

基于网络药理学的附子-淫羊藿药对治疗慢性心功能不全的作用机制

黄嘉滢, 马子霖, 程天翊, 周忠焱, 诸晨*, 唐靖一*
(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的:利用网络药理学探究附子-淫羊藿药对治疗慢性心功能不全的作用机制,并通过心肌细胞 H9c2 和斑马鱼模型进行验证。方法:TCMSP 采集搜索附子、淫羊藿的目标活性成分,UniProt 得到相对应的靶点基因。OMIM, GeneCards 获取与慢性心功能不全相关的靶点信息。Cytoscape 3.6.1 软件,生成靶点网络图。MetaScape 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)的分析,基因本体(GO)生物过程,分子功能,细胞组成,京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。建立心肌细胞 H9c2 缺氧复氧模型,噻唑蓝(MTT)法测定促增殖效果,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 B 淋巴细胞瘤-2 相关的 X 蛋白(Bax),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),蛋白激酶 B(PKB/Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),细胞外调节蛋白激酶(ERK),磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK),聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)蛋白表达。建立血管内皮生长因子酪氨酸酶抑制剂 II (VRI)诱导的斑马鱼节间血管损伤模型,验证促血管新生作用。结果:得到药对活性成分 28 个,209 个靶点,1 296 个疾病靶点,药对与疾病共同基因靶点 94 个。PPI 聚类提示药对可能通过细胞分化、细胞代谢、血管生成等途径干预慢性心功能不全。GO 富集提示药对可能通过改变细胞迁移,血管发育和生成等生物过程治疗慢性心功能不全。10 mg·L⁻¹ 的淫羊藿,10 mg·L⁻¹ 的药对能够促进 H9c2 的增殖($P<0.05$),10 mg·L⁻¹ 的药对能够上调 H9c2 的 Bcl-2, Bcl-2/Bax, PARP 的表达($P<0.05$),降低 Caspase-3, Akt, ERK 的表达($P<0.05$)。药对在 0.3, 0.1 g·L⁻¹ 的质量浓度下有明显的促血管新生的作用($P<0.05$)。结论:附子-淫羊藿药对可以通过提高 Bcl-2, PARP, 提高 Bcl-2/Bax 的比值,降低 Caspase-3, Akt, ERK 的表达,实现 H9c2 的缺氧条件下的促增殖作用,同时可以保护斑马鱼损伤的血管,从而通过多成分、多靶点、多途径的治疗慢性心功能不全。

[关键词] 网络药理学; 慢性心功能不全; 血管新生; 附子; 淫羊藿

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0142-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210711

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210318.1425.007.html>

[网络出版日期] 2021-3-18 16:52

Network Pharmacology-based Analysis on Mechanism of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium in Treatment of Chronic Heart Failure

HUANG Jia-ying, MA Zi-lin, CHENG Tian-yi, ZHOU Zhong-yan, ZHU Chen*, TANG Jing-yi*
(Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of the prescription consisting Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium in the treatment of chronic heart failure (CHF) based on network pharmacology, followed by verification in H9c2 myocardial cells with hypoxia-reoxygenation injury *in vitro* and in zebrafish with vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) tyrosine kinase inhibitor II (VRI) - induced vascular insufficiency. **Method:** The active ingredients in Aconiti Lateralis Radix Praeparata and

[收稿日期] 20201230(021)

[基金项目] 上海市中医药事业发展三年行动计划项目(ZY-(2018-2020)-FWTX-8001);中医药文化背景下的医养结合示范工程建设项目(A1-N19205010302);上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划项目(GWIV-28)

[第一作者] 黄嘉滢,在读硕士,从事中西医结合治疗心血管疾病研究,Tel:021-64385700,E-mail:jiaying_h@qq.com

[通信作者] *唐靖一,博士,主任医师,从事中西医结合治疗心血管疾病研究,Tel:021-64385700,E-mail:jingyi_drtang@163.com;

*诸晨,硕士,主治医师,从事中西医结合治疗心血管疾病研究,Tel:021-64385700,E-mail:sizhchm@126.com

Epimedii Folium were searched from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), the corresponding target genes from the Universal Protein Resource (UniProt), and the CHF-related targets from Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and GeneCards. Both the active ingredient-potential target network and the active ingredient-CHF-related target network were generated using Cytoscape 3.6.1, followed by the protein-protein interaction (PPI) network construction and Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) enrichment analysis based on MetaScape. H9c2 myocardial cells exposed to hypoxia-reoxygenation were selected for determining the proliferation-promoting effect by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), protein kinase B (PKB/Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2 (p-ERK1/2), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) was detected by Western blotting. The efficacy of the prescription in promoting angiogenesis was verified in a zebrafish model of VRI-induced vascular injury. **Result:** There were 28 active ingredients for the prescription, 209 corresponding targets, 1 296 CHF-related targets, and 94 common gene targets shared by the prescription and CHF. PPI network clustering suggested that Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium alleviated CHF by interfering with cell differentiation and metabolism and angiogenesis. GO analysis revealed that CHF relief was achieved via the intervention in such biological processes as cell migration, vascular development, and angiogenesis. Pharmacodynamic experiments verified that Epimedii Folium ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) alone and the prescription ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) both enhanced the proliferation of H9c2 myocardial cells under the hypoxia-reoxygenation condition ($P<0.05$), while the latter also increased the expression of Bcl-2, Bcl-2/Bax, and PARP ($P<0.05$) and reduced the expression of Caspase-3, Akt, and ERK ($P<0.05$). The prescription at the concentrations of 0.3 and 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ promoted angiogenesis ($P<0.05$). **Conclusion:** Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium exert the therapeutic effect against CHF via multiple ingredients, multiple targets, and multiple channels. Such combination promotes the proliferation of H9c2 myocardial cells under hypoxic condition and protects zebrafish from vascular injury by up-regulating the expression of Bcl-2 and PARP, increasing Bcl-2/Bax ratio, and down-regulating the expression of Caspase-3, Akt, and ERK.

[Key words] network pharmacology; chronic heart failure (CHF); angiogenesis; Aconiti Lateralis Radix Praeparata; Epimedii Folium

慢性心功能不全(CHF)是各种心血管事件的最終结果,是各种心脏异常的累积效应,最终导致心脏泵功能下降^[1]。心力衰竭在发达国家的患病率,占成年人口比例约为1%~2%,而75岁以上的老人,患病率则会急剧增加至 $\geq 10\%$ ^[2],65岁以上的患者心力衰竭已成为非择优住院的主要原因。在慢性心功能不全的治疗上,尽管西医进行了内服与手术并行治疗,但是仍然较难取得令人满意的疗效。据研究,充血性心力衰竭一年的总死亡率仍保持在16.5%^[3],显然中医中药治疗慢性心功能不全有着不可替代的优势。严世芸教授在长期的临床实践中,得出了治疗心力衰竭扶正固本的指导治则治法,并且总结除了诸多经验良方。其中,附子、淫羊藿出于严世芸教授的强心饮一方,附子辛热,壮肾之元阳,使水有所主,淫羊藿,暖补肾气,壮阳固本。

中药对于疾病的作用存在着多成分、多靶点、多途径的特点,而网络药理学利用了计算机数据库整合分析,从“成分-靶点-通路-机制-作用药效”的思路出发,能够全面地分析药物干预疾病发生发展的机制。现已明确,慢性心功能不全发生、发展的基本机制主要与心脏重塑有关,心肌、血管平滑肌、血管内皮细胞等发生一系列变化^[4]。基于中药治疗疾病的成分复杂,作用机制繁复,加大了药物研究和新药研发的工作量和难度。网络药理学通过从多个层面提取出药物的活性成分及其对应作用靶点,构建可视化网络,预测药物及复方的作用机制^[5],可以减少药物筛选的工作量,指导实验及临床更加有针对性的进行进一步深入研究。

因此本研究拟通过网络药理学的架构,建立附子-淫羊藿药对治疗慢性心功能不全的相关蛋白表

达及靶点网络,探究药物的作用机制和通路。并利用心肌细胞 H9c2 的缺氧复氧模型,用噻唑蓝(MTT)法测定附子-淫羊藿药对的促增殖作用,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)体外验证附子-淫羊藿药对对于B淋巴细胞瘤-2相关的X蛋白(Bax),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),蛋白激酶B(PKB/Akt),磷酸化蛋白激酶B(p-Akt),细胞外调节蛋白激酶(ERK),磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK),聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的表达,利用血管内皮生长因子酪氨酸酶抑制剂Ⅱ(VRI)诱导的斑马鱼节间血管损伤模型^[6],验证附子-淫羊藿药对对血管内皮生长因子(VEGF)的相关表达。为今后更加深入地探究中药复方治疗慢性心功能不全的作用机制以及临床的推广应用打下基础。

1 材料

熟附片(产地四川,批号181123),淫羊藿(产地内蒙古,批号2019051603)由上海中医药大学附属龙华医院中药房提供,经上海中医药大学附属龙华医院中药房副主任药师奚燕鉴定产地明确,药材均为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)规范。将药物用RO纯水浸没浸泡1h后,随着浸泡液一同,第一次加水至药物10倍量,熟附子煎煮2h,淫羊藿煎煮1h,附子-淫羊藿药对按照临床常用比例1:5的配比,过滤;第二次加水至药物8倍量,煎煮1h,过滤,两次的滤液浓缩至约1:1~1:2(mL:g),浓缩液制成冻干粉,溶于二甲基亚砜(DMSO)中,-20℃保存。高糖改良培养基(DMEM),胎牛血清,胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为8120360,42F4390K,2185855);聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶制备试剂盒(碧云天生物技术公司,批号122820210109),ELC超敏发光试剂盒(碧云天生物技术公司,批号P0018FS);兔抗Bcl-2,兔抗Bax,兔抗Caspase-3,兔抗GAPDH,兔抗p-Akt,兔抗Akt,兔抗p-ERK 1/2,兔抗ERK 1/2,兔抗PARP(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为2870s,2772s,9665s,5174P,2965s,4685s,4370S,4695s,9532s);Anti-Rb 2nd(Biosharp,批号BL003A);Marker(美国Thermo公司,批号26616);TriPure™ Isolation Reagent(瑞士Roche/Sigma公司,批号11667165001);VRI(德国Calbiochem公司,批号676481-5MG)溶解于DMSO中,并配制为浓度100 mmol·L⁻¹, -20℃储存。

内皮细胞标记绿色荧光的转基因斑马鱼 Tg

(fli-1a:EGFP)^[1],由上海中医药大学附属龙华医院斑马鱼实验室提供,实验符合动物伦理要求。心肌细胞 H9c2(购自中科院细胞库)

SMZ18型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司),HERAcell 240 i型28.5℃培养箱(德国Heraeus公司),TPM10000型移液器(Eppendorf公司),3524型24孔板(美国Corning公司),430720型细胞培养瓶(美国Corning公司),BB15型37℃培养箱(德国Heraeus公司),SZ51型显微镜(日本Olympus公司),infinite 200Pro型酶标仪(美国Thermo公司),PowerPac HC型电泳仪和PowerPac Basic型转膜仪(美国Bio-Rad公司),Optronix型缺氧工作站(英国Oxford公司),MIKRO 200R型冷冻离心机(德国Hettich公司)。

2 方法

2.1 附子、淫羊藿化学成分收集、活性成分的筛选和潜在靶点预测 采集选用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[7],查找搜索附子、淫羊藿的全部化学成分,限制条件以口服生物利用度(OB)≥30%^[8],类药性(DL)≥0.18^[9]进行筛选,得到附子、淫羊藿的目标活性成分。再利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[10]将TCMSP预测的附子、淫羊藿活性成分的靶点蛋白与其对应的靶点基因名称(人源)进行转换。

2.2 慢性心功能不全的疾病靶点收集 采用“chronic heart failure”作为关键词,检索人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>),GeneCards(<http://www.genecards.org/>)^[11-12]数据库,获取与慢性心功能不全相关的靶点信息。

2.3 活性成分-潜在靶点网络和活性成分-慢性心功能不全疾病靶点网络构建和分析 将附子、淫羊藿活性成分的靶点基因信息导入Cytoscape 3.6.1软件,生成附子、淫羊藿活性成分-潜在靶点网络。在活性成分-潜在靶点网络的基础上,进一步与慢性心功能不全疾病靶点进行对比,生成活性成分-慢性心功能不全疾病靶点网络。

2.4 药物疾病重合靶点的蛋白相互作用(PPI)网络构建 利用MetaScape数据库^[13](<https://metascape.org/>),将活性成分和疾病的重合靶点进行PPI分析,以κ=0.3作为阈值,得到PPI网络的聚类模块,直观地展现出靶点之间的相互作用。

2.5 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 利用

MetaScape 数据库^[13] (<https://metascape.org/>), 导入药物疾病重合靶点后, 分别进行 GO 生物过程(BP), GO 分子功能(MF), GO 细胞组成(CC), KEGG 通路富集分析(KEGG Pathway), 参数定为 Min Overlap=3, $P_{\text{value}} \text{ Cutoff}=0.01$, Min Enrichment=1.5。

2.6 体外心肌细胞 H9c2 验证

2.6.1 心肌细胞 H9c2 的培养和传代 H9c2 细胞培养于 25 cm² 培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱, 待细胞长至 80% 融合时, 使用胰蛋白酶消化传代, 平均 3 d 传代 1 次。用 MTT 法检测的细胞, 接种于 96 孔板; 用于蛋白收集的细胞接种于 55 cm² 细胞培养皿中, 接种密度为 1×10⁵ 个/mL, 培养 2 d, 细胞长至 70%~80% 换液后进行处理。

2.6.2 细胞的处理及分组 心肌细胞 H9c2 分为空白组, 缺氧复氧组(模型组), 附子提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹), 淫羊藿提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹), 附子-淫羊藿药对提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹)。空白组将心肌细胞 H9c2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 于 37 °C, 20% O₂, 5% CO₂ 中培养。模型组将心肌细胞 H9c2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 待细胞融合度达 70%~80% 时, 将含有 10% 血清的 DMEM 培养液更换为无血清无糖 DMEM 培养基, 置于低氧工作站中(1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) 中进行缺氧培养 14 h。取出细胞, 去掉培养液, 重新加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 于 37 °C, 20% O₂, 5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 即完成 H9c2 细胞缺氧复氧模型。附子提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹), 淫羊藿提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹), 附子-淫羊藿药对提取物组(0.1, 1, 10 mg·L⁻¹), 加入无血清无糖 DMEM 培养基时将提取物稀释成各浓度加入 H9c2 细胞中, 其余同模型组。

2.6.3 MTT 法测定附子-淫羊藿的促增殖效果 将细胞悬液以 100 个/μL 的浓度, 再以每孔 100 μL 的量种于 96 孔板中, 按 2.6.2 项下方法处理后抽去各孔的旧培养液, 用 0.5% 的 DMEM 培养液稀释 5% 的 MTT 溶液至 1% 的浓度。每孔加入 1% MTT 100 μL, 37 °C, 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 4 h, 随后抽去 MTT 溶液, 并加入 DMSO 100 μL 至每孔中。将培养板放置摇床上避光震荡 15 min, 等完全溶解后, 用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度 A。

2.6.4 Western blot 测定蛋白表达 选取 2.6.3 项中得出结果的有效药物提取物组, 将细胞悬液以 1×10⁵ 个/mL 的浓度种于 55 cm² 细胞培养皿中, 按 2.6.2 项下方法处理后, 抽去各皿的旧培养液, 用置于 4 °C

的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液 100 μL, 使用细胞刮刀将细胞刮下, 加入离心管中, 使用 4 °C 预冷的离心机, 离心半径 6 cm, 转速 12 000 r·min⁻¹, 离心 15 min, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量定为 20 μg, 用裂解液配平各组蛋白浓度, 按照蛋白样品-上样缓冲液 4:1 制备蛋白上样样品, 95 °C 水浴加热 7 min, 使蛋白充分变性。配制 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 分离胶和 5% 的 SDS-PAGE 浓缩胶, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 电压 80 V 电泳 40 min 待 Marker 完全分层后, 120 V 继续电泳 1 h, 转膜恒流 250 mA 1 h, 取出 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 4 h, 用磷酸盐吐温缓冲液(PBST) 洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min, 一抗 GAPDH, Bax, Bcl-2, Caspase-3, p-Akt, Akt, p-ERK 1/2, ERK 1/2, PARP (1:1 000) 4 °C 孵育过夜(12~15 h)。第二天取出, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min 后, 于二抗(1:1 000) 室温孵育 2~3 h, 使用 ELC 发光法显影, 用 Image J 计算条带灰度值, 实验重复 3 次。

2.7 对斑马鱼节间血管损伤模型的保护作用药效验证

2.7.1 斑马鱼的饲养 参照 *The Zebrafish Book*^[14] 标准, 斑马鱼的养殖和繁殖在全封闭循环系统进行, 鱼房内光照/黑暗(自动计时器保持 14 h 光照/10 h 黑暗交替循环), 室内温度, 水温, pH, 电导率以及各项水质指标均符合饲养要求, 每日定时 2 次喂食成鱼粮及丰年虾。

2.7.2 斑马鱼的准备 选择品种为内皮细胞标记绿色荧光的转基因斑马鱼 Tg(fli-1a:EGFP)^{yl}, 同一生产日期的健康成熟斑马鱼按雌雄 2:1 的比例放入交配用鱼缸中, 于次日上午 9 点抽取隔板, 2 h 后收集雌雄斑马鱼交配产下的受精胚胎, 经清洗后, 加入胚胎培养液, 放入 28.5 °C 的培养箱中培养。

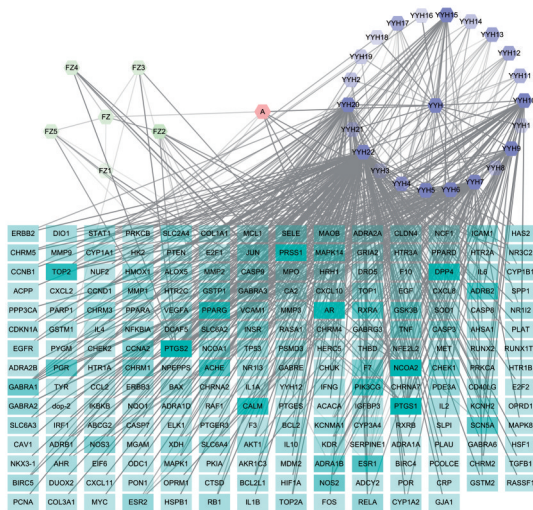
2.7.3 VRI 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型的建立和附子-淫羊藿药对的给药干预 选择状态良好, 受精 20 h 的转基因斑马鱼, 将其放入加入培养液的 24 孔板中, 每孔放入 8~10 条。以建立诱导血管损伤稳定模型的 VRI 浓度为培养液干预 4 h, 采用 3 倍浓度梯度稀释法, 分别加入质量浓度为 0.3, 0.1, 0.03 g·L⁻¹ 的附子-淫羊藿药对的溶液为培养液, 并设不加入 VRI 的培养液为空白组, 仅加入 VRI 的培养液为模型组, 放入 28.5 °C 的培养箱中。培养至约受精 48 h 后, 在荧光倒置显微镜下观察斑马鱼的状态, 并统计斑马鱼节间血管指数(ISV index)=完整

血管数×1+不完整血管数×0.5。

2.8 统计方法 采用SPSS 24.0统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,数据不符合正态分布则采用秩和检验,用中位数(四分位间距)表示。各组实验数据统计时,以对照组为基准归一。

3 结果

3.1 附子-淫羊藿的活性成分及预测靶点的网络构建 通过TCMSP查找搜索到附子的化合物共65个,筛选后共21个,活性成分6个。淫羊藿化合物共130个,筛选后共23个,活性成分22个,附子、淫羊藿共有成分1个谷甾醇。组方共有209个靶点(去重后),共有成分靶点3个。附子-淫羊藿活性成分靶点网络,总共包含238个节点,511条边,见图1。



绿色六边形.附子的活性成分;紫色六边形.淫羊藿的活性成分;湖蓝色矩形.靶点;透明度渐变表示节点度值的不同.颜色越深度值越大

图1 附子-淫羊藿活性成分潜在靶点网络

Fig. 1 Network diagram of potential targets of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium active components

3.2 附子-淫羊藿活性成分慢性心功能不全疾病靶点网络构建 OMIM得到慢性心功能不全疾病靶点428个, GeneCards得到慢性心功能不全疾病靶点1 296个,去重后的疾病靶点为1 296个。利用韦恩图得到附子-淫羊藿药对和慢性心功能不全的共同基因靶点94个。94个基因对应的活性成分共22个,附子4个,淫羊藿17个,1个共有成分谷甾醇。再通过Cytoscape 3.6.1软件作出附子-淫羊藿活性

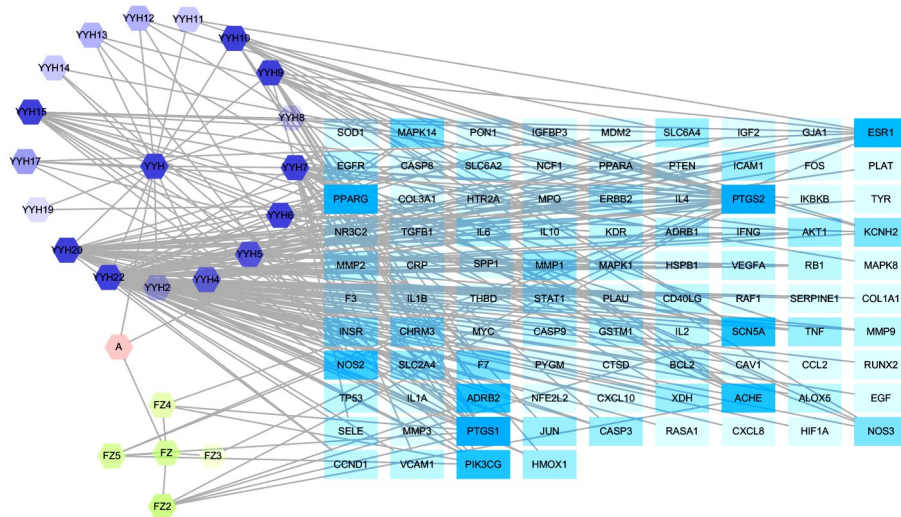
成分慢性心功能不全疾病靶点网络图,其中节点数118个,边253条,见图2。对图2进行拓扑分析,将度值>10的活性成分进行筛选,得到7个活性成分,分别为MOL000098,水黄皮素79个靶点;MOL000006,木樨草素33个靶点;MOL004391,8-(3-甲基丁-2-烯基)-2-苯基色酮[8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone]14个靶点;MOL004380,2,7-二氢高刺桐春(11个靶点;MOL004373,脱水淫羊藿素(anhydroicaritin)15个靶点;MOL000422,山柰酚29个靶点;MOL003542,8-异戊烯基山柰酚11个靶点,这些活性成分可能对于治疗慢性心功能不全有着重要的作用。

3.3 附子-淫羊藿活性成分慢性心功能不全疾病靶点的PPI网络构建 PPI网络去除游离节点后,有88个节点,461条边,见图3。对上述节点的度值取平均值为10.47,其中排名前三的V-Jun肉瘤病毒癌基因同源物(JUN)度值为40,促分裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)度值为39,表皮生长因子受体(EGFR)度值为33,对PPI网络提取类簇,将所有得到的类簇按照基因功能的 $-\lg P$ 排序,排名前三的是GO:0001568血管发育(33.3);GO:0030335细胞迁移正调控(32.5);GO:2000147细胞运动正调控(31.9),提示附子-淫羊藿药对可能通过这些途径干预慢性心功能不全。

以kappa值=0.3作为阈值,得到PPI网络的5个聚类模块,结果见图4,提示附子、淫羊藿可能通过细胞分化、细胞代谢、血管生成等途径干预慢性心功能不全的发生发展。见表1。

3.4 GO功能富集分析和KEGG通路富集分析 利用MetaScape数据库分别对GO生物过程,GO细胞组成,GO分子功能进行富集分析,按 $-\lg P$ 排名取前20,提示附子、淫羊藿可能通过细胞迁移、细胞成分运动正调控,细胞黏附调节,血管形态、发育和生成,对脂多糖、细菌源分子、营养水平、有毒物质、活性氧自由基的应答等生物过程干预慢性心功能不全的发生发展;可能通过改变膜筏、膜微区、膜区、小窝、质膜筏等细胞组成改善慢性心功能不全;可能通过结合蛋白质结构域,转录因子,蛋白磷酸酶,生长因子,整合素,RNA聚合酶II转录因子等调节分子功能、通过影响细胞因子活性、受体配体活性、受体调节活性、蛋白质同源二聚活性、丝氨酸水解酶活性、内肽酶活性等调节分子功能,治疗慢性心功能不全。

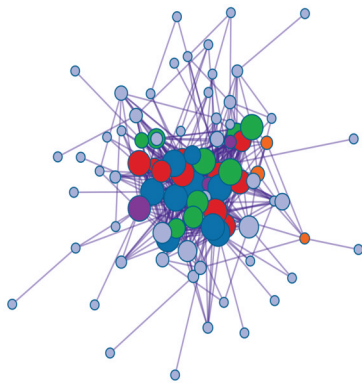
利用MetaScape数据库对KEGG通路进行富集



绿色六边形.附子的活性成分;紫色六边形.淫羊藿的活性成分;蓝色矩形.附子淫羊藿活性成分与CHF疾病共同靶点;透明度渐变表示节点度值的不同.颜色越深度值越大

图 2 附子-淫羊藿活性成分慢性心功能不全疾病靶点网络

Fig. 2 Common target network diagram of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium active component and chronic heart failure disease



红色.MCODE1;蓝色.MCODE2;绿色.MCODE3;紫色.MCODE4;橙色.MCODE5;圆形节点的大小表示度值的大小,圆形节点的颜色表示其集群身份,(即相同颜色的节点属于同一个集群)

图 3 附子-淫羊藿 CHF 核心靶点网络 PPI

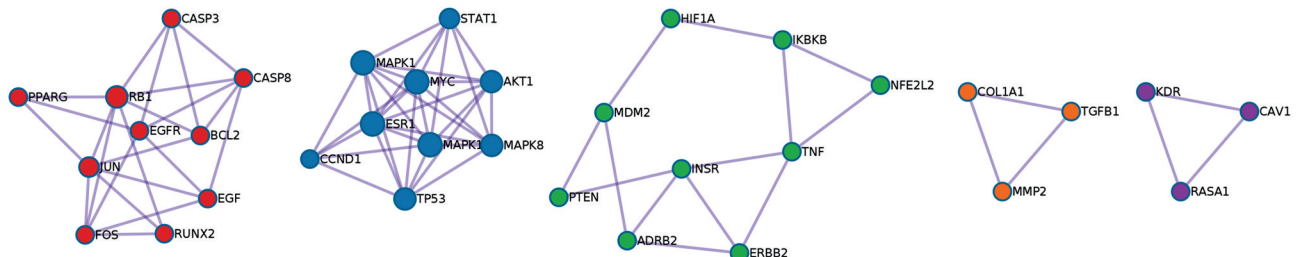
Fig. 3 Core target network PPI of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium-CHF

分析,结果显示,附子、淫羊藿组方可能参与调节 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬

化、癌症的通路,IL-17 信号通路, TNF 信号通路, MAPK 信号通路等通路。

3.5 附子-淫羊藿对心肌细胞 H9c2 模型组促增殖结果及相关蛋白表达

3.5.1 附子-淫羊藿对心肌细胞 H9c2 模型组促增殖结果 MTT 结果显示,缺氧复氧模型组与空白组相比差异具有统计学差异 ($P < 0.05$),表明心肌细胞 H9c2 A/R 模型造模成功。附子在 $0.1, 1, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 淫羊藿在 $0.1, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 附子-淫羊藿药对在 $0.1, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下与 A/R 组相比,没有统计学差异。淫羊藿在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 附子-淫羊藿药对在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下与模型组相比具有统计学差异 ($P < 0.05$),并且附子-淫羊藿药对在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下较淫羊藿 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有上升的趋势。因此选用附子-淫羊藿药对在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下进行 Western blot 实验。见表 2。



红色.MCODE1;蓝色.MCODE2;绿色.MCODE3;紫色.MCODE4;橙色.MCODE5

图 4 基于 MCODE 的附子-淫羊藿 CHF 基因相互作用的模块

Fig. 4 Interaction module of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium-CHF-gene based on MCODE

表1 附子-淫羊藿-CHF聚类分析

Table 1 MCODE of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium-CHF

类簇	类簇中包含的靶点	MCODE 评分/分	类簇主导的基因功能 TOP 3(按-IgP 排序)
MCODE1	FOS, BCL2, EGFR, JUN, 成骨细胞特异性转录因子2(RUNX2), EGF, CASP8, CASP3, RB1, PPARG	2.3	GO:0002521 白细胞分化(10); GO:0071496 细胞对外界刺激的应答(9.1); GO:0070997 神经元死亡(9.1)
MCODE2	AKT1, MAPK1, ESRI, MYC, TP53, MAPK14, MAPK8, CCND1, STAT1	3.6	GO:0009411 对紫外线的应答(9.4); GO:0009314 对辐射的应答(8.9); GO:0050673 上皮细胞增殖(8.8)
MCODE3	PTEN, IKKBK, NFE2L2, INSR, MDM2, 肾上腺素能受体β2(ADRB2), HIF1A, TNF, ERBB2	1.4	GO:0031331 细胞分解代谢过程的正调节(11.5); GO:0009896 分解代谢过程的正调节(11.0); GO:0071417 细胞对有机氮化合物的反应(8.1)
MCODE4	Ras p21 蛋白活化子1(RASA1), 血管内皮细胞生长因子受体2(KDR), CAV1	1	GO:0001570 血管生成(7.6); GO:0048514 血管形态发生(4.8); GO:0030155 细胞粘附调节(4.7)
MCODE5	I 型胶原α1 蛋白(COL1A1), 基质金属蛋白酶2(MMP2), 转化生长因子β1(TGFB1)	1	GO:0032963 胶原蛋白代谢过程(7.2); GO:0030198 细胞外基质组织(5.5); GO:0001503 骨化(5.5)

表2 附子-淫羊藿对心肌细胞 H9c2 A/R 模型促增殖作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effects of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium on proliferation of H9c2 A/R model ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白		0.58±0.02
模型		0.15±0.02 ¹⁾
附子	0.1	0.15±0.01
	1	0.15±0.01
	10	0.15±0.01
	10	0.15±0.01
淫羊藿	0.1	0.17±0.01
	1	0.17±0.02
	10	0.22±0.03 ²⁾
附子-淫羊藿药对	0.1	0.19±0.05
	1	0.18±0.03
	10	0.29±0.04 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.0001$,与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

3.5.2 附子-淫羊藿药对对 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Akt, ERK, PARP 蛋白表达的影响 网络药理学预测, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Akt 可能是附子-淫羊藿治

疗慢性心功能不全的重要靶点,对细胞运动和增殖起着重要的作用。与空白组相比,模型组在 Bcl-2, Bcl-2/Bax, PARP 的表达上有明显的降低($P<0.05$),在 Caspase-3, p-Akt/Akt, p-ERK/ERK 的表达上有明显的升高($P<0.05$),在 Bax 的表达上无明显差异。与模型组相比,附子-淫羊藿药对组 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下在 Bcl-2, Bcl-2/Bax, PARP 的表达上有明显的升高($P<0.05$),在 Caspase-3, p-Akt/Akt, p-ERK/ERK 的表达上有明显的降低($P<0.05$),在 Bax 的表达上无明显差异。见表3,图5。

3.6 附子-淫羊藿药对对 VRI 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型的保护作用药效验证 根据网络药理学预测,血管形态、发育和生成的生物过程可能是附子-淫羊藿药对干预慢性心功能不全的发生发展的重要途径,见图6,表4。结果, VRI 在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下与空白组相比,节间血管数明显减少($P<0.05$),说明 VRI 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型造模成功。附子-淫羊藿药对在 $0.3, 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下与模型组相比,节间血管数有显著增加($P<0.05$),在 $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下没有显著效果,但存

表3 附子-淫羊藿对 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Akt, ERK, PARP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effects of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Akt, ERK, PARP ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/Bax	Caspase-3/GAPDH	p-Akt/Akt	p-ERK/ERK	PARP/GAPDH
空白	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.0±0.00	1.00±0.00
模型	0.54±0.07 ¹⁾	0.79±0.05	0.69±0.07 ¹⁾	2.17±0.18 ¹⁾	2.02±0.09 ²⁾	1.44±0.26 ¹⁾	0.30±0.03 ²⁾
附子-淫羊藿药对($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.54±0.16 ⁴⁾	0.92±0.09	1.72±0.28 ³⁾	1.8±0.18 ⁵⁾	0.85±0.25 ³⁾	0.6±0.21 ⁴⁾	0.66±0.05 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$,⁵⁾ $P<0.001$ 。

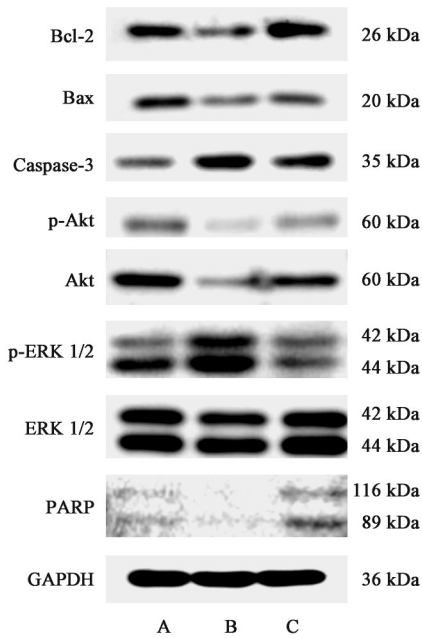
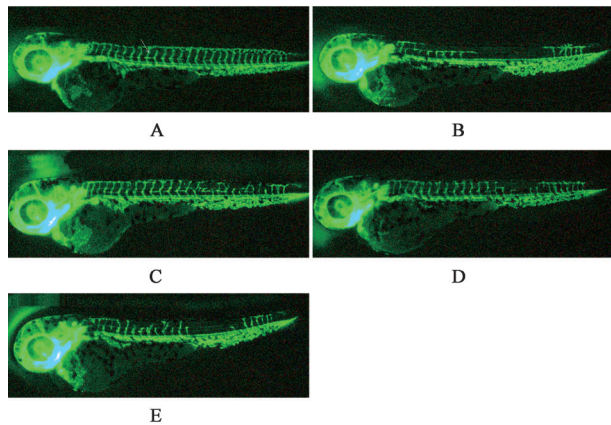


图5 附子-淫羊藿对 Bcl-2, Bax, Caspase-3, p-Akt, Akt, p-ERK 1/2, ERK 1/2, PARP 的电泳表达

Fig. 5 Effects of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium on the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, p-Akt, Akt, p-ERK 1/2, ERK 1/2, PARP

在增加的趋势,作用效果呈剂量依赖。



A.空白组;B.模型组;C,D,E.附子-淫羊藿药对0.3,0.1,0.03 mg·L⁻¹组
图6 附子-淫羊藿药对对 VRI 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型的药效荧光

Fig. 6 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium in VRI - induced zebrafish ISV

4 讨论

中医学治疗心力衰竭历史悠久,虽然中医中没有明确的与慢性心功能不全对应的病名,但由于慢性心功能不全的患者症状多表现为胸闷心慌、乏力、呼吸困难、咳嗽、咳痰、喘憋、水肿等症,故中医归属于“心悸”“喘证”“心胀”“心水”“水肿”等病证范畴^[15]。制附子作为《伤寒论》中的特色饮片,为补

表4 附子-淫羊藿药对对 VRI 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型的保护作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Protective effects of Aconite and Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Epimedii Folium in VRI - induced zebrafish ISVs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	VRI 浓度 /nmol·L ⁻¹	质量浓度 /mg·L ⁻¹	ISV index/%
空白			100.00±0.00
模型	100	-	48.08±2.67 ¹⁾
附子-淫羊藿药对	100	0.3	81.33±2.43 ²⁾
	100	0.1	74.01±1.31 ²⁾
	100	0.03	52.50±4.63

注:与空白组比较¹⁾ P<0.01,与模型组比较²⁾ P<0.01。

命门真火之要药^[16],作为《伤寒论》中治疗心衰的经典方真武汤的君药,附子以大辛大热之力,承温煦脾土之功,心衰阳虚水犯则憋喘肿胀,附子补火助阳,气化则水行。实验研究表明,制附子中含有的消旋去甲乌药碱,有肾上腺素β-受体兴奋作用^[17]。同时在临床研究中,附子可以通过降低血清 NO, IL-1β 水平,从而抑制炎症细胞因子^[18],拮抗心脏缺血缺氧,增强窦房结的兴奋性,增加冠状动脉流量,降低周围血管阻力,从而治疗慢性心功能不全^[19]。中医理论认为,淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效^[20]。淫羊藿的主要成分有多糖、生物碱、黄酮类化合物等^[21]。实验研究表明,主要活性成分之一的淫羊藿苷,可以通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,刺激促肾上腺皮质激素的释放,从而扩张外周血管^[22],于多个环节干预炎症介质、黏附分子和前炎症细胞因子等^[23]。

本实验通过网络药理学预测,附子、淫羊藿组方的核心作用靶点可能是 JUN, MAPK1, EGFR, TP53, MYC, AKT1 等,核心团簇作用的机制可能通过细胞分化、细胞代谢、血管生成等途径干预慢性心功能不全的发生发展。因此选用 VRI 诱导的 Tg (fli-1a; EGFP)^{y1} 斑马鱼血管损伤模型及心肌细胞 H9c2 的缺氧复氧模型分别从体内体外验证附子、淫羊藿组方的作用机制。结果表明附子、淫羊藿组方对 Tg (fli-1a; EGFP)^{y1} 斑马鱼的血管损伤具有保护作用,通过提高 Bcl-2, PARP 的表达,提高 Bcl-2/Bax 的比值,降低 Caspase-3, p-Akt/Akt, p-ERK/ERK 的表达,实现心肌细胞 H9c2 的缺氧条件下的促增殖作用。

斑马鱼由于高繁殖力、外部受精、幼虫的透明性以及蛋白质编码与疾病相关基因和人类高度相

似等优势,成为了研究人类疾病较为典型的模型^[24]。斑马鱼 Tg(fli-1a:EGFP)^{y1} 的荧光表达可以直观地观察到药物对血管内皮生长因子 VEGF-VEGFR 信号通路的作用^[25]。慢性心功能不全缺血缺氧的一系列表现,恰好是 VEGF 及其受体(VEGFR)表达的诱因。现已证实,VEGF 作用于血管内皮上的受体,激活下游信号通路,起到抗炎、抗心肌细胞凋亡、促血管新生等多方面的作用^[26]。VEGF 分为 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFD, PIGF; 其中 VEGF-A 主要结合在 VEGFR-1 和 VEGFR-2, VEGFR-2 通过调节内皮细胞实现血管的增殖、迁移从而促进血管生成^[27], 继而改善心室重构, 治疗慢性心功能不全。研究表明上调的 VEGF 激活下游 PI3K-AKT 的信号通路, 磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1) 和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-2(PDK2) 促使蛋白激酶 B(Akt) 完全被激活, 继而被磷酸化的 AKT 可以调控相关死亡启动子(BAD), Bax, Bcl-2, 调节细胞的增殖、凋亡、分化以及迁移等^[28], 另一方面被磷酸化的 Akt 分别通过 mTORC2 和 FOXO1 促进内皮细胞增殖和血管新生^[29]。

同时, 上调的 VEGF 也会通过蛋白激酶 C(PKC) 激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 信号通路。MAPK 是信号从细胞表面转导到细胞内部的重要传递者, 在生长增殖、细胞分化、细胞运动中起着重要的作用。MAPK 接收 MKK 和 MKKK 的活化信号而被激活, 表现为逐级磷酸化。哺乳动物中, 下级的 ERK 广泛存在于各种组织, 参与细胞的增殖分化的调控。多种生长因子受体、营养相关因子受体等都需要 ERK 的活化来完成信号转导过程^[30]。Caspase 是能够引起细胞凋亡, 引起凋亡蛋白酶的级联反应。其中 Caspase-3 可以直接降解细胞内的结构蛋白和功能蛋白, 引起凋亡。被激活的 Caspase-3 促进死亡底物的裂解, 如聚 ADP-核糖聚合酶(PARP), DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK), P21 激活激酶 1(PAK1) 等, 从而诱导细胞凋亡^[31]。

综上所述, 本研究利用了网络药理学的方法, 初步研究了附子、淫羊藿组方治疗慢性心功能不全的作用机制, 并且挖掘了更多潜在的靶点, 为今后治疗慢性心功能不全的实验研究指导了方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会. 心力衰竭合理用药指南(第2版)[J]. 中国医学

前沿杂志:电子版, 2019, 11(7):1-78.

- [2] Mosterd A, Hoes A W. Clinical epidemiology of heart failure[J]. Heart (British Cardiac Society), 2007, 93(9):1137-1146.
- [3] DOKAINISH H, TEO K, ZHU J, et al. Global mortality variations in patients with heart failure: results from the International Congestive Heart Failure (INTER-CHF) prospective cohort study [J]. Lancet Glob Health, 2017, 5(7):e665-e672.
- [4] 陈佳斌, 秦佳枫, 赵钢. 慢性心力衰竭的中西医发病机制及其治疗进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(3):378~380.
- [5] 翁洁琼. 基于网络药理学优化的三阴方干预 EMT 抑制三阴乳腺癌转移机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [6] 周忠焱, 赵外荣, 范竹鸣, 等. 通阳活血方在内皮细胞及斑马鱼模型上促血管新生作用及其机制的研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(12):2868-2870.
- [7] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6(1):13.
- [8] TIAN S, WANG J, LI Y, et al. Drug-likeness analysis of traditional Chinese medicines: Prediction of drug-likeness using machine learning approaches [J]. Mol Pharma, 2012, 9(10):2875-2886.
- [9] TAO W Y, WANG X, LI B H, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1):1-10.
- [10] Consortium U P. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D506-D515.
- [11] LEE C M, BARBER G P, CASPER J, et al. UCSC Genome Browser enters 20th year [J]. Nuclc Acids Res, 2020, 48(D1):756-761.
- [12] Calabrese Calabrese, Davidson NR, Demirciolu D, et al. Genomic basis for RNA alterations in cancer [J]. Nature, 2020, 578(7793):129-136.
- [13] ZHOU Y, ZHOU B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):615-621.
- [14] WESTERFIELD M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish [M]. Eugene: University of Oregon Press, 1989.
- [15] 张艳, 礼海, 王彩玲. 浅谈慢性心衰中医病名病机研

- 究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1547-1548.
- [16] 贺亚男, 陈露梦, 黄伟, 等. 微波炮附子炮制工艺影响因素研究[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3157-3164.
- [17] 聂玉雯, 陈华峰, 罗瑜, 等. 益气温阳法辅治正常甲状腺功能病态综合征疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2020, 36(7): 908-909.
- [18] 张丽琴. 基于相关炎性因子探讨薏痹颗粒治疗膝骨关节炎的临床疗效[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [19] 吴锦慧. 参附注射液对老年骨折患者甲状腺素水平的影响及对心脏的保护作用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9): 1308-1310.
- [20] 王皓田. Epimedin B 抗 LPS 诱导的原代星形胶质细胞炎症反应的作用机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [21] 邓轶轩. 古汉养生精改善老年大鼠术后认知功能障碍及对海马 SYN-1、PSD-95 表达的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
- [22] 王婷. 参芪补肺方治疗慢阻肺稳定期(肺肾气虚兼血瘀证)的临床观察及对血清 IL-17 的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [23] 宋璐琳. 一种子宫灌注剂的工艺及质量标准研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [24] RYAN R, MOYSE B R, RICHARDSON R J. Zebrafish cardiac regeneration-looking beyond cardiomyocytes to a complex microenvironment [J]. Histochem Cell Biol, 2020, 154: 533-548.
- [25] ZHOU ZY, XIAO Y, ZHAO WR, et al. Pro-angiogenesis effect and transcriptome profile of Shuxinyin formula in zebrafish [J]. Phytomedicine, 2019, 65(4): 153083.
- [26] 朱思行, 曲畅, 朱灵妍, 等. 活血软坚方在斑马鱼和内皮细胞模型上的促血管新生作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 129-136.
- [27] 马卓. 血清血管内皮生长因子在不同类型冠心病的差异分析[D]. 唐山: 华北理工大学, 2017.
- [28] 朱金墙, 宋宛珊, 马妍, 等. PI3K/Akt 信号通路及血管性痴呆的关系及中药干预作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 223-229.
- [29] FERNANDEZ-HERNANDO C, ROTLLAN N, WANSCHER A C, et al. Genetic evidence supports a major role for Akt1 in VSMCs during Atherogenesis [J]. Circulation Res, 2015, 116(11): 1744-1752.
- [30] 鲁广建, 狄文玉, 张群妹, 等. MicroRNA-184 调控 Ras/MAPK/ERK 途径与老年肾细胞癌肿瘤细胞增殖、迁移及凋亡的关系[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(3): 625-629.
- [31] PIRNIA F, SCHNEIDER E, BETTICHER D C, et al. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(9): 905-914.

[责任编辑 顾雪竹]