

论 著

· 网络药理学 ·

羟基红花黄色素 A 治疗心脑血管疾病
作用机制的网络药理学研究^{*}乐世俊^{**} 白雪 黄昱曦 王文晓 高欢 唐于平

(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 利用网络药理学研究羟基红花黄色素 A (HSYA) 治疗心脑血管疾病的潜在机制。方法 通过挖掘近 10 年 HSYA 治疗心脑血管疾病的相关文献, 搜集其抗心脑血管疾病的作用靶点, 再利用生物学信息注释数据库 (DAVID) 进行 GO 富集及 KEGG 通路分析, 最后采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“靶点-信号通路”交互网络和拓扑分析。结果 HSYA 通过调控 NFKB1 和 RELA 等 94 个潜在靶点, 干预流体切应力与动脉粥样硬化、TNF 信号通路、脂肪细胞因子信号通路和 Apelin 信号通路等重要信号通路发挥治疗心脑血管疾病的作用。结论 该研究从网络药理学角度初步揭示了 HSYA 改善心脑血管疾病的多维调控网络机制, 为其临床应用提供了理论依据。

关键词:羟基红花黄色素 A; 网络药理学; 心脑血管疾病; 作用机制

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 2096-1340 (2021) 05-0106-07

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.05.022

Mechanism Research of Hydroxysafflower Yellow A
in The Treatment of Cardiovascular and Cerebrovascular
Diseases by Network pharmacology

LE Shijun BAI Xue HUANG Yuxi WANG Wenxiao GAO Huan TANG Yuping

(Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: Objective To study the potential mechanism of hydroxysafflower yellow A (HSYA) in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases by network pharmacology. **Methods** By excavating the relevant literature on the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases by HSYA in recent 10 years, the anti cardiovascular and cerebrovascular disease targets were collected, and then the biological information annotation database (DAVID) was used for go enrichment and KEGG pathway analysis. Finally, the “target-signal pathway” interactive network and topology analysis were constructed by Cytoscape 3.8.0 software. **Results** HSYA plays a role in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases by regulating 94 potential targets such as NFKB1 and RELA, intervening in important signal pathways such as fluid shear stress and atherosclerosis, TNF signal pathway, adipocytokine signal pathway and Apelin signal pathway. **Conclusion** This study preliminarily reveals the multi-dimensional regulatory network mechanism of HSYA in impro-

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81903786); 陕西省自然科学基金 (2019JQ-054); 陕西中医药大学学科创新团队建设项目 (2019-YL10)

^{**} 通讯作者: 乐世俊, 讲师。E-mail: shijun_yue@163.com

ving cardiovascular and cerebrovascular diseases from the perspective of network pharmacology, which provides a theoretical basis for its clinical application.

Key words: Hydroxysafflower yellow A; Network pharmacology; Cardiovascular and cerebrovascular diseases; Action mechanism

随着社会老龄化和竞争的加剧,心脑血管疾病为主的慢性病已成为影响我国居民健康的主要负担。环境污染和不健康生活方式如锻炼缺乏、烟草和酒精滥用等因素更加速了心脑血管疾病的流行。当前,心脑血管疾病对我国人民身体健康构成的危害已列慢性非感染性疾病的第一位,成为我国公共卫生领域亟待解决的问题^[1]。现有临床证据表明,与西医治疗相比,中医药在心脑血管疾病的治疗中具有独特的优势和不可取代的地位,其中活血化瘀类中药尤为重要^[2]。

红花是菊科草本植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花,作为传统活血化瘀中药已有2500多年的应用历史,始载于《开宝本草》,现为中医临床治疗心脑血管疾病常用中药之一。红花在中药方剂中以汤剂煎服为主,其水溶性成分是发挥药理效应的物质基础^[3,4]。红花水提物制成的红花注射液收载于卫生部药品标准中药成方制剂二十册中,临床上广泛用于心脑血管疾病的治疗^[5]。迄今,已从红花中分离鉴定200余种化合物,主要包括醌式查尔酮碳苷类、黄酮类、生物碱类、亚精胺类、甾体类及有机酸类等^[6]。其中,MESELHY等^[7]在1993年首次分离到的羟基红花黄色素A(HSYA)属于醌式查尔酮碳苷类化合物,是红花发挥活血化瘀功效最主要的有效单体成分,《中国药典》明确规定以该成分为指标进行红花药材质量控制。现代临床研究证实,HSYA在防治脑卒中^[8]、血管性痴呆^[9]等心脑血管疾病有确切疗效,但其作用机制尚未系统阐明。

网络药理学融合系统生物学、多向药理学、计算生物学、网络分析等多学科的技术和内容,进行多层次网络的构建,从整体的角度去探索药物与疾病间的关联性,指导新药研发和临床精准用药^[10-12]。因此,通过查阅近10年HSYA治疗心脑血管疾病的临床前实验研究,搜集其治疗心脑血管疾病的潜在作用靶点,再运用网络药理学方法从系统层面预测HSYA治疗心脑血管疾病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件 通用蛋白质数据库 UniProt (<http://www.uniprot.org/>);生物学信息注释数据库 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>);京都基因和基因组百科全书数据库 KEGG (<https://www.kegg.jp/>);网络拓扑分析与编辑软件 Cytoscape 3.8.0 (<http://cytoscapeweb.cytoscape.org/>)。

1.2 HSYA 作用靶点的搜集 通过对“谷歌学术”“中国知网”进行大量文献挖掘,本课题组已搜集了 HSYA 治疗心脑血管疾病(包括心肌缺血、高血压、动脉粥样硬化、脑缺血、血管痴呆等)的潜在作用靶点^[13]。由于靶点信息来源于不同物种,将搜集到的靶点录入 UniProt 数据库中检索,限定物种为“Homo sapiens”,剔除重复、非人源和不规范的靶点,经检索和转化操作最终得到与 HSYA 相关的靶点信息。

1.3 靶点 GO 富集和 KEGG 通路分析 将 HSYA 的潜在作用靶点信息以 Gene Symbol 格式导入 DAVID 数据库中,选择 Gene Ontology (GO)项下生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)3个模块进行 GO 富集分析,然后选择 Pathway 项下 KEGG pathway 进行分析,设定阈值 $P < 0.01$ 。选取心血管疾病和脑血管疾病的前10条生物过程(biological process)绘制条形图,选取心脑血管疾病的前20条信号通路绘制气泡图。

1.4 HSYA“靶点-信号通路”网络构建和拓扑分析 将 HSYA 的潜在作用靶点和相关信号通路信息导入 Cytoscape 3.8.0,构建“靶点-信号通路”网络。网络图中的节点为靶点和信号通路,靶点与相应通路之间有相互作用关系的以边相连。运用 Network Analyzer 插件对此网络进行拓扑性质分析,探究 HSYA 对心脑血管疾病的潜在作用机制。

2 结果

2.1 HSYA 作用靶点的搜集 前期通过挖掘近10年关于 HSYA 治疗心脑血管疾病的临床前实验研究数据,搜集到 HSYA 的潜在作用靶点。运用 Uni-

Prot 检索功能对靶点进行筛选,最终获取 HSYA 作用于心血管疾病和脑血管疾病的潜在靶点分别为 68 和 54 个,且共同作用靶点为 28 个,见图 1。这

些共同作用靶点如 VEGFA、HIF1A、TNF、NFKB1、RELA 等主要参与 HSYA 对动脉粥样硬化、脑缺血和心肌缺血等疾病的治疗作用。

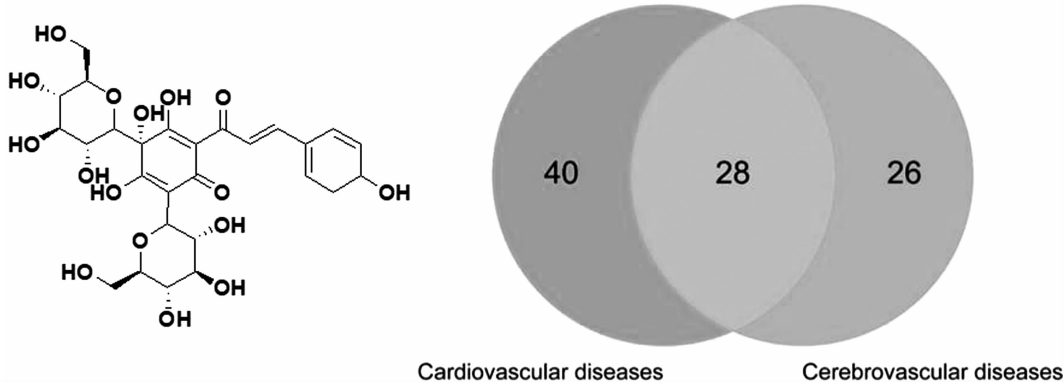


图 1 HSYA 作用于心血管和脑血管的潜在靶点分析

2.2 HSYA 作用靶点的 GO 富集和 KEGG 通路分析 将 HSYA 作用于心血管疾病和脑血管疾病的潜在靶点分别进行 GO 富集分析,结果如图 2 和 3 所示。在生物过程、细胞组分和分子功能 3 个模块中,HSYA 作用于心血管疾病和脑血管疾病潜在靶点的富集结果十分相似,表明两者存在相互关联的病理机制。具体而言,HSYA 可能主要在胞质、胞浆和 PI3K 复合体中通过蛋白结合、激酶活性和超氧化物歧化酶活性调节脂多糖介导的信号转导

途径(LPS-mediated signaling pathway)、一氧化氮生物合成过程(NO biosynthetic process)、NF-κB 转录因子活性(NF-κB transcription factor activity)和炎症反应(inflammatory response),从而发挥抗氧化和抗炎等药理作用治疗心脑血管疾病。另外,细胞对缺氧的反应(cellular response to hypoxia)和巨自噬(macrophagy)等生物过程与脑血管病的发病密切相关,而 HSYA 可以调控这些生物过程。

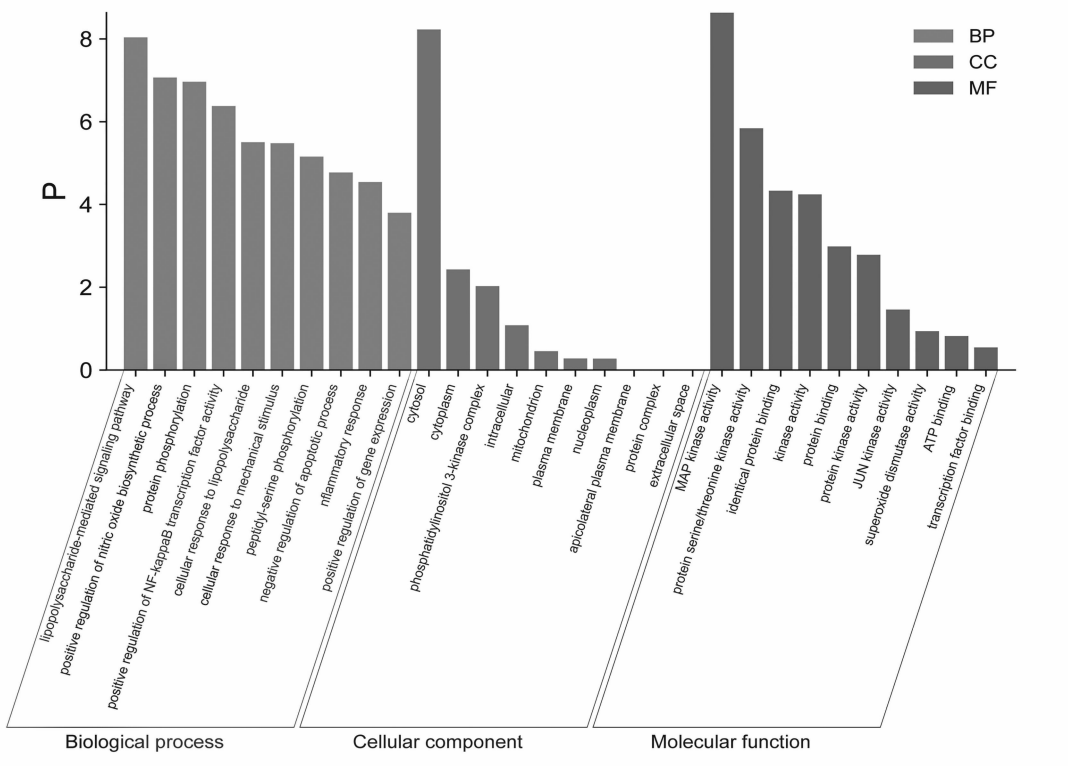


图 2 HSYA 作用于心血管疾病潜在靶点的 GO 富集结果(前 10 条)

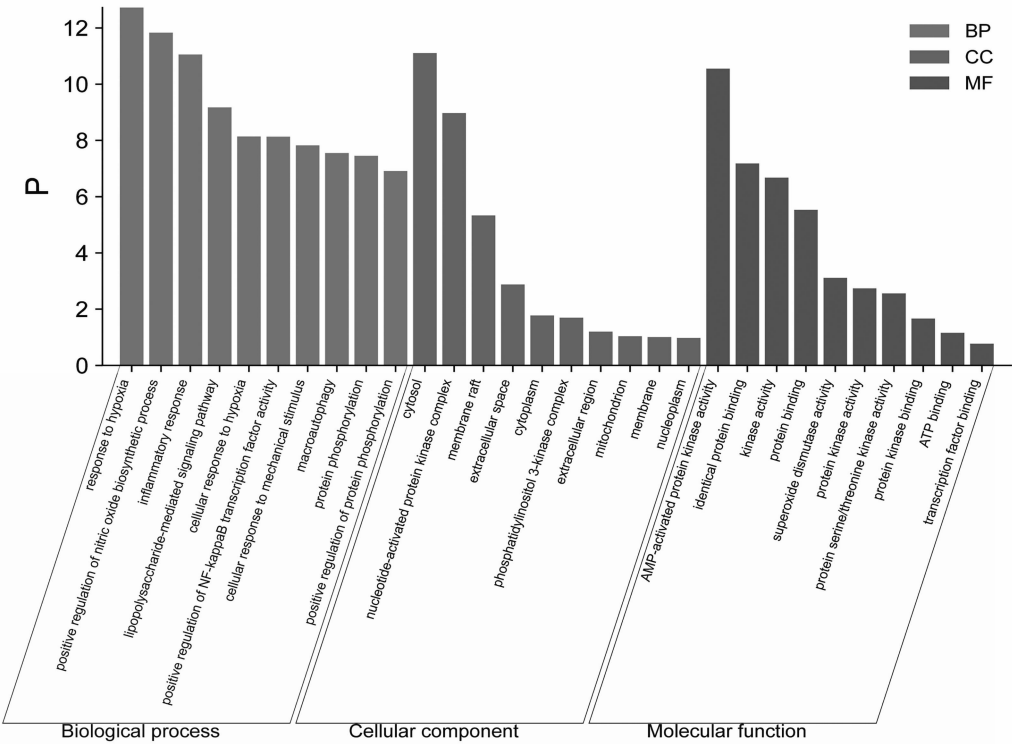


图3 HSYA 作用于脑血管疾病潜在靶点的 GO 富集结果(前10条)

通过 KEGG 通路注释分析探讨 HSYA 防治心脑血管疾病潜在靶点的通路分布。结果如图 4 所示,HSYA 可通过作用于多个靶点调控脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)、流体切应力与动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、Apelin 信

号通路(Apelin signaling pathway)、鞘磷脂信号通路(sphingolipid signaling pathway)、松弛素信号通路(relaxin signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)和 Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)等复杂信号网络,发挥抗心脑血管疾病的作用。

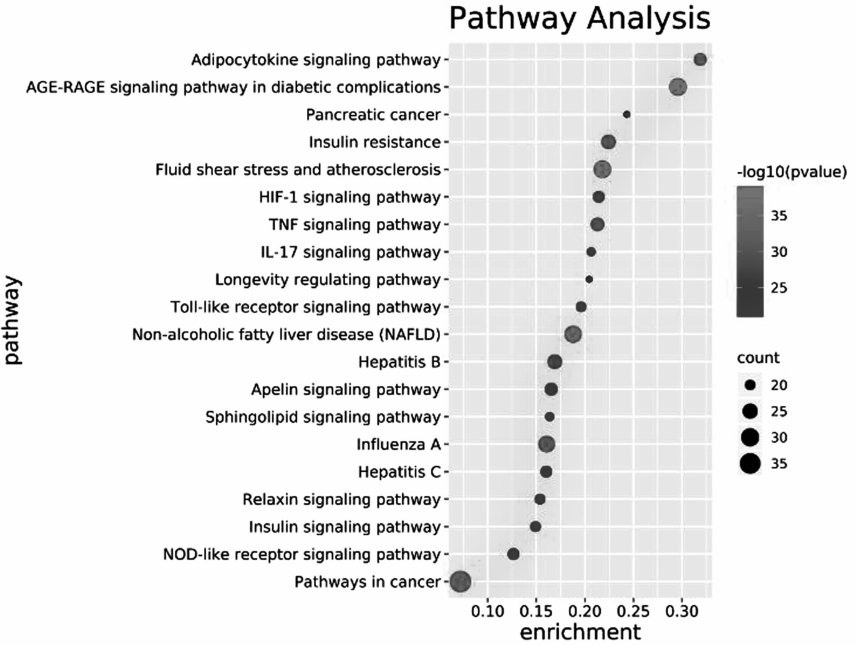


图4 HSYA 作用于心脑血管疾病潜在靶点的 KEGG 通路分析(前20条)

2.3 HSYA 的“靶点-信号通路”网络构建和拓扑分析 如图 5 所示, HSYA 的“靶点-信号通路”网络包含了 96 个节点(76 个靶点和 20 条信号通路)和 453 条边, 呈现出了多靶点、多通路的作用特点。根据度值排名前 10 位的靶点及信号通路见表 1,

表 1 HSYA 治疗心脑血管疾病的 TOP 10 潜在靶点和信号通路

序号	靶点	度值	中介中心性	信号通路	度值	中介中心性
1	NFKB1	18	0.035797	Pathways in cancer	37	0.172422
2	RELA	18	0.035797	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	29	0.054753
3	AKT1	17	0.036602	Fluid shear stress and atherosclerosis	29	0.09702
4	AKT2	17	0.036602	Non-alcoholic fatty liver disease	28	0.074809
5	AKT3	17	0.036602	Influenza A	27	0.06098
6	MAPK10	16	0.022964	Insulin resistance	24	0.038485
7	MAPK8	16	0.022964	Hepatitis B	24	0.029152
8	MAPK9	16	0.022964	TNF signaling pathway	23	0.034596
9	PIK3CA	16	0.036404	Adipocytokine signaling pathway	22	0.040568
10	MAPK1	14	0.029303	Apelin signaling pathway	22	0.121577

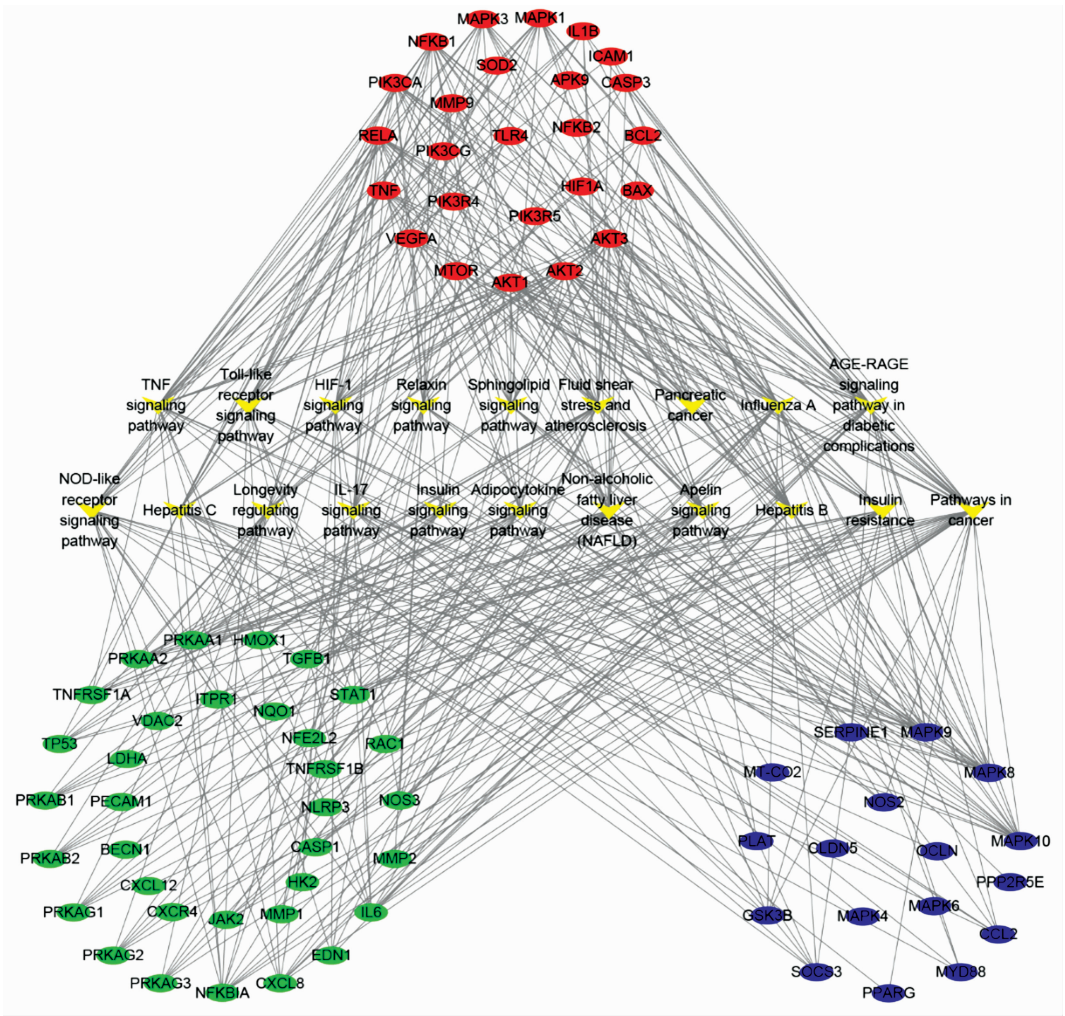


图 5 HSYA 治疗心脑血管疾病的靶点-信号通路网络图

(绿色节点: 心血管疾病潜在靶点; 蓝色节点: 脑血管疾病潜在靶点; 红色节点: 心脑血管疾病重合靶点; 黄色节点: KEGG 通路)

3 讨论

目前,西医治疗心脑血管疾病以化学药物如抗血小板药物阿司匹林、他汀类药物阿托伐他汀等和介入手术治疗为主,但长期服药易发生不同程度的耐药和副作用,而手术治疗经济负担重、禁忌症多,且仍不能有效降低远期终点事件。活血化瘀类中药治疗心脑血管疾病疗效确切,有着广阔的应用前景^[14]。HSYA 为活血化瘀中药红花的主要有效成分,其注射剂已在临床上广泛用于治疗心脑血管疾病^[8-9,15],但其作用机制尚未系统阐明。

本研究搜集得到 94 个文献来源的 HSYA 治疗心脑血管疾病潜在作用靶点,在分别对心脑血管疾病和脑血管疾病的潜在靶点进行 GO 富集分析过程中,发现两者的富集结果十分相似,提示 HSYA 治疗心脑血管疾病可能存在共同的抗氧化和抗炎药理作用机制。在 KEGG 通路注释分析过程中,发现大部分信号通路均与心脑血管疾病的发生发展密切相关。其中,HIF-1 信号通路已被蛋白质组学研究证实是 HSYA 发挥抗脑缺血再灌注损伤作用的重要通路^[16]。本研究进一步运用网络药理学方法构建了 HSYA 治疗心脑血管疾病的“靶点-信号通路”网络,揭示了其具有多靶点、多通路的作用特点。网络拓扑分析结果结合临床研究证据提示,HSYA 对动脉粥样硬化及其引发的脑卒中和心肌梗死具有较好的治疗潜力和疗效,但仍需开展更多基础实验和临床试验研究。

值得关注的是,HSYA 可能通过调节胰岛素抵抗(insulin resistance)、胰岛素信号转导通路(insulin signaling pathway)、非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease)和长寿调节通路(longevity regulating pathway)等对心血管代谢性疾病具有潜在治疗作用。近期研究相继报道了 HSYA 在心血管代谢性疾病(如肥胖和糖尿病)中的治疗作用^[17-18]。同时,本课题组也已证实 HSYA 的减肥和改善胰岛素抵抗的作用,并且肠道菌群是其潜在的“靶点”^[19]。此外,与癌症相关的信号通路也表明 HSYA 具有一定的抗肿瘤潜力。有研究报道 HSYA 可以抑制肿瘤毛细血管的生成发挥抗肿瘤作用^[20]。

综上所述,本研究通过网络药理学技术,分析了 HSYA 在治疗心脑血管疾病中的潜在靶点和信号通路,为进一步的分子机制研究提供了理论依据,也为活血化瘀类中药在治疗心脑血管疾病方面提供了机制研究的思路。但是本研究仅基于网

络药理学层面对 HSYA 治疗心脑血管疾病的潜在作用机制进行了预测,且 HSYA 可能通过调节肠道菌群等多种途径对心脑血管疾病起到直接或间接调控作用,因此运用虚拟分子对接、分子生物学和多组学技术结合体内外药效学实验验证网络药理学预测的 HSYA 潜在作用的有价值的靶点和信号通路或将成为下一步研究的重要内容。

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] Hao P, Jiang F, Chen Y, et al. Traditional Chinese medication for cardiovascular disease[J]. Nature Reviews Cardiology, 2015, 12(2):115-122.
- [3] 唐梅森,龚后武,黄征德,等.冠心病血瘀证症状与药物组成最大频繁关联模式挖掘[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4):492-494.
- [4] Yue S, Tang Y, Li S, et al. Chemical and biological properties of quinochalcone C-glycosides from the florets of *Carthamus tinctorius* [J]. Molecules, 2013, 18 (12): 15220-15254.
- [5] Lu Q, Xu J, Li Q, et al. Therapeutic efficacy and safety of safflower injection in the treatment of acute coronary syndrome[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, Article ID:6617772.
- [6] 乐世俊,唐于平,王林艳,等.红花中黄酮类化合物的分离与体外抗氧化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (17):3295-3300.
- [7] Meselhy MR, Kadota S, Momose Y, et al. Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca^{2+} antagonistic activity of tinctormine[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1993, 41(10):1796-1802.
- [8] Hu MZ, Zhou ZY, Zhou ZY, et al. Effect and safety of hydroxysafflor yellow A for injection in patients with acute ischemic stroke of blood stasis syndrome; A phase II, multicenter, randomized, double-blind, multiple-dose, active-controlled clinical trial[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020, 26:420-427.
- [9] Tian JA controlled, double-blind, randomized pilot clinical trial of hydroxysafflor yellow a on cognitive function in patients with vascular dementia[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2006, 79(2):44.
- [10] 李梢. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(4):527-532.
- [11] Yue SJ, Liu J, Feng WW, et al. System pharmacology-based dissection of the synergistic mechanism of Huangqi and Huanglian for diabetes mellitus [J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8:694.

- [12] 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.
- [13] Bai X, Wang WX, Fu RJ, et al. Therapeutic potential of hydroxysafflor yellow A on cardio-cerebrovascular diseases[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 01265.
- [14] 唐颖弘, 戴君. 活血化瘀类中成药在心脑血管疾病中的使用情况[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29 (2): 47-49.
- [15] 秦劭晨, 梁伟雄, 温晓文, 等. 注射用羟基红花黄色素A治疗急性缺血性中风血瘀证疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (21): 157-161.
- [16] Xu H, Liu TL, Wang WJ, et al. Proteomic analysis of hydroxysafflor yellow A against cerebral ischemiareperfusion injury in rats[J]. *Rejuvenation Research*, 2019, 22: 503-512.
- [17] Yan K, Wang X, Pan H, et al. Safflower yellow and its main component HSYA alleviate diet-induced obesity in mice; Possible involvement of the increased antioxidant enzymes in liver and adipose tissue[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 482.
- [18] Lee M, Zhao H, Liu X, et al. Protective effect of hydroxysafflor yellow A on nephropathy by attenuating oxidative stress and inhibiting apoptosis in induced type 2 diabetes in rat[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, , Article ID: 7805393.
- [19] Liu J, Yue SJ, Yang ZR, et al. Oral hydroxysafflor yellow A reduces obesity in mice by modulating the gut microbiota and serum metabolism[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 134: 40-50.
- [20] Xi S, Zhang Q, Liu C, et al. Effects of hydroxy safflower yellow-A on tumor capillary angiogenesis in transplanted human gastric adenocarcinoma BGC-823 tumors in nude mice[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 32 (2): 243-248.

(收稿日期: 2020-09-09 编辑: 杨芳艳)