

· 配伍 ·

## 黄芪-当归药对治疗糖尿病心肌病的分子机制

董又滋<sup>1</sup>, 赵泉霖<sup>2\*</sup>, 高丽君<sup>2</sup>, 王文静<sup>3</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;  
3. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

**[摘要]** 目的:通过网络药理学结合体内动物实验研究的方法,探讨黄芪-当归药对(芪归药对)干预糖尿病心肌病(DCM)的作用机制。方法:从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和中药分子机制生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)数据库中筛选黄芪、当归二味药物的活性成分及基因靶点,通过疾病数据库检索DCM的有关靶点,经过比对得到芪归药对和DCM的共同特异性靶点,建立芪归药对“主要活性成分-DCM-靶点”作用网络,进行化合物-DCM共同靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,通过复合分子检测法(MCODE)进行重要模块分析,利用DAVID数据库进行基因本体(GO)以及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,探究其可能的分子机制并进行实验验证。结果:通过网络药理学方法筛选确定了126个芪归药对治疗DCM的核心靶点;经KEGG通路富集分析提示上述关键靶点与炎症反应及氧化应激、胰岛素抵抗、细胞凋亡等通路有关;体内实验发现芪归药对可延缓高糖对DCM大鼠的心肌细胞损伤,提示芪归药对对以上病理进程具有一定的干预作用。结论:芪归药对可能通过作用于白细胞介素-6,血管内皮生长因子A,肿瘤坏死因子,TP53基因,核转录因子等多个靶点治疗DCM,其主要途径为调节细胞凋亡、改善氧化应激及炎症反应,调节糖脂代谢,基于网络药理学及实验验证的研究方法为DCM的发病机制及临床治疗提供了新思路。

**[关键词]** 黄芪-当归药对;网络药理学;糖尿病心肌病(DCM)

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0016-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211118

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210706.1704.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-07 8:38

### Molecular Mechanism of Medicinal Pair Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix Against Diabetic Cardiomyopathy

DONG You-zi<sup>1</sup>, ZHAO Quan-lin<sup>2\*</sup>, GAO Li-jun<sup>2</sup>, WANG Wen-jing<sup>3</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China;  
2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China;  
3. The Second Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the action mechanism of medicinal pair Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix against diabetic cardiomyopathy (DCM) based on network pharmacology and *in vivo* animal experiment. **Method:** The active ingredients and targets of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM), and the relevant targets of DCM from the disease database. The common specific targets between the medicinal pair and DCM obtained via comparison were used for constructing the main active

**[收稿日期]** 20210223(025)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81774254)

**[第一作者]** 董又滋,在读博士,从事内分泌与代谢性疾病的临床及研究, Tel:0531-68617098, E-mail:dong\_youzi@163.com

**[通信作者]** \* 赵泉霖,博士,主任医师,博士生导师,从事内分泌与代谢性疾病的临床及研究, Tel:0531-68617098, E-mail:zhaquanlin@medmail.com.cn

ingredients of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix-DCM-target network, followed by protein-protein interaction (PPI) analysis of compound-DCM common targets and the screening of important modules using Molecular Complex Detection (MCODE) plugin. The gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis was carried out based on DAVID for exploring the possible molecular mechanisms, which were then subjected to experimental verification. **Result:** A total of 126 core targets of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix for treating DCM were screened out based on network pharmacology. As indicated by KEGG pathway enrichment analysis, the above-mentioned key targets might be related to such pathways as inflammatory response, oxidative stress, insulin resistance, and apoptosis. The findings of *in vivo* animal experiments demonstrated that Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix delayed high glucose-induced cardiomyocyte injury of DCM rats, suggesting that this medicinal pair intervened in the pathological process to a certain extent. **Conclusion:** Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix alleviates DCM possibly by acting on multiple targets including interleukin-6, vascular endothelial growth factor A, tumor necrosis factor, TP53 gene, and nuclear transcription factor, regulating apoptosis and glucolipid metabolism, and improving oxidative stress and inflammatory response. The research based on network pharmacology and experimental verification has provided new ideas for investigating the pathogenesis of DCM and its clinical treatment.

**[Keywords]** medicinal pair Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix; network pharmacology; diabetic cardiomyopathy (DCM)

糖尿病大血管并发症是糖尿病患者致残、致死的主要原因,其中糖尿病心肌病(DCM)具有高发病率和危害性大的特点,临床主要表现为直立性低血压、充血性心力衰竭、心律失常等,严重可引起心源性休克、猝死<sup>[1-3]</sup>。有研究显示,氧化应激、线粒体受损、糖脂毒性等均与DCM的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>。高血糖可通过诱导细胞凋亡、加速纤维化、直接损伤线粒体等途径导致心肌损伤<sup>[5-6]</sup>。在治疗方面,西医一般采用控糖、降压、降脂以及防治心力衰竭等手段,预防和延缓心肌病进展。但目前尚无统一有效的治疗方法,且存在特异性、精准性较差等不足<sup>[7]</sup>。

近年来,临床研究发现,中医药对DCM具有良好效果。《内外伤辨惑论》中记载的当归补血汤,就是一首黄芪与当归(芪归药对)配伍的方剂,具有气血双补的作用,临床常用于治疗肾病综合征、糖尿病病变、虚劳眩晕及癌症等<sup>[8]</sup>。最近的研究发现,芪归药对可改善糖尿病患者的尿蛋白和脂质代谢,改善糖尿病周围神经病变、糖尿病肾病等并发症<sup>[9-11]</sup>。通过在2型糖尿病大血管病变证属气虚血瘀患者原有的治疗方案中加用芪归复方,可发现患者的血糖及糖化血红蛋白情况均有不同程度的改善,芪归药对还能调节核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2),血红素氧合酶1(HO-1),超氧化物歧化酶(SOD)的水平<sup>[12-13]</sup>。有学者运用代谢组学方法研究发现,芪归复方可通过改善糖脂代谢及炎症反应降低2型糖尿病小鼠的

血糖水平<sup>[14]</sup>。此外,芪归药对能降低心肌细胞肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的释放,增加部分抗凋亡蛋白如B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)等的表达,抑制心肌细胞促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase或CASP)-3及Caspase-9,肿瘤抑制蛋白和转录因子p53的表达,抑制心肌细胞的凋亡进程,改善心肌缺血情况<sup>[15-16]</sup>。课题组在前期研究也发现,益气活血的芪归药对及其有效成分可以降低血糖,改善高糖引起的细胞凋亡<sup>[17-19]</sup>,但其作用机制尚不明确。因此,本研究旨在通过网络药理学研究结合体内动物实验的方法,建立芪归药对-DCM-靶点互作网络,阐释黄芪当归配伍以治疗DCM可能的作用机制,以期为DCM的病因学研究及疾病治疗方面提供进一步探索的依据。

## 1 方法

**1.1 中药活性成分及靶点筛选** 在中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)中分别检索芪归两药的全部化学成分,结果导入到Excel表中,活性化合物的筛选需同时满足口服生物利用度(OB)≥30%并且类药性(DL)≥0.18<sup>[20]</sup>;在中医分子机理生物学信息分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)数据库中对黄芪及当归进行检索,检索条件为Score≥20,  $P_{\text{value}} < 0.05$ <sup>[21]</sup>,检索得到化合物成分符合OB≥30%和DL≥

0.18。将两个数据库的成分预测靶点进行合并、去重,建立芪归药对化学成分-靶点数据库。

**1.2 疾病靶点筛选** DCM相关靶点的检索来源于毒性与基因比较数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)及人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)三大疾病数据库。

**1.3 药物成分-靶点网络构建** 芪归药对主要活性成分的预测靶点与DCM疾病预测靶点进行映射,获得芪归药对-DCM的共同靶点,通过Cytoscape 3.7.2软件构建“芪归药对活性成分-作用靶点”网络图。

**1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建** 将1.3项下得到的共同作用靶点导入STRING(<https://string-db.org/>)数据库中,筛选条件为置信度分数score>0.9,隐藏网络中无联系的节点,余参数不变,利用Cytoscape 3.7.2进行蛋白质互作网络

的分析及可视化,并使用MCODE插件筛选主要的PPI网络模块,筛选标准设为degree cutoff = 2, node score cutoff = 0.2, K-score = 2, max depth = 100,结果以P<0.05表示差异具有统计学意义<sup>[22]</sup>。

**1.5 基因本体(GO)功能、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 利用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对芪归药对及DCM共同作用靶点进行GO功能(生物功能、分子功能和细胞功能)和KEGG通路富集分析。结果均以P<0.05表示具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 芪归药对化合物的筛选** 将TCMSP及BATMAN-TCM中的检索结果合并,共得芪归药对化学成分22个,其中当归2个,预测靶点93个,黄芪20个,预测靶点541个,共有靶点58个,最终核心预测靶点634个。见表1。

表1 芪归药对活性成分

Table 1 Active ingredient in medicinal pair Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix

药物	Mol ID	成分	OB/%	DL
黄芪	MOL000398	isoflavanone	109.99	0.30
黄芪	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
黄芪	MOL000392	formononetin	69.67	0.21
黄芪	MOL000433	fa	68.96	0.71
黄芪	MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26
黄芪	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
黄芪	MOL000211	mairin	55.38	0.78
黄芪	MOL000371	3,9-di-O-methylisissolin	53.74	0.48
黄芪	MOL000239	jaranol	50.83	0.29
黄芪	MOL000354	isorhamnetin	49.6	0.31
黄芪	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
黄芪	MOL000417	calycosin	47.75	0.24
黄芪	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
当归	MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76
黄芪	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
黄芪	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
黄芪	MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
黄芪	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
当归	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
黄芪	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	36.74	0.92
黄芪	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
黄芪	MOL000387	bifendate	31.10	0.67

**2.2 DCM 疾病靶点筛选** 在 CTD, OMIM 和 GeneCards 数据库中检索,共得到与 DCM 相关的人类靶点共 1 656 个。

**2.3 治疗 DCM 化合物及潜在靶点筛选** 经进一步筛选得到 18 个芪归药对-DCM 共同成分,对应 125 个潜在基因靶点(黄芪 124 个,当归 32 个,共同靶点 31 个)。对网络进行拓扑分析得出,作用靶点数量>10 的化合物有 14 个,包括 MOL000098 槲皮苷, MOL000422 山柰酚, MOL000358  $\beta$ -谷甾醇等等,这些化合物可能在 DCM 发病及治疗过程中起重要作用。此外,18 个化合物的作用靶点数量全部 $\geq 2$ ,说明了芪归药对治疗 DCM 机制的复杂性。

**2.4 PPI 网络构建** 将映射所得的 125 个共同靶点导入 STRING 数据库中,结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,利用 MCODE 插件将芪归药对靶点的 PPI 网络进行模块聚类分析;选取 degree>39(中位数)的靶点,利用 CytoHubba 插件筛选出节点数为前 10 位的药物。

**2.5 芪归药对-DCM-基因的生物学过程** 从 GO 分析结果中筛选  $P<0.05$  的部分,得出 473 个生物学过程(BP),81 个分子功能(MF)及 48 个细胞组成(CC)。按显著性程度由小到大进行排序显示,芪归药对-DCM-基因的 BP 显著富集在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、凋亡过程的负调控、老化、一氧化氮(NO)的合成调节、细胞对脂多糖的反应、血管舒张的正性调节、氧化应激等;MF 主要富集在蛋白质、同二聚化活性酶结合、支架蛋白结合、血红素结合、类固醇激素受体活性等;CC 主要富集在细胞外基质、细胞外间隙及小凹等,见表 2。

**2.6 芪归药对-DCM-基因的生物学通路** 经 KEGG 富集分析得到通路 129 条,结合相关文献并根据  $P<0.05$  进行筛选,得到与 DCM 有关通路共 120 条,按通路所含的靶基因数目进行排序,选取基因数目大于 20 的通路作图(前 15 条),见表 3。与疾病相关通路有 47 条,包括 1 型/2 型糖尿病、胰腺癌、结核、类风湿关节炎、乙肝、丙肝、非酒精性脂肪肝、癌症通路、癌症中的蛋白多糖,炎症相关通路如核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路以及肿瘤坏死因子(TNF)信号通路等,此外还有胰岛素抵抗、低氧诱导因子(HIF)1,环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等,上述结果提示芪归药对可能通过干预这些通路治疗 DCM。

## 2.7 体内实验

**2.7.1 实验动物** 课题组选用的 SPF 级雄性 SD 大

鼠由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号 SCXK(鲁)2014-0007,体质量 180~200 g,符合山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会要求,批件号 AWE-2019-007。

**2.7.2 材料及仪器** 链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 S0130);二甲双胍(规格 0.5 g/片 $\times$ 20 片,国药准字 H20023370);苏木素、伊红染液(Solarbio 公司,批号 G1120);脑钠肽(BNP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒,胰岛素 ELISA 试剂盒(华美生物有限公司,批号分别为 I08016965, G21016964);血清甘油三酯(TG)测定试剂盒、总胆固醇(TC)测定试剂盒、糖化血清蛋白(GSP)测定试剂盒(长春汇力有限公司,批号分别为 2019003, 2019004, 2019005)。JY92-II n 型超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);Neofuge 15R 型台式高速冷冻离心机(Heal Force 公司);DW-86L626 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);TL-420D 型水浴锅(姜堰天力医疗器械厂有限公司);RT3100 型自动洗板机,Chemray 240 型全自动生化分析仪(美国 Rayto 公司);Epoch 型酶标检测仪(美国 BioTek 公司);M5Vet 型超声诊断仪(迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

**2.7.3 分组及模型建立** SD 大鼠分为模型组、二甲双胍组、芪归药对组和空白组,每组各 5 只,空白组给予普通饲料喂养,其余各组给予高脂高糖饲料喂养 6 周,禁食 12 h 后腹腔注射 STZ 30 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  1 次,72 h 后经尾静脉取血测空腹血糖(FPG)连续 3 次 $\geq 16.7$  mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 则造模成功<sup>[23-24]</sup>。

**2.7.4 给药方法** 各组于造模成功后次日开始灌胃,中药组给予质量浓度为 1 g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的芪归药液(等比)灌胃 5.40 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ ,黄芪及当归配方颗粒均购于山东中医药大学附属医院(规格 10 g/袋),二甲双胍组给予二甲双胍溶液灌胃 0.45 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ <sup>[25-26]</sup>,给药期间空白组给予普通饲料,余组给予高脂高糖饲料。每日观测大鼠一般情况,每周测定体质量及 FPG。

**2.7.5 标本采集** 灌胃 12 周后将大鼠处死,迅速分离心脏组织,按照病理取材制作心肌石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色处理,进行心肌病理学、超微结构的形态学观察,对比各组心肌细胞损害程度、纤维结缔组织增生及炎性细胞浸润情况等。

**2.7.6 实验结果** 与空白组比较,模型组血糖升高显著,体质量减轻明显( $P<0.01$ );与模型组比较,芪归药对组、二甲双胍组一般情况均明显改善

表 2 芪归药对-DCM-基因的 GO(前 10 位)

Table 2 GO analysis of Qi-Gui couplet medicinal-DCM-gene (Top 10)

类别	基因功能	数目/个	$P_{\text{value}}$
BP	negative regulation of apoptotic process	32	$1.38 \times 10^{-21}$
BP	response to drug	26	$2.02 \times 10^{-19}$
BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	38	$3.98 \times 10^{-17}$
BP	aging	19	$2.26 \times 10^{-16}$
BP	positive regulation of gene expression	21	$4.97 \times 10^{-15}$
BP	extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	11	$3.76 \times 10^{-14}$
BP	positive regulation of transcription, DNA-templated	26	$5.12 \times 10^{-14}$
BP	cellular response to lipopolysaccharide	15	$1.00 \times 10^{-13}$
BP	response to estradiol	14	$1.20 \times 10^{-13}$
BP	positive regulation of angiogenesis	15	$1.29 \times 10^{-13}$
CC	extracellular space	45	$1.77 \times 10^{-19}$
CC	membrane raft	17	$7.36 \times 10^{-13}$
CC	cytosol	55	$5.34 \times 10^{-11}$
CC	plasma membrane	59	$2.42 \times 10^{-9}$
CC	extracellular region	34	$5.43 \times 10^{-9}$
CC	caveola	9	$1.33 \times 10^{-9}$
CC	cell surface	17	$8.43 \times 10^{-7}$
CC	extracellular matrix	13	$8.51 \times 10^{-7}$
CC	receptor complex	9	$2.49 \times 10^{-6}$
CC	mitochondrion	26	$2.84 \times 10^{-6}$
MF	enzyme binding	30	$3.06 \times 10^{-23}$
MF	protein binding	108	$5.78 \times 10^{-16}$
MF	identical protein binding	32	$1.94 \times 10^{-15}$
MF	transcription factor binding	18	$2.95 \times 10^{-11}$
MF	protein heterodimerization activity	20	$1.27 \times 10^{-9}$
MF	protein homodimerization activity	24	$2.98 \times 10^{-9}$
MF	cytokine activity	12	$7.06 \times 10^{-8}$
MF	protein kinase binding	16	$1.10 \times 10^{-7}$
MF	steroid hormone receptor activity	8	$1.67 \times 10^{-7}$
MF	ubiquitin protein ligase binding	14	$1.92 \times 10^{-7}$

( $P < 0.01$ ); 药物组组间比较, 二甲双胍组较芪归药对组降低血糖作用明显( $P < 0.05$ ), 改善体质量作用二者无差异, 见表 4。

与空白组比较, 模型组 GSP, 血脂(TG, TC), INS 及 BNP 均有明显差异; 与模型组比较, 芪归药对组糖脂指标有显著改善( $P < 0.05$ ), 二甲双胍组以上指标均有显著改善( $P < 0.01$ ), 二者降低 BNP 的作用相当, 见表 5, 6。

超声心动结果显示, 与空白组相比, 模型组左心室舒张末期内径(LVIDd), 收缩末期内径(LVIDs)及左室射血分数(LVEF)均有显著差异( $P <$

$0.01$ ); 与模型组比较, 芪归药对组、二甲双胍组以上指标均有显著改善( $P < 0.01$ ); 药物组组间比较, 二甲双胍组改善 LVEF, LVIDd 作用明显, 二者降低 LVIDs 作用相当, 见表 7。

HE 染色显示, 空白组大鼠的心肌细胞排列紧密, 形态正常, 胞质丰富, 未见明显异常。模型组大鼠局部心肌细胞消失, 可见少量纤维结缔组织增生以及少量的炎性细胞浸润, 并可见少量棕黄色色素沉着。芪归药对组心肌细胞排列紧密, 形态正常, 胞质丰富, 局部血管周围少量炎性细胞浸润。二甲双胍组心肌细胞排列紧密, 形态正常, 胞质丰富, 局

表3 芪归药对-DCM-基因的生物学通路(Top15)

Table 3 Qi-Gui couplet medicinal-DCM-gene biological pathways (Top 15)

通路编号	通路名称	数目/个	$P_{value}$
hsa05200	pathways in cancer	48	$3.18 \times 10^{-28}$
hsa04151	磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt或AKT) signaling pathway	32	$1.16 \times 10^{-14}$
hsa05161	hepatitis B	30	$1.52 \times 10^{-23}$
hsa05205	proteoglycans in cancer	27	$2.88 \times 10^{-16}$
hsa04668	TNF signaling pathway	24	$1.69 \times 10^{-19}$
hsa05164	influenza A	24	$1.42 \times 10^{-14}$
hsa04010	MAPK signaling pathway	24	$4.22 \times 10^{-11}$
hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	23	$1.62 \times 10^{-18}$
hsa04510	focal adhesion	23	$4.77 \times 10^{-12}$
hsa05166	HTLV-I infection	23	$3.05 \times 10^{-10}$
hsa05215	prostate cancer	21	$1.47 \times 10^{-17}$
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	21	$9.21 \times 10^{-17}$
hsa05152	tuberculosis	21	$1.76 \times 10^{-11}$
hsa04014	Ras signaling pathway	21	$1.49 \times 10^{-9}$
hsa05206	microRNAs in cancer	21	$8.41 \times 10^{-8}$

表4 各组大鼠一般情况比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Comparison of general situation of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	体质量/g
空白	$4.08 \pm 0.35$	$463.00 \pm 16.06$
模型	$28.46 \pm 1.41^{1)}$	$361.40 \pm 14.74^{1)}$
芪归药对	$19.32 \pm 1.26^{1,2,3)}$	$396.20 \pm 18.86^{2)}$
二甲双胍	$17.22 \pm 0.64^{1,2)}$	$411.00 \pm 13.64^{2)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与二甲双胍组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表6同)。

表5 各组大鼠糖化血清蛋白、血脂比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Comparison of glycation serum protein and blood lipid serotonin in each group of rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	GSP	TG	TC
空白	$1.60 \pm 0.18$	$0.83 \pm 0.06$	$1.66 \pm 0.16$
模型	$2.77 \pm 0.35^{2)}$	$1.98 \pm 0.40^{2)}$	$2.41 \pm 0.35^{2)}$
芪归药对	$2.27 \pm 0.21^{1,3)}$	$1.34 \pm 0.42^{1,3)}$	$2.24 \pm 0.36^{1,3)}$
二甲双胍	$1.90 \pm 0.39^{4)}$	$1.17 \pm 0.22^{4)}$	$1.80 \pm 0.35^{4)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表7同)。

部血管内可见少量白细胞。以上两组用药后均有所改善,提示芪归药对能够改善大鼠心肌细胞炎症浸润,减缓结缔组织增生及色素沉着,延缓大鼠DCM改变。见图1。

### 3 讨论

传统中医学将DCM纳入“胸痹”“消渴”“心悸”

表6 各组大鼠INS,BNP校正吸光度比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 6 Comparison of INS and BNP absorbance in each group of rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

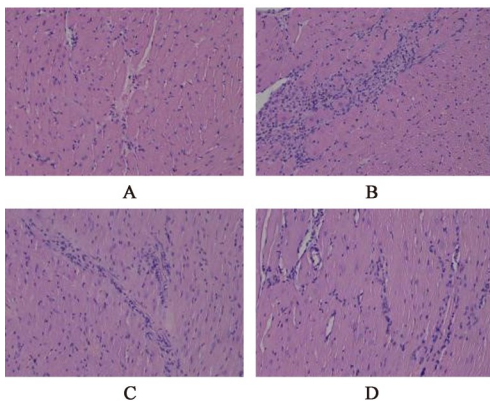
组别	INS	BNP
空白	$0.57 \pm 0.06$	$0.19 \pm 0.08$
模型	$0.21 \pm 0.10^{1)}$	$0.37 \pm 0.03^{1)}$
芪归药对	$0.34 \pm 0.03^{2)}$	$0.30 \pm 0.09^{2)}$
二甲双胍	$0.50 \pm 0.09^{2)}$	$0.26 \pm 0.13^{2)}$

表7 各组大鼠左心室血流、形态比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 7 Comparison of blood flow and morphology in each group of rats' left ventricle ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	LVEF/%	LVIDd/cm	LVIDs/cm
空白	$87.39 \pm 4.14$	$0.49 \pm 0.04$	$0.30 \pm 0.03$
模型	$64.67 \pm 2.10^{2)}$	$0.70 \pm 0.01^{2)}$	$0.63 \pm 0.03^{2)}$
芪归药对	$68.74 \pm 3.60^{4)}$	$0.63 \pm 0.04^{4)}$	$0.59 \pm 0.03^{4)}$
二甲双胍	$71.77 \pm 1.97^{4)}$	$0.56 \pm 0.08^{4)}$	$0.50 \pm 0.07^{4)}$

等范畴,古今医家多从“浊、瘀、毒、虚”等角度阐释DCM的病机,表现为“本虚标实”,本虚有气虚、血虚、阴虚及阳虚之别,且以气虚为主;标实分气滞、痰凝及瘀血,以瘀血为要。尽管DCM的病因病机复杂多变,辨治重点在不同阶段亦有差异,但气虚血瘀始终贯穿于DCM的整体病情变化过程,因此应该以益气活血为本病的基本治法,兼以虚实、标本同治。黄芪、当归组方理论基础丰富,临床应用较广泛,是具有一定代表性的经典药对之一。二者



A. 空白组; B. 模型组; C. 芪归药对组; D. 二甲双胍组

图 5 各组大鼠心肌组织细胞 (HE, ×200)

Fig. 5 Cardiac tissue cells of rats in each group (HE, ×200)

配伍既能独立成方,又常作为基础药对参与组方,因而历来备受医家重视。芪归药对配伍的原则主要为气血配伍,补中益气之黄芪配伍养血活血之当归,使芪归药对兼具益气养血、益气活血以及益气以摄血的 3 种作用。应用芪归药对及单味中药与其有效单体的相关药理学研究发现,以一定比例配伍的芪归药对可以抑制血管内膜增生<sup>[27]</sup>;芪归药对用药比例在 3:2 时能更有效地调节 NO,一氧化氮合酶(NOS)的水平,减轻内皮损伤<sup>[28]</sup>。有学者发现黄芪多糖能够干预糖尿病模型大鼠血清白细胞介素(IL)-6,血管紧张素 II 水平,降低转化生长因子- $\beta_1$ 和 TNF- $\alpha$  表达水平,抑制心肌细胞凋亡,推测这可能是其治疗 DCM 的机制之一<sup>[29]</sup>。曹琼丹等<sup>[30]</sup>应用黄芪甲苷干预 1 型糖尿病大鼠,发现黄芪甲苷通过促进核呼吸因子-1 的表达进而干预大鼠心肌细胞内线粒体的生物合成,最终影响能量代谢水平。另有研究显示,黄芪注射液可以改善 T2DM 心肌病大鼠的心肌功能,使 T2DM 心肌病大鼠血清胰高血糖素样肽-1 水平提高,心肌细胞损伤减轻<sup>[31]</sup>。

本研究通过筛选最终得到 22 个芪归药对中的生物活性成分,分别对应成分关键靶点 126 个,从“化合物-基因靶点互作网络图”中可见,有效成分槲皮素,红景天苷, $\beta$ -谷甾醇,7-O-甲基异马齿苋醇,双歧杆菌,3,9-二氧甲基尼索林,毛花素,山柰酚等可以调控 TNF, IL-6, 血管内皮生长因子(VEGF)A, TP53 等靶点,而丝氨酸/苏氨酸激酶-1, $\beta_2$ 肾上腺素受体,二肽基肽酶-4,雌激素受体 $\alpha$ ,雌激素受体-2, TNF, 微管亲和调节激酶-14,前列腺素内过氧化物合酶-2, NOS-2 等能被大于 2 个活性成分所调控,提示多个靶点可能被不止 1 个活性成分调控,体现了芪归药对治疗 DCM 的彼此协调、共同调节的作用

机制。由 PPI 网络图可见靶点间具有多种相互作用,构成了复杂的生物网络体系,其中网络的连接度越大,表明芪归药对通过此靶点干预 DCM 的可能性越大。笔者在 PPI 网络中按照 DC 排名筛选出了前几位关键靶点,分别为 Akt1, IL-6, TNF, VEGFA, TP53, CASP3, JUN, MAPK1 等等。有研究显示<sup>[32]</sup>, DCM 大鼠表皮生长因子受体(EGFR)的蛋白表达水平显著升高,超微结构观查可见心肌胶原组织显著增生,推测高血糖状态激活 EGFR 与配体的结合,从而启动相关信号通路级联反应,促进了 DCM 的心肌纤维化。抑制 TNF- $\alpha$  的表达能减少心肌纤维化,从而改善心脏功能<sup>[33]</sup>。糖尿病患者血清中 TNF, IL-6 等炎性细胞因子浓度升高提示慢性炎症与舒张功能异常相关<sup>[34]</sup>, TNF- $\alpha$  能引发细胞损伤及炎症,促进心肌纤维化进程<sup>[35]</sup>。高血糖能促进活性氧簇(ROS)生成,激活 p53/细胞色素 C 氧化合成酶 2(SCO2)信号通路,使心肌细胞中线粒体的耗氧量增加,导致 ROS 生成过度及脂质堆积,最终引起心功能不全<sup>[36]</sup>。在 DCM 患者的尸检标本中可发现心肌纤维化及毛细血管基底膜和微动脉内膜增厚。研究发现 VEGF 表达下调,其下调与毛细血管密度降低、内皮细胞凋亡及间质纤维化密切相关,其根本原因是活性 NO 水平降低<sup>[37]</sup>。高糖激活的蛋白激酶 C(PKC)可减少血管内皮 NO 生成,增加前列腺素的合成,从而引起内皮功能障碍。此外,PKC 能调控 PI3K/Akt, MAPK 等蛋白激酶的活性,导致血管内皮功能损伤、血管收缩<sup>[38]</sup>。动物实验结果提示,芪归药对能调节糖尿病大鼠的糖脂代谢水平,增加胰岛素的释放,降低 DCM 模型大鼠的 BNP 水平,改善心室血流状况,抑制心室肌肥厚性改变。病理结果显示,芪归药对能抑制 DCM 大鼠心肌结缔组织增生和炎症反应,结合以上网络药理学研究结果,推测芪归药对可能通过 TNF, IL-6, VEGFA, TP53, NF- $\kappa$ B, JUN, Akt1 等核心靶点,作用于 NF- $\kappa$ B 通路, TNF 通路,胰岛素抵抗通路, HIF-1 通路, cAMP 通路等关键信号通路,调节 NO 的合成、干预炎症反应及氧化应激,抑制细胞凋亡过程,最终延缓 DCM 的进展。以上研究结果同时也提示了网络药理学进行靶点预测的准确性。

经过在 TTD, DRUGBANK, DISGENET, CTD, GENECARDS, OMIM, PHARMGKB, GAD, KEGG 等数据库中进行初步筛选,发现 CTD, GENECARDS 和 OMIM 中基本涵盖其余数据库关于本病的全部靶点,因此,为避免重复、减少工作

量,课题组最终选择以上3个数据库进行疾病靶点归纳。通过对芪归药对-DCM-基因网络分析显示,芪归药对治疗DCM的潜在作用机制多富集在调节血管舒张、细胞凋亡的抑制、抗炎、抗氧化应激等生物学过程,与炎症反应相关的包括PI3K/Akt, TNF, TGF- $\beta$ ;与氧化应激相关的主要为磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)通路;MAPK, NF- $\kappa$ B通路,与氧化应激和炎症反应均密切相关。经KEGG富集分析可发现,有31条通路中包含IL-6,其中起主要作用的有HIF-1信号通路以及胰岛素抵抗通路;94个化合物通过IL-6起作用。IL-6在正常生理情况下能促进胰岛细胞行使功能,在病理状态下,又能作为损伤因子抑制胰岛细胞的生理功能<sup>[39]</sup>。HIF可以激活NF- $\kappa$ B<sup>[40]</sup>,低氧抑制脯氨酸羟化酶-1(PHD1)的生物活性,激活抑制性 $\kappa$ B激酶并磷酸化I $\kappa$ B,导致NF- $\kappa$ B解离并激活下游基因(如炎症因子)的转录<sup>[41]</sup>。本课题组前期研究亦表明<sup>[18]</sup>,芪归药对能够通过调控NF- $\kappa$ B, IL-6基因通路,改善DCM大鼠相关临床症状。体内实验提示,芪归药对能调节糖尿病大鼠糖脂代谢,抑制炎症细胞浸润及纤维结缔组织增生,延缓心肌细胞凋亡,改善了大鼠左心室血流状况及形态,猜测其机制可能与芪归药对参与调节TNF信号通路及NF- $\kappa$ B等炎症相关通路,胰岛素抵抗, HIF-1信号通路等相关信号通路有关,通过改善胰岛素抵抗、抑制氧化应激及炎症反应,以治疗心肌病变及动脉粥样硬化,该研究为深入探讨芪归药对治疗DCM的作用机制提供了指导。

当今已有越来越多临床前研究探索发掘了治疗糖尿病大血管及微血管并发症的新靶点,且对于作用于此类潜在疾病靶点的中药及其防治作用得到了进一步证实。本研究通过网络药理学分析结合体内动物实验验证的研究方法,对芪归药对治疗DCM的主要活性成分、基因靶点及核心作用机制进行了分析。由芪归药对主要活性成分-靶点网络图和KEGG通路分析可知,芪归药对通过多种化学成分共同作用于炎症、氧化应激凋亡等信号通路的多个靶点及蛋白,体现了传统中药组方多成分、多途径、多靶点治疗疾病的特点,为临床辨治病因病机繁复的DCM提供了思路借鉴。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] HUYNH K, BERNARDO B C, MCMULLEN J R, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new

treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(3):375-415.

- [2] CHAVALI V, TYAGI S C, MISHRA P K. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013, 6: 151-160.
- [3] SIVASANKAR D, GEORGE M, SRIRAM D K. Novel approaches in the treatment of diabetic cardiomyopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1039-1045.
- [4] YILMAZ S, CANPOLAT U, AYDOGDU S, et al. Diabetic cardiomyopathy; summary of 41 years [J]. *Korean Circ J*, 2015, 45(4):266-272.
- [5] KUMAR R, YONG Q C, THOMAS C M, et al. Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 302(5):R510-R517.
- [6] BRAHMA M K, PEPIN M E, WENDE A R. My sweetheart is broken: role of glucose in diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes Metab J*, 2017, 41(1): 1-9.
- [7] 叶加虎,孙虹,朱平. 糖尿病心肌病的药物治疗进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2020, 22(5): 551-552.
- [8] 方欢乐,张慧,陶炎炎,等. 黄芪-当归药对研究进展 [J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(8):633-636, 640.
- [9] 赵晓梅. 黄芪当归合剂治疗糖尿病患者的临床疗效 [J]. *中医中药*, 2017, 15(9): 170-172.
- [10] 赵娟. 自拟黄芪当归汤治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察 [J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(5): 584-586.
- [11] 韩晓冰,贾冉,张鼎,等. 苯那普利与黄芪当归合剂治疗糖尿病肾病临床观察 [J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2019, 6(25):163-164.
- [12] 王勇,王浩,阴永辉. 芪归药对通过激活Nrf2通路干预气虚血瘀型T2DM大血管病变的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(7):1694-1697.
- [13] 任小旦,张莹雯,王秀萍,等. 当归补血汤对高糖条件下系膜细胞Nrf2表达及T-SOD、MDA的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(26):2855-2858.
- [14] 孙丽丽,白海英,郑文惠,等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS的当归补血汤治疗2型糖尿病小鼠的代谢组学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(3):636-644.
- [15] 王时光,梁国庆,朱静,等. 当归补血汤对冠脉结扎致心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡的保护作用 [J]. *中成药*, 2016, 38(11):2458-2461.
- [16] 孙艳,孙樱丹,徐厚谦. 当归补血汤含药血清对血管紧张素II诱导的心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(19):250-254.
- [17] 孔畅. 黄芪-当归药对调控Nrf2通路改善糖尿病小鼠

- 肾脏氧化损伤的机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [18] 阴永辉. 黄芪甲苷与阿魏酸抑制NF- $\kappa$ B信号途径干预糖尿病大鼠大血管病变的作用及机制[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [19] 阴永辉, 孔畅, 张丽君, 等. 黄芪当归不同配比对糖尿病模型大鼠MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(4): 375-377.
- [20] 师帅, 胡元会, 吴华芹, 等. “丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 192-197.
- [21] CAI L, KANG Y J. Cell death and diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Toxicol, 2003, 3(3): 219-228.
- [22] 黄秀芳, 高运吉, 廖钢, 等. 基于网络药理学探索射麻止咳液治疗哮喘的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 187-195.
- [23] 沈亚非, 徐焱成. 链脲佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(2): 79-80.
- [24] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 高糖高脂饮食诱导的2型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5): 290-294.
- [25] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 33-34.
- [26] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬. 药理实验中动物间和动物与人见的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1070.
- [27] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归不同配伍比例对大鼠血管内膜增生的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 56-59.
- [28] 郭良清, 张丽君, 孔畅, 等. 不同配比黄芪当归对糖尿病大鼠血管内皮损伤的早期干预比较[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(7): 576-577.
- [29] 陈红霞, 曹霞, 卢红, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 山东医药, 2016, 56(30): 17-19.
- [30] 曹琼丹, 杨育红, 于胜男, 等. 黄芪甲苷对I型糖尿病大鼠心肌细胞PGC-1 $\alpha$ 和NRF-1表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(8): 1096-1100.
- [31] 江红, 段滨红, 向朝峰, 等. 黄芪注射液对糖尿病心脏病大鼠左心室功能及血清GLP-1水平的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(11): 2052-2054.
- [32] 艾文, 谢培益, 陈延伟, 等. EGFR在大鼠I型糖尿病心脏病纤维化作用的实验研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2013, 22(3): 219-222.
- [33] RAJESH M, MUKHOPADHYAY P, BATKAI S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(25): 2115-2125.
- [34] ZHANG Y, WANG J H, ZHANG Y Y, et al. Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF- $\beta_1$  and miR-29 pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23010.
- [35] DUERRSCHMID C, CRAWFORD J R, REINEKE E, et al. TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin- II -induced cardiac fibrosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 57: 59-67.
- [36] NAKAMURA H, MATOBA S, IWAI-KANAI E, et al. p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus caused by excessive mitochondrial respiration-mediated reactive oxygen species generation and lipid accumulation[J]. Circ Heart Fail, 2012, 5(1): 106-115.
- [37] 管春辉, 王晓丽. 阿奇霉素联合痰热清治疗肺炎链球菌肺炎的临床疗效研究[J]. 医学信息, 2017, 30(5): 155-156.
- [38] LI Z, ADBULLAH C S, JIN Z Q. Inhibition of PKC- $\theta$  preserves cardiac function and reduces fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(11): 2913-2924.
- [39] 王玲, 张才军, 李维波, 等. 枸杞多糖对2型糖尿病患者T淋巴细胞亚群和细胞因子的调节作用[J]. 河北中医, 2001(12): 888-890.
- [40] NIZET V, JOHNSON R S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(9): 609-617.
- [41] CUMMINS E P, BERRA E, COMERFORD K M, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(48): 18154-18159.

[责任编辑 顾雪竹]