

基于 GEO 数据库联合网络药理学研究川芎-赤芍药对治疗动脉粥样硬化的药理过程及分子机制[△]

陈启庭^{1*}, 林洪¹, 陈利捷², 卓超林¹, 岳双冰¹, 金字¹, 张森^{1#} (1. 深圳市第二人民医院中西医结合科, 广东深圳 518000; 2. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530001)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)06-0655-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.06.004



摘要 目的:探讨活血化瘀中药药对川芎-赤芍拮抗动脉粥样硬化的潜在分子机制及药理过程。方法:使用 R 语言 Limma 包分析 GEO 数据库 GSE43292 数据集,对有表达差异的动脉粥样硬化基因进行筛选和提取。川芎-赤芍药对所含的化学活性组分及靶点通过中药系统药理学数据库与分析平台检索。合并差异基因和药物作用靶点以获得共同的靶点。利用在线分析工具 STRING 和 Cytoscape 构建药物和靶点的调控网络以及靶点间的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。然后利用 R 语言注释靶点基因的基因本体 (GO) 功能,分析京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路,再进行基因集富集分析 (GSEA) 以验证 KEGG 的通路和富集的情况,确定靶点基因的调控功能和参与基因调控功能的信号转导通道。结果:共筛选出动脉粥样硬化差异基因 1 244 个,川芎-赤芍药对含 36 个生物活性成分,其中靶点为环加氧酶 1、肾上腺素受体、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ -、激酶插入域受体、孕激素受体、基质金属蛋白酶 9、CXC 趋化因子配体 8、蛋白激酶 C β 、白细胞介素 6、CD14、二肽基肽酶-4、PIK3CG、肾上腺素受体 α 1B、微管相关蛋白 2、尿激酶纤溶酶原激活剂和单胺氧化酶 B。靶点在 GO 中主要富集在合成 DNA 过程的调控、DNA 生物合成的过程、含胶原的细胞外基质、细胞外基质、蛋白酶结合、细胞迁移、血管形成过程、膜筏结构、转录的调节等与动脉粥样硬化炎症、脂肪代谢及血管生成相关的生物学注释。脂质与动脉粥样硬化通路和核因子 κ B 信号通路与动脉粥样硬化关系最为密切,并且在 KEGG 信号通路和 GSEA 均显示出富集。结论:川芎-赤芍药对通过潜在的 13 个活性成分作用于可能的 16 个靶点调控相关信号转导通路,通过抗炎、调脂和保护血管等方式产生抗动脉粥样硬化的作用。

关键词 川芎-赤芍药对;动脉粥样硬化;GEO 数据库联合网络药理学;信号通路

Pharmacological Process and Molecular Mechanism of *Chuanxiong Rhizoma-Radix Paeoniae Rubra* Drug Pair in the Treatment of Atherosclerosis Based on GEO Database Combined with Network Pharmacology[△]

CHEN Qiting¹, LIN Hong¹, CHEN Lijie², ZHUO Chaolin¹, YUE Shuangbing¹, JIN Yu¹, ZHANG Miao¹ (1. Dept. of Integrated Chinese and Western Medicine, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518000, China; 2. Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the potential molecular mechanism and pharmacological process and molecular mechanism of blood-activating and stasis-removing traditional Chinese medicine (TCM) drug pair of *Chuanxiong rhizoma-Radix paeoniae rubra* in the treatment of atherosclerosis. **METHODS:** R language Limma package was used to analyze GSE43292 dataset of GEO database, the genes of atherosclerosis with differential expression were screened and extracted. The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform was retrieved for the chemical active components and targets in *Chuanxiong rhizoma-Radix paeoniae rubra* drug pair. Differential genes and drug targets were combined to obtain common targets. Online analysis tools of STRING and Cytoscape were used to construct regulatory network of drugs and targets and protein-protein interaction (PPI) network between targets. R language was used to annotate gene ontology (GO) function of the target genes, analyse the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway, and perform Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to validate the KEGG pathway and enrichment. The regulatory functions of target genes and signal transduction channels

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目 (No. 82104770);广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2022A1515011456)

* 主治医师。研究方向:中西医结合肿瘤。E-mail: qitingchen@163.com

通信作者:博士后。研究方向:中西医结合临床。E-mail: shuixi.an@163.com

involved in gene regulatory functions were determined. RESULTS: A total of 1 244 differential genes of atherosclerosis were screened out, and the *Chuanxiong rhizoma-Radix paeoniae rubra* drug pair contained 36 bioactive components, the targets were respectively PTGS1, AR, PPARG, KDR, PGR, matrix metalloproteinase 9, CXC chemokine ligand 8, PRKCB, interleukin 6, CD14, DPP4, PIK3CG, ADRA1B, MAP2, PLA2 and MAOB. The targets in GO were mainly enriched in the regulation of synthetic DNA process, process of DNA biosynthesis, collagen-containing extracellular matrix, extracellular matrix, protease binding, cell migration, angiogenesis process, membrane raft structures, regulation of transcription and other biological annotations related to atherosclerotic inflammation, lipid metabolism and angiogenesis. Lipid and atherosclerosis pathway and nuclear factor κ B signaling pathway were most closely related to atherosclerosis, which showed enrichment in both KEGG signaling pathway and GSEA. CONCLUSIONS: *Chuanxiong rhizoma-Radix paeoniae rubra* drug pair regulates the relevant signal transduction pathways through potential 13 active components by acting on 16 possible targets, and achieves anti-atherosclerotic effects through anti-inflammatory, lipid-regulating and blood vessel protection.

KEYWORDS *Chuanxiong rhizoma-Radix paeoniae rubra*; Atherosclerosis; GEO database combined with network pharmacology; Signaling pathway

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种由脂质代谢紊乱及泡沫细胞在动脉壁下沉积引起的慢性炎症性疾病,主要累及大中型动脉,是引发冠心病、脑梗死和外周血管病等心脑血管疾病的共同病理基础^[1-2]。目前仍缺乏安全、积极且有效的治疗,患者即使应用现阶段循证依据最充分的他汀类药物和阿司匹林,也只能降低约 30% 的心脑血管事件的发生。研究指出,中医药在抗氧化、抗炎、调节脂质代谢等方面的多靶点作用使其在抗 AS 方面具有独特优势^[3-5]。瘀血阻滞是 AS 最主要的病因病机,活血化瘀是目前防治该病的有效中医策略^[6]。活血化瘀中药药对川芎-赤芍是中国科学院院士陈可冀根据临床经验及 AS 中医病理机制,将活血化瘀经典复方血府逐瘀汤中核心药物进一步精炼简化而来,其成药芍药胶囊在临床上被广泛用于多种心脑血管疾病,如 AS、经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后动脉再狭窄、血脂异常和冠心病心绞痛等,且均取得了显著疗效^[7]。实验研究发现,芍药胶囊能够调节血脂,抗炎,抑制血管内皮细胞的增殖与迁移,预防血管重构,从而延缓 AS 的发生、发展^[8-10]。然而,传统中药复方化学成分复杂,靶点众多,在此基础上出现的分子-分子、靶点-靶点、分子-靶点之间错综复杂的药理交互作用,给川芎-赤芍药对治疗 AS 的机制研究带来极大困难。中医药网络药理学是结合计算机科学和中药药理学的一门新兴学科,有助于中药复方的有效成分、作用靶点和机制的探索。本研究利用 GEO 高通量数据结合网络药理学方法,以川芎-赤芍药对治疗 AS 为研究对象,对其有效成分、潜在的治疗靶点及介导的信号通路进行发掘,构建中药活性成分-靶点-药理调控网络,从而阐明其药理作用及分子机制,为中医药现代化的基础研究和中成药制剂研发提供新靶点和新思路。

1 资料与方法

1.1 差异基因表达分析

提取 GEO 数据库 GSE43292 数据集中 32 例 AS 患者颈动脉内膜病理标本及对应患者的远处正常的动脉组织的基因表

达量,应用 R 语言的 Limma 包进行配对差异分析, $\log |FC| > 0.5$, 矫正 $P < 0.05$ 作为筛选标准,通过热图可视化进行分析。利用 pheatmap 包对前 20 个上调和 20 个下调的差异基因聚类分析后,通过热图可视化展示。

1.2 筛选川芎-赤芍药对的活性成分与靶点

以“川芎”“赤芍”为关键词,通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)初筛其化学活性成分。限制类药性(DL) ≥ 0.18 、口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$,进行主要活性成分的筛除,随后检索活性成分对应的人源靶点信息。

1.3 构建川芎-赤芍药对活性成分-靶点调控网络和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络

合并差异基因和活性成分的作用靶点以获得靶点,使用 Cytoscape 3.7.1 建立中药活性成分-靶点的调控网络。利用 STRING(<https://string-db.org/>)、Cytoscape 创建靶点的 PPI 网络。

1.4 靶点功能和通路富集分析

为探究靶点基因的功能与信号通路途径,采用 R 语言 clusterProfiler 包进行靶点的基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。GO 分析内容包括生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)。基因数 ≥ 2 和 $P < 0.01$ 作为富集分析的显著性阈值。

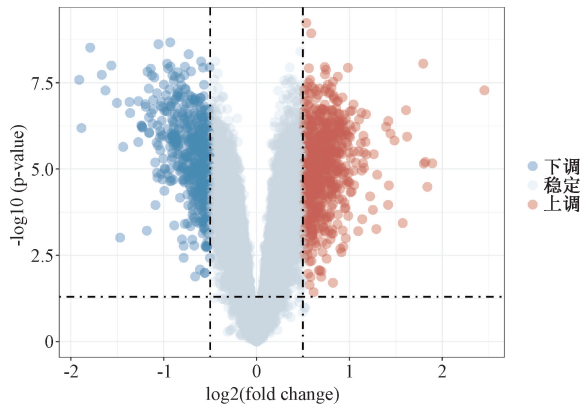
1.5 GSEA 通路富集分析

利用 GSE43292 数据集对 KEGG 通路富集分析发现的主要细胞信号通路结果进行基因集富集分析(GSEA)通路富集,验证所在通路在 AS 患者中的富集情况。

2 结果

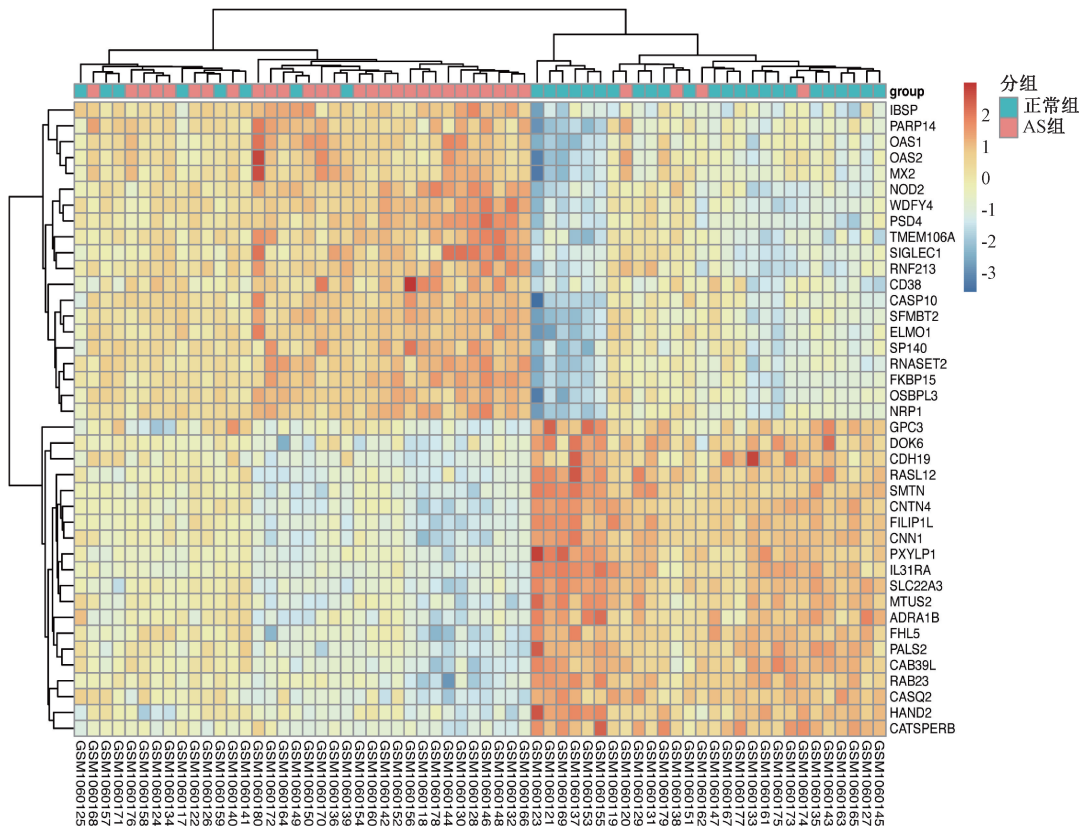
2.1 AS 中差异基因的表达

从 GSE43292 数据集中共筛选出与 AS 相关的 1 244 个差异表达基因(显著上调的基因 688 个,显著下调的基因 556 个),与对照组比较差异有统计学的意义($\log |FC| > 0.5$, 矫正 $P < 0.05$)。以火山图展示所有差异基因,见图 1。热图展示了前 20 个表达上调以及下调的基因,见图 2、表 1。



蓝色圆点代具有统计学差异下调的 556 个基因,红色圆点代表具有统计学差异上调的 688 个基因,灰色圆点代表无统计学差异的基因。

图 1 差异基因火山图



方块的颜色表示对应基因的表达,蓝色为下调基因,红色为上调基因,颜色越深表示表达差异越大。

图 2 前 20 个上调和 20 个下调基因的热图

(ADRA1B)、微管相关蛋白 2(MAP2)、尿激酶纤溶酶原激活剂(PLAU)和单胺氧化酶 B(MAOB),其与 13 种生物活性成分密切相关(其余 22 个成分无 AS 相关的靶点)。除 MOL001494、MOL002135 来自川芎外,其余 11 个成分均来自赤芍;其中 PTGS1、PGR 与川芎-赤芍药对活性成分关系最为密切,在 AS 斑块中分别表现为上调和下调,见图 3。

2.4 PPI 网络的构建

通过 STRING 构建出包含 13 个节点(16 个靶点中有相互关联的是 13 个,另 3 个独立不成网络)的 PPI 网络,其中与

2.2 川芎-赤芍药对中生物活性成分的筛选

通过 TCMSP 检索到川芎、赤芍 2 味中药所含化合物共 295 个,其中 $OB \geq 30\%$ 的化合物有 164 个(占 55.60%), $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 的化合物共 36 个,见表 2。

2.3 构建川芎-赤芍药对的活性成分-靶点之间的调控网络

利用上述中药活性和药物靶点构建川芎-赤芍药对治疗 AS 的活性成分-差异基因之间的复方调控网络。该网络由 31 个节点组成,中间 13 个节点是川芎-赤芍药对的生物活性成分,外周 16 个节点是中药潜在的生物靶点。这些靶点包括环加氧酶 1(PTGS1)、肾上腺素受体(AR)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPARG)、激酶插入域受体(KDR)、孕激素受体(PGR)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、CXC 趋化因子配体 8(CXCL8)、蛋白激酶 C β (PRKCB)、白细胞介素 6(IL-6)、CD14、二肽基肽酶-4(DDP4)、PIK3CG、肾上腺素受体 $\alpha 1B$

MMP9、CXCL8 和 IL-6 相互作用的蛋白数目最多;CXCL8 与 IL-6、IL-6 与 MMP9、CXCL8 与 MMP9、IL-6 与 PPARG、KDR 与 MMP9 关联评分最高,关系最为密切,见图 4。

2.5 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

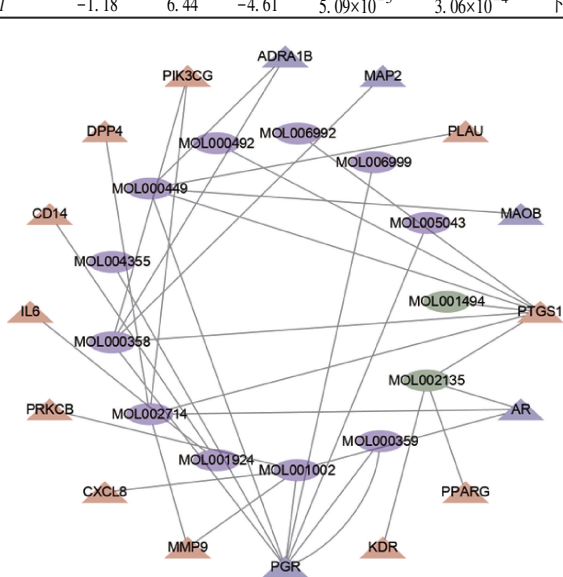
对靶点基因的 GO 功能和 KEGG 信号通路进行分析。GO 功能的注释结果显示,包含 52 个 BP 条目、2 个 CC 条目和 3 个 MF 条目。主要涉及 DNA 合成过程的调控、DNA 生物合成的过程、含胶原的细胞外基质、细胞外基质和蛋白酶结合等与心肌纤维化相关的 BP,细胞迁移、血管形成过程、膜筏结构

表 1 前 20 个上调和下调的基因

基因	logFC	平均表达	t	P	校正 P	表达
FABP4	2.45	5.57	8.41	6.18×10 ⁻¹⁰	9.79×10 ⁻⁷	上调
JCHAIN	1.89	9.89	5.67	2.06×10 ⁻⁶	2.62×10 ⁻⁵	上调
MMP7	1.84	7.95	6.87	5.56×10 ⁻⁸	3.34×10 ⁻⁶	上调
MMP9	1.82	9.36	6.38	2.37×10 ⁻⁷	6.70×10 ⁻⁶	上调
CD36	1.80	9.76	6.18	4.41×10 ⁻⁷	9.64×10 ⁻⁶	上调
IBSP	1.79	7.91	8.27	9.30×10 ⁻¹⁰	1.06×10 ⁻⁶	上调
IGHA1	1.62	10.98	5.86	1.15×10 ⁻⁶	1.74×10 ⁻⁵	上调
DPP4	1.61	7.60	7.57	6.87×10 ⁻⁹	1.70×10 ⁻⁶	上调
MMP12	1.57	9.65	4.34	1.15×10 ⁻⁴	5.97×10 ⁻⁴	上调
MME	1.49	6.64	6.84	5.99×10 ⁻⁸	3.46×10 ⁻⁶	上调
IGKC	1.44	9.45	5.95	8.88×10 ⁻⁷	1.48×10 ⁻⁵	上调
ATP6V0D2	1.43	6.54	6.60	1.24×10 ⁻⁷	4.86×10 ⁻⁶	上调
HMOX1	1.42	8.49	8.22	1.07×10 ⁻⁹	1.06×10 ⁻⁶	上调
MMP8	1.42	5.55	5.99	7.75×10 ⁻⁷	1.37×10 ⁻⁵	上调
IL1RN	1.39	6.93	7.37	1.25×10 ⁻⁸	1.90×10 ⁻⁶	上调
PLA2G7	1.30	9.25	6.26	3.43×10 ⁻⁷	8.32×10 ⁻⁶	上调
CHI3L1	1.29	9.22	5.41	4.58×10 ⁻⁶	4.72×10 ⁻⁵	上调
CD52	1.26	8.43	6.80	6.69×10 ⁻⁸	3.62×10 ⁻⁶	上调
AQP9	1.25	9.12	4.95	1.82×10 ⁻⁵	1.35×10 ⁻⁴	上调
IGKV2-24	1.22	7.17	4.70	3.95×10 ⁻⁵	2.50×10 ⁻⁴	上调
CNTN1	-1.91	6.99	-6.84	6.04×10 ⁻⁸	3.47×10 ⁻⁶	下调
TPH1	-1.89	8.72	-6.71	8.85×10 ⁻⁸	4.07×10 ⁻⁶	下调
CNTN4	-1.79	7.34	-7.77	3.83×10 ⁻⁹	1.37×10 ⁻⁶	下调
CASQ2	-1.67	8.55	-7.94	2.38×10 ⁻⁹	1.33×10 ⁻⁶	下调
MYOCD	-1.63	8.16	-7.36	1.29×10 ⁻⁸	1.90×10 ⁻⁶	下调
FHL5	-1.56	8.03	-7.26	1.73×10 ⁻⁸	2.04×10 ⁻⁶	下调
HAND2-AS1	-1.50	6.31	-6.21	4.02×10 ⁻⁷	9.20×10 ⁻⁶	下调
CARTPT	-1.47	6.49	-4.62	5.06×10 ⁻⁵	3.04×10 ⁻⁴	下调
ATRNLI	-1.44	8.25	-6.06	6.27×10 ⁻⁷	1.20×10 ⁻⁵	下调
RPS6KA6	-1.37	6.73	-6.36	2.55×10 ⁻⁷	6.97×10 ⁻⁶	下调
CNTN3	-1.36	6.96	-6.57	1.35×10 ⁻⁷	5.12×10 ⁻⁶	下调
NPY1R	-1.27	6.76	-6.67	9.87×10 ⁻⁸	4.33×10 ⁻⁶	下调
LRRN1	-1.27	5.44	-6.72	8.60×10 ⁻⁸	4.04×10 ⁻⁶	下调
RYR2	-1.24	7.06	-6.60	1.23×10 ⁻⁷	4.85×10 ⁻⁶	下调
LINC00670	-1.24	6.50	-6.63	1.12×10 ⁻⁷	4.61×10 ⁻⁶	下调
PDE8B	-1.23	6.82	-6.63	1.12×10 ⁻⁷	4.61×10 ⁻⁶	下调
NPR3	-1.23	7.70	-6.56	1.41×10 ⁻⁷	5.22×10 ⁻⁶	下调
ACADL	-1.20	7.00	-6.02	7.05×10 ⁻⁷	1.29×10 ⁻⁵	下调
PLCB4	-1.19	6.37	-6.87	5.49×10 ⁻⁸	3.33×10 ⁻⁶	下调
ITLN1	-1.18	6.44	-4.61	5.09×10 ⁻⁵	3.06×10 ⁻⁴	下调

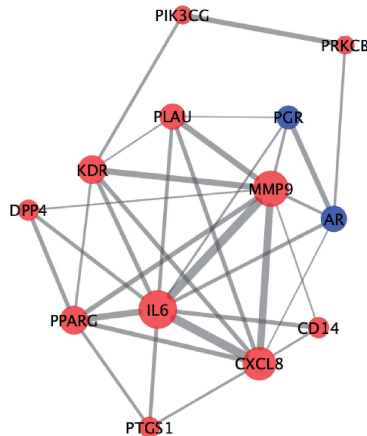
表 2 36 个川芎-赤芍药对活性成分 (OB≥30%且 DL≥0.18)

药物	分子 ID	活性成分	OB/%	DL
川芎	MOL001494	亚油酸乙酯 (mandenol)	42.00	0.19
川芎	MOL002135	杨梅酮 (myricanone)	40.60	0.51
川芎	MOL002140	川芎喹 (perlolirine)	65.95	0.27
川芎	MOL002151	川芎醌 (senkyunone)	47.66	0.24
川芎	MOL002157	川芎蔡呋内酯 (wallichilide)	42.31	0.71
川芎	MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75
川芎	MOL000433	FA	68.96	0.71
赤芍	MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)	43.06	0.43
赤芍	MOL001918	芍药苷元 (paeoniflorgenone)	87.59	0.37
赤芍	MOL001921	芍药新苷 (Lactiflorin)	49.12	0.80
赤芍	MOL001924	芍药苷 (paeoniflorin)	53.87	0.79
赤芍	MOL001925	芍药苷-qt (paeoniflorin-qt)	68.18	0.40
赤芍	MOL002714	黄芩素 (baicalin)	33.52	0.21
赤芍	MOL002776	黄芩苷 (baicalin)	40.12	0.75
赤芍	MOL000358	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
赤芍	MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75
赤芍	MOL004355	菠甾醇 (spinasterol)	42.98	0.76
赤芍	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
赤芍	MOL000492	(+)-儿茶素 ((+)-catechin)	54.83	0.24
赤芍	MOL006990	(1S,2S,4R)-trans-2-hydroxy-1,8-cineole-B-D-glucopyranoside	30.25	0.27
赤芍	MOL006992	(2R,3R)-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30
赤芍	MOL006994	1-o-beta-d-glucopyranosyl-8-o-benzoylpaeonisuffrone-qt	36.01	0.30
赤芍	MOL006996	1-o-beta-d-glucopyranosylpaeonisuffrone-qt	65.08	0.35
赤芍	MOL006999	stigmast-7-en-3-ol	37.42	0.75
赤芍	MOL007003	苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)	31.14	0.54
赤芍	MOL007004	芍药内酯苷 (albiflorin)	30.25	0.77
赤芍	MOL007005	芍药内酯苷-qt (albiflorin-qt)	48.70	0.33
赤芍	MOL007008	4-ethyl-paeoniflorin-qt	56.87	0.44
赤芍	MOL007012	4-o-methyl-paeoniflorin-qt	56.70	0.43
赤芍	MOL007014	8-debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45
赤芍	MOL007016	芍药苷元酮 (paeoniflorigenone)	65.33	0.37
赤芍	MOL007018	9-ethyl-neo-paeoniaflorin A-qt	64.42	0.30
赤芍	MOL007022	槲叶吴萸素 B (evofolinB)	64.74	0.22
赤芍	MOL007025	异苯甲酰芍药苷 (isobenzoylpaeoniflorin)	31.14	0.54
赤芍	MOL002883	油酸乙酯 (Ethyl oleate)	32.40	0.19
赤芍	MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71



椭圆形代表中药活性成分,其中紫色表示来自赤芍的活性成分,绿色表示来自川芎的活性成分;三角形表示活性成分的靶点,其中红色代表上调基因,蓝色代表下调基因。

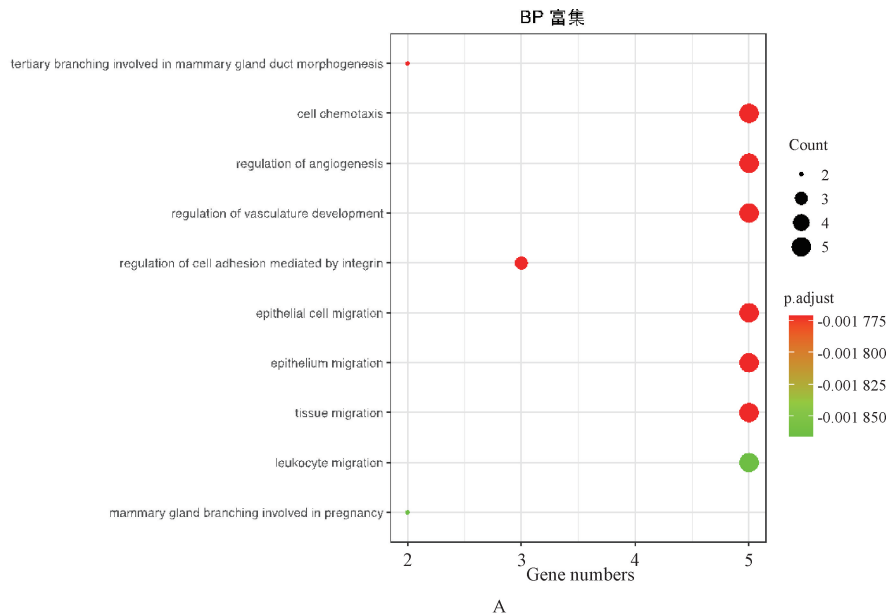
图 3 活性成分-靶点调控网络



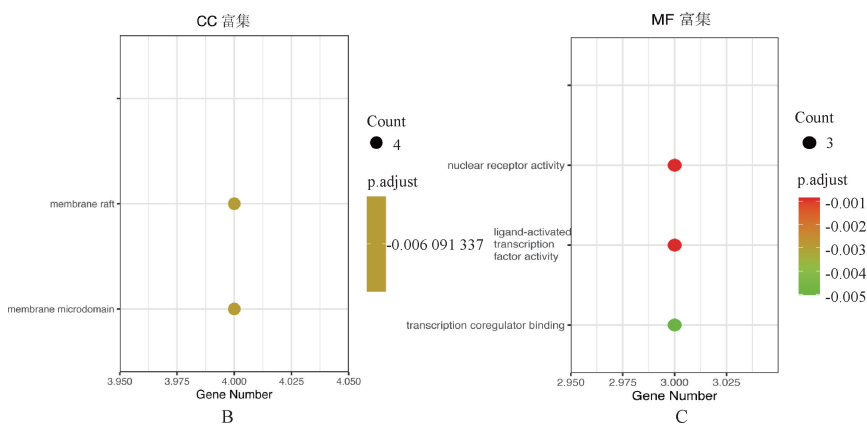
圆形大小代表相互作用的蛋白节点数目,红色表示基因上调,蓝色表示基因下调,线条粗细代表关联评分大小。

图 4 靶点 PPI 网络

和转录的调节等与 AS 炎症、脂肪代谢、血管生成相关的 CC 和 MF。主要富集的基因包括 AR、PGR、PIK3CG、DPP4、KDR 和 PPARG 等。GO 功能富集分析见图 5。KEGG 通路富集分析结果显示,13 个相互作用的靶点涉及 14 条通路的调控过程。在



A



A. BP; B. CC; C. MF。

图 5 GO 功能富集分析气泡图

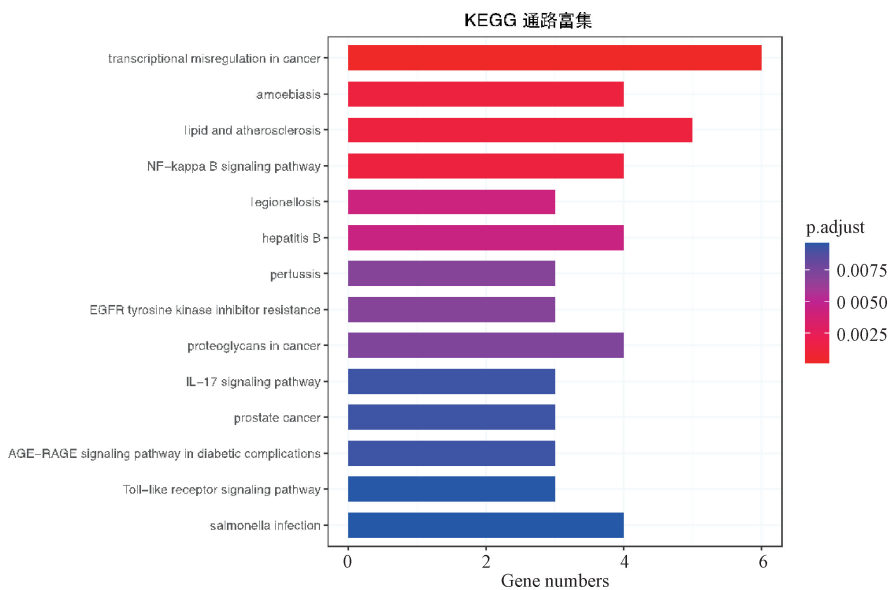


图 6 KEGG 通路富集分析柱状图

这些信号通路中,核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路、脂质代谢信号通路是与 AS 直接相关的 2 条信号通路,基因丰度最高,分别

有 4 个基因 (*CXCL8*、*PRKCB*、*CD14*、*PLAU*) 和 5 个基因 (*PPARG*、*MMP9*、*CXCL8*、*IL-6* 和 *CD14*) 参与到上述通路调控过程,见图 6。根据上述药物靶点预测,GO 功能和 KEGG 通路富集分析,推测川芎-赤芍药对可能是通过多种生物活性物质调控相应的靶点表达,继而调节 NF- κ B 和脂质代谢通路,起到抗 AS 的作用。

2.6 GSEA 通路富集分析

由于 GO 和 KEGG 富集分析仅关注差异显著的基因,无疑会弱化差异表达相对不显著但却有更高权重生物学意义的基因。因此,本研究使用 GSEA 对 GSE43292 数据集进行分析,验证该数据集是否仍存在脂质代谢和 NF- κ B 通路的富集。结果显示,该基因集中脂质与 AS 通路、NF- κ B 通路显著富集在高表达区(矫正 $P<0.01$),见图 7。

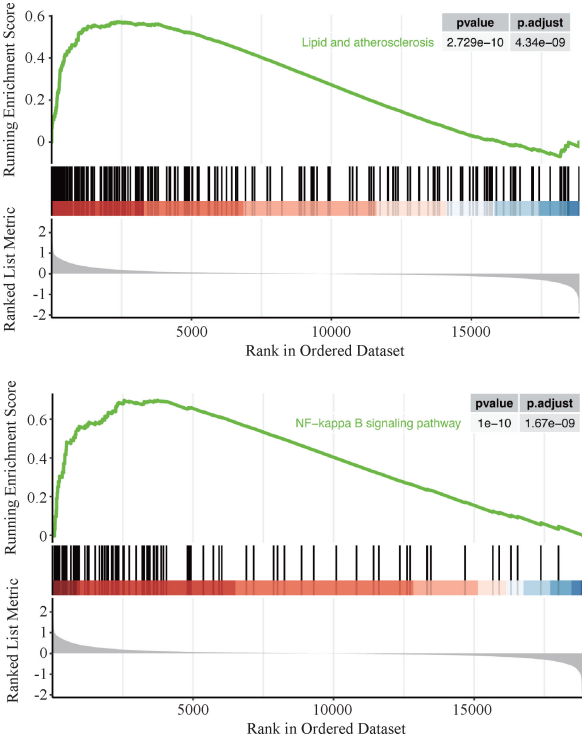


图 7 GSEA 通路富集分析

3 讨论

中医学认为,血瘀是引起 AS 的最重要的病因病机,贯穿于 AS 等心脑血管疾病发生、发展的始末。活血化瘀中药川芎-赤芍药对是根据明代王清任《医林改错》中经典中医方血府逐瘀汤逐渐简化发展而来,临床上常被用来防治 AS,疗效明显^[11]。川芎温通辛散,是血中气药,活血化瘀的同时又行血中之气滞;赤芍苦寒,擅散瘀止痛又凉血清热;二药相须协同互补,配伍后既加强了活血祛瘀,又借气使行血破滞的功效翻倍。

本研究通过高通量测序数据结合网络药理学方法,构建了中药活性成分和靶点之间的调控网络,发现了一系列川芎-赤芍药对的关键活性成分,有利于从分子层面阐明川芎-赤芍药对的具体作用机制。 β -谷甾醇是一种富含植物种子的天然植物固醇,通过激活 PPARG 和腺苷 5-单磷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 调节雷帕霉素靶蛋白信号通路,抑制血管紧张素 II 诱

导的血管平滑肌细胞迁移^[12]。鞣花酸广泛存在于化瘀类中药中,可通过 Nrf2/HO-1 或 TGF- β /Smad 等通路抗氧化、抗炎和保护内皮细胞,降低心血管疾病风险^[13-14]。豆甾醇通过核受体 LXR 非依赖性途径促进肠道胆固醇分泌^[15-16]。值得注意的是,一项研究发现,血浆豆甾醇的积累虽然可降低血浆胆固醇,但会导致实验小鼠左心室功能障碍、心脏间质纤维化和巨噬细胞浸润等心脏损伤,并增加死亡风险^[17]。芍药苷属于单萜类化合物,可减弱氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的血管生成;芍药苷联合川芎嗪的组合不仅可抑制 ox-LDL 诱导的 CD31、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 VEGF 受体 2 (VEGFR2) 的表达,而且可降低 ox-LDL 诱导的 Notch1、Jagged1 和 Hes1 的表达,有助于稳定 AS 斑块^[18]。研究发现,不同浓度梯度的芍药苷能够抑制肿瘤坏死因子 (TNF) α 诱导的人脐静脉内皮细胞的 IL-6、IL-8 表达和环氧酶 2 的活性,减弱炎症通路 NF- κ B/YY1 的激活,改善人脐静脉内皮细胞的活力,进而发挥抗 AS 的作用^[19]。黄芩素是天然黄酮化合物,可有效减少高脂饮食喂养诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠动脉中单核/单核巨噬细胞的浸润,抑制 IL-6、TNF- α 、血管细胞黏附分子-1 和细胞间黏附分子-1 的 mRNA 水平及 NF- κ B 信号通路的活性,从而减少 AS 斑块面积,而这种抗 AS 的作用与血脂水平无明显关系^[20]。黄芩素还可通过激活 PPARG/LXR α 通路来抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞脂质,促进胆固醇外排,抑制脂质累积和炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达^[21]。黄芩素通过激活 AMPK/Mfn-2 轴,抑制下游 MAPKs/NF- κ B 信号转导,发挥抗炎、抗 AS 作用^[22]。综合已有基础研究及本研究结果,提示川芎-赤芍药对可能通过芍药苷、黄芩素和川芎嗪等有效成分影响和调控 NF- κ B 等信号通路,发挥抗氧化、抗炎和抗血管生成的作用,从而保护血管、抗 AS。此外,本研究中所发现的一些活性成分至今尚未见相关实验报道,值得进一步研究。

PTGS1、PGR 是本研究构建的调控网络中发现的与川芎-赤芍药对活性成分关系最为密切的 2 个靶点。PTGS1 的上调与 PGR 的下调是导致 AS 发生、发展的重要分子机制。PTGS1 是编码催化花生四烯酸转化为前列腺素相似酶的基因之一,在炎症反应和 AS 的情况下,PTGS1 可表现为诱导性的表达,其编码的蛋白质 COX-1 参与血栓素 A2 的生成,能收缩血管、使血小板聚集活化以及增殖血管平滑肌细胞,其作用可被非甾体抗炎药如阿司匹林所抑制^[23]。PTGS1 的基因多态性对 AS 脑梗死急性期患者应用阿司匹林治疗的敏感性和疗效均有影响,在应用阿司匹林的临床治疗中,应根据患者基因型差异,进一步合理用药^[24]。PGR 编码的蛋白受体与黄体酮结合产生生理作用,黄体酮通过膜黄体酮受体激活 FA 信号传导引起血管平滑肌细胞松弛,起到抗 AS 的作用^[25]。此外,黄体酮可抑制 ox-LDL 诱导的单核巨噬细胞免疫反应,可能有利于降低绝经前妇女心血管疾病的发病率^[26-27]。

GO 富集分析发现,脂质代谢信号通路、NF- κ B 信号通路与川芎-赤芍药对抗 AS 密切相关,与现有的研究结果相互印证。NF- κ B 的主要亚基 p65 被激活后,进入细胞核内直接调节靶点的表达,从而影响 AS 等心脑血管疾病中细胞增殖、分化和炎症反应,促进心血管疾病发生、发展^[28]。芍药胶囊能够降低

AS 兔主动脉 NF-κB p65 的蛋白结合活性,降低血清 IL-2、IL-6 及 TNF-α 水平,从而抑制炎症反应,达到抗 AS 的目的^[29]。

综上所述,本研究基于高通量数据和中药网络药理学构建了中药活性成分-靶点-信号通路的调控网络,探索川芎-赤芍药对抗 AS 的作用机制,据此发现的一些靶点和信号通路具有潜在的诊断和治疗价值。然而,本研究仅对现有数据分析,结果仍需进一步科学实验验证。本研究通过探讨活血化瘀中药川芎-赤芍药对干预 AS 的网络药理学作用机制,以期为该药对进一步的实验基础研究和临床应用及推广提供理论支撑,也为探索中医药治疗 AS 的新研究靶点和方向提供科学依据。

参考文献

[1] SOEHNLEIN O, LIBBY P. Targeting inflammation in atherosclerosis-from experimental insights to the clinic[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8): 589-610.

[2] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.

[3] ZHAO Y, AN X F, LIU J S, et al. The improvement of oxidative stress by two proprietary herbal medicines in type 2 diabetes[J]. *Complement Ther Med*, 2018, 40: 120-125.

[4] LIU Z, XU S, HUANG X, et al. Cryptotanshinone, an orally bioactive herbal compound from Danshen, attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23): 5661-5675.

[5] 《心肺血管病杂志》编辑部. 中国心血管健康与疾病报告 2019[J]. *心肺血管病杂志*, 2020, 39(10): 1157-1162.

[6] 蒋跃绒, 谢元华, 张京春, 等. 陈可冀治疗心血管疾病血瘀证用药规律数据挖掘[J]. *中医杂志*, 2015, 56(5): 376-380.

[7] 袁蓉, 王燕, 丛伟红, 等. 芍药胶囊治疗心血管病研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 640-643.

[8] ZHANG L, JIANG Y R, GUO C Y, et al. Effects of active components of Red Paeonia and Rhizoma Chuanxiong on angiogenesis in atherosclerosis plaque in rabbits[J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(5): 359-364.

[9] ZHANG Y H, ZHANG Y, LI J, et al. Protective effects of Xiongshao Capsule (芍药胶囊) on anti-inflammatory function of high-density lipoprotein in an atherosclerosis rabbit model[J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(5): 357-361.

[10] 盛松, 徐凤芹, 张艳虹. 芍药胶囊对动脉粥样硬化模型兔血脂和超敏 C 反应蛋白的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(17): 2595-2598.

[11] 袁蓉, 施伟丽, 信琪琪, 等. 川芎—赤芍药对研究进展[J]. *环球中医药*, 2019, 12(5): 808-811.

[12] HE S M, HE S Q, CHEN Y K, et al. Beta-sitosterol modulates the migration of vascular smooth muscle cells via the PPARG/AMPK/mTOR pathway[J]. *Pharmacology*, 2022, 107(9/10): 495-509.

[13] MICHICOTL-MENESES M M, THOMPSON-BONILLA M D R, REYES-LÓPEZ C A, et al. Inflammation markers in adipose tissue and cardiovascular risk reduction by pomegranate juice in obesity induced by a hypercaloric Diet in wistar rats[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2577.

[14] 邹琳, 张昕, 李丽. 鞣花酸通过转化生长因子-β/丝/苏氨酸激

酶受体通路对心肌梗死大鼠心肌纤维化的改善作用[J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(8): 843-849.

[15] LI C M, LIU Y, XIE Z, et al. Stigmasterol protects against ang II-induced proliferation of the A7r5 aortic smooth muscle cell-line[J]. *Food Funct*, 2015, 6(7): 2266-2272.

[16] LIFSEY H C, KAUR R, THOMPSON B H, et al. Stigmasterol stimulates transintestinal cholesterol excretion independent of liver X receptor activation in the small intestine[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 76: 108263.

[17] TAO C, SHKUMATOV A A, ALEXANDER S T, et al. Stigmasterol accumulation causes cardiac injury and promotes mortality[J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 20.

[18] YUAN R, SHI W L, XIN Q Q, et al. Tetramethylpyrazine and paeoniflorin inhibit oxidized LDL-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells via VEGF and notch pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 3082507.

[19] 陈莉, 范晓迪, 史大卓, 等. 芍药苷抑制 NF-κB/YY1 信号通路改善 TNF-α 诱导人脐静脉内皮细胞炎症反应的实验研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(22): 3756-3763.

[20] 韦磊, 王绚, 陈雄, 等. 汉黄芩素缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化和 NF-κB 介导的动脉炎症反应[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(5): 750-757.

[21] ZHANG Z Z, YU X H, TAN W H. Baicalein inhibits macrophage lipid accumulation and inflammatory response by activating the PPARγ/LXRα pathway[J]. *Clin Exp Immunol*, 2022, 209(3): 316-325.

[22] ZHANG X X, QIN Y T, RUAN W B, et al. Targeting inflammation-associated AMPK/Mfn-2/MAPKs signaling pathways by baicalein exerts anti-atherosclerotic action[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4442-4455.

[23] SMITH W L, DEWITT D L, GARAVITO R M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 145-182.

[24] 钱剑宁. PTGS1、LTC4S、GP1BA 基因多态性与肇庆地区动脉粥样硬化型脑梗死急性期患者阿司匹林疗效的相关性研究[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(18): 181-183.

[25] PANG Y F, THOMAS P. mPRα and PR co-operate in progesterone inhibition of endothelial cell focal adhesion[J]. *J Mol Endocrinol*, 2023, 70(1): e220073.

[26] BEJAN-ANGOULVANT T, ARNAL J F. Endogenous and exogenous estrogens[J]. *Presse Med*, 2019, 48(11 Pt 1): 1244-1248.

[27] GROH L A, VEREL D E, VAN DER HEIJDEN C D C C, et al. Immune modulatory effects of progesterone on oxLDL-induced trained immunity in monocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112(2): 279-288.

[28] LI W J, JIN K H, LUO J C, et al. NF-κB and its crosstalk with endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 988266.

[29] 张艳虹, 徐凤芹. 芍药胶囊对动脉粥样硬化兔主动脉 NF-κB 及相关炎症因子的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(7): 2334-2337.

(收稿日期:2023-08-14 修回日期:2023-11-27)