

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学的生脉饮(党参方)治疗动脉粥样硬化性 心血管疾病的潜在分子机制

杨婷^{1,2}, 陈利娜², 瞿水清^{2,3}, 杨源民², 王娅杰², 郑钟原^{1,2}, 刘慧^{2,3}, 郑晓俊^{4*}, 李玉洁^{2*}

(1.山西医科大学药学院, 太原 030001; 2.中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

3.广东药科大学中药学院, 广州 510006; 4.山西医科大学第一医院, 太原 030001)

[摘要] 目的:运用网络药理学方法,研究生脉饮(党参方)治疗动脉粥样硬化性心血管病(ASCVD)的活性成分、作用靶点和分子通路,揭示生脉饮(党参方)治疗ASCVD的分子机制,并为组方配伍的合理性阐释提供依据。方法:借助中西医结合数据库(SymMap),中药系统药理学技术平台(TCMSP)以及BATMAN-TCM平台获取生脉饮(党参方)主要化学成分, SymMap和中医药百科全书(ETCM)检索化合物靶点,借助疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET)和基因组注释(GeneCards)数据库检索疾病靶点;化合物靶点与疾病靶点作交集得到生脉饮(党参方)作用于ASCVD的预测靶点。利用蛋白质相互作用(String)数据库构建靶蛋白相互作用(PPI)网络图,借助Cytoscape软件获取生脉饮(党参方)作用于ASCVD的关键化合物和关键靶点,最后用The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID)网站将富集到的关键靶点进行基因本体(GO)生物学过程分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。结果:生脉饮(党参方)作用于ASCVD的关键化合物有33个,关键靶点有25个。GO分析结果显示,生脉饮(党参方)治疗ASCVD关键靶点的生物功能主要涉及凋亡过程的调控、炎症反应、一氧化氮合成的调节、胰岛素分泌的调节等生物学过程;KEGG通路主要富集到磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、凋亡信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、雌激素信号通路等20条信号通路。结论:本研究通过网络药理学从分子水平探讨生脉饮(党参方)治疗ASCVD的活性成分与潜在靶点,初步验证了生脉饮(党参方)的作用机制,并为进一步深入探究其作用机制奠定了理论基础。

[关键词] 生脉饮(党参方); 动脉粥样硬化性心血管疾病; 网络药理学; 作用机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0151-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201706

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200628.1332.003.html>

[网络出版日期] 2020-6-28 17:52

Mechanism of Shengmai Yin (Dangshen Prescription) in Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Based on Network Pharmacology

YANG Ting^{1,2}, CHEN Li-na², QU Shui-qing^{2,3}, YANG Yuan-min², WANG Ya-jie², ZHENG Zhong-Yuan^{1,2},

LIU Hui^{2,3}, ZHENG Xiao-jun^{4*}, LI Yu-jie^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510006,

China; 4. The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** By means of network pharmacology, the active ingredients, targets and

[收稿日期] 20200227(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673640);科技部中捷国际科技合作项目(2017-42-4);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301012002)

[第一作者] 杨婷, 硕士, 从事药理机制研究, E-mail: 18435148439@163.com

[通信作者] * 郑晓俊, 硕士, 副主任药师, 从事临床药学研究, Tel: 0351-4639485, E-mail: 834575168@qq.com;

* 李玉洁, 博士, 研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: yjli@icmm.ac.cn

molecular pathways of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) were studied, in order to reveal the molecular mechanism of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in the treatment of ASCVD, and provide the rational explanation of the compatibility of the combination. **Method:** The main chemical components of Shengmaiyin (Dangshen prescription) were obtained by means of SymMap database, traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) platform and BATMAN-TCM platform. Compound targets were retrieved by SymMap and the Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM), and disease targets were retrieved by DisGeNET and GeneCards databases. The intersections of compound targets and disease targets were used to obtain the predicted targets of song-decoction on ASCVD. The Protein-Protein Interaction (PPI) network diagram was constructed through STRING database, and key compounds and targets of Shengmaiyin (Dangshen prescription) acting on ASCVD were obtained through Cytoscape. Finally, the enriched key targets were put for Gene Ontology (GO) biological process analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis through the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). **Result:** There were 33 key compounds and 25 key targets of Shengmaiyin (Dangshen prescription) for ASCVD. The GO analysis showed that the biological functions of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in the treatment of key ASCVD targets mainly involved biological processes, such as the regulation of apoptosis, inflammatory response, regulation of nitric oxide synthesis and regulation of insulin secretion. The KEGG pathway was mainly enriched in 20 signaling pathways, including tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, apoptosis signaling pathway and estrogen signaling pathway. **Conclusion:** Through network pharmacology, this study explored active ingredients and potential targets of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in the treatment of ASCVD at the molecular level, preliminarily verified the mechanism of action of Shengmaiyin (Dangshen prescription), and laid a theoretical foundation for further study on the mechanism of action.

[Key words] Shengmaiyin (Dangshen prescription); atherosclerotic cardiovascular disease; network pharmacology; mechanism

动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)的概念由来已久,其不仅包括被广泛熟知的急性冠脉综合征、心肌梗死、稳定或不稳定心绞痛、冠状动脉血管重建术,近日又将动脉粥样硬化源性的卒中或短暂性脑缺血发作、外周动脉疾病或血管重建术纳入指南^[1]。ASCVD死亡病例占居民疾病死亡人数的四成以上,是全球各种疾病发病率和死亡率的最主要因素之一^[2]。在我国中风(2.63%),缺血性心脏病(2.06%)等学血管相关的慢性疾病的致死率分列前2位,ASCVD的治疗和防控已成为我国重大的公共卫生问题。

生脉饮具有益气复脉,养阴生津之功,是治疗气阴两虚证的代表方剂,也是目前中医临床的经典常用方^[3]。现代药理学研究结果表明,生脉饮在保护心脏功能,改善心脏状态等有较好的药效,同时对神经中枢系统、内分泌系统及消化系统具有不同程度的治疗作用。临床应用于慢性心力衰竭、冠心病、心肌病、病毒性心肌炎、肺心病等的治疗。生脉

饮有人参方与党参方两种组方,人参方药性温热,多用于血压降低、急性心肌梗死、心衰等急、重症患者。党参方药性平和,不燥不腻,具有复脉固脱之功,长期服用不至于助火碍气,可广泛适用于亚健康,病情较轻的慢性心血管疾病患者^[4]。

生脉饮(党参方)化学成分复杂,潜在有效靶点众多,功能主治多种多样。其对ASCVD的干预作用及机制目前尚不明确,仍然缺乏分子生物层面,尤其是分子靶点与信号通路水平的研究^[5]。本研究通过网络药理学的手段,建立了生脉饮(党参方)-ASCVD-靶点互作网络,将中药复方庞杂的药物活性成分与疾病的药物作用靶点相结合,探索生脉饮(党参方)治疗ASCVD的可能作用机制,从分子水平阐释其与基础实验结果及临床疗效间的关联,以期为临床治疗ASCVD提供进一步的科学证据。

1 方法

1.1 生脉饮(党参方)化学成分及作用靶点筛选 本研究采用SymMap(<http://www.symmap.org>)数据

库, BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>)数据库以及PubMed数据库,检索生脉饮(党参方)中的各位中药,包括党参、麦冬、五味子。并结合TCMSP平台(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-sp.php>),根据各化合物的口服生物利用度(OB),类药性(DL)筛选出符合条件(OB \geq 30%, DL \geq 0.18)的候选化合物。除此之外,通过查阅文献资料,找到生脉饮(党参方)中因上述筛选条件被删除但对疾病研究有一定潜在价值的化学成分。再通过TCMSP数据库及PubMed数据库,得到药物的潜在靶点。

1.2 ASCVD 疾病靶点确定 通过 DisGeNET (<http://disgenet.org>), 数据库及 GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库中分别以“atherosclerosis”“myocardial ischemia”“stenocardia”“myocardial infarction”“cerebral ischemia”“Ischemic stroke”等为检索词,得到 ASCVD 主要涉及的疾病靶点。

1.3 “药物活性成分-疾病作用靶点”网络的构建 通过 Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) 对 1.2.1 和 1.2.2 检索所得数据求交集,获得生脉饮(党参方)-ASCVD 的共同靶点,利用 STRING 平台和 Cytoscape3.6.1 软件构建成分-靶点网络图。节点(node)代表生脉饮(党参方)中所含药物化学成分与潜在靶点作用靶点;边(edge)展现了中药成分和其作用靶点之间的关系。根据化合物与靶点连接情况可筛选出生脉饮(党参方)作用于 ASCVD 的关键化合物。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将生脉饮(党参方)-ASCVD 共同作用靶点导入 STRING (<https://string-db.org>) 数据库中,隐藏网络中无联系的节点,余参数默认不变,将得到的结果以文本形式导入 Cytoscape3.6.0 软件中进行可视化,并使用 Cytoscape 的插件(MCODE)筛选重要的蛋白互作(PPI)网络的模块,筛选标准为 degree cut off=2, node score cut off=0.2, K-score=2, maxdepth=100, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。分析靶点相关的拓扑参数,选取自由度(Degree),介数中心性(Betweenness),接近中心性(Closeness)均大于平均值的节点作为关键靶点。

1.5 基因本体注释分析(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书通路分析(KEGG)通路富集分析 利用 DAVID (<http://david.nifcrf.gov/>) 数据库对生脉饮(党参方)和 ASCVD 共同作用得到的交集基因进行 GO 和 KEGG。以 $P < 0.05$ 为阈值,将其按

P value 升序进行排序,并选取排序居于前 20 位的 GO 生物过程和 KEGG 代谢通路。

2 结果

2.1 治疗 ASCVD 关键化合物筛选 生脉饮(党参方)中含有的 33 个活性成分,包括木犀草素,7-甲氧基-2-甲基异黄酮,灌木远志酮 A,豆甾醇,菠菜甾醇,黄豆黄素,麦冬皂苷,麦冬黄烷酮,麦冬高异黄酮,五味子素,五味子酯甲,戈米辛等。其中 10 个来自党参,16 个来自麦冬,7 个来自五味子(表 1)。通过检索 DisGeNET 数据库及 GeneCards 数据库,并结合已有文献共收集汇总获得与 ASCVD 相关蛋白靶点 7 192 个。通过韦恩图发现生脉饮(党参方)和 ASCVD 共同靶基因 119 个(图 1)。化合物靶点网络(图 2)中绿色节点代表 3 种中药,紫色、蓝色、粉色圆形节点分别代表来源于党参、五味子、麦冬的化合物,黄色圆形节点代表基因靶点,一个节点的 Degree 表示网络中和节点相连接的边的数目。根据网络的拓扑学性质筛选度值较大的靶点进行分析,这些连接化合物较多的靶点可能是化合物作用的关键靶点。对图 2 进行拓扑分析,有 6 种化合物的作用靶点数量 \geq 10,分别为木犀草素(52 个),豆甾醇(36 个),7-甲氧基-2-甲基异黄酮(24 个),黄豆黄素(17 个),麦冬高异黄酮(16 个),戈米辛(10 个),这些化合物有可能在治疗 ASCVD 过程中发挥着重要作用。

2.2 关键靶点筛选 将 119 个共同靶点导入 STRING 中,结果见图 3(图中线条粗细代表作用力强弱),将结果以文本形式导出,然后导入 Cytoscape 软件中,选取 Degree, Closeness $>$ 平均值的节点作为关键靶点。网络中各节点的 Degree 平均值为 18.16, Closeness 平均值为 0.46, Betweenness 平均值为 0.01。Degree, Closeness 及 Betweenness 均超过平均值的靶点有 25 个(表 2),包括蛋白激酶 B1 (Akt1), MAPK3, MAPK1, TP53, IL-6, Caspase-3, VEGFA, JUN, TNF, PTGS2, EGFR, MMP9, ERBB2, ESR1, CAT, PPARG, IL-10, IL-4, APP, CDK2, NOS2, DLG4, CNR1, DRD2, NQO1, 推测这些靶点可能是生脉饮(党参方)治疗 ASCVD 的关键靶点。其中度值最高的是 Akt1,能与 69 个蛋白发生相互作用,度值紧随其后的 MAPK3, MAPK1, TP53, Caspase-3, 分别能与 61, 59, 59, 58 个蛋白发生相互作用。同时利用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件将生脉饮(党参方)靶点 PPI 网络进行聚类分析,(图 4)通过对生脉饮(党参方)PPI 网络进行聚类分析得

表 1 生脉饮(党参方)中含有的 33 个活性化合物基本信息

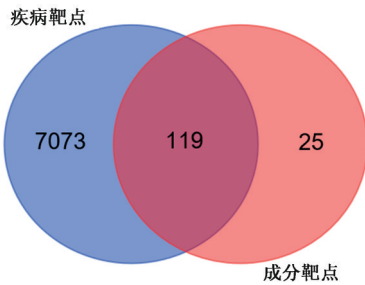
Table 1 Basic Information for 33 active compounds of Shengmaiyin (Dangshen prescription)

来源中药	PubChem CID	化合物	来源数据库
党参	5280445	木犀草素(luteolin)	TCMSP
	5317750	黄豆黄素(glycitein)	TCMSP
	911486	7-甲氧基-2-甲基异黄酮(7-methoxy-2-methyl isoflavone)	TCMSP
	5318332	11-羟基兰金断肠草碱(11-hydroxyrankinidine)	TCMSP
	5283663	α -菠菜甾醇(chondrillasterol)	TCMSP
	160179	川芎啉(perlolyrine)	TCMSP
	33934	邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)	TCMSP
	5281331	菠菜甾醇(spinasterol)	TCMSP
	441965	灌木远志酮 A(frutinone A)	TCMSP
	14807783	甾甾酮(stigmaterone)	TCMSP
五味子	433636	长贝壳杉素 A(longikaurin A)	TCMSP
	285342	去氧哈林通碱(deoxyharringtonine)	TCMSP
	91864462	当归酰基戈米辛 O(angeloylgomisin O)	TCMSP
	5318785	五味子乙素(schisanwilsonin B)	TCMSP
	11516888	戈米辛 R(gomisin R)	TCMSP
	3001662	五味子醇甲(gomisin A)	TCMSP
	443027	戈米辛 C(gomisin C)	TCMSP
麦冬	46173858	麦冬皂苷 A(ophiopogonin A)	BATMAN -TCM
	46173857	麦冬皂苷 B(ophiopogonin B)	BATMAN -TCM
	483248	麦冬皂苷 C(ophiopogonin C)	BATMAN -TCM
	46173859	麦冬皂苷 D(ophiopogonin D)	BATMAN -TCM
	996586	甲基麦冬黄烷酮 A(methyl ophiopogonanone A)	Pub Chem
	53468064	甲基麦冬黄烷酮 B(methyl ophiopogonanone B)	Pub Chem
	14826840	麦冬黄烷酮 B(ophiopogonone B)	BATMAN -TCM
	5317212	6-醛基异麦冬黄烷酮 B(6-aldehydo-isoophiopogonone B)	BATMAN -TCM
	9996586	麦冬黄烷酮 A(ophiopogonanone A)	BATMAN -TCM
	10871974	麦冬黄烷酮 C(ophiopogonanone C)	BATMAN -TCM
	5316797	麦冬黄烷酮 E(ophiopogonanone E)	BATMAN -TCM
	11968811	麦冬皂苷 A(ophiopogon A)	BATMAN -TCM
	11968812	麦冬皂苷 B(ophiopogon B)	BATMAN -TCM
	181686	红门兰醇(orchinol)	BATMAN -TCM
	5280537	N-反式-阿魏酰酪胺(N-trans-feruloyltyramine)	BATMAN -TCM
5280794	植物甾醇(stigmaterol)	BATMAN -TCM	

出了其中显著性较强的 3 个模块,其中显著性最强的模块 a 中包含 Akt1, JUN, Caspase-3, Caspase-7, NFKBIA, MCL1 等靶点基因,这表明生脉饮(党参方)可能通过抑制凋亡反应发挥作用,其聚类详细信息见表 3。

2.3 生脉饮(党参方)治疗 ASCVD 的 GO 功能富集分析 根据富集程度(Count 值由小到大)进行部分展示,同时展示 $-\log(P\text{-value})$ 值($P < 0.05$)。GO 分析

结果提示生脉饮(党参方)-ASCVD-基因的生物过程(BP)显著富集在凋亡过程的调控、细胞增殖、氧化应激及氧化还原反应、雌二醇反应、炎症反应、一氧化氮合成的调节、钾离子运输及跨膜转运、胰岛素分泌等;分子功能(MF)主要富集在锌离子结合、蛋白激酶激活、延迟整流钾通道活性、氧化还原酶活性、类固醇激素受体活性、细胞因子活性,一氧化氮合酶活性等。细胞组分(CC)主要富集在在细胞



红色代表生脉饮(党参方)靶点;蓝色代表ASCVD疾病靶点;深红色部分为共同靶点

图1 生脉饮(党参方)-ASCVD共同基因靶点数

Fig. 1 Genes target set of Shengmaiyin (Dangshen prescription) - ASCVD-gene

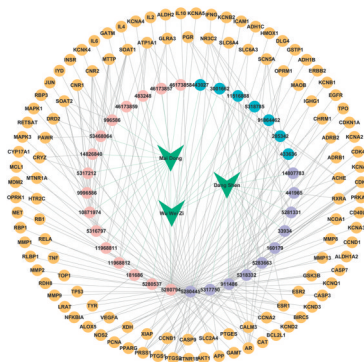


图2 化合物-疾病靶点互作网络

Fig. 2 Interaction diagram of compounds and disease targets

外空间、细胞外基质、质膜、线粒体、内质网、高尔基体、电压门控钾通道复合物等。见图5。

2.4 生脉饮(党参方)治疗ASCVD关键靶点的KEGG通路富集分析 KEGG富集分析得到通路条,根据 $P < 0.05$ 并结合相关文献进行筛选,得到与



图3 生脉饮(党参方)-ASCVD-核心靶点PPI网络

Fig. 3 PPI network diagram of Shengmaiyin (Dangshen prescription) - ASCVD-gene

ASCVD相关通路20条,见图6。其中免疫与炎症相关信号通路5条,TNF信号通路,T细胞受体(TCR)信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,Toll样受体(TLR)信号通路,NOD样受体信号通路;此外还有凋亡及氧化应激相关磷酸酰基醇-3激酶(PI3K)/Akt信号通路,FoxO信号通路;雌激素信号通路;肾上腺素能信号通路;低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、胰岛素抵抗信号通路、钙信号通路等。分析结果表明,生脉饮(党参方)可能通过作用于这些通路起到防治ASCVD的作用。

2.5 多维网络图分析 将上述过程获得的药物,化合物,关键靶点,KEGG通路信息构建多维网络图,从多维网络图各个节点之间的相互作用关系可获得复方中药材-化合物-靶点-通路之间的关系(见图7)。

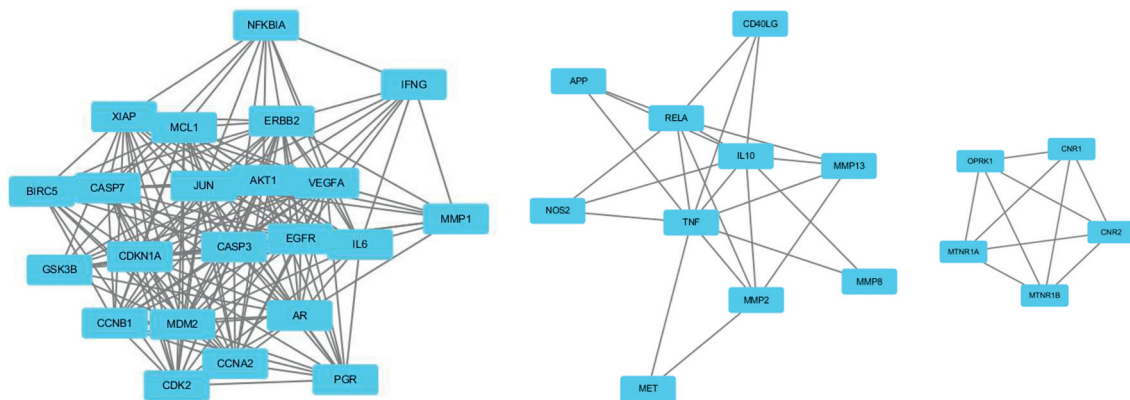


图4 基于MCODE的生脉饮(党参方)-ASCVD-基因互作模块

Fig. 4 Interaction module of Shengmaiyin (Dangshen prescription) - ASCVD-gene based on MCODE

3 讨论

3.1 生脉饮(党参方)组方分析 生脉饮(党参方)出自金代医家张元素所著《医学启源》,书中所著:“生脉饮(党参方),补肺中元气不足。”本方原主治

耗气伤阴、气阴两虚之证^[6]。后随各国各代名家不断开拓探索,将生脉饮(党参方)用于了心系病证的治疗上。如《医方集解》言:“人有将死脉绝者,服此能复生之,其功甚大。”阐明了生脉饮(党参方)可荣

表 2 生脉饮(党参方)治疗 ASCVD 关键靶点基本信息

Table 2 Basic information of key target of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in treating ASCVD

蛋白	全称	Degree	Betweenness	Closeness
Akt1	蛋白激酶 B1 (serine/threonine protein kinase 1)	69	0.09547313	0.67241379
PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferator activated receptor gamma)	40	0.07317659	0.55980861
IL-10	白细胞介素-10(interleukin-10)	38	0.01334631	0.54929577
IL-4	interleukin-4	34	0.02633003	0.53917051
MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase 1)	59	0.05226941	0.63243243
TP53	细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53)	59	0.04438145	0.61578947
IL-6	interleukin-6	58	0.04032432	0.61256545
PTGS2	前列腺素内过氧化物酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	51	0.01602608	0.585
NOS2	一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2)	26	0.01577012	0.51769912
TNF	肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)	54	0.02195599	0.6
VEGFA	血管内皮细胞生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)	56	0.05934338	0.62566845
DLG4	dMAGUK 支架蛋白 4 (disc large MAGUK scaffold protein 4)	22	0.05628803	0.49367089
APP	β -淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid-beta precursor protein)	34	0.03409944	0.53917051
EGFR	表皮生长因子受体(epidermal growth factor recepto)	49	0.0140876	0.57635468
NQO1	NAD(P)H 醌脱氢酶(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1)	18	0.01745329	0.47177419
CDK2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin dependent kinase 2)	31	0.02314992	0.50869565
CNR1	大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1)	22	0.01254595	0.5
JUN	Jun 原癌基因 (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)	55	0.02060155	0.60309278
DRD2	多巴胺受体 D2 型基因 (dopamine receptor D2)	19	0.01815828	0.48953975
Caspase-3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)	58	0.03062639	0.62234043
CAT	过氧化氢酶(catalase)	42	0.07371536	0.57073171
MAPK3	丝裂原活化蛋白酶(mitogen-activated protein kinase 3)	61	0.0480208	0.63586957
MMP9	基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9)	47	0.0135645	0.57635468
ESR1	雌激素受体 1 (estrogen receptor)	44	0.01337062	0.55188679
ERBB2	酪氨酸激酶受体 2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)	45	0.01278075	0.57352941

表 3 生脉饮(党参方)PPI 网络节点聚类分析结果

Table 3 Clustering analysis results of Shengmaiyin (Dangshen prescription) PPI network node

类簇 (cluster)	类簇中包含的靶点	MCODE 聚 类评分/分	类簇中包含 节点数/个	类簇中包含 边数/个
a	VEGFA, MCL1, MDM2, CDKN1A, JUN, AKT1, CASP3, IL-6, CCNB1, ERBB2, EGFR, AR, Caspase-7, PGR, CCNA2, MMP1, BIRC5, IFNG, GSK3B, NFKBIA, CDK2, XIAP	16.57	22	174
b	MMP8, IL-10, MMP2, CD40LG, MMP13, MET, RELA, APP, NOS2, TNF	5.11	10	23
c	OPRK1, CNR1, MTNR1B, MTNR1A, CNR2	5	5	10

养一身气血,益气滋阴,复脉固脱^[7]。生脉饮(党参方)中将人参更换为党参,其性甘温,益元气,补肺气,生津液,是为君药,麦冬甘寒养阴清热,润肺生津,用以为臣,党参、麦冬合用,则益气养阴之功益彰,五味子酸温,敛肺止汗,生津止渴,为佐药。三药合用,一补一润一敛,益气养阴,生津止渴,敛阴止汗,使气复津生,汗止阴存,气充脉复。

生脉饮(党参方)的现代药理作用主要集中在心系、肺系疾病。研究表明其能够增加冠状动脉血流量和营养心肌,改善心肌缺血,恢复心肌代谢功能,减少心肌耗氧量和耗能量,提高心肌的耐缺氧能力。同时还有类肾上腺皮素的兴奋作用,增强网状内皮细胞在休克、低血压状态下清理各种病理物质的能力^[8]。将方中人参更换为党参生脉饮(党参

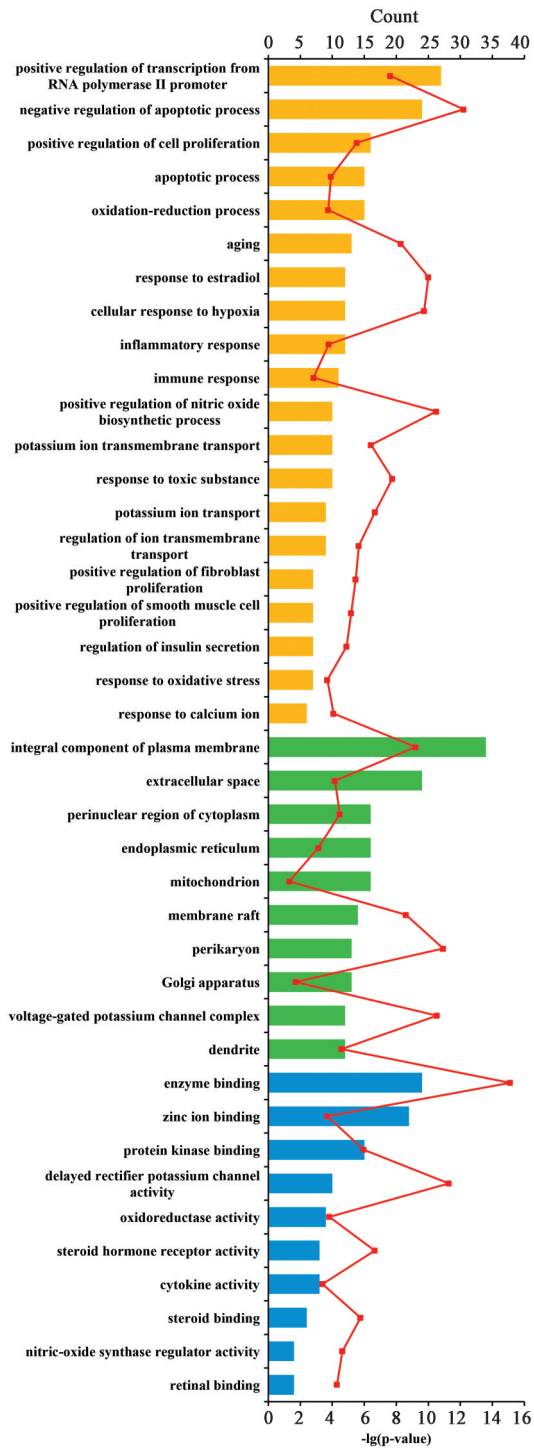


图5 生脉饮(党参方)治疗ASCVD的GO功能富集分析
Fig. 5 Histogram of GO function enrichment for core target of Shengmaiyin (Dangshen prescription) in treating ASCVD

方)又因其药性平和,不同年龄段、体质的患者均可长期服用。因此,其更适用于病程绵延的ASCVD等慢性心血管疾病。

3.2 生脉饮(党参方)成分分析 通过筛选得到生脉饮(党参方)的有效成分有33个,其中有6种化合物的作用靶点数量 ≥ 10 ,分别为木犀草素(52个),豆

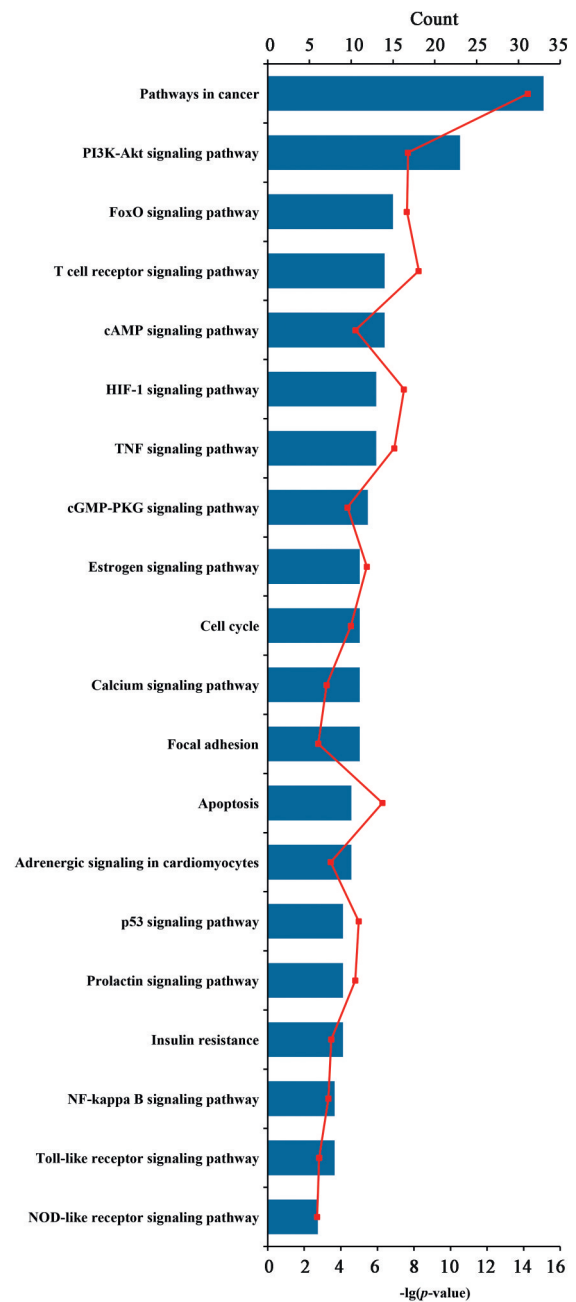
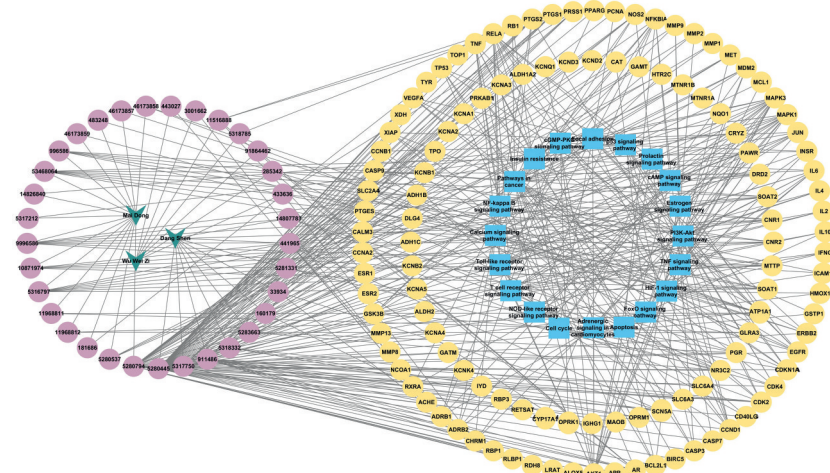


图6 生脉饮(党参方)治疗ASCVD关键靶点的KEGG通路富集分析
Fig. 6 Enriched KEGG pathways for core target of Shengmaiyin (Dangshen prescription) for ASCVD

甾醇(36个),7-甲氧基-2-甲基异黄酮(24个),黄豆黄素(17个),麦冬黄烷酮(16个),戈米辛(10个)。这些靶点很有可能是生脉饮(党参方)治疗ASCVD的关键靶点。木犀草素,7-甲氧基-2-甲基异黄酮、麦冬黄烷酮均为黄酮类化合物,具有显著的抗炎,抗氧化应激和抗血小板聚集等心血管保护作用^[9]。来源于中药党参的成分木犀草素能够显著逆转A/R(A/R)损伤所致心肌收缩力降低、心肌梗死、乳酸脱



绿色代表生脉饮(党参方)中的药物组成,紫色代表化合物成分,黄色代表生脉饮(党参方)治疗ASCVD的关键靶点,蓝色代表富集到的KEGG通路

图7 生脉饮(党参方)“药材-成分-靶标-通路”网络

Fig. 7 “Herb-compound-target-pathway” network of Shengmai Yin (Dangshen prescription) for treating ASCVD

氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的大量释放、心肌细胞凋亡,保护缺血再灌注损伤的心肌,减少心肌细胞凋亡,并能够显著抑制激活型细胞凋亡蛋白酶Caspase-3的表达^[10]。此外,木犀草素能够有效抑制肿瘤坏死因子诱导的血管炎症反应;并能够抑制TGF- β 型受体信号传导抑制血管平滑肌细胞增殖;调节还原型辅酶II(NADPH)氧化酶/活性氧(ROS)/NF- κ B和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,抑制NOX4和ROS的表达,从而缓解氧化应激^[11-12]。麦冬主要成分麦冬黄烷酮可使血清和肝脏中的丙二醛含量降低,谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性增高,不同程度清除氧自由基和过氧化氢,显著改善心脑血管氧化应激损伤从而发挥心脑血管保护作用^[13-14]。党参中的成分豆甾醇能明显抑制环氧合酶2(COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,抑制前列腺素E₂(PGE₂)和一氧化氮(NO)的释放,减轻心血管炎症反应。豆甾醇还能显著降低胆固醇的吸收,改善脂质代谢异常,降低血清胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和三酰甘油的水平^[15]。此外,五味子中主要成分戈米辛J具有舒张血管的作用,能够诱导人冠状动脉内皮细胞中NO产生,实验结果表明戈米辛J诱导的血管舒张主要由NO依赖途径介导,是通过钙依赖性和Akt依赖性途径在人冠状动脉内皮细胞中激活eNOS,增加NO产生并导致内皮依赖性血管扩张^[15]。3味中药中的活性成分较多,药理作用均集中于保护心肌细胞,改善心脏功能等。同时,三者皆在临床应用于心血管疾病且具有较好的的疗效。

3.3 关键靶点分析 通过对生脉饮(党参方)-ASCVD-基因网络分析可以发现,党参中的木犀草素,7-甲氧基-2-甲基异黄酮,灌木远志酮A及五味子中的戈米辛等17个化合物通过调控PTGS2(COX-2)发挥作用,黄豆黄素,豆甾醇等15个化合物通过调控雌激素的作用靶点(ESR1)及雄激素受体(AR)起作用。COX-2是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶,可以诱导炎症细胞释放趋化因子,募集炎性细胞迁移,并在巨噬细胞中与脂多糖协同诱导表达IL-6,IL-1^[16]。目前临床研究发现,COX的单核苷酸多态性(SNP)与脑梗死的发病率之间存在相关性^[17]。低水平的COX-2可能促进泡沫细胞的产生,从而增加动脉粥样硬化和心血管疾病的风险^[18]。因此,生脉饮(党参方)可能通过抑制炎症表达治疗ASCVD。ESR1调控着雌激素水平。雌激素可直接作用于平滑肌细胞、内皮细胞、血管外膜的成纤维细胞,并能够增强抗氧化性能,发挥调节血脂,改善凝血与纤溶系统的功能,在抗动脉粥样硬化疾病中发挥重要作用^[19]。在脑缺血中,雌激素能够增强神经再生,促进卒中后的神经恢复。因此,生脉饮(党参方)可能通过与ESR1及AR等靶标蛋白之间的相互作用,达到治疗缺血性脑卒中的效果。

通过对化合物-疾病靶点互作网络的拓扑学性质分析可以发现,在Degree, Closeness及Betweenness均超过平均值的25个关键靶点中度值最高的是Akt1,能与69个蛋白发生相互作用,度值紧随其后的MAPK3,MAPK1,TP53,Caspase-3,分

别能与61,59,59,58个蛋白发生相互作用。Akt1是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于蛋白激酶B(Akt/PKB)家族的一员,在细胞代谢、细胞周期调控、转录调控等多种生物学过程中具有重要作用具有重要作用,参与炎症过程、心血管疾病、糖尿病等的发展^[20-21]。Akt1可协同磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶,促进三磷酸磷脂酰肌醇与其自身结合,由胞浆转移至质膜并发生磷酸化,Akt1活化后可激活下游蛋白mTOR^[18]。研究发现,麦冬皂苷可能通过活化AMPK,抑制Akt/mTOR通路,促进心肌组织自噬,从而改善糖尿病大鼠心脏功能受损^[22]。MAPK3(ERK1)是丝裂原活化蛋白激酶3。其通过上游激酶对其酪氨酸(Tyr)和苏氨酸(Thr)残基的双重磷酸化激活后,从胞质迁移到细胞核中,使转录因子磷酸化。MAPK通路是将胞外信号传导至胞内的重要介导者,参与细胞增殖、细胞分化及细胞周期调控等过程。大量实验表明MAPK信号通路参与了脑缺血、缺氧损伤的多个阶段,脑缺血损伤时MAPK3磷酸化受到抑制,而应用MAPK通路特异性抑制剂后,在磷酸化的MAPK3表达减少的同时,缺血区细胞凋亡数目增加,提示MAPK3参与了缺血后神经元的保护,并在脑缺血再灌注中发挥抗凋亡作用^[23]。Caspase-3与Caspase-7被认为是细胞凋亡的关键酶,在动脉粥样硬化的形成过程中,促进了巨噬细胞的聚集和凋亡细胞的清除,从而抑制了坏死核心的形成并降低了动脉粥样硬化斑块的不稳定性^[24]。依赖Caspase的凋亡通路是心肌凋亡的主要通路^[25]。研究表明麦冬皂苷D可能通过激活Akt/GSK-3 β 通路,进而抑制Caspase-3,减轻糖尿病所致大鼠心肌细胞凋亡^[26]。五味子素可通过下调Caspase-3的表达,发挥抑制心肌细胞凋亡的作用,以减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤^[27]。

此外,本研究通过对生脉饮(党参方)PPI网络进行聚类分析得出了其中显著性较强的3个模块,其中显著性最强的模块a中包含Akt1, JUN, Caspase-3, Caspase-7等靶点基因,这表明生脉饮(党参方)可能通过抑制凋亡反应发挥作用。综上所述,生脉饮(党参方)可能通过调节上述基因靶点的表达,减轻由其引发的细胞凋亡反应、从而延缓ASCVD的发生和发展。但其参与抗心肌缺血,抑制心肌细胞凋亡与自噬通路的作用还需要进一步研究。

3.4 通路结果分析 目前研究认为,凋亡在ASCVD病理过程中起着基础性作用。KEGG富集

分析结果显示,有较多靶点富集在与凋亡相关的信号通路。PI3K/Akt信号通路可能为生脉饮(党参方)发挥治疗作用的潜在通路。PI3K及其下游靶点Akt1是保护特别是心肌免受心肌缺血再灌注损伤的信号转导酶的保守家族^[28-30]。党参中的木犀草素、豆甾醇及麦冬主要成分麦冬皂苷D可作用于Akt1,通过PI3K/Akt/eNOS途径增加NO的释放量来诱导心肌缺血血管的再生^[31]。NO可以通过激活蛋白激酶C和线粒体ATP敏感性钾离子通道,改善线粒体功能,抑制线粒体释放凋亡因子,在调控细胞凋亡的过程中起到了关键作用^[32]。同时NO还具有扩张血管、清除氧自由基等重要生理功能,是冠状动脉粥样硬化等疾病的重要因子^[33]。在作用的主要信号通路中,Akt/GSK3/CRBE信号通路参与增加缺血后脑源性神经营养因子BDNF的表达,可防治脑缺血性损伤。

TCR, TNF, NF- κ B, Toll样受体, NOD样受体信号通路与炎症反应密切相关,提示生脉饮(党参方)可能通过作用于结果中的炎症因子,调节炎症信号通路,抑制炎症反应,从而发挥抗ASCVD的作用。TNF参与细胞生长和增殖、炎性和免疫反应等过程, TNF信号通路的激活,能够激活诱导NF- κ B入核,激活NF- κ B信号通路,促进TNF- α , IL-6, IL-8等炎症因子的释放,从而引起和加重机体炎症反应^[34]。NOD样受体信号途径的激活促进AS的发展, NOD蛋白质是重要模式识别受体, NOD样受体主要包括NOD1和NOD2,能够活化NF- κ B和MAPK信号通路,促进细胞释放IL-6, IL-8, CCL2, TNF- α 等促炎因子,促进机体炎症反应。此外, NOD1, NOD2能够与Toll样受体协同增强机体的免疫反应,当机体炎症和免疫反应太过,则会对血管造成损伤,促进AS的形成^[35]。综上,生脉饮(党参方)有可能通过调节TNF, NF- κ B, NOD样受体及Toll样受体信号通路,抑制IL-6, IL-8, TNF- α 等炎症因子的表达,继而影响机体炎症反应。此外,以Toll受体4所代表的Toll信号通路,可作用于HMGB1,参与脑缺血/再灌注作用^[36]。NF- κ B和TNF信号通路所代表的经典炎症通路,参与炎症因子的释放,与缺血性卒中的机制密切相关。

综上所述,通过网络药理学及相关分析,从分子生物学水平深入探讨了生脉饮(党参方)在治疗ASCVD的潜在分子机制。研究结果显示,生脉饮(党参方)作用于Akt1, MAPK3, MAPK1, TP53, Caspase-3, Caspase-7等靶点,抑制细胞凋亡,保护心

脑血管,改善胰岛素抵抗等机制治疗ASCVD,同时可能通过作用于PTGS2,IL-10,IL-6,IL-4,TNF等多个靶点,调节TNF信号通路,NF- κ B信号通路,NOD样受体信号通路等,通过抑制炎症反应达到防治ASCVD的作用。本研究为深入探讨生脉饮(党参方)治疗ASCVD的作用机制提供了科学的指导和新的思路。此外,本研究结果表明雌激素受体(ESR1)及雄激素受体(AR)与生脉饮(党参方)及ASCVD关系密切,但目前尚未有实验研究证明其相关性,故可据此开展进一步的实验探索。

[参考文献]

- [1] 中华心血管病杂志编辑委员会.中国心血管病预防指南(2017)[J].中华心血管病杂志,2018,46(1):10-25.
- [2] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394 (10204): 1145-1158.
- [3] 曹占鸿,潘建衡,李娜,等.生脉散现代药理作用及作用机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(22):212-218.
- [4] 黄青萍.生脉饮中人参党参的薄层鉴别[J].广西中医药,2004,27(1):57.
- [5] 楚楚,徐绍静,吴琼琼,等.HPLC同时测定生脉饮(党参方)中多组分的含量[J].中药材,2013(5):820-823.
- [6] 徐丽萍,裴妙荣,杨翠玲,等.生脉散分析方法的研究进展[J].山西职工医学院学报,2007,17(2):77-78.
- [7] 杜玉杰,陶永.生脉饮加味治疗心律失常4则[J].中医临床杂志,2012,24(9):894.
- [8] 张晨,王哲,徐强,等.生脉方及其主要药物治疗心血管病药理作用研究概况[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(14):51-53.
- [9] 程艳刚,李国艳,谭金燕,等.黄酮类化合物抗心肌缺血作用机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(6):82-85.
- [10] 万蕾.Caspase 3表达调控在木犀草素抗大鼠离体心脏A/R损伤中作用机制研究[D].南昌:南昌大学,2018.
- [11] BASU A, DAS A S, MAJUMDER M, et al. Antiatherogenic roles of dietary flavonoids chrysin, quercetin, and luteolin [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2016, 68(1): 89-96.
- [12] LU W, KANG J, HU K, et al. The role of the Nox4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway in rat hypertension induced by chronic intermittent hypoxia [J]. Sleep Breath, 2017, 149(4): A581.
- [13] LIN M, WEI S, WAN G, et al. Methylphenylpogonanone a protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and attenuates blood-brain barrier disruption *in vitro* [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e124558.
- [14] WANG A Y, LIU B F, LIANG A Z, et al. Homoisoflavonoids and the antioxidant activity of *Ophiopogon japonicus* root [J]. Iran J Pharm Res, 2017, 16(1): 357-365.
- [15] CSUPOR D, WIDOWITZ U, BLAZSÓ G, et al. Anti-inflammatory activities of eleven centaurea species occurring in the carpathian basin [J]. Phytother Res, 2013, 27(4): 540-544.
- [16] NIA A M, KALANTARIPOUR T P, BASIRI M, et al. Nepeta dschuparensis bornm extract moderates COX-2 and IL-1 β proteins in a rat model of cerebral ischemia [J]. Iran J Med Sci, 2017, 42(2): 179-186.
- [17] 刘盈盈,易兴阳,王淳,等.COX基因多态性与缺血性卒中的相关性研究[J].西部医学,2019,31(6):883-888.
- [18] 卢长青,贾合磊,雷震,等.五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤[J].安徽医科大学学报,2019,54(3):86-90.
- [19] PAPAVALASSILIOU A G, TOUSOULIS D, SIASOS G, et al. Vascular inflammation and atherosclerosis: the role of estrogen receptors [J]. Curr Med Chem, 2015, 22 (22): 2651-2665.
- [20] 陈凡,叶俊梅,张玉彬.Akt在心血管疾病中的调控作用[J].药学研究,2018,37(5):291-294,297.
- [21] 吴青华,李冰涛,朱水兰,等.蒙古族药芯芭治疗2型糖尿病的网络药理学研究[J].中国中药杂志,2020,45(8):1764-1771.
- [22] 饶小娟,吴毓敏,王彦.麦冬皂苷介导AMPK/Akt/mTOR通路对糖尿病大鼠心肌细胞自噬的影响[J].中国循证心血管医学杂志,2018,10(11):1362-1367.
- [23] HU B, LIU C, PARK D. Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7): 1089-1095.
- [24] LIU X, TAN W, YANG F, et al. Shengmai injection reduces apoptosis and enhances angiogenesis after myocardial ischaemia and reperfusion injury in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 629-636.
- [25] INSERTE J, CARDONA M, PONCELAS-NOZAL M, et al. Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling [J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(2): 18.

- [26] 曹斌,于梅.麦冬皂苷D对大鼠心肌细胞凋亡及 caspase 通路的影响[J].中国药师,2019,22(3):451-456.
- [27] CHANG R, LI Y, YANG X, et al. Protective role of deoxyschizandrin and schisantherin A against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61590.
- [28] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [29] 陆定艳,李靖,孙佳,等.参芎葡萄糖注射液通过激活 PI3K/AKT 通路拮抗 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞凋亡[J].中国中药杂志,2019,44(17):3773-3779.
- [30] 聂阳,丁立,黄海潮,等.PI3K/Akt-eNOS 信号通路在甘木通总黄酮后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用[J].中国中药杂志,2018,43(23):4692-4697.
- [31] 罗俊华,姜辉,吴娜,等.生脉注射液在老龄感染性休克患者中的应用价值及对 ET-1、NO 表达的影响[J].临床军医杂志,2014,42(9):890-893.
- [32] HE F, XU B L, CHEN C, et al. Methylophopogonanone A suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 763-771.
- [33] 孙晓莉,郑雪冰,王蕊,等.生脉注射液对心肺复苏中心肌再灌注损伤的保护作用[J].中国实验诊断学,2015,19(8):96-98.
- [34] WANG L, LU W, GAO Y H, et al. Anluohuaxianwan Alleviates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats through upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and downregulation of nuclear factor-kappa B/I κ B α signaling pathway [J]. World J Tradit Chin Med, 2019, 5(2):95-103.
- [35] GU J, LIU G, XING J, et al. Fecal bacteria from Crohn's disease patients more potently activated NOD-like receptors and Toll-like receptors in macrophages, in an IL-4-repressible fashion [J]. Microb Pathog, 2018, 121:40-44.
- [36] TIAN X, LIU C, SHU Z, et al. Review: therapeutic targeting of HMGB1 in stroke [J]. Curr Drug Deliv, 2017, 14(6): 785-790.

[责任编辑 周冰冰]