

基于网络药理学和实验验证探讨黄芪耐缺氧的作用机制

李爱平*,张星星,朱云峰,但春风,李犇,秦雪梅

(山西大学 中医药现代研究中心,山西 太原 030006)

摘要:采用网络药理学探讨黄芪耐缺氧的潜在作用机制。利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)结合大量文献获取黄芪的主要化学成分及其靶点;通过在线人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)、GeneCards、DrugBank和Uniprot数据库筛选耐缺氧相关靶点;利用功能蛋白关联(String)网络进行蛋白质相互作用(Protein-Protein Interaction, PPI)分析筛选关键靶点;采用Metascape数据库分析其参与的生物过程及通路;利用分子对接和实验进行验证。结果显示,黄芪有24个主要有效成分,238个作用靶点,整合多个数据库得出耐缺氧靶点1 013个,两者相交靶点137个。基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析包含生物过程(Biological Process, BP)1 916个,细胞组成(Cellular Component, CC)102个,分子功能(Molecular Function, MF)176个,京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路获得199条。筛选得到黄芪耐缺氧核心靶点有血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)等,反推黄芪潜在的活性成分有黄酮和皂苷类成分如槲皮素和黄芪甲苷等。分子对接验证槲皮素、山柰酚、黄芪皂苷I、II、III和黄芪甲苷与VEGFA、HIF-1 α 均展现出良好的结合作用。酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)确证黄芪可通过下调核心靶基因VEGFA的表达发挥抗缺氧作用,果蝇实验进一步表明黄芪具有耐缺氧作用。本研究初步阐明黄芪中黄酮和皂苷类成分如黄芪甲苷、槲皮素等可通过调控关键靶点HIF-1 α 、VEGFA发挥抗缺氧的作用。研究结果有望为黄芪在典型作业环境(如高原低氧)中的开发应用提供依据。

关键词:网络药理学;分子对接;黄芪;耐缺氧;血管内皮生长因子A

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2395(2025)02-0226-12

Hypoxia Tolerance Effect and Mechanism of *Astragali Radix* Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

LI Aiping*, ZHANG Xingxing, ZHU Yunfeng, DAN Chunfeng, LI Ben, QIN Xuemei

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Network pharmacology was used to explore the potential mechanism underlying the hypoxia tolerance of *Astragali Radix* (AR). The primary active components and molecular targets of AR were identified using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database and a large number of literatures. Targets related to hypoxia tolerance were screened through Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards, DrugBank and Uniprot databases. The functional protein association (STRING) network was employed to screen key targets for protein-protein interaction (PPI) analysis. The

收稿日期:2024-07-06;接受日期:2024-11-19

基金项目:国家自然科学基金(82204595);山西省基础研究计划资助项目(202303021221070);博士后基金(340903);山西省重点实验室(202105D121009)

* 通信作者:李爱平(1988-),女,山西大同人,博士,副研究员,研究方向为基于代谢组学技术的药食同源中药质量控制及肾病药理。E-mail:aipingli@sxu.edu.cn

引文格式:李爱平,张星星,朱云峰,等.基于网络药理学和实验验证探讨黄芪耐缺氧的作用机制[J].山西大学学报(自然科学版),2025,48(2):226-237. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024164.

biological processes and pathways involved were analyzed using Metascape database. Molecular docking and animal experiments were used for verification. The results showed that AR contains 24 main active ingredients and 238 action targets, comparing with 1 013 hypoxia tolerance targets identified by integrating multiple databases, resulting in 137 shared targets. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis revealed 1 916 biological processes (BP), 102 cell compositions (CC), 176 molecular functions (MF), and 199 KEGG pathways. Key targets for hypoxia tolerance in AR were identified as VEGFA, HIF-1 α and IL-6. The potential active ingredients of AR are flavonoids and saponins such as quercetin and astragaloside IV. Molecular docking proved that quercetin, kaempferol, astragaloside I, II, III and astragaloside IV demonstrated strong combination between VEGFA and HIF-1 α . ELISA confirmed the ability of AR to mitigate hypoxia suppressing VEGFA expression, a core target gene. The experiments of *Drosophila* further showed that AR has hypoxia tolerance. The study provides initial evidence that flavonoids and saponins in AR, such as astragaloside IV and quercetin, can alleviate hypoxia by modulating key targets HIF-1 α and VEGFA, offering potential implications for the utilization of *Astragalus* root in challenging environmental conditions such as high-altitude hypoxia.

Key words: network pharmacology; molecular docking; *Astragali Radix*; hypoxia tolerance; VEGFA

0 引言

在需氧生物中,氧张力是组织维持发育的最关键生理因素之一。氧气在能量代谢中起着至关重要的作用,哺乳动物依赖氧气以产生三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP),无论是在高海拔地区还是在贫血或肺部疾病的临床环境中,都易产生缺氧情况^[1]。缺氧是指组织中氧气水平低或不足,与生理和病理状况有关^[2]。机体在缺氧时会产生各种反应,如眩晕、头疼眼花、耳鸣如潮、四肢无力、心慌、气急、气短、呼吸急促和心脏跳动过速等,甚至出现呼吸衰竭,进而可能会危及生命。有研究显示,轻度缺氧时,机体会通过提高氧气利用效率和血液运输能力来缓解缺氧带来的不适感,如增加组织细胞内膜表面积或线粒体的数量等;然而,严重缺氧时,机体的代偿反应难以正常进行,致使组织细胞和器官遭受严重损伤与功能异常,甚至出现死亡现象^[3]。

黄芪,为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,其性味甘而微温,归肺、脾两经,具有补气升阳,利水消肿,生津养血等功效。黄芪主要活性成分有多糖、皂苷,黄酮等,具有清除自由基、保护细胞结构、抗凋亡和抗氧化的功效^[4]。已有研究表明,在缺氧条件下,黄芪多糖可以抑制细胞自噬,促使血管内皮细胞增殖,从而推进新的血管生成^[5]。此外,黄芪百合颗粒可以显著增强肺功能,降低肺的干湿比,减少下游促炎细胞因子的释放,减轻高原缺氧诱导的肺组织损伤^[6]。黄芪总皂苷可通过抑制体内的氧化应激损伤,有效提高超氧化物歧化酶和过氧化氢酶

两种抗氧化酶水平,从而减轻缺氧性肺动脉高压造成的肺损伤^[7]。黄芪总黄酮在缺氧条件下可显著刺激细胞增殖,促进血管舒张,抑制凋亡,从而舒张缺氧肾上腺素收缩的肠系膜动脉^[8]。

缺氧环境可以诱导氧化应激、炎症反应等,进而对机体组织器官造成损伤,而黄芪则可以减轻这一情况,但其耐缺氧的作用机制尚未清楚。本研究通过网络药理学,寻找黄芪中与耐缺氧相关的有效成分,并运用分子对接技术和动物实验进行验证,探讨黄芪耐缺氧潜在的分子机制。

1 网络药理学方法

1.1 黄芪有效成分和潜在作用靶点的筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<http://tcmospw.com/tcmosp.php>)在线数据库中,搜索黄芪,筛选同时满足口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的有效成分,并结合文献及课题组前期的实验结果,收集黄芪的有效成分。

在TCMSP数据库中收集黄芪有效成分对应的靶点;在PubChem数据库中输入有效成分的化学物质唯一的数字识别号码(Chemical Abstracts Service, CAS),将其转换为简化分子线性输入系统编号(simplified molecular input line entry system, SMILES),随后在Swiss Target Prediction数据库中进行搜索,获取其对应成分的靶点,将获得的靶点去除重复后进行整合。

1.2 耐缺氧相关靶点的收集

通过在线人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)(<https://omim.org/>)等可以获取疾病靶点的数据库,以“anti-hypoxia、hypoxia tolerance”作为关键词进行搜索,去除重复靶点进行整合。

1.3 收集疾病和药物共有靶点

将整理后的药物和疾病蛋白靶点输入到 interactivenn(<http://www.interactivenn.net/>)中获得疾病和药物共有靶点,并制作韦恩图。

1.4 构建“药物-化合物-靶点”网络图

将药物名称、有效成分、靶点信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件中构建药物-有效成分-靶点网络。

1.5 构建蛋白互作网络图和预测活性成分

在 STRING 数据库中(<https://cn.string-db.org/>),对共有靶点基因进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,采用 Cytoscape 3.8.0 软件对结果进行可视化处理。依据网络拓扑参数 Degree 值筛选出核心靶点,与有效成分靶点进行映射,获得活性成分。

1.6 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

运用 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>)对共有靶点进行基因本体(Gene Ontology, GO)分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,选定物种为“Homo sapiens”, $P < 0.05$,获取排名靠前的生物过程(Biological Process, BP),细胞组成(Cellular Component, CC),分子功能(Molecular Function, MF)或通路。分析结果进行可视化处理。

1.7 分子对接

在 TCMSP 数据库搜索核心有效成分,下载 3D 结构的 mol2 文件;靶蛋白基因从 PDB 数据库中下载核心靶点蛋白质结构获得潜在作用靶点的 sdf 文件,利用 OpenBabel 2.4.1 将黄芪有效成分和潜在作用靶点 3D 结构的 sdf 文件转化为 mol2 格式。采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件,分别将小分子及蛋白质结构进行加氢、去水等操作,设置为配体及受体并保存为 pdbqt 文件。对接盒子的大小由配体和受体的大小及结合位点决定,设置合适的对接盒子大小后进行多次半

柔性对接,选择最低结合能时的模式进行分析,使用 PyMOL 进行可视化。

2 验证实验

2.1 黄芪对缺氧小鼠耐缺氧相关蛋白表达的影响

2.1.1 药品制备

山西浑源黄芪(仿野生蒙古黄芪),购自山西西北岳神耆生物科技有限公司,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

黄芪水提物制备:取黄芪适量,浸泡 8 h,分别以 10 倍和 8 倍量的水,分两次回流提取,每次提取 2 h,最终浓缩为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,冷冻在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存,于给药前稀释至合适浓度。

2.1.2 实验动物分组及造模

选取雄性昆明小鼠,体质量 $18 \text{ g} \sim 20 \text{ g}$,共 21 只(北京华阜康,许可证号:SCXK(京)2019-0008)。正式试验前适应性饲养 3 d,温度: $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 24 \text{ }^{\circ}\text{C}$;湿度 $30\% \sim 40\%$;给予自由饮食和交替 12 h 光照,均在常氧环境中饲养。将小鼠随机分为 3 组,每组 7 只:正常对照组(C)、模型组(M)、黄芪给药组(HQ)。HQ 组每天进行灌胃给药处理($860 \text{ mg/kg} \cdot \text{bw}$),C 组、M 组小鼠需灌胃相应的生理盐水。常氧条件下灌胃预防性给药 14 d,第 15 天动物放入高原低压低氧模拟舱中,模拟海拔 4 000 m,灌胃给药 21 d,每 12 h 明暗交替;第 36 d 在低氧环境进行 90 min 自由游泳实验。游泳结束后捞出,毛巾擦干,将小鼠麻醉后,眼球取血,用 EP 管收集血液后,放置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 2 h,用高速冷冻离心机以 $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min,取上清液于 EP 管中,放置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中冻存备用。小鼠摘眼球取血完成后颈椎脱位处死,取小鼠肝脏液氮速冻后分装,放置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中冻存备用。上述实验符合军事医学研究院实验动物伦理委员会指导原则(福利伦理审查编号:IACUC of AMMS-04-2022-042)。

2.1.3 ELISA 法检测大鼠肝脏、血清中总 VEGFA 水平

取小鼠血清、肝脏组织,严格按照试剂盒说明操作,采用酶联免疫吸附试验(Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay, ELISA)法检测血清和肝脏中血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)水平。

2.2 浑源黄芪对缺氧果蝇耐缺氧能力的影响

2.2.1 黄芪冻干粉制备

取“2.1.1”项下黄芪水提物放置于真空冷冻干燥机内冻干,冻干后研磨为粉状,放置干燥器内备用。

2.2.2 培养基的制备

基础培养基的配制步骤:称取85 g的玉米粉和70 g的蔗糖,从1 000 mL纯水中取出少量并搅拌溶解。将剩余的纯水加入电饭锅煮沸,取适量沸腾的纯水将18 g的酵母粉溶解,随后向锅中加入琼脂并搅拌均匀,待重新沸腾后,加入玉米粉和蔗糖混合后的溶液,边加边搅拌以防粘锅,等再次沸腾后,加入酵母粉溶液并搅拌均匀,将锅调为保温,最后加入5 mL的丙酸,充分搅拌使之混匀。

用药培养基的配制方法:将黄芪冻干粉加入已配好的基础培养基中,并快速搅拌混匀使冻干粉完全溶解。制成含1.25 mg/mL的黄芪冻干粉的用药培养基。

2.2.3 实验分组

收集72 h内羽化的雄果蝇,随机分为3组,C(空白组)、M(模型组)、HQ(黄芪给药组),每组果蝇数不得少于100只,每管25只左右。在0 d—14 d的时候为基础培养,每3天换一次培养基,在15 d—20 d的时候为给药培养,按1.25 mg/mL的给药量培养6 d,培养环境温度大约为25℃,湿度大约为70%。最后一天给药后2 h,做常压耐缺氧实验和攀爬实验,继而观察给药后5 d的死亡情况。

2.2.4 常压耐缺氧实验

最后1 d给药后,将所有果蝇换至空EP管内,并用薄纱布封口,随后将其放入充满CO₂的塑料盒(先放入厌氧包0.5 h使盒中氧气被吸收完全)中密封2 h,在无氧条件下果蝇会逐渐丧失正常的活动力,并倒在薄纱布处。实验结束后,将果蝇转移到基础培养基中,使其恢复到正常状态,记录并统计果蝇5 d内的死亡数。之后每隔3 d换一次管。

2.2.5 攀爬实验

完成常压耐缺氧实验后,果蝇恢复4 h~6 h后,将果蝇放入透明塑料长管(透明塑料长管为19 cm,小于1 cm记为1,此后每隔2 cm为一个挡位),让其适应5 min,轻拍管子震荡使果蝇全部落于管底,开始计时2 min,果蝇因负趋地性会向上攀爬,随后记录管中每段高度果蝇的数量,进行统计分析。攀爬试验连续测量3次,每次间隔20 min。

2.3 统计学分析

采用Graph Pad 9.5.0(GraphPad Software, American)分析,数据用均值±标准差表示,通过评估数据正态性以及方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用*t*检验, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪有效成分和潜在作用靶点的收集

药物有效成分经 $OB\geq 30\%$ 和 $DL\geq 0.18$ 条件筛选后,从TCMSP数据库中查找到黄芪有效成分20个,靶点462个,其中3个有效成分需要通过PubChem和SMILES数据库进行靶点搜索。在文献和课题组前期的实验结果中,查找到黄芪有效成分12个。删去重复,共得到24个黄芪有效成分,如表1所示。通过Uniprot数据库将整理后的有效成分靶点蛋白名转换为基因名,删除无法对应的靶点和重复值,进行整合得到238个潜在的作用靶点。

3.2 疾病靶点的获取

通过GeneCards、OMIM、Uniprot和DrugBank数据库检索获得的耐缺氧相关靶点数量分别为3 705、30、36和156个,通过去重整合共得到1 013个与耐缺氧相关的靶点。黄芪和耐缺氧靶点融合后获得137个交集靶点,结果如图1所示。

3.3 共有靶点获取及网络“药物-化合物-靶点”构建

使用Cytoscape 3.8.0软件将黄芪的24个有效成分与248个构建药物-化合物-靶点的拓扑网络,由图2所示可见,黄芪的一个有效成分可作用于多个靶点,同时一个靶点也可以和多个成分产生关联,表明黄芪通过多成分、多靶点协同发挥耐缺氧作用。

表1 黄芪有效成分

Table 1 Active ingredients of *Astragali Radix*

编号	MOLID	活性成分
HQ1	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol
HQ2	MOL000098	quercetin
HQ3	MOL000211	Mairin
HQ4	MOL000239	Jaranol
HQ5	MOL000296	hederagenin
HQ6	MOL000354	isorhamnetin
HQ7	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol
HQ8	MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin
HQ9	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol
HQ10	MOL000379	9,10-dimethoxypteroecarpin-3-O-β-D-glucoside
HQ11	MOL000387	Bifendate
HQ12	MOL000391	Ononin
HQ13	MOL000392	formononetin
HQ14	MOL000398	isoflavanone
HQ15	MOL000401	Astragaloside I
HQ16	MOL000403	Astragaloside II
HQ17	MOL000405	Astragaloside III
HQ18	MOL000407	Astragaloside IV
HQ19	MOL000417	Calycosin
HQ20	MOL000418	3'-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-O-beta-D-glucoside
HQ21	MOL000422	kaempferol
HQ22	MOL000433	FA
HQ23	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside
HQ24	MOL000442	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene

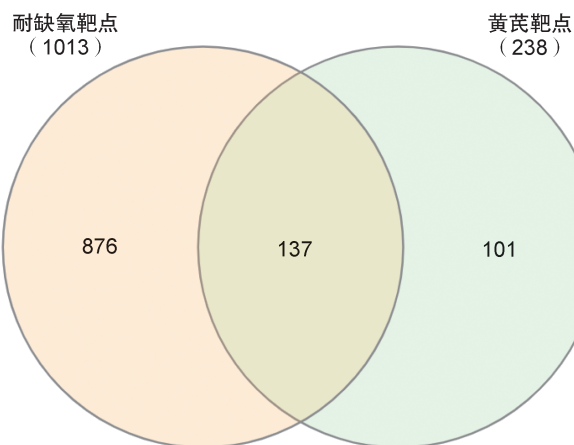


图1 黄芪和耐缺氧交集靶点

Fig. 1 Intersection targets of *Astragali Radix* and hypoxia tolerance

3.4 蛋白互作网络图及活性成分预测

利用 STRING 平台构建药物与疾病交集靶点的 PPI 网络,共有 137 个节点,2 922 条边,可视化后如图 3 所示。依据网络拓扑参数 Degree

值,排名前 10 的靶点依次为蛋白激酶 B (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF)、肿瘤蛋白 53 (Tumor Protein 53, TP53)、VEGFA、胱天蛋白酶 3 (Caspase-3, CASP3)、白细胞介素-1β (Interleukin-1 beta, IL-1β)、表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)、缺氧诱导因子-1α (Hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1α)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2), 如表 2 所示。将前 10 个核心靶点与黄芪有效成分靶点进行映射,得到黄芪耐缺氧的潜在活性成分有:黄芪甲苷、槲皮素、山柰酚、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III。

3.5 GO 富集分析

利用 Metascape 平台进行富集分析,共筛选与 BP 相关的有 1 916 条,CC 102 条,MF 176

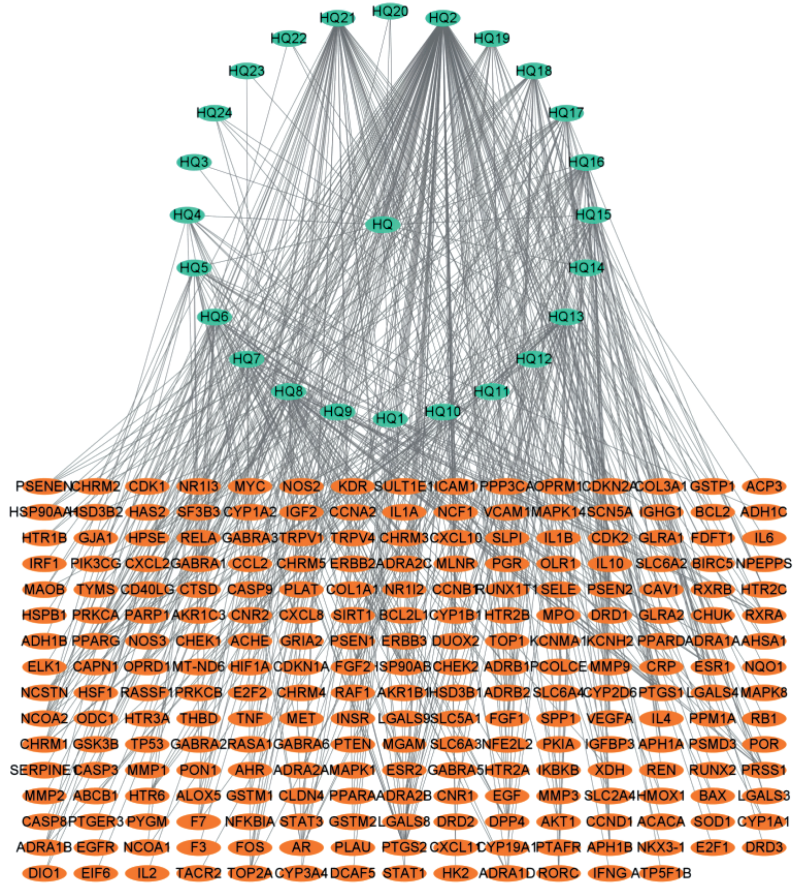


图2 “黄芪-有效成分-靶点”网络

Fig. 2 Network diagram of "Astragali Radix-active ingredients-targets"

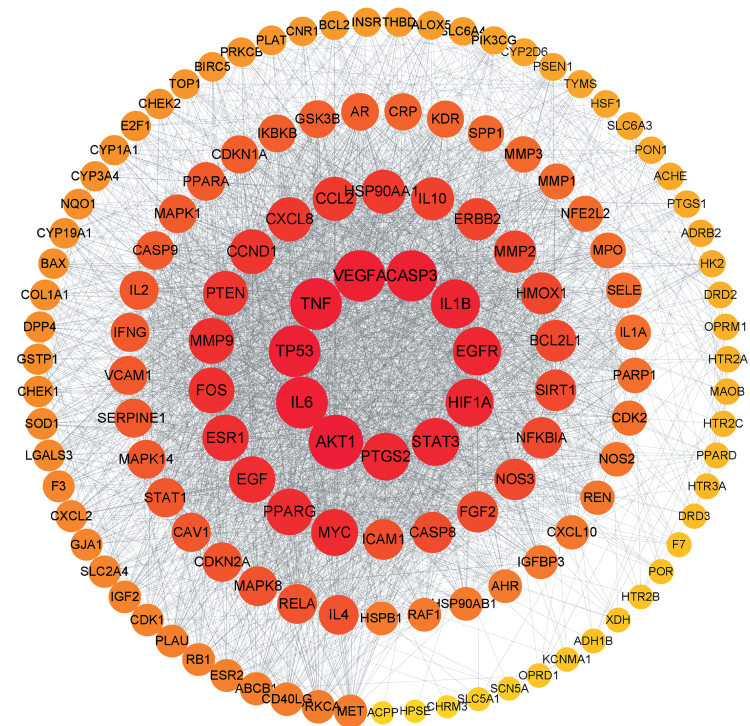


图3 PPI网络模型

Fig. 3 PPI network model

表2 核心靶点及Degree
Table 2 Core targets and Degree

No.	靶点名称	中文名称	Degree
1	AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶	110.0
2	IL6	白细胞介素-6	101.0
3	TNF	肿瘤坏死因子	100.0
4	TP53	细胞肿瘤抗原p53	100.0
5	VEGFA	血管内皮生长因子A	99.0
6	CASP3	半胱氨酸蛋白酶-3	98.0
7	IL1 β	白细胞介素-1 β	91.0
8	EGFR	表皮生长因子受体	89.0
9	HIF-1 α	缺氧诱导因子-1 α	88.0
10	PTGS2	前列腺素G/H合成酶2	87.0

条;按 P 值排序,分别选取 BP、CC、MF 排名前 10 的 GO 条目作图,结果见图 4;BP 主要涉及细胞对氮化合物、无机物质、化学应激反应、缺氧以及对激素的反应等;CC 主要涉及膜囊泡、膜微区、质膜、囊腔、轴突等;MF 主要富集在 DNA 结合转录因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、蛋白激酶结合、转录因子结合、磷酸转移酶活性等。

3.6 KEGG 富集分析

KEGG 通路分析得到 199 条黄芪耐缺氧的通路,选取排名前 20 的通路作图,结果如图 5 所示,主要包括 P13K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 信号通路等,提示上述通路可能是黄芪发挥耐缺氧作用的关键通路。

3.7 分子对接验证结果

根据网络药理学得到的核心靶点结合文献调研发现,VEGFA、HIF-1 α 与耐缺氧关系密切,选择缺氧关键靶点 VEGFA 和 HIF-1 α 与黄芪主要活性成分进行分子对接验证。结合能反映小分子与靶蛋白的结合情况;结合能 < 0 ,说明小分子与靶蛋白可以结合,数值越小,结合的概率越高,验证结果如表 3 所示。结果显示,VEGFA 与 HIF-1 α 和黄芪主要活性成分均有很好的结合作用,且 VEGFA 与活性成分的结合作用强于 HIF-1 α 与活性成分的结合作用。同时,在筛选到的黄酮类成分中,槲皮素和 VEGFA 与 HIF-1 α 的结合作用强于山柰酚;在筛选到的皂苷类成分中,黄芪甲苷和 VEGFA 与 HIF-1 α 的结合作用强于黄芪皂苷 I、黄芪皂苷

II、黄芪皂苷 III。部分活性成分与核心靶点的分子对接图如图 6 所示。

3.8 ELISA 检测结果

研究表明,缺氧时 HIF-1 α 高表达,同时其下游靶点 VEGF 水平显著增加,因此在本研究中选择 VEGFA 进行后续实验验证。与空白组相比,模型组大鼠血清和肝脏中 VEGFA 含量均显著升高 (** $P < 0.01$);与模型组相比,黄芪给药组血清和肝脏中 VEGFA 含量均有不同程度降低 (**** $P < 0.001$ 或 ** $P < 0.01$),如图 7 所示。结果提示,黄芪中活性成分可能通过降低 VEGFA 含量发挥耐缺氧的作用。

3.9 攀爬实验结果

空白、模型和给药组果蝇多居于下部,但组间没有明显的变化趋势;与空白组相比,模型组果蝇中部占比高于空白组,多居于中下部,表明缺氧条件可使果蝇的攀爬能力降低;与模型组相比,黄芪给药组的上部果蝇占比显著高于模型组 (* $P < 0.05$),如图 8 所示,说明黄芪可缓解缺氧导致的攀爬能力减弱的情况。

3.10 死亡率

与空白组相比,模型组在第 5 天的死亡数急剧增加,表明造模成功;与模型组相比,黄芪给药组果蝇在第 5 天的死亡情况有所降低。如图 9 所示,说明黄芪可缓解由缺氧造成的死亡情况。

4 讨论与结论

在存在缺氧压力的情况下,哺乳动物细胞会激活一系列下游途径,主要包括缺氧诱导因子(HIF)、自噬、哺乳动物靶蛋白雷帕霉素等能量代谢途径,以及内质网应激等细胞应激途径^[9-10]。缺氧不仅限制活动能力,还可引起心、肺、脑损伤,影响生命健康,因此开展有效提升耐缺氧能力的药物研究具有重要意义。黄芪具有补气的功效,含黄芪的药方常用于治疗缺氧损伤,但其耐缺氧的机制尚未明确。因此本研究运用网络药理学技术筛选黄芪发挥耐缺氧的活性成分、靶点及通路,并结合分子对接和动物实验进行初步验证,为黄芪在提高缺氧耐受能力的应用提供依据。

本研究预测性筛选出黄芪 24 个有效成分以及 238 个靶点,将黄芪的 238 个靶点与 1 013

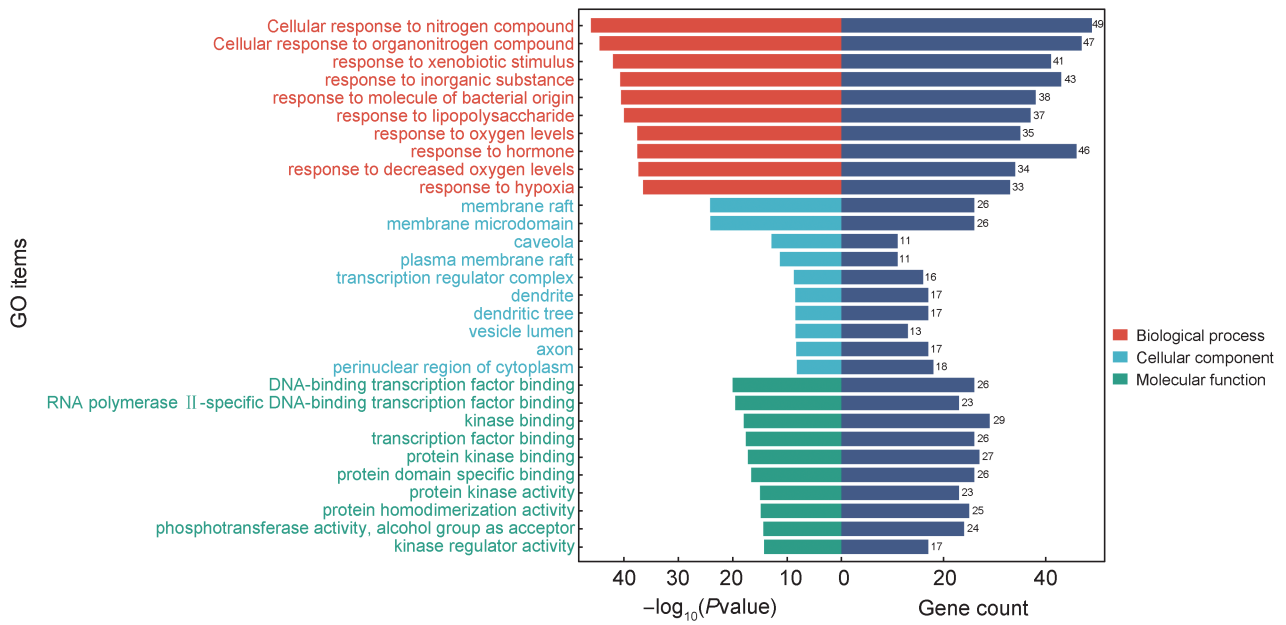


图4 GO功能富集图

Fig. 4 GO functional enrichment diagram

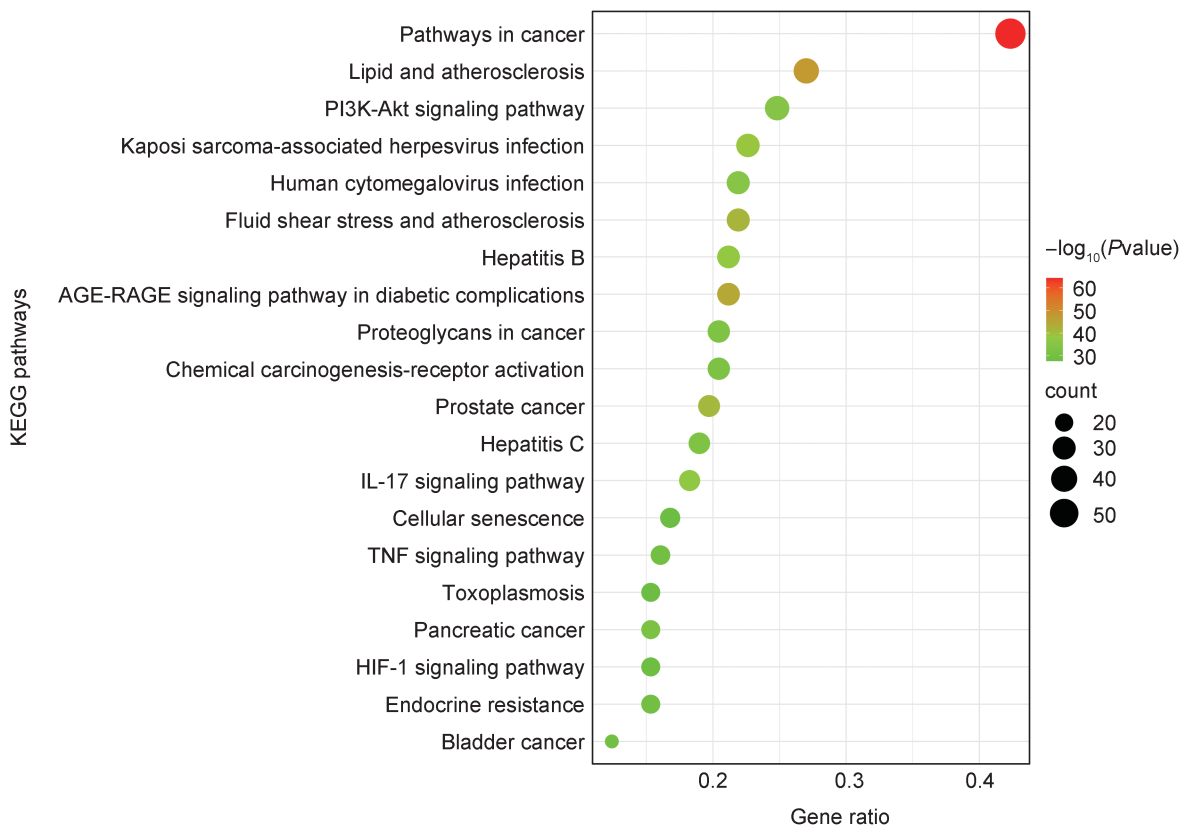


图5 KEGG通路富集分析(前20)

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

个耐缺氧相关靶点取交集,得出137个共有关键靶点,其中位于蛋白质-蛋白质相互作用网络中心的有VEGFA、HIF-1 α 、IL-6等。缺氧诱导因子(HIF-1 α)是一种氧依赖性转录激活因

子^[11],HIF可参与血管生成,血管张力,金属转运,糖酵解,线粒体功能,细胞生长和存活等生命过程,表明HIF在氧稳态中的核心作用^[12]。缺氧环境下,通心络可以通过提高HIF蛋白表

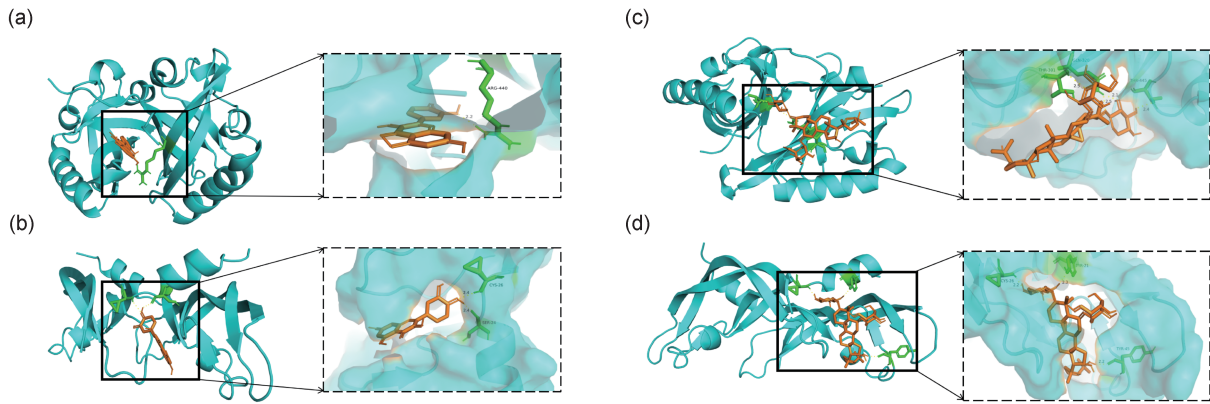


图6 主要活性成分与核心靶点分子对接图

(a)为槲皮素与HIF-1 α 对接;(b)为槲皮素与VEGFA对接;(c)为黄芪甲苷与HIF-1 α 对接;(d)为黄芪甲苷与VEGFA对接。

Fig. 6 Molecular docking diagram of main active ingredients and core targets

(a) Quercetin docking with HIF-1 α ; (b) Quercetin docking with VEGFA; (c) Astragaloside docking with HIF-1 α ; (d) Astragaloside docking with VEGFA.

表3 主要活性成分与核心靶点的分子对接

Table 3 Main active ingredients and core targets by molecules docking

化合物	VEGFA/(kcal·mol ⁻¹)	HIF-1 α /(kcal·mol ⁻¹)
槲皮素	-7.1	-7.6
山柰酚	-7.2	-7.2
黄芪皂苷 I	-8.6	-7.2
黄芪皂苷 II	-9.0	-7.9
黄芪皂苷 III	-9.3	-8.3
黄芪甲苷	-8.6	-9.6

达水平,进而发挥抗凋亡作用,从而改善血管内皮细胞缺氧损伤^[13]。在缺氧性肺动脉高压期间,线粒体自噬在缺氧的肺组织中上调,缺氧线粒体自噬受体介导的线粒体自噬可通过活

性氧-缺氧诱导因子 1 α (Reactive oxygen species-Hypoxia-inducible factor 1 α , ROS-HIF1 α) 通路并促进肺动脉平滑肌细胞增殖,最终导致肺血管重塑^[14]。靶组织相应缺氧产生的 VEGF,是血管发育和稳态的主要调节因子,VEGF 基因的转录受 HIF 控制^[15]。有研究表明,HIF-1 α 和 VEGFA 可参与缺血缺氧脑卒中血管再生,表现其强大的抗氧化活性^[16]。另外,VEGFA 被证实对缺氧复氧成骨细胞损伤有明显的保护作用^[17]。缺氧会导致很多炎症介质的释放,且缺氧程度越重,炎症介质释放量增加。其中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 是缺氧性组织损伤中的重要介质。有研究表明,知母皂苷 B 通过抑制缺

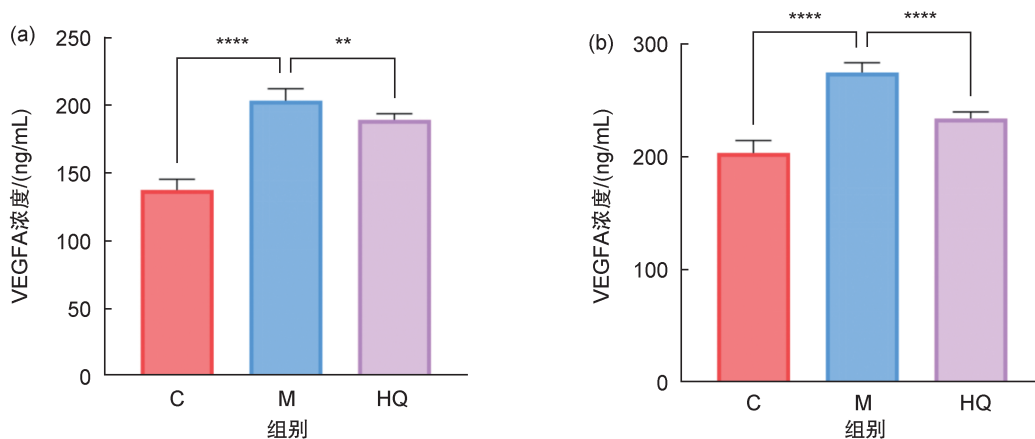
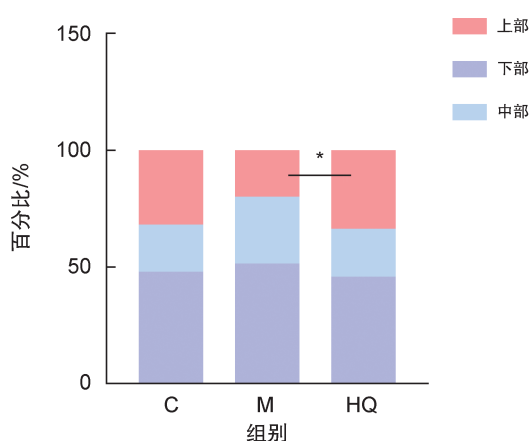


图7 黄芪对慢性缺氧小鼠肝脏、血清中 VEGFA 水平的影响

(a)为肝脏中 VEGFA 浓度;(b)为血清中 VEGFA 浓度;**** $P < 0.001$,** $P < 0.01$ 。

Fig. 7 Effect of Astragali Radix on the level of VEGFA in liver and serum of chronic hypoxia mice

(a) VEGFA concentration in liver, (b) VEGFA concentration in serum; **** $P < 0.001$,** $P < 0.01$.



注:HQ与M上部果蝇占比比较, * $P < 0.05$ 。

Note: The proportion of flies in the upper part of HQ and M was compared, * $P < 0.05$.

图8 黄芪对果蝇耐缺氧模型攀爬能力的影响

Fig. 8 Effect of Astragali Radix on the climbing ability of *Drosophila* hypoxia tolerance model

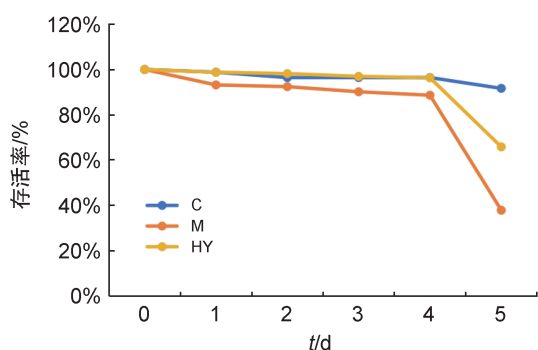


图9 常压缺氧试验后果蝇5d内的生存情况

Fig. 9 Survival of *Drosophila* within five days after hypoxia test

氧/复氧损伤星形胶质细胞的炎症始动因子TNF- α 的表达,下调水通道蛋白4(Aquaporin-4, AQP-4)和IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌,减轻脑缺血/再灌注损伤的症状^[18]。AKT1是细胞存活和增殖的重要基因,过表达AKT1的间充质肝细胞在缺氧/复氧条件下表现出更高的存活率和心脏分化,并有效改善了缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡^[19]。本研究发现,与空白组比较,模型组小鼠血清和肝脏中VEGFA含量均显著升高;与模型组相比,黄芪给药组血清和肝脏中VEGFA均有不同程度降低。果蝇实验进一步表明,黄芪可缓解果蝇缺氧状态。结果提示,黄芪中活性成分可改善小鼠缺氧状态,可能与调控VEGFA有关。

KEGG富集分析发现多条与黄芪耐缺氧相

关的信号通路,包括癌症途径、IL-17信号通路、缺氧诱导因子-1信号通路等。此外,活性成分预测和分子对接验证结果显示黄酮和皂苷类成分与VEGFA和HIF-1 α 均有较好的结合作用,其中黄芪甲苷和槲皮素具有更好的结合作用。有研究报道,黄芪甲苷通过作用于HIF-1 α 相关通路,改善野百合碱引起的大鼠氧化应激进而减轻肺功能损伤^[20]。亦有研究发现,黄芪甲苷可改善因长期缺氧诱发海马神经元和空间学习与记忆的损伤,该作用与减轻氧化应激并抑制细胞凋亡密切相关^[21]。另外,黄芪甲苷被报道刺激并稳定缺氧损伤的H9c2心肌细胞中HIF-1 α 的表达,从而增强H9c2细胞的活力并减少细胞凋亡^[22]。据报道,槲皮素可通过沉默调节蛋白1/跨膜BAX抑制因子6(Silent Information Regulator 1/transmembrane BAX inhibitor motif containing 6, SIRT1/TMBIM6)通路调节线粒体自噬和内质网应激并抑制缺氧/复氧诱导的氧化应激损伤^[23]。同时,在一项缺血缺氧性引起的退行性改变和炎症的研究中,槲皮素被发现可减少氧化应激,上调HIF-1 α 和VEGF的表达^[24]。另外,在抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究中,乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)含量可作为损伤程度判定的指标,槲皮素被证实能明显降低细胞LDH的释放,降低细胞内一氧化氮(NO)含量,从而改善缺氧复氧损伤后的细胞存活率,提示槲皮素可能通过NO相关通路对心肌细胞缺氧复氧损伤起到保护作用^[25]。本研究中,分子对接结果发现,黄芪中皂苷类和黄酮类成分与HIF-1 α 和VEGFA均具有较好的结合作用,推测黄芪皂苷类和黄酮类成分如甲苷、槲皮素等在耐缺氧中发挥关键作用,具体可能通过调控HIF/VEGF信号通路实现。

本研究采用体外分子对接及体内动物实验对网络药理学预测结果进行了初步的验证,虽已明确黄芪具有确切的耐缺氧作用,且黄芪皂苷类和黄酮类成分如甲苷、槲皮素等关键活性成分可能通过调控HIF-1 α 和VEGFA等发挥作用,然而这些活性成分能否提高实验大鼠耐缺氧能力需要后期实验支撑。另外,黄芪的多靶点调控作用仍需大量分子生物学实验验证。

参考文献:

- [1] BURTSCHER J, MALLET R T, BURTSCHER M, *et al.* Hypoxia and Brain Aging: Neurodegeneration or Neuroprotection?[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, **68**: 101343. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101343.
- [2] CORRADO C, FONTANA S. Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(16): 5611. DOI: 10.3390/ijms21165611.
- [3] 李臣亮. 白囊耙齿菌水提物的抗疲劳、耐缺氧活性及其颗粒剂制备的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
LI C L. Study on the Anti-fatigue and Anti-anoxia Activity of the Water Extract of *Paecilomyces Leucocephala* and the Preparation of Its Granules[D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [4] 全欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, **22**(5): 1246-1249. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.05.099.
TONG X. The Pharmacology Study of Active Constituents from *Astragalus*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2011, **22**(5): 1246-1249. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.05.099.
- [5] 周严东, 高娜, 陈叶飞, 等. 基于细胞自噬探讨缺氧条件下黄芪多糖促进血管新生的机制[J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志, 2023, **6**: 35-42. DOI: 10.3969/j.issn.2096-5516.2023.01.006.
ZHOU Y D, GAO N, CHEN Y F, *et al.* Investigate the Mechanism of *Astragalus* Polysaccharides Promoting Angiogenesis Under Hypoxiacondition Based on Autophagy [J]. *Chinese Journal of Alzheimer's Disease and Related Disorders*. 2023, **6**: 35-42. DOI: 10.3969/j.issn.2096-5516.2023.01.006.
- [6] ZENG Y D, CAO W J, HUANG Y, *et al.* Huangqi Baihe Granules Alleviate Hypobaric Hypoxia-induced Acute Lung Injury in Rats by Suppressing Oxidative Stress and the TLR4/NF-KB/NLRP3 Inflammatory Pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, **324**: 117765. DOI: 10.1016/j.jep.2024.117765.
- [7] 李旭东, 马勇, 邓润鹏, 等. 黄芪总皂苷对缺氧性肺动脉高压作用探讨[J]. 天津医药, 2021, **49**(3): 264-268. DOI: 10.11958/20201704.
LI X D, MA Y, DENG R P, *et al.* The Potential Effects of Astragaloside on Hypoxic Pulmonary Hypertension[J]. *Tianjin Med J*, 2021, **49**(3): 264-268. DOI: 10.11958/20201704.
- [8] LIU Q, ZHANG L, SHAN Q Y, *et al.* Total Flavonoids from *Astragalus* Alleviate Endothelial Dysfunction by Activating the Akt/eNOS Pathway[J]. *J Int Med Res*, 2018, **46**(6): 2096-2103. DOI: 10.1177/0300060517717358.
- [9] NAKAZAWA M S, KEITH B, SIMON M C. Oxygen Availability and Metabolic Adaptations[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, **16**(10): 663-673. DOI: 10.1038/nrc.2016.84.
- [10] RATCLIFFE P J. Oxygen Sensing and Hypoxia Signaling Pathways in Animals: The Implications of Physiology for Cancer[J]. *J Physiol*, 2013, **591**(8): 2027-2042. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.251470.
- [11] LEE J W, BAE S H, JEONG J W, *et al.* Hypoxia-inducible Factor (HIF-1)Alpha: Its Protein Stability and Biological Functions[J]. *Exp Mol Med*, 2004, **36**(1): 1-12. DOI: 10.1038/emmm.2004.1.
- [12] WEBB J D, COLEMAN M L, PUGH C W. Hypoxia, Hypoxia-inducible Factors (HIF), HIF Hydroxylases and Oxygen Sensing[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(22): 3539-3554. DOI: 10.1007/s00018-009-0147-7.
- [13] 梁俊清, 徐海波, 陈小娟, 等. 通心络通过PI-3K/Akt/HIF信号通路改善血管内皮细胞缺氧损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2012, **28**(5): 846-851. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.05.014.
LIANG J Q, XU H B, CHEN X J, *et al.* Tongxinluo Improves Anti-hypoxia Ability of Vascular Endothelial Cells via PI-3K/Akt/HIF Pathway[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2012, **28**(5): 846-851. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.05.014.
- [14] LIU R X, XU C L, ZHANG W L, *et al.* FUNDC1-mediated Mitophagy and HIF1 α Activation Drives Pulmonary Hypertension During Hypoxia[J]. *Cell Death Dis*, 2022, **13**(7): 634. DOI: 10.1038/s41419-022-05091-2.
- [15] RATTNER A, WILLIAMS J, NATHANS J. Roles of HIFs and VEGF in Angiogenesis in the Retina and Brain[J]. *J Clin Invest*, 2019, **129**(9): 3807-3820. DOI: 10.1172/JCI126655.
- [16] VISWANATHA G L, SHYLAJA H, NANDAKUMAR K, *et al.* Acteoside Isolated from *Colebrookea oppositifolia* Attenuates I/R Brain Injury in Wistar Rats via Modulation of HIF-1 α , NF-KB, and VEGF Pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, **29**(5): 1565-1577. DOI: 10.1007/s10787-021-00851-6.
- [17] 赵伊婷, 张裕祥, 马洁, 等. 血管内皮生长因子165/骨形态发生蛋白改善缺氧复氧状态下成骨细胞损伤[J]. 中国组织工程研究, 2024, **28**(35): 5669-5674. DOI: 10.12307/2024.809.
ZHAO Y T, ZHANG Y X, MA J, *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor 165/bone Morphogenetic Protein Improves Osteoblast Injury Under Hypoxic and Reoxygenated Conditions[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2024, **28**(35): 5669-5674. DOI: 10.12307/2024.809.
- [18] 丁玲, 胡毅, 刘洁, 等. 知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2019, **30**(4): 488-492. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.12.
DING L, HU Y, LIU J, *et al.* Protective Effects and the Mechanism of Anemarsaponin B on Hypoxia/Reoxy-

- generation Injury Astrocytes[J]. *China Pharm*, 2019, **30**(4): 488-492. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.12.
- [19] CHEN B D, CHEN X C, LIU C, *et al.* Co-expression of Akt1 and Wnt11 Promotes the Proliferation and Cardiac Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Attenuates Hypoxia/Reoxygenation-induced Cardiomyocyte Apoptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **108**: 508-514. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.047.
- [20] 龚晓男, 孙洋, 王洪新. 黄芪甲苷通过 Calpain-1/HIF-1 α 改善野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠氧化应激[J]. *中药药理与临床*, 2021, **37**(2): 33-38. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20210322.001.
- GONG X N, SUN Y, WANG H X. Astragaloside IV Improves Oxidative Stress in Rats with Pulmonary Hypertension Induced by Monocrotaline Through Calpain-1/HIF-1 α [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2021, **37**(2): 33-38. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20210322.001.
- [21] MENG Y, YU S X, ZHAO F, *et al.* Astragaloside IV Alleviates Brain Injury Induced by Hypoxia via the Calpain-1 Signaling Pathway[J]. *Neural Plast*, 2022, **2022**: 6509981. DOI: 10.1155/2022/6509981.
- [22] LI B, YU J J, LIU P P, *et al.* Astragaloside IV Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia Injury via HIF-1 α and the JAK2/STAT3 Pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2021, **9**(18): 1435. DOI: 10.21037/atm-21-4080.
- [23] CHANG X, ZHANG T, MENG Q Y, *et al.* Quercetin Improves Cardiomyocyte Vulnerability to Hypoxia by Regulating SIRT1/TMBIM6-related Mitophagy and Endoplasmic Reticulum Stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, **2021**: 5529913. DOI: 10.1155/2021/5529913.
- [24] ABDEL-HAMED A R, MEHANNA E T, HAZEM R M, *et al.* *Plicosepalus acacia* Extract and Its Major Constituents, Methyl Gallate and Quercetin, Potentiate Therapeutic Angiogenesis in Diabetic Hind Limb Ischemia: HPTLC Quantification and LC-MS/MS Metabolic Profiling[J]. *Antioxidants*, 2021, **10**(11): 1701. DOI: 10.3390/antiox10111701.
- [25] 杨溢, 曾绚, 雷光远. 槲皮素抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的作用及机制研究[J]. *基层医学论坛*, 2019, **23**(17): 2377-2379. DOI: 10.19435/j.1672-1721.2019.17.005.
- YANG Y, ZENG X, LEI G Y. Quercetin Protects Cardiomyocytes Subjected to Anoxia/Reoxygenation Injury [J]. *Med Forum*, 2019, **23**(17): 2377-2379. DOI: 10.19435/j.1672-1721.2019.17.005.