

UPLC-Q-TOF-MS结合网络药理学探讨黄芪-附子治疗心力衰竭的作用机制

钟颢¹, 张瑶¹, 李军², 毛涵¹, 陈向云^{1*}, 李尧锋^{1*}

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025;

2. 贵州中医药大学中药民族药资源研究院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)和网络药理学探究黄芪-附子治疗心力衰竭的作用机制和物质基础。方法:运用UPLC-Q-TOF-MS技术分析黄芪-附子溶液中的化学成分,通过PubChem数据库筛选活性成分及作用靶点,利用比较毒性基因组学数据库(CTD)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和GeneCard数据库检索心力衰竭疾病靶点,通过Venn分析获得共有靶点。利用STRING数据库分析靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)关系,利用Metascape数据库进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,采用SYBYL-X 2.1.1软件对关键靶点和活性成分进行分子对接分析。通过大鼠心力衰竭模型对关键靶点进行实验验证。结果:黄芪-附子溶液中共鉴定出202个化学成分,经预测其中64个活性成分作用于183个靶点治疗心力衰竭,重要的活性成分有咖啡酸、L-精氨酸、鹰嘴豆芽素A、腺嘌呤、烟酸、反式阿魏酸、对香豆酸、核黄素、毛蕊异黄酮等,主要的作用靶点有白细胞介素(IL)-6、胱天蛋白酶(Caspase)-3、血管内皮生长因子受体A(VEGFA)、蛋白激酶B1(Akt1)、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1B、基质金属蛋白酶(MMP)-9等,主要涉及缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、TNF信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路、Toll样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、叉头框蛋白O(FoxO)信号通路等。分子对接结果显示黄芪-附子溶液中的活性成分与HIF-1信号通路中关键蛋白HIF-1 α 、VEGFA、Akt1、Caspase-3、IL-6有较好的结合能力。动物实验结果显示,黄芪-附子溶液能显著改善心力衰竭大鼠血流动力学指标,降低血清心钠肽(ANP)、脑钠素(BNP)和IL-6含量,改善心肌组织病理学变化,保护心肌细胞线粒体形态,下调心力衰竭大鼠心肌组织中HIF-1信号通路关键蛋白HIF-1 α 、VEGFA、磷酸化(p)-Akt的表达,降低Caspase-3的活化。结论:黄芪-附子通过多成分、多靶点、多途径治疗心力衰竭,实验验证说明其可通过改善心肌组织病理学变化、调节HIF-1信号通路发挥治疗心力衰竭的作用,为后续的药效物质基础研究提供了重要参考。

[关键词] 心力衰竭; 黄芪; 附子; 网络药理学; 缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0070-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221612 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221008.1556.006.html>

[网络出版日期] 2022-10-09 16:26:50

Mechanism of Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata in Treatment of Heart Failure Based on UPLC-Q-TOF-MS and Network Pharmacology

ZHONG Xie¹, ZHANG Yao¹, LI Jun², MAO Han¹, CHEN Xiangyun^{1*}, LI Yaofeng^{1*}

(1. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Guiyang 550025, China; 2. Resource Institute for Chinese & Ethnic Materia Medica of

Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

[收稿日期] 2022-07-25

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81960864,81860873);贵州省高层次创新型人才“千层次”人才项目(贵中医[ZQ2018005]);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2016]1401);贵州中医药大学学术新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2017]5735号-06)

[第一作者] 钟颢,在读硕士,从事中医药防治心血管疾病研究,E-mail:zx2020010004@163.com

[通信作者] *陈向云,博士,副教授,硕士生导师,从事中医药防治心血管疾病研究,E-mail:chenxyunxy@163.com;

*李尧锋,博士,副教授,硕士生导师,从事中药活性成分筛选及防治心血管疾病研究,E-mail:lyfengxy2010@163.com

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata in the treatment of heart failure and substance basis based on ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometer (UPLC-Q-TOF-MS) and network pharmacology. **Method:** The chemical components of Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata solution was analyzed by UPLC-Q-TOF-MS, and the active components and targets were screened out by the PubChem database. The targets related to heart failure disease were retrieved from Comparative Toxicogenomics Database(CTD), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and GeneCard databases, and the common targets were obtained by Venn analysis. The target protein-protein interactions (PPI) were analyzed using the STRING database. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using the Metascape database, and molecular docking verification of key targets and active components was performed using SYBYL-X 2.1.1. Experimental validation of key targets was carried out using the rat model of heart failure. **Result:** There were 202 chemical components identified in Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata solution, of which 64 active components were predicted to act on 183 targets for the treatment of heart failure. The important active components were caffeic acid, *L*-arginine, biochanin A, adenine, nicotinic acid, *trans*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, riboflavin, calycosin, etc. The main targets were interleukin (IL)-6, cysteine aspartic acid specific protease (Caspase)-3, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), protein kinase B1 (Akt1), tumor necrosis factor (TNF), IL-1B, matrix metalloproteinase (MMP)-9, etc. The main signaling pathways involved hypoxia-inducible factor (HIF)-1 signaling pathway, TNF signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, forkhead box O (FoxO) signaling pathway, etc. The molecular docking results showed that the active components in Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata solution had a good binding ability with HIF-1 α , VEGFA, Akt1, Caspase-3, and IL-6, which were the key proteins in the HIF-1 signaling pathway. Animal experiments showed that Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata solution significantly improved the hemodynamic indexes, reduced the serum atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and IL-6 levels, improved the myocardial histopathological changes, protected the mitochondrial morphology of cardiomyocytes, down-regulated the expression of HIF-1 α , VEGFA and phosphorylation(p)-Akt, and reduced the activation of Caspase-3 in the myocardial tissue of rats with heart failure. **Conclusion:** Astragali Radix-Aconiti Lateralis Radix Praeparata treats heart failure in a multi-component, multi-target, and multi-pathway manner. The experimental validation indicates that it treats heart failure by improving myocardial histopathological changes and regulating HIF-1 signaling pathway, which provides references for the subsequent pharmacodynamic substance research.

[Keywords] heart failure; Astragali Radix; Aconiti Lateralis Radix Praeparata; network pharmacology; hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway

心力衰竭是由于心脏的收缩和(或)舒张功能障碍而引起的心脏循环障碍症候群,会导致不同程度的呼吸困难、乏力、心律失常、水肿等临床症状,严重时还可能引发心源性休克、恶性心律失常等不良事件,危及患者的生命,是各种病因所致心脏疾病的终末阶段^[1]。据2021年《中国心血管健康与疾病报告》显示,心力衰竭患者有890万人,在 ≥ 35 岁的成年人中,心力衰竭的患病率为1.3%,且随着年龄的增长而增加^[2]。虽然近年来对心力衰竭发生和发

展机制有了进一步了解,新的治疗方法也不断出现,使心力衰竭患者的病死率有所下降,但心力衰竭的患病率逐年升高,因此心力衰竭的防治仍然是目前心血管疾病防治中亟待解决的重要内容^[3]。心力衰竭的发病机制较复杂,研究认为与血流动力学异常、心肌损伤、心室重构、免疫炎症系统激活和神经内分泌激活等相关^[4],治疗药物主要有利尿剂、强心剂、血管扩张剂、血管紧张素转换酶抑制剂等^[5]。然而心力衰竭预后较差,患者的5年生存率与恶性

肿瘤相近^[6]。

近年来研究发现中医药防治心力衰竭具有多成分、多靶点、多途径的作用特点,在控制症状、降低病死率及再住院率等方面呈现出独特优势。中医注重改善患者症状,也提高患者的生活质量^[7]。根据中医临床表现,心衰早期以气虚为主,继而出现气阴两虚、阳气不足,导致气血阴阳亏虚,治法以益气、温阳为主,兼利水、活血等^[8]。黄芪和附子作为治疗心力衰竭的常用中药,黄芪具有益气固表、利水消肿等功效,附子具有回阳救逆、补火助阳等功效,两者配伍可温阳补气,阳气充盛则瘀血通、痰饮消、气血得畅^[9]。然而黄芪-附子药对防治心力衰竭的作用机制尚不清楚。网络药理学由英国科学家 HOPKINS^[10]首次提出,可构建药物-靶点-疾病网络,能系统分析药物作用机制,与中药整体调控机体的思路相吻合,为阐释中药作用机制提供了新的方法^[11]。本研究首先利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS)分析了黄芪-附子的化学成分,利用网络药理学分析了其治疗心力衰竭的潜在作用靶点,再结合心力衰竭大鼠模型对其关键作用靶点进行了实验验证,探明黄芪-附子药对治疗心力衰竭的潜在价值,为临床运用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 黄芪饮片(四川博仁药业有限责任公司,批号 X201102107,产地甘肃,规格 10 g/包);附子饮片(贵阳济仁堂中药饮片厂,批号 X20210103,产地四川,规格 10 g/包);马来酸依那普利片(扬子江药业集团江苏制药股份有限公司,国药准字 H32026568,批号 21010512,规格 5 mg/片);盐酸异丙肾上腺素(北京索莱宝科技有限公司,批号 H0200,规格 100 mg/瓶)。

大鼠脑钠素(BNP)、大鼠心钠肽(ANP)、大鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为 E-EL-R0126c、E-EL-R0017c、E-EL-R0015c);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、马松(Masson)三色染色试剂盒、高效RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为 G1120、G1340、R0010、P1260、PC0020、P1040);PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号 PG210);ECL显影液(Affinity生物科技有限公司,货号 KF001);蛋白激

酶B1(Akt1)、磷酸化蛋白激酶B1(p-Akt1)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、剪切的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、 β -微管蛋白(β -tubulin)抗体(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为 AF1777、AF1546、AF1213、AC033、AF7087、AF1216);血管内皮生长因子A(VEGFA)抗体(美国Abcam公司,货号 ab214424)。

1.2 动物 SPF级雄性SD大鼠84只,体质量(200±20)g,购于长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物合格证号 SCXK(湘)2019-0014。饲养于贵州中医药大学基础医学实验中心动物房,饲养条件为温度(23±2)℃,湿度(55±5)%,明暗循环各12h,自由采食。动物实验通过贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(20210098)。

1.3 仪器 RE-3002型旋转蒸发器(巩义市瑞德仪器设备有限公司);BL-420S型生物信号采集系统(成都泰盟软件有限公司);UHPLC超高效液相色谱仪, Triple TOF 5600+高分辨质谱仪(美国AB Sciex公司);MultiskanGO型全波长酶标仪(美国Thermo公司);PowerPac Basic型电泳转印仪、ChemiDoc Touch化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 黄芪-附子溶液制备 按质量比2:1分别称取黄芪20g、附子10g,加入10倍体积去离子水回流提取2h,滤过,滤渣加入8倍体积去离子水回流提取2h,滤过,合并2次提取液,再利用旋转蒸发器浓缩至含生药量0.624g·mL⁻¹,0.22 μ m微孔滤膜过滤,4℃冷藏备用,供化学成分分析和动物药理学实验用。另外,分别取黄芪20g、附子10g,按此方法制备黄芪溶液(含生药量4.16g·mL⁻¹)、附子溶液(含生药量2.08g·mL⁻¹),供化学成分分析。

2.2 黄芪-附子溶液成分分析 取上述提取液5 μ L进样分析。采用Waters UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1mm×100mm,1.7 μ m);流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(含0.1%甲酸)(B);梯度洗脱(0~3.5min,5%~15%B;3.5~6.5min,15%~30%B;6.5~12.5min,30%~70%B;12.5~18.0min,70%~100%B;18.0~25.0min,100%B)。体积流量0.4mL·min⁻¹;柱温40℃。质谱条件:采用电喷雾离子化源(ESI),正、负离子扫描模式,扫描范围m/z 50~1000,雾化气压(GS1)379kPa,辅助气压力379kPa,气帘气压力241kPa,温度550℃,喷雾电压5500V(正离子模式)或-4000V(负离子模式),轰击能量40eV,碰撞能量差20V。使用Progenesis QI软件将质谱原

始导入,结合METLIN MS/MS数据库,利用Progenesis QI软件的自动化结构匹配功能对成分碎片进行筛选和匹配,以结构片段分数>70分为标准^[12]。

2.3 黄芪-附子药对治疗心力衰竭活性成分-作用靶点网络构建 将上述方法获得的黄芪-附子化学成分,使用PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取这些化学成分的靶点蛋白,整理出黄芪-附子的活性成分及作用靶点,检索时间为2021年8月5日。利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)将蛋白名称转换为基因名,并限定物种为人类。使用比较毒性基因组学数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>)、人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)数据库获取心力衰竭疾病靶点,收集CTD数据库中标记为Marker/Mechanism的靶点,OMIM数据库中标记为已知基因序列、表型及分子基础的靶点及GeneCards数据库中与心力衰竭相关分数>20分的靶点,汇总并删除重复项,检索时间为2021年8月12日。将药物活性成分作用靶点与疾病靶点进行Venn分析,得到交集靶点,作为黄芪-附子药对治疗心力衰竭的潜在作用靶点。使用Cytoscape 3.8.0软件(<https://cytoscape.org/>)构建药物活性成分-靶点网络。

2.4 靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析 使用STRING数据库(<https://www.string-db.org/>),将最小蛋白互作分数设置为>0.7的高置信度项,对上述交集靶点进行PPI分析,将此结果导入Cytoscape 3.8.0软件构建蛋白相互作用网络。通过Cytoscape软件中的CytoHubba网络分析插件,利用MCC算法筛选出核心靶点。

2.5 靶点蛋白功能注释分析 使用Metascape数据库(<https://metascape.org/>)对上述交集靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析,设定 $P<0.1$ 。然后利用微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对结果数据进行可视化,绘制GO富集柱状图和KEGG富集气泡图。

2.6 分子对接分析 从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)及ZINC数据库(<https://zinc.docking.org/>)下载活性成分的结构文件(MOL2格式),作为小分子化合物配体。从蛋白质结构数据库(PDB, <https://www.rcsb.org/>)下载靶点蛋白3D结构(PDB格式),作为受体。利用SYBYL-X 2.1.1和iGEMDOCK v2.1软件对小分子化合物和蛋白进行分子对接和计算结合能。SYBYL-X 2.1.1软件中Surflex-Dock模块进行分子对接,对蛋白进行抽离原有配体、去水、末端处理、加氢,以完成蛋白的准备和配体提取,分子对接结果根据total score值评价活性成分与靶点蛋白的结合能力。

2.7 心力衰竭大鼠模型建立及分组 将84只SD大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常组(14只)和模型组(70只)。模型组大鼠皮下多点注射盐酸异丙肾上腺素 $170\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每隔24 h给药1次,共2次^[13];正常组大鼠皮下注射等体积生理盐水。诱导4周后,检测大鼠血清BNP含量,若其BNP含量显著升高,则表明心力衰竭大鼠模型复制成功。黄芪、附子的剂量以2020年版《中华人民共和国药典》中的药物用法与用量及临床治疗心力衰竭方剂常用剂量为参考^[14-15],设置人用剂量为黄芪20 g、附子10 g。参照《中药药理研究方法学》中人与动物体表面积换算公式等效计量法换算为大鼠用中剂量黄芪-附子药对,大鼠用高、中、低剂量按照2:1:0.5的比例设置^[16]。造模成功的大鼠随机分为5组,心力衰竭模型组、依那普利组($2.08\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和黄芪-附子低、中、高剂量(1.56 、 3.12 、 $6.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组。各给药组大鼠均按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃相应浓度药物,正常组和模型组大鼠灌胃等体积去离子水,每天1次,连续治疗4周。

2.8 BL-420生物机能实验系统监测大鼠血流动力学指标 按大鼠体质量 $4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射25%乌拉坦进行麻醉。大鼠仰卧位固定于实验台上,颈正中线切开皮肤,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离右侧颈总动脉,结扎远心端,夹闭近心端,随后在靠近心端做一个V型切口,插入带肝素的静脉穿刺套管针,慢慢退出穿刺针,松开近心端,缓慢推进套管至左心室,将穿刺套管与BL-420生物机能实验系统的压力换能器连接,监测各组大鼠血流动力学指标,记录其左心室内压峰值(LVSP)、左心室舒张末压(LVEDP)、左心室内压最大上升速率($+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)和左心室内压最大下降速率($-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)。

2.9 大鼠心重指数测定 摘取大鼠心脏,洗掉血液,用滤纸吸干水分,称量心脏质量,计算心脏质量与大鼠体质量的比值,即得心重指数。

2.10 大鼠心肌组织形态学和超微结构观察 切取大鼠左心室心肌组织,以4%多聚甲醛固定后,经乙

醇脱水、二甲苯透明,浸蜡,包埋,制得常规心肌组织石蜡包埋块。切片后,经常规脱蜡、水化,进行HE染色及Masson染色,以中性树胶封片后置显微镜下观察各组大鼠心肌组织形态学变化情况。

切取大鼠左心室心肌组织,4% Gluta固定液固定,梯度丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,烤箱60℃固化48h,超薄切片,乙酸双氧铀浸泡45min,柠檬酸铅浸泡30min,进行电子染色,置于透射电镜下,观察各组大鼠心肌组织超微结构的变化情况。

2.11 ELISA检测各组大鼠血清BNP、ANP、IL-6含量 采集大鼠腹主动脉血5mL,4℃,2500 r·min⁻¹离心10min,离心半径10cm,取上层血清,于-20℃保存,待测。采用ELISA检测各组大鼠血清中BNP、ANP、IL-6的含量,严格按照各试剂盒说明书操作。

2.12 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达 取大鼠左心室心肌组织进行组织蛋白提取和蛋白浓度测定,将适量心肌组织加入RIPA组织/细胞裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂,利用FastPrep-24快速样品制备仪匀浆之后进行低温离心,获得上清液。配置BCA工作液,进行蛋白浓度测定。配置SDS-PAGE胶、蛋白样品加样、电泳、电转、封闭、一抗(稀释比例1:1000)4℃孵育过夜、TBST水洗、二抗孵育(稀释比例1:5000)、曝光拍摄。通过Image J软件对条带灰度值进行分析,用 β -tubulin灰度值作为比较,对结果进行分析并计算相对表达。

2.13 统计学分析 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较满足正态分布及方差齐性的用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验,不满足正态分布及方差齐性的用秩和检验,多组间比较用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪-附子溶液活性成分分析 根据质谱数据分析,获得正、负离子模式下黄芪-附子溶液的质谱基峰图,见表1;通过与各药材图谱对照确定化合物来源归属,共鉴定出202个化学成分。将这些化学成分在PubChem数据库中检索,发现74个化学成分具有作用靶点,作为黄芪-附子溶液的活性成分,包括21个黄酮类、13个羧基酸类、7个氨基酸类、6个苯甲酸类、6个脂肪酸类、5个糖苷类、4个生物碱类、3个嘌呤类、2个二萜类、2个酚类、2个醛类、1个异戊二烯脂类、1个咯嗪和异咯嗪类、1个肉桂酸及其衍生物,其中45个活性成分来自黄芪;29个活性成分来自附子,见表1和增强出版附加材料。

3.2 黄芪-附子溶液治疗心力衰竭潜在作用靶点分析 通过PubChem数据库获得黄芪-附子溶液中74个活性成分作用靶点831个,通过CTD、OMIM、GeneCards数据库获得心力衰竭疾病靶点733个,经Venn分析得到交集靶点183个,即为黄芪-附子溶液治疗心力衰竭的潜在作用靶点,构建“成分-靶点”关系网络见增强出版附加材料,其中黄色菱形代表黄芪活性成分,绿色菱形代表附子,蓝色圆形代表治疗靶点。该网络中涉及的活性成分64个,度值排名靠前的活性成分有caffeic acid、L-arginine、biochanin A、adenine、nicotinic acid、trans-ferulic acid、*p*-coumaric acid、(-)-riboflavin、calycosin、DL-arginine等,度值排名靠前的靶点有环加氧酶2(PGCS2)、环加氧酶1(PGCS1)、诱导型一氧化氮合酶2(NOS2)、肿瘤坏死因子(TNF)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、IL-6、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、白细胞介素-1B(IL-1B)、雌激素受体1(ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARG)等,表明黄芪-附子溶液通过多成分、多靶点协同调节治疗心力衰竭。

3.3 治疗心力衰竭靶点蛋白互作分析 PPI分析显示183个治疗靶点间存在互作关系,圆形越大代表节点度较大,与其相互作用的蛋白数量越多。利用MCC算法筛选出网络的核心靶点,排名前15个核心靶点包括IL-1B、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、IL-6、Caspase-3、VEGFA、TNF、Akt1等,颜色越深代表重要程度越高,见增强出版附加材料。

3.4 治疗心力衰竭靶点蛋白功能注释分析 将上述183个治疗靶点导入Metascape数据库进行GO分析和KEGG分析,GO分析结果显示,显著富集的功能分子108个条目,主要包括蛋白结合、蛋白二聚体活化、金属离子结合等;生物过程有807个条目,主要包括凋亡过程负调控、炎症反应、缺氧应答、信号转导等;细胞组分有63个条目,主要包括细胞外空间、细胞质膜、细胞质、线粒体等。KEGG分析结果显示,显著富集的生物信号通路116条,其中缺氧诱导因子信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路、Toll样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、叉头框蛋白O(FoxO)信号通路等是与心力衰竭密切相关的信号通路。见增强出版附加材料。

在这些信号通路中HIF-1信号通路的富集度最高、*P*值最小,结合黄芪-附子溶液治疗心力衰竭的活性成分-靶点网络分析,发现富集到此信号通路的靶点蛋白有27个,因此该通路可能是黄芪-附子溶

表1 黄芪-附子溶液活性成分及来源归属

Table 1 Ingredient identification and source attribution of solution of Astragali Radix and Aconiti Lateralis Radix Preparata solution

No.	化合物	来源	No.	化合物	来源
1	L-精氨酸	附子	38	染料木苷	黄芪
2	麦芽二糖	黄芪	39	波尔定碱	附子
3	麦芽三糖	黄芪	40	核黄素	黄芪
4	D-甘露醇	黄芪	41	柚皮素-7-O-葡萄糖苷	黄芪
5	DL-精氨酸	附子	42	邻羟基肉桂酸	附子
6	DL-羟基丁二酸	黄芪	43	3'-甲氧基大豆苷	黄芪
7	腺嘌呤	黄芪	44	芥子酸	黄芪
8	L-焦谷氨酸	附子	45	3-羟基-4-甲氧基肉桂酸	附子
9	烟酸	黄芪	46	邻氨基甲酸	黄芪
10	6-羟基嘌呤	黄芪	47	印度黄檀苷	黄芪
11	柠檬酸	黄芪	48	甘草苷	黄芪
12	3-羟基-2-吡啶甲酸	附子	49	滨藜黄苷	黄芪
13	2-甲基富马酸	附子	50	射干苷	黄芪
14	D-焦谷氨酸	附子	51	木犀草素 7-甲基醚	黄芪
15	去甲猪毛菜碱	附子	52	高车前苷	黄芪
16	苯乙醛	附子	53	3-羟基苯甲酸	黄芪
17	腺苷	黄芪	54	根皮苷	黄芪
18	甲基丙二酸	黄芪	55	壬二酸	黄芪
19	L-异亮氨酸	黄芪	56	苯甲酰新乌头原碱	附子
20	鸟嘌呤	黄芪	57	黄芩苷	黄芪
21	L-脯氨酸	黄芪	58	芒柄花苷	黄芪
22	柠康酸	附子	59	苯甲酰次乌头碱	附子
23	羟甲基糠醛	附子	60	毛蕊异黄酮	黄芪
24	咖啡酸	附子	61	4',6-二羟基-3'-甲氧基螯合酮	黄芪
25	泛酸	黄芪	62	新乌头碱	附子
26	对香豆酸	附子	63	飞机草素	黄芪
27	L-色氨酸	黄芪	64	土大黄苷	黄芪
28	5'-甲基硫代腺苷	附子	65	鹰嘴豆芽素 A	黄芪
29	(2R)-2E-(3S)-(4S)-3-羟基-4-甲基-1-辛烯-6-炔-5-氧带吡咯烷基庚酸	附子	66	柳穿鱼黄素	黄芪
30	3,4-二羟基苯甲醛	附子	67	红车轴草素	黄芪
31	龙胆酸	附子	68	十八碳三烯酸	黄芪
32	香草酸	附子	69	次乌头碱	附子
33	1,4-二羟基-2-萘甲酸	附子	70	刺芒柄花素	黄芪
34	反式阿魏酸	黄芪	71	十二烷二酸	黄芪
35	没食子酸	附子	72	4',6-二甲氧基-7-羟基异黄酮	黄芪
36	附子灵	附子	73	5-羟甲基糠醛	附子
37	丁香酸	黄芪	74	维甲酸	附子

液治疗心力衰竭的关键通路。从黄芪-附子溶液调控 HIF-1 信号通路进一步分析发现,黄芪作用于通路中的表皮生长因子受体(EGFR)、PI3K、信号转导及转录激活蛋白 3(STAT3)、钠尿肽前体蛋白 A(NPPA)等靶点;附子作用于通路中的内肽酶 1(END1)等靶点;黄芪和附子共同作用于通路中的

IL-6、Akt、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、HIF-1 α 、VEGFA、Bcl-2、NOS2、血清运铁蛋白(TF)等靶点,提示黄芪-附子溶液中的活性成分可协同作用于 HIF-1 信号通路,调控血管生成、血管张力、细胞铁代谢、细胞增殖凋亡等,进而起到治疗心力衰竭的作用。见增强出版附加材料。

3.5 分子对接分析 上述结果显示 HIF-1 信号通路是黄芪-附子溶液治疗心力衰竭的关键通路,选择该通路中几个关键蛋白进行分子对接分析。在 PDB 数据库中查找并下载 HIF-1 信号通路中关键靶点 HIF-1 α 、VEGFA、Akt1、Caspase-3、IL-6 的蛋白结构文件,这些蛋白 PDB ID 分别为 5JWP、3QTK、

6HHF、1RHJ、1IL6。分子对接预测结果见表 2,化合物与蛋白结合能均 $<-60 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$),表明具有较好的结合活性,另外 $\text{total score}\geq 5$ 表示小分子化合物与蛋白具有良好结合活性^[17];结合活性较好的化合物的对接见增强出版附加材料。

表 2 黄芪-附子溶液活性成分与核心靶点分子对接结果

Table 2 Results of component in Astragali Radix and Aconiti Lateralis Radix Preparata solution for docking with core genes

化合物	靶点蛋白	total score	结合位点	结合能/kcal·mol ⁻¹
L-arginine	HIF-1 α	8.314 8	GLN147/ASN83/ASN294/HIS199/HIS279/GUL201/ASN205	-87.48
citric acid	VEGFA	5.093 9	ARG98/LYS100/LEU59/CYS54/ASP56/ASN55/SER43	-84.31
DL-arginine	VEGFA	5.282 7	TYR18/ASN55	-76.03
L-arginine	VEGFA	6.789 2	TYR18/ASN55/TYR14/LYS41/CYS54/ASP56	-73.26
(-)-riboflavin	Akt1	7.404 2	GLY294/PHE293/ASP274/THR291/ASP292/THR82/ASN54	-117.25
(-)-riboflavin	Caspase-3	7.169 4	ARG179/SER236/HIS237/GLN283/ARG341	-130.69
baicalin	Caspase-3	6.483 3	SER381C/PHE381D/ASP381E	-101.59
formononetin	Caspase-3	5.081 1	HIS237/ASP381E	-97.96
L-arginine	Caspase-3	5.869 5	ARG314/ARG179/SER339/GLN283	-87.15
calycosin	IL-6	7.391 5	LEU65/LEU63/SER170/ARG169	-94.22
DL-arginine	IL-6	5.687 8	GLU173/MET68/LYS67	-78.95
L-arginine	IL-6	6.400 5	SER177/MET68/GLU173	-86.71

3.6 各组大鼠血流动力学指标和心质量指数情况 与正常组比较,模型组大鼠 LVSP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 显著降低, LVEDP、心重指数显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠

LVSP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 显著升高, LVEDP、心重指数显著降低 ($P<0.01$);黄芪-附子低剂量组大鼠 LVSP、LVEDP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 、心重指数与模型组比较,差异均无统计学意义,见表 3。

表 3 各组大鼠血流动力学指标和心质量指数情况 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Determination results of cardiac function indexes and heart weight index in rats of each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	心功能指标				心重指数/%
		LVSP/mmHg	LVEDP/mmHg	$+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}/\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$	$-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}/\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$	
正常组		137.49 \pm 10.10	3.25 \pm 0.21	1 933.50 \pm 98.50	1 877.42 \pm 95.50	0.29 \pm 0.03
模型组		107.59 \pm 10.53 ¹⁾	14.08 \pm 0.19 ¹⁾	1 535.65 \pm 94.03 ¹⁾	1 402.29 \pm 89.53 ¹⁾	0.38 \pm 0.04 ¹⁾
黄芪-附子低剂量组	1.56	120.63 \pm 8.00	13.44 \pm 0.11	1 587.99 \pm 105.01	1 458.12 \pm 91.57	0.36 \pm 0.03
黄芪-附子中剂量组	3.12	134.03 \pm 10.70 ³⁾	6.10 \pm 0.12 ³⁾	1 831.28 \pm 87.58 ³⁾	1 702.22 \pm 96.02 ³⁾	0.33 \pm 0.02 ³⁾
黄芪-附子高剂量组	6.24	135.88 \pm 10.50 ³⁾	4.34 \pm 0.15 ³⁾	1 854.29 \pm 91.12 ³⁾	1 810.22 \pm 92.58 ³⁾	0.30 \pm 0.01 ³⁾
依那普利组	2.08	133.61 \pm 8.70 ³⁾	3.62 \pm 0.22 ³⁾	1 813.22 \pm 81.00 ³⁾	1 676.56 \pm 101.53 ³⁾	0.28 \pm 0.01 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;1 mmHg \approx 0.133 kPa(表 4、表 5 同)

3.7 各组大鼠血清 BNP、ANP、IL-6 的含量 与正常组比较, HF 模型组大鼠血清 BNP、ANP、IL-6 的含量显著升高,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。与模型组比较,黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠血清 BNP、ANP、IL-6 的含量显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);黄芪-附子低剂量组与 HF 模

型组大鼠比较,血清 BNP、ANP、IL-6 的含量虽有所下降,但差异均无统计学意义,见表 4。

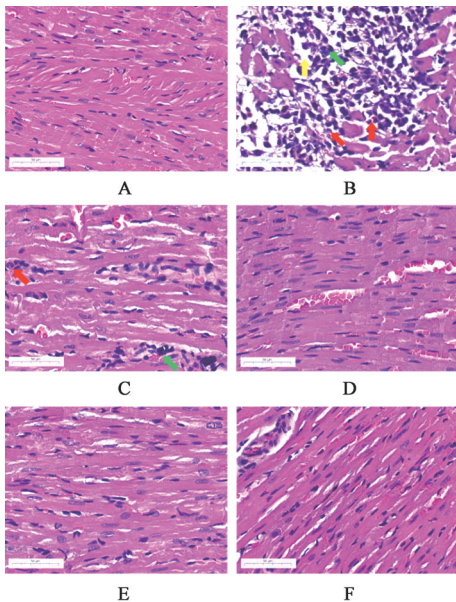
3.8 各组大鼠心肌组织形态学变化情况

3.8.1 HE 染色 正常组大鼠的心肌细胞排列整齐,肌纤维连接紧密,胞核清晰;模型组大鼠心肌细胞结构被破坏,肌纤维断裂(如黄色箭头所示),排

表4 各组大鼠血清BNP、ANP、IL-6含量情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	BNP	ANP	IL-6
正常组		72.48±13.06	78.05±3.48	102.05±9.51
模型组		229.40±11.01 ¹⁾	143.59±32.10 ¹⁾	245.93±18.26 ¹⁾
黄芪-附子低剂量组	1.56	197.47±8.16	119.02±24.15	208.91±13.00
黄芪-附子中剂量组	3.12	152.00±45.30 ³⁾	95.01±23.73 ³⁾	147.22±14.49 ³⁾
黄芪-附子高剂量组	6.24	105.51±24.73 ³⁾	85.26±12.92 ³⁾	137.13±20.28 ³⁾
依那普利组	2.08	164.35±17.84 ³⁾	93.81±20.80 ³⁾	131.62±13.31 ³⁾

列较紊乱,肌束间隙及肌周间隙模糊不清,部分心肌细胞坏死(如绿色箭头所示),肌细胞出现丝状物或溶解消失、形成空泡,有炎性细胞浸润(如红色箭头所示);黄芪-附子低剂量组大鼠心肌细胞排列稍紊乱,肌纤维稍稀疏,心肌细胞间隙明显增宽,部分出现灶性坏死情况(如绿色箭头所示),少量炎性细胞浸润(如红色箭头所示);黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌细胞排列较整齐,肌纤维断裂较少,部分间隙稍有增宽,见图1。



注:A.空白组;B.模型组;C~E.黄芪-附子低、中、高剂量组;F.依那普利组(图2-图4同)

图1 各组大鼠心肌组织形态学情况(HE,×400)

Fig. 1 Morphological observation results of myocardial tissue in rats of each group (HE, ×400)

3.8.2 Masson染色 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织中胶原纤维明显增多,心肌纤维化程度明显加重(如红色箭头所示);与模型组比较,黄芪-附子低剂量组大鼠心肌纤维化程度稍降低,黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌纤维化程度均明显减轻,见图2。

3.8.3 透射电镜 正常组大鼠的心肌细胞肌丝完

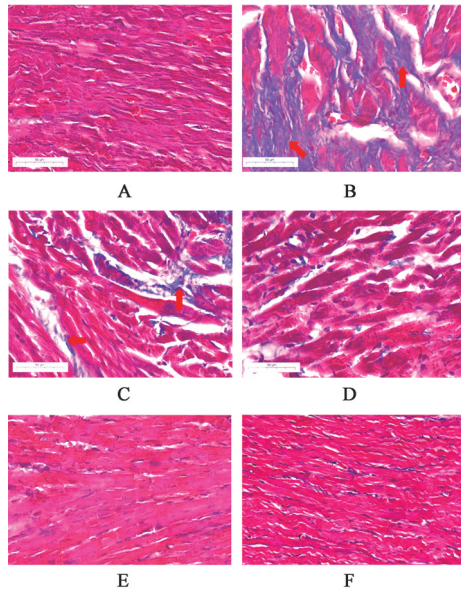


图2 Masson染色观察各组大鼠心肌纤维化情况(Masson,×400)

Fig. 2 Observation results of myocardial fibrosis in rats of each group (Masson, ×400)

整,排列整齐紧密,肌丝间线粒体整齐,线粒体形态正常,边界清晰,线粒体嵴明显;模型组大鼠心肌细胞肌丝排列疏松紊乱,肌丝断裂溶解,肌丝间线粒体数量明显增多、排列紊乱(如黄色箭头所示),线粒体形态不规则,线粒体嵴紊乱,部分线粒体肿胀、外膜破裂(如蓝色箭头所示);黄芪-附子低剂量组大鼠心肌细胞肌丝排列稍紊乱,部分肌丝断裂,肌丝间线粒体排列稍整齐,线粒体形态不规则,线粒体嵴紊乱,有线粒体肿胀破裂情况(如蓝色箭头所示);黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌细胞肌丝排列和线粒体形态明显改善,肌丝排列较整齐,肌丝间线粒体排列整齐,线粒体形态较规则,线粒体肿胀程度明显改善,线粒体嵴稍明显,线粒体外膜无明显破裂情况,见图3。

3.9 各组大鼠心肌组织HIF-1信号通路关键蛋白表达情况 为了探究HIF-1 α 信号通路在黄芪-附子溶液治疗心力衰竭中的作用,本研究检测了此信号通

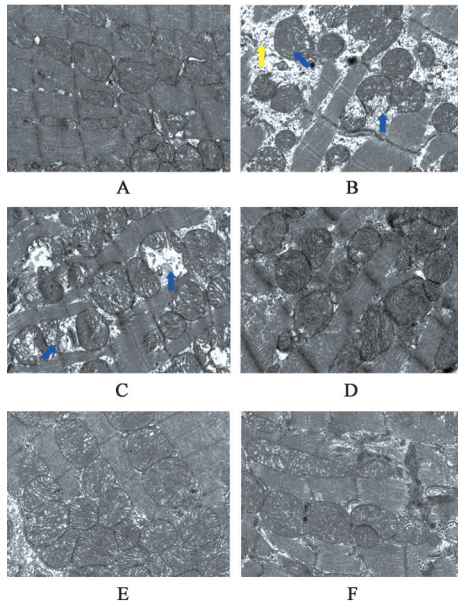


图3 各组大鼠心肌细胞超微结构情况(透射电镜, ×8 000)

Fig. 3 Observation resultse in rats of each group(TEM, ×8 000)

路关键蛋白 HIF-1 α 、VEGFA、p-Akt1 的表达情况, 结果见图4。与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 HIF-1 α 、VEGFA、P-Akt1 蛋白表达显著增加, 差异

表5 各组大鼠心肌组织 HIF-1 通路相关蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Protein expression of HIF-1 pathway in myocardium of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	HIF-1 α / β -tubulin	VEGFA / β -tubulin	p-Akt1 /Akt1	Caspase-3 / β -tubulin	cleaved Caspase-3 / β -tubulin
正常组		0.19±0.02	0.07±0.01	0.14±0.01	0.07±0.01	0.40±0.02
模型组		0.65±0.06 ¹⁾	0.53±0.06 ¹⁾	0.41±0.04 ¹⁾	0.62±0.08 ¹⁾	0.96±0.05 ¹⁾
黄芪-附子低剂量组	1.56	0.53±0.05	0.39±0.04 ²⁾	0.32±0.02 ²⁾	0.26±0.03 ³⁾	0.82±0.05 ²⁾
黄芪-附子中剂量组	3.12	0.43±0.05 ³⁾	0.26±0.02 ³⁾	0.24±0.01 ³⁾	0.24±0.04 ³⁾	0.55±0.03 ³⁾
黄芪-附子高剂量组	6.24	0.20±0.02 ³⁾	0.12±0.02 ³⁾	0.14±0.03 ³⁾	0.12±0.02 ³⁾	0.18±0.01 ³⁾
依那普利组	2.08	0.38±0.04 ³⁾	0.27±0.02 ³⁾	0.25±0.01 ³⁾	0.24±0.02 ³⁾	0.39±0.02 ³⁾

3.10 各组大鼠心肌组织 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达情况 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著增加($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌组织 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著减少($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪-附子低剂量组大鼠心肌组织 Caspase-3 蛋白表达显著减少($P<0.01$), cleaved Caspase-3 蛋白表达明显减少($P<0.05$)。表明黄芪-附子溶液能减少心力衰竭大鼠的心肌细胞凋亡情况, 见图4和表5。

4 讨论

中医药是复杂、整体的系统科学, 其既体现在化学物质的多成分, 又体现在药物作用的多靶点、

均有统计学意义($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪-附子中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌组织 HIF-1 α 、VEGFA、p-Akt1 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义($P<0.01$); 与模型组大鼠比较, 黄芪-附子低剂量组心肌组织 VEGFA、p-Akt1 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$), HIF-1 α 蛋白表达虽有所下降, 但差异无统计学意义, 见图4和表5。

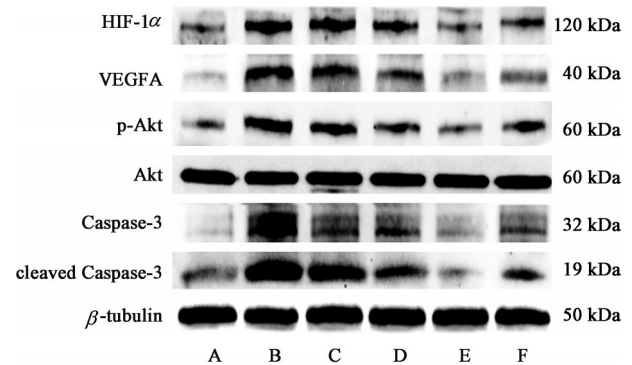


图4 各组大鼠心肌组织 HIF-1 通路相关蛋白表达

Fig. 4 Protein expression of HIF-1 pathway in myocardium of rats in each group

多层次、多环节上。中医认为心力衰竭的病因病机为“本虚标实”, 随着心的气血阴阳亏虚进而累及其他脏腑, 产生瘀血、痰浊、水饮等病理产物, 阻碍全身的气血运行, 进而加重心力衰竭症状^[18]。黄芪甘温补益, 既可补气亦可行气兼利水, 气充气行则瘀血得通、气血得畅^[19]; 附子辛热温阳, 尤温心阳, 可“益火之源以消阴翳”, 阳气充盛则瘀血得通、痰饮得消, 标本兼治^[20], 故黄芪和附子是治疗心力衰竭的常用药物^[21]。本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术联合网络药理学和动物实验验证试图揭示黄芪-附子治疗心力衰竭的药效物质基础和作用机制。

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定出黄芪-附子溶液 202 个化合物, 通过网络药理学分析发现其中 64 个活性成分治疗心力衰竭的潜在作用靶

点183个。在活性成分-靶点网络中发现黄芪-附子溶液治疗心力衰竭的重要成分有 *L*-arginine、(-)-riboflavin、caffeic acid、calycosin、*DL*-arginine等,主要作用的靶点有 IL-6、Caspase-3、VEGFA、Akt1、TNF、IL-1B、MMP-9等。*L*-arginine具有扩张血管增加血流量的作用,可以通过激活 *L*-精氨酸/一氧化氮通路增加机体内一氧化氮含量,减轻心肌重构,发挥对心力衰竭心肌的保护作用^[22];(-)-Riboflavin参与机体大量的能量代谢过程,可提高心肌中的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)与黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)含量并激活短链酰基辅酶A脱氢酶(SCAD),改善心肌能量代谢,从而抑制小鼠心力衰竭症状^[23]。KEGG富集分析结果显示黄芪-附子溶液调控HIF-1信号通路、TNF信号通路、PI3K/Akt信号通路、Toll样受体信号通路、MAPK信号通路、FoxO信号通路等多条信号通路发挥治疗作用,其中潜在治疗靶点富集到HIF-1信号通路的较多,该信号通路可能是黄芪-附子药对治疗心力衰竭的关键靶标。HIF-1信号通路是生物处于低氧状态下的应激信号通路,受到PI3K/Akt、MAPK等通路的调控^[24]。在缺氧条件下,HIF-1 α 会不断累积并与HIF-1 β 形成二聚体,并在核内与组蛋白乙酰基转移酶p300/CBP等相互作用,激活下游VEGFA、EDN1、NOS2、TF、促红细胞生成素(EPO)等靶基因的转录,具有促进血管内皮细胞分裂增殖、诱导血管生成再生、调节血管张力、促进红细胞生成、调整细胞铁代谢等作用,可改善心肌细胞供氧,同时也能够调控细胞的增殖凋亡、促进细胞厌氧呼吸等,降低心肌细胞耗氧量,维持心肌细胞的功能^[25]。然而在长期的缺氧条件下,HIF-1 α 的过表达会造成细胞能量代谢紊乱,诱导细胞凋亡,破坏心肌细胞^[26]。以往研究发现,通过基因敲除希佩尔-林道(VHL)基因后稳定高表达HIF-1 α 的小鼠可发生严重的心力衰竭和心脏横纹肌肉瘤^[27]。因此,HIF-1 α 的激活在心力衰竭初期可一定程度缓解心肌细胞缺氧、缓解心力衰竭症状,但是持续稳定的表达和活化会诱发心肌肥大、心肌纤维化、心肌细胞凋亡,进而发展为心力衰竭。

分析了黄芪-附子溶液对心力衰竭的影响及对HIF-1信号通路的调控作用,进一步阐明了黄芪-附子配伍治疗心力衰竭的作用机制。血清ANP和BNP水平可反映心力衰竭的严重程度,对心力衰竭有较好的诊断价值,ANP和BNP的水平越高,表明患者的心力衰竭程度越重,患者死亡率和住院率就越高、预后越差^[28]。心肌细胞线粒体是为心脏提供

所需能量的重要细胞器,维持线粒体的正常形态和功能与心肌细胞舒缩活动密切相关^[29-30]。另外线粒体介导的凋亡信号通路也是心肌细胞凋亡的重要途径之一^[31],当心肌细胞受到内外产生的不良刺激时,会破坏线粒体膜电位的稳定性,内膜通透性增加,基质渗透压升高,线粒体肿胀,并释放细胞色素C和凋亡诱导因子等,激活Caspase-3,引起细胞凋亡^[32]。实验结果表明黄芪-附子溶液能显著改善心力衰竭大鼠血流动力学指标和心质量指数,降低血清BNP、ANP、IL-6的含量,改善心肌组织病理学变化,抑制心肌纤维化,减轻线粒体损伤,保护心肌细胞线粒体的形态和功能,说明黄芪-附子溶液对心力衰竭大鼠具有治疗作用。另外,黄芪-附子溶液能降低心力衰竭大鼠心肌组织中HIF-1信号通路关键蛋白HIF-1 α 、VEGFA、p-Akt1的表达,降低Caspase-3的活化,减少心肌细胞凋亡。说明黄芪-附子溶液能够改善心肌组织病理学变化和抑制HIF-1信号通路的激活,进而起到治疗心力衰竭大鼠的作用。

本研究分析了黄芪-附子溶液的化学成分,预测发现其64个活性成分通过作用183个靶点,调控HIF-1信号通路、TNF信号通路及PI3K/Akt信号通路等治疗心力衰竭,初步阐释了其疗效机制。通过动物疾病模型实验研究表明黄芪-附子溶液能改善心力衰竭大鼠心脏舒缩功能和心肌组织病理学变化、保护心肌细胞线粒体损伤、抑制心肌细胞凋亡、调控HIF-1信号通路,进一步明确了其作用机制。本研究为黄芪-附子药对治疗心力衰竭提供了依据,也为后续的药效物质基础研究提供了新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李世军. 老年心力衰竭流行病学和病理生理学及预后的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(3):318-320.
- [2] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2021》概述[J]. 中国心血管病研究, 2022,20(7):577-596.
- [3] PONIKOWSKI P, VOORS A A, ANKER S D, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC[J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(8):891-975.

- [4] 郑刚. 心力衰竭发病机制研究新进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(4): 428-431.
- [5] 李萌, 雷帅, 张陈平等. 心力衰竭药物治疗的研究进展[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(5): 455-458.
- [6] MALAGOLI A, ROSSI L, BURSI F, et al. Left atrial function predicts cardiovascular events in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2019, 32(2): 248-256.
- [7] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141.
- [8] 卢健棋, 李苏依, 卢俊桑, 等. 中医药治疗慢性心力衰竭的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 145-148.
- [9] 史君, 王星, 赵慧辉, 等. 近20年慢性心力衰竭中医现代临床用药规律分析[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(10): 841-848.
- [10] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [11] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(1): 171-178.
- [12] LI X Z, ZHANG S N, LIU Q, et al. The active ingredients analysis of *Herba Lysimachiae* treating osteoarthritis based on the LC-MS/MS technology and public bioinformatics platforms[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(20): 3799-3809.
- [13] 苏珏, 赵宇曦, 朱炳睿, 等. 慢性心力衰竭大鼠中西医模型研究进展[J]. 国医论坛, 2022, 37(3): 75-78.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1-404.
- [15] 张志国, 李庆海. 芪附生脉心衰方联合西药治疗慢性心力衰竭40例[J]. 中医研究, 2020, 33(5): 10-12.
- [16] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1262.
- [17] 李亚辉, 杨欣, 冯俐, 等. 基于网络药理学及分子对接分析丹参黄芪芪伍治疗冠心病和心绞痛的活性成分及作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(22): 2259-2265.
- [18] 彭菊琴, 侯丕华, 彭娴, 等. 射血分数保留心力衰竭中医证素分布规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3660-3664.
- [19] 刘静, 徐江林, 石晓路, 等. 益气活血法对舒张性心力衰竭大鼠心肌细胞钙稳态的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(2): 165-175.
- [20] 李焱, 姜泽丰, 乔冬卉, 等. 附子-黄芪-葶苈子角药对心力衰竭模型大鼠心肌细胞线粒体膜电位及钙调球蛋白NCX1、SERCA2的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 252-258.
- [21] 车方远, 符俊杰, 王巍. 基于数据挖掘的从阳论治慢性心力衰竭用药规律探究[J]. 浙江中医杂志, 2021, 56(8): 616-617.
- [22] 李伟建, 方达, 梁利军, 等. 左旋精氨酸通过激活L-arg-NO通路对异丙肾上腺素致大鼠心力衰竭的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(12): 1716-1720.
- [23] 徐庆萍, 钟小艺, 秦学, 等. 核黄素通过激活SCAD抑制小鼠心力衰竭[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 853-860.
- [24] 龚焱婷, 李彦萍, 程亚茹, 等. 基于HIF-1信号通路研究芪参益气滴丸治疗心肌缺血的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3949-3959.
- [25] 孟祥阳, 王蒙蒙, 张坤, 等. 缺氧诱导因子氧感知信号通路与“高氧-低氧悖论”的研究进展[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(4): 433-437.
- [26] 丁然然, 哈艳平, 王振良, 等. 低氧诱导因子-1与缺血性心肌损伤保护的研究进展[J]. 中国细胞生物学报, 2015, 37(10): 1447-1457.
- [27] LEI L, MASON S, LIU D, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(11): 3790-3803.
- [28] 翟优, 刘思远, 陈善夫, 等. 4种中药注射剂改善大鼠慢性心力衰竭的药效研究[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4248-4254.
- [29] 高佳明, 郭浩, 张业昊, 等. 芪龙胶囊对气虚血瘀型缺血性心肌病大鼠心肌纤维化和血液循环的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1327-1335.
- [30] EMELYANOVA L, PRESTON C, GUPTA A, et al. Effect of aging on mitochondrial energetics in the human atria[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(5): 608-616.
- [31] CAO C, YU H, WU F, et al. Antibiotic anisomycin induces cell cycle arrest and apoptosis through inhibiting mitochondrial biogenesis in osteosarcoma [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, 49(6): 437-443.
- [32] KAWAI C, PESSOTO F S, RODRIGUES T, et al. pH-sensitive binding of cytochrome c to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(35): 8335-8342.

[责任编辑 顾雪竹]