

# 基于网络药理学探究养心通脉方对冠心病的作用机制

朱梓铭<sup>1</sup>, 郑景辉<sup>2</sup>, 唐友明<sup>2</sup>, 徐文华<sup>1</sup>, 伍燕宏<sup>1</sup>, 罗蔚<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011)

**摘要:**目的: 利用网络药理学技术更全面地预测养心通脉方( *Yangxin Tongmai Formula*, YTF) 对冠心病( coronary heart disease, CHD) 潜在的作用机制。方法: 利用药物靶点数据库分析平台, 基于化合物 ADME 特性筛选养心通脉方中相关活性成分, 预测化合物的作用蛋白质靶点, 进一步构建靶点蛋白数据集; 基于 Genecards 数据库获取 CHD 高度相关蛋白靶点, 构建数据集; 将养心通脉方与 CHD 靶点数据集进行对比与分析, 并基于共同靶点构建蛋白质-蛋白质互作网络( Protein-protein interaction, PPI) 网络, 靶点通路网络( target-pathway network) 及进行生物信息学分析。结果: 经分析养心通脉方中 62 个化合物, 99 个作用蛋白质靶点以及 CHD 相关的 20 个共同靶点( 占养心通脉方化合物靶点的 25%) 发现, 相关靶点共有 55 个的生物学过程及 39 条通路被显著富集(  $P < 0.05$ )。本次预测结果与养心通脉方前期已证实的成果在功效及机制上有一定契合。结论: 本研究基于网络药理学, 通过构建多维调控网络初步揭示了养心通脉方对 CHD 的作用机制, 为其的临床应用提供了理论依据。

**关键词:** 养心通脉方; 网络药理学; 冠心病; 作用机制

中图分类号: R541.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-4719(2019)08-1582-06

## Study of *Yangxin Tongmai* Formula on Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology

ZHU Ziming<sup>1</sup>, ZHENG Jinghui<sup>2</sup>, TANG Youming<sup>2</sup>, XU Wenhua<sup>1</sup>, WU Yanhong<sup>1</sup>, LUO Wei<sup>1</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China;

2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China)

**Abstract:** *Objective:* To predict the potential therapeutic mechanism of *Yangxin Tongmai* Formula ( YTF) on coronary heart disease ( CHD) using network pharmacology. *Methods:* Drugs and targets analysis databases were used to screen the bioactive components in YTF based on ADME characteristics and predict their corresponding targets. Meanwhile, the CHD highly related targets were obtained from Genecards database. Based on the common targets of CHD and YTF target, the protein-protein interaction ( PPI) network and target-pathway network were constructed for a further bioinformatics analysis. *Results:* After analyzing 62 compounds, 99 protein targets and 20 common targets related to CHD( accounting for 25% of the target of YTF compound) , bioin-

[5] 马群力. 消风散治疗过敏性疾病验案 5 则[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(21): 2874-2875.

[6] 张贵春, 张士卿. 过敏煎验案四则[J]. 山东中医杂志, 2011, 30(2): 133-134.

[7] 王媛媛, 卢景熙. 运用保和丸治疗过敏性疾病验案三则[J]. 广州医药, 2012, 43(2): 49-50.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[9] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012.

[10] 唐德才. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.

[11] 刘瑞玲. 过敏性疾病的病因和预防[J]. 中国临床医生杂志, 2003, 31(9): 4-5.

[12] 抗组胺 H1 受体药在儿童常见过敏性疾病中应用的专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(3): 161-170.

[13] 李华斌, 王向东, 王洪田, 等. 口服 H1 抗组胺药治疗变应性鼻炎 2018 广州共识[J]. 中国耳鼻咽喉科杂志, 2018, 18(3): 149-156.

[14] 苏小露. 过敏性体质的中医认识[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(14): 150-151.

[15] 高洁, 陈燕, 贝煜, 等. 浅析解表药性味与主要化学成分、现代药理作用的相关性[J]. 中药材, 2010, 33(2): 317-319.

[16] 程丑夫. 过敏性疾病当从风论治[J]. 江苏中医药, 2002, 23(3): 1-3.

[17] 党小利. 浅谈过敏性疾病的种类与诊断[J]. 心血管病防治知识, 2011(3): 78-79.

[18] 覃骊兰, 马淑然, 兰毓营. 从“肝肺同治”论治过敏性哮喘的理论初探[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 769-770.

[19] 孙博航. 银柴胡的化学成分和抗过敏活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.

[20] 史琦, 宋芊, 阎玥, 等. 从肺脾论治过敏性疾病[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3265-3268.

[21] 王文禹, 刘冰. 从脾胃论治过敏性疾病[J]. 河北中医, 2014, (9): 1329-1330.

基金项目: 国家自然科学基金项目( 81660776); 广西自然科学基金( 2016JJA140115); 广西科学研究与技术开发计划项目( 桂科攻 1598012-55) 广西中医药大学研究生教育创新计划项目( YCSY2018034)

作者简介: 朱梓铭( 1992- ), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。

通讯作者: 郑景辉( 1976- ), 男, 教授, 硕士研究生导师, 博士后, 研究方向: 中医药防治心血管疾病, E-mail: jinghuizheng@yeah.net.

formatics result showed that a total of 55 biological processes and 39 pathways were significantly enriched ( $P < 0.05$ ). This results partially agreed with the previous studies of YTF in the efficacy and mechanism. *Conclusion*: Through constructing a multi-dimensional regulatory network based on the network pharmacology, this study initially revealed the mechanism of YTF on CHD and provided a theoretical basis for a further clinical application.

**Keywords:** *Yangxin Tongmai* Formula; network pharmacology; coronary heart disease; mechanism

中医药有着数千年的历史,由于药材和人体的复杂性,大多数中药的作用机制目前尚不清楚,尤其是自古以来有卓越疗效的经典配方。网络药理学(Network Pharmacology)自2007年由 Andrew L Hopkins 提出,并被认为是下一个药物研发新模式<sup>[1-2]</sup>。该方法学是将药物作用网络与生物网络整合在一起,分析药物在此网络中与特定节点或模块的相互作用关系<sup>[3]</sup>,揭示与划分疾病相关的基因,预测靶点范围和化合物的药理作用<sup>[4]</sup>,打破长期以来对中药及复方的单成分提取鉴定及有限靶点验证的研究模式,弥补了传统研究方法中低效率、高成本、盲目性、局限性的缺陷。随着生物信息大数据时代的发展,近10年来,网络药理学不仅成为中药及复方研究新思路,并逐渐成为构建更具备中医哲学特点的“药、靶、病、证”整体系统研究的关键性枢纽<sup>[5]</sup>。

养心通脉方(*Yangxin Tongmai* Formula, YTF)是我国著名中医学家秦伯未先生运用“扶养心气,和通血脉”之法治疗胸痹心痛的有效名方,其中人参、桂枝补益心气,温通血脉;地黄滋阴生津,和通气血;丹参活血养血、宣通经脉,佐以泽泻利水渗湿,化其痰浊而补阴<sup>[6]</sup>。多年临床实践表明,该方能治疗缓解心绞痛、抗心肌缺血、降低血脂、改善机体胰岛素敏感性等,在冠心病(coronary heart disease, CHD)以及代谢相关的心血管疾病的运用中发挥可观疗效,前期研究中已发现该方,但由于中药成分的复杂性仍有许多作用途径尚未明确。本研究首次借助网络药理学手段基于前人实验大数据研究成果,为该方在冠心病的作用机制做出整体性预判和前瞻性预测,并为后续研究提供理论支持。

## 1 材料与方法

1.1 软件及数据库 分析软件和数据库主要包括 TCMSp 分析平台 (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/index.php>)、TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/search/>)、DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/releases/latest>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、GeneCard 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)、KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/>)、STRING 数据库 (<http://string-db.org/>)、Venny2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)、ImageGP 可视化工具 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>)、Cytoscape 3.4.0 软件以及 ClueGO、NetworkAnalyzer 等插件。

1.2 养心通脉方活性成分的筛选 养心通脉方中药物化合物为口服利用,基于化合物 ADME 性质,即通过吸收、分布、代谢、排泄过程筛选活性化合物。其中口服生物利用度(Oral bioavailability, OB)指的是药物

的有效成分或活性基被吸收到达体循环并被吸收的速度与程度;类药性(Drug-likeness, DL)指药物包含一些特定的功能基团或者具有与大多数药物相同或相似的物理特征,这2个参数是中药成分 ADME 的关键参数。利用 TCMSp 数据平台,输入组方中5味药物名称进行初步筛选,其中人参、地黄、桂枝、泽泻  $OB \geq 30\%$ ;  $DL \geq 0.18$ ,丹参  $OB \geq 50\%$ ;  $DL \geq 0.25$ ,基于上述阈值初步筛选高吸收率活性化合物。

1.3 构建化合物靶点关系网络 将初步筛选出的化合物进行文献检索,并结合 TCMID 数据库、DrugBank 数据库、TTD 数据库检索化合物的详细信息并进行确认核对,最终确定的化合物导入 TCMSp 分析平台进行靶点预测,将靶点结果在 Uniprot 数据库中一一查对,选择物种为人源(Homosapiens),蛋白质 ID 转化为基因名称(Gene Symbol)并剔除非人类和不规范、非特指代命名靶点,以确保靶点的可靠性,建立靶点数据集,并将最终的化合物-靶点的多重对应关系录入 Cytoscape3.4.0 中,构建二阶拓扑关系网络。

1.4 CHD 靶点数据挖掘以及相关性筛选 基于 GeneCard 数据库检索 CHD 相关靶点, GeneCard 数据库的功能相关度分析是基于 GIFTs 算法<sup>[7]</sup>完成的,即将现有基因研究累积量作为背景向量集,并将特定的基因研究累积量划分与背景相关的多元二进制子向量,对比背景集向量的分值作为其相关度得分。本研究将初步检索出的结果根据相关度得分(Related Score)由高到低筛选前200个疾病相关度最高的靶点作为后续分析的集合。

1.5 养心通脉方与 CHD 相关靶点的关联分析 利用 Venn 分析工具,将养心通脉方候选靶点与 CHD 的共同基因相关联,其结果进一步录入 STRING 数据库中,扩大并分析靶点相互作用关系,利用 Cytoscape3.4.0 中 NetworkAnalyzer 插件分析蛋白质互作关系网络节点拓扑结构参数,初步得出 hub-target。

1.6 养心通脉方与 CHD 相关靶点的生物信息学分析 将靶点上传至 DAVID 在线分析平台,进行生物学过程(Biological Process BP)、细胞组分(Cellular Component CC)、分子功能(Molecular Function MF)分析,利用 ImageGP 可视化富集分析综合结果;并利用 ClueGO 插件进行 KEGG 通路富集分析,最终构建出靶点通路关系网络(Target-Pathway Network TPN)。

1.7 拓扑网络关键节点分析 利用 Cytoscape 软件中 NetworkAnalyzer 插件,分析拓扑网络中各靶点的平均最短路径(AverageShortestPathLength, ASPL)、介数中心性(BetweennessCentrality, BC)、中心紧密度(ClosenessCentrality, CC)及连通度(Degree)参数,拟 Degree 值作为判断核心靶点(Hub target)的直接标准。

## 2 结果

2.1 筛选养心通脉方活性化合物 设置  $OB \geq 30\%$ ;

DL≥0.18,其中丹参 OB≥50%; DL≥0.25,共有 62 个活性化合物,包括人参 17 个,桂枝 5 个,泽泻 10 个,丹参 20 个,地黄 9 个(其中重复 4 个),见表 1。

表 1 养心通脉方活性化合物基本信息

ID	分子	OB(%)	DL	药物
M0359	sitosterol	36.91	0.75	泽泻, 桂枝, 地黄
M0830	Alisol B	34.47	0.82	泽泻
M0831	Alisol B monoacetate	35.58	0.81	泽泻
M0832	alisol b 23 - acetate	32.52	0.82	泽泻
M0849	16β - methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77	泽泻
M0853	alisol B	36.76	0.82	泽泻
M0854	alisol C	32.70	0.82	泽泻
M0856	alisol C monoacetate	33.06	0.83	泽泻
M0862	[[ (1S, 3R) - 1 - [(2R) - 3, 3 - dimethyloxiran - 2 - yl] - 3 - [(5R, 8S, 9S, 10S, 11S, 14R) - 11 - hydroxy - 4, 4, 8, 10, 14 - pentamethyl - 3 - oxo - 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 16 - decahydrocyclopenta [a] phenanthren - 17 - yl] butyl] acetate	35.58	0.81	泽泻
M2464	1 - Monolinolein	37.18	0.30	泽泻
M0569	digallate	61.85	0.26	丹参
M7050	2 - (4 - hydroxy - 3 - methoxyphenyl) - 5 - (3 - hydroxypropyl) - 7 - methoxy - 3 - benzofurancarboxaldehyde	62.78	0.40	丹参
M7058	formyltanshinone	73.44	0.42	丹参
M7064	przewalskin b	110.32	0.44	丹参
M7068	Przewaquinone B	62.24	0.41	丹参
M7069	przewaquinone c	55.74	0.40	丹参
M7079	tanshinaldehyde	52.47	0.45	丹参
M7081	Danshenol B	57.95	0.56	丹参
M7082	Danshenol A	56.97	0.52	丹参
M7088	cryptotanshinone	52.34	0.40	丹参
M7094	danshenspiroketallactone	50.43	0.31	丹参
M7105	epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31	丹参
M7108	isocryptotanshi - none	54.98	0.39	丹参
M7120	miltionone II	71.03	0.44	丹参
M7125	neocryptotanshinone	52.49	0.32	丹参
M7130	prolithospermic acid	64.37	0.31	丹参
M7132	(2R) - 3 - (3, 4 - dihydroxyphenyl) - 2 - [(Z) - 3 - (3, 4 - dihydroxyphenyl) acryloyl] oxy - propionic acid	109.38	0.35	丹参
M7140	(Z) - 3 - [2 - [(E) - 2 - (3, 4 - dihydroxyphenyl) vinyl] - 3, 4 - dihydroxy - phenyl] acrylic acid	88.54	0.26	丹参

ID	分子	OB(%)	DL	药物
M7150	(6S) - 6 - hydroxy - 1 - methyl - 6 - methylol - 8, 9 - dihydro - 7H - naphtho [8, 7 - g] benzofuran - 10, 11 - quinone	75.39	0.46	丹参
M7155	(6S) - 6 - (hydroxymethyl) - 1, 6 - dimethyl - 8, 9 - dihydro - 7H - naphtho [8, 7 - g] benzofuran - 10, 11 - dione	65.26	0.45	丹参
M0073	ent - Epicatechin	48.96	0.24	桂枝
M0358	beta - sitosterol	36.91	0.75	桂枝, 人参
M0492	(+) - catechin	54.83	0.24	桂枝
M1736	(-) - taxifolin	60.51	0.27	桂枝
M0422	kaempferol	41.88	0.24	人参
M0449	Stigmasterol	43.83	0.76	人参, 地黄
M0787	Fumarine	59.26	0.83	人参
M2879	Diop	43.59	0.39	人参
M3648	Inermin	65.83	0.54	人参
M4492	Chrysanthemaxanthin	38.72	0.58	人参
M5308	Aposiopolamine	66.65	0.22	人参
M5314	Celabenzine	101.88	0.49	人参
M5317	Deoxyharringtonine	39.27	0.81	人参
M5318	Dianthramine	40.45	0.20	人参
M5320	arachidonate	45.57	0.20	人参
M5321	Frutinone A	65.90	0.34	人参
M5344	ginsenoside rh2	36.32	0.56	人参
M5348	Ginsenoside - Rh4qt	31.11	0.78	人参
M5356	Girinimbin	61.22	0.31	人参
M5357	Gomisin B	31.99	0.83	人参
M5360	malkangunin	57.71	0.63	人参
M5376	Panaxadiol	33.09	0.79	人参
M5384	suchilactone	57.52	0.56	人参
M5399	alexandrinqt	36.91	0.75	人参
M5401	ginsenoside Rg5qt	39.56	0.79	人参
M0357	Sitogluside	20.63	0.62	地黄
M3697	methyl 9, 10 - methylene - hexadecanoate	22.94	0.15	地黄
M3703	glutinoside	21.33	0.52	地黄
M3712	methyl (1S, 4aS, 7aS) - 7 - methylene - 1 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) - 3, 4, 5 - trihydroxy - 6 - [(2R, 3R, 4R, 5S, 6R) - 3, 4, 5 - trihydroxy - 6 - methyl - tetrahydropyran - 2 - yl] oxy - methyl] tetrahydropyran - 2 - yl] oxy - 4a, 5, 6, 7a - tetrahydro - 1H - cyclopenta [d] pyran - 4 - carboxylate	28.27	0.84	地黄
M3718	6 - O - p - coumaroylajugol	26.13	0.85	地黄
M3730	Rehmannioside A	25.95	0.87	地黄
M3733	6 - O - vanilloylajugol	23.44	0.84	地黄

2.2 构建化合物-靶点网络( compound - target network ,CTN) 化合物导入 TCMSPP 预测对应的靶点 ,初步得出 898 个靶点 ,由于化合物靶点存在多重对应关系 ,分析后最终确定为 99 个唯一靶点 ,保存原有的互作关系录入 Cytoscape 构建化合物-靶点网络( 见插页 I 图 1) 。其中化合物节点为 62 个 ,作用靶点为 99 个 ,经 NetworkAnalyzer 分析较为关键的节点( hub nodes) 信息 ,见表 2( 各类别仅列出 Degree 最高的前 5 个) 。

表 2 化合物-靶点关系网络中关键节点详细信息

Category	ID/Name	ASPL	BC	CC	Degree
compound	M0422	1.99	0.26	0.50	52
compound	M0358	2.02	0.12	0.50	48
compound	M0449	2.10	0.16	0.48	42
compound	M0787	2.15	0.07	0.46	41
compound	M7088	2.22	0.04	0.45	35
target	AR	1.85	0.11	0.54	41
target	ESR1	1.88	0.07	0.53	39
target	PTGS2	1.91	0.06	0.52	33
target	NOS2	1.95	0.05	0.51	30
target	DPP4	2.00	0.03	0.50	30

表 3 冠心病相关性靶点信息

Rank	Gene Symbol	Description	Gifts	Relevance Score
1	APOE	Apolipoprotein E	71	86.50
2	IL6	Interleukin 6	70	85.15
3	ACE	Angiotensin I Converting Enzyme	70	83.14
4	TNF	Tumor Necrosis Factor	77	76.89
5	APOB	Apolipoprotein B	65	72.81
6	NOS3	Nitric Oxide Synthase 3	72	63.67
7	VWF	Von Willebrand Factor	68	62.63
8	IL10	Interleukin 10	66	61.11
9	APOA1	Apolipoprotein A1	70	59.57
10	TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1	75	59.27
11	PON1	Paraoxonase 1	65	58.99
12	INS	Insulin	67	57.89
13	SCN5A	Sodium Voltage - Gated Channel Alpha Subunit 5	70	55.07
14	AGTR1	Angiotensin II Receptor Type 1	71	55.02
15	MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase	64	54.94
16	ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1	69	53.31
17	LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor	72	53.16
18	TNNI3	Troponin I3 ,Cardiac Type	69	53.16
19	LMNA	Lamin A/C	66	52.96
20	LPL	Lipoprotein Lipase	70	52.13

2.3 CHD 靶点数据集的筛选 基于 GeneCards 数据库 ,输入关键词“coronary heart disease”初步得出 4 ,566 个相关基因 ,根据 relevance score 筛选相关度最高的前 200 个靶点作为候选 CHD 疾病靶点集合 ,见表 3 ( 仅列出 relevance score 前 20 个) 。

2.4 养心通脉方靶点与 CHD 相关靶点关联分析 将 99 个养心通脉方药物预测靶点与 200 个 CHD 高度相关性靶点 ,作为候选子集录入 venny2.1 ,交集中共同靶点有 20 个 ,占有所有靶点的 7.2% ,占养心通脉方化合物靶点约 25% ,见插页 I 图 2。

2.5 蛋白质互作关系( Protine Protine Interaction PPI) 分析 将共有交集的 20 个蛋白质导入 STRING 数据库中 ,设置中度置信度 ,最小互作需求得分( minimum required interaction score) 为 0.400 扩大 1 倍相互作用范围 ,最终得出 40 个互作蛋白 ,211 个作用关系 ,将其构建 PPI 网络 ,插页 I 图 3。其中平均节点连通度( average node degree) 为 10.6。经拓扑参数分析 ,其中 40 个靶点的 Degree 最高值 25 ,中位数为 9 ,见表 4( 仅列出 degree 分值最高的前 10 个) 。

表 4 PPIN 关键节点拓扑学参数分析

Name	ASPL	BC	CC	Degree
IL1B	1.36	0.14	0.74	25
TNF	1.44	0.06	0.70	23
CALM2	1.46	0.11	0.68	21
CALM1	1.46	0.11	0.68	21
NOS3	1.51	0.04	0.66	19
SPTAN1	1.54	0.07	0.65	19
IFNG	1.56	0.06	0.64	19
VCAM1	1.64	0.03	0.61	17
PPARG	1.79	0.06	0.56	15
SELE	1.77	0.01	0.57	15

2.6 PPI 靶点生物信息学分析 将 40 个靶点导入 DAVID 中进行生物信息学分析 ,经富集分析发现共有生物学过程( Biological Process ,BP) 74 个 , $P < 0.05$  有 55 个 ,细胞组分( Cellular Component ,CC) 17 个 , $P < 0.05$  有 11 个 ,分子功能( Molecular Function ,MF) 17 个 , $P < 0.05$  有 12 个 ,表 5( BP 仅列出  $P$  值最小的前 15 个 ,CC、MF 仅列出  $P$  值最小的前 5 个) ,见插页 I 图 4。

2.7 PPI 网络通路富集分析并构建靶点通路网络 利用 Cytoscape - ClueGO 插件 ,将 40 个靶点录入 KEGG 通路富集分析 ,并构建靶点通路网络 ,设置 Network Specificity 为 Medium 等级 ,KappaScore 为 0.4 经 Bonferroni 校正  $P$  value 错误率 ,仅显示校正后  $P < 0.05$  的通路 ,共得出 39 个通路 ,经 Kappa 聚类将 39 个通路分为 4 组 ,分别为: 结核( Tuberculosis) 、流体剪切力与动脉粥样硬化( Fluid shear stress and atherosclerosis) 、阿尔茨海默病( Alzheimer's disease) 、HIF - 1 信号通路( HIF - 1 signaling pathway) ,见插页 I 图 5。

表 5 生物信息学 GO 分析结果

Category	Term	Count	GeneRatio (%)	P Value
Biological Process	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	4	6.57	5.33E-06
Biological Process	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	9	14.77	9.26E-06
Biological Process	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	4	6.57	3.31E-05
Biological Process	positive regulation of membrane protein ectodomain proteolysis	3	4.92	2.24E-04
Biological Process	negative regulation of smooth muscle cell proliferation	3	4.92	6.46E-04
Biological Process	regulation of insulin secretion	3	4.92	7.38E-04
Biological Process	activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	3	4.92	0.003549
Biological Process	positive regulation of protein kinase B signaling	3	4.92	0.004845
Biological Process	oxidation-reduction process	4	6.57	0.004975
Biological Process	smooth endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis	2	3.28	0.005096
Biological Process	positive regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	2	3.28	0.005096
Biological Process	positive regulation of caldiciol 1-monooxygenase activity	2	3.28	0.005096
Biological Process	cellular response to lipopolysaccharide	3	4.92	0.006327
Biological Process	heat generation	2	3.28	0.007634
Biological Process	vasodilation by norepinephrine-epinephrine involved in regulation of systemic arterial blood pressure	2	3.28	0.007634
Cellular Component	membrane raft	4	6.57	9.59E-04
Cellular Component	Golgi apparatus	6	9.85	0.001673
Cellular Component	integral component of plasma membrane	7	11.49	0.005489
Cellular Component	nucleus	12	19.70	0.007572
Cellular Component	receptor complex	3	4.92	0.008299
Molecular Function	heme binding	4	6.57	0.003174
Molecular Function	tetrahydrobiopterin binding	2	3.28	0.005604
Molecular Function	nitric-oxide synthase activity	2	3.28	0.008395
Molecular Function	norepinephrine binding	2	3.28	0.011178
Molecular Function	arginine binding	2	3.28	0.011178

### 3 讨论

养心通脉方对 CHD 心血瘀阻证、高脂血症、高脂血症伴胰岛素抵抗具有较好的疗效,对于防治冠状微循环障碍和微血栓形成,改善心肌供血,缓解心绞痛作用。在机理学方面发现养心通脉方具备改善心肌缺血、增加冠状动脉血流量、促进血管再生等心肌修复功能。本文基于网络药理学法构建“活性成分—靶点—特定疾病靶点—生物信息学及通路分析”流程,循序渐进的构建多个二级拓扑网络并逐层统计分析,全面阐释了养心通脉方作用与 CHD 的潜在活性成分、靶点及其相关作用机制的预测。

养心通脉方中隐丹参酮 ( cryptotanshinone ) ( M7088 ,Degree = 35 )、β - 谷甾醇 ( beta - sitosterol ) ( M0358 ,Degree = 48 )、豆甾醇 ( Stigmasterol ) ( M0449 ,Degree = 42 )、山柰酚 ( kaempferol ) ( M0422 ,Degree = 52 )、原阿片碱 ( Fumarine ) ( M0787 41 ,Degree = 42 ) 在网络中处于核心地位调控的靶点众多,并参与了多种心血管疾病的调控,Lo SH 等<sup>[8]</sup>发现隐丹参酮,可以通过抑制 STAT3 来缓解 1 型糖尿病大鼠的心肌纤维化, Liu F 等<sup>[9]</sup>的研究还发现隐丹参酮可通过抑制钙超载而降低心肌缺血损伤。大量研究表明植物甾醇类化合物 β - 谷甾醇、豆甾醇等具有降胆固醇、抗炎作用,对氧自由基具有较强的抑制作用<sup>[10]</sup>,另 β - 谷甾醇不仅能抵抗动脉炎症反应<sup>[11-12]</sup>还能降低阿司匹林介导的胃黏膜损伤<sup>[13]</sup>,山柰酚能作用线粒体调节 SIRT1 表达达到对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护<sup>[14]</sup>,抑制 MAPK 信号通路减弱心肌缺血性损伤<sup>[15]</sup>;另外,原阿片碱又名普鲁托品 ( Protopine) 大量研究及实验证明具有镇痛、抑制血小板聚集、松弛平滑肌、抗心律失常、抗肿瘤抗肝损伤等作用<sup>[16-17]</sup>。通过同类研究发现,养心通脉方中关键成分涉及了包括调节血管活性、心肌细胞代谢、中枢镇痛等多种机制。

养心通脉方中 CHD 相关性靶点占该方靶点总数的 25% 经分析一氧化氮生物合成过程的正调控、胰岛素分泌调节、参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性,去甲肾上腺素参与血管舒张调节等生物学过程被显著富集,该结果与养心通脉方对 CHD 的前期研究结果有一定切合。另 39 个通路被显著富集,经 Kappa 聚类发现多个靶点参与调节多条通路并具备相似的功能面,值得注意的是被显著富集的流体剪切力与动脉粥样硬化通路( KEGG PATHWAY: map05418) 与 CHD 发生发展机制高度相关,该组聚类中生物学功能相近的通路还包括 TNF 信号通路( TNF signaling pathway )、糖尿病并发症相关 AGE - RAGE 通路( AGE - RAGE signaling pathway in diabetic complications) 等 21 条。已有大量的研究表明,该通路揭示了血流在内皮表面血管壁产生的摩擦力(即剪切力)机制,并在血管生物学中导致动脉粥样硬化的过程发挥重要调控作用<sup>[18-19]</sup>。参与该通路的靶点有 12 个,其中 NOS3、NOS2、PPARG 靶点同时为 CTN 与 PPI 中的关键靶点,NOS2 在正常物体中几乎没有表达,在抵御外来因素入侵时,它才会表现出活性<sup>[20]</sup>,而 NOS3 基因的变化与冠状动脉痉挛

的易感性有关。在心血管疾病的发生过程中,常出现内皮功能紊乱等初期症状,此过程与 NO 介导的血管舒张密切相关,而 NO 的释放是由内皮 NOS3 所调控<sup>[21]</sup>,血流剪切力也能通使 NOS3 磷酸化来影响 NOS3 的功能<sup>[22]</sup>,从而推测养心通脉方改善心肌缺血、增加冠状动脉血流量、促进血管再生等心肌修复的功能有可能与该通路及核心靶点密切相关。另外,TNF、IL1B、IFNG 在 PPI 网络中处于关键位置拓扑学连通度较高,TNF 作为一种重要的细胞因子,参与多种细胞内信号通路包括细胞凋亡和细胞生存以及炎症和免疫,IFNG 表达于先天或后天性形成的免疫细胞中,参与多种炎症、免疫反应。这些与炎症、免疫、细胞凋亡相关的基因或在 CHD 过程中与心肌、血管内皮细胞的损伤和修复中存在一定联系<sup>[23]</sup>。另外,血脂血糖调节异常,是 CHD 的高危因素,TNF、IFNG、NOS2 能参与胰岛素分泌的调节,TNF 通过调节脂肪分解引起的血浆游离脂肪酸水平变化激发胰岛素调控<sup>[24]</sup>,IFNG 通过调节先天性和适应性免疫参与肥胖相关的代谢疾病<sup>[25]</sup>,前期研究已证实,养心通脉方可通过抑制 C - myc 基因、下调 PDGF - A 从而改善机体胰岛素敏感性,基于本次研究结果,该方抑制胰岛素抵抗的机制可能与调控 TNF、IFNG、NOS2 等更多的基因有关。这些已有的实验结果回顾性养心通脉方。综上,本研究基于网络药理学手段通过将养心通脉化合物、靶点、疾病、通路进行多节点、多中心、多功能面分层分析,初步揭示了养心通脉方对冠心病作用的多维调控网络,本次研究结果与前期研究基础在机制和功效上有一定的契合,也之后本课题组后续工作的开展提供了前瞻性指引,进一步为中医药及复方机制的研究提供了理论参考。

参考文献

[1] Hopkins A L. Network pharmacology[J]. Nature Biotechnology 2007, 25(10): 1110 - 1111.

[2] Andrew L Hopkins. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nature chemical biology 2008 4(11): 682.

[3] 周文霞. 网络药理学研究进展和发展前景[J]. 中国药理学与毒理学杂志 2015(5): 760 - 762.

[4] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. Chinese Journal of Natural Medicines 2013, 11(2): 110.

[5] 蔡甜甜, 潘华峰, 王奇, 等. 中药复方在病证基础上的网络药理学研究[J]. 中华中医药杂志 2016(11): 4746 - 4748.

[6] 郑景辉. 养心通脉方研究述评[J]. 吉林中医药 2015, 35(2): 187 - 190.

[7] Harel A, Inger A, Stelzer G, et al. GifTS: annotation landscape analysis with GeneCards[J]. Bmc Bioinformatics 2009, 10(1): 348.

[8] Lo S H, Hsu C T, Niu H S, et al. Cryptotanshinone Inhibits STAT3 Signaling to Alleviate Cardiac Fibrosis in Type 1 - like Diabetic Rats[J]. Phytotherapy Research 2017, 31.

[9] Liu F, Huang ZZ, Sun YH, et al. Four Main Active Ingredients Derived from a Traditional Chinese Medicine Guanxin Shutong Capsule Cause Cardioprotection during Myocardial Ischemia Injury Calcium Overload Suppression[J]. Phytotherapy research: PTR 2017, 31(3): 507.

[10] 常翠青. 植物甾醇与心血管疾病的研究进展和应用现状[J]. 中国食物与营养 2016, 22(6): 76 - 80.

[11] Loizou S, Lekakis I, Chrousos GP, et al. Beta - sitosterol exhibits anti - inflammatory activity in human aortic endothelial cells[J]. Molecular Nutrition & Food Research 2010, 54(4): 551.

[12] Saeidnia S, Manayi A, Gohari A R, et al. The story of beta - sitosterol - a review[J]. European Journal of Medicinal Plants, 2014, 46(8): 590 - 609.

[13] 肖志彬, 刘小雷, 成日青, 等.  $\beta$  - 谷甾醇对阿司匹林致胃黏膜损伤副作用及其药理作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志 2016(1): 148 - 152.

[14] Guo Z, Liao Z, Huang L, et al. Kaempferol protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury via mitochondrial pathway mediated by SIRT1[J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 761(10): 245.

[15] Kapil S, Salma M, Nanda G, et al. Kaempferol Attenuates Myocardial Ischemic Injury via Inhibition of MAPK Signaling Pathway in Experimental Model of Myocardial Ischemia - Reperfusion Injury[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016, 2016(9): 1 - 10.

[16] Chen C H, Liao C H, Chang Y L, et al. Protopine, a novel microtubule - stabilizing agent, causes mitotic arrest and apoptotic cell death in human hormone - refractory prostate cancer cell lines[J]. Cancer letters 2012, 315(1): 1 - 11.

[17] Wing Shing Ho J, Wan Man Cheung M, Wai Lam Yu V. Active phytochemicals from Chinese herbs as therapeutic agents for the heart[J]. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents) 2012, 10(3): 251 - 255.

[18] Xiao X, Liu J, Hu J, et al. Protective effects of protopine on hydrogen peroxide - induced oxidative injury of PC12 cells via  $Ca^{2+}$  antagonism and antioxidant mechanisms[J]. European journal of pharmacology 2008, 591(1 - 3): 21 - 27.

[19] Li X, Yang Q, Wang Z, et al. Shear stress in atherosclerotic plaque determination[J]. DNA and cell biology 2014, 33(12): 830.

[20] Brown A J, Teng Z, Evans P C, et al. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis[J]. Nature Reviews Cardiology 2016, 13(4): 210.

[21] Bryan M T, Duckles H, Feng S, et al. Mechanoresponsive networks controlling vascular inflammation[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology 2014, 34(10): 2199 - 2205.

[22] Mattila J T, Thomas A C. Nitric Oxide Synthase: Non - Canonical Expression Patterns[J]. Frontiers in Immunology 2014, 5: 478.

[23] Xia N F, Rstermann U, Li H. Resveratrol and endothelial nitric oxide[J]. Molecules 2014, 19(10): 16102 - 21.

[24] Bharath L P, Mueller R, Li Y, et al. Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear - stress - induced increases in nitric oxide bioavailability[J]. Can J Physiol Pharmacol 2014, 92(7): 605 - 612.

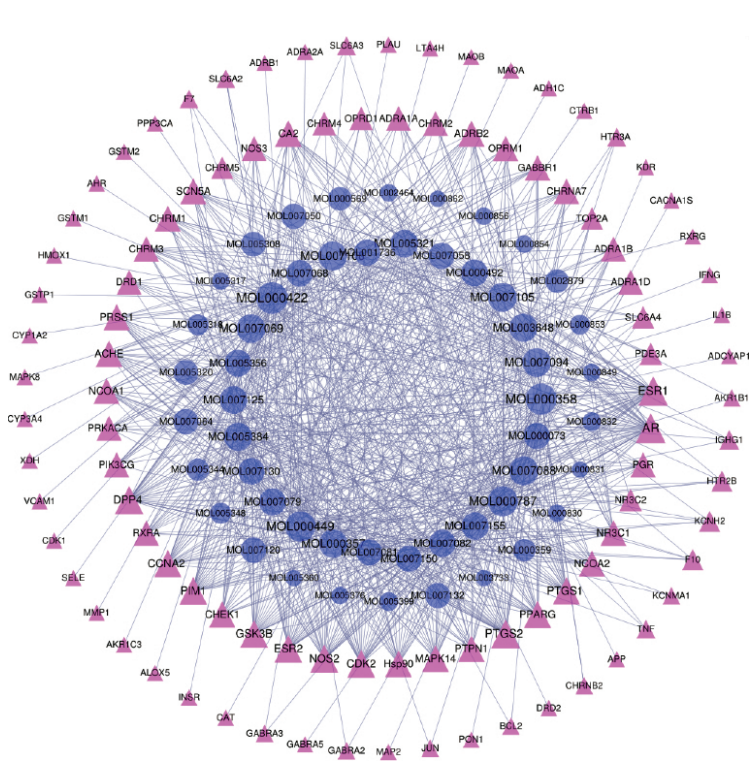
[25] Hashemzadeh A A, Nasoohi N, Raygan F, et al. Flaxseed Oil Supplementation Improve Gene Expression Levels of PPAR -  $\gamma$ , LP(a), IL - 1 and TNF -  $\alpha$  in Type 2 Diabetic Patients with Coronary Heart Disease[J]. Lipids 2017( Suppl 1): 1 - 9.

[26] Zhou Z, Zeng C, Nie L, et al. The effects of TLR3, TRIF and TRAF3 SNPs and interactions with environmental factors on type 2 diabetes mellitus and vascular complications in a Han Chinese population[J]. Gene 2017, 626: 41 - 47.

[27] McLaughlin T, Ackerman S E, Shen L, et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity - associated metabolic disease[J]. Journal of Clinical Investigation 2017, 127(1): 5.

# 基于网络药理学探究养心通脉方对冠心病的作用机制

朱梓铭 (正文见1582~1587页)



注：蓝色圆形为化合物，粉色三角形为靶点，节点大小由Degree分值高低显示

图1 化合物-靶点网络

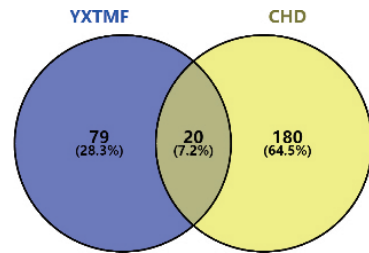
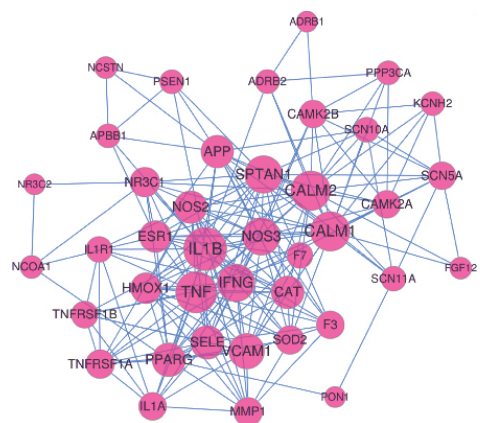


图2 养心通脉方与CHD相关性靶点交集



注：红色圆形为靶点，节点大小由degree分值高低显示

图3 蛋白质相互作用网络

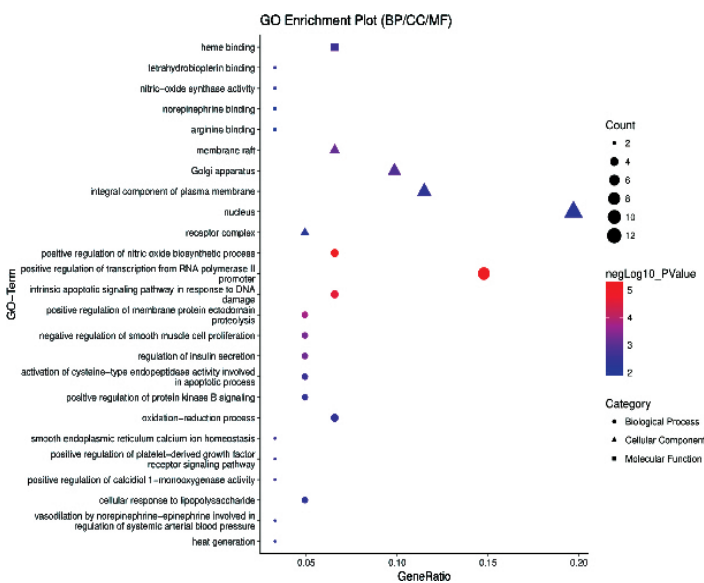
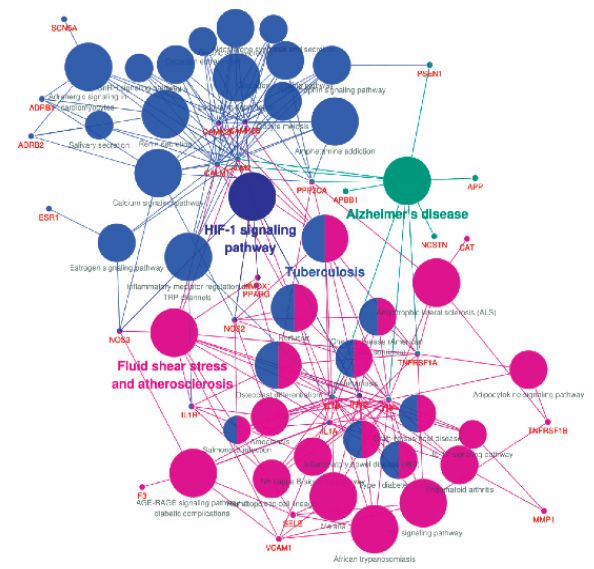


图4 生物信息学富集分析结果



注：小圆点代表靶点，大圆形代表通路，各颜色代表不同聚类组

图5 靶点通路聚类网络