

· 数据挖掘 ·

丹红注射液治疗冠心病心绞痛基因网络的模块划分与生物学机制分析

陈寅莹^{1,2}, 王忠³, 南景一⁴, 王朋倩⁵, 王阶^{1*}

(1. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053;

2. 中国中医科学院 博士后流动站, 北京 100700;

3. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

4. 山东丹红制药有限公司, 山东 菏泽 274000;

5. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:运用模块药理学分析框架,从功能模块水平探索丹红注射液治疗冠心病心绞痛的药理作用机制。方法:融合中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)中药物成分对应的靶点和疾病靶点数据库(DisGeNET, OMIM和CTD)的心绞痛相关基因,利用STRING version 11.0构建丹红注射液治疗心绞痛的靶点网络;MCODE, MCL和GLay算法识别功能模块,通过最小网络结构熵优化模块识别结果。利用DAVID version 6.8生物信息分析平台对模块进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果:整合丹红注射液相关的262个基因与心绞痛相关的192个基因,构建丹红注射液治疗心绞痛靶点网络,包含414个节点和6621条边。经最小网络结构熵优化后,用MCODE算法识别出12个功能模块(节点数>3个),其中最大模块(模块1)有47个节点和962条边,MCODE评分41.826分。对丹红注射液治疗心绞痛的基因网络和MCODE划分的模块进行KEGG通路富集分析,分别得到37条和58条KEGG通路,且有86.5%的覆盖率。12个模块富集到的通路大致可分为十一类,其中人类疾病(45%),信号转导(17%),氨基酸代谢(14%)相关的通路所占比例较大。模块1富集到的通路数量最多,有39条,主要功能为信号转导相关模块。模块3是氨基酸代谢相关模块。结论:丹红注射液治疗冠心病心绞痛的治疗效应是通过多模块、多通路、多功能作用实现的,其主要通过调节与信号转导,氨基酸代谢,神经活性配体-受体相互作用,Ca²⁺和p53信号相关的模块发挥治疗作用。

[关键词] 丹红注射液; 冠心病心绞痛; 模块药理学; 药理机制; 网络结构熵; 模块识别; 信号通路

[中图分类号] R22;R96;R285;C37;R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0185-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200746

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191209.1527.002.html>

[网络出版日期] 2019-12-9 16:45

Analysis of Modular Network Mechanism of Danhong Injection in Treatment of Coronary Angina Pectoris

CHEN Yin-ying^{1,2}, WANG Zhong³, NAN Jing-yi⁴, WANG Peng-qian⁵, WANG Jie^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053,

China; 2. Postdoctoral Research Station, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Shandong Danhong Pharmaceutical Co. Ltd., Heze 274000, China; 5. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20190927(008)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-029)

[第一作者] 陈寅莹,博士,助理研究员,从事中药临床药理学与治疗学研究, Tel:010-88001245, E-mail:fanok77@126.com

[通信作者] *王阶,博士,主任医师,从事中西医结合心血管病防治研究, Tel:010-88001229, E-mail:wangjie0103@126.com

[Abstract] **Objective:** To explore the pharmacological mechanism of Danhong injection (DHI) in the treatment of coronary heart disease with angina pectoris from the level of functional modules by modular pharmacological analysis framework. **Method:** The targets of drug components in the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and the angina-related genes in DisGeNET, OMIM and CTD databases were combined to construct the target network of DHI for the treatment of coronary angina pectoris by STRING version 11.0. Functional modules were identified by the molecular complex detection (MCODE), Markov cluster (MCL) and GLayer algorithms, and the results were optimized by the minimum network structure entropy algorithm. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed on the modules by DAVID version 6.8 bioinformatics analysis platform. **Result:** By integrating 262 genes related to DHI and 192 genes related to angina pectoris, the target network of DHI for angina pectoris was constructed, including 414 nodes and 6 621 edges. After optimization of the minimum network structure entropy, 12 functional modules (number of nodes>3) were identified by MCODE algorithm, of which the largest module (module 1) has 47 nodes and 962 edges, MCODE score=41.826. KEGG pathway enrichment analysis was conducted on the gene network of DHI for angina pectoris and the modules divided by MCODE, and 37 and 58 KEGG signaling pathways were obtained respectively, with the coverage rate of 86.5%. The pathways enriched by the modules could be roughly divided into 11 categories, among which human diseases (45%), signal transduction (17%), and amino acid metabolism (14%) were involved in a large proportion. Module 1 was enriched into 39 pathways, which was signal transduction-related module. Module 3 was amino acid metabolism-related module. **Conclusion:** The therapeutic effect of DHI on coronary heart disease with angina pectoris is achieved through multiple modules, multiple pathways and multiple functions, mainly by regulating modules related to signal transduction, amino acid metabolism, neuroactive ligand-receptor interaction, Ca²⁺ and p53 signaling.

[Key words] Danhong injection; angina pectoris in coronary heart disease; modular pharmacology; pharmacological mechanism; network structure entropy; module identification; signaling pathways

冠心病心绞痛的发病机制非常复杂,是涉及一系列分子机制变化的多基因、多通路、多靶点的复杂疾病。其发病机制通常与粥样硬化造成心外膜冠状动脉狭窄,降低冠脉循环对心肌的血液供应有关,冠脉微循环、心肌供血与代谢需氧间的不平衡也发挥了重要作用。分子机制可能涉及血管内皮功能、免疫炎症、血栓形成、脂质代谢、氧化损伤等多因素参与^[1]。目前指南推荐临床用药以硝酸酯类、钙拮抗剂、抗血小板聚集药、改善心肌代谢药物、稳定粥样斑块药物以及 β -受体阻滞剂等为主。尽管部分药物起效迅速、疗效显著,但面对冠心病心绞痛这一多通路、多基因复杂疾病来说仍存在一定局限性^[2],传统抗心肌缺血治疗并不能降低心血管不良事件的发生,仍有5%~15%的难治性患者有心绞痛症状发作^[2-3]。中医药在冠心病心绞痛治疗方面具有独特优势。丹红注射液是临床治疗冠心病心绞痛的有效中药注射剂,如稳定性心绞痛、不稳定性心绞痛、梗死后心绞痛等,其对胸部疼痛症状有减轻作用。丹红注射液主要成分为丹参、红

花,具有活血化瘀、通脉舒络之功效。药理学研究表明,丹红注射液具有改善血液黏稠度、抑制炎症反应、抗血小板聚集、抗凝血、抗血栓形成、改善微循环、改善血管内皮功能、抗氧化损伤等作用^[4-5]。临床研究表明,丹红注射液能减少心绞痛发作次数、提高心电图复查有效率、改善ST段缺血、改善血液流变学指标^[5-6]。虽然丹红注射液能有效缓解临床症状,但目前大多数研究都是评价其疗效与安全性,其潜在的分子机制尚不清楚,且多数研究仅局限于单一靶点,缺少从多基因、多靶点、多通路的系统层面来探索其治疗心绞痛血瘀证的药理作用机制研究,即缺乏系统网络水平的认识。

本课题组前期结合网络药理学方法和多靶点治疗思路,提出了“模块药理学”理念^[7-8]。模块药理学认为复杂疾病治疗需要一种模块化的靶点研究模式,强调对复杂生物网络进行模块化分析,用以度量和整合药物干预网络的特征。探索模块结构是突破药物和疾病相关生物网络的关键环节,为有效寻找中药多靶点作用间的关系,笔者前期建立了

系统的模块分析框架^[9],对大网络进行分解或解构,找到药物特异性针对的小网络(即模块),有助于大网络的降维和简化。本研究拟运用模块药理学的分析框架,从网络-模块层面进一步探索丹红注射液治疗冠心病心绞痛的药理作用机制,以期为该制剂的临床合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcmssp.php>)^[10]中分别输入“丹参”“红花”,查找相关成分对应的靶点。在 DisGeNET (version 6.0, <http://www.disgenet.org/home/>)^[11], OMIM (人类孟德尔遗传数据库, <https://www.omim.org/>), CTD (比较毒物基因组学数据库, <http://ctdbase.org/>)^[12] 数据库中,以“angina pectoris”“stenocardia”“breast-pang”“coronarism”或“heartstroke”为检索词,检索心绞痛相关基因。

1.2 疾病相关基因与药物相关基因的差异分析 比较丹红注射液相关基因与心绞痛相关基因之间的异同,找出两者的重叠基因与差异基因。

1.3 靶点网络构建与拓扑结构分析 利用 STRING (version 11.0, <https://string-db.org/>)^[13] 构建药物-疾病靶点网络,并用 Cytoscape (version 3.6.0)^[14] 对网络进行可视化处理。计算网络的典型拓扑属性,包括节点、边、直径、平均距离、度、紧密度中心性、介数中心性和特征向量中心性等。

1.4 功能模块识别与优化 分别用 MCODE (molecular complex detection), 马尔可夫聚类 (Markov cluster, MCL) 和 GLay 算法对上述整合疾病与药物相关基因的网络进行功能模块识别。MCODE 算法^[15] 最初是设计来检测蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络中的蛋白质复合物的一种聚类算法,其能够在大规模的蛋白相互作用网络里检测出紧密连接的区域(即分子复合物)。现在该方法也可用于在其他类型的网络中检测出聚类。该算法主要包括3个步骤:①基于局部网络密度的节点赋权重;②分子复合物(即模块)预测;③可选的后期处理操作。该方法最终通过顶点加权的方式生成聚类。MCODE 算法的优势在于节点赋权重只需要做一次,其可以直接去调整研究者感兴趣的聚类而不用考虑网络的其余部分,并且允许检查聚类之间的连接性。MCL 算法^[16] 是一种基于随机流模拟的图形聚类算法,被广泛应用于各种生物网络的聚类分析。其核心思想是模拟图中(即相互作用网络中)

的随机游走过程。首先,循环(loops)被添加到输入的图中,为每个节点分配循环权重作为连接这些节点的所有边的最大权重,之后这个图就被转换成一个随机的马尔科夫矩阵,再通过概率改变和反复修改转移概率矩阵以实现随机流模拟。GLay 算法^[17] 能够有效地布局非常大的网络或生成层次树。其主要优势在于能允许各种算法的布局计算从当前网络布局状态开始,这增加了极大的灵活性,使用户能够通过调整参数或一起使用不同的布局算法逐步改进布局。

为找到最佳模块识别结果,采用前期提出的最小网络结构熵的方法进行优化^[18],计算公式为 $I_i = k_i / \sum_{i=1}^N k_i$, $E = -\sum_{i=1}^N I_i \ln I_i$ 。式中 N 为网络中节点数目, k_i 为第 i 个节点的连接度, I_i 为第 i 个节点的重要度。

1.5 模块的功能富集分析 根据基因本体论(GO, <http://www.geneontology.org/>)提供的功能注释信息对上述经过最小熵优化的模块进行功能富集分析。利用 DAVID (version 6.8, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)^[19] 分析平台对模块进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,选择 Bonferroni 校正后 $P < 0.05$ 的通路。

2 结果

2.1 丹红注射液与心绞痛相关基因 丹红注射液由丹参与红花2味中药组成,在 TCMSP 数据库中分别查找丹参 (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) 红花 (*Carthami Flos*) 所含成分对应的靶点,合并去除重复后共计得到 262 个相关靶点。在 DisGeNET, OMIM 和 CTD 数据库中检索心绞痛相关基因,将检索结果合并去除重复之后,一共得到 192 个心绞痛相关基因。整合丹红注射液相关基因与心绞痛相关基因,一共得到 439 个基因,其中包含 15 个重叠基因,见图 1。

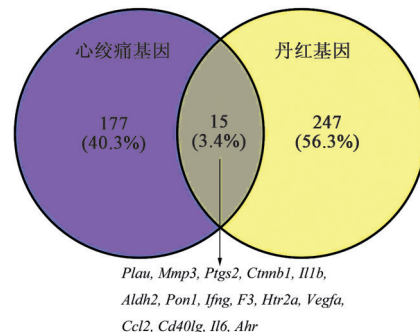


图1 丹红注射液相关基因与心绞痛相关基因

Fig. 1 Venn diagram for Danhong injection-related genes and angina pectoris-related genes

2.2 药物-疾病靶点网络的构建 利用 STRING 11.0 软件构建丹红注射液治疗心绞痛的靶点网络, 该网络包含 414 个节点和 6 621 条边, 网络中节点的拓扑参数见表 1, 靶点网络见图 2。结果显示, 网络节点的最大度数为 201, 其中有 19 个节点度数 ≥ 100 。

15 个重叠基因中, 有 9 个节点度数 ≥ 50 。网络节点的度数与介数中心性、紧密度中心性、平均最短路径长度、聚集系数之间的关系见图 3~6, 结果发现介数中心性、紧密度中心性随度数的增加呈增加趋势; 而随着度数增加, 平均最短路径长度则逐渐减小。

表 1 丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络的拓扑参数(只列出度数排名前 30 的节点)

Table 1 Topological parameters of target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris of coronary heart disease (only listed nodes with top 30 degrees)

节点	介数	桥接	质心	紧密度	度数	离心率	特征向量	辐射度
胰岛素(INS)	17 988.61	13.66	46	0.002	201	0.333	0.177	4.470
白细胞介素-6(IL-6)	6 214.33	8.23	-46	0.001	166	0.333	0.170	4.358
肿瘤坏死因子(TNF)	5 164.15	7.76	-67	0.001	150	0.333	0.161	4.308
血管内皮生长因子 A(VEGFA)	3 108.43	7.18	-89	0.001	133	0.333	0.152	4.254
肿瘤蛋白 p53(TP53)	6 163.32	9.36	-96	0.001	132	0.250	0.134	4.237
过氧化氢酶(CAT)	8 894.93	15.53	-91	0.001	121	0.333	0.113	4.249
表皮生长因子(EGF)	2 389.86	6.75	-114	0.001	119	0.250	0.137	4.194
C-X-C 基序趋化因子配体 8(CXCL8)	2 228.22	7.77	-115	0.001	115	0.333	0.138	4.191
趋化因子 2(CCL2)	1 335.00	5.09	-122	0.001	112	0.333	0.140	4.174
有丝分裂原激活蛋白激酶 1(MAPK1)	3 730.93	11.58	-127	0.001	107	0.333	0.123	4.162
JUN	1 885.39	6.63	-123	0.001	105	0.333	0.128	4.172
IL-10	1 066.76	4.47	-131	0.001	103	0.333	0.133	4.153
Toll 样受体 4(TLR4)	1 985.54	7.55	-132	0.001	103	0.333	0.129	4.150
表皮生长因子受体(EGFR)	2 984.60	10.02	-123	0.001	102	0.250	0.118	4.172
瘦素(LEP)	1 684.29	6.85	-126	0.001	102	0.250	0.122	4.165
IL-1B	1 211.48	5.64	-128	0.001	101	0.333	0.128	4.160
MAPK8	1 902.26	7.20	-132	0.001	100	0.333	0.125	4.150
一氧化氮合酶 3(NOS3)	1 932.64	9.47	-120	0.001	100	0.250	0.122	4.179
前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)	1 691.52	7.87	-134	0.001	100	0.250	0.129	4.145
非受体酪氨酸激酶(SRC)	2 820.69	8.68	-132	0.001	99	0.333	0.115	4.150
C 反应蛋白(CRP)	1 285.91	6.26	-124	0.001	99	0.333	0.120	4.169
雌激素受体 1(ESR1)	3 061.87	10.77	-140	0.001	95	0.250	0.108	4.131
载脂蛋白 E(APOE)	2 420.42	10.56	-131	0.001	95	0.250	0.110	4.153
脑源性神经营养因子(BDNF)	4 882.75	15.73	-136	0.001	93	0.333	0.096	4.140
内皮素 1(EDN1)	1 555.21	7.97	-146	0.001	93	0.250	0.114	4.116
血管紧张素转换酶(ACE)	2 184.10	10.04	-144	0.001	91	0.250	0.101	4.121
血管紧张素原(AGT)	2 278.24	11.35	-146	0.001	90	0.250	0.096	4.116
丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 E1(SERPINE1)	780.68	4.85	-152	0.001	89	0.250	0.117	4.102
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)	1 221.06	6.82	-145	0.001	89	0.250	0.109	4.119
谷氨酸丙酮酸转氨酶(GPT)	3 650.93	18.95	-137	0.001	88	0.333	0.086	4.138

2.3 功能模块识别与优化 分别用 MCODE, MCL 和 GLay 算法对上述丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络进行功能模块识别, 见表 2。熵越小, 系统越稳定, 最小熵具有最小不确定性, 从大网络中

别出功能模块的过程是一个熵减的过程, 熵越小, 节点间越相似, 识别出来的功能模块就越稳定。通过最小网络结构熵算法优化后发现, 用 MCODE 算法划分网络后熵值最小。因此, 本研究选用

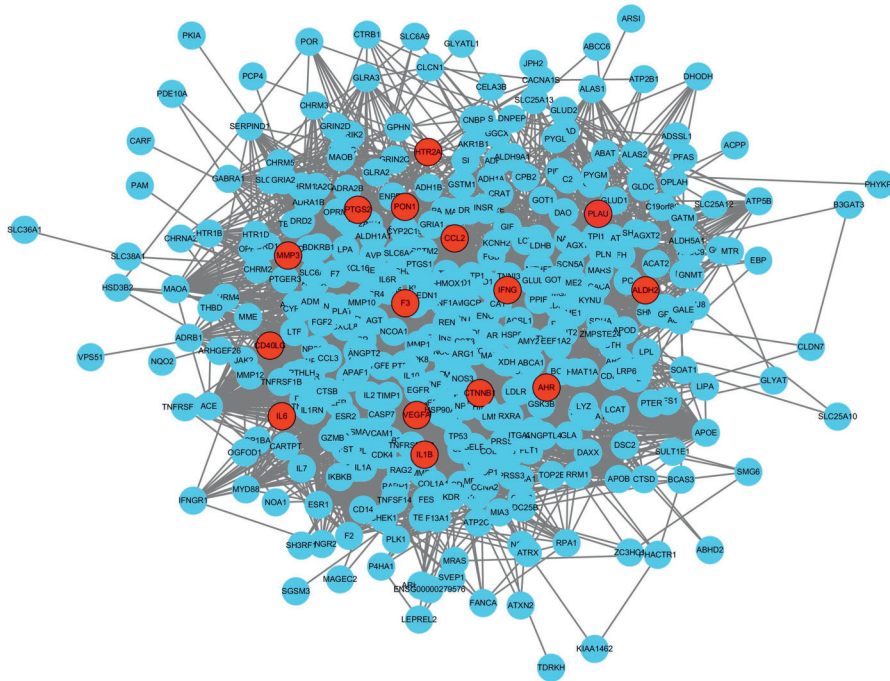


图2 丹红注射液治疗心绞痛的靶点网络

Fig. 2 Target network of Danhong injection in treatment of angina pectoris

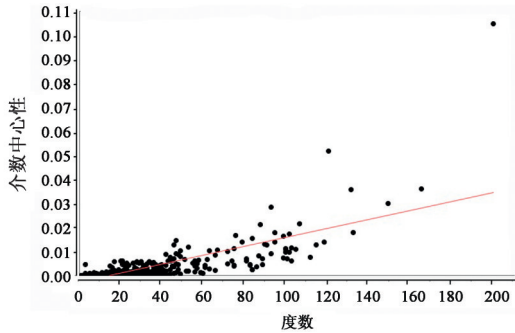


图3 丹红注射液治疗心绞痛靶点网络中介数中心性随节点度数的变化趋势

Fig. 3 Changing trend of betweenness centrality with node degree in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

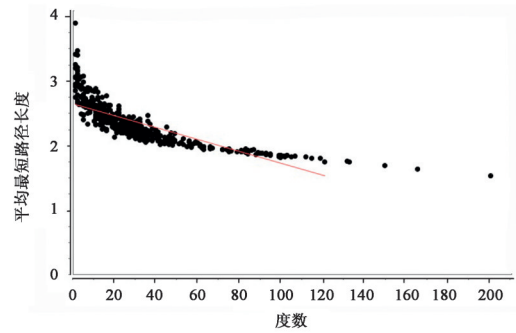


图5 丹红注射液治疗心绞痛靶点网络中平均最短路径长度随节点度数的变化趋势

Fig. 5 Changing trend of average shortest path length with node degree in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

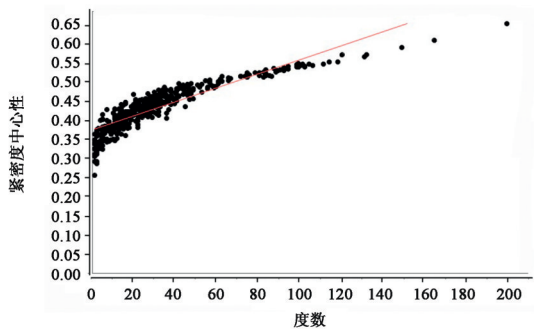


图4 丹红注射液治疗心绞痛靶点网络中紧密度中心性随节点度数的变化趋势

Fig. 4 Changing trend of closeness centrality with node degree in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

MCODE 算法识别的功能模块作进一步分析。MCODE 算法是根据复合物中每个蛋白的平均连接数量(即 MCODE 评分, MCODE 评分=密度×节点数)对模块进行排序。在靶点网络中共识别出 12 个模块(节点数>3), 见图 7, 根据 MCODE 评分排序, 最大模块有 47 个节点和 962 条边, 评分 41.826 分; 最小模块有 4 个节点和 5 条边, 评分 3.333 分。

2.4 重叠基因在模块中的分布情况 从模块识别结果可以看出, 丹红注射液与心绞痛相关基因两者重叠的基因主要分布在 MCODE 评分排名前七的模块中, 其中, 模块 1 包含的重叠基因数量最多, 有 7 个重叠基因[*IL1B*, *VEGFA*, *CCL2*, 基质金属蛋白酶

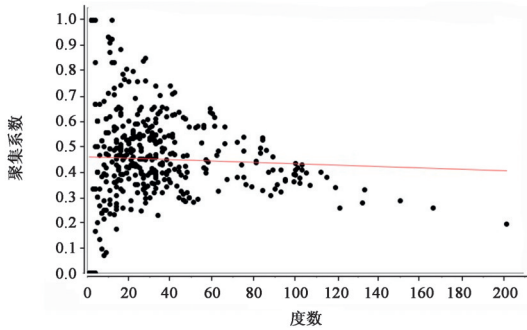


图6 丹红注射液治疗心绞痛靶点网络中聚集系数随节点度数的变化趋势

Fig. 6 Changing trend of clustering coefficient with node degree in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

表2 丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络的模块划分结果和熵值

Table 2 Numbers and entropy values for module division in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

算法	模块数量/个	熵
MCODE	12	4.977
MCL	11	5.473
GLay	4	5.654

3(*MMP3*), *IL6*, *PTGS2* 和 γ -干扰素(*IFNG*)]；模块4包含了4个重叠基因[连环蛋白 β_1 (*CTNNB1*), *CD40*配体(*CD40LG*), 凝血因子III(*F3*)和尿激酶型纤溶酶原激活物(*PLAU*)]；模块2[芳香烃受体(*AHR*)]，模块5[乙醛脱氢酶2(*ALDH2*)]，模块6[5-羟色胺受体2A(*HTR2A*)]，模块7[对氧磷酸酶1(*PON1*)]都只包含1个重叠基因。

2.5 GO功能富集分析 利用DAVID软件对丹红注射液治疗心绞痛靶点网络及MCODE划分后的模块进行KEGG通路富集分析,结果发现原来未划分的靶点网络富集到37条KEGG通路,而MCODE划分后的12个模块一共富集到64条通路,去除重复后,还剩下58条通路。两者重叠的通路共有32条。12个模块富集到的通路大致可以分为十一大类,见图8,其中人类疾病(human diseases)(占比45%),信号转导(signal transduction)(占比17%),氨基酸代谢(amino acid metabolism)(占比14%)相关的通路所占比例较大。

模块1富集到的通路数量最多,有39条,该模块主要富集到信号转导及信号分子相关的通路,包括低氧诱导因子-1(*HIF-1*)信号, *TNF*信号, 转录因子叉头框蛋白O(*FoxO*)信号, *MAPK*信号, *VEGF*信

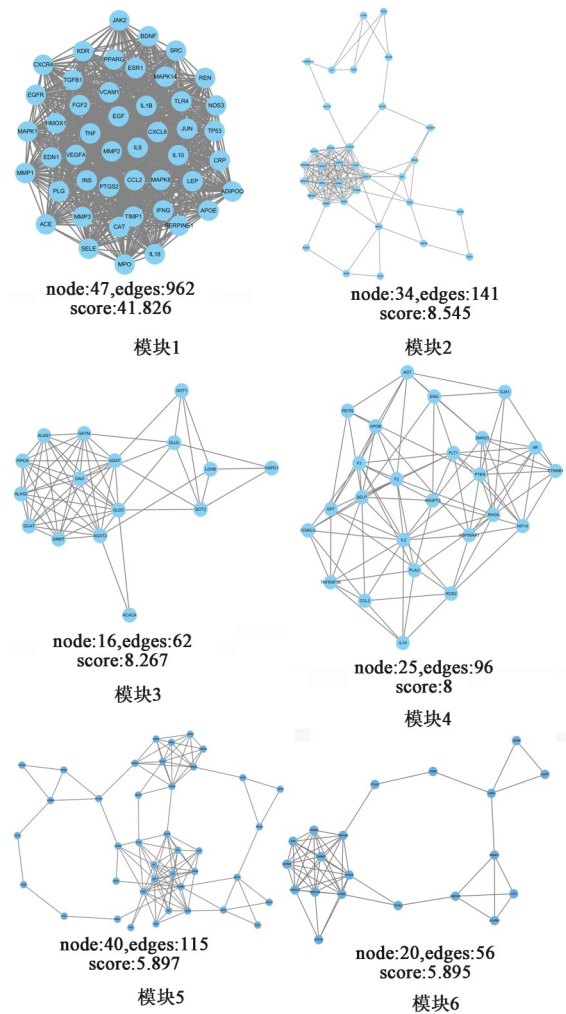


图7 丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络通过MCODE算法识别出的前6个功能模块

Fig. 7 Top 6 functional modules identified by MCODE algorithm in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

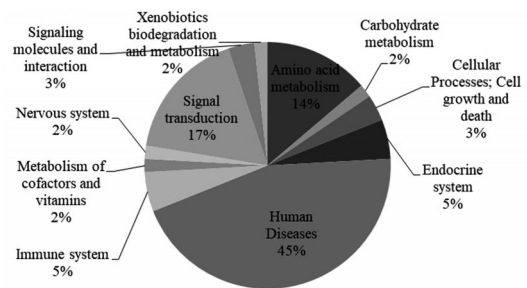


图8 丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络中12个模块的KEGG通路富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis for 12 modules in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

号, 细胞因子受体相互作用, 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(*PI3K/Akt*)信号, *Ras*相关蛋白1(*Rap1*)信号,

酪氨酸激酶受体(ErbB)和核转录因子- κ B(NF- κ B) 信号通路,见图9,称之为信号转导相关模块。

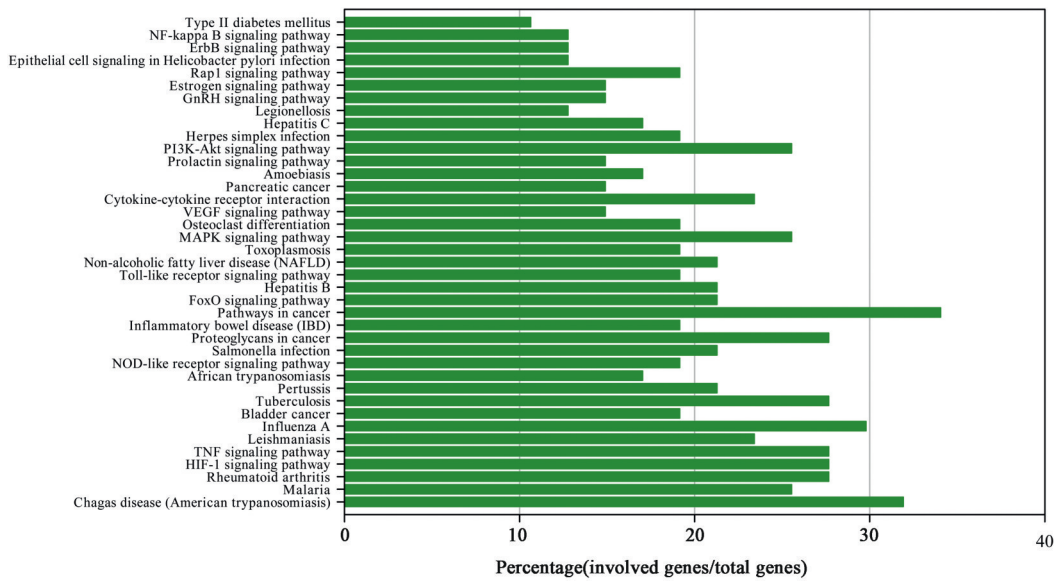


图9 丹红注射液治疗冠心病心绞痛靶点网络中模块1富集到的39条通路

Fig. 9 Thirty-nine pathways enriched by module 1 in target network of Danhong injection for treatment of angina pectoris

模块2只富集到神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)1条通路。模块3主要集中到氨基酸代谢相关的通路上,包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸和脯氨酸代谢,称之为氨基酸代谢相关模块。模块4和5都只富集到癌症通路(pathways in cancer)1条通路。模块6富集到钙离子信号(calcium signaling pathway)和神经活性配体-受体相互作用通路。模块7主要富集在细胞生长与死亡(cell growth and death)相关通路上,包括细胞周期和p53信号通路。模块9富集到氨基酸生物合成,代谢途径,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路。模块10富集到碳代谢通路。模块11只富集到补体和凝血级联通路。模块12富集到药物代谢-细胞色素P450,苯丙胺成瘾,多巴胺能突触和半乳糖代谢4条通路。

3 讨论

3.1 丹红注射液治疗冠心病心绞痛的模块药理作用机制 冠心病心绞痛是涉及一系列生物化学和分子机制变化的多基因复杂疾病。研究表明,复杂疾病治疗应该瞄准整个疾病网络,其有效的临床干预应同时调节多个靶点。因此,过去局限于单一靶点或通路的研究存在明显局限性。虽然网络药理学为研究中药复方提供了新思路,但生物网络具有显著的模块性,探索模块结构是理解药物靶点网络

的关键环节。因此,本研究运用模块药理学分析框架,从丹红注射液靶点网络中一共识别出12个功能模块,再结合这12个功能模块富集的通路,发现除与其他人类疾病相关的通路外,信号转导与氨基酸代谢相关的通路所占比例最大。已有文献证明了其中一部分功能模块所代表的主要通路,与丹红注射液及心绞痛的相关性,但另一部分模块的功能与心绞痛的关系仍有待于进一步证实。

具体来看,模块1是MCODE评分最高的,从结构上看,模块1的节点数和边数最多,从功能上看,模块1富集到的通路数量最多,有39条,且其中21条通路与原靶点网络富集的通路重叠,这在一定程度上说明模块1是丹红注射液治疗心绞痛靶点网络中的重要模块。模块1是信号转导相关模块,主要富集到信号转导相关的通路。研究表明HIF-1 α 在调节心脏保护中发挥了重要作用^[20],HIF-1 α 信号有助于组织重塑过程^[21]。已知PI3K/Akt通过调节许多下游信号介导细胞保护作用,FoxO亚家族是PI3K/Akt调节的一个重要下游靶点,其可能对心肌缺血再灌注损伤具有保护效应^[22]。MAPK在缺血过程中被激活,可能导致结构和功能的改变^[23]。在稳定性心绞痛和长期冠状动脉完全闭塞患者中,血浆中血管生成生长因子如VEGF,胎盘生长因子(PLGF)和肝细胞生长因子的水平存在差异^[24],高剂量VEGF治疗心绞痛效果较好,在平板运动试验

时间和心绞痛频率改善方面有良好趋势^[25]。丹红注射液可显著增加VEGF的表达^[26]。有研究发现冠心病相关的关键基因参与ErbB信号传导途径,该信号通路在冠心病中具有重要作用^[27]。NF- κ B通过调节炎症和细胞存活在许多组织中发挥关键作用,在不稳定型心绞痛患者的外周单核细胞中选择性地被显著激活^[28]。研究表明,丹红注射液通过抑制NF- κ B信号通路可显著抑制炎症反应^[29]。丹红注射液对内皮炎症包括NF- κ B, (c-Jun)和p38激活以及TNF- α 分泌具有全面的抗炎作用,可能是其治疗冠心病的潜在机制^[30]。因此,笔者推测模块1信号转导模块可能是丹红注射液治疗心绞痛的关键作用靶点。

模块2和6都富集到神经活性配体-受体相互作用通路。研究表明药物可能通过调节神经活性配体-受体相互作用途径,在心脏保护中发挥重要作用^[31]。模块3是氨基酸代谢相关模块,主要集中到氨基酸代谢相关的通路上。氨基酸在缺血和心力衰竭中具有调节心脏代谢的作用,一些临床试验报道了精氨酸补充剂治疗心绞痛有效,精氨酸对微血管性心绞痛患者的治疗效果与改善内皮依赖性冠状动脉血管舒张有关^[28,32]。丹红注射液通过调节精氨酸加压素的表达和分泌,可减轻缺血再灌注神经元细胞引起的心肌损伤^[33]。模块6还富集到钙离子信号通路,心肌细胞的兴奋-收缩耦联依赖于离子稳态,特别是通过精确调节细胞内钙离子(Ca^{2+})来维持心脏功能的强度和频率。钙拮抗剂是目前减轻症状及改善缺血的主要药物之一,钙拮抗剂通过改善冠状动脉血流和减少心肌耗氧起到缓解心绞痛作用^[34]。

模块7富集到p53信号通路,有研究表明p53信号通路与不稳定型心绞痛血瘀证相关,TP53可能是不稳定型心绞痛血瘀证的重要生物标志物^[35]。丹红注射液可显著对抗缺氧造成的损伤,增强超氧化物歧化酶(SOD)活性,明显下调p53 mRNA表达,抑制细胞凋亡^[36]。上述几个功能模块的主要功能都与冠心病心绞痛发病机制相关,因此,笔者推测丹红注射液可能通过干预这些相关模块来发挥抗心绞痛作用。

3.2 模块药理学分析方法的优势 从疾病角度来看,破译和优化疾病靶点网络中的模块化结构是揭示复杂疾病病理机制的关键步骤,不同的模块可以为疾病结局的变化贡献不同的功能;从药物发现角度来看,功能模块对于理解现代药理学的重要组成

部分是极为重要的,且理解与药效相关的功能模块可作为定义疾病过程或药物疗效的终点^[8]。因此,从大网络中识别出功能模块是非常重要的。有研究指出分别对网络和模块进行功能富集分析,结果显示网络划分成模块之后,模块会富集到很多原来网络没有的功能,表明模块识别可以揭示一些隐藏的功能^[37]。本研究结果显示,原靶点网络富集到了37条KEGG通路,而MCODE划分的模块富集到了58条通路,两者重叠的通路有32条,即原基因网络中86.5%的信号通路都可以被覆盖,说明划分后的模块不仅可以覆盖原网络的大部分通路信息,还能识别出一些原网络分析获取不到的隐藏的信号通路。因此,丹红注射液治疗心绞痛靶点网络划分后的模块可以代表原网络的大部分功能,并在功能富集上有一定优势。

综上所述,通过模块药理学分析,笔者发现丹红注射液治疗冠心病心绞痛的治疗效应是通过多模块、多通路、多功能作用实现的,其中5个功能模块的主要功能都与冠心病心绞痛发病机制相关,丹红注射液可能作用于这些与心绞痛发病机制相关的模块来发挥治疗作用,主要与调节信号转导,氨基酸代谢,神经活性配体-受体相互作用, Ca^{2+} 和p53信号有关。且大网络划分后的模块可以代表原网络的大部分功能,并在功能富集上有一定优势。因此,为减少疾病-药物靶点网络分析和功能分析的复杂性,必须要对大网络进行分解,识别出功能模块。这种基于功能模块水平的分析方法为研究丹红注射液的药理作用机制提供了新思路和新策略。

[参考文献]

- [1] ALBRECHT S. The pathophysiology and treatment of stable angina pectoris [J]. US Pharm, 2013, 38(2): 43-60.
- [2] TARKIN J M, KASKI J C. Pharmacological treatment of chronic stable angina pectoris [J]. Clin Med, 2013, 13(1):63-70.
- [3] YU Y N, HU S Y, LI G X, et al. Comparative effectiveness of Di'ao Xin Xue Kang capsule and compound Danshen tablet in patients with symptomatic chronic stable angina [J]. Sci Rep, 2014, 4:7058.
- [4] 邵明辉,刘兰梅,马仁强,等. 丹红注射液一般药理学实验研究 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 335-338.
- [5] 朱芹英,黄学莲,唐玲. 丹红注射液治疗不同类型血

- 瘀型心绞痛的疗效与安全性再评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14):201-205.
- [6] 彭丽虹, 余正, 盛春雷. 丹红注射液治疗冠心病心绞痛随机对照试验的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2011, 11(1):57-63.
- [7] WANG Z, LIU J, YU Y N, et al. Modular pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7(8):667-677.
- [8] WANG Z, WANG Y Y. Modular pharmacology: deciphering the interacting structural organization of the targeted networks[J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(11/12):560-566.
- [9] 陈寅莹, 冯丽鹏, 李勇, 等. 模块分析法: 解密复杂疾病和药物作用机制的新策略[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20):4112-4116.
- [10] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [11] PIÑERO J, BRAVO À, QUERALT-ROSINACH N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D833-D839.
- [12] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. The comparative toxicogenomics database: update 2019 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D948-D954.
- [13] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D607-D613.
- [14] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11):2498-2504.
- [15] BADER G D, HOGUE C W V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, doi:10.1186/1471-2105-4-2.
- [16] ENRIGHT A J, VAN DONGEN S, OUZOUNIS C A. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(7):1575-1584.
- [17] SU G, KUCHINSKY A, MORRIS J H, et al. GLayer: community structure analysis of biological networks [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(24):3135-3137.
- [18] CHEN Y Y, YU Y N, ZHANG Y Y, et al. Quantitative determination of flexible pharmacological mechanisms based on topological variation in mice anti-ischemic modular networks [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158379.
- [19] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44-57.
- [20] TEKIN D, DURSUN A D, XI L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(9):1085-1094.
- [21] ABE H, SEMBA H, TAKEDA N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24(9):884-894.
- [22] ZHANG M Q, ZHENG Y L, CHEN H, et al. Sodium tanshinone II_A sulfonate protects rat myocardium against ischemia-reperfusion injury via activation of PI3K/Akt/FOXO3A/Bim pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(11):1386-1396.
- [23] CLARK J E, SARAFRAZ N, MARBER M S. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(2):192-206.
- [24] BRIGUORI C, TESTA U, COLOMBO A, et al. Relation of various plasma growth factor levels in patients with stable angina pectoris and total occlusion of a coronary artery to the degree of coronary collaterals [J]. *Am J Cardiol*, 2006, 97(4):472-476.
- [25] YANG Y, SHI C, HOU X, et al. Modified VEGF targets the ischemic myocardium and promotes functional recovery after myocardial infarction [J]. *J Control Release*, 2015, 213:27-35.
- [26] LI S N, LI P, LIU W H, et al. Danhong injection enhances angiogenesis after myocardial infarction by activating MiR-126/ERK/VEGF pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120:109538.
- [27] GHATGE M, NAIR J, SHARMA A, et al. Integrative gene ontology and network analysis of coronary artery disease associated genes suggests potential role of ErbB pathway gene EGFR [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4253-4264.
- [28] RITCHIE M E. Nuclear factor-kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris [J]. *Circulation*, 1998, 98(17):1707-1713.
- [29] JIANG X, LYU B, LI P, et al. Bioactivity-integrated UPLC/Q-TOF-MS of Danhong injection to identify NF- κ B inhibitors and anti-inflammatory targets based on endothelial cell culture and network pharmacology

- [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174:270-276.
- [30] LYU M, YAN C L, LIU H X, et al. Network pharmacology exploration reveals endothelial inflammation as a common mechanism for stroke and coronary artery disease treatment of Danhong injection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15427.
- [31] WANG J, CHENG J, ZHANG C, et al. Cardioprotection effects of sevoflurane by regulating the pathway of neuroactive ligand-receptor interaction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery [J]. *Comput Math Methods Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/3618213.
- [32] MARAZZI G, ROSANIO S, CAMINITI G, et al. The role of amino acids in the modulation of cardiac metabolism during ischemia and heart failure [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(25):2592-2604.
- [33] YANG M, ORGAH J, ZHU J, et al. Danhong injection attenuates cardiac injury induced by ischemic and reperfused neuronal cells through regulating arginine vasopressin expression and secretion [J]. *Brain Res*, 2016, 1642:516-523.
- [34] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(3):195-206.
- [35] WANG J, YU G. A systems biology approach to characterize biomarkers for blood stasis syndrome of unstable angina patients by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/510208.
- [36] 周鹏, 何昱, 杨洁红, 等. 丹红注射液对缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护机制 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(24):4844-4848.
- [37] FARBER C R. Systems-level analysis of genome-wide association data [J]. *G3 (Bethesda)*, 2013, 3(1):119-129.

[责任编辑 刘德文]