

基于网络药理学的参附汤作用机制分析

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

[摘要] **目的:**探讨参附汤的功效物质基础和作用机制。**方法:**依托中药系统药理学分析平台(TCMSP)检索参附汤2味中药人参、附子的化学成分和作用靶点。进而构建化合物-靶点网络、构建蛋白互作(PPI)网络、进行基因本体(GO)功能富集分析、进行基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,研究参附汤作用机制。**结果:**化合物-靶点网络包含23个化合物和相应靶点118个,关键靶点涉及PTGS2,PTGS1,NCOA2,ADRB2等。PPI网络包含114个蛋白,关键蛋白涉及Akt,AP-1,p56蛋白等。GO功能富集分析得到GO条目236个,其中生物过程相关的条目191个,分子功能相关的条目20个,细胞组成相关的条目25个。KEGG通路富集筛选得到10条信号通路涉及calcium signaling pathway,neuroactive ligand-receptor interaction,apoptosis,pathways in cancer等。**结论:**本研究结果初步验证参附汤防治疾病的分子机制,为进一步深入探讨其作用机制提供先导信息和基础。

[关键词] 参附汤;网络药理学;蛋白互作网络(PPI);基因本体(GO);信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0211-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160211

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1046.022.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 10:46

Mechanism of Shenfutang 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 efficacy and mechanism of Shenfutang. **Method:** The chemical components and corresponding targets related to Shenfutang were searched from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The compound-target network and the protein-protein interaction (PPI) network were established, and the GO functional enrichment analysis and the KEGG pathway enrichment analysis were made to explore the mechanism of Shenfutang. **Result:** The compound-target network contained 23 chemical components and 118 targets. The hub targets involved PTGS2, PTGS1, NCOA2, ADRB2. The PPI network contained 114 proteins, in which the hub proteins involved AKT, AP-1, p56. The GO functional enrichment analysis showed 236 GO entries (including 191 for biological process, 20 for molecular function, 25 for cellular component). The KEGG pathway enrichment analysis showed 10 pathways, involving calcium signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, apoptosis, and pathways in cancer. **Conclusion:** The result of the study preliminarily verifies the basic pharmacological effects and related mechanisms of Shenfutang, thus laying a solid foundation for further study on the mechanism of action.

[Key words] Shenfutang; network pharmacology; protein-protein interaction network (PPI); gene ontology (GO); signaling pathway

[收稿日期] 20170213(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473547,81673829)

[第一作者] 刘鑫馥,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

参附汤出自明代严用和的《济生续方》，由人参、附子组成，是中医临床常用的益气救脱的名方。参附汤具有益气回阳固脱之功，主治元气大亏、阳气暴脱证，见四肢厥逆、冷汗淋漓、呼吸微弱、脉微欲绝^[1]。《医宗金鉴·删补名医方论》记载“补后天之气无人参，补先天之气无如附子，此参附汤之所由立也。”方中人参大补元气，能振衰于式微，回阳气于将绝；附子是回阳救逆要药，能助人参生发阳气，有较好强心之功，参附同用，能令阳气渐旺，心功渐复，转危为安。此方药味虽少而用量较重，功力专而无所牵制，所以阳气虚脱非此莫属^[2]。现代药理学研究表明，参附汤具有增加冠脉流量，提高超氧化物歧化酶活性，改善血流动力学，抵抗心肌受损等功效^[3]。现今临床作用于休克、多种心脏疾病如心肌梗死、心衰及心律失常等均有较好的疗效^[4]，由参附汤经过现代工艺提取的参附注射液广泛应用于心血管、肿瘤的治疗并取得了较好的疗效^[5]。随着现代分子生物学的发展，参附汤治疗多种疾病的研究已经进入细胞层面和基因转录水平，但结合网络药理学在系统层面对参附汤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^[6-7]。网络药理学融合了系统生物学、多向药理学、计算生物学、网络分析等多学科的技术和内容，从多靶点的研究策略出发，实现药物作用的综合网络分析，其研究策略的整体性、系统性特点与中药及其方剂的多成分、多途径、多靶点协同作用的原理不谋而合，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^[7-8]。本研究采用网络药理学方法分析参附汤治疗多种疾病的药效物质基础和分子作用机制，希冀为深入开展参附汤基础实验研究及临床合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 参附汤的化学成分数据库 本研究依托中药系统药理学分析平台 (TCMSP) (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)，以“人参”、“附子”为关键词检索参附汤中人参、附子的全部化学成分。

1.2 活性化合物筛选 口服生物利用度是药物 ADME 特性 (即吸收、分布、代谢、排泄) 中最重要的药代动力学参数之一，它表示口服的药物到达血液循环系统所占口服剂量的比率，高的口服生物利用度通常是决定生物活性分子 (即有药效作用的分

子) 类药性的关键指标^[9-10]。因此，本研究以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 阈值 $OB \geq 30\%$ 和类药性 (druglikeness, DL) 阈值 $DL \geq 0.18$ 作为活性化合物的筛选条件，将 TCMSP 中具有较高活性的化合物筛选出来。

1.3 化合物-靶点网络的构建 将参附汤的化合物和相关靶点通过 Cytoscape 3.4.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建化合物-靶点网络，以探究参附汤的药理学作用机制。

1.4 蛋白互作 (PPI) 网络的构建 为了说明靶点蛋白在系统水平上的作用，将参附汤相关靶点的基因上传至在线 STRING 10.0 软件 (<http://string-db.org>)，获取蛋白相互作用信息。该软件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，因此本研究选取打分值 > 0.7 的高置信度数据，以确保数据的可靠性。将得到的蛋白相互作用数据导入 Cytoscape 3.4.0 软件，构建 PPI 网络。利用 R version 3.3.2 软件 (<https://www.r-project.org/>) 对 PPI 网络中的蛋白绘制条形图。

1.5 基因本体 (GO) 功能富集分析 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 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对 PPI 网络中的蛋白进行 GO 功能富集分析。

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 v 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对 PPI 网络中的蛋白进行 KEGG 通路富集分析，并且通过 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

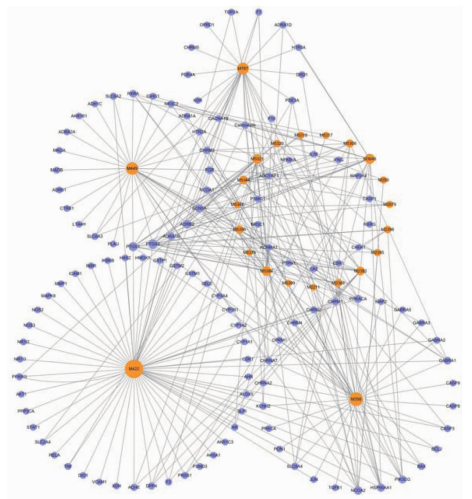
2.1 活性化合物的筛选 通过 TCMSP 共收集到参附汤中化合物 255 个，其中 190 个来自人参，65 个来自附子。以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ ，筛选出活性化合物 43 个，其中 22 个来自人参，21 个来自附子。表 1 为参附汤中含有的 43 个活性化合物基本信息。

2.2 参附汤化合物-靶点相互作用网络 化合物-靶点网络总共包括 141 个节点 (23 个化合物节点、118 个靶点节点) 和 284 条边，其中橙色节点表示化合物分子，蓝色节点表示药物靶点，每条边则表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系 (图 1)，43 个化合物中有 20 个未参与网络构建。在网络中，一个节点的度 (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 Degree 较大的

表 1 参附汤中含有的 43 个活性化合物基本信息

Table 1 Information for 43 active compounds of Shenfutang

编号	名称	OB/%	DL	来源
M5314	celabenzine	101.88	0.49	人参
M2421	ignavine	84.08	0.25	附子
M2419	(R)-norcoclaurine	82.54	0.21	附子
M2398	karanjin	69.56	0.34	附子
M5308	aposiopolamine	66.65	0.22	人参
M5321	frutinone A	65.9	0.34	人参
M3648	inermin	65.83	0.54	人参
M5356	girimibin	61.22	0.31	人参
M787	fumarine	59.26	0.83	人参
M2388	delphin_qt	57.76	0.28	附子
M5360	malkangunin	57.71	0.63	人参
M5384	suchilactone	57.52	0.56	人参
M2395	deoxyandrographolide	56.3	0.31	附子
M2415	6-demethyl-desoline	51.87	0.66	附子
M2397	karakoline	51.73	0.73	附子
M2422	isotalatizidine	50.82	0.73	附子
M2392	deltoin	46.69	0.37	附子
M5320	arachidonate	45.57	0.2	人参
M449	stigmasterol	43.83	0.76	人参
M2879	diop	43.59	0.39	人参
M2401	neokadsuranic acid B	43.1	0.85	附子
M422	kaempferol	41.88	0.24	人参
M2433	(3R, 8S, 9R, 10R, 13R, 14S, 17R)-3-hydroxy-4, 4, 9, 13, 14-pentamethyl-17-[(E, 2R)-6-methyl-7-[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 17-decahydr	41.52	0.22	附子
M5318	dianthramine	40.45	0.2	人参
M2211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.2	附子
M5401	ginsenoside Rg ₅ -qt	39.56	0.79	人参
M2406	2, 7-dideacetyl-2, 7-dibenzoyl-taxayunnanine F	39.43	0.38	附子
M5317	deoxyharringtonine	39.27	0.81	人参
M4492	chrysanthemaxanthin	38.72	0.58	人参
M2434	carosifloside I_qt	38.16	0.8	附子
M358	beta-sitosterol	36.91	0.75	人参
M5399	alexandrin_qt	36.91	0.75	人参
M359	sitosterol	36.91	0.75	附子
M5344	ginsenoside Rh ₂	36.32	0.56	人参
M2393	demethyl-delavaine A	34.52	0.18	附子
M2394	demethyl-delavaine B	34.52	0.18	附子
M2410	benzoyl-napelline	34.06	0.53	附子
M2423	jesaconitine	33.41	0.19	附子
M5376	Panaxadiol	33.09	0.79	人参
M5357	gomisin B	31.99	0.83	人参
M538	hypaconitine	31.39	0.26	附子
M5348	ginsenoside-Rh ₄ -qt	31.11	0.78	人参
M2416	deoxyaconitine	30.96	0.24	附子



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

图 1 参附汤化合物-靶点网络

Fig.1 Compound-target network of Shenfutang

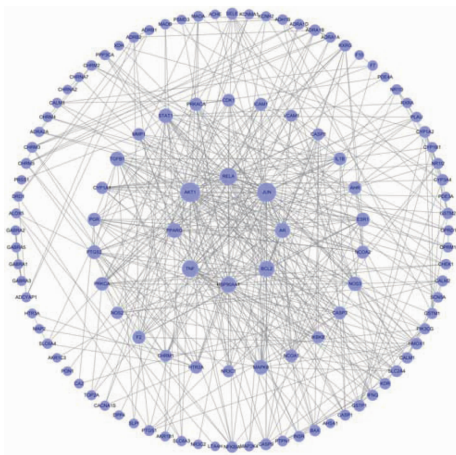
节点进行分析,这些连接化合物或靶点较多的节点在整个网络中起到枢纽的作用,可能是关键的化合物或者靶点。表 2 列出了化合物-靶点网络中的关键节点及其拓扑学性质。该网络中,每个化合物的平均靶点数目为 12.3 个,每个靶点平均与 2.4 个化合物相互作用,因此参附汤中存在一个化合物与多个靶点之间的相互作用,同时也存在不同化合物共同作用于同一个靶点的现象,这体现了参附汤多成分与多靶点之间共同作用的机制,同时也符合中药复方的特点。从化合物的角度,有 43.5% 的化合物的作用靶点 ≥ 10 个,其中靶点 ≥ 20 个的化合物有 4 个。Degree 排名前 5 位的是山柰酚(M422), β -谷固醇(M358),豆甾醇(M449),原阿片碱(M787),高丽槐素(M3648),分别能与 62,37,31,28,18 个靶点蛋白发生相互作用。从靶点的角度,Degree 排名前 2 位的是前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 和前列腺素内过氧化物合酶 1 (PTGS1),分别能与 15 个和 13 个化合物发生相互作用。核受体辅激活因子 2 (NCOA2) 和 β_2 -肾上腺素能受体 (ADRB2) 均对应了 10 个化合物。

2.3 参附汤靶点 PPI 网络的构建与分析 PPI 网络(图 2)包含 114 个节点,471 条边,其中节点表示蛋白,每条边则表示蛋白与蛋白之间的相互作用关系。根据节点的 Degree 绘制出了前 30 个关键蛋白质节点的条形图(图 3)。Degree ≥ 20 的节点包括 Akt1, JUN, RELA, TNF, Bcl-2, HSP90AA1, AR, PPARG。Degree 排名前 3 位的是 Akt1 编码的蛋白激酶 B (Akt/PKB, JUN 编码的激活蛋白-1 (AP-1),

表 2 化合物-靶点网络的关键节点及其拓扑学性质

Table 2 Topologic characteristics of hub nodes from compound-target network

名称	类型	介数	度
kaempferol (M422)	化合物	0.522 712 34	62
beta-sitosterol (M358)	化合物	0.217 306	37
stigmasterol (M449)	化合物	0.193 240 09	31
fumarine (M787)	化合物	0.131 295 15	28
inermine (M3648)	化合物	0.036 854 27	18
frutinone A (M5321)	化合物	0.028 458 71	16
suchilactone (M5384)	化合物	0.048 929 84	16
PTGS2	靶点	0.140 271 15	15
PTGS1	靶点	0.071 340 36	13
ginsenoside rh2 (M5344)	化合物	0.102 042 35	12
deltoin (M2392)	化合物	0.013 435 45	11
NCOA2	靶点	0.061 836 9	10
ADRB2	靶点	0.020 965 98	10
girinimbin (M5356)	化合物	0.008 075 41	10
SCN5A	靶点	0.017 917 7	9
HSP90AA1	靶点	0.027 595 16	8
PRKACA	靶点	0.032 929 52	8
aposiopolamine (M5308)	化合物	0.005 244 93	8
PI3KCG	靶点	0.021 433 02	7



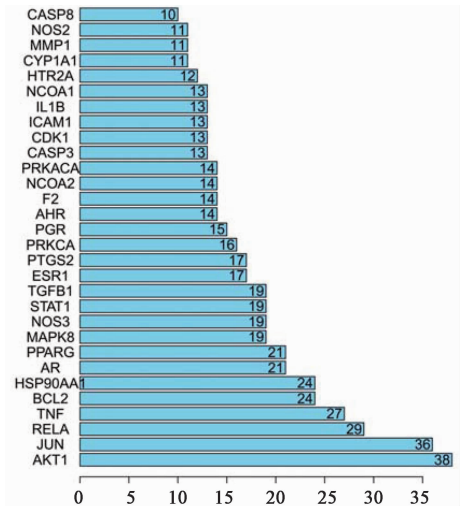
节点表示蛋白;节点的大小与节点的度呈正比例关系

图 2 参附汤相关靶点的 PPI 网络

Fig.2 PPI network of Shenfutang-related targets

RELA 编码的 p56 蛋白,分别能与 38,36,29 个蛋白发生相互作用。

2.4 GO 功能富集分析 利用 DAVID 平台进行 GO 功能富集分析,对参附汤 PPI 网络中涉及的 114 个蛋白在基因功能中的作用进行了研究。根据错误



数字表示节点的 Degree

图 3 PPI 网络中的关键节点

Fig.3 Hub nodes from PPI network

发现率 (false discovery rate, FDR) 确定了 236 个 GO 条目 (FDR < 0.05, 表 3 根据 FDR 列出前 20 个), 其中生物过程相关的条目最多, 有 191 个, 主要涉及对有机物质的反应、分子功能的调控、系统过程的调控、多细胞生物过程的调控、级联反应、细胞坏死以及凋亡的调控等方面; 分子功能相关的条目 20 个, 主要涉及受体活性、神经递质结合等方面; 细胞组成相关的条目 25 个, 主要涉及细胞组分、细胞质膜等方面。

2.5 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 平台的 KEGG 通路富集分析功能, 对参附汤 PPI 网络中涉及的 114 个蛋白在信号通路中的作用进行了研究, 得到 45 条信号通路, 根据 FDR < 0.05 筛选出 10 条 (表 4, 图 4), 包括钙离子信号通路 (calcium signaling pathway), 神经活性配体-受体相互作用信号通路 (neuroactive ligand-receptor interaction), 细胞凋亡信号通路 (apoptosis), 癌症信号通路 (pathways in cancer), Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway), 小细胞肺癌信号通路 (small cell lung cancer), 细胞色素 P450 异物代谢信号通路 (metabolism of xenobiotics by cytochrome P450), NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway), 脂肪细胞因子信号通路 (adipocytokine signaling pathway), 前列腺癌信号通路 (prostate cancer), 表明参附汤的有效成分可能通过作用于这些信号通路来达到治疗疾病的目的。

3 讨论

参附汤具有回阳救逆、益气固脱的作用, 临床上

表 3 参附汤 PPI 网络中的 GO 条目 (FDR < 0.05)

Table 3 GO entries in PPI network (FDR < 0.05)

类别	GO 编号	名称	基因数/个	FDR
生物过程	0010033	response to organic substance	38	1.54×10^{-17}
分子功能	0008227	amine receptor activity	14	1.12×10^{-14}
细胞组成	0000267	cell fraction	39	1.44×10^{-13}
生物过程	0044093	positive regulation of molecular function	31	1.89×10^{-13}
生物过程	0044057	regulation of system process	24	3.89×10^{-13}
生物过程	0051240	positive regulation of multicellular organismal process	22	5.77×10^{-13}
生物过程	0007242	intracellular signaling cascade	42	1.15×10^{-12}
生物过程	0014070	response to organic cyclic substance	17	2.70×10^{-12}
生物过程	0042127	regulation of cell proliferation	33	1.08×10^{-11}
生物过程	0042981	regulation of apoptosis	33	1.97×10^{-11}
生物过程	0043067	regulation of programmed cell death	33	2.60×10^{-11}
分子功能	0043176	amine binding	16	2.63×10^{-11}
生物过程	0010941	regulation of cell death	33	2.87×10^{-11}
细胞组成	0005626	insoluble fraction	32	7.35×10^{-11}
生物过程	0009719	response to endogenous stimulus	24	1.48×10^{-10}
生物过程	0051241	negative regulation of multicellular organismal process	17	3.51×10^{-10}
生物过程	0043085	positive regulation of catalytic activity	26	4.52×10^{-10}
细胞组成	0005624	membrane fraction	30	1.29×10^{-9}
生物过程	0009725	response to hormone stimulus	22	1.78×10^{-9}
细胞组成	0044459	plasma membrane part	48	2.52×10^{-9}

表 4 参附汤 PPI 网络中的通路 (FDR < 0.05)

Table 4 Pathway in PPI network (FDR < 0.05)

编号	名称	基因数/个	FDR
hsa04020	calcium signaling pathway	19	1.85×10^{-6}
hsa04080	neuroactive ligand-receptor interaction	22	3.94×10^{-6}
hsa04210	apoptosis	14	4.20×10^{-6}
hsa05200	pathways in cancer	24	1.30×10^{-5}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	12	1.97×10^{-3}
hsa05222	small cell lung cancer	11	2.65×10^{-3}
hsa00980	metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	9	1.23×10^{-2}
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	9	1.58×10^{-2}
hsa04920	adipocytokine signaling pathway	9	2.83×10^{-2}
hsa05215	prostate cancer	10	3.36×10^{-2}

用于心源性休克、心力衰竭、缓慢性心律失常等心血管病已达 20 余年,疗效确切,已成为急症抢救的必备药物^[11]。为了探究参附汤的作用机制,依托 TCMS 中药系统药理学分析平台研究了参附汤 2 味中药(人参、附子)的有效成分,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,为参附汤多成分、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 PTGS2, PTGS1, ADRB2 等。PTGS 是花生四烯酸合成前列腺素类物质的关键限速酶,有 2 种异构酶 PTGS1 和 PTGS2。PTGS 及其产物参与机体的肿瘤新生、血压调节、炎症反应、凝血平衡等多种生理和病理过程^[12]。陈世宏等^[13]对冠状动脉结扎致大鼠急性心肌缺血模型的中医证型进行反证研究,发现参附汤可提高 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 指标,但与模型组比较无统计学意义。此外,关于参附汤通过对 PTGS 的调控影响前列腺素类物质合成的相关报道较少,因此本研究的结果仍需进一步深入研究。ADRB2 是 G 蛋白偶联受体的超家族成员,其基因位于第 5 号染色体,主要通过介导交感神经系统儿茶酚胺递质的生理学效应。ADRB2 主要分布于呼吸系统,松弛支气管平滑肌,还与糖原分解以及胰岛素和胰高血糖素的分泌有关^[14]。已有研究显示,由参附汤经过现代工艺提取的参附注射液通过抗缺血、缺氧、清除氧自由基,抗脂质过氧化,减轻细胞内 Ca^{2+} 超载,升高血压、改善微循环等作用能够提高 ADRB2 活性,减轻心肺复苏后心肌细胞损伤^[15]。将参附汤的

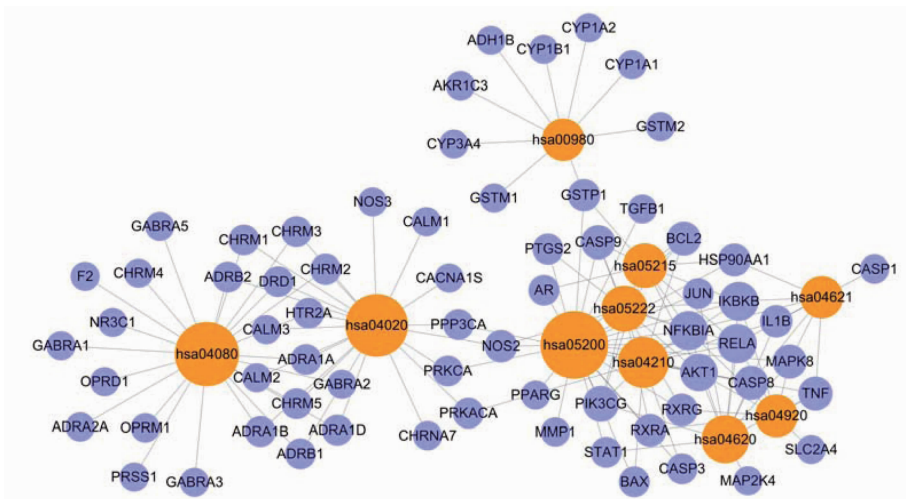


图 4 靶点-通路网络(FDR < 0.05)

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

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,其中 Akt1 编码的 Akt 和 JUN 编码的 AP-1 蛋白 Degree 远高于其他蛋白,由此推测参附汤正是通过多种组分与这些关键靶点直接或间接相互作用达到治疗疾病的目的。Akt 是细胞生长信号通路中的传感器,在生长因子或胰岛素介导的信号转导中扮演重要角色,在营养代谢、细胞生长、转录调控和细胞存活中也具有重要作用^[16]。参附注射液可以通过作用于 Akt 信号通路参与脑缺血调节作用^[17]。诸多研究显示,参附汤中人参的主要活性成分人参皂苷类可以调节多种与 Akt 相关的信号通路,如人参皂苷 Rg₁ 可抑制 OGD 引起 PC-12 细胞损伤,作用机制可能与激活 mTOR/Akt 信号通路调控 FoxO3 核质穿梭密切相关^[18];人参皂苷 Rb₁, Rg₁ 和 Re 对皮质酮所致 SY5Y 细胞受损具有明显保护作用,其作用机制可能与调节神经营养因子细胞信号转导通路上游的 Akt-CREB 通路有关^[19];PI3K/Akt 信号通路在人参皂苷 Rb₁ 促进神经干细胞增殖作用中发挥重要作用^[20];抑制 PI3K, Akt 活性是人参皂苷 Rg₃ 诱导人乳腺癌细胞 MCF7/Adr 细胞凋亡的重要机制之一^[21]。AP-1 是 Toll 样受体,肿瘤坏死因子受体, T 细胞受体, B 细胞受体等多种信号通路的关键下游,参与调控多种炎症介质及细胞因子的表达^[22]。近年研究发现,人参皂苷类可以调控 AP-1 的表达,如人参皂苷代谢产物抑制炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的支气管上皮细胞分泌 RANTES 的机制可能与抑制 AP-1 对下游靶基因的调控有关^[23];人参皂苷 Rh₂ 抑制肝癌 HepG2 细胞的迁移可能是

通过抑制 AP-1 转录因子从而降低基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 的表达来实现的^[24];人参皂苷 Rh₂ 可以通过促进小鼠前胃癌 MFC 细胞 AP-1 的活性,在转录水平调控凋亡相关蛋白,进而诱导凋亡发生而完成抑制肿瘤细胞分裂增殖进而杀死肿瘤细胞的全过程^[25]。因此,推断参附汤中的活性成分可能通过对这些关键靶点进行调控,从而治疗多种疾病。为了说明参附汤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,参附汤治疗多种疾病的基因功能主要体现在对有机物质的反应、受体活性、细胞组分等方面。在基因的 KEGG 通路富集中,筛选得到 10 条信号通路。由此推测,参附汤正是通过多种组分作用于这些信号通路达到治疗疾病的目的。大多数的基因富集到了与癌症有直接关系的通路上,包括 pathways in cancer, small cell lung cancer, prostate cancer。因此,推断参附汤中的活性成分可能通过作用于与癌症直接相关的通路,从而对多种癌症起到治疗作用。目前已有诸多报道^[26-29]表明,临床应用参附注射液联合西医治疗晚期非小细胞肺癌能改善患者的生活质量,改善中医症状,减轻化疗引起的毒副作用,提高疾病控制率。然而,本研究得出的参附汤治疗小细胞肺癌罕有临床报道,因此本研究结果尚需临床验证。已有研究显示,参附注射液可以通过对免疫细胞的保护、上调前列腺癌细胞的免疫凋亡受体的表达,抑制前列腺癌细胞的免疫逃逸,诱导其凋亡^[30];参附注射液治疗晚期前列腺癌患者具有较佳疗效,能有效改善患者的血清前列腺特异抗原水平

及生存质量^[31]。本研究显示,炎症反应和免疫反应相关的通路 Toll-like receptor signaling pathway 和 NOD-like receptor signaling pathway 分别富集了 12 个和 9 个基因。已有研究证明,参附注射液可作用于 Toll 样受体信号通路,其防治中枢神经系统的感染性疾病还可能与调节其固有免疫识别受体有关还可能与有关^[17]。本研究显示,与信号转导密切相关的通路 calcium signaling pathway 富集了 19 个基因,与信号分子及相互作用密切相关的通路 neuroactive ligand-receptor interaction 富集了 22 个基因,与细胞凋亡密切相关的通路 apoptosis 富集了 14 个基因,与外来物质的降解和代谢密切相关的通路 metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 富集了 9 个基因,与内分泌系统密切相关的通路 adipocytokine signaling pathway 富集了 9 个基因。钙调磷酸酶 (CaN) 作为细胞内 Ca^{2+} 敏感的信号物质,在心力衰竭的发展中起重要作用,而细胞内 Ca^{2+} 升高是启动 CaN-NFAT3 信号通路的起始信号^[32]。童妍^[33]研究表明,参附汤能改善能量代谢,使细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,抑制钙超载。同时,参附汤能抑制 CaN-NFAT3 通路的活性,阻止心肌肥大及心衰的发生发展,最终使心功能得到明显改善,心阳虚症状得到改善,使慢性心力衰竭得到恢复。孙江波等^[34]和范颖等^[35]研究表明,参附汤通过调控 apoptosis 信号通路中的多个基因如 Bcl-2, Bax, Cyt-C, Caspase-9, Caspase-3 等,抑制线粒体途径的细胞凋亡,以防治阿霉素毒性损伤,进而保护心肌功能。何家乐^[36]研究表明,对急性脑梗死患者给予参附注射可以使花生四烯酸经 CYP450 的代谢产物 EET 含量下降,来达到治疗心血管疾病的目的是。肖勇^[37]研究表明,参附注射液减毒作用机制与细胞色素 P450 酶密切相关。由此可见,本研究结果与多数已有研究保持一致,然而参附汤对于 small cell lung cancer, neuroactive ligand-receptor interaction, NOD-like receptor signaling pathway, adipocytokine signaling pathway 等信号通路的调控作用仍需进一步深入研究。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,对参附汤多成分、多靶点、多途径的复杂网状关系进行研究。研究结果验证参附汤防治疾病的分子机制,为进一步深入探讨其作用机制提供先导信息和基础,也为研究成分更为复杂的中药复方作用机制提供借鉴。

[参考文献]

- [1] 邓中甲. 方剂学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2010:139.
- [2] 陈潮祖. 中医治法与方剂[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2015:616.
- [3] 刘智,王健全,王星云,等. 参附汤抗大鼠心肌缺血作用与 apelin 表达的相关性研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(12):1760-1763.
- [4] 杨勇,任长虹,孟红旭,等. 参附汤有效组分配伍对离体大鼠心肌细胞 L 型钙通道的影响[J]. 中草药, 2014, 45(24):3594-3598.
- [5] 杜婷,孙荣进,田华,等. 参附注射液的药效学及作用机制研究进展[J]. 中国药师, 2013, 16(11):1732-1734.
- [6] 刘鑫馗,吴嘉瑞,蔺梦娟,等. 基于网络药理学的吴茱萸汤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16):203-210.
- [7] 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.
- [8] 刘鑫馗,吴嘉瑞,蔺梦娟,等. 基于网络药理学的四君子汤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16):194-202.
- [9] 刘惠. 基于系统药理学的甘草作用机制和新药发现研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013.
- [10] 李伯会. 大小柴胡汤“加减味”和郁金方“君臣佐使”的系统药理学研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.
- [11] 叶争荣,徐国良,聂晶,等. 参附汤对心血管疾病药理作用和临床应用研究进展[J]. 江西中医药, 2016, 47(1):75-77.
- [12] 田亚汀,张玉平,田小菲,等. 环氧化酶在肠道运动功能障碍中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4):1124-1127.
- [13] 陈世宏,叶耘,尚正录,等. 不同治法对大鼠心肌缺血模型中医证型的反证研究[J]. 上海中医药大学学报, 2005, 19(4):36-38.
- [14] 罗亨全,邝祥醒,李本义. 肾上腺素能受体与前列腺癌的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(4):372-376.
- [15] 谢伟峰. 参附对心肺复苏大鼠心肌 β 肾上腺素能受体影响的实验研究[D]. 上海:第二军医大学, 2008.
- [16] 李欣. 蛋白激酶 B 结构与功能研究进展[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2014, 33(4):314-317.
- [17] 吕燕妮,付龙生,周健,等. 参附注射液作用机制的计算机系统生物学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21):217-221.
- [18] 严洁萍,沈浓儿,叶强,等. mTOR/Akt/FoxO3 信号通

- 路在人参皂苷 Rg₁ 抗 PC-12 细胞 OGD 损伤的作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1554-1559.
- [19] 汪婷婷, 董宪喆, 刘婉婉, 等. 人参皂苷 Rb₁, Rg₁ 和 Re 调控 Raf-CREB, Akt-CREB, CaMK II -CREB 信号转导通路的体外研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2065-2070.
- [20] 郑玉芹, 姜正林, 徐美玉. 人参皂苷 Rb₁ 对体外培养胎鼠神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(3): 273-279.
- [21] 朴丽花, 蔡英兰, 张默函, 等. 人参皂苷经 PI3K/AKT 通路诱导乳腺癌细胞凋亡[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(9): 946-949.
- [22] 潘海燕, 薛陆静, 王逸平, 等. NF- κ B 和 AP-1 对 A 型流感病毒性心肌炎组织中异位胰蛋白酶及促炎细胞因子表达的调控[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 791-796.
- [23] 李群益, 陈莉, 张留弟, 等. 人参皂苷代谢产物 Compound K 抑制 TNF- α 诱导的人支气管上皮细胞分泌 RANTES[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(7): 722-726.
- [24] 冯子强. 中药有效成分抑制肿瘤细胞迁移和逆转多药耐药的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- [25] 吴歌. 人参皂苷单体 Rh₂ 诱导小鼠前胃癌 MFC 细胞凋亡的信号转导机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [26] 龙顺钦, 廖桂雅, 河文峰, 等. 生活质量量表评价参附注射液对肺癌化疗患者生活质量的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(12): 2090-2092.
- [27] 王跃蓉, 白光洪, 李青, 等. 参附注射液联合 GP 方案治疗气虚型晚期 NSCLC 的临床疗效观察[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(13): 2081-2085.
- [28] 杨旭平, 赖丹, 黄毅岚, 等. 参附注射液联合化学治疗对非小细胞肺癌疗效的 Meta 分析[J]. 中国药业, 2014, 23(9): 16-19.
- [29] 张素芳, 常万里, 张玉芳, 等. 参附注射液配合化疗治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(5): 505-506.
- [30] 白遵光, 吕立国, 吴巧玲, 等. 参附注射液对前列腺癌 PC-3 细胞免疫逃逸的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 16-19.
- [31] 陈晓农, 王荣江. 参附注射液对晚期前列腺癌患者的 PSA 水平及生存质量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1459-1461.
- [32] 于澎, 刘佳, 陈海燕, 等. 参附汤配伍前后对亡阳证大鼠心肌钙调神经磷酸酶信号通路的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(6): 975-977.
- [33] 童妍. 温补心阳法治疗心阳虚型慢性心力衰竭大鼠的分子机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012: 1-2.
- [34] 孙江波, 于彩娜, 徐丹, 等. 中药人参、附子及其小复方参附汤抑制阿霉素心脏毒性损伤大鼠细胞凋亡的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(4): 754-756.
- [35] 范颖, 才丽平, 于彩娜, 等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 135-138.
- [36] 何家乐. 参附配伍减毒的体内物质基础及作用机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [37] 肖勇. 参附注射液及其有效成分人参皂苷 Re 的减毒作用机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.

[责任编辑 邹晓翠]