

基于网络药理学探讨真武汤治疗慢性心力衰竭的作用机制

许洪彬^{1a}, 蔡向军^{1b}, 方彩珊^{1b}, 邓洁宜^{1a}, 史佩玉^{1b}, 莫嘉浩^{1a}, 梁浩锐^{1b}, 袁天慧^{2*}, 吴辉^{2*} (1.广州中医药大学, a.第二临床医学院, b.第一临床医学院, 广州 510006; 2.广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: 目的 基于网络药理学探讨真武汤治疗慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF) 的作用机制。方法 通过中药网络药理学分析平台(TCMSP)获取真武汤中候选化合物, 利用 SwissTargetPrediction 平台进行候选靶标预测, 并将 TCMSP 中相应化合物的靶点作为补充, 利用 Uniprot 数据库将靶点蛋白转化成基因名; 通过 CTD 和 TTD 数据库获取 CHF 的相关基因, 将真武汤靶标(基因)与 CHF 相关基因取交集作为真武汤治疗 CHF 的潜在靶标, 将交集基因提交至 STRING11.0 在线数据库进行蛋白互做分析, 并借助网络可视化软件 Cytoscape 3.7.1 绘制蛋白相互作用网络图, 利用 Excel 构建真武汤中药-潜在化合物-潜在靶标网络, 并利用 Cytoscape 3.7.1 进行可视化; 通过 RStudio 的 clusterProfiler 包进行通路富集分析; 利用分子对接技术对关键靶点和化合物的相互作用进行验证。**结果** 通过设置 OB 和 DL 值筛选得到真武汤化合物 59 种, 在获得交集基因 36 个后, 剔除不含交集基因(靶标)的化学成分, 最终筛得化合物 49 种, KEGG 富集分析共获得 36 条, 其中 13 条与 CHF 相关, 分子对接结果显示真武汤主要活性成分与 CHF 关键靶点具有较好的结合。结果表明去甲乌头碱、3β-乙酰氧基苍术酮、山奈酚、芍药苷、豆甾醇、β-谷甾醇等为真武汤主要活性成分, 白介素 6、内皮型一氧化氮合酶、血红素加氧酶 1、前列腺素 G/H 合酶 2、过氧化氢酶等为主要作用靶标, 主要调控环鸟苷酸-蛋白激酶 G 信号通路、肾素分泌、钙信号通路等通路。**结论** 本研究初步明确了真武汤通过多成分-多靶点-多通路治疗 CHF 的作用机制, 为深入研究真武汤的药效物质基础和作用机制奠定基础。

关键词: 真武汤; 慢性心力衰竭; 网络药理学; 有效成分; 通路分析; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)15-1801-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.002

引用本文: 许洪彬, 蔡向军, 方彩珊, 等. 基于网络药理学探讨真武汤治疗慢性心力衰竭的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1801-1811.

Study on the Mechanism of Zhenwu Decoction in Treating Chronic Heart Failure Based on Network Pharmacology

XU Hongbin^{1a}, QI Xiangjun^{1b}, FANG Caishan^{1b}, DENG Jieyi^{1a}, SHI Peiyu^{1b}, MO Jiahao^{1a}, LIANG Haorui^{1b}, YUAN Tianhui^{2*}, WU Hui^{2*} (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, a. The Second Clinical Medical College, b. The First Clinical Medical College, Guangzhou 510006, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of Zhenwu decoction in treating chronic heart failure(CHF) through network pharmacology. **METHODS** Candidate compounds in Zhenwu decoction were obtained through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP). SwissTargetPrediction platform was used to predict candidate targets, the targets of the corresponding compounds in TCMSP were supplemented. Uniprot database was used to convert target proteins into gene names. Genes related to CHF were obtained by CTD and TTD databases, taking the intersection of Zhenwu decoction target(gene) and CHF-related gene as the potential target of Zhenwu decoction in the treatment of CHF. The intersection gene was submitted to STRING11.0 online database for protein interchange analysis, the network diagram of protein interaction was drawn by using network visualization software Cytoscape 3.7.1. By using Excel, the network of Zhenwu decoction-potential compound-potential target was constructed, Cytoscape 3.7.1 was used for visualization. Path enrichment analysis was performed through RStudio's clusterProfiler package. Molecular docking techniques were used to validate the interactions between key targets and compounds. **RESULTS** There were 59 compounds of Zhenwu decoction which were screened by setting OB and DL values. After 36 intersection genes were obtained and chemical components without intersection genes (targets) were eliminated, 49 compounds were finally screened. A total of 36 articles were obtained by KEGG enrichment analysis, 13 of which were related to CHF. The results of molecular docking showed that the main active ingredients

基金项目: 国家自然科学基金项目(81704036); 广东省自然科学基金项目(2017A030310121); 国家中医临床研究基地建设项目(国中医药科技函[2018]131 号)

作者简介: 许洪彬, 男 Tel: 13535205117 E-mail: 1271979706@qq.com **通信作者:** 吴辉, 男, 博士, 主任中医师 Tel: 13826057026 E-mail: wuhui026@163.com 袁天慧, 女, 博士, 副主任医师 Tel: 18666085946 E-mail: laura.yth@hotmail.com

of Zhenwu decoction had a good combination with the key targets of heart failure. Deoxyaconitine, 3 β -acetoxyatractylone, kaempferol, paeoniflorin, stigmasterol and β -sitosterol were the main active ingredients of Zhenwu decoction, interleukin 6, nitric oxide synthase 3, heme oxygenase 1, prostaglandin G/H synthase 2 and catalase were the main targets, main control cyclic guanylic acid-protein kinase G signaling pathway, renin secretion and calcium signaling pathway. **CONCLUSION** This study preliminarily clarified the mechanism of Zhenwu decoction in treating CHF through multi-component, multi-target and multi-pathway therapy, laying a foundation for further study on the pharmacodynamics basis and mechanism of Zhenwu decoction.

KEYWORDS: Zhenwu decoction; chronic heart failure; network pharmacology; active components; pathway analysis; molecular docking

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由心肌病变、心脏负荷异常和心律失常等原因导致的心室收缩和(或)舒张功能下降,从而引起的一组复杂临床综合征^[1],具有较高患病率及预后差等特点^[2]。西医在药物治疗上主要采用血管紧张素转换酶抑制剂、 β -受体阻滞剂、醛固酮受体拮抗剂和利尿剂等进行治疗。中医学认为 CHF 属本虚标实之证,以心阳虚为本,淤血水饮为标,治疗以温阳利水为主,故常以真武汤加减治疗^[3-5]。

真武汤出自《伤寒杂病论》中“太阳病,发汗,汗出不解,其人仍发热,心下悸,头眩,身动,振振欲擗地者,真武汤主之”。其由茯苓、白芍、白术、生姜、附子五味药组成,主要功用为温阳利水。王茜^[6]予对照组西药口服,治疗组利用真武汤及其加减方治疗 CHF,结果表明治疗组的疗效(92.5%)>对照组(72.5%),其每搏输出量、左室射血分数等指标也要优于对照组($P<0.05$)。王金梁^[7]进行真武汤治疗心衰的疗效观察,对照组给予常规治疗,观察组在常规治疗的基础上加用真武汤,结果表明观察组患者治疗的总有效率明显高于对照组患者($P<0.01$),表明真武汤治疗心衰疗效确切。研究表明真武汤具有改善心衰患者的心脏射血分数、每搏输出量、心搏量指数、心脏指数,降低血浆内皮素水平,拮抗过度激活的神经内分泌系统,拮抗心肌细胞的凋亡等作用^[8]。

中药复方具有多成分、多靶点、多途径的特点,传统的研究方法很难从系统层面研究真武汤的作用机制。而网络药理学通过融合系统生物学、多向药理学、计算生物学、网络分析等新兴的理念和方法,从多个层次探究药物和疾病的关系,具有一定的系统性和整体性^[9]。因此本研究将运用网络药理学的方法探究真武汤治疗 CHF 的作用机制。

1 资料与方法

1.1 真武汤活性化学成分筛选

在中药网络药理学分析平台(TCMSP)([http://ibts.](http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php)

hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php)搜索收集真武汤中五味中药(附子、白术、茯苓、生姜、白芍)所包含的所有化学成分。口服生物利用度(oral bioavailability, OB)表明口服药物到达循环系统的比例,类药性(drug likeness, DL)高的化合物一般具有稳定的物理化学性质和良好的药动学性质^[10],本研究设置 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ ^[11]对得到的化合物进行筛选,得到真武汤的候选化合物,并将所有候选化合物保存为 mol2 格式。

1.2 活性成分靶点预测

将“1.1”项下 mol2 文件经 Chem3D 18.0 转化为 SDF 格式文件后导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),设置物种为“Homo sapiens”进行靶点预测,并将候选化合物在 TCMSP 数据库对应的靶标作为补充,在 UniProt 数据库(www.Uniprot.org)获取其靶点蛋白对应的基因名,其中设置检索条件“organism: homo sapiens 和 reviewed: yes”。将 SwissTargetPrediction 和 TCMSP 得到的靶点基因合并去重后即真武汤的候选靶标。

1.3 CHF 相关基因的获取

以“Heart Failure”为关键词在毒性与基因比较数据库(comparative toxicogenomics database, CTD)(<http://ctdbase.org/>)、药物治疗靶标数据库(therapeutic targets database, TTD)(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)检索与 CHF 相关的基因,Excel 合并去重后即 CHF 相关基因。CHF 相关基因与真武汤候选靶标的交集作为真武汤治疗 CHF 可能的潜在靶标。将真武汤治疗 CHF 可能的潜在靶标基因提交至 STRING 11.0(<https://string-db.org/>)在线数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络模型,将蛋白种类设置为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值设为“high confidence (0.700)^[12]”。

1.4 可视化网络构建

利用真武汤中药、潜在化合物和可能的靶标

构建真武汤中药-潜在化合物-潜在靶标(herb-potential compounds-potential targets, HB-pC-pT)网络。利用 PPI 的结果建立 CHF 相关基因相互作用网络。

1.5 KEGG 通路富集分析

利用 RStudio 的 clusterProfiler 包对“1.3”项下真武汤治疗 CHF 的潜在靶标进行 KEGG 通路富集分析并用 RStudio 的 ggplot2 包对与 CHF 相关的通路制作气泡图。

1.6 关键活性成分与关键靶点的分子对接验证

利用 AutoDock Vina(v1.1.2)^[13]对真武汤关键活性成分和关键靶点进行分子对接实验,验证其相互作用活性。对接过程中,只改变药效分子配体的构象,而保持受体蛋白的刚性不变;首先生成受体结合部位的格点盒子及其参数,再根据拉马克遗传算法优化配体结构,然后发出配体与受体的对接计算指令以产生多个结合构象,最后从中寻找最佳的结合构象并依照半经验自由能函数做出对接结果评价。具体方法如下:在 TCMSP 网站下载化合物结构文件,经 AutoDockTools(v1.5.6)加极性氢、分配电荷、设置可旋转键后保存为“pdbqt”格式文件;从 PDB 网站(<http://www.rcsb.org/>)下载需要对接的靶点蛋白,其中靶点蛋白的选择遵循以下原则:①人源蛋白优先;②分辨率越高越好;③具有原始配体且原始配体要对接的活性成分结构相似高的优先;利用 PyMol (v2.3.0)将靶蛋白和原始配体分离并去除水分子,然后将

配体和受体导入 AutoDockTools(v1.5.6)加极性氢、分配电荷并保存为“pdbqt”格式文件;设置蛋白原配体为对接盒子中心,其格点盒子大小设定为 40×40×40(每个格点的间距为 0.375Å),若靶点蛋白无原配体存在则依据已有研究报道的靶标活性口袋附近的关键氨基酸残基确定对接区域,其余参数均设为默认值。将准备好的蛋白文件、配体文件、化合物文件以及脚本放入相应文件夹,利用 AutoDock Vina(v1.1.2)进行分子对接,首先将靶蛋白原配体对接回蛋白,以其结合自由能作为筛选阳性化合物的阈值,再将选取的活性成分一一与关键蛋白进行分子对接,并提取其结合自由能作为评价其结合强弱的指标;利用 Discovery studio(v2016)和 Chimera(v1.13)对结果进行分析处理。

2 结果

2.1 中药候选化合物筛选结果

经 TCMSP 数据库检索并以 OB≥30%和 DL≥0.18 作为筛选条件,筛选出真武汤候选化合物共 59 种。真武汤的君药附子含有 21 种活性成分,占 59 种化合物的 36%;真武汤的臣药茯苓、白术含有 22 种活性成分,占 59 种化合物的 37%;真武汤的佐药生姜、白芍含有 17 种活性成分,占 59 种化合物的 29%。其中β-谷甾醇为佐药生姜和佐药白芍共有的化合物,谷甾醇为君药附子和佐药白芍共有化合物。各活性成分的详细信息见表 1。

表 1 真武汤活性成分的基本信息

Tab. 1 Basic information of the active ingredients of Zhenwu decoction

化合物编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
Mol01	11,14-eicosadienoic acid(11,14-二十碳二烯酸)	39.99	0.20	附子
Mol02	delphin_qt(飞燕草苷_qt)	57.76	0.28	附子
Mol03	deltoidin(德尔妥因)	46.69	0.37	附子
Mol04	demethyldehvaline A(去甲基棱砂贝母碱 A)	34.52	0.18	附子
Mol05	demethyldehvaline B(去甲基棱砂贝母碱 B)	34.52	0.18	附子
Mol06	deoxyandrographolide(去氧穿心莲内酯)	56.30	0.31	附子
Mol07	karakoline(多根乌头碱)	51.73	0.73	附子
Mol08	karanjin(水黄皮素)	69.56	0.34	附子
Mol09	neokadsuranic acid B(新南五味子酸 B)	43.10	0.85	附子
Mol10	2,7-dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F(2,7-二去乙酰基-2,7-二苯酰一云南紫杉宁 F)	39.43	0.38	附子
Mol11	benzoylnapelline	34.06	0.53	附子
Mol12	6-demethyldehvaline	51.87	0.66	附子
Mol13	deoxyaconitine(去氧乌头碱)	30.96	0.24	附子
Mol14	(R)-norcoclaurine(去甲乌头碱)	82.54	0.21	附子

续表 1

化合物编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
Mol15	ignavine(惰碱)	84.08	0.25	附子
Mol16	isotalatizidine(异塔拉定)	50.82	0.73	附子
Mol17	jesaconitine	33.41	0.19	附子
Mol18	(3 <i>R</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i>)-3-hydroxy-4,4,9,13,14-pentamethyl-17-[(<i>E</i> , 2 <i>R</i>)-6-methyl-7-[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1,2,3,7,8,10,12,15,16,17-decahydr	41.52	0.22	附子
Mol19	carnosifloside I _{qt}	38.16	0.80	附子
Mol20	sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	附子、白芍
Mol21	hypaconitine(次乌头碱)	31.39	0.26	附子
Mol22	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>R</i> , 16 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	茯苓
Mol23	trametenolic acid(氢化松苓酸)	38.71	0.80	茯苓
Mol24	7,9(11)-dehydropachymic acid(7,9(11)-去氢茯苓酸)	35.11	0.81	茯苓
Mol25	cerevisterol(酒酵母甾醇)	37.96	0.77	茯苓
Mol26	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>R</i> , 16 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	茯苓
Mol27	ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3β-ol	43.51	0.72	茯苓
Mol28	ergosterol peroxide(过氧化麦角甾醇)	40.36	0.81	茯苓
Mol29	(2 <i>R</i>)-2-[(5 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>R</i> , 16 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
Mol30	3β-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	茯苓
Mol31	pachymic acid(茯苓酸)	33.63	0.81	茯苓
Mol32	poricoic acid A(茯苓酸 A)	30.61	0.76	茯苓
Mol33	poricoic acid B(茯苓酸 B)	30.52	0.75	茯苓
Mol34	poricoic acid C(茯苓酸 C)	38.15	0.75	茯苓
Mol35	hederagenin(常春藤皂甙元)	36.91	0.75	茯苓
Mol36	dehydroeburicoic acid(去氢齿孔酸)	44.17	0.83	茯苓
Mol37	12-seneciyl-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol(12-千里光酰基-8-反式白术三醇)	62.40	0.22	白术
Mol38	14-acetyl-12-seneciyl-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol(14-乙酰基各里光酰基-8-反式白术三醇)	60.31	0.31	白术
Mol39	14-acetyl-12-seneciyl-2 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol(14-乙酰基-12-千里光酰基-8-顺式折术三醇)	63.37	0.30	白术
Mol40	α-amyrin(α-香树精)	39.51	0.76	白术
Mol41	(3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	白术
Mol42	3β-acetoxyatractylone(3β-乙酰氧基苍术酮)	54.07	0.22	白术
Mol43	8β-ethoxy atractylenolide III(8β-乙氧基苍术内酯 III)	35.95	0.21	白术
Mol44	β-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	生姜、白芍
Mol45	6-methylgingediacetate2(甲基姜辣二醇双乙酸酯 2)	48.73	0.32	生姜
Mol46	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	生姜
Mol47	poriferast-5-en-3β-ol	36.91	0.75	生姜
Mol48	dihydrocapsaicin(二氢辣椒碱)	47.07	0.19	生姜
Mol49	11α, 12α-epoxy-3β-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12β-olide	64.77	0.38	白芍
Mol50	paeoniflorgenone(芍药苷元)	87.59	0.37	白芍
Mol51	(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 14 <i>S</i>)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	白芍
Mol52	lactiflorin(芍药新苷)	49.12	0.80	白芍
Mol53	paeoniflorin(芍药苷)	53.87	0.79	白芍
Mol54	paeoniflorin _{qt} (芍药苷 _{qt})	68.18	0.40	白芍
Mol55	albiflorin _{qt} (芍药内酯苷 _{qt})	66.64	0.33	白芍
Mol56	benzoyl paeoniflorin(苯甲酰芍药甙)	31.27	0.75	白芍
Mol57	mairin(丁子香酮)	55.38	0.78	白芍
Mol58	kaempferol(山奈酚)	41.88	0.24	白芍
Mol59	(+)-catechin[(+)-儿茶素]	54.83	0.24	白芍

2.2 候选化合物靶标预测

经 SwissTargetPrediction 和 TCMSP 共得到 57 种候选化合物(来源于附子的去甲基梭砂贝母碱 A 和来源于白芍的芍药内酯苷_{qt} 在 SwissTargetPrediction 和 TCMSP 均未找到对应靶标)的 373 个预测靶标;君药、臣药和佐药的靶点数分别为 208, 138 和 208。君药靶标、臣药靶标和佐药靶标之间具有明显的重叠,君药和臣药具有 68 个共同靶标;君药和佐药具有 89 个共同靶标;臣药和佐药具有 74 个共同靶标;君药、臣药和佐药具有 52 个共同靶标,结果见图 1。

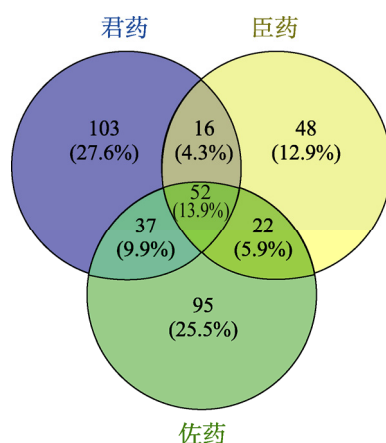


图 1 真武汤靶标分布情况

Fig. 1 Target distribution of Zhenwu decoction

2.3 CHF 相关基因收集

在 CTD 数据库(数据库更新时间 Data updated 2019 年 9 月 3 日)检索到 65 771 条与 CHF 相关的基因,选择已经有实验验证的“M(marker/mechanism)”或“T(therapeutic)”的靶标 119 条;在 TTD 数据库检索到 73 个与心力衰竭相关靶点蛋白,去掉只与急性心力衰竭相关且在 UniProt 中未找到相关条目或未验证的蛋白共得到与 CHF 相关的靶点基因 52 个;2 个数据库得到的基因合并去重共得到 159 条与 CHF 相关基因。将 159 条与 CHF 相关的基因与真武汤候选化合物的 373 个预测靶标基因取交集得到 36 条真武汤治疗 CHF 可能的潜在靶标,结果见图 2。

2.4 可视化网络构建

2.4.1 真武汤 HB-pC-pT 网络的构建 将“2.3”项下真武汤治疗 CHF 的 36 条潜在靶标输入 Excel,通过 VLOOKUP 函数找出每一条基因对应的中药化合物和对应中药,并剔除不含交集基因的化合物,建立 HB-pC-pT 网络并导入 Cytoscape 3. 7. 1 进行可视化处理,结果见图 3。网络图中存在 90

个节点(5 味中药, 49 个化合物, 36 个潜在靶标), 200 条相互作用。利用网络分析(Network Analyzer)插件对节点的拓扑学参数进行计算,以度(Degree)和中介中心性(betweenness centrality, BC)^[14]对君药、臣药和佐药各自重要化合物进行筛选,结果见表 2。君药中化合物飞燕草苷_{qt}、去甲乌头碱、德尔妥因、去氧穿心莲内酯具有较高的 Degree 和 BC;臣药中化合物常春藤皂苷元、3 β -乙酰氧基苍术酮具有较高的 Degree 和 BC;佐药中化合物山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇、芍药苷具有较高的 Degree 和 BC。这些化合物的具体 Degree 和 BC 值见表 2。

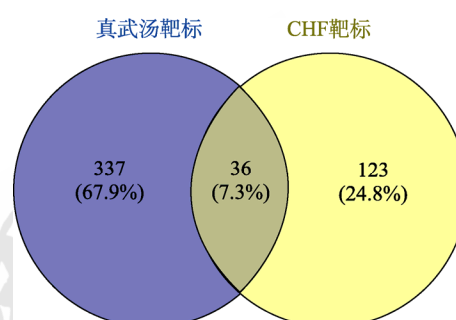


图 2 “疾病基因和中药靶标基因”韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of “disease genes and target genes of traditional Chinese medicine”

2.4.2 CHF 相关基因 PPI 网络 将“2.3”项下真武汤治疗 CHF 的 36 条潜在靶标提交至 STRING11.0 在线数据库构建 PPI 网络模型,并利用 Cytoscape 3. 7. 1 对网络进行可视化,去掉游离的基因后网络图中 33 个基因存在 58 条相互作用,结果见图 3。利用插件 cytoHubba 的连接度算法计算网络中的关键基因,筛选到的关键基因有白介素 6(interleukin 6, *IL6*)、内皮型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase 3, *NOS3*)、血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1, *HMOX1*)、前列腺素 G/H 合酶(prostaglandin G/H synthase 2, *PTGS2*)、过氧化氢酶(catalase, *CAT*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPARG*)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, *TNF*)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*)等。

2.5 KEGG 通路富集结果

利用 Rstudio 的 clusterProfiler 包对“2.3”项下 36 条真武汤治疗 CHF 的潜在靶标进行富集分析,共富集得到 35 条通路,通过对 KEGG 结果预

解读后得到 13 条与 CHF 相关的通路,利用 ggplot2 包绘制出 CHF 相关通路富集气泡图,结果见图 4,

其中按 *P*-value 降序排列排名前 5 的通路富集到的具体基因见表 3。

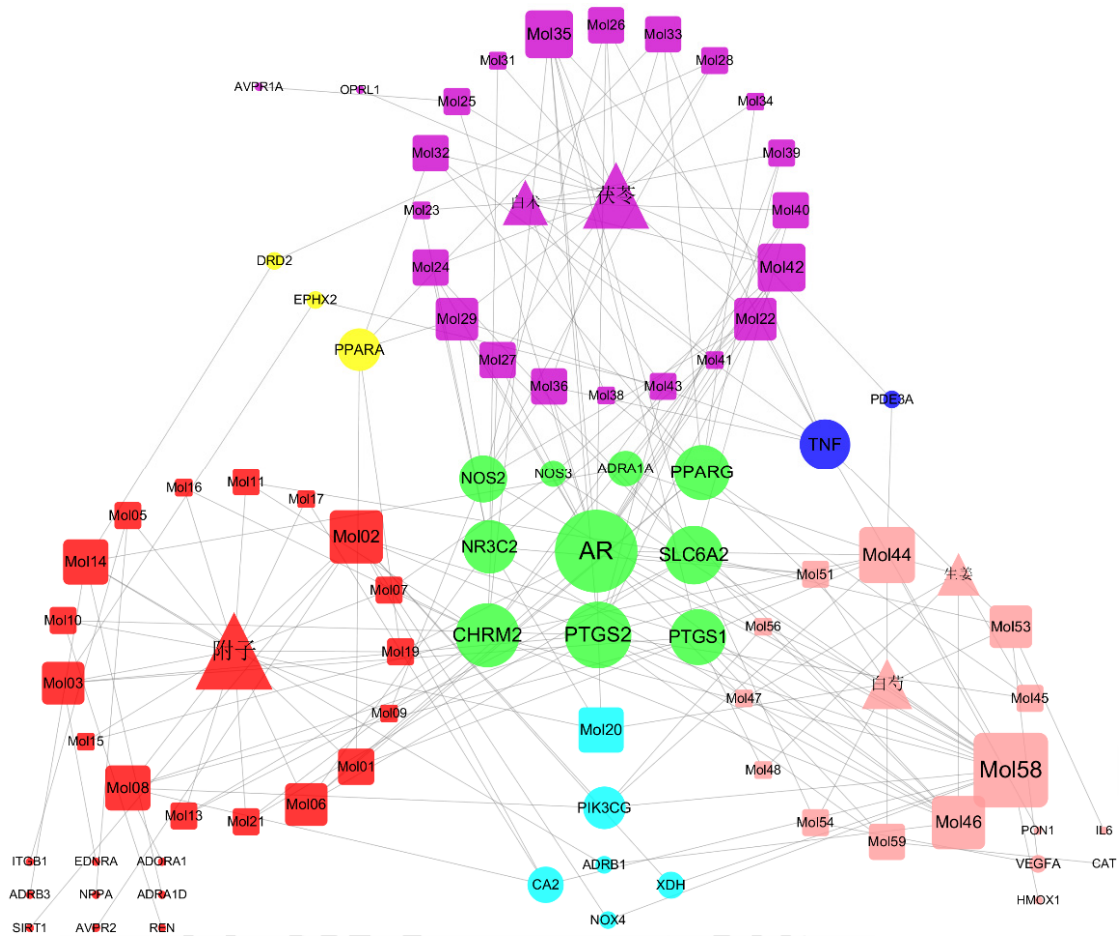


图 3 真武汤 HB-pC-pT 网络图
三角形、正方形和圆形分别代表中药、化合物和靶标。

Fig. 3 HB-pC-pT network diagram of Zhenwu decoction
Triangle, square and circle represent traditional Chinese medicine, compound and target respectively.

表 2 前 5 个化合物的 2 个中心度指标
Tab. 2 Two centrality indexes of top 5 compounds

化合物编号	来源	度	化合物编号	来源	中介中心性
君药			君药		
Mol02	附子	9	Mol02	附子	0.072 364
Mol08	附子	6	Mol14	附子	0.067 547
Mol14	附子	6	Mol05	附子	0.044 688
Mol03	附子	5	Mol03	附子	0.044 602
Mol06	附子	5	Mol06	附子	0.039 217
臣药			臣药		
Mol35	茯苓	7	Mol35	茯苓	0.049 087
Mol42	白术	7	Mol42	白术	0.048 990
Mol29	茯苓	5	Mol25	茯苓	0.023 991
Mol22	茯苓	5	Mol28	茯苓	0.012 122
Mol40	白术	4	Mol29	茯苓	0.011 716
佐药			佐药		
Mol58	白芍	15	Mol58	白芍	0.173 783
Mol44	生姜、白芍	10	Mol44	生姜、白芍	0.076 963
Mol46	生姜	9	Mol46	生姜	0.068 549
Mol53	白芍	5	Mol53	白芍	0.039 338
Mol59	白芍	4	Mol20	白芍	0.027 186

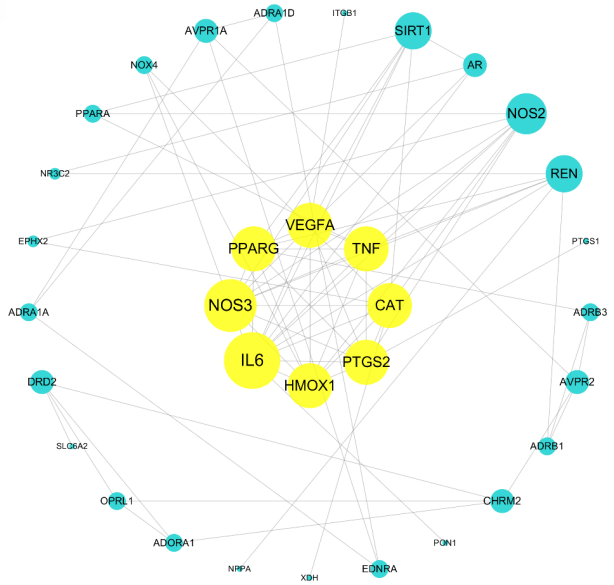


图 4 PPI 网络图
Fig. 4 PPI network diagram

表 3 CHF 相关前 5 通路富集的基因

Tab. 3 Genes enriched in the top 5 pathways related to CHF

通路	基因
cGMP-PKG signaling pathway (环鸟苷酸-蛋白激酶 G 信号通路)	<i>ADRB1, ADRA1D, ADRA1A, ADRB3, PIK3CG, EDNRA, NPPA, NOS3, ADORA1, PDE3A</i>
Renin secretion (肾素分泌)	<i>ADRB1, ADRB3, REN, EDNRA, NPPA, ADORA1, PDE3A</i>
Calcium signaling pathway (钙信号通路)	<i>ADRB1, ADRA1D, ADRA1A, ADRB3, CHRM2, EDNRA, NOS3, NOS2, AVPR1A</i>
cAMP signaling pathway (环磷酸腺苷信号通路)	<i>DRD2, ADRB1, PPARA, CHRM2, EDNRA, NPPA, ADORA1, PDE3A</i>
Vascular smooth muscle contraction(平滑肌收缩)	<i>ADRA1D, ADRA1A, EDNRA, NPPA, AVPR1A</i>

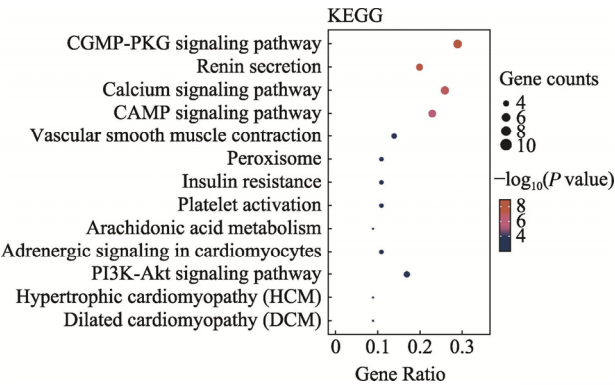


图 5 CHF 相关通路富集图

Fig. 5 CHF related pathway enrichment diagram

2.6 分子对接结果

将“2.4.1”项下筛选出的关键活性成分(飞燕草苷_{qt}、去甲乌头碱、德尔妥因、去氧穿心莲内酯、常春藤皂苷元、3 β -乙酰氧基苍术酮、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇、芍药苷)和蛋白互作网络中中度值(Degree)排名前 5 的基因(*IL6*、*NOS3*、*HMOX1*、*PTGS2*、*CAT*)进行分子对接实验,验证其相互作用活性。其中关键基因的靶蛋白信息及原配体对接情况见表 4,活性化合物与靶蛋白的对接结果见表 5。AutoDock Vina 评价小分子与蛋白质结合的好坏主要通过结合能来表示,即计算后拟合得到的 ΔG 值,结合能 <0 说明配体与受体可以自发结合,且值越小表示结合能越高,活性成分越容易与受体结合,故本研究筛选与每个靶蛋白对应的结合能最低的化合物,并对其关键残基和作用力进行分析,并做出结合示意图,结果见图 6;据图可知,真武汤活性成分与关键靶点的 5 次对接中,化合物均进入了活性位点,并与活性位点的关键残基形成 1~4 个氢键(CAT 蛋白与常春藤皂苷元未形成氢键);其中来自茯苓的化合物常春藤皂苷元与 CAT 蛋白的 A 链残基 Phe198 形成 2 个

Pi-Sigma 键,与残基 Tyr215、Phe446、His305、Pro151、Val302、Pro304、Ala445、Val450、Arg203 形成烷基或 Pi-烷基相互作用;来自白芍的化合物芍药苷与 HMOX1 蛋白 A 链残基 Arg136、Thr135 各形成 1 个氢键,与 Leu147 形成 1 个 Pi-Sigma 相互作用;与 Leu54、Ala28、His25 形成烷基或者 Pi-烷基相互作用;来自生姜的化合物豆甾醇与

表 4 靶蛋白信息和原配体对接结果

Tab. 4 Target protein information and original ligand docking results

基因	靶蛋白 PDB ID	原配体	结合能
<i>IL6</i>	1ALU	N/A(Andrographolide)*	-6.2 kcal·mol ⁻¹
<i>NOS3</i>	4D1P	Q16	-8.1 kcal·mol ⁻¹
<i>HMOX1</i>	1N45	HEM	-9.6 kcal·mol ⁻¹
<i>PTGS2</i>	5IKQ	JMS	-9.1 kcal·mol ⁻¹
<i>CAT</i>	1DGF	NDP	-8.9 kcal·mol ⁻¹

注: **IL6* 蛋白 1ALU 无原配体,从 DrugBank 网站(<https://www.drugbank.ca/>)搜索与其有相互作用的小分子药物 Andrographolide 作为阳性对照。

Note: **IL6* protein 1ALU had no original ligand and was searched from the DrugBank website (<https://www.drugbank.ca/>) for the small molecule drug Andrographolide that interacted with it as a positive control.

表 5 关键化合物与关键蛋白的对接结果

Tab. 5 Docking results of key compounds and key proteins

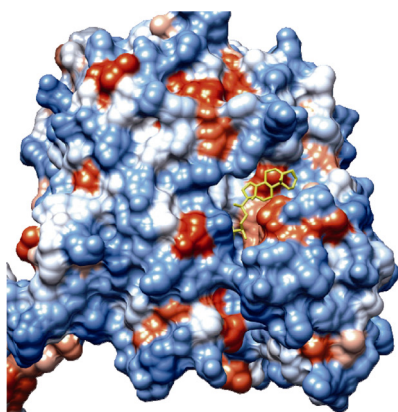
化合物编号	化合物名称	靶蛋白				
		<i>IL6</i>	<i>NOS3</i>	<i>HMOX1</i>	<i>PTGS2</i>	<i>CAT</i>
Mol02	delphin_qt	+	+	-	-	-
Mol03	deltoin	+	+[-8.7]	-	-	+
Mol06	deoxyandrographolide	-	-	-	-	-
Mol14	(R)-norcoclaurine	+	+	-	-	-
Mol35	hederagenin	+	-	-	-	+[-9.7]
Mol42	3 β -acetoxyatractylone	+	-	-	-	-
Mol44	β -sitosterol	+	+	-	-	+
Mol46	stigmasterol	+[-7.6]*	-	-	-	+
Mol53	paeoniflorin	+	+	-[-9.1]	-	+
Mol58	kaempferol	+	-	-	-[-8.4]	-

注: [] 里表示对应化合物与靶点的结合能是所有化合物与靶蛋白结合能最低的一项; “+” 表示对应化合物与靶点结合能低于原配体与靶蛋白的结合能; “-” 表示对应化合物与靶点结合能高于原配体与靶蛋白的结合能。

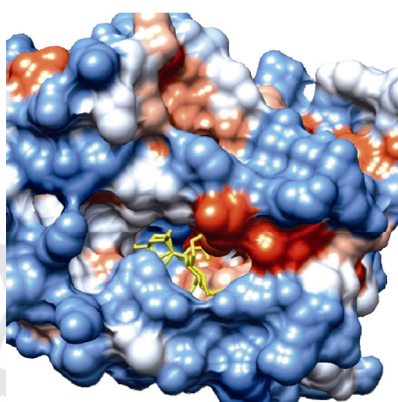
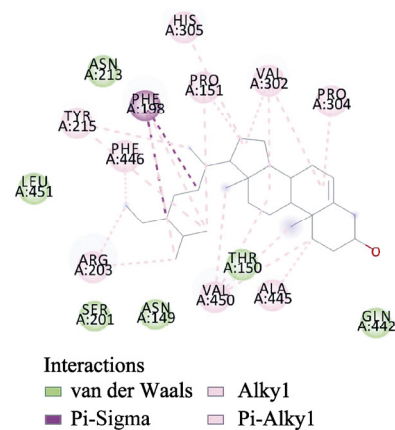
Note: [] meant the binding energy of the corresponding compound to the target was the lowest binding energy of all the compounds to the target protein; “+” indicated that the binding energy of the corresponding compound to the target was lower than that of the original ligand to the target protein; “-” indicated that the binding energy of the corresponding compound to the target was higher than that of the original ligand to the target protein.

IL6 蛋白的残基 Arg179 形成 1 个氢键, 与残基 Lys171、Ile36、Leu178、Leu33、Arg30 之间形成烷基相互作用; 来自附子的化合物德尔妥因与 NOS3 蛋白 A 链残基 Gln 行程 2 个残基, 与 Arg250 和 Arg372 各形成 1 个氢键, 与 Glu361 和 Hem500 各形成 1 个 Pi-阴离子相互作用, 与 Val336、

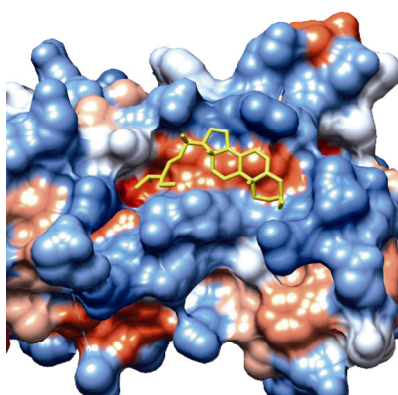
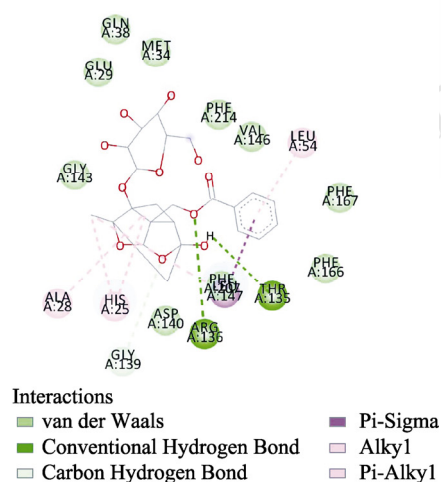
Ala266、Pro334 之间形成烷基或 Pi-烷基相互作用; 来自白芍的化合物山萘酚与 PTGS2 蛋白 A 链的 Ser530、Gln192、His90 之间各形成 1 个氢键, 与 Ser353 形成 Pi-Sigma 相互作用, 与 Val349、Leu352、Val523 之间形成 Pi-烷基相互作用。这些相互作用为化合物的结合提供了较强的静电力贡献。



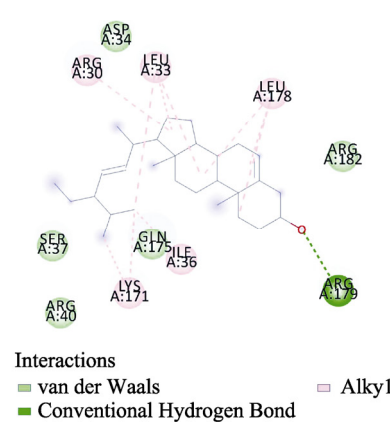
A



B



C



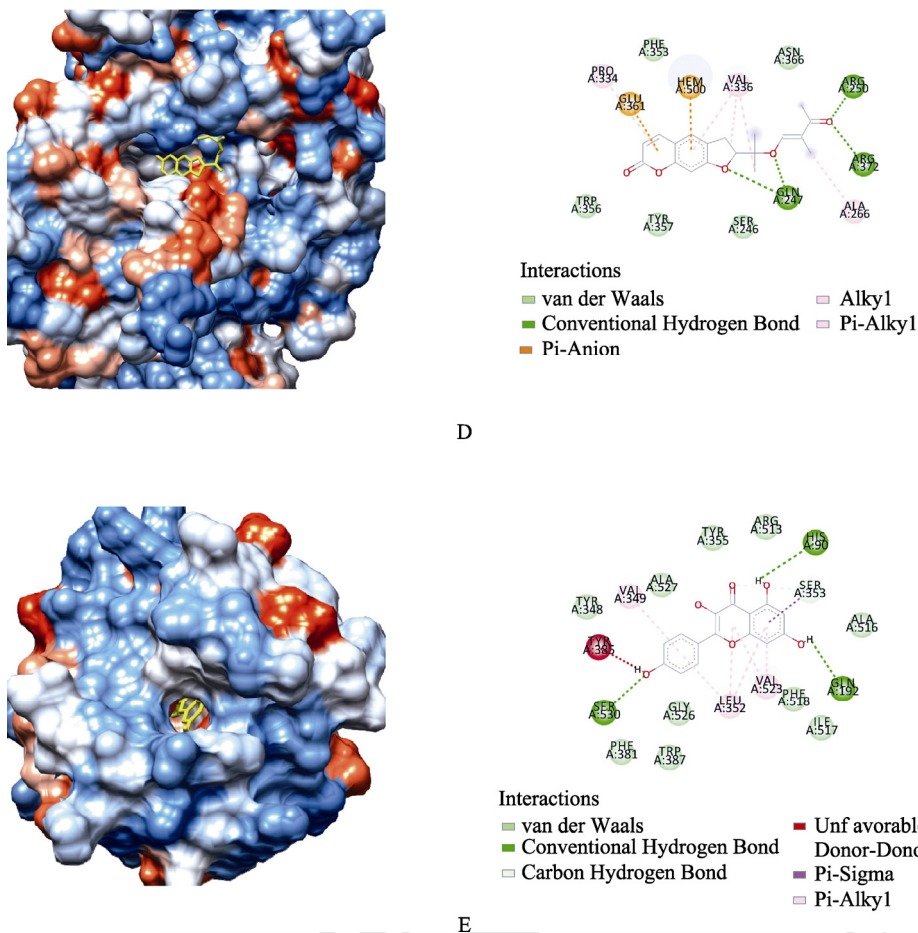


图6 真武汤活性成分与关键靶点分子对接结合示意图及结合作用分析

A-CAT 与常春藤皂苷元; B-HMOX1 与芍药苷; C-IL6 与豆甾醇; D-NOS3 与德尔妥因; E-PTGS2 与山奈酚。

Fig. 6 Interaction of active components and key target molecules combined diagram and combined action analysis in Zhenwu decoction

A-CAT and hederagenin; B-HMOX1 and paeoniflorin; C-IL6 and stigmasterol; D-NOS3 and deltoin; E-PTGS2 and stigmasterol.

3 讨论

真武汤以附子为君药，温肾暖脾、化气行水；茯苓、白术为臣药，补气健脾、利水渗湿；生姜、白芍为佐药，生姜散寒止呕，白芍敛阴和营，全方具温阳利水之功效，用治脾肾阳虚、水湿泛滥之证。现代临床多运用真武汤加减或真武汤与西药合用治疗 CHF 且收效良好^[15]。

本研究借助 TCMSP 平台，通过设置 OB 和 DL 筛选得到真武汤活性成分 59 种，经 SwissTarget Prediction 平台进行靶标预测和 TCMSP 平台靶标补充得到 373 条真武汤的靶标，与 CHF 靶标进行对比，得到交集基因 44 个，剔除不含交集基因(靶标)的化合物后，最终获得潜在化合物 51 种。通过真武汤中药-潜在化合物-潜在靶标网络分析可见关键化合物是附子中的飞燕草苷_qt、去甲乌头碱、德尔妥因、去氧穿心莲内酯，白术中的 3 β -乙酰氧基苍术酮，茯苓中的常春藤皂苷元，白芍中的山

奈酚、芍药苷，生姜中的豆甾醇以及白芍和生姜共有的 β -谷甾醇。经文献验证，去甲乌头碱作为肾上腺素能受体激动剂能通过激动 β 肾上腺素能受体发挥强心作用，被认为是附子的主要强心成分^[16]；苍术酮作为白术的挥发油成分之一，对高血压患者具有独特的降压效果^[17]；常春藤皂苷元具有抗肿瘤、抗抑郁、抗菌抗炎、抗糖尿病的作用^[18]，但其在心血管领域的研究并不多见；山萘能够抑制心肌细胞凋亡^[19]和抑制缺氧心肌细胞的氧化应激作用^[20]；大鼠实验表明芍药苷据有减轻心室重构、改善心功能的作用^[21]； β -谷甾醇、和豆甾醇均是常见的植物甾醇类成分，具有抗氧化、降低胆固醇、抗炎症、抗肿瘤等药理活性^[22-23]，能够降低心血管疾病的风险^[24]；化合物飞燕草苷_qt、德尔妥因和去氧穿心莲内酯等虽然在网络中处于重要的地位，但是目前在心血管疾病的治疗方面还没有相应的报道，可以作为以后研究的方向；此

外有些化合物虽然在网络中并没有处于重要的地位但是其有效性和作用机制已被证实,如附子中除了去甲乌头碱以外多根乌头碱、去氧乌头碱、次乌头碱等乌头碱类化合物也具有强心作用^[25];茯苓中的三萜类化合物茯苓酸等具有利尿作用^[26],此外茯苓中还含甾醇类化合物,如酒酵母甾醇、过氧化麦角甾醇等。以上报道与本研究结果相互印证,表明网络药理学研究真武汤治疗 CHF 的分子机制具有科学性。

为了深入研究真武汤治疗 CHF 的关键蛋白,对预测得到的真武汤治疗 CHF 的潜在靶标进行 PPI 网络分析,IL6、NOS3、HMOX1、PTGS2、CAT 等基因在网络中具有较高的 Degree,在网络中处于重要地位。IL6 在心肌细胞急性反应中起到保护作用,但 IL6 长期高表达会造成心肌收缩力下降和心肌肥厚^[27],IL6 参与 CHF 的发生发展机制可能与 IL6 与 IL6 受体结合所导致的负性肌力作用、细胞毒作用和心肌重塑等有关^[28];NOS3 是一氧化氮合酶蛋白家族的成员之一,其能通过释放一氧化氮限制钙离子内流,起到心脏保护作用^[29]。HO-1 (HMOX1)作为一种应激蛋白,其表达产物具有抗氧化应激、抑制细胞凋亡、抗炎、抗增殖等功能^[30],研究显示心衰患者血清中 HO-1 表达水平显著升高,在心衰的发生发展过程中起到保护作用^[31];PTGS2 又称环氧合酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2),是一种炎症的诱导型介质,在心力衰竭患者血清中显著上调,COX-2 能通过参与炎症反应引起心肌肥厚^[31],在心力衰竭的发生发展中起着重要作用;CAT 作为氧化应激状态的指标之一,能够预测患者的心肌病理变化^[32],常被用作 CHF 临床观察研究的指标。

基于 KEGG 代谢通路的结果分析发现,真武汤主要作用于环鸟苷酸-蛋白激酶 G(cyclic guanylic acid-protein kinaseG, cGMP-PKG)信号通路、肾素分泌、钙信号通路等通路。cGMP-PKG 信号通路和松弛血管平滑肌、减轻心肌肥厚、减轻病理重构相关^[33-34],对心室重构和肥厚具有有益的影响。肾灌注不足时肾素分泌增加,肾素可通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统促进血管紧张素 2 的生成,后者能够使全身小动脉收缩并促进醛固酮的分泌,醛固酮分泌增多会造成水钠潴留、心肌纤维化和心室重构^[35],从而加重心衰。心脏兴奋-收缩偶联离不开钙离子的作用,钙稳态

对心肌细胞的正常结构和功能的调节具有重要作用,而钙离子的异常也会造成心肌肥大或收缩障碍等^[36]。

综上所述,本研究通过网络药理学分析结合文献学习后发现去甲乌头碱、3 β -乙酰氧基苍术酮、山奈酚、芍药苷、豆甾醇、 β -谷甾醇等为真武汤主要活性成分,IL6、NOS3、HMOX1、PTGS2、CAT 等为主要作用靶标,主要调控 cGMP-PKG 信号通路、肾素分泌、钙信号通路等通路。本研究对阐明真武汤的作用机制具有借鉴意义,但所得结论仍需进一步实验或临床验证。

REFERENCES

- [1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组,中国医师协会心力衰竭专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心力衰竭和心脏病杂志(中英文), 2018, 2(4): 196-225.
- [2] WANG M, HU J J, CAI Z B. Advances research of sacubitril-valsartan's pleiotropic effects on cardiovascular diseases [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(17): 2236-2239.
- [3] CHANG L, FAN X F. To observe the curative effect of Zhenwu decoction in the treatment of patients with chronic heart failure [J]. Cardiovasc Dis J Integr Tradit Chin West Med(中西医结合心血管病电子杂志), 2016, 4(27): 147, 150.
- [4] 李柏林. 真武汤重用茯苓治疗心病心力衰竭的临床疗效[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(12): 2327.
- [5] TAO Y Q, LI W L, ZHANG J L, et al. Clinical research of integrated Zhenwu decoction on heart failure in pulmonary heart disease [J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急诊), 2016, 25(5): 900-902.
- [6] 王茜. 真武汤及其加减方治疗心力衰竭临床对照试验的系统评价[J]. 中国农村卫生, 2016(22): 23-24.
- [7] WANG J L. Clinical observation on Zhenwu decoction in the treatment of heart failure [J]. Guangming J Chin Med(光明中医), 2019, 34(14): 2110-2112.
- [8] 段沂彤, 李文杰. 真武汤治疗充血性心力衰竭研究近况[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 1060-1061.
- [9] LIU Z H, SUN X B. Network pharmacology: New opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2012, 47(6): 696-703.
- [10] CHEN G M, ZHONG X Y, ZHAO J L, et al. Target prediction and mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang in treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. China J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(8): 214-222.
- [11] RU J L. Construction and utilization of traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform [D]. Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2015.
- [12] YANG Q, LYU L L, SUN R. Mechanism analysis of Salviae Miltiorrhiza and Ligustrazine Hydrochloride Injection based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(11): 2606-2613.

- [13] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [14] XU H Y, WANG S S, YANG H J, et al. Study on action mechanism of adjuvant therapeutic effect compound Ejiao slurry in treating cancers based on network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2014, 39(16): 3148-3151.
- [15] HU H Y, WANG L Q, GUO J. Clinical application and prospect of Zhenwu decoction in the treatment of chronic heart failure [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药)*, 2019, 50(8): 75-78.
- [16] YUAN W. A research on the pharmacological action of Fuzi [J]. *Clin J Chin Med(中医临床研究)*, 2018, 10(4): 145-147.
- [17] 董大京, 刘兰祥, 张健. 苍术酮对高血压的疗效[J]. *河北医学*, 1997, 3(4): 63-64.
- [18] XING Y, NAN M L, WANG X, et al. Research progress of hederagenin [J]. *China J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志)*, 2017, 23(22): 226-234.
- [19] ZHANG C C, ZHANG J, HAN W N, et al. Effect of Kaempferol, Apigenin on injury of mitochondria in H₂O₂-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志)*, 2008, 24(7): 1431-1433.
- [20] YU X, GUO S Z, SHI T J, et al. Protective effect of kaempferol and formononetin against myocardial oxidative stress damage [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志)*, 2018, 45(12): 2465-2468.
- [21] LIU M, AI J, FENG J, et al. Effect of paeoniflorin on cardiac remodeling in chronic heart failure rats through the transforming growth factor β 1/Smad signaling pathway [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(3): 272-280.
- [22] ZHOU Z Y, LU Q, LIU Y, et al. Research and development progress of stigmasterol [J]. *China Mod Med(中国当代医药)*, 2015, 22(24): 15-17.
- [23] LIU W L, JI Y, HUANG A X. Research and development progress of β -sitosterol [J]. *Farm Prod Proc(农产品加工)*, 2019(1): 77-79, 82.
- [24] ZHANG L, CHEN Q S, YAN Y L, et al. Phytosterols in the prevention and treatment of cardiovascular diseases [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2013, 34(23): 344-350.
- [25] TANG M, ZHAO L C, XU M, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of *Aconiti lateralis Radix Praeparata* [J]. *Guihaia(广西植物)*, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [26] LIU H Z, WU S L, ZHANG D Y, et al. A review on separation and medicinal value of active pharmaceutical ingredients from *Poria cocos* [J]. *Edible Fungi China(中国食用菌)*, 2015, 34(6): 1-6.
- [27] FONTES J A, ROSE N R, ČIHÁKOVÁ D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure [J]. *Cytokine*, 2015, 74(1): 62-68.
- [28] 张玲姬, 孙晓东. 细胞因子在心力衰竭中的作用[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7(3): 336-338.
- [29] 金春花, 刘文博, 关宏铜, 等. 一氧化氮合酶各种亚型的信号通路对心力衰竭的作用机制与治疗的研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(8): 830-832.
- [30] 周凌云, 牟文玲, 赵林山, 等. miR-873 与 miR-525 对血红素加氧酶-1 的调控作用[J]. *科学技术创新*, 2019(15): 31-32.
- [31] CHEN D C. The changes and the significance of serum MiRNAs and HO-1 in patients with chronic heart failure [D]. Shandong University(山东大学), 2014.
- [32] 曾利伟, 杨晶. DDD 起搏治疗老年心力衰竭对患者新功能及氧化应激水平的影响[J]. *内科*, 2018, 13(6): 853-855.
- [33] KONG Q W, BLANTON R M. Protein kinase G I and heart failure: Shifting focus from vascular unloading to direct myocardial antiremodeling effects [J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(6): 1268-1283.
- [34] BIRSCHMANN I, WALTER U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [J]. *Acta Biochim Polonica*, 2004, 51(2): 397-404.
- [35] 张平. 醛固酮受体拮抗剂依普利酮研究进展[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2019, 36(2): 65-68, 72.
- [36] LIU W J, CHEN P Y, WANG Y, et al. Sarcoplasmic Reticulum calcium leak and heart failure [J]. *Sci Sin Vitae(中国科学:生命科学)*, 2018, 48(1): 24-29.

收稿日期: 2019-06-19
(本文责编: 曹粤锋)