

血清药物化学结合网络药理学探讨养心氏片治疗冠心病的物质基础与作用机制

伊晓娇^{1,2}, 朱俊峰^{2,3}, 余丽霞¹, 张静慧², 吴永江^{2*} (1.杭州市西溪医院药剂科, 杭州 310023; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058; 3.浙江省肿瘤医院药剂科, 杭州 310022)

摘要: **目的** 探讨养心氏片治疗冠心病的药效物质基础与潜在的作用机制。**方法** 采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术对养心氏片(Yangxinshi tablet, YXST)的入血成分进行分析; 利用 STITCH、TCMSP、Binding DB 数据库预测 YXST 入血成分的靶点; 采用 TTD、DrugBank、PharmGKB、MalaCards、CTD 数据库收集冠心病相关靶点; 通过 STRING 数据库对得到的成分靶点和疾病靶点构建蛋白相互作用关系(protein-protein interaction, PPI)网络从而筛选 YXST 治疗冠心病的潜在靶点; 利用 R 软件的 clusterProfiler 包对潜在靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释和京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析; 采用 Cytoscape 软件构建“入血成分-潜在靶点”网络并分析关键化合物和关键靶点。**结果** 通过对大鼠口服灌胃给予 YXST 提取液后的血浆进行分析, 共检测到 26 个原型成分。在数据库中收集得到入血成分对应的 287 个靶点和冠心病相关的 199 个靶点。通过交集分析和 PPI 网络的构建共获得 70 个 YXST 治疗冠心病的潜在靶点。对潜在靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析发现, YXST 治疗冠心病主要涉及了炎症反应、氧化应激以及晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体(advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE)、动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)、白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、C 型凝集素受体、Th17 细胞分化、Toll 样受体等信号通路。通过构建“入血成分-潜在靶点”网络分析得到 3 个关键化合物和 16 个关键靶点。**结论** YXST 可通过调节 TNF、PTGS2、NOS2、NOS3 等关键靶点干预炎症反应、氧化应激、动脉粥样硬化等过程发挥治疗冠心病的作用, 其潜在的有效成分为大豆苷、小檗碱和葛根素。本研究充分体现了 YXST 通过多成分-多靶点-多途径治疗冠心病的作用特点, 为深入研究 YXST 的药理作用机制提供重要参考。**关键词:** 养心氏片; 冠心病; 入血成分; 网络分析; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)16-1954-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.16.006

引用本文: 伊晓娇, 朱俊峰, 余丽霞, 等. 血清药物化学结合网络药理学探讨养心氏片治疗冠心病的物质基础与作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 1954-1962.

Combining Serum Pharmacochemistry and Network Pharmacology to Explore the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanisms of Yangxinshi Tablet in Treating Coronary Heart Disease

YI Xiaojiao^{1,2}, ZHU Junfeng^{2,3}, YU Lixia¹, ZHANG Jinghui², WU Yongjiang^{2*} (1.Department of Pharmacy, Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3.Department of Pharmacy, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the pharmacodynamic material basis and mechanisms of Yangxinshi tablet(YXST) in treating coronary heart disease. **METHODS** HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS method was performed to analyze the blood-entry components of YXST. The targets of blood-entry compounds were derived from STITCH, TCMSP and Binding DB database. The targets related to coronary heart disease were collected from TTD, DrugBank, PharmGKB, MalaCards and CTD database. Protein-protein interaction(PPI) network was constructed for the obtained compound targets and disease targets using STRING database to screen potential anti-coronary heart disease targets of YXST. Gene ontology(GO) function annotation and kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway analysis of potential targets were performed using the clusterProfiler package in R. The blood-entry components-potential target network was further constructed by Cytoscape software to obtain key compounds and key targets. **RESULTS** Rat plasma after oral administration of YXST was analyzed and 26 prototype compounds could be detected. A total of 287 compound targets corresponding to blood entry components and 199 disease targets associated with coronary heart disease were collected in the database. By intersection analysis and PPI network construction, 70 potential anti-coronary heart disease targets of YXST were obtained. According to the results of GO function annotation and KEGG pathway analysis, YXST treating coronary heart disease mainly involved in the inflammatory response, oxidative stress and advanced glycationend products-receptor for advanced glycationend products(AGE-RAGE), atherosclerosis, tumour necrosis

作者简介: 伊晓娇, 女, 博士 Tel: (0571)88208621 E-mail: xjyi@zju.edu.cn *通信作者: 吴永江, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88208621 E-mail: yjwu@zju.edu.cn

factor(TNF), interleukin-17(IL-17), C-type lectin receptor, Th17 cell differentiation and Toll-like receptor signaling pathways. By constructing and analyzing the blood-entry components-potential target network, 3 key compounds and 16 key targets were obtained. **CONCLUSION** YXST can interfere with the inflammatory response, oxidative stress and atherosclerosis process by regulating TNF, PTGS2, NOS2 and NOS3. The potential effective compounds are daidzein, berberine and puerarin. This study fully reflect the characteristics of YXST in treating coronary heart disease through multi-component, multi-target and multi-pathway, and provide an important reference for further research on the pharmacological mechanisms of YXST.

KEYWORDS: Yangxinshi tablet; coronary heart disease; prototype compound; network analysis; inflammatory response; oxidative stress

冠心病是临床上常见的一种心血管疾病, 主要发生于中老年人群。近年来, 随着人们饮食结构和生活习惯的变化, 该病的发病率和死亡率逐年上升, 并呈现年轻化趋势, 严重威胁人类健康^[1]。冠心病主要是由冠状动脉结构或功能异常, 使血管狭窄、痉挛或阻塞, 造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏疾病^[2-3]。中医理论认为, 冠心病属“胸痹”“心痛”范畴, 因痰浊阻滞, 瘀血气滞, 累及于心, 导致心脉不畅, 血脉痹阻^[4-5], 故治疗原则上应以活血化瘀为法^[6]。

养心氏片(Yangxinshi tablet, YXST)是由黄芪、党参、丹参、葛根、淫羊藿、山楂、地黄、当归、黄连、延胡索、灵芝、人参和甘草共 13 味药材制成的一种中药复方制剂, 具有益气活血、化瘀止痛之功效, 在临床上常用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗塞等心血管疾病^[7]。现代药理学研究表明, YXST 具有抗血小板聚集、降低血黏度、抑制血栓形成、降低心肌耗氧量、改善心肌缺血, 增强心功能等作用^[8]。目前, 对 YXST 的研究多集中于临床或是在动物模型上对某些因子的考察, 缺乏对其药效物质基础和作用机制的深入研究。

网络药理学融合了系统生物学、多向药理学等理论, 通过对“药物-靶点-疾病”之间复杂互作关系网络的分析, 多层次地阐明药物治疗疾病的作用机理^[9-10]。网络药理学具有整体、系统的分析特点, 已经被广泛应用于中药领域各方面的研究。此外, 血清药物化学认为, 给药后血液中含有的成分才是中药复方在体内直接发挥药效作用的物质^[11-12]。因此, 本研究首先采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术对 YXST 的入血成分进行分析。在此基础上, 结合网络药理学技术分析 YXST 入血成分的作用靶点, 探讨 YXST 治疗冠心病可能的物质基础和作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、四元

泵、柱温箱、自动进样器和紫外检测器均购自美国 Waters 科技有限公司; Triple TOF 5600^{plus} 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); XS105DU 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); H1650-W 型高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

YXST(规格: 0.6 g×36 片/盒; 批号: 151102)由青岛国风药业股份有限公司提供。木兰花碱(批号: MUST-15110910)、葛根素(批号: MUST-13111203)、甘草苷(批号: MUST-16032801)、黄连碱(批号: MUST-15011004)、表小檗碱(批号: MUST-15022101)、大豆苷(批号: MUST-12102710)、非洲防己碱(批号: MUST-13101201)、盐酸药根碱(批号: MUST-15112011)、盐酸小檗碱(批号: MUST-12122110)、巴马汀(批号: MUST-12022707)、脱氢紫堇碱(批号: MUST-12051002)、丹酚酸 B(批号: MUST-13103113)和灵芝酸 A(批号: MUST-16051010)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司, 纯度均>98%。甲醇(色谱纯, 批号: 20141016)购自百灵威科技有限公司; 甲酸(色谱纯, 批号: k1612047)购自阿拉丁试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物

6 只 SD 大鼠, ♂, 体质量(200±20)g, 购自浙江省医学科学院实验动物中心。动物使用许可证号: SYXK(浙)2012-0178。适应性饲养 1 周, 自由进食饮水, 保持 12 h 光照/黑暗, 温度为(20±2)℃, 相对湿度控制在(50±10)%。所有动物实验操作遵守浙江大学实验动物道德伦理委员会有关规定。

1.3 样品制备

1.3.1 YXST 提取液的制备 取 YXST, 除去包衣, 研细。称取 20 g 粉末, 用 500 mL 70% 甲醇超声处理 60 min, 抽滤, 将提取液浓缩至每 1 mL 含生药粉末 1 g。

1.3.2 大鼠血浆样品的制备 大鼠受试前 12 h 禁

食不禁水,口服灌胃给予 YXST 提取液 14 g·kg⁻¹。给药前和给药后 1 h 从尾静脉取血 0.5 mL, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆, 于-20 °C 下保存。分析前, 取血浆样品 200 μL, 加入 5 倍量甲醇, 涡旋 30 s 后静置 10 min, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液在常温下氮气吹干, 残渣用 200 μL 70% 甲醇复溶, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清供 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析。

1.4 色谱与质谱条件

HPLC 分离采用 Waters UPLC system, 色谱柱为 Waters CORTECS C₁₈+(4.6 mm×150 mm, 2.7 μm)。流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和 0.1% 甲酸甲醇溶液(B), 梯度洗脱: 0~20 min, 5%→25% B; 20~40 min, 25%→41% B; 40~60 min, 41%→81% B; 60~65 min, 81%→96% B; 65~70 min, 96% B。分析时间 70 min, 后运行 10 min, 进样量 10 μL, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。

质谱分析采用 Triple TOF 5 600^{plus} 质谱仪, 对 ESI 正(+)/负(-)离子同时进行扫描, 参数设置如下: 喷雾电压: +5.5 kV(+)/-4.5 kV(-); 离子源温度: 600 °C(+)/550 °C(-); Gas 1: 空气, 50 psi; Gas 2: 空气, 50 psi; CUR: 氮气, 30 psi; 碰撞电压: (40±20) V; 扫描范围: TOF-MS 为 *m/z* 100~2 000, TOF-MS/MS 为 *m/z* 50~2 000。实验数据利用 Peakview 软件(AB SCIEX, version 1.2.0.3)进行处理。

1.5 网络药理学分析

1.5.1 YXST 入血成分靶点的收集 基于上述鉴别得到的 YXST 入血成分, 用化合物名称或结构式(SMILES 格式表示)为关键词在 STITCH(Search Tool for Interactions of Chemicals and Proteins Database, <http://stitch.embl.de/>)、TCMSP(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、Binding DB(<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>)数据库中进行检索, 得到每个入血成分的靶点。再通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将靶点名归整成标准基因名(Official symbol), 限定物种为“Homo sapiens”。

1.5.2 冠心病相关靶点的收集 以“coronary heart disease”“coronary disease”为关键词, 通过 TTD (Therapeutic Target Database, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)、DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)、MalaCards

(<https://www.malacards.org/>)、CTD(Comparative Toxicogenomics Database, <http://ctdbase.org/>)数据库进行检索, 获取冠心病相关的靶点, 并按“1.5.1”项下方法进行标准化。

1.5.3 YXST 治疗冠心病潜在靶点的筛选 取入血成分靶点与疾病靶点的交集, 即得 YXST 治疗冠心病的直接作用靶点。此外, 将成分靶点和疾病靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)进行蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析, 限定物种为“Homo sapiens”, 根据置信度分值选择 confidence score≥0.7 的数据, 并使用 Cytoscape 软件(version 3.6.0)进行可视化, 进一步筛选与疾病靶点存在间接作用关系的成分靶点。将直接和间接作用靶点合并即得 YXST 治疗冠心病的潜在靶点。

1.5.4 功能注释及通路分析 基于上述所得的 YXST 治疗冠心病的潜在靶点, 利用 R 语言(version 3.4.1)的 clusterProfiler 包进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释和京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析, 探索 YXST 治疗冠心病的分子作用机制。

1.5.5 网络的构建及分析 将得到的入血成分和对应的潜在靶点导入 Cytoscape 软件构建“入血成分-潜在靶点”网络图, 再利用 Network Analyzer 插件对网络进行拓扑性质分析, 包括节点度(degree)、介数中心度(betweenness centrality)和紧密中心度(closeness centrality)。依据 3 项数值均在平均值以上的标准筛选 YXST 治疗冠心病的关键化合物和关键靶点。

2 结果

2.1 YXST 入血成分的鉴别

根据前期对 YXST 化学成分定性分析的结果^[13], 本研究对 YXST 灌胃给药前后的大鼠血浆进行比对分析, 通过提取母离子、比较保留时间和质谱裂解规律, 同时结合文献和对照品信息, 对 YXST 的入血成分进行了鉴别。给药前后大鼠血浆在正负离子模式下的总离子流图见图 1, 从中共定性鉴别出 26 个原型成分, 分别为葛根素、甘草苷、丹酚酸 B、灵芝酸 A、黄连碱、药根碱等, 具体信息见表 1。

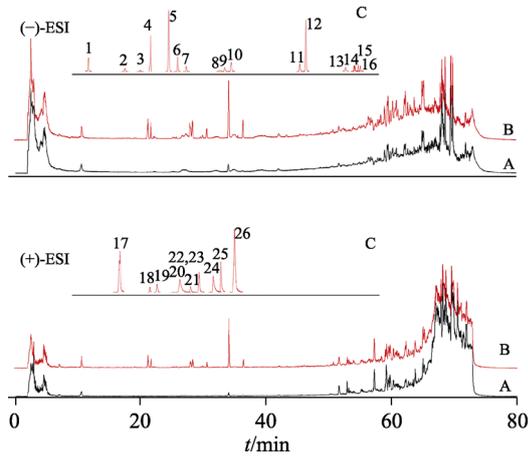


图1 给药前后大鼠血浆在正负离子模式下的总离子流图
A-空白血浆; B-含药血浆; C-入血成分的提取离子峰。
Fig. 1 Total ion chromatograms of blank plasma and rat plasma after oral administration of YXST in positive and negative ion mode
A-blank plasma; B-rat plasma after oral administration of YXST; C-extraction ion peaks of prototype components.

2.2 靶点收集与 YXST 治疗冠心病潜在靶点的筛选 通过检索 STITCH、TCMSP 和 Binding DB 数

据库,收集得到 19 个入血成分对应的 655 个靶点,合并后共得 287 个成分靶点。根据 TTD、DrugBank、PharmGKB、MalaCards 和 CTD 数据库,合并去重后共获得 199 个冠心病相关的疾病靶点。并不是所有的入血成分靶点都能发挥特定药效。因此,首先将 287 个成分靶点与 199 个疾病靶点进行关联,筛选得到 42 个重叠的靶点,即为 YXST 治疗冠心病的直接作用靶点,结果见图 2。

此外,为进一步分析与疾病靶点存在间接作用的成分靶点,把成分靶点与疾病靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析,将获得的数据利用 Cytoscape 进行可视化。其中,成分靶点与疾病靶点不能直接或间接与彼此相互作用的节点被去除。再利用 Network Analyzer 插件对该 PPI 网络中所有节点的 degree 值进行分析,计算得平均 degree 为 18.33。筛选 degree 大于平均 degree 2 倍的节点作为 hub node^[14],共有 54 个节点符合标准。在这些 hub node 中,有 40 个是成分靶点,26 个是疾

表 1 基于 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 的 YXST 入血成分鉴定结果

Tab. 1 Identification of prototype components by HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

序号	t_R /min	化合物	分子式	选择离子	m/z	CAS
1	12.013	β -(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- O - β -D-glucopyranoside (β -(3,4-二羟基苯基)-乙基- O - β -D-吡喃葡萄糖苷)	$C_{14}H_{20}O_8$	$[M-H]^-$	315.108 5	76 873-99-9
2	17.719	puerarin-4'- O -glucoside (葛根素-4'- O -葡萄糖苷)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	$[M-H]^-$	577.157 0	N/A
3	20.124	daidzein-4',7'- O -glucoside (大豆苷元-4',7'- O -葡萄糖苷)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	$[M+COOH]$	623.163 3	53 681-67-7
4	21.925	(2R)-2-(p -hydroxybenzyl)malic acid ((2R)-2-(p -羟基苄基)苹果酸)	$C_{11}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	239.056 8	N/A
5 ^a	24.696	puerarin (葛根素)	$C_{21}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	415.104 0	3 681-99-0
6	25.993	3'-methoxypuerarin (3'-甲氧基葛根素)	$C_{22}H_{22}O_{10}$	$[M-H]^-$	445.114 8	117 047-07-1
7	27.434	mirificin (葛根素芥菜糖苷)	$C_{26}H_{28}O_{13}$	$[M-H]^-$	547.146 9	N/A
8 ^a	32.993	liquiritin (甘草苷)	$C_{21}H_{22}O_9$	$[M-H]^-$	417.119 6	551-15-5
9	33.669	liquiritin apioside or isoliquiritin apioside(芹糖甘草苷/异芹糖甘草苷)	$C_{26}H_{30}O_{13}$	$[M-H]^-$	549.162 6	74 639-14-8/120926-46-7
10	34.604	daidzin isomer (大豆苷异构体)	$C_{21}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	415.104 0	N/A
11 ^a	45.096	Salvianolic acid B (丹酚酸 B)	$C_{36}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	717.148 3	115 939-25-8
12 ^a	46.471	daidzein (大豆苷元)	$C_{15}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	253.051 6	486-66-8
13	52.829	isoliquiritigenin (异甘草素)	$C_{15}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	255.066 3	961-29-5
14	54.187	formononetin (芒柄花黄素)	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	267.067 0	485-72-3
15 ^a	54.829	ganoderic acid A (灵芝酸 A)	$C_{30}H_{44}O_7$	$[M-H]^-$	515.302 0	81 907-62-2
16	55.054	lucidenic acid A (赤芝孢子酸 A)	$C_{27}H_{38}O_6$	$[M-H]^-$	457.260 4	N/A
17 ^a	16.557	magnoflorine (木兰花碱)	$C_{20}H_{24}NO_4$	$[M]^+$	342.169 8	2 141-09-5
18	21.624	tetrahydrocolumbamine (四氢非洲防己碱)	$C_{20}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	342.170 8	483-34-1
19	22.507	protopine (原阿片碱)	$C_{20}H_{19}NO_5$	$[M+H]^+$	354.135 0	130-86-9
20 ^a	26.224	coptisine (黄连碱)	$C_{19}H_{14}NO_4$	$[M]^+$	320.092 7	3 486-66-6
21 ^a	27.791	epiberberine (表小檗碱)	$C_{20}H_{18}NO_4$	$[M]^+$	336.123 8	6 873-09-2
22 ^a	29.103	columbamine (非洲防己碱)	$C_{20}H_{20}NO_4$	$[M]^+$	338.139 7	3 621-36-1
23 ^a	29.180	jatrorrhizine (药根碱)	$C_{20}H_{20}NO_4$	$[M]^+$	338.139 4	3 621-38-3
24 ^a	31.129	berberine (小檗碱)	$C_{20}H_{18}NO_4$	$[M]^+$	336.123 7	2 086-83-1
25 ^a	32.645	palmatine (巴马汀)	$C_{21}H_{22}NO_4$	$[M]^+$	352.155 5	3 486-67-7
26 ^a	35.197	dehydrocorydaline (脱氢紫堇碱)	$C_{22}H_{24}NO_4$	$[M]^+$	366.171 6	3 0045-16-0

注: ^a通过与对照品比较被确认。

Note: ^aFurther confirmed with reference compounds.

病靶点, 除去两者重叠的 12 个靶点, 剩下的 28 个成分靶点即为 YXST 治疗冠心病的间接作用靶点, 结果见图 2。将 42 个直接靶点与 28 个间接靶点合并即得 YXST 治疗冠心病的潜在靶点。70 个潜在靶点信息见图 2。

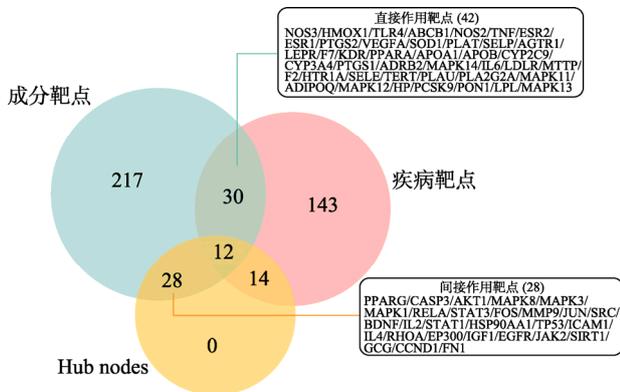


图 2 成分靶点-疾病靶点-hub node 韦恩图
 矩形框内所列均为交集的直接和间接作用靶点。
 Fig. 2 Venn diagram of compound targets, disease targets and hub nodes
 Direct and indirect targets in the intersection were list in rectangular box.

2.3 功能注释及通路分析

对 YXST 治疗冠心病的潜在靶点进行 GO 功能注释分析, 结果见图 3。70 个潜在靶点主要富集于胞外刺激反应、氧化应激反应、炎症反应的调节、活性氧代谢过程的正调控、药物反应等生物过程(biological process, BP); 主要涉及膜筏、膜区、囊腔、内质网内腔、血浆脂蛋白颗粒等细胞组分(cellular component, CC); 主要影响 MAP 激酶活性、信号转导-丝氨酸/苏氨酸激酶活性、核

心启动子序列特异性 DNA 结合、血红素结合、受体调节活性、细胞因子受体结合等分子功能(molecular function, MF)。进一步对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析发现, YXST 治疗冠心病主要涉及晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体(advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE)、动脉粥样硬化、TNF、IL-17、C 型凝集素受体、Th17 细胞分化、Toll 样受体等信号通路, 结果见图 4。

2.4 网络的构建及分析

YXST “入血成分-潜在靶点”网络共包含 86 个节点, 矩形表示入血成分有 16 个, 圆形表示潜在靶点有 70 个; 边共有 191 条, 表示化合物和靶点之间的联系, 结果见图 5。利用 Network Analyzer 插件对网络的拓扑性质进行分析, 以节点度、介数中心度和紧密中心度为标准对入血成分和潜在靶点分别进行筛选, 详细信息见表 2。3 项数值均在平均值以上的关键化合物有 3 个, 为大豆苷、小檗碱、葛根素。3 项数值均在平均值以上的关键靶点有 16 个, 为 PTGS2、PTGS1、NOS2、ESR1、NOS3、HSP90AA1、ADRB2、ESR2、MAPK14、CASP3、JUN、PPARG、AKT1、TNF、MAPK3、MAPK1。这些成分和靶点很有可能是 YXST 治疗冠心病的药效物质和作用靶点。

3 讨论

冠心病已经成为严重危害人类健康的常见疾病之一, 其发病机制在于冠状动脉血管发生粥样硬化引发器质性狭窄、阻塞后, 导致的心肌缺血、

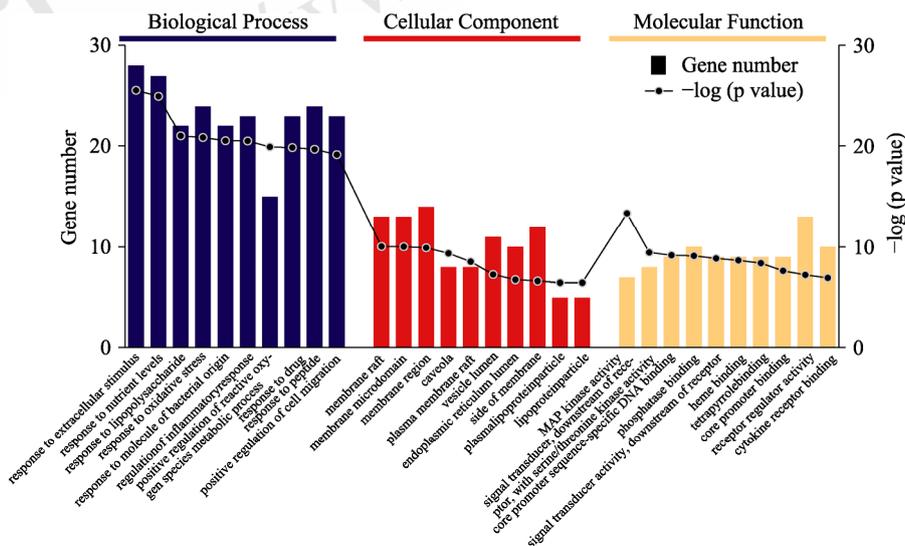


图 3 YXST 潜在靶点的 GO 功能注释分析
 Fig. 3 GO function annotation for potential targets of YXST

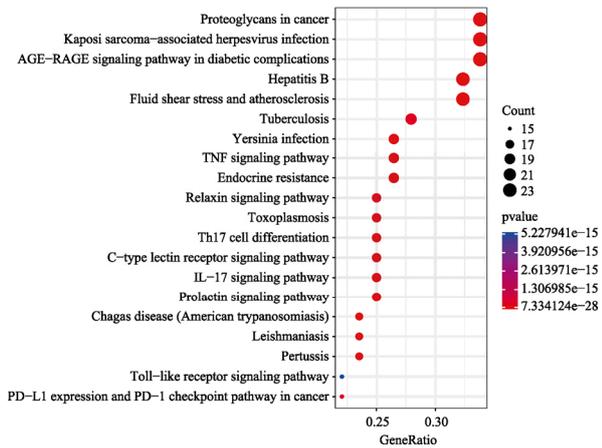


图 4 YXST 潜在靶点的 KEGG 通路分析
Fig. 4 KEGG pathway analysis for potential targets of YXST

缺氧或坏死。目前临床上对冠心病患者以二级预防为主，但长期服用西药存在耐药性强、耐受性差、不良反应严重等问题^[15]。研究发现，中药及其制剂在有效治疗冠心病、改善患者预后、减少不良反应、降低病死率方面有着独特的优势^[16]。

YXST 是由黄芪、党参、丹参等 10 余种药材制备成的中药复方制剂，具有扶正固本、益气活血、行脉止痛等功效。Zhu 等^[17]发现，与单纯西药基础治疗相比，联合使用 YXST 能够进一步提高冠心病患者临床疗效，显著降低血清中总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白、超敏 C 反应蛋白的水平，且无明显不良反应。王海燕等^[18]通过比

较对照组(常规西药治疗)和养心氏组(常规西药治疗+YXST)治疗稳定型冠心病的疗效，发现养心氏组临床症状改善总有效率高于对照组，同时左室射血分数提高，N 末端 B 型脑钠肽前体和血小板聚集率均下降。由此可见，YXST 治疗冠心病的临床疗效已基本明确，但是对其药效物质基础和作用机制却鲜有研究。

表 2 YXST 治疗冠心病关键成分和关键靶点的网络分析结果

Tab. 2 Network analysis of key compounds and key targets of YXST in treating coronary heart disease

序号	名称	节点度	介数中心度	紧密中心度
C1	Daidzein	37	0.375 0	0.506 0
C2	Berberine	36	0.417 3	0.506 0
C3	Puerarin	26	0.216 4	0.447 4
T1	PTGS2	15	0.112 0	0.544 9
T2	PTGS1	12	0.051 5	0.483 0
T3	NOS2	11	0.050 3	0.506 0
T4	ESR1	10	0.044 9	0.500 0
T5	NOS3	10	0.043 4	0.494 2
T6	HSP90AA1	10	0.042 8	0.472 2
T7	ADRB2	9	0.038 7	0.467 0
T8	ESR2	6	0.014 2	0.404 8
T9	MAPK14	5	0.015 8	0.433 7
T10	CASP3	4	0.016 8	0.452 1
T11	JUN	4	0.016 8	0.452 1
T12	PPARG	4	0.009 0	0.393 5
T13	AKT1	3	0.012 0	0.438 1
T14	TNF	3	0.012 0	0.438 1
T15	MAPK3	3	0.012 0	0.438 1
T16	MAPK1	3	0.012 0	0.438 1

注：C-成分；T-靶点。
Note: C-compound; T-target.

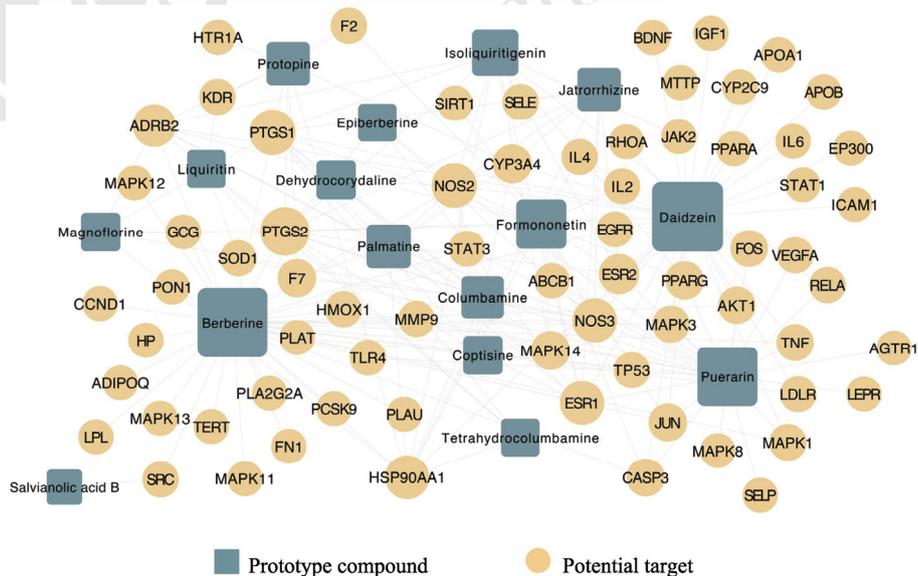


图 5 YXST “入血成分-潜在靶点” 网络图
节点的大小随节点度的增大而变大。
Fig. 5 The prototype compound-potential target network of YXST
The map node size got larger with increased degree.

随着系统生物学的蓬勃发展和虚拟运算技术的不断创新,网络药理学在中药复方研究领域得到了广泛应用,如确定药效成分、预测作用靶点、阐明作用机理等。Chen 等^[19]运用基于网络药理学的方法成功预测了 YXST 治疗心力衰竭的活性成分和潜在靶点,但其采用的是对复方中鉴定得到的 179 个化学成分进行分析。众所周知,中药中的许多化学成分尽管含量较高,但由于在体内代谢消除快速等原因难以达到有效浓度,从而无法发挥药效作用。中药血清药物化学通过鉴定给药后血液中含有的成分,确定中药复方在体内直接起作用的物质。因此,本研究在前期采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术在 YXST 中鉴别得到 127 个化合物的基础上^[13],通过对大鼠口服灌胃给予 YXST 提取液后的血浆进行分析,共检测到 26 个原型成分。再利用网络药理学分析技术获得了 YXST 中 16 个入血成分对应的 70 个潜在靶点。进一步对“入血成分-潜在靶点”网络进行分析,得到 3 个关键成分和 16 个关键靶点,这些成分和靶点很有可能是 YXST 治疗冠心病的药效物质和作用靶点。

通过对 70 个潜在靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析发现,YXST 治疗冠心病主要涉及了炎症反应、氧化应激以及 AGE-RAGE、动脉粥样硬化、TNF、IL-17、C 型凝集素受体、Th17 细胞分化、Toll 样受体等信号通路,结果见图 3~4。研究表明,动脉粥样硬化斑块主要是由浸润的炎症细胞介导形成,因此炎症反应是冠心病被广泛认可的重要机制。在动脉粥样硬化斑块内,活化的炎症细胞会释放大量的促炎细胞因子,如白细胞介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor α , TNF α)等^[20]。KEGG 通路富集分析结果也显示,YXST 可以通过调节动脉粥样硬化过程、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等发挥治疗冠心病的作用,结果见图 4。其中,IL-17 信号通路在冠心病的发展过程中起着关键调控作用,是介导炎症级联反应的重要通路^[21]。IL-17 主要是由 Th17 细胞分泌产生的炎症因子,其与受体结合后,可进一步激活下游通路促进炎症的发生,包括 NF- κ B 途径、MAP 激酶途径等^[22]。TNF 作为一类具有多种生物学功能的重要细胞因子,参与诱导细胞内多条信号通路,如炎症反应、免疫反应、细胞存活和凋亡。TNF 分为 TNF- α 和 TNF- β 2 种,其中

TNF- α 可由成熟的心肌细胞合成分泌并参与多种心血管疾病的发生发展^[23]。研究表明,冠心病患者体内的 TNF- α 水平显著升高,并与病情严重程度相关。血清中的 TNF- α 可作为冠心病患者预后和疾病评估的重要生物标志物^[24]。TNF 也是 16 个关键靶点之一,提示 YXST 可通过抑制 TNF 的表达发挥治疗冠心病的作用。此外,排名第 1 的关键靶点 PTGS2,也称为环氧化酶 2(cyclooxygenase, COX-2),是花生四烯酸合成内源性前列腺素的关键酶。COX-2 在正常心肌细胞中活性极低,当受到炎症信号等刺激时,其表达水平显著升高,引起 PEG₂、PGE₁ 和 PGL₂ 等含量增加,导致炎症反应和组织受损^[25]。研究证实,选择性 COX-2 抑制剂可改善冠心病患者的内皮依赖性血管舒张功能,减少慢性低度炎症和氧化应激^[26]。这表明,YXST 可通过降低 PTGS2 的水平起到心脏保护作用。

氧化应激在冠心病的发生发展中也有着重要作用。冠心病患者的血管功能处于异常状态,血管内皮受损严重,主要表现为动脉壁增厚和弹性变差等。研究表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)之间的不平衡会导致氧化应激状态的失常,从而引起血管状态尤其是血管内皮功能不同程度的损伤^[27-28]。NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化产生,NOS 包括内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)3 种亚型。其中,iNOS,即关键靶点 NOS2,在机体处于病理状态时会被激活产生大量的 NO,NO 和超氧阴离子 O₂⁻ 迅速结合生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸离子(ONOO⁻),诱导细胞膜发生脂质过氧化,加速动脉粥样硬化斑块的形成^[29]。此外,eNOS(即 NOS3)需要形成二聚体结构才具有生物学活性,而过氧化物会氧化结合部位的锌原子,使其活性降低,NO 生成减少,导致动脉血栓的形成。在 eNOS 转基因处理的家兔上,动脉粥样硬化病变明显消退^[30]。以上结果提示,YXST 可以通过作用于 NOS2、NOS3 等靶点调节机体的氧化应激状态从而干扰冠心病的发展进程。

通过对 YXST “入血成分-潜在靶点”网络进行分析,得到 3 个关键化合物,为大豆苷、小檗碱和葛根素。大豆苷和葛根素同属黄酮类化合物,

均被证明对心血管疾病有着良好的疗效。大豆苷可以降低低密度脂蛋白胆固醇,抑制促炎细胞因子、细胞黏附蛋白和血小板聚集,诱导 NO 生成,改善血管反应性等^[31]。在高脂饮食的 ApoE^{-/-}小鼠上,大豆苷通过抑制炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 的表达减轻炎症反应,同时降低黏附分子 VCAM-1、ICAM-1 和 E-selection 的水平从而抑制动脉粥样硬化的进展^[32]。葛根素已被制成注射液、胶囊、片剂、滴眼液等,在临床上被广泛用于治疗冠心病、心律失常、高血压、视网膜静脉阻塞等,疗效显著^[33]。研究证明,葛根素能有效改善冠心病患者的临床症状和血管内皮功能,降低炎症因子水平^[34]。小檗碱属于喹啉类生物碱,已被报道在心脑血管的治疗中具有抗炎、抗血小板、降血脂、降血压和抗动脉粥样硬化等作用^[35]。Zhu 等^[36]发现小檗碱可以增加肠道中 Akkermansi 菌群的丰度从而改善高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化病变。

综上所述,本研究通过血清药物化学和网络药理学相结合的方法,初步探讨了 YXST 治疗冠心病的药效物质基础和作用机制,发现其可通过调节 TNF、PTGS2、NOS2、NOS3 等关键靶点干预炎症反应、氧化应激、动脉粥样硬化过程等,其潜在的有效成分为大豆苷、小檗碱和葛根素。本研究充分体现了中药复方多成分、多靶点、多途径的协同作用特点,为 YXST 的进一步药理机制研究提供重要参考,同时为中药药效物质的阐明提供新的研究思路。但由于数据库和网络分析的局限性,还需进一步采用体内外模型对分析得到的关键成分和关键蛋白进行实验验证。

REFERENCES

- [1] 周宾. 益气活血类中药在冠心病治疗中的应用效果分析[J]. 中国社区医师, 2019, 21(3): 121, 123.
- [2] 项志敏. 正确认识冠心病和冠脉病[J]. 中国社区医师, 2011, 13(1): 11.
- [3] LIU J L, ZHANG Y H. Study on the therapeutic effect and mechanism of Chinese materia medica on coronary heart disease [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med(长春中医药大学学报), 2019, 35(3): 589-592.
- [4] 杨红涛. 冠心病心绞痛的多脏腑辨证论治体会[J]. 光明中医, 2014, 29(9): 1957-1958.
- [5] CHEN W N, ZHU A S, CONG P W, et al. Molecular mechanism of Erchen Decoction in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology [J]. Chin Tradit

- Herbal Drugs(中草药), 2019, 50(2): 441-448.
- [6] 柴露露, 孙明月, 姚贺之, 等. 基于网络药理学的冠心宁片治疗冠心病稳定型心绞痛作用机制[J]. 中成药, 2019, 41(4): 933-936.
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1275-1276.
- [8] 陈安妮, 高越, 赵亚红, 等. 养心氏片药理作用机制与临床研究进展[J]. 解放军药理学学报, 2017, 33(2): 172-175, 182.
- [9] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [10] HOPKINS A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [11] 田代真一. 血清药理学[J]. と“血清药化学”——汉方的药理学かい始未つた药物血中浓度测定の新しい世界, 1988(5): 54.
- [12] 苏玉陈. 中药血清药物化学研究及发展[J]. 科研, 2015(30): 234, 236.
- [13] ZHU J F, YI X J, ZHANG J H, et al. Chemical profiling and antioxidant evaluation of Yangxinshi Tablet by HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS combined with DPPH assay [J]. J Chromatogr B, 2017(1060): 262-271.
- [14] ZHU J F, YI X J, ZHANG Y W, et al. Systems pharmacology-based approach to comparatively study the independent and synergistic mechanisms of Danhong injection and Naoxintong capsule in ischemic stroke treatment [J]. Evid-Based Complementary Altern Med, 2019(10): 1-17.
- [15] 胡黎文, 余国辉, 杜怡雯, 等. 冠心病心绞痛的中医药治疗研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(5): 183-185.
- [16] XU W H, ZHENG J H, ZHAO Y, et al. Molecular biological mechanism of tanshinone IIA in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and bioinformatics [J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2019, 50(5): 1131-1140.
- [17] ZHU X L, LI Y P, WANG X L, et al. Meta analysis on clinical efficacy and safety of Yangxinshi Tablets in the treatment of patients with coronary heart disease and angina pectoris [J]. Chin Med Herald(中国医药导报), 2018, 15(28): 120-124, 129.
- [18] 王海燕, 周卿婷, 张杰. 养心氏片治疗稳定型冠心病的疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(24): 3093-3096.
- [19] CHEN L D, CAO Y, ZHANG H, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Yangxinshi Tablet for treating heart failure [J]. J Ethnopharmacol, 2018(219): 359-368.
- [20] YUDKIN J S, KUMARI M, HUMPHRIES S E, et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? [J]. Atherosclerosis, 2000, 148(2): 209-214.
- [21] BOUTET M A, NERVIANI A, GALLO AFFLITTO G, et al. Role of the IL-23/IL-17 axis in psoriasis and psoriatic arthritis: The clinical importance of its divergence in skin and joints [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 530.
- [22] CORTEZ D M, FELDMAN M D, MUMMIDI S, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK-and ERK1/2-dependent C/EBP-

- beta, NF-kappaB, and AP-1 activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(6): H3356-H3365.
- [23] MELDRUM D R, CLEVELAND J C Jr, MD, CAIN B S, et al. Increased myocardial tumor necrosis factor- α in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65(2): 439-443.
- [24] XING J Y, LIU Y S, CHEN T. Correlations of chemokine CXCL16 and TNF- α with coronary atherosclerotic heart disease [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 773-776.
- [25] 尤启冬. 药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [26] CHENEVAR D R, HÜRLIMANN D, BÉCHIR M, et al. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2003, 107(3): 405-409.
- [27] 蔡红娟, 马姝颖, 尚俊宏, 等. 颈动脉粥样硬化指标及氧化应激指标与冠心病的关系研究[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(21): 102-104.
- [28] 于治利, 关立克. 一氧化氮与血管内皮细胞功能障碍[J]. *吉林医学*, 2011, 32(2): 318-320.
- [29] ONOZATO M L, TOJO A, GOTO A, et al. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: Effects of ACEI and ARB [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(1): 186-194.
- [30] HAYASHI T, SUMI D, JULIET P A R, et al. Gene transfer of endothelial NO synthase, but not eNOS, plus inducible NOS regressed atherosclerosis in rabbits [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(2): 339-351.
- [31] GAO Y, GU W W, CHEN L L, et al. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(30): 4129-4136.
- [32] HAYASHI T, SUMI D, JULIET P A R, et al. Gene transfer of endothelial NO synthase, but not eNOS, plus inducible NOS regressed atherosclerosis in rabbits [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(2): 339-351.
- [33] LIU X M, ZHAO Y L, GAO E Z, et al. Pharmacokinetic comparisons of puerarin, daidzin and the glucuronide metabolite of puerarin after administration of total flavonoid from *Gegen* alone and total flavonoid from *Gegen* combined with total saponin from *Sanqi* in rats under different physiological states [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2013(931): 127-133.
- [34] ZHANG S L, CHEN L, ZHOU Z Y, et al. Effects of puerarin on clinical parameters, vascular endothelial function, and inflammatory factors in patients with coronary artery disease [J]. *Med Sci Monit*, 2019(25): 402-408.
- [35] DU Y, ZHANG J. Effect of berberine hydrochloride on plasma LDLR level in patients with coronary heart disease and its correlation analysis [J]. *Pract Pharm Clin Remed(实用药物与临床)*, 2018, 21(11): 1244-1248.
- [36] ZHU L, ZHANG D Y, ZHU H, et al. Berberine treatment increases *Akkermansia* in the gut and improves high-fat diet-induced atherosclerosis in *Apoe^{-/-}* mice [J]. *Atherosclerosis*, 2018(268): 117-126.

收稿日期: 2019-09-07
(本文责编: 曹粤锋)