

基于网络药理学的生脉散作用机制分析

刘鑫旭, 吴嘉瑞*, 张丹, 张晓朦
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] **目的:**探讨生脉散的作用机制。**方法:**本研究选取生脉散中 3 味中药人参、麦冬、五味子含有的 33 个活性成分, 通过 PharmMapper 服务器预测其活性成分的潜在靶点, 进而构建化合物-靶点网络、构建蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络、进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析、进行基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 的生物通路富集分析, 研究生脉散作用机制。**结果:**化合物-靶点网络包含 249 个节点, 关键靶点涉及转甲状腺素蛋白 (TTR) 等。PPI 网络包含 155 个节点, 关键靶点涉及酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC), 蛋白激酶 B α (Akt1) 等。GO 条目 95 个, 其中生物过程相关的条目 67 个, 分子功能相关的条目 22 个, 细胞组成相关的条目 6 个。KEGG 通路 8 条, 涉及肿瘤信号通路 (pathways in cancer), 前列腺癌 (prostate cancer), 胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway) 等。**结论:**本研究结果初步验证了生脉散的基本药理作用及其机制, 并为进一步深入揭示其作用机制奠定了良好基础。

[关键词] 生脉散; 网络药理学; 蛋白互作 (PPI); 基因本体 (GO); 京都基因与基因组百科全书 (KEGG)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0219-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160219

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.0955.018.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 9:55

Mechanism of Shengmaisan Based on Network Pharmacology

LIU Xin-kui, WU Jia-rui*, ZHANG Dan, ZHANG Xiao-meng
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of action of Shengmaisan. **Method:** Potential targets related to 33 active chemical components from Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus of Shengmaisan were predicted through PharmMapper server. Compound-target network, protein-protein interaction (PPI) network, gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were constructed to explore the mechanism of action of Shengmaisan. **Result:** Compound-target network contained 249 nodes, in which the key targets involved Transthyretin (TTR), etc. PPI network contained 155 nodes, in which the key targets involved Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Akt1), etc. In GO enrichment analysis, there were 95 GO terms, including 67 terms related to biological process, 22 related to molecular function and 6 related to cellular components. In KEGG pathway enrichment analysis, there were 8 KEGG pathways, involving pathways in cancer, prostate cancer, insulin signaling pathway and so on. **Conclusion:** The results of the study have preliminarily verified the basic pharmacological effects and related mechanisms of Shengmaisan, and laid a solid foundation for further studies on the mechanism of action of Shengmaisan.

[Key words] Shengmaisan; network pharmacology; protein-protein interaction (PPI); gene ontology (GO); Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)

[收稿日期] 20170402(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473547,81673829)

[第一作者] 刘鑫旭,在读硕士,从事临床中药学研究,Tel:15811155905,E-mail:lxkchuige@163.com

[通讯作者] *吴嘉瑞,博士,教授,硕士生导师,从事临床中药学研究,Tel:010-84738662,E-mail:exogamy@163.com

生脉散始见于金代名医张元素的《医学启源》，由人参、麦冬、五味子 3 味药材组成，是治疗气阴两虚证的代表方剂，也是中医临床常用方之一。生脉散具有益气生津，敛阴止汗之功，主治温热、暑热，耗气伤阴证，见汗多神疲，体倦乏力，气短懒言，咽干口渴，舌干红少苔，脉虚数；久咳伤肺，气阴两虚证，见干咳少痰，短气自汗，口干舌燥，脉虚细^[1]。方中人参甘温大补元气，益肺生津，固脱止汗，为君药；麦冬甘寒，滋阴润燥，与人参相配，气阴双补，为臣药；五味子酸温，益气生津，敛阴止汗，与人参、麦冬相伍，既可固气津之外泄，又能复气阴之耗损，为佐药。三药合用，使元气充，肺阴复，而脉归于平^[2]。现代药理学研究表明，生脉散可增加心肌能量供应、扩张冠脉、提高缺氧耐受性、增强心肌收缩力、抑制脂质过氧化、降低内分泌因子、抑制钙超载、防止心室重构^[3]等多种药理活性，常用于冠心病、病毒性心肌炎、肺心病、心律失常、心力衰竭、低血压病、高血压病等心血管疾病的防治^[4]。由生脉散经过现代工艺提取的生脉注射液在临床上广泛用于治疗心肌梗死、心源性休克、感染性休克等症，是一种确有疗效的中药注射剂^[5]。随着现代细胞生物学、分子生物学等学科的发展，生脉散治疗多种疾病的研究已经进入细胞层面和基因转录水平，并且已有研究应用计算机系统生物学方法预测生脉散血中移行成分分子靶标^[6]。然而，应用网络药理学方法在系统层面对生脉散全方的作用机制的研究较少。不同于化学药的药理特征通常为单一成分及靶点，中药则具有多成分、多靶点的特点，其作用机制更为复杂，这使得中药的深入研究呈现巨大困难，而中药网络药理学则为复杂中药系统的研究提供了新的思路和视角^[7-8]。网络药理学是在现代药理学研究的基础之上提出的药物设计与开发的新方法和新策略，其是以系统生物学为基础，从整体水平观察“药物-靶点-疾病”复杂网络关系，进而指导新药研发及药理作用研究^[9]。网络药理学研究策略具有整体性、系统性的特点，这与中医药整体观与辨证论治的原则不谋而合^[10]，已被广泛用于中药潜在活性成分和作用靶点的预测及中药作用机制的阐述^[11]。本研究采用网络药理学方法分析、预测生脉散治疗多种疾病的分子作用机制，希冀为深入开展生脉散基础研究及临床合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 生脉散活性成分分子结构 经过文献调研，选取生脉散中 3 味中药人参、麦冬、五味子含有的 36

个活性成分为对象进行研究，其中将人参皂苷 Rg₂ 和人参皂苷 20-(R)-Rg₂，人参皂苷 Rg₃ 和人参皂苷 20-(R)-Rg₃，人参皂苷 Rh₁ 和人参皂苷 20-(R)-Rh₁ 异构体作为同一个成分，最终确定为 33 个成分。通过 TCM Database@Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw/zh-tw/>) 和 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找并导出 33 个活性成分三维化学结构数据。

1.2 生脉散活性成分潜在靶点预测 生脉散活性成分的潜在靶点通过 PharmMapper 服务器 (<http://59.78.96.61/pharmmapper/>) 预测，PharmMapper 是基于反向药效团匹配法的化学小分子潜在靶点和生物活性预测的服务器，通过对 Targetbank, Binding DB, Drugbank, PDTD 四大数据库进行快速检索获取药物靶点信息，使其预测结果更加可靠^[12]。将 33 个活性成分的三维化学结构数据分别导入 PharmMapper，设置参数为不选择构象变化，选择人类数据库，设置最终产生 50 个蛋白构象。将 PharmMapper 对同一化合物预测产生的相同靶点剔除，取得生脉散化合物潜在靶点信息。

1.3 化合物-靶点网络的构建 将生脉散的化合物和相关靶点导入 Cytoscape 3.4.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建化合物-靶点网络，以探究生脉散的药理学作用机制。Cytoscape 是一个开放源码的生物信息分析软件，其核心架构是网络，每个节点 (node) 是基因、蛋白质或分子，而节点与节点之间的连接 (edge) 则代表着这些生物分子之间的相互作用^[13]。

1.4 PPI 网络的构建 为了说明靶点蛋白在系统水平上的作用，将生脉散相关靶点的基因上传至在线 STRING 10.0 数据库 (<http://string-db.org>)，获取蛋白相互作用信息。STRING 数据库是一个储存已知的和预测的蛋白质相互作用的数据库，包含蛋白间直接的和间接的相互作用，它对每一个蛋白相互作用信息都有一个打分值，打分值越高说明蛋白的相互作用置信度越高^[14]，因此本研究选取打分值 > 0.9 的最高置信度蛋白质互作关系数据，将其导入 Cytoscape 3.4.0 软件构建 PPI 网络。

1.5 GO 富集分析 为了说明中药化合物的靶点蛋白在基因功能中的作用，本研究采用 David v 6.7 数据库 (<https://david-d.ncicrf.gov/home.jsp>) 对 PPI 网络中的蛋白进行基因本体 GO 富集分析。David 数据库整合多种类别的数据库资源，采用改进的 Fisher 精确检验算法对基因集进行富集分析，

提供富集分析结果的 P -value 和 FDR ^[15]。本研究选择 GO 中生物过程 (biological process), 分子功能 (molecular function) 和 细胞组成 (cellular component) 3 个模块对基因进行功能注释, 并且利用 R version 3.3.2 (<https://www.r-project.org/>) 软件对 GO 富集分析中的 GO 条目绘制条形图。

1.6 KEGG 通路富集分析 为了说明中药化合物的靶点蛋白在信号通路中的作用, 本研究采用 David v6.7 数据库对 PPI 网络中的蛋白进行 KEGG 生物通路富集分析, 并且利用 Cytoscape 3.4.0 软件对 KEGG 通路富集分析中的信号通路构建靶点-通路网络。

2 结果

2.1 生脉散化合物-靶点网络的分析 生脉散中含有的 33 个活性化合物基本信息, 其中 18 个来自人参, 5 个来自麦冬, 10 个来自五味子 (表 1)。化合物-靶点网络 (图 1) 总共包括 249 个节点 (33 个化合物节点和 216 个靶点节点), 组成 1 343 条化合物-靶点联系。该网络描述了化合物-靶点的相互作用关系, 揭示了生脉散的潜在药理学的相互作用关系, 其中节点代表化合物和靶点, 每条边则代表他们之间的潜在联系。在网络中, 一个节点的度值 (Degree) 表示网络中和节点相连的路线的条数。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。表 2 列出了化合物-靶点网络中的关键靶点及其拓扑学性质。生脉散化合物-靶点网络平均度值为 5.4, 每个靶点平均度值为 6.2, 其中 15 个靶点能与 ≥ 20 个化合物发生相互作用, 这体现了生脉散多成分与多靶点之间共同作用的机制, 同时也符合中药复方的特点。化合物-靶点网络中度值 ≥ 20 的关键靶点包括 TTR, GSTP1, FKBP1A, HSP90AA1, CA2, FABP6, CRABP2, METAP2, MAP2K1, MMP3, THRB, HSD17B1, AR, ABO, TTPA, 其中, 度值最高的转甲状腺素蛋白 (TTR) 能与 32 个化合物发生相互作用, 度值紧随其后的谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (GSTP1) 和 FKBP12 蛋白 (FKBP1A) 均能与 29 个化合物发生相互作用。

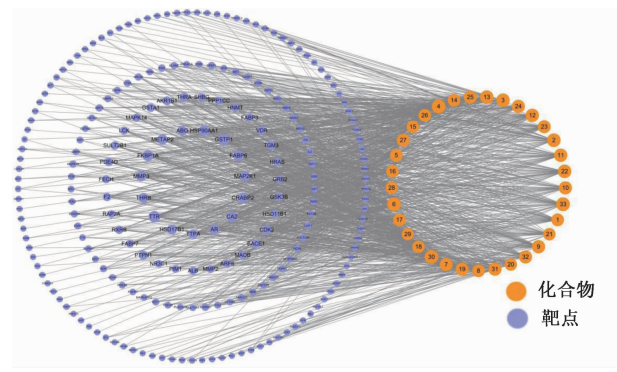
2.2 生脉散靶点 PPI 网络的分析 为了更好地理解生脉散的作用机制, 本研究基于蛋白质-蛋白质相互作用关系, 构建了生脉散潜在靶点的蛋白质-蛋白质相互作用网络 (图 2)。PPI 网络包含 155 个节点和 527 条相互作用关系 (连线)。根据网络拓扑学性质, 其中介数 (Betweenness Centrality, BC) 和度值大

表 1 生脉散中含有的 33 个活性化合物基本信息

Table 1 Information for 33 active compounds of Shengmaisai

序号	化合物	来源中药	来源数据库
1	人参皂苷 R ₀	人参	TCM Database@ Taiwan
2	人参皂苷 Ra ₁	人参	TCM Database@ Taiwan
3	人参皂苷 Ra ₂	人参	TCM Database@ Taiwan
4	人参皂苷 Ra ₃	人参	TCM Database@ Taiwan
5	人参皂苷 Rb ₁	人参	TCM Database@ Taiwan
6	人参皂苷 Rb ₂	人参	TCM Database@ Taiwan
7	人参皂苷 Rb ₃	人参	TCM Database@ Taiwan
8	人参皂苷 Rc	人参	TCM Database@ Taiwan
9	人参皂苷 Rd	人参	TCM Database@ Taiwan
10	人参皂苷 Re	人参	TCM Database@ Taiwan
11	人参皂苷 Rf	人参	TCM Database@ Taiwan
12	人参皂苷 Rg ₁	人参	TCM Database@ Taiwan
13	人参皂苷 Rg ₂	人参	TCM Database@ Taiwan
14	人参皂苷 Rg ₃	人参	TCM Database@ Taiwan
15	人参皂苷 Rh ₁	人参	TCM Database@ Taiwan
16	人参皂苷 Rh ₂	人参	TCM Database@ Taiwan
17	人参皂苷 Rh ₃	人参	TCM Database@ Taiwan
18	人参皂苷 Rh ₄	人参	TCM Database@ Taiwan
19	麦冬甲基黄烷酮 A	麦冬	PubChem
20	麦冬甲基黄烷酮 B	麦冬	TCM Database@ Taiwan
21	麦冬皂苷 A	麦冬	TCM Database@ Taiwan
22	麦冬皂苷 B	麦冬	TCM Database@ Taiwan
23	麦冬皂苷 D	麦冬	TCM Database@ Taiwan
24	戈米辛 A	五味子	TCM Database@ Taiwan
25	五味子醇甲	五味子	PubChem
26	五味子甲素	五味子	PubChem
27	五味子乙素	五味子	PubChem
28	五味子丙素	五味子	PubChem
29	五味子酯甲	五味子	PubChem
30	五味子酯乙	五味子	TCM Database@ Taiwan
31	五味子酯丙	五味子	TCM Database@ Taiwan
32	五味子素	五味子	TCM Database@ Taiwan
33	五味子醇乙	五味子	PubChem

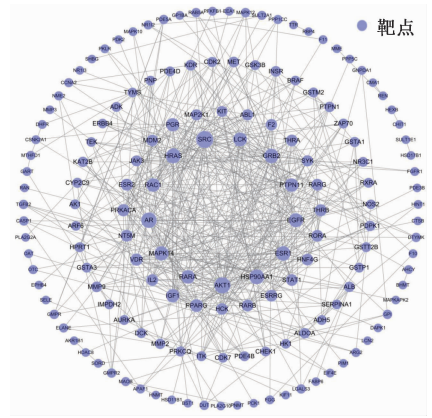
于均值 (介数 = 0.025 5, 度值 = 6.8) 的关键节点有 21 个 (表 3), 占全部节点数目的 13.55%。这些关键节点包括 SRC, Akt1, AR, HSP90AA1, HRAS, ESR1, MAPK14, EGFR, RARA, RAC1, PTPN11, IGF1, PGR, PPARG, PRKACA, NT5M, F2, MMP9, ALDOA, GSTA1, CYP2C9, 其中, 度值最高的酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC) 能与 34 个蛋白发生相互作用,



橙色表示化合物,蓝色表示靶点,节点的大小与节点的度值呈正比例关系(图 4 同)

图 1 生脉散化合物-靶点网络

Fig. 1 Compound-target network of Shengmaisai



节点表示靶点,节点的大小与节点的度值呈正比例关系

图 2 生脉散相关靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of Shengmaisai related targets

表 2 化合物-靶点网络的关键靶点及其拓扑学性质

Table 2 Topology characteristics of hub targets from compound-target network

靶点(基因)	靶点(蛋白)	介数	度
TTR	Transthyretin	0.037 556 79	32
GSTP1	Glutathione S-transferase P	0.031 532 16	29
FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	0.033 085 20	29
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	0.027 868 20	28
CA2	Carbonic anhydrase 2	0.025 662 46	27
FABP6	Gastrotopin	0.025 943 66	27
CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	0.026 041 45	26
METAP2	Methionine aminopeptidase 2	0.024 225 33	25
MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	0.019 586 82	24
MMP3	Stromelysin-1	0.020 975 10	24
THRB	Thyroid hormone receptor beta	0.019 302 79	24
HSD17B1	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 1	0.022 302 24	24
AR	Androgen receptor	0.014 474 00	21
ABO	Histo-blood group ABO system transferase	0.016 253 31	21
TTPA	Alpha-tocopherol transfer protein	0.012 907 20	20

表 3 PPI 网络中的关键节点及其拓扑学性质

Table 3 Topology characteristics of hub nodes from PPI network

靶点(基因)	靶点(蛋白)	介数	度
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	0.132 761 09	34
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	0.098 006 87	30
AR	Androgen receptor	0.207 466 96	28
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	0.163 311 80	25
HRAS	GTPase HRas	0.060 688 66	25
ESR1	Estrogen receptor	0.087 707 65	24
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	0.065 651 96	22
EGFR	Epidermal growth factor receptor	0.042 243 94	22
RARA	Retinoic acid receptor alpha	0.072 828 46	20
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	0.051 373 53	20

续表 3

靶点(基因)	靶点(蛋白)	介数	度
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	0.036 128 21	20
IGF1	Insulin-like growth factor IA	0.066 283 19	19
PGR	Progesterone receptor	0.028 255 04	19
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	0.039 316 30	17
PRKACA	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	0.209 979 08	15
NT5M	5(3)-deoxyribonucleotidase, mitochondrial	0.086 796 76	13
F2	Prothrombin	0.055 271 70	12
MMP9	Matrix metalloproteinase-9	0.032 903 37	9
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	0.064 691 46	8
GSTA1	Glutathione S-transferase A1	0.141 417 62	7
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9	0.027 490 42	7

度值紧随其后的蛋白激酶 B α (Akt1) 和雄激素受体 (AR) 分别能与 30 个和 28 个蛋白发生相互作用。

2.3 GO 功能富集分析 利用 DAVID 平台进行 GO 功能富集分析,对生脉散 PPI 网络中涉及的 155 个蛋白在基因功能中的作用进行了研究。根据错误发现率 (false discovery rate, FDR) 确定了 95 个 GO 条目 (FDR < 0.05, 表 4 根据 FDR 列出前 20 个, 图 3),

其中生物过程相关的条目最多,有 67 个,主要涉及磷酸化、对有机物质的反应、细胞内信号级联、对刺激的反应、代谢过程等方面;分子功能相关的条目 22 个,主要涉及受体活性,蛋白激酶活性,核苷及核苷酸结合,ATP 结合等方面;细胞组成相关的条目 6 个,主要涉及细胞质基质、细胞组分、可溶组分、囊泡等方面。

表 4 生脉散 PPI 网络中的 GO 条目 (FDR < 0.05)

Table 4 List of GO enrichment results to genes in PPI network (FDR < 0.05)

类别	GO 编号	名称	基因数/个	FDR
分子功能	0003707	steroid hormone receptor activity	18	3.82×10^{-18}
分子功能	0004879	ligand-dependent nuclear receptor activity	18	1.06×10^{-16}
生物过程	0006468	protein amino acid phosphorylation	40	2.92×10^{-15}
生物过程	0010033	response to organic substance	41	6.12×10^{-15}
生物过程	0007242	intracellular signaling cascade	52	2.89×10^{-14}
生物过程	0016310	phosphorylation	42	3.55×10^{-14}
生物过程	0009719	response to endogenous stimulus	31	8.39×10^{-14}
生物过程	0006793	phosphorus metabolic process	45	1.89×10^{-13}
生物过程	0006796	phosphate metabolic process	45	1.89×10^{-13}
分子功能	0004672	protein kinase activity	37	3.11×10^{-13}
生物过程	0009725	response to hormone stimulus	29	5.77×10^{-13}
细胞组成	0005829	cytosol	49	1.70×10^{-12}
分子功能	0001882	nucleoside binding	53	3.06×10^{-9}
生物过程	0032868	response to insulin stimulus	15	6.45×10^{-9}
分子功能	0001883	purine nucleoside binding	52	8.85×10^{-9}
分子功能	0032555	purine ribonucleotide binding	56	1.06×10^{-8}
分子功能	0032553	ribonucleotide binding	56	1.06×10^{-8}
分子功能	0004713	protein tyrosine kinase activity	18	1.25×10^{-8}
分子功能	0017076	purine nucleotide binding	57	1.75×10^{-8}
分子功能	0005524	ATP binding	49	2.37×10^{-8}

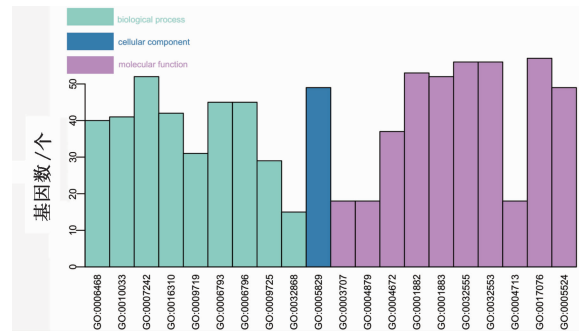


图 3 GO 条目在生物过程、分子功能、细胞组成上的分布 (FDR < 0.05)

Fig. 3 Distribution of GO terms in biological process, molecular function and cellular component (FDR < 0.05)

2.4 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 平台的 KEGG 通路富集分析功能,对生脉散 PPI 网络中涉及的 155 个蛋白在信号通路中的作用进行研究,得到 56 条信号通路,根据 FDR < 0.05 筛选出 8 条(表 5,图 4),包括肿瘤信号通路 (pathways in cancer),前列腺癌 (prostate cancer),胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway),黄体酮介导的卵母细胞成熟 (progesterone-mediated oocyte maturation),嘌呤代谢 (purine metabolism), VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway), FcεRI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway), GnRH 信号通路 (GnRH signaling pathway)。

表 5 生脉散 PPI 网络中的通路 (FDR < 0.05)

Table 5 List of pathway enrichment results to genes in PPI network (FDR < 0.05)

编号	通路名称	基因数/个	FDR
hsa05200	Pathways in cancer	29	1.34×10^{-5}
hsa05215	Prostate cancer	15	5.40×10^{-5}
hsa04910	Insulin signaling pathway	17	3.37×10^{-4}
hsa04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	13	0.001 978 13
hsa00230	Purine metabolism	16	0.009 133 163
hsa04370	VEGF signaling pathway	11	0.022 863 961
hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	11	0.032 484 371
hsa04912	GnRH signaling pathway	12	0.045 585 466

3 讨论

生脉散是中医益气养阴的著名古方,在临床上广泛用于冠心病、心力衰竭、心肌炎、心肌梗死等心血管疾病的治疗,随着现代医学的不断发展,生脉散的应用范围也日益广泛^[16-17]。为了探究生脉散的作用机制,本研究选取生脉散中 3 味中药人参、麦

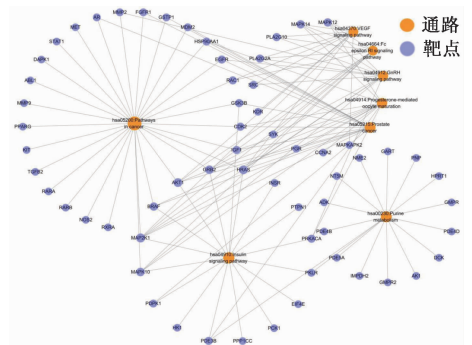


图 4 靶点-通路网络 (FDR < 0.05)

Fig. 4 Target-pathway network (FDR < 0.05)

冬、五味子含有的 33 个活性成分,通过 PharmMapper 服务器预测了生脉散活性成分的潜在靶点,同时构建了化合物-靶点网络,分析了化合物与靶点直接的相互作用关系,为生脉散多成分、多靶点、多途径的治疗机制提供了参考。化合物-靶点网络的关键靶点包括 TTR, GSTP1, FKBP1A 等。TTR 是一种四聚体结构蛋白,主要存在于在血液和脑脊液中,分别由肝脏和大脑的脉络丛产生。TTR 在体内的主要功能是参与甲状腺素和视黄醇的转运,维持体内视黄醇、甲状腺素和视黄醇结合蛋白的正常水平。TTR 蛋白还有其他非转运蛋白的功能如水解载脂蛋白 AI 的蛋白酶活性促进动脉粥样硬化;水解 Aβ 淀粉样蛋白的蛋白酶活性延缓阿尔海默症发病等。已证明 TTR 与人体多种疾病相关,如老年性系统性淀粉样变、家族型淀粉样多神经病、类风湿关节炎、糖尿病、癌症等^[18-21]。因此,推测生脉散治疗冠心病等心血管疾病和糖尿病等代谢性疾病可能与调控 TTR 蛋白有关。血性心力衰竭患者存在甲状腺激素分泌异常,甲状腺激素异常程度与心脏病变程度相关,生脉注射液可纠正充血性心力衰竭患者异常的甲状腺激素水平^[22],因此,推测生脉散中的活性成分可能通过调控 TTR 达到纠正甲状腺分泌异常的目的。将生脉散的靶点进行 PPI 映射并构建网络,对网络分析后发现了多个与多种复杂疾病紧密相关的关键靶点,包括 SRC, Akt1, AR 等。SRC 是膜结合非受体酪氨酸蛋白激酶家族成员之一,在神经元的增殖、分化和存活中起着重要的生理作用^[23]。SRC 蛋白通过多条信号通路介导细胞内信号传递,参与细胞的黏着与运动、细胞的增殖、细胞的存活、血管收缩及胞内运输等生理过程,在多种实体肿瘤细胞及组织如胰腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等中 SRC 过表达或活性增强^[24]。SRC 通过复杂的细胞内信号转导机制,作用于细胞连接相关

的骨架蛋白,影响细胞连接的结构与功能的完整性,导致细胞间隙增大,使血管的通透性增加^[25],由此推断生脉散中的活性成分可能通过调控 SRC 达到治疗多种心血管疾病的目。Akt1 属于蛋白激酶 B (Akt/PKB) 家族的一员。Akt 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞代谢、细胞存活、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,参与炎症、癌症、糖尿病及心血管疾病等的发生发展^[26]。糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,其中 90% 以上是 2 型糖尿病^[27]。糖尿病属中医消渴范畴,2 型糖尿病患者以气阴两虚型最为多见,而生脉散具有益气生津之功,主治气阴两虚证,生脉散及其加减方在气阴两虚型糖尿病治疗中取得良好疗效^[28-29]。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要特点,在 2 型糖尿病患者中,肝细胞可通过 PI3K/Akt 胰岛素信号通路异常导致糖代谢异常^[30]。已有研究表明,2 型糖尿病大鼠 Akt1 在肝组织表达较正常对照组总体上为先降低后增高趋势^[30],2 型糖尿病时大鼠肾皮质 PI3K/Akt 信号通路被激活,Akt 总蛋白表达水平增加^[31]。因此,推断生脉散治疗 2 型糖尿病的作用机制可能与其调控 Akt1 蛋白的表达密切相关。为了说明生脉散作用靶点在基因功能和信号通路中的作用,本研究对 PPI 网络中出现的基因进行了 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析发现,生脉散治疗多种疾病的基因功能主要体现在磷酸化、对有机物质的反应、受体活性、蛋白激酶活性、细胞质基质、细胞组分等方面。在基因的 KEGG 通路富集中,筛选得到 8 条信号通路,其中 6 条为生物功能相关信号通路,2 条为疾病相关信号通路。生物功能相关信号通路中,内分泌调节相关信号通路有 3 条,包括胰岛素信号通路、黄体酮介导的卵母细胞成熟、GnRH 信号通路。免疫调节相关信号通路为 FcεRI 信号通路。信号转导相关信号通路为 VEGF 信号通路。代谢作用信号通路为嘌呤代谢。疾病相关信号通路中,2 条信号通路均为肿瘤相关信号通路,包括肿瘤信号通路、前列腺癌。因此,推测生脉散中的活性成分可能通过作用于这些信号通路中的关键因子达到治疗多种复杂疾病的目的。本研究发现,生脉散作用的大部分基因富集在与内分泌调节密切相关信号通路上。其中,胰岛素信号通路主要包括两条信号通路,丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路和 PI3K-Akt 通路。MAPK 通路是诱发肿瘤细胞增殖的中心环节^[32],PI3K-Akt 通路参与增殖、分化、调亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调

节,在细胞代谢、细胞周期调控、细胞生长调亡等多种生物学过程中发挥着重要作用^[33]。由此可见,生脉散治疗糖尿病等多种内分泌疾病的作用机制与胰岛素信号通路中关键因子的表达密切相关。此外,还有较多的基因富集在两条与肿瘤相关的信号通路,包括肿瘤信号通路和前列腺癌信号通路,因此,推测生脉散可能在多种肿瘤的治疗过程中发挥一定的作用。

[参考文献]

- [1] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003:157.
- [2] 谢鸣. 方剂学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016:166.
- [3] 彭明勇, 李艳. 生脉散的临床应用及药理研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(1):224-226.
- [4] 彭成. 中药药理学 [M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016:364.
- [5] 詹淑玉. 生脉注射液蛋白质组学与药效物质体内过程研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [6] 朱艳芳, 朱伟. 生脉散血中移行成分分子靶标的计算机系统生物学预测 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):278-282.
- [7] 李娜, 张新庄, 王俨如, 等. 基于网络药理学方法探讨通塞脉片治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9):1706-1712.
- [8] 吴嘉瑞, 金燕萍, 王凯欢, 等. 基于网络药理学的“金银花-连翘”药对作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5):179-183.
- [9] 高宁, 李天聪, 程玉鹏, 等. 龙胆裂环烯醚萜类有效成分作用机理的网络药理学研究 [J]. 化学工程师, 2017(1):14-16, 26.
- [10] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. 药学学报, 2012, 47(6):696-703.
- [11] 张建永, 王岚, 梁日欣, 等. 基于网络药理学分析丹参山楂组分配伍抗动脉粥样硬化的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23):4408-4415.
- [12] LIU X, OUYANG S, YU B, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (Web Server issue): W609-W614.
- [13] 霍梦琪, 张燕玲, 郑世超, 等. 基于共表达蛋白相互作用网络探讨川芎嗪治疗冠心病的机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(12):989-997.
- [14] 任真真, 张燕玲, 王星, 等. 三七皂苷类成分的蛋白质相互作用网络分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11):2097-2101.
- [15] 李丕栋. 基于系统生物学的肝癌分子机制及护肝片

- 治作用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [16] 王亚萍,年莉. 生脉散在心血管疾病中的应用[J]. 山西中医学院学报,2012,13(6):64-67.
- [17] 陈海芳,戚进,余伯阳. 生脉散中人参、麦冬和五味子提取物体外抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(19):37-42.
- [18] 彭晨. 转甲状腺素蛋白在肿瘤研究中的进展[D]. 蚌埠:蚌埠医学院,2014.
- [19] 张凤. 转甲状腺素蛋白 Val30Ala 突变致家族型淀粉样多神经病的作用机制研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [20] 段红茹. 研究转甲状腺素蛋白化学修饰在老年性淀粉样变形成机制中的作用[D]. 天津:天津医科大学,2013.
- [21] 冯强,孙续国,张福江,等. 类风湿关节炎患者血清转甲状腺素蛋白化学修饰的蛋白质组学分析[J]. 检验医学,2011,26(3):185-189.
- [22] 朱贵月,解建,朱兴雷,等. 充血性心力衰竭患者甲状腺激素变化及生脉注射液的干预作用[J]. 上海中医药杂志,2004,38(10):11-13.
- [23] 吴杰. Src 真核表达载体的构建与表达[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2013,29(5):57-60.
- [24] 梁晓爽. Rap1GAP 下调宫颈癌细胞-基质粘附机制的研究[D]. 大连:大连医科大学,2012.
- [25] 张伟金,郭晓华. 非受体酪氨酸蛋白激酶介导内皮细胞通透性改变的研究进展[J]. 微循环学杂志,2014,24(1):61-64.
- [26] 周巍. AKT1/NF-kappaB/Notch-1/PTEN 信号轴在胃癌细胞化疗耐药性中的作用及机制研究[D]. 武汉:武汉大学,2013.
- [27] 冷雪,谷丽艳,朱芳. 2 型糖尿病中医证型流行病学调查及其中医病因病机初探[J]. 中华中医药杂志,2015,30(3):732-735.
- [28] 吴小秋. 基于代谢组学的生脉注射液干预 2 型糖尿病气阴两虚证的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.
- [29] 陈惠,孙朦朦,安然,等. 生脉散治疗糖尿病研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(10):2170-2172.
- [30] 贾春利. PI3K、AKT1、AKT2 和 NFκB 在 2 型糖尿病骨质疏松大鼠肝组织表达[D]. 石家庄:河北医科大学,2012.
- [31] 石明隽,肖瑛,桂华珍,等. 糖尿病大鼠肾组织中 AKT 的表达及意义[J]. 中国老年学杂志,2011,31(22):4375-4378.
- [32] 张欣霞,陈婷,涂盛,等. 胰岛素信号通路与肿瘤风险相关性的研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(5):418-422.
- [33] 罗丹萍. HCV 蛋白 NS5A 在胰岛素信号通路中的作用[D]. 广州:南方医科大学,2012.

[责任编辑 邹晓翠]