 1	62	<i>HK2</i>	Hexokinase-2
25	<i>CHRM3</i>	Muscarinic acetylcholine receptor M3	63	<i>CAV1</i>	Caveolin-1
26	<i>RELA</i>	Transcription factor p65	64	<i>OLR1</i>	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1
27	<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1	65	<i>SELE</i>	E-selectin
28	<i>GSTM2</i>	Glutathione S-transferase Mu 2	66	<i>RAF1</i>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
29	<i>ELK1</i>	ETS domain-containing protein Elk-1	67	<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
30	<i>NFKBIA</i>	NF-kappa-B inhibitor α	68	<i>EIF6</i>	Eukaryotic translation initiation factor 6
31	<i>CYP1B1</i>	Cytochrome P450 1B1	69	<i>MYC</i>	Myc proto-oncogene protein
32	<i>ADH1B</i>	All-trans-retinol dehydrogenase	70	<i>ESR1</i>	Estrogen receptor
33	<i>HTR3A</i>	5-hydroxytryptamine receptor 3 A	71	<i>RXRβ</i>	Retinoic acid receptor RXR-beta
34	<i>IRF1</i>	Interferon regulatory factor 1	72	<i>HSF1</i>	Heat shock factor protein 1
35	<i>CCND1</i>	G1/S-specific cyclin-D1	73	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A
36	<i>POR</i>	NADPH-cytochrome P450 reductase	74	<i>CASP8</i>	Caspase-8
37	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	75	<i>HSPB1</i>	Heat shock protein β-1
38	<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2	76	<i>CTSD</i>	Cathepsin D

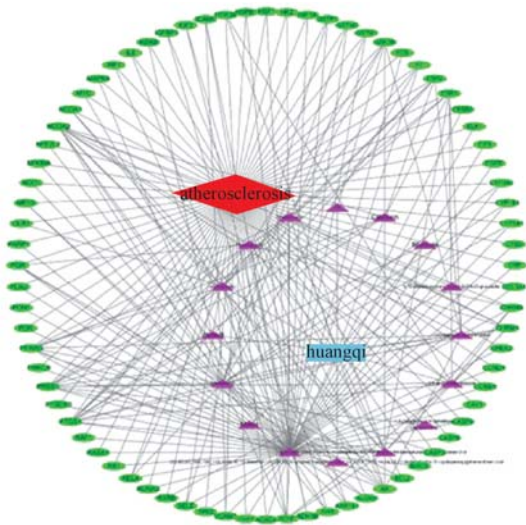


图 2 黄芪“活性成分-靶点”网络图

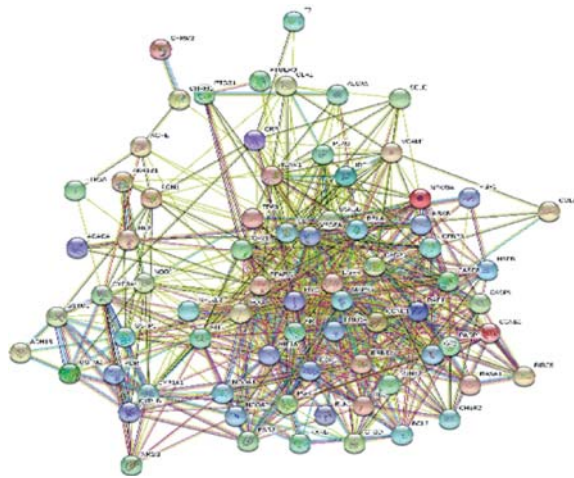


图 3 黄芪与动脉粥样硬化蛋白质相互作用核心网络图

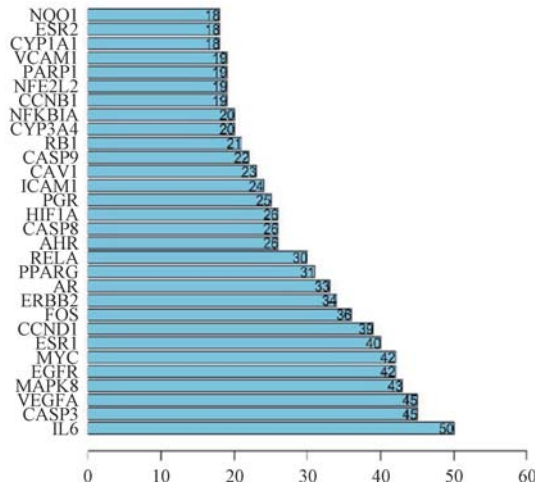


图 4 黄芪治疗动脉粥样硬化的核心靶点

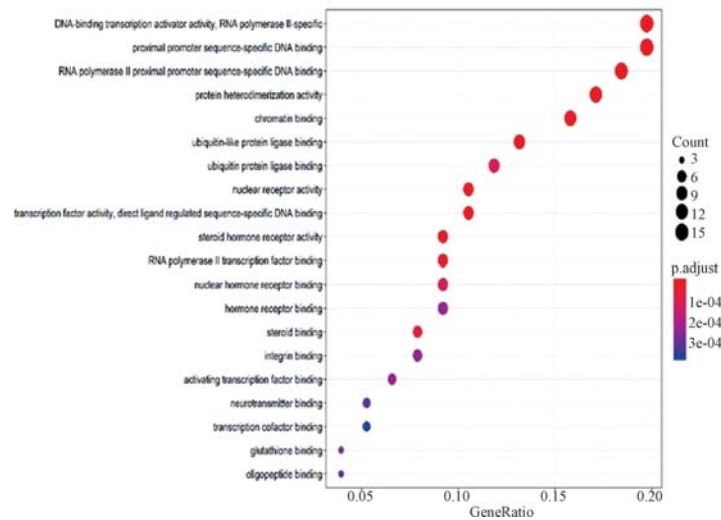


图 5 黄芪-动脉粥样硬化关键靶点的 GO 生物学过程富集分析

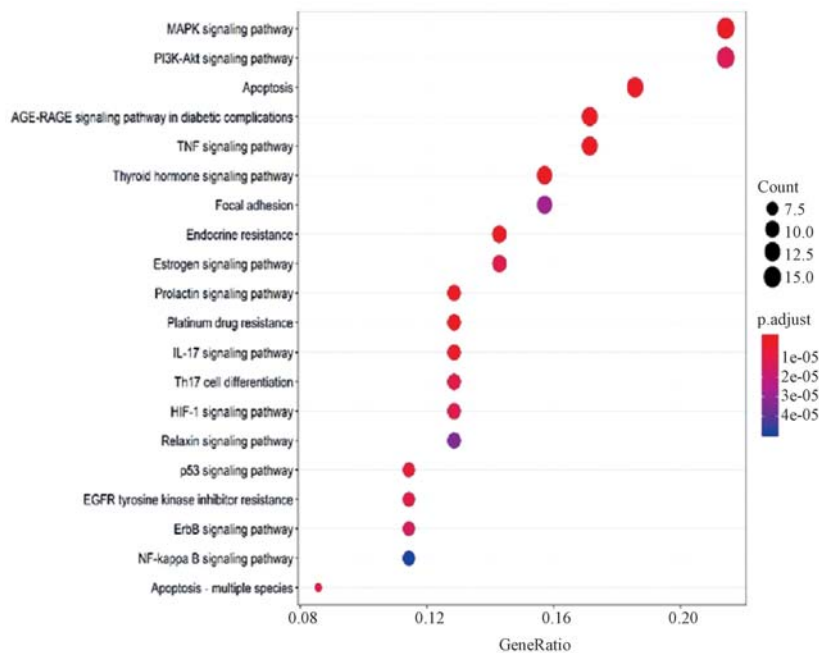


图 6 黄芪-动脉粥样硬化关键靶点的 KEGG 代谢通路富集分析

3.3.2 KEGG 通路富集分析 黄芪抗动脉粥样硬化的 KEGG 富集分析结果显示靶点被富集在 62 条通路上, 其中包括 MAPK 通路、PI3K/Akt 通路、细胞凋亡通路、AGE-RAGE 通路等, 见图 6 (展示了前 20 位的 KEGG 分析结果)。参与 MAPK 信号通路的核心靶点有 RELA、IKBKB、CASP3、MAPK8、EGFR、VEGFA、FOS、ELK1、RAF1、PRKCA、ERBB2、MYC、HSPB1、IGF2、RASA1, 是含有核心靶点最多的信号通路, 见图 7。

3.4 黄芪提取物对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 细胞增殖的影响 如图 8A 所示, 当细胞经 0~1 mmol/L 浓度的 H_2O_2 处理后, 细胞存活率随着 H_2O_2 浓度升高而逐渐下降, 当 H_2O_2 浓度为 0.9 mmol/L, 细胞存活率为 62.5%; H_2O_2 浓度为 1 mmol/L 时, 细胞存活率低于 40%, 不利于后续的实验, 所以选择浓度为 0.9 mmol/L 的 H_2O_2 处理做为造模条

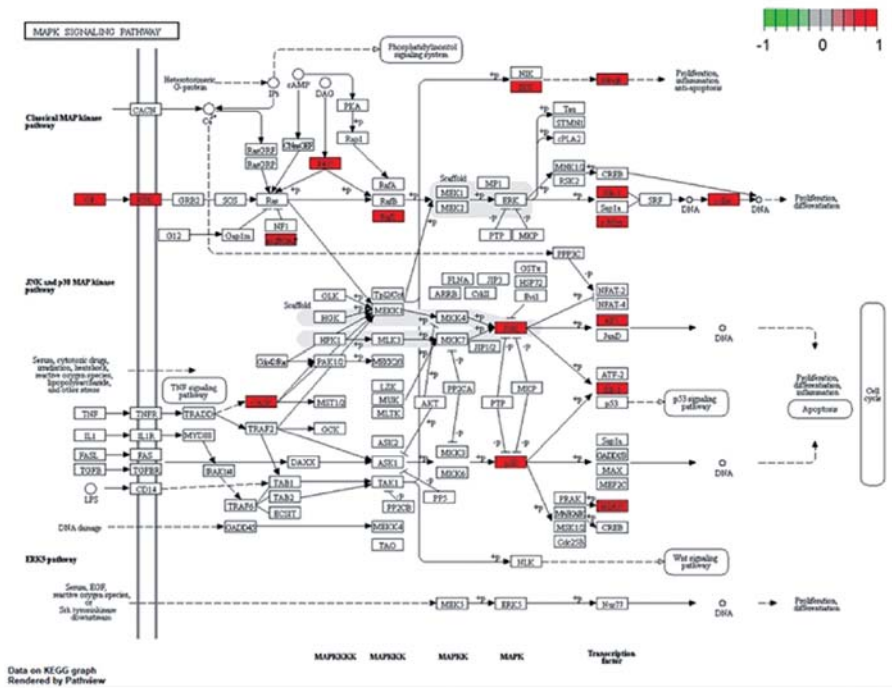


图 7 MAPK 信号通路

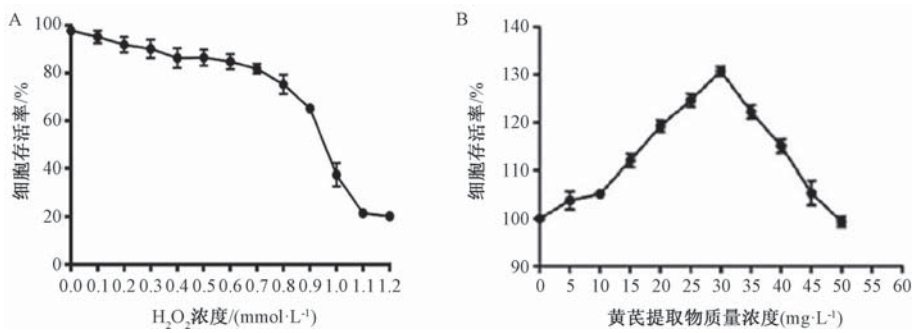
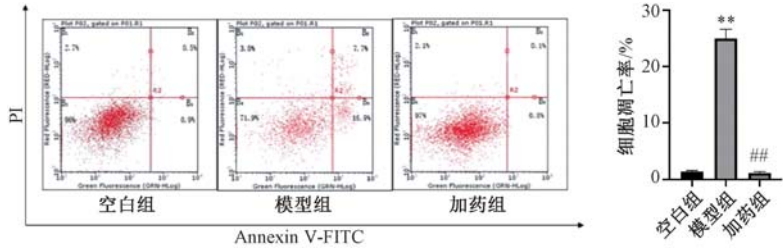


图 8 黄芪提取物对 HUVECs 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

件。如图 8B 所示, 黄芪提取物在 0~30 mg/L 的剂量范围内, 随着黄芪提取物剂量的升高细胞增殖率也升高, 在 30 mg/L 时细胞增殖率最高; 但当剂量超过 30 mg/L 时, 增殖能力开始逐渐下降, 当剂量达到 50 mg/L 时, 细胞的增殖已无明显变化,

故选用 30 mg/L 的黄芪提取物进行后续的研究。

3.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 如图 9 所示, 与空白组比较, 模型组 HUVECs 细胞的凋亡率升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 加药组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)。



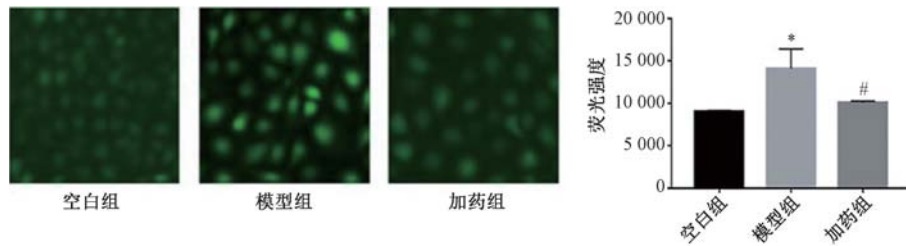
注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 9 各组细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 黄芪提取物对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 细胞中 ROS 水平及 SOD 活性的影响 如图 10 所示, 与空白组比较, 模型组细胞荧光强度增强, 表明细胞中 ROS 水平升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 加药组细胞荧光强度减弱, 表明加药组

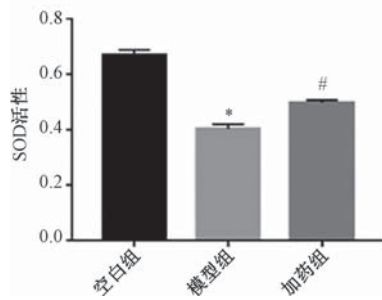
ROS 水平受到抑制 ($P<0.05$)。如图 11 所示, 与空白组比较, 模型组细胞中 SOD 活性降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 加药组细胞 SOD 活性升高 ($P<0.05$)。

3.7 黄芪提取物对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 细胞中 p38



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

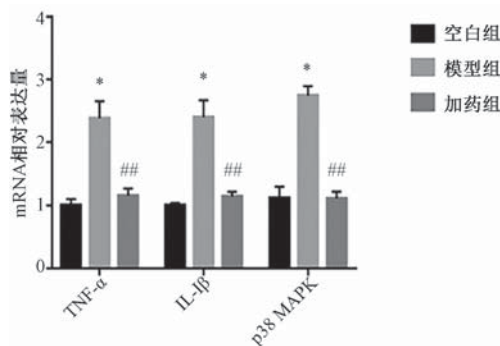
图 10 各组细胞中 ROS 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



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

图 11 各组细胞中 SOD 活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组细胞 p38 MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，加药组细胞 p38 MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达均降低 ($P<0.01$)，见图 12。



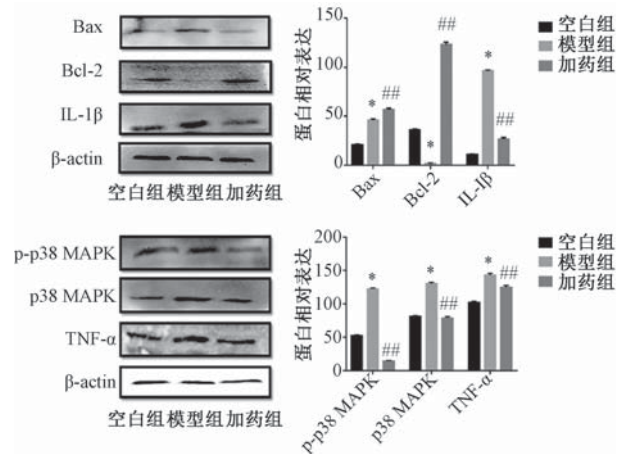
注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 12 各组细胞中 p38 MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达

3.8 黄芪提取物对 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 细胞中 p38-MAPK、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达的影响 如图 13 所示，与空白组比较，模型组细胞中 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，而 Bax、IL-1 β 、TNF- α 、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，加药组细胞中 Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，IL-1 β 、Bax、TNF- α 、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

动脉粥样硬化作为心脑血管疾病的重要病理基础，其发生发展过程始终是基础和临床研究的重点，目前的研究认为动脉粥样硬化与内皮细胞损伤、脂质紊乱、免疫应答和与其相关的慢性炎症有紧密的联系^[5]。中医对动脉粥样



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

图 13 各组细胞中 p38-MAPK、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达

硬化的认识多为本虚标实之症，提出的血瘀、热毒和痰浊等病理因素与血栓形成、炎症以及脂质浸润等学说一一对应，因此通过活血化瘀、化痰以及清热解毒等方法来抑制血栓形成、调节血脂以及抗炎^[6]。黄芪的药效甚多，常用于不同的疾病治疗中，但其根本还是“益气”的功效，因此黄芪常被用于治疗动脉粥样硬化性疾病。由于中药的活性成分众多、作用靶点与机制尚不完全明确，缺乏系统性和严谨性的研究，随着系统生物学的发展，基于大数据的网络药理学已成为分析中药复杂成分作用机制的重要方法^[7]。

本研究利用网络药理学方法筛选出了黄芪的 22 种潜在活性成分，并与动脉粥样硬化相关靶点进行比对，得到了 76 个共有的靶点基因，结果表明 IL-6、CASP3、VEGFA、MAPK8、EGFR 等基因可能是黄芪抗动脉粥样硬化的主要作用靶点。已有相关文献表明，IL-6 作为炎症细胞因子参与机体的炎症反应，其水平升高可促进血管内皮细胞及平滑肌细胞发生变性、坏死进而导致动脉粥样硬化形成、粥样斑块破裂甚至血栓形成^[8]；CASP3 在细胞凋亡过程中起重要作用，当细胞的线粒体膜受到损伤，细胞色素会释放到细胞外进而激活 CASP3 诱导细胞凋亡^[9]；VEGFA 与 EGFR 对于血管中内皮细胞的增殖、迁移及分化等具有重要作用^[10]；MAPK8 参与细胞增殖、凋亡、应激以及炎症反应等过程^[11]。由此推测，黄芪抗动脉粥样硬化的作用机制与细胞凋亡过程相关。GO 功能富集分析结果显示黄芪与动脉

粥样硬化的作用机制涉及多种代谢过程和细胞进程,多种生物分子参与其中共同调控复杂的代谢网络,体现出中药多种成分通过多种途径作用于多靶点的特点。通过 KEGG 通路富集结果可知,MAPK、PI3K/Akt、细胞凋亡等通路是黄芪抗动脉粥样硬化的重要途径,特别是 MAPK 通路 with 黄芪拥有最多的共同靶点,它能将细胞外的信号与细胞及细胞核之间的反应信息进行传递,从而参与到细胞的增殖、分化、凋亡以及自噬等生物过程,同时也参与了炎症、肿瘤等疾病的发生^[12],因此本研究以 MAPK 通路作为目标验证其与黄芪提取物的相互作用,从而分析网络药理学结果的可行性。

研究表明,内皮细胞的损伤和功能失调常为动脉粥样硬化发生的最初环节,之后损伤组织会释放炎症介质和凝血酶因子等作用于炎症细胞产生炎症反应并激活纤维蛋白原与血小板,进而产生血栓炎症反应^[13]。p38 MAPK 作为 MAPK 家族中极为重要的一部分,主要参与炎症调控的过程^[14],并且与氧化损伤过程具有紧密联系。本实验以 0.9 mmol/L 浓度的 H₂O₂ 处理细胞来建立氧化损伤模型从而模拟动脉粥样硬化的最初发生进程,并使用黄芪提取物进行干预。结果显示黄芪提取物处理后的细胞 ROS 水平降低,SOD 活性升高,细胞凋亡率也降低,说明黄芪提取物具有抗氧化的作用,同时能够抑制氧化损伤细胞的凋亡水平。RT-qPCR 和 Western blot 实验结果表明,与模型组比较,黄芪提取物处理后的细胞中 p38 MAPK、p-p38 MAPK、IL-1 β 、TNF- α mRNA 和蛋白表达均降低,说明黄芪提取物能够作用 p38 MAPK 途径并且调控相关基因的表达,明确黄芪提取物参与了炎症的进程,有利于后续更加深入的研究。Bao 等^[15]研究结果表明 p38 MAPK 被激活后能够通过磷酸化或促进炎症因子(如 TNF- α 、IL-1)活化 NF- κ B,而 NF- κ B 被激活后也可以通过其产物反过来激活自身和 p38 MAPK 表达,形成复杂的相互激活网络,从而参与动脉粥样硬化的进程。这与本研究结果一致,说明黄芪提取物可能通过抑制 p38 MAPK/TNF- α /IL-1 途径相关基因的转录与蛋白表达来调控炎症反应过程,进而影响动脉粥样硬化的发生与发展。

综上所述,本研究通过网络药理学对黄芪治疗动脉粥样硬化的药效成分、作用靶点及通路进行了分析,预测了黄芪抗动脉粥样硬化的基因靶点与作用通路,并通过细胞实验初步证实了黄芪提取物通过 MAPK 通路抑制受氧化应激损伤细胞的凋亡、降低细胞中的 ROS 水平以及下调炎症因子的表达,进而影响动脉粥样硬化的发生发展。实验结果显示了黄芪可以通过多成分、多靶点、多通路抗动脉粥样硬化的特点,初步验证的结果则表明了网络药理预测的

可行性,为黄芪抗动脉粥样硬化的深入研究提供依据。

参考文献:

- [1] 李永朝. 动脉粥样硬化发生机制的研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(5): 174-175.
- [2] 庞树朝, 张军平, 陈美玲, 等. 中医药治疗动脉粥样硬化新进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(1): 214-217.
- [3] 吴 娇, 王 聪. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(9): 755-760.
- [4] Promsote W, Veeranan-Karmegam R, Ananth S, et al. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid attenuates oxidative stress and inflammation in retinal pigment epithelium[J]. *Mol Vis*, 2014, 20: 73-88.
- [5] 张 华, 倪 昀, 王思静, 等. 动脉粥样硬化的发生机制和中医药干预研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3342-3347.
- [6] 安冬青, 吴宗贵. 动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国全科医学, 2017, 20(5): 507-511.
- [7] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [8] Bartekova M, Radosinska J, Jelemensky M, et al. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease[J]. *Heart Fail Rev*, 2018, 23(5): 733-758.
- [9] 苏胜有. Caspase 家族与神经细胞凋亡的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(80): 76-77.
- [10] 李晓蕊, 郭青龙, 卢 娜. VEGFA/VEGFR2 作用于血管内皮细胞途径及其抑制剂研究进展[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 274-278.
- [11] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [12] 徐 瑞, 黄 鹏, 张玮冰, 等. p38 MAPK 在动脉粥样硬化机制中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(17): 4365-4368.
- [13] Kattoor A J, Pothineni N V K, Palagiri D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(11): 42.
- [14] Su L, Wang Z, Huang F, et al. 18 β -glycyrrhetinic acid mitigates radiation-induced skin damage via NADPH oxidase/ROS/p38 MAPK and NF- κ B pathways[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 60: 82-90.
- [15] Bao M H, Zhang Y W, Zhou H H. Paeonol suppresses oxidized low-density lipoprotein induced endothelial cell apoptosis via activation of LOX-1/p38 MAPK/NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(2): 543-551.