

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学及质谱技术的葶苈大枣泻肺汤抗心力衰竭的有效成分发现及作用机制分析

赵洁¹, 王欢欢¹, 欧阳意¹, 赖华清², 郭非非¹, 唐力英¹, 吴宏伟^{1*}, 杨洪军¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的:基于网络药理学、高分辨质谱及分子对接技术探讨葶苈大枣泻肺汤治疗心力衰竭(简称心衰)的有效成分及作用机制。方法:通过文献查阅并结合 BATMAN-TCM 数据库对葶苈大枣泻肺汤中两味中药成分及药物靶标进行检索;以“heart failure”作为关键词,利用 GeneCards 数据库,对心衰疾病的靶标进行搜集;基于药物与疾病的共同靶标利用 STRING 数据平台进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,并通过 Cytoscape 软件进行网络拓补分析,最后得到核心靶标;基于核心靶标通过 DAVID 数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并建立“药物-成分-靶点-通路”分子网络。基于以上网络药理学研究结果,采用高分辨质谱技术对水煎汤剂进行分析,确证筛选出的活性成分;并采用 AutoDock 4.2.6 软件,对关键活性成分与相关靶标进行分子对接验证。结果:共获得葶苈子 85 种成分,大枣 49 种成分,药物靶标 1 078 个,疾病靶标 1 549 个,共同靶标 262 个。经蛋白质相互作用分析及网络拓补分析后,获得核心靶标 23 个,活性成分 33 个,涉及 19 条信号通路($P < 0.05$)。质谱分析结果表明异香草酸,南葶苈素 A,山柰酚-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷等 18 个成分在水煎汤剂中得到确认;分子对接分析结果表明异香草酸,南葶苈素 A,山柰酚-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷等 6 个核心成分(度值排名前 6)与沉默信息调节因子 1(SIRT1),白细胞介素(IL)1B,蛋白激酶 B α (AKT1),肿瘤坏死因子(TNF)有较好的结合活性;复方整体干预治疗心衰的过程主要涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),低氧诱导因子-1(HIF-1),雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)等信号通路。结论:该研究初步揭示了葶苈大枣泻肺汤抗心衰的有效成分及其作用机制,对于指导临床精准用药及葶苈大枣泻肺汤质量控制标志物的筛选、抗心衰活性成分的发现提供参考。

[关键词] 葶苈大枣泻肺汤; 心衰; 网络药理学; 靶点; 通路

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0151-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210414

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210201.1748.005.html>

[网络出版日期] 2021/2/2 9:31

Explore Effective Constituents and Mechanism of Tingli Dazao Xiefeitang in Treatment of Heart Failure Based on Network Pharmacology and Mass Spectrometry

ZHAO Jie¹, WANG Huan-huan¹, OUYANG Yi¹, LAI Hua-qing², GUO Fei-fei¹, TANG Li-ying¹,
WU Hong-wei^{1*}, YANG Hong-jun¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effective constituents and mechanism of Tingli Dazao Xiefeitang for the treatment of heart failure through network pharmacology and high resolution mass spectrometry technique as well as molecular docking technique. **Method:** Chemical components and potential

[收稿日期] 20201213(012)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1708900);山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1305)

[第一作者] 赵洁,在读硕士,从事中药防治心脑血管作用机制解析研究,Tel:010-64032656,E-mail:1195278394@qq.com

[通信作者] *吴宏伟,博士,副研究员,从事中药质量控制及心脑血管代谢组学研究,Tel:010-64032656,E-mail:hwwu@icmm.ac.cn

targets in *Descurainiae Semen Lepidii Semen* and *Jujubae Fructus* were searched by referring to literature and BATMAN-TCM database. The disease targets were searched in GeneCards database with "heart failure" as the key word. STRING platform was used to construct protein-protein interaction (PPI) network based on common targets of drugs and disease. The network topology was analyzed by using Cytoscape 3.7.2 software to obtain the core targets eventually. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of the core targets was conducted through DAVID database to draw a network of "herb-compound-target-pathway". Based on the results of the network pharmacology research above, high resolution mass spectrometry was used to analyze the decoction and confirm the selected active components. AutoDock 4.2.6 software was used for molecular docking verification of key active components and related targets. **Result:** A total of 85 components were obtained in *Descurainiae Semen Lepidii Semen*, and 49 components were obtained in *Fructus Ziziphi Jujubae*. A total of 1 078 drug targets and 1 549 disease targets were identified. After PPI analysis and network topology analysis, 23 core targets and 33 active components were obtained, involving 19 signaling pathways ($P < 0.05$). Mass spectrometry analysis results indicated that 18 components such as isovanillic acid, *descuraininA* and *kaempferol-7-O-β-D-glucopyranoside* were confirmed in decoction. Molecular docking analysis results indicated that 6 core components (degree value top 6), such as isovanillic acid, *descurainin A* and *kaempferol-7-O-β-D-glucopyranoside*, had good binding activity with silent information regulatory factor 1 (SIRT1), interleukin (IL) 1B, protein kinase Bα (AKT1) and tumor necrosis factor (TNF). The compound recipe for heart failure mainly involved mitogen-activated protein kinase (MAPK), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), Mammalian target of rapamycin (mTOR) and other signaling pathways. **Conclusion:** This study preliminarily investigated the effective constituents and mechanism of *Tingli Dazao Xiefeitang* in the treatment of heart failure. It can provide references for the precise clinical medication and screening of quality control markers, as well as the discovery of active components in the treatment of heart failure.

[Key words] *Tingli Dazao Xiefeitang*; heart failure; network pharmacology; targets; pathway

葶苈大枣泻肺汤出自张仲景《金匱要略》，该方由葶苈子、大枣2味药构成，具有泻肺祛痰，利水平喘的功效，方中葶苈子苦寒，泻肺热，降肺逆，利水消痰，行皮间水气而消肿，但由于其性烈苦寒，常佐以大枣，达到去邪而不伤正的目的。在中医临床上，常可用于肺部感染疾病或百日咳、支气管扩张、肺心病、心力衰竭（简称心衰）等，因其能够泻肺行水，下气平喘，且具有强心功效，因此临床中常将本方加减以治疗心衰。

目前，葶苈大枣泻肺汤（水煎液）的化学研究报道较少，葶苈子中主要含有强心苷类、黄酮类、硫苷类、苯丙素类、芥子苷类、有机酸类等化学成分^[1]，大枣主要含有由三萜类、皂苷类、糖类、糖苷类、蛋白质及氨基酸类、维生素类及其他类化学成分^[2]；药理学研究发现，葶苈大枣泻肺汤具有抗菌、抗炎、调血脂，止咳平喘，利水消肿，改善免疫等功能^[3]，还可以通过松弛痉挛的气管平滑肌以缓解肺结核症状^[4]，也有文献报道其能强心并增加冠状动脉流量，还可以降低炎症水平，抑制心室重构，改善心肌纤维化，延缓心衰进程，对慢性心衰有良好的临床疗效^[5-6]。

心衰表现为心脏的收缩功能和（或）舒张功能发生障碍，是多种心血管疾病的终末期表现，在临床上常伴有咳痰、咳嗽、下肢水肿、呼吸困难、消化功能下降等症状^[7]。在西医中，一般利用一些强心利尿扩张血管的药物另佐以器械治疗^[8]，但流行病学资料显示，心衰患者的病死率仍然较高^[9]，而且长期用药会造成耐药性且不良反应比较大。中医治疗以补虚泻实为治疗原则，遵循整体观念，辨证论治，对心衰治疗有着明显改善和治疗作用。临床研究表明，葶苈大枣泻肺汤对于改善心功能、延缓心衰的发生、缓解心衰的症状具有较好的防治及治疗作用，且长期服用未见不良反应^[10-12]，但是其潜在的有效成分、作用机制及作用环节尚不明确。

本研究采用网络药理学方法，对数据库收录及文献报道的葶苈子、大枣的化学成分进行收集、整理，在此基础上采用BATMAN-TCM网络药理学分析平台，对药物成分的靶标进行预测；与此同时基于GeneCards数据库，收集整理心衰疾病发生、发展过程中的相关分子靶标，通过STRING数据库建立药物靶标与疾病靶标间的蛋白质-蛋白质相互作用

(PPI)网络,进一步过滤、筛选葶苈大枣泻肺汤抗心衰潜在的靶标及相关药物分子。

众所周知,葶苈大枣泻肺汤等中医经典名方,临床用药均为水煎汤剂,而源于数据库的化学成分数据均为单味药材分离、分析得到化学成分,与实际临床汤剂中的成分相差较大,因此,为了使网络药理学预测分析的结果更加准确,针对网络药理学筛选得到的潜在药效分子,采用高分辨质谱分析技术对水煎汤剂进行靶向性分析确证,并对得到的核心成分与其对应的靶点进行分子对接验证,从而准确解析葶苈大枣泻肺汤抗心衰的有效成分及其作用机制,为临床精准用药、复方质量控制标志物的筛选以及药效成分的筛选提供参考。

1 材料和方法

1.1 药材成分靶标收集 基于文献查阅检索(如CNKI, SciFinder)及生物信息学分析平台BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>),总结葶苈大枣泻肺汤中的两味药材葶苈子、大枣的化学成分,并根据结构相似性得分(>20分)对药物成分靶标进行预测。

1.2 心衰疾病靶标搜集 以“heart failure”作为关键词,利用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>),对心衰疾病的靶标进行搜集,以相关性得分(Relevance score \geq 15.5)作为筛选条件,对心衰疾病的靶标进行筛选。

1.3 PPI网络的构建及核心靶标的筛选 为了聚焦葶苈大枣泻肺汤有效作用靶标,取葶苈大枣泻肺汤的化学成分靶标与心衰疾病靶标的交集,利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),构建的 PPI 网络(PPI score $>$ 0.4)。将筛选后的靶标导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中进行可视化分析,利用连接度(degree),介度(betweenness),紧密度(closeness)3个拓扑参数(在网络中发挥关键作用)进行筛选,首次筛选以 \geq degree值中位数的2倍作为筛选条件,第二次筛选,取 degree, betweenness, closeness 这3个值的中位数,以同时 \geq 这3个值的中位数作为筛选条件,进一步缩小核心靶标范围,构建“药物靶标-疾病靶标”相互作用网络。

1.4 通路富集分析 将获取的核心靶标使用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,解析葶苈大枣泻肺汤潜在作用机制。

1.5 葶苈大枣泻肺汤化学成分分析验证

1.5.1 供试品的制备 按照目前临床常规的用法

用量,称取葶苈子 10 g,大枣 12 枚,先以清水浸泡 0.5 h,再加入水 300 mL,以武火煎煮沸腾以后再以文火煎煮 30 min,过滤倒出水煎液,再加水 200 mL,以武火煎煮沸腾后再以文火煎煮 40 min,过滤,将2次合并得到最终水煎液;水煎液不经浓缩直接冷冻干燥,得冻干粉;取粉末 2 g,加入 20% 甲醇 2 mL,超声震荡 40 min 溶解,过 0.22 μ m 滤膜,得供试品溶液。

1.5.2 色谱及质谱条件 UltiMate3000型超高效液相色谱仪,LTQ-Orbitrap型质谱仪(美国 Thermo 公司);HSS T3-C₁₈色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m);流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱(0~38 min, 5%~95%A)。

1.5.3 成分的鉴定 针对网络药理学筛选出的核心靶标对应的潜在活性化合物,计算各化合物的分子离子及其准分子离子的质荷比(*m/z*),对供试品分析数据进行靶向性的提取,在相对误差(δ) $<$ 10 ppm 的条件下,初步确定目标化合物,最终结合二级质谱信息对目标化合物进行鉴定。

1.6 分子对接验证 基于葶苈大枣泻肺汤质谱分析验证结果,结合 PPI 网络,从中选取 degree 值排名靠前的 6 个成分,与相应蛋白靶标进行分子对接验证。首先将药物成分分子式导入 Chem 3D 软件(18.0)进行能量最小化后,保存为*.pdb 格式文件;通过 PDB 数据库 (<http://www1.rcsb.org/>) 下载相应靶标蛋白结构的*.pdb 格式文件,并利用 Pymol 软件(2.4.1)对靶标蛋白受体进行加氢、移除溶剂分子、分离原配体等预处理,再借助 AutoDock 软件(4.2.6),对靶标蛋白质受体进行原子类型定义、电荷计算等,最后保存为*.pdbqt 格式文件。最后运用 Autodock 对药物分子及靶标蛋白进行分子对接,根据结合能筛选出最佳构象后,用 Pymol 软件对结果进行可视化分析。

2 结果

2.1 葶苈大枣泻肺汤化学成分靶标分析结果 基于文献检索查阅,共收集得到葶苈子 85 种成分,主要为强心甘类、黄酮类、硫苷类等成分。基于 BATMAN-TCM 数据库大枣 49 种成分,主要为皂苷类、糖类、维生素类、三萜类等成分。

基于 BATMAN-TCM 数据库,分析葶苈子、大枣化学成分作用的靶标,根据结构相似性得分(>20),并去除重复值以后,分别得到葶苈子化学成分作用靶标 545 个,大枣化学成分作用靶标 737 个,二者合并去除重复值后,共得到 1 078 个靶标。

2.2 心衰疾病靶标分析结果 通过 GeneCards 数据

库,搜索心衰疾病相关的靶点,共有13 195个靶标,以Relevance score为参数指标,依次取中位数3.55,7.69,15.5进行筛选,最终以Relevance score>15.5为筛选条件,得到心衰疾病相关靶标1 549个(去除重复值以后)。

2.3 PPI网络的构建及核心靶点的筛选 将成分靶标与疾病靶标共同导入到韦恩2.1.0中,获取两者的交集共有262个靶标,见图1。将这262个靶标导入到STRING数据库中进行蛋白质相互作用分析(PPI),根据PPI得分(>0.4),初步筛选关键靶标蛋白,然后导入Cytoscape 3.7.2中进行蛋白质互作网络构建,通过Network Analyzer插件对网络的拓朴性质进行分析,首先以网络节点的degree值中位数的两倍为阈值进行筛选,然后同时取degree, betweenness, closeness 3个拓朴参数的中位数为阈值(分别为73,0.008 4,0.555 2)再次筛选,最终获得23个相互作用的核心靶标,见图2,3。图2中靶标的节点面积越大,颜色越深,代表degree值越大,表示与其相关的靶标蛋白数量越多,处于网络中的核心环节;图3直观的表明了蛋白与蛋白之间的相互作用,蛋白之间连线越粗,表明相应蛋白质之间的相互作用越强。

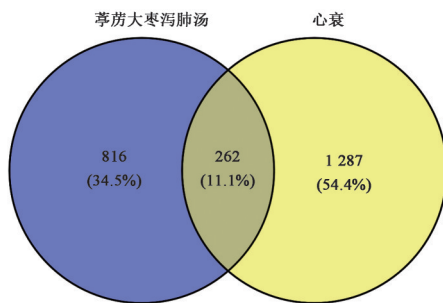


图1 葶苈大枣泻肺汤与心衰交集靶标
Fig. 1 Common targets between Tingli Dazao Xiefeitang and heart failure

2.4 KEGG通路富集分析 利用DAVID数据库对葶苈大枣泻肺汤中的23个核心靶标KEGG通路富集分析,筛选 $P<0.05$ 的数据,并选出前20条结果做以下分析,表中数量值的大小表示在该条通路富集的靶标数,数量值越大则说明富集的靶标数越多; P 值表示该通路于心衰的相关强弱,值越小代表相关性越强。KEGG通路富集分析表明,与这些靶标关联最为密切的有低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路,叉头框蛋白(FOXO)信号通路,环磷酸鸟苷(cGMP)-cGMP依赖性蛋白激酶(PKG)信号通路,肿瘤坏死因子(TNF)信号通路,甲状腺激素信号通

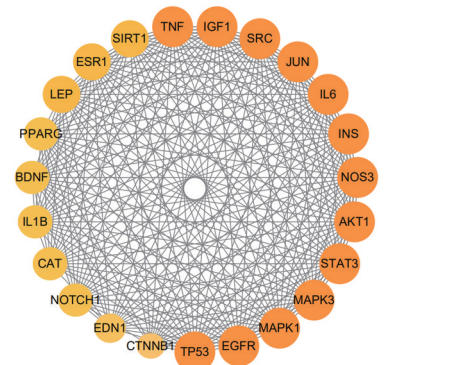


图2 葶苈大枣泻肺汤靶标与靶标的相互关系
Fig. 2 Relationship map between target and target of Tingli Dazao Xiefeitang

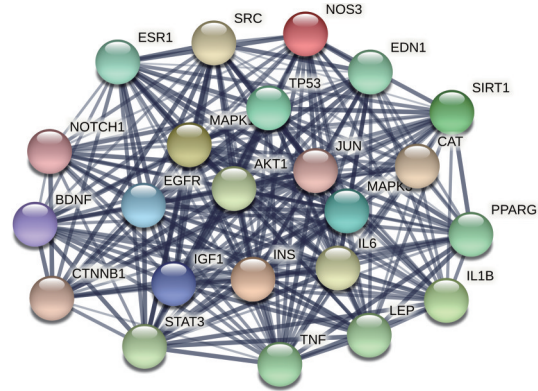


图3 葶苈大枣泻肺汤核心靶标的PPI
Fig. 3 PPI network of core targets of Tingli Dazao Xiefeitang

路,癌症途径,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,Toll样受体信号通路,癌蛋白(RAS)信号通路,雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)信号通路等。关键靶标KEGG通路富集见表1。

基于以上分析结果,将葶苈大枣泻肺汤的化学成分、抗心衰的潜在作用靶标及其富集得到的信号通路,导入Cytoscape 3.7.2软件绘制“药物-成分-靶标-通路”网络,见图4,表2;其中有沉默信息调节因子1(SIRT1),白细胞介素(IL)1B,TNF,表皮生长因子受体(EGFR),蛋白激酶 $B\alpha$ (AKT1)等23个核心靶标,对应槲皮素-7- O - β -龙胆双糖苷、山柰酚-7- O - β - D -吡喃葡萄糖苷、异鼠李素-3,7-二- O - β - D -吡喃葡萄糖苷、豆甾醇等33个成分,其中21个成分来源于葶苈子,12个来源于大枣,以及MAPK, HIF-1, mTOR, FOXO等19条通路。

2.5 葶苈大枣泻肺汤抗心衰核心化学成分的分析验证 为了进一步确认基于数据库及计算筛选得到的葶苈大枣泻肺汤中抗心衰活性成分的准确性,采用高分辨质谱分析对葶苈大枣泻肺汤中化学成分进行了分析验证。表2中网络药理学筛选的33

表 1 葶苈大枣泻肺汤关键靶标 KEGG 通路富集分析
Table 1 Enrichment analysis of key target KEGG pathway of Tingli Dazao Xiefeitang

信号通路	P	基因占比/%	数量/个
HIF-1 signaling pathway	5.88×10 ⁻¹²	43.48	10
FOXO signaling pathway	1.24×10 ⁻¹⁰	43.48	10
Proteoglycans in cancer	1.65×10 ⁻¹⁰	47.83	11
Prostate cancer	6.43×10 ⁻⁹	34.78	8
Hepatitis B	8.00×10 ⁻⁹	39.13	9
TNF signaling pathway	2.55×10 ⁻⁸	34.78	8
Thyroid hormone signaling pathway	4.21×10 ⁻⁸	34.78	8
Prolactin signaling pathway	6.39×10 ⁻⁸	30.43	7
Pathways in cancer	1.15×10 ⁻⁷	47.83	11
MAPK signaling pathway	6.13×10 ⁻⁷	39.13	9
Toll-like receptor signaling pathway	7.09×10 ⁻⁷	30.43	7
mTOR signaling pathway	8.44×10 ⁻⁷	26.09	6
ErbB signaling pathway	6.41×10 ⁻⁶	26.09	6
NOD-like receptor signaling pathway	2.58×10 ⁻⁵	21.74	5
Non-small cell lung cancer	2.58×10 ⁻⁵	21.74	5
AMPK signaling pathway	3.48×10 ⁻⁵	26.09	6
VEGF signaling pathway	3.63×10 ⁻⁵	21.74	5
T cell receptor signaling pathway	2.52×10 ⁻⁴	21.74	5
Ras signaling pathway	6.10×10 ⁻⁴	26.09	6
cGMP-PKG signaling pathway	1.42×10 ⁻³	21.74	5

个核心活性成分,计算各化合物的分子离子及其准分子离子的 *m/z*,对供试品分析数据进行靶向性的提取,在 $\delta < 10$ ppm 的条件下,并结合二级质谱信息,最终分析得到 18 个化合物,其中 6 个来源于大枣,

12 个源于葶苈子,主要包括山柰酚-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,异鼠李素-3,7-二-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,异鼠李素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,异鼠李素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷, isovanillic acid, uracil, sylvestrene, 4-戊烯酰胺, descurainin A, 山柰酚-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、橙黄胡椒酰胺乙酸酯等,见表 3,图 5。

2.6 分子对接分析 基于质谱分析验证的 18 个成分,在“药物-活性成分-关键靶点-通路”网络中选取 degree 值排名前 6 位的关键活性成分(其中 5 个源于葶苈子,1 个源于大枣),与其对应的靶标做分子对接。利用 AutoDock 对接以后,每个成分与其对应靶标按结合能值从小到大排列,发现每种成分与其对应的靶标都能较好的结合,其中结合能越低,表明构象越稳定,见表 4。最后利用 Pymol 软件,选取每个成分与其靶标对接的最佳构象进行可视化分析,直观的展现 6 个关键活性成分与其结合最稳定的靶标蛋白间的构象关系,见图 6。

3 讨论

“心衰”一词首见于宋陈师文之《圣济总录·心脏门》“心衰则健忘,不足则胸腹胁下与腰背引痛,惊悸,恍惚,少颜色,舌本强。”^[13]在《素问·逆调论篇》中有云:“若心气虚衰,可见喘息持续不已”及“夫不得卧则喘者,是水气之客也”,将心衰的病机阐述为心阳虚衰,水饮上泛^[14]。张仲景在《金匮要略》中写道:“支饮不得息,葶苈大枣泻肺汤主之”,“肺病,喘不得卧,葶苈大枣泻肺汤主之”。可见,葶苈大枣泻肺汤可从“支饮”这一范畴来治疗心衰^[15]。早在《本草纲目》中就有记载其疗效,而在现代医学实验研究中,可证明葶苈子具有强心的功效,甚至

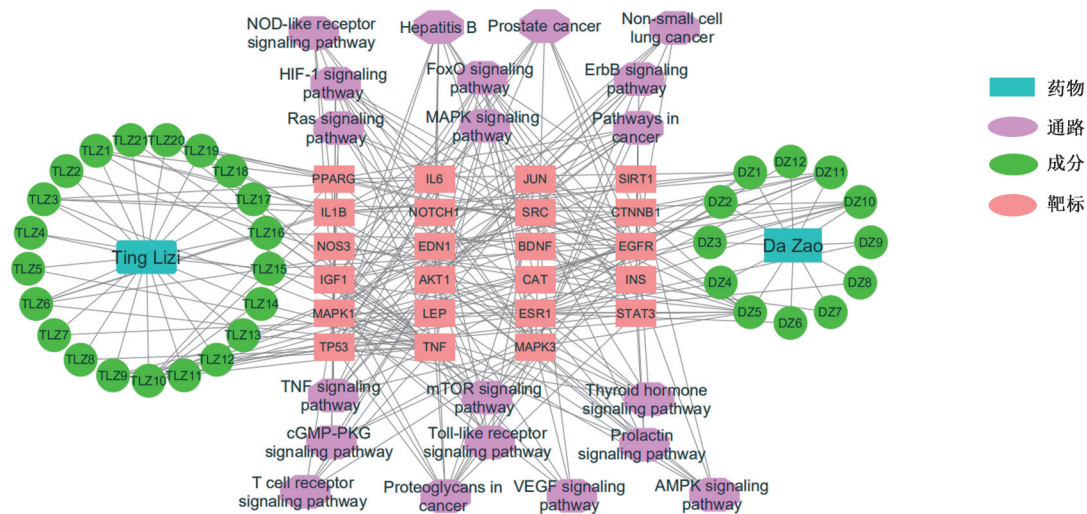


图 4 葶苈大枣泻肺汤中药物-活性成分-关键靶标-通路
Fig. 4 Network of drug-active component-key target-disease pathway of Tingli Dazao Xiefeitang

表2 葶苈大枣泻肺汤筛选出的活性成分

Table 2 Active ingredient of Tingli Dazao Xiefeitang

成分编号	成分名称	分子式	成分来源
DZ1	betulin(桦木醇)	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	大枣
DZ2	betulinic acid(白桦脂酸)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	大枣
DZ3	catharanthamine(长春花胺)	C ₄₆ H ₃₆ N ₄ O ₉	大枣
DZ4	maslinic acid(山楂酸)	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	大枣
DZ5	protoporphyrin(原卟啉)	C ₃₄ H ₃₄ N ₄ O ₄	大枣
DZ6	stepholidine(左旋千金藤啶碱)	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	大枣
DZ7	stigmasterol(豆甾醇)	C ₂₉ H ₄₈ O	大枣
DZ8	sylvestrene	C ₁₀ H ₁₆	大枣
DZ9	tauremisin	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	大枣
DZ10	ursolic acid(熊果酸)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	大枣
DZ11	vitamin B ₁₂ (维生素B ₁₂)	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	大枣
DZ12	vomifoliol(吐叶醇)	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	大枣
TLZ1	4-甲氧基芥子酸	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	葶苈子
TLZ2	山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-7-O-[(2-O-反式-芥子酰基)-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)]-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₅	葶苈子
TLZ3	4-戊烯酰胺	C ₅ H ₉ NO	葶苈子
TLZ4	cholesterol(胆固醇)	C ₂₇ H ₄₆ O	葶苈子
TLZ5	quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranose	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	葶苈子
TLZ6	thymine(5-甲基嘧啶)	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	葶苈子
TLZ7	uracil(尿嘧啶)	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	葶苈子
TLZ8	橙黄胡椒酰胺乙酸酯	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	葶苈子
TLZ9	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	葶苈子
TLZ10	槲皮素-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	葶苈子
TLZ11	槲皮素-7-O-β-龙胆双糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	葶苈子
TLZ12	南葶苈素A	C ₂₆ H ₂₄ O ₉	葶苈子
TLZ13	尿嘧啶核苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	葶苈子
TLZ14	山柰酚-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	葶苈子
TLZ15	山柰酚-7-O-β-龙胆双糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	葶苈子
TLZ16	山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	葶苈子
TLZ17	异鼠李素-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	葶苈子
TLZ18	异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	葶苈子
TLZ19	异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	葶苈子
TLZ20	异鼠李素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	葶苈子
TLZ21	异香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	葶苈子

注:成分标号同图4。

还有学者因其适应证可能是充血性心衰而将其归为强心药^[16]。在临床上,常常将葶苈大枣泻肺汤加味联合治疗慢性心衰,来提高疗效,为更全方位研究其对心衰的治疗,本文通过网络药理学借助多个生物信息学数据以及 Cytoscape, Autodock 等多个软件,构建 PPI 网络以及“药物-成分-靶标-通路”的网

络,来探究作用机制。

从图4可以看到,本研究中最终筛选到33个核心成分,23个蛋白靶标,以及对应的19条关键通路。在得到的23个关键蛋白靶标中,主要涉及SIRT1, IL1B, TNF, EGFR, AKT1等靶标。

其中,SIRT1是第3类组蛋白去乙酰化酶

表3 正离子模式下部分化合物的鉴定和数据归属

Table 3 Compound identification and attribution in positive ion models

No.	t_R /min	检测离子	实测值	理论值	δ	分子式	化合物	来源
1	0.63	[M+H] ⁺	137.131 8	137.132 5	-5.10	C ₁₀ H ₁₆	sylvestrene	大枣
2	1.40	[M+H] ⁺	113.034 1	113.034 6	-4.42	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	uracil(尿嘧啶)	葶苈子
3	1.48	[M+H] ⁺	169.048 9	169.049 6	-4.14	C ₈ H ₈ O ₄	异香草酸	葶苈子
4	3.13	[M+H] ⁺	100.075 0	100.075 7	-6.89	C ₅ H ₉ NO	4-戊烯酰胺	葶苈子
5	5.55	[M+H] ⁺	449.106 4	449.107 9	-3.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
6	5.69	[M+H] ⁺	641.165 8	641.171 2	-8.42	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	异鼠李素-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
7	5.73	[M+H] ⁺	328.152 8	328.154 4	-4.88	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	stepholidine(左旋千金藤啶碱)	大枣
8	7.40	M ⁺	480.144 2	480.141 5	5.62	C ₂₆ H ₂₄ O ₉	南葶苈素A	葶苈子
9	8.24	[M+H] ⁺	611.155 5	611.160 7	-8.51	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山柰酚-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
10	8.61	[M+H] ⁺	225.147 2	225.148 5	-5.77	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	vomifoliol(吐叶醇)	大枣
11	8.81	[M+Na] ⁺	603.129 3	603.132 0	-4.48	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-ara binopyranose	葶苈子
12	9.68	[M+H] ⁺	479.116 3	479.118 4	-4.38	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
13	9.68	[M+H] ⁺	479.116 3	479.118 4	-4.38	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	异鼠李素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
14	16.32	[M+H] ⁺	473.359 7	473.362 6	-6.13	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	maslinic acid(山楂酸)	大枣
15	17.78	M ⁺	456.356 4	456.359 8	-7.45	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	betulinic Acid(白桦脂酸)	大枣
16	17.78	M ⁺	456.356 4	456.359 8	-7.45	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	ursolic acid(熊果酸)	大枣
17	20.24	[M+H] ⁺	445.212 2	445.212 2	0.00	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	橙黄胡椒酰胺乙酸酯	葶苈子
18	24.94	M ⁺	638.182 7	638.184 1	-2.19	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷	葶苈子

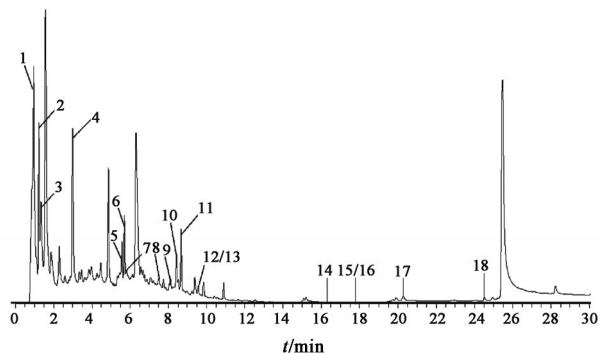


图5 葶苈大枣泻肺汤总离子流色谱(254 nm)

Fig. 5 TIC of Tingli Dazao Xiefeitang (254 nm)

Sirtuins 家族的重要成员,其在哺乳动物的心脏能够高度表达,通过 SIRT1 能够改善心肌细胞代谢,缓解心衰进程^[17],还能促进血管生成,调控心肌细胞钙离子,进而改善心衰^[18],因此近几年来被发展为治疗心衰的新型有效作用靶点。如尹新军等^[19]采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织中 SIRT1 的表达水平,发现与心衰模型组相比, SIRT1 激活剂在改善心衰的同时,大鼠血清中 IL-1β, TNF-α 水平能够明显降低,可见 SIRT1 可以通过抑制炎症水平,实现对心肌的保护作用,本研究分子对接结果提示葶苈大枣泻肺汤中的 Sylvestrene 对该靶标具有较好的结合作用;IL1B 可

以激活机体的免疫反应,在心衰形成时还会诱导心肌细胞肥大,与慢性心衰的发病机制息息相关^[20],如文献中基于大鼠心衰的模型,用 Western blot 测得在模型组中 IL1B 的表达水平远高于假手术组,且会随着心功能不全呈线性升高,而在辅以药物治疗以后,改善心衰的同时 IL1B 的表达又会降低,可见 IL1B 与心功能密切相关^[21],本研究分子对接结果提示葶苈大枣泻肺汤中的异香草酸对该靶标具有较好的结合作用;TNF 是炎症细胞因子的重要成员,其主要功能就是调节免疫细胞^[22],减轻心衰后自身免疫力下降带来的症状同时还能抑制心肌细胞代谢紊乱而造成心肌肥大的现象^[23],本研究分子对接结果提示葶苈大枣泻肺汤中的异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对该靶标具有较好的结合作用;文献研究表明,通过调节 EGFR 能够降低促炎因子的表达,抑制细胞凋亡^[24],如文献报道基于血管紧张素 II 诱导的心肌肥大模型,采用 Western blot 分析发现模型组 EGFR 高表达,而在使用 EGFR 抑制剂治疗后,心肌肥大相关指标及标志物均有明显改善,本研究分子对接结果提示葶苈大枣泻肺汤中的山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与 EGFR 具有较好的结合作用^[25];AKT1 在

表4 成分与对应靶标分子对接验证

Table 4 Verification results of molecular docking between components and corresponding targets

成分	靶标	结合能 /kJ·mol ⁻¹	来源
异香草酸	SIRT1	-25.52	葶苈子
	INS	-25.15	
	IL1B	-24.56	
	BDNF	-23.39	
	IL6	-19.87	
	TP53	-19.75	
	PPARG	-18.74	
sylvestrene	IL1B	-30.08	大枣
	LEP	-28.07	
	CAT	-24.73	
	ESR1	-23.60	
	IGF1	-23.47	
	EDN1	-21.21	
	南葶苈素 A	AKT1	
	SRC	-34.72	
	EGFR	-27.28	
山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	EGFR	-31.76	葶苈子
	TNF	-27.53	
异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷	TNF	-26.11	葶苈子
	EGFR	-18.12	
异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	TNF	-25.52	葶苈子

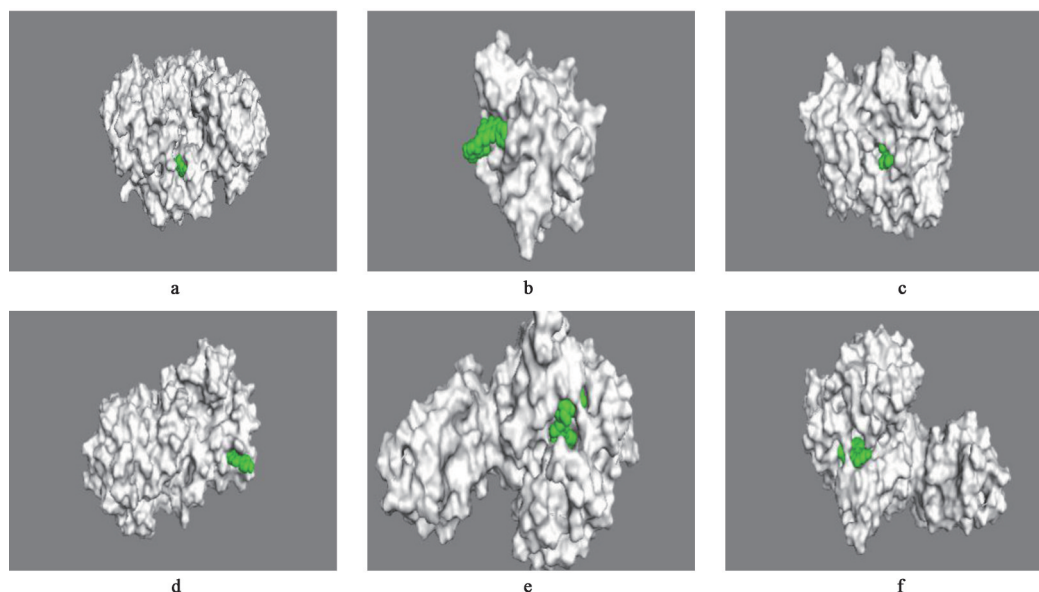
生物体内参与细胞凋亡和葡萄糖代谢等一些细胞过程, KAPUSTIAN 等^[26]在肌球蛋白诱导心肌炎的小鼠实验模型中, 采用 Western blot 证明了在心衰过程中, AKT1 的活性会下调, AKT1 与心功能存在密切关系, 并且有研究表明, 南葶苈子水提液可通过干预 AKT1-磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-mTOR 构成的信号通路, 抑制心肌细胞凋亡, 改善心衰大鼠的心室重构症状^[27], 本研究分子对接结果提示葶苈大枣泻肺汤中的南葶苈素 A 与 AKT1 具有较好的结合作用

质谱分析及分子对接验证结果显示, 异香草酸与 SIRT1 分子对接的结合能为 -25.52 kJ·mol⁻¹; Sylvestrene 与 IL1B 分子对接的结合能为 -30.08 kJ·mol⁻¹; 南葶苈素 A 与 AKT1 分子对接的结合能为 -34.89 kJ·mol⁻¹; 山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与 EGFR 分子对接的结合能为 -31.76 kJ·mol⁻¹; 异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与 TNF 分子对接后的结合能分

别为 -26.11 kJ·mol⁻¹ 和 -25.52 kJ·mol⁻¹。一般情况下, 结合能 < 0 均能说明成分与靶标能够自发结合, 当结合能 ≤ -20.92 kJ·mol⁻¹ 时, 说明成分与靶标结合良好, 对接的结合能越低, 说明结合越紧密, 所产生的生物效应越显著。以上成分与相应的关键靶标蛋白具有较好的结合活性, 从分子对接的角度验证了基于结构相似性的网络药理学预测结果。

基于高分辨质谱, 以网络药理学筛选得到的 33 个活性成分为目标, 对葶苈大枣泻肺汤进行分析, 共验证分析得到 18 个成分。其原因一方面是由于目标成分含量过低, 另一方面由于存在离子共流出、离子抑制等分析因素的影响, 导致目标化合物没有被全部检测到。在检测出来的 18 个成分中山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷等均为苷类成分, 体内水解后变成对应的苷元, 如山柰酚、异鼠李素、槲皮素等。大量研究表明, 这些成分对于心衰亦都有一定治疗作用, 例如: 槲皮素具有抗氧化应激、抑制炎症反应、抗癌等作用^[28-29], 它能够有效改善心肌损伤, 改善内皮细胞以及心功能的作用^[30-31]; 山柰酚对损伤组织具有保护作用^[32], 同时还具有抗癌、抗氧化^[33]等功效; 异鼠李素能够调节血管内皮细胞, 调节免疫, 抗炎, 抗氧化等作用^[34], 且近年来发现异鼠李素在心血管疾病治疗中扮演着越来越重要的角色, 体现在能抗动脉粥样硬化, 抑制心肌肥大等等作用上^[35]。

KEGG 通路分析结果表明, 葶苈大枣泻肺汤干预治疗心衰的过程中主要涉及 MAPK, HIF-1, mTOR, FOXO, TNF 等 19 条信号通路。其中, MAPK 信号通路是从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, 可以分为 4 个亚族, 其中的 p38 MAPK 信号通道是引起众多心肌纤维化因素的共同通路, 它与心室重构关系极为密切, 能够诱导心肌蛋白合成, 切断 p38 MAPK 通路可以抑制心肌肥大和增厚, 改善心功能^[36]; HIF-1, 是普遍存在于哺乳动物细胞内维持机体氧稳态的重要转录因子, HIF-1α 是 HIF 的调节亚基, 具有促血管新生、抗缺氧、改善代谢的功能^[37]。HIF-1 通过调节血氧利用、葡萄糖代谢、血管生成、组织重塑等过程, 在缺血性心脏病、心衰等心脏病理生理中起着关键作用^[38]; mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 有研究表明, 激活 mTOR 信号通路能够预防缺血再灌注损伤急性期所致的心肌损伤, 在缺血条件下, 通过 AMPK/mTOR 信号通路介导心肌细胞自噬, 起到心



a. 异香草酸与SIRT1; b. Sylvestrene与IL1B; c. 南葶苈素A与AKT1; d. 山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与EGFR; e. 异鼠李素-7-O-β-龙胆双糖苷与TNF; f. 异鼠李素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷与TNF

图6 关键活性成分与结合最稳定的靶标蛋白间的构象关系

Fig. 6 Conformational relationship between the key active components and most stable binding target proteins

肌保护作用^[39-40]。此外,FOXO1作为转录因子涉及炎症、细胞凋亡、线粒体功能障碍、氧化应激等多种生物功能,与糖尿病心肌病导致的心脏代谢、结构和功能的改变具有密切关系^[41-42]。总之,通路富集分析结果提示了葶苈大枣泻肺汤抗心衰的复杂作用机制。

综上所述,本文利用网络药理学、质谱分析、分子对接技术,对解析葶苈大枣泻肺汤抗心衰的有效成分及其作用机制进行研究,其结果对于指导临床精准用药以及葶苈大枣泻肺汤质量控制标志物的筛选以及抗心衰活性成分地发现提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 周喜丹. 葶苈子化学成分及饮片鉴别研究[D]. 北京:中国中医科学院,2015.
[2] 刘世军,唐志书,崔春利,等. 大枣化学成分的研究进展[J]. 云南中医学院学报,2015,38(3):96-100.
[3] 张珊珊. 王伟运用加味葶苈大枣泻肺汤治疗肺心病心衰的经验[J]. 广西中医药,2016,39(2):59-61.
[4] 王娟,马菁菁,王昱. 葶苈大枣泻肺汤治疗复发难治性肺结核疗效及对免疫功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2020,29(33):3730-3733.
[5] 郝轩轩,谢世阳,王幼平,等. 葶苈大枣泻肺汤对心肌梗死后大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(5):2649-2652
[6] 王晓,杨永生. 苓桂术甘汤合葶苈大枣泻肺汤治疗慢

性心衰(痰饮阻肺型)临床疗效观察[J]. 甘肃科技, 2019,35(22):132-134,168.
[7] ZHANG L Y, YI P F, GUO X, et al. Astragaloside IV inhibits the Inflammatory Injury of chicken type II pneumocytes induced by avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Inflammation, 2016, 39(5): 1660-1669.
[8] 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. 中国心力衰竭诊断和治疗指南2014 [J]. 中华心血管病杂志,2014,42(2):98-122.
[9] 司全金. 开拓慢性心力衰竭治疗新思路[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2020,22(10):1009-1011.
[10] 姜德绪,朱洪亮. 葶苈大枣泻肺汤治疗风心病心衰25例[J]. 陕西中医,1980(4):15-17.
[11] 龚昌杰,黄路梅,蔡霞,等. 葶苈大枣泻肺汤加减对慢性心力衰竭患者尿液白蛋白/肌酐比值及炎症因子的影响[J]. 现代生物医学进展,2013,13(2):327-330,400.
[12] 程吉成,曾传生,方紫艺. 加味葶苈大枣泻肺汤治疗心力衰竭疗效观察[J]. 四川中医,2020,38(6):96-98.
[13] 张艳,宫丽红,钱新红,等. 慢性心衰中医分期分级临床辨证体会[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(5):801-802
[14] 侯志涛,宋晓晨,宋丽颖,等. 基于网络药理学探讨强心胶囊治疗慢性心力衰竭的作用机制[J]. 世界中医药,2020,doi:11.5529.R.20201026.1439.010.
[15] 李彬,谢世阳,王新陆,等. 葶苈大枣泻肺汤治疗心力衰竭现状探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(2):238-240.

- [16] 王晴川,刘广芬,李常春. 播娘蒿种子(华东葶苈子)的强心作用、生物活性、吸收、蓄积及毒性反应[J]. 福建医学院学报,1964(Z1):27-33.
- [17] ARDEHALI H, SABBAB H N, BURKE M A, et al. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies [J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14(2):120-129.
- [18] 郭鑫,杨俊. SIRT1对心衰的保护作用研究进展[J]. 实用医学杂志,2013,29(11):1877-1878.
- [19] 尹新军,王贝贝,李新建,等. 白芍总苷调控Sirt1/Foxo1通路对慢性心力衰竭大鼠的保护作用研究[J]. 天津医科大学学报,2021,27(1):6-10.
- [20] 杨建峰,魏经汉. 慢性心力衰竭患者血清IL-1 β 、TNF- α 水平及临床意义[J]. 实用全科医学,2007(11):954-955.
- [21] LIU Q, WANG T, YU H, et al. Interaction between interleukin-1 beta and angiotensin II receptor 1 in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to progression of heart failure [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(11):870-875.
- [22] 任莉,王凯杰,宗阳. 以肿瘤坏死因子(TNF)为受体借助网络药理学和分子对接技术挖掘治疗新型冠状病毒肺炎的中药单体[J]. 中药药理与临床,2020, doi:10.13412/j.cnki.zyyl.20201110.007.
- [23] 常亮,徐璐,贾妍,等. 内脂素调节EGFR通路及其对心肌细胞肥大的影响[J]. 海南医学院学报,2020, doi:10.13210/j.cnki.jhmu.20200729.001.
- [24] 王雪,蒙臣,曾文,等. 表皮生长因子受体信号通路影响紧密连接的作用与机制研究进展[J]. 中国医药导报,2020,17(15):37-40.
- [25] PENG K, TIAN X, QIAN Y, et al. Novel EGFR inhibitors attenuate cardiac hypertrophy induced by angiotensin II [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3):482-494.
- [26] KAPUSTIAN L, KROUPSKAYA I, ROZHKO O, et al. Akt1 expression and activity at different stages in experimental heart failure [J]. *Pathophysiology*, 2014, 21(2):147-51.
- [27] 杨明,董竹琴,罗颖,等. 基于PI3K/Akt/mTOR信号通路研究南葶苈子水提液对心力衰竭模型大鼠心室重构的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2019,29(6):442-445,526.
- [28] 焦美,钟涵宇,陈克研,等. 槲皮素通过TGF β_1 /Smad3信号通路改善慢性心衰大鼠心肌纤维化[J]. 解剖科学进展,2020,26(4):391-395.
- [29] 李璐佳,李国文,谢燕. 光甘草定和槲皮素对乳腺癌细胞能量代谢的调控作用[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3786-3791.
- [30] KONDRATIUK V E, SYNYSIA Y P. Effect of quercetin on the echocardiographic parameters of left ventricular diastolic function in patients with gout and essential hypertension [J]. *Wiad Lek*, 2018, 71(8):1554-1559.
- [31] RICARD-BLUM S, BAFFET G, THÉRET N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68(9):122-149.
- [32] 雷晓青,陈鳌,刘毅,等. 山萘酚药理作用的研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2017,34(2):61-62.
- [33] 张锦,赵翠翠,韩维娜,等. 黄酮类化合物对心肌细胞凋亡的作用[J]. 中国药理学通报,2008,24(5):635-639.
- [34] 滕丹,栾新尧. 异鼠李素的药效学研究进展[J]. 中医临床杂志,2016,28(4):593-596.
- [35] 马悦,闫姗,南晓东,等. 异鼠李素的心血管药理作用研究进展[J]. 甘肃科技,2020,36(19):158-160.
- [36] 陈会君,李力恒,徐倩,等. 苏木乙酸酯提取物对慢性病毒性心肌炎小鼠心脏功能及心肌组织p38 MAPK mRNA的影响[J]. 中医药信息,2020(6):50-54.
- [37] 石秀娟,魏易洪,唐靖一,等. Hif-1 α 在中医药治疗心力衰竭中的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2020,38(1):118-121.
- [38] 陈斌,陶敏,康品方,等. 缺氧诱导因子-1 α 与心血管疾病的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2018,38(11):2788-2791.
- [39] AOYAGI T, KUSAKARI Y, XIAO C Y, et al. Cardiac TOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(1):H75-H85.
- [40] 杨资鉴,秦富忠. mTOR信号通路在缺血性心脏病中的研究进展[J]. 中国当代医药,2016,23(33):16-19.
- [41] 梁书秋,陶亚楠,李丹,等. 双酚A对小鼠睾丸间质细胞毒性及miR-203-3p和PI3K/AKT/FOXO1信号通路的影响[J]. 实用药物与临床,2020,23(7):584-588.
- [42] KANDULA V, KOSURU R, LI H, et al. Forkhead box transcription factor 1: role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15:44.

[责任编辑 顾雪竹]