

· 临床论著 ·

基于网络药理学的黄芪治疗冠心病机制研究

彭 瑜^{1,2} 王永祥^{1,2} 秦红岩³ 臧凯宏⁴

摘要 **目的** 基于网络药理学探讨黄芪治疗冠心病的机制。**方法** 应用 TCMSP、DRAR-CPI、Unipro-tKB、GeneCards 数据库预测黄芪主要活性成分及其治疗冠心病的作用靶点。应用 Cytoscape 软件,构建黄芪—冠心病疾病靶点群网络;并对靶点 GO 富集分析和 KEGG 信号通路进行分析。**结果** 黄芪对冠心病发挥治疗作用涉及 19 个活性成分和 107 个潜在作用靶点,其中主要包括调节凝血过程靶点(PROC、VDR、F9、ITGAL)、脂代谢调控靶点(RXRA、PLA2G2A、PPARD、PPARA、NR1H4)以及氧化应激调控靶点(GSTT1、SOD1)等。GO 分析发现黄芪参与调控甾体激素、细胞对脂多糖反应、血管舒张的正向调节等生物学过程;KEGG 分析结果显示黄芪参与调控补体和凝血级联反应、胰岛素抵抗、缺氧诱导因子 1 信号通路、细胞色素 P450 药物代谢等信号途径。**结论** 黄芪治疗冠心病的作用机制主要包括凝血、脂代谢及抗氧化损伤过程调节。本研究为黄芪治疗冠心病的基础与临床研究提供一定参考。

关键词 黄芪;冠心病;网络药理学;凝血过程;脂代谢;氧化损伤

Study on Mechanism of Astragalus Membranaceus in Treatment of Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology

PENG Yu^{1,2}, WANG Yong-xiang^{1,2}, QIN Hong-yan³, and ZANG Kai-hong⁴ 1 Department of Heart Center, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou (730000); 2 Key Laboratory of Cardiovascular Diseases of Gansu Province, Lanzhou (730000); 3 Department of Pharmacy, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou (730000); 4 College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou (730000)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *astragalus membranaceus* in the treatment of coronary heart disease (CHD) based on network pharmacology. **Method** By means of TCMSP, DRAR-CPI, UniproKB, and GeneCards database, the main active components of *astragalus membranaceus* and the target of the treatment of coronary heart disease were predicted. The target group network of *astragalus membranaceus* and coronary heart disease was constructed by Cytoscape software. Finally, the target GO enrichment analysis and the KEGG signal path were analyzed. **Result** There were 19 active components and 107 potential targets in *astragalus membranaceus* for CHD, which mainly involved regulating coagulation process (PROC, VDR, F9, ITGAL), lipid metabolism (RXRA, PLA2G2A, PPARD, PPARA, NR1H4), and anti-oxidative damage (GSTT1, SOD1). GO analysis showed that *astragalus membranaceus* was involved in the regulation of steroid hormone mediated, cell response to lipopolysaccharide, positive regulation of vasodilation and so on. KEGG analysis showed that *astragalus membranaceus* was involved in the regulation of complement and coagulation cascade reaction, insulin resistance, hypoxia-inducing factor 1 signaling pathway, cytochrome P450 drug metabolic pathway and so on. **Conclusion** The mechanism of *astragalus membranaceus* in treating CHD mainly includes coagulation, lipid regulation and anti-oxygen injury process. This study provides references for the treatment of coronary heart disease with as-

基金项目:科技部国家重点研发计划项目(No. 2018YFC1311505);甘肃省心血管疾病重点实验室建设项目(No. 1206RTSA025);2020 兰州大学中央高校基本科研专项资金(No. lzujbky-2020-kb18);甘肃省心血管病临床医学研究中心(No. 甘科技[2018]20号);重大疑难病中西医临床协作试点项目(No. 国中医药办政发[2018]3号)

作者单位:1. 兰州大学第一医院心脏中心(兰州 730000); 2. 甘肃省心血管疾病重点实验室(兰州 730000); 3. 兰州大学第一医院药剂科(兰州 730000); 4. 甘肃中医药大学药学院药理教研室(兰州 730000)

通讯作者:臧凯宏, Tel: 0931-8356552, E-mail: zangkh@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200725. 292

tragalus membranaceus.

KEYWORDS *astragalus membranaceus*; coronary heart disease; network pharmacology; coagulation process; lipid metabolism; anti-oxidative damage

冠心病是世界范围内发病率和病死率最高的慢性病之一,动脉粥样硬化是冠心病发病的主要病理基础^[1]。氧化应激、脂代谢紊乱和炎症是动脉粥样硬化的主要病理机制^[2]。冠心病可归属于中医学胸痹、心痛范畴^[3],传统中药方剂如通脉活血汤^[4]、养心汤^[5]等在冠心病治疗中显示了较好的疗效,而黄芪则是上述方剂的主要成分。黄芪具有补益心气的作用,现代研究发现黄芪具有扩张血管、降低血小板活化程度及增强心肌收缩力等药理作用^[6]。目前,黄芪治疗冠心病的临床功效已有报道^[7],但对于其有效成分、药物作用靶点和信号通路相关研究不足。本研究基于网络药理学研究方法,通过筛选黄芪有效活性成分并分析其治疗冠心病靶点和调控的信号通路,分析作用机制,为相关研究提供科学依据。

资料与方法

1 黄芪主要活性成分数据库构建 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>),输入关键词“黄芪”,在搜索的结果中,选择口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug-like, DL) ≥ 0.18 作为筛选条件,将所筛选的化合物作为黄芪主要活性成分,信息保存为 mol2 格式。

2 黄芪治疗冠心病靶点筛选 登陆 DRAR-CPI 服务器(<http://cpi.bio-x.cn/drar/>)上传黄芪活性成分的 mol2 格式文件,选取标准分数(Z-score) < -0.5 的靶点作为候选药物靶点。进而利用 Uniprot 数据库的 UniprotKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) 搜索功能,导入黄芪靶点的蛋白质结构数据库(protein data bank, PDB) ID 号,限定物种为人,经检索和转化操作得到黄芪活性成分的基因靶点。

通过在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/#>) 输入关键词“coronary disease”和“coronary heart disease”搜索已报道的与冠心病相关的基因,去除重复基因和假阳性基因,将挖掘到的冠心病相关基因和药物靶点基因映射筛选出共同靶点,从而得到黄芪治疗冠心病的作用靶点。

3 成分—作用靶点网络和成分—作用靶点—通路网络构建与分析 将黄芪的活性成分和治疗冠心病作用靶点导入 Cytoscape Version 3.4.0 软件,构建

黄芪—冠心病靶点群网络,根据图中化合物的自由度及介数分析,来确定黄芪治疗冠心病的潜在化合物的名称。依据节点的大小与节点度的高低,自由度及介数值最终确定排名靠前的化合物,这些排名靠前的化合物可能是黄芪治疗冠心病的主要物质基础。

4 基因本体数据库(gene ontology, GO)生物富集分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析 GO 数据库是一个在生物信息学领域中广泛使用的数据库,其主要功能包括:细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)和生物过程(biological process, BP)。利用 DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>),对黄芪治疗冠心病的作用靶点进行基因本体论生物过程富集分析(CC、MF、BP),设定错误风险率 < 0.05 筛选出排名靠前的生物过程(CC、MF、BP),用 R3.4.0 软件和相关软件包作图。再通过 KEGG 信号通路富集分析,研究药物靶点主要信号通路。物种限定为人类,阈值设定为 $P < 0.05$,按涉及的靶点数目多少进行排序,筛选排名靠前的生物过程或通路,用 R3.4.0 软件和相关软件包绘图。

5 分子对接验证 为了明确黄芪生物活性成分和关键靶标之间的结合活性,本研究采用分子对接验证。首先利用 DS4.0 软件构建关键靶标的分子对接模型,进而与黄芪有效成分进行分子对接,最终结果 LibDockScore > 105 分,认为对接活性较好。

结果

1 黄芪治疗冠心病活性成分筛选(表 1) 共获得 19 个治疗冠心病活性成分,具体成分名称及分子序列号见表 1。

2 黄芪治疗冠心病靶点筛选(表 2) 共筛选出黄芪靶基因 f339 个,冠心病途径所得靶基因 946 个,将 2 种相关基因映射,共发现 107 个共同基因,确定为黄芪治疗冠心病的靶基因,将节点度排名前十的靶点列入表 2 中。其中,维生素 K 依赖蛋白 C 前体/抗凝蛋白 C(vitamin K-dependent protein C, PROC)、维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)、凝血因子 IX(coagulation factor IX, F9)、整合素 α L(integrin subunit alpha L, ITGAL) 参与凝血调控过程;人视网

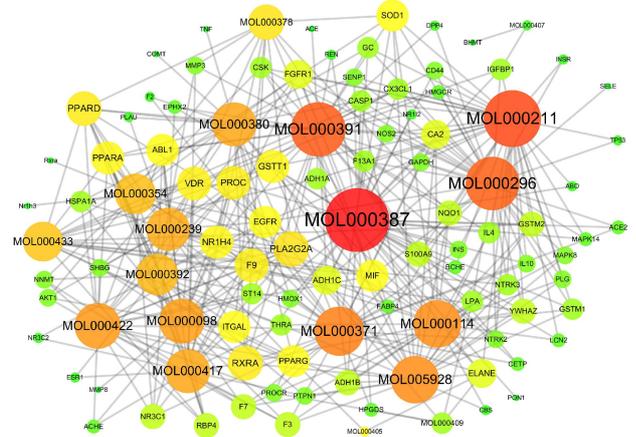
表 1 黄芪主要生物活性成分

序号	活性成分	分子序列号
1	vanillic#Acid (香草酸)	MOL000114
2	quercetin (槲皮素)	MOL000098
3	ononin (芒柄花苷)	MOL000391
4	kaempferol (山柰酚)	MOL000422
5	jaranol (华良姜素)	MOL000239
6	isorhamnetin(异鼠李素)	MOL000354
7	isoferulic Acid (异阿魏酸)	MOL005928
8	hederagenin (常春藤皂苷元)	MOL000296
9	formononetin (芒柄花黄素)	MOL000392
10	folic Acid (叶酸)	MOL000433
11	calycosin (毛蕊异黄酮)	MOL000417
12	bifendate (联苯双酯)	MOL000387
13	betulinic Acid (桦木酸)	MOL000211
14	astragaloside IV (黄芪甲苷IV)	MOL000409
15	7-O-Methylisomucronulatol (7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇)	MOL000378
16	3,9-Di-O-methylnissolin (美迪紫檀素)	MOL000371
17	astrapterocarpan (黄芪紫檀烷苷)	MOL000380
18	astragaloside VI (黄芪甲苷VI)	MOL000407
19	astragaloside III(黄芪甲苷III)	MOL000405

酸 X 受体 α (retinoid X receptor alpha, RXRA)、磷脂酶 A2-II A (phospholipase A2 group II A, PLA2G2A)、过氧化物酶增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator activated receptor delta, PPAR δ)、过氧化物酶增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR α)、胆汁酸受体 (nuclear receptor subfamily 1 group H member 4, NR1H4) 与脂质代谢相关; 谷胱甘肽硫转移酶 T1 (glutathione S-transferase theta 1, GSTT1) 与抗氧化损伤调节相关。

3 黄芪活性成分—冠心病治疗靶点网络构建 (图 1) 将上述黄芪作用靶点导入 Cytoscape 软件, 构建黄芪—冠心病靶点群网络。图中共有 126 个节点, 416 条边。其中 MOL 节点为黄芪活性成分共有 19 个。依据节点的大小和节点度的高低排名, 靠前的

活性成分有 MOL000387 (联苯双酯), 其次是 MOL000211 (桦木酸), MOL000391 (芒柄花苷), MOL000298 (常春藤皂苷元), 可能是黄芪治疗冠心病的主要成分。



注: MOL 节点代表黄芪主要活性成分, 其他节点代表冠心病作用靶点; 节点的大小代表成分和靶点的作用数量; 直线代表黄芪成分与疾病靶点相互作用。

图 1 黄芪活性成分—冠心病治疗靶点网络

4 GO 富集分析 (图 2) CC 分析主要包括细胞外间隙 (extracellular space)、胞外区 (extracellular region)、胞外囊泡 (extracellular exosome)、受体复合物 (receptor complex); MF 分析主要包括甾体激素受体活性 (steroid hormone receptor activity)、RNA 聚合酶 II 转录因子活性 (RNA polymerase II transcription factor activity) 酶结合 (enzyme binding)、锌离子结合 (zinc ion binding); BP 分析主要包括甾体激素介导的信号通路 (steroid hormone mediated signaling pathway)、细胞对脂多糖的反应 (cellular response to lipopolysaccharide)、血管舒张的正向调节 (positive regulation of vasodilation)、细胞内受体信号通路 (intracellular receptor signaling pathway)。

表 2 黄芪治疗冠心病的主要靶点

序号	靶点名称	全球蛋白资源数据库编号	基因编号
1	retinoid X receptor alpha (RXRA)	P19793	6256
2	phospholipase A2 group II A (PLA2G2A)	P14555	5320
3	peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR δ)	Q03181	5467
4	vitamin K-dependent protein C (PROC)	P04070	5624
5	vitamin D receptor (VDR)	P11473	7421
6	coagulation factor IX (F9)	P00740	2158
7	peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α)	Q07869	5465
8	nuclear receptor subfamily 1 group H member 4 (NR1H4)	Q96R11	9971
9	glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)	P30711	2952
10	integrin subunit alpha L (ITGAL)	P20701	3683

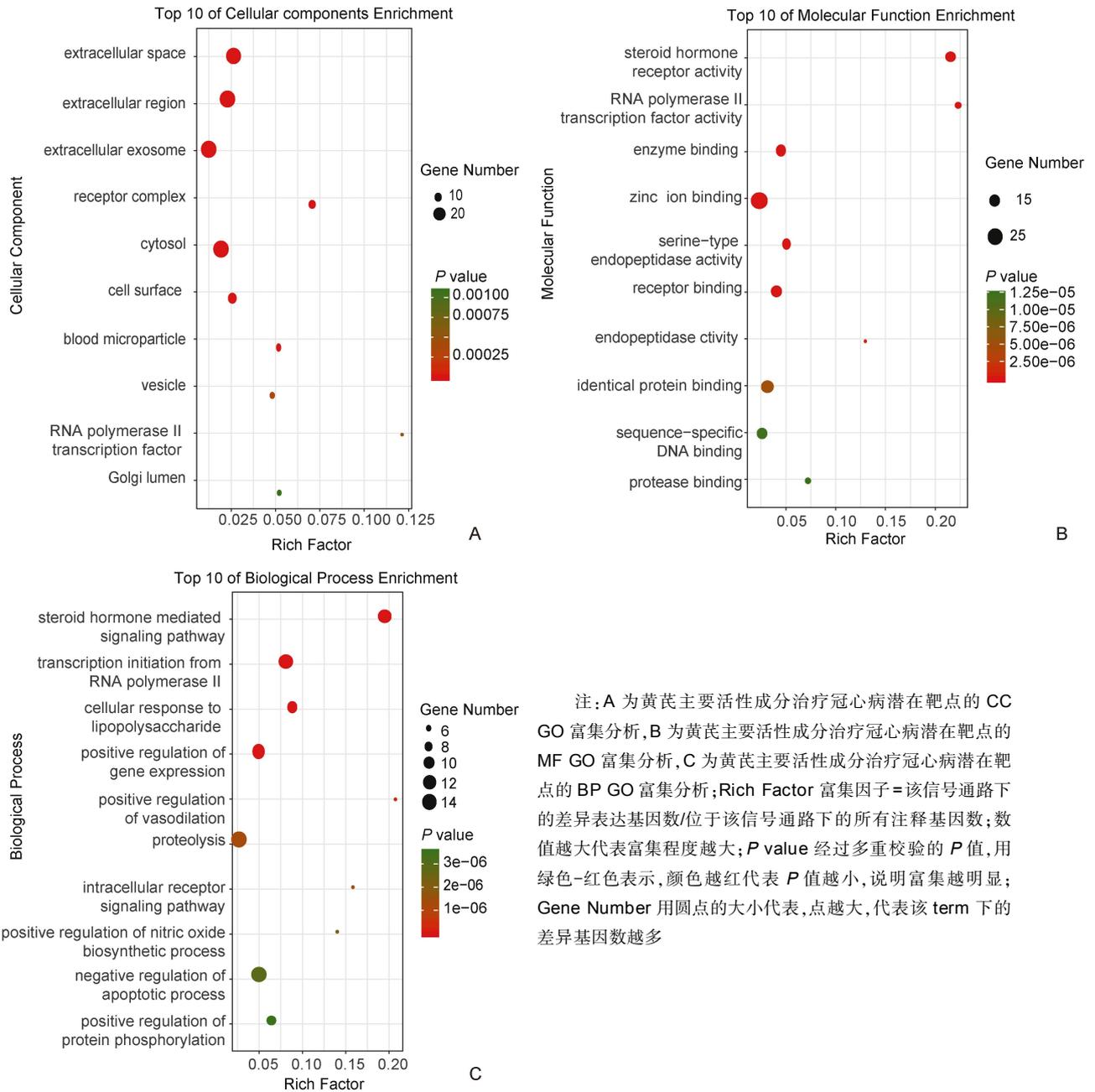


图 2 黄芪主要活性成分治疗冠心病潜在靶点的细胞成分 GO 富集分析

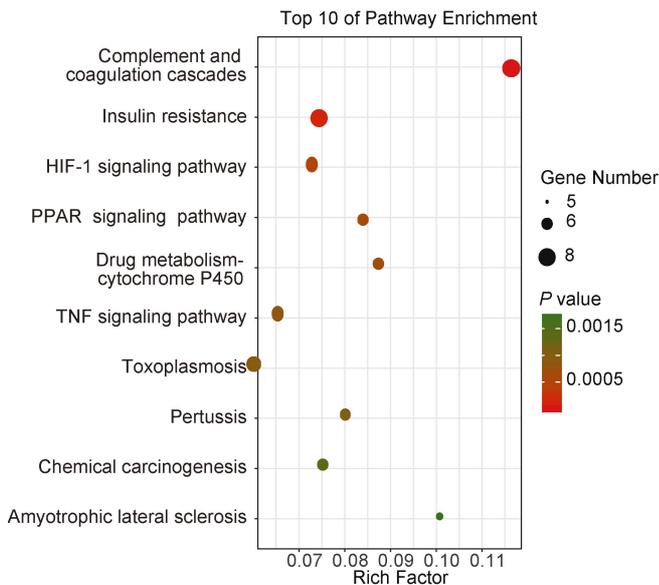
注: A 为黄芪主要活性成分治疗冠心病潜在靶点的 CC GO 富集分析, B 为黄芪主要活性成分治疗冠心病潜在靶点的 MF GO 富集分析, C 为黄芪主要活性成分治疗冠心病潜在靶点的 BP GO 富集分析; Rich Factor 富集因子 = 该信号通路下的差异表达基因数/位于该信号通路下的所有注释基因数; 数值越大代表富集程度越大; P value 经过多重校验的 P 值, 用绿色-红色表示, 颜色越红代表 P 值越小, 说明富集越明显; Gene Number 用圆点的大小代表, 点越大, 代表该 term 下的差异基因数越多

5 KEGG 信号通路分析(图 3) 共筛选出 19 条与黄芪治疗冠心病相关的通路, 主要包括补体和凝血级联反应 (complement and coagulation cascade)、胰岛素抵抗 (insulin resistance)、缺氧诱导因子 1HIF-1 信号通路(HIF-1signaling pathway)、细胞色素 P450 药物代谢通路(Drug metabolism-cytochrome P450)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)等。

6 成分—靶点—通路网络(图 4) 采用 Cytoscape 软件构建黄芪有效化学成分—靶点蛋白—通路网络模型。黄芪 19 种化学成分和 107 个共同作用靶点以

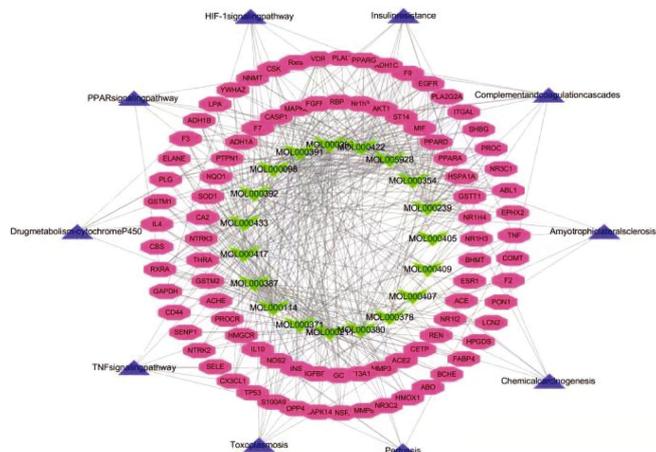
及排名前十信号通路间的关联关系见图 4。从图中可得知黄芪有效活性成分作用治疗冠心病的靶点分布于不同的代谢通路, 具有多成分、多靶点、多途径的特性。

7 分子对接验证(图 5) PPARA 与紫檀烷苷和芒柄花苷有较好的结合活性; VDR 与联苯双酯和芒柄花苷具有较好的结合活性; NR1H4 与桦木酸有较好的结合活性; PROC 与毛蕊异黄酮有较好的结合活性; F9 与美迪紫檀素有较好的结合活性; RXRA21 与山柰酚有较好的结合活性; PPARD 与香草酸有较好的结合活性。黄芪主要作用靶标和有效活性成分间具有较好的结合活性, 存在紧密的功能联系。



注:Rich Factor 富集因子=该信号通路下的差异表达基因数/位于该信号通路下的所有注释基因数,数值越大代表富集程度越大; P value 经过多重校验的 P 值,用绿色-红色表示,颜色越红代表 P 值越小,说明富集越明显; Gene Number 用圆点的大小代表,点越大,代表该 term 下的差异基因数越多。

图 3 黄芪主要活性成分治疗冠心病潜在靶点的 KEGG 信号通路

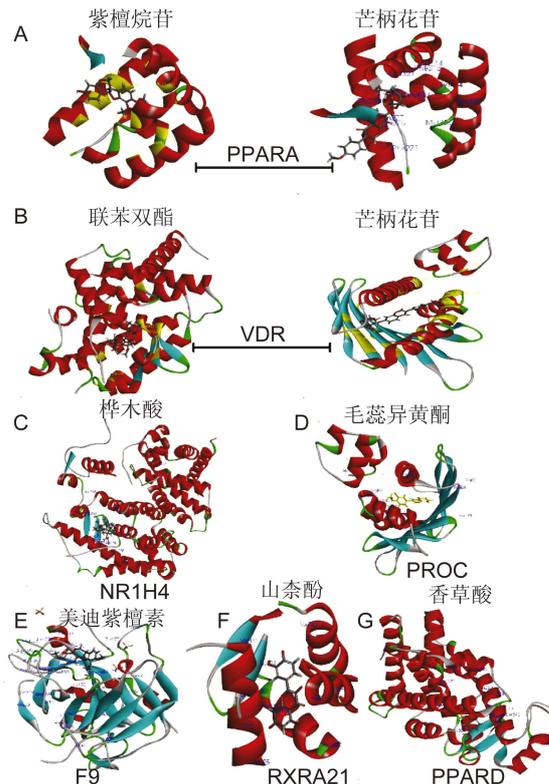


注:图中蓝色节点代表信号通路,红色节点代表作用靶点,绿色节点代表黄芪生物活性成分

图 4 黄芪有效成分—作用靶点—信号通路图

讨论

黄芪是临床中广泛使用的补益类中草药之一^[8]。药理学研究和临床实践证实黄芪具有免疫调节、抗氧化、抗癌、抗菌、抗病毒等多种生物学功能^[9,10]。研究显示,黄芪的主要生物活性成分对糖尿病和冠心病具有较好的疗效^[8],冠心病相关中成药中黄芪也是主要成分之一,因此研究黄芪的化学成分和其治疗冠心病的



注:图为各活性成分与作用靶蛋白结构的三维模拟结合

图 5 分子对接结果

机制具有重要意义。

现代研究显示,黄芪的化学成分主要有黄芪多糖、黄酮类及皂苷类等^[11]。在冠心病和缺血性心脏病中发挥治疗作用的有效成分包括黄芪甲苷^[12]、黄芪多糖^[13]、毛蕊异黄酮^[14]、四氢叶酸^[15]等。本研究建立的黄芪活性成分—冠心病治疗靶点网络中,除上述已报道成分外,联苯双酯、梓木酸、芒柄花苷、常春藤皂苷元、美迪紫檀素等也具有治疗冠心病的作用。这些活性成分靶点数目和重要靶点分子对接结果大于 5,提示这些成分是黄芪治疗冠心病的主要活性物质。本研究建立的黄芪活性成分—治疗冠心病靶点网络中,按照与成分的相互作用数目,黄芪作用的主要靶蛋白主要包括以下 3 类:(1) 脂代谢相关蛋白 (RXRA、PLA2G2A、PPARD、PPARA、NR1H4);(2) 凝血相关蛋白 (PROC、VDR、F9、ITGAL);(3) 抗氧化损伤相关蛋白 (GSTT1、SOD1)。网络分析结果提示黄芪主要通过调节凝血过程和血小板活化、脂代谢和抗氧化损伤途径治疗冠心病。

KEGG 信号通路富集分析发现,共有 19 条信号通路与黄芪治疗冠心病作用相关,主要包括:凝血和补体级联反应、胰岛素抵抗、HIF-1 信号通路和细胞色素

P450 代谢通路等。该结果与成分—靶点网络中分析所获得的黄芪作用主要靶蛋白结果比较一致,提示黄芪可能通过以上信号通路发挥冠心病治疗作用。冠心病患者血液高凝状态、内皮损伤和斑块破裂、凝血过程激活及其所致的血管栓塞,在急性冠脉综合征的发生起到重要作用^[16],因此预防和治疗血栓是冠心病治疗的关键手段。PLA2 反应是花生四烯酸从磷脂中产生的重要途径,研究表明 PLA2 和细胞色素 P450 的联合作用是心肌损伤的原因,特异性阻断 PLA2 和细胞色素 P450 是心肌治疗新的策略^[17]。此外,研究显示冠心病患者存在明显的脂质过氧化损伤,其损伤的严重程度与体内脂质代谢以及抗氧化酶活性水平有关^[18]。HIF-1 是一种缺氧诱导的 DNA 结合蛋白,在心肌缺血缺氧时可诱导心肌 HIF-1 α 的表达增加,可有效保护心肌并改善心肌细胞的缺血缺氧^[19]。本研究结果提示,黄芪具有调节凝血、脂代谢及抗氧化反应等作用。此外,黄芪主要成分桦木酸是 PLA2 的天然抑制剂^[20],PLA2 是花生四烯酸产生的主要途径,也是决定后续血小板活化的重要上游代谢酶^[17],因此推测桦木酸可能是黄芪治疗冠心病的主要活性成分之一。

综上所述,黄芪通过多成分、多靶点、多途径治疗冠心病。成分—靶点网络分析和 KEGG 信号通路富集结果表明:黄芪主要通过抗血栓(调节凝血过程)、抗氧化损伤、调节脂代谢等途径实现心肌保护和冠心病治疗作用。本研究利用网络药理学分析了黄芪在治疗冠心病中的作用机制,为黄芪治疗冠心病提供了一定依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Joseph P, Leong D, Mckee M, et al. Reducing the global burden of cardiovascular disease, Part 1: the epidemiology and risk factors [J]. *Circ Res*, 2017, 121(6): 677-694.
- [2] Zhong SS, Li LX, Shen X, et al. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 144(11): 266-278.
- [3] 江明桑. 中医诊治胸痹心痛证学术源流探讨及文献整理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [4] 徐耀智, 汪敏, 王勇. 通脉活血汤治疗冠心病心绞痛 51 例 [J]. *实用中医内科杂志*, 2012, 26(9): 17-18.
- [5] 朱慧渊, 王玉, 万海同. 养心汤治疗胸痹心痛 35 例临床观察 [J]. *中华现代中医学杂志*, 2006, 2(4): 357-358.
- [6] 战英, 孟小平, 战莉. 黄芪联合美乐心治疗冠心病 73 例疗效观察 [J]. *心脏杂志*, 2007, 19(1): 116-116.
- [7] 付华, 陈焕春, 王东升. 黄芪注射液对冠心病患者血流变学及血脂的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2006, 15(2): 165-166.
- [8] Liu Y, Liu J, Wu KX, et al. A rapid method for sensitive profiling of bioactive triterpene and flavonoid from *Astragalus Mongholicus* and *Astragalus Membranaceus* by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1085: 110-118.
- [9] Ji PY, Aye aye T, Xiaohua L, et al. Triterpene and flavonoid biosynthesis and metabolic profiling of hairy roots, adventitious roots, and seedling roots of *astragalus membranaceus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40): 9-8862.
- [10] Pan HY, Fang CM, Zhou TS, et al. Accumulation of calycosin and its 7-o-beta-d-glucoside and related gene expression in seedlings of *Astragalus Membranaceus* Bge. bar. mongholicus (bge.) hsiao induced by low temperature stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 20-1111.
- [11] 段亚丽, 谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状 [J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(3): 35-38.
- [12] 刘天一, 何观虹, 姚丽. 黄芪甲苷治疗心血管疾病研究进展 [J]. *中医药信息*, 2013, 30(2): 117-120.
- [13] 戴力, 王东侠, 刘岩. 黄芪多糖对缺血性心脏病患者心功能的影响 [J]. *山东医药*, 2016, 56(36): 49-51.
- [14] 李翔. 基于网络药理学的芪参益气方抗心肌缺血整合作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [15] 吴佳妮, 郭书文, 陈曦, 等. 益气活血方分子作用于心肌缺血疾病靶点的网络药理学研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(2): 467-471.
- [16] Vedantham S, Thorpe PE, Cardella JF, et al. Quality improvement guidelines for the treatment of lower extremity deep vein thrombosis with use of endovascular thrombus removal [J]. *J Vas Interv Radio*, 2009, 20(7): 227-239.
- [17] Caro AA, Cederbaum AI. Role of vtyochrome P450 in phospholipase A2-and arachidonic acid-mediated cytotoxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(3): 364-375.
- [18] 马建林, 毛焕元. 冠心病患者体内脂质过氧化损伤的临床研究 [J]. *中国医师杂志*, 1998, 3(9): 9-11.
- [19] Weidemann A, Johnson RS. Biology of hif-1 α [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 621-627.
- [20] Khan MF, Nahar N, Rashid RB, et al. Computational investigations of physicochemical, pharmacokinetic, toxicological properties and molecular docking of betulonic acid, a constituent of *Coryphalata* (roxb.) with phospholipase A2 (pla2) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 48.

(收稿: 2019-08-20 在线: 2020-08-06)

责任编辑: 邱禹