

基于网络药理学探究三七治疗冠心病的潜在作用机制^Δ

黄桂锋^{1*}, 郑晓虹¹, 麦喆钊², 杨诏钧², 林雪莹³, 李俊哲²(1. 汕头市潮阳区大峰医院心血管内科, 广东 汕头 515100; 2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510405; 3. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1959-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.18

摘要 目的: 研究三七治疗冠心病的成分、靶点及通路, 探讨其发挥治疗作用的潜在分子机制。方法: 基于网络药理学方法, 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)检索获取三七的活性成分; 利用DRAR-CPI服务器、GeneCards和DisGeNET数据库筛选出与三七治疗冠心病相关的作用靶标; 采用Cytoscape 3.6.0软件构建三七有效成分-冠心病作用靶标网络; 采用String数据库绘制作用靶标的相互作用网络, 并运用Network Analyzer工具计算靶标连接度, 筛选出潜在核心靶标, 然后通过Systems Dock Web Site服务器的分子对接验证核心靶标与有效成分的结合力; 利用KEGG通路富集分析和基因本体(GO)分类富集分析获取三七治疗冠心病的重要信号通路和分子功能, 并构建重要信号通路的“有效成分-作用靶标-信号通路”网络。结果: 筛选出三七中治疗冠心病的5个有效成分(豆甾醇、 β -谷固醇、人参皂苷rh2、槲皮素、三七皂苷r1), 5个成分共作用于96个靶标并存在134种作用关系; 5个核心靶标分别为蛋白激酶B(AKT)、白细胞介素6(IL-6)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、c-JUN蛋白(c-JUN)、肝磷脂结合表皮生长因子(HB-EGF), 其主要通过改变蛋白结合作用以及调控磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)、低氧诱导因子1(HIF-1)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路来发挥治疗冠心病的作用。结论: 三七治疗冠心病不仅是通过作用于多个靶标而发挥多种效果, 而且可通过靶标之间的相互作用产生复杂的网络调节效果。

关键词 三七; 冠心病; 网络药理学; 成分; 靶标; 通路; 作用机制

Potential Mechanism of *Panax notoginseng* for Coronary Heart Disease Based on the Network Pharmacology

HUANG Guifeng¹, ZHENG Xiaohong¹, MAI Zhexing², YANG Zhaojun², LIN Xueying³, LI Junzhe²(1. Dept. of Cardiovascular Medicine, Shantou Chaoyang District Dafeng Hospital, Guangdong Shantou 515100, China; 2. Second College of Clinical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3. First College of Clinical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the component, target and pathway of *Panax notoginseng* for coronary heart disease (CHD) and its potential molecular mechanism. METHODS: Based on network pharmacology, active components of *P. notoginseng* were retrieved with TCMSP platform. The targets of *P. notoginseng* for CHD were screened by using DRAR-CPI server, GeneCards and DisGeNET databases. Cytoscape 3.6.0 software was used to form the effective components-CHD targets network of *P. notoginseng*. String database was used to draw target interaction network. Network Analyzer tool was used to calculate target connectivity, and potential core targets were screened. Molecular docking between the core targets and the effective components of *P. notoginseng* was performed by Systems Dock Web Site server. KEGG pathway enrichment analysis and gene ontology (GO) enrichment analysis were also carried out to explore the important signal pathway and molecular function of *P. notoginseng* for CHD. “Effective component-target-signal pathway” network of important signal pathway were constructed. RESULTS: Five effective components (stigmaterol, β -sitosterol, ginsenoside rh2, quercetin, notoginsenoside r1) were screened from *P. notoginseng* for CHD, which acted on 96 targets and had 134 functional relationships. Five core targets were protein kinase B (AKT), interleukin 6 (IL-6), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), c-JUN protein (c-JUN) and heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF), which played an important role in the treatment of CHD by altering protein binding and regulating signaling pathways as phosphatidylinositol-3 kinase-protein/kinase B (PI3K/AKT), hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). CONCLUSIONS: *P. notoginseng* in the treatment of CHD is not only play a variety of effects through the role of multiple targets, but also produce complex network regulation effect through the interaction between targets.

KEYWORDS *Panax notoginseng*; Coronary heart disease; Network pharmacology; Component; Target; Pathway; Mechanism

随着社会经济的发展和人们生活质量的提高, 高脂、高糖的饮食习惯日渐普遍, 导致冠状动脉粥样硬化

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81403225); 广东省中医药局科研项目(No.20181088); 广州中医药大学本科生拔尖创新人才培养项目(No.BKBJCX2018003)

* 副主任医师, 硕士。研究方向: 冠心病。电话: 0754-82256266。E-mail: hgf206@126.com

性心脏病(以下简称“冠心病”, CHD)的发病率和病死率逐年增加, 已严重影响到人们的生活质量^[1]。CHD指冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞, 造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病, 病情严重可导致患者猝死^[2-3]。CHD在临床的药物思路主要包括抗血小板聚集、调脂、扩张冠脉、减轻心肌耗氧量、改善心脏重构等^[4-6]。目前, 随着中医药的蓬勃发

展,中药在辅助治疗CHD方面发挥了重要作用。本研究团队发现,临床上采用血栓通注射液或胶囊联合常规药物治疗CHD往往可以取得更好的疗效^[7-8]。而血栓通相关制剂的主要药味均为三七^[9-10],因此本研究团队认为三七在CHD治疗过程中可发挥巨大的作用。现代药理学研究也证实,三七总皂苷可改善能量代谢障碍,促进受损组织对能量物质的利用,有利于组织结构和功能的恢复;有利于清除自由基和抗氧化应激,减少细胞损伤;能调控细胞凋亡信号通路,明显减少心肌细胞凋亡,可在一定程度上减少CHD诱因的产生,从而降低CHD的发生风险^[11-12]。三七化学成分复杂,对相关疾病的治疗具有多成分、多靶点、多途径等特点,但是目前对其药理学研究仅停留在单成分研究或对其对某种动物模型和某个/某几个相关因子的影响,尚无法很好地解释其在治疗CHD中作用广泛、效果良好的特点,其化学活性成分和作用机制均不明确。

网络药理学是以系统生物学为基础,利用生物网络数据库、各种生物网络构建方法和生物网络分析技术,通过网络构建工具,系统阐述“药物-基因-靶点-疾病”之间复杂网络关系的一门交叉学科^[13]。本研究应用网络药理学的方法,分析三七的化学成分、作用靶标、信号通路,并进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析以及基因本体(GO)分类富集分析,揭示三七的多靶标、多通路协同作用机制,旨在发掘其治疗CHD的新靶点和新通路,为临床治疗CHD提供新思路,同时也为三七的临床应用提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 三七活性成分的获取

利用中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/>)检索三七的化学成分。以“三七”为关键词在该平台进行检索,获得其化学成分的信息,包括分子名、分子量、脂水分配系数、半衰期、口服吸收度(OB)和类药性(DL)等。由于并非所有成分均能作为药物进入人体内发挥作用,所以根据TCMSP平台的推荐,选取同时满足“OB值大于30%”“DL值大于0.18”这两个纳入条件^[14]的化学成分,作为三七的活性成分。

1.2 三七治疗CHD的作用靶标基因的获取

1.2.1 三七活性成分靶标基因的获取 采用Discovery Studio 4.0软件对“1.1”项下获取的三七活性成分进行预处理;选择“Minimize ligands”模块,选择“CHARMm”力场,能量优化算法采用“共轭梯度法”和“最陡下降法”,对活性成分进行能量最小化分析;分子多构象生成选择“BEST”模式进行。通过Chembiodraw Ultra 12.0软件绘制三七活性成分的3D结构图,然后将所有活性分子的3D结构上传到DRAR-CPI服务器(<http://cpi.bio-x.cn/drar/>),并基于反向分子对接方法对活性成分和靶标间相互作用的亲和性进行评分。按照该服务器推荐,选定Z-score值小于-0.5的蛋白^[15]作为三七活性成分的靶标蛋白,并记录活性成分和靶标蛋白的对应关系。然后通

过UniProtKB数据库(<https://www.uniprot.org/>)检索活性成分靶标蛋白的分子名,检索字段为“All Fields”,限定物种为“Human”,从而获取靶标蛋白的相应基因与其UNIPROTKB编号(UPID)。

1.2.2 CHD疾病靶标基因的获取 分别在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)中进行检索,以“Coronary heart disease”或“CHD”为关键词,获取CHD疾病靶标基因。

1.2.3 三七治疗CHD的成分-疾病靶标基因的获取 采用Excel 2007软件录入三七活性成分靶标基因和CHD疾病靶标基因,对两者进行对比并筛选出交集基因,作为三七治疗CHD的成分-疾病靶标基因(简称为“作用靶标”);同时,筛选出上述靶标基因对应的UPID。

1.3 有效成分-作用靶标基因网络的构建

根据“1.2.3”项下筛选获得的作用靶标基因,从“1.1”项下获取的三七活性成分中筛选出三七中可能具有CHD治疗作用的活性成分,作为有效成分。将这些有效成分和作用靶标基因及两者间的对应关系文件导入Cytoscape 3.6.0软件,构建有效成分-作用靶标基因网络,并对网络可视化图谱进行读取和分析。

1.4 核心靶标的获取

1.4.1 潜在核心靶标的获取 将“1.2.3”项下获得的三七治疗CHD的作用靶标基因的UPID导入String数据库(<https://string-db.org/>),限定物种条件为“Homo sapiens”,检索获取作用靶标基因的相互作用网络关系。再将这一相互作用网络关系文件导入Cytoscape 3.6.0软件,绘制作用靶标基因的相互作用网络。采用该软件的“Network Analyzer”工具对相互作用网络进行分析并计算各作用靶标的连接度(Degree)。Degree值代表某个靶标与其可能具有相互作用关系的其他靶标数量,该值越高则意味着该靶标在三七治疗CHD中发挥的作用可能越大。筛选Degree值最大的5个作用靶标作为潜在核心靶标。根据各个作用靶标的Degree值调整节点的面积大小,绘制作用靶标的相互作用网络图(Degree值越大则节点面积越大),并对图谱进行读取和分析。

1.4.2 潜在核心靶标与有效成分之间结合力的分子对接验证 将“1.4.1”项下获得的潜在核心靶标导入System Dock Web Site服务器(<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>),按照服务器原始参数设定,将潜在核心靶标与“1.3”项下获得的三七治疗CHD的有效成分进行分子对接,得到对接评分(Docking score),用来评价有效成分与潜在核心靶标的结合力,以验证核心靶标的真实性。当对接评分>4.25时,表示成分和靶标具有一定的结合能力;当对接评分>5.0时,表示其结合能力较强;当对接评分>7.0时,表示其结合能力很强^[16]。

1.5 重要信号通路和分子功能的获取

将“1.2.3”项下获得的三七治疗CHD的作用靶标基因导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),设置

“Select Identifier”为“UNIPROT ACCESSION”、“List Type”为“Gene List”,选择“Functional Annotation Tool”,获得KEGG通路富集分析和GO分类富集分析的结果,并重点关注GO分类富集分析结果中的分子功能(Molecular function, MF)部分。选取 $P < 0.001^{[7]}$ 的信号通路和分子功能,并根据富集基因数由多到少排序,选取排名前20位的信号通路和分子功能,结合现有文献,从中筛选三七治疗CHD的重要信号通路和分子功能并进行分析。

1.6 重要信号通路的“有效成分-作用靶标-信号通路”网络构建

通过DAVID数据库,在筛选重要信号通路的同时,找出富集于上述信号通路中的作用靶标基因,并与“1.2.3”项下获得的三七治疗CHD的作用靶标基因进行对比,筛选出交集靶标。将这些交集靶标与“1.3”项下获得的三七治疗CHD的有效成分相配对,然后将配对关系文件导入Cytoscape 3.6.0软件,构建出重要信号通路的“有效成分-作用靶标-信号通路”的网络关系图,对图谱进行读取并分析三七治疗CHD的分子机制。

2 结果

2.1 三七活性成分的筛选结果

从TCMSP平台上检索到三七所含的化学成分有119个,符合纳入条件的活性成分共5个,分别为豆甾醇(Stigmasterol)、 β -谷固醇(Beta-sitosterol)、人参皂苷rh2(Ginsenoside rh2)、槲皮素(Quercetin)、三七皂苷r1(Notoginsenoside r1),详见表1。

表1 三七活性成分

Tab 1 Active components of *Panax notoginseng*

序号	活性成分	中文名称	OB, %	DL
1	Stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
2	Beta-sitosterol	β -谷固醇	36.91	0.75
3	Ginsenoside rh2	人参皂苷rh2	36.32	0.56
4	Quercetin	槲皮素	46.43	0.28
5	Notoginsenoside r1	三七皂苷r1	42.00	0.19

2.2 三七治疗CHD作用靶标基因的筛选结果

在DRAR-CPI服务器中对三七的5个活性成分进行反向分子对接后,结果Z-score值小于-0.5的靶标有147个;通过UniProtKB数据库获得其对应的基因和UPID;再将上述靶标基因与GeneCards和DisGeNET数据库中的CHD相关基因比对、取交集后,筛选出三七治疗CHD的作用靶标基因96个,详见表2。

2.3 有效成分-作用靶标网络的构建结果

根据作用靶标基因的筛选结果,从三七的5个活性成分中筛选出5个有效成分(见表1),即活性成分均为有效成分。经有效成分与作用靶标基因配对后绘制出有效成分-作用靶标基因网络图(见图1)。由图1可见,网络中共有101个节点,包括5个有效成分和96个作用靶标基因,其中矩形节点代表有效成分,圆形节点代表作用靶标基因;另有134条边线,代表5个有效成分与96

表2 三七治疗CHD的作用靶标基因

Tab 2 Target genes of *P. notoginseng* for CHD

序号	作用靶标基因	UPID	序号	作用靶标基因	UPID	序号	作用靶标基因	UPID
1	ADCYAP1	P18509	33	IL1B	P01584	65	PON1	P27169
2	AKT	P31749	34	IL2	P60568	66	POR	P16435
3	CCNB1	P14635	35	IL6	P05231	67	PPARA	Q07869
4	CCND1	P24385	36	INSR	P06213	68	PPARD	Q03181
5	CHRM1	P11229	37	IRF1	P10914	69	PPARG	P37231
6	CHRM2	P08172	38	c-JUN	P05412	70	PRKACA	P17612
7	CHRM3	P20309	39	KCNH2	Q12809	71	PRKCA	P17252
8	CHUK	O15111	40	LTAH	P09960	72	PRKCB	P05771
9	CXCL8	P10145	41	MAP2	P11137	73	PRSSI	P07477
10	E2F1	Q01094	42	MGAM	O43451	74	PTEN	P60484
11	E2F2	Q14209	43	MMP1	P03956	75	PTGS1	P23219
12	HB-EGF	P01133	44	MMP3	P08254	76	PTGS2	P35354
13	EGFR	P00533	45	MMP9	P14780	77	RAF1	P04049
14	ELK1	P19419	46	MPO	P05164	78	RASA1	P20936
15	ERBB2	P04626	47	MYC	P01106	79	RB1	P06400
16	ERBB3	P21860	48	NCF1	P14598	80	RELA	Q04206
17	F2	P00734	49	NCOA1	Q15788	81	RUNX2	Q13950
18	F3	P13726	50	NCOA2	Q15596	82	RXRA	P19793
19	FOS	P01100	51	NFE2L2	Q16236	83	SCN5A	Q14524
20	GJA1	P17302	52	NFKB1A	P25963	84	SELE	P16581
21	GSTM1	P09488	53	NOS3	P29474	85	SLC2A4	P14672
22	GSTM2	P28161	54	NQO1	P15559	86	SLC6A4	P31645
23	GSTP1	P09211	55	NR1E2	O75469	87	SOD1	P00441
24	HIF-1 α	Q16665	56	NR1E3	Q14994	88	SPP1	P10451
25	HK2	P52789	57	NR3C2	P08235	89	STAT1	P42224
26	HMOX1	P09601	58	ODC1	P11926	90	TGFB1	P01137
27	HSF1	Q00613	59	OPRM1	P35372	91	THBD	P07204
28	HSP90AB1	P08238	60	PARP1	P09874	92	TNF	P01375
29	ICAM1	P05362	61	PGR	P06401	93	VCAM1	P19320
30	IFNG	P01579	62	PIK3CG	P48736	94	VEGFA	P15692
31	IGF2	P01344	63	PLAT	P00750	95	XDH	P47989
32	IL10	P22301	64	PLAU	P00749	96	IL1A	P01583

个靶标基因之间存在134种作用关系,其中槲皮素可与83个靶标基因产生作用。由该网络可见,同一作用靶标基因可对应不同的有效成分,而同一有效成分也可以作用于不同的靶标基因,表明三七治疗CHD具有多成分、多靶标的特点。

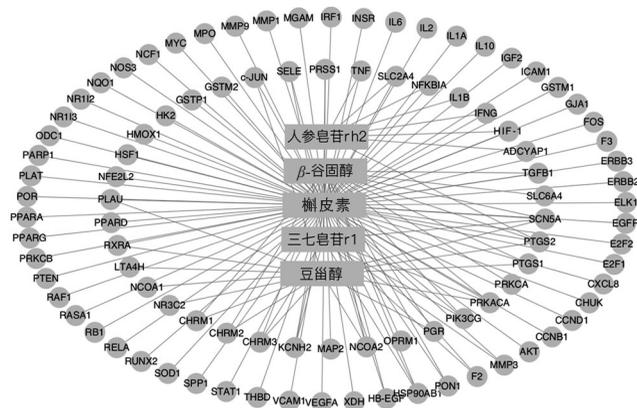


图1 有效成分-作用靶标基因网络

Fig 1 Effective component-target gene network

2.4 核心靶标的筛选结果

对通过String数据库获得的作用靶标的相互作用网络关系,绘制出靶标的相互作用网络图,结果见图2。由

图2可见,该网络共包括96个节点、1 187条边线,其中圆形节点表示作用靶标,边线表示靶标之间的相互作用关系。经“Network Analyzer”工具计算得出各作用靶标的连接度,结果见表3。由表3可见,连接度最高的5个靶标分别为蛋白激酶B(AKT)、白细胞介素6(IL-6)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、c-JUN蛋白(c-JUN)、肝磷脂结合表皮生长因子(HB-EGF)。因此,本团队认为,上述5个靶标在三七治疗CHD中发挥了重要作用,为潜在核心靶标。结合图2亦可看出,上述5个作用靶标可影响多个靶标,进一步证实了三七治疗CHD不仅是通过作用于多个靶标而发挥多种效果,还通过靶标之间的相互作用产生了复杂的网络调节效果。

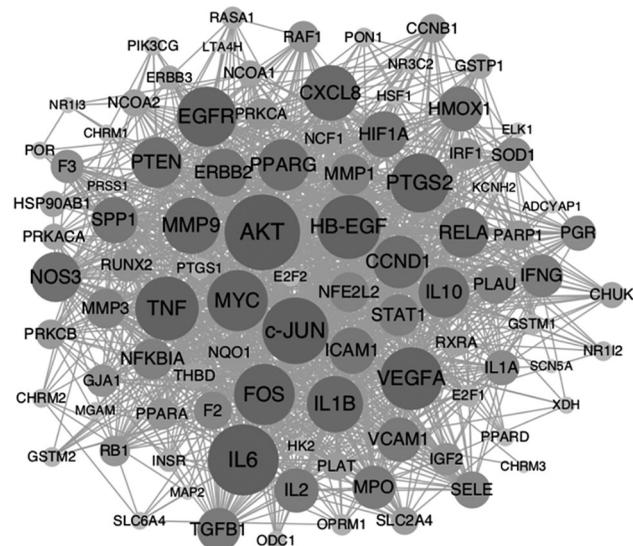


图2 作用靶标的相互作用网络
Fig 2 Target interaction network

将5个潜在核心靶标与三七的5个有效成分进行分子对接验证后,结果在25种可能的对接关系中,有4种对接关系的对接评分>7.0,占16%;有9种对接关系的对接评分在7.0~5.0之间,占36%;有9种对接关系的对接评分在5.0~4.25之间,占36%;有3种对接关系的对接评分<4.25,占12%。由此可见,5个潜在核心靶标与三七的有效成分结合活性高,两者之间具有较强的结合能力。本团队认为,该5个靶标在实际情况中确实发挥了较大的作用,因此确定为三七治疗CHD的核心靶标。

2.5 重要信号通路和分子功能的筛选结果

经KEGG通路富集分析,符合筛选条件的信号通路有20条,详见表4;经GO分类富集分析,符合筛选条件的分子功能有20个,详见表5。结合已有文献及相关研究,本团队认为,在三七治疗CHD中发挥重要作用的通路有磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路、低氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路;作用较大的分子功能是蛋白结合(Protein binding)。

2.6 有效成分-作用靶标-信号通路网络构建结果

基于重要信号通路的筛选结果,构建出有效成分-

表3 作用靶标的连接度

Tab 3 Target connectivity

作用靶标	连接度	作用靶标	连接度	作用靶标	连接度	作用靶标	连接度
AKT	70	IL2	36	NQO1	21	GSTM1	10
IL6	65	VCAM1	36	RB1	21	PON1	9
VEGFA	61	MPO	35	PARP1	20	HK2	9
c-JUN	60	TGFB1	35	NCF1	20	ODC1	9
HB-EGF	59	IFNG	34	PRKCB	20	GSTM2	9
TNF	57	STAT1	33	CCNB1	19	NR1I2	9
MYC	55	MMP1	32	SLC2A4	19	CHRM2	8
FOS	54	NFKBIA	32	PLAT	18	NR3C2	8
EGFR	53	MMP3	31	NCOA2	17	PPARD	8
PTGS2	52	NFE2L2	31	PRKACA	16	PIK3CG	8
MMP9	50	PLAU	29	HSP90AB1	16	HSF1	8
IL1B	49	F2	29	RXRA	16	E2F2	8
CXCL8	48	SELE	28	THBD	16	SLC6A4	7
CCND1	45	PGR	26	CHUK	16	POR	7
PPARG	44	SOD1	26	HIF-1 α	16	XDH	6
PTEN	43	IL1A	26	HB-EGF	16	MGAM	6
IL10	43	F3	24	NCOA1	16	CHRM1	6
RELA	42	GJA1	23	GSTP1	15	NR1I3	5
NOS3	42	RUNX2	23	ERBB3	15	MAP2	4
ERBB2	40	IGF2	23	OPRM1	12	ELK1	4
SPP1	38	PRKCA	22	INSR	12	ADCYAP1	3
ICAM1	38	RAFI	22	RASA1	12	PRSS1	3
HIF1A	38	IRF1	22	E2F1	12	LT44H	3
HMOX1	37	PPARA	22	PTGS1	11	SCN5A	3

表4 作用靶标的KEGG通路富集分析结果

Tab 4 Analysis results of KEGG pathway enrichment of target

通路	对应中文名称	作用靶标数	通路总靶标数	P
PI3K/AKT signaling pathway	磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路	21	345	9.72×10^{-9}
HTLV-I infection	人类嗜T淋巴细胞病毒I型感染	20	254	3.44×10^{-10}
MAPK signaling pathway	丝裂原活化蛋白激酶信号通路	18	253	1.70×10^{-8}
Influenza A	甲型流感	17	174	4.99×10^{-10}
HIF-1 signaling pathway	低氧诱导因子1信号通路	16	96	7.94×10^{-13}
TNF signaling pathway	肿瘤坏死因子信号通路	16	107	4.09×10^{-12}
MicroRNAs in cancer	癌症相关小分子糖核酸	16	286	3.15×10^{-6}
Pancreatic cancer	胰腺癌	15	65	4.59×10^{-14}
Prostate cancer	前列腺癌	15	88	3.81×10^{-12}
Osteoclast differentiation	破骨细胞分化	15	131	9.31×10^{-10}
Leishmaniasis	利什曼病	14	71	3.65×10^{-12}
FoxO signaling pathway	叉头框转录因子O亚族1信号通路	14	134	1.29×10^{-8}
Focal adhesion	黏着斑	14	206	2.02×10^{-6}
Ras signaling pathway	Ras信号通路	14	226	5.65×10^{-6}
Bladder cancer	膀胱癌	13	41	5.97×10^{-14}
Non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌	13	56	3.61×10^{-12}
Small cell lung cancer	小细胞肺癌	13	85	6.28×10^{-10}
Rheumatoid arthritis	风湿性关节炎	13	88	9.50×10^{-10}
Toll-like receptor signaling pathway	Toll样受体信号通路	13	106	8.43×10^{-9}
Thyroid hormone signaling pathway	甲状腺激素信号通路	13	115	2.15×10^{-8}

作用靶标-信号通路网络图,详见图3。由图3可见,该网络共有49个节点,其中三角形节点为有效成分,圆形节点为作用靶标基因,六边形节点为重要信号通路。由该网络图可见,三七治疗CHD的机制主要是由5个有效成分作用于41个作用靶标,从而调控HIF-1、MAPK、PI3K/AKT信号通路,发挥抗炎、保护缺血损伤、减少动脉粥样硬化的作用。

表5 作用靶标的分子功能GO分类富集分析结果

Tab 5 Analysis results of GO pathway enrichment for molecular function of target

分子功能	对应中文名称	作用靶标数	总靶标数	P
Protein binding	蛋白结合	81	878	4.08×10^{-11}
Enzyme binding	酶结合	22	333	1.28×10^{-16}
Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	转录因子活性, 序列特异性DNA结合	22	961	6.39×10^{-3}
Identical protein binding	相同蛋白结合	20	749	2.95×10^{-3}
DNA binding	DNA结合	19	1 674	5.25×10^{-3}
Sequence-specific DNA binding	序列特异性DNA结合	17	518	2.89×10^{-3}
Protein homodimerization activity	蛋白同源二聚化活性	17	730	2.88×10^{-3}
Zinc ion binding	锌离子结合	16	1 169	2.16×10^{-3}
Transcription factor binding	转录因子结合	15	284	6.38×10^{-10}
ATP binding	三磷酸腺苷结合	14	1 495	7.55×10^{-3}
Protein heterodimerization activity	蛋白异源二聚化活性	13	465	1.14×10^{-3}
Protein kinase binding	蛋白激酶结合	12	376	8.47×10^{-3}
Chromatin binding	结合染色质	11	391	6.95×10^{-3}
Cytokine activity	细胞因子活性	10	176	6.46×10^{-7}
Protein kinase activity	蛋白激酶活性	10	359	1.89×10^{-3}
Drug binding	药物结合	9	76	1.03×10^{-3}
Steroid hormone receptor activity	类固醇激素受体活性	8	56	2.65×10^{-3}
Growth factor activity	生长因子活性	8	162	3.58×10^{-3}
Transcription coactivator activity	转录辅激活因子活性	8	248	5.00×10^{-3}
Serine-type endopeptidase activity	丝氨酸肽链内切酶活性	8	255	5.90×10^{-3}

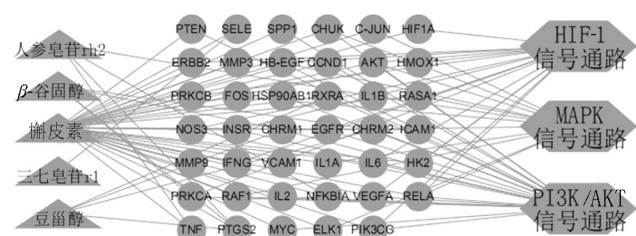


图3 有效成分-作用靶标-信号通路网络

Fig 3 Effective component-target-signaling pathway network

3 讨论

中药三七,其味甘、微苦,入足厥阴肝经,具有和营止血、通脉行瘀的功效,可用于各种血瘀证的治疗^[18]。现代药理学研究发现,三七可有效治疗动脉粥样硬化,具有抗粥样硬化斑块形成、抗氧化、抗炎的作用,可抑制IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症因子的表达^[19]。

由本研究获得的有效成分-作用靶标基因网络图可知,三七治疗CHD的有效成分分别为豆甾醇、 β -谷固醇、人参皂苷rh2、槲皮素和三七皂苷r1。这5个有效成分可作用于96个作用靶标基因从而产生对CHD的治疗效果。其中,槲皮素可作用于83个靶标,可能在治疗中发挥了最广泛、最重要的作用。既有研究亦证明了槲皮素对于心血管疾病的治疗确实发挥了积极的作用:其可减少肥大心肌细胞中的蛋白浓度,减轻心肌肥大程度;可提高心肌细胞ATP水平和线粒体膜电位,降低活性氧簇(ROS)含量,从而改善心肌细胞线粒体代谢,改善心肌细胞能量代谢紊乱和凋亡,对于心肌细胞具有保护作用^[20]。从本研究获得的有效成分-作用靶标基因网络图

可知,三七可通过多成分作用于多靶标来治疗CHD。

由本研究获得的作用靶标相互作用网络图可知,三七治疗CHD的各作用靶标之间存在复杂的相互影响,这表明其作用机制复杂多样,不仅是某个成分作用于某个靶标产生的,还有靶标之间的相互影响。分子对接结果证实,核心靶标可与有效成分紧密结合,由此说明本研究对于核心靶标的预测与实际情况吻合度较高。结合相互作用网络图与分子对接结果,本研究团队认为,AKT、IL6、VEGFA、c-JUN、HB-EGF为核心靶标,可对多个其他靶标产生影响,可发挥多方面的、综合的治疗效果。这一推论也符合既有研究成果。AKT是PI3K通路中的一个重要蛋白,可调控细胞凋亡、增殖、抗氧化等多种反应^[21]。韩军等^[22]研究发现,金丝桃苷可使AKT磷酸化、激活,促使TNF- α 和IL-6活性降低,减轻炎症反应,保护缺血再灌注损伤心肌。所以,本研究团队认为三七也可起到活化AKT、抑制炎症反应的作用。IL-6又被称为前炎症因子,可调控机体炎症发生,促进冠状动脉粥样硬化^[23]。Scheller J等^[24]研究发现,IL-6水平与冠状动脉严重病变的发生率呈正相关。郭旗等^[25]也通过研究发现,随着CHD临床症状的加重,IL-6水平在依次递增。因此,本研究团队推测三七是通过抑制IL-6的生物学功能从而减轻CHD症状并减缓病情的进展,从而达到治疗目的。HB-EGF是表皮生长因子家族成员之一,参与多种生理病理过程,如心脏发育、心肌修复、心肌肥大等^[26]。有研究证实,在动脉粥样硬化斑块组织中,HB-EGF在主动血管平滑肌细胞和巨噬细胞中有明显高表达,能促进动脉硬化,加重CHD的临床症状^[27]。对此,本研究团队考虑三七可能是通过降低HB-EGF的表达来减轻CHD的临床表现。c-JUN是激活蛋白1(AP-1)的异源二聚体形式,已有研究证实,c-JUN可诱导内皮细胞黏附因子产生、增加趋化因子表达和泡沫细胞生成,从而促进动脉粥样硬化的形成与发展^[28]。因此,三七有可能通过抑制c-JUN的表达来发挥防治CHD的作用。VEGFA是血管内皮因子家族中的一种类型,与不同受体结合后可以激活不同的下游信号通路来发挥作用^[29],然而关于VEGFA在CHD治疗中的作用机制尚未明确,缺少相关研究。

从本研究的GO分类富集分析结果可知,三七可通过影响蛋白结合的功能以达到治疗CHD的目的。有研究发现,部分结合蛋白的大量合成可导致CHD发生率升高,例如血清视黄醇结合蛋白4(RBP4)在动脉粥样硬化组中分泌的增多,对CHD的发生起到一定诱导作用^[30];脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(AFABP)也是一种可诱发CHD的结合蛋白,其在巨噬细胞中是炎症反应的关键调节因子,可参与到动脉粥样硬化的过程中,是心血管疾病的炎症性危险因素^[31]。因此,本研究团队推测三七可抑制蛋白结合功能,减少RBP4和AFABP等结合蛋白的合成分泌,达到防治CHD目的。

从本研究KEGG通路富集分析结果和有效成分-作

用靶标-信号通路网络图可知,三七治疗CHD主要是通过调控PI3K/AKT信号通路、HIF-1信号通路和MAPK信号通路从而发挥作用。其中,PI3K/AKT信号通路在心肌细胞的凋亡、炎症反应、抗氧化反应中发挥着至关重要的作用^[21]。研究表明,当心肌细胞受到损害时,PI3K/AKT信号通路可抑制心肌炎症反应的发生,限制内源性负反馈调节因子和代偿机制的产生,从而减少恶性病变的发生,保护受损心肌^[32-33]。HIF-1是HIF-1信号通路中的重要因子,广泛存在于多细胞动物体内,在低氧状态下,机体可通过调节HIF-1信号通路来上调HIF-1的表达,从而维持内环境的氧稳态^[34]。目前越来越多的研究致力于利用HIF-1 α 来调控多种血管生成因子的表达,由此对缺血缺氧的心肌组织进行基因治疗,达到促进新生血管的生成、改变靶组织代谢情况从而减轻心肌缺血损伤的目的^[35]。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)是MAPK通路中的重要下游蛋白,作为细胞内信号传导酶,在心肌缺血再灌注损伤信号传导通路中发挥了重要作用^[36]。张成哲等^[37]研究发现,脾虚型CHD模型动物的p38 MAPK蛋白表达明显升高,猜测其可能通过激活核转录因子 κ B(NF- κ B),进而诱导IL-6、TNF- α 的释放,参与动脉粥样硬化的形成,导致CHD的发生。

综上所述,三七治疗CHD的过程涉及多个活性成分、作用靶标及通路,这与中医药治疗疾病“多成分、多靶标、多通路”的作用特点相符合。本研究所得结论大部分与现有研究报道相一致,但也有部分结论并无足够的既有相关研究支持,这可能是对数据进行多次交互分析产生的误差,但从另一个角度看也可为研究者提供该领域新的研究切入点。本文仅从理论层面研究了三七治疗CHD的作用机制,实际应用中还需要更多的临床试验和相关细胞、分子实验等对本结论进行验证。

参考文献

[1] HTET S, ALAM K, MAHAL A, et al. Economic burden of chronic conditions among households in Myanmar: the case of angina and asthma[J]. *Health Policy Plan*, 2015, 30(9): 1173-1183.

[2] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 274.

[3] 郭志刚, 梁亚玲. 饮食调节及基因改变在防治冠心病中的新观点[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 19(1): 2-4.

[4] 李昌利. 硫酸氢氯吡格雷片治疗冠心病的应用效果[J]. *中国当代医学*, 2019, 26(1): 79-81.

[5] 李金姬, 李莉. 瑞舒伐他汀与阿托伐他汀治疗冠心病的临床对比观察[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(2): 114.

[6] 孙鹏, 高红新. 硝酸甘油联合低分子肝素钠治疗冠心病心绞痛的效果观察[J]. *中国实用医药*, 2018, 13(31): 126-127.

[7] 孙鲁军. 复方血栓通胶囊辅助冠心病心绞痛临床观察[J]. *实用中医学杂志*, 2018, 34(5): 579-580.

[8] 赵海军. 单硝酸异山梨酯注射液联合血栓通注射液治疗冠心病心绞痛临床研究[J]. *新中医*, 2018, 50(9): 37-40.

[9] 梁艳. 探讨血栓通治疗急性ST段抬高型心肌梗死的临床效果[J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(8): 85-86.

[10] 董君君, 胡家才, 杨娜. 复方血栓通胶囊治疗下肢动脉硬化闭塞症的临床观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(13): 1421-1424.

[11] 陈红艳, 陈安, 卢芳国, 等. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35(1): 154-157.

[12] 靳朴, 武杰. 三七总皂苷在心血管疾病中的研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2018, 23(6): 527-530.

[13] 邢心睿, 吕狄亚, 柴逸峰, 等. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(2): 97-102.

[14] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.

[15] WU Z, LI W, LIU G, et al. Network-based methods for prediction of drug-target interactions[J]. *Front Pharmacol*, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01134.

[16] HSIN KY, MATSUOKA Y, ASAI Y, et al. SystemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W507-W513.

[17] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nature Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.

[18] 殷捷鸿. 中药三七抗衰老作用研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(12): 3060-3061.

[19] 熊敏琪, 崔金刚, 陈瑜, 等. 三七总皂苷抗动脉粥样硬化作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(5): 656-660.

[20] 吴舜, 陈明君, 周燕. 槲皮黄酮改善心肌细胞肥大过程中对线粒体功能及动力学的的影响[J]. *天津中医药*, 2019, 36(1): 83-86.

[21] 潘晔, 殷佳, 蔡雪朦, 等. 基于PI3K/AKT信号通路探讨中医药治疗冠心病的研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(19): 4100-4104.

[22] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与PI3K/AKT信号通路的关系[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 118-123.

[23] 陶敏, 郑康超, 肖森森, 等. IL-6与冠心病相关性的研究进展[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2016, 45(5): 585-587.

[24] SCHELLER J, CHALARIS A, SCHMIDT-ARRAS D, et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5): 878-888.

[25] 郭旗, 马维冬, 张春艳, 等. 冠心病患者血浆hs-CRP、IL-6和可溶性IL-6受体水平的变化及意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(3): 349-352.

[26] NISHIDA M, MIYAGAWA J, YAMASHITA S, et al. Localization of cd9, an enhancer protein for proheparin-binding epidermal growth factor, in human atherosclerotic plaques possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation[J]. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1236-1243.

[27] 刘一剑, 谭祖松, 邓晋, 等. 冠心病患者血清中HB-EGF、TGF- β_1 的表达[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(31): 1-4.

天麻中总多酚的大孔树脂纯化工艺优化^Δ

蔺蓓蓓^{1*}, 郑红星¹, 刘祥¹, 周天华¹, 胡红忠², 陈琛^{1#} (1. 陕西理工大学中德天然产物研究所/陕西省天麻山茱萸工程技术研究中心/陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西百圣生物工程有限公司, 陕西略阳 724300)

中图分类号 R284.2; R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1965-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.19

摘要 目的: 建立天麻中总多酚的含量测定方法, 并对其大孔树脂的纯化工艺进行优化。方法: 采用福林酚比色法测定天麻中总多酚的含量。以吸附、解吸性能为考察指标, 采用静态吸附和解吸试验对4种大孔树脂进行筛选, 采用动态吸附和解吸试验对上样液流速、上样液质量浓度、洗脱溶剂体积分数、洗脱流速、洗脱液体积进行考察, 从而对其纯化工艺进行优化。结果: 没食子酸检测质量浓度的线性范围为4~32 μg/mL ($r=0.999\ 9$); 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 加样回收率为95.51%~102.94% ($RSD=2.54\%$, $n=6$)。D301型大孔树脂对天麻中总多酚的静态吸附和解吸能力相对较强; 最优纯化工艺为上样液流速2倍柱体积/h, 上样液质量浓度4 mg/mL, 洗脱溶剂(乙醇)体积分数70%, 洗脱流速3 BV/h, 洗脱溶剂体积5 BV。按最优纯化工艺优化后的天麻中总多酚含量为0.381 mg/g。结论: 所建含量测定方法灵敏度高、稳定性好; 优化的纯化工艺稳定、可行。

关键词 天麻; 总多酚; 大孔树脂; 福林酚比色法; 纯化工艺

Optimization of Purification Technology of *Gastrodia elata* Total Polyphenols by Macroporous Resin

LIN Beibei¹, ZHENG Hongxing¹, LIU Xiang¹, ZHOU Tianhua¹, HU Hongzhong², CHEN Chen¹ (1. Chinese-German Joint Institute for Natural Product Research, Shaanxi University of Technology/Shaanxi Provincial Engineering Research Center of *Gastrodia elata* and *Cornus officinalis*/College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Shaanxi Hanzhong 723000, China; 2. Shaanxi Baisheng Biological Engineering Co., Ltd, Shaanxi Lueyang 724300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of total polyphenols from *Gastrodia elata*, and to optimize the purification technology of macroporous resin. METHODS: The content of total polyphenols from *G. elata* was determined by Folin-ciocailu colorimetry. Using the absorption and desorption performance as index, 4 kinds of macroporous

- [28] 王婷, 夏大胜, 何强, 等. 心绞痛患者血清内脂素水平变化与激活蛋白1、基质金属蛋白酶2的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(5): 1-3.
- [29] SHIBUYA M. VEGF-VEGFR system as a target for suppressing inflammation and other diseases[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015, 15(2): 135-144.
- [30] 蒋伏松, 成兴波, 李慧娟, 等. 血清视黄醇结合蛋白4与2型糖尿病颈动脉粥样硬化的关系[J]. 苏州大学学报(医学版), 2009, 29(3): 508-510, 517.
- [31] 王武祥, 贾永平, 郭贝贝, 等. 冠心病患者PCI术前后血清AFABP的变化及意义[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(8): 947-949.
- [32] 张可璇, 毛洪, 雅孟雪, 等. PI3K/AKT调节线粒体Cx43蛋白表达在H₂S后处理离体大鼠心肌中的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 248-253.
- [33] KANG Y, HU M, ZHU Y, et al. Antioxidative effect of the herbal remedy Qin Huo Yi Hao and its active component tetramethylpyrazine on high glucosetreated endothelial cells[J]. *Life Sci*, 2009, 84(13/14): 428-436.
- [34] 戴国华, 宋宪波, 马培泽, 等. 微小RNA-223-3p通过调节Rps6kb1/HIF-α信号通路抑制缺血心肌微血管内皮细胞血管新生[J]. 中华心血管杂志, 2014, 42(12): 1039-1047.
- [35] 高洁, 陈运清. 缺氧诱导因子1和心血管疾病关系研究进展[J]. 现代医学卫生, 2016, 32(23): 3634-3637.
- [36] 陈松, 韩永丽, 吴松, 等. 针刺“内关”预处理对大鼠缺血再灌注心肌的保护作用及机制研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017, 46(5): 526-530.
- [37] 张成哲, 蔡甜甜, 潘华峰, 等. 益气健脾方加减治疗巴马小型猪脾虚型冠心病的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2300-2304.

(收稿日期: 2019-02-28 修回日期: 2019-05-25)

(编辑: 段思怡)

Δ 基金项目: 国家高端外国专家项目(No. GDT20186100426); 国家教科文卫重点引智项目(No. W20166100045); 陕西省重点研发计划项目(No. 2017NY-070); 陕西理工大学教育厅专项项目(No. 18JK0156); 陕西省创新能力支撑计划项目(No. 2019XY-04)

* 硕士研究生。研究方向: 天然产物化学。E-mail: 18142340208@163.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士研究生。研究方向: 天然产物化学。电话: 0916-2641661。E-mail: cchen@snut.edu.cn