

基于网络药理学和动物实验探究羟基红花黄色素 A 治疗肺纤维化的作用机制

栾智华^{1*}, 刘军艳², 魏砚明²,

王永辉³, 杜俊民², 赵乐³, 刘珊²

¹山西中医药大学实验管理中心; ²山西中医药大学中药与食品工程学院; ³山西中医药大学基础医学院, 晋中 030619

摘要: 基于网络药理学及动物实验探讨羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 治疗肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 的作用靶点及机制。利用网络药理学相关数据库 SwissTargetPrediction、PharmMapper、GeneCards、OMIM、TTD 筛选 HSYA 和 PF 的作用靶点, 取两者交集得到共同靶点, 构建蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。借助 David 数据库进行 GO 及 KEGG 富集分析, 以探究 HSYA 治疗 PF 可能的分子机制。采用博来霉素建立肺纤维化小鼠模型, 通过 HE、Masson 染色对肺组织进行形态学观察, 并检测肺组织中羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量; 运用免疫组化和 Western blot 对小鼠肺组织中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 通路的相关蛋白进行检测。网络药理学方法筛选出药物疾病的共同靶点 132 个; GO 富集分析得到 719 个条目, KEGG 通路富集分析筛选出 160 条信号通路, 主要涉及 PI3K-AKT、Ras、MAPK 等信号通路。IHC 和 Western blot 结果显示, HSYA 组肺组织中的 PI3K、AKT、mTOR 的蛋白表达较模型组显著减少 ($P < 0.01$)。网络药理学分析及动物实验结果提示, HSYA 可能通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来影响 PF 的发病进程, 为 HSYA 的临床应用提供了科学依据。

关键词: 网络药理学; 羟基红花黄色素 A; 肺纤维化; PI3K/AKT/mTOR

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

Mechanism of hydroxysafflower yellow A in the treatment of pulmonary fibrosis based on network pharmacology and animal experiments

LUAN Zhi-hua¹, LIU Jun-yan²,

WEI Yan-ming², WANG Yong-hui³, DU Jun-min², ZHAO Le³, LIU Shan²

¹Experimental Management Center, Shanxi University of Chinese Medicine;

²College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine;

³College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Exploring the targets and mechanisms of hydroxysafflower yellow A (HSYA) in the treatment of pulmonary fibrosis (PF) based on network pharmacology and animal experiments. Network pharmacology databases such as SwissTarget Prediction, PharmMapper, GeneCards, OMIM, and TTD were used to screen the targets of HSYA and PF, common target and protein-protein interaction (PPI) network were obtained by the intersection. Using the David database for GO and KEGG enrichment analysis, to explore the possible molecular mechanisms of HSYA treatment for PF. The mouse model of pulmonary fibrosis was established by bleomycin. The morphology of lung tissue was observed by HE and Masson staining, and the content of hydroxyproline (HYP) in lung tissue was detected; Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the proteins related to phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) pathway in mouse lung tissue. The network pharmacology method screened 132 common targets for drug diseases; GO enrichment analysis yielded 719 entries while KEGG pathway enrichment analysis screened 160 signaling pathways, mainly involving PI3K-AKT, Ras, MAPK and other signaling pathways. IHC and Western blot results showed that the protein expression of PI3K, AKT, and mTOR in the lung tissue of the HSYA group was significantly reduced compared to the model group ($P < 0.01$). Network pharmacology analysis and animal experimental results suggest that HSYA may affect the pathogenesis of PF by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, providing scientific basis for the clinical application of HSYA.

Key words: network pharmacology; hydroxysafflor yellow A; pulmonary fibrosis; PI3K/Akt/mTOR

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种致命的进展性疾病, 会导致肺部组织过度积聚细胞外基质, 同时伴有病理组织重建, 导致正常肺组织遭到严重破坏, 且不可逆转^[1]。PF 的病因复杂, 主要特点是患者的肺功能下降, 生活质量恶化^[2]。目前用于改善肺功能的西医治疗手段有限, 有时会产生不良反应^[3]。

在传统中医药中, 红花已被广泛用于治疗脑脊髓炎血管和心血管疾病^[4]。羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA), 作为一种从红花中分离的水溶性化合物, 具有多种药理特性, 例如抗炎、抗氧化和心血管保护^[5]。研究表明 HSYA 可通过抑制炎症减轻小鼠的哮喘症状^[6]。本课题组前期研究表明, HSYA 对肺纤维化小鼠具有明显的保护作用^[7], 但其作用机制尚不清楚。网络药理学以系统生物学、多向药理学为理论基础, 以生物分子网络分析方法为工具, 寻找和识别疾病相关网络的关键节点^[8, 9], 其整体性、系统性和对药物间相

互作用的研究也符合中医药的基本特点。故本文先采用网络药理学方法进行预测,再通过动物实验来探究 HSYA 抗 PF 的作用机制,为下一步临床用药和系统科学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 软件与数据库

软件: Venny2.1.0、Cytoscape3.9.1。

数据库: PharmMapper 数据库 (lilab-ecust.cn)、SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>)、Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、微生信-在线生物信息学分析、可视化云平台 (bioinformatics.com.cn)。

1.1.2 药物与主要试剂

博来霉素(批号: 20067411, 浙江翰晖制药有限公司); 地塞米松注射液(批号: 320E051, 北京索莱宝生物科技有限公司); HSYA (批号 H811425, 上海麦克林生化科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); BCA 蛋白定量试剂盒(批号: 23223, 美国 Thermo); 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体、磷酸化-蛋白激酶 B (phosphorylation protein kinase B, p-AKT) 抗体、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体、磷酸化-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphorylation mammalian target of rapamycin, p-mTOR) 抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体、 β -actin 抗体(批号: 154598、81283、8805、109268、32028、8227, 美国 abcam); 磷酸化-磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylation phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体(批号: 0163, abbkine); 羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 试剂盒、Masson 染液(批号: 202105103、202108116, 南京建成科技有限公司)。

1.1.3 动物

雌性 ICR 小鼠, SPF 级, 6~8 周龄, 平均体质量 (16 ± 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006。在受控温度 (22 ± 2) °C、相对湿度 35%~45%、12h 的光/暗循环交替条件下饲养。本动物实验已经山西中医药大学实验动物伦理委员会审核(伦理审批号: AWE202404340)。

1.1.4 仪器

BX53 正置显微镜（日本 Olympus 公司）；RM2235 石蜡切片机、Histocore 石蜡包埋机（德国 Leica 公司）；MK3 酶标仪（芬兰雷勃公司）；ChemiScope 6000 Touch 成像仪（上海勤翔科学仪器有限公司）；Centrifuge 5810R 离心机（德国 Eppendorf 公司）；DYY-6C 型电泳仪电源（北京市六一仪器厂）；Cary 50 紫外分光光度计（上海魁元科技仪器有限公司）；PH-240A 电热恒温培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析

1.2.1.1 HSYA 的作用靶点筛选

利用 SwissTargetPrediction、PharmMapper 数据库检索 HSYA 的作用靶点，去除重复基因，通过 UniProt 数据库进行靶点信息的确认和校正。

1.2.1.2 PF 的相关靶点筛选

以“pulmonary fibrosis”为关键词，从 GeneCards、OMIM、TTD 数据库获取 PF 的作用靶点，删除重复靶点，即为 PF 的作用靶点。

1.2.1.3 构建“药物-靶点-疾病”网络

将 HSYA 的作用靶点和 PF 的相关靶点导入 Venn 图在线平台，取两者交集，即为 HSYA 治疗 PF 的潜在靶点，并绘制“HSYA-共同靶点-PF”网络。

1.2.1.4 构建蛋白互作（protein-protein interaction, PPI）网络

将潜在靶点上传至 STRING 数据库，设定物种为“Homo sapiens”，相互作用阈值设为大于等于 0.7。随后将得到的 TSV 文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件，绘制 PPI 网络图，按 Degree 值从大到小排序，将前 30 位作为治疗 PF 的核心靶点。

1.2.1.5 对潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析

通过 David 数据库对输入的交集靶点进行分析，利用微生信在线工具可视化生成气泡图和柱状图。最后运用 Cytoscape 3.9.1 软件绘制“疾病-药物-靶点-通路”网络。

1.2.2 动物实验

1.2.2.1 分组、造模和给药

将小鼠随机分为 4 组 ($n=15$)，对照组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、HSYA 组 (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 及地塞米松组 (dexamethasone, Dex)。依据文献^[10]方法鼻腔滴注博来霉素建模，建模 1 d 后腹腔注射给药干预，HSYA 组给予 HSYA (6 mg/kg)；地塞米松组给予地塞米松 (3 mg/kg)；对照组、模型组给予同等剂量生理盐水，1 次/d，连

续给药 28 d。

1.2.2.2 取材及指标检测

给药后第 29 d, 每组各取 5 只小鼠处死。左肺经 4%多聚甲醛固定 72 h, 用于病理观察; 取右肺冻存于-80 °C冰箱, 一部分用于 Western blot 检测蛋白表达, 一部分用于检测 HYP 含量。

1.2.2.3 组织病理形态变化

组织经充分固定后, 常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 上机制成 4 μm 厚切片。然后烤片、脱蜡水洗、分别进行 HE、Masson 染色, 于正置显微镜下观察肺泡炎和肺纤维化的病理变化。

1.2.2.4 肺组织 HYP 含量测定

按照 HYP 试剂盒说明书进行操作, 于 550 nm 波长处测定吸光度值, 计算肺组织中 HYP 的含量。

1.2.2.5 免疫组化检测蛋白表达

切片经脱蜡、脱苯至水, 双氧水灭活标本的内源性过氧化物酶的活性, 水浴高湿加热进行抗原修复, 血清封闭非特异性位点。滴加一抗在 4 °C 孵育过夜, 滴加二抗孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核 3 min, 封片镜检, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析目标蛋白的相对表达量。

1.2.2.6 Western blot 检测蛋白表达

从肺组织中提取蛋白并定量, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 接着将目标蛋白转印至 PVDF 膜, 取蛋白条带置于装有封闭液的平皿中摇动封闭。然后分别加入 β-actin、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 一抗在 4 °C 孵育过夜, 加入二抗在室温孵育 90 min, 最后化学发光显色, 利用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.2.3 数据统计分析

应用 SPSS 22.0 进行统计分析, 数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学预测结果

2.1.1 HSYA 的靶点预测

利用 PharmMapper 数据库检索到 HSYA 的作用靶点 299 个, 以 norm fit 大于等于 0.4 为

筛选条件，得到 277 个靶点；通过 SwissTargetPrediction 数据库得到 87 个靶点；两个数据库的靶点进行合并去重，最终取得作用靶点 335 个。

2.1.2 PF 的靶点获取

GeneCards 数据库获得 6 867 个靶点，得到的结果以“relevance”为指标，利用中位数进行筛选，得到 1 540 个靶点；OMIM 数据库获得 23 个靶点；TTD 数据库获得 28 个靶点；合并 3 个疾病数据库结果并删除重复项，共获得 PF 的作用靶点 1 558 个。

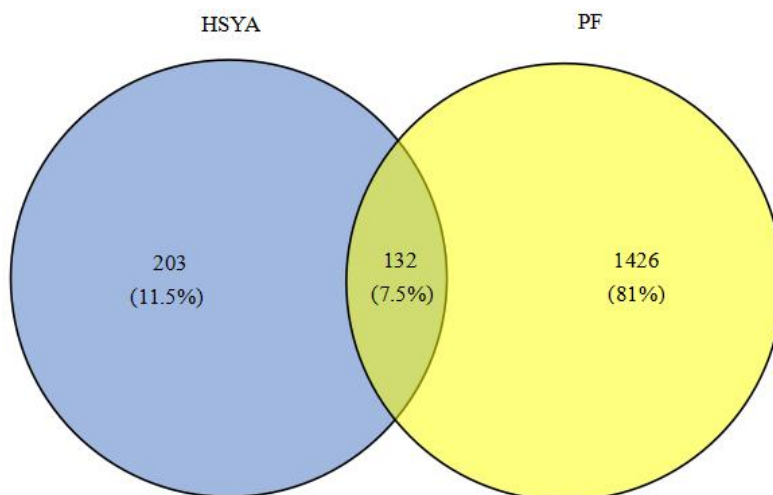


图 1 HSYA 与 PF 的靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of HSYA and PF targets

2.1.3 构建 HSYA 治疗 PF 的共同靶点网络图

如图 1 所示，将 HSYA 和 PF 的靶点上传至在线 Venny 平台进行映射，得到 132 个靶点。利用 Cytoscape 3.9.1 软件绘制“HSYA-共同靶点-PF”网络图，该网络包括 134 个节点和 263 条边（见图 2）。

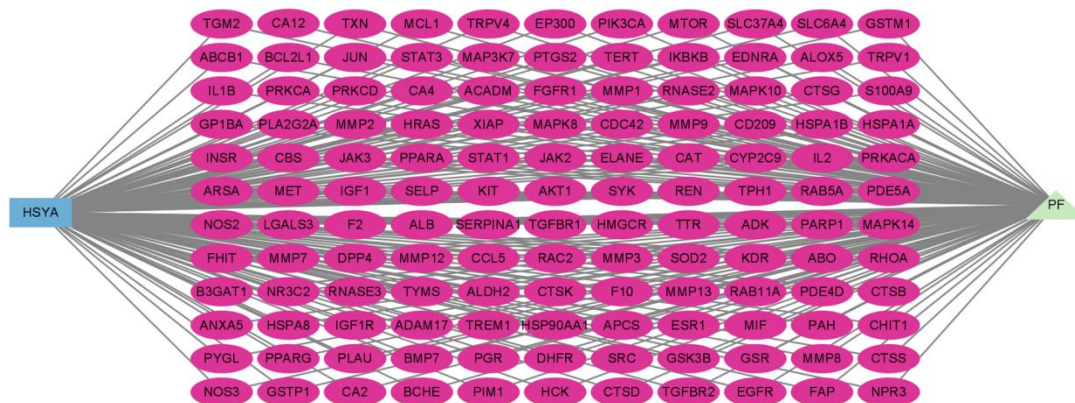


图 2 HSYA-共同靶点-PF 的关系网络图

Fig. 2 Relationship network diagram of HSYA-common target-PF

2.1.4 PPI 的网络构建

利用 STRING 数据库进行潜在作用靶点的 PPI 分析, 并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建 PPI 网络, 该网络包含 112 个节点和 570 条边, 节点颜色越深表示该靶点在网络中越重要 (见图 3)。利用 Cytoscape3.9.1 软件对 PPI 网络参数分析, 获得度值排前 30 位的核心靶点 (见表 1)。

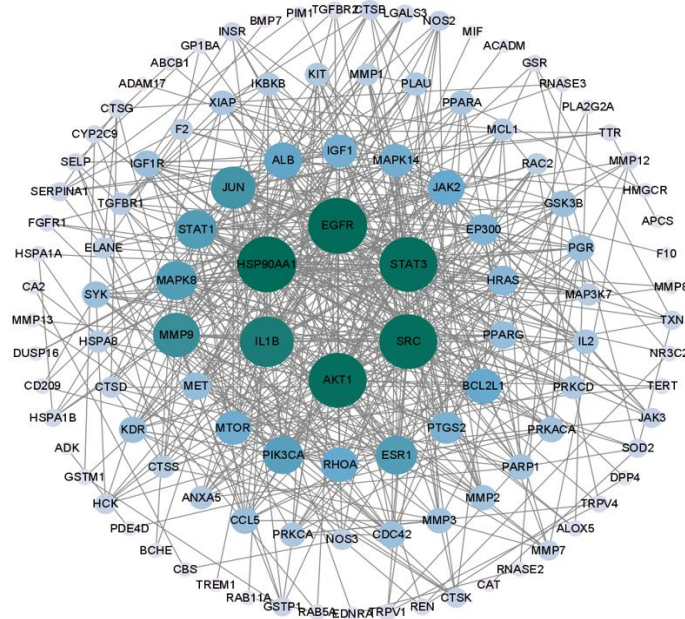


图 3 HSYA 治疗 PF 潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of potential targets of HSYA in the treatment of PF

表 1 HSYA 治疗 PF 的核心靶点

Table 1 The core targets of HSYA treatment for PF

| 靶点 Target | 度值 Degree | 中介系数 Betweenness | 接近度 Closeness |
|--------------|--------------|------------------|---------------|
| EGFR | 41 | 0.103 316 | 0.572 165 |
| HSP90AA1 | 41 | 0.110 035 | 0.533 654 |
| STAT3 | 40 | 0.072 369 | 0.536 232 |
| AKT1 | 40 | 0.074 402 | 0.569231 |
| SRC | 40 | 0.075 243 | 0.531 100 |
| IL1B | 36 | 0.124 833 | 0.554 999 |
| MMP9 | 30 | 0.101 629 | 0.533 654 |

| | | | |
|--------|----|------------|-----------|
| JUN | 28 | 0.029 692 | 0.518 692 |
| STAT1 | 25 | 0.013 189 | 0.491 150 |
| MAPK8 | 25 | 0.039 115 | 0.497 758 |
| ESR1 | 25 | 0.030 111 | 0.518 692 |
| PIK3CA | 24 | 0.009 020 | 0.451 219 |
| ALB | 22 | 0.150 322 | 0.500 000 |
| BCL2L1 | 21 | 0.026 252 | 0.474 359 |
| JAK2 | 21 | 0.007 037 | 0.468 354 |
| RHOA | 21 | 0.024 856 | 0.480 519 |
| MTOR | 20 | 0.004 653 | 0.454 918 |
| MAPK14 | 19 | 0.032 665 | 0.470 339 |
| IGF1 | 19 | 0.014 642 | 0.482 609 |
| PTGS2 | 18 | 0.058 327 | 0.497 758 |
| EP300 | 17 | 0.009 864 | 0.464 435 |
| HRAS | 16 | 0.004 179 | 0.438 735 |
| PPARG | 14 | 0.001 818 | 0.460 581 |
| MET | 14 | 0.003 824 | 0.453 061 |
| KDR | 13 | 0.003 410 | 0.445 783 |
| GSK3B | 13 | 0.003 707 | 0.435 294 |
| CCL5 | 13 | 0.022 125 | 0.449 393 |
| CDC42 | 13 | 0.002 601 | 0.444 000 |
| SYK | 13 | 0.004 0254 | 0.400 722 |

2.1.5 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

经 GO 分析获得 719 个条目，生物进程（biological process, BP）、细胞组分（cellular component, CC）、分子功能（molecular function, MF）分别为 530 个、70 个、119 个。依据 *P* Value 排序，选取 BP、CC、MF 排名前 10 位的条目可视化生成柱状图（见图 4）。BP 条目主要涉及细胞凋亡过程的负调控、蛋白激酶 B 信号传导的正调控、蛋白质磷酸化等；MF 条目主要涉及酶结合、相同的蛋白质结合、ATP 结合、肽酶的活动等；CC 条目主要涉及 ficolin-1、细胞外区域、质膜、聚焦粘附等。KEGG 通路富集分析得到 160 条通路，根据富集基因数目由多到少进行降序排列，并选取前 20 条通路绘制气泡图，表明 HSYA 可能通过调节 PI3K-AKT、Ras、MAPK 等信号通路来发挥抗 PF 的作用（见图 5）。将排名靠前的 30 个靶点、KEGG 得到的前 20 条信号通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建“疾病-药物-靶点-通路”网络，该网络包括 52 个节点，282 条边（见图 6）。

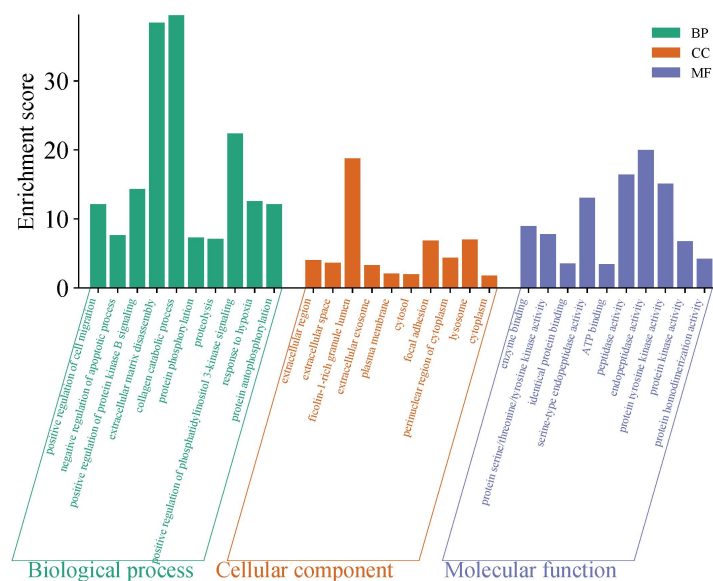


图 4 HSYA 治疗 PF 相关靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of PF-related targets treated by HSYA

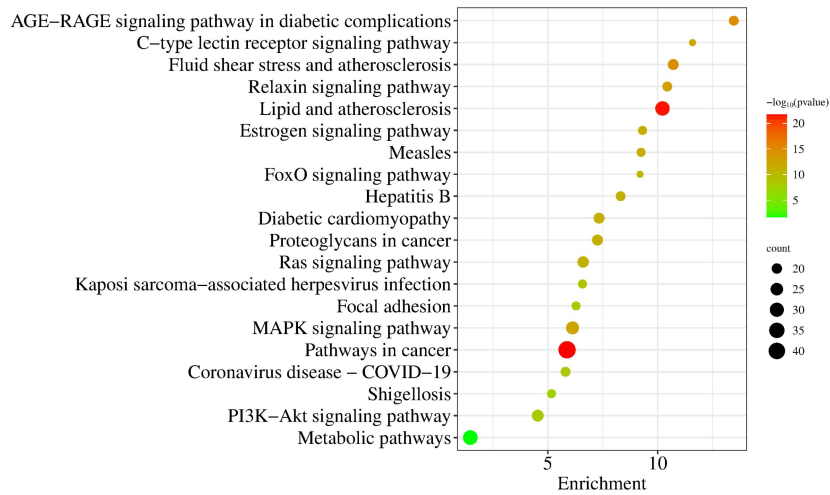


图5 HSYA 治疗 PF 潜在靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of HSYA in the treatment of PF

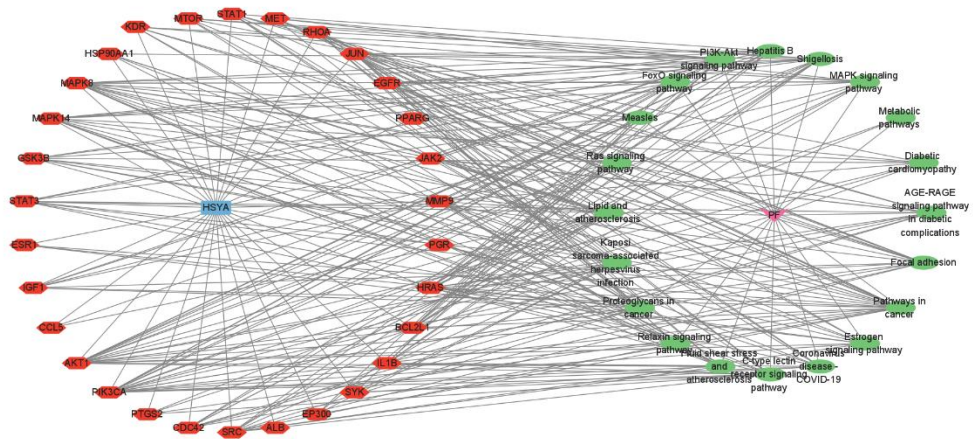


图6 HSYA 治疗 PF 的“疾病-药物-通路-靶点”网络

Fig. 6 The “disease-drug-pathway-target” network of HSYA in the treatment of PF

注：橙色六边形节点代表靶点；绿色椭圆形节点代表通路。

Note: The orange hexagonal node represents the target; Green oval nodes represent pathways.

2.2 动物实验结果

2.2.1 肺组织病理学变化

肺炎的病变见图 7，对照组的肺脏结构没有明显病变；模型组的肺泡间隔增厚，肺泡中的中性粒细胞、巨噬细胞浸润增加；治疗组的肺泡损伤程度均明显减轻。肺纤维化的病变见图 8，对照组的肺泡结构完整清晰；模型组的肺间质被大量细胞外基质充填，有的肺泡腔出现蓝色胶原纤维；HSYA 及地塞米松可明显抑制胶原蛋白在肺部积聚。

图 7 HSYA 对肺纤维化小鼠肺泡炎的影响 (HE, ×400)

Fig. 7 The effect of HSYA on alveolar inflammation in mice with pulmonary fibrosis (HE, ×400)

图 8 HSYA 对肺纤维化小鼠胶原沉积的影响 (Masson, ×400)

Fig. 8 The effect of HSYA on collagen deposition in mice with pulmonary fibrosis (Masson, ×400)

2.2.2 肺组织 HYP 含量

与对照组相比, 模型组肺组织中的 HYP 含量明显增多 ($P<0.01$)。给药干预后, 相较于模型组, HSYA 能够明显减少小鼠肺组织中 HYP 含量表达 ($P<0.05$), 如表 2 所示。

表 2 肺组织中的 HYP 含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Determination of HYP content in lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 Group | HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$) |
|-------------|---------------------------------|
| Con | 0.48±0.02 |
| Mod | 0.96±0.05 ^{##} |
| HSYA | 0.72±0.03 ^{**} |
| Dex | 0.79±0.04 ^{**} |

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

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

2.2.3 免疫组化和 Western blot 检测 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达

与对照组相比, 模型组肺组织中的 PI3K、AKT、mTOR 表达明显增多 ($P<0.01$)。给药干预后, 相较于模型组, HSYA 能够明显减少小鼠肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 表达 ($P<0.05$), 如图 9、图 10、表 3、表 4 所示。

图 9 免疫组化测定小鼠肺组织 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达 (×400)

Fig. 9 Immunohistochemical determination of PI3K/AKT/mTOR pathway related protein expression in mouse lung tissue(×400)

表 3 免疫组化检测各组小鼠肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达的平均光密度统计 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Average optical density statistics of PI3K, AKT, and mTOR protein expression in lung tissue of mice in each group by IHC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 Group | PI3K | AKT | mTOR |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Con | 1.38±0.12 | 1.21±0.16 | 0.67±0.13 |
| Mod | 6.36±0.25 ^{##} | 5.80±0.24 ^{##} | 5.76±0.22 ^{##} |
| HSYA | 4.52±0.16 ^{**} | 3.76±0.18 ^{**} | 3.64±0.14 ^{**} |
| Dex | 5.63±0.21 [*] | 4.50±0.23 [*] | 4.53±0.11 [*] |

图 10 各组小鼠肺组织中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白免疫印迹结果

Fig. 10 Immunoblot results of PI3K/AKT/mTOR pathway proteins in lung tissue of mice in each group

表 4 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Relative expression of PI3K/AKT/mTOR pathway related proteins in lung tissue of mice in each group by Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 Group | p-PI3K/PI3K | p-AKT/AKT | p-mTOR/mTOR |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Con | 0.37±0.01 | 0.38±0.01 | 0.31±0.01 |
| Mod | 1.06±0.03 ^{##} | 1.12±0.06 ^{##} | 1.02±0.06 ^{##} |
| HSYA | 0.52±0.03 ^{**} | 0.55±0.03 ^{**} | 0.48±0.01 ^{**} |
| Dex | 0.64±0.04 ^{**} | 0.66±0.03 ^{**} | 0.58±0.02 ^{**} |

3 讨论与结论

PF 是一种进行性的间质性肺部疾病，以成纤维细胞的过度增殖和细胞外基质沉积为特征，引起肺结构的破坏和纤维化病灶的形成^[1]。HSYA 已被证明对心血管系统、脑缺血损伤、抗肿瘤和抗组织器官纤维化等方面都有药理作用。有研究表明 HSYA 可能通过调控

PI3K/AKT/mTOR 和 ERK/MAPK 通路来抑制 LPS 介导的 A549 和 H1299 细胞的增殖、迁移及侵袭^[12]。张亚丹等发现 HSYA 可抑制 TGF- β 1 诱导 NIH/3T3 细胞与 PF 相关的信号转导, 呈现明显的量效关系, 其作用靶点可能为 TGF- β RII^[13]。但目前关于 HSYA 在 PF 中的作用机制尚未完全阐明。

本研究首先利用网络药理学相关数据库获取 HSYA、PF 的相关靶点, 接着通过 STRING 数据库对 132 个潜在靶点进行了 PPI 分析, 然后利用 Cytoscape 3.9.1 软件制作 PPI 网络, 进行网络拓扑学分析, 选择度值排前 30 位的靶点作为核心靶点, 发现 AKT1、MTOR 等关键蛋白排名靠前, 提示与 HSYA 治疗 PF 的关系密切。

GO 功能富集分析结果显示, HSYA 治疗 PF 的过程中涉及的 MF、CC、BP 广泛, 表明 HSYA 抗 PF 是多靶点、多途径的复杂过程。KEGG 富集分析显示, HSYA 可能主要通过调节 PI3K-AKT、Ras、MAPK 等信号通路来延缓 PF 的发展。

PI3K/AKT 信号通路代表纤维化发生过程中的一个关键信号传导节点, 对开发新的抗纤维化策略具有潜在的意义^[14]。AKT 是位于 PI3K 下游的靶蛋白, PI3K 的激活会引起 AKT 磷酸化^[15]。AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在细胞生长、增殖、代谢等多种细胞功能中起重要作用^[16]。活化的 AKT 作用于 mTOR、NF- κ B、FoxO3a 等下游靶蛋白, 对细胞增殖、自噬、凋亡等多个过程起调控作用^[17]。因此, 根据网络药理学预测结果及相关文献研究, 本文选取 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白进行验证。实验结果显示, 经 HSYA 治疗后, 肺纤维化小鼠的肺泡炎及肺纤维化程度得到明显减轻, 肺组织的 HYP 含量显著降低 ($P<0.01$); 肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$), 表明 HSYA 可能通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来抑制 PF 的发展, 从而达到治疗的作用。

综上所述, 本研究利用网络药理学技术与体内实验, 证实 HSYA 能够减轻肺纤维化小鼠的肺泡炎及肺纤维化程度, 可能与调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

参考文献

- 1 Deng Q,Zhang JJ,Gao YQ,et al.MLN4924 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the early inflammatory process[J].Am J Transl Res,2017,9:1810-1821.
- 2 Shu YM,Ma M,Pan XX,et al.Cobalt protoporphyrin-induced nano-self-assembly for CT imaging,magnetic-guidance,and antioxidative protection of stem cells in pulmonary fibrosis treatment[J].Bioact Mater,2022,21:129-141.
- 3 Roach KM,Castells E,Dixon K,et al.Evaluation of pirfenidone and nintedanib in a human lung model of fibrogenesis[J].Front Pharmacol,2021,12:679388.

- 4 Jiang SJ, Shi Z, Li CY, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury by suppressing macrophage activation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 2595-2608.
- 5 Pan RY, Zhang YD, Zheng M, et al. Hydroxysafflor yellow A suppresses MRC-5 cell activation induced by TGF-beta1 by blocking TGF-beta1 binding to TbetaRII[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 264.
- 6 Li XY, Piao YH, Song YL, et al. The effect of hydroxysafflower yellow pigment A on airway inflammation in asthmatic mice through AMPK/NF- κ B/NLRP3[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2022, 33: 594-597.
- 7 Luan ZH, Wei YM, Chang YX. Protective effects of hydroxysafflower yellow A on pulmonary fibrosis in mice[J]. *Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志)*, 2022, 38: 555-558.
- 8 World Federation of Chinese Medicine Societies. Network pharmacology evaluation method guidance-draft[J]. *World J Tradit Chin Med(世界中医药)*, 2021, 16: 527-532.
- 9 Wang ZY, Wang X, Zhang DY, et al. Traditional Chinese medicine network pharmacology: development in new era under guidance of network pharmacology evaluation method guidance[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47: 7-17.
- 10 Luan ZH, Wei YM, Liu BW, et al. Establishment on ICR mouse model of pulmonary fibrosis induced by nasal instillation of bleomycin[J]. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med(山西中医学院学报)*, 2017, 8: 18-21.
- 11 Chen X, Li ZP, He XW, et al. Isorhynchophylline alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating ERK/p27Kip1 signaling pathway in mice[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2022, 34: 750-760.
- 12 Jiang M, Zhou LY, XU N, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibited lipopolysaccharide-induced non-small cell lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by suppressing the PI3K/AKT/mTOR and ERK/MAPK signaling pathways[J]. *Thorac Cancer*, 2019, 10: 1319-1333.
- 13 Zhang YD, Pan RY, Zang BX, et al. The inhibition of HSYA on the TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis associated signal pathway[J]. *J Cardiovasc Pulm Dis(心肺血管病杂志)*, 2016, 35: 145-149.
- 14 Wang JC, Hu KL, Cai XY, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 18-32.
- 15 Wang SQ, Liu D, Ye XC, et al. Pharmacodynamic material basis and anti-inflammatory mechanism of *Chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju based on UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with network pharmacology[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47: 4190-4201.
- 16 Yang Y, Tan XY, Qiu ZP, et al. Molecular mechanism of *Eriobotryae Folium* against triple-negative breast cancer

based on network pharmacology and experimentation[J].Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2024,44:408-416.

17 Zhong JT,Ding S,Zhang XY,et al.To investigate the occurrence and development of colorectal cancer based on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J].Front Biosci(Landmark Ed),2023,28:37.

收稿日期: 2024-06-07 接受日期:

基金项目: 山西省中医药管理局科研项目(2024ZYB038); 山西省中医药管理局方药配伍及功用重点研究室项目(zyyyjs2024023); 山西省教育厅研究生教改项目(2023JG159); 山西中医药大学研究生教改项目(2023JG005)

*通信作者 E-mail: llzh4215@163.com