

基于网络药理学和实验验证研究黄芪-党参药对干预 动脉粥样硬化的作用机制

陈晶晶¹, 贺 粤^{2*}, 张文风¹, 黄 超²

¹长春中医药大学, 长春 130117; ²深圳市宝安区人民医院, 深圳 518000

摘 要: 基于网络药理学、分子对接及实验验证探究中药药对黄芪-党参 (Astragali Radix-Codonopsis Radix, AR-CR) 治疗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的分子作用机制。首先通过检索 TCMSP、PubChem、SwissTargetPrediction、Uniprot、GeneCards 等数据库, 获取中药药对 AR-CR 的活性成分, 预测该药对的作用靶点, 筛选动脉粥样硬化的相关靶点基因, 然后利用 Venny 平台、STRING 数据库、Cytoscape (Version3.8.2) 软件进行拓扑分析获取 AR-CR 治疗动脉粥样硬化的关键靶点, 使用 DAVID 数据库对所获得的关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并借助 Auto Dock tools、Auto Dock cina 对核心蛋白与活性成分完成分子对接, 最后, 利用氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导人脐静脉内皮细胞, 建立 AS 细胞模型进行体外生物学验证。AR-CR 共检索到 34 个活性化合物, 并预测潜在化合物靶点 426 个, 通过与 875 个 AS 靶点进行交集映射, 获得 AR-CR 治疗 AS 关键靶点 69 个, 筛选出 3,9-二邻甲基苯胺、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、5 α -甾甾烷-3,6-二酮、木犀草素 4 个主要活性化合物, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase, AKT1)、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、丝裂原激活蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3) 等 25 个核心靶点。KEGG 通路富集分析得到关键通路为糖基化终末产物 (advanced glycation end-product, AGE)/糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation endproduct, RAGE) 信号通路和脂质与动脉粥样硬化信号通路等。分子对接结果显示 4 个主要活性化合物与核心靶点蛋白均能连接, 其中与 TP53 的结合活性最强。体外实验结果表明低、中、高剂量的 AR-CR 能够促进动脉粥样硬化模型细胞增殖, 抑制其凋亡, 并促进 TP53 mRNA 及 TP53 蛋白表达。综上, 该研究初步揭示 AR-CR 治疗 AS 的作用机制, 与网络药理学及分子对接预测的 TP53 因子相关, 通过调控 TP53 因子促进 AS 模型细胞增殖, 抑制其凋亡, 为临床治疗 AS 提供了理论基础。

关键词: 黄芪-党参; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 分子对接; TP53; 实验验证

中图分类号: R259 **文献标识码:** A

Intervention mechanism of Astragali Radix-Codonopsis Radix on atherosclerosis based on network pharmacology and experimental verification

CHEN Jing-jing¹, HE Yue^{2*}, ZHANG Wen-feng¹, HUANG Chao²

¹*Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;* ²*Shenzhen Bao'an District People's Hospital, Shenzhen 518000, China*

Abstract: This study aims to explore the molecular mechanism of herb pair Astragali Radix-Codonopsis Radix (AR-CR) in the treatment of atherosclerosis (AS) based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. Firstly, the active substances of AR-CR herb pair are obtained, the target of the pair is predicted, and the target genes related to atherosclerosis are screened, by searching for TCMSP, PubChem, SwissTargetPrediction, Uniprot, GeneCards and other databases. Then, the Venny platform, STRING database and Cytoscape (Version 3.8.2) software are used for topology analysis to obtain the key targets of AR-CR herb pair in the treatment of AS. The DAVID database is used to perform GO and KEGG enrichment analysis on the obtained key targets, and the molecular docking of core proteins and active substances is completed with Auto Dock tools and Auto Dock vina. Finally, oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) is used to induce human umbilical vein endothelial cells, and an atherosclerotic cell model is established for in vitro biological verification. Thirty-four active compounds are obtained from AR-CR in total, and 426 potential compound targets are predicted. By communicating with 875 AS targets, 69 key targets for the treatment of AS are obtained, and 4 active compounds, including 3,9-di-*O*-methylnissolin, 7-Methoxy-2-methyl isoflavone, 5 α -stigmastan-3,6-dione and luteolin and serine/threonine-protein kinase (AKT1), tumor protein p53 (TP53), Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) and other 25 core targets are screened out. KEGG pathway enrichment analysis shows that the key pathways are advanced glycation end products (AGE) / receptor of advanced glycation end products (RAGE) signaling pathway and lipid-atherosclerosis signaling pathway. The results of molecular docking indicates that the four main active compounds could be connected with the core target proteins, and the bond activity of TP53 is stronger. The results of the in vitro experiment makes clear that low, medium and high dose of AR-CR could enhance the proliferation of atherosclerotic model cells, inhibit their apoptosis, and boost the expression of TP53 mRNA and TP53 protein. In summary, this study preliminarily reveals that the mechanism of AR-CR in the treatment of AS is related to TP53 factor predicted by network pharmacology and molecular docking. Via modulation of TP53 factor, AR-CR can promote the proliferation of AS model cells and inhibit their apoptosis, which provides a theoretical basis for clinical treatment of AS.

Key words: Astragali Radix-Codonopsis Radix; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking; TP53; experimental verification

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是全球范围内血管疾病的主要原因, 对人类健康构成严重威胁, 常见的危险因素包括高血脂、高血压、糖尿病、肥胖、久坐、吸烟以及精神压力等^[1]。AS 具有复杂的发病机制, 目前研究表明其主要的病理特征是血管内皮氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low

density lipoprotein, ox-LDL)沉积, ox-LDL 是诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤的重要原因之一^[2]。AS 治疗手段主要为西药治疗, 但长期服药也会带来价格昂贵、依从性差、耐药性差、肝肾毒副作用等众多弊端^[3]。目前大量临床研究已证实, 中药治疗 AS 具有多成分、多靶点、多途径的优势, 对于动脉粥样硬化的防治具有重要作用^[4]。

AS 属于中医学“瘀证”“胸痹”范畴, 因此中医学认为其病机总属本虚标实, 多从补虚、祛除实邪方面进行干预。黄芪-党参(Astragali Radix-Codonopsis Radix, AR-CR)是临床上常用的且经典的补益药对, 具有补中益气, 生津养血的功效^[5]。黄芪(Astragali Radix, AR)始载于《神农本草经》, 主治气血亏虚之证, 其含有的异鼠李素、毛蕊异黄酮、黄芪多糖、黄芪总黄酮、黄芪皂甙等能够抗炎、扩血管、抗氧化应激、抗心肌纤维化, 保护心脏功能, 对心血管疾病的治疗起着积极作用^[6,7]; 党参(Codonopsis Radix, CR)初见于《本草从新》, 《本草正义》中言其可替代人参使用, 能够补脾养胃, 润肺生津, 现代研究表明, 其含有的党参苍术内酯 III、党参多糖、党参炔萜等, 具有调节机体免疫力、抗氧化等作用^[8]。研究表明, 该药对能够有效的治疗心血管疾病的配伍中 1:1 的比例居多, 占 48.1%^[9]。然而目前对于 AR-CR 治疗 AS 的作用机制研究仍然较少。

本研究通过网络药理学方法, 筛选 AR-CR 治疗 AS 主要活性化合物和核心靶点, 然后运用分子对接技术进行分子动力学验证, 最后应用细胞实验进行体外生物学验证。以期为 AR-CR 临床治疗 AS 提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

数据库: TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php/>)、PubChem 数据库 (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、STRING 在线平台 (<https://cn.string-db.org/>)、DAVID 平台 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

软件: Cytoscape3.8.2、R (version 4.2.1)、Chemdraw、Auto Docktools、Auto Dockvina、PyMOL 等。

1.2 药物、试剂与仪器

黄芪提取物(黄芪干燥根部提取的水溶性粉末, 批号: Q20220926-006)、党参提取物(党参干燥根部提取的水溶性粉末, 批号: Q20220921-001)均购自于陕西本禾生物工程有限公司, 检测报告各项均符合标准。

胎牛血清（美国 GIBCO 公司，批号：10270-106）；CCK-8 增殖检测试剂盒（碧云天公司，批号：C0038）；H-DMEM 培养基（美国 Hyclone 公司，批号：AAM210569）；逆转录试剂盒（法国 Transgen 公司，批号：AT341）；qPCR 试剂盒（法国 Transgen 公司，批号：AQ601）；30% 丙烯酰胺 Acrylamide（美国 Bio-Rad 公司，批号：161-0156）；三羟甲基氨基甲烷（美国 Bio-Rad 公司，批号：161-0719）；甘氨酸（国药公司，批号：62011516）；四甲基乙二胺(tetramethyl ethylene diamine, TEMED)(美国 Sigma 公司，批号：T8090)；ECL Plus 发光试剂盒(上海翊圣生物公司，批号：S17851)；Tween-20（南京翼飞雪生物公司，批号：YT0020-100）；PMSF（贝斯特生物公司，批号：BP0004）；BCA 定量试剂盒（碧云天公司，批号：P0012）；TP53 抗体（兰杰柯公司，批号：bs-6637R）；羊抗兔 IgG-HRP（贝斯特生物公司，批号：BK0027）。

酶标仪（美国 KAYTO 公司）；流式细胞仪（美国 Becton-Dickinson 公司）；qPCR 荧光定量系统（杭州博日公司）；垂直电泳系统（北京六一生物公司）；凝胶成像仪（上海勤翔公司）；台式高速冷冻离心机（北京大龙公司）。

1.3 细胞

人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVECs）购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.4 网络药理学

1.4.1 获取黄芪-党参活性成分、靶点和 AS 疾病靶点

基于 TCMSP 数据库，以“口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(drug-likeness, DL)≥0.18”为筛选条件，筛选 AR-CR 的 ADME 性质良好的化合物；使用 PubChem 数据库检索 AR-CR 化合物的 2D 结构和 SMILES，然后借助 Swiss Target Prediction 数据库，以“Probability >0，且通过 Uniprot 数据库注释后，以符合“Reviewed”和“Homo sapiens”为筛选条件，筛选可能性较大的基因作为 AR-CR 化合物的潜在靶点基因。

利用 Genecards 数据库，以 Relevance score 大于等于 1 及“Reviewed”和“Homo sapiens”为筛选条件，筛选获取 AS 的相关靶点基因；将 AR-CR 化合物靶点与 AS 靶点取交集并绘制韦恩图，把交集靶点定义为 AR-CR 治疗 AS 的“关键靶点”。

1.4.2 构建 AR-CR 药效靶点网络和筛选主要活性化合物

运用 Cytoscape3.8.2 软件根据中药-化合物-关键靶点-疾病的映射关系，构建 AR-CR 的药效学靶点网络。运用 Network Analyzer 插件分析网络中心性，进一步根据网络中心性结果中的度值（度值

越大,代表靶点在网络中发挥的作用越关键)由大到小对化合物进行排列以筛选得到 AR-CR 的主要活性化合物。

1.4.3 筛选 AR-CR 干预 AS 的“核心靶点”

通过 STRING 在线平台获得关键靶点的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络后,下载 tsv文件并导入 Cytoscape3.8.2,运用 Network Analyzer 插件进一步分析网络中心性,并进行可视化。以“大于 Degree 值的 2 倍中位数”为筛选标准,建立核心靶点的 PPI 网络,筛选 AR-CR 干预 AS 的核心靶点。

1.4.4 GO 和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 平台对黄芪-党参作用于动脉粥样硬化的关键靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路的富集分析,以“ P 值 <0.05 ”为筛选条件,筛选可能性较大的条目。GO 富集分析结果具体包含生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cell component, CC)三部分,各选取前 10 的条目进行其可视化。KEGG 通路的富集分析结果选取前 20 的通路进行可视化,对 AR-CR 作用于 AS 的关键通路中所涉及的蛋白进行研究。

1.5 分子对接

为了进一步验证以上网络药理学结果,将 AR-CR 主要化合物与核心靶点进行分子对接,并且评价其之间的结合力。配体的准备:通过 PubChem 数据库查询获取 AR-CR 的 4 个主要化合物的 CAS 号,并使用 Chemdraw 绘图软件绘制化合物的 2D 结构以作为小分子配体。受体的准备:选取 Degree 值前三的核心靶点,从 Uniprot 数据库查询其人类蛋白编号,使用 RCSB 数据库查询蛋白有效片段的晶体结构以作为大分子受体。通过 Auto Docktools 软件对配体和受体进行氢化、计算电荷以及定义原子类型等操作,使其转化为 PDBQT 文件,然后找到蛋白质的活性口袋。最后运用 Auto Dockvina 软件进行分子对接验证,进一步筛选最小自由能的组合,并使用 PyMOL 软件对其可视化。

1.6 细胞实验验证

1.6.1 细胞培养与传代

将 HUVECs 细胞加入专业的培养基置于 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养;细胞传代:将生长至 90 %汇合的细胞进行传代。

1.6.2 中药药液配制

根据以下含药浓度将黄芪提取物和党参提取物按照 1 : 1 的比例溶于 DMSO 培养液中,以配制

低、中、高剂量中药药液，浓度及剂量参考文献方法制定^[10-11]：（1）低剂量中药药液：黄芪 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （2）中剂量中药药液：黄芪 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （3）高剂量中药药液：黄芪 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。最后将配制好的中药药液储藏于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.6.3 细胞模型复制方法

待 HUVECs 细胞状态达到对数生长期，经预实验选取浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ox-LDL 溶液处理 HUVECs 12 h 以诱导动脉粥样硬化细胞模型。培养环境：37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 孵育。完全培养基：DMEM 培养基 44.5 μL 、空白血清 5 μL 、抗生素 0.5 μL ；含药培养基：DMEM 培养基 44.5 μL 、中药药液 5 μL 、抗生素 0.5 μL 。

1.6.4 细胞分组及处理

待细胞长势稳定良好，取 96 孔板，按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 接种 HUVECs，加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ox-LDL 溶液处理 12 h、DMSO 孵育 12 h 记为模型（model, Mod）组。同时将 DMSO 孵育 24 h 的 HUVECs 记为空白（control, Con）组。其余分为低剂量（AR-CR in low dose, AC-L）组（黄芪 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中药药液处理 12 h）、中剂量（AR-CR in middle dose, AC-M）组（黄芪 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中药药液处理 12 h）、高剂量（AR-CR in high dose, AC-H）组（黄芪 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、党参 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中药药液处理 12 h），AC-L、AC-M、AC-H 三组均加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ox-LDL 溶液处理 12 h。Mod 组及 Con 使用完全培养基培养，AC-L、AC-M、AC-H 三组使用含药培养基培养，500 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。培养条件：细胞培养箱，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 。

1.6.5 CCK-8 法检测细胞增殖

将药物干预处理完毕的各组细胞从细胞培养箱取出，弃去细胞上层培养基，每孔加入 100 μL 含 0.5 %FBS 的新鲜培养基、10 μL CCK-8 试剂，再置于细胞培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 孵育 2 h。而后将 96 孔板放入酶标仪，在 450 nm 进行读数以测定各组的 OD 值。

1.6.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将药物干预处理完毕的各组细胞从细胞培养箱取出，使用移液枪将细胞培养液吸出并收集至另一新的离心管中，然后使用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）冲洗贴壁细胞一次，而后 2 000 r/min，离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 重悬细胞并计数，取 100 μL 1 \times 结合缓冲液重悬细胞，PBS 洗涤 2 次后，按照凋亡试剂盒说明依次加入 5 μL 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素、5 μL 碘化丙啶，混匀后置于 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 左右使用铝箔包裹，避光孵育 15 min。随即进行流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

1.6.7 RT-PCR 法检测细胞实验各组的 TP53 mRNA 的表达

使用 Trizol 法提取各组 HUVECs 细胞总 RNA 并进行稀释，以将分光光度计调零（设最终稀释倍数为 n ），取稀释液进行 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 测定后，按照以下公式计算 RNA 浓度：终浓度（ng/ μ L）=（OD₂₆₀） \times （稀释倍数 n ） \times 40。配制 RT 反应液，具体组分为：RNA、5 \times 逆转录缓冲液 4 μ L、基因组去除试剂 1 μ L、RNase free H₂O 20 μ L，45 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟进行逆转录，85 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 灭活逆转录酶，-20 $^{\circ}$ C 保存 cDNA。使用 GenBank 数据库查询目的基因的序列以完成引物设计，分别以 U6、GAPDH 作为内参基因（见表 1）。

表 1 目的基因引物设计

Table 1 Primer design of target gene

引物名称	引物序列	产物长度
Primer name	Primer sequence	Product length (bp)
TP53	F: GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	133
	R: TCCGTCCCAGTAGATTACCAC	133
GAPDH	F: ACTCCACTCACGGCAAATTCAA	136
	R: ACATACTCAGCACCGGCCTCAC	136

1.6.8 Western blot 法检测 TP53 的蛋白表达

提取经过处理的细胞培养液蛋白，测定 562 nm 处的吸光度值，根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。用 BCA 法测定蛋白浓度，聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜后将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中，置摇床上缓慢摇动，室温封闭 2 h。加入一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后浸于 1 \times TBST 缓冲液中，于摇床上洗涤 3 次，每次 8 min。加入二抗，于室温摇床上孵育 1.5 h。洗膜后将 PVDF 膜置于保鲜膜上，取 ECL 试剂盒中 A 液和 B 液按 1:1 比例混合，混匀后加在膜的表面，移入凝胶成像分析仪中，化学光敏模式曝光显影。

1.7 统计分析处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析，计量资料采用均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，若符合正态分布，组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），多重比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AR-CR 活性成分、靶点和 AS 疾病靶点

在 TCMS 数据库中筛选出 AR-CR 的 ADME 性质良好的化合物 34 个，其中来自 AR 的 18

个 (AR01~AR18)、来自 CR 的 16 个 (CR01~CR16) (见表 2)。靶标结果显示, 去重后的药物靶点共计 426 个, 包括 AR 靶点 314 个、CR 靶点 294 个。利用 Genecards 数据库获得相关性较大的 AS 靶点 875 个, 将化合物靶点和疾病靶点映射得到 AR-CR 和 AS 的交集靶点, 即关键靶点 69 个 (见图 1)。

表 2 AR-CR 的 34 个化合物信息

Table 2 The information of 34 compounds from AR-CR

编号 Code	化合物名称 Compound name	OB (%)	DL
AR01	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.23	0.78
AR02	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
AR03	白桦脂酸 Mairin	55.38	0.78
AR04	华良姜素 Jaranol	50.83	0.29
AR05	胡萝卜苷 Hederagenin	36.91	0.75
AR06	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31
AR07	3,9-二邻甲基苯胺 3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48
AR08	7- <i>O</i> -甲基-异微凸剑叶莎醇 7- <i>O</i> -Methylisomucronulatol	74.69	0.3
AR09	黄芪异黄烷苷 Methylnissolin-3- <i>O</i> -glucoside	36.74	0.92
AR10	黄芪紫檀烷苷 Astrapterocarpan	64.26	0.42
AR11	联苯双酯 Bifendate	31.1	0.67
AR12	芒柄花黄素 Formononetin	69.67	0.21
AR13	二氢异黄酮 Isoflavanone	109.99	0.3
AR14	毛蕊异黄酮 Calycosin	47.75	0.24
AR15	山柰酚 Kaempferol	41.88	0.24
AR16	叶酸 Folic acid	68.96	0.71
AR17	异微凸剑叶莎醇 (<i>R</i>)-Isomucronulatol	67.67	0.26
AR18	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
CR01	木犀草素 Luteolin	36.16	0.25
CR02	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
CR03	粉苞苣甾醇 Chondrillasterol	42.98	0.76
CR04	邻苯二甲酸二异辛酯 Diisooctyl phthalate	43.59	0.39
CR05	豆甾醇葡萄糖甙 Stigmasterol glucoside	43.83	0.76
CR06	7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-Methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.2
CR07	α -菠菜甾醇 α -Spinasterol	42.98	0.76
CR08	灌木远志酮 A Frutinone A	65.9	0.34
CR09	蒲公英赛醇 Taraxerol	38.4	0.77
CR10	豆甾-7-烯醇 Stigmast-7-enol	37.42	0.75
CR11	顺-11,14-二十碳二烯酸甲酯 11,14-Eicosadienoic acid,	39.67	0.23

	methyl ester			
CR12	5 α -豆甾烷-3,6-二酮	5 α -Stigmastan-3,6-dione	33.12	0.79
CR13	曼陀罗灵	Daturilin	50.37	0.77
CR14	黄豆黄素	Glycitein	50.48	0.24
CR15	豆甾酮	Stigmasterone	45.4	0.76
CR16	11-羟基兰金断肠草碱	11-HydroxyranKinidine	40	0.66

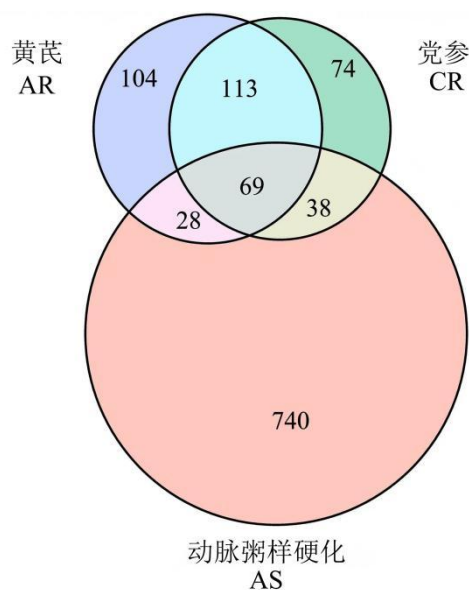


图 1 AR-CR 活性成分与 AS 交集靶点

Fig. 1 Intersection targets of active ingredients of AR-CR and AS

2.2 AR-CR 治疗 AS 的药效靶点网络构建及主要活性化合物

根据“中药-化合物-关键靶点-AS”的映射关系，构建中药药对 AR-CR 治疗 AS 的药效靶点网络图（见图 2），其中紫色菱形代表“活性化合物”，蓝色圆形代表治疗性“关键靶点”，连接线代表各个节点之间的关系。根据 AR-CR 治疗 AS 的药效靶点网络中化合物节点的网络中心性，即 Degree 值大小，筛选得到该网络中的关键化合物，最终得到 4 个主要活性化合物（见表 3），度值越大则代表其在网络中发挥的作用越关键。

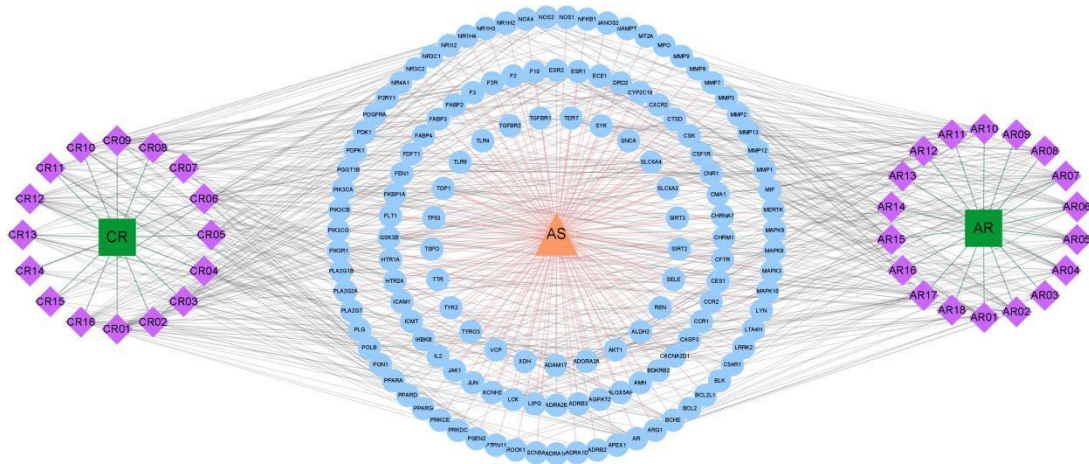


图 2 AR-CR 治疗 AS 的药效靶点网络图

Fig.2 Efficacy target network diagram of AR-CR therapy for AS

表 3 AR-CR 的 4 个主要活性化合物

Table 3 Four main active compounds of AR-CR

编号	化合物名称	度值	介数中心性	紧密度中心性
Code	Compound name	Degree	Betweenness centrality	Closeness centrality
AR07	3,9-二邻甲基苯胺 3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin	28	0.024	0.402
CR06	7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-Methoxy-2-methyl isoflavone	27	0.019	0.395
CR12	5 α -豆甾烷-3,6-二酮 5 α -Stigmastan-3,6-dione	27	0.017	0.384
CR01	木犀草素 Luteolin	25	0.012	0.395

2.3 AR-CR 干预 AS 的“核心靶点”

从“STRING”在线数据库获得 135 个关键靶点的 PPI 网络。通过 Cytoscape 的 Network Analyzer 插件对 PPI 网络进行中心性分析及可视化（见图 3），主要由 135 个节点、1070 条连接线组成，节点代表靶点蛋白，其 Degree 值越高，节点越大、颜色越深，代表该节点在网络中的作用越关键；连接线代表靶点蛋白之间的相互作用关系，连接线越粗，代表关系越紧密。根据 PPI 网络的中心性分析结果显示 Degree 的 2 倍中位数等于 24，以 Degree>24 为筛选条件，筛选出 25 个发挥核心作用的

核心靶点,并使用“STRING”数据库获得核心靶点的 PPI 网络。根据 Degree 值由大到小的顺序排列“核心靶点”,筛选出 Degree 值最大前 3 的核心靶点为: AKT1、TP53、MAPK3 (见图 4)。

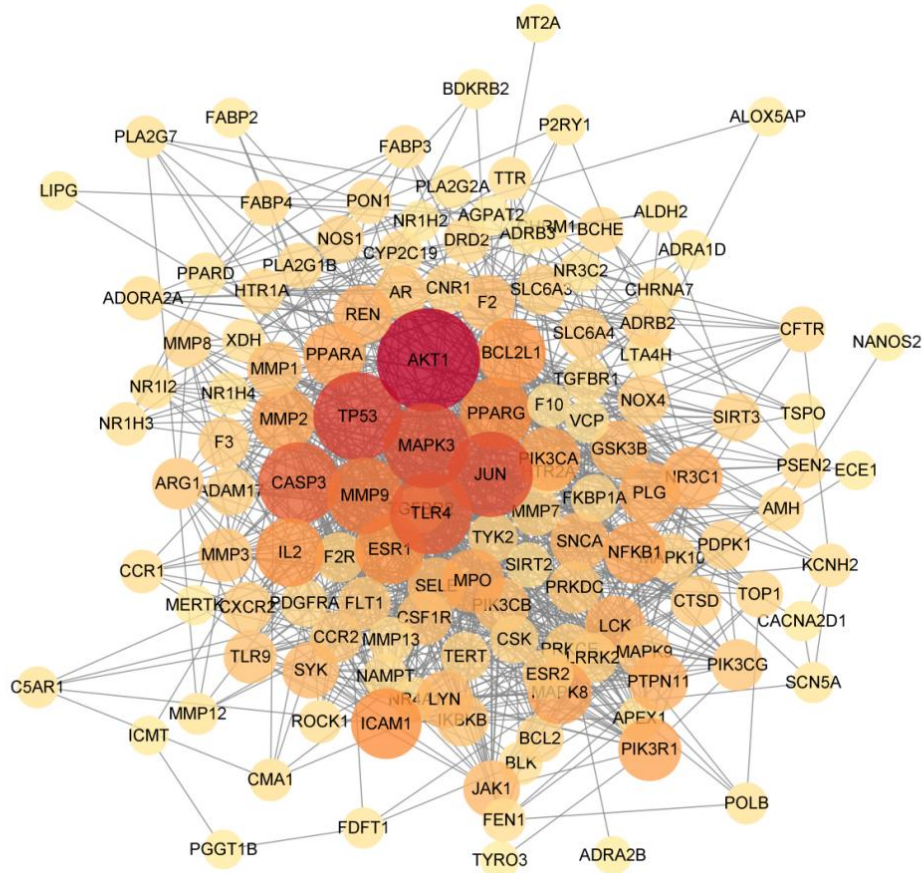


图 3 关键基因的 PPI 网络图

Fig.3 PPI network of key genes

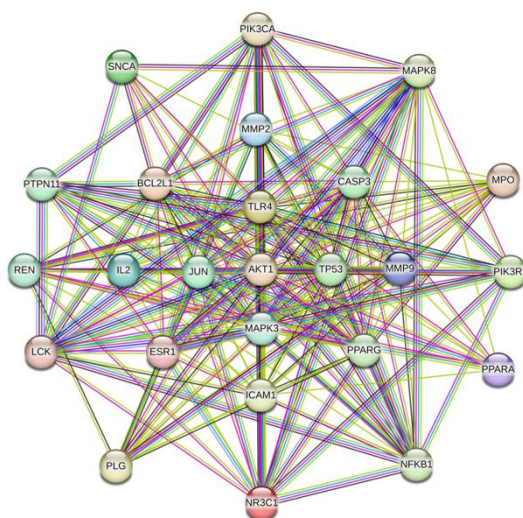


图 4 核心靶点的 PPI 网络图

Fig.4 PPI network of core targets

2.4 基因本体 GO 和 KEGG 通路富集分析

根据 DAVID 数据库关键靶点的 GO 和 KEGG 富集结果，并以 $P\text{-value}<0.05$ 为筛选条件，筛选可能的条目。GO 富集分析结果显示，共富集到 400 个 BP、60 个 CC、98 个 MF，分别选取 $P\text{-value}$ 最小的前 10 绘制富集结果柱状图，Count 代表功能富集条目中包含关键靶点的数目。根据条目 $P\text{-value}$ 最小的前 10 个，筛选 Count 最多的条目，得到最具研究意义的条目，分别为 BP: RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控 (Count=32)、CC: 细胞质膜 (Count=75)、MF: 同种蛋白结合 (Count=35) (见图 5)。KEGG 信号通路富集分析结果显示，共得到 140 条 KEGG 信号通路，选取 $P\text{-value}$ 最小的前 20 个通路进行可视化，图中气泡的大小代表通路所包括的关键靶点的 count 值，其中 count 值较大的有糖基化终末产物-糖基化终末产物受体、脂质与动脉粥样硬化、癌症、麻疹信号通路，在 R (version 4.2.1) 软件中使用“KEGGREST”包提取到 531 个通路基因，与差异表达基因进行映射得到 494 个通路差异表达基因，并使用 KEGG 网站进行可视化 (见图 6)。

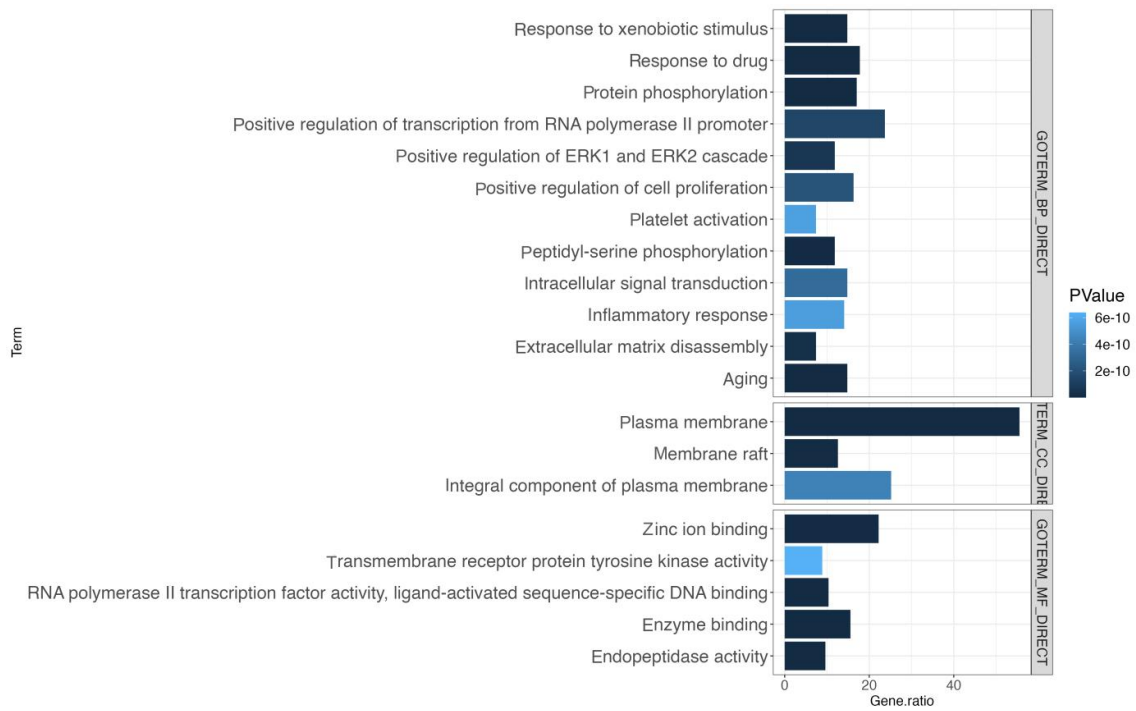


图 5 AR-CR 治疗 AS 的相关靶点的 GO 富集分析结果

Fig.5 GO enrichment analysis results of related targets for AR-CR treatment of AS

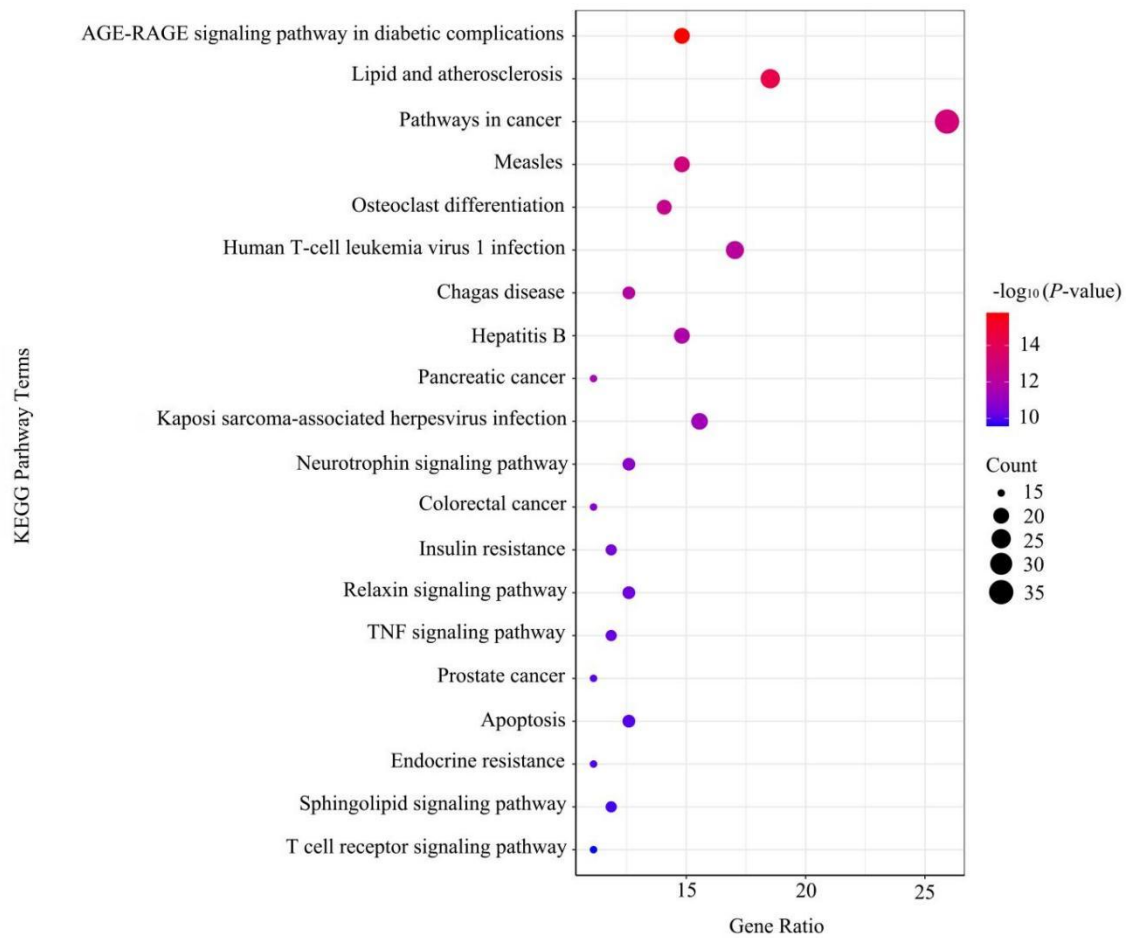


图 6 KEGG 信号通路富集分析

Fig.6 KEGG pathway enrichment analysis

2.5 分子对接验证结果

4 个主要化合物与“核心靶点”通过分子对接成功验证了网络药理学分析结果（见表 4），结合能越小，则其结合越稳定，结果显示结合能最低者的分子对接组合均为与 TP53 的分子对接结果（见图 7）。

表 4 主要化合物与核心靶点的分子对接结果

Table 4 Molecular docking results of main compounds and core targets

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	结合能 Binding energy (kcal/mol)		
			AKT1	TP53	MAPK3
3,9-二邻甲基苯胺	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	314.36	-6.17	-7.12	-5.34
3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin					
7-甲氧基-2-甲基异黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	266.31	-6.48	-7.66	-6.08

7-Methoxy-2-methyl isoflavone					
5 α -豆甾烷-3,6-二酮					
	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	428.77	-7.37	-8.57	-7.4
5 α -Stigmastan-3,6-dione					
木犀草素 Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.25	-7.58	-8.46	-6.81

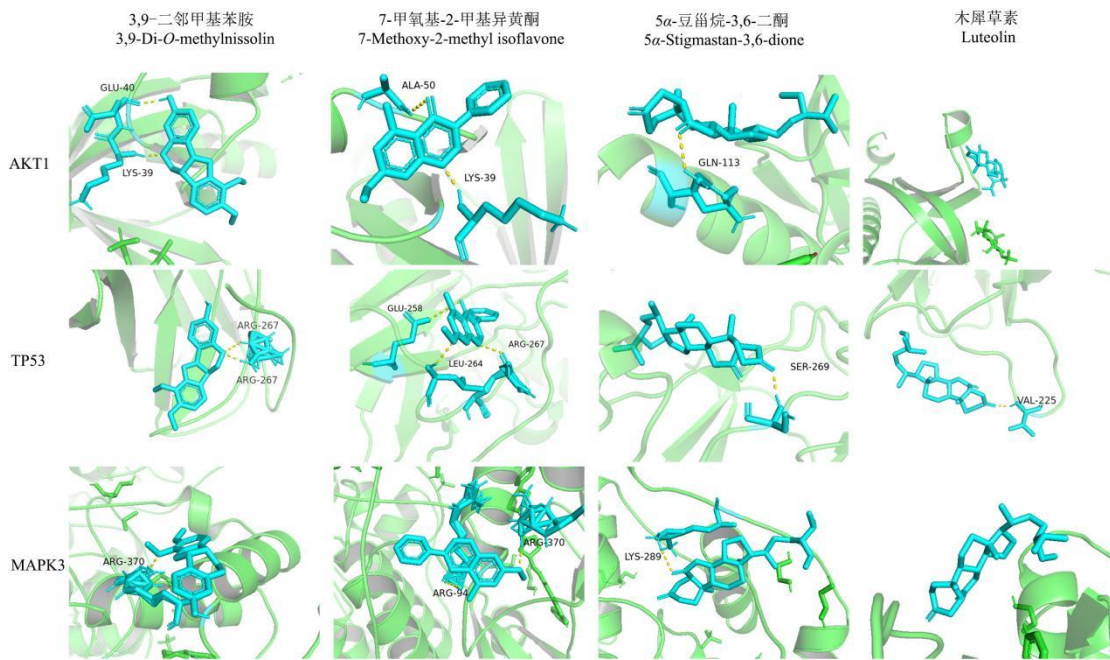


图 7 分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results

2.6 细胞实验结果

2.6.1 AR-CR 对 HUVECs 细胞增殖能力的影响

CCK-8 法检测结果显示, 0 h 各组 HUVECs 的 OD 值比较 ($P>0.05$); 与 Con 组比较, Mod 组 24、48、72 h 的 HUVECs 细胞的 OD 值均降低 ($P<0.01$); 与 Mod 组比较, AC-L 组 HUVECs 细胞的 OD 值在 24、48 h 增加 ($P<0.05$), 而在 72 h 明显增加 ($P<0.01$); 与 Mod 组比较, AC-M 组和 AC-H 组 24、48、72 h 的 HUVECs 细胞的 OD 值均明显增加, 差异均具有显著统计学意义 ($P<0.01$); 与 AC-M 组比较, AC-L 组 HUVECs 改善细胞 OD 值的作用在 24、48 h 与 AC-M 组相当, 差异不具有统计学意义 ($P>0.05$), 而在 72 h 时作用弱于 AC-M 组 ($P<0.05$); 与 AC-M 组比较, AC-H 组 24、48、72 h 的 HUVECs 细胞的 OD 值均升高 ($P<0.01$) (见表 5), OD 值越高证明活细胞数越多, 供试品的细胞增殖能力就越强^[12]。CCK8 结果表明, AR-CR 药液质量浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$

时，HUVECs 细胞具有促进细胞生长的作用，且随着给药浓度升高，细胞增殖能力显著增强，故将这 3 个质量浓度作为给药组的质量浓度，进行后续实验和比较。

表 5 各组细胞 0、24、48、72 h 细胞 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Comparison of OD values of cells in each group at 0, 24, 48 and 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	OD (450 nm)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Con	0.221±0.029	0.597±0.045	0.928±0.014	1.234±0.045
Mod	0.236±0.010	0.380±0.027 ^{△△}	0.527±0.028 ^{△△}	0.715±0.027 ^{△△}
AC-L	0.228±0.020	0.459±0.034 ^{**}	0.633±0.041 [*]	0.903±0.018 ^{###}
AC-M	0.235±0.026	0.491±0.019 ^{**}	0.694±0.027 ^{**}	0.983±0.038 ^{**}
AC-H	0.242±0.018	0.551±0.013 ^{**###}	0.887±0.015 ^{**###}	1.175±0.035 ^{**###}

注：与 Con 比较，^{△△} $P < 0.01$ ；与 Mod 比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 AC-M 比较，[#] $P < 0.05$ ，^{###} $P < 0.01$ ，下同。

Note: Compared with the Con, ^{△△} $P < 0.01$; Compared with the AC-M, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with the AC-M, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$, the same below.

2.6.2 AR-CR 对 HUVECs 细胞凋亡的影响

流式细胞术凋亡结果显示，与 Con 组比较，Mod 组 HUVECs 总凋亡率增加 ($P < 0.01$)；与 Mod 组比较，AC-L 组、AC-M 组及 AC-H 组处理后细胞的总凋亡率均出现不同程度的降低 ($P < 0.01$)，且降低细胞总凋亡率的治疗作用随着给药浓度升高而增强；与 AC-M 组比较，AC-L 组降低细胞总凋亡率的治疗作用弱于 AC-M 组，AC-H 组降低细胞总凋亡率的治疗作用优于 AC-M 组 ($P < 0.01$)。这些结果提示低、中、高剂量的 AR-CR 对 ox-LDL 刺激的 HUVECs 细胞具有保护作用，并且呈正相关（见图 8）。

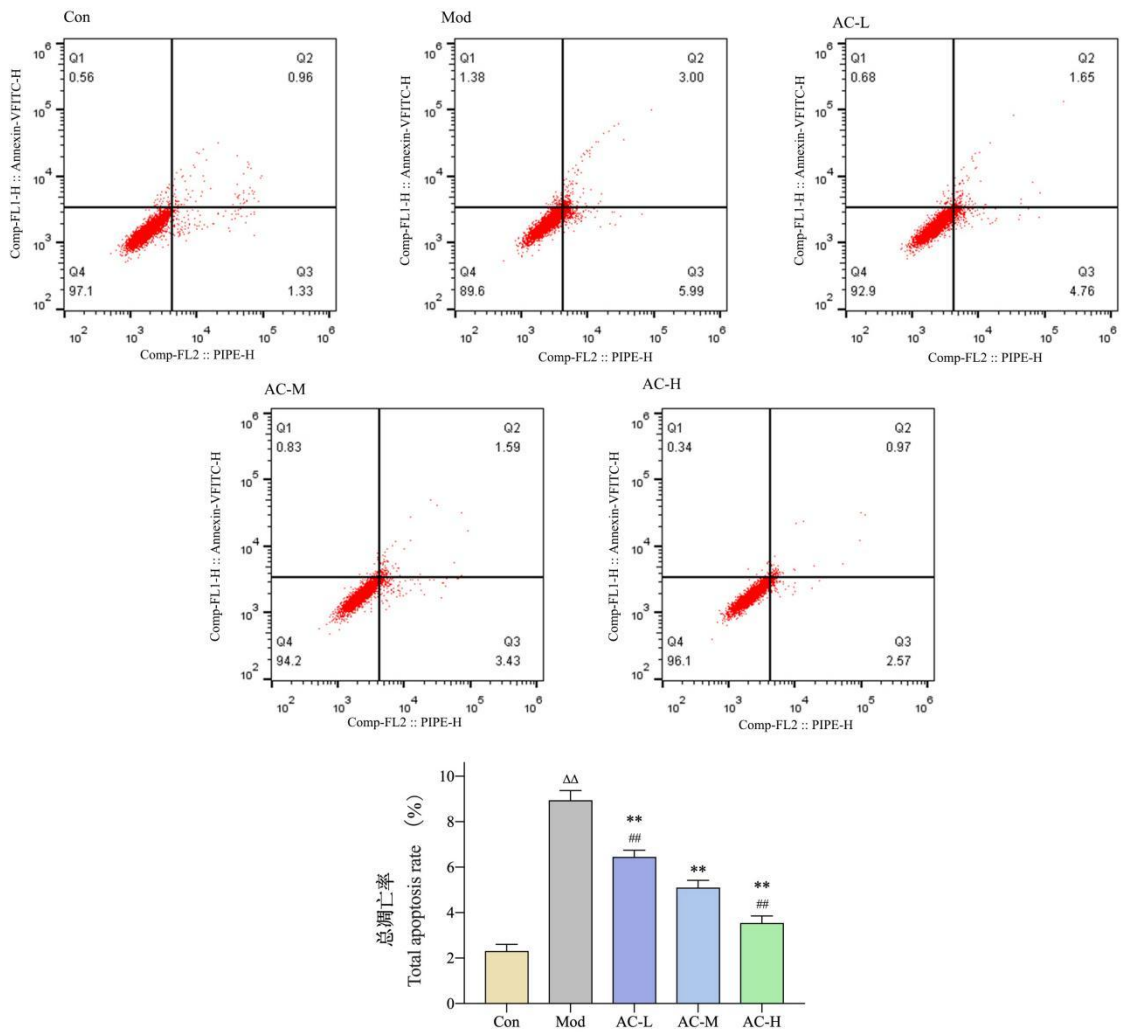


图8 各组 HUVECs 细胞的总凋亡率

Fig.8 Total apoptosis rate of HUVECs cells in each group

2.6.3 AR-CR 对 HUVECs 细胞 *TP53* mRNA 表达的影响

与 Con 组相比, ox-LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理 HUVECs 细胞 24 h 后, HUVECs 细胞培养上清液中 *TP53* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 Mod 组比较, AC-L 组、AC-M 组及 AC-H 组的 *TP53* mRNA 含量明显降低 ($P < 0.01$), 且其降低 *TP53* mRNA 含量的作用随着给药浓度升高而增强; 与 AC-M 组比较, AC-L 组升高 *TP53* mRNA 含量的治疗作用弱于 AC-M 组, AC-H 组升高 *TP53* mRNA 含量的治疗作用优于 AC-M 组 ($P < 0.01$), 提示 AR-CR 能够调控 HUVECs 细胞的 *TP53* mRNA 水平 (见图 9)。

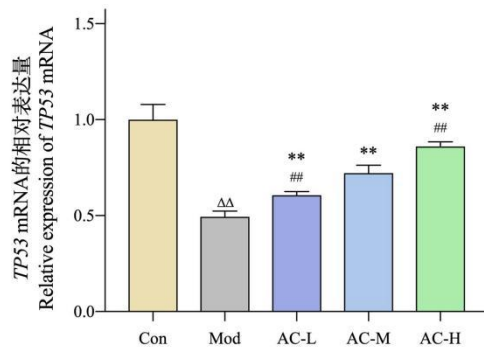


图9 各组 HUVECs 中 TP53 mRNA 表达比较

Fig.9 Comparison of TP53 mRNA expression in HUVECs of each group

2.6.4 “黄芪-党参”对 HUVECs 细胞 TP53 蛋白表达的影响

与 Con 组比较, Mod 组 HUVECs 细胞的 TP53 的蛋白表达水平降低 ($P<0.01$); 与 Mod 组比较, AC-L 组的 TP53 的蛋白表达水平增加 ($P<0.05$), 而 AC-M 组、AC-H 组 HUVECs 的 TP53 的蛋白表达水平明显增加 ($P<0.01$); 与 AC-M 组比较, AC-L 组升高 TP53 蛋白表达水平的治疗作用弱于 AC-M 组, AC-H 组升高 TP53 蛋白表达水平的治疗作用优于 AC-M 组 ($P<0.01$)。这些结果提示低、中、高剂量的 AR-CR 能够调控 HUVECs 细胞的 TP53 蛋白水平 (见图 10)。

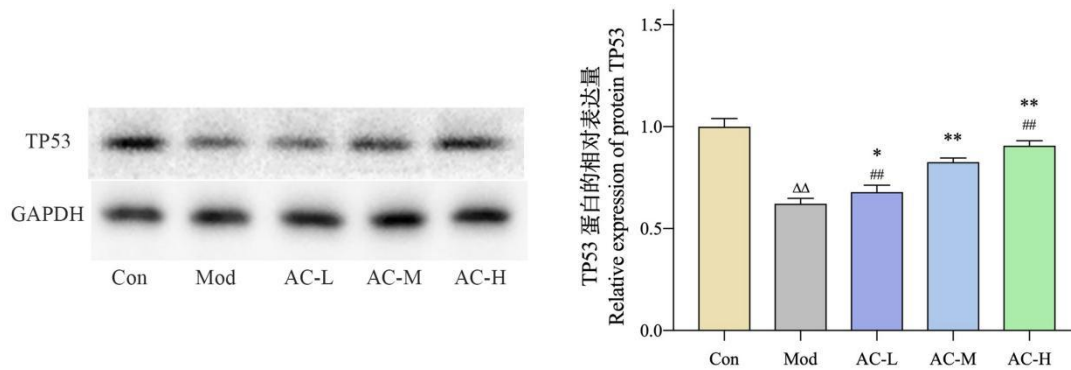


图 10 各组 HUVECs 中 TP53 的蛋白表达水平比较

Fig.10 Comparison of TP53 protein expression level in HUVECs of each group

3 讨论与结论

AS 最为典型的病理特点表现为 ox-LDL 在动脉壁内或壁上缓慢沉积, 形成富含脂质的黄色粥样斑块, 斑块破裂使组织缺血、缺氧, 最终诱发急性心脑血管意外, 因此调控脂质代谢、氧化应激反应等网络中的相应靶点, 能够有效地改善动脉粥样硬化^[13]。AR-CR 是经典的补虚药对, 现有研究表明, 补虚类中药能够抗氧化应激、促进脂质代谢、抑制血管平滑肌细胞增殖, 从而对抗 AS^[14]。

在本研究中, 利用网络药理学方法, 揭示了 AR-CR 治疗 AS 的潜在靶点与作用机制, 结果表明,

AR-CR 中的 34 个化合物能够作用于 426 个潜在靶点，通过与 AS 的 875 个疾病靶点交集映射，得到 AR-CR 干预 AS 的相关靶点 69 个。PPI 互作分析筛选得到 AKT1、TP53、MAPK3 等 25 个核心靶点，其能够与 AR-CR 中的 4 个主要化合物 3,9-二邻甲基苯胺、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、5 α -甾甾烷-3,6-二酮、木犀草素协同发挥抗 AS 的作用。

AKT1 与体内的脂质代谢水平显著相关，此外，AKT1 表达上调还可促进细胞的增殖；AS 模型小鼠的 TP53 表达增加可减少易损斑块和脂质积累，同时，TP53 还能够调控 AS 脂质代谢及炎症细胞因子的分泌；MAPK3 能够调节自噬机制改善 AS。众多研究表明，这些靶点基因可影响 AS 发病过程中的糖脂代谢和炎症等，参与调控细胞的增殖、分化和凋亡、细胞迁移、血管生成、自噬等机制^[15,16]。AR-CR 的核心靶点对 AS 的治疗起重要作用，分子对接结果显示，来自 AR-CR 的 4 个主要活性化合物配体和核心靶点 AKT1、TP53、MAPK3 的蛋白受体均能通过氢键连接而形成稳定的构象，初步验证了网络药理学分析结果。进一步对结果的分析发现，“核心靶点”TP53 与主要活性化合物的亲和力普遍较强，或许其为 AR-CR 治疗 AS 分子作用机制的关键物质基础。TP53 是一个被广泛研究的肿瘤抑制基因，既往对该基因的研究主要聚焦于其通过参与癌细胞的分化、增殖、迁移、凋亡等的细胞过程，而发挥调控癌症发生发展的机理讨论。然而，最近的研究发现，TP53 与 AS 也存在较大联系，可能通过调控细胞周期停滞、细胞凋亡、抑制细胞自噬、改善脂质代谢、减少糖酵解和保护氧化应激等等途径参与 AS 的发生发展^[17]。由此可知，AR-CR 可通过多成分、多靶点发挥抑制 AS 细胞增殖、自噬、迁移和促进凋亡等抗 AS 效果，TP53 或许为 AR-CR 治疗 AS 分子作用机制的关键靶点。

为明确 AR-CR 是如何通过关键靶点发挥作用，本研究进一步通过功能富集分析进行阐述。GO 功能富集分析提示，AR-CR 主要通过细胞膜、膜筏等细胞组分调控细胞对蛋白磷酸化、炎症反应、细胞增殖等生物学过程发挥 RNA 聚合酶 II 转录因子结合、特异性 DNA 结合酶结合等影响基因和蛋白质的表达等分子功能。KEGG 富集分析结果显示 AR-CR 影响多条信号通路干预 AS，其中 AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样信号通路、癌症信号通路、麻疹信号通路为富集较多的信号通路。AGE-RAGE 信号通路与氧化应激和炎症反应显著相关，可直接或间接参与血管损伤，同时能够促进 AS 斑块的形成。脂质与动脉粥样信号通路参与了血管壁内低密度脂蛋白的积聚和氧化修饰，以及泡沫细胞的形成，与斑块的易损性有着密切联系^[18]。癌症信号通路与 MAPK、PI3K-Akt、mTOR、凋亡和 NF-kappa B 以及其他著名的致癌途径，如 Wnt、TP53、Notch 和 Ras 通路表现出相对较高的连接性，可通过调节细胞的周期进展和新陈代谢影响 AS 的发生发展^[19]。Measles 信号通路可通过调

控免疫来起到抗 AS 的重要作用^[20]。因此可通过调控相关信号通路延缓 AS 的进展。本研究利用体外细胞实验加以验证,黄芪-党参提取物药液干预 HUVECs 细胞后,CCK-8 检测提示经过 ox-LDL 处理的 HUVECs 细胞生长得到促进;流式细胞术检测显示其凋亡率明显下降;PCR 检测显示 TP53 mRNA 水平明显上调;同时 Western blot 检测提示 TP53 蛋白表达上升,说明黄芪-党参提取物能够促进动脉粥样硬化模型细胞的增殖,抑制其凋亡,机制可能与上调 TP53 因子的表达有关。

本研究通过网络药理学分析 AR-CR 治疗 AS 的主要活性成分、关键靶点及可能参与的信号通路,通过分子对接技术对主要化合物及核心靶点进行初步验证,最终通过细胞实验验证 AR-CR 调控 TP53 因子,促进 AS 模型细胞的增殖,抑制其凋亡,下一步将通过体内实验验证,探索与 TP53 相关的通路以及更具体的分子机制,为 AR-CR 临床治疗 AS 提供依据。

参考文献

- 1 Fan ZG,Yuan Y,Ouyang XQ,et al.Study on the mechanism of modified Buyang Huanwu Decoction in preventing and treating atherosclerosis through Nrf2/ARE pathway[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:644-652.
- 2 Chen DC,Ma CQ,Yang K,et al.Down-regulation of taurine up-regulated gene 1 alleviates oxidative damage induced by ox-LDL in HUVECs[J].Basic Clin Med(基础医学与临床),2019,39:509-513.
- 3 Lechner K,von Schacky C,McKenzie AL,et al.Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis:pathways and mechanisms beyond traditional risk factors[J].Eur J Prev Cardiol,2020,27:394-406.
- 4 Kumar S,Mittal A,Babu D,et al.Herbal medicines for diabetes management and its secondary complications[J].Curr Diabetes Rev,2021,17:437-456.
- 5 Liu ZP,Cao P,Zhong J,et al.Exploration on the mechanism of Astragali Radix and Codonopsis Radix couplet medicines in treating diabetic nephropathy based on network pharmacology[J].China Med Her(中国医药导报),2021,18:121-125.
- 6 Zhang RC.The pharmacological action and application effect of *Astragalus membranaceus*[J].J North Pharm(北方药学),2020,17:167-168.
- 7 Yan SM,Yan SQ,Yang X,et al.Exploring the molecular mechanism of Huangqi in treating diabetic peripheral vascular diseases based on network pharmacology and molecular docking[J].China J Chin Med(中医学报),2021,36:2661-2666.
- 8 Xia ZD,Ma RX,Wang FY,et al.Research progress on immunomodulatory activity and mechanism of Codonopsis Radix[J].Chung Ts'ao Yao(中草药),2023,54:4334-4345.
- 9 Li QY,Lu XY,Dong YQ,et al.Analysis of TCM application data of different ratios for codonopsis pilosulae and *Astragalus membranaceus*[J].Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med(云南中医中药杂志),2018,39:20-25.
- 10 Feng JW,Li JW,Li DY,et al.Effect and mechanism of astragalus extract on the osteogenic differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J].Prog Anat Sci(解剖科学进展),2023,29:29-32.
- 11 Liu AM.Anti-inflammatory effects of dopamine lipopolysaccharide(LPS)-stimulated RAW264.7 cells via inhibiting NLRP3 inflammasome activation[D].Jinan:Shandong University(山东大学),2019.
- 12 Lin CL,Wang X,Li SM,et al.Determination of the optimal experimental conditions for cell proliferation assay(CCK-8 assay)[J].Anim Sci Abroad:Pigs Poultry(国外畜牧学:猪与禽),2017,37:88-90.
- 13 Chiorescu RM,Mocan M,Inceu AI,et al.Vulnerable atherosclerotic plaque:is there a molecular signature?[J].Int J Mol Sci,2022,23:13-14.
- 14 Hou TF,Chen YY,Zhang QQ,et al.Study on the mechanism of action of 3 kinds of 16 kinds of commonly used anti-atherosclerosis traditional Chinese medicine[J].China Pharm(中国药房),2018,29:2432-2438.

- 15 Huang CY,Deng JS,Huang WC,et al.Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice,through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways,and suppressing oxidative stress-mediated er stress-induced apoptosis and autophagy[J].Nutrients,2020,12:1742-1750.
- 16 Wang H,He F,Liang B,et al.P53-Dependent LincRNA-p21 protects against proliferation and anti-apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by upregulating SIRT7 via MicroRNA-17-5p[J].J Cardiovasc Transl Res,2021,14:426-440.
- 17 Zhao ZW,Zhang M,Zou J,et al.TIGAR mitigates atherosclerosis by promoting cholesterol efflux from macrophages[J].Atherosclerosis,2021,32:76-86.
- 18 Khatana C,Saini NK,Chakrabarti S,et al.Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis[J].Oxid Med Cell Longev,2020,67:524-530.
- 19 Li F,Wu T,Xu Y,et al.A comprehensive overview of oncogenic pathways in human cancer[J].Brief Bioinform,2020,21:957-969.
- 20 Valenzuela NM.Late phase endothelial cell inflammation is characterized by interferon response genes and driven by JAK/STAT,not NF- κ B[J].Vascul Pharmacol,2022,14:90-107.

收稿日期：2024-05-16 接受日期：2024-09-05

基金项目：国家自然科学基金（81903985）；深圳市宝安区医疗卫生科研项目（2023JD256）；长春中医药大学“杏林学者工程-青年科学家项目”培养计划（QNKXJ2-2021ZR20）

*通信作者 E-mail: 17745138850@163.com