

基于网络药理学对破格救心汤治疗急性心力衰竭主要活性成分及潜在靶点分析

张明 李光智 林道斌

广州中医药大学附属海南省中医院心血管科一病区,海南海口 570203

[摘要] 目的 运用网络药理学研究方法对破格救心汤(PJD)治疗急性心力衰竭(AHF)主要活性成分及核心靶基因进行分析。方法 采用中药系统药理学分析平台获得破格救心汤的有效活性成分及作用靶点基因,然后通过 GeneCards 数据库收集 AHF 疾病基因,然后对药物作用基因及疾病相关基因进行韦恩分析,确定药物作用交集靶点,然后取交集靶点进行综合分析。结果 研究发现破格救心汤治疗 AHF 的主要活性成分为槲皮素、山柰酚、谷固醇、柚皮素、人参皂苷-Rh2 等,主要调控的关键基因为胱天蛋白酶 3、禽肉瘤病毒 17 的假定转化基因、血管内皮生长因子 A、白细胞介素-1 β 、肿瘤蛋白 p53、雌激素受体 α 、白细胞介素-6、低氧诱导因子-1A、肿瘤坏死因子和丝氨酸/苏氨酸激酶-1。结论 本研究结果初步探讨了破格救心汤治疗 AHF 的基本药理作用及其机制,并为进一步的试验研究奠定了良好的基础。

[关键词] 网络药理学;破格救心汤;急性心力衰竭;分子对接

[中图分类号] R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616(2024)07-0191-04

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2024.07.43

Network pharmacological analysis of Poge Jiuxin Decoction in the treatment of acute heart failure

ZHANG Ming LI Guangzhi LIN Daobin

Ward I, Cardiovascular Department, Hainan Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Hainan, Haikou 570203, China

[Abstract] Objective To analyze the main active ingredients and core target genes of Poge Jiuxin Decoction (PJD) in the treatment of acute heart failure (AHF) using network pharmacology research methods. **Methods** The effective active ingredients and target genes of (PJD) were obtained by traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), and AHF disease genes were collected through the Gene Cards database. Then, Venn analysis was performed on the drug action genes and disease-related genes to determine the intersection action targets of drugs, and then the intersection targets were taken for comprehensive analysis. **Results** The study found that the main active ingredients of Poge Jiuxin Decoction in the treatment of AHF were quercetin, kaempferol, sitosterol, naringin, ginsenoside-Rh2, etc. The key regulatory genes were caspase-3, Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, vascular endothelial growth factor A, interleukin-1 β , tumor protein p53, estrogen receptor 1, interleukin-1, hypoxia inducible factor-1A, tumor necrosis factor, and aerine/threonine kinase-1. **Conclusion** The results of this study preliminarily explore the basic pharmacological effects and mechanisms of Poge Jiuxin Decoction in the treatment of AHF, and lay a good foundation for further test research.

[Key words] Network pharmacology; Poge Jiuxin Decoction; Acute heart failure; Molecular docking

急性心力衰竭(acute heart failure, AHF)是指急性发作的左心室功能障碍,导致心室充盈程度或射血能力受损的一组复杂临床综合征^[1],是本世纪心血管病学领域的两大难题之一^[2]。

破格救心汤(Poge Jiuxin Decoction, PJD)由名老中医李可所创,是治疗 AHF 的临床经验方^[3]。多

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目(20A200278)。

项临床研究表明在 AHF 治疗过程中在西药的基础上加用 PJD,往往能取得更好的疗效^[4-6]。然而,由于 PJD 治疗 AHF 的药理作用机制尚未明确,这限制了该方的进一步推广。

为探讨 PJD 治疗 AHF 的机制,给进一步的实验室研究做好前期铺垫,本研究采用网络药理学方法,分析 PJD 治疗 AHF 的药物-化合物-靶点机制。

1 材料与方法

1.1 PJD活性成分和药物靶基因的筛选

由于PJD中高丽参或可以用人参及红参替代,所以本研究决定根据本课题组前期临床研究所使用的破格救心汤方药(干姜、附子、麝香、山萸肉、红参、炙甘草、磁石、生龙骨、生牡蛎),然后通过中药系统药理学数据库与分析平台,检索上述药物的活性成分和活性成分对应的基因。

1.2 AHF疾病基因的获取与交集基因的筛选

本研究通过GeneCards数据库寻找AHF的疾病基因并建立数据集,然后将疾病基因与1.1筛选出的活性成分对应的基因进行韦恩分析,获取交集基因。这些交集基因可能是PJD治疗AHF过程中所调控的基因。

1.3 交集基因中的核心基因筛选

通过STRING数据库建立交集基因的蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络(参数设置:a.物种限制为人类;b.隐藏游离点;c.设定置信度>0.7;d.其他保持默认设置),对交集基因进行分析,筛选出核心基因。再将交集基因的蛋白互作网络数据导入Cytoscape软件(版本3.9.0)。运用Cytoscape软件中的插件分子复合物检测工具(Molecular Complex Detection tool, MCODE)(版本1.5.1)对蛋白互作网络中最显著的模块进行筛选和识别,其标准为MCODE评分>5,截断度=2,节点评分截断度=0.2, k-score=2,最大深度=100。此外,本研究将差异基因PPI网络中Degree ≥ 10的基因定义为核心基因,然后用Cytoscape插件cytoHubba识别核心基因。

1.4 交集基因的细胞功能注释分析与通路富集分析

利用R语言软件中的Bioconductor、clusterProfiler等程序包对交集基因进行细胞功能注释与通路富集分析,设置p value及q value均<0.05为限制条件运行R语言脚本导出富集分析结果,再绘制柱状图展现细胞功能注释分析得到的生物学进程(biological processes, BP)、分子功能(molecular function, MF)以及细胞组分(cellular component, CC)结果;利用基因富集柱状图、通路信息图展示通路富集分析结果。

1.5 分子对接

为了验证活性成分与交集基因的作用关系,本研究还进行了分子对接验证。首先从PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载筛选的蛋白结构文件,活性成分三维结构通过Pub Chem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得。在AutoDock Tools 1.5.6软件中对蛋白

结构进行加氢去水处理,并保存为*.pdbqt格式文件;然后将上述方法获得的活性成分文件和蛋白结构文件导入到AutoDock Tools软件中进行分子对接。

1.6 药物-活性成分-关键基因网络的建立

为了筛选PJD治疗AHF的关键活性成分,本研究将1.3得到的关键靶基因与其对应的药物活性成分,导入Cytoscape(版本3.9.0)软件建立药物-活性成分-靶点的相互作用网络关系图,并利用该软件中的CytoNCA插件分析网络节点的相关拓扑参数作进一步分析。

2 结果

2.1 PJD活性成分及药物靶点的筛选结果

本研究共找到121种PJD活性成分以及395个对应的药物靶基因。

2.2 疾病靶点及交集靶点的筛选结果

通过Gene Cards数据库检索到10 409个AHF疾病基因,与2.1获取的药物作用靶点进行韦恩分析,得到交集基因319个,为PJD治疗AHF潜在靶基因(图1)。

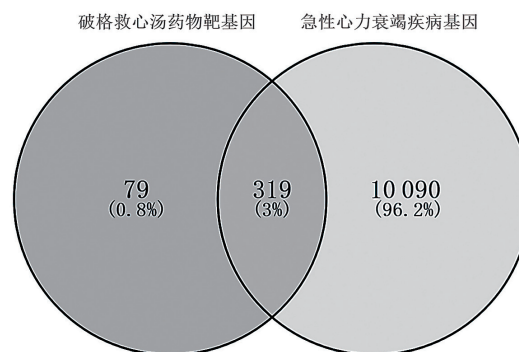


图1 药物靶点与AHF疾病靶点韦恩分析图

2.3 PPI和模块网络的构建及核心基因的选择

通过STRING数据库得到了交集基因的PPI网络模型,该模型共有节点318个,边5425条(图2A)。使用Cytoscape软件分析蛋白互作网络的拓扑结构,当Degree ≥ 10时,从PPI网络中鉴定出10个核心基因,分别为胱天蛋白酶3(caspase-3, CASP3)、禽肉瘤病毒17的假定转化基因(Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, JUN)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)、雌激素受体α(estrogen receptor 1, ESR1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、低氧诱导因子-1A(hypoxia inducible factor-1A, HIF1A)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、丝氨酸/苏氨酸激酶1(aerine/threonine kinase-1, AKT1)(图2B)。

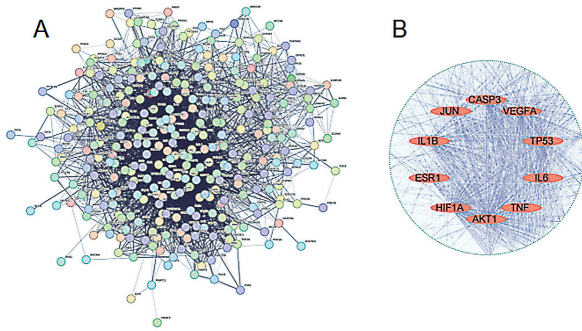


图2 PPI网络图

2.4 交集基因的细胞功能注释及通路富集分析结果

运用 R 语言软件对 319 个交集基因进行细胞功能注释 ($P < 0.05$) 得到 1871 种细胞功能条目, 其中 BP 7037 种、MF 1262 种、CC 609 种。通路富集分析 ($P < 0.05$) 获得 301 条通路, 富集基因最多的通路富集到了 50 个交集靶基因, 富集基因最少的通路富集到了 3 个交集靶基因。

2.5 药物-活性成分-关键基因网络建立结果

本研究通过 Cytoscape 软件建立药物-活性成分-关键基因网络。在该图中有药物节点 6 个, 活性成分节点有 66 个, 靶点节点 10 个。在图中, 方形代表关键基因, 椭圆形代表活性成分, 菱形节点代表药物节点。本研究发现作用到关键基因个数最多的前 5 个活性成分分别是槲皮素、山柰酚、谷固醇、柚皮素、人参皂苷-Rh2, 在关键基因中, 与活性成分相互作用最多的关键基因是 ESR1。见图 3。且槲皮素与 ESR1 存在相互作用, 所以本研究选择这对活性成分-关键基因作为分子对接研究对象。

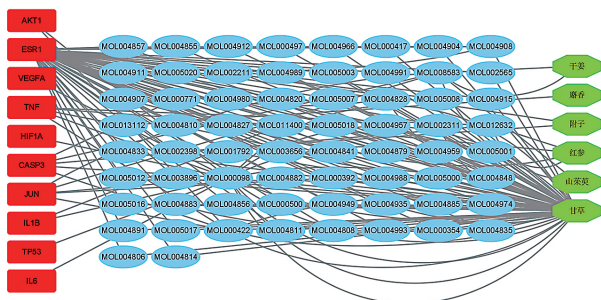


图3 药物-活性成分-关键基因网络图

2.6 分子对接

结果发现本研究选择的槲皮素与 ESR1 的结合能 ≤ -6.2 kcal/mol, 当结合能 < -4.0 kcal/mol 时, 表明配体分子和受体结合良好^[7]。见图 4。

3 讨论

本研究通过网络药理学研究方法, 发现破格救心汤治疗 AHF 的主要活性成分为槲皮素、山柰酚、

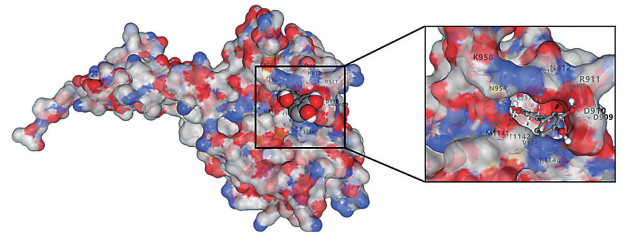


图4 分子对接图

谷固醇、柚皮素、人参皂苷-Rh2 等, 主要调控的关键基因为 CASP3、JUN、VEGFA、IL-1 β 、TP53、ESR1、IL-6、HIF1A、TNF 和 AKT1。这些活性成分及靶点大部分都经过临床试验或动物实验验证对 AHF 有治疗效果。

槲皮素是黄酮类化合物。研究发现, 槲皮素具有抑制细胞凋亡、改善细胞氧化应激、加强免疫力和抗炎等功能, 摄入槲皮素能够改善心力衰竭预后^[8]。Sharma 等^[9]发现使用槲皮素干预心力衰竭大鼠模型后, 可以促进核因子红细胞系 2 相关因子 2 表达, 从而增强抗氧化能力, 达到改善大鼠心功能的目的。

关键基因方面, ESR1 全称为雌激素受体, 研究表明雌激素受体对心脏重塑有抑制作用。如雌激素受体敲除的小鼠会出现心肌肥厚的现象, 进一步的心肌组织病理学检查后发现, 雌激素受体下的心肌细胞结构紊乱, 细胞间的连接出现异常^[10]。此外, 还有研究发现, 雌激素受体可能会通过增强心肌细胞闰盘的稳定性抑制 AHF, 因为心肌闰盘是心肌细胞的连接处, 它的稳定性是心肌收缩功能的基础, 而雌激素受体基因表达的增加可以增强心肌细胞闰盘的稳定性^[11]。IL-1 β 、IL-6、TNF 都是炎症相关因子, AHF 发生后会促进这些炎症因子的释放, 加重炎症反应, 而长时间的炎症刺激不但会促进心肌细胞凋亡加重心功能的损伤, 还会促进心肌成纤维细胞增殖加速心肌纤维化导致患者预后不良^[12]。CASP3 是细胞焦亡的启动因子, 激活的 CASP3 能够切割线粒体的特定站点以释放活动的 N 终端域, 以及在质膜上穿孔以诱导细胞焦亡^[13]。JUN 的表达异常会促进心肌细胞凋亡, 从而加速左室肥厚过程^[14]。VEGFA 会促进心肌成纤维细胞增殖, 研究显示敲除 VEGFA 的小鼠较正常小鼠更容易出现心力衰竭。进一步的研究表明, VEGFA 具有促进心脏毛细血管生成的作用, 过表达 VEGFA 会通过促进新生血管, 改善心肌供血, 从而抑制心力衰竭^[15]。TP53 位于染色体 17q13 上, 编码 TP53 蛋白质。过表达 TP53 会导致细胞生长停滞、细胞凋亡和细胞分化^[16]。根据目前的研究结果, TP53 对 AHF 的作用可能与其改

善心脏重构有关^[17]。HIF1A是由 α 亚基和 β 亚基构成的异源二聚体,HIF1A的表达上升会造成心肌细胞能量代谢异常,造成心肌收缩力下降^[18]。AKT1具有抗心肌细胞凋亡的作用,过表达AKT1可提高心肌细胞抗凋亡能力从而缓解心脏重构^[19]。

综上所述,本研究通过网络药理学研究方法,找出了PJD治疗AHF的活性成分及关键基因,这些活性成分与基因间的相互作用可能是PJD治疗AHF的作用机制。网络药理学研究只是理论研究,研究结果需要进一步的实验验证,这将是进一步的研究目标。

[参考文献]

- [1] Arrigo M, Jessup M, Mullens W, et al. Acute heart failure[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 16.
- [2] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 985.
- [3] 袁思成, 芮庆林. 破格救心汤临床研究进展[J]. 中国中医急症, 2020, 29(4): 739-742.
- [4] 王育怀, 刘嘉琪, 何志广, 等. 破格救心汤治疗急性心力衰竭的疗效观察[J]. 中国中医急症, 2021, 30(10): 1808-1811.
- [5] 陆小强, 黄惠铁, 何成辉. 破格救心汤联合西药治疗慢性肺源性心脏病并心力衰竭的临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(9): 22-23.
- [6] 及孟, 李光智, 余洪, 等. 破格救心汤联合重组人脑利钠肽对急性心力衰竭患者心功能及血清BNP、CK-MB和cTnI水平的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(9): 1524-1527.
- [7] 雷雅婷, 唐浪, 吴广阳. 基于网络药理学与分子对接探讨丹参-川芎药对改善肝癌癌前病变的作用机制[J]. 大众科技, 2022, 24(7): 96-101.
- [8] 陈振华, 胡晓艳, 赵滕, 等. 槲皮素对心血管系统疾病的影响及其新剂型研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 440-443.
- [9] Sharma A, Parikh M, Shah H, et al. Modulation of Nrf2

by quercetin in doxorubicin-treated rats[J]. Heliyon, 2020, 6(4): e03803.

- [10] Rosenzweig R, Kumar V, Gupta S, et al. Estrogen Receptor- β Agonists Modulate T-Lymphocyte Activation and Ameliorate Left Ventricular Remodeling During Chronic Heart Failure[J]. Circ Heart Fail, 2022, 15(7): e008997.
- [11] 陈纪焯, 马跃, 李媛, 等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗慢性心力衰竭作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(6): 75-80.
- [12] Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, et al. Inflammation in Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(11): 1324-1340.
- [13] Ding J, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. Nature, 2016, 535(7610): 111-116.
- [14] 魏佳明, 刘承鑫, 李卉, 等. 益心泰有效组分对慢性心力衰竭兔左室肥厚和心肌细胞凋亡的干预作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(6): 53-58.
- [15] Collén A, Bergenhem N, Carlsson L, et al. VEGFA mRNA for regenerative treatment of heart failure[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(1): 79-80.
- [16] 李耀征, 白保强, 孙亚勤, 等. 急性冠脉综合征患者术后血清TP53、miR-222-3p与预后的关系[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2022, 14(5): 571-574.
- [17] 朵杰, 白洁, 韩琼. 微小RNA-17-5p通过靶向调控TP53INP1的表达对急性心肌梗死后心室重构的影响[J]. 国际心血管病杂志, 2022, 49(2): 112-116.
- [18] 张晓红, 时景璞. 缺氧诱导因子-1调控缺氧状态下心肌细胞自噬和凋亡的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, 27(9): 1087-1093.
- [19] 高彦琳, 陈厚良, 赵胜, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨白藜芦醇治疗心力衰竭的分子机制[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3703-3708.

(收稿日期: 2023-08-14)

(上接第171页)

- [31] 赵思宇, 曹昱, 雷燕妮, 等, 刘民. 2013-2017年北京市120院前急救患者疾病谱特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(4): 474-479.
- [32] 周贤慧, 王显江, 黄奇迅, 等. 烟台市开发区2017-2018年院前急救流行病学调查分析[J]. 中华灾害救援医学, 2019, 7(2): 61-65.
- [33] 张彦红, 孙秀翠, 王倩, 等. 青海省海北藏族自治

州120疾病谱与急救资源的合理配置[J]. 青海医药杂志, 2018, 48(11): 72-74.

- [34] 邵良, 凌峰, 付丰平. 株洲市2017年院前急救疾病谱调查[J]. 临床急诊杂志, 2018, 19(8): 548-550.
- [35] 卫鹏羽, 李海燕, 何光辉, 等. 16905例院前急救患者流行病学分析[J]. 中国卫生统计, 2019, 36(4): 535-537, 540.

(收稿日期: 2023-08-20)